

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460665

研究課題名(和文)短パルス光の機械的・音響的作用を用いた血液脳関門の新規制御・評価技術の創出

研究課題名(英文)Development of novel techniques for control and evaluation of the blood-brain barrier based on mechanical and acoustic effects of short-pulsed light

研究代表者

佐藤 俊一 (Sato, Shunichi)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・その他部局等・准教授)

研究者番号：90502906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は先行研究において、短パルスレーザーで発生させた圧力波(フォトメカニカル波)を用いて脳血管の障壁(血液脳関門)を一時的に開放できることを見出した。本研究ではこの効果に基づき、ラットの悪性脳腫瘍、特に再発の原因となる腫瘍周縁部の浸潤腫瘍細胞に安全かつ効率よく薬剤を送達できることを示した。血管から漏出する薬剤の動態を画像化する方法、および臨床応用に必要な要素技術についても検討を行った。

研究成果の概要(英文)：We previously found that a pressure wave induced by a short laser pulse, which is called a photomechanical wave, could transiently open the blood-brain barrier. On the basis of this effect, we showed in this study that a drug can safely and efficiently be delivered to the lesion, including infiltrated malignant cells in the peritumoral region, in a rat glioma model; infiltrated malignant cells are associated with the risk of recurrence. We also investigated photoacoustic imaging of the distribution of drug molecules leaked out of the vessels, as well as component technologies needed for the future clinical application of the present drug delivery method.

研究分野：レーザー医学, バイオフォトンクス

キーワード：血液脳関門 血液腫瘍関門 グリオーマ 薬剤輸送 フォトメカニカル波 ナノ秒パルスレーザー 光音響(断層)イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の血管には、血管内の物質を血管外に移行しにくくする機構があり、脳の場合これを血液脳関門(blood-brain barrier: BBB)と呼ぶ。その詳細なメカニズムは解明されていないが、毛細血管の内皮細胞間の結合が密であること(密着結合)、および内皮細胞の膜タンパク(トランスポーター)が選択的分子透過作用、侵入物質排出作用を有することが寄与していると考えられている。本来このBBBは脳を保護する役割を担っているが、脳へ薬剤を輸送しようとした際に強力な障壁として働くため、治療効果が制限を受けてしまうという問題がある。代表的な例として、悪性脳腫瘍の治療においては、腫瘍中心部を外科的に切除したのち、再発の原因となる周縁部の浸潤腫瘍細胞を標的とした抗腫瘍薬治療が施行されるが、BBBの存在によりその効果は大きく制限されてしまう。そのためBBBを制御し、安全かつ効率的に開放するための技術が強く求められている。BBBの制御法としては化学的方法と物理的方法が研究されており、前者は目的薬剤がトランスポーターを通過できるように修飾する方法、後者は物理的エネルギーを用いて内皮細胞の密着結合または細胞膜の透過性を亢進させて目的薬剤を血管外に移行させる方法が主流である。物理的方法は広範な種類の分子に応用可能である利点があり、特に高強度集束超音波を用いる方法が精力的に研究されているが、現状では安全性、制御性に課題が残されている。なお腫瘍の場合、血管の障壁を血液腫瘍関門(blood-tumor barrier: BTB)と呼ぶこともある。

著者らは、光吸収体に高強度の短パルスレーザーを照射した際に発生する圧力波(photomechanical wave: PMW)を用いた遺伝子導入の研究に取り組んできたが、その過程でPMWに血管透過性亢進作用があることを見出した(雑誌論文②)。すなわちラット尾静脈にエバンスブルー(EB)を注入後、皮膚、筋、脳にPMWを適用したところ、同部位においてEBが血管外に漏出し周囲の細胞内に導入されることがわかった。脳の結果はPMWによりBBBが開放することを意味し、脳への新しい薬剤輸送法として注目される。一方、生体組織にごく低強度のパルス光を照射すると組織中の光吸収体に吸収されて断熱膨張が起き、光音響波と呼ばれる超音波が発生する。これを組織表面で検出すると、その伝搬時間より吸収体の深さ情報が、また圧力振幅より濃度情報が得られ、これを光音響断層イメージング(photoacoustic tomography: PAT)法と呼ぶ。血液および薬剤のそれぞれに吸収される二波長の光を用いることにより、血管および薬剤の深さ分布を同時に画像化することが可能と考えられ、経血管薬剤輸送の評価技術として注目される。

すなわち短パルス光は高強度にすること

によりBBBの開放が、また低強度にすることにより薬剤動態の観察が可能である。ここで短パルスとは $10^{-9} \sim 10^{-8}$  s (1~10 ns)程度の時間幅を指し、その物理的意味については後述する。

### 2. 研究の目的

本研究は、上述したPMWによるBBB開放技術をグリオーマ(悪性神経膠腫)の抗腫瘍薬治療に応用するための検討を行うことを目的とした。ラットグリオーマモデルを対象にBBBを安全かつ効率的に開放する条件を明らかにするとともに、治療の重要な標的となる浸潤腫瘍細胞に対する薬剤送達効率について評価を行った。またPAT法によりBBB透過薬剤の動態評価を試みた。さらに本BBB開放技術を臨床応用するための要素技術として、深部組織標的化技術、光ファイバーを用いた適用技術につき検討を行った。

### 3. 研究の方法

本研究に関わるすべての動物実験は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会による承認を受けて実施した。

#### (1) PMWの発生

図1にPMWの発生法と典型的な圧力波形を示す。標的組織上にターゲット(天然ゴムシートにポリエチレンテレフタレート板を接着したもの)を置き、高強度ナノ秒532 nm Nd:YAGレーザーを照射すると、レーザーがゴムシートに吸収されてプラズマが生成し、その膨張に伴って圧力波(PMW)が発生する。ナノ秒レーザーパルスは自らが生成したプラズマに吸収され、プラズマの内部エネルギーを増大させるために効率的な圧力発生が可能である。ポリエチレンテレフタレート(PET)板はプラズマを閉じ込めて圧力を高める効果がある。天然ゴムは生体軟組織と音響インピーダンスが近いいため、効率的な圧力伝搬が可能である。PMWはピーク圧力が高いが時間幅が短いため、生体損傷を支配する力積(圧力の時間積分値)が小さく、副作用の少ない適用が可能である。

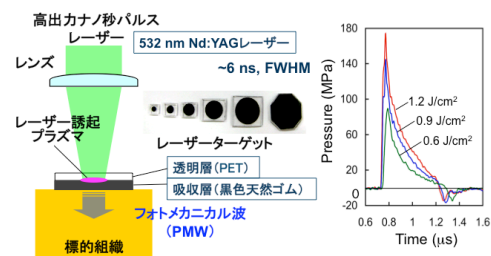


図1 PMWの発生法と典型的な圧力波形。

#### (2) ラットグリオーマモデルを対象としたPMWによるBBB開放実験

ラット脳の両半球にC6グリオーマ細胞を注入して腫瘍を形成後、頭蓋骨を開窓して両半球の脳表上にそれぞれ上記ターゲットを

配置した。ラット尾静脈に模擬薬剤としてエバンスブルー (EB) を注入後、片半球のターゲットのみにレーザー (ビーム直径 5 mm) を照射して PMW を作用させ、反対半球をコントロールとした。4 時間後に脳を灌流固定し、脳組織内の EB の分布を蛍光により評価した。また緑色蛍光タンパク (enhanced green fluorescence protein: EGFP) を発現する C6 グリオーマ細胞を用いたモデルを対象に、浸潤腫瘍細胞への薬剤送達効率につき評価を行った。

### (3) PAT 法による薬剤動態の評価実験

図 2 に PAT 装置のセンサー部の構造を示す。光ファイバーで伝送されたナノ秒パルス光を脳に照射し、発生した光音響信号を超音波センサーで受信した。光音響信号を効率的に発生させるためには、光の時間幅が発生した音響波の散逸時間より十分に短い必要があり (応力閉じ込め条件)、時間幅ナノ秒のパルス光がその条件を満たす。センサーに音響レンズを取り付け、検出領域を限定することにより空間分解能を高めた。センサーの詳細については文献 [雑誌論文③] で述べられている。光源には光パラメトリック発振器を用い、波長 532 nm で血管の分布を、また 670 nm で薬剤 (EB) の分布を画像化した。

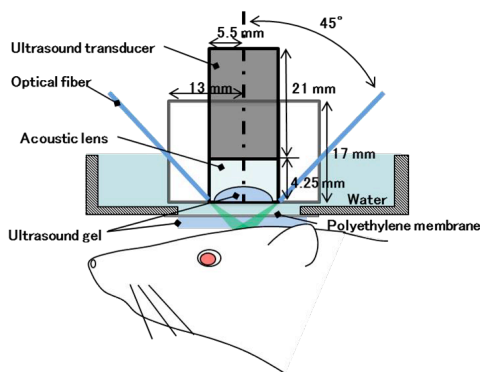


図 2 PAT 装置のセンサー部の構造。

### (4) 臨床応用のための要素技術の検討

PMW による BBB 開放技術を臨床応用するためには、深部組織を標的化する方法、および操作性の高い光ファイバーを用いた PMW 適用法を確立することが必要と考えられるため、これらの要素技術について基礎的な検討を行った。図 3 に深部標的化のための装置図を示す。発生した PMW を市販光学レンズの凹面で反射させて標的の深度において集束させる方式とした。また図 4 に光ファイバー型 PMW 発生装置 (ファイバー先端部にカーボンブラックを添加したシリコンゴムキャップを装着し、同ゴムにレーザーを吸収させて PMW を発生させた。

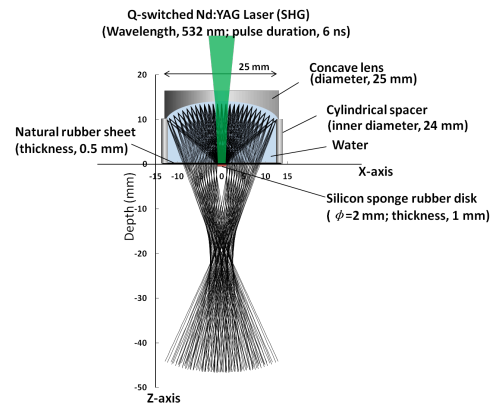


図 3 深部標的化のための装置の構造。

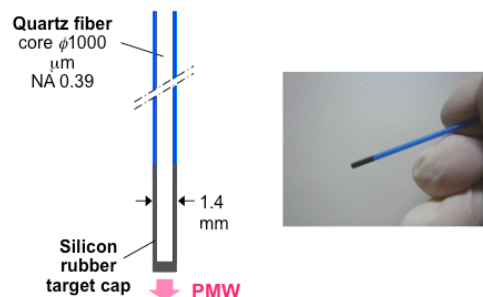


図 4 光ファイバー型 PMW 発生装置 (ファイバー先端部) の構造と写真。

## 4. 研究成果

### (1) ラットグリオーマモデルを対象とした PMW による BBB 開放実験

レーザーフルエンス (ピーク圧力) を変化させて PMW を適用した場合の、ラット脳断面の明視野像、EB の蛍光強度分布、HE (hematoxylin-eosin) 染色画像を図 5 に示す。フルエンスの増大に伴い EB の漏出量すなわち蛍光強度が増大しその領域も拡大しているが、 $0.6 \text{ J/cm}^2$  では硬膜下出血が認められた。このため  $0.4 \text{ J/cm}^2$  を最適条件と判断した。この条件において EGFP 発現グリオーマモデルに対して PMW を適用した場合の、腫瘍中心部と周縁部の境界付近の拡大画像を図 6 に示す。これより PMW の適用により腫瘍周縁部のグリオーマ細胞への薬剤送達が顕著に増大していることがわかった。EB は血

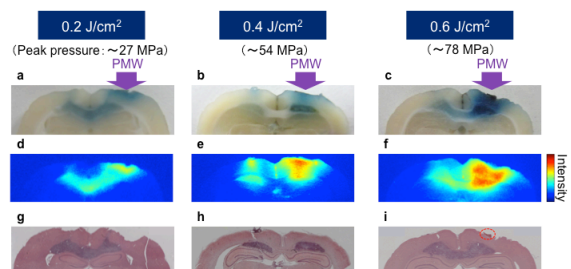


図 5 ラット脳断面の明視野像、EB の蛍光強度分布、HE 染色画像。



中で血清アルブミンと強固に結合することからマクロ分子とみなせる。一般的な抗腫瘍薬ははるかに低分子量であることから、同様の効果が抗腫瘍薬についても得られると期待される。

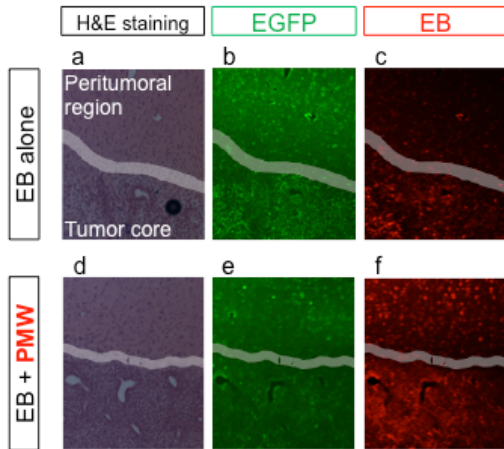


図6 EGFP発現グリオーマモデルに対してPMWを適用した場合の、腫瘍中心部と周縁部の境界付近の拡大画像。

## (2) PAT法による薬剤動態の評価実験

図7にEBを静脈注射したラットの脳にPMWを適用した場合の、血管、EB分布の光音響画像の経時変化を示す。PMW適用部位におけるEBの漏出とその分布の変化を捉えることができた(雑誌論文④)。しかしながら画像化領域は脳表から1~2mmの領域に限られ、より深部の画像化には光の照射法、センサーの性能について再検討する必要があることがわかった。

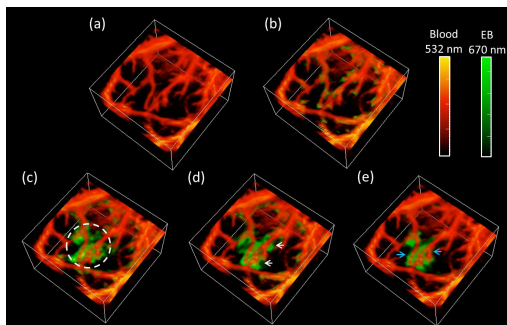


図7 EBを静脈注射したラットの脳にPMWを適用した場合の、血管(赤)、EB(緑)分布の光音響画像の経時変化。白破線の円がPMW適用部を示す。

## (3) 臨床応用のための要素技術の検討

集束装置(図3)を用い、水中の深度20mmを標的としてPMWを集束させたときのシャドウグラフを図8に示す。標的とした深度においてコントラストが最も高くなっており、所望の集束特性が得られていることがわかった(雑誌論文⑤)。

光ファイバー型PMW発生装置(図4)で繰

り返しレーザー照射により発生したPMWの圧力波形の変化を図9に示す。繰り返し照射によりターゲット材が劣化してプラズマ閉じ込め効果が減弱するが、20パルス以上まで薬剤送達に必要な圧力特性が得られることがわかった(雑誌論文⑥)。

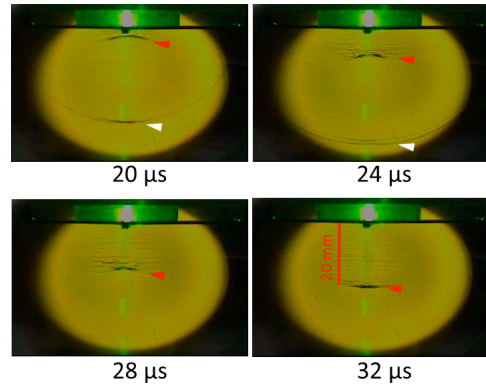


図8 集束装置(図3)を用い水中の深度20mmを標的としてPMWを集束させたときのシャドウグラフ。

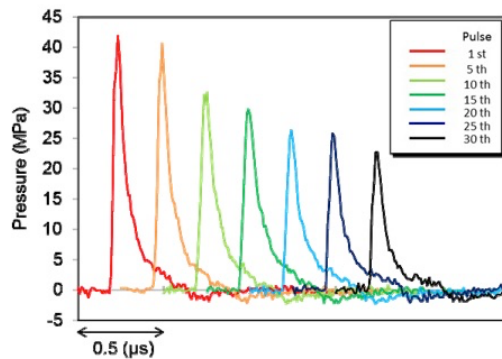


図9 光ファイバー型PMW発生装置(図4)で繰り返しレーザー照射により発生したPMWの圧力波形の変化。

以上より、PMWによるBBB開放技術がラットグリオーマモデルに対する薬剤輸送に有効であることが示され、今後実際の抗腫瘍薬を用いて治療効果の向上を実証する計画である。臨床応用に必要な深部組織標的化技術、光ファイバーを用いたPMW適用技術についても目標とする成果が得られた。一方PAT法による送達薬剤分布の評価については、観測深度を増大させるため、さらなる検討が必要であることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計11件)

- ① Yasuyuki Tsunoi, Shunichi Sato, Satoko Kawauchi, Yusuke Akutsu, Yoshihiro Miyagawa, Koji Araki, Akihiro Shiotani, Mitsuhiro Terakawa: Theranostic system for drug delivery and pharmacokinetic imaging based on

nanosecond pulsed light-induced photomechanical and photoacoustic effects, Jpn. J. Appl. Phys. 54, 116601/1-6 (2015). 査読あり

- ② Shunichi Sato, Ken Yoshida, Satoko Kawauchi, Kazue Hosoe, Yusuke Akutsu, Norihiro Fujimoto, Hiroshi Nawashiro, Mitsuhiro Terakawa: Highly site-selective transvascular drug delivery by the use of nanosecond pulsed laser-induced photomechanical waves, J. Control. Release 192, 228-235 (2014). 査読あり
- ③ Yasuyuki Tsunoi, Shunichi Sato, Ryota Watanabe, Satoko Kawauchi, Hiroshi Ashida, Mitsuhiro Terakawa: Compact acoustic-resolution photoacoustic imaging system with fiber-based illumination, Jpn. J. Appl. Phys. 53, 126701 (6 pages) (2014). 査読あり
- ④ Ryota Watanabe, Shunichi Sato, Yasuyuki Tsunoi, Satoko Kawauchi, Toshiya Takemura, Mitsuhiro Terakawa: Photoacoustic imaging for transvascular drug delivery to the rat brain, Proc. SPIE 9305, 930523 (5 pages) (2015). 査読あり
- ⑤ Takuichirou Shimada, Shunichi Sato, Satoko Kawauchi, Hiroshi Ashida, Mitsuhiro Terakawa: Focusing of photomechanical waves with an optical lens for depth-targeted molecular delivery, Proc. SPIE 8941, 89410B (6 pages) (2014). 査読あり
- ⑥ Koki Nakano, Shunichi Sato, Satoko Kawauchi, Hiroshi Ashida, Izumi Nishidate: Optical fiber-based photomechanical molecular delivery system, Proc. SPIE 8938, 89381J (6 pages) (2014). 査読あり

〔学会発表〕 (計 29 件)

- ① 佐藤俊一: フォトメカニカル波 (ナノ秒パルスレーザー誘起圧力波) による in vivo 薬剤・遺伝子デリバリー, 遺伝子・デリバリー研究会第 14 回夏期セミナー (阿蘇いこいの村, 熊本県阿蘇市, 2014 年 8 月), 要旨集 特別講演 2.
- ② Shunichi Sato: Targeted delivery and controlled release of molecules by the use of photomechanical waves, Biomedical Imaging and Sensing Conference 2014 (Pacifico Yokohama, Kanagawa April, 2014), BISC1-2.
- ③ 佐藤俊一: パルスレーザーの機械的作用を用いた高機能分子デリバリーシステム, 第 79 回レーザー加工学会 (関西大学, 大阪府吹田市, 2013 年 5 月), 第 79 回レーザー加工学会講演論文集, 3-8.

〔図書〕 (なし)

〔産業財産権〕 (なし)

〔その他〕 (なし)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 俊一 (SATO, Shunichi)  
防衛医科大学校・その他部局等・准教授  
研究者番号: 90502906

### (2) 研究分担者

佐藤 泰司 (SATO, Yasushi)  
防衛医科大学校・その他部局等・准教授  
研究者番号: 10505267

川内 聡子 (KAWAUCHI, Satoko)  
防衛医科大学校・その他部局等・助教  
研究者番号: 20506505