

(様式10)

財団法人医療機器センター
外国人研究者招へい事業
(萌芽的先端医療技術推進研究推進事業)

研究実績報告書

1. 招へいされた外国人研究者

所属・職名：シドニー大学・顕微鏡および微量分析のためのオーストラリアキーセンター
・電子顕微鏡ユニット・準教授/ディレクター代理 (博士)

Australian Key Centre for Microscopy & Microanalysis,

Electron Microscope Unit, The University of Sydney

Associate Professor/Dputy Director (BClin Chem BSc MSC PhD BioMed Sc)

氏 名：フィリップ セレスタ ピエール ブラット

Filip Celesta Pierre Braet

2. 受入研究者

所属・職名：東京慈恵会医科大学・講師

氏 名：松浦 知和

3. 招へい期間：平成18年10月30日 ～ 平成18年11月10日 (12日間)

4. 研究課題：担癌動物および癌モデルにおける抗CD147抗体ラベルマイクロバブル集積性の 微細形態学的検討 ―走査トンネル顕微鏡を用いた観察―

5. 研究活動の概要

- ① 10月30日 (月曜日)：主任研究者・大川清、分担研究者・松浦知和、協力研究者・永妻啓介で、プロジェクトの目的・研究の進行状況に関して、Braet博士に説明後、意見交換を行った。
(東京慈恵会医科大学)
- ② 10月31日 (火曜日)：分担研究者・松浦知和、協力研究者・斉藤勝也、永妻啓介とともに、血管内皮細胞の性状に関して意見交換を行った。(東京慈恵会医科大学)
- ③ 11月2日 (木曜日)：分担研究者・伊藤貴司、射谷和徳、協力研究者・今野剛人、近藤裕道
(以上アロカ(株)研究所)、分担研究者・松浦知和と、マイクロ・ナノバブルの開発と
超音波イメージングに関して、意見交換を行った。(アロカ(株)研究所)
- ④ 11月6日 (月曜日)：新潟大学医歯系顕微解剖学分野・牛木辰男教授を訪問し、原子間

顕微鏡 (AFM) 技術に関して意見交換。その後、“Probing surface and submembranous structures in living (liver) cells with the atomic force microscope”と題してセミナーを開催。参加者20名。(新潟大学大学院)

- ⑤ 11月7日 (火曜日) : 東京慈恵会医科大学にて2つのセミナー開催。演題名 “How correlative imaging techniques contributed to the study of the liver sieve” および “How correlative imaging techniques contributed to the study of colorectal liver metastasis” で合わせて2時間の講演。参加者40名。(東京慈恵会医科大学)
- ⑥ 11月9日 (木曜日) : 東京理科大学・理工学部・阿部研究室訪問。“Australia’s national microscopy & microanalysis research facility: An overview of biomolecular microscopy techniques” と題してセミナーを開催。参加者50名。その後、分担研究者・阿部正彦、酒井秀樹、流動研究員・土屋好司、協力研究者・大久保貴広、酒井俊郎、鳥越幹二郎 (以上、東京理科大学)、分担研究者・松浦知和と、マイクロ・ナノバブルの電子顕微鏡観察法に関して、意見交換。(東京理科大学・理工学部)
- ⑦ 他の滞在日は、報告書の作製、意見交換でBraet博士が提示した資料の収集、共著論文 “The Hepatic Sinusoidal Lining and Colorectal Liver Metastasis” 作製に時間を費やした。

6. 研究活動の成果

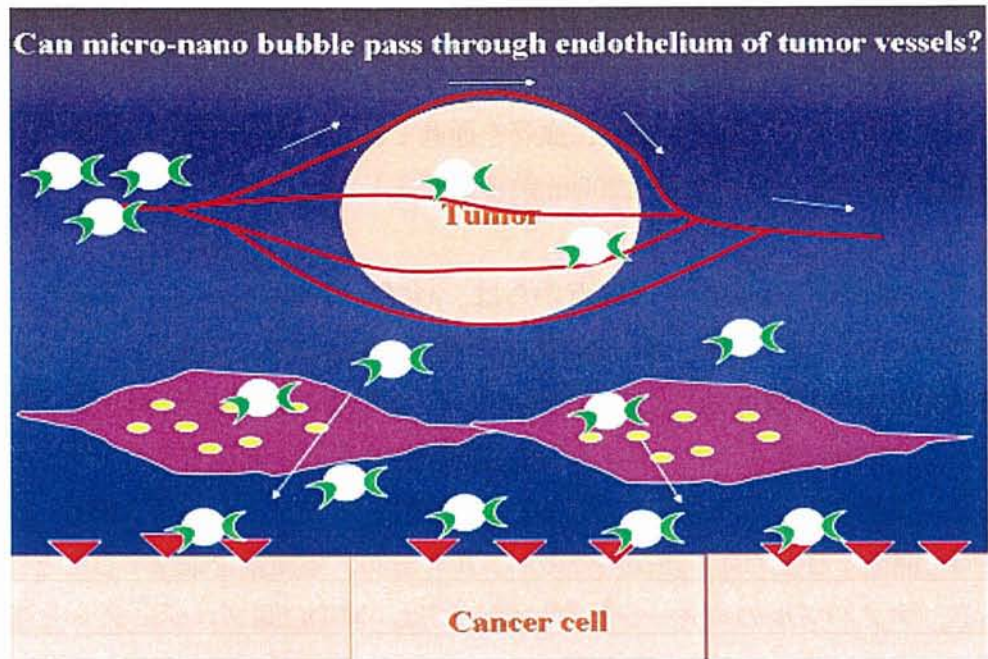
今回のFilip Braet博士招へいの主たる目的は、本プロジェクトで開発する超音波造影剤 (抗CD147抗体ラベルマイクロ・ナノバブル) の集積性を、担癌ヌードマウスやバイオリアクターに作製した癌モデルで確認するための微細形態学的観察法に関して、共同研究を行うためである。Braet博士との討議、意見交換によって、以下のような成果が得られた。

① マイクロ・ナノバブルは腫瘍血管を通過して腫瘍に到達するか？

超音波造影剤は、音響インピーダンスが組織と著しく低い気体を用いることが望ましく、このためマイクロバブルが臨床的には用いられている。本プロジェクトで開発中の超音波造影剤も、シクロアミロース界面活性剤および重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤を新規に開発し、それらの新規界面活性剤で作製したマイクロ・ナノバブル (粒径100nmから1 μ m) である。

新規超音波造影剤に求められる機能としては、1)均一な粒径、2)生体内での安定性と分解性 (相反する性質)、3)血管通過性、4)目的病変への集積性 (本プロジェクトでは癌)、5)生体内での超音波振動性、破壊性である。均一なナノバブルを多量に生産する方法としては、「多孔質ガラス膜による単分散状ナノバブルの生成法」を応用する予定である。また、生体内でのバブルの安定性・生分解性に関しては、界面活性剤の材質等を検討中である。集積性はマイクロ・ナノバブルへの抗CD147抗体標識を検討している。問題は、

血管通過性の良いマイクロ・ナノバブルの設計である。マイクロ・ナノバブルの粒径もこの問題を明らかにしないと設定できない。



Braet博士は、ブリュッセル自由大学のEddie Wisse教授のもとで、肝臓類洞内皮細胞の篩状小孔 (fenestrae) の形成に関して研究を続けてきた。また、2004年にシドニー大学での現職となってからは、大腸癌の肝臓転移モデルでの腫瘍血管の特性に関して、研究を続けている。これらの専門知識、最新知見を、「マイクロ・ナノバブルの血管通過性」という問題の解決のため役立てることをBraet博士に期待し、招へいした。博士は、内皮細胞を物質が通過する機構を5つに分類した。1) Coated pits、2) Caveolae、3) vesiculo vacuolar organelle (VVO)、4) Pore (fenestrae)、5) Pinocytosisを介する物質通過機構である。このうち、VVOやfenestraeは200nm前後の内皮細胞に開く小孔で、200nm前後のナノバブルであれば受動的に通過する可能性がある。また、電子顕微鏡観察では、生体の内皮細胞・培養内皮細胞ともに1 μ m前後の径の大きな孔 (Gapと呼ぶ) が観察される。博士によればこの孔が生理的なものか、電子顕微鏡観察のための処理中の人工物かは未だにわからないとのことであった。ウイルス感染などによって生じた可能性もあるとのことである。

さらに腫瘍までにマイクロ・ナノバブルが到達・集積するには、内皮細胞を含め5つの関門が想定される。1) 血管内皮細胞、2) 内皮細胞と実質細胞の間隙 (肝臓であれば Disse Space)、3) 細胞間結合装置 (adherence junction、tight junction、gap-junction)、4) 腫瘍周囲の細胞外マトリックス (ECM)、5) 癌細胞の不均一性 (CD147をターゲットとして治療しても腫瘍塊中には非発現癌細胞もある)、である。腫瘍塊には腫瘍血管が

あるので、実質細胞間をマイクロ・ナノバブルが通過することはあまり想定しなくて良いが、別な目的（例えば生体細胞への遺伝子導入など）でナノバブルを用いるとすれば、こうした関門も考慮に入れる必要がある。Braet博士からの示唆として、動脈硬化病変への抗酸化薬剤のDDSなどにもナノバブルが使えるのではないかとのことであった。

以上を総合すると、腫瘍塊の腫瘍血管にも200nm前後のporeや1 μ m前後のGapがあれば、マイクロ・ナノバブルは受動的に血管を通過できる可能性がある。腫瘍までの到達のみが目的であればバブルの粒径は200nm前後が望ましい。

一方、超音波で画像化する観点からは、バブルの粒径が小さくなると、バブルからの反射エコーは小さくなり、高い周波数の利用が必要となる。周波数が高くなると、超音波の組織での減衰は増加し、その結果深い部位で感度が低下するという問題も発生する。しかし、粒径の小さいナノバブルでも腫瘍細胞特異的に集積することで、一つの集合体となり、通常の周波数の超音波でも強い反射特性を示すことも推察される。従って、画像化技術を開発する上でも、組織内でのバブルの分布、集積量を確認することは重要な課題である。ナノバブルのイメージングに関しては、NEDO側プロジェクトと連携して研究を進めている。アロカ（株）研究所では、バブルの非線形特性を利用した高感度検出技術の開発を進め、さらにバブルの粒径と集積性による検出感度について検証を行う予定である。

② マイクロ・ナノバブルの癌モデルあるいは担癌動物における集積性の観察方法の検討

Braet博士招へい以前は、原子間顕微鏡（AFM）で生体内でのマイクロ・ナノバブルの観察ができるのではないかと期待していた。Braet博士はAFMによって、培養類洞内皮細胞のfenestraeを生きたまま観察することに、世界ではじめて成功している。しかし、動物臓器・組織での観察には未だAFM技術（機器開発）が不十分であるとの見解であった。新潟大学の牛木教授によれば、「今後AFM技術を進歩させ、生体臓器を生きたままAFMで観察できるように努力するし、可能である。」とのことであった。

Braet博士からは、代案として、2つの方法が提案された。1) X-ray Micro Computed Tomography: 微小组織のためのCTで、骨などの硬組織であれば100nm、一般組織であれば300-500nmの分解能がある。マイクロ・ナノバブルをリアクターの癌モデルあるいは担癌動物に注入・還流し、その後組織を固定し、CT用造影剤を注入。X-ray Micro Computed Tomographyで血管イメージとバブルのコントラストを3次元的に再構築する。この方法に関しては、バイオリアクターでの癌モデルで試すこととなった。バイオリアクターに不死化肝細胞、内皮細胞、伊東細胞を共培養し、肝臓オルガノイドを作製する。そこに、癌細胞（原発性肝癌株、大腸癌細胞株など）を投入し、マイクロ癌モデルを作製する。リザーバーからマイクロ・ナノバブルを還流後、グルタルアルデヒドで還流固定し、

そこにCT造影剤を還流、X-ray Micro Computed Tomographyでイメージ化する。プラスチック製の小型バイオリアクター（平成17年度試作）と細胞培養担体を今回オーストラリアに持ち帰り、コントロールイメージをチェックすることになった。また、シドニー大学のMaster Research Project Opportunityとして学生の研究テーマの一つとして、研究を遂行することになった。2) マイクロ・ナノバブルにAu(gold)ラベル抗CD147抗体を標識し、臓器に還流する。組織をビブラトームで100nmに薄切し、光学顕微鏡レベルで抗CD147抗体の存在位置を確認する。さらに、パラフォルムアルデヒドで固定して、電子顕微鏡レベルで抗体に標識したAuを観察する。間接的ではあるが、マイクロ・ナノバブルの分布・集積を観察できる。AuラベルではなくFITC標識で行っても良い。Braet博士からは、こうした解析のために、研究者をBraet博士の研究施設に派遣し、遂行することが望ましいと指摘された。

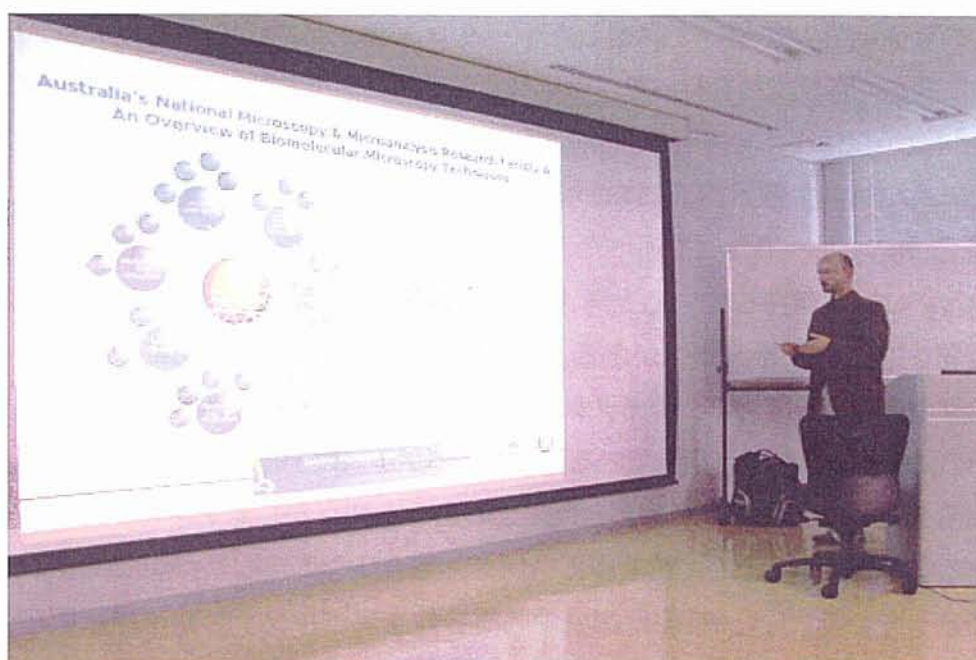
③ マイクロ・ナノバブルのフリーズ・フラクチャーTEMでの観察法

超音波診断用微小気泡化造影剤（マイクロ・ナノバブル）として利用可能な界面活性剤として、生体適合性・生分解性を有するシクロアミロース修飾界面活性剤を新規に合成し、この界面活性剤を用いて調製したマイクロ・ナノバブルのフリーズ・フラクチャーTEM像に関して意見交換を行った。マイクロ・ナノバブル調製30分後のフリーズ・フラクチャーTEM像からは平均粒子径200nmの微小気泡と思われる球状の像が観察されている。また、この微小気泡分散水溶液において超音波診断装置による画像化にも成功している。Braet博士によれば、①の項で述べたとおり、腫瘍塊の腫瘍血管にも200nm前後のporeや1 μ m前後のGapが存在していると考えられ、本系にて調製したマイクロ・ナノバブルが腫瘍血管を通過できる可能性がある。本プロジェクトでは腫瘍患部の選択的イメージング・治療を目的としており、マイクロ・ナノバブルに抗CD147抗体をラベルすることで腫瘍患部への能動的な集積を目指しているが、微小バブル（粒子径200nm）の特徴を活かした受動的な集積も期待できることが分かった。このような観点からもナノバブルの存在をより明確にする必要がある。そこで溶液中に分散した集合体を直接観察可能なcryo-TEMを行うことを予定している。cryo-TEMは溶液中の集合体をアモルファス状氷中に固定化した後に凍結状態を保持したままTEMにより直接観察する方法で、急速凍結直前の“より生きた”ままの像を観察可能である。Braet博士にはcryo-TEM観察技術に関するご教授頂き、今後の観察に向けて有益な知見が得られた。

④ オーストラリアの国家プロジェクトNanostructural Analysis Network Organisation (NANO)に関する情報提供

現在、Braet博士は、Nanostructural Analysis Network Organisation (NANO) (<http://www.nano.org.au/>) の構成メンバーの一人である。NANOは、生物・物理システムにおける試料や材料の構造や化学的性質をナノレベルで解析するためのオーストラリア国家としてのリーダー機構である。国家としてナノテクノロジーやバイオテクノロジーを振興する上で、原子レベル・分子レベルでの構造と機能の解析を連携して行うための、研究ネットワークである。そこでは、研究者間の連携はもちろん、企業との協調、アジア・オセアニアを中心とした学生や研究者への教育も担う。Braet博士のように、欧州、米国などからも facility memberを招へいし、それぞれのcore nodeには、最先端の分析機器がそなえられている。

日本においても、ナノテクノロジー分野において、省庁や大学間を越えた協力システムの構築の重要性が痛感された。



NANO was established with five core nodes. NANO welcomes the formation of additional and associate nodes within the NANO structure. Download the [additional node policy](#) for details. If you would like to participate please contact Executive Director [Prof. Simon P Ringer](#).

The Core Nodes



The University of Sydney

NANO-MNRF Headquarters

Australian Key Centre for Microscopy and Microanalysis (AKCMM)



MicroAnalytical Research Center (MARC)



**THE UNIVERSITY OF
NEW SOUTH WALES**

Electron Microscope Unit (EMU)



**THE UNIVERSITY
OF QUEENSLAND**


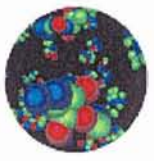
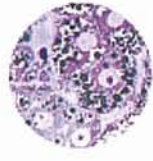





Centre for Microscopy & Microanalysis (CMM)



**THE UNIVERSITY OF
WESTERN AUSTRALIA**

WA Centre for Microscopy & Microanalysis (WACM)

NANO was fortunate in attracting CSIRO and the University of Wollongong as additional nodes.

	<p>Specimen Preparation Biological Materials Live Cell Culturing Thermomechanical Processing</p>		<p>Advanced Ion Platforms Nanoscale Mass Spectroscopy Atom Probe Tomography Ion Milling and Machining Ion Implantation</p>
	<p>Light and Laser Optics Fluorescence Imaging Transmission Optical Microscopy Metallurgical Microscopy Live Cell Imaging</p>		<p>Scanned Probe Techniques Vibrational Spectroscopy Atomic Force Microscopy Scanning Tunneling Microscopy Raman Spectroscopy</p>
	<p>Scanning Electron Microscopy Analytical Spectroscopy In-situ Imaging and Testing Metrology</p>		<p>X-ray Technologies X-ray Diffraction X-ray Fluorescence X-ray Microtomography</p>
	<p>Transmission Electron Microscopy Analytical Spectroscopy Diffraction Phase and Z-contrast Imaging Cryo Techniques</p>		<p>Visualisation and Simulation Computed Spectroscopy Computed Diffraction Image Analysis</p>

⑤ その他

Braet博士からのコメントとして、マイクロ・ナノバブルを用いた微小癌の診断・治療システムは、癌のみならず、動脈硬化予防のための抗酸化治療、遺伝子治療など他分野の診断や治療にも有用であろう、とのことであった。意見交換、講演に忙しい日々を過ごされたが、それ以外の日々も観光をすることもなく、論文作成、報告書作成、オーストラリアの研究室とのやりとりをして、日本での12日間の研究期間が終了した。その勉学・研究に対する真摯な取り組みからも、学ぶべきものは多かった。

7. 外国人研究者のレポートは、別添のとおりである。

NANO @ The University of Sydney



ELECTRON MICROSCOPE UNIT*

People, Research Services, Programs & Training

N A N O



Activity Report 30 Oct – 10 Nov 2006

A/Prof Filip Braet
Deputy Director
filip.braet@emu.usyd.edu.au
www.emu.usyd.edu.au

* Incorporating the Australian Key Centre for Microscopy & Microanalysis

NANOSTRUCTURAL ANALYSIS NETWORK ORGANISATION
MAJOR NATIONAL RESEARCH FACILITY
NANO-MNRF





Monday 30 October 2006

Micro-Nano Bubble Project I



NANO

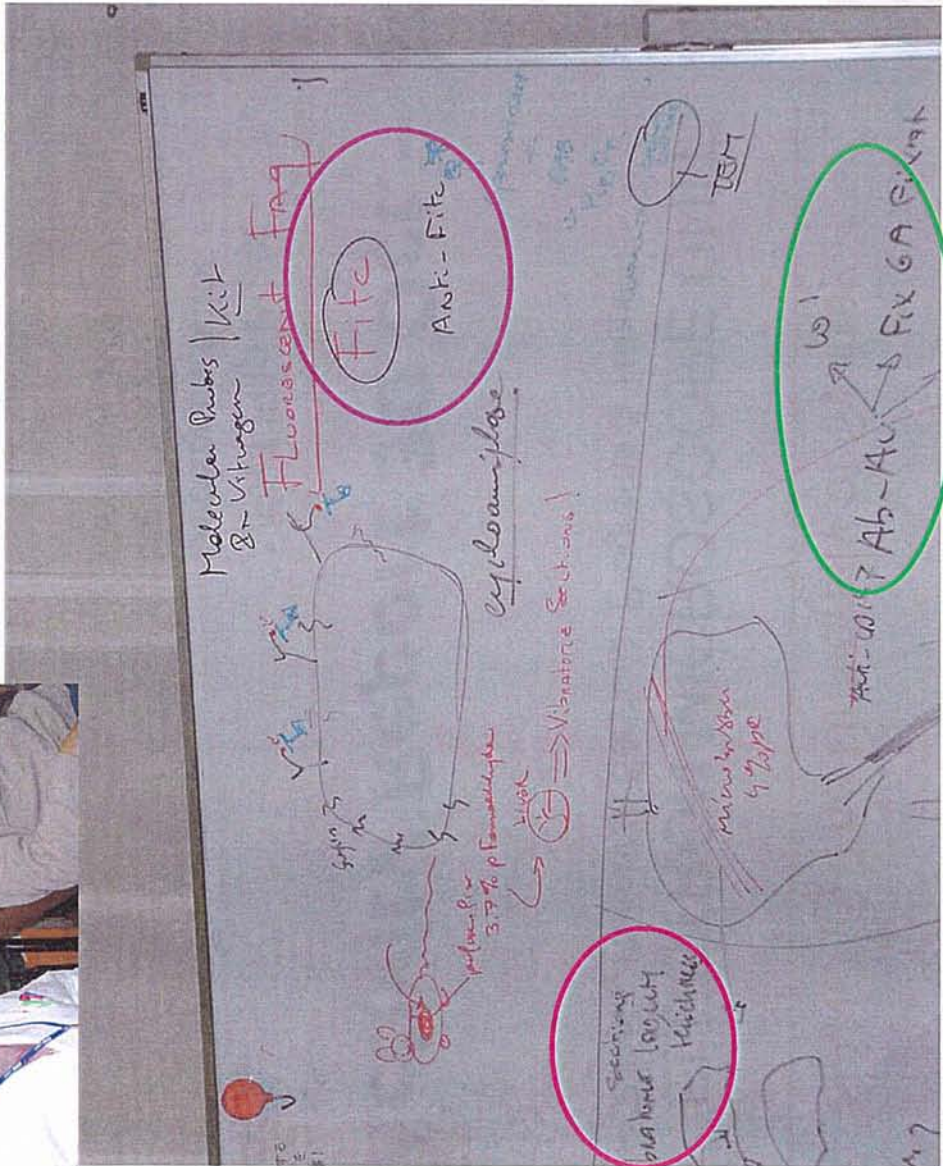


* Information of endothelium and its pore formation ?!

* Information of tumor vessels ?!
RECA-1 IgG (clone HIS52 Serotec)

* Atomic force microscopy ?! **Not possible!**

* Can micro-nano bubble pass through endothelium of tumor vessels ?!





NANO

Hepatology or Liver International?

PF 5.287

"Monophology" Science

Relevant Molecules are lacking

There is no clear view of any mechanistic plan/pathway of the role of L-RAT in the different discussed diseases.

Therefore I advise to neglect the paper although recognizing the high quality LFT, CLM & CHL DATA

Based on our findings we propose the following L-RAT pathways under different relevant pathophysiological conditions (See Figure 10) i.e. (1) ... (4) ...

Hypothesis 5

The Diagram shows a cycle between HEP. EC. I. C. NO. and RNAi. RNAi leads to L-RAT, which in turn leads back to HEP. EC. I. C. NO. There is also a direct path from HEP. EC. I. C. NO. to L-RAT.

Open ups future research studies on the role of L-RAT

Time axis: 1 2 3 4 5 10

1: Time axis 1
2: Time axis 2
3: Time axis 3
4: Time axis 4
5: Time axis 5

10: Time axis 10

The Diagram illustrates a cycle between HEP. EC. I. C. NO. and RNAi. RNAi leads to L-RAT, which in turn leads back to HEP. EC. I. C. NO. There is also a direct path from HEP. EC. I. C. NO. to L-RAT.

The Diagram illustrates a cycle between HEP. EC. I. C. NO. and RNAi. RNAi leads to L-RAT, which in turn leads back to HEP. EC. I. C. NO. There is also a direct path from HEP. EC. I. C. NO. to L-RAT.

The Diagram illustrates a cycle between HEP. EC. I. C. NO. and RNAi. RNAi leads to L-RAT, which in turn leads back to HEP. EC. I. C. NO. There is also a direct path from HEP. EC. I. C. NO. to L-RAT.

The Diagram illustrates a cycle between HEP. EC. I. C. NO. and RNAi. RNAi leads to L-RAT, which in turn leads back to HEP. EC. I. C. NO. There is also a direct path from HEP. EC. I. C. NO. to L-RAT.



N A N O



- * The **advice** given as on 31 October (increase the number of samples; RECA1 – SE1; hypothesis model)
- * I am able to **scientifically edit** your manuscript
- * I am able to edit the text for **English**
- * I will check the EM immunogold labeling (... the part molecular part ... **immuno molecular labelling**)
- * I will explore whether the work meets the standards for **Journal of Hepatology** & introduce it to ...



Tuesday 31 October 2006

Gap Junctional Function Project



NANO

In cellular Adhesion (Adhesion contracts are needed to maintain → LHM Sieving?

Sieving
 Sieving

Transendothelial Transport
 IM → 2% GA-Fixative

18G Needle
 4

TEM

1 Coated pits
 2 Caveolae
 3 VVO's Vesicular Transport Granules
 4 Pores = Fenestrations?

SPINOUTOSIS → Primary

30min
 Transon BALANCED
 A

V. per...
 Adhesion...
 30min

COMMUNE

A



N A N O



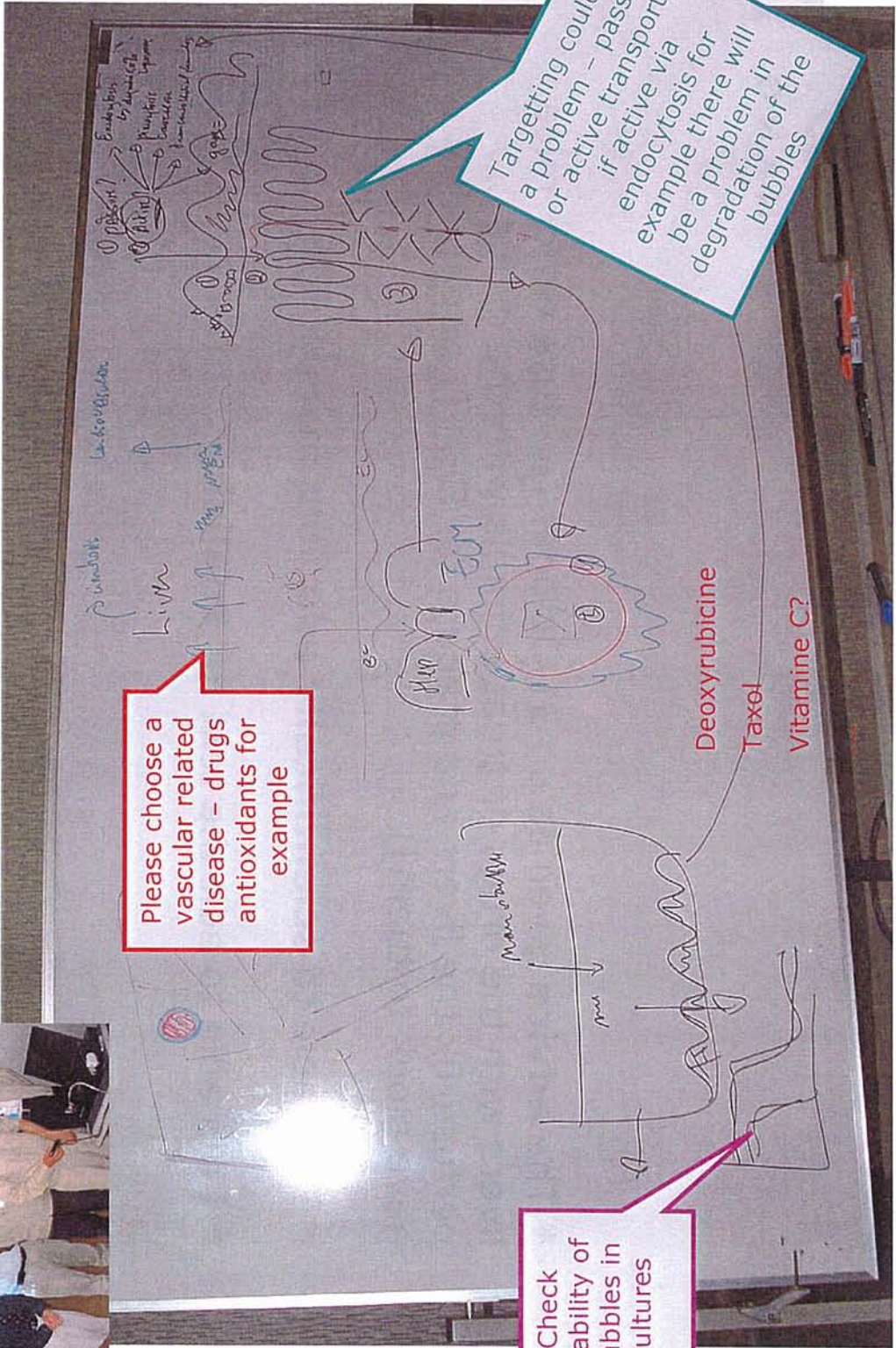
- * The **advice** given as on 31 October (perfuse rat or mice livers with the drugs or treat animals with the drugs ... perfuse-fix the livers and prepare for SEM [I am able to have a look to them])
- * I am able to **scientifically edit** your manuscript
- * I am able to edit the text for **English**

Thursday 02 November 2006

Micro-Nano Bubble Project II



NANO



大学院特別講義 顕微解剖学セミナー

Probing Surface and Submembranous Structures in Living(Liver)Cells with the Atomic Force Microscope

(原子間力顕微鏡で生きた細胞の表面構造と
細胞膜直下の構造を探る)

Prof. Filip Braet

Australian Key Centre for Microscopy and Microanalysis(AKCMM),
The University of Sydney

日時: 11月6日(月) 17:00 - 18:30

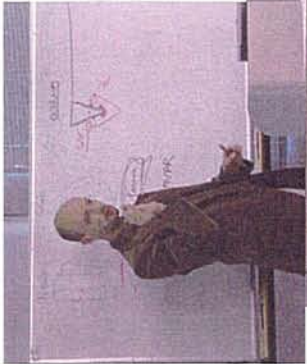
場所: 東研究棟 3階 302 共同集会室

Braet 博士は、肝類洞内皮細胞やクッパー細胞の表面形状を原子間力顕微鏡により液中で生きた状態で観察することに挑戦しているユニークな研究者です。この方法により、クッパー細胞がラテックスビーズを取り込む過程や、線維芽細胞の細胞膜下ストレス線維の動態をリアルタイムで可視化することに成功してきました。

本講演では、博士のこうした研究の成果を紹介していただくとともに、この方法の利点・問題点・将来性についても触れていただきます。

御興味のある方の多数の御参加をお待ち申し上げます。

大学院医歯学総合研究科 顕微解剖学分野(第三解剖)
お問い合わせ 内線2062 牛木



Thursday 10 November 2006
Micro-Nano Bubble Project III



NANO



Micro-Nano Bubble Project III

Shadow

AFM

Fluorescent SEM

→ length 10.25 um

→ SEIT 2 mm

→ Nano Bubble

Pillbox

FORMVAR



N A N O



Oral Presentations by Filip Braet:

Braet F. Seminar: ***Probing surface and submembranous structures in living (liver) cells with the atomic force microscope.*** Niigata University, School of Physics, Niigata, Japan, **6 November 2006.**

Braet F. Seminar: ***How correlative imaging techniques contributed to the study of the liver sieve.*** Jikei University Hospital, School of Medicine. Tokyo, Japan, **7 November 2006.**

Braet F. Seminar: ***How correlative imaging techniques contributed to the study of colorectal liver metastasis.*** Jikei University Hospital, School of Medicine. Tokyo, Japan, **7 November 2006.**

Braet F. Seminar: ***Australia's national microscopy & microanalysis research facility: An overview of biomolecular microscopy techniques.*** Tokyo University of Science. Tokyo, Japan, **9 November 2006.**

**During Visit We Wrote The
Following Paper:**



N A N O



THE HEPATIC SINUSOIDAL ENDOTHELIAL LINING AND COLORECTAL LIVER METASTASES

Filip Braet¹, Keissuke Nagatsuma², Masaya Saito³, Lilian Soon¹,
Eddie Wisse¹ and Tomokazu Matsuura⁴

*¹Australian Key Centre for Microscopy and Microanalysis (AKCMM),
Electron Microscopy Unit, The University of Sydney, NSW 2006,
Australia; ²Department of Pathology, The Jikei University School of
Medicine, Tokyo, Japan; ³Division of Gastroenterology and
Hepatology, Department of Internal Medicine, The Jikei University
School of Medicine, Tokyo, Japan; ⁴Department of Laboratory
Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan*

World Journal of Gastroenterology 2007