

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26242053

研究課題名(和文)超音波による微小気泡の凝集体形成を利用した生体内細胞デリバリー技術の創成

研究課題名(英文) Establishment of in vivo cell delivery technique using bubble aggregation under ultrasound exposure

研究代表者

榎田 晃司 (Masuda, Kohji)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60283420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、細胞に特異的に付着する受容体を用い、細胞を包含した微小気泡の凝集体を形成した。さらに音響放射力を利用して細胞を運搬するための基本的な技術を開発した。微小気泡と細胞はそれぞれ別々の波長で励起発光するように染色した。水槽中に設置された複数の超音波音源からの音波が、蛍光顕微鏡の同一視野内に焦点を形成するような実験系を構築した。形成した音場中の空間的形狀や位置を視野内で変化させ、凝集体の動態を画像処理により追跡した。その結果、微小気泡の破壊を押さえることにより、凝集体を制御可能な持続時間を向上させることに成功した。また、超音波照射位置精度を動物実験によって検証し、その有効性を確認した。

研究成果の概要(英文)：We confirmed the controllability of aggregation of cells with bubbles compared with those without bubbles. However, because of the destruction of bubbles under continuous ultrasound exposure, there is a compatibility problem between controllability and duration of aggregation. Therefore, we prepared various shapes and motions of acoustic field to investigate the mobility of aggregations. The cells and bubbles were previously dyed with fluorescent probes to distinguish them in fluorescence observation. The displacement length of the aggregations of interest was calculated from successive fluorescent images. When bubbles were exposed to high pressure sound, we found that the destruction of bubbles caused the motion deceleration of the aggregation. When bubbles were trapped in low pressure sound, we succeeded in the longer motion of aggregations. Also, we confirmed the effectiveness of ultrasound positioning through the experiments using animals.

研究分野：医用生体工学、医用超音波

キーワード：治療用細胞 微小気泡 音響放射力

### 1. 研究開始当初の背景

近年、治療のために特別に調製した細胞を患者に注入し、ガン等の疾患を抑え込む細胞移植治療が活発に行われている。例えば造血幹細胞移植は、ドナーから抽出した造血幹細胞を患者に輸注して置き換える手法であり、免疫細胞療法は、患者自身から抽出した細胞の免疫力を人工的に強化して体に戻す方法である。特定の臓器、例えば肝臓を対象とした細胞移植では、肝硬変の患者に対して骨髄間葉系幹細胞を輸注することによる線維化の改善や、肝移植においてドナー由来のNK細胞を活性化した後レシピエントに輸注する抗ガン免疫療法が報告されている。このような細胞移植治療では、移植細胞が標的部位に定着して直接機能し始めることが期待される一方、血行性に移植された細胞は基本的に全身に拡散するため、カテーテルの接近が困難な部位では血流に任せる以外に送達手段が無い。そのため、実際の細胞移植治療は単独ではその効果に限界があり、分子標的薬などが併用されているのが現状である。

ところで研究代表者はこれまで、超音波による音響放射力が及ぼす空間(超音波音場)を局所的に形成することによって、比重の軽い微小気泡(直径 0.5~数  $\mu\text{m}$ )を生体内で能動的に誘導制御する新しい治療技術の開発を行ってきた。連続的に細分岐する人工血管モデルにおいて、微小気泡の懸濁液を通過させ、音響放射力によって特定の経路に多くの微小気泡を誘導制御することに成功している。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が行ってきた超音波による微小気泡の動態制御法を応用し、治療の主角となる移植細胞を生体内の血管網を経由して運び届ける「細胞デリバリー技術」を創成し、微小気泡と超音波を用いた新たな治療法として確立することを目的とする。移植細胞そのものは比重が大きく、音響放射力が十分に作用しないため、細胞の周囲に微小気泡を取り付くように凝集体を形成する。

本研究の最終目標は、図1のように生体外で製造された移植細胞を含んだ微小気泡凝集体を、生体内に輸注した後、血管構造のモニタリングは3次元血管構造解析法を活用し、その情報に従って3次元超音波音場分布を形成し、音響放射力によって凝集体を標的部位まで誘導することである。

標的部位では音響放射力を凝集体の捕捉に作用させ、蓄積を確認した暁には、微小気泡を高音圧の超音波で段階的に破壊し、微小気泡が包含する薬剤の効果も併用し、移植細胞の徐放をコントロールする。本手法の発展により、同治療における投与効率の欠点を克服し、薬物との連携を様々に設定できる新しい治療法の可能性が拓ける。

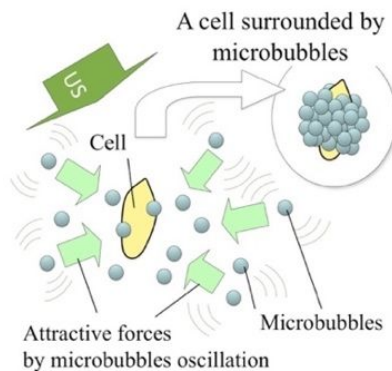


図1 細胞—微小気泡凝集体形成の模式図

### 3. 研究の方法

本研究では、マウス由来の Colon-26 細胞と、それに特異的に付着するトランスフェリンを表面に付着させた微小気泡リポソームを用いた。細胞への微小気泡の接着を促進するため、専用のチャンバによって懸濁液中に均一に超音波を照射した。細胞と微小気泡はそれぞれローダミン、DiO と呼ばれる染色を施すことにより、蛍光顕微鏡での観察下で別々の波長で励起発光させる。

生理食塩水中にて微小気泡と細胞の懸濁液を調整し、1 MHz の連続波超音波を照射して凝集体を形成した。その凝集体をチャンバから取り出し、生理食塩水で薄めて懸濁液を作成した。図2に示すように、ポリエチレングリコールモノメタクリレート(PEGMA)で製作された平板流路を水槽の水面に設置し、水中に設置したトランスデューサにより超音波を照射すると共に、焦点領域を蛍光顕微鏡によって観察する実験系を構築した。

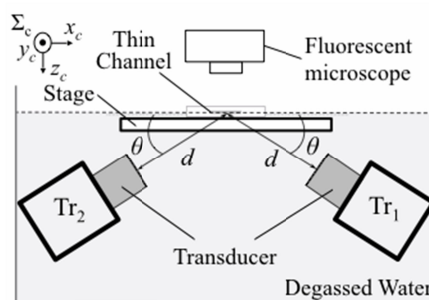


図2 水面の流路中の凝集体に対する音波照射系

上述した微小気泡や細胞の誘導制御を将来的に生体応用するためには、標的部位の血管網情報を事前に把握することに加え、超音波トランスデューサを把持し、体表面上で安定的に固定しつつ、位置指令に追従する機械制御技術が不可欠である。そこで過去に開発した超音波診断用パラレルリンク型ロボットの構成を発展させ、超音波器具の位置制御を行った。同ロボットには6軸力センサが搭載され、超音波器具の自重を考慮した位置-力制御法を提案した。また接触対象の力学的

特性に応じた制御パラメータの最適化を検討した。

#### 4. 研究成果

図2の実験系にて、2つの音波を干渉させ、さらにその音波の位相を変調させて空間的な移動を生成し、音波の動きに対する凝集体の挙動を観測した。2つの音源の周波数を5 MHzに統一し、最大音圧250 kPa-ppの定在波を45  $\mu\text{m/s}$ の速度で周期的な運動をさせた場合の凝集体の平均位置と、比較対象としての細胞のみの場合の平均位置を図3に示す。これより、同条件での超音波照射に対して、明らかに凝集体の制御能が高いことが示された。

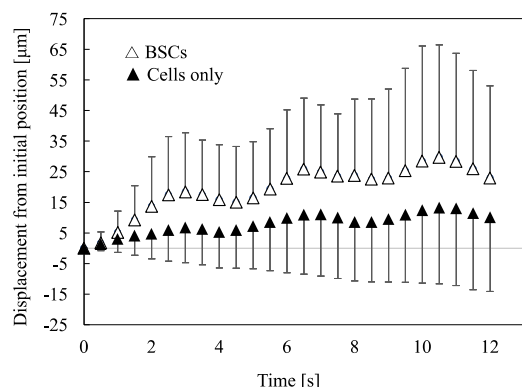


図3 定在波の周期的変動に対する凝集体および細胞の位置変化

続いて、Y字形状の分岐を有する人工血管流路を用いて、流体中の細胞—微小気泡凝集体を誘導する実験を行った。まず内径1.4 mmから2本の内径1.0 mmの流路 Path A および Path B に分岐する人工流路（分岐角90 deg）を製作し、凝集体を目的の流路へ押し出した。照射超音波の中心周波数は5 MHzであり、分岐部分を通過する凝集体の様子を図4に示す。

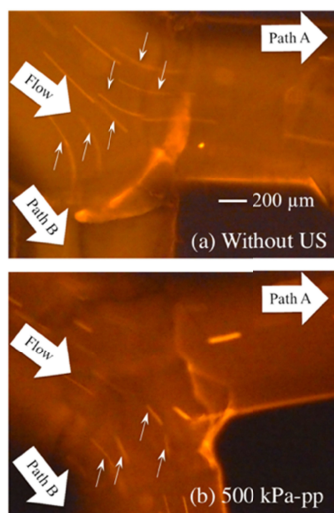


図4 Y字分岐流路における細胞の挙動：(a)超音波照射無し (b)連続超音波による誘導中

ここでは毎秒30フレームで撮影している

ため、細胞の動きは軌跡として捉えられる（図中の矢印）。超音波照射の無い(a)では、細胞が Path A, Bの両方の流路を通過しているが、(b)では最大音圧は連続超音波を照射中の様子であり、明確に Path B側に多くの細胞が流入していることが分かる。下流側で凝集体を回収し、それらの蛍光輝度の差から誘導性能を比較したところ、照射音波の音圧に比例して、誘導効率が向上する事が分かった。

前述のロボットを用いて、音波照射精度を検証する実験を行った。ロボットには中心周波数5 MHzの超音波音源を把持させた上で動作を行い、ニードル型ハイドロフォン（HNR-0500, ONDA）で音圧の空間分布を計測した。接触力制御および姿勢補正制御を実施し、ハイドロフォンの感度分布からビーム幅方向誤差と、音軸方向誤差を計測した。その結果、姿勢補正制御の導入により、位置誤差を約0.7 mmに押さえることに成功した。

以上のシステムを用いて、生体の血管に対し超音波照射を実施し、体内における超音波照射精度の検証を行った。図5に示すように、麻酔下のウサギの耳を固定し、脱気水で満たした水を介して耳の血管の分岐部に超音波照射するように超音波音源を把持したロボットを駆動させた。幅1.5 mm程度の血管を目標位置と設定し、トランスデューサの移動後、検証用の微小気泡を注入し、トランスデューサより超音波を照射した。その結果を超音波診断機にて分岐後の血管をBモードで観測した。図6に示すように、超音波を照射に同期して輝度値が変化した。これは超音波が血管に正確に照射されたことにより、血管内の微小気泡に変化があったことを示す。本結果は、1.5 mm以下の精度で位置決めが実施できたことを示すと考えられる。



図5 ウサギを用いた実験の様子

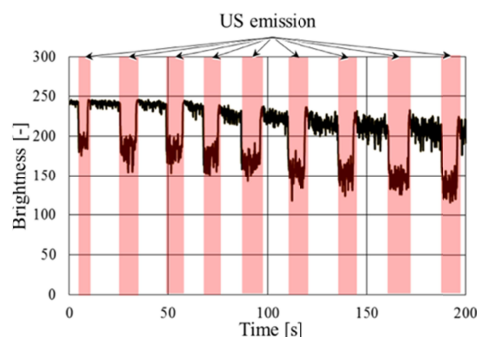


図6 断続的な照射超音波に対する血管内の輝度の時間変化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. R.Oitate, A.Shimomura, H.Wada, T.Mochizuki, K.Masuda, Y.Oda, R.Suzuki, and K.Maruyama: "Validation of tracking performance of cell-microbubble aggregation versus variation of acoustic field," Jap. J. Applied Physics, 56, 2017 (in press) (査読有)
2. 榎田晃司、保坂直斗、出町文、宮澤慎也、澤口冬威、夏目薫、望月剛: 音響放射力を利用した微小気泡および細胞の生体内デリバリーを目指して、STATE OF THE ART 超音波診断・治療支援システム開発の最先端、超音波医学, 2016 (オンライン DOI: 10.3179) (査読有)
3. 小井土悳、和田洗、保坂直斗、望月剛、榎田晃司、小田雄介、鈴木亮、丸山一雄: 超音波音場に対するバブルリポソームの誘導制御能の血液中での検証、超音波医学、43, pp.639-648, 2016 (査読有)
4. H.Wada, J.Koido, S.Miyazawa, T.Mochizuki, K.Masuda, J.Unga, Y.Oda, R.Suzuki and K.Maruyama: "Experimental analysis of behavior in nanobubbles using echograms under ultrasound exposure," Jap. J. Applied Physics, 55, 07KF06, 2016 (査読有)
5. 夏目薫、和田義久、小野木真哉、望月剛、榎田晃司: パラレルリンクロボットを用いた患者体表面における超音波治療器具の面接触制御、日本コンピュータ外科学会誌、17, pp.343-354, 2016 (査読有)
6. 榎田晃司、小野木真哉、吉永崇: 超音波診断・治療器具の光学的三次元位置トラッキングとその応用、超音波テクノ、28, pp.5-9, 2016 (査読無)
7. F.Demachi, Y.Murayama, N.Hosaka, T.Mochizuki, K.Masuda, S.Enosawa, T.Chiba, Y.Oda, R.Suzuki, K.Maruyama: "Preliminary study to form microbubbles-surrounded cells as carrier for cellular therapy and evaluation of controllability with fluorescence imaging," Jap. J. Applied Physics, 54, 07HF19, 2015 (査読有)
8. 澤口冬威、保坂直斗、江田廉、小野木真哉、望月剛、榎田晃司: 3次元超音波音場の時分割送信による微小気泡の局所的捕捉効率向上のための実験的検討、生体医工学、53, pp.179-186, 2015 (査読有)
9. 夏目薫、入澤佐智恵、小野木真哉、望月剛、榎田晃司: パラレルリンク型ロボットによる超音波治療デバイスの位置および接触力のハイブリット制御システムの開発、生体医工学、Vol.53, No.1, pp.21-31, 2015 (査読有)
10. S.Onogi, T.H.Phan, T.Mochizuki, and K.Masuda: "Automatic Doppler Volume Fusion of 3D Ultrasound using Point-based Registration of Shared Bifurcation Points,"

Advanced Biomedical Eng., 4, pp.27-34, 2015 (査読有)

11. 榎田晃司、保坂直斗、出町文、小井土悳、ファントゥアンフン、澤口冬威、鶴井信宏、宮澤慎也、村山優太、山下智己、和田洗、小野木真哉、望月剛: マイクロバブルを用いた超音波セラノスティクスの実現を目指して、メディカルイメージング, 3, pp.45-52, 2015 (査読無)

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 古谷飛鳥、和田洗、鈴木俊哉、追立理喜、望月剛、榎田晃司、Johan Unga、小田雄介、鈴木亮、丸山一雄: 「音響放射力分布の時間変化を利用したナノバブルの局所的濃度操作法の実験的検証」、日本超音波医学会 第 90 回学術集会、2017 年 5 月、栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)
2. 榎田晃司、追立理喜、下村明栄、和田洗、望月剛、小田雄介、鈴木亮、丸山一雄: 「音場分布の空間移動に対する細胞-微小気泡凝集体の挙動観測とその解析」、日本超音波医学会 第 90 回学術集会、2017 年 5 月、栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)
3. 木村允俊、山下智己、望月剛、榎田晃司、絵野沢伸: 「B モード及びドプラモードボリューム中の 3 次元血管構造の比較検証のためのファントムの製作」、日本超音波医学会 第 90 回学術集会、2017 年 5 月、栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)
4. K.Masuda, R.Oitate, A.Shimomura, T.Sawaguchi, T.Mochizuki: "Possibility of active induction of bubble-surrounded cells in flow under ultrasound exposure," 9th Biomedical Eng. Int'l Conf.e, Nov. 2016, Luang Prabang (Laos)
5. K.Masuda, K.Natsume, Y.Wada, S.Irisawa, and Sh.Onogi: "Development of Robotic System with Optical Position Sensing for Ultrasound Theranostics," Int'l Conference on Biomedical Eng., Oct. 2016, Yogyakarta (Indonesia)
6. K.Masuda, T.Sawaguchi, H.Wada, R.Oitate, T.Mochizuki, S.Enosawa, Y.Oda, R.Suzuki, and K.Maruyama: "Active control of nanobubble-surrounded cells propelled by acoustic radiation force with verification of frequency dependence," IEEE Int'l Ultrasonics Symp., Sep. 2016, Tours (France)
7. K.Masuda, S.Miyazawa, H.Wada, T.Kurokawa, K.Natsume, Y.Wada, and T.Mochizuki: "Active induction of bubble liposome at the bifurcation of in vivo blood vessel with optical measurement and robotic positioning," IEEE Int'l Ultrasonics Symp., Sep. 2016, Tours (France)
8. 和田義久、夏目薫、川本祥太郎、望月剛、榎田晃司: パラレルリンク型ロボットを用いた生体内における微小気泡の動態制御実験、第 34 回日本ロボット学会、2016 年

- 9月、山形大学(山形市)
9. 和田洸、宮澤慎也、望月剛、榎田晃司、Johan Unga、小田雄介、鈴木亮、丸山一雄：音響放射力形成によるナノバブルの超音波断層像を用いた挙動解析、日本超音波医学会第89回学術集会、2016年5月、京都国際会館(京都市)
  10. 和田洸、小井土惇、宮澤慎也、望月剛、榎田晃司：生体内での血流中における音響放射力形成によるナノバブルの動態制御、日本超音波医学会第89回学術集会、2016年5月、京都国際会館(京都市)
  11. 澤口冬威、追立理喜、水口草太郎、望月剛、榎田晃司：細胞を包含した微小気泡凝集体の超音波照射下での制御持続性の検討、日本超音波医学会第89回学術集会、2016年5月、京都国際会館(京都市)
  12. 追立理喜、澤口冬威、望月剛、榎田晃司：照射超音波の条件に対する細胞-微小気泡凝集体の制御能の検証、第55回日本生体医工学会大会、2016年4月、富山国際会議場(富山市)
  13. T.Sawaguchi, F.Demachi, Y.Murayama, R.Oitate, S.Minakuchi, T.Mochizuki and K.Masuda: "Active control of cell with microbubbles for cellular immunotherapy by acoustic force," 8th Biomedical Eng. Int'l Conference, 2011, Pattaya (Thailand)
  14. K.Natsume, S.Onogi, T.Mochizuki, and K.Masuda: "Robotic control of therapeutic device on body surface considering contact force and moment," 8th Biomedical Eng. Int'l Conf., 2015, Pattaya (Thailand)
  15. K.Masuda, J.Koido, S.Miyazawa, H.Wada, N.Hosaka, and T.Mochizuki: "Active induction of in vivo microbubbles by acoustic radiation force at the bifurcation of blood vessel and its evaluation," Int'l Conf. of the IEEE Eng. in Medicine and Biology, 2015, Milan (Italy)
  16. 和田洸、小井土惇、宮澤慎也、望月剛、榎田晃司：生体内での血流中における音響放射力形成によるバブルリポソームの動態制御、日本超音波医学会第27回関東甲信越地方会、2015年11月、TFT会館(東京都江東区)
  17. 山下智己、ファントゥアンフン、小野木真哉、望月剛、榎田晃司：Bモードとドプラモードの3次元重みづけ融合による血管網情報の再構築、第24回日本コンピュータ外科学会大会、2015年11月、東京大学(東京都文京区)
  18. 榎田晃司、出町文、村山優太、保坂直斗、望月剛、絵野沢伸、千葉敏雄、小田雄介、鈴木亮、丸山一雄：超音波による細胞治療のための微小気泡凝集体の形成法と蛍光観測による制御性の評価、日本超音波医学会第88回学術集会、2014年5月、パシフィコ横浜(横浜市)
  19. 宮澤慎也、保坂直斗、和田洸、望月剛、榎

- 田晃司：位相差を伴う複数焦点音場の時分割送信による微小気泡の制御法の検討、日本超音波医学会第88回学術集会、2014年5月、パシフィコ横浜(横浜市)
20. 澤口冬威、保坂直斗、宮澤慎也、望月剛、榎田晃司、小田雄介、鈴木亮、丸山一雄：治療用バブルリポソームの生体内血管中での捕捉のための超音波照射条件の検討、日本超音波医学会第88回学術集会、2014年5月、パシフィコ横浜(横浜市)
  21. 夏目薫、小野木真哉、望月剛、榎田晃司：患者体表における反力・モーメントを考慮した超音波治療器具の接触制御、日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会、2014年5月、富山総合体育館(富山市)
  22. 和田洸、小井土惇、宮澤慎也、望月剛、榎田晃司：バブルリポソームの血流中誘導のための超音波照射の実験的検討、第54回日本生体医工学会大会、2014年5月、名古屋国際会議場(名古屋市)
  23. 小野木真哉、呉佳蔚、馬場稔、橋爪誠、榎田晃司：超音波直交二断面画像を用いた空気圧駆動超音波プローブ走査機構による目標物体の追従制御、第54回日本生体医工学会大会、2014年5月、名古屋国際会議場(名古屋市)
  24. 小野木真哉、ファントゥアンフン、山下智己、橋爪誠、榎田晃司：三次元超音波画像における血管網情報抽出と補正、第54回日本生体医工学会大会、2014年5月、名古屋国際会議場(名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 1 件)

名称：微小気泡担持複合体、微小気泡担持複合体の製造方法、微小気泡担持複合体の動態制御方法、及び医薬組成物

発明者：榎田晃司、望月剛、出町文

権利者：東京農工大学

種類：特許

番号：特開2016-199520

取得年月日：2016年12月1日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~masuda>

6. 研究組織

(1)研究代表者

榎田晃司 (MASUDA, Kohji)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授  
研究者番号：60283420

(2)研究分担者

丸山一雄 (MARUYAMA, Kazuo)

帝京大学・薬学部・教授  
研究者番号：30130040

(3) 研究分担者

鈴木亮 (SUZUKI, Ryo)  
帝京大学・薬学部・准教授  
研究者番号：90384784

(4) 研究分担者

千葉敏雄 (CHIBA, Toshio)  
日本大学・総合科学研究所・教授  
研究者番号：20171944

(5) 研究分担者

山下紘正 (YAMASHITA, Hiromasa)  
日本大学・総合科学研究所・准教授  
研究者番号：00470005

(6) 研究分担者

絵野沢伸 (ENOSAWA, Shin)  
国立成育医療研究センター・先端医療開発  
室・研究員  
研究者番号：40232962

(7) 研究分担者

安井久一 (YASUI, Kyuichi)  
産業技術総合研究所・先端製造プロセス部  
門・研究員  
研究者番号：30277842