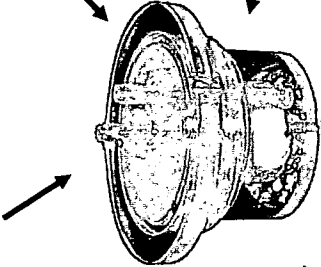


Tuesday 13 November 2007

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

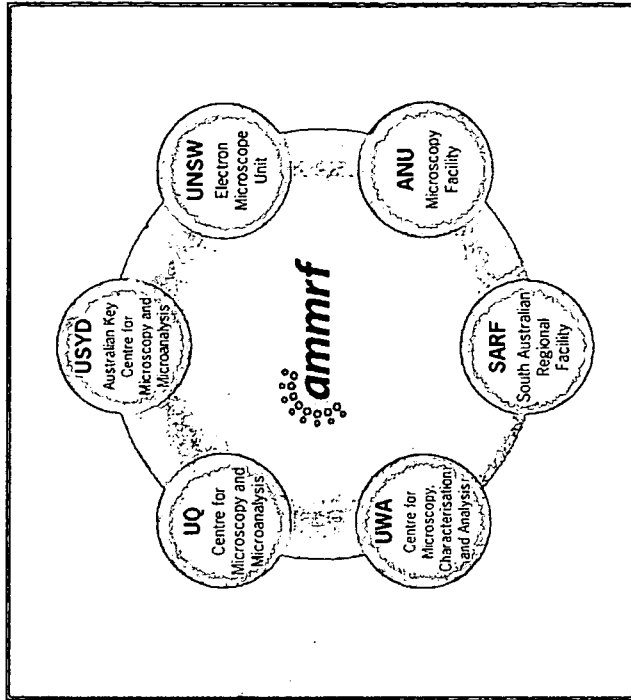
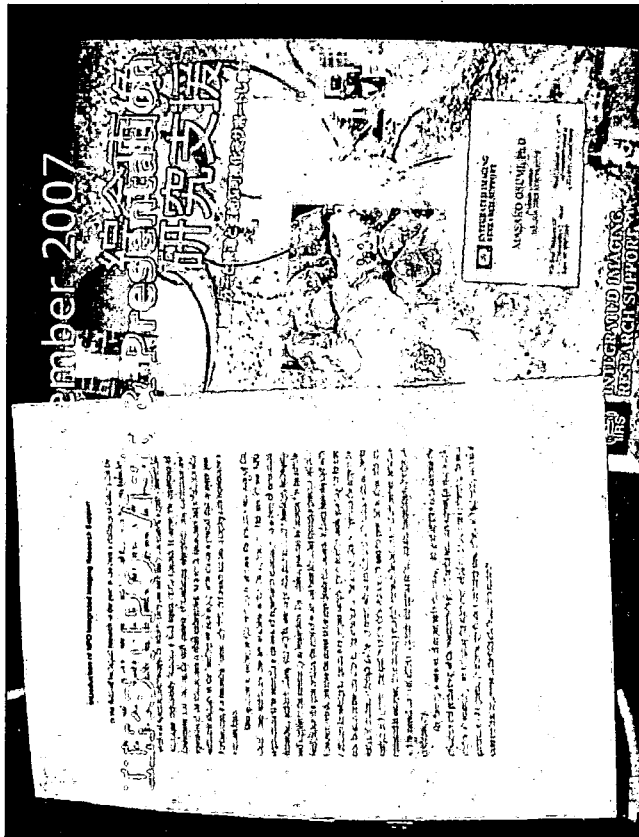
Doctor Braet advice:

- 
1. With KEIMA labelled bubbles - *in vitro* co-culture experiments can be considered to study uptake
 2. Ultrasound data can be elaborated with total imaging of fluorescent labelled bubbles in the bioreactor - i.e., comparative kodak imaging (similar to total animal imaging studies)
 3. The technology of making fluorescent labelled bubbles is now available - so we can consider FRET studies; this model would help us to study uptake mechanism by detecting another fluorescent peak etc ...
 4. The group of Scherphof and Kamps did already a lot of work in making liposomes - PEG liposomes were modified with HAS for example which significantly changed the uptake of particles and as such different liver cell types could be targetted
 5. We have now KEIMA labelled microbubbles - it would be interesting to have a CYP transfected HCF7 cell line - As such we can study if indeed the green labelled bubbles reach the blue labelled cancer cells for example

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





The interactive business meeting was based on a seminar at Japan Women's University:

Braet F. Seminar: Australian microscopy & microanalysis research facility (AMMRF): A joint venture between Australian university-based microscopy and microanalysis centres. NPO Integrated Imaging Research Support, Japan Women's University. Tokyo, Japan, 15 November 2007

IIRS Members Present:

**Professor Masako Osumi (IIRS) Japan Women's University);
 Dr Yoshiaki Hataba (Head of Research Center IIRS);
 Professor Yoshinobu Mineyuki (University of Hyogo / TBC Visitor to Sydney); Professor Shohei Yamashina (Kitasato University); Professor Hideyo Yamaguchi / Teikyo University); Doctor Tomoyuki Matsuura (Jikei University)**

Main Outcome:

**Visit IIRS/NPO delegation to Sydney nodes USyd & UNSW ~ in the week of December 10, 2007
 IIRS committee member proposal International (F. Braet) & National (T. Matsuura) scientific & technical committee**

Thursday 15 November 2007

Business Dinner with Biott ABLE® Group (Dr Shutaro Ishikawa) & TORII PHARMACEUTICAL Co. (Dr Tadashi Mizuima)

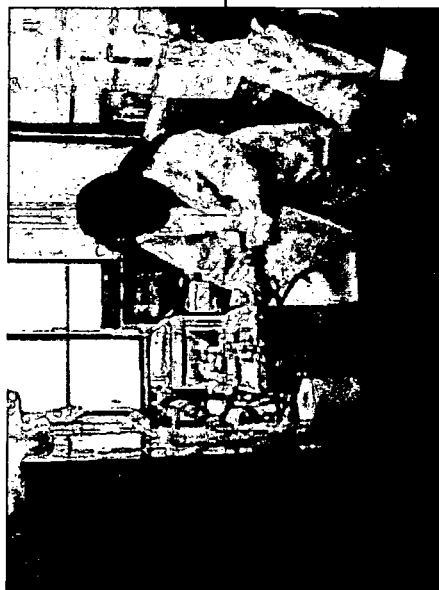
In this evening meeting I had the opportunity to meet with Dr Matsuura's collaborators:

- (i) Mr Ishikawa explained me about the technology of the Bioreactors & products available; and,
- (ii) Mr Mizuima explained me about Nafamostat Mesilate, a protease inhibitor launched in Japan under the name Futhan.

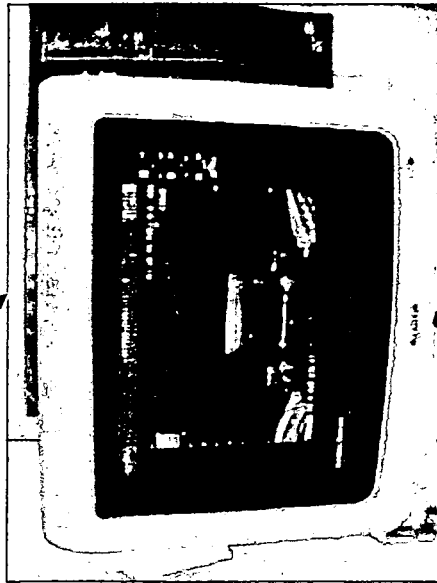
Tuesday 20 November 2007

Microbubble Experiment Dr Matsuura's Laboratory

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



Step 1: sample preparation
Liver bioreactor
with anti-CD147
Ab labeling
microbubbles



Step 2: Imaging with US

Step 3: The
interpretation with
Dr. Matsuura's team

Tuesday 20 November 2007

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

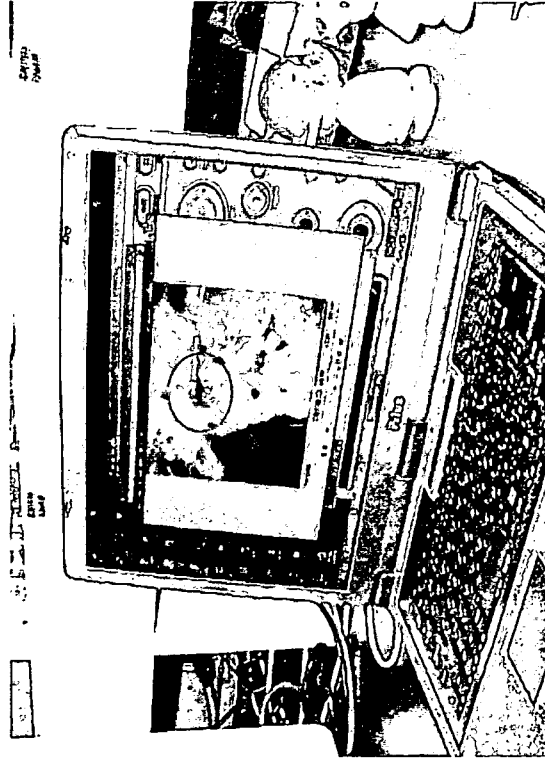
Hitachi eSEM Miniscope TM-1000 (Aus\$ 50K): The instrument has superb / excellent imaging capabilities under environment conditions. Wet liver tissue was investigated at 10,000x that was first fixed with glutaraldehyde, rinsed for 10' in PBS and made conductive with a Hitachi Platinum solution.

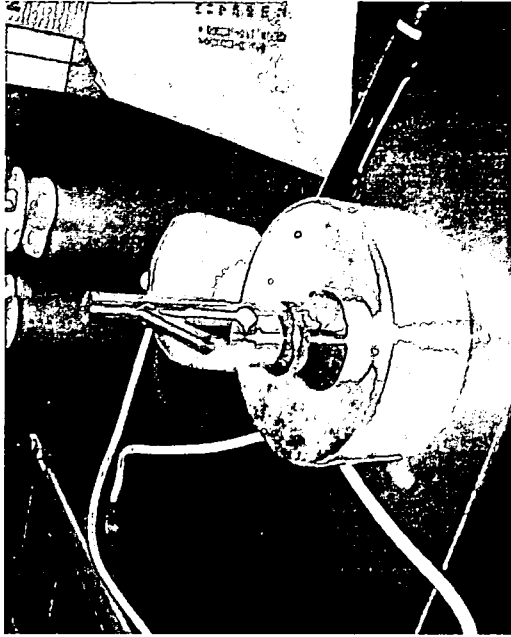


Advice given herein:

- Filip will send 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.

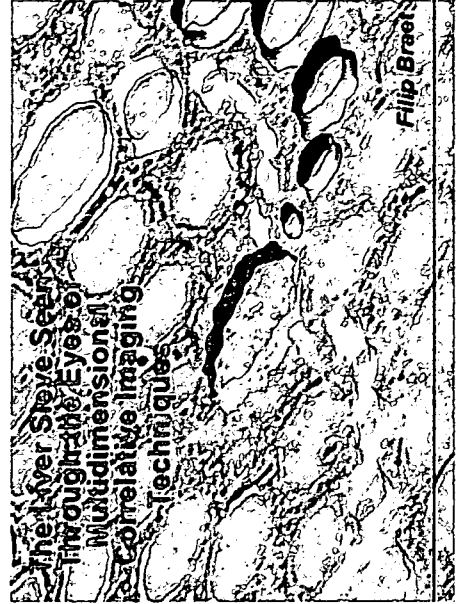
=> Point 1 and point 2 can be a communication in LIVER INTERNATIONAL in 2008





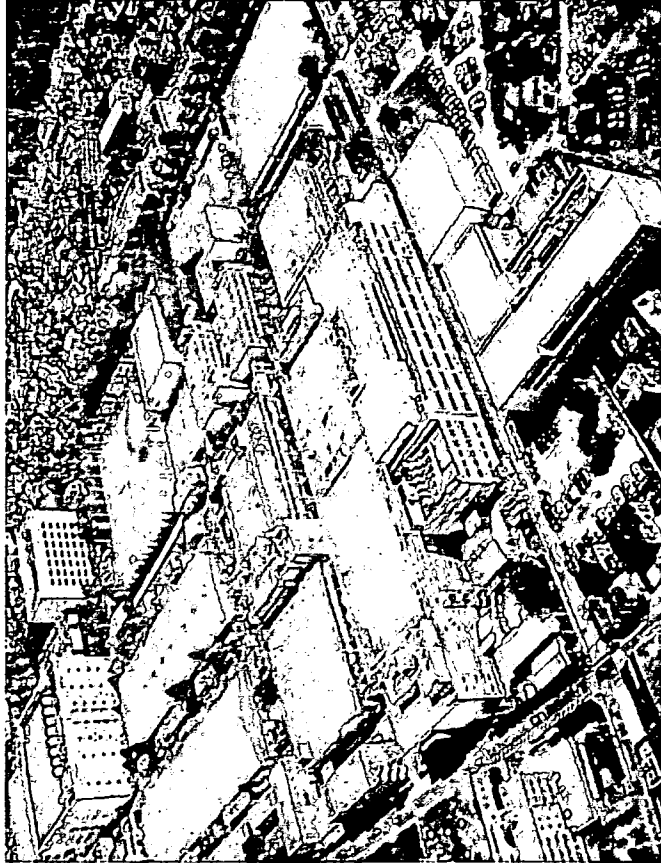
The day (20 November) was concluded with a seminar at Sanno Hospital:

Braet F. 1st Seminar IUHW International Seminar at Sanno Hospital: The liver sieve seen through the eyes of multidimensional correlative imaging techniques. International University of Health and Welfare. Minato-ku Tokyo, Japan, 20 November 2007



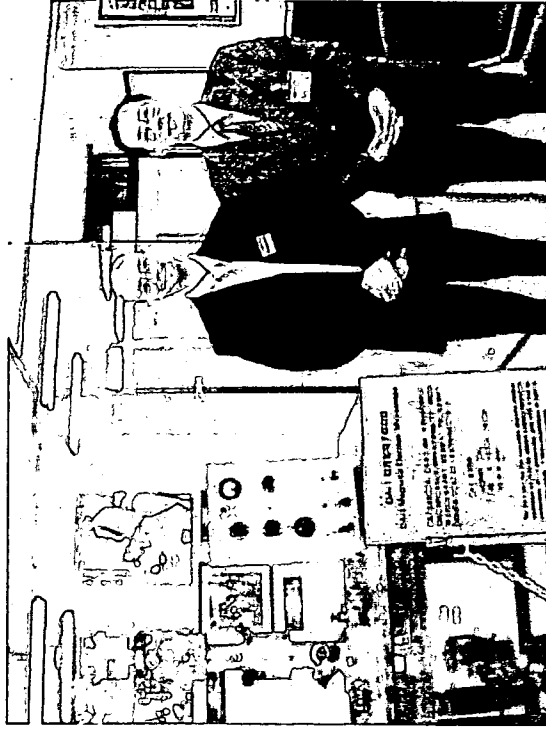
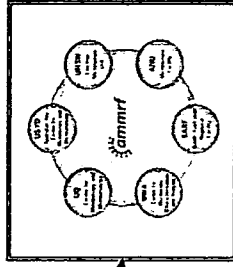
Wednesday 21 November 2007

Visit Mr Yoshida Jeol- Discussing TEM procurement, AMMRF & NPO

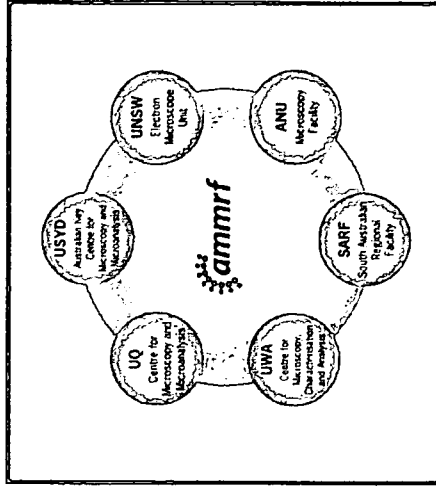


Met with cryo 2100 specialists, TEM holders specialists,
Tomography specialists, TMP technology

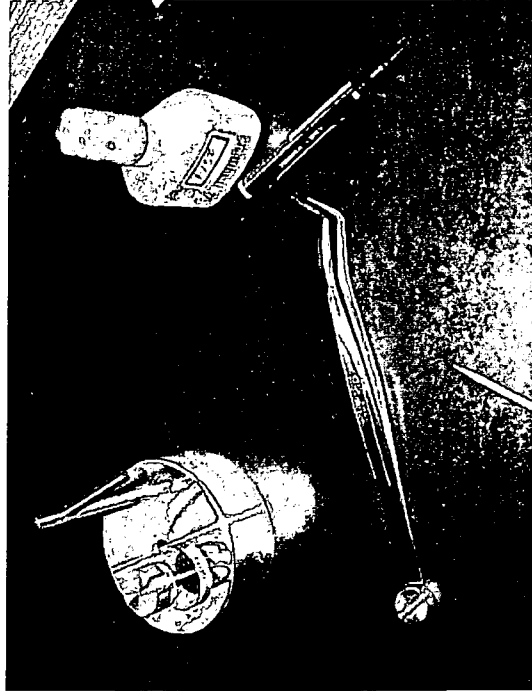
Presentation: AMMRF: A
joint venture between
Australian university-
based microscopy and
microanalysis centres



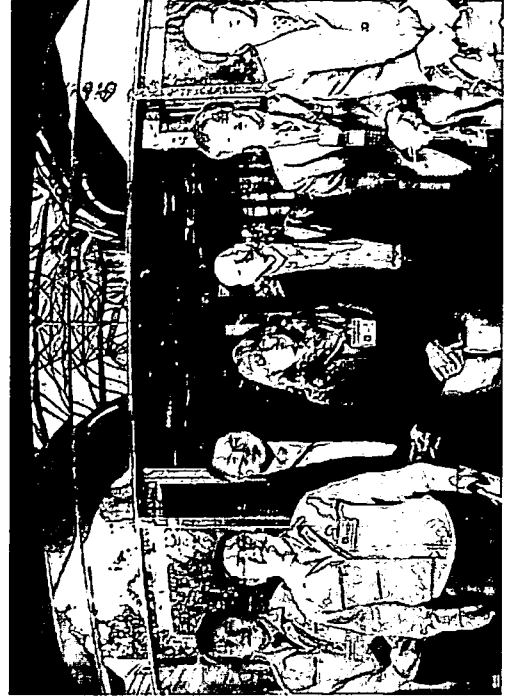
Thursday 22 November 2007
Visit Hitachi (Katsuta)- Discussing SEM Microscope TM-1000
Research Project Dr.Matsuura, Hitachi in Australia, AMMRF & NPO,
And demonstration model in Sydney



Presentation: AMMRF: A joint venture between Australian university-based microscopy and microanalysis centres



Discussion ample prep for low vacuume observation

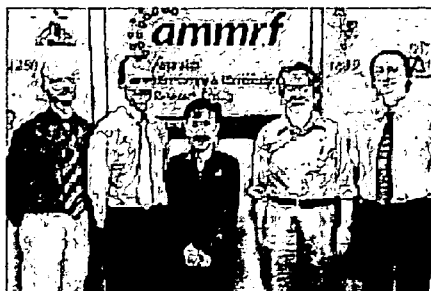


The two weeks JAAME Award visit of Dr Braet was concluded with a Business dinner with Dr. Matsuura's team members on 22 November 2007





The University of Sydney



From left to right, Filip Braet, Miles Appley, Masako Ozumi, Yoshiyabu Mineyuki and Simon Ringer in the Key Centre on December 10, 2007.



A/Prof. Filip Braet during his seminar at Tokyo University of Science.

International Collaborative Partnership between the AMMRF and IIRS

At the end of last year, A/Prof. Filip Braet, Deputy Director of the Key Centre and EMU, travelled to Japan thanks to an award from the "Japan Association for the Advancement of Medical Equipment (JAAME)". This was the second such award to Filip in the space of two years and the trip was Filip's second in twelve months. During these travels, Filip visited Jikei University, Niigata University, Tokyo University of Science, Japan Women's University and the International University of Health & Welfare. Besides the seminars that Filip presented on his research and his ongoing collaboration with the Department of Internal Medicine at Jikei University Hospital, he also canvassed the AMMRF in a series of talks in each of these institutions. This journey was topped off by visits to the application laboratories of electron-microscope manufacturers JEOL and Hitachi.

During this visit, Filip spent a considerable amount of time with the General Director of "Integrated Imaging Research Support (IIRS)", Professor Masako Ozumi-sensei, in exploring possible collaborative partnerships between Australia and Japan. IIRS is a major Japanese fa-

city for microscopy-based imaging, particularly in the life sciences, and both groups were eager to see what could be learnt from the different approaches used by their foreign counterparts. After Filip's meeting with the board members of IIRS, Professors Ozumi and Mineyuki soon made a follow-up visit to the AKCMM/EMU at the University of Sydney and the EMU at the University of New South Wales.



Outcomes from these interactions include a memorandum of understanding between the AMMRF and IIRS, which is at an advanced stage of development, and the appointment of IIRS-nominee Professor

Emeritus Shohei Yamashina of Kitasato University as a member of the AMMRF's International Technical Advisory Board.

More Information:



A/Prof. Filip Braet
 Deputy Director
 Tel. +61 2 8351 7619
 f.braet@usyd.edu.au

(様式13)

財団法人医療機器センター
外国への日本人研究者派遣事業
(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. 派遣研究者

所属・職名：東京慈恵会医科大学 消化器・肝臓内科 助教

氏 名：永妻 啓介

2. 研究に従事した派遣先の機関

名 称：シドニー大学電子顕微鏡ユニット・電子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
Australian Key Center for Microscopy and Microanalysis,
Electron Microscope Unit, The University of Sydney

所 在 地：Madsen Building, F09, The University of Sydney, NSW 2006,
Australia

3. 研究に従事した派遣先の研究指導者

所 属 機 関：シドニー大学電子顕微鏡ユニット・電子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
Australian Key Center for Microscopy and Microanalysis,
Electron Microscope Unit, The University of Sydney

職名・氏名：准教授/ディレクター代理（博士）・フィリップ セレスタ ピエール
ブラット
Associate Professor/Duputy Director (BClin Chem BSc MSC PhD
BioMed Sc)・Filip Celesta Pierre Braet

4. 派遣期間：平成19年7月24日 ～ 平成19年11月1日（102日間）

5. 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・マイクロX線CTを用いて

6. 研究活動の概要

マイクロX線CTを用いた3次元癌浸潤・転移モデルの微細形態学的解析を遂行するために、シドニー大学電子顕微鏡ユニットが主催する以下の講習会に参加した。

- ①Introductory Microscopy & Microanalysis (平成19年7月30日～8月9日)
- ②Biological Specimen Preparation, TEM & SEM (平成19年8月20日～24日)
- ③Introduction to Confocal Microscopy (平成19年10月2日～5日)

①では、微細形態の解析についての一般的な方法、手順、及び適応についての講義があった。また、実習では当施設の豊富な機器を用いてTEM、SEM、AFM、EDSの解析などのデモンストレーションがあった。②では、実際に組織の細切、固定、脱水、包埋、超薄切といった基本的なTEM、SEMのサンプル作成の実習を行なった。③では、共焦点レーザー顕微鏡の使い方、レーザー顕微鏡で取り込んだ画像の3D再構築を行なった。マイクロX線CT後の再構築にも用いるVGStudioMaxやimarisなどのSoftwareの使い方の実習を行なった。

上記、講習会で習得した技術を生かし、Filip Braet博士の指導の下においてマイクロX線CTを用いて、RFBで3次元培養し作成された肝オルガノイド2検体の解析を行なった。今回は、バイオリアクターに不死化内皮細胞・伊東細胞および肝細胞を培養し、擬似肝臓（肝臓オルガノイド）を作成し、そこに超音波造影剤として臨床で用いられている単分散リン脂質マイクロバブル（商品名ソナゾイド）を還流したもの、及び同様の肝オルガノイドに金ナノ粒子標識リポソームを還流したものの2検体を用い、肝オルガノイド内の血管と集積したバブル、及びリポソームとの関係を観察した。また、マイクロX線CTによる観察後に、バイオリアクター内の組織を取り出し、TEM、SEMでも観察し比較した。

7. 派遣事業の成果

今回の派遣事業の主たる目的は、3次元癌浸潤・転移モデルを用いて、超音波造影剤としてのマイクロ・ナノバブルが、腫瘍血管を介して腫瘍組織に到達・集積するか微細形態学的に明らかにすることである。今回は、バイオリアクターに不死化内皮細胞・伊東細胞および肝細胞を共培養し、擬似肝臓（肝臓オルガノイド）を作成し、そこに超音波造影剤として臨床で用いられている単分散リン脂質マイクロバブル（商品名ソナゾイド）を還流したもの、及び同様の肝オルガノイドに金ナノ粒子標識リポソームを還流したものの2検体を用い、肝オルガノイド内の血管と集積したバブル、及びリポソームとの関係を観察した。また、マイクロX線CTによる観察後に、バイオリアクター内の組織を取り出し、TEM、SEMでも観察し比較検討した。以下のような成果が得られたので、報告する。

目的 単分散リン脂質マイクロバブル（商品名ソナゾイド）及び金ナノ粒子標識リポソームを還流した肝臓オルガノイドの微細形態（特に血管とマイクロバブル、リポソームの関係）を観察する。

① マイクロX線CTでの解析

方法 バイオリアクターで不死化内皮細胞・伊東細胞および肝細胞を共培養し、擬似肝臓（肝臓オルガノイド）を2検体作成した。それぞれに、単分散リン脂質マイクロバブルであるソナゾイド及び Drug Delivery System の医薬材料として研究されている金ナノ粒子標識リポソームを還流し、その後、2%GAで還流固定し、マイクロX線CTで観察した。また、肝臓オルガノイドと組織形成のための足場であるアパタイトファイバースキャフォールドを判別しやすくするために、それぞれをオスミウムで後固定した後に、再度マイクロX線CTで観察した。

マイクロX線CTとは？

Medical CTの開発から約10年遅れの1980年代前半に初めてマイクロX線CTが開発され、その後改良を重ね、現在ではTABLE1に示す6社で製造されている。

シドニー大学電子顕微鏡ユニットには、2004年にベルギーのSKYSCAN社のSky Scan 1072 Desktop X-ray Microtomographが導入された。

我々が普段臨床で使用するConventionalなmedical CTは、空間分解能が1-2.5mmであるが、このマイクロX線CT（SkyScan1072）の一般的な空間分解能は5 μ mである。

以下に、利点と欠点を示した。

利点

- ① 脱水、固定、薄切などの処理が必要ないため、簡易であり、また組織のartifactが少ない。
- ② 上記の処理が必要ないため、生体においては、ありのままの状態を観察できる。
- ③ TEM、SEMでは観察時に、真空となるため、wet tissueを観察できないが、CTではwet tissueでも観察できる。
- ④ 画像再構築ソフトを用いて、3D画像で表現できる。
- ⑤ 撮影できるサンプルの大きさに制限があるものの、部分的でなく、臓器そのものを観察できる。

欠点

- ① 撮影、及び画像解析に時間を要す。
- ② 長時間の撮影では、X線照射による組織のダメージが発生する。
- ③ TEM、SEMと比較して、現段階では一般的には空間分解能は劣る。

表1に各社のマイクロX線CTを示した。

表1 Summary of selected, manufacturer-supplied, performance characteristics of several commercially available micro-CTscanners. (Courtesy of data provided by G. Wang, University of Iowa.)

	BIR	EVS/GE	ImTek	Scanco	SkyScan	Stratec
Scanner Name	<i>ACTIS Volume CT</i>	<i>eXplore RS</i>	<i>MicroCAT II</i>	<i>VivaCT 40</i>	<i>SkyScan- 1076</i>	<i>XCT Research M</i>
Micro-Focused Source	3 μm 10-225 kV 0.01-3 mA	20-90 kVp 0.18 mA	9 μm 80 kVp	5, 7 μm 50-70 kVp 0.16 mA	5 μm 20-100 kV 10W	50 μm 45-60 kV 0.2-0.5 mA
Detector Array	1408 by 1888	2048 ²	4096 ²	2048 by 255	4000 by 2300	12 detectors
Field of View	300 mm	40 mm	35-110 mm	20-40 mm	35 or 68 mm	50 mm
Spatial Resolution	12.5 μm	27-90 μm	15 μm	10 μm	9-35 μm	70-500 μm
Scan Speed	1-30 fps	180-900 s	5 fps	360 s (1024 ² by 100)	5 fps	80 s
Remark	Manipulators for part & detector		Respiratory/ cardiac-gating		Physiological Monitoring	Narrow fanning

シドニー大学電子顕微鏡ユニット SkyScan1072 (図 1)

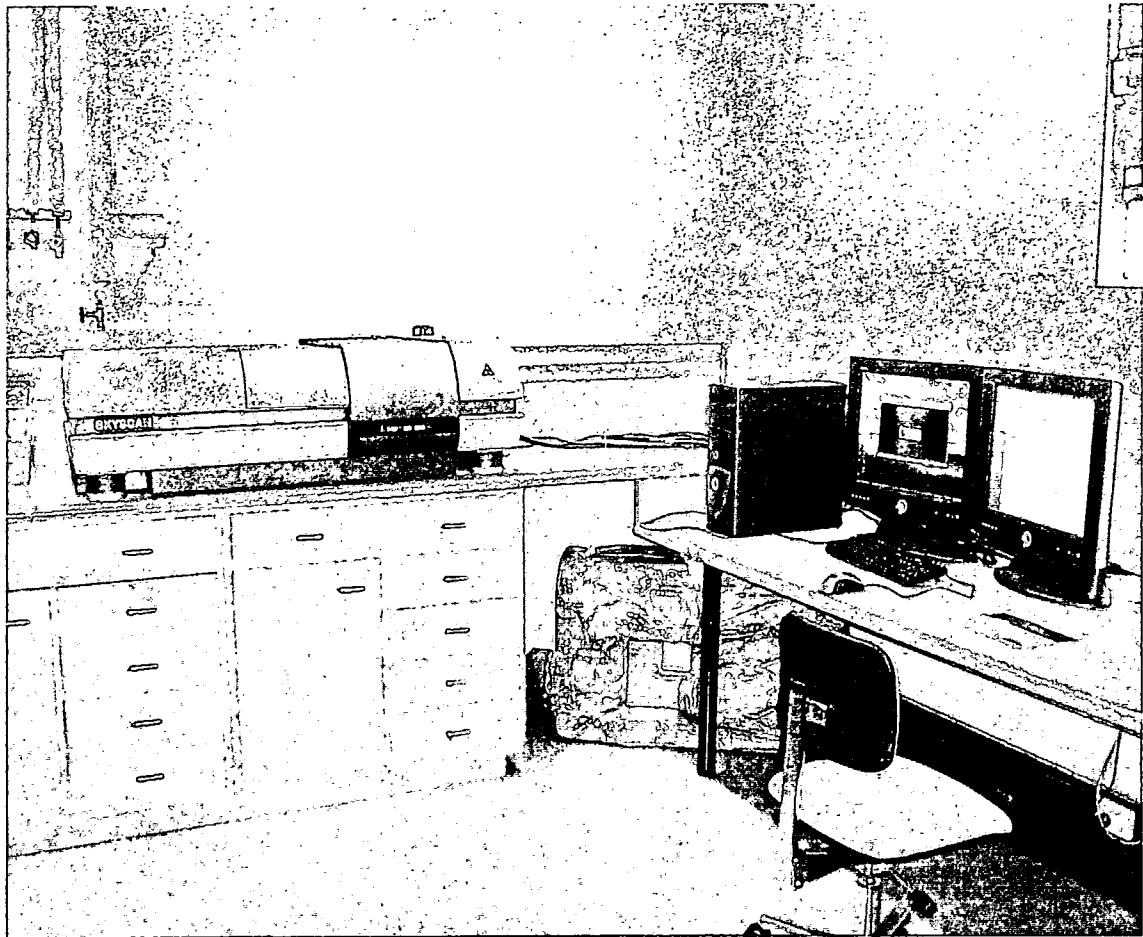
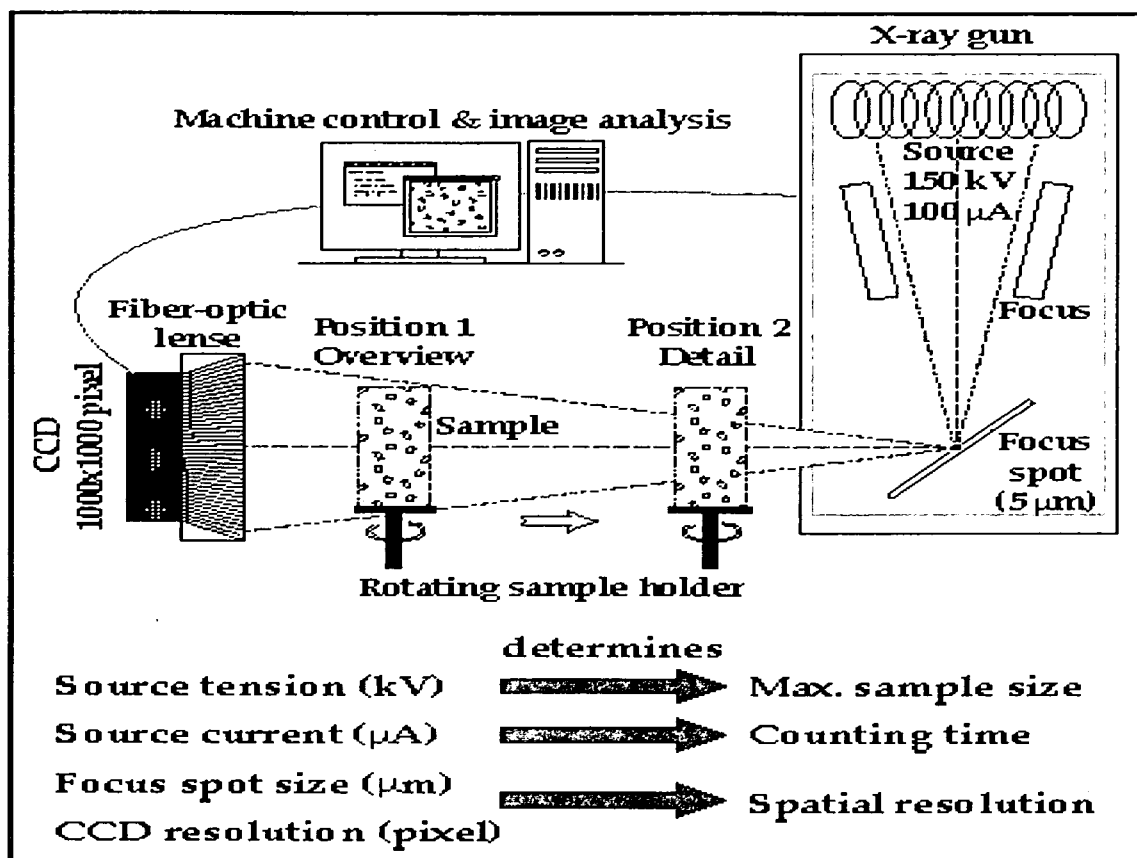


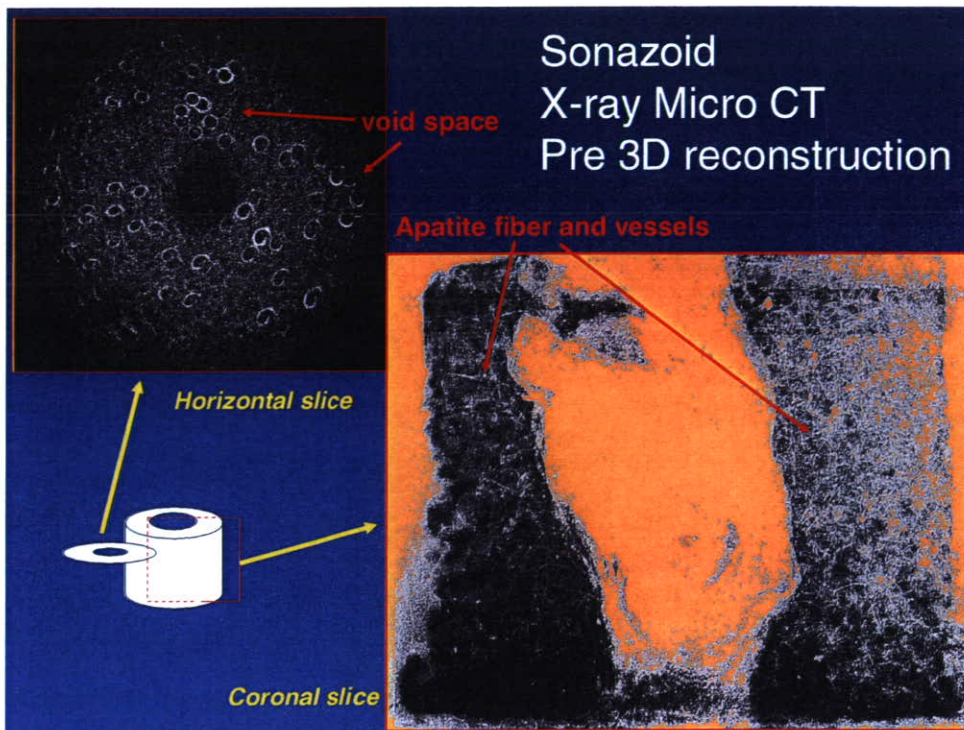
図1の左側にあるのがMicro CT。カバーを開けると中央にサンプル台があり、サンプルを台に固定する。カバーを閉めると、その外側にはX-rayが漏れない仕組みになっている。まずは、サンプルにX-rayをあてて、Voltage(kV), Current(μ A), Power(W) その他の条件をセッティングし、撮影を開始する。ConventionalなCTは検体(人)を囲むように360度からX-rayが照射されるが、Micro CTでは、X-rayが一方方向からのみサンプルに向かって照射される。このため、台座が撮影ごとにゆっくりと360度回転することで、すべての撮影が完了する。撮影には、約2時間を要する。(図2)



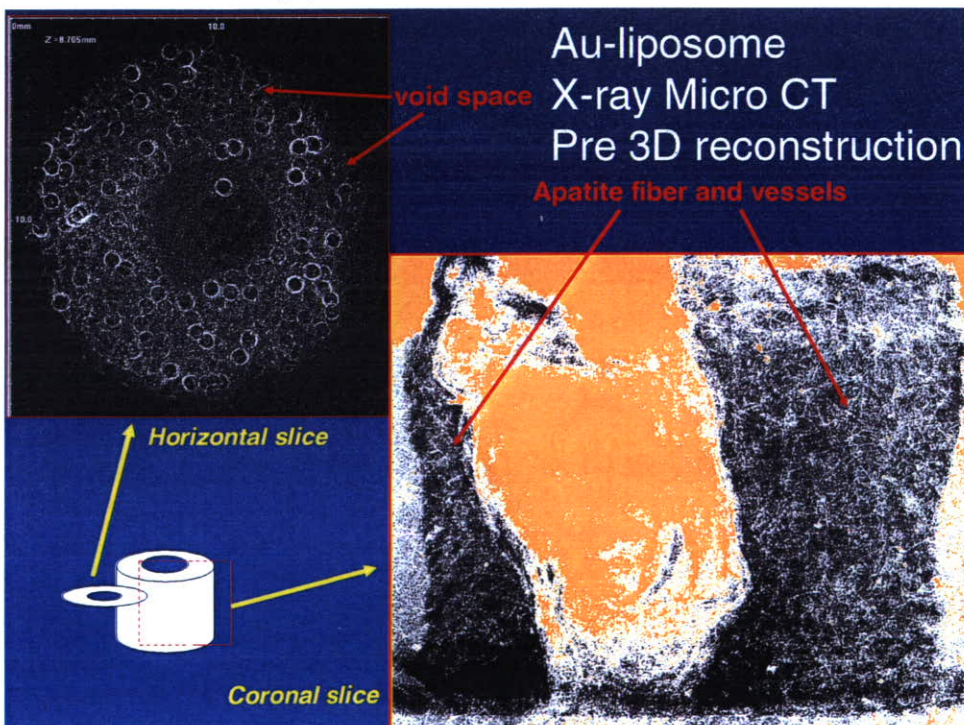
(図2 マイクロ CT 原理)

マイクロ CT の撮影終了後は、3D imaging software である NRecon で再構築画像を作成した。

それぞれの結果は、以下図 3, 4 に示した。



(図3 ソナゾイド マイクロCT)



(図4 金ナノ粒子標識リポソーム マイクロCT)

ソナゾイド、金ナノ粒子標識リポソーム(Au-liposome)ともに、水平断で $200\text{-}300\mu\text{m}$ の均一な間隙を認め、冠状断では、スキャフォールドであるアパタイトファイバーと微細な血管構築が観察された。今後は、得られた画像から VGStudioMax で 3D 再構築を行い、血管と還流した微粒子との関係を明らかにしていく予定である。

② SEM(Scanning Electron Microscopy)、TEM(Transmission Electron Microscopy)での解析

方法(SEM) マイクロX線CTでの観察後に、バイオリクターチャンバーから組織を取り出し、30%、50%、70%、95%、100%エタノール濃度を漸次上げていき、組織の脱水を行なった。脱水後にサンプルを細切し、SEMサンプルについては、一昼夜、hexamethyldisilazane(HMDS)を用いて自然乾燥させた。その後、乾燥したサンプルを載台、樹脂で固定し、導電のための銀ペーストを被覆し、イオンスパッタコーティングを施行し、ソナゾイドを還流した検体、及びリポソームを還流した検体をPhilips社のSEM 505で観察した。

方法(TEM) SEMサンプルと同様にマイクロX線CTでの観察後に、バイオリクターチャンバーから組織を取り出し、30%、50%、70%、95%、100%エタノール濃度を漸次上げていき、組織の脱水を行なった。脱水後にサンプルを細切し、エタノールとSpur樹脂の混合液で数回置換した後、Spur樹脂でBEEMモールドに包埋し、60℃24時間で重合させた。包埋したサンプルをマイクロトームで90nmの超薄切切片を作成し、それぞれの検体をZeiss社の902Aで観察した。

結果

Sonazoid (図 5)

SEMの弱拡大では、足場となっているアパタイトファイバースキャフォールド (AFS) が密に存在するところと、直径200 μm 程度の比較的均一な間隙を認め、間隙の一部には、AFSと絡みついたシート状の組織の形成が見られた。強拡大では、シート状の組織には数百nmレベルの小孔が散見され、これはVesiculo vacuolar organelle(VVO)やfenestraeといった内皮細胞の小孔である可能性が指摘された。表面にはsmall particleが観察された。TEM像では、内皮細胞表面にSEMでみられたsmall particleがみられ、これらのparticleが細胞間に入り込んでいく様子がみられた (図5 矢頭)。これらのparticleはソナゾイドの一部のリン脂質である可能性が示唆された。

Au-liposome (図6)

SEMの弱拡大では、ソナゾイドと同様にAFSが密に存在するところと、直径 $200\mu\text{m}$ 程度の比較的均一な間隙を認め、間隙の一部には、AFSと絡みついたシート状の組織の形成が見られた。強拡大では、シート状の内皮細胞にfenestraeを認め、残存したAFS表面にAu-liposomeと考えられる球状のsmall particleが観察された(図6左下)。TEMでは、細胞内に多数の金粒子が観察され、Au-liposomeの細胞内への移行が確認された。また、興味深いことに、ソナゾイドと比較して、細胞の多くが変性していたため、これがAuやliposomeによる細胞障害作用によるものなのか、今後検討していく予定である。