

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 診断用超音波造影剤の特徴を活かした低侵襲かつ局所選択的超音波治療法の開発に関する研究
2. 研究開発代表者： 大谷 健太郎（国立循環器病研究センター 再生医療部）
3. 研究開発の成果

本年度は、超音波治療法の開発への足がかりである、新鮮血栓および腫瘍血管に対する特異的超音波分子イメージングの確立を目指し、①本邦において臨床使用可能な超音波造影剤 Sonazoid を基盤とした簡便な分子標的気泡(Sonazoid-lactadherin 複合体)作製法の確立、②新鮮血栓に対する分子標的性を検討するための *in vitro/in vivo* 実験の基盤確立および③腫瘍血管に対する分子標的性を検討するための担癌マウス実験系の基盤確立を行った。分子標的気泡作製に通常必須な洗浄・遠心分離操作を省略した簡便な作製法を確立するために、当初は Sonazoid 中の Lactadherin 濃度を ELISA により定量することで、Sonazoid と Lactadherin の最適な混合比率を算出しようと試みた。しかし、Sonazoid と未反応の Lactadherin の除去が物理的に困難であったため、急遽 FACS による検討へと方針を転換した。Alexa488 標識 Lactadherin と Sonazoid とを様々な条件にて混合し FACS 解析した結果、洗浄・遠心分離操作が不要な、混合するだけで簡便に Sonazoid-lactadherin 複合体を作製可能な混合比率を見出すことができた。また、将来の Sonazoid-lactadherin 複合体の臨床応用を見据えて、健常人における血中 Lactadherin 濃度の測定を行った( $3.5 \pm 0.3$  ng/mL、 $n=16$ )。

次に、*in vitro* 実験系としてヒト/マウス血餅作製法を確立し、Sonazoid-lactadherin 複合体の標的分子と想定される GPIIb/IIIa の発現を免疫染色にて確認した。Sonazoid-lactadherin 複合体の血餅に対する分子標的性についても *in vitro* 実験にて検討を試みたが、血餅に対する気泡の非特異的な吸着が数多く認められたため、今後実験系を見直して再検証する予定である。また、*in vivo* 実験系として塩化鉄(III)塗布によるマウス頸動脈血栓モデルを作製し、*in vitro* 実験と同様に頸動脈血栓中に GPIIb/IIIa の発現を確認した。並行して、今後超音波分子イメージングで使用予定である超音波診断装置にて、直径 1mm 足らずのマウス頸動脈内腔の超音波造影像が取得可能であることを確認した。

腫瘍血管に対する分子標的性については、ヒト卵巣腺腫(SK-OV-3)細胞を皮下移植した担癌マウスを用いて検討した。腫瘍組織内に Sonazoid-lactadherin 複合体の標的分子と想定されるインテグリン $\alpha v \beta 3$ の発現を確認した後、SK-OV-3 細胞移植 7~8 日(腫瘍体積は平均  $168.5 \pm 21.1$  mm<sup>3</sup>)の担癌マウスにおいて、 $6 \times 10^6$  個(100 $\mu$ L)の Sonazoid あるいは Sonazoid-lactadherin 複合体をマウス頸静脈より投与し、投与 10 分後の腫瘍組織の染影性を比較検討した。症例間で多少のバラツキは認められたが、Sonazoid 投与群に比し、Sonazoid-lactadherin 複合体投与群で腫瘍組織輝度は若干高い印象を得た。今後詳細な輝度解析を行う予定である。

本年度の検討により、簡便な分子標的気泡作製法の確立に加え、新鮮血栓および腫瘍血管に対する分子標的性を検討するための研究基盤を整備することができた。今後は、Sonazoid-lactadherin 複合体を用いた超音波分子イメージングの確立と、それを基盤とした新たな超音波治療法の開発を進めて行く予定である。