

1. T Nakajima, M Yasunaga, Y kano, F Koizumi, K Kato, T Hamaguchi, Y Yamada, K Shirao, Y Shimada, Y Matsumura. Synergistic antitumor activity of the novel SN-38 incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. *Int J Cancer*. 122 : 2148-2153, 2008.
- ② R Suzuki, T Takizawa, Y Negishi, N Utoguchi, K Sawamura, K Tanaka, E Namai, Y Oda, Y Matsumura, K Maruyama. Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles. *Journal of controlled release*. 125: 137-144, 2008.
3. Y Saito, M Yasunaga, J Kuroda, Y Koga, Y Matsumura. Enhanced distribution of NK012 and prolonged sustained-release of SN-38 within tumors are the key strategic point for a hypovascular tumor. *Cancer Sci*, 99; 6, 1258-1264, 2008.
- ④ M Sumitomo, F Koizumi, T Asano, A Horiguchi, K Ito, T Asano, T Kakizoe, M Hayakawa, Y Matsumura. Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, strongly suppresses renal cancer progression. *Cancer Res*. 68(6):1631-1635, 2008.
5. Y Matsumura. Poly (amino acid) micelle nanocarriers in preclinical and clinical studies. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (eds. VHL Lee, MK Forrest, and GS Kwon) Elsevier B.V. V.60/8 pp. 899-914, 2008
- ⑥ K Sai, Y Saito, M Itoda, H Fukushima-Uesaka, T Nishimaki-Mogami, S Ozawa, K Maekawa, k Kurose, N Kaniwa, M Kawamoto, Naoyuki Kamatani, K Shirao, T Hamaguchi, N Yamamoto, H Kunitoh, Y Ohe, Y Yamada, T Tamura, T Yoshida, H Minimai, Y Matsumura, A Ohtsu, N Saijo, J Sawada. Genetic Variations and Haplotypes of ABCC2 encoding MRP2 in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet*. 23(2): 139-147, 2008.
- ⑦ Nakajima-Eguchi T, Yanagihara K, Takigahara M, Yasunaga M, Kato K, Hamaguchi T, Y Yamada, Y Shimada, K Mihara, T Ochiya, Y Matsumura. Antitumor effect of SN-38-releasing polymeric micelles, NK012, on spontaneous peritoneal metastases from orthotopic gastric cancer in mice compared with irinotecan. *Can Res*. 68(22):9318-9322, 2008.
8. J Kuroda, J Kuratsu, M Yasunaga, Y Koga, Y Matsumura. Potent antitumor effect of SN-38-incorporating polymeric micelle, NK012, against malignant glioma. *Int J Cancer*. (2008, in press)
9. Y Koga, M Yasunaga, Y Moriya, T Akasu, S Fujita, S Yamamoto, H Baba, Y Matsumura. Detection of the DNA point mutation of colorectal cancer cells isolated from feces stored under different conditions. *Jpn J Oncol*. (2008 in press)
10. Y Koga, M Yasunaga, S Katayose, Y Moriya, T Akasu, S Fujita, S Yamamoto, H Baba, Y Matsumura. Improved recovery of exfoliated colonocytes from feces using newly developed immuno-magnetic beads. *Gastroenterology Res Practice*. (2008 in press)
11. Y Koga, M Yasunaga, Y Moriya, T Akasu, S Fujita, S Yamamoto, T Kozu, H Baba, Y Matsumura. Detection of colorectal cancer cells from feces using quantitative real-time RT-PCR for colorectal cancer diagnosis. *Can Sci*. 99(10):1977-1983, 2008.
- ⑫ T Hamaguchi, K Kato, H Yasui, C Morizane, M Ikeda, H Ueno, K Muro, Y Yamada, T Okusaka, K Shirao, Y Shimada, H Nakahama Y Matsumura A Phase I and Pharmacokinetic Study of NK105, a Paclitaxel-incorporating Micellar Nanoparticle Formulation. *Brit J Cancer*. 2007 97:170-176,.
13. Y Matsumura. Preclinical and clinical studies of anticancer drug-incorporated polymeric micelles. *J Drug Targeting* 2007, 15(7-8) : 507-517.
14. T Nakajima, M Yasunaga, Y kano, F Koizumi, K Kato, T Hamaguchi, Y Yamada, K Shirao, Y Shimada, Y Matsumura. Synergistic antitumor activity of the novel SN-38 incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. *Int J Cancer*. 2007 (in press).
15. S Onouchi, H Matsushita Y Moriya, T Akasu, S Fujita, S Yamamoto, T Minowa, S Nomura, H Hasegawa, M Kitajima, Y Matsumura. New method for colorectal cancer diagnosis based on SSCP analysis of DNA from exfoliated colonocytes in naturally evacuated feces. *Anticancer Res*. 2007 (in press)
16. T Negishi, F Koizumi, H Uchino, J Kuroda, T Kawaguchi, S Naito, Y Matsumura. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, is a more potent radiosensitizing agent compared to free paclitaxel. *Brit J Cancer*. 2006, 95:601-606.
17. F Koizumi, M Kitagawa, T Negishi, T Onda, S Matsumoto, T Hamaguchi, Y Matsumura.

Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors. *Cancer Res.* 2006, 66:10048-10056..

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
平成 20 年度 分担研究報告書

ナノバブルと超音波を用いた転移性肝がんの
早期診断システムの開発

研究分担者	福本 学	東北大学加齢医学研究所・教授
研究分担者	森 士朗	東北大学病院・講師
研究分担者	小野栄夫	東北大学大学院医学系研究科・教授
研究分担者	松村保広	国立がんセンター東病院・部長
研究代表者	小玉哲也	東北大学大学院医工学研究科・教授

研究要旨：これまで我々はナノバブルを超音波造影剤として用いることにより、腫瘍微小新生血管を二次元および三次元画像として抽出し、この血管構築画像から悪性腫瘍の転移や局所再発を早期に診断する画像診断システムの開発を試みてきた。本研究においては、これまで我々が開発してきたナノバブルと超音波を用いた画像診断システムモデルの診断精度を我々が開発した肝転移マウスモデルを用いて検討した。

【実験方法】ルシフェラーゼタンパク発現腫瘍細胞 C26-luc (BALB/c マウス・大腸癌) EMT6-luc (同・乳癌) を同系マウスの、HT29-luc (ヒト・大腸癌) を SCID マウス (HT29-luc) の脾臓に接種し、実験的肝転移腫瘍をナノバブルと超音波を用いた画像診断システムで、腫瘍微小血管の二次元および三次元構築画像として、経過時的に捉えるとともに、*in vivo* 生体発光イメージングシステムを用いて腫瘍の増殖状態を確認した。【結果および考察】本研究で提唱したナノバブルと超音波を用いた画像診断システムを用いることにより、数 mm レベルの腫瘍の腫瘍微小新生血管の二次元および三次元画像の構築が可能であり、この腫瘍微小新生血管の構築画像のパターンを解析することにより、本診断システムが、これまでの CT、MRI、PET、あるいは従来の超音波画像診断等では診断が困難であった悪性腫瘍の微小肝転移の早期診断に有用である可能性が示唆された。

- A. 研究目的
肝臓は、門脈を介した、血行性転移
の好発臓器である。一般に、外科的に
切除可能な所属リンパ節以外の臓器

に転移巣を形成したがん患者の予後は不良であるが、肝臓の場合、機能の余力が大きく、境界が明瞭な転移巣は切除の可能性があり、原発巣が制御されている肝転移患者の治療成績の向上には、転移病巣の早期診断が不可欠である。肝転移の画像診断としては、現在、X線 CT や MRI、PET、あるいは超音波画像診断が有効な手段として常用されている。しかし、これらや通常の超音波画像診断法では微小転移巣は捉えられない場合が多いのが現状である。

これまで我々は、超音波イメージング装置(最高周波数 80MHz)を用いることにより、光学顕微鏡の空間分解能では認識不可能な 200nm 以下のバブルを、超音波散乱を利用することで捉えられることを見出した。さらに、ナノバブルを超音波造影剤として用いることにより、腫瘍新生血管を二次元および三次元構築画像として抽出することに成功した。

本研究においては、これまでの我々の研究成果に基づき、直径 1cm 以下の肝転移病巣の早期診断に応用可能で、しかも小規模の診療施設でも設置可能なナノバブルと超音波を用いた新しい画像診断システムの開発を我々が開発した肝転移マウスモデルを用いて検討した。

B. 研究方法

1. 肝転移マウスモデル

ルシフェラーゼタンパク発現腫瘍細胞(C26-luc; BALB/c 系マウス大腸癌

細胞、EMT6-luc; 乳癌細胞)を同系マウス、ヒト大腸癌細胞 (HT29-luc) を 10^5 個 SCID マウス(HT29-luc)の脾臓に接種し、接種後 2 日目で脾摘を行った。超音波を用いた画像診断システムで、腫瘍微小血管の二次元および三次元構築画像として、経過時的に捉えるとともに、*in vivo* 生体発光イメージングシステムを用いて腫瘍の増殖状態を確認した。また、上記腫瘍組織に関して、病理組織学的にも検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、各施設の動物倫理委員会の了承を得て実施する。

C. 研究結果および考察

1. 肝転移病巣の *in vivo* 生体発光イメージングシステムによる解析

接種した腫瘍細胞のうち、EMT6-luc 細胞を接種した脾臓におけるルシフェラーゼによる発光強度は、接種細胞数および接種後の時間依存性に増大した。EMT6-luc 細胞を用いた実験群において、肝転移病巣の形成が認められた。さらに、肝臓におけるルシフェラーゼによる発光は、脾臓への接種後 2 日で検出され、その発光強度は、脾臓の発光強度に依存して検出することができた。この結果より、脾臓に接種した EMT6-luc 細胞が、肝臓に転移し増殖したことが示唆された。

2. 肝転移病巣の病理組織学的検討

EMT6-luc 細胞を接種し腫瘍病巣を形成した脾臓、および転移病巣の形成

が示唆された肝組織を病理組織学的に検討した。その結果、脾臓および肝臓に、EMT6-luc 細胞に特徴的な腺癌を確認できた。

3. 肝転移病巣の高周波超音波イメージングシステムによる解析

上記に示した脾臓および肝臓における腫瘍細胞の増殖過程を高周波超音波イメージングシステムにより解析した。まず、EMT6-luc 細胞を脾臓に接種したマウスにおいて、接種後 2 日で、肝臓内にルシフェラーゼによる発光を検出できたが、この病巣をナノバブルを超音波造影剤として用い、高周波超音波イメージング装置にて血管構築し解析すると、腫瘍相当部において血管密度が増大していた。以上の結果より、腫瘍の増殖に伴って腫瘍新生血管の増生が促進されていると考えられた。

一方、肝臓の転移病巣についてナノバブルと超音波イメージング装置を用いて肝臓内の微小血管を三次元構築画像として解析してみると、肝臓内に占める血管の領域の経時的な増加が検出された(図 1)。この所見は、ルシフェラーゼ発光の検出からも転移によるものと考えられた。

さらに、以上の解析結果を基に、脾臓と肝臓における血管密度と体積の変化を検討すると、いずれの臓器においても腫瘍細胞の増殖に伴い、血管密度が増大することが示唆され、この血管密度の変化は転移後かなり早期の時点で検出することができた。

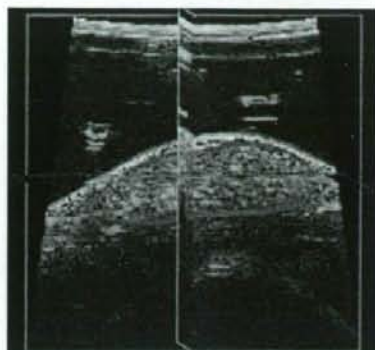


図 1. ナノバブルと超音波を用いた肝腫瘍内部の血管構造。

D. 結論

1. EMT6-luc 細胞を BALB/c 系マウスの脾臓に接種した実験群において、接種後 2 日目で、肝転移病巣の形成が認められた。また、EMT6-luc 細胞を接種した脾臓におけるルシフェラーゼによる発光強度は、接種細胞数および接種後の時間依存性に増大した。
2. 上記肝転移モデルは、再現性に優れた転移病巣を形成することが可能であり、この肝転移モデルは、臨床試験導入用肝転移モデルとして有用であることが明らかとなった。
3. ナノバブルと超音波イメージング装置を用いることにより、通常の超音波画像では判別できない微小転移病巣での血管の密度や形状の変化、あるいは壊死病巣の存在等を定性的かつ定量的に捉えることが可能であり、この血管構築

画像や壊死病巣の形成の特徴から
転移病巣を早期に診断することが
できる可能性が示唆された。

G. 研究発表
別紙参照

F. 健康危険情報
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohtake Y., Maruko A., Ohishi N., Fukumoto M, Ohkubo Y	Effect of aging on EGF-induced proliferative response in primary cultured periportal and perivenous hepatocytes.	J Hepatol,	48(2):	246-54	2008.
Umemura A, Itoh Y, Itoh K, Yamaguchi K, Nakajima T, Higashitsuji H, Onoue H, Fukumoto M, Okanoue, Fujita J:	Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and IGFBP-5 expression in human hepatocellular carcinoma.	Hepatol	47(2):	493-502,	2008.
Roudkenar MH, Li L, Baba T, Kuwahara Y, Nakagawa H, Wang L, Kasaoka S, Ohkubo Y, Ono K, Fukumoto M:	Gene expression profiles in mouse liver cells after exposure to different types of radiation.	J Radiat Res	49(1)	29-40	2008.
Takeyama J, Sasano H, Fukumoto M:	Giant chordoma occupying the whole abdominal cavity.	Pathology	40(3):	313-314	2008.

Li L, Shoji W, Ohshima H, Obinata M, Fukumoto M, Kanno N	Crucial role of peroxiredoxin III in placental antioxidant defense of mice.	FEBS Lett	582(16)	2431-2434	2008
Ishibashi M, Nakayama K, Yeasmin S, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Fukumoto M, Miyazaki K	A BTB/POZ gene, NAC-1, a tumor recurrence-associated gene, as a potential target for Taxol resistance in ovarian cancer.	Clin Cancer Res	14(10)	3149-3155	2008
Nakayama N, Nakayama K, Yeasmin S, Ishibashi M, Katagiri A, Iida K, Fukumoto M, Miyazaki K.	KRAS or BRAF mutation status is a useful predictor of sensitivity to MEK inhibition in ovarian cancer	Br J Cancer	99(12)	2020-2028	2008
Huan Z, Nakayama K, Nakayama N, Ishibashi M, Yeasmin S, Katagiri A, Purwana IN, Iida K, Maruyama R, Fukumoto M, Miyazaki K:	Genetic classification of ovarian carcinoma based on microsatellite analysis: relationship to clinicopathological features and patient survival.	Oncol Rep	19(3)	775-781	2008
Miyashita H, Mori S, Fukumoto Y, Sato A, Fukumoto M, Kawamura H:	Loss of heterozygosity of the PTH/PTHrP type 1 receptor in oral squamous cell carcinoma.	Mol Med Report	1	821-825	2008

Roudkenar MH, Halabian R, Ghasemipour Z, Roushandeh AM, Rouhbakhsh M, Nekogoftar M, Kuwahara Y, Fukumoto M, Shokrgozar MA.	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin acts as a protective factor against H ₂ O ₂ toxicity.	Arch Med Res	39(6)	560-566	2008
Ohtake Y, Maruko A, Kuwahara Y, Fukumoto M, Ohkubo Y.	Stabilities of ⁶⁷ Ga- and ¹¹¹ In-labeled transferrin in vitro.	Protein Pept Lett	16(2)	138-42,	2009
Nariyama N, Ohhigashi T, Umetani K, Shinohara K, Tanaka H, Maruhashi A, Kashino G, Kurihara A, Kondo T, Fukumoto M:	Spectromicroscopic film dosimetry for high-energy microbeam from synchrotron radiation.	Appl Rad Isot	67(1)	155-9.	2009
Kuwahara Y, Li L, Baba T, Nakagawa H, Shimura T, Yamamoto Y, Ohkubo Y, Fukumoto M.	Clinically relevant radioresistant cells efficiently repair DNA double-strand breaks induced by X-rays.	Cancer Sci. 2009 [Epub ahead of print]			
Ohtake Y, Maruko A, Kuwahara Y, Fukumoto M, Ohkubo Y.	Stabilities of ⁶⁷ Ga- and ¹¹¹ In-labeled transferrin in vitro.	Protein Pept Lett.	16(2)	138-42,	2009

Kashino G, Kondoh T, Nariyama N, Umetani K, Ohigashi T, Shinohara K, Kurihara A, Fukumoto M, Tanaka H, Maruhashi A, Suzuki M, Kinashi Y, Yong L, Masunaga S, Watanabe M, Ono K	Inductions of DNA double strand breaks and cellular migrations through the bystander effects in the cells irradiated with slit type microplanar beam of the SPring-8 synchrotron.	Int J Radiat Oncol Biol Physic			2009
--	---	-----------------------------------	--	--	------

国際会議での発表

発表者氏名	論文タイトル名	学会・研究会名	巻号	ページ	開催日	開催地
Horie S, Watanabe Y, Hen R, Tomita N, Oosawa F, Fujisawa S, Ono M, Fukumoto M , Mori S, Matsumura Y, Kodama T.	Bladder cancer therapy using nanobubbles and two different intensities of ultrasound.	The 2008 Nanomedicine Conference.	Program	p5.	19-24 September 2008.	Hotel Eden Roc, Sant Feliu de Guixols, Spain.
Chen R, Chiba M, Watanabe Y, Horie S, Tomita N, Fukumoto M , Nori S, Kodama T.	Local gene delivery system of nano/microbubbles-enhanced ultrasound aimed for treatment of gingival tumor.	2008 International Conference on Frontiers of Dental and Craniofacial Research.	Program pp	96-97.	November 1-3, 2008.	Beijing International Convention Center (BICC), Beijing, China,

Tomita N, Horie S, Oosawa F, Rui C, Watanabe Y, Morikawa H, Ohki K, Fukumoto M , Mori S, Kodama T.	Development of diagnostic imaging system for regional lymph node micrometastasis with high-frequency ultrasound.	2008 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS).	Abstract Book	p388.	November 2-5, 2008.	Beijing International Convention Center (BICC), Beijing, China.
Chen R, Tomita N, Baba T, Oosawa F, Watanabe Y, Horie S, Mori S, Fukumoto M , Kodama T.	Contrast-Enhanced High-Frequency Ultrasound Imaging of Liver Metastases in preclinical models.	2008 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS).	Abstract Book	p391.	November 2-5, 2008.	Beijing International Convention Center (BICC), Beijing, China.

国内会議での発表

発表者氏名	論文タイトル名	学会・研究会名	巻号	ページ	開催日	開催地
陳鋭, 千葉美麗, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 林治秀, 福本学, 森士朗, 小玉哲也.	歯周組織への遺伝子導入を目指した新しい非ウイルス法の開発.	日本実験力学会 2008年度年次講演会	講演論文集	52-53頁.	2008年 6月30日-7月2日	北海道 大学学術交流会館
富田典子, 堀江佐知子, 大澤ふき, 李麗, 渡辺夕紀子, 陳鋭, 大木宏介, 森川秀広, 福本学, 森士朗, 小玉哲也.	高周波超音波を利用した腫瘍性リンパ節内血管構築による早期診断法の開発.	東北大学 イノベーション フェア 2008 in 仙台			2008年 9月30日	仙台国 際セン ター
堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 陳鋭, 富田典子, 大澤ふき, 小野栄夫, 藤澤優, 森士朗, 福本学, 松村保広, 小玉哲也	膀胱がん治療のための分子デリバリーシステムの開発.	東北大学 イノベーション フェア 2008 in 仙台.			2008年 9月30日	仙台国 際セン ター.
陳鋭, 富田典子, 馬場泰輔, 大澤ふき, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 森士朗, 福本学, 小玉哲也.	ナノバブルを用いた肝転移診断に関する三次元高周波超音波イメージング.	第 67 回日 本 癌 学 会 学 術 総 会.	Proceedin gs	p313.	2008年 10月28日~30日	名古屋 国際会 議場.
堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 陳鋭, 富田典子, 大澤ふき, 小野栄夫, 福本学, 藤澤優, 松村保広, 森士朗, 小玉哲也.	膀胱がん治療のための新しい薬剤到達法の開発.	第 67 回日 本 癌 学 会 学 術 総 会.	Proceedin gs	p315.	2008年 10月28日~30日	名古屋 国際会 議場.
渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 陳鋭, 大澤ふき, 船木善仁, 菊池洋平, 山崎浩道, 石井慶造, 小野栄夫, 福本学, 森士朗, 小玉哲也.	癌疼痛緩和およびPETによるイメージング.	第 67 回日 本 癌 学 会 学 術 総 会.	Proceedin gs	p388.	2008年 10月28日~30日	名古屋 国際会 議場.

富田典子, 堀江佐知子, 大澤ふき, 陳銳, 渡邊夕紀子, 森川秀広, 大木宏介, 福本学, 森士朗, 小玉哲也.	高周波超音波を利用した新しいリンパ節内微小転移診断システムの開発.	第 67 回日本癌学会学術総会.	Proceedings	p495.	2008 年 10 月 28 日 ~ 30 日	名古屋国際会議場
堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 陳銳, 富田典子, 大澤ふき, 小野栄夫, 福本学, 藤澤優, 松村保広, 森士朗, 小玉哲也.	ナノバブルと超音波を用いた膀胱がんへの遺伝子導入法の開発.	第 46 回日本癌治療学会総会.	日本癌治療学会誌第 43 巻第 1 回	113 頁.	2008 年 10 月 30 日-11 月 1 日	名古屋国際会議場

1. Ohtake Y., Maruko A., Ohishi N., Fukumoto M, Ohkubo Y: Effect of aging on EGF-induced proliferative response in primary cultured periportal and perivenous hepatocytes. *J Hepatol* 48(2):246-54, 2008.
2. Umemura A, Itoh Y, Itoh K, Yamaguchi K, Nakajima T, Higashitsuji H, Onoue H, Fukumoto M, Okanoue, Fujita J: Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and IGFBP-5 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol* 47(2):493-502, 2008.
3. Roudkenar MH, Li L, Baba T, Kuwahara Y, Nakagawa H, Wang L, Kasaoka S, Ohkubo Y, Ono K, Fukumoto M: Gene expression profiles in mouse liver cells after exposure to different types of radiation. *J Radiat Res* 49(1):29-40, 2008.
4. Takeyama J, Sasano H, Fukumoto M: Giant chordoma occupying the whole abdominal cavity. *Pathology* 40(3):313-4, 2008.
5. Li L, Shoji W, Ohshima H, Obinata M, Fukumoto M, Kanno N: Crucial role of peroxiredoxin III in placental antioxidant defense of mice. *FEBS Lett* 582(16):2431-4, 2008.
6. Ishibashi M, Nakayama K, Yeasmin S, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Fukumoto M, Miyazaki K: A BTB/POZ gene, NAC-1, a tumor recurrence-associated gene, as a potential target for Taxol resistance in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 14(10):3149-55, 2008.
7. Nakayama N, Nakayama K, Yeasmin S, Ishibashi M, Katagiri A, Iida K, Fukumoto M, Miyazaki K. KRAS or BRAF mutation status is a useful predictor of sensitivity to MEK inhibition in ovarian cancer. *Br J Cancer* 99(12):2020-8, 2008.
8. Huan Z, Nakayama K, Nakayama N, Ishibashi M, Yeasmin S, Katagiri A, Purwana IN, Iida K, Maruyama R, Fukumoto M, Miyazaki K: Genetic classification of ovarian carcinoma based on microsatellite analysis: relationship to clinicopathological features and patient survival. *Oncol Rep* 19(3):775-81, 2008.
9. Miyashita H, Mori S, Fukumoto Y, Sato A, Fukumoto M, Kawamura H: Loss of heterozygosity of the PTH/PTHrP type 1 receptor in oral squamous cell carcinoma. *Mol Med Report* 1:821-5, 2008.
10. Baba T, Nishimura M, Kuwahara Y, Ueda N, Naitoh S, Kume M, Yamamoto Y, Fujita J, Funae Y, Fukumoto M: Analysis of gene and protein expression of cytochrome P450 and stress-associated molecules in rat liver after spaceflight. *Pathol Int* 58(9):589-95, 2008.
11. Roudkenar MH, Halabian R, Ghasemipour Z, Roushandeh AM, Rouhbakhsh M, Nekogoftar M, Kuwahara Y, Fukumoto M, Shokrgozar MA. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin acts as a protective factor against H₂O₂ toxicity. *Arch Med Res* 39(6):560-6, 2008.

12. Nariyama N, Ohhigashi T, Umetani K, Shinohara K, Tanaka H, Maruhashi A, Kashino G, Kurihara A, Kondo T, Fukumoto M: Spectromicroscopic film dosimetry for high-energy microbeam from synchrotron radiation. *Appl Rad Isot* 67(1):155-9. 2009.
13. Ohtake Y, Maruko A, Kuwahara Y, Fukumoto M, Ohkubo Y. Stabilities of ⁶⁷Ga- and ¹¹¹In-labeled transferrin in vitro. *Protein Pept Lett* 16(2):138-42, 2009.
14. Kuwahara Y, Li L, Baba T, Nakagawa H, Shimura T, Yamamoto Y, Ohkubo Y, Fukumoto M. Clinically relevant radioresistant cells efficiently repair DNA double-strand breaks induced by X-rays. *Cancer Sci*. 2009 [Epub ahead of print]
15. Ohtake Y, Maruko A, Kuwahara Y, Fukumoto M, Ohkubo Y. Stabilities of ⁶⁷Ga- and ¹¹¹In-labeled transferrin in vitro. *Protein Pept Lett*. 16(2):138-42, 2009.
16. Kashino G, Kondoh T, Nariyama N, Umetani K, Ohigashi T, Shinohara K, Kurihara A, Fukumoto M, Tanaka H, Maruhashi A, Suzuki M, Kinashi Y, Yong L, Masunaga S, Watanabe M, Ono K: Inductions of DNA double strand breaks and cellular migrations through the bystander effects in the cells irradiated with slit type microplanar beam of the SPring-8 synchrotron. *Int J Radiat Oncol Biol Physic*, 2009.

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
平成 20 年度 分担研究報告書

高周波超音波イメージングシステムを用いた
リンパ節転移画像診断システムの開発

研究分担者	森 士朗	東北大学病院・講師
研究分担者	小野栄夫	東北大学大学院医学系研究科・教授
研究分担者	松村保広	国立がんセンター東病院・部長
研究代表者	小玉哲也	東北大学大学院医工学研究科・教授

研究要旨：これまで我々はナノバブルを超音波造影剤として用いることにより、腫瘍微小新生血管を二次元および三次元画像として抽出し、この血管構築画像から悪性腫瘍の所属リンパ節転移や局所再発を早期に診断する画像診断システムの開発を試みてきた。本研究においては、これまで我々が開発してきたナノバブルと超音波を用いた画像診断システムモデルの診断精度を我々が開発したリンパ節転移マウスモデルを用いて検討した。【実験方法】ルシフェラーゼタンパク発現腫瘍をマウス鼠径リンパ節に接種し、この実験腫瘍の腋窩リンパ節への転移腫瘍をナノバブルと超音波を用いた画像診断システムで、腫瘍微小血管の二次元および三次元構築画像として、経過時的に捉えるとともに、*in vivo* 生体発光イメージングシステムを用いて腫瘍の増殖状態を確認した。さらに上記画像診断システムによる腫瘍増殖の解析結果とナノバブルと超音波を用いた画像診断システムによる画像解析結果とを比較検討した。【結果および考察】本研究で提唱したナノバブルと超音波を用いた画像診断システムを用いることにより、数 mm レベルの腫瘍の腫瘍微小新生小血管の二次元および三次元画像の構築が可能であり、この腫瘍微小新生血管の構築画像のパターンを解析することにより、本診断システムが、これまでの CT、MRI、あるいは PET 等では診断が困難であった悪性腫瘍の微小リンパ節転移の早期診断に有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

悪性腫瘍の治療成績の向上には、所属リンパ節転移の早期診断が不可欠

である。所属リンパ節転移の画像診断としては、現在、X線 CT や MRI あるいは PET が有効な手段として常用さ

れている。しかし、微小な所属リンパ節転移あるいは直径 1cm 以下の転移リンパ節の診断に関しては、X線 CT や MRI あるいは PET 等の画像診断では捉えられない場合が多く、結局のところ切除組織標本の病理組織学的診断に委ねざるを得ないのが現状である。

一方、急速に進行する少子高齢者社会において、悪性腫瘍の患者に占める高齢者の数が増加し、さらに、これらの患者をケアする家族の負担も増大している。このような状況において、CT、MRI、あるいは PET 等の大型画像診断装置が設置されている中核病院への通院が困難である高齢者の症例をしばしば経験する。この問題の解決策の一つとして、小規模の診療施設でも設置可能な超音波画像診断装置による診断が考えられるが、現在の医療用超音波診断装置の診断精度は、直径 1cm 以下の転移リンパ節の診断が困難である CT や MRI にも及ばないのが現状である。

これまで我々は、超音波イメージング装置（最高周波数 80MHz）を用いることにより、光学顕微鏡の空間分解能では認識不可能な 200nm 以下のバブルを、超音波散乱を利用することで捉えられることを見出した。さらに、ナノバブルを超音波造影剤として用いることにより、腫瘍新生血管を二次元および三次元構築画像として抽出することに成功した。

本研究においては、これまでの我々の研究成果に基づき、直径 1cm 以下の

転移リンパ節の早期診断に応用可能で、しかも小規模の診療施設でも設置可能なナノバブルと超音波を用いた新しい画像診断システムの開発を我々が開発したリンパ節転移マウスモデルを用いて検討した。

B. 研究方法

所属リンパ節転移モデル

ヒトのリンパ節と同等の大きさのリンパ節腫脹を来たす MRL/MpJ-*lpr/lpr* (MRL/lpr) マウスの鼠径リンパ節に、我々が樹立したルシフェラーゼ発現転移性腫瘍細胞株である MRL-KM-luc 細胞 (1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 cells / site) を接種、腋窩リンパ節における転移病巣を以下に示すように検討した。

2. 音響性ナノバブルの作製

平成 19 年度に開発した作製法に従い、内部にパーフルオロプロパンガスを封入した音響性ナノバブルを作製した。

転移病巣の病理組織学的解析

腋窩リンパ節に転移病巣を形成した MRL/lpr マウスをジエチルエーテル麻酔を用いて屠殺、腋窩リンパ節を摘出し、ホルマリン固定後、通法に従い病理組織切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い病理組織学的に検討した。

転移病巣の画像解析

腋窩リンパ節への転移腫瘍をナノバ

ブルと超音波を用いた画像診断システムで、腫瘍微小血管の二次元および三次元構築画像として、経過的に捉えるとともに、*in vivo* 生体発光イメージングシステムを用いて腫瘍の増殖状態を確認した。さらに上記画像診断システムによる腫瘍増殖の解析結果とナノバブルと超音波を用いた画像診断システムによる画像解析結果とを比較検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、各施設の動物倫理委員会の了承を得て実施する。

C. 研究結果および考察

1. 腋窩リンパ節における転移病巣の *in vivo* 生体発光イメージングシステムによる解析

MRL-KM-luc 細胞を接種した鼠径リンパ節におけるルシフェラーゼによる発光強度は、接種細胞数および接種後の時間依存性に増大し、さらに、図1に示すように鼠径リンパ節の発光強度に依存して、腋窩リンパ節にルシフェラーゼ活性を検出することができた。この結果より、鼠径リンパ節に摂取した MRL-KM-luc 細胞が、腋窩リンパ節に転移し増殖したことが示唆された。

2. 腋窩リンパ節における転移病巣の病理組織学的検討

MRL-KM-luc 細胞を接種し腫瘍病巣を形成した鼠径リンパ節、および転移病巣の形成が示唆された腋窩リンパ節

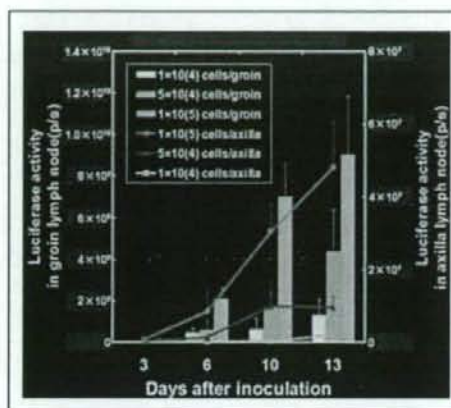


図 1.鼠径リンパ節と腋窩リンパ節における発光相関性

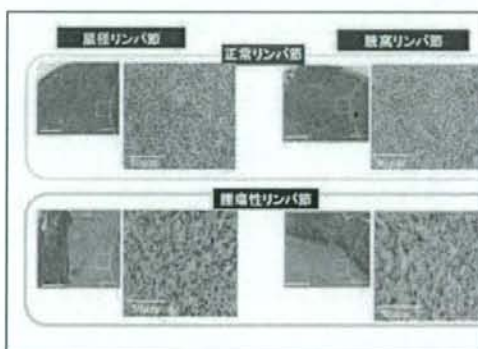


図 2. 鼠径リンパ節および腋窩リンパ節での MRL-KM-luc 細胞の病理組織像

を病理組織学的に検討した。その結果、図2に示すように、鼠径リンパ節および腋窩リンパ節に、MRL-KM-luc 細胞に特徴的な病理組織像を確認できた。

3. 腋窩リンパ節における転移病巣の高周波超音波イメージングシステム

による解析

上記に示した鼠径リンパ節および腋窩リンパ節における腫瘍細胞の増殖過程を高周波超音波イメージングシステムにより解析した。まず、MRL-KM-luc 細胞を接種した鼠径リンパ節において、ルシフェラーゼ活性が強くなった接種後 10 日で、リンパ節内に腫瘍組織に特徴的な低エコー領域が観察された。この領域は腫瘍組織の増大とともに拡大していた。この病巣をナノバブルを超音波造影剤として用い、高周波超音波イメージング装置にて血管構築し解析すると、腫瘍相当部において血管密度が増大していた。さらに、リンパ節全体における血管の占める割合も増大していた。以上の結果より、腫瘍の増殖に伴って腫瘍新生血管の増生が促進されていると考えられる。

MRL-KM-luc 細胞を接種した 13 日目の鼠径リンパ節においては、ルシフェラーゼ活性が低下しており、超音波画像上で低エコー領域が認められた。この所見は、リンパ節内に形成された腫瘍病巣か、腫瘍形成に伴う壊死組織の形成を示唆するものであるが、ナノバブルと超音波イメージング装置を用いて、三次元血管構築画像で解析すると、超音波画像上で認められた低エコー領域の内部には血管構造は認められず、その周囲においては血管密度が増大していたことから、同病変が腫瘍形成に伴う壊死組織の形成であることが明瞭に判別できた (図 3)。

一方、腋窩リンパ節の転移病巣につ

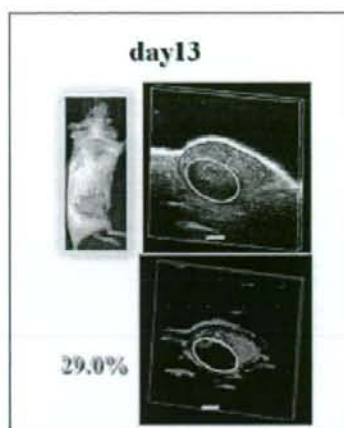


図 3. ナノバブルと超音波イメージング装置を用いた三次元血管構築画像. 壊死組織の形成を確認

いて解析してみると、超音波画像では、今回の実験期間内において、はっきりとした腫瘍形成は確認できなかったが、ナノバブルと超音波イメージング装置を用いてリンパ節内の微小血管を三次元構築画像として解析してみると、リンパ節内に占める血管の領域の経時的な増加が検出された。この所見は、ルシフェラーゼ発光の検出からも転移によるものと考えられた。

次に、転移リンパ節の三次元画像からある一定位置で二次元断面画像を抽出し、血管の形状を経時的に比較した。その結果、MRL-KM-luc 細胞接種後、10 日目になるとリンパ節内の一部の領域で血管が密集しており、この密集領域が 13 日目にはさらに増加していることが明らかになった。この画像の変化は、腫瘍細胞の増殖によるものと思われるが、ナノバブルと超音波イメージング装置を用いることにより、

通常の超音波画像では判別できない病変を検出できる可能性が示唆された。

さらに、以上の解析結果を基に、鼠径リンパ節と腋窩リンパ節における血管密度と体積の変化を検討すると、いずれのリンパ節においても腫瘍細胞の増殖に伴い、血管密度が増大することが示唆された。

D. 結論

1. ヒトのリンパ節と同等の大きさのリンパ節腫脹を来たす MRL/lpr マウスの鼠径リンパ節に、我々が樹立したルシフェラーゼ発現転移性腫瘍細胞株である MRL-KM-luc 細胞を接種することにより、腋窩リンパ節に再現性に優れた転移病巣を形成することが可能であり、このリンパ節転移モデルは、臨床試験導入用リンパ節転移モデルとして有用であることが明らかとなった。

2. ナノパブルと超音波イメージ

ング装置を用いることにより、通常の超音波画像では判別できない正常リンパ節と腫瘍性リンパ節内での血管の密度や形状の変化、あるいは壊死病巣の存在等を定性的かつ定量的に捉えることが可能であり、この血管構築画像や壊死病巣の形成の特徴から転移病巣を早期に診断することができ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
別紙参照

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Watanabe Y, Aoi A, Horie S, Tomita N, Mori S, Morikawa H, Matsumura Y, Vassaux G, Kodama T.	Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin.	Cancer Science.	99(12)	2525-253 1	2008