

日本超音波医学会平成 21 年度第 1 回超音波分子診断治療研究会抄録

代 表：立花克郎（福岡大学医学部解剖学教室）
日 時：平成 21 年 8 月 7 日（金）
場 所：北海道大学情報科学研究科（札幌市）

共 催：第 2 回基礎技術研究会
第 2 回基礎技術研究会共催の為、「超音波医学」37 卷 3 号に掲載
されていますので、ご参照下さい。

日本超音波医学会平成 21 年度第 2 回超音波分子診断治療研究会抄録

代 表：立花克郎（福岡大学医学部解剖学教室）
日 時：平成 21 年 12 月 18 日（金）
場 所：産業技術総合研究所 臨海副都心センター別館 11 階会議
（東京都江東区）
共 催：第 2 回超音波とマイクロバブルの相互作用に関するシン
ポジウム

1) 超音波照射下での微小気泡のふるまいと細胞への作用の観察
工藤信樹（北海道大院情報科学研生命人間情報科）
一般のソノポレーションでは、導入効率を高めるために、連続
もしくは長いパルス超音波の照射が行われる。これに対し我々
は、気泡が細胞に付着した条件では、短いパルス超音波を一回照
射するだけでもソノポレーションが起きることを見出し、これに
基づく安全なソノポレーションの実現を目指して研究を進めている。
パルス超音波のもう一つの特徴として、細胞や気泡に与える
音響放射圧が連続波に比べて格段に低く、超音波照射前から後
にかけての細胞の変化を顕微鏡で連続観察ができることが挙げられ
る。連続波照射では、細胞が音響放射圧によって視野外に消える
ため、これを追跡して変化を調べるのは非常に難しい。本報告で
は、この特徴を生かして、気泡のふるまいと細胞への作用の関連
を調べた結果について述べる。

2) 超音波気泡マニピュレーションによるキャビテーション増強
山越芳樹（群馬大院工）
超音波により引き起こされる微小気泡のキャビテーションによ
るソノポレーションでは、細胞への薬液導入効果の向上のために
超音波中で微小気泡に加わる音響放射圧を用いることが考えられ
ている。今回、高含水の高分子ゲルである NIPA ゲル（N-isopropylacrylamide gel）をソノポレーション評価用血管模擬ファン
トムとして用い、超音波ボンピング波と呼ぶ気泡を破壊しないが
気泡に音響放射圧を加えることができる超音波で気泡のダイナミ
クスを制御し、気泡破壊に伴うキャビテーション効果の増強を試
みたのでその結果を報告する。

3) マイクロバブルを用いた生体内での超音波作用増強効果
荻仲 潔、歌代浩志、西原輝章、高木 周、松本洋一郎（東大
院工）
近年、悪性腫瘍の治療法として HIFU (High intensity Focused
Ultrasound) が注目されており、数多くの臨床例が報告されてい
る。HIFU は、体外から強力な超音波を集束させて患部のみに非
常に高い熱エネルギーを発生させて、焦点の組織のみを加熱凝固
させる方法であり、外科的手術の必要がなく、低侵襲であるとい
う大きなメリットを持つ。

しかし、超音波が伝播する過程で骨や脂肪があることによって、
超音波が反射、屈折、減衰を起こしてしまうため、頭蓋骨に覆わ
れた脳腫瘍や体内深部に存在する肝腫瘍には十分なエネルギーが
届かず、一般的には治療が非常に困難である。この問題を解決す
るためにマイクロバブルを用いた HIFU の研究がなされている。
マイクロバブルに超音波を照射すると、マイクロバブルが振動し
て熱エネルギーを発生することが分かっており、このマイクロバ
ブルを患部に存在させることで弱い超音波でも高い熱エネルギー
を発生させて、治療が可能となることが期待されている。そこで
本研究では、マイクロバブルを用いた HIFU 治療において、意図
した部位のみを効率よく治療するための加熱領域制御法を開発す
ることを目的としている。

4) Physicochemical properties and disposition of micro-
bubble ultrasound contrast agent (Sonazoid[®])
Manabu Matsumura (Translational Medicine and Clinical pharma-
cology, R&D Division, Daiichi Sankyo Co., Ltd.)

The principal mechanism of contrast agent for ultrasonography is
the scattering of ultrasound from small envelopes of gas as they un-
dergo volume oscillations in the sound beam. During ultrasound
scanning, body cavities and compartments containing microspheres
will thus appear bright (White) compared with regions without con-
trast agent. Since air is highly soluble in the surrounding matrix, to
increase the stability of microbubbles without including a rigid stabi-
lizing structure, a more slowly diffusing, low solubility gas such as
low molecular weight perfluorocarbons have been utilized. Sonazoid[®]
is one of such products, which consists of perfluorobutane gas (PFB,
C₄F₁₀) microbubbles stabilized by a phospholipids (hydrogenated egg
phosphatidyl serine). The product is formulated as a lyophilized
powder for injection and is reconstituted with sterile water before
use. Each mL of reconstituted suspension contains 8 μ L of the mi-
crobubbles whose volume median size is 2 to 3 μ m.

5) マイクロバブルの生体内 in situ 生成およびその医用応用
川畑健一¹、浅見玲衣¹、吉川秀樹¹、東 隆¹、梅村晋一郎²
(¹日立中研、²東北大工)

我々は、腫瘍診断・治療を目的とし、マイクロバブルの高い造
影能とナノ微粒子の高い体内選択性を両立するため、体内投与時
はナノサイズの液滴で、超音波パルスにより目的部位のみで気化
しマイクロバブルを生成する造影剤および造影システムの開発を
行っている。本造影剤（相変化ナノ液滴）は複数の液体パーフル
オロカーボンを含むことを特徴とするサブミクロンサイズのエマ
ルションであり、過熱状態で存在し、超音波パルスにより過熱状

態を解消することで本来の気体に戻るという機序によりマイクロバブルを生成する。マイクロバブル造影剤が加熱凝固治療およびキャビテーション治療用の増感剤として効果があることが知られていることから、本相変化ナノ液滴から生成したマイクロバブルもまた治療用増感剤特に部位選択性の高い治療増感剤としての応用が期待される。今回、この相変化ナノ液滴の造影および治療増感に関する基礎検討を行った。

6) 悪性黒色腫に対する超音波とマイクロバブルを併用したメルファランの抗腫瘍効果の検討

松尾美希^{1,2}, 山口和記², Loreto B.FERLL Jr.¹, 遠藤日富美¹, 小川皓一¹, 立花克郎¹, 中山樹一郎² (¹福岡大医解剖学, ²同皮膚科学)

メラノーマは非常に侵襲性の強い皮膚悪性腫瘍で、侵襲期のメラノーマにおいては様々な化学療法が行われているが、良好な生存結果が得られず効果的な新しい治療法の確立が切望されている。メルファランはかつてメラノーマの化学療法に使用されていたが、有効な治療効果が得られず、標準的化学療法として用いられるには至らなかった。そこで本研究は、超音波キャビテーションによる細胞内薬剤輸送の増強効果を応用し、メルファランのメラノーマに対する抗腫瘍効果を *in vitro*, *in vivo* で検討した。

7) 超音波による DNA 損傷応答とマイクロバブルによる増強

古澤之裕¹, 趙慶利¹, 田淵圭章², 高崎一朗², 藤原美定¹, 近藤 隆¹, 高橋昭久³, 大西武雄³ (¹富山大院医薬研 (医学) 放射線基礎医学, ²富山大生命科学先端研究センター, ³奈良県立医大生物学)

超音波は現代医療において画像診断分野のみでならず、機械的作用や熱的作用を利用してがん治療にも用いられている。例えばハイパーサーミア用超音波加熱装置は病巣を 41 ~ 14°C にする目的でがん温熱療法に用いられており、また集束超音波 (HIFU) 治療装置は集中させた超音波の高温を利用して、前立腺がんや乳がんのアブレーション治療に用いられている。温熱誘導がん細胞死の原因の一つとして γ H2AX フォーカス形成に示唆される DNA 損傷が報告されており、最近 HIFU によっても DNA 損傷が誘発され、そのシグナル伝達経路が活性化されることが報告された。十分な温度上昇をとまう超音波照射条件下では熱作用が DNA

損傷を引き起こすことが考えられるが、他の超音波作用が直接細胞内の DNA に与える影響はいまだ明らかではない。そこで我々は、温度上昇を極力抑制した条件の低強度パルス超音波が細胞内 DNA に与える影響について検討した。またマイクロバブル添加効果についても調べた。

8) リボソーム型微小気泡 (バブルリボソーム) の超音波がん遺伝子治療への応用

鈴木 亮¹, 小田雄介¹, 宇都口直樹¹, 丸山一雄¹, 根岸洋一², 中川晋作³ (¹帝京大薬, ²東京薬大薬, ³大阪大院薬)

Interleukin-12 (IL12) 発現遺伝子を用いたがん遺伝子治療は、Natural killer (NK) 細胞、細胞傷害性 T 細胞の活性化、interferon- γ 産生誘導などの強力な抗腫瘍免疫の活性化によるがん治療として期待されている。このがん遺伝子治療法を確立するためには、*in vivo* において安全かつ効率よくがん組織に IL12 発現遺伝子導入可能な方法の開発が必要となる。これまでに我々は、超音波造影ガス封入リボソーム (バブルリボソーム) と超音波の併用が *in vivo* において、既存の非ウイルスベクターである Lipofectamine2000 よりも効率よく遺伝子導入可能であることを明らかにしてきた。そのため、バブルリボソームと超音波の併用は、IL12 がん遺伝子治療に有用な遺伝子導入法として期待される。

そこで本研究では、本遺伝子導入法を用いた IL-12 発現遺伝子導入における抗腫瘍効果を評価した。

9) ソノポレーションの基礎と応用方法

立花克郎 (福岡大医解剖学)

現在超音波薬物導入に使われているマイクロバブルは市販されている超音波造影剤を単に流用しているに過ぎない (受動的 Targeting)。薬物の“運び屋”や“ブースター”として専用開発された“テラーメイドマイクロバブルも検討されるようになり、その大きさ、殻の性質など診断治療に最適化されたバブルや特定の組織のみに集積する、“知的 (Intelligent)”バブルも夢ではなくなってきた (能動的 Targeting)。将来、確立された超音波治療法になるまでにはより多くの基礎実験が必要である。いずれにしても、超音波で非侵襲的かつ安全に薬物を増強・制御できればあらゆる疾患に対する新しい治療方法として役に立つと考えられる。

日本超音波医学会平成 21 年度第 3 回超音波分子診断治療研究会抄録

代 表：立花克郎 (福岡大学医学部解剖学教室)

日 時：平成 22 年 3 月 6 日 (土)

場 所：福岡大学 (福岡市)

【招待講演】座長 立花克郎 (福岡大学医学部解剖学教室)

1) 筋組織への超音波遺伝子デリバリーシステムによる疾患治療への応用

根岸洋一¹, 遠藤(高橋)葉子¹, 鈴木 亮², 丸山一雄², 新橋幸彦¹ (¹東京薬科大薬, ²帝京大薬)

我々は、超音波造影ガス封入リボソーム (バブルリボソーム) を用いた超音波遺伝子デリバリーシステムの開発を行っている。今回、筋組織への超音波遺伝子デリバリーシステムを確立し、さらに遺伝子治療に有用な手法となるか否かを明らかとするために、がんやリウマチモデルに対する治療用遺伝子の局所筋組織への投

与を行い、全身循環を介したサイトカイン療法を試みた。本講演では、得られた結果に基づき、本遺伝子デリバリーシステムの遺伝子治療への可能性について述べる。

2) 超音波応答性リボソームの開発とがん治療への応用

鈴木 亮, 小田雄介, 丸山一雄 (帝京大薬生物薬剤学)

これまでに我々は、超音波造影ガスを封入した超音波応答性リボソーム (バブルリボソーム) と超音波の併用による遺伝子導入法を開発した。そこで本研究では、本遺伝子導入法のがん遺伝子治療における有用性を評価した。マウス卵巣がん (OV-HM) 細胞を移植したマウスのがん組織内にバブルリボソームと IL-12 発現プラスミド DNA を投与し、体外からがん組織に向け超音波照射することで遺伝子治療を行った。その結果、5 例中 4 例のマウスで完全治癒が得られるような強力ながん治療効果が認められた。

このことから、バブルリポソームと超音波照射は、IL-12 がん遺伝子治療において有用な非ウイルスベクターシステムとなることが示唆された。

【一般講演】座長 立花克郎（福岡大学医学部解剖学教室）

1) 超音波による DNA 損傷

近藤 隆（富山大院医薬研(医学)放射線基礎医学）

超音波は、その機械的作用や熱的作用を利用することでがん治療に用いられ、ハイパーサーミアへの応用では病巣を一定温度以上に加温することで、また集束超音波によるアブレーション治療への応用では音波集中による高温を利用し、治療機器に使用されている。温熱による細胞死誘導機構の一つとして DNA 損傷が注目されており、温度上昇が十分な超音波照射条件下では熱による DNA 損傷を引き起こすことが考えられる。しかし、超音波が直接細胞内の DNA に与える影響ははまだ明らかではない。最近我々は、温度上昇を伴わない照射条件の超音波が、遺伝子発現変化とアポトーシスを引き起こすことを示した。本講演では、超音波により誘導される DNA 損傷、特に DNA 二本鎖切断について、gH2AX の検出と中性コメットアッセイ法および DNA 損傷応答分子群の解析法により得られた結果について概説する。また、温熱および放射線の効果について類似点および相違点を考察する。

2) パルス超音波と微小気泡を用いたソノポレーションによる抗がん剤効果増強と遺伝子導入効率向上に関する基礎的検討

渡辺典子, 工藤信樹, 清水孝一（北海道大院情報科学研生命人間情報科）

我々はパルス超音波と微小気泡を用いたソノポレーションに関する研究を行っている。本報告では、その有用性を確認するため 2 つの検討を行った結果を述べる。まず、パルス超音波を用いた安全なソノポレーションとしての抗がん剤の効果増強を、抗がん剤タキソールとオキサリプラチンを用いて検討した。その結果、ソノポレーションがオキサリプラチンの効果増強に有用であることが示された。次に、遺伝子導入効率の向上の基礎的検討として、光ピンセットを用いて気泡位置の制御を行い各気泡位置条件での細胞膜損傷を観察した。その結果、気泡の大きさや付着部位を制御することにより細胞損傷の程度が制御できることが示された。

3) バブルリポソームのシェル特性とダイナミクス

工藤信樹（北海道大院情報科学研生命人間情報科）

超音波の照射により細胞内への薬物送達を行うソノポレーションでは、その効率を増強するために超音波造影剤の直径 1~数ミクロンの微小気泡が用いられている。最近では、リポソームの内部に微小な気泡を取り込ませた気泡、バブルリポソームをソノポレーションに応用する研究も進められている。この気泡の直径は数百 nm と小さいため、従来から用いられている超音波造影剤とは超音波照射下での動的な特性が大きく異なることが予想される。本発表では、気泡懸濁液の透過係数の音圧特性を測定することによって気泡のダイナミクスを評価する方法を用いて、シェルの組成が異なる 5 種類のバブルリポソームのダイナミクスについて検討を行った結果について報告する。

4) High-speed photography of sonoporation

S.F.Moossavi-Nejad（福岡大医解剖学）

The objective of this project was to elucidate the relationship between ultrasound contrast agents (UCAs) and sonoporation. Sonoporation is an ultrasound-induced, transient cell membrane per-

meability change that allows for the uptake of normally impermeable macromolecules. Sonoporation is used to design new drug delivery systems using US and contrast agents. However, the underlying mechanisms are still unknown. One hypothesis is that oscillating microbubbles cause cell deformation resulting in enhanced cell membrane permeability. Specifically, this study will reveal the interaction between oscillating and moving microbubble and a single cell hold on the tip of a femtotip capillary glass under a microscope recorded with a fast framing camera at 5000 frames per second. In conclusion, the use of new experimental method makes it possible to reveal the mechanisms of interactions between ultrasound, microbubbles and cells. The results determine the role that linear cavitation plays in eliciting sonoporation under low frequency ultrasound.

5) 超音波応答性リポソームを用いた樹状細胞ワクチン療法によるがん転移予防効果

小田雄介, 鈴木 亮, 平田圭一, 宇都口直樹, 丸山一雄（帝京大薬生物薬剤学）

樹状細胞 (DC) によるがん免疫療法では DC 細胞質内がん抗原を導入し、MHC クラス I 抗原提示を介して有効な抗腫瘍免疫が誘導される。したがって、本療法を効果的な治療法として確立するためには、DC 細胞質内への抗原デリバリー技術が必須となる。我々は、超音波応答性リポソーム (バブルリポソーム) と超音波を利用した新規抗原デリバリー技術を確認した。そこで、本報告ではこの抗原デリバリー技術を利用した DC 免疫による B16BL6 (マウスメラノーマ) 細胞の肺転移予防効果について述べる。

6) 超音波を用いた再生医療用細胞外マトリックスの製造

三島健司（福岡大工化学システム工）

我々は、高圧力の超臨界二酸化炭素の応用技術として、マイクロカプセル・ナノ粒子などの製造技術を開発し、化粧品や健康食品製造への実用化に成功した。今回は、脂質に対して溶解性の制御が容易な高圧力の超臨界二酸化炭素中にて、超音波照射を併用することで、豚組織から細胞の拒絶反応の原因となる細胞核などを除去し、再生医療用の素材となる細胞外マトリックスを製造する方法について検討した。その結果、超臨界二酸化炭素のみで抽出するよりも、高圧力下で超音波照射を併用する方が、効率的に細胞外マトリックスを製造できることがわかった。

7) 二酸化チタン・超音波触媒法によるがん細胞傷害と増殖抑制

清水宣明, 仁宮一章（金沢大環日本海域環境研究センター, 生体機能計測研究部門）

これまで我々は TiO₂ に超音波を照射すると、活性酸素種であるヒドロキシルラジカル (・OH) の生成が促進され、大腸菌やレジオネラなどに対し効果的な殺菌効果が得られることを報告した (二酸化チタン / 超音波触媒法)。今回 *in vitro* での培養がん細胞に対する細胞傷害効果の確認およびそのメカニズムの解析、さらに *in vivo* での担がんマウスに対する抗腫瘍効果の確認を行った。その結果、二酸化チタン / 超音波触媒法を適用することでがん細胞の増殖抑制効果が確認でき、また細胞死メカニズムがアポトーシスによるものであることが明らかとなった。さらに担がんマウスにおいても抗腫瘍効果を確認することができた。

8) C32 細胞株における酸化チタンと超音波の併用による殺細胞効果について

原田慶美, 遠藤日富美, Loreto B.FERLL, 立花克郎（福岡大

医解剖学)

現在、光触媒の代表的物質である酸化チタンは、光により励起され非常に強い酸化力を持ち、優れた抗菌性、抗腫瘍効果が報告されている。そこで、我々は超音波と酸化チタンと併用し殺細胞効果を認めるか、メラノーマ細胞 (C32 細胞) 株において *in vitro*, *in vivo* にて評価した。その結果、*in vivo* にて酸化チタン、超音波単独ではほとんど影響が見られなかったが、酸化チタンと超音波を併用することで殺細胞効果を認めた。また、その効果は、酸化チタンの濃度、超音波の強度に依存し、増強された。*in vivo* においても、酸化チタンと超音波を併用することで、抗腫瘍効果を認めた。

9) ナノバブル・マイクロバブルの医療への応用

立花克郎 (福岡大医解剖学)

細胞に遺伝子を導入する技術には、ウイルスペクターを用いた

方法やエレクトロポレーション法があるが、ともに局所的な細胞への導入に不適切である。超音波による細胞穿孔法とマイクロバブル (微小気泡) を併用して薬物・遺伝子を細胞内へ取り込ませるソノポレーション法 (超音波穿孔法, SONOPORATION) は、標的細胞へのダメージも低く、効率よく薬物や遺伝子を細胞内へ導入することができる。我々は上記の実験を行う時に単細胞周辺に規則的で、安定なジェット流が発生することを発見した。すべての実験は細胞が浮遊状態で行われた。マイクロバブルの振動でおこるこの液体ジェット流を利用し、細胞を能動的に空間移動することが可能である。我々は超音波照射時にマイクロバブル (直径4ミクロン) に隣接する細胞を詳しく観察した。高速度ビデオカメラによる画像解析で細胞の回転運動が明らかとなった。今後、この音響力学的なマニピュレーション方法を利用し、細胞の3次元観察に応用できると期待される。