

<特集「光生体イメージングの進歩と医療」>

LNP（ランタニドナノ粒子）を用いた イメージングについて

村山 康利*¹, 湯浅 英哉², 大辻 英吾¹

¹京都府立医科大学大学院医学研究科消化器外科学

²東京工業大学大学院生命理工学研究科分子生命科学専攻

Cancer Imaging by using Upconversion Lanthanide Nanoparticles

Yasutoshi Murayama¹, Hideya Yuasa² and Eigo Otsuji¹

¹Department of Digestive Surgery,

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

²Department of Life Science,

Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

抄 録

蛍光物質を用いたイメージング技術の発展は目覚ましく様々な分野で研究されている。癌の局在診断にも応用されているが、通常用いられる蛍光タンパクは可視光で励起されるため、その光透過性が問題であり、深部観察は不可能である。また、早期に退色するため、長時間の観察は困難である。それに対して、希土類より合成されたランタニドナノ粒子（LNP）は近赤外（NIR）光を励起光とし、アップコンバージョンにより可視光を発光する。さらに退色しない性質を有する。

このLNPの性質を利用したイメージングが発展すれば、今まで困難であった深部観察が可能となり、癌の診断技術が飛躍的に向上すると考える。本稿では、LNPを利用したイメージングの現状と将来への展望について解説する。

キーワード：ランタニドナノ粒子（LNP）、イメージング、アップコンバージョン、近赤外（NIR）。

Abstract

The development of imaging technology using fluorescent substances has been marked and studied in various fields. Fluorescence imaging is applied to the localized diagnosis of cancer. This method usually involves fluorescent proteins. Because fluorescent proteins are excited by visible light and activated, optical transparency is a problem, and the observation of deep parts is impossible. In addition, the long-term observation is difficult because fluorescence fades quickly. In contrast, lanthanide nanoparticles (LNPs), composed of rare earth elements, undergo near-infrared (NIR) light excitation and emit visible light by upconversion. Furthermore, LNPs do not fade.

If imaging using LNPs develops, the observation of deep parts will become possible and technology

平成25年2月25日受付

*連絡先 村山康利 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465番地
murayama@koto.kpu-m.ac.jp

to diagnose cancer will improve markedly. In this report, I explain the present conditions of imaging using LNPs and the future prospects.

Key Words: Lanthanide nanoparticle (LNP), Imaging, Upconversion, Near-infrared (NIR).

はじめに

近年、光線力学診断 (Photodynamic diagnosis: PDD) が様々な癌の診断に用いられている^{1,3)}。PDD とは癌親和性の蛍光試薬を投与し、癌組織に選択的に蓄積させ、特定波長の励起光を照射することで発せられる蛍光を観察することにより癌の局在診断を行う方法である。PDD は簡便な診断法であり、リアルタイム診断が可能であり、また、生体侵襲性が少ない診断方法として注目されている。

ランタニドナノ粒子 (LNP) は生体組織の透過性が高い近赤外光を励起光とし、アップコンバージョンによりエネルギーの高い可視光を発光する。また、退色することもなく、毒性もないため、LNP を用いたイメージングが近年注目されている。

そこで、LNP を用いたイメージングについて、現状と将来への展望について述べる。

ランタニドナノ粒子 (LNP) とは

通常のイメージングには蛍光タンパクや蛍光ナノ粒子などの蛍光物質が用いられる。蛍光タンパクは退色しやすく、光毒性による細胞のダメージの点が欠点である。蛍光ナノ粒子はバイオイメージング分野での応用が期待され、さかんに研究されている⁴⁾。しかし、量子ドットなどのナノ粒子は蛍光タンパクより退色しないが、人体に有害な Cd や Hg を含んでおり課題が多い。また、両者ともにその励起光は可視光であり、その光深達性が問題である。これに対してランタニドナノ粒子 (LNP) は生体組織の透過性が高い近赤外光を励起光とするため、近年注目されている。

LNP とは希土類から成るナノ粒子であり、アップコンバージョンにより近赤外励起で赤 (655 nm)・緑 (545 nm)・青色 (520 nm) を発

光する。蛍光タンパク質と違って退色することもなく、光毒性・それ自体の毒性もない^{5,6)}。

通常の蛍光とは、紫外線や可視光線を励起すると、蛍光物質がそのエネルギーを吸収し、電子が励起し、それが基底状態に戻る際に余分なエネルギーを電磁波として放出する現象である。このように通常、蛍光は励起光と同一あるいはより長波長の電磁波 (エネルギーが低い電磁波) が放出される。それに対して、アップコンバージョン発光は近赤外光を照射し、2段階以上高いエネルギー状態に励起することで照射光線よりもエネルギーが高い、短波長の可視光を発光させることができる。例えば、NaYF₄:Yb/Er の LNP では 980 nm で励起すると、まず Yb³⁺ が 980 nm の光を受け取り、このエネルギーを Er³⁺ に渡す。Er³⁺ は同じエネルギーを持つ状態であるが、励起状態である Yb³⁺ からもう一度エネルギーを受け取り、さらにエネルギーを蓄える事が可能である。非放射遷移 (放熱) により少しエネルギーの低い状態より基底状態に戻ることににより緑と赤の発光が起こる⁷⁻¹⁰⁾ (図 1, 2)。

Zhang らによると、ラットでは投与された LNP はまず、肺や心臓に集積し、1週間で尿中や糞便中に排泄される¹¹⁾。また、Zhou らによるとマウスに投与された LNP は肝や脾臓に蓄積し、7日までにそのほとんどが、21日までにすべてが、胆汁中に排泄される¹²⁾。

この LNP は希土類のイオンを変更する事、組成を変更する事、表面修飾により発光の色調ならびに発光色の比率を変化させる事が可能であり、また、その溶媒により発光強度を変化させる事も可能である。

ランタニドナノ粒子 (LNP) の合成

LNP はその合成法により、ナノ粒子型、棒状、キューブ型の形があり、その大きさは数十 nm から数 μ m までである。

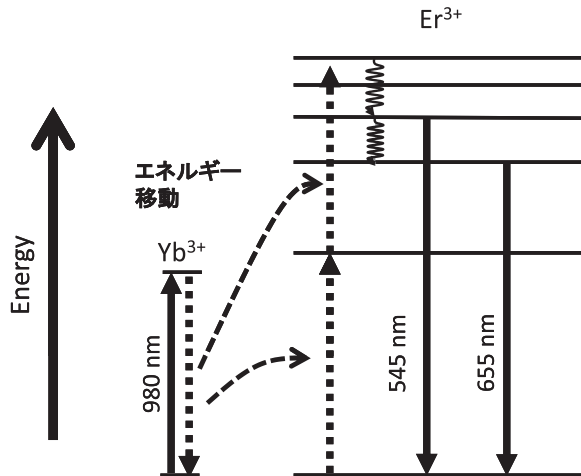
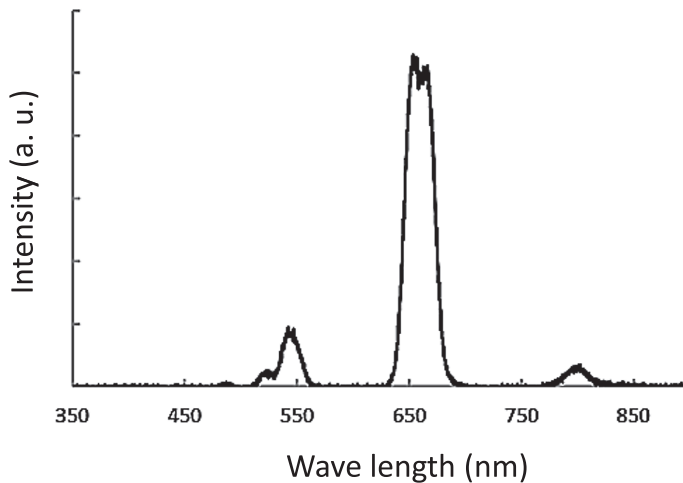


図1 LNP 励起によるアップコンバージョン機構

図2 PEI被覆 LNP (NaYF₄: Yb/Er) に 980 nm, 400 mW で励起した発光スペクトル像

以下に合成法の例を示す。

1. PEI (Polyethyleneimide) 被覆 NaYF₄: Yb/Er の合成¹³⁾

NaCl, YCl₃, YbCl₃, ErCl₃ に PEI, NH₄F, エチレングリコールを混合させ, 200°C, 2 時間オートクレーブすることで合成する (図 3a)。

この透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscopy: TEM) 像を図 4 に示す。

2. オレイン酸 (OA) 被覆 NaYF₄: Yb/Er/Gd の合成

NaOH, YCl₃, YbCl₃, ErCl₃, ScCl₃ にオレイン酸, エタノール, NH₄F を混合させ, 上記同様に 200°C, 2 時間オートクレーブすることで合成する (図 3b)。

3. COOH 被覆 NaYF₄: Yb/Er/Gd の合成

上記で合成したオレイン酸被覆 LNP にシクロヘキサン, t-ブチルアルコール, 蒸留水, K₂CO₃ を常温で混合し, さらに KMnO₄, NaIO₄

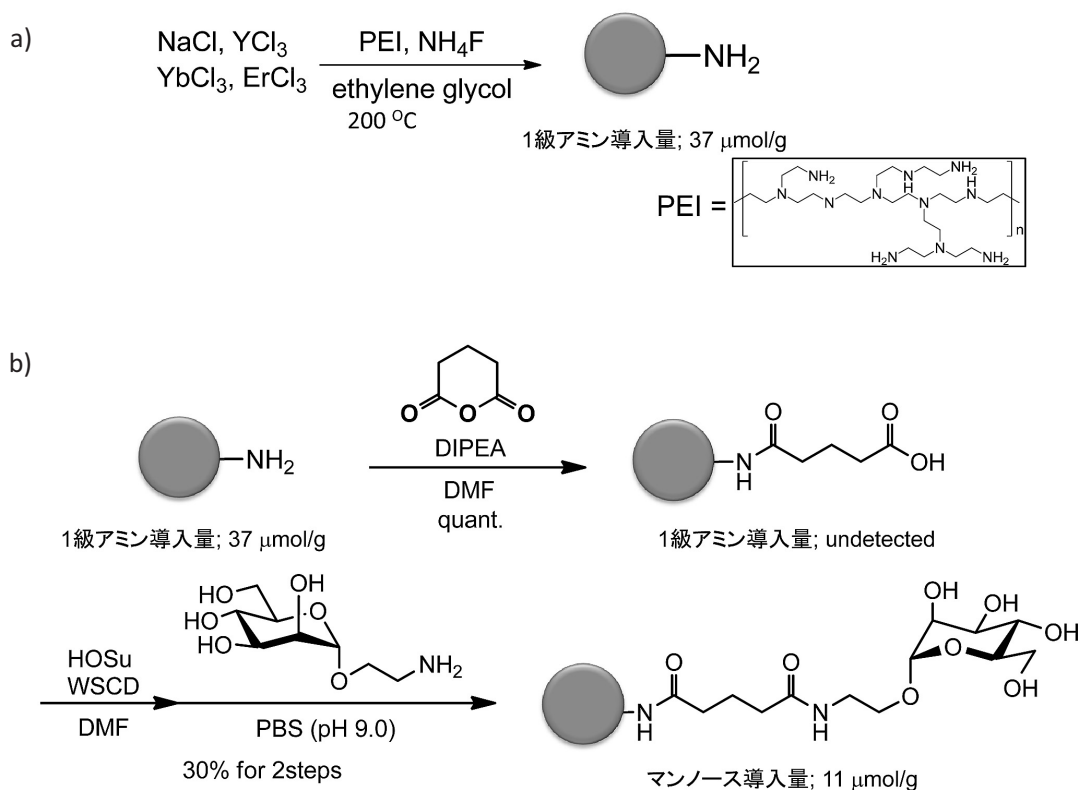
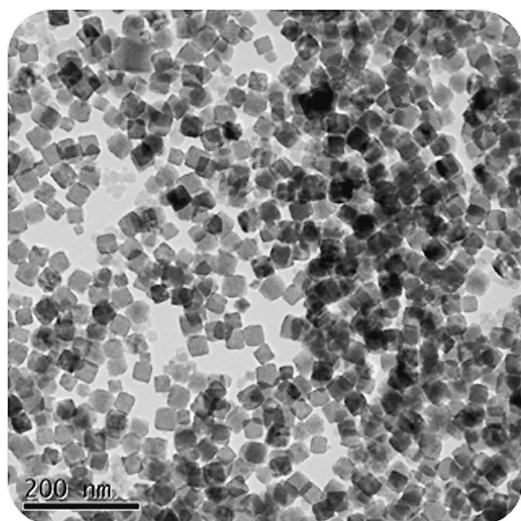


図3a PEI被覆LNP合成過程のシエーマ

b オレイン酸被覆LNP合成過程のシエーマ

図4 PEI被覆LNP (NaYF₄: Yb/Er)の透過電子顕微鏡 (TEM) 像

を40°C, 48時間混合することで合成する。

これらに糖鎖(マンノース)を付加することも可能である。糖付加による発光強度の変化を見るために、糖付加PEI被覆LNPと糖付加OA被覆LNPの発光スペクトルを測定した。その結果、PEI被覆のLNPでは発光強度が著明に低下したが、逆にオレイン酸被覆のLNPでは発光強度の増加が確認できた(図5)。

LNPを用いたイメージング

今までに行われているLNPを用いたイメージングについて述べる。

葉酸のレセプターは様々な腫瘍に発現しているという性質を用いて、Hela細胞を皮下移植したマウスのイメージングが報告されている¹⁴。また、 $\alpha\text{v}\beta 3$ インテグリンは、血管新生中の内皮細胞や一部の腫瘍細胞に高発現しているが、通

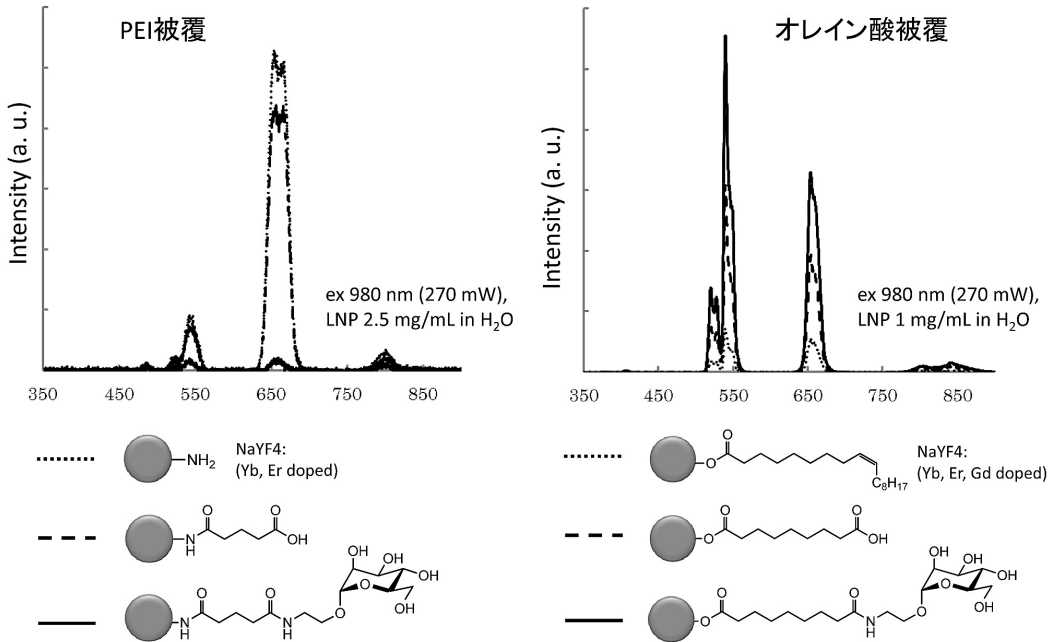


図5 糖付加による発光強度への影響

PEI 被覆 LNP のマンノース付加では発光強度が著明に低下したが、オレイン酸被覆 LNP のマンノース付加は発光強度が増加した。

常の内皮細胞や正常細胞にはほとんど発現していない。また、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンは、arginine-glycine-aspartic acid (RGD) peptide を認識するという性質を有する。このペプチドをラベルした LNP を用いて、マウスに移植した glioblastoma 細胞のイメージングが報告されている¹⁵⁾。その他、HER2 抗体をラベルした LNP を用いたイメージング¹⁶⁾ や、リンパ節や血管のイメージングなど数多く報告されている。LNP を用いた癌のイメージングの問題点は癌のヘテロゲナイティーやその集積効率などが挙げられる。

さらに Gd をラベルすることで MRI (magnetic resonance imaging) に応用したり¹⁷⁾、放射性同位元素をラベルすることで PET (positron-emission tomography) に応用¹⁸⁾ することができる。

このように LNP に様々な物質をラベルする事で、その物質の性質によりさまざまな部位に集積させる事が可能である。

LNP を用いた癌イメージング

当教室で行った LNP を用いた腫瘍イメージングについて述べる。今回行った LNP の癌イメージングは、LNP が正常組織の血管に比べて物質透過性が高い癌組織にある新生血管から透過・移行し、滞留し易いという EPR 効果 (Enhanced Permeation and Retention effect) を利用している。

<方法> ①生後4週雌の BALB/c ノードマウスの皮下に 0.1 ml の PBS (Phosphate buffered saline) を加えた 5×10^6 個のヒト胃癌細胞株である MKN-45 を移植した。②移植後4週目にエーテル麻酔下に腹腔内に 0.1 ml PBS を加えた 10 mg/body の LNP (rare earth inorganic crystal, Shanghai Keyan Phosphor Technology Co., Ltd.) を腹腔内投与した。③投与後4時間でマウスを再度全身麻酔下に観察した。観察装置は蛍光実体顕微鏡 (MVX-10 Olympus 製)、CCD カメラ (DP73 Olympus 製) を用いた。励起光は 980 nm

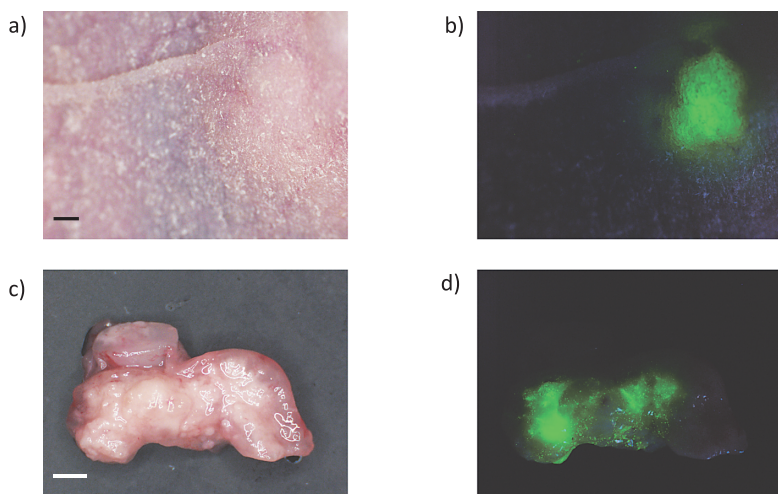


図 6a ノードマウス皮下移植モデルの白色像. scale bar: 1mm
 b NIR 励起により、皮下腫瘍部に一致して LNP の発光を認める。
 c 摘出皮下腫瘍断面の白色像。
 d NIR 励起すると、LNP の発光を腫瘍内部に確認した。

(L980P300J, Thorlabs Japan 製)出力は 330 mW, 発光観察用のフィルターは $<700\text{ nm}$ (E700sp-29 Chroma 製ショートパスフィルタ)を用いた。
 <結果> 980 nm で励起すると、腫瘍部に一致して LNP の緑色の発光が観察された。この皮下腫瘍を摘出し観察すると、より明瞭に LNP 由来の緑色発光が確認できた。赤色の発光は発光強度が弱く、確認できなかった (図 6)。

今後の展望と課題

今回我々が行ったイメージングは EPR 効果のみで腫瘍組織に LNP を分布させた。ヌードマウスの皮膚は透過し、その発光を確認できたが、摘出した腫瘍の発光は疎な部位があり、課題が残る。今後さらに癌組織に蓄積させるためには何種類かの抗体を結合させる必要性、また、その発光を認識するためには好感度 CCD の開発、より光透過性の高い赤色の発光または近赤外領域の発光を放出する、より発光効率の高い LNP の合成が必要である。さらに、マウスの個体全体をイメージングするには、より早く広範囲をスキャンする装置の開発が必要であり、臨床応用するにもさらに高性能の装置の開

発が必要である。それらが可能となれば、今までは表在性の癌診断のみでしか行えなかった蛍光イメージングが、深部の癌局在診断につながると考えられる。またこれらが発展することにより Photodynamic therapy (PDT) へも展開できるものと考えられる。

おわりに

希土類から合成されたランタニドナノ粒子 (LNP) を用いたイメージングの現状について解説した。今までの報告は *in vitro* やマウス、ラットのような小動物での *in vivo* イメージングであり、臨床応用はされていない。LNP の癌への集積やスキャンニング装置の開発など多くの課題は残るものの、生体の窓と呼ばれる近赤外領域で励起される LNP を用いたイメージング技術は今後、癌の進展度診断技術の発展に大きく寄与するものと考えられる。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

- 1) Kishimoto H, Kojima T, Watanabe Y, Kagawa S, Fujiwara T, Uno F, Teraishi F, Kyo S, Mizuguchi H, Hashimoto Y, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T. In vivo imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Nat Med* 2006; 12: 1213-1219.
- 2) Murayama Y, Harada Y, Imaizumi K, Dai P, Nakano K, Okamoto K, Otsuji E, Takamatsu T. Precise detection of lymph node metastases in mouse rectal cancer by using 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* 2009; 125: 2256-2263.
- 3) Murayama Y, Ichikawa D, Koizumi N, Komatsu S, Shiozaki A, Kuriu Y, Ikoma H, Kubota T, Nakanishi M, Harada Y, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Kokuba Y, Takamatsu T, Otsuji E. Staging fluorescence laparoscopy for gastric cancer by using 5-aminolevulinic acid. *Anticancer Res* 2012; 32: 5421-5427.
- 4) Ballou B, Lagerholm BC, Ernst LA, Bruchez MP, and Waggoner AS. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjug Chem* 2004; 15: 79-86
- 5) Pansare V, Hejazi S, Faenza W, Prud'homme RK. Review of Long-Wavelength Optical and NIR Imaging Materials: Contrast Agents, Fluorophores and Multifunctional Nano Carriers. *Chem Mater* 2012; 24: 812-827.
- 6) Wu S, Han G, Milliron DJ, Aloni S, Altoe V, Talapin DV, Cohen BE, Schuck PJ. Non-blinking and photostable upconverted luminescence from single lanthanide-doped nanocrystals. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 10917-10921.
- 7) Auzel F. Upconversion and anti-Stokes processes with f and d ions in solids. *Chem Rev* 2004; 104: 139-173.
- 8) Wang F, Liu X. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals. *Chem Soc Rev* 2009; 38: 976-989.
- 9) Wang F, Banerjee D, Liu DY, Chen X, Liu X. Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy. *Analyst* 2010; 135: 1839-1854.
- 10) Zhou J, Liu Z, Li F. Upconversion nanophosphors for small-animal imaging. *Chem Soc Rev* 2012; 41: 1323-1349.
- 11) Abdul Jalil R, Zhang Y. Biocompatibility of silica coated NaYF₄ upconversion fluorescent nanocrystals. *Biomaterials* 2008; 29: 4122-4128.
- 12) Xiong L, Yang T, Yang Y, Xu C, Li F. Long-term in vivo biodistribution imaging and toxicity of polyacrylic acid-coated upconversion nanophosphors. *Biomaterials* 2010; 31: 7078-7085.
- 13) Wang F, Chatterjee DK, Li ZQ, Zhang Y, Fan XP, Wang MQ. Synthesis of polyethylenimine/NaYF₄ nanoparticles with upconversion fluorescence. *Nanotechnology* 2006; 17: 5786.
- 14) Xiong LQ, Chen ZG, Yu MX, Li FY, Liu C, Huang CH. Synthesis, characterization, and in vivo targeted imaging of amine-functionalized rare-earth up-converting nanophosphors. *Biomaterials* 2009; 30: 5592-5600.
- 15) Xiong L, Chen Z, Tian Q, Cao T, Xu C, Li F. High contrast upconversion luminescence targeted imaging in vivo using peptide-labeled nanophosphors. *Anal Chem* 2009; 81: 8687-8694.
- 16) Jiang S, Zhang Y, Lim KM, Sim EKW, Ye L. NIR-to-visible upconversion nanoparticles for fluorescent labeling and targeted delivery of siRNA. *Nanotechnology* 2009; 20: 155101.
- 17) Das GK, Heng BC, Ng SC, White T, Loo JS, D'Silva L, Padmanabhan P, Bhakoo KK, Selvan ST, Tan TT. Gadolinium oxide ultranarrow nanorods as multimodal contrast agents for optical and magnetic resonance imaging. *Langmuir* 2010; 26: 8959-8965.
- 18) Liu Q, Chen M, Sun Y, Chen G, Yang T, Gao Y, Zhang X, Li F. Multifunctional rare-earth self-assembled nanosystem for tri-modal upconversion luminescence /fluorescence /positron emission tomography imaging. *Biomaterials* 2011; 32: 8243-8253.

著者プロフィール



村山 康利 Yasutoshi Murayama

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科消化器外科学・助教

略 歴：2000年3月 京都府立医科大学医学部卒業

2000年4月 京都府立医科大学外科研修医

2002年4月 社会保険神戸中央病院外科医員

2004年4月 京都府立医科大学消化器外科修練医

2006年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科博士課程

2010年3月 京都府立医科大学大学院医学研究科博士課程修了

2010年4月～現職

専門分野：下部消化管外科学・内視鏡外科学

- 主な業績：1. Hatakeyama T, Murayama Y, Komatsu S, Shiozaki A, Kuriu Y, Ikoma H, Nakanishi M, Ichikawa D, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Kokuba Y, Inoue K, Nakajima M, Otsuji E. Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells. *Oncol Rep* 2013; 29: 911-916.
2. Matsumura A, Kubota T, Taiyoh H, Fujiwara H, Okamoto K, Ichikawa D, Shiozaki A, Komatsu S, Nakanishi M, Kuriu Y, Murayama Y, Ikoma H, Ochiai T, Kokuba Y, Nakamura T, Matsumoto K, Otsuji E. HGF regulates VEGF expression via the c-Met receptor downstream pathways, PI3K/Akt, MAPK and STAT3, in CT26 murine cells. *Int J Oncol* 2013; 42: 535-542.
3. Murayama Y, Ichikawa D, Koizumi N, Komatsu S, Shiozaki A, Kuriu Y, Ikoma H, Kubota T, Nakanishi M, Harada Y, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Kokuba Y, Takamatsu T, Otsuji E. Staging fluorescence laparoscopy for gastric cancer by using 5-aminolevulinic acid. *Anticancer Res* 2012; 32: 5421-5427.
4. Nakanishi M, Kokuba Y, Murayama Y, Komatsu S, Shiozaki A, Kuriu Y, Ikoma H, Ichikawa D, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Otsuji E. A new approach to laparoscopic lymph node excision in cases of transverse colon cancer. *Digestion* 2012; 85: 121-125.
5. Murayama Y, Ichikawa D, Kubota T, Okamoto K, Fujiwara H, Otsuji E. Prognostic impact of lymph node metastasis along the left gastric artery in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2011; 58: 1603-1606.
6. Murayama Y, Harada Y, Beika M, Koizumi N, Harada K, Komatsu S, Shiozaki A, Kuriu Y, Ikoma H, Nakanishi M, Ichikawa D, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Kokuba Y, Takamatsu T, Otsuji E. Photodynamic Diagnosis of Colorectal Cancer. Okura I, Tanaka T. Aminolevulinic acid. Tokyo. SBI ALApromo Co., Ltd. 2011. 159-167.
7. Kubota T, Taiyoh H, Matsumura A, Murayama Y, Ichikawa D, Okamoto K, Fujiwara H, Ikoma H, Nakanishi M, Kikuchi S, Ochiai T, Sakakura C, Kokuba Y, Sonoyama T, Suzuki Y, Matsumoto K, Nakamura T, Otsuji E. Gene transfer of NK4, an angiogenesis inhibitor, induces CT26 tumor regression via tumor-specific T lymphocyte activation. *Int J Cancer* 2009; 125: 2879-2886.
8. Murayama Y, Harada Y, Imaizumi K, Dai P, Nakano K, Okamoto K, Otsuji E, Takamatsu T. Precise detection of lymph node metastases in mouse rectal cancer by using 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* 2009 15; 125: 2256-2263.
9. Kubota T, Taiyoh H, Matsumura A, Murayama Y, Ichikawa D, Okamoto K, Fujiwara H, Ikoma H, Nakanishi M, Kikuchi S, Sakakura C, Ochiai T, Kokuba Y, Taniguchi H, Sonoyama T, Matsumoto K, Nakamura T, Otsuji E. NK4, an HGF antagonist, prevents hematogenous pulmonary metastasis by inhibiting adhesion of CT26 cells to endothelial cells. *Clin Exp Metastasis*. 2009; 26: 447-456.