

日本超音波医学会 第40回関西地方会学術集会

第17回 関西地方会講習会

日時 / 2013年11月9日(土)

場所 / **大阪国際会議場**
(グランキューブ大阪)

〒530-0005 大阪市北区中之島5丁目3-51
TEL:06-4803-5555

<http://us40kns.umin.jp/>

会長 / 大崎 往夫

大阪赤十字病院 消化器内科

〒543-8555 大阪市天王寺区筆ヶ崎町5-30

TEL:06-6774-5111 FAX:06-6774-5131

Email: us40kans@osaka-med.jrc.or.jp

ナージチューブの留置を行った。

《結果》初期治療としてEUS-PCDを施行した13例中、内外瘻術9例、内瘻術3例、穿刺吸引術のみが1例であった。ドレナージのみで嚢胞が軽快・消失したのが11例、内視鏡的ネクロセクトミーを追加したのが1例であった。嚢胞内容物の液状化がなく、穿刺吸引術のみとなった1例は外科的ネクロセクトミーを施行した。合併症は、ステントの嚢胞内送込が1例、穿刺後の後腹膜血腫が1例であった。

《結語》EUS-PCDは、肺仮性嚢胞・WONに対して有効な治療法であるが、重篤な合併症も生じ得るため、適応を慎重に検討し、施行することが必要である。

【シンポジウム2】

座長：平井都始子（奈良県立医科大学中央内視鏡・超音波部）

前川 清（近畿大学医学部附属病院中央超音波診断・治療室）

「超音波診断の新たな展開 —新技術の導入及び新規領域への応用—」

SY2-1 Sonazoid を基盤とした分子標的気泡作成法の開発とその特性評価

大谷健太郎（国立循環器病研究センター研究所再生医療部）

《背景》近年、超音波造影剤である微小気泡の殻の表面に生体内抗原に特異的な抗体やペプチド、タンパクを結合させ（分子標的気泡）、炎症性血管病変・血栓・動脈硬化・新生血管などに特異的に気泡を集積させて画像化する超音波分子イメージングの開発が進んでいる。基礎研究においては数多くの分子標的気泡が利用可能であるが、臨床応用可能な分子標的気泡は未だ開発されていない。

《目的》本研究の目的は、本邦で臨床使用可能な超音波造影剤Sonazoidから分子標的気泡が作成可能か否かについて検討することである。

《方法と結果》Sonazoidの殻の構成成分であるホスファチジルセリン（PS）を足場として使用することで、Sonazoidの表面にIgG抗体やタンパク（Lactadherin：PSとインテグリン $\alpha v \beta 3$ との橋渡しタンパク）を付与できる可能性が示唆された。また、Lactadherinを気泡表面に付与することで、Sonazoidのインテグリン $\alpha v \beta 3$ 発現細胞への集積は有意に増加した。

《結語》Sonazoidを基盤とした分子標的気泡作成の可能性が示唆された。また、Sonazoid-Lactadherin複合体が新生血管に対する分子標的気泡になり得る可能性が示唆された。今後、*in vivo*実験により、その診断有用性について検討を行う予定である。

SY2-2 側頭動脈病変に対する血管エコーの有用性について

眞口浩敏¹、高坂仁美²、福住典子²、沖 都安²、久保田義則³
（¹北播磨総合医療センター神経内科、²神戸大学医学部附属病院検査部、³北播磨総合医療センター中央検査室）

《はじめに》超音波装置の進歩にともない、今まで検出困難であった領域への臨床応用がすすんでいる。血管領域においても、より体表に近い血管の評価が可能となった。今回、頭頸部領域の血管エコーの応用として側頭動脈エコーの有用性について報告する。

《側頭動脈観察の意義》側頭動脈炎を疑う場合や浅側頭動脈-中大脳動脈バイパス術を施行する際に、側頭動脈エコーは有用である。側頭動脈炎については、短軸像での血管全周性の低輝度肥厚像（hypochoic halo）が特徴的なエコー所見であり、診断に有用

である。また、側頭動脈炎の確定診断には側頭動脈生検を施行するが、生検部位や範囲の決定、その後の治療効果判定にもエコーを用いることができる。浅側頭動脈-中大脳動脈バイパス術は、浅側頭動脈頭頂枝または前頭枝、あるいはその両方の動脈を中大脳動脈と吻合させ血行再建させる手術であり、もやもや病や内頸動脈閉塞、中大脳動脈閉塞などの疾患で用いられる。側頭動脈エコーは浅側頭動脈の狭窄や閉塞の有無、術後血流の増加を確認するのに有用である。また、術後の場合は頭蓋内に流入する血流も観察することが可能である。

《おわりに》側頭動脈はエコーで評価可能な血管であるが、その観察法や臨床的意義はそれほど周知されていない。今回の報告により側頭動脈エコーの有用性について少しでも伝えることができれば幸いである。

SY2-3 エコートラッキング法による頸動脈の血管機能評価 — stiffness parameter β の臨床的意義 —

絵本正憲、元山宏華、稲葉雅章（大阪市立大学大学院医学研究科代謝内分分泌病態内科学）

《背景》エコートラッキング法による超音波法では、頸動脈などの局所動脈壁固有硬化度を示す stiffness parameter β （SP β ）を評価可能であるが、その臨床的意義に関する知見は限定されている。

《目的および方法》高精度エコートラッキングシステムを搭載した超音波診断装置（ProSound SSD 6500, ProSound F 75）を用いて、非糖尿病患者439名および2型糖尿病患者1528名において総頸動脈のSP β および同一部位のIMTを測定し、その臨床的意義を検討した。

《結果》非糖尿病患者のSP β は 10.5 ± 4.2 （SD）であり、年代とともに有意に上昇し、同年代では健常者に比し2型糖尿病、冠動脈疾患合併糖尿病の順により高値を示した。多因子補正による解析では、冠動脈疾患合併のオッズ比は、SP β 20以上単独群ではそれ未満群と比較して1.55倍、IMT 1.3 mm以上群のカットオフ値と組み合わせると3.12倍であった。SP β に対して、年齢、血圧、糖尿病はIMTと共通の関連因子であったが、女性、BMIは特異的な関連因子であった。また、透析患者の観察コホートでは、SP β はIMTとともに心血管死予後予測因子であった。

《結論》SP β は、動脈硬化の機能的変化を反映する有用なサロゲートマーカーのひとつであり、今後の前向き研究成果が期待される。

SY2-4 サルコイドーシスにおける障害心筋早期発見の試み — スペックルトラッキングを用いて —

折居 誠、平田久美子、谷本貴志、太田慎吾、山野貴志、猪野 靖、山口智由、久保隆史、今西敏雄、赤阪隆史（和歌山県立医科大学循環器内科）

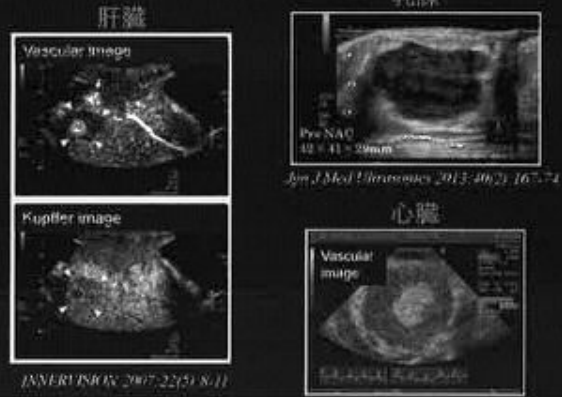
《目的》心サルコイドーシスの早期診断において、遅延造影心臓MRI（DEMRI）による障害心筋の検出が有用とされる一方、心エコーによる指標は確立されていない。我々は、局所的な壁運動を鋭敏に評価しうるスペックルトラッキング法を用い、早期の心病変を同定し得るかにについて検討した。

《方法》対象は既知の心病変を有さないサルコイドーシス42例（肺病変28例、皮膚病変11例、眼病変10例）、性別と年齢をマッチさせた正常コントロール10例。除外基準は、心病変を示唆する所見を有する症例およびDEMRI禁忌例。2Dスペックルトラッキングを施行し、左室16分画のradial（RS）、circumferential

Sonazoidを基盤とした分子標的気泡作成法の
開発とその物性評価

国立循環器病研究センター研究所 再生医療部
大谷 健太郎

造影超音波イメージング

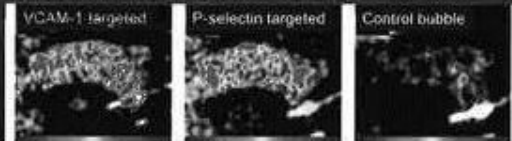


背景

微小気泡の表面に生体内分子に特異的な抗体・
ペプチドを接着させた分子標的気泡を用いた
超音波分子イメージングが広く行われている。

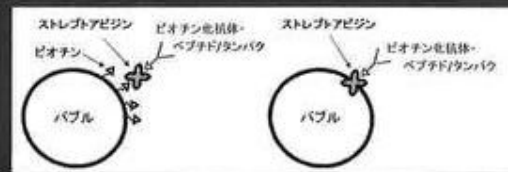
Thrombosis ES. J Nucl Cardiol 2008;15:576-86
Leong-Poi H. Cardiovasc Res 2009;84:190-200

動脈硬化性病変に対する超音波分子イメージング



Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010;30:54-9

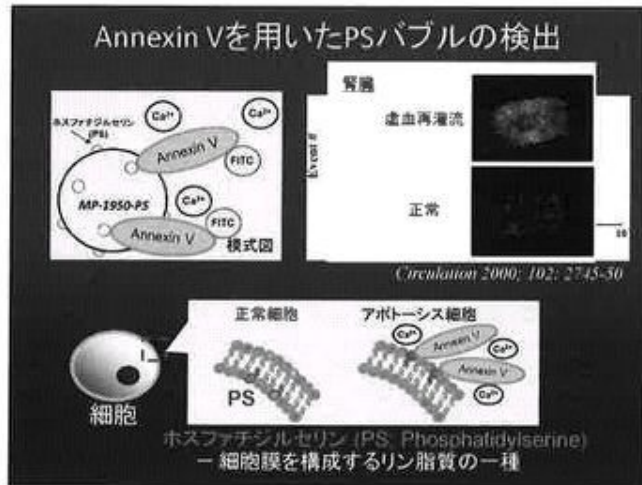
既報の分子標的微小気泡の代表例



アビジン-ビオチン結合:

非常に強い親和性と特異性を有しており、様々な研究に
利用されている。

→しかし、ビオチン化バブルの作成は容易ではない。



超音波造影剤 Sonazoid

- ・ 本邦で臨床使用可能な第二世代の超音波造影剤 (第一三共)
- ・ 肝腫瘍性病変、乳房腫瘍性病変に適応

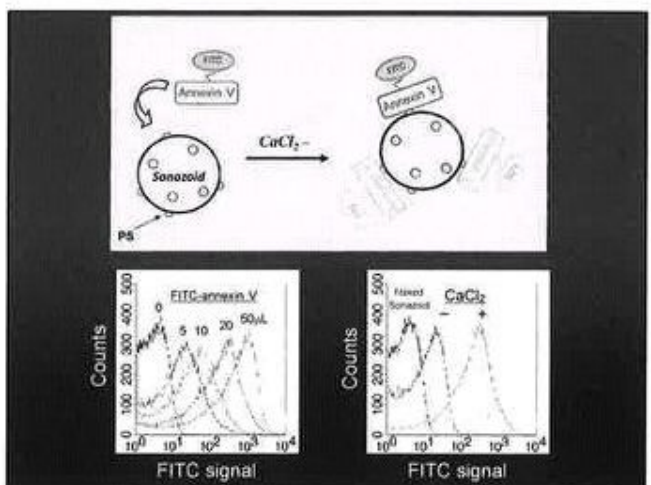
| 組成・性状 | |
|---------------------|----------------------------|
| 1バイアル中 | |
| ペルフルタン マイクロバブル含量 | 添加物 |
| 15μL | 水素添加型ホスファチルセリンナトリウム塩 0.2mg |
| | 精製白糖 181mg |

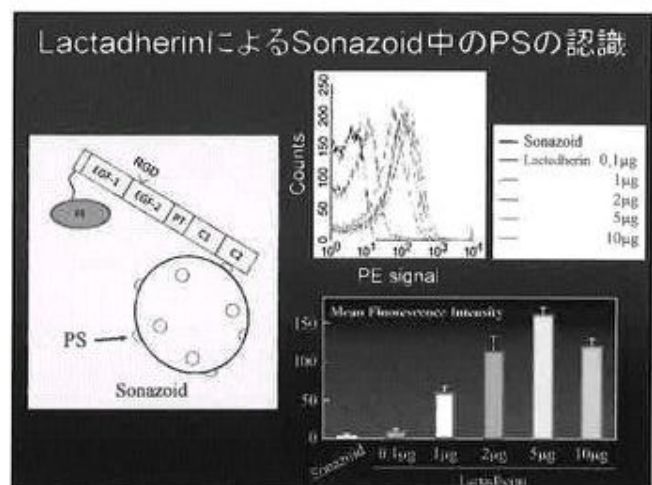
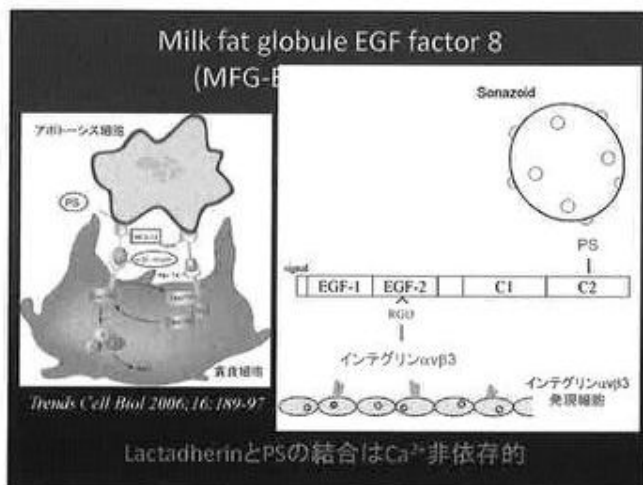
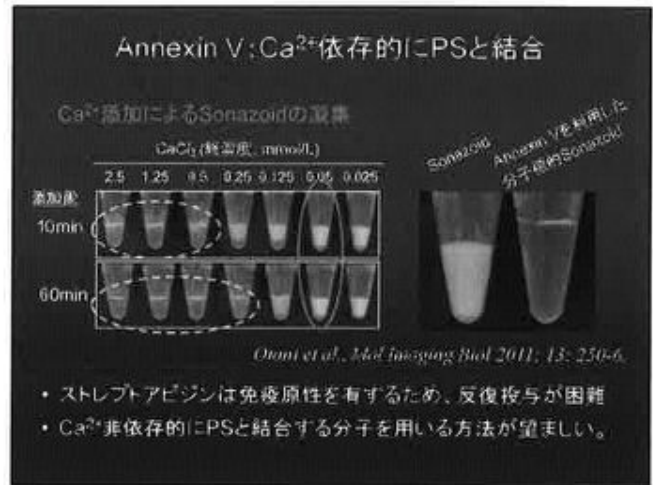
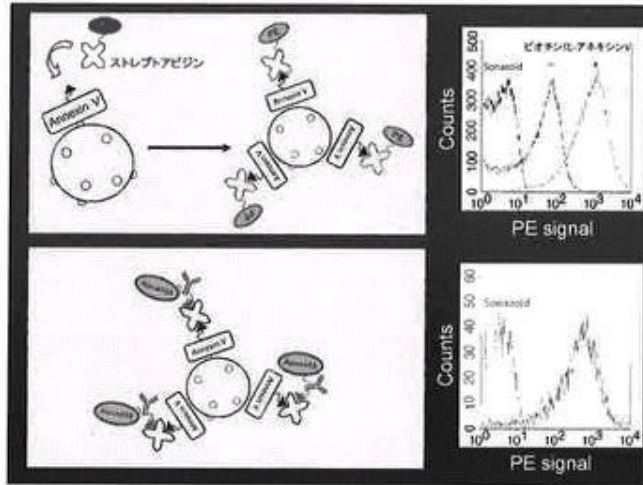
Ultrasound Med Biol 2008; 34: S24-33

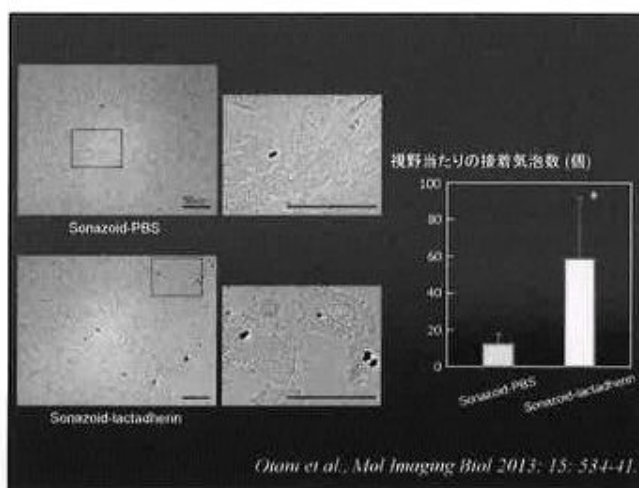
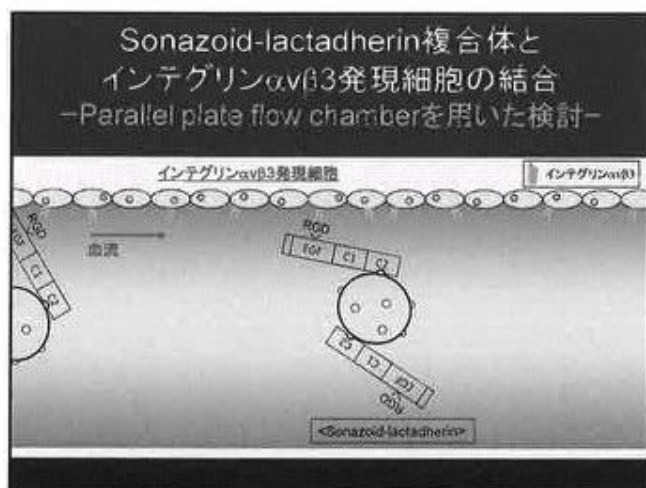
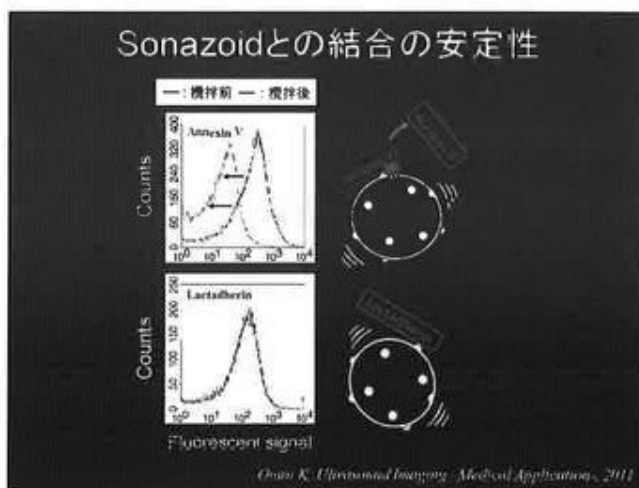
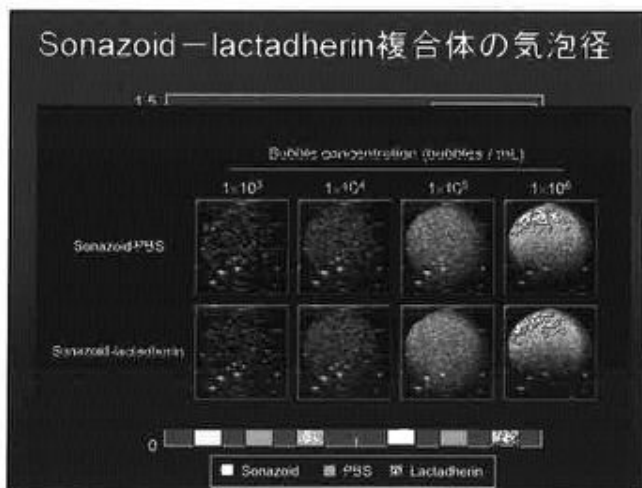
→ Annexin Vを利用することで、
Sonazoidから分子標的微小気泡の作成が可能?

目的

Sonazoidを基盤とした分子標的気泡作成の可能性を検討する







まとめ

- PSを足場として利用することで、Sonazoidの表面にIgG抗体やタンパクを付与できる可能性が示唆された。
- Sonazoid-lactadherin複合体形成による、気泡径の増大及び造影能の低下は認められなかった。
- Lactadherinの仲介により、Sonazoidのインテグリン $\alpha v \beta 3$ 発現細胞への接着数は有意に増加した。

将来の展望

腫瘍血管の分子イメージング

- ・ 悪性度の評価
- ・ 治療効果判定

インテグリン $\alpha v \beta 3$

新生血管の分子イメージング

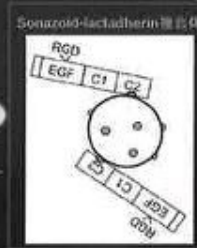
- ・ 再生医療の効果判定

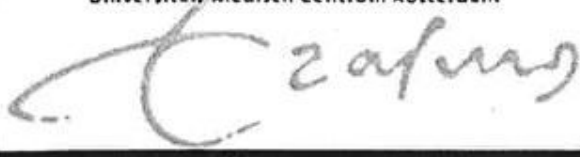
熱タンパクGP11b/IIIa

血栓の分子イメージング

- ・ 早期診断
- ・ 血栓溶解療法(?)

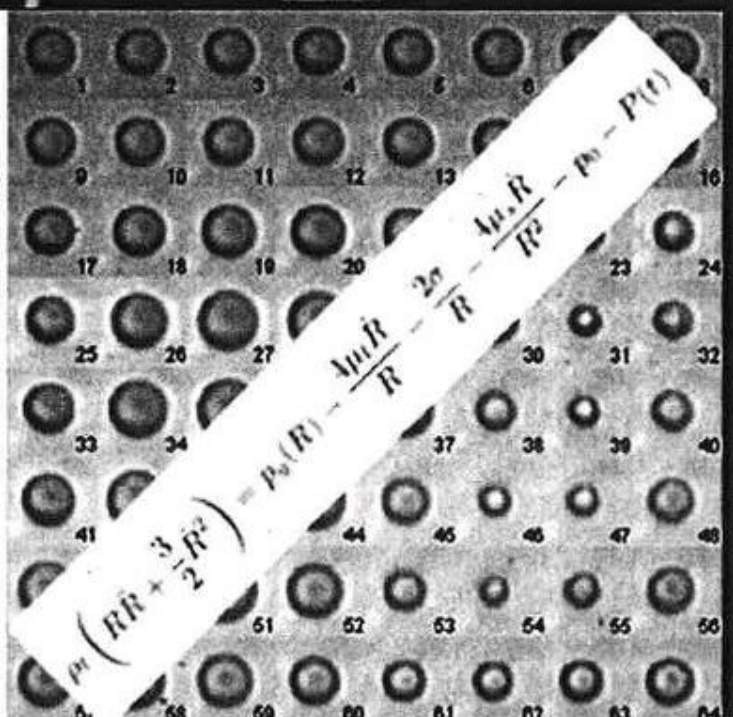
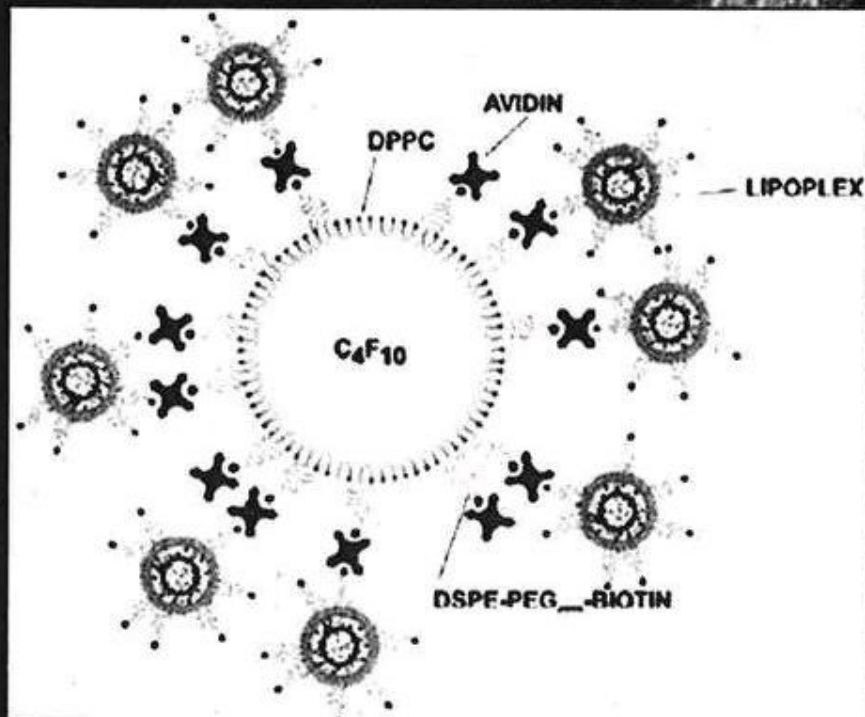
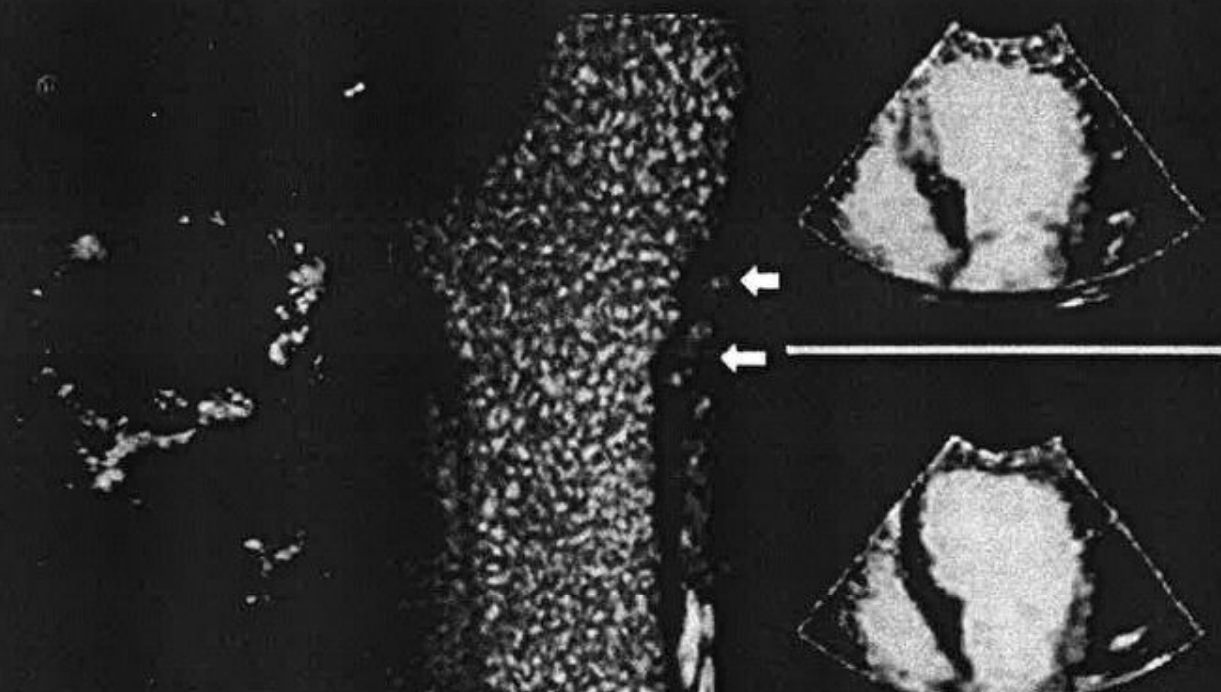
アビジン-ビオチン結合





The 19th European Symposium on Ultrasound Contrast Imaging

- An ICUS Conference -



Abstract book

January, 23-24 2014, Rotterdam, The Netherlands

Organized by Arend Sch—16— Edward Leen, Nico de Jong

Erasmus MC Rotterdam - Imperial College London

Development of integrin $\alpha\beta3$ -targeted microbubbles based on clinically available ultrasound contrast agent

Kentaro Otani

*Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering,
National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Japan*

Background and Aim

Phagocytosis of apoptotic cells is carried out through bridging of phosphatidylserine (PS)-expressing apoptotic cells and integrin $\alpha\beta3$ -expressing phagocytes with lactadherin. The aim of this study was to examine whether microbubbles targeted to integrin $\alpha\beta3$ could be produced by conjugating a PS-containing clinically available ultrasound contrast agent with lactadherin (**Figure 1**).

Methods

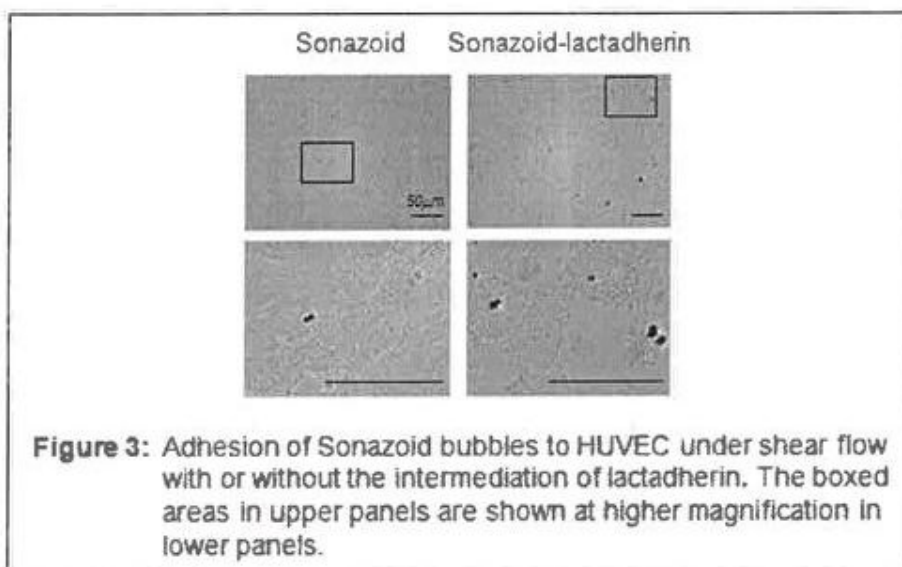
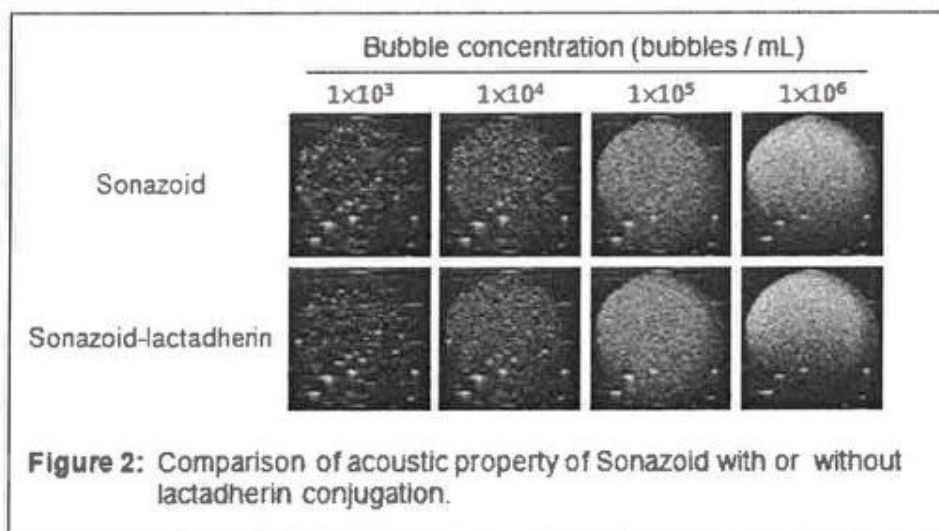
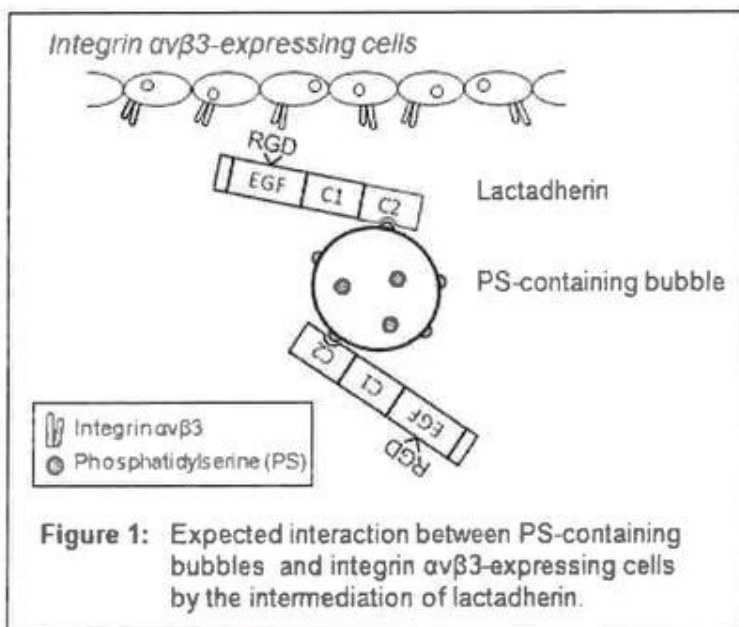
PS-containing perfluorobutane-filled microbubbles (Sonazoid) were incubated with R-phycoerythrin (PE) labeled-lactadherin, and the presence of PE-positive bubbles was examined by FACS analysis. Secondly, the attachment of lactadherin to integrin $\alpha\beta3$ -expressing cell (human umbilical vein endothelial cell; HUVEC) was also examined by FACS analysis. Finally, the adhesion of Sonazoid bubbles to HUVEC was examined using a parallel plate flow chamber. The number of adherent bubbles with or without the intermediation of lactadherin was compared.

Results

By increasing the dose of lactadherin, the number of PE-positive Sonazoid bubbles became larger. It was noteworthy that the mean diameter of Sonazoid bubbles did not change even after conjugating with lactadherin (2.90 ± 0.04 vs. 2.81 ± 0.02 μm). Furthermore, the acoustic property of Sonazoid bubbles was not influenced by the conjugation with lactadherin (**Figure 2**). The binding between lactadherin and HUVEC was also confirmed by the FACS analysis. The parallel plate flow chamber study revealed that the number of Sonazoid bubbles adherent to HUVEC was increased about five times by the intermediation of lactadherin (12.1 ± 6.0 to 58.7 ± 33.1 bubbles) (**Figure 3**).

Conclusion

Our study demonstrated that the development of integrin $\alpha\beta3$ -targeted Sonazoid bubbles could be feasible by the intermediation of lactadherin. Because integrin $\alpha\beta3$ is well-known to play a key role in angiogenesis, the lactadherin-bearing Sonazoid bubbles has feasibility as a clinically translatable targeted ultrasound contrast agent for angiogenesis.



Development of integrin $\alpha v \beta 3$ -targeted microbubbles based on clinically available ultrasound contrast agent

Kentaro Otani



Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering
National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Japan

Background

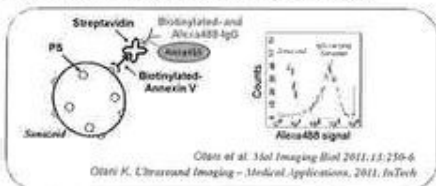
- Contrast ultrasound imaging with molecular-targeted bubbles enables the noninvasive visualization of molecular dynamics in situ.

< Clinically available bubbles in Japan >

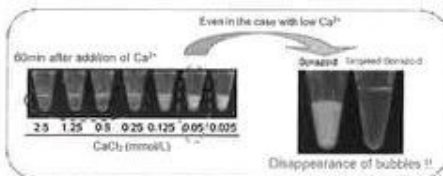
Sonazoid® (Daichi-Sankyo Co., Ltd.)

- is one of 2nd generation contrast agents.
- consists of perfluorobutane gas microbubbles stabilized by a membrane of hydrogenated egg phosphatidylserine (PS).

- We reported previously the feasibility of antibody-carrying microbubbles preparation based on Sonazoid by using annexin V and biotin-avidin complex formation.

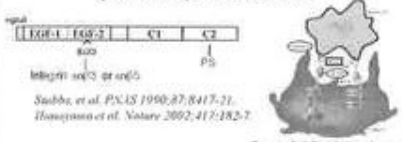


- However, the necessity of Ca^{2+} for achieving the binding between PS and annexin V markedly reduced the number of bubbles due to the significant aggregation.



- Additionally, the usage of biotin-avidin complex formation is a barrier for the clinical translation of molecular targeted-bubbles, because of the immunogenicity of streptavidin.

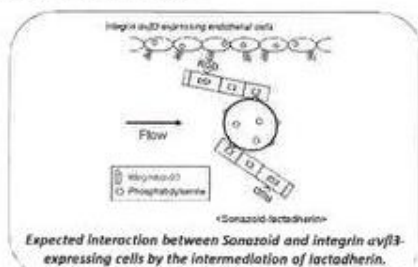
Milk fat globule EGF factor 8 (MFG-E8, lactadherin)



- a protein secreted from macrophages.
 - accelerate the engulfment of apoptotic cells.
- Binding between PS and lactadherin is Ca^{2+} -independent.

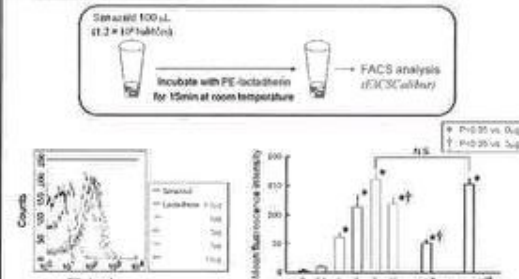
Aim

- We hypothesized that lactadherin has the potential to be a mediator between PS-containing bubbles and integrin $\alpha v \beta 3$ -expressing cells.
- The aim of this study was to examine whether microbubbles targeted to integrin $\alpha v \beta 3$ could be produced by conjugating Sonazoid with lactadherin.

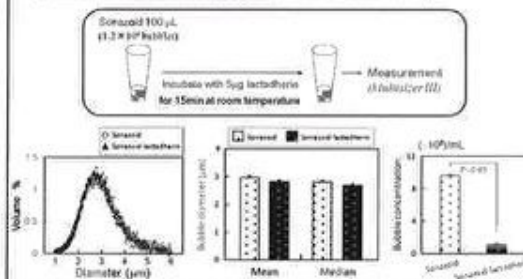


Methods and Results

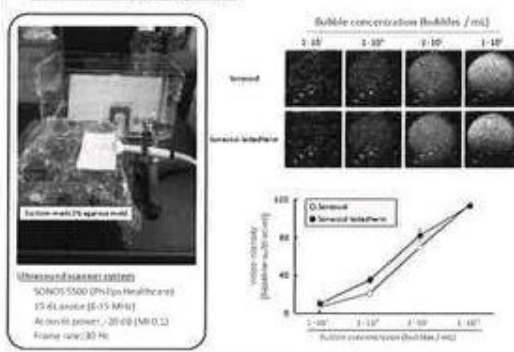
1) Binding between Sonazoid and lactadherin



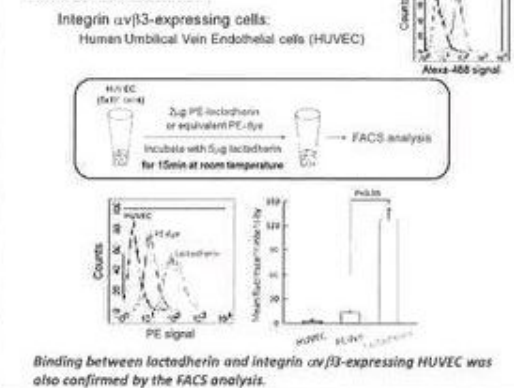
2) Size distribution and concentration of Sonazoid before and after conjugation with lactadherin



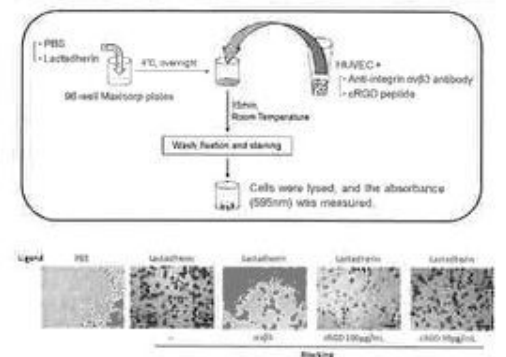
3) Acoustic property of Sonazoid with or without lactadherin conjugation



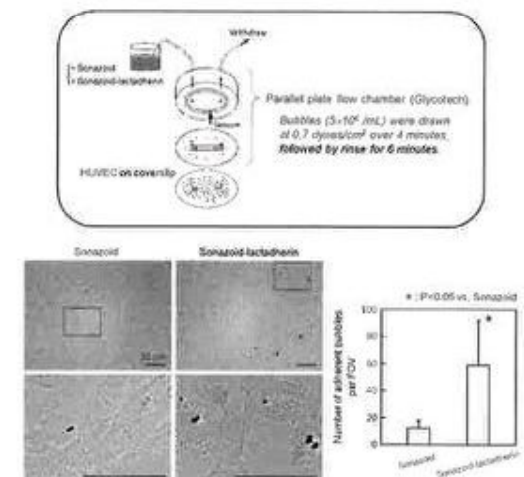
4) Binding between integrin $\alpha v \beta 3$ -expressing cells and lactadherin



5) Specificity of binding between lactadherin and HUVEC



6) Attachment of Sonazoid with HUVEC under shear flow



Summary and Conclusion

- Bubbles size of Sonazoid was not altered even after conjugating with lactadherin.
- Attachment of Sonazoid to integrin $\alpha v \beta 3$ -expressing cells were augmented by the intermediation of lactadherin.
- Because integrin $\alpha v \beta 3$ is well known to play a key role in angiogenesis, the lactadherin-bearing Sonazoid has feasibility as a clinically translatable targeted ultrasound contrast agent for angiogenesis.

Disclosure information

I have no relationships to disclose.

第6回アジア造影超音波会議

The 6th Asian Conference on Ultrasound Contrast Imaging (ACUCI 2014)

President

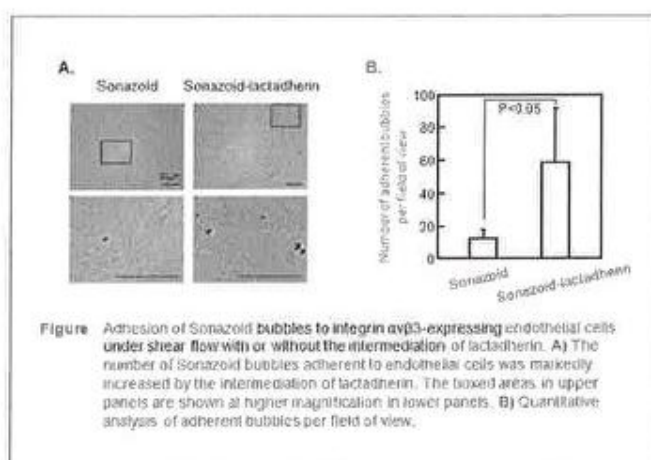
Fuminori Moriyasu

Tokyo Medical University

May 10, 2014 / Pacifico Yokohama

Kentaro Otani*National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute*

Ultrasound molecular imaging with molecular-targeted bubbles enables the noninvasive visualization of molecular dynamics in situ. Although some ultrasound contrast agents have been clinically applied for the vascular/Kupffer imaging, however the clinically translatable molecular-targeted bubble has not been developed until now. The aim of this study was to examine the feasibility of molecular-targeted bubbles preparation based on Sonazoid, a clinically available ultrasound contrast agent in Japan. As Sonazoid is stabilized by a membrane of hydrogenated egg phosphatidylserine (PS), we planned to utilize the PS as a scaffold for attaching IgGs and proteins onto Sonazoid. For detecting PS in Sonazoid, annexin V and lactadherin were utilized. By using biotin-avidin complex formation and annexin X, the attachment of IgG onto the surface of Sonazoid was feasible. However, majority of bubbles were disappeared during the bubbles preparation due to the addition of Ca^{2+} for maintaining the binding between PS and annexin V. On the other hand, lactadherin was superior to annexin V, because Ca^{2+} is unnecessary for the binding between PS and lactadherin. Furthermore, the lactadherin-bearing Sonazoid bubbles have an ability to bind with integrin $\alpha v \beta 3$ -expressing endothelial cells (Figure). Because integrin $\alpha v \beta 3$ is well-known to play a key role in angiogenesis, the lactadherin-bearing Sonazoid might have feasibility as a clinically translatable targeted ultrasound contrast agent for angiogenesis.



Development of molecular targeted-bubbles based on Sonazoid

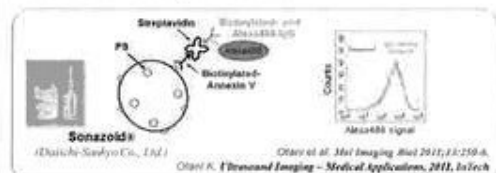


Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering,
National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute,
Suita, Japan

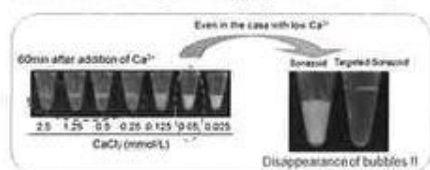
Kentaro Otani

Background and Aim

- Contrast ultrasound imaging with molecular-targeted bubbles enables the noninvasive visualization of molecular dynamics in situ.
- We reported previously the feasibility of antibody-carrying microbubbles preparation based on Sonazoid, which consists of perfluorobutane gas microbubbles stabilized by a membrane of hydrogenated egg phosphatidylserine (PS), by using annexin V and biotin-avidin complex formation.

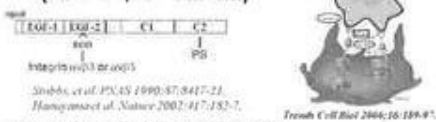


- However, the necessity of Ca^{2+} for achieving the binding between PS and annexin V markedly reduced the number of bubbles due to the significant aggregation.



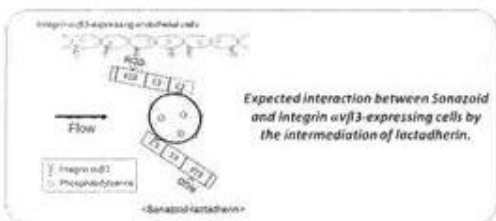
- Additionally, the usage of biotin-avidin complex formation is a barrier for the clinical translation of molecular targeted-bubbles, because of the immunogenicity of streptavidin.

Milk fat globule EGF factor 8 (MFG-E8, lactadherin)



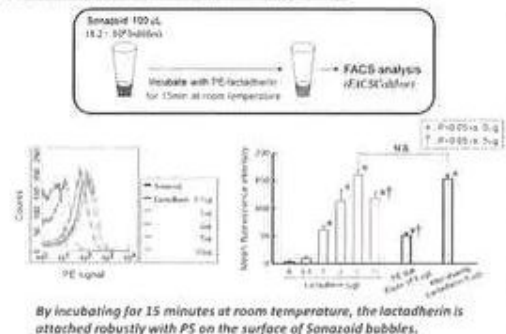
- is a protein secreted from macrophages.
 - accelerates the engulfment of apoptotic cells.
- Binding between PS and lactadherin is Ca^{2+} -independent.

- So, we hypothesized that lactadherin has the potential to be a mediator between PS-containing bubbles and integrin $\alpha v \beta 3$ -expressing cells.
- The aim of this study was to examine whether microbubbles targeted to integrin $\alpha v \beta 3$ could be produced by conjugating Sonazoid with lactadherin.

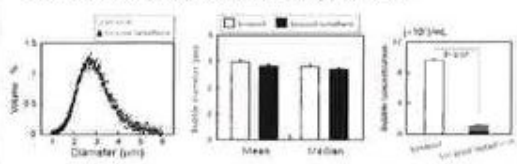


Methods and Results

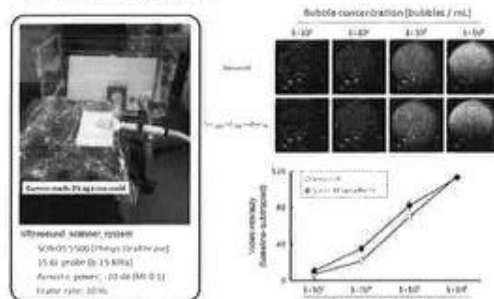
1) Binding between Sonazoid and lactadherin



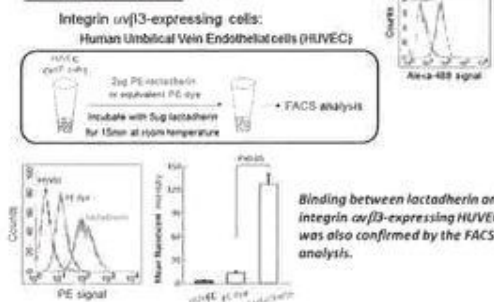
2) Size distribution and concentration of Sonazoid before and after conjugation with 5 μ g lactadherin



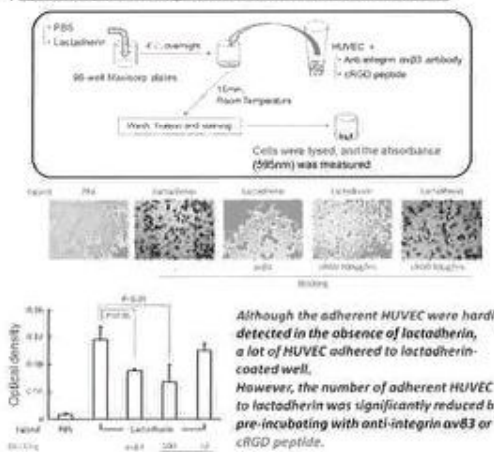
3) Acoustic property of Sonazoid with or without lactadherin conjugation



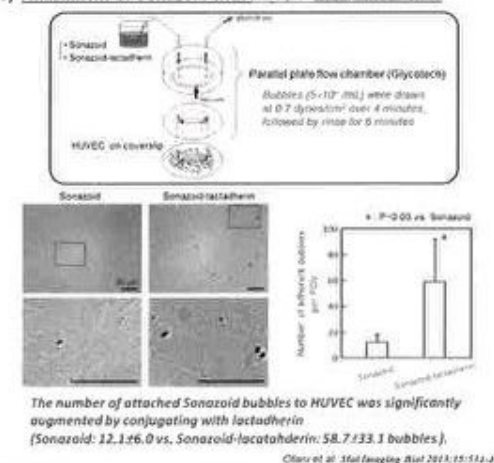
4) Binding between integrin alpha5 beta3-expressing cells and lactadherin



5) Specificity of binding between lactadherin and HUVEC



6) Attachment of Sonazoid with HUVEC under shear flow



Summary and Conclusion

- Bubbles size of Sonazoid was not altered even after conjugating with lactadherin.
- Attachment of Sonazoid to integrin $\alpha v \beta 3$ -expressing cells were augmented by the intermediation of lactadherin.
- Because integrin $\alpha v \beta 3$ is well known to play a key role in angiogenesis, the lactadherin-bearing Sonazoid has feasibility as a clinically translatable targeted ultrasound contrast agent for angiogenesis.

Disclosure information

I have no relationships to disclose.