

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：10101
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23650247
研究課題名（和文） ：超音波と微小気泡を用いた細胞局所刺激手法の開発
研究課題名（英文） ：Development of local cell stimulation method using ultrasound exposure in presence of microbubbles
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）：

細胞のメカノトランスダクション研究への応用を目的に、細胞局所を機械的に刺激する新しい手法を提案した。この方法では、大きさ数ミクロンの微小気泡を細胞に接触させた状態で超音波を照射することにより、気泡が細胞よりも強い音響放射力を受けることを利用して局所刺激を実現する。微小気泡の位置制御は光ピンセットで実現した。刺激対象としてラットから単離・培養した心筋細胞を用いることとし、拍動の電氣的ペースングと気泡付着状態での超音波照射を顕微鏡観察下で行える観察チャンバを開発した。手法の有用性を確認するため、気泡を付着した培養心筋細胞に超音波を照射する実験を行い、機械刺激による期外収縮を誘導できることを確認した。さらに、心筋細胞の不応期を求める実験を通じて拍動周期に依存して不応期が変化することを確認し、機械的刺激に対する細胞の反応を調べる上での本刺激手法の有用性を確認した。

研究成果の概要（英文）：

A novel technique for local mechanical stimulation of cells was proposed to study mechanotransduction of living cells. A cell with an attached micron-sized bubble is stimulated by this technique by using the effect of larger acoustic radiation force being applied to the bubble than to the cell. Optical tweezers were used to control the position of a bubble. Cardiac myocytes isolated from neonatal rats were used for mechanical stimulation, and a cell culture chamber for microscopic observation under exposure of ultrasound exposure was developed. Cardiac myocytes with attached microbubbles were irradiated with ultrasound, and the generation of premature ventricular contraction by the mechanical stimulation was confirmed. Experiments to evaluate the refractory period of the myocytes were carried out using this technique, and changes in the period depending on the beating frequency were found, suggesting the usefulness of the proposed technique for studying cell reactions to mechanical stimulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：細胞骨格，メカノトランスダクション，細胞局所機械刺激，心筋細胞，超音波，光ピンセット，微小細胞

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞や血管内皮細胞は、常に心拍動という機械的ストレスにさらされた状態にあり、この持続的な刺激のもとで初めて細胞本来の機能が発揮される。細胞が力学刺激を受け入れる仕組みを細胞力覚、生理・病態反応や遺伝子発現に転換される過程の分子機構をメカノトランスダクションといい、その解明を目指す研究が盛んに行われている。

最近では、研究対象が組織レベルから単一細胞レベルにシフトし、急速に進展したナノ技術を応用して細胞局所に機械的な刺激を加え、その反応を調べる研究がなされている。細胞の局所に機械的な刺激を加える方法として、磁気ビーズを細胞に付着させて磁界を印加する方法と、原子間力顕微鏡のカンチレバーで直接細胞に力を加える方法が報告されている。しかし、前者には長期間にわたる細胞の変化を観察できないという点に、後者では、多点刺激ができないという点に限界がある。より高度な細胞機能を調べるためには、自由度の高い細胞刺激方法の開発が望まれている。研究代表者は、ソノポレーション、すなわち超音波照射の機械的刺激により細胞膜の透過性を一時的に向上させ、細胞に遺伝子や薬剤を取り込ませる手法について研究している。細胞の音響インピーダンスは水とほぼ等しく、通常の状態ではパルス超音波の照射が細胞に作用を与えることはない。しかし、細胞に音響インピーダンスが全く異なる気泡を付着させると気泡が強い力を受け、その結果2次的に細胞に機械的作用を与える現象が起きる。研究代表者は、この現象を利用することでパルス超音波でもソノポレーションが起きうることを世界に先駆けて報告してきた。

2. 研究の目的

パルス超音波の単独照射では細胞に機械的な作用がほとんど無いにも関わらず、音場内に置かれた微小気泡は強い力を受けることから、研究代表者は、この現象を細胞の局所刺激に応用することを着想した。その実現可能性を確認するために、本研究の目的を以下のように設定した。

- (1) 光ピンセットを用いて細胞に微小な気泡を接触させた状態で、超音波を加えることにより細胞の局所刺激を実現する装置を試作する。
- (2) 開発した装置を用いて心筋細胞に機械的刺激を加え、心筋細胞に誘導される拍動変化の短期間観察を行うことにより本手法の有効性を検討する。

当初、血管内皮細胞への長期間刺激の作用について検討することも目的としていた。しかし、心筋細胞への影響について興味深い知見が得られ、その検討を優先したため、血管

内皮細胞の検討まで至らなかった。

3. 研究の方法

まず、下記第1-3項目に示す実験装置の開発・改良について検討した。その結果を基に改良した装置を用いて第4項目に示した実験を行い、超音波照射と微小気泡による細胞の局所刺激手法の実現可能性を検討した。

(1) 微小気泡捕捉力の改良

気泡を光ピンセットで捕捉するために用いるドーナツビームの発生には、空間光変調器で発生した位相ホログラムを用いている。これまでは、図1aに示すホログラムで発生したラゲールガウシアンビーム（以LGビーム）を用いていた。今回改良した装置では、図1bに示すホログラムに変更し、ビームの回折の影響が小さく光密度が高いベッセルビームを用いることとした。

(2) 観察チャンバ

超音波の照射と高倍率顕微観察を同時に実現する培養容器として、図2aに示す μ -Slide VI flow through (ib80606, 日本ジェネティクス)を用いた。これは厚さ0.4 mm、幅3.8 mmの薄い流路をスライドガラス大のプラスチック板内部に設けたものである。また、超音波の機械的刺激が拍動に与える影響を調べることを目的に、電気刺激による拍動ペーシングの機能も付加した。図2bに示すように、流路両端に設けられた培養液灌流用のパイプから刺激用の電極を挿入し、電圧5 Vの矩形波電圧を印加することによりペーシングを実現した。

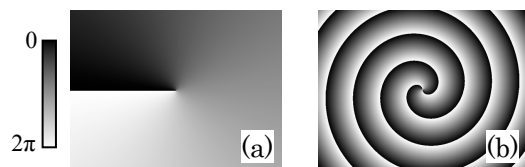


図1 ドーナツビーム作成用ホログラム

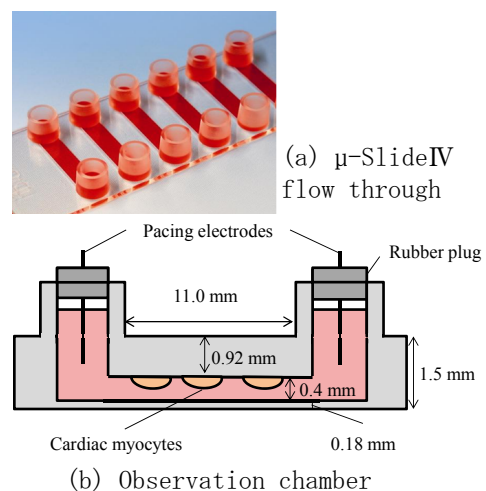


図2 試作した観察チャンバ

(3) 超音波音源

従来、超音波発生には凹面型振動子を用い、焦点に置いた細胞に超音波を照射していた。しかし、この方法では容量数リットル程度の大きさの水槽を用いて焦点と観察細胞の位置を正確に一致させる必要があり、長期間にわたる連続培養・超音波照射が難しかった。そこで、本研究では平板振動子を音源として用い、その中心に開けた小孔を通じて顕微観察を実現することを考え、その実用性を検討した。

(4) 心筋細胞不応期

上記により開発した実験システムの有用性を確認するため、心筋細胞の拍動周期と不応期との関連に関する検討を行い、これを通じて細胞局所刺激方法としての有用性を検討した。

4. 研究成果

(1) 光ピンセットの改良

2種類のホログラムを用いて発生させた気泡捕捉用ドーナツビームの画像を図3に示す。従来のラゲルガウシアンビームに比べ、ベッセルビームの形状が明確で輝度も高い。ベッセルビームの最大輝度値は、LGビームの1.8倍高く、気泡の捕捉力は2.4倍に向上した。捕捉力の向上により、気泡位置の制御範囲が大幅に向上し、従来困難であった細胞核上への気泡の移動も容易に実現できた。

(2) 観察チャンバ

開発した観察チャンバを実際に心筋細胞の培養に使用し、単離・培養した心筋細胞が自律拍動を再開すること、電気刺激によるペーシングが可能であることを確認した。図4は培養心筋細胞に電氣的ペーシングを行った結果である。グラフは、顕微画像上のある点における輝度の時間的変化を計測した結果であり、1つのパルス波形が心筋の1拍動を示す。前半はペーシングを行っていない自律拍動状態であり、拍動周期に揺らぎが見られている。これに対し、ペーシングを開始した後半では一定周期で規則正しく拍動している。

(3) 超音波音源

シャーレに播種した心筋細胞を用いた予備実験の結果、平板振動子の中央に直径が波長程度(2 mm)の小孔を開けても、回折効果により小孔直下の細胞に期外収縮を発生させ得ることを確認した。しかし、観察チャンバによる超音波の減衰により、チャンバ内に播種した心筋細胞には期外収縮を発生させることができず、平板振動子の使用は見送ること

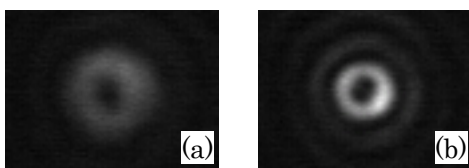


図3 気泡捕捉用ドーナツビーム

した。

(4) 心筋細胞の不応期に関する検討

拍動している心筋細胞に微小気泡を付着させた状態で超音波を照射すると、再現性良く期外収縮を誘導することができる。音圧を大きくすると、超音波の単独照射でも誘導が起きる。この現象を利用し、超音波の照射タイミングを少しずつ変化させながら期外収縮の発生の有無を調べると、機械的刺激に対する心筋の不応期を求めることができる。そこで、本研究で開発した実験装置を用いて心筋細胞の不応期に関する検討を行った。

超音波発生には、中心周波数1 MHzの集束型振動子を用い、微小気泡を加えた場合には、最大負圧0.19 MPa、波数3波のパルス超音波を照射した。超音波を単独で照射する場合には、最大負圧1.3 MPa、波数5波～15波のパルス超音波を照射した。微小気泡としては、照射した音圧では破壊されないプラスチックシェルバブル(直径3～5 μm, F-04, 松本油脂製薬)を用いた。今回開発した光ピンセットでは、密集した心筋細胞のコロニー上で気泡を長距離移動させることが困難であった。そこで、本実験では積極的な位置制御は行わないこととし、細胞コロニー上のランダムな位置に気泡が付着する条件とした。

心筋細胞が自律拍動する状態で計測した期外収縮発生の時間閾値は、 194 ± 67 ms (n=13)であった。これに対し、周期1秒で心筋細胞を電氣的ペーシングした状態で計測した時間閾値は 292 ± 23 ms (n=10)であった。ペーシングによって閾値のばらつきが減少したことから、期外収縮発生の時間閾値は拍動周期に依存すると考えられた。この拍動周期依存性は、電氣的刺激で同等の実験を行った結果でも確認された。

一方、微小気泡が付着した条件では、ペーシングをする条件でも時間閾値が 253 ± 78 ms (n=12)となり、超音波照射単独の場合に比べてばらつきが増加した。超音波照射単独の場合には細胞コロニー全体に一樣な機械的刺激が加わるのに対し、気泡添加時には気泡が付着した細胞にのみ刺激が加わる。気泡添加によりばらつきが増加したのは、刺激を受ける細胞数が減少したため、心筋細胞毎の不応期のばらつきが観察されやすくなったためと考えられる。この結果は、気泡位置を制御

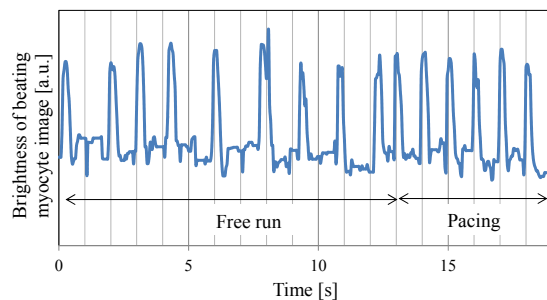


図4 培養心筋の拍動と電氣的ペーシング

することにより期外収縮をトリガする細胞を選択できることを意味し、本研究で開発した実験装置を用いて細胞レベルでの局所選択刺激が実現できることを実証する結果と考えられる。

一方、刺激強度を強くすると音響放射圧により気泡が吹き飛ばされ、光ピンセットによる気泡の捕捉は、これを妨げることができない。気泡を細胞に強く付着する分子で修飾するなど、更なる工夫が必要である。

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21件)

1. Kudo N, Tanaka Y, Uchida K. Basic studies on sonoporation with size- and position-controlled microbubbles adjacent to cells. IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings 2013, in print. 査読有.
2. Tanaka Y, Kudo N. Relation between cell membrane tension and repair of membrane damaged during sonoporation, IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings 2013, in print. 査読有.
3. Oda Y, Suzuki R, Otake S, Nishiie N, Hirata K, Koshima R, Nomura T, Utoguchi N, Kudo N, Tachibana K, and Maruyama K. Prophylactic immunization with Bubble liposomes and ultrasound-treated dendritic cells provided a four-fold decrease in the frequency of melanoma lung metastasis, Journal of Controlled Release 2012, 160(2): 362-6. 査読有.
4. Sasaki N, Kudo N, Nakamura K, Lim SY, Murakami M, Kumara WRB, Tamura Y, Ohta H, Yamasaki M, and Takiguchi M. Activation of microbubbles by short-pulsed ultrasound enhances the cytotoxic effect of cis-diamminedichloroplatinum (II) in a canine thyroid adenocarcinoma cell line in vitro, Ultrasound in Medicine and Biology 2012, 38(1): 109-118. 査読有.
5. Kudo N, and Kinoshita Y. A study on sonoporation of cells cultured on a soft collagen gel scaffold. AIP Conference Proceedings 2012 (12th International Symposium on Therapeutic Ultrasound), 1503: 61-4. 査読有.
6. 水内美里, 工藤信樹: 超音波照射と電気刺激による期外収縮発生に関する培養心筋細胞を用いた検討, 日本超音波医学会超音波基礎技術研究会資料 2012, 2012(2): 38-43. 査読無.
7. 吉松幸里, 工藤信樹, 鈴木 亮, 丸山一雄: パルス超音波を用いたソノポレーションにおける薬物付着型微小気泡の有用性に関する基礎的検討, 日本超音波医学会超音波基礎技術研究会資料 2012, 2012(2): 44-48. 査読無.
8. Yamaguchi S, Kobayashi H, Narita T, Kanehira K, Sonezaki S, Kudo N, Kubota Y, Terasaka S, Houkin, K. Sonodynamic therapy using water-dispersed TiO₂-polyethylene glycol compound on glioma cells: comparison of cytotoxic mechanism with photodynamic therapy. Ultrasonics Sonochemistry 2011, 18:1197-1204. 査読有.
9. 松井智子, 工藤信樹: Sonoporationによる抗がん剤の効果増強の多角的評価, 日本超音波医学会超音波基礎技術研究会資料 2012, 2011(4):17-21. 査読無.
10. 佐々木東, 中村健介, 工藤信樹, 滝口満喜: 診断装置によるソノポレーションの特徴と条件設定, 日本超音波医学会超音波基礎技術研究会資料 2011, 2011(2), 53-55. 査読無.
11. 木下勇人, 工藤信樹: ゲル上に培養した細胞へのソノポレーション効果に関する検討, 日本超音波医学会超音波基礎技術研究会資料 2011, 2011(2): 47-52. 査読無.
12. 奥山 学, 工藤信樹, 清水孝一: 光ピンセットを用いた超音波造影剤微小気泡の位置制御装置の開発, 電子情報通信学会技術研究報告 2011, 111(84): 7-12. 査読無.

〔学会発表〕 (計26件)

1. 吉松幸里, 工藤信樹, 鈴木 亮, 丸山一雄, 微小気泡の薬物付加法や膜特性がソノポレーション現象に与える影響, 日本超音波医学会平成24年度第4回超音波分子診断治療研究会 (2013/3/2: 福岡, 福岡大学医学部)
2. 工藤信樹, 田中裕人, 細胞培養の足場硬さによるソノポレーション現象の違い, 日本ソノケミストリー学会第5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 (招待講演) (2012/12/15: 東京, 帝京大学板橋キャンパス)
3. 吉松幸里, 工藤信樹, 鈴木 亮, 丸山一雄: 蛍光物質付着型バブルリポソームを用いたsonoporationの検討, 第28回日本DDS学会学術集会, 1-G-01, 143 (2012/7/4-5: 札幌, 札幌コンベンションセンター)
4. 水内美里, 工藤信樹, 超音波照射と電気刺激による培養心筋細胞の期外収縮発生の時間閾値に関する検討, 日本超音波医学会第85回学術集会, 演題番号85-基-005, S334 (2012/5/25-27: 東京, グランドプリンスホテル新高輪)
5. 奥山 学, 工藤信樹, 清水孝一, パルス超音波と微小気泡を用いた細胞へのマイクロインジェクションの試み, 日本超音波医学会第85回学術集会, 85-基-017, S340 (2012/5/25-27: 東京, グランドプリンスホテル新高輪)
6. 吉松幸里, 工藤信樹, 鈴木 亮, 丸山一

- 雄, 蛍光物質付着型バブルリポソームを用いたsonoporationの検討, (第1回新人賞口演), 日本超音波医学会第85回学術集会, S119 (2012/5/25-27: 東京, グランドプリンスホテル新高輪)
7. 工藤信樹, 佐々木東, 滝口満喜, パルス超音波を用いたソノポレーションの実現に向けたいくつかの基礎的検討, 日本超音波医学会第85回学術集会, 85-SY-基06, S174 (2012/5/25-27: 東京, グランドプリンスホテル新高輪)
 8. 工藤信樹, *In vitro* と *in vivo* 条件におけるソノポレーションの最適条件と効果の違いに関する検討, 日本超音波医学会第85回学術集会, (2012/5/25-27: 東京, グランドプリンスホテル新高輪)
 9. 工藤信樹, キャピテーションの生体作用, 日本超音波医学会第85回学術集会, 85-WS-基02, S177 (2012/5/25-27: 東京, グランドプリンスホテル新高輪)
 10. 田中裕人, 工藤信樹, ソノポレーション効果の制御を目指したタイムラプス観察システムの開発, 第51回日本生体医工学会大会, O2-06-4 (2012/5/10-12: 福岡, 福岡国際会議場)
 11. 内田和輝, 奥山 学, 工藤信樹, 清水孝一, ソノポレーションの機序検討に向けた細胞と微小気泡の同時位置制御, 第51回日本生体医工学会大会, O2-06-5 (2012/5/10-12: 福岡, 福岡国際会議場)
 12. 内田和輝, 田中裕人, 工藤信樹, ソノポレーション研究のための光ピンセットを用いた微小気泡位置制御システムの開発, Optics & Photonics Japan 2012日本光学会年次学術講演会, 25aA2 (2012/10/23-25: 東京, タワーホール船堀)
 13. 奥山 学, 工藤信樹, 清水孝一, ソノポレーション基礎研究のための光ピンセットを用いた微小気泡位置制御装置の開発, 日本超音波医学会第84回学術集会, S316 (2011/5/27-29: 東京, グランドプリンスホテル新高輪)
 14. 松井智子, 工藤信樹, 2種類の前立腺がん細胞におけるソノポレーションによる抗がん剤の効果増強, 日本超音波医学会第84回学術集会, S317 (2011/5/27-29: 東京, グランドプリンスホテル新高輪)
 15. 木下勇人, 工藤信樹, 細胞の培養状態がソノポレーションの効率に与える影響に関する検討, 日本超音波医学会第84回学術集会, S317 (2011/5/27-29: 東京, グランドプリンスホテル新高輪)

〔その他〕
受賞

1. 日本超音波医学会 第2回新人賞, 2013
内田和輝, 工藤信樹
ソノポレーション基礎研究のための光ピンセットシステムの気泡捕捉力の改良
2. 日本超音波医学会 第1回新人賞, 2012
吉松幸里, 工藤信樹
蛍光物質付着型バブルリポソームを用いたsonoporationの検討
3. 第51回日本生体医工学会北海道支部大会
研究奨励賞, 2012
吉松幸里, 工藤信樹
気泡の位置がsonoporationの効率向上に与える影響に関する検討
4. 第10回日本超音波治療研究会, 2011
佐々木東, 工藤信樹, 滝口満喜
超音波診断装置および造影剤による *in vivo* でのシスプラチンの治療効果増強
5. 第41回日本超音波医学会北海道地方会
優秀演題賞, 2011
佐々木東, 中村健介, 工藤信樹, 滝口満喜
超音波診断装置および超音波造影剤による抗がん剤の抗腫瘍効果の増強
6. 第40回日本超音波医学会北海道地方会
優秀演題賞, 2011
奥山勇人, 工藤信樹, 清水孝一
光ピンセットを用いた微小気泡の位置制御とソノポレーションへの応用

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)研究協力者

奥山 学 (OKUYAMA MANABU)
木下 勇人 (KINOSHITA YUTO)
松井 智子 (MATSUI TOMOKO)
水内 美里 (MIZUUCHI MISATO)
吉松 幸里 (YOSHIMATSU YURI)
北海道大学・大学院情報科学研究科・
修士課程学生