

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15971

研究課題名（和文）膀胱内ソノポレーションによる膀胱癌局所治療法の開発

研究課題名（英文）Ultrasound-assisted intravesical chemotherapy

研究代表者

佐々木 東（Sasaki, Noboru）

北海道大学・獣医学研究院・助教

研究者番号：00754532

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：膀胱癌の標準的治療の1つである抗がん剤の膀胱内注入療法の効果向上のために、超音波と小さな気泡を組み合わせた薬物送達（ドラッグデリバリー）法の開発を行っている。臨床応用に向けて、犬をモデルに、本研究の膀胱内ドラッグデリバリー法が安全性であるか、実際にどれくらい抗がん剤をデリバリーできるか検証した。正常犬においては、膀胱内に投与した抗がん剤は血液中からは検出されなかった、また膀胱粘膜に含まれる抗がん剤濃度がドラッグデリバリーによって増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、抗がん剤の膀胱内注入療法に超音波と小さな気泡によるドラッグデリバリー法を組み合わせても、抗がん剤による全身的な副作用を生じないことが示された。同時に、膀胱内に注入された抗がん剤がドラッグデリバリー法によって、より高濃度でがん組織に作用する可能性が示唆された。これらの結果から、超音波と小さな気泡によるドラッグデリバリー法は膀胱癌の標準治療の1つである抗がん剤の膀胱内注入療法の効果向上を安全に高める方法と証明できたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Intravesical chemotherapy after transurethral resection is a treatment option in patients with non-muscle invasive bladder cancer. The efficacy of intravesical chemotherapy is determined by cellular uptake of intravesical drugs. Therefore, drug delivery technologies in the urinary bladder are promising tools for enhancing the efficacy of intravesical chemotherapy. Ultrasound-triggered microbubbles cavitation may enhance the permeability of urothelium and thus may have a potential as a drug delivery technology in the urinary bladder. The aim of this preliminary safety study was to assess the systemic absorption of an intravesical drug that was delivered by ultrasound-triggered microbubble cavitation in the urinary bladder of normal dogs. The combination of ultrasound and microbubbles did not increase the plasma concentration of intravesical pirarubicin. Tissue pirarubicin concentration in the sonicated region was higher than that of the non-sonicated region in two of three dogs.

研究分野：超音波医学

キーワード：ソノポレーション 膀胱注入療法 ピラルピシン 非筋層浸潤膀胱癌 マイクロバブル 超音波

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

人の膀胱腫瘍は全世界で9番目に多い腫瘍であり、その70%は粘膜に局限する筋層非浸潤性膀胱癌である。治療法は内視鏡摘出術および術後の膀胱内BCG療法である。しかし5年再発率は50~70%、かつ30%の症例では筋層浸潤性膀胱癌へと進行し、膀胱全摘術を余儀なくされる。したがって膀胱内BCG療法後の非侵襲的な治療法が必要である。また海外ではBCGワクチンの品不足が進行しており、膀胱内BCG療法の代替法が必要となってきた。

獣医領域での膀胱腫瘍は犬に多く、腫瘍全体の2%を占める。ほぼ全ての症例が筋層浸潤性膀胱癌であり、治療法は膀胱全摘ないしは尿管移設に化学療法を組み合わせることが多く、人とは異なり膀胱内注入療法は行われていない。犬の膀胱癌では発生部位が膀胱三角部（尿管開口部および尿道入口にかけて）であるために、臨床上、最も予後に影響を与えるのは尿路閉塞であり、癌の局所コントロールが重要である。

ソノポレーション（音響穿孔）とは、超音波と微小気泡を併用するドラッグデリバリー法である。超音波が気泡を振動させる際に、気泡近傍の細胞の細胞膜透過性が亢進（穿孔）、普段は細胞内に入りにくい薬剤や遺伝子を細胞内に導入することができる。超音波を非侵襲的に腫瘍局所へ照射できるため、ソノポレーションは低侵襲的かつ腫瘍選択的な治療法である。膀胱は体外と連続した体表臓器で液体を内部に貯める袋状の構造であるため、薬剤もしくは気泡の投与および保持が可能、かつ超音波の減衰が起こりにくい。つまり、膀胱はソノポレーションに最適な臓器であり、膀胱内ソノポレーションは膀胱癌の新たな局所治療法として、医療ならびに獣医療の双方にとって有望である。

ソノポレーションは非侵襲的なドラッグデリバリー法として1990年代から期待され様々な研究が行われてきたものの、未だ臨床応用には至っていない。申請者はこれまでの自身の研究経緯から、そこには3つの要因があると考えた。第1はin vitroとin vivoのギャップである。in vitroでは単層に培養した腫瘍細胞に対してソノポレーションを行う。in vivoでは厚みのある組織の表面もしくは組織中の血管に対してソノポレーションを行う。したがって、必ずしもin vitroの機序がin vivoに適用できない。第2はデリバリーの定量である。一般には治療効果の判定が主体で、標的臓器での薬剤濃度の定量は行われてこなかった。第3は薬剤の全身動態の解析である。薬剤のデリバリーに主眼が置かれ、使われる薬剤の全身での挙動に与える影響は不明である。

2. 研究の目的

一般に膀胱内に薬剤を投与すると、多くの薬剤では膀胱粘膜から吸収され全身作用を及ぼすことが知られている。また、ソノポレーションの機序が「透過性亢進」であることから、膀胱から吸収される薬剤が増加する可能性も考えられる。本研究では、ソノポレーションによるドラッグデリバリーを膀胱癌治療法の1つとして確立するために、犬の膀胱癌を自然発症モデルと捉え、犬におけるソノポレーションの安全性ならびに組織中の抗がん剤濃度の変化を検討した。

3. 研究の方法

安全性検討として、健康なビーグル犬を対象に、膀胱内ソノポレーションを1回、もしくは9回の2プロトコル（各3頭）で実施した。鎮静下の犬の膀胱に尿道カテーテルを留置し、生理食塩水20 mLに溶解した抗がん剤ピラルビシン塩酸塩超音波造影剤ソナゾイドを膀胱内に注入した。注入後速やかに超音波診断装置の造影対応リニアプローブを用いて超音波を1分間照射した。30分後に注入した薬剤を抜去し、泌尿器科用灌流液ウロマチックSにて3回洗浄した。1回投与プロトコルでは膀胱注入ピラルビシンの血中移行の有無を評価するために経時的な採血を行った。9回投与プロトコルでは膀胱注入ピラルビシンの血中移行の蓄積を評価するために、毎回の処置前後に採血を行なった。ピラルビシンの定量には液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計（LC/MS/MS）を用いた。なお、本動物実験は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」（承認番号20-0081）に基づき適切に行われた。

さらにドラッグデリバリーの本態と言うべき、組織中の薬剤濃度を評価した。健康なビーグル犬3頭を対象に、膀胱内に抗がん剤ピラルビシン塩酸塩および超音波造影剤ソナゾイドを投与し、体外から超音波診断装置の造影対応リニアプローブを用いて超音波を1分間照射した。その後、超音波照射部位および非照射部位の膀胱組織に含まれるピラルビシン濃度をLC/MS/MSにて定量した。なお、本動物実験も「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」（承認番号20-0081）に基づき適切に行われた。

4. 研究成果

膀胱内でソノポレーションを1回行った場合、血液中からはピラルビシンが検出されなかった（表1）。また週1回、合計9回実施した場合でも、回数が増えることによる蓄積も認められなかった（表2）今回投与したピラルビシン濃度は人の膀胱注入療法に用いられる投与量と遜色がないため、臨床的な濃度で膀胱内ソノポレーションを行なっても、膀胱から全身循環には移行

しないと予想される。

表 1. 1 回実施時の血中ピラルビシン濃度 (ng/mL)

	投与前	15 min	30 min	1 hr	2 hr	4 hr	8 hr	24 hr
犬 1	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
犬 2	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
犬 3	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5

表 2. 9 回実施時の血中ピラルビシン濃度 (ng/mL)

	1 回目	2 回目	3 回目	4 回目	5 回目	6 回目	7 回目	8 回目	9 回目
犬 4	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
犬 5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
犬 6	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5

一方、超音波照射部位の膀胱組織に含まれるピラルビシン濃度は 3 頭中 2 頭で非照射部位と比較して高値となったが、1 頭では変わらなかった (表 3)。

表 3. 膀胱組織中のピラルビシン濃度

	犬 1	犬 2	犬 3
超音波照射部位	1.65 µg/g-tissue	0.19 µg/g-tissue	2.43 µg/g-tissue
非照射部位	0.21 µg/g-tissue	0.21 µg/g-tissue	1.04 µg/g-tissue

膀胱内投与した薬剤の粘膜移行は、尿 pH の影響および尿による希釈の影響を受けることが知られている。また、ピラルビシンは正常膀胱粘膜より腫瘍組織への移行が優れる、とされている。今後、膀胱癌症例での臨床研究データによりデリバリーの定量的評価を行い、がん治療法としての有用性を示していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Presset Antoine, Bonneau Corentin, Kazuyoshi Sasaoka, Nadal-Desbarats Lydie, Mitsuyoshi Takiguchi, Bouakaz Ayache, Kudo Nobuki, Escoffre Jean-Michel, Sasaki Noboru	4. 巻 46
2. 論文標題 Endothelial Cells, First Target of Drug Delivery Using Microbubble-Assisted Ultrasound	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ultrasound in Medicine & Biology	6. 最初と最後の頁 1565 ~ 1583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ultrasmedbio.2020.03.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 KONDO TAKASHI, SUZUKI RYO, SASAKI NOBORU, TAKIGUCHI MITSUYOSHI	4. 巻 36
2. 論文標題 New Development of Ultrasonic Cancer Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thermal Medicine	6. 最初と最後の頁 75 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3191/thermalmed.36.75	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Noboru, Ikenaka Yoshinori, Aoshima Keisuke, Aoyagi Teiichiro, Kudo Nobuki, Nakamura Kensuke, Takiguchi Mitsuyoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Safety Assessment of Ultrasound-Assisted Intravesical Chemotherapy in Normal Dogs: A Pilot Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 837754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2022.837754	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐々木東、工藤信樹、Chrit Moonen、滝口満喜
2. 発表標題 表在細胞への送達と限界・頭頸部癌と膀胱癌
3. 学会等名 第18回日本超音波治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木東、青柳貞一郎、池中良徳、工藤信樹、中村健介、滝口満喜
2. 発表標題 超音波と気泡を併用する膀胱内注入療法の犬における安全性の検討
3. 学会等名 日本超音波医学会第94回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木東、池中良徳、青島圭佑、青柳貞一郎、工藤信樹、中村健介、滝口満喜
2. 発表標題 超音波診断装置と超音波造影剤による膀胱癌治療法の開発
3. 学会等名 日本超音波医学会第51回北海道地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Noboru Sasaki, Nobuki Kudo, Kensuke Nakamura, Mitsuyoshi Takiguchi
2. 発表標題 Ultrasound-assisted intravesical chemotherapy: preliminary safety results in a dog model
3. 学会等名 27th European Symposium on Ultrasound Contrast Imaging (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究協力者	工藤 信樹 (Kudo Nobuki)		

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			
フランス	Inserm U1253	Imagerie & Cerveau		
オランダ	Bethel Encapsulates			