

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670303

研究課題名(和文) 高圧過飽和溶液を利用した革新的な超音波診断造影剤の開発

研究課題名(英文) Supersaturated water as a novel ultrasound contrast agent

研究代表者

立花 克郎 (TACHIBANA, Katsuro)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40271605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、飽和溶解量以上に気体を溶解させた水(高圧過飽和溶液)に超音波を付与することで微細な気泡を生成できる現象に着目し、過飽和溶存水を併用した超音波薬物導入方法の検討を行った。超純水を0.5MPaに加圧して過飽和溶存水を作成した。白血病リンパ球HL60細胞混濁液を過飽和溶存水に混合し超音波を照射した。照射後、Propidium Iodide (PI)及びトリパンブルー色素により染色を行い、細胞内への薬物導入能及び、細胞生存率の評価を行った。超音波と過飽和溶存水との併用によりPIで染色された生細胞数の増加が見られ、高圧過飽和溶液は細胞に影響を与えた。また、超音波診断装置で造影効果も認められた。

研究成果の概要(英文)：High pressure supersaturated water was produced and ultrasound was irradiated. As a result, very small micro-sized bubble formed within the liquid. Water pressurized to 0.5MPa in combination with air was made to a supersaturated water condition. The water was added to HL-60 leukemia cell in combination with PI staining agent and trypan blue stain. After ultrasound exposure, the cell showed uptake of the two stain which suggests that the micro-sized bubble contributed to this phenomenon. It was suggested that ultrasound delivered drugs within the cell without cell killing. The microbubbles also showed high acoustic signals using conventional ultrasound diagnostic device. Supersaturated water might be useful as a ultrasound contrast agent as well as drug delivery agent.

研究分野：超音波医科学

キーワード：バブル 超音波 造影剤

1. 研究開始当初の背景

超音波の医療への応用は、超音波画像診断のみならず超音波メスや近年では HIFU など治療の分野にも広がっている。Feshheimer らが 1987 年に哺乳動物への超音波を用いた遺伝子導入を成功させるなど、1990 年代には超音波エネルギーの非温熱効果と薬物を併用する全く新しい“超音波・薬物効果促進作用”が発見され超音波治療の可能性が期待されている。この超音波により細胞膜に一時的に“孔”をあけ一過性の薬物透過促進現象は Unger らによりソノポレーションと名づけられている。ソノポレーションにより分子量の大きい物質を細胞内に取り込ませることが可能であることを報告している。ソノポレーションにマイクロバブルを添加することにより、より低い超音波エネルギーで導入効率が格段に向上することが発見されてからは多くの研究でマイクロバブルを添加している。近年ではバブルの殻の素材をリポソームとしてその中に造影ガスを封入したバブルリポソームが開発されており、リポソームに標的指向性のある分子などを修飾することにより目的部位への到達性の向上も確認されている。リポソームは細網内皮系に捕捉されるため血中安定性、滞留性に乏しく PEG などによる修飾が必要である。一方、シェルのないマイクロバブルは強力超音波によるキャビテーションにより極めて微細な気泡が発生することが知られおり、溶存気体の飽和度が高いほど発生しやすい。ある程度の高圧下で気体を溶解させた溶存気体過飽和な状態の高圧過飽和溶存水を生成し、圧力変化を付与することでマイクロバブルを発生させることができる。このマイクロバブルの造影効果と細胞への影響を調べた研究は今まで報告されていなかった。

2. 研究の目的

これまでに、マイクロバブルを併用した超音波薬物導入方法が報告されている。本課題では、飽和溶解量以上に気体を溶解させた水（過飽和溶存水）に超音波を付与することで微細な気泡を生成できる現象に着目し、過飽和溶存水を併用した超音波薬物導入方法の基礎検討とその造影効果を調べた。

3. 研究の方法

超純水を 0.5MPa に加圧して空気を溶解させた高圧過飽和溶存水を作成した。超純水と空気を回転数 1725rpm の自給式ロータリーベーンポンプ (OM4-MDG-045 (オーラテック社)) により混合し加圧を行った。加圧後、溶存気体の気泡化を防ぐため、チューブにより緩やかに常圧まで減圧することで過飽和溶存水を作成した。作成した過飽和溶存水はスターラーとともに袋に密封し、2 時間、加温、攪拌した後に常温にて静置しその気体発生量の測定を行った。白血病リンパ球 HL 60 細胞混濁液 (最終濃度が  $5.0 \times 10^6$ ) を過飽和

溶存水で作成した培地と混合し、超音波 (1 MHz, 0.1 および 1 W/cm<sup>2</sup>) を 10 秒間照射した。照射後、Propidium Iodide (PI) 及びトリパンプルー色素により染色を行い、細胞内への薬物導入能及び、細胞生存率の評価を行った。超音波照射と過飽和溶存水との併用により PI で染色された生細胞数の増加を蛍光顕微鏡で観察した。また、高速度カメラにより超音波付与時の細胞を観察した。超音波造影剤の効果は VSCAN (GE ヘルスケア) のポータブル超音波診断装置で観察した。

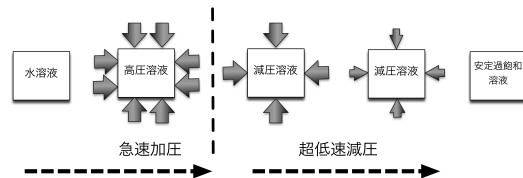


Fig.1

過飽和溶液の機械的刺激による微小気泡の発生

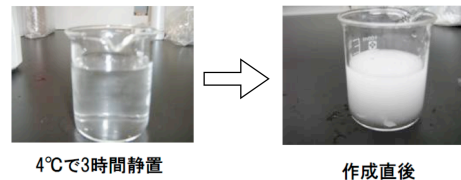


Fig.2

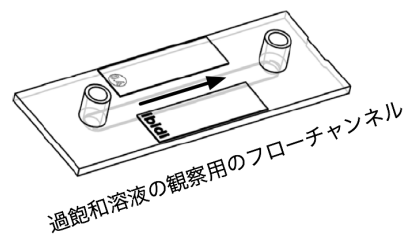


Fig.3

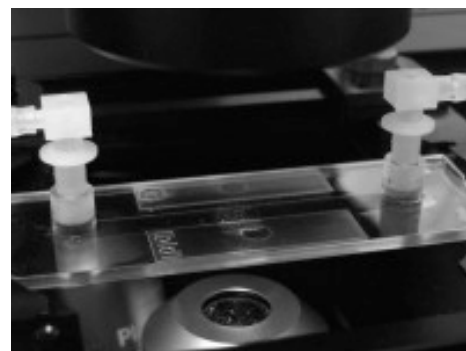


Fig.4

#### 4. 研究成果

高圧過飽和溶存水を使用した培養液において超音波を照射した細胞では、TBで染色は認められなかった。一方、PIに染色された細胞が一部（5%以下）認められたが、超純水を使用したサンプル群においては、TBに染色はまったく観察されなかった。PIに染色された細胞はほとんど見られなかった。PIは、細胞内の2本鎖DNAと結合して蛍光を供することから、TBに染色されず、PIに染色された細胞は、PIが細胞内に導入された生細胞と考えられた。

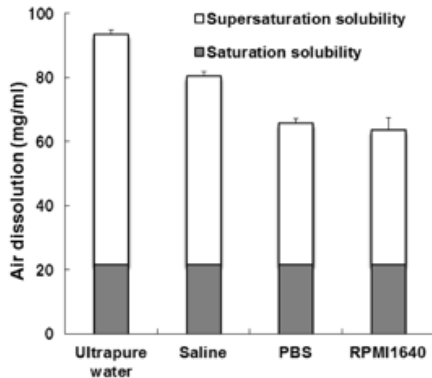


fig 1 高圧過飽和溶液内に溶存しているガスの量

次に超音波強度とPIとTrypan blueの染色率の関係を調べた。超音波の音響強度が0.1 W/cm<sup>2</sup>および1 W/cm<sup>2</sup>の場合のいずれも、過飽和溶存水の使用により、PIの導入効率は有意に上昇した。また、1 W/cm<sup>2</sup>の超音波照射では約5%の細胞にPIが導入された。

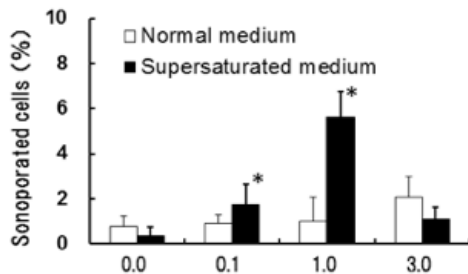


fig 2 薬物流入細胞%と超音波照射強度の関係

超音波照射強度と細胞生存率の比較では、高圧過飽和水のグループで明らかに超音波細胞殺傷率の上昇が認められた。高圧過飽和溶液がキャビテーションの核となって、細胞膜に影響を与えたものと考えられた。

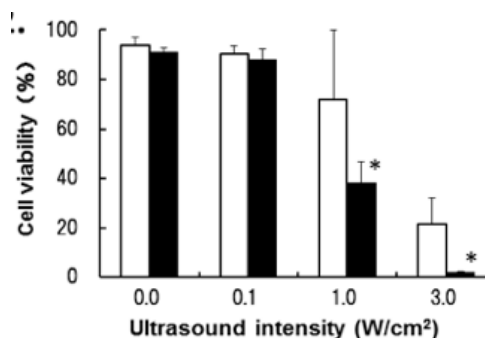


fig 3 超音波強度と細胞生存率の関係

超音波造影剤としての高圧過飽和溶液はVSCANの画像からhigh echo signalが認められた。動物実験での検討が必要であるが、超音波造影効果が強く示唆され、今後の超音波造影剤としての研究開発が期待される。

#### 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1件)

- 超音波遺伝子導入法の原理と方法  
SURGERY FRONTIER 立花克郎  
22(1):69-72, 2015(査読有)

[学会発表] (計5件)

- 異なる周波数掃引超音波の照射による癌細胞殺細胞効果の比較 第14回日本超音波治療研究会 (JSTU) 渡邊晶子、ムサビ N.S.、遠藤日富美、フェリル ロリト、立花克郎 高知 11/28, 2015
- 「革新的な診断治療用バブル薬剤の新しい製造方法の研究開発」立花克郎 福岡大学新技術説明会 東京 JST 6/11, 2015
- 第26回日本心エコー図学会学術集会「そこまで来た超音波治療」立花克郎、北九州国際会議 3/26-28, 2015
- 第17日本栓子検出と治療学会 分子診断治療の今後の展望 立花克郎 福岡市 10/4-5, 2014

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.fukuoka-u.ac.jp/research/data/researcher.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立花 克郎 (TACHIBANA Katsuro)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40271605

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：