

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02107

研究課題名(和文)フレキシブル超音波アレイによる体表面貼り付け型細胞デリバリーシステムの開発

研究課題名(英文)Development of cell delivery system attaching flexible ultrasound array on body surface

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)・教授

研究者番号：60283420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：免疫細胞療法などに応用するため、細胞の周囲に微小気泡を付着させた凝集体を形成し、音響放射力を利用して細胞を血流中で運搬するための技術を開発した。流体中の凝集体に対して様々な方向から超音波音場を照射することで凝集体を制御できることを、実験結果を中心に示した。細胞への損傷に関しては、超音波照射のエネルギーだけでなく、音圧値も支配的であることが分かった。超音波による凝集体の捕捉の理論モデルの構築、および実験結果との比較について検討した。さらに、体表上における音源の設置位置の優先順位を表示させた。実際の人体の体表面の情報を用いて、音源の接触範囲に対する治療計画ソフトウェアを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療のために特別に調製した細胞、例えば活性化したNK細胞を患者に注入する治療法では、患者に対する副作用が少ないため、外科手術・化学療法・放射線療法に次ぐガン治療として注目されている。しかし血行性に輸注された細胞は基本的に全身に拡散するため、固形ガンなどの標的部位への集積効率には限界があることが問題である。そのため、本研究によって目的の細胞を標的部位に能動的に送達することができれば、注入量に対する効率を飛躍的に向上させることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In order to apply to immune cell therapy, we have developed a technique for forming aggregates with bubble-surrounded cells (BSCs) and delivering cells in the bloodstream using acoustic radiation force. It is necessary to control the BSCs by irradiating the ultrasound field from various directions to aggregates in the fluid, focusing on the experimental results. With respect to damage to cells, not only the energy of ultrasound irradiation, but also sound pressure was found to be dominant. We constructed a theoretical model to trap aggregates on blood wall by ultrasound and compared it with the experimental results. Furthermore, it was displayed priority of the installation position of the sound source on the body surface. Using information on the surface of the actual human body, we have developed a therapy-planning software for the contact range of the sound source.

研究分野：生体医工学

キーワード：音響放射力 アレイトランスデューサ 超音波 微小気泡 治療用細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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する治療が活発に行われており、例えば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が報告されている。また活性化したNK細胞や、T細胞受容体遺伝子による抗ガン免疫療法は、外科手術・化学療法・放射線療法に次ぐ第4のガン治療として注目されている。また分離膵島をI型糖尿病患者の肝臓に移植し、膵臓の機能を代用させる細胞移植も取り組まれている。これらの治療法では、患者由来の細胞を用いる場合は副作用の恐れが小さく、細胞が標的部に定着して直接機能し始めることが期待される一方、血行性に輸注された細胞は基本的に全身に拡散するため、固形ガンなどの標的部への集積効率には限界があることが問題である。

### 2. 研究の目的

本研究では、特に肝臓内での細胞デリバリーを実現するため、複数の湾曲型超音波アレイトランスデューサ(以下、アレイ)の連携によって時間的・空間的に音響放射力を設計し、細胞の周囲に微小気泡が取り付いた細胞-微小気泡凝集体(以下、凝集体)を制御する技術を確認することを目的とする。アレイの駆動方法を確立するため、体表面に設置した複数のアレイの協調駆動を導入し、同時に画像情報との連携を行うソフトウェアを開発する必要があった。

具体的には、画像取得用の超音波プローブと複数のアレイの空間的位置を非接触の位置センサで検出し、次に画像情報を元に解析された3次元血管構造から、目的の経路上に必要な超音波音場の空間分布を計算するようなインターフェースを開発する。この状態で、カテーテルを介して細胞-微小気泡凝集体を輸注し、凝集体が血管分岐部を通過する瞬間に合わせて各アレイの動作を連携させ、凝集体を標的部まで誘導する。

### 3. 研究の方法

#### (a) 超音波照射と微小気泡が細胞に与える影響の検証

この項目では、超音波の連続照射や気泡の破壊が細胞に与えるダメージについて検証した。CD8陽性Tリンパ球と、それに特異的に付着する抗CD8抗体を修飾した微小気泡を用いて、先行研究と同様の条件で細胞表面に共有結合させ、凝集体を形成した。水温を37℃とした脱気水中にアレイを設置し、水面上に細胞濃度100000/mlとした細胞-培地懸濁液を0.1ml注入した96穴Well plateを設置し、超音波照射を行った。超音波のパラメータは連続波、中心周波数3MHz、最大音圧を400kPa-ppとし、照射時間は最大40分とした。照射後にCO<sub>2</sub>インキュベータ(37℃、CO<sub>2</sub>5%)でおよそ24時間培養後、生細胞数測定キットであるCCK-8を懸濁液に注入し、反応させるため4時間培養後、プレートリーダーで吸光度測定を行った。

#### (b) 細胞-微小気泡凝集体の動態制御

人工血管中に形成した音場に対する凝集体の挙動の変化を観測した。水槽底面には中心周波数3MHz、128素子のアレイを設置し、蛍光顕微鏡の視野内に焦点を形成するような実験系を構築した。ポリビニルアルコールで形成された流路を使用し、凝集体と生理食塩水の懸濁液を注入した後、音波照射下での凝集体の様子を、蛍光顕微鏡を用いて撮影し、解析ソフトを用いて捕捉面積を計測した。また形成した音場中における凝集体の動態を蛍光顕微鏡により観測した。超音波音場形状として、複数の焦点を流路に沿って形成し、1焦点あたりの最大音圧を100~400kPaの範囲で変化させ、壁面へ捕捉される凝集体の面積を検証した。また実験結果との比較として、流路内に流れる凝集体に対して働く音響放射力と、流速と血管内の位置から、凝集体の移動距離

を逐次計算し、凝集体の壁面到達率を、MATLAB を用いたシミュレーションにより再現した。

(c) 湾曲超音波アレイによる超音波音場形成と画像系との連携

通常の画像診断等に用いられる超音波プローブでは、隣接する素子間の位置関係が固定であるため、各素子を駆動する電圧の位相差の計算は比較的単純である。一方、湾曲アレイの場合は、位相差の計算に素子間の位置関係を取り入れる必要がある。体表面のような凹凸面にアレイ面を密着させた場合、その形状計測の精度が問題となる。本研究では中心周波数 3 MHz、128 個の素子数を有するアレイを 2 個用いた。また形成された 3 次元音場を直接計測する代わりに、自由水中内にカテーテルを配置し、カテーテルの挙動を観測した。カテーテルを中心に線対称、あるいは点対称になるようにアレイを設置した。

さらに、3 次元空間内での画像取得用プローブと、複数のアレイとの連携を行うための GUI ソフトウェアを、Visual C++によって開発する。画像情報から得られた 3 次元血管網構造を仮想空間に展開し、治療に必要な超音波音場の位置情報を特定すると共に、状況を観測可能なインターフェースを構築する。

#### 4 . 研究成果

(a) 超音波照射と微小気泡が細胞に与える影響の検証

超音波を照射した懸濁液の吸光度を照射していない懸濁液の吸光度で除し、百分率をとったものを細胞生存率として定義した。音圧 100~350 kPa-pp では照射時間によらず生存率は 100 %を示したが、音圧 375、400 kPa-pp では照射時間によって生存率が低下した。特に音圧 400 kPa-pp の照射時間 20 分以降では平均生存率は 40 %以下となり、生細胞数に超音波照射の有無によって大きな差が生まれた。また、照射時間 10 分では 375 ,400 kPa-pp でも生存率は 100 %に近いことから、超音波照射のエネルギーだけでなく、音圧値にも細胞生存率には密接に関連していると考えられる。本実験により、音圧と照射時間をパラメータとした超音波照射を細胞に行い、細胞生存率を算出することで細胞への影響を検討した。

(b) 細胞-微小気泡凝集体の動態制御

実験の結果、複数焦点音場を形成することで、同じエネルギー量においても捕捉面積は増加し、最大音圧 350kPa-pp の条件では、焦点を 3 個同時に形成する方が、単焦点に比べて捕捉面積が 40%程度向上した。また、最大音圧 300 kPa-pp 以下では、焦点数が増加するにつれて捕捉面積が減少する傾向が得られた。シミュレーションで算出した壁面への移動距離と、実験結果から計測した捕捉面積を比較したところ、相関係数は 0.778 となった。捕捉面積と壁面への移動距離は相関がみられた。この結果により、凝集体の捕捉効果をシミュレーションによって推測することが可能となった。

(c) 湾曲超音波アレイによる超音波音場形成と画像系との連携

実験に用いた音場は、焦点の最大音圧が 500 kPa-pp、duty 比 60 %のバースト波とした。両アレイをカテーテルの軸に対して線対称に配置した場合と、点対称に配置した場合の音軸垂直方向への変位を比較したところ、線対称に配置した方の変位が 20%ほど大きくなった。これは点対称の場合は互いの音波進行方向を打ち消す方向に音響放射力作用するためであり、これから、血流方向を基準ベクトルとした場合、アレイが血流に対して軸回転対象に配置することが高効率であることが分かった。

インターフェースの構築状況としては、超音波画像で捉えた標的となる体内の血管網の位置に対して、体表上におけるアレイの設置位置の優先順位を表示させた。実際の人体の体表面の情報を用いて、アレイの接触範囲に対する治療計画ソフトウェアを開発した。これにより、治療に有効的な体勢や呼吸条件を選択し、治療に反映できる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Oitate Riki, Otsuka Takuya, Seki Masakazu, Furutani Asuka, Mochizuki Takashi, Masuda Kohji, Suzuki Ryo, Maruyama Kazuo	4. 巻 57
2. 論文標題 Acoustic field sweeping for active induction of bubble-surrounded T-cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 07LF10 ~ 07LF10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7567/JJAP.57.07LF10	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 MASUDA Kohji	4. 巻 45
2. 論文標題 Part 11. How to investigate acoustic radiation force with micro object	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Choonpa Igaku	6. 最初と最後の頁 187 ~ 190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3179/jjmu.JJMU.T.11	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 MASUDA Kohji, HOSAKA Naoto, DEMACHI Fumi, MIYAZAWA Shinya, SAWAGUCHI Toi, NATSUME Kaoru, MOCHIZUKI Takashi	4. 巻 45
2. 論文標題 Towards <math>in vivo</math> delivery of microbubbles and cells using acoustic radiation force	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Choonpa Igaku	6. 最初と最後の頁 167 ~ 172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3179/jjmu.JJMU.R.88	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 木村允俊、片井拓弥、鈴木俊哉、山下智己、望月剛、榎田晃司、絵野沢伸	4. 巻 55
2. 論文標題 Bモードとドプラモードの両方に対応した血管分岐構造を有する超音波ファントムの製作	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生体医工学	6. 最初と最後の頁 258-266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Riki Oitate, Akie Shimomura, Hikaru Wada, Takashi Mochizuki, Kohji Masuda, Yusuke Oda, Ryo Suzuki, and Kazuo Maruyama	4. 巻 56
2. 論文標題 Validation of tracking performance of cell-bubble aggregation versus variation of acoustic field	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 07JF25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.7567/JJAP.56.07JF25	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 榊田晃司、保坂直斗、出町文、宮澤慎也、澤口冬威、夏目薫、望月剛	4. 巻 45
2. 論文標題 音響放射力を利用した微小気泡及び細胞の生体内デリバリーを目指して	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 超音波医学	6. 最初と最後の頁 167-172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Masakazu Seki, Takuya Otsuka, Riki Oitate, Kohji Masuda1, Johan Unga, Ryo Suzuki, and Kazuo Maruyama	4. 巻 58
2. 論文標題 Viability validation of therapeutic cells according to surrounded amount of microbubbles and ultrasound exposure condition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 SGGE13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.7567/1347-4065/ab19ab	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 -

〔学会発表〕 計25件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Kohji Masuda, Takuya Otsuka, Masakazu Seki, Riki Oitate, Johan Unga, Ryo Suzuki, and Kazuo Maruyama
2. 発表標題 Experimental study for active control of bubble- surrounded cells by acoustic radiation force with considering optimal production and cell viability
3. 学会等名 IEEE International Ultrasound Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuya Katai, Ikumu Yasuda, Mitsutoshi Kimura, Yoshihiro Edamoto, and Kohji Masuda
2. 発表標題 Three-dimensional extension of blood vessel network based on extraction of blood vessel shape and the tree- structured analysis in ultrasound volume
3. 学会等名 Ultrasound Electronics Symposium ( 国際学会 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masakazu Seki, Takuya Otsuka, Riki Oitate, Kohji Masuda, Johan Unga, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama
2. 発表標題 Viability validation of therapeutic cells according to surrounded amount of microbubbles and ultrasound exposure condition
3. 学会等名 Ultrasound Electronics Symposium ( 国際学会 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kiyonobu Nozaki ,Asuka Furutani, Kosuke Watanabe, Takuya Katai, Kohji Masuda, Johan Unga, Ryo Suzuki, and Kazuo Maruyama
2. 発表標題 Fluorescent observation of microbubble behavior according to time division emission of multiple focal points considering blood vessel shape
3. 学会等名 Ultrasound Electronics Symposium ( 国際学会 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安田育武, 片井拓弥, 木村允俊, 小野木真哉, 枝元良広, 榎田晃司
2. 発表標題 超音波ボリュームデータより再構成された3次元血管網構造の解析とCTデータとの比較
3. 学会等名 日本コンピュータ外科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片井 拓弥, 安田 育武, 木村 允俊, 山下 智己, 小野木 真哉, 望月 剛, 榊田 晃司, 枝元 良広, 絵野沢 伸
2. 発表標題 血管分岐形状を利用した血管網の 3 次元拡張法の開発と超音波-CT 間の比較
3. 学会等名 日本生体医工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohji Masuda, Toshiya Suzuki, Riki Oitate, Hidetaka Ushimizu, Asuka Furutani, and Takashi Mochizuki
2. 発表標題 Active control of micro objects in blood vessel by forming tempo-spatial variation of acoustic field
3. 学会等名 World Congress of Medical Physics and Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片井拓弥、木村允俊、山下智己、小野木真哉、望月剛、榊田晃司、枝元良広、篠崎雅史
2. 発表標題 超音波ボリューム中の血管分岐部の特徴を利用した 3 次元血管網の空間的拡張とその評価
3. 学会等名 第26回日本コンピュータ外科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川本祥太郎、和田義久、木村允俊、小野木真哉、望月剛、榊田晃司
2. 発表標題 音響放射力による微小物体の血管内誘導のための超音波直交 2 断面のフィードバックと血管追従
3. 学会等名 第26回日本コンピュータ外科学会大会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 木村允俊、片井拓弥、鈴木俊哉、山下智己、望月剛、榎田晃司、絵野沢伸
2. 発表標題 Bモードとドプラモードの両方に対応した血管分岐構造を有する超音波ファントムの製作
3. 学会等名 生体医工学シンポジウム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 片井拓弥、山下智己、望月剛、榎田晃司
2. 発表標題 血管分岐点の空間分布を利用した3次元血管網の拡張と連結評価
3. 学会等名 日本超音波医学会 第90回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古谷飛鳥、和田洸、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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本超音波医学会 第90回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村允俊、山下智己、望月剛、榎田晃司、絵野沢伸
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本超音波医学会 第90回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 追立理喜、下村明栄、和田洸、望月剛、榎田晃司、小田雄介、鈴木亮、丸山一雄
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第56回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大塚拓也、関政和、追立理喜、榎田晃司、Johan Unga、鈴木亮、丸山一雄
2. 発表標題 超音波音場形状に対する細胞-微小気泡凝集体の捕捉効果とその解析
3. 学会等名 日本超音波医学会 第92回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田育武、片井拓弥、渡邊晃介、岡留寛斉、枝元良広、榎田晃司
2. 発表標題 複数方向から取得した超音波ボリュームの合成による血管網構造の3次元拡張とその評価
3. 学会等名 日本超音波医学会 第92回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊晃介、片井拓弥、安田育武、枝元良広、榎田晃司
2. 発表標題 超音波プローブの位置・姿勢検出による3次元血管網再構成ナビゲーションシステムの開発
3. 学会等名 日本超音波医学会 第92回学術集会
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Takuya Katai, Ikumu Yasuda, Kosuke Watanabe, Kansai Okadome, Yoshihiro Edamoto, Shin Enosawa, and Kohji Masuda
2 . 発表標題 Three-dimensional extension of blood vessel network by combining multiple ultrasound volumes from different directions
3 . 学会等名 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Masakazu Seki, Tatsuya Saito, Takuya Otsuka, Naoya Kajita, Takashi Mochizuki, Johan Unga, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Kohji Masuda
2 . 発表標題 Viability variation of T-cells under ultrasound exposure according to adhesion condition with microbubbles
3 . 学会等名 Ultrasound Electronics Symposium ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Tatsuya Saito, Masakazu Seki, Takuya Otsuka, Naoya Kajita, Yoshitaka Miyamoto, Johan Unga, Kazuo Maruyama, Ryo Suzuki, Kohji Masuda
2 . 発表標題 Experimental study of damage on vascular endothelial cells according to microbubble concentration and ultrasound exposure
3 . 学会等名 Ultrasound Electronics Symposium ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Takuya Otsuka, Masakazu Seki, Kiyonobu Nozaki, Takumi Chikaarashi, Ryota Akutsu, Johan Unga, Kazuo Maruyama, Ryo Suzuki, and Kohji Masuda
2 . 発表標題 Theoretical analysis of retention distribution of bubble-surrounded cells with tempo-spatial division emission
3 . 学会等名 Ultrasound Electronics Symposium ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Junya Takano, Yutaro Kobayashi, Hidetaka Ushimizu, Kansai Okadome, Takashi Mochizuki, and Kohji Masuda
2. 発表標題 Effect of contact condition of blood vessel wall in thin catheter bending using acoustic radiation force
3. 学会等名 Ultrasound Electronics Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中泰良, 高野潤也, 川本祥太郎, 牛水英貴, 小野木真哉, 榎田晃司
2. 発表標題 血管内の極細カテーテル屈曲制御のための超音波音場形成インターフェースの精度検証
3. 学会等名 第28回日本コンピュータ外科学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本聡, 牧野雄一, 川本祥太郎, 小野木真哉, 榎田晃司
2. 発表標題 微小物体の血管内誘導制御のための超音波トランスデューサの体表面設置補助ソフトウェアの開発
3. 学会等名 第28回日本コンピュータ外科学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊晃介, 安田育武, 片井拓弥, 小野木真哉, 枝元良広, 榎田晃司
2. 発表標題 血管構造を利用した3次元超音波ボリュームに対する2次元超音波画像のレジストレーション手法の検討
3. 学会等名 第28回日本コンピュータ外科学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 超音波画像解析装置、カテーテルシステム、及びプログラム	発明者 榎田晃司、神田浩輔	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2019-150296	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

東京農工大学 大学院生物システム応用科学府 榎田研究室 <a href="http://www.tuat.ac.jp/~masuda">http://www.tuat.ac.jp/~masuda</a>
--

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・教授   (32643)	
研究分担者	鈴木 亮  (Suzuki Ryo)  (90384784)	帝京大学・薬学部・准教授   (32643)	