

⑥ 重合性ジェミニ型陽イオン界面活性剤

3.1. 抗マウスCD147ペプチド抗体の作製：
マウスbasigin (CD147)の配列SLNSSGVDIVGHRWMRGGKVを合成し、ウサギを免疫して抗体を作成した。

3.2. 免疫組織化学解析：上記抗体を用いて酵素抗体法を行い、マウス組織でのCD147の局在を解析した。

C. 研究結果

1.1. ヒト癌細胞の移植による腫瘍動物モデル系の開発：

①12C3抗体では、A431(類表皮癌)、A375(メラノーマ)、A549(肺癌)およびHLC1(肺癌)は、発現の強弱があるもののすべて陽性であったが、CMT315(マウス乳癌細胞株)は陰性であった。培養下でテネイシン非産生株(A431とA549)と培養下でテネイシン産生株(A375とHLC1)における染色パターンに違いが見られた。後者の方は、前者よりも強い反応が細胞の辺縁に観察されるが、前者の細胞では、弱い反応が細胞表面全体に散在的に観察された。

②それぞれの腫瘍におけるテネイシン発現を免疫染色で検討したところ、2008腫瘍では、宿主間質細胞由来のテネイシンとともに腫瘍自体の産生するテネイシンが癌巣内外に沈着して見られた。それに反し、C13腫瘍では、宿主間質由来のテネイシンが観察されるものの、腫瘍由来のテネイシンは、一部を除いて殆ど検出することが出来なかった。

1.2. マウス転移腫性瘍細胞の移植による腫瘍動物モデル系の開発

マウス乳癌細胞を皮下移植し、4週間腫瘍を成長させたところ、肺および肝臓に転移腫瘍が観察できた。これらの腫瘍は、テネイシンを発現していた。肺では、直径500 μ mから1mm位の転移腫瘍が散在性に確認できた。一方、肝臓における転移腫瘍は、比較的大きく成長していたがそれでも3mm程度であった。

2. 界面活性剤の影響

1) 全ての界面活性剤は、バブルの形成効率や、安定性などを指標に選択されたものであるが、シクロアミロース修飾界面活性剤とタウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤は、投与後、2週間に影響を示すものの、21日ではほぼ正常値に戻り、生体への影響が比較的軽いものであると考えられる。

2) しかし、バブルの長期安定のためのグリセリンの添加は、結果として血液生化学データへの影響は少ないものの、投与時の動物の反応に問題があるので、その詳細を検討する必要がある。

3) 重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤の方は、毒性が低いと考えられるが、重合性ジェミニ型陽イオン界面活性剤は、用量依存性に急性毒性を示すが、量を減らすことで、その影響を軽減できた。

3.1. 抗マウスCD147ペプチド抗体の作製： ペプチドを認識する抗体を作成した。

3.2. 免疫組織化学解析：

①抗体の染色性について：マウス乳癌細胞を染色したところ、本抗体は細胞を認識するが、その局在は細胞膜よりも細胞質に多く観察された。一方、この細胞を移植し形成された腫瘍では、腫瘍細胞膜が陽性に染色されていた。

②各組織の免疫染色結果：

【精巣】赤血球は、殆ど陽性に染色された。また、精巣においては、ライディツヒ細胞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、異なっていた。

【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、中心静脈の内皮及びグリッソン氏鞘内の血管及び胆管は陰性であった。

【腎臓】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。更に、ネフロン立体再構築によって尿細管では、近位・遠位曲尿細管及びヘンレの上行脚に局限して

強い発現を認めた。

D. 考察

分子標的イメージングを用いて癌の診断を行う場合、腫瘍のみを標的とするのではなく、癌の間質における状態も把握する必要がある。そのため、免疫系なども含めて観察できるマウス転移モデルは、今後の前臨床的な検証に有用であると考えられる。また、バブル形成能や保持時間などを考慮して開発している界面活性剤の生体への影響を評価するために動物実験は不可欠である。今回用いた界面活性剤に関しては、原料としては生体影響が低いと考えられたが、最終生成物として形成されたバブルが、生体に投与された際、どのような生体影響を持つのか、また、バブルとして機能するのかを検証する必要があると考える。

E. 結論

腫瘍細胞は、CD147を発現しているが、周囲の組織においては、CD147を発現しているものも多く、腫瘍の場所によっては、それらを識別する必要があると考えられ、今後、マウスCD147抗体を結合したバブル及びマウス腫瘍モデルでの詳細な研究によって評価することが重要であると考えられる。

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. 健康危惧情報

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
- 3) Sousa KM, Mira H, Hall AC, Jansson-sjostrand L, Kusakabe M, Arenas E. (2007) Microarray analyses support a role for Nurr1 in resistance to oxidative stress and neuronal differentiation in neural stem cells. *Stem Cells*, 25(2):511-9
- 4) 日下部守昭、青塚聡、佐々木直一、井上循、松葉恭一、橋本尚詞、磯西成治、安田允、石川博 (2007) 抗がん剤耐性特異的遺伝子の探索—シスプラチン耐性特異的遺伝子の発現はシスプラチンによって上昇する—、*乳癌基礎研究*、16:51-58
- 5) Tsukamoto T, Yamamoto M, Fukami H, Yoshikawa A, Sakai H, Hirata H, Kusakabe M, and Tatematsu M, (2006) Susceptibility to colon carcinogenesis in C3H ↔ C57BL/6 chimeric mice reflects both tissue microenvironment and genotype. *Cancer Letter*, 239:205-11
- 6) Yonezawa S, Yoshizaki N, Kageyama T, Takahashi T, Sano M, Tokita Y, Masaki S, Inaguma Y, Hanai A, Sakurai N, Yoshiki A, Kusakabe M, Moriyama A, Nakayama A. (2006) Fates of Cdh23/CDH23 with mutations affecting the cytoplasmic region, *Hum Mutat.*, 27(1):88-97
- 7) Matsuda A, Hirota T, Akahoshi M, Shimizu M, Takahashi A, Tamari M, Nakashima K, Takahashi N, Obara K, Doi S, Miyatake A, Yuyama N, Kamogawa Y, Enomoto T, Ohshima K, Tsunoda T, Miyatake S, Izuhara K, Kusakabe M, Hopkin, J., Shirakawa T. (2005) Coding SNP in Tenascin-C Fn-III-Ddomain associates

with adult asthma. Hum Mol Genet. 14; 2779-2786

- 8) 佐々木直一、青塚聡、松葉恭一、井上循、磯西成治、石川博、日下部守昭 (2005) HiCEP を用いたシスプラチン耐性ガン細胞の網羅的発現プロファイリング、乳癌基礎研究、14:5-9

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
- 2) 山本昌美、塚本徹哉、平田暁大、酒井洋樹、日下部守昭、立松正衛 (2006)、「MNU 誘発マウス胃病変における性差と系統差—3系統のマウスとキメラマウスを用いた解析」第22回日本毒性病理学会、鹿児島、1月
- 3) 南條 博、小林實貴夫、吉成由樹、高橋正人、吉田誠、川村公一、山内美佐、杉田暁大、小松正代、日下部守昭、増田弘毅 (2006)、フィジカルトレーニングによる骨髄由来細胞の局在。第95回日本病理学会総会、東京 (日本病理学会雑誌 第96巻 第1号 P318)、5月
- 4) Nanjo H, Kobayashi M, Yoshinari Y, Takahashi M, Yoshida M, Kawamura K, Kusakabe M. and Masuda H. (2006), Systemic organ distribution of bone marrow-derived cells in mice. XIVth Internal vascular biology meeting, Netherlands (Vascular pharmacology P82) June
- 5) 日下部守昭、橋本尚詞、磯西成治、井上循、松葉恭一、安田允、石川博 (2006)、卵巣癌のシスプラチン耐性に関与する遺伝子の解析、第65回日本癌学会総会、横浜、9月
- 6) Kusakabe M., Aotsuka S, Inoue J, Matsuba K, Hashimoto H, Isonishi S, Yasuda M, and Ishikawa H. Effect of tenascin-C on the gene expression in the cisplatin-sensitive

and cisplatin-resistant ovarian tumor cell lines, ヒト細胞学会、8月26-27日、筑波、2005

- 7) 日下部守昭、青塚聡、佐々木直一、井上循、松葉恭一、橋本尚詞、磯西成治、安田允、石川博：シスプラチン耐性細胞 (C13) 特異的遺伝子の発現はシスプラチンによって上昇するが、テネイシン欠損環境では下降する。第15回乳癌基礎研究会、9月2-3日、沖縄、2005

H. 知的財産権出願・登録状況
なし

7. *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 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、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」の構築を試みた。これまでの調査から、AFSはヒト肝癌由来のFLC-4細胞の三次元培養に好適であり、RFBを用いた高密度・三次元培養では、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）よりも優れた細胞増殖性を示した。さらに、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*系での三次元微小腫瘍モデルの構築も試みた。

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(Apatite-fiber scaffold; AFS)」の開発に成功している。

本研究の目的は、このAFSが「微小腫瘍モデル」構築の足場材料として有効であるかどうかを見極め、その成果をプロジェクトの推進に活用することである。

そのような目標のもと、一昨年度、このAFSを微小腫瘍モデル構築の足場材料として適用すべく、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。

さらに、最終年度は、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「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)」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

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1mass%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クター(RFB)に装填し、FLC-4細胞を 3×10^8 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。

一方、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(H. Tanabe, M. Aizawa 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℃で5h、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7.5mm×1, 2.5, 3.5mm）を48wellプレートに設置し、細胞培養を行なった。TFS群に 5×10^5 個/cm³に調整したFLC-4細胞懸濁液を0.25cm³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

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

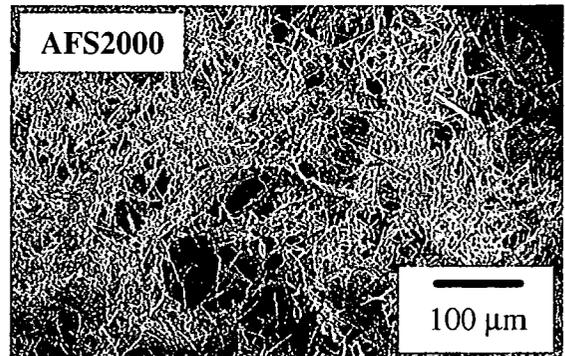


図1 AFS2000の微細構造

	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

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 μm 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。

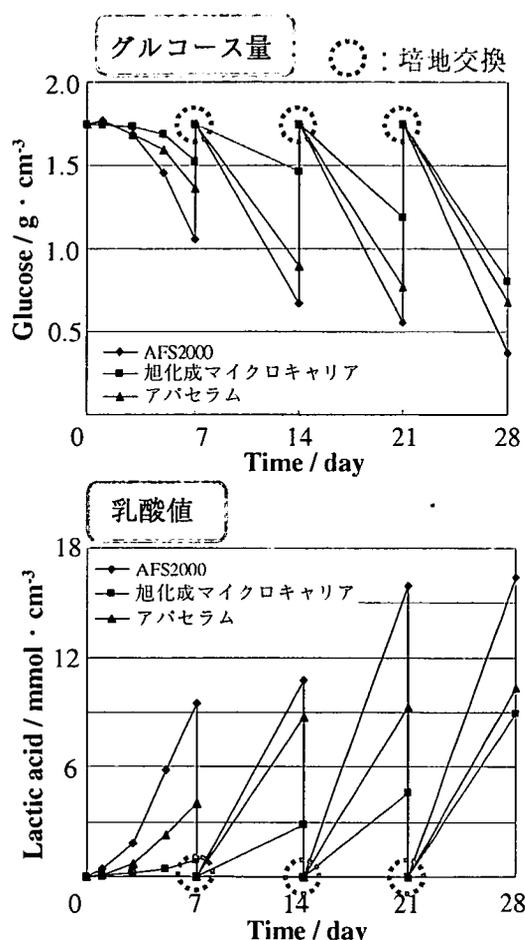


図3 各培養基材における成育状態の比較

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。

ついで、生体で吸収を受けやすいTFS群について記載する。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。

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ところ、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った。Controlのポリスチレンプレートと比較して、TFS群のDNA量が低いレベルであったのは、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。

FLC-4細胞を播種して28日間培養したTFS2000をSEM観察したところ、TFSの気孔内に細胞が観察され、AFS同様に三次元的な組織を構築していた。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。

また、本研究で試用したTFSも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

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ミ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。

また、本研究の TFS は、AFS の微細構造に加えて、アパタイトよりも生体で吸収されやすい性質も備えており、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, Yoshizawa-Fujita M, 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).
- 1-15) Aizawa M, Itatani K, and Okada I, “Synthesis of various apatites and porous coating of biocompatible calcium-phosphate films via spray-pyrolysis technique”, *Phosphorus Res. Bull.*, **20**, 61-78(2006).
- 1-16) Morisue H, Matsumoto M, Chiba K, Matsumoto H, Toyama Y, Aizawa M, Kanzawa N, T. J. Fujimi, Uchida H, Okada I, “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).
- 1-17) Aizawa M, Ueno H, Itatani K and Okada I, “Synthesis of calcium-deficient apatite fibres by a homogeneous precipitation method and their characterizations”, *J. Eur. Ceram. Soc.*, **26**, 501-507(2006).
- 1-18) Miyazaki A and Aizawa M, “Adhesion, Proliferation and Morphology of Osteoblasts Cultured on Apatite Ceramics with Preferred Orientation to a-plane”, *Key Engineer. Mater.*, **309-311**, 109-112(2006).
- 1-19) Ohno T and Aizawa M, “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).
- 1-20) Aizawa M, N. Patel, A. E. Porter, 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).
- 1-21) Aizawa M, Uchida H, Okada I, T. J. Fujimi, Kanzawa N, Matsumoto M, Morisue H and Toyama Y, “Development of Apatite Fiber Scaffolds Promoting Hard-tissue Regeneration and Their Application to Biomedical Devices “, *Archives of BioCeramics Research*, **6**, 9-12(2006).
- 1-22) Honda M, T. J. Fujimi, Kanzawa N, Izawa K, Tsuchiya T, Aizawa M, “Osteogenic Differentiation in a Three-dimensional Apatite-fiber Scaffolds”, *Archives of BioCeramics Research*, **6**, 171-174(2006).
- 1-23) Izumi S, Honda M, Kanzawa N, T. J. Fujimi, Uchida H, Tsuchiya T, Morisue H, Matsumoto M, Aizawa M, “Apatite-fiber Scaffold Provides Three-dimensional Culture Environment for Osteoblast-like cells”, *Archives of BioCeramics Research*, **6**, 175-178(2006).
- 1-24) Tanaka Y, Morisue H, Matsumoto M, Toyama Y and Aizawa M, “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).
- 1-25) Onaya N, Ohno T, Pak-kon. Choi and Aizawa M, “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).
- 1-26) Yamamoto H and Aizawa M, “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).
- 1-27) Yoshikawa A, Horiguchi Y, Oribe K, and Aizawa M, “Mechanical Property of Apatite Cement Hardened by Chelating-effect of Inositol Phosphate”, *Archives of BioCeramics Research*, **6**, 216-219(2006).
- 1-28) Hiramoto A, Matsuura T and Aizawa M, “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).
- 1-29) Miyazaki A, Kanzawa N and Aizawa M, “Adhesion, Proliferation and Differentiation of Osteoblasts Cultured on Apatite Ceramics with Preferred Orientation to a-plane”, *Archives of BioCeramics Research*, **6**, 224-227(2006).
- 1-30) Tanabe H, Ohbuchi A, Nakamura T, and Aizawa M, “Release profiles of calcium and phosphate ions from the β -tricalcium phosphate fiber scaffolds in the HEPES buffer solutions”, *Archives of BioCeramics Research*, **6**, 236-239(2006).
- 1-31) Aizawa M, Ono A, Ohno T and P-K. Choi, “Synthesis of Calcium-phosphate Microsphere with well-controlled Particle Size by Ultrasonic Spray-pyrolysis Technique and Their Sinterability”, *Phosphorus Res. Bull.*, **19**, 1-6(2005).
- 1-32) Igeta N, Katakami T and Aizawa M, “Fabrication and Characterization of the Apatite-fiber Scaffolds with Enhanced Mechanical Property using Apatite Gels as a Sintering Agent”, *Phosphorus Res. Bull.*, **19**, 42-47(2005).
- 1-33) Hiramoto A, Matsuura T and Aizawa M, “Three-dimensional cell culture of hepatocytes using apatite-fiber scaffold”, *Archives of BioCeramics Research*, **5**, 238-241(2005).
- 1-34) Aizawa M, Itatani K and Okada I, “Characterization of Porous β -tricalcium Phosphate Films Formed on Alumina Ceramics by Spray-pyrolysis Technique and Their *in vitro* Evaluations Using Osteoblasts”, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **113**, 245-251 (2005).
- 1-35) Okada I, Namiki Y, Uchida H, Aizawa M and Itatani K, “MD simulation of crystal growth of NaCl from its supersaturated aqueous solution”, *J. Mol. Liq.*, **118**, 131-139 (2005).
- 1-36) Aizawa M, A. E. Porter, S. M. Best and W. Bonfield, “Ultrastructural Observation of Single-crystal Apatite Fibres”, *Biomaterials*, **26**, 3427-3433(2005).

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（出願日 2008 年 2 月 7 日）

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（出願日 2008 年 1 月 29 日）

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（2007 年 9 月 18 日）

- 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
- 1-6) 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
- 1-7) 相澤 守・松浦知和・特願 2005-079350・バイオリアクター・学校法人明治大学
- 1-8) 相澤 守・松浦知和・特願 2005-079350・肝細胞の培養・学校法人明治大学

8. 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 准教授

協力研究者 永妻啓介 東京慈恵会医科大学 大学院

（平成19年度 外国への研究者派遣事業にてシドニー大学へ派遣）

協力研究者 Filip Braet シドニー大学 准教授

（平成18年度、19年度 外国人研究者招へい事業にて招へい）

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。オルガノイドの3次元微細形態の解析は、マイクロX線CTで行った。また、肝臓モデルにCD147発現ヒト肝癌細胞株FLC-7を注入し、癌の転移・浸潤モデルを作製した。CD147陽性細胞は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。さらに、この3次元腫瘍モデルをファントムとして利用し、CD147認識抗体を標識したマイクロバブルの集積性を超音波診断装置で検討した。

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。平成19年度は、バイオリアクター内に3次元培養した癌モデルをファントムとして、抗CD147抗体

標識マイクロバブルが集積するか、超音波診断装置を用いて検討した。

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スキャフォールド (AFS) 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 AFS 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。

3 週間培養後、市販の超音波造影剤ソナゾイドを還流し、超音波で観察後、1.2% グルタルアルデヒドで還流固定し、シドニー大学に送付してマイクロ X 線 CT で解析した。解析後、肝臓オルガノイドを透過型電子顕微鏡と走査型電子顕微鏡で観察した。

また、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。マイクロ X 線 CT での観察では、培養液の流入、流出口が開くリアクター上部での組織化が良好で、AFS は溶解していた (図 1)。ソナゾイドは還流液とともにオルガノイド周囲から内部へ還流された。電子顕微鏡による観察では、一部の内皮細胞内にソナゾイドが取り込まれていた (図 2)。

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。

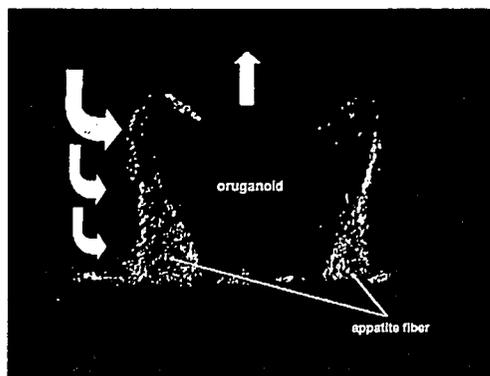


図 1 マイクロ X 線 CT 像。AFS が強調されており、組織化した部分、固定液の存在部位は黒色。



図 2. 内皮細胞内にソナゾイドが取り込まれている (矢印)。



図3：癌浸潤・転移モデル

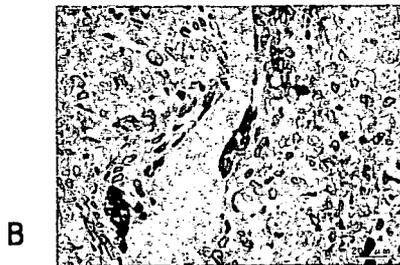


図4：
拡大

C

図3 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3 B)。図4 は拡大像であるが、図4 A に示す FLC-7 細胞の血管内皮細胞への付着、図4 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4 C)。擬似血管内腔に付着した細胞塊も観察された (図5)。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6)。



図5：血管内腔に付着した細胞塊

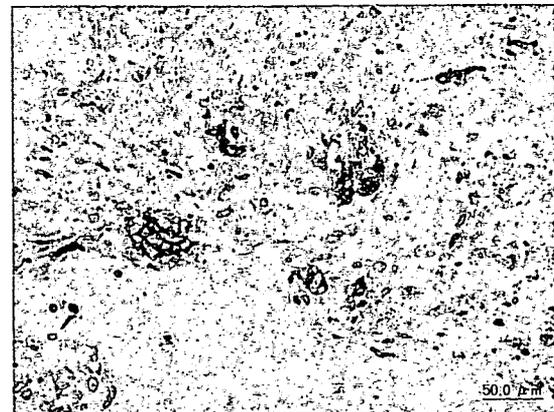


図6：組織内に小腫瘍塊を形成

バイオリアクターを利用した3次元癌モデルをファントムとした抗 CD147 抗体標識マイクロバブルの集積実験を行ったところ、超音波診断装置でバブルの集積を確認できた(図7、8)。



図7：3次元癌モデルでの実験



図8：標識バブルの3次元癌モデルへの集積

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、その集積性を検討した。以上から、集積性超音波造影剤の超音波画像を検討するためのファントムとしての3次元組織・癌モデルを開発することができ、集積性超音波造影剤の実用化に寄与できる目途がたった。

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) 松浦知和、幡場良明、石川周太郎、小川哲朗：多孔質水酸アパタイトを用いたバイオ人工肝臓。セラミックス 2005; 40: 869-872.

2) Matsuura T: Bioreactors for 3-dimensional high density culture of human cells. *Human Cell* 2006; 19:11-16.

3) 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

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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.

8) 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

9) 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

10) 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) 松浦知和, 池脇克則, 前橋はるか, 大川清 :

バイオ人工臓器を用いた生体代替シミュレーション,
イノベーションジャパン 2005 2005年9月
27日

2) 松浦知和 : ラジアルフロー型バイオリ
アクターを用いた体外循環型バイオ人工
肝臓の開発. 第8回日本組織工学会 2006年
9月1日

3) 齊藤勝也, 松浦知和, 政木隆博 他 :
3次元還流共培養下でのオレアミド投与による
再構築肝組織の形態変化—類洞内皮細胞の
篩板状小孔について—. 第41回日本肝臓学会
総会 2005年6月17日

4) 松浦知和, 池脇克則, 前橋はるか, 大川清 :
バイオリアクターを用いた生体代替研究の流れ.
第4回国際バイオ EXPO 2006年5月20日

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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

9) 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

—

1 0) 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

1 1) The 9th International Symposium on
Ultrasound Contrast Imaging, 2007 年 12 月 15—
16 日、大阪

1 2) 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

9. 新規界面活性剤を用いたナノバブルの調製および 抗 CD147 抗体標識微小気泡の超音波分子イメージング

分担研究者 阿部正彦 東京理科大学工学部 教授

分担研究者 酒井秀樹 東京理科大学工学部 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： 超音波診断用造影剤（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、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新規に合成し、これら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、その超音波分子イメージングに成功した。また、多孔質ガラス膜を用いたところ、直径約 600 nm で単分散な微小気泡を多量に調製できることが分かった。そこで、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 抗体を微小気泡界面に標識し、肝癌細胞 FLC-7 を培養した三次元癌細胞モデルを用いて、抗体標識バブルの集積性について検討した。その結果、本研究において調製した抗 CD147 抗体標識バブルは肝癌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。微小気泡を超音波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、④粒子径の均一化（単分散化）、⑤低音圧での振動特性の向上、⑥治療患部への標的指向性を付与するための抗体標識、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実用困難なのが現状である。そこで、最適な微小気泡調製に向けて、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新規に合成し、これらの新規界面活性剤を用いたナノメートルサイズを有する微小気泡の調製を試みた。また、微小気泡に標的指向性を有するために、抗 CD147 抗体を微小気泡に標識し、その腫瘍細胞への集積性と超音波分子イメージングについて検討を行った。

B. 研究方法

1. 新規界面活性剤を用いた微小気泡の調製

界面活性剤には、新規に合成したシクロアミロース修飾界面活性剤 (図1) 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 (図2) を用いた。

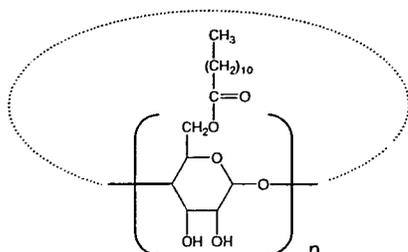


図1 シクロアミロース修飾界面活性剤

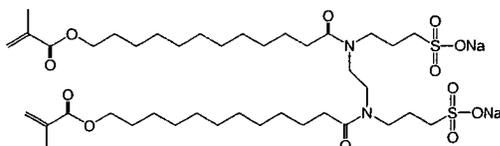


図2 タウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤

シクロアミロース修飾界面活性剤の合成の確認は、 $^1\text{H-NMR}$ および IR により行い、タウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤の合成は、 $^1\text{H-NMR}$ 、 IR 、 Fab-MS 、元素分析によって確認した。微小気泡の分散安定性を向上させるために、内包ガスには難溶性の六フッ化硫黄(SF_6)を、溶媒には30%グリセリン水溶液をそれぞれ用いて、(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。

(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、超音波ホモジナイザー (周波数: 20 kHz) 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。

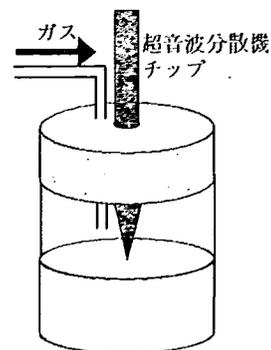


図3 超音波照射法による微小気泡調製の模式図

(b) 多孔質ガラス膜法

図4のように、チューブ状の多孔質ガラス膜(SPG膜)内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 (細孔径: 70 nm) 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。

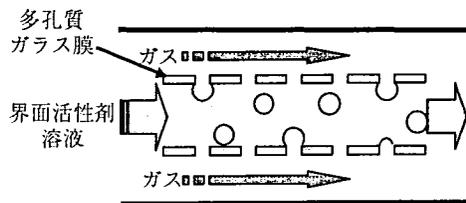


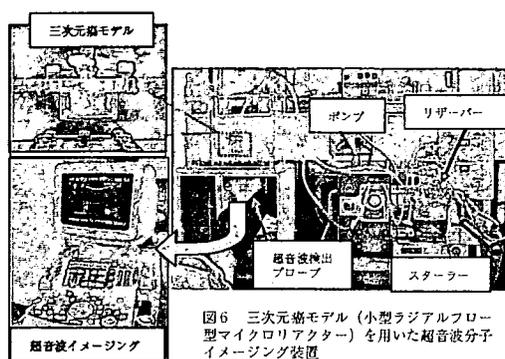
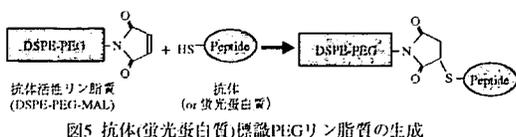
図4 多孔質ガラス膜を用いた微小気泡調製の模式図

II. 抗 CD147 抗体標識バブルの調製とその超音波分子イメージング

微小気泡に抗体を標識するために、図5の反応に従って、抗体活性リン脂質 (DSPE-PEG-MAL) に抗体を結合させた。気泡の分散安定性を向上させるためにリン脂質として Sodium dipalmitoylphosphatidylserin (DPPS) を用い、抗体標識 PEG リン脂質との混合微小気泡を調製した。

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癌モデル

(図6)を用いた。ハイドロキシアパタイトファイバーカラム内でヒト肝癌細胞 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癌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。



微小気泡の分散安定性の向上を試みた。なお、SF₆ は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。

本研究におい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ところ、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 分後の透明部においても明瞭な画像化に成功した (図7)。

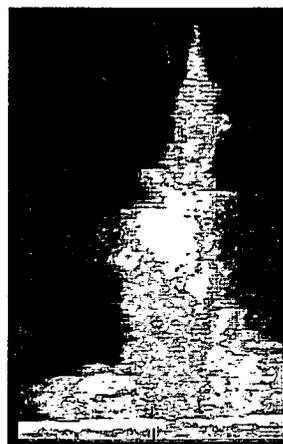


図7 シクロアミロース修飾界面活性剤を用いて調製した微小気泡の超音波診断画像

C. D. 研究結果、考察

I. 新規界面活性剤を用いた微小気泡の調製

(a) 超音波照射法

はじめに汎用の界面活性剤である sodium dodecyl sulfate (SDS, cmc: 8×10^{-3} mol/L) を用いて、超音波分散法による微小気泡調製の最適条件の検討を行った。内包ガスに窒素を、溶媒にイオン交換水を用いて調製したところ、調製直後から気泡は浮上して二層分離し、調製 2 分後には透明になった。また、超音波診断装置を用いた音響特性試験においても画像化できなかったことから、気泡の分散安定性が低いことが分かった。気泡の不安定要因として、(1)気泡の浮上、(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、内包ガスに難溶性の SF₆ を、溶媒の粘度を向上させるために 30%グリセリン水溶液をそれぞれ用いて、

また、光学顕微鏡観察からはマイクロメートルサイズの大きな気泡の存在は確認できず、フリーズフラクチャー(FF)法による透過型電子顕微鏡(TEM)観察において、直径約 200nm 程度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8)。

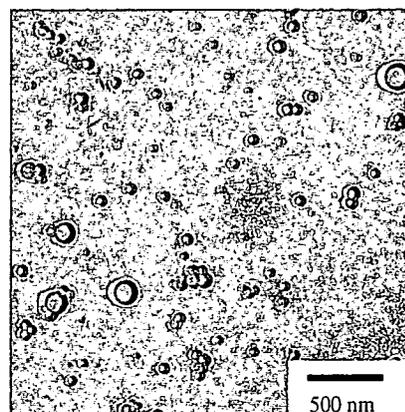


図8 シクロアミロース修飾界面活性剤を用いて調製した微小気泡のFF-TEM像

以上より、シクロアミロース修飾界面活性剤を

用いて、ナノバブル(直径 200nm 程度)を調製することができ、その超音波分子イメージングに成功した。

(b) 多孔質ガラス膜法

多孔質ガラス膜(SPG 膜)は単一の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発生を試みた。内包ガスには N_2 を用いた。

その結果、調製 1 分で溶液全体が白濁する程度の多量の微小気泡が調製できることが確認された。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が狭く、単分散であることが分かった (図 9)。

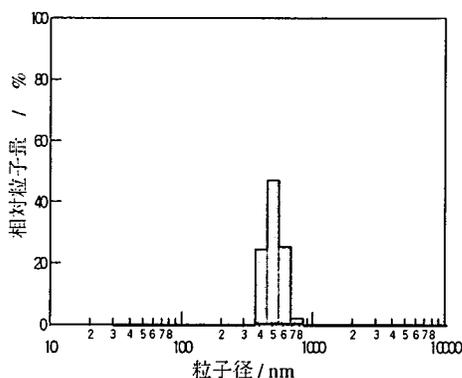


図 9 多孔質ガラス膜を用いて調製した微小気泡の粒子径分布 (重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤)

II. 抗 CD147 抗体標識バブルの調製とその超音波分子イメージング

はじめに、抗 CD147 抗体のモデル物質として蛍光蛋白質 Keima (Ex. 440nm, Em. 620nm) を用いて微小気泡に抗体が標識可能かどうかを検討した。

図 5 の反応により得られた 2.2×10^{-8} mol/L の DSPE-PEG-MAL-Keima を 1.2×10^{-5} mol/L の DPPS と混合させた後に、超音波照射法により

微小気泡の調製を行った。

図 10 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。

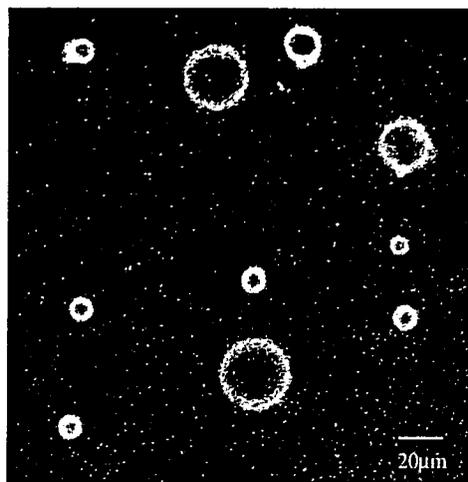


図 10 蛍光蛋白質 Keima 標識混合微小気泡の共焦点レーザー顕微鏡観察像

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、三次元肝癌細胞モデルを用いてヒト肝癌細胞 FLC-7 への集積性について検討した。

図 11 に循環開始 1 分後と 10 分後の超音波診断画像の結果を示す。循環直後では、アパタイトファイバーカラム外において、超音波により微小気泡が明瞭に画像化され、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 分後に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、カラム内をメディ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。超音波診断画像で得られた像が気泡に起因していることを確認するために、高音圧の超音波を照射した。気泡は高い音圧の超音波照射により崩壊する

ので、高音圧印加前後の超音波画像を比較することにより、微小気泡の有無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、印加後には観察されなかったことから、肝癌細胞内で観察された超音波診断像は微小気泡に起因することが分かった。以上の結果より、抗 CD147 抗体標識バブルが肝癌細胞 FLD-7 に選択的に集積することが分かった。

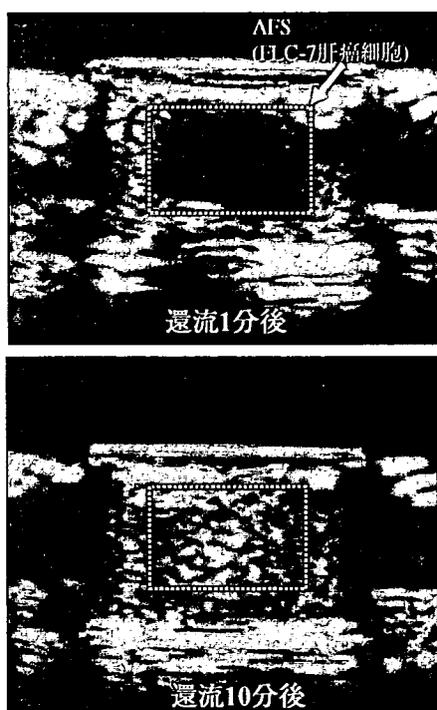


図1 1 三次元肝癌モデルを用いた抗CD-147抗体標識バブルの超音波分子イメージング

次に、市販の造影剤(Sonazoid)を用いて同様の実験を行った。図1 2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。

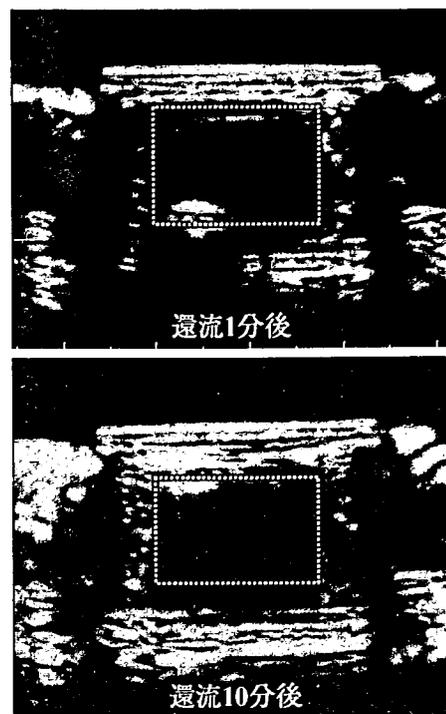


図1 2 三次元肝癌モデルを用いた市販の造影剤Sonazoidの超音波分子イメージング

E. 結論

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、数100 nmサイズの微小気泡(ナノバブル)を調製することができ、また、超音波診断装置により、ナノバブルを画像化することに成功した。

また、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。

現在、市販の超音波造影剤は、いずれも1 μ 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乏しいのが現状である。本研究で調製された微小気泡は、血中滞留性および腫瘍への集積性に優れ、悪性癌の早期診断に有用であると期待される。