

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670546

研究課題名(和文)金ナノ粒子を用いた腫瘍のCTイメージング

研究課題名(英文)X-ray computed tomography imaging of a tumor with high sensitivity

研究代表者

大内 憲明(Ohuchi, Noriaki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90203710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：X線CTの画像コントラストを強調するために現在医療機関で広く用いられている造影剤はヨードを基材とした低分子物質であり、造影される臓器は非特異的である。今回金ナノ粒子を用いた新規造影剤を作成し、腫瘍血管の特性であるEPR(enhanced permeability and retention)効果を利用して腫瘍を特異的に造影することを試みた。EPR効果を向上させるために作成した金ナノ粒子の表面にPEG(polyethylene glycol)を担持させ血液滞留性を上げることに成功した。さらに作成した粒子を担癌マウスに投与し、腫瘍を特異的に造影することをX線CTで確認した。

研究成果の概要(英文)：Contrast agents are often used to enhance the contrast of X-ray computed tomography (CT) imaging of tumors to improve diagnostic accuracy. However, because the iodine-based contrast agents currently used in hospitals are of low molecular weight, the agent is rapidly excreted from the kidney. This leads to nonspecific enhancement of contrast images for tissues. Here, we created gold (Au) nanoparticles as a new contrast agent to specifically image tumors with CT using an enhanced permeability and retention (EPR) effect. Au has a higher X-ray absorption coefficient than does iodine. Au nanoparticles were supported with polyethylene glycol (PEG) chains on their surface to increase the blood retention. The developed Au nanoparticles were injected into tumor-bearing mice, and the distribution of Au was examined with CT imaging, transmission electron microscope (TEM) imaging. The results show that specific localization of the developed Au nanoparticles in the tumor.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：金ナノ粒子 腫瘍イメージング EPR効果

1. 研究開始当初の背景

X線CTは現在臨床現場において病気の画像診断で広く行われており、より高精度な診断を行う際は造影剤が使用されるが、現在利用されている市販造影剤は低分子製材からなるため、濃度勾配に従って分布し、癌を含め臓器非特異的に造影される。そのためより癌組織を特異的に造影する新たな高感度造影剤の開発が期待されている。近年、癌細胞への受動的な薬剤送達方法としてナノ粒子を用いた Enhanced permeation and retention effect (EPR 効果) と呼ばれる概念が注目されている。EPR 効果は腫瘍組織に特異的に認められる現象であり、この概念を用いることで癌に選択的にナノ粒子を集積させることが可能と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では高い造影能を保持する金ナノ粒子を合成し、EPR 効果によって癌を特異的にCT イメージングし臨床応用へつなげることを狙いとする。

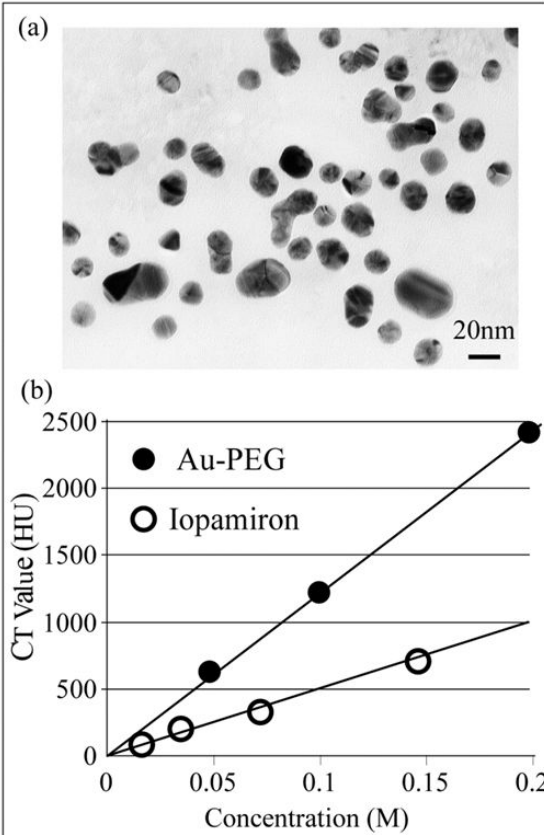
3. 研究の方法

polyethylene glycol (PEG) を担持した金ナノ粒子を合成するために、最初に塩化金酸溶液を加熱し還元反応にて金ナノ粒子を合成する。粒径の異なる複数種類の金ナノ粒子合成を行い造影に適した粒径を検討する。その後PEG修飾を行い生成することによりPEG鎖を担持した金ナノ粒子 (Au/PEG 粒子) 作製を行うが、PEGの種類や修飾方法によって粒子表面の特性が大きく異なるためにその修飾条件についても検討を行う。Au/PEGの造影剤としての機能を評価するために濃度あたりのCT値を測定する。CT値はX線吸収の程度を数値化したものである。測定は動物実験用X線CT (ALOKA製 LACHETA LCT-200) を用いる。Au/PEGの濃度あたりのCT値を測定して市販のヨード系造影剤と比較してCT造影剤としての機能を評価する。また、担癌マウスCT撮影に関して、PEG修飾の影響を評価するために担癌マウスの尾静脈にAu/PEGナノ粒子を投与してCT撮影を行う。血液滞留性の評価方法としてマウスの心臓内のCT値推移を測定する。心臓内には血液が流れており、そのCT値は血液中のAu量と比例することからCT値の変化が血液滞留性の指標となる。投与前のCT値を基準として投与後のCT値の時間経過に伴うCT値の変化を相対値として測定してPEG修飾による血液滞留性を評価する。癌については投与前後でCT撮影を行い画像上の変化を観察することで造影効果を評価し、適切な造影剤の形状、濃度、修飾方法などについて検討を行う。また、Auは電子線を吸収する性質を持ち電子顕微鏡にて明瞭に観察することが可能である。このことから粒子の微細なレベルの組織内での局在観察のために電子顕微鏡観察を行う。特に癌組織については詳細な観察検討を行い新生血管との関係や

EPR 効果について検討を行う。

4. 研究成果

(1) EPR 効果は150nm以下の粒径で効果を発揮することが知られている。今回の研究でEPR 効果が高く癌に運搬される効率が優れていると思われる30nmの粒径を持つナノ粒子



をCT用造影剤として作製した (図1a) 図1

作製した粒子の平均粒径は30.4nmであり、肉眼では暗赤色を呈した。作製した粒子は観察内の数か月で凝集するとはなかった。更に、造影能を評価するために濃度勾配ごとのCT値を測定したところ、濃度に比例して造影能を持つことを明らかにした (図1b)。一般的に用いられているX線CT用の造影剤であるイオパミドールと造影能を比較したところ、濃度あたり約2倍の造影効果を有することが明らかとなった (図1b)。この結果から、Au/PEGナノ粒子はX線CTの造影剤として優れた能力を持つことが明らかとなった。

(2) Au/PEGナノ粒子のマウスでのX線CTの造影効果を調べるため、マウス尾静脈に粒子を投与し、心臓、肝臓、脾臓の時間経過ごとのCT値を測定した。その結果、心臓CT値の時間推移は粒子注入後から急激な上昇を示し、その後高い値を保ちながら徐々に低下していく様子が観察でき、その半減期はおおよそ24時間であった。Auナノ粒子を用いた造影剤はこれまでに報

告があったが本研究で作製した粒子はより優れた滞留性を示すことが明らかとなった。

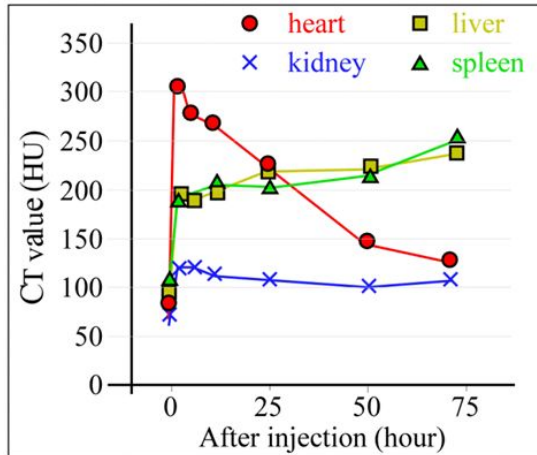


図 2

血液滞留性が優れているということは腫瘍血管からの造影剤の漏出時間が長くなるということに他ならず、すなわち EPR 効果を高め、腫瘍の描出がより鮮明になるということであるため、本作製粒子が腫瘍イメージングに適している可能性が示唆された。

次に肝臓、脾臓といった臓器の CT 値の推移を測定した。肝臓、脾臓は網内径と呼ばれる 60-180nm の細かい網目状の組織であり体内に注入されたナノ粒子は速やかにこれら網内径に捕捉されることが報告されている。それゆえ目的組織に粒子を運搬するのに肝臓、脾臓に取り込まれてしまうことは重要な問題となる。投与されたナノ粒子は数分でこれら網内径に取り込まれることがこれまでいくつかの報告にされているが、本作製粒子ではより緩徐に網内径に取り込まれていく様子が肝臓、脾臓の CT 推移から明らかとなった。このような結果となった理由として Au ナノ粒子に担持させた PEG が網内径捕捉を免れる役割を果たしていることが考えられた。以上の結果からは作製した 30nm の Au/PEG ナノ粒子は腫瘍特異的に可視化する優れた造影剤であると考えられる。

(3) 作製した Au/PEG ナノ粒子が優れた血液滞留性を有することが明らかとなったため、これを用いて担癌マウスの腫瘍イメージング実験を行った。その結果、時間経過とともに腫瘍が造影される様子が描出される結果となった。また、特に腫瘍辺縁が明瞭に描出されることが可能であった(図 3)。特に腫瘍辺縁が強く造影される原因として、腫瘍の外層に EPR 効果が発現される新生血管が多く存在することが考えられた。また一方で造影効果が比較的弱い腫瘍内部では新生血管の造成が乏しいことが示唆される結果となった。このことは一般的に報告されている腫瘍の栄養血管の成熟過程に一致する結果であり腫瘍成熟過程を可視化できたと考えられる。

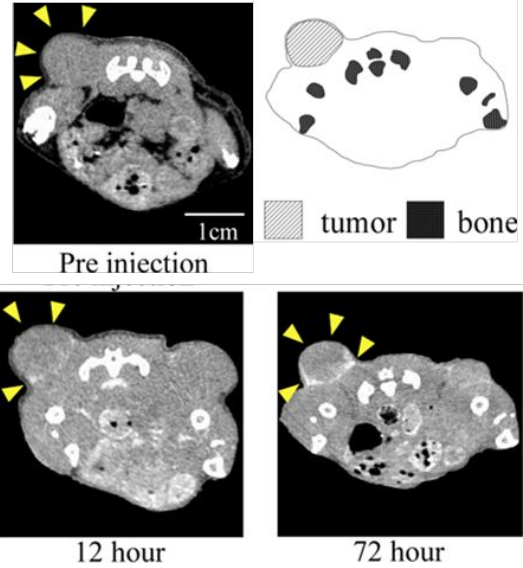


図 3

(4) Au は電子線を吸収する性質を持ち電子顕微鏡にて明瞭に観察することが可能である。このことから粒子の微細なレベルの組織内での局在観察するために電子顕微鏡観察を行った(図 4)。図 3 で示した腫瘍の X 線 CT イメージを行った同個体を用いて電子顕微鏡用に観察用の切片を作製した。その結果、作製した Au/PEG ナノ粒子は腫瘍内の毛細血管に多く存在し、一部の粒子はマクロファージに貪食される様子が観察された。

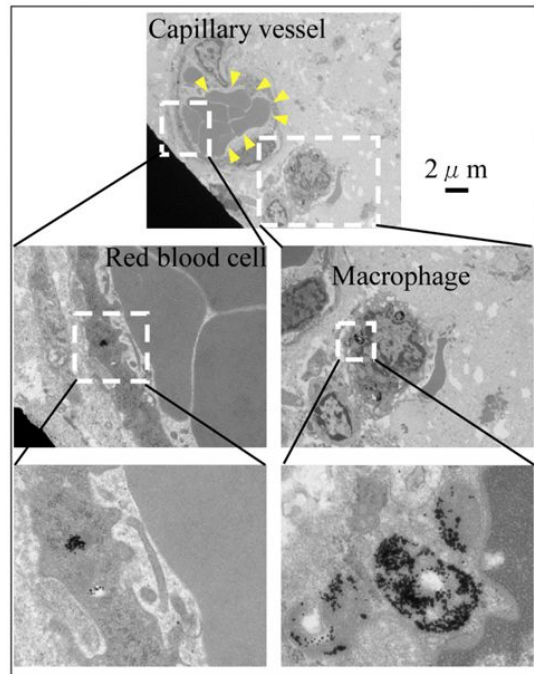


図 4

本研究では市販のヨード基材を用いた造影剤の約 2 倍の造影能をもつ 30nm の Au/PEG ナノ粒子を作製した。優れた造影効果をもつ Au は癌のイメージングに有用である可能性が

示唆された。また、電子顕微鏡による組織観察にて直接的にEPR効果を観察できたが、EPR効果を可視化した報告はほとんど見られないため、今後の癌イメージング分野において重要な実験結果となる可能性が考えられる。

参考文献

Hainfeld JF, Slatkin DN and Smilowitz HM
2004 Phys Med Biol. 49 N309

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) Kobayashi Y, Morimoto H, Nakagawa T, Kubota Y, Gonda K, Ohuchi N. Fabrication of gadolinium hydroxide nanoparticles using ion-exchange resin and their MRI property. Journal of Asian Ceramic Societies 査読あり 4: 138-142 (2016).

(2) Kobayashi Y, Ayame T, Shibuya K, Nakagawa T, Kubota Y, Gonda K, Ohuchi N. Stabilization of silica-coated silver iodide nanoparticles by ethanol-washing. Pigment & Resin Technology 査読あり 45: 99-105 (2016).

(3) Kobayashi Y, Matsudo H, Kubota Y, Nakagawa T, Gonda K, Ohuchi N. Preparation of silica-coated quantum dot nanoparticle colloid solutions and their application in in-vivo fluorescence imaging. Journal of Chemical Engineering of Japan 査読あり 48: 112-117 (2015).

(4) Kobayashi Y, Nagasu R, Nakagawa T, Kubota Y, Gonda K, Ohuchi N. Preparation of Au/silica/poly(ethylene glycol) nanoparticle colloid solution and its use in x-ray imaging process. Nanocomposites 査読あり 2: 83-88 (2015).

〔学会発表〕(計5件)

(1) Kubota Y, Gonda K, Kobayashi Y, Kamei T, Takano M, Nakagawa T, Matsudo H, Shibuya K, Ohuchi N. Diagnostic Advantages of New Contrast Agent Using Gold and Quantum Dots. 8th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2014) December 4-6, 2014 Matsuyama (Ehime Univ. Nanka Memorial Hall)

(2) Oikawa T, Gonda K, Kubota Y, Kobayashi Y, Kamei T, Shibuya K, Takano M, Kano T, Tabata T, Ohuchi N. Development of Photothermal Therapy Using Gold Nanorods 8th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2014) December 4-6, 2014 Matsuyama (Ehime Univ. Nanka Memorial Hall)

(3) 久保田洋介、権田幸祐、中川智彦、亀井尚、大内憲明 マルチモダルイメージングを

用いたセンチネルリンパ節微小転移検出法の開発 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月8日 名古屋(名古屋国際会議場)

(4) 及川隆洋、権田幸祐、久保田洋介、小林芳男、亀井尚、澁谷恭輔、高野真由美、鹿野隼社、田畑拓也、大内憲明 金ナノロッドを用いた温熱療法の開発 ナノ学会第13回大会 2015年5月11-13日 仙台(東北大学片平さくらホール)

(5) 久保田洋介、権田幸祐、亀井尚、大内憲明 金および蛍光量子ドットを用いた新しい造影剤の開発 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25-27日 横浜(パンフィコ横浜)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

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

大内憲明 (OHUCHI, Noriaki)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 90203710

(2) 研究分担者

権田幸祐 (GONDA, Kohsuke)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 80375435

多田寛 (TADA, Hiroshi)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号: 50436127