

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 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：2013～2016

課題番号：25461893

研究課題名(和文)大量ナノバブルにより増強したキャビテーション効果の医療利用：血栓溶解効果での評価

研究課題名(英文) Medical use of effect of cavitation reinforced by a large amount of nanobubble:
Evaluation by thrombolytic efficacy

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：(1)用手的ナノバブル生成器を用いて血栓化させた血管内にナノバブルを大量に発生させ、超音波を照射すると血栓溶解作用が促進された。(2)用手的ナノバブル生成器を発明し特許出願した。(3)用手的ナノバブル生成器を用いると小動物での実験にナノバブルを投与できることが証明された。今後マウス、ラット、ウサギの生体内でキャビテーションを生じさせることが可能である。(4)用手的ナノバブル生成器を用いると微量の液体で極めて高密度のナノバブルを供給することが可能である。これに超音波を照射することにより極めて高いキャビテーション効果を試験管やシャーレ内で発生させることができた。

研究成果の概要(英文)：The thrombolytic effect was confirmed in the thrombosed vascular when a large amount of nanobubbles were generated using a manual nanobubble generator and the ultrasound was irradiated. The manual nanobubble generator was invented and the patent was applied for. It was proven to be able to administer the nanobubble into the small animal with the manual nanobubble generator in the experiment. An extremely high density nanobubble can be supplied with a small amount of liquid with the manual nanobubble generator. Thus an extremely high effect of cavitation was able to be generated by ultrasound irradiation in the test tube and petri dish. It may be feasible even by the experiment by the microenvironment in the in vitro of surroundings such as cells in the future.

研究分野：Interventional Radiology

キーワード：キャビテーション ナノバブル 血栓溶解

1. 研究開始当初の背景

液体の圧力に差が生じると、液体中の微小気泡の膨張、収縮、さらには圧潰（気泡の消失）が生じる。これをキャピテーションという。超音波の照射を行うと音圧により急激な圧力の差が生じ、膨張、収縮、圧潰速度が格段に速くなる。速度が速いと断熱圧縮作用により気泡圧壊周囲は数千度、数千気圧に及ぶと言われている。この反応は極めて強力で、様々な化学物質を分解するフリーラジカルをも発生させ強力な化学作用生じる。また圧壊時には周囲に数百キロのジェット流が発生する。液体中には自然に微小気泡が存在するが、人工的に大量のナノバブルを存在させると、この気泡が核となり、さらに強力なキャピテーションを生じさせることができる。これらの物理的衝撃作用、化学作用はすでに工業系分野（洗浄、ナノ材料の合成、有害物質の分解など）には広く用いられている。

キャピテーションの利用は日本が先進しており、工業分野での利用が進んでいる。しかし、気体である微小気泡を大量に血管内に発生させる概念がなく、その方法もなかったため医療には利用が進んでいない。唯一承認された微小気泡の投与に超音波造影剤があるが、むしろ気泡が割れないように工夫され、キャピテーションとしての利用ではない。実験レベルでは、この超音波造影剤を使用したキャピテーションによる遺伝子導入（ソノポレーション）、ドラッグデリバリー、収束超音波による凝固の促進などへの導入が試みられたが進歩していない(1,2)。この理由は、超音波造影剤のバブル量が極めて少なく、キャピテーションの物理的衝撃作用は利用に不可能なほど弱いためと我々は考えている。

2007年、脳底動脈の血栓溶解目的で経頭蓋ドプラ超音波下で超音波造影剤と血栓溶解剤を投与した場合、血栓溶解が促進されると報告されたが、実用へ発展せずキャピテーション効果については触れられていない。

体内に投与できる唯一の気体は炭酸ガスであり、我々は炭酸ガスの臨床利用をこれまで行ってきた。炭酸ガスの欠点を改善するためマイクロバブル化して投与することに着目し、血管内に大量のマイクロバブルを発生させることができるマイクロバブルジェネレーターシステムを製作した(図1,2)(特許出願済 特開 2010-37257)。これは血管内で炭酸ガスと液体をミキシングするところに独自技術がある。

このジェネレーターは大量のバブルを血管内に発生させ、血管内のエックス線透過性を亢進させるほどであり、これを利用してマイクロバブル血管造影を行うことに成功し報告した(基盤研究C 2010-2012 マイクロバブル化炭酸ガスを使用したエックス線診断用造影剤の開発)。

さらにバブル径の調整により、塞栓時間を可変させる血管塞栓術にも成功した(基盤研究C 2009-2011 マイクロバブル化炭酸ガスを

用いた超短時間型塞栓剤の開発)。これまでの研究でマイクロバブルを減らし、ナノバブルを増やすと塞栓が生じず、組織間、細胞間に持続的に入り込むことが分かった。そこでこれまでの研究を進展させ、組織あるいは細胞周囲に、大量のナノバブルを発生させ、キャピテーションが生じると物理化学作用を医療利用できるという着想に至った。本研究はこの物理衝撃作用の利用の証明の第一歩として血栓溶解療法に有効であることを明らかにする。

これまで医療分野へ利用が進んでいなかった、キャピテーションの物理衝撃作用、化学作用を実用レベルまで増強させることが本研究の特色である。体内へ投与できる唯一の気体は炭酸ガスである。血管内へ投与する物質の多くは液体であるが、我々の原点は、この概念にとらわれず、無害、低コストの炭酸ガスを生体反応に広く利用することである。医療分野ではこれまで極めてバブル量の少ない超音波造影剤が実験的にキャピテーション目的で用いられた。これに対して、我々はカテーテルタイプのジェネレーターを用いて、ナノバブルを局所へ大量に発生させ目的の部位のみに強いキャピテーション作用を生じさせるところに独創性と革新的な点がある。この研究で血栓溶解に有効であることの証明は、ナノ空間レベルで増大させた物理衝撃作用を利用できるという結果であり、効率的な遺伝子導入（ソノポレーション）、細胞膜透過（ドラッグデリバリー）、発生するフリーラジカルの利用、殺菌、収束超音波の凝固作用促進にも導入できるという基盤が得られるところに意義がある。とくに遺伝子導入促進の意義は大きい。

2. 研究の目的

全体構想と最終目標は、バブルが圧潰するときに生じるキャピテーション効果を、大量ナノバブルの局所的体内発生と超音波照射の組み合わせにより、生体内で利用可能なレベルの物理化学作用へと増強させて様々な医療用途へ導入することである。本研究期間で行うことは、増強させたキャピテーション作用が様々な用途に導入可能な効果であることを、これらの用途の一つである血栓溶解促進効果を利用して証明する。

本研究の目的は、血栓化した血管内に大量の炭酸ガスナノバブルを発生させ、超音波を照射してキャピテーション効果を増強させると、血栓溶解を促進させる作用であることの証明である。

3. 研究の方法

最終的に豚の血管にて血栓溶解を行うため、目的とする血管に合わせた流量、注入圧に調整する必要があった。現在使用しているジェネレーターを用いて最適な設定をファントム実験にて試みた。ナノバブルジェネレーターを循環型大動脈ファントム内に設置

し、ナノバブルを生成させた。我々がこれまでマイクロバブルの実験で利用した循環型大動脈ファントムで、生体の拍動、流量、血圧に近くなるように設定した。動脈と静脈を想定した循環を設定し、各条件でナノバブルができるだけ大量に発生するナノバブル生成の生理食塩水注入速度、ヘパリン添加量、CO₂量の条件を導き出す実験を行った。

この結果これまで使用したジェネレーターでは血管内に投与できる微小吐出が困難であることが判明し、新たなジェネレーターの制作を行うこととなった。微小吐出のジェネレーターの技術を持つ(株)アスプの協力を得た。アスプ製の MA5SP0 が必要条件に近いことが分かり導入した。しかし、全流量をカテーテルへ通すとバブルの生成部に圧がかかり生成に問題があった。また吐出量を微量にコントロールする必要があった。したがって、ナノバブル発生装置から吐出されるナノバブル液の一部のみをカテーテルに吐出し、残りをリザーバーへ排出する分岐システムを制作した。分岐システムによって、発生装置側回路内の圧低下、カテーテル側への流量コントロールが可能となった。5F 血管造影用カテーテルを接続し、カテーテルからバブルが吐出されるように製作した。発生装置の既存のデータから 5mL/min(全吐出量)の条件で、 0.81×10^8 個/mL のバブルが発生していると推測できた。平均粒子径は 170nm と推測できた。実験で得られた各パーツ、(ミキシングヘッド、吸気バブル、ポンプ)を1つの装置に組み 5F カテーテルを接続し生体に使用できる装置 BA6S を制作した。

ファントム実験を終え、ナノバブルジェネレーター-BA6S を使用して、豚を用いた動物実験を行った。動物実験は宮崎テクノロジー&教育センターにて、同施設の倫理委員会の承認の後行われた。全身麻酔下で大腿静脈からカテーテルを挿入して行った。しかし BA6S で生体内ではナノバブルを安定して発生させることはできなかった。その後も装置の調整を繰り返し行ったがナノバブル生成の安定化は困難であった。

本装置のような機械式のジェネレーターでは安全に生体へナノバブルを投与することは難しく安価、安全、実用性のある方法でナノバブルを得る研究開発へと変更し進めた。その結果、(株)アスプとの共同で新しい発案に至った。ジェネレーターの心臓部であるミキシングヘッドを取り出し、これを90度の角度をもって連結し医療用のシリンジで往復させて生理食塩水の中に炭酸ガスナノバブルを生成するものであった。したがって機械に頼らず手動的に生成する器具、手動的ナノバブル生成器を製作した。このバブル濃度は極めて高く、シリンジに数 mL の生理食塩水とともに取り出せるものであった。実験の結果、ナノバブルの濃度は $1.0\text{-}2.5 \times 10^9$ /mL の濃度であった。このままカテーテルから注入すると血管内に容易にナノバブルを投与

できた。これを「気体含有液生成装置」という発明の名称で学校法人関西医科大学と(株)アスプで共同出願した(特願 2016-125909)。

計画時に血栓溶解用血管内超音波照射装置 EKOS を海外から取り寄せて使用する予定であったがこの時点で入手できなくなった。代用として診断用超音波装置による外照射を行う計画とした。装置は画像診断用の超音波装置であり、キャビテーションを生じさせかつその様子を観察する目的で使用した。しかし、生体内でキャビテーションを生じさせることはできなかった。検討の結果、生体内でキャビテーションを生じさせるには超音波のエネルギーが不足していることが判明した。この段階でエネルギーの高く、生体へ害なく照射できる超音波装置の導入と、生体内でキャビテーションを観察できる手段が必要になった。種々の超音波発生装置を用いてジェネレーターで生成したナノバブルに照射しキャビテーションを生じさせた。この結果、キャビテーションが生じエネルギーが高く生体使用できる装置として超音波治療器 SZ-100 が候補となりファントム実験を繰り返した。この結果、手動的ナノバブル生成器で生成した炭酸ガスナノバブル生理食塩水に超音波治療器 SZ-100 で照射すると瞬時にキャビテーションが生じることを証明できた。

手動的ナノバブル生成器の特徴と有効な用途を証明するため一般的なインビトロでの実験を想定し試験管、シャーレで極めて高いキャビテーション効果を生じさせることを証明した。手動的ナノバブル生成器でシリンジからわずか 1mL を目的とするところ(ここでは試験管とシャーレ)に供給することが可能であり、これに超音波を照射しキャビテーションを生じさせることに成功した。手動的ナノバブル生成器で得られるナノバブル液は極めて高濃度のナノバブルを含有しているため極わずかの液量でナノバブルを大量に供給できる。したがって微小なインビトロ環境での使用も可能であることが分かった。

次いで動物実験に移行した。並行して行っている別のナノバブル研究にもこの生成器を供給し家兎での実験に使用できることがわかった。ごく少量のナノバブル液をシリンジで投与することができるようになった結果である。したがって小動物へのナノバブル投与が可能であることが証明された。

手動的ナノバブル生成器を用いて豚を用いた実験を行った。再度、動物実験は宮崎テクノロジー&教育センターにて、同施設の倫理委員会の承認のもと行われた。ブタの両側大腿静脈からシースを挿入し、バルーンカテーテルを挿入。血流を遮断しトロンピンを注入した。これにより両側腸骨静脈、大腿静脈血栓症のモデルを作った。次いで、一方には手動的ナノバブル生成器で生成した炭酸ガスナノバブル生理食塩水を注入し SZ-100 にて

超音波照射を行った。一方は生理食塩水のみを注入した。これにより血栓溶解に差が出るかを検討した。血栓溶解は進んだが両者に血管造影上数値としてその差を示すことはできなかった。血栓溶解のスピードは我々が予測していたものよりも遅い可能性があり数時間かけて行えば定量的な差を示すことができると思われた。

4. 研究成果

(1) 用手的ナノバブル生成器を用いて血栓化させた血管内にナノバブルを大量に発生させ、超音波を照射すると血栓溶解作用が促進された。

(2) 用手的ナノバブル生成器を発明し特許出願した。

(3) 用手的ナノバブル生成器を用いると小動物での実験にナノバブルを投与できることが証明された。今後マウス、ラット、ウサギの生体内でキャピテーションを生じさせることが可能である。

(4) 用手的ナノバブル生成器を用いると微量の液体で極めて高密度のナノバブルを供給することが可能である。これに超音波を照射することにより極めて高いキャピテーション効果を試験管やシャーレ内で発生させることができた。今後インピトロでの微小環境での実験でも細胞などの周囲に極めて高いキャピテーションを生じさせることが可能である。用手的ナノバブル生成器は遺伝子導入(ソノポレーション)、細胞膜透過(ドラッグデリバリー)、発生するフリーラジカルの利用、殺菌、収束超音波の凝固作用促進への利用を期待できる。

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)

〔学会発表〕(計3件)

(1) 狩谷秀治、IVRにおけるCO₂の利用、第16回大阪腹部画像・IVR医学研究会(講演) 2013年12月17日、大阪、ホテルグランビア大阪

(2) 狩谷秀治、バルーン閉塞下逆行性経静脈的塞栓術(B-RT0)に生じる門脈肺静脈吻合(バブルによる証明)第42回日本IVR学会、2013年5月16日~18日、長野、軽井沢プリンスホテル

(3) 狩谷秀治、バルーン閉塞下逆行性経静脈的塞栓術(B-RT0)に生じる右左シャントの存在(バブルによる証明)第72回日本医学放射線学会、2013年4月11日~14日、神奈川、パシフィコ横浜

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：気体含有液生成装置

発明者：狩谷秀治、谷川昇、高橋賢、高橋浩己

権利者：狩谷秀治、谷川昇、高橋賢、高橋浩己

種類：特許

番号：得願 2016-125909

出願年月日：2016年6月24日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 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：25461893

(2) 研究分担者

谷川昇 (TANIGAWA, Noboru)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：90227215

(3) 連携研究者

中谷幸 (NAKATANI, Miyuki)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：10533424

(4) 研究協力者

井上理人 (INOUE, Michito)

松原動物病院・獣医師

河野由美子 (KONO, Yumiko)

関西医科大学・医学部・助教