

令和元年6月5日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19825

研究課題名(和文)大量ナノバブルにより増強したキャビテーション効果を利用したソノポレーションの評価

研究課題名(英文) Evaluation of sonoporation using cavitation effect increased by a large quantity of nanobubbles

研究代表者

上野 裕 (UENO, Yutaka)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：90716458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：平成27年度、28年度にビーカー内での実験を行い、キャビテーションが生じる条件に合った機材の開発を行った。さらに家兎肝動脈での実験を行い、生体内でもキャビテーションとソノポレーションが生じることが明らかとなった。この実験をさらに発展し、人体に近い豚での実験に切り替える方針とした。このため平成29年度から平成30年度前半で情報収集を行い、平成30年度後半で実際の動物実験を行った。豚の肝動脈からナノバブルとシスプラチンを動注、肝表面から超音波照射し、照射した部分と、していない部分の肝組織を採取、変化を確認した。人体に近い条件、実臨床同様の薬剤投与下でソノポレーションが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キャビテーション効果によるエネルギー作用はこれまで医療分野へ利用が進んでいなかった。現在実験結果を解析中であり、本研究結果からは局所の大量バブルの発生により、キャビテーション効果を実用レベルまで増強させることができ、なおかつ人体に近い環境における生体内でもソノポレーションが発生しうることが明らかになった。大量のナノバブルにより生体でキャビテーション効果を利用できるという結果は、他の臨床利用として遺伝子導入、フリーラジカルによる殺菌、収束超音波の凝固作用促進、血栓溶解にも導入できるところに意義がある。とくにウイルスを使用しない生体での遺伝子導入促進の意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：The experiments in the beaker were conducted in 2015 and 2016 and the equipment was developed that met the conditions for cavitation. Furthermore, experiments with the hepatic artery of rabbits revealed that cavitation and sonoporation occur in vivo. This experiment was further developed, and it was decided to switch to an experiment with a pig close to the human body. For this reason, information was collected in the first half of fiscal 2018 from 2017, and an actual animal experiment was conducted in the second half of fiscal 2018. Nanobubbles and cisplatin were injected from the hepatic artery of the pig, and the liver tissue was irradiated with ultrasound from the surface of the liver, and the irradiated and non-irradiated portions were collected to confirm the change. Sonoporation was revealed under conditions similar to the human body and under similar clinical administration.

研究分野：医歯薬学 内科系臨床医学 放射線科学

キーワード：インターベンショナルラジオロジー IVR ナノバブル キャビテーション ソノポレーション

1. 研究開始当初の背景

液体の圧力に差が生じると、液体中の微小気泡の膨張、収縮、さらには圧潰（気泡の消失）が生じる。これをキャビテーションという。超音波の照射を行うと音圧により急激な圧力の差が生じ、膨張、収縮、圧潰速度が格段に速くなる。速度が速いと断熱圧縮作用により気泡圧壊周囲の温度、気圧が著しく上昇し、数千度、数千気圧に及ぶと言われている。この反応は極めて強力で、様々な化学物質を分解するフリーラジカルをも発生させ強力な化学作用が生じる。また圧壊時には周囲に数百キロのジェット流が発生する。液体中には自然に微小気泡が存在するが、人工的に大量のナノバブルを存在させると、この気泡が核となり、さらに強力なキャビテーション効果を生じさせることができる。これらの物理的衝撃作用、化学作用はすでに工業系の分野（洗浄、ナノ材料の合成、有害物質の分解など）には広く用いられている。しかし、気体である微小気泡を大量に血管内に発生させる概念がなく、その方法もなかったため医療には利用が進んでいない。唯一承認された微小気泡の投与に超音波造影剤があり、実験レベルではこれを利用したキャビテーション効果によるソノポレーション、ドラッグデリバリー、収束超音波による組織凝固の促進などへの導入が試みられたが進歩していない。この理由は、超音波造影剤のバブル量が極めて少なく、キャビテーション効果は実用に不可能なほど弱いためと我々は考えている。そこで、我々は組織あるいは細胞周囲に、大量のナノバブルを発生させ、増強したキャビテーション効果を医療利用するという着想に至った。

2. 研究の目的

全体構想は、バブルが圧潰するとき生じる物理的衝撃作用（キャビテーション効果）を、生体内で利用可能なレベルの物理化学作用へと増強させ様々な医療用途へ臨床導入することである。我々の独創性はキャビテーション効果を *in vivo* で実用的なエネルギーに増強するため、局所で極めて大量のナノバブルを発生させ、これに高周波を照射するところにある。本研究では様々な医療用途のうち生体でのソノポレーション（細胞膜に一時的に穴をあけ物質を細胞内に導入する）に利用し、増強したキャビテーション効果が臨床応用できることを確認する。本研究の目的は、増強したキャビテーション効果が生体内でソノポレーションを生じさせることを証明することである。

3. 研究の方法

当初計画

H27 年度：家兔肝動脈用微小流量用システム制作とファントム実験によるデータ取得

H28 年度：

動物実験 1

27 年度に得たいいくつかの条件の範囲で家兔の肝動脈に効率よく大量のナノバブルを発生でき、家兔が volume over とならない条件を明らかにする。

動物実験 2

得られた条件で家兔肝動脈にナノバブルを発生させ体表から高周波を行い、キャビテーションを生じさせる。

H29-30 年度：

動物実験 3

1. バブルなし、2. バブルのみ、3. バブルと高周波照射ありの 3 条件で肝細胞へのテクネシウムの取り込み量を比較し、増強したキャビテーション効果がソノポレーションに有用であることを明らかにする。ナノバブルジェネレーターカテーテルとは別に肝動脈にマイクロカテーテルを挿入し、テクネシウムを緩徐に動注する。ソノポレーションによる肝細胞へのテクネシウムの導入の程度を肝の SPECT-CT 画像を定量することにより比較する。

実際の実験

平成 27 年度、28 年度にピーカー内でのナノバブル発生及び消失の実験を行った。これによりナノバブルの発生装置およびバブルの消失の条件を明らかにした。また、同時に家兔での実験も開始した。ピーカーでの実験と同様の条件で家兔肝動脈へのナノバブルの注入を行うとともに体表エコーを照射し、肝臓内のバブル圧壊の観測を行った。ピーカーでの実験は計 10 回行い、ピーカー内でナノバブルを発生させ、そこに超音波の照射を行うことで、瞬時にナノバブルが消失する条件を確認した。ナノバブルをピーカー内の生理食塩水に投入するとこの生理食塩水は混濁する。この混濁した生理食塩水の入ったピーカーに高圧の超音波照射を行うことでナノバブルが瞬時に消失すれば生理的食塩水の透過性は明らかに向上する。この結果から、ピーカー内にナノバブルを投与できる機材の開発を行い、キャビテーションが生じるナノバブル（濃度 $1.07 \sim 2.50 \times 10^9$ 個/mL）を発生させる機材を開発し、超音波の照射条件（3MHz、10.0 W 直径 3.5 cm 円形平面プローブ）を明らかにした。これと併せて家兔の実験では、平成 27 年度に家兔 2 羽、平成 28 年度に家兔 2 羽の少数の動物を用いて実験を行った。今までに明らかになっている条件で家兔肝動脈からナノバブルを注入すると同時に体表からエコーを照射した。また、体表エコーで肝臓を観察してナノバブルの通過前後で肝臓の輝度の変化を観察した。この結果から生体内でキャビテーション、ソノポレーションが生じることが明らかになった。ま

たソノポレーション発生後の家兎にも血管造影を行って血行動態に変化がないことを確認した。ナノバブルに用いる二酸化炭素による血管塞栓が生じないことを明らかにし、安全性を確認した。この結果から、生体内でキャビテーション、ソノポレーションが生じることが明らかになり、小動物での実験は終了して、これを発展させる形でより人体の環境に近い状況でソノポレーションを生じさせることを検討することとした。

そこで当初計の画書にも記載の通り、豚を用いた実験に切り替える方針とした。豚での実験はこれまでも当研究チームでの使用経験があり、手技的な問題はなく妥当と考えられた。平成29年度から平成30年度前半は情報収集を行った。当初家兎の実験ではキャビテーション、ソノポレーションの確認のためにテクネシウムの動注を行い、家兎自体をSPECT-CTで撮像し、肝臓のテクネシウム取り込み量を検出する計画をしていたが、当施設のSPECT-CTは小動物用のため、豚での実験ではこの確認の方法を変更する必要があった。そのため、どのような実験で生体内でのキャビテーション、ソノポレーションが明らかに消えるかの情報収集を行う必要があった。豚での実験はより人体の環境に近くするため、薬剤投与で行うことが必要と考え、またソノポレーションの確認は血管造影及び病理的な変化で明らかにすることとした。バブルの消失と合わせて病理的な変化がなければ組織損傷を生じていないことが明らかとなり、ソノポレーションが生体内で起こることが確認できると考えた。

平成30年度後半で実際の動物実験を行った。その際の実験計画の概略を下記に示す。

全身麻酔下の豚の右側大腿動脈に5Frシースを1本留置、シースから血管造影用カテーテルを挿入する。肝動脈へカテーテルを留置して、肝動脈造影を施行、肝臓全体が描出されていることを確認する。豚を開腹し、肝臓を露出する。自動注入器を用いてシスプラチンを一定時間(約10分)かけて100mg動注する。もう一方からCO₂ナノバブルを同時に動注(1分間につき1回注入、径10回)する。この際、肝表面から超音波プローベを肝臓の両側にあてる。右側の肝臓にのみ超音波照射を行う。左側の肝臓には超音波照射は行わない。

肝臓の超音波を当てた領域と、超音波を当てなかった領域の双方から、経2か所の組織を其々30-50mgほど切り出して採取する。

豚6頭から合計12個の組織を採取したのち、切り出した組織の損傷、破壊、熱傷の有無を確認する。

4. 研究成果

開発したナノバブル発生装置のバブル濃度：1.07～2.50×10⁹個/mL

キャビテーション発生に最適な超音波照射条件：3MHz、10.0W 直径3.5cm円形平面プローベ

家兎肝動脈での実験 計4羽

生体内でのキャビテーション、ソノポレーションの確認

体表エコーでの肝臓の変化：生体内でキャビテーション、ソノポレーションの確認

ソノポレーション発生後の家兎肝動脈血管造影：二酸化炭素による血管塞栓なし

豚での実験におけるソノポレーションの発生実験 計6頭

人体に近い条件、実臨床に即した薬剤投与下でのソノポレーションの確認

下記、切り出した組織の損傷、破壊、熱傷の有無

豚	検体1 超音波 (-)	なし
	検体2 超音波 (+)	なし
豚	検体3 超音波 (-)	なし
	検体4 超音波 (+)	なし
豚	検体5 超音波 (-)	なし
	検体6 超音波 (+)	なし
豚	検体7 超音波 (-)	なし
	検体8 超音波 (+)	なし
豚	検体9 超音波 (-)	なし
	検体10 超音波 (+)	なし
豚	検体11 超音波 (-)	なし
	検体12 超音波 (+)	なし

シスプラチン測定は行えなかった。

人体に近い条件、実臨床に即した薬剤投与下で実験を行い、病理的な変化がないことが明らかとなった。この結果から、生体内でのキャビテーション、ソノポレーションが明らかになった。家兎での実験と合わせ、生体内でキャビテーション、ソノポレーションを生じさせた場合でも、安全性は示された。人体に近い条件、臨床に即した薬剤投与下での実験でも安全性が示されたことは重要である。

この結果は今後学会発表を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし
6. 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：狩谷 秀治
ローマ字氏名：(KARIYA, Shuji)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。