

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業：低侵襲・非侵襲医療機器(ナノテクノロジー)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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 千葉 敏雄

平成 23 (2011) 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 千葉 敏雄	1
---	---

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 千葉 敏雄	5
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 梅澤 明弘	7
3. マイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入 松本 洋一郎	9
4. 音響放射力による生体内微小気泡制御法の検討 榊田 晃司	14
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 望月 剛	17
6. 幹細胞への超音波遺伝子導入・培養・保存方法の検討 宮本 義孝	19

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	26
-----------------	----

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進：低侵襲・非侵襲医療機器（ナノテクノロジー）研究事業）
 総括研究報告書

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は正

総括研究者 千葉敏雄 国立成育医療研究センター 臨床研究センター 副センター長

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。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。本プロジェクトの最終年度である本年度は、これまでに得られた成果をもとに、実際の動物モデルへの応用、および本システムの完成を目指した。

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/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

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性を利用し、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。そこで本研究ではシエールを持つ微小気泡である第2世代の造影剤を使用して、音場内における微小気泡の挙動を光学的に観測し、超音波の周波数や音圧、照射時間などのパラメータ変化に伴う微小気泡の捕捉量を測定する事で、安定で効率的な捕捉条件の検証を行った。

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ピ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。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。マウス性線維芽細胞系 NIH3T3 を細胞培養容器に培養する。ウェル内の細胞培養液に導入遺伝子とマイクロバブルを混和し、平面超音波を上方より照射する。導入遺伝子は緑色蛍光蛋白質 (GFP) プラスミドを、マイクロバブルは Sonazoid[®] を用いる。超音波の波形をバーストとすることで一定の照射時間に対し照射休み時間を設けることになり、連続波に比べ細胞へのダメージが抑制されるという知見が得られている。本研究ではこの

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しうる治療システム・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で胎児肝に集積・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

バースト波形に着目し、遺伝子導入率のバースト波形に対する依存性を調査した。

B-3 胎仔肝への超音波併用遺伝子導入手技の開発

前年度に得られた遺伝子導入条件をもとに *in vivo* 妊娠 ICR マウスを用いて胎仔への超音波による遺伝子導入実験を引き続き行った。Frequency:1MHz、Intensity:1W/cm²、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。

実際の手法は、ベントバルビタール麻酔下で、妊娠 ICR マウス（妊娠 15 日目）を開腹後、胎仔肝へブラスミド（5 μg）とマイクロバブル（Sonazoid®）の混合液を注入した直後、子宮外より超音波照射を行い、その後縫合閉腹した。超音波照射 24 時間後に犠死マウスより胎仔肝臓を切除し、蛍光顕微鏡にて GFP の発現を観察した。また、上記実験と同様に超音波による遺伝子導入を行い、超音波照射後 1 日目から 7 日目（出生後 3 日目）までのマウス胎仔肝およびマウス出生仔肝サンプルを採取し、蛍光顕微鏡にて GFP 遺伝子の発現を観察した。

C-4 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

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構築を目的とし、本年度は、遺伝子導入効率を高める上で重要な標的部位におけるマイクロバブル（ソナゾイド）の生体内での動態について検討を行った。本研究では、実験動物として、JWウサギを用いた。超音波造影剤はソナゾイドを用いた。超音波診断装置として Prosaound α 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。実験はウサギ静脈中に注射したソナゾイドの腎臓における動態について検討した。同様の実験をソナゾイドの濃度を変更して行った。

B-5 ヒト肝細胞・組織の供給体制の整備

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、凍結保存した。

B-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

本研究では、母体外からの超音波照射により遺伝子を発現させる安全性の高い胎児期遺伝子治療の確立を目的とする。そこで、本年度も引き続き、超音波遺伝子導入法を用い、幹細胞（Adipose tissue-derived stem cells: ASCs など）への遺伝子導入実験を

行った。さらに、幹細胞の中でも、有力な細胞ソースである誘導多能性幹細胞（Induced pluripotent stem cells: iPS）の最適な凍結保存法を検討したので報告する。本年度の課題

1) ASCs への超音波遺伝子導入

2) 誘導多能性幹細胞の凍結保存液の検討

マウス iPS 細胞（理化学研究所細胞バンクより供与）の凍結保存液として、培養液、培養液+10% DMSO、培養液+10% Glycerol、培養液+5% DMSO、培養液+5% Glycerol、培養液+5% DMSO+5% Glycerol、Cell Freezing Medium-DMSO、Cell Freezing Medium-Glycerol、セルバンカー、セルバンカープラス、セルバンカー 2、セルバンカー 3 を使用した。凍結は、バイセル（BICELL）を用い、緩速凍結にて -80℃ 下で保存した（1週間から 1 年間）。融解後、iPS 細胞の生存率を測定し、1-3 日間培養後、細胞の形態を観察し、その増殖能を検討した。

（倫理面への配慮）

国立成育医療研究センター

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、研究室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および考え方が年次毎に異なること予想され、「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。

名古屋大学

実験動物に関して、「動物の愛護及び管理に関する法律」（昭和 48 年法律第 105 号）、「実験動物の飼養及び管理等に関する基準」（昭和 55 年総理府告示第 6 号）及び「名古屋大学動物実験指針」に基づき、適正な使用及び取り扱いを行う。

C. 研究結果

C-1 超音波ナビゲーション技術の開発

本研究では、微小気泡を用いた超音波 DDS 実現のた

め、体外からの超音波照射により血管内を流れる第2世代の造影剤である微小気泡の捕捉に関する可能性について実験を通して検討を行った。まず周波数3-10 [MHz]の超音波を照射し、ポリエチレングリコールで作成した流路を流れる微小気泡が凝集体を形成しながら捕捉される様子を光学的観測で確認した。さらに赤血球を懸濁した場合において、超音波の周波数、音圧、照射時間の変化に対し捕捉される微小気泡の量を評価し、赤血球の存在が捕捉量を増大させる条件が存在する事を確認した。

C-2 超音波遺伝子導入技術の開発

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法の高効率化を目指し、以下の知見を得た。超音波のバースト波形をパラメータとした遺伝子導入実験より、1パルスにおける照射時間が長いほど、照射休み時間が長いほど遺伝子導入効率が向上することを示した。PRF をパラメータとした実験では低PRFで遺伝子導入率が向上することが示され、照射時間、照射休み時間依存性と一致した。

C-3 胎仔肝への超音波併用遺伝子導入手技の開発

超音波を用いた遺伝子導入後24時間経過したマウス胎仔肝臓において、GFP陽性率58%(26/45)と高い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は4%(2/42)、超音波照射のみのサンプルにおいては2%(1/36)と、GFP陽性率は低いものであった。次に導入された遺伝子の発現期間について検討した。超音波照射後1日目のサンプルにおいてGFPの発現が確認された。この遺伝子発現は減少しているが超音波照射後7日目のサンプルにおいても確認された。

C-4 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

ソナゾイドを用いた超音波診断装置でのウサギ腎臓の造影に成功した。ソナゾイドの濃度は臨床的に使用される濃度(15 μ l/kg)では血管造影が確認された。ソナゾイドの濃度を上げることにより(150 μ l/kg)腎臓全体の造影画像が得られた。

C-5 ヒト肝細胞・組織の供給体制の整備

初年度から引き続き、先天性代謝性肝疾患の患者様から摘出されたレシピエント肝より、肝細胞を分離・培養、および増殖させることに成功した。また、初代肝細胞を、1)分離および2)培養後に凍結し、液体窒素下で保管した。得られた初代培養肝細胞の*in vitro*/*in vivo*における特性解析を行った。

in vitro

正常肝細胞特異的遺伝子の発現が確認された。

in vivo

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した。移植後4週間に摘出した移植組織部位において、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した。

C-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

1) ASCsへの超音波遺伝子導入

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/cm²)を設定し、マイクロバブル(10% v/v 培養培地溶液)、プラスミドDNA (20 μ g/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。

2) 誘導多能性幹細胞の凍結保存法の検討

12種類の凍結保存液を用いて、凍結融解後のiPS細胞の生存率、細胞形態および増殖能を評価したところ、セルバンカープラス、セルバンカー3が細胞の形態も良く、増殖能も高い傾向を示した

D. 考察

超音波ナビゲーション技術では、生体内における微小気泡の安定及び効率的な捕捉の条件を考察する。周波数には3 [MHz]などの低い周波数が多い微小気泡を捕捉する事ができ、効率が良いと考えられる。音圧は、可能な限り高い音圧を使用した方が多くの微小気泡を捕捉出来る。照射時間は照射時間が長い方が捕捉出来る量が多くなり、照射時間を長くする事でより照射を終了しても照射時と同等の捕捉量を実現出来る。

超音波遺伝子導入技術の開発は、照射時間をパラメータとした結果から、照射時間が長いほど、遺伝子導入率が向上し、生存率は低下していた。これは、照射時間の増大に伴い1パルス間に生じる細胞膜表面の小孔のサイズが大きくなることに起因すると考察される。また、照射休み時間をパラメータとした結果から照射休み時間の増加に伴い、遺伝子導入率、細胞生存率ともに向上している。これは、十分な照射休み時間を設けることで細胞へのダメージが抑制され、小孔が生じ遺伝子が導入された細胞が生存できるようになったことに起因すると考察される。

マウス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。また、遺伝子の発現は超音波照射から1週間後まで確認された。その後は発現が確認されなかったことから、一過性の発現であると考えられる。DNAに組み込まれることによる一過性に発現し消失するため、低侵襲な超音波と組み合わせることでより安全な遺伝子治療を確立できる可能性が示された。

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では、超音波診断装置 Prosaound α 10 を用

いて、ウサギ腎臓の造影に成功した。また、ソナゾイドの濃度を変更することにより血管から腎臓全体まで造影可能であった。今回の結果から、注入するマイクロバブルの濃度を調節し、超音波造影で確認することにより遺伝子導入をコントロールできる可能性が示唆された。

ヒト肝細胞・組織の供給体制の整備としては、ヒト肝組織（国立成育医療研究センターにてインフォームドコンセント済み）から得られた肝細胞を収集することに成功した。得られた肝細胞を免疫不全マウスに移植し、体内でヒトアルブミン産生も確認できた。成育疾患の中でも入手困難な先天代謝異常症のバイオリソースを構築することができ、本事業の治療対象である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の開発に大きく寄与すると考えられる。

組織由来幹細胞への超音波遺伝子導入・培養・保存方法の検討においては幹細胞への超音波遺伝子導入法の検討を行った。ソノポレーション後に、ASCsの約40%はダメージを受けたが、細胞内への遺伝子の取り込みが確認できた。さらに、幹細胞の中でも、有力な細胞ソースである誘導多能性幹細胞（iPS細胞）の凍結保存液を検討し、最適な保存液を見出した。誘導多能性幹細胞の品質を確保することができ

たので、今後の研究に利用されることを期待する。

E. 結論

本年度（3年目）で、各研究課題における要素技術（超音波ナビゲーション in vitro/超音波遺伝子導入 in vitro, in vivo）はほぼ確立された。超音波ナビゲーション・超音波遺伝子導入の要素を組み合わせた使用も可能になった。今後はこれらの技術を複合的に活用し、より生体に近いモデルでの検証を行い、臨床応用を目指し継続的な発展を続けていく。

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：低侵襲・非侵襲医療機器（ナノテクノロジー）研究事業）
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 国立成育医療研究センター 副センター長

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、実験動物への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。

前年度までにマウス胎仔への超音波を用いた遺伝子に成功した。今年度は遺伝子発現効率の向上と、遺伝子発現期間について検討した。

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)。

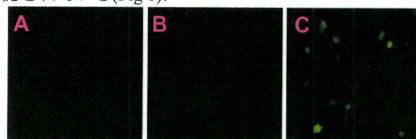


Fig 1 培養細胞への超音波を用いた遺伝子導入

A. Sonazoid®のみ B. 超音波照射のみ
C. Sonazoid®+超音波照射

前年度に得られた遺伝子導入条件をもとに in vivo 妊娠 ICR マウスを用いて胎仔への超音波による遺伝子導入実験を引き続き行った。Frequency:1MHz、Intensity:1W/cm²、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、妊娠 ICR マウス (妊娠 15 日目) を開腹後、胎仔肝へプラスミド (5µg) とマイクロバブル (Sonazoid®) の混合液を注入した直後、子宮外より超音波照射を行い、その後縫合閉腹した。超音波照射 24 時間後に犠死マウスより胎仔肝臓を切除し、蛍光顕微鏡にて GFP の発現を観察した。また、この遺伝子発現期間についても検討した。

(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、管理者と相互協力的にも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

ス胎仔肝臓において、高い 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 遺伝子の発現は低いものであった。(Fig 2)



Fig 2 マウス胎仔肝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

GFP 陽性率は混合液注入のみで超音波照射なしのサンプルにおいて 4%(2/42)、マイクロバブルなしで超音波照射のみのサンプルにおいて 2%(1/36)、と低い陽性率であったが、超音波とマイクロバブルを併用したサンプルにおいて 58%(26/45)と高い陽性率が確認された。(Table 1)

	GFP 陽性率
超音波照射のみ	4% (2/42)
マイクロバブルのみ	2% (1/36)
マイクロバブル + 超音波照射	58% (26/45)

Table 1 マウス胎仔肝への遺伝子導入率

次に導入された遺伝子の発現期間について検討した。上記実験と同様に超音波による遺伝子導入を行い、超音波照射後 1 日目から 7 日目(出生後 3 日目)までのマウス胎仔肝およびマウス出生仔肝サンプルを採取し、蛍光顕微鏡にて GFP 遺伝子の発現を観察した。超音波照射後 1 日目のサンプルにおいて GFP の発現が確認された。この遺伝子発現は減少しているが超音波照射後 7 日目のサンプルにおいても確認された (Fig 3)。

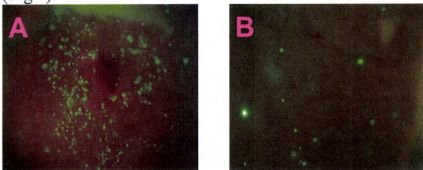


Fig 3 遺伝子発現期間
A.超音波照射 1 日後 B.超音波照射 7 日後
D. 考察

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率が確認された。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。また、遺伝子の発現は超音波照射から 1 週間後まで確認された。その後は発現が確認されなかったことから、一過性の発現であると考えられる。これは、ゲノム DNA に組み込まれ恒常的に発現するウイルスベクターと違い、一過性のため発現効率の点では劣る。しかし、ゲノム DNA に組み込まれないため癌化の危険性が減少する。低侵襲な超音波と組み合わせることでより安全な遺伝子治療を確立できる可能性が示された。

E. 結論

in vivo においてマウス胎仔に超音波照射を用いた遺伝子導入が可能であった。超音波照射による遺伝子発現は一週間確認された。

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

・ Wenji YUAN, Takashi KAKIMOTO, Shuichi KUNO, Yoshitaka MIYAMOTO, Shin ENOSAWA, Takashi MOCHIZUKI, Koji MASUDA, Yoichirou MATSUMOTO, Toshio CHIBA: Fetal gene therapy: a combination of non-viral vector and ultrasound irradiation, IFMSS2010, September 2010.

・ Miyamoto Y, Ueno H, Hokari R, Yuan W, Kuno S, Kakimoto T, Enosawa S, Yoshinaka K, Matsumoto Y, Chiba T, Hayashi S: Ultrasound -assisted gene transfer to adipose tissue-derived stem/progenitor cells (ASCs).

10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound (ISTU10), Tokyo Japan, 2010/6/9-12.

・ Kakimoto T, Gen B, Kuno S, Hoakri R, Tsuchiya R, Miyamoto Y, Enosawa S, Mochizuki T, Umezawa A, Masuda K, Matsumoto Y, Chiba T: Minimally Invasive Fetal Gene Therapy Using Nonviral Vector by Ultrasound Irradiation. 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound (ISTU10), Tokyo Japan, 2010/6/9-12.

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、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抽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、凍結保存した。本研究を行う上で、これらの成育バイオリソースは、極めて重要な役割を担う。

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/マイクロバブル破砕と細胞の小孔形成・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

肝移植の際、抽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抽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、凍結保存した。

(倫理面への配慮)

国立成育医療研究センター

国立成育医療研究センターにおいては、対象となるヒト細胞に関し、研究面において既に倫理審査を

受け、承認を受けている（国立成育医療研究センター、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、受付番号197、201、平成18年6月承認、受付番号237、238平成19年11月承認、受付番号293、315、平成20年10月承認、受付番号350、平成21年12月承認、受付番号403、平成22年7月承認）。

(<http://www.ncchd.go.jp/center/information/ethics/index.html>)

それぞれの組織については、平成22年11月1日施行された「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成22年厚生労働省告示第380号）」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。さらに、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るため、「厚生労働科学研究に関する指針」に準拠する。

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

初年度から引き続き、先天性代謝性肝疾患の患者様から抽出されたレシピエント肝より、肝細胞を分離・培養、および増殖させることに成功した。以下に、肝組織の詳細情報を示す。

臓器提供者	性別	病名	数
レシピエント	女	胆道閉鎖症	5
レシピエント	男	胆道閉鎖症	1
ドナー	女	胆道閉鎖症	1
ドナー	男	胆道閉鎖症	1
レシピエント	女	糖原病 I 型	1
レシピエント	男	糖原病 I 型	1
ドナー	男	糖原病 I 型	2
レシピエント	男	先天性肝線維症	1
レシピエント	女	プロピオン酸血症	1

また、初代肝細胞を、1) 分離および 2) 培養後に凍結し、液体窒素下で保管した。その詳細は、以下の通りである。

Hep2013	レシピエント	肝実質細胞
	レシピエント	肝非実質細胞分画 1
	レシピエント	肝非実質細胞分画 2
	レシピエント	肝非実質細胞分画 3
Hep2015	ドナー	肝実質細胞
	ドナー	肝非実質細胞分画 1
	ドナー	肝非実質細胞分画 2
	ドナー	肝非実質細胞分画 3
Hep2017	レシピエント	肝非実質細胞分画 1
	レシピエント	肝非実質細胞分画 2
Hep2018	レシピエント	肝非実質細胞分画
Hep2019	レシピエント	肝非実質細胞分画

得られた初代培養肝細胞の *in vitro* / *in vivo* における特性解析を行った。

in vitro

正常肝細胞特異的遺伝子の発現が確認された。

in vivo

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した。移植後 4 週間目に摘出した移植組織部位において、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した。

D. 考察

ヒト肝組織 (国立成育医療研究センターにてインフォームドコンセント済み) から得られた肝細胞を収集することに成功した。得られた肝細胞を免疫不全マウスに移植し、体内でヒトアルブミン産生も確認できた。成育疾患の中でも入手難な先天代謝異常症のパイオリソースを構築することができ、本事業の治療対象である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の開発に大きく寄与する。

E. 結論

本事業を行う上で、鍵となる先天代謝異常症の成育パイオリソースの構築に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yazawa T, Kawabe S, Inaoka Y, Okada R, Mizutani T, Imamichi Y, Ju Y, Yamazaki Y, Usami Y, Kuribayashi M, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol Cell Endocrinol*, 336(1-2):127-132, 2011.

2. Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol Ther*, 19(2):400-407, 2011.

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、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。

超音波のバースト波形をパラメータとした遺伝子導入実験より、1パルスにおける照射時間が長いほど、照射休み時間が長いほど遺伝子導入効率が向上することを示した。PRFをパラメータとした実験では低 PRF で遺伝子導入率が向上することが示され、照射時間、照射休み時間依存性と一致した。

A. 研究目的

超音波遺伝子導入法は超音波照射により細胞膜に一時的な小孔を物理的に生じさせることで遺伝子導入を実現する手法であり、マイクロバブルの援用により導入の効率が向上するという知見がある。本研究は小孔形成細胞に対し効率的に遺伝子を導入する手法の開発を目的とし、超音波照射条件を最適化し、マイクロバブルの細胞に対する寄与を増大させることにある。

B. 研究方法

超音波遺伝子導入実験装置の概略図を Fig.1 に示す。マウス性線維芽細胞系 NIH3T3 を細胞培養容器に培養する。ウェル内の細胞培養液に導入遺伝子とマイクロバブルを混和し、平面超音波を上方より照射する。導入遺伝子は緑色蛍光蛋白質(GFP)プラスミドを、マイクロバブルは Sonazoid® を用いる。

超音波の波形をバーストとすることで、Fig.3 のように一定の照射時間に対し照射休み時間を設けることになり、連続波に比べ細胞へのダメージが抑制されるという知見が得られている。本研究ではこのバースト波形に着目し、遺伝子導入率のバースト波形に対する依存性を調査する。

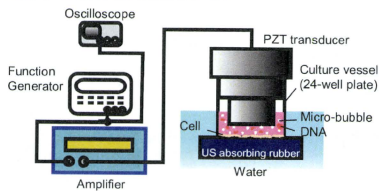


Fig.1 Experimental apparatus

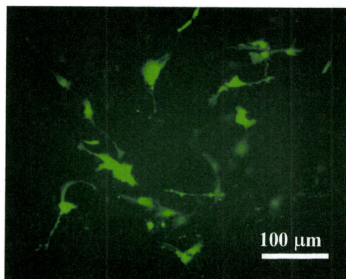


Fig.2 Fluorescent observation of GFP

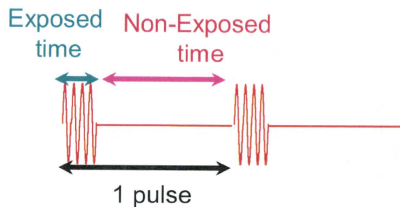


Fig.3 Burst waveshape

(倫理面への配慮)
なし

C.研究結果

Fig.4 (a),(b)は照射時間をパラメータとした実験の結果である。これより、照射時間が長いほど、遺伝子導入率が向上し、生存率は低下していることが判る。これは、照射時間の増大に伴い1パルス間に生じる細胞膜表面の小孔のサイズが大きくなることに起因すると考察される。

Fig.5 (a),(b)は照射休み時間をパラメータとした実験の結果を示している。照射休み時間の増加に伴い、遺伝子導入率、細胞生存率ともに向上していることがわかる。これは、十分な照射休み時間を設けることで細胞へのダメージが抑制されたため、小孔が生じ遺伝子が導入された細胞が生存できるようになったことに起因すると考察される。

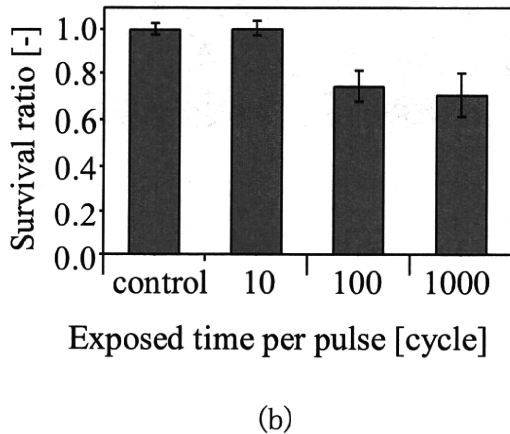
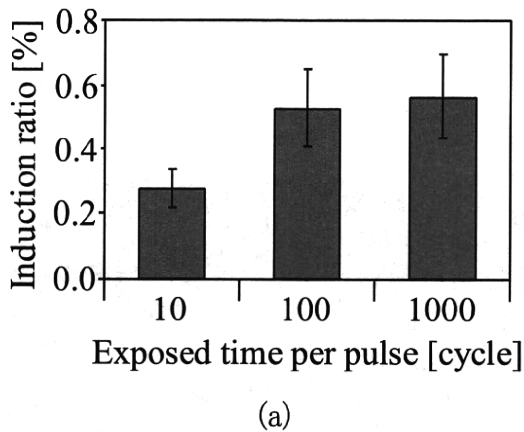


Fig.4 Dependency on exposed time per pulse

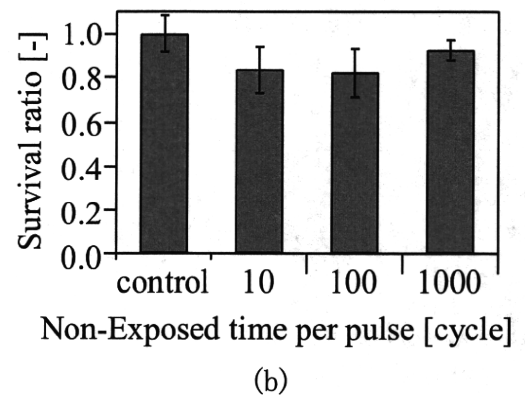
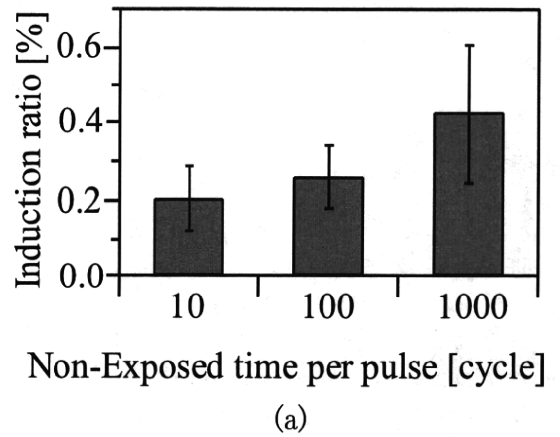


Fig.5 Dependency on Non-Exposed time per pulse

D.結論

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法の高効率化を目指し、以下の知見を得た。

超音波のバースト波形をパラメータとした遺伝子導入実験より、1パルスにおける照射時間が長いほど、照射休み時間が長いほど遺伝子導入効率が向上することを示した。PRFをパラメータとした実験では低PRFで遺伝子導入率が高くなることが示され、照射時間、照射休み時間依存性と一致した。

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

- (1) 超音波とマイクロバブルによる非侵襲治療応用, 葭仲 潔、妹尾直彦、西原輝幸、岡本旭生、一柳満久、鈴木潤、宮田哲郎、高木周、松本洋一郎、日本超音波医学会、東京ファッションタウンビル、2010/10/30

- (2) A Study of Micro-bubble Enhanced Ultrasound Gene Induction , Akio Okamoto, Rie Tachibana, Kiyoshi Yoshinaka, Kensuke Osada, Shu Takagi, Kazunori Kataoka, Yuichi Tei, Yoichiro Matsumoto, 6th world congress of Biomechanics, Singapore. 2010/08/01
- (3) A study of micro-bubble enhanced sonoporation, Akio Okamoto, Rie Tachibana, Kiyoshi Yoshinaka, Kensuke Osada, Shu Takagi, Kazunori Kataoka, Yuichi Tei, Yoichiro Matsumoto, 10th International Symposium on therapeutic Ultrasound (ISTU10), Tokyo. 2010/06/11
- (4) A Study of Micro-bubble Enhanced Ultrasound Gene Induction, 岡本旭生、橘理恵、葭仲 潔、長田健介、高木周、片岡一則、鄭雄一、松本洋一郎、キャピテーションに関するシンポジウム(第15回)、大阪府立大学、2010/11/22
- (5) Microbubble enhanced ultrasound therapy in human body, Kiyoshi Yoshinaka, Swiss/Japan International Seminar on

Medical Engineering Based on Vessel Biology, Zurich, 2010/11/15

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

- 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 梶田晃司 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性を利用し、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手法を検討した。超音波を局所的に集束させると、音響放射力が形成され、微小気泡を集めさせたり、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、また直線管路内に微小気泡を堆積させる現象を示している。最終年度では、赤血球や血管壁を用いた実験を行い、生体内に近い状況でも同様の捕捉現象が見られることを確認した。

A. 研究目的

現代の医療にとって投薬治療は必要不可欠な方法として用いられている反面、投薬効率や副作用など解決すべき問題が存在する。そのため、患部のみに必要な薬物を送る選択的薬物伝送や遺伝子治療の研究が盛んになっており、中でも物理的な手法である超音波は低侵襲な治療システムとして注目されている。これは、薬物を付与した微小気泡を体内に注入し、血流により患部へ到達する微小気泡を、体外からの超音波照射により破壊する事で疾患部のみへの投薬を実現する手法である。この手法の特徴は微小気泡破壊時に発生する機械的衝撃を利用し、細胞への遺伝子導入を目的とする様な治療に応用出来る事であり、化学的な DDS とは異なる治療法の実現が期待されている。超音波と微小気泡を用いた 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。

1. 多くの微小気泡を疾患部に誘導する技術
2. 疾患部で微小気泡を捕捉する技術
3. 捕捉された微小気泡を破壊する技術

特に 2 の捕捉に関しては疾患部における投薬量の調整を行える可能性がある他、破壊を行う際に微小気泡へ十分な超音波を照射する事ができ、血管壁へ微小気泡を付着させる事による導入効率の向上も期待できるなどの利点がある。通常微小気泡には超音波造影剤を利用するが、これまでの音響放射力を利用した微小気泡の捕捉に関する研究はシェルを持たない第一世代の微小気泡を使用したものであった。これは微小気泡を破壊する事で一時的に造影効果を得るもので、長時間のモニタリングには不適であった。そこで近年、造影時の超音波に安定であるシェルを持つ第 2 世代の微小気泡が開発され、長時間のモニタリングが可能となった。

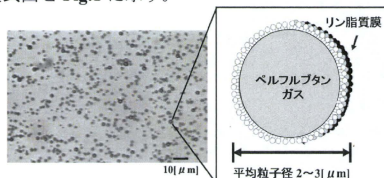
そこで本論文ではシェルを持つ微小気泡である第 2 世代の造影剤を使用して 音場内における微小気

泡の挙動を光学的に観測し、超音波の周波数や音圧、照射時間などのパラメータ変化に伴う微小気泡の捕捉量を測定する事で、安定で効率的な捕捉条件の検証を行ったので報告する。

B. 研究方法

(1) 微小気泡へ作用する音響放射力

本研究では微小気泡として、現在臨床において超音波造影剤として用いられる Sonazoid[®]（第一三共製薬）を使用した。これはペルフルブタンをリン脂質で安定化した比較的強い強度を持つ平均粒子径 2-3[μm]の微小気泡であり、生体内へ注入後も 10 分に渡り安定に存在する。Sonazoid[®]の顕微鏡写真と模式図を Fig.1 に示す。

Fig.1 Microscopic and Schematic image of Sonazoid[®]

一般に物体が音波の照射を受けた場合、音波が生じる放射力、すなわち音響放射力を受ける。この大きさは流体力学的手法を用いて解析的に求められており、微小気泡のような球体が受ける力は平面進行波の場合、次式で与えられる。

$$F_{ac} = \pi r^2 Y_p P \quad \text{式(1)}$$

ここで r は球の半径、 P は入射音波の平均エネルギーである。また、 Y_p は音響放射力関数と呼ばれ、球の弾性的性質や媒質中の音波の伝播定数 $k=2\pi/\lambda$ (λ :波長) などに依存する非常に複雑な関数である。

(2) 微小気泡の捕捉方法

前節で述べた音響放射力を利用し、血液中を流れる微小気泡を捕捉する場合の概念図を Fig.2 に示す。

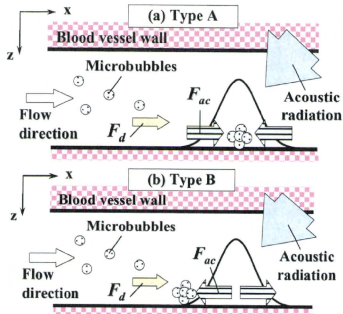


Fig.2 image of trapping fluid microbubbles with acoustic radiation force

微小気泡が血管内に局所的に形成されたポテンシャルエネルギーの起伏が激しい箇所を通過する際、音響放射力の発生機序が2種類考えられる。タイプAの場合は勾配のピークに向かう力が働くため、Fig.2中(a)のように微小気泡が捕捉される。また、タイプBの場合はピークから外側に向かう力が働くため、Fig.2中(b)のように捕捉されると考えられる。どちらの場合も微小気泡が水流から受ける抗力 F_d と音響放射力が拮抗する事で捕捉が行われると考えられる。尚、 F_d はストークスの法則より次式で表される。

$$F_d = 6\pi\mu u_r \quad \text{式(2)}$$

ここで μ は媒質の粘性率、 u_r は流速である。

(3) 模擬血管による捕捉実験

まず、実験に用いる流路として、超音波透過性に優れたポリエチレングリコール(PEG)を使用し、血管を模した内径 2[mm]の直線流路を作成した。微小気泡には Sonazoid[®]を使用し、付属の注射用水で作成した2[m]の懸濁液を50倍に薄め、濃度約0.0003[mL/kg]の懸濁液を作成した。また、ブタの血液から赤血球を抽出し、同懸濁液に混ぜたものも用意した。光学観測のための実験系を Fig.3 に示す。流路は脱気水を満たした水槽の底面に敷かれた吸音板の上に設置し、チューブを使用してポンプと接続した。音源には中心周波数が 3-10[MHz]の範囲の複数の集束型超音波トランスデューサを使用し、発信器で生成した波形を、アンプで増幅した信号してトランスデューサに印加した。光学観測にはマイクロスコプ (VC7700, Omron 社製) を使用し、流路の底面から観測を行った。

実験手順として、まずトランスデューサによる音波の照射方向を水流 $\theta=60[\text{deg}]$ となるように設置した。この際、音圧分布の最大地点が視野中央に位置するように流路とトランスデューサの距離を調整した。続いて作成した流路の上流 200[mm]から微小気泡の懸濁液を注入した。ここで注入量は観測視野内を約40[sec]に渡り微小気泡が通過する5[m]とした。

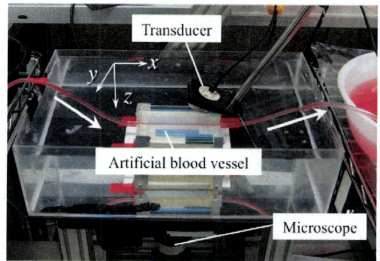


Fig.3 Configuration between transducer, microscope and the artificial blood vessel

尚、超音波の集点と観測視野の中央、流路の中心軸の3つが一点で一致するように配置するため、Fig.4 に示すように光学式3次元位置計測装置(POLARIS Vicra, NDI 社製)を使用した。まず、計測されたトランスデューサの3次元位置と振動子面と焦点の距離から焦点位置を推定した。そして予め計測しておいた観測視野の中心(点P)に焦点が一致するようにトランスデューサの位置を調整した。

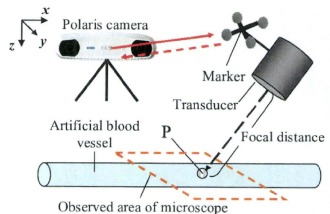


Fig.4 Positional adjustment of the focal point of acoustic field by using a 3-dimensional optical tracker

(倫理面への配慮) 該当しない

C. 研究結果

(1) 周波数変化による微小気泡の挙動変化
流路内の流速を20[mm/sec]とし、超音波を40[sec]照射した時の微小気泡の挙動を観測した。視野中央での最大音圧はそれぞれ300[kPa] (MI値0.09-0.17)とし、微小気泡が破壊されないよう通常 Sonazoid[®]の超音波診断で使用されるMI値0.2-0.3より低い値とした。周波数が3 [MHz]と10 [MHz]時の観測画像を Fig.5、Fig.6 に示す。5[sec]時の画像にはシミュレーションより算出された音場を重畳表示した画像をそれぞれ示す。各周波数で微小気泡が捕捉される様子を観測し、また Secondary Bjerknes 力に起因した微小気泡間の引力によるものと見られる微小気泡の集体形成も見られた。

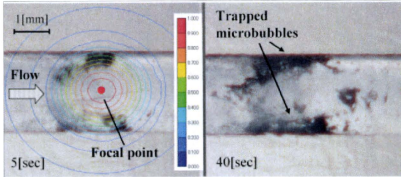


Fig.5 Trapped microbubbles under ultrasound emission with control frequency of 3[MHz], in 5 and 40[s] after start of the emission.

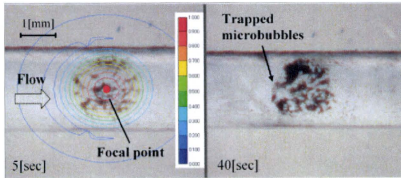


Fig.6 Trapped microbubbles under ultrasound emission with control frequency of 10[MHz], in 5 and 40[s] after start of the emission.

周波数が 3[MHz] の場合、微小気泡が焦点から離れた位置に捕捉される傾向があった。一方、周波数が 10[MHz] の場合は焦点付近に捕捉される傾向が見られた。これらの結果を Fig.2 と比較すると、周波数が 3[MHz] の場合は焦点から外側に向く力が働いたと見られ、これは 2 節で述べた音響放射力のタイプ A であると考えられる。一方、周波数が 10[MHz] の場合は焦点に向かう力が働いたと見られ、これは音響放射力のタイプ B であると考えられる。

(2) 周波数による微小気泡の捕捉面積の変化

続いて微小気泡の捕捉量の評価を行った。Fig.7 に示すように微小気泡が流れていない初期状態と測定画像を差分処理する事により得られる画像をラベリングし、捕捉面積を微小気泡の量と見なして評価した。

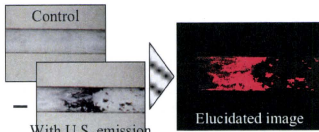


Fig.7 Image of procedure to evaluate the amount of trapped microbubbles

上記の手法を使用し最大音圧 300[kPa]において周波数による捕捉面積の変化を測定したグラフを Fig.8 に示す。エラーバーは値が 4 回の実験の平均値である事を示す。捕捉面積が一番大きかったのは周波数 3[MHz] の場合であり、10[MHz] の場合は 40[sec]において 3[MHz] の 3 分の 1 以下という結果となった。一

方、照射時間に対する捕捉面積の変化については周波数に関係なく 10~30[sec]において増加する傾向が見られた。また、グラフの横軸右端の OFF は超音波を 40[sec]で照射終了後、3[sec]後に観測した残存微小気泡の面積を示しており、最大捕捉面積に対して半分程度の微小気泡が照射終了後も残存する事が分かった。

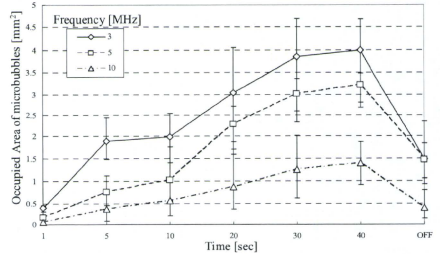


Fig.8 Occupied area of microbubbles versus emission time of U.S. and frequency

(3) 音圧、照射時間による捕捉面積の変化

4.2 節の結果を受け、最も捕捉面積が大きかった周波数 3[MHz] のトランスデューサを使用し、焦点の最大音圧を変化させた場合の微小気泡の捕捉面積を測定した。流速 20[mm/sec]において超音波を 60[sec]照射した際の結果を Fig.9 に示す。尚、エラーバーは 4 回の実験の平均値である事を示す。捕捉面積は音圧の増加に従い増加し、音圧が一番高い 300[kPa]では一番低い 120[kPa]に比べ、60[sec]において約 2.5 倍多く捕捉できる結果となった。

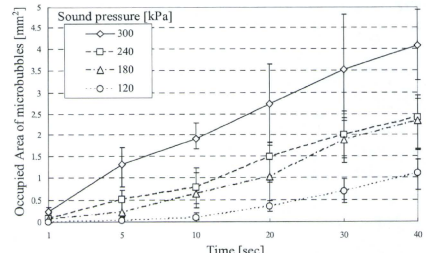


Fig.9 Variation of occupied area of microbubbles versus emission time of U.S. and sound pressure

次に超音波の照射時間をパラメータとし、周波数 3[MHz]、音圧 300[kPa]、流速 20[mm/sec]の条件下で超音波照射時の微小気泡の捕捉面積と照射終了後の変化を観測した。その結果を示したグラフを Fig.10 に示す。尚、実線は照射時間に対する 1,5,10,20,30,40[sec]の時の微小気泡の捕捉面積を示しており、破線はそれぞれの時刻で超音波の照射を終了し、3[sec]経過後も壁面に付着していた微小気泡の

面積との差を示す。また、エラーバーは4回の実験の平均値である事を示す。

この結果、微小気泡の捕捉面積と残存面積は共に照射時間の増加に従い増加する傾向がある事が分かった。また捕捉面積に対する残存面積の割合を見た場合、どの照射時間においても4割程に収まっており、捕捉面積に対し一定の割合で微小気泡が残存した事が分かった。

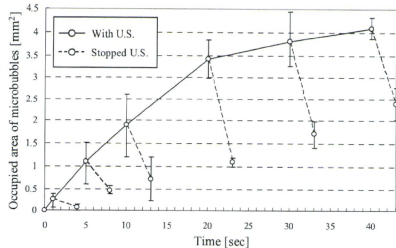
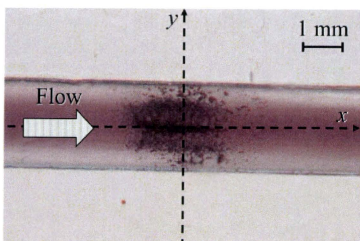


Fig.10 Variation of occupied area of microbubbles under U.S. emission continuously (bold line), and decrease after stopping the emission (broken line).

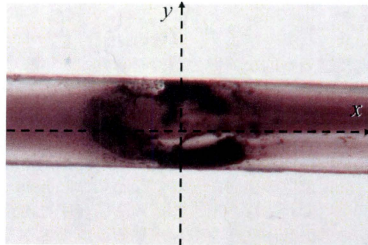
(4) 赤血球を懸濁した微小気泡の捕捉

上記の結果を踏まえ、微小気泡の懸濁液に更に赤血球を混ぜた懸濁液を用いて同様に実験を行った。微小気泡の濃度は0.15[L/kg]、赤血球の濃度を5.4 x 10⁵[L]とした懸濁液において、照射超音波の中心周波数を3[MHz]、流速を20[mm/s]とした時の結果をFig.11に示す。ここで(a)は最大音圧100[kPa]、(b)は300[kPa]の場合で、照射開始後40秒後の顕微鏡画像である。この結果より、音圧に比例して捕捉面積が増大することが分かった。また赤血球を含まない同条件の結果と比較すると、赤血球が存在したことによって、捕捉面積は増大した。

Fig.12は、赤血球の濃度に対する捕捉面積の結果を示す。微小気泡の濃度は0.15[L/kg]、流速を20[mm/s]、最大音圧を100[kPa]とし、中心周波数を2種類で比較している。こちらの結果においても、赤血球の存在が捕捉面積を増大させる作用があることが分かった。また、照射音波の中心周波数の違いには大差がないことも確認できた。



(a) maximum sound pressure of 100 kPa



(b) maximum sound pressure of 300 kPa

Fig.11 Microscope images of the observation area after 40 sec after injection under continuous ultrasound emission.

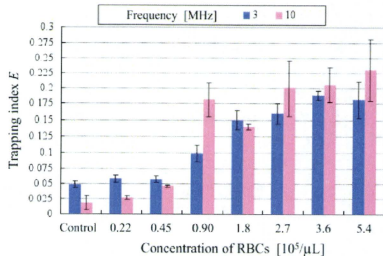


Fig.12 Trapping index of microbubbles with RBCs versus concentration of RBCs and central frequency of ultrasound emission

Fig.13は照射音圧に対する捕捉面積の変化を示す。中心周波数は3[MHz]、流速は20[mm/s]であり、上記と同様に照射開始後40秒後の顕微鏡画像から解析したものである。特に音圧100[kPa]以上の場合において、赤血球の濃度差が4倍程度あるにも関わらず、捕捉量には大差がなかった。また赤血球の存在による捕捉量増大の効果は、200および300[kPa]よりも100[kPa]の際に際立って観察された。これより、超音波照射下の赤血球及び微小気泡の挙動が非常に複雑であることが示された。

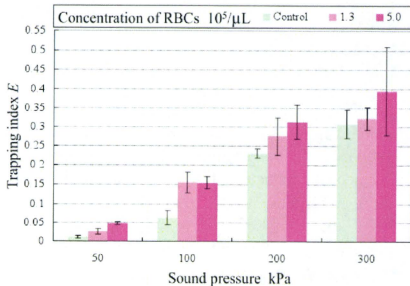


Fig.13 Trapping index of microbubbles with RBCs versus maximum sound pressure of ultrasound emission and concentration of RBCs

D.考察

前章の結果を踏まえ、生体内における微小気泡の安定及び効率的な捕捉の条件を考察する。まず、周波数については 3[MHz]などの低い周波数を使用した方が多くの微小気泡を捕捉する事ができ、効率が良いと考えられる。ただし 10[MHz]の場合、音場の中心付近に捕捉される傾向がある事から生体内において捕捉位置の検討が容易になる利点はある。続いて音圧に関しては、出来るだけ高い音圧を使用した方が多くの微小気泡を捕捉出来るので効率が良く、例えば音圧 240[kPa]で照射時間 40[sec]における捕捉量を音圧 300[kPa]では 30[sec]程度で実現出来る。照射時間と残存する微小気泡の量を比較した場合、どちらも照射時間が長い方が捕捉出来る量が多くなり効率が良いと考えられる。また、照射時間 10[sec]における捕捉量と 40[sec]照射した後に残存する微小気泡の量が同等である事から、照射時間を長くする事により照射を終了しても照射時と同等の捕捉量を実現出来る事が分かる。ただし生体内で照射時間を長くする場合、高い音圧では熱作用による細胞の破壊などが起きる事が考えられるため、低い音圧での利用が望ましいと考えられる。

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、体外からの超音波照射により血管内を流れる第 2 世代の造影剤である微小気泡の捕捉に関する可能性について実験を通して検討を行った。まず周波数 3-10[MHz]の超音波を照射し、ポリエチレングリコールで作成した流路を流れる微小気泡が凝集体を形成しながら捕捉される様子を光学的観測で確認した。さらに赤血球を懸濁した場合において、超音波の周波数、音圧、照射時間の変化に対し捕捉される微小気泡の量を評価し、赤血球の存在が捕捉量を増大させる条件が存在する事を確認した。

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

1. Kohji Masuda, Ryusuke Nakamoto, Nobuyuki Watarai, Ren Koda, Yuto Taguchi, Teruyuki Kozuka, Yoshitaka Miyamoto, Takashi Kakimoto, Shin Enosawa, Toshio Chiba: "Effect of existence of red blood cell in trapping performance of microbubbles by acoustic radiation force", Japanese Journal of Applied Physics, Vol.50,印刷中,2011
2. 梶田晃司, 中元隆介, 渡會展之: 超音波による生体内マイクロカプセルの動態制御, 非破壊検査, 非破壊検査,59(11),562-566,2010

3. Kohji Masuda, Nobuyuki Watarai, Ryusuke Nakamoto, and Yusuke Muramatsu: "Production of local acoustic radiation force to constrain direction of microcapsules in flow", Japanese Journal of Applied Physics, 49, 07HF11, 2010
4. 村松悠佑, 梶田晃司: 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, 22(1), 105-109, 2010

2.学会発表

1. Ryusuke Nakamoto, Nobuyuki Watarai, Ren Koda, Kohji Masuda, Teruyuki Kozuka, Yoshitaka Miyamoto and Toshio Chiba: "Effect of the existence of red blood cell in trapping performance of microbubbles by acoustic radiation force", Proc. of the 31st Symposium on Ultrasonic Electronics, 383-384, 2010
2. Ren Koda, Nobuyuki Watarai, Ryusuke Nakamoto, Nobuhiko Shigehara, Taku Ohta and Kohji Masuda: "Observation of aggregation forming of microcapsules under various conditions of ultrasound emission", Proc. of the 31st Symposium on Ultrasonic Electronics, 387-388, 2010
3. Kohji Masuda, Ren Koda, Nobuyuki Watarai, Ryusuke Nakamoto, Yoshitaka Miyamoto and Toshio Chiba: "Attempt for active control of microbubbles in blood flow by forming local acoustic field Proc. of 9th Congress of Asian Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology", 90, 2010
4. Kohji Masuda, Nobuyuki Watarai, Ryusuke Nakamoto, Yoshitaka Miyamoto, Keri Kim and Toshio Chiba: "Study to prevent the Density of Microcapsules from diffusing in Blood Vessel by Local Acoustic Radiation Force", Proc. of 32nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBS), 402-405, 2010
5. 梶田晃司, 中元隆介, 江田廉, 渡會展之, 宮本義孝, 千葉敏雄: 凝集体形成を利用した微小気泡の生体内超音波制御法の検討, 日本超音波医学会第 22 回関東甲信越地方会学術集会抄録集, 60, 2010
6. 渡會展之, 江田廉, 中元隆介, 梶田晃司, 宮本義孝, 千葉敏雄: 血管分岐部での凝集体形成によるマイクロカプセルの流路選択性向上のための実験的検討, 日本超音波医学会 第 83 回学術集会論文集, 37, S338, 2010

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

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 望月剛 日立アロカメディカル株式会社 東京事業所技術開発部 主査

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、実験動物（ウサギ）を用い、生体内でのソナゾイドの超音波造影条件について評価・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は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。さらに、マイクロバブルの濃度・標的細胞へ接近させることが遺伝子導入効率を高める上で非常に重要である。

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、遺伝子導入効率を高める上で重要な標的部位（実験では標的部位を腎臓とした）におけるマイクロバブル（ソナゾイド）の生体内での動態について検討を行った。

B. 研究方法

超音波診断装置を用いた生体内でのマイクロバブルの動態

【材料】本研究では、実験動物として、JWウサギを用いた。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2.3～2.9um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）が得られる特徴を有する。超音波診断装置として ProSound α10（日立アロカメディカル株式会社）、超音波プローブはリニア型（4～13MHz）を用いた。実験はウサギに静注したソナゾイドの腎臓における動態について検討した。

【方法】イソフルラン麻酔下で、JWウサギ（3kg前後）を水槽中に沈め、耳介周囲静脈よりソナゾイドを注入した。超音波診断装置を用いて、ソナゾイドの腎臓内での動態を観察した。同様の実験をソナゾイドの濃度を変更して行った。



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

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究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

ソナゾイドを用いた超音波診断装置でのウサギ腎臓の造影に成功した。ソナゾイドの濃度は臨床的に使用される濃度（ $15\mu\text{l/Kg}$ ）では血管造影が確認された。ソナゾイドの濃度を上げることにより（ $150\mu\text{l/Kg}$ ）腎臓全体の造影画像が得られた。（Fig2 A・B）



A



B

Fig2 超音波診断装置での造影画像（ウサギ腎臓）

A $15\mu\text{l/Kg}$

B $150\mu\text{l/Kg}$

D. 考察

本研究では、超音波診断装置 ProSound α 10 を利用して、ウサギ腎臓の造影に成功した。また、ソナゾイドの濃度を変更することにより血管から腎臓全体まで造影可能であった。我々が目指す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においてマイクロバブルは造影・遺

伝子導入の両方において非常に重要である。

遺伝子導入においてはマイクロバブルの濃度を変更することにより遺伝子導入効率が上昇することが知られている。

本研究においてはさらなるマイクロバブルと遺伝子導入効率との検討が必要ではあるが、今回の結果から、注入するマイクロバブルの濃度を調節し、超音波造影で確認することにより遺伝子導入をコントロールできる可能性が示唆された。

E. 結論

超音波診断装置 ProSound α 10 を用いたウサギ腎臓の造影に成功した。マイクロバブルの濃度による造影像の変化も確認した。

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