

日本超音波医学会平成 23 年度超音波分子診断治療研究会抄録

代表：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）

第 1 回

日時：平成 23 年 8 月 5 日（金）

場所：北海道大学情報科学研究科（札幌市）

共催：第 1 回基礎技術研究会

平成 23 年度第 1 回基礎技術研究会共催の為、「超音波医学」39 巻 2 号に掲載されていますので、ご参照下さい。

第 2 回

日時：平成 23 年 11 月 26 日（土）

場所：東京医科大学病院 6 階講堂（東京都新宿区）

共催：第 10 回超音波治療研究会

1) 過飽和溶存水を利用した超音波薬物導入法の開発

崎村拓巳¹、松村吉浩¹、福島省吾¹、平 圭祐¹、立花克郎²（¹パナソニック電工先行技術開発研究所、²福岡大学医学部解剖学講座）

【目的】 これまでに、マイクロバブルを併用した超音波薬物導入方法が報告されている。本研究では、飽和溶解量以上に気体を溶解させた水（過飽和溶存水）に超音波を付与することで微細な気泡を生成できる現象に着目し、過飽和溶存水を併用した超音波薬物導入方法の検討を行った。【方法】 超純水を 0.5 MPa に加圧して空気を溶解させた過飽和溶存水を作成した。ヒト HL 60 細胞混濁液を過飽和溶存水で作成した培地と混合し、超音波（1 MHz、0.1 および 1 W/cm²）を 10 秒間照射した。照射後、Propidium Iodide (PI) 及びトリパンブルー色素により染色を行い、細胞内への薬物導入能及び、細胞生存率の評価を行った。【結果】 超音波と過飽和溶存水との併用により PI で染色された生細胞数の増加が見られ、その効率性は 1 W/cm² の超音波付与で約 5% であった。

2) 多剤耐性克服における Sanazole と超音波併用の有益性の検討

岡澤成祐^{1,2}、Mariame Ali Hassan¹、林 龍二²、近藤 隆¹、戸邊一之²（¹富山大学医学薬学研究部放射線基礎医学講座、²富山大学医学部第一内科）

癌細胞の薬剤耐性を克服することは悪性腫瘍治療戦略上重要な課題である。最近、著者らは放射線治療の臨床研究が進められている低酸素性細胞放射線増感剤 sanazole が固形癌由来の HeLa 細胞に対して、特異的細胞毒性を示すとともに、細胞内酸化ストレスを増やし、超音波併用による細胞死増強効果を示すことを報告した。Doxorubicin はその作用機序に酸化ストレスの関与が知られており、超音波の併用による効果増強も報告されている。本研究では細胞内酸化ストレスに注目して、ヒト子宮肉腫細胞株（MES-SA）と同 doxorubicin 耐性株（MES-SA/DX5）を用い、sanazole および超音波併用による抗腫瘍細胞致死効果増強の検討を試みた。

3) 超音波感受性物質を用いたがん超音波力学療法の *in vivo* 抗腫瘍効果

芝口浩智¹、水流弘文¹、大村忠寛²、黒木 求³、黒木政秀¹（¹福岡大学医学部生化学、²福岡大学医学部脳神経外科、³福岡大学医学部看護）

がん治療を考えると、低出力の超音波と超音波感受性物質を用いたがんの超音波力学療法（SDT）は、超音波の生体深部にまで到達できる性質や取り扱いの簡便さ、奏功するための蛋白質-遺伝子を必要としない、などを考えると極めて有望である。新規超音波感受性物質として 2 種類のポルフィリン誘導体を用いた SDT のヒト胃癌細胞株の皮下腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果を *in vivo* で、また、その作用機序の詳細を *in vitro* でそれぞれ検討した。さらに、実際に脳腫瘍の術中蛍光診断に用いられる 5-アミノレブリン酸を用いた集束超音波照射による抗腫瘍効果を、ラット頭蓋内グリオーマモデルを用いて検討した。一方、SDT では、超音波のキャビテーション現象に伴う細胞膜の一過性穿孔による薬物の細胞内への取込み増強が期待できることから、抗癌剤との併用についても検討した。これらの SDT の結果を *in vivo* における抗腫瘍効果を中心に報告する。

4) バブルリポソームと超音波照射を併用したアンチセンスオリゴ導入による筋ジストロフィーの核酸治療システムの開発

根岸洋一¹、小島卓雄¹、塩野 瞳¹、高橋葉子¹、鈴木 亮²、丸山雄一²、新槇幸彦¹（¹東京薬科大学・薬学部、²帝京大学・薬学部）

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の治療法として、アンチセンスオリゴ（AON）の導入により、エクソン上の変異によって生じたストップコドンを読み飛ばすことで、ジストロフィンタンパク質発現を回復させるエクソンスキッピング療法が注目されている。しかし、高容量かつ頻回投与が問題視されている。これまでに我々は、バブルリポソーム（BL）と超音波照射（US）併用による筋組織への効率的な経静脈的遺伝子導入法を開発している。そこで本研究では、DMD モデルマウスに対して、エクソンスキッピング誘導する AON を BL と US 併用による筋組織への経静脈的導入を行い、ジストロフィン発現回復の有無を検討した。その結果、BL と US 併用により、AON 導入することで、US 未処理群と比較して、有意なジストロフィン発現を認めた。よって、本法が DMD の治療を目的とした AON 導入法として有望な手段となることが明らかとなった。

5) 超音波による遺伝子発現制御と治療応用への検討

森井章裕¹、小川良平²、渡部明彦¹、近藤 隆²、布施秀樹¹（¹富山大学大学院医学薬学研究部腎泌尿器科学講座、²放射線基礎医学講座）

【目的】 超音波に反応して活性化する人工プロモーターを構築し、治療応用の可能性を検討する。【対象および方法】 我々はこれまで前立腺癌細胞株において放射線で活性化する転写因子を組み合わせる刺激応答性の人工プロモーターの構築を行っている。これらのプロモーターの反応性が酸化剤により抑制されることから、酸化ストレスが関与していると考えられ、超音波刺激においても高い反応性が見られるかを検討した。【結果】 すでに構築した多数の放射線応答人工プロモーターの超音波での反応性ルシフェラーゼアッセイにて調べた。最も反応性が高かったクローン 880-8 プロモーターの制御下にルシフェラーゼ、または自殺遺伝子 *fcy::fur* を発現する細胞株を構築した。これらの細胞に超音波を照射したところ、導入遺伝子の有意な発現増強を認め、治療

効果の増強も確認された。【結語】人工プロモーターを用いた超音波遺伝子発現制御の臨床応用への可能性が示唆された。

6) Optical observation of cell sonoporation with low intensity ultrasound

Seyedeh Moosavi Nejad¹, S. Hamid R. Hosseini²,
Hidenori Akiyama², Katsuro Tachibana¹ (¹Department of Anatomy, Fukuoka University School of Medicine, ²Bioelectrics Research Center, Kumamoto University)

Sonoporation is a promising drug delivery technique with great potential in medicine. Here, we introduce a new *in vitro* method utilizing capillary-microgripping system and microtransducer to achieve maximum level of experimental flexibility for capturing real time highly magnified images of cell-microbubble interaction, hitherto unseen in this context. Insonation of isolated single cells and microbubbles parallel with high speed microphotography and fluorescence microscopy allowed us to identify dynamic responses of cell-membrane/microbubble in correlation with sonoporation. Our results showed that bubble motion and linear oscillation in close contact with the cell membrane can cause local deformation and transient porosity in the cell membrane without rupturing it. This method can also be used as an *in situ* gene/drug delivery system of targeted cells for non-invasive clinical applications.

7) 腫瘍栄養血管閉塞を目的とした強力集束超音波治療システムの開発

木原泰三¹, 望月 剛¹, 田辺良子¹, 吉澤 晋², 梅村晋一郎³, 土肥健純⁴, 柿本隆志⁵, 元 文姫⁵, 山下紘正⁵, 千葉敏雄⁵ (¹日立アロカメディカル株式会社, ²東北大学大学院医学研究科, ³東北大学大学院工学研究科, ⁴東京大学大学院情報理工学系研究科, ⁵成育医療研究センター臨床開発センター)

【目的】腫瘍栄養血管、特に胎児仙尾部奇形腫の血管を閉塞治療するための強力集束超音波 (HIFU) 治療システムを開発する。【方法】128 個の出力回路を並列に配置し、素子インピーダンス 200 Ω 程度のアレイ型振動子を駆動できる装置を開発した。この装置は、最大駆動電圧 400 Vp-p、周波数 1 ~ 5 MHz の擬似正弦波による振動子駆動の能力を有する。【結果】128 ch 球殻振動子と組み合わせで性能評価したところ、焦点寸法は直径約 5 mm、長さ約 10 mm の楕円体で、焦点における最大ピーク音圧は 100 MPa 以上と見積られる。位相制御により焦点座標を焦点面内で ± 15 mm 以上、照射方向で ± 10 mm 以上移動できることを確認した。トリかさ身を使用した実験で、低音圧長パルスの条件では熱変性作用が強く、高音圧短パルスの条件では穿孔作用が強いことを確認した。【まとめ】腫瘍栄養血管閉塞治療の研究に限らず、広く利用可能な HIFU 駆動装置を開発した。今後、三次元超音波による血管照準追従機能と組み合わせる予定である。

8) HIFU を用いた仙尾部奇形腫に対する新たな治療法の検討

柿本隆志¹, 山下紘正¹, 元 文姫¹, 望月 剛², 木原泰三², 梅村晋一郎³, 吉澤 晋³, 土肥健純⁴, 千葉敏雄¹ (¹国立成育医療研究センター臨床研究センター, ²日立アロカメディカル株式会社, ³東北大学大学院医学研究科, ⁴東京大学大学院情報理工学系研究科)

我々が治療を目指す仙尾部奇形腫 (Sacrococcygeal teratoma; SCT) とは妊娠母体内で胎児仙尾骨に発生する腫瘍である。本腫瘍は胎児へと交通する血管の血流を増加させ栄養分を吸収しつつ

成長する。本腫瘍は出生後の治療で多くが回復するが、出生前に急速に増大した場合には胎児心不全をきたし予後不良となることもある。現在行われている胎児期治療は子宮切開下の外科的切除であるが、本手技は母体、胎児への侵襲性が高い。我々は仙尾部奇形腫の胎児期治療として、妊娠母体体外からの HIFU 照射により栄養血管を閉塞する新たな低侵襲治療法の開発を目指している。今回、共同研究開発を行っている HIFU 照射装置を用いてラット下大静脈をモデルとした *in vivo* 血管閉塞実験を行ったのでその結果につき報告する。

第3回

日時：平成 24 年 1 月 20 日 (金)

場所：名古屋駅前イノベーションハブ (名古屋市)

共催：日本ソノケミストリー学会第 4 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、産業技術総合研究所 (AIST) 中部センター

1) ソノポレーション機序解明のためのマイクロバブル位置制御

工藤信樹, 奥山 学 (北海道大学大学院情報科学)

ソノポレーションとは、超音波照射によって細胞膜の透過性を一時的に向上させて、通常は入らない物質を細胞内に取り込む手法を言う。この手法による導入効率は一般的に低く、微小気泡を加えたり、強力で持続時間が長い超音波を照射したりすることで、効率の向上が図られている。これに対し我々は、微小気泡が細胞に接触した状態では、短いパルス超音波でもソノポレーションが起きることを報告し、微小気泡がソノポレーションに果たす役割について検討してきた。一般に、*in vitro* におけるソノポレーションの機序検討は、培養液に懸濁した浮遊細胞を用いて行われることが多い。この方法では、超音波の放射圧によって液体中に懸濁された細胞と気泡が攪拌されるので、ソノポレーションの瞬間を直接観察することは難しい。これに対して、接着細胞とパルス超音波を用いる我々の検討では、気泡が細胞に作用をもたらす瞬間をつぶさに観察できると言う大きな利点がある。

ソノポレーションの機序に関する詳細な検討を行うには、気泡の大きさや細胞からの距離を自由に制御できることが望ましい。そこで我々は、光ピンセットを用いて気泡を捕捉することでこれを実現し、様々な条件とソノポレーション効果の関連を検討している。本発表では、我々が開発した光ピンセット装置について報告する。

2) 溶存気体飽和度がソノルミネッセンス強度に与える影響

辻内 亨 (産業技術総合研究所)

水溶液に揮発性溶質をある程度以上の濃度で添加すると純水時と比べてソノルミネッセンス (SL) 強度が低下することが知られている。アルコール分子は気泡表面に吸着し気泡膨張時に気泡内へ入り込み、気泡内でハイドロカーボンが生成される。このハイドロカーボンが気泡圧壊時に分解し気泡内温度を低下させるため、SL 強度が低下すると考えられる。

一方、アルコール分子は界面活性があるため気泡に吸着し、近接する気泡間の液層が薄膜化する際に液表面でアルコールの濃度勾配が生じる。この濃度勾配が気泡間液層の流動を遅くするため液層の薄膜化がゆっくりとなり、その結果、気泡同士の合体が阻害され無添加時と比べて気泡数が多くなる。Sunartio らは比較的 low-power の下でアルコール添加し、低濃度の場合に純水時と比べて高い SL 強度を得ている。

ところで溶存気体飽和度 (Degree of Saturation; DOS) はソノケミカル反応効率を決める指標のひとつである。溶液に超音波照射すると、照射時間の経過とともに溶液の DOS は減少する。これは、気泡が rectified diffusion や secondary Bjerknes force に起因する合体により大粒径化し系の外へ脱ガスするためである。本報ではエタノールを添加した 261 kHz 超音波照射水溶液における SL 強度の DOS 依存性を決定するとともにアルコール添加-無添加の違いについて検討した。

3) ソノルミネッセンス気泡のダイナミクスとラジカル生成速度の関係

畑中信一 (電通大院情報理工)

キャビテーション気泡によってつくられる反応場は、大きく分けて2つある。すなわち、気泡内部における熱分解反応場と、そこで生じたラジカルによる液体内でのラジカル反応場である。多くのソノケミカル反応は、ラジカル反応、特に OH ラジカルによる酸化反応が関与しているため、OH ラジカルの生成効率を上げることが、ソノケミストリーの高効率化にとって重要な鍵となる。

それでは、OH ラジカル生成のために最適な条件は何であろうか。現在までに、OH ラジカルの定量法とともに、種々の実験条件下で定量した数多くの報告がある。しかし、多数の気泡が生成・消滅および合体・分裂を繰り返す複雑な系で、実験装置等に依存しない普遍的な条件を見出すのは難しい。そこで、より単純な系であるシングルバブルの研究により、OH ラジカル生成に影響する基本的因子を押さえることは、多数気泡での結果を理解する上でも大きな意味を成すであろう。

シングルバブルから生じる OH ラジカル量に関しては、Didenko と Suslick がテレフタル酸 (TA) 定量法を用いて初めて測定した。一方、著者らはルミノール発光に関する実験結果を報告した。ここで、不安定に動く気泡 (ダンシング気泡) がルミノール発光、すなわち、OH ラジカル量の増加に有効であることを示唆したが、安定気泡でのルミノール発光は検出以下であったため、不安定気泡と安定気泡の定量的な比較はできなかった。そこで本研究では、ダンシング気泡を含めたシングルバブルのダイナミクスを観察しながら、TA 定量法を用いて OH ラジカル量の超音波周波数および音圧振幅依存性を調べたので報告する。

4) 超音波キャビテーションの崩壊現象を利用した結石破砕

池田貞一郎¹、吉澤 晋²、高木 周³、松本洋一郎⁴ (1) (株) 日立中研、² 東北大学大学院、³ 東京大学大学院、⁴ 東京大学)

結石破砕治療 (SWL; Shock Wave Lithotripsy) の研究においてキャビテーション現象は、体組織損傷因子としての解析のみならず、同時にその大きな崩壊圧が、結石破砕片微細化に役立つとの観点からも研究が続けられている。本研究では、衝撃波による高圧を用いずに、“超音波キャビテーションの崩壊現象によるエロージョンで、結石のみを破砕する手法”を開発することを目的とし、固体壁面に生成するクラウドキャビテーションの挙動を制御することを、研究の対象とした。事前検討として、固体壁面上に発達するクラウドキャビテーションが、発生・成長し、崩壊に至るまでの過程を、高速度カメラ撮影とハイドロフォンによる崩壊圧測定により観測し、その挙動を調べた。また球形気泡クラウドの数値計算により、超音波圧力場中における気泡群の崩壊挙動を調べた。その結果、高周波数の超音波により安定なクラウドキャビテーションを固体壁面上に生成させ、低周波数の超音波により崩壊を導くという手法を提案した。本発表では、提案した手法の

効果を確認するためにモデル結石、および実際の腎臓結石による破砕実験を行った結果を報告する。

5) 多点キャビテーション気泡群を用いた超音波加熱治療

吉澤 晋¹、森山達也¹、岩崎永子¹、中村高太郎¹、梅村晋一郎² (1) 東北大学工学部、² 東北大学医工学研究科)

強力集束超音波 (HIFU: High-Intensity Focused Ultrasound) を用いた治療では、体外で発生させた超音波を患部に集束することによって、組織を局所的に加熱凝固させる。これによって、非侵襲に癌などの治療を行うことができるために注目されている。HIFU の焦点における圧力振幅は大きく、音響キャビテーションが発生する。発生、成長したキャビテーション気泡は集束超音波の圧力場を乱して治療の精度を低下させる一方で、気泡振動などによるエネルギー散逸の付加によって加熱作用を増強することが知られている。したがって、音響キャビテーションを適切に制御できれば、従来よりも高効率かつ高精度な超音波治療法を実現することが可能となる。ここでは、広範囲でキャビテーション気泡の加熱増強効果を利用することを目的とし、新しく開発した超音波照射方法について紹介する。本手法では、高強度かつ短時間の超音波 (「トリガーパルス」と呼ぶ) を走査して複数箇所にキャビテーションを生成・成長させ、直後に比較的低強度で広い焦点領域を持つ超音波を連続照射 (「加熱用超音波」と呼ぶ) することで、広範囲の組織を効率よく加熱凝固させることが可能となった。

6) 新規造影剤を用いる超音波 chemo-thermal 治療

川畑健一、丸岡貴司、浅見玲衣 (日立製作所中央研究所)

マイクロバブル (MB) は優れた超音波造影剤であり、疾病の確定診断等に重要である。この MB は、超音波治療の増感剤としても有用であることが最近の研究により明らかになってきた。超音波加熱およびキャビテーション生成を促進する効果があり、超音波治療をより効率よく行うことが可能であると期待されている。MB の増感剤としての使用には、部位選択的な MB が必須となる。部位選択的な MB を得るためのアプローチとしては、MB 表面に、疾病に関連する抗原を認識する標的分子を付加することが広く行われている。ただ、現状では、部位特異性と治療に十分な濃度とを両立することが困難である。我々は、部位選択的な MB を得るための別なアプローチとして、まず MB のナノサイズの液体前駆体 (相変化ナノ液滴 (以降 PCND)) を投与し、目的部位のみで物理刺激 (超音波パルス) により液体→気体の相変化を生じて MB を部位選択的に生じるという手法を検討している。本手法は、原理的に、PCND に部位特異性がない場合であっても、物理刺激を部位選択的に行うことにより MB を局所的に生成することが可能である。これまでに、体内目的部位のみでの PCND からの MB 生成および生成した MB による超音波生体作用の増強効果の確認を行ってきた。今回、PCND から生成した MB により熱的作用のみならず、キャビテーションを生成し、その化学作用を用いる治療を行うための検討を行った。特に、化学作用を生成するキャビテーションを生じるための超音波照射法に関する *in vitro* 予備検討の結果を中心に報告する。

7) ナノ粒子計測装置「NanoSight (ナノサイト)」によるナノバブル計測

入江文字 (日本カンタム・デザイン株式会社)

マイクロバブルやナノバブルは洗浄効果など特殊な働きが注目され様々な業界で実用化試験が行われている。しかしながらその

効果について学術的な知見は未だ途上である。バブルの持つ各種効果を研究する上でサイズと濃度測定が重要なポイントとなる。そこでナノバブルを固体粒子とみなして、既存のナノ粒子観察・測定法による分析が試みられている。しかしながら、電子顕微鏡は、減圧環境が必要なため液中のバブル観察・測定には不適である。また、レーザー回折法や動的散乱法を用いた粒度分布計による測定では、①結果は粒子径の分布と頻度で表されるため個数密度データが直接得られない、②測定に置いて物性情報・散乱強度のデータが必要、③バブルの散乱光強度が弱いなどの理由で、特にナノバブルについては測定が難しいのが現状である。ここでは、このような既存装置で難しかったナノバブルの観察・粒度分布測定・超密度計測を簡便に行うことを利用した“NanoSight システム”について紹介するとともに、ナノバブル測定例を紹介する。

8) マイクロバブルとナノバブルの違いについて

安井久一（産業技術総合研究所）

マイクロバブルとナノバブルの定義には、幾つかあるが、大雑把に言えば、前者は1 μm ~ 100 μm 程度、後者は1 μm 以下の大きさの気泡を指す。マイクロバブルは、光学顕微鏡で見ることができ、超音波照射によって発生するキャビテーション気泡のサイズに一致しており、その存在はよく知られている。一方のナノバブルは、近年注目を集めているが、多くの研究者がその存在を認めているのは、固体表面上のみで、液体中に存在するかどうかは、依然として論議を呼んでいる。

これに対して、気泡が負に帯電していることから、気泡表面での静電的反発力によって、気泡内部のラプラス圧力が打ち消され、気泡の溶解消滅を防いでいるとのアイデアが発表されている。しかしそれらは定性的な議論であった。そこで、本研究では、定量的な検討を行い、その結果について述べる。

9) バブルリポソームと超音波の併用による遺伝子導入特性の評価

鈴木 亮、小田雄介、丸山一雄（帝京大学薬学部）

これまでに当研究グループでは、超音波造影ガスを封入した新規リポソーム（バブルリポソーム、BL）の開発を行ってきた。このBLは超音波造影のみならず、治療用超音波照射と併用した低侵襲的な薬物・遺伝子デリバリーを可能とする新たなDDS製剤として期待される。そこで本研究では、このBLと超音波の併用による細胞への遺伝子導入特性について検討した。

その結果、得られた遺伝子導入特性から、BLと超音波の併用は、血清の影響を受けることなく遺伝子導入可能な方法として *in vivo* における効率のよい遺伝子導入方法として期待される。また、本方法では超音波を照射したときのみ遺伝子導入が誘導されるため、超音波照射部位をコントロールすることで超音波照射部位特異的な遺伝子導入が可能になると考えられる。そこで、BLと超音波の併用による低侵襲的かつ組織特異的な遺伝子導入システムの確立を試みた。BLとルシフェラーゼ発現プラスミドDNAを尾静脈から全身投与後、直ちに肝臓に向けて体外から経皮的に超音波照射した。その2日後にマウスから各臓器を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、超音波照射した部位である肝臓において高いルシフェラーゼ発現が認められた。このようにBLとプラスミドDNAが血流を介して流れていたにも関わらず肝臓に遺伝子導入できたのは、BLが超音波照射部位である肝臓部位で崩壊し同時に遺伝子を肝臓に導入したためであると考えられ、本法は、効率のよい非ウイルスベクターとして遺伝子

治療に応用可能になるものと期待される。

10) 微小気泡を用いた脳組織灌流画像

塩貝敏之（恵心会京都武田病院脳神経科学診療科）

Perfusion CT/MRIや各同位元素による single photon emission CTなどの神経放射線学的画像診断法と同様に、微小気泡である超音波造影剤（UCA）と経頭蓋 color duplex sonography用の超音波画像診断装置により、脳組織灌流動態が評価可能である。この経頭蓋的脳組織灌流画像 transcranial perfusion imaging (TPI) に最初に導入されたUCAはLevovist[®]で、可溶性の空気を包む shell は Galactose 基材で、表面活性剤として palmitic acid が添加され mechanical index (MI) 値の高い、即ち高音圧超音波照射で破壊・造影される特徴がある。その後欧州などで臨床導入された Sonovue[®] や本邦で肝腫瘍性疾患に適応の Sonazoid[®] などの第2世代UCAでは、内容はフッ化炭素よりなる難溶性ガスで、第1世代UCA Levovist[®] と比較して、shell が破壊されにくく、増強効果も長い。我々はLevovist[®] を用い、画像描出法の比較、経頭蓋 Doppler や Dynamic CT との関係、脳血管反応性、探触子固定装置の開発などを検討して来た。しかし本法の脳循環測定法としての臨床的意義は、とくに定量性に関して未確立である。現在までのTPI定性・定量解析法を紹介し、今後を展望する。

第4回

日時：平成24年3月3日（土）

会場：福岡大学医学部臨床講堂（福岡市）

【超音波の安全性について、生物・化学作用からの考察】

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）

超音波は診断のみでなく、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。超音波による温熱療法装置は病巣を加温することで温熱（ハイパーサーミア）治療に用いられており、また集束超音波は超音波を集中させることによる高温を利用し前立腺がんや乳がんの治療に用いられている。温熱によるがん細胞死誘導のメカニズムの一つとしてリン酸化ヒストン H2AX (γ H2AX) フォーカス形成に示されるDNA損傷が注目されている。温度上昇が十分な超音波照射条件下では熱作用によりDNA損傷を引き起こすことが考えられるが、超音波が直接細胞内のDNAに与える影響は明らかではない。本研究では γ H2AX形成を中心に、超音波のDNA損傷誘発機構に関して調べ、放射線および温熱の生物作用と比較検討し、超音波の安全性について考察した。

【“必ずうまくいくソノポレーション法：実験の実際とコツ”・概論発表】

鈴木 亮¹、根岸洋一²（¹帝京大学薬学部生物薬剤学教室、²東京薬科大学・薬学部薬物送達学教室）

近年、ソノポレーションを利用した薬物・遺伝子デリバリー技術が注目されている。その中でも特にマイクロ・ナノバブルを併用したソノポレーションは、超音波単独によるソノポレーションより細胞や組織に対するダメージが低く、デリバリー効率を改善しうる方法として期待されている。この方法では、使用するマイクロ・ナノバブルの種類や超音波照射条件・照射方法などがデリバリー効率に大きく影響する。そこで、本セッションでは、実際にマイクロ・ナノバブルと超音波の併用を利用している研究者から、実験の実際やコツなどに関して経験談をご紹介いただき、ソ

ノボレーションの今後の展開や課題などについて議論したい。

・各論発表

1) Characterization of high intensity ultrasound (強力超音波 (HIFU) の音場測定方法について)

“Bioelectrics and Medical Application of Nonlinear Ultrasound (Shock Waves)”

Hamid Hosseini (Bioelectrics Research Center and Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University)

Results of research on biomedical application of pulsed electric field and shock waves are presented. In order to exploit systems for shock wave therapy, we have been working for the development of clinical devices that are based on the concept of shock waves or related phenomena. The talk describes new therapeutic devices designed for the minimally invasive approach to vascular thrombolysis, selective dissection of tissues, and drug or DNA delivery. To investigate the response of cells to shock loading, a precise method of shock waves generation has been developed. This method has been studied for application in cardiovascular therapy, cancer treatment, and cranioplasty in close vicinity of the brain. A laser ablation shock wave assisted particle acceleration device has been developed for delivering drug and DNA into soft tissue targets. The penetration depth of micro-particles observed in the experimental targets is believed to be sufficient for pharmacological treatments. In order to achieve an efficient method for rapid revascularization of cerebral thrombosis, a laser shock wave induced liquid jet system has been developed. The micro-liquid jet system has been further improved and successfully applied for selective dissection of soft tissue preserving nerve and blood vessels.

2) Sonotransfection using ultrasound and film bottomed cell culture container (フィルム底の培養ウエルを使った超音波遺伝子導入法について)

“Methods and Protocols: Sonotransfection and Sonoporation”

Loreto Feril (福岡大学医学部解剖学講座)

Experimental methods involving therapeutic ultrasound are varied and using a more standardized one is often times difficult. This is because of the many different types of ultrasound devices currently in use coupled with differences in sonication set-up designs. Despite all these variations, a more easy to apply and a more commonly available set-up is usually preferred for someone who is a beginner in this research field. Here, we will present a typical sonotransfection protocol with an *in vitro* set-up using the film-bottomed 24- or 96-well culture dishes. In addition, our protocol utilizing an *in vivo*-simulated set up will also be presented.

3) Use of high speed camera to observe cells and microbubbles (高速カメラを用いた細胞観察について)

“Optical observation of cell sonoporation with ultrasound”

Seyedeh Moosavi Nejad, Hamid Hosseini, and Katsuro Tachibana (福岡大学医学部解剖学講座)

Due to the inadequacy of the existing models for coupling with highly sensitive imaging techniques, direct observation of the actual precursor events of cell-microbubble interaction under low intensity ultrasound has not been possible. Here, we introduced an *in-vitro* method utilizing capillary-microgripping system and micro-

transducer to achieve maximum level of experimental flexibility for capturing real time highly magnified images of cell-microbubble interaction. Insonation of isolated single cells and microbubbles parallel with high speed microphotography and fluorescence microscopy allowed us to identify dynamic responses of cell-membrane/microbubble in correlation with sonoporation. Our results showed that bubble motion and linear oscillation in close contact with the cell membrane can cause local deformation and transient porosity in the cell membrane without rupturing it. Challenges of using high magnified objective lenses as well as setting the new *in vitro* set up for observing such a dynamic phenomenon were discussed.

【一般演題】

1) 超音波造影剤微小気泡の制御とソノポレーション研究への応用

奥山 学, 工藤信樹, 清水孝一 (北海道大学大学院情報科学研究科生命人間情報科学専攻)

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検討を行なっている。本手法では、微小気泡の付着した部位に細胞膜の損傷を生じさせることができる。微小気泡の大きさや付着位置を変えることにより、膜損傷の程度や薬剤などの導入量を制御できればソノポレーション研究に有用である。そこで、超音波造影剤サイズの気泡をトラップできる光ピンセットの開発を行い、その実用性を検証してきた。今回は、微小気泡を制御し、薬剤を目的とする細胞に選択的に導入した結果について述べる。

2) 強力パルス超音波によるファントム内温度上昇について

遠藤信行, 土屋健伸, 佐久間優, 田中 伸 (神奈川大学工学部電子情報フロンティア学科)

筆者らは、熱電対を用いて、連続超音波照射時の温度上昇を計測してきた。本報告では90 x 90 x 90 mmの寒天ファントム (IEC 60601-2-37 参照) に超音波を照射した場合の、ファントム内の温度上昇を、赤外線カメラによる熱画像法により2次元計測した。

以下の項目について測定し、精密計測のための基礎資料を得た。

- 1) 連続波照射時の、照射方向に擬似骨が在る場合とない場合の差異
- 2) 照射超音波パルス波の Duty 比を変えた場合の温度上昇の差異
- 3) 電気的損失による送波器自身の発熱の影響

3) 超低濃度次亜塩素酸と超音波併用の癌細胞への影響

熊川みどり (福岡大学病院輸血部)

次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) は殺菌剤であり、食品添加物としても利用されている安全な薬品であるが、その効果は非解離型次亜塩素酸 (HOCl) の濃度に依存する。HOCl の作用機序は十分に解明されていないが、受動拡散により細胞壁と形質膜を通過するため、細胞の外部と内部の両面から酸化作用を及ぼし殺菌効果が増大すると考えられている。今回我々は殺菌効果が見込めない超低濃度の NaClO を種々の癌細胞株に添加し、更に超音波を照射して殺細胞効果を確認した。その結果 NaClO 単独投与での殺細胞効果は濃度および時間依存性を示し、また細胞株によっても反応性が異なった。更に超音波照射により NaClO の殺細胞効果が増強された。今後 *in vivo* 実験を予定しているが、その結果によっては癌患者に応用され得る可能性が期待できる。

4) ナノバブル処理を行った *Enterococcus faecalis* の SEM による観察

辺見浩一¹, 新井淳子¹, 川島伸之¹, 市野瀬志津子², 鈴木孝尚³, 山下直也³, 立花克郎⁴, 中島美佐子⁵, 須田英明¹ (¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科歯髄生物学分野, ²同医歯学研究支援センター機器分析部門, ³ネッパジーン株式会社, ⁴福岡大学医学部解剖学講座, ⁵国立長寿医療研究センター口腔疾患研究部)

根管内細菌を安全にかつ効果的に除去するために, 我々は組織傷害性の低い 0.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (NaClO) にナノバブル (NB) を加え超音波を照射することで, 十分な殺菌効果が得られることを明らかにした. 今回その殺菌メカニズムの一端を明らかにする目的で, NB を加えた *Enterococcus Faecalis* (EF) に超音波照射し, その表面性状を走査型電子顕微鏡にて観察した. その結果 EF 表面に多数の小孔の開存が認められ, これが 0.5% NaClO の殺菌効果を促進したと推察された. 動物細胞のみならず細胞壁を有する細菌においても, NB に超音波を照射することで小孔が開存することが明らかになった.

5) 光感受性薬物と HIFU を併用した細胞破壊効果の検討

内藤玲子¹, S. Moosavi², 遠藤日富美², 立花克郎², 中山樹一郎¹ (¹福岡大学医学部皮膚科学講座, ²福岡大学医学部解剖学講座)

光学的療法 (photodynamic therapy: PDT) はそのターゲットを局所に限ることができ, 比較的低侵襲といえるが, 組織の深部にまで到達できる光線は多くない. 我々は, PDT で用いられる光線にかわり, 深部にまで到達可能な超音波を用いる sonodynamic therapy に着目している. PDT は主に活性酸素による組織障害メカニズムにより殺細胞効果を示すとされており, 我々は sonodynamic therapy での組織障害メカニズムやその効果を検討している. 今回我々は, 臨床的に用いられる verteporfin と HIFU を併用した際の C32 に対する殺細胞効果を HIFU 照射直後に検

討した. 本報告では, その殺細胞効果を複数の測定方法を用いた結果, また, メカニズムについても若干の考察を加え報告する.

6) がん細胞を特異的に認識する超音波刺激応答性リポソーム

清水宣明, 仁宮一章 (金沢大学 環日本海域環境研究センター)

腫瘍部位に特異的に集積し, また超音波照射により薬剤の放出制御が可能な新規リポソームを開発した. 温度感受性高分子 (2C₁₂-poly(NIPAM-co-NIPAM)) を表面修飾したリポソームに超音波照射強度 0.5 W/cm² を 120 秒間照射すると, リポソーム内包物の 56% を放出することができた. 対照の未修飾リポソームでは 13% の放出率であった. さらに, がん細胞を特異的に認識・結合する PDGF レセプター結合型 DNA アプタマーを修飾した超音波刺激応答性リポソームは PDGF レセプターを高発現している, 悪性度が強いヒト乳がん由来細胞株 MDA-MB-231 に対して強い特異的結合能を有することを確認した.

7) 低出力超音波 (LIPUS) による骨折治癒促進の分子メカニズム

楠山讓二 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科口腔生化学分野)

低出力超音波 (LIPUS: low intensity pulsed ultrasound) は, 骨折治療に臨床応用されている機械的刺激である. LIPUS の照射は骨折癒合が促進することが知られており, 一部の症例では健康保険の適用となっている. しかし LIPUS をはじめとした機械的刺激が, 骨代謝にどのような分子メカニズムで作用するかは不明な点が多い. 我々のこれまでの研究で骨芽細胞は LIPUS を受容し, 種々の細胞を誘導するケモカインを産生することで, 骨折部に骨代謝に関与する細胞を誘引していることが分かった. 今回は, 骨芽細胞の LIPUS 受容機構について述べた後, LIPUS の間葉系幹細胞に対する分化方向調節機構について報告し, LIPUS が種々の細胞に作用することで果たし得る機能的役割を検討する.