

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22500407
 研究課題名（和文） 生体イメージングのためのマルチモーダル量子ドット造影剤の開発
 研究課題名（英文） Development of quantum dot-based multimodal contrast agents for whole body imaging
 研究代表者
 神 隆 (JIN TAKASHI)
 独立行政法人理化学研究所・ナノバイオプローブ研究チーム・チームリーダー
 研究者番号：80206367

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、近赤外発光半導体量子ドットを基盤として、生体のマルチモーダルイメージングが可能な造影剤を開発することである。本研究では、発光の量子収率 50%以上の高輝度近赤外発光 CdSeTe/CdS 量子ドットを合成した。さらに、近赤外蛍光および MRI での生体イメージングを可能とする近赤外発光 CdSeTe/CdS 量子ドットおよび酸化鉄(Fe₃O₄)ナノ粒子からなるマルチモーダル造影剤を開発し、ヒト乳癌移植ヌードマウスでの乳癌腫瘍のデュアルモーダルイメージングに成功した。

研究成果の概要（英文）：

The objective of this work was to develop multimodal contrast agents based on near-infrared (NIR) emitting quantum dots for whole body imaging. We could synthesis highly fluorescent near infrared emitting CdSeTe/CdS quantum dots with fluorescence quantum yield of > 50 %. Furthermore, we developed multimodal (NIR/MRI) contrast agents consisting of CdSeTe/CdS quantum dots and Fe₃O₄ nanoparticles and conducted dualmodal imaging of human breast tumors implanted to a nude mouse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	2500000	750000	3250000
2011年度	500000	150000	650000
2012年度	500000	150000	650000
総計	3500000	1050000	5550000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体イメージング、マルチモーダル造影剤、量子ドット、近赤外蛍光、MRI、ヒト乳癌、ヌードマウス

1. 研究開始当初の背景

生体を個体レベルで非侵襲的にイメージングする方法として、X線 CT, MRI (核磁気共鳴画像法), PET (ポジトロン断層法) 等が医学分野で癌の診断や血管造影に広く用いられている。また最近では、近赤外光を用いた光 (蛍光) イメージング法が高感度測定法として注目されている。これらの生体イメージング法においては、組織や臓器の画像のコントラストを強調するためしばしば造影剤が用いられる。たとえば、光イメージング法では蛍光性の微粒子や化合物が、MRI では核の緩和時間に影響を与えるガドリウム、鉄イオンなどの常磁性物質が、また PET では陽電子崩壊する化合物が使われる。しかし、それぞれの生体イメージング法では、異なる化学構造、特性をもつ造影剤が使われるため、1種類の造影剤を使って生体をマルチモーダルイメージングすることは困難である。

癌などの腫瘍部位を、光、MRI、PET 等でマルチモーダルイメージングすることが可能なら、画像から得られる情報の信頼性は従来に比べ格段に向上すると考えられている (*Nature Photonics*, 1, 487, 2007 年)。癌組織を特異的に検出するための造影剤は、MRI、PET などではすでに実用化されているが、光イメージングにおいては造影剤の開発は非常に遅れている。蛍光プローブを用いる光イメージングでは、原理的には1分子レベルの検出が可能であり非常に高感度ではあるが、生体では光の散乱による空間分解能の低下が問題となる。そのため、三次元での正確な位置情報を得るためには、MRI や PET と併用することが望ま

しい。このようなマルチモーダルイメージングには、光、MRI、PET すべての測定法において共通に使用できるマルチモーダル造影剤が必要である。

これまでに報告されているマルチモーダル造影剤のほとんどが、可視部領域で発光する蛍光材料を使ったものであり、個体レベルでの光イメージングには適さない。生体では可視光を吸収するヘモグロビンなどをはじめとする数多く内在性色素が存在するため可視光はほとんど透過せず、唯一組織を透過できる光が、700-1100nm の近赤外光である (*Nat. Biotechnol.* 19, 316, 2001 年)。近赤外の蛍光材料として、シアニン系の有機色素が一般的であるが、水中での蛍光の量子収率は極めて低く 1%前後である。そのため、光イメージングにおいては、高輝度な近赤外蛍光材料が望まれている。その候補として最も有望なのが半導体量子ドットである。ここ数年の間に、半導体量子ドットを利用した造影剤の合成研究が世界的に盛んになってきているが、現在までのところ、生体透過性のよい近赤外発光の量子ドットを使ったマルチモーダル造影剤の研究報告はない (*JACS.* 129, 3848, 2007 年)。

2. 研究の目的

MRI、PET は癌の早期発見や病変部位の非侵襲イメージング法として、医療診断分野で広く普及している。しかし、これら装置は、大型で非常に高価であり簡単に移動させる事が出来ない。これらの装置に比べると、光イメージング装置は価格が安くコンパクトで、移動も比較的自由に汎用性が高い。しかし、現在のところ光 (蛍光) イメージング装置は臨床レベルでの実用化に

は至っていない。実用化の技術的条件としてあげられるのが、検出感度の向上と3次元での画像化であり、高感度な光造影剤が求められている。光造影剤としては、従来、インドシアニン系の近赤外蛍光試薬が用いられてきたが、輝度が低く、励起光により退色してしまうという欠点があった。この問題を解決する新規蛍光材料が、半導体量子ドットである。本研究では、近赤外で発光する量子ドットを利用して、MRI や PET でも共通に利用可能なマルチモーダル造影剤を開発する。

3. 研究の方法

近赤外発光半導体量子ドットを基盤として、生体のマルチモーダルイメージングが可能な造影剤の開発をおこなう。目標とするマルチモーダル造影剤の特性は、1) 近赤外領域 (800-1100nm) で高輝度蛍光特性を有する、2) 近赤外蛍光、MRI、PET の同時測定が可能、3) 毒性がなく生体親和性が高い、4) 大量合成が可能なことである。マルチモーダル造影剤は、基礎研究分野では、マウス等小動物での癌や特定組織のイメージングあるいは薬物動態などの解析に、また医療臨床分野では、乳癌や甲状腺癌の早期診断やリンパ節の無侵襲診断薬としての応用が期待できる。

高輝度発光近赤外半導体量子ドットとして CdSeTe/CdS の既報の合成法を改良する事により、蛍光発光 (820 nm) の量子収率の改善を目指した。高輝度 CdSeTe/CdS 半導体量子ドットは、表面が疎水性有機分子で被覆されているため、グルタチオンを被覆剤として量子ドット表面を親水化した。グルタチオンを被覆量子ドットでは、トリペプチドであるグルタチオン分子が配位しているため、EDC などのカルボジイミドによるカップリング反応を用いて乳がん細胞特

異的な抗 HER2 抗体の修飾が可能である。また、MRI 用の造影剤として機能させるため、酸化鉄 (Fe_3O_4) ナノ粒子を層構造にもつハイブリッド造影剤の開発を目指した。作製したマルチモーダル造影剤の有効性を確かめるため、ヒト乳癌移植ヌードマウスでの乳癌腫瘍の近赤外蛍光/MRI のデュアルイメージングをおこなった。

4. 研究成果

本研究では、発光の量子収率 50%以上の高輝度近赤外発光 CdSeTe/CdS 量子ドットを合成した。さらに、近赤外蛍光および MRI での生体イメージングを可能とする近赤外発光 CdSeTe/CdS 量子ドットおよび酸化鉄 (Fe_3O_4) ナノ粒子からなるマルチモーダル造影剤を開発し、ヒト乳癌移植ヌードマウスでの乳癌腫瘍のデュアルモーダルイメージングに成功した。

本研究により、近赤外領域 (800-900nm) で高輝度発光する半導体量子ドットの合成、乳がん腫瘍イメージング用のマルチモーダルプローブの開発が可能となった。開発に成功した高輝度発光近赤外半導体量子ドットは、従来の近赤外有機色素、蛍光蛋白質に比べ、格段に高輝度であり、生体深部イメージング用マルチモーダルプローブとして非侵襲での血管、リンパ組織、がん腫瘍の高感度イメージングに利用可能である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件) すべて査読あり

1) Huan Wang, Yukio Imamura, Naoya Matsumoto, Nao Yoshikawa, Junichiro Nakagawa, Kazuma Yamakawa, Tomoki Yamada, Yuki Murakami, Satoko Mitani, Takashi Jin, Hiroshi Ogura, Takeshi Shimazu and Akitoshi Seiyama, "Matrix Metalloproteinase-9 Triggers the Gap Junction Impairment and Somatosensory Neuronal

- Dysfunction in Septic Encephalopathy”, *Biochem. Pharmacol.* 2:108. Doi:10.4172/2167-0501.1000108, 2013.
- 2) S. Tanaka, K. Aoki, A. Muramatsu, H. Ishitobi, T. Jin and Y. Inouye, “Synthesis of green-emitting Pt₈ nanoclusters for biomedical imaging by pre-equilibrated Pt/PAMAM(G4-OH) and mild condition”, *Opt. Mater. Exp.* 3, 157-165, 2013.
 - 3) Miyuki Hasegawa, Tsukasaki Yoshikazu, Tatsuya Ohyanagi and Takashi Jin, “Bioluminescence resonance energy transfer coupled near-infrared QDs using GST-tagged luciferase for *in vivo* imaging”, *Chem. Commun.* 49, 228-230, 2013.
 - 4) Qiang Ma, Yuko Nakane, Yuki Mori, Miyuki Hasegawa, Yoshichika Yoshioka, Tomonobu M. Watanabe, Kohsuke Gonda, Noriaki Ohuchi and Takashi Jin, “Multilayered, Core/shell Nanoprobes Based on Magnetic Ferric Oxide Particles and Quantum Dots for Multimodality Imaging of Breast Cancer Tumors”, *Biomaterials*, 33, 8486-8494, 2012.
 - 5) Y. Nakane, S. Sasaki, M. Kinjo, and T. Jin “Bovine serum albumin-coated quantum dots as a cytoplasmic viscosity probe in a single living cell”, *Anal. Methods*, 4 (7), 1903 -1905, 2012.
 - 6) M. Ohmachi, Y. Komori, A. H. Iwane, F. Fujii, T. Jin, and T. Yanagida, “Fluorescence microscopy for simultaneous observation of 3D orientation and movement and its application to quantum rod-tagged myosin V”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 109, 5294-5298, 2012.
 - 7) Yurika Saitoh, Nobuo Terada, Sei Saitoh, Nobuhiko Ohno, Takashi Jin, Shinichi, Ohno “Histochemical analyses and quantum dot imaging of microvascular blood flow with pulmonary edema in living mouse lungs by “in vivo cryotechnique”, *Histochemistry and Cell Biology*, 137(2), 137-51, 2012.
 - 8) Ohyanagi, Tatsuya; Nagahori, Noriko; Shimawaki, Ken; Yamashita, Tadashi; Hinou, Hiroshi; Sasaki, Akira; Jin, Takashi; Kinjo, Masataka; Nishimura, Shin-Ichiro “Importance of sialic acid residues illuminated by live animal imaging using phosphorylcholine self-assembled monolayers-coated quantum dots”, *J. Am. Chem. Soc.* 133, 12507-12517, 2011.
 - 9) J. Miyazaki, S. Kinoshita, and T. Jin, “Non-radiative exciton recombination through excitation energy transfer in quantum dot clusters”, *J. Lumin.* 131, 539-542, 2011.
 - 10) Dhermendar, K. Tiawari, Takashi Jin, and J Behari, “Bio-distribution and toxicity assessment of intravenously injected anti-HER2 antibody conjugated CdSe quantum dots in Wistar rat.”, *Int. J. Nanomed.* 6, 463-475, 2011.
 - 11) Shin-Ichi Tanaka, Jun Miyazaki, Dhermendar, K. Tiawari, Takashi Jin, and Yasushi Inouye, “Fluorescent platinum (Pt₅) nanoclusters: their synthesis, purification, characterization, and application to bio-imaging”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 431-435, 2011.
 - 12) Dhermendar, K. Tiawari, Takashi Jin, and J Behari, “Dose-dependent *in vivo*-toxicity assessment of silver nanoparticles in wistar rat”, *Toxicology Mechanism and Methods*, 21, 13-24, 2011.
 - 13) Jun Miyazaki, Shuichi Kinoshita, Takashi

Jin, "Analysis of excitation energy transfer in quantum dot clusters in the presence of nonluminescent dots", *Phys. Status Solidi C* 8, No. 1, 54-57, 2011.

14) Nobuo Terada, Yurika Saitoh, Sei Saitoh, Nobuhiko Ohno, Takashi Jin, and Shinichi Ohno, "Visualization of microvascular blood flow in mouse kidney and spleen by quantum dot injection with "in vivo cryotechnique", *Microvasc Res.*, 80, 419-498, 2010.

15) Takashi Jin, Dharmendra K. Tiwari, Shin-ichi Tanaka, Yasushi Inouye, Keiko Yoshizawa and Tomonobu M. Watanabe, "Antibody-ProteinA conjugated quantum dots for multiplexed imaging of surface receptors in living cells", *Molecular. BioSystems*, 6, 2325-2332, 2010.

16) Tomonobu M. Watanabe, Shingo, Fukui, Takashi Jin, Fumihiko Fujii, and Toshio Yanagida, "Real-time Nanoscopy by using Blinking Enhanced Quantum Dots", *Biophys. J.* 99, L50-L52, 2010.

17) Takashi Jin, Akira Sasaki, Masataka Kinjo, and Jun Miyazaki, "A quantum dot-based ratiometric pH sensor", *Chem. Commun.*, 46, 2408-2410, 2010.

18) Takashi Jin
"Near-infrared fluorescence detection of acetylcholine in aqueous solution using a complex of rhodamine 800 and p-sulfonatocalix[8]arene", *Sensors*, 10, 2438-2449, 2010.

19) Takashi Jin
"Synthesis and surface modification of fluorescent semiconductor nanoparticles, and their use for biomedical applications." *J. Soc. Power Technol. Japan*, 47, 646-655,

2010.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 4 件)

1) 「蛍光性半導体量子ナノ粒子の合成と医療への応用」大柳達也、神 隆、「ケミカルエンジニアリング」、10月号、2012年、p18-25.

2) Neuroscience – Dealing with Frontiers Chap 7. p149-166. "Neurochemistry in the pathophysiology of septic encephalopathy", Yukio Imamura, Huan Wang, Naoya Matsumoto, Hiroshi Ogura, Takeshi Shimazu, Takashi Jin and Akitoshi Seiyama, In-Tech open access publisher, 2011.

3) 「半導体量子ドット、その合成法と生命科学への応用」神 隆、「生産と技術」,大阪大学生産技術研究会、p58-65,第 63 巻,第 2 号,2011 年

4) 「蛍光性半導体ナノ粒子 (量子ドット) の合成、表面修飾とその医療応用」神 隆、粉体工学会誌、vol47, p646-655、2010 年

[その他]

ホームページ等

http://www.riken.go.jp/research/labs/qbic/cell_dyn/nanobio_probes/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神 隆 (JIN TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・ナノバイオブ
ローブ研究チーム・チームリーダー

研究者番号：80206367