

2008/200/A

厚生労働科学研究費補助金  
医療機器開発推進研究事業  
ナノメディスン研究

生体超微細 1 分子可視化技術によるナノ DDS と  
がん標的治療に関する研究 (H18-ナノ-一般-001)

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大内 憲 明

平成 21 (2009) 年 3 月

# 目次

I. 総括研究報告	
ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用に関する 大内憲明	1
II. 分担研究報告	
1. 高感度ナノ粒子によるナノDDSとがん標的外科治療に関する研究 武田元博、亀井尚、甘利正和、桜井遊、河合賢朗、仲田栄子	15
2. 量子力学計算による医療用新物質探索と物性予測に関する研究 川添良幸、水関博志	27
3. ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用；バイオマーカー作製に関する研究 粕谷厚生	32
4. 音響光学効果を利用した超音波タグ蛍光イメージング法に関する研究 小林正樹	40
5. がん転移に関わる細胞動態の <i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> イメージングに関する研究 権田幸祐	44
6. AgI/SiO <sub>2</sub> 粒子へのタンパク質担持および Gd/SiO <sub>2</sub> 粒子の作製に関する研究 小林芳男	47
7. 多元イメージングナノ粒子の超臨界水熱合成に関する研究 高見誠一、北條大介	51
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	
別紙 雑誌論文、書籍、学会、特許権等	55
IV. 研究成果の刊行物・別刷	63

# I. 総括研究報告

生体超微細 1 分子可視化技術によるナノ DDS とがん標的治療に関する研究

(主任) 研究者 大内 憲明 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

機能性ナノ粒子を用いたナノからマクロレベルの生体イメージングを実現すべく、新規開発した高感度計測装置による計測を中心として、以下の研究を行った。

1. 高感度計測を可能とする蛍光・X線・MRI ナノマーカーの開発
- ①ヘマトポルフィリンダイマーの理論計算から一番安定な構造を導き光線力学療法には高濃度のヘマトポルフィリンが必要なことを示した (Materials Transactions, 2008)。
- ②. ヘマトポルフィリン誘導体のがん患者末梢血リンパ球への有意な取り込みを認め、がん診断における有用性が示唆された (Tohoku J Exp Med, 2008)。
- ③. 蛍光ナノ粒子表面にシリカコーティングを施す最適条件を決定した (ナノ学会, 2008)。
2. 高速共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた超微細 *in vivo* イメージング法の確立と細胞内タンパクの動態観察
- ①. 転移性乳がん細胞のトレーサー開発および転移過程の細胞動態画像計測に成功した (日本生化学会, 2008)。
3. 生体における腫瘍タンパク分子標的マッピング技術に基づく外科治療の確立
- ①. 独自に開発した内視鏡装置で蛍光ナノ粒子を用いたセンチネルリンパ節蛍光検出に成功し、色素法と比較して高い検出感度を認めた (ナノ学会, 2008)。
- ②. シリカコーティング蛍光ナノ粒子を用い動物をモデルとしたセンチネルリンパ節検出に初めて成功した (ナノ学会, 2008)。
- ③電子走査方式光変調蛍光計測法開発のため、リニアアレイ型トランスデューサの各素子への信号の位相制御による集束化および走査の検討を行い液体散乱媒質中に蛍光体検出に成功した。

今回、量子ドットでラベルした抗腫瘍抗体により、生体内におけるがん細胞の転移過程の可視化に成功した。この結果から、高速共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた超微細 *in vivo* イメージング法は腫瘍における転移メカニズム解明や DDS を観察する上で極めて有用な技術と言える。本技術により、生体内および細胞内における薬物の動態や作用、さらに生体のシグナル伝達を直接観察し得ることから、生体やがんの分子機構やメカニズムの解明に大きく寄与できるものと考えられる。また、がんの分子標的マッピングに基づく外科治療を行う際に不可欠な、深部に位置する病変を蛍光計測で検出し得る技術とともに安全に使用しうるシリカコーティング蛍光ナノ粒子を用いた生体計測が可能となったことは大きな成果であり、今後外科手術時の病巣マーキング等、新たな応用の開発が期待される。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名：武田元博（東北大学医学系研究科、准教授）、川添良幸（東北大学金属材料研究所、教授）、粕谷厚生（東北大学国際高等融合領域研究所、教授）、

小林正樹（東北工業大学、教授）、水関博志（東北大学金属材料研究所、准教授）、名嘉 尚、高見誠一、北條大介（東北大学多元物質科学研究所、准教授）、権田幸祐（東北大学先進医工学研究機構、助教）、

小林芳男(茨城大学工学部、教授)、亀井尚(東北大学病院、助教)、甘利正和(東北大学病院、助教)、仲田栄子(東北大学保健学科、助教) 多田 寛(宮城県立がんセンター、医長)、桜井 遊(東北大学医学系研究科、助教)、河合賢朗(東北大学医学系研究科、助教)、魚森昌彦(東レ・ダウコーニング(株))

#### A 研究目的

現在様々な機能を持つナノ粒子が作製され、実に多様な医療応用が試みられている。我々はこれまで機能性ナノ粒子の作製および単粒子蛍光イメージングが可能な三次元リアルタイム共焦点顕微鏡システムの開発に取り組み *in vivo* 1 粒子イメージングを可能とし、異なる粒径のナノ粒子の動態を検証してきた。また機能性ナノ粒子の一つとして、ナノサイズシリカコーティングヨウ化銀ビーズを作製し、有用性、体内動態を示してきた。

我々は、次の段階として以下に述べる機能性ナノ粒子表面修飾に必要な機能性分子やコーティングに関し更に検討を進めることとした。

ヘマトポルフィリンは、がんの光線力学療法に用いられ、ナノ粒子の機能性分子の有力な候補である。本研究では安定な2量体を第一原理計算により予測した。またシリカコーティングヨウ化銀ビーズの安全性の検証が必要と考え更に検討を進めることとした。更に蛍光ナノ粒子にシリカコーティングを施し、その最適な生成条件を求め、有用性を検討することとした。

転移性がん細胞に対する単クローン抗

体作成に成功しており、本年度はこの抗体を利用して、量子ドット-抗体結合物で高転移性腫瘍細胞表面をラベルし、腫瘍間質から血管内におけるがん細胞動態の生体内計測も試みた。

一方、機能性ナノ粒子を対象とした高感度な計測装置として、超音波変調蛍光計測システムの開発に取り組んできたが、装置の医療応用を目指した電子走査方式光変調蛍光計測法を行うため、リニアアレイ型トランスデューサの各素子への信号の位相制御による集束化および走査の検討を行うこととした。

以上、本年度は、機能性ナノ粒子の体内動態の解明、がんの転移メカニズムの解明および機能性ナノ粒子の機能を最大限に生かす計測システムの構築を主な目的に据え、研究を進めた。

#### B 研究方法

上記目的のために、ナノマーカー開発グループ(川添、水関、粕谷、小林芳、高見、北條ら)、単粒子検出グループ(榎田、多田、河合ら)、臨床応用グループ(武田、小林正樹、甘利、亀井、仲田、桜井ら)をそれぞれ形成し、下記のテーマについて研究を行った。

1. 高感度計測を可能とする蛍光・X線・MRIナノマーカーの開発(小林芳男、名嘉、高見、北條、川添、水関、粕谷ら)：これまで我々が作製した、シリカコーティングヨウ化銀ビーズの体内動態、安全性を確立するため、静脈内投与後、OECD402 に準じ、予備実験で117.2-146.5mg/kgの死亡率が高かったため、同投与量から開始し、順次投与量を

減らして、87.6-117.2mg/kg、58.6-87.6mg/kg、29.3-58.6mg/kgをそれぞれ投与後、投与量と死亡数からLitchfield-Wilcoxon法にてLD50を算定した。

粒径20、40nmの蛍光ポリスチレンビーズにStöber法でシリカコーティングを施した。シリカ層形成にもっとも大きな影響を与えるのはシリカ源であるTetraethyl orthosilicate (TEOS)濃度である。本研究ではTEOS濃度を変え、シリカコーティングに最適なTEOS濃度を検討した。またコーティングした蛍光ナノ粒子を用いて、ラット鼠径部のセンチネルリンパ節を検出する検討を行った。ラットに麻酔を施し、下半身を除毛して足背にシリカコーティング蛍光ナノ粒子懸濁液を皮下注射して膝窩並びに鼠径部の蛍光観察を行い、センチネルリンパ節の検出率並びに蛍光造影持続時間の検討を行った。リンパ節については実験後、透過型電子顕微鏡 (TEM)で観察し、その局在から輸送様式を推測した。すなわち、リンパ節には貪食性細胞としてリンパ節内在性の樹状細胞と遊走性細胞であるマクロファージが存在するが、樹状細胞に取り込まれていればナノ粒子が直接リンパ節を通じた輸送されて樹状細胞に貪食されたと判断し、もしマクロファージに取り込まれていれば注射した皮下で取り込まれてマクロファージによってリンパ節に運ばれたと考える。

光線力学療法 (Photodynamic therapy (PDT))は腫瘍学や眼科学などの医療分野において異なるタイプの患部、腫瘍に対する非侵襲的治療方法として注目を集め

ている。ヘマトポルフィリンは最初の、それと同時に今でも最も使われている光線力学治療薬 (PDT薬剤)であるが、PDT活性を示す正確な異性体構造とヘマトポルフィリン同士の結合様式との関係はいまだに議論がなされており、確定していないのが現状である。今回Density Functional Theory/Time Dependent Density Functional Theory (DFT/TDDFT, 密度汎関数理論、時間依存密度汎関数理論)を用いて、ヘマトポルフィリンダイマーの安定な構造を求めた。更にヘマトポルフィリンは腫瘍組織に集積することが知られ、がんの診断や治療に利用されている。そのためヘマトポルフィリン誘導体はナノ粒子の機能性修飾分子として期待されており、我々はこれまでがん患者において末梢血リンパ球にヘマトポルフィリン誘導体が蓄積することを突き止め、がん診断に応用すべく検討を行った。

また新たなMRI造影剤としてガドリニウムナノ粒子の作製を試みた。

更に、従来ナノ粒子のシリカカプセル化の際に触媒としてアミンが用いられてきたが、アミンは生体に対して有毒であるため、本研究では、アミン系触媒を用いないamine-freeシリカコーティング法に取り組んだ。

2. 高速共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた超微細in vivoイメージング法の確立と細胞内タンパクの動態観察(渡邊、多田、権田)：高転移性がん細胞を抗腫瘍抗体結合蛍光ナノ粒子でラベルし、三次元リアルタイム共焦点顕微鏡システムを用いることにより、がん細胞が腫瘍間

質内を移動する様子を、乳がん細胞株 KPL-4 を移植した担がんマウス生体内で逐次観察した。観察には我々が独自に開発した三次元リアルタイム共焦点顕微鏡システムを用い、dorsal skin fold chamber を形成して腫瘍を窓越しに観察可能とし、腫瘍内の腫瘍細胞について、経時的に観察し、挙動の様式を解析した。

3. 生体における分子標的腫瘍タンパクマッピング技術に基づく外科治療の確立 (武田、小林正樹、甘利、亀井、仲田ら) : 悪性腫瘍に対する外科治療の基本は完全な切除である。従来の悪性腫瘍に対する手術は腫瘍病巣に正常組織をある程度つけた状態で切除することで完全な切除を目指す。しかし、悪性腫瘍は肉眼では見えない浸潤によって周囲に拡がり、肉眼的に切除し得たと判断しても、しばしば病理診断で断端陽性となる。このように肉眼で切除範囲を決定するには限界があり、近年求められている外科手術の個別化遂行のために、手間と時間をかけても迅速病理診断を行うことが必要である。手術の段階で病理診断に匹敵する画像検出法があれば手術時間の短縮だけでなく、病理医の負担を軽減させることもできる。そのためには腫瘍病変を微細なレベルまで可視化する必要がある。ほとんどの腫瘍は体表より深部に存在しているため、蛍光法は有力な腫瘍マーキング法の1つである。しかしながら従来の蛍光計測法は最も蛍光の強い量子ドットを用いた場合でも深部方向の計測限界が1cm程度と浅く、臨床応用を阻むひとつの要因であった。生体に蛍光計測を行うに当たり、

病巣は必ずしも計測表面に存在するわけではなく、多くの場合体表からは同定できない隠れた病変の探索に用いられることが想定されるため、深部に存在する蛍光色素を検出する新たな技術が必要である。これまで計測に用いた装置はそれ自体走査できず、2次元断層画像計測のために試料水槽の機械走査を必要としたため、実際の生体診断装置としての応用するには走査方法に問題があった。電子的走査が可能であれば、測定対象に対して超音波プローブを接触させたままでの画像計測が可能となり、水や水槽を使わなくても画像計測が可能となることから、今年度は電子走査方式光変調法に関する基礎検討を行った。電子走査を行うために圧電素子を多数配列したリニアアレイ型トランスデューサを用い、各素子への信号の位相制御による集束化および走査の有効性を、生理食塩水で希釈した点滴用脂肪製剤中に蛍光色素を置いた模擬生体を用いて検証した。また近年外科治療に内視鏡が導入され、胸腔内腹腔内の手術に広く用いられるようになった。最近ではがんの手術にも用いられるようになり、センチネルリンパ節生検の検討と相まって蛍光検出法の応用に対する期待が大きい。我々は鏡視下蛍光計測装置を独自に試作し、粒径約20nmの量子ドットを用い、ブタをモデルとして胃のセンチネルリンパ節の検出実験を行い、色素法との比較を行った。量子ドットはブタ胃の漿膜下に注射し、独自に作製した内視鏡蛍光計測装置で観察した。

4. ヘマトポルフィリン誘導体によるが

ん診断(武田、甘利、河合、権田)：がん患者および健常者の採血を行い、末梢血からリンパ球を分離、ヘマトポルフィリン誘導体で染色した後、リンパ球にレーザー光を照射してヘマトポルフィリンの生成する一重項酸素の発する光を光電子増倍管で計測した。

#### 倫理面への配慮

本研究は現在までのところ、動物実験による有効性、安全性の検証が主目的である。動物を用いた実験はすべて全身麻酔下に行っており苦痛を伴うものではない。また本研究における動物実験計画は本学の動物実験委員会に実験計画書を提出し、認可されている。

#### C 研究結果

1. 高感度計測を可能とする蛍光・X線・MRIナノマーカの開発(小林芳男、名嘉、川添、水関、粕谷ら)：ヨウ化銀ビーズのLD50は74.2mg/kgと算出された。ポルフィリン誘導体のエーテル結合のダイマーは2つのポルフィリンリング間の $\pi$ - $\pi$ 相互作用により安定化していることが、その安定状態の構造解析から明らかになった(Materials Transactions, 2008)。

蛍光ポリスチレンビーズのシリカコーティング層の生成にはシリカ源であるTEOS濃度が最も重要である。今回、TEOS濃度をそれぞれ0.00038、0.0015、0.009、0.02、0.2Mに変えてシリカコーティングに最適なTEOS濃度を探索した。その結果、TEOS濃度0.02Mで厚さ10nmのシリカ層を形成し、それ以下ではシリカは蛍光ナノ粒子を巻き込んで凝集し、それより高濃

度ではシリカ粒子が単体で生成し、蛍光ナノ粒子表面にシリカ層が形成し難いことがわかった。シリカコーティング蛍光ナノ粒子を用いてラット鼠径部リンパ節の検出実験を行い、色素法に比べて高い検出率と長時間の造影効果の持続を得ることができた(ナノ学会、2008)。

amine-freeシリカコーティング法として、過塩素酸銀( $\text{AgClO}_4$ )水溶液をヨウ化カルシウム(KI)水溶液に添加し、AgIコロイド溶液を調製した。これにシランカップリング剤である(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPS)を加え、その15分後にエタノール、Tetraethoxy silane (TEOS)、NaOHを順に加えることでAgI/SiO<sub>2</sub>複合粒子を作製した。[AgI]= $1.0 \times 10^{-3}$  mol/lとした。その結果、TEOS濃度を4.0 mmol/l以上にするとAgI粒子はシリカによって良好にコーティングされるようになった。またシリカコーティング粒子の平均粒径および分散度はそれぞれ28.3 nmおよび20.8%、31.6 nmおよび16.6%であり、従来よりも小粒径のAgI/SiO<sub>2</sub>複合粒子を合成することができた(Surfaces Engineering, 2008)。

2. 高速共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた超微細in vivoイメージング法の確立と細胞内タンパクの動態観察(多田、権田、河合)：In vitroの細胞を細胞挙動に影響の無いプローブ濃度(5nM)で標識し、膜蛋白質動態を解析した結果、「膜の非伸縮領域」においてPAR1はゆっくりとした拡散運動をしていた( $2 \times 10^4$  nm<sup>2</sup>/s)。一方、膜伸縮運動が活発な葉状仮足上では拡散速度が約5倍に上昇していた。次に、SCID



マウスの皮下にPAR1発現KPL-4細胞で腫瘍を作製した後、プローブ(5nM)を静脈注入し独自のイメージング装置で観察した。血管壁をすり抜け間質を通過したプローブは腫瘍細胞の膜蛋白質PAR1を蛍光ラベルする。がん細胞は血管からの誘引物質(EGFなど)に引き寄せられ、血管方向へ向かって間質中を移動すると考えられている。そこで血管からの細胞位置に注目し、「血管から数百 $\mu\text{m}$ 離れたがん細胞」と「血管近傍のがん細胞」のPAR1の拡散性を調べた。その結果、血管から遠方の細胞のPAR1は、細胞全体に渡りゆっくりとした拡散性(100  $\text{nm}^2/\text{ms}$ 以下)を示したが、血管近傍の細胞ではそれよりも10-300倍速い拡散性を持つことが分かった。さらに血管近傍のがん細胞では、血管に向かって浸潤突起を形成している様子を可視化することに成功した(日本生化学会、2008)。

3. 生体における分子標的腫瘍タンパクマッピング技術に基づく外科治療の確立(武田、小林正樹、甘利、亀井、桜井、仲田ら)：イントラリピッド濃度2.5ml/Lの液体散乱媒質中に光入射面から75mmの位置に蛍光体を挿入し、圧電素子を多数配列したリニアアレイ型トランスデューサを用いて2次元断層画像計測を行った結果、ほぼ蛍光体サイズと同程度の蛍光変調信号のピークを確認することができた。またこのピークは蛍光体が挿入されていないときには消失したことから、蛍光信号であると確認された。イントラリピッドの濃度を変えて測定したところ3ml/Lまで蛍光画像を計測することができた。

量子ドットを用いた鏡視下に蛍光検出法の検討では、よりヒトに近い大型動物であるブタをモデルとして量子ドットを用いた腹腔内センチネルリンパ節検出に成功した。量子ドット(蛍光波長700nm)は懸濁液を原液で200 $\mu\text{l}$ とパテントブルーバイオレット1%液200 $\mu\text{l}$ の混合液を胃漿膜下に注射し、633nmのレーザー光で光励起しつつ高感度CCDカメラに700nmを中心としたバンドパスフィルターを組み合わせた装置で画像計測し、従来から行われる色素法との比較で、量子ドットは色素法を上回る検出率を得た。更に多方向存在するセンチネルリンパ節の検出を可能とする多色での検出にも成功した(ナノ学会、2008)。

4. ヘマトポルフィリン誘導体によるがん診断(武田、甘利、河合、権田)：今回の検討で症例数が少なく、がん種はそろっていないものの、肺がん、腎がん、大腸がん、および乳がんの症例のリンパ球で健常人に比べて有意なヘマトポルフィリン誘導体の取り込みの増大を認めた(Tohoku J Exp Med, 2008)。

#### D 考察

1. 高感度計測を可能とする蛍光・X線・MRI ナノマーカの開発(小林芳男、名嘉、川添、水関、粕谷、武田、甘利、亀井)：ポルフィリン誘導体のシミュレーション実験の結果から、最も安定な異性体はC-C結合構造を有するものであることが明らかになった。エステル結合構造からエーテル結合構造への構造変化は熱力学的に可能であると期待された。一重項-三重項

のエネルギーギャップから全てのダイマー異性体は PDT の光学活性を示すことが分かった。これにより、沢山の候補材料の合成と検討の手間を省くことができ、より早く最も有望な材料の具体的な実験に着手することができる。本手法は物質選別の時間的、費用的コストを大きく削減させ得る技術といえる。

従来粒径20及び40nmの蛍光ビーズのシリカコーティングは困難であったが、最適なTEOS濃度を選択することで双方とも厚さ10nm程度のシリカコーティングを施すことができた。またシリカコーティング蛍光ビーズを用いて初めてラットセンチネルリンパ節生検に成功した。この中でコーティングしない蛍光ナノ粒子に比べて著明に蛍光造影時間が延長した。これはわずかな粒径の違いでナノ粒子の組織滞留性が大きく変わることを意味しており、今後ナノ粒子を用いた創薬に大きな影響を与えるものと思われる。

またamin-freeシリカカプセル化法は有害な薬剤を使用しない点で安全性の確保に大きく寄与すると考えられる。さらに静脈投与時の安全性の確保を中心に臨床応用を目指したい。

2. 高速共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた超微細in vivoイメージング法の確立と細胞内タンパクの動態観察(多田、権田、河合)：細胞運動において、細胞体の平均運動速度が10nm/s、糸状仮足の伸長速度が最速で100nm/s程度であることを考えると、膜蛋白質の拡散速度は細胞体や仮足形成に付随した動きではなく、ほとんどが拡散運動に由来する動きであ

ると考えられる。膜蛋白質は細胞膜を裏打ちするアクチン繊維によって囲い込まれており、これが膜蛋白質の拡散運動を制限している。また、膜伸縮運動はアクチン繊維の重合・脱重合をベースとしている。以上のことを考慮すると、①アクチン繊維の重合・脱重合が不活発な膜の非伸縮領域では、アクチンによるPAR1の囲い込みがタイトなためPAR1の拡散速度が遅くなり、②逆にアクチン繊維の重合・脱重合が活発な膜伸縮領域では、アクチンによるPAR1の囲い込みがルーズなため拡散速度が早くなると考えられる。拡散速度の上昇は、MMP1によるPAR1活性化の確率を上げ、結果として仮足形成のさらなる活性化を促しているのであろうと予測される。実際、楠見(京大)らはアクチン繊維を阻害剤で破壊すると膜蛋白質の拡散速度が増大することを報告している。即ち本成果から、膜蛋白質動態の解析は、細胞運動のアクチン繊維ダイナミックスを調べる良い指標となることが分かった。また血管近傍の細胞ではそれよりも10-300倍速い拡散性を持つことが示されたが、以上の結果は血管近傍の細胞は、遠方の細胞に比べ膜蛋白質PAR1がより動的な状態にあることを示している。*in vitro*の結果を考慮すると、血管近傍の細胞は、遠方の細胞に比べ細胞全体に渡りアクチン繊維の重合・脱重合活性が活発であり、その結果PAR1の拡散性が増大し、浸潤突起形成を活性化しているのかもしれない。この活性化は腫瘍細胞の血管方向への運動に寄与していると考えられる。本研究によって今回初めて腫瘍組織内の腫瘍細胞の動態をin vivoで観察

することができた。さらに腫瘍細胞の血管内移動を細胞レベルでin vivo イメージングできた意義は大きく、今後、腫瘍細胞の血管外進出、定着、増殖等を詳細に解析して転移のメカニズムを解明し、観察精度をさらに発展させて最終的にはがん転移巣に対する抗がん剤の効果を1細胞レベルでリアルタイム観察する技術に応用したい。

3. 生体における分子標的腫瘍タンパクマッピング技術に基づく外科治療の確立(武田、小林正樹、甘利、亀井、桜井、仲田)

今回、アレイ型超音波素子を利用し、焦点走査を機械的走査から電気的走査へ転換する技術の可能性について検討を行い、実用的超音波発振・光検出プローブ開発のめどが立った。診断装置として実用化研究を今後さらに推進していく必要がある。また、これに平行して生体に安全に使用しうる蛍光プローブの開発に取り組んできたが、本年度は蛍光ポリスチレンビーズのシリカコーティング化に取り組み、この粒子を用いてラット鼠径リンパ節を体表から検出することに成功した。本方法は生体におけるセンチネルリンパ節の検出に有用なだけでなく、蛍光色素でマーキングした腫瘍組織の検出にも大きく貢献し、腫瘍を完全に切除し得る精密な外科手術法を確立する上で欠かせない蛍光粒子として期待できる。蛍光検出率は従来のもので変わらないが、粒径の均一化など今後更に改良を重ね、現在進行中のシリカコーティングヨウ化銀ビーズとともに安全性を確認し、生体で使用し得る蛍光粒子として実用化に向けた

検討を重ねて行きたい。さらに、高感度な蛍光計測を生体に応用するためには量子ドットが最も好ましいと考えられるが、その多くは脾臓に非特異的に取り込まれ、効率的な計測ができない。生体内の量子ドットの特異的結合を効率的に抑制し、かつ安全性を確保し得るコーティングとしてシリカによるコーティングを早急に開発したい。

4. ヘマトポルフィリン誘導体によるがん診断(武田、甘利、河合、権田):ヘマトポルフィリン誘導体は腫瘍組織に蓄積し、がん診断や光線力学療法に利用されてきた。光照射によって活性酸素を生成し、がん治療にも応用可能なことから修飾分子の有力な候補である。我々はがん患者のリンパ球にヘマトポルフィリン誘導体が蓄積することを見出し、リンパ球に蓄積したヘマトポルフィリン誘導体の計測をがん診断に応用すべく検討を行ってきた。今回の検討によりがん患者の末梢血から診断可能であることが示唆された。ただし、がん特異性はないため検診などに応用可能と思われる。今後はそれぞれのがんについて検出感度を確定するための検討を進める予定である。以上によりヘマトポルフィリン誘導体はナノ粒子の修飾分子として有用であることが示唆され、診断と治療の両方への利用が期待される。

## E 結論

本研究の結果、生体内においてナノ粒子1粒子レベルで蛍光計測する技術を用い、初めて粒子の大きさによる挙動の違

い、さらには転移細胞の生体内の動態を示すことができた。この手法は今後、癌の細胞レベルでの診断や、薬物動態、シグナル伝達の解明など臨床に直結する基礎研究への応用が期待される。また、蛍光ナノ粒子をシリカコーティングによって内部の蛍光色素を安定化し、組織滞留時間を調節し得たことはナノ粒子を医療応用する上で画期的な技術と言える。

#### F 健康危惧情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

#### G 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takeda M, Tada H, Higuchi H, Kobayashi Y, Kobayashi M, Sakurai Y, Ishida T, Ohuchi N, *In vivo* single molecular imaging and sentinel node navigation by nano-technology for molecular targeting drug delivery system and tailor made medicine. *Breast cancer*, 15(2), 145-152, 2008.
2. Ishida T, Takeda M, Suzuki A, Amari M, Ohuchi N, Significance of irradiation in breast conserving treatment: comparison of local recurrence rates in irradiated and nonirradiated groups. *Int J Clin Oncol*, 13, 12-17, 2008.
3. Lima R, Wada S, Takeda M, Ishikawa T, Tsubota K, Imai Y, Yamaguchi T, *In vitro* blood flow in a rectangular PDMS microchannel: experimental observations using a confocal micro-PIV system. *Biomed Microdevices*, 10, 153-167, 2008.
4. Kobayashi Y, Shimizu N, Misawa K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A, Konno M, Preparation of amine free silica coated AgI nanoparticles with modified Stöber method. *Surfaces Engineering*, 24 (4), 248-252, 2008.
5. Kandori T, Hayase T, Inoue K, Funamoto K, Takeno T, Ohta M, Takeda M, Shirai A, Frictional Characteristics of Erythrocytes on Coated Glass Plates Subject to Inclined Centrifugal Forces. *Journal of Biomedical Engineering*, 130 (5), 051007-1-8, 2008.
6. Kohno M, Takeda M, Niwano Y, Saito R, Emoto N, Tada M, Kanazawa T, Ohuchi N and Yamada R, Early diagnosis of cancer by detecting the chemiluminescence of hematoporphyrins in peripheral blood lymphocytes. *Tohoku J. Exp. Med.*, 216 (1), 47-52, 2008.
7. Suzuki A, Kuriyama S, Kawai M, Amari M, Takeda M, Ishida T, Ohnuki K, Nishino Y, Tsuji I, Shibuya D, Ohuchi N, Age specific interval breast cancers in Japan: estimation of the proper sensitivity of screening using a population-based cancer registry. *Cancer Science*, 99 (11): 2264-2267, 2008.

8. Suvitha A, Belosludov RV, Mizuseki H, Kawaoe Y, Takeda M, Kohno K, Ohuchi N, TD-DFT studies on hematoporphyrin and its dimers. *Materials Transactions*, 49 (11), 2416-2419, 2008.
9. Ishida T, Kiba T, Motohiro Takeda M, Matsuyama K, Satoshi Teramukai S, Ishiwata R, Masuda N, Yuichi Takatsuka Y, Noguchi S, Ishioka C, Fukushima M, Ohuchi N. Phase II study of capecitabine and trastuzumab combination chemotherapy in patients with HER2 overexpressing metastatic breast cancers resistant to both anthracyclines and taxanes. *Cancer Chemother Pharmacol* (in press).
10. 河合賢朗、石田孝宣、武田元博、多田寛、大内憲明、外科医に必要ながん化学療法の知識 B. がん化学療法の実際 7. 乳癌 「乳癌の集学的治療と化学療法」。外科治療、Vol.98、241-249、2008:増刊
11. 武田元博、権田幸祐、樋口秀男、大内憲明、がん分子イメージングの新展開。癌と化学療法、Vol.35、No. 8、1277-1280、2008
12. 武田元博、桜井 遊、叢 莉蔓、小林芳男、菅原旭浩、大内憲明、新規開発ナノサイズヨウ化銀ビーズを用いたX線CT造影効果および体内動態の検討。乳癌基礎研究、Vol.17、57-60、2008
13. 武田元博、小林芳男、小林正樹、桜井遊、甘利正和、石田孝宣、鈴木昭彦、大内憲明。機能性ナノ粒子による生体イメージングーがん診療への応用ー。ナノメディシン ナノテクの医療応用、宇理須恒雄編、オーム社、pp. 64-74、2008
14. 武田元博、権田幸祐、大内憲明。機能性ナノ粒子の医学領域における展開。有機分散系の分散・凝集技術、川口春馬編、シーエムシー出版、pp. 252-261、2008
- (国際会議)
1. Ohuchi N, Takeda M, Kawai M, Tada H, Sakurai Y, Gonda K, Higuchi H. Novel imaging techniques with functional nano-objects for cancer diagnosis. *Hot Topics in Molecular Imaging 2008 (TOPIM' 08)*, European Society for Molecular Imaging, Les Houches, France, February 4-8, 2008.
2. Kawai M, Higuchi H, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N. In vivo imaging of vascular permeability using nano-objects in mice tumor. *Hot Topics in Molecular Imaging 2008 (TOPIM' 08)*, European Society for Molecular Imaging, Les Houches, France, February 4-8, 2008.
3. Ohuchi N, Takeda M, Kawai M, Tada H, Sakurai Y, Gonda K, Higuchi H. Molecular imaging with functional nano-objects for cancer diagnosis. *The 5th International Symposium on Nano-Biomedical Engineering Education and Research Centre*. March, 27-28, 2008, Matsushima,

- Japan
4. Ishida T, Kiba T, Takeda M, Matsuyama K, Teramukai S, Masuda N, Takatsuka Y, Noguchi S, Fukushima M, Ohuchi N. Phase II study of Capecitabine and Trastuzumab combination chemotherapy in patients with HER2 overexpressing metastatic breast cancers after failure of both Anthracyclines and Taxanes. The 44th American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting, May 30 - June 3, 2008, Chicago
  5. Suzuki T, Moriya T, Hayashi S, Ohuchi N, Sasano H. Intratumoral concentration of sex steroids in ductal carcinoma in situ (DCIS) of human breast. *Breast Cancer*, 15, Supplement 1, 10-10, 2008, The 26<sup>th</sup> Congress of the International Association for Breast Cancer Research, September 22-24, 2008, Kurashiki, Japan
  6. Nakano T, Tse GM, Tan PH, Kozuka Y, Kanomata N, Ishida T, Ishida K, Watanabe M, Tamaki K, Ohuchi N, Sasano H, Moriya T. Triple negative subtype of ductal carcinoma in situ in Asian women. *Breast Cancer*, 15, Supplement 1, 19-19, 2008, The 26<sup>th</sup> Congress of the International Association for Breast Cancer Research, September 22-24, 2008, Kurashiki, Japan
  7. Kozuka Y, Moriya T, Akiyama F, Kurosuni M, Tse GM, Tan PH, Kanomata N, Ohuchi N, Kurebayashi J, Sasano H. *Breast Cancer*, 15, Supplement 1, 19-20, 2008, The 26<sup>th</sup> Congress of the International Association for Breast Cancer Research, September 22-24, 2008, Kurashiki, Japan
  8. Kawai M, Takeda m, Ishida T, Suzuki A, amari M, Ohuchi n. *Breast Cancer*, 15, Supplement 1, 33-33, 2008, The 26<sup>th</sup> Congress of the International Association for Breast Cancer Research, September 22-24, 2008, Kurashiki, Japan
  9. Takeda M, Sakurai Y, Kobayashi Y, Cong L, Hikage M, Amari M, Ishida T, Gonda K, Ohuchi N. *Breast Cancer*, 15, Supplement 1, 37-37, 2008, The 26<sup>th</sup> Congress of the International Association for Breast Cancer Research, September 22-24, 2008, Kurashiki, Japan
  10. Harada N, Yamada T, Ishida T, Takeda Suzuki A, Amari M, Moriya T, Ohuchi N. *Breast Cancer*, 15, Supplement 1, 36-36, 2008, The 26<sup>th</sup> Congress of the International Association for Breast Cancer Research, September 22-24, 2008, Kurashiki, Japan
  11. Noriaki Ohuchi. Plenary lecture: Drug resistance as a target for cancer chemotherapy by Fujita N. The 26<sup>th</sup> Congress of the International Association for Breast Cancer Research, September 22-24, 2008, Kurashiki, Japan

(Chairman)

12. Gonda K, Takeda M, Kawai M, Sakurai Y, Higuchi H, Ohuchi, N. Imaging of cancer metastasis in living tumor with quantum dots. The 7th International Symposium on Nano-Biomedical Engineering, October 2008, National Cheng Kung University, Tainan.
13. Takeda M, Tada H, Kawai, M, Sakurai Y, Cong L, Gonda K, Higuchi H, Ohuchi N. Bio-imaging by functional nano-particles of nano to macro scale. The 13th International Conferencenon Biomedical Engineering, December 3-6. 2008, Singapore
14. Kawai, M, Takeda M, Ohuchi N. The feature of the interstitial nano drug delivery system with fluorescent nanocrystals of different sizes in the human tumor xenograft in mice. The 13th International Conferencenon Biomedical Engineering, December 3-6. 2008, Singapore
15. Cong L, Takeda M, Watanabe M, Kobayashi Y, Kobayashi M, Ohuchi N. Silica-coated fuorescent nano-Particles for sentinel lymph node biopsy and mapping. Tohoku-NUS student joint symposium. December 9-10, 2008, Singapore.
16. Gonda K, Watanabe TM, Takeda M, Higuchi H and Ohuchi N. *In vivo* imaging of membrane dynamics in

metastatic tumor cells. The 2<sup>nd</sup> International Symposium on Nanomedicine, Asian Core Symposium -Nano and Biomedical Molecular Science-, February 4-7, 2009, Okazaki, Japan.

(国内会議)

1. 武田元博、権田幸祐、桜井 遊、河合賢朗、石田孝宣、大内憲明。機能性ナノ粒子による生体イメージングの臨床検査・外科への応用第55回日本臨床検査医学会 学術集会、シンポジウム10：医学領域におけるナノ粒子展開をめぐる話題「機能性ナノ粒子による生体イメージングの臨床検査への応用」、2008年11月、名古屋。
2. 武田元博、樋口秀男、小林正樹、小林芳男、大内憲明。機能性ナノ粒子によるナノからマクロレベルの生体イメージング。2008年(平成20年)春季応用物理学関係連合講演会 ナノテクの難病研究・医療への応用、2008年3月、千葉。
3. 権田幸祐、渡邊朋信、武田元博、樋口秀男、大内憲明。*In vivo*イメージングで観えてきた癌転移の仕組み、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会、2008年12月、神戸。
4. 権田幸祐、渡邊朋信、武田元博、大内憲明、樋口秀男。がん細胞の膜のダイナミクスは転移の進行にとまない劇的に変化する。2009年生体運動合同班会議、東京大学、2009年1月、東京。
5. 湊真理絵、小林芳男、武田元博、粕谷厚生、大内憲明、AgI/SiO<sub>2</sub>複合粒子コ

- ロイドの調製法の開発。化学工学会第73年会 2008年3月、浜松。
6. 河合賢朗、武田元博、石田孝宣、大内憲明。粒径の異なるナノ粒子による腫瘍間質ドラッグデリバリーシステムの解析。第18回乳癌基礎研究会、2008年7月、福島。
  7. 権田幸祐、武田元博、樋口秀男、大内憲明。In vivo ナノイメージングで観えてきた癌転移の仕組み。第125回バイオメカニクス研究会（日本生体医工学会専門別研究会）、（東北大）2008年10月、仙台。
  8. 権田幸祐、渡邊朋信、武田元博、大内憲明、樋口秀男。量子ドットを用いた腫瘍細胞の膜伸縮運動の *in vivo* イメージング。ナノ学会第6回大会、2008年5月、福岡。
  9. 叢莉蔓、小林芳男、武田元博、櫻井遊、甘利正和、大内憲明。シリカコーティング蛍光ナノビーズによるセンチネルリンパ節生検と分子画像診断。ナノ学会第6回大会、2008年5月、福岡。
  10. 武田元博、小林芳男、小林正樹、櫻井遊、権田幸祐、樋口秀男、大内憲明。ナノヨウ化銀ビーズによるCT造影法の外科応用に関する基礎的検討。ナノ学会第6回大会、2008年5月、福岡。
  11. 河合賢朗、武田元博、石田孝宣、大内憲明。蛍光ナノ粒子を用いた担がんマウスにおける腫瘍間質ナノドラッグデリバリーシステムの解析。ナノ学会第6回大会、2008年5月、福岡。（若手優秀発表賞受賞）
  12. 日景充、亀井尚、武田元博、小林正樹、大内憲明。新規ナノ粒子をトレーサーとした鏡視下手術の基礎的検討。ナノ学会第6回大会、2008年5月、福岡。
  13. 河合賢朗、樋口秀男、武田元博、石田孝宣、鈴木昭彦、甘利正和、宇佐美伸、櫻井遊、渡部剛、大内憲明。腫瘍間質におけるナノスケールでの分子挙動解析によるDDSの解明。第108回日本外科学会定期学術集会、2008年5月、長崎。
  14. 武田元博、樋口秀男、大内憲明、機能性ナノ粒子の医学領域における展開。異分野融合ナノテクノロジー横浜コロキウム、平成20年2月1日、横浜
  15. 武田元博、河野雅弘、佐藤恵美子、山田理恵、甘利正和、鈴木昭彦、石田孝宣、大内憲明。ヘマトポルフィリン誘導体計測によるがん診断の基礎的検討。第18回乳癌基礎研究会、2008年7月、福島
- II. 知的財産権の出願登録状況  
 (国内特許)  
 該当なし  
 (国外特許)  
 該当なし



## II. 分担研究報告

高感度ナノ粒子によるナノDDSとがん標的外科治療に関する研究

（分担）研究者 武田 元博 東北大学医学系研究科 准教授

（分担）研究者 亀井 尚 東北大学病院 助教

（分担）研究者 甘利 正和 東北大学病院 助教

（分担）研究者 桜井 遊 東北大学医学系研究科 助教

（分担）研究者 河合 賢朗 東北大学医学系研究科 医員

（分担）研究者 仲田 栄子 東北大学保健学科 助教

研究要旨

機能性ナノ粒子を用いた分子イメージングによって革新的な医療を実現すべく、新規開発したナノ材料・高感度計測装置を用いた生体計測を中心とし、今年度は大きく以下3つのテーマについて研究を行った。

- ①. 高感度計測を可能とするナノサイズマーカーの開発：粒径 20, 40nm の超微細なナノ粒子のシリカコーティング蛍光ポリスチレンビーズの作製に成功した。同ビーズを用いたセンチネルリンパ節生検を、動物をモデルとして検討し、著明な造影時間の延長を認めた。またヨウ化銀ビーズを用いて担がんマウスの腫瘍の造影に成功し、24 時間以上の造影効果の持続を認めた。
- ②. 蛍光ナノ粒子をトレーサーとした内視鏡装置による消化器のセンチネルリンパ節検出に成功した。鏡視下手術はナノ粒子によるDDSの可能性を探索する研究：蛍光内視鏡装置を独自に開発し、大型動物のセンチネルリンパ節検出に成功した。その中で従来から行われている色素法と比較して検出感度が優れていることを見出した。
- ③. ヘマトポルフィリン誘導体によるがん診断法について検討を行い、がん患者のリンパ球における有意な取り込みの増大を認めた。  
シリカコーティング技術は内部のナノ粒子の安定化のみならず、粒径の調節といった大きな役割も同時に果たし、ナノ材料作製に有用な技術と言える。内視鏡を用いた蛍光計測法は高感度な病巣計測を可能とし、今後切除範囲決定などの外科応用も期待される。以上のナノトレーサーは外科並びに放射線治療における病変可視化マーカーとして有用と考えられる。

A 研究目的

近年がん診療における薬物療法や放射線療法が発達し、多くの診療科が協力して複数の治療法を組み合わせる、いわゆる集学的治療が主流となり、がんの予後は向上しつつある。その中で放射線療法、化学療法並びに外科的切除は3本

の柱ともいえるべき有力な治療法である。

外科切除の際、臓器を温存し手術による障害を軽減するため、腫瘍周辺の最小限の正常組織を含めた腫瘍切除（部分切除）すなわち臓器温存、更には臓器の機能温存を目指した手術が近年様々な臓器に対して行われている。基本的に早期の悪性

腫瘍に対する外科治療の目的は完全な切除であり、従来の外科手術は腫瘍病巣に加え、安全域としてある程度正常組織を含めた切除によって、完全な腫瘍摘出を目指してきた。しかし、悪性腫瘍は肉眼で確認できない微細な浸潤によって周囲に拡がり、肉眼的に切除し得たと判断しても、後に病理診断で断端陽性と診断されることが起こり得る。肉眼・触診による切除範囲決定には精度的に限界があり、近年求められているテーラーメイドメディスンにあるような臓器温存手術を行う際には、手間と時間をかけても迅速病理診断が欠かせない。しかし病理医は一部の大病院にのみ局限しているのが現状で、必ずしもすべての病院で迅速病理診断が可能なのわけではない。外科手術において病理診断に匹敵するがんのイメージング法があれば手術時間の短縮だけでなく、病理医の負担も軽減することが可能である。そのためには腫瘍を超微細なレベルまで可視化する必要がある。ほとんどの腫瘍は体表より深部に存在しているため、腫瘍のマーキングにはX線やMRIおよび蛍光計測法が有力な方法である。我々はすでにこれらのナノサイズレーザーを開発しており、特に蛍光計測はナノ粒子の開発に加え、ナノレベルおよびマクロレベルでの高感度計測を可能とする手法を開発してきた。従来の蛍光計測法は最も蛍光の強い量子ドットを用いた場合でも深部方向の計測限界が1cm程度であり、これが臨床応用を阻むひとつの要因であった。また一方で、抗がん剤を腫瘍に効率的に到達させることで抗腫瘍効果を高める必要性が指摘され、いまやドラッグ

デリバリーシステム(DDS)は薬効を得るための重要な研究分野となった。抗がん剤などの薬物動態を確実に知るためには従来のマクロレベルの大まかに全体量を測る計測ではなく、1分子レベルの計測が最も確実であり、そのためには従来の医学的手法では行い得なかった超精密な*in vivo*蛍光計測法の開発が必要である。本研究では、特に社会的に緊急性の高いがん診断・治療の革新的技術開発を目指し、がんのナノ粒子DDSの*in vivo*におけるナノからマクロレベルの新規計測を行い、新たな診断・治療法の開発、医療応用を目的としている。

近年、特殊な構造・機能を持つナノ粒子が数多く作製され、様々な分野で応用が試みられている。特に医学・薬学分野では、これまで不可能であった診断・治療の実現が期待される。しかし多くのナノ粒子は、安全性が確立されておらず、体内動態も明らかにされていないのが実状である。ゆえに、本研究においては蛍光ナノ粒子を用いた生体内単分子イメージングを試み、乳がんをモデルとした、センチネルリンパ節および、がん病変の可視化による新たな外科治療を開発するとともに、ナノ粒子の体内動態の解明や安全性の確立に向けた研究も併せて行う。更にヘマトポルフィリンは腫瘍組織に集積することが知られ、がんの診断や治療に利用されている。ヘマトポルフィリン誘導体はナノ粒子の機能性修飾分子として期待される。我々はこれまでがん患者において末梢血リンパ球にヘマトポルフィリン誘導体が蓄積することを突き止めており、がんの診断に応用すべく検討を行

った。

## B 研究方法

上記目的のため、高感度ナノ粒子作製グループと共に、X線ナノマーカ―として既に開発したナノサイズヨウ化銀ビーズについて、腫瘍の造影効果を検証する。体内動態を明確にする。またそれに並行して、蛍光計測により病巣を可視化する上で不可欠な、生体深部に存在する蛍光色素を検出する技術の開発に取り組む。ナノ粒子安全性・体内動態検討グループ（武田、粕谷、小林芳、甘利、亀井、仲田）、高感度蛍光検出グループ（亀井、甘利、小林正、武田）、ナノ粒子D D Sグループ（河合、権田、武田）がそれぞれ下記項目について研究を行った。

1. ナノサイズシリカコーティング蛍光ビーズの作成とリンパ輸送動態の解明（武田、亀井、桜井、甘利、小林正、小林芳、仲田）：粒径20, 40nmの蛍光ポリスチレンビーズにStöber法でシリカコーティングを施した。シリカ層形成にもっとも大きな影響を与えるのはシリカ源である Tetraethyl orthosilicate (TEOS) 濃度である。本研究ではTEOS濃度を変え、シリカコーティングに最適なTEOS濃度を検討した。またコーティングした蛍光ナノ粒子を用いて、ラット鼠径部のセンチネルリンパ節を検出する検討を行った。ラットに麻酔を施し、下半身を除毛して足背にシリカコーティング蛍光ナノ粒子懸濁液を皮下注射して膝窩並びに鼠径部の蛍光観察を行い、センチネルリンパ節の検出率並びに蛍光造影持続

時間の検討を行った。リンパ節については実験後、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察し、その局在から輸送様式を推測した。すなわち、リンパ節には貪食性細胞としてリンパ節内在性の樹状細胞と遊走性細胞であるマクロファージが存在するが、樹状細胞に取り込まれていればナノ粒子が直接リンパ管を通じて輸送されて樹状細胞に貪食されたと判断し、もしマクロファージに取り込まれていれば注射した皮下で取り込まれてマクロファージによってリンパ節に運ばれたと考える。

2. 蛍光計測を用いた内視鏡装置による病巣可視化と新しい外科手術の開発（武田、甘利、亀井、権田、小林正）：腫瘍の拡がりを正確に可視化するためには、生体に対し安全かつ検出可能なトレーサーと高感度な計測技術の2つが必要である。腫瘍のマーキングには従来色素や蛍光計測法が有力な方法のひとつである。しかしながら従来動物実験に使用されていた蛍光ナノ粒子は安全性確保のためのコーティングがなされておらず、医療応用にはコーティングが必要である。今回径約20nmの量子ドットを用い、ブタをモデルとして胃のセンチネルリンパ節の検出実験を行い、色素法との比較を行った。ラットをモデルとしたセンチネルリンパ節検出を試みコーティング蛍光ビーズの生体計測の有用性について検討した。さらに電顕にて組織像を確認し、輸送経路の特定を行った。

3. ヘマトポルフィリン誘導体によるがん診断（武田、甘利、河合、権田）：がん患