

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17-19年度 総合研究報告書

平成17年度	28,761,000 円
平成18年度	24,447,000 円
平成19年度	24,447,000 円
予算総額	77,655,000 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 (平成18・19年度) -----	13
	(資料2) ナノメディシン研究成果発表 (平成17～19年度) -----	16
	(資料3) 外国人研究者招へい事業2006 (Dr.Filip Celesta Pierre Braet) -----	26
	(資料4) 外国人研究者招へい事業2007 (Dr.Filip Celesta Pierre Braet) -----	39
	(資料5) EMU Newsletter : International Collaborative Partnership between the AMMRF and IIRS -----	61
	(資料6) 外国への日本人研究者派遣事業 研究実績報告書 -----	62
	(資料7) 関連会議 (平成17～19年度) -----	72
II.	分担研究報告 -----	81
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 -----	85
	大川 清、朝倉 正、青木勝彦	
2.	細胞内在性 RNA アプタマーの標的 RNA 結合タンパク質の同定及び相互作用の機能解析 ---	91
	松藤千弥、堀谷 学	
3.	超音波内視鏡下穿刺吸引細胞・組織診 (EUS-FNA) の有用性と 採取組織の CD147 の発現に関する研究 -----	96
	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 -----	98
	石橋由朗	
5.	子宮頸部腫瘍における CD147 発現解析 -----	100
	山田恭輔、上田 和	
6.	新規界面活性剤の安全性・毒性の検討動物実験のためのマウス CD147 認識抗体の作製 --	102
	日下部守昭	
7.	<i>In vitro</i> 3次元微小腫瘍モデルの作製に関する研究 -----	106
	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 -----	112
	松浦知和、相澤 守、永妻啓介、Filip Braet	
9.	新規界面活性剤を用いたナノバブルの調製および 抗 CD147 抗体標識微小気泡の超音波分子イメージング -----	118
	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 -----	125
	伊藤貴司、射谷和徳、赤羽陸弘	
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 ---	131
	宮本幸夫、射谷和徳、土屋好司、西岡真紀子、中田典生	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	135
IV.	研究成果の刊行物・別刷 (別刷29冊タイトル頁のみ、日経産業新聞2008年2月1日) --	145

# 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

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。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、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、消化管間葉腫瘍 (GIST) や子宮癌の手術摘出標本で、CD147 の発現を免疫組織化学的に確認した。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、本プロジェクトで開発した新規界面活性剤より、200-600nm のナノバブルを作製することができた。また、従来のリン脂質を界面活性剤として、リン脂質に PEG 鎖を介して抗体を結合させ、抗 CD147 抗体を標識したマイクロバブルを作製した。3次元癌モデルを用いた標識マイクロバブルの還流実験では、バブルの癌への集積を超音波画像として確認できた。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た。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。この結果、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 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 明治大学理工学部 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 東京理科大学理工学部 教授

酒井秀樹 東京理科大学理工学部 准教授

### 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。

食道癌:早期食道癌の内視鏡切除例62例で、免疫組織化学的に検討した。

子宮内膜癌:子宮内膜癌39例を免疫組織化学的に評価し、染色強度のスコアリングと病理学的悪性度との比較を行った。

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)、消化管粘膜下間葉系腫瘍(GIST)2例、leiomyoma3例、scwannoma1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)をスキヤ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。

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(商品名ソナゾイド)を還流した3次元培養モデルの微細形態の解析:超音波造影剤検定のための3次元還流培養モデルを、ラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)を用いて作成した。不死化マウス肝細胞、血管内皮細胞、伊東細胞をRFBで共培養し、血管様構造を持つ肝臓オルガノイドを作成した。そこに超音波造影剤として臨床で用いられている単分散リン脂質マイクロバブル(商品名ソナゾイド)を還流したもの、及び同様の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ものの2検体を用い、肝臓オルガノイド内の血管と集積したバブル、及びリポソームとの関係をX線マイクロCTで観察した。

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)、ドキシソルピシン(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。

CD147認識アプタマーの作製(松藤千弥、大川清):CD147の検出感度を向上させるために、MAb12C3抗体よりも高親和性のRNAアプタマーの作成を試みた。60塩基のランダム配列の

両端に特異的なプライマー配列を有する、3 種類の DNA プールを用意した。5x10<sup>14</sup> 分子の RNA を初期プールとして、CD147 に結合する aptamer の選別を行った。

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。

高感度検出アルゴリズムの検討：実験結果とバブル膜の振動シミュレーターによる解析結果とを比較し、妥当性を検証した。シミュレーションを用いて、ナノバブルに各種条件の超音波を送信し、対組織信号比 CTR が最大となる送信方法と検出アルゴリズムを開発した。

高次高調波を利用した画像化装置の試作：シミュレーションによる解析によって、低周波送信でバブルを大きく振動させ、その時発生する高次高調波を利用することで、高い検出感度を得られることが推察された。低い周波数で送信するための振動子と高次高調波を受信するための振動子を独立させた探触子を設計し、バブルからの高次高調波を画像化する実験装置を試作する。試作した実験装置を用いて、ナノ及びマイクロバブルの検出感度（対組織信号比）を測定し、従来技術と比較する。

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。

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（大川清、阿部正彦、酒井秀樹、土屋好司）：抗 CD147 抗体のモデルとして、蛍光蛋白質 Keima を結合した PEG リン脂質を添加した混合バブルを調製し、その分散溶液の共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。

三次元癌モデルを用いた抗 CD147 抗体標識バブルの超音波分子イメージング（射谷和徳、土屋好司、松浦知和）：抗 CD147 抗体標識バブルを調製し、三次元肝癌細胞モデルを用いてヒト肝癌細胞 FLC-7 への集積性について検討した。

## C. 研究結果

### ①CD147の臨床的意義とその捕捉

食道癌におけるCD147の意義：CD147を多く発現する癌は、腫瘍径が大きく、深達度の深い癌に多いことが終了した。

子宮内膜癌における意義：子宮内膜癌 39 例中 38 例 (97.4%) にCD147が陽性であった。

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。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。

### 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、類洞様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IC50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FcHの安定発現株を得た。培地中に分泌されたCD147-FcHはNi-NTAカラムとProteinA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。

X線マイクロCTによる観察では、ソナゾイド、金ナノ粒子標識リポソームともに、水平断で200-300 $\mu$ mの均一な間隙を認め、冠状断では、スキャフォールドであるアパタイトファイバーと微細な血管構築が観察された。TEM、SEMでは、ソナゾイドや金ナノ粒子標識リポソームの一部の粒子が細胞内に取り込まれていた。

### 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。

**抗CD147抗体標識バブルの調製:**微小気泡に抗体を標識するために、抗体活性リン脂質(DSPE-PEG-MAL)に抗体を結合させ、気泡の分散安定性を向上させるためにリン脂質としてSodium dipalmitoylphosphatidylserin (DPPS)を用い、抗体標識PEGリン脂質との混合微小気泡を調製した。抗体が実際に標識されているか直接観察することは困難である。このため、抗CD147抗体のモデルとして、蛍光蛋白質Keimaを結合したPEGリン脂質を添加した混合バブルを調製し、その分散溶液の共焦点レーザー顕微鏡観察を行ったところ、マイクロレベルの気泡界面にKeimaの蛍光を観察できた。

**標識バブルでの超音波分子イメージング:**小型ラジアルフロー型バイオリアクターによる三次元肝癌モデルを用いて、標識バブルの集積性を検討した。ハイドロキシアパタイトファイバークラム内でヒト肝癌細胞FLS-7を培養し、抗体標識バブル分散溶液をリザーバー中に注入して、ポンプで循環させたときの肝癌細胞集塊への集積性を超音波診断装置(SSD- $\alpha$ 10, アロカ(株)製)によって画像化したところ、標識バブルの集積性を超音波で確認できた。

**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ぼ回復した。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。

バブル振動のシミュレーション結果から、低周波数の超音波を利用することで、高次でかつ強い非線形信号が発生することが判明し、

高次高調波を利用することで高感度化の見通しが得られた。更に、低周波超音波を送信するための振動子と、高次高調波エコー信号を受信するための振動子を独立させた探触子を設計し、バブルからの高次高調波エコーを画像化する実験装置を試作した。直径600 nmのナノバブルにおいても第3次以上の高次高調波を検出することで、市販の超音波造影剤と同等の検出感度を得られることを検証した。

ソナゾイドの特性：ソナゾイドは、粒径  $2\mu\text{m}$  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 17 年度は子宮内膜癌で検討し、その発現と悪性度の関連を明らかにした。平成 18 年度は、超音波下肝腫瘍生検せ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 CD147 の発現を検討した。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 分子の臨床の場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 蛋白の大量精製を行った。平成 19 年度には、CD147 を認識するアプタマーを作製を開始し、いくつかのアプタマーを選別した。

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、その後微細腫瘍塊として、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を、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した。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 $2\mu\text{m}$ 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細胞に貪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、新規界面活性剤でマイクロ・ナノバブルを作製していく予定であるが、平成19年度はソナゾイドと同じフォスファチジルセリンを主成分とした抗CD147抗体標識バブルの作製を試みた。

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 $\text{SF}_6$ 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ため、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必要がある。

平成19年度は、抗CD147抗体標識マイクロバブルを作製し、それを3次元癌モデルに還流して、その集積性を超音波診断装置によって観察した。標識バブルは3次元癌モデルに集積し、その集積バブルからのエコーをコントラストモードで画像化することに成功した。

マイクロ・ナノバブルを高感度に検出のためには、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。

従来、ナノサイズのパブルを、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と考えられていた。しかし、ナノバブルの音響特性をシミュレーションと実測で解析したところ、比較的低い周波数(2MHz)の音をナノバブルにあてると、そのエコーの音圧はマイクロバブルに比較して1/10に低下するものの、高次高調波は減衰しにくいことが判明した。高い周波数の超音波(10MHz以上)の利用は、音波の減衰により深い所の検出感度が低下するが、集積ナノバブルであれば低い周波数の超音波で検出できるため、深部の集積を観察できる可能性が示唆された。

以上の検討から、3次高調波を検出するための超音波実験装置を試作し、ファントム実験でナノバブルが画像化できることを証明した。

## 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。CD147認識抗体を標識したマイクロ作製し、3次元癌モデルでその集積性を超音波で画像化した。さらに、ナノバブルが低い周波数の超音波を照射することで、高次高調波を分別することで観察しやすいことが明らかとなった。今後、生体内バリアー(マクロファージによる食食、血管壁など)通過性を高めた造影剤を開発が必要であり、集積バブルはナノバブルが検出上も優位であることが判明した。以上から、今後、抗CD147抗体あるいはCD147認識アプタマー標識ナノバブルの開発と、ナノバブル検出のための高次高調波検出コントラスト超音波診断装置の開発をあわせて実用化する意義が明確となった。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「超早期診断と低侵襲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、萌芽的の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
- 4) 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

5) 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

6) 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

7) The 9<sup>th</sup> International Symposium on Ultrasound Contrast Imaging, 2007年12月15-16日、大阪

8) 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

### 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

1-1) 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

1-2) 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

1-3) 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

1-4) 射谷和徳・特願2007-215654・超音波診断装置・アロカ株式会社

1-5) 射谷和徳・特願2007-318814・超音波診断装置・アロカ株式会社

1-6) 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

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18年3月20日

特願：2006-112666

1-7) 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

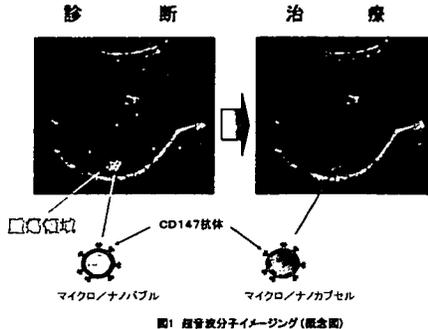
(資料 1)	経済産業省 (NEDO) 及びナノメディシン研究 ポスター発表 (平成 18・19 年度) ---	13
(資料 2)	ナノメディシン研究成果発表 (平成 17~19 年度) -----	16
(資料 3)	外国人研究者招へい事業 2 0 0 6 (Dr.Filip Celesta Pierre Braet) ----	26
(資料 4)	外国人研究者招へい事業 2 0 0 7 (Dr.Filip Celesta Pierre Braet) ----	39
(資料 5)	EMU Newsletter : Inernational Collaborative Partnership between the AMMRF and IIRS -----	61
(資料 6)	外国への日本人研究者派遣事業 研究実績報告書 -----	62
(資料 7)	関連会議 (平成 17~19 年度) -----	72



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、臨床現場で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。



## 2. 概要/目的

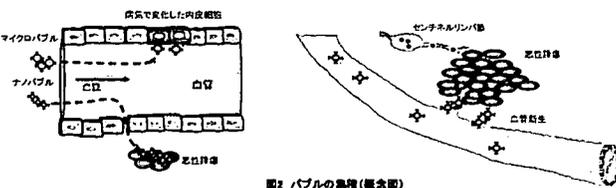
超音波分子イメージング技術では、目的分子捕捉性、選択性に優れた分子プローブと、分子プローブを高感度・高解像度に映像化する画像化技術が両輪となる。分子プローブ(バイオロジック・ケミカル)とその画像化技術(エンジニアリング)の開発を進めることで、トータルパフォーマンスの最適化が達成される。

微小気泡のサイズが、市販の造影剤の数 $\mu\text{m}$ 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。



## 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で単分散なナノバブル(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岡部グループで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。

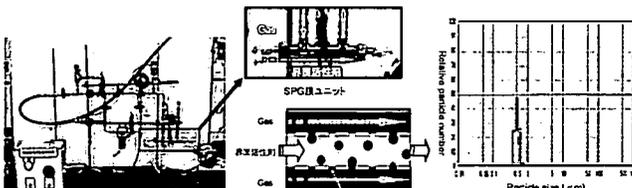
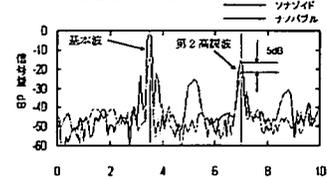


図3 SPG膜を利用したバブル発生装置(技術提供: 宮崎県工業技術センター)とその生成原理  
界面活性剤: 一定の濃度で攪拌し、そこに直径600nmの多孔質ガラスを投入する。発生するバブルの粒径は、多孔質の径、ガス圧、攪拌によって制御される。  
\*SPG: Shirusu Porous Glass

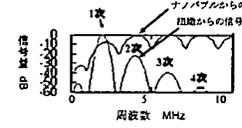
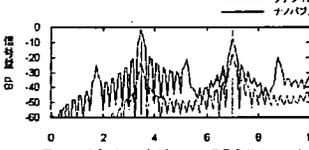
### 4-2 ナノバブルの検出感度

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。



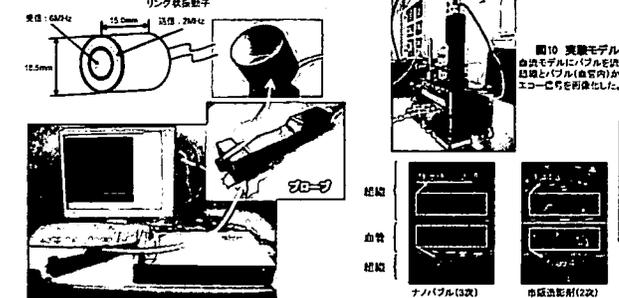
### 4-3 シミュレーション

バブル膜の振動を数値計算で求めるシミュレータを構築し、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励振し、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程度のCTR(対照信噪比)が得られる可能性が示唆された(図8)。



### 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 $\mu\text{m}$ )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、市販の造影剤と同程度の感度(図11)が得られることが実験によって確認された。



### 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映像化された。(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構築し、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構築する。
- 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応用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、薬効が生ず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、薬の代謝をイメージングするPET装置が、色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、経済性から一般病棟まで、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(薬)と選択的に結合可能な抗体を担持させることにより、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/ナノバブルの作成(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)。

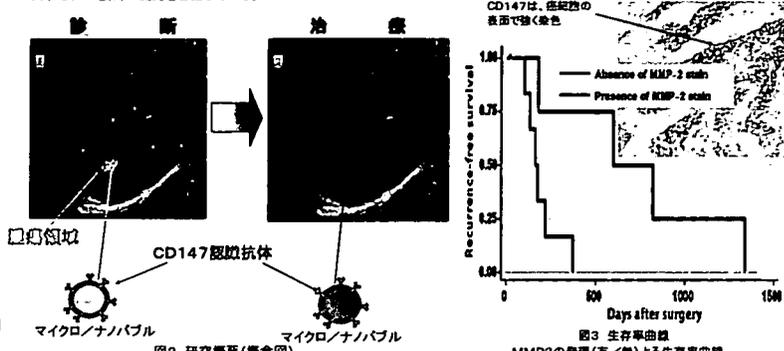


### 2. 研究概要/目的

本研究では、色の強弱マーカーであり、悪性度の高い癌に高集中度で発現する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)。

癌蛋白CD147はMMP-2を誘導し、癌の浸透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ものと期待される。

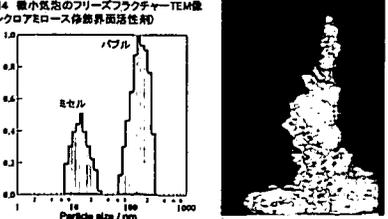
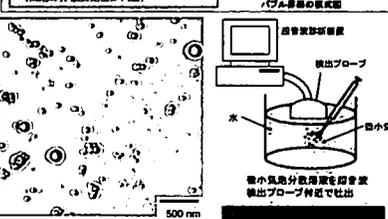
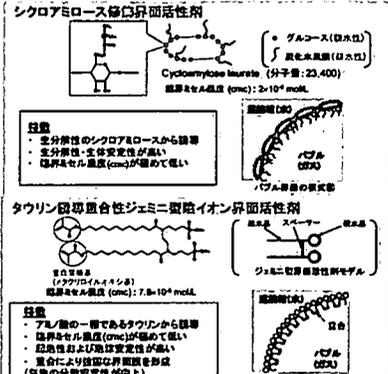
本研究では、生体安全性・生体安定性に優れたマイクロ/ナノメートルサイズの微小気泡に、CD147認識抗体を担持し、悪性腫瘍に特異的に集積された微小気泡を、超音波によってイメージングすることで、早期に悪性度の高い腫瘍を診断することを目的とする。また、CD147認識抗体を担持した微小気泡に薬剤を内包し、腫瘍特異的に集積させた微小気泡を超音波照射により破壊し、薬剤を放出するDDS技術の開発を目指している。



### 3. 研究成果

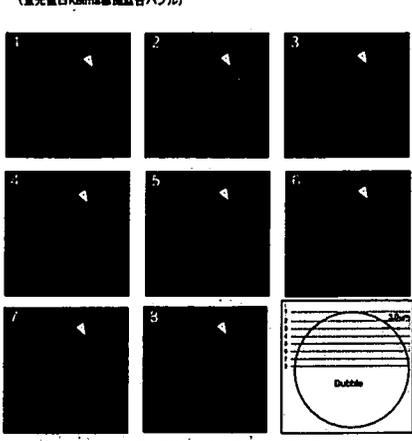
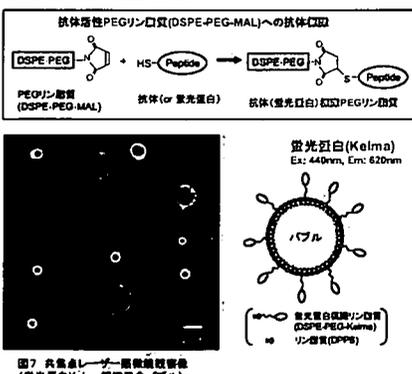
#### 3-1 マイクロ/ナノバブルの調製

共同研究者である東京理科大学阿部のグループでは、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)。



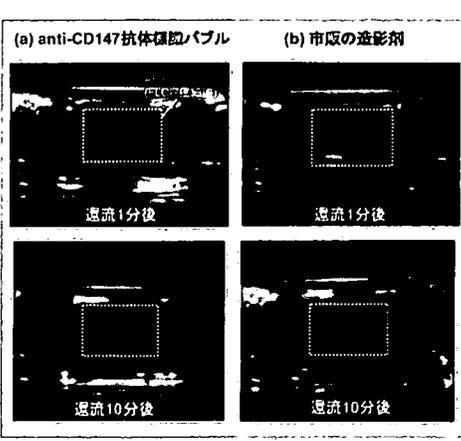
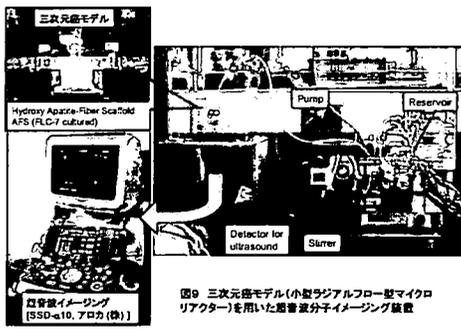
#### 3-2 微小気泡への抗体担持

CD147分子を高集中度で認識するモノクローナル抗体(anti-CD147抗体)を担持した微小気泡を調製した。anti-CD147抗体のモデルとして蛍光蛋白Keimaを担持した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が微小気泡の表面に担持されることが分かった(図7、8)。



#### 3-3 三次元癌モデルを用いたanti-CD147抗体担持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抗体担持バブルの肝癌細胞(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。抗体担持バブルは迅速10~20分で腫瘍内に集積し、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)。



### 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、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、微小気泡表面に抗体を担持した。
- 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て超音波分子イメージング実験を行ったところ、anti-CD147抗体担持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/ナノバブルを作成し、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担持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

平成17年度  
厚生労働科学研究費補助会  
萌芽的先進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)病変の浸透度・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(腫瘍病)

Continuous scan for 60 seconds

$$RFE(\%) = \frac{CI_{tumor} - CI_{liver}}{CI_{liver}} \times 100$$

Probability of Structural  
Time after Treatment (days)

Avascular Tumors (n = 38)  
MST: 293 day

神奈川県立がんセンター消化器内科  
政本隆博先生、大川伸一先生 提供

### 超音波内視鏡(EUS)①

Tumor  
Water-ghost  
総胆管

7.5MHz Curvilinear型 Aloka：下部胆管内の10mm程度の腫瘍。CT、MRIでは総胆管の拡張を認めずのみで、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検出

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

腫瘍領域  
薬剤の集中/放出

12MHz EUS専用機、肉眼鏡は0.7cm角腫瘍。EUSでは3層が連続し総胆管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、手術視察では癌は総胆管内にとどまり浸潤はなかった。5層(総胆管下層)の連続、4層の肥厚は造影総胆管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、  
治療技術を開発する。

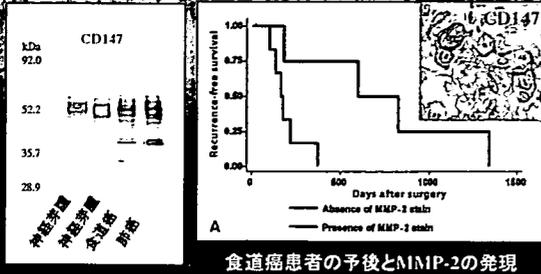
診断 → 治療 → 治療効果の判定

CD147抗体付与  
マイクロバブル

腫瘍領域  
薬剤の集中/放出

## 分子ターゲットとしての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。



## 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)

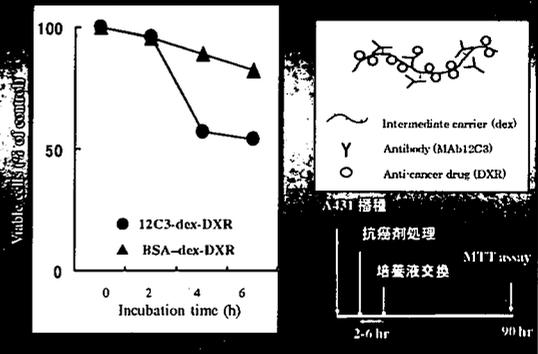
## 研究成果

### 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)



### 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

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**  
気液界面での空殻形成能が、それに対応する通常の型(一重層)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(真鍮)表面張力値を実現

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

↓

**新規複合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤の合成**  
複合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤  
+  
(NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H(タウリン、アミノ酸の一種))

新規複合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤の開発に成功  
(特許庁へ特許出願済/平成17年4月)

### 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) :  $7.8 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$  ... 通常の炭化水素系界面活性剤より低い値  
最低到達表面張力値 ( $\gamma_{\text{cmc}}$ ) : 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)

第2高調波 FFT解析

基本信号

マイクロバブル

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. デジタルシミュレーションの低減
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

### マイクロバブルの非線形振動のシミュレーション

① 入力波形  
② バブル振動  
③ 放射エコー  
④ 周波数解析

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による腫瘍マイクロバブルの検出
- 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 ■ 厚生労働省創薬事業 ■ NEDO創薬事業

