

(報告様式4)

【16im0402001h0006】

平成29年 5月 17日

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) 医療分野研究成果展開事業 産学共創基礎基盤研究プログラム
(英語) Medical Research and Developmental Programs Focused on
Technology Transfer: Collaborative Research Based on Industrial Demand

研究開発課題名： (日本語) 機能性プローブに基づく生体深部光音響イメージング技術の確立
: activatable プローブの開発研究と in vivo 可視化イメージング技術の開発
(英語) Establishment of deeply penetrating photoacoustic imaging technology based on
functional probes: design and synthesis of activatable probes and development of in vivo
imaging technology

研究開発担当者 (日本語) 防衛医科大学校 医用工学講座 教授 石原 美弥
所属 役職 氏名： (英語) Miya Ishihara, Professor, Department of Medical Engineering,
National Defense Medical College

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) ・ 広帯域センサの開発と性能評価, 及び, 励起光・導光の波長可変
開発課題名： ・ 分離性を向上させる識別指標の確立
・ *in vivo* イメージングシステム構築
(英語) ・ Development and evaluation of broadband sensor with multispectral excitation
・ Optimization of method to distinguish from background signals
・ Establishment of in vivo imaging system

研究開発分担者 (日本語) 防衛医科大学校 医用工学講座 教授 石原 美弥
所属 役職 氏名： (英語) Miya Ishihara, Professor, Department of Medical Engineering,
National Defense Medical College

分担研究 (日本語) ・ がん部位検出光音響プローブの開発
開発課題名： (英語) ・ Development of photoacoustic probe for tumor detection

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学 大学院薬学系研究科薬学専攻

大学院医学系研究科生体物理医学専攻 教授 浦野 泰照

所属 役職 氏名： (英 語) Yasuteru Urano, Professor, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Medical Science Graduate Program, University of Tokyo

分担研究 (日本語) ・がん部位検出光音響金ナノ粒子プローブの開発

開発課題名： (英 語) ・ Development of photoacoustic plasmonic gold nanoparticles for tumor detection

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人京都大学 化学研究所 教授 寺西 利治

所属 役職 氏名： (英 語) Toshiharu Teranishi, Professor, Institute for Chemical Research, Kyoto University

II. 成果の概要 (総括研究報告)

浦野泰照教授 (東京大学 大学院薬学系研究科)、寺西利治教授 (京都大学 化学研究所) らのグループとともに、微小がんのリンパ節転移の有無などの臨床的に極めて重要なイメージングを実現するために、**activatable** 光音響プローブを開発し、そのプローブを可視化できるイメージングシステムを構築した。

光音響イメージングは従来の光イメージングでは到達しない深部の可視化が可能であるが、有用な光音響プローブはなかった。我々は深部のがんの検出感度を向上させた **activatable** 光音響プローブの開発に成功した。

浦野グループはプローブレパートリーの拡充により有機小分子色素を用いた光音響プローブを複数開発した。具体的には、520~640 nm に励起波長を持つ3種の新規プローブ母核を開発し、それぞれの **GGT-activatable** プローブを開発した。いずれのプローブとも、*in vitro* 系だけでなく培養がん細胞でその機能が確認され、さらに腹膜播種・皮下移植モデルマウスに適用することで、微小がん部位の迅速蛍光イメージングが可能であることが明らかとなった。

寺西グループは、様々な有機配位子で表面修飾をした種々の粒径の金ナノ粒子をプローブとして合成するとともに、細胞取り込みに係る PEG 臨界被覆率を明らかにした。また、培養細胞やマウスモデルに取り込まれたアニオン性金ナノ粒子が凝集することを利用して、励起波長を長波長化させることに成功した。

構築した光音響マルチスペクトルイメージングシステムは、水溶液、培養細胞、マウスモデル、臨床検体のすべてを対象に測定可能とした。また、浦野グループと寺西グループのプローブの開発過程において、分光器で測定した水溶液の吸収スペクトルと本マルチスペクトルシステムで測定する光音響スペクトルは完全に一致することを実証した。これによりプローブ信号とバックグラウンド信号を識別する手法としてスペクトルアンミキシング法が適用できた。

浦野グループの有機小分子色素を用いたプローブは、光音響信号だけでなく蛍光信号も発生できるために、蛍光イメージングが取得できる利点がある。これにより構築したイメージングシステムで取得した光音響イメージングと、蛍光イメージングを比較して、その性能や有効性を確認した。

3グループの共同成果として、以下の3点を主要な成果とする。1) プローブの **activatable** 化は光音響信号強度の時間変化により確認できた、2) 皮下腫瘍マウスを対象に生体内の様々な光吸収体によるバツ

クランド信号から識別して光音響プローブ由来の信号による腫瘍を可視化した、3) 臨床検体を対象に光音響プローブ信号の分布と病理学的組織像におけるがんの分布が一致していることを確認した。

以上より、当初の目標を達成できた。

To establish deeply penetrating photoacoustic (PA) imaging technology for valuable clinical cancer detection such as sentinel lymph node metastases, we are designing and synthesizing activatable PA probes and developing imaging technology to visualize the activatable PA probes.

PA imaging, which has overcome the drawback of pure optical imaging because ultrasonic waves are less scattered, has the advantage of deep imaging. However, a useful PA probe has so far not been invented. Here, we succeeded in developing activatable PA probes to increase detection sensitivity of deeply penetrating cancer.

The Urano group achieved multiple activatable PA probes using small organic molecules based on the rational design strategy. Three optical scaffolds whose excitation wavelength ranges from 520 to 640 nm were successfully developed, and based on these, corresponding GGT-activatable probes were developed. Their functions were proved with living cultured cells, as well as tumor-dissemination models in the peritoneal cavity and subcutaneously inoculating tumor models where rapid imaging of tiny tumors *in vivo* could be achieved.

The Teranishi group synthesized plasmonic gold nanoparticles (Au NPs) with a variety of sizes and surface ligands, and developed the Au NP-based probes with an optimized surface coverage of PEG molecules for cell uptake. We demonstrated that the anionic Au NPs aggregated in the cultured cells and mouse model, leading to a spectral broadening with a large red-shift.

We developed an *in vivo* multispectral PA imaging system that can be applied in aqueous solutions, cultured cells, mouse models and clinical specimens. By using the developed multispectral system, the spectrally resolved PA signals in the aqueous solutions of both organic small molecules and Au NPs completely agreed with absorption spectra measured by spectrometer. Thus, spectral unmixing can be applied to distinguish the probe signal from the background signal based on the spectra.

The Urano group's organic small molecule probes have the capability to produce both PA and fluorescence signals allowing for comparison between PA and fluorescence images, and we consequently evaluated the performance and efficacy of the developed PA system.

Our three groups, revealed three major joint research achievements: 1) the process of activation were verified that the intensity of the photoacoustic signal increased with time, corresponding to the degree of activation of the synthesized probes; 2) in the case of the mouse model, *in vivo* tumor detection was demonstrated successfully using the synthesized probe for both organic small molecules and Au NPs; 3) using resected specimens, the distribution of probe signals were corresponded with pathological mapping of cancer.

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 3 件、国際誌 5 件）

1. Hirasawa T, Iwatate R, Kamiya M, Okawa S, Urano Y, Ishihara M. “Dependence of photoacoustic signal generation characteristics on fluorescence quantum yields of small organic molecule based contrast agents”. Proceedings of SPIE 19(1), 2017.03, 1006434-1-1006434-7.
2. Hirasawa T, Iwatate R, Okawa S, Kamiya M, Urano Y, Ishihara M. “Multispectral photoacoustic imaging of tumours in mice injected with an enzyme-activatable photo acoustic probe”. Journal of Optics 19(1), 2017.01, 014002-1-014002-14.
3. Hirasawa T, Okawa S, Iwatate R, Kamiya M, Urano Y, Ishihara M. “Effect of reference spectra in spectral fitting to discriminate enzyme-activatable photoacoustic probe from intrinsic optical absorbers”. Proceedings of SPIE, 2016.03, 9708: 970834-1-970834-7.
4. Okawa S, Hirasawa T, Sato R, Kushibiki T, Ishihara M, Teranishi T. “Effect of the optical properties of gold nanoparticles on photoacoustic signals”. Proceedings of SPIE. 2016.03, 9708: 970836-1-970836-5.
5. 石原美弥. “光音響画像の性能を決める指標に関する基礎的検討”. 電気学会研究会資料, 光・量子デバイス研究会. 2016, OQD-16-025, 43-46.
6. Sei K, Fujita M, Okawa S, Hirasawa T, Kushibiki T, Sasa H, Furuya K, Ishihara M. “Appropriate timing of blood sampling for blood gas analysis in the ventilated rabbit”. Journal of Surgical Research, 2016, 206(2), 325-336.
7. 石原美弥. “生体組織を対象とした光音響イメージングの原理とその応用”. 応用物理. 2016, 85(3), 186-192.
8. 石原美弥. “光音響顕微鏡”. 病理と臨床. 2016, 34(1)89-94.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ”Spectral dependence of photoacoustic signals from plasmonic gold nanoparticles in vitro, ex vivo and in vivo”. Symposium. Ishihara M, Hirasawa T, Okawa S, Teranishi T. 5th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, Lisbon, Portugal, 2017, 5th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials Programme: 23-23, 2017.03.08. 国外
2. “Comparison of photoacoustic signal generation characteristics of small organic molecules with various fluorescence quantum yield”. Hirasawa T, Iwatate R, Kamiya M, Ikeda Y, Okawa S, Urano Y, Ishihara M. RIEC International Workshop on Biomedical Optics 2017, Sendai, 2017.03 電気学会光・量子デバイス研究会資料 OQD-17: p.59-62, 2017.03.06. 国内
3. “In Vivo Rapid Cancer Imaging Using Small Molecule-based Fluorogenic Probes”. Yasuteru Urano. The International Society for Fluorescence Guided Surgery (Invited), USA (Boca Raton Resort, FL), 2017.02.15. 国外
4. “がん可視化のための光音響イメージング技術開発”. 石原美弥. レーザー学会学術講演会第 37 回年次大会, 徳島, 2017.01.08. 国内
5. “術中迅速がんイメージングを目指した activatable 蛍光・光音響プローブの開発”. 浦野泰照. レーザー学会学術講演会第 37 回年次大会, 徳島, 2017.01.08. 国内
6. “金ナノ粒子を用いた activatable 光音響イメージングプローブの開発”. 口頭. 寺西利治. レーザー学会学術講演会第 37 回年次大会, 徳島, 2017.01.08. 国内

7. “Novel spirocyclization-based fluorogenic probes: From rapid intraoperative imaging of tiny tumors to super-resolution imaging”. Yasuteru Urano. High-Speed Biomedical Imaging and Spectroscopy II, SPIE BiOS2017 (Invited), USA (San Francisco), 2017.01.31. 国外
8. “Novel spirocyclization-based fluorogenic probes: From rapid intraoperative imaging of tiny tumors to super-resolution imaging”. Yasuteru Urano. The 1st PSL* Chemical Biology Symposium (Invited), France (Institut Curie, Paris), 2016.12.08. 国外
9. “Novel fluorogenic small molecule probes for live imaging-based diagnosis”. Yasuteru Urano. 2016 Northeastern Asian Conference on Molecular Imaging-based Precision Medicine (Invited), China (Hangzhou), 2016.11.12. 国外
10. “Rational design of reversible fluorescent probes for real-time live-cell imaging and quantification of fast glutathione dynamics”. Yasuteru Urano. WMIC 2016 (Invited), USA (Jacob K. Javits Convention Center, NY), 2016.09.08. 国外
11. “Novel fluorogenic probes for in vivo imaging of tiny tumors and super-resolution imaging in living cells”. Yasuteru Urano. RICT2016 (Invited), France (Caen Congress Centre, Normandy), 2016.07.08. 国外
12. “Intraoperative imaging of tiny tumors by novel fluorogenic probes”. Yasuteru Urano. Twenty-Fifth French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry (FJS 2016) (Invited), Tokyo (Keio Plaza Hotel Tama), 2016.05.17 国内
13. “Intraoperative, rapid and sensitive imaging of tiny tumors by novel fluorogenic probes for aminopeptidase”. Yasuteru Urano. The 7th Asian-Pacific Topic Conference (Invited), Tokyo (Keio Plaza Hotel Tokyo), 2016.04.20. 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
なし