

社団法人日本超音波医学会平成 18 年度第 1 回ソノポレーション研究会抄録

代表：立花 克郎（福岡大学医学部解剖学教室）

日時：平成 18 年 7 月 15 日（土）

場所：福岡大学医学部 講義棟 2 階 第 1 中講堂（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) 衝撃波 DDS 用カプセル設計・開発と衝撃波による細胞への力学的刺激

玉川雅章（九州工業大学 大学院生命体工学研究科 生体機能専攻）

Abstract This paper describes the development of microcapsules with high disintegration rate efficiency for drug delivery systems (DDS) using shock waves and the design of the microcapsules. The microcapsules, which include a gas bubble, are made by a micro-manipulation system, and it was found that the production possibility depends on the chemical composition of the microcapsule. To obtain the design index of the capsule structure and configuration, a bubble deformation process near a curved elastic wall, which was an experimental model of the microcapsule membrane, was observed and analyzed. The results show that disintegration efficiency depends on the capsule size and Young's modulus of the membrane. As for Young's modulus, the disintegration efficiency peak value was around 100 kPa under several conditions. The Young's modulus of the microcapsule membrane changed with chemical composition, and was determined by comparing the aspirating process of the capsule membrane with the results of finite element analysis. When the apparent Young's modulus of the membrane considering visco-elasticity is more than 250 kPa, microcapsules including gas bubbles can be produced. In this case, the capsule membrane's optimum elasticity for easy disintegration is 250 kPa when considering the above results. Therefore, it is necessary to design a microcapsule with a gas bubble to optimize elasticity for production and ensure high disintegration rate efficiency.

2) Novel ultrasound exposure system that simulates in vivo condition in investigating sonotransfection and bioeffects of ultrasound

Loreto B Feril, Jr.（福岡大学・医学部解剖学教室）

The discovery that most human diseases (e.g. genetic disorders, cancers and metabolic disorders) are somehow linked to a particular gene or genes has brought unprecedented progress in the science of therapy. Gene therapy, in particular, is formulated for treating certain ailments and is carried out by introducing recombinant genes into the somatic cells to alter the course of a disease process. Several strategies have been designed to attain transfection and eventual integration into the nucleus of the target cells. Viral-mediated gene transfer is efficient to the task, but cytotoxicity, cytopathy, and antigenicity are among the drawbacks that limit its use in therapy.

Use of US in therapy and also in gene transfection has been investigated both in vitro and in vivo.

Greenleaf et. al. (1998) first used non-viral plasmid DNA in combination with ultrasound. It was postulated that ultrasound would initiate the delivery of DNA through the cellular membrane to within the cells and would not at the same time produce irreversible damage to the cells. Bao et al. (1997) further added microbubbles to increase the rate of DNA transfer. Ward et al. (1999) and Tachibana et al. (1999) had earlier theorized that liquid microjets induced in the event of collapse of microbubbles could be the mechanism by which DNA easily penetrates the cell membrane. Scanning electron microscopy and high-speed video imaging technologies have recently revealed images of collapsing microbubbles and ruptured cell membrane surface that supports this theory. Unger (2004) introduced the concept of "tailored made" microbubbles and nanobubbles that target specific tissue lesions to deliver drugs and DNA.

Today, the concept of applying ultrasound as a means for altering the pharmacokinetics in various tissues and drug permeability through cell membranes has expanded into a whole new field ranging from gene therapy to anti-cancer drugs. A new generation of microbubbles and nano-sized bubbles are under development specifically for the purpose of "target and deliver" drug treatment with non-thermal ultrasound. So far the mechanism remained generally unknown, but the leading belief is that US increases DNA uptake by the cells. A study investigated the effects of US on liposome-mediated transfection using 3 different types of liposomes, which have been previously shown to mediate transfection with different degrees of efficiency, showed that US significantly increased luciferase expression when combined with the liposomes²⁹. Optimal enhancement was observed when US was given 2 hr after incubation of the cells with the liposome-DNA complexes, suggesting that US works to enhance transfection only after cells had enough time to interact with the DNA.

More recently, we have shown that improving the survival of cells after having induced membrane damage leads to an improved transfection rate on five cancer cell lines (U937, HeLa, PC-3, Meth A and T-24). It was also shown that optimized US condition resulted in a better transfection rate than that of electrotransfection and liposome-mediated transfection³⁰. Use of engineered microbubbles in sonotransfection has therefore widened the therapeutic potential of this method

3) 超音波を用いたヒト神経線維腫細胞への gene transfection

山口和記（福岡大学・医学部解剖学教室, 皮膚科学教室）

Objective:

Malignant melanoma is one of the most malignant tumours known to man. The prognosis of patients who have disseminated melanoma is very poor and available treatment methods remain unsatisfactory. Newer effective treatment has been desired. We have previously shown that ultrasound-mediated gene transfection can be optimized

in vitro. In this study, we investigated the transfection of Interferon β (IFN β) gene into malignant melanoma cell line using a set up simulating in vivo condition. IFN β is known to be a tumor growth inhibitor. We then investigate whether or not sonotransfection of IFN β on malignant melanoma in nude mice can suppress tumor growth.

Materials and Methods:

In vivo tumor therapy model

Malignant human melanoma (C32) cells subcutaneously inoculated into mice at 2×10^6 cells/tumor site and 2 tumor sites per mouse. Two weeks after melanoma inoculation, tumors were subsequently exposed to 1.011 MHz ultrasound using a 2 cm (diameter) transducer after intra-tumor injection with IFN β genes mixed with microbubble. Sonication (I_{SATA} 0.44 W/cm², burst frequency of 0.5 Hz, 25% duty factor) was done for 2 min daily for three days. Tumor sizes (maximum diameter x width) of the transfected group were measured every 3 days and compared with that of the un-transfected group.

Results:

In vivo, the growth rates of malignant melanomas transfected with IFN β gene, tended to be lower than those treated with ultrasound only.

Conclusions:

These results suggest that ultrasound-mediated IFN β gene therapy could potentially become a non-surgical method in treating skin diseases, such as malignant melanomas. Recently, extensive surgical treatment of advanced malignant melanoma is no longer recommended, thus ultrasound-mediated IFN β gene transfection could also be a new method of treatment.

4) ソノポレーション用超音波プローブの性能特性に関する検討

遠藤日富美 (福岡大学・医学部解剖学教室)

PURPOSE: To determine if commercially available echo-enhanced microbubble contrast agents could be used to increase gene transfection efficiency by means of relatively low-intensity ultrasound-mediated microbubble destruction.

MATERIALS AND METHODS: Two echo enhanced contrast agents BR1 and BR14 (Bracco) were tested in this study. 20 μ g of the reporter plasmid DNA (25 μ g) encoding green fluorescent protein (GFP) and including amounts of microbubbles were mixed with 2×10^6 Chinese hamster ovary (CHO) cells at a final volume of 1 ml. The cells were irradiated with low-intensity therapeutic ultrasound (1 MHz) at an intensity of 1.0 W/cm² and a duty cycle of 10% for 20 seconds (Fig 2, Sonitron 1000; Rich mar, Inola, Okla). Addition of microbubbles resulted in significantly lower viability ($N = 3$). The concentration of the microbubble was adjusted so as to indicate post-ultrasound treatment viability of $50 \pm 10\%$. After the cell viability analysis, the cell suspensions were harvested from the wells, separated by centrifugation, and resuspended in alpha minimal essential medium. Viable cells (2×10^5) were plated into 6-cm dishes. After 48-hour culture, the GFP-positive cells were detected with a digital camera (FUJIX HC-300; Fujifilm, Tokyo, Japan), ARGUS-20 image and a chilled CCD camera (Hamamatsu

Photonics K.K. Hamamatsu, Japan) from an ECLIPSE E 600 fluorescence microscopy (Nikon Inc., Tokyo, Japan) with plain apochromat lenses using a FITC-HVQ filter (EX 450-490 nm, DM 505 nm, BA 520 nm). Cell images were printed out by FUJIX Pictography 3000 (FUJIFILM, Tokyo, Japan).

RESULTS: Low intensity ultrasound irradiation alone just had minimal cell killing effects. Whereas addition of microbubbles resulted in significant reduction of cell viability by ultrasound irradiation. In spite of similar cell killing ration by microbubbles plus ultrasound, BR 14 microbubble showed significantly higher efficiency of gene transfer compared to the BR1 (Fig 3,4).

CONCLUSION: Low intensity ultrasound in the presence of BR14 echo contrast microbubbles induced efficient gent transfer but not with BR1.

5) 超音波音響集束レンズの波動理論による基礎的検討

遠藤信行¹, 土屋健伸¹, 松本さゆり² (¹神奈川大学工学部, ²独港湾空港技術研究所)

音響レンズを用いた水中映像取得装置の開発に向けて、光学レンズ設計手法を導入した水中音響レンズ設計法を検討中である。本稿では、より現実的な音響レンズ設計のために光波と音波のビーム径を比較することを目的とし、光学設計に基づいて視野角および結像面上での像径(ビーム径)を想定したアクリル樹脂性の単レンズ(レンズB)を設計・製作し、その性能を実験的に取得したので報告する。

Authors have been studying an Underwater Acoustic Lens design by using optical lens design method, which is a part of developing an Acoustic Imaging SONSR System. A purpose of this paper is comparing beam radius on an image plate between acoustics and optics which is needed to acoustic lens design method establishment based on optical one. Then LENS B, which is a single tablet, both side concave and acrylic underwater acoustic lens, was designed and made with assumption of view angle and beam radius on an image palate by optical lens design method. This paper reported measured LENS B performance in a tank.

6) 超音波エコーガス封入リポソーム(バブルリポソーム)による非侵襲的遺伝子導入に関する検討

鈴木 亮¹, 滝澤知子¹, 澤村香織¹, 根岸洋一², 宇都口直樹¹, 立花克郎³, 丸山一雄¹ (¹帝京大・薬, ²東葉大・薬, ³福岡大・医)

[目的] 遺伝子治療を含む核酸治療において、目的の核酸を細胞内に安全かつ効率よく導入可能であり、さらに低侵襲的に目的組織に核酸導入可能な技術の開発が望まれている。このような背景の下、これまでに我々は、超音波エコーガスを封入したリポソーム(バブルリポソーム)を開発し、このバブルリポソームと超音波照射技術を組み合わせることで、細胞に遺伝子導入可能であることを見出してきた。そこで、本研究ではバブルリポソームの核酸治療への応用を念頭に、バブルリポソームを用いた細胞への核酸導入に関する特性評価を行った。

[方法] Polyethylene glycol (PEG) で修飾したリポソーム DPPC/DSPE-PEG 2000 を調製し、超音波造影ガスであるパーフルオロプロパンガスを内封してバブルリポソームを調製した。COS-7細胞(サル腎由来細胞)にLuciferase 発現プラスミドおよ

びバブルリポソームを添加後、Sonopore 2000（ネバジーン）により、さまざまな条件にて超音波照射を行った。細胞を洗浄し、一定時間培養後、Luciferase 活性を測定した。pCMV-GL3 control vector/Luc GL3 siRNA または pEGFP-N3/GFP-22 siRNA をバブルリポソームと共に血清存在下で各ウェルに添加し、直ちに超音波照射（Frequency：2132 kHz, Duty：50 %, Burst Rate：2.0 Hz, Intensity：2.5 W/cm², Time：10 sec.）を行い、48 時間培養後のルシフェラーゼ活性または GFP 発現を測定した。

〔結果・考察〕バブルリポソームと超音波照射の併用において、遺伝子量および超音波照射強度に依存した遺伝子発現が認められた。一方、バブルリポソームの過剰添加により遺伝子発現の減弱が認められ、リポソーム添加量の最適化が必要であることが明らかとなった。さらに、本方法では、血清存在下においても遺伝子

発現の低下は認められなかった。バブルリポソームと超音波照射の併用により Luc GL3 siRNA による 90% 近くの Luciferase 活性の特異的な抑制効果が認められた。また、GFP-22 siRNA により GFP 発現抑制効果も確認できた。さらに顕著な細胞傷害性も認められなかった。

〔結論〕我々は、リポソームに超音波エコーガスを封入したバブルリポソームの調製に成功し、超音波診断装置を用いて超音波造影されることを確認した。さらに、バブルリポソームと超音波照射を組み合わせることにより、キャビテーションを介した細胞への遺伝子導入が可能であることも示した。これらの結果より、バブルリポソームは超音波診断用造影剤としてばかりでなく、非侵襲的に遺伝子導入可能な新規キャリアーになるものと期待される。

社団法人日本超音波医学会平成 18 年度第 2 回ソノポレーション研究会抄録

代表：立花 克郎（福岡大学医学部解剖学教室）

日時：平成 18 年 10 月 14 日（土）

場所：福岡大学医学部 講義棟 2 階 第 1 中講堂（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 超音波造影ガス封入バブルリポソームを利用した局所投与による 超音波遺伝子導入効果について

根岸洋一（東京薬科大学・薬学部）

近年、超音波造影剤であるマイクロバブルへの超音波照射により、植物からヒトに至る細胞内へ薬物や遺伝子を送達する方法が注目されている。これは超音波照射を併用することで効率よくバブルが崩壊し、それに伴う一過性のマイクロジェット流を駆動力に、細胞外に存在する核酸（プラスミド DNA や siRNA）を細胞内へと瞬時に送達させる方法である。我々は、組織特異的な分子で表面修飾可能な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」を作製し、それを用いた in vitro, in vivo での簡便な核酸導入法を開発した。

1) 超音波治療の現状：第 6 回国際超音波治療シンポジウム（オクスフォード）からレポート

立花克郎（福岡大学・医学部解剖学教室）

超音波の治療への応用は 50 年以上の長い歴史をもちながら診断領域ほどの脚光を浴びることはなかった。しかし、最近になり、超音波治療の研究が活発になり、その大きな可能性を指摘する者も多くなってきた。超音波エネルギーによって生体内に熱を発生させられることは古くから知られていたが、近年、エコー、CT、MRI などの画像診断技術が飛躍的に進み、リアルタイムで体内の様子を観察しながら、超音波を数ミリ単位の正確さで患部に照射し、癌を熱で Ablate することができる（強力集束超音波治療、HIFU）。前立腺癌などで臨床応用されている。一方、1990 年代に入り、超音波エネルギーの非温熱効果と薬物を併用する全く新しい「超音波・薬物効果促進作用」が発見され、超音波治療の可能性がさらに拡大された。近年、超音波による色々な薬物の効果促進作用が報告され、薬物の投与量のコントロールの目的で超音波エネルギーを利用した治療装置がいくつか米国 FDA に認

可された。超音波非温熱エネルギーはさまざまな生体組織で薬物の吸収を促進させる働きがあることから、血栓溶解療法をはじめ、薬物経皮吸収投与、血管治療、癌化学療法など様々な分野へと広がりを見せている。これらの応用方法の中で現在もっと注目されている新しい技術が超音波遺伝子導入法である。診断用超音波造影剤（マイクロバブル）と超音波を併用することで細胞内へ遺伝子を容易に導入できることが発見され、分子生物研究における超音波遺伝子導入法の応用が期待されている。機械メーカーのみならず製薬会社やバイオテクノロジー市場でこの技術の今後の進展が注目されている。

2) Ultrasound-induced apoptosis and sonotransfection on circulating cancer cells in an in-vivo simulated sonication set-up

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

We have previously shown that low intensity ultrasound can induce cell lysis, necrosis and apoptosis in vitro. Furthermore, we have shown that ultrasound-induced apoptosis can be optimized by using pulsed ultrasound. At the optimized condition, we have also shown that use of microbubbles reduces the threshold for apoptosis induction. In the present study we aimed to investigate apoptosis induction using similar optimized condition in a novel system that simulates in vivo condition. Employing two types of engineered bubbles, one is microbubble OptisonTM (Optison) and the other is liposome-based nanobubbles (liposome) and using monocytic leukemia U937 cells the induction of cell killing particularly apoptosis was then compared. Cells were sonicated at 1.011 MHz, intensities (I_{SAT}) 0.064, 0.15, 0.44, 0.64 W/cm², duty factor 25%, burst rate 0.5 Hz, for 20 sec with or without cavitation bubbles. The results show that no cell killing can be observed in the absence of bubbles even at the highest intensity used. The loss of cell viability increased with increasing ultrasound intensity and more cell killing was observed in the presence of Optison than liposome. At I_{SAT} 0.15 W/cm² apoptosis were 29.07% and 16.27% while necroses were

10.40% and 4.35% with Optison and Liposome, respectively. This result could be explained by the membrane damage theory. Smaller bubbles involved in ultrasound-induced cavitation would result to smaller degrees of membrane damage thus resulting to a more repairable damage by the cell. Such repaired damage may result to continued survival of the cells or preferential killing of cells by apoptosis. These findings could be useful in therapy when apoptosis induction is desired over killing the cells instantly.

3) Sonodynamic therapy of cancer using a novel porphyrin derivative, DCPH-P-Na(I), which is devoid of photosensitivity

* Ken Hachimine, Hirotomo Shibaguchi, Motomu Kuroki, Hiromi Yamada, Tetsushi Kinugasa, Yoshinori Nakae,

** Ryuji Asano, Isao Sakata, *** Yuichi Yamashita, Takayuki Shirakusa, Masahide Kuroki

* Department of Biochemistry, and

** Photochemical Company, Ltd, Okayama 701-1221, Japan

*** Department of Surgery, Faculty of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka 814-0180;

To improve the efficacy of sonodynamic therapy of cancer using photosensitizers, we developed a novel porphyrin derivative

designated DCPH-P-Na(I) and investigated its photochemical characteristics and sonotoxicity on tumor cells. DCPH-P-Na(I) exhibited a minimum fluorescent emission by excitation with light, compared with a strong emission from ATX-70, which is known to reveal both photo- and sonotoxicity. According to this observation, when human tumor cells were exposed to light in the presence of DCPH-P-Na(I) in vitro, the least phototoxicity was observed, in contrast to the strong phototoxicity of ATX-70. However, DCPH-P-Na(I) exhibited a potent sonotoxicity on tumor cells by irradiation with ultrasound in vitro. This sonotoxicity was reduced by the addition of L-histidine, but not D-mannitol, thus suggesting that singlet oxygen may be responsible for the sonotoxicity of DCPH-P-Na(I). DCPH-P-Na(I) demonstrated significant sonotoxicity against a variety of cancer cell lines derived from different tissues. In addition, in a mouse xenograft model, a potent growth inhibition of the tumor was observed using sonication after the administration of DCPH-P-Na(I) to the mouse. These results suggest that sonodynamic therapy with DCPH-P-Na(I) may therefore be a useful clinical treatment for cancers located deep in the human body without inducing skin sensitivity, which tends to be a major side-effect of photosensitizers. (Cancer Sci 2007; 98: 916-920)

社団法人日本超音波医学会平成 18 年度第 3 回ソノポレーション研究会抄録

代表：立花 克郎（福岡大学医学部解剖学教室）

日時：平成 19 年 1 月 13 日（土）

場所：福岡大学医学部 講義棟 2 階 第 1 中講堂（福岡市）

特別講演 座長 立花克郎（福岡大学医学部解剖学教室）

・ Exploitation of ultrasound in membrane permeabilisation
Prof. A.P. McHale (School of Biomedical Sciences, University of Ulster, Coleraine, Co. Derry, Northern Ireland)

The permeabilising effects of electric pulses on cell membranes and the use of ultrasound energy of various intensities, for both thermal effects and enhancement of drug and gene delivery, have led to extensive research into the potential applications of these systems in the development of novel anti-cancer treatments. In the present study we have demonstrated for the first time that the application of brief electric pulses 'sensitises' tumour cells to the effects of low intensity ultrasound. The studies were conducted in human tumours established in athymic nude mice and in many instances resulted in the reduction of tumour mass. The combined electric field and ultrasound approach (CEFUS) was applied in vivo to a murine colon adenocarcinoma (C26) and a human oesophageal adenocarcinoma (OE19). The experiments performed demonstrated the anti-tumour effects of the combined therapy. Varying the electrosensitisation parameters used (voltage, waveform, electrode type) contributed to optimise the procedure. Exponential electric pulses with a peak of 1000 V/cm were initially used, but square wave pulses (1000 V/cm, 1 ms, x2, 1 Hz) were found to be just as effective. All ultrasound

application parameters were kept constant during the study. The growth rate of C26 tumours treated with CEFUS was significantly reduced with respect to untreated controls at day 7 (96% of average initial tumour volume in CEFUS group versus 615% for controls, $P < 0.05$). Similar reduction was observed in OE19 tumours treated with CEFUS by day 4 (82% versus 232%, $P < 0.032$). Our preliminary data suggest that this novel technology could potentially be of wide application in clinical practice for the treatment of solid tumours and is worth further investigation.

・ 超音波と薬剤の相互作用 - 超音波による薬剤効果増強を目指して -

近藤 隆（富山大学院 医学薬学研究部 放射線基礎医学講座）

超音波の医療への貢献は大きく、近年、超音波を用いた治療への応用性が注目されている。その代表的なものが、音響化学療法（Sonodynamic therapy）である。これは、超音波で活性化される薬物と超音波照射を併用することによって、患部の薬物を選択的に活性化させるものであり、新たながん治療への応用性が期待されている。しかしながら、超音波と薬物との併用効果のメカニズムの詳細については、未だ完全には解明されていない。現在提唱されているメカニズムは、①超音波によって、液体中に微小気泡が発生する、いわゆるキャビテーション起こるが、このキャビテーションを増強させて、局所的な温熱効果やせん断応力を増大させる、②超音波により薬物が活性化し、活性酸素種や細胞障害性の有機ラジカルを発生させるという二つである。それぞれのメ

カニズムの詳細は不明であるにもかかわらず、超音波と薬物との併用効果が明確なことから、より効果的な薬物の開発も進み、一部の治療応用も試みられている。本研究では、この後者のグループに属する音響化学療法に関する薬物の多くが光増感作用を有することに着目し、これらの薬物の間での光照射と超音波照射の効果を化学的および生物学的効果について比較検討し、そのメカニズムを明らかにすることを試みた。実験には、ローダミン誘導体とヘマトポルフィリンを用いた。これらの薬物は、いずれも可視領域に極大吸収を持ち、水溶性の色素である。光と超音波の照射実験では、まず可視光源として赤外光をカットしたXeランプ、超音波として1.2MHzの連続波を照射し、そこで発生する活性酸素や有機ラジカルをESR-スピン捕捉法で検出・定量し、さらに、生物学的影響として、細胞増殖能と細胞のviabilityを計測した。はじめに色素溶液への光照射によって発生する活性酸素の定量を行った。光吸収で励起した色素は、酸素分子と反応し一重項酸素などの活性酸素を発生する。これらの活性酸素は2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (TPMD)と反応し常磁性分子であるTANがつくられるので、これをESRで検出した。実際、ローダミン6Gに光を照射するとTANが検出され、この系に一重項酸素の消去剤であるトリプトファンやNaN₃を加えると、シグナルが消失することから、一重項酸素の関与が示された。すべての色素について発生するTANを定量したところ、ローダミン6G、スルフォローダミン、ヘマトポルフィリンの順に大きいことが示された。次に、ヒトリンパ腫細胞株であるU937細胞に各色素を取り込ませ、可視光を照射し、二日後の細胞増殖能を調べた。各色素を10 μMの濃度で取り込ませた例では、ローダミン6G、ヘマトポルフィリンで大きい細胞増殖抑制効果が認められた。実際の組織における薬物効果を評価するためには、色素の細胞内保持性についても考慮されなければならない。今回使用した色素は、いずれも細胞内では主に脂質膜に局在することが報告されているので、オクタノール対水の分配係数を測定したところ、脂質膜への保持性が大きいのは、ローダミン6G、エリスロシン、ヘマトポルフィリンであり、スルフォローダミンは、保持されにくいことが示された(図3)。以上の光照射等の結果から、一重項酸素の発生量、細胞への保持性、増殖抑制効果を総合すると、光照射による細胞増殖抑制効果の違いは、細胞内での一重項酸素の発生量に依存することが示された。

1) 超音波を用いたヒト神経線維腫細胞へのGamma Interferon Gene Transfectionと増殖抑制効果の検討

山口和記(福岡大学・医学部皮膚科学教室・解剖学教室)

超音波エネルギーによる、生体作用、薬剤透過性亢進作用、細胞内遺伝子導入、など、既に多くの論文で最近報告されてきた。本研究の目的は、超小型の超音波発振セラミック技術を応用した超音波照射による遺伝子導入の検討およびその安全な低侵襲治療システムの確立にある。

実験1 正常ヒト表皮メラニン細胞を培養液と1%PSAを用いてCO₂インキュベータ内で培養し、2~3次培養細胞をtrypsinを用いて細胞を剥離、OptiCellTMの側面に播種した。OptiCellは標準マイクロプレートサイズのフレーム内に2つの光学的にクリアなガス透過性生着面を持ち、その間の細胞培養エリアは滅菌の上、シールされている。内部及び内容物には自己シール性のアクセスポートにより無菌操作が可能で、細胞増殖、顕微鏡観察、

選別、分離、細胞トランスフェクション(遺伝子導入)などに利用した。

実験2 ヒト臍帯静脈内皮細胞と正常ヒト皮膚繊維芽細胞のCo-Culture Modelを用いて、超音波照射群、薬剤投与群、超音波照射・薬剤投与併用群、対照群を設定して、VEGF誘導下の管腔形成に与える影響を調べた。超音波機器はSonopore 4000を用いた。薬剤は血管新生阻害剤であるフマジリン誘導体、FR118487及び抗腫瘍剤であるpaclitaxel、5-FU誘導体(5'-DFUR)を使用した。管腔形成能の評価はPCにて画像処理を行い定量的に検討した。

1) 培養した正常ヒト表皮メラニン細胞を5.0~15.0×10⁴/mlの濃度で48時間CO₂インキュベータ内で培養し、OptiCellの面積比で90%以上増殖させた。正常ヒト表皮メラニン細胞を面積比で90%以上増殖させたOptiCellにpEGFP-N1を22 μl、超音波造影剤(マイクロバブル)を100 μl注入し、この装置を用いて様々な出力設定下で超音波を照射した。出力設定は、周波数1.011 MHz、出力電圧(v)、出力周期0.5 Hz、デューティー比25%、パルスタイプrectangular pulse type、スイープタイプtype 1、スイープ幅12%、スイープ間隔100 msで行った。24時間後pEGFP-N1のgene transfectionを蛍光顕微鏡で観察したところ、0.4 Wに比べ0.6 Wの照射群で3倍の遺伝子導入率が得られた。一方照射時間と遺伝子導入率の関係では、10秒と20秒で最高値を得たが、その後低下した。2) 超音波は低出力(1 MHz、1.0 W/cm²)の条件下では、短時間照射は管腔形成を維持または促進する可能性を示したが、照射時間の延長とともに管腔形成を抑制した。3) 超音波照射・薬剤投与併用群は、薬剤投与群に比較して有意に管腔形成抑制効果を示し、その効果は照射部のみならず照射部外にまで及んだ。4) 抗腫瘍剤であるpaclitaxel及び5-FU誘導体(5'-DFUR)は、低濃度下で管腔形成抑制効果を示すことが確認された。

2) 超音波照射による生体ファントム内温度上昇の数値計算と実測地の比較

遠藤信行(神奈川大学・工学部電子情報フロンティア学科)

従来、安全な生体診断といわれてきた超音波診断法もカラードップラ法やハーモニックイメージ法の普及に伴い、かなり強い強度の超音波を照射することが多くなってきた。生体組織中では超音波吸収により温度上昇が起こるので、強力な超音波を照射するような診断装置では、生体組織内部での発熱を抑えることが必要となる。さらに、超音波治療の代表例であるHIFUにおいては、どの程度の温度上昇が起こるかを推定することが重要となる。

そこで本研究では、超音波診断時の温度上昇がどの程度になるかを正確に推定するためのシミュレーターを作ることを目的にした。このため、生体内の音場を正確に数値計算することが可能なFDTD法と、熱が伝搬する状況を正確に推定できるHCE法を結合したシミュレーターを開発した。

さらに、軟部組織と骨が接するような場合には、骨からの反射音波の影響が軟部組織内の温度上昇に大きく現れることが予想されるので、骨の有無による温度上昇の違いを推定した。

その結果

- 生体内部の温度分布が得られた
- 骨の反射によりTissue内の温度が上昇する
- 通常の診断に用いられるようなパルス音波ではほとんど温

度上昇しないことが、確認された。

3) クラミジア感染細胞に対する抗生剤と超音波の併用効果

壇辻百合香 (福岡大学・医学部 解剖学教室)

目的

Chlamydia trachomatis は、世界的にも最も頻度の高い性器感染症で、わが国でもその蔓延が社会問題となっている。男性では尿道炎、女性では子宮頸管炎を引き起こすが、とくに女性で不顕性感染が多く、上行性に広がり、癒着、卵管妊娠、不妊を来す。また、関節などの遠隔地での反応性関節炎の原因菌ともいわれ、慢性持続感染の場合、抗生剤の効果は低いことが多く、より良い治療法の確立が必要である。今回の研究では、*C. trachomatis* 感染細胞における抗生剤と超音波照射の併用効果について検討を行った。

実験方法

宿主細胞として子宮頸部癌細胞 HeLa229 を用い、クラミジア菌種は *C. trachomatis* serovar E を用いた。感染価の明らかなクラミジア菌液を、超音波照射可能な 24well プレートに培養した HeLa 細胞に加え、37°C で 60 分培養後、Doxycycline (DOX) または Ceftriaxone (CZ) を加えた。マイクロバブルとして SonoVue または Bubble Liposome を加え、超音波照射 (1.011 MHz, 0.44 w/cm², 0.5 Hz pulse rate, 25% duty factor, 20 sec.) を行った。48 ~ 72 時間後にクラミジア LPS 抗体を用いた蛍光抗体法にて感染価を測定し、コントロール群と比較した。また、Dextran-fluorescein conjugates についても、同超音波照射での細胞内取り込みを観察した。

結果

宿主細胞である HeLa 細胞またはクラミジアに直接今回の条件での超音波を照射した結果、いずれも生存率に大きな影響を与えなかった。クラミジア感染細胞においては、SonoVue では 1/2 MIC DOX (0.015 μg/ml) 投与の場合、超音波照射でコントロー

ルの 62% または 41% に感染価を抑えた。Bubble Liposome では 1/2 MIC DOX (0.015 μg/ml) 投与の場合、15 ± 12% まで感染を抑えた。CZ の場合、超音波照射後の感染価がばらついたため、SD 値が大きくなったが、1.0 μg/ml 高濃度で感染を抑える傾向にあると考えられた。

加えた Bubble Liposome の量に比例して、感染価を抑える傾向も観察された。

また、Dextran-fluorescein conjugate の HeLa 細胞への取り込みは、超音波照射によって起きることがわかった。

4) Therapeutic potentials of low intensity ultrasound

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

Biological effects of low-intensity ultrasound (US) focusing on US-induced programmed cell death (apoptosis), regulation of gene expression, and US-mediated gene transfection (sonotransfection) are reviewed. Studies have shown that US can induce apoptosis and that certain conditions can provide an optimal apoptosis induction. Sonotransfection of different cell lines in vitro and target tissues in vivo have been reported. Several genes can also be up-regulated or down-regulated by sonication. As to the potential therapeutic applications, apoptosis induction by US may induce direct and fast ways of treating tumor or cancer tissues. Systemic or local sonotransfection might also be a safe and effective gene therapy method in effecting the cure of local and systemic disorders. Gene regulation of target cells may be utilized in modifying cellular response to a treatment, such as increasing the sensitivity of diseased cells while making normal cells resistant to the side effects of the treatment. In addition, gene regulation by US may also play an important part in the enhanced healing of damaged tissues.

社団法人日本超音波医学会平成 18 年度第 4 回ソノポレーション研究会抄録

代表：立花 克郎 (福岡大学医学部解剖学教室)

日時：平成 19 年 3 月 5 日 (月)

場所：国立がんセンター中央病院 管理棟第 1 会議室 (東京都中央区)

特別講演 座長 立花克郎 福岡大学医学部解剖学教室

Biological effects of Pressure Waves: Permeabilization of the Cell Plasma Membrane

Doukas, Apostolos, PhD (助教授 ハーバード大学医学部皮膚科 マサチューセッツ総合病院ウエルマン光医学センター)

ABSTRACT Cell permeabilization using shock waves may be a way of introducing macromolecules and small polar molecules into the cytoplasm, and may have applications in gene therapy and anticancer drug delivery. The pressure profile of a shock wave indicates its energy content, and shock-wave propagation in tissue is associated with cellular displacement, leading to the development of cell deformation. In the present study, three different shock-wave

sources were investigated; argon fluoride excimer laser, ruby laser, and shock tube. The duration of the pressure pulse of the shock tube was 100 times longer than the lasers. The uptake of two fluorophores, calcein (molecular weight: 622) and fluorescein isothiocyanate-dextran (molecular weight: 71,600), into HL-60 human promyelocytic leukemia cells was investigated. The intracellular fluorescence was measured by a spectrofluorometer, and the cells were examined by confocal fluorescence microscopy. A single shock wave generated by the shock tube delivered both fluorophores into approximately 50% of the cells ($p < 0.01$), whereas shock waves from the lasers did not. The cell survival fraction was 0.95. Confocal microscopy showed that, in the case of calcein, there was a uniform fluorescence throughout the cell, whereas, in the case of FITC-dextran, the fluorescence was sometimes in the nucleus and at other times not. We conclude that the impulse of the shock wave (i.e., the pressure integrated over time), rather than the peak pressure, was a dominant factor for causing fluorophore uptake into living cells, and

that shock waves might have changed the permeability of the nuclear membrane and transferred molecules directly into the nucleus.

1) 超音波により変動する遺伝子の解析

- 異なるヒト白血病細胞株 U937 および Molt-4 を用いた検討 -

田淵圭章, 高崎一朗, 工藤信樹, Loreto B. Feril, Jr.,

立花克郎, 趙 慶利, 小川良平, 近藤 隆 (富山大学生命科学先端研究センター, 北海道大学大学院情報科学研究科, 福岡大学医学部解剖学, 富山大学大学院医学薬学研究部放射線基礎医学)

癌の遺伝子治療における課題は, 目的遺伝子の腫瘍細胞(組織)への選択的, 効率的導入です。現在, ウイルスベクターやリポソームが遺伝子導入キャリアとして用いられていますが, 副作用, 遺伝子発現効率や腫瘍組織への集積率の低さが問題となっており, 物理的手法として電気穿孔法の生体への応用も検討されています。超音波は高い集束性が得られる機械的エネルギーで温熱療法, 高温凝固壊死療法, 音響化学療法, 抗癌剤効果増強法に利用されています。他方, 超音波照射はアポトーシスを誘導することが報告されていますが, その分子メカニズムは殆ど解明されていません。

ヒト単球性リンパ腫細胞株 U937 において, 比較的強い連続波超音波処理 (1 MHz, 連続波, ISPTA: 4.9 W/cm²) の6時間後, 約30%のアポトーシスが誘導されました。この条件下, 網羅的遺伝子発現解析により発現変動する遺伝子を調べたところ, 5種類の遺伝子の発現量が増加, 2種類の発現量が減少しました。半

定量的 PCR 法を用いてこれらの遺伝子の発現変動を確認したところ, v-jun とヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) が増加, カテプシン G と v-myb が減少することが判りました。発現が上昇した HO-1 は, 酸化ストレスに反応する遺伝子として知られています。評価した遺伝子の中には, HO-1 以外にも酸化ストレスに関連するスーパーオキシドディスムターゼ, グルタチオントランスフェラーゼ, グルタチオンペルオキシダーゼ, カタラーゼ, NO シンターゼやヒートショックプロテイン (HSP) が含まれていましたが, これらの遺伝子の発現量の変化は観察されませんでした。これまでの我々の研究成果から, 超音波照射により発生する OH 生成を伴うキャビテーションが細胞死を誘導し, この条件下で, 細胞内に酸化ストレスが誘導され, ストレス関連遺伝子群の中で特に HO-1 の発現量が上昇することが判明しました。

近年, 0.3 W/cm² 程度の低強度の非連続波超音波でもアポトーシスが誘導されることが判明しました。ヒトリンパ芽球白血病細胞株 Molt-4 を用いて, 発現変動する遺伝子を調べた結果, この細胞株ではストレス応答遺伝子 HSP ファミリーの DNAJB1, HSPA1B と HSPA6 および抗アポトーシス活性を有する BAG 遺伝子ファミリーの BAG3 の発現上昇と二種類の酵素 IDI1 と HMGCS1 の発現減少を検出しました。また, これら6種類の遺伝子の発現変動はリアルタイム定量的 PCR 法で確認することができました。今後, これらの遺伝子誘導機構の詳細を解明することが超音波による治療に向けた遺伝子発現制御を目指すために必要と考えています。