

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. Research, Tohoku University, 2008, Sendai.

2. 学会発表

Suvitha A, Belosludov RV, Mizuseki H, Kawazoe Y, Kohno M. TD-DFT studies on Oligomers of Hematoporphyrin in ACCMS-VO held during January 26-28, 2008 in Institute for Materials

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

本研究では従来より困難とされた直径 1nm 台まで微小なバイオマーカを、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見出した。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有機分子による表面修飾を施すことによって、1nm 台における世界最高の発光効率を達成した。これにより最小で効率最大のナノサイズ・センシングカプセルが実現した。

A 研究目的

蛍光性バイオマーカに強く望まれている 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の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。従って表面の構造が乱れ、発光効率は極端に落ちることになる。このため現在市販されている蛍光ナノ粒子の直径は 2nm を超えており、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℃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)_x 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℃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)_y 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)_y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、シリコンセブタムで蓋をして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行った。

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 光吸収及び発光測定

TOP を添加していない状態の (CdSe)₃₄ の光吸収スペクトルを黒線で、発光スペクトルを青線で図1に示した。但し、発光スペクトルの 380nm にあるピークはトルエンからのラマン散乱光である。

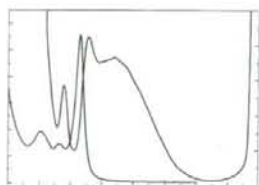


図1. (CdSe)₃₄ の光吸収スペクトル及び発光スペクトル。黒線が光吸収スペクトル、青線が発光スペクトル

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で、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ただけで広が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

図1と同一の試料における TOP 添加後の発光スペクトルの時間変化を図2に示した。

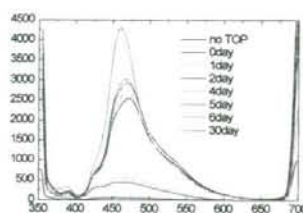


図2. (CdSe)₃₄ の溶液中の表面Se濃度に対して 0.75 倍のモル濃度の TOP を添加した (CdSe)₃₄ の発光スペクトルの時間変化 (励起波長 350nm)

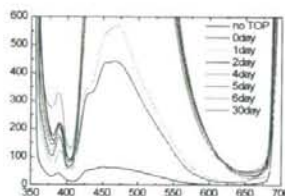


図3. 図2の縦軸を10倍したスペクトル

また、添加直後の変化を調べるため、図3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3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 $(\text{CdSe})_{34}$ 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 2 を見ると 1day と 2day の間でも 455 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 $(\text{CdSe})_{34}$ でも経時変化として見られるが、添加した $(\text{CdSe})_{34}$ 方の方が 4 倍ほど速い。このスペクトル変化は図 1 の吸収スペクトルにおける 415nm のピークのわずかな長波長側へのシフトと 450 nm の肩の出現、即ち $(\text{CdSe})_x$ の成長と直接関係すると考えられる。TOP の添加により $(\text{CdSe})_x$ の成長が速まったとすれば、解釈できる。また後述するが、 $(\text{CdSe})_x$ のエキシトンの発光ピークが 455nm にあることから、図 2 における 455nm 付近のピークは $(\text{CdSe})_x$ 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 $(\text{CdSe})_{34}$ のエキシトンの発光と考えられる 430nm のピーク、 $(\text{CdSe})_x$ のエキシトンの発光と考えられる 455nm のピーク、そして $(\text{CdSe})_{34}$ 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 4 に示した。

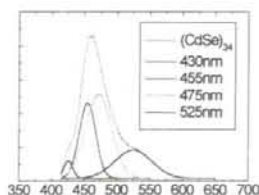


図 4. $(\text{CdSe})_{34}$ の発光スペクトルのピーク分離

7. $(\text{CdSe})_x$ の光吸収と発光スペクトル
TOP を添加していない状態の $(\text{CdSe})_x$ の光吸収スペクトル、発光スペクトルを図 5 に示した。

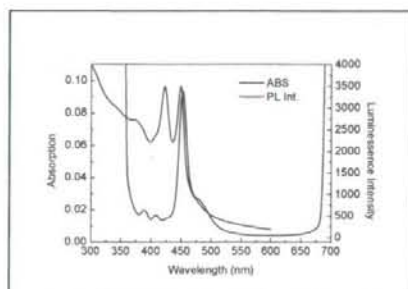


図 5. $(\text{CdSe})_x$ の光吸収スペクトル (黒線) と発光スペクトル (青線)

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 $(\text{CdSe})_x$ 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、 $(\text{CdSe})_{34}$ 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 $(\text{CdSe})_x$ のエキシトンの発光強度は $(\text{CdSe})_{34}$ 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 $(\text{CdSe})_{34}$ と同様に表面準位からの発光と考えられるが $(\text{CdSe})_{34}$ のに比べて弱く観測されている。

8. TOP の添加による $(\text{CdSe})_x$ の発光スペクトルの時間変化

$(\text{CdSe})_x$ の発光スペクトルの時間変化を図 6 に示した。 $(\text{CdSe})_{34}$ 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 480 nm 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 $(\text{CdSe})_x$ 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 7 に、時間変化を図 8 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 $(\text{CdSe})_x$ の表面準位によるかはわからないが、その後の変化は

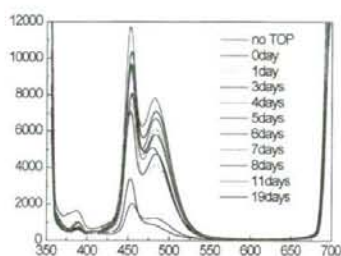


図 6. $(\text{CdSe})_x$ の溶液中の Se 濃度に対して 1.0 倍のモル濃度になるように TOP を添加した $(\text{CdSe})_x$ の発光スペクトルの時間変化 (励起波長 350nm)

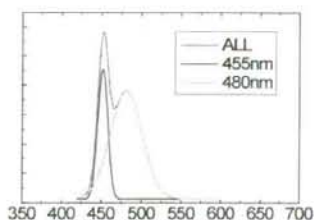


図 7. $(\text{CdSe})_x$ の発光スペクトルのピーク分離

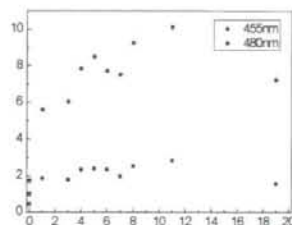


図 8. TOP1.0 $(\text{CdSe})_x$ の分離したピークそれぞれの発光強度の時間変化

新たな粒子の成長によると推測される。

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 9 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。

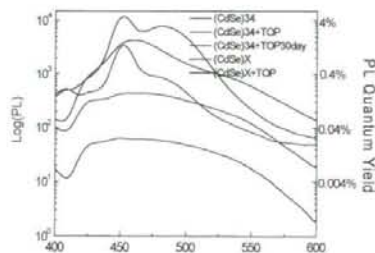


図 9. 各 CdSe ナノ粒子の発光スペクトルと量子効率

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10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TOP₀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)₄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。

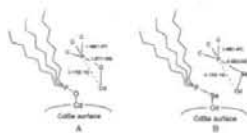


図10. EXAFSの解析から提案された2種類の配位子の結合モデル。

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)₄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11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1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12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。

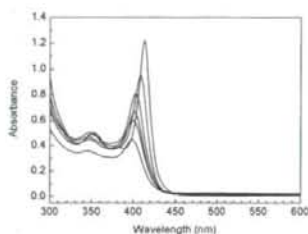


図11. 10度で成長させた(CdSe)₇の吸収スペクトル

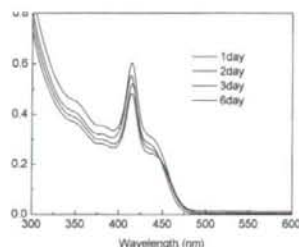


図12. 室温で成長させた(CdSe)₇の吸収スペクトル

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 $(\text{CdSe})_y$ の発光スペクトルを図 13 に示した。発光ピークは比較的鋭く 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

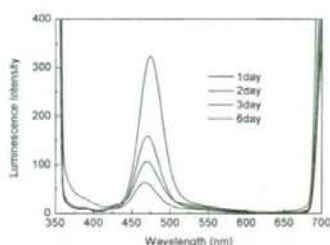


図 13. 室温で作製した $(\text{CdSe})_y$ の発光スペクトルと時間変化。

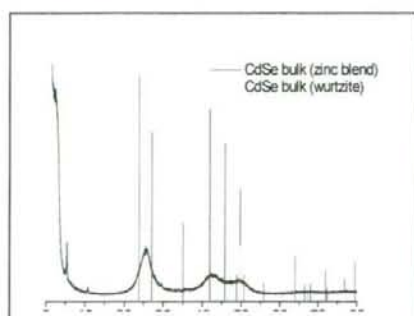


図 14. 長時間静置した試料の XRD の結果

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 14 に長時間静置した $(\text{CdSe})_y$ 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 $(\text{CdSe})_y$ は成長初期は $(\text{CdSe})_x$ 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の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ーとして、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. Park Y, Kasuya A, Dmytruk A, Noda Y, 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, 2690-2695, 2007

2. Dmytruk A, Park, A. Kasuya H, Kikuchi M, Takahashi Y, Kawazoe Y, Watanabe A. Silicon Subiodide Clusters. *J. Nanosci. Nanotech.*, 7, 3788-3791, 2007

3. Takahashi N, Gombojav B, Yoshinari T, Takahashi Y, Nagasaka S, Yamamoto A,

Goto T and A. Kasuya. Luminescences of Pyrene Single Crsytal and Pyrene Molecules Inserted in a Molecular Vessel of Cyclodextrin. *J. Phys. Soc. Jpn.*, 76, 034703-034705, 2007

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

5. 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ことの可能な、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きた。

基本原理に関する検討を行い、蛍光計測が可能な到達可能深度を、理論実験両面から検討を行った。実際の生体試料を用いて実証実験を行うとともに、実験系の改良と計測実験を行い、実用化のための課題の検討を行った。

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。

図1に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を示す。CWレーザー光を、蒸留水を満たしたアクリル水槽に入射し、レーザー光軸と直交するよう配置した共振周波数1MHzの水中用トランスデューサにより集束超音波を照射した。

集束超音波焦点におけるビーム幅は3mm
焦点距離41mmである。水槽のトランスデューサ対向面には、定在波の発生を抑えるための吸収板を配置した。アクリル水槽は3軸自動ステージ（X軸：入射レーザー光軸方向，Y軸：超音波伝搬方向，Z軸：高さ方向）上に設置した。測定用生体試料はアクリル容器内に入れ、その容器は水槽に触れない様にして外部から固定した。水槽のみを3軸移動することにより、超音波焦点が測定試料内を走査し、各点において変調蛍光信号を検出した。蛍光検出は、バンドパス干渉フィルタを装着した光電子増倍管により行い、変調信号成分をスペクトラムアナライザにより検波した。

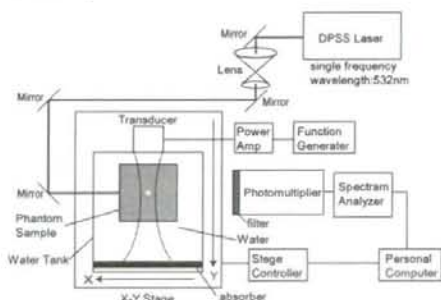


図1 超音波タグ蛍光断層イメージングシステムのブロック

最初の実験では、生体模擬試料を用いた。これは、体積濃度40ml/LのIntralipid-10%水溶液をアガロースによりゲル化した、40×40×70mmに成型したものをを用いた。その中央部には蛍光微粒子（Fluoresbrite Carboxylate Microspheres NY0 蛍光波長590nm）を混合したアガロースを、直径3mm高さ5mmの円柱形に成形して包埋した。光源にはDPSSレーザー（波長532 nm）を用いた。また生体に近い試料として、

ロースハム（明治ケンコーロースハム）を散乱媒質とした検討を行った。前述の生体模擬試料と同様にロースハムを40mm×40mm×70mmに整形し、その中央部に蛍光微粒子（FluoSpheres carboxylate-modified microspheres 0.04 μ m, infrared fluorescent 715/755）を、直径3mm、高さ5mmのシリコンチューブに入れて試料内に挿入した。このとき光源には、波長726nm、出力50mWのTi:Sapphireレーザーを用いた。X、Y両軸の走査は、試料中心部20mmを0.25mm～1mmの分解能で行った。

次に、生体試料として市販の豚ロース肉を用いた実験を行った。ほぼ均質な筋肉部をX:60×Y:60×Z:70mmに成型したものをを用いた。その中央部には蛍光性微粒子（FluoSpheres carboxylate-modified microspheres 0.04 μ m, IR 715/755）を混合したアガロースを、直径3mm高さ5mmの円柱形に成形して包埋した。光源にはDPSSレーザー 励起による波長726nmのTi:Sapphireレーザーを用いた。

さらに、実用化への検討として、測定用プローブについて検討を行った。上述の測定系では、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2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。

(倫理面への配慮)

該当なし

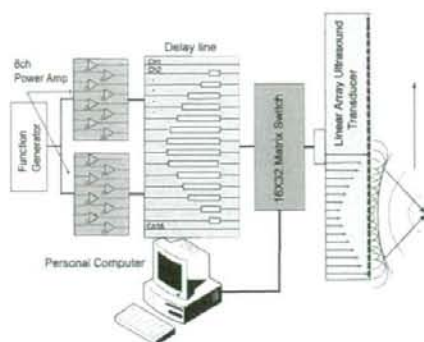


図2 フェイズドアレイ超音波トランスデューサ駆動システムのブロック図

C. 研究結果

図3にアガロース生体模擬試料を用いて画像化した結果を示す。また測定後に縦方向に切断した生体模擬試料の断面写真を図4に示す。試料中央に蛍光体が包埋されている様子がわかる。図3において、中心付近に蛍光強度ピークが明瞭に検出され、そのサイズは実際の蛍光体サイズにほぼ一致した。

図5は市販のロースハムによる2次元画像計測結果である。このときの走査分解能は0.5mmである。走査範囲の中心付近に蛍光変調信号のピークを確認することができる。また図6はピークを含む光軸方向の蛍光強度プロファイルであるが、信号強度ピークの位置は挿入された蛍光体の位置にほぼ一致した。半値幅は4~5mmであった。

図7はブタロース肉生体試料を用いて断層画像計測を行った結果を3次元表示で示したものである。画像中央部の発光強度が高いことがわかる。実際に測定後に試料を切断して内部を確認したところ、予定通りの位置に蛍光体が埋設されてい

たことを確認した。また図8は図7のピークを含む光軸方向の蛍光強度プロファイルであるが、蛍光体サイズ程度の蛍光強度ピークが、超音波中心付近に明瞭に検出され、そのサイズは実際の蛍光体サイズにほぼ一致した。

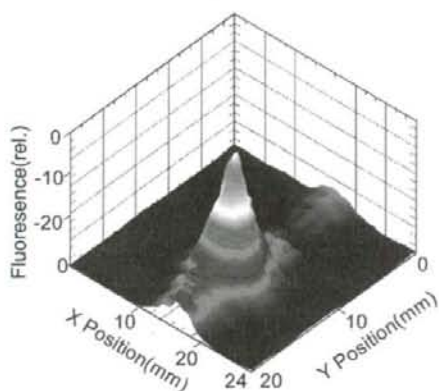


図3 生体模擬試料内部の蛍光分布画像

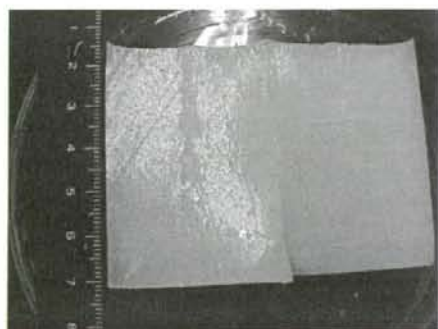


図4 生体模擬試料の切断面写真

図9はアレイ型素子を用いて、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。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。

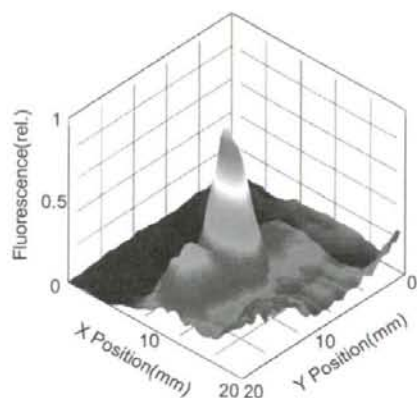


図5 ロースハム内に蛍光体を包埋した生体試料による蛍光断層画像

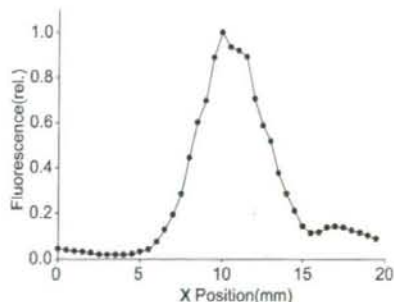


図6 ロースハム試料断層画像の光軸方向のプロファイル

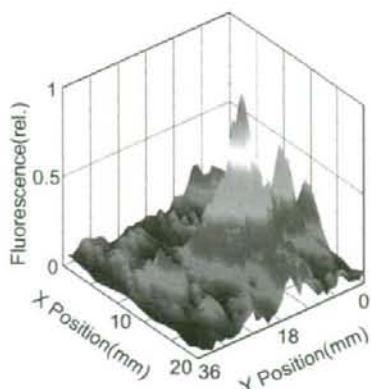


図7 ブタ肉に蛍光物質を包埋した生体試料の蛍光断層画像

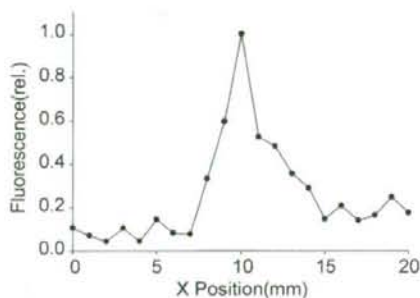


図8 ブタ肉蛍光断層画像の光軸方向プロファイル

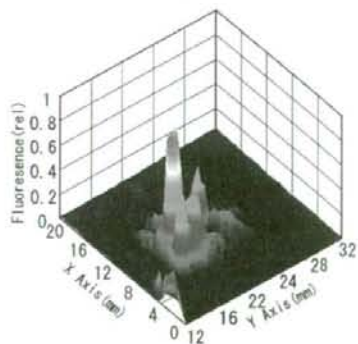


図9 液体散乱媒質内に蛍光体を設置し、フェイズドアレイ素子で蛍光変調して計測した蛍光断層画像

D. 考察

集束超音波の焦点サイズとほぼ同程度の分解能で、深さ20mmの生体組織中に局在した蛍光物質分布を画像計測することができた。また、散乱媒質内に複数箇所蛍光物質を包埋した場合においても、超音波焦点サイズ程度の解像が可能であることがわかった。現在の計測系でのSN比から推定すると、800nm程度の近赤外蛍光を用いることにより、深さ30mm程度までの生体内部の計測が可能であると見積もられた。

また、実用化に向け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

本研究では、光散乱媒質内部の蛍光分布の可視化技術として、超音波タグ蛍光断層画像計測システムの研究開発を行い、生体試料を用いた評価実験を行った。これにより生体内部においておよそ30mm程度の深部蛍光分布の計測が可能であり、本手法がセンチネルリンパ節検索に応用する上での実用的解像度でそのイメージングにおいて有望であるとの結論を得た。また、超音波焦点の走査方法についての検討を行い、位相制御型超音波アレイ素子により電子走査化することで、より高速かつ生体診断に適用可能な計測プローブ開発の目処が立った。今後は、実際の生体による検討を行いながら、センチネ

ルリンパ節検索を目的とした最適なプローブ形状や方式の検討を進め、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、装置化研究につなげていくことが必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi M, Mizumoto T, Shibuya Y, Enomoto M, Takeda M. Fluorescence tomography in turbid media based on acousto-optic modulation imaging. *Appl. Phys. Lett.* 89, 18, 181102, 2006.
2. Kobayashi M, Kasamatsu T, Shibuya Y, Enomoto M. Optical visualization of ultrasound pressure fields in turbid media based on a coherent detection imaging technique. *Jpn. J. Appl. Phys.* 45, A3, 1836-1840, 2006.
3. van Wijk R, Kobayashi M, van Wijk E. Anatomic characterization of human ultra-weak photon emission with a movable photomultiplier and CCD imaging. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 83, 69-76, 2006.
4. Kobayashi M, Mizumoto T, Duc TQ, Takeda M. Fluorescence Tomography of Biological Tissue Based on Ultrasound Tagging Technique, *Proc. SPIE* 6633, pp. 663306-1-5, 2007.
5. Kobayashi M, Sasaki K, Enomoto M, Ehara Y. Highly sensitive determination of transient generation of biophotons during hypersensitive response to cucumber mosaic virus in cowpea. *J. Exp. Botany,*

58, 3, 465-472, 2007.

6. 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.

2. 学会発表

1. Kobayashi M, Mizumoto T, Shibuya Y, Enomoto M, Takeda M. Fluorescence Tomographic imaging using the Ultrasound Tagging Technique. The 9th International Conference on Optics within Life Sciences, November 26-29, 2006, Taipei, Taiwan.
2. Kobayashi M, Mizumoto T, Duc TQ, Takeda M. Fluorescence Tomography of Biological Tissue Based on Ultrasound Tagging Technique. European conferences on Biomedical Optics in 18th International Congress on Photonics in Europe, June 18, 2007, Munich, Germany.
3. Duc TQ, Mizumoto T, Nanbu Y, Takeda M, Kobayashi M. Tomographic Imaging of Fluorophore Embedded in Biological Tissue Based on Ultrasound Tagging Technique. The 7th Pacific Rim Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO), Abstract 1193-1194, August, 2007, Seoul, Korea.
4. Duc TQ, Nanbu, Y Suzuki T, Takahashi S, Takeda M, Kobayashi M. 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 7, December 4, 2008, Taipei, Taiwan.
5. Duc TQ, Nanbu Y, Suzuki T, Takahashi S, Takeda M, Kobayashi M. Fluorescence tomography based-on acousto-optic modulations with phased-array ultrasound transducer. BiOS Part of SPIE Photonic West, paper No. 7177-57, USA, January 27, 2009, San Jose.
 6. 水本喬, 武田元博, 榎本幹, 小林正樹, 音響光学効果を利用した生体計測のための超音波タグ蛍光イメージング法。応用物理学会東北支部第 61 回学術講演会講演予稿集, 講演番号 8pA12, p. 112、2006 年 12 月、仙台。
 7. 水本喬, 武田元博, 榎本幹, 小林正樹, 超音波-光相互作用を利用した生体蛍光断層画像計測法の基礎検討。第 40 回生体医工学会東北支部大会, 抄録集 p. 2、2006 年 7 月、仙台。
 8. 菊地大輔, 岡村均, 小林正樹, 超高感度バイオフィトンイメージングによるヒト体表バイオフィトンのサーカディアンリズム分析。第 40 回生体医工学会東北支部大会, 抄録集 p. 8、2006 年 7 月、仙台。
 9. 水本喬, 武田元博, 榎本幹, 小林正樹, 超音波-光相互作用を利用した生体蛍光断層画像計測法の基礎検討。第 27 回日本レーザー医学会総会, 2006 年 11 月、千葉。論文番号 06-1, 日本レーザー医学会誌 Vol. 27 No. 3, p. 234 (2006)
 10. 菊地大輔, 岡村均, 小林正樹, 超高感度 CCD によるヒト体表バイオフィトン概日リズムの画像計測。第 27 回日本レーザー医学会総会, 2006 年 11 月、千葉。論文番号 05-3, 日本レーザー医学会誌 Vol. 27 No. 3, p. 233、2006。
 11. 水本喬, 武田元博, 榎本幹, 小林正樹, 超音波-光相互作用を利用した生体蛍光断層画像計測法の基礎検討。平成 18 年度電気関係学会東北支部連合大会, 2006 年 8 月、秋田。論文番号 1C11, 講演論文集 p. 85、2006 年 8 月、秋田。
 12. 菊地大輔, 岡村均, 小林正樹, ヒト体表バイオフィトン画像計測によるバイオフィトン発光と生体リズムの相関の検討。平成 18 年度電気関係学会東北支部連合大会, 論文番号 1C12, 講演論文集 p. 86、2006 年 8 月、秋田。
 13. 水本喬, 渋谷幸弘, 榎本幹, 武田元博, 小林正樹, 集束超音波を用いた超音波-光相互作用に基づく散乱媒質内蛍光イメージング法の基礎検討。第 45 回日本生体医工学会大会, 講演番号 P3(16AM)-13-4, 生体医工学 Vol. 44, suppl. 1, p. 514、2006 年 5 月、福岡。
 14. 今野淳, 鈴木聡, 武田元博, 水野麻弥, 小川雄一, 川瀬晃道, 小林正樹, 培養がん細胞 AH109 からのバイオフィトン検出による細胞代謝活性計測の検討。第 45 回日本生体医工学会大会, 2006 年 5 月、福岡。講演番号 P2(15PM)-18-5, 生体医工学 Vol. 44, suppl. 1, p. 434、2006 年 5 月、福岡。
 15. 伊藤勇樹, 今野淳, 鈴木聡, 武田元博, 小林正樹, 培養がん細胞由来バイオフィトンの検出と代謝活性計測への応用。平成 18 年東北地区若手研究者研究発表会, 講演番号 YS-4-59, 講演資料 p. 117、2006 年 2 月、仙台。

16. 菊地大輔, 青山史裕, 泉谷一也, 岡村均, 小林正樹, 超高感度 CCD を用いたヒト体表バイオフotonイメージングによる生理情報計測 I - 生体リズムとバイオフoton発光 -. 平成 18 年東北地区若手研究者研究発表会講演番号 YS-4-63, 講演資料 p. 125, 2006 年 2 月、仙台。
17. 青山史裕, 菊地大輔, 泉谷一也, 小林正樹, 超高感度 CCD を用いたヒト体表バイオフotonイメージングによる生理情報計測 II - バイオフoton発光の体表温度依存性 -. 平成 18 年東北地区若手研究者研究発表会講演番号 YS-4-64, 講演資料 p. 127, 2006 年 2 月、仙台。
18. 水本喬, 渋谷幸弘, 児玉優, 榎本幹, 小林正樹, 超音波 - 光相互作用に基づく生体内蛍光イメージング法の基礎検討. 平成 18 年東北地区若手研究者研究発表会講演番号 YS-4-65, 講演資料 p. 129, 2006 年 2 月、仙台。
19. 水本喬, Trinh Quang Duc, 武田元博, 小林正樹, 音響光学効果を利用した超音波タグ生体蛍光断層イメージング I. 第 54 回応用物理学関係連合講演会講演予稿集, 講演番号 28a-R-5, p. 1087、2007 年 3 月、相模原。
20. 水本喬, 榎本幹, 武田元博, 小林正樹, 超音波タグ散乱媒質内蛍光断層イメージング法の検討. レーザー学会学術講演会第 27 回年次大会講演予稿集, 講演番号 E2-17pV14, p. 150, 2007 年 1 月、宮崎。
21. 大原健, 鈴木祐輔, 水本喬, 榎本幹, 武田元博, 小林正樹, 超音波タグ蛍光イメージング法による生体試料の蛍光断層計測. 平成 19 年東北地区若手研究者研究発表会, 講演番号 YS-5-50, 講演資料 p. 79, 2007 年 3 月、仙台。
22. 山内崇弘, 渡邊尚哉, 小林正樹, 超高感度 CCD を用いたヒト生物フotonイメージングによる皮膚酸化ストレス計測の検討. 平成 19 年東北地区若手研究者研究発表会, 講演番号 YS-5-08, 講演資料 p. 15, 2007 年 3 月、仙台。
23. 菊地大輔, 千葉朋子, 小林正樹, 極微弱発光による化学反応波の動態計測とイメージング. 平成 19 年東北地区若手研究者研究発表会, 講演番号 YS-5-09, 講演資料 p. 17, 2007 年 3 月、仙台。
24. 熊坂増高, 内堀綾斗, 武田元博, 亀井尚, 桜井遊, 大内憲明, 小林正樹, がん転移診断のためのセンチネルリンパ節蛍光イメージング法の検討 - プタを用いた腹腔内視鏡による観察 -. 平成 19 年東北地区若手研究者研究発表会, 講演番号 YS-5-10, 講演資料 p. 19, 2007 年 3 月、仙台。
25. 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 年 8 月、郡山。
26. 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 年 8 月、郡山。
27. 南部雄也，阿部興志，鈴木知佳，水
本喬，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
生体試料深部の蛍光検出。平成 20 年東
北地区若手研究者研究発表会，講演番号
YS-6-05，講演資料 pp. 9-10、2008 年 2
月、仙台。
28. 熊坂増高，月館俊祐，日景允，亀井
尚，武田元博，大内憲明，小林正樹：
腹腔内視鏡を用いたセンチネルリンパ
節蛍光イメージングシステムの開発。
平成 20 年東北地区若手研究者研究発表
会，講演番号 YS-6-44，講演資料 pp.
87-88、2008 年 2 月、仙台。

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、がん転移の仕組み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を明らかに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・浸潤性を高めた。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 HER2 や 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 (Invitrogen 社、Qdot705) に HER2 抗体や PAR1 抗体を結合させた。これらのプローブを用いて、(1) KPL-4 細胞や 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) を組み合わせて基本ユニットを構

成した後、複数の凹凸レンズを組み合わせた資料面にレーザー光を効果的に集光させた。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。本顕微鏡システムによる解析精度を検討した結果、*in vivo* 条件において、9nmの位置精度を実現することに成功した。

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、HER2 や PAR1 動態を解析した結果、「膜の非伸縮領域」においてこれらの膜蛋白質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。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 HER2 や PAR1 の囲い込みがタイトなためこれらの膜蛋白質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、アクチンによる膜蛋白質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、HER2とHER1の2量体形成を促進すること、またMMP1によるPAR1活性化の確率を上げることなどから、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 (免疫不全マウス) の皮下にPAR1発現KPL-4細胞で腫瘍を作製した後、HER2抗体もしくはPAR1抗体を量子ドットに結合させたプローブ (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HER2や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 μ m離れたがん細胞」と「血管近傍のがん細胞」のHER2やPAR1の拡散性を調べた。その結果、血管から遠方の細胞のHER2や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。以上の結果は、血管