

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007 ～ 2009
課題番号：19390329
研究課題名（和文） 多機能センシングナノビーズを用いた乳がん手術の開発
研究課題名（英文） Multifunctional nanoparticles and its application for breast cancer surgery
研究代表者 石田 孝宣 （ ISHIDA TAKANORI ） 東北大学・大学院医学系研究科・准教授 研究者番号：00292318

研究成果の概要（和文）：がん診断・治療において最適な粒径の薬剤は受動的に腫瘍に取り込まれる。我々は、移植乳がんに対し各種サイズの取り込みを画像計測した。その結果、粒径 200nm の粒子は腫瘍血管外に漏出せず、20, 40, 100nm の粒子が腫瘍間質に漏出することを明らかにした。また蛍光量子ドットによる鏡視下センチネルリンパ節検出を試み、センチネルリンパ節の転移開始場所を精細に特定できた。抗腫瘍抗体結合量子ドットにより病巣可視化が可能であり、精細外科手術の実現に向けた基礎を築くことができた。

研究成果の概要（英文）：Nanoparticles in appropriate size can be passively transported in malignant tissue. We performed in vivo imaging of the dynamics of nanoparticles in various sizes. Nanoparticles of 200nm did not leak in cancer tissue. In contrast, nanoparticles of 20, 40 and 100nm could be transported in cancer tissue. We also performed fluorescence nanoimaging of gastric sentinel lymph node of pigs. And we specified the first area for lymph node metastasis in a sentinel lymph node. These techniques are also utilized for ultrafine cancer operation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2008 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳がん、多機能ナノ粒子、蛍光ナノビーズ、センチネルリンパ節、複合ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

1981 年以来、がんはわが国の死亡原因の第 1 位を占めることから、医学研究上の重要課題であり、発がんのメカニズムの解明から治療に至るまでの包括的な研究が急務である。

一方、個々の患者の病態に応じた治療法=オーダーメイドメディスンと科学的根拠に基づく最良の治療=Evidence Based Medicine が、すべてのがん診療に求められている。このよう

な時代の要請の中で、臓器温存手術やセンチネルリンパ節生検法が出現した。腫瘍の正確な局在診断に基づいて、より小さな切除範囲でがん手術を行う方法であり、現在さまざまながん手術に応用されている。固形がんの局在にはさまざまな画像診断が用いられるが、X線CTやMRIがその中心である。X線CTやMRIを行う際、造影剤の使用が欠かせない。それは造影剤により検出感度および特異度が著しく上昇するからである。外科手術における局在・拡がり診断はますます重要になっており、術前から術中にいたるまで、一定の期間造影可能な状態を保つことができれば一度の造影で術前診断から術中の拡がり観察が可能であり、これまでにない、精細な外科治療が可能となる。従来造影剤投与による造影効果は一時的なもので、流出が早く病変の造影のタイミングが難しい。今回、我々は造影剤が腫瘍に到達し、造影剤が長時間病巣に留まることで、造影回数を最小限にとどめ、X線CT、MRIさらに蛍光機能を付加した多機能ナノ粒子を開発することを目指す。また、腫瘍親和性のある抗腫瘍抗体を付加することで特異的に腫瘍を造影するナノ粒子を開発し、術前の病巣評価から術中の蛍光検出による切除範囲の可視化により十分に腫瘍を切除し、かつ侵襲を最小限に抑える真のティラーメイドメディスンの実現を目指す。

がん手術において病巣切除とともにリンパ節郭清が行われるが、リンパ節転移の有無を正確に判定する方法として、センチネルリンパ節生検法(SNB)が取り入れられている。センチネルリンパ節生検法はリンパ節転移のない患者のがん手術においてリンパ節郭清を省略する、いわばリンパ節郭清におけるティラーメイドメディスンの切り札ともいえる手法である。現在ラジオアイソトープ法と色素法が用いられているが、ラジオアイソトープ法はラジオアイソトープ利用施設の制限からすべての病院で用いることは事実上困難である。色素法は体外からは検出できず、直視下でのみ確認可能である。そのためセンチネルリンパ節確認のためには皮膚を切開する必要があるが、センチネルリンパ節の場所が通常と異なる場合には検査できない。これらの欠点を克服する方法として蛍光計測法、X線計測法、MR計測法が提唱されてきた。SNBに用いられる造影剤は粒子がある程度大きくなければならず、従来から用いられる造影剤はリンパ節からすぐに流れ去ることが問題であった。

一方、ナノレベルの分子制御技術は近年次々と新たな物質を生み出してきた。分子レベルでの物質制御技術は目的とする物質を生み出すことに成功している。特にスーパーコンピュータを用いた分子設計によって、これまで知られていなかった物質の存在が次々と予測され、それらの存在が証明されつつある。我々は量子ドットや蛍光ポリスチレンビーズをはじめとした機能性蛍光ナノクラスターの分子設計、さらにその応用のひとつとしてセンチネルリンパ節やがん組織の高感度蛍光イメージングに取り組んできた。

その結果、センチネルリンパ節生検においてマーカーの最適な粒径および蛍光波長を明らかにし、計測に最適な粒径のナノ粒子の作製に成功している(図1、Physicochem. Eng. Aspects, 2004、Cancer Sci., 2005、特許公開2004-269439)。しかし従来の蛍光計測法では限界がある。そのため我々は組織深部に存在するセンチネルリンパ節、または腫瘍病変検出装置の開発に取り組んでいる。また、病巣検出に用いる新たな造影剤としてアレルギーの発生しないシリカコーティング AgI ナノビーズを開発し、ラットのセンチネルリンパ節造影を行った(図2、Colloids and Surfaces A, 2004、IABCR, 2006)。

さらに量子ドットに抗乳癌細胞抗体 trastuzumab を結合させ、独自に開発した高感度蛍光顕微計測装置を用い、蛍光ナノ粒子1粒子を担癌マウス体内において時間分解能0.3msec、空間分解能2nmと超高感度に撮影することに成功した(IABCR, 2006)。

一方、世界的に量子ドットを用いた研究は、分子イメージングをはじめさまざまな医学領域で応用が試みられ、特に量子ドット-抗体結合物を用いた生体における腫瘍イメージングが行われている。しかし多機能性粒子についてのイメージングはほとんど行われていない。さらに安全性の問題についてはようやく研究が始められたに過ぎず、医療用ナノ粒子は体内動態や安全性の確立が急務とされる

2. 研究の目的

本研究では多種の機能を持つナノ粒子を用いることで超精細な乳がん手術を可能とする新しい技術の開発を目指す。がん病巣に対しては特異的抗体、センチネルリンパ節検出に関しては最適な粒径を持ち、かつ比較的長時間標的に留まる蛍光、X線、MRIに利用可能な多機能造影剤を開発する。そして、単一造影剤による術前のX線CT、MRIによるがん病巣検査、術中の精密な病変の蛍光検出技術ならびに蛍光センチネルリンパ節生検法も合わせて確立する。この技術によって将来、現在の医療が目指す外科手術における究極のティラーメイドメディスンと言える、病巣とセンチネルリンパ節の可視化による完全外科切除が実現しうる。また、開発した多機能性ナノクラスターは新たな医療検査薬として、わが国のナノバイオテクノロジー産業にも寄与するものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) シリカコーティングおよび block copolymer コーティングによる蛍光造影能、X線造影能、MRI造影能を併せ持つ複合機能ナノ粒子の作製についてまとめる。

(2) 複合機能ナノ粒子が本来持つ蛍光特性を生かした蛍光マーカー、X線造影剤を作製、さらにモノクローナル抗体と量子ドットなど蛍光ナノクラスターの複合体を作製し、担がん動物に投与しその動態観察を行う。

(3) シリカコーティング蛍光ナノ粒子の蛍光特性や、複合機能ナノ粒子のX線造影剤としての性質・体内動態などのまとめを行う。

(4) 量子ドットおよびシリコンナノカプセル表面に化学的修飾、または抗体等機能性タンパク、または光線力学治療薬などでコーティングし、検査試薬および治療薬として利用可能にする。

(5) シリカコーティングナノ粒子の有用性・安全性についてまとめる。

(6) 蛍光計測法として音響光学効果を利用した新しい蛍光画像計測法の装置にリニアアレイ型プローブを組み込み、動物を用いて有用性を検証する。

4. 研究成果

(1) 粒径20及び40nmの蛍光ナノ粒子に均一なシリカコーティングを施すことに成功し、ラットをモデルとしたセンチネルリンパ節の蛍光検出に成功した。シリカコーティングしたナノ粒子はそれぞれ粒径がおおよそ40及び60nmであり、センチネルリンパ節検出またはEPR効果による特異的集積を利用した腫瘍の画像計測に適した大きさであった。

(2) 量子ドットに抗HER2抗体である、trastuzumabを結合させ、乳がん細胞への結合を確認するとともに、量子ドット+抗CD3抗体を結合させ、ブタをモデルとして、センチネルリンパ節内のT細胞の造影に成功した。この手法の成功により、抗腫瘍抗体を用いることでリンパ節転移病巣の検出に応用することが期待される。また、シリカコーティングガドリニウムナノ粒子の作成に成功し、造影効果が弱いもののX線CT、MRIを用いた造影にそれぞれ成功した。シリカコーティングヨウ化銀ビーズに関してはラットをモデルとして詳細な体内動態の検討を行い、シリカコーティングナノ粒子の体内の集積と排泄経路の特定に成功した。これによりシリカコーティングナノ粒子は尿路排泄でなく、肝排泄を強く示唆する結果

を得た。この成果は今後、ナノ粒子の設計、DDSを考える上で極めて重要と思われる。

(3) シリカコーティング蛍光ナノ粒子の蛍光特性や、複合機能ナノ粒子のX線造影剤としての性質・体内動態などのまとめを行う。蛍光ナノ粒子のシリカコーティングにより蛍光強度は若干低下したが、蛍光寿命の延長を確認した。またX線およびMRI造影ナノ粒子はX線造影剤としてはCT上、従来の造影剤と比較して造影能の低下がみられたものの、肝、脾の十分な造影効果を認めた。しかしMRIの造影効果は動物投与ではわずかであった。今後ガドリニウム濃度のさらなる増加が必要である。

(4) 量子ドットおよびシリコンナノカプセル表面に化学的修飾、または抗体等機能性タンパク、または光線力学治療薬などでコーティングし、検査試薬および治療薬として利用可能にする。シリカコーティングナノ粒子をカルボキシル基とアミノ基で化学修飾することに成功した。これらは今後シリカコーティングナノ粒子を抗体等機能性タンパクで修飾する上で有用である。

(5) シリカコーティングナノ粒子の安全性確認に関し、ヨウ化銀ビーズ（粒径約30-70nm）をラットに投与し、Litchfield-Wilcoxon法にてLD50の評価を行った。LD50はシリカコーティングヨウ化銀ナノ粒子量として、74.2mg/kgと算出された。

(6) 蛍光計測の外科手術をはじめとした医療応用には、深部に存在する蛍光色素検出法の開発が必須である。今回、音響光学効果を利用した蛍光検出の検討を行った。リニアアレイ型プローブを試作し、食肉等模擬生体を用いて有効性の検討を行った。その結果、単体プローブの走査と同様、超音波の空間分解能と同様の精度で蛍光検出できた。これにより生体においても、30mm程度の深さにある蛍光色素の検出が可能と見積られ、実用化が可能となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

① Ishida T, Kiba T, Takeda M, Matsuyama K, 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*, 64, 361-369, 2009. (査読有)

② Kawai M, Higuchi H, Takeda M, Kobayashi Y, Ohuchi N. Dynamics of different sized solid state nanocrystals as tracers for a drug delivery system in the interstitium of a human tumor xenograft. *Breast Cancer Research* 11: R43, 2009. (査読有)

③ Hikage M, Gonda K, Takeda M, Kamei T, Kobayashi M, Kumasaka M, Watanabe M, Satomi S, Ohuchi N. Single particle imaging of the sentinel lymph node with endoscopically injected nanoparticles. *Nanotechnology*, 7:21(18), 185103, 2010. (査読有)

④ 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 (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

① 武田元博, 河野雅弘, 甘利正和, 中島護雄, 石田孝宣, 大内憲明. 末梢リンパ球へマトポルフィリン染色によるがん診断。第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月 1-3 日, パシフィコ横浜

② 武田元博, 権田幸祐, 樋口秀男, 大内憲明. 乳がんのナノ標的イメージングと薬物動態・腫瘍機能解析。第 31 回日本バイオマテリアル学会, 2009 年 11 月 17 日, 京都府民総合交流プラザ

③ 武田元博, 権田幸祐, 樋口秀男, 大内憲明. 蛍光 1 分子計測による薬物動態イメージング。第 48 回日本生体医工学会, 2009 年 4 月 23-25 日, タワーホール船堀

④ 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

⑤ Takeda M, Sakurai Y, Kobayashi Y, Cong L, Hikage M, Amari M, Ishida T, Gonda K, Ohuchi N. Nanosized Silver-Iodide Beads as Novel X-ray Contrast Media for Cancer Detection *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

⑥ Kawai M, Takeda M, Ishida T, Suzuki A, Amari M, Ohuchi N. In Vivo Imaging of Vascular Permeability Using Nano-Objects in Mice Tumor. *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

⑦ 武田元博, 河野雅弘, 佐藤恵美子, 山田理恵, 甘利正和, 鈴木昭彦, 石田孝宣, 大内憲明. ヘマトポルフィリン誘導体計測によるがん診断の基礎的検討。第 18 回乳癌基礎研究会, 2008 年 7 月 12-13 日, 福島

⑧ 河合賢朗, 武田元博, 石田孝宣, 大内憲明. 粒径の異なるナノ粒子による腫瘍間質ドラッグデリバリーシステムの解析。第 18 回乳癌基礎研究会, 2008 年 7 月 12-13 日, 福島

⑨ 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 27-30 日, 名古屋

⑩ 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

⑪ Yu Sakurai, Motohiro Takeda, Cong Liman, Yoshio Kobayashi, Atsuo Kasuya, Masakazu Amari Akihiko Suzuki, Takanori Ishida, Takuya Moriya & Noriaki Ohuchi. In vivo distribution of Silver Iodide beads in cancerous Lesions. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007 年 10 月 5 日, 横浜

⑫ 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 28-29 日, 大阪

⑬ 日景充, 武田元博, 亀井尚, 権田幸祐, 濱中洋平, 大内憲明. ナノサイズ粒子をトレーサーとした鏡視下蛍光センチネルリンパ節生検の開発。第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月 1-3 日, パシフィコ横浜

⑭ 濱中洋平, 権田幸祐, 武田元博, 白石貢一, 横山昌幸, 大内憲明. 高分子ミセル生体内 1 分子イメージングによる DDS 動態評価。第

68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月 1-3 日, パシフィコ横浜

⑮ Takeda M, Yamaguchi T, Ohuchi N. Interdisciplinary research for nanobiomedicine in Tohoku University. 3rd International Symposium on Nanomedicine. November 4-6, 2009, Okazaki.

[図書] (計 3 件)

① 権田幸祐、武田元博、大内憲明「ナノ医療のための *in vivo* ナノイメージング」現代化学 11 月号 49-54 (2009)

② 武田元博、権田幸祐、大内憲明「ナノ DDS と乳癌標的治療」乳癌 テーラーメイド治療の理論と実践 Chapter3 83-90 (2009)

③ 武田元博、権田幸祐、大内憲明。ナノテクノロジーと乳腺外科。医学のあゆみ、Vol. 230、No. 8、507-511 (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

①名称：輸入リンパ管流入部検出方法及び特定細胞同定方法

発明者：日景允

権利者：日景允、権田幸祐、武田元博、亀井尚、大内憲明、郷田秀樹、中野寧

種類：特許権

番号：特願 2009-152781

出願年月日：2009 年 6 月 26 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 孝宣 (TAKANORI ISHIDA)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00292318

(2) 研究分担者

武田 元博 (TAKEDA MOTOHIRO)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10333808

大内 憲明 (OHUCHI NORIAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90203710

(3) 連携研究者

()

研究者番号：