

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591933
 研究課題名（和文） 生体顕微鏡による癌微小血管の内皮特性とリポソーム薬剤送達システム構築の基礎的研究
 研究課題名（英文） The study of drug delivery system at tumor microcirculation in vivo

研究代表者
 片山 富博 (KATAYAMA TOMIHIRO)
 愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：90304625

研究成果の概要：

当初の予定では、癌微小循環を観察し薬剤伝達システムの検討およびその効果を調べる予定であった。しかし、免疫不全マウスに、癌細胞を移植し、その部分を生体顕微鏡にて観察しようとしたが、感染などの問題により観察することが困難となった。そこで、ラットを用いた子宮内膜自家移植による子宮内膜症の微小循環を観察し、その病態を検討した。今後、クリーンルームを用いることにより、この技術を用いて癌微小循環を検討したい。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野： 医歯薬学
 科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・産婦人科学
 キーワード： 微小循環、血管新生、子宮内膜症

1. 研究開始当初の背景

癌の化学療法の歴史は大変古く、ローマ時代から草根や木皮を用いて悪性腫瘍を治療しようとした試みなどが記載されている。しかし、現在の化学療法の基礎が始まったのは第 1 次世界大戦時使用された毒ガス「イペリット」といわれている。その後類似化合物の研究が行われた結果、nitrogen mustard (NH₂) が合成された。NH₂ は白血病やリンパ腫に有効なことが報告され、以後急速に癌化学療法が発展していった。21 世紀に入り癌化学療法は遺伝子治療に代表されるように大きな変化を迎えようとしている。しかし、抗癌化学療法

がしばらく中心であることに異論がないところである。1990 年代に入り多くの抗癌化学療法剤が登場し、現在多くの癌腫に対して世界中で大規模臨床試験が行われている。

抗癌化学療法を考える場合に最も重要となってくるのが、癌の標的化、すなわち腫瘍細胞だけを周囲の正常細胞とどうやって区別するかという課題、また、他の感受性の高い組織（骨髄、腎臓等）への障害をどうやって低下させ副作用を軽減させるかという課題である。現在の抗癌化学療法は、主として抗癌剤そのものを経静脈的に投与し、その一部が腫瘍内に取り込まれ効果を発揮すると

いうものであり、同様に全身の種々の正常細胞にも取り込まれてしまう。婦人科領域においては、子宮頸癌に対して抗癌剤の局所での血中濃度を上昇させるために子宮動脈或いは内腸骨動脈より抗癌剤を投与する方法も行われているが、正常細胞の殺傷効果や副作用に関しては全身への経静脈内投与と同様と考えられている。以上のような背景のもと、薬剤送達システム (drug delivery system: DDS) の研究が癌治療の分野においても精力的に行われている。DDS とは薬剤を適切な量、適切な時間、適切な部位に送達しようとする技術である。この DDS 技術を用いることで、薬物の治療効果を最大限に発揮するとともに副作用を抑えることが可能となる。

DDS の一つの方法として申請者らは、リポソームを候補に挙げている。生体膜の主成分であるリン脂質より構成される閉鎖小胞であるリポソームは、その生体適合性の高さから古くより薬物運搬体として研究されてきた。癌治療の分野においても抗癌剤をリポソームに封入することで各種酵素からの分解を回避する、もしくは生体内動態を制御することが試みられている。申請者らは、リポソームに癌細胞特異的抗体を結合させることで、癌細胞に抗癌剤を送達しようとするアプローチを目的としている。加えて、蛍光生体顕微鏡を用いて腫瘍内の血管を流れる癌細胞特異的抗体結合リポソームの動態を *in vivo* にて観察し、腫瘍血管内皮とリポソームの接着反応並びにリポソームの腫瘍細胞内への取り込みについて検討する予定であった。

2. 研究の目的

ヒト悪性細胞を免疫不全マウスに移植し、その血管新生を作成し生体顕微鏡に観察する予定であった。しかし、免疫不全マウスにての生体顕微鏡を用いた観察は、感染などの問題により技術的に困難を極めた。そこで、まず、Wistar rat を用いた子宮内膜症モデルの血管新生を観察し、この技術を用いて癌微小循環観察に応用しようと考えた。

子宮内膜症の発生に関して、月経時に剥離した子宮内膜組織片が卵管を逆流して骨盤腔に至り、腹膜や卵管に接着・着床することにより子宮内膜症が発症するという子宮内膜細胞の経卵管移植説が提唱されている。現在、腹膜中皮と子宮内膜細胞の接着因子、接着後の増殖因子に関する数多くの研究が精力的に行われている。

今回、皮膚微小循環の観察が可能な背側皮膚透明窓 (dorsal skinfold chamber: DSC) をラット背部に装着し、子宮内膜自家移植モ

デルを作成することにより、経時的に血管新生を起こす様子を観察した。

3. 研究の方法

実験動物

本研究の遂行にあたっては、愛媛大学動物実験規則を遵守して行った。実験は、手術の時点で8ないし9週齢に雌性 Wistar rat を用い、飼育中は個別のケージにて餌と水は自由摂取とした。実験期間中の飼育および全ての実験は、室温が $23 \pm 1^\circ\text{C}$ に制御されたバリア領域で行い、室内照射によって 12 時間毎の明暗調節を行った。

DSC の装着

DSC は 2 枚のフレームと固定用ビス、観察窓用カバーガラス、カバーガラスの留め具から構成される。装着手術に先立ち、pentobarbital (50 mg/kg, intramuscularly; i. m.) により、麻酔を施す。麻酔したラットの背側皮膚をバリカンおよび除毛クリームを用い除毛する。ラットの背側の皮膚をつまみ上げ、皮膚が適度に進展した状態で中央に直径 11 mm の観察窓のあるフレームをつまみ上げた皮膚の片側に装着する。フレームと接していない側の皮膚を直径 14 mm 程度の円形に切り取り、切り取った円形窓から残った側の皮膚の血管網を観察できるようにする。この際、皮膚の血管網の観察を容易にするために、円形窓部分の筋膜層を微小ピンセットなどを用いて取り除く。子宮内膜の自家移植はスミアにて発情前期を確認し、ラット左側腹部を切開し左子宮角より子宮組織を採取した。実体顕微鏡下に採取した子宮組織より内膜層を剥離し、約 0.3mm^2 サイズの切片とし、チャンバー透明窓内に 2 から 3 個移植しました。皮膚の上からさらに一枚のフレームを乗せ、皮膚をサンドイッチ状に挟むように重ねて、固定用ビスでフレームを固定する。最後

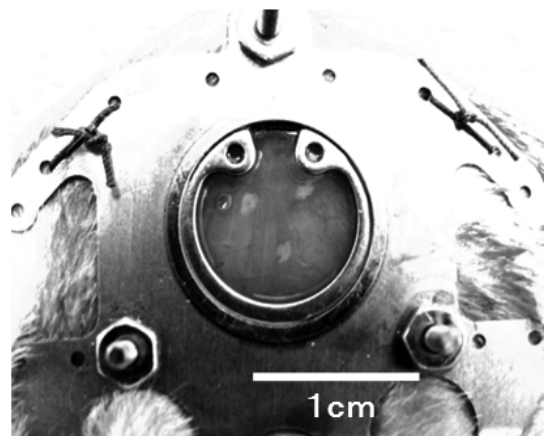


図1 Chamber 内子宮内膜移植部

に観察面にカバーガラスを乗せ、留め具で固定する。なお、DSC を装着したラットおよび chamber 内子宮内膜移植片を図 1 に示す。

リアルタイム微小循環観察システム

本システムは、画像取得部として、正立蛍光顕微鏡 (FN1、ニコン)、レーザー共焦点スキャナユニット (CSU X-1、横河電気)、及び顕微鏡用高感度ビデオカメラ (MC285SPD-LOB0、TI 社) から構成される。レーザー光源としては、ArKr レーザーを用いた。また、画像記録および解析ソフトとして、IPLab-Win (ソリューション社) を用いた (図 2, 3)。5%FITC-Dextran15 万単位 0.15ml を尾静脈から投与し、リアルタイム微小循環観察システムを用いて子宮内膜移植部位に発生する血管及び血流動態を、移植後 0、2、4、7、10、14 日目と経時的に観察した。

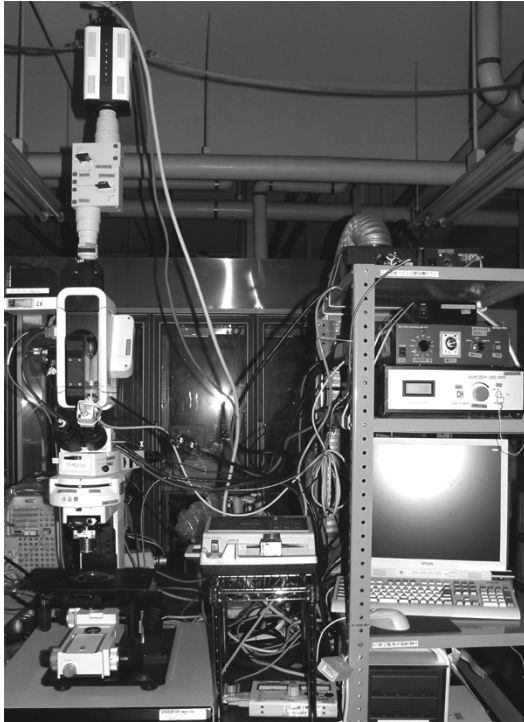


図 2 共焦点顕微鏡観察システム

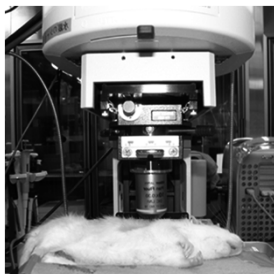


図 3
ラット背部観察図

4. 研究成果

血管新生の経時的变化を観察した。移植直後

は全く血管がなかった。移植後 2 日目にはやや太めの血管ができ始めてきた。さらに 4 日目には移植片を形どるようさらに血管が増えてきた。7 日目には移植片を覆うように細い血管が網の目のように覆った。

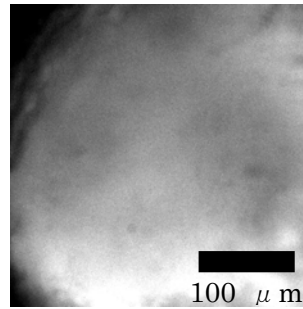


図 4
移植日の
微小循環像

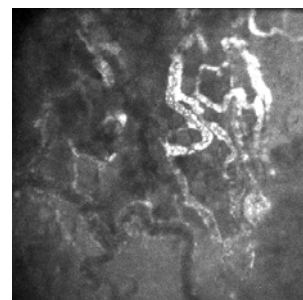


図 5
移植 2 日目の
微小循環像

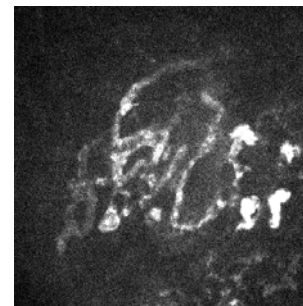


図 6
移植 4 日目の
微小循環像

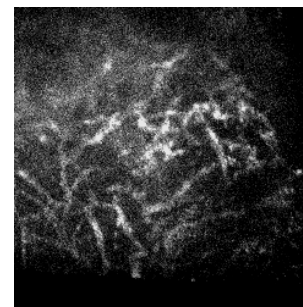


図 7
移植 7 日目の
微小循環像

血管新生が起こってくる area をについて、移植後 4 日目には約 67% の area に血管新生が生じ、7 日目には 92% の area が血管で覆われていた。血管密度も同様の所見であった。また、血管の発芽・進展などもみられた。

今後、子宮内膜症に対する各種薬剤の効果・

免疫不全動物を用いて病態形成検討を行う予定である。

加えて、当初の目的であった、癌微小循環の観察並びに薬剤投与時の微小循環の変化を検討していく予定である。

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 1 件)

In vivo visualization of nitric oxide and interactions among platelets, leukocytes, and endothelium following hemorrhagic shock and reperfusion.

Hiratsuka M, Katayama T, Uematsu K, Kiyomura M, Ito M.

Inflamm Res. In press. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

第 60 回日本産科婦人科学会 2008. 4. 14 横浜
虚血再灌流のラット微小循環に対する影響
と一酸化窒素(NO)の産生 平塚美枝, 片山
富博, 上松和彦, 草薙康城, 伊藤昌春

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 富博(KATAYAMA TOMIHIRO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90304625

(2) 研究分担者

伊藤 昌春(ITO MASAHARU)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10136731

(3) 連携研究者

なし