

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究

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19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20(2008)年4月

目 次

I.	総合研究報告	
	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) 経済産業省 (NEDO)	
	及びナノメディシン研究 ポスター発表 -----	9
	(資料2) ナノメディシン研究成果発表 -----	11
	(資料3) 外国人研究者招へい事業 研究実績報告書 -----	14
	(資料4) 外国人研究者招へい事業 (Dr.Filip Celesta Pierre Braet) -----	27
	(資料5) EMU Newsletter : International Collaborative Partnership	
	between the AMMRF and IIRS -----	49
	(資料6) 外国への日本人研究者派遣事業 研究実績報告書 -----	50
	(資料7) 関連会議 -----	60
II.	分担研究報告 -----	65
1.	超音波造影剤作成に向けた分子標的性向上に向けた研究 -----	69
	大川 清、朝倉 正、青木勝彦	
2.	細胞内在性 RNA アプタマーと標的 RNA 結合タンパク質の相互作用の機能解析 -----	75
	松藤千弥、堀谷 学	
3.	ブタ膵を用いた膵組織に対する超音波内視鏡下	
	Hot Saline 注入法 (E-Hot) の基礎的研究 -----	78
	田尻久雄、今津博雄	
4.	消化管腫瘍における CD147 発現の臨床的意義 -----	80
	石橋由朗	
5.	子宮頸部腫瘍における CD147 発現解析 -----	82
	山田恭輔、上田 和	
6.	CD147 (basigin) のマウス組織内分布の免疫組織学的解析 -----	84
	日下部守昭	
7.	<i>In vitro</i> 三次元微小腫瘍モデルの作製に関する研究 -----	87
	相澤 守	
8.	X 線マイクロ CT を用いた単分散リン脂質マイクロバブル及び	
	金ナノ粒子標識リポソームを還流した 3 次元培養モデルの微細形態の解析 -----	91
	松浦知和、相澤 守、永妻啓介	
9.	抗 CD147 抗体標識微小気泡の調製およびその超音波分子イメージング -----	95
	阿部正彦、酒井秀樹、土屋好司	
10.	超音波分子イメージング装置に関する研究 -----	100
	伊藤貴司、射谷和徳	
11.	造影超音波検査の現状と超音波分子イメージングへの期待 -----	103
	宮本幸夫、中田典生	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	105
IV.	研究成果の刊行物・別刷 (別刷 12 冊、日経産業新聞 2008 年 2 月 1 日) -----	111

I 総合研究報告書

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

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究）

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

主任研究者 大川 清 東京慈恵会医科大学 教授

研究要旨：本研究の目的は、癌の浸潤マーカーである CD147 を分子ターゲットとして、癌を超早期に診断し治療するための超音波分子イメージング技術を確認することである。平成 19 年度は、①分子プローブ標識マイクロ・ナノバブルの作製技術の確認、②標識バブル癌への集積性の超音波による確認、③生体内マイクロ・ナノバブルの超音波による検出技術の開発を行った。抗体を標識したリン脂質を作製し、抗体標識バブルの作製に成功した。また、その標識バブルの癌への集積性を、3次元癌モデルをファントムとして検証した。さらに、ナノバブルに比較的低い波長の超音波をあてると、そこから発生する非線形振動によって生ずるエコーは減衰が少なく、組織からのエコーと判別できることが判明した。このため、将来的には、標識ナノバブルを用いれば、比較的深部からの集積ナノバブルを超音波で検出できる可能性が示唆された。今後さらに、治療を含む実用化研究を推進する。最終的に、わが国独自の超音波分子イメージング技術をハード、ソフト両面で確立する。

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 准教授
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 明治大学工学部 准教授
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
阿部正彦 東京理科大学工学部 教授
酒井秀樹 東京理科大学工学部 准教授

細胞膜表面に発現する糖蛋白の一種で、癌の浸潤マーカーである CD147 を分子ターゲットとした。

超音波で分子イメージングするには、ターゲットを捕捉するプローブを標識した集積超音波造影剤が必要である。平成 19 年度は、集積超音波造影剤として抗 CD147 モノクローナル抗体を標識したマイクロバブルの作製を試みた。また、その集積性についてバイオリクターを用いた 3次元癌モデルで検証した。

一方、アロカ社を中心に、集積バブルを生体内で高感度に検出するための技術開発を進めた。さらに、超音波分子イメージングの実用化のために、平成 18 年 1 月より臨床で使用できるようになった第 2 世代超音波造影剤ソナゾイド（単分散リン脂質膜マイクロバブル）を用いた超音波内視鏡研究（動物実験）と肝臓

A. 研究目的

本研究の目的は、超音波分子イメージング技術を用いてがんを早期診断するシステムを確認することである。本研究では、癌細胞の

疾患への臨床応用に関して研究を推進した。また、抗 CD147 モノクローナル抗体に換わる分子標的プローブとしての CD147 認識アプタマーの開発も着手した。

B. 研究方法

1) 癌に表出する CD147 を認識し集積する超音波造影剤の作製

超音波造影剤としてもマイクロバブルの作製に、今回はリン脂質の単分散膜を利用した。はじめに、ポリエチレングリコール (PEG) の結合したリン脂質にさらに抗体を結合させ、抗体の結合したリン脂質を作製した。標識を確認するために、抗体のかわりに蛍光蛋白 Keima を標識したリン脂質を合成した(図 1)。

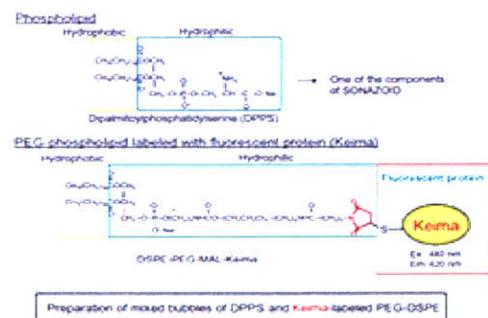


図 1 : Keima を標識したリン脂質

Keima を標識したリン脂質に、市販の超音波造影剤の主成分であるフォスファチジルセリンを混合し、不溶性ガスを封入したマイクロバブルを作製した。

2) 抗 CD147 モノクローナル抗体標識マイクロバブルの集積性の検討

抗 CD147 モノクローナル抗体を標識したマイクロバブルを作製し、その集積性を検証した。この標識バブルの癌での集積性と超音波での描出を検討するため、癌の 3 次元モデルを利用した。癌の 3 次元モデルはこのようなバイオリアクターに癌細胞を 3 次的に培養し、そこに作製した抗 CD147 モノクローナル抗体標識

バブルを還流した。バイオリアクターを水槽内にいれ、下方から超音波診断装置を用いてコントラストモードで観察した (図 2)。

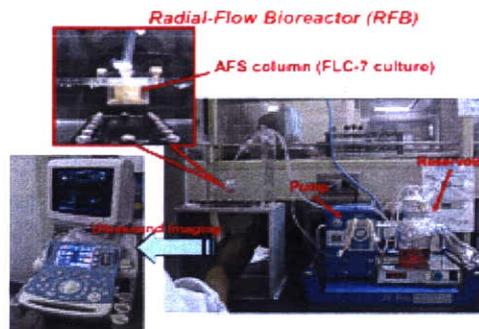


図 2 : 3 次元癌モデルでの還流実験

3) バブルの高感度画像化技術の開発

3 つ目の課題として、生体内の集積バブルを高感度に画像化する技術の開発が必要である。本研究では、独自に開発したシミュレーターを用いて、このようにある音にたいして、バブルがどのように振動するかシミュレーションし、そこから発生するエコーの非線形効果に関して解析した。600nm 径のナノバブルと、既存の超音波造影剤のナノバブル (直径 $2\mu\text{m}$) で、シミュレーションおよび音響特性を実測し、検討した。また、動物実験用の抗マウス CD147 抗体 (ポリクローナル) を作製した。

4) 実用化研究

超音波分子イメージング技術の実用化は、既存の超音波造影剤を用いた臨床経験の延長上で成し遂げられると考え、平成 18 年 1 月から使用可能となったソナゾイドに関して放射線科での臨床経験を総括した。また、超音波内視鏡への応用も考慮し、動物実験も行った。さらに、臨床応用のプローブとしての CD147 認識アプタマーの開発を行った。

C. 研究結果

1) 癌に表出する CD147 を認識し集積する超音波造影剤の作製

図3はバブル作成後静置したバブル混合液の状態を示している。150分後でもマイクロバブルは観察され、動的光散乱法でも直径マイクロメートルオーダーのバブルが存在することがわかる。

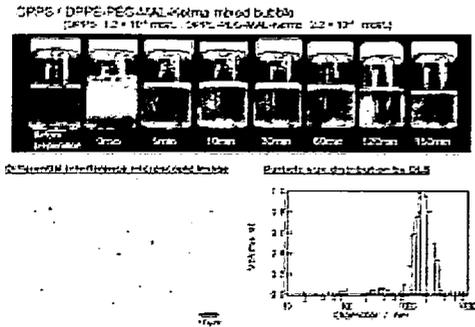


図3：標識マイクロバブル

また、作製した標識バブルの蛍光像で、抗体の代わりに蛍光蛋白 Keima がバブルの界面に存在することが証明された (図4)。

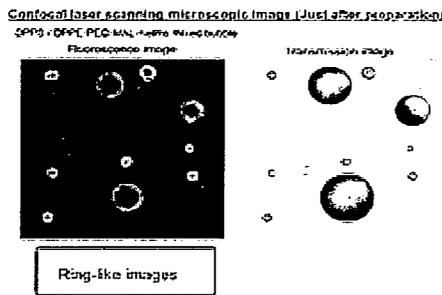


図4：Keima 標識マイクロバブル

以上から、この手法で標識した集積性バブルを作製できることがわかった。

2) 抗CD147モノクローナル抗体標識マイクロバブルの集積性の検討

標識マイクロバブルをリザーバーに添加し、還流を開始すると、バブルがまず癌モデル周囲に流れ込んでいるのが観察された。還流液は周囲から癌中心部に流れ、流出していくため、10分後には、癌部へのバブルの集積が超音波画像として観察できた (図5)。20分間還流しても、バブルは集積していた。同様のことを市販の超音波造影剤 (ソナゾイド) でも行ったが、

集積はほとんど認めなかった。

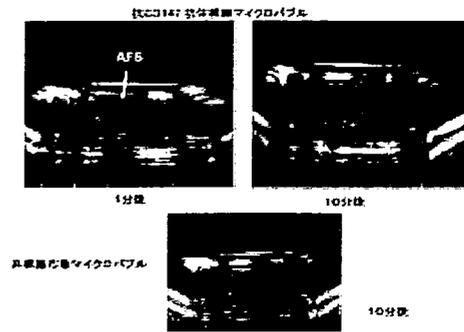


図5：標識バブルの集積

3) バブルの高感度画像化技術の開発

種々のシミュレーションからマイクロバブルに比較して、ナノバブルにおいて、エコーの基本波の音圧は1/10になるものの、エコーの高調波成分の音圧の減衰が少ないことが判明した (図6)。

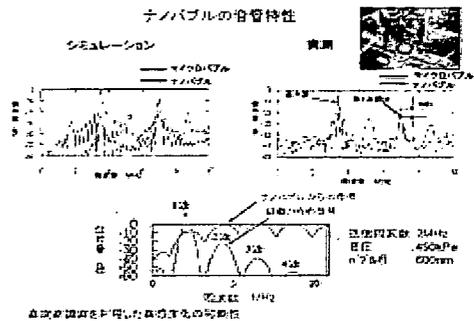


図6：バブルの音響特性

実際に、ナノバブルを作製し、その音響特性を実測したところ、シミュレーションとほぼ同様の結果が得られた。つまり、組織の非線形振動による高調波成分は急速に減衰するのに対し、ナノバブルからの高調波成分の音圧は減衰しないことがわかった。

特に、2 MHz の低い周波数の超音波でナノバブルを振動させると、高調波成分は強く発生することがわかり、この特性を生かせば、生体深部のバブルの集積が観察できる可能性がある。このため、ナノバブルの検出感度を検証するため、送信を2 MHz、受信を6 MHz で行う3次高調波による画像化システムを試作

した(図7)。これはファントム実験の結果では、3次高調波成分を検出することで、ナノバブルでも市販の超音波造影剤のマイクロバブルに匹敵する画像を得ることができた。

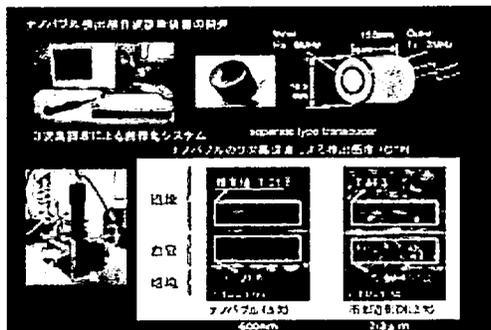


図7：3次高調波画像化システム

4) 実用化研究

この1年間のソナゾイドの臨床使用経験から、造影超音波を使用することで、きわめて小さな肝臓腫瘍の診断、そして治療が円滑に行われるようになった。CTのヨード造影剤が1回の造影で20ml必要で、1万回に1例は生命に関わる副作用が生ずるのに比較して、超音波造影剤はわずか0.5-1mlの造影剤の投与で安全な検査が可能であった。集積超音波造影剤の開発は、早期癌の診断のみでなく、心室内血栓症の診断等にも寄与できる。また、超音波造影剤の患部への直接注入と観察も今後行われる可能性があり、特に超音波内視鏡を用いた検査・治療へ応用される可能性が示唆された。

抗CD147認識アプタマーの開発に関しては、リコンビナントタンパク質に対するアプタマー取得に関する実験系の基盤が整備され、CD147固定化レジンに親和性を有するRNA集団がクローニングされた。CD147に対するアプタマーがこの集団内に含まれる可能性は高いと考えられる。

抗マウスCD147認識抗体は、マウスの腫瘍も染色されたが、肝臓類洞内皮細胞、腎臓細胞も認識した。

D, E. 考察・結論

抗CD147抗体を標識したマイクロバブルを製作し、3次元癌モデルに還流したところ、癌への集積性を超音波で観察することができた。比較的低い周波数の超音波を照射し、ナノバブルからのエコーの3次高調波成分を検出することで、組織からのエコーと判別でき、明瞭なナノバブル集積画像が得られることも判明した。将来的には、ナノバブルからのエコーの高調波成分を検出することで、生体内深部の集積を高感度に描出できると考える(図8)。

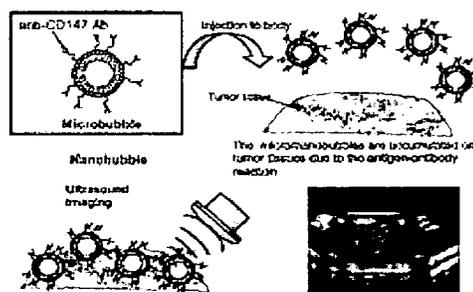


図8：まとめ

そのためにも、集積ナノバブルの開発とそれを検出する超音波診断装置の開発は、あわせて行うべき実用化研究である。一般のコントラスト超音波診断装置とさらに超音波内視鏡にその機能を搭載できれば、ごく早期の深部癌を直接治療できる可能もある。本研究を今後も実用化をめざして継続する。今後の目標は、1)プローブ標識集積性超音波造影剤の実用化、2)ナノバブル作製法の確立と簡便化、3)3次高調波検出超音波診断装置の開発、4)治療への応用である。

F.健康危険情報

現状では開発中の集積超音波造影剤に関して、毒性は認めていない。

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) 第2回日本分子イメージング学会総会

2007年6月28-29日、福井市

2) Konno T, Itani K, Itoh T, Tsuchiya K, Abe M, Sakai H, Matsuura T, Ohkawa K. Approach for early cancer diagnosis using targeted ultrasound contrast agents. The Academy of Molecular Imaging and The Society for Molecular Imaging : Molecular Imaging Joint Conference, 2007, Sept. 8-11 Rhode Island USA

3) 総合科学技術会議 科学技術連携施策群 「ナノバイオテクノロジーが拓くイノベーションの世界」 第二回ナノバイオテクノロジー連携群 成果報告会 2007年12月5日、東京

4) The 9th International Symposium on Ultrasound Contrast Imaging, 2007年12月15-16日、大阪

5) 平成19年度厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業・医療機器開発推進研究 ナノメディシン研究成果発表会 2008年2月27日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 射谷和徳・伊藤貴司・今野剛人・特願 2006-135178・気泡検出装置・アロカ株式会社

2) 射谷和徳・大川 清・松浦知和・阿部正彦・特願 2006-333792・画像形成システム・アロカ株式会社

3) 射谷和徳・大川清・松浦知和・阿部正彦・特願 2007-205952・造影用カプセル・アロカ株式会社

4) 射谷和徳・特願 2007-215654・超音波診断装置・アロカ株式会社

5) 射谷和徳・特願 2007-318814・超音波診断装置・アロカ株式会社

(資料1)	経済産業省 (NEDO) 及びナノメディシン研究 ポスター発表 -----	9
(資料2)	ナノメディシン研究成果発表 -----	11
(資料3)	外国人研究者招へい事業 研究実績報告書 -----	14
(資料4)	外国人研究者招へい事業 (Dr.Filip Celesta Pierre Braet) -----	27
(資料5)	EMU Newsletter : International Collaborative Partnership between the AMMRF and IIRS -----	49
(資料6)	外国への日本人研究者派遣事業 研究実績報告書 -----	50
(資料7)	関連会議 -----	60

施策名:アロカ株式会社
経済産業省(NEDO)

1. 研究の背景 ~形態から機能へ 診断から標的治療へ

超音波診断装置は、簡便・安全・安価・コンパクトであり、医療現場の幅広い分野で利用されている。微小気泡(マイクロバブル)は、超音波の優れた造影剤であり、超音波診断技術の性能向上に貢献している。厚生労働省側の研究グループでは、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、微小気泡の表面に目的分子を捕捉するためのリガンドを標識した超音波用分子プローブの開発を進めている。超音波診断技術と分子イメージング技術の融合により、これまでの形態的な診断に加え、分子の持つ機能情報を画像化する新しい診断技術が、臨床現場より身近な技術として実現できる。更に、超音波は、そのエネルギーを生体内に収束させることに適しており、標識バブルとの組合せは分子標的治療への展開が期待される。

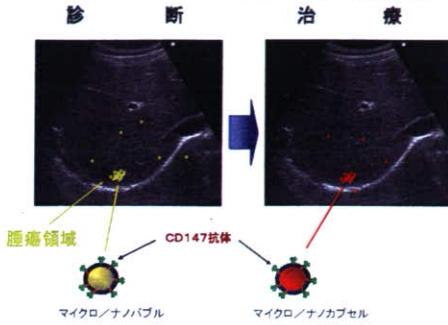


図1 超音波分子イメージング(概念図)

2. 概要/目的

超音波分子イメージング技術では、目的分子捕捉性、選択性に優れた分子プローブと、分子プローブを高感度・高解像度に映像化する画像化技術が両輪となる。分子プローブ(バイオ有機ケミカル)とその画像化技術(エンジニアリング)の開発を連携して進めることで、トータルパフォーマンスの最適化が達成される。

微小気泡のサイズが、市販の造影剤の数 μm から数百nmに小さくなると、生体内の動態や集積性・選択性が高まり、分子プローブとしての基本性能が向上する。また、200nm以下のサイズでは、EPR効果として知られるように血管壁を通過し、腫瘍組織自体のターゲティングが可能となる。一方、バブルを微小化すると、安定性の低下と検出感度の低下が懸念される。本研究では、生体適合性・安定性に優れた微小気泡、特にナノサイズの微小気泡を安定して生成する技術と、高感度に映像化する技術を開発し、悪性度の高い腫瘍を早期に診断できる超音波分子イメージング技術を、世界に先駆けて実用化する。

3. 何故ナノバブル?

超音波の優れた造影剤であるバブルを、ナノサイズにすることで、超音波用分子プローブとして、次の様な優れた特徴が期待される。

- 200nm以下のナノバブルは、血管内皮細胞を通過し、腫瘍組織周辺に到達することが期待される(図2)。
- ナノバブルは、効率的に毛細血管や、センチネルリンパ節などの微細構造に運搬される。
- ナノバブルは、マイクロバブルに比べ、単位体積当たり大きな表面積を持つ。そのため、抗体が標識された標的ナノバブルは、目的分子の捕捉特性の向上が期待される。

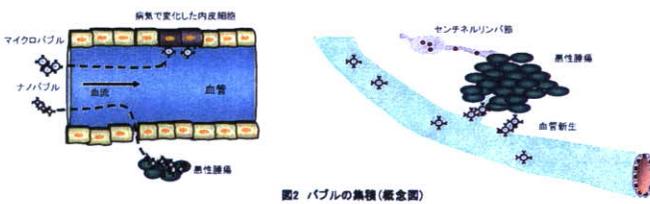


図2 バブルの集積(概念図)

4. 研究成果

4-1 均一粒径分布を持つナノバブルの調製

バブルを高感度に検出する上で、その粒径分布が揃っていることが重要である。宮崎県工業技術センターが開発した*SPG膜を利用したバブル発生装置(図3)で直径600nmで単分散ナノバブル(図4)の生成に成功した。界面活性剤は、共同研究者である東京理科大学の阿部グループが独自に開発したタウリン誘導ジェミニ型界面活性剤を用いた。

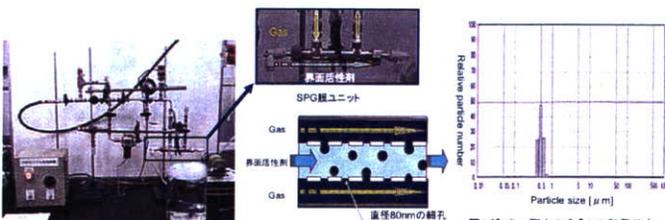


図3 SPG膜を利用したバブル発生装置(技術提供:宮崎県工業技術センター)とその生成原理

界面活性剤を一定の流速で押し、そこに直径80nmの膜孔からガスを圧入する。発生するバブルの粒径は、膜孔の径や、ガス圧、流速によって制御される。

*SPG Shirasu Porous Glass

4-2 ナノバブルの検出感度

バブルの粒径が小さくなると検出感度の低下が懸念される。通常の診断で利用されている低い周波数の送信条件下で、市販の超音波造影剤(商品名:ソナゾイド)と検出感度を比較した(図5)。ナノバブル(600nm)は、市販造影剤(マイクロバブル)に比べ、基本波帯でのエコー強度が大きく減少した。一方、第2高調波帯でのエコー強度の差は、約-5dB程度と小さく(図6)なり、高次高調波を用いることでナノバブルを映像化する事が可能であると推察された。



図5 バブルからのエコー信号の測定

バブル1個からのエコー信号を測定した。送信条件:送信機出力35MHz 送信電圧 MI=0.3波長 8 μsec

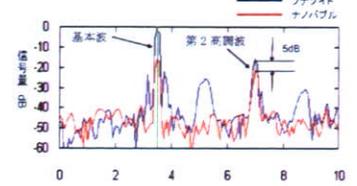


図6 ナノバブルとソナゾイドのエコー信号量(実験結果)

第2高調波の信号量の差は、-5dBと僅かであった。

4-3 シミュレーション

バブル膜の振動を数値計算で求めるシミュレータを作製し、バブルからのエコー信号を求めた。シミュレーション結果(図7)は、図6の実験結果と良く一致した。このシミュレータを用いて、ナノバブルをより高感度に映像化する条件を検討した。その結果、ナノバブルを低い周波数で動かし、第3次以上の高次高調波を映像化することで、マイクロバブルと同等のCTR(対組織信号比)が得られる可能性が示唆された(図8)。

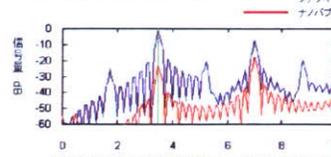


図7 ナノバブルとソナゾイドのエコー信号量(シミュレーション)

実験結果(図6)とシミュレーション(図7)は、良く一致した。シミュレータの実用性が確認された。

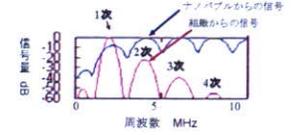


図8 高次高調波による検出

2MHzを通過し、バブル(600nm)と組織から発生する反射エコーをシミュレーションした。バブルからの高次高調波信号量は、高次に依りてほぼ一定であった。一方、組織信号量に発生する高次高調波信号量は、高次に依りて減少した。高次高調波を検出することで、高いCTRが得られることが示唆された。組織信号中の高次高調波の発生は、KZK方程式を用いて計算した。

4-4 高感度画像化技術の検討

送信2MHz、受信6MHzの送受信独立型リング状探触子を搭載したプローブを試作し、高次高調波でバブルを映像化する実験システムを製作した(図9)。実験システム(図10)を用いて、ナノバブル(600nm)の3次高調波とマイクロバブル(ソナゾイド:2.5 μm)の2次高調波による映像化を行い、そのCTRを比較した。ナノバブルでも、市販の造影剤と同等の感度(図11)が得られることが実験によって確認された。

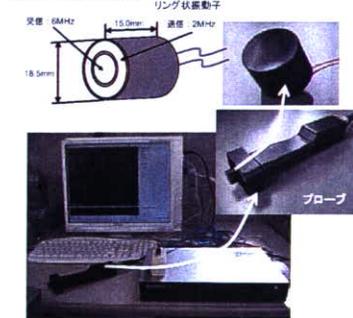


図9 3次高調波による画像化システム



図10 実験モデル
自作モデルにバブルを吹き、組織とバブル(血管内)からエコー信号を画像化した。

図11 ナノバブルの検出感度
ナノバブルの3次高調波による検出感度(CTR)は、市販造影剤の2次(ソナゾイド)と同等であった。

4-5 anti-CD147抗体標識バブルのイメージング実験

厚生労働省側研究と共同で、抗体標識バブルの特異的集積性を確認する実験を行った。抗体標識バブルは、腫瘍組織内でソナゾイドに比べ優位に画像化された。(詳細は厚生労働省側ポスターに掲載)

5. まとめ

- 新規界面活性剤を用い、粒径分布の均一なナノバブルの生成に成功した。
- バブル振動のシミュレータを作製し、ナノバブルを高感度に検出する条件を検討した。
- 3次高調波でバブルを映像化するシステムを試作した。ナノバブル(600nm)で市販マイクロバブルと同程度のCTR(検出感度)が確認された。
- 抗体標識バブルは、標識のないバブルに比べ腫瘍部分を優位に映像化することが出来た。

6. 今後の取組み

- 単分散で500nm以下のナノバブルを生成する技術を開発する。
- 抗体あるいは核酸を標識したナノバブルを作製する。
- 標識ナノバブルの集積性を評価する。
- 高次高調波を用いてバブルを高感度に映像化する超音波分子イメージング専用装置を試作する。

1. 背景～超音波分子イメージング

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、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である。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ある。また最新の臨床診断分野では、癌の代償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る。

分子イメージング装置としては、PET、SPECT、MR、光、X線CT等の技術開発が進んでいるが、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ある。

本研究では、超音波造影剤である微小気泡（バブル）に目的分子（腫瘍）と選択的に結合可能な抗体を標識させることにより、微小気泡を目的部位に選択的に集積させ、それを超音波により画像化することを目的としている。本プロジェクトでは、目的分子の探索と臨床評価（医学・生化学、東京慈恵会医科大学）、分子プローブとして用いるマイクロ・ナノバブルの作製（界面化学、東京理科大学）、超音波画像化技術の確立（音響工学、アロカ）といった異なる分野の三者共同体制を構築し、研究を進めている（図1）。



図1 プロジェクトスキーム

2. 研究概要／目的

本研究では、癌の浸潤マーカーであり、悪性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（図2）。

糖蛋白CD147はMMP-2を誘導し、癌の浸潤を促進することが知られている。主任研究者である東京慈恵会医科大学大川のグループではこれまでに、MMP-2の発現とがん患者の予後に密接な関連があることを明らかにしてきた（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することが期待される。

本研究では、生体安全性・生体安定性に優れたマイクロ・ナノメートルサイズの微小気泡に、CD147認識抗体を標識し、悪性腫瘍に特異的に集積された微小気泡を、超音波によってイメージングすることで、早期に悪性の高い腫瘍を診断することを目的とする。また、CD147認識抗体を標識した微小気泡に薬剤を内包し、腫瘍特異的に集積させた微小気泡を超音波照射により崩壊し、薬剤を放出するDDS技術の開発を目指している。

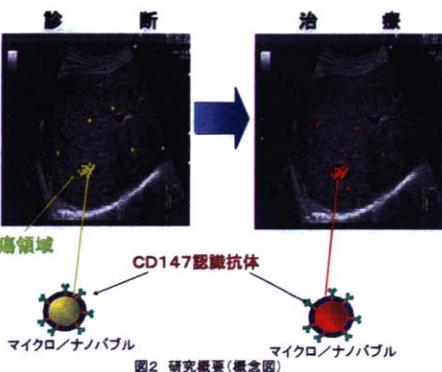


図2 研究概要（概念図）

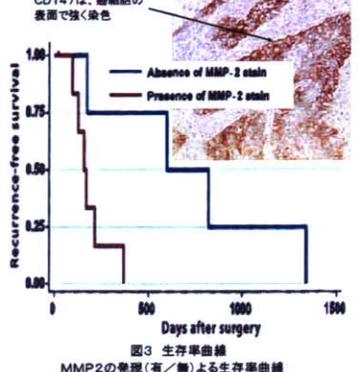


図3 生存率曲線
MMP2の発現(有/無)による生存率曲線
(カプラン-マイヤー法 N=101)

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グループでは、生体安定性に優れた2種類の界面活性剤を新規に合成し、ナノメートルサイズの微小気泡（ナノバブル）の調製に成功した（図4、5）。また、超音波診断装置を用いて、新規界面活性剤により調製したナノバブルの画像化に成功した（図6）。

シクロアミロース修飾界面活性剤

グルコース（親水性）
改良水素鎖（疎水性）
Cycloamylose laurate (分子量: 23,400)
臨界ミセル濃度 (cmc): 2×10^{-4} mol/L

タウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤

親水性
疎水性
ジェミニ型界面活性剤モデル
重合開始剤 (タウリン/ヨウ化カリウム)
臨界ミセル濃度 (cmc): 7.8×10^{-4} mol/L

特徴：
・生分解性のシクロアミロースから誘導
・生分解性・生体安定性が高い
・臨界ミセル濃度 (cmc) が極めて低い

特徴：
・アミノ酸の一種であるタウリンから誘導
・臨界ミセル濃度 (cmc) が極めて低い
・親水性および疎水性安定性が高い
・重合により強固な界面膜を形成 (気泡の分散安定性が向上)

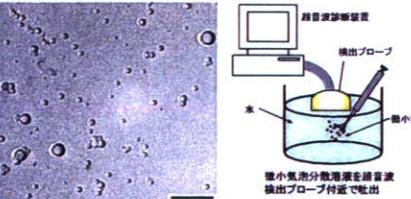


図4 微小気泡のフリーズフラクチャー-TEM像 (シクロアミロース修飾界面活性剤)

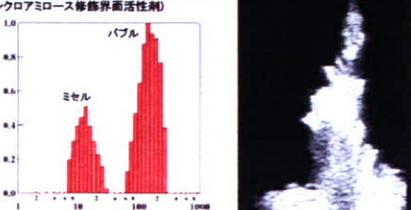


図5 動的光散乱法による微小気泡の粒子径分布 (シクロアミロース修飾界面活性剤)

図6 微小気泡の超音波イメージング (シクロアミロース修飾界面活性剤)

3-2 微小気泡への抗体標識

CD147分子を高感度で認識する単クローン抗体 (anti-CD147抗体) を標識した微小気泡を作製した。anti-CD147抗体のモデルとして蛍光蛋白Keimaを標識したPEGリン脂質を用いて微小気泡の調製を行った。共焦点レーザー顕微鏡観察から、蛍光蛋白Keimaが微小気泡の界面に標識されることが分かった（図7、8）。

抗体修飾PEGリン脂質 (DSPE-PEG-MAL) への抗体標識

DSPE-PEG + HS-Peptide → DSPE-PEG-S-Peptide

PEGリン脂質 (DSPE-PEG-MAL) + 抗体 (or 蛍光蛋白) → 抗体 (or 蛍光蛋白) 標識PEGリン脂質

共焦点レーザー顕微鏡観察像 (蛍光蛋白Keima標識混合バブル)

蛍光蛋白 (Keima)
Ex: 440nm, Em: 620nm

抗体修飾PEGリン脂質 (DSPE-PEG-Keima) リン脂質 (DPPS)

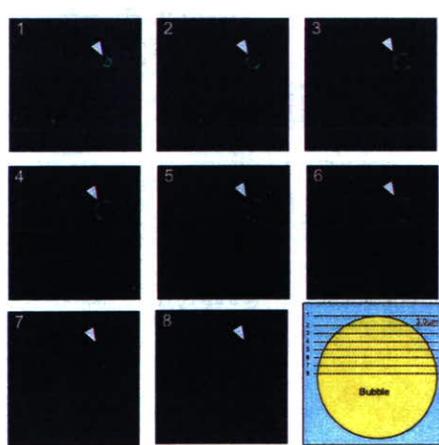


図7 共焦点レーザー顕微鏡観察像 (蛍光蛋白Keima標識混合バブル)

3-3 三次元癌モデルを用いたanti-CD147抗体標識バブルの集積性および超音波イメージング

三次元癌モデル（図9）を用いて、anti-CD147抗体標識バブルの肝癌細胞（FLC-7）への集積性とその超音波分子イメージングを行った。抗体標識バブルは選流10～20分で腫瘍細胞に集積し、超音波のコントラストハーモニックエコーモードで明確に画像化することができた（図10a）。一方、市販の造影剤では腫瘍内への集積性は認められなかった（図10b）。

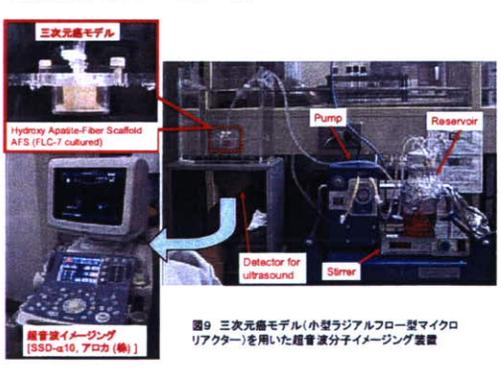


図9 三次元癌モデル (小型ラジアルフロー型マイクロリアクター) を用いた超音波分子イメージング装置

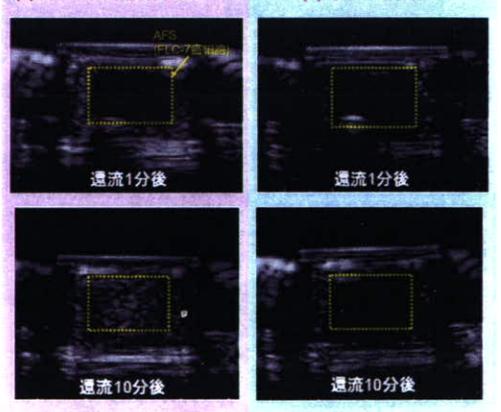


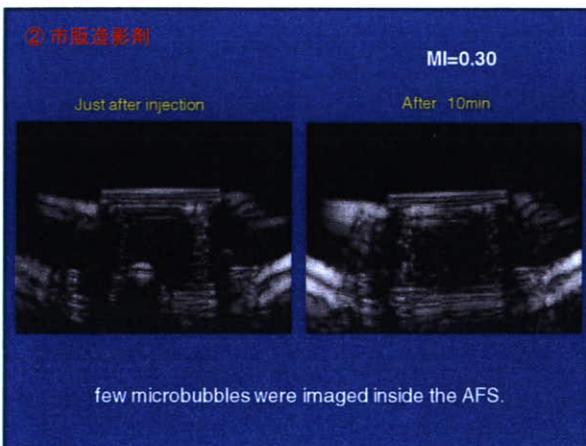
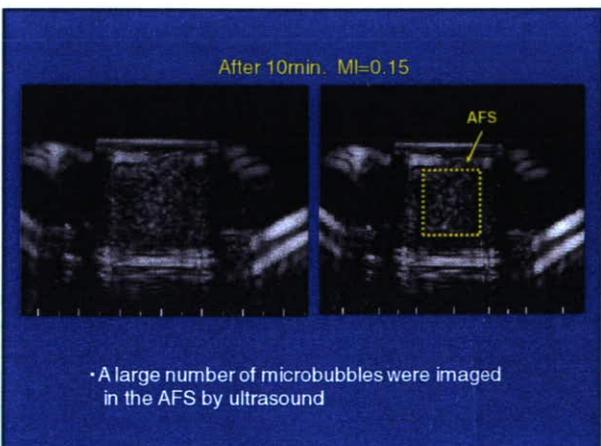
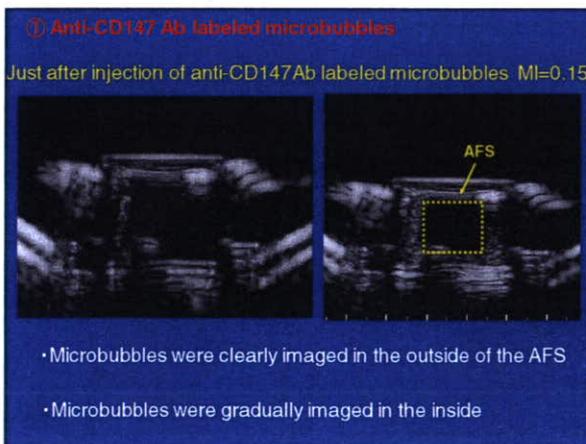
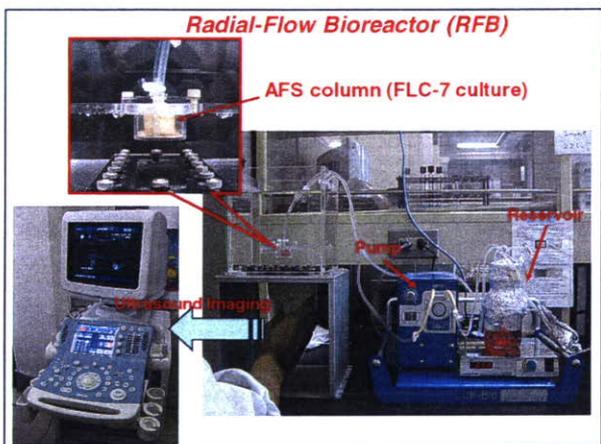
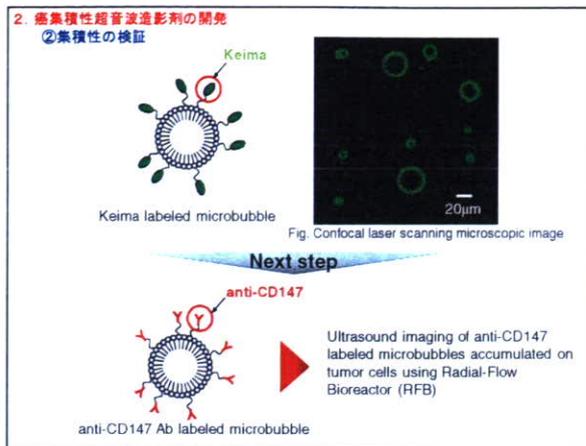
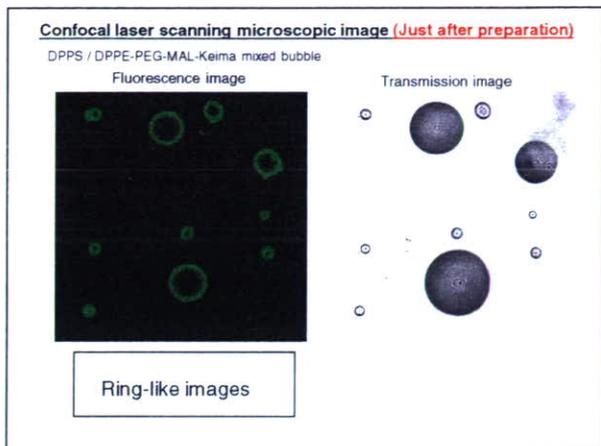
図10 三次元癌モデルにおける超音波分子イメージング

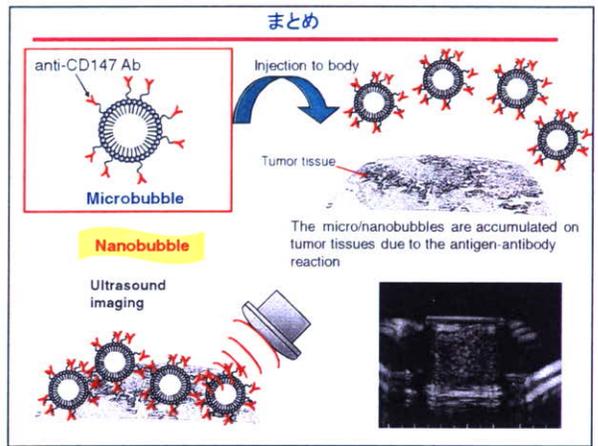
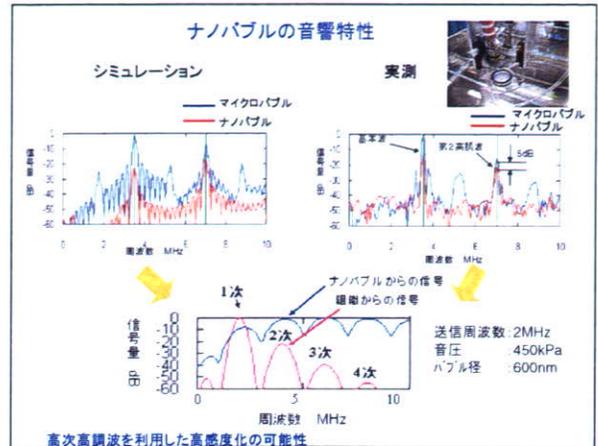
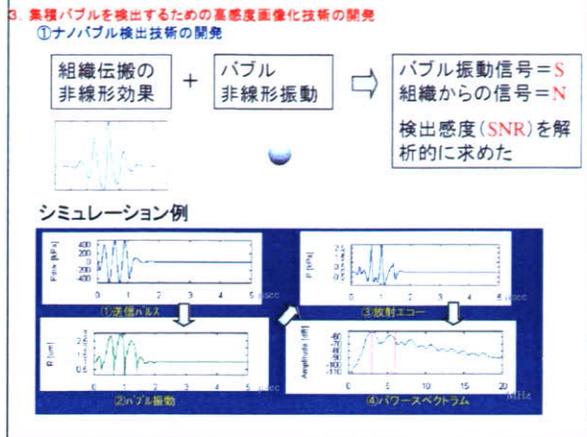
4. まとめ

- 1) 生体安定性に優れた新規界面活性剤によるナノバブルの調製し、超音波診断装置による画像化に成功した。
- 2) anti-CD147抗体を結合させたPEGリン脂質を用いることにより、微小気泡界面に抗体を標識した。
- 3) ラジアルフロー型マイクロリアクターによる三次元癌モデルを用いた超音波分子イメージング実験を行ったところ、anti-CD147抗体標識バブルは腫瘍細胞へ集積し、超音波により明確に画像化することができた。

5. 今後の取り組み

- 1) 臨床応用可能で分散安定性に優れたマイクロ・ナノバブルを作製し、最終的には10名ほどのボランティアに投与して安全性の確認を行う
- 2) 腫瘍細胞への位置選択的な集積を行うために、抗体だけでなくアプタマーを標識させた微小気泡の調製を行う
- 3) 腫瘍治療が可能な独自の治療法を確立し、超音波診断と治療を一体化させたシステムの構築を目指す





- 超音波分子イメージングの実用化に向けて —
- 今後の取り組み
1. プローブ標識集積性超音波造影剤の実用化
 2. ナノバブル作製法の確立と簡便化
 3. 3次高調波検出超音波診断装置の開発
 4. 治療への応用

(様式1)

財団法人医療機器センター
外国人研究者招へい事業
(医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究)

研究実績報告書

1. 招へいされた外国人研究者

所属・職名：シドニー大学・顕微鏡および微量分析のためのオーストラリアキー
センター・電子顕微鏡ユニット・准教授/ディレクター代理 (博士)

Australian Key Centre for Microscopy & Microanalysis,
Electron Microscope Unit. The University of Sydney

Associate Professor/Duputy Director

(BClin Chem BSc MSC PhD BioMed Sc)

氏 名：フィリップ セレスタ ピエール ブラット

Filip Celesta Pierre Braet

2. 受入研究者

所属・職名：東京慈恵会医科大学・講師

氏 名：松浦 知和

3. 招へい期間：平成19年11月11日 ~ 平成19年11月23日 (13日間)

4. 研究課題：3次元癌転移浸潤モデルにおける抗CD147抗体ラベルマイクロバブル
集積性の微細形態学的検討 - マイクロX線CTを用いた解析 -

5. 研究活動の概要

①11月12日(月曜日)：分担研究者・松浦知和、協力研究者・永妻啓介
(日本人研究者派遣事業により平成19年7月24日より11月1日までシドニー
大学に派遣、協力研究者)、酒井俊郎(協力研究者)とマイクロX線CTによる
解析結果に関して討議した。(東京慈恵会医科大学)

②11月13日(火曜日)：平成19年度厚生労働省科学研究費補助金(医療機器
開発推進事業：ナノメディシン研究)大川班第2回会議(参加者は主任研究者
大川清以下20名)へ参加し、分担研究者・協力研究者の結果発表(英語)を
聴取後討議した。会議後、Braet博士のセミナー(演題名：From live cell imaging to
advanced molecular microscopy techniques:bridging the temporal and

spatial resolution gap)。(東京慈恵会医科大学)

③11月15日(木曜日):特定非営利活動法人(NPO)総合画像研究支援(Integrated Imaging Research Support, IIRS)との協議。Braet博士より、Australian microscopy & microanalysis research facility (AMMRF)の組織構成、活動に関して説明があった。IIRSの活動の一環として、12月に大隅理事長と峰雪先生がAMMRFを視察することになった。参加者:大隅正子理事長(日本女子大学名誉教授)、山科正平理事(北里大学名誉教授)、幡場良明研究所所長、山口英世帝京大学名誉教授、峰雪芳宣兵庫県立大学大学院教授、和気健二郎東京医科歯科大学名誉教授、土屋好司(流動研究員)、斉藤勝也(協力研究者)、松浦知和(分担研究者)。(日本女子大学)

④11月20日(火曜日):標識マイクロバブル還流実験。(東京慈恵会医科大学) 実験終了後、セミナー(演題名:The liver sieve seen through the eyes of multidimensional correlative imaging techniques)。参加者:織田正也国際医療福祉大学教授以下約40名。(国際医療福祉大学山王病院)

⑤11月21日(水曜日):日本電子(株)(東京都昭島市)訪問。吉田日本電子(株)部長、永妻啓介(協力研究者)と透過型電子顕微鏡によるTomographyに関して討議。

⑥11月22日(木曜日):日立ハイテクナノテクノロジー事業本部那珂事業所(茨城県ひたちなか市)訪問。多持隆一郎統括主任技師、中沢英子主任技師、今野充技師、二村和幸部長代理より、主に高分解能SEMおよび簡易SEMに関して説明があり、土屋好司(流動研究員)と松浦知和(分担研究者)も加わって討議した。

⑦他の滞在日は、報告書の作製、意見交換でBraet博士が提示した資料の収集、AMMRFとの連絡等に時間を費やした。

6. 研究活動の成果

今回の Filip Braet 博士招聘では、平成 18 年度の招聘時に決定された「3次元癌モデルを用いたマイクロ・ナノバブル集積観察のためのマイクロ X 線 CT の応用」に関する実験結果(途中経過)の報告、また、今後の研究計画を立てることである。

① マイクロ X 線 CT での 3 次元癌モデルの観察

マイクロ X 線 CT は空間分解能が $5\mu\text{m}$ で、材料ばかりでなく生物組織を簡易に wet tissue のまま観察できる。また、専用再構築ソフトで 3D 画像として観察できる。今回観察したのは、以下の 3 種の標本である。

- 1) 肝臓オルガノイド、3次元癌モデルを作製するための、水酸アパタイトファイバースキャフォールド(AFS)カラム
- 2) 肝臓オルガノイドに市販の単分散リン脂質マイクロバブル(商品名ソナゾイド)を還流した標本

3) 肝臓オルガノイドに金ナノ粒子標識リポソームを還流した標本

標本1は平成18年の招聘時にBraet博士がシドニー大学に持ち帰った標本、標本2、3は還流実験を日本で行い、2%グルタルアルデヒドで還流固定後、シドニー大学に送付した標本である。標本2、3に関しては、オスニウム酸で浸漬固定を1週間行った後、マイクロX線CTで撮影し、データを取った。オスニウム酸溶液に長時間浸漬するのは、組織のX線でのコントラストを明瞭にするためである。その後、脱水して乾燥後SEM観察を行った。一部は、脱水後樹脂包埋し、超薄切片を作製し、TEMで観察した。

標本1に関しては、マイクロX線CTによる3次元再構築まで行われており、詳細な3次元画像に関して報告があった。200 μ m前後のマクロポアがAFSカラムに網目状に開いているのが観察された。標本2、3に関しては、マイクロX線CTでの撮影は終了しており、組織化した肝臓オルガノイドがX線フィルムとして提示された。3次元再構築および質的解析は今後行う予定である。以上から、肝臓オルガノイドおよび癌転移モデルをマイクロX線CTで観察することが可能となった。

また、標本2、3のSEMおよびTEM像に関して、提示があった。標本2では単分散リン脂質マイクロバブル(ソナゾイド)が、肝臓オルガノイドの還流側の血管内皮細胞に取り込まれている像が観察された。また、バブルが破裂して生じたリン脂質の遺残物と思われる電子密度の高い物質が内皮細胞の還流側に集ぞくしている像が観察された。標本3では、細胞の破壊がめだち、残った細胞には多くの金粒子を認めた。

② 今後の共同研究

今後、標本2、3のCT画像を3次元に再構築し、組織の血管用構造と実質の関係、金粒子の集積状態など検討する。

最終的には、肝臓オルガノイドに癌細胞を還流し、転移モデルを作製する。そこに新規抗CD147抗体標識バブルを還流し、その集積や抗体の癌転移部への集積をマイクロX線CTで観察する。バブルそのものを固定後観察することは困難なので、金ナノ粒子をダブル標識してCTで観察する。

今回Braet博士が滞在中、癌細胞(ヒト肝癌細胞FLC-7)のみの3次元癌モデルで、抗CD147抗体標識バブルの集積実験を行った。還流実験後、固定し標本4としてシドニー大学に送付した。

③ Braet博士からの提案

抗CD147抗体標識バブルが癌部に集積しているか確認する方法として、超音波で観察するとともに、バブルに蛍光物質(蛍光蛋白)をダブル標識して観察することを提案された。現在、近紫外蛍光物質をバブルに標識する方法を検討しており、標識できれば近赤外蛍光検出画像化装置で、3次元モデルを還流条件下で観察する。

④ AMMRFと日本の提携

平成 18 年度の招聘時、Braet 博士よりオーストラリアの Nanostructure Analysis and Network Organization (NANO) の紹介があった。ナノテクノロジーに関わる材料、ナノバイオロジーに関わる生物の観察、分析を、5 大学が集約して行う組織であり、研究のサポート、共同研究、ナノテクノロジーに関わる教育を行っている。本年 7 月には 8 大学の共同組織となり、AMMRF として発展的に改組されている。日本でも、組織の集約化と研究・教育レベルアップは必要であり、大隅正子日本女子大名誉教授が主催される NPO の IIRS がその先鞭をつけている。今回の Braet 博士の招聘に際し、大隅教授からの強い要望があり、Braet 博士より AMMRF に関して説明いただき、討議した。この時、12 月に大隅教授と峰雪教授が AMMRF の本部のシドニー大学とブランチであるクイーンズランド大学を訪問することが決まった。今後の日本のナノテクノロジーやナノバイオロジーの発展のためにも AMMRF の組織を直接目にし、さらに提携を深めることは、重要な一歩である。

- * 12 月には、両教授は、Braet 博士の仲介により AMMRF の若き Executive Director and CEO の Simon P. Ringer 教授とシドニーにおいて、今後の提携等について前向きな話し合いをもつことができた。なお、Ringer 教授は東北大学で 2 年間学んでおり、日本語も理解できたとの事。

財団法人医療機器センター (JAAME)
外国人研究者招へい事業
活動レポート (2007年11月11日-11月23日)

The Australian Microscopy & Microanalysis Research Facility (AMMRF)
Australian Key Centre for Microscopy & Microanalysis
The University of Sydney

Filip Braet

ELECTRON MICROSCOPE UNIT
People, Research Services, Programs & Training



Headquarters of the Australian Microscopy & Microanalysis Research Facility
Australian Key Centre for Microscopy & Microanalysis

JAAME Activity Report 11 Nov – 23 Nov 2007

 The University of Sydney

Filip Braet



1) 研究の背景と目的

2006 年秋、JAAME によって日本に招へいされ、東京慈恵会医科大学・大川清教授を主任研究者として遂行されている「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」に関して討議した。討議した主題は、この研究で開発された癌集積性マイクロ・ナノバブルが果たして、生体内のマクロファージや腫瘍血管といったバリアを通過して、腫瘍そのものに到達し、集積するかという問題である。バリアに捕捉されたり、通過を阻害されることのない集積性バブルの開発が必要であり、このため、バイオリクターを用いた 3 次元癌モデルに開発した集積性マイクロ・ナノバブルを還流して検証することにした。観察方法として討議の結果、マイクロ X 線 CT を用いて解析し、その後、走査型電子顕微鏡 (SEM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) での観察を同時に行うことにした。2007 年 8 月末から 11 月はじめまで、JAAME の外国への研究者派遣事業によって、永妻啓介氏がシドニー大学にて、東京で還流実験を行った 3 次元腫瘍モデルの固定標本を持ち込み、上記の解析を私の指導のもとに行った。今回、2007 年秋の JAAME による招へいによって、

この1年間に行った共同研究の結果を確認し、討議することで、今後の方向性を決めることとした。また、班会議でプロジェクト全般に関する理解を深めるため、実際の還流実験にも参加した。

2) 永妻啓介先生 (JAAME の外国への派遣事業による) のシドニー大学での研究結果

図1に示すように、グルタルアルデヒド固定後、オスニウム酸で長期固定すると、マイクロX線CTで、微細形態を詳細に観察できる。この手法で、まず私とCarinaおよび永妻は、3次元癌モデルの培養カラムに装填する水酸アパタイトファイバースキャフォールド (AFS) カラムを観察した。図2に示すような3次元画像を再構築でき、有孔率も測定できた。

2006 X-Ray Micro CT Research On Liver Tissue

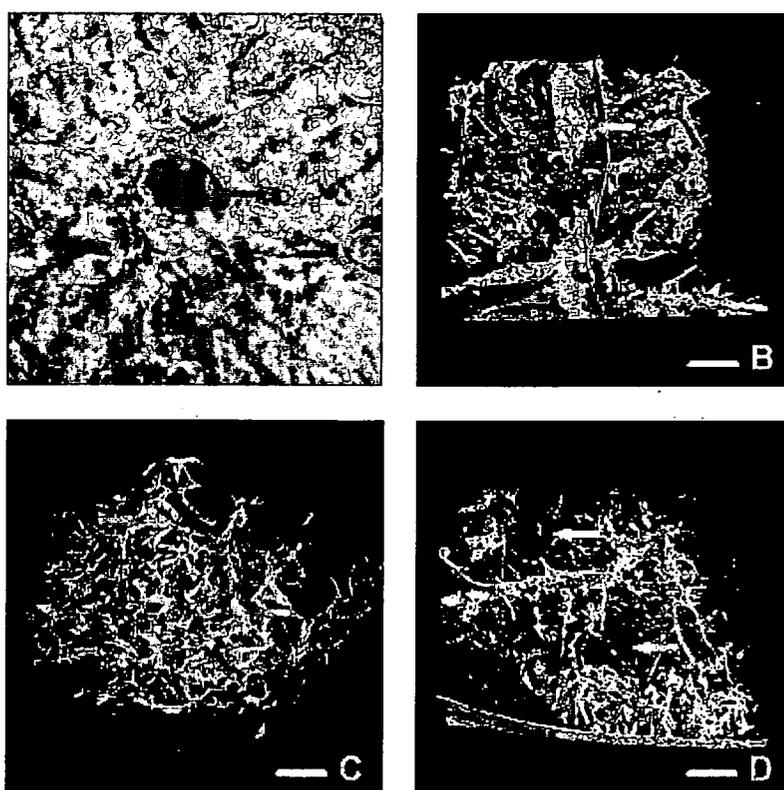


図1.
マイクロX線CTで
の肝臓への癌転移像

Braef F, Nagatsuna K, Saito M, Sook L, Wisse E, Matsuura T. The hepatic sinusoidal endothelial lining and colorectal liver cancer metastases [Editorial] [Editorial Commentary pg. 824]. *World J Gastroenterol* 2007;13:821-825.