

2009/2010A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

ナノバブルと超音波を用いた  
高周波超音波三次元画像診断・分子導入システムの開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小玉 哲也

平成22 (2010) 年 4月

# 目 次

I. 総括研究報告	
ナノバブルと超音波を用いた高周波超音波三次元 画像診断・分子デリバリーシステムの開発に 関する研究 -----	1
小玉 哲也	
II. 分担研究報告	
1. ナノバブルと超音波を用いた高周波超音波三次元 画像診断・分子導入システムの開発に関する研究 -----	10
小野 栄夫	
2. 臨床試験の実施と臨床評価に関する研究 -----	12
志賀 清人	
3. ナノバブルと高周波超音波診断装置を用いた 腫瘍血管構築画像の免疫病理組織学的観点 からの検証 -----	14
森 士朗	
4. 阻害剤の細胞膜への導入に関する 分子動力学シミュレーション -----	22
藤川 重雄	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	24
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	30

# 總 括 研 究 報 告

ナノバブルと超音波を用いた高周波超音波三次元画像診断・分子導入システムの開発  
に関する研究

主任研究者 小玉哲也 東北大学大学院医工学研究科 教授

研究要旨

がんの進展と腫瘍新生血管の体積変化との関連性、および衝撃波の脂質二重膜通過にともなう膜の構造変形を調べることを目的としている。マウスリンパ節転移モデルから、ナノバブルと高周波超音波を使用して得られた腫瘍新生血管の三次元的体積変化が、がんの早期診断の重要な因子になることが示めされた。臨床試験結果においてもこの因子の重要性が示唆された。衝撃波を分子動力学法で計算し、衝撃波通過後に、ナノ秒の時間スケールで膜を貫く水孔が自発的に形成されることが明らかになった。

東北大学大学院医学系研究科

小野栄夫・教授

東北大学病院

志賀清人・講師

東北大学病院

森士朗・講師

北海道大学大学院工学研究科

藤川重雄・教授

A. 研究目的

本研究は以下の課題に関する研究のために実施されたものである。

- (1) マウスリンパ節転移モデルを用いて、ナノバブルと高周波超音波でリンパ節内の血管構造を三次元的に抽出し、血管密度を経時的に調べる。
- (2) 頭頸部リンパ節転移の画像診断に関する臨床試験を実施し、血管内の流れと血管構造の変化を明らかにする。
- (3) シスプラチンの固形腫瘍内投与にともなう血管像の変化を三次元血管抽出法で評価する。
- (4) 薬剤導入にともなう治療効果の改善を目的に、治療性遺伝子を組込んだ長期発現性プラスミドDNAを開発する。
- (5) 衝撃波の作用にともなう脂質二重膜の構造変化を分子動力学法で調べる。

B. 研究方法

- (1) 本研究室が開発したリンパ節転移モデル(16-20週齢)を使用し、腋窩リンパ節内を流れるナノバブル(直径200nm)を高周波超音波(80MHz)で三次元的に抽出し、この血管体積を調べる。超音波画像の病理解析はCD31, CD34, HE, Luc染色で評価する。
- (2) 臨床試験での頭頸部腫瘍の血管造影では、市販の超音波造影剤ソナゾイドと超音波診断装置(12MHz)を使用して血管像を解析する。
- (3) マウス固形腫瘍を作製し、ナノバブルと高周波超音波を用いて、シスプラチン腫瘍内投与後の血管抽出像をコントロール群と比較する。

(4) 治療性遺伝子として腫瘍壊死因子

TNF- $\alpha$ を組込んだ長期発現ベクターを開発する。

(5) 細胞膜の基本構造である脂質二重層膜を、脂質分子(DPPC)と水分子を用いて分子動力学法でコンピュータ上に作成し、この膜に衝撃波を作用させて膜の構造変化を調べる。

C. 研究結果と考察

- (1) 腋窩リンパ節内を流れるナノバブル(直径200nm)を高周波超音波(80MHz)で三次元的に抽出し、経時的な血管密度、血管体積を調べた。転移診断の判定に血管体積の指標が有効であることを明らかにした。病理観察から転移の増殖は血管体積の増加に相関することが示された。
- (2) 頭頸部腫瘍の血管造影観察は、マウス転移モデルで観察された画像と類似していた。このことからマウス転移血管像で得られた手法や知見は臨床試験の画像解析に十分に応用可能であることが示された。
- (3) 腫瘍内部と周辺部ではシスプラチンによる血管縮退効果に差があることが、三次元血管構築法で明らかにされた。この結果は病理解析と一致した。
- (4) TNF- $\alpha$ を組込んだ長期発現性プラスミドDNAを開発した。TNF- $\alpha$ プラスミドDNAの単独導入においても抗腫瘍効果が得られたことから、長期発現ベクターの導入によって、治療効果がさらに改善されるものと期待される。
- (5) 衝撃波による膜構造の変化は、急激な崩壊と穏やかな回復の二つの段階に分かれることがわかった。この結果に基づき、脂質膜の疎水領域に水分子を挿入した状態を初期条件として平衡分子動力学的計算をおこなった。膜疎水領域への水分子の導入により、3ナノ秒内に水孔が自発的に形成され、その水孔の形成率とサイズは導入する水分子の数の増加とともに増加することが示された。

#### D. 結論

(1) マウス転移モデル実験から、関心部位の血管体積を評価することで転移の有無を判断できることが示唆された。この結果は臨床解析に反映されることを意味している。

(2) 本血管構築法は、抗腫瘍分子投与で得られる血管縮退を定量的に捉えることが可能であり、抗腫瘍効果の判定法に有効である。

(3) 衝撃波通過後に、ナノ秒の時間スケールで膜を貫く水孔が自発的に形成され、その水孔の形成率とサイズは挿入する水分子の数の増加とともに増加することが分子動力学法で示された。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Kodama T; Tomita N; Horie S; Sax N; Iwasaki H; Suzuki R; Maruyama K; Mori S; Fukumoto M. Morphological study on acoustic liposome using transmission electron microscopy. Journal of Electron Microscopy (Epub Date 2009/11/13).

(2) Kodama T, Tomita Y, Watanabe Y, Koshiyama K, Yano T, Fujikawa S. Cavitation bubbles mediated molecular delivery during sonoporation. Journal of Biomechanical Science and Engineering. 2009; 4: 124-140.

(3) R. Imai, H. Nakagawa, T. Kanagawa, M. Watanabe, S. Fujikawa, Acoustic Characteristics of Ultrasound in Water Containing Lipid Microbubbles, Proc. of 7th World Conf. on Exp. Heat Transf., Fluid Dynamics and Thermodynamics, Poland, (2009-7), pp.223-228.  
他25編.

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
Kodama T, Tomita N, Horie S, Sax N, Iwasaki H, Suzuki R, Maruyama K, Mori S, Fukumoto M.	Morphological study on acoustic liposome using transmission electron microscopy	Journal of Electron Microscopy			2009
Kodama T, Tomita Y, Watanabe Y, Koshiyama K, Yano T, Fujikawa S.	Cavitation bubbles mediated molecular delivery during sonoporation	Journal of Biomechanical Science and Engineering	4	124-140	2009
Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, Namai E, Taira Y, Okada N, Kadowaki N, Kodama T, Tachibana K, Maruyama K.	A novel strategy utilizing ultrasound for antigen delivery in dendritic cell-based cancer immunotherapy	Journal of Controlled Release	133	198-205	2009
Watanabe Y, Sachiko Horie, Funaki Y, Kikuchi Y, Yamazaki H, Ishii K, Mori S, Vassaux G, Kodama T.	Delivery of Na/I symporter gene into skeletal muscle by using nanobubbles and ultrasound: Visualization of gene expression by positron emission tomography	Journal of Nuclear Medicine			2010 in press
柳下陽子, 小玉哲也.	音響性リポソームと超 音波を利用した遺伝子 薬物デリバリー	血管医学	10-4	91-98	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
Tetsuya Kodama	Molecular delivery system by using nanobubbles and ultrasound	International Symposium on HIV/AIDS, Medicinal Plants and Geophagia, Advancing the frontiers of Research on HIV/AIDS, Medicinal Plants and Geophagia			2009. 7.22- 24	Walter Sisulu University Health Resource Centre Mthatha, Eastern Cape, South Africa
Tomita Y, Inaba T, Uchikoshi R, Kodama T.	Microbubble Disruption by Ultrasound and Induced Cavitation Phenomena	The 7th International Symposium on Cavitation			2009. 8.17-22	Ann Arbor, Michigan, USA
Li L, Horie S, Chen R, Watanabe Y, Sakamoto M, Mori S, Takahashi S, Kodama T.	Three-dimensional high-frequency ultrasound imaging for early diagnosis of lymph node metastasis combined with microbubbles	The 3rd East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering			2009. 12.21-22	Engineering Auditorium, National University Of Singapore, Singapore
Li L, Chen R, Horie S, Watanabe Y, Baba T, Sax N, Sakamoto M, Mori S, Takahashi S, Kodama T.	Ultrasound molecular imaging of lymph node metastasis with nano/microbubbles	International Symposium of AIDS and Tuberculosis (ISAT2010)			2010. 1.13-14	Sendai, Japan
Sax N, Horie S, Li L, Chen R, Watanabe Y, Mori S, Kodama T.	Physical characterization of acoustic liposomes	International Symposium of AIDS and Tuberculosis (ISAT2010)			2010. 1.13-14	Sendai, Japan

Horie S, Watanabe Y, Chen R, Mori S, Matsumura Y, Kodama T.	Targeted gene delivery using nanobubble and ultrasound.	The 5th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electron ics	Book of Abstrac t	115- 116	2010. 2. 24-25	Sendai, Japan
Watanabe Y, Horie S, Funaki Y, Kikuchi Y, Yamazaki H, Ishii K, Mori S, Kodama T.	PET imaging of Na/I symporter gene expression induced by nanobubbles and ultrasound.	The 5th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electron ics	Book of Abstrac t	111- 112	2010. 2. 24-25	Sendai, Japan
Chen R, Watanabe Y, Li L, Horie S, Mori S, Fukumoto M, Kodama T.	Observation for angiogenesis of liver metastases in preclinical models.	The 5th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electron ics	Book of Abstrac t	113- 114	2010. 2. 24-25	Sendai, Japan
Li L, Horie S, Chen R, Watanabe Y, Baba T, Sax N, Sakamoto M, Mori S, Takahashi S, Kodama T.	Four-dimensional high-frequency ultrasound imaging system for early detection of lymph node micro-metastasis.	The 5th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electron ics	Book of Abstrac t	157- 158	2010. 2. 24-25	Sendai, Japan
Sax N, Horie S, Li L, Chen R, Watanabe Y, Mori S, Kodama T.	TEM observation and analysis of echogenic nano-bubbles.	The 5th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electron ics	Book of Abstrac t	159- 160	2010. 2. 24-25	Sendai, Japan
Yagishita Y, Takata Y, Ohki K, Miyashita H, Morikawa H, Sakamoto M, Mori S, Kawamura H, Kodama T.	Volumetric and angiogenetic imaging system by using nanobubbles and high-frequency ultrasound for evaluation of the antitumor effect by cisplatin.	The 5th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electron ics	Book of Abstrac t	161- 162	2010. 2. 24-25	Sendai, Japan



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
渡邊夕紀子, 小玉哲也.	Visualization of NIS gene expression using Fine-PET.	第1回半導体PETカメラワークショップ/ユーザーズミーティング			2009. 4. 25	千里ライフサイエンスセンタービル5F サイエンスホール
李麗, 堀江佐知子, 陳銳, 渡邊夕紀子, 森士朗, 阪本真弥, 小野栄夫, 高橋昭喜, 小玉哲也.	超音波分子イメージング法による新しいリンパ節転移早期診断法の開発.	第6回東北大学バイオサイエンスシンポジウムおよび第14回学際ライフサイエンスシンポジウム.	講演要旨集	186	2009. 6. 16	仙台国際センター
堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 陳銳, 李麗, 森士朗, 小玉哲也.	音響照射圧を用いたターゲティング分子導入法の開発.	第6回東北大学バイオサイエンスシンポジウムおよび第14回学際ライフサイエンスシンポジウム.	講演要旨集	205	2009. 6. 16	仙台国際センター
渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 陳 銳, 李麗, 船木 善仁, 菊地 洋平, 酒巻学, 山崎 浩道, 石井 慶造, 森 士朗, 小玉哲也.	ナノバブルと超音波を利用した遺伝子導入法:マウスを使用したPETによる遺伝子発現の可視化.	第6回東北大学バイオサイエンスシンポジウムおよび第14回学際ライフサイエンスシンポジウム.	講演要旨集	212	2009. 6. 16	仙台国際センター
小玉哲也.	ナノバブルと高周波超音波を用いた血管抽出法の開発.	第25回日本DDS学会.	プログラム予稿集	252	2009. 7. 3-7	東京ドームホテル

渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 陳 銳, 李麗, 船木 善仁, 菊地 洋平, 酒巻学, 山崎 浩道, 石井 慶造, 森 士朗, 小玉哲也.	124Iを使用したNIS遺伝子発現イメージング法の開発:超音波とナノバブルを利用した遺伝子デリバリー.	第25回日本DDS学会	プログラム予稿集	364	2009.7.3-7	東京ドームホテル
李麗, 堀江佐知子, 陳銳, 渡邊夕紀子, 阪本真弥, 森士朗, 高橋昭喜, 小玉哲也.	ナノバブルを用いた超音波によるリンパ節転移早期診断システムの研究開発.	第25回日本DDS学会	プログラム予稿集	363	2009.7.3-7	東京ドームホテル
冨田幸雄, 打越亮介, 稲葉拓也, 小玉哲也.	超音波の作用によるマイクロバブルの破壊とキャビテーション気泡の挙動.	日本混相流学会 年会講演会 2009			2009.8.7-9	熊本大学 黒髪地区南キャンパス
堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 陳銳, 李麗, 森士朗, 小玉哲也.	表在性膀胱がんに対する薬剤送達法の開発.	日本機械学会	2009年度年次大会講演論文集Vol.6	101-102	2009.9.13-16	岩手大学
李麗, 堀江佐知子, 陳銳, 渡邊夕紀子, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也.	超音波分子イメージングによるリンパ節転移早期診断法の開発.	第68回日本日本癌学会学術総会	Proceedings	462	2009.10.1-3	パシフィコ横浜
宮下仁, 森士朗, 高田陽子, 大木宏介, 川村仁, 森川秀広, 小玉哲也.	口腔癌治療のためのナノバブルと超音波を用いた抗腫瘍効果増強法に関する検討.	日本口腔外科学会	雑誌2009年総会特別号 Vol. 55	91	2009.10.9-11	札幌コンベンションセンター
大木宏介, 森士朗, 高田陽子, 宮下仁, 川村仁, 森川秀広, 小玉哲也.	ナノバブルと超音波を用いた高周波超音波診断装置による微小転移検出に関する検討.	日本口腔外科学会	雑誌2009年総会特別号 Vol. 55	91	2009.10.9-11	札幌コンベンションセンター

分 担 研 究 報 告

ナノバブルと超音波を用いた高周波超音波三次元画像診断・分子導入システムの開発に関する研究

分担研究者 小野 栄夫 東北大学教授

研究要旨：超音波造影により描出された組織・臓器イメージを病理組織学的に精査すること、バブル治療応用例における治療効果について病理組織学的に判定することを本研究の目的とした。本年度研究の結果、腫瘍リンパ節転移と腫瘍転移経路を同定し、ナノバブルの医療応用に向けた新展開に貢献した。

A. 研究目的

超音波造影性薬剤封入型ナノバブルを用いて、腫瘍組織の三次元画像解析とがん組織特異的な抗腫瘍分子の導入システムを開発する研究において、病理学的評価を行う。

B. 研究方法

マウスリンパ節に腫瘍細胞を移植したリンパ節転移モデル、皮下移植モデルを作製し、病理組織学的に転移経路などを評価した。抗CD31抗体、抗Lyve-1抗体を用いた免疫染色により、がん転移経路を同定した。  
（倫理面への配慮）  
動物実験は、東北大学動物実験指針に則ったプロトコールで実施された。

C. 研究結果

リンパ節転移モデル：マウスリンパ節転移モデルを用いた実験より、そけい部から腋窩リンパ節に向けた一方向性の転移は、皮下のリンパ管を経由することが示唆された。また、血管新生を評価：マウスのパラフィン包埋組織を用いて、抗CD31抗体を用いた免疫染色による新生血管の定量系を構築した。

D. 考察

リンパ節転移モデルから、リンパ節間の一方向性の連絡経路が存在することは興味深い。ナノバブルの造影特性はがん転移に対して経路特異的かつ予防的な治療を可能にするだろう。

E. 結論

本研究では、ナノバブルの特性である組織造影とがん標的性についての実用性を、実験動物モデルを用いて検証した。がん転移予防治療の可能性が新たに示唆された。

F. 健康危険情報

該当事例なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kaneko I, Suzuki K, Matsuo K, Kumagai H, Owada Y, Noguchi N, Hishinuma T, Ono M. Cysteinyl leukotrienes enhance the degranulation of bone marrow-derived mast cells through the autocrine mechanism. *Tohoku J Exp Med* 217:185-91 (2009).
2. Yamashita M, Iwama N, Date F, Chiba R, Ebina M, Miki H, Yamauchi K, Sawai T, Nose M, Sato S, Takahashi T, Ono M. Characterization of lymphangiogenesis in various stages of idiopathic diffuse alveolar damage. *Hum Pathol* 40:542-51 (2009).
3. Yamashita M, Yamauchi K, Chiba R, Iwama N, Date F, Shibata N, Kumagai H, Risteli J, Sato S, Takahashi T, Ono M. The definition of fibrogenic processes in fibroblastic foci of idiopathic pulmonary fibrosis based on morphometric quantification of extracellular matrices. *Hum Pathol* 40:1278-87 (2009).
4. Han F, Takeda K, Ishikawa K, Ono M, Date F, Yokoyama S, Furuyama K, Shinozawa Y, Urade Y, Shibahara S. Induction of lipocalin-type prostaglandin D synthase in mouse heart under hypoxemia. *Biochem Biophys Res Commun* 385:449-53 (2009).

2. 学会発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

## 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
Kaneko I, Suzuki K, Matsuo K, Kumagai H, Owada Y, Noguchi N, Hishinuma T, <u>Ono M.</u>	Cysteinyl leukotrienes enhance the degranulation of bone marrow-derived mast cells through the autocrine mechanism.	Tohoku J Exp Med	217	185-91	2009
Yamashita M, Iwama N, Date F, Chiba R, Ebina M, Miki H, Yamauchi K, Sawai T, Nose M, Sato S, Takahashi T, <u>Ono M.</u>	Characterization of lymphangiogenesis in various stages of idiopathic diffuse alveolar damage.	Hum Pathology	40	542-51	2009
Yamashita M, Yamauchi K, Chiba R, Iwama N, Date F, Shibata N, Kumagai H, Risteli J, Sato S, Takahashi T, <u>Ono M.</u>	The definition of fibrogenic processes in fibroblastic foci of idiopathic pulmonary fibrosis based on morphometric quantification of extracellular matrices.	Hum Pathology	40	1278-87	2009
Han F, Takeda K, Ishikawa K, <u>Ono M.</u> , Date F, Yokoyama S, Furuyama K, Shinozawa Y, Urade Y, Shibahara S.	Induction of lipocalin-type prostaglandin D synthase in mouse heart under hypoxemia.	Biochemical and Biophysical Research Communication	385	449-53	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）  
（総括・分担）研究報告書

臨床試験の実施と臨床評価に関する研究

分担研究者 志賀清人 東北大学病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 講師

研究要旨

頭頸部癌患者の頸部リンパ節に対してマイクロバブル造影剤を用いた超音波検査を行った。これまで下咽頭癌、喉頭癌、中咽頭癌、口腔癌、甲状腺癌、原発不明癌など20例に対して検討した。これまでの検討では、悪性腫瘍は必ず造影されると考えられる所見が、また、転移のない正常リンパ節は全く造影されない所見が得られている。造影画像をもとに腫瘍内血管のコンピューターを用いた再構築を行ったところ、リンパ節門からリンパ節全体に放射状に伸びる腫瘍血管の構造が明らかとなった。臨床的に他のモダリティでは検出できない癌の転移を、マイクロバブル造影剤を用いた超音波造影を行えば検出できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

研究目的は第一にマイクロバブル造影剤が頭頸部癌のリンパ節転移をどのように描出するのかを検討し、腫瘍内血管のコンピューターを用いた3次元構築を行って癌に特徴的な血管構造を見出すこと。第2にマイクロバブル造影剤による超音波画像が臨床的にどのような有用性を持つのかを検討し、さらに将来のナノバブルを用いた癌治療への基礎的なデータを累積することである。

B. 研究方法

頭頸部癌患者の頸部リンパ節に対してマイクロバブル造影剤を用いた超音波検査を行った。頸部郭清術を予定された頭頸部癌症例のうち適応と判断した症例患者から同意を得た上で、マイクロバブル造影剤perflubutane（商品名ソナゾイド）を静注したうえで超音波検査を行い、リンパ節転移について画像解析の検討を行う。得られた画像（動画）のデータは東北大学流体科学研究所に送り、スーパーコンピューターを用いて3D画像として血管の立体構築を再構成する。

1. リンパ節転移陽性例での検討

まず、触診、穿刺吸引細胞診などで転移が明らかとなった症例についてマイクロバブル+超音波でどのような画像が得られるかについて検討する。同時に転移陰性のリンパ節の画像を収集して陽性例との画像上の違いについて検討する。また、頸部郭清術で得られた検体の一部を用い、連続切片の病理組織学的検討によりリンパ節標本の血管構築をコンピューターで立体化し、超音波装置で得た画像から構築された3D画像と比較する事により超音波造影剤を用いた画像構築の妥当性を検討する。

2. 臨床的に他の検査でリンパ節転移が不明な（あるいは無いと診断された）症例での検討

1. で得られた情報をもとにリンパ節転移陽性と考えられる症例につき、術後の病理診断と比較して、その診断の有効性を検討する。同時に他の画像診断（CT、MRI、FDG-PET）との比較を行う。

（倫理面への配慮）

本研究は東北大学病院倫理委員会の承認のもと行われている。

（承認番号：2009-90）

### C. 研究結果

1. 悪性の頸部腫瘍はすべて造影され、良性の病変は造影されないのか？これまでの検討は主に悪性腫瘍患者に対して行われ（中咽頭癌、下咽頭癌、甲状腺癌、口腔癌など）、良性疾患（神経鞘腫、炎症性リンパ節腫大など）を対象にしていないので、はっきりとは断言できないが、悪性腫瘍は必ず造影されると考えられる所見が集積されている。また、転移のない正常リンパ節は全く造影されない所見が得られている。
2. 甲状腺癌の1例で、左側のリンパ節転移はCT, MRI, PETなどの画像で明らかであったが、右側は小リンパ節のみでこれらの画像上では全く転移を予測できなかった。しかし、マイクロバブル造影超音波で右頸部リンパ節に造影効果を認めたため、手術時に摘出したところ、肉眼的には正常に見えたその2個のリンパ節内に病理組織学的に甲状腺癌の転移が見出された。
3. 最近、頭頸部扁平上皮癌症例に対して化学放射線治療を行う頻度が高くなってきた。そこで、頸部リンパ節の治療効果判定にマイクロバブル造影剤をもちいた造影超音波検査が使えるかどうかを検討した。下咽頭癌の大きな頸部リンパ節転移のある症例に化学放射線治療を行ったところ、原発巣はCRになったが、頸部はPRであったため頸部郭清術を追加治療として施行した。治療前にマイクロバブル造影剤で高度に

造影されたリンパ節が、治療後は全く造影されなくなった。そして、病理組織学的にも癌細胞は全く検出されなかった。

### D. 考察

癌の転移が存在するリンパ節はすべてマイクロバブル造影超音波検査で造影されると考えられた。また、造影の動画画像をコンピューターを用いて血管に注目して再構築すると、リンパ節門からリンパ節全体に放射状に伸びる腫瘍血管の構造が明らかとなった。今後、ナノバブルを用いた癌治療に際して道筋を付けるデータであり、今後も蓄積して行く必要があると考えられた。

臨床的には他のモダリティーでは検出できない癌の転移をマイクロバブル造影剤を用いた超音波造影を行えば検出できる可能性が示唆された。すなわち、マイクロバブル造影剤をもちいた造影超音波検査は潜在リンパ節転移を検出する有効な方法になりうる。また、化学放射線治療前後でマイクロバブル造影剤をもちいた造影超音波検査を行うことにより、治療効果判定が正確にできる可能性が示唆された。

### E. 結論

マイクロバブルと超音波を組み合わせる事により頭頸部癌症例の不顕性リンパ節転移の検出が可能になる可能性が示唆された。また、この方法はリンパ節内の腫瘍血管の構造を明らかにする方法としても有用であると考えられた。

ナノバブルと高周波超音波診断装置を用いた腫瘍血管構築画像  
の免疫病理組織学的観点からの検証

研究分担者 森 士朗 東北大学病院・講師

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高周波超音波を用いた画像診断システムモデルにより得られた腫瘍血管抽出画像が、どのような病理組織学的所見に対応するものかを実験腫瘍を対象にし、免疫病理組織学的に検証してみた。【実験方法】リンフェラーゼタンパク発現腫瘍をマウス皮下に接種し、*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経過時的に捉えるとともに、この実験腫瘍をナノバブルと高周波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可視化した。さらに、ナノバブルと高周波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、これらの画像情報を取得した直後に採取した病理組織標本を腫瘍血管に対する抗体を用いて免疫組織化学的に検討した結果とを比較検討することにより、ナノバブルと高周波超音波を用いた画像診断システムモデルにより得られた腫瘍血管抽出画像が、どのような病理組織学的所見に対応するものかを検証した。【結果および考察】本研究で提唱したナノバブルと高周波超音波を用いた画像診断システムを用いることにより、直径数mmレベルの腫瘍の微小血管の二次元および三次元画像の構築が可能であり、この腫瘍微小血管の構築画像のパターンは、腫瘍血管に対する免疫組織化学的解析結果により明らかとなった腫瘍微小血管の分布と一致するものであり、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、原発巣あるいは所属リンパ節転移の早期診断が不可欠である。悪性腫瘍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、これまで我々が開発してきたナノバブルと高周波超音波を用いた画像診断システムモデルにより得られた腫瘍血管抽出画像が、どのような病理組織学的所見に対応するものかを実験腫瘍を対象にし、免疫病理組織学的に検証してみた。

## B. 研究方法

### 1. 実験腫瘍モデル

免疫不全マウス (SCID, 6-8 week, 20-25g) の両側背部皮下にマウス大腸癌細胞 Colon26-Luc ( $1 \times 10^6$  cells/100 $\mu$ l/site) を接種し、固形腫瘍を形成した。さらに、がん化学療法による治療効果の判定に際して、ナノバブルと高周波超音波を用いた画像診断が有効かどうかを検討する目的で、腫瘍細胞接種後 8,13,16 日後に、固形腫瘍中心部にがん化学療法の代表的薬剤であるシスプラチンを投与した。

### 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。

### 3. 腫瘍血管のナノバブルと高周波超音

### 波を用いた画像解析

マウス尾静脈にナノバブル (1mg/ml, 100 $\mu$ l) を投与し、高周波超音波イメージングシステムで腫瘍血管内バブルの B-mode 画像を得た。超音波装置は Vevo770 (central frequency 40MHz, axial resolution 40 $\mu$ m, lateral resolution 80 $\mu$ m, focal length 6mm, depth of field 1.5mm) を使用した。また、このバブルの輝度値をスーパーコンピュータで解析し、血管構造を構築した (図 1, 2)。この血管構築画像から、ImageJ ソフトを使い、腫瘍単位面積あたりに占める腫瘍血管面積を腫瘍の中心部と周辺部において測定した。

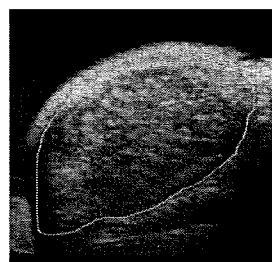


図 1. 血管内を流れるバブルの超音波画像

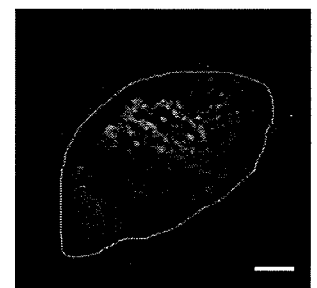


図 2. 血管構築画像

腫瘍組織切片に対し CD31 抗体を使った免疫染色を行い (図 3)、腫瘍単位面積あたりに占める腫瘍血管の数、面積を腫瘍の中心部と周辺部において測定した。

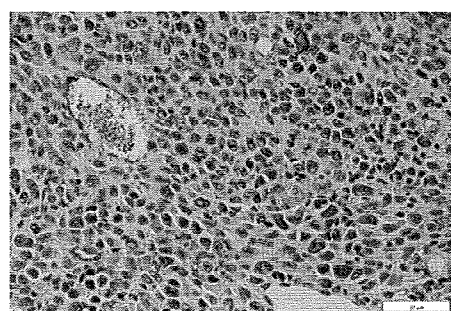


図 3. CD31 陽性の腫瘍血管

### C. 研究結果および考察

マウス固形腫瘍全体を中心部・周辺部に分けて解析したところ、中心部と周辺部で腫瘍血管の密度および血管径の大きさに違いがあることが示唆された。

病理組織的検証から、腫瘍中心部では、未熟な微小血管の増生が認められ、腫瘍単位面積当たりの血管数は周辺部よりも大きく、また単位面積当たりの腫瘍血管面積は中心部よりも周辺部で大きいことが明らかになった(図 4, 5)。

一方、ナノバブルと高周波超音波画像解析装置を用いた解析結果では、中心部より周辺部で腫瘍血管面積の密度が大きい結果となり(図 6)、病理組織的結果と一致した。

以上の結果により、腫瘍の中心部では、周辺部に比較し、循環系に未だ組み込まれていない未熟な新生微小腫瘍血管が多数存在するのに対し、超音波造影剤が通過可能な、血管径が比較的大きい腫瘍血管の密度が低いことが示唆された。

造影 CT 画像における転移リンパ節の特徴的な所見として、rim enhancement が挙げられ、この CT 画像所見は、腫瘍周辺部での腫瘍新生血管の増生と血流の増加、および、急激な腫瘍細胞の増殖に必要な酸素および栄養の供給に、腫瘍血管の増生が対応できなくなるために、腫瘍の中心部が壊死に陥ることにより形成されるものと理解されている。しかし、本研究結果より、中心部が壊死に陥っていない腫瘍においても、腫瘍の中心部では、循環系に未だ組み込まれていない未熟な新生微小腫瘍血管が多数存在する一方で、造影剤が通過可能な血管径が比較的大きい腫瘍血管の密度が低いことにより、rim enhancement のような特徴的

な画像所見が形成されることが示唆された。

一方、シスプラチン投与群においては、腫瘍中心部と周辺部の単位面積あたりの血管数および血管面積に免疫組織学的検討において有意な差は認められず、また、ナノバブルと高周波超音波画像解析装置を用いた解析結果においても、腫瘍の中心部と周辺部の血管密度に有意な差は認められなかった。

従って、今後、がん化学療法や放射線治療を受けた病変部においても腫瘍の存在を示す普遍的で特徴的な腫瘍血管のナノバブルと高周波超音波による腫瘍血管構築画像を捉えるために、様々な腫瘍性病変の画像データを蓄積し検討することが必要かと思われた。

#### D. 結論

今回の病理組織学的検証から、ナノバブルと高周波超音波診断装置を用いた画像解析で、腫瘍組織内の腫瘍血管分布を詳細に捉えることが可能であることが明らかになった。この高周波超音波画像を応用して、転移リンパ節の画像診断基準の一つである rim enhancement 現象を、より小さなリンパ節でも検出可能になることが期待される

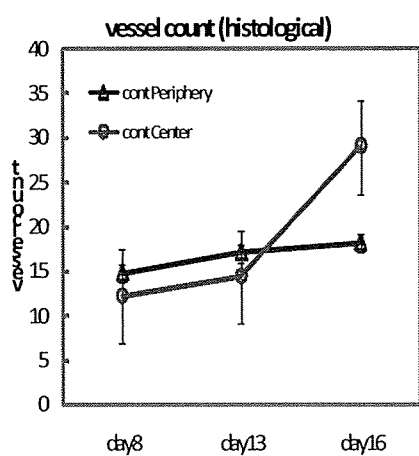


図 4 単位面積あたりの腫瘍血管の数

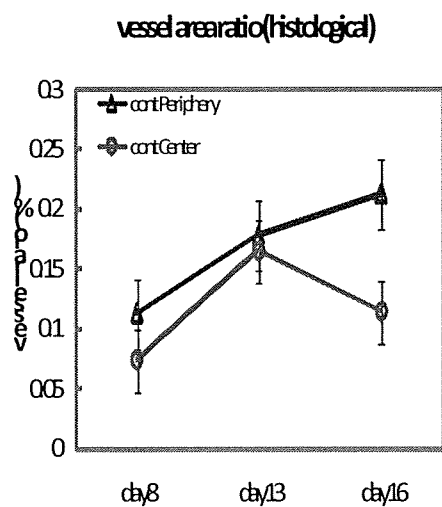


図 5 単位面積あたりの腫瘍血管の面積

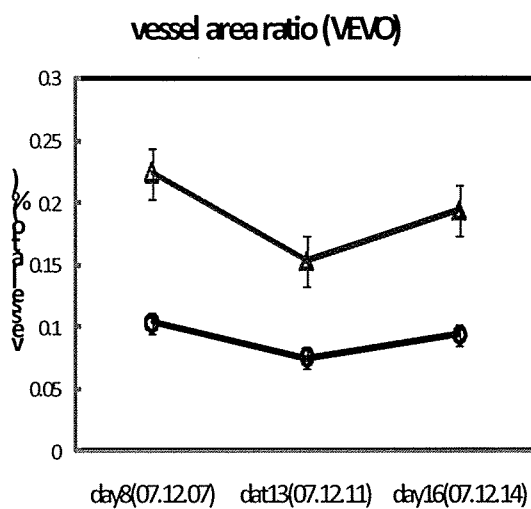


図 6 ナノバブルと高周波超音波画像解析装置による単位面積あたりの腫瘍血管の面積

## 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
Hiroaki Komori, Yoshiko Soga, Shiro Mori, Masato Nose.	Genetic Analysis of Arsenic Toxicities Using an Experimental Mouse Model. In Chemical Pollution in Indochina; Contamination Status, Ecosystem Impact and Remediation Technology. Ed. By Satoru Suzuki and Hideshige Takada.	Tokai University Press		160-167	2009
R. Chen, M. Chiba, S. Mori, M. Fukumoto, T. Kodama.	Periodontal Gene Transfer by Ultrasound and Nano-/Microbubbles.	J Dent Res	88(11)	1008-1013	2009
Tetsuya Kodama, Noriko Tomita, Sachiko Horie, Nicolas Sax, Hiroko Iwasaki, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Shiro Mori, Manabu Fukumoto.	Morphological study on Acoustic liposome using transmission electron microscopy. J Electron Microsc	Journal of Electron Microscopy ( In Press)			
Yuki Tanaka, Hiroaki Komori, Shiro Mori, Yoshiko Soga, Takahito Tsubaki, Miho Terada, Tatsuhiko Miyazaki, Takahiro Fujino, Satoshi Nakamura, Hiroyuki Kanno, Tatsuya Sawasaki, Yaeta Endo, Masato Nose.	Evaluating the Role of Rheumatoid Factors for the Development of Rheumatoid Arthritis in a Mouse Model with a Newly Established ELISA System.	The Tohoku Journal of Experimental Medicine.	220 (3)	199-206	2010