

量子ドットを投与した生物学的試料の PIXE 分析

草野 薫¹、松山 哲生¹、石井 慶造¹、寺川 貴樹¹、松山 成男¹、菅井 裕之¹、
唐橋 昌宏¹、能澤 雄一郎¹、山内 祥聖¹、和田 成一²、世良 耕一郎³

¹東北大学大学院工学研究科量子エネルギー工学専攻
980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-01-2

²岩手医科大学サイクロトロンセンター
022-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

³北里大学 獣医学部
034-8628 青森県十和田市東二十三番町 35-1

1 序論

生命科学の研究において、試料中の元素分布や薬剤の挙動を引き起こした原因となる生体機能を知ることは非常に重要である。PIXE を用いれば元素分布や薬剤の挙動などを分析することは可能であるが、それらと生体機能の間にある関係性を特定することは難しい。一方、量子ドットはマイクロサイズの半導体粒子であり、優れた蛍光特性を持ち、生体分子などを容易に結合できるため、生命科学の分野、特に生体の機能に関する研究で幅広く活用されている。さらに、量子ドットの主な構成元素は、カドミウムやセレンなどの半導体である為、PIXE でも分析が可能である。よって、量子ドットを PIXE トレーサーとして用いれば、生体の機能とそれに伴う元素分布の関係性を示せる可能性がある。

本研究では、マウスに血流染色に対応した量子ドットを投与し、その組織試料を PIXE 分析することにより、PIXE 分析用トレーサーとしての量子ドットの有用性を評価する。

2 量子ドット

量子ドットとは直径がナノメートルサイズの半導体粒子であり、三次元の量子井戸構造を持つ蛍光材料である。量子ドットは図 1 のようなコア/シェル型構造であるため、表面修飾により水溶化しても蛍光を消失せず、優れた蛍光安定性を持つ。コア/シェル型では、バンドギャップの大きい半導体でコア部分を被覆するため、光励起により生成した励起子はコア内に閉じ込められる。その結果、量子ドット表面での無輻射遷移確率が減少し、発光の量子収率および量子ドットの溶液中での安定性が増大する。コア半導体には Cd や Se などが用いられる。CdSe、CdSeTe、ZnSe などは可視光領域から、生体を透過しやすい近赤外線領域までの蛍光を発する。一方、シェル半導体には ZnS が主に用いられる。ZnS は生体に対する毒性が低いため、*in vivo* での実験に適している。さらに、量子ドットはシェル半導体の周りをポリエチレングリコール (PEG) などのポリマーでコーティングされているため、生体分子や官能基などを簡単に結合できる。合成された時点の量子ドットは非常に疎水性が高い有機物で被覆されている為、水へは溶解しない。そのため、量子ドットを水溶化するには表面修飾をして親水性にする必要がある。その方法には、表面の有機層を両親媒性の化合物などで置換する方法と、表面の有機層を残したまま両親媒性ポリマーで被覆する方法がある^[1]。そして、表面修飾された量子ドットにはカルボキシル基やアミノ基が露出しているため、様々な生体分子や官能基を結合することが可能となる。

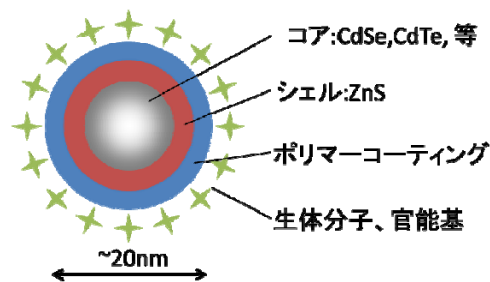


図 1: 量子ドットの構造

3 量子ドットの定量分析

本研究ではライフテクノロジーズジャパン株式会社から購入した量子ドットを使用した。この量子ドットの構成元素は公開されているが、元素ごとの濃度に関する情報がない。そのため、本章ではこの量子ドット 1p モルあたりに含まれる構成元素の質量を調べるために、内部標準法で分析した。なおこの実験は仁科記念サイクロトロンセンター(以下 NMCC) にて PIXE で定量分析をした。

3.1 本研究で使用した量子ドット

本研究で使用した量子ドットは Invitrogen 社の Qtracker® non-targeted quantum dots (以

下 Qdot) である。Qdot はコア半導体に CdTeSe、シェル半導体に ZnS を使用している。CdTeSe は「生体の窓」と呼ばれる生体を透過しやすい近赤外線領域の波長の蛍光を発するため in vivo でのイメージングに有効である。また、PEG 表面コートに反応性官能基を含んでいないため、長時間生体内に留まることができ、小動物の生体内のイメージ、特に血管構造の研究に適している。

3.2 試料調製

本実験では内部標準法で Qdot に含まれる元素を定量するために、内部標準元素としてインジウムを添加して PIXE 用のターゲットを作製した。

まず、0.2 μM の Qdot 30 μl をテフロン製容器にマイクロピペットを用いて滴下した。次に内部標準物質として 1 g/l のインジウム（和光純薬 原子吸光分析用）を 50 μl 添加し、テフロン容器に蓋をし、専用のポリプロピレン容器でしっかりと密閉する。これを、ボルテックスミキサーで 1 分間以上攪拌し、ピペットを用いて試料溶液 10 μl を薄膜（プロレン膜）に滴下し、60℃ のオープン内で乾燥させる。膜上の溶液が十分乾燥したら、再び容器をボルテックスミキサーにかけ、薄膜に 10 μl 滴下し、同様に乾燥させて PIXE のターゲットとした。本実験では同条件の下でターゲット試料を 3 枚ずつ作成し、NMCC にて PIXE で定量分析をした。

3.3 分析結果

図 2 に PIXE 分析により得られた X 線スペクトルを示す。緑色の線が内部標準物質のインジウムを添加したターゲットの X 線スペクトルで、青色の線がインジウムを添加せず Qdot のみで分析した X 線スペクトルである。その結果、Zn、Se、Cd のピークを確認することが出来たが、Te の Kα線(27.38 keV)のピークは観察できなかった。

1p モルの Qdot に含まれる主な構成元素 Cd、Se、Zn の質量を算出した値を図 3 に示す。なお、この実験結果は同一条件の試料ターゲット 3 枚を分析し、その平均値から質量を求めた。1p モルの Qdot に含まれる Cd、Se、Zn の質量は、Cd : 1.0 μg、Se:0.14 μg、Zn:0.04μg であることがわかった(図 3)。

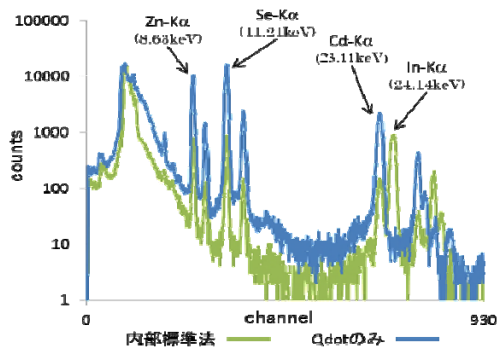


図 2: X 線スペクトルの結果

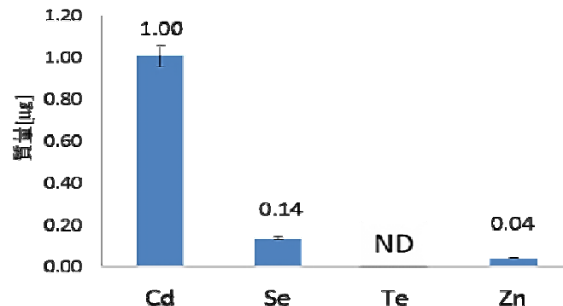


図 3: Qdot 1 pmol 中の各元素の質量

4 量子ドットの PIXE トレーサーとしての応用実験

量子ドットを実際にトレーサーとして用いて実験を行い、その結果から量子ドットのトレーサーとしての有用性を評価する。血流標識の量子ドットを、腫瘍血流遮断剤(以下 AVE8062)を投与した担腫瘍マウスに投与し、AVE8062 による腫瘍内の血流変化と、それが及ぼす元素分布の関係性を、量子ドットでマウスの血流を標識し、PIXE で得られる空間分及び蛍光顕微鏡から得られる蛍光画像を用いて比較した。

4.1 腫瘍血流遮断剤 AVE8062^{[2][3]}

近年、がん細胞を直接治療するのではなく、がん腫瘍に酸素や栄養を供給する腫瘍血流を遮断し、がん腫瘍を兵糧攻めにして治療する腫瘍血管標的薬剤 (Vascular Targeting Agent : VTA) の開発が行われている。VTA には大きく分けて 2 つある。1 つは血管新生阻害剤 (angiogenesis-inhibiting agents : AIA)、もう 1 つは血管遮断剤 (vascular disrupting agents : VDA) である。

AIA は血管新生のシグナルを標的とする薬剤である。腫瘍細胞は酸素や栄養素を供給するために新たな血管網を作成しようと、血管新生のシグナルを発する。AIA による血管新生阻害療法は、がん患者に対して追加的に行われる補助治療や、がんの発生予防といった腫瘍細胞数が比較的少ない場合に最も効果が期待されている。しかし AIA は既存の腫瘍血管に対する作用がなく、ある一定以上の大きさに成長した腫瘍に対しての効果は難しい。

VDA は血管内皮細胞への作用などにより、既存の腫瘍血管の選択的遮断をもたらす薬剤である。腫瘍血管は正常血管に比べ、もろく薄い血管壁をもち、腫瘍内の間質液圧及び腫瘍血管の浸透圧が高いなどの構造上の違いがあり、この違いを利用することにより腫瘍血管の選択的遮断をもたらす。一方で、平滑筋細胞、周辺細胞、神経分布の不足や、血管内皮細胞の形状、機能の異常も報告されている。AVE8062 は VDA に分類される。

AVE8062 の腫瘍血管遮断の作用機構、および 抗腫瘍効果について説明する。AVE8062 投与後、筋繊維の収縮により細動脈の内腔が狭まり血管抵抗が上昇し、約 30 分で腫瘍血流支配血管の血流が完全に途絶える。これにより、腫瘍血管の多くで、内腔が消失する。また、血流遮断後、腫瘍血流を排出する側の結果に多数の赤血球が停留し、2-3 時間後にその赤血球が溶血する。細動脈、腫瘍血流支配血管の収縮が腫瘍血流遮断に寄与しており、二次的に引き起こされる腫瘍血管内腔の消失、滞留した赤血球の溶血により栓塞が生じることで、腫瘍血流の回復を不可能にしている。また、正常血管では投与後血流量は減少するが、正常な形態を維持し、最終的に元に戻る。

4.2 実験の流れ

まず、大腿部に腫瘍を移植したマウスに AVE8062 を投与する。その 24 時間後に血流標識の Qdot を投与し、腫瘍組織を摘出する。摘出した組織から、蛍光観察および PIXE 用のターゲット

トを作製し、蛍光顕微鏡で蛍光画像を撮影した後、東北大学高速中性子実験室(FNL)のサブミリPIXEで元素分布画像を取得した。さらに試料に含まれる元素をNMCCにてPIXE分析で定量した。なお、PIXEで分析する前に蛍光顕微鏡で観察する理由は、PIXE分析後ではビームの影響でターゲット試料の状態が著しく変化し、またQdotの蛍光量が減少するためである。また、蛍光画像はニコンの培養倒立顕微鏡「ECLIPSE TS100」を用いて撮影した。

4.3 実験条件

4.3.1 マウスモデル

腫瘍を移植したマウスはC3H/HeSleマウス、週齢15週のオスを用いた。実験2週間前に後肢大腿四頭筋にNFSa線維肉腫を移植し、実験時は腫瘍が約10mm径に増殖していた。

4.3.2 試料条件

本実験ではAVE8062が引き起こす腫瘍部への血流遮断と、それに伴う腫瘍内部の元素分布の関係性を調べるために、担腫瘍マウスに投与するAVE8062を10mg/kg、40mg/kg、0mg/kgの3つの条件に設定した。

AVE8062を条件ごとに腹腔投与した24時間後にQdotを10pmol/kg(10mg/kgのCdに相当する)尾静脈から投与し、Qdot投与5分後に頸椎屠殺した。そして各条件、腫瘍組織と腎臓をそれぞれ摘出し、蛍光観察とサブミリPIXE用、及びPIXE用のターゲットを作成した。腎臓は泌尿器系の器官で血液のろ過機能を持ち、Qdotを回収するおそれがある。腫瘍組織でQdotが確認できなかった場合、腎臓に集積することが考えられるため、腎臓も分析の対象にした。また、本実験ではAVE8062及びQdotを投与しておらず、かつ腫瘍を移植していないマウスの大腿部をPIXE定量分析、腎臓をサブミリPIXE及びNMCCのPIXEで定量分析を行った。

表1 試料条件

試料番号	Qdot[pmol]	AVE8062[mg/kg]	分析部位	分析方法
1 コントロール	10	0	腫瘍組織	分布/定量
			腎臓	分布/定量
2	10	10	腫瘍組織	分布/定量
			腎臓	分布/定量
3	10	40	腫瘍組織	分布/定量
			腎臓	分布/定量

4.4 PIXE用ターゲットの作成

サブミリPIXEのターゲットには、摘出した組織を急速凍結固定し、それを薄切したものを薄膜に貼付したものを用いる。切片の厚みは厚いほうがX線の収量的に有利である。そこで、切片の厚さは比較的きれいな切片が切れる最大厚の250µmとした。一方、PIXEのターゲットに

は、サブミリ PIXE カメラのターゲットとなる切片に近接する腫瘍切片または腎臓組織に、内部標準試料である In を添加して硝酸灰化し、薄膜上で乾燥させたものを用いた。

4.5 実験結果

4.5.1 腫瘍組織の分析結果

図 4 は AVE8062 を投与していないコントロールの腫瘍の蛍光画像である。図 4 に示した①から⑥の領域において Qdot による蛍光を観察することができた。図 5、図 6 は AVE8062 を 10 mg/kg、40 mg/kg 投与した腫瘍の蛍光画像である。この 2 つの条件では Qdot による蛍光を観察することができなかった。

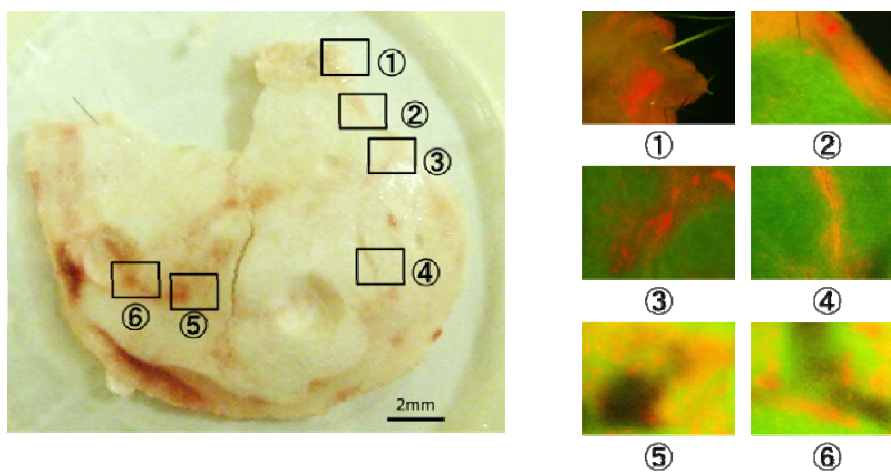


図 4: コントロールと腫瘍 (左) とその蛍光画像 (右)

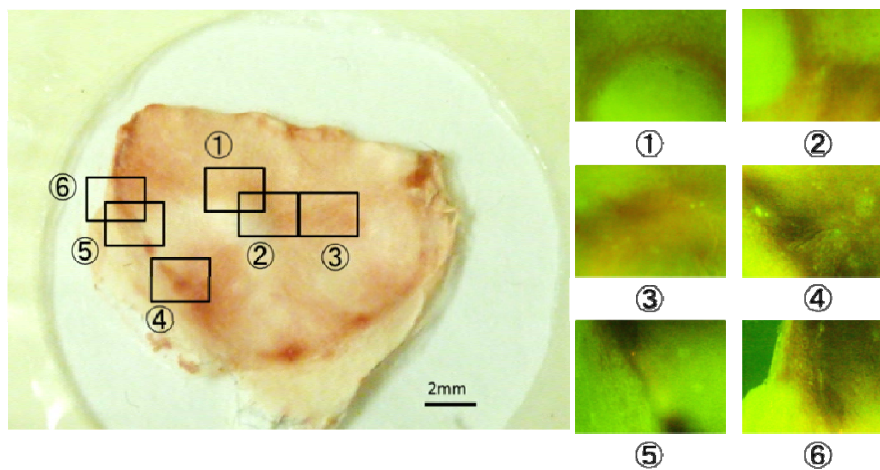


図 5: AVE8062 10 mg/kg 投与 腫瘍 (左) とその蛍光画像 (右)

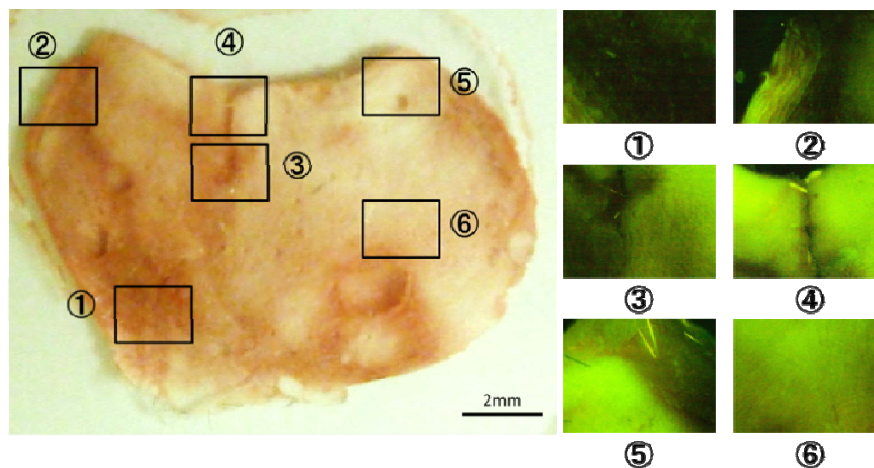


図 6: AVE8062 40 mg/kg 投与 腫瘍 (左) とその蛍光画像 (右)

次に PIXE による定量結果を示す。図 7 は各条件の腫瘍に含まれている Se の濃度である。AVE8062 を 10mg/kg 投与した腫瘍では Se の濃度は 0.38 ± 0.07 ppm、40mg/kg 投与した腫瘍では 0.31 ± 0.05 ppm となりほぼ等しい値になり、AVE8062 0mg/kg では 0.69 ± 0.13 ppm となった。また、全ての腫瘍において、PIXE 分析で Cd を検出することはできなかった。

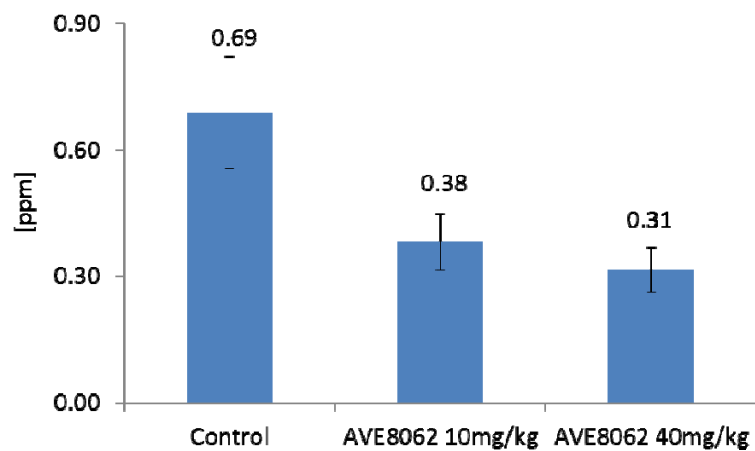


図 7: 各条件の腫瘍に含まれる Se 濃度

4.5.2 腎臓の分析結果

次に、各条件の腎臓の蛍光画像及び、PIXE カメラによる元素分布画像を示す。図 8 はコントロールの腎臓の蛍光画像である。腎臓に Qdot の蛍光を観察することができた。特に、図中の③④⑤の領域で強い蛍光を観察できた。図 9 は AVE8062 10 mg/kg の腎臓の蛍光画像である。切片の周辺部、図中の①③の領域で Qdot の蛍光を観察できたが、AVE8062 0mg/kg に比べると弱い蛍光であった。図 10 は AVE8062 40mg/kg の腎臓の蛍光画像である。切片の周辺部、図中の③④⑤の領域で強い蛍光を観察できた。

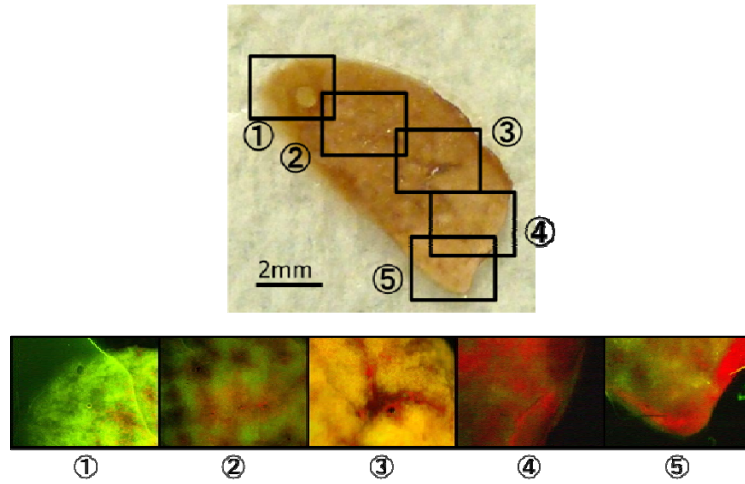


図 8: コントロールの腎臓 (上) とその蛍光画像 (下)

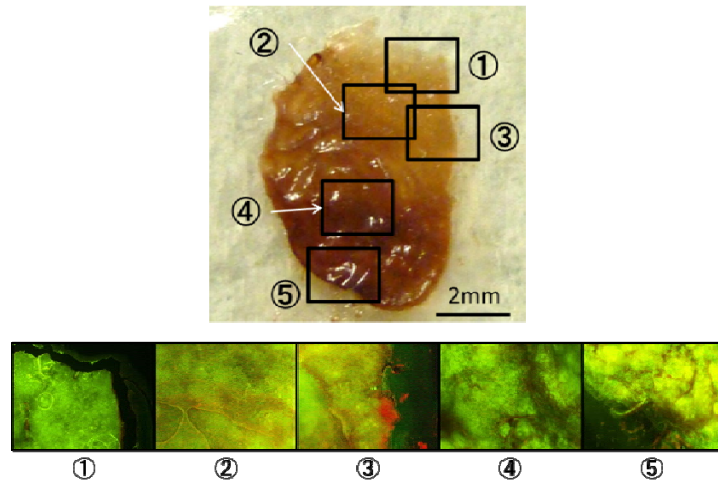


図 9: AVE8062 10mg/kg 腎臓 (上) とその蛍光画像 (下)

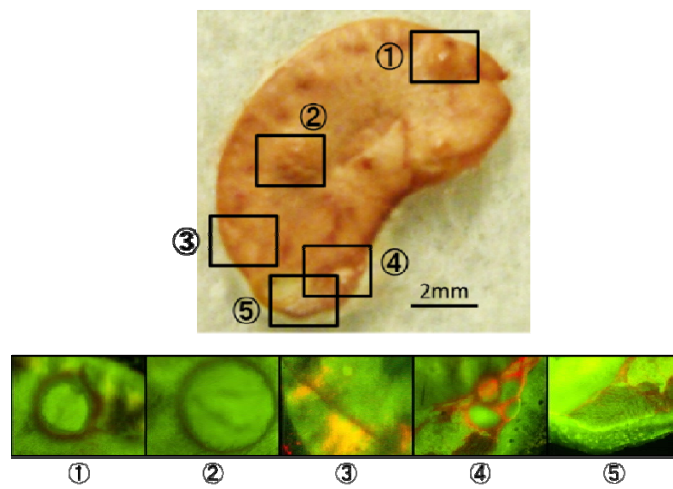


図 10: 腎臓 (上) とその蛍光画像 (下)

次に各条件の腎臓をサブミリ PIXE で得られた結果を示す。図 11、図 12、図 13 はコントロールの腎臓の分析結果である。X 線スペクトルが示すように、Se と Cd のピークを得ることができた。図中の④より Se と Cd の集積が同一の場所で観察できたため、これらを Qdot の集積とみなすことができる。

図 12 は AVE8062 10mg/kg 腎臓のサブミリ PIXE で得られた結果である。図中の X 線スペクトルから、この AVE8062 10mg/kg 投与の腎臓では Se のピークを得ることはできたが、Cd のピークを確認することはできなかった。

図 13 は AVE8062 40mg/kg 腎臓のサブミリ PIXE で得られた結果である。X 線スペクトルが示すように、AVE8062 40mg/kg 投与の腎臓では Se 及び Cd のピークを得ることができた。Se と Cd の集積が一致し、かつ図 10 の蛍光部とも一致するため、これらを Qdot の集積とみなすことができる。

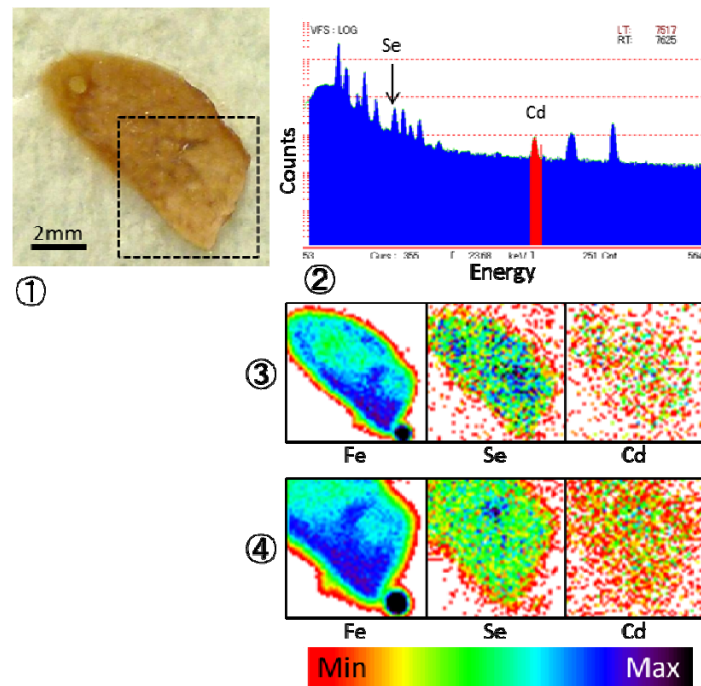


図 11: コントロールの腎臓のサブミリ PIXE の分析結果。サンプル全体のスキャンエリア : 7.5mm × 7.5mm、総電荷量 : 7.1 · C。破線領域のスキャンエリア : 5mm × 5mm、総電荷量 : 9.4 · C。① : 腎臓の切片。切片全体と破線の領域をサブミリ PIXE で分析した。② : 高エネルギー側の X 線スペクトル。③ : 腎臓切片全体の元素分布画像。④ : 破線の領域の元素分布画像。

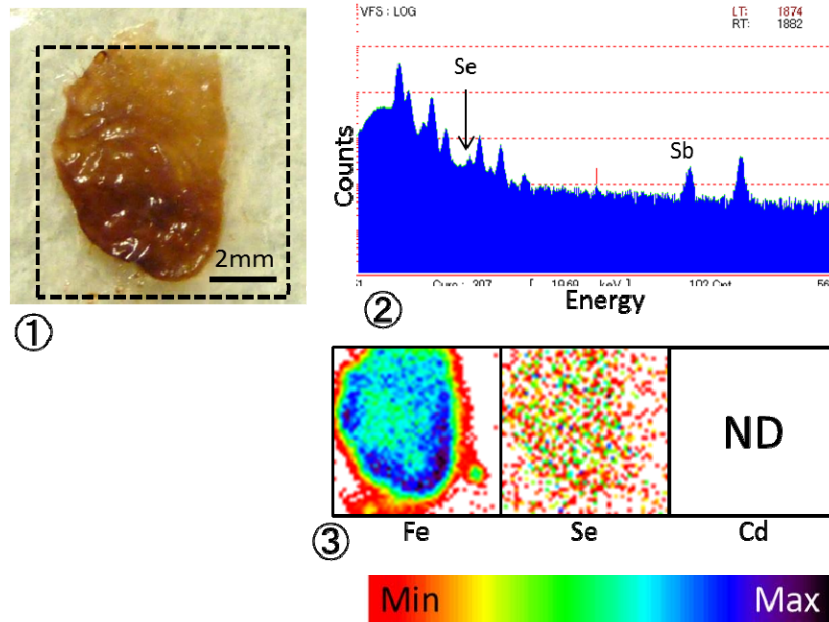


図 12: AVE8062 10mg/kg 腎臓のサブミリ PIXE の分析結果。
 スキャンエリア : 7.5mm × 7.5mm、総電荷量 : 2.3 · C。① : 腎臓切片の破線の領域をサブミリ PIXE で分析した。② : 高エネルギー側の X 線スペクトル。③破線の領域の元素分布画像。

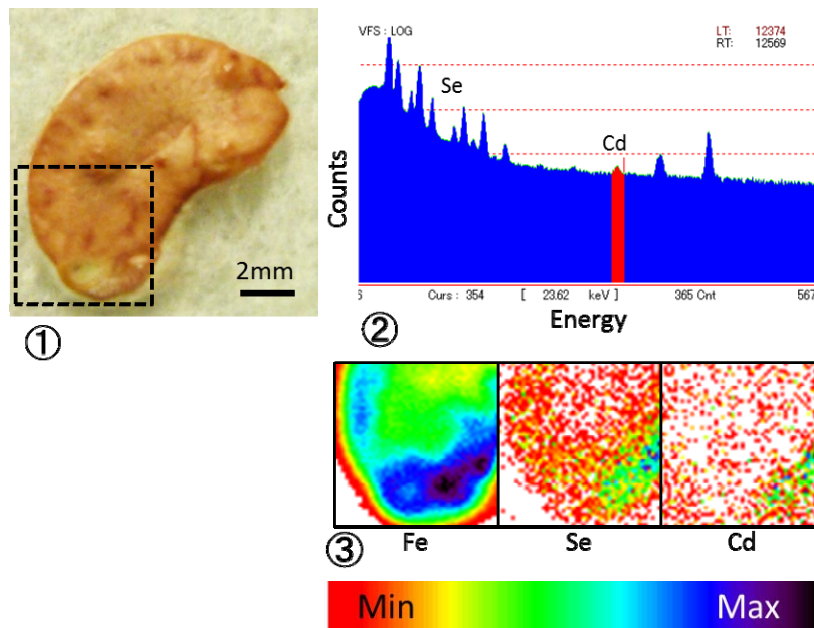


図 13: AVE8062 40mg/kg 腎臓のサブミリ PIXE の分析結果。
 スキャンエリア : 5mm × 5mm、総電荷量 : 16.8 · C。① : をサブミリ PIXE で分析した。② : 高エネルギー側の X 線スペクトル。③破線の領域の元素分布画像。

次に PIXE による定量分析の結果を示す。図 14 は各条件の腎臓に含まれる Se の濃度である。AVE8062 を 10mg/kg 投与した腎臓では Se の濃度は $0.91 \pm 0.13\text{ppm}$ であり、40mg/kg 投与では $1.19 \pm 0.13\text{ppm}$ とほぼ等しい値となり、コントロールでは $4.25 \pm 0.33\text{ppm}$ となった。また、図 15 は Cd の濃度である。AVE8062 を投与した 2 つの腎臓では Cd は検出できなかった。AVE8062 0mg/kg では $25.78 \pm 5.04\text{ppm}$ となった。

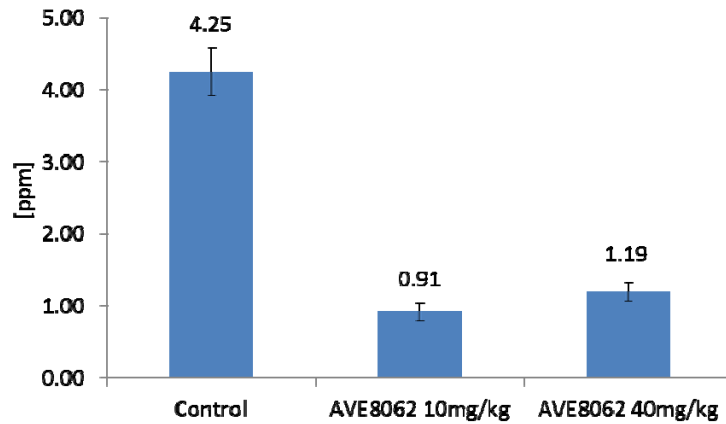


図 14: 各条件の腎臓における Se の濃度

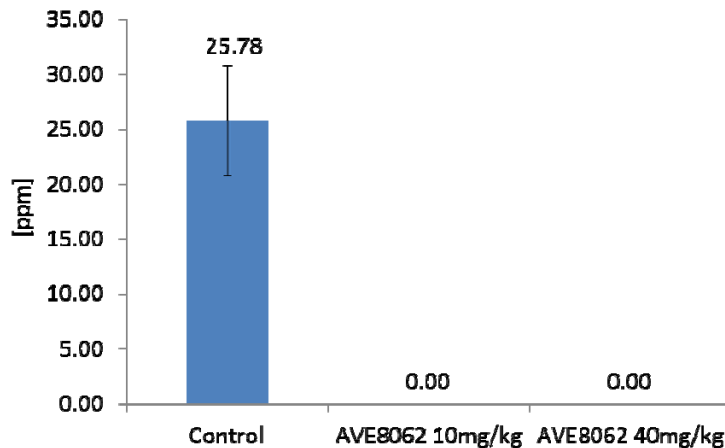


図 15: 各条件の腎臓における Cd の濃度

5 考察

コントロールの腎臓に高い Se と Cd の濃度が検出され、AVE8062 を 40mg/kg 投与したマウスの腎臓ではコントロールとは異なる局所的な Se と Cd の分布が確認することができた。また結果から AVE8062 の遮断効果が正常な腎臓にも副作用として影響している可能性が示唆された。今回、PIXE によって正常な腎臓にも、血流遮断剤の影響が確認された。Q-dot は、生体機能関連の PIXE 分析用トレーサーとしても利用可能であると考えられる。更に抗体で標識された Q-dot を用いれば、PIXE による多様な生体機能や生化学の研究が可能と考えられる。

参考文献

- [1] Andrew M. Smith, Xiaohu Gao, Shuming Nie, Quantum Dot Nanocrystals for In Vivo Molecular and Cellular Imaging, Photochemistry and Photobiology, 2004, 80
- [2] Phinnen, FALM Eskens, Vascular disrupting agents in clinical development, British Journal of Cancer , 2007, 96.
- [3] Katsuyoshi Hori, Sachiko Saito, Microvascular mechanisms by which the combretastatin A-4 derivative AC7700 (Ave8062) induces tumour blood flow stasis, British Journal off Cancer, 2003, 89.

PIXE analysis of biological samples treated with quantum dots

Kaoru Kusano¹, Keizo Ishii¹, Atsuki Terakawa¹, Shigeo Matsuyama¹,
Hiroyuki Sugai¹, Masahiro Karahashi¹, Yuichiro Nozawa¹, Syousei Yamauchi¹,
Tetsuo Matsuyama¹, Seiichi Wada² and Kouichiro Sera³

¹Department of Engineering, Tohoku University
6-6-01-2 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

²Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

³Department of Veterinary Medicine, Kitasato University
35-1 Higashinijyuusannbann-cho, Towada, Aomori 034-8628, Japan

Abstract

Particle induced X-ray emission (PIXE) is an excellent tool for multi-elemental analysis of a wide variety of samples and can provide elemental distribution in the sample using a beam scanning technique. Thus, PIXE plays an important role in various fields of research such as material engineering, environmental science and life science.

In biological and medical fields, it is important not only to evaluate elemental concentration in the sample but also to understand its biological mechanism, whereas PIXE provides only elemental information of the sample. In order to study relationships between elemental distribution and vital function, I aimed to apply Quantum dots (QD) as a biological tracer to PIXE analysis. QD is a semiconductor nanocrystal having unique optical and electronic properties, such as size-and composition-tunable fluorescence emission. In addition, its surface is coated with PEG. Therefore, QD can be conjugated with biological substances such as molecule and antibody associated with biological response.

In this work, QD was applied as a blood-flow tracer in tumor bearing mice treated with the vascular disrupting agent AVE8062. I administered AVE8062 at a single dose of 10mg/kg or 40mg/kg into C3H/HeSlc mice that were transplanted with NFSa fibrosarcoma cells. QD

(10pmol/kg) was injected into the tail veins of the mice 24h after AVE8062 administration. The tumors were excised and frozen immediately with powdered dry ice. Tumor samples were for conventional PIXE analysis as well as fluorescent observation. We also prepared kidney samples in the same way as the tumors. We used Qtracker® of Invitrogen as QD. Because the PEG surface does not contain reactive functional groups, Qtracker® is retained in circulation longer period of time. The conventional PIXE analysis were performed at Nishina Memorial Cyclotron Center (NMCC), while elemental distribution in the sample tissue sections were evaluated from the PIXE analysis using the submillimeter-sized proton beam (submilli-PIXE) at the Fast Neutron Laboratory, Tohoku University.

In the case of the control mouse, fluorescence of QD was observed clearly in both its tumor and kidney samples. I could also observe the elemental distribution of Cd and Se, which are component of QD, in the submilli-PIXE analysis. Although fluorescence was not observed in the tumors and kidney samples of the AVE8062 treatment group (40 mg/kg), the elemental distribution of Cd and Se was observed in only kidney samples.

The results of the present analysis indicate the following points :

- (1) QD was not observed in tumors of the two mice treated with AVE8062 because of tumor blood-flow interrupting effect.
- (2) it is possible to observe fluorescence of QD, even if Cd concentration is under the detection limit in PIXE analysis.
- (3) The relationships between elemental distribution and vital function can be derived by comparing fluorescence images and PIXE images.

In conclusion, I performed both PIXE analysis and fluorescent observation using QD for the same samples. It was difficult to apply Qtracker® of Invitrogen as the blood-flow tracer for PIXE analysis because the elemental concentration concerning the QD is under the level of the detection limit in PIXE analysis. It is suggested that if QD conjugated with biological substances is used, the QD can be detected by PIXE analysis as a biological tracer because concentration of QD in bio-samples is expected to increase.