

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20240053

研究課題名（和文）

：パルス超音波と微小気泡を用いた *in vivo* ソノポレーション法の開発

研究課題名（英文）

：Development of *in vivo* sonoporation method using short-pulsed ultrasound with microbubbles adjacent to cells.

研究代表者

工藤 信樹 (KUDO NOBUKI)

北海道大学・大学院情報科学研究科・准教授

研究者番号：30271638

研究成果の概要（和文）：

本研究の最終的な目的は、パルス超音波と微小気泡を用いることにより、効率が良く生体に対する安全性が高い *in vivo* ソノポレーション手法を開発することにある。今回の研究では、手法の効率向上を主な目的として、ソノポレーションに伴う細胞変化をタイムラプス観察する光学顕微鏡システムを開発した。また、気泡位置を制御できる光ピンセット装置も開発し、細胞膜損傷の程度や発生部位の制御を実現した。開発した装置を用いて、数 10 分間の比較的早い時間内に起きる細胞の損傷と修復を観察し、その発生機序について検討した。また、気泡に取り込まれた薬剤の効果発現をとらえるために観察チャンバを改良し、最大 20 時間程度にわたって細胞に生じる変化を連続観察する手法を確立した。さらに、特定の細胞にのみ付着するターゲティング気泡とシェルに薬剤を付着した気泡を製作し、提案するソノポレーションにおけるこれらの気泡の有用性を確認した。

研究成果の概要（英文）：

The final goal of this study was to develop a safe and efficient method for *in vivo* sonoporation that uses short-pulsed ultrasound in the presence of microbubbles adjacent to cells. A light microscopy system was developed for time-lapse observation of changes in cells generated during sonoporation and used to study methods to improve efficiency of the sonoporation. Optical tweezers were included in the system to control the position and extent of membrane damage by changing bubble size and position. Cell membrane damage and repair, which occur in a period shorter than 20 minutes, were observed using the system and their mechanisms were investigated. The observation chamber was improved to enable observation of long-term cell changes initiated by sonoporation, and the period of time-lapse observation was extended up to 20 hours. Two types of functional bubbles, tissue-targeting bubbles and drug-loaded bubbles, were developed, and their effectiveness for improving the efficacy of the proposed sonoporation method was confirmed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	28,900,000	8,670,000	37,570,000
2009 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2010 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
総計	39,200,000	11,760,000	50,960,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：ソノポレーション、超音波治療、遺伝子導入、ドラッグデリバリー、微小気泡、タイムラプス観察、光ピンセット、ターゲティング気泡。

1. 研究開始当初の背景

(1) *In vivo* ソノポレーションの重要性

遺伝子治療の研究対象は、単一遺伝子欠損病から血管疾患や生活習慣病に広がりつつあり、対象となり得る患者の範囲が急に拡大している。レトロウイルスをベクター（遺伝子を運ぶもの）とする場合、外来遺伝子が宿主の染色体に組み込まれ、遺伝子の発現は長期にわたって持続する。しかし、非ウイルスベクターでは、単に遺伝子が細胞内に取り込まれるだけなので、発現は基本的に一過性であり、例えば肝臓で約 10 日、骨格筋では約 20 日で発現が消失する。それゆえ、効果を持続させるためには繰り返し治療が必須であり、将来的に多くの患者が遺伝子治療を受けることを想定すると、局所治療を繰り返し行える *in vivo* ソノポレーション法の実現は重要な課題である。

(2) ソノポレーションの導入効率

ソノポレーション法の遺伝子導入の効率は、ウイルス法と比べて格段に低い。超音波の音圧を高く、照射持続時間を長くすると導入細胞数は増えるが、死細胞数も増加するため導入効率の向上にはつながらない。しかし、超音波造影剤の微小気泡を加えて超音波を照射すると導入効率が向上することが知られており、現在は、浮遊細胞と微小気泡の懸濁液に連続波もしくはデュティ比が高いバースト超音波を照射する条件でソノポレーションが行われている。

(3) ターゲティング気泡

ソノポレーションの効果は、超音波照射部位にのみ発生するので基本的に局所性は高い。微小気泡に標的性を持たせることは組織選択性をさらに高める上で重要であり、盛んに研究が進められている。

2. 研究の目的

本研究では、パルス超音波と微小気泡を用いた *in vivo* ソノポレーションの実現を最終目的として、下記の項目を具体的な目的とした。

まず、我々が提案するソノポレーション法により生じる細胞の変化を長期間にわたって多点タイムラプス観察実験システムを開発する。この装置には、光ピンセットにより気泡位置を制御する機能も付加し、気泡付着部位にのみ膜損傷が生じるという提案手法の特徴を活かした導入条件の制御を実現する。

次に、開発したシステムを用いて、提案手法によるガン剤導入の促進効果を明らかにする。抗ガン剤の効果促進については、導入時の諸条件と細胞死（ネクローシス、アポトーシス）の発生頻度や細胞周期との関連を調

べ、ソノポレーションが抗ガン剤の効果促進にどの程度寄与するかを明らかにする。

さらに、遺伝子や薬剤の導入効果の増強を目指して、バブルリポソームと呼ばれる直径数 100 nm の気泡を用いて、標的細胞に選択的に付着する気泡や遺伝子や薬剤を付着させた気泡を試作し、その有効性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 観察システム開発

倒立型のタイムラプス顕微鏡と、我々がこれまで開発してきたソノポレーション装置を組み合わせるソノポレーション用タイムラプス観察システムを開発する。また市販の光ピンセット装置を微小気泡捕捉用に改造し、上記顕微鏡と組み合わせることにより、顕微鏡視野内で直径数ミクロンの微小気泡を任意の場所に移動できる機能を実現する。

(2) ソノポレーション現象の観察

ソノポレーションにより細胞内に導入された薬剤が発現する効果を観察するため、超音波照射後 20 時間程度培養状態を保持できる観察用チャンバを開発する。さらに我々が提案するソノポレーション法を用いて抗ガン剤を培養細胞に導入し、導入から発現までの過程をタイムラプス観察する。

(3) 微小気泡の開発と評価

標的とする細胞の表面存在するインテグリンに特異的に付着する標的気泡を試作し、その有用性について検討する。また気泡に薬剤を付加することによるソノポレーションの効果促進の可能性についても検討する。

4. 研究成果

(1) 観察システムの開発

開発した観察システムの構成を図 1 に示す。市販の全自動型タイムラプス顕微鏡（ニコン、Ti-E）をベースとし、超音波発生装置を組み合わせた。超音波の発生には、凹面型振動子を用い、中心周波数 1 MHz、波数 3 波、

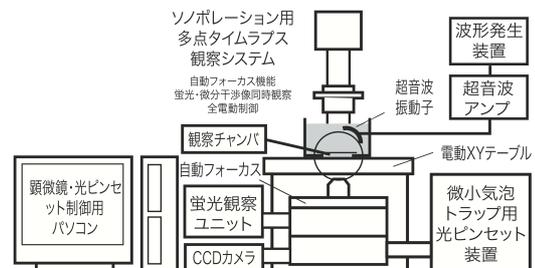


図1 ソノポレーション用多点タイムラプス観察システムの構成

最大負圧 1.1 MPa のパルス超音波を発生させた。この観察システムは、観察視野を自動的にスキャンする機能を有し、1回の実験で複数視野における細胞の変化をタイムラプス観察できる。

(2) 光ピンセットによる気泡のトラップ

顕微鏡のサイドポートに光ピンセット装置（シグマ光機，MMS-1064-2000-2L/2E/2S）を改造した装置を取り付け、顕微鏡の対物レンズ焦点に光ピンセットのための光スポット（波長 1,064 nm，最大出力 1 W）を発生させた。通常の光ピンセットでは、周囲の液体（水）よりも屈折率が高い物質を収束したビームで捕捉するが、屈折率が周囲より低い気泡を対象にする場合にはビーム形状を変更する必要がある（図 2 (a)）。そこで、開発した光ピンセットでは、光路に反射型の液晶空間光変調器（浜松ホトニクス，LCOS-SLM）を挿入し、ホログラム（図 2 (b)）を用いてドーナツ状の光ビーム（ラゲールガウスビーム）を発生させた。

試作装置で発生した光スポットにより直径 1-5 μm 程度の造影剤気泡を 100 mW 以下の光出力で捕捉できることを確認されたことから（図 2 (c)），我々の検討に十分な性能が得られていることを確認した。

(3) 細胞膜の損傷・収縮の観察（短期間）

開発したシステムを用いて、ソノポレーション後の約 20 分間に細胞に生じる早い変化を観察した結果を図 3 に示す。細胞膜の損傷により細胞内部に流入すると赤色の蛍光を生じる PI (Propidium iodide) の蛍光像と細胞内小器官の変化を表す微分干渉像の両方の連続観察を行うことで、細胞膜損傷と修復の機序の検討に有用な情報が得られることが確認できた。

(4) 薬剤効果発現の観察（長期間）

これまで我々は、ソノポレーションによる細胞膜損傷の発生に着目した検討を行ってきた。それゆえ細胞変化の観察は超音波照射後数 10 分間程度に限られていた。しかし、

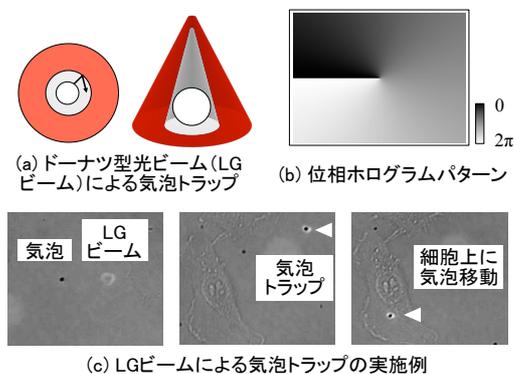
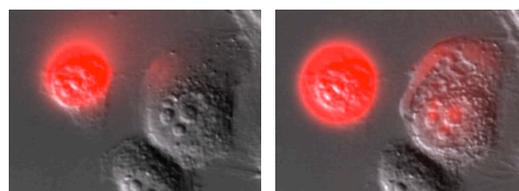


図 2 気泡トラップ用光ピンセット

ソノポレーションによって導入された薬剤の効果発現の検討には、超音波照射から 20 時間程度、連続して細胞の変化を観察する必要がある。そのためには、顕微鏡のオートフォーカス機能の実現、培養環境の維持、細胞毒性の排除を実現する必要がある。

これらを実現するために改良した観察チャンバの構造を図 4 に示す。チャンバの内部には、気泡を懸濁した培養液が満たされており、浮力によって上昇した気泡が細胞に接触する。顕微鏡のオートフォーカス機能は、一般的な観察試料のカバーガラスと空気界面での反射光を利用して実現されている。しかし、我々の観察法では細胞近傍に空気界面が無い場合オートフォーカスが利用できなかった。そこで、カバーガラスに金薄膜層を成膜し、さらに細胞接着因子を塗布した上で細胞培養を行うことにより、オートフォーカスを機能させることが可能となった。

作動距離の短い高倍率の対物レンズを用いるため、観察チャンバの容量は 0.08 ml と小さい。それゆえ長時間観察を行うとチャンバ内の培養環境が劣化し細胞死が生じる。これを防ぐため、容量 3 ml の培養液リザーバを観察チャンバに接続し、20 時間後も培養条件を持続できることを確認した。さらに、これまでカバーガラスをチャンバに固定するために用いていた粘着テープでは長期間観察で水密性を維持できず、細胞毒性もあることが判明した。そこで、細胞を培養したカバーガラスをバネで強く押しつける構造に変更し、シール材を用いなくても水密性が確保できることを確認した。



(a) ソノポレーション直後 (b) ソノポレーション19分後
図 3 ソノポレーションによる細胞膜の損傷と修復

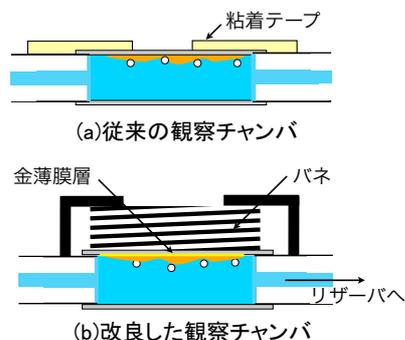


図 4 観察チャンバの改良

以上の改善を行って長時間観察を行った結果を図5に示す。(a)は改造前、(b)は改造後のチャンバを用いて観察を行った結果である。(a)では薬剤付加を行っていない条件にも関わらず、8時間後にほとんどの細胞が死滅している。これに対し(b)では、20時間後にも細胞が健全な状態を保っていることがわかる。

さらに、抗がん剤を入れた状態でソノポレーションを行い細胞の変化を観察した。長期間にわたる観察の過程で、核の凝縮や細胞膜のブレッキングや核の凝縮などアポトーシスに特有な形態変化が捉えられており、開発したシステムがソノポレーションによる抗がん剤効果増強の観察に有効であることが確認された。この点については、今後さらに十分な検討を重ねる予定である。

(5) ターゲティング気泡の有効性

がん細胞や血拴に特異的に発現するインテグリンに特異的に付着する RGD (Arg-Gly-Asp) ペプチドをリガンドとしてターゲティング気泡を作製し、その有効性を培養細胞を用いた *in vitro* 実験により検証した。気泡としては、直径 200 nm~数 μm のバブルリボソームを用い、ペプチドをつけた気泡とつけない気泡の2種類を作製した。また、標的細胞としては前立腺がん細胞を用い、コントロール細胞としては血管内皮細胞を用いた。

図6(a),(b)は、リガンド有無の2種類の気泡を標的細胞である前立腺がん細胞に付着させ、その後ピペッティングを行って細胞への付着力を評価した結果である。リガンドの無い気泡が十分除去される強度でピペッティングを行っても、リガンド有りの気泡ではほとんどの気泡が残存していることがわかる。

図6(c)は、リガンドをつけた気泡を前立腺がん細胞とコントロール細胞である血管内皮細胞に付着させ、ピペッティングを行な

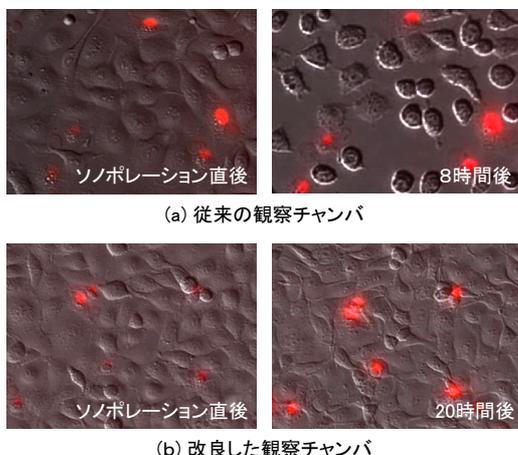


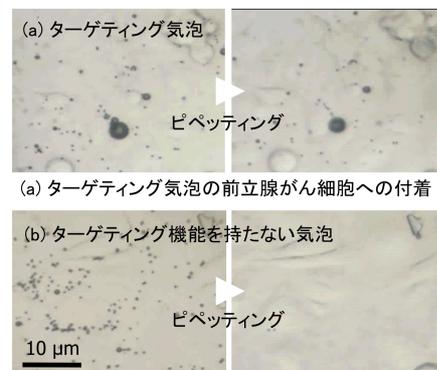
図5 観察チャンバ改良の効果

い、さらに超音波を照射して細胞膜損傷の発生率を蛍光染料 PI で評価した結果である。リガンド有りの気泡を用いた場合、血管内皮細胞では約 3%の細胞に膜損傷が見られたのに対し、がん細胞では 40%程度と損傷率が大幅に向上した。我々の提案するソノポレーション手法では、気泡の付着した部位のみに細胞膜損傷が起きることから、この結果はターゲティング気泡の使用が細胞レベルでの細胞特異性を持つソノポレーションを実現していることを示している。

(6) 気泡への薬剤付加の有効性

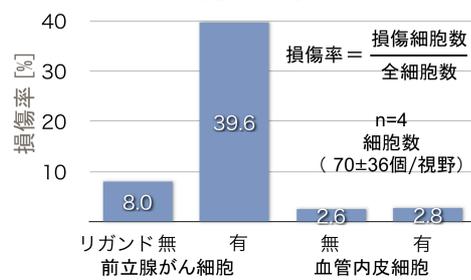
ソノポレーションの有効性を示すためには、微小気泡に付加した遺伝子や抗がん剤などの薬剤がどの程度細胞に取り込まれるかを評価する必要がある。そこで、表面に蛍光染料を付着させた微小気泡を試作し、これを用いてソノポレーションを行った。実験に使用した気泡は、DSPC を主剤とするバブルリボソームで、シェルをカルボシアニン蛍光色素 (DI0) で蛍光標識した。

実験の結果を図7に示す。(a)はシェルに蛍光染料が付着した気泡、(b)この気泡を前立腺がん細胞 PC-3 に付着させた状態での撮影結果である。(c)はこの状態の細胞にパルス超音波を1回照射した後、(d)は、さらにピペッティングを行なった後に同視野で撮影した結果である。各図とも左は明視野像、右は蛍光像である。(a),(b)では、気泡のシェルに蛍光色素が付着していることが確認



(a) ターゲティング気泡の前立腺がん細胞への付着

(b) ターゲティング機能を持たない気泡の前立腺がん細胞への付着



(c) ターゲティング気泡による細胞損傷効果の増強

図6 ターゲティング気泡の有効性

できる。(c)の微分干渉像では、超音波の照射により気泡が消失している。しかし、蛍光像では気泡のあった位置に蛍光が確認されており、シェル物質が残存していることがわかる。さらに(d)ではピペッティングをした後にも蛍光が確認されており、シェルの物質が細胞に強く付着している、もしくは細胞内に取り込まれていることが確認できる。この結果は、微小気泡のシェルに薬剤を付加することにより、細胞に高濃度の薬剤を送達することの可能性を示している。以上の検討結果より、薬剤を付加したターゲティング気泡が、パルス超音波とパルス超音波を用いたソノポレーションで特に有効であることを示している。

(7) 成果の位置づけとインパクト

短いパルス超音波を用いたソノポレーションでは、気泡が付着した場所に、その大きさに応じた細胞膜損傷が発生するという我々の発見は、広く受け入れられるようになってきている。しかし、これを積極的に生かしてソノポレーションの機序を解明し、効率向上を目指す研究はいまだ報告されていない。この意味で、気泡位置制御機能を有するタイムラプス観察装置を世界に先駆けて開発し、ソノポレーション効果の長時間観察の有用性を実証した本研究の意義は高い。

また現在、ターゲティング機能機能を有する気泡と薬剤を付加した微小気泡の開発が盛んに進められている。今回の検討を通じて、これらの気泡が特にパルス超音波を用いたソノポレーションに特に有効であることを示したことは、安全な *in vivo* ソノポレーションの実現を目指す上で、大きなインパクトを持つ。

(8) 今後の展開

光ピンセットによる気泡の捕捉では、当初、ミラーを機械的に高速スキャンしてドーナツ型光ビームを作成することを予定していた。しかし、検討の段階で補足力と位置制御の自由度の向上を目指し、ホログラム法を採用することに方針を変更した。このため、光ピンセットによる気泡制御システムの完成が約1年遅れた。また、長時間連続観察法の開発では、従来の粘着テープ法に代わる観察チャンバのシール法の開発に時間を要した。いずれの問題も乗り越えることができ、現在順調に実験を進めているが、気泡の位置制御によるソノポレーション効果の変化については、現在も実験を継続している。今後、引き続きデータを蓄積しこれらの関係について検討していく予定である。

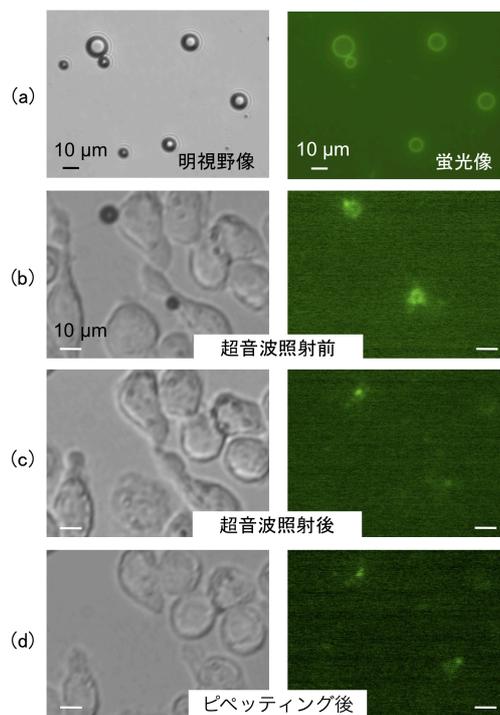


図7 気泡への薬剤付加の有効性

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 38 件)

1. Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, Maruyama K. Progress in the development of ultrasound-mediated gene delivery systems utilizing nano- and microbubbles. *J Control Release* 2011. 149(1):36-41. 査読有.
2. Suzuki R, Namai E, Oda Y, Nishiie N, Otake S, Koshima R, Hirata K, Taira Y, Utoguchi N, Negishi Y, Nakagawa S, Maruyama K. Cancer gene therapy by IL-12 gene delivery using liposomal bubbles and tumoral ultrasound exposure. *J Control Release* 2010. 142(2):245-50. 査読有.
3. Hassan MA, Buldakov MA, Ogawa R, Zhao QL, Furusawa Y, Kudo N, Kondo T, Riesz P. Modulation control over ultrasound-mediated gene delivery: Evaluating the importance of standing waves, *J Control Release* 2010. 141(1): 70-76. 査読有.
4. Kudo N, Sakaguchi K, Suzuki R, and Maruyama K. Effects of Phase Transition of a Lipid Bilayer on Dynamics of Bubble Liposomes. *IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings* 2009: 1255–1258. 査読有.
5. Kudo N, Okada K, and Yamamoto K. Sonoporation by single-shot pulsed ultrasound with microbubbles adjacent to

- cells. Biophysical Journal 2009, 96: 4866–4876. 査読有.
6. Okada K, Kudo N, Hassan MA, Kondo T, and Yamamoto K. Threshold curves obtained under various gaseous conditions for free radical generation by burst ultrasound –Effects of dissolved gas, microbubbles and gas transport from the air–. Ultrasonics Sonochemistry 2009, 16:512–518. 査読有.
 7. Sakaguchi K, Kudo N, Yamamoto K, Suzuki R, and Maruyama K. Characterization of bubble liposomes by measurements of ultrasound attenuation –effects of shell materials–. IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings 2008: 1675–1678. 査読有.
 8. Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, Namai E, Taira Y, Okada N, Kadowaki N, Kodama T, Tachibana K, Maruyama K. A novel strategy utilizing ultrasound for antigen delivery in dendritic cell-based cancer immunotherapy. J Control Release 2009. 133(3):198-205. 査読有.
 9. Okada K, Kudo N, Kondo T, and Yamamoto K. Contribution of the mechanical and sonochemical effects to cell membrane damage induced by single-shot pulsed ultrasound with adjacent microbubbles, Journal of Medical Ultrasonics 2008, 35(4): 169–176. 査読有.

[学会発表] (計 17 件)

特記なきものは招待講演.

1. Kudo N. Activity and safety of contrast agent bubbles. 12th International Symposium on Ultrasound Contrast Imaging. Tokyo, Japan (Tokyo Medical University), 2010/12/11.
2. 鈴木 亮, 超音波感受性リポソームを利用した新たな薬物・遺伝子送達システムの開発に関する研究, 第19回日本バイオイメージング学会学術集会 (奨励賞受賞講演), 横浜 (慶應義塾大学日吉キャンパス), 2010/9/9.
3. 工藤信樹, 清水孝一: 微小気泡とパルス超音波を用いるソノレーションにおける標的気泡の有用性, 日本薬学会第130年会, 岡山 (岡山コンベンションセンター), 2010/3/29.
4. 鈴木 亮, 小田雄介, 宇都口直樹, 丸山一雄, 超音波感受性リポソームを利用した超音波がん治療システムの開発, 日本薬学会第130年会, 岡山 (岡山コンベンションセンター), 2010/3/29.
5. 工藤信樹, 超音波照射下での微小気泡のふるまいと細胞への作用の観察, 第2回超音波とマイクロバブルの相互作用に関するシンポジウム, 東京都 (産業技術総合研究所臨海副都心センター), 2009/12/17.
6. 鈴木 亮, 小田雄介, 宇都口直樹, 根岸洋一, 中川晋作, 丸山一雄. リポソーム型微

小気泡 (バブルリポソーム) の超音波がん遺伝子治療への応用, 第2回超音波とマイクロバブルの相互作用に関するシンポジウム, 東京都 (産業技術総合研究所臨海副都心センター), 2009/12/17.

7. 工藤信樹, 微小気泡のダイナミクス, 第22回日本腹部造影エコー・ドプラ診断研究会 (特別講演), 旭川 (旭川グランドホテル), 2009/4/4.
8. Kudo N, and Yamamoto K. Characterization of microbubbles by measurements of pressure-dependent transmittance of a bubble suspension. 10th International Symposium on Ultrasound Contrast Imaging. Tokyo, Japan (Tokyo Medical University), 2008/12/13-14.
9. 鈴木 亮, 丸山一雄, がん免疫療法における樹状細胞へのリポソーム型バブルを利用した超音波抗原導入法の開発, 日本生体医工学会, 神戸 (神戸国際会議場), 2008/5/10.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 信樹 (KUDO NOBUKI)

北海道大学・大学院情報科学研究科・准教授
研究者番号: 30271638

(2) 研究分担者

鈴木 亮 (SUZUKI RYO)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号: 90384784

山本 克之 (YAMAMOTO KATSUYUKI)

北海道大学・大学院情報科学研究科・教授
研究者番号: 10088867

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

岡田 健吾 (OKADA KENGO)

北海道大学・大学院情報科学研究科・
博士課程学生

坂口 克至 (SKAGUCHI KATSUJI)

八木 智史 (YAGI TOMOFUMI)

渡辺 典子 (WATANABE NORIKO)

千田 裕樹 (CHIDA YUUKI)

奥山 学 (OKUYAMA MANABU)

松井 智子 (MATSUI TOMOKO)

吉松 幸里 (YOSHIMATU YURI)

北海道大学・大学院情報科学研究科・
修士課程学生