

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進事業研究事業：活動領域拡張医療機器開発研究事業

エコーガンによる低侵襲の胎児期遺伝子治療：胎児腹腔内への非ウイルス  
性ベクター注入と胎児肝母体外超音波照射による遺伝子機能発現の出生前  
是正

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 千葉 敏雄

平成 21 (2009) 年 4 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- エコーガンによる低侵襲の胎児期遺伝子治療：胎児腹腔内への非ウイルス性ベクター注入と胎児肝母体外超音波照射による遺伝子機能発現の出生前是正 ----- 3  
千葉敏雄

### II. 分担研究報告

1. 胎児臓器組織への超音波自動照射システムの開発 ----- 6  
千葉敏雄
2. 本遺伝子治療における細胞・動物実験、および分子生物学・医学的検証 ---- 9  
梅澤明弘
3. マイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入 ----- 11  
松本洋一郎
4. 音響放射力を利用した流路内のマイクロカプセル捕捉法の検討 ----- 14  
榎田晃司
5. 超音波診断/自動照射システムの検証 ----- 18  
三木基弘
6. 肝細胞への超音波遺伝子導入・培養・保存方法の検討 ----- 21  
宮本義孝

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 25

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業：活動領域拡張医療機器開発研究）  
統括研究報告書

# エコーガンによる低侵襲の胎児期遺伝子治療：胎児腹腔内への非ウイルス性ベクター注入と胎児肝母体外超音波照射による遺伝子機能発現の出生前是正

統括研究者 千葉敏雄 国立成育医療センター 部長

## 研究要旨

本研究では、異常遺伝子機能の出生前発現を低侵襲性に是正し、出生後治療・ケアの効率的支援と医療費の大幅低減を目的とする。具体的には、1. 標的細胞内で一過性に効果を発現する目的遺伝子を付随した非ウイルス性ベクター（マイクロバブルなど；胎児腹腔内注入）と、2. これを母体体外から超音波照射で胎児肝に集積・破砕し、標的肝細胞・造血幹細胞に導入するシステムを開発する。本年度は、各研究課題における要素技術（超音波ナビゲーション/超音波遺伝子導入）や周辺技術（超音波自動照射システム）の開発と検証を進めた。また、本事業で利用され得る標的細胞の供給体制は完了した。次年度は、これらの技術を基盤とし、ヒト肝細胞および動物モデル（In vivo）を中心とした実験に取り組む。

## 分担研究者

梅澤 明弘 国立成育医療センター研究所/部長  
松本 洋一郎 東京大学大学院工学系研究科/教授  
榎田 晃司 東京農工大学大学院生物システム応用科学府/准教授  
三木 基弘 アロカ株式会社/常務取締役  
宮本 義孝 名古屋大学医学部/助教

## A. 研究目的

近年、欧米では、遺伝性の免疫・血液疾患や先天性代謝異常症に対しては、1. 移植治療（造血幹細胞や肝）、2. 遺伝子治療が一定の成果をおさめているが、1 はドナーのリスクやその慢性的不足と免疫抑制剤の副作用、2 はウイルスベクターの安全性等の課題を抱えている。また、出生後治療だけでは患児への最適な治療時期を失し、医療費のかさむ可能性が高い。そこで、本研究では、異常遺伝子機能の出生前発現を低侵襲性に是正することで、出生後治療・ケアに対する効率的支援と医療費の大幅低減を目指す。

本研究の目的は、出生前治療をより安全・低侵襲に施行し、胎児や新生児の治療成績と予後を改善する治療システム・機器を開発することにある。具体的には、1) 標的細胞（胎児）内で一過性に効果を発現しうる目的遺伝子を付随した非ウイルス性ベクター（マイクロバブルなど；胎児腹腔内注入）と、2) これを母体体外からの超音波照射にて胎児肝に集積・破砕し、標的細胞（肝細胞・造血幹細胞）に導入するシステムを開発する。本研究は、医工連携研究として産官学相互の融合を図りながら、システ

ム・機器開発、評価・検証、事業化への提案を進めるものである。

## B. 研究方法

### B-1 超音波ナビゲーション技術の開発

本年度は、体外から超音波照射により、模擬生体モデル内のマイクロカプセルに音響力を作用させ、その濃度や動態を局所的に制御した。具体的には、これまで、局所的な超音波照射により流体中のマイクロカプセルへの捕捉可能性を確認したが、粒子径が 60[ $\mu$ m]程度と大きく、また超音波の照射方向が限定されていた。そこで血球程度のサイズのカプセルを用い、また音源を複数用いた場合の捕捉法の可能性を検討した。内径 2[mm]の直線流路を持つ模擬血管を含んだ実験系を構築し、1 個または 2 個の集束型トランスデューサを様々な角度に設置し、流路中に局所的音場を形成した。そして上流からカプセル懸濁液を注入し、集束波の焦点地点に設置したマイクロスコープを用いて、カプセル群の挙動を観測した。

### B-2 超音波遺伝子導入技術の開発

本年度は、臨床で利用されているマイクロバブルを用い、標的部位でのバブル破砕・細胞膜での小孔形成・細胞内遺伝子導入の可能性について検証した。超音波遺伝子導入はキャビテーションにより生じる細胞の小孔を介して起こると考えられているが、詳細な機序は不明である。また、マイクロバブルを併用することで導入効率が向上することが示されている。以上を踏まえ、本研究では、マイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入の機序の解明及び、より低侵襲・高効率な手法の開発を開始した。具体



的には、従来の方法では遺伝子導入が起こりにくいマウス胎児性線維芽細胞(NIH3T3)を標的とし、遺伝子導入率の各種パラメータ(超音波強度等)依存性を検証した。

### B-3 胎児臓器組織への超音波自動照射システムの開発

本年度は、腹腔内臓器組織に対し、高精度で超音波照射が可能なシステム構築の可能性につき検証を行った。具体的には、リアルタイム 2D 超音波画像解析による超音波自動照射システムの開発を行った。本システムは、コンピュータ制御下に腹腔内臓器組織の 2D 超音波画像を解析し、標的部位に対し適な超音波照射(集束超音波(HIFU)など)を達成せしめるものである。

### B-4 ヒト肝細胞・組織の供給体制の整備

本事業をさらに進展させるためには、標的細胞の一つである肝細胞での評価が必要不可欠となる。肝移植の際、摘出したドナー肝の一部は移植された肝組織の機能上の問題、解剖学的理由等により一部移植に用いられない肝組織が生じる(余剰肝)。そこで、本研究では、国立成育医療センターにてインフォームドコンセントが得られた、ヒト余剰肝、および肝移植を受けた先天性代謝性疾患の患者さんから摘出されたレシピエント肝から効率よく正常な機能を保持した肝細胞を分離、培養、凍結保存する方法の開発と、その方法で得られた培養肝細胞の *in vitro* および免疫不全マウスを用いた *in vivo* における特性解析を行った。

### B-5 肝細胞への超音波遺伝子導入

胎児では、代謝・免疫・造血機能が一つの臓器(肝)に集約され、出生後の免疫学的トレランスを獲得しやすい。そこで、本年度は、プロジェクトの基盤技術である超音波遺伝子導入法を用い、標的組織である肝臓(肝細胞)への遺伝子導入を行った。肝細胞は、肝臓の約 70% を占め、数ある初代細胞の中でも、培養と凍結が難しい細胞の一つとして挙げられる。我々は、まず、ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 を用い、検討を開始した。

### (倫理面への配慮)

国立成育医療センター研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている(国立成育医療センター研究所、受付番号 25,26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認、受付番号 88,89,90,91 平成 16 年 7 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、

平成 17 年 7 月承認)。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なる予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないよう、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う。

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号 2003-002, 2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

## C. 研究結果

### C-1 超音波ナビゲーション技術の開発

平均粒子径 3.5[ $\mu$ m]のマイクロカプセル(松本油脂製 F-04E)を用い、1 個のトランスデューサを  $\theta=0[\text{deg}]$  に設置し、音圧 210[kPa]、流速 20[mm/s]、周波数 1[MHz]の正弦波で実験を行った結果、流路中央にカプセルの捕捉を確認した。次に両方のトランスデューサを併用し、角度を 3 次元的に様々に変化させて実験を行った結果、単独の場合に比べて捕捉位置が安定した。今後はシミュレーションにより実験結果との比較を行いながら、生体内での実現を目指す。

### C-2 超音波遺伝子導入技術の開発

本研究では導入条件の如何なる因子が導入率を高めるのかを調べた。その結果、マイクロバブルの数密度が多いほど、また超音波強度が大きいほどあるいは照射時間が長いほど遺伝子導入率が上昇することを確認した。しかし、実験条件下においては 1%以下であった。生存率測定と小孔形成細胞の可視化を行った結果、80%程度の細胞が生存しており、また多くの細胞に小孔が形成されていることが判明した。したがって、遺伝子が細胞に取り込まれない、または遺伝子が発現しないことが、遺伝子導入率が低い主因であると示唆される。このことを明らかにすることが今後の課題である。

### C-3 胎児臓器組織への超音波自動照射システムの開発

成人ウサギの拍動心に対し、本システムによる非接触 HIFU 照射を試みたところ、呼吸による移動等の影響を最小限としつつ心腔内標的への高精度ピンポイント焼灼を行うことに成功した。さらに本研

究では、超音波自動照射システムの検証を行い、標的部位での焦点位置合わせの精度向上を目指す。

#### C-4 ヒト肝細胞・組織の供給体制の整備

先天性代謝性疾患のレシビエント肝より、肝細胞を分離、増殖することに成功した。in vitro での特性解析結果、初代培養肝細胞において正常肝細胞特異的遺伝子の発現を確認した。また、in vivo における特性解析として、前述の初代培養肝細胞を免疫不全マウス大腿四頭筋に移植した。その結果、移植後4週間目に摘出した大腿四頭筋において、抗ヒトアルブミン抗体陽性、抗ヒト肝細胞抗体(CK8/18)陽性、抗ヒトビメンチン抗体陽性を示す細胞を検出することに成功した。

#### C-5 肝細胞への超音波遺伝子導入

超音波照射時に、マイクロバブルと培養容器底面の接着細胞(HepG2)との距離が接近するにつれて、細胞に与えるダメージが大きくなるが、遺伝子導入効率が高かった。特に、プラスミド DNA 量が増加するにつれて、HepG2 細胞への遺伝子導入率が高いことが確認できた。また、細胞培養容器内の圧力分布が様ではないため、容器内の接着細胞の場所により、細胞生存率に差が見られた。

#### D. 考察

超音波ナビゲーション技術では、体外から超音波照射によって生じる音響放射力によって、流路内のカプセルの挙動を制御できることを示した。今後はシミュレーションにより実験結果との比較を行いながら、超音波に関する最適な条件の導出と生体モデルへの応用を目指す。超音波遺伝子導入技術の開発としては、超音波強度を大きくするほど照射時間を長くするほど、細胞内での遺伝子導入率が向上することを確認した。今後は、細胞内への遺伝子の取り込みと発現のメカニズムを明らかにすることと、動物モデル(in vivo)での検証を行う。超音波自動照射システムについては、動物の呼吸や心拍動など、周期的な胎動の影響をキャンセルしつつ、目的とする臓器のみへの照射が可能になった。本システムの評価については、最も条件の厳しい心腔内組織への超音波照射を行ったが、遺伝子導入対象としている肝臓などは、より標的が大きいため、現状の位置合わせ精度であっても、十分な効果が見込める。なお胎児の四肢の動きなどについては麻酔により抑制できることから、遅い動き(母体の呼吸など)や速い動き(胎児の心拍動など)のいずれにも対応できる本システムは、遺伝子導入用の超音波照射においても、問題なく適用できると考えられる。ヒト肝細胞・組織の供給体制の整備としては、国立成育医療

センターにてインフォームドコンセントが得られたヒト肝組織から、免疫不全マウス体内でアルブミン産生を伴うヒト肝細胞の分離と培養に成功した。今後は、得られたヒト肝細胞を用いた実験を開始する。その他、本事業に必要な周辺技術の検証も行う。

#### E. 結論

本年度(初年度)は、各研究課題における要素技術(超音波ナビゲーション/超音波遺伝子導入)や周辺技術(超音波自動照射システム)の開発と検証を進めた。また、本事業で利用され得る標的細胞(ヒト肝細胞)の供給体制は完了した。次年度はこれらの技術を基盤とし、ヒト肝細胞および動物モデル(in vivo)を中心とした実験に取り組む。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 千葉敏雄, 特集 小児医療と倫理的緒問題 巻頭言「小児・胎児医療と生命倫理学」, 小児外科, 40(10), 1099-1101, 2008.
2. 石井徹子, 千葉敏雄, 胎児先天性心疾患の外科治療, 心臓, 40(11), 933-937, 2008.

その他各分担研究報告書に記載

##### 2. 学会発表

その他各分担研究報告書に記載

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

各分担研究報告書に記載



厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業：活動領域拡張医療機器開発研究）  
分担研究報告書

## 胎児臓器組織への超音波自動照射システムの開発

分担研究者 千葉敏雄 国立成育医療センター 部長

### 研究要旨

本研究では、腹腔内臓器組織に対し、高精度で超音波照射が可能なシステムを構築することが目的である。近年欧米を中心として、胎児の先天性心疾患を出生前に子宮内で治療することで、重篤な状態になることを防ぎ、最終的な治療成績を高める胎児手術が行われている。しかし、早期に閉鎖した動脈弁や心房中隔など微小な形態的異常に対する現行の心臓手術は、母体腹壁から子宮壁・胎児胸壁・胎児心臓壁を穿孔・貫通して行われる侵襲的なものである。我々は、母体体表から胎児心の超音波断層像を確認し、集束超音波（High Intensity Focused Ultrasound: HIFU）を患部に照射することにより、非接触で低侵襲に治療するシステムの開発を進めている。ここでは、リアルタイム 2D 超音波画像解析による超音波自動照射システムの開発で得た成果について報告する。

### A. 研究目的

本研究の目的は、出生前治療をより安全かつ低侵襲に施行し、胎児や新生児の治療成績と予後を改善する治療システム・機器を開発することである。本年度は、腹腔内臓器組織に対し、高精度で超音波照射が可能なシステム構築の可能性につき検証を行った。特に、子宮内の胎児に見立てた成人ウサギの高速に拍動する心腔内組織に対して、本システムによる非接触 HIFU 照射を試み、胎児の臓器組織への超音波焦点位置合わせ精度の評価を行なった。

胎児期に診断された先天性心疾患は、胎児死亡や死産となる症例が多く、統計では約 1/3 とも言われている。近年では欧米を中心に、出生前に子宮内で外科的に治療することで、重篤な状態になることを防ぎ、最終的な治療成績を高めようとする胎児手術が行われるようになってきている。しかし、成人と比較して高頻度（120～180 回/分程度）に拍動し、しかも非常に小さな心腔内部へのアプローチは困難であり、医師の経験や技量に大きく左右されるのが現状である。これに対し我々は、現在子宮筋腫や前立腺癌、乳癌などで効果を挙げている、集束超音波（High Intensity Focused Ultrasound: HIFU）を用いた低侵襲治療システムの開発を進めている。本システムは、治療対象の様々な周期的な動き（呼吸による臓器の移動や心拍動による細かな振動など）の影響をキャンセルし、体内へのリアルタイム HIFU 照射を可能にするものである。心腔内組織（ここでは心房中隔）への照射の場合は、拍動と共に高頻度に拡張収縮・移動を繰り返す心房中隔を追従しながら、最適なタイミングで HIFU 照射を行うため、2D 超音波画像から心房中隔の位置情報をリアルタイムで捕捉する必要がある。本研究では、超音波画像から

心拍動の周期性を導き、最適なタイミングに合わせ HIFU を照射するシステムを開発したので報告する。

### B. 研究方法

#### B-1 システム構成

本システムは主に、超音波診断装置、HIFU 照射トランスデューサ、正弦波ジェネレータ、増幅用アンプ、超音波画像解析・HIFU 照射指示を行うワークステーションで構成される（Fig. 1）。

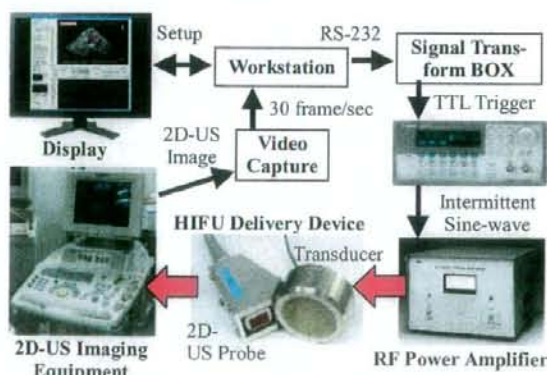


Fig. 1 System configuration.

#### B-2 心拍検出による HIFU 自動照射のタイミング特定

トランスデューサに固定した 2D 超音波プローブで得られる、胎児心の四腔面超音波断層画像を、ビデオキャプチャによって秒間 30 フレームでワークステーションに取り込む。医師はディスプレイに表



示されるビデオ画像を見ながら、心房中隔の位置と心拍の周期性を特定する手がかりとなる。左心室を関心領域 (ROI) として指定する。二値化により、左心室の面積、重心、真円度などのパラメータ値を自動抽出し、心臓の拡大縮小によって相対位置が伸縮する左心室の面積と重心の情報から相似計算を行うことにより、画像的に特徴の無い心房中隔の位置を間接的に同定する。

同時に、左心室の面積変化を連続サンプリングし、離散フーリエ解析によって心拍数と左心室拡大収縮の状態判定 (周期解析) を行うことで、心房中隔への HIFU 照射可能タイミングを決定する。このとき、子宮内胎児では起こらないことだが、患者が呼吸をする場合、呼吸によるターゲットの移動があればその周期解析も同時に行い、画像解析処理と信号伝送に伴うシステム内の遅延量を計算し、適切な照射タイミングを生成するための補正を行う。このタイミングを基に間欠的に HIFU 照射を行い、設定した合計時間を満たすまで照射を繰り返す (Fig. 2)。

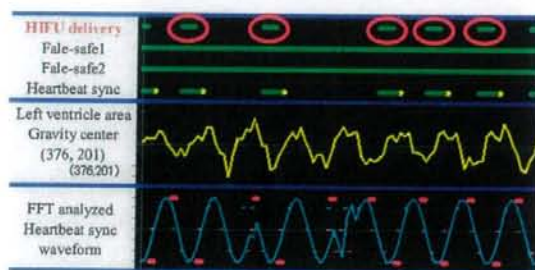


Fig. 2 Determination of HIFU delivery timing with fail-safe by the variation of left ventricle polygonal area.

### B-3 In vivo 実験

本実験では、開発した自動照射システムが正常に機能することを確認し、また、間欠的となる HIFU 照射が移動・拍動する実組織に対しての有効性について評価を行なった。健康な動物 (ウサギ, Japanese White, 雄, 2.8kg, 手術対象とする胎児よりも若干大きい) 4頭を用いて、全身麻酔・人工呼吸・心拍動下にある心腔内の心房中隔に対して HIFU 照射による穿孔を試みた (Fig. 3A)。

四肢を手術台に固定された状態のウサギに対して HIFU 照射を行った。ウサギの心臓は扁平な胸骨に覆われており、超音波が反射してしまうため、本来ならば開胸することなく非接触に行うところを、正中切開にて心臓を露出した状態で照射を試みた。子宮内胎児の場合は胸骨が未発達で超音波を減衰させることはないため、開胸の必要はない。また、胎児と異なり人工呼吸器を用いての肺呼吸がある状態で行うため、肺によって心臓が移動する環境下

で行う。

### (倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

### C. 研究結果

子宮内の胎児を想定し、シリコンシートを底部に張った水槽越しに開胸したウサギ (JW, 雄, 2.8 kg) の心房中隔に対して HIFU 照射を行った (Fig. 3A)。心拍のタイミングに合わせて合計 3 秒間照射した後、摘出心を観察したところ、心腔内組織の焼灼痕と貫通穴を確認したが、心房中隔よりも後壁側にずれていた (Fig. 3B)。

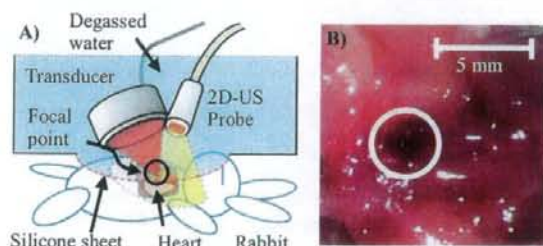


Fig. 3 A) In vivo experiment setting. B) Gross pathologic image of the removed rabbit heart exposed to HIFU.

### D. 考察

本研究では、リアルタイム超音波画像解析を基にした、自動 HIFU 照射システムを開発した。In vivo 実験においては、麻酔下にある成人ウサギに対して、拍動する心腔内の心房中隔へと HIFU のピンポイント照射を可能とした。特に胎児心疾患治療においては、HIFU の低侵襲性は、胎児のみならず母体に対しても有効であり、安全・短時間・低コストで実施可能な術式となりうるものといえる。

拍動する心腔内への HIFU 照射は、最も厳しい条件下での評価であったが、遺伝子導入対象としている肝臓などは、より標的が大きい。現状のシステムであっても、高い効果が見込めると思われる。胎児の四肢の動きなどについては麻酔により抑制でき、母体の呼吸などの遅い動きや心拍動などの速い動きについては、いずれにも対応できるため、本システムは遺伝子導入用の超音波照射においても、問題なく適用できるより安全な低侵襲治療システム

として期待される。

なし

3. その他

なし

## E. 結論

本研究では、リアルタイム 2D 超音波画像解析による超音波自動照射システムの開発を行った。本システムは、コンピュータ制御下に腹腔内臓器組織の 2D 超音波画像を解析し、標的部位に対し至適な超音波照射（集束超音波(HIFU)など）を達成せしめるものである。成人ウサギの拍動心に対し、本システムによる非接触 HIFU 照射を試みたところ、呼吸による移動等の影響を最小限としつつ心腔内標的への高精度ピンポイント焼灼を行うことに成功した。

さらに本研究では、超音波自動照射システムの検証を行い、標的部位での焦点位置合わせの精度向上を課題とし、より安全な手術システムとしての臨床応用を目指していく。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1. 中山智理, 石山昭彦, 石井徹子, 山下紘正, 宮本義孝, 三好敏喜, 東隆, 千葉敏雄, 土岐彰 胎児胸腔内腫瘍性病変に対する新しい治療法 High-intensity focused ultrasound(HIFU)の試み, 日本小児外科学会雑誌, 44(3), 334, 2008.

2. Nakayama N, Ishiyama A, Ishii T, Yamashita H, Miyamoto Y, Miyoshi T, Azuma T, Chiba T, Toki A, Pulmonary Vessel Occlusion Using High intensity Focused Ultrasound (HIFU): Is It Useful for Minimally Invasive Treatment of Fetal Chest Mass?, 15th Congress of the FAOPS 2008 (Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies), 2008, 159, 2008.

3. Yamashita H, Ishii T, Ishiyama A, Nakayama N, Miyoshi T, Miyamoto Y, Kitazumi G, Katsuike Y, Okazaki M, Azuma T, Fujisaki M, Takamoto S, Chiba T, Computer-aided Delivery of High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU) for Creation of an Atrial Septal Defect In vivo, Medical Imaging and Augmented Reality. Springer Berlin/Heidelberg Lecture Notes in Computer Science, 5128, 300-310, 2008

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録



## 本遺伝子治療における細胞・動物実験、および分子生物学・医学的検証

分担研究者 梅澤明弘 国立成育医療センター研究所 部長

### 研究要旨

近年、欧米では、遺伝性の免疫・血液疾患や先天性代謝異常症に対して、1. 移植治療（造血幹細胞や肝細胞）、2. 遺伝子治療が一定の効果をおさめている。上記の治療法は手術による負担を軽減しさらには欠損する酵素の機能を補うことが可能となる。これらの実現に向けて肝から効率よく正常な機能を保持した肝細胞を分離、培養、凍結保存する方法の開発と、その方法で得られた培養肝細胞の *in vitro* および免疫不全マウスを用いた *in vivo* における特性解析を行った。

### A. 研究目的

本研究の目的は、出生前治療をより安全かつ低侵襲に施行し、胎児や新生児の治療成績と予後を改善しうる治療システム・機器を開発することである。その目的は2つに大別でき、1) 胎児標的細胞内で一過性に効果を発現しうる目的遺伝子を付随した非ウイルス性ベクター（マイクロバブルなど；胎児腹腔内注入）の開発と、2) これを母体外からの超音波照射にて胎児肝に集積・破碎し、標的細胞（肝細胞・造血幹細胞）に導入するシステムを開発することである。具体的には、1) 定在波音場によるマイクロカプセルの局在集積技術の開発と、2) 収束超音波による標的部位でのマイクロカプセル/マイクロバブル破碎と細胞の小孔形成・細胞内遺伝子導入技術の開発を目的とする。

本研究は、医工連携研究として産官学相互の融合を図りながら、システム・機器開発、評価・検証、事業化への提案を進めるものである。

### B. 研究方法

我々は本遺伝子治療における細胞・動物実験、および分子生物学・医学的検証を行うため、本研究の標的細胞の一つである肝細胞の臨床応用を目指した研究に従事している。肝臓は多数の複雑な酵素系を持っており、栄養素の代謝、生体に必要な物質の生産、代謝最終産物の処理、有害物質の解毒などを行っている。肝臓の研究や肝臓を利用した研究をする上で、肝細胞培養は極めて有効な手段であるが、樹立肝細胞株では失われている肝機能が多いため初代培養肝細胞が最も有効な手段として用いられている。

肝移植の際、摘出したドナー肝臓の一部は移植された肝組織の機能上の問題、解剖学的理由等により一部移植に用いられない肝組織が生じる（余剰肝）。そこで本研究では、国立成育医療センターにてインフォームドコンセントが得られた、前述のヒト余剰肝、および肝移植を受けた先天性代謝性肝疾患の患

者さんから摘出されたレシビエント肝から効率よく正常な機能を保持した肝細胞を分離、培養、凍結保存する方法の開発と、その方法で得られた培養肝細胞の *in vitro* および免疫不全マウスを用いた *in vivo* における特性解析を行った。

### （倫理面への配慮）

国立成育医療センター研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療センター研究所、受付番号25,26及び27、平成15年1月承認、受付番号49、平成15年10月承認、受付番号55、平成15年11月承認、受付番号88,89,90,91、平成16年7月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認）。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないよう、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う。

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号2003-002,2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

### C. 研究結果

先天性代謝性肝疾患の患者さんから摘出されたレシビエント肝より、肝細胞を分離することに成功

した。また得られた肝細胞を培養下で増殖させることにも成功した。初代培養肝細胞の *in vitro* における特性解析の一環として PCR 反応を行った結果、初代培養肝細胞において正常肝細胞特異的遺伝子の発現を確認した。また、*in vivo* における特性解析として、前述の初代培養肝細胞を免疫不全マウス (NOG マウス; NOD/Shi-*scid*, IL-2R<sup>null</sup>) の大腿四頭筋に移植した。その結果、移植後4週間目に摘出した大腿四頭筋において、抗ヒトアルブミン抗体陽性、抗ヒト肝細胞抗体 (CK8/18) 陽性、抗ヒトビメンチン抗体陽性を示す細胞を検出することに成功した。

#### D. 考察

国立成育医療センターにてインフォームドコンセントが得られたヒト肝組織から、免疫不全マウス体内でアルブミン産生を伴うヒト肝細胞の分離と培養に成功した。以上のことから、本事業で利用され得る標的細胞の供給体制は実験動物レベルで完了したと考えられる。

今後は標的細胞を分担研究者へ安定供給することを目的として、標的細胞の効率良い分離・培養方法の確立を目指す必要がある。

#### E. 結論

本事業を進展させるためには、ヒト細胞・組織を用いた評価が必要不可欠となると考え、ヒト肝組織から細胞を分離・培養し、本事業にて利用できる体制を整えた。今後は本研究によって供給可能となったヒト肝細胞への遺伝子導入技術の確立、および遺伝子疾患モデルマウスを用いた *in vitro*、*in vivo* における細胞機能評価・検証が期待できる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito AT, Nishi J, Ueno H, Umezawa A, Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M, Komuro I. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature*. 454(7202):345-349. 2008.
2. Sullivan S, Ichida JK, Umezawa A, Akutsu H. Elucidating nuclear reprogramming mechanisms: taking a synergistic approach. *Reprod Biomed Online*. 16(1):41-50. 2008.
3. Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A,

Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(35):12921-12926. 2008.

4. Seko Y, Azuma N, Takahashi Y, Makino H, Morito T, Muneta T, Matsumoto K, Saito H, Sekiya I, Umezawa A. Human sclera maintains common characteristics with cartilage throughout evolution. *PLoS ONE*. 3(11):e3709. 2008.

5. Kawakita A, Sato K, Makino H, Ikegami H, Takayama S, Toyama Y, Umezawa A. Nicotine acts on growth plate chondrocytes to delay skeletal growth through the  $\alpha 7$  neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *PLoS ONE*. 3(12):e3945. 2008.

6. Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N. Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol*. 28(7):2125-2137. 2008.

7. Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells*. 26(7):1695-1704. 2008.

8. Kami D, Shiojima I, Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y, Ishii R, Naito AT, Toyoda M, Saito H, Watanabe M, Komuro I, Umezawa A. Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PLoS ONE*. 3(6):e2407. 2008.

#### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



## マイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入

分担研究者 松本洋一郎 東京大学大学院工学系研究科 教授

### 研究要旨

超音波遺伝子導入法は超音波照射によりキャビテーションバブルが発生し、そのバブルが崩壊されるときに細胞膜に穴が開き、マイクロバブルを併用することにより遺伝子導入が促進されると考えられているが詳細なメカニズムは分かっていない。本研究の最終目標はマイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入の機序の解明及び、より低侵襲・高効率な手法の開発である。本年度は、サンプル数を十分確保しつつ遺伝子導入率のパラメータ依存性を見ることを目標とする。細胞を培養した容器内に、導入する DNA とマイクロバブルを加え、ピエゾトランスデューサにより超音波を照射した。ターゲットとする細胞には、従来の方法では遺伝子導入が起こりにくいマウス胎児性線維芽細胞系(NIH3T3)を選択した。導入する遺伝子は、レポーター遺伝子である GFP plasmid を用いた。照射する超音波は、周波数が 2MHz のパースト波(Duty Cycle 10%, 波数 40/360)を採用した。また、マイクロバブルは超音波造影剤である Sonazoid®を用いた。本研究では導入条件の如何なる因子が導入率を高めるのかを調べた。その結果、マイクロバブルの数密度が多いほど、また超音波強度が大きいほどあるいは照射時間が長いほど遺伝子導入率が上昇することを確認した。

### A. 研究目的

近年、医療・生化学・生物学等の進歩により、多くの疾患の原因が遺伝子異常に由来すると明らかになってきている。これらの疾患の治療法の一つとして遺伝子治療が注目されている。遺伝子治療では細胞への遺伝子導入をいかに行うかが課題となる。現在さまざまな遺伝子導入手法が確立されているが、副作用の危険性や侵襲性といった問題点を抱えている。そこで近年注目されているのが超音波を用いた遺伝子導入法である。この手法を用いることで低侵襲な遺伝子導入が可能となる上、導入部位の選択も可能となる。

超音波遺伝子導入法はマイクロバブルを併用することで導入効率が向上することが知られている。この原理はキャビテーションバブルやマイクロバブルの崩壊時に細胞膜表面に向かって気泡内に液柱ジェットが生じ、その圧力によって細胞膜に小孔が形成され、遺伝子が導入されると考えられているが、詳細な機序は不明である。

本研究の最終目標はマイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入の機序の解明、及び、より低侵襲・高効率な手法の開発である。そのためにはまず、超音波照射時の条件変化による遺伝子導入率変化の確認を行うとともに、遺伝子導入現象を分析的に検討することで導入率向上への指針を示すことを目標とする。

### B. 研究方法

Fig.1 に実験装置の概略図を示す。ファンクションジェネレータ(NF 社製 WF1944A)からのパースト波

をアンプ(E&I 社製 2100L)により、出力を増幅させて、トランスデューサから平面波として、超音波を発生させた。周波数は 2.00 MHz とし、Duty Cycle 10 % (40/360) のパースト波として照射した。細胞を 24 well プレート内で培養し、マイクロバブルを導入する遺伝子を混合した培養溶液にトランスデューサを浸し、上部から超音波を照射した。遺伝子を導入させる細胞はマウス線維芽細胞系(NIH3T3)を用いた。線維芽細胞は多機能な未分化細胞で、軟骨への分化誘導遺伝子を細胞外から導入することで軟骨組織の再生治療へ応用が期待されている。導入する遺伝子は、レポーター遺伝子である GFP plasmid を用いた。細胞内に導入されると蛍光タンパク質が生成され、遺伝子が導入された細胞の特定が可能となる。また、マイクロバブルは超音波造影剤として用いられている Sonazoid®を用いた。

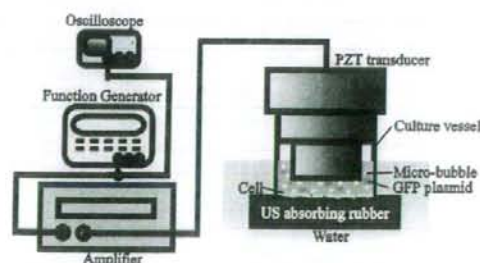


Fig.1 Experimental apparatus

## (倫理面への配慮)

該当しない

## C. 研究結果

遺伝子導入率は超音波照射 48 時間後にフローサイトメトリーにより測定した。これは、GFP plasmid が細胞内に導入されると 48 時間後をピークに細胞内に蛍光が見られるためである。超音波を照射していない細胞をコントロールとして蛍光強度の閾値を定めることで遺伝子導入細胞を定義し、全生存細胞数に対する遺伝子導入細胞の割合として遺伝子導入率を求めた。実験条件は、GFP plasmid 濃度を  $15 \mu\text{g/ml}$ 、マイクロバブル数密度を  $1.7 \times 10^5 \text{ count/mm}^3$  と設定し、超音波強度と超音波照射時間をパラメータとした。実験結果を Fig.2, Fig.3 に示す。超音波強度が高いほどまた、超音波照射時間が長いほど、遺伝子導入率も向上しているといえる。ただし、本研究の実験条件下においては遺伝子導入率が 1 % 以下と大変低くなっている。

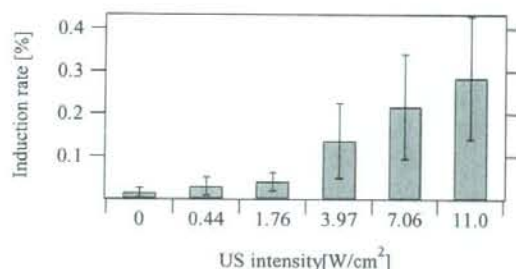


Fig.2 Gene induction rate dependent on US intensity (US exposure time 60 s)

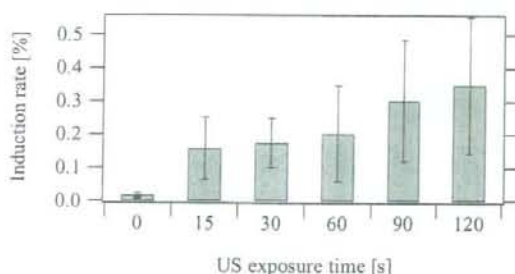


Fig.3 Gene induction rate dependent on US exposure time (US intensity  $1.76 \text{ W/cm}^2$ )

## D. 考察

### (1) 遺伝子導入現象の分析的検討

超音波強度をさらに大きく、かつ照射時間をさらに長くするほど遺伝子導入率の向上が期待される。しかし、まず行った実験条件下において遺伝子導入率が低い原因を特定し、遺伝子導入現象を以下のように要素的現象に分解し、それぞれについて検討することで、更なる遺伝子導入率向上を目指す。

①超音波照射により細胞膜に小孔が生じる。

②生じた小孔を通じて細胞内に遺伝子が取り込まれる。

③超音波及びマイクロバブルの作用を受けた細胞が生存する。

④細胞内で遺伝子が発現する。

本研究では、まず、評価可能な①及び③について検討する。

### (2) 細胞生存率測定

超音波照射により細胞内に高い確率で遺伝子が導入されたとしてもその導入された細胞が生存する確率が低いとすると最終的な遺伝子導入率は小さくなる。そこで、細胞の生存について論じるために、超音波照射後の細胞生存率を細胞毒性試験試薬 Cell Counting Kit 8 (以下 CCK8) を用いて測定する。CCK8 は生細胞の代謝により還元され、橙色の formazan が生成される。formazan 生成量は生細胞数に比例するため、コントロールの吸光度に対するサンプルの吸光度を求めることで生存率を求められる。超音波照射直後、及び 48 時間後に細胞に CCK8 を加え、3 時間程度呈色反応させた後に吸光度を測定した。結果を Fig.4, Fig.5 に示す。この結果から、照射直後、48 時間後ともに 80 % 程度の細胞が生存していることが明らかとなった。そのため、遺伝子導入率向上のためには残った生存細胞について分析する必要がある。

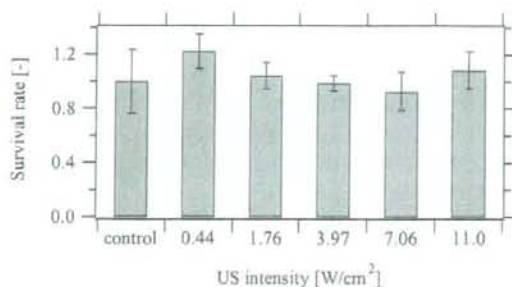


Fig.4 Cell survival rate (shortly after US exposure)



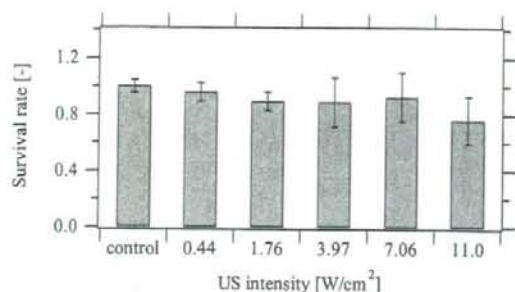


Fig.5 Cell survival rate (48 hours after US exposure)

### (3) 小孔形成細胞の可視化

ここでは細胞に小孔が生じていることを確認する実験について述べる。細胞に小孔が形成されたことは Propidium Iodide(以下 PI)を用いて確認できる。PI は細胞の核を染色する作用があるが、生細胞の膜を透過できないため、小孔が生じた細胞の核のみが染色される。超音波照射時に PI を培養液中に混和することで小孔形成細胞の特定が可能となる。本実験では蛍光観察により可視化を行った。超音波強度を  $1.76 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間を 60 s とした。Fig.6 に明視野観察画像を、Fig.7 に同位置での蛍光観察画像を示す。これらより大多数の細胞に小孔が生じていることが判明した。

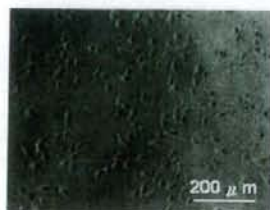


Fig.6 Bright field image



Fig.7 Fluorescence image

## E. 結論

超音波照射条件を変化させて遺伝子導入率を測定することにより、超音波強度を大きくするほど照射時間を長くするほど遺伝子導入率が向上することを確認した。しかし、実験条件下においては 1% 以下であった。生存率測定と小孔形成細胞の可視化を行った結果、80% 程度の細胞が生存しており、また多くの細胞に小孔が形成されていることが判明した。したがって、遺伝子が細胞に取り込まれない、または遺伝子が発現しないことが、遺伝子導入率が低い主因であると示唆される。このことを明らかにすることが今後の課題である。

## F. 健康危険情報

統括研究報告書に記載

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1. Yoji Nakamura, Kiyoshi Yoshinaka, Shu Takagi, Yoichiro Matsumoto, Ultrasound gene transfer into fibroblast cells under microbubble, 8th international symposium on therapeutic ultrasound, 103, 2008.9.13
2. 橋理恵, 岡本旭生, 葭仲潔, 高木周, 松本洋一郎, 超音波印電子導入の蛍光顕微鏡による可視化, 可視化情報全国講演会 2008, Vol28, No2 155-156, 2008.10.11
3. 橋理恵, 岡本旭生, 葭仲潔, 高木周, 松本洋一郎, マイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入に関する研究, 第 7 回日本超音波治療研究会, 2008.11.29
4. 橋理恵, 岡本旭生, 葭仲潔, 高木周, 松本洋一郎, マイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入に関する研究, 第 14 回キャピテーションに関するシンポジウム, 2009.3.20

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 音響放射力を利用した流路内のマイクロカプセル捕捉法の検討

分担研究者 梶田晃司 東京農工大学大学院生物システム応用科学府 准教授

### 研究要旨

本研究では、局所的な超音波から生じる音響放射力特性を利用し、単純な形状の模擬血管において流体中に存在するマイクロカプセルの挙動を制御する研究を進めている。超音波を局所的に集束させると、音響放射力が形成され、空気を含んだマイクロカプセルを集束させたり、その進路を制御することができる。本報告書ではそのための実験系を構築することにより、分岐を有する模擬血管内でカプセルの進行方向を操作できる現象と、また直線流路内にカプセル堆積する現象を示している。今後、超音波の様々な条件に対する、カプセルの挙動の観測法の確立と、理論的検証が必要となる。

### A. 研究目的

中空マイクロカプセルに薬物を含ませ、患部に届ける物理的 DDS の研究では、マイクロカプセルを体外からの超音波照射によって破壊することで目的部にのみ投薬を行う。カプセルに含まれる気体は血液中では優れた超音波感受性を持つため、体外からのモニタリングが容易であり、カプセルの検出と破壊を超音波のみによって行うことが出来る。またこの手法を化学的 DDS や遺伝子治療と組み合わせることにより、カプセルに含まれる薬物を替えるだけで様々な投薬治療を低コストで行うことが出来る。最近では、抹消血管さえも通過することが出来るマイクロカプセルが開発されているため、実現性は高いと考えられる。超音波とマイクロカプセルを用いた DDS 実現のためには大きく分けて以下の3つの技術が必要になる。

- i) カプセルを体内の目的部に誘導・捕捉する技術
- ii) カプセルを破壊する技術
- iii) 体内のカプセルのモニタリング技術

これまでの研究により、ii)では超音波の照射によるカプセルの崩壊、さらには超音波音場内での気泡運動の観察や理論的考察などが行われてきた。iii)に関してはカプセル自身が音響的な反射体となるため、超音波での検出には大きな問題はない。しかしながら、i)に関しては体内に投与した後のカプセルは血流に任せるのみで、拡散によって目的部でのカプセル濃度は低くなり、効果的な投薬治療が行えないといった問題が残っていた。

そこで我々は、分岐を有する模擬血管に超音波を照射することでカプセルに経路選択機能を付加できることを示し、理論的検証を行った。ここでは超音波の音圧や、水流の流速などのパラメータ変化に伴うカプセル誘導・捕捉の精度について光学的観測を行い、そのための条件を算出したので報告する。

### B. 研究方法

#### (1) マイクロカプセルとその懸濁液

本研究ではマイクロカプセルとして、松本油脂社製マイクロスフェアF-80Eを用いた。このカプセルは熱可塑性高分子（AN系コポリマー）の殻で、炭化水素（イソブタン）を内包している。生分解性がないため生体で使用することは出来ないが、本研究で用いる音圧及び流速の範囲で安定であるため採用した。またカプセルの直径は、通常のマイクロバブルで用いられるサイズよりも1桁大きい63-75ミクロンに統一した。本来であれば、赤血球（直径約8ミクロン）程度のサイズのカプセルを用いるべきであるが、後述する模擬血管の製作限界に対する顕微鏡の倍率との関係上この範囲となった。カプセルの顕微鏡写真をFig.1に示す。



Fig.1 Microscopic image of microcapsules F-80E

カプセル懸濁液は、マイクロスフェアF-80Eは粉体状態で存在し、そのサイズは30ミクロン以下のものから120ミクロン程度のもので含まれる。そこでカプセルを水に溶かし懸濁液を作成し、目開き各38, 63, 75, 90ミクロンの篩（ふるい）を用いてカプセルサイズを選別した。

#### (2) 水流中のカプセルに対する音響作用力

マイクロサイズのカプセルやバブルは内部に気体を含むため、超音波照射下で膨張収縮運動（体積振



動)を行う。この体積振動とカプセル付近の音圧勾配の積の時間平均によりカプセルが超音波から受ける音響放射力が決まる。一般的に、音響放射力とはカプセルを超音波の伝播方向へ移動させる力である。そしてこの力は水流中を流れるマイクロカプセルにも作用し、例えば Fig.2 に示すように流体中を移動するカプセルに超音波を照射すると、カプセルの軌跡を制御出来ると考えられる。

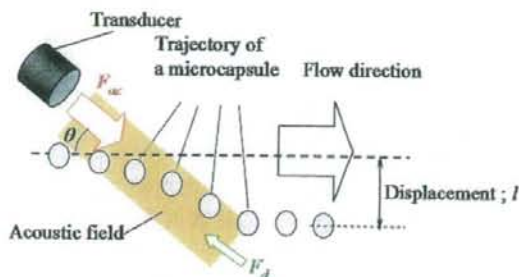


Fig.2 Trajectory of a microcapsule in flow under ultrasound emission.

このうち、超音波がカプセルに及ぼす音響放射力の式は次式で表される。

$$F_{ac} = \frac{4}{3} \pi R_0^3 A \frac{P_A^2}{\rho c^2} \quad (1)$$

ここで  $\rho$  は媒質の密度、 $c$  は音速、 $P_A$  は音圧、 $R_0$  はカプセル径、 $A$  は定数である。また流速  $u_f$  で粘性率  $\mu$  の溶液が流れる流路内のカプセルが受ける抗力は、ストークスの法則より次式で表される。

$$F_d = 6 \pi R_0 \mu u_f \quad (2)$$

したがってカプセルは音場領域において、音響放射力の発生方向に、ストークス抵抗に逆らいながら Fig.2 に示すように移動すると考えられる。カプセルが音響放射力によって移動する距離は式(3)で表される。

$$l = \iint \frac{(F_{ac} - F_d) \sin \theta}{m} dt dt \quad (3)$$

### (3) 分岐を有する模擬血管による誘導実験

実験に用いる模擬血管として、超音波透過性に優れたポリエチレングリコールを用いて外形  $80 \times 50 \times 15 \text{ mm}$  の直方体を作成し、その内部に Fig.3 のように内径  $2 \text{ mm}$  で 1:2 の Y 字型分岐を形成した。分岐部における超音波照射下のカプセル挙動を観察するために、observed area をマイクロ스코プ (LH-7700, オムロン) で観測する実験系を構築した。

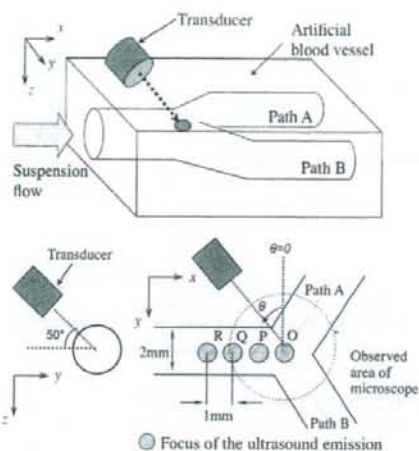


Fig.3 Schematic view of the bifurcated artificial blood vessel.

超音波の照射には中心周波数  $1 \text{ MHz}$  の集束型狭帯域超音波トランスデューサ (PA072, NTR 社製) を用い、ファンクションジェネレータ (WF1946B NF 社製) により、発生させた正弦波を高周波増幅器 (T145-5016A サムウェイ社製) で増幅した。また  $65\text{--}73 \text{ ミクロン}$  のカプセルの共振周波数は約  $100 \text{ kHz}$  前後であり、これによって超音波照射によるカプセル崩壊の可能性は小さい。超音波の音圧と水流の流速の範囲は、 $120\text{--}160 \text{ kPa}$ 、 $100\text{--}250 \text{ mm/s}$  とした。

トランスデューサは直径  $25 \text{ mm}$  の円筒形で、照射面から中心軸上  $45 \text{ mm}$  の位置で放射音圧が最大 (半値幅約  $3 \text{ mm}$ ) となることから、トランスデューサの設置は模擬血管の流路との距離を  $45 \text{ mm}$  に保つことにした。超音波を照射する地点は Fig.3 に示す各地点で、模擬血管の中心軸交点を O 地点とし、この点を基準に P, Q, R を  $1 \text{ mm}$  間隔に決定した。そして O-R の各地点に、トランスデューサを  $y\text{--}z$  平面に対して  $50^\circ$  と固定し、さらに  $x\text{--}y$  平面上のトランスデューサの設置角度  $\theta$  を  $-50^\circ$  から  $80^\circ$  まで変化させ、カプセル誘導実験を行った。また超音波照射地点の変更は、照射角度を決めた後に  $x\text{--}y\text{--}z$  スリムステージ (LT-907-S1, 中央精機社製) を用いて行った。

### (4) 直線流路による捕捉実験

ところで上記の実験系の他に、Fig.4 に示すような直線流路の模擬血管に対し、カプセルの流れに拮抗する方向から超音波を照射する実験系も構築した。模擬血管の製作、超音波の条件などは上記と同じである。トランスデューサは最大 2 個とし、観測地点の上流から注射器を用いて流路内に注入した。そして分岐を有する流路と同様に、マイクロ스코プを用いて焦点付近を流路の底面から倍率 50 倍で観測し、カプセルの挙動の評価を行った。

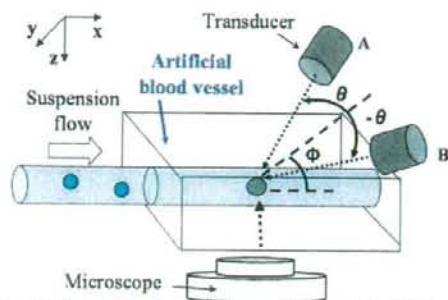


Fig.4 Schematic view of the straight artificial blood vessel.

(倫理面への配慮) 該当しない

### C. 研究結果

#### (1) 分岐を有する模擬血管内の観察

Fig.3 で示した実験系において、流速 100mm/s で流路を流れるカプセルに対して、音圧 160kPa の超音波を Q 地点から流路 B の方向に照射した。その結果、カプセルは流路壁面に押さえつけられ、超音波照射方向に誘導される様子が観察された。Fig.5 にカプセル懸濁液を注入後 200ms 間隔で撮影された分岐部の連続写真を示す。

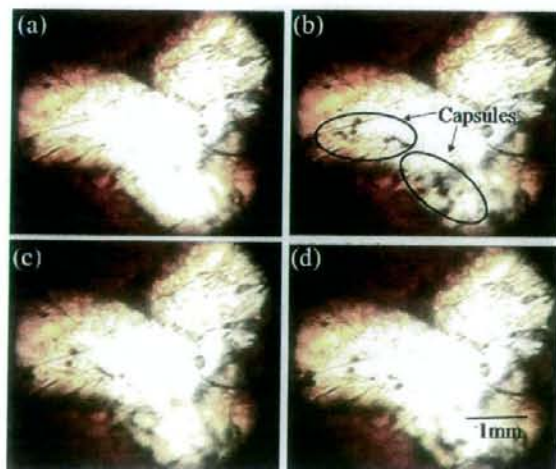


Fig.5 Time series images of the observed area captured every 200ms when capsule solution is injected after the ultrasound radiated at the point Q.

この現象は超音波の照射を停止するとほぼ同時に確認されなくなった。そのためカプセル誘導が音響放射力によって起こされたことが確認された。

#### (2) 直線流路内の観察

Fig.4 の実験系において、まず粒子径が 45、75 ミクロンの 2 種類のカプセルを使用し、 $\alpha=0^\circ$  で 1 個

のトランスデューサにより捕捉実験を行った結果、両方ともカプセルが集合体を形成しながら流路中央で捕捉されている様子を観測した。次に、音圧 110-210kPa、流速 40-100mm/s の間で変化させた時の捕捉されたカプセル集合体の大きさを、画像解析ソフトを使用して評価した。その結果、音圧の増加による捕捉量の増加と流速の上昇により捕捉量が減少する傾向を観測した。また、粒子径 45 ミクロンの方が 75 ミクロンより捕捉量が多かった。

次に粒子径 4 ミクロンのカプセルに変更した結果、流速が 20mm/s 以下であるという条件付きながら、同様の捕捉現象を観測出来た。流速 20mm/s で流路を流れるカプセルに対して、音圧 210kPa の超音波を照射した場合に、カプセルが捕捉されるまでの様子を Fig.6 に示す。また画像処理の結果から、画像中でカプセルが占める面積を捕捉量として研鑽した。Fig.7 に音圧、流速の変化による捕捉量の変化を示す。この結果、血球程度のサイズのカプセルが捕捉できる事が示された。又、トランスデューサ B も使用し、 $\alpha=30^\circ$  で 2 つの音源を利用し捕捉を試みた結果、若干ではあるが捕捉量の増加と捕捉位置の変動が減少し、安定性が向上した。

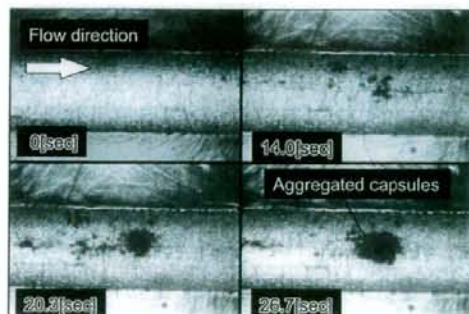


Fig.6 Time series image of trapped microcapsules (Sound pressure 210[kPa], Flow velocity 20[mm/s])

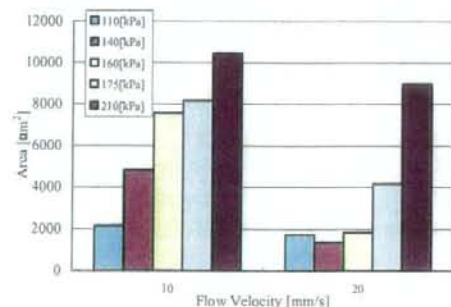


Fig.7 Variation of trapped amount in microcapsules

### D. 考察

分岐を有する模擬血管の実験では、160kPa 程度の



高音圧であればカプセルの誘導が可能であり、音圧を下げるに従いカプセルの誘導精度が落ちていることが分かった。これは音響放射力が小さくなるため、カプセルを目的の流路に移動させることが出来ないためと考えられる。一方、流速が速くなるにしたがって、カプセルが音場領域を通過する時間が短くなる。そのため、カプセルが受ける音響放射力の影響が小さくなり、カプセルの誘導が起り難くなると考えられる。流速については100-250mm/sの間で実験したが、本研究が目的とする抹消血管領域での流速はかなり低くなるため、生体内でも同様の現象を起こすことは可能と考えられる。

一方、直線流路の実験では、赤血球程度の大きさのカプセルに対して音響放射力を作用させ、20mm/sと低流速ながら流路中に捕捉できることを確認した。この現象が観察された音圧は210kPaと高いため、流速が早くなれば更に高い音圧値が必要になることが考えられる。よって生体応用のためには、できるだけ低い音圧値で同様の現象を実現する必要がある。

## E. 結論

本研究では、マイクロカプセルを用いた超音波DDS実現のため、超音波照射によって生じる音響放射力によって、流路内のカプセルの挙動を制御できることを示した。今後はシミュレーションにより実験結果との比較を行いながら、超音波に関する最適な条件の導出を目指す。

## F. 健康危険情報

統括研究報告書に記載

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 梶田晃司、村松悠佑、溝部一行、石原謙：「超音波定在波の印加による流路中のマイクロカプセルの局所的濃度制御とその観測」、生体医工学、Vol.46, No.2, pp.275-282, 2008
2. 梶田晃司：「マイクロカプセルとドラッグデリバリー」、日本機械学会誌「音響関連技術 音響技術でできること」特集、Vol.111, No.1074, pp.404-407, 2008

### 2. 学会発表

1. Yusuke Muramatsu, Sawami Ueda, Ryusuke Nakamoto, Yusuke Nakayashiki, Kohji Masuda, Ken Ishihara: "Active path selection of fluid microcapsules by acoustic radiation force in the artificial blood vessel," Proc. of 4th European Medical & Biological Engineering Conference (EMBEC'08), Nov. 2008, Antwerp,

pp.1589-1593

2. Yusuke Muramatsu, Sawami Ueda, Ryusuke Nakamoto, Yusuke Nakayashiki, Kohji Masuda, Ken Ishihara: "Study of effect in active path selection of fluid microcapsules to the variation of ultrasound emission at the bifurcation point," Proc. of the 29th Symposium on Ultrasonic Electronics, Nov. 2008, Sendai, pp.291-292
3. 村松悠佑、上田沢美、梶田晃司、石原謙：「血管内を流れるマイクロカプセルに対する音響放射力の影響の検討」、日本超音波医学会 第81回学術集会論文集、Vol.35, Suppl., 2008年、神戸、p.S272
4. 梶田晃司、石原謙、上田沢美、村松悠佑：「マイクロカプセルの血管内局所的濃度変化のための音場形成法の検討」、第47回日本生体医工学会大会プログラム・論文集、2008年、神戸、CD-ROM

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
本研究に関しては、なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 超音波診断/自動照射システムの検証

分担研究者 三木基弘 アロカ株式会社 常務取締役

### 研究要旨

本研究では、腹腔内臓器組織に対し、高精度で超音波照射が可能なシステムを構築することが目的である。特に、母体外からの超音波照射により胎児標的組織（細胞）に目的遺伝子を導入し、遺伝子機能異常の出生前発現を低侵襲性に一定期間は正する安全性の高い胎児期遺伝子治療を確立するためには、超音波診断装置とその周辺技術の開発が必要である。本年度は、標的部位での超音波照射によるマイクロカプセル/バブルの破碎を達成するために、超音波診断画像を実時間で取り込み、標的部位のみにマイクロカプセル/バブル破碎用超音波を自動照射するシステムを検証した。

### A. 研究目的

本研究の目的は、母体外からの超音波照射により胎児標的組織（細胞）に目的遺伝子を導入し、遺伝子機能異常の出生前発現を低侵襲性に一定期間は正する安全性の高い胎児期遺伝子治療を確立することである。本課題を達成するためには、高精度な超音波診断装置とその周辺技術の開発が必要不可欠である。

出生前診断とは出生前に胎児の状態を調べる検査であり、先天性異常や病気の有無を診断する。代表的な検査方法は、超音波検査、羊水検査、絨毛検査、臍帯採血や母体血清マーカーなどが挙げられる。その中でも、一般的な検査方法として、エコー（超音波検査）が挙げられ、検査機器の性能の向上（2Dから3D/4D）と共に、胎児の障害が超音波検査で判明する頻度は高くなっている。したがって、胎児治療をより安全かつ低侵襲に行うためには、実時間・高画質・高分解能の超音波画像をナビゲーション画像として利用しなければならない。そこで、本課題では、分担研究者千葉敏雄らが開発した『胎児臓器組織への超音波自動照射システム』を用い、超音波診断装置との連動性を検証し、模擬胎盤から羊胎児（*in vivo*）に利用するための基礎検討を行った。

### B. 研究方法

#### B-1 システム構成

本システムは主に、HIFU 照射デバイス、超音波診断装置（Prosaound α 10、アロカ株式会社）、超音波画像解析と HIFU 照射指示を行うワークステーション、ファンクションジェネレータ、RF パワーアンプの5つの部分から構成される（Fig. 1）。HIFU 照射デバイスは、すり鉢状の圧電セラミックをアルミニウム製のハウジングで覆ったトランスデューサと、トランスデューサの側面に固定された超音波プローブからなる。

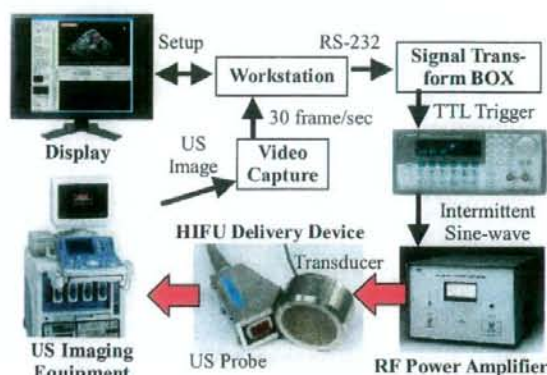


Fig. 1 System configuration.

#### B-2 HIFU 自動照射システムの検証

本実験では、超音波診断装置と HIFU 自動照射システムとの連動性について確認・検証した。ただし本実験では実際には HIFU 自動照射を行わず、シミュレーションのみを行った。

##### 1) 模擬胎盤を用いた超音波画像の取り込み

本実験では、アクリル製の水槽に恒温装置によって子宮内とほぼ同じ 37℃ に保った脱気水を満たし、模擬胎盤を沈めて、診断機器/自動照射システムとの連動性のみ検証した（Fig. 2）。



Fig. 2 実際に使用した模擬胎盤



## 2) 羊胎児を用いた超音波画像の取り込み

本実験では、四肢を手術台に固定された状態の羊（種類コリデル、妊娠 89 日目、胎児長 250mm）に対して、実際の HIFU 照射は行わず、診断機器/自動照射システムとの連動性のみ検証した（Fig. 3）。



Fig. 3 羊胎児の超音波診断

## (倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

## C. 研究結果

### 1) 模擬胎盤を用いた超音波画像の取り込み

3D 超音波プローブを用いて模擬胎盤の 3D 超音波画像を画像解析用のワークステーションに入力した。コンソール上でへその緒部分の 3D モデルが取り込まれていることを確認し、また、HIFU の焦点位置に合わせるために実時間（秒間 30 フレーム）で画像を更新できることを確認した。



Fig. 4 模擬胎盤の 3D/4D 超音波画像の取り込み

## 2) 羊胎児を用いた超音波画像の取り込み

2D 超音波プローブを用いて、羊胎児の 2D 超音波画像を画像解析用のワークステーションに入力した。コンソール上で超音波画像を確認しながら、遺伝子導入の標的とする肝臓組織を探し、HIFU の焦点位置に合わせるため、同じく実時間（秒間 30 フレーム）で画像を更新できることを確認した。

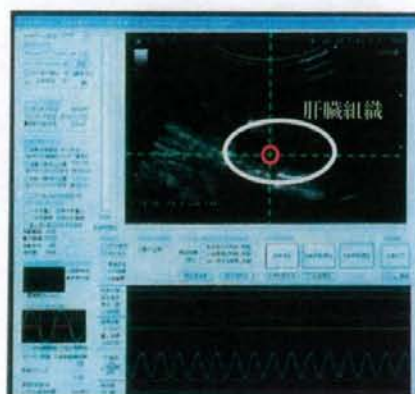


Fig. 5 羊胎児の肝臓組織 2D 超音波画像の取り込み

## D. 考察

本研究では、標的対象に対し、超音波自動照射システム内で、リアルタイムで、エコーとの連動性を確認できた。特に、模擬胎盤では、へその緒付け根を高精度画像で確認できた。また、in vivo 実験で検証するために、妊娠コリデルを用いた、コリデルの妊娠期間は約 147 日であるが、本実験では、妊娠中期の胎児を対象とし、本システム内で肝臓組織の位置情報を捉えることに成功した。本事業において、標的組織である胎児肝臓は補足できたが、実際の対象物は、羊水中での胎児肝臓である。したがって、今後、超音波診断装置（Prosaound10、アロカ株式会社）を用いて、疑似羊水モデル（in vitro）による標的部位での焦点位置合わせの精度向上を課題とし、より安全な低侵襲治療システムを構築する。

## E. 結論

本研究では超音波診断/自動照射システムの開発を行った。本システムはコンピュータ制御下に腹腔内臓器組織の超音波画像を解析し、標的部位に対し至適な超音波照射を行う。本年度は 3D/4D 超音波診断装置と超音波自動照射ソフトとの連動性を検証し、本システムが有効である可能性が見出された。さらに、超音波診断/自動照射システムの標的部位での焦点の精度の有無を評価し、より安全な手術システムとしての in vivo への応用を目指していく。

**F. 健康危険情報**

統括研究報告書に記載

**G. 研究発表**

**1.論文発表**

なし

**2.学会発表**

なし

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

**1. 特許取得**

なし

**2. 実用新案登録**

なし

**3. その他**

なし