

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592550

研究課題名（和文） 口腔癌治療のためのナノバブルと超音波を用いた新しい術中迅速診断システムの開発

研究課題名（英文） An experimental study for development of real time diagnosis system for oral cancer treatment using nanobubbles and ultrasound

研究代表者

森川 秀広 (MORIKAWA HIDEHIRO)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：60302155

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、口腔癌の治療のためのナノバブルと高周波超音波を用いたリアルタイム画像診断法を開発することである。本研究により、超音波造影剤によるハレーション、動脈の拍動による画像のぶれ、未成熟な腫瘍新生血管の画像構築の問題が浮上した。一方、ナノバブルの血中動態の四次元的解析により診断精度が向上することが明らかとなった。本研究では、上記問題点の解決のため高周波超音波画像解析システムのハードおよびソフトの改善を行った。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present study is to develop a real time imaging diagnosis system for oral cancer using nanobubbles and high-frequency ultrasound. As a result, the following problems were revealed, halation caused by the ultrasound contrast agent, blurring of the image caused by arterial pulsation, and imaging of the immature angiogenesis of the tumor. On the other hand, the diagnostic accuracy could be improved by analyzing the four-dimensional dynamics of nanobubbles in the blood flow. In this study, to solve the problems, hardware and software of the high frequency-ultrasound imaging system were improved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：(1) 口腔癌 (2) ナノバブル (3) 超音波 (4) 術中迅速診断  
(5) リアルタイム

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌の術前画像診断法としては、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。これらの画像診断結果は、腫瘍の切除範囲の決定や頸部郭清術の必要性の有無に極めて重要な意味を持つ。しか

し、手術室の現場においては、大まかな切除範囲は術前の画像診断により決定されるものの、例えば、舌癌や頬粘膜癌の実際の切除範囲を決定する際には、手術時の視野の確保のため舌や頬粘膜を牽引している状態で切除範囲を検討する必要があり、術前に撮像された静止状態の画像があまり参考にならない症例もしばしば経験される。このような症例においては、触診により切開線を設定しているのが現状であり、腫瘍の境界が不明な場合には、迅速病理組織診断の結果に基づいて追加切除等を行っている。また、上記の最新の画像診断法においても、直径1cm以下のリンパ節における転移の有無の判断は困難であり、やはり迅速病理診断に頼らざるを得ない。しかし、近年の人口の高齢化に伴い急増しているいわゆる有病者の口腔癌患者においては、手術時間の延長に伴う様々なリスクから、迅速病理組織診断に十分な時間を取れない症例も多く、瞬時に診断可能な新しい術中診断システムの開発が望まれる。

本研究は、上記の臨床の現場での問題を解決するために、以下の学術的背景に基づいて企画された。

- (1) 高周波超音波イメージング装置(最高周波数 80MHz, 分解能 30  $\mu$ m)を使用し、腫瘍血管内を流れるナノバブルの動きが可視化されることを見出している。この現象観察から血管内を移動するバブルの輝度情報を処理することで血管構造を描写できるという着想を得て、現在、直径1cm以下の腫瘍の血管像を二次元的および三次元的に抽出する方法論を展開し、血管密度を評価してきた。
- (2) 直径200nm以下のバブルが腫瘍血管から漏出し血管周囲に滞在する、いわゆるEPR効果(Enhanced Permeability and Retention Effect)を確認した。
- (3) ヒトのリンパ節と同等の大きさをもつMRL/lprマウスの鼠径リンパ節に、ルシフェラーゼ遺伝子(*luc*)を恒常的に発現する腫瘍細胞を移植した場合に、腋窩リンパ節に転移することを生体発光イメージング法で、確認することができた。腋窩リンパ節の血管密度は、転移前に比較し転移後に増加することが見出され、リンパ節転移の有無は血管密度で判断される可能性があることが示されている。
- (4) 超音波プローブで得られた画像データ(x, y, z, t)を、三次元の絶対空間で構築するには、時間tにおけるx軸、y軸、z軸での並進と回転の6軸情報が必要になるが、これまで、我々は、高周波超音波イメージング装置の超音波プローブを6軸アームに固定し、超音波プロ

ーブ先端部の三次元空間での移動の軌跡の情報と超音波プローブの移動中に得られたナノバブルの輝度情報を大型計算機で処理し、三次元空間での自由な超音波プローブの動きで捉えられたナノバブルの輝度情報を三次元構築画像として描出することを試みてきた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、頸部のような解剖学的に複雑な領域や口腔内のような狭い空間内でのスキニングが可能な超音波プローブとナノバブルと高周波超音波を用いた新しい術中迅速画像診断システムを開発することである。

## 3. 研究の方法

### (1) ナノバブルの作製

生体内で得られる血管像を高精度で抽出するナノバブルの膜組成を決定するために、3種類のナノバブルを作製する。

- ① 94mol%Distearoyl-Phosphocholine (DSPC) + 6mol%Distearoylphosphoethanolamine (DSPE) - PEG-OMe、
- ② 51mol%DSPC + 5mol%DSPE + 44mol%Cholesterol、
- ③ butylcyanoacrylate polymer (直径50-200nm) である。

作製したナノバブルのゼータ電位と粒径はゼータ電位・粒径測定システムで計測する。

### (2) リンパ節転移モデルの評価

#### ①MRL/lprマウスの系統維持

MRL/lprマウスを12-16週齢まで系統維持・繁殖させる。この時点で*lpr*遺伝子の表現形質であるリンパ節腫脹が発現し、その大きさはヒトのリンパ節の直径(<1cm)と同等になる。

#### ②鼠径リンパ節への細胞移植と腋窩リンパ節への転移の評価

MRL/lprマウスの鼠径リンパ節に*luc*発現腫瘍細胞( $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  cells/ $30 \mu$ L/site)を移植し、0日、6日、10日、14日目に腋窩リンパ節への転移変化を生体発光イメージング法で調べる。

#### ③高周波超音波イメージング法による解析とナノバブルの決定

移植後0日、6日、10日、14日目に、マウス尾静脈に前述の3種類のナノバブルを注射し、高周波超音波イメージング装置で腋窩リンパ節の血管像を二次元的および三次元的に抽出する。また、その単位面積および単位体積当たりの血管密度を算出する。血管抽出度の高いバブルを以後の実験で使用する。

### (3) 6軸アームを用いた超音波プローブの

## 検討

### ①プローブキャリブレーション

超音波プローブで得られた画像データ(x, y, z, t)を、三次元の絶対空間で構築するには、時間tにおける並進と回転の6軸情報が必要になる。ここでは、超音波プローブを6軸アームに固定し、超音波プローブ先端部の座標系における位置姿勢を、x, y, z [mm]、これに対して回転を考慮した姿勢をx $\theta$ , y $\theta$ , z $\theta$  [deg]とする。ただし、それぞれx, y, z軸周りの角度を表し、x $\theta$ , y $\theta$ , z $\theta$ の順に回転させた姿勢とする。超音波プローブの理想的な基本姿勢は、実視野(FOV)が6軸アーム座標系上のx-y平面上にあり、z方向を向いているものとし、そのときにx, yは0[mm]、x $\theta$ , y $\theta$ , z $\theta$ は0[deg]であるものとする。すなわち、数値的なキャリブレーションは、zに対しておこなうだけで済むようにプローブを設置する。

### ②データ取得・受信・データ転送

ナノバブルをMRL/lprマウスに尾静脈注射し、リンパ節内を移動するナノバブル像を高周波超音波イメージングシステムのBモード画像で取得をおこなう。このデータを、これまで開発してきた実時間画像転送ソフトを使用して、PCに送信する。また、上記データ転送に同期させて、Bモード画像の一枚ずつをソケット通信で、東北大学流体科学研究所設置のスカラー並列型計算システムに転送する。

### ③実時間三次元画像解析

これまで開発してきた血管構造抽出法では、保存されたデータの超音波輝度値の統計量を解析し、血管像を抽出してきた(投稿準備中)。本年度では実時間画像構築には、初期像をバックグラウンドとして、可視化像との差分を考えることで、バブルと周囲の組織との超音波輝度値の差異を明確にできるものと考えられる。

### ④早期診断法への適用性

移植後0日、6日、10日、14日目に、三次元的な血管構造を抽出し、血管密度を測定する。コントロール群の血管密度と対比し、どの時期に、血管密度の優位性が発生するかを確認する。

## 4. 研究成果

実験腫瘍モデルマウスを用いて、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頭頸部領域の腫瘍血管の画像解析における問題点を検討した。その結果、病巣部の近傍に太い動脈がある場合においては、超音波造影剤によるいわゆるハレーションが生じること、さらに、動脈の拍動により血管構築画像にぶれが生じることにより、微小血管の描出が困難になること、未成熟な腫瘍新生血管では未だ循環系に組み込まれてお

らず、組織学的に血管が存在しても画像として描出されないこと、静止画像では、正常組織と病変部との識別が困難であっても、ナノバブルの血中の動態を四次元的に解析することにより、病変部を識別できる場合があることなどが明らかとなった。

これらの問題点に関して、これまで、超音波画像解析装置のハードおよびソフトの両側面からの改善策を検討し、かなりのレベルまで改善することができた。

一方、6軸アームを使用した場合、6軸アームのバックラッシュによる抽出画像の誤差が無視できないレベルで生じることが明らかとなり、6軸アームのバックラッシュの問題の解決をハードおよびソフトの両面から検討した。しかし、現有の6軸アームでの諸問題の解決は困難であり、むしろ比較的狭い範囲を一方向にスキャン可能な超音波プローブを開発し、その超音波プローブを用いて二次元画像を取得し、その二次元画像から三次元画像を構築するシステムの開発の方が現実的と考えられた。現在、リアルタイムでの腫瘍血管の三次元構築画像の抽出を可能にする新たな超音波プローブを試作し検討中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. Tetsuya Kodama, Atsuko Aoi, Yukiko Watabnabe, Sachiko Horie, Mizuho Kodama, Li Li, Rui Chen, Noriyoshi Teramoto, Hidehiro Morikawa, Shiro Mori, Manabu Fukumoto: Evaluation of transfection efficiency in skeletal muscle using nano/microbubbles and ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 36(7): 1196-1205, 2010. 査読有
2. Yagisita Y, Takata Y, Ohki K, Miyashita H, Morikawa H, Sakamoto M, Mori S, Kawamura H, Kodama T. Volumetric and angiogenic imaging system by using nanobubbles and high-frequency ultrasound for evaluation of the antitumor effect by cisplatin. The 5th International Symposium on Medical, Bio-Electronics. Book of Abstract. 161-162, 2010. 査読なし

[学会発表] (計13件)

1. 李麗, 森 士朗, 柳下陽子, サックスニコラ, 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 高地崇, 李深偉, 宮下仁, 森川秀広, 阪本真弥, 小玉哲也: 頭頸部癌所属リンパ節転

- 移の診断・治療に向けたリンパ節腫大マウスを用いたリンパ節転移モデルの開発. 第35回日本頭頸部癌学会. 2011年6月9日-10日 名古屋.
2. 宮下仁, 森 士朗, 柳下陽子, 高田陽子, 大木宏介, 川村仁, 森川秀広, 小玉哲也: ナノバブルと高周波超音波による腫瘍血管構築と VEGF の発現に関する分子学的検討. 第55回日本口腔外科学会総会. 2010年10月16-17日, 千葉.
  3. 柳下陽子, 森 士朗, 高田陽子, 大木宏介, 宮下仁, 森川秀広, 川村仁, 小玉哲也: 口腔癌早期診断のためのナノバブルと高周波超音波による腫瘍血管構築画像の病理学的評価, 第55回日本口腔外科学会総会. 2010年10月16-18日, 千葉.
  4. 柳下陽子, 森 士朗, 李麗, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 陳銳, 高田陽子, 川村仁, 森川秀広, 小玉哲也: ナノバブルと高周波超音波を用いた腫瘍血管構築法の開発. 第26回日本 DDS 学会学術集会. 2010年6月17日-18日, 大阪.
  5. Sachiko Horie, Yukiko Watanabe, Yoko Yagishita, Nicolas Sax, Rui Chen, Li Li, Takanori Kojima, Hidehiro Morikawa, Maya Sakamoto, Masao Ono, Shiro Mori, Tetsuya Kodama: Longitudinal three-dimensional noninvasive imaging analysis and quantification of ant-tumor effects of TNF-alpha gene for small tumor. 2010 World Molecular Imaging Congress. (Oral Presentation: 0717A) September 8-11, 2010, Kyoto, Japan.
  6. 柳下陽子, 森 士朗, 李麗, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 陳 銳, 高田陽子, 大木宏介, 宮下 仁, 小玉瑞穂, 川村 仁, 森川秀広, 小玉哲也: 口腔癌早期診断のためのナノバブルと高周波超音波を用いた画像診断法に関する組織学的検討. 第34回日本頭頸部癌学会. 2010年6月10-11日 東京.
  7. Yagishita Y, Takata Y, Ohki K, Miyashita H, Morikawa H, Sakamoto M, Mori S, Kawamura H, Kodama T. Volumetric and angiogenic 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-Electronics. 24-25, February, 2010, Sendai, Japan.
  8. 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画像診断装置による微小転移検出に関する検討. 第54回(社)日本口腔外科学会総会. 2009年10月9,10,11日, 札幌.
  9. 森 士朗, 高田陽子, 大木宏介, 宮下 仁, 川村 仁, 森川秀広, 小玉哲也: ナノバブルと高周波超音波画像診断装置の遠隔地口腔診断への応用. 第54回(社)日本口腔外科学会総会. 2009年10月9,10,11日, 札幌.
  10. 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. 第54回(社)日本口腔外科学会総会. 2009年10月9,10,11日, 札幌.
  11. 大木宏介, 森 士朗, 李麗, 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 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口腔癌画像診断システムの診断精度に関する研究. 第33回日本頭頸部癌学会. 2009年6月11,12日, 札幌.
  12. 宮下仁, 森 士朗, 李麗, 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 大木宏介, 川村仁, 森川秀広, 小玉哲也: ナノバブルと超音波を用いた抗腫瘍分子導入システムによる抗腫瘍効果に関する研究. 第33回日本頭頸部癌学会. 2009年6月11,12日, 札幌.
  13. 森 士朗, 李麗, 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 大木宏介, 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口腔癌リアルタイム画像診断システムの開発に向けての検討. 第33回日本頭頸部癌学会. 2009年6月11,12日, 札幌.
- 〔図書〕(計0件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計0件)
- 名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年月日:  
 国内外の別:
- 取得状況(計0件)
- 名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

[その他]  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森川 秀広 (MORIKAWA HIDEHIRO)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：60302155

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

森 士朗 (MORI SHIRO)  
東北大学・病院・講師  
研究者番号：80230069

小玉 哲也 (KODAMA TETSUYA)  
東北大学・大学院医工学研究科・教授  
研究者番号：40271986