345 集束超音波トランスデューサを用いた内視鏡的薬剤、遺伝子デリバリー

Endoscopic Drug and Gene Delivery Using Focused Ultrasonic Transducer

- 安居 晃啓 (東北大院・工) 正 芳賀 洋一 (東北大・先進医工)
 陳 俊傑 (東北大院・工) 伊関 洋 (東京女子医科大)
 正 江刺 正善 (東北大院・工) 正 和田 仁 (東北大院・工)

Akihiro YASUI, Tohoku University, Aza Aoba 1, Sendai 980-8579

Yoichi HAGA, Tohoku University Biomedical Engineering Research Organization (TUBERO)

Jiun-Jie CHEN, Tohoku University

Hiroshi ISEKI, Tokyo Women's Medical University

Masayoshi ESASHI, Tohoku University

Hiroshi WADA, Tohoku University

Key Words: Sonodynamic therapy, Sonoporation, Ultrasonic transducer, Focused ultrasound, Drug delivery, Concave shape

1. 緒言

医療の分野において、超音波は体内軟組織の検査・診断に広く用いられると共に、近年は治療への応用にも期待が寄せられている。特に、音響感受性を持つ薬剤の細胞毒性を活性化させる Sonodynamic therapy⁽¹⁾⁽²⁾や、超音波とマイクロバブルの併用で一時的に細胞・組織への薬剤や遺伝子の取り込みを促進させる Sonoporation⁽³⁾⁽⁷⁾などが臨床への応用の観点から注目されている。

我々はこれら新しい超音波治療法を消化器などの体内深部の病巣に対して適応することを考えている。しかし、体外からの超音波照射では、媒質の変化などによる反射、屈折、減衰の影響で体内深部における超音波の正確な位置合わせや最適な強度の実現が困難となる。これに対して、超音波トランスデューサを内視鏡やカテーテルと組み合わせて体内に持ち込み、超音波を照射し、治療を行うことが有効であると考えられる。そこで我々は、上記の目的に適した形状と大きさ、機能を併せ持った超音波プローブの設計、試作を行った。

本研究では、はじめに我々が提案する内視鏡、カテーテルを用いた超音波治療の概念について示す。次に、小型 PZT をポリマーの土台に組み付けて作製した超音波プローブの構造を示す。続いて、試作した超音波プローブに対して、ハイドロホンを用いて行った音場分布の測定方法とその結果について示す。最後に、試作した超音波プローブを用いて行った Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞に対する Green Fluorescent Protein (GFP) プラスミドの遺伝子導入実験の方法と結果について示す。

2. デバイスの設計と作製

2.1 体内からの超音波治療の概要 Fig. 1 に体内からの超音波治療の概要を示す。先端に凹面型の集束超音波トランスデューサを持つ外径 1.5 mm 程度のプローブを、カテーテルまたは内視鏡に搭載、あるいは内視鏡の鉗子口を通して体内に挿入する(Fig. 1(a))。プローブが患部へ到達すると、プローブ中央の貫通穴などを通して注射針を挿入し、薬剤を患部(例えば癌組織)に注入する(Fig. 1(b))。その後、これらの穴を通して超音波検査用ゲルを注入して空気を除き、超音波の減衰を防ぐ(Fig. 1(c))。そして、その場で薬剤を投与した患部に対して集束超音波を照射することで局所的に薬剤の効果を引き起こし、正常組織への影響は最小限に抑えることができる(Fig. 1(d))。

2.2 設計と作製 Fig. 1 の概念に従い設計、試作を行った超音波プローブの構造を Fig. 2(a) に示す。プローブは超音波を発信する圧電セラミックス PZT、PZT を搭載するポリマーの土台、PZT を駆動する電極から構成されており、プローブ

の中心には将来的に薬剤や遺伝子、マイクロバブルなどを患部へ注入するための直径 0.5 mm の貫通穴を確保している。また、局所的な治療と、小型のデバイスでも必要とされる超音波強度を実現するために、PZT は図に示すような外径 5.5 mm、曲率半径 9 mm の凹面形状とし、超音波を収束させる。凹面型 PZT トランスデューサの作製に当たっては、高速立形加工機を用いて分極済みの PZT シートから切削加工によって作製を行った。PZT の厚みは 1.1 mm、この時の中心周波数は 1.83 MHz で、Sonoporation で一般的に利用されている 1-2 MHz の範囲内に設定した。Fig. 2(b) に作製した超音波プローブの写真を示す。

3. 音場分布の測定

3.1 測定方法 作製した収束超音波プローブに対して、ハイドロホンを用いて音場分布の測定を行った。Fig. 3 に測定装置の構成を示す。作製した超音波プローブを水槽内に固定し、Function Generator (model 2416A; Pragmatic Instruments, Inc.) と高周波増幅器 (model 705810; YOKOGAWA) を用いて凹面型 PZT に電圧を印加し超音波を発信させた。音場分布の測定に当たり、プローブの中心軸を Z 軸とし、音源である凹面型 PZT トランスデューサから 9 mm 離れた Z 軸上の座標を原点として X 軸、Y 軸を設定した。ハイドロホンはコンピュータ制御の 3 軸ステージで移動させ、各点での強度の測定を行い、焦点付近における分布を調べた。

3.2 測定結果 始めに、Y = 0 mm の XZ 平面における強度分布の測定を行った結果、X = 0 mm、Z = -3.3 mm の点で最

Fig. 1. Concept of localized ultrasonic treatment using focused ultrasonic transducer in the human body. (a) Insertion of the probe. (b) Injection of drugs. (c) Injection of the ultrasound transmission gel. (d) Enhancement of therapeutic effects and/or cytotoxicity of compounds.

大音圧を記録し、焦点を確認した。次に、焦点面である $Z = -3.3$ mm の XY 平面に対して最大出力時に音場分布の測定を行った。測定の結果、最大出力時の焦点における強度は約 25 W/cm^2 (0.87 MPa)であった(Fig. 4)。

4. 細胞への遺伝子導入実験

4.1 実験方法 作製した超音波プローブの有効性を示すために、CHO 細胞に対して、緑色蛍光蛋白を発現する GFP プラスミドの遺伝子導入実験を行った。Fig. 5 に実験の構成を示す。作製した超音波プローブを水槽内に固定し、Function Generator と高周波増幅器を用いて凹面型 PZT に電圧を印加し超音波を発信させた。水温は 37°C に設定した。超音波の照射はシャーレ越しに行い、超音波の焦点がシャーレの底面に来るように調整を行った。

実験は培養液中の CHO 細胞に、 $20 \mu\text{g/ml}$ の GFP プラスミドとシャーレ中の液量に対して 10% のマイクロバブル製剤 (MB-3, NEPA GENE) を加え、周波数 1.83 MHz 、最大音圧 0.5 MPa の連続波を 2 秒間照射した。照射後に培地交換を行い、24 時間培養後、Phosphate-Buffered Saline (PBS) 下で蛍光顕微鏡 (VF500, Olympus) を用いて、細胞の観察を行った。

4.2 結果 超音波照射 24 時間後の蛍光顕微鏡による CHO 細胞の観察結果を Fig. 6 に示す。矢印で示した細胞で Fig. 6(b) のように緑色蛍光が観察され、細胞内における GFP の発現を確認した。

5. 考察

今回試作した超音波プローブは外径が 5.5 mm である。この大きさでは内視鏡の鉗子口を通す、あるいはカテーテルに搭載するには大きすぎるので今後はデバイスの細径化を試みる。この際には、プローブへ音響整合層を追加し、超音波の伝播を効率良く行う必要がある。

また、本報告では遺伝子導入の確認のみを行った。今後は遺伝子導入効率の確認と、*ex vivo* で組織を用いた遺伝子導入実験を試みる。

6. 結言

体内から超音波治療を行うための凹面型 PZT を用いた外径 5.5 mm の収束超音波プローブを作製した。そして、試作した収束超音波プローブを用いて、CHO 細胞に対して GFP プラスミドの遺伝子導入実験を行った結果、超音波照射 24 時間後に細胞内で GFP の存在を確認した。従って、内視鏡治療に用いることができる程度の大きさの PZT トランスデューサで実際に遺伝子導入が可能であると言える。

参考文献

- (1) Rosenthal, I., Sostaric, J.Z. and Riesz, P., Sonodynamic therapy-a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound, *Ultrason. Sonochem.*, **11**, 349-363, 2004.
- (2) Mišić, V., Riesz, P., Free radical intermediates in sonodynamic therapy, *Ann. NY Acad. Sci.*, **899**, 335-348, 2000.
- (3) Greenleaf, W.J., Bolander, M.E., Sarkar, G., Goldring, M.B., Greenleaf, J. F., Artificial Cavitation Nuclei Significantly Enhance Acoustically Induced Cell Transfection, *Ultrasound in Med. & Biol.*, **24**, 587-595, 1998.
- (4) Taniyama, Y., Tachibana, K., et al, Local Delivery of Plasmid DNA Into Rat Carotid Artery Using Ultrasound, *Circulation*, **105**, 1233-1239, 2002.
- (5) Lawrie, A., Briskin, A.F., Francis, S.E., Cumberland, D.C., Crossman, D.C., Newman, C.M., Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery, *Gene Therapy*, **7**, 2023-2027, 2000.
- (6) Kinoshita, M., Hynynen, K., Intercellular Delivery of Bak BH3 Peptide by Microbubble-Enhanced Ultrasound, *Pharm. Res.*, **22**, 716-720, 2005.
- (7) Kinoshita, M., Hynynen, K., A novel method for the intercellular delivery of siRNA using microbubble-enhanced focused ultrasound, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **335**, 393-399, 2005.

Fig. 2. Fabricated focused ultrasonic probe. (a) Cross-sectional view. (b) Oblique photograph.

Fig. 3. Acoustic field measurement system used in this study. The fabricated ultrasonic probe was fixed in water bath and driven using the function generator and amplifier. Ultrasound generated by the probe was detected by the ultrasonic hydrophone moved in steps of 0.3 mm using the computer-controlled three-dimensional stage.

Fig. 4. Ultrasonic intensity distribution on focal plane (X-Y plane ($Z = -3.3 \text{ mm}$)) by a 120 Vp-p AC signal at 1.83 MHz . The intensity at focal point was about 25 W/cm^2 (0.87 MPa).

Fig. 5. Experimental setup for sonoporation using fabricated focused ultrasonic probe. The culture dish was placed above the probe. CHO cells were exposed to 1.83 MHz continuous ultrasound through the bottom of the dish for 2 s in the presence of 10% microbubbles (MB-3) and $20 \mu\text{g/ml}$ GFP plasmid DNA.

Fig. 6. CHO cell expressing GFP (arrow). (a) Transmission image. (b) Fluorescence image. Successfully sonoporated cell emits green fluorescence resulting from GFP expression.