

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

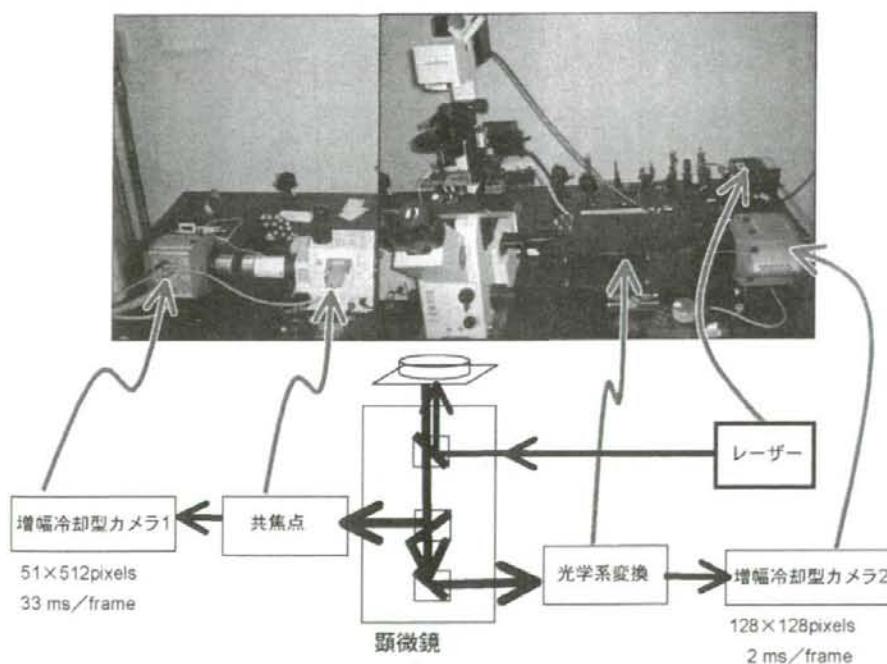


図1-5-1 我々が開発した蛍光顕微鏡システム

顕微鏡右側は、落射照明法により3次元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、

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

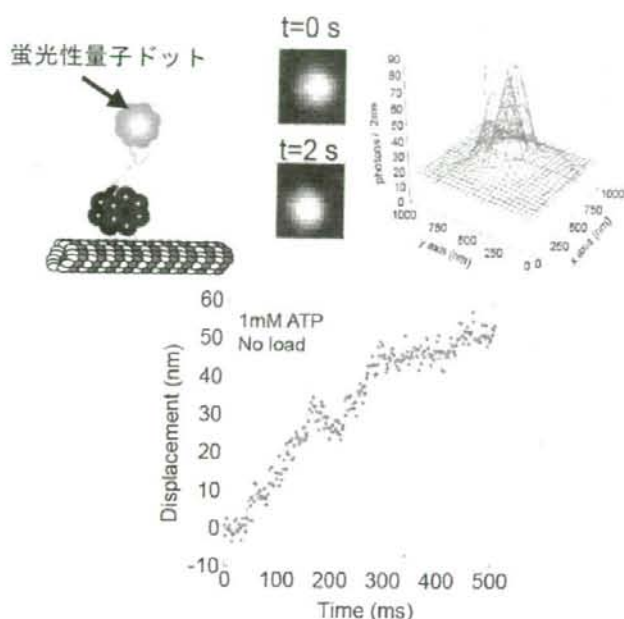
と近似される。ここで、

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

と近似できるので、

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

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 $\text{NA} = 1.3$ 、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、 $d \sim 1\text{nm}$ 程度と考えるとよい。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（画像のピンニングを行えば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

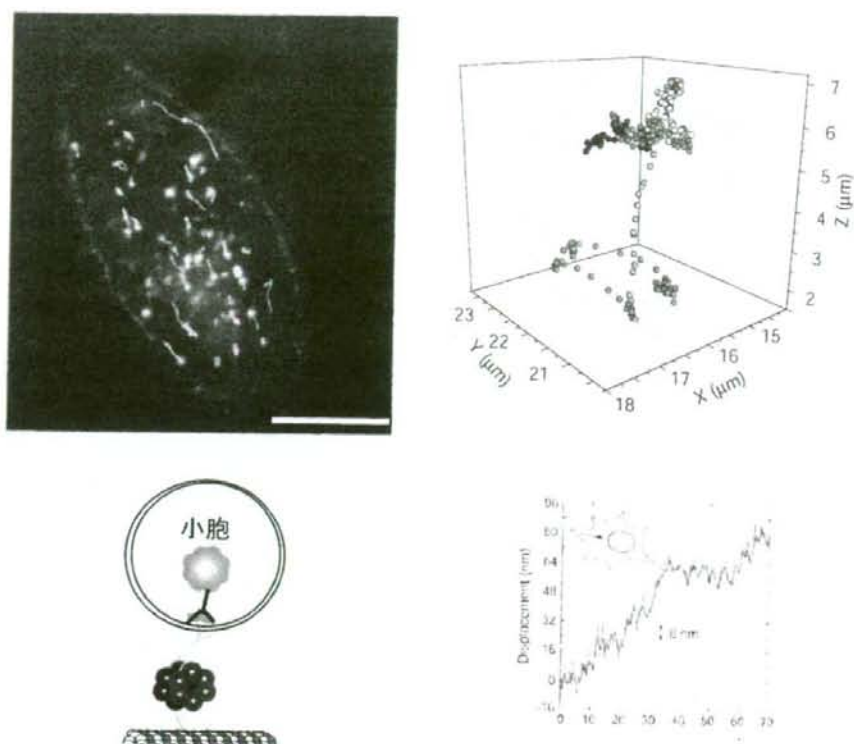


図 1-5-3 蛍光量子ドット-抗HER2抗体を取り込んだ乳がん細胞の蛍光イメージ
 (上左) 白い点が細胞に取り込まれた量子ドットを示し、線が運動の軌跡を表している
 (上右) 共焦点顕微鏡を用いて、対物レンズを上下させて量子ドットの中心の位置を3次的に追跡した。3次元画像は1秒間に3枚えられた
 (下左) 細胞内に取り込まれた小胞が、ダイニンで輸送されているイメージ図
 (下右) 細胞内小胞に取り込まれた量子ドットの運動を、nm精度で追跡したときの軌跡。8nmのステップ状変位が観測された

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

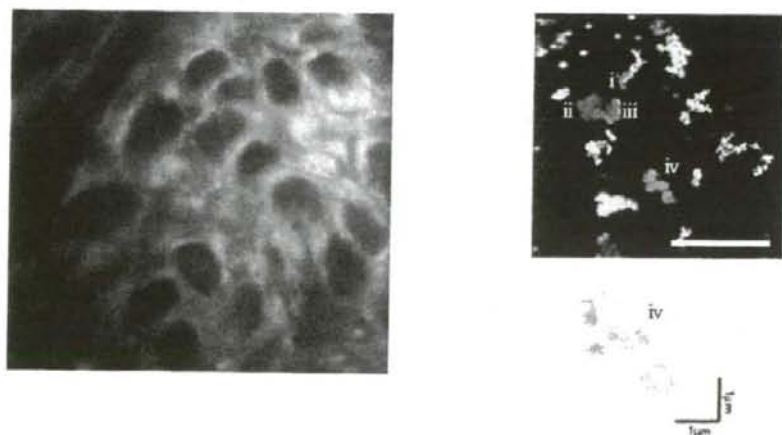


図1-5-4 組織を用いた免疫組織染色と生細胞の連続観察

- (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、ナノ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の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

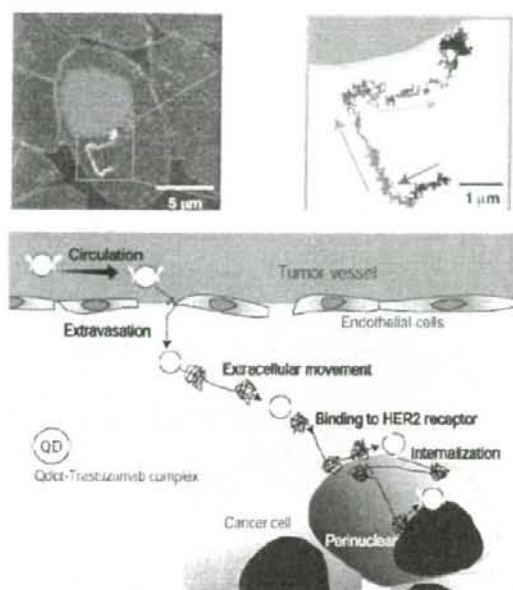


図 1-5-5 マウス内がん細胞の 1 分子可視可の研究

- (左上) 生きたマウスのがん細胞の中を運動する単一量子ドットの結合した抗体の運動の軌跡。イメージは共焦点顕微鏡を用いて、ビデオレートで撮影された
- (上右) 左図を拡大図したもの
- (下) 軌跡を元に速度を計算した

の強力な手法になりうることを示した。

7 むすび

近年の生命科学のイメージング分野は、光学顕微鏡をベースとして、材料・光学・撮像・画像処理の技術が導入されて発展をとげている。しかし、生命の限られた環境で利用できる技術はごくわずかである。人を含めた個体をあつかう医学分野では、細胞や組織による「光の吸収」や「自家蛍光」の問題があり、これらに利用するためには数々の改良が必要である。たとえば、内視鏡と蛍光顕微鏡を組み合わせる（一部はすでに利用されている）、2光子励起法を利用して深部をイメージングする、波長を赤外にする、などが近い将来実用化するであろう。これら以外に、現代の方法では考えられていない研究によって、光の吸収や自家蛍光を抑える方法が現れることを期待したい。

[執筆者プロフィール]

ひぐち ひでお

1983年早稲田大学大学院理工学研究科物理学および応用物理学専攻修士課程修了。同年東京慈恵会医科大学第1生理学教室助手。89年ペンシルバニア大学医学部助手兼任。92年科学技術振興事業団柳田プロジェクト・グループリーダー。97年東北大学大学院工学研究科金属工学専攻助教授。2004年より東北大学先進医工学研究機構教授。理学博士。現在の研究テーマは、タンパク質、細胞、マウスの単一分子のナノ計測、ナノイメージング

おおうち のりあき

1978年東北大学医学部卒。84年東北大学大学院医学研究科卒・医学博士。84年アメリカ国立がん研究所研究員。87年仙台市立病院外科医長。88年東北大学医学部助手。95年東北大学医学部講師。99年東北大学医学部教授。2002～4年東北大学病院副院長を兼任。研究・専門テーマは腫瘍学、乳腺・内分泌外科、分子生物学、がん疫学、ナノメディシン

[参考文献]

1. Medical Bio 2007年 11月号「がんの光イメージング」
2. 小島清嗣, 岡本洋一編, 医学・生物学研究のための画像解析テキスト, 羊土社
3. 山本重夫 監, 「量子ドットの生命科学領域への応用」, CMC出版
4. 横山浩 編, ナノ材料科学, オーム社 (2004)
5. 小川誠二, 上野照剛 監修, 非侵襲・可視化技術ハンドブック, NTS出版 (2007)
6. J.R. Lakowicz: Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (1999)
7. S. Inoue, K.R. Spring 著, ビデオ顕微鏡, 共立出版 (2001)
8. 野島博 編, 顕微鏡の使い方ノート, 羊土社 (1997)
9. Barry R. Masters: Confocal Microscopy and Multiphoton Excitation Microscopy, SPIE, Washington (2006)
10. T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito and T. Yanagida: Nature 374 (1995) 555-559
11. 鳥羽菜, 渡辺朋信, 樋口秀男, ナノメートル計測が拓く1分子の世界 バイオテクノロジージャーナル, 羊土社 (2006) 600-604
12. S. Toba, T. M. Watanabe, L. Yamaguchi, Y. Y. Toyoshima and H. Higuchi: Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103, 5741-5745, 2006
13. M. Bruchez Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss & A. P. Alivisatos: Science 281 (1998) 2013-2016
14. T.M. Watanabe, T. Sato, K. Gonda and *H. Higuchi. Three-dimensional nanometry of vesicle transport in a living cell using dual-focus imaging optics. Biochem. Biophys. Res. Comm. 359 (2007) 1-7
15. T.M. Watanabe, . and *H. Higuchi. Stepwise Movements in Vesicle Transport of HER2 by Motor Proteins in Living Cells. Biophysical J. 92 (2007) 4109-4120
16. S. Li-Shishido, T. M. Watanabe, H. Tada, *H. Higuchi and N. Ohuchi. Biochem. Biophys. Res. Comm. 351 (2006) 7-13
17. X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. Chung and S. Nie: Nat. Biotechnol. 22 (2004) 969-976
18. Tada, H., *H. Higuchi, T.M. Watanabe, and N. Ohuchi. In vivo Real-time Tracking of Single Quantum Dots Conjugated with Monoclonal Anti-HER2 Antibody in Tumors of Mice. Cancer Res. 67 (2007) 1138-1144

ファインケミカルシリーズ

有機分散系の分散・凝集技術

*Dispersion and Aggregation Technology
for Organic Dispersions*

監修：川口春馬

Supervisor : Haruma Kawaguchi

HIGH TECHNOLOGY
INFORMATION

第9章 機能性ナノ粒子の医学領域における展開

武田元博^{*1}, 権田幸祐^{*2}, 大内憲明^{*3}

1 はじめに

ナノメートルオーダーのサイズを持ち、同時にさまざまな機能を持つ粒子が物質制御技術の進歩により盛んに作られている。それらの多くは従来ない機能を持つことから医療における治療や診断を大きく変える力を潜在的に持っている。ナノ材料は大別して、分子レベルでナノ材料を合成するボトムアップ法と、従来存在する物質を分解・分割してより小さな物質を創り、ナノ材料とするトップダウン法の、2つの異なる物質制御技術から作製され、多くは化学や生物学分野の研究者が携わっている。さらに in-silico design と呼ばれる、スーパーコンピュータを用いたシミュレーションによって有用かつ安定な化学構造を予測し合成、または反対に合成した物質の物性から構造を予測する手法が次々に出現するなど、コンピュータサイエンスをはじめとした多くの工学分野もナノテクノロジーの発展に関与している。そこから生み出された様々な物質は、我々の生活を大きく変える可能性を秘めている。その例として、ナノメートルオーダーまで微細化された電子回路の部品やこれらを組み合わせてできたデバイスによるマイクロまたはナノサイズの装置、薬剤を運ぶために作製された dendrimer や中空のポリマーミセル、サイズを変えることで蛍光波長を変えることのできる半導体粒子や新たな機能性分子を付与して創製された分子・クラスターなどが挙げられる。これらの技術は従来の化学合成を中心とした“もの作り”をベースとして、シミュレーションやナノメートルオーダーの高精度な計測技術など、他分野の新しい技術を巻き込みながらさらに発展していこうとしている。

一方、医療に目を向けると、がんは1985年以降、日本人の死因の第一位を占めており、働き盛りの年代のがん死は人口の急速な高齢化が進むわが国において最も緊急に改善しなければならない課題の一つである。我々は、特になん診療において、診断から治療に至るまで診療の様々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きた。

-
- * 1 Motohiro Takeda 東北大学 大学院医学系研究科 ナノ医科学寄附講座 准教授
 - * 2 Kohsuke Gonda 東北大学 大学院医学系研究科 ナノ医科学寄附講座 助教
 - * 3 Noriaki Ohuchi 東北大学 大学院医学系研究科 腫瘍外科学分野；
東北大学 大学院医学系研究科 ナノ医科学寄附講座 教授

本稿では医療におけるナノテクノロジーの応用について特にイメージングの観点から、①医療において画像診断（＝イメージング）が果たす役割、②医療応用可能な機能性ナノ粒子とイメージング、③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解説する。

2 医療において画像診断が果たす役割

医療における3つの柱は疾患（病気）の予防、診断、治療である。疾患の治療を行う前にできるだけ正確な診断をつけなければならない。それは症状が似ていても、疾患が異なると治療法が大きく異なる場合があるからである。診断にあたって、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、癌の進行度＝病期）、③正確な原因；何が原因なのか、を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。通常、診療当初は最も可能性の高い疾患を中心に、いくつかの可能性を含む複数の暫定的な病名を念頭に入れて治療を開始することになる。確定的診断は必ずしも初期につけられるわけではなく、最初にまず大まかな診断を念頭に入れながら症状に対する治療を行い、治療の過程で診断がつけられることも決して珍しくない。その際、医師は絶えず正しい診断は何かを考えながら治療を行い、効果を確かめつつ必要な検査を追加し、正しい診断に向かうこととなる。このような診断に用いられる医療検査として、心電図や呼吸機能を調べる生理学的検査、血液や尿などの成分分析を行う生化学的検査、体組織を顕微鏡で観察する病理検査、体の構造をX線、核磁気共鳴、超音波、放射性同位元素などで画像化して診断に用いる画像検査などが挙げられる。

がん診療においては顕微鏡による組織診断が病名を診断する上できわめて重要である。病名診断に続き、病期診断を行う。すなわちがんの進行の程度を様々な検査を組み合わせで診断するのである。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。特に造影剤を用いた画像診断は固形がん（腫瘍（＝しこり）を形成するがん）の部位診断に欠かせない。X線CTやMRI（magnetic resonance imaging）、PET（positron emission tomography）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った三次元的情報がこれらの断層撮影装置によって得られるようになったのである。正確に病巣の拡がりを捉えることにより、臓器を全切除することなく温存する手術を容易に行い得る。造影剤の使用によりX線CTやMRIでは病巣をコントラストよく描出することができ、さらに最近ではがんの代謝機能を検出するPETの出現で質的診断も可能となりつつある。以上のように様々な画像診断法は造影剤や機能的マーカーを用いて病巣を可視化することにより、診断や外科治療・放射線治療等の局所療法を行う際、治療範囲の決定や治療の効果判定のための最も重要な手段となっている。

3 医療応用可能な機能性ナノ粒子とイメージング

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る。医療応用可能なナノ粒子として量子ドット、金コロイド、シリカコーティングヨウ化銀ビーズなどの無機物から、デンドリマー¹⁾、リポソーム²⁾、高分子ミセル³⁾、ウイルスの外套タンパクから作られた中空ナノ粒子などの有機物まで、極めて多彩なナノ材料が作製され、それぞれ様々な目的で作られている。例を挙げると、量子ドットは優れた蛍光特性を持ち、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。シリカコーティングヨウ化銀ビーズはX線造影効果を持つ材料として作製されている。またデンドリマーやリポソーム、高分子ミセル等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、例えばデンドリマー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等は中空であるため、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、薬剤が病巣に到達するまで健常部位に対する副作用を軽減し、病巣で薬剤を放出することによって病巣での効果的薬物濃度上昇を狙うのである。

その他ナノ粒子に特徴的な事項として、粒子サイズが大きな意味を持つ場合がある。それはがんの診断、治療においてDDSとして利用する場合である。がんが増殖するためには自らの組織の血流が欠かせないが、多くのがんは血管成長因子を直接分泌して自らの組織の成長に必要な血管を新生し、組織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がんに対して血流を賄うため急速に構築される。そのためか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、正常血管内皮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。これはEPR (extended permeability and retention) 効果と呼ばれる。この性質を利用して、100 nm程度またはそれ以下のナノ粒子を用い、腫瘍間質(がん細胞間のすきま)に選択的に取り込ませることでがん組織への効率的なDDSを得ることができる。また、がん選択的な薬剤の到達によって健常組織への傷害を軽減できると期待される。

機能性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必要かつ重要であるが、全身におけるナノ粒子の振る舞い、すなわち体内動態もナノ粒子の安全性に直結するため重要である。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、ナノ粒子は体内動態や排泄経路を考慮して設計・作製されるべきである。

以下、我々が医療応用を目指して用いている機能性ナノ粒子の特性とそれらを用いた画像計測について解説する。

3.1 蛍光ナノ粒子

従来蛍光試薬は医療において眼底撮影など体表から観察可能な血管造影、リンパ管造影などに用いられてきた。近年、半導体蛍光ナノ粒子である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いる。外科領域では、がん手術における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。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いてリンパ節郭清を省略する手術が、外科領域におけるテイラーメイド医療として脚光をあびている。癌病巣から最初にリンパ流を受けるリンパ節がセンチネルリンパ節と定義されるが (図1)、このリンパ節を探し当て、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がセンチネルリンパ節生検である。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も転移がないと判断でき、リンパ節郭清範囲を縮小、または省略できる。

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等が挙げられる。

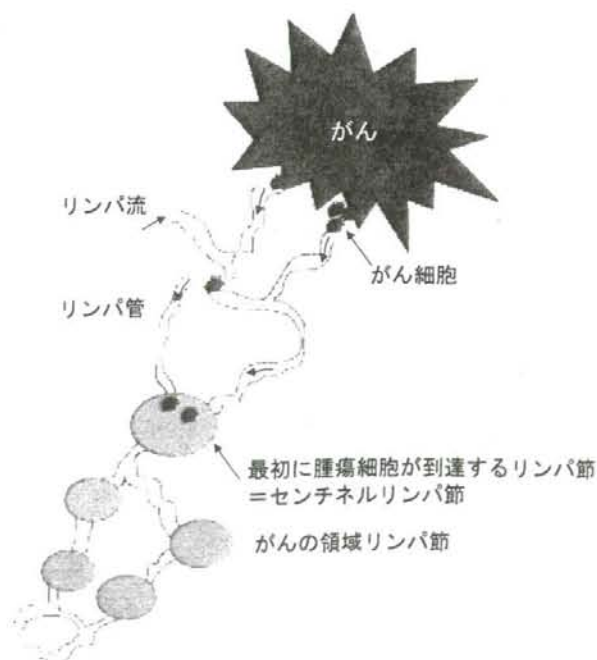


図1 がんとセンチネルリンパ節の模式図

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、同じ材料でも粒径を1~3 nmと変えることで、青から赤に可視域で蛍光波長を変えることができる。そのほかの特徴として、蛍光波長以下の波長ならいずれの波長でも励起可能なことである。また材料が光学的に安定なため、蛍光強度が極めて強い上に退色しにくく、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17 nm程度となっている。欠点として、高価なこと、及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等が挙げられる。近赤域の蛍光を発する量子ドット材料として、PbSeなどがある。

②シリコンナノ粒子も蛍光を発することが知られており、粒径を変えることにより、蛍光波長を変えることができる。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、特に安全性、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, 1000 nm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。またポリスチレンに埋包されているため、有機系蛍光色素単体に比べて蛍光寿命が長い。欠点は量子ドットと比較すると蛍光寿命が短く、退色が早いことである。また高価である。

我々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、蛍光マーカー皮下注射後、数分から30分程度まで造影効果を維持するためには粒径40 nmが最も適し、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⁵⁾。さらに蛍光計測法は従来法の一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我々の検討で明らかになっている。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1 cm程度であることである。検出限界が1 cm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、せいぜい体表リンパ管のみ描出可能である。従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。深部の蛍光マーカーを検出する方法として、タイムゲート方式や、超音波変調法などが深部の蛍光色素検出法が考えられるが、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、生体と同程度の光散乱係数を有するファントムにおいて3 cm程度の深部にある蛍光色素の検出を可能とした(図2)⁶⁾。このような新しい計測技術の早期実用化が望まれる。

分子1個の体内動態を観察するためには分子マーカーを1個または少数レベルで検出する必要がある。現在、*in vivo* (生体内)において粒子1個レベルで検出し得る方法は蛍光計測法のみ

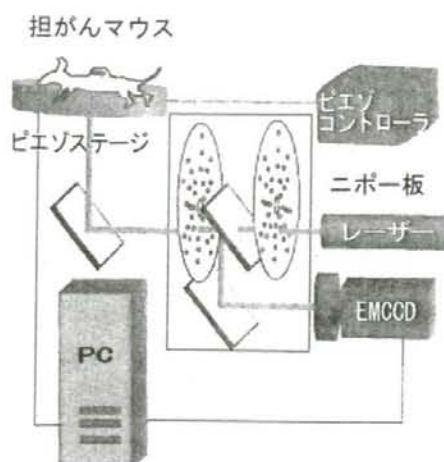


図2 超音波タグ蛍光検出装置

である。我々は独自に開発した装置と、量子ドットを用いて生体内1粒子レベルの薬物動態の計測を試みてきた。生体内の1分子の動きを追跡するには高輝度な蛍光マーカーと高感度な蛍光計測装置、および計測時の生体の固定に工夫が必要である。

我々が用いている装置は倒立顕微鏡、ニポー板式共焦点ユニット、高感度 CCD カメラおよび励起用レーザー等からなるイメージングシステム (図3) であり、HER2 タンパク発現乳がんの治療に用いられる、乳がんに対する抗体治療薬である trastuzumab に量子ドットを結合させ (QT コンプレックス)、HER2 タンパク発現乳がん細胞を移植したヌードマウスに静脈注射してその体内動態を1分子レベルで追跡することを試みた³⁾。計測にあたって呼吸や心拍などの振動の影響を取り除くため、腫瘍表面の皮膚を切開し血管のつながった状態でガラス盤上に腫瘍を乗

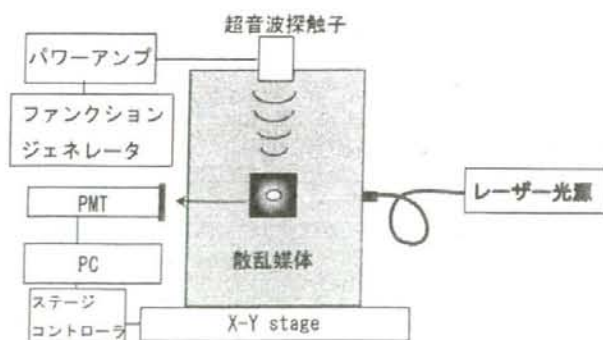


図3 1分子蛍光計測用共焦点顕微鏡

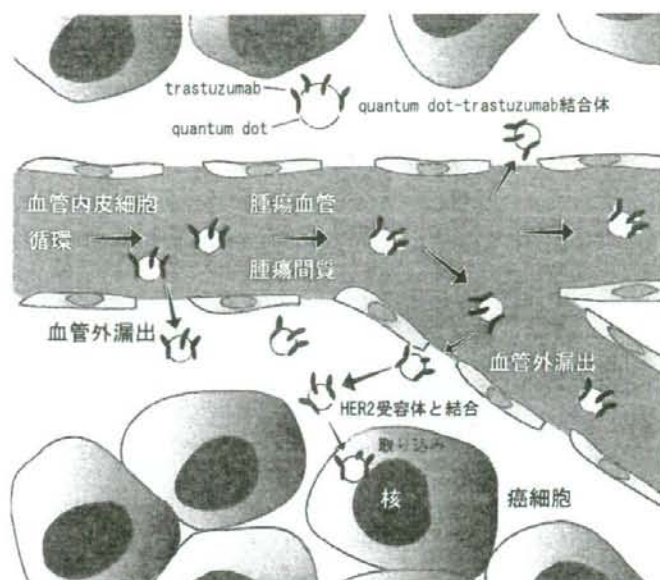


図4 乳がん抗体治療薬の体内動態の模式図

せ観察する手法 (dorsal skin fold chamber) をとった。この手法により、1分子の動きを空間分解能 30 nm、時間分解能 33 nm で捉えることに成功した。QT コンプレックスは細胞内において停滞と直線運動を繰り返し、細胞膜付近の細胞質を移動した後、急激に核周囲に向かい、核付近で停滞する様子を捉える事ができた。図4に模式図を示す。今後この手法により *in vivo*での薬理作用の解明が進むと思われる⁷⁾。

3.2 X線造影剤

X線造影剤として開発されたナノ粒子は現在、金コロイド、ヨウ化銀ビーズ、金属含有フラーレンなどがあり、医療応用に関して基礎的検討がなされている。我々は新規X線造影剤としてヨウ化銀を核とし、シリカの殻を持つナノ粒子を作製した。シリカは物理的・化学的に安定で有害と考えられる物質の生体との遮蔽に役立つと考えたからである。シリカコーティングヨウ化銀ナノ粒子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成り、まず液相法を利用して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) を用いヨウ化銀コロイド液を作製した。この方法により約 20 nm 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。次いで液相を利用したゾル-ゲル法によりシリカコーティングを行った。ヨウ化銀コロイド液にシランカップリング剤である 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPS) を加え、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) を順に添加し、シリカ層を形成した。この方法により、最適な条件を求めて約 20 nm の平均粒子径を持つヨウ化銀ナノ粒子核、厚さ 10 nm のシリカ層を持つナノ粒子を作製し得た (図 5 a)⁸⁾。シリカコーティングヨウ化銀ビーズを X 線 CT の造影剤としてラットに投与した場合の造影 CT 像を図 5 b に示す。これはウサギ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、30 分後に撮影した肝臓の 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内の繰り返し撮影が可能である。例えば、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。

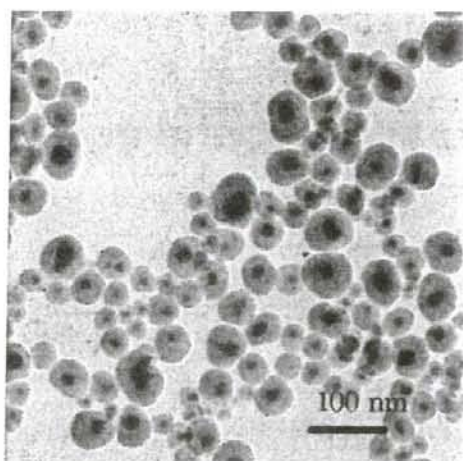


図 5 a ナノサイズシリカコーティングヨウ化銀ビーズの TEM 像

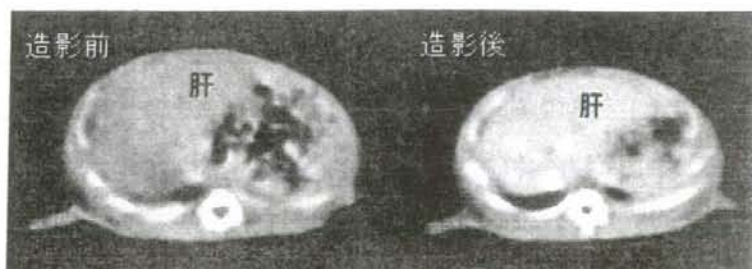


図 5 b ナノサイズシリカコーティングヨウ化銀ビーズによるウサギ肝造影効果