

学位論文題名

マイクロバブルとパルス超音波を用いた ソノポレーションの発生機序に関する研究

学位論文内容の要旨

遺伝子導入法は遺伝子の変異により生じる疾患の治療だけではなく、糖尿病等の生活習慣病の治療にも応用が検討されており、将来的に対象となる患者数の大幅な増加が見込まれている。通常では導入できない外来遺伝子を細胞内に導入する方法としてはウイルスを運び手(ベクタ)とする手法が主流であり、導入効率が高く、またウイルスの種類によっては宿主の染色体に遺伝子が組み込まれるため長期発現が期待できる。しかし、ウイルスベクタの使用にはウイルスの毒性や発癌の可能性など安全性への強い懸念があるため、ウイルスを用いない導入法も盛んに研究されている。その一つであるソノポレーション(sonoporation:音響穿孔法)は、超音波照射により細胞膜の透過性を一時的に向上させることで、遺伝子を細胞内に導入する手法である。この手法の課題は導入効率の低いことと導入遺伝子の発現が一過性であることにある。より強力で連続的な超音波の照射により、導入効率は向上するが死細胞数も増加してしまうため、超音波強度を増加させる手法には限界がある。これに対し、マイクロバブル(微小気泡)の懸濁液を加えると、よりパワーの低い超音波でも高い導入効率を得られることが報告され、注目を集めている。例えば、診断装置で使用されるような安全なパルス超音波を利用できれば、繰り返し導入も可能となり、安全に遺伝子発現を持続させることができるソノポレーションを実現できる。

微小気泡存在下におけるソノポレーションの導入効率の向上には、発生機序の解明が不可欠である。細胞膜の透過性が向上する機序としては、機械的作用および音響化学的作用の2つが考えられている。機械的作用は超音波および微小気泡が機械的に細胞膜を損傷させる作用であり、音響化学的作用は気泡崩壊時に生じるフリーラジカルや H_2O_2 等が細胞膜を化学的に損傷させる作用である。フリーラジカルはDNAやタンパク等を変性させる強い化学活性を持つことから、生体に様々な悪影響を及ぼすものと考えられる。フリーラジカルの発生は一般には連続超音波の照射により起こるとされているが、パルス波でも発生を確認した報告があることから、パルス超音波を用いるソノポレーションにおいても両作用の寄与を明らかにする必要がある。本論文では微小気泡存在下でパルス超音波を1回のみ照射する手法を提案しており、その手法において機械的作用および音響化学的作用それぞれのソノポレーション発生機序への関与を調べることを目的とした。さらに、パルス超音波の安全性を評価するためにフリーラジカルの発生閾値を調べた。本論文で得られた主な成果を以下に示す。

(1) 機械的作用

パルス超音波照射中の細胞と微小気泡の変化をリアルタイムで捉えることを目的として、細胞と微小気泡を顕微鏡で観察しながら超音波を照射できるシステムを構築した。微小気泡(超音波造影

剤 Levovist, 直径約 $1\ \mu\text{m}$) と細胞が接触した状況で, 中心周波数 $1\ \text{MHz}$, 最大負圧 $1.1\ \text{MPa}$, バースト数 3 のパルス超音波を 1 回のみ照射した. 超音波照射中の数 μs 間に生じる細胞と微小気泡の変化を高速度撮影により, 照射前後に生じる細胞の変化をビデオ撮影により観察した. また細胞膜損傷の発生は, 細胞膜損傷検出色素 propidium iodide (PI) を用いた蛍光観察法より評価した. 毎秒 400 万コマ (超音波 1 周期に 4 コマ撮影) で行った高速度撮影の結果, 微小気泡が超音波の正圧・負圧により膨張・収縮し, その直近にある細胞が微小気泡の動きを反映して変形する様子が観察された. さらにビデオ撮影の結果, 観察視野全体に超音波が照射されているのにもかかわらず, 微小気泡がある位置でのみ細胞膜に損傷が生じ, その部位から PI の蛍光が広がっていく様子が観察された. 微小気泡が細胞に損傷を与える瞬間の撮影は世界に先駆けて行われたものであり, 微小気泡のふるまいが細胞に直接機械的な作用を与えていることを示唆する結果であった.

(2) 音響化学的作用

フリーラジカル消去剤 cysteamine により音響化学的作用の有無を制御した. それぞれの条件において, 微小気泡を添加した上でパルス超音波を照射し, 細胞膜損傷率 (損傷細胞数/視野内細胞数) を比較した. その結果, 損傷率は cysteamine 無しでは $8.7 \pm 3.9\%$ (平均値 \pm 標準偏差), 有りでは $10.3 \pm 4.1\%$ であった. 両条件間に有意差はみられなかったことから ($P=0.36$), 音響化学的作用は細胞膜損傷に寄与しておらず, パルス超音波照射により生じる細胞膜損傷には微小気泡の機械的作用のみが寄与していることが確認された.

(3) フリーラジカル発生閾値

フリーラジカルは非常に化学活性が高いため, 発生量がごく微量でも生体に重大な作用をもたらす可能性がある. (2) の検討では, フリーラジカルの発生は細胞膜損傷としては捉えられなかったものの, 全く発生していないことを確認できてはいない. そこでフリーラジカルを electron spin resonance spin trapping 法およびヨウ素-デンプン法を用いて直接検出し, その発生閾値を調べた. ただしパルス超音波照射により生じる微量なフリーラジカルを直接測定することは困難であるため, バースト数の多い超音波を用いてバースト数とフリーラジカル発生量の関係を求め, その結果を外挿することにより発生閾値を求めた. バースト超音波の中心周波数と最大負圧はそれぞれ $1\ \text{MHz}$, $0.03\ \text{MPa}$ で一定とし, バースト数およびパルス繰り返し周波数 (PRF) を変えて 5 分間照射した. 超音波を照射する溶液は生体に近い条件とするため空気飽和した. まず微小気泡なし (超音波のみ) でフリーラジカルの発生量を調べた結果, PRF 一定の条件では, バースト数の低下におおよそ比例して発生量が低下し, あるバースト数で完全に発生しなくなった. 様々な PRF で同様な検討を行った結果, バースト数の閾値は PRF が低下すると増加する傾向にあり, PRF $100\ \text{Hz}$ におけるバースト数は 1200 と推定された. (1), (2) の検討で用いたパルス超音波はバースト数 3 のパルス波を 1 回のみ照射する条件なので, このパルス波の音圧が閾値推定に用いた超音波の音圧に比べて約 30 倍高いことを考慮しても, 十分閾値以下であることが確認された. 次に微小気泡を添加して閾値を調べたところ, 閾値となるバースト数には変化がみられなかった. この結果から, 微小気泡添加によるフリーラジカル発生の可能性は空気飽和条件では非常に低いことが示された.

以上の検討より, 本論文が提案する微小気泡存在下でパルス超音波を 1 回のみ照射するソノレーションでは, 細胞膜損傷の発生機序は音響化学的作用ではなく微小気泡の機械的作用に起因することを明らかにできた. さらに, 本手法ではフリーラジカルが発生する危険性は十分に低く, 本質的に安全であることも示すことができた. 従って, 将来多くの患者を対象に遺伝子治療が行われるようになった場合, 遺伝子の発現を安全に持続できる手法として, 広く使われる治療法となり得るものと期待できる.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 克 之

副 査 教 授 河 原 剛 一

副 査 教 授 平 田 拓

副 査 教 授 渡 邊 日出海

学 位 論 文 題 名

マイクロバブルとパルス超音波を用いた ソノポレーションの発生機序に関する研究

ソノポレーションは、超音波の照射により細胞膜の透過性を向上させて遺伝子や薬物の導入を行う手法である。この手法には、導入効率が低く導入遺伝子の効果が一過性であるという問題点がある。これまでは導入効率の向上を目指して連続超音波がよく用いられていたが、死細胞数が増加するため、導入効率が向上しにくいという問題点があった。それに対し本研究では、直径数ミクロンの微小気泡存在下でパルス超音波を1回のみ照射するという、従来とは全く異なるアプローチでソノポレーションを実現する手法を提案している。この手法では、超音波のエネルギーが連続波よりも低いため、細胞死を起こさずに導入効率が向上すること、遺伝子や薬物の持続的発現を目的とする繰り返し導入が実現できることの2点が期待される。

導入効率の向上を実現するには、その発生機序を明らかにすることが不可欠である。そこで本研究では、発生機序として機械的作用(超音波および微小気泡が機械的に細胞膜を損傷させる作用)および音響化学的作用(気泡崩壊時に生じるフリーラジカルが細胞膜を化学的に損傷させる作用)の2つを考え、提案手法における各機序の寄与を調べることを目的としている。さらに超音波の照射によって発生し、ごく微量でも導入対象組織外に移動すれば生体に重大な悪影響を及ぼす可能性があるフリーラジカルの発生閾値について検討し、提案手法の安全性の検証を行っている。これらの成果は以下のように要約される。

(1) 機械的作用

機械的作用の機序については、微小気泡(超音波造影剤 Levovist, 直径約 $1\mu\text{m}$)と培養細胞が接触した状態で、中心周波数 1MHz 、最大負圧 1.1MPa 、パースト数3のパルス超音波を1回のみ照射し、細胞と微小気泡の変化を観察することで検討を行っている。まず、超音波照射下での微小気泡のふるまいの高速度撮影(撮影速度毎秒400万コマ)を行い、微小気泡が超音波の負圧・正圧に同期して膨張・収縮し、その直近にある細胞が微小気泡の動きを反映して変形する様子を観察している。さらにソノポレーションの過程をビデオカメラを用いてリアルタイムで撮影し、観察視野全体に超音波が照射されているにもかかわらず、微小気泡が接触している場所にのみ細胞膜の損傷が生じる様子を観察している。また、超音波照射後の時間経過に伴い、短時間に損傷細胞数が減少する様子を観

察し、パルス超音波照射により膜損傷を生じた細胞の約 6 割が修復されることを明らかにしている。これらの結果より、微小気泡のふるまいが細胞に直接機械的作用を与えることが、ソノポレーションの重要な機序と考えられると結論づけている。微小気泡が細胞に損傷を与える瞬間の撮影は世界に先駆けて行われたものであり、短時間の細胞膜修復を実証した成果とともに高く評価できる。

(2) 音響化学的作用

音響化学的作用の機序の評価は、フリーラジカル消去剤 **cysteamine** を用いて音響化学的作用の有無を制御した条件下で、細胞膜損傷率 (損傷細胞数/視野内細胞数) を比較することで行われている。その結果、**cysteamine** の有無で損傷率には統計学的有意差はみられず、音響化学的作用は細胞膜損傷に関与していないことを明らかにしている。以上の検討より、本研究により提案されているソノポレーションでは、微小気泡の機械的作用のみが細胞膜損傷を生じさせていることを実証している。

(3) フリーラジカルの発生閾値

ソノポレーションの安全性の観点から化学活性の高いフリーラジカルの発生について、さらなる検討を加えている。具体的には、様々なバースト数とパルス繰り返し周波数 (PRF) を持つバースト超音波を被検溶液に照射し、フリーラジカルの発生閾値を外挿法で精度よく求め、提案手法でのパルス超音波照射条件は、十分に閾値以下であることを明らかにしている。

以上の検討により、本研究で提案されているソノポレーションの手法は、生体内で繰り返し治療を行っても生体に悪影響を及ぼすことのない安全な手法として将来有用な治療法となり得ると結論づけている。

これを要するに、著者は、パルス超音波を用いたソノポレーションの発生機序を解明し、細胞内への遺伝子・薬物移入法に関するソノポレーションの新知見を得たものであり、生体医工学、特に超音波医用工学に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士 (情報科学) の学位を授与される資格あるものと認める。