

#### 4. 超音波内視鏡下穿刺吸引細胞・組織診（EUS-FNA）の有用性と 採取組織の CD147 の発現に関する研究

分担研究者 田尻久雄 東京慈恵会医科大学 教授

協力研究者 今津博雄 東京慈恵会医科大学 助手

研究要旨：当院で超音波内視鏡下穿刺吸引細胞・組織診を行なった 32 例中 29 例で細胞もしくは組織採取が可能（90.6%）であり、採取組織の正診率は 92.9%、悪性疾患を鑑別する感度・特異度は 80%、100%であった。29 例中 14 例で細胞診のみならず組織診が可能であり、CD147 の免疫染色を行ったところ、悪性疾患で CD147 は細胞膜に良性疾患ではサイトゾルに発現するか程度が弱い傾向がみられた。

##### A. 目的

超音波内視鏡下穿刺吸引細胞・組織診（EUS-FNA）は、1992 年に Villmann らが経消化管的に膵腫瘍を穿刺し、細胞診を行なったことに始まり、欧米では急速に普及した。欧米では、主に癌治療前の細胞組織診断の手技として用いられているが、本邦では保険上の問題、機器の問題等により EUS-FNA は普及に至っていない。今回、当院における EUS-FNA の成績を後向きに検討し、採取した組織の CD147 の発現について検討した。

##### B. 対象と方法

我々は画像診断だけでは確診が得られず EUS-FNA の結果が治療方針を決定し得る疾患・病態を EUS-FNA の絶対適応としている。2005 年 1 月より 2007 年 3 月までの期間に EUS-FNA を行なった 32 例を対象に細胞・組織採取率、良悪性を鑑別する感度・特異度を検討した。また細胞診のみならず組織診が可能な症例には CD147 の免疫染色を行い、その発現について検討した。また、超音波内視鏡にはオリンパス社製 GF-UCT240AL5 を観測装置にはアロカ社製 SSD5000 を用い、穿刺針は Cook 社製 ECHOTIP19G、22G、あるいは 25G 針を

用いた。

##### C. 結果

対象症例 32 例の内訳は平均年齢  $58.9 \pm 14$ 、男性 20 例、女性 12 例であり、最終診断は膵腫 6 例、肺癌 1 例、肺癌縦隔リンパ節転移 1 例、食道癌縦隔リンパ節転移 1 例、悪性リンパ腫 1 例、胃 GIST 5 例、胃平滑筋腫 5 例、その他の良性疾患 12 例であった。EUS-FNA による細胞もしくは組織採取は 29 例（90.6%）で可能であり、悪性疾患を鑑別する感度・特異度はそれぞれ 80%（8/10）、100%（22/22）であった。EUS-FNA に伴う偶発症は認めなかった。29 例中 14 例は細胞診のみならず、組織診が可能であり、CD147 の免疫染色を行なった。2 例で判定不能であったが、12 例で CD147 発現の評価が可能であった。Table 1 に各疾患の CD147 の発現部位を示す。

Table 1: CD147 の発現

細胞膜	サイトゾル	陰性	判定不能
肺扁平上皮癌 1 例、 肺癌 1 例、縦隔リンパ 節転移 2 例（食道癌 1 例、肺癌 1 例）、 悪性リンパ腫 1 例、 膵癌 1 例、自己免疫性 膵炎 1 例、サルコ イドーシス 1 例、	GIST1 例、 平滑筋腫 2 例	神経鞘腫 1 例、反応性 リンパ節 1 例	GIST1 例、 平滑筋腫 1 例

#### D. 考察

EUS-FNA は高い細胞・組織採取率と、悪性疾患を鑑別するための高い感度、特異度を示し、有用な検査法と思われる。CD147 は悪性疾患では細胞膜に発現し、良性疾患ではサイトゾルに発現するか、全く発現しない傾向があったが、サルコイドーシス、自己免疫性膵炎など自己免疫と関連する疾患では細胞膜に CD147 の発現がみられた。

#### E. 結論

EUS-FNA は画像診断で確診が得られない疾患の診断法として有用である。EUS-FNA で得られた比較的小さな検体でも CD147 の免疫染色は可能であり、発現部位、程度が臨床度と関連している可能性が示唆された

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

今津博雄、田尻久雄. 感染性膵壊死、膵膿瘍に対する EUS ガイド下ドレナージ術. 胆と膵 27 : 55-60 ; 2006

##### 2. 学会発表

今津博雄、田尻久雄. EUS-FNA における 25G 穿刺針の有用性—適応拡大の可能性について— 第 73 回日本消化器内視鏡学会総会(2007) 東京。

#### H. 知的財産権の出願状況

なし

## 5. 消化管腫瘍における CD147 発現の臨床的意義 —胃 GIST—

分担研究者 石橋由朗 東京慈恵会医科大学 講師

**研究要旨:**CD147 を高感度で認識する単クローン抗体(MAb12C3)を用い、臨床摘出標本で胃 GIST (Gastrointestinal Stromal Tumor : 消化管間質腫瘍) での CD147 発現を検討した。胃 GIST における CD147 発現は、予後不良の高リスク症例に発現し、低リスク症例では認められなかった。CD147 を分子ターゲットとして、超音波内視鏡を用いて悪性度のリスク評価を行うことが可能となればその臨床的価値は高いと考えられた。

### A. 研究目的

胃 GIST の悪性度の診断は、腫瘍径と細胞分裂像のみでありいまだ有用な予後規定因子はない。検査項目として超音波内視鏡が頻用される胃 GIST において CD147 発現を検討し、超音波診断のための癌の分子マーカーとしての意義を検討する。

### B. 研究方法

免疫組織化学的検討当院で外科的に切除された胃 GIST 症例を対象とした。ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を作製し、抗 CD147 抗体 (MAb12C3) を用いた免疫組織染色を行い検討した。腫瘍を腫瘍径、細胞分裂像によって規定される従来の臨床分類 (リスク分類) 行い、それぞれのリスク段階と CD147 発現との関連を検討した。

### C. 研究成果

胃 GIST と CD147 の発現に関して MAb12C3 を用いて免疫組織化学的に検討した。従来の臨床分類において超低リスク、低リスクの症例は CD147 の発現が認められなかった。また高リスク症例では、検討したすべての症例で CD147 の発現が認められた (図 1)。つまり、手術適応とされる高リスク症例に CD147 の発現が認められており、胃 GIST の診断、治療方針の決定に CD147 が寄与する可能性が示唆された。さらに多くの症例にて

検討中である。

胃 GIST における CD147 蛋白発現



図 1

### D. 考察

超音波による癌の分子イメージングの対象としては、超音波プローブに近接する病巣の検出が、超音波の特性上最初の標的として望ましい。胃 GIST は、粘膜下腫瘍のため癌と異なり生検による診断が困難であり、超音波内視鏡によって腫瘍の全貌が明らかにされる疾患である。有望な予後規定因子も見つかっておらず、今回の検討対象とした。従来の臨床分類 (リスク分類) と CD147 発現との関連をみたところ、悪性度が高く手術適応である高リスク症例のみ CD147 発現がみられ、経過観察も考慮される低リスク症例では発現が認められなかった。このことは、CD147 が胃 GIST の悪性度の指標になり、分子ターゲットとしての CD147 の可能性を示唆するものである。

従来の臨床分類では、手術適応を決定する因子は、臨床症状を除くと腫瘍径と細胞分裂像のみであり、悪性度が高いがまだ腫瘍径が小さな早期の段階でのGISTを発見時に手術適応にすることができない。本研究によって有望な成果が得られれば、超音波内視鏡を用いることにより早期に胃GISTの治療方針が決定される画期的な臨床応用につながることを期待される。

## E. 結論

胃GISTにおいては、高リスク症例にCD147の発現が認められた。胃GISTの診断、治療方針の決定にCD147が寄与する可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Omura N, Kashiwagi H, Ishibashi Y, Yano F, Tsuboi K, Kawasaki N, et al. Laparoscopic Heller myotomy and Dor fundoplication for the treatment of achalasia: assessment in relation to morphologic type. Surg Endosc. 2006 ; 20 : 210-3 21.
- 2) Omura N, Kashiwagi H, Tsuboi K, Ishibashi Y, Kawasaki N, Yano F, Suzuki Y, Yanaga K. Therapeutic effects of a laparoscopic Heller myotomy and Dor fundoplication on the chest pain associated with achalasia. Surg Today. 2006 ; 36 : 235-40.
- 3) Shida A, Fujioka S, Kobayashi K, Ishibashi Y, Nimura H, Mitsumori N, Yanaga K. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and -D in gastric carcinoma. Int J Clin Oncol. 2006 ; 11 : 38-43.
- 4) Tsuboi K, Omura N, Kashiwagi H, Yano F, Ishibashi Y, Suzuki Y, Kawasaki N, Mitsumori N, Urashima M, Yanaga K. Laparoscopic Collis gastroplasty and Nissen fundoplication for reflux esophagitis with shortened esophagus in Japanese

patients. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech. 2006;16:401-5.

- 5) Omura N, Kashiwagi H, Yano F, Tsuboi K, Ishibashi Y, Kawasaki N, Suzuki Y, Mitsumori N, Urashima M, Yanaga K. Prediction of recurrence after laparoscopic fundoplication for erosive reflux esophagitis based on anatomy-function-pathology (AFP) classification. Surg Endosc. 2007 ; 21 : 427-30.
- 6) Ueda K, Yamada K, Urashima M, Ishibashi Y, Shirai M, Nikaido T, Takahashi H, Okamoto A, Saito M, Yasuda M, Ohkawa K, Tanaka T. Association of extracellular matrix metalloproteinase inducer in endometrial carcinoma with patient outcomes and clinicopathogenesis using monoclonal antibody 12C3. Oncol Rep. 2007; 17 :731-5.

## H. 知的財産権の出願状況

なし

## 6. *In vitro* 3次元微小腫瘍モデルの作製に関する研究

分担研究者 相澤 守 明治大学 理工学部 助教授

**研究要旨：**本プロジェクトを推進する上で、新規な超音波分子バイオイメージングを検証するための「微小腫瘍モデル」の作製は必要不可欠な要素技術である。本研究では、昨年度に引き続きアパタイトファイバースキャフォールド(AFS)とラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)を併用して、三次元培養を行なうことにより「微小腫瘍モデル」の構築を試みた。特に、AFSの有効性を検証するため、他の代表的な培養基材（セルロースビーズ、気孔率85%アパタイトビーズ）との比較実験を行なった。

### A. 研究目的

現在、骨再生や肝再生をはじめとして、細胞・増殖因子・足場材料の三要素を組み合わせて目的とする組織を再生する「ティッシュエンジニアリング」が注目されている。我々はこれまでに優れた生体適合性を有するアパタイト単結晶ファイバー(AF)を用いて細胞が内部へ侵入できる連通孔を持つ三次元的に培養できる細胞の足場材料(アパタイトファイバースキャフォールド; AFS)の開発に成功している。

昨年度、このAFSを微小腫瘍モデル構築の足場材料としての適用を指向し、まず、第一段階の取り組みとしてAFSにヒト肝癌由来の肝細胞モデルであるFLC-4を播種してその三次元培養下で細胞増殖と形態について検討し、AFSが三次元培養担体として有効であることを明らかにした。さらに、AFSを装填したラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)を用いて三次元培養を行い、細胞の生育状態をモニターし、RFBの足場としてのAFSの実用性を確認した。

今年度は、上記の研究成果に立脚し、「微小腫瘍モデル」を構築するための足場材料として、AFSの他に一般的に利用可能な「セルロースビーズ(旭化成マイクロキャリア)」および「アパセラム(ペンタックス

85%気孔率アパタイトビーズ)」を三次元培養担体として利用し、その肝モデル細胞(FLC-4)の細胞の生育状態について検討した。

### B. 研究方法

AFSは既報(M. Aizawa et al., *Phosphorus Res. Bull.*, 17, 268-273(2004).)と同様にアパタイトファイバー(AF)に質量比で20倍のカーボンビーズを添加した1 mass%混合スラリーを調製し、成形後、1300℃で5h、水蒸気雰囲気下で焼成して作製した。このカーボンビーズをAFの20倍添加したAFSを“AFS2000”とする。得られた焼結体の結晶相をXRDおよびFT-IRにより同定し、微細構造をSEMにより観察した。このAFS2000(直径18mm×15mm)をラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)に装填し、FLC-4細胞を $3 \times 10^8$ 個播種し、三次元的に循環培養を行い、培地中のグルコース量、乳酸値、pHから細胞の生育状態をモニターし、28日後の形態をSEMにより観察した。なお、同条件で「85%気孔率アパタイトビーズ」および「セルロースビーズ」を用いて三次元培養を行ない、AFSの場合と比較検討した。

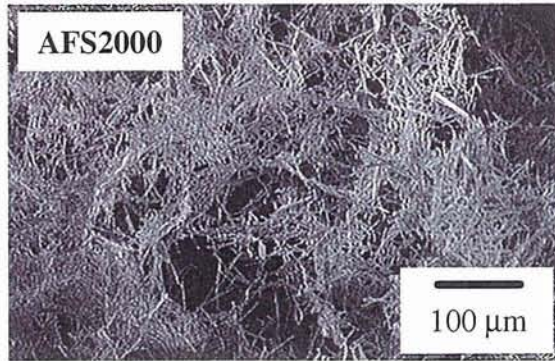


図1 AFS2000の微細構造

	原料	概観	倍率 (×100)	倍率 (×350)
旭化成 マイクロキャリア	セルロース			
アパセラム	HAp			

図2 用いた旭化成マイクロキャリアとアパセラムの概観とSEM写真

(倫理面の配慮)

ヒト ES 細胞など特に倫理面を考慮する実験系を使用していない。

### C. 研究成果

XRD より AFS の結晶相は *c* 軸配向した水酸アパタイト(HAp)単一相であることがわかった。図 1 に示した SEM による微細構造の観察から、AFS2000 の気孔径は細胞が浸潤可能なレベルにあり、気孔同士の連通も確認された。このような細孔構造は細胞が内部まで侵入でき、三次元培養に適している。

一方、セルロースビーズおよびアパタイトビーズの概観およびそれらの微細構造を図 2 に示す。概観はいずれもビーズ状であり、それらの微細構造は多くの気孔を包含した多孔質構造であることが分かる。特に、これらの気孔径は  $50\mu\text{m}$  を超えているものが多く、このなかに細胞が浸潤していく可能性が高い。

図 3 はこれらの 3 種類の培養基材として、RFB を用いて三次元培養を行なった結果である。いずれの培養基材を用いた場合でも、グルコース量が減少していることから細胞がそれを栄養

分として消費していることがわかった。一方、グルコース量の減少に対応して乳酸値は上昇しており、細胞がグルコースを代謝して産生したものと考えられる。

特に、これらの結果は今回調べた28日間でAFSを用いて培養した細胞が最も良好な細胞成育性を示しており、本スキャフォールドはRFBを用いた三次元培養の足場としても有効であることが確認された。

#### D. 考察

本研究で試用したAFSは他に入手可能な培養基材（アパタイトビーズやセルロースビーズなど）と比較して、「微小腫瘍モデル」構築の足場材料として有効であると考えられる。

#### E. 結論

本AFSは細胞の三次元的培養が1ヶ月以上の長期にわたり可能であったが、これはAFSのもつ特異な微細構造、すなわち、細胞の進入可能なマクロ気孔と培地などの栄養物質の浸潤が可能なマイクロ気孔の存在によるものと考えられる。また、アパタイトの結晶面のひとつである*a*面を多く露出していることから、生体吸収性も備えており、本プロジェクトの微小腫瘍モデル構築に向けた足場材料として有効であると結論できる。今後は生体内での吸収性も含めて検討を深める。

#### F. 健康危険情報

総括報告書にまとめて記載。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1-1) M. Aizawa, H. Ueno, K. Itatani and I. Okada, "Synthesis of calcium-deficient apatite fibres by a homogeneous precipitation method and their characterizations", *J. Eur. Ceram. Soc.*, 26, 501-507(2006).
- 1-2) A. Miyazaki and M. Aizawa, "Adhesion, Proliferation and Morphology of Osteoblasts Cultured on Apatite Ceramics with Preferred Orientation to *a*-plane", *Key Engineer. Mater.*, 309-311, 109-112(2006).
- 1-3) T. Ohno and M. Aizawa, "Effect of the Concentrations of the Starting Solution on the Syntheses and Powder Properties of Hollow Tricalcium-phosphate Microspheres by Ultrasonic Spray-pyrolysis Technique", *Key Engineer. Mater.*, 309-311, 235-238(2006).
- 1-4) M. Aizawa, N. Patel, A. e. Porter,

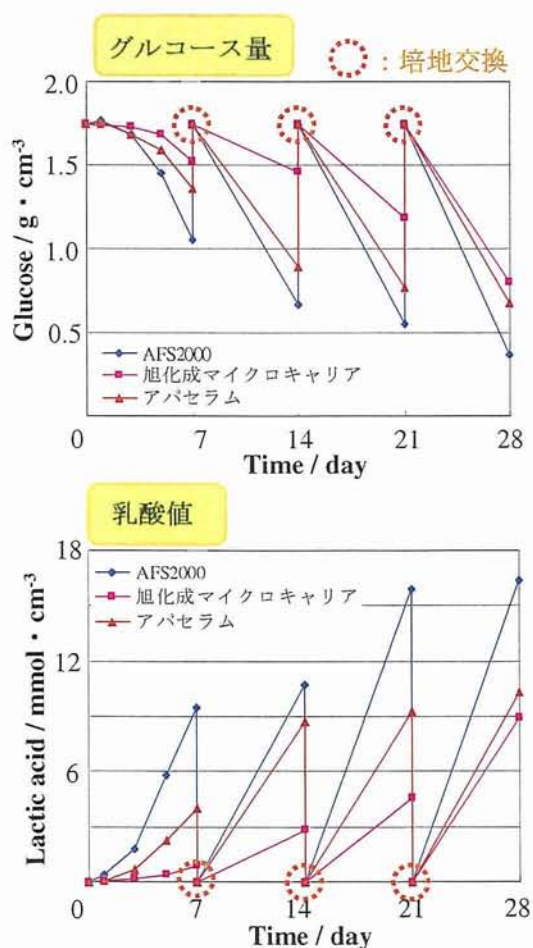


図3 各培養基材における成育状態の比較

- S. M. Best and W. Bonfield, "Syntheses of Silicon-containing Apatite Fibres by a Homogeneous Precipitation Method and Their Characterization", *Key Engineer. Mater.*, **309-311**, 1129-1132(2006).
- 1-5) H. Morisue, M. Matsumoto, K. Chiba, H. Matsumoto, Y. Toyama, M. Aizawa, N. Kanzawa, T. J. Fujimi, H. Uchida, I. Okada, "A novel hydroxyapatite fiber mesh as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances bone union in rat posterolateral fusion model", *Spine*, **31**, 1194-200(2006).
- 1-6) M. Aizawa, H. Uchida, I. Okada, T. J. Fujimi, N. Kanzawa, M. Matsumoto, H. Morisue and Y. Toyama, "Development of Apatite Fiber Scaffolds Promoting Hard-tissue Regeneration and Their Application to Biomedical Devices", *Archives of BioCeramics Research*, **6**, 9-12(2006).
- 1-7) M. Honda, T. J. Fujimi, N. Kanzawa, K. Izawa, T. Tsuchiya, M. Aizawa, "Osteogenic Differentiation in a Three-dimensional Apatite-fiber Scaffolds", *Archives of BioCeramics Research*, **6**, 171-174(2006).
- 1-8) S. Izumi, M. Honda, N. Kanzawa, T. J. Fujimi, H. Uchida, T. Tsuchiya, H. Morisue, M. Matsumoto, M. Aizawa, "Apatite-fiber Scaffold Provides Three-dimensional Culture Environment for Osteoblast-like cells", *Archives of BioCeramics Research*, **6**, 175-178(2006).
- 1-9) Y. Tanaka, H. Morisue, M. Matsumoto, Y. Toyama and M. Aizawa, "Development of Porous Ceramics with Well-controlled Pore Sizes Created From Single-crystal Apatite Fibers and Its Biological Evaluation", *Archives of BioCeramics Research*, **6**, 200-203(2006).
- 1-10) N. Onaya, T. Ohno, Pak-kon. Choi and M. Aizawa, "Effect of ultrasonic vibration frequency on the particle size of hydroxyapatite microspheres synthesized by ultrasonic spray-pyrolysis", *Archives of BioCeramics Research*, **6**, 204-207(2006).
- 1-11) H. Yamamoto and M. Aizawa, "Synthesis of Plate-shaped Apatite with Preferred Orientation to c-Plane Using Enzyme Reaction of Urea with Urease", *Archives of BioCeramics Research*, **6**, 212-215(2006).
- 1-12) A. Yoshikawa, Y. Horiguchi, K. Oribe and M. Aizawa, "Mechanical Property of Apatite Cement Hardened by Chelating-effect of Inositol Phosphate", *Archives of BioCeramics Research*, **6**, 216-219(2006).
- 1-13) A. Hiramoto, T. Matsuura and M. Aizawa, "Three-dimensional Cell Culture of Hepatocyte Using Apatite-fiber Scaffold and Application to a Radial-flow Bioreactor", *Archives of BioCeramics Research*, **6**, 220-223(2006).
- 1-14) A. Miyazaki, N. Kanzawa and M. Aizawa, "Adhesion, Proliferation and Differentiation of Osteoblasts Cultured on Apatite Ceramics with Preferred Orientation to a-plane", *Archives of BioCeramics Research*, **6**, 224-227(2006).
- 1-15) H. Tanabe, A. Ohbuchi, T. Nakamura, M. Aizawa, "Release profiles of calcium and phosphate ions from the  $\beta$ -tricalcium phosphate fiber scaffolds in the HEPES buffer solutions", *Archives of BioCeramics Research*, **6**, 236-239(2006).
2. 学会発表
- 2-1) 相澤 守、平本篤司、松浦知和、松本守雄、"再生医療を支援するアパタイトファイバースキャフォールドの開発", 日本セラミックス協会年会(2006).



2-2) A. Hiramoto, T. Matsuura and M. Aizawa,  
“Three-dimensional Cell Culture of Hepatocyte  
Using Apatite-fiber Scaffold and Application to a  
Radial-flow Bioreactor”, 6th Asian BioCeramics  
Symposium (ABC2006), Bangkok, Thailand,  
November 7-10, 2006.

2-3) H. Tanabe, A. Ohbuchi, T. Nakamura, M. Aizawa,  
“Release profiles of calcium and phosphate ions from  
the  $\beta$ -tricalcium phosphate fiber scaffolds in the  
HEPES buffer solutions”, 6th Asian BioCeramics  
Symposium (ABC2006), Bangkok, Thailand,  
November 7-10, 2006.

2-4) 平本篤司・松浦知和・相澤 守、“アパタイト  
ファイバースキャフォールドとラジアルフロー型  
バイオリアクターによる株化肝細胞の三次元  
培養とその機能”、第 28 回日本バイオマテリアル  
学会大会、東京（アルカディア市ヶ谷）、日本  
バイオマテリアル学会、2006.11.27-28.

#### H. 知的財産権の出願状況

##### 1. 特許取得

1-1) 相澤 守・江本 精・大野俊樹・崔 博坤・  
鹿又宣弘・特願 2006-037092・薬剤送達用担体  
及びそれを利用した医薬・学校法人明治大学

## 7. 超音波造影剤検定のための3次元還流培養腫瘍モデルの作成

### －3次元培養癌転移・浸潤モデルとCD147－

分担研究者 松浦知和 東京慈恵会医科大学 講師

分担研究者 相澤 守 明治大学理工学部 助教授

協力研究者 永妻啓介 東京慈恵会医科大学 大学院

研究要旨：超音波造影剤検定のための3次元還流培養癌転移モデルを、ラジアルフロー型バイオリアクター（RFB）を用いて作成した。不死化マウス肝細胞、血管内皮細胞、伊東細胞をRFBで共培養し、血管様構造を持つ肝臓オルガノイドを作成した。そこに、CD147 発現ヒト肝癌細胞株 FLC-7 を注入し、数日間培養を継続し、10%緩衝ホルマリンで固定した。CD147 陽性細胞を免疫組織化学的に観察した。CD147 陽性 FLC-7 細胞は、肝臓オルガノイドの血管内皮細胞に付着し、血管下面に浸潤、さらに小腫瘍塊を形成していた。今後、このモデルを利用して、CD147 認識抗体を標識したマイクロ・ナノバブルの集積性、超音波での集積画像の検出を検討する。

#### A. 研究目的

超音波造影剤（マイクロ・ナノバブル）の新規開発のためには、マイクロ・ナノバブルの生体での、①安定性（肺や肝臓でのトラップなど）、②血管透過性、③生体内代謝・毒性、④CD147 をターゲットとした腫瘍集積性、⑤超音波による描出性などの検討が必要である。新規界面活性剤を用いて種々の条件（大きさ、均一性、粘性、振動性）のマイクロ・ナノバブルを作製し、その超音波描出性をすべて動物実験で行うことは、困難である。このため、小型ラジアルフロー型バイオリアクター（RFB）を用いて、癌細胞を3次元的な腫瘍塊として培養し、そこに開発したマイクロバブルを還流して超音波での描出ができるか検討することとした。平成17年度は、①ヒト肝臓癌細胞株あるいはマウス不死化肝細胞株とマウス内皮細胞株を共培養し、3次元腫瘍塊あるいは

肝臓オルガノイドの作成を試みた。また、バブルの集積性の観察のため、超音波とマイクロCTで観察できるよう、プラスチック製小型RFBを作製した。マイクロCTでの検討は、シドニー大学の Filip Braet 博士との共同研究である。平成18年度は、肝臓オルガノイドに、CD147 陽性ヒト肝癌細胞株 FLC-7 細胞を還流し、転移・浸潤様式を観察した。

#### B. 研究方法

マウス不死化肝細胞株 IMH-4 とマウス不死化内皮細胞 M1、不死化伊東細胞 A7 を RFB 内で共培養した。培養担体として、可溶性ハイドロキシアパタイトファイバー（HAF）カラムを用いた。肝臓オルガノイド作成は、相澤の開発した HAF カラムを RFB に装填し、マウス不死化肝細胞 IMH-4 と M1 および A7 を共培養した。10日から2週間培養後、CD147 陽性ヒト

肝癌細胞株 FLC-7 を注入し、数日培養後、10% 緩衝ホルマリンで固定。その後、パラフィン包埋切片を作製し、HE 染色および CD147 認識モノクローナル抗体 MAb12C3 で免疫染色し、観察した。

### C. 研究結果

肝臓モデルでは、3種類の細胞を2週間共培養したところ、細胞が増殖・配列し、組織化した。HAF は溶解し、ホルマリン固定・パラフィン包埋標本から組織切片を作製することができた。CD147 陽性 FLC-7 細胞を注入し、数日培養した標本の連続切片を、HE 染色および CD147 免疫染色で観察した。

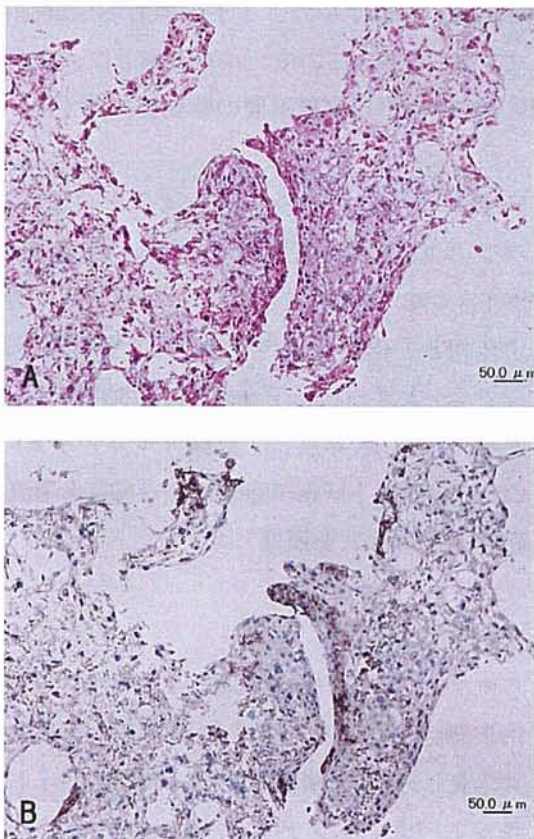


図 1 : 癌浸潤・転移モデル

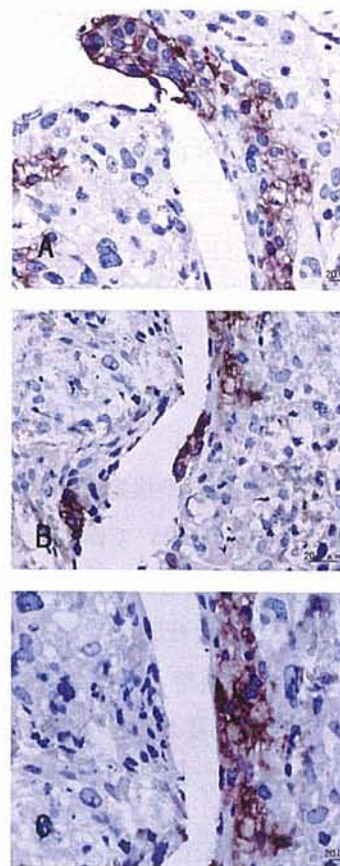


図 2 : 癌の転移・浸潤様式

図 1 A に示すように組織化したマウス肝臓オルガノイドを HE 染色で観察しても、注入されたヒト肝癌細胞 FLC-7 を判別することは、困難である。連続切片を抗 CD147 認識抗体 (MAb12C3) で免疫染色すると、FLC-7 細胞の存在部位が明確となった。図 2 は拡大像であるが、図 2 A に示す FLC-7 細胞の血管内皮細胞への付着、図 2 B に示す浸潤像が観察された。また、血管の下層に広がっている様子も観察された (図 2 C)。擬似血管内腔に付着した細胞塊も観察された (図 3)。拡大像では、CD147 は細胞膜に発現していた。組織内に形成された小腫瘍塊も CD147 陽性の細胞集団として、認識された (図 4)。

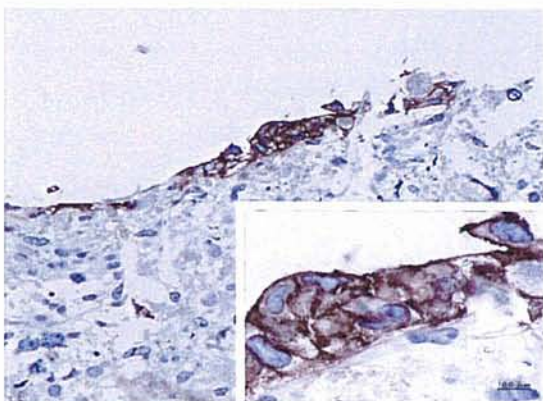


図 3 : 血管内腔に付着した細胞塊

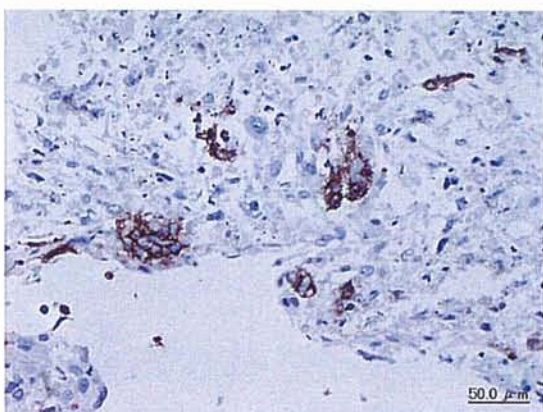


図 4 : 組織内に小腫瘍塊を形成

#### D. 考察

平成 17 年度に、超音波造影剤としてのマイクロバブルの生体内特性のシミュレーションと超音波での観察のため、RFB を用いた 3 次元腫瘍モデルと肝臓オルガノイドが作成できた。平成 18 年度は、肝臓オルガノイドに癌細胞を注入し、癌細胞の付着・浸潤・増殖様式を、CD147 をマーカーとして免疫組織化学的に観察することができた。平成 19 年度は、プラスチック製 RFB で癌浸潤モデルを作製し、そこに試作した抗 CD147 抗体標識マイクロ・ナノバブルを還流し、その集積性を検討する。集積性の検討は、超音波での検討後固定し、マイクロ CT で詳細に行う

#### E. 結論

RFB での 3 次元癌浸潤・転移モデルは、超音波造影剤としての新規マイクロ・ナノバブルの集積性を検討する上で有用である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Masaki T, Matsuura T, Ohkawa K, Miyamura T, Okazaki I, Watanabe T, Suzuki T. : All-trans retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBP beta-LIP. *Biochem J*, 397:345-353, 2006
- 2) Saito M, Matsuura T, Masaki T, Maehashi H, Shimizu K, Hataba Y, Iwahori T, Suzuki T, Braet F. : Reconstruction of liver organoid using a bioreactor. *World J Gastroenterol*, 12:1881-1888, 2006
- 3) Kosuge M, Takizawa M, Maehashi H, Matsuura T, Matsufuji S. : A comprehensive gene expression analysis of human hepatocellular carcinoma cell lines as components of bioartificial liver using radial flow bioreactor. *Liver Int.* 27:101-108, 2007
- 4) Kanai H, Marushima H, Kimura F, Iwaki T, Ohkawa K, Yanaga K, Matsuura T et al. : An extracorporeal bioartificial liver in treatment of pigs with experimental hepatic encephalopathy. *Artificial Organs.* 31:148-151, 2007
- 5) Braet F, Nagatsuma K, Saito M, Soon L, Wisse E, Matsuura T : The hepatic sinusoidal endothelial lining and colorectal liver

metastasis. *World J Gastroenterol* 13(6):  
821-825, 2007

## 2. 学会発表

- 1) 日本分子イメージング学会設立総会・  
第一回学術集会,平成18年5月22、23日、  
京都
- 2) 総合科学技術会議・科学技術連携施策群  
「超早期診断と低信州医療の実現と一体化、  
生活の安全・安心を目指して」第一回ナノ  
バイオテクノロジー連携群 成果報告会。  
平成18年12月12日、東京
- 3) 平成18年度厚生労働科学研究費研究  
成果等普及啓発事業、萌芽的先端的医療技術  
推進研究「ナノメディシン研究成果発表会」  
平成19年2月13日、東京

## Ⅲ. 知的財産権の出願・登録状況

### 特許取得・登録

シトクロームP450発現が誘導された肝細胞および  
肝ミクロソーム (特願2003-43220)

- ① 発明者：松浦知和
- ② 出願人：松浦知和
- ③ 出願日 平成16年3月
- ④ 特許取得 平成19年2月

### 特許出願

画像形成システム (特願 2006-333792)

- ①発明者 大川 清、松浦知和、阿部正彦、  
射谷和徳
- ②出願人：アロカ株式会社
- ③出願日 平成18年12月

## 8. 第2世代超音波造影剤ソナゾイドの特性

分担研究者	宮本幸夫	東京慈恵会医科大学	助教授
分担研究者	射谷和徳	アロカ（株）研究所	主任研究員
流動研究員	土屋好司	財団法人医療機器センター・東京理科大学	
協力研究者	中田典生	東京慈恵会医科大学	講師
協力研究者	西岡真紀子	東京慈恵会医科大学	助手

研究要旨：新規開発のマイクロ・ナノバブルが既存の超音波造影剤と比較して、優れた特性を持つか検討するため、まず、第2世代超音波造影剤であるソナゾイド（Sonazoid）の特性を検討した。ソナゾイドは、粒径  $2\mu\text{m}$  前後で均一で、時間をおいても安定であった。音圧 MI 0.20 までの超音波を連続照射しても、安定であった。今後、ソナゾイドの特性を基準として、新規集積超音波造影剤としての、マイクロ・ナノバブルを開発する。

### A. 研究目的

超音波造影剤（マイクロ・ナノバブル）の新規開発のためには、マイクロ・ナノバブルの、①安定性、②粒径の均一性、③音響特性に関して検討する必要がある。平成19年1月に、レボピストに続く第2世代超音波造影剤ソナゾイド（第一製薬株式会社）が発売され、臨床現場で使用されるようになった。ソナゾイドは、フォスファチジルセリンを主成分とする粒径  $2\mu\text{m}$  の超音波振動性マイクロバブルで、水に難溶性のペルフルブタンが封入されている。静脈内投与直後の血管イメージ、投与後10分以後のクッパーイメージで、超音波での肝臓腫瘍の発見、診断に用いられる。今回は、ソナゾイドの *in vitro* での特性を計測した。

### B. 研究方法

ソナゾイドの安定性を、目視、微分干渉顕微鏡、動的光散乱法による粒径観察で検討

した。また、超音波照射に対する強度、安定性を検討した。

### C. 研究結果

ソナゾイドを水に100倍希釈し、攪拌しながら、それぞれの方法で観察、記録した。

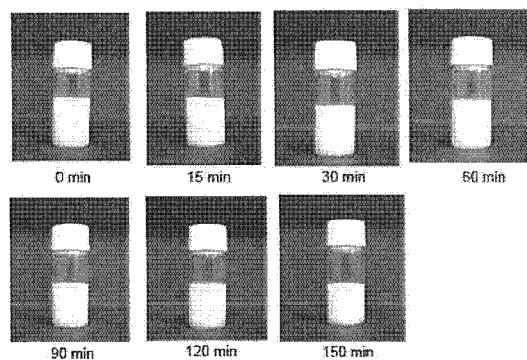
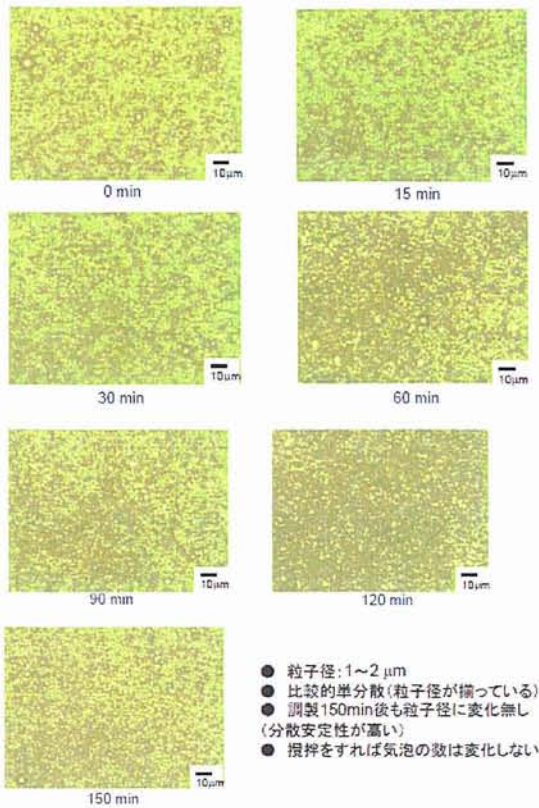


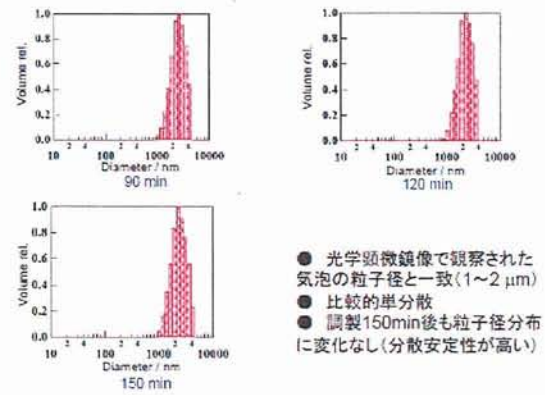
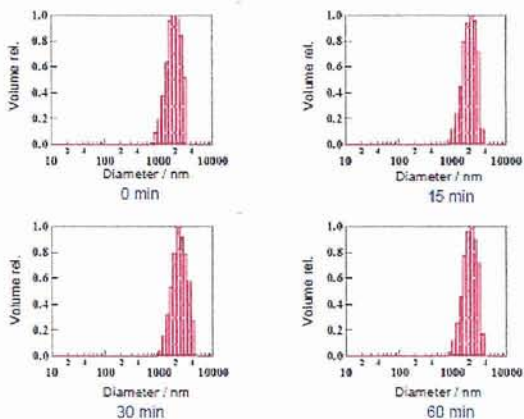
図1：目視観察（攪拌時）



- 粒子径: 1~2 μm
- 比較的単分散(粒子径が揃っている)
- 調製150min後も粒子径に変化無し(分散安定性が高い)
- 攪拌をすれば気泡の数は変化しない

図2：微分干渉顕微鏡での観察

ソナゾイドは目視、顕微鏡観察において、粒径も安定しており、また融合することもなく、分散安定性にも優れていた(図1, 2)。粒系に関しては、動的光散乱法でもその安定性を確認した(図3)。



- 光学顕微鏡像で観察された気泡の粒子径と一致(1~2 μm)
- 比較的単分散
- 調製150min後も粒子径分布に変化なし(分散安定性が高い)

図3：動的光散乱法による粒径分布の測定

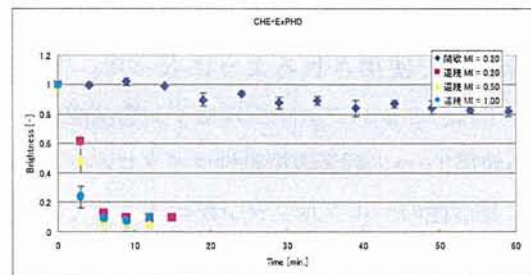
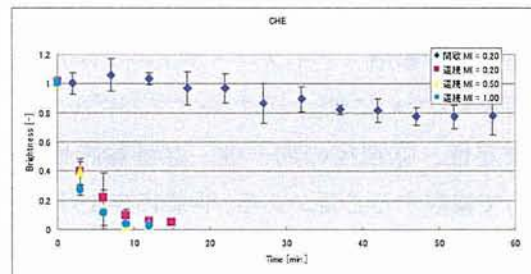
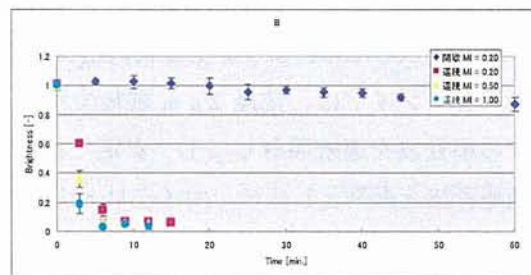


図4：超音波照射時の安定性

音圧が MI 0.20 以下の超音波で、間歇照射であれば、ソナゾイドはほとんど破裂することなく、安定であった。しかし、MI 0.20 以上では、ソナゾイドは破裂した。

#### D. 考察、E. 結論

ソナゾイドは均一な粒径のマイクロバブルで、安定性も高く、MI 0.20 までの音圧にもほとんど破壊されることがなかった。ソナゾイドを基準として、新規の標識集積超音波造影剤の開発を行う。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1) 日本分子イメージング学会設立総会・第一回学術集会. 平成18年5月22、23日、京都

2) 総合科学技術会議・科学技術連携施策群「超早期診断と低信州医療の実現と一体化、生活の安全・安心を目指して」第一回ナノバイオテクノロジー連携群 成果報告会. 平成18年12月12日、東京

3) 平成18年度厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業、萌芽的先端的医療技術推進研究「ナノメディシン研究成果発表会」平成19年2月13日、東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



## 9. ラベル化造影剤を用いた超音波によるがん超早期診断システムの研究開発

分担研究者 阿部正彦 東京理科大学 教授  
分担研究者 酒井秀樹 東京理科大学 助教授  
流動研究員 土屋好司 財団法人医療機器センター・東京理科大学

### 研究要旨

超音波診断用造影剤（マイクロ/ナノバブル）に利用可能な新規界面活性剤として、シクロアミロース修飾界面活性剤およびタウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤を用いて微小気泡の調製を行った。超音波照射法により直径約 200 nm のナノバブルを調製することができ、超音波診断装置を用いてその画像化に成功した。また、多孔質ガラス膜を用いたところ、直径約 500 nm で単分散な微小気泡が調製できることが分かった。本研究により、血中滞留性が高く、腫瘍への集積に有効なサイズの微小気泡が調製された。

### A. 研究目的

微小気泡を超音波診断用造影剤として利用するためには、①高い生体適合性、②高い分散安定性、③気泡の微小化（数 100nm～数 $\mu$ m）、④粒子径の均一化（粒子径分布の縮小）、⑤低音圧での振動特性の向上、⑥治療患部へのターゲティングに向けた抗体の標識、など幾つかの条件が要求されるため、既存の界面活性剤では困難なのが現状である。我々は、最適な微小気泡の調製に向けて、タウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤、およびシクロアミロース修飾界面活性剤を新規に合成し、その溶液物性について検討を行ってきた。

タウリン誘導重合性ジェミニ型界面活性剤は、アミノ酸の一種であるタウリンを出発物質として合成されており、生体安全性に優れることが期待される。また、その臨界ミセル濃度(cmc)は極めて小さく、起泡性および泡沫安定性に優れることから、少量で安定な微小気泡の調製が期待される。また、分子中に重合性基を有しているため、気泡発生後に膜界面で重合させることにより、その分散安定性はさらに向上すると考えられる。

シクロアミロース修飾界面活性剤は、デンプンなどから生成される生分解性のシクロアミロースを用いて合成しているため、その生体安全性は高い。また、その cmc は低いため、低濃度で安定な気泡の調製が期待できる。

本年度は、これら新規界面活性剤を用いて微小気泡の調製を行い、超音波診断装置による画像化を試みた。

### B. 研究方法

界面活性剤には、本研究にて新規に合成したシクロアミロース修飾界面活性剤（図 1, cmc :  $2 \times 10^{-5}$  mol/L）およびタウリン誘導ジェミニ型陰イオン界面活性剤（図 2, cmc :  $8 \times 10^{-5}$  mol/L）を、内包ガスには窒素 ( $N_2$ ) および六フッ化硫黄 ( $SF_6$ ) を、溶媒には蒸留水および 30%グリセリン水溶液を用いて、(a)超音波照射法、および (b)多孔質ガラス膜法による微小気泡の調製を行った。界面活性剤濃度は 4 倍の cmc 濃度とした。

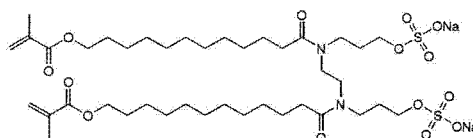


図1 タウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤

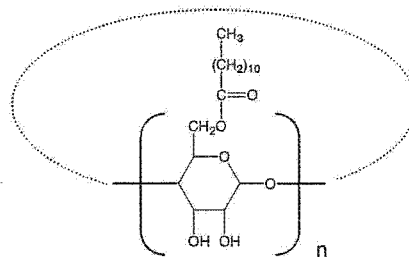


図2 シクロアミロース修飾界面活性剤

#### (a) 超音波照射法

界面活性剤水溶液を内包ガスにより 30 分間バブリングした後、図 3 のように内包ガスを送り込みながら、超音波分散機（周波数：

20kHz)を用いて1分間超音波照射することにより微小気泡を調製した。

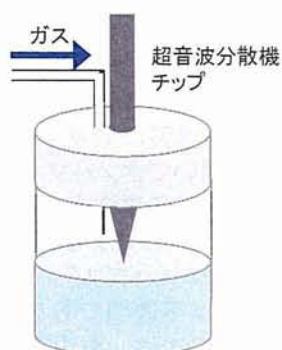


図3 超音波照射法による微小気泡調製の模式図

(b) 多孔質ガラス膜法

図4のように、チューブ状多孔質ガラス膜内部に界面活性剤水溶液を流通させながら、膜の外側から細孔を通して内包ガスを圧入させることにより、微小気泡の調製を行った。

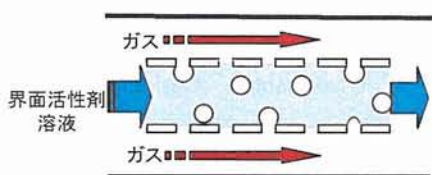


図4 多孔質ガラス膜を用いた微小気泡調製の模式図

C. D. 研究結果、考察

(a) 超音波照射法を用いた微小気泡の調製

はじめに汎用の界面活性剤 SDS (cmc:  $8 \times 10^{-3}$  mol/L)を用いて、超音波照射法による微小気泡調製の最適条件について検討した。気泡の発生孔率は超音波分散機のチップの位置に依存し、チップ先端を気液界面に固定化したときに最も分散量が高いことが分かった。内包ガスに  $N_2$  を用いたところ、調製直後では気泡の発生に伴い溶液は白濁したが、時間経過に伴い気泡は浮上して二層分離し、調製2分後には完全に透明になった。この微小気泡を、超音波診断装置を用いた音響特性試験により画像化を試みた。音響特性試験は、マイクロピペットにより微小気泡を少量採取し、それを水中に固定化した超音波診断装置の検出プローブ付近で吐出させることにより画像化を行った。その結果、調製直後の白濁部では明瞭に画像化ができたが、調製10分後の透明部ではできなかった。これは、微小気泡の分散安定性が低く、透明部においてはその

ほとんどが消失しているためであると考えられる。

そこで、気泡の分散安定性の向上を試みた。気泡の不安定要因として(1)気泡の浮上と(2)内包ガスの溶解に起因した Ostwald 熟成が考えられる。そこで溶媒の粘度を向上させるために、30%グリセリン水溶液を用いて気泡の浮上抑制を試みた。また、内包ガスには難溶性の六フッ化硫黄( $SF_6$ )を用いることで、Ostwald 熟成の抑制を試みた。 $SF_6$  ガスは、最も重いガスの一つであり、その密度は空気の約 5.1 倍であるため、気泡の浮上抑制にも有効である。また、 $SF_6$  は既に網膜剥離の治療分野で使用されている生体安全性の高いガスである。

溶媒に 30%グリセリン水溶液を、内包ガスに  $SF_6$  を用いて SDS 水溶液における微小気泡の調製を行ったところ、白濁部の安定性は10分程度まで向上し、音響特性試験では調製90分後においても微小気泡の画像化に成功した。このことから、グリセリン水溶液および  $SF_6$  を用いることにより、微小気泡の安定性が向上することが分かった。

そこで、次に臨床への応用を鑑み、本研究にて合成したシクロアミロース修飾界面活性剤を用いて微小気泡の調製を行った。溶媒に 30%グリセリン水溶液、内包ガスに  $SF_6$  を用いて調製したところ、SDS と同様、白濁部は調製10分程度まで認められ、超音波診断装置により調製30分後間の透明部においても明瞭な画像化に成功した(図5)。



図5 シクロアミロース修飾界面活性剤を用いて調製した微小気泡の超音波診断画像

また、光学顕微鏡観察からは大きな気泡の存在は確認できなかったことから、マイクロ

メートルサイズ以下の微小気泡の存在は考えられる。そこで、フリーズフラクチャー(FF)法による透過型電子顕微鏡(TEM)観察を行った。その結果、直径約 200nm の球状構造が多数観察されたことから、“ナノバブル”の存在が確認された(図6)。以上より、シクロアミロース修飾界面活性剤を用いて、直径 200nm 程度のナノバブルを調製することができ、超音波診断装置を用いた画像化に成功した。

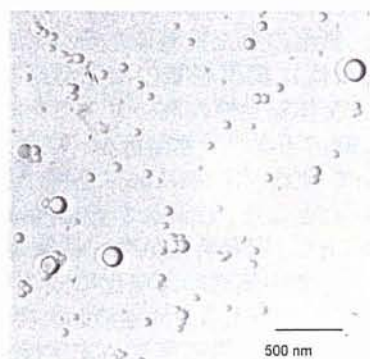


図6 シクロアミロース修飾界面活性剤を用いて調整した微小気泡のFF-TEM像

#### (b) 多孔質ガラス膜を用いた微小気泡の調製

多孔質ガラス膜(SPG膜)は単一な細孔径を有しているため、単分散かつ多量に微小気泡を発生することができる。そこで、本研究にて合成した重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤を用いて微小気泡の発生を試みた。内包ガスには空気をを用いた。

その結果、調製1分で溶液全体が白濁する程の大量の微小気泡が調製できることが確認された。そこで、静的光散乱法により微小気泡の粒子径分布測定を行ったところ、その平均粒子径は約 600nm であり、比較的粒度分布の狭く単分散であることが分かった(図7)。

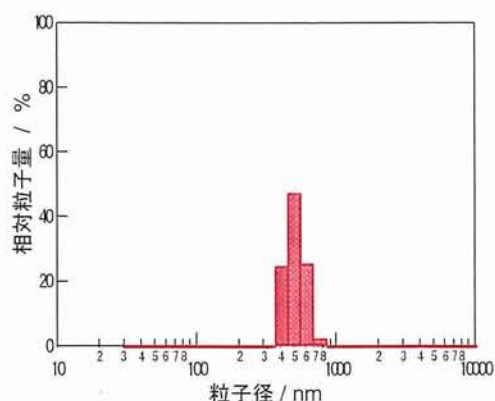


図7 多孔質ガラス膜を用いて調製した微小気泡の粒子径分布(重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤)

#### E. 結論

超音波診断用微小気泡化造影剤として有用な界面活性剤として、シクロアミロース修飾界面活性剤およびタウリン誘導重合性ジェミニ型界面活性剤を用いて、粒子径が 1 $\mu$ m 以下の“ナノバブル”の調製に成功した。また、超音波診断装置を用いてナノバブルの画像化に成功した。現在、超音波造影剤として市販されているレボピストやソナゾイドは、いずれも 1 $\mu$ m 以上の“マイクロバブル”であるため、腫瘍への集積性には不適切である。本研究で調製されたナノバブルは、血中滞留性および腫瘍への集積性に優れることが期待される。今後は、微小気泡に抗体を標識し、東京慈恵会医科大学大川教授の研究グループが開発した小型ラジアルフロー型バイオリクター(RFB)による三次元還流培養システムを用い、微小癌におけるマイクロバブルの集積性および体内動態について検討を行う

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) “Polymerizable Cationic Gemini Surfactant.”  
Masahiko Abe, Kazuyuki Tsubone, Takaaki Koike, Koji Tsuchiya, Takahiro Ohkubo, Hideki Sakai,  
*Langmuir*, Vol.22, No.20, pp.8293-8297 (2006)

##### 2. 学会発表

- (1) “Synthesis and Properties of a Novel Surfactant Modified with Cycloamylose”  
Paveena Wongtrakul, Hidetoshi Ichige, Kenichi Oyaizu, Makoto Yuasa, Takahiro Ohkubo, Hideki Sakai, Masahiko Abe  
第45回日本油化学会年会  
(平成18年9月8日~10日、東京理科大学)
- (2) “新規重合性ジェミニ型界面活性剤の合成と物性”  
小池隆明、坪根和幸、土屋好司、大久保貴広、酒井秀樹、阿部正彦  
第45回日本油化学会年会  
(平成18年9月8日~10日、東京理科大学)
- (3) “新規重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤の合成と水溶液物性”  
和田みゆ紀、坪根和幸、土屋好司、大久保貴広、酒井秀樹、阿部正彦

第 45 回日本油化学会年会  
(平成 18 年 9 月 8 日～10 日、東京理科大学)  
(4) “新規ジェミニ型陰イオン界面活性剤の合成および水溶液物性”  
(5) “新規重合性ジェミニ型陽イオン界面活性剤の合成とその物性”  
小池隆明、坪根和幸、土屋好司、大久保貴広、酒井秀樹、阿部正彦  
2006 年度材料技術研究協会討論会  
(平成 18 年 12 月 1 日～2 日、東京理科大学)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(1) 発明の名称: 重合性 2 鎖 2 親水基含有陰イオン界面活性剤及びその製造方法  
発明者: 坪根和幸、阿部正彦、酒井秀樹、

岩田直之、坪根和幸、土屋好司、大久保貴広、酒井秀樹、阿部正彦  
第 45 回日本油化学会年会  
(平成 18 年 9 月 8 日～10 日、東京理科大学)

大久保貴広

出願人: 坪根和幸(代表)、大川清、松浦知和、

武林敬、阿部正彦、酒井秀樹

出願日: 平成 18 年 3 月 20 日

特願: 2006-112666

(2) 発明の名称: 疎水基を有する環状グルカン誘導体およびその製造方法

発明者: 阿部正彦、湯浅真、市毛秀俊、鷹羽武史、寺田喜信

出願人: 阿部正彦、湯浅真、鷹羽武史、寺田喜信

特願: 2004-241570