(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5805651号
(P5805651)
(45)発行日　平成27年11月4日(2015.11.4)　(24)登録日　平成27年9月11日(2015.9.11)

(51)Int.Cl.　　F I
A61B 5/05 (2006.01)　　A61B 5/05 A
A61K 49/00 (2006.01)　　A61K 49/00 A

請求項の数 21　(全 26 頁)

(21)出願番号　特願2012-538052(P2012-538052)
(86)(22)出願日　平成22年11月5日(2010.11.5)
(65)公表番号　特表2013-509965(P2013-509965A)
(43)公表日　平成25年3月21日(2013.3.21)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/055729
(87)国際公開番号　WO2011/057146
(87)国際公開日　平成23年5月12日(2011.5.12)
審査請求日　平成25年11月1日(2013.11.1)
(31)優先権主張番号　61/259,011
(32)優先日　平成21年11月6日(2009.11.6)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/310,700
(32)優先日　平成22年3月4日(2010.3.4)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　512117292
サイエンティフィック　ナノメディスン，インコーポレイテッド
ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ　ＮＡＮＯＭＥＤＩＣＩＮＥ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国　ニューメキシコ州　８７１１１，アルバカーキ，カントリークラブドライブ　エヌイー　１１１０９
(74)代理人　110001302
特許業務法人北青山インターナショナル
(72)発明者　フリン，エドワード，アール．
アメリカ合衆国　ニューメキシコ州　８７１１１，アルバカーキ，カントリークラブドライブ　エヌイー　１１１０９

最終頁に続く

(54)【発明の名称】標的ナノ粒子及びその磁性粒子を使用する癌等の細胞及び他の生物学的物質の検出、測定、及び撮像

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
１つ又は複数の所定の種類の癌細胞又は生物学的物質の生体内の検出、測定、又は位置特定の装置において、
ａ）患者内の１つ又は複数の所定の種類の癌細胞又は生物学的物質に結合されたナノ粒子を磁化するように構成された磁化サブシステムと、
ｂ）癌細胞又は生物学的物質に結合されていないナノ粒子の磁気モーメントが減衰した後であって、且つ、癌細胞又は生物学的物質に結合されたナノ粒子の磁気モーメントが減衰する前の時間に患者内の領域における残留磁場を検出し、前記残留磁場を解析して、患者内の前記１つ又は複数の所定の種類の癌細胞又は生物学的物質の検出、測定、又は位置特定を行うように構成されたセンササブシステムと、
を備えることを特徴とする、装置。
【請求項２】
請求項１に記載の装置において、前記磁化サブシステムが複数のヘルムホルツコイルを備えることを特徴とする装置。
【請求項３】
請求項１に記載の装置において、前記センササブシステムが磁場勾配計のアレイを備えることを特徴とする装置。
【請求項４】
請求項１に記載の装置において、前記センササブシステムが複数の平面型磁場勾配計を

備えることを特徴とする装置。
【請求項５】
請求項４に記載の装置において、少なくとも１つの平面型磁場勾配計が２ｃｍのベースラインを有することを特徴とする装置。
【請求項６】
請求項４に記載の装置において、少なくとも１つの平面型磁場勾配計が、フォトリソグラフィプロセスを使用して製造されることを特徴とする装置。
【請求項７】
請求項４に記載の装置において、平面型磁場勾配計と通信する超電導量子干渉装置（ＳＱＵＩＤ）をさらに備え、前記ＳＱＵＩＤが、液体窒素の温度前後の温度で超電導であることを特徴とする装置。
【請求項８】
請求項４に記載の装置において、各々が前記複数の平面型磁場勾配計の１つと通信する複数のＳＱＵＩＤをさらに備え、前記ＳＱＵＩＤが、液体窒素の温度前後の温度で超電導であることを特徴とする装置。
【請求項９】
請求項１に記載の装置において、前記センササブシステムが原子磁力計を備えることを特徴とする装置。
【請求項１０】
請求項１に記載の装置において、前記センササブシステムが、電磁逆問題を解くように構成されることを特徴とする装置。
【請求項１１】
１つ又は複数の所定の種類の癌細胞又は生物学的物質の生体内での検出、測定、又は位置特定を行う方法において、
ａ）請求項１に記載の装置を提供すること、
ｂ）複数の標的ナノ粒子を人間以外の動物内に配置することであって、標的ナノ粒子は、１つ又は複数の所定の種類の癌細胞又は生物学的物質に優先的に結合する標的薬に接合する常磁性ナノ粒子を備える、配置すること、
ｃ）磁化サブシステムを使用して、前記ナノ粒子を磁化すること、
ｄ）前記センササブシステムを使用して、癌細胞又は生物学的物質に結合されていないナノ粒子の磁気モーメントが減衰した後であって、且つ、癌細胞又は生物学的物質に結合されたナノ粒子の磁気モーメントが減衰する前の時間に動物内の領域における残留磁場を検出し、前記残留磁場を解析して、１つ又は複数の所定の種類の癌細胞又は生物学的物質の検出、測定、又は位置特定を行うこと
を含むことを特徴とする、方法。
【請求項１２】
請求項１１に記載の方法において、前記標的ナノ粒子が、所定の種類の癌細胞に特異的に結合する抗体で標識されることを特徴とする方法。

【請求項１３】
請求項１２に記載の方法において、前記抗体標識された磁性ナノ粒子が、少なくとも１つの特定の抗体が付着する生体適合性コーティングでコーティングされた磁心を備えることを特徴とする方法。
【請求項１４】
請求項１３に記載の方法において、前記磁心が強磁性材料を含むことを特徴とする方法。
【請求項１５】
請求項１４に記載の方法において、前記強磁性材料が酸化鉄を含むことを特徴とする方法。
【請求項１６】

請求項１５に記載の方法において、前記磁心の直径が３０ナノメートル未満であることを特徴とする方法。
【請求項１７】
請求項１３に記載の方法において、前記生体適合性コーティングが、デキストラン、カルボキシル、アミン、又はその組み合わせを含むことを特徴とする方法。
【請求項１８】
請求項１３に記載の方法において、前記少なくとも１つの特定の抗体が、前立腺癌に固有の抗体、乳癌に固有の抗体、卵巣癌に固有の抗体、ホジキンリンパ腫に固有の抗体、膵臓癌に固有の抗体、ホジキンリンパ腫に関連するリードスタンバーグ細胞に特異的に結合する抗体のうちの１つ又は複数を含むことを特徴とする方法。
【請求項１９】
請求項１３に記載の方法において、前記少なくとも１つの特定の抗体がＣＤ１５抗体又はＣＤ３０抗体を含むことを特徴とする方法。
【請求項２０】
請求項１３に記載の方法において、前記少なくとも１つの特定の抗体がＣＡ－１２５を含むことを特徴とする方法。
【請求項２１】
請求項１３に記載の方法において、前記少なくとも１つの特定の抗体がＨＥＲ－２抗体を含むことを特徴とする方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、標的ナノ粒子及び磁気緩和測定を使用して細胞又は物質の生体内での検出及び測定に関し、特に、人間の癌細胞の検出及び測定に有用である。
【背景技術】
【０００２】
疾病の早期検出により、治療及び回復が成功する確率を最大にすることができる。さらに、疾病の早期検出及び位置特定により、疾病部位に向けられた療法が可能となり、治療の効率を最適化する。適切な検出装置を使用して、治療を監視し、適用される薬剤又は他の形態の療法の効率をさらに増大させることができる。特定の疾病に的を絞ることが可能であることで、治療の予後を向上させることもできる。米国での死亡原因の２位である癌の早期検出及び位置特定により、患者の予後を向上させることができる。癌の検出のために臨床目的で最も一般的に使用される方法はすべて、非特定的である。すなわち、癌性か、それとも良性腫瘍かを区別することができず、１００％精度の検出をもたらすものはない。利用可能な方法はすべて欠点及び弱点を有し、結果として、誤診率が高く、確実に診断される率があまりに低く、これらが共に致死率の増大につながっている。現在利用可能な最も一般的な臨床モダリティは、（１）Ｘ線マンモグラフィ、（２）磁気共鳴撮像（ＭＲＩ）、及び（３）超音波走査であり、利用可能な場合には、（４）ポジトロン放射形断層撮影（ＰＥＴ）が追加の選択肢である。
【０００３】
Ｘ線減衰の測定は、介在媒体の密度についての情報を提供し、ＦＤＡに承認されており、様々な形態の疾病、特に癌の検出に使用される最も一般的な装置である。これは、多くの偽陰性結果及び偽陽性結果に関与もする。早期癌腫瘍を検出可能であるが、良性腫瘍又は癌性腫瘍に関する特定性はない。アーチファクトが、健康な組織から生じ、偽陽性結果を生じさせる可能性がある。照射線量は低いが、Ｘ線及び放射線全般への暴露についての関心も高まっている。全般的に、癌のＸ線撮影での偽陽性の数は高いままであり、Ｘ線方法は早期腫瘍を検出することができない。
【０００４】
超音波は、腫瘍を撮影する第２の方法を提供するために使用される。超音波は優れたコントラスト分解能を有するが、Ｘ線及び他の撮影技法と比較して空間分解能が劣る。超音

波は現在、癌の一次スクリーニングツールとしてＦＤＡにより承認されていないが、通常、日常業務中に検出された任意の異常を調べるために、経過観察として使用される。これは多くの場合、乳癌及び卵巣癌のＸ線像の疑いのある領域を確認するために使用されるツールである。

【０００５】

ＭＲＩは、Ｘ線走査中に見られた潜在的な問題領域に対する経過観察に使用されるが、ＭＲＩ走査の費用は多くの場合、使用を妨げる。ＭＲＩは、組織内の小さな異常を検出することができ、癌が転移したか否かの判断にも有用である。ダイナミック造影（ＤＣＥ）ＭＲＩは潜在的に、良性腫瘍と癌性腫瘍とを区別するが、いくつかの偽陽性を生み出す。ＭＲＩの費用により、スクリーニングツールとしての用途が制限される。癌のＭＲＩ撮像は多くの場合、磁性ナノ粒子を造影剤として使用し、そのようなナノ粒子を注入する基準を提供する一般に認められた計画案である。ナノ粒子重量２ｍｇ／ｋｇの投与量での血管内ＭＲＩ造影剤が、転移病変の検出に使用されている。

【０００６】

疾病の早期検出の重要性により、様々な他の技法が現在、撮影に関して研究されている。これらとしては、ＰＥＴ又はＳＰＥＣＴを使用したシンチマンモグラフィ、インピーダンス断層撮影、及び様々な形態のＲＦ撮像が挙げられる。

【０００７】

早期に検出される多くの癌の治癒率は略１００％であるため、病変を、まだ抑えられている間に早期検出することが極めて重要である。既存の撮像方法は多くの場合、大きな成長が生じるまで、病変を識別しない。ＭＲＩ、ＰＥＴ、超音波、シンチグラフィ、及び他の方法を含め、代替方法の研究が進行中である。現在、これらの方法のいずれも、組織特性の違いを使用して、癌性組織と非癌性組織との腫瘍の種類に関する特定性を有さない。特に、放射線又は非常に高価な処置に頼らず、腫瘍のかなり早期の検出を提供する新しい手法が必要であるのは明らかである。本発明は、生体内で癌を検出する新しい能力を提供する。

【０００８】

発明の開示

本願は、以下の出願に関連し、各関連出願を参照により本明細書に援用する：２００９年１１月６日に出願された米国仮特許出願第６１／２５９，０１１号明細書、２０１０年２月２７日に出願された同第６１／３０８，８９７号明細書、２０１０年3月１６日に出願された同第６１／３１４，３９２号明細書、２０１０年5月5日に出願された同第６１／３３１，８１６号明細書、２０１０年7月7日に出願された同第６１／３６１，９９８号明細書；これらの各々は参照により本明細書に援用される。

【０００９】

本発明は、組織内の癌細胞等の細胞又は物質を検出する装置及び方法を提供する。システムは磁気システムを含み、磁気システムは、既知の磁場を被験者の組織にかけ、対象とする細胞又は物質に結合された標的常磁性ナノ粒子を磁化する磁場生成器と、ナノ粒子の磁化が減衰する際の残留磁場を検出することができる高感度磁気センサとを含む。磁気システムの例は、測定台に配置された患者の癌組織に均一な磁化パルス場を適用するように構成された磁気パルサーを備えた超電導粒子干渉装置センサと、印加されるパルス場により生成される残留磁場を検出し撮像するように構成された残留磁場検出器とを備える。磁気パルサーは、一対のヘルムホルツコイルを備えることができる。残留磁場検出器は、磁場勾配計のアレイを備えることができる。磁気システムの別の例は、原子磁力計と、原子磁場勾配計のアレイ－磁場内の原子のラーモア歳差に基づいて極めて弱い磁場の測定に使用することができる感度が非常に高い磁場センサとを備える。本発明のいくつかの実施形態では、原子磁力計は、原子蒸気セルを含む小さなキャビティを含むチップセットを備える。この蒸気セルはＲｂ原子を含み、円偏光レーザ光で光励起する。原子はラーモア歳差を経験し、この歳差の周波数は、印加磁場に応答して、蒸気の屈折率を変化させる。１組の格子を使用して、印加磁場が変化する際の干渉パターン変化を測定して、第２のレーザ

をこの屈折率変化の測定場として使用することができる。蒸気セルは１つであってもよく、又は磁場勾配計構成内に配置して、距離の関数として場の変化を測定することができる。

【００１０】

本発明による方法は、磁気システムを提供すること、複数の標的（例えば、抗体で標識された）常磁性ナノ粒子を被験者内に注入して、癌細胞、又は対象とする他の細胞若しくは物質に特異的に結合すること、既知の（例えば、均一な）磁化パルス場を印加して、被験者組織内のナノ粒子を磁化させること、及び磁化ナノ粒子の残留磁場を検出し、それにより、患者の癌組織に結合したナノ粒子の像を提供することを含む。標的常磁性ナノ粒子は、生体適合性コーティングでコーティングされた磁心を備えることができ、コーティングには、少なくとも１つの特定の抗体が付着する。例えば、磁心は、酸化鉄等の強磁性材料を含むことができる。抗体等の適した標的薬の例については、以下に説明する。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

添付図面は、本明細書に組み込まれてその一部をなし、本発明を示し、記述と共に本発明を説明する。図面中、同様の要素は同様の番号で参照される。

【００１２】

【図１】図１は、本発明による測定での被験者の組織の準備例の概略図である。

【図２ａ】図２ａは、本発明による測定例の概略図を提供する。

【図２ｂ】図２ｂは、本発明による測定例の概略図を提供する。

【図２ｃ】図２ｃは、本発明による測定例の概略図を提供する。

【図２ｄ】図２ｄは、本発明による測定例の概略図を提供する。

【図３】図３は、図２と併せて説明されるプロセスからの測定の概略図である。

【図４】図４は、本発明での使用に適した装置の概略図である。

【図５】図５は、超電導量子干渉装置（ＳＱＵＩＤ）磁気センサを使用する例示的な装置の概略図である。

【図６】図６は、人間の癌検査に使用可能な例示的なＳＱＵＩＤセンサ装置の概略図である。

【図７】図７は、弱磁場測定用の原子磁力計の概略図及び写真である。

【図８】図８は、生体適合性コーティングを有する磁性ナノ粒子と、特定の細胞を標的とするために付着した抗体との概略図である。

【図９】既知の結合能を有する様々なミクロスフェアとの比較により計算された細胞毎のＨｅｒ２部位の数の図である。

【図１０】図１０は、ＨＥＲ２／ｎｅｕ抗体及びナノ粒子を使用して培養後の時間の関数として測定された２つの乳癌細胞株ＭＣＦ７／ＨＥＲ２１８及びＭＤＡ－ＭＢ－２３１の磁気モーメントの図である。

【図１１】図１１は、２の倍数で細胞をピペットで落とすことによる細胞の数の関数として測定される細胞試料の磁気モーメントの図である。

【図１２】ＭＣＦ７細胞：左が２Ｅ＋０６細胞、右＝１Ｅ＋０６細胞のバイアルが挿入された状態のファントムの図である。

【図１３】図１３は、ＳＱＵＩＤシステム下の裸マウスの写真である。

【図１４】図１４は、マウス腫瘍から得られた位置信頼度プロットを含む。

【図１５】図１５は、３５箇所の異なる測定部位で観察された磁気輪郭線の図である。

【図１６】図１６は、２匹のマウス及び各マウスの両腫瘍の測定の経時変化の図である。

【図１７】図１７は、これらの測定の結果の図であり、生きたマウスに対する生体内測定との非常に十分な一致を示す。

【図１８】図１８は、マウスの実際の腫瘍に重ねられた２つの腫瘍の位置の２次元９５％信頼限界の図である。

【図１９】図１９は、励起後の腫瘍の組織構造の写真である。

【図２０】図２０は、卵巣での腫瘍の成長を示す卵巣癌の図である。

【図２１】図２１は、患者被験者に典型的な距離で、ＳＱＵＩＤセンサ装置の下に配置された実物大卵巣ファントムの写真である。
【図２２】図２２は、図２１に示されるファントム内に挿入された生卵巣細胞の感度研究の結果の図である。
【図２３】図２３は、フローサイトメトリーを使用してこれらの細胞の抗体部位を確認する図である。
【図２４】図２４は、生きたマウス内のヒトの卵巣癌腫瘍に付着した磁性ナノ粒子（Ｏｃｅａｎ　Ｎａｎｏｔｅｃｈから）からの磁気モーメントの図である。
【図２５】図２５は、ＳＱＵＩＤセンサ方法が生体内で機能することの検証に使用されたマウスの写真と共に、マウスからの磁気輪郭場である。
【図２６】図２６は、磁性ナノ粒子をリンパ腫細胞株に付着させる培養時間の関数としてのＳＱＵＩＤセンサシステム内の磁気モーメントの測定のグラフである。
【図２７】図２７は、ナノ粒子に利用可能な部位の数及びＳＱＵＩＤセンサによる検出を特定する際の、リンパ系からのＲＳ細胞のフローサイトメトリー測定の結果の図である。
【図２８】図２８は、ホジキン病を有する患者からの組織構造スライスである。
【発明を実施するための形態】
【００１３】
発明を実施する形態及び産業上の利用可能性
本発明を様々な実施形態及び用途の例の文脈の中で説明する。説明のいくつかでは、簡略化するために用語「検出」が使用されるが、本発明は、細胞又は物質の存在の検出、細胞数又は物質量の測定、細胞又は物質の位置の特定、前からの変化又は変化率の特定、及び同様の特定を提供することができ、これらはすべて用語「検出」の中に含まれる。
【００１４】
本発明による磁気緩和測定の簡略化した例についてまず説明する。図１は、本発明による測定の被験者の組織の準備例の概略図である。この図のイラストは、かなり簡略化されており、説明のし易さのみを意図し、関わる実際の材料の実際の形状、サイズ、特性、又は複雑性を表現することを意図しない。組織１１、例えば、検査すべき臓器又は既知若しくは疑いのある腫瘍部位の部分は、対象とする種類のいくつかの細胞（周囲に「Ｖ」字形構造を有する円として図に示される）と、他の種類のいくつかの細胞（周囲に矩形構造を有する楕円形として図に示される）とを含む。複数の磁性ナノ粒子１２が提供され、小さな円として図に示される。複数の標的分子１３も提供され、小さな三角形として図に示される。ナノ粒子及び標的分子は結合し（又は接合）し、標的ナノ粒子１４を形成する。
【００１５】
次に、標的ナノ粒子を組織１５内に導入することができる。対象とする種類の細胞は、標的分子に対する結合部位又は他の親和性を有し、これは、そのような細胞の周囲の「Ｖ」字形構造により図に示される。標的分子は、対象とする種類の細胞に付着し、これは、「Ｖ」字形構造内に配置された三角形標的分子で図に示される。一般に、各細胞は、多数のそのような結合部位又は親和性部位を有する。他の種類の細胞は、そのような結合部位又は親和性を有さず、これは、標的ナノ粒子が付着していない楕円形で図に示される。細胞に結合しない標的ナノ粒子は、準備された試料内で自由なままであり、これは、いかなる特定の細胞にも接続しない三角形が付着した小さな円で図に示される。
【００１６】
図２（ａ、ｂ、ｃ、ｄ）は、本発明による測定例の概略図を提供する。図２ａでは、組織は図１のものと同様であり、各ナノ粒子の近傍に矢印が追加されている。矢印は、各ナノ粒子の磁化を表し、組織内のナノ粒子の磁化がランダムであることを示す（図では、矢印は、説明をし易くすることのみを目的として、４方向のうちの１つの方向で示され、実際には、磁化は任意の方向を有することができる）。
【００１７】
図２ｂでは、外部磁場（図の右下の輪郭が描かれた矢印で表される）が印加される。印加磁場に応答するナノ粒子の磁化は、ここでは均一であり、これは、すべての磁化矢印が

同じ方向を指すことにより図に表される。

【００１８】

図２ｃは、磁場が除去されて少ししてからの組織を示す。細胞に結合していないナノ粒子は、ブラウン運動により自在に運動し、磁化は素早くランダムに戻り、これは、様々な方向を指す非結合ナノ粒子の磁化矢印で図に表される。しかし、細胞に結合したナノ粒子は、そのような物理的運動を阻止され、したがって、磁化は、印加磁場が存在する場合と略同じままである。

【００１９】

図２ｄは、印加磁場の除去後、より長い時間たった準備試料を示す。結合ナノ粒子の磁化は、この時点までには、ランダムに戻っている。

【００２０】

図３は、図２と併せて説明されたプロセスからの測定の概略図である。磁場は、説明をし易くするために、簡略化された表現で時間の関数として示され、実際には、信号の単位、尺度、及び形状は異なってもよく、より複雑であることができる。プロセスの開始時では、図２ａの状態に対応し、ナノ粒子の磁化はランダムであり、外部磁場が印加される。その時間後、ナノ粒子の磁化は均一であり、図２ｂの状態に対応する。磁場は、非結合ナノ粒子がランダム磁化に戻る間、短時間にわたって無視することができ、図２ｃの状態に対応する。次に、結合したナノ粒子が均一磁化からランダム磁化に遷移する際、磁化を測定することができ、図２ｄの状態に応答する。図２ｃの状態から図２ｄの状態への測定磁化の特徴は、試料内の結合ナノ粒子数、ひいては対象とする種類の細胞の数に関連する。

【００２１】

図４は、本発明での使用に適した装置の概略図である。被験者台４１は、装置の残りの部分と効率的な関係で被験者を配置するように構成される。磁化システム４２、例えば、ヘルムホルツコイルは、磁化システムが磁場を試料に印加できるように、被験者台に相対して取り付けられる。磁気センサシステム４３は、磁化ナノ粒子に関連する小さな磁場を検知できるように、被験者台に相対して取り付けられる。制御・解析システム４４により、例えば、適切なプログラミングを有するコンピュータにより、このシステムは制御され、センサデータが解析される。

【００２２】

図５は、超電導量子干渉装置（ＳＱＵＩＤ）磁気センサを使用する例示的な装置の概略図である。図の上にある液体ヘリウム槽ジュアー５１が、ＳＱＵＩＤセンサの温度を維持する。ＳＱＵＩＤの二次軸方向磁場勾配計が、支持枠５３を通して突出する白色スノート５２内に含まれる。７つの磁場勾配計が、この例示的なスノート内に含まれ、１つは中央にあり、６つは半径２．１５ｃｍの円内にある。各磁場勾配計は低温ＳＱＵＩＤに誘導結合される。２つの円形コイル５４が、磁化パルス場をナノ粒子に提供可能なヘルムホルツ対を形成する。これらのコイルにより生成される均一な場は、可変であるが、通常、４０ガウス～５０ガウスであり、パルス長は通常、３００ｍｓｅｃ～８００ｍｓｅｃである。この例では、木製の枠が、ＳＱＵＩＤ及び測定プラットフォーム並びに磁化コイルを支持する。非磁気支持システムは、非金属構成要素、例えば、プラスチックで構築することができる３次元ステージ５５を備える。上の２つの黒色取っ手は、＋／－１０ｃｍ範囲にわたるｘ－ｙステージの移動を制御し、下の取っ手は、２０ｃｍ範囲にわたり測定台を昇降させるために使用される。試料ホルダを、マウス又は他の小動物等の生きた研究対象物を収容可能なステージ上に挿入することができる。

【００２３】

図６は、人間の癌検査に使用可能な例示的なＳＱＵＩＤセンサ装置の概略図である。木製構造６３は、図５に示される支持枠と同様であることができる。測定台は、患者を配置するベッド６５で置き換えることができる。２つのより大きなヘルムホルツコイル６４は、ベッドの上方及び下方に木製円形形態を備える。これらのより大きなコイルを使用して、均一なパルス場を生成し、患者内に注入された磁性ナノ粒子を磁化することができる。電流は、図５に示される装置で使用される電流から変更、例えば、増大させて、ここでも

、４０ガウス～５０ガウスの範囲の場を生成することができる。図５に示される装置と同様に、磁気勾配計のアレイを有するＳＱＵＩＤジュアー６１を使用して、磁化されたナノ粒子により生成される残留磁場変化を測定することができる。

【００２４】

図７は、弱場測定用の原子磁力計の概略図及び写真である。この装置は、マイクロチップ製造方法を使用して小型化され、複数のユニットを並べて配置して、センサアレイを形成することができる。磁力計の動作は、光ファイバを通して与えられるレーザ光線を与えることを通して行われる。この光線は、蒸気セル内の加熱されたＲｂガスを励起して、特定の原子状態にする。光線はまず、楕円偏光され、蒸気セル内にコリメートされる。ミラーがこの光線を、再びセル及びレンズを通って偏光解析器内に反射する。磁力計の長さに垂直に印加された磁場は、セル内のガスの屈折率を変更し、セルを通る光の偏光を変化させる。偏光の変化は、印加される磁場の大きさをもたらす。励起レーザは、複数の光ファイバケーブルを供給し、したがって、複数の磁力計に使用される。緩和測定用のこれらの磁力計のアレイは、７つの蒸気セルを備えることができ、１つは中央にあり、さらに６つ以上の蒸気セルで囲まれる。磁化コイルから印加される場は、図５に示される装置と直交し、ナノ粒子に最大の観察可能磁気モーメントを誘導する。図７の下にある写真は、本発明と共に適用される原子磁力計の例示的な物理的構成およびサイズを示す。示される装置の感度は、図５に示される例示的なＳＱＵＩＤシステムの感度１．０ｐＴ／√Ｈｚ（１００ｆＴ／√Ｈｚ）と比較して、０．１６ｆＴ／√Ｈｚである。原子磁力計は、極低温冷却剤、特に、液体ヘリウムが常に容易に取得可能ではない臨床用途に原子磁力計を望ましいものにすることができるような極低温冷却剤を必要としない。

【００２５】

乳癌の検出への適用例

乳癌の場合、スクリーニング及び検出に選択される現在の方法はマンモグラフィである。マンモグラフィは、乳癌を早期検出する能力の大きな改良をもたらしたが、それでもなお、良性病変と悪性病変とを区別できず、高密度の瘢痕化した乳房組織内の腫瘍の検出が難しく、乳癌の１０～３０％の検出に失敗するという欠点を有する。腫瘍固有の試薬に接合した磁性ナノ粒子を、緩和場の測定を通してこれらの粒子の検出と共に使用することは、腫瘍を早期検出する能力を向上させる潜在性を有する新技術を表す。さらに、弱場センサを使用しての標的磁性ナノ粒子の検出は、高速であり、標的細胞に結合した粒子のみが検出されるため、ＭＲＩ検出より高感度であることができる。

【００２６】

ヒトの乳癌の約３０％で過剰発現されるＨＥＲ２抗原を発現する乳癌細胞を標的とした接合磁性ナノ粒子を開発した。磁気特性に関してナノ粒子を特徴付け、最適なサイズ及びＦｅのｍｇ当たりの磁気モーメントを選択した。ＨＥＲ２に特異性を有するいくつかの異なる細胞株を研究して、部位密度及び検出のためのセンサシステムの感度を特定した。ＳＣＩＤマウスモデルを、ヒトの細胞株から成長させた腫瘍を使用して研究し、センサシステム下でマウスを撮像し、その後、組織構造研究を確認した。これらの結果は、乳癌を高感度で検出する磁気センサ手法の有効性を示す。

【００２７】

図８は、生体適合性コーティングを有する磁性ナノ粒子と、特定の細胞を標的とするために付着した抗体との概略図である。本発明の実施形態例の実証では、乳癌の３０～４０％に特異的なＨＥＲ２抗体（Ａｂ）を使用した。ナノ粒子は、カルボキシル基を含むコーティングを有し、スルホ－ＮＨＳ法を使用して、ナノ粒子を抗体に接合した。乳癌細胞株ＭＣＦ７、ＭＣＦ７／Ｈｅｒ２－１８（Ｈｅｒ２が安定に導入されたＭＣＦ７クローン）、ＢＴ４７４、及びＭＤＡ－ＭＢ－２３１に対して実行されたフローサイトメトリー。フローサイトメトリーにより特定されたＨｅｒ２結合部位、蛍光プローブＦＩＴＣに接合した抗Ｈｅｒ２抗体。図９は、既知の結合能を有する様々なミクロスフェアとの比較により計算された細胞毎のＨｅｒ２部位の数の図である。Ｈｅｒ２－１８を過剰発現するように操作されたＭＣＦ７細胞は、１１×１０６のＨｅｒ２結合部位を有し、ＢＴ－４７４は２

．８×１０６を有し、ＭＣＦ７は０．１８×１０６を有し、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１は０．１１×１０６を有する。非乳房細胞株はＨｅｒ２結合部位＜４０００／細胞を有する。

【００２８】

図１０は、磁性ナノ粒子（Ｏｃｅａｎ　Ｎａｎｏｔｅｃｈから）を乳癌細胞株に付着させる培養時間の関数としてのＳＱＵＩＤセンサシステム内の磁気モーメントの測定のグラフである。磁性ナノ粒子をカルボキシル生体適合性コーティングでコーティングし、次に、Ｈｅｒ２／ｎｅｕ抗体に接合した。この抗体は、ヒトの乳癌細胞の約３０％に特異的である。標識された磁性ナノ粒子を、生癌細胞を含むバイアル内に挿入し、バイアルの磁気モーメントを、１分～１６分の範囲の様々な時間に測定した。ゼロ時間点は、細胞に加えられる前のナノ粒子バイアルの磁気モーメントである。混ぜられていない粒子に磁気モーメントがないことは、非結合粒子が、このＳＱＵＩＤ撮像方法を使用して磁気信号を与えないことの実証である。細胞と混合すると、磁気モーメントは急激に増大して飽和し、細胞が表面に、１～２分で可能な限り最大の数のナノ粒子を集めたことを示す。一番上の曲線は、Ｈｅｒ２／ｎｅｕ抗体に非常に特異的なことが分かっている乳癌細胞株ＭＣＦ７／Ｈｅｒ２１８のものであり、大きな磁気信号がこれを証明する。乳癌細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－２３１も、Ｈｅｒ２／ｎｅｕで陽性であるが、抗体標的ナノ粒子が付着した部位ははるかに少ない。大きさが小さいことも、この傾向を示す。ＣＨＯ細胞株はＨｅｒ２／ｎｅｕに非特異的であり、培養後、はるかに小さな磁気モーメントを与える。磁気モーメントの存在は、ナノ粒子が細胞に入った細胞のいくらかの食作用を示す。細胞がない場合の曲線は、ナノ粒子のみを含むバイアルの場合であり、粒子のみでは引き続き信号を与えないままであり、したがって、粒子の凝集は発生しない。これらの結果は、標的癌細胞に対する抗体の特異性を実証し、結合した粒子のみが磁気モーメントを与えることを立証する。この結果は、結合しているか、それとも結合していないかに関わらず、すべての粒子を見るＭＲＩ等の他の方法では当てはまらない。

【００２９】

図１１は、２の倍数で細胞をピペットで落とすことによる細胞の数の関数として測定される細胞試料の磁気モーメントの図である。実証される感度は、ＭＣＦ７細胞及びＯｃｅａｎナノ粒子に対し、センサから３．５ｃｍの細胞の場合に細胞１００，０００個である。２．５×１０６ｎｐ／細胞がある。線形性は、磁気モーメントが細胞数をもたらすことを立証する。ＭＲＩコントラストは細胞数の線形関数ではない。典型的なマンモグラムでは、１０００万個の細胞が必要である。

【００３０】

乳房ファントムを、標準のマンモグラム較正ファントムを使用してモデルとして構築した。ファントムは粘土から構築され、非金属材料はこれらの場に対して透明である。生細胞を含むバイアルをファントム内に挿入した。図１２は、ＭＣＦ７細胞：左が２Ｅ＋０６細胞、右＝１Ｅ＋０６細胞のバイアルが挿入された状態のファントムの図である。細胞は、Ｏｃｅａｎ　ＮａｎｏｔｅｃｈからのＨＥＲ２　Ａｂ．ｎｐに接合した。場を５つの７チャネルＳＱＵＩＤ位置＝３５部位にマッピングした。３Ｄ輪郭マップは場の分布を表す。逆問題から得られた位置及びモーメントの大きさ。モーメントにより、上に示される細胞データから、バイアル内の細胞数が突き止められる。

【００３１】

ＳＱＵＩＤセンサ測定に適した乳癌のマウスモデルを開発した。ヒトの乳癌細胞株を有するＳＣＩＤ裸マウスを使用した。図１３は、ＳＱＵＩＤシステム下の裸マウスの写真である。ＳＱＵＩＤ技法による生体内プロセスを研究するために、マウスにヒトのＭＣＦ７細胞を２週間前に２つの場所に注入した。次に、これらの細胞は、マウスの脇腹にヒトの腫瘍を生成し、そのような１つの腫瘍は、マウスの右耳の後ろに見ることができる。管を通してマウスを経口麻酔した。標識された磁性ナノ粒子をこの段階で、尾部注入、腹膜間注入、又は腫瘍間注入のいずれかによりマウスに注入した。注入に続き、示されるようにマウスをセンサシステムの下に配置し、磁化パルスを印加し、注入粒子の結果として生成される磁気モーメントを測定した。生癌細胞の場合と同様に、粒子が腫瘍内の細胞に付着

するまでは、モーメントは観察されなかった。いくつかの場合では、両腫瘍はＭＣＦ７型細胞であり、他の場合では、２つの異なる細胞株を使用して、マウス内に腫瘍を成長させた。マウスは図５に示されるステージ上におり、センサシステムの下でいくつかの位置に動いて、より空間的な情報を得ることができた。時間の関数として測定を行い、粒子が血流から捕捉される速度及び粒子が肝臓に辿り着いた状態での食作用の発生速度を突き止めた。典型的に、マウスを７チャネルＳＱＵＩＤシステムの下の５つのステージ位置に置き、３５の空間位置を得た。次に、特別なコードのすべての位置の磁場を使用し、レーベンバーグ・マルカート理論を使用して電磁逆問題を解き、マウス内のすべての磁性粒子源の位置を突き止めた。次に、この情報を、写真からのマウスの既知の幾何学的形状と比較して、生きた動物内の乳癌腫瘍の位置を特定する正確性及び感度を特定した。図１４は、マウス腫瘍から得られた位置信頼度プロットを含む。左の球は、磁気モーメントが右の腫瘍の~２倍である左の腫瘍からのものである（以下参照）。２双極子最小二乗法により計算された位置、磁気モーメント及び位置を抽出した。モーメントにより、腫瘍内の標識付き細胞の数が決まる。

【００３２】

ＳＱＵＩＤシステムは、２つの異なる担癌動物に対して図１６、図１７、図１８に示される生きている動物への生体内測定を結果として生成する。各マウスは２つの腫瘍を有したが、異なる細胞型を有した。異なる量のナノ粒子が２つの腫瘍のそれぞれにより吸収された。ＭＣＦ７細胞を有するマウスは、腫瘍上のＨＥＲ２／ｎｅｕ抗体に特異的な部位の数が多いことから予期されるように、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１腫瘍を有するマウスよりも高い磁気モーメントを示した。図１５は、図１３で説明した３５の異なる測定部位で観察された磁気輪郭線の図である。これらの磁場の解析により、これらの位置の測定値に一致する腫瘍の空間的位置がもたらされ、ＳＱＵＩＤは、結果として、約３ｍｍの物理的測定よりも高い精度を与える。図１６は、２匹のマウス及び各マウスの両腫瘍の測定の経時変化の図である。粒子の摂取は高速に発生し、最初の１時間で最大付近の信号が得られた。ナノ粒子は、少なくとも、実験長である５時間にわたって腫瘍内に留まる。これらの測定に続き、マウスを安楽死させ、腫瘍及び他の臓器を取り出し、センサシステム下に配置して、注入されたナノ粒子がどれくらい腫瘍内に存在するかを突き止めた。図１７のプロットは、これらの測定の結果の図であり、生きたマウスに対する生体内測定との非常に良好な一致を示す。左下の図では、磁気モーメントは肝臓内で観察され、いくらかの食作用が発生し、粒子が肝臓に送られてなくなったことを示した。続く腫瘍の組織構造も、プルシアンブルー染色を使用して磁性ナノ粒子内の鉄を強調して、細胞への粒子の著しい付着を示した。

【００３３】

信頼領域を計算して、マウスの生体内測定での腫瘍の位置の正確性を突き止めた。図１８は、マウスの実際の腫瘍に重ねられた２つの腫瘍の位置の２次元９５％信頼限界の図である。約＋／－３ｍｍという空間位置の正確性が、ｘ方向及びｙ方向で得られる。図１９は、励起後の腫瘍の組織構造の写真である。１つのＭＣＦ－７腫瘍スライスの顕微鏡像。細胞のプルシアンブルー染色により、細胞に付着したｎｐ内に鉄が存在することが明らかである。矢印はｎｐで覆われた細胞を指す。

【００３４】

乳癌細胞株の抗体に接合した磁性ナノ粒子を検出することにより、高感度磁場センサシステムを乳癌の生体内早期検出に対して実証した。１００万個を超えるナノ粒子が各癌細胞に付着する。方法は、乳房腫瘍に匹敵する距離で＜１００，０００個の細胞まで高感度である。標準のＸ線マンモグラフィでは通常、１０００万個の細胞という細胞密度が必要である。測定されたモーメントは細胞数に対して線形である。すなわち、磁気モーメントの測定により、存在する癌細胞数がもたらされる。非常に高いコントラスト－細胞に付着していないナノ粒子は観察されない。ファントムの研究により、複数のソースの位置が正確に特定され、ソース当たりの細胞数が特定される。マウスモデルは、ヒトの乳癌細胞株の複数の腫瘍を使用して開発され、生体内測定を行い、ナノ粒子注入後、これらの腫瘍の

位置及び癌細胞カウントを特定した。逆問題を解くことにより、腫瘍及び細胞数の発見に成功する。組織構造により、ｎｐマウス腫瘍の存在が確認される。

【００３５】

卵巣癌の検出への適用例

卵巣癌の病因学はあまりよく理解されておらず、先制的なスクリーニングを示唆する危険因子へのエビデンスはわずかである。通常のスクリーニングテストは、腹部膨張等の疑いのある症状がある場合、骨盤内診察であり、通常、結果により癌の進行期が明らかになる。女性の習慣的なスクリーニングは現在、信頼できるスクリーニングテストがないため、行われていない。現在の卵巣癌に伴う大きな問題は、検出されたときには、卵巣から他の臓器に転移していることである。このため、多くの場合、子宮摘出が、卵巣摘出と共に実行される。卵巣癌の存在が早期に識別され、癌が卵巣内に含まれている場合、５年生存率は９５％である。しかし、この段階で検出されるのはわずか２９％である。疾病が局所に広がった場合、この生存率は７２％に落ち、離れた場所に転移した場合、生存率は３１％である。したがって、早期検出方法の開発は必須である。

【００３６】

図２０は、卵巣での腫瘍の成長を示す卵巣癌の図である。これらの腫瘍は、抗体ＣＡ－１２５への多数の受容体を有する細胞からなり、この抗体で標識された磁性ナノ粒子を使用して標的とすることができる。図２１は、患者被験者に典型的な距離で、ＳＱＵＩＤセンサ装置の下に配置された実物大卵巣ファントムの写真である。ファントムには、生卵巣癌細胞を含むバイアルが挿入されている。抗体ＣＡ－１２５で標識された磁性ナノ粒子をこのバイアル内に挿入し、これらの抗体はこれらの卵巣癌細胞に高い特異性を示すため、多数が細胞表面に付着した。次に、これらの磁性ナノ粒子をＳＱＵＩＤセンサ装置により検出して、動物及び人間両方の生体内モデルで生体内測定するための感度較正を提供した。

【００３７】

図２１に示されるファントム内に挿入された生卵巣細胞の感度研究の結果は、３つの異なる卵巣癌細胞株、すなわち、ｔｏｖ－１１２Ｄ、Ｏｖ－９０、及びｎｉｈｏｖｃａｒ－３に関して図２２に示される。プロットは、センサから患者の卵巣までの距離の関数として、３つの異なる細胞株に関してこの装置により検出された細胞の最小数を示す。癌細胞株ｏｖ－９０は、癌の最も悪性の高いもののうちの１つであることが分かっており、これらの結果は、細胞の表面上にＣＡ－１２５の多くの受容体があることを示す。細胞当たりのナノ粒子の数は、これらの測定から推定することができ、細胞当たりｔｏｖ－１１２Ｄでは２０，０００個、ｏｖ－９０では３４００個、及びｏｖｃａｒ－３では６７００個の粒子に対応する。

【００３８】

図２３は、フローサイトメトリーを使用してこれらの細胞の抗体部位を確認する図である。図２３ａ及び図２３ｂは、調べられた４つの細胞株のうちの２つを示す。細胞のみからの信号が示され、アイソタイプ（非特異的な結合分子Ｉｇｇを使用する）、Ｈｅｒ２／ｎｅｕ抗体、及びＣＡ－１２５抗体が示され、これらのプロットでは、部位数は右に向かって増大する。これらの図は、ＣＡ－１２５抗体がこれらの細胞上に多数の部位を有することを示し、ＳＫ－ＯＶ－３がこれらの２つのうちの最大である。抗体Ｈｅｒ２／ｎｅｕは、乳癌細胞の３０％にも特異的である。

【００３９】

時間の関数として測定を行い、粒子が血流から捕捉される速度及び粒子が肝臓に辿り着いた状態での食作用の発生速度を突き止めた。生きたマウス内のヒトの卵巣癌腫瘍に付着した磁性ナノ粒子（Ｏｃｅａｎ　Ｎａｎｏｔｅｃｈから）からの磁気モーメントの、時間の関数としてのＳＱＵＩＤセンサ装置内の磁気モーメント測定を図２４に示す。マウスは、２つの卵巣腫瘍：ＳＫ－ＯＶ－３の腫瘍及びＮＩＨ－ＯＶＣＡＲ３の腫瘍を有した。磁性ナノ粒子をカルボキシル生体適合性コーティングでコーティングし、次に、ＣＡ－１２５抗体に接合した。この抗体は、ヒトの卵巣癌細胞に特異的である。標識された磁性ナノ

粒子をマウス腫瘍内に注入し、マウスの磁気モーメントを、１分～３００分の範囲の様々な時間に測定した。粒子の摂取は高速に発生し、最初の１時間で最大付近の信号が得られた。時間経過は、ナノ粒子が数時間にわたって腫瘍内に留まったことを示す。ナノ粒子は、少なくとも、実験長である５時間にわたって腫瘍内に留まった。異なる量のナノ粒子が２つの腫瘍のそれぞれにより吸収された。ＳＫ－ＯＶ－３細胞を有するマウス腫瘍は、腫瘍上のＣＡ－１２５抗体に特異的な部位の数が多いことから予期されるように、ＮＩＨ－ＯＶＣＡＲ－３腫瘍を有するマウスよりも高い磁気モーメントを示した。ナノ粒子は、注入前は磁気モーメントを与えず、腫瘍内の細胞等の何かに付着した場合のみ、磁気信号をもたらす。実験は、粒子は正常な細胞には結合しないため、腫瘍以外の部位への注入が信号をもたらさないことを示した。ある時間期間後、粒子はシステムから貪食されるため、肝臓はこれらの粒子の蓄積の兆候を示し始める。これらの測定に続き、マウスを安楽死させ、腫瘍及び他の臓器を取り出し、センサ装置下に配置して、注入されたナノ粒子がどれくらい腫瘍内に存在するかを突き止めた。これらの測定は、生きたマウスでの生体内測定と非常によく一致した。続く腫瘍の組織構造も、プルシアンブルー染色を使用して磁性ナノ粒子内の鉄を強調して、細胞への粒子の著しい付着を示した。

【００４０】

ＳＱＵＩＤセンサ方法が生体内で機能することを立証するために使用されるマウスの写真を、このマウスの磁気輪郭場と共に図２５に示す。ヒトの腫瘍がマウスの脇腹に示され、これらは図２５での尾部の上及び両側の隆起である。これらの腫瘍は、ヒトの生卵巣癌細胞をこの重度障害の免疫欠如マウスに注入することにより生成され、６～１０ｍｍ腫瘍が明らかになるまで数週間にわたって成長させた。ＳＱＵＩＤセンサ実験中、管を通してマウスを経口麻酔した。標識された磁性ナノ粒子をこの段階で、尾部注入、腹膜間注入、又は腫瘍間注入のいずれかによりマウスに注入した。注入に続き、図１に示されるようにマウスをセンサの下に配置し、磁化パルスを印加し、注入粒子の結果として生成される磁気モーメントを測定した。生癌細胞の場合と同様に、粒子が腫瘍内の細胞に付着するまでは、モーメントは観察されなかった。いくつかの場合では、両腫瘍はＳＫ－ＯＶ－３型細胞であり、他の場合では、２つの異なる細胞株を使用して、マウス内に腫瘍を成長させた。

【００４１】

図５に示されるステージに配置されたマウスは、センサの下でいくつかの位置に動いて、より空間的な情報を得ることができた。典型的に、マウスを７チャネルＳＱＵＩＤの下の５つのステージ位置に置き、３５の空間位置を得た。次に、コードのすべての位置の磁場を使用し、レーベンバーグ・マルカート理論を使用して電磁逆問題を解き、マウス内のすべての磁性粒子源の位置を突き止めた。次に、この情報を、写真からのマウスの既知の幾何学的形状と比較して、生きた動物内の癌腫瘍の位置を特定する正確性及び感度を特定した。図２５は、３５の異なる測定で観察された磁気輪郭線を示す。これらの磁場の解析により、これらの位置の測定値に一致する腫瘍の空間的位置がもたらされ、ＳＱＵＩＤは、結果として、約３ｍｍの物理的測定よりも高い精度を与える。

【００４２】

ホジキンリンパ腫の検出への適用例

ホジキンリンパ腫（ＨＬ）は、全リンパ腫の３０％を占める。ＨＬは、リンパ節、優先的に頸部と、胸腺とで特徴的に生じるが、進行した疾病では、離れたリンパ節、脾臓、及び骨髄に関わり得る。症例の大半は、１５～３４の若い成人であるが、第２の発症ピークは５５を超える人々に発生する。現在、診断には生検評価が必要とされる。外科的生検は、感染及び出血等の複雑性を有し、生検の評価には通常、３～５日かかる。したがって、腫瘍質量により血が心臓に戻ることが妨げられるＨＬの症例（すなわち、上大静脈症候群、症例のうちの１０％）では、この待機期間中に大きな病的状態及び死亡率が生じ得る。ホジキンリンパ腫を標的とする抗体のうちのいくつか、すなわち、ＣＤ１５、ＣＤ３０、及びＣＤ２５が識別されている。しかし、後者の抗体は、多くの細胞を標的とし、特異性が低い。本発明が大きな臨床の影響を与えることができる別の用途は、療法後の永続的な

ＨＬ検出での用途である。再発を経験した患者が高線量の放射線療法を受ける場合、再発が早期に検出されたとき、予後が良好である。再発した患者は、主に初回寛解の長さによって決まる予後を有する。療法後の特に縦隔での大きな繊維性瘤の残留感覚は、持続性癌が存在するか否かの判断に不確実性をもたらし、繊維性瘤の手術は、出血の問題及び患者の病的状態の制御の難しさを伴う。

【００４３】

本発明の緩和時間測定法は、胸腺及び脾臓等のホジキン病により影響を受ける臓器に存在するリンパ腫細胞の数の定量的推定を提供することができる。ＲＳ細胞は、ＣＤ３０及びＣＤ１５の受容体を数百万含むＢリンパ球から導出される巨大細胞である。Ｔ細胞リンパ球を標的としたＳＱＵＩＤセンサの以前の結果では、より小さい細胞の場合、約百万個のナノ粒子が各Ｔ細胞に付着可能なことが示された。立体障害が、正常なリンパ球へのナノ粒子の付着を制限するが、はるかに大きなＲＳ細胞は、２５～５０倍の結合ナノ粒子を有することができる。ナノ粒子当たりの鉄の量は４．４×１０$^{-6}$ｎｇ／ｎｐである。ＲＳ細胞のサイズが大きいため、細胞当たり数百万個のナノ粒子があり、各細胞は最高で１０ｎｇの鉄を有し得る。脾臓又は胸腺に蓄積した１００個のＲＳ細胞は、１マイクログラムの鉄を含むことができる。１マイクログラム未満が、ＳＱＵＩＤ検出に適切であるため、１００個のＲＳ細胞の検出能が可能である。抗体標識されたナノ粒子の生体内の残留磁化の測定振幅は、リンパ腫癌での重要な診断ツールを提供することができる。信号強度は、腫瘍細胞表面上の抗原密度に依存し、したがって、ナノ粒子により生成される場の強度は、リンパ腫細胞上の抗原部位の数密度に比例する。粒子の数及び密度を突き止めて、検出される磁場の振幅を提供することができる。この情報は、生体内検出の計画並びに使用すべきナノ粒子の選択支援に使用することができる。ＳＱＵＩＤセンサは、ＲＳ細胞に対して高い感度を有し、ホジキン病に対して理想的なセンサシステムであると共に、生検又は化学療法中に疾病の治療を監視する能力なしでの疾病の生体内検出に理想的なセンサシステムである。

【００４４】

図２６は、磁性ナノ粒子（Ｏｃｅａｎ　Ｎａｎｏｔｅｃｈから）をリンパ腫細胞株に付着させる培養時間の関数としてのＳＱＵＩＤセンサシステム内の磁気モーメントの測定のグラフである。磁性ナノ粒子をカルボキシル生体適合性コーティングでコーティングし、次に、ＣＤ３４抗体に接合した。この抗体は、ヒトのリンパ腫細胞の一種類、すなわち、急性リンパ性白血病に特異的である。標識された磁性ナノ粒子を、生癌細胞を含むバイアル内に挿入し、バイアルの磁気モーメントを、１分～１６分の範囲の様々な時間に測定した。ゼロ時間点は、細胞に加えられる前のナノ粒子バイアルの磁気モーメントである。混ぜられていない粒子に磁気モーメントがないことは、非結合粒子が、このＳＱＵＩＤ撮像方法を使用して磁気信号を与えないことを示す。細胞と混合すると、磁気モーメントは急激に増大して飽和し、細胞が表面に、１～２分で可能な限り最大の数のナノ粒子を集めたことを示す。一番上の曲線は、ＣＤ３４抗体に非常に特異的なことが分かっているリンパ腫癌細胞株Ｕ９３７のものであり、大きな磁気信号がこれを証明する。下の曲線は、同じ細胞株であるが、非特異的なマーカーＢＳＡのものであり、培養後、はるかに小さな磁気モーメントを示す。ＢＳＡの磁気モーメントの存在は、ナノ粒子が細胞に入った細胞のいくらかの食作用を示す。Ｕ９３７は、Ｔリンパ球細胞のリンパ腫であり、ＲＳはＢリンパ球細胞のリンパ腫である。リンパ球細胞の主目的の１つは、属さない粒子を食べることでるため、この量の非特異性は予期される。これらの結果は、標的癌細胞に対する抗体の特異性を実証し、結合した粒子のみが磁気モーメントを与えることを立証する。この結果は、結合しているか、それとも結合していないかに関わらず、すべての粒子を見るＭＲＩ等の他の方法では当てはまらない。

【００４５】

ＲＳ細胞の試料は、細胞バンク及び多量の標本の全国的に認められた機関であるＵｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　ＭｅｘｉｃｏにあるＴｉｓｓｕｅ　Ｂａｎｋ施設から得た。ＲＳ細胞を検出するＳＱＵＩＤセンサシステムの効率は、手作業での血球計数器カウントによ

り特定された試料内のＲＳ細胞数と比較した。これらの分離したＲＳ細胞を、分離手順中、ＣＤ１５及びＣＤ３０に特異的に結合したナノ粒子で標識した。感度の較正を、１／１０細胞～１／１００，０００細胞の範囲にわたる連続希釈により実行した。悪性細胞上のナノ粒子密度の範囲は、１０７ナノ粒子／細胞を超えた。ＣＤ１５の部位密度は、受容体数／細胞を定量化するフローサイトメトリー技法を使用して突き止められた。ＣＤ１５及びＣＤ３０の部位の数／細胞を、免疫蛍光染色技法を使用して確認した。

【００４６】

図２７は、ナノ粒子に利用可能な部位の数及びＳＱＵＩＤセンサによる検出を特定する際の、リンパ系からのＲＳ細胞のフローサイトメトリー測定の結果の図である。図２７Ａは、リンパ節標本から分離されたＲＳ細胞の形態学的外観を示す写真である。図２７Ｂは、骨髄試料のフローサイトメトリー解析を示し、エンリッチメント手順を実行して、試料内のＲＳ細胞の頻度をフローサイトメトリー用に強化する前が（Ｂ１）であり、後が（Ｂ２）である。通常、ＲＳ細胞は、正常なリンパ球細胞の１０４個又は１０５個に１つの頻度で発生し、検出のために、フローサイトメトリーによりＣＤ１５及びＣＤ３０染色を使用する前に強化しなければならない。ＳＱＵＩＤセンサシステムは、生体内でＲＳ細胞をすべて検出し、サンプリングを必要としないため、フローサイトメトリー特定で必要とされる強化が必要ない。

【００４７】

リンパ節は、胸腺を除き、ＲＳ細胞が蓄積する主な部位の１つである。図２８は、ホジキン病を有する患者からの組織構造スライスである。ＲＳ細胞は、免疫ペルオキシダーゼ染色を用いて染色した。抗体ＣＤ１５は右側に示され、抗体ＣＤ３０は左側に示される。周囲の細胞は、リンパ節内の非悪性細胞である。ＳＱＵＩＤセンサは、リンパ節内で標識されたこれらのＲＳ細胞のうち数百個を検出することができる。

【００４８】

前立腺癌の検出への適用例

前立腺癌は、標準スクリーニング技術を使用しての早期検出がないため、高い致死率を有する。米国での２００９年の症例数は１９２，２８０であり、２７，３６０人が死亡した。前立腺癌は、男性の死亡の９％を占め、生存期間中に前立腺癌を発症する確率は６人に１人である。この疾病は通常、前立腺の肥大、泌尿器系の問題が生じるまで、又は他の臓器に広がるまで検出されない。この疾病の無症状での検出は通常、デジタル検査、高いＰＳＡテスト結果、又は生検により行われる。ＰＳＡテストは現在、信頼性が低いと見なされており、感染の危険を伴う多くの不必要な生検を生じさせている。デジタル検査もかなり主観的である。前立腺癌のテストは非常に物議を醸すものである。米国のみでのＰＳＡテストの費用は、３０億ドルを超え、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅで報告された最近の研究では、現在のスクリーニング方法により、５５歳を超える男性の死亡率が低減しないことが分かった。本発明は、この癌を転移前に検出することができる。

【００４９】

組織内の前立腺癌を検出する例示的な方法は、患者を超電導量子干渉装置センサ装置の測定台に配置すること、複数の抗体標識された磁性ナノ粒子を患者内に注入して、患者内の組織に特異的に結合させること、均一な磁化パルス場を印加して、患者内に注入されたナノ粒子を磁化すること、及び磁化されたナノ粒子の残留磁場を検出し、それにより、患者の組織に結合したナノ粒子の像を提供することを含む。組織は、前立腺組織を含むことができ、抗体標識された磁性ナノ粒子は、前立腺癌細胞の抗原に特異的に結合することができる。抗体標識された磁性ナノ粒子は、特定の抗体が付着する生体適合性コーティングでコーティングされた磁心を備えることができる。例えば、磁心は、酸化鉄等の強磁性材料を含むことができる。例えば、生体適合性コーティングは、デキストラン、カルボキシル、又はアミンを含むことができる。前立腺癌の検出の場合、特定の抗体はＰＳＭＡ抗体であることができる。

【００５０】

前立腺特異膜抗原（ＰＳＭＡ）は、大半の前立腺癌で高度に発現する膜貫通糖タンパク質である。これは、ｍＡｂ７Ｅ１１とも称される。これは、固形癌の腫瘍血管内皮の表面に発現するが、正常な前立腺細胞には発現しない。前立腺癌内で観察されるＰＳＭＡの量は、腫瘍の重症度又は段階に従う。フローサイトメトリーにより、ＬＮＣａＰ及びＰＣ－３を含む前立腺癌のいくつかの細胞株にこの抗体に対する多数の受容体部位があり、その一方で、ＰＳＭＡ陰性細胞株ＤＵ－１４５が発現を示さないことが示された。磁性ナノ粒子をこれらの陽性細胞株に付着させた結果は、細胞毎に１００万個以上のナノ粒子を示した。これらの結果は、細胞毎のナノ粒子に関する卵巣癌及び乳癌及び体内の腫瘍の深さからの結果に匹敵し、ＳＱＵＩＤセンサを使用する生体磁気検出方法は、卵巣癌と同じ感度を前立腺癌に対して有する（上で参照により援用された関連出願の１つ又は複数に記載）。したがって、卵巣癌についての研究結果を、前立腺癌の検出及び位置特定にそのまま当てはめることができる。卵巣癌のＣＡ－１２５抗体と比較して、ＰＳＭＡは、生体内前立腺特異的標的戦略に対してさらに高い特異性を有する。

【００５１】

ＳＱＵＩＤセンサ方法は、腫瘍内の微小血管構造の定量的推定を提供することができ、血管新生（血管形成）及び個人の腫瘍等級付けの新しい代用につながる。ナノ粒子を使用した実験的な前立腺癌モデルでの腫瘍微小血管特徴付けの研究において、腫瘍の成長及び悪性度／等級が、腫瘍の新血管形成と直接的な関係を有することが示されている。他の研究は、腫瘍内の磁性粒子の濃度が、組織のグラム当たりナノ粒子約２．３ｍｇであると推定している。この濃度は通常、肝内動脈投与された放射線ミクロスフェアを介して治療を受けたヒトの肝臓癌患者の腫瘍内で達成され、ナノ粒子は、腫瘍の血管年輪内に凝縮する傾向を有する。１ナノグラム未満が、ＳＱＵＩＤ検出に適切である。生体内の抗体標識されたナノ粒子の残留磁化の測定振幅は、前立腺癌で重要な診断ツールを提供することができる。信号強度は、腫瘍細胞表面上の抗原密度に依存し、したがって、ナノ粒子により生成される場の強度は、前立腺腫瘍細胞上の抗原部位の数密度に比例する。したがって、粒子の数及び密度は、検出される磁場の振幅を提供する。次に、この情報は、生体内検出の計画並びに使用すべきナノ粒子の選択支援に使用することができる。

【００５２】

膠芽細胞腫の検出への適用例

脳腫瘍は特に致死率が高く、複数の形態で発生する。グリア細胞に関わる癌は、最も一般的な形態であると共に、最も悪性度の高い人間の脳腫瘍でもある。様々なグリア細胞が、乏突起膠腫（乏突起膠細胞に関わる）、星状細胞腫（星状細胞に関わる）、及び膠芽細胞腫の種類の癌の発生に関与し得る。後者は、最も頻繁に発生する脳腫瘍である。これらの種類の癌は通常、非常に短期間で死に至る。膠芽腫細胞は、この腫の癌の撮像に使用し得るＥＧＦＲ抗体、８１Ｃ６抗体、及びＰＴＮ抗体等のマーカーにより標的とすることができる。Ｕ－２５１等のマウスモデル及び脳腫瘍細胞株が、人間に適用する前のテストに利用可能である。

【００５３】

脳腫瘍の標的で重要な考慮事項は、マーカーが付着したナノ粒子の血液脳関門をわたる輸送である。この関門は、悪性腫瘍に関連する血管系ではいくらか開かれているが、それでもなお障害であり続ける。親油性表面でコーティングされ、抗体又はペプチドに接合したナノ粒子の使用は、関門を通過する能力を増大させる。さらに、マーカーを有するナノ粒子は、親油性表面を有するポリマーコーティング内に封入することができ、ミセル内は別の手法であり、脳内に入ると、加熱ＲＦ又は超音波パルスのわずかな印加を使用して接合したナノ粒子をポリマーから解放すること。

【００５４】

脳腫瘍を検出する例示的な方法は、患者を超電導量子干渉装置センサ装置の測定台に配置すること、複数の抗体標識された磁性ナノ粒子を患者内に注入して、患者内の脳腫瘍に特異的に結合させること、均一な磁化パルス場を印加して、患者内に注入されたナノ粒子を磁化すること、及び磁化されたナノ粒子の残留磁場を検出し、それにより、患者の組織

に結合したナノ粒子の像を提供することを含む。標的は脳腫瘍であり、抗体標識された磁性ナノ粒子は、脳腫瘍細胞の抗原に特異的に結合することができる。抗体標識された磁性ナノ粒子は、特定の抗体が付着する生体適合性コーティングでコーティングされた磁心を備えることができる。例えば、磁心は、酸化鉄等の強磁性材料を含むことができる。例えば、生体適合性コーティングは、デキストラン、カルボキシル、又はアミンを含むことができる。膠芽細胞腫の検出の場合、特定の抗体はＥＧＦＲ抗体又は同様の抗体であることができる。

【００５５】

血管形成ＥＧＦＲはいくつかの形態を有し、膠芽腫細胞を含むいくつかの種類の癌細胞により発現するが、正常な細胞では発現しない表皮性成長因子受容体（ＥＧＦＲ）の一種である。ＥＧＦＲは現在、膠芽細胞腫と診断された患者への免疫療法臨床試験を受けている。これは、磁気緩和時間検出に適し、体内に注入される磁性ナノ粒子に接合することができる。これらの磁性ナノ粒子は、血流能関門を貫通する標的ナノ粒子の有効性を増大させる、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等のコーティングを備えることができる。本発明の別の実施形態例では、マーカーが付着した磁性ナノ粒子を、血流脳関門を貫通可能なポリマーコーティング内に含めてから、小さなＲＦ加熱パルスを印加し、又は超音波を使用して解放することができる。これらの血管形成ペプチドを磁性ナノ粒子に付着させ、これらを細胞に付着させた結果は、細胞毎のナノ粒子に関する卵巣癌及び乳癌及び体内の腫瘍の深さからの他の抗体結果の使用に匹敵する。ＳＱＵＩＤセンサ等のシステムを使用する生体磁気検出方法は、卵巣癌と同じ感度を脳腫瘍に対して有する（上で参照により援用された関連出願の１つ又は複数に記載）。したがって、乳癌及び卵巣癌についての研究結果を、脳腫瘍の検出及び位置特定にそのまま当てはめることができる。

【００５６】

膵臓癌の検出への適用例

いくつかの腫瘍マーカーが膵臓癌に存在する。ＣＡ１９－９は、この癌で増大するマーカーの一例であるが、あまり感度がよくなく（７７％）、非特異的（８７％）である。マーカーの組み合わせが、Ｍ．Ｄ．Ａｎｄｅｒｓｏｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｎｔｅｒにより示唆されており、これらは膵臓癌のスクリーニングに関してテスト中である。これらのマーカーは、マイクロＲＮＡであり、ｍｉＲ－２１、ＭｉＲ－２１０、ｍｉＲ－１５５、及びｍｉＲ－１９６ａを含む。しかし、この組み合わせも、低い感度（６４％）しか達成しないが、ＣＡ１９－９よりも高い特異性（８９％）を達成する。加えて、いくつかの抗体が、人間の膵臓癌の特定の細胞株に対して識別されており、例えば、ＦＧ細胞株であり、これらはＳ３－１５、Ｓ３－２３、Ｓ３－４１、Ｓ３－６０、Ｓ３－１１０、及びＳ３－５３を含む。別の識別マーカーは、膵臓癌及び間質性腫瘍細胞に高度に発現するウロキナーゼプラスミノーゲン活性化受容体（ｕＰＡＲ）である。後者のマーカーは、磁性ナノ粒子を、裸マウス内で異種移植片として成長した膵臓癌に送達するために使用されている。これらのマーカーは、標識された造影剤として使用される場合、マウスの腫瘍のＭＲＩ検出をもたらす。メカニズムは主に、腫瘍内皮細胞へのナノ粒子の送達である。

【００５７】

膵臓癌の診断に関して、信頼できる撮像手法はない。したがって、ＭＲＩの標的造影剤としてのバイオマーカーの開発又は磁気緩和をより高感度にすることは、大きな進歩である。ＭＲＩは、腫瘍内の小さな異常を検出することができ、癌が転移したか否かの判断にも有用である。ダイナミック造影（ＤＣＥ）ＭＲＩは潜在的に、良性腫瘍と癌性腫瘍とを区別するが、いくつかの偽陽性を生み出す。ＭＲＩの費用により、スクリーニングツールとしての用途が制限される。腫瘍のＭＲＩ撮像は多くの場合、上述したように磁性ナノ粒子を造影剤として使用し、そのようなナノ粒子を注入する基準を提供する一般に認められた計画案である。ナノ粒子重量２ｍｇ／ｋｇの投与量での血管内ＭＲＩ造影剤が、転移病変の検出に使用されている。しかし、膵臓癌でのＭＲＩの使用は非常に制限されている。

【００５８】

本発明は、腫瘍内の微小血管構造の定量的推定を提供することができ、血管新生（血管

形成）及び個別の腫瘍等級付けの新しい代用につながる。ナノ粒子を使用した実験的な膵臓癌モデルでの腫瘍微小血管特徴付けの研究の結果において、腫瘍の成長及び悪性度／等級が、腫瘍の新血管形成と直接的な関係を有することが示されている。他の研究は、腫瘍内の磁性粒子の濃度が、組織のグラム当たりナノ粒子約~２．３ｍｇであると推定している。この濃度は通常、肝内動脈投与された放射線ミクロスフェアを介して治療を受けたヒトの肝臓癌患者の腫瘍内で達成され、ナノ粒子は、腫瘍の血管年輪内に凝縮する傾向を有する。ナノグラムが、本発明による検出に十分である。生体内の抗体標識されたナノ粒子の残留磁化の測定振幅は、膵臓癌で重要な診断ツールを提供することができる。信号強度は、腫瘍細胞表面上の抗原密度に依存し、したがって、ナノ粒子により生成される場の強度は、膵臓腫瘍細胞上の抗原部位の数密度に比例する。粒子の数及び密度を突き止めて、検出される磁場の振幅を提供することができる。この情報は、生体内検出の計画並びに使用すべきナノ粒子の選択支援に使用することができる。膵臓癌細胞株の例としては、ｕＰＡＲ抗体に特異的であることが分かっているＦＧ又はＭＩＡ　ＰａＣａ－２が挙げられる。

【００５９】

本発明を様々な実施形態例及び設計考慮事項に関連して本明細書に記載のように説明した。上記説明が単に本発明の原理の適用を示すものであり、本発明の範囲が本明細書に鑑みて特許請求の範囲により決定されるべきであることが理解されよう。本発明の他の変形及び変更が当業者には明らかになろう。

【図１】

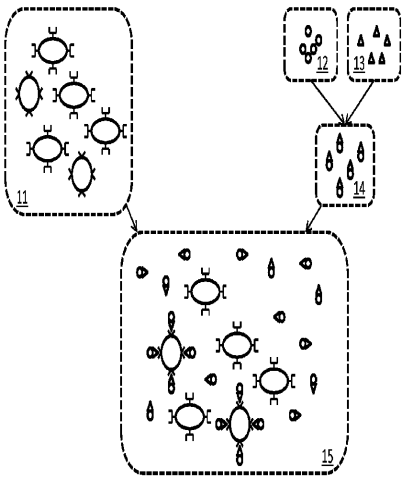


Fig. 1

【図２ａ】

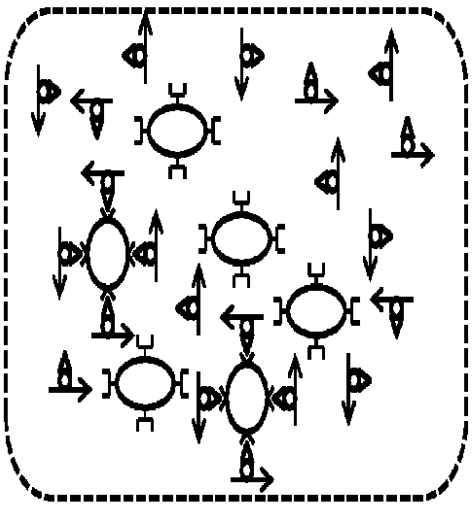


Fig. 2a

【図２ｂ】

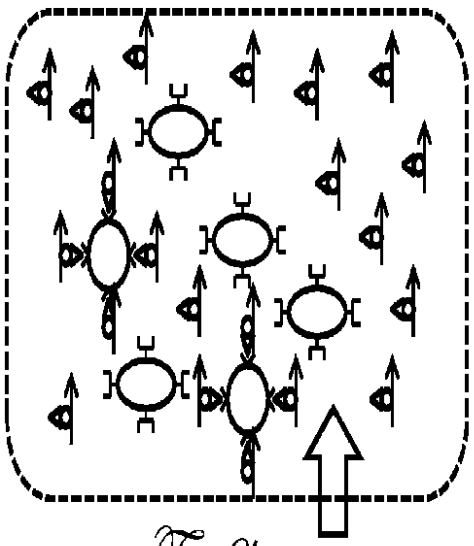


Fig. 2b

【図２ｃ】

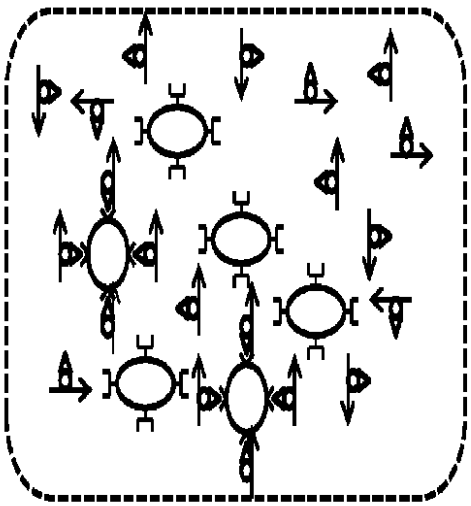


Fig. 2c

【図２ｄ】

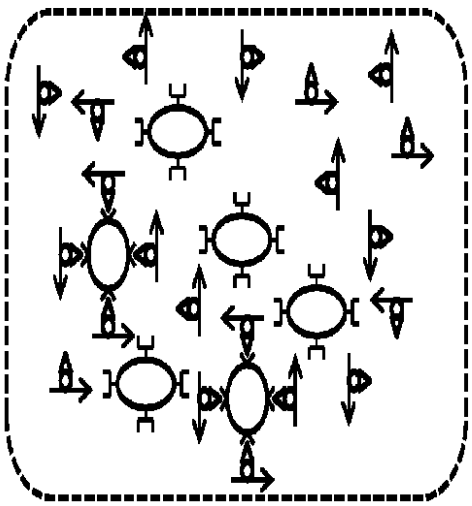


Fig. 2d

【図３】

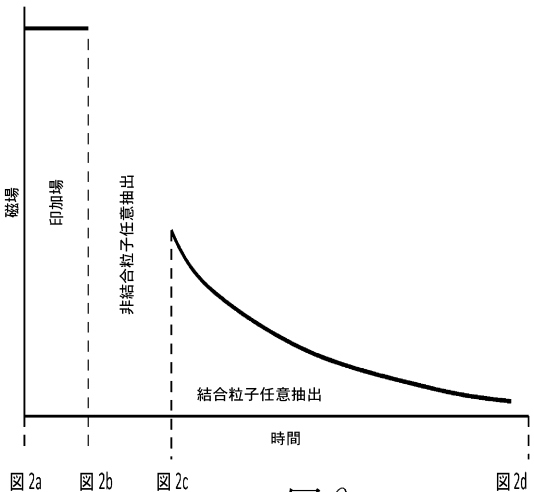


図3

【図４】

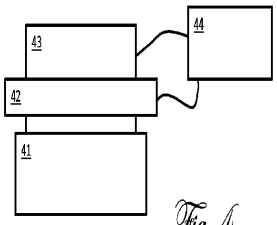


Fig. 4

【図５】

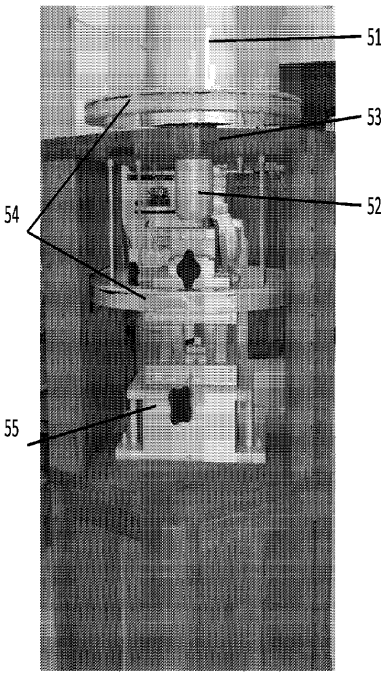


Fig. 5

【図６】

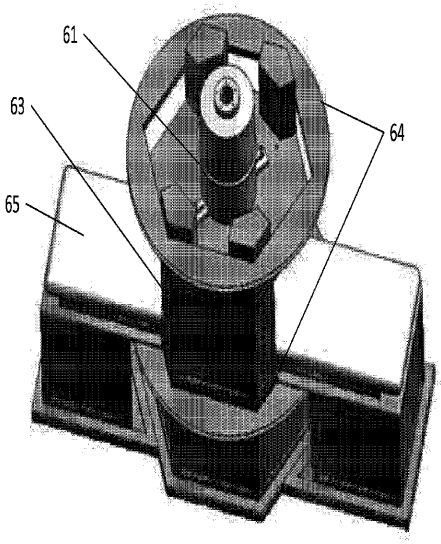


Fig. 6

【図７】

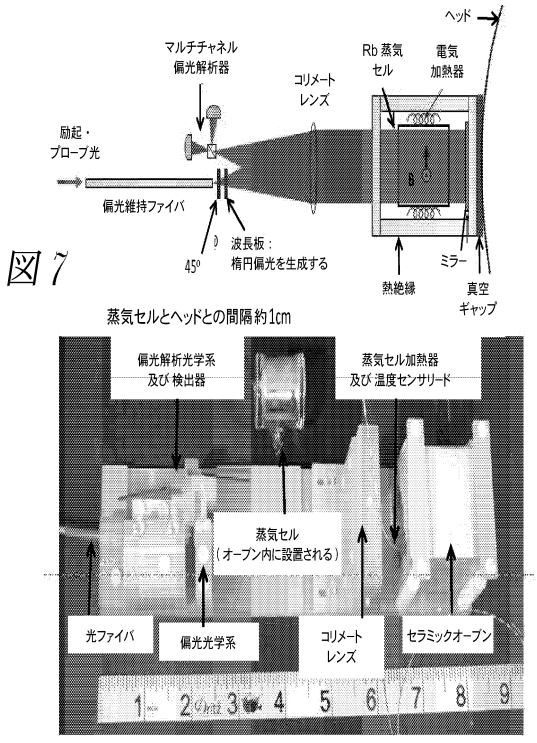


図 7

【図８】

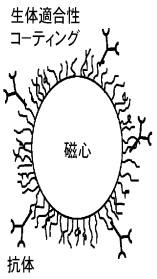


図8

【図９】

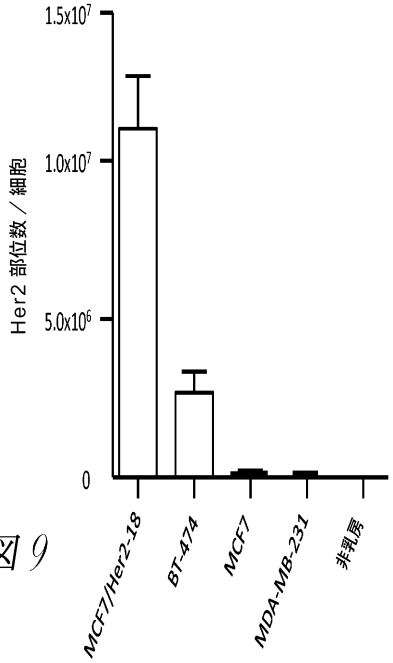


図9

【図１０】

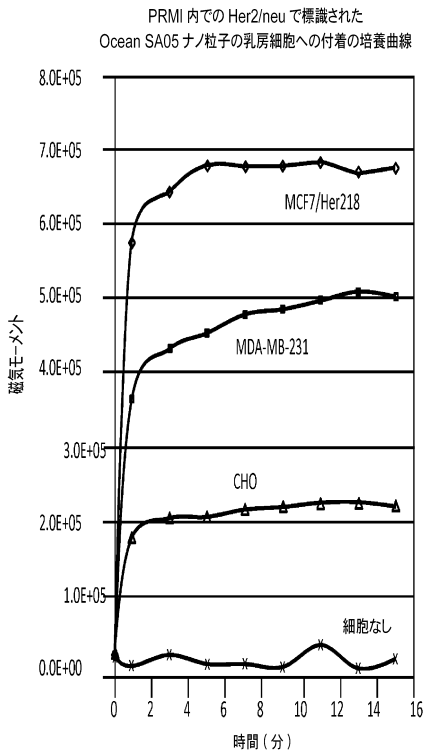


図10

【図１１】

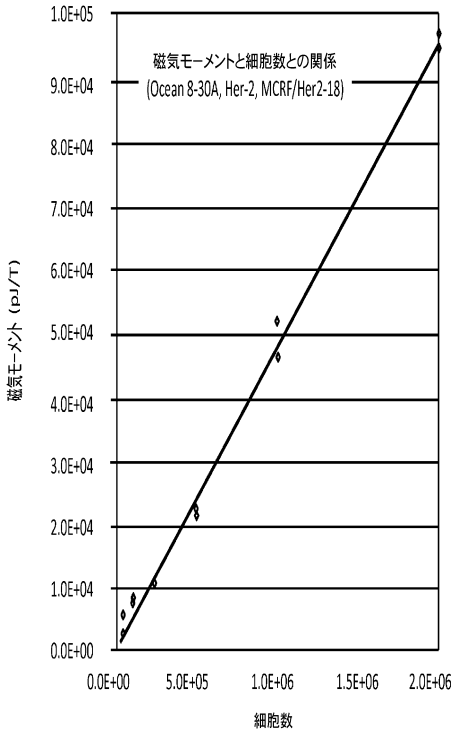


図11

【図１２】

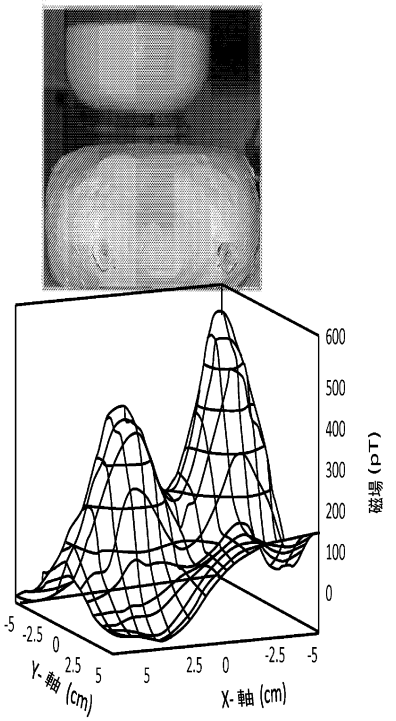


図12

【図１３】

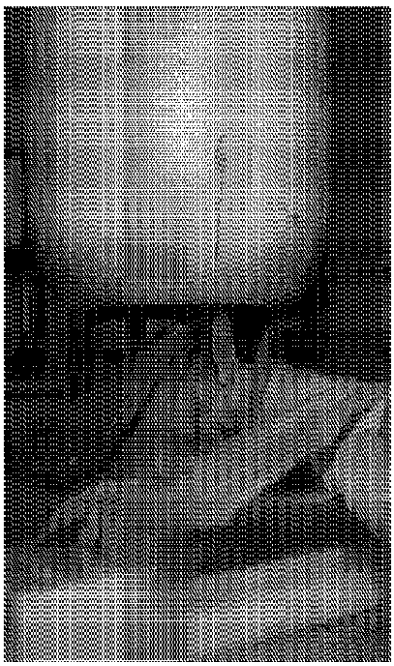


Fig. 13

【図１４】

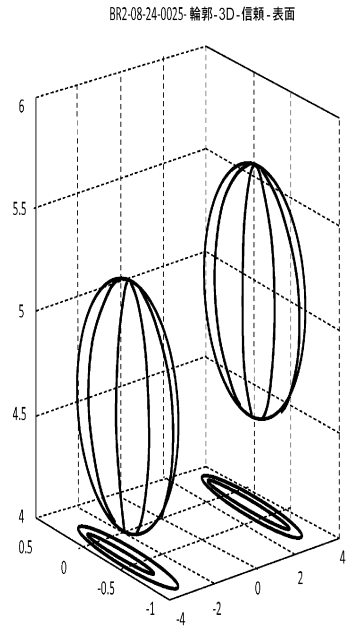


図14

【図１５】



Fig. 15

【図１６】

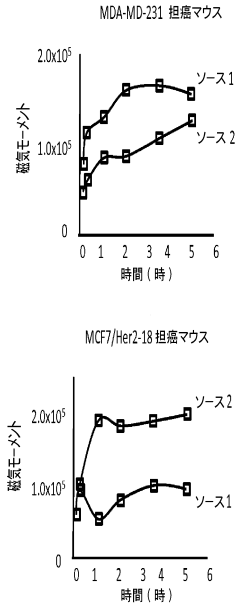


図16

【図１７】

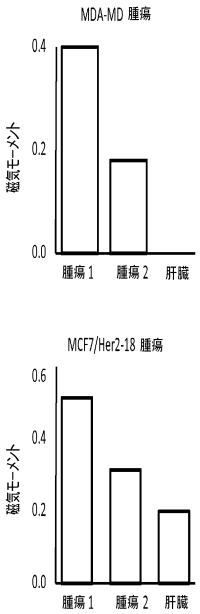


図17

【図１８】

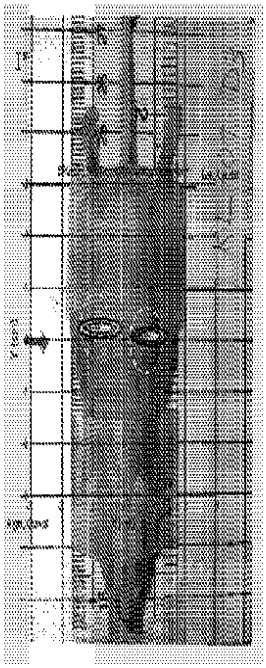


Fig. 18

【図１９】

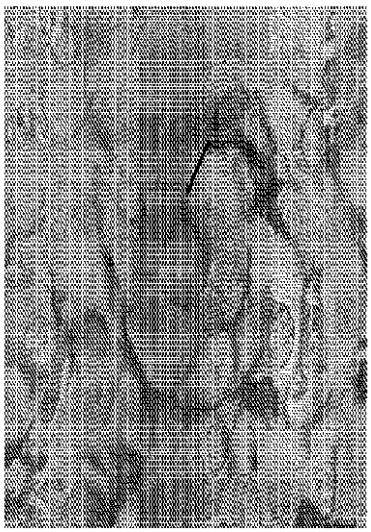


Fig. 19

【図２０】

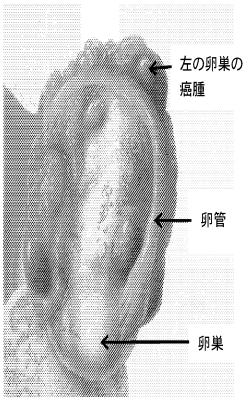


図20

【図２１】

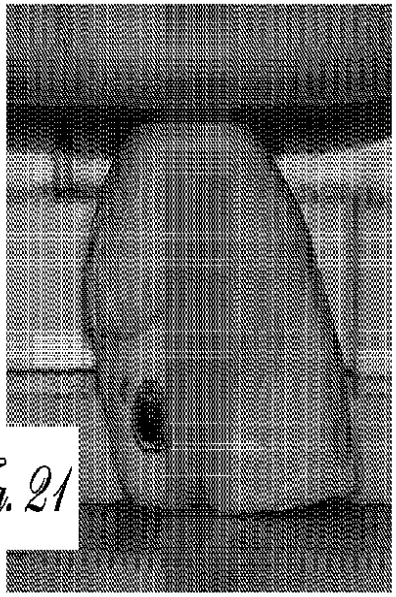


Fig. 21

【図２２】

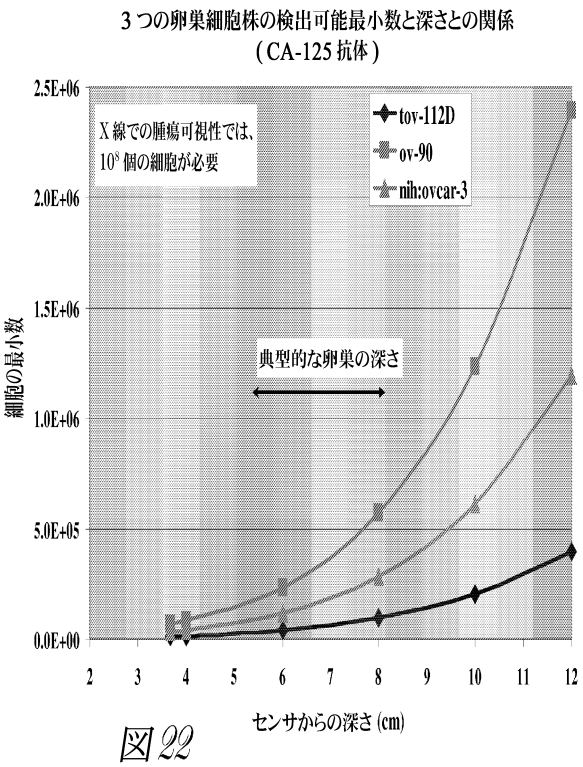


図22

【図２３】

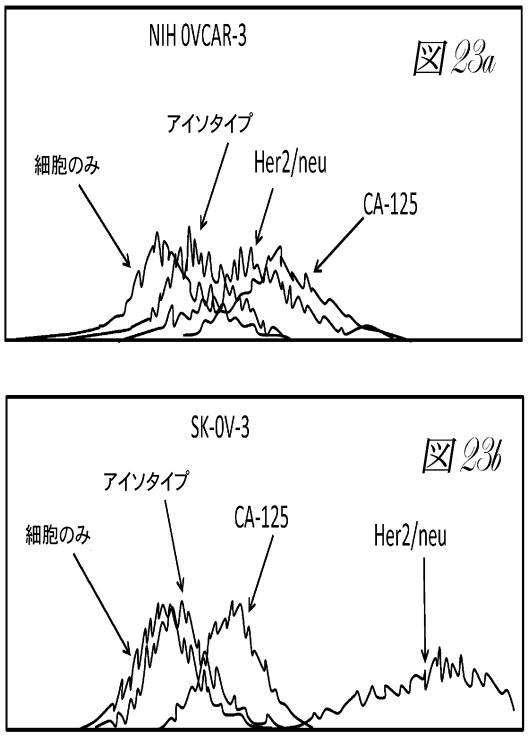


図23a

図23b

【図２４】

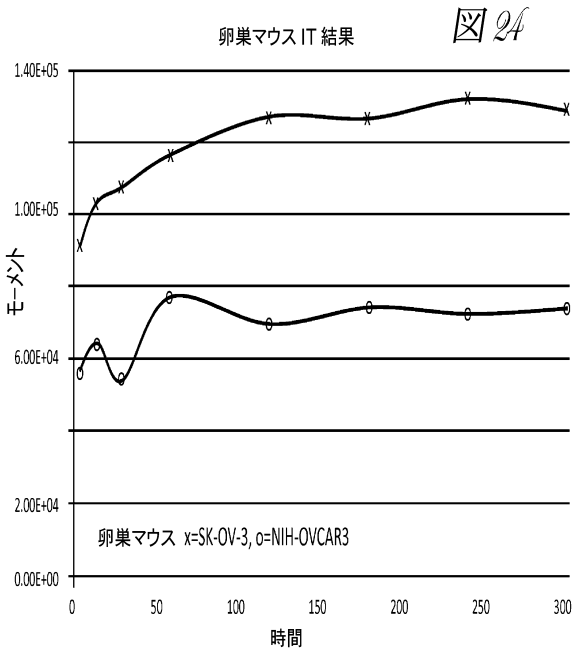


図 24

【図２５】

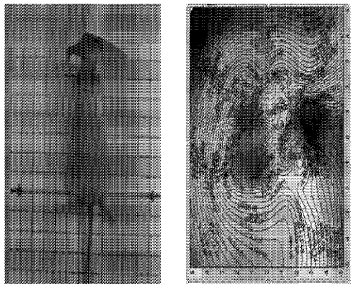


Fig. 25

【図２６】

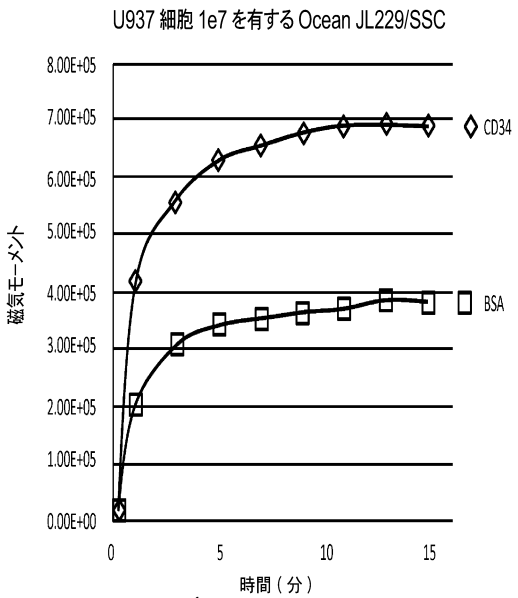


図 26

【図２７】

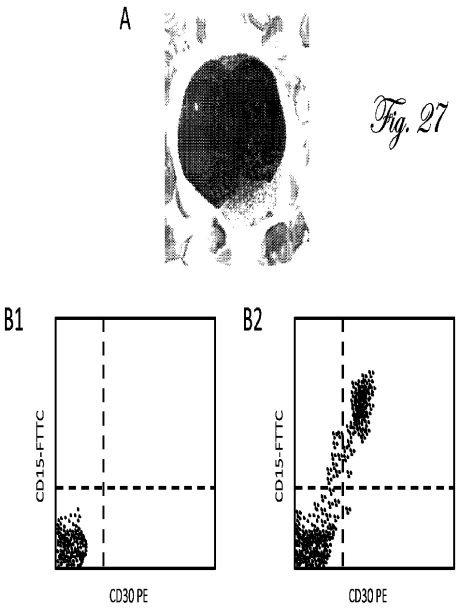
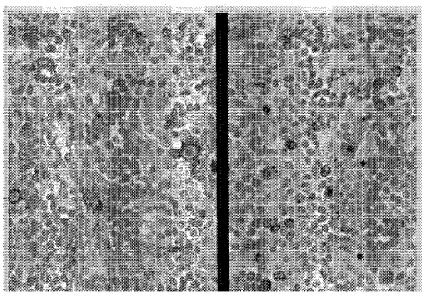


Fig. 27

【図２８】

Fig. 28



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/308,897
(32)優先日 平成22年2月27日(2010.2.27)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/314,392
(32)優先日 平成22年3月16日(2010.3.16)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/331,816
(32)優先日 平成22年5月5日(2010.5.5)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/361,998
(32)優先日 平成22年7月7日(2010.7.7)
(33)優先権主張国 米国(US)

審査官 田邉 英治

(56)参考文献 特開平０２－０８４９３３（ＪＰ，Ａ）
特表平０６－５０７３７１（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００２／０１７７７６９（ＵＳ，Ａ１）
特開平０４－００５５９０（ＪＰ，Ａ）
特表平１０－５１１４５７（ＪＰ，Ａ）
特開２００９－２３６５９８（ＪＰ，Ａ）
特開平０７－２２７３８５（ＪＰ，Ａ）
特表２００７－５３０４２２（ＪＰ，Ａ）
特表２００５－５２３７３６（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｂ 5／０４－ 5／０５
Ａ６１Ｋ ３９／００－３９／４４
Ａ６１Ｋ ４９／００－４９／０４
Ａ６１Ｋ ５１／００
Ｇ０１Ｎ ２７／７２－２７／９０