

2020/6/1 Literature Seminar 質問回答

B4 渥美渉

文献セミナーでは、ナノ粒子(NPs)を用いて音響力学療法の効果を増強するという研究について説明させていただきました。ここでは、セミナーの中で答えられなかった質問に対して回答させていただきます。

・キャビテーションのメカニズムについて (P5)

セミナー内ではキャビテーションについて、①核形成 ②気泡の成長 ③圧壊の3段階を経てエネルギー放出が生じるというように説明いたしました。ここでは、その機構についてもう少し詳しく説明させていただきます。

超音波は正圧、負圧が交互に媒質を伝わり、負圧になったときに媒質分子同士の距離が大きくなります。そして、一定以上の振幅を持った負圧が媒質に伝達されると、媒質分子が存在しない空洞が形成します。空洞化が生じると、その周辺にある溶存ガスが空洞内に移動することで気泡が形成します。(①に相当)

ここで生じた気泡核に対してさらに超音波を照射すると、気泡は振動を開始します。ヘンリーの法則より、正圧の時には溶解度が上昇することで気泡から気体分子が流出し、負圧の時には溶解度が減少するので気泡に気体分子が流入します。また、気泡の振動には膨張しやすく圧縮されにくいという特徴があります。これは、圧縮の際には気体分子同士の距離が短くなることで、相互作用が無視できなくなり圧縮に争うためであると考えられます。以上のことを踏まえると、時間経過に伴って気泡が成長していくこととなります。また、定常波の場合、気泡同士が合体することによっても気泡が成長するとされています。

(②に相当)

気泡サイズが大きくなっていくと、その気泡は照射された超音波によって共振するサイズに達します。気泡の共振によってサイズが一気に大きくなり、その後には圧壊します。この時に急激な圧力変動を生じ、これが機械的な作用を生みます。また、この圧壊が断熱圧縮的に生じることから、圧壊した気泡は高温に達します。これによって、熱分解や sonoluminescence が生じると考えられます(③に相当)。

(Kenneth S. Suslick, *Science*, 1990, 247, 1439–1445.)

・どうやって化合物の濃度を測定しているのか？ (P16)

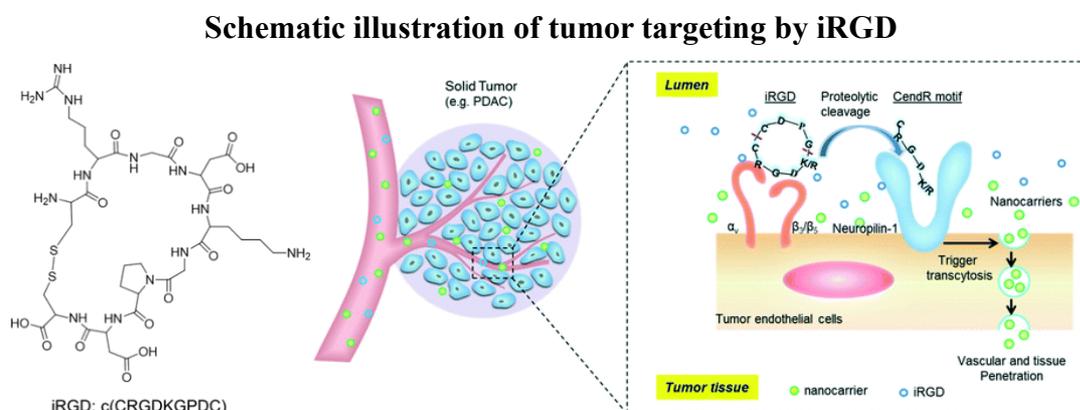
a~d の各サンプルを 5 mL の水に溶解させ、半透膜袋 (MWCO:3500) の中にに入れておきます。半透膜袋は 45 mL の PBS 溶液 (pH 5.5/7.3) に浸し、溶液が均一になるようにかき混ぜ続けます。各時間において 2 mL 袋の外の溶液を採取し、そこに含まれる ART もしくは ALA の含有量を HPLC によって計測します。そこから得られたデータを元に、縦軸を放出された累計、横軸を時間としたグラフがセミナー内で紹介したものになります。

・尻尾に色素が集積しているのはなぜ？ (P19)

論文をもう一度確認してみましたが、それに関する言及はされていませんでした。しかし、尾全体の image が示されていないため、尾の先に色素が溜まっているという可能性も否定できません。尾の先では血流が遅いため、長時間色素が止まっていたということも考えられます。ただ、尾の組織に対して何らかの選択性があるということは考えにくいです。

・Glioma に対する選択性はどのようにして出ているのか？ (P22)

ここでは、iRGD というペプチドを NP に修飾することによって glioma の targeting を実現しています。iRGD は腫瘍組織、もしくは腫瘍血管に過剰発現している $\alpha v \beta 3 / 5$ integrin に結合します。すると、iRGD は host protease によって加水分解を受けて、CendR motif というペプチド断片が露呈します。すると、今度はこの CendR motif が neuropilin という膜貫通タンパク質と結合することで、NP の endocytosis を促します。



(Xiangsheng Liu *et al. Mol. Syst. Des. Eng.*, 2017, 2, 370–379.)

・ BBB opening によって通過可能な分子のサイズは？ (P23)

文献セミナー内では、micro bubble を用いた BBB opening によってエバンスブルーが透過するということを述べました。エバンスブルーは血清アルブミンと結合しているということと、血清アルブミンの分子量が約 66,000 であるということから、紹介した研究においては少なくともこのサイズの分子は通過するということがわかります。また、micro bubble を用いた BBB opening は抗体医薬を用いた glioma 治療への適用も期待されていて、研究が進められています。抗体の分子量はおよそ 150,000 であり、実際に抗体を透過させた例もあるため、この程度の分子量サイズならば通過可能であると考えられます。

(M Kinoshita, *Top Magn Reson Imaging*, 2006, 17, 209–215.)

・ 体重でがんの治療効果を評価しているにはなぜか？ (P24)

論文を確認したところ、glioma では *in situ* での腫瘍体積の測定が難しいこと、また蛍光イメージングに偏りが生じてしまうことから、体重変化を glioma に対する治療効果を評価するために用いているとありました。おそらくがん全般に対する治療効果を評価できる指標ではなく、glioma の治療効果にのみ有効な指標なのではないかと考えられます。

Glioma が進行すると、腫瘍によって頭蓋骨内の圧力が高まったり脳が障害されたりすることにより、様々な機能障害が症状として現れるということが知られています。その一つとして嚥下障害 (dysphagia) があります。これによって glioma の患者、もしくは glioma のモデルマウスは摂食することができなくなり、体重の減少につながると考えられます。他にも感情の消失や無気力症 (apathy) といった様々な性格や行動の変化が glioma の進行に伴って現れ、これらが主な症状だと知られています。このような観点から、glioma の治療がうまくいっているかどうかの指標として体重変化を用いたのだと考えられます。

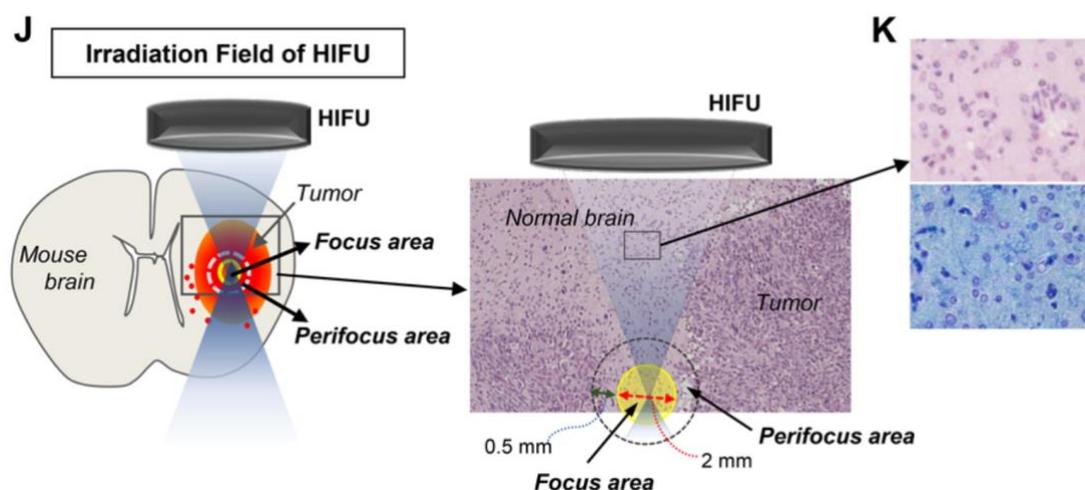
(Frolien W Boele *et al. Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 2015, 11, 1413–1420.)

・ 超音波はどの程度範囲を絞って照射することが可能か？

HIFU (High Intensity Focused Ultrasound) で用いられている超音波照射機器では、複数のトランスデューサーから超音波を照射し、焦点で超音波を合成させるという手法を用いることで局所的な超音波照射が実現しています。

下の図の場合では、超音波は Focus area と Perifocus area を合わせて半径 2.5

mm の範囲に超音波が照射されています。これによって、がん組織に対して集中的に超音波を照射し、かつ正常組織に対するダメージを最小限に抑えることが可能になります。なお、BBB opening の場合でも同様に照射範囲を局所的に設定することが可能なため、opening の範囲も局所的となり標的の主要組織を狙った drug delivery が可能であると考えられます。



(S Sehiro et al. *J Neurosurg*, 2018, 129, 1416–1428.)

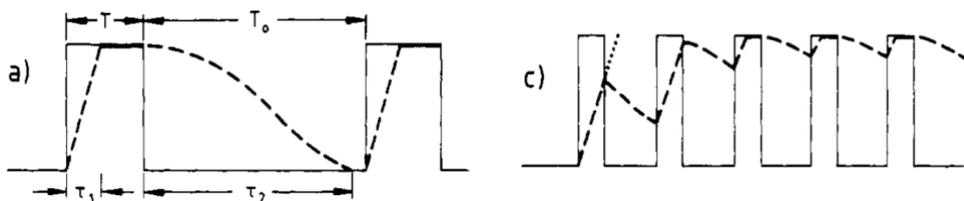
・超音波の interval time の効果はどういったものなのか？

上のキャビテーションのメカニズムの項で説明いたしました通り、キャビテーションの発生では気泡の形成、成長、そして圧壊がポイントになります。しかし、成長の段階で気泡が共振に適切なサイズよりも大きくなってしまった場合、その気泡は超音波の反射体としてしか働くことができず、これにより効率的にキャビテーションを起こすことができなくなります。そこで、interval time を設けることにより、一旦気泡の成長を止め、気泡が合体によって共振サイズより大きくなることを防ぐことが可能になります。すなわち interval time の導入によって cavitation 発生の効率化が実現できます。

Interval time には適切な長さがあると考えられます。というのも、超音波の照射を止めることによって気泡が徐々に消失していくため、気泡が完全に消失するよりも前に再照射を開始しなければならないからです。

以下のようなグラフを元にして考えるとわかりやすいかと思います。このグラフでは、横軸は時間で、縦軸は気泡の活性化の程度（気泡のサイズ）を表し

ています。また、 T が超音波の照射時間、 T_0 が超音波を照射しない時間 (Interval time) を表し、 τ_1 は気泡の活性化に要する時間、 τ_2 は気泡が不活性になる (消失する) までに要する時間を表しています。



a)の場合だと、 $T > \tau_1$, $T_0 > \tau_2$ であるため、照射時間が長く、また Interval time も長い条件となっています。この場合、活性化時間が長いために気泡は共振サイズを超えてしまいますし、また interval time の間に完全に気泡が消失してしまい、効率的に cavitation を起こすことができません。しかし、c)の場合だと、 $T < \tau_1$, $T_0 < \tau_2$ となり、適度に活性化と不活性化を繰り返していくことによって気泡が共振サイズを超えず、効率的に cavitation が起こると考えられます。しかし、照射条件によってどの程度の τ_1, τ_2 が得られるかを予測することは難しいため、照射条件ごとに最適化を検討する必要があると考えられます。

(J. Am. et al. Chem. Soc., 1989, III, 1974–1979.)

・ナノ粒子を形成させる必要はあるのか？

確かに、ナノ粒子を形成しなくとも分子の化学修飾によって SDT の効果を増強することは可能であると考えられます。例えば、Porphyrin 系の sonosensitizer では、様々な誘導体を探索することによってより効果の高いものが発見されてきたという経緯があります。今回のセミナーでも、従来の sonosensitizer が疎水性に起因する体内動態の悪さが問題点として挙げられていますが、これも構造の改善によってある程度解決することが可能ではないかと考えられます。ただし NPs を用いれば、比較的簡便に体内動態の問題を解決できるということ、そして今まで研究されていきた sonosensitizer を用いていち早く臨床試験に移行し得るということ、また近年の Drug Delivery System の発展によって優れた NPs が開発されてきたということから、NPs を用いた手法も有用であると私は考えます。