

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08624

研究課題名（和文）消化管腹膜播種に対するレーザー光線を用いた新規光線照射装置の開発

研究課題名（英文）Development of irradiation equipment using laser beam for the dissemination of gastrointestinal carcinoma

研究代表者

白下 英史（Shiroshita, Hidefumi）

大分大学・医学部・講師

研究者番号：50596955

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）：本研究の目的は、難治性の胃癌腹膜播種病変に対するレーザー光線照射を用いた新規治療法を開発することである。まず、レーザー光での5-ALAを用いた光線照射の抗腫瘍効果および至適照射量を明らかにした。次に、胃癌細胞株であるNUGC-4、MKN45に対するレーザー光およびパルスレーザーでの5-ALAを用いた光線照射の抗腫瘍効果および至適照射量を明らかにした。さらに、ルスレーザーを拡散照射させるガルバノミラーシステムを用い、抗腫瘍効果を確認した。また、レオウイルスにKillerRedを導入したウイルスを作成し、胃癌細胞株NUGC-4に対しての感染の成立および蛍光発現を確認し、殺細胞効果を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹膜播種は癌の播種結節が腹腔内に広範囲に広がった状態であり、胃癌の転移形式のうち最も頻度が高く、予後不良である。病巣すべてを肉眼的に同定することは難しく、通常抗癌剤治療が行われるが、十分な効果がある治療法は確立されていない。光線療法では光の“拡散”という特性を活かし、腹膜播種という広範囲で全てを肉眼的に同定することが難しい病変に対しても効果的である。近年、LED光線を用いた光線力学療法が報告されるようになってきたが、抗腫瘍効果は十分とはいえない。新しい光線力学療法が確立すれば、腹膜播種に対する治療が増え、さらに内視鏡で使用できれば低侵襲治療が格段に発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to develop a new therapy using the laser beam radiation for peritoneum dissemination of gastric cancer.

At first we determined antitumor effect of the rays radiation using 5-ALA by the laser beam and an optimal exposure dose.

Then, we determined antitumor effect and an optimum exposure dose of the rays radiation of laser beam and pulse laser using 5-ALA for NUGC-4 and MKN45 which were gastric cancer cell line.

Furthermore, using Galvano mirror system which made pulse laser irradiated spread, we confirmed antitumor effect. Also, we made the virus which introduced KillerRed into reovirus and confirmed establishment of the infection for gastric cancer cell line NUGC-4 and onset of fluorescence and determined cytotoxicity reaction.

研究分野：消化器外科

キーワード：腹膜播種 光線療法 レーザー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腹膜播種は癌の播種結節が腹腔内に広範囲に広がった状態であり、胃癌の転移形式のうち最も頻度が高く、予後不良である。病巣すべてを肉眼的に同定することは難しく、通常抗癌剤治療が行われるが、十分な効果がある治療法は確立されていない。近年、光感受性物質 (ALA; アミノレブリン酸) を投与したうえで LED 光線照射 (励起波長 405nm) をすると、腫瘍組織の蛍光観察 (蛍光波長 640nm) が可能になる光線力学診断 (ALA-PDD) が報告されている。さらに、光線力学療法 (ALA-PDT) が、消化管癌に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されている (Hino H, *et al.* J Surg Res 2013)。光線療法では光の“拡散”という特性を活かし、腹膜播種という広範囲で全てを肉眼的に同定することが難しい病変に対しても効果的である。しかしながらこれら LED を用いた光線照射では腫瘍組織の蛍光観察は可能であるものの、光線治療での抗腫瘍効果は十分とはいえない。一方レーザー光線照射は食道癌や脳腫瘍に対して臨床応用がはじまったものの、レーザー光線の直進性から比較的小範囲の病巣に対する治療としてのみ使用されている (丸山ら, Jpn J Neurosurg 2016)。LED は安価であるものの、単波長ではないため、単波長のレーザーの方がより効率良く ALA-PDT を行うことができる。また、レーザー光線は直進性が強く、エネルギーも大きく、腹腔鏡や内視鏡などのような細いファイバーに应用する場合には有利である。さらにレーザー光線を広範囲に拡散できれば腹膜播種などの広範囲の病巣に対する治療が可能となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、レーザー光線照射による胃癌腹膜播種病変に対する新規治療法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) 消化管癌に対する LED 光線と比較したレーザー光線療法効果の評価

in vitro における、蛍光観察と照射量ごとの抗腫瘍効果の確認。

in vivo における、蛍光観察と抗腫瘍効果の確認。

(2) 腹膜播種に対するレーザー光線療法の治療効果の評価

腹膜播種モデルマウスを用いて腹腔鏡手術を想定した形で、気腹下に腹腔内へ光線を照射し、蛍光観察と抗腫瘍効果を発揮するかを明らかにする。

(3) レーザー光をより広範囲照射する拡散能を有するファイバーの開発

ファイバーの先端構造にレーザー光を拡散させる工夫をする。

4. 研究成果

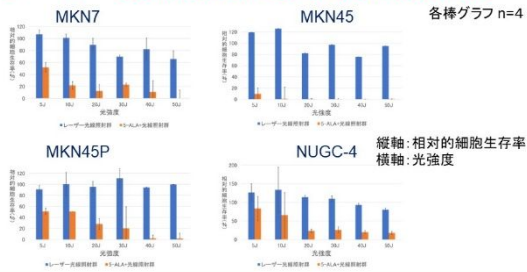
まず、in vitro 実験における ALA-PDD/PDT の抗腫瘍効果および至適照射量を決定した。

具体的には、レーザー (単光子 637nm、2 光子 1036nm) と 5-ALA を用いて複数の胃癌細胞株の殺細胞効果を in vitro で検討した。MKN45P、MKN7 に対して PDT (672nm+5ALA)、50J/cm² にて 95% 以上の殺細胞効果を得られた。

つぎに、in vitro 実験における MKN45、NUGC-4 の ALA-PDD/PDT の抗腫瘍効果および至適照射量を決定した。具体的には、レーザー (単光子 637nm、2 光子 1036nm) と 5-ALA を用いて複数の胃癌細胞株の殺細胞効果を in vitro で検討した。MKN45、NUGC-4 に対して PDT (672nm+5ALA)、50J/cm² にて 95% 以上の殺細胞効果を得られた。2 光子に関してはレーザー装置の作成及び照射装置を作成し、レーザー照射を行った。照射範囲が狭いために、効果判定が困難であったが拡散装置にて改善が見込めた。さらに、抗腫瘍効果を期待して細胞への 5-ALA の集積をあげるため、レオウイルスによる siRNA の細胞への輸送及び DDS の利用の準備段階として KillerRed のベクターを購入し、大腸菌によって増幅し、レオウイルスに KillerRed を導入したウイルスを作成し、胃癌細胞株 NUGC-4 に対して感染の成立および蛍光発現を確認し、殺細胞効果について明らかにした。

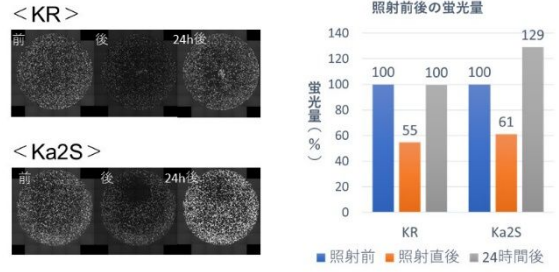
また、パルスレーザーをより広い範囲に照射するため、ガルバノミラーシステムを使用、より抗腫瘍効果があることを確認した。

レーザー光線照射による殺細胞効果



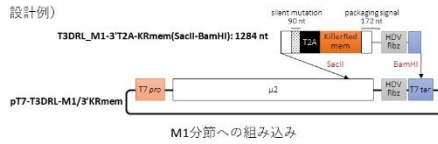
各細胞株ともに光強度依存性に殺細胞効果が上昇した。細胞株によって殺細胞効果に違いがあった。

KR(Killer Red)遺伝子組み換えウイルスを用いたレーザー光線照射による殺細胞効果



照射直後にKR・Ka2Sともに蛍光量が減少し、24時間後は増加した。

レオウイルスへのKR遺伝子への組み込み



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Y. Shirasaka, Y. Oshima, T. Inoue, Y. Maeda, T. Hiratsuka, T. Akagi, K. Suzuki, T. Shibata, Y. Ueda, M. Tojigamori, H. Shiroshita, T. Etoh, N. Shiraishi, and M. Inomata
2. 発表標題 Development of photodynamic diagnosis and therapy for peritoneal dissemination using NIR fiber laser system
3. 学会等名 SPIE Photonics West (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白坂 美哲, 大嶋 佑介, 井上 高教, 前田 康大, 平塚 孝宏, 赤木 智徳, 鈴木 浩輔, 柴田 智隆, 上田 貴威, 當寺ヶ盛 学, 白下 英史, 衛藤 剛, 白石 憲男, 猪股 雅史
2. 発表標題 がん腹膜播種に対する光線力学診断および治療法の開発
3. 学会等名 レーザー学会 第536回研究会「フォトニクス・ワークショップ in九州～別府～」
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	猪股 雅史 (Inomata Masafumi) (60315330)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	藤島 紀 (Fujishima Hajime) (70733624)	大分大学・医学部・客員研究員 (17501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平塚 孝宏 (Hiratsuka Takahiro) (20600886)	大分大学・医学部・客員研究員 (17501)	
研究分担者	衛藤 剛 (Etoh Tsuyoshi) (00404369)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	
研究分担者	井上 高教 (Inoue Takanori) (40243969)	大分大学・理工学部・教授 (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関