

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 大川 清

平成18(2006)年4月

## 目 次

I.	総括研究報告	
	ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発 -----	1
	大川 清	
	(資料1) ナノメディシン研究発表会資料 -----	9
	(資料2) CD147 関連論文 -----	19
	(資料3) 関連会議 -----	43
II.	分担研究報告 -----	49
	1. 胆・膵腫瘍性病変に対する画像診断に関する研究 -----	49
	田尻久雄	
	2. 超音波造影剤レボピストによる肝臓癌の描出 -----	51
	宮本幸夫	
	3. 癌の浸潤マーカーとしての分子ターゲット CD147 -----	52
	大川 清	
	4. CD147 発現腫瘍の臨床的意義 — 食道癌と子宮内膜癌 — -----	57
	石橋由朗、山田恭輔	
	5. 新規超音波造影剤（振動性ナノ・マイクロバブル）の開発 -----	59
	阿部正彦、酒井秀樹	
	6. 超音波分子イメージング装置に関する研究 -----	61
	伊藤貴司、射谷和徳、赤羽睦弘	
	7. In vitro 3次元微小腫瘍モデルの作製に関する研究 -----	62
	相澤 守	
	8. 超音波造影剤検定のための3次元還流培養腫瘍モデルの作成 -----	65
	松浦知和	
	9. 動物実験：腫瘍動物モデルの開発に関する研究 -----	68
	日下部守昭	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	73
IV.	研究成果の刊行物・別刷 -----	79

# I 総括研究報告書

ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発

大川 清

ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発

主任研究者 大川 清 東京慈恵会医科大学 教授

研究要旨：超音波診断法は広く医療に利用されており、超音波内視鏡の発達や超音波造影剤の開発によって、癌の早期発見にもより寄与できる診断法である。本研究では、癌の浸潤マーカーであり、悪性度の高い癌に高頻度で発現する CD147 分子をターゲットとして、超音波診断法によってきわめて早期に悪性腫瘍を診断し、あわせて治療するシステムの開発を目指している。まず研究者らは独自に開発した CD147 を高感度で認識する単クローン抗体（MAb12C3）を用い臨床摘出標本で食道癌、子宮内膜癌での CD147 発現と予後の関連を明らかにし、培養細胞株でもその結果を確認した。また、分子イメージングに利用するために、MAb12C3 をラベルした新規超音波造影剤（超音波振動性マイクロバブル）の開発が必要不可欠であり、新規界面活性剤の開発を行い、成功した。一方、マイクロバブル検出のための超音波診断機器の開発も進めており、低音圧の超音波照射で生体深部の高分解能を実現する必要があるが、パルス圧縮などの技術を応用することで、連続超音波でも分解能1mmが得られることを検証した。さらに、マイクロバブルの生体特性や超音波照射による音響特性に関して検討するため、3次元腫瘍モデル、担癌動物モデルを作成した。次年度以降、医学・界面活性学（化学合成）・音響工学の連携で、実用的な超音波による癌の早期診断システム開発研究を進めていく。

分担研究者

田尻久雄	東京慈恵会医科大学	教授
宮本幸夫	東京慈恵会医科大学	助教授
松浦知和	東京慈恵会医科大学	講師
石橋由朗	東京慈恵会医科大学	講師
山田恭輔	東京慈恵会医科大学	講師
相澤守	明治大学理工学部	助教授
日下部守昭	(財)動物繁殖研究所	主席研究員
伊藤貴司	アロカ(株)研究所	主幹研究員
射谷和徳	アロカ(株)研究所	主席研究員
赤羽陸弘	アロカ(株)研究所	研究員
阿部正彦	東京理科大学理工学部	教授
酒井秀樹	東京理科大学理工学部	助教授

A. 研究目的

本研究では、癌の浸潤・転移マーカーである

CD147 を分子ターゲットとし、新規開発の安全性の高い超音波造影剤（マイクロバブル）に CD147 高親和性物質を標識、集積させ、臨床で広く用いられる超音波診断法で悪性度の高い微小癌を極めて早期にイメージングする。さらに、抗癌剤等を包含した標識マイクロバブルを微小癌に集積させ、収束超音波を利用して加療する技術を開発する。

B. 研究方法

①超音波診断法における分子ターゲット技術の必要性（田尻久雄、宮本幸夫）

臨床超音波検査法は、心臓エコー検査として循環器疾患領域、腹部超音波検査法として肝臓・胆道・膵臓・腎臓疾患領域、経膈エコー検査法として卵巣・子宮など産科婦人科疾患領域、

他にも乳腺・甲状腺疾患領域でも高頻度に利用されている。しかも、検診による腫瘍性疾患の一次スクリーニング検査としていずれも重要である。従来心臓の機能検査を主目的とする心臓エコー検査法においてすら、心房粘液腫の早期発見、心臓原発悪性リンパ腫、心臓への癌の播種など悪性腫瘍の診断に寄与している。そこで、超音波内視鏡（EUS）技術を駆使して、比較的腫瘍深度が浅い消化管腫瘍や深部腫瘍でもプローブを腫瘍に内部から近づけることで腫瘍性疾患の早期診断を行っている田尻らによる臨床を介しての研究から、「癌の分子イメージング」の必要性に関して検討した。

一方、体表から肝臓・膵臓などの深部臓器の腫瘍性疾患を診断し、最も一次スクリーニングとして用いられる腹部超音波検査における超音波造影剤の現状に関して、その利点と欠点に関して、宮本らが検討を行った。

②分子ターゲットとしてのCD147の意義と捕捉抗体の感度検定（大川 清、石橋由朗、山田恭輔）

大川らは作製した癌細胞の細胞膜表面に発現する糖蛋白で、癌浸潤マーカーのCD147認識単クローン抗体（MAb12C3）をターゲットであるCD147分子捕捉のためのナノバブル標識用デバイスとして活用するため、その精製および親和特性を解析した。また、ヒト化抗体、アプタマーの作製のため、リコンビナントCD147蛋白の発現系を構築した。

分子ターゲットとしてのCD147の臨床的意義を明確にするため、外科的切除を施行した切除標本で、石橋は食道癌のCD147の発現を免疫組織化学的に検討した。早期食道癌は、内視鏡切除症例（62例）、でMAb12C3抗体の染色を行った。山田は子宮内膜癌（39例）を腫瘍が高分化型または中分化型、子宮筋層浸潤が1/2以内、頸管浸潤を認めない症例（低リスク群：27例）、低分化型で子宮筋層浸潤が1/2をこえるか頸管浸潤を認める、の1つ以上を満たす症例

（高リスク群：12例）に分類し、免疫組織学的評価で染色強度、染色パターンをそれぞれ0、1、2、3点とスコアリングし両群の比較を行った。

③新規超音波造影剤（マイクロバブル）の開発とそのラベル化（阿部正彦、酒井秀樹）

阿部、酒井、土屋らは、超音波診断用微小気泡化造影剤（マイクロバブル）に利用可能な新規界面活性剤の合成およびその界面物性について研究を行った。作製するマイクロバブルの条件は、1）生体適合性に優れ、安全性が高い、2）均一な微粒子で、安定している、3）低音圧での振動特性に優れている、4）抗体や核酸の標識が可能である、などの条件を満たすことが必要である。

④マイクロバブル検出用超音波診断装置の開発（伊藤貴司、射谷和徳、赤羽睦弘）

CD147認識MAb12C3を超音波で画像化する技術の研究開発を行った。まず、超音波によって振動するマイクロバブルを作製するために、音響特性測定システムを構築した。また、その振動シミュレーションをコンピューター上で行い、作製するマイクロバブルと反響検出システム開発のための基礎データを集積した。

⑤評価系としての3次元腫瘍モデルと担癌動物モデル（相澤 守、松浦知和、日下部守昭）

本プロジェクトを推進する上で、新規な超音波分子バイオイメージングを検証するための「微小腫瘍モデル」の作製は必要不可欠な要素技術である。相澤は、アパタイト単結晶ファイバー（HAF）から腫瘍モデル細胞の三次元足場を構築し、ラジアルフロー型バイオリクター（RFB）を用いて循環培養することにより微小腫瘍モデルの構築を指向した。松浦らは、超音波造影剤検定のための3次元還流培養腫瘍モデルを、ラジアルフロー型バイオリクター（RFB）を用いて作成した。多孔質ハイドロキシアパタイトビーズまたは相澤の開発したHAFカラムを

RFBに充填し、癌細胞、肝細胞、血管内皮細胞をRFBで共培養した。

また、目下部は、ヒト癌を用いた移植動物モデルおよびマウスの転移細胞系を用いた腫瘍動物モデルの基礎的検証を行った。具体的には移植したヒト癌腫におけるCD147の発現を検討した。

### C. 研究結果

#### ①超音波診断法における分子ターゲット技術の必要性

田尻と今津は、胆道・膵臓腫瘍診断における4つの画像検査法(EUS、MDCT、MRCP、ERCP)の診断能に関して比較検討した。4つの診断法の中で、EUSは腫瘍の描出、良悪性の鑑別に優れ、stagingも可能であった。良悪性度の診断に関する感度、特異度はいずれもほぼ90%であった。

宮本と西岡による肝臓腫瘍の血流からみた肝臓癌に関する超音波造影剤レボピストを用いた検討では、腫瘍径が大きく血流の豊富な肝臓癌はレボピストで造影され、診断的な意義を認めた。しかし、腫瘍径が10mm以下で血流の少ない腫瘍の確定診断に有用化は疑問であった。さらに、検査をする上で、レボピストの半減期が短い上に、超音波を照射しバブルの破壊時の音響を計測するため、超音波造影剤がすぐに消失してしまい、測定が難しいという点が指摘された。

#### ②分子ターゲットとしてのCD147の意義と捕捉抗体の感度検定

大川は、MAb12C3の生物活性と親和性を多面的に培養細胞株を利用し検証した。MAb12C3はきわめて高感度に種々の癌細胞表面のCD147を認識し、さらに集積した。このことは、MAb12C3標識抗癌剤が殺細胞効果を増強することでも証明された。一方、より高感度のヒト化抗体やアダマール作製のため、ヒトリコンビナントCD147の発現系を構築した。安定した発現を得るにはさらに改良が必要であるが、ヒトリコンビナントCD147を精製することができた。

石橋は、早期食道癌とCD147の発現に関して

MAb12C3を用いて免疫組織化学的に検討した。腫瘍の大きさ、深達度に有意な関係がでた。つまり、CD147が濃く発現する癌は大きく、そして強く染まるものは深達度の深い癌に多いことが、統計学的に有意なものとして証明された。早期癌でもかなり強い染色性が認められた。異形成粘膜(前癌状態)のものにも強い染色を認めた。山田も子宮内膜癌39例中38例(97.4%)と高率に癌細胞表面にCD147発現を確認するとともに、染色強度から低リスク群は0-5点に、高リスク群は2-6点に分布し、両群中間値には統計学的に有意差を認めた。これはCD147強陽性例で腫瘍の広がり・深部到達度(筋層内浸潤)が強く予後が悪いことを証明できた。

#### ③新規超音波造影剤(マイクロバブル)の開発とそのラベル化

超音波診断用造影剤に利用可能な界面活性剤として、(I)重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤および(II)シクロアミロース修飾界面活性剤の新規合成に着手し、目的物質の合成に成功した(特許申請中)。また新規に合成した界面活性剤の界面物性測定から効果的に気泡(マイクロバブル)を調製可能な知見を得た。

#### ④マイクロバブル検出用超音波診断装置の開発

マイクロバブルの振動シミュレーターを作成し、一定条件でバブル固有の振動が発生することを確認した(特許申請予定)。パルス圧縮などの技術を応用することで、連続超音波でも分解能1mmが得られることを検証した。TPX樹脂がRFB材料として加工性及び超音波の透過性に優れていることを確認した。

#### ⑤評価系としての3次元腫瘍モデルと担癌動物モデル

HAFカラムあるいは多孔質HAビーズは、RFBを用いた3次元培養の足場としても有効であると考えられる。RFB内に血管様構造を持つ腫瘍あるいは肝臓オルガノイドが作成できた。

本年度行った動物実験からは、生体におけるCD147の発現は、腫瘍の性質はもちろん宿主環境から影響を受けることが予測できる。

#### D. 考察

現状で行われている EUS での検討から、病変部に近接して検査・診断する EUS では、現行でも確定診断に有用であるが、より小さい腫瘍の早期診断における確診率をあげるために、「分子イメージング」技術が有用と考える。この特性を有意義に活用するため、まず CD147 発現と臨床統計解析の進んだ食道癌に対する超音波内視鏡的アプローチ、そして CD147 発現と臨床癌進達度の解析がされ、且つ外来診療で頻繁に行われ、数ミリの妊娠初期胎嚢をも検出可能な安定した解像能力を持つ経膈エコーでの子宮内膜癌の検索を中心に限られた疾患臓器での有用性を優先的・重点的に検証したい。特に、超音波造影剤としてのマイクロバブルをより小さいバブルにした場合（例えば200nm径）は、現在の超音波装置では高周波数の超音波を照射しないと描出ができないため、照射深度を得ることができない。このため、病変部に近づくことができる EUS は有用である。さらに、消化管のように自動運動をする臓器の描出には、MRI よりも有用である。現在唯一使用されている超音波造影剤レボピストは、血流情報を得るには有用である。しかし、生体内での半減期が短く、また超音波照射によるバブルの破裂による反響をキャッチするため、実際の検査では繰り返しの造影剤投与（保険上一検査3回まで投与可能）が必要となる。このため、分子ターゲットのための抗体などのラベルには適さない。このため、新規超音波造影剤としても超音波振動性マイクロバブルの開発が必要と考えた。

分子標的としての CD147 は、限られた臨床腫瘍例での検討では有るが、癌患者の生命予後と CD147 分子の発現にきわめて高い負の相関を認め、CD147 強発現腫瘍では浸潤能が強いことが原因と考えられる。このため、CD147 発現早期癌の発見・診断は、癌の早期治療の上できわめて意義があると考えられた。CD147 分子の臨床の場における人体での捕捉には、マウス単

クロン抗体 MA612C3 のヒト化が必要であるが、ヒト化抗体作製における技術は基本特許が押えられており、将来の実用化もふまえて、より高感度のアプタマー作製や新規ヒト化抗体作製技術に関しても今後検討する必要がある。

超音波診断は、超音波に対する物質の音響インピーダンスの差を検出することが基本原理である。このため、生体臓器と音響インピーダンスが著しく異なる物質が超音波造影剤として適している。このため、「気体」が最も良い材料で、このために安全で安定したマイクロ・ナノバブルの作成が必要となった。本研究から、まず、界面活性剤として、(I)重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤および(II)シクロアミロース修飾界面活性剤の新規合成に成功した。これらを材料に、新規マイクロバブルを効率よく作製する技術を開発し、作製したマイクロバブルの音響特性や生体内代謝、毒性を慎重に検討する予定である。また、抗体等の標識法に関しても現在検討をすすめており、2種の方法での標識を試す予定である。

マイクロバブルの検出に関しては、FMCW 法の応用によって、ナノバブルであっても超音波診断装置で検出できる可能性がシミュレーションによって示された。さらに、マイクロバブルの非線形固有振動を高感度に検出するためには、粒径分布の揃ったバブル発生技術の開発が重要であり、このためマイクロ、ナノバブル生産法に関しても機器を含めて開発する必要がある。また、TPX を材質に用いることで、3次元腫瘍モデルをバイオリクター内で超音波によって検出できることがわかった。細胞培養用担体は、単独では強い超音波反射特性を示す。細胞が培養された状態での観察を行う必要がある。

TPX 製 RFB 培養システムを用いた3次元腫瘍モデルは、超音波造影剤としての新規マイクロバブルの特性を検討する上で有用である。マイクロバブルと HAF の音響コントラストを観察できるか次年度検討する。また、動物腫瘍モデルを樹立しマイクロバブルの集積性の検討に

際して、宿主組織の微小環境の影響を十分考慮する必要があると考える。今後、癌とその間質細胞との相互作用を、上手く利用できる動物腫瘍モデルの樹立を目指して行く予定である。

#### E. 結論

新規超音波造影剤の開発によって、超音波を利用した分子イメージング技術はより進歩・実現できる可能性が示された。今後、いくつかの技術的ブレイクスルーは必要であるが、実現すればきわめて有用な癌の早期診断技術および治療技術となり、社会に貢献できると考える。

#### F. 健康危険情報

超音波造影剤の開発にあたっては、将来生体に投与することを考慮し、今後動物実験等で毒性試験等を行う予定であり、その都度情報を公開する。

#### G. 研究発表

1) 平成17年度厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業、萌芽的先端的医療技術推進研究「ナノメディシン研究成果発表会」平成18年2月28日、東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請

1. 発明の名称：重合性2鎖2親水基含有陰イオン界面活性剤及びその製造方法

①発明者：坪根和幸、阿部正彦、酒井秀樹、大久保貴広、和田みゆき

②出願人：坪根和幸(代表)、大川 清、松浦知和、武林 敬、阿部正彦、酒井秀樹

③出願日 平成17年10月

2. 発明の名称：新規血漿糖タンパク質の産生方法(特願2005-277428)

①発明者 大川 清 ②出願人：大川 清

③出願日 平成17年9月

3. 発明の名称：プロテアソーム阻害剤耐性細胞の治療用組成物、治療用キット、及びプロテアソーム阻害剤耐性癌の治療用化合物のスクリーニング方法(特願2005-180494)

①発明者：大川 清 ②出願人：大川 清

③出願日 平成17年6月

4. 発明の名称：ガス混合装置及びガス混合法(特願2006-050548)

①発明者 藤原邦彦、松浦知和 ②出願人：エイブル(株)、大川 清、松浦知和、

③出願日 平成18年2月



資料 1	ナノメディシン研究発表会資料	-----	9
資料 2	CD 1 4 7 関連論文	-----	19
資料 3	関連会議	-----	43

平成17年度  
厚生労働科学研究費補助金  
萌芽的先端医療技術推進研究事業

## ラベル化造影剤を用いた超音波による がんの超早期診断システムの研究開発

主任研究者： 東京慈恵会医科大学 大川 清

ナノメディシン研究成果発表会  
平成18年2月28日 13:50-14:00  
(財)がん研究振興財団 国際交流センター 東京  
発表者：松浦知和

### 研究の背景1 ～なぜ超音波なのか～

超音波診断：臓器・組織の音響インピーダンスの差を画像化

特色：① 生体の微小病変を検出

② 低侵襲性

③ 簡便・迅速

④ 検査コストが安価



一般医家に広く普及  
検診に貢献  
医療経済に貢献

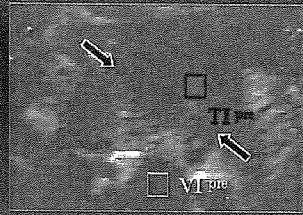
課題：① 微小病変の質的・機能的診断機能の付与

浅部・深部微小病変の悪性度  
可動性管腔臓器(消化管、子宮)病変の浸達度・悪性度

② 治療への応用

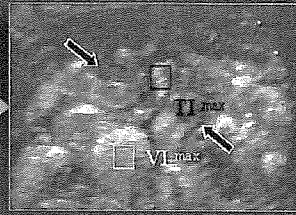
## 研究の背景 2 ～超音波造影剤～

超音波造影剤による血流情報の意義(解読点)

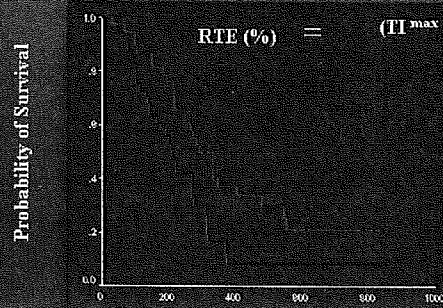


造影効果が得られる前の時間  
Pre-enhancement (pre)

Continuous scan  
for 60 seconds



最大の腫瘍造影効果が得られた時間  
Maximal enhancement (max)



$$\text{RTE (\%)} = \frac{(\text{TI}_{\text{max}} - \text{TI}_{\text{pre}})}{(\text{VI}_{\text{max}} - \text{VI}_{\text{pre}})} \times 100$$

**Avascular Tumors (n = 38)**

**MST: 293 days**

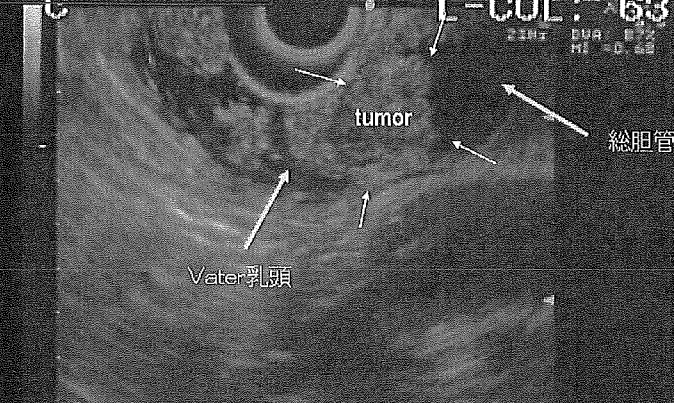
**Vascular Tumors (n = 40)**

**MST: 210 days**

神奈川県立がんセンター消化器内科  
政木隆博先生、大川伸一先生 提供

Time after Treatment (days)

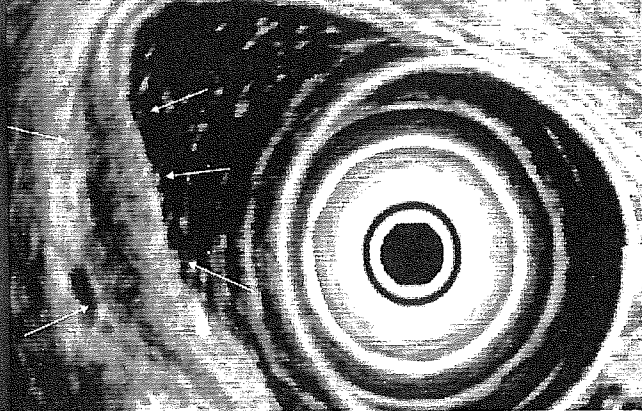
## 超音波内視鏡(EUS)①



7.5MHz Curvilinear型 (Aloka)。下部胆管内の10mm大の腫瘍。CT、MRIでは総胆管の拡張を認めるのみで、この腫瘍は全く描出できなかった。ERCP下の生検では悪性所見なし(生検がヒットせず)。手術にて下部胆管癌の診断。

造影EUSで下部胆管癌と診断できる可能性

## 超音波内視鏡(EUS)②

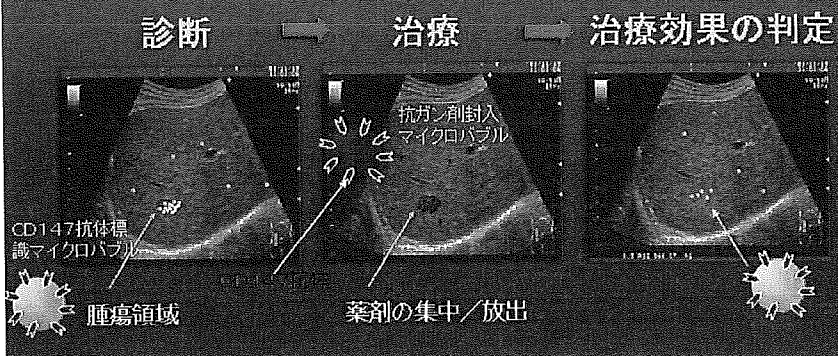


12MHzEUS専用機。肉眼型は0-IIc早期胃癌, EUSでは3層が途絶し粘膜下層への浸潤が考えられた。4層(筋層)も肥厚し、筋層への浸潤も疑われたが、手術標本では癌は粘膜内にとどまりM癌であった。3層(粘膜下層)の途絶、4層の肥厚は潰瘍痕から来るものであった。

1. 造影EUSでM癌と診断できる可能性
2. 可動性管腔臓器病変の診断

## 目的

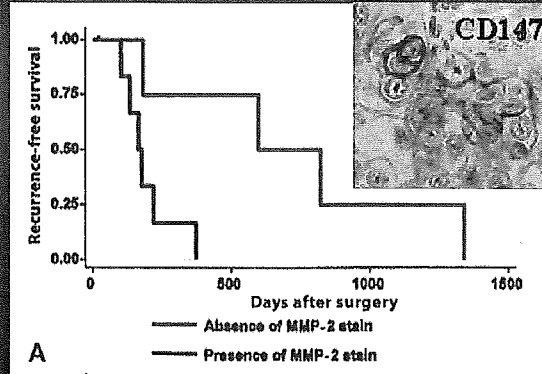
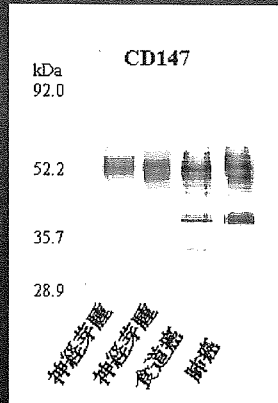
本研究では、癌の浸潤マーカーを分子ターゲットとし、新規超音波造影剤(マイクロバブル)と組み合わせた超音波検査による癌の診断技術を開発する。さらに、微小癌診断・治療を統合的に行うシステムを創出する。





## 分子ターゲットとしてのCD147

CD147はMMP-2(コラゲナーゼ)を誘導し、癌の浸潤を促進する悪性度マーカーとして有用である。MMP-2の発現はがん患者の予後と密接に関連する。



食道癌患者の予後とMMP-2の発現

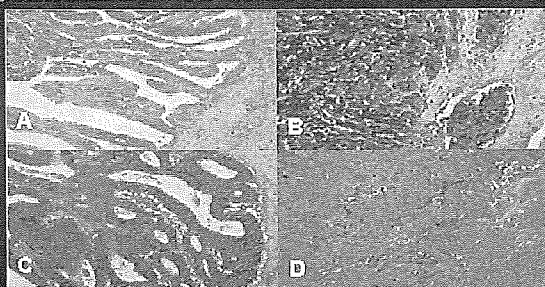
## 平成17年度の研究経過

1. CD147認識モノクローナル抗体(MAb12C3)による分子捕捉感度の検討(厚生労働)
2. 超音波による分子イメージング検定系(*in vitro* 3次元腫瘍モデル)の作製(厚生労働/NEDO)
3. 新規超音波造影剤(マイクロバブル)の開発(厚生労働/NEDO)
4. 超音波を利用した高感度画像化技術の開発(NEDO)

# 研究成果

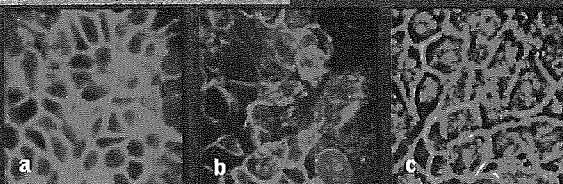
## 1. CD147認識モノクローナル抗体 (MAb12C3)による分子捕捉感度の検討

### ①免疫組織学的検討(分子ターゲットとしてのCD147の発現)

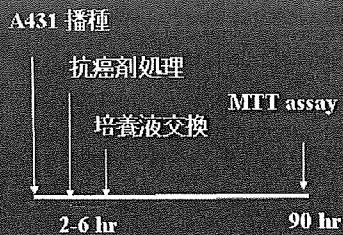
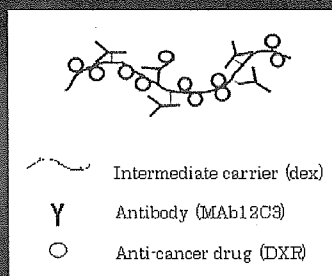
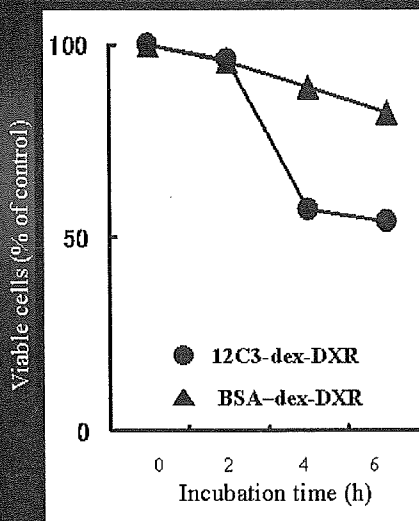


- 子宮内膜癌発現例
- A: ローリスク
- B: ハイリスク(深部筋層内転移)
- C: ハイリスク(腺形成を有し分化型に見えるが、CD147発現は強度)
- D: 左下の他の部分では未分化癌形態を示している。

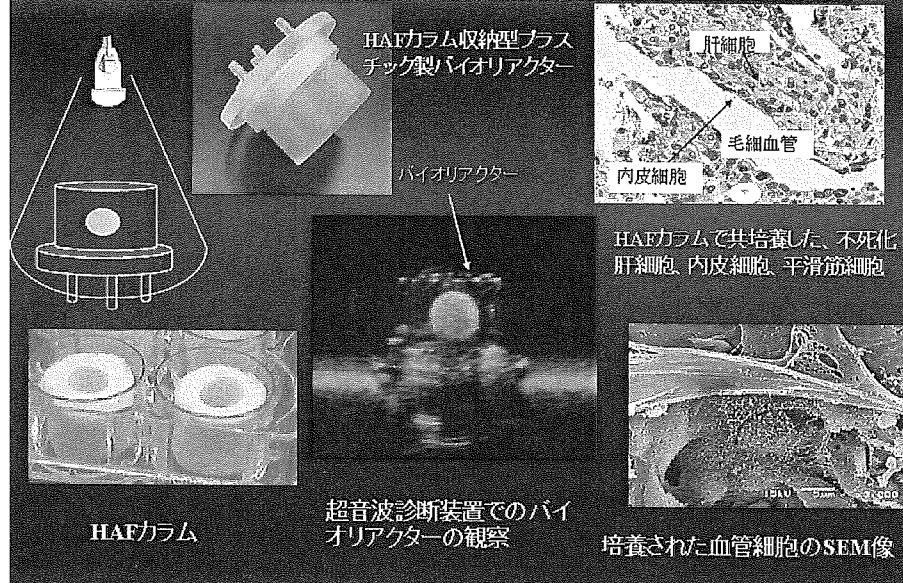
- 非同種癌細胞
- a. 子宮内膜癌 (Ishikawa)
- b. 扁平上皮癌 (A431)
- c. 肝細胞癌 (FLC-7)



### ② MAb12C3標識抗癌剤とBSA標識抗癌剤の殺細胞効果の比較



## 2. *in vitro* 3次元腫瘍モデルの作成



## 3. 新規超音波診断用造影剤(マイクロバブル)の開発

超音波診断用造影剤に要求されるマイクロ/ナノバブルの条件

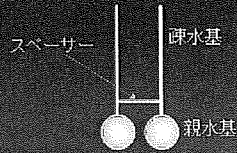
- ① 生体適合性、安全性
- ② バブルの安定化
- ③ 粒子径の微小化(数百nm~数 $\mu$ m)
- ④ 粒子径の均一化
- ⑤ 低音圧での振動特性の向上
- ⑥ 抗体・核酸の標識



図中の界面活性剤は同図参照

新規界面活性剤の合成

## ジェミニ型陰イオン界面活性剤



### 特徴

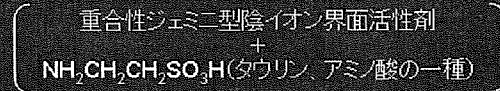
気液界面での吸着膜形成能が、それに対応する通常の型（一鎖型）の界面活性剤よりも優れる

- ・ かなりの低濃度で非常に低い  $\gamma_{cmc}$  (最低到達表面張力値) を発現し、界面活性能に優れる
- ・ 優れた起泡性および高い膜粘度（泡の安定性）に優れる

超音波診断用造影剤（マイクロバブル）の調製に利用可能な陰イオン界面活性剤

- 条件
- ① マイクロバブルの安定化
  - ② 任意に消泡が可能
  - ③ 生体適合性

### 新規重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤の合成



新規重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤の開発に成功

## ジェミニ型陰イオン界面活性剤の表面張力

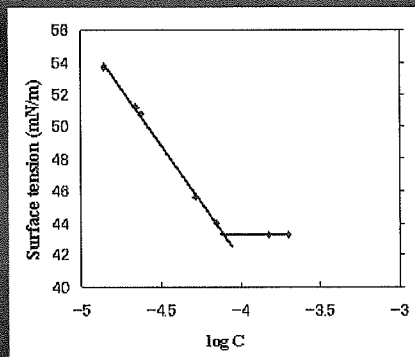


図 表面張力-濃度プロット

臨界ミセル濃度 (cmc) :  $7.8 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$  ... 通常の炭化水素系界面活性剤よりも低い値  
最低到達表面張力値 ( $\gamma_{cmc}$ ) : 43.3 mN/m

安定性の高いバブルが調製できることを示唆

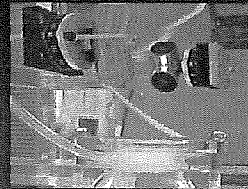


## 4. 高感度画像化技術の開発

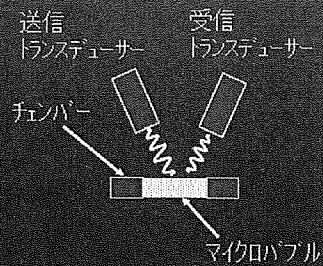
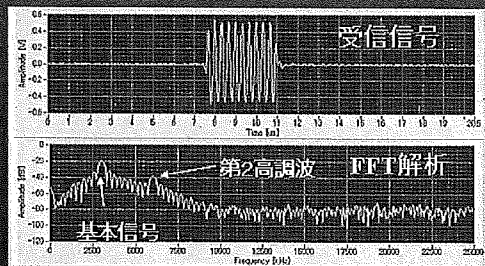
### ① バブル音響特性測定システムの開発

- a. 反射特性
- b. 非線形特性
- c. 安定性

測定システム



測定データ(非線形特性)



### ② 高感度画像化技術の基礎検討

～パルス圧縮技術等の応用～

低音圧連続送信によるバブル共振振動に伴う非線形信号の画像化

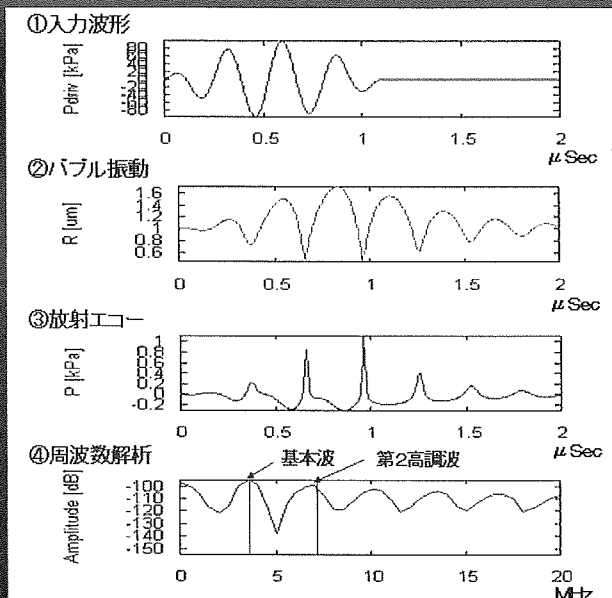
特徴

1. ティッシュハーモニックの低減
2. 送信電力の増大による対受信系とのSNRの改善
3. バブル共振効率の改善

課題

低音圧で共振特性に優れたバブル

## マイクロバブルの非線形振動のシミュレーション



バブル半径:  $1 \mu\text{m}$   
 周波数: 3.6 MHz

## 平成18年度開発目標 ～臨床応用に向けて～

- 分子イメージングに適した新規超音波造影剤 (マイクロ/ナノバブル) の開発
- 3次元腫瘍モデルの作成と超音波イメージング
- 抗体標識マイクロバブルの作成
- CD147認識ヒト化抗体・アプタマーの開発
- マイクロバブルの高感度画像化技術の開発
- 動物実験用装置の試作

■ 共同事業 ■ 厚生労働省側事業 ■ NEDO側事業

## 研究体制

### アロカ(株)研究所

研究開発責任者

伊藤 貴司

研究員

射谷 和徳

赤羽 陸弘

超音波画像化技術

### 東京理科大学

界面科学研究所

教授 阿部 正彦

助教授 酒井 秀樹

流動研究員 土屋 好司

界面活性剤・マイクロバブル

### 東京慈恵会医科大学

主任研究者 生化学講座教授 大川 清

研究員

田尻 久雄

宮本 幸夫

松浦 知和

石橋 由朗

山田 恭輔

目下部 守昭

相澤 守

抗体・微小腫瘍モデル・前臨床試験

# Therapeutic Effect of Treatment with Polyclonal or Monoclonal Antibodies to $\alpha$ -Fetoprotein That Have Been Conjugated to Daunomycin via a Dextran Bridge: Studies with an $\alpha$ -Fetoprotein-producing Rat Hepatoma Tumor Model<sup>1</sup>

Yutaka Tsukada,<sup>2</sup> Kiyoshi Ohkawa, and Nozomu Hibi

Department of Biochemistry, School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan [Y. T.]; Department of Microbiology, Sapporo Medical College, Sapporo, Japan [K. O.]; and Tumor Laboratory, Kokubunji, Tokyo, Japan [N. H.]

## ABSTRACT

Purified monoclonal mouse or polyclonal horse antibodies (Ab) to rat  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) were conjugated with daunomycin via a dextran bridge. The therapeutic effect of these Ab-daunomycin conjugates on an AFP-producing rat hepatoma which was inoculated s.c. in Donryu rats was studied. Tumors (s.c.) and distant metastases were present by 14 days after tumor inoculation and the serum AFP level was 35  $\mu$ g/ml. The injection of the Ab-daunomycin conjugate, started on day 14, significantly prolonged host survival with inoculated controls having a median survival of 25 days compared to 57 and 60 days for the treated groups. In a second study the Ab-daunomycin conjugates were injected i.v. every other day for five times after the surgical resection of the s.c. tumor. There was a slight therapeutic effect with either antibody or daunomycin alone but treatment with the AFP Ab-daunomycin conjugates significantly prolonged survival and 60% of these treated animals were "tumor free" when sacrificed on day 100. Serial quantitation of the concentration of AFP in the serum of the treated tumor-bearing or in the tumor-resected rats correlated with the therapeutic effectiveness of the Ab-daunomycin conjugates. These experiments show that the optimal treatment with specific antibody-drug conjugates will be in hosts where there is a small residual tumor burden such as may exist following resection of a primary tumor mass. They further show that the serial quantitation of serum AFP can be utilized to determine if residual tumor is present following treatment with Ab-daunomycin conjugates.

## INTRODUCTION

It has been hoped that polyclonal and monoclonal antibodies against tumor-associated antigens could be conjugated to chemotherapeutic agents and that these antibody-drug conjugates would increase the effectiveness of chemotherapeutic agents in the treatment of cancer. We have previously reported that specific antibodies to AFP<sup>3</sup> inhibited tumor growth *in vitro* as well as *in vivo* (1, 2) and that the specific antibody-drug conjugates were more effective than either antibody or drug alone (3). Further studies showed that affinity-purified polyclonal and monoclonal antibodies to AFP that were conjugated with anti-cancer drugs were highly effective in therapy (4). In this report we have investigated the effect of AFP antibody daunomycin conjugates on the survival of rats with a s.c. tumor or on the survival of rats following surgical resection of a s.c. tumor mass. We found that the most effective treatment with the antibody daunomycin conjugates occurred when treatment was initiated after the surgical resection of the primary tumor.

## MATERIALS AND METHODS

**Experimental Animal and Hepatoma Cells.** Donryu rats weighing 200 g were used in this experiment. Rats were inoculated s.c. with  $1 \times 10^6$

Received 12/5/86; revised 5/6/87; accepted 5/13/87.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Cancer Research from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan.

<sup>2</sup> To whom requests for reprints should be addressed, at Department of Biochemistry, School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.

<sup>3</sup> The abbreviation used is: AFP,  $\alpha$ -fetoprotein.

cells into the right thigh. By day 14 solid tumors which were 15–20 mm in diameter were present and microscopic examination of sacrificed animals showed that all of them had micrometastases in their lungs (5). The serum AFP averaged 35  $\mu$ g/ml (6).

**Statistical Analysis.** For statistical analysis Student's *t* test was used.

**Antibody-Drug Conjugate.** Purified polyclonal and monoclonal antibodies to rat AFP were conjugated to the antineoplastic drug daunomycin via a dextran (Dextran T-10; Pharmacia, Sweden) bridge as previously described (7–10). The conjugate retained both the antibody and drug activity. The molar ratio of antibody to daunomycin was 1 to 50 (3, 4). Various controls were prepared in a similar fashion (10).

**AFP Determination.** Serum AFP level was determined by radioimmunoassay (11). Blood samples were taken from the tail vein.

**Chemical Reagents.** All of the chemical reagents used were of analytical grade.

## RESULTS

In the first study tumor-bearing rats were injected intravenously with 200  $\mu$ g of daunomycin every other day for 5 times with treatment being initiated on the 14th day after inoculation of the tumor (Fig. 1). Nontreated control rats or rats treated with normal horse immunoglobulin died from the progressive tumor growth and they had a median survival of 25 days. Rats treated with monoclonal or polyclonal antibodies to AFP survived slightly longer and they had a median survival time of 32 days. The median survival days of rats which received normal horse immunoglobulin-daunomycin conjugate, daunomycin alone, or a mixture of the polyclonal antibody to AFP and daunomycin ranged from 40 to 48 days. The longest median survival of 57 and 60 days, respectively, was observed in the group of rats which received either the monoclonal or the polyclonal antibody to AFP-daunomycin conjugate.

Serum AFP concentrations were quantitated in all of the animals just prior to their demise (Fig. 2). High serum AFP levels of 200  $\mu$ g/ml was observed in the nontreated group and in the group of rats injected with normal horse immunoglobulin, daunomycin, and conjugate of normal horse immunoglobulin and daunomycin. Moderate elevations in the serum from 12 to 20  $\mu$ g/ml was observed in rats injected with either the monoclonal or the polyclonal antibodies to AFP or with the mixture of polyclonal antibody to AFP and daunomycin. Low serum AFP levels from 2 to 3.8  $\mu$ g/ml was observed in the rats which were injected with the conjugates of monoclonal or polyclonal antibodies and daunomycin.

We next examined the effect of specific conjugate therapy after surgical resection of the s.c. tumor (Fig. 3). The resection of the tumor at day 14 after inoculation of AH66 cells prolonged the lives of rats significantly ( $P < 0.05$ ) compared to no treatment. The rats which were treated with monoclonal or polyclonal AFP antibody, daunomycin, normal horse immunoglobulin-daunomycin conjugate, or a mixture of polyclonal antibody to AFP and daunomycin, after surgical resection of primary tumor, showed a significant prolongation of survival when compared to only surgical resection or to surgical resection plus