

# 日本超音波医学会平成 24 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 24 年 8 月 3 日（金）

会場：北海道大学大学院情報科学研究科（札幌市）

共催：基礎技術研究会

平成 24 年度第 2 回基礎技術研究会共催の為、「超音波医学」40 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 24 年 11 月 17 日（土）

会場：KITEN ビル 8 階コンベンションホール（宮崎市）

共催：日本超音波治療研究会

### 1) 生体模擬ファントムを用いた超音波の加熱およびキャビテーション作用の評価

川畑健一，浅見玲衣（日立製作所中央研究所）

生体模擬ファントムは、医療の様々な分野で用いられるが、超音波治療用のファントムとして用いるには、母材すなわち超音波的に生体を模擬したもの、指示剤すなわち超音波による生体作用が生じた部位を可視化するものが必要になる。現在我々は、超音波の熱的作用（加熱凝固作用）と化学的作用（音響化学作用）について、それぞれ母材と指示剤との組み合わせに関する検討を行なっている。今回は特に、HIFU 治療用の、装置のメンテナンスに適した、超音波に対する感度が高くかつ制御の可能なファントムに関して報告する。HIFU 用のファントムとしては、一般にハイドロゲルの一種であるポリアクリルアミドゲルを母材とし、指示剤としてアルブミンを用いるものが広く知られている。アルブミンの熱変性による白変により超音波の熱作用を可視化するのである。しかしながら、この系においては、用いられているアルブミンが、指示剤であると同時に超音波吸収剤としての役目も担っており、そのことがファントムの特性変化のコントロールを難しくしていた。我々は、ファントムに超音波吸収剤を導入することで、特性調整を試みた。種々の物質の検討の結果、超音波吸収剤であり、かつアルブミンの変性促進剤として働く高分子剤を見出した。その結果、超音波吸収特性の調整だけでなく、アルブミンの熱変性温度も調整可能なファントムを得ることが可能となった。このファントムによれば、アルブミンの変性温度を概ね 45～65℃の範囲で調整可能である。このファントムをメンテナンス用途に用いる場合、特に超音波照射装置がベッド内に組み込まれている際に有用であると考えられる。このような装置では、超音波発生器を水槽等に入れ、体温に暖めたファントムに照射することが困難なためである。通常用いられているファントムは常温（25℃）で超音波を照射すると、生体で加熱凝固作用が見られる条件でも、ほとんど変化が見られない。これに対し、今回調製したファントムでは、常温での照射で、焦点部位に明らかな変性を認めたことから、目的とする装置のメンテナンス用に適していると考えられた。

### 2) キャビテーションを伴う高強度音場測定用センサの開発に関する基礎研究

—キャビテーションセンサ及び堅牢なマイクロホンの開発—  
椎葉倫久<sup>1</sup>，植村友樹<sup>1</sup>，岡田長也<sup>2</sup>，内田武吉<sup>3</sup>，菊池恒男<sup>3</sup>，黒澤 実<sup>4</sup>，竹内真一<sup>1</sup>（<sup>1</sup>桐蔭横浜大学，<sup>2</sup>本多電子（株），<sup>3</sup>産業技術総合研究所（NMIJ），<sup>4</sup>東京工業大学大学院）

近年、音響キャビテーションや高強度の音響パワーの測定技術の重要性が高まっている。医療分野では、遺伝子導入のためのソノポレーション、HIFU 治療装置等がある。ソノポレーションシステムにおいては、音響キャビテーションの発生量や発生位置の測定が非常に重要である。そこで、英国の NPL (National Physical Laboratory) は、高分子圧電膜を用いて空間分解能を有するキャビテーションセンサを開発した。しかし、このセンサは寿命が非常に短いという懸念が指摘されているようである。我々は水熱合成法を用いて Ti パイプの外側に PZT 多結晶膜を成膜し、その外周を独立気泡スポンジの音響アイソレータで覆った堅牢な円筒形キャビテーションセンサを試作した。ソノポレーションを想定した周波数 150 kHz の定在波音場における音響キャビテーションの発生の様子を、試作したキャビテーションセンサを機械走査しながら、その出力信号の高周波成分から計算した BIV (広帯域積分電圧) の空間分布を計測することで、キャビテーションセンサとしてのその有用性を検討したので報告する。また、HIFU (High Intensity Focused Ultrasound) 治療装置や超音波診断装置用プローブ等から発生する超音波の音圧の空間分布はマイクロホンと呼ばれる水中用標準マイクロホンを使用して評価する必要がある。しかし、一般に市販されている従来のマイクロホンは HIFU 治療装置等から照射される強力超音波に耐え得る構造上の配慮がなされていないので、強力超音波の音場を測定しようとする、エロージョンにより受音面にある圧電素子やその電極が壊れてしまうという問題点があった。我々はチタンを受音面にしてその裏面に水熱合成 PZT 多結晶膜を成膜する構造の円形ユニモルフ振動体を作ることで、強力超音波音場の測定を行っても壊れないように工夫した堅牢なマイクロホンを作製したので合わせて報告する。

### 3) ドラッグデリバリーシステムに向けた超音波マニピュレーションを用いたマイクロバブル内包型ベシクルの破壊に関する研究

井上和仁<sup>1</sup>，牛嶋裕之<sup>1</sup>，東 隆<sup>1</sup>，葭仲 潔<sup>2</sup>，佐々木明<sup>1</sup>，高木 周<sup>1</sup>，松本洋一郎<sup>1</sup>（<sup>1</sup>東京大学大学院，<sup>2</sup>産業技術総合研究所）

現在、癌治療の汎用的な治療法の一つである、化学療法において、抗癌剤を効率良く患部に集め、副作用を極力低減した治療法が望まれている。抗癌剤を患部に集める手法として、ドラッグデリバリーシステムによる薬剤の導入が注目されている。この手法は抗癌剤をキャリアに封じ込めることで薬剤輸送過程における通常細胞への副作用を抑え、任意の場所でキャリアからリリースする手法と組合せることで、癌細胞近傍のみ選択的に作用させることが可能になる。この手法に用いられるキャリアとして期待されるものの一つに、脂質二分子膜がカプセル状に会合し、マイクロバブルという微小気泡と薬剤を内包したマイクロバブル内包型ベシクルがある。このキャリアの特徴として、生体の細胞膜を構

成する主成分である脂質二分子膜で表面を覆われているため、生体適合性が高く、さらにマイクロバブルを内包しているため、超音波照射によって、薬剤のリリースを制御できる可能性がある。この特徴に加えて、リガンドを修飾させることによるターゲティング機能の付加や超音波によるキャリアのトラッピング、破壊方法の確立が実現すれば、ドラッグデリバリーシステムへの応用が可能になる。本研究室では破壊方法の確立に注目し、先行研究においては超音波定在波中で第一ビヤクネス力に起因するマイクロバブルの並進運動によってベシクルを破壊することに成功している。しかし、この研究ではマイクロバブル内包型ベシクルをマイクロピペットによって固定した状態で破壊実験を行っており、非接触でベシクルの空間的な位置制御をする方法の確立には至っていない。そこで本研究では超音波定在波中においてマイクロバブルが定在波の腹に集まるといった性質を用いて、マイクロバブル内包型ベシクルのトラッピングを行い、任意の位置で固定した上で破壊するシステムの開発を目的とする。今回、直径 30 mm の円筒型振動子を 6 分割した 1 MHz の素子と幅 10 mm の 2 MHz の平板振動子 4 個を縦横方向に平行に向かい合わせた素子の二種類を用いた実験を行った。水中で超音波を照射し定在波を作った際の音圧分布を可視化した様子、それぞれの振動子にかかる電圧に位相差を与えることで音圧分布が変化している様子を報告する。また上記の二種類の振動子で作った超音波定在波中にマイクロバブルを注入した場合のマイクロバブルの挙動についても報告する。

#### 4) ナノバブルを利用した超音波がん治療と免疫療法の併用による低侵襲的がん治療法の構築に関する基礎的検討

鈴木 亮, 小田雄介, 小俣大樹, 澤口能一, 丸山一雄 (帝京大学薬学部)

【目的】 これまでに我々は、リポソーム型微小気泡 (バブルリポソーム) への超音波照射により誘導される発熱とジェット流を利用した超音波がん温熱療法について報告してきた。この療法では、がん細胞の死滅に伴いがん関連抗原ががん組織内に放出されると考えられる。そのため、このがん組織内に抗原提示細胞である樹状細胞を投与することで、樹状細胞ががん関連抗原を取り込み抗原提示して強力な抗腫瘍免疫が誘導されるものと期待される。実際に、バブルリポソームを用い超音波がん温熱療法を行った後に樹状細胞をがん組織に投与したところ、がん治療効果が増強することが明らかとなった。さて、本療法ではバブルリポソームをがん組織内に局所投与して有効性を評価してきた。バブルリポソームは静脈内投与可能であり、静脈内投与するシステムの方が患者にとって負担の少ない治療法になると考えられる。そこで本研究では、バブルリポソームを静脈内投与した時の治療効果について検討した。【方法】 BALB/c マウスの後背部皮下に、マウス結腸がん Colon-26 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells) を移植し、8 日後、バブルリポソーム ( $500 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ ) を尾静脈内投与した。その直後、がん組織に向けて経皮的に超音波照射 (周波数: 1 MHz, 強度:  $4 \text{ W}/\text{cm}^2$ , Duty: 50%, 時間: 2 分間) した。この超音波治療の 1, 2, 3, 5 日後にマウス骨髄由来樹状細胞 ( $1 \times 10^6$  cells) をがん組織内または尾静脈内投与した。その後、経時的に腫瘍径を測定した。【結果・考察】 バブルリポソームを尾静脈内投与後、腫瘍組織に超音波照射し樹状細胞を静脈内投与することで、若干の抗腫瘍効果の増強が認められた。一方、樹状細胞を腫瘍内投与すると、さらに強い抗腫瘍効果が認められた。このことから、バブルリポソームの静脈内投与でも抗腫瘍効果の増強が得られることが

明らかとなった。しかし、樹状細胞の静脈内投与では、投与された樹状細胞が効率よくがん組織に到達しないと報告されている。そのため、樹状細胞のがん組織への移行効率に起因して、今回のような樹状細胞の投与方法の違いによる抗腫瘍効果の差異が認められたものと考えられた。そこで今後は、超音波治療後に行う免疫療法として、静脈内投与に適している活性化リンパ球療法との併用について検討を行う予定である。

#### 5) アニオン性を有した超音波応答性遺伝子ベクターの開発

黒崎友亮<sup>1,2</sup>, 川上 茂<sup>1</sup>, 丸山一雄<sup>3</sup>, 橋田 亮<sup>1,4</sup> (1)京科大学大学院薬学研究科, (2)日本学術振興会, (3)帝京大学薬学部, (4)京都大学物質・細胞統合システム拠点)

遺伝子医薬品の臨床応用には遺伝子導入効率のみならず、安全性が高い遺伝子導入技術の開発が必須である。アニオン性の高分子である DNA, RNA などの核酸は、同じくアニオン性の細胞膜と静電的に反発するため、細胞内へ取り込まれにくい。また、静脈内投与後に速やかに腎排泄されることが知られており、それ単体での遺伝子導入は困難である。これまでに、カチオン性の高分子やリポソームと核酸とのカチオン性複合体が高い細胞内取り込みと遺伝子導入効果を示すことが報告されている。しかしながら、これらのカチオン性化合物は一般的に細胞障害性が高く、生体成分との相互作用もあることから、中性あるいはアニオン性で標的細胞内へ遺伝子を導入できる遺伝子導入法の開発が望まれる。我々は、これまでに超音波造影ガスを内包したカチオン性リポソームと核酸とのカチオン性複合体に超音波を併用することで、超音波照射部位に選択的に高い遺伝子導入を得ることに成功している。本研究では、新たに核酸と生分解性・生体適合性のカチオン性高分子、超音波造影ガスを内包するアニオン性リポソームからなるアニオン性の超音波応答性遺伝子ベクターの開発を行った。カチオン性高分子として、ポリリジン、ポリアルギニン、プロタミンを用いた。また、アニオン性リポソームは Distearoylphosphatidylglycerol (DSPG), Distearoyl-phosphatidylcholine (DSPC), Polyethyleneglycol 2000-distearoylphosphatidylethanolamine (PEG-DSPE) をモル比で 7:2:1 で混合したものを用い、超音波造影ガスとしてパーフルオロプロパンガスを使用した<sup>1)</sup>。この新規遺伝子ベクターは粒子径が約 500 nm 程度、 $\zeta$  電位が  $-30 \text{ mV}$  から  $-40 \text{ mV}$  程度のアニオン性の微粒子であり、pDNA を内包している事が示された。またこの遺伝子ベクターは、市販の遺伝子ベクターである Lipofectamine 2000 と比較して細胞障害性が低いことが明らかになった。さらに、マウスへ静脈内投与後に超音波照射を行うことで、照射部位選択的に高い遺伝子導入効果を示した。以上、生分解性・生体適合性成分から構成されるアニオン性を有した超音波応答性遺伝子ベクターの開発に成功した。

#### 6) Enhancement of ultrasound-induced cancer cell killing by streptomycin

Feril, Loreto B. Jr.<sup>1</sup>, Tachibana K<sup>1</sup>, Kondo T<sup>2</sup>, Ogawa R<sup>2</sup>, Cui ZG<sup>2</sup> (1)福岡大学医学部解剖学, (2)富山大学医学部)

Background: This study aims to determine the effects of streptomycin against cancer cells when combined with therapeutic ultrasound. Methods: Human cancer cell lines (leukemia U937, malignant melanoma C-32, cervix carcinoma HeLa and oral squamous cell carcinoma HSC-2), and normal melanocytes were used in the study. First, immediate (up to 6 hr) and long-term (up to 3 days) toxicities of streptomycin at various concentrations (100 to

20,000  $\mu\text{g/ml}$ ) were investigated. The recommended dose for streptomycin is 100  $\mu\text{g/ml}$ . The cells were then exposed to ultrasound (1.0 MHz; 0.54 W/cm<sup>2</sup>; duty factor of 25%; pulsed at 0.5 Hz; for 20 s) with or without streptomycin. Results: There was no immediate toxicity of streptomycin at the recommended dose, but 3-day treatment resulted in growth inhibitions. At higher doses, varying level of toxicity on cell lines resulted in cell death. Normal melanocyte was shown to be the most resistant of the cell lines. Among the cancer cell lines, the order of sensitivity to the agent is as follows: U937 > HSC-2 > HeLa > C-32. U937 is therefore the most sensitive among the cancer cell lines, while C-32 is the most resistant. Immediate toxicity was observed only at 5 x the recommended dose. Ultrasound exposure in the presence of streptomycin resulted in significant enhancement of ultrasound-induced cell killing, including enhanced induction of ultrasound-induced apoptosis.

Conclusion: The findings suggest potential clinical use of streptomycin to augment the anticancer effect of therapeutic ultrasound.

#### 7) HIFU and Sonodynamic therapy of Melanoma cells with Verteporfin

Moosavi Nejad S. Fatemeh<sup>1</sup>, Katsuro Tachibana<sup>1</sup>, S. Hamid R. Hosseini<sup>2</sup>, Hitomi Endo<sup>1</sup>, Koichi Ogawa<sup>1</sup>, Reiko Naito<sup>3</sup>, Juichiro Nakayama<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Department of Anatomy, Fukuoka University School of Medicine, <sup>2</sup>Bioelectrics Research Center, Kumamoto University, <sup>3</sup>Department of Dermatology, Fukuoka University School of Medicine)

Sonodynamic therapy (SDT) is a new modality for cancer therapy by using ultrasound to enhance the cytotoxic effects of sonosensitizers drugs. Ability of focusing high intensity ultrasound deeply into a small region of a tumor is a unique advantage of HIFU (high-intensity focused ultrasound) for a non-invasive cancer treatment. In this study, we evaluated the antitumor effects of HIFU combined with Verteporfin (Visudyne) on a melanoma cell line both *in vitro* and *in vivo*. Human melanoma cells (C32) were irradiated with HIFU (frequency, 3.5 MHz; burst rate, 100 Hz; duty cycle, 50%) in the presence and/or absence of Verteporfin (400  $\mu\text{l/ml}$ ). Cytotoxic effect of Verteporfin with HIFU *in vitro* was greater than that of Verteporfin or HIFU alone. Cell viability had direct correlation with the intensity and duration of HIFU exposure, as well as concentration of Verteporfin in the suspension. *In vivo* results showed increase necrotic areas with significant hemorrhage in the groups treated with Verteporfin and HIFU. In this study, our findings provide a rational basis for the development of an effective HIFU based sonodynamic activation method. This technique may offer non-invasive therapy for melanoma in the near future.

#### 8) 低出力超音波 (LIPUS) による間葉系幹細胞の分化方向制御機構

楠山讓二, 松口徹也 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科口腔生化学分野)

【目的】 LIPUS (Low Intensity Pulsed Ultrasound: 低出力超音波) は臨床にて骨折治療に応用されている物理刺激である。骨髓腔内や骨折部には骨代謝に関わる骨芽細胞や破骨細胞に加え、間葉系幹細胞が存在している。そのため、LIPUS 刺激は間葉系細胞に

も作用を及ぼすことで、骨代謝における機能的役割を發揮させている可能性がある。そこで LIPUS 照射が間葉系幹細胞の分化方向に与える影響について実験を行った。【方法】マウス間葉系幹細胞株 ST2 細胞に対し、LIPUS を臨床使用条件である 30 mW/cm<sup>2</sup> の強度で 20 分間照射した。刺激後、MAP kinase ファミリー分子の活性化をウェスタンブロッティングで調べた。また ST2 細胞を骨分化及び脂肪分化誘導培地にて、LIPUS を連日 20 分間照射しながら培養した。培養後に分化の程度をアリザリンレッド S 染色及びオイルレッド O 染色、骨分化及び脂肪分化マーカーの mRNA 発現レベルを用いて評価した。

【結果】 LIPUS 刺激は ST2 細胞にて ERK のリン酸化を一過性に著しく誘導した。一方で、p38 と JNK のリン酸化は著明な変化を認めなかった。特異的阻害剤を用いた実験によって、LIPUS による ERK のリン酸化は、MAP3K の一種である Cot/Tpl2, MAP2K である MEK, 細胞骨格制御に関わる ROCK を介することが分かった。LIPUS を照射しながら培養することで、ST2 細胞の脂肪分化は抑制され、骨分化は促進された。これらの分化調節作用は Cot/Tpl2 および ROCK を阻害することでブロックされた。このメカニズムには、脂肪分化マスター転写因子である PPARgamma2 のリン酸化が関与することが示唆された。【考察】 LIPUS 刺激は、間葉系幹細胞に ROCK-MEK-Cot/Tpl2-ERK 経路を介したシグナルを誘導することで、骨分化と脂肪分化の方向性を調節する。

#### 9) 口腔がんに対する HIFU とチタニア・シリカ複合体併用療法の開発

高橋宏昌<sup>1</sup>, Seyedeh Moosavi Nejad<sup>2</sup>, Loreto B. Feril Jr.<sup>2</sup>, 遠藤日富美<sup>2</sup>, 喜久田利弘<sup>1</sup>, 立花克郎<sup>2</sup> (<sup>1</sup>福岡大学医学部医学科歯科口腔外科学講座, <sup>2</sup>福岡大学医学部医学科解剖学講座)

【緒言】光に励起されたチタニアは非常に強い酸化力を持ち、癌治療に用いる試みが報告されている。また、チタニアに超音波を照射することによっても光触媒反応と同様、触媒作用を示し活性酸素を発生させることが明らかになってきた。しかしチタニアは、酸、アルカリ、水および有機溶剤には溶解しない、という化学的性質を有している。また、pH 6 前後に等電点を有しているため、中性付近の水系溶媒中では凝集を生じてしまい、これを均一に分散させることは極めて難しい。そのため、チタニア自体を医薬品として使用することは非常に困難である。今回、チタニア・シリカ複合体を有する光触媒を含む高分散性の水溶液の提供を受け、高密度焦点式超音波 (HIFU) を併用し、扁平上皮癌細胞株における殺細胞効果を検討したので報告する。【材料・方法】細胞は扁平上皮癌細胞株 (HSC-2) を使用し、試薬はチタニア・シリカ複合体水溶液を用いた。細胞浮遊液を作成し、試薬を加えた後に HIFU を照射した。直後に細胞生存率を計測した。超音波照射条件は、Frequency: 3.5 MHz, Intensity: 4 W, 8 W, 12 W, 16 W, Voltage: 30 V, 40 V, 50 V, 60 V, Burst Rate: 100 Hz, Duty factor: 50%, Duration: 0.1 sec, 1 sec, 3 sec とした。試薬の濃度は、試薬 0  $\mu\text{l}$  (コントロール), 試薬 5  $\mu\text{l}$ , 15  $\mu\text{l}$  ならびに 30  $\mu\text{l}$  の 4 通りとした。すなわち 48 グループでそれぞれ 3 回実験を行った。【結果】 3 秒間 HIFU 照射をしたとき、チタニア・シリカ複合体水溶液濃度が 30  $\mu\text{l/ml}$  の場合、電圧 30 V のとき細胞生存率はコントロールとほとんど変わらなかったが、電圧が 40 V のときの細胞生存率は約 80%, 50 V のとき約 60%, 60 V のとき約 40%であった。【結論】 試薬の濃度、超音波の強度、照射時間に

依存して殺細胞効果が増強された。本研究結果から、チタニア・シリカ複合体水溶液と HIFU を併用した全く新規の口腔がん治療法を実用化できる可能性が示唆された。

#### 10) ハーモニックモーションイメージングを用いた加熱凝固領域の評価

青柳良佑<sup>1</sup>, 前野俊介<sup>1</sup>, 中村弘文<sup>1</sup>, 東 隆<sup>1</sup>, 竹内秀樹<sup>2</sup>, 藤原圭祐<sup>2</sup>, 射谷和徳<sup>2</sup>, 葭仲 潔<sup>3</sup>, 佐々木明<sup>1</sup>, 高木 周<sup>1</sup>, 松本洋一郎<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京大学大学院工学系研究科, <sup>2</sup>日立アロカメディカル株式会社, <sup>3</sup>産業技術総合研究所)

悪性腫瘍の治療法の一つである HIFU(強力集束超音波)治療を実用化するにあたっては、体内の加熱凝固領域をリアルタイムに可視化する必要がある。これは伝搬媒質の不均一さや減衰が患者に依存するため、ドーズ量を事前に決めることが困難であり、照射中にもドーズ量を最適化することが望ましいためである。本研究では、小型な装置かつ低コストな超音波を用いた加熱凝固領域のモニタリング手法の開発を目的とし、加熱凝固域を高い分解能で判別することを目標とする。加熱凝固の判定には Harmonic Motion Imaging (HMI) という手法を用いる。HMI では、集束超音波を振幅変調させることで焦点領域における放射圧の強度にも振幅変調を加え、生体組織の振動を誘起する。凝固に伴う組織の硬さの変化を、振動の振幅変化として検出し、凝固判別を行う。変性前後の変位の振幅変化はパルスエコー法で計測する。本研究では、豚の肝臓を使用し上記の手法を用いて実験を行った。超音波強度は 2000 W/cm<sup>2</sup>, 照射時間は 45 s, エコー信号は 1 周期の振動につき 13 回で照射開始から 1 s 毎に計 46 回取得した。エコー信号のフレームレートは 436 Hz, 変調周波数は 34, 67, 102, 168 Hz とした。実験結果より、各変調周波数において照射 0 s 後の振幅で規格化すると、照射 15 s 後の振幅減少率は、34 Hz では 31%, 67 Hz では 50%, 102 Hz では 74%, 168 Hz では 83% となり、振幅変化の周波数依存性が確認された。また、同様の実験系において、ゲルと肝臓の境界面が集束超音波の焦点領域となるように配置し、カメラによる凝固域の測定を行った。この実験結果と先述のエコー信号から見積もった超音波伝播方向の凝固域の比較を行った。エコー信号から検出された振動の振幅において、凝固前である照射 0 s 後から 4 s 後までの平均振幅を初期振幅とし、初期振幅から振幅が 50% 以上減少した領域を凝固域として判別した。その結果、両者の見積もりにおいて平均相対誤差 14% という高い整合性が得られた。また、高い変調周波数は感度が高く振動領域が小さいので、小さな凝固域の判別に有効であり、低い変調周波数は感度が悪く振動領域が大きいので、大きな凝固域の判別に有効であることが確認された。今後は、方位方向にスキャンしながら同様のモニタリングを行うことで、凝固域の二次元マッピングを目指す。

#### 11) 超音波 CT を用いた超音波診断治療の基礎研究

中村弘文<sup>1</sup>, 青柳良佑<sup>1</sup>, 金川哲也<sup>1</sup>, 東 隆<sup>1</sup>, 葭仲 潔<sup>2</sup>, 佐々木明<sup>1</sup>, 高木 周<sup>1</sup>, 松本洋一郎<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東京大学大学院工学系研究科機械工学専攻, <sup>2</sup>産業技術総合研究所ヒューマンライフテクノロジー研究部門)

HIFU 治療では切開の必要がないため低侵襲に治療を行うことができ、患者の QOL 向上が期待される。一方で、治療中の患部を直接視認することができないため、外部から患部を可視化する手法の確立が重要である。我々の研究室では超音波ガイド下による安全で確実な HIFU 治療の実現を目標としている。特に本研究

では、乳癌治療への適用を目指したリング型アレイトランスデューサを用いた超音波治療・診断統合システムの開発を行っている。リング型アレイトランスデューサを用いることにより透過超音波を利用したトモグラフィが可能となる。そしてトモグラフィでは、パルスエコー法では取得が困難であった音速や減衰率の分布を得ることが原理的に可能なため、治療の高精度制御に有用な情報を得られる期待が大きい。また音速の温度依存性に基づいて治療中の温度上昇を計測する手段としても期待される。このように HIFU 治療に CT の技術を組み合わせた HIFU-CT に関する取り組みを報告する。リング型アレイトランスデューサを用いた計測システムの実現のために数値シミュレーションによる計測システムの検討を行った。具体的には生体組織を模擬した系とこれを取り囲むリング型アレイトランスデューサを用いて透過超音波の音圧データを取得するシミュレーション系を構築した。パルスの中心周波数は 2 MHz, リングサイズは小型化したモデルとして直径 35 mm, 素子数は 32, 正常組織の音速を 1500 m/s, 領域の中心部に設定した音速が異なる部位の直径を 10 mm とした。次に音圧波形から到達時間を抽出し、円環内生体組織の音速分布を再構成する手法を検討した。既に実用化している X 線 CT に比べて、超音波 CT では屈折・回折の影響によって、伝搬経路長が複雑に変化する。経路長の変化を CT 再構成に取り込む手法が重要となる。そこで回折・屈折した経路を通った場合と、直線経路で近似した場合の伝搬時間差に関して、音速の変化による影響を調べた。その結果、音速変化が 100 m/s 程度でも 0.5  $\mu$ s と大きな伝搬時間差が生じることを確認した。今後幾つかの生体不均一構造のモデルにおける伝搬時間差を調べ、再構成アルゴリズムにおける近似手法に関して調べていく予定である。また、上記の提案手法を実証するためのリング型アレイトランスデューサを用いた計測システムの進捗状況についても報告する予定である。

#### 12) 集束超音波治療におけるシミュレーションを採用した多媒質中の焦点位置制御手法の開発

鳴見竜太<sup>1</sup>, 松木航介<sup>1</sup>, 岡 功<sup>1</sup>, 東 隆<sup>1</sup>, 沖田浩平<sup>2</sup>, 佐々木明<sup>1</sup>, 葭仲 潔<sup>3</sup>, 高木 周<sup>1</sup>, 松本洋一郎<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京大学工学系研究科, <sup>2</sup>日本大学生産工学部, <sup>3</sup>産業技術研究所)

体内深部の悪性腫瘍に対する HIFU 治療において、骨や脂肪等の生体内組織の音響特性の相違による焦点のずれが、その臨床応用を妨げる一つの要因となっている。本研究は、HIFU 治療の体内深部への応用を目指し、多媒質中を伝播する集束超音波に対する焦点位置制御手法を確立することを目的とする。多媒質系として、他の生体内組織との音響特性の差が大きい骨を意識した系と、乳房のように複数の軟組織が細かい構造を有する系、それぞれを研究対象とした。焦点制御法として、アレイ型トランスデューサを用いた位相制御法を応用した。トランスデューサの各素子に与える位相値は、数値シミュレーションを採用した時間反転法により得た。この手法は、まず目的部位に仮想的に点音源を設置し、その点音源から発信された超音波をトランスデューサ各素子で受信する。次に、受信した各素子の信号に対して、参照となる信号を基に相互相関をとり、相関値が最大となる位相を位相遅延の値とするものである。骨を意識した系では、骨と音響特性の近いアクリルをファントムとして水槽内の超音波伝播経路に設置し、焦点近傍の音場を測定することで焦点制御の精度を見積もった。この実験には素子数 56 のアレイ型トランスデューサを用いた。周波数は 2 MHz, 焦点距離, 開口径は 100 mm である。アクリル

ファントムはトランスデューサの開口端から 40 mm の位置に設置され、音場はニードル型ハイドロフォンを 3 次元制御することで測定した。その結果、位相制御前に確認された焦点のずれやサイドローブを、位相制御によって抑制できることを確認した。また、シミュレーションのモデルを変更することで、縦波に加え、弾性体中を伝わる横波の伝播を計算し、焦点制御に与える影響を比較した。その結果、縦波に加え横波の伝播を考慮することで、焦点制御の精度が向上することが確認された。生体軟組織の細かい構造に着目した系では、まず軸対称モデルにより軟組織の多媒質系を模擬し、その多媒質系が超音波伝播に及ぼす影響を見積もった。その結果、音響特性の差が小さい軟組織によっても、その細かな構造に起因する屈折や散乱の繰り返しにより大きな焦点誤差が生じる可能性が示唆された。今後は、乳房の MRI データを数値シミュレーションに取り込むことで、乳がんの HIFU 治療における焦点誤差を予測し、その制御法を開発していく予定である。

### 13) 超音波加熱治療の高速化を目的とした多点キャビテーション生成による広範囲焼灼手法

吉澤 晋<sup>1</sup>、中村高太郎<sup>1</sup>、浅井 歩<sup>1</sup>、安田 惇<sup>1</sup>、梅村晋一郎<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>東北大学大学院工学研究科、<sup>2</sup>東北大学大学院医工学研究科)

【目的】強力集束超音波 (HIFU) による加熱治療では、一般的には数秒から 20 s 程度の超音波照射によって 10 ~ 100 mm<sup>3</sup> 程度の組織を加熱凝固させる。したがって、cm オーダの大きさの治療対象に対しては数十回~数百回の繰り返し照射を行う必要があり、さらに超音波伝播経路の正常組織を冷却する時間を照射毎に必要なとするため、治療が長時間にわたることが HIFU 治療における問題点の 1 つとなっている。特に深部治療においては冷却時間が長時間化の主要因となっている。そこで本研究では、キャビテーション気泡を利用して効率の良い超音波加熱を実現し、1 回の超音波照射でより広範囲の組織を加熱凝固させる手法の開発を行った。照射する超音波のエネルギーを保ったまま照射領域を拡大することで、必要な冷却時間を増加させずに繰り返し照射の回数を減らすことができ、超音波治療の大幅な高速化に繋がることが期待される。【方法】直径 100 mm、焦点距離 100 mm のトランスデューサを用いて周波数 1 MHz の超音波を発生させた。最初に超音波強度 30 kW/cm<sup>2</sup> の強力な超音波を用い、焦点を高速スキャンすることで 1 ms 以内に 4 点でキャビテーション気泡を発生させた。その直後に超音波強度を 0.8 kW/cm<sup>2</sup> に低下させて 10 s の照射を行い、気泡を持続的に振動させることで広範囲で効率の良い組織加熱を行った。超音波照射対象は、生態模擬ゲルまたは鶏ササミ肉とした。【結果と考察】透明な生態模擬ゲルへの超音波照射の高速度撮影を行い、4 点の焦点スキャンによって次々にキャビテーション気泡を発生、成長させ、それを維持することができることがわかった。さらに、鶏ササミ肉を対象とした加熱凝固実験を行い、加熱凝固体積を求めた。4 点間において焦点を高速スキャンすることで広範囲を一度に加熱した場合、4 点を独立に加熱した場合の 2.6 倍の凝固体積が得られた。さらに瞬時的に高強度な超音波を照射することでキャビテーション気泡を発生させることで、凝固体積はさらに 1.6 倍に拡大し約 600 mm<sup>3</sup> となった。この結果から、本手法により 1 回の超音波照射で効率的に大きな領域の加熱凝固を行えることがわかった。【結論】キャビテーション気泡の加熱増強効果を広い領域で利用することにより、照射する超音波エネルギーを増加させずに凝固体積を大幅に拡大で

きることがわかった。

## 第 3 回

日時：平成 24 年 12 月 15 日 (土)

会場：帝京大学板橋キャンパス大学棟大学院講義室 (東京都板橋区)

### 1) 細胞培養の足場の硬さによるソノポレーション現象の違い

工藤信樹、田中裕人 (北海道大学大学院情報科学)

ソノポレーションとは、超音波の照射により細胞の膜透過性を一過性に向上させ、通常は入らない物質を細胞内に導入する技術をいう。膜透過性の一時的な向上の機序の一つとして、超音波照射下で生じるキャビテーション気泡の機械的な作用による細胞膜の穿孔が挙げられている。ソノポレーションの検討は、培養細胞を対象とする *in vitro* 条件と、生体内を対象とする *in vivo* 条件の両面で行われているが、生体の内外では、気泡のふるまいや細胞の損傷と修復が大きく異なると予想される。しかし、その違いを具体的に検討した報告は、これまであまり報告されていない。そこで本研究では、生体の内外で異なる条件として生体組織の柔軟性に着目し、細胞培養の足場層の硬さの違いがソノポレーション効果に与える影響を調べた結果について述べる。

### 2) 気泡クラウドと微小窪みの同時観察による気泡クラウドキャビテーションの評価

山越芳樹 (群馬大学大学院工学研究科)

気泡を破壊しないが気泡に十分な体積振動を生じさせる音圧を持つ超音波場中に微小気泡を導入すると、気泡は超音波場から音響放射圧を受けて複雑な運動を示す。これは気泡に加わる 2 つの音響放射圧が相互に関連しあい気泡を動かすためであるが、これら気泡に働く音響放射圧を利用するとターゲット付近で気泡密度を向上させたり、さらには気泡のキャビテーション時にソノポレーションの穿孔効率や穿孔の質 (孔の大きさやアスペクト比) 等を著しく改善できる可能性がある。このためには、まず気泡クラウドからのキャビテーションを実験的に評価することが必要になる。本稿では我々の研究室で得られた実験結果を示すとともに、音響放射圧によるソノポレーションの制御に結び付く可能性のある基礎的な結果を報告する。

### 3) 小型キャビテーションセンサ、ソノケミルミネセンス、ソノルミネセンス および 超音波診断画像を用いた音響キャビテーションの空間分布の観察

竹内真一<sup>1,2</sup>、椎葉倫久<sup>1</sup>、植村友樹<sup>2</sup> (<sup>1</sup>桐蔭横浜大学大学院工学研究科、<sup>2</sup>桐蔭横浜大学医用工学部)

当研究室では、英国 NPL の B. Zeqiri らの提案した中空円筒型キャビテーションセンサを参考に、チタン製中空パイプの外側面に水熱合成 PZT 多結晶膜を成膜して、さらにその外周を独立気泡スポンジの音響アイソレータで覆った小型・堅牢な独自のキャビテーションセンサを開発している。チタン製パイプの中空円筒内で発生した音響信号は、チタン製パイプの肉厚方向を伝搬して水熱合成 PZT 多結晶膜で受信できるが、キャビテーションセンサの外側で発生した音響信号は独立気泡スポンジの音響アイソレータで遮音されるので、水熱合成 PZT 多結晶膜に到達できない。したがって、キャビテーションセンサを中空円筒内で発生した音響キャビテーションに対しては感度を有するが、外部で発生した音響キャビテーションに対しては感度を持たない。キャビテーションセンサの出力信号は、センサの中空円筒内で発生したもの

と考えることができる。また、我々の開発したキャビテーションセンサでは、水熱合成 PZT 多結晶膜はチタン製パイプと独立気泡性スポンジの音響アイソレータに挟まれており、音響キャビテーションに直接曝されることはないので、本質的に堅牢な構造となっている。本報告では、150 kHz ソノリアクタの水槽内に定在波音場を形成し、そこで発生する音響キャビテーションを我々のキャビテーションセンサ、ソノケミルミネセンス、ソノルミネセンスおよび超音波診断装置の B モード画像を用いて、比較検討したので、その結果を報告する。

#### 4) 超音波の定在波音場を用いた微小物体／微小気泡のハンドリング

小塚晃透（産業技術総合研究所）

近年、マイクロマシンをはじめ、バイオテクノロジー、微粉体の精製等、微小物体を非接触で操作する技術が求められている。非接触で物体に力を作用させるには、静電気や磁力を用いる手法があるが、電気分解や、対象物の制約がある。また、1970 年に Ashkin により光の放射圧による微粒子操作が発表されて以来、レーザマニピュレーションの研究も盛んに行われている。さて、光に放射圧があるように、同じ波動現象である超音波にも音響放射圧と呼ばれる力が存在し、非接触で物体を操作することが可能である。これまで筆者らは、超音波の定在波音場を形成して、音圧の節に微小物体を捕捉し、音場を制御することで捕捉した物体を非接触で操作できることを示してきた。本報では、超音波を用いた微小物体の非接触操作に関する基本的な手法を示すと共に、気泡が音場中でどのような挙動を示すのかについても、観察する手法と共に報告する。

#### 5) 超音波造影剤併用 HIFU における照射プロトコルの開発

霞仲 潔<sup>1</sup>、歌代浩志<sup>2</sup>、西原輝幸<sup>2</sup>、東 隆<sup>2</sup>、佐々木明<sup>2</sup>、高木 周<sup>2</sup>、松本洋一郎<sup>2</sup>（<sup>1</sup>産業技術総合研究所、<sup>2</sup>東京大学大学院工学系研究科）

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、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 (MB) を用いた HIFU の研究がなされている。MB に超音波を照射すると、MB 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 MB 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。本研究では、MB 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。先行研究により MB を用いることにより、加熱増強がされること、それと同時に MB の濃度を示すボイド率が高くなるにつれ加熱される領域が音源側に近づくため加熱領域のコントロールが難しくなるということが分かっており、我々は超音波が透過する部分の MB を消去する手法を開発した。また、これまでの研究で異なった種類の超音波造影剤、内部気体、シェルが異なるバブルでも本手法が有効であることを示してきた。今回は流

路が存在するファントム中で同様の手法が有効かどうかを検証したので、その結果を報告する。

#### 6) マイクロバブルによる超音波加熱作用の促進について

佐々木一昭（東京農工大学農学研究院）

近年、超音波造影剤として使われる微小気泡（マイクロバブル）による超音波加熱作用の増強効果が知られてきた。Sanghvi らにより、アルブネックスの前立腺への局所投与で強力集束超音波 (HIFU) による前立腺の加熱凝固領域が拡大されることが報告された。生体組織中の超音波吸収がマイクロバブルの投与により局所的にコントロール可能となれば、強力な超音波強度を到達させていく深い腫瘍に対する HIFU 治療効果を増強できると考えられる。このような観点から、フルオロカーボン気泡を含有する超音波造影剤であるオプチゾン投与による集束超音波の熱作用促進効果を検証し、オプチゾン投与による HIFU 組織凝固効果の促進についてラット腎臓を対象とした動物実験により検討したので、その結果を報告する。

#### 7) 超音波ナノバブルを応用した歯の感染根管内細菌の除去効果

川島伸之<sup>1</sup>、辺見浩一<sup>1</sup>、市野瀬志津子<sup>2</sup>、鈴木孝尚<sup>3</sup>、山下直也<sup>3</sup>、立花克郎<sup>4</sup>、中島美砂子<sup>5</sup>、須田英明<sup>1,6</sup>（<sup>1</sup>東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座歯髄生物学分野、<sup>2</sup>医歯学研究支援センター機器分析部門、<sup>3</sup>ネッパジーン株式会社、<sup>4</sup>福岡大学医学部解剖学教室、<sup>5</sup>国立長寿医療センター研究所口腔疾患研究部口腔機能再生研究室）

根尖性歯周炎は、根管内細菌が原因で惹起される根尖歯周組織の炎症性反応であり、根管内の無菌化を図ることで病変の治療を誘導する。根管内の無菌化において重要なのが根管洗浄であり、歯内療法においては一般的に 6% 次亜塩素酸ナトリウム溶液を使用する。6% 次亜塩素酸ナトリウム溶液は、すべての細菌に対して非特異的に作用し非常に強力な殺菌効果を示すが、同時に強い組織傷害性も有する。根管洗浄時に根尖より 6% 次亜塩素酸ナトリウム溶液が漏えいした場合、根尖歯周組織のみならず隙を通じて顔面、頸部の様々な部位に浸透し、その部で組織破壊を起こす。そのため、毛細血管が破壊され顔面および頸部に血腫が表出するとともに、激しい痛みを誘発する。このようなアクシデントを防止するため、6% 次亜塩素酸ナトリウム溶液にて根管洗浄を行う際には、圧をかけないで洗浄操作を行うことが鉄則である。しかし十分な殺菌効果は維持されていながら、可能な限り組織傷害性を低くすることができれば、より安全に根管処置を行うことができるものと期待される。ところで、ナノバブルはナノサイズのパーティクルで、ドラッグデリバリー等の分野において利用されている。超音波と併用することにより、ターゲットの細胞あるいは組織に微小な穴をあけ、その穴よりタンパク質、核酸などを導入する。本研究の目的は、ナノバブルを根管洗浄に応用することで低濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液の殺菌効果を増強させ、十分な殺菌効果を有しながら生体為害性の低い根管洗浄システムを確立することである。

#### 8) 血拴動脈硬化疾患の診断と治療における分子標的性バブルリポソームの活用

萩沢康介<sup>1</sup>、西岡利彦<sup>2</sup>、鈴木 亮<sup>3</sup>、丸山一雄<sup>3</sup>（<sup>1</sup>防衛医科大学校生理学、<sup>2</sup>埼玉医大総合医療センター心臓内科、<sup>3</sup>帝京大学薬学部薬物送達学）

急性心筋梗塞をはじめとする循環器疾患の主病態は、動脈硬化による不安定プラークの形成とそれに引き続く血栓形成を主因と

する急性冠症候群の発症である。これに対する診断および治療の焦点は、急性冠症候群発症前では不安定プラークの早期診断と退縮導入であり、急性冠症候群発症後は血栓の局在診断と血栓溶解（破碎）療法である。その病態の基盤である内皮傷害と血小板血栓の形成にはインテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 及び  $\alpha$ V $\beta$ 3 の活性化が共通しており、これらを標的とした薬剤も開発されている。我々はインテグリンを標的とするバブルによる超音波作用増強を利用した非侵襲的な血栓動脈硬化疾患の診断・治療法の開発を行ってきた。これまでに活性化血小板 IIb IIIa 複合体に結合するペプチドを配合したナノサイズのバブルリポソームの作製に成功し、これにより通常の超音波診断装置で動脈血栓の輝度が著明に増強したことを報告している。またそれを用いて診断と同時に超音波による血栓の破碎と溶解を相乗作用させる新しい治療法を開発している。さらに不安定プラークに強く発現する  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 及び  $\alpha$ V $\beta$ 3 インテグリンの両者を標的として、経皮的超音波による局在診断にも取り組んでいる。今回はこれら研究開発の現状と今後の方向性について、これまでの知見に基づいて論じたい。

#### 9) バブルリポソームと超音波の併用によるがん温熱療法と免疫系の関係

鈴木 亮, 小田雄介, 小俣大樹, 澤口能一, 丸山一雄 (帝京大学薬学部)

これまでに我々は、薬物キャリアーとして臨床応用されているリポソームに超音波造影ガスを封入した新たなタイプの超音波感受性リポソーム (バブルリポソーム (BL)) を開発した。この BL に超音波を照射すると、バブルの振動や圧壊 (キャビテーション) が生じ、その時に発生するマイクロジェット流を利用することで、遺伝子・薬物デリバリーが可能になることを見出してきた。また、超音波照射強度を高めていくと BL の圧壊時にさらに激しいマイクロジェット流や発熱が誘導されるため、直接がん細胞を傷害可能となる。そこで本研究では、BL と超音波照射の併用によるがん温熱療法について検討した。また、本方法により傷害されたがん細胞は生体内で免疫担当細胞により処理されることで、がん細胞に対する抗腫瘍免疫系が活性化されると考えられる。そこで本研究では、本療法における抗腫瘍効果への免疫担当細胞の関与についても検討したので、その結果を報告する。

#### 10) 超音波放射力を用いた微小気泡制御装置開発に向けて

望月 剛<sup>1</sup>, 江田 廉<sup>2</sup>, 小野木真哉<sup>2</sup>, 榎田晃司<sup>2</sup> (<sup>1</sup>(株) MU 研究所, <sup>2</sup>東京農工大学大学院)

現在、強力な超音波エネルギーを利用し体内で腫瘍等を焼灼する治療 (High Intensity Focused Ultrasound: HIFU 治療) が実施されている。この方法は開腹手術に対して非観血で患者への負担が少ないことから、今後さらに発展することが予想される。しかし HIFU 焦点の体積が小さいために一度に焼灼できる体積が小さく、従って大きな腫瘍などでは治療時間が長い問題、強力な超音波エネルギーを体内に照射するために大口径の超音波照射部が必要となり、それによる治療適用部位が制限される問題や体表付近の熱傷の問題等と、解決すべき課題も少なくない。一方で、近年抗がん剤等による薬物療法も進んでいるが、生体内に薬剤が注入されると血流と共に拡散するために治療対象部位では薬物濃度が低くなり治療効果が低下する問題に加え、不要な部位にも薬物の影響が及ぶ副作用などの問題が存在する。そこでこれらの問題解決として、すなわち目標部位に薬剤を効率良く輸送する方法、いわゆる Drug Delivery System (DDS) の一つとして、薬剤を小さなカ

プセルに充填し、そのカプセルを体内に注入した後に、体外から超音波を用いて目的の部位までそれらを誘導する微小気泡制御技術が注目されている。本稿ではその技術の紹介と今後の展望を述べる。

#### 11) バブルリポソームと超音波を用いて抗原送達した樹状細胞の免疫によるがん転移予防効果

小田雄介, 鈴木 亮, 小俣大樹, 澤口能一, 丸山一雄 (帝京大学薬学部)

がんの診断・治療技術の進展に伴い、多くのがん種において治療成績は良化傾向にある。その一方で、細胞レベルでのがん転移は早期に発生することから、再発・転移予防を目的とした治療法の確立が急務となっている。がん免疫療法は、免疫記憶を利用することで長期的に全身性の抗腫瘍効果を期待できることから転移・再発予防における有望な治療法とされている。なかでも樹状細胞を用いたがん免疫療法は、抗原特異的な細胞傷害性を誘導可能であるため副作用の少ない低侵襲的な治療法として期待されている。本療法の成功の鍵は、樹状細胞上の MHC クラス I 抗原提示を介してがん特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導することにある。しかし、一般に MHC クラス I には樹状細胞の細胞質に存在する内在性抗原が提示されており、がん関連抗原のような外来性抗原は MHC クラス II に抗原提示される。したがって、樹状細胞免疫療法を効果的な治療法として確立していくためには、外来性抗原であっても内在性抗原のように MHC クラス I へ抗原提示誘導可能な抗原送達システムが必要である。このような背景のもと、我々は超音波感受性リポソーム (バブルリポソーム) と超音波の併用による新規抗原送達法を開発した。本方法はソノポレーションによる細胞膜透過性促進作用を利用することで、抗原を直接細胞質へと送達可能であった。また、本抗原送達法により送達された抗原はあたかも内在性抗原のように MHC クラス I 抗原提示を誘導可能であることが判明している。そこで本研究では、バブルリポソームと超音波による抗原送達法をがん免疫療法に応用していくことを目的として、腫瘍抽出抗原を用いた樹状細胞免疫による転移予防効果について検討した。

#### 12) がん細胞と特異的に結合する超音波刺激応答性リポソームの創製

清水宣明<sup>1</sup>, 仁宮一章<sup>1</sup>, 山下貴広<sup>2</sup> (<sup>1</sup>金沢大学環日本海域環境研究センター, <sup>2</sup>金沢大学大学院自然科学研究科自然システム学専攻)

薬剤投与の最適化を目指した技術であるドラッグデリバリーシステム (DDS) は、新規がん治療法のための技術として注目されている。DDS 治療により、副作用の低減および治療効果の向上などが期待される。DDS では、薬剤を内包するナノキャリアのひとつとしてリポソーム (Liposome: Lipo) が用いられている。リポソームは、生体膜成分であるリン脂質によって構成される脂質二重膜構造の小胞体である。リポソームには、毒性や抗原性が低いこと、様々な表面修飾が容易で標的化に適することといった薬剤キャリアとしての利点が存在する。しかし、リポソームを用いた DDS においても、①キャリアからの薬剤放出の制御、②キャリアの腫瘍部位への集積性の制御は十分になされていない。本研究ではリポソームに温度応答性高分子 (thermosensitive polymer: TSP) を修飾した超音波刺激応答性リポソーム (TSP-Lipo) を作製した。超音波刺激応答性リポソームに腫瘍部位への集積能を持つがん細胞認識分子として、DNA アプタマー (DNA aptamer: DNA aptamer)

Apt) を修飾し、ヒト乳がん由来の細胞株 MDA-MB-231 に対する特異的結合性の付加を試みた。さらに、構築した超音波刺激応答性-がん細胞指向性リポソーム (Apt-TSP-Lipo) に抗がん剤ドキシソルビシン塩酸塩 (Doxorubicin: DOX) を内包させ、*in vitro* での抗腫瘍効果についても検討した。

#### 第 4 回

日時：平成 25 年 3 月 2 日 (土)

会場：福岡大学医学部臨床大講堂 (福岡市)

#### 特別講演 1) Acoustics-based multi-modality molecular imaging and targeted therapy

Pai-Chi Li (Distinguished Professor, Department of Electrical Engineering, National Taiwan University)

This paper provides a review of advanced multi-modality molecular imaging and targeted therapy using ultrasound on 1) advanced US imaging using high frequency, 2) photo-acoustic biomedical applications, 3) potential utilization of gold nano-rod, 4) molecular targeted imaging, 5) multi-functional agents for imaging and therapeutics, and 6) photo-thermal therapy. Other applications in future are also discussed.

#### 特別講演 2) 見果てぬ夢

伊藤阿耶雄 (重慶医科大学医用超音波工学研究所顧問)

演者が取り組んできた超音波を応用した治療技術を主体に報告するが、研究会長の御要望により、企業活動に接すること少ない大学の研究者を対象に、企業における研究開発の進め方の一端も紹介する。超音波を応用した治療技術については、超音波ハイパーサーミア・超音波結石破碎・集束超音波 (HIFU) を紹介し、最後に HIFU による早期肝癌治療の臨床成績・今後の課題・展望を報告する。

#### 特別講演 3) 集束超音波治療におけるバブルの役割

鹿仲 潔, 東 隆, 佐々木明, 高木 周, 松本洋一郎 ((独) 産業技術総合研究所ヒューマンライフテクノロジー研究部門研究員)

バブル (超音波造影剤) は超音波診断・治療時に併用することにより、様々な効果をもたらす事が知られている。たとえばその名の通り造影効果や、集束超音波照射時における加熱増強効果、細胞への物質導入などが挙げられる。ここではこれまでに我々が行ってきた研究内容を軸に最近のトピックスも交えて紹介する。

#### 【一般演題】

#### 1) 超音波による DNA 損傷と ATR の役割について—熱作用との比較研究

古澤之裕<sup>1</sup>, 近藤 隆<sup>2</sup> (<sup>1</sup>理化学研究所・東京大学医科学研究所, <sup>2</sup>富山大学大学院医学薬学研究部放射線基礎医学講座)

超音波と温熱は異なる物理作用を有するが、ともにリン酸化ヒストン H2AX (γH2AX) フォーカス形成で示される DNA 損傷 (DNA 二本鎖切断) が生成されることが判明してきた。これらの原因として超音波による DNA 二本鎖切断はキャピテーションに伴う機械的作用によることが報告され、また、温熱によるそれは部分的であるが細胞内に生成する活性酸素種 (ROS) によることもわかってきた。一般に DNA に損傷が生じた場合、細胞は DNA 複製あるいは細胞分裂を行う前に細胞周期チェックポイント機構により一時的に細胞周期を停止してその修復を試みる。これにより損傷が修復出来た場合は DNA 複製・細胞分裂を再開す

るが、修復不可能な場合はアポトーシス誘導機構により細胞死を誘導する。電離放射線では、このような DNA 損傷応答は、ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) の活性化と Chk1, Chk2 のリン酸化として知られているが超音波や温熱での DNA 損傷応答の詳細は不明であった。本研究では超音波の DNA 損傷誘発機構と主にその後働く ATR (Ataxia-Telangiectasia and Rad3-Related) の役割を調べ、温熱の生物作用と比較し、その相違について考察した。

#### 2) 強力パルス超音波によるファントム内温度上昇の非線形解析

遠藤信行, 土屋健伸, 田中 伸, 佐久間優 (神奈川大学工学部電気電子情報工学科)

近年の診断装置では、治療用の超音波機器と同じように生体組織内の温度上昇に伴う手法が開発・運用されている。例えば、音響放射圧を利用する弾性計測法に関しては、日本超音波医学会の HP においてもその使用方法に関する注意 (音響放射圧を用いたイメージング装置の生体への影響について) が記載されている。そこで、音響放射圧を生じさせるような強力パルス波をファントム (JIS 規格で制定されている) に照射した場合の温度上昇について、非線形性を考慮した解析と、熱画像法を用いた 2 次元面観測結果とを比べ、非線形温度推定法の有効性について確認した。

#### 3) フォノンニック結晶で構成された音響レンズによる超音波の集束

土屋健伸, 穴田哲夫, 遠藤信行 (神奈川大学工学部電気電子情報工学科)

我々は超音波を集束させる音響レンズに関する研究としてフォノンニック結晶で構成された音響レンズについて解析およびモデル実験を行っている。通常の音響レンズの形状が材質パラメータによって決定されるが、フォノンニック結晶で構成された音響レンズは平面形状で焦点が形成される。理論的には波長近くまで焦点幅が狭くなる事が特異的であり、局所に高音圧を発生させることが可能となる。本報告では、まず数値解析を用いてフォノンニック結晶構造音響レンズを設計し、その性能について述べる。次に縮尺を変更したモデルを作成して、集束音場の測定を行い、焦点距離、集束利得、ビーム幅の基礎データの測定結果を報告する。

#### 4) バブルリポソームと集束超音波を併用した核酸導入法の基礎的検討

根岸洋一<sup>1</sup>, 山村 翔<sup>1</sup>, 奥津大輔<sup>1</sup>, 高橋葉子<sup>1</sup>, 鈴木 亮<sup>2</sup>, 丸山一雄<sup>2</sup>, 新橋幸彦<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京薬科大学薬学部, <sup>2</sup>帝京大学薬学部)

集束超音波 (HIFU) は、超音波エネルギーを一点に集めることができ、局所部位や深部組織へ核酸を導入することができると考えられている。本研究では、超音波造影ガス封入リポソーム (バブルリポソーム: BL) と HIFU を併用した *in vivo* 核酸導入法の開発を目的とし、マウス骨格筋を対象とした基礎的導入実験を行った。マウスの筋組織に対して、BL とルシフェラーゼ遺伝子をコードしたレポータープラスミド (pDNA) の混合溶液を筋組織内へと局所投与し、直後に HIFU を照射し、数日後に導入組織におけるルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、pDNA 単独投与群と比較して、pDNA の投与に BL と HIFU を併用することで、有意な遺伝子発現の増強効果が認められた。このことから BL に HIFU を併用することで、新たな核酸導入法が確立できるものと期待される。



#### 5) 微小気泡の薬物付加法や膜特性がソノポレーション現象に与える影響

吉松幸里<sup>1</sup>, 工藤信樹<sup>1</sup>, 鈴木 亮<sup>2</sup>, 丸山一雄<sup>2</sup> (<sup>1</sup>北海道大学情報科学, <sup>2</sup>帝京大学薬学部)

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ため、気泡自体に薬物を付加することができれば、より効率の良い薬物導入が実現できると考えられる。また、導入の効率は、薬剤の付加法や気泡膜の力学的な特性によって変化すると考えられる。そこで本研究では、アルブミンもしくはリポソームを膜の基材とし、これに薬物を模倣して蛍光染料を付加した微小気泡を作製した。また、これらの気泡を用いて顕微鏡下で細胞へのソノポレーション実験を行い、膜特性とソノポレーション効果の関連について検討を行った結果について述べる。

#### 6) 過酸化水素の光分解および水の超音波分解を併用したヒドロキシルラジカル生成系の殺菌効果

生 宏, 中村圭祐, 菅野太郎, 佐々木啓一, 庭野吉己 (東北大学大学院歯学研究科)

過酸化水素への青色可視光照射による光分解および水への超音波照射による超音波分解によってヒドロキシルラジカルが生成することが知られている。ヒドロキシルラジカルは活性酸素の一種であり非常に強い酸化力を有しているため、細菌に作用させることで殺菌効果が得られる。本研究では過酸化水素の光分解と水の超音波分解を併用した場合のヒドロキシルラジカル生成量の分析および黄色ブドウ球菌に対する殺菌試験を行った。結果として両者の併用によるヒドロキシルラジカル生成と殺菌効果の増大が認められた。

#### 7) 複数音源を用いたマイクロバブル及びバブルリポソームの流体内動態制御

江田 廉, 望月 剛, 榎田晃司, 小田雄介, 鈴木 亮, 丸山一雄 (東京農工大学大学院生物システム応用科学府, 帝京大学薬学部)

我々は、人工血管内を流れるマイクロバブルを音波照射によって能動的に動体制御する研究を行っている。気泡制御に単板振動子を使用する場合、血管構造の複雑化に伴って使用する音源数が増大してしまう問題があった。そこで、これまでに2次元アレイトランスデューサを用いた多段分岐血管を流れる気泡の動体制御手法を提案し、複数箇所焦点を同時に形成することで音源数を削減した気泡制御を報告してきた。本報では、薬物・遺伝子キャリアーとしての可能性・安定性・汎用性などの観点から開発されたバブルリポソームに対して超音波による流体内動体制御を行い、その挙動を従来のマイクロバブルの挙動と比較した結果について報告する。

#### 8) 樹状細胞がん免疫療法における超音波抗原デリバリー法の有用性評価

鈴木 亮, 小田雄介, 小俣大樹, 澤口能一, 丸山一雄 (帝京大学薬学部)

樹状細胞がん免疫療法において、樹状細胞へのがん関連抗原の送達は重要な課題となっている。特に、強力な抗腫瘍免疫系を活性化する樹状細胞のMHCクラスI分子上にごん関連抗原を提示するためには、樹状細胞に対して外来性抗原であるがん関連抗原を樹状細胞の細胞質内に効率よく送達する必要がある。そこで本研究では、バブルリポソームを利用した超音波デリバリーシステムに着目し、樹状細胞への抗原送達能を評価した。モデル抗原としてニワトリ卵白アルブミン (OVA) を用い、樹状細胞の細胞質内への抗原送達能を評価したところ、バブルリポソームと超音波を併用することで、エンドサイトーシスを介さず抗原が細胞質内に導入されることが明らかとなった。また、本方法で抗原化した樹状細胞の免疫により抗原特異的な免疫応答が誘導されることが示された。このことから、本抗原送達法が樹状細胞がん免疫療法における新たな抗原送達方法になるものと期待される。