

金ナノロッドと近赤外光を用いた診断・治療システム

新留琢郎,^{*a,b,c,d} 塩谷 淳,^a 秋山泰之,^a 大賀 晃,^a
野瀬圭介,^a Dakrong Pissuwan,^a 新留康郎^a

Theragnostic Approaches Using Gold Nanorods and Near Infrared Light

Takuro NIIDOME,^{*a,b,c,d} Atsushi SHIOTANI,^a Yasuyuki AKIYAMA,^a Akira OHGA,^a
Keisuke NOSE,^a Dakrong PISSUWAN,^a and Yasuro NIIDOME^a^aFaculty of Engineering, ^bCenter for Future Chemistry, ^cInternational Research Center for Molecular Systems, Kyushu University, 744 Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan, and ^dPRESTO, Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

(Received September 1, 2010)

Gold nanoparticles have unique optical properties such as surface-plasmon and photothermal effects. Such properties have resulted in gold nanoparticles having several clinical applications. Gold nanorods (which are rod-shaped gold nanoparticles) show a surface plasmon band in the near-infrared region. They have therefore been proposed as contrast agents for bioimaging, or as heating devices for photothermal therapy. Polyethylene glycol-modified gold nanorods systematically administrated into mice can be detected with integrating sphere, and the stability of the gold nanorods in blood flow evaluated. After intravenous injection of gold nanorods followed by near-infrared laser irradiation, significant tumor damage triggered by the photothermal effect was observed. To deliver gold nanorods to the target tissue, thermosensitive polymer gel-coated gold nanorods were prepared. After intravenous injection of the gel-modified gold nanorods and irradiation of the tumor, a larger amount of gold was detected in the irradiated tumor than in the non-irradiated tumor. This effect is due to the hydrophobic interaction between the cellular membrane or the extracellular matrix and the gel surfaces induced by the photothermal effect. Furthermore, the photothermal effect enhanced the permeability of the stratum corneum of the skin. As a result of treatment of the skin with ovalbumin and gold nanorods followed by near-infrared light irradiation, a significant amount of protein was detected in the skin. The gold nanorods therefore showed several functions as a photothermal nanodevice for bioimaging, thermal therapy, and a drug delivery system.

Key words—gold nanorods; near infrared; photothermal effect; drug delivery system

1. はじめに

球状金ナノ粒子は可視光域（500 nm 付近）に吸収を持ち、赤い色素として古くから知られている。¹⁾ 特にステンドグラスにみられる厳かな赤色は何百年経っても色褪せることはなく私たちの心を落ち着かせてくれる。一方、私たちの日常生活でも金ナノ粒子は利用されている。薬局で販売されている妊娠検査キットの、あるいは、病院で行われるイン

フルエンザ感染の簡易診断のための色素が挙げられる。金は“高価なもの”というイメージがあるが、1グラム約3500円（2010年8月11日現在の金相場）であり、それを原料に金ナノ粒子を作製したとしても大きなコストはかからず、安価な材料であると言える。ちなみに、ドキソルビシンを試薬として購入しても、5ミリグラムで1万円前後はする。近年、この金ナノ粒子を病気の診断や治療に応用しようという研究が盛んになってきている。

暗視野顕微鏡を用いて、金ナノ粒子を観察するとキラキラ輝きながらブラウン運動する様子が観察される。これは金ナノ粒子からの強い光散乱によるもので、El-Sayedらのグループは金ナノ粒子表面を上皮成長因子（Epidermal Growth Factor）EGFレ

^a九州大学大学院工学研究院, ^b同未来化学創造センター, ^c同分子システム科学センター（〒819-0395 福岡市西区元岡744）, ^d科学技術振興機構さきがけ（〒332-0012 埼玉県川口市本町4-1-8）

*e-mail: niidome.takuro.655@m.kyushu-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウムS10で発表されたものを中心に記述したものである。

セプター抗体で修飾し、細胞に結合させ、この細胞からの散乱光を利用してがん細胞のイメージングに成功した。^{2,3)} ほかにも、薬物送達システムにおけるキャリアーとしても期待されている。例えば、抗がん剤であるメソトレキセートを金表面に吸着させ、担がんマウスに投与すると、メソトレキセート単独の場合に比べ、高い抗がん活性が認められた。メソトレキセートが金ナノ粒子表面に集積したことによる濃縮効果であると考えられている。⁴⁾ Gibsonらはバクリタキセルを金表面に共有結合で修飾し、その効果を評価している。⁵⁾

このように、金ナノ粒子は診断・治療のための機能性ナノ材料として期待されているが、ここで利用できる光は500 nm付近の可視光である。しかし、可視光は生体組織への透過性が低く、応用範囲が制限される。そこで、組織透過性の高い近赤外光の利用が好ましい。本総説では近赤外域に強い吸収を持つ金ナノ粒子、特に金ナノロッドを用いたイメージングや治療法について紹介したい。

2. 金ナノロッド

金ナノロッドは棒状の金ナノ粒子で、短軸方向の電子振動に由来する500 nm付近（可視光域）の吸収と長軸方向に由来する800–900 nm付近（近赤外域）の吸収を持つ（Fig. 1）。1997年にYuらによって報告されたこの粒子はカチオン性界面活性剤、hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) のミセル存在下で簡便に作製できる。⁶⁾ また、サイズやアスペクト比（長軸/短軸比）を変えることにより、光学特性をチューニングでき、用いる光源や対

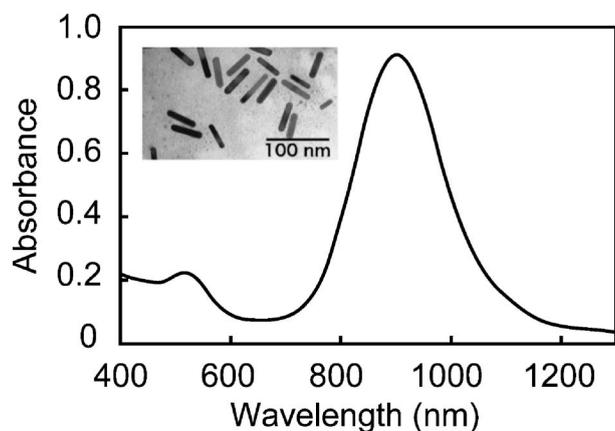


Fig. 1. Absorption Spectrum of Gold Nanorods and a TEM Image of the Gold Nanorods

象物に合わせて、自由に選択できる。さらに、吸収した光エネルギーを効率よく熱に変換する効果（フォトサーマル効果）も示し、この特性を利用すれば、体内に存在する金ナノロッドを体外から照射する近赤外光で加熱することが可能になる。超短パルスレーザーを利用すれば、二光子励起発光も起こるので、一般の蛍光イメージングのように、高感度なバイオイメージング技術へと発展させることもできるだろう。このように、近赤外光吸収、発光、フォトサーマル効果という特性を活かした新しい診断・治療を実現するナノ材料として期待されている。

3. 金ナノロッドの生体適合性化

金ナノロッドを作製する際に共存させるCTABは、そのミセル構造がロッド形成時の結晶成長を制御することに加え、作製後の分散安定性に重要な働きをしている。しかし、このCTABは界面活性剤であり、強い細胞毒性を持つ。したがって、バイオサイエンスあるいはメディカル分野でこの金ナノロッドを応用するためには、分散安定性を保ちつつ、生体適合化する必要がある。そこで、われわれはポリエチレングリコール（PEG）鎖で金表面を修飾した。⁷⁾ その結果、粒子のゼータ電位はほぼ中性となり、電子顕微鏡観察からも金ナノロッド周囲にPEG鎖が密に修飾されていることがわかった。培養細胞毒性に対する毒性は認められず、また、マウスへ静脈投与後、6時間後においても、投与量の30%が血中を循環し、高い血中滞留性を持つことがわかった。最終的に金ナノロッドは肝臓と脾臓に蓄積するが、短期的な肝毒性、腎毒性、サイトカイン応答といった副作用はみられなかった。

4. 体内に存在する金ナノロッドの分光分析

われわれはマウス体内に存在する金ナノロッドの直接観察を試みた。まず行ったことは、近赤外光源の上にマウスを乗せ、近赤外光を検出できるCCDカメラで観察した。マウス腹部は明るく観察され、比較的近赤外光を通すことが確認できた。そこに、



新留琢郎

1966年鹿児島県生まれ。94年九州大学大学院理学研究科博士課程修了、博士（理学）。長崎大学工学部、同大学大学院生産科学研究科助手を経て、04年より九州大学大学院工学研究院助教授、そして、07年より准教授。無機ナノ粒子と機能性有機分子を組み合わせた次世代医療ナノ材料の研究を行っている。

PEG 修飾金ナノロッドを腹腔内投与，あるいは，尾静脈投与すると，その腹部が暗くなる様子が観察された．そこで，この様子を分光学的に解析するために，積分球という分光装置を用いた．積分球は物体からの反射光を測定する装置で，その反射光スペクトルから吸収スペクトルも得られる装置である．われわれはマウスをこの積分球のポートに乗せ，マウス腹部の吸収スペクトルを測定した (Fig. 2)．その結果，金ナノロッドに由来する明確な吸収スペクトルが観察され，マウス体内を循環する金ナノロッドの直接検出に成功した.⁸⁾ また，900 nm における吸収値の時間経過を追跡した結果，それは減少し，その減少速度から半減期を算出することができた．PEG 修飾金ナノロッドの場合は 200 分程度であり，CTAB で安定化している金ナノロッドの半減期は 0.8 分であったことから，PEG 修飾することにより血中安定性が飛躍的に向上していることを定量的に示すことができた．このような吸収による金ナノロッドのモニタリングは LED 光源でも達成可能であり，安価な検出システムをつくることができると期待している．また，組織透過性が高いと期待される超短パルスレーザー光を光源として用い，トモグラフィー技術と組み合わせることで，3次元

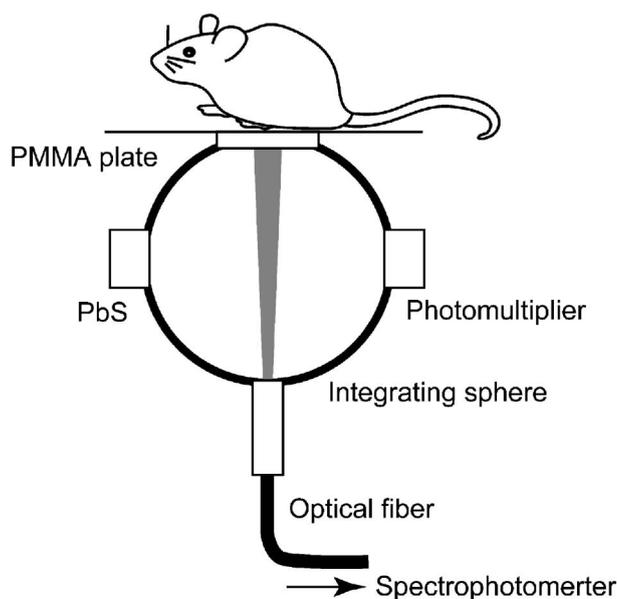


Fig. 2. Schematic Representation of the Spectroscopic Analysis of Gold Nanorods in a Mouse

The anesthetized mouse was placed on a port of an integrating sphere. Monochromatic light from a spectrophotometer was introduced into the abdomen of the mouse through optical fibers.

のイメージングへも発展できると考えている．

5. 金ナノロッドを造影剤として用いたバイオイメージング

金ナノロッドに光照射すると，熱が発生すると同時に超音波も発生する (オプトアコースティック効果)．その発生場所を従来の超音波エコー画像診断装置の技術を使うことによって，金ナノロッドの存在場所を画像化できる．Eghtedari らは PEG 修飾金ナノロッドをヌードマウスの皮下に投与し，そこへ，波長 757 nm のパルスレーザー (平均パワー密度 6 mJ/cm²) を照射しながら，超音波信号を検出した (Fig. 3)．その結果，金分布の 2 次元画像はもちろんのこと，深度方向の情報も得ることができた.⁹⁾ 超音波を検出するこの方法は体内深部のイメージングを可能にするが，光照射の深度に関する限界も残る．しかし，カテーテルを通して，レーザー照射すれば，適用範囲は広がるのではないかと期待される．

6. がんのフォトサーマル治療

がん組織を局所的に加熱し，治療するハイパーサーミアという手法がある．金ナノロッドをがん組織に集積させ，近赤外光を照射すれば，そのフォトサーマル効果により同様の効果が期待される．そこでわれわれは，担がんマウスの腫瘍内に金ナノロッドを局所投与し，そこへ近赤外レーザー光を照射

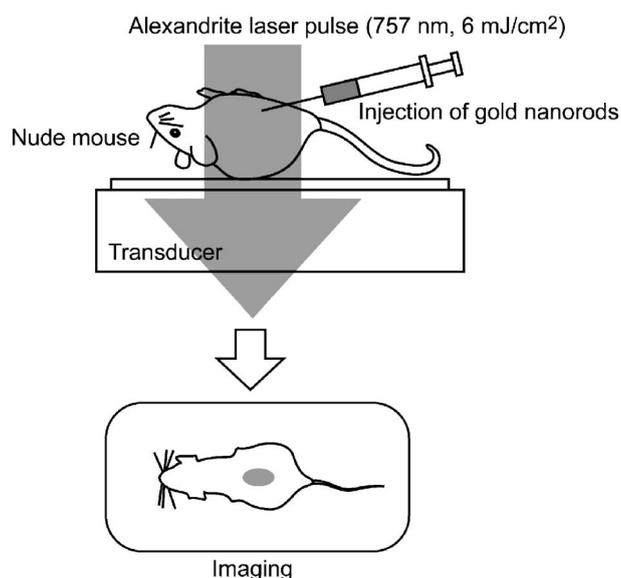


Fig. 3. Schematic Representation of *in vivo* Experiment to Detect Subcutaneously Injected Gold Nanorods Using Single-channel Acoustic Transducer

(Nd: YAG レーザー波長 1064 nm, 周波数 20 Hz, パワー~750 mW, ビーム径 5 mm, 時間 3 分) した。その結果, 腫瘍の成長抑制が観察された (Fig. 4).¹⁰⁾ 金ナノロッドを静脈投与し, レーザー光照射した場合にも腫瘍の増殖抑制は認められたが, その効果は低かった。これは, PEG 修飾金ナノロッドは腫瘍組織の Enhanced Permeation and Retention (EPR) 効果により正常組織より高濃度に蓄積してはいるが, 腫瘍への局所投与の場合に比べればその量は少なく, そのため効果が弱かったと考えられる。したがって, より高い抗腫瘍効果を得るためには金ナノロッドの腫瘍への積極的なターゲティングが必要であることが指摘された。

Dickerson らも, PEG 修飾金ナノ粒子を局所あるいは静脈投与し, 担がんマウスの腫瘍部位にレーザー照射し (波長 808 nm, 平均パワー密度 1-2 W/cm², ビーム径 6 mm, 時間 10 分), 腫瘍の成長抑制を評価した。その結果, 有意な抗腫瘍効果が認められ, この場合も, 局所投与の方がより高い効果を見せた。さらに, レーザー光を照射し, 各場所での吸収スペクトルを測定することにより, 金ナノロッドの *in vivo* イメージングに成功している。¹¹⁾ 金ナノロッドの病変部位への正確なターゲティングが可

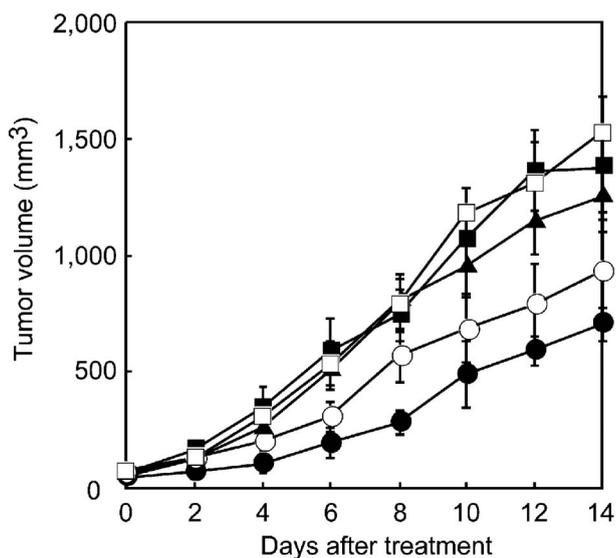


Fig. 4. Tumor Growth after Photothermal Treatment
Tumor-bearing mice were injected with PEG-modified gold nanorods and laser irradiated (Nd: YAG laser 1064 nm, 20 Hz, 750 mW, 3 min). Direct injection of the gold nanorods and the laser irradiation (●). Intravenous injection of the gold nanorods and the laser irradiation (○). Direct injection of gold nanorods alone (□). Direct injection of 5% glucose and the laser irradiation (■). Non-treated mice (▲).

能になれば, 病変部位のイメージングによる診断と副作用の少ない効果的なフォトサーマル治療が実現するだろう。

7. フォトサーマル効果によりコントロールされる金ナノロッドのデリバリーシステム

一般に, 薬物のデリバリーにおいて, 標的となる細胞を認識する化合物 (リガンドや抗体など) で修飾するという手法が用いられる。腫瘍においては, EPR 効果もターゲティングの重要な要素となる。このような手法を用いて, 金ナノロッドをターゲティングした報告は既にいくつかある。^{12,13)} そこで, われわれは金ナノロッドのフォトサーマル効果を活かしたターゲティングができないかと考えた。つまり, 親水性ポリマーである *N*-ポリイソプロピルアクリルアミドは加熱すると, 相転移を起こし, 疎水性に変わる。この温度感受性ポリマーを金ナノロッド表面に修飾すれば, フォトサーマル効果により光照射した場合にのみ相転移が起こると期待される。^{14,15)} そして, 生体組織中でこの現象を起こせば, 光照射部位のみで相転移が起こるため, 金ナノロッドが細胞表面や細胞間マトリクスに吸着するだろうというシナリオである (Fig. 5)。実際に, この温度感受性ポリマーゲルで修飾した金ナノロッドを左右に 2 つの腫瘍を移植したマウスへ尾静脈投与し, その後, 右腫瘍に近赤外レーザー光を照射した結果, 右腫瘍への有意な金の蓄積が認められた。この結果はレーザー照射可能な任意の部位に金ナノロッドを集積させることができることを示しており, 腫瘍のみならず, 様々な疾患に適用が期待される。

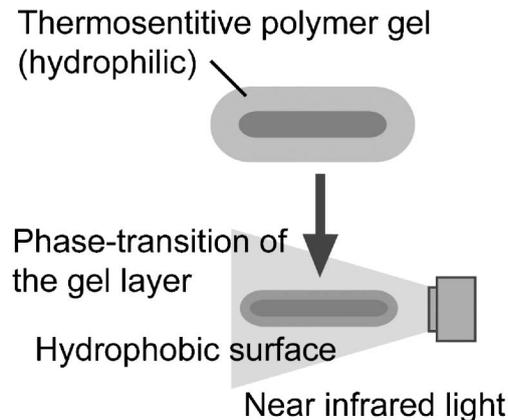


Fig. 5. Targeting Strategies of Gold Nanorods
Controlled retention system triggered by phase-transition of thermosensitive polymer (*N*-isopropylacrylamide) gel.

8. プロテアーゼ活性にตอบสนองするデリバリーシステム

一方、腫瘍特異的に発現しているプロテアーゼにตอบสนองして集積するシステムも構築した (Fig. 6). すなわち、金表面にペプチド鎖を介して PEG 鎖を修飾する. このペプチド鎖を腫瘍選択的に発現しているプロテアーゼの基質配列とすれば、腫瘍部位でのみペプチド鎖が切断される. すると、金ナノロッド表面は疎水性に変わり、周辺組織に蓄積するだろう. これまでにマトリクスメタロプロテアーゼやウロキナーゼ様プラスミノージェンアクチベーターの基質配列を使って、これらプロテアーゼ存在時のみ金ナノロッドが凝集することを確認した. 現在、担がんマウスを使って、*in vivo* での評価を行っている.

9. フォトサーマル効果を利用した薬物デリバリーシステム

金ナノロッドを薬物キャリアーとし、その薬物放出をフォトサーマル効果によりコントロールしようという試みが報告された.¹⁶⁾ フォトサーマル効果により発生した熱で、薬物を放出させるシステムで、温度感受性分子として二本鎖 DNA が利用された. フォトサーマル効果により金ナノロッド表面の温度が上昇すれば、二本鎖 DNA は解離し、固定されていない DNA 鎖は遊離する (Fig. 7). このシステムを利用して、遊離した一本鎖 DNA をアンチセンス DNA として機能させることに成功している.

われわれも、PEG 修飾金ナノロッドにおいて、連続波レーザー光を照射すれば、金ナノロッドの形

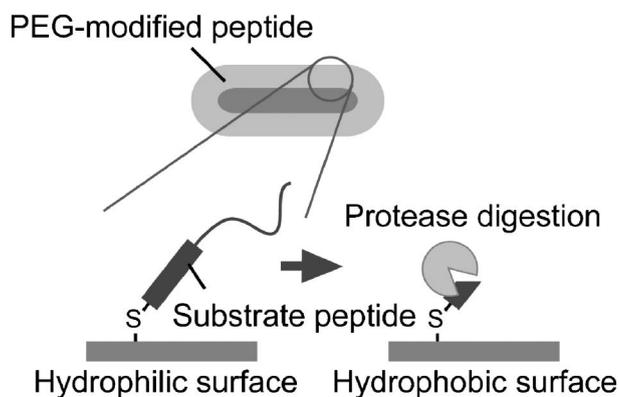


Fig. 6. Targeting Strategies of Gold Nanorods

Controlled retention system triggered by releasing of PEG chain from the gold surface.

状は変わらないまま、連続的な温度上昇が起こるが、パルスレーザー光を照射すると、金原子の再配置が起こり、球状へと変化することを明らかにしている. そして、ロッドが球状に変化すれば表面積が小さくなり、結果的に修飾した PEG 鎖の一部が解離することがわかった.¹⁷⁾ 照射するレーザー光を選択することによって、単純な加熱や修飾分子の放出をコントロールでき、金ナノロッドは高次の薬物デリバリーシステムを支えるプラットフォームとして期待される.

フォトサーマル効果で発生する熱を皮膚の物質透過性の亢進に利用する試みも行っている. もともと皮膚の角質層は異物が体内に侵入するのを防ぐものであるために、疎水性の低分子化合物を除いて、物質透過性は極めて低い. しかし、タンパク質や核酸

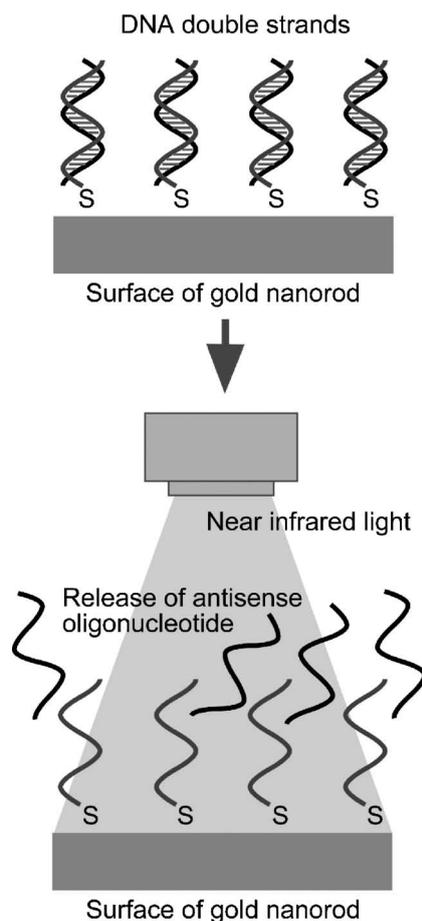


Fig. 7. Schematic Representation of Remote Controlled Release of DNA Oligonucleotides Mediated by Photothermal Effect of the Gold nanorods

The sense DNA oligonucleotides are attached to the surface of gold nanorods with a thiol bond. The antisense DNA oligonucleotides are hybridized with the sense DNA oligonucleotides. These antisense DNA oligonucleotides are released after laser irradiation due to the photothermal effect.

といった親水性高分子を皮膚から体内に入れることができれば、高分子薬物はもちろんのこと、ワクチンの投与ルートにもなり、注射を必要としない安全で簡便なワクチン接種を実現する。そこでまず、金ナノロッドと抗原タンパク質との複合体をつくらせるのであるが、ここでは内部に金ナノロッドとタンパク質を固体コアとして持つ solid-in-oil (S/O) エマルジョンを作製した。S/O エマルジョンはタンパク質の経皮吸収を促進するが、その吸収（角質層透過）は十数時間かかり、より迅速な経皮吸収システムが求められていた。¹⁸⁾ そこで、金ナノロッドを内部の固体相に混合し、そのフォトサーマル効果による経皮吸収効率の向上を評価した。その結果、より多くのタンパク質が皮内に移行することが明らかになり、さらに、抗体産生も認められた。今後、投与量や光照射の最適化を行う必要はあるが、ヒートショックタンパク質の誘導もできるこの手法はがんワクチンへの応用も含めて、その可能性は極めて高いと期待している。

8. おわりに

金ナノロッドは調製が容易で、粒径制御も可能で、粒子表面の様々な化学修飾も行える。また、光吸収や二光子励起発光に加え、光散乱、フォトサーマル効果、フォトアコースティック効果といった有機分子にはない特徴を持っている。一方で、ナノ粒子であるがゆえの毒性の問題がよく指摘される。慎重な解析が待たれるところではあるが、金自体は生体適合性を持つ金属であり、生体内では比較的早期に粒子同士が凝集し、ナノサイズの特性を失うことも考えられる。いずれにせよ、分光光学から化学、生物学、薬学、医学といった様々な分野から多くの研究者が集まり、それぞれの知恵を出し合って、新しいテクノロジーが次々と生まれ、様々な評価が進んでいる。今後、次世代の医療を担う新規ナノ材料として大きく発展するものと期待している。

なお、本研究の中の動物実験は九州大学動物実験規則に則り、九州大学動物実験委員会の承認を受け、行われたものである。

謝辞 本研究は科学研究費補助金基盤研究 B (19300172, 22300158) 及び科学技術振興機構さきがけ「界面の構造と制御」の支援によって行われた。

REFERENCES

- 1) “Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications,” ed. by Hayat M. A., Academic Press, San Diego, 1989.
- 2) El-Sayed I. H., Huang X., El-Sayed M. A., *Cancer Lett.*, **239**, 129–135 (2006).
- 3) El-Sayed I. H., Huang X., El-Sayed M. A., *Nano Lett.*, **5**, 829–834 (2005).
- 4) Chen Y. H., Tsai C. Y., Huang P. Y., Chang M. Y., Cheng P. C., Chou C. H., Chen D. H., Wang C. R., Shiau A. L., Wu C. L., *Mol. Pharm.*, **4**, 713–722 (2007).
- 5) Gibson J. D., Khanal B. P., Zubarev E. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 11653–11661 (2007).
- 6) Yu Y.-Y., Chang S.-S., Lee C.-L., Wang C. R. C., *J. Phys. Chem. B.*, **101**, 6661–6664 (1997).
- 7) Niidome T., Yamagata M., Okamoto Y., Akiyama Y., Takahashi H., Kawano T., Katayama Y., Niidome Y., *J. Control. Release*, **114**, 343–347 (2006).
- 8) Niidome T., Akiyama Y., Shimoda K., Kawano T., Mori T., Katayama Y., Niidome T., *Small*, **7**, 1001–1007 (2008).
- 9) Eghtedari M., Oraevsky A., Copland J. A., Kotov N. A., Conjusteau A., Motamedi M., *Nano Lett.*, **7**, 1914–1918 (2007).
- 10) Niidome T., Akiyama Y., Yamagata M., Kawano T., Mori T., Niidome Y., Katayama Y., *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **20**, 1203–1215 (2009).
- 11) Dickerson E. B., Dreaden E. C., Huang X., El-Sayed I. H., Chu H., Pushpanketh S., McDonald J. F., El-Sayed M. A., *Cancer Lett.*, **269**, 57–66 (2008).
- 12) Liao H., Hafner J. H., *Chem. Mater.*, **17**, 4636–4641 (2005).
- 13) Huang X., El-Sayed I. H., Qian W., El-Sayed M. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2115–2120 (2006).
- 14) Shiotani A., Mori T., Niidome T., Niidome Y., Katayama Y., *Langmuir*, **23**, 4012–4018 (2007).
- 15) Kawano T., Niidome Y., Mori T., Katayama Y., Niidome T., *Bioconjugate Chem.*, **20**, 209–212 (2009).
- 16) Lee E. S., Liu G. L., Kim F., Lee L. P., *Nano*

-
- Lett.*, **9**, 562–570 (2009).
- 17) Yamashita S., Niidome Y., Katayama Y., Niidome T., *Chem. Lett.*, **38**, 226–227 (2009).
- 18) Tahara Y., Honda S., Kamiya N., Piao H., Hirata A., Hayakawa E., Fujii T., Goto M., *J. Control. Release*, **131**, 14–18 (2008).