

- by Anti-MPO Antibody,
13ANCA-Workshop, April 26-29, 2007,
Cancun, Mexico
37. Toshiko Ito-Ihara, Kazuo Suzuki, Kazuko Uno, Toshiyuki Komiya, Tomomi Tsujii, Tatsuo Tsukamoto, Takahiko Ono, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Eri Muso. Circulating levels of IL-12, 23 and IL-18 in patients with MPO-ANCA-associated vasculitis. 13ANCA-Workshop, April 26-29, 2007, Cancun, Mexico.
 38. S Kobayashi, T Ito-Ihara, K Suzuki, S Fujimoto, RA Watts, DG Scott, DJ Jayne, H Hashimoto and the Japan-UK AAV Study Group. INCIDENCE OF ANCA-ASSOCIATED VASCULITIS IN JAPAN: A PRELIMINARY REPORT FROM JAPAN-UK COLLABORATION STUDY.13ANCA-Workshop, April 26-29, 2007, Cancun, Mexico.
 39. E. Muso, K. Uno, T. Ito-Ihara, T. Komiya, K. Suzuki. Immomodulatory effect of intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in MPO-ANCA related polyangiitis with RPGN by amelioration of impaired IFN α production (IFN-P) . 13ANCA-Workshop, April 26-29, 2007, Cancun, Mexico.
 40. R A Watts, D G Scott, D J Jayne, S Kobayashi, K Suzuki, H Hashimoto and S Fujimoto EPIDEMIOLOGY OF RENAL ANCA-ASSOCIATED VASCULITIS IN THE UK AND JAPAN. 13ANCA-Workshop, April 26-29, 2007, Cancun, Mexico.
 41. W. Yumura, J. Yamashita, M. Itabashi, T. Nagao, A. Ishida-Okawara, T. Matsuo, A. Hasegawa, Y. Aratani, K. Nitta, T. Nakayama and K. Suzuki. Contribution of CD69 in MPO-ANCA-associated glomerulonephritis in mice. 13ANCA-Workshop, April 26-29, 2007, Cancun, Mexico.
 42. Kazuko Uno, Eri Muso, Toshiko Ihara, Toshiyuki Komiya, Yoshiki Omatsu, Yoko Mitsuishi, Kayo Inaba, Kazuo Suzuki. Comparison of IFN-alpha production in response to Sendai virus stimulation and the number of peripheral plasmacytoid dendritic cells in healthy subjects and patients with various diseases: Characteristics of MPO-ANCA-associated glomerulonephritis and vasculitis. 13ANCA-Workshop, April 26-29, 2007, Cancun, Mexico.
 43. K. Suzuki. Molecular Events on Damage of Glomerular Endothelial Cells bound with MPO-ANCA, International Symposium on Primary Systemic Vasculitis, September 29, 2007, Tokyo
 44. Kazuo Suzuki. Trace of Myeloperoxidase (MPO) in Vasculitis Development. The 2nd Asian Meeting on Synchrotron Radiation Biomedical Imaging. November 23-25, 2007, Jeju, Korea
 45. Kazuo Suzuki. Current Situation of Synthetic Immunoglobulins and Their Therapeutic Approach. International Conference on Regulation of Inflammatory Diseases Vasculitis and Asthma - 2008 in Chiba - Therapeutic Strategy for Vasculitis Based on International Collaboration Researches. January 18-19, 2008, Chiba, Japan.
 46. Kensuke Joh, Takashi Nakazato, Takao Sugiyama, Eri Muso, Wako Yumura, Shigeto Kobayashi, Kazuo Suzuki. Morphological variety of MPO-ANCA related renal small vessel vasculitis in Japan : Correlation between histological and clinical parameters. International Conference on Regulation of Inflammatory Diseases Vasculitis and Asthma - 2008 in Chiba - Therapeutic Strategy for Vasculitis Based on International Collaboration Researches. January 18-19, 2008, Chiba, Japan
 47. Yosuke Kameoka, Masahiro Furutani, Kazuo Suzuki. Prevalence of variety of artificial poly-clonal gamma globulin. International Conference on Regulation of Inflammatory Diseases Vasculitis and Asthma - 2008 in Chiba - Therapeutic Strategy for Vasculitis Based on International Collaboration Researches. January 18-19, 2008, Chiba, Japan.
 48. Shigeto Kobayashi, Shoichi Fujimoto, Kazuo Suzuki. Update Japan/EUVAS projects. March 3-4th 2008, Zurich.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）**
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

半導体などナノ粒子による薬剤・細胞伝達システムの開発
(H19-ナノ一般-012)

炎症性骨破壊における破骨細胞前駆細胞送達メカニズムの解明
ーバイオイメーキング手法を用いてー

分担研究者： 鈴木 恵子・昭和大学歯学部歯科薬理学教室・講師

協力研究者： 竹下 文隆・国立がんセンター研究所がん転移研究室・研究員

研究要旨

骨破壊の担当細胞である破骨細胞と、炎症細胞および免疫細胞が複雑に相互作用する炎症性骨破壊の病態解明のため、疾患モデル動物体外から観察できる破骨前駆細胞を用いてバイオイメーキング手法により実験を行った。その結果、全身的に投与した破骨前駆細胞が MCP1 および MIP1alpha の作用を介して炎症部位にリクルートされ、成熟破骨細胞へと分化することが確認された。また、現在開発中の治療薬の作用メカニズムについて、*in vitro*, *in vivo* 両面から評価できる成果を得ることができた。

A:研究目的

病的骨吸収疾患の効果的な治療法の開発を最終目的として、バイオイメーキング手法により骨破壊部位への破骨細胞前駆細胞の送達メカニズムを解明するために行った。

ヒトを含む動物は、成体においても骨吸収と骨形成がカップルした骨代謝を継続的に行い、常に骨改造を行うことにより身体支持・運動という動物にとって不可欠な機能を維持している。また、この両反応は厳密に制御される必要がある。ところが関節リウマチ、歯周病、骨転移腫瘍などでは骨代謝バランスの崩壊（骨吸収異常亢進）により、重篤な骨破壊が起こる。その結果、歩行困難・歯の喪失・耐え難い骨痛などが生じ、患者の QOL は

著しく損なわれる。これら成因の異なる複数の疾患において骨破壊を起こす唯一の細胞である破骨細胞は造血幹細胞に由来するが、多くの調節因子およびそれらの受容体を免疫・炎症に関与する細胞と共有するため、炎症性骨破壊の病態は極めて複雑である。たとえば関節リウマチでは増殖した滑膜細胞と免疫系の過剰な活性化により骨代謝バランスの崩壊が誘導されると考えられている。したがって、効果的な治療法の開発という最終目的を果たすためには、このように複数の細胞種が相互に関連する病的骨破壊機構の解明をめざす必要がある。本研究では、バイオイメーキング手法を中心として以下に示すような独自の研究手法を用いて *in vitro*, *in vivo* 両面から検討を行った。

1) 半導体ナノ粒子などを用いたバイオイメージング手法の確立

半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果によって強力な蛍光を出す。この物理現象は理論的には古くから証明されていたが、近年、レーザー共焦点顕微鏡など蛍光観察技術の進歩と相まって、医療・生物学への応用が確立され急速に進展している。半導体ナノ粒子は、蛍光強度が高いことに加えて、単一励起波長照射でも粒子サイズの差により異なる波長をもつ蛍光を発すること、また長時間の励起光照射によっても蛍光強度が減衰しないという特徴を持つ。そのため、蛍光減衰曲線を読みとることにより他の蛍光分子と区別することもできる。すなわち複数の蛍光あるいは発光特性をもつ分子と併用し、標的分子の細胞内および生体内での動態を追跡することで、時空間的な相互作用を解明することが可能である。このような可視化技術は非侵襲の状態でも体外からの観察が可能であることから、麻酔下で生きたままの動物、すなわち同一動物体内の変化を詳細に検討できるという極めて有用な手法である。

2) 炎症性骨破壊の病態モデル動物作製と骨破壊評価法の確立

転移部位において骨破壊を起こすT細胞リンパ腫由来細胞 (BW5147) から、我々がクローニングした新規骨吸収因子 γ -GTP (GGT) はリウマチ関節炎の患者、関節炎モデル動物で血中濃度上昇が認められたことから、病的骨破壊の原因物質のひとつであると考えられる。さらに歯周病菌由来 GGT をラット歯肉溝に投与することにより歯槽骨破壊が惹起された。

このときの組織レベルでの検討の結果、破骨細胞の局在は GGT 投与後の時間経過にもなつて2相性の変化を示された。すなわち、早期の破骨細胞集積はすでに近傍に存在していた成熟破骨細胞の遊走を示し、その後の変化は破骨細胞への分化能を有する細胞 (生体内においてはまだ同定されていない) が未知の全身を制御する情報伝達手段により活性発現部位 (骨破壊誘導局所) に送達されていることを示すものである。このことから、腫瘍骨転移と骨破壊部位への破骨前駆細胞の移動は共通因子により制御される類似のメカニズムによる可能性もあることが示唆された。さらに歯槽骨吸収、骨髄炎などに関与していると考えられる細菌由来の lipolysaccharide (LPS), lipopeptide により作製した炎症性骨破壊モデル動物を用いて実験をおこなう。従来、炎症性骨破壊は炎症反応により産生されたサイトカインなどにより、はからずも破骨細胞が活性化されてしまう望ましくない生体反応であると考えられていた。しかし、最近、破骨細胞による組織破壊は、炎症局所への細胞の速やかなリクルートに必要な反応であるという説も提唱されている。これを解明するために複数の細胞種がインタクトな状態で相互作用する *in vivo* の解析手法の確立をめざした。

B:研究方法

1) 培養破骨細胞形成系を用いる研究

本研究で使用する破骨前駆細胞は継代培養が不可能であるため、ラット

骨髄由来細胞を M-CSF, RANKL 共存下で培養することにより、成熟破骨細胞を誘導する。In vivo imaging への応用を想定して、ナノ粒子など、細胞を動物体外から可視化するための細胞調製の予試験を行う。また、実験によっては遺伝子欠損マウス由来の骨髄細胞を使用し、野生型と比較することにより破骨細胞分化や活性化に対する標的分子の必要性についても検討する。

2) 炎症性骨破壊モデル動物を用いる in vivo imaging
従来の我々の研究成果から、破骨細胞形成を促進することが示されている細菌由来成分である lipopolysaccharide (LPS) および lipopeptide をマウス頭蓋骨骨膜下に投与して炎症性骨破壊モデル動物を作製する。このマウスに luciferase transgenic (LucTg) または EGFP transgenic (EGFPTg) ラット由来骨髄細胞を adoptive transfer により移入し、細胞の生体内動態について IVIS™, OV110™ を用いて in vivo imaging を行う。

3) 炎症性骨破壊モデル動物についての生化学的検討
In vivo imaging 実験終了直後の動物から、頭蓋骨、頭部炎症皮膚、脾臓、骨髄を採取する。これらの組織から Lysing matrix™ を用いて total RNA を調製し、real time RT-PCR により遺伝子発現を調べる。

4) 炎症性骨破壊モデル動物についての組織化学的検討

In vivo imaging 実験終了直後の動物から、頭蓋骨、脾臓、大腿骨を採取する。凍結切片作製後、免疫蛍光染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡により標的分子の局在について検討する。

(倫理面への配慮)

本研究は昭和大学遺伝子組換え実験安全委員会 (承認番号: 0777, 0877)、昭和大学動物実験委員会 (承認番号: 19031, 19032) および国立がんセンター動物実験委員会 (承認番号: H19-A25M1) の諸規定を遵守して遂行した。

C:研究結果

1) 高輝度の蛍光を発するナノ粒子を負荷した破骨前駆細胞から成熟破骨細胞を誘導することができた。また、luciferase transgenic ラットの繁殖に成功し、このラットおよび EGFP transgenic ラット由来の骨髄細胞から野生型と同様の破骨細胞を誘導することができた。

2) In vivo imaging に用いたものと同一の個体を小動物用 X 線 CT スキャン装置 (Lucus eXplore; GE healthcare) で撮影・画像構築することにより、炎症部位での骨破壊の程度を数値化する方法を確立した。

3) LucTg ラット由来骨髄細胞を MCSF, RANKL 存在下で培養して破骨前駆細胞を調製した。この細胞を LPS, Pam3CSK4 投与により炎症性骨破壊を起こした SCID マウスに adoptive transfer により移入し、細胞の生体内動

態について *in vivo imaging* を行った結果、細胞移入後 3 日以内に骨破壊部位に Luc 由来の発光を観察することができた。これに対して、前駆細胞に分化していない主としてリンパ球からなる骨髄細胞画分を投与した場合には、2 次リンパ節を中心として全身的に分布していたことから、破骨細胞前駆細胞のみが、炎症部位に特異的にリクルートされることが示された。

4) 骨破壊部位における細胞についてさらに詳細に検討するために、EGFP Tg ラット由来の骨髄細胞を用いて、同様の *in vivo imaging* を行った結果、炎症を惹起したマウスでは頭蓋骨に蛍光をもつ多核細胞が分布することが示された。凍結切片を作製して免疫染色後、レーザー共焦点顕微鏡により観察した結果、多核で TRAP 活性をもつ EGFP 陽性細胞が確認された。このことから、移入したラット由来前駆細胞がホストであるマウス体内で成熟破骨細胞へと分化したことが示された。

5) LucTg ラット由来の破骨前駆細胞を移入したマウスの頭蓋骨サンプルの遺伝子発現について *real-time RT-PCR* により解析した結果、*luciferase*, *rat GAPDH* の発現、さらに *rat TRAP mRNA* 量の増加がみられたことから、全身投与した骨髄細胞由来の破骨前駆細胞が炎症部位まで遊走し、TRAP 活性を有する破骨細胞へと分化したことが示された。また、現在開発中の治療薬および Zoledronate 同時投与により当該遺伝子の発現は部分的に減弱したことから、治療薬により前駆細胞のリクルートが抑制されると考えられた。

LPS および Pam3CSK4 を投与したマウスの頭蓋骨の遺伝子発現について *real-time RT-PCR* により解析した結果、骨吸収マーカー (TRAP, *cathepsinK*, *MMP9*)、炎症性サイトカイン (*TNFalpha*, *IL1beta*, *IL6*)、および (*MCP1*, *MIP1alpha*) の発現上昇が認められた。

D: 考察

1) 達成度について

本研究の 2 つの目的、すなわち、① 半導体ナノ粒子などを用いたバイオイメージング手法の確立、② 炎症性骨破壊の病態モデル動物作製およびその評価法の検討について順調に成果をあげることができた。とりわけ、イメージングに使用するナノ粒子負荷および EGFP 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子を恒常的に発現させた破骨前駆細胞からも通常通り成熟破骨細胞が形成されることが確認されたこと、さらに生きたままの麻酔動物のエックス線 CT 画像取得および骨形態計測法を確立することもでき、今後、本研究を継続することで一定の成果が得られると考えられる。

また、以上の結果にもとづいて現在論文作成中である。

2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について

生きたままの動物を使用した *In vivo imaging* は国際的にみてもまだ例が少なく先進的な研究である。これに培養細胞系を用いた分子生物学・細胞生物学的な研究成果を加えることにより、トランスレーショナル・リサーチとして当該分野の学術的発展に多大な影響を与えること

が予想される。また本研究において確立した病態モデル動物での実験は、麻酔下で同一動物での時空間変化が検討できるため、得られる結果は、実際に生体内で起きている事象を忠実に反映することから信頼性が高く、動物数削減の観点からも有用な手法である。すなわち、最低限の動物使用により、ヒトでの疾患治療薬開発に貢献する重要な示唆を与える可能性が高い。現在の高齢社会において、人々がより健康かつ明るい人間的な生活を送るためには、自分の体重を支え、自由に移動するのに十分な強度をもつ骨格を保ち、会話や食事の楽しみを享受できるよう、健全な歯を維持することにつながる本研究の成果は社会的に非常に大きな意味をもつと考えられる。

3) 今後の展望について

In vivo imaging 手法を用いた研究により種々の標的分子および細胞の生体内動態の追跡ができるようにする。そのため、最終分化に至る途中段階の分化マーカー遺伝子をナノ粒子でラベルしたプローブに加え、蛍光蛋白発現ベクターをつないだプローブを導入した破骨前駆細胞をマウスに移入して in vivo imaging 手法を用いて観察する。これにより、蛍光強度の減衰曲線の差から、複数のマーカー分子が区別できるようにする。また炎症性骨破壊の病態を解明するとともに、現在開発中の治療薬（本年度、骨形成促進薬として東北大と共同で海外特許出願）を適用してその有効性について同時に解析可能にする予定である。

E: 結論

生きたままの炎症性骨破壊モデルマウスにおいて、全身的に投与したラット由来の破骨前駆細胞が炎症部位に観察された。この現象は遺伝子解析および免疫組織化学的解析の結果からも確認され、全身循環血中の前駆細胞が炎症部位にリクルートされることにより、急激な骨破壊が惹起されることが示された。また、現在開発中の骨吸収疾患治療薬について、前駆細胞の炎症局所への遊走抑制が作用メカニズムのひとつであると考えられる。

F: 健康危機情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G: 研究発表

1. 論文発表

1 Keiko Suzuki and Shoji Yamada: Functional significance of intracellular form of osteopontin in the migration and fusion of osteoclasts. *Dentistry in Japan*, 43: 150-153, 2007.

2 Hisashi Shinoda, Sadaaki Takeyama, Keiko Suzuki, Shinobu Murakami and Shoji Yamada: Pharmacological topics of bone metabolism: A novel bisphosphonate for the treatment of periodontitis, *J Pharmacol. Sci.*, 106: 555-558, 2008.

3 Triacylated lipopeptide, a component of Gram-positive bacteria, induces osteoclastogenesis in the absence of RANKL and resorbs calvarial bone *in vivo* through Toll-like receptor 2. Oral

Ther Pharmacol, in press.

4 Nobuhiro Sakai, Keiko Suzuki, Tomio Morohashi and Shoji Yamada: Na⁺/Ca²⁺ exchanger mRNA and orientation of F-actin filaments in cultured osteoblastic cells. Dent Med Res, in press.

2. 学会発表

1 鈴木恵子、山田庄司：“メタボローム解析による難治性疾患治療法の基盤構築—リウマチ関節炎発症メカニズムの解明”（平成 18 年度昭和大学共同研究成果発表会, Tokyo, March 2007）

2 Keiko Suzuki, Sawako Moriwaki, Shumpei Niida, Shoji Yamada. γ -glutamyltranspeptidase (GGT), a marker of inflammation, induces osteoclastogenesis by stimulating cytoskeletal rearrangement of preosteoclasts. (The 80th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Nagoya, March 2007)

3 Hisashi Shinoda, Sadaaki Takeyama, Keiko Suzuki, Shinobu Murakami, and Shoji Yamada. A novel bisphosphonate for the treatment of periodontitis. (The 80th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Nagoya, March 2007)

4 Keiko Suzuki, Sadaaki Takeyama, Shinobu Murakami, Hisashi Shinoda and Shoji Yamada. Relationship between bone resorption and bone formation in neonatal calvaria cultured

with bisphosphonates. (The 25th Annual Meeting of The Japanese Society for Bone and Mineral Research, July 2007)

5 Keiko Suzuki, Susan R. Rittling, David T. Denhardt, Shoji Yamada and Jaro Sodek. Intracellular Form of Osteopontin Plays an Important Role in Osteoclastogenesis and Bone Resorption. (Gordon Research Conference, Biddeford, USA, August 2007)

6 S. Moriwaki, K. Suzuki, M. Takami, K. Ikeda, S. Niida. GGT gamma-Glutamyltranspeptidase) Stimulates Osteoclast formation by Acting Directly on Osteoclast Precursor Cells. J Bone Min Res, 22 (suppl 1) (29th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Hawaii, USA, September 2007)

7 鈴木恵子、山田庄司：骨吸収メカニズムの解明とそれに基づいた創薬の試み、(ハイテクリサーチセンター整備事業成果報告会、Tokyo, March 2008)

8 Keiko Suzuki, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto and Shoji Yamada: Pam₃CSK₄, a TLR2 agonist, induces osteoclastogenesis RANKL-independently. (The 81st Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Yokohama, March 2008)

9 Keiko Suzuki, Susan R. Rittling, David T. Denhardt, Shoji Yamada and Jaro Sodek: Immunocytochemical

Analysis of Osteopontin Function in Osteoclast Formation and Activation (CIHR Group in Matrix Dynamics Symposium, Toronto, May 2008)

10 村上忍、竹山禎章、鈴木恵子、山田庄司、篠田壽：歯周病治療薬としての [(4-methylthio) phenylthio] methanebisphosphonate の妥当性 (日本薬理学会北部会、Sendai, September 2008)

11 篠田壽、村上忍、竹山禎章、鈴木恵子、山田庄司：ワークショップ「歯周疾患による骨量減少の薬物療法」骨形成作用をもつ新規ビスホスフォネートに関する知見 (第 50 回歯科基礎医学会学術大会、Tokyo, September 2008)

12 森脇佐和子、鈴木恵子、宮内睦美、高田隆、新飯田俊平：細菌由来の gamma-グルタミルトランスペプチダーゼは骨破壊因子か (第 50 回歯科基礎医学会学術大会、Tokyo, September 2008)

13 鈴木恵子、新飯田俊平、山田庄司：Toll-like receptor 2 アゴニストによる RANKL-および TNFalpha-非依存的な破骨細胞誘導 (第 26 回日本骨代謝学会、Osaka, October 2008)

14 川添祐亮、宮内睦美、田口明、田妻進、鈴木恵子、新飯田俊平、高田隆：胆汁うっ滞性肝疾患に伴う gamma-glutamyl transpeptidase 血症が骨破壊に及ぼす影響について (第 26 回日本骨代謝学会、Osaka, October 2008)

15 Keiko Suzuki, Fumitaka Takeshita,

Takahiro Ochiya, Kenji Yamamoto and Shoji Yamada: Visualization of preosteoclast movement in a murine model of inflammatory osteolysis induced by lipopolysaccharide. (The 82nd Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Yokohama, March 2009)

16 鈴木恵子、山田庄司：「炎症・免疫システムの新たな paradigm による病態の解明と治療法の開発」—炎症性骨破壊における破骨細胞の動態— バイオイメージング手法による解析— (平成 20 年度昭和大学共同研究成果発表会, Tokyo, March 2009)

17 鈴木恵子、山田庄司：炎症性骨破壊モデル動物における破骨細胞の体内動態 (第 27 回日本骨代謝学会、Osaka, Sep 2009)

18 篠田壽、鈴木恵子、村上忍、竹山禎章、山田庄司：Anabolic な作用を持つ新規ビスホスホネート、[4-(methylthio) phenylthio] methanebisphosphonate (第 27 回日本骨代謝学会、Osaka, Sep 2009)

19 篠田壽、鈴木恵子、村上忍、竹山禎章、山田庄司：新規ビスホスホネート、[4-(methylthio) phenylthio]

methanebisphosphonate の骨形成促進作用 (第 60 回日本薬理学会北部会、Toyama, Sep 2009)

20 Keiko Suzuki, Fumitaka Takeshita, Kenji Yamamoto, Shoji Yamada and Takahiro Ochiya: Recruitment of osteoclast

precursor cells into the inflammatory site where extensive bone destruction occurs. (The 83rd Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Yokohama, March 2010)

2 1 鈴木恵子、山田庄司：「炎症・免疫システムの新たな paradigm による病態の解明と治療法の開発」
—炎症性骨破壊における破骨細胞の動態—バイオイメージング手法による解析—（平成 21 年度昭和大学共同研究成果発表会，Tokyo, March 2010）

3. その他の業績

- 1 IN Cell Image Competition 2010, アジアチャンピオン
- 2 Bio Techniques, 48(3) 表紙掲載

H:知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

特許出願

- 1 [4-(メチルチオ)フェニルチオ]メタンビスホスホン酸又は薬学的に許容され得るその塩を有効成分とする骨形成促進剤（特願 2008-225484）
- 2 [4-(メチルチオ)フェニルチオ]メタンビスホスホン酸又は薬学的に許容され得るその塩を有効成分とする骨形成促進剤（PCT/JP2009/003758）

半導体などナノ粒子による薬物・細胞伝達システムの開発

(H19-ナノ-一般-012)

量子ドットを利用した硝子体可視化の試み

分担研究者：山本 悟・国家公務員共済組合連合会横浜栄共済病院眼科・部長代行

協力研究者：山本 健二・国立国際医療センター研究所・副所長

協力研究者：星野 昭芳・国立国際医療センター研究所・流動研究員

協力研究者：真鍋 義則・国立国際医療センター研究所・研究生

協力研究者：藤岡 宏樹・国立国際医療センター研究所・研究生

研究要旨

本研究は、一桁ナノメートルサイズの量子ドットを用いて、生物・医療分野に利用できるように、表面加工および表面修飾したものを透明な眼球硝子体腔に入れることによって量子ドットが持つ蛍光で硝子体を染色し、硝子体の詳細を観察可能なようにするものであり、これによって安全で簡易な硝子体手術も可能となる。これらにより硝子体が引き起す眼疾患の病理の解明や治療法の進歩に貢献することを目指す。

A. 研究目的

近年、多くの眼疾患が硝子体の病理学的及び／又は生理学的変化と関連していることが知られてきている。たとえば、加齢による硝子体の液化融解（liquefaction）は網膜剥離や網膜裂傷（retinal tear）を誘導し、また黄斑浮腫（macular edema）は黄斑（macula）への硝子体牽引（traction）に関連し、それぞれを原因として重症例、進行例では失明をもたらす。

そのため、硝子体内の混濁状態や病変の有無を観察することは重要である。しかし、硝子体は透明なゲル上物質から構成されるため、硝子体内の観察は困難であり、日常的な臨床的状況で透明な硝子体を観察するための適切な方法はない。

更に、硝子体の手術においても透明なゲルを対象とするため視認性の高い組織の手術に較べると難しく、また、手術によるリスクも高い。

以上のことから日常的な診断及び／又は手術において、眼の硝子体を簡便に安全に観察し得る手段及び方法を提供することを目的とする。

B. 研究方法

ナノ粒子を摘出豚眼内に27Gの注射針にて注入し、日常外来で使用する細隙灯顕微鏡で観察する。

他の染色材料も同様に注入して比較検討を行なう。

また、硝子体手術を豚眼にてシュミレーションし、注入したナノ粒子で染色された豚眼と、その他の染料にて染色された豚眼における手術の簡易性・安全性を比較検討

する。

C. 研究結果

他の染料に比べ、ナノ粒子によって染色された硝子体の観察は容易であり、詳細を観察し得る。

また、硝子体手術においても、ナノ粒子で染色された硝子体の切除は簡易で、かつ安全性が高かった。

また、眼科臨床用細隙灯顕微鏡にての記録をするために家庭用ハイビジョンビデオカメラを用いた記録システムを考案した。

D. 考察

1. 達成度について

豚眼による実験にて良好な結果を得ているが健康危険対策に更なる改良を試みてゆく方針である。

2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

1) 学術的意義

硝子体が可視化されることによって眼科学の進歩が期待される。

2) 国際的意義

国際学会にて他国の学者より関心が向けられている。

3) 社会的意義

日々の臨床における診察治療から手術治療に及ぶまで適応範囲は広く、社会的意義は高いと思われる。

新たに考案した安価な細隙灯顕微鏡用観察システムは一般眼科臨床においても患者や家族への眼科疾患の説明や疾患の記録に有益であり、このシステムが広まることによる社会的意義も高いと考えられる。

3) 今後の展望について

上記達成度にも記してあるが健康危険対策を充実させ、より早く臨床分野への普及を促進させたいと考えている。

また、細隙灯顕微鏡用観察システムについては、今後論文発表などによって認知度を上げてゆきたいと考えている。

E. 結論

ナノ粒子は日常臨床における硝子体観察には有用な染料となり得る。

また、硝子体手術においては、ナノ粒子利用によって、より簡易で安全性の高い手術とすることが可能である。

F. 健康危険情報

本研究で使用している QD に関して更に安全性の高いものを目指して研究中である。

G. 研究発表

1. 論文発表

○1) 欧文

Visualizing Vitreous Using Quantum Dots as Imaging Agents Satoru Yamamoto, Noriyoshi Manabe, Kouki Fujioka, Akiyoshi Hoshino, and Kenji Yamamoto IEEE Transactions on Nanobioscience. Vol. 6, No. 1 March 2007

High-Definition Slit Lamp Video Camera System Satoru Yamamoto, Noriyoshi Manabe, Kenji Yamamoto Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging (In Press)

2. 著書

なし

3. 学会発表

1) 国際学会

1) Manabe N, Yamamoto S, Fujioka K, Hoshino A, Yamamoto K. IMAGING TRANSPARENT VITREOUS OF THE EYE USING NANO PARTICLES, Particles 2008 (May. 10-13, 2008) (Orlando, Florida, U.S.A.)

2) S. Yamamoto, N. Manabe, A. Hoshino, K. Yamamoto, Application of colloidal quantum dots to visualization of transparent vitreous of the eye at clinical situation, Bios 2006 (Photonics West) (January, 2006, San Jose, California, U.S.A.).

(国際シンポジウム)

1) Hoshino A, Yamamoto S, Manabe N, , Fujioka K, , Yamamoto K., Visualizing invisible vitreous using Aqueous Colloidal Quantum Dots as Imaging Agents. AMN-3 Third International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology (February 11-16 Wellington New Zealand)

2) Satoru Yamamoto, An application of quantum dots in ophthalmology, International Symposium on Colloidal Quantum Dots for Biomedical Applications and Their Safety (November 2005 Kobe, Hyogo, Japan)

2) 国内学会

1) 「蛍光ナノ粒子を用いた硝子体病変の視覚化」

真鍋法義, 山本悟, 藤岡宏樹,

星野昭芳, 山本健二

(国立国際医療センター研,

横浜栄共済病院, 東京医歯大院)

第45回日本臨床分子医学会学術集

会

神戸

平成20年7月

2) 「ナノ粒子を用いた硝子体病変の視覚化」

真鍋法義, 山本悟, 藤岡宏樹,

星野昭芳, 山本健二

(国立国際医療センター研,

横浜栄共済病院, 東京医歯大院)

粉体工学会秋期研究発表会

大阪

平成19年10月

3) 「量子ドットの一つの医療応用」

山本悟1)、星野昭義2)、真鍋法義2)、
山本健二2)

1) 国家公務員共済組合連合会横浜栄共
済病院、2) 国立国際医療センター

ナノ学会第4回大会

京都大学百周年時計台記念館

平成18年5月19日

4) 「水溶性量子ドットを用いた

硝子体病変の視覚化」

真鍋法義, 山本悟, 藤岡宏樹,

星野昭芳, 山本健二

(国立国際医療センター研,

横浜栄共済病院, 東京医歯大院)

第15回日本バイオイメーキング
学会学術集会

岩手医科大学60周年記念館

平成18年11月1日

5) 「硝子体病変の可視化～水溶性量子ドットを用いて～」

真鍋法義, 山本悟, 藤岡宏樹,

星野昭芳, 山本健二

(国立国際医療センター研,

横浜栄共済病院, 東京医歯大院)

第127回日本薬学会

富山

平成17年3月15日

4.知的所有権の出願・取得状況

1) 特許出願

発明の名称 蛍光ナノ粒子を含む眼の硝子
体染色剤及び染色方法

請求項1 蛍光ナノ粒子を含む眼の硝子体
染色剤。

請求項2 蛍光ナノ粒子が、コア単層構造
又はコア・シェル重層構造を有する、請求
項1記載の染色剤。

請求項3 蛍光ナノ粒子が、半導体元素を
含む、請求項1または2記載の染色剤。

請求項4 請求項1～3のいずれか1項記
載の染色剤を眼の硝子体に注入すること
を含む、眼の硝子体の染色方法。

特許願

整理番号 P005HST-30

受付番号 50600113344

提出日 平18.1.23

出願番号通知 (事件の表示)

特願2006- 13760

特許庁長官よりの受領書

(平成18年1月23日付け)

識別番号 100113402

氏名(名称) 前 直美

2) その他なし

総括

表面加工および表面修飾した量子ドットを豚眼の透明な眼球硝子体腔に入れることによって量子ドットが持つ蛍光で硝子体を染色し、硝子体の詳細を観察可能にする実験を行なってきた。

これによりナノ粒子によって染色された硝子体の観察は容易であり、詳細を観察し得ることが判明した。

また、量子ドットを注入した豚眼を使用して硝子体手術を試みたところ、量子ドットで染色された硝子体の切除は簡易で、かつ安全性が高いことも判明した。

以上のことから日常臨床における硝子体の診断において、眼の硝子体を容易に観察し得る方法と硝子体手術に関しては簡易で安全性の高い手術法を提供することができるのではないかと考えられた。

また、硝子体が引き起す眼疾患の病理の解明や治療法の進歩に貢献することも期待される。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）分担総合研究報告書

半導体などナノ粒子による薬剤・細胞伝達システムの開発

(H19-ナノ一般-012)

ナノ粒子標識による癌特異抗体のシグナル増強と診断法の確立

研究分担者	馬目 佳信	東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター DNA医学研究所・分子細胞生物学・教授
研究協力者	渡辺 美智子	東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター DNA医学研究所・分子細胞生物学・講師
研究協力者	藤岡 宏樹	東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター DNA医学研究所・分子細胞生物学・助教
研究協力者	真鍋 法義	財団法人医療機器センター 流動研究員 国立国際医療センター研究所 協力研究員
研究協力者	野村 真弓	東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター DNA医学研究所・分子細胞生物学・技術員
研究協力者	都丸 慶子	東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター DNA医学研究所・分子細胞生物学・技術員
研究協力者	星野 昭芳	東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 医用エンジニアリング研究室・ポストドクト ラルフェロー

研究要旨

本研究は分担者らが1996年に樹立したヒト甲状腺癌に対する特異抗体（JT95抗体）に対しナノ粒子修飾を行うことで抗体の癌特異的シグナルの増強を図り、診断・治療応用に向けた最適診断条件の確立を目的としている。この特異抗体によるがんの確定診断は生体への侵襲を考慮し、簡便で非侵襲的な血液や尿による診断を最終目標と設定している。

本研究期間においては、最終目標に向かうための第一段階として、JT95抗体のカドミウム・セレン量子ドット（QD）による直接標識、並びに抗IgM抗体とQDを組み合わせた三段階反応について、その活性、及び応用の評価を行なった。

ELISA様システムやウェスタンブロッティングによる活性測定では抗体が本来の活性を失うことなく甲状腺癌抗原と特異的に反応することが確認できた。また、免疫組織染色でも甲状腺癌抗原を特異に認識し染色できることが蛍光顕微鏡像により示された。

このJT95が認識するがん抗原は糖鎖ファイブロンクチンであり、甲状腺癌組織には固有の修飾変異型で発現しがんの転移・増大に大きく関与するとされている。本研究を進展させ、甲状腺癌特異的認識抗体によるがんの早期診断システムを開発することによって、現在、甲状腺癌の確定診断に用いられているFine Needle Aspiration (FNA)：穿刺吸引細胞診を補完し、より非侵襲的で患者の負担を軽減した診断が可能となる。

A:研究目的

本研究の目的は甲状腺癌の非侵襲的な診断システムを構築するためのナノ粒子直接・間接標識による癌特異抗体のシグナル増強と診断法の確立である。

研究の重要な要素はシステム構築の基本となる癌抗原検出抗体の特異性である。本研究でナノ粒子標識のターゲットとした JT95 モノクローナル抗体は免疫原としてヒト甲状腺乳頭癌の膜分画を用いている。作製過程で 2,400 以上の抗体産生ハイブリドーマから選択された JT95 抗体は正常組織とは反応せず、甲状腺癌を特異的に認識する。甲状腺癌の 90%以上を占める甲状腺乳頭癌患者の免疫組織染色法では 158 例のうち 151 例に陽性を示し陽性率は 95%以上であった。この特異性は抗体樹立当初より甲状腺癌の診断に適していると考えられており、選択的な分子標的治療を行なえる可能性が示唆されてきた (Takeyama H et al., *Cancer Res.*, 56: 1817-1822, 1996)。

JT95 抗体が認識する癌特異抗原は 250 kDa の糖鎖修飾型ファイブロネクチンであり、この抗原は患者血清中にも 105 kDa の分泌型として存在し、甲状腺癌患者血清を試料とした ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)法では転移・再発甲状腺癌で 80%,初発甲状腺癌では 51%に陽性という検出結果を得ている。

本研究では、この JT95 抗体と蛍光ナノ粒子(QD)とを組み合わせることによって、シグナルの増強を図り、更なる高精度な診断システムを構築することを目的としている。

B:研究方法

(a) 細胞:甲状腺癌細胞 SW1736 細胞株、及びそのタンパク抗原をサンプルとして用いた。

(b) 検出法: 3つの生化学的手法 (1) 細胞染色、(2) ウェスタンブロッティング、(3) 96 穴プレートを用いた ELISA 様システムにて抗原への反応を検証した。細胞染色像は、35mm glass bottom dish、または、チャンバースライドに培養した SW1736 細胞に対し、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss; LSM510)、3D ライブセル光学顕微鏡 (Delta Vision; Applied Precision)、または、蛍光顕微鏡(BZ-9000; Keyence)を用いた。

(c) 検出抗体の作製: JT95 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは無血清培地・COSMEDIUM001(コスモバイオ社)で5日間培養した後、遠心し上清中に産生された抗体をスタートサンプルとした。培養上清(抗体含有)は遠心フィルターデバイス(ミリポア社 セントリコン・プラス・70)を用いて濃縮後、HiTrap-IgM アフィニティカラム (GEヘルスケア社)による精製または Sephacryl S-300 カラムによって分画し最終精製を行なった。活性確認用の ELISA 抗原としてはヒト甲状腺癌細胞 SW1736 と膵臓癌細胞 MIAPaCa のタンパク (cell lysate)、および SW1736 培養上清タンパクを 10 µg よりダブルダイリューションを行って用いた。同抗原を ELISA プレートに固相化し 4 °C/一晩反応させた。その後ペルオキシダーゼ標識抗マウ

ス IgG, M を 60 分作用させた後、基質の TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) を反応させて 450 nm の吸光度を測定した。

- (d) 検出試薬：甲状腺癌特異的抗体 JT95 への QD の直接標識 (平成 20 年度)、並びに間接標識 (平成 21 年度：ビオチン化抗マウス IgM 抗体、及び QD-streptavidin) で検出を行なった。抗体の対照群として正常マウスから採取した IgM (Normal IgM) を用いた。
- (e) 抗体へのナノ粒子の直接標識法：JT95 抗体は 5 量体の IgM であり定常域が J 鎖で結合されている。このため蛍光色素やマイクロビーズなど通常の分子イメージングや診断に用いられる担体とは結合が難しく、臨床応用を図るには、確実な担体修飾の条件検討が必要とされている。このことから、まず、安定した修飾法確立のため標識ナノ粒子として、カドミウム・セレン量子ドットを選び抗体・量子ドット結合体の作製を行なった (量子ドットはインビトロジェン社の 655ITK™ Carboxyl Quantum Dots を用いた。

量子ドットは、数百～数千の半導体物質をコアとした蛍光特性を有するナノクリスタルで、従来の蛍光物質の欠点とされていた退色を限りなく少なくし、微弱反応の増強・安定した蛍光強度の持続などの利点を有する。ナノ粒子による標識は Borate buffer を用いて、架橋試薬には EDC、NHS あるいは sulfo-NHS (Pierce Biotechnology) を用いて結合を行なった。標的抗体 JT95 には抗体本体

(IgM タンパク) へ標識を行う事とした。

上記試薬による結合抗体は脱塩カラム (Microspin column) により残存試薬除去の後、限外ろ過フィルター (Microcon Ultra-cell YM100) による精製を行なった。濃度は無修飾量子ドットの蛍光を基に算定した。

標識に際し、十分な量子ドット結合能が得られなかった場合には反応官能基を酸性のカルボキシル基から塩基性のアミノ基に換えて結合を試み、最も有効な標識抗体の作製方法を試みた。

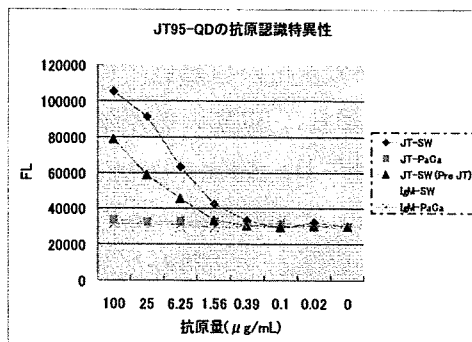
C:研究結果

1. QD 直接標識抗体を用いた検証：量子ドット (Qdot 655 ITK™ Carboxyl Quantum Dots) による標識結合体作製は JT95 抗体、および対照としての非免疫マウス由来・精製 IgM に対し合計 5 回行われた。いずれもアフィニティカラム精製 JT95 抗体: 0.1 mg・1 mg をスタートサンプルとした。最終的な標識結合体濃度は Normal IgM-QD が平均 45nM、JT95-QD は 12-30nM であった。

各回の JT95-QD および対照 Normal IgM-QD 試料について ELISA 法、ウエスタンブロット法および免疫組織染色法による抗体活性の測定を行なった。その結果、図 1 に示したように、甲状腺癌抗原に対し特異活性を有する量子ドット結合体の作製を行う事が出来た。

図 1. JT95-QD 直接標識抗体の活性 :

- (1) JT-SW; JT95-QD の SW1736 甲状腺がん細胞に対する活性
- (2) JT-SW(Pre JT); (1)に対して、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の JT95 抗体を前処理し、JT95-QD の活性を阻害したもの
- (3) JT-PaCa; JT95-QD の MIAPaCa 膵臓がん細胞に対する活性
- (4) IgM-SW; Normal IgM-QD の SW1736 甲状腺がん細胞に対する活性
- (5) IgM-PaCa; Normal IgM-QD の MIAPaCa 膵臓がん細胞に対する活性



同時に行なったウェスタンブロッティングによる活性測定でも目的とする甲状腺癌特異的な 250 kD および 105 kD のタンパク位置に QD の蛍光を確認することができた (データ未掲載)。また、共焦点レーザー顕微鏡による解析では、対照 Normal IgM-QD の非蛍光確認と同条件で JT95-QD が甲状腺癌を特異的な蛍光を検出が確認できた。3D ライブセル光学顕微鏡では、SW1736 細胞の細胞膜が染色されている像が観察された (データ未掲載)。

2. QD 間接標識を用いた検証 : 蛍光顕微鏡観察、ウェスタンブロッティング、

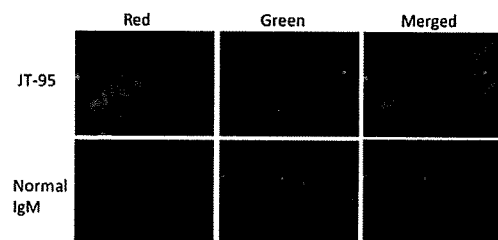
及び ELISA 様システムにおいて、抗原を特異的に検出することに成功した。

(1) 細胞染色 :

JT95 抗体と QD によって、甲状腺がん細胞株 SW1736 を特異的に染色することに成功した (図 2)。対照群の GFP 発現 U937 細胞は染色されず、また、Normal IgM でも細胞は染色されていない。更に、従来法の一つである phycoerythrin (PE) 染色では、JT95 を示す赤い蛍光が、緑の検出範囲に漏れることがあったが、QD では漏れが見られなかった (データ未掲載)。

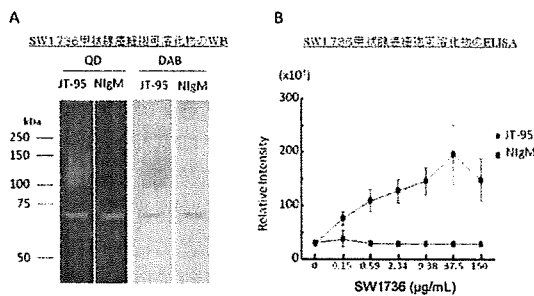
(2) ウェスタンブロッティング : QD で染色した場合、従来法の diaminobenzidine (DAB) 染色と比較して、検出されたタンパク質は同様であったが、バンドの視認性が良くなった (図 3A)。

図 2. JT95 抗体と間接標識 QD による、SW1736 細胞と GFP 発現 U937 細胞の染色。Normal IgM (対照群); 正常マウス IgM



(3) ELISA 様システム:これまで報告されていた 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の検出範囲 (Takeyama et al., *Cancer Res.*, 1996)よりも、検出限界が約 6.7 倍高い 0.15-37.5 ng/mL まで検出が可能であった (図 3B)。Normal IgM では、測定値が上昇しなかった。

図 3. JT95 抗体と QD による抗原の検出。(A) ウェスタンブロッティング法。(B) 96 穴プレートを用いた ELISA 様システム。



D: 考察

1. 達成度について:

平成 20 年度より開始された本研究は、カドミウム・セレン量子ドットを甲状腺癌特異的抗体 JT95 抗体へ直接的、または間接的に標識することに成功し、甲状腺がん抗原の検出感度を高めることに成功した。

特に、一般的に直接標識が困難とされている IgM 抗体へのナノ粒子標識を、結合条件の適正化により成功させたことは、JT95 を使った検出試験のブレークスルーとなった。これにより、さらに *in vitro* での有効性の検討、今後の動物実験への使用が可能となった。

2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について:

2008 年の U.S. National Cancer Institute (NCI) の発表によれば、米国では女性における甲状腺がんの発生率が 1973 年から 2002 年の間に約 2.4

倍の上昇を示した (L. Davies et al., *JAMA.*, 295: 2164-2167, 2006)。韓国でも Korea Central Cancer Registry (KCCR) は甲状腺がん発生率が男女を合わせた部位別全がん発生順位で肝臓がんを抜いて全体の第 4 位となったことを報じている。同様に日本でも甲状腺がんの発生率は女性の全がん発生順位の上位には含まれていないものの、1975 年より上昇を続け 1980 ~ 1990 年の 10 年で 2.8 倍という高い値を示し、増加傾向は現在も続いている。急激な発生率増加の原因として 1970 年以降の診断機器の進歩や診断基準の変化が言われている。

しかし、NCI の癌疫学・遺伝学研究部門の Dr. Susan Devesa によれば、発生した甲状腺癌の 87% は 2 cm より小さい微小な乳頭癌だが、4-5 cm 以上もある腫瘍も検出され単に物理的/病理学的原因とは限定しにくく他の要因 (例えば CT スキャンにおける大量の放射線が潜在的なリスクとなるか) も考慮し研究を進めるべきとされている。このように甲状腺がんの早期診断、確定診断システムの開発が早急に求められている状況にあり、本研究は早期診断、確定診断に加え、非侵襲的な方法を目指していることから、本高感度検出システム開発の成功は国際的にも評価されるものと思われる。

3. 今後の展望について:

JT95 モノクローナル抗体の認識する抗原が糖鎖修飾型ファイブロネクチンであることはヒト甲状腺癌細胞株:

SW1736 培養上清より行われた抗原解析より明らかにされている (Kimura N. et al., *Biochem. Biophys. Res. Com.* 251(2): 449-453, 1998)。また、2007 年に申請者らのグループは JT95 が確定診断・予後診断にも応用できる可能性について報告した。FNA 法で甲状腺癌と診断され 10-12 年のフォローアップを行った 57 症例のうち再検査後・良性と診断された 10 症例について、FNA 法による診断と平行して行った JT95 による免疫染色結果では、10 症例のうち 9 症例で当初より陰性 (癌抗原が存在しない) としており、また、フォローアップ期間内に再発した 6 症例についても JT95 は当初より 6 症例全例が陽性 (癌抗原存在) であるという結果を示していた。これらの症例について、再検査でも 6 症例中 5 症例のみを悪性と診断した FNA 法に比べ、JT95 は信頼性が高いことが明らかとなり、この抗体による今後の診断・治療への応用展開が有望であることが示されている (Takeyama H, et al., *Pathol. Res. Pract.* 203(7): 507- 15, 2007)。

JT95 抗体は、IgM 抗体であるため、IgG 化やフラグメント化によって、更なる抗原特異的親和性が得られる可能性もある (Fujioka K, et al., *J Nanomater.* (2010))。将来的に、最適化した抗体を用い、本研究で遂行した QD による高感度検出システムを組み入れることによって、より精度を高め、血液や尿からといった、より低侵襲な診断が可能になると考えられる。

E:結論

以上のように、本研究では半導体ナノ粒子を直接的に、または間接的に標識した JT95 抗体がその活性を失うことなく高感度に甲状腺がん癌抗原を検出できることを証明した。

特に JT95 抗体はこれまでカドミウム・セレン半導体ナノ粒子の有効な結合が報告されていない IgM タイプのモノクローナル抗体であり、IgG タイプ以外の抗体に対しても安定した標識が行えること証明できた。

本研究成果は、より安全性を有する量子ドット(シリコンナノ粒子など)を用いることによって生体への安全性が確立されれば、動物体内に応用することも可能となり、がん診断領域において、これまでよりも簡便・確実・非侵襲的な診断・治療を可能にするであろう。このことは、急激な患者の増加が問題となっている本疾患に対し大きな福音となり、臨床応用の期待は更に高まると考えられる。

F:健康危機情報

なし

G:研究発表

1. 論文発表

1. Kouki Fujioka, Noriyoshi Manabe, Mayumi Nomura, Michiko Watanabe, Hiroshi Takeyama, Akiyoshi Hoshino, Sanshiro Hanada, Kenji Yamamoto, and Yoshinobu Manome; Detection of thyroid carcinoma antigen with

Quantum dots and monoclonal IgM antibody (JT-95) systems, *J. Nanomater.* (2010). *Accepted.*

3. その他の業績
なし

2. 学会発表

1. 藤岡宏樹、山本健二; 半導体ナノ粒子の生物・医療応用とその安全性, 第7回 Cell Biology Summer Meeting 2008: 基調講演, 2008年7月5-6日(千葉県 鴨川市)

H:知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
なし

2. Michiko Watanabe, Hiroshi Takeyama, Yoshinobu Manome; DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A THYROID CANCER SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY. 8th International Conference of Anticancer Research. 17-22, October 2008., Kos, Greece.

3. 藤岡宏樹、星野昭義、真鍋法義、花田三四郎、昼岡正樹、佐藤慶介、Richard D Tilley、平栗健二、山本健二、馬目佳信; 蛍光ナノ粒子 QD を使った医療応用、第8回 Cell Biology Summer Meeting 2009: 一般講演、2009年7月11-12日(茨城)

4. 藤岡宏樹、渡辺美智子、野村真弓、武山浩、馬目佳信; 甲状腺癌特異的認識抗体 JT95 と蛍光ナノ粒子 QD による新規抗原検出法の開発、財団法人東京都医学研究機構 21年度研究交流フォーラム:ポスター発表(予定)、2010年3月11日(東京)