

2008/200/B

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18年度～20年度 総合研究報告書

主任研究者 大 内 憲 明

平成 21 (2009) 年 3 月

目次

I. 総合研究報告	
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研究	1
大内憲明	
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	19
武田元博、亀井尚、甘利正和、桜井遊、河合賢朗、仲田栄子	
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	34
川添良幸、水関博志	
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	38
粕谷厚生	
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	46
小林正樹	
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	55
権田幸祐	
6. AgI/SiO ₂ 粒子へのタンパク質担持および Gd/SiO ₂ 粒子の作製に関する研究	58
小林芳男	
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	65
名嘉尚、高見誠一、北條大介	
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	73
IV. 研究成果の刊行物・別刷	89

I. 総合研究報告

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 ナノマーカの開発
 - ①. ナノサイズヨウ化銀ビーズの体内分布を X 線 CT、TEM に加え、誘導結合プラズマ法で定量計測し、肝細胞への取り込み並びに胆汁への移行を認めた (TOPIIM, 2008)。
 - ②. 昨年開発したガドリニウム粒子に改良を加え、MRI 造影剤として 3 重構造のガドリニウムナノ粒子を世界で初めて作製した (Colloids and Surfaces A, 2007)。
 - ③. 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. 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* 分子イメージング法の確立と細胞内タンパクの動態観察
 - ①. 量子ドットでラベルした抗乳がん抗体トラスツマブの *in vivo* 分子イメージングに成功した (Cancer Res, 2007)。
 - ②. 腫瘍における各サイズのナノ粒子の動態を 1 粒子レベルで初めて明らかにした (TOPIIM 2008)。
 - ③. 転移性乳がん細胞に対する抗腫瘍抗体 (抗 PAR1 抗体) を開発し、転移過程の細胞動態画像計測に世界で初めて成功した (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. 深部組織蛍光マーカー検出に不可欠な超音波蛍光検出法の開発に成功した (Appl. Phys. Lett, 2006)。
 - ②. 蛍光ナノ粒子のシリカコーティング並びに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)。
4. ヘマトポルフィリン誘導体計測による末梢血を用いたがん診断
 - ①. 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)。

今回、生体内における量子ドット、蛍光ナノ粒子のサイズ毎の動態の違いを 1 粒子レベルで初めて観察した。また生体内におけるがん細胞の転移過程の可視化にも成功した。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 DDS やがんの病態を観察する上で極めて有用な技術である。さらに生体内および細胞内における薬物の動態や作用、生体のシグナル伝達を直接観察し得ることから、生体の様々な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。今回開発した抗 PAR1 抗体はがんの分子標的治療薬としても応用が期待される。また、分子標的マッピングに基づくがんの外科治療を行う際に不可欠な、深部病変を蛍光計測で検出し得る技術と共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に成功したことは大きな成果であり、今後生体内でのがん細胞観察による新たな治療法への展開が期待される。

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

様々な機能を持つナノ粒子が作製され、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から、単粒子イメージング、外科治療への応用を目指して装置開発を行い、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* 粒子イメージングを可能とした。更に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、有用性を示してきた。

我々は、次の段階としてシリカコーティングヨウ化銀ビーズの血管内投与後の体内動態や、安全性の検証、並びに1分子イメージング技術の生体応用として、DDSの検証を行うこととした。ナノ粒子のサイズは薬剤の挙動を規定する大きな因子と考えられるが、我々の計測装置は蛍光ナノ粒子の挙動を1粒子レベルで計測可能である。今回異なる粒径のナノ

粒子の動態をそれぞれ検証した。更に転移性がん細胞に対する単クローン抗体を作成を試みた。本研究ではこの抗体を利用し、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のダイナミクスの計測も試みた。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み、体深部の蛍光トレーサーを対象とした計測の実現を目指した。

以上により本研究では、機能性ナノ粒子の体内動態の解明、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、名嘉、高見、北條ら)、単粒子検出グループ(権田、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、CT撮影・TEM観察を行い、腎、心、肺、脾についてヨウ化銀ビーズの存在を確認し、さらに誘導結合プラズマ法により各臓器に残存する元素の定量計測を行った。ヨウ化銀ビーズはシリカコーティングにより特異な二重構造をとっているためTEMによる

観察が容易である。また安全性試験として、ナノサイズヨウ化銀ビーズの量を変えて静脈投与し、死亡率を評価した。

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。

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多重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と考えられるため、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) : 抗がん剤DDS研究のモデルとして、HER2タンパク陽性乳がん細胞を移植したマウスに量子ドット結合抗HER2抗体トラスツズマブを投与し、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、腫瘍血管、腫瘍組織、腫瘍細胞をそれぞれ経時的に観察した。また同モデルを利用し、粒径20nm、40nm、100nmの各サイズの蛍光ナノ粒子懸濁液を、乳がん細胞株KPL-4を移植した担がんマウスに静脈注射し、腫瘍間質におけるナノ粒子の挙動を観察した。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、腫瘍血管、腫瘍組織、腫瘍細胞を経時的に観察、挙動の様式をサイズ毎にそれぞれ解析した。また高転移性がん細胞（PAR1発現）を移植したマウスに抗PAR1抗体結合量子ドットを静注して腫瘍細胞を量子ドットでラベルし、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、担がんマウス生体内で逐次観察した。

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。本研究では超音波変調蛍光検出法の開発に取り組み、水槽に高散乱媒質であるイントラリビッドと蛍光標的を入れた模擬生体を用い、その深部にある蛍光色素の検出実験を行った。また実用化に向けた装置の改良として、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の評価を行った。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。

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、高見、北條、川添、水関、粕谷ら):ヨウ化銀ビーズの体内動態を詳細に解析するため、ラットにヨウ化銀ビーズを静脈注射直後にX線CTで撮像し、造影効果を確認した後、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ビーズの分布を観察、ならびに各臓器、胆汁、尿について誘導結合プラズマ法により銀の定量解析を行った。その結果、投与直後は肺、肝、腎、脾臓とも血管内に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、それ以外の臓器にヨウ化銀ビーズは認められなかった。誘導結合プラズマ法では、投与1時間後から投与後3日目まで胆汁中に銀元素を認めた。尿中には計測を通して銀元

素は検出されなかった。

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。

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。

RI造影剤として、Stöber法によりシリカ-ガドリニウム-シリカの3層構造のナノ粒子の作製を試み、MRIによる造影効果を確認したところ、シリカ-ガドリニウムナノ粒子に比べて高い造影効果があることがわかった。さらに、シリカコーティングした金コロイドを用い、X線による造影効果を確認するとともに、細胞毒性試験を行った。ガドリニウム内包シリカコーティングビーズをMRIで撮像した結果、水およびシリカ-ガドリニウムナノ粒子と比較して高い造影効果を確認できた。

amine-freeシリカコーティング法とし

て、過塩素酸銀 (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/SiO₂複合粒子を作製した。[AgI]= 1.0×10^{-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/SiO₂複合粒子を合成することができた。

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) ; ハーセプチンは細胞膜上のHER2に結合した後、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた。細胞内に取り込まれたハーセプチンを含む小胞は細胞膜に沿ってしばらく輸送された後、突然方向を変化させ核へ一気に到達し、核内へ移行した。核内に移行したハーセプチンは核周辺領域(perinuclear region)に濃縮され、ここで蛋白質分解を受けていることが予想された (Cancer Res, 2007)。

一定サイズのナノ粒子は腫瘍血管を透過して、腫瘍組織に蓄積されることがわかっているが、腫瘍血管から漏出したナノ粒子は腫瘍間質に出て更に間質内の流れに応じてそれぞれ運動することとなる。その際、ナノ粒子は粒径に応じて挙動が異なる

ことが予測されるため、本年度は20nm、40nm、100nmのナノ粒子の腫瘍間質における動態を1粒子レベルで計測した。ナノ粒子の挙動はランダムな運動と方向性を持った運動が組み合わされたものであり、解析によって拡散と間質内の体液の流れによるものであることが判明した。また、粒径の増大につれて拡散の低下が認められたが、間質内の体液の流れによる運動は粒径には依存せず、腫瘍内の場所に大きく依存していた。得られた結果からシミュレーションを行った結果、血管外漏出から腫瘍へ至るまでの時間を算出し得た (Hot Topics in Molecular Imaging, 2008)。

*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(2×10^4 nm²/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μm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 nm²/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) : これまで超音波タグ蛍光イメージング装置によりアガロース生体模擬試料を用いて画像計測に成功し、生体の光散乱係数に近い光散乱媒体中で3cmの深さにある蛍光色素の検出に成功した。ま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。

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 μ lとバ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、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。

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康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

機能性ナノ粒子を利用したDDSにおいて動態に関与する大きな要素は粒径とゼータ電位である。特に腫瘍組織におけるDDSに粒径は重要であり、サイズ効果によってナノ粒子が選択的に取り込まれることが指摘されている。従ってナノ粒子の腫瘍への集積後の腫瘍内の動態に与える粒径の影響を把握することは極めて重要である。EPR(extended permeability and retention)効果によって腫瘍組織に到達し得るサイズを予備的に検討した結果、200nmのナノ粒子は腫瘍血管を通過せず、20nm、40nm、100nmは通過できたため、20nm、40nm、100nmの各粒径についてそれぞれ詳細にその動態を計測し、解析した。これまでの研究で生体内におけるトラスツズマブ結合量子ドットの単分子イメージングに世界で初めて成功しており、本手法は今後、生体内の薬物動態や信号伝達の研究を大きく進歩させるものになると考えられる。

新たなX線CTなどの造影剤として開発したナノサイズヨウ化銀ビーズの体内動態の検討を行い、胆汁中に銀を検出することにより、排泄経路を特定することができた。臨床応用を目指すナノ粒子の実用化にあたり、安全投与量の決定ならびに体内動態、排泄経路の解明は必ず必要

となる。多くのナノ粒子が有用性のみ強調される一方で、体内動態・排泄経路が明確に示されていない現状を考えると本研究はその点でも極めて意義深いものである。現在まだサンプル数が少ないため今後更に解析を進め、排泄経路を確定したい。

以下各項目について述べる。

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、高見、北條、川添、水関、粕谷）：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。

これまでシリカコーティングヨウ化銀ビーズが造影剤として有用であること、各主要臓器におけるシリカコーティングヨウ化銀ビーズの存在を、TEMにより観察、その体内動態を示してきた。今回初めて誘導結合プラズマ法で各臓器、胆汁ならびに尿中の銀元素を計測した。胆汁中に銀を検出、尿中に銀が計測されたことからシリカコーティングヨウ化銀ビーズは胆汁排泄されることが強く示唆された。また、シリカコーティングヨ

ウ化銀ビーズは従来の造影剤に比べ造影効果が2-3日と長期にわたって持続し、1週間以内に完全に排泄されることがわかった。したがって、シリカコーティングヨウ化銀ビーズは長時間造影効果を維持したい病変の描出に有効であり、例えば手術や放射線治療において治療前後に持続した造影効果が必要な際に有用であり、新たな用途が期待される。がんの場合EPR効果によって腫瘍に長時間にわたって蓄積、造影効果を維持することが期待されることから、抗体など特別な結合分子を用いずとも長時間の造影効果が得られるものと考えられる。

ラット、ウサギを用いた血管内投与では血管内に凝集等も起こらず、短時間では血栓形成等の重大な障害も観察されなかった。現在の問題として、従来のX線造影剤に比べて造影効果がやや不足であることが挙げられる。

昨年度の課題であった高濃度化については、粒径500nmのヨウ化銀ビーズについては従来の3倍程度の濃度にまで改良されており今後、更に小さい粒径のシリカコーティングヨウ化銀ビーズの高濃度化に取り組みたい。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）：異なる粒径の蛍光ナノ粒子の腫瘍間質における動態を詳細に計測

することができた。20nmのナノ粒子は腫瘍血管付近から間質、細胞間までリンパ流の影響を強く受け、これとは対照的に粒径100nmの粒子は腫瘍血管付近でこそリンパ流の影響を受けるものの、腫瘍間質や腫瘍細胞間ではほとんど拡散運動のみであることが明らかになった。今回の知見はがん治療におけるDDSを考える上で極めて重要である。つまり今回のモデルにおいてEPR効果によりナノ粒子を腫瘍血管から漏出させるには100nmかそれ以下であることが必要で、腫瘍間質から速やかに移動させ、腫瘍から流し去る、または腫瘍細胞に到達させるには粒径20nmかそれ以下の小さなナノ粒子がよく、間質に長時間とどめておくには40nm以上の大きな粒子がよいことになる。このように間質における動態を詳細に検討した研究は過去になく、新たなナノ粒子のDDS検討に極めて有用な手法といえる。我々はこれまでにトラスツズマブがエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、核内に移行するまでの一連の過程を観測しており、トラスツズマブがどのような経路を辿って核に至るのかを明確に知ることができた。今後は本研究で開発した装置を使って、以上のようなDDSに関する研究に加え、多重蛍光染色も用いて、トラスツズマブの薬効メカニズムの詳細や、薬剤耐性のメカニズムをリアルタイムイメージングの利点を生かして解明していくことを目指す。また、装置の高速化・位置高精度化、分解能向上を図り、トラスツズマブの細胞内動態をさらに詳細にイメージングすること、装置を担がんマウスの腫瘍細胞イメージングへ応用する

こと等を試みる予定である。

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。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)：従来の蛍光計測法の計測限界である1cm以上の深さの蛍光色素の検出に成功したため、現在、超音波素子のアレイ化など実用化に向けた装置の改良を行っている。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いる。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と変わらないが、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非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。また、金ナノ粒子の造影剤の開発も試みており、安全性を確認しつつ、X線造影剤としての応用を検討している。

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) Kobayashi M, Mizumoto T, Shibuya Y, Takeda M and Enomoto M, Fluorescence tomography in turbid media based on acousto-optic modulation imaging. *Applied Physics Letter*, 89, 1811022, 2006.
- 2) Park YS, Liz-Marzán LM, Kasuya A, Kobayashi Y, Nagao D, Konno M, Mamykin S, Dmytruk A, Takeda M, Ohuchi N, X-ray Absorption of the Gold Nanoparticles with Thin Silica Shell. *J. Nanosci. Nanotech.*, 6, 3503-3506, 2006.
- 3) Tada H, Higuchi H, Watanabe TM,

Ohuchi N. In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice. *Cancer Res*, 67, 1138-1144, 2007.

- 4) Lima R, Wada S, Takeda M, Tsubota K, Yamaguchi T, in vitro confocal micro-PIV measurements of blood flow in a square microchannel: The effect of the haematocrit on instantaneous velocity profiles. *Journal of Biomechanics*, 40, 2752-2757, 2007.
- 5) Kobayashi Y, Imai J, Ngao D, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A, Konno M, Preparation of multilayered silica-Gd-silica core-shell particles and their magnetic resonance images. *Colloids and Surfaces A*, 308 (1), 14-19, 2007.
- 6) Kobayashi Y, Misawa K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A, Konno M, Control of Shell Thickness in Silica-Coating of AgI Nanoparticles. *Advanced Materials Research* 29-30, 191-194, 2007.
- 7) Park YS, Kasuya A, Dmytruk A, Yasuto N, Takeda M, Ohuchi N, Sato Y, Tohji, K Uo M, Watari F. Concentrated colloids of silica-encapsulated gold nanoparticles: colloidal stability, cytotoxicity, and X-ray absorption. *J. Nanosci. Nanotech.* 7 (8), 2690-2695, 2007.
- 8) Park YS, Dmytruk A, Dmytruk I, Noda Y, Kasuya A, Takeda M, Ohuchi N. Aqueous-phase synthesis of

- ultra-stable small CdSe nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotech.* 7 (11), 3750-3753 2007.
- 9) Zhou X, Shao Z, Kobayashi Y, Wang X, Ohuchi N, Takeda M, Kasuya A, Photoluminescence of CdSe and CdSe/CdO·nH₂O Core/Shell Nanoparticles Prepared in Aqueous Solution. *Optical Materials*, 29, 1048-1054, 2007.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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).
- 17) 樋口秀男、大内憲明、単一量子ドットのバイオ・医療ナノイメージング、宇理須恒雄編、ナノメディシン ナノテクノ医療応用、52-63、2008年2月。
- 18) 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。
- 19) 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。
- 20) 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。
- 21) 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。
- 22) 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) Sakurai Y, Takeda M, Kasuya A, Kobayashi Y, Kamei t, Amari M, Cong L, Ohuchi N. Nano size silver iodide beads as novel contrast media for sentinel lymph node navigation surgery. The 9th International Symposium of Future Medical Engineering based on Bio-manotechnology, Sendai, January 7-9, 2007.
- 2) Cong L, Takeda M, Ohuchi N. Silica coated nano-particles for biomedical contrast imaging. The 9th International Symposium of Future Medical Engineering based on Bio-manotechnology, Sendai, January 7-9, 2007.
- 3) Takeda M, Tada H, Kawai M, Sakurai Y, Higuchi H, Ohuchi N, In vivo Single Molecular Imaging and Sentinel Node Navigation using Nano-biotechnology for Medical Application. The 3rd Tohoku-NUS Symposium on Nano-Biomedical Engineering in the East Asian-Pacific Rim Region, 10-11 Dec 2007, National University of Singapore
- 4) Kawai M, Takeda M, Higuchi H, Ohuchi N, Tumor Interstitial Nano-particle Delivery and Analysis in the Human Tumor Xenograft in Mice. The 3rd Tohoku-NUS Symposium on Nano-Biomedical Engineering in the East Asian-Pacific Rim Region, 10-11 Dec 2007, National University of Singapore
- 5) Hamanaka Y, Takeda M, Tada H, Kawai M, Sakurai Y, Amari M, Suzuki A, Ishida T, Ohuchi N, In vivo tracking of anti-cancer drugs and the active sites conjugated with quantum dots. The 3rd Tohoku-NUS Symposium on Nano-Biomedical Engineering in the East Asian-Pacific Rim Region, 10-11 Dec 2007, National University

- of Singapore
- 6) Sakurai Y, Takeda M, Cong L, Amari M, Kasuya A, Kobayashi Y, Kamei T, Ohuchi N, In vivo Distribution of Silver Iodide Beads in Cancerous Legions. The 3rd Tohoku-NUS Symposium on Nano-Biomedical Engineering in the East Asian-Legions, 10-11 Dec 2007, National University of Singapore
 - 7) Kawai, M., Higuchi, H., Gonda, K., Takeda, M., and Ohuchi, N. In vivo imaging of vascular permeability using nano-objects in mice tumor. 2nd "Hot Topics in Molecular Imaging - TOPIM" meeting of the European Society for Molecular Imaging. February 2008 Grenoble, France.
 - 8) Ohuchi, N., Takeda, M., Kawai, M., Tada, H. Sakurai, Y., Gonda, K., and Higuchi, H. Novel imaging techniques with functional nano-objects for cancer diagnosis. 2nd "Hot Topics in Molecular Imaging - TOPIM" meeting of the European Society for Molecular Imaging, February 2008 Grenoble, France.
 - 9) Ohuchi N, Tada H, Sakurai Y, Kawai M, Takeda and Higuchi H, Cancer research based on nano-bio technology: Nano-DDS and molecular imaging of single particle *in vivo*. 1st International Symposium on Nanomedicine-from basic to Applications- (ISNM2007), April 2007, Okazaki
 - 10) Y. Kobayashi, N. Shimizu, M. Takeda, N. Ohuchi, A. Kasuya, M. Konno, Preparation of Amine-Free Silica-Coated AgI Nanoparticles with a Modified Stöber Method, The 9th Annual Conference of the Yugoslav Materials Research Society (YUCOMAT 2007), 2007, Herceg Novi, Montenegro
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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

- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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)
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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.
- 25) Gonda K, Watanabe TM, Takeda M, Higuchi H and Ohuchi N. *In vivo* imaging of membrane dynamics in metastatic tumor cells. The 2nd International Symposium on Nanomedicine, Asian Core Symposium-Nano and Biomedical Molecular Science-, February 4-7, 2009, Okazaki, Japan.
- 26) Takeda M, Gonda K, Kawai, M, Sakurai Y, Cong L, Higuchi H, Ohuchi N. Bioimaging and dynamics of functional nano-particles. The 2nd International Symposium on Nanomedicine, Asian Core Symposium-Nano and Biomedical Molecular Science-February 4-7, 2009, Okazaki, Japan.
- 27) Hikage M, Takeda M, Kamei T, Kobayashi M, Gonda K, Nakano T, Sakurai Y, Kawai M, Liman C, Hamanaka Y, Kumasaka M, Satomi S, Ohuchi N. Basic examination of the fluorescent endoscopic surgery using nanoparticle tracer. The 2nd 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、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。
- 2) 武田元博、桜井遊、小林芳男、叢莉蔓、甘利正和、亀井尚、石田孝宣、鈴木昭彦、菅原旭浩、大内憲明、ナノサイズヨウ化銀ビーズの腫瘍とセンチネルリンパ節のX線CT造影効果。第17回乳癌基礎研究会、2007年7月、大阪。
- 3) Motohiro Takeda, Hideo Higuchi & Noriaki Ohuchi, Nano-imaging of single quantum dots and nano-particles in mice tumor. 第

- 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月、横浜。
- 4) Kawai M, Higuchi H, Takeda M, N O. In Vivo Imaging of Vascular Permeability Using Nanocrystals in Mice Tumor. 第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月、横浜。
 - 5) 河合賢朗, 樋口秀男, 大内憲明. マウス腫瘍新生血管における透過性の In vivo imaging. ナノ学会第 5 回大会、2007 年 5 月、つくば。
 - 6) 甘利正和、石田孝宣、武田元博、鈴木昭彦、宇佐見伸、多田寛、大内憲明、進行・再発乳癌におけるカペシタピンの治療効果の検討。第 107 回日本外科学会総会、2007 年 4 月、大阪。
 - 7) 甘利正和、石田孝宣、武田元博、鈴木昭彦、大内憲明、若年者乳癌の臨床病理学的検討。第 15 回日本乳癌学会学術総会、2007 年 6 月、横浜。
 - 8) 大内憲明, 多田寛, 河合賢朗, 武田元博, 石田孝宣, 樋口秀男. 生体超微細 1 分子可視化によるナノ DDS と乳癌標的治療. 第 15 回日本乳癌学会総会、2007 年 6 月、横浜。
 - 9) 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 年春季第 55 回応用物理学関係連合講演会、2008 年 3 月、船橋。
 - 10) 湊真理絵、小林芳男、液相法による AgI/SiO₂ 複合粒子の作製法の開発の研究。第 18 回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会、2007 年 11 月、水戸。
 - 11) 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 平成 20 年 3 月武田元博、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。
 - 12) 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。
 - 13) 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。
 - 14) 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。
 - 15) 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 2000 年 3 月、浜松。