

平成 22年 3月 31日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2006～2009
 課題番号：18300175
 研究課題名 (和文) 脳腫瘍に対する新規超音波セラグノーシス・システムの開発
 研究課題名 (英文) Development of “theragnosis” system for malignant glioma.
 研究代表者
 馬目 佳信 (MANOME YOSHINOBU)
 東京慈恵会大学・医学部・教授
 研究者番号：30219539

研究成果の概要 (和文)：脳腫瘍の中でグリオーマは浸潤性が高く予後も不良だが、遠隔転移を起こすことは稀であり、有効な局所療法を確立すれば患者の長期生存や治癒が期待できる。本研究では超音波を利用して、治療を行いながらイメージングにより診断を行うセラグノーシス・システム装置の試作を行った。この装置では周波数 500kHz, 連続波を 0-3W/cm² の超音波強度で照射することが可能である。本研究によりバブル製剤を用いた脳腫瘍音響力学療法の有用性が明らかとなり今後のグリオーマの治療への貢献が期待される。

研究成果の概要 (英文)：Glioma is one of the most common and intractable tumors in the brain. Since its prognosis is unfavorable, an alternative therapies or treatments are needed. In spite of poor prognosis, distant metastasis is quite rare in the patients and cause of the death is mostly local recurrence of the tumor. Therefore, long survival or even a cure can be expected only by control of local recurrences. In this study, prototype of theragnosis system for glioma was produced. This system enabled to irradiate therapeutic ultrasound to glioma as local treatment (therapy) while monitoring the process (diagnosis). EUB6500 ultrasound diagnostic instrument was utilized and combined to therapeutic ultrasound generator and amplifier. The system could emit 500 kHz, continuous 0-3W/cm² of ultrasound. Current results demonstrated a beneficial effect of therapeutic insonation to glioma in combination to microbubbles and suggested future application for clinical use.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2007年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2008年度	8,399,942	2,520,000	10,919,942

2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
総計	14,899,942	4,470,000	19,369,942

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：検査・診断システム，超音波装置，脳腫瘍，超音波診断，超音波治療，音響化学療法，マイクロバブル

1. 研究開始当初の背景

ナノサイエンスの発展と共に生体内の情報を可視化する分子イメージングの開発が医用システムの領域でも進んできている。生体情報を可視化する技術には様々なものがあるが超音波を用いる方法は、これまで診断の目的で造影剤として開発されたバブル製剤が、より強い強度の超音波の照射によりキャビテーションを起こして生体へ様々な影響を起こすことが明らかになってきた。特に癌細胞や血栓などの破壊作用が知られるに至り治療への幅広いアプリケーションの可能性が広まっている。このような治療用の超音波は手軽に、しかもリアルタイムで病変に物理的外力を与えることができ、一方で周波数が重ならない波長での病変の診断も可能なため、上手にシステムを構築することによって病変の診断と治療を同時に、しかも簡便な方法で行えるといった特徴のある検査・診断システムを創出することが可能である。このような背景のもとに本課題では脳腫瘍を対象にバブル製剤を用いて造影効果により診断を行いながらリアルタイムで腫瘍を破壊することができる新しい可視化・治療システムの開発を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では対象を脳腫瘍、特に神経膠腫（グ

リオーマ）を念頭において開発をすすめることを目的とした。脳には種々の細胞が存在するため色々な腫瘍が発生するが、脳腫瘍全体で見ると約4分の1以上を占めるのが神経膠腫、すなわちグリオーマである。この腫瘍は予後が不良で比較的良性のものでも完治させることは難しく、また最近の手術療法や化学療法、放射線療法、免疫療法が格段に進歩しているにも関わらず効果は限定的である。このようにグリオーマは難治性であるが、一方、頭蓋外への転移は稀であり、死因のほとんどは局所での再発によるものである。この事は有効な局所療法を確立できれば患者の長期生存が期待できることを意味する。しかも中枢神経系は損傷を受けると再生が難しいため、このような性質をもつ脳腫瘍は局所療法とはいえ十分なモニタリングの下で有効かつ安全に治療されなければならない。これらのニーズを満たす治療システムとして超音波は最適な道具を提供することとなるため、グリオーマを対象に、超音波による治療すなわちセラピー（therapy）と診断すなわちディアグノーシス（diagnosis）を同時に行うシステムであるセラグノーシス（theragnosis）・システムを開発することを計画した。

3. 研究の方法

実験系でグリオーマの立体培養を行い、それ

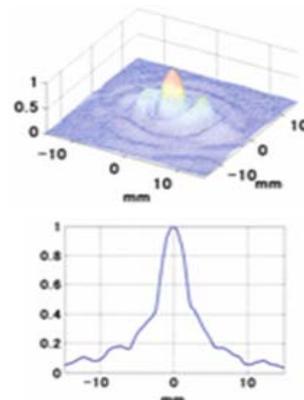
を元に治療用超音波の周波数、強度、マイクロバブルとの併用条件などを決定し、得られた条件を検討して試作機を組み立てるという手法を用いた。本研究は(1) 超音波照射条件検討用立体培養脳腫瘍モデル、(2) 音響化学活性物質、(3) 脳腫瘍イメージング用プローブ、(4) 新規脳腫瘍治療用超音波照射装置の4つの要素から構成される。

(1)について細胞外基質を足場にしたスポンジを作成しその中で各種ヒト脳腫瘍細胞株を立体培養した。この装置の中で腫瘍細胞を培養することにより、超音波照射でも細胞が足場から剥がれずトランスデューサーを含む治療用超音波の条件が決定されるような方法を検討した。(2)については超音波造影剤として市販されている薬剤が将来の応用性が高いと判断し、マイクロバブル製剤として現在認可されているレボピストを中心に検討を行い、超音波の条件と組み合わせで濃度を検討した。また標準化が行えるよう利用されたバブルの粒径を計測した。(3)の診断プローブは3次元培養した脳腫瘍およびラット皮下脳腫瘍モデルで実際に画像を見ながら検討し、①画像が最も鮮明に見えること、②治療用のトランスデューサーと一体化して設計する必要があることなどから規格を決定した。(4)に関して実際にグリオーマに対する治療効果をモデルおよび動物を用いて計測しながらトランスデューサーの最適化を図った。

4. 研究成果

(1)ヒト脳腫瘍細胞であるT98Gグリオーマ細胞株をI型コラーゲンや組織適応性ゼラチンを利用して組み立てた立体培養用メッシュの中で培養することで目的のモデルを得ることができた。このデバイスの中で腫瘍細胞は突起を伸ばし足場の基質や細胞同士で互いに良

く接着していることが電子顕微鏡等で確認された。この脳腫瘍モデルで超音波の効果を調べるためのクロミウム酸放出アッセイを検討した。すなわちモデルを放射性同位体で標識されたクロミウム酸(300 μ Ci)で4時間ラベルし洗浄、その後超音波を照射することによって培養液中に放出された同位体の量から膜が破壊された死細胞の率を算出することができ、動物実験のための照射条件の最適化が容易となった。(2) 現在超音波造影剤として用いられているレボピストを用いて臨床で用いられている濃度まで検討したところ有効な濃度が存在し60mg/ml以上の濃度では殺細胞性に変化が認められなくなるなどが判明した。30mg/mlの濃度でマイクロバブルを作成すると平均粒径が10 μ mと安定していることが分かった。(3)診断用プローブに関して治療用のトランスデューサーを一体化させる場合と別途に設計する場合の両方で比較を行い画像や操作性からフィンガータイプのプローブを選択した。(4)治療用超音波周波数は当初腫瘍の破壊効果の高い210 kHzを念頭に開発を進めていたが200kHz帯のものは製作の段階でトランスデューサーの口径を広くしても超音波ビームが十分に収束せず正常の中枢神経系組織を回避して腫瘍部に治療用超音波を安全に照射することが難しいことが判ったため、同じく頭蓋骨を通過することが可能かつ十分な強



ハイドロフォンで測定したビームパターン

度を脳内組織に与えることができる500 kHzを選択してトランスデューサーを作成した。診断用プローブの位置は治療用ビームの焦点に置く必要から、最終的に口径60mmのトランスデューサーのビームシミュレーションを行い、中央に診断用超音波プローブのための19mmの角穴を空けたものを作製した。

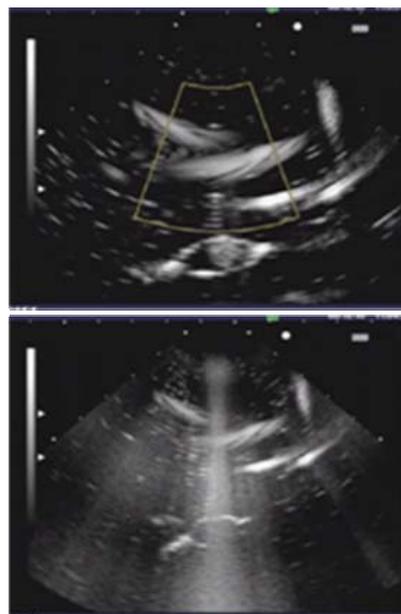
超音波は生体で用いる場合に骨で減衰するが腫瘍と同じ超音波強度さえ照射されれば、生体内でも同じ効果が得られる可能性が高い。治療効果については発表論文を参照のこと。実際に作成した試作機（下）と照射中の画像（右欄）を示す。



試作したシステムの写真

超音波技術は、我が国が世界をリードしてきた数少ない科学技術の分野であり、今後、国際的競争を勝ち抜くためにも精力的に研究を進めていかなければならない先端医療技術の1つである。一方、悪性腫瘍も本国では罹患する患者数が増加しており、腫瘍の早期診断、治療システムの開発も急務となっている。今回の研究での成果は条件さえ検討すれば超音波が届く範囲での脳腫瘍以外の悪性腫瘍の局所療法にも応用することができ、安価で安全かつ有効な診断と治療を行うことができるためインパクトは大きいと考えられる。

なおこの研究を対象に、平成21年度、ひら



治療用超音波の照射部のモニター(上)と照射中の画像(下)

めき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～KAKENHI が研究成果の社会還元・普及事業として平成21年7月31日（金）に東京慈恵会医科大学で行われた（整理番号 HT21068：プログラム名：脳の病気を調べる方法～頭蓋内病変の診断技術～）。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Manome Y, Mizuno S, Akiyama N, Fujioka K, Saito H, Hataba Y, Kobayashi T, Watanabe M. Three-dimensional cell culture of glioma and morphological comparison of four different human cell lines. Anticancer Research 2010, in press.
- ② Manome Y, Furuhashi H, Hashimoto A, Funamizu N, Suzuki R, Ishizawa S, Akiyama N, Kobayashi T, Watanabe M. Application of Therapeutic Insonation to Malignant Glioma Cells and Facilitation by Echo-contrast Microbubbles of Levovist. Anticancer Research 29 2009, 235-242.

〔学会発表〕（計 15 件）

- ① 馬目佳信. 脳腫瘍治療における超音波分子生物学的技術 特別企画[基礎技術研究会共催セッション] 日本超音波医学会関東甲信越地方第 21 回学術集会. 2009 年 11 月 7 日 東京TFTビル（東京都）
- ② 稲葉宣晴、石澤将、木村真規、柴崎敏昭、馬目佳信. グリオーマ細胞の増殖に対する ROCKアイソフォームの関与 第 126 回成医会総会 2009 年 10 月 1 日 東京慈恵会医科大学（東京都）
- ③ Manome Y., Kobayashi T. Watanabe M. Three-dimension cell culture and comparison of morphology of four different glioma cell lines. The 15th Congress of the European Cancer Organization 2009 年 9 月 21 日. ICC Berlin(ドイツ・ベルリン市)
- ④ Inaba N, Ishizawa S, Kimura M, Watanabe M, Shibasaki T., Manome Y. Different roles of ROCK isoform in malignant glioma cells. The 15th Annual Meeting 2009, Japan Society of Gene Therapy 2009 年 7 月 10 日 Osaka University Convention Center (大阪府)
- ⑤ 藤岡宏樹、星野昭義、真鍋法義、花田三四郎、昼岡正樹、佐藤慶介、Richard D Tilley、平栗健二、山本健二、馬目佳信. 蛍光ナノ粒子QDを使った医療応用 Cell Biology Summer Meeting 2009 2009 年 7 月 12 日 つくばグラントホテル（茨城県）
- ⑥ 馬目佳信、小林寿光、幡場良明、渡辺美智子. 三次元培養脳腫瘍細胞の形態学的変化. 日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会 2009 年 5 月 29 日 仙台国際センター(宮城県)
- ⑦ Y Manome, T. Kobayashi, M. Watanabe Morphologic characterization of human glioma cells in three-dimensional cell culture 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC9) Nov. 4, 2008, ICC, Jeju,

韓国

- ⑧ Manome Y. Watanabe M. Three-dimensional cell culture of human glioma cells and morphological differences. Eighth International Conference of Anticancer Research. Oct 18, 2008, Kos, ギリシャ.
- ⑨ 馬目佳信 脳腫瘍の治療開発～何故私は超音波を選択するのか？～ DNA医学研究所夏季セミナー 2008 年 7 月 24 日 東京慈恵会医科大学
- ⑩ 稲葉宣晴 渡辺美智子 馬目佳信. ROCK シグナルノックダウン-グリオーマ細胞の抗腫瘍剤感受性の変化. Cell Biology Summer Meeting 2008 Molecular Meta-strategy -- 分子レベルの診断・治療をめざす網羅的戦略 -- 平成 20 年 7 月 6 日、鴨川市 千葉.
- ⑪ Manome Y., Hataba Y, Watanabe M. Morphology of human glioma cell lines in three-dimensional cell culture. Cell Biology Summer Meeting 2008 Molecular Meta-strategy -- 分子レベルの診断・治療をめざす網羅的戦略 -- 平成 20 年 7 月 5 日、鴨川市 千葉.
- ⑫ 渡辺美智子、小林寿光、馬目佳信. 遺伝的変異と超微細構造との関連 日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会. 平成 20 年 5 月 22 日. 国立京都国際会館, 京都.
- ⑬ 馬目佳信 超音波による悪性腫瘍治療法の可能性について. 高知大学医学部公開セミナー 平成 20 年 1 月 8 日 高知県南国市
- ⑭ 渡辺美智子、馬目佳信 3次元培養法によるヒトグリオーマ細胞の形態と特性の変化 Cell Biology Summer Meeting 2007 治療と診断法の融合～Theranostics～ 平成 19 年 7 月 28 日、伊東.
- ⑮ 馬目佳信 分子操作 第 46 回日本生体医工学会大会専門別研究会 16「ナノメディシン研究会」平成 19 年 4 月 27 日宮城県仙台市

〔その他〕（計 2 件）

① 馬目佳信 光線力学的療法と音響力学的療法 慈大新聞「診療メモ」平成 20 年 6 月号.

② 馬目佳信 脳の病気を調べる方法～頭蓋内病変の診断技術～ 平成 21 年度ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～ KAKENHI. (<https://cp11.smp.ne.jp/gakujutu/seminar>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬目 佳信 (MANOME YOSHINOBU)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：30219539

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし