超音波とマイクロバブルによる セラノスティクス

帝京大学 薬学部*

小侯大樹*・鈴木 亮*・Johan Unga*・丸山一雄*

Theranostics based on microbubbles and ultrasound

Ultrasound imaging and ultrasound therapy using high intensity focused ultrasound are applied in clinic. Ultrasound is a promising candidate for developing theranostics system because of its safety, non-invasiveness, relatively cheap equipment and imaging in real time. Ultrasound contrast agents (Microbubble) have been developed to visualize tissues clearly. Recently, the combination of microbubbles and ultrasound is not only applied for imaging but also therapy like enhanced drug delivery. Ultrasound can induce microbubble oscillation, stable cavitation and inertial cavitation depending on the ultrasound intensity. These phenomena are used for imaging and therapy. Although several microbubbles have been developed in the world and applied for ultrasound diagnostics, it is not approved for therapy. Therefore, in order to establish ultrasound theranostics, we have tried to develop novel bubbles which are suitable for diagnostics and therapeutics. In this review, we describe our studies and introduce recent studies for establishing ultrasound theranostics.

超音波は臨床において診断と治療に利用されているため、セラノスティクスを実現していくうえで有用な物理エネルギーであると期待されている。現在、数種の超音波造影剤(マイクロバブル)が臨床で超音波診断のために使用されている。最近では、超音波を照射することで生じるマイクロバブルの振動や圧壊といった振る舞いを利用した薬物デリバリー法の開発など治療への応用が研究されている。しかしながら、現在臨床で使用されているマイクロバブルは超音波診断を目的として開発されており、治療を目的としたマイクロバブルは承認されていない。そこで筆者らは新規バブルの開発を行い超音波セラノスティクスの研究を進めてきた。本稿では、これまでの筆者らの取り組みとともに、最近の超音波セラノスティクスの研究動向について紹介する。

Daiki Omata*, Ryo Suzuki*, Johan Unga*, Kazuo Maruyama*

Keywords: Ultrasound, Microbubble, Theranostics

1. はじめに

セラノスティクス(Theranostics)は、治療(Therapeutics)と診断(Diagnostics)を組み合わせた造語であり、Funkhouser John が最初に提唱したとされている¹⁾。セラノスティクスは治療と診断を一体的に行うシステムを指し、治療機能と診断機能をもつデバイスを使用することや、治療の最適化のための診断を意味している。例として、ゼヴァリン®(イブリツモマブ チウキセタン)やハー

セプチン®(トラスツズマブ)があげられる。ゼヴァリン®はCD20陽性のB細胞性腫瘍を標的としており、治療の適格性を確認するためにインジウム(¹¹¹In)標識イブリツモマブ チウキセタンを投与後、シンチグラムを撮像し、骨髄への取り込みなどの治療リスクを評価する。適格性が確認された場合には、イットリウム(⁹⁰Y)標識イブリツモマブ チウキセタンを使用した放射線治療を行う。治療の最適化のための診断と実際の治療が可能なセラノスティクスといえる。現在利用される診断方法として、MRI、PET、CT、蛍光、超音波などがあげられる。そのなかで超音波は古くから超音波造影診断に使用

* Faculty of Pharma Sciences, Teikyo University

され、近年の超音波技術の進展に伴い3D造影が可能になり、超解像超音波についても研究が進められている²⁾。さらに、強力集束超音波を用いて超音波エネルギーを数mm³の範囲に集め、腫瘍組織を焼灼する治療も行われている。このように超音波は診断と治療に利用される物理エネルギーであるとともに、超音波造影装置は比較的小型で安価であること、被曝がないため繰り返し利用可能であること、リアルタイムイメージングが可能であることなどの利点がある。そこで筆者らは超音波に注目したセラノスティクス構築に取り組んでいる。本稿では、超音波セラノスティクスについて、筆者らの研究をまじえ、最近の研究動向を紹介する。

2. 超音波と超音波造影剤(マイクロバブル)

胎児超音波検査で使用するような超音波のみによる画像検査が可能であるが、超音波造影剤(マイクロバブル)を使用する画像検査も行われる。マイクロバブルは名前のとおり1~10 μ m程度のサイズをもち、気体を脂質などで覆い安定化した気泡である(図1)。マイクロバブルを使用した超音波造影は1960年代後半に初めて行われた。生理食塩水を攪拌した溶液を投与することで超音波エコーが増強したことが始まりである。これは、攪拌により圧縮された気泡が超音波を反射し、超音波シグナルを増強したことによる。1990年代になると空気をアルブミンで覆ったマイクロバブルがFDAに認可され

た。その後、マイクロバブルの安定性と生体適合性の改善が行われ、現在ではパーフルオロカーボンや六フッ化硫黄を脂質で覆ったマイクロバブルが日米欧で認可されている(表)。

超音波診断にはさまざまな超音波造影法が利用できる。一般的な超音波造影法であるブライトネスモード(Bモード)は、超音波の反射を利用した方法であり、組織間で音響インピーダンスが異なるために起こる超音波の反射波を画像化している。マイクロバブルを使用した場合には、超音波がマイクロバブルにあたることで生じる反射波を画像化できるが、同様に組織からの反射波も含んだ信号を画像化することになる。コントラストモードは、マイクロバブルの振動を利用した造影方法である。マイクロバブルに対して超音波を照射するとマイクロバブルは振動し、その振動により反射波には照射した超音波よりも高い周波数の超音波(高調波成分)が含まれる。位相を反転した2回のパルス波を加算することで、組織からの信号を低減し、マイクロバブルの反射波に含まれる高調波成分の信号を強調して画像化することが可能である。第一世代のマイクロバブルであるレボビスト[®]は、超音波照射により気泡が崩壊することで生じるハーモニック信号(高調波成分)を画像化するものであり、心エコー図検査、ドプラ検査、子宮卵管エコー図検査に使用された。この造影ではマイクロバブルを破壊しながら診断するため、撮像するタイミングに工夫が必要であった。第二世代としてパーフルオロカーボンや六フッ化硫

図1 マイクロバブルの構造

表 上市されたマイクロバブル

マイクロバブル	ガス	外殻成分	粒子サイズ(μm)	個数濃度(個/mL)
レボビスト	空気	ガラクトース、 パルミチン酸	1~3	
オブチゾン	パーフルオロプロパン (C ₃ F ₈)	血清アルブミン	2.5~4.5	5~8×10 ⁸
デフィニティー	パーフルオロプロパン (C ₃ F ₈)	DPPC、DPPA、 MPEG5000DPPE	1.1~2.5	6.4×10 ⁷ ~1.2×10 ¹⁰
ソノビュー	六フッ化硫黄 (SF ₆)	DSPS、DSPG、 パルミチン酸	1.5~2.5	1.5~5.6×10 ⁸
ソナゾイド	パーフルオロブタン (C ₄ F ₁₀)	HSPS	2~3	9.1×10 ⁸

黄をタンパク質や脂質でコーティングしたマイクロバブルが開発された。本邦では、パーフルオロブタンを水素添加卵黄ホスファチジルセリンナトリウムで覆った構造を有するソナゾイド[®]が承認されている。肝腫瘍性病変と乳房腫瘍性病変の診断に使用され、肝腫瘍性病変の造影では、投与直後から得られる血管イメージングとクッパーイメージングが用いられる。ソナゾイド[®]の外殻成分はホスファチジルセリンであるため、ホスファチジルセリンに対するレセプターを有する肝臓のクッパー細胞に取り込まれる。そのため血管の造影だけでなく、クッパー細胞の存在する正常肝実質を造影可能であり、クッパー細胞の存在しない悪性腫瘍を陰影欠損像として診断することができる。

近年、マイクロバブルと超音波を使用した治療への応用についても多くの研究が進められている。比較的低強度の超音波とマイクロバブルを利用したソノポレーション法は薬物や遺伝子デリバリー法として期待されている。マイクロバブルは照射される超音波の強度によりその振る舞いに変化する(図2)。超音波は疎密波であるため、正圧と負圧の異なる音圧からなる波であり、超音波の正圧により気泡(マイクロバブル)は収縮し、負圧により膨張する。前

述したように、超音波診断に使用される低強度の超音波照射において、マイクロバブルは超音波を反射しBモードの超音波造影像として画像化される。または、マイクロバブルの収縮膨張による振動から生じる高調波成分を画像化し、コントラストモードの超音波造影像として画像化できる。高い強度の超音波照射により、気泡は収縮と膨張を繰り返し大きくなっていき、内圧が外圧に耐えられなくなると気泡の圧壊が起こる。マイクロバブルの超音波反射や振動は超音波造影に利用される。マイクロバブルの振動や圧壊に伴う機械的作用はソノポレーション法として薬物や遺伝子デリバリーへの応用が研究されている。圧壊に伴う熱的作用はがん温熱療法への応用が期待されている。マイクロバブルと超音波による薬物デリバリーについて、詳細なメカニズムは明らかとなっていないが、超音波照射によってマイクロバブルの振動および圧壊に伴うマイクロジェット流の誘導が起こり、この機械的作用によって細胞膜に一過性の小孔が生じると考えられている³⁾。小孔の形成により細胞膜の透過性が一時的に高まり、薬物の細胞質へのデリバリー効率が高まると考えられる(図3)。超音波照射によるマイクロバブルのさまざまな振る舞いに伴う、機械的作用、熱的作用を利

図2 マイクロバブルの振る舞い

マイクロバブルの異なる振る舞いが超音波造影や治療に利用される。

図3 ソノポレーション法

用した疾患治療について研究が進められている。

現在上市されているマイクロバブルは超音波診断を目的としている。そのため超音波セラノスティクスを構築していくなかで治療を考えた場合に、既存のマイクロバブルが治療のために最適であるかは定かではない。マイクロバブルの生体内での安定性や超音波に対する応答性は、内包する気体、外殻成分、粒子サイズなどにより影響を受ける⁴⁾。そこで筆者らは、診断と治療を目的とした超音波セラノスティクスを構築するため新規バブルの開発を進め、超音波造影や薬物デリバリーについて評価してきた。

3. 超音波とマイクロバブルによるイメージング

さまざまなマイクロバブルが開発されるなかで、超音波診断法においてもマイクロバブルを用いた超音波造影に特有な方法が開発されてきた。Flash Replenishment Imaging(FRI)は、超音波造影を行い撮像中に存在するマイクロバブルをフラッシュエコー(高音圧の超音波)を使用して崩壊させることで、血管内を再灌流するマイクロバブルを観察し、リアルタイムに血流動態を観察する方法である。ほかにも Maximum Intensity Projection(MIP)法は、マイクロバブル由来の輝度のなかで最高輝度のみを画像化してくことで、微細な血管構造を描出することを可能にしている。

腫瘍の血管構造や血流動態を観察することは、治療効果の予測や評価のために有用であると考えられる。そこで、開発してきたバブルを用いた腫瘍血管の造影を行い、さらにマイクロバブルを用いた特有

図4 バブルと超音波による腫瘍組織の造影

(a)Bモード画像 バブル投与前。(b)Bモード画像 バブル投与後。
(c)コントラストモード画像 バブル投与前。
(d)コントラストモード画像 バブル投与後。

な超音波造影方法に適応可能か検討を加えた。マウスメラノーマ細胞である B16 /BL6細胞を移植した担がんマウスに対して、バブルを尾静脈内より投与し、直ちに腫瘍組織の超音波造影を行った。超音波造影装置は VIVO2100、周波数は18 MHzを使用した。一般的に使用される超音波造影法である Bモードとマイクロバブルの造影に汎用されるコントラストモードにおいて、腫瘍組織のバブルを観察した。その結果、Bモードおよびコントラストモードいずれにおいてもバブルを投与することで、腫瘍内の血管様構造を観察することができた(図4)。今回の観察ではバブル投与直後から腫瘍組織の超音波造影を行っているため、バブルは血管内に存在していると推察された。腫瘍の血管様構造が観察できたこ

とから、尾静脈から投与したバブルが、全身を循環し腫瘍組織まで流入したことになる。同様に、マイクロバブルに特有な超音波造影法である FRI に開発したバブルが利用可能が評価した。その結果、フラッシュエコーを照射することでバブル由来の輝度が消失し、再灌流するバブルの様子を観察することが可能であった。超音波造影の画像から得られる輝度を解析した結果からも、フラッシュエコーによる輝度の低下とバブルの再灌流に伴う輝度の再上昇を確認した。また、MIP 法によるバブルの観察を行ったところ、腫瘍組織における微小な血管構造の描出が可能であった。これらのことから、開発してきたバブルは FRI や MIP といった方法により腫瘍血管の血流動態や微小血管構造を評価できることが示唆された。マイクロバブルと超音波を利用した超音波造影は本邦ではすでに肝腫瘍性病変の診断に使用されているが、現在もさまざまな研究が進められており対象疾患が拡大することが期待される。ソナゾイド[®]を用いたリンパ節診断や^{5,6)}、ヨーロッパで承認されているソノビュー[®]を用いたクローン病に対する超音波診断が報告されている⁷⁾。

最近では、より正確に微細な血管構造を描出するための超解像超音波に関する研究が注目を集めている^{2,8,9)}。これは、個々のマイクロバブルの血管内の動きを高いフレームレートで撮像し、マイクロバブルの動きを追跡することで正確に血管構造を画像化する手法である。Opacis[®]らは、この手法を用いヒトの腫瘍の微小血管構造を描出可能であることを報告している²⁾。微小血管構造を把握できるようになることから、腫瘍の状態を把握するための診断や治療効果の判定などに有用であるとともに、ほかの炎症性疾患やリウマチなどの免疫疾患の診断などにも役立つ技術になると考察していた。また、分子標的型マイクロバブルによる腫瘍や循環器疾患における血管内皮のイメージングが盛んに研究されている。腫瘍血管の造影では VEGFR2 を標的としたマイクロバブルを用いることで、腫瘍の新生血管を造影できることが報告され、BR55 というマイクロバブルは乳がんや前立腺がん患者などで評価されている^{10,11)}。筆者らは腫瘍血管に高発現するシンデカンを標的とした AG73 ペプチド修飾バブルを開発し、

腫瘍血管造影が可能であることを報告している¹²⁾。また、ほかのグループからは、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンと VEGFR2 を標的としたマイクロバブルが報告されている¹³⁾。血栓の診断のために標的分子を修飾したマイクロバブルも研究されている^{14,15)}。超解像超音波や分子標的型のマイクロバブルを利用することで、より正確に疾患の病態を把握し、治療の計画を立て、治療効果を評価するということが可能になると期待される。

4. 超音波とマイクロバブルによる治療

高強度の超音波エネルギーを数 mm 単位で患部に對して正確に照射することのできる強力集束超音波が臨床応用され、超音波エネルギーによる前立腺がんや子宮筋腫の低侵襲的焼灼治療が行われている。脳疾患治療への超音波エネルギーの利用も進められ、本態性振戦の治療を目的とした脳に対する超音波照射装置が治療用医療機器 (ExAblate4000) として 2016 年に薬事承認を得ている。このように超音波は治療にも利用できる物理エネルギーとして注目されている。さらに最近では、超音波とマイクロバブルを併用することで、細胞内や組織に対して薬物を効率よく送達するための超音波技術が研究されている。筆者らは超音波セラノスティクスの実現のために新規バブルの開発を進め、前述したようにバブルの超音波造影能を評価するとともに、バブルを用いた薬物デリバリーや疾患治療についても取り組んできたので紹介する。

マイクロバブルと超音波による細胞膜透過性や組織透過性の亢進による薬物送達効率の向上が期待できる。まず、簡便に観察可能なマウスの耳において、モデル薬物として青色色素であるエバンスブルーを用い、バブルと超音波による血管透過性亢進について検討した (図 5)。エバンスブルーとバブルをマウス尾静脈から投与し、超音波造影用のゲル上にのせたマウスの右耳に超音波を照射した。今回使用した超音波は非集束型の超音波である。超音波照射 10 分後、1 時間後にマウスの左右の耳を観察したところ、超音波を照射した右耳のみにエバンスブルーが血管外へ漏出している様子が観察できた。ま

た、10分後よりも1時間後においてよりエバンスブルーが漏出していることを確認した。このことから、バブルと超音波を利用することで血管の透過性を亢進可能であり、今回の条件では1時間程度透過性の亢進効果が持続することが示唆された。次に、バブルと超音波を用いた腫瘍組織への薬物送達効率の向上および抗腫瘍効果について検討を行った¹⁶⁾。担がんマウスにドキソルビシンとバブルを静脈内投与し、経皮的に腫瘍組織に向けて超音波を照射した。ドキソルビシン単独投与(1 mg/kg)と比べて、ドキソルビシン(1 mg/kg)とバブルを投与し超音波を併用した群では高い腫瘍増殖抑制効果が観察された。この効果は5 mg/kgのドキソルビシン単独処置群と同程度であった。また、腫瘍組織へのドキソルビシン移行量を測定したところ、ドキソルビシン単独投与群と比べて、ドキソルビシンとバブルを投与し超音波を併用した群で、腫瘍組織内のドキソルビシン移行量の増大が確認された。バブルと超音波を併用することで、腫瘍血管の透過性が亢進し、ドキソルビシンの腫瘍組織内への移行量が増加した結果、高い腫瘍増殖効果が得られたと考えられた。現在、鳥取大学の大崎先生との共同研究において、イヌのがんにおけるバブルと超音波による薬物送達効率の向上について検討を進めている。このようにバブルと超音波の併用は薬物送達効率を向上し、より優れたがん治療法になる可能性がある。実際に、ノル

ウェーのグループはヒト膀胱がん患者に対してマイクロバブルと超音波によりゲムシタビン治療効果の増強を試みる世界初の臨床試験を行っている¹⁷⁾。膀胱がんに対する化学療法の治療効果は十分とはいええず、Dimceviskiらは診断用の超音波とヨーロッパで承認されているソノビュー[®]を使用したゲムシタビンの治療効果増強を目指した第I相試験を行った。10人の切除不能膀胱がん患者に対して、本治療を行ったところ、5名の患者で腫瘍の縮小が認められた。また、いずれの患者においても特別な毒性や副作用は観察されなかった。ゲムシタビン単独で治療した患者と比べて、併用治療を行った患者で治療サイクル数を増やすことが可能であった。この試験は第I相試験であったため、患者数を増やした評価をしていく必要があるが、この結果は超音波とマイクロバブル、化学療法の併用は有用ながん治療方法になると期待させるものである。

がん治療のための腫瘍組織への薬物送達以外にも脳への薬物送達のためにマイクロバブルと超音波を利用した技術が注目を集めている。脳への薬物送達では、血液と脳実質の間の物質移動を厳密に制御する血液脳関門(Blood brain barrier: BBB)が存在するため、脂溶性の低分子薬物以外は脳へ送達することが困難である。これが脳疾患治療のための医薬品開発の1つの問題となり、BBBの薬物透過性を制御するためにさまざまな方法が研究されている。その

なかで、マイクロバブルへの超音波照射で生じる振動や圧壊といった振る舞いを利用して、一時的にBBBをオープニングし脳内へ薬物を送達する方法が近年注目されている。筆者らが開発してきたバブルと超音波によるBBBオープニングについて、モデル薬物としてエバンスブルーを使用して検討した。その結果、バブルと超音波を併用することで超音波を照射した位置選択的にエバンスブルーが移行することを確認した。さらに、周波数や超音波強度を最適化することで、組織傷害性を抑えられることを見出してきた。これらの結

図5 バブルと超音波による血管透過性亢進

果から、バブルと超音波を用いることで低侵襲的にBBB オープニングが可能になることが示唆された。この分野ではカナダのSunnybrook Research Instituteのグループが精力的に研究開発を進めている。2015年に脳腫瘍患者に対して抗がん剤を効率的にデリバリーするために、マイクロバブルと集束超音波を使用した臨床試験を行った¹⁸⁾。2017年にはアルツハイマー病の患者に対する集束超音波を使用したBBB オープニングの第I相試験が始まった¹⁹⁾。このように超音波とマイクロバブルを利用した脳疾患に対する治療が劇的に進展しようとしている。

マイクロバブルと超音波による機械的作用を利用した薬物デリバリーのみではなく、熱的作用を利用した治療法も研究されている。筆者らは、マイクロバブルと超音波の熱的作用を利用したがん温熱療法について報告してきた²⁰⁾。正常細胞に比べて、がん細胞は熱に対して抵抗性が低いため、43度の温度で死滅する。そこでまず、十分な温度上昇が得られるか検討するため、担がんマウスの腫瘍組織内にバブルを投与し、超音波を照射し腫瘍組織の温度を測定した。その結果、超音波のみを照射した群では約38度であったのに対して、バブルと超音波を併用した群では約44度まで上昇することを確認した。次に、抗腫瘍効果について検討したところ、超音波のみを照射した群と比較し、バブルと超音波を併用した群において有意な腫瘍増殖抑制効果が確認できた。バブルと超音波の熱的作用を利用することで、腫瘍組織の温度を上昇させることが可能であり、がん温熱療法への応用が期待される。

文献

- 1) Kelkar S.S. and Reineke T.M., *Bioconjug. Chem.*, **22**, 1879-1903 (2011)
- 2) Opacic T., *et al.*, *Nat. Commun.*, **9**, 1527 (2018)
- 3) Fan Z., *et al.*, *Ther. Deliv.*, **5**, 467-486 (2014)
- 4) Sirsi S. and Morden M., *Bubble Sci. Eng. Technol.*, **1**, 3-17 (2009)
- 5) Shiamazu K., *et al.*, *Cancer Med.*, **6**, 1915-1922 (2017)
- 6) Oikawa S.I., *et al.*, *Oncol. Lett.*, **15**, 4171-4176 (2018)
- 7) Quaia E., *et al.*, *Radiology*, **281**, 606-616 (2016)
- 8) Harput S., *et al.*, *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control.*, **65**, 803-814 (2018)
- 9) Song P., *et al.*, *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control.*, **65**, 149-167 (2018)

5. おわりに

超音波はすでに診断と治療に利用され、セラノステイクスを実現していくために有望な物理エネルギーであると考えられる。超音波技術の発展により3D造影やマイクロバブルを利用した超解像超音波造影の開発が進められ、造影画像の高解像度化および定量的な解析が可能になりつつある。このような技術は超音波診断可能な疾患を増やし、また、術者の技量に依存する側面があった超音波造影法をより再現性の高い方法にすると考えられる。治療においては強力集束超音波やソノポレーション法によるがん治療や脳疾患治療のための臨床試験が進められている。VEGFR2を標的にしたマイクロバブル(BR55)のヒトでの臨床試験が進められているが、BR55は診断を目的にしたものであり、治療においては安全に高い効果が得られるように組成やサイズなどを最適化したマイクロバブルの開発が重要であると考えている。超音波セラノステイクスを実現していくためには、医学、薬学、工学などさまざまな分野が融合し開発に取り組む必要がある。筆者らも超音波セラノステイクスが医療に貢献するよう研究に取り組んでいきたい。

謝辞

紹介した研究の一部は、文部科学省私立大学戦略的基盤形成事業(平成25年~29年度)およびAMED脳科学研究戦略推進プロジェクト(課題番号JP16dm0107115)によるものである。

- 10) Willmann J.K., *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, **35**, 2133-2140 (2017)
- 11) Smeenge M., *et al.*, *Invest. Radiol.*, **52**, 419-427 (2017)
- 12) Negish Y., *et al.*, *Biomaterials*, **34**, 501-507 (2013)
- 13) Yuan H.X., *et al.*, *Ultrasound Med. Biol.*, **44**, 1460-1467 (2018)
- 14) Gunther F., *et al.*, *Sci. Rep.*, **7**, 14898 (2017)
- 15) Lux J., *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **9**, 37587-37596 (2017)
- 16) Ueno Y., *et al.*, *Cancer Biol. Ther.*, **12**, 270-271 (2011)
- 17) Dimcevski G., *et al.*, *J. Control. Release.*, **243**, 172-181 (2016)
- 18) ClinicalTrials.gov Identifier : NCT02343991
- 19) ClinicalTrials.gov Identifier : NCT02986932
- 20) Suzuki R., *et al.*, *Cancer Sci.*, **107**, 217-223 (2016)