

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 未来医療を実現する医療機器・システム研究開発事業
(英語) Development of medical devices and systems for advanced medical services

研究開発課題名： (日本語) 磁気ナノ粒子によるセンチネルリンパ節の特定とがん転移の迅速診断法の開発
(英語) Development of magnetic nanoparticle techniques for identifying sentinel lymph node and rapid diagnosis of tumor metastasis

研究開発担当者 (日本語) 大学院工学系研究科 准教授 関野 正樹
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Engineering, Associate Professor, Masaki Sekino

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) センチネルリンパ節特定用磁気プローブの開発及び動物実験による有効性
開発課題名： 検討
(英語) Development of magnetic probe for identifying sentinel lymph node and preclinical studies

研究開発分担者 (日本語) 大学院農学生命科学研究科 准教授 中川 貴之
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Associate Professor, Takayuki Nakagawa

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

乳がんの転移の有無の検査においては、放射性トレーサー薬剤を病巣付近からリンパ系へ投与して検知器で追跡することによって、がん細胞が最初に到達するリンパ節(センチネルリンパ節)を特定し、摘出して術中に検査する方法が、現在は一般的である。しかし、放射性薬剤を扱える医療機関は限られており、また、リンパ節の染色標本の作製と病理医による診断に、実臨床では 1 時間程度の待ち時間を要している。本開発では、放射性薬剤に代えて磁気ナノ粒子をトレーサーとして用い、これを磁気プローブで探索する手法によって、設備面の制約や被曝を解消する。また、抗体ラベル

した蛍光磁性ビーズを磁気力によってリンパ節標本に 1 分で高速集積させる、新しい迅速免疫染色法を用いて、迅速な転移診断を可能にする。これらの医療機器を技術的に確立するとともに、事業化を推進するため、以下の開発を行った。

磁気プローブ開発に関して、承認申請時に必要となる JIS および IEC の規格への適合のための試験機の製作 (5 台) とドキュメント作成を完了し、平成 28 年 9 月に試験機関へ提出、平成 28 年 12 月に適合証明書を取得した。摘出したリンパ節内に含まれる磁気ナノ粒子の量を計測する鉄定量装置の仕様を、コンピュータ・シミュレーションに基づいて確定し、試作機の製作を完了した。また、口腔癌センチネルリンパ節生検を 1 例実施し、口腔癌においても、磁気によるセンチネルリンパ節生検が可能であることを示した。

また、動物を対象として、磁気ナノ粒子の投与による生体内リンパ系への量的、時間的分布等の基礎的検討を行い、犬および人に対する磁気プローブによるセンチネルリンパ節検出法に用いる投与プロトコルの基礎データを明らかにした。また本検出法が実験犬や乳癌を含む犬担癌症例に対して色素法と同等の検出感度を持ち、投与例の中で重篤な副作用は見られず、本検出法が有用かつ安全である可能性を示した。

迅速免疫染色法の開発においては、乳がん細胞認識抗体として抗 EGFR 抗体、抗サイトケラチン 19 抗体、及び抗テネイシン C 抗体を選定し、各抗体を蛍光磁気ビーズ上に化学的に固定化することで、蛍光磁気ビーズの磁気捕集を取り入れた迅速免疫染色に用いる抗体標識化蛍光磁気ビーズを 3 種作製した。迅速免疫染色の多重染色を目的に、蛍光磁気ビーズの蛍光多色化を検討した。

蛍光磁気ビーズの磁気捕集工程を組み込んだ迅速免疫染色機器の開発に向け、機器に搭載する要素技術を抽出し、機器に搭載すべき技術項目を選定した。用手法で検討している迅速免疫染色プロトコルを詳細に検討すべく、磁気捕集と薬液交換の機構を備えた実証器具を製作した。

手術中に迅速に免疫染色を行うために必要な 2 つの因子として、①抗体標識蛍光磁気ビーズの迅速診断における使用法の決定 (使用する磁石や洗浄方法の決定を含む) と、②ターゲットの選択及びその臨床的意義の検証があげられる。また、①の原理検証を行うため、モデルターゲットを発現したモデルサンプル・モデル動物を作製する必要がある。本年度はマウスとブタでリンパ節転移モデルを作製し、それらのサンプルを用い用手法において染色時間 1 分、抗体反応後の洗浄時間 1 分で染色を完了できる条件を決定した。また、ターゲット分子の探索では、広く乳癌の転移診断に用いられる CK19 をまず選択した。ただし、乳癌のリンパ節転移では 1.7~3.8% の患者が CK19 陰性であり、またそれらの中にはトリプルネガティブ乳癌など悪性度の高い癌が含まれていると言われる。その取りこぼしとなりうる転移を見逃さないため、悪性度の高い癌で多く発現されるテネイシン C を選択した。この 2 つのターゲットの組み合わせで転移癌をどれだけカバーできるか検証するため、まず乳癌患者 20 症例を選択し、その原発巣とリンパ節を CK19 とテネイシン C で染色した。引き続き症例を収集している。

転移診断をシステム化する取り組みとして、転移癌の性状を迅速に診断するため、5 種類 (CK19, CD44, CD147, EGFR, Her2) のウサギポリクローナル抗体を作製し、ゼノグラフト腫瘍及び培養癌細胞株を用いた免疫染色によって抗体の特異性を確認し、抗体標識蛍光磁気ビーズ作製のため迅速診断開発グループに提供した。一方、抗ヒトテネイシン C 抗体は、そのハイブリドーマから可変領域の塩基配列を決定し改変抗体作製の準備を整えた。更に、ビーズ標識後の抗体の特異性及び安定性を確認するための標準陽性品としてヒトテネイシン C の各ドメインの cDNA を導入したトランスフォーマントを作製した。②手術中の磁気プローブの誤作動防止のための非磁性手術器具とし

て、チタン製筋鈎を 30 本作製し臨床試験に提供した。また、リンパ節把持撮子は、最終仕様を固めた。③センチネルリンパ節内の転移癌を非破壊に検出するために、リング型超音波プローブを設計し、予備的実験 (64Ch) によって得られた結果を基盤に、128Ch リングプローブを作製し、解像度 0.15 mm を達成した。256Ch リングプローブを作製してファントムを用いて撮像した結果、中心部にアーチファクトが存在した。種々テストを重ね、その原因が、素子間のクロストークであることを突き止め、新規にプローブの設計を行った。④事業化では「磁性ナノ粒子を用いたセンチネルリンパ節探索システム」及び「転移癌の性状迅速診断システム」を上市する準備を行った。磁気プローブは、磁性体探知器として、PMDA 開発前相談対面助言後、フォローアップ面談に臨んだが、大幅に使用法などの内容を変更したため、全般相談から新規に相談を受けることとなった。一方、体外診断薬は、開発前相談対面助言により抗体標識蛍光磁性ビーズの性状確定や、再現性、安定性を検証中である。非磁性手術道具は、一般医療機器として申請、また、磁気ナノ粒子集積量測定器の開発、リンパ節非破壊検査装置、体外診断試薬の免疫反応装置に関しては基本設計が固まり次第、全般相談及び、開発前相談を実施する予定である。⑤海外展開を見据えて CE マーク取得に必要な調査を開始した。そのうち IEC 電気安全性規格に関する適合証明書を取得した。⑥中小規模の病院への本システムの円滑な導入のため、アンケート調査内容を検討しアンケートを作成した。

医師主導多施設共同試験としてリゾビスト®・磁気プローブ開発機を用いた乳癌センチネルリンパ節生検の臨床試験を開始し、当初の研究計画書による必要症例数、472 例に対し、100 例 (21.1%) が登録された時点でセンチネルリンパ節の同定率は 79.0%とアイソトープ法に比べ非常に低かった。また、最初の 50 例の登録の時点で有害事象の報告はなかった。センチネルリンパ節同定率を上げるためリゾビスト®を手術前日に投与することとし、また、統計学的再検討により必要症例数を 180 例とした。新しい研究計画書に則って 45 例が登録され (症例登録達成率 25%)、センチネルリンパ節同定率は 93.3%と良好な結果であった。

英文

The current standard technique for identifying the sentinel lymph node of breast cancer is to inject a radioisotope tracer into the lymphatic system and to detect the tracer intraoperatively using a gamma-probe. The radioisotope technique is available only in limited number of hospitals. Making pathological specimen and the diagnosis of metastasis take approximately one hour, which should be completed during the surgery. In this study, the limitation of radioisotope technique is solved by using a magnetic tracer and a newly developed magnetic probe. A new system of magnetic immunostaining is developed to realize a rapid diagnosis of metastasis. This system includes a fluorescent magnetic particles labeled with antibodies and a magnet for concentrating the particles on the specimen in one minute. The following items were developed for establishing these techniques and for commercializing the devices.

We fabricated a test device of the handheld magnetic probe and the document to be submitted for JIS and IEC applications, and obtained the certificate of conformance. The specification of the iron quantification device for the extracted lymph nodes was determined by utilizing numerical simulations. We fabricated a prototype of the iron quantification device. In order to verify the feasibility of application to other cancers, we performed a clinical trial for oral cancer. The sentinel lymph node was successfully detected using the magnetic probe, suggesting that

the sentinel lymph node biopsy using magnetic technique can be applied to oral cancer as well as to breast cancer.

We revealed the change in distribution of magnetic tracer (Resovist®) by dosage, dilution and time effect in vivo, which applied for the protocol of sentinel lymph node detection using the magnetic probe in clinical trials both in human and veterinary medicine. This sentinel lymph node detection method showed equivalent sensitivity efficacy to blue dye method and no severe side effect in experimental animal and tumor-bearing dogs with mammary gland tumor and others. These findings suggested the efficacy and safety of this protocol.

We examined the preparation of antibody-coated fluorescent magnetic beads for a rapid immunohistochemical staining introducing magnetic collection of the fluorescent magnetic beads. As antibodies for breast cancer which immobilize on the beads, anti-EGFR antibody, anti-cytokeratin 19 antibody, and anti-tenascin C antibody were selected. Each antibody was immobilized chemically on the beads and three antibody-coated fluorescent magnetic beads were produced. For multiple immunohistochemical staining, production of multicolored fluorescent magnetic beads was examined.

Toward the development of the rapid immunohistochemical staining device containing the operation of magnetic collection of fluorescent magnetic beads, we picked and screened element technologies mounting on the device. To investigate minutely protocols of the rapid immunohistochemical staining by manual method, several demonstrators equipped with various functions were fabricated.

Immunohistochemistry is powerful method for diagnosis cancer metastasis, however, it takes hours to finish. In order to have result during operation, we are developing rapid immunostaining method using antibody labeled multi modal probe (MMP). There are two important factor for this strategy, one is staining condition for MMP on rapid immunostaining (include type of magnet and washing condition), and the other is the target. Development of animal model is also necessary for verification of the method. In this year, we developed mouse and swine lymph node metastasis model. We used frozen sections of them, and achieved one minutes staining time and one minutes washing time. For the target search, we chose CK19 for the first target due to wide expression of CK19 in breast cancer and metastasis. Because 1.7~3.8% lymph node metastasis dose not express CK19, we also chose tenascin C due to its strong expression in malignant cancer and metastasis. Primary cancer and lymph node metastasis form twenty patients were chosen for verification the concept.

In order to rapidly diagnose the properties of metastatic cancer, 5 rabbit polyclonal antibodies (CK19, CD44, CD147, EGFR, Her2), were developed, and immunohistochemically tested their specificities using xenograft tumor and cultured cancer cell line. After that, they were passed to the research group for development rapid diagnose for preparing antibody labeled fluorescent magnetic beads. On the other hand, the nucleotide sequence of the variable region of anti-human tenascin C antibody was determined by using their hybridoma. Furthermore, transformants were prepared by introducing cDNA of each domain of human tenascin C for confirming the specificity and stability of the antibody after bead labeling. Thirty titanium fooks were prepared

as nonmagnetic surgical instruments to prevent malfunction of the magnetic probe during surgery, and were provided for clinical trials. In addition, the final specification of the lymph node forceps were decided. In order to nondestructively detect metastatic cancer in the sentinel lymph node, a ring type ultrasonic probe was designed. A 128 Ch ring probe which design based on the results obtained by the preliminary experiment (64 Ch) was made. Its resolution is 0.15 Mm. As a result of making a 256 Ch ring probe and imaging using a phantom, artifact was found at the center of images. We repeatedly tested and found out that the cause is crosstalk between the elements, and designed a new 256Ch probe. In systematization and commercialization, we prepared to launch "sentinel lymph node search system using magnetic nanoparticles" and "rapid diagnosis system of metastatic cancer properties." As to the magnetic probe, as a magnetic detector, we have attended a follow-up consultation according to previous advices of Pre-Development consultation. However, since we improved the content of usage etc. greatly, it was decided to receive new Pre-Development consultation from general introduction consultation. On the other hand, a rapid diagnostic drugs have been verified the properties of antibody-labeled fluorescent magnetic beads according to inquiry previous advices of Pre-Development Consultation. As for non-magnetic surgical instrument, they will be applied as a general medical device for pharmaceutical applications. As for another developing devices, such as iron quantification device, lymph node non-destructive inspection device and immune reaction device for rapid diagnostic reagent, we plan to apply general introduction consultation, followed by pre-development consultation, once basic design is settled. For oversea expansion, we started a survey necessary for CE marking acquisition. Among them, we obtained a certificate of conformity on JIS Electrical Safety Standards. In order to smoothly introduce this system to small and medium scale hospitals, we surveyed the contents of the questionnaire and created a questionnaire.

We began a multicenter clinical trial to develop a new technique of sentinel lymph node biopsy (SLNB) using Resovist®/magnetic probe system model. A total of 472 patients were needed for demonstrating non-inferiority of Resovist®/magnetic probe system compared with an isotope technique. In initial 100 patients (21.1% of needed 472 patients), a SLN detection rate was 79.0% being much lower than that of the isotope method. No adverse events had been reported when initial 50 patients were included in this study. In order to increase the detection rate of SLN, Resovist® began to be subdermally injected a day before surgery. In addition, statistical re-analysis needed 180 patients calculated based on an predicted 95% SLN detection rate. All these amendments were written in a revised new protocol. Based on the new protocol, 45 patients (25.0% of needed 180 patients) were initially recruited, and the SLN detection rate was 93.3% close to the predicted SLN detection rate (95%).

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 2件）

1. Akihiro Kuwahata, Shinichi Chikaki, Asli Ergin, Miki Kaneko, Moriaki Kusakabe, Masaki Sekino. Three-dimensional sensitivity mapping of a handheld magnetic probe for sentinel

lymph node biopsy. AIP Advances. 2017, 056720, 1-5.

2. Miki Kaneko, Kaichi Ohashi, Shinichi Chikaki, Akihiro Kuwahata, Mikio Shiozawa, Moriaki Kusakabe, Masaki Sekino. A magnetic probe equipped with small-tip permanent magnet for sentinel lymph node biopsy. AIP Advances.2017, 056713, 1-4.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Three-dimensional sensitivity mapping of a handheld magnetic probe for sentinel lymph node biopsy, ポスター, Akihiro Kuwahata, Shinichi Chikaki, Asli Ergin, Miki Kaneko, Moriaki Kusakabe, Masaki Sekino, 61st Annual Conference on Magnetism and Magnetic Materials, 10/31/2016-11/04/2016, 国外.
2. A magnetic probe equipped with small-tip permanent magnet for sentinel lymph node biopsy, 口頭, Miki Kaneko, Kaichi Ohashi, Shinichi Chikaki, Akihiro Kuwahata, Mikio Shiozawa, Moriaki Kusakabe, Masaki Sekino, 61st Annual Conference on Magnetism and Magnetic Materials, 10/31/2016-11/04/2016, 国外.
3. Dynamic MRI of magnetic nanoparticles in sentinel lymph nodes, ポスター, Wenqi Qiu, Akihiro Kuwahata, Zonghao Xin, Shinichi Chikaki, Muneer Ahmed, Moriaki Kusakabe, Masaki Sekino, 1st International Society of Magnetic Resonance in Medicine Japan Chapter, 2/23/2017, 国内.
4. Magnetic techniques for diagnosis of breast cancer metastasis, 口頭, Masaki Sekino, Akihiro Kuwahata, Miki Kaneko, Shinichi Chikaki, Norio Tanabe, Takayuki Nakagawa, Kohei Saeki, Mikio Shiozawa, Hiroyuki Takei, Seigo Nakamura, Moriaki Kusakabe, Joint Symposium between the University of Tokyo and the Seoul National University, 2016/7/29, 国内.
5. 乳がんセンチネルリンパ節生検に用いる永久磁石型磁気プローブの空間感度分布特性, 口頭, 桑波田晃弘, Asli Ergin, 隣 真一, 金子美樹, 塩澤幹雄, 武井寛幸, 中村清吾, 中川貴之, 佐伯亘平, 斎藤逸郎, 日下部守昭, 関野正樹, マグネティックス研究会, 2016/10/07, 国内.
6. センチネルリンパ節生検に用いる磁気プローブの開発と感度特性評価, ポスター, 桑波田晃弘, 金子美樹, 隣真一, 田辺記生, 斎藤逸郎, 武井寛幸, 中村清吾, 塩澤幹雄, 中川貴之, 佐伯亘平, 日下部守昭, 関野正樹, 東京大学医学部附属病院先端医療シーズ開発フォーラム, 2017/2/2, 国内.
7. 低侵襲がん診断磁気機器の研究, ポスター, 隣 真一, 桑波田晃弘, 日下部守昭, 関野正樹, 第8回東京大学低温センター研究交流会, 2017/2/23, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし