

Feasibility of Sonoporation Using Nano-sized Bubble Liposomes as Treatment of Infective Endocarditis: A Study on Rat Model of Experimental Endocarditis

Kasumi Masuda, Mami Yamashita, Toshihiko Asanuma, Ryo Suzuki*, Kazuo Maruyama*, Kotaro Mitsutake**, Satoshi Nakatani

Osaka University Graduate School of Medicine

* Teikyo University, School of Pharmaceutical Sciences

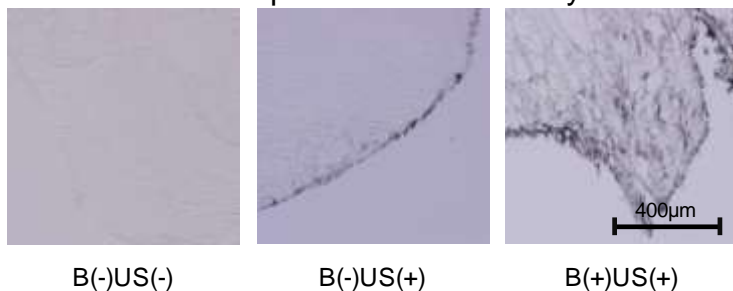
** Saitama Medical University International Medical Center

Background: Because vegetations are covered by the biofilm, sufficient amount of antibiotics is required as a treatment of infective endocarditis. Sonoporation is the use of ultrasound for modifying the permeability of cellular membranes and is used for drug and gene delivery. Under the presence of microbubbles, sonoporation has been shown to enhance its effect, but may cause tissue damage. Recently nano-sized bubble liposomes (BLs) (average diameters less than 2 μm) have been developed. Combination of ultrasound and BLs is expected to deliver various molecules effectively with less tissue damage. We investigated the effect of sonoporation with BLs on vegetations using rat model of experimental endocarditis.

Methods: A polyethylene catheter was passed into the left ventricle crossing the aortic valve from the right carotid artery of male Sprague-Dawley rats ($n = 35$) to induce aortic regurgitation. *Enterococcus faecalis* (6.8×10^8 CFU/ml) was intravenously injected 3 days after catheterization. Two days after injection, vegetations ($n = 13$) were isolated from the aortic valve and were randomly assigned to 3 groups with (+) and without (-) bubbles (B) and ultrasound exposure (US): B(-)US(-) ($n = 4$), B(-)US(+) ($n = 4$) and B(+)US(+) ($n = 5$). The vegetations were fixed in saline (400 ml) containing India ink (4 ml). Ultrasound (frequency: 1.0 MHz, intensity: 1.0 W/cm²) was applied to the vegetation for 10 minutes (1s insonification, 4s stop) using a Sonitron 2000. The degree of ink penetration was graded on 4-point scale on the cut specimen.

Results: The penetration score was 0 ± 0 for B(-)US(-), 0.56 ± 1.03 for B(-)US(+) and 1.65 ± 1.09 for B(+)US(+) ($p < 0.001$ compared to B(-)US(-) and B(-)US(+)). Thus, by using BLs combined with ultrasound, ink permeated in the inside of the vegetation effectively.

Conclusion: Sonoporation with BLs may be a useful method of drug delivery to vegetations.



バブルリポソームを用いた感染性心内膜炎の超音波治療の基礎的検討

増田佳純、山下真未、浅沼俊彦、鈴木亮*、丸山一雄*、光武耕太郎**、中谷敏

大阪大学医学系研究科 機能診断科学講座

*帝京大学薬学部 薬学科

【背景】 感染性心内膜炎（IE）の治療では抗菌薬を静脈投与しているが、疣腫に直接抗菌薬を浸透させるのは困難である。近年、微小気泡存在下での超音波照射によるソノポレーション効果を応用して組織内への薬物デリバリーが可能となった。また、ナノサイズの超音波造影剤であるバブルリポソームは低侵襲的かつ局所的に薬物デリバリーが可能であると考えられている。

【目的】 ラットに IE を発症させ、バブルリポソームを用いたソノポレーションの疣腫への効果を検討する。

【方法】 頸動脈からのカテーテル挿入により大動脈弁逆流を作製した雄性 SD ラット (n=52) に対し、尾静脈より腸球菌 *Enterococcus faecalis* (6.8×10^8 CFU/ml) を投与して、IE を発症させた。菌注入 2 日後、大動脈弁より疣腫を摘出した。得られた疣腫 (n=13) を用いてコントロール群としての B(-)US(-)群 (n=4)、超音波照射単独の B(-)US(+)群 (n=4)、バブルリポソーム併用の B(+)US(+)群 (n=5) の 3 群で検討した。墨汁を混合した生理食塩水中に疣腫を固定し、RICH-MAR 社製 Sonitron2000 (周波数 1 MHz、強度 1.0 W/cm²) を用いて 1 秒照射後 4 秒停止で間歇照射を 10 分間行った。一切片につき辺縁部を 4 箇所観察し、墨汁滴の染色深達度を 4 段階評価した。

【結果】 染色深達度は B(-)US(-)群は 0 ± 0 、B(-)US(+)群は 0.56 ± 1.03 、B(+)US(+)群は 1.65 ± 1.09 (vs. B(-)US(-); $p < 0.001$, vs. B(-)US(+); $p < 0.001$) であり、超音波照射とバブルリポソーム併用によって墨汁が疣腫内部に効果的に浸透することがわかった。

【結語・考察】 バブルリポソームを用いたソノポレーションは疣腫への効果的な薬物デリバリーの方法となり得ることが示唆された。

質疑応答

質問 マイクロバブルとの違いは？なぜマイクロバブルではなくナノバブルを用いたのか？

応答 マイクロバブルは、平均径 1-6 μ m で、治療応用に用いるには大きいと考えられます。粒子径がナノサイズのバブルリポソームはソノポレーションによって形成される小孔のサイズも小さいものとなります。よって、病変近傍組織へのソノポレーションの影響も抑えることができると考えられます。

質問 これから検討すべきことは何ですか？

応答 今後臨床に応用していくためには、IE を発症した生体内に薬物を投与し、in vivo においてバブルリポソームによる薬物デリバリー効果を検討する必要があると思います。実際には、IE 発症ラットに抗菌薬を標的したバブルを投与し、超音波照射を行い、生存率を検討することを考えています。