

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659201

研究課題名（和文）

ナノサイズバブルリポソーム投与下超音波照射を用いた感染性心内膜炎の効果的治療法

研究課題名（英文）

Study on effective treatment of infective endocarditis using sonoporation and nano-size bubble liposome

研究代表者

中谷 敏 (NAKATANI SATOSHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80393221

研究成果の概要（和文）：感染性心内膜炎は心臓に疣腫を生じる全身性敗血症であるが、疣腫がバイオフィームに覆われているため抗菌剤の浸透が十分に行われず難治性となる。バブル存在下に超音波を照射することによる組織内薬剤浸透効果の増強作用（ソノポレーション）が感染性心内膜炎の治療効果を上げる可能性について検討した。その結果、ナノサイズバブルリポソーム存在下の超音波照射によりラットに作成した疣腫内への薬物浸透効果が認められた。

研究成果の概要（英文）：Vegetation seen in infective endocarditis is covered by the biofilm which prevents effective penetration of antibiotics. We evaluated the feasibility of sonoporation as an aid of drug delivery to vegetation. We found combination of nano-size bubble liposomes and ultrasound exposure enhanced the ability of dye penetration to vegetation obtained from rat endocarditis model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	0	1,000,000
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	270,000	3,270,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：臨床心血管病態学、超音波治療

1. 研究開始当初の背景

感染性心内膜炎は心臓弁膜に疣腫を形成する難治性重症敗血症である。治療には有効抗菌薬の投与が必須であるが、疣腫中では血小板-フィブリン複合体がバイオフィームとなって病原体を覆っているため薬剤の到達が悪く、そのため抗菌薬の長期大量投与を余儀なくされる。マイクロバブルは超音波照射により破

壊され、そのジェット流のエネルギーで近傍組織に小孔をあけることが知られている（ソノポレーション）。バブルのサイズが大きければ薬剤浸透効果は大きいと思われるが、同時に組織破壊も強い。微小サイズのバブル（ナノサイズバブルリポソーム）を使ってソノポレーションを起こすことができれば、疣腫を破壊せずに薬剤を浸透させることができ、感

染性心内膜炎に対する効率的な治療が可能になると思われる。

2. 研究の目的

ナノサイズバブルリポソーム存在下にソノポレーションを利用してバイオフィームに小孔をあけ薬物の組織内浸透をはかることが可能かどうかを検討すること。

3. 研究の方法

薬剤を浸透させるモデルとして、初年度は血栓を、次年度は生体内組織としてラットの大腿四頭筋を、最終年度には実際にラットに感染性心内膜炎を起こして形成された疣腫に対して検討を行った。年度別の方法は以下のとおりである。

(1) 初年度方法

ナノサイズバブルリポソームは、リポソームとパーフルオロプロパンから以下の手順により作成した。すなわち、①5 mL バイアル瓶にリポソーム 2 mL を入れて、パーフルオロプロパン 7.5 mL でバイアル瓶内の空気を置換し、アルミキャップを閉める。②さらにパーフルオロプロパン 7.5 mL をバイアル瓶に加圧封入する。③使用直前に超音波洗浄機 (BRASON 社製 yamato 2210 周波数 47 kHz) を用いてバイアル瓶に約 10 分間超音波照射を行う。この製法により図 1 のごとく、平均粒子径 950 nm のリポソーム内に粒子径 100-200 nm のガス気泡が数個含まれるバブルリポソームを作成することができる。



図 1 作成されたバブルリポソームの外観

イヌ静脈血を用いて試験管内で作成された赤色血栓に対するウロキナーゼの溶解効果がバブルリポソーム投与下超音波照射併用で増強されるかどうかを検討した。赤色血栓は、ウロキナーゼ単独 (UK 群)、超音波照射を併用した UK+US 群、さらにバブルリポソームを併用した UK+US+BL 群に分けた。超音波は RICH-MAR 社製 Sonitron 2000 (周波数: 1 MHz、デューティー比: 100%) を用いて 2 秒照射 4 秒停止のサイクルで照射を行い、溶解操作前後で血栓重量の変化をみた。照射時間は 5 分、10 分、20 分の三通りで検討し、超音波強度

は 0.1 W/cm²、1.0 W/cm² の三通りで検討した。

(2) 次年度方法

雄性 SD ラット 10 匹の両側大腿四頭筋 (n=20) を用いた。蛍光色素 FITC-デキストラン (0.18 mg/g) をバブルリポソームまたは生理食塩水と混合し、腹部大動脈より 0.3 ml/min にて持続注入した。バブルリポソーム (0.01 ml/g) 注入群 (B(+))US(-) 群、(n = 5)、バブルリポソーム注入に超音波照射を併用した群 (B(+))US(+) 群、(n = 5)、および生理食塩水 (0.01 ml/g) 注入群 (B(-))US(-) 群、(n = 5)、生理食塩水注入に超音波照射を併用した群 (B(-))US(+) 群、(n = 5) の 4 群に分類した。超音波照射には、東芝社製探触子 (周波数 2.2 MHz) を用い、mechanical index 1.6、照射間隔 20 秒、照射回数 10 回/秒とした。プロトコル終了後、大腿四頭筋を摘出し凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡を用いて FITC-デキストランの血管外漏出の有無を観察した。また、ELISA 法にて FITC-デキストランの吸光度を測定し、FITC-デキストランの濃度を求めた。

(3) 最終年度方法

雄性 SD ラット (n=30) を用い、右総頸動脈より大動脈弁を經由し左心室内へポリエチレンカテーテルを留置することにより大動脈弁逆流モデルを作製し、さらに 3 日後に尾静脈より腸球菌を投与し感染性心内膜炎を発症させた。菌注入 2 日後ラットを安楽死させ大動脈弁より疣腫を摘出した。得られた疣腫 (n=8) を用いてコントロール群としての B(-))US(-) 群 (n=1)、超音波照射単独の B(-))US(+) 群 (n=3)、バブルリポソームを注入し超音波照射をした B(+))US(+) 群 (n=4) で検討した。墨汁入り生理食塩水中に疣腫を固定し、RICH-MAR 社製 Sonitron 2000 (周波数 1 MHz、強度 0.7 W/cm²、デューティー比 100%) を用いて 1 秒照射後 4 秒停止で間歇照射を 10 分間行った後、疣腫の切片を作製し墨汁滴の深達度を 4 段階で評価した。

4. 研究成果

(1) 初年度結果

超音波強度 1.0 W/cm² 下で照射時間 5 分では 3 群で変化は見られなかった (UK, UK+US, UK+US+BL : 15.7 ± 2.0%, 16.6 ± 3.7%, 17.9 ± 5.0%)。照射時間 10 分では、ウロキナーゼ単独群と比較して超音波照射併用群において質量減少率は有意に高くなった (15.9 ± 5.8% vs. 23.9 ± 3.7%, p < 0.05)。照射時間 20 分では、ウロキナーゼ単独群と比較して超音波照射併用群とバブルリポソーム併用群において質量減少率は有意に高くなった (UK vs. UK+US : 12.6 ± 1.6% vs. 23.4

± 5.2%, $p < 0.05$, UK vs. UK+US+BL : 12.6 ± 1.6% vs. 23.4 ± 3.5%, $p < 0.05$)。しかし UK+US 群と UK+US+BL 群の間には差がなかった。すなわち、血栓溶解効果は超音波照射併用により増強されるが、ナノサイズバブルリポソーム併用によるさらなる溶解増強効果は確認できなかった。これは通常のマイクロバブルに比べて、ナノサイズバブルではバブルの大きさが小さいために組織破壊が軽度であることを反映していると考えた。なお照射時間 10 分群において、超音波強度 1.0 W/cm² では、強度 0.1 W/cm² と比較して質量減少率は有意に高くなり (12.1 ± 2.4% vs. 23.9 ± 3.7%, $p < 0.001$)、ある程度の超音波強度が確保されなければ臨床的效果を発揮するのは困難であることが予測された。

(2) 次年度結果

蛍光顕微鏡観察により、B(+)^{US(+)} 群では FITC-デキストランが筋細胞に滞留しているのが認められたが、他群では認められなかった (図 2)。各検体において ELISA 法より求めた FITC-デキストラン濃度は、B(+)^{US(+)} 群で 46.3 ± 31.3 μg/ml と他群に比べやや高値を示した (B(+)^{US(-)} 群; 31.7 ± 18.6 μg/ml、B(-)^{US(+)} 群; 35.7 ± 11.2 μg/ml、B(-)^{US(-)} 群; 27.7 ± 16.2 μg/ml)。したがって超音波照射とバブルリポソームの併用による生体内組織への局所分子導入の可能性が示唆された。

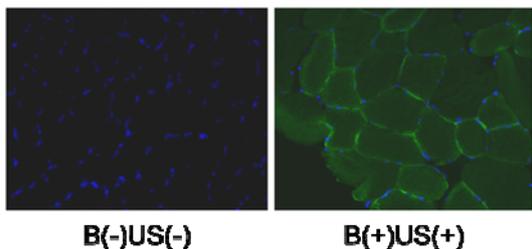


図 2

(3) 最終年度結果

大動脈弁逆流発症率は 67%であり感染性心内膜炎発症率は全体の 33%であった。得られた疣腫は平均径約 2 mm であった。B(-)^{US(-)} 群では疣腫内に墨汁滴を認めず、B(-)^{US(+)} 群では辺縁にのみ認めたのに対し、B(+)^{US(+)} 群では疣腫の内部にまで墨汁滴が浸透していた (図 3)。墨汁滴深達度は B(-)^{US(-)} 群 (0)、B(-)^{US(+)} 群 (0.75 ± 1.07)、B(+)^{US(+)} 群 (1.97 ± 0.93) とバブルリポソームを用いたソノポレーションは疣腫への効果的な薬物デリバリーの方法となり得ることが示唆された。

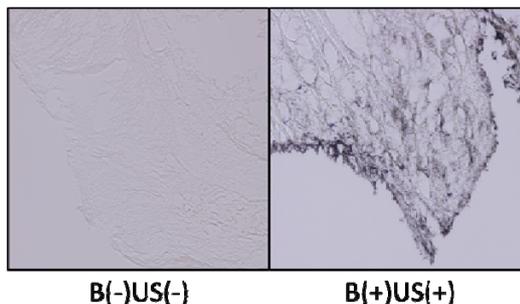


図 3

(4) 総括および展望

本研究は前例のない検討であり方法論も確立していなかったことから、ソノポレーションを生じさせる組織として、最初に試験管内血栓、次いで生体内大腿四頭筋を経て、最終的に実際に動物に感染性心内膜炎を起こして形成された疣腫を材料とした。動物実験とは言え、疣腫に対して行ったこの種の検討は例をみない。結果として、取り出した疣腫に対して墨汁滴を用いた検討ではあったが、ソノポレーションの効果を確認することができた。今後は感染性心内膜炎ラットに対して、ソノポレーション下で抗菌薬を投与することにより生存率が向上するかどうかの検討が必要である。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

① Kasumi Masuda, Mami Yamashita, Toshihiko Asanuma, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Kotaro Mitsutake, Satoshi Nakatani. Effect of sonoporation with bubble liposomes on vegetations using rat model of experimental endocarditis. 第 23 回日本心エコー学会、2012 年 4 月 19 日、大阪

② Kasumi Masuda, Mami Yamashita, Toshihiko Asanuma, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Kotaro Mitsutake, Satoshi Nakatani. Feasibility of sonoporation using nano-sized bubble liposomes as treatment of infective endocarditis: a study on rat model of experimental endocarditis. 23rd American Society of Echocardiography Annual Scientific Sessions, 2012 年 7 月 2 日, Maryland, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 敏 (NAKATANI SATOSHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80393221

(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

浅沼 俊彦 (ASANUMA TOSHIHIKO)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
准教授
研究者番号：80379271

(3) 連携研究者

なし