

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18200036

研究課題名（和文）標的とする単細胞への革新的な薬物・遺伝子超音波導入システムの確立

研究課題名（英文）Development of a novel targeted single cell drug/gene delivery system

研究代表者

立花 克郎（TACHIBANA KATSURO）

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40271605

研究成果の概要：

本課題の目標であった超音波照射時における浮遊単細胞のリアルタイム顕微鏡観察システムを構築することができた。また、高速ビデオカメラにてマイクロバブルの挙動を観察すると同時に薬物が細胞内に流入する現象を初めてデジタル映像でとらえることができた。この顕微鏡システムを用いることで超音波の最適条件と各種のマイクロバブルの比較が可能となった。得られたデータ解析より、多種の細胞にこの技術が応用可能と考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	15,300,000	4,590,000	19,890,000
2007年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2008年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
年度			
年度			
総計	3,2100,000	9,630,000	41,730,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学

キーワード：超音波エネルギー、神経細胞、周波数、超小型超音波プローブ、遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

遺伝子工学の分野では、細胞に遺伝子を導入する技術を用いて研究が進められている。ウイルスを用いた方法やエレクトロポレーション法があるが、ともに局所的な細胞への導入に不適切である。近年、超音波を用い細胞内に遺伝子を導入する方法が注目を集めている。細胞に超音波を照射すると一時的に薬物の細胞内への取り込みが促進されるという現象は古くから知られていた。最近その取り込みのメカニズムの概要が明らかにされつつある。超音波によって細胞周辺で微細な泡が発生し、また非常に短時間で潰れて消失

するキャビテーションと呼ばれる物理運動が起こる。この微細な泡が細胞の周囲で破裂することによってマイクロなジェット水流が起これ細胞膜に微細な穴を開ける（Induction of cell membrane porosity by ultrasound. /Tachibana K, Uchida T, Ogawa K, Yamashita N, Tamura K -Lancet (1999, 353: 1409)。この穴を通して細胞内への薬物の取り込みが行われていると考えられている。この超音波照射による取り込み能は、脂質などから成るマイクロバブルと超音波照射を併用した場合さらに高まる。この超音波による細胞穿孔とマイクロバブルを併用し

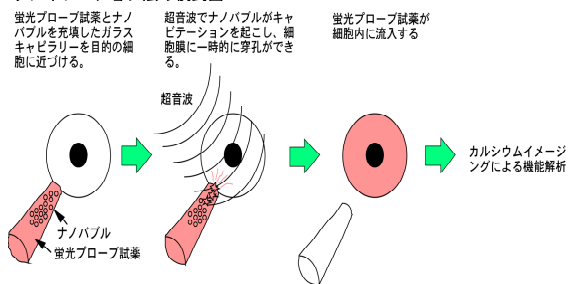
て薬剤を細胞内へ取り込ませる方法（ソノポレーション法）は、標的細胞へのダメージも低く、効率よく遺伝子を導入できることがわかっており(Ohta S, Suzuki K, Tachibana K, Yamada G. Microbubble - enhanced sonoporation: Efficient gene transduction technique for chick embryos. Genesis 37:91-101, (2003))、すでにこの方法は医学臨床分野において薬剤デリバリーシステムの一つとして有効であるとの研究成果がある。本研究課題のように光学顕微鏡を用いて多数の細胞の中から標的とする1個の細胞へ薬物・遺伝子を注入する手法の研究は世界的にまだない。

脳内情報処理機構を調べる方法として、主に電気生理学的方法（細胞内記録法）と膜電位や細胞内カルシウムイオン濃度をモニターする神経活動イメージング法が用いられてきた。電気生理学的手法は、神経回路を構成するニューロン素子の機能的特性を詳細に解析できる利点があるが、神経回路の構成、およびその特性を詳細に調べることには限界がある。一方、膜電位イメージング法は多点同時計測により神経回路の特性を調べる利点はあるが、細胞外にその指示薬を付着させる方法が一般的で、そのシグナル源を特定する（ニューロンを同定する）ことは難しい場合が多い。またカルシウムイメージング法では、細胞内に蛍光プローブ試薬を導入し神経活動に起因した細胞内カルシウム濃度の増減をモニターすることができる。しかし、細胞内への蛍光プローブ試薬の導入にはアセトメチル誘導体を使う方法が一般に用いられているが、これは培養細胞系でしか使用できないため、脳機能解析には不適切である。

2. 研究の目的

(1) 超音波エネルギーを用い、標的とした1個の細胞へ”micro(nano)syringe”のごとく、薬物又は遺伝子を注入する画期的な実験手法を、研究期間内に確立することを目標とする。

(2) 新しいソノポレーション法の開発と確立
ソノポレーション法の模式図



3. 研究の方法

(1) 実験システムの構築と微調整：
高性能蛍光顕微鏡とマイクロマニピュレー

ターを調整し、顕微鏡下で観察しながらマイクロバブルと併用して蛍光色素を1個の細胞に超音波インジェクションする。この際、光速度カメラでマイクロバブルの破裂する様子を撮影し、画像解析による超音波最適条件を検討した。

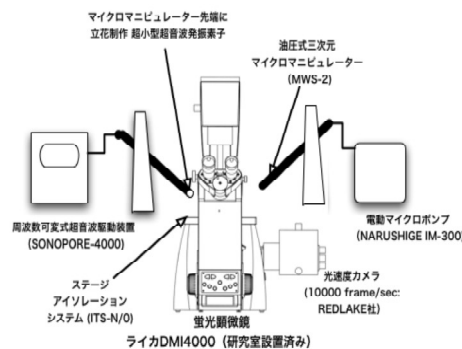
(2) ソノポレーション法によるニューロン内への蛍光色素注入のための最適条件を検索する。ソノポレーション法の様々な条件下（超音波強度、duty比、照射時間）で、ニューロンに蛍光色素テトラメチルローダミンデキストランを注入し、その形態を共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡で観察した（使用バブルは Optison、BR1、BR14、Levovist、ナノバブル）。

(3) 高速ビデオカメラ・システム設定条件
Microscopic system: Leica DMI3000 B inverted microscope and Narishige micromanipulation equipment. MotionPro X4TM is the first high-speed camera featuring a CMOS sensor a double - exposure mode which allows two consecutive exposures within a 100-nanosecond interval. Max framing rates 5,100 fps (30- 5100 fps) with 512H x 512V Resolution. MotionPro X camera 4GB

4. 研究成果

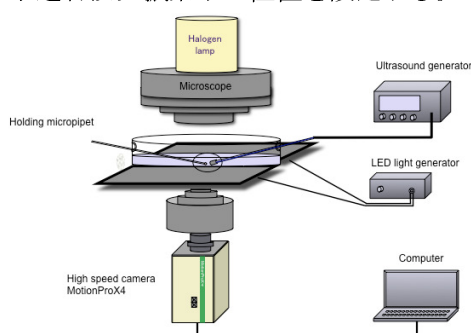
(1) 今までにない全く新しい高速ビデオカメラ・顕微鏡観察システムを構築することに成功した。

① 全体の構成

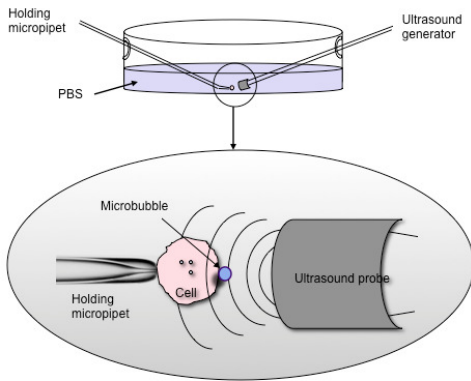


②

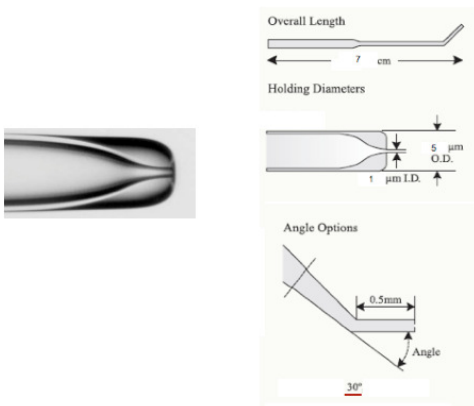
単細胞を顕微鏡下で観察しながらマイクロマニピュレータを操作すると同時に超微小超音波発振素子の位置を設定する。



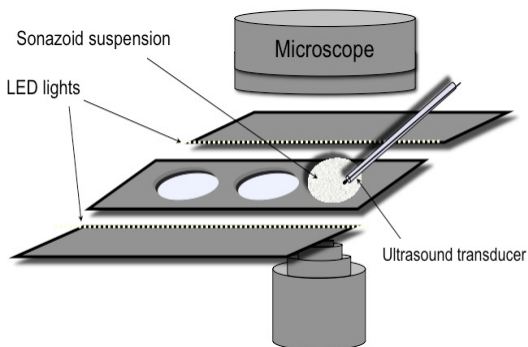
③ シャーレ内開放式観察システム



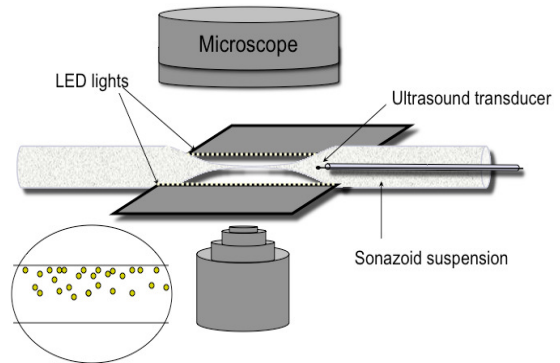
④ 最適指された新しく作成した超微小細胞固定用（ホルディングピペット）カラス管を作成した。通常のサイズの10分の1を特別に作成し、細胞のコントロールに必要な最適な挿入角度を得た。



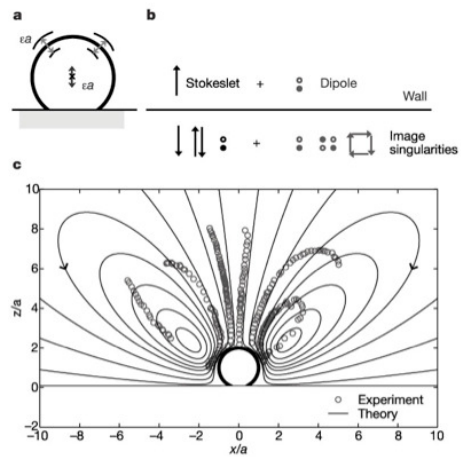
⑤ 細胞培養液滴表面張力を利用した新しい暗視野横式光学照明方式の構築（開放式）



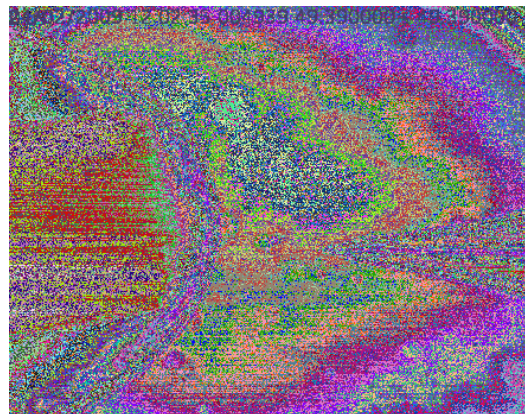
⑥ 水流下の細胞・微小気泡観察用セットアップ（閉鎖式）



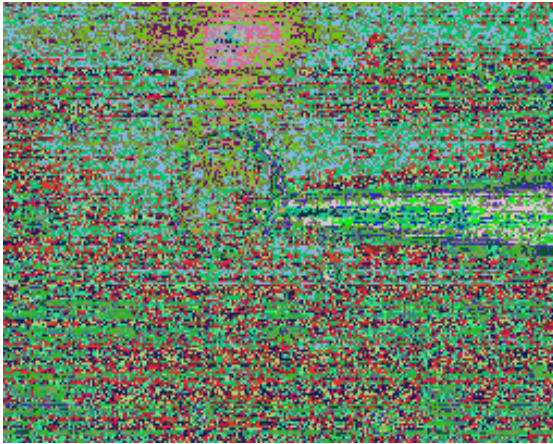
⑦ 液滴中の微小気泡の挙動理論値



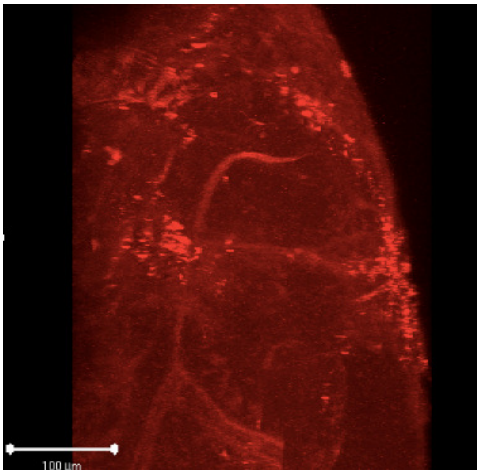
⑧ 超微小超音波発振素子（左）と細胞固定用マイクロピペット（右）



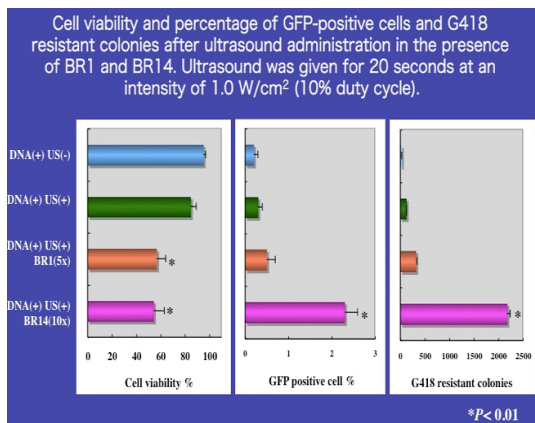
- ⑨ マイクロバブルとがん浮遊細胞を固定して観察視野へ移動した様子
(細胞の直径約30 μ)



- ⑩ マイクロバブルを利用し単一の神経細胞に蛍光色素を注入。3次元的に画像を再構築し視覚化した。



- ⑪ BR1とBR14のマイクロバブルの遺伝子導入率の比較検討の結果、有意な違いが認められた。



本課題の目標であった顕微鏡観察下で浮遊した単一細胞を超音波照射時にリアルタイムで観察できる顕微鏡システムの構築に成功した。また、高速カメラでマイクロバブルの挙動を観察すると同時に薬物が細胞内に流入する現象を世界で初めてデジタル映像でとらえられた。得られたデータを元にあらゆる細胞にこの技術の応用が可能と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計12件)

- ① Hassan MA, Feril LB Jr, Suzuki K, Kudo N, Tachibana K, Kondo T, Evaluation and comparison of three novel microbubbles: enhancement of ultrasound-induced cell death and free radicals production., *Ultrason Sonochem*, 16(3):372-8, 2009、査読有り
- ② Hiroyuki Ai, Jürgen Rybak, Randolph Menzel, Tsunao Itoh, Response characteristics of vibration-sensitive interneurons related to Johnston's organ in the honeybee, *Apis mellifera*, *J. Comp. Neurol.* 515:145-160, 2009 査読有り
- ③ 立花 克郎, 超音波感受性マイクロバブルを利用した血管壁へのドラッグデリバリー、*血管医学*, 9(3):287-291, 2008、査読有り
- ④ Tachibana K, Feril LB Jr, Ikeda-Dantsuji Y, Sonodynamic therapy, *Ultrasonics*, 48(4):253-259, 2008、査読有り
- ⑤ Feril LB Jr, Tachibana K, Ikeda-Dantsuji Y, Endo H, Harada Y, Kondo T, Ogawa R, Therapeutic potential of low-intensity ultrasound (part 2): biomolecular effects, sonotransfection, and sonoporation, *Journal of Medical Ultrasonics*, 35:161-167, 2008、査読有り
- ⑥ H Ai, Y Kusakabe, T Itoh, Three-dimensional reconstruction of neural tracts and commissures in the bee brain, *Comparative Biochemistry and*

Physiology, Part B, Biochemistry & molecular biology, 151(4):457, 2008、査読有り

- ⑦ Feril Loreto, Tachibana K, Ogawa K, Irie Y, Therapeutic Potential of Low-Intensity Ultrasound(Part1): Thermal and Sonomechanical Effects, J. Med Ultrasonics, 35 : 153-160, 2008、査読有り
- ⑧ Ohta S, Ogino Y, Suzuki K, Kamimura M, Tachibana K, and Yamada G, Gene Transfer/delivery and Expression of DNA and RNA Sonoporation: An Efficient Technique for the Introduction of Genes into Chick Embryos, Edited by Theodore Friedmann, John Rossi, Cold Spring Harbor Laboratory Press 711-716, 2007、査読有り
- ⑨ Journal of Comparative Neurology, Topographic organization of sensory afferents of Johnston's organ in the honeybee brain, Wiley-Liss, Inc, 1030-1046, 2007、査読あり
- ⑩ Yamashita T, Sonoda S, Suzuki R, Arimura N, Tachibana K, Maruyama K, and Sakamoto T, A novel bubble liposome and ultrasound-mediated gene transfer to ocular surface: RC-1 cells in vitro and conjunctiva in vivo, Experimental Eye Reserch 85(6)741-748, 2007、査読あり
- ⑪ Feril LB Jr, Kondo T, Tabuchi Y, Ogawa R, Zhao Q-L, Nozaki T, Yoshida T, Kudo N, and Tachibana K, Biomolecular Effects of Low Intensity Ultrasound: Apoptosis, Sonotransfection, and Gene Expression, Japanese Journal of Applied Physics 46(7B):4435-4440, 2007、査読有り
- ⑫ Katsuro Tachibana, Emerging Technologies Using Ultrasound for Drug Delivery : Emerging Therapeutic Ultrasound, World Scientific, 131-166, 2006、査読有り

[学会発表] (計7件)

- ① 立花克郎 : マイクロバブルと超音波治療、第4回超音波分子診断治療研究会、2009年1月9日、名古屋
- ② 立花克郎 : マイクロバブルの治療への応用、第10回国際造影超音波シンポジウム

2008年12月13日、東京医科大学病院

- ③ 立花克郎 : 神経超音波の基礎、第11回日本栓子検出と治療学会 (エンボラス学会)、2008年11月1日、倉敷
- ④ 原田慶美、遠藤日富美、山口和記、立花克郎 : U937細胞におけるドキシルと超音波併用による殺細胞効果について、第2回超音波分子診断治療研究会 (第2回基礎技術研究会共催) 2008年8月8日、北海道大学
- ⑤ 原田慶美、立花克郎、遠藤日富美、フェリル ロリト、山口和記 : 超音波・マイクロバブル・抗がん剤の併用による癌細胞株U937への殺細胞効果について日本超音波医学会第81回学術集会 2008年5月23日、神戸
- ⑥ 立花克郎、フェリル ロリト : Emerging Technologies Using Ultrasound for Drug Delivery, International Symposium on Sonochemistry and Sonoprocessing 2007 - New horizons in Sonochemistry and Sonoprocessing 2007年12月8日、京都
- ⑦ 遠藤日富美、立花克郎、フェリル ロリト : Enhanced Gene Transfer by Echo Contrast Agents: Comparison between BR1 and BR14 in Vitro and in Vivo, 10th Annual Meeting American Society of GENE THERAPY, 2007年6月2日、Seattle Washington USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立花 克郎 (TACHIBANA KATSURO)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号 : 40271605

(2) 研究分担者

藍 浩之 (AI HIROYUKI)
福岡大学・理学部・助教
研究者番号 : 20330897

(3) 連携研究者