

公益社団法人日本超音波医学会平成 27 年度超音波分子診断治療研究会抄録

代表：梅村 晋一郎（東北大学大学院医工学研究科）

第 1 回

日時：平成 27 年 8 月 7 日（金）

場所：北海道大学情報科学研究科棟 11 階大会議室

共催：基礎技術研究会，光超音波画像研究会

日本音響学会アコースティックイメージング研究会

抄録は，基礎技術研究会のものを参照下さい。

第 2 回

日時：平成 27 年 11 月 7 日（土）

場所：名古屋大学工学研究科 1 号棟 142 室（東山キャンパス）

共催：日本ソノケミストリー学会

第 8 回超音波とファインバブルの相互作用に関するシンポジウム

1) 気泡と細胞の相互作用の側方からの高速度観察

工藤信樹，五十嵐康信（北海道大学）

気泡が付着した細胞にパルス超音波を照射することによって細胞膜の透過性を一時的に向上し，通常は入らない薬剤や遺伝子を細胞内に効率良く導入するソノポレーションについて検討している。細胞膜の透過性向上は，細胞に付着した微小気泡が超音波照射により膨張収縮することによって生じることから，微小気泡のふるまいを理解することはソノポレーション研究において重要な意味を持つ。これまで我々は，培養細胞を対象にソノポレーションを行ない，培養細胞の足場層の硬さがソノポレーションの効率に大きな影響を与えることを示してきた。本研究では，気泡と足場層や細胞の相互作用を側方から観察することにより，そのメカニズムについて検討を行った結果について報告する。

2) 微小気泡を利用した超音波遺伝子デリバリー

鈴木 亮¹，小俣大樹¹，小田雄介¹，Johan Unga¹，根岸洋一²，丸山一雄¹（¹帝京大学，²東京薬科大学）

安全で有効な遺伝子治療を確立していくためには，低侵襲的かつ標的組織特異的に遺伝子を導入可能なツールの開発が急務とされている。これまでに我々は，ポリエチレングリコール修飾リポソームに超音波造影ガスであるパーフルオロプロパンを封入したリポソーム型微小気泡（バブルリポソーム）を開発した。このバブルリポソームに超音波を照射すると，バブルの圧壊（キャビテーション）が誘導される。そして，この圧壊時に生じるジェット流を駆動力とすることで，種々な細胞種に遺伝子を導入することが可能である。この遺伝子導入は，バブルリポソームと超音波の併用時のみで可能であるため *in vivo* 遺伝子導入に応用した場合，超音波照射部位のみに遺伝子導入可能な画期的方法になりうると期待される。そこで本研究では，バブルリポソームを利用した組織特異的な超音波遺伝子導入法の確立を試みた。

3) 超音波治療のためのモジュール化トランスデューサーの開発

荻仲 潔¹，竹内秀樹¹，東 隆²，高木 周²（¹産業技術総合研究所，²東京大学）

現在，悪性腫瘍の治療方法として HIFU（High Intensity Focused Ultrasound: 高密度集束超音波）が注目を集めている。HIFU 治療は体外から集束超音波を体内で焦点を結ぶように照射し，皮膚切開なしに焦点部付近のみを加熱凝固・壊死させる治療法であり，

非侵襲的に体内の特定部のみを選択的に治療することが可能な治療法である。HIFU 治療において，多媒質による位相のずれなどを補正するために位相制御を用いた体内での焦点位置制御の重要性があり，それに伴いトランスデューサーの多素子化が進められている。しかしながら，現状のトランスデューサーは一体成型（単板振動子をカッティング，あるいはコンポジット材料を敷き詰め形成）で製作されることが殆どで，設計製造等に 2～4 ヶ月を要する。また，ある素子に不良が出た場合，不良素子だけの修理やメンテナンスが非常に難しいといった問題がある。そこで，本提案ではモジュール型治療素子の開発に取り組んでいる。おおよそ親指大の大きさのモジュールに多素子トランスデューサー（4 ch～16 ch 程度）とハイパワーアンプを内蔵したものを想定しており，これらのモジュールを複数配置する事により，例えば数百 ch～数千 ch の多素子 HIFU トランスデューサーを構成することができる。

4) ファインバブルによるハイドレード生成と油滴回収

安田啓司（名古屋大学）

新エネルギーとして，日本近郊の海底に多く存在するメタンハイドレートの利用が期待されている。海底にあるメタンハイドレートの分解・輸送法の開発には地上での実験も不可欠であり，その効率的な生成技術の開発が求められている。また，ハイドレートの特性を生かした応用研究として，天然ガスの輸送，貯蔵，ガス分離，蓄熱材や冷蔵装置の開発などが行われている。ガスハイドレートの形成装置には，高压タンク内の静止した液体中にガスをノズルから分散するものが多く，形成速度が低いことが問題である。本研究では，メタンハイドレートを高速で作成する装置の開発を目的とし，ファインバブル発生器を用いた装置を製作した。ファインバブル発生器におけるガス，液の流量などを変化させ，操作条件の最適化を行った。持続可能な社会の構築のため，食品工場などの O/W エマルションを含む排水から油分を分離・回収し，リサイクルすることは重要である。水中の気泡は，疎水的な微粒子を物理的に吸着させる作用があり，添加剤などを用いないクリーンな分離が可能である。本研究では，ファインバブルを用いて O/W エマルションからの油分の分離・回収を試みた。また，油分の回収に及ぼす，試料と操作条件の影響について検討した。

5) ファインバブル水を用いた放射性セシウム汚染土壌の効率的洗浄技術の開発

豊原治彦¹，佐藤敦政²（¹京都大学，²アース）

東日本大震災の発生から既に 4 年半が経過した。この地震は，津波による大きな被害を東北地方太平洋岸にもたらしたが，それに加え東京電力福島第一原子力発電所からの放射性物質の漏洩という，これまでに人類が経験したことのない大規模な放射能汚染を誘発した。福島県以外ではがれき処理もほとんど終了し復興に向けて着々と都市計画が進んでいるのに対し，放射能汚染の被害を受けた福島県では中間貯蔵施設の建設の遅れから，避難住民の帰還が遅々として進まず，復興には程遠い状況となっている。筆者らは，汚染土壌や汚染焼却灰からの放射性物質の除去を目的として，微粒子分級サイクロンを組み込んだ洗浄装置と独自開発した高性能凝集沈殿剤を組み合わせた除染プラントを開発し，これを

用いて福島県伊達市のグラウンド表土、福島県郡山市の側溝汚泥、福島県飯館村の田畑表土に加え、一般廃棄物の焼却灰（福島県、栃木県、岩手県）で実証実験を行ってきた。これらの実証実験において、洗浄工程でファインバブル水を用いることにより効率的に汚染物質を除去することができた。本稿ではそのうち、田畑表土の洗浄の結果について報告する。

6) 外部刺激を印加したファインバブル混合液の洗浄効果の検討

牛田晃臣¹、小山貴裕¹、中本義範²、長谷川富市¹、鳴海敬倫¹
(¹新潟大学、²TECH)

人々の健康志向の向上により、生野菜（加工品を含む）の消費が増大している。これらは食品工場で洗浄・加工され、小売店へ輸送されている。このとき、殺菌剤を使用し腐敗を防止している。しかし、人体に影響の少ない濃度であるが、薬品を使用することは好ましいことではなく、使用量削減が望まれる。一方、微細気泡を用いた研究が数多く報告されている。その応用例は多く、環境負荷低減の観点からも有効な成果が報告されている。しかしながら、本研究が対象とする生野菜に対する洗浄効果を検討した例は、極めて少ない。また、従来の研究において、交番流 + 微細気泡による機械的作用に着目した洗浄効果が報告されている。このような状況に鑑み、本研究では、交番流式洗浄を用いた生野菜洗浄に微細気泡を使用し、野菜洗浄に対する微細気泡の効果を検討することを目的とする。

7) ウルトラファインバブルの動的平衡モデル

安井久一、辻内 亨、兼松 渉、加藤一実（産業技術総合研究所）

気体の拡散方程式を解くと、ウルトラファインバブル（直径 100 nm - 200 nm）の寿命は、20 μ s - 80 μ s しかない。それにも拘わらず、ウルトラファインバブル（UFB）は数ヶ月にもわたって安定だと言われている。そのため、観測されている UFB は、気泡ではなく固体粒子であると考えられる研究者も少なくない。しかしながら、2014 年に、カンチレバーに埋め込まれた微細管路内に UFB 水を通し、カンチレバーの共鳴周波数の変化から固体粒子と気泡を判別する手法を用いて、UFB が気泡であることが確認された（同時に、固体粒子も検出された）。それでは、UFB は、どのような機構で安定化しているのか？それには現在のところ、7つの説が有る。1つは、気泡表面が有機物等で完全に覆われているとする説。2つ目は、気泡表面がナノ粒子ではほぼ完全に覆われているとする説。3つ目は、固体粒子の割れ目に気泡がトラップされているとする説。4つ目は、気泡表面の帯電により電気反発力が働き安定化するという説。5つ目は、電解質による電気反発力説。6つ目は、多数個の気泡の存在による気体拡散の抑制説。そして7つ目は、疎水性溶質（気体）による相分離説。本研究では、新たに、動的平衡説を調べた。動的平衡説は、固体表面上のナノバブル（UFB と同義）で提案されたモデルで、疎水性表面で疎水性の気体の濃度が高くなることから、疎水性表面付近では気泡内に気体が流入し、それ以外の部分からの気体流出量とつり合って安定化する。

第3回

日時：平成 27 年 11 月 28 日（土）

場所：高知市文化プラザかるぽーと小ホール

共催：第 14 回日本超音波治療研究会（JSTU 2015）

1) 超音波によるマイクロバブルのマニピュレーションに関する研究

尾崎太一¹、井上和仁¹、東 隆¹、一柳満久²、高木 周¹、
松本洋一郎¹（¹東京大学、²上智大学）

近年、超音波と直径数 μ m 程度のマイクロバブルを用いた薬剤を効率よく標的細胞のみに作用させる Drug Delivery System (DDS) 技術が盛んに研究されている。これらのマイクロバブル DDS の先行研究においては、気泡の一方向への駆動や、流路内で押しとどめるといった段階にしか至っていない。もし、空間的に気泡を制御して狙った細胞のみに作用を起こし、また細胞の狙った部位への限局的な作用が可能となれば、マイクロバブル DDS の詳細なメカニズムの検討が可能となる。このために超音波によるマイクロバブルの非接触なマニピュレーション技術の研究を行う。

2) 兎を用いたマイクロバブルの超音波誘導実験

望月 剛¹、和田 洗¹、宮澤慎也¹、小井土惇¹、鈴木 亮²、
丸山一雄²、榊田晃司¹（¹東京農工大学、²帝京大学）

現在主流の強力集束超音波（HIFU）治療は音響エネルギーを局所に集中させ、高エネルギーで生体組織を破碎または熱凝固により患部の治療を行う方法である。この方法は主に超音波の物理的作用を使用するもので、治療成績が比較的患者の固体差等の影響を受けにくい方法と言える。しかし、強力な超音波エネルギーを一点に集中させる方法であるために照射による治療範囲が狭く、処置領域が広い場合には治療時間がかかる。また高エネルギー照射のために皮膚や正常組織などへの炎症に注意が必要である、などの問題が指摘されている。そこで、本研究では低エネルギーの超音波と薬剤との併用による治療における高効率な方法の開発を進めている。具体的には、体内に注入した薬剤は通常血流循環により体全体に拡散するので、この薬剤をマイクロバブル（以下 MB）内に封入し、超音波放射力を利用してこの MB を患部に誘導し、そこで MB を集積し、さらにそれを低音圧の HIFU で破壊し、薬剤の送達及び薬剤の活性化を行う方法である。今回は生体中において MB を超音波で誘導可能であることを動物実験で確認したので、その結果を報告する。

3) PCND の気泡化後の振る舞いと周囲温度の関係性について

菊池健太郎、田中 純、石島 歩、東 隆、南畑孝介、
山口哲志、長棟輝行、佐久間一郎、高木 周（東京大学）

相変化ナノ液滴（Phase Change Nano Droplet: PCND）は超音波が照射されると、気泡へと相変化する。相変化後の PCND は、気泡のまま残存する場合と消失する場合があることが音響的、光学的観測により確認されている。これらの残存消失の切り替わりは PCND の内部組成の沸点と周囲温度の大小関係によって起こることが、これまでの研究で見出された。この残存消失のメカニズムをより詳細に調べることで、どのタイミングでの周囲温度が残存消失に関わっているかを特定することを本研究の目的とする。

4) Development and testing of a new freeze-dried nanobubble for US imaging and therapy

Johan Unga, Daiki Omata, Yusuke Oda, Mutsumi Sugii,
Hitoshi Uruga, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama (Teikyo University)

To develop a novel bubble formulation for ultrasound (US) imaging and therapy with small particle size and a good stability and test the formulation as US contrast agent and for gene delivery in vitro and in vivo. Changes in the lipid composition had a big impact on the properties of the bubbles produced. A mixture of three different lip-

ids in the stabilizing layer resulted in the most stable bubbles. In vivo imaging of B 16BL6 tumours in mice, using the most stable bubbles showed half-lives substantially longer than for the commercial bubble Sonazoid.

5) マイクロバブル併用超音波 in vitro における血栓溶解増強効果の定量解析

王 作軍, 中田典生, 横山昌幸 (東京慈恵会医科大学)

In vitro 研究を通じて, マイクロバブル (MB) と 500 kHz 超音波併用の血栓溶解増強作用の特徴を定量的に把握する. 臨床で超音波診断に用いている MB の血中濃度でも血栓溶解促進効果があったことから, 本法が生体に安全に適用できる可能性が示唆された.

6) 脳への標的指向性を有する pDNA 搭載ペプチド修飾バブルリポソームの開発

高橋葉子¹, 根岸洋一¹, 石田一馬¹, 鈴木 亮², 丸山一雄², 新嶺幸彦¹ (¹東京薬科大学, ²帝京大学)

高齢化社会の進行に伴い, 中枢神経疾患の患者数は増大する傾向にあり, その有効な治療薬の開発が急務である. 中枢神経疾患の治療薬開発において, 脳組織への効率的なデリバリーが重要な課題とされている. これまでに我々は, PEG リポソームに超音波造影ガスを封入したバブルリポソームを開発し, 超音波造影剤, および遺伝子・核酸デリバリーツールとしての有用性を示してきた. 本研究では, 脳への標的指向性を有する新規ペプチド修飾バブルリポソームを開発し, 超音波造影剤, および遺伝子デリバリーツールとしての適用を目指す. 今回我々は, 血液脳関門への集積が報告されている Angiopep-2 に着目し, ペプチド修飾バブルリポソームの調製を試み, その標的指向性を評価した. さらに, 全身投与における遺伝子導入の効率化を目指し, カチオン性脂質含有ペプチド修飾バブルリポソームを調製し, バブルリポソーム表面への pDNA の搭載, pDNA 搭載後の組織集積性についても検討した.

7) 悪性神経腫に対する腫瘍特異的超音波力学療法: 光増感剤併用効果について

末廣 論, 大上史朗, 高野昌平, 山下大介, 西川真弘, 大西丘倫 (愛媛大学)

悪性神経腫は手術, 放射線・化学療法を含む最新の集学的治療を行っても, 依然その予後は不良である. その原因として, 浸潤性が高い腫瘍にも拘わらず, 脳の機能温存の為に, 広範な腫瘍切除が行えないこと, 浸潤した腫瘍幹細胞による腫瘍再発が挙げられる. 近年, ガンに対する新たな治療として超音波による超音波力学療法 (Sonodynamic therapy: SDT) が試みられており, SDT に光感受性物質を併用することの相乗効果も報告されている. 悪性神経腫では, 腫瘍特異的光感受性物質として 5-aminolevulinic acid (5-ALA) が既に, 臨床使用されており, 今回, 我々は, 悪性神経腫において, 5-ALA 投与下での SDT の抗腫瘍効果について検討を行った.

8) 悪性神経腫細胞株に対するポルフィリン誘導体を用いた音響力学療法

遠藤将吾, 工藤信樹, 山口 秀, 住吉洗城, 茂木洋晃, 金子貞洋, 小林浩之, 寺坂俊介, 寶金清博 (北海道大学)

神経腫は成人脳腫瘍の約 20% を占め, なかでも膠芽腫に代表される悪性神経腫は外科的切除に放射線化学療法を組み合わせてもその 5 年生存率は約 10% と不良である. 本腫瘍は正常脳組織に浸潤性に進展することから 90% 以上が切除断端近傍から再

発を来す. このため生存率の改善のためには如何に浸潤腫瘍を制御し局所再発を防ぐかが重要である. ここで我々は本腫瘍に対する新規補助療法として音響力学療法 (sonodynamic therapy: SDT) に着目して, その抗腫瘍効果を in vitro で検証した. SDT とは腫瘍細胞内に蓄積させた触媒を超音波によって励起し, その際に発生する活性酸素により酸化的細胞損傷を与えるという治療方法である. 組織深達度に優れた超音波を用いた本治療は切除困難な脳深部の腫瘍への効果も期待できる有望な治療法と考えられる. 本研究では既に悪性神経腫に対する術中蛍光診断薬として広く臨床応用されている 5-Amino-levulinic acid hydrochloride とその代謝産物である protoporphyrin IX, および原発性悪性脳腫瘍に対する光線力学療法薬として保険承認されている talaporfin sodium を触媒に用いた.

9) MC3T3-E1 前骨芽細胞様細胞における低出力パルス超音波の遺伝子応答

田淵圭章¹, 鈴木信雄², 近藤 隆¹ (¹富山大学, ²金沢大学)

低出力パルス超音波 (LIPUS) は, 臨床において骨折治療に用いられている. 動物や細胞レベルで LIPUS の効果は種々報告されているが, その分子メカニズムは未知の部分が多い. 今回, 我々は, LIPUS の効果の分子メカニズムを明らかにする目的で, DNA マイクロアレイとバイオインフォマティクス解析を用いて LIPUS に応答する遺伝子を調べ, 効果を予測した. LIPUS 処理細胞において 24 時間後 1.5 倍以上発現が増加する遺伝子が 38 個, 減少する遺伝子が 37 個観察された. 遺伝子の機能解析により, 増加する遺伝子群では TGFB1 や P38 MAPK の活性化に引き続いて機能として「細胞の移動」が促進することが予測された.

10) 低出力超音波刺激 (LIPUS) は間葉系幹細胞の多継代培養による分化能喪失を防ぐ

楠山讓二, 成宣ファン, 仙波伊知郎, 松口徹也 (鹿児島大学)

間葉系幹細胞 (MSC: mesenchymal stem cell) は自己複製能力を持つ多能性細胞であり, 骨芽細胞, 軟骨芽細胞, 脂肪前駆細胞, 筋芽細胞へと分化することができる. MSC の採取は比較的容易であるが, 多継代にわたって培養すると分化能を喪失することが知られている. そのため MSC の臨床応用を成功させるためには, 幹細胞の分化多能性を維持させる新しい細胞培養法の開発が必要である. 我々はこれまでに MSC に対して, 難治性骨折治療に臨床応用されているメカニカルストレスである低出力超音波 (LIPUS: low-intensity pulsed ultrasound) を加えることで, MSC の分化能を制御できることを報告している. 本研究ではその成果を進展させ, LIPUS 照射が MSC の分化能維持に与える影響を解析した.

11) 異なる周波数掃引超音波の照射による癌細胞殺細胞効果の比較

渡邊晶子, ムサビ・ネジャド・セイエデ, 遠藤日富美, フェリル・ロリト, 立花克郎 (福岡大学)

近年, 超音波の癌治療応用を目指し, 様々な超音波照射条件による殺細胞効果の検討が行われている. 本検討では異なる超音波周波数掃引における癌細胞の殺細胞効果を比較した. 駆動周波数を高周波数から低周波数へ掃引する場合のほうが, 殺細胞効果が高くなる傾向が見られた. この照射方法を, より効率的な超音波治療に応用できる可能性が示唆された.

12) 超音波による細胞周期変動を利用した増感放射線療法の可能性

藤沢真代, 佐々木東, 安井博宣, 工藤信樹, 滝口満喜 (北海道大学)

放射線療法はガンの三大治療法の一つであるが, 放射線抵抗性や局所再発といった課題が存在する. 増感放射線療法は放射線感受性を改善することでこれらの課題克服を目指している. 一方, マイクロバブル存在下での超音波照射は細胞膜の透過性を亢進させるが, その他にもフリーラジカルの産生, 細胞周期進行の停止や細胞死の増加を起こすことも知られている. 我々はその中でも細胞周期の変動に着目し, バブルと超音波を組み合わせる新しい増感放射線療法の可能性を検討している. 細胞周期を変動させて放射線感受性期分画を増加させることができれば, 腫瘍選択的に放射線増感作用を得られると考えられる. 今回はその第一段階として *in vitro* での検討を行ったので報告する.

13) 膵臓癌細胞のアポトーシス誘導に関する基礎研究

佐藤貴亮, 西村裕之, 萩原啓実, 吉田 薫, 竹内真一 (桐蔭横浜大学)

膵臓癌は初期にはほとんど自覚症状がなく, 進行も早いために早期発見が非常に難しいという特徴がある. 膵臓癌細胞は膵臓外に浸潤しやすく周囲のリンパ節や臓器に転移しやすいという特徴もあるため, 発見された段階で摘出手術が行えないほどに進行している事例が多々ある. そこで我々は, 摘出手術が行えない膵臓癌に対する追加療法として超音波によるアポトーシス誘導を考えている. 今回は, 膵臓癌細胞株 MIA-PaCa2 に超音波を照射した際のアポトーシス誘導について検討を行ったので報告する.

14) Sonochemical Internalization による抗腫瘍効果に関する基礎的研究

大崎智弘¹, 宇都義浩², 石塚昌宏³, 田中 徹³, 山中信康⁴, 倉橋 司⁴, 東 和生¹, 村端悠介¹, 柄 武志¹, 伊藤典彦¹, 今川智敬¹, 岡本芳晴¹ (1鳥取大学, 2徳島大学, 3SBI ファーマ, 4伊藤超短波)

Photochemical Internalization (PCI) は, 細胞膜に集積性のある光増感剤を用いた新規ドラッグデリバリーシステム (DDS) である. 光増感剤を事前に投与し, さらにエンドサイトーシスで取り込まれる薬剤を投与した後, レーザー光を照射すると, 薬剤が細胞質内に効率よく放出される. 腫瘍に対する PCI は, 主にプレオマイシン (BLM) が用いられ, 治療効果の改善が報告されている. しかしながら, PCI に用いるレーザー光は, 組織透過性において限界があり, 深部腫瘍に対しては治療が困難である. レーザー光に比べてより深部まで組織透過性のある超音波 (US) で PCI を施す新規治療法を Sonochemical Internalization (SCI) と定義した. 本研究では, 光増感剤 (AIPcS2a, 5-ALA), 抗がん剤 (BLM) および超音波を用い, SCI を実施することが可能かどうか検討し, その抗腫瘍効果について評価した.

15) Evaluation of mechanical damage to cancer cells by high-intensity focused ultrasound in the presence of microbubbles and titanium dioxide

Seyedeh Moosavi Nejad¹, 立花克郎¹, 遠藤日富美¹, Loreto Feril¹, 高橋宏昌², 成平恭一¹, 喜久田利弘¹ (1福岡大学, 2自衛隊横須賀病院)

本発表では, 樹状細胞を用いたがん免疫療法におけるソノポレーションの有効性を検討した結果について報告する. 模擬抗原付加

気泡を用いて, (1) 気泡が細胞外に接着した状態と (2) 細胞内に貪食された状態においてソノポレーションを行い, 細胞質内への抗原導入の様子を調べた. ソノポレーションによる細胞変化を共焦点顕微鏡観察した結果, (1) の場合には5%の細胞にのみ細胞質内への導入が見られたのに対し, (2) の場合には79%の細胞に導入が見られた. これは, 気泡を貪食した細胞を対象にソノポレーション条件を最適化する事の重要性を示す結果と考えられる.

16) 膀胱癌を模した3次元培養系でのシスプラチンデリバリー

佐々木東, 工藤信樹, 滝口満喜 (北海道大学)

浸潤性膀胱癌は腫瘍組織が筋層に浸潤しているタイプで, 膀胱摘出術が適応となる. 近年では術後のQOL維持のために膀胱温存療法も選択肢になってきている. 膀胱は表在臓器であり, また内腔が液体で満たされているため, 超音波治療の適応になると考える. そこで, 超音波とマイクロバブルによる抗がん剤デリバリーを膀胱温存療法に適応すべく研究を始めた. まず *in vitro* として, 膀胱癌を模した3次元培養系で抗がん剤のシスプラチンの効果増強を検討した.

17) 低侵襲的な超音波がん温熱免疫療法の開発に向けた基礎的検討

鈴木 亮¹, 小田雄介¹, 小俣大樹¹, Johan Unga¹, 宇留賀仁史¹, 杉井むつみ¹, 根岸洋一², 丸山一雄¹ (1帝京大学, 2東京薬科大学)

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.

第4回

日時:平成28年3月5日(土)

場所:福岡大学医学部臨床大講堂

1) 再生医療への超音波医学の貢献

大谷健太郎 (国立循環器病研究センター研究所)

近年, ①腫瘍性病変の鑑別診断, ②細胞や組織への薬剤・遺伝子導入, ③組織灌流の定量化, ④分子標的気泡を用いた超音波分子イメージングなど, 超音波と微小気泡を併用した様々な超音波医学的手法が生命科学分野において広く利用されている. 本講演では, 我々がこれまで取り組んできた再生医療, とりわけ幹細胞移植療法における超音波と微小気泡の併用法の有用性および今後の展望について紹介する.

2) 低出力超音波刺激 (LIPUS) は骨芽細胞の LPS 誘導性炎症反応を抑制する

中尾寿奈¹, 楠山讓二², 田沼順一¹, 松口徹也² (朝日大学, ²鹿児島大学)

歯周病は成人の歯の喪失の主な原因で, 細菌感染による炎症疾患である。骨芽細胞はグラム陰性菌の LPS によりケモカインを産生し, 炎症細胞の遊走を誘導する。骨代謝の促進効果から骨折治療に臨床応用されている LIPUS の炎症性疾患への効用について検討した。今回, 骨芽細胞に LPS 刺激を与えたところケモカイン CXCL1, CXCL10 と CCL2 の mRNA 発現量は著しく上昇した。そのうち, CXCL1 と CXCL10 の発現は LIPUS 共刺激にて有意に抑制された。この抑制機構について, NFκB の活性, その上流キナーゼの活性, TLR4 の発現, TLR4/MyD88 複合体形成等 LPS 誘導シグナル伝達への LIPUS の影響を検討した結果を述べる。

3) 免疫細胞療法への応用を目指した細胞-微小気泡凝集体の形成と超音波照射による動態制御

榊田晃司¹, 澤口冬威¹, 追立理喜¹, 望月 剛¹, 小田雄介², 鈴木 亮², 丸山一雄² (東京農工大学, ²帝京大学)

免疫細胞療法などに応用するため, 細胞の周囲に微小気泡を付着させた凝集体を形成し, 音響放射力を利用して細胞を血流中で運搬するための技術を開発している。本研究では, マウス由来の Colon-26 細胞と, それに特異的に付着する微小気泡 (バブルリポソーム) を用いており, 現在, 様々な条件の超音波照射下での制御持続性について検討している。先行研究と同様に, 同凝集体を微小閉空間に封入し, 蛍光顕微鏡にて観察する実験系を構築した。微小閉空間内に対して制御用の超音波を照射し, 視野内の凝集体の動態を画像処理により追跡した。その結果, 照射時間が長くなるにつれて凝集体を動かすことはできなくなった。これは微小気泡の崩壊が進み, 細胞の推進力が低下したことが原因と考えられる。

4) 温熱および超音波による DNA 損傷応答の比較と分子標的の探索

古澤之裕¹, 近藤 隆² (富山県立大学, ²富山大学)

超音波は臨床において, 画像診断のみでなく癌治療にも用いられており, その機序として熱的作用と非熱的作用の寄与が考えられている。温熱や超音波の非熱的作用は細胞内の DNA を標的とし, DNA 損傷の中で最も重篤とされる二本鎖切断を引き起こす。一方, 生物は DNA 損傷に対する応答分子を備えており, この重篤な損傷を修復し細胞死を回避することが知られている。この DNA 損傷応答経路は, 放射線やある種の化学療法剤により活性化することが知られているが, 温熱や超音波による影響についてはあまり研究されていなかった。我々は, 熱処理や超音波照射した細胞において, DNA 損傷応答経路がどのように働いているかを調べ, 本経路の分子が細胞死増感の標的となりうるかを検討してきた。ここでは, 温熱処理および超音波照射した細胞において, 活性化する DNA 損傷応答経路分子の比較と, 分子標的薬による細胞死増感についてまとめた結果を報告する。

5) Development of a new freeze-dried nanobubble for US imaging and therapy

Johan Unga¹, Daiki Omata^{1,2}, Yusuke Oda¹, Mutsumi Sugii¹, Hitoshi Uruga¹, Ryo Suzuki¹, Kazoo Maruyama¹ (Teikyo University, ²Utrecht University)

We aimed to develop a lipid-stabilized freeze-dried bubble for ultra-

sound (US) imaging and therapy with small particle size and a good stability and test the formulation as US contrast agent and for gene delivery *in vitro* and *in vivo*. The bubble stability *in vitro* could be significantly improved by changing the lipid composition but the bubble size was always in the range 500-800 nm. In comparison with the commercial bubble Sonazoid our bubble was shown to have a superior circulation time *in vivo* in mice and also to be appropriate for tumour neo-vasculature imaging. Further, bubbles in combination with ultrasound exposure could greatly enhance the delivery of plasmid DNA into cells *in vitro* in cell culture and *in vivo* in mice.

6) 樹状細胞への抗原導入におけるソノポレーションの有効性に関する基礎的検討

工藤信樹, 高田 亮 (北海道大学)

本発表では, 樹状細胞を用いたがん免疫療法におけるソノポレーションの有効性を検討した結果について報告する。模擬抗原付加気泡を用いて, (1) 気泡が細胞外に接着した状態と (2) 細胞内に貪食された状態においてソノポレーションを行い, 細胞質内への抗原導入の様子を調べた。ソノポレーションによる細胞変化を共焦点顕微鏡観察した結果, (1) の場合には 5% の細胞にのみ細胞質内への導入が見られたのに対し, (2) の場合には 79% の細胞に導入が見られた。これは, 気泡を貪食した細胞を対象にソノポレーション条件を最適化する事の重要性を示す結果と考えられる。

7) 音響化学治療を目的とした集束超音波による活性酸素生成の高効率化及び空間分布の検討

安田 惇, 吉澤 晋, 梅村晋一郎 (東北大学)

超音波で生成させることのできるキャビテーション気泡は, 細胞毒性をもち, がん細胞を死滅させることができる。音響化学治療はこの原理と, さらに音響化学活性物質と呼ばれる, 活性酸素の生成を促進させる化学物質を用い, がん組織に活性酸素を生成させ, がんを治療する手法である。この治療法では, 活性酸素をがん組織のみに局在化させることと, 効率よく生成させることが重要である。本研究では, 音響化学活性物質の存在している溶液内に生成させたキャビテーション気泡の挙動を高速度撮影し, 活性酸素生成領域を可視化し, さらに活性酸素生成量を定量することにより, 活性酸素生成の局在化と高効率化を両立させることができる超音波照射シーケンスについて検討を行った。

8) 模擬血管を有するファントムの集束超音波照射時の温度測定基礎研究

沈 楽辰, 毛利裕則, 土屋健伸, 遠藤信行 (神奈川大学)

超音波照射による生体ファントム内部の温度上昇の研究を行っている。本研究では, 血液の熱搬送効果を考慮するため, 模擬血管を有する生体寒天ファントムを用いて, 集束超音波照射時の温度上昇分布を熱画像法で測定した。この実験結果と簡単なシミュレーション結果を比較したところ, 最大温度上昇値に約 3 度の差異が存在することが分かった。そこで, 熱画像を取得する際の空中への熱放射が原因ではないかと考え, 熱電対法と画像法の比較検討による追加実験を行った。追加実験によっても, 実測値とシミュレーション値とが完全には一致はしなかったが, 両者の差異が小さくなることが確認できた。

9) 高周波超音波画像装置 (Prospect) を使った微小気泡のイメージング

渡邊晶子, Seyedeh Moosavi-Nejad, 遠藤日富美, Loreto Feril, 立花克郎 (福岡大学)

これまでにマイクロバブルを利用した超音波造影効果について多くの研究が行われてきた。我々は、マイクロバブル超音波造影剤ソナゾイドからマイクロバブル成分を排除した残存成分の物理特性を測定し、ソナゾイドの中にナノレベルのバブルの存在を初めて確認することができた。今回は、ナノサイズのバブルの共振周

波数に近い中心周波数 40 MHz の超音波プローブと高分解能超音波イメージング装置 Prospect (S-Sharp 社製) を使用し、各音響条件で、血流を模擬した実験システムを流れるソナゾイドナノバブルの超音波造影画像を撮影した。高周波超音波により、血管を模擬した実験システム内を流れるナノバブルの動態を可視化することが出来た。今後、実験システムの改良や音響条件の詳細な検討を行う。将来的に、ナノバブル超音波造影剤の頸動脈プラーク診断への応用が期待できる。