

平成21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18500372

研究課題名（和文） ソノポレーション現象を応用した新たな肝癌治療の開発

研究課題名（英文） A new therapeutic approach to liver cancer using sonoporation

研究代表者

鈴木 康秋（SUZUKI YASUAKI）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：60360989

研究成果の概要：造影超音波によるマイクロバブルの sonoporation（超音波穿孔）を応用した肝癌に対する抗癌剤の新たな drug delivery system の開発を目的とした基礎研究をおこなった。In vitro 解析では、培養肝癌細胞株の培養液中に超音波造影剤と蛍光色素を加えて、超音波照射後に蛍光顕微鏡観察をおこない、肝癌細胞内への sonoporation 効果による蛍光色素導入を確認した。In vivo 解析では、培養肝癌細胞株皮下移植マウスや DEN 誘発肝発癌マウスに造影超音波をおこない、sonoporation 効果を解析するための至適条件を検討した。さらに、マウスに超音波造影剤と蛍光色素を投与後、自家蛍光内視鏡 AFI を用いた蛍光腹腔鏡観察をおこない、超音波照射マウスにおいて肝臓内に蛍光色素が効果的に導入されていることを明らかにした。以上より、臨床用超音波診断装置や超音波造影剤を用いても肝臓において sonoporation 効果が認められ、肝癌に対する抗癌剤の新たな drug delivery system の開発と臨床応用につながると考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	480,000	3,980,000

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：超音波医科学、肝癌

1. 研究開始当初の背景

難治性進行肝癌の抗癌剤による化学療法においては、経カテーテル動注療法

やりザーバーポートを留置した動注療法をおこない、drug delivery system としては油性造影剤リピオドールが用

いられている。しかし、これらの治療は侵襲的治療であり、手技的にも熟練を要する。また、リピオドールの停滞は腫瘍のみならず非腫瘍部にも起こるため、背景肝組織のリピオドールによる虚血および抗癌剤による細胞障害があり、肝機能障害・肝予備能低下をきたすため、分量の抗癌剤投与が困難なことが多く、低侵襲で非腫瘍部への影響が少ない新たな drug delivery system が期待されていた。生体への侵襲が極めて少ない超音波は、肝硬変の合併が多い肝癌の治療に用いるのに理想的である。近年、超音波の診断技術の進歩に伴い、超音波の治療応用の試みがなされており、超音波照射によって細胞表面近くで気泡崩壊が起こると、細胞膜に一過性で可逆性の小孔が生じる sonoporation (超音波穿孔) という現象が報告された (Nature 423:153-156, 2003)。さらに現在臨床で使用されている超音波造影剤のマイクロバブルの崩壊により、sonoporation 効果が増強することが明らかになった (Radiology 229:423-428, 2003)。またマイクロバブルは、進行肝癌により多く取り込まれ、超音波照射で強い造影効果を発揮することを我々は見いだしており (Eur J Radiol 48:214-249, 2003)、マイクロバブルと超音波を用いた sonoporation による進行肝癌の新たな drug delivery system の可能性が期待される。

2. 研究の目的

本研究は、超音波照射によるマイクロバブルの sonoporation を用いた、進行肝癌に対する抗癌剤の新たな drug delivery system の開発の基礎的知見を得ることを目的とした

3. 研究の方法

臨床での応用を念頭におき、超音波装置は臨床用の超音波診断装置 Aplio-XG (東芝メディカルシステムズ)、超音波造影剤は肝癌の使用が認可されているペルフルブタンマイクロバブル Sonazoid (第一三共) を使用した。なお、動物実験は本学動物実験施設運営委員会の承諾のもと施行し、「旭川医科大学における動物実験に関する指針」を遵守しておこなった。

(1) 培養肝癌細胞株における sonoporation 効果の *in vitro* 解析

肝癌細胞株 (Huh7) を 6-well plate で培養し、培養液 3ml 中に超音波造影剤 Sonazoid (1.5 μ l/ml) と、蛍光色素として、膜損傷を受けた細胞内部に侵入し蛍光を発する propidium iodide; PI (10

μ g/ml) の混合液を加えた。well 内の培養液に高周波プローブ PLT-1202AT (中心周波数 12MHz) を当て、超音波を 30 秒間照射し、pulse subtraction mode にて観察した。その後、蛍光顕微鏡 IX71 (オリンパス) にて観察をおこない、細胞内への sonoporation 効果による蛍光色素導入の有無を検討した。なお、比較対象群として、PI 単独投与・超音波未照射群、PI+Sonazoid 投与・超音波未照射群、PI 単独投与・超音波照射群、を設定した。さらに、超音波の音圧を、Mechanical index; MI 0.3 とした低音圧 (マイクロバブルを共振させる) 群と MI 1.0 の高音圧 (マイクロバブルを破壊する) 群に分けて比較した。

(2) 担癌マウスにおける造影超音波の至適条件の設定

癌細胞株皮下移植マウスや肝発癌マウスに Sonazoid を用いた造影超音波をおこない、*in vivo* で sonoporation 効果を解析するための至適条件 (超音波設定や超音波造影剤濃度など) を検討した。皮下移植マウスは、培養肝癌細胞株 (KP-1N) を 7 週齢の雄ヌードマウスの背部皮下に移植して担癌状態とした。また、肝発癌マウスは、2 週齢の離乳前の雄マウスに diethylnitrosamine (DEN; 5 μ g/g body weight) を腹腔内投与し、化学肝発癌した 48 週齢マウスを用いた。造影超音波の基本設定は、ヒト肝腫瘍での観察と同じ造影ハーモニック法の低音圧 pulse subtraction mode とし、微小病変の観察が可能な高周波プローブ PLT-1204AT (中心周波数 12MHz) を用いた。

(3) マウス肝臓における sonoporation 効果の蛍光腹腔鏡を用いた *in vivo* 解析

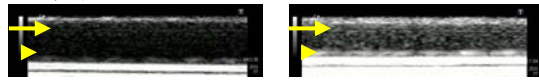
24 週齢の雄マウスに超音波造影剤 Sonazoid と、蛍光色素 Fluorescence (50 μ l/body) を静脈投与し、高周波プローブ PLT-1204AT (中心周波数 12MHz) を用いて肝臓に超音波を 5 分間照射した。Sonazoid の投与量は、(2) の検討結果より、ヒト推奨投与量の 1/200 量 (0.075 μ l/kg) とした。投与 1 時間後に、Auto Fluorescence Imaging (AFI) モードを装備した細径自家蛍光内視鏡 BF XP60 (オリンパス) を腹腔内に挿入し、蛍光腹腔鏡 (Image Enhanced Laparoscopy; IEL) として肝表面の生体観察をおこなった。比較対照のため、正常コントロール (PBS 投与のみ)、Fluorescence 投与のみ、Sonazoid と Fluorescence 投与のみ (超音波未照射) の各マウスも蛍光腹腔鏡をおこなった。肝細胞内への sonoporation 効果による蛍光色素導入の解析は、画像解析ソフト (Image J) を用いておこなった。

4. 研究成果

(1) 培養肝癌細胞株における sonoporation 効果の in vitro 解析

培養液に超音波照射しているときの様子を造影超音波モードの画面で観察すると、培養液内にマイクロバブルの共振・破壊による点状高エコーが均一に認められた (図1・矢印)。また、plate 底面にある細胞群は淡い高エコーとして描出され (図1・矢頭)、細胞表面近傍にもマイクロバブルが存在し、sonoporation が可能な状態になっていることを確認した。また、図1の如く、低音圧 (MI 0.3) より高音圧 (MI 1.0) で超音波を照射した方がマイクロバブルの造影効果が良好であった。

図1 Sonazoid を付加した培養肝癌細胞株の超音波照射

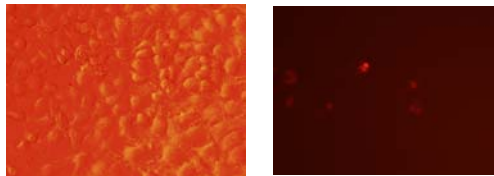


低音圧 (MI 0.3)

高音圧 (MI 1.0)

次に、超音波照射後に蛍光顕微鏡で観察すると、PI が導入された細胞は図2のように蛍光観察で赤色蛍光として認められた。

図2 超音波照射した培養肝癌細胞株の蛍光顕微鏡観察 (×200)

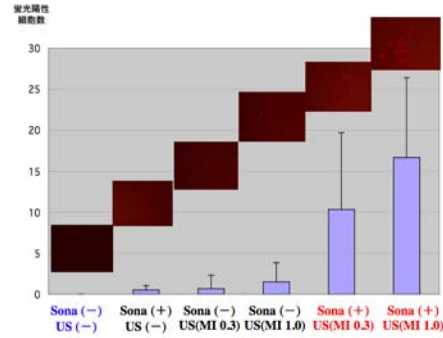


通常観察

蛍光観察

そこで、200 倍の倍率で通常観察と蛍光観察で対比しながら、1plate あたり 6 箇所領域を観察し、1 視野における蛍光陽性細胞数をカウントして、各群における 1 視野平均陽性細胞数を算出した。その結果、コントロールの PI 単独投与・超音波 (US) 未照射群は 0、PI+Sonazoid 投与・US 未照射群は 0.5、PI 単独投与・US 照射 (MI 0.3) 群は 0.7、PI 単独投与・US 照射 (MI 1.0) 群は 1.5 であったのに対し、最も効率よく sonoporation 効果があると考えられる PI+Sonazoid 投与・US 照射群では、低音圧 (MI 0.3) 照射では 10.3、高音圧 (MI 1.0) 照射では 16.7 と有意に蛍光陽性細胞数が多かった ($p < 0.01$) (図3)。

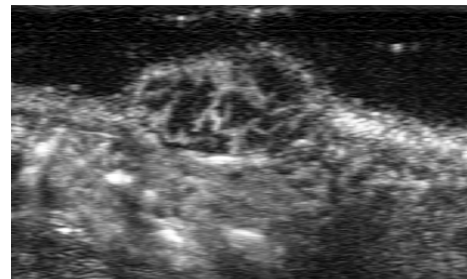
図3 培養肝癌細胞株の蛍光陽性細胞数



(2) 担癌マウスにおける造影超音波の至適条件の設定

癌細胞株皮下移植マウス 7 匹の腫瘍 7 結節 (平均最大腫瘍径 9.9 ± 1.0mm) と DEN 誘発肝発癌マウス 2 匹の腫瘍 4 結節 (平均最大腫瘍径 16.2 ± 6.4mm) に対し、Sonazoid を投与し造影超音波を施行した。造影ハーモニックモードにより、両マウス群とも腫瘍が造影された。(図4、図5)。

図4 癌細胞株皮下移植マウスの造影超音波

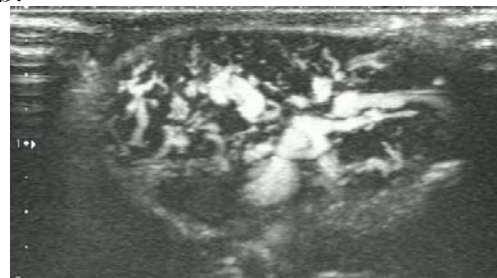


腫瘍血管像



腫瘍濃染像

図5 DEN 誘発肝発癌マウスの造影超音波



腫瘍血管像



腫瘍濃染像

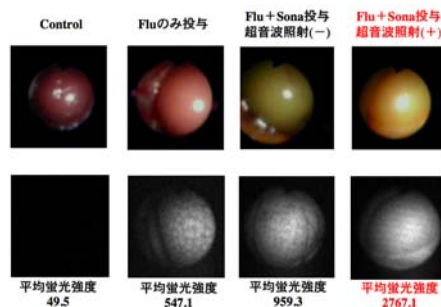
Sonazoidの投与量は、ヒト推奨投与量と等量、1/10、1/50、1/100、1/200量で検討した結果、1/200量(0.075 μ l/kg)で腫瘍血管、腫瘍濃染像が感度、分解能良く描出されたので、in vivo解析の基本投与量とした。また、超音波設定は音圧0.2~0.3、周波数10~14Mhzが至適条件と判定した。

(3)マウス肝臓における sonoporation 効果の蛍光腹腔鏡 (IEL) を用いた in vivo 解析

蛍光腹腔鏡画像の蛍光強度解析の結果、正常コントロール (PBS 投与のみ) マウスは平均蛍光強度 49.5、Fluorescence 単独投与マウスは 547.1、Sonazoid と Fluorescence 投与・超音波未照射マウスは 959.3 であったのに対し、Sonazoid と Fluorescence 投与・超音波照射マウスは 2767.1 と強い蛍光強度を認め (図 6)、マイクロバブルと超音波の sonoporation 効果により、肝細胞への Fluorescence 導入が向上したと考えられた。

以上の検討より、in vitro, in vivo いずれの実験系においても、超音波造影剤のマイクロバブル存在下の超音波照射により、最も蛍光色素の細胞内導入効率が高く、sonoporation 効果によると考えられた。この、sonoporation による薬剤導入は、通常臨床で使用される超音波診断用装置、超音波プローブ、超音波造影剤を用いて可能で

図 6 蛍光腹腔鏡による肝臓の蛍光強度解析 (上段:通常内視鏡画像、下段:蛍光画像)



あることが明らかになった。本研究による基礎的知見をもとに、今後、sonoporation 効果による抗癌剤の肝癌細胞内への導入とそれによる抗腫瘍効果を検討する予定である。進行肝癌を灌流する血流はほとんどが動脈性血流であり、マイクロバブル投与後早期の動脈相においては、マイクロバブルは肝癌のみに多く取り込まれることより、マイクロバブルと抗癌剤を投与後に癌部のみを超音波照射することにより癌細胞への sonoporation 効果が増強し、より選択的に癌細胞内に抗癌剤を注入することが可能と考えられる。さらに、sonoporation により生じた細胞膜の小孔は、超音波照射を中断すれば修復される一過性、可逆性のものであるため (J Med Ultrasonics 32:3-11, 2005)、超音波照射を繰り返すことにより癌細胞内への抗癌剤集積が高まる可能性がある。本研究が臨床応用されれば、低侵襲で、癌部位に特異的に強い抗腫瘍効果をもたらし、しかも非腫瘍部のダメージが少ない、理想的な肝癌の target therapy が施行できるようになると考えられる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- 1, 鈴木康秋, 大竹孝明, 高後裕, 他. Sonazoid造影超音波を併用した肝癌の局所療法. 第 16 回日本消化器病関連学会週間 (JDDW), 東京, 平成 20 年 10 月 2 日
- 2, 鈴木康秋, 大竹孝明, 高後裕, 他. 肝細胞癌診断体系における造影超音波の有用性. 第 81 回日本超音波医学会学術集会, 神戸, 平成 20 年 5 月 24 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 康秋 (SUZUKI YASUAKI)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号: 6 0 3 6 0 9 8 9

(2) 研究分担者

大竹 孝明 (OHTAKE TAKAAKI)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号: 1 0 3 5 9 4 9 0

(3) 連携研究者

無し