

# 機能性ナノ粒子を用いた革新的画像計測法と医療応用



大内 憲明

医学系研究科 医科学専攻 外科病態学講座  
腫瘍外科学分野 教授  
E-mail: noriakio@mail.tains.tohoku.ac.jp

## 1. はじめに

近年、ナノテクノロジーは様々な生体由来材料や人工材料等を用い、生体構造を模した物質、さらには全く新しい構造を持つ種々のナノ粒子を生み出している。その多くはこれまでにないユニークな機能、性質を持ち、多くの分野で利用が始まっている。ナノテクノロジーによって生み出された新しい材料の応用は、医療分野においても精力的に試みられており、診断から治療に至るまで有望な手法・技術が次々に開発されている。

現在の医療における大きな潮流は、個々の患者の病態に即した、最適・最小限の医療、すなわち「個別化医療」と、実証された治療法を取り入れる「Evidence Based Medicine (EBM)」の2つであり、これらを根底から支えているのが高度な診断・治療技術と医療統計である。ナノテクノロジーは、従来にない機能を持った材料の創製や装置の超微細化を可能とするため、これまでの常識を超える精細な診断や病巣特異的な治療の実現に大きな期待が寄せられている。

ナノテクノロジーの応用領域のひとつとして、Drug Delivery System (DDS) が挙げられる。これは、病巣または標的臓器に効率的に薬剤を到達させることにより、薬効を高め、副作用を減らすことを目的としているが、その開発には薬物の体内動態、すなわち到達経路を詳細に解明することが重要である。我々は、蛍光ナノ粒子を生体内1粒子レベルで計測する技術を開発し、高い空間分解能、時間分解能での計測が可能となった。また、ナノテクノロジーは材料開発のみでなく、電子機器などの超小型化をも強力に推進してきている。カプセル内視鏡や体内手術ロボットなど、これまでには考えられなかった治療法の実用化が目前に迫っている。ナノテクノロジーによる新しい手法の開発は、人工臓器や外科手術など、その他あらゆる医療の領域で期待され、医療技術を革新する潜在的な力を持つ。このような時代の大きな変化を背景に、我々は機能性ナノ粒子を用

いた新しい計測技術を開発し、医療への応用を検討してきた。

本稿では、我々の機能性ナノ粒子を用いた医療応用への取り組み、特に蛍光計測ならびにX線CT造影法について概説する。

## 2. 機能性ナノ粒子を用いたイメージング

### 2.1 抗がん薬の蛍光1粒子イメージング

近年、分子1個を識別、追跡することで薬物動態を明らかにする手法が注目されている。従来、蛍光色素を用いた1分子計測は蛍光色素の蛍光強度不足や装置の感度不足のため計測が困難であった。最近になり、量子ドットと超高感度な受光素子が出現し、蛍光1粒子を高“時間・空間”分解能で計測することが可能となった。我々は生体内の薬物動態を1分子レベルで計測するため、超高感度蛍光計測システム(図1)を独自に開発した。装置は倒立顕微鏡、ニポ一板式共焦点ユニット、Electron multiplying charge-coupled device (EMCCD)カメラ、レーザー光源から成る。我々は乳がん細胞に発現したHER2タンパクに対する単クローン抗体 trastuzumab と量子ドットの結合物(Q-T complex)を作製し、ヒト由来乳がん細胞株KPL-4担がんマウスに対し超高感度蛍光計測システム用い、静脈投与後のQ-T complexの体内動態について蛍光1粒子計測を試みた。

その結果、担癌マウスにおいて、Q-T complexの①血管内での挙動、②血管外への漏出、③細胞膜への結合、④細胞内への取り込み、⑤細胞内の動態をin vivoで捉えることに成功した。この中でQ-T complexはそれぞれの段階で特異な動きを示すことが明らかになった。すなわち、血管内および血管外への漏出時には、ランダムな動きと急速な一方の動きが組み合わせられた動きを示し、細胞内でも同様に微細でランダムな動きと急激で速い、核に向かう運動が観察された(図2)。細胞内での挙動はアクチンやダイニンなどの細胞内モータータンパクに

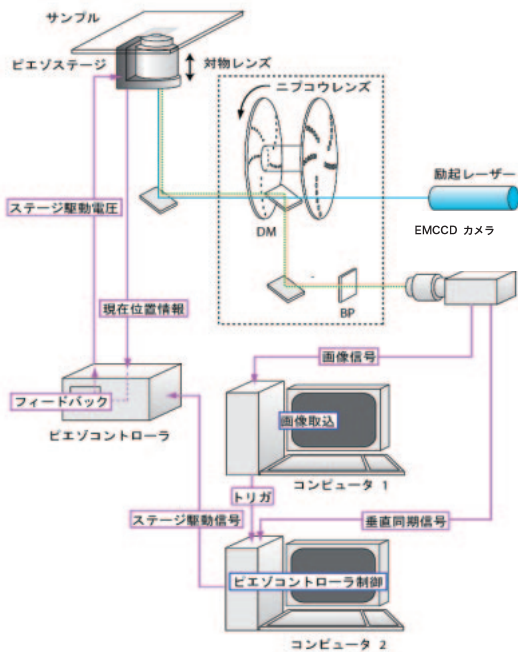


図1. 超高感度蛍光計測システム

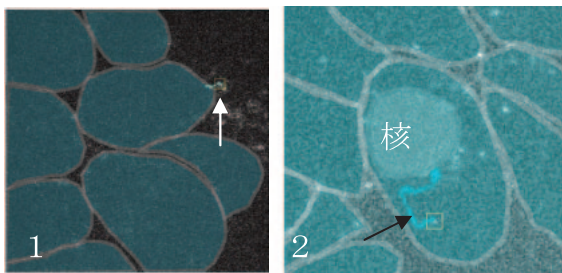


図2. 超高感度1粒子蛍光計測システムによって検出した量子ドット-トラツズズマブ結合物(Q Tコンプレックス)の軌跡

1. 細胞周囲から細胞内に入るQ Tコンプレックスの軌跡 (白矢印)
2. 細胞内Q Tコンプレックスの軌跡 (黒矢印)

結合しての能動的な輸送によることが強く示唆された。

このように1粒子の動態を高感度に直接検出する手法は現在のところ我々のシステム以外にはなく、今後、他の薬剤の薬物動態や生体内のシグナル伝達の解明に大きく寄与するものと考えられる。

## 2.2 超音波タグを用いた蛍光断層画像計測法

がん手術において、がんの原発臓器を全摘せず部分切除を行って臓器を温存する手術はすでに広く行われている。さらに現在、不要なリンパ節郭清を

省略する目的で行われるセンチネルリンパ節生検法は、低侵襲な個別化医療を実現する手法として不可欠とされている。センチネルリンパ節生検では、色素法やラジオアイソトープ法が最も一般的に行われているが、色素法は体外からの識別ができないことや、RI法は法的規制により利用施設が限定されるなどの欠点を有する。我々は、法的規制によらない、どの施設でも利用可能なセンチネルリンパ節検出法として、ナノサイズ蛍光粒子を用いた蛍光検出法の開発に取り組んできた。まず、ラットをモデルとし、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、数分から30分程度の造影効果を得るには粒径40nmが最も集積性に優れ、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。さらにセンチネルリンパ節検出率において、蛍光計測法は従来行われている色素法よりも優れていることが明らかになった。しかしながら、従来の蛍光計測法では深部方向の計測に限界があり、体表から深部に存在する蛍光色素の位置情報検出は困難であった。すなわち、最適な波長・サイズの粒子を選定しても検出可能な深さは1cm程度に過ぎない。乳がんを例に挙げると、腋窩リンパ節が所属リンパ節であり、この部位が切除(リンパ節郭清と言う)の対象となる。通常、腋窩リンパ節は体表1cm以上深部にあるため、体表からリンパ節が検出できる可能性は低く、せいぜいリンパ管が描出されるのみであり、従来の計測法では例え高輝度の蛍光ナノ粒子を用いたとしても実用性は低いと言わざるを得ない。そこで我々は、次に述べる超音波タグを用いた蛍光断層画像計測法を開発した。

生体組織内に超音波音場が形成されると、屈折や散乱係数などの光学特性の空間分布が誘起され、このとき、音場内の光は音圧変化に依存して強度変調される。媒質内で焦点を結ぶ集束超音波を利用すると、音場焦点において空間選択的に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とき、外部において観測される変調蛍光信号は超音波焦点と蛍光体の位置が一致したときに最大となる。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(図3)。連続波発振レーザー光を、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で焦点距離は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

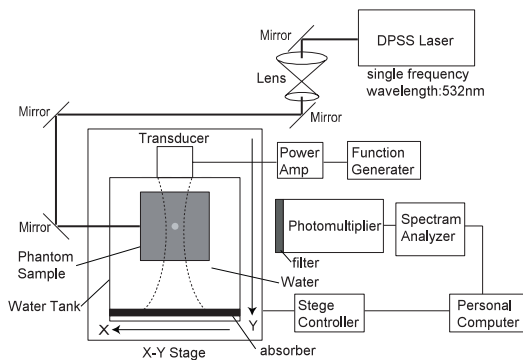


図3. 超音波タグを用いた蛍光断層画像計測装置

ル水槽は3軸自動ステージ(X軸:入射レーザ光軸方向, 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.

模擬生体ではあるが, 以上の試作装置により, 我々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深部にある蛍光色素の検出に成功した(図4). この手法により3cm程度すなわち, 乳がんのセンチネルリンパ節生検においてほぼ実用的と考えられる深度の蛍光色素検出が可能である.

生体において1cm以上の深部の蛍光標的を検出する技術は, これまでの蛍光計測の限界を大きく打ち破るものであり, 乳がん手術に限らずその応用範囲を飛躍的に広げることができると考えられる.

### 2.3 ナノサイズヨウ化銀ビーズによるX線造影剤

我々は数十ナノメートルの粒径を持つ新規のX線造影剤として, ヨウ化銀を核とし, シリカの被殻を持つナノ粒子を作製した. ナノサイズシリカコーティングヨウ化銀ビーズ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る.

我々は液相法を利用してヨウ化銀粒子を作製している. 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( $\text{AgClO}_4$ )を用いる. それぞれの水溶液を作製し, ヨウ化カリウム水溶液を攪拌しながら過塩素酸銀を添加してヨウ化銀コロイド液を作製した. この方法により約20nm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.

スキャン方向

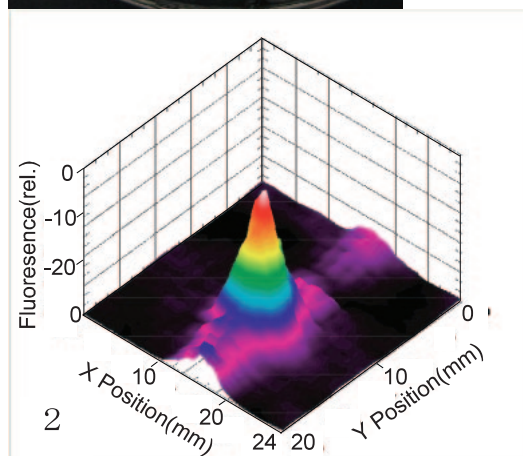
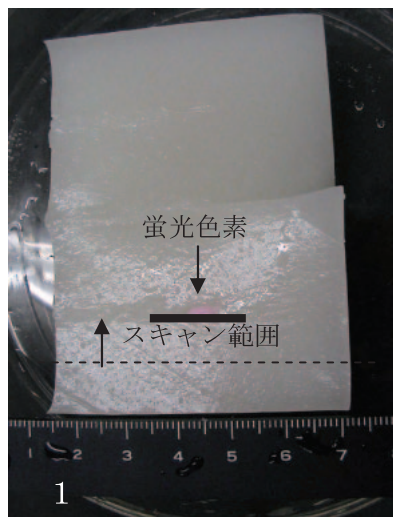


図4. 蛍光断層画像計測装置により計測した模擬生体内深部に存在する蛍光色素の検出

1. 模擬生体内のスキャン断面と蛍光色素
2. 検出した蛍光強度の2次元分布

ヨウ化銀ナノ粒子のシリカコーティングは液相を利用したゾル-ゲル法を用いて行った. 上記のように作製し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-mercaptopropyltrimetoxysiane (MPS)を加え, 15分後にエタノール, 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) を順に添加する. MPS, TEOS, DMA それぞれの濃度を変え, 最適な濃度条件を選定した. TEOSの濃度はシリカ殻の厚さ調整に関係しており, 2-4mMが最適であった. また触媒として用いるDMAはシリカ殻の生成に関わり, 10-100mMの濃度で有効にシリカ殻が生成される(ことがわかっている). 以上の条件で平

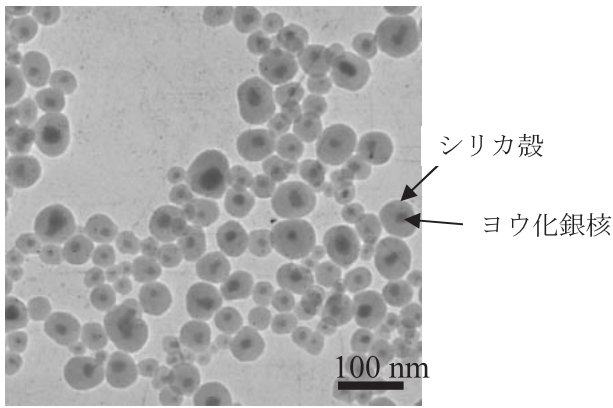


図5. シリカコーティングヨウ化銀ビーズの透過型電子顕微鏡像

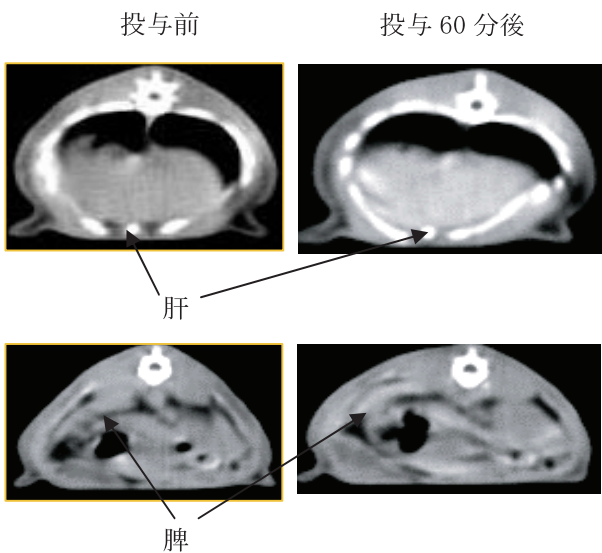


図6. シリカコーティングヨウ化銀ビーズ静脈注射後の肝および脾の造影効果の経時変化

均粒径約 60nm のシリカコーティングヨウ化銀ビーズを作製することに成功した (図5)。

次に、ナノサイズシリカコーティングヨウ化銀ビーズをラットに静脈注射し、経時的に造影剤の貯留しやすい肝、脾をX線CT撮影し、その造影効果を検討した (図6)。ナノサイズヨウ化銀ビーズは、投与直後は臓器の増影効果を示さないが、投与後約一時間でゆっくりと増影効果を示していくことがわかる。増影効果は24時間程度持続し、その後徐々に減少、1週間後には増影効果が認められなくなる。このような性質は従来の造影剤には見られないものであり、長時間の造影効果を必要とする、例えば手術前後のCT撮影による切除範囲の確認やCTガイド下の手術などに利用可能と考えられる。

ナノ粒子を医療応用する際、大きく問題となるのが安全性の確保である。現在医療応用が試みられているナノ粒子として、リポソームやポリマーを用いた中空構造のもの、固体クラスターなどが挙げられる。前者は生体物質に近い材料が用いられ、後者は、これまでに安全性の確立されていないものが多い。そのため投与時の安全性と、体内での処理および排泄の確認が極めて重要である。我々はナノサイズヨウ化銀ビーズ投与後の体内分布を検討するため、各臓器を透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope; TEM) で観察した。(特に、) 体内の物質排泄に関与する肝・腎、および最初に強い増強効果を示す脾を中心に検討した。その結果、腎においては血管内にナノサイズヨウ化銀ビーズが観察されるのみであり、脾においては静脈洞にヨウ化銀ビーズが滞留するものの、免疫細胞への貪食は認められなかった。肝においては、肝細胞への取り込みが認められた。さらに誘導結合プラズマ法による元素分析を行ったところ、胆汁中に高濃度の銀を検出し、ヨウ化銀ビーズの胆汁排泄を示唆する結果が得られた。

シリカコーティングは、ヨウ化銀が生体に接触することで生じるアレルギーなどの有害事象を防ぐ目的で施している。シリカコーティングによって安全な排泄を確保できれば、急性毒性を防ぐのみでなく、長期安全性の点からも好ましいと言える。今後、医療応用のためにはさらに、成長や生殖面における安全性についても検討が必要である。

今回、シリカコーティングヨウ化銀ビーズにより、X線CT画像で長時間の造影効果を得られることが示されたが、様々な抗腫瘍抗体等の機能性分子を結合させることで診断と治療を兼ね備えた薬剤の創製が期待でき、外科手術や治療効果判定など治療上極めて有用と言える。現在分子標的治療薬が次々と開発されていることから、その応用範囲は広いと考えられる。

### 3. 機能性ナノ粒子による革新的画像計測法の展望

従来 *in vitro*、もしくは“多数の分子の集まり”でしか知ることのできなかつた DDS の情報が、我々の蛍光1粒子計測法により *in vivo* 分子レベルで直接計測可能となった。1粒子の動態を個々に計測できることから、多数の粒子の動態に関するデータを統計学的に処理することで、極めて詳細な DDS のデータを取得可能である。更には薬剤のみでなく、生体内の情報伝達物質を標識することにより、シグナル伝

達の解明に活用することも期待される。これにより、有効な病変到達性を持つ薬剤の開発や基礎医学研究に大きく貢献すると考えられる。

超音波タグを用いた蛍光断層画像計測法による蛍光計測法は従来行われてきたセンチネルリンパ節生検法の大きな欠点を補い、従来法に代わり得るセンチネルリンパ節生検法になると考えられる。臨床応用に至る前に動物実験による有用性の検証や、装置の最適化を行う必要はあるが、蛍光計測における基盤技術として極めて有望である。本方法はセンチネルリンパ節生検のみでなく、標識した腫瘍の蛍光検出による外科手術や放射線治療にも有用であり、テーラーメイド医療を推進する上で重要な手法となり得る。

ナノ粒子の排泄経路の解明および完全な分解や排泄は、とりわけ長期安全性に深く関わると考えられる。ヨウ化銀ビーズは特異な二重構造から TEM で体内分布を確認可能なため、排泄経路を特定できる貴重なナノ粒子といえる。シリカコーティングは胆汁排泄経路をとることが示唆されたが、ヨウ化銀ビーズはポリマーや他の高分子でコーティングすることも可能であり、ナノ粒子の体内動態を検討する上でも非常に有用である。

以上のように、従来にないユニークな物性を持つナノ粒子を利用した新しい手法・技術は、創薬や外科手術、診断など様々な面から将来の医療に大きな変革をもたらすことが期待される。

#### 4. おわりに

現在急速に発展しつつあるナノテクノロジーを医療に取り入れる橋渡し研究は、工学分野、および医学分野それぞれにおいて単独で推進することはできない。また、研究者がそれぞれの分野を個別に学んだとしても有効にナノ医療を推進することは不可能である。そのため複数領域の研究者が場を1つにして共通の言葉で話し合える環境、共通の言葉・知識を学ぶ組織の構築が次代の研究を担う人材育成上最も重要である。今後も我々は、これまで述べた研究を通じ、大学院生、ポスドクに異分野融合研究と教育の場を与え、医学・工学双方の素養を持つ次の世代を担う研究者の育成を推進する予定である。

#### 文 献

- [1] Takeda M, Kobayashi M, Takayama M, Suzuki S, Ishida T, Ohnuki K, Moriya T, and Ohuchi N. Biophoton detection as a novel technique for cancer imaging. *Cancer Science* **95**, 656-661, 2004.
- [2] Kobayashi Y, Misawa K, Kobayashi M, Takeda M, Konno M, Satake M, Kawazoe Y, Ohuchi N, and Kasuya A. Slica-coating of fluorescent polystyrene microspheres by a seeded polymerization technique and their photo-bleaching property. *Colloids and surfaces A: Physicochem Eng Aspects* **242**, 47-52, 2004.
- [3] Kobayashi Y, Misawa K, Takeda M, Kobayashi M, Satake M, Kawazoe Y, Ohuchi N, Kasuya A, and Konno M. Slica-coating of AgI semiconductor nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **251**, 197-201, 2004.
- [4] Kasuya A, Sivamohan R, Barnakov YA, Dmitruk I M, Nirasawa T, Romanyuk VR, Kumar V, Mamykin SV, Tohji K, Jeyadevan B, Shinoda K, Kudo T, Terasaki O, Liu Z, Belosludov RV, Sundararajan V, and Kawazoe Y. Ultra-stable nanoparticles of CdSe revealed from mass spectrometry. *Nature Materials* **3**, 99-102, 2004.
- [5] Nakajima M, Takeda M, Kobayashi M, Suzuki S, and Ohuchi N. Nano-sized fluorescent particle as a new tracer for sentinel node detection: An experimental model for decision of appropriate size and wavelength. *Cancer Science* **96**, 353-356, 2005.
- [6] Zhou X, Kobayashi Y, Ohuchi N, Takeda M and Kasuya A. Strong luminescence of CdSe nanoparticles by surface modification with gadmium (II) hydrous oxide. *International Journal of Modern Physics B* **19**, 2835-2840, 2005.
- [7] Zhou X, Kobayashi Y, Romanyuk V, Ohuchi N, Takeda M, Tsunekawa S, and Kasuya A. Preparation of silica encapsulated CdSe quantum dots in aqueous solution with the improved optical properties. *Applied Surface Science* **242**, 281-286, 2005.
- [8] Kasuya A, Noda Y, Dmitruk I, Romanyuk V, Tohji K, Kumar V, Belosludov R, Kawazoe Y, and Ohuchi N. Stoichiometric and ultra-stable nanoparticles of II-IV compound semiconductors. *Eur Physical Journal D* **34**, 39-41, 2005.
- [9] Kobayashi Y, Misawa K, Kobayashi M, Takeda M, Konno M, Satake M, Kawazoe Y, Ohuchi N, and Kasuya A. Silica-coating of fluorescent polystyrene microspheres

by a modified Stober method and their stability against photo-bleaching. *e-Polymers* **052**, 1-8, 2005.

[10]Li-Shishido S, Watanabe TM, Tada H, Higuchi H, and Ohuchi N. Reduction in nonfluorescence state of quantum dots on an immunofluorescence staining. *Biochem Biophys Res Com* **351**, 7-13, 2006.

[11]Tada H, Watanabe T, Higuchi H, and Ohuchi N. In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice. *Cancer Res* **67**, 1138-44, 2007.

[12]Park YS, Liz-Marzán LM, Kasuya A, Kobayashi Y, Nagao D, Konno M, Mamykin S, Dmytruk A, Takeda M, and Ohuchi N. X-ray Absorption of the Gold Nanoparticles with Thin Silica Shell. *J Nanosci Nanotechnol* **6**, 3503-06, 2006.

[13]Mamykin S, Kasuya A, Dmytruk A, and Ohuchi N. Photocurrent of nanoassembled Si film in contact with electrolyte. *J Alloys Compounds* **434-435**, 718-720, 2007.

[14]Park YS, Kasuya A, Dmytruk A, Yasuto N, Takeda M, Ohuchi N, Sato Y, Tohji, K Uo M, and Watari F. Concentrated colloids of silica-encapsulated gold nanoparticles: colloidal stability, cytotoxicity, and X-ray absorption. *J Nanosci Nanotech* 2007 (in press).

[15]Park YS, Dmytruk A, Dmitruk I, Noda Y, Kasuya A, and Ohuchi N. Aqueous-phase synthesis of ultra-stable small CdSe nanoparticles. *J Nanosci Nanotech* 2007 (in press).

[16]Kobayashi Y, Imai J, Nagao D, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A, and Konno M. Preparation of multilayered silica-Gd-silica core-shell particles and their magnetic resonance images. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* **308**, 14-19, 2007.

[17]Takeda M, Tada H, Higuchi H, Kobayashi Y, Kobayashi M, Sakurai Y, Ishida T, and Ohuch 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* (in press).

[18]中島護雄, 武田元博, 大内憲明. 蛍光ナノ粒子による癌センチネルリンパ節検出とナノ医療の展望. 日本機械学会誌 **109**, 90-93, 2006.

[19]大内憲明, 武田元博, 中島護雄, 多田寛, 樋口秀男. 分子イメージング, DDSによる診断・機能評価. DDS研究の現状と将来展望(Pharm Tech Japan **21**), 日本 DDS 学会編, Pharm Tech Japan, 59-62, 2005.

[20]多田寛, 樋口秀男, 渡邊朋信, 大内憲明. 抗HER2 抗体標識量子ドットを用いたマウス腫瘍内での単粒子イメージング. 可視化情報 **26**, 181-182, 2006.

[21]樋口秀男, 渡邊朋信, 多田寛, 武田元博, 大内憲明. バイオナノイメージングとナノ医療. 応用物理 **75**, 695-698, 2006.

[22]大内憲明. 癌の診断と治療に向けたイメージング技術の進展: ナノテクノロジーのがん医療への期待. バイオテクノロジージャーナル **7**, 22-24, 2007.

[23]樋口秀男, 渡邊朋信, 李松花, 多田寛, 大内憲明. 蛍光性量子ドットによるがん細胞の単一分子ナノイメージング. バイオテクノロジージャーナル **7**, 30-35, 2007.

[24]武田元博, 小林芳男, 小林正樹, 桜井遊, 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—がん診療への応用—. ナノメディシンの基礎と最先端, オーム社 (in press).