

2007 X-Ray Micro CT Research On Liver Bioreactor Tissue

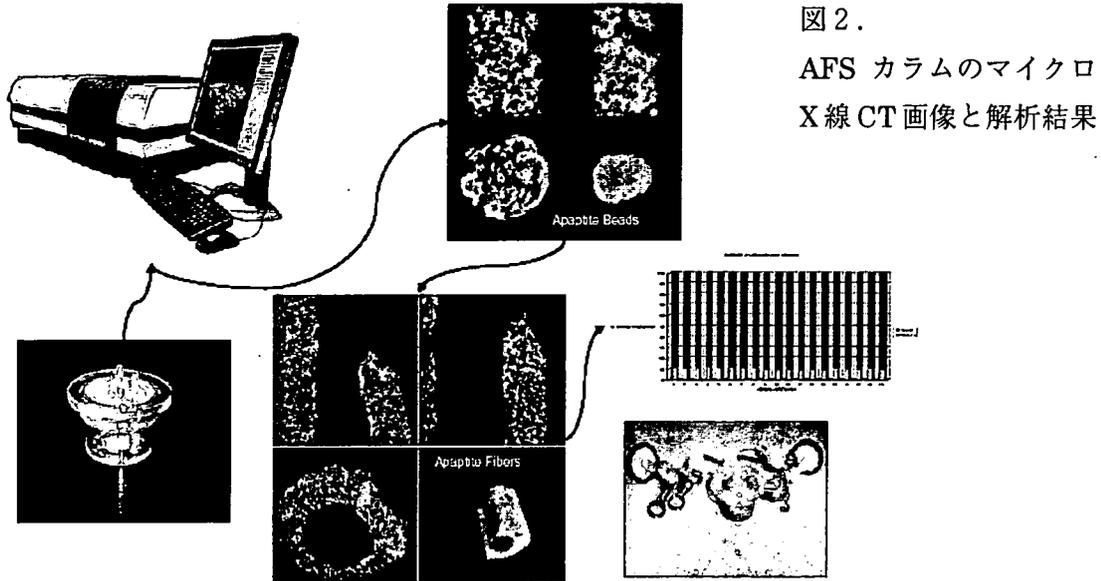


図2.  
AFS カラムのマイクロ  
X線 CT画像と解析結果

ついで、マウス不死化肝細胞、内皮細胞、伊東細胞を共培養した肝臓オルガノイドを作製し、そこに市販の超音波造影剤ソナゾイド（リン脂質単分散膜バブル）を還流したサンプルを解析した。サンプルは、グルタルアルデヒドで一晩、4℃で還流固定し、その後オスニウム酸で1週間固定した。マイクロX線CTで撮影後、同じサンプルをSEMおよびTEMで観察した。図3に示すように、肝臓オルガノイドをマイクロCTで撮影することができ、今後3次元構築し、質的解析を行う。また、SEMとTEMでも微細形態を観察したが、特にTEMで内皮細胞内に取り込まれたソナゾイド像が観察された(図4)。

Doctor Nagatsuma reports:

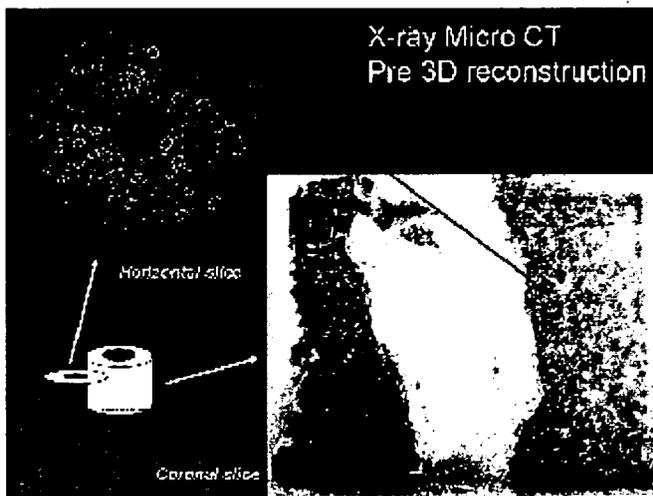


図3.  
肝臓オルガノイドの  
マイクロX線CT像  
(断面)



図4.  
ソナゾイド還流後の  
肝臓オルガノイドの  
TEM像  
矢印：ソナゾイド

3番目のサンプルは、協力研究者の酒井俊郎博士の開発した Au-liposome を還流したサンプルで、同様にマイクロ X 線 CT を撮影後、電子顕微鏡観察した。細胞内には金粒子が多数観察され、細胞障害が目立った。

### 3) 11月12日のミーティング

松浦知和、酒井俊郎、永妻啓介とともに、前記の実験結果に関して討議した（図5）。肝臓オルガノイド内皮細胞におけるソナゾイドの取り込み機構の解明、オルガノイドの各部位（上・中・下、外側・内側）による形態観察が今後の課題となった。また、3次元での血管構築しに関しても今後観察することにした。さらに、新規開発の集積性バブルの還流サンプルでも、2008年以降マイクロ X 線 CT で観察することにした。内皮細胞やマクロファージでの取り込みを軽減するには、リン脂質のみではない他の界面活性剤を混ぜた単分散バブルも必要かもしれない。

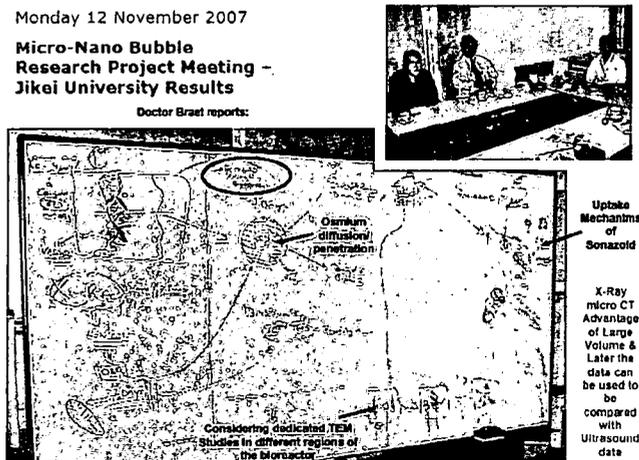


図5.  
会議風景

4) 11月13日の会議

大川班第2回班会議に参加し、討議した(下記プログラム)。会議終了後、講演を行った。

平成19年度厚生労働省科学研究費補助金(医療機器開発推進事業: ナノメディシン研究)  
-超音波分子イメージングプロジェクト- 大川班 第2回会議

日時:平成19年11月13日火曜日 午後2時-午後5時

場所:東京慈恵会医科大学附属病院・中央棟 8階会議室

研究課題:ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発

1. 挨拶(主任研究者:東京慈恵会医科大学・大川 清)
2. 事務連絡
3. 抗CD147抗体標識バブルの作製(東京理科大学・土屋好司、阿部正彦) 14:10-14:30
4. ナノバブルの高感度超音波検出法の検討(アロカ株式会社・今野剛人、射谷和徳)  
14:30-14:50

コーヒーブレイク 14:50-15:10

5. 3次元固形癌モデルを用いた造影超音波実験(東京理科大学・藤原和慶)  
15:10-15:30
6. 話題提供
  - ① シドニー大学でのマイクロCTを用いた3次元固形癌モデルの解析  
(東京慈恵会医科大学・永妻啓介) 15:30-15:50
  - ② ナノゴールド粒子をラベルしたリポソームの開発(東京理科大学・酒井俊郎)  
15:50-16:10
  - ③ CD147認識アプタマーの作製(東京慈恵会医科大学・青木勝彦) 16:10-16:30

7. 総合討論 16:30-17:00

情報交換会 17:00-18:30 (Wine & Cheese)

Filip Braet 博士セミナー 19:00-20:00 南講堂

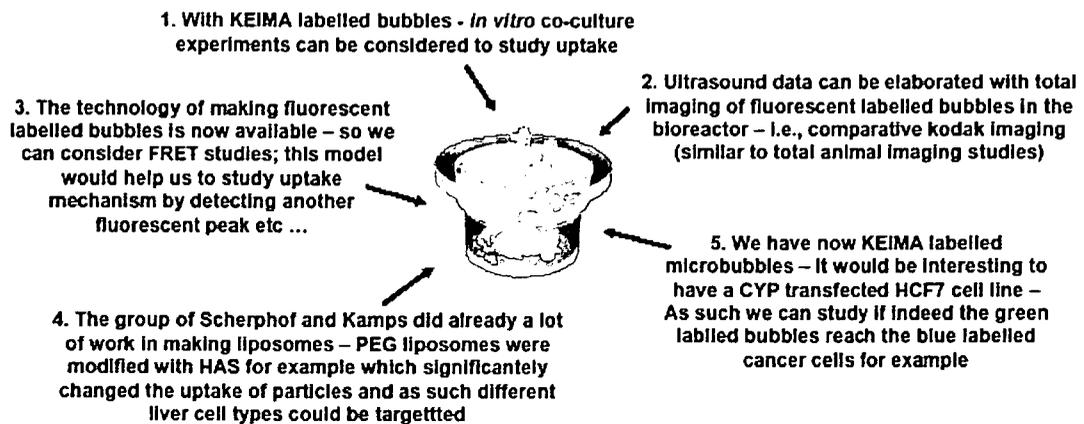
**From live cell imaging to advanced molecular microscopy techniques: bridging the temporal and spatial resolution gap.**

会議全般から、蛍光蛋白 KEIMA をラベルしたマイクロバブルを利用することで、バブルの集積・局在の確認を超音波とあわせて行えること、FRET でバブルのアップテイクメカニズムを解析すること、さらに、遺伝子や薬剤をターゲティングする技術開発などを提案した (図 6)。

Tuesday 13 November 2007

Micro-Nano Bubble Research Project Meeting –  
Research Partner Presentations at Jikei Hospital

Doctor Braet advice:



The day was concluded with a seminar at Jikei Hospital:

Braet F. Seminar: From live cell imaging to advanced molecular microscopy techniques: bridging the temporal and spatial resolution gap. Jikei University Hospital, School of Medicine. Tokyo, Japan, 13 November 2007

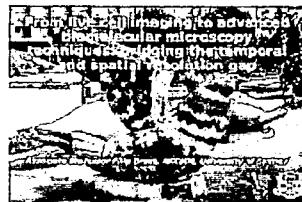
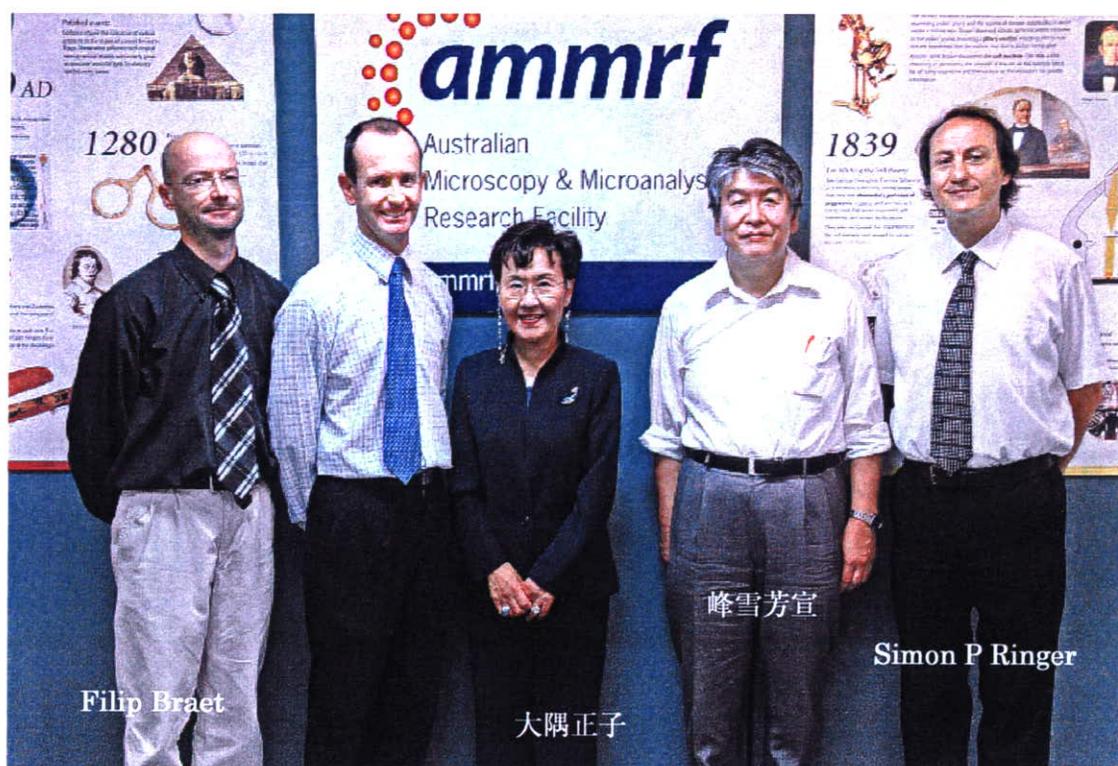


図 6

5) 11月15日のNPO 総合画像研究支援 (大隅正子理事長) での講演と討議

総合画像研究支援 (IIRS) のメンバーに AMMRF の現状に関して説明し、今後の提携の検討を行うこととした。この結果、IIRS の大隅正子理事長と峰雪芳宣教授が 12 月 10 日にシドニー大学を訪問し、AMMRF のディレクターである Simon P Ringer 教授と討議した (図 7)。



Sydney, 10 december 2007

図 7

#### 6) 11月20日のマイクロバブル還流実験

マイクロバブルの3次元癌モデルへの還流実験に参加した。抗CD147抗体標識バブルを、ヒト肝臓癌細胞株 FLC-7 を培養した癌モデルに還流し、その集積性を超音波で観察した。この実験では、バブルが安定せず集積性は明確でなかったが、実験の全貌を理解することができた (図 8)。

Tuesday 20 November 2007

## Microbubble Experiment Dr Matsuura's Laboratory

Follow-up experiments after last week's meeting on Tuesday 13 November 2007

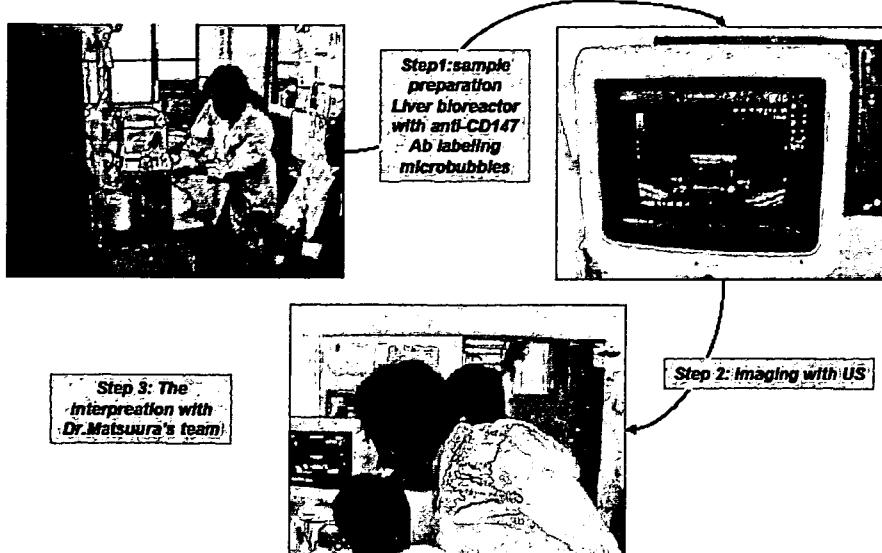


図 8. 実験風景

また、研究に用いていた簡易 SEM に興味をおぼえた (図 9)。サンプルをグルタルで固定後、そのまま観察でき、肝臓オルガノイドの内皮の篩板状小孔もきれいに観察できた。

Tuesday 20 November 2007

## Hitachi eSEM Table-top Experiment @ Dr Matsuura's Laboratory

Hitachi eSEM Miniscope TM-1000 (Aus\$ 50K): The instrument has superb / excellent imaging capabilities under environment conditions. Wet liver tissue was investigated at 10,000x that was first fixed with glutaraldehyde, rinsed for 10' in PBS and made conductive with a Hitachi Platinum solution.



### Advice given herein:

- Filip will sent the SEM samples obtained in Sydney by Dr Nagatsuma to Dr Matsuura for comparative analysis between classical SEM & eSEM
  - Compare PBS washing with ammonium acetate buffer washing = reducing phosphate crystal formation / check if this results in improved image quality?
  - Another point to consider is to treat it with 2% osmium - even osmium is not needed for eSEM imaging ... it can however enhance the contrast of the images as osmium is a metal which will give rise to an enhanced electron scattering
  - The eSEM images are (1) the first SEM images recorded under wet conditions in the liver endothelial field: THIS is NEW information and as such is an interesting observation and worthwhile to publish in one or another format; and (2), this eSEM images also undoubtedly show fenestrae, sieve plates, coated pits in the cell line.
- ⇒ Point 1 and point 2 can be a communication in LIVER INTERNATIONAL in 2008

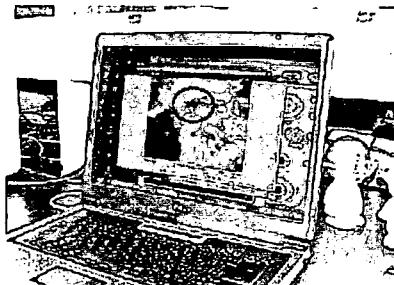


図 9. 簡易 SEM

7) 日本電子（株）、日立ハイテクノロジーの訪問

11月21日に立川の日本電子（株）を訪問し、TEMに関して技術的な討議を行った。  
11月22日には勝田の日立バイオテクノロジーを訪問し、簡易SEMと高分解能SEMに関して、技術的な意見交換を行った。

---

**ELECTRON MICROSCOPE UNIT**  
People, Research Services, Programs & Training



---

Headquarters of the Australian Microscopy & Microanalysis Research Facility  
Australian Key Centre for Microscopy & Microanalysis

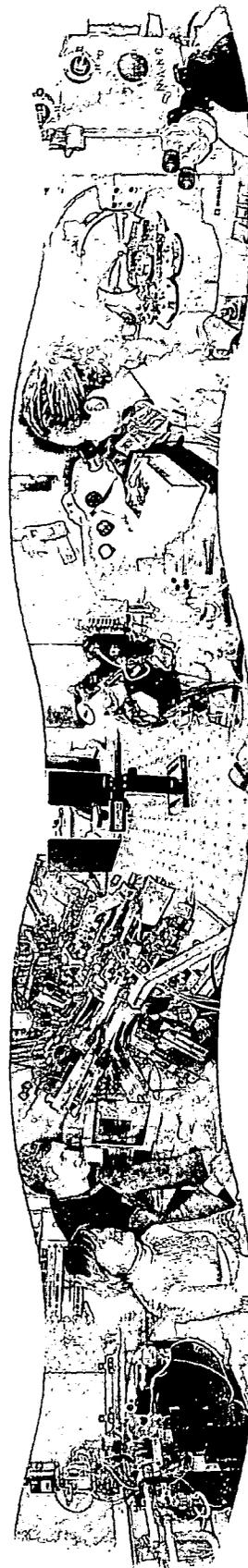
# ***JAAME Activity Report***

## ***11 NOV – 23 NOV 2007***



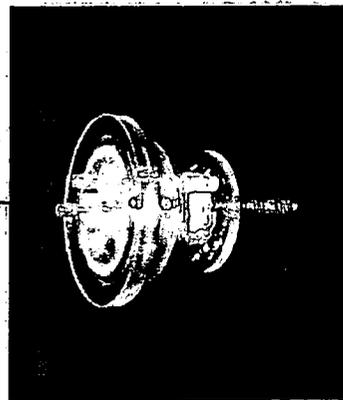
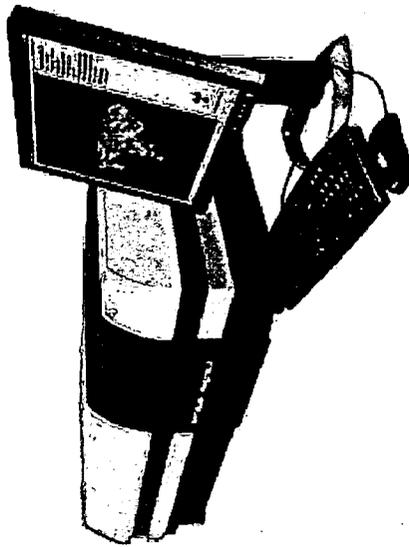
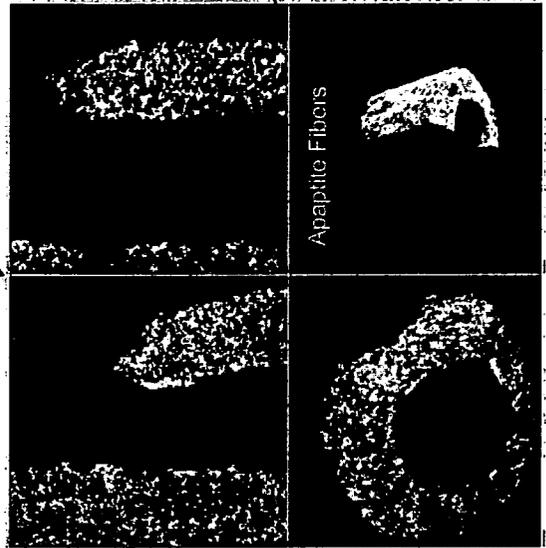
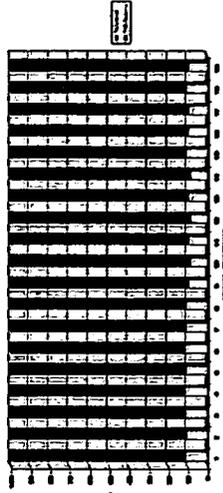
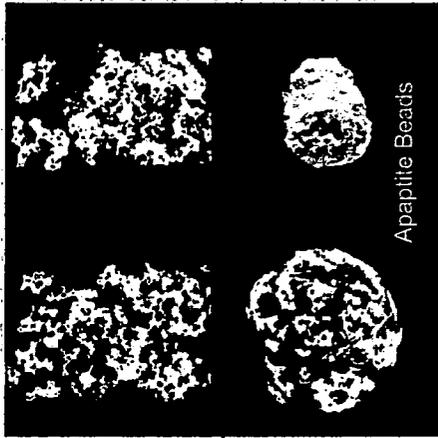
The University of Sydney

Filip Braet

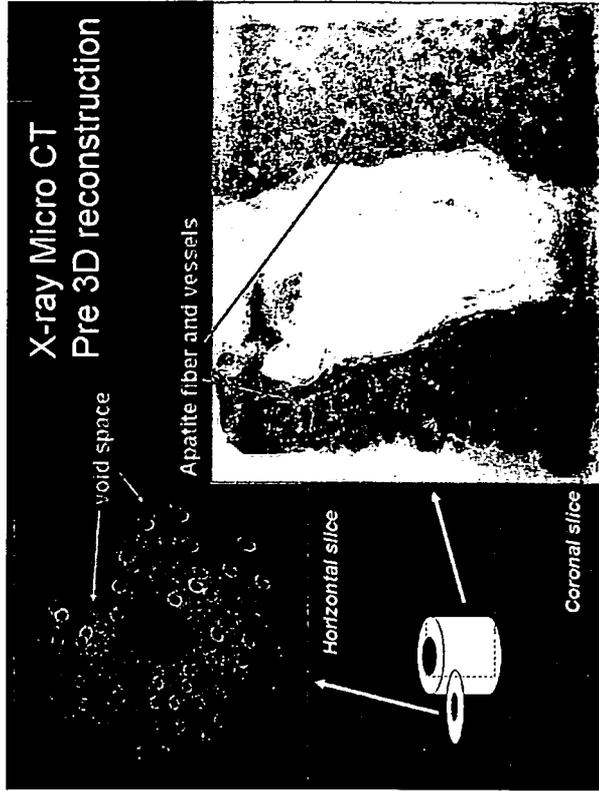




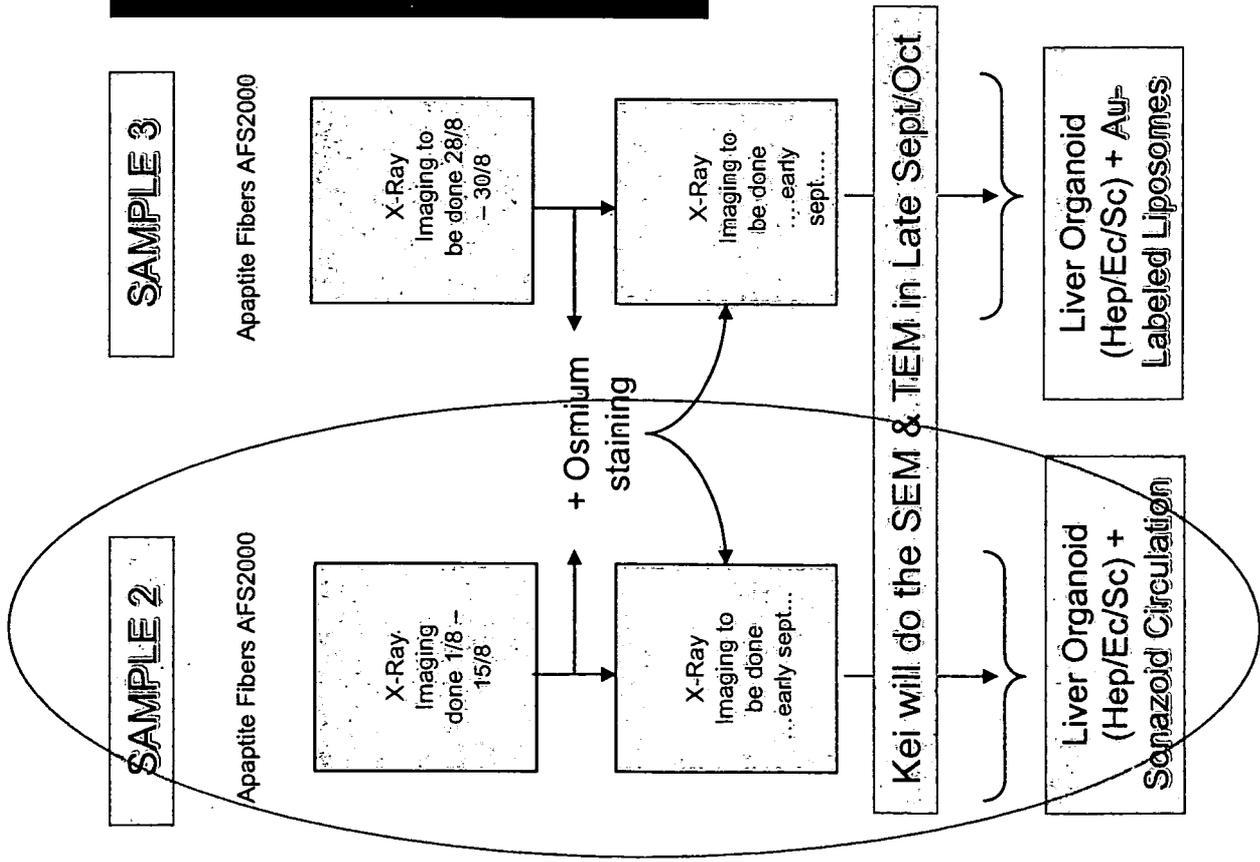
# 2007 X-Ray Micro CT Research On Liver Bioreactor Tissue

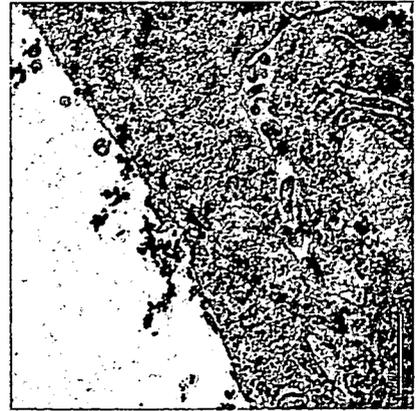
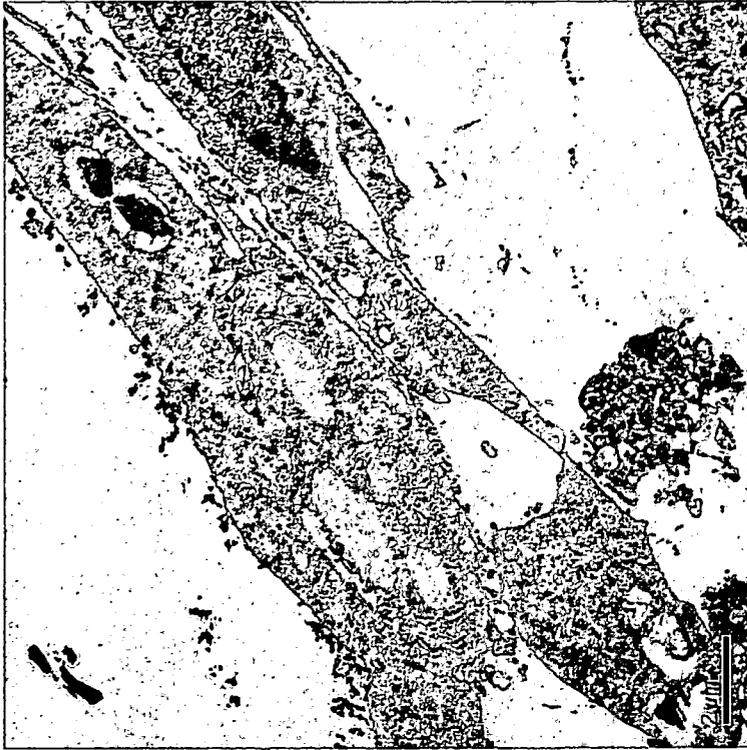


Doctor Nagatsuma reports:



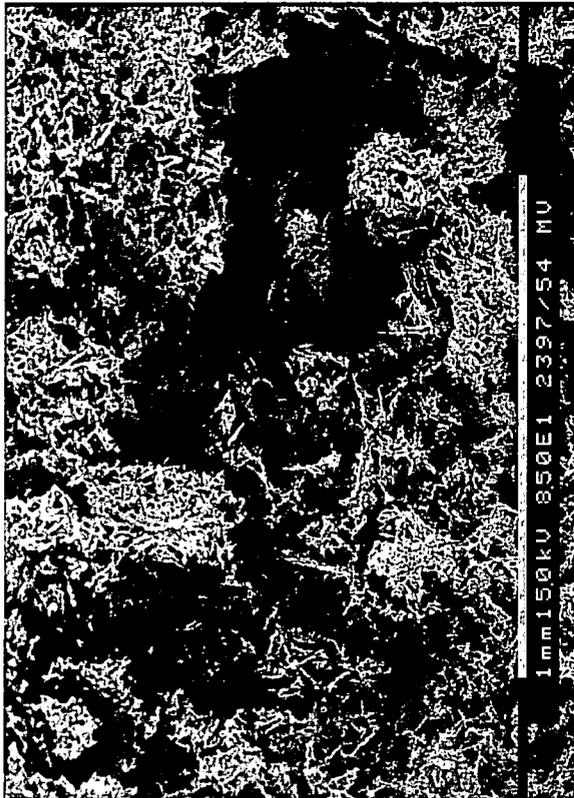
To Be Computer Modelled  
in Sydney November –  
December 2007

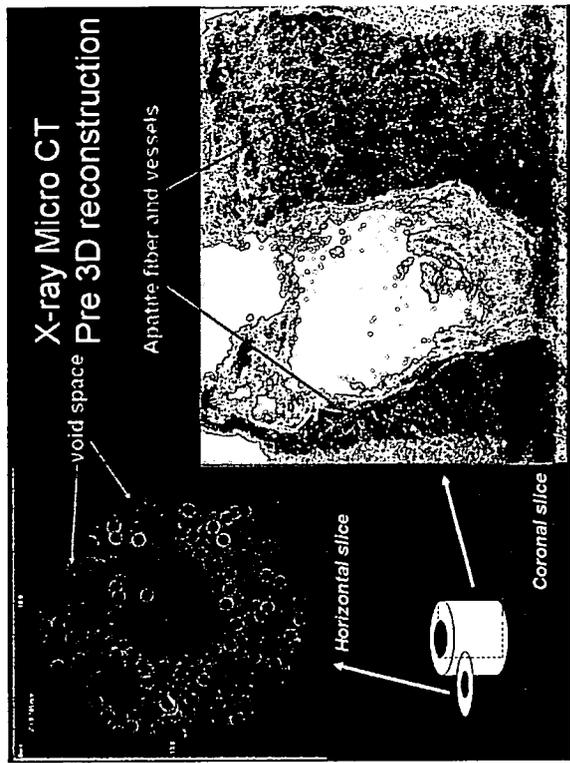




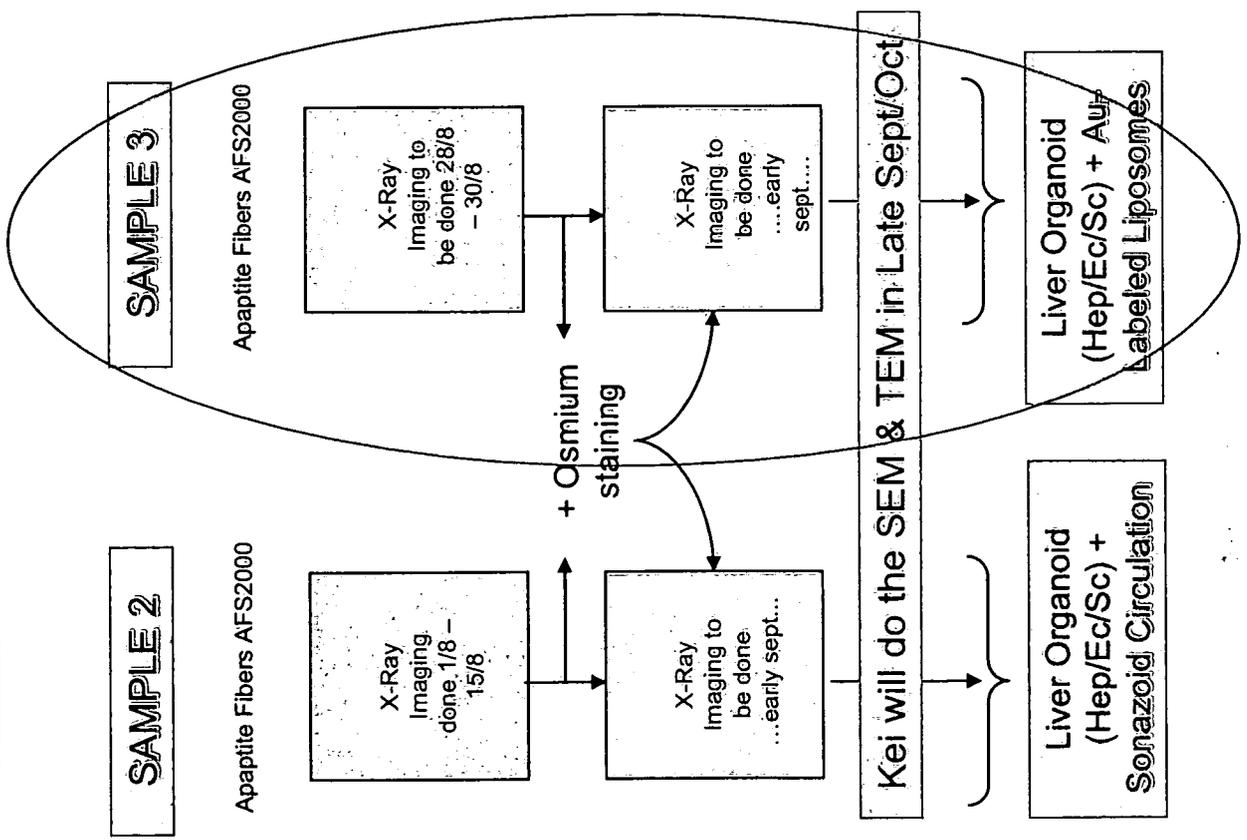
Apapite Fibers AFS2000

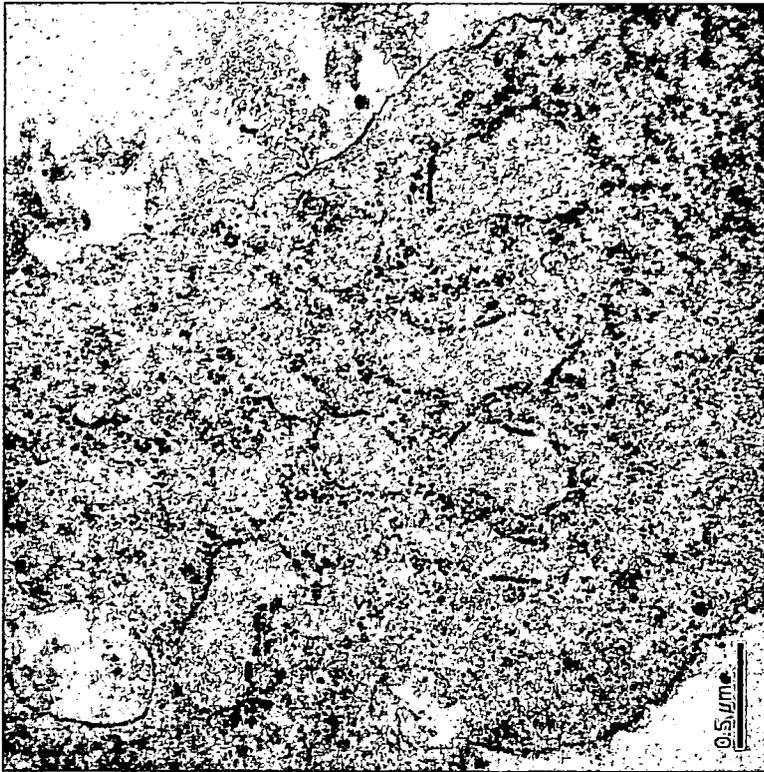
Liver Organoid  
(Hep/Ec/Sc) +  
Sonazoid Circulation





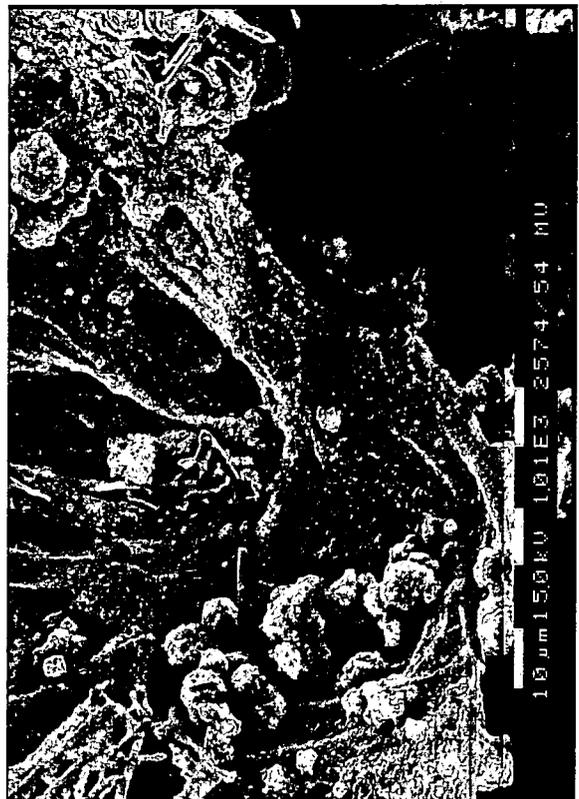
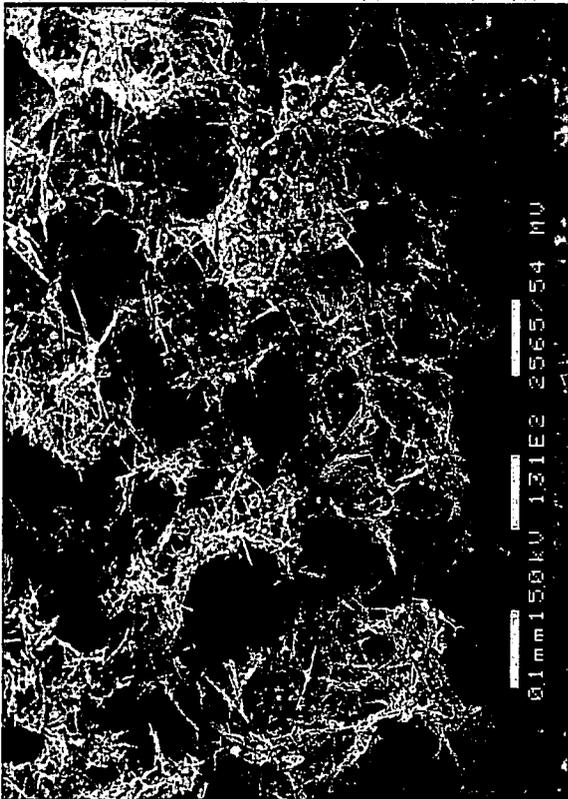
**To Be Computer Modelled  
in Sydney November –  
December 2007**





Apaptite Fibers AFS2000

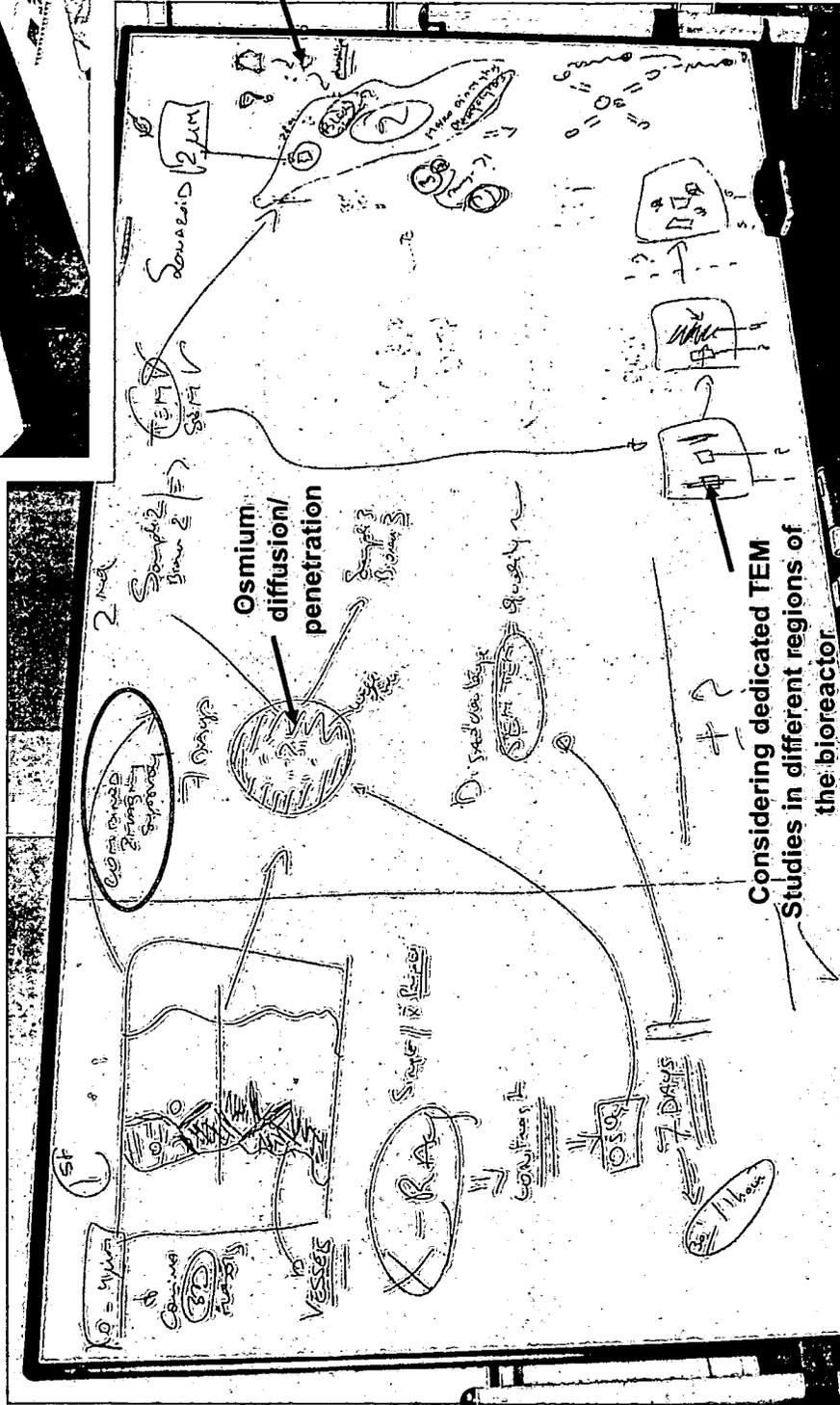
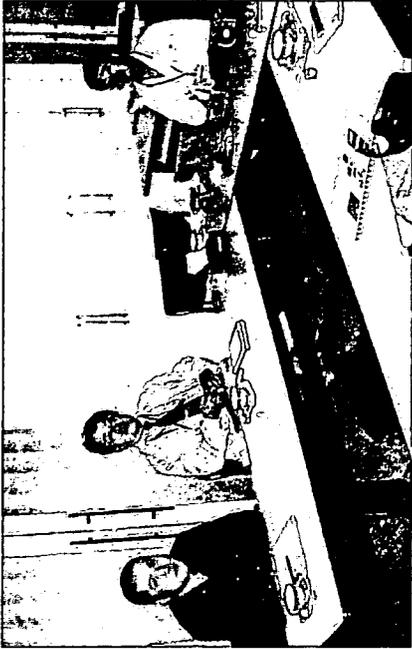
Liver Organoid  
(Hep/Ec/Sc) +  
Au-Labeled  
Liposomes

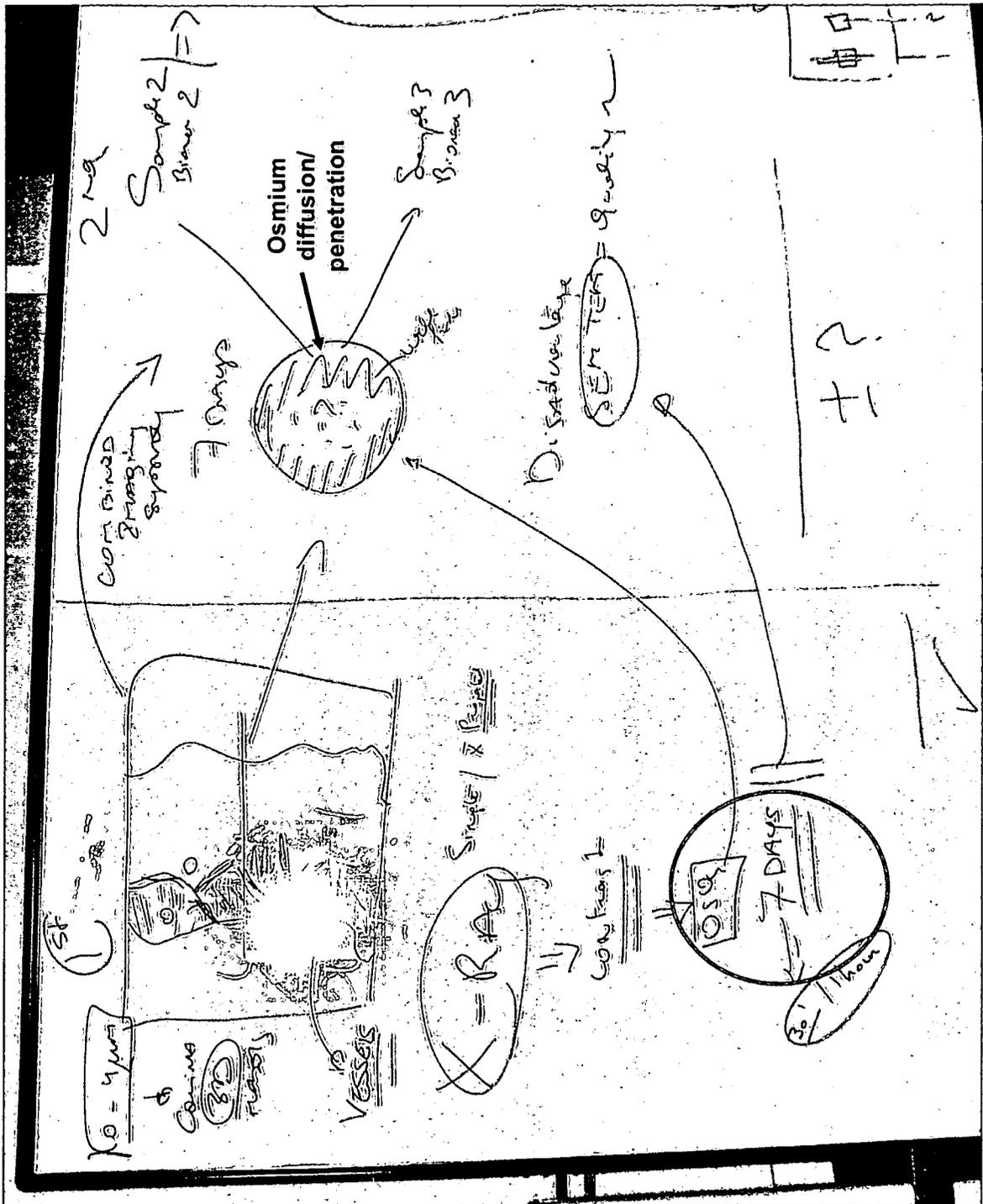


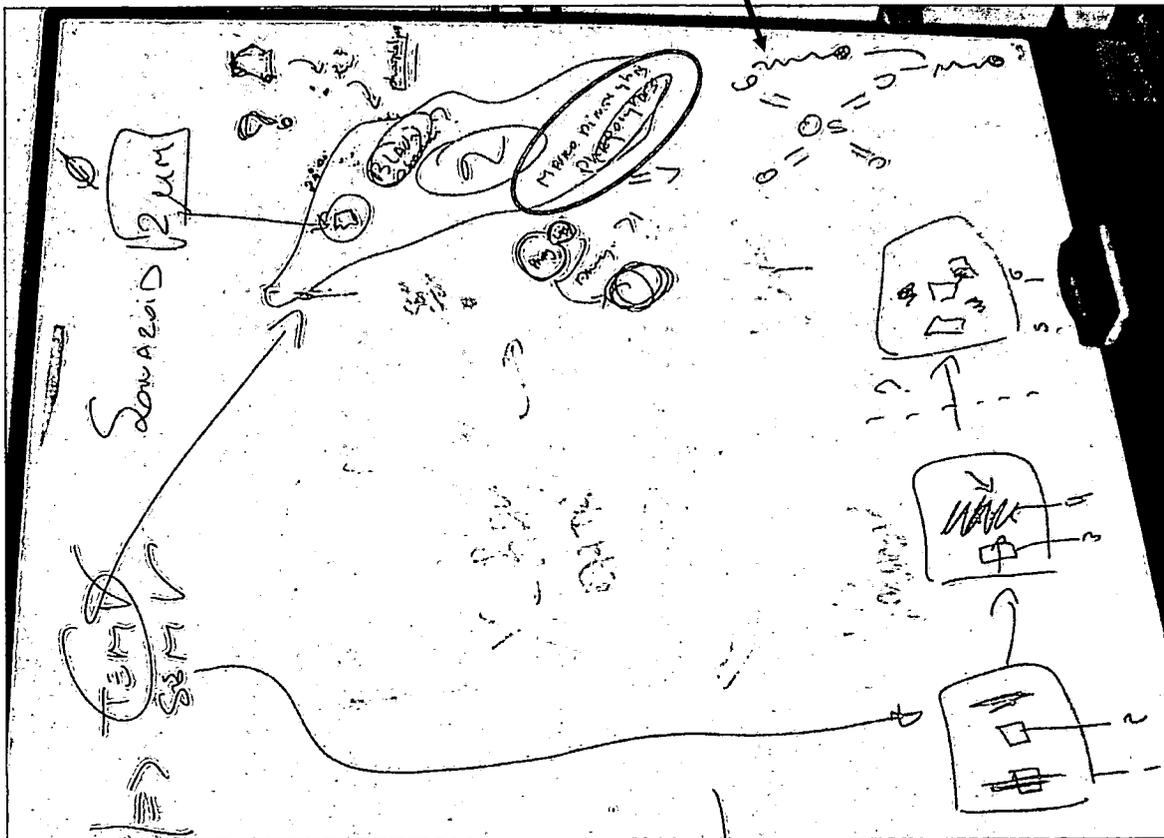
Monday 12 November 2007

# Micro-Nano Bubble Research Project Meeting - Jikei University Results

Doctor Braet reports:



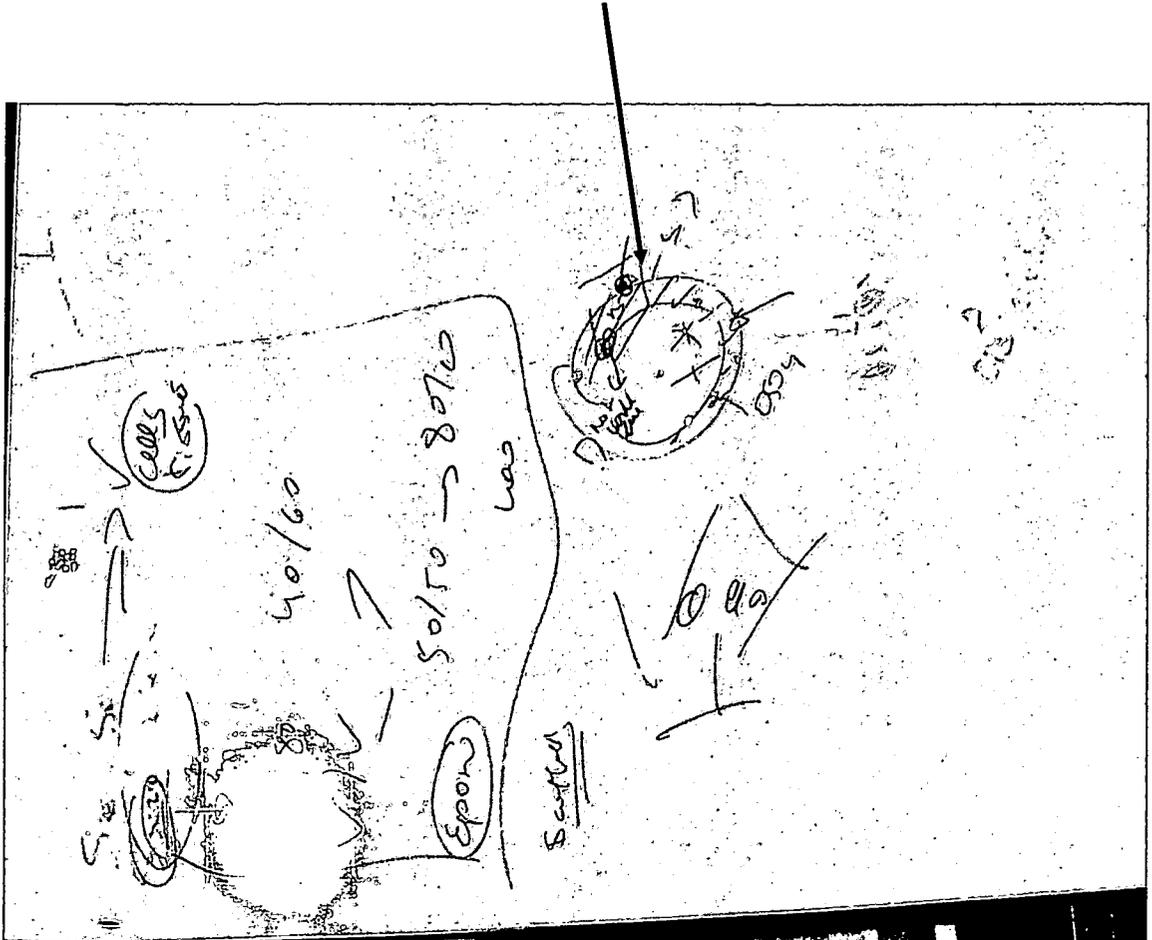


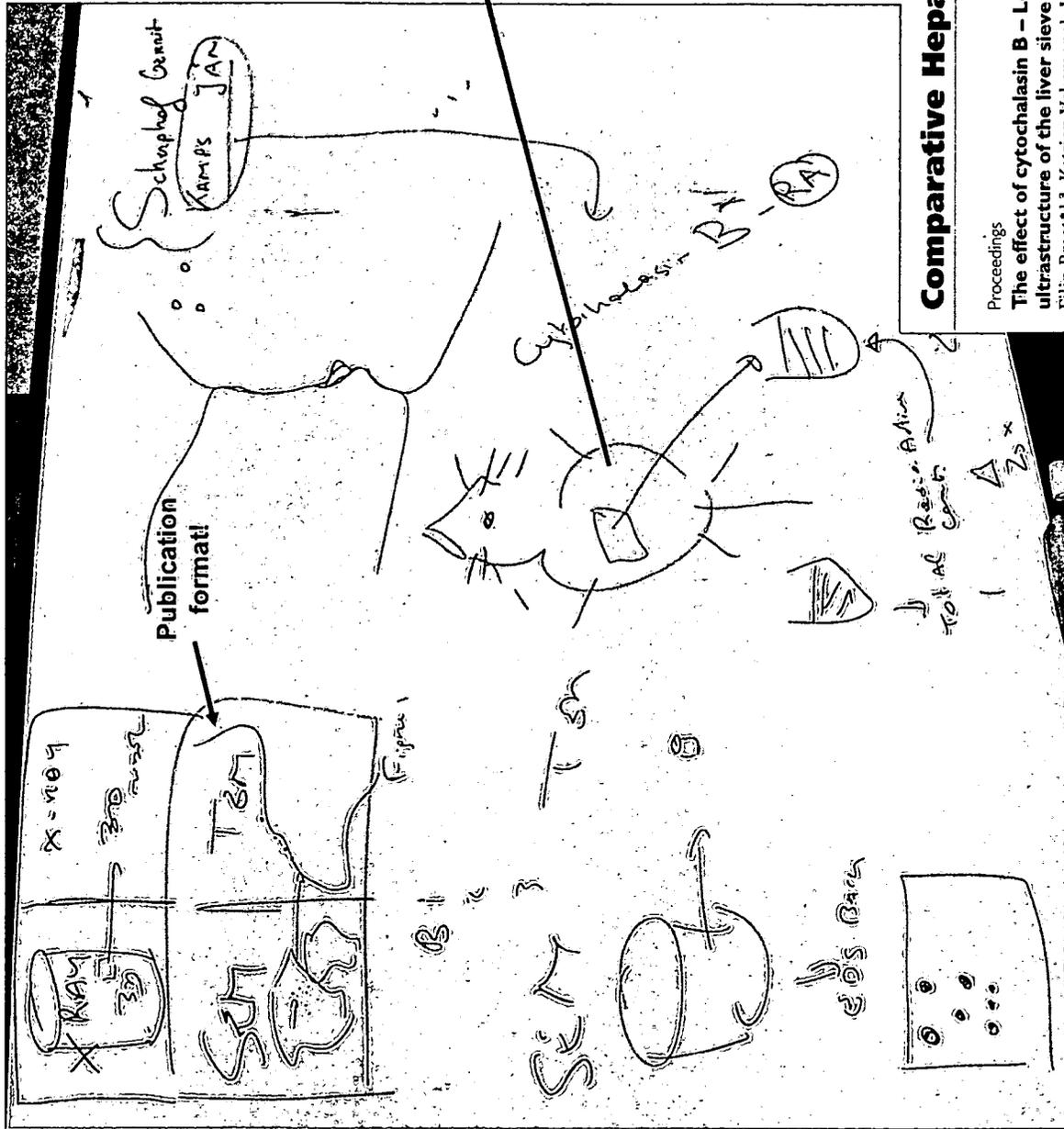


The long osmium  
impregnation  
staining may explain  
why the sonazoid is  
so dark stained: -  
phospholipid -  
osmium complex

Advice for future TEM studies:

1. Sampling, exactly record place here tissue samples is taken from - now we took samples in a double-blind ad random manner
2. Embedding, start with 20/80 Epon/EtoH, than 40/60, 60/40, 80/20, 100/100, 100/100. Will result in better infiltration





If we want to know the exact amount of lipo's taken up – we can consider to label them with a radio-active labeled probe, than beta-counter?!

## Comparative Hepatology

BioRxiv Central

Open Access

Proceedings

The effect of cytocholasin B – Loaded liposomes on the ultrastructure of the liver sieve

Filip Braet<sup>1,2</sup>, Katrien Vekemans<sup>1</sup>, Henriette Morselt<sup>2</sup>, Ronald De Zanger<sup>1</sup>, Eddie Wisse<sup>1</sup>, Gerrit Scherphof<sup>2</sup> and Jan Kamps<sup>2</sup>

Doctor Matsuura reports  
about the 24 October 2007  
experiment:

