

2009 13003A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 千葉 敏雄

平成22（2010）年 5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. 胎児肝への超音波併用遺伝子導入手技 (in vivo) 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 ---- 8  
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. 音響放射力による生体内微小気泡制御法の検討----- 14  
榊田晃司
5. 超音波診断装置を用いた標的部位への遺伝子導入の基礎検討----- 19  
三木基弘
6. 組織由来幹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 ----- 24

### 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・破碎し、標的肝細胞・造血幹細胞に導入するシステムを開発する。前年度は、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）の開発と検証を進めた。本年度は、これらの技術を基盤としてより生体に近いモデルでの検証を進めた。次年度は、得られた成果をもとに、実際の疾患動物モデルへの応用、および本システムの完成に取り組む。

**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  
榊田 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/技術部長兼技術担当取締役  
宮本 義孝 名古屋大学医学系研究科/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。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**

本研究では、局所的な超音波から生じる音響放射力の特徴を利用し、単純な形状の模擬血管中を流れる、空気を含んだ微小気泡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、微小気泡を集合させたり、その進路を制御することができる。本実験では、分岐を有する模擬血管内で微小気泡の進行方向を操作できる現象と、また直線流路内に微小気泡を堆積させる現象を示している。前年度までは微小気泡の直径が数十マイクロンであり、生体応用できないサイズであったが、本年度は生体応用可能な直径 10 ミクロン以下の微小気泡を用いて検証した。

**B-2 超音波遺伝子導入技術の開発**

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。本研究の目的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。前年度は、標的細胞への遺伝子導入率を向上させるためには超音波照射の強度・時間が重要であることを明らかにしたが、その導入率が1%以下と低いものであった。本年度はその原因を解明し、さらなる向上を目指した。まず、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検証した。標的細胞として、従来法では遺

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、導入する遺伝子として、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 のバースト波(Duty Cycle 10%,波数 40/360)を採用した。

### B-3 胎仔肝への超音波併用遺伝子導入手技の開発

本年度は、細胞実験での結果をもとに、胎仔肝への超音波照射による遺伝子導入を試みた。具体的には、麻酔下に開腹した妊娠マウスで子宮を露出し、子宮内マウス胎仔の肝に、マイクロバブル(ソナゾイド)と DNA (GFP プラスミド) の混合液を直視下に注入した。注入後直ちに子宮外からの超音波照射を行い、その後に母体開腹創を縫合した。超音波照射後 24-48 時間で胎仔とその臓器を回収して GFP の発現につき検討した。

### B-4 ヒト肝細胞・組織の供給体制の整備

標的であ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遂行する上で、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。初代培養肝細胞の入手経路として、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、研究材料として有用な培養肝細胞の寿命延長株の樹立を試みた。

### B-5 組織由来幹細胞への超音波遺伝子導入・培養・保存方法の検討

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。中でも、肝臓には肝実質細胞以外にも様々な細胞が共存し、そこには多分化能を有する幹細胞(肝幹細胞など)が数多く存在する。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、移植・再生医療の新たな細胞源として注目され、比較的に入しやすい脂肪由来幹細胞(Adipose tissue-derived stem cells: ASCs)を利用して、遺伝子導入実験を行った。具体的には、マウス皮下

脂肪組織から分離、培養した ASCs に対して、超音波造影剤として利用されるマイクロバブル(ソナゾイド)とプラスミド DNA による遺伝子取り込みの基礎検討を行った。さらに、ヒト由来幹細胞への利用を考え、培養法と凍結保存の基礎検討も行った。

### (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に、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

粒子の直径が 10 ミクロン以下のカプセルを用いて、直径 2mm 程度の人工血管内で捕捉・誘導といった制御を行うために必要なパラメータを導出した。カプセルの直径が小さくなると、カプセルが受ける音響放射力の大きさは半径の 3 乗に反比例する。しかしカプセル自身が効率的にエネルギーを吸収する周波数の超音波を照射すると、Bjerknes 力が生じてカプセル同士が凝集を起こすことが確認された。このことを利用し、複数の超音波音源から照射される音波のエネルギーを一点に集束させることにより、直線流路内を 20mm/s で流れるカプセルを凝集させ、捕捉できることを確認した。また分岐を有する流路を用いて、超音波を照射する角度と位置を調整することにより、分岐部への到達前にカプセルを凝集させることにより、同じ流速で目的側の経路へほぼ 100%の効率で誘導できた。

## 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、効果的なプロトコルを見いだした。特に、高強度、長時間超音波照射により、遺伝子導入率の向上が示唆された。また、バースト周波数を小さくすることで導入率が向上する傾向も示唆された。さらに、遺伝子の高分子ミセル化を行うことによって、超音波遺伝子導入においても導入率が向上することを明らかにした。

## C-3 胎仔肝への超音波併用遺伝子導入手技の開発

マイクロバブルとの併用による遺伝子導入率の向上が確認され、超音波を用いる本手技は、胎児期遺伝子治療に応用可能であることが示唆された。さらに本研究では、高分子キャリア併用、もしくは標的指向性を *in vivo* 条件下で賦与した場合の検証も進めている。

## C-4 ヒト肝細胞・組織の供給体制の整備

前年度から引き続き、先天性代謝性肝疾患のレシピエント肝より、肝細胞を分離、増殖することに成功した（全16例：以下、レシピエント肝14例；正常ドナー肝2例）。また、これらの初代培養肝細胞の *in vitro* における特性解析を行い、正常肝細胞特異的遺伝子の発現が確認できた。

多くの初代培養細胞は20-40継代程度の増殖能力を持つものの、継代を重ねるにつれて、増殖能および分化能が低下し、細胞死をむかえる。研究で利用するために、より細胞の品質を高め、かつ腫瘍化能を持たない寿命延長株が必要であると考え、CDK4, Cyclin D1, hTERT, これら3種類の遺伝子の導入を試みた。その結果、メチルマロン酸血症(MMA)のレシピエント肝細胞、およびCPS1欠損症のレシピエント肝細胞の寿命延長株作製に成功した。

## C-5 組織由来幹細胞への超音波遺伝子導入・培養・保存方法の検討

超音波照射条件を設定し、マイクロバブル(0-40% v/v 細胞培養液)の量を変えながら、ASCsへのダメージを検証した。その結果、マイクロバブルの量が5-10%の時に効率よく破砕された。得られた知見をもとに、超音波照射条件(周波数: 3.122MHz, Duty比50%, Burst Rate 2.0Hz, Duration 10sec, 出力強度1.15-1.21 W/Cm<sup>2</sup>)を設定し、マイクロバブル(10% v/v 培養地溶液)、プラスミドDNA(20ug/mL)を加え実験を行ったところ、低い導入効率ではあるが、ASCsへの遺伝子発現が確認できた。

## D. 考察

超音波ナビゲーション技術では、生体応用可能な直径10ミクロン以下の微小気泡(マイクロカプセ

ルなど)を用い、体外から超音波照射によって生じる音響放射力により、流路内のカプセルの挙動(補足および誘導)を制御できることを示した。今後は、市販の超音波造影剤を用いて、より生体に近いモデルで検証を行う。また、生体内での照射位置を明確に確認するインターフェースの開発を進め、その安全性を高める。超音波遺伝子導入技術の開発としては、高強度、長時間超音波照射により、遺伝子導入率の向上が確認された。さらに、遺伝子の高分子ミセル化を行うことにより、プラスミドDNAの分解を抑制できるため、より超音波照射による遺伝子導入率が向上した。今後は、超音波照射条件だけでなく、高分子キャリアとの併用により標的指向性を高めるとともに、ヒト由来細胞(肝細胞および幹細胞)での検証を進める。胎仔肝への超音波併用遺伝子導入手技の開発については、子宮内マウス胎仔の肝に対して、マイクロバブル(ソナゾイド)とDNAプラスミドとの併用による遺伝子導入率の向上が確認された。これにより、超音波を用いた本手技が胎児期遺伝子治療に応用可能であることが示唆された。今後は、高分子キャリア併用、もしくは標的指向性を *in vivo* 条件下で賦与した場合の検証を進めてゆく。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余剰肝(疾患肝、正常肝)から、効率良く免疫不全マウス体内で正常機能を維持する肝細胞を分離し、培養、凍結保存する方法を開発した。また、研究材料として有用なレシピエント肝細胞の寿命延長株作製にも成功した。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(2年目)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)を基盤として、より生体に近いモデルでの検証を進め、有意の成果を得た。次年度は、実際の疾患モデルへの応用、および本システムの完成に取り組む。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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

## 胎児肝への超音波併用遺伝子導入手技（in vivo）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

本研究の目的は、胎児の先天性代謝異常に対する新たな遺伝子治療法を確立することにある。その手法として、まず、1) 遺伝子治療における目的遺伝子を運搬するキャリアーとして、非ウイルスベクターを用いた。続いて、2) 遺伝子導入手技として、母体外からの超音波照射を行うことで、出生前に安全かつ低侵襲性に治療を行うとともに、病状の重篤化を防止し、患者の予後改善を目指している。本年度は、目的実現のために、実験動物を用いた遺伝子導入を行った。

### A. 研究目的

本研究で我々が治療を目指す先天性代謝異常とは、遺伝子異常により酵素が正常に機能しない、あるいは酵素が欠損している病態である。症状は様々あるが、体内で特定の酵素が産生されないため代謝機能が働かず、その結果、一部の酵素が蓄積し、発達障害や意識障害・心身発達遅延を引き起こし、死亡する例も少なく無い。

現在の先天性代謝異常に対する治療法として、移植治療及び遺伝子治療が挙げられる。しかし、移植治療には、慢性的なドナー不足や移植後の免疫抑制剤副作用など、解決すべき多くの問題がある。一方、遺伝子治療においても、ウイルスベクターが用いられているが、その安全性が強く懸念されている。先天性代謝異常は難治性のものが多く、出生後早期に治療することにより機能回復が期待できるものもある。しかし、出生後治療のみでは患児への最適な治療時期を逃し、高額な医療費と長期の治療が本人、家族への大きな負担となる場合もある。

そこで、本研究では、より治療効果の期待できる胎児期での治療を目指している。さらに目的遺伝子を標的臓器へ導入する手法として、低侵襲性の超音波照射を用いる。遺伝子導入方法として胎児ヘリスクが少ない非ウイルス性ベクターをキャリアーとして用い、安全かつ低侵襲性の胎児期での遺伝子治療を目指している。

### B. 研究方法

超音波を用いた遺伝子導入には、プラスミド DNA (pEGFP-N3, Clontech)、超音波照射装置 (SONITRON 2000V, NEPAGENE) およびマイクロバブルを使用する。このプラスミド DNA には GFP 遺伝子がコードされており、細胞内に導入され遺伝子発現により蛍光タンパクが発現し、導入効率確認の指標となる。また、マイクロバブル (Sonazoid®, GE Healthcare)

には遺伝子導入効率を高める効果があり、培養細胞 (HepG2) への遺伝子導入実験より、その効果が確認されている (Fig 1)。



Fig 1 培養細胞への超音波を用いた遺伝子導入  
A. Sonazoid®のみ B. 超音波照射のみ  
C. Sonazoid®+ 超音波照射

In vitro で得られた遺伝子導入条件をもとに in vivo での超音波による遺伝子導入の確認のため、ICR マウスを用いて実験を行った。Frequency: 1MHz、Intensity: 1W/cm<sup>2</sup>、Duty rate: 50%、Time: 30sec の超音波照射条件で遺伝子導入実験を行った。

実際の手技は、ペントバルビタール麻酔下で、5週齢 ICR 系雌性マウス (20g~18g) を開腹後、肝左葉外側葉表面へ、プラスミド (30µg) とマイクロバブル (Sonazoid®) の混合液を注入した後、超音波照射を行い、その後に縫合閉腹した。超音波照射 24 時間後に犠死マウスより肝臓を切除し、蛍光顕微鏡にて GFP の発現を観察した。また、同様の実験をマウス胎仔 (妊娠 15 日) 肝に対しても行い、24 時間後に観察し遺伝子導入の評価・検討を行った。

### (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

超音波を用いた遺伝子導入後 24 時間経過したマウス肝臓において、GFP 遺伝子の発現が観察された。コントロールとして、混合液注入のみで超音波を照射しなかったサンプル及び超音波照射のみのサンプルにおいては、GFP 遺伝子の発現が観察されなかった (Fig 2)。同様の結果をマウス胎仔においても確認した (Fig 3)。

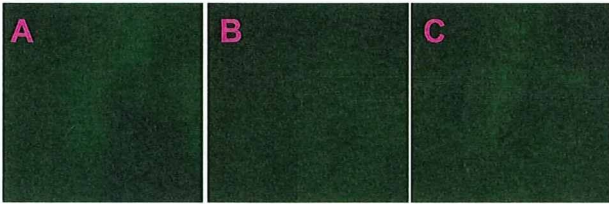


Fig 2 マウス肝臓への超音波を用いた遺伝子導入  
A. Sonazoid®のみ B.超音波照射のみ  
C. Sonazoid®+超音波照射



Fig 3 マウス胎仔肝臓への超音波を用いた遺伝子導入  
A. Sonazoid®のみ B.超音波照射のみ  
C. Sonazoid®+超音波照射

### D. 考察

遺伝子の導入効率を高めるうえで、Sonazoid®の併用が有用であることが示された。さらに、Sonazoid®と超音波照射の同時併用により、最も高い遺伝子導入効率を確認された。Sonazoid®非添加及び超音波照射のみのサンプルでは、遺伝子発現が確認されなかったことから、超音波を用いた遺伝子導入にはマイクロバブルが必要不可欠と考えられる。

本研究では、遺伝子導入効率をさらに向上させるべく実験を継続する。また、臨床応用により近い、疾患マウスモデルを用いた実験も継続していく。

### E. 結論

in vivoにおいて成体マウスへの超音波照射にて遺伝子導入が可能であった。同様にマウス胎仔においても、超音波照射による遺伝子導入が可能であった。

### 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

- 元文姫, 上野瞳, 穂刈玲, 柿本隆志, 久野周一, 土屋玲子, 宮本義孝, 絵野沢伸, 千葉敏雄. マイクロバブルと超音波による in vivo 遺伝子導入の試み. 第 32 回日本分子生物学会年会. 横浜, 2009 年 12 月 9-12 日
- 穂刈玲, 上野瞳, 元文姫, 久野周一, 柿本隆志, 土屋玲子, 宮本義孝, 絵野沢伸, 千葉敏雄. エコーガンによる非ウイルスベクターの細胞内への導入. 第 32 回日本分子生物学会年会. 横浜, 2009 年 12 月 9-12 日
- 土屋玲子, 上野瞳, 元文姫, 穂刈玲, 久野周一, 柿本隆志, 宮本義孝, 絵野沢伸, 葭仲潔, 松本洋一郎, 千葉敏雄. 第 8 回日本超音波治療研究会. 東京, 2009 年 11 月 28 日

### 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

## 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 独立行政法人国立成育医療研究センター 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とから、本研究は有効な治療法のない胎児および新生児の治療法開発の大いなる礎となる。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) 超音波音場形成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遂行する上で、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、研究材料として有用な培養肝細胞の寿命延長株の樹立を試みた。

### (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に、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ピエント肝より、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。

具体的には肝移植の際に生じた余剰肝 16 例の供与を受けた。16 例の肝組織の詳細は以下の通りである。

メチルマロン酸血症 (MMA) のレシピエント肝 ; 1 例、CPS1 欠損症のレシピエント肝 ; 1 例、OTC 欠損症のレシピエント肝 ; 1 例、アラジール症候群のレシピエント肝 ; 1 例、先天性門脈閉鎖症のレシピエント肝 ; 1 例、プロピオン酸血症のレシピエント肝 ; 1 例、胆道閉鎖症のレシピエント肝 ; 8 例、胆道閉鎖症のドナー肝 (正常肝) ; 2 例。以上、16 例の肝組織より 16 株の肝細胞の分離に成功した。

また、分離直後、細胞培養後の上記 16 株の肝細胞について凍結保存を行った。

これらの初代培養肝細胞の *in vitro* における特性解析の一環として、肝細胞特異的遺伝子のプライマーセットを用いて 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することができた。

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) の大腿四頭筋と頸部皮下に移植することにより、各細胞株の分化能の評価を行った。その結果、移植後 4 週間目に摘出した大腿四頭筋および頸部皮下において、抗ヒトアルブミン抗体陽性、抗ヒト肝細胞抗体 (CK8/18) 陽性、PAS 染色陽性を示すヒト細胞を検出することに成功した。

初代培養細胞の多くは 20 継代から 40 継代程度の増殖能力を持つものの、継代を重ねるにつれて、増殖能、分化能が低下し、細胞死をむかえることが分かっている。研究に用いる場合、再現性のある結果が求められることから、細胞の性質を保持し、腫瘍化能を持たない寿命延長株が必要であると考え、CDK4、Cyclin D1、hTERT、これら 3 種類の遺伝子の導入を試みた。その結果、メチルマロン酸血症 (MMA) のレシピエント肝細胞、および CPS1 欠損症のレシピエント肝細胞の寿命延長株作製に成功した。

### 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。

本事業の治療対象である胎児や新生児の有機酸代謝異常症、尿素サイクル異常症等の先天代謝異常

症では、生体試料の収集が非常に困難と考えられている背景の中で、患者さん由来の組織より複数の細胞株を樹立できた本研究成果は、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・機器を開発する上で大きなアドバンテージである。

### E. 結論

我々は本事業を進展させるために、ヒト余剰肝 (疾患肝、正常肝) から効率良く免疫不全マウスの体内で正常な機能を保持する肝細胞を分離し、培養、凍結保存する方法を開発した。また、研究材料として有用なレシピエント肝細胞の寿命延長株作製にも成功した。

本研究によって供給可能となった上記のヒト肝細胞、寿命延長株は、本事業の研究目的である標的細胞の小孔形成、および細胞内遺伝子導入技術の開発に大いに貢献できるに違いない。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Kawamichi Y, Cui CH, Toyoda M, Makino H, Horie A, Takahashi Y, Matsumoto K, Saito H, Ohta H, Saito K, Umezawa A. Cells of Extraembryonic Mesodermal Origin Confer Human Dystrophin in the Mdx Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *J Cell Physiol* (in press)
2. Haraguchi Y, Sekine W, Shimizu T, Yamato M, Miyoshi S, Umezawa A, Okano T. Development of a new assay system for evaluating the permeability of various substances through 3-dimensional tissue. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009, doi:10.1089/ten.TEC.2009.0459. (in press)
3. Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Hum Mol Genet*. 19(3):480-493, 2010.
4. Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T. Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. *Genes Cells*. 14(12):1395-1404, 2009.
5. Takahashi H, Toyoda M, Birumachi J, Horie A, Uyama T, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Shortening of human cell life span by induction of p16ink4a through the platelet-derived growth factor receptor beta. *J Cell Physiol*. 221(2):335-342, 2009.
6. Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, Akutsu H, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A. Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological

- co-activator EWS. *Exp Cell Res.* 315(16):2727-2740, 2009.
7. Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi JI, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation.* 78(2-3):137-142, 2009.
  8. Yazawa, T, Inanoka Y, Mizutani T, Kuribayashi M, Umezawa A, Miyamoto K. Liver receptor homolog-1 regulates the transcription of steroidogenic enzymes and induces the differentiation of mesenchymal stem cells into steroidogenic cells. *Endocrinology.* 150(8):3885-3893, 2009.
  9. Katsube K, Ichikawa S, Katsuki Y, Kihara T, Terai M, Lau LF, Tamamura Y, Takeda S, Umezawa A, Sakamoto K, Yamaguchi A. CCN3 and bone marrow cells. *J Cell Commun Signal.* 3(2):135-145, 2009.
  10. Segawa Y, Muneta T, Makino H, Nimura A, Mochizuki T, Ju YJ, Ezura Y, Umezawa A, Sekiya I. Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profiles. *J Orthop Res.* 27(4):435-441, 2009.
  11. Miyagawa Y, Okita H, Itagaki M, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N. EWS/ETS regulates the expression of the Dickkopf family in Ewing family tumor cells. *PLoS One.* 4(2):e4634, 2009.

## 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 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ことが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 のバースト波(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、効果的なプロトコルを見いだした。

### A. 研究目的

#### A-1 研究背景

近年、遺伝子に異常・欠陥があるがために発病してしまう病気を遺伝子の根本から治療することが試みられている。この遺伝子治療は細胞への遺伝子導入をいかに行うかが課題となる。すでに現在、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の問題点を抱えている。そこで、超音波を用いた遺伝子導入法が注目されている。この手法を用いることで低侵襲、かつ、目的とする部位のみの遺伝子導入が可能となる。超音波遺伝子導入法はマイクロサイズの気泡を併用することで導入効率が向上するという知見が得られている。

{1} 微小気泡の振動や崩壊時に生じる圧力により細胞膜に穴が形成されて、その穴を介して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。また、導入率が低く、導入条件の最適化がなされていないという問題がある。

#### A-2 研究目的

本研究の最終目標は、低侵襲・より高効率な手法の開発である。そのためにまず、遺伝子導入率を高める要因を明らかにすること、導入率向上への指針を示すことを目的とする。

### B. 研究方法

#### B-1 実験装置

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)からの出力をアンプ(E&I 社製 2100L, 325LA)により増幅させ、トラ

ンスデューサから平面波として、超音波を発生させる。周波数は 2.00 MHz とした。細胞へのダメージが少ないという知見が得られていることから[2]、バースト波を採用した。細胞は 24 well プレート内で培養したマウス線維芽細胞系(NIH3T3)を用いた。超音波造影剤として用いられているマイクロバブルである Sonazoid®を混和した培養溶液(D-MEM, FBS 10%, P/S 1%)にトランスデューサを浸し、上部から超音波照射を行った。培養容器の底は吸音材と接触させているため、培養容器内で超音波は進行波になっている。

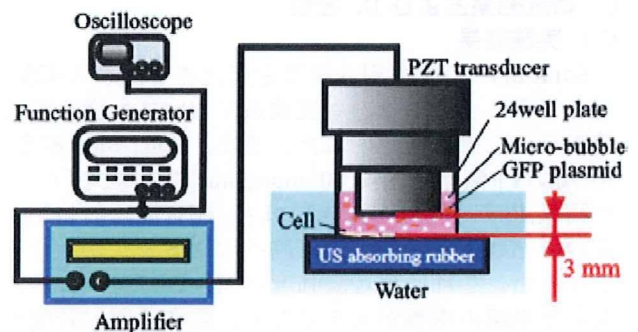


Fig.1 Experimental apparatus

#### B-2 超音波照射条件による効率化実験

##### B-2-1 実験概要

遺伝子導入率を向上させる方法として、細胞が死なない程度に細胞膜により大きく、長時間、穴を開けることが考えられる。そこで、よりよい超音波条件を探るため、遺伝子導入率と細胞の生存率の測定を行った。

## B-2-2 導入率測定法

導入する遺伝子は GFP プラスミド(15 µg/ml)を用いた。この遺伝子が導入された細胞は、細胞内で緑色蛍光タンパク質を生成するため、遺伝子が導入された細胞が判別可能となる。遺伝子導入後 48 時間後にタンパク質の生成量がピークに達するため超音波照射後 48 時間後にフローサイトメトリにより測定を行った。フローサイトメータの細い流路に細胞を一個一個流し、レーザー光を当て、その散乱光より細胞の個数を求め、散乱光の蛍光より遺伝子導入細胞を判別し、個数を求めて、導入率を測定している。

## B-2-3 生存率測定法

細胞の生存率を細胞毒性試験試薬 Cell Counting Kit 8(以下 CCK8)を用いて測定を行った。CCK8 は生細胞の代謝により還元され、橙色の formazan が生成する。formazan 生成量は生細胞数に比例し、溶液中の formazan 量と溶液の吸光度も比例する。このことから、超音波照射を行わない細胞の培養液をコントロールとし、コントロールの吸光度とサンプル培養溶液の吸光度を比較することで生存率を求めた。超音波照射直後と遺伝子導入率を測定している超音波照射後 48 時間後に、細胞培養液に CCK8 を加え、3 時間程度呈色反応させた後、吸光度を測定した。

### (倫理面への配慮)

該当しない

## C. 研究結果および D. 考察

### C-1 実験結果

Sonazoid®の体積割合濃度を変化させ、導入率測定を行うことにより、本実験系においても微小気泡造影剤の効果が確認された。また、Sonazoid®濃度 10%[V/V](気泡数密度  $10^5$  count/mm<sup>3</sup>)で実験を行った結果、超音波強度が大きいほど、超音波照射時間が長いほど導入率が向上し細胞へのダメージが大きくなった。これは超音波強度が大きいほどバブルの振動や崩壊の影響が大きくなり、超音波照射時間が長くなるほど、バブルの振動や崩壊の回数が増加して細胞膜に穴が開きやすくなるためであると考えられる。また、一回あたりのバースト波の ON, OFF の長さをもとに増加させると導入率が向上する傾向が確認され、Duty 比が同じであってもバースト周波数を小さくすると導入率が向上することが示された (Fig.2)。また、バースト波の 1 回あたりの ON の長さが増加することで細胞へのダメージが大きくなることが確認され、Fig.3 に示すようにバースト周波数を低くしても細胞へのダメージが大

きくなっていることが確認された。このため、1 回あたりのバースト波の ON の時間が長くなるほどバブルが大きく振動、あるいは崩壊しやすくなると考えられる。

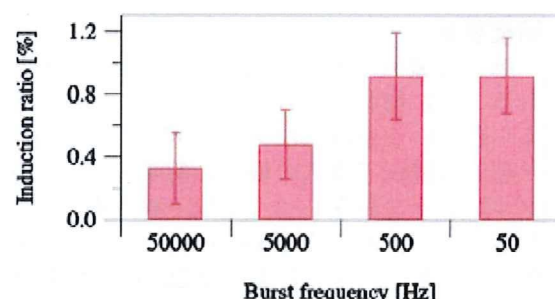


Fig.2 Gene induction ratio dependent on Burst frequency (Ultrasound exposure time : 60 s, Ultrasound intensity: 5.08 W/cm<sup>2</sup>, Duty ratio: 10 %)

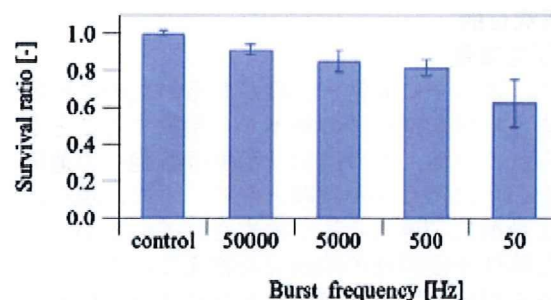


Fig.3 Cell survival ratio dependent on Burst frequency (Ultrasound exposure time : 60 s, Ultrasound intensity: 5.08 W/cm<sup>2</sup>, Duty ratio: 10 %)

### C-2 高分子ミセルを用いた遺伝子導入実験

導入率を向上させる他の方法として、遺伝子を細胞膜内に入りやすくすること、遺伝子の発現効率を上ることが考えられる。本実験では遺伝子をコンパクト化し、かつ遺伝子を安定化させることが可能であるという知見が得られている[3]高分子ミセル化を行った。遺伝子と高分子(PEG-PLys 12-13)を結合させることでミセル状にする方法である。この高分子ミセル状の遺伝子はトランスフェクションにより細胞内に取り込まれることが確認されているが[4]、本実験では超音波遺伝子導入に用いても効果があることを確認することを行った。

### C-3 遺伝子の血清による分解

培養溶液内に含まれる血清によりプラスミドが分解されて発現効率が低下している可能性がある。そのため、電気泳動法による遺伝子分解の確認を行った。培養溶液と、そのままのプラスミド、高分子

ミセル化を行ったプラスミドをそれぞれ、0, 15, 30, 60 分間反応させ、EDTA, DDTA を溶液に加え、ミセルを解離させた後に、電気泳動を行った。プラスミドは通常 supercoil 状(SC)になっており、分解されると open circle 型(OC), liner 型になる。遺伝子の形状により泳動抵抗が変わり、移動距離が変わる。電気泳動を行った結果、supercoil 型のラインと、open circle 型のラインが確認された。この結果から、時間経過とともにプラスミドが培養溶液により分解されていること、また、高分子ミセル化を行うことにより分解が抑制されていることが示唆された。

#### C-4 導入率測定結果

高分子ミセル化を行うことによりインキュベーションを行っただけで、わずかに遺伝子が導入されている。しかし、超音波照射を行った際にも、高分子ミセル化を行っていないプラスミドに対して導入率が向上していることが確認された。このことから、超音波照射による遺伝子導入においても遺伝子の高分子ミセル化が有用であることが示された。

#### E. 結論

高強度、長時間超音波照射により、遺伝子導入率向上が示唆された。また、バースト周波数を小さくすることで導入率が向上する傾向も示唆された。さらに、遺伝子の高分子ミセル化を行うことによって、超音波遺伝子導入においても導入率が向上することを明らかにした。

#### 参考文献

- [1] Kengo O., et al., " A basic study on sonoporation with microbubbles exposed to pulsed ultrasound" J. Med Ultrasonics, Vol. 32, pp. 3- 11, 2005
- [2] Hun P., et al., " Study of Sonoporation Dynamics Affected by Ultrasound Duty cycle" , Ultrasound Med Bio, Vol. 31, pp. 849-856, 2005
- [3] S. Katayose, K. Kataoka, " Water-Soluble Polyion Complex Associates of DNA and Poly(ethyleneglycol)-Poly(L-lysine) Block Copolymer" , Bioconjugate Chem. Vol. 8, pp.702-707, 1997
- [4] K. Itaka, K. Kataoka, " Recent development of nonviral gene delivery systems with virus-like structures and mechanisms" , European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Vol. 71, pp.475-483, 2009

#### 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

##### 招待講演

1. 葭仲潔, 松本洋一郎. 超音波とマイクロバブルによる医療応用. CNBI Seminar Series #86, Center for NanoBio Integration The University of Tokyo 2009 10 07
2. 葭仲潔. マイクロバブルを用いた超音波医療応用. 第 4 回低侵襲医療機器実現化フォーラム・第 16 回ナノメディシン研究会, 東京慈恵医科大学 2009 年 11 月 24 日
3. 葭仲潔 (東大). 「マイクロバブルを用いた生体内での超音波作用増強効果」日本ソノケミストリー学会主催 第 2 回 超音波とマイクロバブルの相互作用に関するシンポジウム, 産業技術総合研究所 臨海副都心センター別館 平成 21 年 12 月 18 日.
4. Kiyoshi YOSHINAKA. Noninvasive Ultrasound Diagnostic and Therapeutic System. 2009 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA2009) Workshop TW-F7: Innovation in Medical Robotics Kobe Japan 5 月 12 日 2009 年

##### 一般講演

1. 岡本旭生、橋理恵、葭仲潔、高木周、松本洋一郎、長棟輝行、山口哲志. マイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入. 第 48 回日本生体医工学会大会, タワーホール船堀, 日本生体医工学会誌 生体医工学 Vol.47 suppl.1 2009 P300 2009.4.23-25
2. 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. 日本超音波医学会第 82 回学術集会 東京国際フォーラム, 超音波医学 Vol.36, Supplement April 2009 P 56 2009.5.22-24
3. 岡本旭生、橋理恵、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. 第 8 回日本超音波治療研究会 学士会館 2009.11.28.
4. Tachibana, Okamoto, Yoshinaka, Takagi, Matsumoto. Micro-bubble enhanced sonoporation. AIP CONFERENCE PROCEEDINGS 1215 9TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THERAPEUTIC ULTRASOUND pp315-318, Aix en province 2009/09/24-26

#### 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

## 音響放射力による生体内微小気泡制御法の検討

分担研究者 榎田晃司 東京農工大学 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の特徴を利用し、単純な形状の模擬血管中を流れる、空気を含んだ微小気泡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、微小気泡を集合させたり、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微小気泡の進行方向を操作できる現象と、また直線流路内に微小気泡を堆積させる現象を示している。2008年度までは微小気泡の直径が数十ミクロンであり、生体応用できないサイズであったが、2009年度は生体応用可能な直径10ミクロン以下の微小気泡を用いて検証した。

### A. 研究目的

微小気泡に薬物を含ませ、患部に届ける物理的DDSの研究では、微小気泡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。微小気泡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、微小気泡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、微小気泡に含ませ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バブルが開発されているため、実現性は高いと考えられる。

08年度までの研究により、我々はマイクロカプセルを用いることにより、分岐を有する模擬血管に超音波を照射して音響放射力を生成することで、カプセルに経路選択機能を付加できることを示した。しかし、カプセル粒子径が60[ $\mu\text{m}$ ]程度と大きく、超音波の照射方向を限定していたため、生体応用可能な手法としての検討が不足していた。そこで09年度は微小気泡として血球程度の大きさのカプセルを用い、また同等の音源を複数用いて任意の方向からの超音波照射による誘導・捕捉法の可能性を検討した。さらに様々なパラメータの変化による影響を光学顕微鏡画像から評価し、音響放射力との関連を考察したので報告する。

### 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-04E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。生分解性が無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、4-20ミクロンの

ものを選別し、平均値は10ミクロン以下にした。照射超音波からカプセルが受ける音響放射力はカプセルのサイズの2乗に比例するため、カプセルのサイズが10分の1になると、音響放射力は100分の1に激減する。カプセルの顕微鏡写真をFig.1に示す。

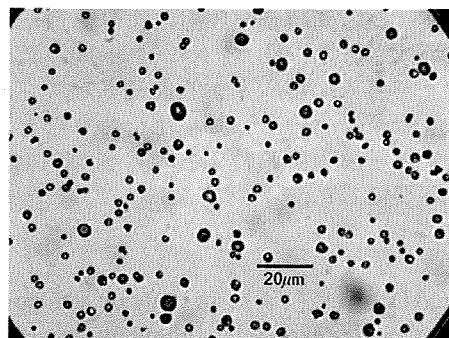


Fig.1 Microscopic image of microcapsules F-04E

#### (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、カプセルの軌道を制御出来ると考えられる。また、Fig.3のようにカプセルの流れに対向して超音波を照射すると、カプセルは流路壁面に押しつけられると考えられる。

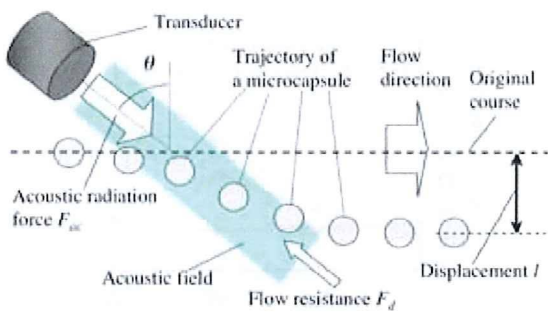


Fig.2 Trajectory of a microcapsule in flow under ultrasound emission.

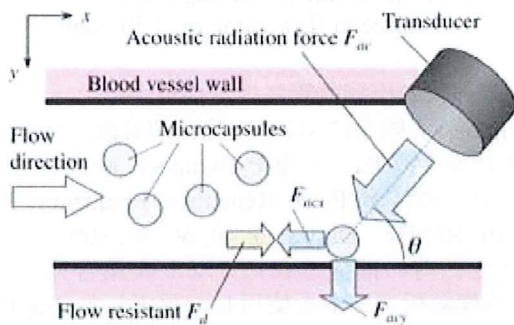


Fig.3 Behavior of fluid microcapsules under ultrasound emission.

### (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.4 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روسコープ (LH-7700, オムロン) で観測する実験系を構築した。

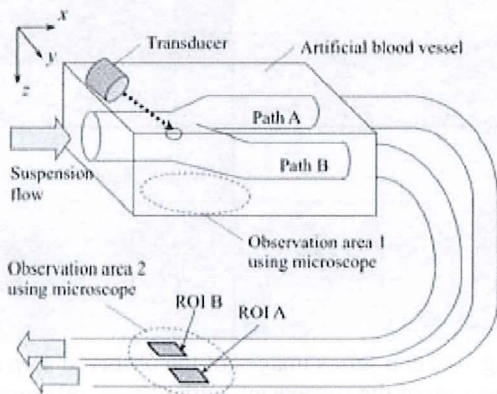


Fig.4 Schematic view of the bifurcated artificial blood vessel.

超音波の照射には中心周波数  $0.5 \sim 5\text{MHz}$  の狭帯域平面波超音波トランスデューサを用い、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。超音波の音圧と水流の流速の範囲は、 $100\text{-}250\text{kPa}$ 、 $20\text{-}250\text{mm/s}$  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.5 に示すように模擬血管の中心軸交点から  $2\text{mm}$  上流の点 Q に決定した。そして  $x\text{-}y$  平面上のトランスデューサの設置角度  $\theta$  を変化させ、カプセル誘導実験を行った。

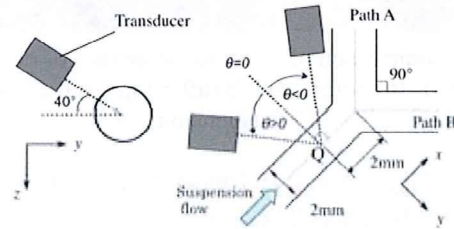


Fig.5 Position configuration of the transducer on the artificial blood vessel.

### (4) 直線状の模擬血管による捕捉実験

ところで上記の実験系に加え、Fig.6 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。カプセル懸濁液を観測地点の上流から注射器を用いて流路内に注入し、分岐を有する流路と同様に、マイクروسコー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。

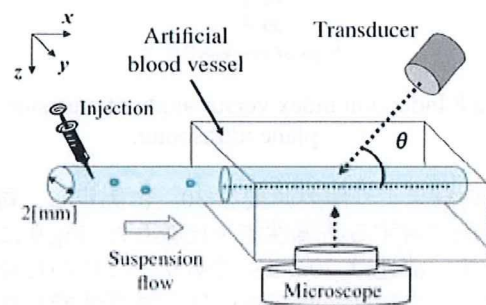


Fig.6 Schematic view of the experiment to trap fluid microcapsules

(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による誘導実験

Fig.4,5 で示した実験系において、流速  $20\text{mm/s}$  で流路を流れるカプセルに対して、音圧  $400\text{kPa}$ 、中心

周波数 2MHz 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.7 にカプセル懸濁液を注入前後の分岐部の顕微鏡写真を示す。

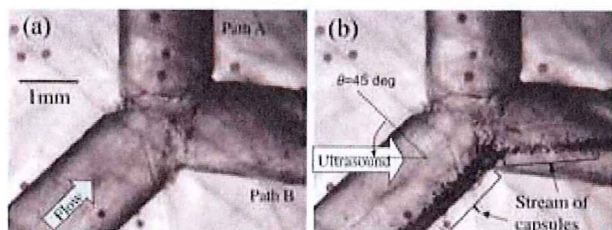


Fig.7 Comparison of microscope images of observation area 1. (a) before and (b) after injection of capsule suspension.

次に Fig.5 に示した分岐部におけるトランスデューサの照射角度を変化させて、カプセルを誘導するために最適な角度を導出するための実験を行った。流速を 20 mm/s、中心周波数を 3 MHz とし、照射音圧をパラメータとした結果を Fig.8 に示す。縦軸は下流領域において定義した Induction index である。この結果より、超音波の照射は誘導したい流路 B 側に押し出される方向に行くことが有効であることが明確になった。

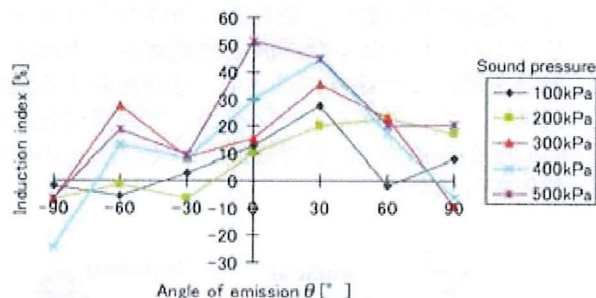


Fig.8 Induction index versus angle of emission using plane ultrasound.

この結果より照射角度を 30° に固定し、周波数及び音圧に対する誘導性能を比較した。Fig.9 に結果をします。流速は 20mm/s であり、これから音圧が高いほど、また周波数が高いほど誘導性能が高まること示された。

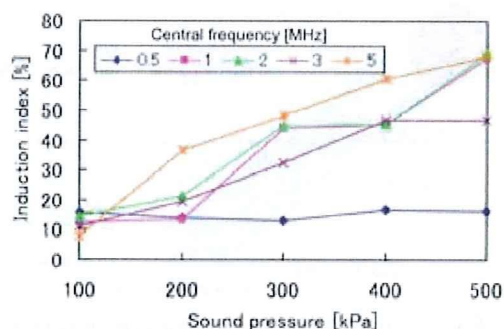


Fig.9 Induction index versus maximum sound pressure of plane ultrasound by the angle of emission of 30 degree in flow velocity of 20 mm/s.

## (2) 直線状の模擬血管による捕捉実験

Fig.6 の実験系において、集束超音波を用いて焦点の音圧を 300kPa、流速を 20mm/s に固定し、パルス繰り返し周波数(Pulse Repetition Frequency, PRF)を 10, 20, 50 kHz、Duty 比を 40, 60, 80, 100 % 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。Fig.10 は、注入直後から 87 秒後までの経過を撮影した顕微鏡写真である。注入は 10 秒以内に終了しているが、20 秒経過後から 100 ミクロン程度の集合体が形成され、徐々に大きくなっていくことが分かった。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評価した。その結果を Fig.11 に示す。これから、PRF に対する捕捉量に大きな変化はないが、Duty 比を増加させていくと、集合体が占める面積が増加することが示された。

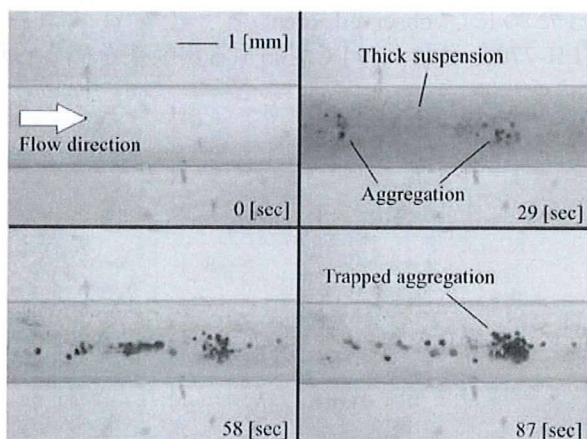


Fig.10 Time series images of the observed area after injection of the suspension with ultrasound emission.



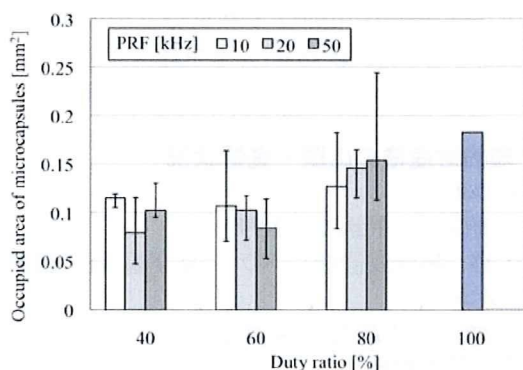


Fig.11 Occupied area of trapped microcapsules versus duty ratio of ultrasound.

### (3) 動物実験への適用と音場可視化インターフェースの試作

Fig.12,13 のように、肌を露出させたウサギに対し、肝動脈の断層像を観察しながら 1MHz の集束型超音波を照射した。その前にウサギの耳から注入したソナゾイドが、2 分以内に肝臓に現れることを確認していたが、照射超音波による音響放射力の影響は確認できなかった。この原因として、音波の焦点領域が直径 3mm 程度であり、観察領域が数センチ四方と広いため、照射状況が確認できないことが挙げられた。そのため、生体内での照射を確認できるインターフェースが必要となることが分かった。



Fig.12 A scene of application to a rabbit.



Fig.13 An echogram during the experiment.

このため、プローブとトランスデューサ、および目的部位の相対的な位置関係を 3 次元的なグラフィックで表現するインターフェースを設計・開発した。プローブ及びトランスデューサの位置姿勢計測には光学式 3 次元計測装置 Polaris を利用し、OpenGL によって仮想空間上に描画した。更に、トランスデューサの音圧分布のシミュレーション結果を用いて仮想空間上に音場を可視化し、超音波断層面上にその分布を重畳表示することも可能である。Fig.14 にその画面を示す。

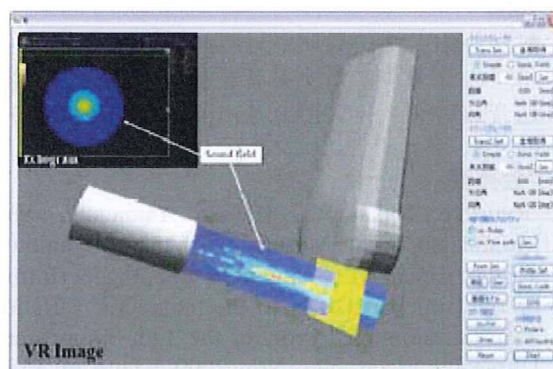


Fig.14 Graphical interface for recognition relative position between transducer (left) and probe (right).

### D. 考察

08 年度の結果に引き続き、分岐を有する模擬血管の誘導実験、直線状の模擬血管での捕捉実験では、生体応用可能な赤血球程度の大きさのマイクロカプセルに対して音響放射力を作用させ、それらを制御できることを確認した。最終年度は、市販されているマイクロバブルを用いた検証が必要となるが、カプセルよりもバブルの方が音響放射力に反応しやすいため、同様の結果が得られると期待される。

一方、実際に動物実験に適用した場合、生体内での照射位置を明確に確認するため、目的部位とトランスデューサの位置関係をモニタできるインターフェースの有効性が明らかとなった。またこれまでに使用してきた音圧は数百 kPa と高いため、今後の生体応用のためには安全性を考慮して、できるだけ低い音圧値での制御法を確立する必要がある。

### E. 結論

本研究では、微小気泡を用いた超音波 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、流路内の微小気泡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. Kohji Masuda, Yusuke Muramatsu, Sawami Ueda, Ryusuke Nakamoto, Yusuke Nakayashiki, and Ken Ishihara: "Active Path Selection of Fluid Microcapsules in Artificial Blood Vessel by Acoustic Radiation Force," Japanese Journal of Applied Physics, Vol.48, No.7, 07GK03, 2009
2. 榊田晃司、村松悠佑、中元隆介:「生体内マイクロカプセルの検出と操作による薬物治療」、ケミカルエンジニアリング、Vol.54, No.7, pp.508-513, 2009
3. 村松悠佑、榊田晃司:「模擬血管中を流れるマイクロカプセルに対する音響放射力とその影響」、超音波テクノ、Vol.22, No.1, pp.105-109, 2010

### 2. 学会発表

1. Ryusuke Nakamoto, Hayato Yamauchi, Yusuke Muramatsu, Kohji Masuda, Yoshitaka Miyamoto and Toshio Chiba: "Evaluation of trapping performance of fluid microcapsules to the parameter variation in acoustic radiation," Proc. of the 30th Symposium on Ultrasonic Electronics, Nov. 2009, Kyoto, pp.545-546
2. Kohji Masuda, Nobuyuki Watarai, Ren Koda, Ryusuke Nakamoto and Yusuke Muramatsu: "Production of local acoustic radiation force to constrain microcapsules from diffusion in blood vessel," Proc. of the 30th Symposium on Ultrasonic Electronics, Nov. 2009, Kyoto, pp.529-530
3. Kohji Masuda, Ryusuke Nakamoto, Yusuke Muramatsu, Yoshitaka Miyamoto, Keri Kim, and Toshio Chiba: "Study to trap fluid microcapsules in artificial blood vessel by producing local acoustic radiation force," IFMBE Proceedings (World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering), Vol.25, Sep. 2009, Munich, pp.206-207
4. Kohji Masuda, Ryusuke Nakamoto, Yusuke Muramatsu, Yoshitaka Miyamoto, Keri Kim and Toshio Chiba: "Active Control of Microcapsules in Artificial Blood Vessel by producing Local Acoustic Radiation Force," Proc. of 31st Annual International Conference of the IEEE EMBS, Sep. 2009, Minneapolis, pp.295-298
5. 榊田晃司、中屋敷悠介、中元隆介、上田沢美、村松悠佑:「模擬血管内での音場形成による流路内マイクロカプセルの誘導効率の検討」、日本超音波医学会 第82回学術集会論文集、Vol.36, Suppl., 2009年、東京、p.S305
6. 中元隆介、村松悠佑、上田沢美、榊田晃司、千葉敏雄、宮本義孝:「音響放射力の作用による流路中のマイクロカプセル捕捉法の検討」、日本超音波医学会 第82回学術集会論文集、Vol.36, Suppl., 2009年、東京、S305
7. 中元隆介、村松悠佑、上田沢美、中屋敷悠介、榊田晃司、宮本義孝、千葉敏雄:「局所的音響放射

力による流体中のマイクロカプセルの安定な捕捉法の検討」、第48回日本生体医工学会大会プログラム・論文集、2009年、東京、CD-ROM

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
  - ・出願番号: 特願 2010-99212
  - ・名称: 超音波診断システム及び超音波診断・治療システム
  - ・出願日: 平成 22 年 4 月 22 日
2. 実用新案登録
  - なし
3. その他
  - なし

## 超音波診断装置を用いた標的部位への遺伝子導入の基礎検討

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是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、超音波造影診断および超音波遺伝子導入による治療を一元化した新しいシステムの開発が必要である。本年度は、超音波診断装置を用いたソナゾイドの動態観察と実験動物を用いた標的部位（肝臓）における遺伝子導入につき評価・検討を行った。

### A. 研究目的

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。我々が目標とする胎児期遺伝子治療とは、母体外からの超音波照射により胎児標的組織（細胞）に非ウイルスベクターを用いて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是正するという安全性の高い新しい手技である。

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。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。一方近年、超音波照射による非ウイルスベクターを標的組織（細胞）に導入する手法が開発され、超音波造影剤として、臨床検査で使用されているマイクロバブルを併用することにより、その導入効率が高くなるという報告がなされている。

我々は、超音波造影診断および超音波遺伝子導入による治療を一元化した新しいシステム（Fig.1）の構築を目的とし、本年度は、超音波造影診断装置モニタリング下、実験動物を用いて標的部位（肝臓）における遺伝子導入につき評価・検討を行った。

### B. 研究方法

超音波診断装置によるマイクロバブル破碎とラット肝臓への遺伝子導入

【材料】本研究では、実験動物として、SD ラットおよびマウス胎仔を用いた。また哺乳類細胞レポーターベクターとして、GFP 遺伝子を含むプラスミド DNA（pEGFP-N3; Clontech）を用いた。超音波造影剤として、臨床検査で使用されているソナゾイド（第一三共株式会社）を用いた。ソナゾイドは、内部気体が C4F10 で、シェルが 2.3~2.9  $\mu\text{m}$  の超音波に対して安定なマイクロバブルである。また、持続

的な造影効果（血管イメージングならびにクーパーイメージング）が得る特徴を有する。超音波診断装置として Prosaound  $\alpha$  10（アロカ株式会社）、超音波プローブはリニア照射型を用いた（Fig2）。

【方法】ペントバルビタール麻酔下で、SD ラット（380~400g）を開腹後、肝左葉外側葉表面へ、プラスミド DNA（30 $\mu\text{g}$ ）とソナゾイドの混合液（ソナゾイド 25%）を注入した後、超音波診断装置を用いて、ソナゾイド破碎の様子をモニターで観察しながら、超音波照射（マニュアルフラッシュ）を行い、その後に縫合閉腹した。超音波照射 24 時間後に犠牲マウスより肝臓を切除し、蛍光顕微鏡にて GFP の発現を観察した。



Fig.1 超音波診断および超音波遺伝子導入による治療を一元化した新しいシステム



Fig.2 リニア照射型プローブ

### (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

遺伝子導入後 24 時間経過したラット肝臓において、僅かながら GFP の発現が観察された (Fig 3)。マウス胎仔においても同様の実験を行ったが、24 時間後に胎仔はほとんど死んでしまい、生き延びた胎仔でわずかながら、GFP の発現が観察された (Fig 4)。



Fig.3 超音波診断装置によるラット肝臓への遺伝子導入

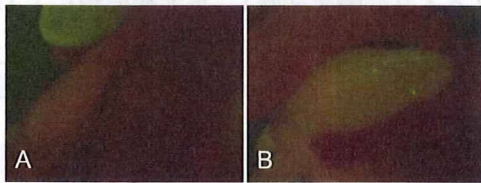


Fig.4 超音波診断装置によるマウス胎仔への遺伝子導入

### D. 考察

本研究では、超音波診断装置 Prosaound  $\alpha$  10 を利用して、ラットおよびマウス胎仔の肝臓への遺伝子導入を行った。それぞれの肝臓で非常に僅かではあるが遺伝子発現が確認された。また、遺伝子導入効率が低い理由としては、周波数及び超音波照射条件が大きく関係しており、今後の検討課題である。マウス胎仔の死の理由として、超音波照射によるマイクロバブル破碎による肝臓へのダメージがあまりにも大きかったため、照射条件の最適化と安全性を評価し直す必要がある。

### E. 結論

超音波診断装置 Prosaound $\alpha$ 10 による超音波照射により肝臓を造影し、かつ僅かながら遺伝子導入を達成することができた。

### 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