

機関番号：11301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791971
 研究課題名（和文） ナノバブルと超音波を用いた新しい口腔癌のリンパ節転移早期診断システムの開発
 研究課題名（英文） Development of a new diagnosis system for detection of early lymph node metastasis of oral cancer by using nano-bubbles and ultrasound
 研究代表者
 大木 宏介（OHKI KOUSUKE）
 東北大学・大学院歯学研究科・助教
 研究者番号：40431514

研究成果の概要（和文）：口腔癌のリンパ節転移早期診断システムの開発を目的として、ナノバブルと超音波を用いた四次元画像解析システムの有用性を検証した。その結果、この画像解析システムを用いることにより、数 mm レベルの腫瘍組織内の微小腫瘍血管の分布や密度を描出できること、対象となる臓器の血管密度を四次元的に解析することにより、び慢性に浸潤するタイプの腫瘍の初期浸潤を検出することが可能であることなどが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We examined the usefulness of four-dimensional imaging system utilizing nano-bubbles and ultrasound to diagnose early lymph node metastasis of oral cancer. As a result, the imaging system enabled us to detect early tumor invasion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：ナノ材料、癌、歯学、病理学

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまで東北大学大学院医学研究科治療医学講座分子デリバリーシステム研究分野と共同で、ナノバブルと超音波を用いた画像診断に関する研究を行ってきたが、同研究室には、超音波三次元イメージング装置が設置されている。この超音波三次元イメージング装置に関しては、製造会社との秘密保持契約により、超音波イメージング処理に関するソースコードの開示が認

められている。一方、我々は、Fas 遺伝子に機能的な欠損を有し、鼠径リンパ節が直径 10mm 程に腫脹する MRL/lpr マウスの尾静脈にナノバブルを注入すると、その直後には、超音波イメージング装置で鼠径リンパ節内の血管内を流れる一個一個のナノバブルの動きを画像として確認している。この腫脹したリンパ節に MRL 系マウス由来の腫瘍細胞を生着させれば、リンパ節転移モデルを作製することができる。なお、このマウスは我々が常に繁殖維持している。本研究は、以上の研究

の流れから、転移リンパ節の微小血管をマイクロレベルの三次元画像として非侵襲的に構築することにより、リンパ節転移の早期診断が可能ではないかという着想に至った。

2. 研究の目的

口腔癌の画像診断法としては現在、CT・MRI・PETなどが有効な手段として常用されている。しかし、これらの画像検査法を用いても直径1cm以下の所属リンパ節における微小転移の有無を正確に診断することが困難である場合が多く、頸部郭清術の必要性の有無や放射線照射範囲の設定等の判断に際し苦慮する場合が多い。

本研究の目的は、ナノバブルと超音波を用いた新しい四次元画像解析システムを用いて、口腔癌のリンパ節早期診断システムを開発することである。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

本研究を遂行するためには、血管に注入したナノバブルを超音波イメージング装置で観察し易く、しかも飼育し易く多数使用可能なモデル動物が望まれる。これまで我々は、様々な疾患モデル動物を用いて、超音波分子導入実験を行ってきたが、上記の条件に合致すると思われるモデル動物は、MRL/lprマウスで、対象臓器は鼠径リンパ節と思われた。このマウスは*Fas*遺伝子の変異マウスで、4か月齢位になると鼠径リンパ節が直径10mm程に腫脹する特徴を有し、共同研究者の東北大学病院の森士朗講師らが、自己免疫疾患の遺伝子解析のため、繁殖、維持してきたマウスである。これまで我々は、このマウスの尾静脈にナノバブルを注入すると、その直後には、超音波イメージング装置で鼠径リンパ節内の血管内を流れる一個一個のナノバブルの動きを画像として確認でき、超音波分子導入装置で超音波を照射すると、瞬時にナノバブルが画像上で消失することを確認している。

(2) ナノバブルの作製

脂質ナノバブルをロータリーエバポレーターで作製した。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した。

(3) エコー輝度情報の定量化

ナノバブルを静注し、血管から漏出・滞留するナノバブルを小型動物用超音波イメージング装置(最高周波数80MHz)で取得し、ナノバブル直径、動注濃度の経過時間に対するエコーの輝度情報を定量化した。

(4) リンパ節転移モデルの作製

MRL/lprマウスの鼠径リンパ節にMRL/lprマウスに生着するルシフェラーゼを恒常的に発現する腫瘍細胞を接種し、リンパ節転移モデルを作製した。腋窩リンパ節への転移病巣の形成は、生体発光イメージング装置を用いて確認した。ルシフェラーゼによる腋窩リンパ節転移の検出精度は、超音波画像解析装置による血管密度確定法に比べて精度が高いことから、ルシフェラーゼで転移が確定された日数と血管構築像で転移が観察された日数の差が、血管構築法による早期診断法の限界である。

(5) 転移リンパ節の病理組織標本作製

通法に従い、転移リンパ節の病理組織標本(HE染色)を作製し、病理組織学的に観察した。

(6) 転移リンパ節微小血管の三次元画像構築

高周波超音波三次元イメージング装置を用いて、転移リンパ節の微小血管をマイクロレベルの三次元画像として構築し観察した。

(7) 転移リンパ節の病理組織学的所見とその微小血管三次元画像所見との比較検討

転移リンパ節の病理組織学的所見とその微小血管三次元画像とを比較検討し、画像の表現性および再現性の精度を評価した。

4. 研究成果

実験腫瘍モデルマウスとルシフェラーゼ遺伝子を恒常的に発現する実験腫瘍細胞株を用いて、ナノバブルと高周波超音波を用いた画像診断システムモデルの診断精度を検証した。

その結果、以下のことが明らかになった。第一に、ナノバブルと高周波超音波を用いた画像解析システムを用いることにより、キャリパーでは精確な実測が不可能な深部の腫瘍の体積を精確に測定できること、第二に、この超音波画像解析装置による解析結果とin vivo生体発光イメージングシステムによる解析結果と相関性がみられること、第三に、これまでの画像診断システムでは検出が困難な数mmレベルの腫瘍組織内の微小腫瘍血管の分布や密度を描出できることが明らかとなった。さらに、実際の臨床においては、増殖パターンや浸潤様式の異なる腫瘍に対応できる画像診断システムが要求されることから、ナノバブルと高周波超音波画像解析システムを用いて、増殖パターンや浸潤様式の異なる腫瘍細胞株を用いて、診断精度の検証を行った。その結果、び慢性に浸潤するタイプの腫瘍の初期浸潤像は、従来の超音波診断装置では検出が困難であったが、ナノバブ

ルと高周波超音波画像診断装置を用いて対象となる臓器の血管密度を四次元的に解析することにより、腫瘍の初期浸潤を検出することが可能であった。

以上より、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口腔癌の微小リンパ節転移や局所再発の早期診断に有用である可能性が示唆された。

一方、本研究においては、実験動物を全身麻酔下で固定した状態で、超音波画像解析装置の超音波プローブも三次元的に高精度で再現性の高い位置決めが可能な超音波プローブレールシステムを用いて解析を行ったが、実際の臨床においては、患者の体動による画像のぶれや測定部位の近傍に拍動する動脈が存在することによる画像のぶれ、頸部所属リンパ節のように病巣部の近傍に太い動脈がある場合の超音波造影剤によるいわゆるハレーションの問題など、今回の動物実験では解決できない様々な問題が存在するものと思われる。

今後、本研究の結果を臨床に応用するためには、臨床の現場で浮上すると予想される様々な問題点を踏まえ、より臨床の現場を考慮した診断装置の研究、開発が必要かと思われる。

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 1 件)

熊本 裕行、大木 宏介、Detection of CD133, Bmi-1, and ABCG2 in ameloblastic tumors. J Oral Pathol Med. 査読有り、39(1):87-93, 2010.

[学会発表] (計 11 件)

1. 大木 宏介、森 士朗、宮下 仁、川村 仁、小玉 哲也。 ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた口腔癌の遺伝子治療を想定した分子導入法の検討。 第 55 回 日本口腔外科学会総会 2010 年 10 月 16 日-18 日 幕張。
2. 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的評価。 第 55 回 日本口腔外科学会総会 2010 年 10 月 16 日-18 日 幕張。

3. 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 日-18 日 幕張。
4. 大木 宏介、宮下 仁、山口 晃史、佐藤 実、佐藤 英明、森 士朗、熊本 裕行、川村 仁。 下顎骨に発生した平滑筋肉腫の 1 例 (口外)。 第 48 回 NPO 法人日本口腔科学会・第 36 回 (社) 日本口腔外科学会 北日本地方会 2010 年 5 月 21-22 日 仙台。
5. Yoko Yagishita, Yoko Takata, Yukiko Watanabe, Sachiko Horie, Rui Chen, Li Li, Kosuke Ohki, Hitoshi Miyashita, Hidehiro Morikawa, Maya Sakamoto, Shiro Mori, Hiroshi Kawamura, Tetsuya Kodama. 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-Electronics. 2010 年 2 月 24-25 日 仙台。
6. 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。 第 54 回 日本口腔外科学会総会 2009 年 10 月 9 日-11 日 札幌。
7. 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 日本口腔外科学会総会 2009 年 10 月 9 日-11 日 札幌。
8. 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。 ナノバブルを用いた高周波超音波診断装置の遠隔地口腔癌診断への応用。 第 54 回 日本口腔外科学会総会 2009 年 10 月 9 日-11 日 札幌。
9. 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検討。 第 33 回 日本頭頸部癌学会 2009 年 6 月 11 日-12 日 札幌。
10. 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検討。 第 33 回

日本頭頸部癌学会 2009年6月11日-12日 札幌.

11. 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日-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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大木 宏介 (OHKI KOUSUKE)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 40431514

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: