

者と健常人から採血して分離したリンパ球をヘマトポルフィリン誘導体で染色し、ヘマトポルフィリンにレーザー照射して一重項酸素を発生させ、一重項酸素が基底状態に戻る際の発光を計測した。

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. シリカコーティング蛍光ビーズを用いたセンチネルリンパ節生検の検討 (武田、亀井、甘利、小林芳、仲田) : 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。銀ビーズの体内動態について、ラットにヨウ化銀ビーズを静脈注射直後、経時的にX線CTで撮像して造影効果の持続を確認した後、安楽死させ、各臓器を摘出して透過型電子顕微鏡でヨウ化銀粒子の分布を観察し、一部の個体は誘導結合プラズマ法で銀の元素

定量を行った。その結果、投与直後は肺、肝、腎、脾臓とも血管内のヨウ化銀ビーズを確認できたが、その後は肝細胞にのみ取り込みが見られ、それ以外の臓器ではヨウ化銀ビーズを認めなかった。誘導結合プラズマ法については、投与後24時間までは脾臓と肝臓に銀が検出されたが、1週間後にはまったく検出されなくなった。また腎臓においてはシリカコーティングヨウ化銀ビーズが血流中に存在する時間以外には銀はほとんど検出されず、以上により体外への完全排泄が示唆された(2nd "Hot Topics in Molecular Imaging - TOPIM" meeting of the European Society for Molecular Imaging)。

新たなMRI造影剤として、ガドリニウムナノ粒子を作製した。ガドリニウムはそれ自体コロイドを形成し難いため、最初にStöber法によりシリカナノ粒子を作製し、ガドリニウムコーティングを施した後、更にシリカコーティングし、3重粒子とすることで初めて作製に成功した(Colloids and Surfaces A, 2007)。ガドリニウム内包シリカコーティングビーズはMRIで撮像し、水および昨年度に作製したシリカ-ガドリニウムナノ粒子と比較して高い造影効果を示すことが確認できた。今回作製したシリカコーティング金コロイド粒子は、X線CTにて水に比較して増強効果を認め、培養細胞を用いた毒性試験を行った(J. Nanosci. Nanotech., 2007)。

2. 蛍光内視鏡を用いた腫瘍可視化による新しい外科手術の開発(武田、甘利、亀井、小林正) :

1) 鏡視下手術における蛍光検出法の開発；鏡視下手術は主に腹腔、胸腔内の外科手術において低侵襲な手術方法として知られ、センチネルリンパ節生検とともに外科治療の中心になりつつある。センチネルリンパ節生検は、様々な悪性腫瘍の手術へ応用されており、リンパ節転移陰性症例の不要なリンパ節郭清を省略し得る手法として広く行われている。我々はこれまでセンチネルリンパ節生検における蛍光計測法の利用を提唱し、最適な波長と粒子サイズの検討を行い、蛍光波長は近赤外光、粒子サイズは40nmが妥当であることを発表してきた(Nakajima, Cancer Science, 2005)。今回、量子ドットを用い、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 μ lとパテントブルーバイオレット1%液200 μ 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た(図1)。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。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示した。蛍光色素は色素と異なり肉眼的に視野を汚すことがなく、肉眼での手術手技を妨げることがないため極めて有用と考えられる。蛍光法はその検出限界が1cm程度とまだ実用的な深さの計測ができないことが最大の問題であり、より深い深度に存在する蛍光色素を検出し得

る超音波蛍光断層撮影法と組み合わせた装置の実用化が期待される。これまで実態顕微鏡による断端観察法を検討してきたが、内視鏡はある程度の拡大観察も可能なことから鏡視下手術のみならず、通常の内眼でも手術にも断端の観察など病巣検出に利用可能であることがわかった。

また、シリカコーティングヨウ化銀ペースによる腫瘍の造影に初めて成功した。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)：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、乳がんなどの症例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有意な増大を認めた。

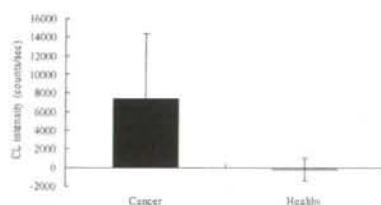


図1 がん患者と健常人のヘマトポルフィリン誘導体取り込みの比較

D 考察

我々の研究の目的は、高機能ナノ粒子の開発と医療応用である。機能性ナノ粒子を用いた高感度計測法を確立するにあたって、ブレイクスルーとなる新しい基盤計測技術の開発はもちろんのこと、ナノ粒子の体内動態・排泄経路の明確化、安全性の確立も欠かすことはできない。本年は既に既存の蛍光ナノ粒子にシリカコーティングを施し、センチネルリンパ背生検における有用性を検討した。更に

開発したナノ粒子の生体内動態、排泄経路、安全投与量のうち、シリカコーティング蛍光ナノ粒子はリンパ節への輸送様式を貪食された細胞から検討した。

以下、個々の項目について考察した。

1. シリカコーティング蛍光ビーズを用いたセンチネルリンパ節生検の検討（武田、亀井、甘利、小林芳、仲田）：シリカコーティング蛍光ビーズがセンチネルリンパ節トレーサーとして有用であることを今回初めて示した。粒径40nmの蛍光ナノ粒子をシリカコーティングしたものは造影時間が2倍以上延長した。これは主にサイズの増大効果があるためと考えられる。コーティングしない粒子に比べて100分以上の造影時間延長を認めた。この結果はわずかな粒径の違いで滞留性が大きく変わることを示しており、サイズを調整する手段としてシリカコーティング技術は極めて有用と考えられる。また、シリカコーティングによって蛍光寿命が延長することも確認しており、内包する蛍光粒子保護の意味からも有用と言える。現在更に粒径を微調節する技術を確立し、リンパ節をはじめとする組織滞留性を調節する技術として今後の発展が期待される。シリカコーティング粒子は、これまでの研究でシリカコーティングヨウ化銀粒子の体内動態を検討しており、臓器としては肝臓並びに脾臓に蓄積し、腎臓には蓄積しないことがわかっている。更に腫瘍の造影実験にも成功し、従来の造影剤に比べ長時間の造影効果を有することがわかっている。この結果はナノ粒子の大きさの違いにより腫瘍間質の動態が大幅に異なる結果とも一致しており、

昨年度の一定の大きさを持つナノ粒子が腫瘍間質において造影効果は投与後24時間以降も持続し、1週間以内に排泄されることが明らかになっている。また、誘導結合プラズマ法による定量計測では胆汁中に銀が検出され、尿中には銀が検出されなかったことからシリカコーティングヨウ化銀ビーズの胆汁排泄が強く示唆された。更に、血管内で凝集等も起こさず、短期観察ではあるが血栓形成等の重大な障害も認められなかった。現在多くのナノ粒子は体内動態、排泄経路明らかにされていないが、シリカコーティングナノ粒子については体内動態、排泄経路の重要な部分が解明されつつある。したがってシリカコーティング技術は今後、ナノ粒子の臨床応用、またその用途を決める上で大きな役割を果たすものと期待される。

以上によりシリカコーティングヨウ化銀ビーズはその粒径により病変の造影効果を長時間維持したい場合に有用であり、外科手術や放射線治療など、治療において病変の領域を視覚化する際に実に有望な新規マーカーである。また、がんの場合 EPR (extended permeability and retention) 効果があるため、さらに長時間にわたって腫瘍に蓄積し、造影効果を維持することが期待される。

また、前年度でシリカコーティングヨウ化銀ビーズのCT値が従来の造影剤に比べて低いことが問題となっていたが、今年度の研究でこれまでのシリカコーティングヨウ化銀ナノ粒子の10倍程度の懸濁液に比べ10倍と従来の造影剤に匹敵するCT値が達成され、今後の臨床応用に

向けて一つの大きな問題を解決したと言える。今後更に粒径の小さなシリカコーティングヨウ化銀ビーズの高濃度化を行う予定である。シリカを含めナノ粒子コーティング技術はナノテクノロジーの行く末を決める重要な技術であることから、今回体内分布・動態が詳細に示された意義は大きい。

2. 蛍光内視鏡を用いた腫瘍可視化による新しい外科手術の開発（武田、甘利、亀井、小林正ら）：今回、臨床を想定した内視鏡を用いて胃の所属リンパ節の検出実験を行ない、ブタの胃所属リンパ節を100%検出することができたが、色素法に比べてやや優れた検出率を示すことが初めて明らかにされた。本方法で肉眼による色素法では識別が困難なリンパ節も蛍光検出できることができ、この結果により蛍光検出法は、センチネルリンパ節生検に有用なだけでなく、蛍光色素でマーキングした腫瘍病変の検出・外科手術への応用も可能で、肉眼での観察に比べて高感度な病巣検出を可能にすると考えられ、我々が将来的に目指す腫瘍を完全に切除し得る精密な外科手術法の確立に大きく貢献しうる基盤技術になり得る。現在の検出装置は試作機であるため、今後更に改良を重ね、滅菌環境で使用し得る装置を作製していく予定である。

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）：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

シリカコーティング技術は蛍光ナノ粒子の滞留性を著しく向上させ、蛍光寿命の延長などの特性向上と相まって極めて有用な機能付与技術と言える。ナノ粒子のコーティング技術は機能を付与する上でも、ナノ粒子を保護し、生体適合性を得る上でも重要な技術であり、今後の更なる発展が期待される。昨年度の明らかにした生体内の排泄経路の特定と相まってナノ粒子の医療応用を推進する上で欠かせない技術となる。ナノ粒子の体内動態は医療を中心とした生体応用に不可欠な研究であり、今後の医療応用に向けて、大きな弾みになると考えられる。また、深部に存在する蛍光色素の検出を可能とする技術、内視鏡観察技術の開発は、蛍光計測の医療応用を進める上で極めて重要な意義を持つ。また大型動物に

において鏡視下に腹腔内のセンチネルリンパ節を検出できた意義は大きい。

更にナノ粒子の生体に対する安全性確保はナノメディシンを円滑に実現する上で最も重要であり、慎重かつ的確に行なわなければならない。したがって引き続き体内動態を含めた検討を行う必要がある。

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 single 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, *n 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、櫻井遊、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 26th 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 26th Congress of the International Association for Breast Cancer Research, September 22-24, 2008, Kurashiki, Japan
7. Kozuka Y, Moriya T, Akiyama F, Kurosumi M, Tse GM, Tan PH, Kanomata N, Ohuchi N, Kurebayashi J, Sasano H. *Breast Cancer*, 15, Supplement 1, 19-20, 2008, The 26th 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 26th 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 26th 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 26th 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 26th 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
- 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 27-30 日、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 27-30 日、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ックスは転移の進行にとも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/SiO₂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、平成 20 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

(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

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、2008年2月、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

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

分担研究者 川添 良幸 東北大学金属材料研究所 教授

分担研究者 水関 博志 東北大学金属材料研究所 准教授

研究要旨

光線感作物質を構成するヘマトポルフィリンとそのダイマーの理論計算を行った。PBEPBE 汎関数と 6-31G(d) 基底を用いた構造最適化計算がもつともポルフィリンの X 線結晶構造解析の結果と一致していた。3 種類あるヘマトポルフィリン同士を繋ぐ結合のうち、C-C 結合をもつ構造が一番安定であることが分かった。予想されたエネルギー変化量 ($\Delta G = -13.9$ kcal/mol) によるとエステルからエーテルへの構造変化は熱力学的に期待出来るものであった。時間依存密度汎関数理論計算は Q バンド吸収の最大値は大きく変化しない、かつ、低い振幅強度を持つことを示していた。そのため、ダイマーは多い投薬量のときのみ PDT 活性をもつ。

A. 研究目的

光線力学的療法 PDT は非侵襲的な治療であり、腫瘍学や眼科学での様々な病気の治療に使われる。がん治療の PDT の基本的な組み合わせは体内に光が透過できる波長領域 ($\lambda = 620 - 850$ nm) に吸収をもつ光敏感な薬、適切な波長をもつ光源と酸素分子である。光線感作物質はガン細胞に蓄積され、低い毒性をもつ。光によって活性化された分子は異なる反応を示し、シングレットからトリプレット励起状態に放射を伴わず（項間交差）変化できる。後半のステップの割合は分子中の重い元素により増進される（重原子効果）。主要な細胞毒性薬はシングレットの分子性酸素である。これはトリプレットから基底状態の分子性酸素に変化するエネルギー

生成するためには、この光線感作物質のトリプレット状態が分子性酸素の第 1 励起エネルギーの 0.98 eV に近い方がよい。

現在、光線感作物質はがん治療に使われており、フォトフリンはこのグループに属している。フォトフリンは金属を含まないオリゴマー状のポルフィリン（ヘマトポルフィリン）の混合物である。その混合物は 2 個から 9 個のリゴマー状のヘマトポルフィリンを含んでいて、それらのオリゴマー状の脱水状態の製品はエーテル、エステル、C-C 結合を持っていると信じられている。実験的な困難さから、大きなオリゴマーの単離、精製は難しく、現在でも大きな難題である。ヘマトポルフィリンおよびその派生物と光力学的活性に関して構造と活性の観点からの研究

はいくつか報告されているが、定量的な議論やPDT活性を担っている合成物中の正確な構造情報に関する研究報告はない。

近年、時間依存密度汎関数理論計算TDDFTは少ないコンピューター資源で電子状態のスペクトルの評価に有効であり、励起エネルギーと振動強度を予測できることが知られている。この論文ではPDTに使われる典型的なヘマトポルフィリンのモノマーとダイマーに関して構造とエネルギーとスペクトルの関係を系統的に調べた。この理論計算は実験結果と強く関連させ、リンカーの種類によるモノマーとダイマーの吸収スペクトルの振る舞いへの影響を調べ、より大きなオリゴマーのより複雑なスペクトルに関する情報を得る。特に、モノマーとダイマーの1) 構造とその立体配座、2) 吸収スペクトルとその電子状態の起源、3) シングレット-トリプレットエネルギーギャップをDFTとTDDFTによって調べる。また可能限り報告のある実験値と比較し、PDT活性を担う分子の性質を明らかにする。

B. 研究方法 (計算方法)

予め全ての計算はGaussian03を用いた。構造最適化と振動数解析、TDDFT計算は6-31g(d)基底で一般勾配化法を取り入れたPBEPBE汎関数を用いた。最近の報告から、6-31g(d)基底を用いることにより、より正確な分子形状と垂直励起エネルギー値を求めることが出来る事が知られている。構造最適化のときは対称性を考慮せずに計算した。エネルギー的に安定状態であることは振動数解析から確認した。計算した全ての系で負の振動数は見られ

なかった。シングレット状態では制限法、トリプレットでは非制限法を適用した。吸収スペクトルは時間依存密度汎関数理論計算により基底状態からの垂直励起エネルギーから評価した。計算機は東北大学・金属材料研究所・計算材料学センターのスーパーコンピューティングシステムを、計算プログラムとしては非経験的分子軌道計算プログラムGaussian03を用いた。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

Molecular geometries

ヘマトポルフィリンモノマーは様々なpHにより3つの異なる結合様式を取ることができる。実験的にはエーテル結合-C-O-C-、エステル結合-CO-O-C-、および、-C-C-結合をもつヘマトポルフィリンダイマーが知られている。ヘマトポルフィリン誘導体は単離が難しく、計算結果と比較可能な単結晶のデータが存在しない。そのため、類似のポルフィリンと比較した。さらに、ポルフィリンとヘマトポルフィリンは同様の電子状態をもつ。6-31g(d)基底を用いHF, B3LYP, B3P86, PBEPBEの異なる計算方法でガス相のヘマトポルフィリンモノマーの構造最適化を行った。最近の報告から、6-31g(d)基底を用いることにより、ポルフィリンではより正確な値を得られることが知られている。テストをした計算方法ではPBEPBEがもっともポルフィリンの実験値と一致

していた。そのため、ダイマー構造の最適化にはPBEPBEと6-31g(d)を用いた。

ダイマーのもっとも安定な立体配座を特定するために、構造最適化計算は異なる初期構造から始めた。2つのポルフィリンを同じ面に置いたものと、2つのポルフィリンを互いに垂直になるように置いたものの2種類である。Figure 2に最も低いエネルギーの立体配座を示す。C-C結合をもつ異性体は一部直線的な構造をしているが、他の2つは折り畳まれた構造をしている。さらにエーテル結合では2つのヘマトポルフィリン環の間に $\pi-\pi$ 相互作用が見られた。C-C結合のものが一番安定で、エーテル結合ダイマーはエステル結合ダイマーよりも13.3kcal/mol安定であった。予測した自由エネルギー変化 ($\Delta G = -13.9$ kcal/mol) は、室温でエーテルからエステルへの構造変化は水溶液溶媒中では熱力学的にあり得ることを示している。これはすでにアルカリ性水溶液で実験的に確認されている。さらに、3つの結合様式で振動数解析を行い、ヘシアン行列の固有値が全て正であり、対応する振動数は実数であることを確認した。これはこれらの構造が安定構造(少なくとも局所的に安定構造)であることを示している。

Electronic Spectra of Monomer and Dimer
TDDFTを用いてヘマトポルフィリンのモノマーとダイマーの吸収スペクトルを計算した。モノマーの計算値 λ_{\max} は実験データとよく一致していた。強く共役した環があるために、ポルフィリンライク

な系では400nm付近に強い吸収を示す。これはB band領域と呼ばれ、さらにQ band領域と呼ばれる500から800nmの間に弱いピークが見られる。孤立系におけるこれらの化合物のスピンを含むシングレット遷移を計算した。振動強度と遷移の性質は、620nm付近のピークに関して遷移に寄与する軌道の割合を求めた。

ダイマーの620nm波長領域の最も低い励起エネルギーは弱い遷移を引き起す。振動強度は0.0072から0.0001である。この遷移は主にHOMO-2からLUMO+3への励起で、エステルダイマーではHOMO-2からLUMOへの励起による。一方、HOMO-2からLUMOへ、HOMO-3からLUMO+3へ、HOMO-2からLUMO+2への遷移はエーテルダイマーの遷移に寄与している。C-C結合ダイマーではHOMO-1からLUMO+2へとHOMO-1からLUMO+4への遷移が寄与している。この最も低い励起エネルギーは2.02-2.07eVである。これはPDTに応用可能なバンド遷移である。すべてのダイマーで2つのヘマトポルフィリン間に強い π 共役はなく、励起エネルギーの大きなシフトは見られなかった。さらにポルフィリン環の π 電子の数は変化していなかった。これはポルフィリン、クロリン、バクテリオクロリンの最大の吸収を増大させたりシフトさせたりするのに寄与している。

Singlet-triplet energy difference
最適な性能を出すために光線感作物質がもつべき基本的な性質の一つがシングレット-トリプレットエネルギーギャップ(0.98eVよりも大きいか等しい必要がある)である。ダイマーのシングレット-

トリプレットエネルギーギャップ (ΔE) を求めた。これらのダイマーの値は 1.52eV から 1.69eV の間にあり、0.90eV よりも大きな値であった。これより、これらのダイマーはトリプレットからシングレット分子性酸素への変換が可能である。しかし、 ΔE はわずかな差であり、注意しなくてはならない。

D. 考察

本研究ではヘマトポルフィリンとそのダイマーの基底状態の構造、吸収スペクトルを TDDFT により研究した。基底状態の性質は形状パラメーターと電子励起に似ており、計算し、解析し、比較な実験データと比較した。6-31g(d) 基底を用いた PBEPBE 汎関数が良い結果を導くことが分かった。異なる結合で構成されるダイマーを構造最適化し、エステル結合と C-C 結合のダイマーは電荷の分離をもち、エーテル結合のダイマーは 2 つのポルフィリン環の間で π - π 相互作用が見出された。エステル結合からエーテル結合への変換は熱力学的に有りうることが示され、これは実験で観察された結果と一致している。これらを光線力学治療に使うと、2 つのスペクトルの観点は重要である。(a) シングレットからトリプレットへのギャップは 0.96eV よりも大きいこと (b) Q-band 吸収はあまり変化せず、かつ小さい振幅幅を持っていること。このため、ダイマーは高濃度において PDT 活性への寄与が可能になる。

E. 結論および今後の研究計画

今後はヘマトポルフィリンのより大きな

オリゴマーに関して様々な配座異性体を研究し、安定性と構造の関係を明らかにし、TDDFT 計算によりスペクトル測定の実験結果をサポートする計画である。本研究プロジェクトでは、ヘマトポルフィリン誘導体をナノ粒子の有力な機能付与分子の有力な候補と考えている。そのため将来の課題として、蛍光・X線・MRI マーカー表面に生体親和性（水中完全分散・生体無毒性）と細胞内組織ターゲット指向の機能を付加させる表面化学修飾を行い、タンパク質や光線力学治療薬（光照射でがん細胞を破壊する薬剤のこと）が結合できるよう改良する研究を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Suvitha A, Belosludov RV, Mizuseki H, Kawazoe Y, Takeda M, Kohno M, Ohuchi N. TD-DFT studies of hematoporphyrin and its dimers *Materials Transactions*, 49, 2416-2419, 2008.

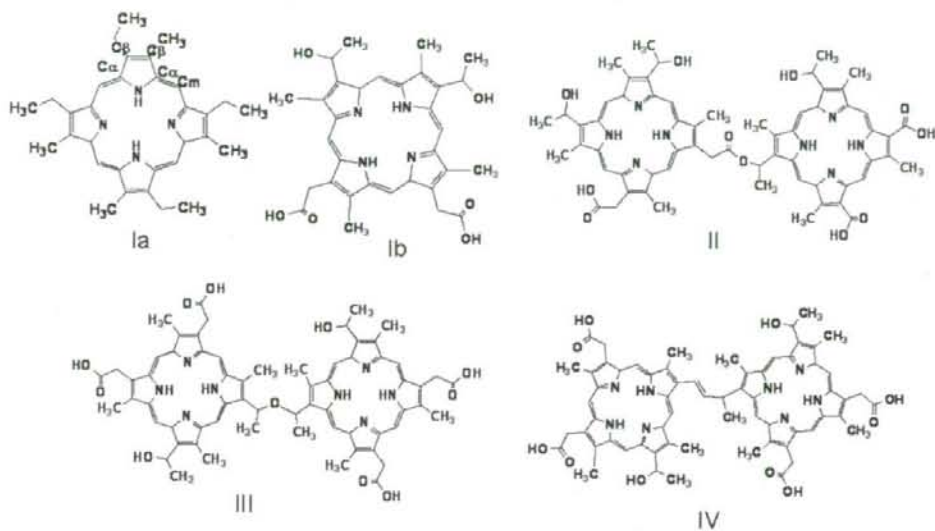


Figure 1: (Ia) Porphyrin (Ib) Hematoporphyrin (II) Ester linked dimer (III) Ether linked dimer and (IV) C-C linked dimer.

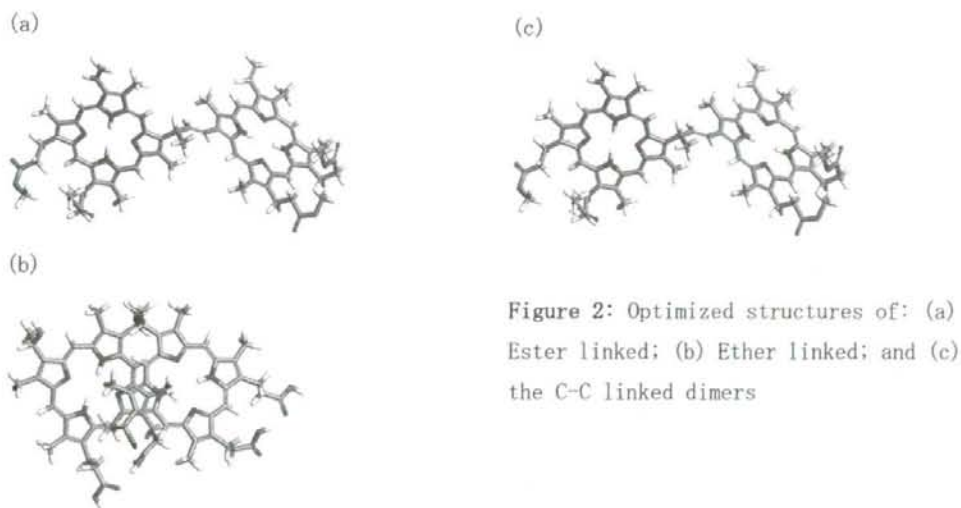


Figure 2: Optimized structures of: (a) Ester linked; (b) Ether linked; and (c) the C-C linked dimers

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

(分担) 研究者 粕谷 厚生 東北大学国際高等融合領域研究所 教授

研究要旨

従来より困難とされてきた直径 1nm 台の微小なバイオマーカーを、光学的に優れた化合物半導体である CdSe について作製する方法を独自に開発した。特に直径が 1.5nm から 1.9nm の間に安定に存在する発光効率の高い試料については有機分子による表面修飾を施すことで、直径 1nm 台のナノ粒子では世界最高の発光効率を達成した。これにより最小で最大効率のナノサイズ・センシングカプセルを実現した。

A 研究目的

現在、極微細な蛍光性バイオマーカーが望まれている。我々はこれまで 1nm 台まで微小な発光ナノ粒子を作製し、粒子表面を分子修飾することによって従来からの発光効率を遙かに上回るバイオマーカーを合成することが出来た。ナノ粒子は直径が 2nm を割ると表面を占める原子数が内部に比べて極端に増えて来るために活性化し、周囲の環境にも極めて敏感となって粒子の構造を原子レベルで精密に整えることが難しくなる。従って表面構造が乱れ、発光効率は極端に低下する。このため現在市販されている蛍光ナノ粒子の直径は 2nm を超えている。しかしこれらを分子マーカーとして用いる際、より小さい方が生体分子の動態へ影響が少ないと考えられるため、粒径 1nm 台以下が強く求められてきた。この難問を解決するために、ナノ粒子の安定性が原子数に依存することに着目した。直径が 1nm 台になると構成原子数も 100 を割るようになり、特定の原子数でのみ安定となって

不安定で構造の乱れた粒子を反応条件に工夫を凝らすことよって除去することが出来た。さらに粒子表面を分子修飾することにより周囲の環境による影響を取り除き、発光効率の高い安定なバイオマーカーを作製して各種測定に役立てた。

B 研究方法

直径が 1nm 台になると構成原子の数は 100 を割り、1 個の増減で安定性が大きく変化するようになる。従って粒子の成長条件によっては安定な粒子だけを選択的に合成することも可能になる。その結果成長する粒子は安定性に支配されているため、原子の数のみならず配列構造までが一意的に定まることになる。この方法により、直径が 1.5nm の $(\text{CdSe})_{34}$ 、1.7nm の $(\text{CdSe})_x$ 、1.9nm の $(\text{CdSe})_y$ 等の原子数まで揃った安定なナノ粒子を作製することが出来た。また配列構造も揃っているため、表面修飾等によって安定化が図られて発光効率が高められることを明らかにした。

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. 試料作製

試料作製と表面改質に用いた試薬を以下に示す。

$3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (硫酸カドミウム8/3水和物)

Se (粉末状)

Na_2SO_3 (亜硫酸ナトリウム)

界面活性剤 (octylamine or decylamine)

メタノール

Toluene

蒸留水

Trioctylphosphine (TOP)

Trioctylphosphine oxide (TOPO)

試薬はSe (粉末) を除くすべてを和光純薬工業株式会社から、Se (粉末) は株式会社高純度科学研究所から購入した。

2. 原料溶液の調整

原料溶液はCd²⁺イオン源とSe²⁻イオン源の2種類を準備した。以下にそれらの調整法を記す。

■ CdSO₄水溶液 (溶液A)

室温下で、 $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ を 1.931 g 計量したものにH₂Oを50 ml 加え、超音波洗浄機でよく混合し完全に溶かしたものを溶液Aとする (Cd濃度は1.5 M)。

■ Se水溶液 (溶液B)

Seを1 g、 Na_2SO_3 を4.78 g計量したものにH₂Oを250 ml 加え加熱する。その際、遮光するために容器をアルミ箔で覆い、95 °Cで2日間攪拌しながら熱し続け完全に溶かしたものを溶液Bとする (Se濃度は0.5 M)。

3. CdSe ナノ粒子の作製

作製したCdSe ナノ粒子は3種類あり、いずれも作製に用いた界面活性剤と有機溶媒が有毒なため実験操作はドラフト内で行った。

■ (CdSe)₃₄ ナノ粒子

- 1). サンプル管に溶液Aを1mlとH₂Oを19ml加え、そこにメタノール10ml加える。
- 2). 界面活性剤を2.5ml加えよく振り混ぜる。
- 3). 溶液Bを10ml、トルエン30mlをそれぞれ別の容器に用意する。
- 4). サンプル管に溶液Bを加え、すぐにトルエンを加える。
- 5). 室温下で1日暗所に静置することで、粒子サイズのそろった(CdSe)₃₄がトルエン中に生成される。

■ (CdSe)₄ ナノ粒子

- 1). (CdSe)₃₄溶液からトルエン層を分離する。
- 2). (CdSe)₃₄溶液に対して2:1の割合でオクチルアミンを加えて、60°Cに保ち良く攪拌しながら3~4週間静置しておくことで得た。

■ (CdSe)₁ ナノ粒子の作製

トルエン中で成長する(CdSe)₃₄について同様の方法で溶媒をクロロホルム代えて作製した後、3~4週間静置すると(CdSe)₁が得られる。

4. CdSe ナノ粒子の表面改質

粒子を安定化させ発光効率を上げる為に表面をTOPで分子修飾を行った。

■ (CdSe)₃₄の表面改質

1). (CdSe)₃₄ 溶液のトルエン層を分離してフラスコに移し、シリコンセプタムで蓋をしてArガスによりバブリングすることによって脱気をおこなった。

2). シリンジを用いて CdSe 溶液中の Se 濃度に対して様々な割合で TOP を添加し、スターラーでよく攪拌しながら暗所で保存した。

■ (CdSe)_xの表面改質

1). (CdSe)_x 溶液をフラスコに移し、シリコンセプタムで蓋をしてArガスによりバブリングすることによって脱気をおこなった。

2). シリンジを用いて CdSe 溶液中の Se 濃度に対して 1.0 倍及び 5.0 倍の TOP を添加し、スターラーでよく攪拌しながら暗所で保存した。

5. (CdSe)₃₄ 発光測定

先ず、光吸収スペクトルを見ると 415nm に鋭いピークを持つ。次に発光スペクトルを見ると (CdSe)₃₄ は 430nm に鋭いピークが、長波長側にはブロードなピークがある。ここで 430nm のピークは鋭く、吸収ピークよりわずかに長波長側で発光しているの、エキシトンによる発光であると考えられ、ストークスシフトは 15nm となっている。一方、長波長側のブロードなピークは、表面にある多くの再結合中心からの発光が多数重なり合っていると考えられる。

6. TOP の添加による (CdSe)₃₄ の発光スペ

クトルの時間変化

TOP 添加後の (CdSe)₃₄ 発光スペクトルの時間変化を図 1 に示した。

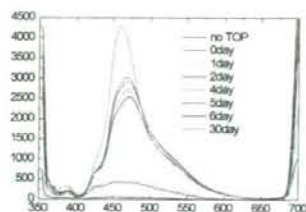


図1. (CdSe)₃₄の溶液中の表面Se濃度に対して0.75倍のモル濃度のTOPを添加した (CdSe)₃₄の発光スペクトルの時間変化(励起波長350nm)

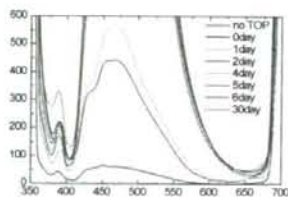


図2. 図1の縦軸を10倍したスペクトル

また、添加直後の変化を調べるため、図 2 には縦軸を 10 倍したのも示した。ただし測定毎に試料の濃度が等しくないので、発光スペクトルは励起波長 350nm における吸光度で割ることにより溶液の濃度差によって生じるスペクトル強度の誤差の補正を行っている。

まず図 2 を見ると全体的に no TOP と 0 day の間で急激にピークが上昇している。この TOP 添加直後の変化は TOP が (CdSe)₃₄ ナノ粒子に配位したことによって起こると考えられる。また図 1 を見ると 1day と

2dayの間でも455nmから475nm付近のピークがかなり上昇している。この変化はTOPを添加しない(CdSe)₃₄でも経時変化として見られるが、添加した(CdSe)₃₄の方が4倍ほど速い。このスペクトル変化は(CdSe)₃₄の吸収スペクトルにおける415nmのピークのおよそ長波長側へのシフトと450nmの肩の出現、即ち(CdSe)_xの成長と直接関係すると考えられる。TOPの添加により(CdSe)_xの成長が速まったとすれば、解釈できる。また後述するが、(CdSe)_xのエキシトンの発光ピークが455nmにあることから、図1における455nm付近のピークは(CdSe)_xのエキシトンの発光によると推察される。以上のピークの変化をより詳しく見るために(CdSe)₃₄のエキシトンの発光と考えられる430nmのピーク、(CdSe)_xのエキシトンの発光と考えられる455nmのピーク、そして(CdSe)₃₄の表面の再結合準位などからの発光と考えられる475nm及び525nm付近に肩を示す幅広い裾野のピークを分離して図3に示した。

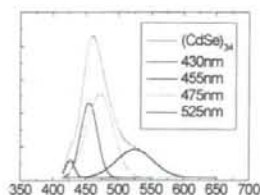


図3. (CdSe)₃₄の発光スペクトルのピーク分離

7. (CdSe)_xの光吸収と発光スペクトル
TOPを添加していない状態の(CdSe)_xの光吸収スペクトル、発光スペクトルを図4

に示した。

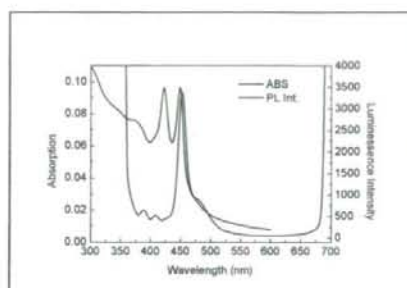


図4. (CdSe)_xの光吸収スペクトル(黒線)と発光スペクトル(青線)

光吸収スペクトルを見ると450nmと425nmに鋭いピークを持つ。発光スペクトルを見ると(CdSe)_xは455nmに主要な鋭い発光ピークがあり、他にも480nm付近にブロードな弱い発光が存在する。ここで455nmの発光ピークは鋭く、吸収ピークの450nmに近い値であるため、(CdSe)₃₄と同様に455nmのピークはエキシトンによる発光であると考えられ、ストークスシフトは5nmと測定された。発光強度を比較すると(CdSe)_xのエキシトンの発光強度は(CdSe)₃₄のより約18倍強い。このため長波長側のブロードなピークは(CdSe)₃₄と同様に表面準位からの発光と考えられるが(CdSe)₃₄に比べて弱く観測される。

8. TOPの添加による(CdSe)_xの発光スペクトルの時間変化

(CdSe)_xの発光スペクトルの時間変化を図6に示した。(CdSe)₃₄の結果と少し異なるが0dayによる変化の後に1日かけて455nmのピークと480nm付近のブロードなピークの強度が上昇し、その後は緩やかな増加となっている。前者の455nmの発光ピークは(CdSe)_xのエキシトンからと

考えられ、後者とピーク分離した結果を図5に、時間変化を図6に示す。

1日程度でTOPが配位してエキシトンの455nmピークが増大するが、480nmピークはその後も上昇している。1dayまでの480nmピークの変化が(CdSe)_xの表面準位によるかはわからないが、その後の変化は新たな粒子の成長によると推測される。

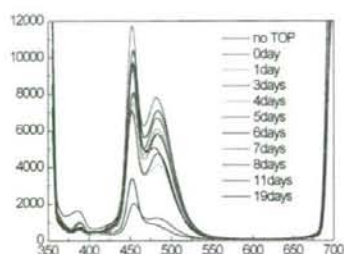


図5. (CdSe)_xの溶液中のSe濃度に対して1.0倍のモル濃度になるようにTOPを添加した(CdSe)_xの発光スペクトルの時間変化(励起波長350nm)

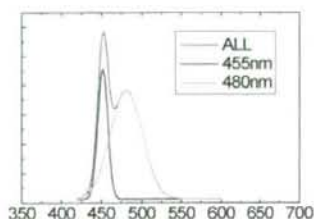


図6. (CdSe)_xの発光スペクトルのピーク分離

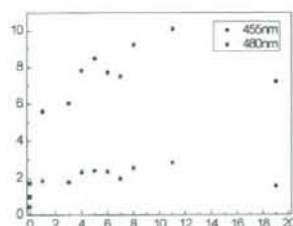


図7. TOP1.0 (CdSe)_xの分離したピークそれぞれの発光強度の時間変化

D. 考察

1. CdSe ナノ粒子の発光の量子効率

TOPの添加によりそれぞれのCdSeナノ粒子の発光の量子効率がどの程度上昇したのかを、基準物質である硫酸キニーネの発光効率と比較することで調べた。

図8に各CdSeナノ粒子の発光スペクトルと量子効率を示した。横軸に波長(nm)、左縦軸に発光強度、右縦軸に量子効率を示した。

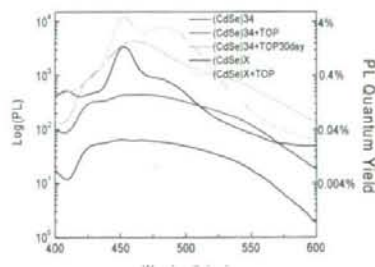


図8. 各CdSeナノ粒子の発光スペクトルと量子効率

2. CdSe ナノ粒子表面における分子修飾のNMR測定による検証と結合状態

TOPの添加直後の発光効率の向上はTOPとCdSeが結合したためと考えた。添加したTOPがそれぞれのCdSeナノ粒子と結合しているとすれば、図9からTOPのPとCdSeのSeが結合すると予想される。またTOPが酸化してTOPOになっていれば、Cdと結合すると考えられている。どのような結合が実際に生じているかを確かめるために(CdSe)₃₄と(CdSe)₇について、³¹PのNMR測定を待ち時間30秒、積算回数2000回で行った。標準物質には10wt%リン酸水溶液を用いた。その結果、それぞれのスペクトルにはTOPのPとCdSeのSeが結合していると考えられる新たなピークが35~40ppm付近に観測された。

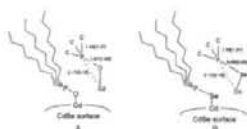


図9. EXAFSの解析から提案された2種類の配意子の結合モデル。

しかもピーク幅が鋭く、粒子が非常に小さいことを示している。従って、(CdSe)₃₄、(CdSe)₇について発光効率が上昇した理由はCdSeナノ粒子表面のSeとTOPが結合したことによると解釈された。また粒子へのTOPの被覆率は5%と見積もられた。

3. (CdSe)₇の成長と粒子の構造

図10は10℃において成長させた(CdSe)₇の吸収スペクトルである。図4と同様な吸収スペクトルであるが、低温で作製したために非常にゆっくりと成長しながら415nmのピークが出現している。

図11は室温で成長させた結果を示す。415nmのピーク以外に450nm付近に肩が現れている。

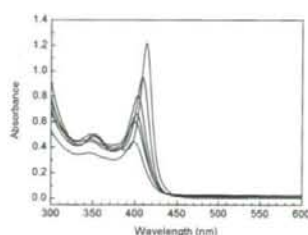


図10. 10度で成長させた(CdSe)₇の吸収スペクトル

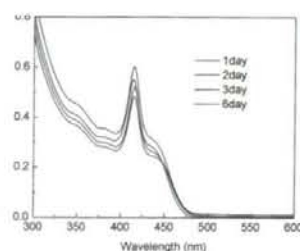


図11. 室温で成長させた(CdSe)₇の吸収スペクトル

このことからトルエン中で温度を上げると(CdSe)₇が成長するのと同じように、クロロホルム中でも温度を上げると同じようなサイズに揃った1nm粒子、(CdSe)₇が成長すると推測される。但しこの450nm付近のスペクトル形状は図6に示した(CdSe)₇とは大きく異なることから、互いに違う構造の試料と考えられる。しかもピーク或いは肩が鋭くなく、(CdSe)₇試料にはある程度サイズに分布があると推定される。

室温で作製した(CdSe)₇の発光スペクトルを図12に示した。発光ピークは比較