

平成21年 5月29日現在

研究種目：基礎研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18500392

研究課題名（和文） 超音波とマイクロバブル動注療法を併用した癌性腹膜炎への効果

研究課題名（英文）

Effect of ultrasound on peritonitis carcinomatosa with intravascular microbubble

研究代表者

内田 俊毅（UCHIDA TOSHIKI）

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：00330910

研究成果の概要：マイクロバブル併用療法が超音波化学療法の作用増強を認めなかった事より、癌細胞周囲の血管内のキャビテーション(バブルの崩壊)が、超音波化学療法に影響していなかった事が判明した。これにより、超音波化学療法の殺細胞効果のメカニズムは細胞内でのキャビテーションの発生による事が示唆されたため、より細胞内でキャビテーションが発生し易いと思われる低周波の超音波照射を施行した所、癌移植マウスで飛躍的に治療効果を高める事ができた。さらに電子顕微鏡で、癌細胞内のミトコンドリアが特異的に破壊される事実を発見した事で、今後、癌治療に新しい道を開くものと思われる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	600,000	4,200,000

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、癌治療、マイクロバブル

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 背景：近年、超音波技術を用いて、効率的に遺伝子導入を試みる研究が発展してきた。また、超音波を集中的に照射し、癌患部の局所温度を高温にすることによって治療効果を得る、強力集束超音波治療（High Intensity Focused Ultrasound Therapy; HIFU）も既に実用化されている。しかし、超音波エネルギーを用いて光感受性物質であるヘマトポルフィリン誘導体を励起させ、癌細胞を破壊するという方法は、未だ実験段階にある。我々は、以前より、非温熱領域で

の超音波の癌治療の有用性について研究してきた。胃癌、白血病細胞などの *in vitro* の実験において、癌細胞表面に微小な孔が多数あいていることを発見し、Lancet 等 {Ogawa K, Tachibana K, Uchida T, et al. High-resolution scanning electron microscopic evaluation of cell-membrane porosity by ultrasound. Med Electron Microsc 34: 249-253(2001)、Tachibana K, Uchida T, Ogawa K, et al. Induction of cell-membrane porosity by ultrasound. Lancet. 353: 1409 (1999)、Tachibana K,

**Uchida T**, et al. Eliminating adult T-cell leukaemia cells by ultrasound. **Lancet**. 349: 325 (1997)、**Uchida T, Tachibana K**, et al. Elimination of Adult T-cell Leukemia Cells by Ultrasound in the Presence of Porfimer Sodium. **Anticancer drugs**. 8 : 329-335(1997)、**内田俊毅, 立花克郎**, 他、成人T細胞白血病細胞に対するポルフィマーナトリウムを用いた音響化学療法の効果. **超音波医学**. 23 : 663-668(1996) : **菊池賞受賞** }の学術誌に発表してきた。さらに、白血病移植マウスを用いた *in vivo* の実験によって、超音波化学療法の有用性 { **内田俊毅, 立花克郎**, 他、白血病移植マウスにおける Porfimer Sodium の音響化学療法の有用性. **J med Ultrasonics**. 32(3): 323-327(2005) } を報告した。また遺伝子導入の分野では、超音波にマイクロバブルを併用する事によってマイクロバブルが容易にキャビテーションを誘発し、遺伝子導入高率が高まる事を報告した { **Tachibana K(7) An efficient gene transfer method mediated by ultrasound and microbubbles into the kidney. J Gene Med**. 7: 108-116(2005)、**Tachibana K**. Emerging technologies in therapeutic ultrasound: thermal ablation to gene delivery. **Hum Cell**. 17:7-15(2004)、**Tachibana K(2) Local delivery of Plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. Circulation** 105: 1233-1239 (2002)、**Tachibana K(2) Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. Gene Therapy** . 9:372-380(2002)}。さらに、次々と種々のマイクロバブルの開発が行われ、我々はその有用性を考える上で、超音波の殺細胞効果を増強する可能性も期待していたが、体系的にマイクロバブルの併用療法についてチャレンジした実験は誰も行っていなかった。

(2) 動機 : 当時、光感受性物質に超音波を併用して、どのレベルで光感受性物質が励起され、どのように殺細胞されるのか、そのメカニズムは全く不明であった。そのため超音波の照射条件については無限の組み合わせが考えられ、最も効率的な条件を設定するためには膨大な時間と労力が必要とされた。そのため条件を科学的に絞り込むには、そのメカニズムを解明することが急務であった。さらに、開発されつつあったマイクロバブルの超音波化学療法に対する増強作用の有無についての研究もほとんど行われておらず、我々実験グループは、これらの命題を解決する事によって、癌治療が飛躍的に発展するのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

胃癌、大腸癌の腹膜播種した病態に対する治療法は、白血病細胞のように抗癌剤に感受性が高い癌とは異なり、化学療法を行っても寛解状態へ持って行くことは不可能である。また患者の全身状態は、強力な化学療法に耐えられる状態にないのが現状で、従来の積極的な治療法はかえって死期を早めてしまう。

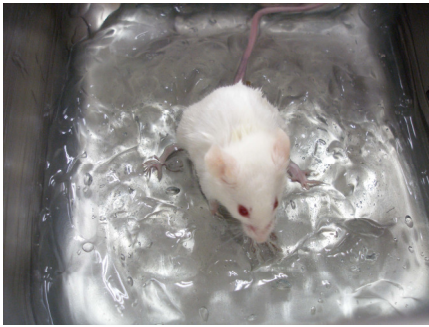
私たちは、動物実験において、局所、及び全身的に超音波を照射する方法に、マイクロバブルの動脈内持続注入を同時に行い、飛躍的に癌細胞に対する殺細胞効果を上げようという今まで癌治療の分野では誰も行ったことのない独創的な研究を目的とした。しかも使用する超音波は低エネルギーで無害であり、尚且つ、光感受性物質やマイクロバブルは人体に低侵襲、及び無害な薬物で、癌の患者に対して非常に負担が少ない。

これらの実験によって、将来、救命不可能と思われた癌性腹膜炎を呈するような末期癌患者に対して、抗がん剤を使用しない「骨髄抑制のない、負担の少ない」今までは異なる全く新しい治療法として、臨床応用への道を開くものと思われ、さらに、超音波化学療法メカニズムを解明し、より高率的な超音波の照射条件を導き出す事を目的とした。

## 3. 研究の方法

MKN45 (胃癌)、DLD-1 (大腸癌)、Colon-26 (大腸癌)の細胞株、ソナゾイド(Sonazoid、超音波診断用造影剤、第一三共)、SV-25 (超音波用マイクロバブル、研究用、ネッパジン)のマイクロバブル、フォトフィリン {Porfimer Sodium ; Photofrin (Pf)、ワイズ)、ビスダイン (Verteporfin ; Visudyne、ノバルティス ファーマ)の光感受性物質を用いて *in vitro* 実験を行い、最も効果的と思われた大腸癌の細胞株 Colon-26 とフォトフィリン、ソナゾイドでの組み合わせで *in vivo* 実験を行った。マウス (BALB/c、6 週齢、メス) の腹腔内に Colon-26 を 0.5ml (細胞数  $1 \times 10^6$ /body) 注入し、その移植 4 日後に、5%ブドウ糖液 0.5ml、フォトフィリン 0.5ml (5%ブドウ糖液で希釈、 $100 \mu\text{g}/\text{body}$ ) を腹腔内へ投与した。癌組織以外の正常組織からフォトフィリンが wash out される 48 時間後、腹腔内にカテーテルを留置し、超音波ゲル (ソノゼリー、TOSHIBA、脱気水で希釈) を入れた超音波槽 (15 × 15 × 10 cm、BRANSON 1210、BRANSON 社、USA、周波数 47 kHz、超音波強度  $5 \times 10^4$  Pa) の中へエーテル麻酔をしたマウスを入れ、超音波を 4 分間連続照射した。同時に、生理的食塩水 0.5ml、ソナゾイド 0.5ml をポンプで 4 分間、腹腔内へ持続注入した。

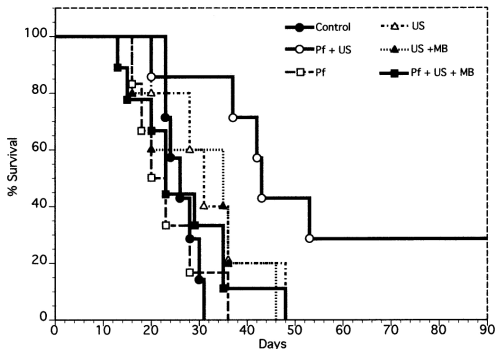
超音波槽内のマウス



マウスの照射後の生存率を確認し、また、超音波照射直後に解剖して、正常組織、癌組織の細胞内部構造の変化を透過電子顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果

(1) Colon-26 移植マウスの各治療における生存期間：



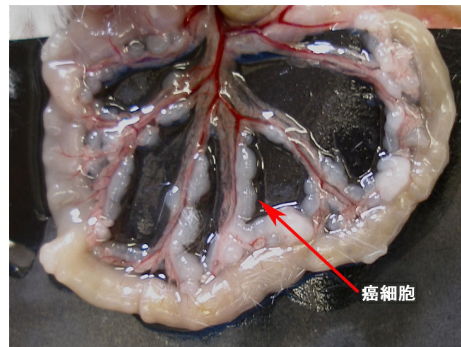
各群の平均生存日数は、コントロール群 (Control)、Pf 単独投与群 (Pf)、超音波単独照射群 (US)、マイクロバブル単独投与群 (MB)、Pf+超音波照射群 (Pf+US)、Pf+マイクロバブル投与群 (Pf+MB)、超音波+マイクロバブル投与群 (US+MB)、Pf+超音波+マイクロバブル併用群 (Pf+US+MB) で、それぞれ  $26.0 \pm 1.5$  日、 $23.5 \pm 3.0$  日、 $32.6 \pm 4.6$  日、 $24.6 \pm 2.4$  日、 $58.3 \pm 13.0$  日、 $28.8 \pm 6.4$  日、 $30.6 \pm 5.5$  日、 $26.8 \pm 3.7$  日であった。コントロール群と Pf+超音波照射群の生存期間は、有意水準 0.01 で有意差を認めた。(Logrank 検定、 $P < 0.01$ )。その他の群はすべて、コントロール群との間に有意差を認めなかった。

(2) Colon-26 の癌性腹膜炎を呈したマウスに対するフォトフィリン投与+低周波超音波照射における癌細胞の変化を透過電子顕微鏡で観察：

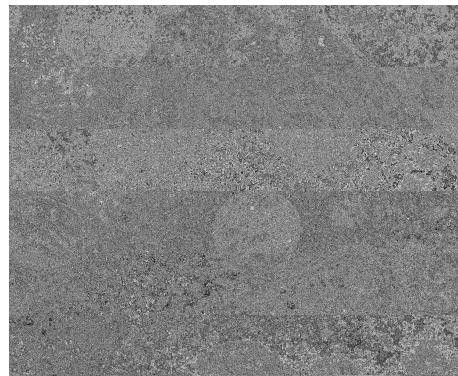
透過電子顕微鏡写真では、フォトフィリン+超音波群で、癌細胞内のほとんどのミトコンドリアが特異的に破壊されているのが観察された。しかし、その他の群の腸間膜・腹膜・脾臓の転移細胞、及び、正常のリンパ組織、脾臓組織では、ミトコンドリアを含めた

細胞内微細構造にはまったく変化は見られなかった。

腸間膜の癌細胞 (Colon-26 / Control)



未治療群のマウス腸間膜の癌細胞内ミトコンドリア (Colon-26 / Control)



超音波化学療法後のマウス腸間膜の癌細胞内ミトコンドリア破壊像 (Colon-26 / Pf+US)



#### 【考察】

当初、診断用超音波プローブを用いて、モニタリングと超音波照射治療を同時に行ったが、マウスのパイロット実験で、診断用超音波プローブを最大強度にしてもコントロール群と比較して生存率の延命効果を得られなかったため、超音波モニタリングと超音波照射装置を分離して実験した。またマイクロバブル投与方法について、腹部大動脈への

投与、及び尾静脈への投与を行ったが、パイロット実験で同様にマウスの生存率の延命効果を全く得られず、さらに、血管系への持続注入の困難さによって、統計上の精度を上げることができなかつたため、最終的にマイクロバブルの腹腔内持続投与の効果を検討した。

超音波によってキャビテーションが発生し、細胞に影響していることは、以前より *in vitro* での細胞表面の変化 (Induction of Cell-membrane Porosity by Ultrasound. Lancet 1999; 353: 1409, その他) などで、我々は報告してきた。また、超音波の殺細胞効果の *in vitro* 及び *in vivo* の効果についても報告してきた。今回、マイクロバブルを併用して超音波化学療法が増強されるのか、そして、実際にモニタリングして、超音波が生体内でどう作用しているかを確認した。

癌周囲の栄養血管内で、マイクロバブルによってキャビテーションが発生し、癌の栄養血管を破壊して兵糧攻めにするのではないかと、または直接、血管内で発生したキャビテーションのエネルギーが、近傍の癌細胞へ作用して超音波化学療法の作用増強を引き起こすのではないかと当初、予想していた。しかし、マイクロバブルの腹部大動脈、尾静脈、及び腹腔内投与群ではすべて、フォトフィリン+超音波照射群でみられた延命効果は増強されず、未治療群 (コントロール群) と同じ生存期間であった。この事は、超音波化学療法に対してマイクロバブル投与が抑制的に作用していると考えられ、全く逆の結果を示した。これとは対照的にマイクロバブルを使用せず、超音波のみによってフォトフィリンを励起した場合のマウスは明らかに延命しており、超音波がどのように生体内の癌細胞へ作用しているのか、さらなる考察を必要とした。

溶媒内での *in vitro* の超音波照射実験では、細胞周囲の溶媒中にキャビテーションが容易に発生するが、マイクロバブルの添加によってキャビテーションの発生はさらに増大し、超音波化学療法の殺細胞効果は増強した。この事は、マイクロバブルがキャビテーションの核となり、結果的に殺細胞効果を増強したと思われる。では、組織内ではどうなるのか。

実験結果より、マイクロバブル投与によって栄養血管内に発生したキャビテーションの効果は、癌細胞に全く影響していなかった。逆に血管内に、マイクロバブルによってキャビテーションが容易に発生する事で、超音波エネルギーが吸収され、いわゆるブラインド効果によって、癌組織への超音波照射の効率の悪化を呈し、超音波化学療法を阻害したと思われる。この事は、血管を中心とするキャビテーションが、フォトフィリンの励起のメ

カニズムに関与していない事を意味すると思われる。しかし、癌組織に超音波が作用しているのは明らかで、血管以外に組織内に容易にキャビテーションを発生するような要素 (溶媒の場所) は存在しないと思われるが、これをどう考えるのか。周囲と接する癌表面にキャビテーションの発生する要素がなければ、細胞内に超音波が影響していると考えるのが妥当であり、細胞に直接、超音波エネルギーが作用し、細胞質内にキャビテーションが発生しているのではないかと考えた。

マウスの胃癌細胞の *in vivo* 実験において、今回、最終的に使用した 47 kHz の超音波より高い周波数である 1 MHz の周波数の超音波を使った実験では、超音波化学療法の生存期間に有意差を認めなかった。この事は、培養液よりも粘性度の高い細胞質内では、以前より使用していた 450kHz~1MHz の超音波周波数よりもさらに低周波の超音波の方が、細胞内にフォトフィリンを励起させる効果的なサイズのキャビテーションを発生させやすいのではないかと推論し、47 kHz の周波数帯の発生器を使用した。

Colon-26 を用いた今回の *in vivo* 実験では、フォトフィリン+超音波照射群で、コントロール群と比較して有意に延命・治癒し、尚且つ、透過電子顕微鏡では、癌細胞のミトコンドリアが特異的に破壊されていた。

元来、ミトコンドリア内ではポルフィリンの産生と関連しており、ヘマトポルフィリン誘導体であるフォトフィリンは、癌細胞のミトコンドリアに特異的に結合すると言われている。今回の比較的low周波の超音波では、細胞内、またはミトコンドリア内にキャビテーションを引き起こし、ミトコンドリアに集積したフォトフィリンを励起して殺細胞したと考えられる。ミトコンドリアに超音波が特異的に作用している事より、エネルギー産生のあるミトコンドリアを破壊する事によって細胞死を引き起こす可能性が示唆され、アポトーシス、またはネクローシス、またはともに引き起こしている可能性が高いと思われる。ミトコンドリアはアポトーシスの調節にも深く関与しており、Bax や Bcl-2 などに影響し、cytochrome C の放出や、Caspase 3 産生に影響している可能性が示唆された。またミトコンドリアを完全に破壊せず、部分的な破壊でも、容易にアポトーシスの pathway に影響を与えている可能性も示唆され、現在、追加実験を行っているところで、今後、学術誌に発表予定である。

#### 【内外における位置づけとインパクト】

我々のグループの研究は、国際的にも、マイクロバブル、超音波遺伝子導入療法の分野で最先端に位置している。また超音波癌治療技術領域では、元来、超音波化学療法は、日

本独自に発展してきた分野である。しかし現在、抗癌剤などを併用しない非温熱領域の低強度の超音波化学療法は、我々のグループ以外ほとんど実験されていない。またさらに、今回のマイクロバブルの効果や、低周波の超音波照射の効果、及びそのメカニズムについての実験結果は、世界で初めての報告となり、今後、新しい癌の治療法となる事が期待される。今まで治療不可能とされた病態に対して有効な手立てとなると考えられるため、癌治療の分野に与えるインパクトは、非常に大きいと言える。

#### 【今後の展望】

癌細胞のエネルギー産生場であり、アポトーシスの調整と深く関わるミトコンドリアを、特異的に破壊でき、殺細胞できたという事、及び、組織浸透度の高い超音波を用いる事によって広範囲に十分照射できる事、またマウスの実験では、癌性腹膜炎が完全に治癒しているマウスもみられた事より、臨床的には、大腸癌に限らず、膵臓癌、胃癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌など、癌性腹膜炎を呈した多くの末期の癌患者に対して、十分治癒を期待できると思われる。また、超音波照射装置は、重粒子線などの機器と比較にならない程安価に作製可能で、さらに不規則に動く消化管や全身疾患である白血病など、広範囲な病巣にも効果を発揮し、さらに、副作用もない事より、今後の臨床試験が期待される。

#### 【まとめ】

当初の目的であったマイクロバブルの超音波化学療法の増強作用を認める事はできなかったが、そのネガティブデータより、超音波による殺細胞のメカニズムが解明され、比較的low周波の超音波照射を用いる事で、癌細胞内のミトコンドリアを特異的に破壊でき、飛躍的に超音波化学療法の効果を高める事ができた。これらの実験結果より、今後の癌治療に新しい道を開くものと思われる。

#### 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)

##### 〔雑誌論文〕(計3件)

- ① Hassan MA, Feril LB Jr, Suzuki K, Kudo N, Tachibana K, Kondo T, Evaluation and comparison of three novel microbubbles: Enhancement of ultrasound-induced cell death and free radicals production, *Ultrason Sonochem.*, 16(3), 372-378, 2008、査読有
- ② 立花克郎、フェリルロリト、壇辻百合香、*Sonodynamic Therapy, Ultrasonic.*, 48(4)、253-259、2008、査読有
- ③ 小川皓一、*Electron microscopy*、

*Philippine Physics Journal*, 29, 80-89、2007、査読有

##### 〔学会発表〕(計3件)

- ① 立花克郎、マイクロバブルの治療への応用、第10回国際造影超音波シンポジウム、2008.12.13、東京
- ② 立花克郎、超音波の治療への応用—再生医療から癌治療まで—、日本皮膚科学会第340回福岡地方会、2007.3.10、福岡
- ③ 立花克郎、超音波の治療応用—新しいがん治療への利用法—、日本放射線影響学会第49回大会、2006.9.6、札幌

##### 〔図書〕(計1件)

- ① 立花克郎、放射線医科学—生体と放射線・電磁波・超音波—超音波による治療、学会出版センター、139-140、2007

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

内田 俊毅 (UCHIDA TOSHIKI)  
福岡大学・医学部・助教  
研究者番号：00330910

##### (2) 研究分担者

立花 克郎 (TACHIBANA KATSURO)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号：40271605  
小川 皓一 (OGAWA KOICHI)  
福岡大学・医学部・准教授  
研究者番号：60078780