

## 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 4 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21650124

研究課題名（和文） ナノバブルと超音波を用いた実時間リンパ節転移早期がん確定診断法の開発

研究課題名（英文）

Development of a real time diagnosis of lymph node metastasis by ultrasound and nanobubbles

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ナノバブルと超音波を用いた実時間血管構築法によって、直径 1cm 以下のリンパ節転移に対する早期がん確定診断法の開発を目的とする。まず、バブルの輝度情報にもとづく血管抽出アルゴリズム、color difference based on standard deviation (CDS) 法を確立した。つぎに、ナノバブルと高周波超音波、および CDS) 法を併用し、リンパ節転移モデルに適用したところ、本方手法は、リンパ節転移の早期診断だけでなく、治療効果の評価にも有効であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of the present study is to develop a real time diagnostic method of lymphatic metastasis less than 1cm in diameter. First we developed the color difference based on standard deviation (CDS) method. Next we succeeded in extracting vascular structures in the tumors of less than 1 cm in diameter by high-frequency ultrasound (HF-US) system, nanobubbles (NBs), and the CDS method. We applied the methodology to the lymphatic metastasis model, and found that it was applicable to early diagnostic and treatment evaluation of lymphatic metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	0	1,000,000
2010 年度	900,000	0	900,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：分子デリバリーシステム分野

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：がん

## 1. 研究開始当初の背景

がん全体の治癒率は 50%であり、進行がんの固形腫瘍ではわずか 10%でしかない。がんによる死亡原因の多くは、がん細胞が他臓器に転移するからであり、転移を制しない

限りがんは克服できない。転移はリンパ行性、血行性、播種性が考えられるが、特にリンパ行性経路上で最初に位置するリンパ節、いわゆるセンチネルリンパ節転移の診断は、がんの予後判定や治療方針の決定に

重要な指針を与えることになる。CT, MRI, PET, 超音波などの現在の医療診断装置では、サイズ感度が低いために、直径が1cm以下の部位を「がん」とであると確定することは約65%の割合で判断できないものと報告されており、早急ながん確定診断法の開発が望まれる。

## 2. 研究の目的

本研究では、ナノバブルと超音波を用いた実時間血管構築法によって、直径1cm以下のリンパ節転移に対する早期がん確定診断法の開発を目的にする

## 3. 研究の方法

(1) 東北大学遺伝子組換え実験計画書および東北大学動物実験計画書の承認後に、本実験を実施した。

(2) リンパ節転移モデルでは、ヒトのリンパ節の大きさまで腫脹する MXH-10 マウスを使用した。

(3) CDSD 法は移動するバブルの輝度情報を処理する手法から開発された。

(4) ナノバブルは逆相蒸発法をもとに作製した。

(5) 腫瘍細胞は、ルシフェラーゼを恒常的に発現する EMT6-luc マウス乳癌細胞, およびマウス結腸癌細胞 Colon26-luc 細胞, KM-luc マウス線維芽細胞を使用した。

(6) 腫瘍成長と縮退の評価には、生体発光イメージング法および免疫組織学的手法を用いた。

(7) 抗腫瘍分子には、シスプラチン(CDDP)を用いた。

## 4. 研究成果

以下、成果を示す。

(1) CDSD 法, およびナノバブルと高周波超音波システムを用いることで、直径1cm以内の腫瘍新生血管構造の抽出が可能になった。これにより、診断だけでなく、抗腫瘍効果の定量も可能になった〔雑誌論文1〕。

(2) 生体内のバブルの安定性を高めるために、ポリイオン性ヒドロゲルを殻の成分にもつナノバブルを開発した〔雑誌論文2〕。

(3) 透過型電子顕微鏡を使用して、開発したナノバブルの形態学評価をおこなった。バブルの殻は二重脂質膜であり、ガスの封入率は、全バブルの20%程度であることが示された。〔雑誌論文3〕

(4) マウス転移モデルに適用し、リンパ節転移の早期診断だけでなく、治療効果の評価にも有効であることが示された。〔学会発表11, 13, 17〕

(5) 診断法の確立だけでなく、治療にも応用可能であるかを検証するために、バブルと超音波を用いた抗腫瘍分子の腫瘍への導入実験をおこない、抗腫瘍効果の増強が確

認された。〔雑誌論文4, 5〕

## 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5件)

1. Kodama T, Tomita N, Yagishita Y, Horie S, Funamoto K, Hayase T, Sakamoto M, Mori S. Volumetric and angiogenic evaluation of antitumor effects with acoustic liposomes and high-frequency ultrasound. *Cancer Research*. 2011 ; 71(22); 6957-6964. 査読有,

2. du Toit LC, Govender T, Pillay V, Choonara YE, Kodama T. Investigating the effect of polymeric approaches on circulation time and physical properties of nanobubbles. *Pharmaceutical Research*. 2011; 28:494-504. 査読有

3. 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*. 2010; 59(3): 187-196. 査読有

4. Kodama T. Cavitation bubbles mediated molecular delivery during sonoporation. *Journal of Biomechanical Science and Engineering*. 2009; 4: 124-140. 査読有

5. 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. 2009; 133: 198-205. 査読有

〔学会発表〕(計18件)

1. 畠山友梨子, 李麗, サックスニコラ, 阪本真弥, 森士朗, 小玉哲也. 鼠径リンパ節内

- の圧力上昇にともなう輸出リンパ管への流出特性. 第70回日本癌学会学術総会予稿集 127頁. 2011年10月3日(月)-5日(水)(名古屋国際会議場)
2. Hatakeyama Y, Kodama T. Characteristics of the flow to the efferent lymphatic vessel upon increased pressure in the groin lymph node. Joint Research Program with Korea (Jeju University). September 26-29, 2011
  3. Sato S, Kodama T. Study of a highly accurate analysis technique with high frequency ultrasound Joint Research Program with Korea (Jeju University). September 26-29, 2011.
  4. Kato S, Kodama T. Development of an exogeneous molecular delivery system into the lymph node via lymphatic vessel. Joint Research Program with Korea (Jeju University). September 26-29, 2011
  5. 小島貴則, 藤川重雄, 小玉哲也. 音響性リポソームの減衰特性における実験的かつ論理的解析. 日本超音波医学会東北地方会第40回学術集会(2010年9月26日(日)・仙台)
  6. 佐藤祥太, 李麗, 柳下陽子, 阪本真弥, 高橋昭喜, 森士朗, 小玉哲也. マイクロバブルと高周波超音波を用いた三次元イメージング法による転移リンパ節の血管密度の評価. 日本超音波医学会東北地方会第40回学術集会(2010年9月26日(日)・仙台)
  7. Sax N, Horie S, Li L, Chen R, Watanabe Y, Mori S, Sakamoto M, Kodama T. Development and characterization of echogenic polyglucosylated liposomes. 第26回日本DDS学会学術集会プログラム予稿集 288頁. 2010年6月17日(木)-18日(大阪国際交流センター).
  8. 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. Dec. 21 - 22, 2009 Engineering Auditorium, National University Of Singapore, Singapore.
  9. 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学会学術集会プログラム予稿集 299頁. 2010年6月17日(木)-18日(大阪国際交流センター)
  10. 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. Book of Abstract. 161-162. February 24-25, 2010, Sendai, Japan.

11. Li L, Horie S, Rui CHEN, 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-Electronics. Book of Abstract. 157-158. February 24-25, 2010, Sendai, Japan.

12. 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-Electronics. Book of Abstract. 159-160. February 24-25, 2010, Sendai, Japan.

13. 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). January 13-14, 2010, Sendai, Japan.

14. 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). January 13-14, 2010, Sendai, Japan.

15. 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 頁. 2009 年 10 月 9 日~11 日.

16. Kodama T. Molecular delivery system by nanobubbles and ultrasound. International Symposium on HIV/AIDS, Medicinal Plants and Geophagia, Advancing the frontiers of Research on HIV/AIDS, Medicinal Plants and Geophagia at Walter Sisulu University Health Resource Centre Mthatha, Eastern Cape, South Africa 22 – 24 July 2009.

17. 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頁. 2009年7月3-7日(東京ドームホテル).

18. 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頁. 2009年7月3-7日(東京ドームホテル)

[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

<http://www.ecei.tohoku.ac.jp/kodama/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

早瀬 敏幸 (HAYASE TOSHIYUKI)  
東北大学・流体科学研究所・教授  
研究者番号：30135313