

令和 3 年 5 月 5 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08089

研究課題名（和文）超音波制御ウルトラファインバブルで組織標的性を高める薬剤性血管新生療法の開発

研究課題名（英文）A possibility of ultrasound irradiation-induced burst of ultrafine bubbles of alprostadil for augmenting therapeutic angiogenesis

研究代表者

佐々木 健一郎 (Sasaki, Ken-ichiro)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：70320190

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：プロスタグランジンE1（PGE1）製剤アロプロスタジルは血管新生療法効果増強作用を持つ。ナノサイズのultrafine bubble（UFB）は超音波照射による任意破裂が可能である。経皮的超音波照射によるUFB化アロプロスタジル（UBA）の治療標的組織内破裂が薬剤組織移行性を高めれば、その血管新生療法効果増強作用も高まるかもしれない。試験管内やラット血流内のUBAは診療用超音波診断装置で観察可能であった。経皮的照射でラット血流内UBAを破裂させる幾つかの超音波条件でウェル内のUBAを破裂させたが、ウェル内のPGE1濃度は減少していた。仮説検証には別の超音波照射条件を追加探索する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療標的組織内の薬剤封入UFBまたはUFB化薬剤を経皮的超音波照射によって破裂させる革新的薬物療法の開発を試みた。今回の実験結果から選出したUFB破裂超音波照射条件は薬物構造自体に影響を与える程の強度内容であり、臨床応用に直結する結果を得るには至らなかったが、経皮的超音波照射で破裂させた血流中のUFBを超音波診断装置で観察し、その変化を評価する方法技術を獲得することができた。今後、薬物構造に影響を与えない照射条件の探索実験が、本研究開発目標を達成させる上で必要である。

研究成果の概要（英文）：Alprostadil, which is a synthetic analog of prostaglandin E1 (PGE1) with a high tissue absorption, was reported to augment the efficacy of therapeutic angiogenesis by cell transplantation (TACT). If it is possible to burst ultrafine bubbles of alprostadil (UBA) in ischemic tissues by ultrasound irradiation (UI), the ability of tissue absorption in alprostadil may be enhanced in the ischemic tissues and thereby the efficacy of TACT for the ischemic tissues may be augmented. We successfully produced UBA with albumin, and the UBA were visualized by ultrasonic diagnostic equipment in vitro and in vivo. Although we found several conditions of UI in order to burst the UBA in vivo, the concentration of PGE1 in the UBA solution in vitro decreased after the UI among the several conditions found in this study. Further experiments for finding other conditions of UI in order to not only burst the UBA, but also to increase the concentration of PGE1, are needed to prove the study's hypothesis.

研究分野：血管新生療法

キーワード：ウルトラファインバブル 超音波

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

閉塞性動脈硬化症、閉塞性血栓性血管炎、膠原病性血管炎などの末梢動脈疾患による重症下肢虚血 (critical limb ischemia: CLI) 患者の中には、既存の治療法では病状が改善せず、肢切断を余儀なくされる例も少なくない。このような患者を救済する治療戦略の1つに「血管新生療法」がある。患者自身の骨髓や皮下脂肪組織から選択的に抽出した細胞を虚血肢に筋注投与することで、側副血行血管を増加させ、虚血組織への血液供給量の増加を図る新たな治療法である。当施設でも2001年に実施開始して以来、多くのCLI患者を救済してきた。しかし、その一方で、十分な効果が得られず救肢に至らなかった例も経験してきた。そのような効果不十分例を救済する新たな治療法の開発を目指し、我々は以前、薬物輸送担体リポドマイク로스フェアにプロスタグランジン E1 (PGE1) を封入したりポ PGE1 製剤を皮下投与で併用することで血管新生効果を増強させる動物実験に成功した。同薬剤は通常の PGE1 製剤よりも治療標的組織への運搬効率が高い特徴を有しているが、この薬剤の組織内運搬効率を人工的にさらに高めることができれば、血管新生効果をさらに高めることができるかもしれない。

福岡大学の立花克郎博士開発技術によって製造されるナノメートル直径サイズの微細泡 ultrafine bubble (UFB) は、数ヶ月間に渡って破裂することなく液体内に滞在できる一方、超音波照射で任意に破裂させることが可能である。そこで本研究代表者は、液体の市販医薬品リポ PGE1 製剤を UFB 化し、それを血管内投与した後、患部の虚血肢組織血管内を通過する際に経皮的超音波照射によって任意破裂させることで、患部へより局所的に PGE1 を運搬させることが可能か否か、それによって患部への細胞局所投与による血管新生療法効果を増強させ得るか、これらの疑問点を検証する実験を立案した。

2. 研究の目的

以下の5つの疑問点、【1】市販医薬品リポ PGE1 製剤であるアロプロスタジルの UFB 化は可能か、【2】アロプロスタジル UFB (A-UFB) を超音波診断装置で観察することは可能か、【3】A-UFB を超音波照射によって試験管内および生体内 (動物下肢血管内血流中) で破裂させることは可能か、【4】A-UFB 超音波照射破裂によって試験管内および生体内 (動物下肢血管内または骨格筋組織内) の PGE1 濃度は上昇するか、【5】動物虚血下肢モデルへ血管内投与した A-UFB を経皮的超音波照射によって虚血下肢血管内で破裂させることにより血管新生療法反応を増強させることは可能か、について検証することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) A-UFB の作製と観察

既知の UFB 精製条件を参考に、市販のアロプロスタジルとヒト血清アルブミンの混合液を様々な条件で高速攪拌し、アロプロスタジル・バブルの精製を試みる。精製確認は超音波診断装置 (LOGIQ E9、GE 社製) のコンベックス型プローブ (1~6 MHz) や高周波リニア型プローブ (8~18 MHz) を用いて、独自の *in vitro* 血管流体モデル (右図) のチャンネル内を流れるバブルの音響シグナル観測によって行う。



次に、ガス全身麻酔下にあるラットの尾静脈より A-UFB を注入し、右鼠径静脈に流入して来た A-UFB の観察を動物用超音波診断装置 (Veno3100、プライムテック社製) で試みるとともに、観察可能な UFB の注入濃度を探索する。

(2) 超音波照射による A-UFB 破裂条件の探索

ラット血管内を流れる A-UFB を超音波観察するための至適濃度を確立した後、ラット鼠径静脈中枢側直上の皮膚に接触させた超音波照射用円盤型トランスデューサー (ネッパジーン社製超音波遺伝子導入機器 Sonopore KTAC-4000 付属品) を介して、様々な条件の超音波照射を血管内に行い、血流内 A-UFB の破裂を試みるとともに、その破裂状況を観察する。

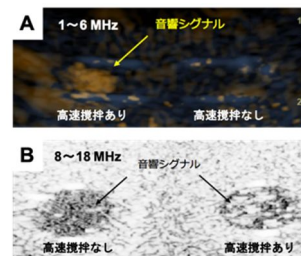
(3) 超音波照射による A-UFB 破裂後の溶媒内アロプロスタジル濃度変化の調査

ガス透過性膜底式チャンパーに A-UFB 溶液を注入し、その底面を介して超音波照射用円盤型トランスデューサーから様々な条件下に超音波を照射する。照射後の溶液サンプル中のプロスタグランジン E1 濃度を ELISA 法で測定し、超音波非照射サンプル中の濃度と比較する。この *in vitro* 実験によって、超音波照射による A-UFB の破裂がサンプル内プロスタグランジン E1 濃度を上昇させることが確認できた後、次にラット鼠径静脈血流内の A-UFB を経皮的超音波照射によって破裂させることで、血中または超音波照射部組織内のプロスタグランジン E1 濃度が上昇するか否か、そしてその効果が虚血下肢における血管新生効果 (血流回復増強効果) に貢献するか否か *in vivo* 実験で調査する。

4. 研究成果

(1) A-UFB の作製と観察

ヒト血清 0.12% アルブミンと混合した 0.0001% アロプロスタジル溶液を 6,500 rpm で高速撹拌したのち、*in vitro* 血管流体モデルのチャンネル内腔で超音波観察したところ、コンベックス型プローブ(1~6 MHz) と高周波リニア型プローブ(8~18 MHz) の両方でバブルの音響シグナルを観測することができた(右図)。



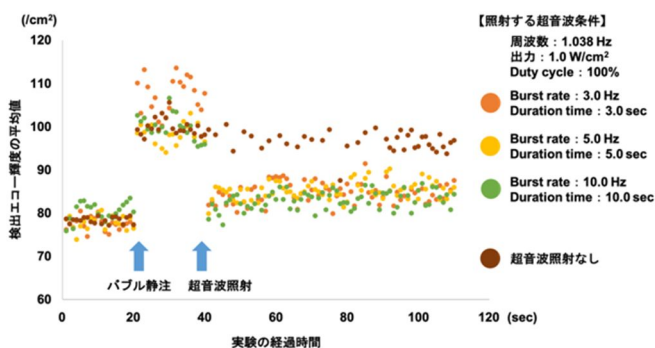
(2) 超音波照射による A-UFB 破裂条件の探索

A-UFB よりも安価に作製可能な、超音波診断用造影剤「ソナゾイド」を用いて作製したソナゾイド UFB を用いて、血流中の UFB を血管外照射で破裂させるための超音波条件(周波数、出力、duty cycle、burst rate、duration time)を探索した。ラット尾静脈から注入したソナゾイド UFB が鼠径静脈を流れる際、血管外からの超音波照射を受け、その直後に血流中エコー輝度がどのように変化するかを 8 つの条件で調査した結果を右のテーブルに示す。

周波数: 1.038 MHz						
出力 (W/cm ²)	Duty cycle (%)	Burst rate (Hz)	Duration time (sec)	エコー輝度変化 (/mm ²)	P 値	
0.5	50	50	120	-86.9 (-584.3, 117.5)	0.223	
1.0	50	50	120	-22.3 (-198.3, 872.0)	<0.001	
0.5	100	3	3	-56.8 (-136.3, 13.0)	0.968	
1.0	100	3	3	-144.1 (-220.5, 207.3)	0.020	
0.5	100	5	5	-269.3 (-441.9, -64.6)	0.113	
1.0	100	5	5	-441.6 (-1140.5, 281.2)	0.059	
0.5	100	10	10	-490.6 (-895.0, -56.9)	0.357	
1.0	100	10	10	-303.4 (-931.9, 286.0)	0.048	

この結果をもとに、エコー輝度の減少幅が広く、かつ統計検定で P 値が近似している 3 つの超音波条件(周波数: 1.038 MHz 固定、出力: 1.0 W/cm² 固定、duty cycle: 100% 固定、burst rate: 3.0/5.0/10.0 Hz のいずれか、duration time: 3.0/5.0/10.0 sec のいずれか)を選択し、それぞれの条件下において、照射前後 120 秒間で定量評価した血流中エコー輝度の変化を右の図に示す。

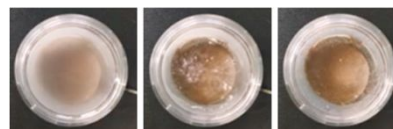
超音波照射前後におけるエコー輝度の変化 (n=5) は、中央値(四分位値)で示されている。エコー輝度は画像解析面積(1.0 mm²) 当たりの輝度で算出された値。エコー輝度の変化を共分散分析法で解析した。



バブル静注直後に鼠径静脈血流中のエコー輝度は急激に上昇し、経皮的に血管内へ超音波を照射した直後から、その上昇したエコー輝度は急激に減少した。一方、超音波を照射しなければ、その上昇したエコー輝度に変化は認められなかった。以上の結果より、血管内への経皮的超音波照射が血流中の UFB を破裂させ得ることが確認できた。

(3) 超音波照射による A-UFB 破裂後の溶媒内アロプロスタジル濃度変化の調査

先の動物実験で得られた血流内 UFB 破裂超音波照射条件が、ウェル内懸濁液中の A-UFB 破裂条件にも適合し、当初は白濁液の姿を呈していた A-UFB 懸濁液を無色透明な液体に変化させた様子を右の図に示す。



超音波照射前 超音波照射中 超音波照射後

100%アロプロスタジルバブル液に超音波照射した際の経過写真。照射前は白色懸濁液だったが、照射後はバブル破壊によって無色透明液となっている。

このように、ウェル内の A-UFB 懸濁液超音波照射前後における肉眼的様子観察方を確立させた後、5 種類の濃度で A-UFB 懸濁液をウェル内で破裂させ、その回収サンプル内における PGE1 濃度を ELISA 法で測定した。超音波照射を行わない「未処理」群、「超音波照射単独処理」群、「A-UFB 混合下超音波照射処理」群の 3 つで、その濃度変化を比較した結果を次のテーブルに示す。

その濃度変化を比較した結果を次の

少数実験結果であっても A-UFB 混合下超音波照射処理サンプル内の PGE1 濃度が著しく低下することが判明した。この結果は、これまでの実験結果から設定した超音波照射条件で血流内 A-UFB を血管外から破裂させたとしても、血液中および照射部組織中の PGE1 濃度を上昇させることには至らず、血管新生療法効果の増強に貢献できない可能性を示唆するものであった。本研究を継続するためには、実験(2)に立ち返り、異なる超音波照射条件を探索する必要がある。

		PGE1 測定濃度 (pg/mL, mean ± SD)		
		C (n=3)	U (n=3)	B (n=3)
APS 濃度	100%	3741.5 ± 803.8	3847.4 ± 644.5	2801.2 ± 953.6
	10%	707.7 ± 189.4	675.5 ± 214.8	401.7 ± 252.0
	2%	161.5 ± 44.1	126.9 ± 5.5	61.5 ± 26.0
	1%	62.3 ± 28.4	64.2 ± 20.3	11.8 ± 12.8
	0.2%	28.1 ± 13.0	28.1 ± 1.4	3.6 ± 5.1

APS : 実験で使用したアロプロスタジル液

C : 未処理 (コントロール)

U : 超音波照射 (周波数: 1.038 MHz、出力: 1.0 W/cm²、duty cycle: 100%、burst rate: 10.0 Hz、duration time: 10.0 sec) 処理

B : アロプロスタジルバブル混合+超音波照射 (上記同条件) 処理

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sasaki K, Fukumoto Y	4. 巻 82
2. 論文標題 Pretreatment of Endothelial Progenitor Cells for Effective Cell Therapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 2248-2249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-18-0768.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe Akiko, Sheng Hong, Endo Hitomi, Feril Loreto B., Irie Yutaka, Ogawa Koichi, Moosavi-Nejad Seyedeh, Tachibana Katsuro	4. 巻 5
2. 論文標題 Echographic and physical characterization of albumin-stabilized nanobubbles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e01907 ~ e01907
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2019.e01907	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松隈洋介、内山弘規、江崎丈裕、立花克郎、渡邊 晶子
2. 発表標題 高速攪拌によるファインバブル作成の最適な回転数および加速度の数値的検討
3. 学会等名 第28回 日本超音波医学会九州地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片伯部幸子、渡邊晶子、佐々木健一郎、石崎勇太、吉川尚宏、大塚昌紀、福本義弘、立花克郎
2. 発表標題 アロプロスタジル・バブル超音波局所破壊による新規血行再建療法の可能性
3. 学会等名 第28回 日本超音波医学会九州地方会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	立花 克郎 (Tachibana Katsuro) (40271605)	福岡大学・医学部・教授 (37111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------