

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12733

研究課題名（和文）新規超音波造影剤と高密度焦点式超音波(HIFU)を用いた低侵襲治療システムの開発

研究課題名（英文）Development of minimally invasive drug delivery system using novel microbubble and high-intensity focused ultrasound (HIFU)

研究代表者

蘆田 玲子 (Ashida, Reiko)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90570581

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：我々の研究は、超音波とマイクロバブルを用いた新規ドラッグデリバリーシステムの開発を目的としています。超音波のキャビテーションやソノポレーションを活用し、腫瘍への薬剤到達を効率化し、抗腫瘍効果を向上させることを目指しています。具体的には、(A)相変化ナノ液滴(PCND)と高強度集束超音波(HIFU)の併用、(B)新規治療用マイクロバブルと超音波を用いた膵癌治療を行っています。進捗として、ブタにおけるPCNDと小型HIFUを用いた組織融解の実証、担癌マウスにおけるGemcitabineとマイクロバブル併用療法の抗腫瘍効果の検証を行い、いずれも良好な結果を得て学会発表と論文化を行いました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超音波とマイクロバブル(MB)を用いた新規ドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発を目的とし、癌治療の効果を大幅に向上させる可能性を秘めている。学術的意義として、キャビテーションやソノポレーションといった超音波の機械的作用を利用したDDSの効率化は、薬剤の腫瘍への到達率を高め、副作用を低減する新しい治療法の確立に貢献する。社会的意義としては、膵癌などの難治性癌に対する治療効果を向上させることで、患者の生存率を向上させ、治療の負担を軽減することが期待される。特に、相変化ナノ液滴(PCND)とHIFUの併用技術や新規治療用MBを使用した膵癌治療の実証は、臨床応用への道を拓く重要なステップとなる。

研究成果の概要（英文）：Our research aims to develop a novel drug delivery system using ultrasound and microbubbles. We aim to utilize ultrasound cavitation and sonoporation to improve the efficiency of drug delivery to tumors and enhance anti-tumor effects. Specifically, we are (a) combining phase change nano-droplets (PCND) with high-intensity focused ultrasound (HIFU) and (b) using novel therapeutic microbubbles and ultrasound to treat pancreatic cancer. As progress, we have demonstrated tissue melting using PCND and small HIFU in pigs and verified the anti-tumor effect of the combination therapy of gemcitabine and microbubbles in cancer-bearing mice, both with favorable results, which were presented at academic conferences and published in papers.

研究分野：医用システム関連

キーワード：マイクロバブル 膵癌 超音波 高強度集束超音波(HIFU) キャビテーション

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の研究の目的は超音波とマイクロバブルを用いてキャビテーションやソノポレーションといった超音波による機械的作用を用いて Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果を増強させ、抗腫瘍効果の向上および腫瘍への効率的な薬剤到達を目的としたドラッグデリバリーシステムを構築することである。

### 2. 研究の目的

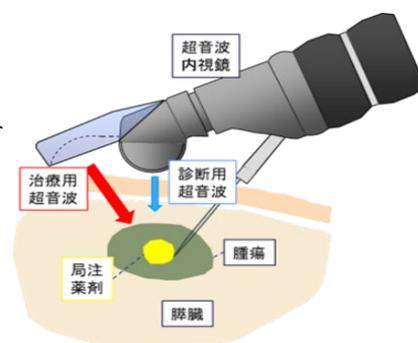
本研究では以下の新規治療用マイクロバブルを用いた超音波治療法の開発を目的としている。(A) マイクロバブルを圧縮することにより液滴化することで局注が可能となった相変化ナノバブル (phase change nano droplet: PCND) と市販の超音波内視鏡に装着可能な小型 High Intensity Focused Ultrasound (EUS-HIFU) を併用したヒストトリプシーに準じた組織破壊を主とする超音波の機械的作用を用いた新規治療法における有用性と安全性を検証することである。(B) 体表超音波と新規治療用マイクロバブルを使用して、膵臓細胞に対する Gemcitabine との併用療法における EPR 効果を用いた抗腫瘍効果の上乗せ効果を in vivo で検証し、その安全性を評価することである。

### 3. 研究の方法

#### (A)

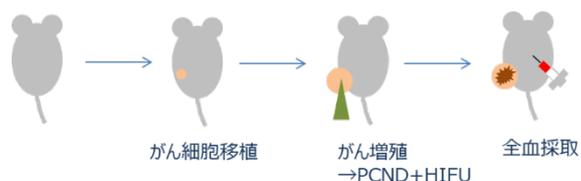
##### (1) EUS-HIFU+PCND を用いたヒストトリプシーの検証

これまでマウスなどの小動物で示してきた治療コンセプトを大型動物を用いて検証する。まず麻酔下でブタの肝臓や膵臓内へ PCND を経胃的に超音波内視鏡下で局注する。その後 EUS-HIFU を用いて経消化管的に局注部位を照射し、組織融解が可能かどうか検証した。



##### (2) 安全性の検証

大腸がんモデルである Colon26 をマウスに皮下移植し、PCND を腫瘍に直接局所投与したのちに HIFU を照射させ、腫瘍抗原である Fn14 の血中変化を測定し、治療によって血中内に腫瘍抗原が増加するかどうかを検証した。コントロールとしては circulating tumor cell (CTC) として血中に colon26 細胞の静脈注射を行い、Fn14 の抗原性の変化を測定した。



#### (B)

##### (1) 担癌マウスの作製

マウス膵癌 (PAN02) 細  $2 \times 10^6$  cells/100 $\mu$ L/mouse を C57BL/6 マウスの背部に移植した。細胞移植から 7、14、21 日後に腫瘍体積・体重を測定し、約 200mm<sup>3</sup> になった時点で実験に用いた。21 日後に約 200mm<sup>3</sup> になった。

##### (2) バブルと超音波による治療における至適な超音波装置の MI 値の検討

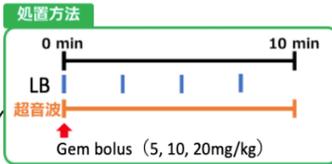
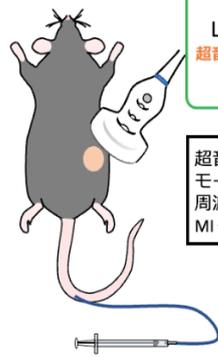
超音波の周波数を 2.2MHz に固定時の、至適な MI 値の検討を行った。担癌マウスに対して Gemcitabine (Gem) 30mg/kg とリピッドバブル (LB) (1x10<sup>7</sup> particles/10 $\mu$ L) を 2.5 分間隔で 4 回間欠投与し、MI 値を 0.2、0.7 または 1.2 で、超音波処理 4 時間後の Gem 移行量で決定した。

##### (3) バブルと超音波による治療効果の検討

担癌マウスに対して、Gem 5、10、20mg/kg を尾静注し、超音波照射しながら、リピッドバブル (LB) (1x10<sup>7</sup> particles/10 $\mu$ L) を 2.5 分間隔で 4 回間欠投与した。超音波装置に、GE LOGIQ E9 c1-6 プローブを用いた。このセットを、治療スケジュールに示すように Day0、3、6 に行った。

### 【処置方法】

C57BL/6J, ♀  
PAN02 担がんマウス

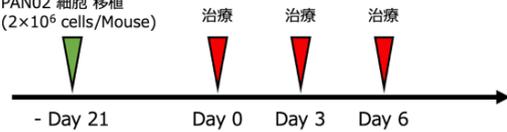


超音波 : GE LOGIQ E9 c1-6プローブ  
モード : Contrast Mode  
周波数 : 2.2 MHz  
MI 値 : 0.2

LB bolus  
10  $\mu$ L/回  
2.5分間隔で4回

### 【治療スケジュール】

PAN02 細胞 移植  
( $2 \times 10^6$  cells/Mouse)

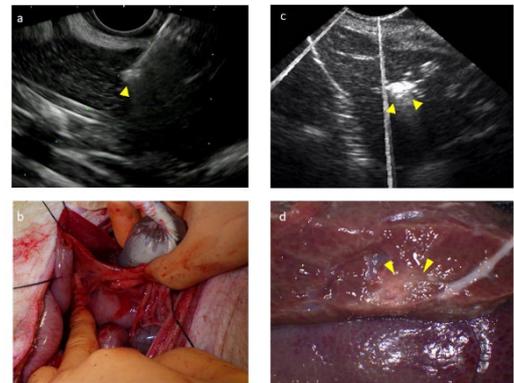


## 4. 研究成果

### (A)

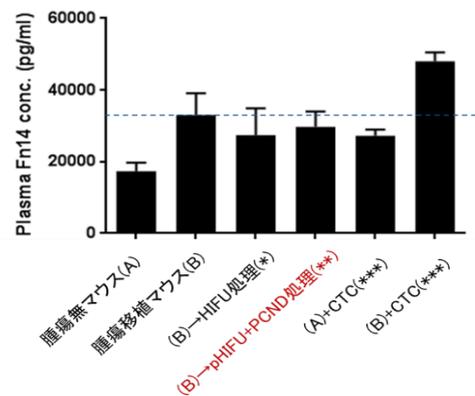
#### (1) EUS-HIFU+PCND を用いたヒストトリプシーの検証

市販の超音波内視鏡を経口的に胃内へ挿入し、経胃的にPCNDをブタ肝臓および膵臓に局注した。その後小型HIFU機器を用いて経胃的に肝臓にHIFU照射したところ、PCNDが液体から気化することを確認した。その後、摘出した臓器でPCNDが局注された部位のみに組織融解が生じていることも確認した。これらの結果を論文化した。



#### (2) 安全性の検証

血中Fn14値はコントロール群では有意に増加したが、PCND局注+HIFU照射群では治療の前後で有意に増加せず、本治療の安全性が示された。



### (B)

#### (1) バブルと超音波による治療における至適な超音波装置のMI値の検討

図1に示す様に、超音波照射条件MI値0.2の超音波照射とLBを併用することで、がん組織へのGemの移行量増大が認められた。しかし、MI値の増加に伴い、がん組織へのGemの移行量が減少した。本研究では、LBの投与量を $2 \times 10^6$  cells/ $10 \mu$ Lを4回投与しており、LBの多さが関係している可能性があり、投与量とMI値の関係について検討しなかったため、考察が難しい。

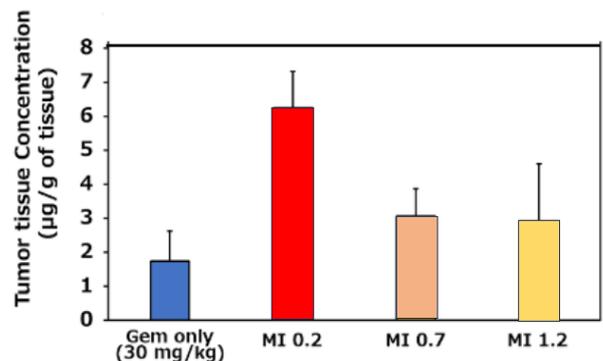


図1 LBと超音波によるGem移行量に対するMI値の影響

(2) バブルと超音波による治療効果

図2に示すように、Gem 5mg/kg が有意な治療効果を示した。10mg/kg および 20mg/kg では、単独でも治療効果があり、LB と超音波による Gem の移行量増加は得られていると思うが、有意な治療効果が得られなかった。図2に示すように、Gem 5mg/kg が有意な治療効果を示したが、その時のサバイバルを図3に示す。Gem 単剤群と比較し、LB と超音波を併用した群の生存期間が延長していることがわかる。

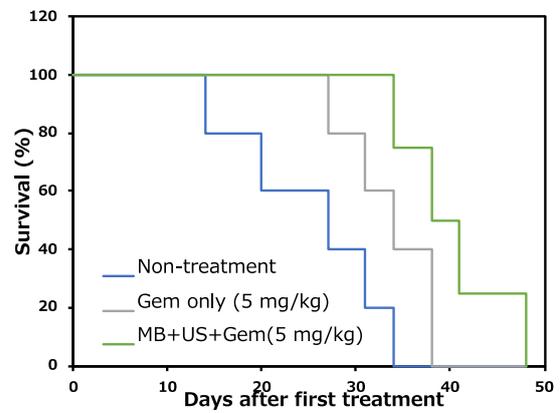
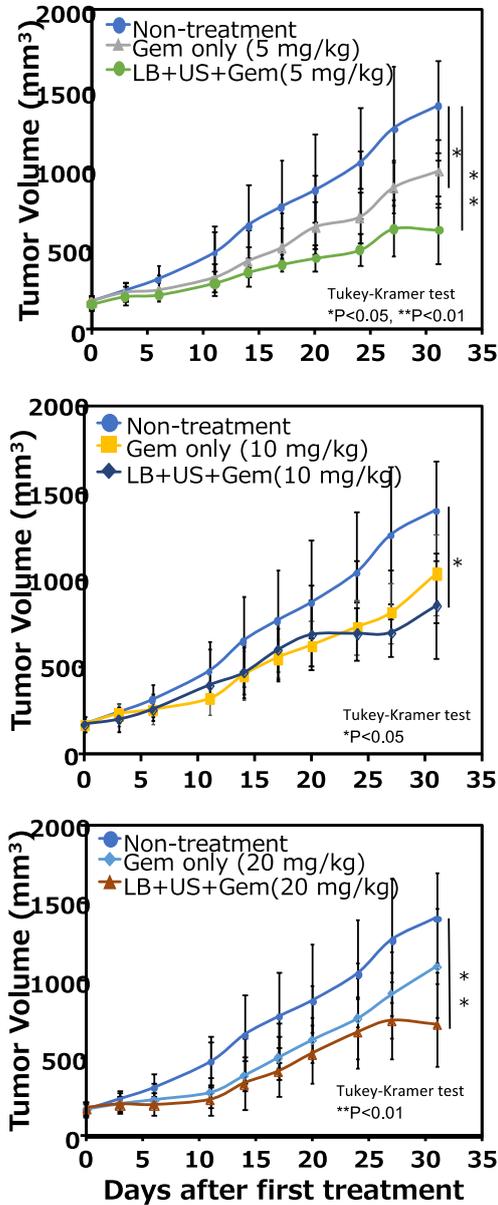


図3 LBと超音波によるGem5mg/kgのサバイバル

図2 バブルと超音波によるGemの治療効果

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kitano Masayuki, Tamura Takashi, Yamashita Yasunobu, Itonaga Masahiro, Ashida Reiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Usefulness of EUS-FNA with contrast-enhanced harmonic imaging for diagnosis of gallbladder tumor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endoscopic Ultrasound	6. 最初と最後の頁 224 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/EUS-D-20-00112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kanno Atsushi, Yasuda Ichiro, Ashida Reiko, Kato Hironari, Nakai Yousuke, Ryozaawa Shomei, Kitano Masayuki, Isayama Hiroyuki, Ohtsubo Koushiro, Masamune Atsushi, Izawa Naoya, Okuno Nozomi, Iwasa Yuhei, Kin Toshifumi, Saragai Yosuke, Yokode Masataka, Collaborators	4. 巻 33
2. 論文標題 Adverse events of endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration for histologic diagnosis in Japanese tertiary centers: Multicenter retrospective study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	6. 最初と最後の頁 1146 ~ 1157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.13912	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Emori Tomoya, Nuta Junya, Kawaji Yuki, Tamura Takashi, Hatamaru Keiichi, Itonaga Masahiro, Yamashita Yasunobu, Ashida Reiko, Shimokawa Toshio, Koike Masataka, Ikoma Akira, Sonomura Tetsuo, Kawai Manabu, Kitano Masayuki	4. 巻 36
2. 論文標題 Value of contrast enhanced harmonic endoscopic ultrasound for diagnosing hepatic metastases of pancreatic cancer: A prospective study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 3402 ~ 3409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15661	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita Yasunobu, Shimokawa Toshio, Ashida Reiko, Dietrich Christoph F., D'Onofrio Mirko, Hirooka Yoshiki, Kudo Masatoshi, Mori Hideaki, Sofuni Atsushi, Kitano Masayuki	4. 巻 47
2. 論文標題 Value of Low-Mechanical-Index Contrast-Enhanced Transabdominal Ultrasound for Diagnosis of Pancreatic Cancer: A Meta-analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ultrasound in Medicine & Biology	6. 最初と最後の頁 3315 ~ 3322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ultrasmedbio.2021.08.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ashida Reiko, Kawabata Ken-ichi, Asami Rei, Kitano Masayuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Novel treatment system using endoscopic ultrasound-guided high-intensity focused ultrasound: A proof-of-concept study	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 88 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2023.11.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 REIKO ASHIDA
2. 発表標題 Novel treatment using combination of newly developed microbubbles and ultrasound to increase vascular permeability of anti-cancer drug
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 江守 智哉, 蘆田 玲子, 北野 雅之
2. 発表標題 膵胆道領域における造影USの有用性 膵癌肝転移検出における造影ハーモニックEUSの有用性
3. 学会等名 日本超音波医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Reiko Ashida
2. 発表標題 HIGH-FREQUENCY ULTRASOUND AND RADIOFREQUENCY ABLATION
3. 学会等名 ASGE & JGES joint session (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	丸山 一雄  (Maruyama Kazuo)  (30130040)	帝京大学・薬学部・特任教授   (32643)	
研究 分担者	北野 雅之  (Kitano Masayuki)  (50314571)	和歌山県立医科大学・医学部・教授   (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------