

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

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 大川 清

平成19(2007)年4月

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

平成18年度 総括研究報告書

(予算総額 24,447,000 円)

主任研究者 大川 清

平成19(2007)年4月

## 目 次

I.	総括研究報告		1
	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) 経済産業省 (NEDO) ポスター発表	-----	11
	(資料2) ナノメディシン研究成果発表	-----	12
	(資料3) 外国人研究者招へい事業 (Dr.Filip Celesta Pierre Braet)	-----	19
	(資料4) 関連会議	-----	43
II.	分担研究報告		
	1. 癌の浸潤マーカーとしての分子ターゲット CD147	-----	51
	— <i>In vitro</i> , <i>In vivo</i> における Mab12C3 の集積性の検討と親和性など標的性改善への試み—		
	大川 清、松藤千弥、田尻久雄、石橋由朗、山田恭輔		
	2. 細胞内在性 RNA アプタマーの標的分子としての新規 RNA 結合タンパク質の同定	--	58
	松藤千弥		
	3. 針生検で採取した肝臓癌における CD147 の染色と臨床的意義	-----	60
	田尻久雄、大川 清		
	4. 超音波内視鏡下穿刺吸引細胞・組織診 (EUS-FNA) の有用性と	-----	62
	採取組織の CD147 の発現に関する研究		
	田尻久雄		
	5. 消化管腫瘍における CD147 発現の臨床的意義 — 胃 GIST —	-----	64
	石橋由朗		
	6. <i>In vitro</i> 3次元微小腫瘍モデルの作製に関する研究	-----	66
	相澤 守		
	7. 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	-----	71
	— 3次元培養癌転移・浸潤モデルと CD147 —		
	松浦知和、相澤 守		
	8. 第2世代超音波造影剤ソナゾイドの特性	-----	75
	宮本幸夫、射谷和徳		
	9. ラベル化造影剤を用いた超音波によるがん超早期診断システムの研究開発	-----	78
	阿部正彦、酒井秀樹		
	10. 超音波分子イメージング装置に関する研究	-----	82
	伊藤貴司、射谷和徳、宮坂好一、小倉 玄		
	11. 分子イメージング用マイクロバブル材料である界面活性剤の生体への影響に関する研究	---	86
	日下部守昭		
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	95
IV.	研究成果の刊行物・別刷	-----	101

# 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

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：本研究は、広く医療に利用されている超音波診断技術を利用した早期癌の分子イメージング技術の確立が、最終目標である。具体的には、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、CD147 認識抗体を標識した超音波造影剤の微小癌への集積を、超音波診断装置によって描出し、あわせて治療するシステムの開発を目指している。平成 18 年度は、CD147 を高感度で認識する単クローン抗体（MAb12C3）を用い、針生検で採取した早期肝癌、超音波内視鏡下での腫瘍生検標本等で、CD147 の発現を免疫組織化学的に検討した。蛍光標識した MAb12C3 を担癌ヌードマウスに投与し、MAb12C3 が生体で腫瘍に集積するかを確認した。超音波分子イメージングには、MAb12C3 をラベルした集積超音波造影剤（超音波振動性マイクロ・ナノバブル）の開発が必要であり、平成 17 年度に開発した新規界面活性剤より、200–600nm のナノバブルを作製した。一方、マイクロ・ナノバブル検出のための超音波診断機器の開発も進めている。バブル振動シミュレーターと組織非線形効果解析シミュレーターを開発し、エコーの非線形特性を利用して、バブルの振動によって生ずる第 2 高調波（ハーモニック）と組織の高調波を識別する技術開発を行った。次年度以降、医学・界面化学（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 *in vivo* レベルに進めていく。

分担研究者

田尻久雄	東京慈恵会医科大学	教授
松藤千弥	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	主任研究員
宮坂好一	アロカ(株)研究所	主任研究員
小倉 玄	アロカ(株)研究所	課員
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・ナノバブル）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・ナノ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

①CD147 の臨床的意義とその捕捉（大川 清、田尻久雄、山田恭輔、石橋由朗）

針生検で採取した微小肝細胞癌における CD147 の免疫組織化学的検討と臨床的意義 (大川 清、田尻久雄) : CD147 をターゲティング分子として描出できる可能性のある早期癌、前癌病変に関して、MAb12C3 を用いて免疫組織化学的に検討した。

早期肝癌 : 肝生検症例は 2003 年 1 月から 3 年間に施行された 22 例を対象とし、肝腫瘍生検および背景肝生検検体を免疫染色し、患者背景と染色強度を比較検討した。

超音波内視鏡下針生検組織における CD147 の発現 : 超音波内視鏡観察下で、Ultrasound Biopsy Needle を用いて生検した組織 14 検体のパラフィン包埋標本を、MAb12C3 を用いて免疫組織科学的に検討した。病理組織学的診断は、扁平上皮癌 (SCC) 3 例 (内 1 例は肺癌)、腺癌 2 例 (膵臓癌、リンパ節転移)、消化管間質腫瘍 (GIST) 2 例、leiomyoma 3 例、scwannoma 1 例、自己免疫性膵炎 (AIP) 1 例、原発性硬化性胆肝炎 (PSC) のリンパ節 1 例、サルコイドーシス 1 例である。  
②評価系としての 3 次元癌浸潤モデルと担癌動物モデルでの CD147 発現と MAb12C3 の集積性 (相澤 守、松浦知和、大川 清)

3 次元癌浸潤モデル (相澤守、松浦知和) : CD147 発現ヒト肝癌細胞株 FLC-7 を用いて、バイオリアクターに作成した 3 次元肝臓モデル (肝臓オルガノイド) への浸潤過程を免疫組織化学的に検討した。肝臓オルガノイドは、5ml 容量のラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) にアパタイト単結晶ファイバー (HAF) (明治大学・相澤研究室開発) をスキャフォールドとして充填し、そこに、不死化マウス肝細胞 (IMH-4)、伊東細胞 (A7)、内皮細胞 (M1) を共培養して作成した。その上で、ヒト肝癌細胞株 FLC-7 を注入し、数日後にホルマリン固定し、病理組織学的に検討した。

CD147 発現腫瘍 *in vitro*, *in vivo* 担癌動物モデルでの MAb12C3 の集積性 (大川 清) : MAb12C3 の *in vitro* CD147 特異標的性と MAb12C3 とリン脂質結合体の安定性を、培養腫瘍細胞を用い

抗 CD147 抗体 (MAb12C3)、ドキシソルビシン (DXR) の酸化デキストラン架橋抗癌複合体 (MAb12C3 -DXR 複合体) の抗腫瘍効果とリポソーム集積性で検討した。また担癌ヌードマウスでも、MAb12C3 の集積性に関して検討した。ヒト扁平上皮癌 A431 をヌードマウス皮下に移植し、腫瘍塊を作成後、近赤外蛍光色素標識 MAb12C3 をマウスの腹腔内に投与した。その後、経時的に、蛍光イメージング装置 (Odyssey) で、マウス全身の蛍光画像を記録した。

アプタマーの作製 (松藤千弥、大川 清) : 昨年度作成した発現系を用いて得られた CD147 タンパク質は糖鎖修飾が細胞表面上の本来のものより小さく、一過性発現系のためリコンビナントタンパク質の大量調製が困難であった。そこで今年度はリコンビナント CD147 (CD147-Fc) 発現系の改良を試みた。

③新規界面活性剤を用いた超音波造影剤 (マイクロバブル) の創生とそのラベル化 (阿部正彦、酒井秀樹、土屋好司、日下部守昭)  
新規超音波造影剤 (マイクロ・ナノバブル) の創生 (阿部正彦、酒井秀樹、土屋好司) : 平成 17 年度、超音波診断用微小気泡化造影剤 (マイクロ・ナノバブル) に利用可能な 2 種の新規界面活性剤、シクロアミロース修飾界面活性剤とタウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤の合成に成功した。平成 18 年度はこれらの新規界面活性剤から、マイクロ・ナノバブルの作製を試みた。バブルの発生方式として、超音波分散方式と多孔質ガラス方式で検討した。内包ガスとしては、窒素および難溶性の六フッ化硫黄 (SF<sub>6</sub>) を用いた。バブルの粒径分布は、フリーズフラクチャー法による透過型電子顕微鏡観察と動的光散乱法で測定した。

新規界面活性剤のマウスにおける安全性・毒性の検討 (日下部守昭) : シクロアミロース修飾界面活性剤 (高濃度と低濃度)、タウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤、シクロアミロース修飾界面活性剤 (含 30% グリセリン)、重合性ジェミニ型陽イオン界面活性剤及び SDS 水溶液の

生体毒性を検討するため、それぞれ臨床で想定される投与量の10-100倍量をマウスに投与し、その血液生化学検査(アルブミン、グルコース、コレステロール、尿素窒素、総合ビリルビン、直接ビリルビン、間接ビリルビン)及び病理組織学的解析(腎臓、肝臓、肺、脾臓及び心臓)を行った。

④超音波によるマイクロ・ナノバブルの画像化(伊藤貴司、射谷和徳、今野剛人、宮本幸夫) マイクロ・ナノバブル検出のための高感度画像化技術の開発(伊藤貴司、射谷和徳、今野剛人): バブル振動シミュレーターと組織非線形効果解析シミュレーターを開発し、エコーの非線形特性を利用して、バブルの振動によって生ずる第2高調波(ハーモニック)と組織の高調波を識別する技術開発を行った。

ソナゾイドの特性(宮本幸夫): 新規開発のマイクロ・ナノバブルが既存の超音波造影剤と比較して、優れた特性を持つか検討するため、まず、第2世代超音波造影剤であるソナゾイド(Sonazoid)の特性を検討した。ソナゾイドの安定性を、目視、微分干渉顕微鏡、動的光散乱法による粒径観察で観察。また、超音波照射に対する強度、安定性を検討した。

### C. 研究結果

#### ①CD147の臨床的意義とその捕捉

針生検で採取した微小肝細胞癌におけるCD147の免疫組織化学的検討と臨床的意義: 染色強度は4段階でスコア化し評価した。肝生検腫瘍組織は、腫瘍径8-23mm(中央値14.5mm)であった。腫瘍検体と背景肝の染色強度を比較したところ、 $P<0.01$ と有意に腫瘍部で濃染を認めた。また15mm未満のより小さな腫瘍検体群でも、 $P<0.05$ と有意に濃染を認める結果となった。微小な早期肝癌においても、CD147は発現を認めた。

超音波内視鏡下針生検組織におけるCD147の発現: 14検体中、4標本は病理組織学的検査に使用し、組織の残りが少なく、判定ができなかった。

このため、10検体のCD147の発現に関して、検討した。SCC3例と腺癌2例では、CD147は細胞膜に強陽性であった。Leiomyoma、GISTなど非上皮性腫瘍では、cytosolに陽性で、1例のGISTでは強くCD147が発現していた。非腫瘍性病変でも、PSCではcytosolで弱く発現し、AIPやサルコイドーシスでは細胞膜に強陽性であった。

#### ②評価系としての3次元癌浸潤モデルと担癌動物モデルでのCD147発現とMAb12C3の集積性

3次元癌浸潤モデルでのCD147の発現: マウス肝臓オルガノイドに注入すると、類洞洋構造の内皮細胞へ付着し、さらに血管下に浸潤するCD147陽性像細胞を認めた。また、微小なCD147陽性腫瘍塊の形成も認めた。以上から、3次元癌浸潤モデルを用いて、次年度、集積超音波造影剤(MAb12C3標識マイクロ・ナノバブル)の集積性、超音波による描出性を検討する。CD147発現腫瘍 *in vitro*, *in vivo* 担癌動物モデルでのMAb12C3の集積性: 持続暴露実験から得られたIC80の薬剤濃度1.0 $\mu$ Mで2、4、6時間のみ複合体暴露し増殖培地に変更96時間培養した後の生細胞率は対照のIgG-DXR, BSA-DXRに比べMAb12C3-DXRは強い殺細胞効果を発揮しCD147を標的とした抗腫瘍活性が示された。MAb12C3とGFPの二重標識リポソーム(MAb12C3/GFP-Liposome)の2時間暴露はCD147発現細胞への結合・蓄積した。一方、MAb12C3IgG(5mg/ml)の2時間前処理は同Liposomeの集積を強く抑制した。このLiposomeへの抗体の組み込み方法は今後バブルへの抗体の組み込みに可能性を示した。MAb12C3は、全身に分布下のうち、皮下の腫瘍に集積し、120時間後にも特異的集積が観察された。MAb12C3が癌のターゲティングに優れた抗体であることが、証明された。

アプタマーの作製: 293 Tet-On細胞にリポフェクション法で導入し、ハイグロマイシンBとG418で選択したCD147-FcHの安定発現株とCD147-FcHの発現ベクターから、CD147のcDNA領域を欠失(FcH)の発現ベクターを

作成し同様に FeH の安定発現株を得た。培地中に分泌された CD147-FeH は Ni-NTA カラムと Protein A カラムで高純度に精製可能であり CD147 認識アプタマーの作製のため、多量の抗原蛋白精製のため準備が完成した。

③新規界面活性剤を用いた超音波造影剤（マイクロバブル）の創生とそのラベル化  
新規超音波造影剤（マイクロ・ナノバブル）の創生：超音波分散方式では、ともに 200nm の粒径のナノバブルが作製できた。ナノバブルの生成量は少なかったが、シクロアミロース修飾界面活性剤を用いて調製したナノバブルにおいて、超音波診断装置を用いた画像化に成功した。一方、加圧方式の一種である多孔質ガラス方式では、分子量の大きいシクロアミロース修飾界面活性剤では、バブルは作製できなかった。分子量の小さいタウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤では、空気を内包した 600nm の均一で安定なナノバブルを大量に作製することができた。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り、それぞれの条件を今後検討する。

新規界面活性剤のマウスにおける安全性・毒性の検討：①シクロアミロース修飾界面活性剤（高濃度と低濃度）、タウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤の投与では、投与後死亡した動物はなかった。しかし、シクロアミロース修飾界面活性剤（含 30%グリセリン）では、投与後、麻酔の覚醒が遅く、数匹がそのまま死亡した。また、重合性ジェミニ型陽イオン界面活性剤投与では、他と同量の投与で、雌雄共にすべて死亡してしまったので、投与量を 1/4 にした。②高濃度シクロアミロース修飾界面活性剤投与の影響は、雄の方が早期に見られ、雌雄間で反応時期に差が見られた。一方、低濃度シクロアミロース界面活性剤投与では、雌雄差は更に明確であった。一方、タウリン誘導重合性

ジェミニ型陰イオン界面活性剤投与では、その反応時期に雌雄差は見られず、3 週目までに雌雄共ほ回復した。また、これらの投与後 78 日目において、各組織には病的組織変化は観察できなかった。③低濃度シクロアミロース（30%グリセリン）の投与では、シクロアミロース単独に比べその影響は軽減していた。④ジェミニ型陽イオン界面活性剤の投与群の生化学値及び病理組織観察は、他の界面活性剤に比べて影響が少なく見えた。しかし、雌の肺の血管周囲に出血が見つかった。

④超音波によるマイクロ・ナノバブルの画像化  
マイクロ・ナノバブル検出のための高感度画像化技術の開発：バブルからの非線形信号（ハーモニック）と組織伝搬中に発生するハーモニックを識別するために、組織及びバブルから発生するハーモニックを数値解析によって求めるシミュレーターを作成した。このシミュレーターを用いて、レーダー分野で応用されている低音圧の長いチャープ信号を利用したパルス圧縮法を、バブルの画像化方法として検討した。バブルの共振周波数を中心とした信号を用いることで、従来技術に比べ、2 倍以上の高い検出感度と、空間分解能 1mm 以下の高い解像度が得られることが確認された。

また、ナノバブルの画像化を目的とした高周波超音波の利用についても検討を進めた。15MHz の振動子を搭載した、動物実験用超音波プローブを試作し、担癌マウスでその性能を確認した。  
ソナゾイドの特性：ソナゾイドは、粒径 2 $\mu$ m 前後で均一で、時間においても安定であった。音圧 MI 0.20 までの超音波を連続照射しても、安定であった。今後、ソナゾイドの特性を基準として、新規集積超音波造影剤としての、マイクロ・ナノバブルを開発する。

#### D. 考察

CD147 が早期癌の分子ターゲットとして意義があるか、平成 18 年度は、超音波下肝腫瘍生検採取した微小肝癌および超音波内視鏡（EUS）



下針生検を行って採取した組織を用いて、免疫組織化学的に検討した。径 14mm 以下の通常の造影 CT や腹部超音波検査では確定診断が困難な肝細胞癌でも、CD147 は細胞膜に発現していることが確かめられた。また、EUS 下の生検組織でも、扁平上皮癌や腺癌では、強く細胞膜に CD147 が発現していた。このため、CD147 は、微小癌、深部癌、リンパ節転移など診断が困難な症例における、癌の分子ターゲットとして有用と考えられる。一方、非上皮性の腫瘍でも陽性ではあるが、CD147 の発現は弱く、細胞内分布も cytosol のものが多い。AIP やサルコイドーシスでは、細胞膜に CD147 は強陽性であり、今後多くの症例で検討が必要であり、細胞表面腫瘍マーカーとしての意義以外の CD147 の病理・生理機能を考える上で興味深い所見である。

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る。CD147 分子の臨床における人体での捕捉には、マウス単クローン抗体 Mab12C3 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。このため、平成 18 年度は、アプタマー作製のため、CD147 蛋白質の大量精製を行った。また、RNA 研究の専門家の松藤千弥教授が分担研究者として加わり、この分野の研究を進めていく研究体制を整えた。研究当初計画より遅れているが、平成 19 年度には、CD147 を認識するアプタマーを作製する予定である。

CD147 認識抗体 (MAb12C3) の癌への集積性の評価のため、3 次元癌浸潤モデルと担癌マウスモデルで検討した。小型ラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) にハイドロキシアパタイトファイバー (HAF) を充填し、そこに細胞を共培養して、肝臓オルガノイドを作製した。そこに、ヒト肝細胞癌株化細胞を流すと、CD147 陽性癌細胞が、血管に付着、浸潤、その後微腫瘍塊として、生着・増殖する様子が観察

できた。この 3 次元還流癌浸潤モデルが、開発する集積型標識マイクロ・ナノバブルの機能評価に使用できると考えられた。また、担癌ヌードマウスに、蛍光標識した抗 CD147 抗体を腹腔または静脈から注入すると、腫瘍部に特異的に集積し、100 時間に渡って残存した。このため、*in vivo*においても CD147 が分子ターゲットとして有用と考えられた。しかし、蛍光での観察では、集積が明瞭になるまで 8-24 時間を要するため、バブルに標識する抗体量、バブルの粒径、腫瘍の血流、などによって、集積条件が変化する可能性がある。バブルの生体内での安定性の設定に関しても、十分考慮する必要がある。

超音波造影剤としては、現行で使用されているレボビストは、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が必要であった。平成 19 年 1 月に、第一製薬 (株) より第 2 世代超音波造影剤ソナゾイド (Sonazoid) の臨床使用が可能になった。ソナゾイドは、超音波振動性マイクロバブルであり、粒径は 2  $\mu$ m 前後と均一で、生体内でも 2 時間以上安定である。現在のところ、静注直後の血流イメージと 10 分以降肝臓 Kupffer 細胞に食食後のクッファーイメージングで、主に肝臓腫瘍の早期発見と鑑別に用いられている。ソナゾイドを比較基準として、今後の新規マイクロ・ナノバブルを作製していく予定である。このため、ソナゾイドの粒径分布、音響特性、音響強度、安定性を測定している。

新規界面活性剤を材料として、マイクロ・ナノバブルの作製を行った。シクロアミロース修飾界面活性剤とタウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤ともに、超音波分散方式では、200nm 前後の粒径のナノバブルを作製することが

できた。しかし、均一で大量のバブルを作製するには、加圧方式の一種である多孔質ガラス方式が優れており、後者の界面活性剤で600nmの粒径の均一なナノバブルを大量に作製できた。不溶化ガスSF<sub>6</sub>を用いると安定性の高いバブルの作製が可能となるが、ガスが液化する圧力が比較的低いこと、得られるガス圧が低く、加圧方式でバブルを作製する条件設定に工夫が必要である。現在、超音波造影剤として認可されているレボピストやソナゾイドは、ともに粒子径がマイクロメートルサイズと大きく、血中滞留性や腫瘍患部への集積性に優れているとは言えない。新規界面活性剤を用いてナノサイズのバブルの調製とその画像化に成功したので、今後は血中での安定性の向上について検討する。

新規界面活性剤の毒性に関して、動物で検討した。実際の臨床で用いる量よりかなり高容量をマウスに投与しても、特に問題はなかった。血清生化学検査では、界面活性剤としての作用である溶血を示唆する間接ビリルビンの上昇を認めた。また、シクロアミロース修飾界面活性剤では、当初の予想のように血中グルコースの上昇を認めたが、生体内でシクロアミロースが代謝された結果と考えられた。以上から、本研究においてマイクロ・ナノバブルの作製の材料としている2つの新規界面活性剤、シクロアミロース修飾界面活性剤およびタウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤の安全性は高い。しかし、*in vitro*の発泡実験で溶媒として用いる30%グリセリンとともに生体に用いることは慎重を要す。このため、生体へ投与する際の溶媒に関しても、今後、検討する必要がある。また、バブルとして投与した際の毒性についても検討する。

マイクロ・ナノバブルを高感度に検出するためには、バブルの音響的特性を考慮した画像化技術の開発が重要である。そのため、バブル生成を担当とする東京理科大学のグループと、検出を担当するアロカが、緊密に連携して研究を進めている。

パルス圧縮法による解析結果は、共振周波数以外の周波数において、その検出感度が低下することを示した。このことは、高感度検出に適したバブルの特性として、バブル粒径の均一性が重要であることを示唆している。また、従来技術による第2世代超音波造影剤ソナゾイドの画像化では、超音波の照射を受けて、バブルは徐々に消失している。分子イメージングにおける画像化技術では、バブルの長い時間による特異的な集積を検出することが要求されるため、極力バブルを壊さないで画像化することが必要である。パルス圧縮法を用いた低音圧送信法は、市販の造影剤の画像化にも有用であるが、標識バブル(分子プローブ)の画像化において、その有用性はより高まることが期待される。

ナノサイズのバブルを、個別に画像化するためには、高い周波数の利用が必要となる。一方、高い周波数の利用は、深い所の検出感度が低下する。ナノバブルの画像化では、バブルの集積性と、それを検出するための超音波の周波数についての検討を進める必要がある。

## E. 結論

CD147の癌分子ターゲットとしての価値が、臨床症例からより確認された。また、新規超音波造影剤としてのマイクロ・ナノバブルの開発にも成功した。今後、CD147認識抗体を標識したマイクロ・ナノバブルを作製し、生体内での安定性、生体内バリアー(マクロファージによる貪食、血管壁など)通過性を高めた造影剤を開発する。そのために、3次元癌浸潤モデルを利用し、さらに、担癌動物モデルで検証する。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。一説によれば、日本国内の超音波造影剤の需要は年間5億円程度で、造影CTの2%に満たない市場であるが、技術革新により造影剤と機器が進歩すれば、100億円前後の市場となると予想される。世界的にも、安全で安心な医療用超音波造影剤の市場は、現在の1000億円から、2010年までに

約 4500 億円にのびると予想されている。今後、いくつかの技術的ブレイクスルーは必要であるが、日本独自の集積超音波造影剤とその高感度が増加技術の開発が実現すれば、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、社会医療の面から貢献できる。さらに外国の製剤のみに頼らないといった点からも、日本の医薬品業界の発展にも貢献できる。

## 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っているが、現状では重篤な毒性は認めていない。今後も、毒性実験の結果は、その都度情報を公開する。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表に示す。

### 2. 学会・研究会発表

1) 日本分子イメージング学会設立総会・第一回学術集会。平成 18 年 5 月 22、23 日、京都

2) 総合科学技術会議・科学技術連携施策群「超早期診断と低信州医療の実現と一体化、生活の安全・安心を目指して」第一回ナノバイオ

テクノロジー連携群 成果報告会。平成 18 年 12 月 12 日、東京

3) 平成 18 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 19 年 2 月 13 日、東京

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 取得特許

1. 発明の名称：シトクロームP450発現が誘導された肝細胞および肝ミクロソーム（特願 2003-43220）
  - ① 発明者：松浦知和
  - ② 出願人：松浦知和
  - ③ 出願日 平成16年3月
  - ④ 特許取得 平成19年2月27日

### 特許申請

1. 発明の名称：画像形成システム（特願 2006-333792）
  - ① 発明者 大川 清、松浦知和、阿部正彦、射谷和徳
  - ② 出願人：アロカ株式会社
  - ③ 出願日 平成 18 年 12 月

資料 1	経済産業省 (NEDO) ポスター発表	11
資料 2	ナノメディシン研究成果発表	12
資料 3	外国人研究者招へい事業 Dr.Filip Celesta Pierre Braet	19
資料 4	関連会議	43

研究課題名: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に係る先導研究

研究担当者名:伊藤 貴司 発表者:射谷 和徳

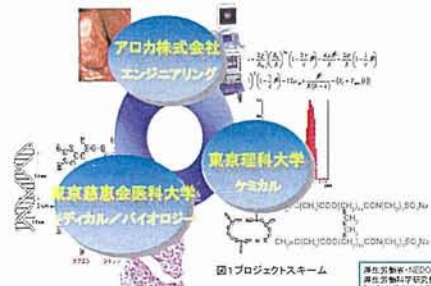
施策名:アロカ株式会社  
経済産業省(NEDO)

1. 背景～超音波分子イメージング～

バイオテクノロジーの急速な発展は、広い分野に大きな変革をもたらすと期待されています。分子イメージングは、分子生物学的情報を生体内で画像化する技術です。バイオテクノロジーの基礎研究成果を、実用化するためのキーテクノロジーとして位置づけられています。例えば、薬剤のターゲット分子(主に蛋白質)の生体イメージングは、創薬の有力な開発ツールであり、細胞が生産する分子の生体イメージングは、再生医療の最も重要な評価技術の一つです。また最新の臨床診断分野では、種の代謝をイメージングするPET装置が、癌の早期診断技術として広く利用されています。

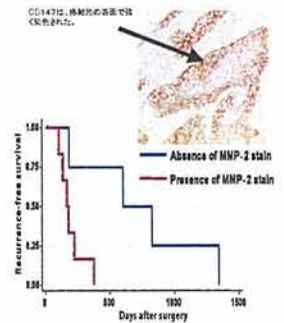
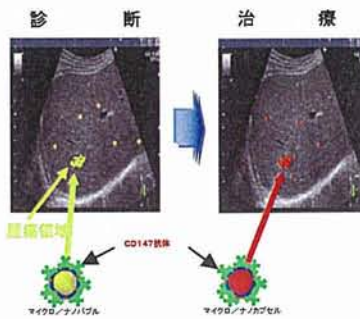
分子イメージング装置では、PET、SPECT、MR、光、X線CT等の技術開発が進んでいます。超音波診断装置は、安全性、簡便性、リアルタイム性、経済性から一般病院まで、広く普及した診断技術です。超音波を利用した分子イメージングの実現は、従来の形態的な診断に分子がもつ機能的な情報を付加した新たな診断技術をも、より身近にします。

超音波分子イメージングでは、超音波造影剤である微小気泡(ナノバブル)に目的分子を捕捉するための標識を行い、目的部位に集積させ、それを画像化します。本研究では、目的分子の探索(バイロロジー)、分子プローブ=マイクロ/ナノバブルの作製(ケミカル)、画像化技術(エンジニアリング)、臨床評価(メディカル)の異なる分野の連携が要求されています(図1)。



2. 研究概要/目的

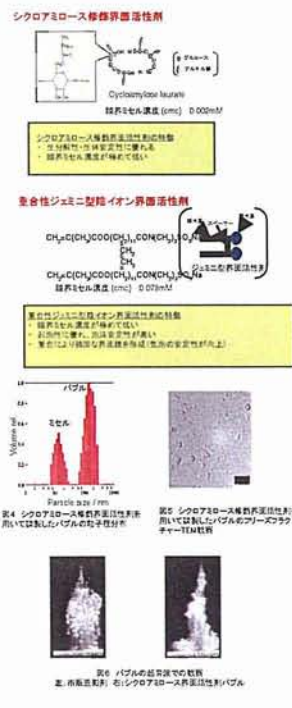
本研究では、悪性度の高い癌に高頻度で発現するCD147分子をターゲットとして、超音波診断法によってきわめて早期に悪性腫瘍を診断し、あわせて治療するシステムの開発を目指しています(図2)。  
糖蛋白CD147はMMP-2を誘導し、癌の浸潤を促進します。共同研究者である東京慈恵医科大学の大川グループでは、MMP-2の発現とがん患者の予後の密接な関連を明らかにしてきました(図3)。CD147分子をターゲットとしたイメージングは、超早期の悪性腫瘍の診断を可能にし、またその後の治療方針の決定にも重要な情報を提供します。  
生体安全性・安定性に優れたマイクロ/ナノサイズの微小気泡に、CD147抗体を標識した分子プローブを開発します。悪性腫瘍に特異的に集積された分子プローブを、超音波によってイメージングすることで、早期に悪性度の高い腫瘍を診断します。また、CD147抗体を標識したカプセルに薬剤を内包し、腫瘍特異的に集積させ、カプセルに超音波エネルギーを照射し、薬剤を放出するDDS技術を開発します。



3. 研究成果

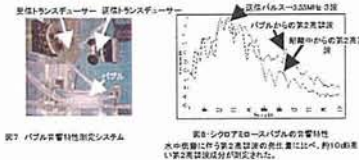
3-1 マイクロ/ナノバブルの調製

共同研究者である東京理科大学の阿部グループでは、生分解性に優れた2種類の新規界面活性剤を開発しました。また、新規界面活性剤によるマイクロ/ナノサイズの微小気泡(ナノバブル)の調製に成功しました。



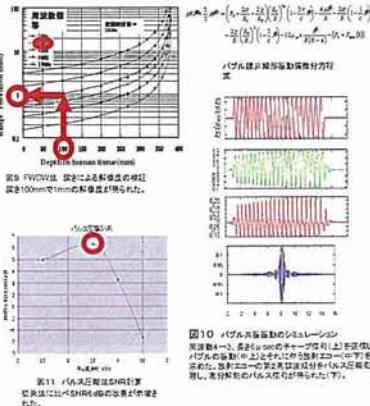
3-2 バブル音響特性の測定

マイクロ/ナノバブルの音響的特性を測定(図7)しました。新規界面活性剤によるバブルでは、組織に比べ約10dB強い第2高調波成分が観測されました(図9)。バブル非線形性を利用した高感度検出技術の実用化が示唆されました。



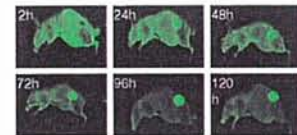
3-3 高感度画像化技術の開発

レーダー技術で利用されているFMCWやパルス圧縮等の低い音圧の長いパルス信号を用いた検出方法の検討を進めました。FMCWによる連続信号でも、生体内での1mm以下の解像度が得られることを確認しました(図9)。また、バブルの共振振動と、組織振動中に発生する非線形振動を解析するシミュレータを製作しました(図10)。シミュレーションでは、パルス圧縮法を利用した検出方法が、従来法に比べSNRが16dB改善されることが推察されました(図11)。



3-4 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

担癌ヌードマウスに、近赤外蛍光IRDye800CW標識Mab12C3を注射し、抗体集積の時間経過を観察しました。モノクローナル抗体Mab12C3は、in vivoにおいても悪性腫瘍に優れた親和性を示すことを確認しました。

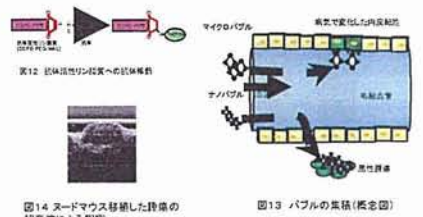


4. まとめ

- 1) 生分解性に優れた新規界面活性剤によるマイクロ/ナノバブルの調製に成功しました。また、その物性的・音響的特性を測定しました。
- 2) 検出感度のシミュレータを製作しました。FMCW法等を利用し、低音圧の長いパルスによる検出感度の向上と、解像度を検証しました。
- 3) モノクローナル抗体(Mab12C3)は、in vivoにおいても悪性腫瘍に高い親和性を持つことを確認しました。

5. 今後の取り組み

- 1) Mab12C3抗体を修飾したPEGリン脂質を新規界面活性剤に少量混ぜて、標識バブルを調製します(図12)。
- 2) ナノキャビラレータ構造を利用したバブル生成方法の検討します。バブルの微小化、単分散化を進め、生体分解性・安定性に優れたナノバブルを世界に先駆けて開発します。
- 3) ナノバブルは、内皮細胞透過し、組織への浸透が期待されます。X線マイクロCT技術を用いて、バブルの生体内での集積を調べます(図13)。
- 4) バブル径が小さくなると単体の検出感度は低下します。バブル径、バブルの集積量、超音波の周波数、検出感度について検討を進めます。
- 5) 高周波超音波を利用した画像化装置を試作し、3次元腫瘍モデルや小動物を用いた検証実験を行います(図14)。

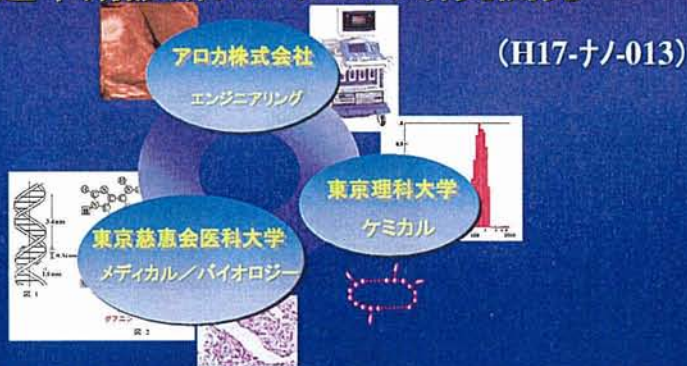


平成18年度 厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業

萌芽的先端医療技術推進研究事業

ナノメディシン研究成果発表会【分子イメージング】31

## 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



(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構・  
分子イメージング機器研究開発プロジェクト  
悪性腫瘍等治療支援分子イメージング機器に関する先導研究  
研究開発責任者: アロカ株式会社 伊藤 貞司

主任研究者: 東京慈恵会医科大学 大川 清

東京 2007年2月13日 15:30-15:40

目的: 超音波分子イメージング技術の確立と超早期がん診断への応用

癌の浸潤マーカーCD147を分子ターゲットとし、造影超音波技術による微小癌診断システムを創出する。

### 1. 超音波: 20kHz以上の振動エネルギーの伝搬

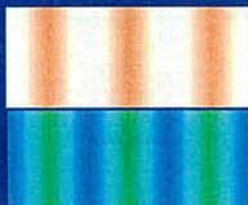
音速 343 m/s (空気中)

1530 m/s (水中)

水中での波長 約0.5 mm (3 MHz)



### 2. 超音波造影剤: 分子イメージング用新規マイクロ・ナノバブル



バブルの  
非線形振動  
(シグナル)

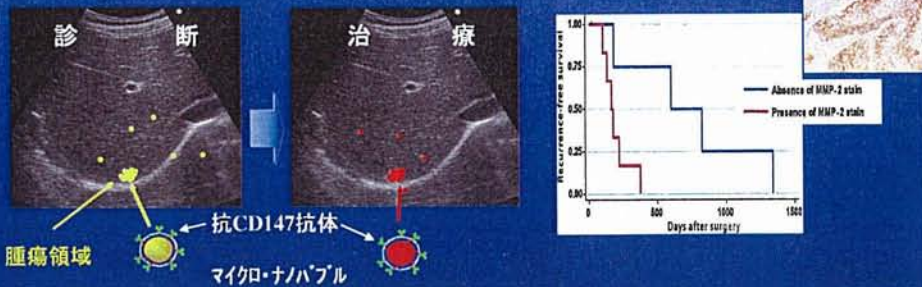
組織の  
非線形振動  
(ノイズ)

高調波成分  
(ハーモニック)  
識別技術の  
確立

# 研究の概要

## 平成18年度の研究経過:

1. 超音波造影剤としてのマイクロ・ナノバブルの開発
  - ①新規界面活性剤によるマイクロ・ナノバブルの調製 (厚労省・NEDO)
  - ②バブル物理化学的特性・音響的特性の測定 (厚労省・NEDO)
2. マイクロ・ナノバブル検出技術の開発
  - ③非線形振動を用いた高感度画像化技術の開発 (NEDO)
3. ターゲット分子CD147の捕捉
  - ④モノクローナル抗体の*in vivo*分子捕捉感度の検討 (厚労省)



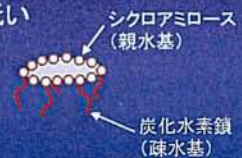
# 研究成果: マイクロ・ナノバブルの生成

## 2種類の新規界面活性剤



### シクロアミロース修飾界面活性剤

- ・ 生分解性・生体安定性に優れる
- ・ 臨界ミセル濃度が極めて低い



### 特許出願



### タウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤

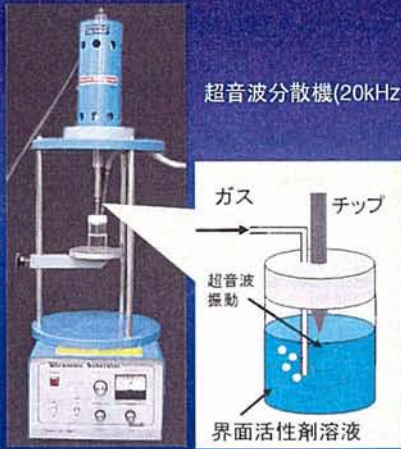
- ・ 臨界ミセル濃度が極めて低い
- ・ 起泡性に優れ、泡沫安定性が高い
- ・ 重合により強固な界面膜の形成(気泡安定性の向上)



### 特許出願

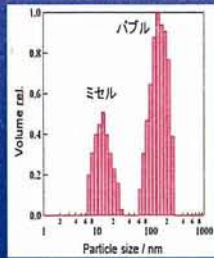
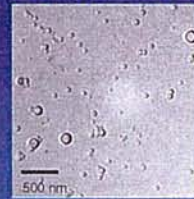
# バブル発生方法の検討 I

## 超音波分散方式

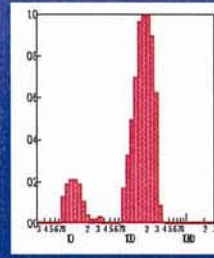
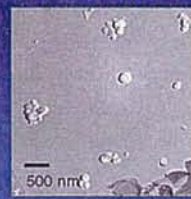


ナノバブル(200nm)の生成が  
確認された

### シクロアミロース



### ジェミニ重合型

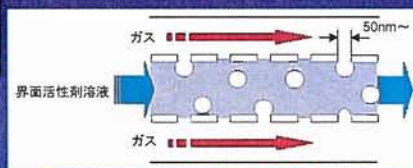


上: フリーズフラクチャTEM観察  
下: 動的光散乱

# バブル発生方法の検討 II

## 多孔質ガラス方式

原理: 単一孔より気体を送入し、液相中に気泡を発生する



### 特徴:

- ・単分散化(気泡径の制御・安定性向上)
- ・目的ガスの内包(安定性向上)
- ・多量の気泡の発生

## バブル発生実験(ジェミニ型界面活性剤)

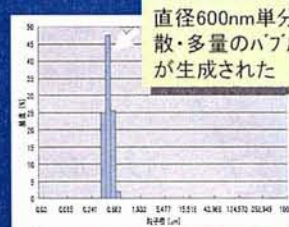


調製開始直後



調製中(約1分後)

粒径分布測定



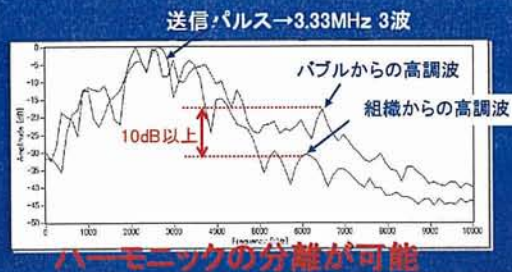


# バブル音響特性の測定

① 超音波診断装置による観察 左:レホビスト 右:シクロアミロスバブル



② バブル非線形特性の測定



# 高感度画像化技術:シミュレータの作成

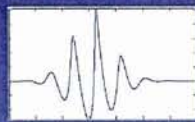
組織伝搬の  
非線形効果

+

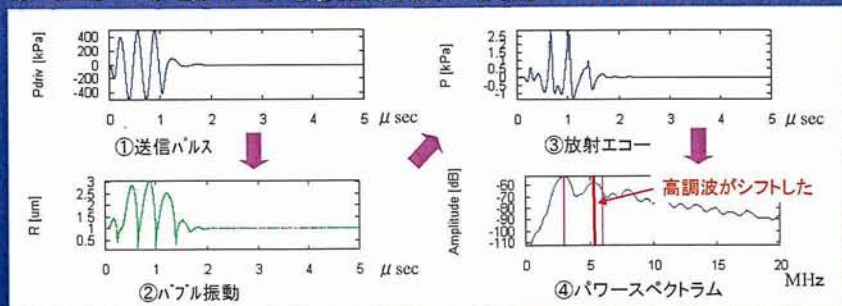
バブル  
非線形振動



バブル振動信号=S  
組織からの信号=N  
検出感度(SNR)を解  
析的に求めた

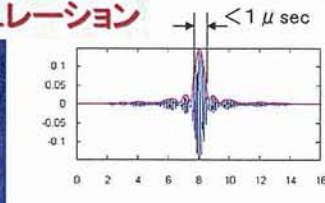
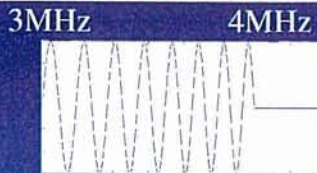


シミュレーションによる検出方法の検討 (特許出願)

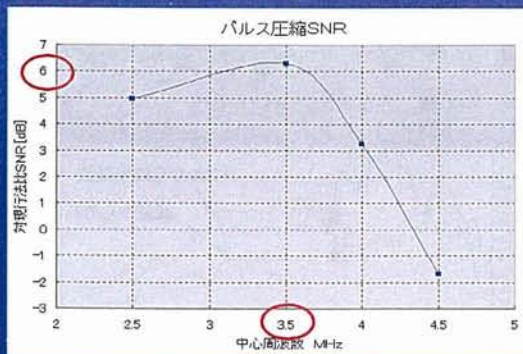


## パルス圧縮法による分解能とSNRの検討

### 2 $\mu\text{m}$ 径のマイクロバブルでのシミュレーション



送信波形 = チャープ信号  $6 \mu\text{s}$     受信波形: パルス圧縮後の波形  $< 1 \mu\text{s}$

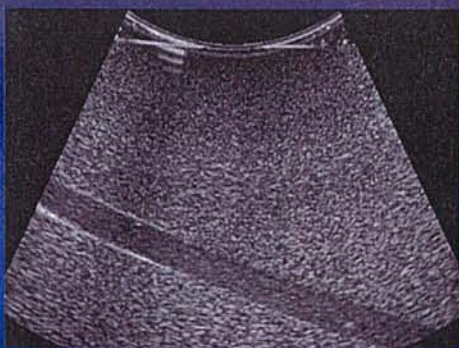


分解能 1.5mm

中心周波数 3.5MHz の  
チャープ信号

SNR 6dB UP

## 超音波造影剤ソナゾイドの血流モデルにおける超音波イメージ



Bモード

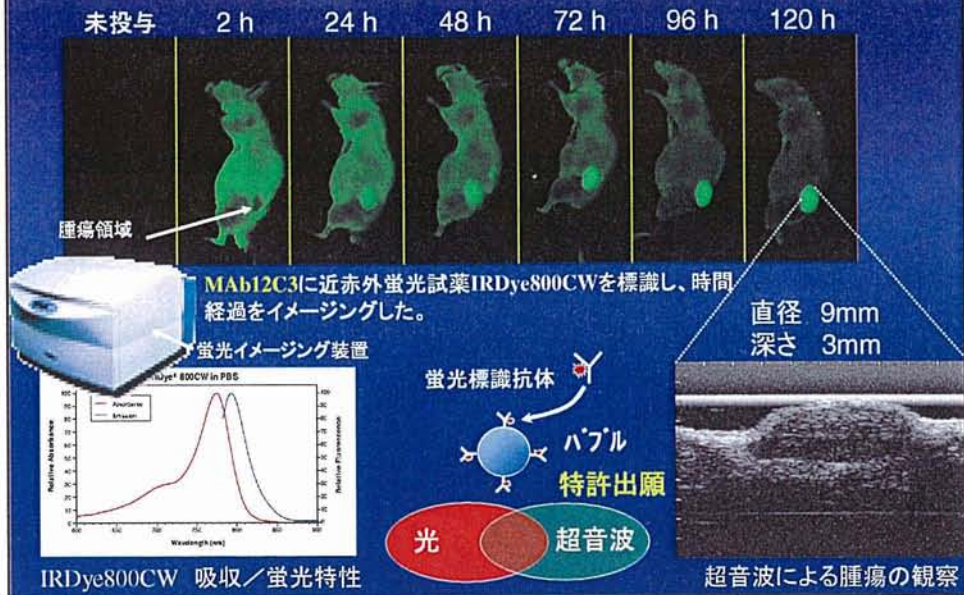


ハーモニック(第2高調波)

1. バブルと組織のハーモニックの識別感度の増強  
強い放射エコー(音圧)  
高調波の周波数の変化
2. パルス圧縮法による検出感度の増強

## in vivo 実験 分子捕捉能の確認

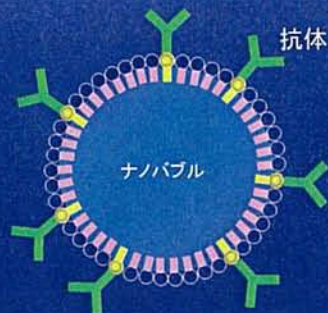
抗CD147抗体MAb12C3は、in vivoでも高い分子捕捉能を示した



## 今後の取り組み

### 1. 標識マイクロ・ナノバブルの開発

マイクロ・ナノバブルに抗CD147抗体MAb12C3を標識した分子プローブを作製する。



抗体を修飾したナノバブルの模式図

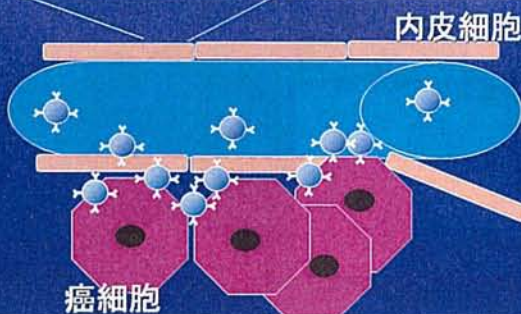
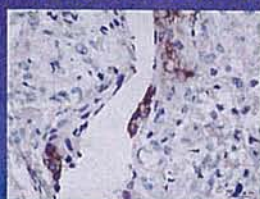
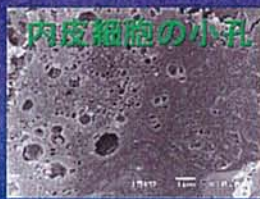
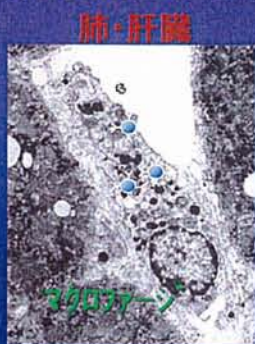
新規界面活性剤 (シクロアミロース修飾界面活性剤 or 重合性ジェミニ型界面活性剤)

抗体活性PEGリン脂質

# 今後の取り組み

## 2. 標識マイクロ・ナノバブルの生体内動態の検討

生体内で、標識マイクロ・ナノバブルが腫瘍細胞に到達するための条件・集積性を調べる。



分子ターゲットCD147

高感度ナノバブル検出法

広帯域・高周波振動子

超音波分子イメージング

集積ナノバブルの画像化

安定したナノバブルの作製

標識ナノバブルの作製