

日本超音波医学会 平成 19 年度第 1 回超音波分子診断治療研究会

代 表：立花克郎（福岡大学医学部解剖学教室）

日 時：平成 19 年 6 月 23 日（土）

場 所：福岡大学医学部看護学科棟 1 階

【招待講演】 座長 立花克郎（福岡大学医学部解剖学教室）

超音波治療の最前線 - HIFU（強力集束超音波）から音響化学療法まで -

梅村晋一郎（東北大学工学部）

もともと機械的な振動の伝播である超音波は、単独でも、その機械作用や、それが組織に吸収されることにより生ずる加熱作用を生体に対して発生する。これらの作用は、ミクロン程度の微小気泡が共存することによって著しく増幅される。さらに、これらだけにとどまらず、微小気泡が急速に圧壊する瞬間に局所的な高温を生じ、これによって音響化学反応を生じることがある。ここでは、最近、臨床的に普及し始めている強力集束超音波 HIFU による加熱凝固療法をマイクロバブルにより加速する研究、このマイクロバブルをナノ液滴から生じさせる研究、音響化学反応によって抗腫瘍効果を発生させる研究について紹介する。

【一般演題】

1) 超音波を併用した液体二酸化炭素抽出の組織への応用

三島建司（福岡大学工学部化学システム工学科）

液体二酸化炭素および超臨界二酸化炭素は、極性の強いタンパク質、アミノ酸に対して親和性が低く、それらをほとんど溶解しない。しかし、液体二酸化炭素および超臨界二酸化炭素は、油脂や脂質などに対して溶解力を持っている。その溶解力は、圧力により大きく変化し、分離・精製が容易である。また、使用する圧力が 2MPa 程度の圧力域では、タンパク質などの生体関連物質を変性させる可能性も低く、二酸化炭素自身の反応性が低いことから、組織からの脂肪や脂質の分離用媒体として注目されている。超音波を併用した液体二酸化炭素にて、組織からの脂肪抽出を試みた。超音波を併用することにより、従来法では、分離・除去が困難であった脂肪などの分離の可能性が示された。さらに、二酸化炭素を用いた合成系の概要を解説した。

2) U937 における光感受性物質と超音波を併用した殺細胞効果について

原田慶美（福岡大学医学部解剖学教室）

Potential clinical use of ultrasound in enhancing the effects on anticancer drug in the treatment of cancers has become the center of wide interest. So We investigated the effect of cell killing by combination of microbubble (Perflubutance; Sonazoid[®]) and US, anticancer drug (Vindesine Sulfate; Fildesin[®]) and US, Sonazoid[®]-Fildesin[®] and US. Human myelomonocytic lymphoma U937 cells were used for the experiments. Experiments were conducted in 6 groups; (1) non-treated, (2) Fildesin[®] treated, (3) US treated, (4) Fildesin[®] + US, (5) Sonazoid[®] + US, (6) Fildesin[®] + Sonazoid[®] + US. Added 250 $\mu\text{g/ml}$ Fildesin in U937 suspension and sonicated by 1.011 MHz US (Burst rate: 5 Hz, Duty: 25%) at intensities of 0.6 W/cm² for 60s. The cells incubated for 0.5 ~ 5 hr after sonication. The viability was evaluated by MTT assay. The result, The most cell killing effect was observed in group (4)·(5). The anticancer effect of fildesin was observed after 5 hr invasion. And the effect was enhanced by combination of Fildesin[®] and US.

3) Low-intensity ultrasound inhibits cancer cell growth in vitro and tumor growth in vivo

Loreto Feril (Dept of Anatomy, Fukuoka University School of Medicine)

In this portion of the review we will focus and discuss various aspects of low-intensity ultrasound (US), with emphasis on mild thermal effects, apoptosis induction and sonomechanical effects. Mild thermal effects of US have been commonly applied for physical therapy. Though US has clear beneficial effects, the advantage of using US over the other heating modalities remains unclear. US have also been used in vivo and clinically in the treatment of wounds and fracture with promising results. On the biomolecular level, studies have shown that US can induce apoptosis and that certain conditions can provide an optimal apoptosis induction. As to the potential therapeutic applications, in addition to the thermal and other physical effects, apoptosis induction by US may offer a direct and rapid treatment of tumor or cancer tissues. Technological advances and rapidly accelerating research works in this field are providing an ever increasing array of therapeutic potentials for low-intensity US

日本超音波医学会 平成 19 年度第 2 回超音波分子診断治療研究会

代 表：立花克郎（福岡大学医学部解剖学教室）

日 時：平成 19 年 9 月 22 日（土）

場 所：明治大学生田キャンパス第 2 校舎 A 棟特殊プレゼンホール（4F）

1) 超音波の熱作用の検討 - マイルドハイパーサーミアによる遺伝子発現変化 -

高崎一朗¹、田淵圭章¹、趙 慶利²、小川良平²、近藤 隆²（¹富山大学生命科学先端研究センター、²富山大学大学院医学薬学研究部放射線基礎医学講座）

To clarify the detailed molecular mechanism underlying cellular responses to nonthermal low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS), gene expression patterns and genetic networks in human lymphoma U937 cells were examined using global-scale microarrays and computational gene expression analysis tools. Six hours after LIPUS treatment (0.3 W/cm² for 1 min), apoptosis (14 ± 3.8%, mean ± SD) without no cell lysis was observed. Of 22,283 probe sets analyzed, LIPUS down-regulated 193 genes and up-regulated 201 genes by > 1.5-fold. For down-regulated genes, the significant

genetic network D was associated with cellular growth and proliferation, gene expression, or cellular development. For up-regulated genes, the significant genetic network U was associated with cellular movement, cell morphology, and cell death. The present results indicate that LIPUS affects the expression of many genes and will provide novel insight into the biomolecular mechanisms of LIPUS in therapeutic application for cancer therapy.

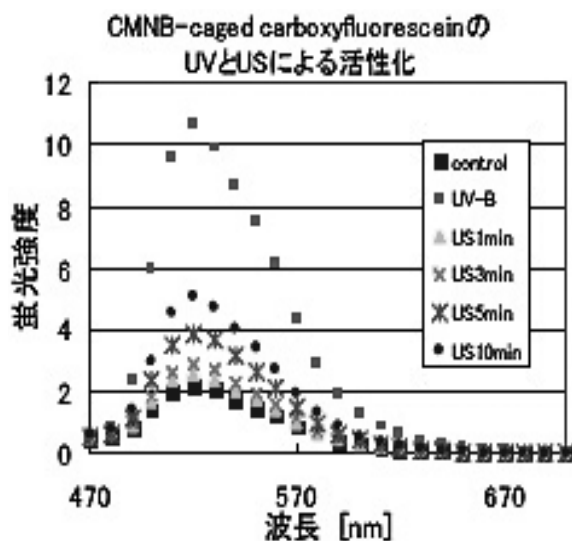
2) 超音波による光分解性ケージド化合物の活性化

金森 茜, 平岡和佳子 (明治大学理工学部物理学科)

近年超音波発生装置や照射技法の進歩に伴い, ソノケミカル効果を利用した治療法や診断法の開発が期待されている. 現在ソノダイナミックセラピーに適用されている薬物は, フォトダイナミック効果を持つ薬物から転用されたもので, 種類も限られている. 本研究は, 従来の治療薬とは異なるメカニズムで活性化し治療や診断に適用可能な薬物の開発を目的として, 主に光分解性クロスリンクを持つケージド化合物を用いて, 超音波による分解・活性化の可能性について検討をおこなった. ケージド化合物とは, 生理活性物質や蛍光物質などの機能性分子を光分解性分子基と結合させた薬物の総称である.

実験には, 超音波分解のターゲットとして CMNB: (5-carboxymethoxy-2-nitrobenzyl) 基, または CMNCBZ: ((5-carboxymethoxy-2-nitrobenzyl)-oxy) carbonyl) 基を持つ蛍光色素とそのデキストラン結合分子, 加えて Feril & 近藤 (1) により超音波活性が報告されている (N,N'-Bis(carboxymethyl)-N,N'-dinitroso-p-phenylenediamine (BNN) (caged NO) を使用した. 超音波照射は 1 MHz 連続波で, 照射用水槽中の強度 1.43 W とした. 対比実験としての光照射は, 超高压水銀ランプで, 照射強度 0.01 W とした. 各薬物の活性化は, 主に蛍光色素の放出で測定した. 細胞内での活性化の測定には, 白血球 B 細胞由来の PLB-985 を使用し, フローサイトメーターで蛍光量を定量した. その結果, いずれの化合物においても, 超音波によりクロスリンクが切断され蛍光物質が放出される様子が観察され, 一部細胞内でも同様の効果が観察された. 以上の結果は, 超音波による新たな診断・検出, 治療薬開発の可能性を示すものと考えられる.

(1) Ultrason Sonochem. 2006, 13, 397.



3) 弾性表面波による生体組織の硬さ評価

崔 博坤 (明治大学理工学部)

医学的应用という見地から, 生体組織の力学的特性のデータが重要視されてきている. しかし, 生体軟組織のように, 指で押すと簡単に变形するといった特徴を持つソフト物質の「硬さ」については, その定量化は難しい. ずれ弾性率のみならず粘性率を利用することで [硬さ] の指標により近づくのではないかと考えられる.

数百 Hz の表面波を伝搬させ, その速度・吸収を測定することにより, 試料のずれ弾性率の実部, 虚部 (すなわち粘性率) が得られる. 加振器からの振動を物質表面に伝搬させ, レーザ光の反射偏向から表面波を検出する. 拡散反射光でも検出できる CCD 型変位計を用いた. 用いた試料は, アガロースゲル 0.3-1%, カラギーナンゲル 0.3-1%, コンニャク, 豆腐, 豚レバーなどである. Fig. 1 は, 200 Hz で得られたずれ弾性率実部 G' と虚部 G'' を 2 次元的にプロットしたものである. 弾性 (実部) だけでは区別のつかないものも, 粘性 (虚部) を入れると特性が異なることがよくわかる.

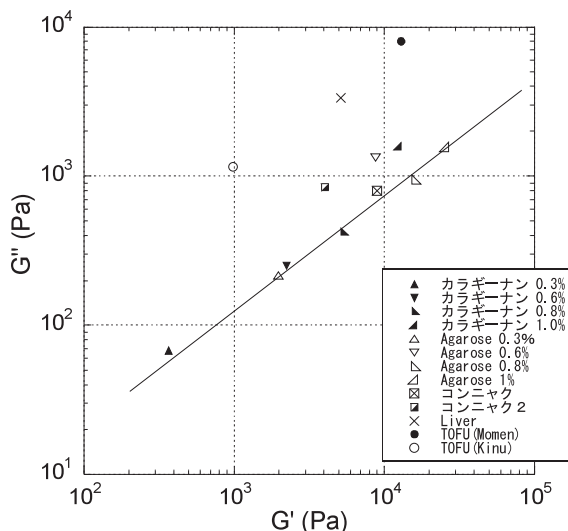


Fig. 1 Plot of shear modulus G' and G'' for various soft materials

4) パルス超音波を用いたソノポレーションにおける細胞変化のタイムラプス観察

工藤信樹, 後藤慎吾, 渡辺大士, 岡田健吾, 山本克之 (北海道大学大学院情報科学研究科)

【はじめに】我々はパルス超音波と微小気泡を用いた sonoporation (音響穿孔法) に関する検討を行っている. 以前, 我々は膜損傷による細胞外への蛍光染料の流出を可視化することにより膜の損傷と修復のダイナミクスを捉えたが [1], 蛍光観察だけでは細胞膜が変化の様子を十分に捉えることが出来ないという問題があった. そこで今回, 蛍光観察に加えて微分干渉法による観察を行い, 損傷および修復が起きている細胞の膜変化の様子を捉えた結果について報告する.

【方法】実験は倒立型顕微鏡のステージ上に観察チャンバと超音波振動子を備えた水槽を配置して行い, 微小気泡として Levovist[®], 膜損傷の評価に蛍光色素 PI (propidium iodide) を用いた. 一層に培養した細胞 (PC3) に微小気泡を付着させた状態で中心周波

数 1 MHz, 最大負圧 1.1 MPa, 波数 3 波のパルス超音波を 1 回照射し, 超音波照射前後の数秒間を微分干渉像でリアルタイム撮影し, その後引き続き, 蛍光像と微分干渉像を 10 秒間隔でタイムラプス撮影した。

【結果および検討】 観察結果を示す。(a) 照射前: 細胞 A, B に微小気泡が付着している。(b) 照射直後: 気泡の付着部位近傍に蛍光が見られたことから, 膜が損傷したことがわかる。細胞によっては損傷部位が徐々に膨張する様子も観察された。(c) 照射約 10 分後: 細胞 A では, 細胞内の蛍光輝度の上昇と損傷部位の膨張が持続的に観察されたことから, 膜の修復が起きなかったと考えられる。一方, 細胞 B では, 照射後 2 分程度で蛍光強度の増加と損傷部位の膨張が止まり, やがて細胞内での拡散による蛍光輝度の低下と膨張した細胞膜の原状復帰が見られたことから, 膜の修復が起きたものと考えられる。また, 細胞 B のような修復のほかに, 細胞膜の変化がほとんど見られず損傷後数秒で修復が完了する場合も観察された。これは, 前者がカルシウムイオン存在下で起こる細胞内の小胞が損傷をふさぐ能動的修復を, 後者が脂質二重膜の流動性によって起こる受動的修復を捉えた結果と考えられる。

【まとめ】 パルス超音波の照射により気泡付着部位に生じる細胞膜の損傷を, 微分干渉像と蛍光像でタイムラプス観察した。微分干渉像では, 細胞の損傷と修復に伴う膜変化が観察可能であり, 機序の違いによる膜修復の違いが捉えられた。

5) 生体吸収性セラミックス微小球による DDS の開発と超音波の応用

江本 精¹, 長沼康子¹, 瓦林達比古¹, 立花克郎², 鹿又宣弘³, 相澤 守⁴ (¹福岡大学医学部産婦人科, ²福岡大学医学部解剖, ³早稲田大学理工学部化学科, ⁴明治大学理工学部応用化学科)

【目的】 われわれは, 生体に対して安全で低浸襲な Drug Delivery System (以下, DDS) の開発を行っている。そのキャリアーとして, 超音波噴霧熱分解法による生体吸収性のセラミックス微小球の合成およびその特性について報告してきた (明治大学)。本研究では, がん治療 DDS として臨床応用に向けた基礎的知見を得るために, 超音波噴霧熱分解法にて作製したセラミックス微小球に血管新生阻害剤を担持させ, *in vitro* での薬剤除放挙動および *in vivo* での抗腫瘍効果を調べた。

【方法】 超音波噴霧熱分解により Ca/P 比が 1.50 の TCP セラミックス中空微小球を作製し, 超音波洗浄後に凍結乾燥して DDS キャリアーとして用いた。本研究で用いた微小球の平均粒径は 1.2 μm であった。この微小球に血管新生阻害剤である TNP-470 を凍結乾燥して担持させ, 生理食塩水中での薬剤除放挙動を調べた。また, TNP-470 をわれわれが樹立したヒト子宮肉腫株 (Cancer 1992) FU-MMT-3 を用いて *in vitro* および *in vivo* ノードマウス移植腫瘍に対する抗腫瘍効果について検討した。

【結果】 微小球の TNP-470 担持量を測定した結果, 薬剤の約 75% は一時間以内に急速に除放され, 残り約 25% は緩やかに除放されること (二段階除放) が確認された。*in vitro* での評価では, 培地中の TNP-470 濃度が 0.001 - 0.0025% で FU-MMT-3 細胞の増殖を阻害した。*in vivo* では, 本微小球及び TNP-470 を担持させた微小球を腫瘍近傍へ皮下投与した結果, 腫瘍の増殖を有意に抑

制した。血管内皮細胞の免疫組織化学染色にて, 微小球は移植腫瘍組織内の微小血管を塞栓した形で認められた。

【結論】 超音波噴霧熱分解法にて作製した生体吸収性の TCP セラミックス微小球に血管新生阻害剤 (TNP-470) を担持することに成功し, 薬剤の二段階除放が確認された。TCP セラミックス微小球は腫瘍組織内の微小血管を塞栓し, TNP-470 を担持した微小球による治療群は有意に腫瘍抑制効果を示した。臨床応用に向けた TCP セラミックス微小球の高度がん治療 DDS キャリアーとしての有用性が示唆された。

6) The Effects of Low Intensity Ultrasound on Tumors: Preliminary Study in Mice

立花克郎, 遠藤日富美 (福岡大学医学部解剖学教室)

Recently we demonstrated that low-intensity ultrasound combined with echo contrast microbubbles can be utilized to deliver genes into tumor cells. However, the effect of ultrasound on tumors and the safety of ultrasound in cancer patients are still unknown. In this study, we determined whether the tumor growth of human gastric carcinoma could be affected by directly irradiating the tumors in nude mice with low-intensity ultrasound.

MATERIALS AND METHODS: *In vitro*, 2×10^6 /ml CHO cells were irradiated with low-intensity therapeutic ultrasound (1 MHz) at 0.2 - 2.0 W/cm², 10 - 70% duty cycle for 20 - 60 seconds. ($n = 5$). The cell viability was immediately analyzed. *In vivo*, human gastric carcinoma cells (MKN-74) were subcutaneously implanted in Balb/c nu/nu mice at 0.1 ml with 5×10^6 cells per mouse. The tumors which were approximately 5 - 6 mm in diameter were directly sonicated for 2 minutes once daily for three days, at a 1-MHz, 20 - 50% duty cycle, 0.5 - 2.0 W/cm² intensity ($n = 8$) and tumor diameters were examined twice a week. The temperatures at the surface and the inside of tumor were also measured.

RESULTS: *In vitro*, at duty cycle 50%, sonication resulted in just about 10% decrease in cell viability at 0.2 - 1.0 W/cm² intensity for 20 - 60 seconds, but the sonication at 1.5 - 2.0 W/cm² intensity significantly reduced cell viability depending on the duration of sonication. At intensity 1.0 W/cm², there was no difference at duty cycle 10 - 50% for 20 - 60 seconds. *In vivo*, there was no significant difference of the tumor sizes in the groups of 0.5, 1.0, 2.0 W/cm² at duty cycle 50% compared with the unsonicated control group. At duty cycle 20%, there was no significant difference in the tumor size between 0.5 W/cm² and control group, but the tumor growth increased in 1.0 W/cm² and 2.0 W/cm² intensity groups compared with control group. The temperatures of the interior tumor were raised about 5°C and the temperatures of the tumor surface were raised about 2°C after sonication for 10 minutes and there was no significant difference in the separated groups.

CONCLUSION: Tumor growth of human gastric carcinoma was not affected by direct irradiation with low intensity ultrasound at intensity 0.5, 1.0, 2.0 W/cm² and duty cycle 50%. It could also be suggested that low intensity ultrasound irradiation used for other purposes is safe to use on patients.

日本超音波医学会 平成 19 年度第 3 回超音波分子診断治療研究会

代 表：立花克郎（福岡大学医学部解剖学教室）

日 時：平成 20 年 2 月 23 日（土）

場 所：福岡大学医学部看護学科棟 中講堂 1

【特別講演】 座長 立花克郎（福岡大学医学部解剖学教室）

1) 超音波力学的療法を併用した肉腫に対する切除法

岡田恭司（秋田大学医学部神経運動器学講座整形外科学分野）

To determine if there is any synergistic antitumor effect of ultrasound (US) in the presence of sparfloxacin, one of new-quinolone (NQ) antibiotics, 0.2 mM solution of SPFX was used as sonodynamic compound against sarcoma 180 cells in vitro. After US irradiation at 0.11 W/cm² for 30 seconds, the survival rates of tumor cells in 0.2 mM SPFX added groups were significantly lower than those without ($P < 0.001$). In May-Giemsa smear, most of tumor cells were maintained intact in control group. However, in the SPFX added group, the tumor cells were mostly broken into pieces. The synergistic antitumor effects of SPFX were also dose dependent. In scanning and transmission electron microscopic study, most cells in the control group were spherical, but in the SPFX-added group the cells were aspherical. Cell membranes were often ruptured, and numerous pores of various sizes were observed. Some cells were totally disintegrated. These findings suggest that NQ antibiotics would be promising compounds for antitumor activities under US irradiation, and the most characteristic changes of synergistic antitumor activities of US and SPFX were on cell membrane.

2) 超音波を用いた分子標的治療の可能性 - 基礎医学的立場での検討 -

近藤 隆（富山大学大学院医学薬学研究部放射線基礎医学講座）

Interest in molecular imaging and in molecularly-targeted therapy has grown tremendously, and ultrasound may offer new tools for modern cancer therapy. To understand how therapeutic ultrasound works, it is necessary to understand its biological effects at the molecular level. In this review, investigations on the molecular aspects of ultrasound are discussed, with emphasis on apoptosis induction, gene expression, and gene transfection. In these studies, apoptosis induction was assayed with flow cytometry and with other methods targeting indicators of apoptosis. Gene expression was evaluated using western blotting, real-time polymerase chain reaction, and microarray analysis. Gene transfection was investigated using a luciferase assay and other methods. The reported results show that low intensity ultrasound can induce apoptosis in cancer cell lines, and that this effect can be optimized using pulsed ultrasound. Sonication can result in the down-regulation or up-regulation of some genes. Of particular interest is the striking up-regulation of the heme oxygenase-1 gene, a gene usually associated with oxidative stress in human lymphoma U937 cells. Introducing genes using ultrasound with or without microbubbles also exhibited promising results.

3) 超音波照射時の生体内音圧・温度分布の推定法とその応用

遠藤信行（神奈川大学工学部電子情報フロンティア学科）

医用超音波は、非侵襲的な画像診断のために一般的に使用されているが、吸収減衰により発熱現象が起こる。近年、超音波出力は高くなりつつあり、生体内温度上昇の安全性の確認が非常に重要となっている。しかしながら、生体内内部における発熱状態を非侵襲的に詳細に確認することは難しい。そこで、Bモード撮像法で使用される寒天ファントムの音響特性を様々に変化させたファントムを製作し、超音波照射によるファントム内部の発熱状態を確認し、これから生体内内部の温度上昇を推定するための基礎資料を得ることを目的として研究を行った。さらに骨（反射体）の有無でファントム内の温度上昇がどのように異なるか検討を行った。

【一般演題】

1) ナノバブルの音響特性に関する基礎的検討

工藤信樹（北海道大学大学院情報科学研究科生体計測工学研究室）

New methods for ultrasound contrast imaging that use amplitude-encoded ultrasound pulses have recently been developed. An understanding of various behaviors of bubbles exposed to ultrasound pulses with different pressures is important for using these methods. In order to study the dependence of bubble behavior pressure, a high-speed observation system was improved to generate pulses that have various pressures at pulse intervals of several tens of microseconds. A microbubble was exposed to five ultrasound pulses with increasing pressures (normalized pressure of 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 and 1.8 at pulse intervals of 20 μ s). The total frame number of the high-speed camera is 24, and 5 frames were assigned to the first 4 pulses and 4 frames were assigned to the first to the last pulse. The ultrasound contrast agents Definity and Levovist[®] were used in the experiments, and the center frequency of ultrasound pulses was set at 1 MHz. It was found that the amplitude of bubble oscillation generally increased with increase in pulse pressure, though discontinuous increase in oscillation amplitude was frequently observed in the results obtained using Levovist[®]. This strong nonlinear relationship between pressure of ultrasound pulse and amplitude of radial oscillation should be considered in amplitude-encoded contrast imaging methods.

2) 超音波刺激を用いた骨代謝制御

渡辺敏之（九州大学歯学研究院口腔常態制御学）

骨芽細胞による骨形成、ならびに破骨細胞による骨吸収の作用によって、骨組織におけるリモデリングが維持されている。これらの細胞の機能の制御には、サイトカインをはじめとする化学的因子のほか、重力や振動などの物理的因子が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。ことに近年では、骨折の治療過程で患部に超音波の振動を与えることによって骨形成が高まる効果が認められ、臨床的な応用も進んできている。しかしながら、超音波の出力・照射時間・パルスといった条件による差異、あるいは照射によって細胞レベルでの遺伝子や蛋白の発現がどのように変化するのか、といった細胞生物学的な機序は充分に明らかになっていない。本研究では、24 well Plate にマウス骨芽細胞

系細胞株：MCⅢTⅢ-E1を播種し、アスコルビン酸・デキサメタゾン存在下で培養。2日後細胞が底面に付着しているのを確認し、各Plateに異なる条件の超音波を照射。その後さらに2～3週間培養し、底面に沈着した石灰化物をアリザリンレッドで染色し比較検討した。その結果、超音波照射群は対照群よりも石灰化物が多く沈着しており、中でもFrequency 1.0 MHz・Intensity 15V・Duty cycle 25%の条件で30秒から60秒照射した群は、対照群との差が顕著であった。このことから、In vitroにおける超音波照射が、骨芽細胞による石灰化を促進させることが示唆された。

3) 抗がん剤（フェルデシン）・マイクロバブル・超音波照射併用療法の抗腫瘍効果について

原田慶美（福岡大学医学部解剖学教室）

Potential clinical use of ultrasound in enhancing the effects on anticancer drug in the treatment of cancers has become the center of wide interest. So we investigated the effect of cell killing by combination of microbubble (Perflubutane; Sonazoid[®]) and US (ultrasound), anticancer drug (Vindesine Sulfate; Fildesin[®]) and

US, Sonazoid[®]-Fildesin[®] and US. Human myelomonocytic lymphoma U937 cells were used for the experiments. Experiments were conducted in 6 groups; (1) non-treated, (2) Fildesin[®] treated, (3) US treated, (4) Fildesin[®] + US, (5) Sonazoid[®] + US, (6) Fildesin[®] + Sonazoid[®] + US. Added 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fildesin[®] in U937 suspension and sonicated by 1.011 MHz US (Burst rate: 5 Hz, Duty: 25%) at intensities of 0.6 W/cm^2 for 60s. The cells incubated for 0.5 ~ 5 hr after sonication. The viability was evaluated by MTT assay. The results, the most cell killing effect was observed in group (4)・(5). The anticancer effect of Fildesin[®] was observed after 5 hr incubation. And the effect was enhanced by combination of Fildesin[®] and US. The above experimental results suggest that combination of ultrasound and contrast agent microbubbles could be used for enhancement of conventional anti-cancer drugs such as Fildesin[®]. Further experiments are needed to evaluate the exact mechanism of this phenomenon.