

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11282

研究課題名(和文)超音波力学療法(SDT)による口腔がんの腫瘍増殖抑制効果に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Basic study on tumor growth inhibitory effect of oral cancer by Sonodynamic therapy (SDT)

研究代表者

吉田 憲司(Yoshida, Kenji)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：40183701

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):近年、口腔がん治療における超音波力学療法(STD)の進歩とその治療効果などの重要性が報告されている。本研究では、市販の超音波照射装置に独自のSDTシステムを加え、治療効果について基礎的検討を行うために新しいSDTシステムを構築した。その結果、ヒト口腔扁平上皮癌細胞皮下移植マウスに対する超音波単独療法の抗腫瘍効果が確認されたが、超音波感受性物質5-ALA前処理+超音波併用群の抗腫瘍効果についてはさらに検討する必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文):Recent advances of sonodynamic therapy(STD) in oral cancer treatment and its significance such as therapeutic effects are reported. In this study a unique SDT system was added to a commercially available ultrasonic irradiation device, and a new SDT system was constructed to conduct a basic study on its therapeutic effect. As a result, the antitumor effect of SDT on human oral squamous cell carcinoma cell subcutaneously transplanted mice was confirmed, However it was considered that further research will be needed regarding the antitumor effect of the Sonodynamic sensitizer 5-ALA pretreatment + ultrasonic combination group

研究分野：口腔外科学

キーワード：Sonodynamic Therapy 口腔扁平上皮がん 5-ALA 培養細胞 マウス 抗腫瘍効果 超音波感受性物質
超音波遮蔽板

1. 研究開始当初の背景

超音波は従来、主として画像診断機器に利用されてきたが、近年、難治性骨折の治癒促進のために超音波を利用する低出力超音波パルス治療 (LIPUS) や超音波骨切削機器による骨の切削、さらにはがん治療における高密度集束超音波治療 (HIFU) など新規治療機器への超音波の臨床応用が盛んになってきた。なかでも増感剤として超音波感受性物質を投与し、がん細胞に超音波を照射して抗腫瘍効果を得る超音波力学療法 (SDT) は、光線力学治療 (PDT) に代わるがんの新規局所治療法として期待されている。芝口らは、ラットの脳深部に播種した腫瘍 (グリオーマ) に超音波感受性物質として、5-アミノレブリン酸 (以下 5-ALA) を用いて集束型の低出力超音波を照射することにより、明らかな抗腫瘍効果を得たと報告している。しかし、口腔がん細胞に対し超音波感受性物質を組み合わせた SDT の抗腫瘍効果の詳細は明らかではない。本研究助成申請者の吉田らはこれまでに「口腔悪性腫瘍に対する光線力学治療 (PDT) と癌転移効果の検討」や「口腔がん可視化による早期診断のための光線力学診断 (PDD : Photodynamic diagnosis) に関する基礎的研究」などに関する一連の基礎的研究を行い、口腔がんに対する光生物反応の作用機序ならびその臨床応用について明らかにしてきている。今回は、これらの光線力学的知見と対比することにより、口腔がん治療における感受性物質 (5-ALA) を併用する新しい超音波力学治療 (SDT) の特性の解明を目指して本研究を計画した。

2. 研究の目的

近年、各種臓器がんに対し超音波と超音波感受性物質を組み合わせた超音波力学療法 (Sonodynamic Therapy、SDT) が新規非侵襲的治療として注目されている。従来の光線力学療法 (Photodynamic Therapy、PDT) に比べて超音波のため、光感受性物質による皮膚光線過敏症などの重篤な副作用が少なく、また PDT 光源に比べ生体組織深部まで到達させることができるため、深部の腫瘍に対しても治療効果が期待できることが報告されている。しかしながら、口腔がんに対する超音波力学療法の抗腫瘍効果と副作用などの臨床的意義に関してはこれまで殆ど明らかにされていない。本研究では集束型ではない市販の超音波照射装置に独自の改良を加えて新しい SDT システムを構築し、その治療効果と副作用について検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト口腔扁平上皮癌 (UMSCC-81) 細胞株を用いた超音波照射 (UST) の *in vitro* 殺細胞効果

超音波照射装置としては市販の超音波治療器 (ITO UST-770) とプローブ (L 型照射端子) を用いた。発振周波数 Hz, 出力 W (mW/cm^2) 及び発振時間 (Duty, %) の 3 つのパラメーターの変更により種々の条件での照射が可能である。照射範囲を限定し、副作用を軽減するため、中心部に穴の空いた $2 \times 2 \text{cm}$ の遮蔽板 (シールド、厚紙 4 枚の重層構造) を作成し、96 穴 Plate で培養した細胞に底面から遮蔽板を介してプローブをジェルで密着させながら照射する方法を考案した (図 1)。実験では照射時間, 周波数, 出力等のパラメーターを変えて殺細胞効果の至適条件を検討した。



図 1 *In vitro* 超音波照射法

(2) ヒト口腔扁平上皮癌 (UMSCC-81) 細胞皮下移植マウスを用いた *in vivo* 腫瘍縮小効果予備実験で照射端子を麻酔下のマウス皮膚に直接、接触させて照射したところ、皮膚の広範囲な火傷や下肢麻痺などの重篤な副作用が見られたため、照射端子とマウス皮膚の間に遮蔽板 (シールド、4 枚紙重層構造) を介在させ、照射する方法を開発した (図 2)。

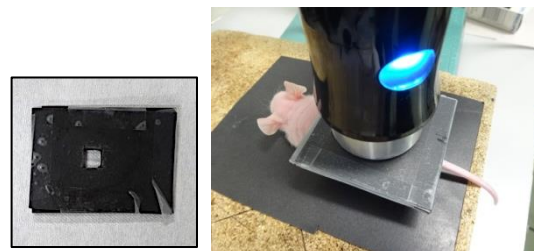


図 2 遮蔽板 (左) を用いた *In vivo* 超音波照射法

4. 研究成果

超音波照射 (UST) の *in vitro* 殺細胞効果

実験では照射範囲を限定するため、遮蔽板を介して照射した。UMSCC-81 細胞の生存は周波数とはあまり関係なく、出力, 発振時間, 照射時間に依存して強く抑制された。3Hz/3W/50%Duty 条件下では照射時間依存的に 2 分照射で 98% が死滅した。照射 2 時間後に細胞数をカウントしたが、形態学的にはアポトーシスではなく、ネクローシスであった。また 5-ALA 添加 (1mM) の影響を検討したが、5-ALA による明らかな細胞死の促進は認めなかった (図 3)。

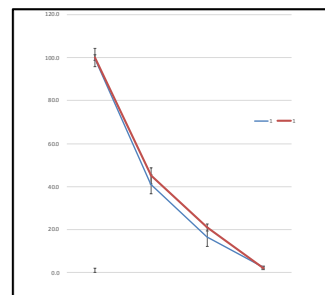


図 3 UST の *in vitro* 殺細胞効果。5-ALA (+) 赤、5-ALA (-) 青。横軸; 0, 0.5, 1, 2 分、縦軸;

細胞数(% of control)

(2) 超音波照射(UST)の in vivo 腫瘍縮小効果
予備実験で直接腫瘍に超音波を照射したところ、照射範囲が腫瘍以外にも拡がり、下肢麻痺などの重篤な副作用が見られた(図4)。



図4 超音波直接照射による右下肢の片麻痺
そこで本実験の前にまず、超音波による副作用を回避するための遮蔽板の材質を検討した。

遮蔽板の素材としてアクリル、ゴム、樹脂製スポンジ、発泡ポリプロピレン及び紙(厚紙を4枚重層した構造)を検討した。その結果、アクリル、樹脂製スポンジ、ゴム製遮蔽板では超音波の遮蔽効果がなく、逆に蓄熱効果があり、副作用軽減効果がないことが判明した。一方、発泡ポリプロピレン及び紙(4枚重層構造)では超音波の遮蔽効果が見られ、腫瘍に局限した照射が可能でこれにより重篤な副作用の回避に成功した。これらの遮蔽板は材質中に大量のエアースペースがあり、これが超音波に対する強い遮蔽効果を生み出す理由と考えられた。

この遮蔽板(紙4枚重層構造)を用いて本実験を行なった。種々の照射条件を検討した結果 3Hz/3W/50%Duty/6分間の固定照射が副作用は皮膚表面の軽度火傷など限定的で、かつ抗腫瘍効果が最大になることが判明した。

UMSCC-81細胞の皮下接種4日後に上記の条件で皮下腫瘍に超音波1回照射を行い、腫瘍サイズの継時変化を3週間観察した。その結果、無処置対照群(n=5匹)に比べ、超音波単独照射群(5-ALA前投与なし)(n=6匹)では有意な腫瘍増殖の低下が認められた(p<0.05)。一方、5-ALA前投与を行なった超音波照射群(n=5匹)でも腫瘍増殖低下が認められたが、超音波照射単独群と比べ、腫瘍縮小効果は統計的に有意ではなかった(図5, 6)。



図5 超音波照射の腫瘍縮小効果。左;対照、中;5-ALA前処理後超音波照射、右;超音波単独照射(痂皮のみで腫瘍は消失)

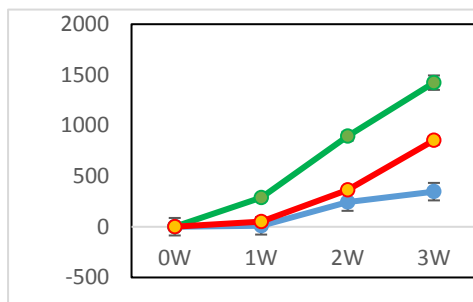


図6 超音波照射の腫瘍縮小効果。緑;対照群、

赤;5-ALA前処理後超音波照射群、青;超音波単独照射群(p<0.05, vs 対照, 3週後)。縦軸;腫瘍体積、横軸;移植後の時間経過(週)。

次に超音波照射した腫瘍組織を組織学的に検討した。その結果、超音波単独照射では皮下組織内の腫瘍は殆どが死滅し、壊死に陥っていたのに対し、筋肉組織に浸潤していた深部腫瘍に対しては効果が限定的で、腫瘍の残存が認められた。我々のこれまでの経験からも、従来の紫外線領域の波長の光線力学療法では皮下腫瘍に対する効果が限定的であったことと比較すると、今回の超音波力学療法は比較的深部(皮下組織まで)の腫瘍に対しても効果が認められた点は本法の大きな優位点と言える。また腫瘍上部の正常皮膚には軽度の火傷が見られたが、時間の経過とともに痂皮に移行し、4週間後には概ね正常皮膚に被覆され、副作用も可逆的な範囲に留まっていた(図7)。

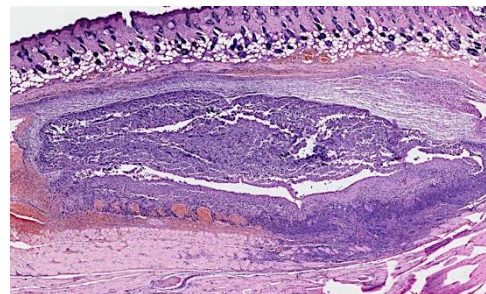


図7 皮下腫瘍に対する超音波照射(UST)の抗腫瘍効果に関する組織学的検討(HE染色)。皮下組織内の腫瘍は殆どが壊死に陥るが(*), 筋肉浸潤部では一部残存が見られる。

副作用としては上記火傷以外に皮下出血なども認められた。これは皮下組織内の小静脈の内皮細胞の熱による損傷によるものと考えられる。これは照射時間に依存的で、6分以内の照射であればほぼ回避できるものであった。

考察

今回、超音波遮蔽板(シールド)を用いて超音波照射を高出力状態に保ちながら、腫瘍以外への照射を極力防止し、副作用を最小限に留めた独自の超音波照射治療システムを確立することに成功した。これによりマウス皮下腫瘍に対する上記超音波治療システムの顕著な腫瘍縮小効果を明らかにした。超音波力学療法が組織透過度の低い光線力学療法に比べて、比較的深部の腫瘍に対しても有効性の高い治療法である可能性を示唆した。超音波治療の深部到達度に関してはさらに発振周波数を下げる(例えば1Hz)ことにより、理論上、より深部まで超音波を到達させることが期待できるが、逆に副作用を増大させる可能性もあり、今後の検討課題である。

今回の超音波照射治療システムの抗腫瘍

効果の機構に関しては 5-ALA などの超音波増感物質の併用は有効でなく、超音波単独照射であることから、PDT と類似の機序による活性酸素生成などは直接関与していないものと考えられる。超音波単独では温熱作用による細胞毒性や音響キャビテーションにより発生する気泡による細胞の機械的破壊などの可能性が報告されている。実際、今回の in vitro の実験からは活性酸素が関与する細胞死で見られるアポトーシスは少なく、ネクローシスが主体と思われる。また照射後の局所温度は in vitro, in vivo とも 50℃程度の上昇が見られており、温熱作用による細胞死が関わっている可能性が強く示唆される。

今回の実験において超音波単独照射に比べて、5-ALA 前処理+超音波併用群でなぜ腫瘍縮小効果がむしろ軽度に留まったかについては明らかではないが、今回実験に用いた口腔がん細胞株 (UMSCC-81) の 5-ALA 取り込み活性が低いことも一因と考えられる。今回、5-ALA に関しては 300mg/kg マウスを腹腔内に投与して 4 時間後に取り込み活性を検出した。検出は 410nm 付近の波長を透過するフィルターを備えた Xe ランプ (励起光) および 460nm の波長をカットするフィルターを用いて行ったが、波長 636nm および 705nm の赤色蛍光は皮膚全体にある程度観察されたが、皮下腫瘍への特異的な集積は認められなかった (図 7)。

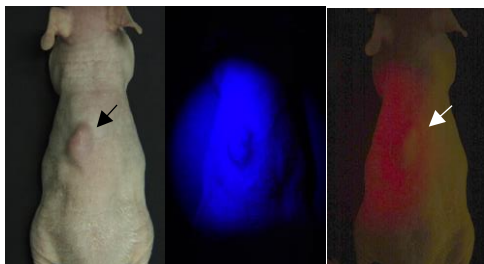


図 7 UMSCC-81 皮下腫瘍への 5-ALA 投与後の集積の検討。左;明視野、中;励起光、右;赤色蛍光。皮膚全体に集積し、腫瘍特異的ではない。

今回はグリオーマなど陽性コントロールの準備ができなかったため、今後はこの点を改善して、5-ALA 前処理+超音波併用群の抗腫瘍効果についてはさらに検討する余地がある。

今回の結果では超音波単独療法の皮下腫瘍に対する抗腫瘍効果についてポジティブな結果が得られたが、超音波照射は今回用いた低出力のリハビリ用機器による照射でも高出力、長時間 (10 分以上) 一定の場所に固定して照射すると比較的深部に存在する血管や神経などを損傷し、副作用を惹起する危険性があることを臨床応用を考える場合には銘記すべきものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 憲司 (YOSHIDA, kenji)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：40183701

(2) 研究分担者

中西 速夫 (NAKANISHI, hayao)
愛知県がんセンター (研究所)・分子腫瘍学分野・研究員
研究者番号：20207830

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()