

認めた ($p < 0.01$)。また、リンパ節転移陽性例の転移巣における CD147 発現は、原発巣と同様の発現であった。

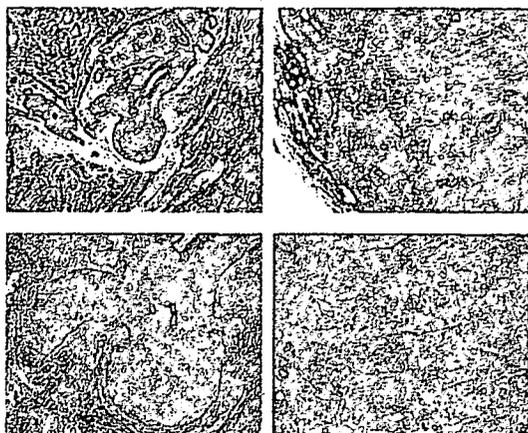


図 2：リンパ節転移陽性例
(左：原発巣 右：転移巣)

D. 考察、E. 結論

子宮頸部腫瘍組織において CD147 が高率に発現していることが明らかになった。その染色強度は臨床進行期との相関を示しており、諸家の報告同様、腫瘍浸潤に関与することが確認された。また、高度扁平上皮内病変組織においても高い発現率を示し、腫瘍の浸潤・転移以外の、子宮頸癌の発生段階におけるメカニズムに関与する因子である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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*, 17: 731-735, 2007

- 2) Takakura S, Saito M, Ueda K, Motegi M, Takao M, Yamada K, Okamoto A, Niimi S, Sasaki H, Tanaka T, Ochiai K. Irinotecan hydrochloride (CPT-11) and cisplatin as first-line chemotherapy after initial surgery for ovarian clear cell adenocarcinoma. *Int Surg*, 92:202-208, 2007

2. 学会発表

- 1) 第 59 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会。平成 19 年 4 月 14-17 日、京都
- 2) 第 66 回日本癌学会学術総会。平成 19 年 10 月 3-5 日、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

6. CD147 (basigin) のマウス組織内分布の免疫組織学的解析

分担研究者 日下部守昭 財団法人動物繁殖研究所 主席研究員

研究要旨：現在用いているCD147抗体（12C3）はヒト特異的抗体であるため、マウス腫瘍実験系での使用できない。そのため、マウスCD147 (basigin) を認識するペプチド抗体を作成し、免疫組織学的にCD147の組織分布を解析した。

A. 研究目的

本研究課題では、CD147抗体を結合させマイクロバブルを体内に注入し、抗体認識依存性に腫瘍に集積したバブルを超音波によってバイオイメージとして捉え、癌の早期診断法の開発を目指している。そこで用いる12C3抗体は、ヒト特異的であるので、マウスに移植されたヒト癌を特異的に染め出すことはできるが、癌周囲組織（マウス組織）におけるCD147の超音波イメージへ影響は不明である。本研究の目的は、マウスにおけるCD147の組織分布を免疫組織化学的に解析し、腫瘍のイメージングに及ぼすと考えられるCD147の影響を検討することである。

B. 研究方法

1. 抗マウスCD147ペプチド抗体の作製：

CD147の細胞外部分のエピトープでMMP-2の誘導に中和活性のある部分が、ヒトではCD147のSLNDSATEVTGHRWLKGGVVである報告(J of Pathol, 2004, 202: 341-351)に従って、この配列に対応するマウスCD147(basigin)の配列SLNSSGVDIVGHRWMRGGKVペプチドを合成し、ウサギを3回免疫して抗体を作成した。

2. 免疫組織化学解析：

マウス組織は、0.1N Naリン酸緩衝液中で、マイクロウエーブで前固定後、0.1N Na-リン酸緩衝4%パラホルムアルデヒド(pH7.2)で後固定し、アルコール脱水後、ポリエステルワックスに包埋し、4 μ m厚の切片を作製した。

切片は、脱ワックス後、熱によってリトリープした後、免疫酵素抗体法を施して観察した。

C. 研究結果

1. 抗マウスCD147ペプチド抗体の作製：

抗体作製過程において、抗体価の上昇の有無は、ペプチドを用いたELISA法によって確認し、3回目の最終免疫より7日目で堵殺採血した。また、一部抗体は、ペプチドを用いたアフィニティ精製後、免疫染色に用いた。

2. 免疫組織化学解析：

① 抗体の染色性について：本抗体を用いてマウス乳癌細胞を染色したところ図1に示すように、本抗体はマウス乳癌細胞を認識するが、培養細胞では、細胞質が染色されていたが、腫瘍では細胞膜が陽性に染め出されていた（図2）。

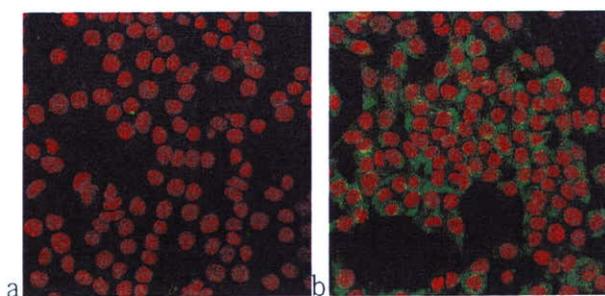


図1：CMT315マウス乳癌細胞の免疫染色；
a. コントロール血清、b. CD147抗体

腫瘍細胞の細胞膜が陽性に染色されており、網目状に見える。一方、周囲の結合組織は陰性である。

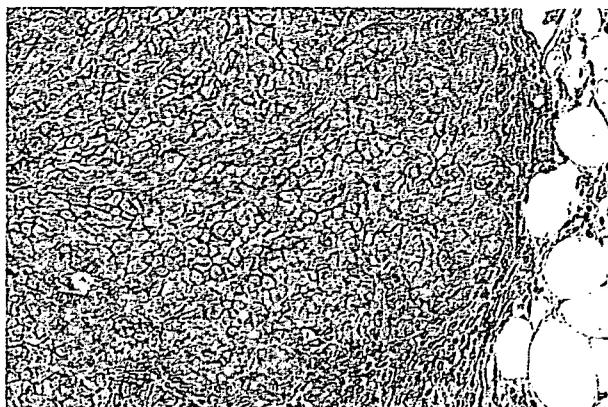


図 2 : CMT315腫瘍の免疫染色像

②各組織の免疫染色結果：

【精巣】赤血球は、陽性に染色されていた(a)。また、精巣では、ライディッヒ細胞(b)は、細胞膜が陽性に染色されるが、精細管においては、精細管上皮サイクルによってその局在は変化していた。その場合、精母細胞の細胞膜が陽性であるが、セルトリー細胞は陰性であった。(c)、spermatidの細胞質も強陽性に染色されていた(d)。

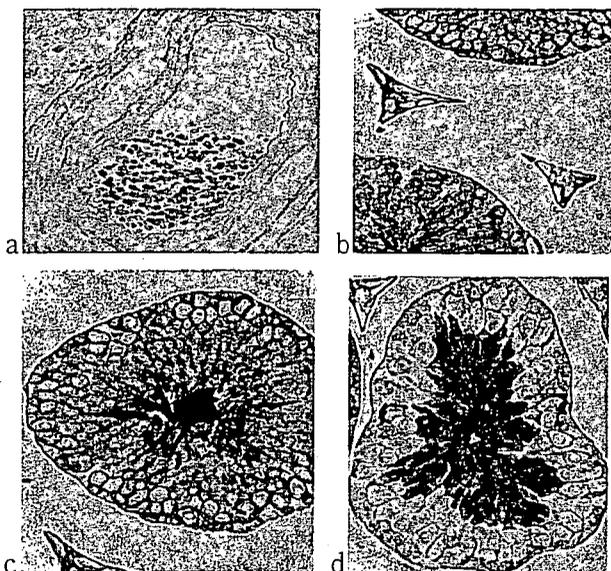


図 3 : 精巣における染色像 ; a. 動脈内の赤血球、b. ライディッヒ細胞、c. 精母細胞の細胞膜が陽性であるが、d. spermatid

【肝臓】類洞内皮細胞が特異的に陽性に染色されていた。一方、中心静脈の内皮(図4写真左下隅)及びグリッソン氏鞘内の血管及び胆管は陰性であった(図4)。



図 4 : 肝臓の免疫染色像

【腎臓】髓質外層内帯と皮質が陽性に染色された(図5-a)。尿細管上皮細胞の膜及び細胞質内に陽性の反応が観察できた(図5-b)。更に、ネフロン立体再構築によって尿細管における発現の局在を明らかにした(図6)。

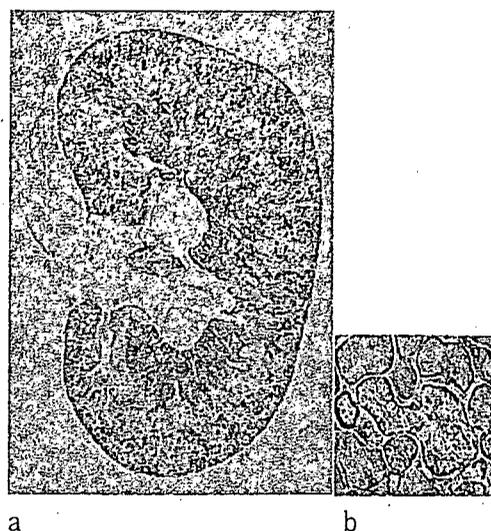


図 5 : 腎臓の免疫染色像
a. 全景 ; b. 皮質断面

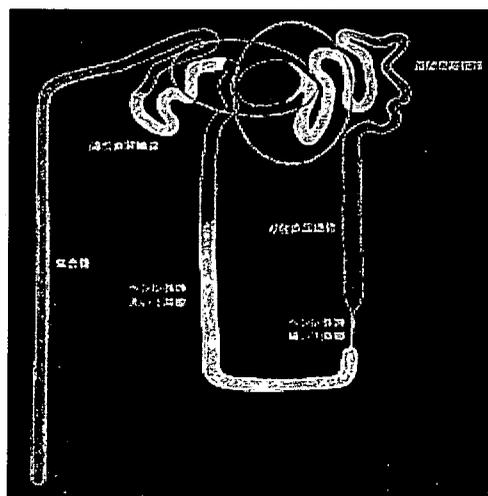


図 6 : 立体再構築によるネフロン内のCD147の発現部位の模式図。

D. 考察

1. 抗マウスCD147ペプチド抗体の作製：

今回作製した抗体は、マウス各組織におけるCD147の局在を特異的に染色していると考えられた。今回は、CD147の機能を中和すると予想される配列に対する抗体を作製したが、今後この抗体がCD147の機能を中和するか如何かを検証する必要がある。

2. 免疫組織化学解析：

① 免疫染色の結果、CD147は生体内の多くの組織で発現していることが分かった。特に赤血球が陽性であったことは、今後のイメージングへの影響を確認する必要性が示唆していた。

② CD147は、細胞膜のみならず細胞質内にも検出できることが分かった。また、その発現部位は、精巣などでは、精子形成過程においてダイナミックに変化することもわかった。

③ 皮下に移植した乳癌細胞では、腫瘍自体は陽性に染色されるが、その周囲は陰性であり、本分子を標的としたイメージの診断効果を期待できる。

④ ネフロン内の立体再構築によって、ネフロン内の部位によって発現が異なることが分かった。

⑤ 肝臓では、類洞内皮や赤血球が陽性に染まることから、肝臓内の癌組織の識別に関してはこれらの陽性細胞のイメージがどのように見られるのかを、別途詳細に検討する必要性が示唆された。

E. 結論

癌細胞の診断における周囲正常組織のCD147のイメージへの影響を検討するために、肝臓の類洞の立体再構築を行なって、CD147のイメージングとの相関を検討する。更に、作製したマイクロバブル及び超音波診断装置を用いてマウス腫瘍を診断し、CD147を標的とした超音波イメージング診断の評価を行なう予定である。

(倫理面への配慮)

本研究における、動物実験では全て全身麻酔下ですべての処理を行ない、また、過麻酔によって屠殺しており、動物に苦痛与えてはいない。また、動物実験は(財)動物繁殖研究所の動物実験指針に則って行われた。

F. 健康危険情報

本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

G. 研究発表

1. 論文発表

① Hashimoto H, Kusakabe M, and Ishikawa H, (2008) A novel method for three-dimensional observation of the vascular networks in the whole mouse brain. *Microsc Res Tech*, 71(1):51-9

② Ito T, Ohi S, Tachibana T, Takahara M, Hirabayashi T, Ishikawa H, Kusakabe M, and Hashimoto H, (2008) Development of the mucosal vascular system in the distal colon of the fetal mouse. *Anat Rec*, 291(1):65-73

2. 学会発表

① 日下部守昭、井上循、青塚聡、君島伊造 (2007) ヒト乳癌組織において特異的に発現する遺伝子の探索：経過報告、大阪、7月

H. 知的財産権出願・登録状況
なし

7. *In vitro* 三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 准教授

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キ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、これまでに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、AFSが三次元微小腫瘍モデルの足場として有効であることを検証した。本年度は、アパタイトよりも生体内で吸収を受けやすい「 β -リン酸三カルシウムファイバー」から構成されるスキャフォールドを用いて、*in vitro*系で三次元微小腫瘍モデルの構築を試みた。

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る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 (Aizawa M. et al., *Phosphorus Res. Bull.*, **17**, 268-273(2004).)。

これまでに、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。

ついで、そ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も検討した。

その結果、AFS は市販のアパタイトビーズやセルロースビーズよりも三次元微小腫瘍組織を構築するのに適した足場を提供することを見出した。

本年度は、より生体組織と近い三次元構造の構築を目指して、アパタイトよりも生体内で吸収を受けやすい β -リン酸三カルシウム(β -Ca₃(PO₄)₂; β -TCP)ファイバーからなる足場材料を作製し、腫瘍モデルの足場材料としての機能について調査した。

B. 研究方法

リン酸三カルシウムファイバースキャフォールド(TCP fiber scaffold; TFS)は既報と同様な方法(Tanabe H, Aizawa M. et al., *Arch. BioCeram. Res.*, **6**, 236-239(2006).)で作製した。リン酸カルシウムファイバー(CPF)に質量比で 0, 10 および 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、1050 °C で 5 h、空気気流中で焼成して作製した。このカーボンビーズを CPF の 0, 10 および 20 倍添加して得た TFS をそれぞれ、“TFS0”, “TFS1000”, “TFS2000”とする。得られた TFS 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。

これらの TFS (直径 7.5 mm×1, 2.5, 3.5 mm) を 48 well プレートに設置し、細胞培養を行なった。TFS 群に 5×10⁵ 個/cm³ に調整した FLC-4 細胞懸濁液を

0.25 cm³ 播種し、1 ヶ月に渡る細胞増殖特性および走査型電子顕微鏡(SEM)による形態観察を行なった。なお、細胞の増殖性は細胞中の DNA 量を測定することにより行なった。

(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

作製した 3 種類の TFS の結晶相はいずれもβ-TCP 単一相であることがわかった。これらの TFS 群の微細構造を SEM により観察したところ、カーボンビーズの添加量とともに TFS 中の気孔径は拡大し、特に TFS2000 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。

図 1 はこれらの TFS 群に FLC-4 細胞を播種し、その増殖性を 1 ヶ月間に渡り調査した結果である。Control に用いた二次元系のポリスチレンプレートよりも DNA 量は低いレベルにあったが、TFS 群の細胞増殖性は良好であることが分かる。Control のポリスチレンプレートと比較して、TFS 群の DNA 量は低いレベルにあったが、これは実質的に培養可能な面積に対して接着細胞数が少ないために対数増殖期への誘導が遅れたことが原因と考えられる。

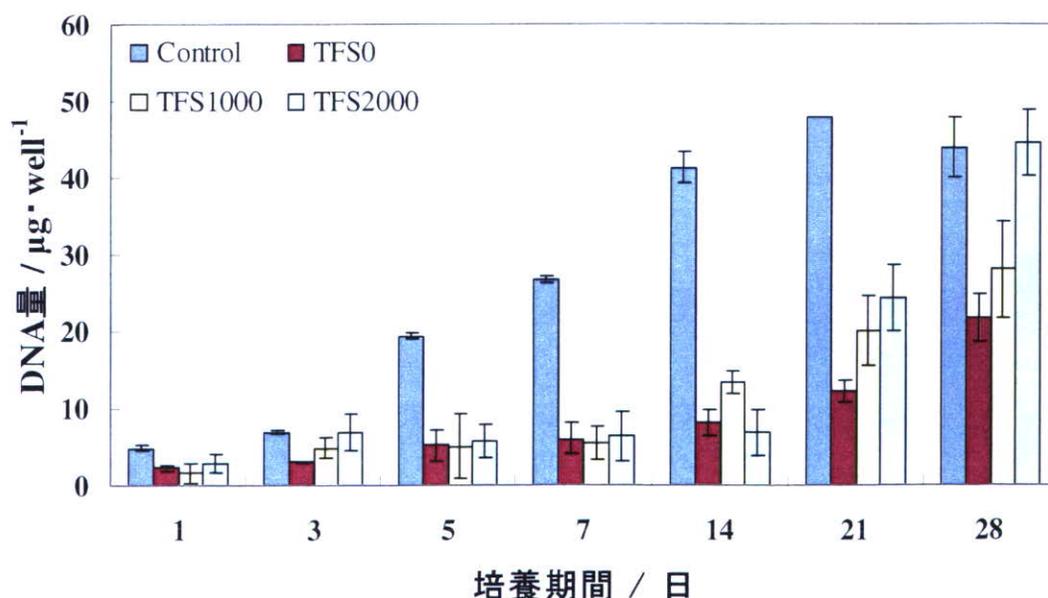


図1 TFSに播種したFLC-4細胞の増殖性

図 2 は TFS2000 に FLC-4 細胞を播種して 28 日間

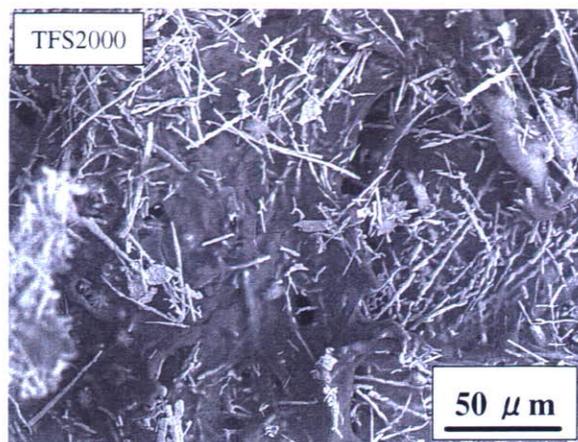


図2 TFS2000を用いて28日間培養した FLC-4細胞のSEM観察

培養したものの SEM 写真である。TFS の気孔内に細胞が浸潤して三次元的な組織を構築している様子が伺える。このような構造は微小腫瘍モデルとして有効であると期待される。

D. 考察

本研究で試用した TFS はこれまでに検討を進めてきた AFS と同様に「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。特に、TFS は AFS よりも生体内で吸収を受けやすい性質をもつため、実験目的に応じて、AFS と TFS を使い分けることも可能である。

E. 結論

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ミクロ気孔の存在によるものと考えられる。本研究のTFSは、その微細構造に加えて、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RFBを利用した高密度・三次元培養についても検討していく。

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) Horiguchi Y, Yoshikawa A, Oribe K and Aizawa M. "Fabrication of Chelate-setting Hydroxyapatite Cements from Four Kinds of Commercially-available Powder with Various Shape and Crystallinity and Their Mechanical Property", *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **116**, 50-55(2008).
- 1-2) Aizawa M, Ohno T, Kanomata N, Yano K and Emoto M. "Anti-tumorigenesis of Hollow Calcium-phosphate Microsphere Loaded with Anti-angiogenic Agent", *Key Engineer. Mater.*, **361-363**, 1215-1218(2008).
- 1-3) Aizawa M, Hiramoto A, Maehashi H, and Matsuura T. "Reconstruction of Liver Organoid Using an Apatite-fiber Scaffold, a Radial-flow Bioreactor, and FLC-4 Cells of Hepatocyte Model", *Key Engineer. Mater.*, **361-363**, 1165-1168(2008).
- 1-4) Taki A, Yoshimura H and Aizawa M. "Microstructural observation of calcium-deficient single crystal apatite fibers and phase changes during heating", *Key Engineer. Mater.*, **361-363**, 147-150(2008).
- 1-5) Honda M, Izumi S, Kanzawa N, Tsuchiya T and Aizawa M. "Microenvironment of apatite-fiber scaffold affects cell proliferation and resulting cell differentiation", *Key Engineer. Mater.*, **361-363**, 1075-1078(2008).
- 1-6) Motojima S, Igeta N and Aizawa M. "Enhancement of the mechanical property of apatite-fiber scaffold using type I-collagen", *Key Engineer. Mater.*, **361-363**, 943-946(2008).
- 1-7) Kida K, Horiguchi Y, Oribe K, Morisue H, Matsumoto M, Toyama Y and Aizawa M. "Biological Evaluation of Chelate-setting Apatite Cement using

Inositol Phosphate", *Key Engineer. Mater.*, **361-363**, 335-338(2008).

- 1-8) Fukano H, Aizawa M and Yoshimura H. "In Vitro Synthesis of Calcium Nanoparticles Using the Protein Cage of Apoferritin", *Key Engineer. Mater.*, **361-363**, 183-186(2008).
 - 1-9) Sugiyama N, Kunibu R, M. Yoshizawa-Fujita, Takeoka Y, Aizawa M, Rikukawa M. "Ring-opening Bulk Polymerization of L-lactide in Porous Hydroxyapatite", *Chem. Lett.*, **36**, 1476-77(2007).
 - 1-10) 田口哲志、小林博之、斉藤浩史、内田義之、相澤 守、"カルボキシルメチル化キトサンとクエン酸系架橋剤から構成される2成分系医療用接着剤の開発", *日本接着学会誌*, **43** (8), 307-312(2007).
 - 1-11) Fujino T and Aizawa M. "Preparation of apatite powder including bone minerals and its characterization", *Archives of BioCeramics Research*, **7**, 175-178 (2007).
 - 1-12) Yoshihisa H, Onaya N, P. - K. Choi and Aizawa M. "Preparation of calcium-phosphate microsphere with well-controlled particle sizes by ultrasonic spray-pyrolysis technique", *Archives of BioCeramics Research*, **7**, 185-188 (2007).
 - 1-13) Horiguchi Y, Oribe K and Aizawa M. "Fabrication of chelate-setting cements from apatite powder synthesized via a wet process and its mechanical property", *Archives of BioCeramics Research*, **7**, 201-204 (2007).
 - 1-14) Iwamoto Y, Miyashita T, Tanaka Y, Sugiyama N, Takeoka Y, Rikukawa M and Aizawa M. "Fabrication of Biodegradable β -tricalcium Phosphate/poly-(L-lactic acid) Hybrids and Their In Vitro Evaluation", *Archives of BioCeramics Research*, **7**, 289-292 (2007).
- ### 2) 学会発表
- 2-1) Aizawa M, Hiramoto A, Maehashi H, and Matsuura T. "Reconstruction of Liver Organoid Using an Apatite-fiber Scaffold, a Radial-flow Bioreactor, and FLC-4 Cells of Hepatocyte Model", International Symposium on Ceramics in Medicine, Nantes, France, 24-26 October 2007.
 - 2-2) Tada H, Matsuura T, Maehashi H, and Aizawa M. "Three Dimensional Cell Culture of Hepatocytes Using β -tricalcium Phosphate Fiber Scaffolds", 7th Pacific Rim Conference on Ceramic and Glass Technology (PacRim7), Shanghai, China, 11-14

November 2007.

- 2-3) 相澤 守、平本篤司、前橋はるか、松浦知和、
“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を用いた再生肝オルガ
ノイドの構築”、第 29 回日本バイオマテリアル学会
大会、大阪（千里ライフサイエンスセンター）、
日本バイオマテリアル学会、2007.11.26-27.
- 2-4) 多田博信、前橋はるか、松浦知和、相澤 守、
“リン酸三カルシウムファイバースキャフォールドに
よる株化肝細胞の三次元培養”、第 11 回生体関連
セラミックス討論会、大阪（千里ライフサイエンス
センター）、日本セラミックス協会生体関連材料部会、
2007.12.3.
- 2-5) 相澤 守、平本篤司、前橋はるか、松浦知和、
“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肝細胞の三次元
培養”、第 20 回アパタイト研究会、東京（東京都立
産業技術研究センター）、日本アパタイト研究会、
2007.12.17.

H. 知的財産権の出願状況

1. 特許取得

- 1-1) 相澤 守・堀口悠紀子・特願 2008-027149・セメント
用材料、セメント用材料の製造方法、セメントの製造
方法及びセメント・学校法人明治大学
- 1-2) 相澤 守・堀口悠紀子・吉川哲史・特願
2008-017521・セメント組成物、セメントキット、
セメント及びセメントの製造方法・学校法人明治大学
- 1-3) 相澤 守・堀口悠紀子、International Patent
Application No. PCT/JP2007/068031、“セメント用材料
およびセメント”、学校法人明治大学
- 1-4) 相澤 守・堀口悠紀子・特願 2007-014536・セメント
用材料およびセメント・学校法人明治大学
- 1-5) 相澤 守・吉川哲史・堀口悠紀子・特願
2007-014544・セメント用材料およびセメント・学校法人
明治大学

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進事業：ナノメディシン研究）
分担研究報告書

8. X線マイクロCTを用いた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3次元培養モデルの微細形態の解析

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 准教授
協力研究者 永妻啓介 東京慈恵会医科大学 大学院

本研究は、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）の一環として行なわれた。

派遣研究者：永妻啓介（東京慈恵会医科大学 消化器・肝臓内科）

派遣先：Electron Microscope Unit, Australian Key Centre for Microscopy and Microanalysis,
The University of Sydney

派遣中の研究指導者：Associate Professor/Acting Director (Deputy Director) Dr. Filip Braet

派遣期間：平成19年7月24日～平成19年11月1日

なお、本研究の研究成果の詳細は研究実績報告書として提出済みである。

研究要旨：超音波造影剤検定のための3次元還流培養モデルを、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、及び同様の肝臓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、肝臓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X線マイクロCTで観察した。その後、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。X線マイクロCTによる観察では、ソナゾイド、金ナノ粒子標識リポソームともに、水平断で200-300 μ 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。TEM、SEMでは、ソナゾイドや金ナノ粒子標識リポソームの一部の粒子が細胞内に取り込まれており、またリポソームでは、興味深いことに肝臓オルガノイドを構成する細胞が変性している所見が得られた。今後は、3次元癌浸潤・転移モデル、及びX線マイクロCTを用いて、CD147認識抗体を標識したマイクロ・ナノバブルの集積性を検討する。

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X線マイクロCTで観察できるように、プラスチック製小型RFBを作製した。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。平成19年度は、共同研究者であるシドニー大学のFilip Braet博士の指導の下、肝臓オルガノイドに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、実際に、X線マイクロCTで観察した。

B. 研究方法

相澤の開発した可溶性ハイドロキシアパタイトファイバー(HAF)カラムをRFBに装填し、マウス不死化肝細胞IMH-4とマウス不死化内皮細胞M1、不死化伊東細胞A7を共培養し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、2%グルタルアルデヒド(GA)で還流固定した。その後、5日間、2%オスミウムで後固定(浸漬固定)し、X線マイクロCTで観察した。観察後に、RFB内の組織を取り出し、

TEM、SEMでも観察し比較検討した。

C. 研究結果

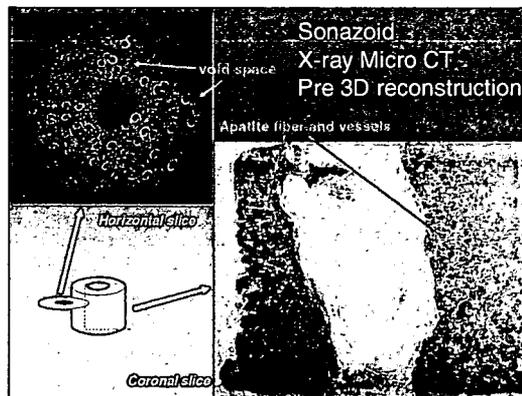


図1: ソナゾイド X線マイクロCT

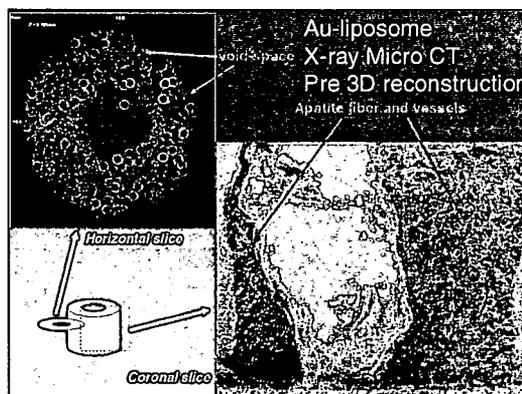


図2: 金ナノ粒子標識リポソーム X線マイクロCT

X線マイクロCTの2D画像の結果を、図1、2に示した。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200-300 μ 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HAF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3次元画像構築ソフトである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。

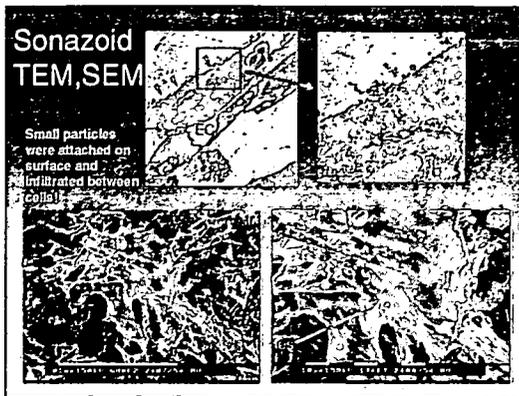


図3: ソナゾイド TEM, SEM

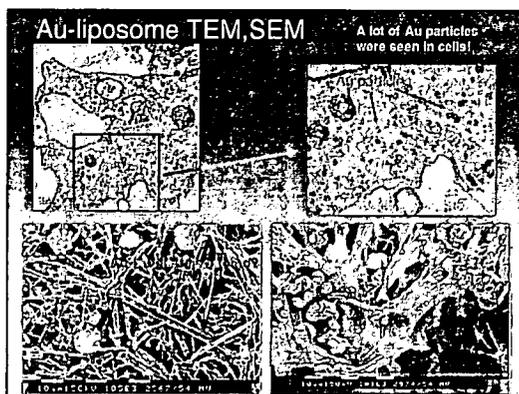


図4: 金ナノ粒子標識リポソーム TEM, SEM

ソナゾイドのTEM、SEMの結果を図3に示した。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 $200\mu\text{m}$ 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3 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。

金ナノ粒子標識リポソームのTEM、SEMの結果を図4に示した。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4 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。

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3次元還流モデルを作製し、そこに既存のマイクロバブルであるソナゾイドとDDSなどで幅広く用いられている金ナノ粒子標識リポソームを還流し、集積性をX線マイクロCT、TEM、SEMで実際に観察することができた。今後は、肝臓オルガノイドに癌細胞を注入した癌浸潤・転移モデルに抗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。

E. 結論

RFBでの3次元還流培養モデルは、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) Mamori S, Nagatsuma K, Matsuura T, Ohkawa K, Hano H, Fukunaga M, Matsushima M, Masui Y, Fushiya N, Onoda H, Searashi Y, Takagi I, Tagiri H. Useful detection of CD147 (EMMPRIN) for pathological diagnosis of early hepatocellular carcinoma in needle biopsy samples. *World J Gastroenterol*. 2007 Jun 7;13(21):2913-7.
- 2) Saito M, Matsuura T, Nagatsuma K, Tanaka K, Maehashi H, Shimizu K, Hataba Y, Kato F, Kashimori I, Tajiri H, Braet F. The Functional Interrelationship between Gap Junctions and Fenestrae in Endothelial Cells of the Liver Organoid. *J Membr Biol*. 2007 Jun 14;217 : 115-121
- 3) 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
- 4) Murakami K, Inoue Y, Hmwe SS, Omata K, Hongo T, Ishii K, Yoshizaki S, Aizaki H, Matsuura T, Shoji I, Miyamura T, Suzuki T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor

system. *J Virol Methods*. 148(1-2):174-81, 2008.

2. 学会発表

- 1) 第2回日本分子イメージング学会総会
2007年6月28-29日、福井市
- 2) 第11回日本肝臓学会大会 (JDDW2008)
平成19年10月18日-19日、神戸
ワークショップ2. 肝の再生医学・医療/
人工肝臓の現状と展望
肝 W2-5 体内埋め込み型バイオ人工肝臓の開発—水酸アパタイトファイバーカラムを用いた肝臓オルガノイドの作製—
- 3) 総合科学技術会議 科学技術連携施策群
「ナノバイオテクノロジーが拓くイノベーションの世界」第二回ナノバイオテクノロジー連携群
成果報告会 平成19年12月5日、東京
- 4) The 9th International Symposium on
Ultrasound Contrast Imaging, 2007年12月
15-16日、大阪
- 5) 平成19年度厚生労働科学研究費研究成果等
普及啓発事業・医療機器開発推進研究 ナノ
メディシン研究成果発表会 平成20年2月
27日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

9. 抗 CD147 抗体標識微小気泡の調製およびその超音波分子イメージング

分担研究者 阿部 正彦 東京理科大学理工学部 教授

分担研究者 酒井 秀樹 東京理科大学理工学部 准教授

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： 癌の浸潤マーカーである CD147 分子を高感度で認識する抗 CD147 抗体を標識した超音波造影剤（微小気泡）を調製し、三次元還流癌細胞モデルを用いて、抗体標識微小気泡の腫瘍細胞への集積性および超音波診断装置による画像化を試みた。まず、抗 CD147 抗体のモデルとして、蛍光蛋白質 Keima を結合した PEG リン脂質を添加した混合バブルを調製し、その分散溶液の共焦点レーザー顕微鏡観察を行ったところ、微小気泡界面に蛍光蛋白質 Keima が標識できることが分かった。そこで、同様の手法を用いて抗 CD147 抗体標識微小気泡を調製し、肝癌細胞 (FLC-7) を培養した三次元癌モデル内に循環させたところ、抗体標識微小気泡は 10-20 分で腫瘍細胞に集積し、超音波のコントラストハーモニックエコーモードで明瞭に画像化された。一方、市販の造影剤では腫瘍細胞への集積性は認められなかった。このことから、本研究にて調製した抗 CD147 抗体標識微小気泡は腫瘍細胞に選択的に集積し、その超音波分子イメージングに成功した。

A. 研究目的

超音波診断は安全性、非侵襲性、簡便性、リアルタイム性、経済性の観点から一般に広く普及した医療診断技術である。一般に超音波診断用造影剤としては、超音波照射により強いエコーを発する微小気泡（直径 10 μ m 以下）が用いられ、主に血管部分のより鮮明な描出に貢献しているが、気泡サイズが大きく、血管外にある目的患部への選択的な集積性に貧しいという問題がある。そこで本研究では、癌の浸潤マーカーであり、悪性度の高い癌に高頻度で発現する CD147 分子をターゲットとし、抗 CD147 抗体を標識した直径数 100nm サイズの微小気泡(ナノバブル)を調製すること

を目的とする。平成 18 年度までの研究では、生体適合性に優れた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重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤を新規に合成し、直径 200nm 程度の“ナノバブル”を調製できることを見出してきた。そこで平成 19 年度では、腫瘍患部への標的指向性を目的として、抗 CD147 抗体標識バブルの調製、および三次元肝癌腫瘍モデルを用いた抗体標識バブルの集積性と超音波分子イメージングを行った。

B. 研究方法

I. 微小気泡への抗体標識

微小気泡へ抗体標識できるのかを検討するために、抗 CD147 抗体のモデル物質として、

蛍光蛋白質 Keima (Ex. 440 nm, Em. 620 nm) を用いた。抗体活性 PEG リン脂質 DSPE-PEG-MAL (日本油脂製) を用いて、図 1 の反応に従い、蛍光蛋白質 Keima 標識 PEG リン脂質 (DSPE-PEG-MAL-Keima) を作製した。

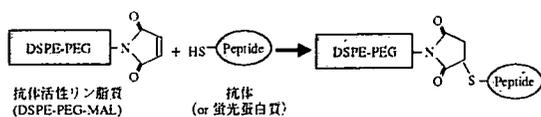


図 1 抗体 (蛍光蛋白質) 標識PEGリン脂質の生成

リン脂質として Sodium dipalmitoylphosphatidylserin (DPPS) を用い、Keima 標識 PEG リン脂質との混合微小気泡を調製した。

II. 三次元癌モデルを用いた抗 CD147 抗体標識バブルの超音波分子イメージング

図 1 の反応によって得られた抗 CD147 抗体標識 PEG リン脂質を用いて、DPPS との混合バブルを調製した。抗体標識バブルの集積性の確認は、分担研究者である東京慈恵会医科大学の松浦の研究グループにおいて開発した小型ラジアルフロー型バイオリアクターによる三次元肝臓モデル (図 2) を用いた。ハイドロキシアパタイトファイバークラム内でヒト肝臓細胞 FLS-7 を培養した。抗体標識バブル分散溶液をリザーバー中に 20 mL 注入して、ポンプで循環させたときの肝臓細胞への集積性を超音波診断装置 (SSD- α 10, アロカ (株) 製) によって画像化を試みた。

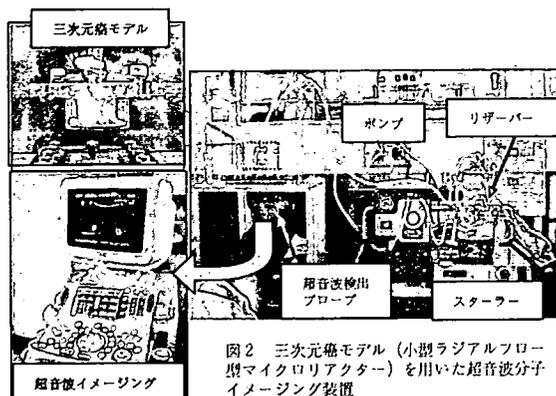


図 2 三次元癌モデル (小型ラジアルフロー型マイクロリアクター) を用いた超音波分子イメージング装置

C. D. 研究結果、考察

I. 微小気泡への抗体標識

1.2×10^{-5} mol/L の DPPS に 2.2×10^{-8} mol/L の DSPE-PEG-MAL-Keima を混合させた後に、内包ガスとして生体不活性な六フッ化硫黄 (SF_6) を送り込みながら、20 kHz 超音波ホモジナイザーにより 1 分間超音波照射することにより、蛍光蛋白質標識混合バブルを調製した。

図 3 に調製直後の共焦点レーザー顕微鏡観察像を示す。その結果、リング状の蛍光像が観察されたことから、微小気泡界面に蛍光蛋白質が標識可能であることが分かった。

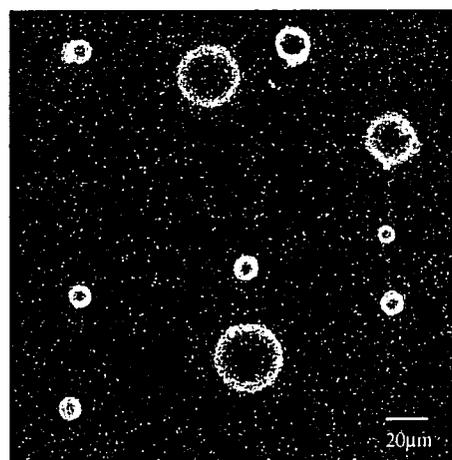


図 3 蛍光蛋白質 Keima 標識混合微小気泡の共焦点レーザー顕微鏡観察像

II. 三次元癌モデルを用いた抗 CD147 抗体標識バブルの超音波分子イメージング

I の検討から抗 CD147 抗体を微小気泡界面に標識できることが示唆された。そこで、同様の手法を用いて抗 CD147 抗体標識バブルを調製し、三次元肝臓細胞モデルを用いてヒト肝臓細胞 FLC-7 への集積性について検討した。

図 4 に循環開始 1 分後と 10 分後の結果を示す。循環直後では、アパタイトファイバークラム外の領域で超音波により明瞭に画像化され、徐々にカラム内に浸透していく様子が観察された。また、循環開始 10 分後ではカラム

内においても超音波によって明瞭に画像化されたことから、抗 CD147 抗体標識バブルが選択的に肝癌細胞 FLC-7 に集積することが示唆された。そこで、カラム内をメデイウムによって洗浄した後に、再び超音波診断装置を用いて検出したところ、カラム内の一部で画像化された。そこで、超音波画像で得られた像が気泡に起因するものか、を確認するために、音圧の高い超音波を照射した前後の超音波診断画像を比較した。微小気泡は高い音圧の超音波を照射すると崩壊するので、高音圧印加前後の超音波画像を比較ことにより、微小気泡に依るものかを確認することができる。その結果、高音圧印加前に認められた像が高音圧印加後に消失したことから、微小気泡に起因する像であることが確認された。以上の結果より、抗 CD147 抗体標識バブルが肝癌細胞 FLD-7 に集積することが分かった。

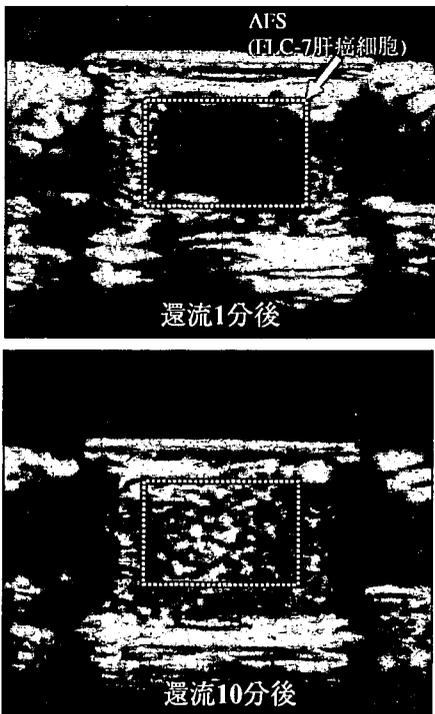


図4 三次元肝癌モデルを用いた抗CD-147抗体標識バブルの超音波分子イメージング

次に、市販の造影剤(Sonazoid)を用いて同様に実験を行った。図5に循環開始1分後および10分後の超音波診断画像を示す。その結果、市販の造影剤では循環開始10分後においても、肝癌細胞内で超音波画像が得られなかったことから、市販の造影剤では肝癌細胞に集積性に乏しいことが分かった。

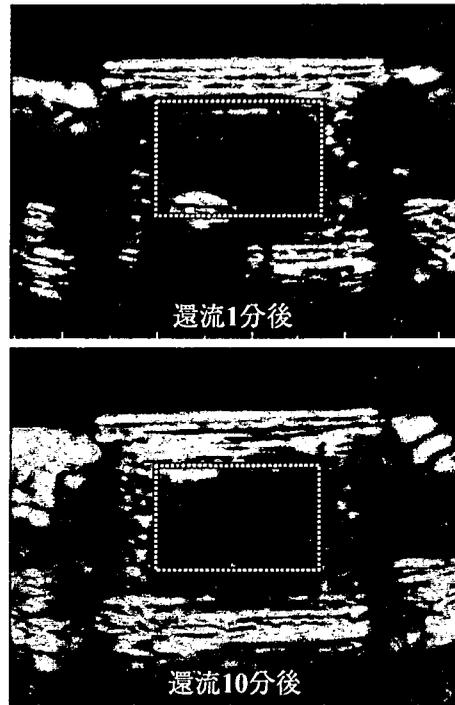


図5 三次元肝癌モデルを用いた市販の造影剤Sonazoidの超音波分子イメージング

E. 結論

抗 CD147 抗体を微小気泡界面に標識できることが分かった。抗 CD147 抗体標識バブルを用いて肝癌細胞への集積性を試みたところ、抗体標識バブルは腫瘍細胞に選択的に集積し、その超音波分子イメージングに成功した。一方、市販の超音波造影剤では腫瘍細胞への集積性は認められなかった。本研究にて調製した抗 CD147 抗体標識バブルは、腫瘍患部の早期診断に有用であることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sakai K, Umezawa S, Tamura M, Takamatsu Y, Tsuchiya K, Torigoe K, Ohkubo T, Yoshimura T, Esumi K, Sakai H, Abe M. Adsorption and micellization behavior of novel gluconamide-type gemini surfactants. *J. Colloid Interface Sci.*, 318, 440-448, 2008.

2) Abe M, Nakayama A, Kondo T, Morishita H, Tsuchiya K, Utsumi S, Ohkubo T, Sakai H. Preparation of tiny biodegradable capsules using electrocapillary emulsification. *J. Microencapsulation*, 24, 777-786, 2007.

3) Tsuchiya K, Ishikake J, Kim, T. S., Ohkubo T, Sakai H, Abe M. Phase behavior of mixed solution of a glycerin-modified cationic surfactant and an anionic surfactant. *J. Colloid Interface Sci.*, 312, 139-145, 2007.

2. 学会発表

1) “Preparation of micro/nano bubbles for ultrasound contrast agents”

Tsuchiya K, Fujiwara K, Konno T, Itani K, Ito T, Matsuura T, Ohkawa K, Tsubone K, Sakai H, Abe M. American Chemical Society (ACS) 234th National Meeting & Exposition, Aug. 21, 2007 (Boston, USA)

2) “超音波診断用微小気泡の調製と物性”

藤原和慶、土屋好司、今野剛人、射谷和徳、伊藤貴司、松浦知和、大川清、坪根和幸、酒井秀樹、阿部正彦

第46回日本油化学会年会

平成19年9月6日、京都

3) “シクロアミロース修飾界面活性剤の合成とその界面物性”

吉津祐美、Wongtrakul Paveena、三瓶春代、寺田喜信、鷹羽武史、土屋好司、酒井健一、酒井秀樹、阿部正彦

第46回日本油化学会年会

平成19年9月6日、京都

4) “新規重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤の気/液界面での“ダブル”ボラ型吸着挙動”
和田みゆ紀、坪根和幸、土屋好司、酒井健一、酒井秀樹、阿部正彦

第46回日本油化学会年会

平成19年9月6日、京都

5) “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

色材協会創立80周年記念会議

平成19年9月13日、東京

6) “超音波診断用造影剤として利用可能な微小気泡の開発”

土屋好司、藤原和慶、今野剛人、射谷和徳、伊藤貴司、松浦知和、大川清、坪根和幸、酒井秀樹、阿部正彦

色材協会創立80周年記念会議

平成19年9月14日、東京

7) “超音波診断用造影剤の開発に向けたマイクロナノバブルの調製”

土屋好司、藤原和慶、今野剛人、射谷和徳、伊藤貴司、松浦知和、大川清、坪根和幸、酒井秀樹、阿部正彦

第60回コロイドおよび界面化学討論会

平成19年9月20日、長野

8) “超音波診断用造影剤への応用を目指したマイクロナノバブルの調製”

土屋好司、阿部正彦

平成 19 年 11 月 30 日、千葉

9) “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、酒井健一、酒井秀樹、阿部正彦

平成 19 年 12 月 1 日、千葉

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、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

10. 超音波分子イメージング装置に関する研究

分担研究者 伊藤貴司 アロカ（株）研究所 主幹研究員

分担研究者 射谷和徳 アロカ（株）研究所 主任研究員

研究要旨：超音波分子イメージング技術では、目的分子捕捉性、選択性に優れた分子プローブと、分子プローブを高感度・高解像度に映像化する画像化技術が両輪となる。本研究では、微小気泡、特に直径 $1\mu\text{m}$ 以下のナノバブルを、超音波によって高感度にイメージングするための要素技術を開発する。

微小気泡は、超音波によって膨張・収縮を繰り返すことで造影作用、すなわち強いエコーを発生する。ナノバブルにおいても、 2MHz 以下の低い周波数の超音波を利用することで、バブルが大きく膨張・収縮し、その結果、高次でかつ強い非線形信号が発生することが判明した。低周波数超音波を送信する振動子と、高次高調波エコー信号を受信する振動子を独立させた探触子を設計し、バブルからの高次高調波エコーを画像化する実験装置を試作した。ナノバブルにおいても第3次以上の高次高調波を検出することで、市販の超音波造影剤と同等の検出感度が得られることを検証した。

A. 研究目的

微小気泡のサイズが、市販の造影剤の数 μm から数百 nm に小さくなると、生体内の集積性・選択性が高まり、分子プローブとしての分子捕捉能が向上する。また、 200nm 以下のサイズでは、EPR効果として知られるように血管壁を通過し、腫瘍組織自体のターゲティングが可能となる。一方、バブルを微小化すると、安定性の低下と検出感度の低下が懸念される。本研究では、生体適合性・安定性に優れた微小気泡、特にナノサイズの微小気泡を高感度に画像化する技術を開発する。

B. 研究方法

19年度は、主に3つの項目について検討を行う。

① ナノバブル音響特性の測定

ナノバブルとマイクロバブル（市販造影剤）の反射エコーを測定し、音響特性を比較する。

② 高感度検出アルゴリズムの検討

実験結果とバブル膜の振動シミュレーターによる解析結果とを比較し、妥当性を検証する。シミュレーションを用いて、ナノバブルに各種条件の超音波を送信し、対組織信号比CTRが最大となる送信方法と検出アルゴリズムを開発する。

③ 高次高調波を利用した画像化装置の試作

シミュレーションによる解析によって、低周波送信でバブルを大きく振動させ、その時発生する高次高調波を利用することで、高い検出感度が得られることが推察された。低い周波数で送信するための振動子と高次高調波を受信するための振動子を独立させた探触子を設計し、バブルからの高次

高調波を画像化する実験装置を試作する。試作した実験装置を用いて、ナノ及びマイクロバブルの検出感度（対組織信号比）測定し、従来技術と比較する。

C. 研究成果

① ナノバブル音響特性の測定

通常の診断で利用されている低い周波数の送信条件で、市販の超音波造影剤（商品名：ソナゾイド）と検出感度を比較した（図1）。ナノバブル（ 600nm ）は、市販造影剤（マイクロバブル）に比べ、基本波帯でのエコー強度が大きく減少した。一方、第2高調波帯でのエコー強度の差は、約 -5dB 程度と小さくなり（図2）、高次高調波を用いることでナノバブルを映像化する事が可能であると推察された。

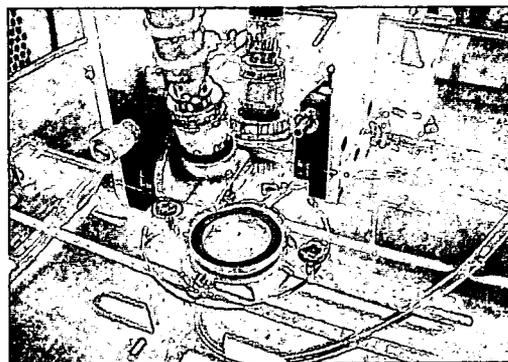


図1 バブルからエコー信号の測定

バブル1個からのエコー信号を測定した。
送信条件：送信周波数 3.5MHz
送信音圧： $MI \approx 0.3$ 波長 $8\mu\text{sec}$

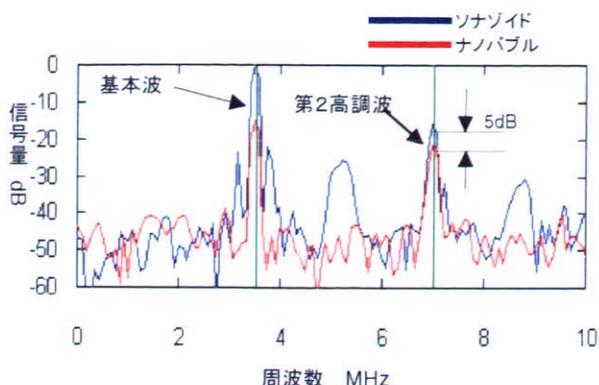


図2 ナノバブルエコー信号量 (実験結果)
第2高調波の信号量の差は、-5dB と僅かであった。

② 高感度検出アルゴリズムの検討

バブル膜の振動を数値計算で求めるシミュレーターを作製し、バブルからのエコー信号を求めた。シミュレーション結果 (図3) は、図2の実験結果と良く一致した。このシミュレーターを用いて、ナノバブルをより高感度で画像化する条件を検討した。その結果、ナノバブルを低い周波数で励振し、第3次以上の高次高調波を画像化することで、マイクロバブルと同等のCTR (対組織信号比) が得られる可能性が示唆された (図4)。

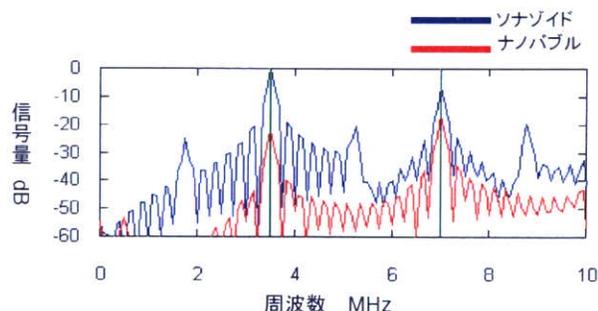


図3 ナノバブルのエコー信号量 (シミュレーション)
実験結果 (図2) とシミュレーションは、良く一致した。シミュレーターの妥当性が確認された。

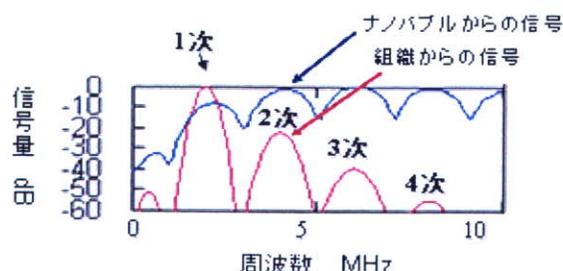


図4 高次高調波による検出

バブル (600 nm) と組織から発生する反射エコーをシミュレーションした。バブルからの高調波信号量は、高次においてもほぼ一定であった。一方、組織伝搬中に発生する高調波信号量は、高次になるほど減少した。

③ 高次高調波を利用した画像化装置の試作

送信 2 MHz、受信 6 MHz の送受信独立型リング状探触子を搭載したプローブを試作し、高次高調波でバブルを画像化する実験システムを製作した (図5)。血流モデル (図6) を用いて、ナノバブル (600 nm) の3次高調波とマイクロバブル (ソナゾイド: 2.5 μm) の2次高調波による映像化を行い、そのCTRを比較した。ナノバブルでも、市販の造影剤と同等の感度 (図7) が得られることが実験によって確認された。

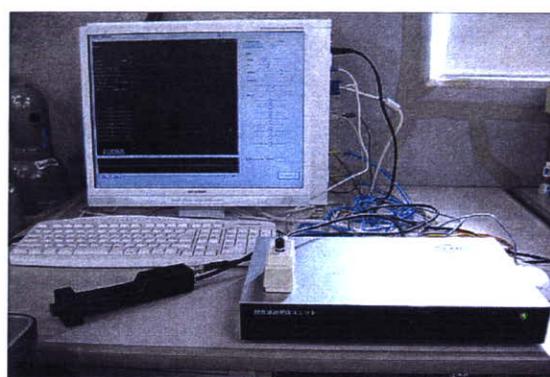


図5 3次高調波による画像化システム
上: プローブ 下: 本体

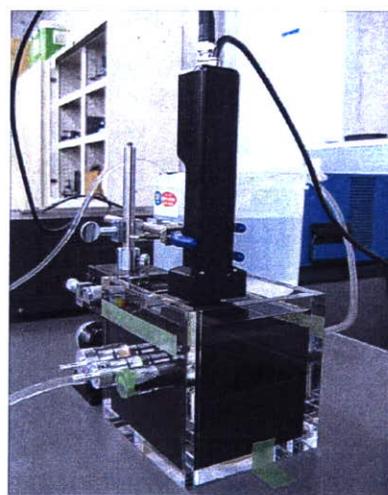


図6 血流モデル

血管モデルにバブルを流し、組織とバブル (血管内) からエコー信号を画像化した。

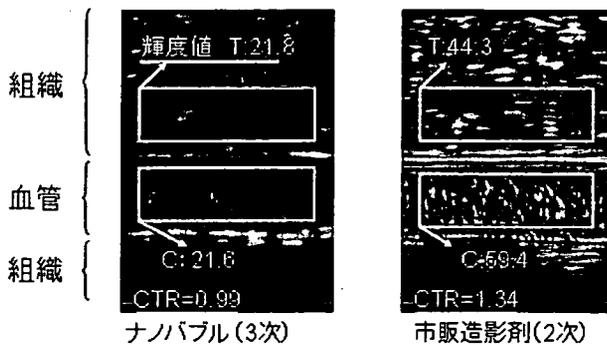


図7 ナノバブルの検出感度

ナノバブルの3次高調波による検出感度(CTR)は、市販造影剤の2次(コントラスト剤)と同等であった。

D. 考察

バブルは、共振周波数よりも低い超音波で励振することで大きく膨張し、それに伴い強い非線形信号を発生することが確認された。送信周波数として2MHz以下の低い周波数を利用することで、3次高調波でも6MHz以下となり、生体深部のバブルからの情報を画像化することが可能である。これまで、ナノバブルを画像化する場合、より高い周波数を使用することが検討されていた。この場合、生体内での超音波の減衰によって、深い所の画像化に課題があった。我々が提案する技術を利用することで、ナノバブルによる分子プローブを、深部臓器に利用することが可能となる。

また、この技術はマイクロサイズのバブルにおいても応用が可能である。市販の超音波造影剤(マイクロバブル)に適用することで、従来の技術に比べ検出感度が3倍以上向上する実験結果も得られている。

EPR効果で腫瘍領域へバブルを集積させるためには、直径200nm以下のより小さいバブルを利用することが要望されている。直径200nm以下で、単分散かつ安定性に優れたナノバブルを生成する必要がある。また、バブルの微小化に伴い、エコー絶対量が低下する。高次高調波とパルス圧縮を組み合わせた技術についても検討を進める必要がある。

E. 結論

ナノバブルでは、マイクロバブルに比べ反射エコー量が減少するため、その検出感度の低下が懸念される。単一バブルからの反射エコーを測定するための実験システムを構築し、独自に開発した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調製したナノバブルと、市販の超音波造影剤によるマイクロバブルの反射エコー強度の比較測定を行った。従来ナノバブルの検出に不向きと考えられていた低い周波数の超音波を利用することで、大きな非線形エコー信号が発生し、

マイクロバブルと比較しても、その信号強度差は僅かであることが確認された。また、バブルからのエコー信号強度を解析するためのシミュレーターを用い、実験結果を検証した。実験とシミュレーション結果は、非常に良く一致し、ナノバブルにおいても、低い周波数の超音波を利用し、その時発生する高次高調波を検出することで、高感度に画像化出来ることが示唆された。そこで、2MHzの低い周波数で送信し、バブルからの第3次高調波を画像化する実験システムを製作し、画像化実験を行った。ナノバブルにおいても、従来のマイクロバブルと同等の感度が得られることが確認された。

F. 健康危険情報

総括報告書にまとめて記載。

G. 研究発表

2. 発表

- 1-1) 射谷和徳 他 “ラ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” 第46回日本生体医工学会 平成19年4月25日
- 1-2) 今野剛人・射谷和徳・伊藤貴司 “超音波分子イメージング用ナノプローブの開発—ナノバブルの生成” 日本超音波医学会第80回学術集会 平成19年5月20日
- 1-3) 今野剛人・射谷和徳・伊藤貴司 他 “Approach for Early Cancer Diagnosis Using Targeted Ultrasound Contrast Agents” Joint Molecular Imaging conference 平成19年9月12日
- 1-4) 射谷和徳・伊藤貴司 他 “ラ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” 第2ナノバイオ連携施策群成果報告会 平成19年12月5日
- 1-5) 射谷和徳 他 “Preparation and Detection of Nanobubbles: Toward Ultrasonic Molecular Imaging” 第9回国際造影超音波シンポジウム 平成19年12月16日

H. 知的財産権の出願状況

1. 特許取得

- 1-1) 射谷和徳・大川清・松浦知和・阿部正彦・特願2007-205952・造影用カプセル・アロカ株式会社
- 1-2) 射谷和徳・特願2007-215654・超音波診断装置・アロカ株式会社
- 1-3) 射谷和徳・特願2007-318814・超音波診断装置・アロカ株式会社