

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19591527

研究課題名（和文） CdSe ナノクリスタルを用いた食道癌組織の生体内リアルタイム
イメージング

研究課題名（英文） In vivo real time imaging of esophageal cancer with CdSe nanoparticle

研究代表者

亀井 尚 (KAMEI TAKASHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：10436115

研究成果の概要（和文）：

蛍光プローブとしての CdSe-Her2 抗体複合体の安定した作成法を確立し、Her2 発現ヒト食道癌を用いた担癌マウスにおいて、静脈内投与により、体外から腫瘍組織を蛍光検出することができた。また、臨床応用を念頭に励起光の高出力化、検出能の改善も行った蛍光内視鏡下手術システムを新規に試作した。大動物モデルとしてブタを用い、消化管におけるリンパ管網やセンチネルリンパ節の蛍光検出を蛍光シグナルにより、リアルタイム検出に成功した。

研究成果の概要（英文）：

We developed ultra-stable nanoparticles of CdSe conjugated with anti-Her2 antibody as a novel functional fluorescent probe for in vivo imaging. After intravenous injection of this nanoparticle, we were able to detect the fluorescent signals and image of human esophageal cancer in tumor-bearing nude mouse from outside the body successfully. Furthermore, we developed new surgical system for endoscopic fluorescent surgery based on clinical application. Using this fluorescent detection system and CdSe as a nano-tracer, we succeeded in real time imaging of lymph networks and sentinel lymph node biopsy of gastrointestinal tract in pig model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総 計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：食道癌、CdSe ナノクリスタル、蛍光計測、リアルタイムイメージング、センチネルリンパ節、蛍光内視鏡手術

1. 研究開始当初の背景

(1) 蛍光計測は主に光工学から進歩していたが、その医療応用はほとんど試みられていなかった。一方、ナノテクノロジーの発展によりその技術がさまざまな医療分野に応用されつつあり、ナノメディスンとして診断や治療を大きく飛躍させるものとして注目を集め始めた時期であった。

(2) 新規に創生された半導体ナノクリスタルは従来の有機系蛍光色素にはない大きな特長を持っている蛍光粒子である。蛍光強度が数十倍、励起光照射によってもほとんど退色しない、外殻をポリマーでコーティングでき、抗体やペプチドなどの官能基を結合させることで、機能性粒子となるなどの特徴を有している。その医学への応用はごく限られた分野の細胞生物学で使用され始めたばかりであった。

(3) 癌治療、特に手術治療においてリアルタイムに癌の存在部位、広がり詳細にイメージングすることは切除範囲の決定や不要なリンパ節郭清を避ける意味で、重要であるが、その的確な手法が模索されていた時期でもあった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、半導体蛍光物質 **CdSe** ナノクリスタルに癌細胞分子標的タンパクに特異的に結合する抗体・ペプチドなどの官能基を付加させることにより癌細胞に集積させる機能を持たせ、生体内でリアルタイムに癌組織を蛍光イメージングする手法を確立させることである。

3. 研究の方法

(1) CdSe-Her2 抗体複合体その他の機能的ナノ粒子の作成と精製

抗 Her2 抗体は分子標的治療薬として市販されており、比較的多量に入手可能である。これを用いて、安定した複合体の作成に必要な温度や反応時間などの条件検討を行う。また、非特異的集積を減らす目的で、粒子表面のコーティングおよび精製条件の検討を行う。さらに他の癌分子標的になりうるモノクローナル抗体や癌ペプチドなどの官能基を付加させた機能的粒子を作成し、蛍光計測を検討する。

(2) 坦癌マウスでの生体内イメージング
Her2 を発現しているヒト食道癌細胞株をヌードマウスに移植し、坦癌マウスを作成する。先に作成した CdSe-Her2 複合体をマウス尾静

脈から投与し、リアルタイムに腫瘍を蛍光計測する。また、リンパ節転移モデルマウスを作成し、転移リンパ節での蛍光検出が可能か検討し、さらに摘出下リンパ節における癌転移巣と粒子の関係を病理組織学的に検討する。

(3) 蛍光内視鏡手術を想定したシステムの新規開発と大動物モデルでの蛍光計測

臨床応用を念頭に、蛍光計測装置と高出力レーザー励起装置を組み合わせた硬性内視鏡型（腹腔鏡あるいは胸腔鏡）のシステムを作成する。それを用いて、ブタモデルで、CdSe を胃、小腸、食道などの消化管粘膜下に局注し、これからドレナージされるリンパ管・リンパ節の内視鏡下蛍光検出を検討する。また、脂肪組織を通しての深部のシグナルが検出可能か検討する。

4. 研究成果

(1) 抗 Her2 抗体を付加させた CdSe 粒子はその精製条件を検討することにより、安定した蛍光特性を保持し、比較的大量に作成する方法を確立した。この蛍光特性は細胞レベルで確認した後、後述する坦癌マウスの癌組織イメージングで確認した。一方、その他の官能基については食道癌特異的にターゲットとなる分子やペプチドについては抗 EGFR 抗体を用いて検討したが、抗体を大量に入手することが困難であり、細胞レベルでの検討にとどまった。

(2) マウス背部に癌細胞を移植した坦癌マウスを作成し、この癌組織を体外から蛍光検出できるか検討した。尾静脈から投与した CdSe-Her2 複合体は、癌組織に集積し蛍光シグナルを検出できた。しかし、生体内では肝臓や脾臓といった網内系組織への非特異的集積で投与量の多くがロスしていることもわかり、これを回避する粒子表面のコーティング（シリカコーティングと PEG コーティング）を検討したが、有意に非特異的集積を減らすまでは至らなかった。深部の蛍光検出に関しては概ね 1cm 程度であればレーザー励起光が到達可能で、蛍光シグナルを検出できることが分かった。

(3) 市販されている内視鏡手術システムに高出力のレーザー励起光と高感度蛍光検出装置を組み込んだ一体型のシステムを新規に作成した。バンドパスフィルターは 700-800nm に最適なものを組み込み、可視光外、近赤外領域をターゲットとし自家蛍光の影響をなるべく排除しつつ通常の術野を汚染しない波長のものとした。これを用いて大動物生体内イメージングの検討を行った。ブ

タ消化管粘膜下層に経口軟性内視鏡下にCdSe粒(QD)を投与、これを消化管外から胸腔鏡下あるいは腹腔鏡下にリアルタイムに観察した。投与直後より、ドレナージされるリンパ管を蛍光観察でき、さらにはセンチネルリンパ節と判断されるリンパ節を検出可能であった。腸管膜や脂肪組織を通しての観察も可能で、これも概ね1cm弱の深度であれば励起光が到達でき、蛍光が観察可能なことを明らかにした。摘出したセンチネルリンパ節は不均一な蛍光シグナルを呈しており、病理組織学的検討を加えた結果、転移開始部位とされる輸入リンパ管周囲に蛍光が集積することも明らかにした。これは実際のリンパ節転移の術中迅速診断において、この蛍光シグナルを目安に診断すれば、小転移巣の見逃しを防止できる科学的根拠を有した画期的な手法と考えられた。

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 1 件)

1. Nano-imaging of the lymph network structure with quantum dots.

Hikage M, Gonda K, Takeda M, Kamei T, Kobayashi M, Watanabe M, Satomi S, Ohuchi N.

Nanotechnology 2010 May 7;21(18) in press(査読有)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Single particle imaging of the sentinel lymph node with endoscopically injected fluorescent nano-objects

Hikage M, Kamei T et al (East Asian Pacific Student Workshop on nano-biomedical engineering・2009/12/21・Singapore)

2. Fluorescent sentinel lymph node biopsy under endoscopic surgery using nano-objects

Hikage M, Kamei T et al (3rd int symposium on Nanomedicine・2009/11/4・岡崎)

3. Development of the fluorescent Sentinel lymph node biopsy under endoscopic surgery using novel nano-sized particle

Hikage M, Kamei T et al (日本癌学会・2009/10/1・横浜)

4. ナノ粒子をトレーサーとした鏡視下手術の基礎的検討

日景允、亀井尚ほか(日本ナノ学会・2009/5/10・東京)

5. ナノスケール蛍光粒子を用いたセンチネルリンパ節生検の基礎的検討

日景允、亀井尚ほか(日本外科学・2009/4/2・福岡)

6. Basic examination of the endoscopic surgery using nanoparticle tracer

Hikage M, Kamei T et al (World Congress of Endoscopic Surgery・2008/9/5・Yokohama)

7. ナノ粒子を用いたセンチネルリンパ節生検の基礎的検討

日景允、亀井尚ほか(日本内視鏡学会2008/9/2・横浜)

8. Basic examination of the fluorescent endoscopic surgery using nanoparticle tracer

Hikage M, Kamei T et al (Int Symposium on Nanomedicine・2008/5/8・福岡)

9. 新規ナノ粒子をトレーサーとした鏡視下手術の基礎的検討

日景允、亀井尚ほか(日本ナノ学会・2008/5/6・福岡)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：輸入リンパ管流入部検出方法および特定細胞同定方法

発明者：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

権利者：東北大学

種類：特願

番号：2009-152781

出願年月日：2009/6/26

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井 尚 (KAMEI TAKASHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：10436115

(2) 研究分担者

宮田 剛 (MIYATA GO)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60282076

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

里見 進 (SATOMI SUSUMU)
東北大学・病院・教授
研究者番号：00154120

(3)連携研究者

小林 正樹 (KOBAYASHI MASAKI)
東北工業大学・工学部・教授
研究者番号：90332981