

1つである。われわれは、特になん診療において、診断から治療にいたるまでのさまざまな段階で機能性ナノ粒子を医療応用することを目指して研究を行っている。

本稿では、特になん診療において求められるナノテクノロジーへの期待を中心に、(1) 機能性ナノ粒子とは何か、(2) 医療における画像診断の重要性、(3) われわれが取り組んでいる新しい機能性ナノ粒子と医療における画像診断応用、(4) 機能性ナノ粒子を用いたイメージングの今後の展開について、順に概説する。なお、われわれが開発したX線造影用のヨウ化銀ビーズについては作成法についても解説する。

2 機能性ナノ粒子とは何か

ナノ粒子は、数百ナノメートル以下の大きさを持つ粒子と定義され、量子ドット、金コロイド、ヨウ化銀ビーズなどの無機物から、 dendrimer [1], リポソーム [2], 高分子ミセル [3] などの有機物まで、きわめて多彩な材料が該当する。人工的に作られたナノ粒子は、それぞれさまざまな目的で作られており、たとえば量子ドットはそれ自体優秀な蛍光特性を持ち、有機系蛍光色素の20~30倍もの蛍光強度、高い耐光性、励起波長の多様性などを示す。ヨウ化銀ビーズは、X線造影効果を持つ材料として作製されている。

また dendrimer や リポソーム、高分子ミセルなどは薬剤を内包する空間を持つことから Drug Delivery System (DDS) に利用される。DDSとは、薬剤を目的とする標的臓器・部位へ輸送するシステムのことであり、たとえば dendrimer は樹枝状に伸びたポリマーの多数の枝の間に物質を挟み込み、またリポソームや高分子ミセルなどは、中空であるため、内部に薬剤を内包することによってDDSに利用される。薬剤を内包することによって健常部位に対する副作用を軽減し、病巣での薬剤放出を狙うのである。

このように、機能を有するナノ粒子を生体に投与する場合、病変部に特異的に集積してそれぞれの機能を発揮することはもちろん重要であるが、病変部以外に存在するナノ粒子の振る舞いも重要である。つまり、体内動態はナノ粒子の安全性に直結する。理想的には体内に蓄積することなく、排泄または分解される必要があり、ナノ粒子は排泄経路も考慮して作製されるべきなのである。

ナノ粒子の大きさはさまざまであるが、医療応用する際にサイズが大きな意義を持つ場合がある。それは悪性腫瘍のDDSとして応用する場合である。

悪性腫瘍の早い成長には血流が欠かせないが、多くの悪性腫瘍は血管成長因子を直接分泌して自らの腫瘍の成長に必要な血管を新生し、腫瘍周囲の血管網を構築する。これを腫瘍血管というが、腫瘍血管は急速に成長する腫瘍に対して血流を賄うため急速に構築される。そのため通常の血管内皮と構造が異なり血管孔が大きいことが指摘されている^[4]。その結果、通常では通過し得ない数十から百ナノメートルの物質を透過させることが知られている。この性質を利用して、100nm程度またはそれ以下のナノ粒子を作製して、腫瘍間質に選択的に取り込ませることで腫瘍への効率的なDDSを得ることができる。また腫瘍選択的な薬剤の到達によって、健常組織のダメージを軽減できると期待される。

3 医療における画像診断の重要性

医療の基本は病気の予防、診断、および治療である。治療を行う前に診断をつけなければならない。診断においては、①正しい病名；何の病気であるか、②正しい病期；どの程度の重さの病気なのか（例、がんの進行度＝病期）、③正確な原因；何が原因なのか（明らかでないことも多いが）をまず明らかにしようとする。これらは病気を正しく治療するために必須の事項である。

暫定的な診断が決定した後、治療が開始される。もちろん、診療初期には症状に対する治療を行い、経過を見ながら診断をつけていくことも珍しくない。この場合も医師は絶えず正しい診断は何かを考えながら、治療に対する効果を確かめつつ追加の検査を行い、正しい診断に向かうこととなる。がん診療における病名診断には組織診断がきわめて重要である。病名診断に続き、その拡がり、すなわち病期診断が行われる。その際、非常に重要な役割を担っているのが画像診断である。

X線CTやMRI、PETなどの新しい画像診断は、従来の単純X線写真に頼った診断法を一変させた。すなわち、従来得ることのできなかつた三次元的情報が得られるようになったのである。画像診断は特に固形がんで重要であり、がんの代謝機能を検出するPETの出現で質的診断を可能とする画像診断はさらに

その重要性を増している。画像診断は特にがんなどにおいて診断から外科治療・放射線治療などの局所療法を行う際、その範囲を決定するための重要な手段である。

4 われわれが取り組んでいる新しい機能性ナノ粒子と医療における画像診断応用

以下、それぞれの機能性ナノ粒子について解説する。

4-1 蛍光マーカー

蛍光薬は眼底撮影などの血管造影、リンパ管造影などに用いられてきた。近年、量子ドットが開発され、その優れた蛍光特性からさらに多くの応用法が考えられてきた。

外科領域では、がん手術の際のセンチネルリンパ節生検に蛍光ナノ粒子を用いる手法が注目されている。その理由は、センチネルリンパ節生検に用いる造影剤には適切な粒子サイズが必要とされ、蛍光ナノ粒子はその最適なサイズをとり得るからである。ある一定の大きさに調整可能な蛍光ナノ粒子としては、①量子ドット、②シリコンナノ粒子、③蛍光色素含有ポリスチレンビーズなどが挙げられる。

まず、①量子ドットは半導体の結晶であり、蛍光波長は材料、粒径によって決定される。最もポピュラーに利用される量子ドットは、カドミウムセレンであるが、同じ材料でありながら粒径を1~3nmと変えることで、青から赤に蛍光波長を変えることができる。そのほかの特徴として、材料が光学的に安定なため、蛍光がきわめて退色しにくく、蛍光寿命が従来の有機系蛍光色素に比べて長いという点が挙げられる。市販のものは蛍光特性改善のためにZnS、ポリマーなどでコーティングされ、粒径が17nm程度となっている。欠点として、高価なこと、および材料にカドミウムを用いているため、安全性についての懸念が挙げられる。

②シリコンナノ粒子も粒径を変えることにより、波長可変である。物質として安定であり有害な元素を含まないことが最大の利点である。また材料が安価、豊富であるため、安全性、経済性の面で注目されている。

③蛍光色素内包ポリスチレンビーズは、ポリスチレンビーズ樹脂中に蛍光色

素を含有したもので、直径20, 40, 100, 200, 500, 1000nmのサイズの均一なビーズがそれぞれ市販されている。蛍光波長は、可視域から近赤外まで複数の波長が選択できる。欠点は、量子ドットと比較すると蛍光寿命が短く、退色が早い。また高価なことが挙げられる。

前述したように、ナノサイズ蛍光ビーズの最も重要な医療応用の1つとして、がん手術におけるセンチネルリンパ節生検が挙げられる。センチネル(sentinel)とは英語の軍隊用語で、歩哨、見張りを示す。現在、センチネルリンパ節生検に基づく手術が、外科領域におけるテイラーメイド医療として脚光を浴びている。がん病巣から最初にリンパ流を受けるリンパ節、すなわちセンチネルリンパ節を探し当て、そのリンパ節の転移状況を調べることにより転移そのものの有無を診断し、その結果から他のリンパ節の転移の可能性を判断する方法である。センチネルリンパ節に転移がない場合は、その他のリンパ節に転移がないと判断でき、リンパ節郭清(予防的な除去)範囲を縮小、省略できる。その際、がんの手術に先立って、センチネルリンパ節を検出することが必要となってくるが、現在は主に ^{99m}Tc 標識コロイドに代表されるラジオアイソトープ(RI)法と、イソソルフアンブルー、インドシアニンググリーンなどによる色素法が用いられている。

この2つの方法を、単独あるいは併せて用いることで、精度高くセンチネルリンパ節を同定することができるが、それぞれに長短所がある。RIの長所としては、皮切前に体外から同定可能であり、最小限の皮切で生検可能、深部のリンパ節に対しても有用、定量的・客観的評価が可能といったことが挙げられる。短所としては、検査費用が高価であり、また、放射線の取り扱いに対する法的な規制から、限られた施設でしか行えないのが難点である。一方、色素法は安価で、手技が簡便である反面、熟練を要し、また体外診断できないので客観的評価が難しい。センチネルリンパ節が存在する可能性のもっとも高い場所を推測して皮切を加えるため、最適なアプローチが時として困難である。

そこで、われわれはそれらと併用あるいは代替となる新たな診断法として、蛍光ビーズをトレーサーとして使用する方法に着目した。蛍光計測法はRIと異なって、煩雑な取り扱いなしに体外診断、客観的評価が可能であり、また、手術中リアルタイムに蛍光観察することにより視認できる。

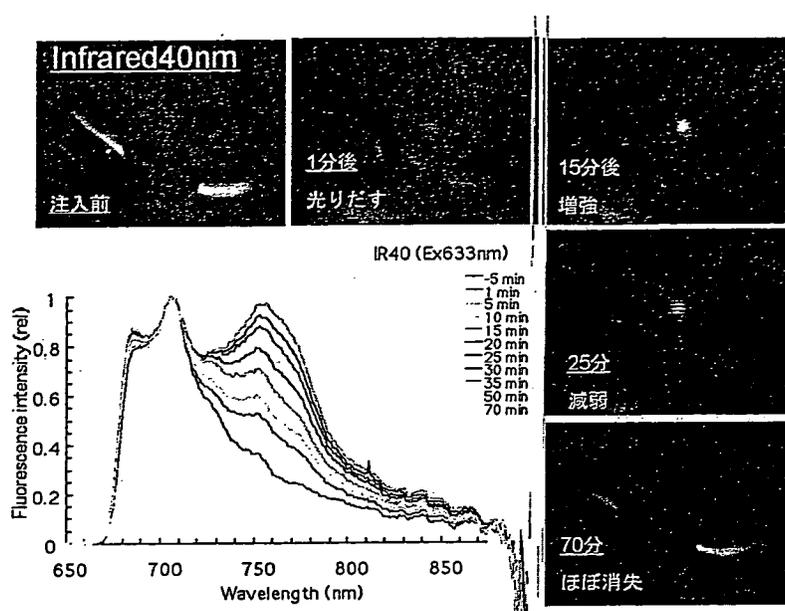


図1-6-1 Infrared 40nmビーズを注射後の右鼠径リンパ節の蛍光画像と分光スペクトル

生体内に投与されたナノ粒子の挙動を規定する要因としては、化学的要因（化学的組成、表面電荷、pH、浸透圧など）、物理的要因（粒径、粒径分布、粒子の形、濃度分布、粒子の安定性など）などがあるが、そのなかでも粒径は最も大きな要因である。すなわち、径がごく小さなものは、間質腔から内皮細胞間隙を通過して毛細リンパ管内に入り込むが、ある程度大きくなるとマクロファージの貪食作用で取り込まれた後にリンパ節に運ばれる。

われわれはラットをモデルとして、蛍光ポリスチレンビーズを用いたセンチネルリンパ節検出法における最適な粒径および蛍光波長について検討を行った。その結果、数分から30分程度の造影効果を得るには粒径40nmが最も集積性に優れ、蛍光波長は近赤域が最もS/N比の優れた波長であることが示された（図1-6-1）^[5]。さらに蛍光計測法は、従来法の1つである色素法よりもセンチネルリンパ節検出率において優れていることが示されている。

蛍光法の欠点は、蛍光そのものが肉眼ではわかりにくいいため、蛍光計測装置が必要であることと、現在の計測方法では深部方向の計測限界が1cm程度であることである。検出限界が1cm程度では、乳がんにおける腋窩のセンチネルリンパ節検出は困難で、体表リンパ管の描出のみ可能である。したがって量子ドットの特性を生かす、新しい原理に基づく蛍光検出法が必要である。タイム

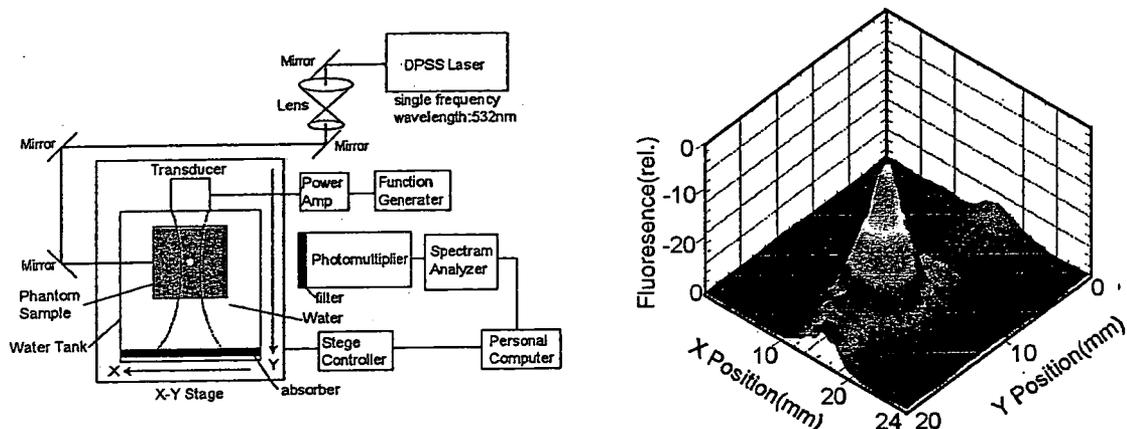


図1-6-2 超音波タグ蛍光断層イメージングシステムのブロック図 (左) およびIntralipid-アガロースゲル内に蛍光物質を包埋した生体模擬試料内部の蛍光分布画像 (右)

ゲート方式や、超音波変調法などが深部の蛍光色素検出法として考えられるが、小林らは超音波変調に基づく音響学的効果を利用した新規手法で、3cm程度の深部の蛍光色素検出を可能とした (図1-6-2) [6]。早期の実用化が望まれる。

またわれわれは基礎医学領域で、輝度の高い量子ドットを結合した薬物や生体分子を観察する、1分子イメージング法を確立した。薬物や生体分子の生体内動態観察が高い時間空間分解能で実現できたため、DDSの効率化を進める上で有用な新しい手法として注目されている [7]。

4-2 X線造影剤

われわれは、数十ナノメートルの粒径を持つ新規のX線造影剤として、ヨウ化銀を核とし、シリカの被殻を持つナノ粒子を作製した。ナノサイズシリカコーティングヨウ化銀ビーズ作製は、ヨウ化銀ナノ粒子生成と、そのシリカコーティングからなる。以下、小林が開発した作製手順について概説する [8]。

①ヨウ化銀ナノ粒子作製

われわれは液相法を利用して、ヨウ化銀粒子を作製している。ヨウ素源としてヨウ化カリウム (KI)、銀源として、過塩素酸銀 (AgClO_4) を用いる。それぞれの水溶液を作製し、ヨウ化カリウム水溶液を攪拌しながら過塩素酸銀を添加して、ヨウ化銀コロイド液を作製した。この方法により、約20nmの平均粒子径を持つヨウ化銀ナノ粒子を作製することができた。

②ヨウ化銀ナノ粒子のシリカコーティング

ヨウ化銀ナノ粒子のシリカコーティングは、液層を利用したゾル-ゲル法を用いて行った。上記①で作製したヨウ化銀コロイド液にシランカップリング剤である3-mercaptopropyltrimetoxysiane (MPS) を加え、15分後にエタノール、オルトケイ酸テトラエチル (Tetraethyl orthosilicate, TEOS), 塩基性触媒であるジメチルアミン (dimethyl amine, DMA) を順に添加する。MPS, TEOS, DMAそれぞれの濃度を変え、最適な濃度条件を選定した。

TEOS濃度を変えることで、シリカ殻の厚さを調整できることがわかった。実験の結果、TEOS濃度は $0.002 \sim 0.004 \text{ mol/l}$ が最適で、それ以上になるとシリカ粒子が増えることが明らかになった。また、触媒として用いるDMAはシリカ殻の生成に関わり、濃度として $0.01 \sim 0.1 \text{ mol/l}$ において有効にシリカ殻が生成されることがわかっている。以上の条件で、平均粒子径約60nmのシリカコーティングヨウ化銀ビーズを作製することに成功した (図1-6-3)。

シリカコーティングヨウ化銀ビーズを、X線CTの造影剤として用いた場合の造影CT像を図1-6-4に示す。これはラットにシリカコーティングヨウ化銀ビーズ懸濁液を静脈注射し、注射前、60分後に撮影した肝、脾のCT像である。従来の造影剤は造影効果が数分で終了し、長時間の造影効果が得られない。シリカコーティングヨウ化銀ビーズは、ある程度粒径が大きいため、血流の緩やかな血管洞の存在する肝臓や脾臓において長時間造影効果が得られるものと考えられる。このため一回の造影剤投与で、一定時間後の繰り返し撮影

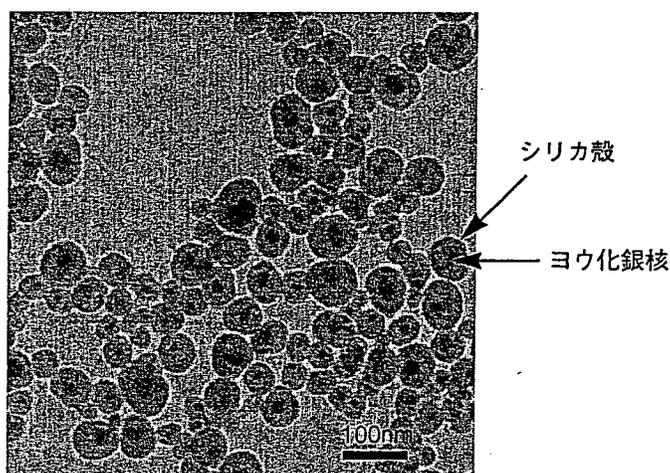


図1-6-3 シリカコーティングヨウ化銀ビーズの透過電顕像

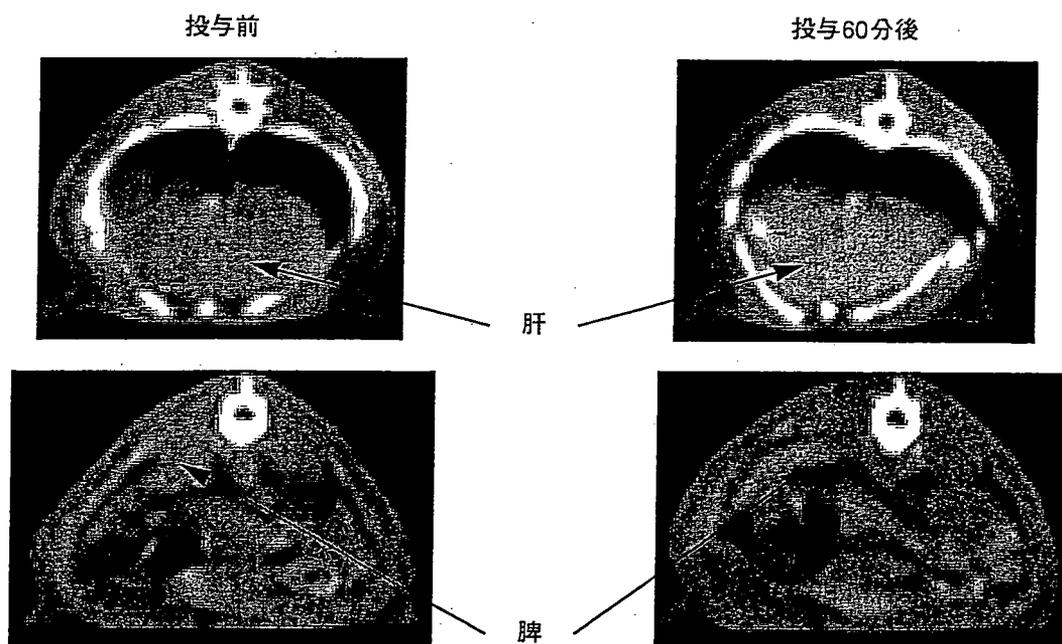


図1-6-4 シリカコーティングヨウ化銀ビーズ静脈注射後の肝および脾の造影効果

が可能である。すなわち、がんの外科手術において、術前に一度造影するだけで、切除前の三次元マーキングと切除後の病巣確認がCT撮影で可能となる。

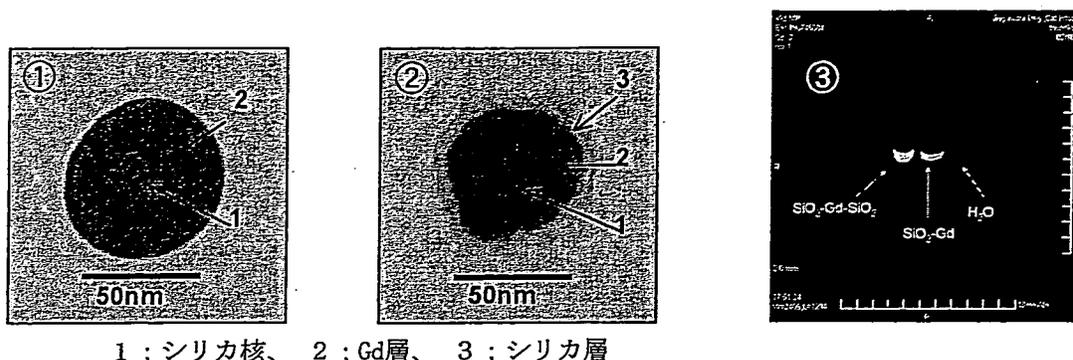
ナノサイズヨウ化銀ビーズはセンチネルリンパ節生検にも応用可能であり、予備的検討でも長時間の造影効果が示された。しかし現段階では造影効果が弱く、濃度、粒径などさらに検討が必要である。

4-3 MRI造影剤

ガドリニウムのような常磁性元素を用いたナノ粒子が作製されている。われわれはナノサイズヨウ化銀ビーズと同様MRI造影剤として、ガドリニウムを用いたナノ粒子を作製した。ガドリニウムは水溶液中でコロイド形成し難いため、まずシリカ核をStöber法で作製し、これにガドリニウムが沈着するようにして作製した。作製したガドリニウムナノ粒子は、MRIにて水に比較して高信号が得られた(図1-6-5)。

5 機能性ナノ粒子を用いたイメージングの今後の展開

近年、悪性腫瘍血管の構築上の特性による、ナノ粒子の選択的腫瘍造影効果が指摘されているが、ナノ粒子のサイズ選択による腫瘍への選択的蓄積は、



1 ; シリカ核、 2 ; Gd層、 3 ; シリカ層

- ① $\text{SiO}_2\text{-Gd}$ 粒子の走査透過電子顕微鏡像
 ② $\text{SiO}_2\text{-Gd-SiO}_2$ 粒子の走査透過電子顕微鏡像
 ③ ナノサイズガドリニウム粒子懸濁液のT1強調MRI画像

図1-6-5 ナノサイズガドリニウム粒子懸濁液のT1強調MRI画像

今後のDDSのあり方に大きく影響すると予測される。現在、抗がん剤結合ナノ粒子の作製が試みられているが、抗体を利用した超選択的DDSはイメージングのみならず、治療においても大きな力を発揮するものと考えられる。現時点で、高分子PEGミセルを初めとした、いくつかのナノ粒子についての臨床試験が進行中である。その結果は1~2年先になると考えられるが、良好な抗腫瘍効果と副作用低減が見込まれることから、新しい抗がん剤DDSとして期待される。

われわれの研究により、数十ナノメートル程度の粒径のマーキング機能を持つナノ粒子は、一定時間臓器に滞留し造影効果を持続することが示唆されている。病巣を長時間描出し続ける新規造影剤の特性は、外科治療や放射線治療において治療標的を可視化し加療する上で大きな利点であり、この性質を利用した新たな治療法の確立が大いに期待される。

また、量子ドットはきわめて明るい優れた蛍光材料であるが、医療応用のためには、現在の蛍光計測の計測限界を超える深部の計測技術の開発が必要である。われわれの超音波変調に基づく、音響学的効果を利用した方法で3cm程度の深部の蛍光色素検出が可能となった。優れた機能を持つナノ粒子であっても、同時に計測法が進歩しなければ活用が難しい場合もあるといえる。

ナノ粒子には従来にはない新規物質が多く、その医療応用にはそれぞれに安全

性の確立が必須である。安全性評価については、急性毒性のみでなく、成長・生殖毒性なども考慮するべきである。ナノ粒子の医療応用を実現させるためには、開発を進めるのみではなく、安全性に関する一定の基準に基づいたガイドラインの早期確立を実現させ、その基準を満たすナノ粒子の創製を目指していかなければならない。

[執筆者プロフィール]

たけだ もとひろ

1987年東北大学医学部卒業、2001年東北大学病院助手、05年より東北大学大学院工学研究科准教授。バイオロボティクス専攻、大学院医学系研究科 腫瘍外科学分野。研究・専門テーマは乳腺外科、ナノテクノロジーの医療応用

[参考文献]

1. Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J. (Tokyo)*, 17 (1985) 117-132,
2. Iga K, Ohkouchi K, Ogawa Y, Toguchi H, Membrane modification by negatively charged stearyl-polyoxyethylene derivatives for thermosensitive liposomes: reduced liposomal aggregation and avoidance of reticuloendothelial system uptake. *Drug Target.*, 2 (3) (1994) 259-67
3. Nishiyama N, Okazaki S, Cabral H, Miyamoto M, Kato Y, Sugiyama Y, Nishio K, Matsumura Y, Kataoka K., Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Res.* 15;63 (24) (2003) 8977-83
4. Maeda H, Matsumura Y, Tumorotropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* 6 (1989) 193-210
5. Nakajima M, Takeda M, Kobayashi M, Suzuki S, Ohuchi N, (total 5, 2nd) Nano-sized fluorescent particle as a new tracer for sentinel node detection: An experimental model for decision of appropriate size and wavelength. *Cancer Sci.*, 96 (2005) 353-356
6. Kobayashi M, Mizumoto T, Shibuya Y, Takeda M and Enomoto M, Fluorescence tomography in turbid media based on acousto-optic modulation imaging. *Applied Physics Letter*, 89 (2006) 1811022
7. Tada H, Higuchi H, Watanabe TM, Ohuchi N: In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice. *Cancer Research* 67 (2007) 1138-1144
8. Kobayashi Y, Misawa K, Takeda M, Kobayashi M, Satake M, Kawazoe Y, Ohuchi N, Kasuya A, Konno M. Silica-coating of AgI semiconductor nanoparticles. *Colloids and Surfaces A*, 251 (2004) 197-201

1-5 単一量子ドットのバイオ・医療ナノ イメージング

樋口秀男 東北大学先進医工学研究機構
大内憲明 東北大学医学研究科第2外科

現代の医学は、われわれの身体の生理現象や疾患を分子レベルで解明する方向に進んでいる。なかでも細胞や分子イメージング分野は急速に発展をしている。これらのイメージングを可能にする装置として、光を利用した内視鏡・顕微鏡・光トポグラフィー、音の反射を利用した超音波、X線の吸収を利用したX線CT、水の回転緩和時間を核磁気共鳴法で測定するMRI、陽電子の位置を同定するPETが知られている。

現在人体に利用されているこれらの装置の空間分解能は、光で0.1～1mm、超音波やX-CTやMRIで1～10mm、PETで10mm程度である^[1, 2]。動物実験レベルでは、分解能は人より10～100倍程度よいのであるが、細胞レベル(10 μ m)でイメージングできる装置は光しかない。さらに細胞レベルを超えて真の分子レベルに向かうためには、光を利用することが最善である。近年の材料開発と顕微鏡技術の進歩により、強い蛍光を発する単一のナノ粒子である量子ドットをイメージングし、粒子の中心の位置を決める場合の位置精度は数nmにも達しており、まさに分子レベルのイメージングが可能である^[3-5]。この節では、最近の量子ドットを用いた単一分子レベル、かつnm精度のイメージングの原理や実験を説明する。

1 蛍光物質の生物学への応用

ナノ粒子のなかでも、蛍光性量子ドットが現在これほど脚光を浴びているのは、生物学の蛍光観察の歴史と強い関係がある。天然石や生物には蛍光を発する物質、たとえば蛍(光)石や染料が多数存在する。1850年頃には、色素(染料)が人工的に合成された。20世紀前半までに化学分野で、蛍光分子の特性や量子化学的な解析がなされた。それ以後、高感度の蛍光分光器や蛍光顕微鏡が進歩し、生物への応用が発展した。近年では、細胞生物学や医療診断

で蛍光物質が頻繁に使われている。

現在蛍光分子で測定できるものは、局在（場所）、角度、数nmの距離、環境変化などである^[6]。局在を観測することは、蛍光免疫法やGFPに代表されるように、もっとも一般的に用いられている。角度測定は、主にタンパク質の構造変化や膜タンパク質の回転を検出するのに利用される。数nmの距離測定には、蛍光エネルギー移動（fluorescence energy transfer, FRET）法と呼ばれる方法がよく利用される。これは2つの蛍光色素間の距離が数nm以内になると、短波長の吸収波長を持つ蛍光分子（ドナー分子）から発せられた蛍光を、近い距離にある他方の蛍光分子（アクセプター分子）が吸収するので、アクセプター分子が蛍光を発する量子力学的効果を利用する方法である。環境のセンシングでは、蛍光分子の蛍光強度や蛍光波長が、pH、温度、疎水性、誘電率などによって変化する特性を利用して、環境を色や波長で知ることができる。この節では、蛍光観察のもっとも基本となる局在を扱った例を紹介する。

1960年頃までは、蛍光観察には透過型蛍光顕微鏡が用いられたが、1970年代に優れたダイクロミラーが安価に製造できるようになって、このミラーと励起フィルターおよびバンドパスフィルターを1つのキューブに組み込んだ、現在のタイプの落射蛍光顕微鏡が市販された。この顕微鏡によって、背景光を劇的に落とすことに成功して暗い像も撮影可能となった。しかしこの落射蛍光顕微鏡は、細胞などの厚い試料では背景からの蛍光があるため、コントラストが悪かった。この問題点を解決したのが、1980年初頭に現れた共焦点顕微鏡で、厚い試料（といっても100 μ m程度まで）でも、光学的切片を取り背景光を大幅に減らすことができた^[7-9]。

共焦点顕微鏡開発の進んだ1980年代には、電気記録のCCDカメラや高感度ビデオカメラの性能の進歩とビデオテープ・コンピュータなどの記録媒体も進歩した。これらのカメラや記録媒体は、生物分野では蛍光観察時に多用されることとなった。現在では、家庭用デジタルカメラやビデオカメラでも、蛍光観察が十分できるまでに感度が上がりかつコストが下がった。最先端の蛍光イメージングの研究では、カメラ感度をさらに上げる増幅機構や電気ノイズを低減するための冷却機構を備えた超高感度低ノイズカメラ、たとえば冷却式EM-

CCDビデオカメラが利用されている。カメラの画像は、一般にはコンピュータに取り込まれ、観たい情報のみを取り出し、その部分を増強する優れたソフトが利用される。われわれが使用している実際の装置を図1-5-1に示した。

2 蛍光量子ドットを用いたタンパク質分子の蛍光ナノイメージング

有機蛍光分子を用いた1分子蛍光観察が、1995年に日本で初めて成功した^[10]。この論文では、筋肉モータータンパク質のミオシン分子に有機蛍光分子を結合し1分子を観察した。さらに蛍光分子をエネルギー源の分子であるATPに結合し、1分子の化学反応を可視化するなど画期的な研究を行った。この観察方法を利用して、蛍光をラベルしたモータータンパク質1分子の運動が観察された。ただし、この蛍光の位置精度は20~50nmほどしかなく、動いているか否かを検出するに過ぎなかった。位置精度を上げ、蛍光の位置の中心を1nm程度の精度で測定できれば、分子の運動を直接イメージングできるはずである。精度

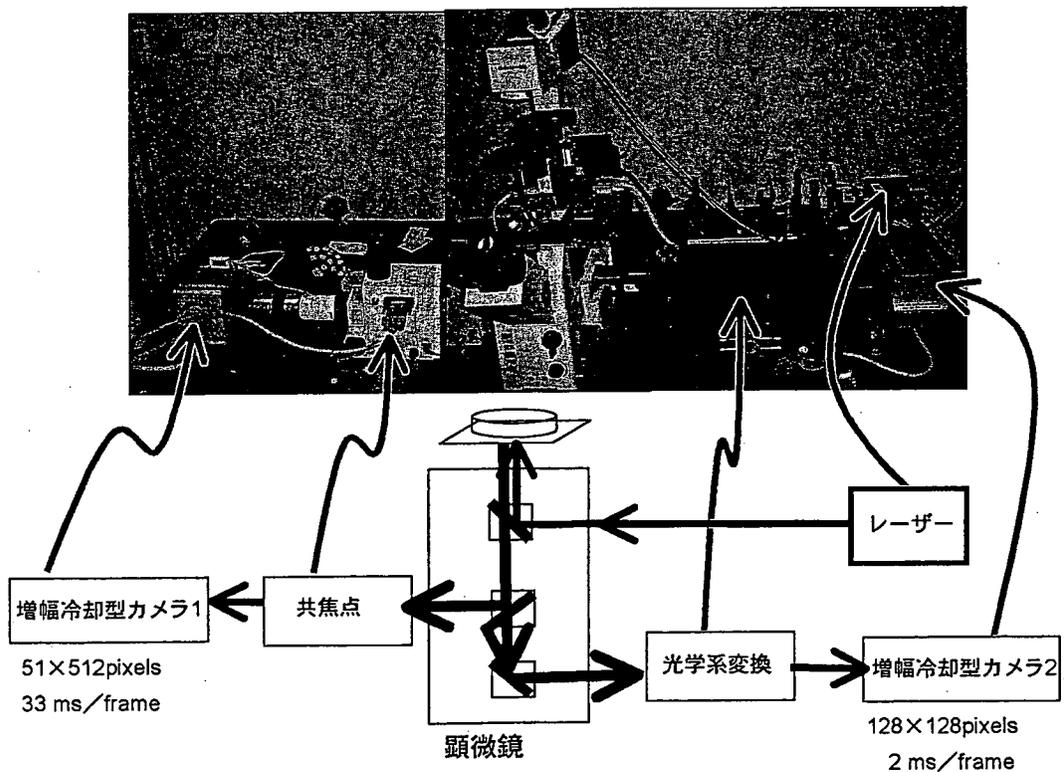


図1-5-1 我々が開発した蛍光顕微鏡システム

顕微鏡右側は、落射照明法により3次的に量子ドット輝点を追跡する。左側は、共焦点顕微鏡により、細胞やマウスを観察する

を上げるためには、明るい蛍光物質、顕微鏡の振動の減少、背景光の減少、イメージング装置のノイズの低減、そして光子数を増加するなどのテクノロジーが必要である (図1-5-1)。

蛍光材料として、非常に明るい量子ドットを用いた (量子ドットについては次の項で詳しく説明をする)。量子ドットは直径2~5nmのCdSeを核とし、まわりは水との接触を遮断するために厚さ2~3nmのZnSでコートされている。この量子ドットは、短波長で励起するともっとも明るくなるが、細胞にダメージを与えるので、われわれはダメージがほとんどないグリーンレーザーでも励起される量子ドットを用いた。振動の減少には、ナノ計測で培われたノウハウが活かされ、ステージや対物レンズの振動を主に抑えた。背景光の減少のためには、レーザーからの光を通さず、蛍光のみを透過する優れた光学フィルターが選ばれた。イメージングカメラのノイズの低減と明るいイメージを得るために、冷却しながら電子増幅するEM-CCDカメラが利用された。光子数の増加のためには、レーザー光を集光して、蛍光を励起する光を強くした^[11]。

蛍光の位置は、蛍光強度をガウス関数でフィッティングすることで、正確に求めることができる。ガウス関数の中心の位置精度 d は、蛍光輝点の半値幅 w とCCDにカウントされる光子数 n で、

$$d \sim w / \sqrt{n}$$

と近似される。ここで、

$$w \sim 0.6 \lambda / NA \quad (\lambda \text{ は蛍光波長, } NA \text{ は対物レンズの開口数})$$

と近似できるので、

$$d \sim 0.6 \lambda / (NA \sqrt{n})$$

と表される。たとえば、われわれが実験で用いる蛍光波長 $\lambda = 600\text{nm}$ 、開口数 $NA = 1.3$ 、光子数 $n = 100000$ のとき、 $d = 0.88\text{nm}$ である。実際には、鏡の非平面性やごみなどによって分解能は落ち、 $d \sim 1\text{nm}$ 程度と考えてよい。単一量子ドットに照らす励起光を非常に強くすると、撮影時間5ms (ミリ秒) でこのくらいの光子が得られる。量子ドットは、退色するまでに約1億光子を受光できるので、1nm精度では1000フレームの画像を得ることができる (5ms × 1000フレーム = 5秒)。励起光を百分の1に下げて、ビデオレートで撮影した場合、位置精度は4nmに下がるが、約1時間 (33ms × 10万フレーム = 3300

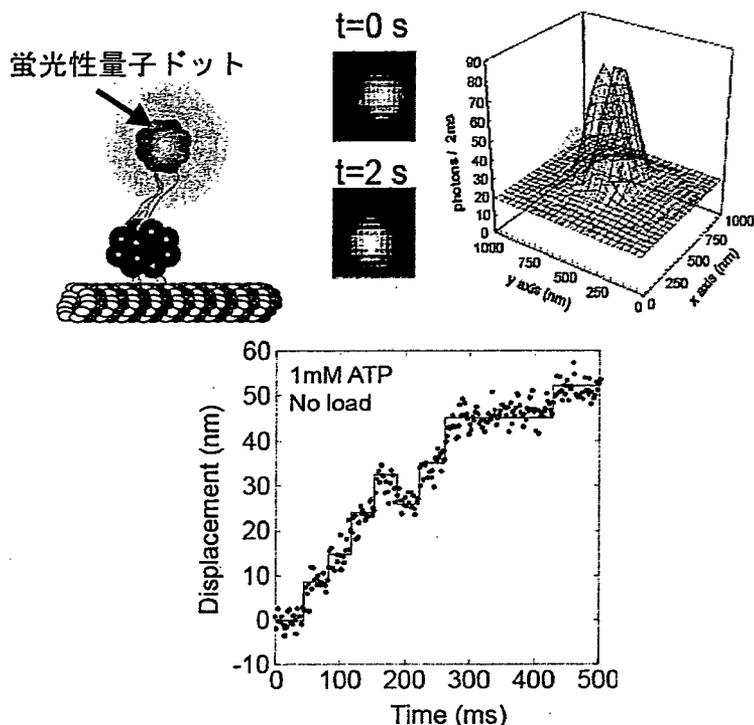


図1-5-2 蛍光量子ドットを用いたモータータンパク質ダイニンの1分子ナノイメージング
 (上) 量子ドットはCdSeを核とし、まわりは水との接触を遮断するためにZnSでコートされている。蛍光量子ドットをダイニン分子に結合し、蛍光像の強度分布をガウス分布でフィットさせて、蛍光輝点の位置を1nm精度で決定した
 (下) ダイニン1分子にCdSe量子ドットを付加し、その蛍光像の位置を経時的に解析した例。点が測定値を示し、線は、ノイズを平均化して求められたステップ状の運動を表す。この運動から、ダイニンは8nm単位のステップを行うことが明らかとなった

秒) のイメージングが可能となる。

この方法を利用して、細胞分裂や細胞輸送に関与する運動するモータータンパク質であるダイニンやキネシンに量子ドット (CdSe) を結合して、1分子の運動を観察した。EM-CCDによって撮影された画像の蛍光像は、2次元のガウス関数のフィッティングによって、中心の位置を求める。このような、1分子の蛍光像をnm精度で測定するイメージング法は、近年FIONA (Fluorescence Imaging with One Nanometer Accuracy) 法と呼ばれている。筆者らは、細胞質ダイニンに量子ドットを結合して、2msの高速撮影を行い、生理環境に近い条件下 (無負荷で高ATP濃度) で、8nmのステップを初めて観察した (図1-5-2) [12]。

3 量子ドットの優れた蛍光特性と欠点

半導体材料の結晶サイズが、約10nm以下であるナノ粒子を量子ドットと呼ぶ。量子ドットでは、電子が限られた領域に閉じこめられるために、エネルギー順位が飛び飛びとなる^[5]。CdSe, CdS, CdTe, ZnSeなどの物質では、このエネルギー順位の差が可視光から赤外光のエネルギー程度となるために、光を吸収し蛍光が発せられる。

量子ドットの優れた特性は、吸収係数の高さや酸化に強いことである。吸収係数は、たとえばCdSeでは3百万にもなり、有機蛍光色素やGFP (green fluorescence protein) 関連タンパク質の数万から十万とくらべると、30倍以上である。量子ドットは、無極性溶媒では高い発光効率(量子収率)を示すが、水などの極性溶媒中では消光して、量子収率は非常に小さい。この消光を防ぐために、量子ドットをZnSなどでコートし、水などの極性分子との接触を防ぐことで、量子収率はもとの高い値に戻る。その量子収率は0.4~0.6であるので、明るい有機蛍光色素と同程度である。したがって、同一強度の光で励起した場合、量子ドットは有機蛍光色素の30倍程度の明るさにすることができる。

2つめの特徴の酸化に強いという点は、酸素が必要な細胞やマウス内の観測にも有用な特性である。有機蛍光色素では、酸素が存在すると、容易に不可逆な化学反応を行い退色してしまうのに対して、ZnSでコートされた量子ドットは酸素濃度にあまり依存せず、退色時間が非常に遅い。たとえばCdSe-ZnS粒子の退色時間は、ローダミン、Cy3, GFPなどの有機・たんぱく質の蛍光分子の30~100倍も遅い。吸収係数の高さや退色時間の遅さから、量子ドットはこれまでの蛍光物質の1000~10000倍もの蛍光光子を発する桁違いの特性を持っている。

量子ドットの欠点を知ることも重要なので2つ挙げておく。量子ドット自体の大きさは2~5nmであり、タンパク質に匹敵するサイズであるが、量子ドットのまわりがZnSでコートされ、さらに外側をポリマーやタンパク質でコートするので、最終的な大きさは15~20nmである。大きいために起こる可能性がある立体障害や、拡散速度の低下への注意が必要である。もう1つは、量子ドットの蛍光が消えて再び光る点滅(ブリンキング)現象が知られている。消え

ている時間が短ければ、撮影時間を長くすれば、消えたフレームをなくすことができる。撮影時間を短く時間分解能を上げて観察したいときには、後で述べるような溶液に工夫が必要である。

4 量子ドットによる細胞内ナノイメージング

細胞生物分野での量子ドットの分子イメージングは、1998年にBruchezらが2種類の量子ドットを用いた、培養細胞の核とアクチン繊維の蛍光2重染色に関する研究に始まった^[13]。以後、生細胞イメージングへも応用され、細胞内小器官の多色イメージングが行われるようになった。

われわれは、蛍光性ナノ粒子を用いて、運動中の細胞表面の詳細な観測を試みた^[14, 15]。乳がんの約30%では、細胞膜上のレセプターHER2を過剰発現している。このタンパク質に対する抗体（抗HER2抗体）は、乳がん患者に投与される分子標的抗がん剤（ハーセプチン）である。この抗HER2抗体を、蛍光性量子ドットに化学架橋させ、乳がん細胞KPL-4と混合したところ、まず量子ドットは細胞膜に結合し、1時間ほどの間に、細胞内に膜ごと小胞を形成して取り込まれた（エンドサイトーシス）。その後、量子ドットを含んだ小胞は、細胞内を細胞核に向けて輸送された。この小胞の運動を、レーザー共焦点顕微鏡で蛍光観察を行った。対物レンズを上下にずらすことで、観察像の3次元像を取得し、新たに開発された装置にて解析した。

330msごとに9枚の共焦点像を取得し、1つの3次元画像を構築した（図1-5-3）。そして、量子ドットの3次元位置を取得するため、蛍光強度を重みとした輝点の重心を計算するソフトウェアを開発した。このソフトを用いて、細胞内において、モーター蛋白質によって輸送されている量子ドットの位置の経時変化を3次元計測できた（分解能約10nm）（図1-5-3）。さらにその装置で、抗体-量子ドットが細胞膜から核付近に輸送される過程が、単一分子レベルでナノイメージングされた。

現在では、細胞内のタンパク質や受容体の動態を2nmかつ2ms（画像のビニングを行えば0.3msまで向上）の精度で解析することに成功し、ステップ状の運動を捉えることができた。この実験により細胞内の運動は、精製したタンパク質の実験系でえられたステップ運動の結果と矛盾しないことが明らかにされ

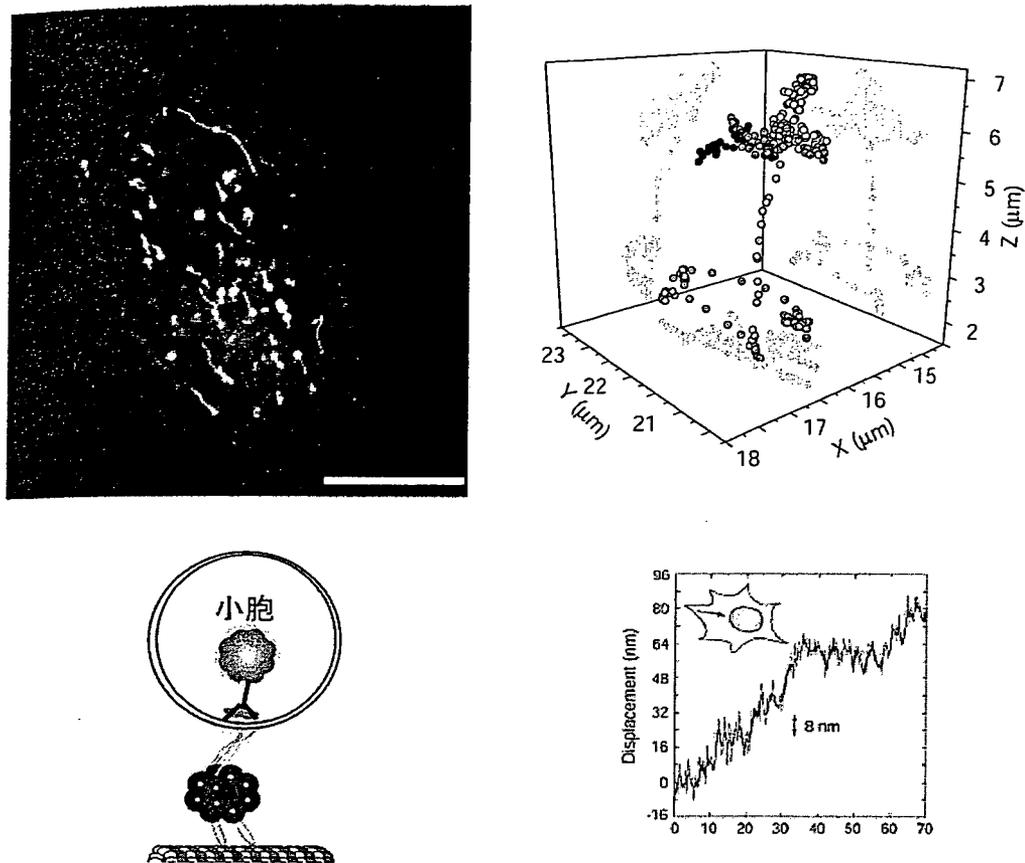


図1-5-3 蛍光量子ドット-抗HER2抗体を取り込んだ乳がん細胞の蛍光イメージ
 (上左) 白い点が細胞に取り込まれた量子ドットを示し、線が運動の軌跡を表している
 (上右) 共焦点顕微鏡を用いて、対物レンズを上下させて量子ドットの中心の位置を3次元的に追跡した。3次元画像は1秒間に3枚えられた
 (下左) 細胞内に取り込まれた小胞が、ダイニンで輸送されているイメージ図
 (下右) 細胞内小胞に取り込まれた量子ドットの運動を、nm精度で追跡したときの軌跡。8nmのステップ状変位が観測された

た。さらに、精製した系では得られない現象として、細胞内ではレールタンパク質の乗り換えや、レール上で停止する現象が見られた。これらの現象の解明は、今後に残された重要課題である。

5 免疫染色における量子ドットの応用

細胞生物学や医学においては、客観的かつ高感度に細胞や組織を診断できる定量的手法の開発が必須である。そこで細胞や組織の免疫染色法のために、蛍光量子ドットのもつ優れた蛍光強度と、安定性の利点を生かした方法を開発した [16]。

量子ドットに、乳がん細胞に対する抗HER2抗体を結合させて、この量子ドット-抗体複合体を用いて、ホルマリンで固定した乳がん培養細胞と組織、および培養乳がん生細胞の免疫染色を行った。抗体の細胞や組織への非特異的な結合を抑えるために、抗体を反応させる前にブロッッキングを行う。従来法では、量子ドット-抗体複合体は非特異的な結合が多かったので、ブロッッキング法を改良して、非特異的な結合を効率的に抑制した。これにより乳がん細胞に特異的な免疫染色観察を、高感度に行うことが可能となった。標本を緑色レーザーにて励起、高感度カメラを備えた落射蛍光顕微鏡で蛍光画像を取得した(図1-5-4)。1時間観察しても、蛍光像はほとんど劣化しなかった。また、量子ドット単一粒子を容易に観察できた。このように、感度が高く安定な免疫染色が可能となった。

また、生きた細胞や組織の量子ドットを観察する際には、単一量子ドットは、1秒間に数回~数十回も明滅が起きてしまい、1つの粒子を連続的に観察することは従来は困難であった。そこで、還元剤の2-メルカプトエタノールやグルタチオンをさまざまな濃度にして、量子ドットの明滅を観測した。1~10mM程度の2-メルカプトエタノールやグルタチオンは、明滅を抑えて、量子

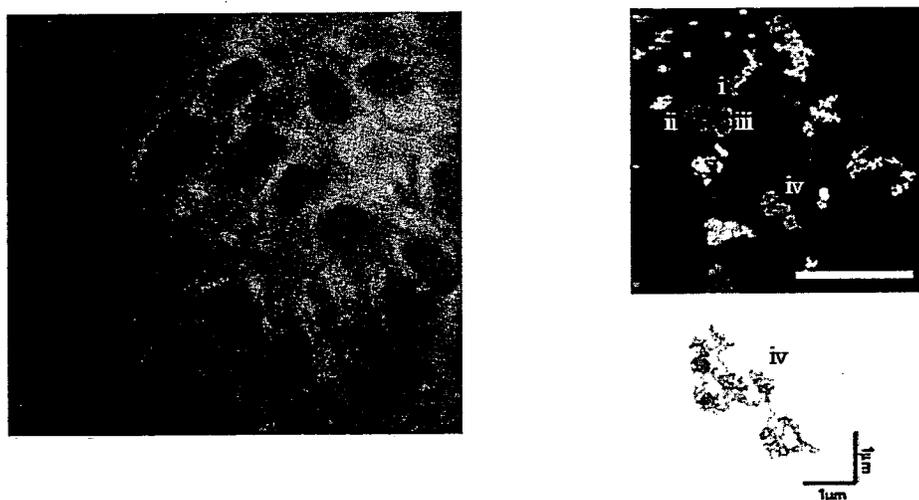


図1-5-4 組織を用いた免疫組織染色と生細胞の連続観察

- (左) マウスから取り出した腫瘍をホルマリン固定して、量子ドット-抗体複合体にて染色を行った。写真の1辺は60 μm に相当する
- (右) 還元剤の2-メルカプトエタノールを含んだ培地にて生細胞に量子ドット-抗体複合体を反応させて、蛍光像を長フレーム(2500枚)観察することができた。線は量子ドットの軌跡を表す。下の図は軌跡を拡大した

ドットが長時間連続的に蛍光を発することを可能にした。そこで1mM程度の2-メルカプトエタノール存在下で、生きた細胞に結合した量子ドット-抗体複合体の挙動を、単一粒子レベルで長時間連続的に観察できた(図1-5-4)。

本研究結果は、新しい病理学的手法のみならず、基礎医学、特に生細胞における単一粒子解析やタンパク質動態の解析、ナンドラッグデリバリーシステム(DDS)可視化など、薬理研究への貢献が期待される。

6 マウス内in vivo単粒子イメージング

細胞内小胞輸送の1分子イメージングで見たように、量子ドットは、従来の有機系蛍光色素と比較して、格段に蛍光強度が高く耐光性が強いため、細胞ばかりでなく、生きた個体の生体内イメージングにも応用できる^[17]。特に、生体内での単粒子のイメージングに用いるプローブとして最適である。

われわれは、細胞内ナノイメージングで用いたものと同様なテクノロジーを用いて、担がんマウスの生体腫瘍内の小胞に結合した単一量子ドットを追跡することに成功した^[18]。量子ドットに、転移性乳がんに対する抗がん剤である抗HER2モノクローナル抗体を約1分子結合させた。一方、マウスにHER2発現乳がんを埋め込み腫瘍に成長させた、担がんマウスを作製した。量子ドット-抗体を担がんマウスの尻尾の静脈に注射後、腫瘍内に集積した様子を背部の皮膚に固定した窓を通してイメージングした。

単一量子ドット-抗体の複合体は、まず血管をすり抜けて血管とがん細胞間の結合組織内に入った。結合組織内では、数 $\mu\text{m}/\text{sec}$ の早い移動と停止を繰り返し、拡散をした。量子ドット-抗体ががん細胞に出会うと、細胞に結合し、細胞膜に沿って移動をした。がん細胞に結合した量子ドット-抗体のいくつかは、細胞内にエンドサイトーシスし、細胞内を輸送された(図1-5-4)。モータータンパク質に乗っていると思われる小胞は、細胞内を600nm/sec程度で動き、動いては止まり、動いては止まりを繰り返した(図1-5-5)。最終的に、量子ドットを含んだ小胞は、細胞核の付近で遅い小さな動きをした。

この研究では、高感度(ビデオレート、空間分解能30nm)にて、マウスの腫瘍血管から腫瘍細胞に到達する様子を捉え、その挙動を定量的に解析できるようになった。今後、この方法が効率的なドラッグデリバリーの発展のため