

的鋭く 450nm の吸収の肩の位置に近いことから、励起子によるピークと考えられる。また長波長側の裾の強度も非常に低く、構造の整った良質の試料が成長したと考えられる。

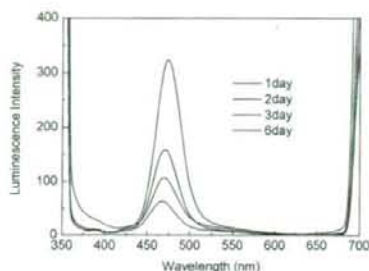


図 12. 室温で作製した  $(\text{CdSe})_4$  の発光スペクトルと時間変化。

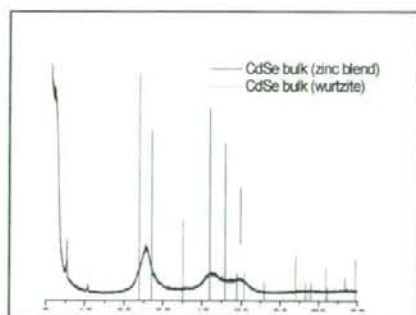


図 13. 長時間静置した試料の XRD の結果

図 13 に長時間静置した  $(\text{CdSe})_4$  試料の XRD の結果を示す。ピーク位置と線幅をみると、Wurtzite 或いは Zinc Blende 型構造をとる微結晶ナノ粒子と判断される。以上のことから  $(\text{CdSe})_4$  は成長初期は  $(\text{CdSe})_4$  に近い特定の離散的サイズの 1nm 粒子であるが、次第に連続的サイズが取れるバルク様の結晶に成長して行く粒子

と考えられる。従って CdSe は 1nm 台のごく微小な粒子では特定の原子数を持つ離散的なサイズでのみ安定であるが、それ以上では連続的サイズの微結晶で安定であることが始めて明らかとなった。

#### 4. CdSe の 1nm 台粒子の構造と発光効率

TOP の添加によって発光の強度が全スペクトル域にわたって一様に増加したことから、TOP は表面に結合することによって特定の発光過程にだけ影響を与えるのではなく、発光効率全体を決めている過程を減少させていると解釈出来る。この結果は光励起によって生成した電子とホールペアあるいはどちらかの寿命が TOP を粒子表面に配位したことによって延びたために再結合の機会が増加し、全ての表面準位を介する発光が同等に増えたことによると考えられる。NMR 測定は、TOP が粒子表面の Se と結合していることを示しているが、Se はホールトラップとして働くことで知られている。従って TOP と結合することによりトラップの機能を不活性化させることが発光効率の増大に寄与することがわかった。

#### E. 結論

理論計算および NMR 測定の結果によれば  $(\text{CdSe})_{34}$  の表面は Se 原子で占められている。強いて言えば表面はホールトラップで占められているので発光効率が 0.3% と非常に低い。この 1.5nm の粒子が 1.7nm の  $(\text{CdSe})_x$  へ、1.9nm の  $(\text{CdSe})_y$  へと成長するには Cd 原子が Se 原子を覆うこととなり、ホールトラップが次第に減少して発光効率が上がると解釈出来る。ナノ粒子は 1nm 台になって始めて安定構

造が原子数にまで依存して変化するというナノ構造に最も特徴的な性質が現れ、原子配列までが単一な粒子として選択的に大量合成出来る。この試料によって発光効率を決めている主要な要素を同定することが可能となった。

一般にナノ粒子は表面を化学修飾することによって有用な機能が更に拡大する。特に原子配列の求まった1nm粒子については原子1個の精度で分子修飾が出来、発光過程の微視的機構解明に基づく飛躍的な性能向上や最適化が図れる。これによりバイオマーカとして、これまで困難であった1nm領域における諸過程の追跡が行えるようになった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Romanyuk V, Dmitruk I, Barnakov I, Belosludov R, Kasuya A. Ultra-Stable Nanoparticles in AIIBVI (AII = Cd, Zn; BVI = S, Se, Te) Compounds. J Nanosci Nanotechnol, 8, 1-8, 2008

2) Dmytruk A, Dmitruk I, Blonsky I, Belosludov R, Kawazoe Y, Kasuya A. ZnO clusters: Laser ablation production and time-of-flight mass spectroscopic study. Microelectronics J. 40, 218-220, 2009

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

（分担）研究者 小林 正樹 東北工業大学 教授

研究要旨

量子ドットを用いたがんの転移が頻発するリンパ節の検出や量子ドット-抗体複合体を用いた腫瘍の検出のため、生体内蛍光を高精度にイメージングする、高感度蛍光イメージングシステムの開発を行った。本年度は昨年度に継続し、生体外から非侵襲的に生体深部の蛍光分布をイメージングするための、超音波による音響光学効果を利用した超音波タグ蛍光イメージング装置の実用化に向けた開発研究を行った。

A. 研究目的

従来の蛍光検出法では、生体のような散乱媒質中の蛍光分布計測を行うことはできない。われわれは散乱媒質中での蛍光分布を高い解像度で計測するため、超音波と光の相互作用を利用して空間選択的に蛍光分布情報を得る、超音波タグ蛍光断層イメージング法について検討を行っている。今年度は、昨年度の研究結果により見積もられた到達可能深度を、実際の生体試料を用いて実証するため、実験系の改良と計測実験を行い、同時に実用化に向けての課題について検討を行った。

B. 研究方法

生体組織内に超音波音場が形成されると、屈折率や散乱係数などの光学特性の空間分布が誘起される。進行波の場合音圧の時間的な変化に依存した光強度の変化をもたらす。すなわち媒質内で焦点

を結ぶ集束超音波を利用すると、その焦点において空間選択的に光強度変調を与えることができる。媒質中に蛍光物質が局在する場合、励起光や発生した蛍光は強度変調を受け、超音波焦点と蛍光体の位置が一致したときその信号は最大となる。各点において変調蛍光信号を検出し、変調信号成分をスペクトラムアナライザにより検波することにより散乱媒質中における蛍光特性の空間選択的計測が可能となる。

これまでの方法では、測定試料をアクリル水槽に満たした蒸留水中に浸漬し、ここにCWレーザー光と、レーザー光軸と直交するよう配置した水中用トランスデューサにより集束超音波を照射し、トランスデューサが取り付けられている水槽ごと2軸走査し、集束超音波焦点を試料内において走査した。2次元断層画像計測のためにこのように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に際し、その走査方法に問題があった。機械走査に代えて、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。このような観点から、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は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が可能となる。図1に、アナログ式遅延回路を用いた位相制御システムの概要図を示す。ここでは、フェイズドアレイトランスデューサによる蛍光変調信号検出の可能性を検討することを目的としてアナログおよびデジタル両遅延回路並びに駆動アンプ回路の設計試作を行い、蛍光計測系と組み合わせた総合システムの設計試作を行った。アナログ式回路では、遅延回路の後段にコンピュータ制御によるマトリックススイッチング回路を接続し、焦点距離を固定したまま一軸リニア走査ができる構成とした。また、デジタル遅延回路においては、リニア走査だけでなく、ステアリング走査による焦点移動が可能なシステム構成とした。図1にシステムのブロック図を示す。

ここでの測定には、光散乱媒質としてイントラリピッド水溶液を用い、その内部に蛍光性微粒子 (FluoSpheres carboxylate-modified microspheres  $0.04\mu\text{m}$ , IR 715/755) を混合したアガロースを、直径3mm高さ5mmの円柱形に成形し、シリコンチューブに包埋したもの

を用いた。実験での光源にはDPSSレーザー励起による波長726nmのTi:Sapphireレーザーを用い、X,Y両軸のステージを機械走査することで、断層画像計測を行った。

(倫理面への配慮)  
該当なし

### C. 研究結果

図2は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、2次元断層画像計測を行った結果である。図2より、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。イントラリピッドを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。

### D. 考察

本年度研究では、昨年度までの研究結果を踏まえ、本手法の実用化に向けた研究として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氣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。

### E. 結論

本プロジェクトが目的とするセンチネルリンパ節検索をはじめとする、臨床診断装置を目的とした蛍光断層画像計測装置の実用化に向けて大きく前進した。



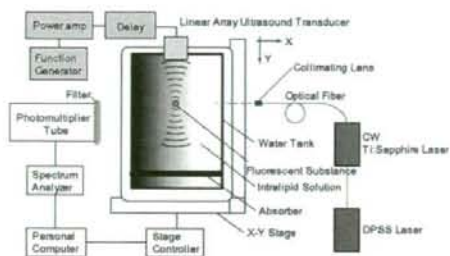
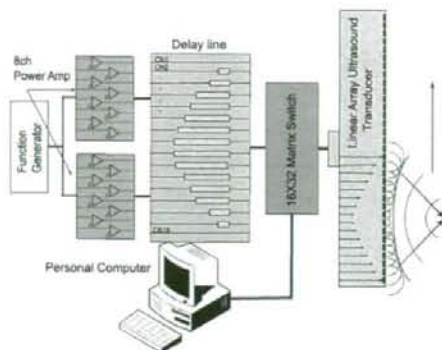


図 1 超音波タグ蛍光断層イメージングシステムのブロック図(a)フェイズドアレイ超音波トランスデューサ駆動システム(b)全体システム

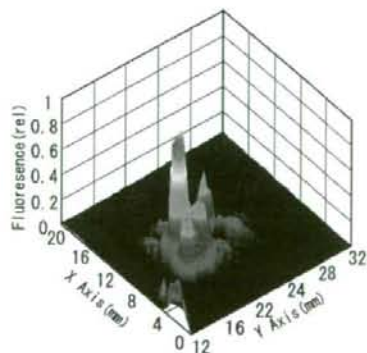


図 2 液体散乱媒質内に蛍光体を設置し、フェイズドアレイ素子で蛍光変調して計測した蛍光断層画像

## F. 健康危険情報

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

小林正樹：生命科学・医学応用のための極微弱発光・蛍光イメージング技術. 顕微鏡, Vol. 43, No. 3, pp. 202-206 (2008)

### 2. 学会発表

Q. D. Trinh, Y. Nanbu, T. Suzuki, S. Takahashi, M. Takeda, M. Kobayashi: Basic study on application of the phased-array transducer to determine fluorescence in turbid media based-on acousto-optic effects. International Conference on Laser Applications in Life Sciences (LALS 2008), Abstract book p. 7 (Taipei, Taiwan) (December 4 2008)

Q. D. Trinh, Y. Nanbu, T. Suzuki, S. Takahashi, M. Takeda, M. Kobayashi: Fluorescence tomography based-on acousto-optic modulations with phased-array ultrasound transducer. BiOS Part of SPIE Photonic West, paper No. 7177-57 (San Jose, USA) (January 27, 2009)

南部雄也, 鈴木知佳, 高橋誠樹, Trinh Quang Duc, 小林正樹: 超音波タグ蛍光断層イメージング法による生体組織の蛍光断層画像計測. 平成 20 年年度電気関

係学会東北支部連合大会, 講演番号 2E14,  
講演論文集 p. 183 (2008)

熊坂増高, 日景允, 亀井尚, 武田元博, 大  
内憲明, 小林正樹: ナノ蛍光微粒子によ  
るセンチネルリンパ節検索のための腹腔  
内視鏡蛍光イメージングシステムの開発.  
平成 20 年年度電気関係学会東北支部連  
合大会, 講演番号 2E15, 講演論文集 p. 184  
(2008)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許 (公開)

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

がん転移に関わる細胞動態の *in vitro* 及び *in vivo* イメージングに関する研究

(分担) 研究者 権田 幸祐 東北大学医学系研究科 助教

研究要旨

がんの最も脅威な点の1つは転移能である。転移性がん細胞は膜伸縮運動(仮足形成)によって原発巣から血管に向かって運動し、血流に乗り他の組織へ転移する。これまで、がん転移を細胞レベルで解析する研究は、技術的な困難さから培養皿(*in vitro*)で主に行われてきた。しかし細胞や血管が複雑に位置・配行する腫瘍(*in vivo*)は *in vitro* と大きく異なるため、がん細胞運動や抗がん剤効果を生理的に理解し治療に役立てるには、腫瘍内の細胞動態を可視化する技術(*in vivo* イメージング)が必要となる。本研究では、腫瘍内の転移性がん細胞の動態を明らかにするために、高輝度で長時間観察可能な量子ドットを用い、独自の光学系を用いたナノ計測法により、9nm の位置精度で腫瘍細胞の細胞膜の流動性や形態の観察を試みた。その結果、腫瘍組織内の存在場所に依存して細胞膜の流動性や形態が大きく異なること可視化することに成功した。

A. 研究目的

担がんマウスの腫瘍細胞の動態をナノメーター、ミリ秒スケールで *in vivo* イメージングし、がん転移に関わる細胞膜の流動性や形態を明らかにする。

B. 研究方法

低浸潤性ヒト乳がん培養細胞KPL-4 (HER2 (Human Epidermal growth Factor Receptor 2) 高発現株)に、乳がん細胞の転移能を活性化する遺伝子 PAR1 (Protease-Activated Receptor 1) を導入し、細胞の運動性・浸潤能を高めた。また、PAR1 発現細胞を特異的に標識するために、抗PAR1モノクローナル抗体を調製した。次に細胞膜上のPAR1をラベルするプローブを作製するために、高輝度で長時間退

色しない量子ドットにPAR1抗体を結合させた。このプローブを用いて、(1) PAR1 発現KPL-4細胞をラベルし *in vitro* で観察を行うこと、(2) PAR1 発現KPL-4細胞を用いてSCIDマウス(免疫不全マウス)に腫瘍を調製し、マウス尾静脈から注入したプローブでラベルされた腫瘍細胞の *in vivo* 観察を行うことを試みた。また、観察の際は、仮足形成が活発な膜伸縮領域と非伸縮領域に分けてイメージングを行った(イメージング装置は以下に示す)。

【イメージング装置】IX71 落射照明顕微鏡(オリンパス)に、532nm レーザー、横河社製共焦点ユニット、EM-CCD カメラ(アンドール)を組み合わせ、これに独自に開発したマウス観察用の低振動性ステージを取り付けて *in vivo* イメージング装置を

開発した。イメージング画像は、共同研究者の渡邊（大阪大・助教）によって開発された輝点解析用ソフトを用いて解析した。

#### C & D. 研究結果&考察

*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( $2 \times 10^4 \text{ nm}^2/\text{s}$ )。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。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クスを調べる良い指標となることが分かった。

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。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。

#### E. 結論



本研究では、独自の *in vivo* イメージング装置を用いてがん転移に重要な腫瘍細胞の膜動態をナノメーター、ミリ秒スケールでイメージングすることに成功した。その結果、血管近傍細胞は、遠方の細胞に比べ、アクチン繊維ダイナミックスが活発であり、これにより PAR1 の拡散性が増大し、浸潤突起形成を促進させている可能性が示唆された。

これまでは技術的な問題のため、このような分解能で腫瘍内の細胞を可視化し、細胞動態を議論することは出来なかった。しかし、本研究によって新たな *in vivo* イメージング法が確立し、*in vivo* における細胞動態の本質に迫ることが可能となった。今後は、本研究によって開発された *n vivo* イメージング技術の精度をさらに発展させると共に、抗がん剤のがん転移への効果を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と考えている。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yoo J, Kambara T, Gonda K, Higuchi H. Intracellular imaging of targeted proteins labeled with Quantum Dots. *Experimental Cell Research*, 314, 3563-3569, 2008.

### 2. 学会発表 (筆頭著者のみ)

① 榎田幸祐、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」第6回ナノ学会、2008年5月、福岡。

② 榎田幸祐、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 *in vivo* イメージング」第60回日本細胞生物学会 ワークショップ、2008年7月、横浜。

③ 榎田幸祐、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)、2008年10月、仙台。

④ Gonda, K., Takeda, M., Kawai, M., Higuchi H., and Ohuchi, N. Imaging of cancer metastasis in living tumor with quantum dots. 7th International Symposium on Nano-Biomedical Engineering, October 2008, National Cheng Kung University, Tainan

⑤ 榎田幸祐、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。

⑥ 榎田幸祐、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。

⑦ Gonda, K., Watanabe, T.M., 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 (invited).

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

（分担）研究者 小林 芳男 茨城大学工学部 教授

研究要旨

昨年度までに、X線造影粒子として AgI ナノ粒子を、MRI 造影粒子として Gd 化合物ナノ粒子を対象として、各ナノ粒子のシリカカプセル化法の開発および造影特性の検討を行った。本年度は、AgI ナノ粒子系に関しては、シリカカプセル化 AgI (AgI/SiO<sub>2</sub>) 複合粒子へのタンパク質担持法を、Gd 化合物ナノ粒子系に関しては、シリカ粒子をコアとして用いない、シリカカプセル化 Gd 化合物 (Gd/SiO<sub>2</sub>) 複合粒子の作製法を開発した。

A. 研究目的

X線あるいはMR造影剤はアレルギー等の副作用が問題となっている。また、これらの造影剤は溶液状であるので、分析部位に長時間留まることができないため、安定した造影を行うことが困難である。その解決策として造影能を有する材料のカプセル化が考えられる。これにより、造影剤と生体が直接接触することを防ぎ、さらには体液中での造影剤の流速を制御できると予想されるので、良好な造影能を発現することが期待される。本研究では、これまで、X線造影能を有するヨード化合物として合成が比較的容易な AgI を、MR 造影能を有する物質として知られる Gd を取り上げ、これらの材料のシリカカプセル化法を開発した。本年度は、より精密に複合微粒子を合成することを目的として、これまでに行った開発研究を継続する。また、得られた粒子の造影能の評

価やタンパク質担持法の開発も行う。

B. 研究方法

B-1. 各種複合粒子の作製

B-1-1. AgI/SiO<sub>2</sub>粒子の表面修飾およびタンパク質の担持：タンパク質はアミノ基やカルボキシル基と結合するものが多い。本研究では、粒子表面のアミノ化およびカルボキシル化を検討した。AgI/SiO<sub>2</sub>粒子コロイドはamine-freeシリカカプセル化法により調製した。得られたAgI/SiO<sub>2</sub>粒子にaminopropyltrimethoxysilaneを作用させることにより粒子表面のアミノ化を行った(AgI/SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)。さらにsuccinic anhydride/DMF溶液を作用させることにより、カルボキシル基を表面に導入した(AgI/SiO<sub>2</sub>-COOH)。タンパク質の担持はこれらの各表面修飾試料コロイドにタンパク質水溶液を添加することにより行った。用いたタンパク質は牛血清アルブミン

(BSA) である。

B-1-2. Gd/SiO<sub>2</sub>複合粒子の作製法の開発：  
昨年度までの研究においてシリカ粒子を  
コアとして用いた理由は、Gd化合物単独  
では微細な粒子を合成することが困難で  
あるからである。また、シリカコアの使  
用により、粒子中のGdを高濃度にするこ  
とは困難である。一方、分散安定剤種や  
各種濃度条件等は粒子の形状や大きさに  
大きな影響を及ぼすことが予想できる。  
したがってこれらの影響を詳細に検討す  
ることにより、得られる知見が微細複合

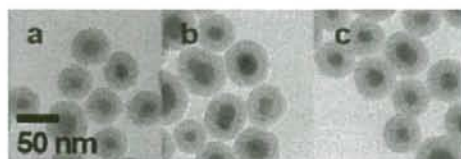


図1. 各粒子のTEM像.  
(a) AgI/SiO<sub>2</sub>、(b) AgI/SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>、  
(c) AgI/SiO<sub>2</sub>-COOH

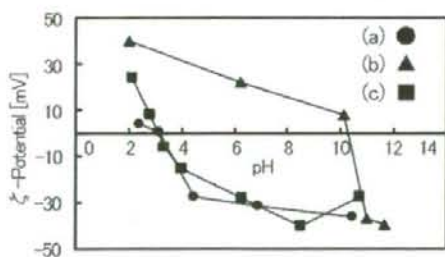


図2. 各粒子のゼータ電位のpH依存性.  
(a) AgI/SiO<sub>2</sub>、(b) AgI/SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>、  
(c) AgI/SiO<sub>2</sub>-COOH

粒子の作製法の確立に反映できる可能性  
がある。本節では、Gd化合物粒子を均一  
沈澱法により調製し、これをコアとして  
Stöber法によりシリカコーティングを行  
う方法の開発に取り組んだ。

## B-2. キャラクターゼーション

粒子の形状を透過型電子顕微鏡(TEM)

により調べた。TEM観察用試料は、コロジ  
オン膜貼り付けCuメッシュにコロイド溶  
液を直接的かして乾燥させることにより  
作製した。粒子の表面状態は光電子分光  
装置(XPS)およびレーザーゼータ電位計  
によりそれぞれ調べた。BSAの吸着量は  
分光光度法により測定した。

## 倫理面への配慮

本研究は現在までのところ人体を対象  
とした実験を行っていないため倫理的問  
題は生じない。また、動物実験は全て麻  
酔下で行い、動物愛護に十分配慮してあ  
る。

## C. 研究結果

C-1. AgI/SiO<sub>2</sub>粒子の表面修飾およびタン  
パク質の担持：図1に各表面修飾粒子の  
TEM像を示す。各表面修飾後も、凝集や  
癒着、あるいはコアシェル構造の損傷  
等は見られなかった。図2にゼータ電位  
を示す。アミノ化により、等電点が高pH  
側に、カルボキシル化により、再び低pH  
側にそれぞれシフトした。このことから、  
アミノ化とカルボキシル化が良好に行わ  
れたことが窺われる。図3に  
AgI/SiO<sub>2</sub>-COOHのXPSスペクトルを示す。  
カルボキシル化により、C=Oのピークが

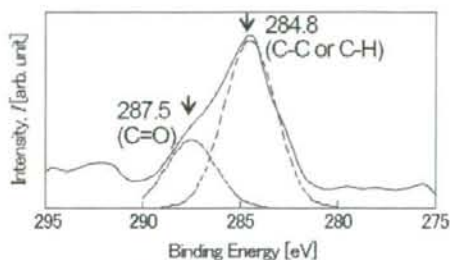


図3. AgI/SiO<sub>2</sub>-COOH粒子のC1s XPSスペ  
クトル。



現れた。このことも、カルボキシル基の導入を示している。タンパク質担持実験によると、表面修飾により、よりBSAが吸着することがわかった。これに関しては、第61回コロイドおよび界面化学討論会で報告した。

C-2. シリカカプセル化 Gd 化合物 (Gd/SiO<sub>2</sub>) 複合粒子の作製法の開発：図 4a および b に PVP および SDS をそれぞれ安定剤として用いて作製した Gd 化合物粒子の TEM 像を示す。粒径はそれぞれ 51.84±12.16 nm (a) および 38.92±6.04 nm (b) であった。図 4c および d にそれぞれこれら粒子を用いて作製した Gd/SiO<sub>2</sub> 粒子の TEM 像を示す。いずれも

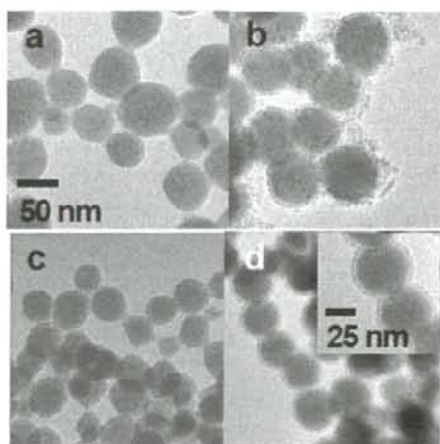


図 4. 各粒子の TEM 像。  
(a, c) Gd、(b, d) Gd/SiO<sub>2</sub>。  
(a, b) PVP 使用、(c, d) SDS 使用

5~10 nm 程度のシリカ層が形成されている様子が観察された。現在、発表の準備を行っている。

#### D. 考察

D-1. AgI/SiO<sub>2</sub> コア-シェル型複合粒子：

AgI/SiO<sub>2</sub> 粒子は、表面修飾を行うことによりタンパク質の担持が可能であることがわかった。この結果は、患部への特異吸着の可能性を示しており、センチネルリンパ節生検技術の実用化に向けて今後の展開が期待される。

D-2. Gd-SiO<sub>2</sub> 系コア-シェル型複合粒子：昨年度までに、シリカをコアとして用いた、SiO<sub>2</sub>/Gd/SiO<sub>2</sub> 多層複合粒子の作製法の開発を行った。本年度の検討により、シリカをコアと用いずとも Gd/SiO<sub>2</sub> コア-シェル型複合粒子の合成が可能であることがわかった。この複合粒子は粒子1個あたりの Gd 含有量が SiO<sub>2</sub>/Gd/SiO<sub>2</sub> 多層複合粒子に比べて大きいので、より鮮明な画像化が可能であると予想される。これらの Gd-SiO<sub>2</sub> 系コア-シェル型複合粒子コロイドは濃度が小さいため、画像化に用いるコロイド溶液を準備するためには、合成したコロイド溶液を多段階、長時間工程により濃縮する必要がある。したがって、実用的には高濃度でしかも分散性が優れるコロイド溶液を用いる必要があるため、今後はこれらの点を解決する技術の開発が必要となる。

#### E. 結論

液相中での化学反応を利用して、各種シリカカプセル化ナノ粒子の作製およびタンパク質担持に成功した。得られた複合粒子は、新たな医療診断材料としての利用が期待される。実用化に向けた研究が待たれる。

#### 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) Y. Kobayashi, N. Shimizu, K. Misawa, M. Takeda, N. Ohuchi, A. Kasuya, M. Konno, "Preparation of Amine-Free Silica-Coated AgI Nanoparticles with Modified Stöber Method," *Surface Engineering*, 24 (2008) 248-252.

### 2. 学会発表

1) 湊真理絵、小林芳男、武田元博、粕谷厚生、大内憲明、医療検査用コア-シェル型複合粒子の合成に関する研究。第61回コロイドおよび界面化学討論会平成20年9月

## H. 知的財産権の出願登録状況

準備中

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

分担研究者 高見誠一 東北大学多元物質科学研究所 准教授  
分担研究者 北條大介 東北大学多元物質科学研究所 助教

研究要旨 本年度は、昨年度までに合成条件の探索を行った  $Gd(OH)_3$ 、 $GdVO_4$  ナノ粒子を流通式超臨界水熱合成装置により合成するとともに、粒子の凝集を抑制する手法として OH 基修飾を提案し、これを実現する手法を検討した。

A. 研究目的

本研究では、ナノ粒子を用いた診断・治療に用いることのできる多元イメージングナノ粒子の実現を目指し、 $Gd(OH)_3$ 、 $GdVO_4$ ・RE (RE は希土類元素) ナノ粒子の合成にも取り組んでいる。本年度は、流通式装置を用いて均一かつ小粒径のナノ粒子合成を目的とするとともに、生体内での凝集抑制を目的としたナノ粒子の表面修飾手法の開発を行った。

B. 研究方法

ナノ粒子の合成は、回分式反応器ないし流通式反応器により行った (図 1)。

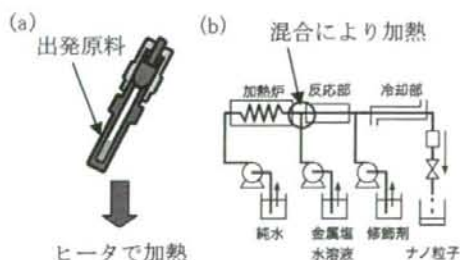


図 1 (a) 回分式、(b) 流通式による合成

合成するナノ粒子の表面修飾を行うために、回分式反応器による合成の際には、表面

修飾剤と原料とを同時に回分式反応器に封入後、加熱した。流通式装置を用いる場合には、図 1 b に示すように修飾剤供給ラインを増設した。

C, D. 研究結果、考察

1)  $Gd(OH)_3$  ナノ粒子の流通式合成

流通式装置を用いて、合成した  $Gd(OH)_3$  ナノ粒子のサイズ制御を目指し、混合部の内径・pH の影響を検討した。反応温度は、結晶  $Gd(OH)_3$  が形成する  $270^\circ\text{C}$  とした。流通式装置において原料液と加熱水とが混合する箇所の管の内径を変えて合成した粒子の TEM 像を図 2 に示す。XRD 測定からいずれも結晶性  $Gd(OH)_3$  であることを確認している。粒子形状は直方体、あるいは紡錘形であった。混合部内径を 4.8, 2.3, 1.3 mm と小さくすることで、生成する粒子の長軸方向の平均粒径が 121, 63, 39 nm と小さくなることが明らかとなった。これは、図 2 中に示すように、管径を細くすることで原料と加熱水との混合時間が短くなり、粒子成長を抑制したためである。

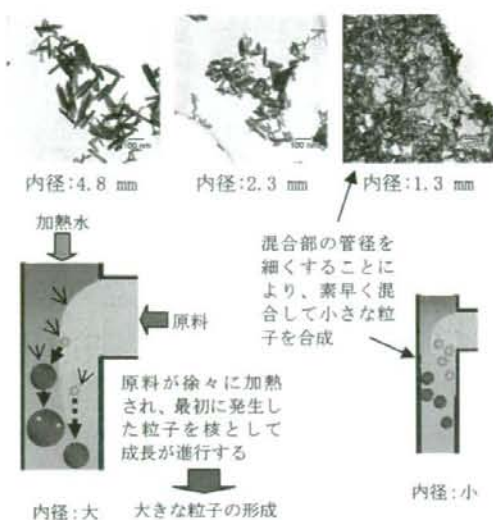


図2 混合部内径を変えて作製した  $Gd(OH)_3$  粒子の TEM 像

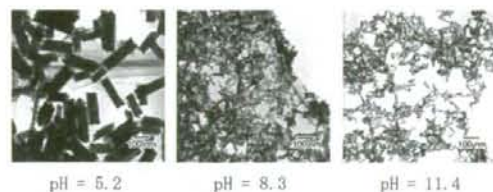


図3 pHを変えて作製した  $Gd(OH)_3$  粒子の TEM 像

反応溶液の pH を変えて作製した粒子の TEM 像を図3に示す。この際の反応条件は温度  $270^{\circ}C$ 、混合部内径  $1.3\text{ mm}$  とし、反応時間を  $2.5\text{ s}$  とした。生成物は pH にかかわらず結晶性の  $Gd(OH)_3$  が得られた。pH を  $5.2$ ,  $8.31$ ,  $11.43$  と上げるにつれて、生成粒径が  $181$ ,  $39$ ,  $29\text{ nm}$  と減少した。

以上に示すように、流通式超臨界水熱合成装置を用いて、混合状態や pH を操作因子として溶解度を急速に減少させることにより、 $Gd(OH)_3$  粒子のサイズを目的とする  $10\sim 100\text{ nm}$  まで制御可能となることを明らかとした。

## 2) $GdVO_4$ ナノ粒子の流通式合成

昨年度、回分式装置を用いて明らかにした合成条件に基づいて、 $GdVO_4$  ナノ粒子の合成を流通式装置で行った。合成条件を表1に示す。XRD 測定より、いずれの条件においても合成された試料は  $GdVO_4$  結晶性であることが

明らかとなった。

表1 流通式装置を用いた実験条件

加熱水 流速 ( $\text{ml}/\text{min}$ )	原料	濃度 ( $\text{mol}/\text{L}$ )	流速 ( $\text{ml}/\text{min}$ )	混合部 内径 ( $\text{mm}$ )	反応 温度 ( $^{\circ}C$ )	pH
12	$NH_4VO_3$ KOH $Gd(NO_3)_3$ $Eu(NO_3)_3$	0.005 0.01 0.00465 0.00035	3	2.3	400, 300	4
12	$NH_4VO_3$ KOH $Gd(NO_3)_3$ $Eu(NO_3)_3$	0.005 0.01 0.00465 0.00035	3	0.3	400	4

生成物の TEM 像を図4に示す。回分式反応器を用いた実験では、反応温度を変えても粒径は変化しなかったが、内径  $2.3\text{ mm}$  の混合部を用いて  $300$ ,  $400^{\circ}C$  で作製した  $GdVO_4$  ナノ粒子の粒径はそれぞれ  $17\text{ nm}$ ,  $15\text{ nm}$  となり、高い合成温度でより小さなナノ粒子を合成することに成功した。

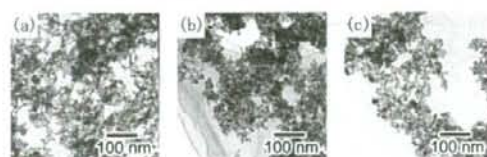


図4 反応温度を変え流通式装置で作製した  $GdVO_4:Eu$  粒子の TEM 像。(a) 混合部内径  $2.3\text{ mm}$ ,  $300^{\circ}C$ , (b)  $400^{\circ}C$ , (c) 混合部内径  $0.3\text{ mm}$ ,  $400^{\circ}C$

さらに、混合部内径を  $0.3\text{ mm}$  と小さくして  $400^{\circ}C$  で作製することで、粒子径を  $12\text{ nm}$  まで小さくすることに成功した。 $Gd(OH)_3$  の合成でも述べたように、内径を小さくすることでより混合が速くなり、低溶解度すなわち高過飽和度が達成されたためと考えている。

## 3) ナノ粒子表面修飾法の開発

$Gd(OH)_3$ ,  $GdVO_4$  ナノ粒子の合成に続き、本年度は診断・治療用ナノ粒子の表面修飾法の開発を行った。 $Gd(OH)_3$  を対象とし、まず、どのような有機化合物の官能基が  $Gd(OH)_3$  の表面と結合するかを明らかにした。図5に示す3種類の修飾剤共存下の共存下で  $Gd(OH)_3$  の合成を試みた。



図5 使用した修飾剤の構造式

合成したナノ粒子のXRDパターンより、上記3種類のいずれの修飾剤存在下でも $Gd(OH)_3$ ナノ粒子を合成できることが明らかとなった。赤外吸収スペクトルの測定より、デカン酸存在下で合成した粒子の表面に、修飾剤とナノ粒子表面の結合に起因する $COO^-$ ピークが確認できた。そこで、以降の実験ではカルボキシル基( $-COOH$ 基)を含む化合物を修飾剤として用いることとした。

以上の予備的な検討に続き、本研究では生体中での分散を目指したナノ粒子の表面修飾を試みた。中性に近い状態である生体中でも分散を保つため、 $OH$ 基をその構造中に持ち、親水性を有しかつ立体反発が可能な修飾剤を修飾剤として選択した。本研究では、図6に示すグルコン酸カリウム、クエン酸カリウムによる表面修飾を試みた。

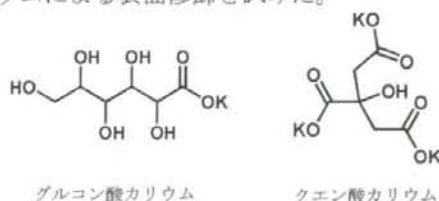


図6 用いた修飾剤の構造

まず、これまでに述べた手法で $Gd(OH)_3$ ナノ粒子を合成して反応管から取り出した後、上記修飾剤と混合し、反応管に再び封入して加熱した。その結果得られたナノ粒子の形状を図7に示す。



図7 表面修飾前後の $Gd(OH)_3$ ナノ粒子の形状

ここに示すように、2回目の加熱により粒子は若干成長しているものの、ももとの粒子とほぼ同様の形状を有している。上記有機分子がナノ粒子表面を修飾しているか確認するために赤外吸収スペクトルを測定したところ、 $OH$ 基に対応する $3300\text{ cm}^{-1}$ 付近にピークが観測された。また、 $2900\text{ cm}^{-1}$ 付近には $CH$ 伸縮振動に由来するピークが確認された。表面修飾を行っていない粒子ではこれらのピークが存在しないことから、 $Gd(OH)_3$ ナノ粒子とグルコン酸カリウムを共存させて加熱することにより、グルコン酸を $Gd(OH)_3$ ナノ粒子の表面に複合化できると結論付けられる。

以上に示したように、グルコン酸カリウムを用いることで、 $Gd(OH)_3$ ナノ粒子の表面に $OH$ 基を多く有するグルコン酸を複合化できることを明らかにした。(図8)

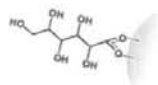


図8 グルコン酸修飾ナノ粒子の表面分子構造

## E. 結論

本年度は、昨年度までの結果に基づき、流通式反応装置を用いて $Gd(OH)_3$ ,  $GdVO_4:RE$ などの粒子を合成する手法の開発を行った。流通式装置を用いることより、粒子径が均一で、平均粒子径の小さなナノ粒子の合成に成功した。

さらに生体内におけるナノ粒子の凝集を抑制するために必要な表面修飾構造を議論し、 $OH$ 基を多く含む有機分子を、 $COOH$ 基をリンカーとして用いてナノ粒子表面に複合化する方法を提案した。グルコン酸カリウムを用い、 $Gd(OH)_3$ ナノ粒子の表面修飾にも成功した。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表、総説

- 大原 智, 梅津光央, 名嘉 節, 高見 誠一, 阿尻雅文, 「超臨界流体技術の開



発と応用 第2章 超臨界流体を用いる微粒子・有機合成技術、6. 超臨界水を用いたナノ粒子製造」シーエムシー出版、56-61、(2008)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 別紙 1

雑誌論文 (2008年)

発表者氏名	連名著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	号	開始	終了頁	出版年
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
Lima R	Wada S, Tanaka 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	2	153	167	2008
Romanyuk V	Dmitruk I, Barnakov I Yu, Belosludov R, Kasuya A	Ultra-Stable Nanoparticles in AIIBVI (AlI = Cd, Zn; BVI = S, Se, Te)	Compounds Journal of Nanosci. and Nanotech	8		1	8	2008
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	51007-1-8		2008
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 nanotechnology for molecular targeting drug delivery system and tailor made medicine.	Breast Cancer	15	2	145	152	2008
Kohno M	Takeda M, Niwano Y, Saito R, Emoto N, Tada M, Kanazawa T, Ohuchi N, Yamada R	Early diagnosis of cancer by detecting the chemiluminescence of hematorporphyrins in peripheral blood lymphocytes	Tohoku J. Exp. Med.	216	1	47	52	2008
Suwitha A	Belosludov RV, Mizuseki H, Kawaoe Y, Takeda M, Kohno K, Ohuchi N	TD-DFT studies on hematorporphyrin and its dimers	Materials Transactions	49	11	2416	2419	2008

Yoo J	Kambara T, Gonda K, Higuchi H	Intracellular imaging of targeted proteins labeled with Quantum Dots.	Experimental Cell Research	314	19	3563	3569	2008
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最新展開	癌と化学療法	35	8	1277	1280	2008
武田元博	桜井 遊、巖 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	17		57	60	2008
小林正樹		生命科学・医学応用のための極微弱発光・蛍光イメージング技術	顕微鏡	43	3	202	206	2008
Dmytruk A	Dmitruk I, Blonsky I, Belosludov R, Kawazoe Y, Kasuya A	ZnO clusters: Laser ablation production and time-of-flight mass spectroscopic study	Microelectronics J	40		218	220	2009
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	Cancer Chemother Pharmacol					in press