

## 就任講演

# 超音波の生体作用と治療応用の基礎的研究

近 藤 隆

富山医科薬科大学医学部放射線基礎医学教室

### はじめに

超音波は人の耳には聴こえない高い周波数の音波で、放射線と同様に医学診断上不可欠の技術となっている。また、実験室においては洗浄装置や細胞破壊装置等として広く用いられている。最近、超音波工学の進歩により、治療応用の研究が進み、がん温熱療法、結石破壊、ドラッグデリバリーシステムへの応用等多岐にわたって利用されようとしている。超音波の作用機構に関する研究では、超音波によるフリーラジカル生成は微小空間の高温高压による極限環境化学反応によることが明らかにされてきた。本稿では最初に超音波による生体作用、特にフリーラジカル生成とその影響について述べ、次に治療応用に関する実験例について概説する。

### 超音波の生体作用機序

超音波の生体作用には熱作用と非熱作用があり、後者はキャビテーション作用と非キャビテーション作用に分類される (Table 1 参照)。

Table 1 Biophysical modes of ultrasound

Thermal effects
Non-thermal effects
Non-inertial cavitation
Inertial cavitation
Free radicals
Shock waves
Non-thermal and non-cavitation effects

熱作用は組織中に伝播する超音波振動による組織分子の変位に依存する。熱は組織中の超音波吸収の結果として産生される。熱作用は治療応用の重要因子であるとともに、診断用超音波の安全性に関する重要な因子でもある。

液体中を超音波が伝播すると、疎密波のため液体中に過圧部と負圧部が生じ、ある強度 (しきい値) 以上では負圧により液体が引き裂かれ空洞が生じる。この現象はキャビテーション (空洞現象) と呼ばれる。これらの空洞が核となり、微小気泡が発生し、圧力振幅に対応した断熱膨張と圧縮を繰り返す (安定型キャビテーション, Non-inertial cavitation)。さらに超音波の強さが増すと、この気泡は圧縮時につぶれ崩壊する (崩壊型キャビテーション, Inertial cavitation)。この時、液体分子は極めて大きな加速度で衝突するために、局所的に数千度の高温と数百気圧の高圧が衝撃的に発生する。このため、気泡中で水蒸気となった水分子は熱分解され、 $\cdot\text{OH}$  および  $\cdot\text{H}$  が生じる。

最近の研究により、超音波によるフリーラジカル生成領域には三つあると考えられている。最近の反応を起こす領域は気泡中心部の気相で、最も温度が高く、水分子を含め揮発性の溶質分子は熱分解される。次は気泡の気相と周囲液相の間の境界領域で、非揮発性溶質分子は主にここに集積して熱分解される。最後は周囲の液相で放射線化学と類似した反応を示す<sup>1, 2)</sup>。

非熱的非キャビテーション作用は Radiation pressure, Radiation force, Radiation torque および Acoustic streaming による。これによる生物学的効果は超音波強度に依存し、作用発現に関する超音波強度のしきい値はないと考えられている。

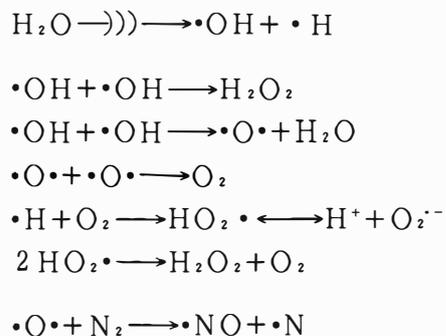
超音波による活性酸素生成

超音波によるフリーラジカル生成において、その生物学影響を考えると活性酸素種の・OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> およびO<sub>2</sub><sup>·-</sup>が重要である。短寿命フリーラジカルを比較的安定なラジカル種に変えてESR（電子スピン共鳴装置）で観測するESR-スピン捕捉法を用いて超音波による水の分解で生成する活性酸素種を検討した。スピン捕捉剤としてDMPO（5, 5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide）を用いて超音波照射中の希ガスの種類を変えて調べたところDMPO-OH生成量は希ガスの熱伝導度に逆比例した<sup>3)</sup>。報告されている希ガスのキャビテーション気泡崩壊時の最終温度の計算値を当てはめてみると水の超音波分解による・OH生成量はキャビテーション気泡崩壊時の最終温度に依存することが判明した<sup>2)</sup>。生成した・OHは再結合し、長寿命の過酸化水素となる。

超音波によるシトクロムC還元のスーパージンターゼ（SOD）による阻害実験より酸素存在時のO<sub>2</sub><sup>·-</sup>の生成は知られているが、無酸素時のO<sub>2</sub><sup>·-</sup>の生成を認めた例はなかった。著者らは高濃度のDMPOを用い、酸素存在時の超音波照射でO<sub>2</sub><sup>·-</sup>との反応付加体であるDMPO-OOHの生成を認めることができたが、無酸素溶液ではこの生成は認められなかった。ところが同様の条件でシトクロムCの還元の程度は照射時間に依存して増加し、SODの添加により抑制された。SODによる阻害効果は溶存気体の種類により異なり、キャビテーション気泡の最終崩壊温度の高い順と一致した。ギ酸ナトリウムの存在下では、シトクロムC還元型の生成は増加した。これらの結果は超音波によるキャビテーション気泡の崩壊時の温度がより高温となる場合に酸素が存在しなくても、・OH+・OH→O+H<sub>2</sub>Oの高温化学反応による酸素が生じ、・Hとの反応でHO<sub>2</sub>・（O<sub>2</sub><sup>·-</sup>の酸化型）が生成するものと考えられる<sup>4)</sup>。ユビキノンのユビキノール生成を指標にした実験結果は上記仮定を支持した<sup>5)</sup>。最近の研究では、窒素を含めば、・NOも生成することが判明した<sup>6)</sup>。これら活性酸素種は“癌の音響化学療法”<sup>7-9)</sup>における活性化機構に関与していることが示唆されており、今後の機構解明が期待されている（超音波による活性酸素生成反応をTable 2 に示し

た）。

Table 2 Formation of oxygen radicals by ultrasound



DNAに生じるフリーラジカル

イオン化放射線のDNA損傷は生成する活性酸素に由来する。超音波により生成する代表的活性酸素である・OHがDNA成分である塩基、ヌクレオシド、およびヌクレオチドと反応し、いかなるラジカル種が生成するか、また超音波に特異的なラジカルが生じるか否かを検討した。ピリミジン塩基の水溶液を超音波照射すると、放射線照射時にも認められる5, 6二重結合部位に・OHが付加したと思われるラジカル中間体（例えば5-y1ラジカル）が認められた<sup>10)</sup>。ヌクレオシドを用いても同様の結果を得た。溶質の濃度をあげるためヌクレオチドであるTMP（チミジン-5'-リン酸）水溶液を超音波照射すると、濃度が低い時には・OHの付加やH原子引抜きによるTMP塩基部の5-y1ラジカルやメチレンラジカルが認められたが濃度が高くなると通常の・OHとの反応では認められないメチルラジカルの生成が認められた<sup>11)</sup>。これは溶質の直接熱分解によるもので、キャビテーション気泡周囲に高い濃度で集積するすべての有機分子に当てはまる<sup>12, 13)</sup>。

DNA溶液に超音波照射した時、DNAの低分子化（主にDNAの二本鎖切断による）が認められるが、これは主にキャビテーションにともなう機械的作用（せん断力）によることが知られている<sup>14)</sup>。超音波による・OHがDNAの低分子化にどのように寄与するか、超音波誘発DNAの一本鎖切断と二本鎖切

断に対するフリーラジカルスクベンジャーの効果について調べた。その結果、DNAの二本鎖切断の収率は変らなかったが、DNAの一本鎖切断の収率は減少した。これにより、超音波強度が崩壊型キャビテーションの発生するしきい値を越え、照射時間が相対的に長い場合には・OHによる一本鎖切断も生成することが示された<sup>15)</sup>。

超音波誘発細胞内DNA鎖切断についてもフリーラジカル生成との関連より一連の研究がされ<sup>16-18)</sup>、チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた実験では・OHが再結合して長寿命となった過酸化水素は比較的安定で超音波誘発DNA一本鎖切断の原因となることが報告された<sup>17)</sup>。DNA鎖切断が超音波照射後生細胞あるいは死細胞に生じたものかの疑問があったが、最近のマイクロゲル電気泳動法による単一細胞のDNA鎖切断の検討では、生細胞にも生じるとする知見が得られている<sup>18)</sup>。著者らの検討では・OHが有意に生成する条件で細胞内DNA一本鎖切断は認められるものの、二本鎖切断は認められなかった<sup>19)</sup>。

超音波の生物効果は熱作用や機械的作用が主たる原因とされているが、超音波誘発フリーラジカルの細胞死への寄与も無視できない。培養細胞致死効果に対するシステアミンによる防護効果の実験よりフリーラジカルの細胞死への寄与を調べたところ、照射後生き残った細胞に対して増殖能を20%上げた<sup>20)</sup>。システアミンによる防護効果の報告はあるが、その程度は実験条件によって大きく異なり数%から数十%にまでおよぶ。キャビテーションは粘度の高い細胞内よりも細胞外液に発生しやすいが、仮に細胞外液にフリーラジカルが生成したとしてもその寿命(・OHで約 $8.7 \times 10^{-9}$ 秒)から計算された拡散距離(約9.3nm)では細胞核近傍へは到達し得ない。細胞内まで取り込まれるシステアミンによる防護効果が実際のところ何によるのか、同一の音響条件での比較、他のフリーラジカルスクベンジャーの効果を含め再検討を要する問題である。診断用パルス波および連続波超音波の生体作用をTable 3にまとめた。

#### 超音波温熱治療効果のin vitroにおける検討

癌温熱療法(ハイパーサーミア)は癌組織が熱に

Table 3 Biological effects of ultrasound

	Pulse waves*		Continuous waves	
	in vitro	in vivo	in vitro	in vivo
Cavitation	+	***	+	+
Free radicals	+	?	+	?
Intracellular DNA damages	+	?	+	?
Growth suppression/ Cellular damages	+	?	+	+
Sister chromatid exchange	****	?	+	?
Mutation	?	?	+	?
Transformation	?	?	-	?

+, Positive

-, Negative

?, No report

\* Pulse waves with power level for diagnostic use.

\*\* Positive results have been reported in papers dealing with rodent lung hemorrhage as an indicator of cavitation in vivo.

\*\*\* Most of recent reports have shown negative results.

弱いことを利用した治療法で、超音波を用いた深部加温装置が開発されている。超音波の非熱作用がハイパーサーミアによる細胞死を増強するか否かin vitroにおいて検討した。キャビテーション発生が溶存気体の種類に影響されることを利用し制御を試みた。亜酸化窒素は溶解度が高く $\gamma$ 値(定圧比熱と定容比熱の比)の低い三原子ガスでキャビテーション気泡温度を下げ、フリーラジカル生成を抑制する<sup>20, 21)</sup>。また、高い周波数では超音波誘発細胞死も抑制するため、温度制御条件下では超音波の非熱的非キャビテーション作用を選択的に作用させることができる。ハイパーサーミア処理と超音波照射(単独では致死効果を示さない)を併用すると非致死的超音波が温熱による細胞致死効果を増強することが判明した<sup>22)</sup>。この結果は超音波加温装置によるハイパーサーミア治療では超音波の非熱作用による治療効果の増強が期待できることを示唆している。一方、同様の条件で放射線や薬剤との併用効果を検討したところ、膜の流動性を上げるリドカイン作用

下では、細胞致死効果の増強を認めたが、X線照射による致死効果に対してはなんら修飾作用を示さなかった<sup>23)</sup>。細胞膜に作用する超音波増感剤の探索が期待される。

#### 超音波を用いた薬物経皮吸収促進効果の検討

薬物の経皮吸収を超音波を利用して制御しようとする試みがされている<sup>24, 25)</sup>。著者らは超音波加温テストシステムが体表面の冷却のため恒温水循環装置による冷却水を流せる構造を有することを利用し、雄Wistarラット皮膚におけるノルアドレナリン(NA)およびヒスタミン経皮的吸収に対する超音波の非熱的作用による薬物増強効果について検討した。ビーム実効長を短縮するため周波数(3 MHz以上)、組織損傷を防ぐため強度(0.75W/cm<sup>2</sup>以下)を使用し、照射部位の温度上昇を抑制した条件でラットを麻酔下、薬剤をゲル状にして腹部に塗布した後超音波照射を行った。薬物による生理学的変化の指標として、血圧、心拍数、血流量等を測定したところ、超音波併用照射NA群では、非照射NA群に比較して血圧、心拍数の最大増加率が有意に高くなった。ヒスタミンについても検討したところ、超音波併用照射群で負の最大増加率が高い傾向を示した。超音波加温テストシステムは深部加温に加えて、超音波の非熱的作用を利用することにより薬物の経皮的吸収の促進に有用と思われる<sup>26)</sup>。

#### ま と め

診断技術として発達してきた超音波科学であるが、超音波造影剤の開発にともないさらに広く発展する可能性が示されている。治療応用もキャビテーション制御技術を組み込んだアコースティックナイフとして前立腺肥大治療<sup>27, 28)</sup>への応用やマイクロバブル製剤と組み合わせた遺伝子治療<sup>29)</sup>や血栓溶解治療<sup>30)</sup>への応用が始まっており、今後さらに安全且つ効率的な先端的治療法の開発と発展が期待される(応用例をTable 4にまとめた)。

Table 4 Biomedical application of ultrasound

Diagnosis in many fields

Therapy

Lithotripsy  
Hyperthermia for cancer therapy  
Nebulization  
Surgical aspiraton  
Decalcification  
Physiotherapy  
Gene therapy with microbubbles  
Tissue ablation by high intensity focused ultrasound ("Acoustic knife")  
Enhancement of transdermal drug delivery  
Thrombolysis  
Activation of drugs ("Sonodynamic therapy")

Laboratory use

Cell disruption  
Liposome preparation  
Emulsification  
Cleaning  
Sonoporation  
Manupuration of cells

#### 文 献

- 1) Suslick K. S.: Sonochemistry. Science 247: 1439-1445, 1990.
- 2) Riesz P. and Kondo T.: Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. Free Radical Biol. Med. 13: 247-270, 1992.
- 3) Kondo T., Gamson J., Mitchell J. B. et al.: Free radical formation and cell lysis induced by ultrasound in the presence of different rare gases. Int. J. Radiat. Biol. 54: 955-962, 1988.
- 4) Kondo T., Misik V. and Riesz P.: Sonochemistry of cytochrome c. Evidence for superoxide formation by ultrasound in argon-saturated aqueous solution. Untrosonics Sonochem. 3: S193-S199, 1996.
- 5) Kondo T. and Riesz P.: Sonolysis of ubiq-

- uinone in aqueous solutions. An EPR spin trapping study. *Int. J. Radiat. Biol.* 69 : 113-121, 1996.
- 6) Misik V. and Riesz P.: Nitric oxide formation by ultrasound in aqueous solutions. *J. Phys. Chem.* 100 : 17986-17994, 1996.
- 7) Umemura S., Yumita N., Nishigaki R. et al.: Mechanism of cell damage by ultrasound in combination with hematoporphyrin. *Jpn. J. Cancer Res.* 81 : 962-966, 1990.
- 8) Umemura S., Kawabata K., Sasaki K. et al.: Recent advances in sonodynamic approach to cancer therapy. *Ultrasonics Sonochem.* 3 : S187-S191, 1996.
- 9) Tachibana K, Uchida T, Hisanao S. et al.: Elimination adult T-cell leukemia cells with ultrasound. *Lancet* 349 : 325, 1997.
- 10) Kondo T., Krishna C. M. and Riesz P.: Sonolysis, radiolysis, and hydrogen peroxide photolysis of pyrimidine derivatives in aqueous solutions : A spin-trapping study. *Radiat. Res.* 116 : 56-73, 1988.
- 11) Kondo T., Krishna C. M. and Riesz P. : Pyrolysis radicals formed by ultrasound in aqueous solutions of nucleotides : A spin trapping study. *Int. J. Radiat. Biol.* 57 : 23-33, 1990.
- 12) Kondo T., Krishna C. M. and Riesz P. : Sonolysis of concentrated aqueous solutions of nonvolatile solutes: spin-trapping evidence for free radicals formed by pyrolysis. *Radiat. Res.* 118 : 211-229, 1989.
- 13) Kondo T., Krischenbaum L. J., Kim H. et al.: Sonolysis of dimethyl sulfoxide-water mixtures: A spin-trapping study. *J. Phys. Chem.* 97 : 522-527, 1993.
- 14) Elsner H. I. and Linblad E. B.: Ultrasonic degradation of DNA. *DNA* 8 : 697-701, 1989.
- 15) Kondo T., Arai S., Kuwabara M. et al.: Damage in DNA irradiated with 1.2 MHz ultrasound and its effect on template activity of DNA for RNA synthesis. *Radiat. Res.* 104 : 284-292, 1985.
- 16) Miller D. L., Thomas R. M. and Frazier M. E.: Single strand breaks in CHO cell DNA induced by ultrasonic cavitation *in vitro*. *Ultrasound Med. Biol.* 17 : 401-406, 1991.
- 17) Miller D. L., Thomas R. M. and Frazier M. E.: Ultrasonic cavitation indirectly induces single strand breaks in DNA of viable cells *in vitro* by the action of residual hydrogen peroxide. *Ultrasound Med. Biol.* 17 : 729-735, 1991.
- 18) Miller D. L., Thomas R. M. and Frazier M. E.: Comet assay reveals DNA breaks induced by ultrasonic cavitation *in vitro*. *Ultrasound Med. Biol.* 21 : 841-848, 1995.
- 19) Kondo T., Kodaira T. and Kano E.: Free radical formation induced by ultrasound and its effects on strand breaks in DNA of cultured FM3A cells. *Free Radical Res. Commun.* 19 : S193-S200, 1993.
- 20) Kondo T. and Kano E.: Effects of free radicals induced by ultrasonic cavitation on cell killing. *Int. J. Radiat. Biol.* 54 : 475-486, 1988.
- 21) Kondo T., Fukushima Y., Kon H. et al.: Effect of shear stress and free radicals induced by ultrasound on erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 269 : 381-389, 1989.
- 22) Kondo T. and Kano E.: Enhancement of hyperthermic cell killing by non-thermal effect of ultrasound. *Int. J. Radiat. Biol.* 51 : 157-166, 1987.
- 23) Kondo T. and Kano E.: Absence of synergistic enhancement of non-thermal effects of ultrasound on cell killing induced by ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 52 : 627-633, 1987.
- 24) Levy D., Kost J., Meshulam Y. et al.: Effect of ultrasound on transdermal drug delivery to rats and guinea pigs. *J. Clin. Invest.* 83 : 2074-2078, 1989.
- 25) Mitragotri S., Blankschtein D. and Langer R.: Ultrasound-mediated transdermal pro-

- tein delivery. *Science* 269 : 850-853, 1995.
- 26) Koike M., Ikeda K., Abe Y. et al.: Studies on ultrasonically enhances transdermal drug absorption. In: *Hyperthermic Oncology in Japan '96* (Sugimachi K. ed.) : 148-149, Fukuoka Printing, Fukuoka, 1996.
- 27) Bihrlé R., Foster R. S., Sanghvi N. T. et al.: High intensity focused ultrasound for the treatment of benign prostatic hyperplasia : Early united states clinical experience. *J. Urol.* 151 : 1271-1275, 1994.
- 28) Madersbacher S., Kartzik C., Susani M. et al.: Tissue ablation in benign prostatic hyperplasia with high intensity focused ultrasound. *J. Urol.* 152 : 1956-1961, 1994.
- 29) Porter T. R., Iverson P. L., Li S. et al.: Interaction of diagnostic ultrasound with synthetic oligonucleotide-labeled perfluorocarbon-exposed sonicated dextrose albumin microbubbles. *J. Ultrasound Med.* 15 : 577-584, 1996.
- 30) Tachibana K. and Tachibana S.: Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. *Circulation* 92 : 1148-1150, 1995.