

マイクロバブル

AccuSizer®

様々な超音波分子イメージング診断・治療において信号強度を増強するための造影剤として使用されている超音波は、マイクロバブルの存在に非常に敏感です。この方法は、超音波造影 (CEUS) と呼ばれています。マイクロバブルの粒度分布および濃度は、イメージング技術の画像品質と患者の安全にとって重要です。AccuSizer (アキュサイザー) は正確な分子イメージングのために使用する、マイクロバブルのサイズおよび濃度を決定するために適した方法です。

序論

超音波を用いた分子イメージング診断・治療は、マイクロバブルを利用します。ここでマイクロバブルは組織を囲んで、血液との間の感度を増加させる造影剤として作用します。理想的には、マイクロバブルは、選択的表面改質により、ターゲットとした領域に吸着させることができます。対象となるマイクロバブル造影剤 (MCA) には、多くの場合、高親和性リガンドが含まれていて、ターゲットに接近すると、病理組織からの音響信号を増幅します。

Definity®のような標準的な臨床用のマイクロバブルは、研究用に購入することができます。また動物実験の場合は一般的に、研究者が独自に作成することを好みます。カリフォルニア大学デービス校¹では、フェラーラ研究室の研究者が様々な研究のために独自のマイクロバブルを作っています。

マイクロバブルのアプリケーションの1つに、血管新生の研究があります。そこでは、腫瘍の発生で見られるような、既存の血管から新しい血管が新生する物理的なプロセスの研究を行っています。超音波イメージング技術で、静脈内注入した、マイクロバブルを含むMCAを検出することで、血管新生を定量化することができます。組織の流入比率は組織灌流に関連していて、得られた画像から、血流、灌流、血管の構造を解釈することができます。体内の癌などに対するマイクロバブルの標的化は、イメージング技術の大きな助けになります。マイクロバブルの表面にペプチドを添加することで、表面を修飾して、対象の組織をマイクロバブルの標的にします。

CRPPRIは、ニューロピリン-1 (NRP) 標的化ペプチドです。

NRPは、血管内皮増殖因子の受容体であり、その活性化は、複数の腫瘍型ならびに腫瘍血管系に見られます。カリフォルニア大学デービス校、フェラーラ研究室で調製したマイクロバブルは、血管新生の研究のなかで、血管新生を促すために使用しました。ここでは、



図1 Lantheus Vialmix

CRPPRIマイクロバブルを用いて、乳癌モデルにおける腫瘍血管新生を評価しました。この研究の目標は、腫瘍の局所NRPの濃度を評価するために、超音波分子イメージングを使用する系をデザインすることでした。マイクロバブルは、下記の方法で調製しました。

マイクロバブルの調製

マイクロバブル膜を構成する脂質を、真空下で乾燥させた後、脱気したマイクロバブルバッファーで再懸濁しました。マイクロバブルバッファーは、0.9%の塩化ナトリウム水溶液を80%、プロピレングリコールを10%、グリセロールを10%混合し、水酸化ナトリウム水溶液でpHを7.4に合わせて調製しました。乾燥させた脂質混合物をウォーターバス中で、温めたマイクロバブル緩衝液に2.5 mg/mLの濃度で、再懸濁し、脂質の全てが透明な溶液に再懸濁されるまで、15分間超音波処理しました。次に溶液を室温にて冷却し、容量2 mLのガラス製の血清バイアルに1 mLをピペットで注入しました。使用するまでボトルのヘッドスペースを、10 mLのパーフルオロブタンを用いてパージし、4°Cで保存しました。

上記の方法で調整したマイクロバブル1バイアルをVIALMIX® (図1)で振とうし、マイクロバブルをアクティベートしました。

アクティベートしたマイクロバブル懸濁液を、3 mLのシリンジに集め、脱気したダルベッコリン酸緩衝液 (DPBS) で充てんしました。ケーキ状のマイクロバブルを10分間 300 RCFの遠心分離で、回収しました。ケーキ状のマイクロバブルは、2.5 mLのDPBSで再懸濁し、10 µm以上のバブルを次の手順で除去しました。1) 16RCFで1分間遠心分離し、2) 45RCFで1分間遠心分離を行い、両方の手順で、ケーキ状のバブルを除去し、懸濁液を回収しました。得られた懸濁液から1 µm未満のバブルを除去するために、300 RCFで3分間の遠心分離を行いました。ここでは浮かんでいるバブルを除去し、ケーキ状のバブルを回収しました。粒子サイズと濃度を、アキュサイザーAD (図2)を用いて、振とうから3時間以内に測定しました。参考文献^{2,3}にマイクロバブルの作成プロセスをより詳細について示しています。



図2 アクサイザーAD

このマイクロバブル作製プロセスでは、Lantheus Medical Imaging 社が販売している、別の脂質製剤を使用しましたが、FDA承認のDEFINITY (perflutren)の脂質懸濁液の調製と似た方法で、マイクロバブルを作製しました。

サイズおよび濃度を決定するために、マイクロバブルをアクサイザー ADで測定しました。コントロール群のマイクロバブルの粒度分布を図3に示し、CRPPR-マイクロバブルの粒度分布を図4に示しました。

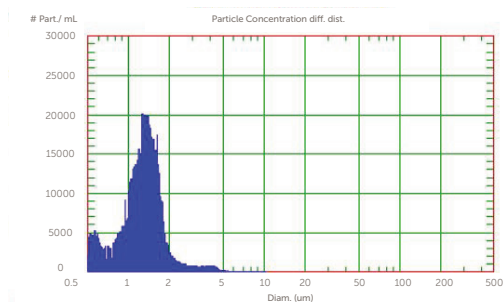


図3 コントロール群のマイクロバブルのサイズ分布

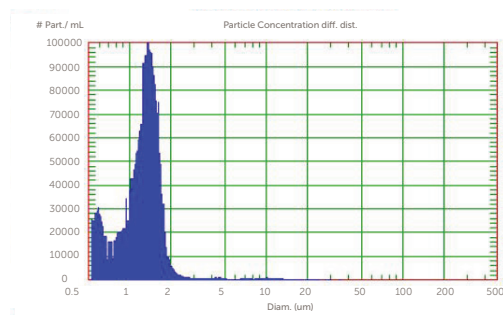


図4 CRPPRマイクロバブルのサイズ分布

まとめ

インビボで使用するためには、マイクロバブルの最終的なサイズが重要です。マイクロバブルの直径が 10 μm 以上である場合、動物実験において副作用が見られます。直径1~2 μm の範囲にマイクロバブルをコントロールすることは、循環中の粒子の安定性と、動物の安全のために適しています。アクサイザーは、造影剤として使用されるマイクロバブルのサイズおよび濃度を決定するために適した方法であると言えます。

参考文献

- ¹ The Dr. Katherine Ferrara Lab in the UC Davis Biomedical Engineering Department – Special thanks to Hua Zhang and Elizabeth Ingham for sharing this data and helping create this document
- ² Zhang, H. et al., *Ultrasound molecular imaging of tumor angiogenesis with a neuropilin-1-targeted microbubble*, Biomaterials 56 (2015) 104-113
- ³ Feshitan JA, Chen CC, Kwan JJ, Borden MA. *Microbubble size isolation by differential centrifugation*. J Colloid Interface Sci 2009; 329:316-24

詳細情報

詳細情報および最新情報については、インテグリスまでお問い合わせください。
www.entegris.com の「[お問い合わせ](#)」ページから最寄りのインテグリスをご確認いただけます。

販売条件

全ての購入は、インテグリスの「販売条件」に従うものとします。インテグリスの「販売条件 (Entegris Terms and Conditions of Sale)」は、www.entegris.com のホームページのフッターにある「[販売条件](#)」をクリックすると、閲覧または印刷することができます。



日本インテグリス合同会社

東京 | TEL (03)5442-9718 FAX (03)5442-9738 〒108-0073 東京都港区三田1-4-28 三田国際ビルディング
 大阪 | TEL (06)6390-0594 FAX (06)6390-3110 〒532-0011 大阪市淀川区西中島6-1-1 新大阪プライムタワー
 九州 | TEL (092)471-8133 FAX (092)471-8134 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東1-13-9 いちご博多駅東ビル

Entegris®, Entegris Rings Design®, およびその他の製品名は Entegris, Inc. の商標です。詳細はwww.entegris.comの[規定/商標](#)をご覧ください。全てのサードパーティの製品名、ロゴ、企業名、商標、登録商標は、それぞれその所有者に帰属します。それらの使用は、商標権所有者との提携、同者による支援、推奨を示すものではありません。

©2018-2021 Entegris, Inc. | All rights reserved. | 7127-10536ENT-0421JPN