

圧電体バイオセンサを用いた ナノ・マイクロバブル検出システムの開発と医用応用

Development of Nano- and Micro-bubble Sensing System Using Piezoelectric Biosensor

H28助自93

代表研究者 吉 田 憲 司 千葉大学 フロンティア医工学センター 助教
Kenji Yoshida Assistant Professor, Center for Frontier Medical Engineering, Chiba University

共同研究者 渡 辺 好 章 同志社大学 生命医科学部 教授
Yoshiaki Watanabe Professor, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University

In this study, the system based on quartz crystal microbalance(QCM) was constructed for quantitatively evaluating the performance of nano- or microbubbles called targeted bubbles (TMBs). TMBs with ligand can specifically absorb to the target molecule. In the application of ultrasound molecular imaging and ultrasound drug delivery system, it is very important to understand how many and how long TMBs absorb to target molecule expressed in tumor and inflammatory site. Our proposed system is expected to solve the issue. Previously we developed a prototype system with the dropping system where the sample liquid was dropped on the QCM surface. By using this system, we quantitatively examine how the amount of absorbed TMBs relates to that of the target molecule. In the examination, the shift of resonant frequency of QCM during the reaction was monitored as the index for evaluating the amount of target molecule (Δf_{target}) and specifically absorbed TMBs (Δf_{TMBs}). As a result, it was demonstrated that they have weak positive correlation ($r=0.44$). This result indicated that our proposed system could quantify the performance of TMBs. The dropping system, however, had some issue such as poor measurement accuracy. In addition, it was too difficult to control the experimental condition such as flow volume and concentration of target molecule and TMBs. Thus we developed the flow system, where the sample liquid was automatically flowed into the QCM. It was demonstrated that the measurement accuracy of flow system was three or four times larger than that of dropping system. The evaluation using flow system will be powerful tool to quantify the affinity in the interaction between TMBs and target molecule.

研究目的

診断と治療の両側面で利用可能な超音波を用いたセラノティクス（診断と治療の同時施行）の概念が注目され、その方法論について議論されている。基本的概念は、標的（疾患）部位を特異的に認識するように設計した超音波診断用造影剤に薬物を付加することで、標的部

位の上に薬物を送達し、かつ超音波による可視化も同時に行うというものであり、局所的薬物療法としても注目されている。技術の核となる造影剤は“targeted bubble”と呼ばれるナノ・マイクロバブルであり、既のがん組織における新生血管および炎症組織に表在する分子を標的にした造影剤が開発されており、*in-vivo*実験において患部への造影剤集積効果を超音波診

断像から評価できることが示されている。超音波セラノティクスを実現へ導くためには、「造影剤の設計と作成(標的指向化と薬物付加)」、「造影剤の標的指向性の評価」、「造影剤の体内動態のリアルタイム追跡技術」、「標的部位での薬物放出制御(造影剤の破壊制御)」、「細胞内への薬物送達技術」など様々な技術課題が残されている。申請者を中心とする研究グループでは、上記課題を解決するため総合的に取り組みを進めている。

申請課題は造影剤の標的指向性の評価システムの構築である。標的部位に対する造影剤の吸着効率(時間×量)は、造影剤のサイズや数密度、血管サイズや血流速、標的分子以外の物質(非特異的吸着)などの影響を受けると想定される。しかし、*in-vivo*実験では上記の条件を制御することが難しく、現状で造影剤の標的分子に対する特異的吸着能(造影剤と標的分子の親和性)の定量評価は行われていない。標的分子の量(濃度)と造影剤のサイズ・数密度を同時にリアルタイムで定量評価するシステムを確立することができれば、造影剤と分子の親和性評価が可能となり、アイデア段階で留まっている超音波セラノティクスの実用性を検証する有用なシステムとなりうる。申請課題では、これまでに提案している圧電バイオセンサ(水晶共振子)を用いた評価機構を改良し、計測精度の向上を目指した。

概 要

水晶共振子(Quartz Crystal Microbalance; QCM)は微小質量センサや生体分子間の反応をリアルタイムに検出する圧電バイオセンサとして応用されている。センサ表面に加えられる質量負荷やセンサ表面の粘弾性的性質の変化をQCMの電気インピーダンスの変化として検出することにより上記のような応用が実現され

る。本研究では、QCMを医療用造影剤として使用されるナノ・マイクロバブルの検出用センサとして利用し、造影剤の重要な性能の一つである標的指向性をQCMの電気インピーダンスの変化として定量評価するシステムを構築することを目指した。

医用超音波の分野では、特定の生体分子と結合することができるナノ・マイクロバブルが開発され、超音波画像診断における造影剤や超音波ドラッグデリバリーシステム(USDDS)における薬物担体として利用されている。血管新生や炎症に関連する生体分子に対する標的指向性を有したバブルを利用することで、腫瘍組織や炎症組織に効率的にバブルを集積させることが可能となる。バブルと標的分子間の親和性はイメージングにおける感度やUSDDSにおける薬物の集積効率に影響する重要な特性であり、定量的に評価する必要がある。このような背景から、これまでの研究において滴下型セルにQCMを組み込んだ評価システムを構築している。QCM表面に標的分子を固定化し、バブル懸濁液をセンサ表面に滴下することで、センサ表面上においてバブルと標的分子の生化学反応を生じさせる。この滴下式システムにおいて無負荷時、標的分子固定化時、バブル吸着時のそれぞれの状態におけるQCMの共振周波数を計測することで、バブルの吸着量(数密度)を評価することができる。しかし、標的分子濃度とバブル吸着量の量的関係性については検証できていなかった。また、滴下式システムでは再現性が悪く、検出感度が低いという問題も確認された。

研究期間内において、第一の実施項目として、滴下式システムを用いて標的分子濃度とバブル吸着量の関係性を定量的に評価し、提案システムの有効性を検証した。まず、標的分子としてストレプトアビジンをQCM表面に固

定化した。QCM表面に固定化したアビジンを走査型電子顕微鏡により評価するとともに、アビジン固定前後におけるQCMの共振周波数の変化から定量化した。次に、ストレプトアビジンとそれに特異的に吸着するビオチンを固定化したバブル(ビオチン化バブル)との反応を評価した。ストレプトアビジンに吸着したバブルの量についても反応前後におけるQCMの共振周波数の変化から定量化した。その結果、QCM表面に固定化したアビジンの量と吸着したバブルの量の間で弱い相関が確認され(相関係数 $r=0.44$)、提案システムの有効性が示された。

次に、計測の再現性を改善するため、フロー式の評価システムを構築し、その計測精度を滴下式と比較検証した。滴下式からフロー式にすることで、作業工程の減少によるヒューマンエラーの防止、評価試料の蒸発による温度変化の抑制等が期待でき、計測精度が向上することが期待される。滴下式システムにおいて手作業で行っていたアビジンの固定化、バブル懸濁液の滴下工程を、シリンジポンプを組み込んだフロー式では自動で実施することができる。両システムを用いてストレプトアビジンと反応したビオチン化バブルの吸着量を評価したところ、両者の間で周波数シフト量の平均値に大きな差異は確認されなかったが、そのばらつき(変動係数)は滴下型セルの場合0.34、フロー型セルの場合0.09となり計測精度が格段に改善されることを確認した。また、共振子表面上に固定された造影剤数を光学顕微鏡により観察し、付着バブルの個数を計測したところ、そのばらつき(変動係数)は滴下型セルの場合では0.11程度、フロー型セルの場合は0.011となり、この結果からもフロー型セルの使用でシステムの安定性が改善されることが示された。

－以下割愛－