

ライフイノベーションに貢献するナノ粒子の創製

並木 禎尚

了徳寺大学・健康科学部医学教育センター

要旨

ナノ（10億分の1）メートルサイズの微小カプセルに薬剤を搭載し、その挙動を自由に操ることにより、適切なタイミングで標的部位に薬剤を集積させるシステムを開発した。本総説では筆者らが取り組んできた、癌の診断・治療に利用できるライフイノベーション技術を中心に、グリーンイノベーション技術への波及効果についても紹介する。

キーワード：ナノ粒子， ライフイノベーション， ナノ医療

Fabrication of Nanoparticle as a Future Theranostic and Preventive Medicine

Yoshihisa Namiki

Center for Medical Education, Faculty of Health Science, Ryotokuji University

Abstract

Free manipulation of the movement of drugs with remote-controlled magnetism is expected to be a next-generation technology. Remotely manipulating position of nanoparticles, which are capsules that contain drugs and respond to various type of physical energy, will lead to an innovative medicine that allows “pinpoint” diagnosis, treatment and prevention of disease. We aim to realize innovative nanomedicine in which we can control the accumulation, release, and effects of drugs with nanometer-sized capsules.

Keywords : Nanoparticle, Life innovation, Nanomedicine

I. 背景

科学技術の融合は、医学の進歩を加速させる。ナノテクノロジー、マテリアルサイエンス、バイオテクノロジーの進歩は目覚しく、診断・治療技術の発展に貢献してきた。一方、癌は世界中で主な死因となっており、進行癌は未だ不治の病である。ナノ粒子の利用により、薬剤の正常組織への分布を減らし癌病巣への集積を高めることで、これまで手に負えなかった進行癌のピンポイント治療や、癌細胞から放出される微量の蛋白質や遺伝子断片を鋭敏に検出することで、超早期の段階で迅速診断がそれぞれ可能になる。

II. ガン治療用ナノ粒子の開発

リポソームは最も古くから研究されてきたナノサイズのカプセルである^{1,2)}。リポソームには、(1) 水溶性薬剤をカプセル内部に封入できる、(2) 脂溶性薬剤をカプセル膜成分として保持できる、(3) 陽性荷電(カチオニック)リポソームは、陰性荷電を示す核酸医薬と複合体を形成するので細胞の食作用による取り込みを利用して遺伝子を導入できる、などの特長がある。本項では、これまで開発してきた癌治療用リポソームについて述べる。

1. リポソームを用いた遺伝子治療の開発

ここでは、強力なプロモーター・エンハンサー／転写活性因子を組み合わせることにより、導入効率を高めた遺伝子治療について述べる³⁾。

非ウイルス性の遺伝子運搬体(ベクター)の中でも、カチオニックリポソームは調整が容易で、ウイルス性ベクターで問題となる発癌(癌遺伝子活性化)やウイルス活性化などの致命的な有害事象を回避できる利点がある。ところが、非ウイルス性ベクターの遺伝子導入効率は概して低いという問題がある。

そこで、強力なプロモーター・エンハンサーであるCAG遺伝子、転写活性を促進する染色体タンパク質HMG-1, 2 (high mobility group 1, 2)を併用することにより、多重膜カチオニックリポソームの遺伝子導入効率の増強を試みた(図1B)。

最初に、導入効率を可視化するためのレポーターである蛍光に関わるルシフェラーゼ酵素遺伝子、若しくは腫瘍縮小効果を持つTNF- α (tumor necrosis factor- α) 遺伝子それぞれをCAG遺伝子下流に結合したプラスミドDNAを作製した。HMG-1, 2の併用により、癌細胞株においてルシフェラーゼ活性が倍増することを確認した。続いて、最適比のリポソーム／ルシフェラーゼ発現プラスミド／HMG-1, 2複合体を転移性乳癌マウスモデルに投与後、ルシフェラーゼにより分解され発光する基質であるルシフェリンと反応させたところ腫瘍組織選択的な発光を確認した(図1C, D)。さらに、TNF- α を発現するプラスミドDNA (pcagTNF- α)を含むリポソームと、抗腫瘍性サイトカインであるINF- γ (interferon- γ)を併用投与したところ、担癌動物モデルの生存期間は大幅に延長した(図1E)。以上の結果から、強力なプロモーター・エンハンサー／転写活性因子の併用により、カチオニックリポソームの欠点である低い導入効率を改善できることが明らかとなった。非ウイルス性ベクターの安全性を生かした、転移性癌の有効な治療法の開発に役立つことが示唆された。

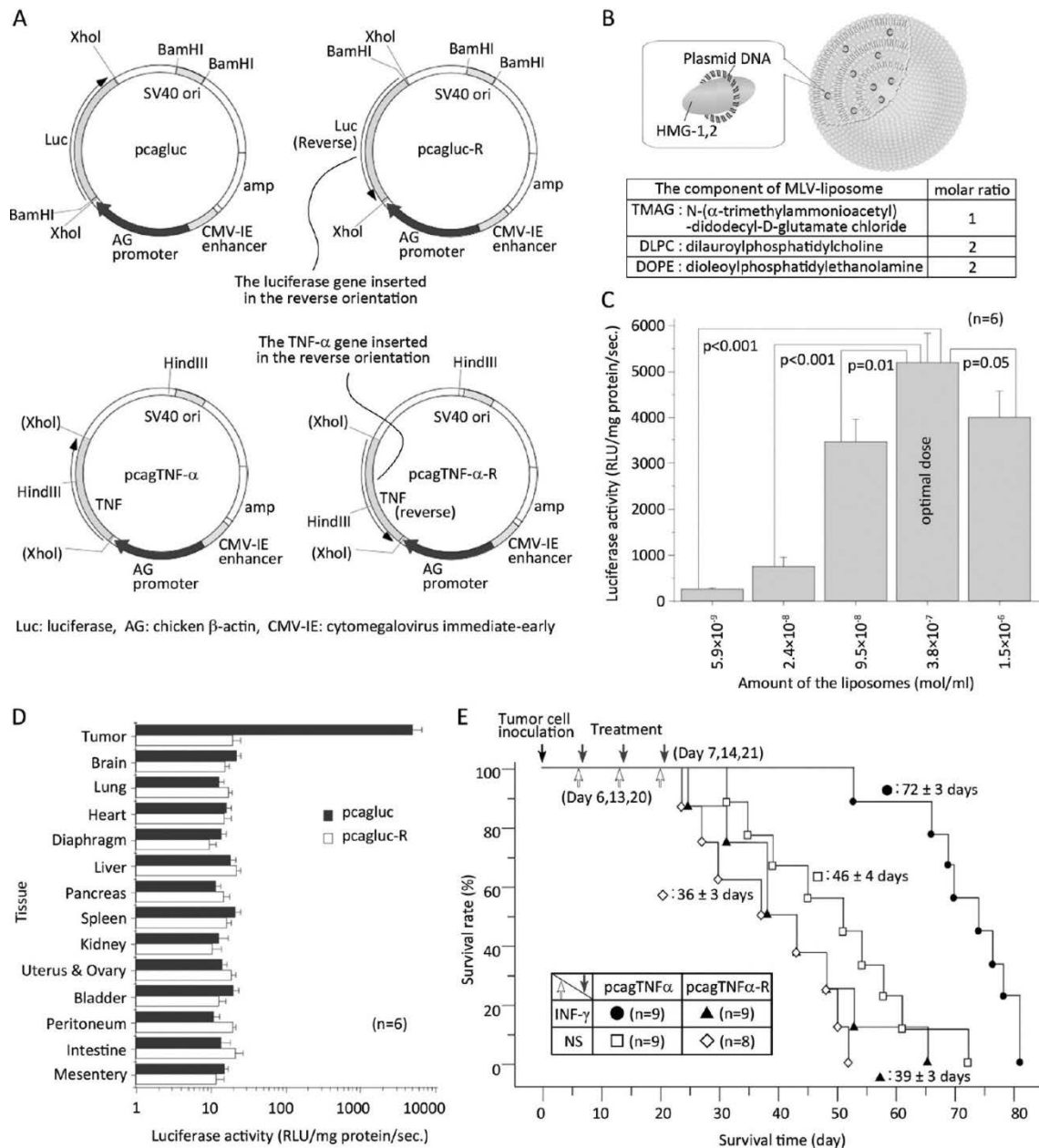


図1. (A) プラスミドDNAの遺伝子配列. (B) 多重膜カチオンリポソームへのプラスミドDNA/HMG-1, 2複合体の搭載. (C) 遺伝子導入効果が最大となるリポソーム投与条件の検討. 癌性腹膜炎モデル(ヌードマウス)にリポソーム(プラスミドDNA/HMG-1, 2複合体を含有)を腹腔内投与した. ルシフェラーゼ遺伝子を強力に発現するプラスミドDNA (pcagLuc)を用いた. 投与2日後に腹膜転移巣のルシフェラーゼ活性を測定した. (D) 各臓器・組織におけるルシフェラーゼ発現量. マウス腹腔内にpcagLuc/HMG-1, 2/リポソーム (3.8×10^{-7} mol) 複合体を投与した. (E) 癌性腹膜炎モデルを用いた治療実験. マウスにINF- γ (4000 U: 白色矢印), pcagTNF- α /HMG-1, 2/リポソーム (3.8×10^{-7} mol) 複合体 (黒色矢印) を投与した. (C-E) ヒト乳癌細胞株MCF-7 (7.5×10^6) を腹腔内接種した (Day 0). リポソーム ($10 \mu\text{mol}$) /HMG-1, 2 (96 μg) /DNA (300 μg) 複合体を腹腔内投与した. 参考文献3を改変. Copyright 1998 Stockton Press.

2. ラジオアイソトープによる治療遺伝子の発現コントロール

ここでは、放射線感受性プロモーターとラジオアイソトープを組み合わせ、標的選択性を高めた遺伝子治療について述べる⁴⁾。

腫瘍に限定した治療遺伝子の発現は、治療効果の増強・有害事象の回避の観点から重要である。FOS, JUN, Egr (early growth response) ファミリーをコードする遺伝子は、様々な物理刺激による初期シグナル伝達において主要な役割を演じる。例えば、Egr-1 遺伝子は細胞増殖・細胞分裂停止・組織修復など生体防御に関与する。一方、電離放射線は活性酸素の発生を介して、間接的にEgr-1遺伝子の転写を活性化することが知られている⁵⁾。

そこで、ラジオアイソトープと放射線感受性プロモーター (Egr-1 promoter) を組み合わせることにより、癌細胞選択的な治療遺伝子の発現制御を試みた。最初に、Egr-1プロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合したプラスミドDNA (pEgr-1-Luc) を、カチオニックリポソームを用いてヒト膀胱癌細胞株AsPC-1に導入後、培養液にラジオアイソトープを加えEgr-1を活性化したところ、ルシフェラーゼが強力に発現することを確認した (図2B)。続いて、pEgr-1-Lucを導入したAsPC-1細胞の培養液に各種ラジオアイソトープを添加したところ、腫瘍集積性が高く腫瘍シンチグラフィに用いられるクエン酸ガリウム (Ga-67) がEgr-1活性化に最も有効であることが明らかとなった (図2C, D)。さらに、Egr-1プロモーター下流に単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (HSV/TK) 遺伝子を結合したプラスミドDNA (pEgr-1-TK) をAsPC-1細胞に導入後、Ga-67, ガンシクロビル (GCV) と反応させた。Ga-67によりEgr-1が活性化されHSV/TK遺伝子が発現、GCVのリン酸化により細胞が障害されることを確認した (図2E)。

以上の結果より、ラジオアイソトープ、放射線感受性プロモーターの併用によるHSV/TK遺伝子の発現制御、HSV/TKで分解されてはじめて毒性を発揮するプロドラッグの組み合わせは、腫瘍選択性・安全性の高い癌治療法の開発に役立つことが示唆された。

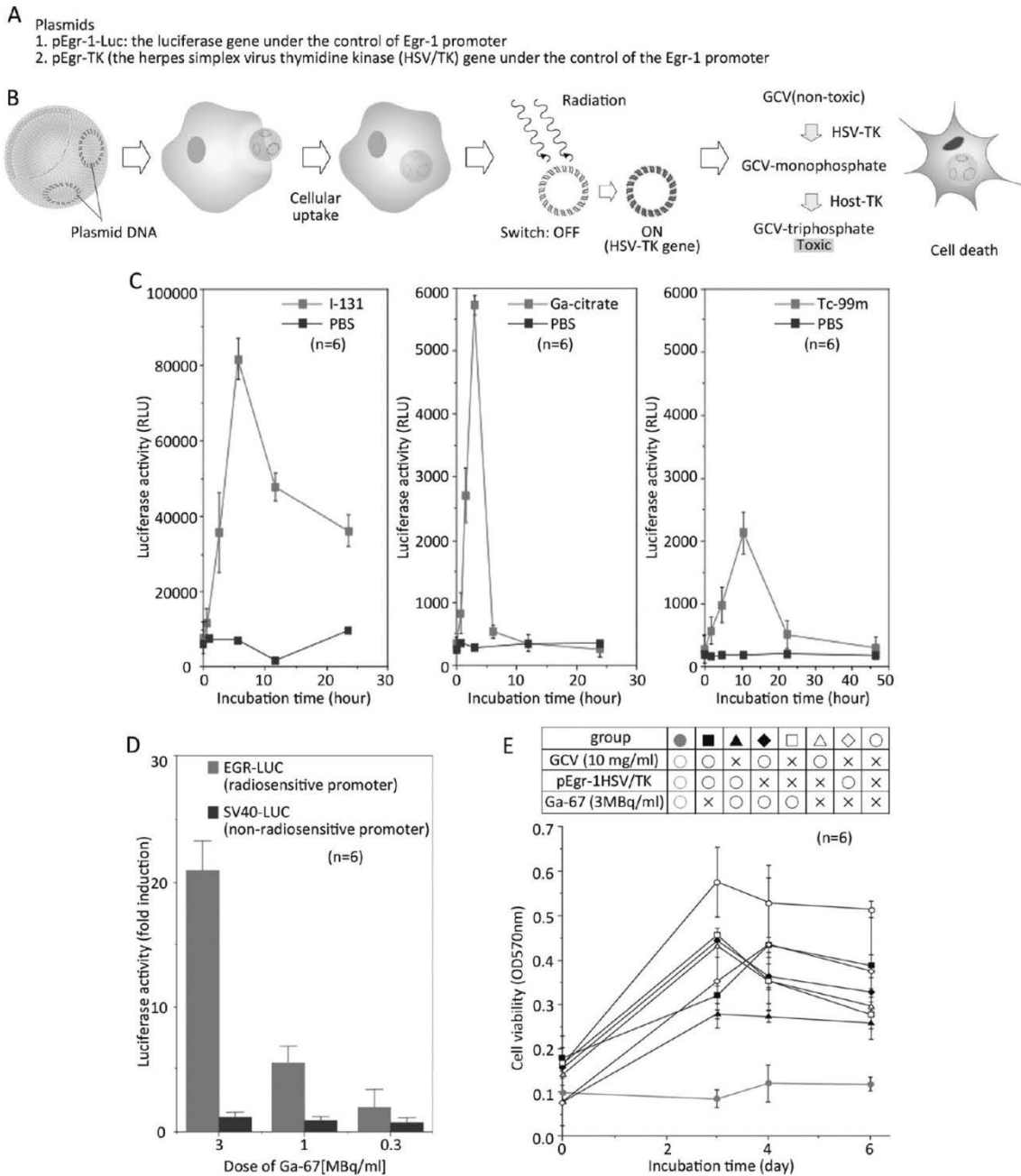


図2. (A) 使用したプラスミドDNA. (B) 放射線感受性Egrプロモーター, ラジオアイソトープの併用による治療遺伝子の発現コントロール. (C) ラジオアイソトープによるEgrプロモーターの活性化 (時間依存性). pEgr-Luc遺伝子を導入した膵癌細胞株の培養液にI-131, Ga-67, Tc-99mを添加後, ルシフェラーゼ活性を測定した. (D) Ga-67によるEgrプロモーターの活性化 (放射線量依存性). 各種プラスミドDNAを導入した癌細胞株の培養液に放射性クエン酸ガリウムを添加, 3時間後にルシフェラーゼ活性を測定した. (E) pEgr-TKを導入した癌細胞株の培養液にGa-67を, 15分後にガンシクロビルを添加した (Day 0). MTT色素法により細胞生存率を定量した (Day 2). (C-E) ヒト膵癌細胞株 (AsPc-1: 3.0×10^4) を用いた. 参考文献4を改変. Copyright 1997 Mary Ann Liebert, Inc.

3. テーラーメイドリポソームによる遺伝子治療効果の増強

ここでは、リポソームの個別設計（テーラーメイド）により、導入効率を高めた遺伝子治療について述べる⁶⁾。

スキルス胃癌末期に頻発する腹膜播種の抑制により腸閉塞などを回避できれば無病生存期間の延長につながるが、確立された治療法は存在しない。腹膜播種を促進する物質として、スキルス胃癌細胞やスキルス関連線維芽細胞から分泌されるHGF (Hepatocyte Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), KGF (Keratinocyte Growth Factor) などが知られている。NK4はHGFのc-Met受容体に結合し、HGFを競合的に阻害する他、KGF, FGFの働きを抑制する⁷⁾。また、分子標的薬であるゲフィチニブはEGF受容体のチミジンキナーゼを阻害する⁸⁾。

一方、抗癌剤感受性、ベクターの遺伝子導入効率は癌細胞の種類により大きく異なる。そこで、それらの最適化は抗腫瘍効果の増強に有効と考え、各種スキルス胃癌細胞におけるゲフィチニブによる細胞毒性、カチオニックリポソーム組成による遺伝子導入効率の相違を調べた。さらに、スキルス胃癌動物モデルを用いて、リポソーム組成を最適化したNK4導入遺伝子治療にゲフィチニブを併用した効果について検証した。

最初に、8種類のスキルス胃癌細胞株のゲフィチニブ感受性を調べたところ、5種類の細胞において中～高度の抗腫瘍効果を認めた。続いて、高いゲフィチニブ感受性を示したNUGC-4細胞を用いて、8種類のリポソームのうち遺伝子導入効率が最大となる組成を検索した(図3A)。さらに、スキルス胃癌患者の癌組織より分離培養した線維芽細胞NF22と、NUGC-4細胞をマウス腹腔内に同時接種することにより「線維芽細胞に囲まれ癌細胞が増殖する」スキルス胃癌特有の病態を再現した(図3C)。最終的に、スキルス胃癌動物モデルを用いて、ゲフィチニブ感受性、リポソーム組成の両者の最適化により(図3D)、腫瘍組織における癌細胞の増殖・アポトーシス抵抗性、血管新生を最大限抑制したところ、癌の進行が有意に遅延した(図3E)。以上の結果より、分子標的薬や遺伝子導入ベクターを、個々の患者に応じて最適化できれば、治療効果が大きく副作用の少ない癌個別化治療の開発に役立つことが示唆された。

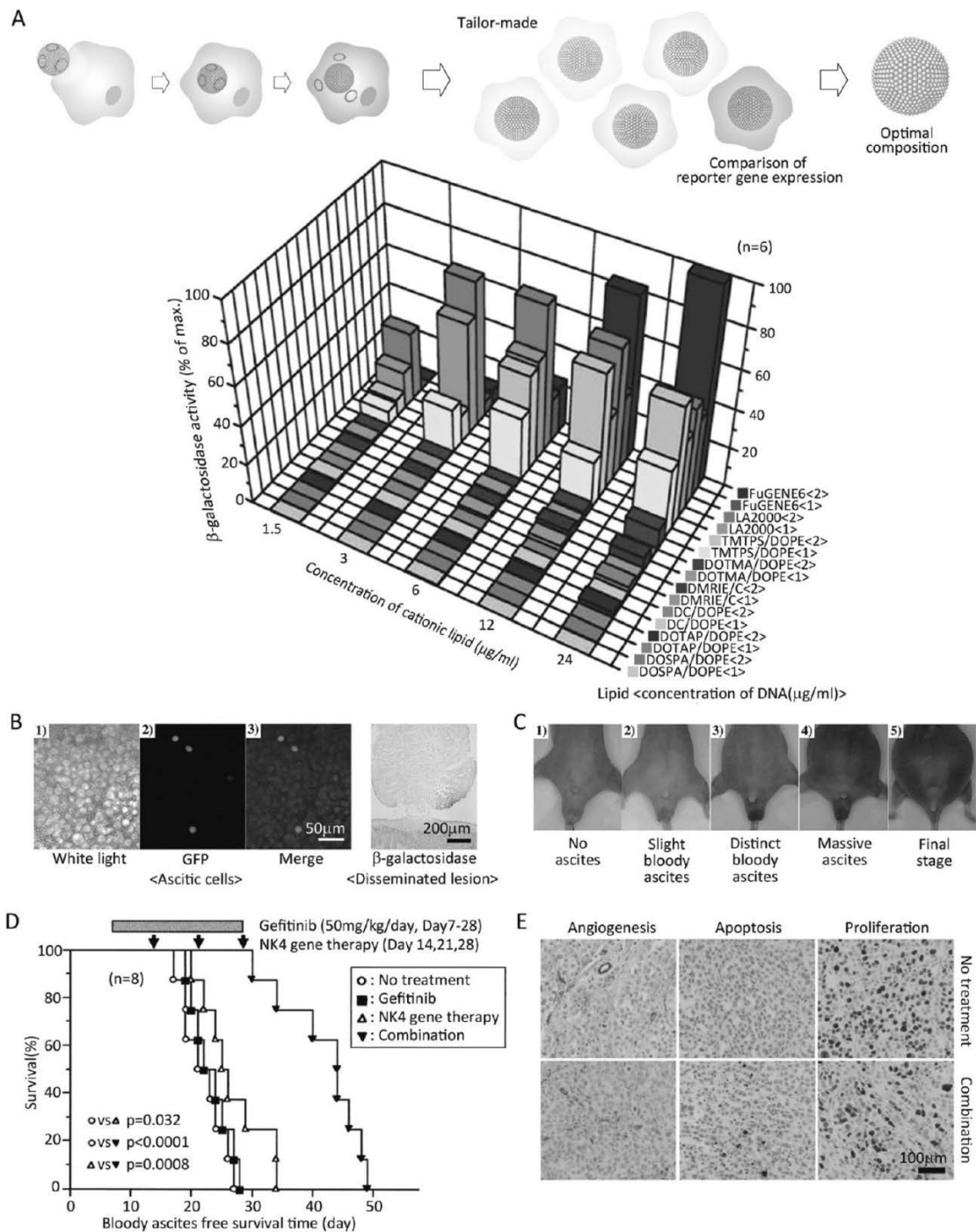


図3. (A) NUGC-4細胞におけるカチオンリポソーム/DNA複合体の投与量の最適化. NUGC-4細胞の培養液にカチオンリポソーム (1.5-24 $\mu\text{g/ml}$) /pCMV-SPORT β -gal (1-2 $\mu\text{g/ml}$) 複合体を添加・培養後、 β -ガラクトシダーゼ活性を比較した. (B) 血性腹水中の遊離細胞 (小型細胞:マウス赤血球; 大型細胞:NUGC-4細胞), 腹膜転移巣におけるレポーター遺伝子の発現. NUGC-4細胞を腹腔内接種し作製した癌性腹膜炎マウスモデルにLA2000 (6 $\mu\text{g/ml}$) /pcDNA3.1CT-GFP (2 $\mu\text{g/ml}$) /HMG-1, 2タンパク (1.28 μg) 複合体を腹腔内投与 (1mL) した (Day 21). 腹水中浮遊細胞におけるGFPの発光は、蛍光顕微鏡により検出した (Day 28). 同様に、マウスモデルにLA2000 (6 $\mu\text{g/ml}$) /pCMV-SPORT β -gal (2 $\mu\text{g/ml}$) /HMG-1, 2タンパク (1.28 μg) 複合体を腹腔内投与 (1mL) した (Day 21). 腹膜転移巣における β ガラクトシダーゼ発現は、X-Gal染色により検出した (Day 28). (C) 腹腔内へのNUGC-4細胞, 線維芽細胞NF-22の同時接種後の癌性腹膜炎の進行. (D) リポソームによるNK4遺伝子導入とゲフィチニブを併用した治療効果. (E) 治療後の癌組織の免疫組織染色. 腫瘍細胞の接種24日後に、Ki-67, ssDNA, vWFの免疫染色を行うことにより、細胞増殖, アポトーシス, 血管新生の程度について検討した. (D, E) マウスモデルにゲフィチニブの経口投与, LA2000 (6 $\mu\text{g/ml}$) /pcDNA3.1CT-GFP (2 $\mu\text{g/ml}$) /HMG-1, 2タンパク (1.28 μg) 複合体, 若しくはLA2000 (6 $\mu\text{g/ml}$) /pcDNA3hNK4 (2 $\mu\text{g/ml}$) /HMG-1, 2タンパク (1.28 μg) 複合体の腹腔内投与を行った. (C-E) ヒト胃癌細胞株 (NUGC-4 : 1.0 $\times 10^6$), ヒト線維芽細胞株 (NF22 : 2.0 $\times 10^6$) を同時接種した (Day0). 参考文献6を改変. Copyright 2005 Wiley-Liss, Inc.

4. 光増感ステルスリポソームによる光線力学的治療

ここでは、脂溶性光増感剤を組み込んだステルスリポソーム（PSSL: Photosensitive stealth liposome）による、光線力学的効果の増強について述べる⁹⁾。

光線力学的療法は、早期胃癌の根治、進行胃癌で問題となる通過障害の解除を目的とした低侵襲治療として用いられている¹⁰⁾。ところが、現行の光増感剤であるポルフィリンナトリウムの腫瘍集積性は低く、全身に拡散し光線過敏性皮膚炎を惹起するため、腫瘍中の薬剤濃度を高める治療法の開発が望まれている。

一方、*in vitro*試験で有効性が報告されている脂溶性光増感剤を、通常の水溶性光増感剤の代わりに臨床に用いることで、治療効果を高められる可能性があるが、水分散しないため、静脈内に投与した場合、血液中で凝集塊を形成し致死的な塞栓症を引き起こす危険性が高い。また、脂溶性粒子をナノサイズまで微細化すれば水分散可能になるが、それだけでは異物除去システムである細網内皮系（Reticuloendothelial System: RES）により体内から排除されてしまう。

そこで、脂溶性光増感剤であるクロリンe6エステルをリポソームの膜成分として組み込んだPSSL（クロリンe6エステル: DLPC: DOPE=1:2:2（モル比））を作製し（図4A）、さらにRESによる捕捉を回避するため表面をポリエチレングリコール（PEG）で修飾した。PSSL、水溶性光増感剤であるクロリンe6ナトリウム（Ce6Na）の胃癌細胞株における光線力学的効果を比較したところ、PSSLは同量のクロリン環を含むCe6Naの最大53倍以上の抗腫瘍効果を示した（図4B）。蛍光顕微鏡による観察では、PSSLは同モル量のクロリン環を含むCe6Naに比べ、胃癌細胞へのより強い集積性を示した（図4C）。これらの結果より、光増感効果の増強は主にPSSL化による細胞への光増感剤の取り込み増加による可能性が示唆された。

続いて、PEG修飾PSSLのステルス（RES回避）機能を検証するため、動物モデルに静脈内投与後、代表的なRESである肝臓への取り込みを定量した。投与2時間後、PEG修飾PSSLの捕捉量は非修飾PSSLと比べ1/3から1/2に抑制された。光線力学的効果について検証したところ、PSSL（2.5mg/kg）投与群では皮下腫瘍は完全消失したが、Ce6Na（2.5mg/kg）投与群では、Laser照射10日後に局所再発を認めた（図4D）。PSSLは胃癌動物モデルにおいて強力な光増感効果を示したことから、胃癌に対する新たな治療法としての開発が期待される。

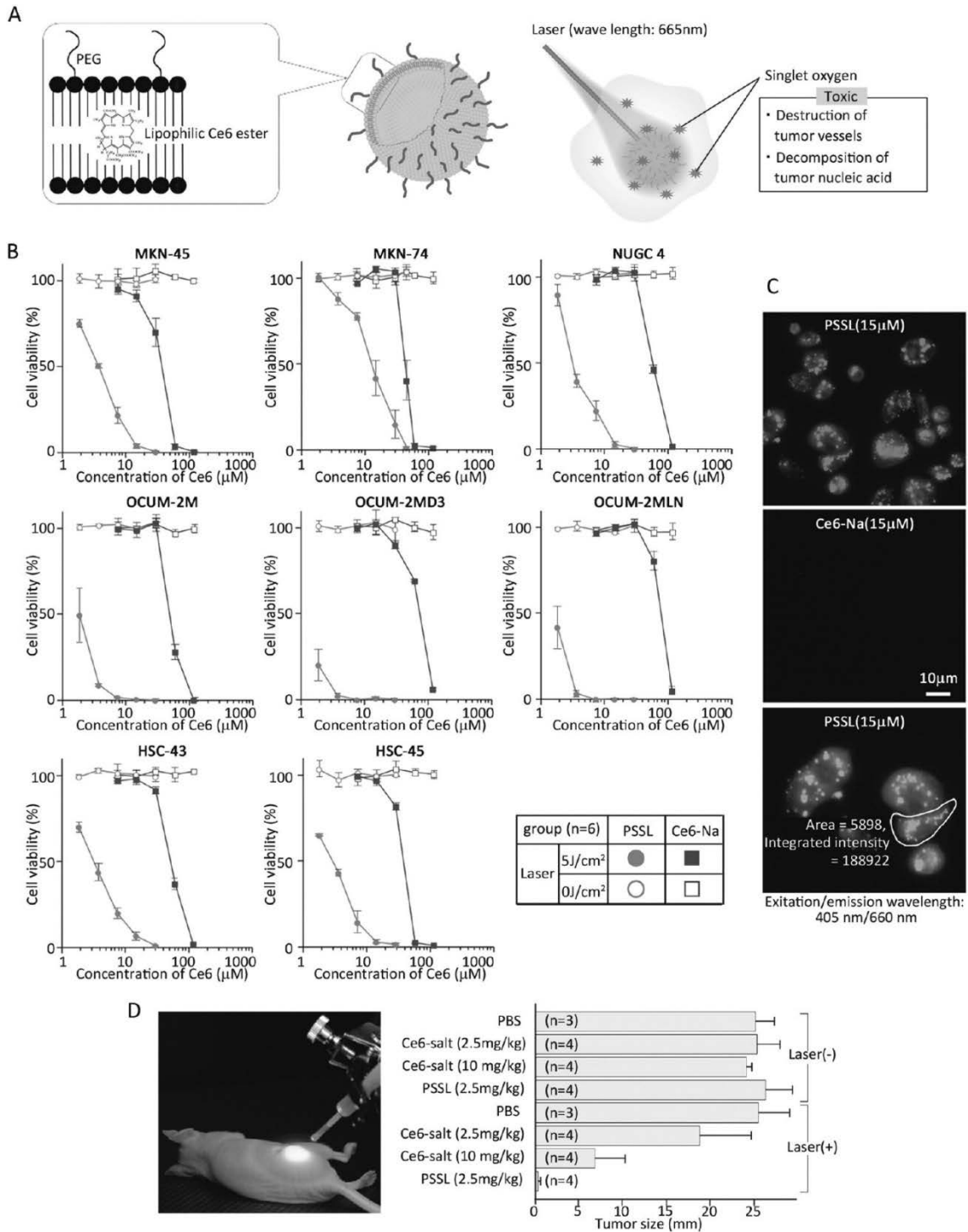


図4. (A) PSSLの構造. PSSLを構成する脂質二重膜の成分として脂溶性Ce6エステルを含有する. (B) 各種胃癌細胞株におけるPSSL, 水溶性Ce6Naの光線力学的効果. PSSL, Ce6Naを細胞培養液に添加, 30分間培養後, レーザー光を照射した. 照射15時間後に細胞生存率を調べた(細胞毒性試験). (C) HSC-45細胞におけるPSSL, Ce6Naの取り込みの観察. OCUM-2MD3細胞におけるPSSLの取り込みの定量. (D) 担癌動物モデルにおけるPSSLおよびCe6Naの光線力学的効果. HSC-45細胞(1.0 x 10⁶)をヌードマウスの皮下に接種した. 腫瘍サイズが12mm((長径+短径)/2)に達した際に, 300 μl のPBS, PSSL, Ce6Naを投与した. 2時間後にレーザー光(100J/cm²)を腫瘍部位に照射, さらに20日後に腫瘍サイズを測定した. 参考文献9を改変. Copyright 2004 Elsevier Ltd.

Ⅲ. ガン診断・治療のための磁性ナノ粒子の開発

磁性材料はナノ粒子に、磁気検出による病気の診断、磁気誘導によるドラッグデリバリーシステム、交流磁場の照射による温熱治療など多くの可能性を与える。本項ではこれまで開発してきた癌の診断・治療に応用できる磁性ナノ粒子について述べる。

1. siRNA送達のための磁性脂質ナノ粒子

ここでは、癌の進展に関与する遺伝子を破壊するRNA干渉のための核酸医薬を患部に送達する手段としての磁性ナノ粒子の有用性について述べる¹¹⁻¹⁵⁾。

短鎖干渉RNA (siRNA) による疾患関連遺伝子の分解は有望だが、病巣にsiRNAを送達する方法は確立されていない^{16,17)}。そこで、siRNAを患部に磁力で強制送達するため、オレイン酸で被覆した磁性ナノ結晶(コア部)と、核酸医薬を結合できる陽性荷電脂質(シェル部)から構成される磁性脂質ナノ粒子(LipoMag)の開発を試みた(図5A)。

最初に、蛍光標識したsiRNA (F-siRNA) とLipoMagの複合体を皮下腫瘍モデルの静脈内に投与後、腫瘍に磁気を照射したところ腫瘍血管に蛍光色素が集積した。一方、腫瘍の血管内皮細胞におけるEGFRの過剰発現を確認、治療の良い標的になりうることが示唆された(図5C, E)。続いて、LipoMag, PolyMag(市販されているポリマー被覆磁性粒子)とF-siRNAとの複合体を静脈内投与した。siRNAの生体内分布を調べるため各臓器の蛍光強度を測定したところ、F-siRNA/LipoMag群において腫瘍への強い蛍光集積を観察した(図5F)。さらに、EGFRを標的とするsiRNA (siRNA^{EGFR}) とLipoMagの複合体を皮下腫瘍モデルの静脈内に投与後に磁気誘導したところ、腫瘍サイズは非投与群の約半分に抑制されたが(図5G)、siRNA^{EGFR}/PolyMag複合体の投与群では、腫瘍抑制効果は認められなかった。また、siRNA^{EGFR}/LipoMag複合体の投与群では、腫瘍組織における血管新生・細胞増殖の抑制、アポトーシスの促進が免疫染色により明らかとなった。最終的に、マウス胃壁への胃癌細胞株の接種により作製した同所性胃癌モデルを用いて、体内深部腫瘍に対するsiRNA^{EGFR}/LipoMag複合体の磁気誘導効果について検討した。その際、腫瘍に磁気を効率良く安全に照射するため、磁気回路を生体適合性の高いチタンで密封した磁気照射装置を開発、腫瘍近傍に留置した(図5H)。siRNA^{EGFR}/LipoMag複合体の投与群における有意な抗腫瘍効果を認め(図5I)、腫瘍血管の増殖に関与する遺伝子を分解する核酸医薬の磁気による送達の有用性が示唆された。

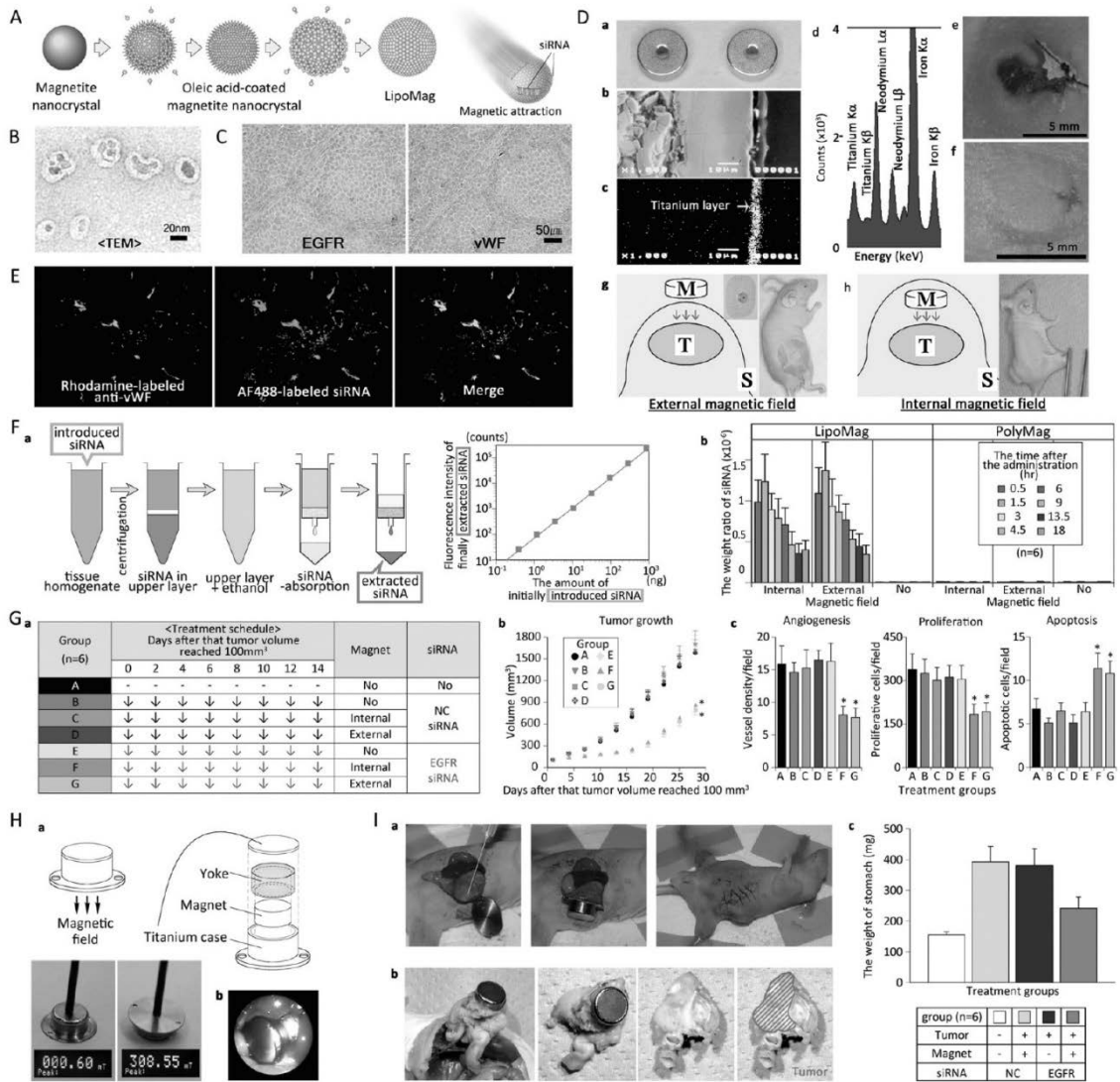


図5. (A) LipoMagの調整. (B) LipoMagの透過型電子顕微鏡による解析 (ネガティブ染色). (C) 腫瘍組織 (NUGC-4細胞を皮下移植したマウスモデル) の連続切片の免疫組織染色. (D) 皮下腫瘍モデルへの生体適合磁石の留置. (a) イオンプレATING法により表面を窒化チタンで被覆したネオジウム磁石 (左: 生体適合磁石). 通常のネオジウム磁石 (右). (b) 生体適合磁石の走査型電子顕微鏡解析. (c, d) EDX (energy disperse X-ray) 解析. (e, f) ニッケルめっきされた通常のネオジウム磁石は金属アレルギーを惹起したが, 窒化チタンで被覆することにより防止できた. (g) 生体適合磁石 (M) を腫瘍組織 (T) 直上の皮膚 (S) にテーピング固定した. (h) 生体適合磁石 (M) を腫瘍組織 (T) と皮膚 (S) の間に外科的に挿入・留置した. (E) 動物モデルの皮下腫瘍 (NUGC-4を接種) におけるsiRNAの分布 (静脈内投与後). (F) 生体内に分布したsiRNAの定量. 組織破砕懸濁液に添加したAlexa Fluor 488標識siRNAをカラム抽出後, 蛍光強度を測定したところ, siRNA添加量は蛍光強度に比例した. (G) 腫瘍組織に分布したsiRNAの対腫瘍重量比. LipoMag, PolyMagとsiRNAの複合体を静脈注射後に磁気誘導した. (H) LipoMagにより送達したsiRNA^{EGFR}の抗腫瘍効果. 動物モデルの腫瘍サイズを測定した. (a) 治療スケジュール. (b) 腫瘍サイズの経時変化. (c) 最終投与2日後に, vWF, Ki-67, ssDNAの免疫染色を行い腫瘍組織の血管新生, 細胞増殖, アポトーシスの程度について調べた (P<0.01; Aグループ (無治療群) と比較). (I) 体内に留置可能な磁気照射装置. (a) ヨーク (磁気回路) に設置したネオジウム磁石をチタンケースに入れ, チタン蓋をTIG溶接した. 磁力計で測定したところ装置片面に強い磁場を検出した. (b) マウス胃壁に達した磁気照射装置の生体適合性について半年間観察したところ, 有害事象を認めなかった. (I) 同所性胃癌モデルにおけるLipoMag/siRNA^{EGFR}複合体の磁気誘導による効果. (a) NUGC-4細胞 (1.0 × 10⁶) をマウス胃壁に接種した後, 磁気照射装置を移植部の胃壁に達した. 腫瘍接種7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21日後にLipoMag/siRNA^{EGFR}複合体を尾静脈に投与した. (b, c) 腫瘍接種24日後にマウスモデルの胃重量を測定した. マウスの体重20グラム当たりsiRNA^{EGFR} (6 μg), 総脂質 (69.1 μg) から構成されるLipoMag/siRNA^{EGFR}複合体を投与した. 参考文献11を改変. Copyright 2009 Macmillan Publishers Limited.

2. 強磁性窒化鉄を用いた薬剤送達効率の向上

ここでは、磁性ナノ粒子を用いた遺伝子の送達効率向上のための、磁性材料としての窒化鉄 (Fe_{16}N_2) の有用性について述べる¹⁸⁾。

主に、窒化鉄はIT (Information technology: 情報技術) 領域における高密度記録媒体の材料として使用されてきた¹⁹⁾。バイオ領域における磁性材料としては主に酸化鉄が用いられており、窒化鉄の利用は世界初の試みである。

窒化鉄には、(1) 酸化鉄 (Fe_3O_4) と比べ透磁率が高い、(2) 酸化鉄と同様、生体適合性が高いなど、優れた特長がある。磁性材料を酸化鉄から窒化鉄に変更することにより、磁性ナノ粒子の磁気集積性、遺伝子導入効率が向上することを確認した (日立マクセル社との共同研究、図6A-D)。

最初に、酸化防止層の表面をもつ窒化鉄微粒子を作製後、粒子表面を疎水性のオレイン酸で被覆した。続いてオレイン酸、陽性荷電脂質/リン脂質の疎水基同士を結合させることにより、最外層を親水基で覆い粒子を水分散可能な状態にした (図6E)。ルシフェラーゼを発現するプラスミドDNA (pcagluc: マイナスに荷電) に、窒化鉄/陽性荷電脂質複合体 (プラスに荷電) を混ぜ、静電引力により両者を結合させた (図6F)。磁気誘導による癌細胞株への遺伝子導入後、ルシフェラーゼ活性を調べたところ、窒化鉄の利用により、導入効率が従来の酸化鉄を用いた場合と比べ大幅に向上することが明らかとなった (図6G)。バイオメディカル用途を目指した窒化鉄ナノ粒子の開発は、標的指向性DDSや疾患の高感度検出などライフイノベーション技術の発展に役立つことが期待される。

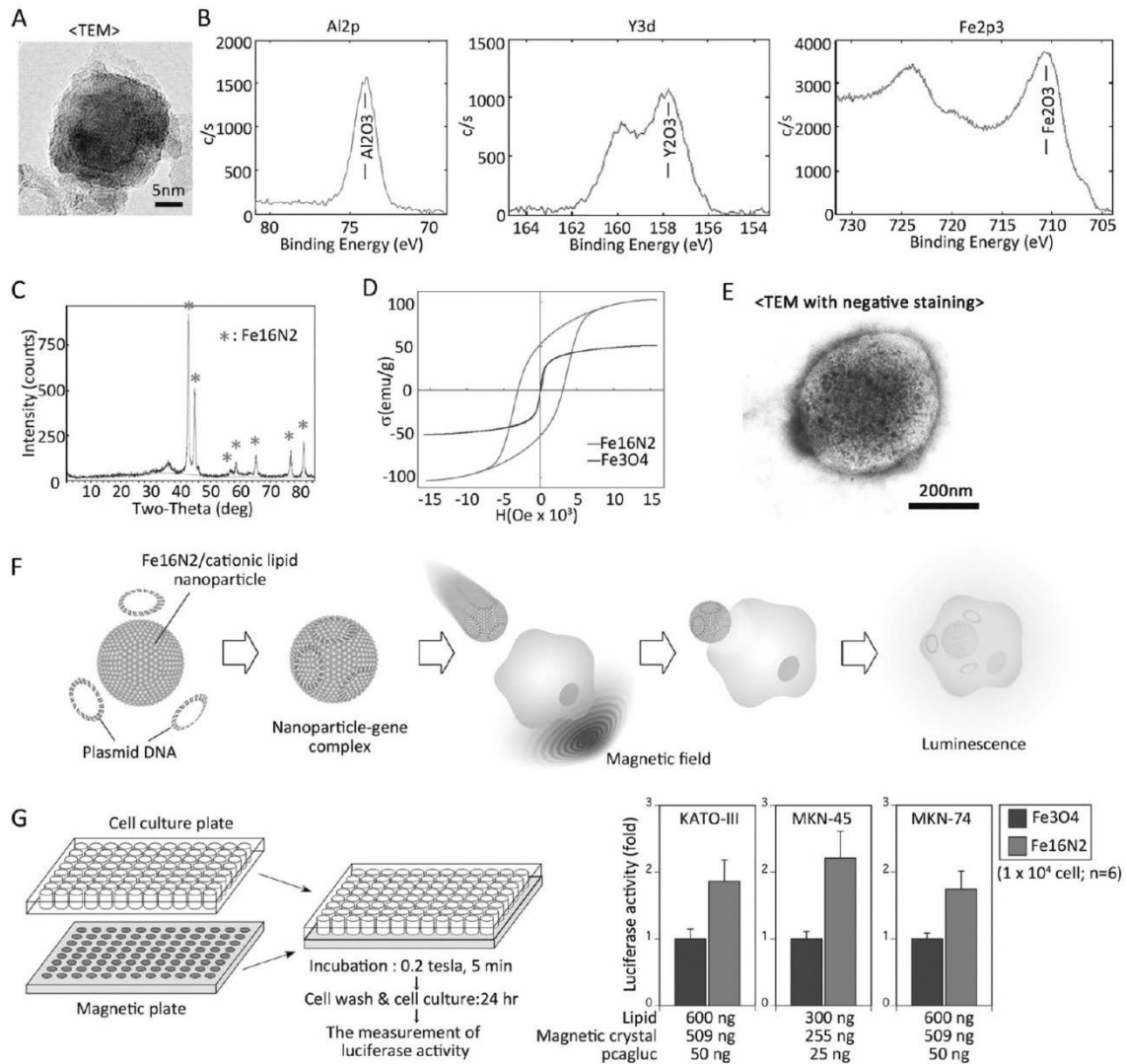


図6. (A) 酸化防止皮膜をもつ窒化鉄を素材とするコアシェル構造体の透過型電子顕微鏡による解析. 粒子径, 皮膜厚の平均値はそれぞれ26 nm, 3.5 nmであった. (B) XPS解析. 皮膜は, アルミニウム, イットリウム, 鉄の酸化物から構成されることを確認した. 皮膜は, 窒化鉄の酸化分解を防ぐ. (C) XRDにより, ナノ構造体のコア部がFe₁₆N₂ 固有の解析パターンと一致することを確認した. (D) コアシェル構造体および四酸化三鉄の磁気特性の解析 (ヒステリシス曲線). コアシェル構造体は, 飽和磁化103.1 emu/g, 保磁力3055 Oeを示した (四酸化三鉄の飽和磁化, 保磁力はそれぞれ50.8 emu/g, 0 Oe). (E) コアシェル構造体を素材とする強磁性脂質ナノ粒子の透過型電子顕微鏡による解析 (ネガティブ染色). (F) 強磁性脂質ナノ粒子の磁気誘導によるレポーター遺伝子の導入. (G) 強磁性脂質ナノ粒子 (窒化鉄/陽性荷電脂質複合体), 通常の磁性脂質ナノ粒子 (四酸化三鉄/陽性荷電脂質複合体) を用いて磁気導入したレポーター遺伝子の胃癌細胞株における発現. 参考文献19を改変. Copyright 2011 Sciyo.

3. 水溶性抗癌剤を搭載できる強磁性カプセルの水熱合成

ここでは, 水溶性薬剤を磁気誘導するためのDDSとして, 数ナノメートル厚のシェルをもつ数百ナノメートル径の磁性カプセルの有用性について述べる^{20,21)}.

従来の磁性ナノ粒子は, 外層部の膜成分として脂溶性薬剤を含有させることは可能であるが, 中空構造をもたない充実性のため水溶性薬剤を搭載できない. そこで, 内部に水溶性抗癌剤を搭載できる中空スペースをもち, 目的部位に磁気誘導できる磁性構造体を開発した. 最初に, 負電荷をもつシリカ微粒子表面を陽性荷電ポリマー (PDDA: poly (diaryldimethylammonium chloride)) で被覆, 強磁性カプセルの鋳型として用いた. ポリオール法²²⁾ を改変し, 鋳型表面のPDPAに鉄白金微粒子を成長させた. 続いて, 高温

高圧（400℃，37MPa）の超臨界水²³で処理したところ，鉄白金微粒子同士がネットワーク状に熱融合し，処理を続けることによりシリカ粒子が徐々に溶解した．その結果，数ナノメートル厚の多孔状のシェルから構成される中空カプセルが得られた^{24,25}．乾燥させたカプセルと抗癌剤水溶液を混合後，真空処理により中空部分を脱気し抗癌剤を充填した²⁴．さらに，抗癌剤の漏出を防ぐため，カプセル表面の多孔部をホスファチジルコリンで密封した．最終的に，抗癌剤充填カプセルを磁気誘導できることを観察（図7B），胃癌細胞株に対する抗腫瘍効果を確認した（図7C）．

磁性カプセルは，医療分野において従来困難であった水溶性薬剤の患部への磁気送達を可能にするだけでなく，粒子内外に大きな表面積をもつ多孔金属カプセルは，工業分野においても，触媒，燃料電池などの反応面積増大による高効率化に貢献しうる．

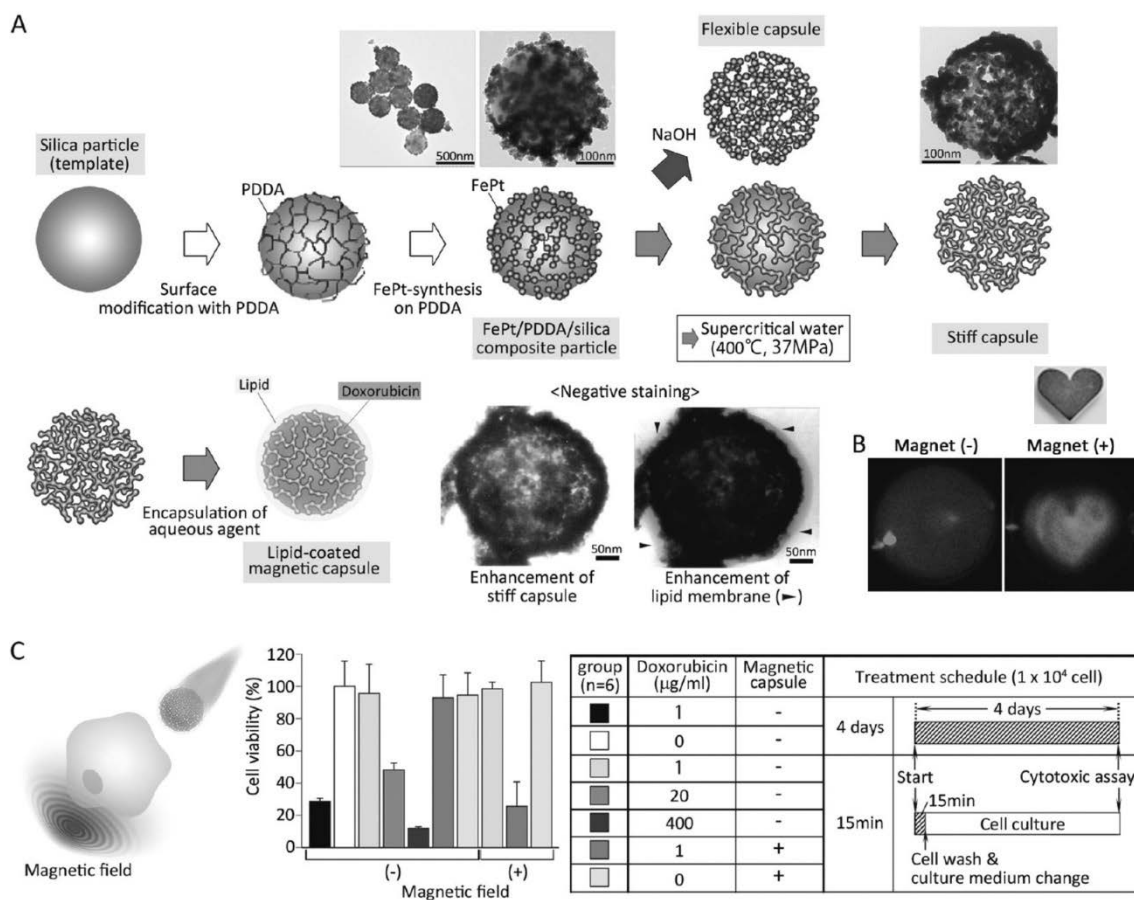


図7. (A) 磁性多孔カプセルの調整方法および透過型電子顕微鏡による解析. (B) ドキソルビシン（水溶性抗癌剤）を搭載した磁性多孔カプセルの磁気誘導. ハート型磁石による集積後，励起光を照射し高感度カメラ（-100℃ 冷却CCD）にてドキソルビシンに由来する蛍光を検出した. (C) ドキソルビシン搭載磁性カプセルを磁気誘導（0.2テスラ）し，MKN-45胃癌細胞における抗腫瘍効果を検討した. 0.3N 塩酸-50% エタノール処理によりカプセル内容を放出後，蛍光強度を測定し，カプセルのドキソルビシン含有量を計算した. (B, C) 励起波長：510nm；蛍光波長：550nm. 参考文献20, 25を改変. Copyright 2011 American Chemical Society.

4. 近赤外蛍光磁性ナノ粒子とマイクロリアクターを用いた癌診断

ここでは癌診断ツールとしての磁性蛍光ナノ粒子の有用性について述べる²⁶⁾。蛍光色素を担持させた磁性ナノ粒子表面を抗体で修飾後、水溶液に分散させ抗原を混ぜたところ凝集塊を形成した。マイクロチャンネルリアクター²⁷⁾に流し磁場を照射したところ、ナノ粒子の集積パターンの相違により抗原の有無を識別することができた。

具体的には、近赤外蛍光 (NIRF: near-infrared fluorescent) で標識後、癌胎児性抗原 (CEA: carcinoembryonic antigen) を認識する抗体で修飾した磁性ナノ粒子を合成、抗体修飾には、SPDP、ジチオトトレイトールを用いた²⁸⁾。続いて、得られた粒子を水溶液に分散後、CEA抗原を混合したところ抗原抗体反応により粒子同士が凝集した (図8B)。凝集塊を含む水溶液を、磁石を装着したマイクロチャンネルリアクターに流した (図8C)。抗原が存在しない場合、ナノ粒子は凝集塊を形成せず徐々に磁場に引き寄せられた。抗原が存在する場合、凝集塊を形成したナノ粒子は磁場で引き寄せられず流路を通過した (図8D, E)。これらの結果より、検討した条件においては、凝集塊を通過させる駆動力が、磁性を帯びた凝集塊を引き寄せる磁力を上回ることが示唆された。

特に、今回開発した方法には、(1) 無機ELシートを用いるため、光学顕微鏡など簡単な装置で磁性粒子の動きをリアルタイムで観察できる、(2) 近赤外蛍光を用いるため、非特異的バックグラウンドによるノイズを最小にできる、などの特長がある。今後、反応条件、マイクロリアクターの断面積・流速を最適化することにより、微量の患者検体を用いて、疾患を高感度・迅速に診断するツールになりうる。また、体内の病巣を体外から検出するツールとしても役立つ可能性があることを、In vivoイメージング装置、MRIを用いて確認した (図8F, G)。

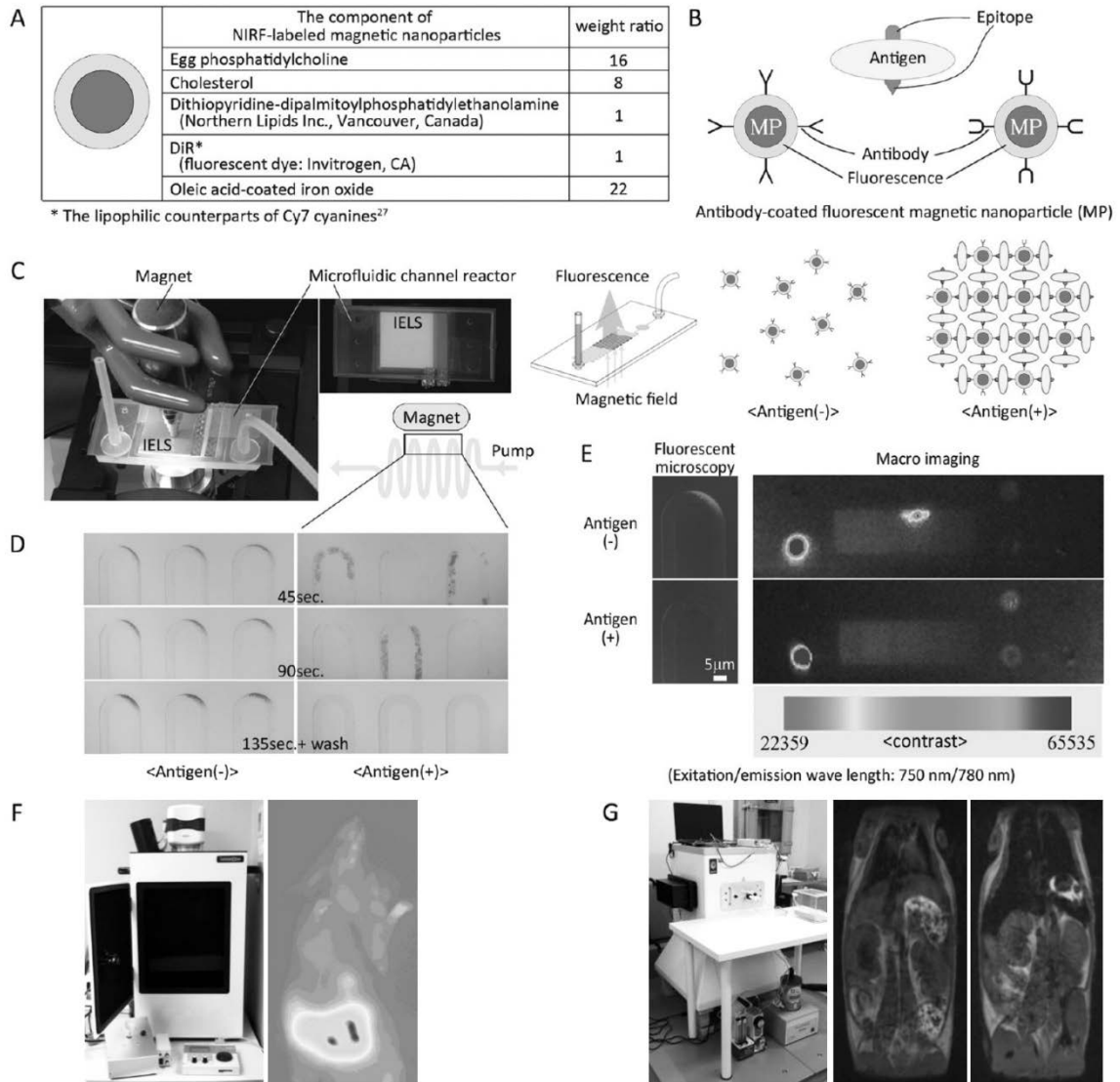


図8. (A) NIRF磁性ナノ粒子の組成. (B) 抗原抗体反応によるNIRF磁性ナノ粒子の凝集. (C) 無機ELシート (IELS) を装着したマイクロリアクターに磁場 (0.4テスラ) を照射した. 光学顕微鏡の観察部位に磁石を設置すると, 光源~対物レンズ間の光路は遮られる. そこで, 磁石とマイクロリアクターの間に装着したIELSをマイクロリアクターの磁気照射部位の光源として用いた (IELSは0.3mmと薄く, 磁場の減衰は無視できる). シリンジポンプ (NanoJet, Chemyx Inc. TX) を用いて, マイクロリアクターの流速を25 nL/分に制御した. (D) マイクロリアクターを用いた抗原抗体反応の観察. (E) マイクロリアクター, 磁性蛍光ナノ粒子を用いたCEA抗原 (100ng/mL) の検出. (F) 静脈注射により肝臓に集積した抗体非修飾NIRF磁性ナノ粒子の蛍光検出. (G) 肝臓に集積した抗体非修飾NIRF磁性ナノ粒子のMRIによる検出 (中: 投与前, 右: 投与後). (E, F) マクロイメージングシステム (Lumazone, Roper Industries, Inc., FL) を用いてナノ粒子の発する近赤外蛍光を検出した. 参考文献27を改変. Copyright 2011 American Chemical Society.

IV. セシウム吸着剤を磁力で回収できる磁性除染剤

ここでは、磁力を利用した放射性セシウムの迅速除染法について述べる。

1. 汚染水に対応した磁性除染剤

汚染水から放射性セシウムを効率良く磁石で取り除ける磁性除染剤を発明した（特許4932054号，特許5755377号）。DDSの開発過程で原発事故による大規模な放射能汚染が発生した。磁性ナノ粒子への薬剤担持技術を応用することで，セシウムを吸着する性質をもつプルシアンブルー（フェロシアン化鉄）を四酸化三鉄（砂鉄成分）の微粒子表面に結合した「磁気回収できる除染剤」を開発，汚染水から99%の放射性セシウムを10秒以内に磁石で取り除けることを確認した（図9A,B）²⁹⁻³²。

2. 飛灰に対応した磁性除染剤

飛灰スラリーから放射性セシウムを直接取り除ける画期的な除染システムを発明（特許5753960号），その有用性を環境省の実証試験にて発表したところ，高く評価され先端技術大賞を受賞した（<http://www.fbi-award.jp/sentan/jusyoku/2014/index.html>）。

大量に発生した除染廃棄物は仮置き場で保管されており，可燃物だけでも1000万m³（cf. 東京ドーム：124万m³）を超える。中間貯蔵に向け焼却減容化が必要であるが，放射性セシウムが濃縮した焼却残渣（可燃物の体積の1割）が相当量発生する。残渣の2割が飛灰（残りは主灰）であるが，飛灰のセシウム濃度は主灰の10倍以上高い。飛灰中のセシウムの大半は水溶性のため，水を加え泥状にした飛灰スラリーをフィルターでろ過した液体成分に，除染剤を混ぜることによりセシウムを取り除けるが，膨大なコスト・処理時間を要する。さらに，分離・脱水した固形成分には3～5割の水分が残るため，埋め立てると水分中の高濃度セシウムが拡散し，土壌・地下水などが放射能で汚染される。一方，放射性廃棄物の減容化の観点から，少量の薬剤で大きな除染効果を得ることが重要である。除染剤の粉末化により表面積を拡大しセシウム吸着サイトを増やすことは有用であるが，細かな除染剤ほど回収が難しいといった課題が生じる。

そこで，飛灰スラリーに混ぜた粉末状除染剤にセシウムを吸着させ磁石で回収できれば，（1）スラリーの段階で取り除けるため，処理済スラリーや脱水固形物には水溶性セシウムは残らず，埋め立て後の放射能拡散を防止できる，（2）表面積が大きく磁気分離可能なため，減溶化・除染スピードを高い次元で両立できる，と考え本技術を開発した³³⁻³⁵。

具体的には，磁気吸着性の高い非酸化鉄系微粒子，強アルカリの飛灰スラリー中で安定なフェロシアン化ニッケルを材料として，飛灰用磁性除染剤を新たに作製した。大容量磁気記録媒体に使用される磁性粉のメーカーで，世界の90%のシェアをもつDOWAエレクトロニクス社に本技術を供与，同社の製造プラントにて大量生産の準備を整えた（<http://www.dowa-electronics.co.jp/function/decontamination.html>）。さらに，大成建設に本除染剤を供給，栃木県那須市に除染プラントを設置し環境省の実証試験に参加した。処理前後の飛灰の放射線量を測定したところ，最大92.1%（40500→3200（Bq/kg）），平均90.6%の高い除染率を示した（図9C-F）。

本技術の実用化は大量に保管されている飛灰の迅速減容化だけでなく，被曝の危険性の高い使用済除染剤の回収工程の無人化にも役立つ。スラリーから水溶性セシウムを除染できるため，処理済飛灰からのセシウムの溶出・拡散防止に貢献する。

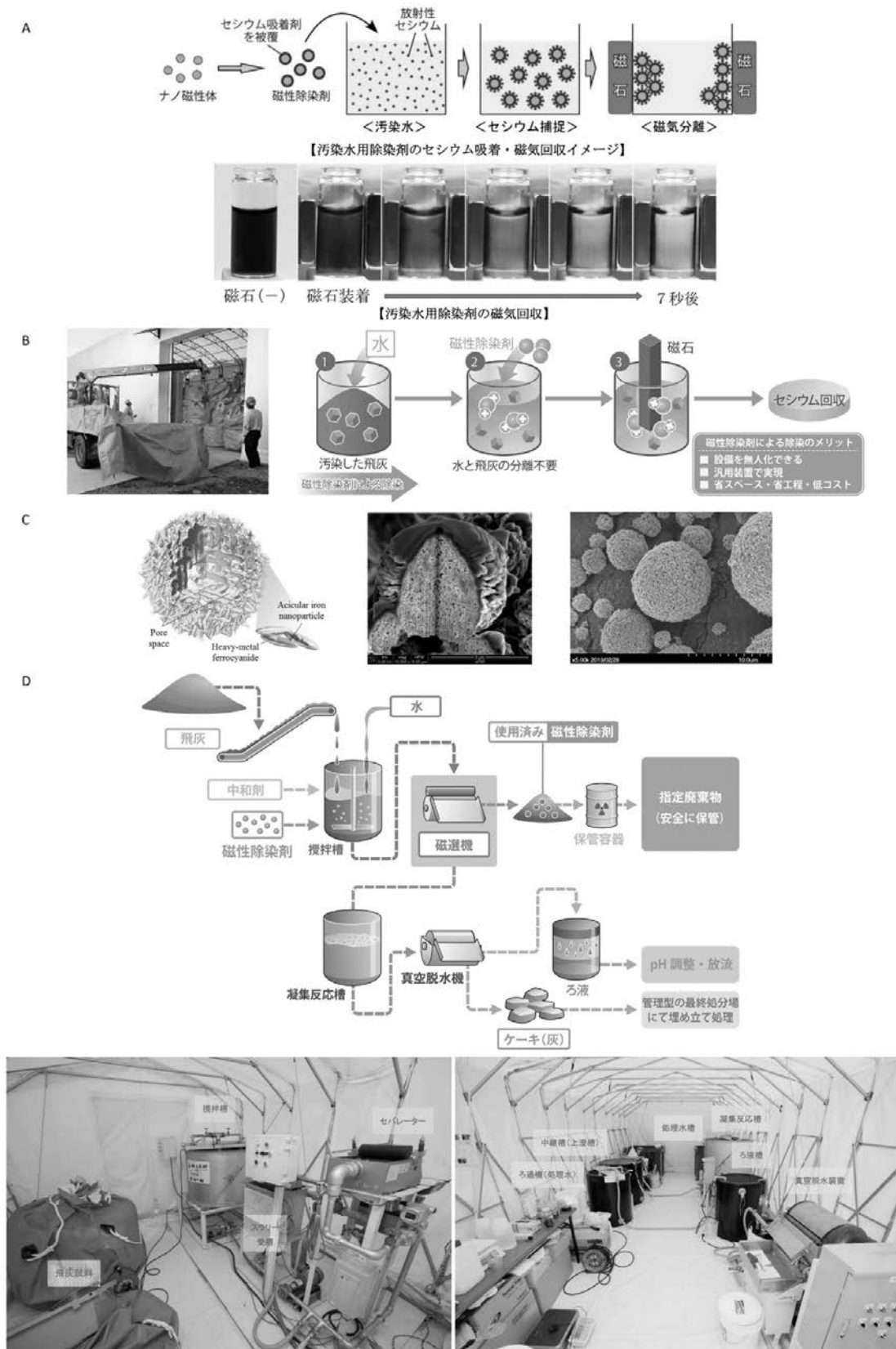


図9. (A) 汚染水用除染剤のセシウム吸着・磁気回収イメージ (上). 汚染水用除染剤の磁気回収 (下). (B) 実証試験で使用したゴミ焼却場に保管中の汚染飛灰 (左; 24000~33000 Bq/kg), 磁性除染剤による飛灰浄化法の概略図 (右). (C) 飛灰用磁性除染剤. 模式図 (左; 1/8カットモデル). FIB-SEM解析 (中). SEM解析 (右). (D) 飛灰処理システムフロー図 (上). 飛灰処理プラント (下; 環境省 実証試験にて大成建設が施工). 参考文献33-35を改変. Copyright 2014 Macmillan Publishers Limited & Fuji-Sankei Communications.

V. まとめ

ナノテクノロジー、マテリアルサイエンス、バイオテクノロジーなど異分野技術の融合は、革新的な癌の診断・治療技術の創製や新たな産業の振興につながる。特に重要なことであるが、これまでの経験を活かして、現在、本学にて取り組んでいる、革新的なストレスフリー研究の推進に貢献できれば幸いである。

VI. 謝辞

以下の助成金を適正使用し研究を実施した（①～⑬：研究代表者，⑭：研究分担者）。

①最先端・次世代研究開発支援プログラム（内閣府），②産業技術研究助成事業（NEDO），③基盤研究B（文科省），④基盤研究C（文科省），⑤若手研究B（文科省），⑥武田科学振興財団助成金，⑦池谷科学技術振興財団助成金，⑧濱口生化学振興財団助成金，⑨ライフサイエンス振興財団助成金，⑩双葉電子記念財団助成金，⑪土屋文化振興財団助成金，⑫DOWAホールディング社テクノファンド，⑬日立マクセル社共同研究費，⑭デクセリアルズ社共同研究費，⑮フクダエンジニアリング社共同研究費，⑯大成建設社共同研究費，⑰除染技術実証事業（環境省）

VII. 参考文献

- 1) Shah RB, Khan MA (2009) Nanotechnology in Drug Delivery, Springer, New York. 621-647.
- 2) Bangham AD (1961) A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids. *Nature* 192, 1197-1198.
- 3) Namiki Y, Takahashi T, Ohno T (1998) Gene transduction for disseminated intraperitoneal tumor using cationic liposomes containing non-histone chromatin proteins. *Gene Therapy* 5, 240-246.
- 4) Takahashi T, Namiki Y, Ohno T (1997) Induction of the suicide HSVtk gene by activation of the Egr-1 promoter with radioisotopes. *Human Gene Therapy* 8, 827-833.
- 5) Weichselbaum RR, Kufe DW, Advani SJ, Roizman B (2001) Molecular targeting of gene therapy and radiotherapy. *Acta Oncologica* 40, 735-738
- 6) Namiki Y, Namiki T, Yoshida H, Date M, Yashiro M, Matsumoto K, Nakamura T, Yanagihara K, Tada N, Satoi J, Fujise K (2006) Preclinical study of a 'tailor-made' combination of NK4-expressing gene therapy and gefitinib for disseminated peritoneal scirrhous gastric cancer. *International Journal of Cancer* 118, 1545-1555.
- 7) Matsumoto K, Nakamura T (2003) NK4 (HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor) in cancer biology and therapeutics. *Cancer Science* 94, 321-327.
- 8) Mendelsohn J, Baselga J (2000) The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19, 6550-6565.
- 9) Namiki Y, Namiki T, Date M, Yanagihara K, Yashiro M (2004) Enhanced photodynamic antitumor effect on gastric cancer by a novel photosensitive stealth liposome. *Pharmacological Research* 50, 65-76.
- 10) Dougherty TJ (1984) Photodynamic therapy of malignant tumors. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2, 83-116.
- 11) Namiki Y, Namiki T, Ishii Y, Koido S, Nariai K, Yanagisawa S, Kashiwagi H, Fujise K, Tada N (2009) A novel magnetic crystal-lipid nanostructure for magnetically guided in vivo gene delivery. *Nature*

Nanotechnology 4, 598-606.

【Nature誌 注目すべき論文に選出】

<http://www.nature.com/am/journal/v2/n1/full/am20109a.html>

- 12) 並木禎尚 (2010) 磁性ナノ粒子を用いた癌治療を目指して. 医学のあゆみ 232, 819-821.
- 13) 並木禎尚 (2012) 核酸医薬などのドラッグデリバリーを目指した磁性ナノコンポジットの創成. 遺伝子医学 23, 163-168.
- 14) Namiki Y (2013) Synthesis of lipidic magnetic nanoparticles for nucleic acid delivery. *Methods in Molecular Biology* 948, 243-250.
- 15) 並木禎尚 (2015) DDSキャリア作製プロトコル集. シーエムシー出版, 東京. 235-243,
- 16) Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- 17) Toub N, Malvy C, Fattal E, Couvreur P (2006) Innovative nanotechnologies for the delivery of oligonucleotides and siRNA. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 60, 607-620.
- 18) Namiki Y, Matsunuma S, Inoue T, Koido S, Kuse Y, Tada N (2011) Nanocrystal, Sciyo, Croatia, 349-372.
- 19) Sasaki Y, Usuki N, Matsuo K, Kishimoto M (2005) Development of NanoCAP Technology for High-Density Recording. *IEEE Transactions on Magnetics* 41, 3241-3243.
- 20) Fuchigami T, Kawamura R, Kitamoto Y, Nakagawa M, Namiki Y (2011) Ferromagnetic FePt nanoparticles/polycation hybrid capsules designed for a magnetically guided drug delivery system. *Langmuir* 27, 2923-2928.
- 21) 瀧上輝顕, 河村 亮, 山崎陽太郎, 北本仁孝, 中川 勝, 並木禎尚 (2010) FePt/SiO₂ 複合型磁性ナノ粒子の作製. *Journal of the Japan Society of Powder and Powder Metallurgy* 57, 636-641. 【粉体粉末冶金協会論文賞受賞】
- 22) Jeyadevan B, Urakawa K, Hobo A, Chinnasamy N, Shinoda K, Tohji K, Djayaprawira DDJ, Tsunoda M, Takahashi M (2003) Direct synthesis of fct-FePt nanoparticles by chemical route. *Journal of Applied Physics* 42, 350-352.
- 23) Ikushima Y (1997) Supercritical fluids: an interesting medium for chemical and biochemical processes. *Advances in Colloid Interface Science* 71, 259-280.
- 24) Namiki Y, Kitamoto Y, Nakagawa M, Fuchigami T, Kawamura R (2011) The preparation of magnetic hollow nanostructures and the drug carrier which contains these nanostructures. *International Patent Application PCT/JP2011/000638*.
- 25) Fuchigami T, Kawamura R, Kitamoto Y, Nakagawa M, Namiki Y (2011) A magnetically guided anti-cancer drug delivery system using porous FePt capsules. *Biomaterials* 33, 1682-1687.
- 26) Namiki Y, Fuchigami T, Tada N, Kawamura R, Matsunuma S, Kitamoto Y, et al. (2011) Nanomedicine for cancer: lipid-based nanostructures for drug delivery and monitoring. *Accounts of Chemical Research* 44, 1080-1093.
- 27) Degre G, Brunet E, Dodge A, Tabeling P (2005) Improving agglutination tests by working in microfluidic channels. *Lab on a Chip* 5, 691-694.
- 28) Barbet J, Machy P, Leserman LD (1981) Monoclonal antibody covalently coupled to liposomes. *Journal*

of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry 16, 243-258.

- 29) セシウム除去 最短15 秒；磁性もった微粒子使用. 日本経済新聞朝刊 新聞記事 2011.9.21.
- 30) Namiki Y, Namiki T, Ishii Y, Koido S, Nagase Y, Tada N, Kitamoto Y (2012) Inorganic-Organic Magnetic Nanocomposites for use in Preventive Medicine: A Rapid and Reliable Elimination System for Cesium. Pharmaceutical Research 29, 1404-1418.
- 31) 並木禎尚 (2012) ナノサイズの磁性微粒子で放射性物質除去—高効率・短時間で除去・回収が可能—. 工業材料 60, 58-59. 【工業材料キーワード40に選出】
- 32) 並木禎尚 (2011) 汚染地で進む実証実験 従来技術の限界に挑戦. 日経エコロジー, 32-33.
- 33) Namiki Y, Ueyama T, Yoshida T, Watanabe R, Koido S, Namiki T (2014) Hybrid micro-particles as a magnetically-guidable decontaminant for cesium-eluted ash slurry. Scientific Reports 4, 6294.
- 34) 渡邊亮栄, 並木禎尚 (2014) 磁性除染剤による焼却飛灰からの放射性セシウム除去技術開発. 環境浄化技術 13, 74-78.
- 35) 上山俊彦, 吉田貴行, 前川弘樹, 根岸 昌範, 今村 聡, 並木禎尚 (2014) 異分野技術の融合による焼却飛灰スラリーから放射性セシウムを磁力で迅速回収できるコンパクトな除染システムの開発. -ライフサイエンス発の画期的なグリーンイノベーション技術の創製-【第28回 先端技術大賞 特別賞受賞(産経新聞社・フジテレビ)】. <http://www.fbi-award.jp/sentan/jusyuu/2014/index.html>

(平成27年11月30日稿)

査読終了日 平成27年12月25日