

光と超音波・圧力波の複合的作用を利用した 医療技術の進展

佐藤 俊一*・小原 實**

Progress in Light-Ultrasound/Pressure Wave Combined Medical Technology

Shunichi SATO* and Minoru OBARA**

Interaction of tissue or material with laser pulses generates thermoelastic waves (photoacoustic waves) or photomechanical waves (laser-induced stress waves), depending on the irradiation laser intensity. In this article, recent progress in photoacoustic imaging and photomechanical wave-based drug delivery systems are reviewed. Photoacoustic technique realizes functional imaging and deep tissue imaging with a high spatial resolution. Systems for conventional ultrasound and photoacoustic coimaging have also been developed, which enables noninvasive, reliable diagnosis of malignant tumors such as breast cancers. With photomechanical waves, efficient, targeted gene transfection of central nervous systems, as well as skins and muscles, can be obtained. This would be a useful tool for gene therapy and regenerative medicine. We demonstrated that wound healing (grafted tissue adhesion) can be accelerated by hepatocyte growth factor gene transfer based on photomechanical waves. There are many potential clinical applications based on light and ultrasound/pressure wave combined technologies.

Key words: photoacoustic wave, imaging, photomechanical waves, gene delivery

電話の発明で有名な Bell は、1880 年、密閉容器中の各種試料に太陽光を断続的に照射することにより音波が発生することを報告した¹⁾。これが光音響効果 (photoacoustic effect) の発見とされている。その後、光音響効果はガスの濃度計測や固体試料の分光測定などに応用され、光音響分光法として発展する。しかし、生体・医学分野における診断やイメージングに関する研究が盛んになってきたのは 1990 年代後半になってのことである。生体医用光学分野の最大規模の国際会議 BiOS においては、2000 年より光音響関係のコンファレンスが設置され、2008 年の論文数は 85 件に達し、最も研究が盛んなテーマのひとつとなっている (2009 年はさらに増加し 98 件)。なおこの中には、超音波で変調した対象を光イメージングする acousto-optical imaging に関する論文も相当数含まれている。

一方、レーザーの治療応用に目を向けると、1960 年のレーザーの誕生から数年のうちに、あざの除去や網膜凝固などの臨床応用が開始され、レーザーサージェリー (laser

surgery) とよばれる分野が形成されていく。しかし、その過程で、高強度のパルスレーザーを用いた場合の音響的な組織障害が大きな問題として浮上し、そのメカニズムに関する基礎研究も活発に進められた。図 1 にパルスレーザー照射による音響波、圧力波発生メカニズムを模式的に示した。レーザー強度が低い場合、一定条件下で光吸収による断熱膨張が起これば、熱弾性波が発生する (詳しくは後述)。これが上記光音響効果の実体で、この熱弾性波を光音響波 (photoacoustic wave または optoacoustic wave) とよび、診断やイメージングに応用されている。レーザー強度が高くなると、照射対象物表面の物質の除去 (アブレーション) が起こるようになり、このプロセスはさまざまな手術に用いられている。ここで、物質飛散の反力として圧力波が発生し、これが組織障害の原因になるので注意を要する。一方、この圧力波をアブレーションプロセスのモニタリングに応用する試みもなされている。さらに、レーザー強度が高くなり物質がイオン化してプラズマが生成さ

* 防衛医科大学校防衛医学研究センター情報システム研究部門 (〒359-8513 所沢市並木 3-2) E-mail: shunsato@ndmc.ac.jp

** 慶應義塾大学理工学部電子工学科 (〒223-8522 横浜市港北区日吉 3-14-1)

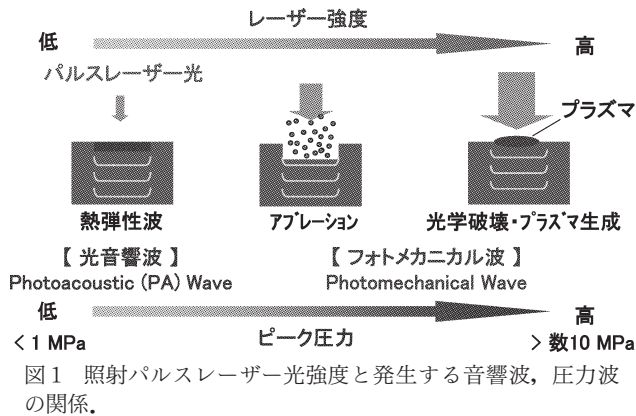


図1 照射パルスレーザー光強度と発生する音響波、圧力波の関係。

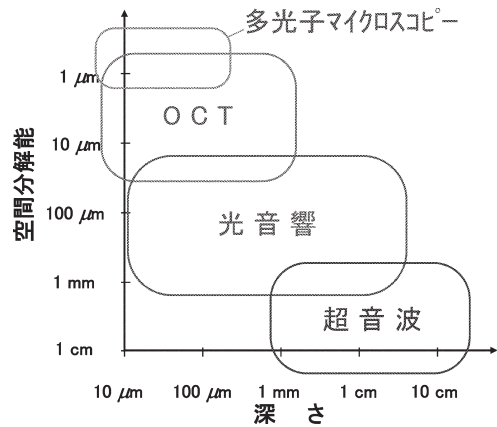


図2 各種断層光イメージングと超音波イメージングの特性。

れると、その膨張に伴って強い圧力波（衝撃波）が発生し、これはレーザー誘起衝撃波、レーザー誘起応力波 (laser-induced stress wave: LISW)、フォトメカニカル波 (photomechanical wave) などとよばれている。これら名称の定義は明確でなく混乱もあるが、本稿では、アブレーションやプラズマ生成に伴う生体に大きな機械的作用を及ぼしうる圧力波を総じてフォトメカニカル波とよぶことにする。フォトメカニカル波を用いた治療としては結石破碎がすでに臨床応用されているが、ハーバード・メディカルスクールの Doukas^{*1} らはその生体膜透過性の亢進作用に着目し、薬剤分子の培養細胞内への輸送²⁾ や経皮吸収の促進³⁾ など、ドラッグデリバリーに関して包括的な研究を進めた。

このように、光と音響波、圧力波の複合作用を基盤とした医学応用は多様であるが、本稿では、光音響波を用いた診断・イメージングと、フォトメカニカル波を用いたドラッグデリバリーの中で重要な位置づけにある遺伝子デリバリーに関する研究動向について紹介したい。なお、衝撃波を超音波として扱うのは一般的ではないが、本稿では、超音波を高周波成分を有する圧力波と広く解釈して話を進めたい。

1. 光音響診断・イメージング

1.1 特徴および応用範囲

図2に、生体の断層像を得ることができる代表的な光イメージングと超音波イメージングの特性を示した。光音響断層イメージング (photoacoustic tomography: PAT) は最高数十 μm の空間分解能、最大数 cm の観測深度が得られ、ちょうど optical coherence tomography (OCT) と超

音波イメージングの間を埋めるユニークな特性を有している。すなわち、ある程度深い組織を高空間分解能でイメージングできる技術といえる。そして、図に示した各イメージング技術は、観測対象が異なることに注意を要する。一般に、多光子マイクロスコープは蛍光、OCTは光散乱、超音波イメージングは反射超音波（超音波エコー）を観測するのに対し、光音響イメージングは光吸収に基づく信号を観測する。光音響イメージングは、目的とする光吸収体 (chromophore) に選択的に吸収される波長の光を用いることにより、きわめて高いコントラストのイメージングが可能となる。血液（ヘモグロビン）を対象とする場合、例えば緑色のパルス光を用いればよいが、観測深度は光侵達長により制限されるため、深部の血管イメージングにはより長波長の光が利用される。

光音響イメージングの多くは血管（血液）を観測対象としているが、単にその解剖学的情報を得るという目的のみならず、その応用範囲は非常に広い。重要な例として、神経活動に伴う脳血流の増大を観測する脳機能イメージング⁴⁾、新生血管を観測する腫瘍^{5,6)} や組織再生のモニタリング⁷⁾、血流遮断をとらえることによる組織障害診断⁸⁻¹⁰⁾ や術中モニタリングなどがある。また、酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの吸収スペクトルの違いを利用した血液酸素化度の診断¹¹⁾ や、メトヘモグロビンなど異常ヘモグロビンの検出も可能である。造影剤を用いることなく、これらの生体情報を深さ分解的に得られる点が重要である。血液以外の対象としてはメラニン、グルコースなどの内因性物質のほか、投与した薬剤や導入した遺伝子の発現など外因性物質の例もある。これらの多くはまだ動物実

^{*1} Doukas 博士は、圧力波の名称を当初はレーザー誘起衝撃波とよび、その後レーザー誘起応力波、フォトメカニカル波と変えてきた。理由は、彼の研究所が病院の中にあり臨床研究も多く行っていたが、衝撃（ショック）や応力（ストレス）の医学的意味がネガティブで、被験者の印象がよくなかったためとのことであった。

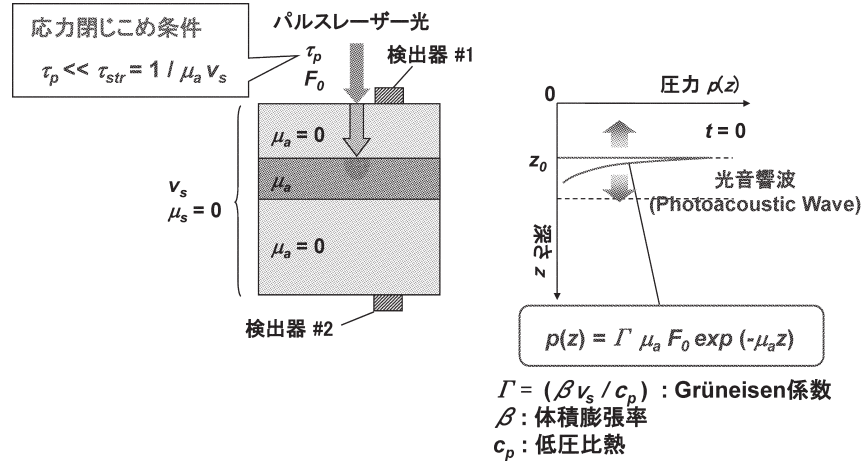


図3 光音響波の発生原理説明図.

験の段階であるが、皮膚色素性病変（ポートワイン母斑¹²⁾など）の診断、乳がんの診断^{6,13)}などは臨床応用が始まっている。

光音響イメージングはワシントン大学（セントルイス）の Wang らのグループが世界をリードしており、数年前まではその独壇場ともいえる状況にあったが、ここ 1~2 年は多くの有力なグループがしのぎを削って競う展開となっている。以下本稿では、光音響法の原理について簡単に説明したのち、研究開発動向を知るうえで特に重要と考える脳機能イメージング、高分解能化（光音響マイクロコピー）、超音波診断とのデュアルモダリティ化について紹介したい。

1.2 原理および装置構成

図3に示すように、深さ $z = z_0$ に吸収係数 μ_a の層が存在する半無限透明媒質（散乱係数 $\mu_s = 0$ 、音速 v_s ）の表面に、時刻 $t = 0$ でパルス幅 τ_p 、フルエンス F_0 のビーム径の大きいレーザー光を照射することを考える。レーザー光は吸収層で吸収され、レーザーのパルス幅 τ_p が応力緩和時間 $\tau_{str} (= 1/\mu_a v_s)$ より十分に小さい場合、熱弾性過程により次式で示される応力波が放出される。

$$p(z) = \frac{\beta v_s^2}{c_p} \mu_a F_0 \exp(-\mu_a z) \quad (1)$$

ここで、 β は体積膨張率、 c_p は定圧比熱、 $\beta v_s^2 / c_p = \Gamma$ はグリュネーゼン係数とよばれる無次元数で、光から熱弾性波への変換効率を表す。式(1)で示される圧力波（光音響波）は二分され、それぞれ媒質の表面方向と裏面方向に伝搬する。前者を媒質表面（ $z = 0$ ）に配置した検出器（図の検出器 #1）で検出すると、その振幅ないし指数関数的スロープより μ_a に関する情報を、また伝搬時間と音速 v_s の積より吸収層の深さ z_0 を知るができる（後方ま

たは反射型検出方式）。検出器を媒質裏面に配置する形式（図の検出器 #2）でも同様の計測が可能である（前方または透過型検出方式）。光の散乱を考慮する場合は、式(1)において μ_a の代わりに減衰係数 μ_{eff} を用いる。複数の吸収層がある場合も、観測した光音響波を各層で発生する光音響波の合成と考えればよく、この方法により、吸収体の深さ方向分布計測（depth profiling）が可能となる。

検出器を組織表面に沿って走査し各計測点の信号を合成すれば、上述した光音響トモグラフィー（PAT）が可能となる。また図4(a), (b)に示したように圧電素子アレイを用いる方式（それぞれ前方、後方検出方式）、同図(c)のように対象を中心に圧電素子を周回させてデータを取得し、それを再構築する方式などもある。(a)は皮膚や皮下組織のイメージング、(b)は乳がんの診断、(c)は小動物の脳や関節のイメージングなどに適用されている。

1.3 脳機能イメージング

前出の Wang らは、図4(c)に示した方式によりラットの経皮的な光音響イメージングを行った⁴⁾。時刻 t 、位置 r における応力波（光音響波） $p(r, t)$ は、組織に単位体積、単位時間に蓄積する光エネルギーの熱関数を $H(r, t)$ とするとき、次の波動方程式により表される¹⁴⁾。

$$\nabla^2 p(r, t) - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 p(r, t)}{\partial t^2} = -\frac{\beta}{c_p} \frac{\partial H(r, t)}{\partial t} \quad (2)$$

$$H(r, t) = A(r) I(t) \quad (3)$$

ここで、 $A(r)$ は組織内の位置 r における光エネルギーの蓄積、すなわち求めるべき組織の吸収分布を、また $I(t)$ は照射光のパルス波形を表し、 $p(r, t)$ より $A(r)$ を再構築する。実験ではラット頭部を脱毛して水中に置き、第二高調波 Q スイッチ Nd:YAG レーザーの出力ビーム（波

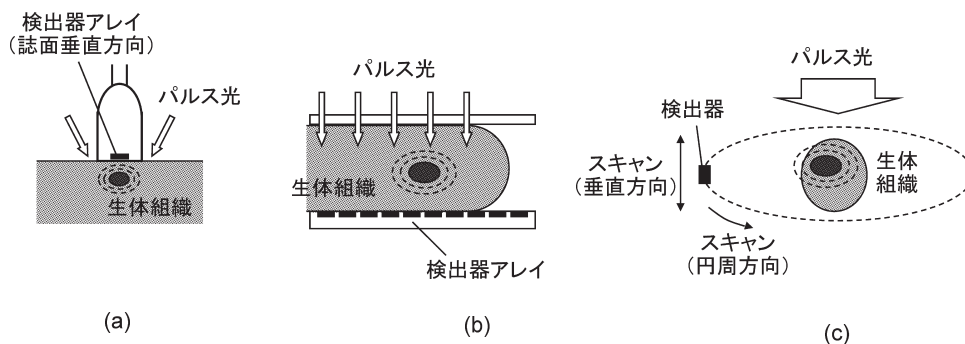


図4 光音響断層イメージング (PAT) の検出器と光照射の構成例。

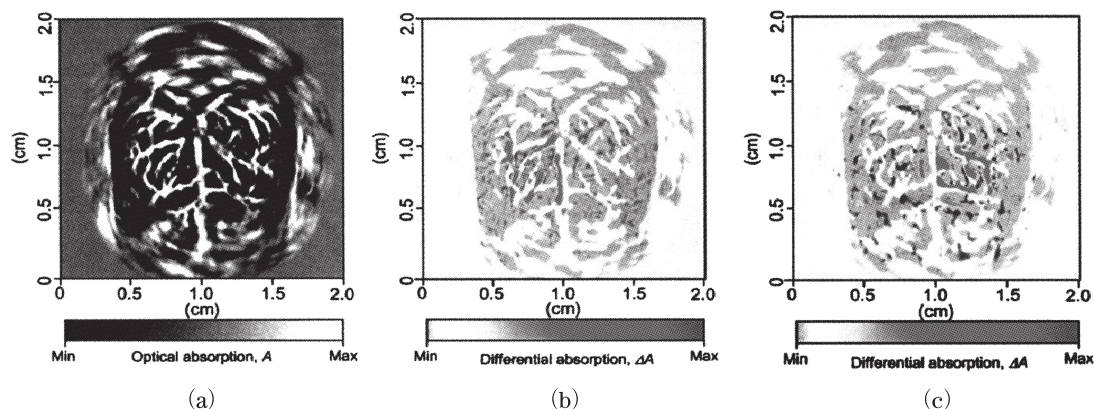


図5 ラット大脳皮質の光音響断層イメージング例⁴⁾。(a) 血管構造の光音響イメージ, (b, c) それぞれ左側, 右側のヒゲを刺激したときの血液信号の変化。励起波長 532 nm。

長 532 nm, パルス幅 6.5 ns) を拡大, 均一化して頭部に照射した。光は皮膚, 頭蓋骨の伝搬によりさらに均一化されて脳組織に到達し, 組織内の吸収分布 (血液濃度分布) に比例した振幅の光音響波を発生。図 4 (c) に示したように検出器 (中心周波数 3.5 MHz) を周回させて光音響信号を収集し, 各ポイントで得られた信号を再構築してトモグラムを得た。ラットのヒゲを刺激したときの信号変化について調べた結果を図 5 に示す。刺激した側の半球の信号が増大しており, 刺激による血液循環動態の変化が高分解能でとらえられていることがわかる。当時, 小動物が対象とはいえ, 経皮的にこのような高分解能の血管イメージングを実現したことは世界を驚かせた。光の減衰および音響波の頭蓋骨による反射を考えると, 本技術を直ちに人に応用することは困難と思われるが, 2008 年, 同グループは切除標本ながらアカゲザルの脳を対象としたイメージングの試みについて報告している¹⁵⁾。

1.4 光音響マイクロコピー

物質内部の微小な構造を観察する手段として, 1970 年代後半より光音響マイクロコピーに関する研究が進められてきた。2003 年ごろより生体応用に関する研究が盛ん

になり, ここでもその進展に Wang らのグループが大きく貢献している。図 6 (a) に示すように, リング状の照射レーザービームを用い, 観察点上部の組織表面は照明されない (暗視野) 方式を採用した¹⁶⁾。これによると, 光音響計測でしばしば問題となる組織表面近傍に存在する吸収体 (皮膚の場合メラニンや毛包) による強い信号の発生が抑制され, 内部構造に由来する信号を観察しやすくなる。光音響信号の検出には高開口数 (0.44), 中心周波数 50 MHz の超音波検出器を用い, 照射リングビームと検出器の両焦点を空間的に一致させている。光源には波長可変色素レーザー (パルス幅 6 ns) が用いられている。同図 (b)~(d) に, 波長 584 nm (酸素化および脱酸素化ヘモグロビンの等吸収点) の照射光を用いて, 人の手のひらの皮膚の血管を観測した結果を示す。深さ方向分解能 15 μm , 横方向分解能 45 μm , 観測深度 3 mm 以上を実現している。この空間分解能は光の特性ではなく, 超音波検出器の特性により決まっている。このシステムは通常の顕微鏡と同等以上の大きさで固定式であるが, その後小型化が進められ, ハンドヘルド型のシステムも開発されている¹⁷⁾。今後, 臨床応用が進むであろう。

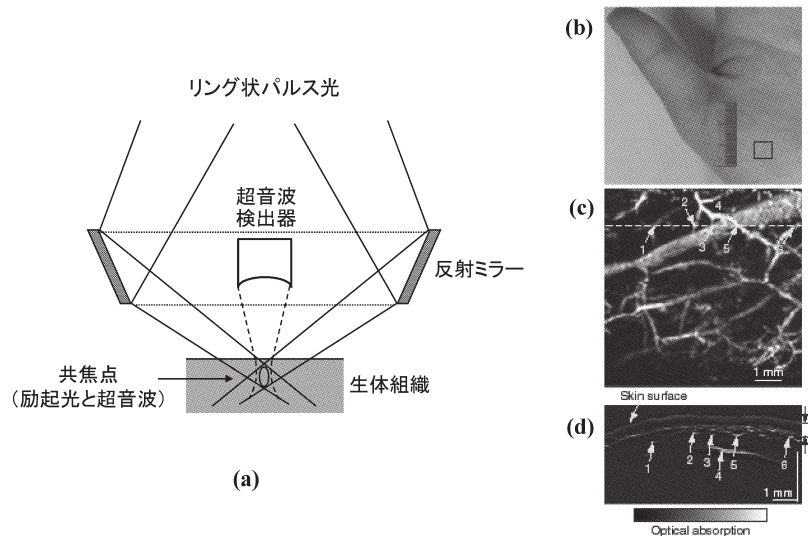


図6 暗視野反射型光音響マイクロスコープ。照射部の構造 (a) と人手掌部皮膚の *in vivo* 計測 (b)~(d)。 (b) 計測部位, (c) 角質下血管の光音響イメージ, (d) (c) の破線部の B スキャン光音響イメージ¹⁶⁾。

1.5 超音波診断とのデュアルモダリティー化

2004年、華南師範大学 (South China Normal University) の Zeng らが、超音波と光音響波の複合イメージング技術について報告した¹⁸⁾。通常の超音波イメージングではリニアアレイ型の検出器が用いられ、これが超音波の送信と受信 (超音波エコーの検出) を兼ねている。この検出器で同時に (タイミングをずらして) 光音響波の検出も行い、超音波と光音響波の両方のイメージを取得する。重要な点は両者のデータが全く異なる情報を提供することで、上述したように、超音波は音響的特性の分布 (簡単にいえば固さの分布)、光音響波は光吸収の分布を表す。彼らは、市販の超音波イメージング装置 (320 素子リニアアレイ素子使用) に、光音響波励起用光源として第二高調波 Q スイッチ Nd:YAG レーザー (532 nm, 7 ns, 30 Hz) を組み合わせ (光照射系の構成は述べられていない)、ファントムを対象に同時イメージングを行った。

この方式は、乳がんの診断等への応用が期待されることから、超音波診断装置メーカーの注目するところとなった。乳がんの発症率は欧米において非常に高く、米国では 8~9 人に 1 人に達し、その早期診断が社会問題となっている^{*2}。現在、最も一般的な診断法は X 線マンモグラフィであるが、X 線被ばくによる発がんが問題となっている。次いで超音波診断の適用が多いが、信号のコントラストが必ずしも十分でない。光音響イメージングでは、がん組織特有の新生血管や血液酸素化度等に関する情報も得

られることから、より信頼性の高い診断が可能になると期待されている。2007年、GE Global Research 社はミュンヘン工科大学、Innolas 社と共同で、GE Health Care 社製超音波診断装置に第二高調波 Q スイッチ Nd:YAG レーザーと近赤外光パラメトリック発振器 (OPO) を組み合わせたシステムを発表した (図 7)¹⁹⁾。また、2008年の BiOS では、Philips Research 社を中核とするグループが、同社製超音波診断装置と近赤外 OPO を組み合わせたシステムに関して 3 件の論文を発表している²⁰⁾。最近、診断のマルチモダリティー化に関する研究が盛んであるが、この方式は検出器を完全に共有できる点が特徴である。著者らの知る限り、まだ実際に乳がん診断へ応用した結果については報告されていないが、今後研究が加速するであろう。

2. フォトメカニカル波を用いたドラッグデリバリー

さまざまな難治性疾患や感染症、重症外傷の治療法として DNA や siRNA (small interfering RNA; 低分子二本鎖 RNA) を用いる分子治療が注目を集めているが、それらマクロ分子を標的細胞内に安全かつ高効率にデリバリーする技術が大きな課題となっている。そのデリバリー法として、これまでウイルスの感染力を利用する方法 (ウイルスベクター法) が広く用いられてきたが、ウイルス自体のもつ毒性や抗原性に基づく副作用があること、体内動態を制御しにくいことなどの問題があり、臨床応用が進んでい

*2 わが国においても発症率が急増しており、20 人に 1 人程度に達している。

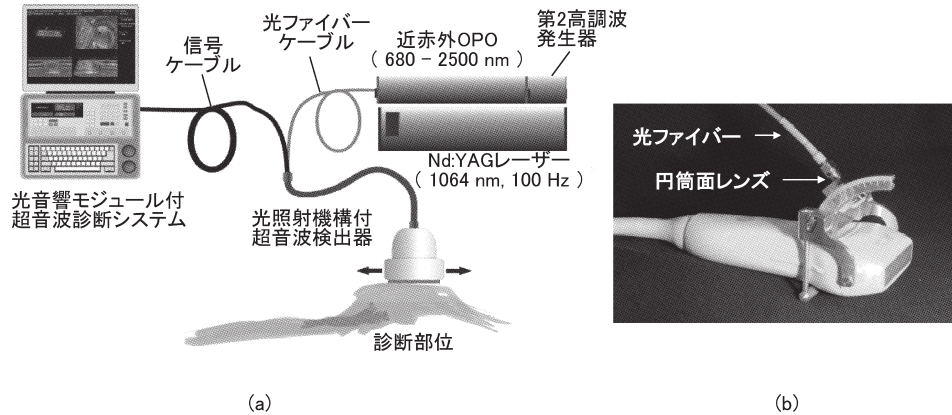


図7 超音波-光音響波複合イメージングシステムの構成図 (a) と光照射機構付超音波検出器 (b)¹⁹⁾.

ない。このため、ウイルスを用いないデリバリー技術が大きな注目を集めている。現在、非ウイルスデリバリー技術として、高分子ミセルやリポソームを用いた化学的アプローチが成果を上げているが、高電圧パルス、超音波、光などを用いた物理的アプローチの研究も精力的に進められている。これら物理的方法の利点は、時間・空間選択性にすぐれたデリバリーが可能であることにある。著者らは、フォトメカニカル波を用いた遺伝子デリバリー技術の開発を進めている。

2.1 フォトメカニカル波の発生と特性

図8に、著者らのフォトメカニカル波を用いた遺伝子デリバリーの概念図を示す。標的組織に目的の遺伝子をコードしたプラスミドDNAを注入し、同部位に光吸収材（ターゲット）を置く。そこに所望のスポット径でパルスレーザー光を照射して、フォトメカニカル波を発生させる。このターゲットを用いる方式は前出のDoukasらの考案によるもので、光学的作用と機械的作用は分離され、生体には後者のみが働く。ターゲットの上面に光学的に透明な層を設けると、プラズマの閉じ込め効果により圧力のピーク値と時間幅（力積）が増大する²¹⁾。著者らは通常、レーザーとして第二高調波（532nm）QスイッチNd:YAGレーザー（パルス幅6ns）、ターゲットとして黒色ゴム/PET（polyethylene terephthalate）の組み合わせを用いている。ナノ秒のレーザーパルスは自らが生成したプラズマに効率よく吸収されるため、プラズマの内部エネルギーが増大し、デリバリーに有利な力積の大きい圧力波を発生するのに都合がよい。ピーク圧力が過度に上昇すると細胞障害を招くが、光吸収材として弾性体（ゴム）を用いることが、ピーク圧力の上昇を抑え圧力持続時間（パルス幅）を延ばすことに有効であった。

図9に、遺伝子デリバリーに用いるフォトメカニカル波

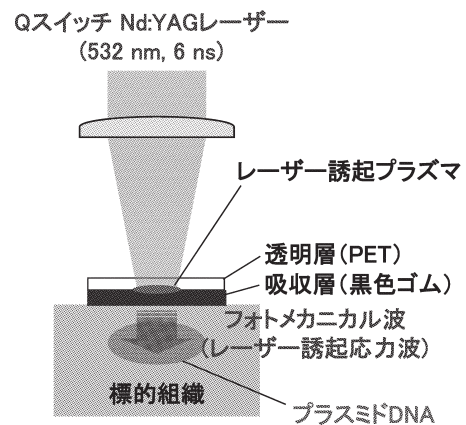


図8 フォトメカニカル波による遺伝子デリバリーの概念図。

と超音波の特性の比較を示した³⁾。フォトメカニカル波は立ち上がり速度が非常に速く ($>10^8 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$)、ピーク圧力が数十MPaに達する圧縮性（正圧）の圧力波であるのに対し、超音波は周波数が数百kHz～数MHz、ピーク圧力が高々数百kPaの正弦波状圧力波である。また、図10(a)にシャドウグラフ法により撮影した水中を伝搬するフォトメカニカル波（レーザー照射スポット径6mm、フルエンス $0.5 \text{ J}/\text{cm}^2$ ）、(b)に超音波（プローブ径6mm、強度 $4 \text{ W}/\text{cm}^2$ 、周波数1MHz）の画像を示した。超音波は放射状に広がっているのに対し、フォトメカニカル波は深さ10mm程度においても平坦な波面が維持されており、空間選択的な作用、深部組織への作用を得るのに適した特性を有していることがわかる。

フォトメカニカル波による遺伝子デリバリーメカニズムの詳細は未解明であるが、強い圧縮性圧力波による細胞膜の過渡的変性およびDNAの押し込め効果等が考えられている。図11は、フォトメカニカル波によりプラスミドDNAの導入を試みた培養細胞の走査型電子顕微鏡写真を

	フォトメカニカル波	超音波
圧力波形		
特徴	正圧が主体(圧縮性)	周期的正圧 / 負圧
ピーク圧力	300 - 1000 bar (30 - 100 MPa)	1 - 5 bar
適用時間	(100 ns - 10 μs) x 数パルス	数10分
立ち上がり	$10^9 - 10^{10} \text{ bar s}^{-1}$	

図9 フォトメカニカル波と超音波の特性の比較³⁾。

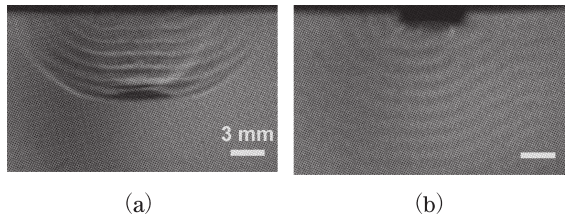


図10 水中を伝搬するフォトメカニカル波 (a) と超音波 (b) のシャドウグラフ。

示している。変性した細胞膜にプラスミド DNA の一部が貫入している様子がみられるが、高電圧パルスや超音波を作用させた細胞にみられる明確な小孔はこれまで観測されていない。同じ圧力波であっても、キャビテーションを主要なメカニズムとする超音波とは異なるメカニズムによると考えている。なお、*in vivo* におけるデリバリーにおいては、圧力刺激による細胞活性化の寄与を示唆するデータも得られている。

2.2 フォトメカニカル波による遺伝子デリバリー

2.2.1 皮膚・移植皮膚への遺伝子デリバリー

フォトメカニカル波による *in vivo* における最初の遺伝子デリバリーは、ラット皮膚を対象に実証された²²⁾。皮膚はプラスミド DNA の注入のみでも一定レベルの遺伝子デリバリーが可能であるが、フォトメカニカル波の適用により遺伝子発現レベルが2桁以上高められること、さらに遺伝子の発現がレーザー照射部位に局限して得られることがわかった (レポーター遺伝子使用)。すなわち、*in vivo* において高効率かつ高度に部位選択的な遺伝子デリバリーが可能であることが示された。このとき、遺伝子発現は表皮細胞において観測されたが、その後の実験により、真皮、

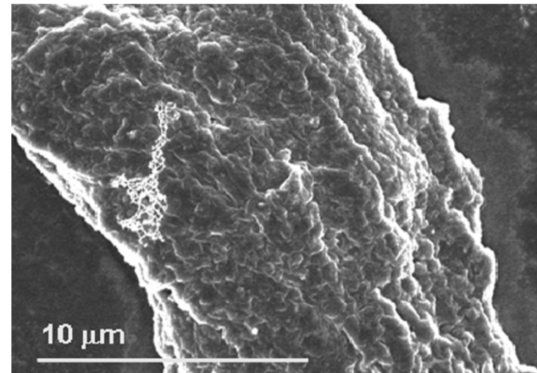


図11 フォトメカニカル波によりプラスミド DNA の導入を試みた培養細胞 (NIH3T3 細胞) の走査型電子顕微鏡写真。ターゲット照射レーザーフルエンス 1.3 J/cm^2 、パルス数 20。

毛包においても強い発現が得られることがわかった。図12は、フォトメカニカル波により *LacZ* 遺伝子をデリバリーしたラット皮膚を自家移植した場合の、移植24時間後のヘマトキシリン・エオジンおよび X-gal による二重染色組織断面画像である (青色部が遺伝子の発現を示す)。これより、表皮 (特に基底層)、真皮上層、毛包に強い遺伝子発現が得られていることがわかる。表皮基底層と毛包は皮膚幹細胞の存在部位として知られ、各種治療応用の重要な標的である。これらの特性を利用した組織工学的応用について後述する。

2.2.2 神経系・筋組織への遺伝子デリバリー

一般に、神経系や筋組織などの非分裂細胞への遺伝子デリバリーは困難である。しかし、パーキンソン病、ハンチントン病など多くの神経変性疾患は有効な治療法が確立していないため、遺伝子治療への期待が高い。これらの神経

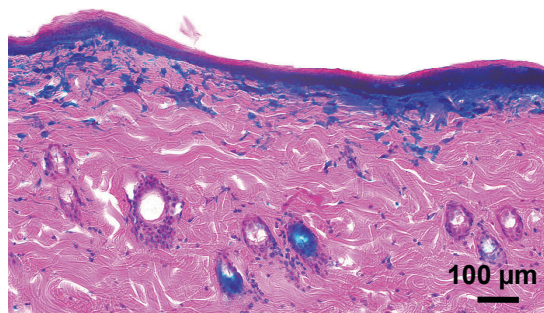


図12 *LacZ* 遺伝子をデリバリーしたラット移植皮膚のヘマトキシリン・エオジン, X-gal 二重染色画像 (移植後 24 時間).

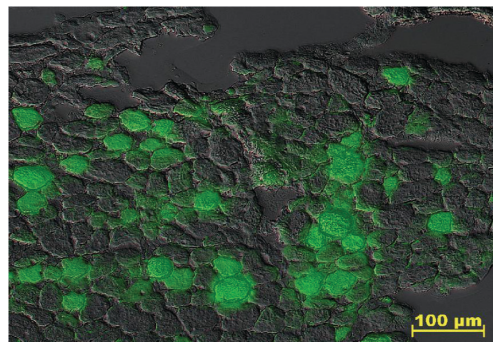


図14 *EGFP* 遺伝子をデリバリーしたラット頸骨筋の断面画像.

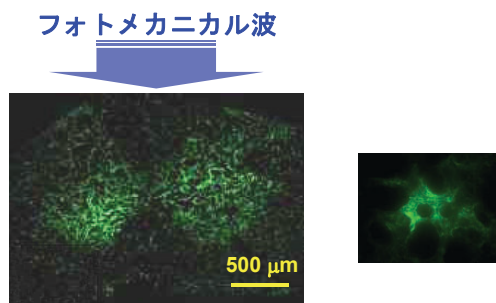
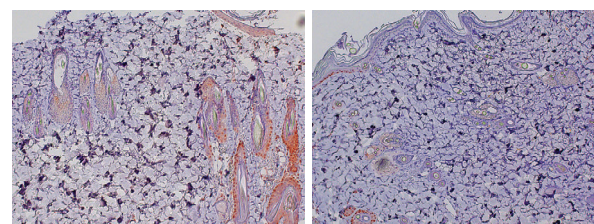


図13 *EGFP* 遺伝子をデリバリーしたラット脊髄の断面画像.



(a) (b)

図15 ラット自家移植皮膚の細胞増殖活性評価結果 (Ki-67 免疫染色). (a) *HGF* 遺伝子デリバリー群, (b) 通常移植群.

変性疾患では、特定部位の神経細胞が変性、壊死することから、それらを標的とした選択的デリバリー技術が求められる。著者らは、マウスの脳を対象に、フォトメカニカル波を用い、カチオン性試薬 (ポリエチレンイミン) を併用することにより、脳室壁や海馬歯状回に *EGFP* (enhanced green fluorescence protein) 遺伝子をデリバリーできることを示した²³⁾。その他、中枢神経系としては脊髄を対象とした遺伝子デリバリー実験を進めている。交通事故等による脊髄損傷も有効な治療法が確立されておらず、神経再生を目的とした遺伝子治療への期待が大きい。図13は、フォトメカニカル波により *EGFP* 遺伝子のデリバリーを試みたラット脊髄の断面画像を示している。ここでプラスミド DNA (20 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) は、椎弓切除して脊髄実質内に直接注入し、注入部位にターゲットを設置してレーザー照射した (スポット径 3 mm, 0.3 J/cm², 3 パルス)。広く灰白質において強い遺伝子発現が観測され、本方法が脊髄への遺伝子デリバリーにも有効であることが示された。今後、フォトメカニカル波の経椎骨的、さらに経皮的適用によるデリバリーについて検討を進める予定である。

筋への遺伝子デリバリーは、筋ジストロフィーなどの筋疾患治療ばかりでなく、各種生理活性タンパクの徐放や DNA ワクチンへの応用も大きな期待を集めている。図14は、ラット筋疾患モデルを対象に、フォトメカニカル波に

より *EGFP* 遺伝子のデリバリーを試みた筋組織の断面画像を示している (レーザー照射 7 日後)。頸骨筋に塩酸ブピバカインを注入して筋障害を誘起したのち、プラスミド DNA (200 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$) を筋肉注射し、注入部位にターゲットを設置してレーザー照射した (スポット径 6 mm, 1 J/cm², 3 パルス)。フォトメカニカル波を経皮的に作用させているにもかかわらず、筋細胞内に強い遺伝子発現が得られている。皮膚表面から深さ最大 6 mm 程度の筋組織においても発現が認められ、本方法が深部組織へも有効であることを示している。

2.2.3 組織工学への応用

遺伝子デリバリーは、難治性疾患の治療ばかりでなく、組織工学・再生医療においても基幹技術として重要な位置づけにある。著者らは、フォトメカニカル波を用いて移植皮膚に血管新生作用を有する肝細胞増殖因子 (*HGF*; hepatocyte growth factor) 発現遺伝子を導入することにより、移植組織の生着を促進するための研究に取り組んでいる。これまで、本方法により血管新生が有意に促進されることを示してきたが²⁴⁾、今回、実際の生着促進を確認するため、細胞増殖活性、血流、再上皮化等について包括的な評価を行った。

ラット背部から 2 cm×2 cm の皮膚を採取し、皮下脂肪を除去して移植片とした。これをそのまま移植した群 (通

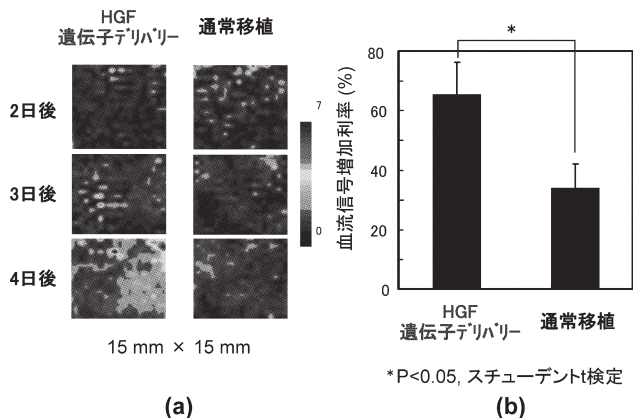


図 16 レーザードップラー血流計によるラット自家移植皮膚の血流評価結果。(a) 血流信号分布, (b) 移植後3日から4日における血流信号増加率。

常移植群)と、フォトメカニカル波により *HGF* 遺伝子発現ベクターをデリバリーしたのちに移植した群 (遺伝子デリバリー群) に分けて評価を行った。後者において、プラスミド (10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) は移植片の中央と四隅の計5か所に注入した。図 15, 16 にそれぞれ, Ki-67 免疫染色による細胞増殖活性 (移植3日後) およびレーザードップラー血流計による血流分布について評価した結果を示す。図 15 より, 遺伝子デリバリー群では上皮や毛包において顕著な細胞増殖活性が認められ, これらの部位に遺伝子が効率的に導入されていることが寄与していると考えられる (図 12)。また図 16 より, 遺伝子デリバリー群において移植後3日から4日にかけての血流増加率が有意に増大し, 移植後の血行再開が早まっていることがわかる。さらに, AE1/AE3 免疫染色により再上皮化について評価したところ, 遺伝子デリバリー群においては移植7日後において再上皮化がほぼ完成しているのに対し, 通常移植群では上皮化は部分的であることがわかった。これらの結果は, フォトメカニカル波による *HGF* 遺伝子のデリバリーが移植皮膚の生着促進に有効であることを示している。このような高機能化した皮膚はスーパースキンとよばれ, その開発は移植・再生医療における大きなテーマのひとつとなっている。本方法は, 皮膚以外の組織・臓器への適用も可能であるとえられる。

以上, 光音響イメージングと, フォトメカニカル波を用いた遺伝子デリバリーに関する研究動向について紹介した。現時点で臨床応用まで進んでいるものは限定的であるが, 技術的進展は急速であり, 今後多くの臨床研究が進められていくであろう。

最後に, 本稿で紹介した内容は, 「光と超音波, 圧力波

の複合作用を利用した医療技術」という領域においては, ほんの一部分に過ぎないことを強調したい。他の重要な技術については, 本特集号の他の解説論文を参考にさせていただきたい。また, この領域, 特にイメージング関係の最新情報を得るためには上述した BiOS の光音響関係のコンファレンス (Photon Plus Ultrasound: Imaging and Sensing) の Website や Proceedings が有用である。これらもぜひ参照していただきたい。

なお, 本論文の「1. 光音響診断・イメージング」は電気学会編「バイオメディカルフォトンクス: 生体医用光学の基礎と応用」の4.3節を, また「2. フォトメカニカル波を用いたドラッグデリバリー」は同学会全国大会シンポジウム (2009年3月) および研究会 (同年2月) の発表論文を加筆, 修正して作成した。

本稿で述べた遺伝子デリバリー関係の研究にあたり, 防衛医科大学校の齋藤大蔵教授, 津田均博士, 苗代弘博士, 佐藤泰司博士, および慶応義塾大学医学部の岡野栄之教授より多くの助言をいただいた。また, 電子顕微鏡観察は防衛医科大学校の市来やよい氏, 脊髄, 筋組織, 移植皮膚への遺伝子デリバリーは, それぞれ慶応義塾大学大学院理工学研究科の安藤貴洋氏, 高野慎太氏, 相澤和也氏の実験による。各位に深甚なる感謝の意を表します。

文 献

- 1) A. G. Bell: "On the production and reproduction of sound by light," *Am. J. Sci.*, **20** (1880) 305-324.
- 2) 例えば, S. Lee, T. Anderson, H. Zhang, T. J. Flotte and A. Doukas: "Alteration of cell membrane by stress waves *in vitro*," *Ultrasound Med. Biol.*, **22** (1996) 1285-1293.
- 3) 例えば, A. G. Doukas and N. Kollias: "Transdermal drug delivery with a pressure wave," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56** (2004) 559-579.
- 4) X. Wang, Y. Pang, G. Ku, X. Xie, G. Stoica and L. V. Wang: "Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional *in vivo* imaging of the brain," *Nat. Biotechnol.*, **21** (2003) 803-806.
- 5) G. Ku, X. Wang, X. Xie, G. Stoica and L. V. Wang: "Imaging of tumor angiogenesis in rat brains *in vivo* by photoacoustic tomography," *Appl. Opt.*, **44** (2005) 770-775.
- 6) S. Manohar, S. E. Vaartjes, J. G. C. van Hespren, J. M. Klaase, F. M. van den Engh, A. K. H. The, W. Steenbergen and T. G. van Leeuwen: "Region-of-interest breast images with the Twente Photoacoustic Mammoscope (PAM)," *Proc. SPIE*, **6437** (2007) 643702.
- 7) M. Yamazaki, S. Sato, D. Saitoh, Y. Okada, H. Ashida and M. Obara: "Photoacoustic monitoring of neovascularities in grafted skin," *Lasers Surg. Med.*, **38** (2006) 235-239.
- 8) S. Sato, M. Yamazaki, D. Saitoh, H. Tsuda, Y. Okada, M. Obara and H. Ashida: "Photoacoustic diagnosis of burns in rats," *J. Trauma*, **59** (2005) 1450-1456.
- 9) M. Yamazaki, S. Sato, H. Ashida, D. Saitoh, Y. Okada and M. Obara: "Measurement of burn depths in rats using

- multiwavelength photoacoustic depth profiling," J. Biomed. Opt., **10** (2005) 064011.
- 10) K. Aizawa, S. Sato, D. Saitoh, H. Ashida and M. Obara: "Photoacoustic monitoring of burn healing process in rats," J. Biomed. Opt., **13** (2008) 064020.
 - 11) R. O. Esenaliev, I. V. Larina, K. V. Larin, D. J. Deyo, M. Motamedi and D. S. Prough: "Optoacoustic technique for noninvasive monitoring of blood oxygenation: A feasibility study," Appl. Opt., **41** (2002) 4722-4731.
 - 12) J. A. Viator, B. Choi, M. Ambrose, J. Spanier and J. S. Nelson: "*In vivo* port-wine stain depth determination with a photoacoustic probe," Appl. Opt., **42** (2003) 3215-3224.
 - 13) T. Khamapirad, P. M. Henrichs, K. Mehta, T. G. Miller, A. T. Yee and A. A. Oraevsky: "Diagnostic imaging of breast cancer with LOIS: Clinical feasibility," Proc. SPIE, **5697** (2005) 35-44.
 - 14) M. Xu and L. V. Wang: "Photoacoustic imaging in biomedicine," Rev. Sci. Instrum., **77** (2006) 041101.
 - 15) X. Yang and L. V. Wang: "Monkey brain cortex imaging by use of photoacoustic tomography," Proc. SPIE, **6856** (2008) 685608.
 - 16) H. F. Zhang, K. Maslov, G. Stoica and L. V. Wang: "Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive *in vivo* imaging," Nat. Biotechnol., **24** (2006) 848-851.
 - 17) K. Maslov, H. F. Zhang and L. V. Wang: "Portable real-time photoacoustic microscopy," Proc. SPIE, **6437** (2007) 643727.
 - 18) Y. Zeng, D. Xing, Y. Wang, B. Yin and Q. Chen: "Photoacoustic and ultrasonic coimage with a linear transducer array," Opt. Lett., **29** (2004) 1760-1762.
 - 19) C. Haisch, K. Zell, J. I. Sperl, S. Ketzer, M. W. Vogel, P. Menzenbach and R. Niessner: "OPUS: Optoacoustic imaging combined with conventional ultrasound for breast cancer detection," Proc. SPIE, **6631** (2007) 663105.
 - 20) 例えば, J. Dean, V. Gornstein, M. Burcher and L. Jankovic: "Real-time photoacoustic data acquisition with Philips iU 22 ultrasound scanner," Proc. SPIE, **6856** (2008) 685622.
 - 21) R. Fabbro, J. Fournier, P. Ballard, D. Devaux and J. Virmont: "Physical study of laser-produced plasma in confined geometry," J. Appl. Phys., **68** (1990) 775-784.
 - 22) M. Ogura, S. Sato, K. Nakanishi, M. Uenoyama, T. Kiyozumi, D. Saitoh, T. Ikeda, H. Ashida and M. Obara: "*In vivo* targeted gene transfer in skin by the use of laser-induced stress wave," Lasers Surg. Med., **34** (2004) 242-248.
 - 23) Y. Satoh, Y. Kanda, M. Terakawa, M. Obara, K. Mizuno, Y. Watanabe, S. Endo, H. Ooigawa, H. Nawashiro, S. Sato and K. Takishima: "Targeted DNA transfection into the mouse central nervous system using laser-induced stress waves," J. Biomed. Opt., **10** (2005) 060501.
 - 24) M. Terakawa, S. Sato, D. Saitoh, H. Tsuda, H. Ashida, H. Okano and M. Obara: "Enhanced angiogenesis in grafted skins by laser-induced stress wave-assisted gene transfer of hepatocyte growth factor," J. Biomed. Opt., **12** (2007) 034031.

(2009年1月26日受理)