

Fig. 3. Hierarchical clustering with dendrogram using the cancer:normal ratio (A) or using cancer alone (B) or using normal esophageal mucosa alone (C). Branch length, similarity of distances of samples as judged by their expression patterns. Red or black, major clusters. R, relapsed; S, surviving without relapse; E, early esophageal cancer (T₁); A, advanced esophageal cancer (T₂ and T₃).

same patient, suggesting that profiling gene expression ratios may provide more informative findings from a huge number of variables with a small number of samples, and reduce the effects of individuality. Comparisons of gene expression profiling between cancerous tissue and paired normal counterparts have been reported in previous studies (5, 6). However, they did not use the ratio of paired expression for analysis but merely used comparison. As shown in Fig. 2C, the gene expression profiles in normal esophageal tissue were not homogeneous, thus adjustment using normal counterparts is obligatory to produce an accurate comparison among patients. Differences in gene expression profiles may arise not only from the nature of cancer cell biology but also from individuality as well as from organ-specificity. Paired samples from the same patients share the same genomic DNA and same exposure of esophageal mucosa to hazardous environments such as heavy alcohol drinking and smoking in the same duration and amounts, thus the differences in gene expression ratios most likely originate from the biological nature of the esophageal carcinoma, canceling out individuality. Heterogeneity among individuals was

high in both normal and cancer gene expression profiles as shown in Fig. 1. By matching original esophageal tissue, organ-specific RNA expression patterns could also be deleted. Therefore, the ratio of cancer:normal expression is thought to predict clinical outcome quite efficiently.

Dhanasekaran *et al.* (7) examined over 700 prostate-cancer samples using a microarray to determine hepsin and pim-1 proteins as clinical prognostic markers. Bigger sample sizes enable us to stratify patients with known prognostic factors; however, the use of numerous arrays raises problems from an economical point of view. When a study population is narrowed depending on an etiologically identical group, sample size can be dramatically reduced. Hedenfalk *et al.* (8) targeted hereditary breast cancer with mutation at either *BRCA1* ($n = 7$) or *BRCA2* ($n = 7$) and demonstrated different gene expression profiles for the two groups. When investigators tried to abstract the truth from a large dataset obtained from gene expression profiles, they contrived new statistical approaches in addition to hierarchical clustering. Nielsen *et al.* (9) succeeded in molecular classification of soft-tissue tumors by singular value decomposition using 41 samples. For molecular classification of small round blue-cell tumors (SRBCTs), Khan *et al.* (10) applied artificial neural networks using 63 samples (23 biopsies and 40 different cell lines). Supervised machine learning has been used for analysis of gene expression profiling in diffuse large B-cell lymphoma and other kinds of carcinomas (11–13). Others applied epidemiological strategy in combination with hierarchical analysis (14, 15). However, to apply gene expression profiling for general clinical use, the predictability of the clinical outcome has to be superior to existing clinical prognostic factors. The present study has proven the efficiency of gene expression profiling for clinical oncology, as Zhang *et al.* (16) demonstrated with colon cancer using recursive partitioning for the analysis of gene expression profiles.

Many sorts of cell cycle-related genes were highly expressed in our cancerous tissue compared with our normal tissue, which is suspected to be a parallel phenomenon of cell proliferation or a consequence of the tumorigenic process rather than an etiological finding of esophageal carcinoma. Similar phenomena have also been reported in the gene expression profiling of other carcinomas (17, 18). In contrast, profiling gene expression ratios discriminated prognosis of patients efficiently, as described above. These profiles showed different hierarchical clustering from data sets of cancer tissue alone. The enhanced

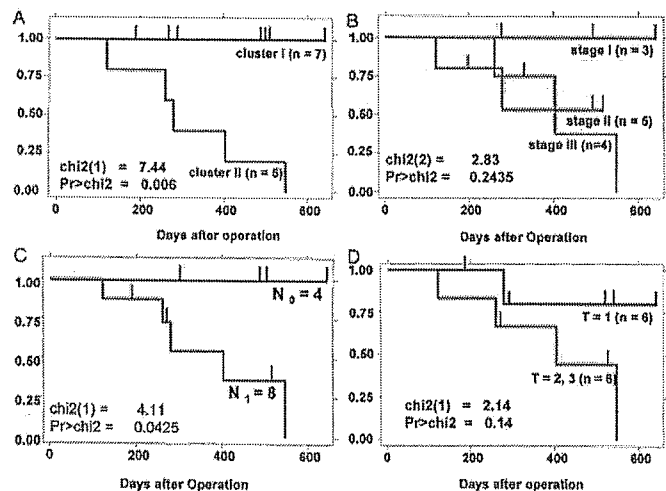


Fig. 4. Kaplan-Meier estimates of relapse-free survival among patients with squamous cell carcinoma of the esophagus days after operation by clusters calculated with gene expression ratios of cancer and normal tissues (A), by clinical stages (I, II, III; B), by presence of regional lymph node metastasis (N₀, N₁; C), and by invasion levels of primary tumor according to TNM classification (early, advanced; D).

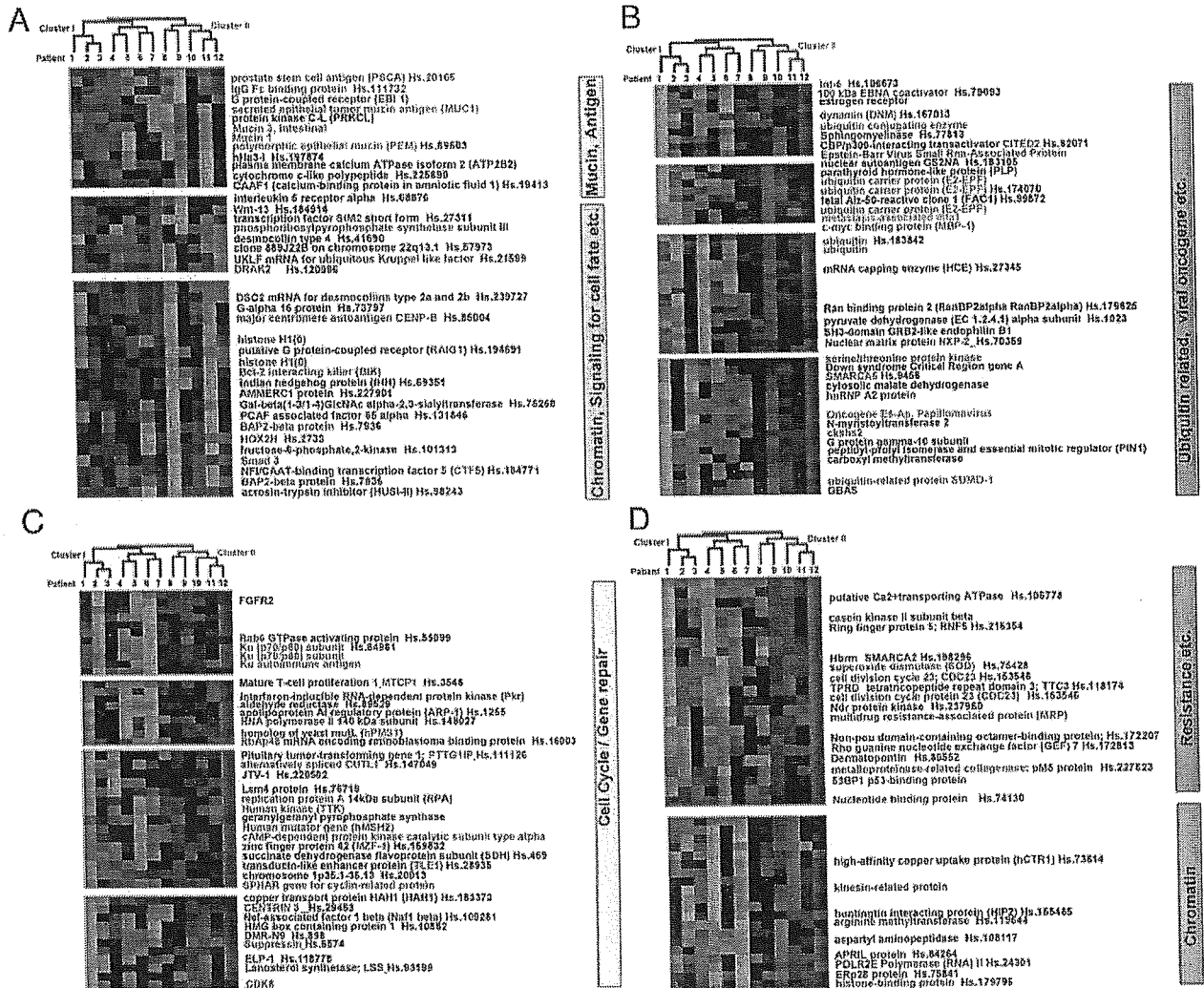


Fig. 5. Profiling gene expression ratios of paired cancerous and normal tissues from the same patients. The typical profiles of genes expressed higher in cluster I, in which no relapse cases were observed, are shown in A. The typical profiles of genes expressed higher in cluster II, in which all five cases relapsed, are shown in B, C, D).

expression of mucin-related proteins in the better prognostic group (cluster I) may reflect the existence of normal function as esophageal mucosa. Viral oncoproteins related to EBV and HPV E6-Ap were detected in the poor prognostic group (cluster II). No previous reports have demonstrated expression of the *EBV* gene in esophageal squamous cancer cells, even in a high-prevalence area in China (19). On the contrary, the high frequency of occurrence of HPV in esophageal squamous cell carcinoma implicated HPV as one of the possible etiological factors in this disease (20). However, its prevalence seemed to be lower than first reported, or else the contribution of HPV to the etiology of esophageal cancer differs among geographic areas, being low in European countries and high in Asian countries (21, 22).

Kihara *et al.* (23) applied microarray analysis to 20 esophageal cancer tissue samples to detect a 52-gene set that predicted sensitivity against chemotherapy. In our study, a variety of genes related to gene-repair, apoptosis, and chemoradiotherapy resistance were up-regulated in the poor prognostic group (cluster II). In particular, higher expression of *superoxide dismutase (SOD)*, *MRP*, and *ubiquitin-conjugating* and *-carrier protein* may be consistent with previous reports (24, 25). *MRP* is well documented to play a role in the mechanism of chemoresistance, and, recently, VX-710 (biricodar; Incel), which restores drug sensitivity to P-glycoprotein (MDR1)- and MRP1-expressing cells, was shown to have efficacy in patients with

advanced chemoresistant breast cancer in a Phase II study (26). Up-regulation of ku70/80 may also prevent DNA damage and apoptosis induced by chemoradiotherapy, as reported previously (27). The higher expression of MTA1 in the poor prognostic group (cluster II) in the present study is consistent with a previous report that an esophageal cancer overexpressing MTA1 showed significantly higher frequencies of adventitial invasion and lymph node metastasis (28).

In conclusion, gene expression profiling using the ratio of paired cancer and normal tissue samples from the same patient may more efficiently predict the clinical outcome of esophageal squamous cell cancer and delineate molecules that affect the prognosis of the patients.

REFERENCES

1. Kelsen, D. P., Ginsberg, R., Pajak, T. F., Sheahan, D. G., Gunderson, L., Mortimer, J., Estes, N., Haller, D. G., Ajani, J., Kocha, W., Minsky, B. D., and Roth, J. A. Chemotherapy followed by surgery compared with surgery alone for localized esophageal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 339: 1979-1984, 1998.
2. Sobin, L. H., and Wittekind, C. TNM classification of malignant tumors, Ed. 5. New York: Wiley-Liss, 1997.
3. Sturm, I., Petrowsky, H., Volz, R., Lorenz, M., Radetzki, S., Hillebrand, T., Wolff, G., Hauptmann, S., Dorken, B., and Daniel, P. T. Analysis of p53/BAX/p16(ink4a)/CDKN2 in esophageal squamous cell carcinoma: high BAX and p16(ink4a)/CDKN2 identifies patients with good prognosis. *J. Clin. Oncol.*, 19: 2272-2281, 2001.

4. Ahr, A., Karn, T., Solbach, C., Seiter, T., Strebhardt, K., Holtrich, U., and Kaufmann, M. Identification of high risk breast-cancer patients by gene expression profiling. *Lancet*, 359: 131–132, 2002.
5. Xu, X.-R., Huang, J., Xu, Z.-G., Qian, B. Z., Zhu, Z. D., Yan, Q., Cai, T., Zhang, X., Xiao, H. S., Qu, J., Liu, F., Huang, Q. H., Cheng, Z. H., Li, N. G., Du, J. J., Hu, W., Shen, K. T., Lu, G., Fu, G., Zhong, M., Xu, S. H., Gu, W. Y., Huang, W., Zhao, X. T., Hu, G. X., Gu, J. R., Chen, Z., and Han, Z. G. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profile of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 18: 15089–15094, 2001.
6. Moustafa, A.-E., Alaoui-Jamali, M. A., Batist, G., Hernandez-Perez, M., Serruya, C., Alpert, L., Black, M. J., Sladek, R., and Foulkes, W. D. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal and squamous carcinoma cells. *Oncogene*, 21: 2634–2640, 2002.
7. Dhanasekaran, S. M., Barrette, T. R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K. J., Rubin, M. A., and Chinnaiyan, A. M. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature (Lond.)*, 412: 822–826, 2001.
8. Hedenfalk, I., Duggan, D., Chen, Y., Radmacher, M., Bittner, M., Simon, R., Meltzer, P., Gusterson, B., Esteller, M., Kallioniemi, O. P., Wilfond, B., Borg, A., and Trent, J. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 344: 539–548, 2001.
9. Nielsen, T. O., West, R. B., Linn, S. C., Alter, O., Knowling, M. A., O'Connell, J. X., Zhu, S., Fero, M., Sherlock, G., Pollack, J. R., Brown, P. O., Botstein, D., and van de Rijn, M. Molecular characterization of soft tissue tumours: a gene expression study. *Lancet*, 359: 1301–1307, 2002.
10. Khan, J., Wei, J. S., Ringner, M., Saal, L. H., Ladanyi, M., Westermann, F., Berthold, F., Schwab, M., Antonescu, C. R., Peterson, C., and Meltzer, P. S. Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat. Med.*, 7: 673–679, 2001.
11. Shipp, M. A., Ross, K. N., Tamayo, P., Weng, A. P., Kutok, J. L., Aguiar, R. C., Gaasenbeek, M., Angelo, M., Reich, M., Pinkus, G. S., Ray, T. S., Koval, M. A., Last, K. W., Norton, A., Lister, T. A., Mesirov, J., Neuber, D. S., Lander, E. S., Aster, J. C., and Golub, T. R. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat. Med.*, 8: 68–74, 2002.
12. Pomeroy, S. L., Tamayo, P., Gaasenbeek, M., Sturla, L. M., Angelo, M., McLaughlin, M. E., Kim, J. Y., Goumnerova, L. C., Black, P. M., Lau, C., Allen, J. C., Zagzag, D., Olson, J. M., Curran, T., Wetmore, C., Biegel, J. A., Poggio, T., Mukherjee, S., Rifkin, R., Califano, A., Stolovitzky, G., Louis, D. N., Mesirov, J. P., Lander, E. S., and Golub, T. R. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature (Lond.)*, 415: 436–442, 2002.
13. Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., and Lander, E. S. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science (Wash. DC)*, 286: 531–537, 1999.
14. van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R., and Friend, S. H. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature (Lond.)*, 415: 530–536, 2002.
15. Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Fisher, R. I., Gascoyne, R. D., Muller-Hermelink, H. K., Smeland, E. B., Giltman, J. M., Hurt, E. M., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, W. H., Jaffe, E. S., Simon, R., Klausner, R. D., Powell, J., Duffey, P. L., Longo, D. L., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Sanger, W. G., Dave, B. J., Lynch, J. C., Vose, J., Armitage, J. O., Montserrat, E., Lopez-Guillermo, A., Grogan, T. M., Miller, T. P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Delabie, J., Holte, H., Krajci, P., Stokke, T., and Staudt, L. M. Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.*, 346: 1937–1947, 2002.
16. Zhang, H., Yu, C. Y., Singer, B., and Xiong, M. Recursive partitioning for tumor classification with gene expression microarray data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 6730–6735, 2001.
17. Prakash, K., Pirozzi, G., Elashoff, M., Munger, W., Waga, I., Dhir, R., Kakehi, Y., and Getzenberg, R. H. Symptomatic and asymptomatic benign prostatic hyperplasia: molecular differentiation by using microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 7598–7603, 2002.
18. Bhattacharjee, A., Richards, W. G., Staunton, J., Li, C., Monti, S., Vasa, P., Ladd, C., Beheshti, J., Bueno, R., Gillette, M., Loda, M., Weber, G., Mark, E. J., Lander, E. S., Wong, W., Johnson, B. E., Golub, T. R., Sugarbaker, D. J., and Meyerson, M. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 13790–13802, 2001.
19. Chang, F., Syrjanen, S., Shen, Q., Cintonino, M., Santopietro, R., Tosi, P., and Syrjanen, K. Evaluation of HPV, CMV, HSV and EBV in esophageal squamous cell carcinomas from a high-incidence area of China. *Anticancer Res.*, 20: 3935–3940, 2000.
20. Toh, Y., Kuwano, H., Tanaka, S., Baba, K., Matsuda, H., Sugimachi, K., and Mori, R. Detection of human papillomavirus DNA in esophageal carcinoma in Japan by polymerase chain reaction. *Cancer (Phila.)*, 70: 2234–2238, 1992.
21. Matsha, T., Erasmus, R., Kafuko, A. B., Mugwanya, D., Stepien, A., and Parker, M. I. Human papillomavirus associated with esophageal cancer. *J. Clin. Pathol.*, 55: 587–590, 2002.
22. Borysiewicz, L. K., Fiander, A., Nimako, M., Man, S., Wilkinson, G. W., Westmoreland, D., Evans, A. S., Adams, M., Stacey, S. N., Bournsnel, M. E., Rutherford, E., Hickling, J. K., and Inglis, S. C. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet*, 347: 1523–1527, 1996.
23. Kihara, C., Tsunoda, T., Tanaka, T., Yamana, H., Furukawa, Y., Ono, K., Kitahara, O., Zembutsu, H., Yanagawa, R., Hirata, K., Takagi, T., and Nakamura, Y. Prediction of sensitivity of esophageal tumors to adjuvant chemotherapy. *Cancer Res.*, 61: 6474–6485, 2001.
24. Huang, P., Feng, L., Oldham, E. A., Keating, M. J., and Plunkett, W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature (Lond.)*, 407: 390–395, 2000.
25. Spataro, V., Norbury, C., and Harris, A. L. The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *Br. J. Cancer*, 77: 448–455, 1998.
26. Toppmeyer, D., Seidman, A. D., Pollak, M., Russell, C., Tkaczuk, K., Verma, S., Overmoyer, B., Garg, V., Ete, E., Harding, M. W., and Demetri, G. D. Safety and efficacy of the multidrug resistance inhibitor Incel (biricodar; VX-710) in combination with paclitaxel for advanced breast cancer refractory to paclitaxel. *Clin. Cancer Res.*, 8: 670–678, 2002.
27. Zhao, H. J., Hosoi, Y., Miyachi, H., Ishii, K., Yoshida, M., Nemoto, K., Takai, Y., Yamada, S., Suzuki, N., and Ono, T. DNA-dependent protein kinase activity correlates with Ku70 expression and radiation sensitivity in esophageal cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.*, 6: 1073–1078, 2000.
28. Toh, Y., Kuwano, H., Mori, M., Nicolson, G. L., and Sigimachi, K. Overexpression of metastasis-associated MTA1 mRNA in invasive esophageal carcinomas. *Br. J. Cancer*, 79: 1723–1726, 1999.

関連会議

会議	日時	場所	参加グループ	主題
1	平成 17 年 5 月 24 日	慈恵医大	慈恵・理科大・アロカ	マイクロバブルの開発
2	平成 17 年 6 月 20 日	慈恵医大	慈恵・アロカ	リアクターを用いた評価系
3	平成 17 年 8 月 2 日	慈恵医大	慈恵・理科大・アロカ	全体会議
4	平成 17 年 8 月 22 日	理科大	理科大・アロカ	マイクロバブル作製
5	平成 17 年 11 月 7 日	アロカ	慈恵・理科大・アロカ	マイクロバブル作製
6	平成 17 年 12 月 5 日	慈恵医大	慈恵・理科大・アロカ	研究の進行状況の確認
7	平成 18 年 1 月 27 日	理科大	理科大・アロカ	マイクロバブル作製
8	平成 18 年 1 月 31 日	慈恵医大	慈恵・アロカ	超音波分子イメージングの 臨床上的適応
9	平成 18 年 3 月 25 日	芝パーク ホテル	慈恵・理科大・アロカ	平成 17 年度報告会及び 平成 18 年度計画

大川班研究報告会 「超音波分子イメージング研究会」

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)(ナノメディシン分野)
研究課題: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(H17-ナノ-013)

主任研究者 大川 清

日時:3月25日土曜日午後2時-8時

場所:芝パークホテル・桜の間

I. 発表会 (発表者:敬称略) 14:00-16:30

1. あいさつ(大川 清)
2. ターゲット分子 CD147の臨床的意義
 - ①モノクローナル抗体の作成と婦人科癌での発現 (山田恭介)
 - ②食道癌における発現と意義 (石橋由朗)
3. 3次元腫瘍モデル
 - ①アパタイトファイバー (相澤 守)
 - ②KAST「分子イメージング」講習会報告 (丸島秀樹、大川 清)
 - ③腫瘍モデルと腫瘍血管 (斉藤勝也、松浦知和)
4. 腫瘍動物モデル (日下部守昭)
5. 超音波診断
超音波内視鏡と癌 (今津博雄、田尻久雄)
6. 超音波造影剤としてのマイクロバブルの開発 (土屋好司、酒井秀樹、阿部正彦) 20 分間
7. マイクロバブル検出用超音波機器の開発(シミュレーション含む) (今野剛人、射谷和徳、伊藤貴司)
20 分間

II 平成 18 年度に向けての話し合い 16:30-17:30

議題

1. マイクロバブルの作製
2. マイクロバブルへの抗体ラベル
3. マイクロバブルの血管透過性
4. マイクロバブルの超音波でのイメージング

* 事務連絡

III.懇親会(各自で共同研究など話し合うために) 17:30-20:00

* 東京理科大・アロカ(株)研究所はそれぞれ20分程度、他は各自10分間程度の発表でお願いいたします。

Ⅱ 分担研究報告

1. 胆・膵腫瘍性病変に対する画像診断に関する研究 ----- 49
分担研究者 田尻久雄 東京慈恵会医科大学 教授
2. 超音波造影剤レボピストによる肝臓癌の描出 ----- 51
分担研究者 宮本幸夫 東京慈恵会医科大学 助教授
3. 癌の浸潤マーカーとしての分子ターゲット CD147 ----- 52
分担研究者 大川 清 東京慈恵会医科大学 教授
4. CD147 発現腫瘍の臨床的意義 — 食道癌と子宮内膜癌 — ----- 57
分担研究者 石橋由朗 東京慈恵会医科大学 講師
分担研究者 山田恭輔 東京慈恵会医科大学 講師
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
分担研究者 阿部 正彦 東京理科大学 教授
分担研究者 酒井 秀樹 東京理科大学 助教授
6. 超音波分子イメージング装置に関する研究 ----- 61
分担研究者 伊藤 貴司 アロカ(株)研究所 主幹研究員
分担研究者 射谷 和徳 アロカ(株)研究所 主任研究員
分担研究者 赤羽 睦弘 アロカ(株)研究所 研究員
7. *In vitro* 3次元微小腫瘍モデルの作製に関する研究 ----- 62
分担研究者 相澤 守 明治大学 理工学部 助教授
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
分担研究者 松浦知和 東京慈恵会医科大学 講師
9. 動物実験：腫瘍動物モデルの開発に関する研究 ----- 68
分担研究者 日下部守昭 (財)動物繁殖研究所 主席研究員

1. 胆・膵腫瘍性病変に対する画像診断に関する研究

分担研究者 田尻久雄 東京慈恵会医科大学 教授

協力研究者 今津博雄 東京慈恵会医科大学 助手

研究要旨:胆膵腫瘍性病変に対し CT、MRCP、EUS、ERCP が広く行なわれている。胆膵腫瘍性疾患が疑われ、CT、MRCP、EUS の3つのすべての検査により精査された85例の後向き検討を行なったところ、良悪性の鑑別に関するそれぞれの感度・特異度は CT 69.2%、83.9%、MRCP 60%、83.2%、EUS 87.2%、90.3%(感度: EUS vs. MRCP $p=0.01$)であった。75例が最終的に腫瘍と診断され、その腫瘍の描出率は MDCT 76.3%、EUS 93.2%($p=0.019$)であった。胆・膵腫瘍の描出、良悪性の鑑別において EUS は最も優れていた。

A. 目的

胆・膵腫瘍性病変に対する診断法として現在、超音波(EUS)、Multi-detector Computed Tomography (MDCT)、Magnetic resonance cholangiopancreatography (MRCP)、内視鏡的逆行性膵胆管造影(ERCP)が広く行なわれている。しかし、ERCP は現在のところ診断法というよりはむしろ、胆管ドレナージなどの治療に重きが置かれているものの、EUS、MDCT、MRCP に至っては漫然とすべての検査が行なわれている。本研究では後向き研究により胆・膵腫瘍性病変に対する4つの検査法の診断能およびその位置付けについて明らかにする。

B. 方法

2004年1月より2005年9月まで腹部超音波検査、血液検査等で胆・膵腫瘍が疑われ MDCT、EUS (GF-UCT240-AL5、アロカ SSD5000、GF-UM2000)、MRCP すべての検査により精査が行われた85例を対象とした。最終診断は手術材料、超音波内視鏡下穿刺吸引細胞診(EUS-FNA)、ERCP 下ブラシ細胞診/生検、

臨床経過によりなされた。

C. 結果

85例の最終診断は腫瘍性病変75例(膵悪性腫瘍40例、胆道悪性腫瘍12例、その他の悪性腫瘍3例、良性膵腫瘍16例、良性胆道腫瘍・狭窄4例)、非腫瘍性良性疾患10例であった。52例に主に減黄、細胞採取を目的として ERCP が行われた。①. 85例において良悪性の診断に関する感度、特異度は MDCT 69.2%、83.9%、EUS 87.2%、90.3%、MRCP 60%、83.2%(感度: EUS vs. MRCP $p=0.01$)であり、②. ERCP が行われた52例で、その所見を standard とした場合、胆・膵管拡張の有無、狭窄部位の正診率は MDCT 80.5%、EUS 95.2%、MRCP 95.2%($p=N.S$)であった。また、③. 最終的に腫瘍と診断された75例の腫瘍性病変の描出率は MDCT 76.3%、EUS 93.2%($p=0.019$)であり、④. 手術が行われた胆管癌5例・膵癌12例について T staging、N staging の正診率は EUS 71.4%、64.3% MDCT 50%、42.9%($p=N.S$)であった。

D. 考察

胆・膵腫瘍の描出、良悪性の鑑別において EUS は最も優れており、staging も可能であった。CT は腫瘍の描出において EUS に劣るが、staging において EUS で描出しにくい臓器(肝の一部など)の評価が可能であった。また MRCP から得られる情報は EUS、CT でも得ることが可能であった。MRCP では腫瘍そのものの評価ができないため staging ができないという欠点もあり、MRCP が有用な症例は限定される。

E. 結論

胆・膵腫瘍の描出、良悪性の鑑別において EUS は最も優れている。EUS、MDCT を上回る MRCP の診断能は限定され、胆・膵腫瘍の診断体系として EUS、CT を first-line として行い、減黄処置、細胞採取の方法として ERCP を行うのが妥当である。

F. 超音波内視鏡関連研究発表

1. 論文

1) Seewald S, Imazu H, Omar S, et al. EUS-guided drainage of hepatic abscess. *Gastrointest Endosc* 61;495-98, 2005.

2) Seewald S, Groth S, Omar S, Imazu H, et al. Aggressive endoscopic therapy for pancreatic necrosis and abscess: a new safe and effective treatment algorithm. *Gastrointest Endosc* 62; 92-100, 2005.

2. 学会発表

1) 今津博雄、角谷宏、田尻久雄
DPC 時代の胆・膵腫瘍性病変に対する診断体系 第71回日本消化器内視鏡学会総会 2006、東京

2) Imazu H, Uchiyama Y, Kakutani H, et al. Can proximal biliary disorders be accurately assessed with curvilinear EUS? EUS2006, Amsterdam

3) Imazu H, Uchiyama Y, Kakutani H, et al. Comparison of the diagnostic accuracy of EUS, MDCT, MRCP and ERCP in intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas EUS2006, Amsterdam

2. 超音波造影剤レボピストによる肝臓癌の描出

分担研究者 宮本幸夫 東京慈恵会医科大学 助教授

協力研究者 西岡真樹子 東京慈恵会医科大学 助手

研究要旨: 現行で臨床に用いられる超音波造影剤はレボピスト一種類のみである。レボピストで得られる血流情報は血流が豊富である肝臓癌において、診断を決定する上で有用である。しかし、直径1cm以下の肝臓癌では血流はまだ豊富でなく、血流情報のみで確定診断することはできない。このため、肝生検が必要となるが、観血的検査であることから、今後、マイクロバブルを利用した分子ターゲティングの応用が期待される。

A. 研究目的

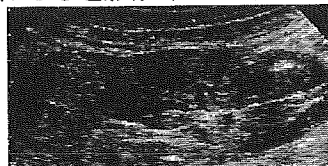
レボピストによる肝臓癌血流の描出性を検討した。

B. 研究方法

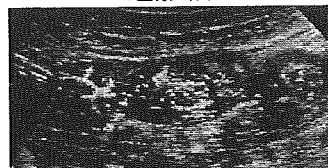
レボピスト(ガラクトース・パルミチン酸混合物)2.5gを注射用水20mlにけん濁し、5分間静置した後、患者肘静脈より注入した。腹部超音波診断装置で肝臓を観察した。

C. 研究結果

レボピスト投与20秒前後で、肝臓癌内の血管が造影された(図)。しかし、腫瘍径1cm以下の癌では血流が豊富でないため、造影剤による造影効果は不十分であった。



造影前



造影後

D. 考察

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。

E. 結論

現在用いられる超音波造影剤(レボピスト)は、血流情報を超音波で得るには有用であるが、微小癌の診断にはそれだけでは不十分である。分子イメージングなど、より有用な付加価値のある超音波造影剤の開発が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

3. 癌の浸潤マーカーとしての分子ターゲット CD147

分担研究者 大川 清 東京慈恵会医科大学 教授

研究要旨:Micro-, nano-bubble に腫瘍浸潤マーカー分子の CD147 を高感度に認識する抗体(MAb12C3)を標識して腫瘍細胞を標的し超音波診断装置により捕捉描出することで良悪性の予測など癌の超早期診断を可能にするため抗体の基礎的性格と更なる改善を検討した。

A. 研究目的

Micro-, nano-bubble に腫瘍親和性物質を標識して腫瘍細胞を標的するため抗体(MAb12C3)の性格と腫瘍親和性を検討した。また CD147 をより高感度に検出するために、MAb12C3 より高親和性のヒト型モノクローナル抗体の作成とモノクローナル抗体の代替技術としてのアプタマーの作成を検討するためリコンビナントヒト CD147 蛋白質の作成を試みた。

B. 研究方法

抗体の産生と精製

MAb12C3(IgG1 \cdot κ)産生ハイブリドーマを Balb/c マウス に腹腔内投与し 腹水を得た。抗体 IgG は Protein A カラムで精製した。

MAb12C3 認識エピトープの同定

MAb12C3 が認識する 137 アミノ酸領域をコードする塩基配列を pGEX-6P-3 に挿入し、グルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合蛋白質として大腸菌内で発現させた。さらにこの融合蛋白質のアミノ酸残基数が20ずつ異なる欠失変異体を6種類作成し SDS-PAGE-western blot 解析にて MAb12C3 が認識する領域を解析した。

タンパク合成阻害の CD147 発現への影響

K562 白血病細胞株に cycloheximide (10 mg/ml) 処理し経時的に細胞を採取し蛋白抽出し SDS-PAGE-western blot 解析で蛋白の消長を検討した。コントロールとして α -tubulin、

RNA-polymerase II を指標とした。

抗体の標識

0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl に溶解した MAb12C3 (2mg/ml) を Alexa Fluor 488 carboxylic acid, TFP ester を用い標識した。標識効率をみると蛋白:Alexa488 比は1:5.0であった。正常マウス IgG1 \cdot κ を同様処理し、対照とした。

細胞標的 ELISA を用いた抗体集積性の検定

A431 細胞 (2 \times 10³/well) を 96wells プレートに播種、3日間培養後細胞は2回 PBS 洗浄後 0.25%グルタールアルデヒド加リン酸緩衝液(PBS)で30分間室温処理し、PBS で洗浄後 0.1%グリシン, 1%牛血清アルブミン(BSA)加トリス塩酸緩衝液(TBS)でブロックした。MAb12C3 IgG は 10 μ g, 1 μ g, 0.01 μ g, 0.001 μ g/ml に Tween 20加 TBS で希釈し細胞と2時間室温反応後抗-マウス IgG-HRP で反応、発色し、比色した。

培養生細胞を用いた抗体の集積性の検討

蛍光観察用ディッシュ(コーニング No. 3911-035)で培養した細胞は RPMI1640+0.1% NaN₃ で1回洗浄後、同液で希釈した Alexa 488 標識 MAb12C3 と4 $^{\circ}$ C、3時間反応後 PBS で洗浄し、検鏡した。

細胞障害性を指標とした抗体集積性の検討

デキストラン(MW:10,000)を過ヨーン酸酸化し、0.1M PBS 中で MAb12C3 IgG と反応し、ついでこの反応物とアドリアマイシン(DXR)をカップリングし

濃縮、ゲルろ過後、ろ過滅菌して用いた。結合抗体:DXR モル比は1:50である。コントロールは MAb12C3 を BSA に変えた複合体である。細胞障害性検討は A431 培養株 (5×10^3 /well) を用い 48wells プレートで6時間培養後 LD50 値である $1.0 \mu\text{M}$ を0、2、4、そして6時間暴露後、新鮮培地に変換し、さらに90時間培養し、生細胞数を MTT assay で測定した。

リコンビナントヒト CD147 の作成

CD147 の細胞外ドメインをコードする塩基配列を pIRESpuro3 と pcDNA3 に挿入した。pIRESpuro3 を用いた発現系では CD147 細胞外ドメインのカルボキシル末端側にウサギ IgG の Fc 領域を導入した。また、pcDNA3 を用いた発現系では CD147 細胞外ドメインのカルボキシル末端側にヒスチジンタグと 3xFLAG タグを導入した(図1)。それぞれのコンストラクトを HEK293 細胞にトランスフェクションし、培養上清に分泌されたリコンビナント CD147 蛋白質を精製した。

C. 研究結果

Balb/c マウス腹水から精製した MAb12C3 IgG の濃度は8~10mg/ml 腹水であった。エピトープ解析から MAb12C3 は CD147(全長 385 アミノ酸残基)の 213 から 232 番目にあたる ANIQLHGPPRVKAVKSSEHI のペプチド領域を認識することが明らかになった(図2)。

Alexa 488 標識 MAb12C3 を用いた蛍光観察により A431, Ishikawa, FLC7 等用いたすべての細胞株の細胞膜に強い CD147 の局在を認め、使用抗体は50 ng/ml の濃度で十分蛍光シグナルを認識可能であった(図3)。また、生細胞は勿論、ホルマリン固定標本でも同様の結果であった。A431 を用いた細胞標的 ELISA において MAb12C3 は5~10 ng/ml で有意なシグナルを発していた。

MAb12C3 を用いた SDS-PAGE- western blot 解析で CD147 は検索したすべての細胞株(子宮内膜癌、肺癌、神経芽細胞腫、白血病)に発現していた。また、cycloheximide ($10 \mu\text{g/ml}$)処理に

よる蛋白合成阻害により CD147 の半減期は 48h 以上と長期安定であった(図4)。

MAb12C3-DXR 複合体は2~4時間の薬剤接触によりコントロールに比較し約2倍の殺細胞効果が示され、MAb12C3 は2時間後には細胞に強く結合する可能性が示された(図5)。

それぞれの発現系で培養上清にリコンビナント CD147 蛋白質が分泌された。pIRESpuro3 を用いた発現系では Protein A カラムで、pcDNA3 を用いた発現系では Ni-NTA カラムを用いて CD147 蛋白質のアフィニティー精製が可能であった。精製された Fc 融合 CD147 蛋白質では、グリコペプチダーゼ F で処理することにより、リコンビナント CD147 蛋白質から糖鎖を除去することが可能であった(図6a)。また、HRV C3 プロテアーゼで処理することにより、CD147 の細胞外ドメインから Fc 領域を切り離すことが出来た(図6b)。一方、これらのリコンビナント CD147 蛋白質は、細胞表面に存在する CD147 とは異なる低分子量の糖鎖修飾を受けていた。

考察

MAb12C3 は培養腫瘍細胞に固定の有無に関わらず極めて低濃度の抗体で強い親和性を示した。CD147 は多くの細胞に少量ながら発現が認められているにもかかわらず既に我々の報告のようにホルマリン固定パラフィン包埋切片では正常組織では3つの組織(顎下腺皮脂腺細胞、黄体細胞)にのみ中程度の発現を見るにすぎず、あまり広範囲の分布は認めなかった。今後全身の抗原分布等の解析は臨床応用に向け早期に解決しなければならない問題である。

標的蛋白の turnover は分子標的の時間制約に大きな影響を与えるが western blot による CD147 の半減期を検討した結果48h後も減少はなく CD147 は turnover の長い分子と判断される。この結果は本蛋白分子を細胞の標的分子とすることに有利である。また、標的蛋白の局在を利用した標的癌化学療法の研究にも有利であり手始めとして行った DXR 結合 MAb12C3 は抗体価、薬剤価共低下しているにもかかわらず薬剤負荷後

2~4時間以内に強い親和性で細胞に集積することが確認でき、さらなる標的治療薬の開発の可能性が膨らんだ。これらの結果から CD147 認識 MAb12C3 が初期の目的である CD147 高発現で高転移性癌の捕捉に有効であることが確認でき、MAb12C3 を次年度中に新規開発 nano-, micro-bubble への搭載を可能にし、向高悪性腫瘍へのインテリジェントバブルを試作する。

リコンビナント CD147 蛋白質はやや糖鎖修飾は異なるがペプチド部分に相違は無く抗原分子としてあるいはアプタマー作製の標的分子として充分利用可能と考えられるのでさらに産生系の確立を目指す。

E. 結論

CD147 は早期癌の中でも浸潤能力の高い悪性早期癌の分子ターゲットとして有用である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1.Wada A, Ohkawa K, Tsudzuki M, et al.

A nucleotide substitution responsible for the tawny coat color mutation carried by the MSKR inbred strain of mice

J.Heredity, 96,145-149, 2005

2.Asakura T, Imai A, Ohkawa K, et al.

Relationship between expression of drug-resistance factors and drug sensitivity in normal human renal proximal tubular epithelial cells in comparison with renal cell carcinoma.

Oncol.Reports 14, 601-607, 2005

2. 学会発表

1.和田あづみ、都築政起、大川 清、他

MSKR.129(B6)-Oaz1tm および

MSKR-Chr10B6.129-Oaz1tm の育成とこれら遺伝的背景が Oaz1 欠損体へ及ぼす影響

第52回日本実験動物学会総会 2005,5月

2.朝倉 正、前田和洋、大川 清、他

GSH 結合 DXR によるアポトーシス誘導は JNK 活性化を介した Bax の細胞質からミトコンドリアへの

移行が関与する

第64回日本癌学会総会、2005,9月

3.石橋由朗、浦島充佳、大川 清、他

食道癌手術症例の DNA アレイ解析からみた新しい予後規定因子の検討

第25回日本分子腫瘍マーカー研究会 2005,9月

4.Aoki T, Shimada Y, Ohkawa K, et al.

Cadmium-induced cytotoxicity and accumulation of polyubiquitinated proteins in human proximal tubular HK-2 cells

第78回日本生化学会大会、2005,10月

5.Asakura T, Maeda K, Ohkawa K, et al.

Bcl- x L-deamination and liberation to the cytoplasm was enhanced apoptosis by treatment with GSH-DXR rather than DXR

第78回日本生化学会大会、2005,10月

6.丸島秀樹、松浦知和、大川 清、他

¹³C-呼気試験の in vitro 3次元培養系への応用

第21回¹³C 医学応用、呼気病態生化学研究会、2005、11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

図の説明

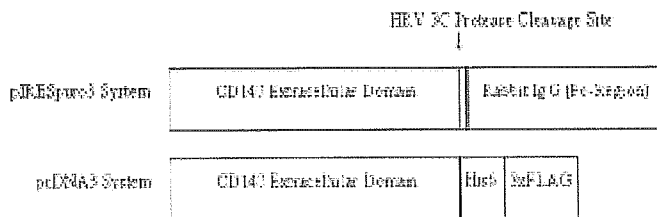


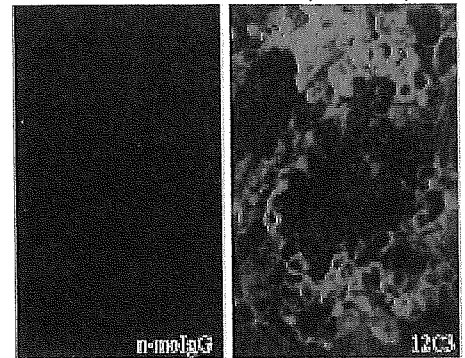
図1: リコンビナントCD147コンストラクト

```

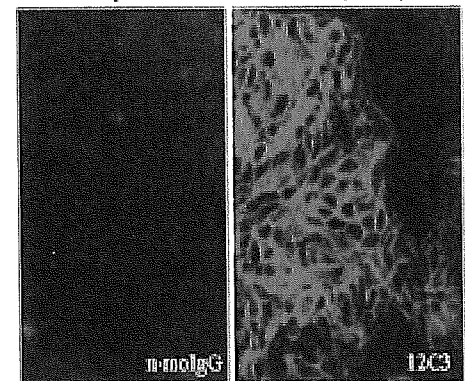
maaalfvllgfsllgHGASGAAGTVFTTVEDLGSKILLTCSLND
SATEVTGHRWLKGGVVLKEDALPGQKTEFKVDSDDQW
GEYSCVFLPEIPMGTTANQLI-QF*PRVKAVKSSSEHINEGETA
MLVCIKSESVPPVTDWAWYKITTSEDKALMngscarffvsssq
grselhienlunreapggryrengtsk;gsdqaiitlrvrshlaalwpllgivaevlvt
iiflyekarkpedvlddddqgsupllcsgqhqndkqknvraqnss
    
```

図2: エピトープ解析

Endometrial carcinoma (Ishikawa)



Epidermoid carcinoma (A431)



Hepatoma (FLC7)

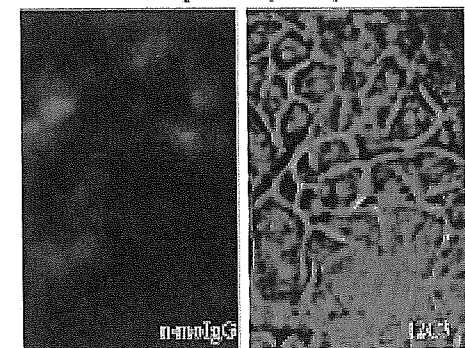


図3: MAM2C3 蛍光抗体直接法

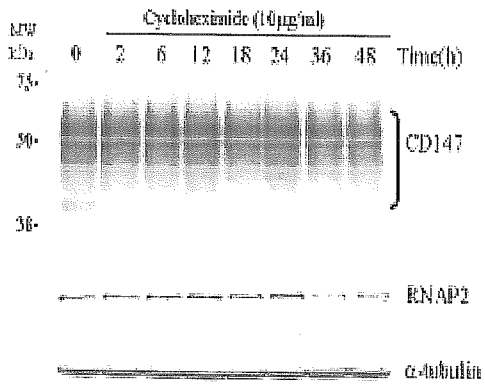


図4: CD147turn-over (K562 leukemia cell)

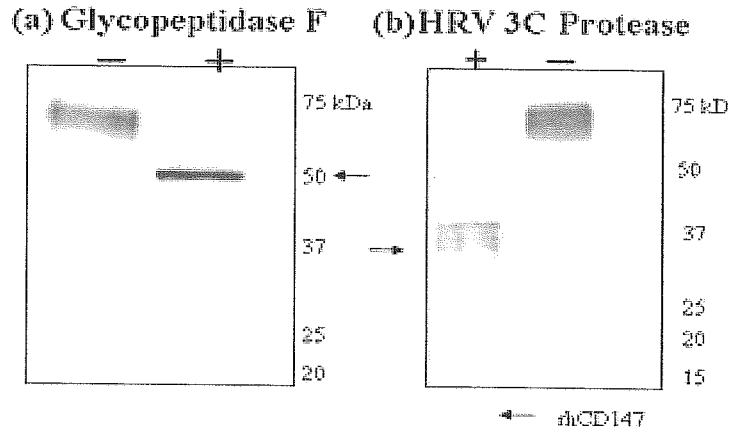


図6:リコンビナントヒトCD147蛋白質

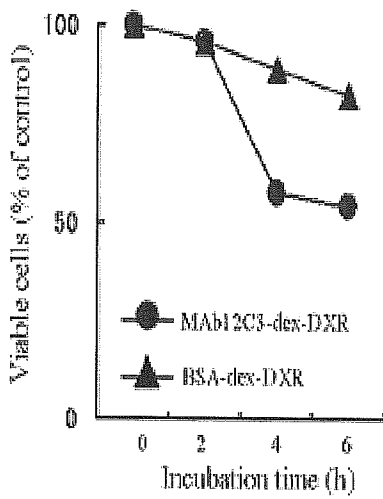


図5:MAb12C3-dex-DXRの選択毒性

4. CD147 発現腫瘍の臨床的意義 — 食道癌と子宮内膜癌 —

分担研究者 石橋由朗 東京慈恵会医科大学 講師

分担研究者 山田恭輔 東京慈恵会医科大学 講師

研究要旨: 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た。CD147 を分子ターゲットとして、超音波内視鏡や経膈エコーで、早期癌を診断することは臨床的に価値が高いと考えられた。

A. 研究目的

食道癌および子宮内膜癌における CD147 発現の臨床病理学的検討から、超音波診断のための癌の分子マーカーとしての意義を検討する。

B. 研究方法

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、食道癌および子宮内膜癌での 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)、で抗体 (MAb12C3) の染色を行った。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、これらから 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。

C. 研究結果

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、さらに検討中である。

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。(図)

D. 考察

超音波による癌の分子イメージングの対象としては、超音波プローブに近接病巣の検出が、超音波の特性上最初の標的として望ましい。このため、超音波内視鏡や経膈エコーで描出できる病巣をはじめの CD147 発現の検討対象とした。今回の臨床病理学的検討から、CD147 は癌の悪性度、深達度と関連していた。このことから、食道癌や子宮内膜癌の分子ターゲットとして CD147 は十分意義がある。

E. 結論

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重点的に検証したい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 山田恭輔、上田和、斎藤元章、斎藤絵美、茂木真、高倉聡、新美芳樹、佐々木寛、田中忠夫: 卵巣癌腫瘍減量手術における消化管合併切除. 日本産婦人科手術学会機関誌. 2005; 16: 53-59

2. Aikou Okamoto, Takashi Nikaido, Kazunori Ochiai, Satoshi Takakura, Misato Saito, Yuko Aoki, Nobuya Ishii, Nozomu Yanaihará, Kyosuke Yamada, Osamu Takikawa, Rie Kawaguchi, Seiji Isonishi, Tadao Tanaka and Mitsutoshi Urashima
Indoleamine 2, 3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. Clin Cancer Res. 2005;11:6030-6039.

3. 山田恭輔、岡本三四郎、高尾美穂、上田和、齋藤元章、茂木真、落合和徳: インフォームドコンセントの実際 卵巣がん 手術療法 標準的手術. 産科と婦人科 増刊号. 2006; 73: 343-348

4. Ishibashi Y, et al. A case study of remnant gastric ulcer : eradication of Helicobacter pylori not only improved the ulcer but also decreased p53 protein expression. JMAJ 48(5) 241-5 2005

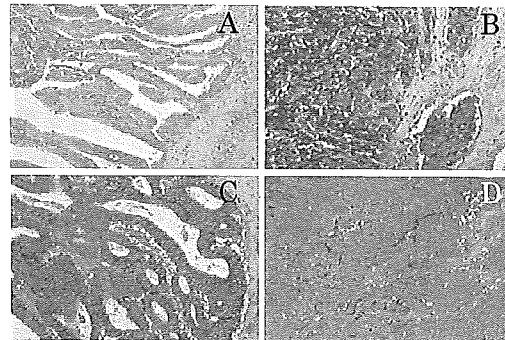
H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図. 子宮内膜癌 CD147 発現

A: ローリスク、B: ハイリスク(筋層内浸潤)

C: ハイリスク(分化型、強発現)

D: 未分化型



5. 新規超音波造影剤(振動性ナノ・マイクロバブル)の開発

分担研究者 阿部 正彦 東京理科大学 教授
分担研究者 酒井 秀樹 東京理科大学 助教授
流動研究員 土屋 好司 (財)医療機器センター

研究要旨: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。マイクロバブルを超音波診断用造影剤として利用するためには、1)高い生体適合性、2)高い分散安定性、3)気泡の微小化、4)粒子径の均一化、5)低音圧での振動特性の向上、6)抗体・核酸等の標識など幾つかの条件が必要となるが、既存の界面活性剤でこれらを満たすのは困難である。そこで、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。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。

(I) 重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤

A. 研究目的

ジェミニ型界面活性剤は、通常の一鎖一親水基型界面活性剤の二分子がスペーサーで連結された二鎖二親水基型界面活性剤であり、臨界ミセル濃度(cmc:界面活性剤水溶液においてミセルが形成し始める濃度)が通常の一鎖型界面活性剤よりも10-1000倍優れることから注目されている。さらに優れた気泡性と高い膜粘度を有するので、泡沫安定性に優れるのが特徴である。このような特徴を有するジェミニ型界面活性剤を用いれば安定性の高いバブルの調製が期待される。そこで、生体適合性に優れ、任意に消泡可能なマイクロバブルの調製を目指し、アミノ酸の一種であるタウリンから誘導した重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤の新規合成に着手した。

B. 研究方法

新規重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤 $(\text{CH}_2)_2[\text{N}[\text{CO}(\text{CH}_2)_{11}\text{OCOC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2](\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}]_2$ (1)は、 $(\text{CH}_2)_2[\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{H}]_2$ (2)と $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2)_{11}\text{COCl}$ (3)を水酸化ナトリウム存在下でアシル化することにより合成を行った。また比較検討のため 1 に対応する“モノマー(ジェミニ型ではない通常の一鎖一親水基型界面活性剤)” $\text{CH}_3\text{N}[\text{CO}(\text{CH}_2)_{11}\text{OCOC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2](\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$ (4)、および 1 に対して重合性基を有さないジェミニ型界面活性剤 $(\text{CH}_2)_2[\text{N}[\text{CO}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3](\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}]_2$ (5)および

そのモノマー $\text{N}[\text{CO}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3](\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{Na}$ (6)についても合成した。

C. D. 研究結果、考察

まず、エチレンジアミンと1,3-プロパンスルホン水中で反応させて 2 を得た。12-ヒドロキシラウリン酸と塩化メタクリロイルをテトラヒドロフラン中ピリジンの存在下で反応させて重合性基としてメタクリロイル基を導入し、その後、オキサリクロリドを反応させ酸クロリドに変換して 3 を得た。2 の 3 によるアシル化を水/アセトン(7/3)中、水酸化ナトリウムの存在下(pH 10~8)で行い、目的物質である 1 (吸湿性白色固体)を得た。元素分析の結果、C: 53.09% (53.44%); H: 8.36% (8.07%), N: 2.56% (3.11%) (括弧内は一水和物としての理論値)及び $^1\text{H-NMR}$: 6.0 ppm, 5.6 ppm($\text{CH}_2=$), IR: 1176cm^{-1} (スルホン基)、FAB-MS: $857(\text{M}-\text{Na})^+$ の各スペクトルから、目的物質である重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤 1 の合成が確認できた。本成果に関しては既に特許申請済(平成17年10月24日)である。また、4、5、6 についても同様に各元素分析より生成が確認できた。

そこで次に、本研究により合成された重合性ジェミニ型界面活性剤 1 の表面張力測定を行った。その結果、1 の cmc は $7.8 \times 10^{-5} \text{mol}/\text{dm}^3$ であり、ジェミニ型界面活性剤に特徴的な極めて低い cmc を示し、 γ_{cmc} は $43.4 \text{mN}/\text{m}$ まで低下することが分かった。以上の結果から、本研究において新規に合成された重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤を用いれば、少量で安定性の高いマイクロバブルを調製できることが期待される。

(II) シクロアミロース修飾界面活性剤

A. 研究目的

シクロアミロースは、デンプンなどを原料として微生物や植物中の酵素により合成される高重合度の環状 α -1,4 グルカンであり、高い親水性、生分解性、耐老化性(長時間低温に放置しても劣化しない)、包接性などの特徴を有する。シクロアミロースは親水性が極めて高い分子であるので、分子中の水酸基を介して疎水基を導入することができれば生体安全性、環境適合性の高い高分子界面活性剤が合成できると期待される。そこでシクロアミロースの水酸基に脂肪酸を導入した生体安全性の高い新規な界面活性剤を合成し、その界面物性について検討を行った。

B. 研究方法

シクロアミロースへの疎水基導入にあたり、まずシクロアミロースを塩化 p -トルエンスルホニル (p -TsCl) を用いてトシル化した。次にトシル化したシクロアミロースをジメチルスルホキシド (DMSO) 中で、ラウリン酸ナトリウムを添加して反応させ、目的物質であるシクロアミロースラウレートを作成した。

C. D. 研究結果、考察

水酸化ナトリウム水溶液中でシクロアミロースと p -TsCl を反応させ、シクロアミロースラウレートを合成した。トシル基の導入は $^1\text{H-NMR}$ および UV/vis 吸収スペクトルより確認した。次にトシル化したシクロアミロースを DMSO に溶解させ、ラウリン酸ナトリウムを添加して窒素雰囲気下で加熱攪拌した。これによりトシル基とラウリン酸ナトリウムを交換反応させ、目的物質であるシクロアミロースラウレートを合成した。目的物質は $^1\text{H-NMR}$ により同定された。

そこで、得られたシクロアミロース誘導体について、水に対する表面張力低下能を測定した。その結果、シクロアミロースは水の表面張力(約72mN/m)を低下させなかったが、シクロアミロースラウレートは約60mN/m、シクロアミロースラウレートは約40mN/mと水の表面張力を減少させることができた。以上より、本研究にて合成されたシクロアミロース修飾界面活性剤を用いれば生体適合性に優れた安定性の高い

バブルが調製できることが期待される。

E. 結論

超音波診断用微小気泡化造影剤(マイクロバブル)として有用な界面活性剤として、重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤、およびシクロアミロース修飾界面活性剤を新規に合成し、これらの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)が調製可能な知見が得られた。

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

- (1) “Synthesis and Properties of a Novel Surfactant Modified with Cycloamylose”
Paveena Wongtrakul, Hidetoshi Ichige, Kenichi Oyaizu, Makoto Yuasa, Takahiro Ohkubo, Hideki Sakai, Masahiko Abe
第58回コロイドおよび界面化学討論会(平成17年9月8日~10日、宇都宮大学)
- (2) “新規重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤の合成と水溶液物性”
坪根和幸、和田みゆ紀、土屋好司、大久保貴広、酒井秀樹、阿部正彦
日本化学会第86春季年会(発表予定)
(平成18年3月27日~30日、日本大学)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- (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
発明者: 坪根和幸、阿部正彦、酒井秀樹、大久保貴広、和田みゆ紀
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
出願日: 平成17年10月24日
- (2) 発明の名称: 疎水基を有する環状グルカン誘導体およびその製造方法
発明者: 阿部正彦、湯浅 真、市毛秀俊、鷹羽武史、寺田喜信
出願人: 阿部正彦、湯浅 真、鷹羽武史、寺田喜信
特願: 2004-241570

6. 超音波分子イメージング装置に関する研究

分担研究者 伊藤 貴司 アロカ(株)研究所 主幹研究員
分担研究者 射谷 和徳 アロカ(株)研究所 主任研究員
分担研究者 赤羽 睦弘 アロカ(株)研究所 研究員

研究要旨:CD147 抗体をラベル化した超音波造影剤(マイクロバブル)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。マイクロバブルの検出システムの基礎技術を検討し、連続超音波を高分解能で検出する技術に関してシミュレーションし、高分解能検出が可能と判断した。生体モデルとしてのラジアルフロー型バイオリアクターでの3次元培養モデル超音波検出のためのシステムを試作した。

A. 研究目的

- ①悪性腫瘍特異的に集積されたマイクロバブルを超音波で高感度に検出し、画像化する技術を開発する。
- ②バブルの集積性、検出感度の超音波を用いて In Vitro で観察・評価するための3次元超音波用腫瘍モデルを作製する。

B. 研究方法

- ①マイクロバブルの音響的特性を測定するシステムを構築する。
- ②連続超音波をマイクロバブルに与え、その時発生する非線形振動を検出技術を検討する。
- ③連続超音波を高分解能で検出する技術を検討する。
- ④RFB(ラジアルフロー型バイオリアクター)及び細胞培養用担体を超音波の透過性に優れた樹脂に変更する。
- ⑤RFB の底面から超音波プローブを装着するように改造する。

C. 研究結果

- ①マイクロバブルの音響的特性を測定するシステムを構築した。
- ②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)
- ③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。
- ④TPX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超音波用TPX製RFBを試作し、超音波診断装置で観察できることを確認した。

D. 考察

- ①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る。
- ②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。

E. 結論

- ①一定条件の超音波をマイクロバブルに与えると、生体組織では発生しないバブル固有の非線形振動が発生する。このバブル固有の信号を検出することで、マイクロバブルを高感度に検出する技術の開発が見込まれる。
- ②バブル集積性、検出感度を超音波を用いて In Vitro で観察・評価するための超音波用RFBを試作した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

- 1.論文発表
特になし
- 2.学会発表
特になし

H. 知的財産権の出願・登録

- 1.特許取得
1件:造影剤の振動パターンを利用して超音波造影イメージングを行う方法及び装置
- 2.実用新案登録
特になし
- 3.その他
特になし