

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10456

研究課題名(和文) ナノバブル生成器の開発：バブル投与下超音波照射によるソノポレーション効果での検証

研究課題名(英文) Sonoporation effect under the presence of a large amount of micro-nano bubbles

研究代表者

狩谷 秀治 (KARIYA, Shuji)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40368220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：豚肝動脈からシスプラチンと二酸化炭素マイクロナノバブルを同時に注入し、肝表面から超音波照射を行い、ソノポレーションを生じさせると肝組織内のシスプラチン濃度が上昇した。生体でもキャビテーション効果を増大させることにより、ソノポレーションを実用レベルにまで到達させることが可能であった。

本研究にてマイクロナノバブル発生装置が開発された。このマイクロナノバブル発生装置は、両端にシリンジを接続する構造となっている。生理的食塩水と二酸化炭素が各シリンジに注入され、ポンピングにより装置内を往復させて生理食塩水中にマイクロナノバブルを生成できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多量のマイクロナノバブルの局所投与と超音波照射によりキャビテーションが増強されると生体内でも実用レベルのソノポレーション効果が得られると考えられた。

本実験結果からvivoでの動物実験や臨床においてDNAやRNAの細胞内導入への応用も可能と思われる。また、本実験のように薬剤の細胞内濃度を上昇させることも期待でき、さらに今回の経カテーテル的動脈内注入、局所超音波照射の手法を用いれば標的臓器のみにソノポレーション効果を増大させることも期待できる。例えば、標的臓器の細胞内の抗癌剤濃度を高めることにより、投与する抗癌剤量の減量が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The concentration of cisplatin in liver tissue was increased by performing sonoporation after simultaneously injecting cisplatin and carbon dioxide micro-nanobubbles into the hepatic artery of swine and applying ultrasonic irradiation to the surface of the liver. By increasing the cavitation effect, sonoporation at a level practical for use in vivo was achieved. A micro-nano bubble generator was developed in this study. This micro-nano bubble generator has a structure in which syringes are connected at both ends. Physiological saline and carbon dioxide are injected into each syringe, and pumped back and forth inside the device to generate micro-nano bubbles in the saline.

研究分野：インターベンショナルラジオロジー

キーワード：キャビテーション ソノポレーション マイクロバブル ナノバブル

1. 研究開始当初の背景

液体中のナノマイクロバブル(以下バブル)は、バブルが消える過程で膨張、収縮を経て泡の圧潰と呼ばれる消失が生じ、この圧潰時にバブル周囲の狭い範囲ではあるが極めて大きなエネルギーが生じる。これをキャビテーション効果という。さらにバブルを含む液体に超音波照射を行うと音圧により強制的に急激な水圧の差が生じ、バブルのキャビテーションが格段に速くなりキャビテーション効果も格段に増強する。こうなると断熱圧縮作用によりバブル圧壊周囲は数千度、数千気圧に及びこの反応は極めて強力となる。液体中には自然に少量のバブルが存在するが、人工的に大量のバブルを存在させなおかつ超音波照射を行うとキャビテーションがさらに増強され生体利用可能なエネルギーとなる。

キャビテーションの利用は工業分野(洗浄、ナノ材料の合成、有害物質の分解など)で日本が先進しているが、医療分野では国内外ともほとんど利用されていない。これはバブルが気体ゆえに血管内へ大量に投与する発想がないためと考えられる。唯一承認されたバブルの投与に超音波造影剤があるが、バブルは微量でありこれによるキャビテーション作用は軽微である。作用は軽微でもソノポレーションによる遺伝子や薬剤の培養細胞への導入、集束超音波による凝固に一定の効果があり生体で確認されている。しかしこれが臨床利用に発展しない理由として、超音波造影剤のバブル量が極めて少なく、キャビテーションの物理的衝撃作用は生体内での利用に不可能なほど弱いためと報告者らは考えた。また生体内への多量バブルの投与方法がなかった。体内に投与するためには針やカテーテルを通して注入する必要があるが、いったん生成したバブルをこれら細径のデバイスを通すと圧がかかりバブルの維持ができない。工業分野でもこの細径のデバイスを通す技術は必要とされていなかったためなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、二酸化炭素マイクロナノバブルを大量に豚肝臓内に注入し、超音波を照射することで、生体において実用レベルのソノポレーションが実行可能であることを証明することである。豚肝臓内に大量の二酸化炭素ナノマイクロバブルを存在させた状態で超音波を照射すると同時に肝動注されたシスプラチンの組織内濃度が上昇することを証明することである。

3. 研究の方法

実験には豚が用いられた。二酸化炭素マイクロナノバブルが大量に生成され、これが経カテーテル的に肝動脈から注入された。バブルと同時に経カテーテル的にシスプラチンが投与された。肝の一部に超音波が照射されソノポレーションを生じさせた。ソノポレーションによりシスプラチンの取りこみが増強していることが、超音波照射と非照射の肝組織を比較し確認された。9頭が使用され、6頭は内側左葉に超音波照射がおこなわれ、3頭は内側右葉に超音波照射が行われた。

(1) カテーテル留置

右側大腿動脈に 5Fr シースが留置され、そこから血管造影用カテーテルが挿入された。総

肝動脈にカテーテル先端が留置された。超音波プローブを直接肝表面に当てるため豚は開腹され、肝臓が直視下に露出された。この状態で肝動脈造影が施行され、肝臓に造影剤が均一に分布し、全体が描出されていることが確認された。

(2) 二酸化炭素マイクロナノバブルの生成

二酸化炭素マイクロナノバブルの生成には、報告者らが本研究にて開発したマイクロナノバブル発生装置(機体含有生成装置、特許第 6847338)が使用された。このマイクロナノバブル発生装置は、両端にシリンジを接続する構造となっていた。生理的食塩水 5mL と二酸化炭素ガス 5mL が各シリンジに注入され、10 回のポンピングにより装置内を往復させて生理食塩水中にマイクロナノバブルが生成された。なお、本マイクロナノバブル発生装置で生成する生理食塩水中の二酸化炭素マイクロナノバブルの濃度は $1.07 \sim 2.50 \times 10^9$ 個/mL であった。

(3) 薬剤の投与と超音波照射

シスプラチン 100 mg が 10 分かけて動注された。同時に(2)で作成された二酸化炭素マイクロナノバブルを含む生理食塩水全量が 1 分毎に計 10 回注入された。肝内側左葉あるいは肝内側右葉のどちらか一方に肝表面から超音波照射 (Effective radiating area 5.0 cm^2 、連続照射、出力 2 W/cm^2 、周波数 3MHz) が超音波照射装置 (SONICTIZER SZ-100, MINATO MEDICAL SCIENCE CO., LTD. Osaka, Japan) を使用して 10 分間の動注の間行われた。超音波照射プローブは手動的に把持され、目視にて照射中は肝表面の同一部位に固定された。超音波照射部位は照射直後に、その中心部に針が知入され、マーキングされた。

(4) 組織の採取とシスプラチン濃度の評価

シスプラチンの薬剤の投与と超音波照射の終了後にマーキングに用いた針を目安に肝組織が切り出された。さらに比較のため照射されていない内側対側葉の肝組織も切り出された。切り出された肝組織断面の異常の有無が肉眼的に評価された。この採取した肝組織から白金濃度測定用として肝表面から 5mm の深さの肝実質が約 500 mg 採取された。採取後、組織は液体窒素で -80 度に凍結保存された。組織内の白金測定方法は Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) により行われた。シスプラチン濃度の上昇は白金の濃度上昇として評価された。

(5) Statistical Analysis

超音波照射の有無による組織内白金濃度の比較は、Wilcoxon signed-rank test により行われ、有意水準は $p=0.05$ とされた。

4 . 研究成果

超音波照射群の肝組織内白金濃度の平均 \pm SD は $6.260 \times 10^3 \pm 2.070 \text{ ng/g}$ であり、非照射群のそれは $3.280 \times 10^3 \pm 0.430 \text{ ng/g}$ であった。肝組織の白金濃度は超音波照射群のほうが非照射群より有意に高かった ($p = 0.004$)。いずれの検体においても採取した肝組織に組織の挫滅や変色、弾性の変化などの肉眼的な異常所見は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 気体含有液生成装置	発明者 狩谷秀治	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6847338	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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	谷川 昇 (TANIGAWA Noboru) (90227215)	関西医科大学・医学部・教授 (34417)	

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
---------	---------