

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月14日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659274

研究課題名（和文） 血管閉塞による新しい抗腫瘍療法の開発

研究課題名（英文） Development of a new anti-tumor therapy by occlusion of blood vessels.

研究代表者

出家 正隆 (DEIE MASATAKA)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：30363063

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、腫瘍への血流を阻害し、腫瘍細胞を壊死へと誘導する新しい腫瘍治療法を開発することである。本研究では、まず赤血球にマイクロビーズを結合させる手法を確立した。次に、赤血球-マイクロビーズ結合体をラットに投与し、頭蓋骨表面に磁石を設置することで、赤血球-マイクロビーズ結合体を中大脳動脈に集積させ、中大脳動脈を閉塞することに成功した。より侵襲を小さくし、手技を簡便にする目的で条件を変えて実験を行ったが、この条件下では血管の閉塞が起こらないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop a new anti-tumor therapy that blocks blood-flow to the tumor and necrotizes the tumor. First, we erected a method that couples microbeads with blood cells. Secondly, we glued a magnet to the surface of rat's skull and injected the microbead - blood cell complexes into the rat's internal carotid artery. As a result, we succeeded to occlude the rat's middle cerebral artery. To lessen the damage to rats and to make the surgical technique simple, we conducted next experiment under another condition. The experiment showed that the middle cerebral artery of a rat was not occluded in that condition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	510,000	3,410,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：腫瘍・磁性・血管閉塞

1. 研究開始当初の背景

現在、腫瘍に対する治療として、手術、放射線療法、化学療法、それらを組み合わせた集学的治療などが行われているが、完治が困難なケースがあることや、生体への影響が大きいこと、副作用の問題等、解決すべき点は

多い。今回、我々は、腫瘍細胞への血流を阻害することで腫瘍細胞を壊死させるという新しい治療法を試みるべく研究計画を立案した。具体的には、腫瘍周囲に外磁場を作成し、血管内に磁気ターゲティングした血液細胞を投与することで、腫瘍の栄養血管をそ

の細胞にて閉塞し、血流を遮断するというものである。我々はこれまで、磁気ターゲティングシステムを用いた Natural killer 細胞による抗腫瘍効果についての研究を行ってきた。さらに、中大脳動脈基部を塞栓糸で閉塞する脳梗塞モデルラットを用いた研究や、磁気ターゲティングした血液細胞を動脈内に投与し、外磁場によって脳血管に細胞を集積させ、血管を閉塞するという脳梗塞モデルラットの作成についての研究も並行して行っている。このように、我々のこれまでの磁気ターゲティング法に関する知見、抗腫瘍治療に関する知見、血管閉塞に関する知見の積み重ねから、今回の腫瘍に対する血管閉塞による新しい治療法の着想に至った。

2. 研究の目的

腫瘍への血流を阻害し、腫瘍細胞を壊死へと誘導する新しい腫瘍治療法の開発を試みる。具体的には、腫瘍周囲に外磁場を作成し、血管内に磁気ターゲティングした血液細胞を投与することで、腫瘍の栄養血管を閉塞し、血流を遮断するというものである。本研究の成功により、血流阻害による腫瘍壊死を誘導するという新しい腫瘍治療法の臨床応用へとつながりうると考える。さらに、本法を発展させることにより、体内の様々な部位の腫瘍に効果を発揮する治療法になりうると考えられる。

3. 研究の方法

(1) $18\sim 21\times 10^8$ 個のビーズ (Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG) と抗ラット赤血球抗体 (IgG fraction rabbit anti-rat red blood cell) 540 μg を加え、 4°C で12時間攪拌した。分離用磁石を用いてビーズ-抗ラット赤血球抗体結合体を抽出した (図1)。8週齢の Wistar 系雄性ラット2匹 (体重290 g, 300 g) を麻酔し、右総頸静脈より300 μl の静脈血を採取した。ビーズ-抗ラット赤血球抗体結合体と静脈血を混合し、 4°C で1時間攪拌することで、ビーズと赤血球を結合させた。

ラットに麻酔を行い、右大腿部を皮切し、大腿動脈を露出した。大腿動脈の湾曲部から5 mm 遠位部に、円柱形の磁石 (直径5 mm, 高さ3 mm, 0.39 テスラ) を固定した。ビーズ-赤血球結合体を右総腸骨動脈にカテーテルを用いて注入し、2時間後に磁石を取り外し、右大腿動脈を摘出した。摘出した動脈をパラフィン包埋した後、組織を5 μm に薄切し、撮影した。

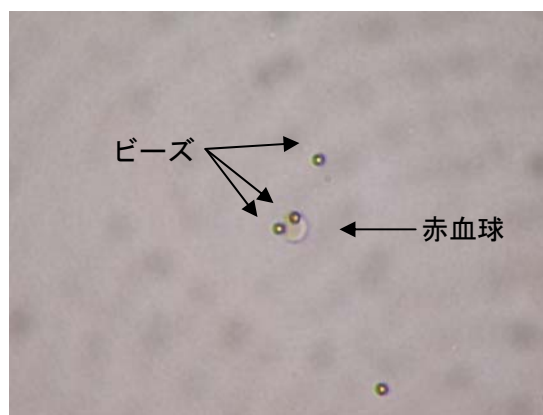


図1 ビーズ-赤血球結合体

(2) 8週齢の Wistar 系雄性ラット27匹 (体重260~320 g) を使用した。麻酔下で頸部正中中部皮膚を切開し、左内頸動脈を他の組織から分離した。次に左側頭部を皮切し、咬筋を頬骨弓から切離し、頬骨弓を剪刀で切断、除去した。卵円孔の約3 mm 前方の頭蓋骨を小型ドリルを用いて研磨し、中大脳動脈を視認するように、磁石を頭蓋骨に接着固定した。磁石は、円柱形の磁石を大小2種類使用した。

先述した手法と同様に作製したビーズ-赤血球結合体を内頸動脈内にカテーテルを用いて注入した。注入から2時間または4時間後に磁石を取り外した。本研究では磁石のサイズ2種類と磁石設置時間2種類を採用し、それらを組み合わせることで、下記3条件で実験を行った。

「条件Ⅰ」磁石大 (直径5 mm, 高さ3 mm, 0.39 テスラ) - 磁石設置時間4時間

「条件Ⅱ」磁石大-磁石設置時間2時間

「条件Ⅲ」磁石小 (直径2 mm, 高さ1 mm, 0.26 テスラ) - 磁石設置時間4時間

磁石を取り外した24時間後に、全てのラットに対し2種類の神経学的評価を実施した。その後ラットを屠殺し、脳を摘出した。脳切片作成用簡易スライサーを用いて、2 mm 厚の冠状切片を5切片作製した (bregma の前方2切片, 後方3切片)。この冠状切片を、 37°C の2% TTC 生理食塩水溶液に7分間浸漬して染色した。染色した脳切片を撮影し、画像をパーソナルコンピュータに取り込んだ (図2)。

Scion image を用いて各切片の左右大脳半球の染色部面積を計測した。

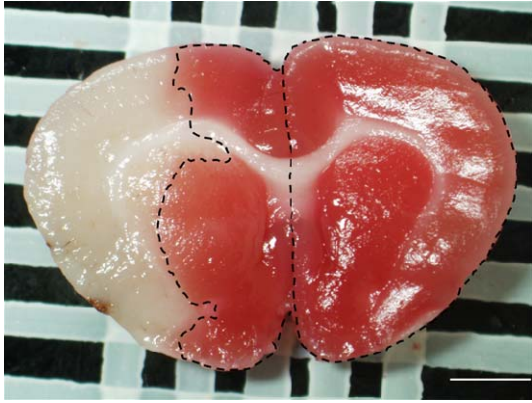


図2 脳切片染色像
染色されていない部分が梗塞部である。

(3) 8週齢のWistar系雄性ラット4匹(体重260~320g)を使用した。麻酔下で左側頭部を皮切し、側頭筋中央部を切開した後、切開部に円柱形の磁石(直径5mm, 高さ3mm, 0.39テスラ)を埋め込んだ。先述した手法と同様に作製したビーズ-赤血球結合体を右大腿動脈からカテーテルを用いて注入した。1時間後に磁石を取り外した。

磁石を取り外した24時間後に、全てのラットを屠殺し、脳を摘出した。脳切片作成用簡易スライサーを用いて、2mm厚の冠状切片を5切片作製した。この冠状切片を、37°Cの2% TTC生理食塩水溶液に7分間浸漬して染色した。染色した脳切片を撮影し、画像をパーソナルコンピュータに取り込んだ。

4. 研究成果

(1) 大腿動脈切片のHE染色像については、磁石を設置しない条件では、大腿動脈内に赤血球が残存している様子が観察され、ビーズはわずかのみ存在していた。磁石を設置した条件では、大腿動脈がビーズ-赤血球結合体によって完全に閉塞されている様子が観察された(図3)。

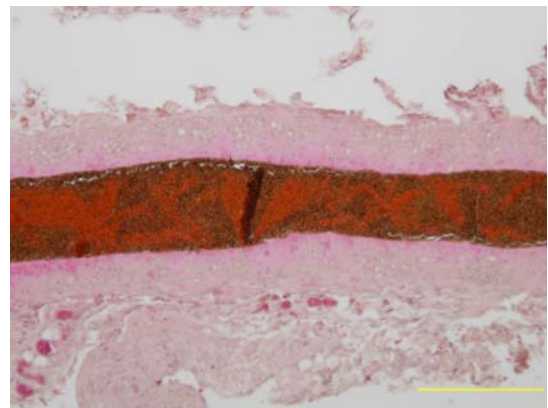
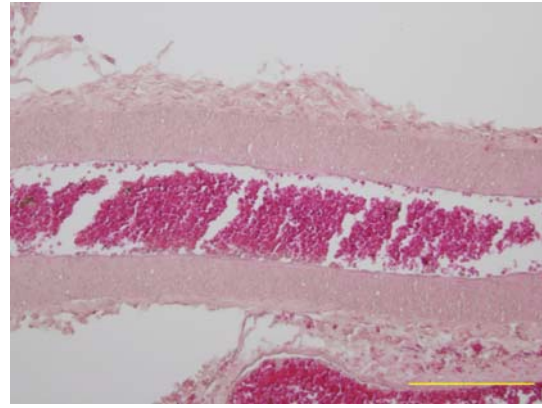


図3 大腿動脈のHE染色像

上の写真が磁石を設置しない条件、下の写真が大腿動脈近傍に磁石を設置した条件である。

(2) 手術中に死亡したラットは、条件Ⅰが7匹、条件Ⅱが0匹、条件Ⅲが3匹であった。手術終了直後に生存していたラットのうち、手術24時間後に生存していたラットは、条件Ⅰでは6匹中3匹、条件Ⅱでは6匹中5匹、条件Ⅲでは5匹中2匹であった。各条件で生存していたラットを、それぞれⅠ-1~Ⅰ-3、Ⅱ-1~Ⅱ-5、Ⅲ-1、Ⅲ-2とした。非梗塞側大脳半球(右大脳半球)容積に占める脳梗塞容積の割合を表1に示した。脳梗塞が認められた7匹の脳梗塞容積の平均値と標準偏差は 39.6 ± 24.9 (%)であった。脳梗塞が認められた7匹全てにおいて、中大脳動脈皮質枝の灌流領域である側頭部皮質に脳梗塞が観察された。一部のラットでは線条体内側部、海馬、視床にも脳梗塞が観察された。Kendallの順位相関係数を用いて、脳梗塞容積割合と2つの神経学的評価との相関関係を検証したところ、どちらも有意な相関関係を示した。

表 1 非梗塞側大脳半球容積に占める脳梗塞容積の割合

個体	脳梗塞容積 (%) ^a
I-1	0
I-2	43.1
I-3	64.3
II-1	4.5
II-2	43.1
II-3	0
II-4	57.4
II-5	5.6
III-1	58.9
III-2	0

(3) 本手法では4匹のラットのいずれについても脳梗塞は認められなかった。

(4) 研究成果のまとめ

本研究では、まず赤血球にマイクロビーズを結合させる手法を確立した。作製したビーズ-赤血球結合体を用いて大腿動脈を閉塞可能であることが画像で確認出来た。次に、赤血球-マイクロビーズ結合体をラット内頸動脈より投与し、ラット頭蓋骨表面に磁石を設置することで、赤血球-マイクロビーズ結合体を中大脳動脈に集積させ、中大脳動脈を閉塞することに成功した。ただし、本手法は頸部の切開や内頸動脈へのアプローチによりラットに対して大きな侵襲が加わることとなった。そこで次に、赤血球投与時の侵襲を小さくし、より手技を簡便にする目的で大腿動脈からの赤血球投与を試みた。また、より手技を簡便化するために磁石設置時間を1時間とし、頭蓋骨を研磨せず、側頭筋を切開し、切開部に磁石を埋め込む手法を用いた。これらの条件にて血管閉塞が起こるかどうかについて検証したところ、この条件下では血管の閉塞が起こらないことが明らかとなった。血管閉塞法の確立には、上記の条件についてさらなる検討が必要であることが示された。

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2件) (いずれも査読あり)

- 1) Moriyama H, Kanemura N, Brouns I, Pintelon I, Adriaensen D, Timmermans JP, Ozawa J, Kito N, Gomi T, Deie M. Effects of aging and exercise training on the histological and mechanical properties of articular structures in knee joints of male rat.

Biogerontology. 2012;13(4):369-81.

- 2) Otani T, Maejima H, Tobimatsu Y, Shimada N, Toriyama M, Deie M. Synaptogenesis in the contralateral primary motor after focal brain infarction in rats. J. Phys. Ther. Sci. 22(1). 69-74. 2010.

[学会発表] (計2件)

- 1) Otani T, Maejima H, Moriyama H, Shimada N, Shidahara H, Toriyama M, Orita N, Tobimatsu Y, Deie M. The number of synapses in the primary motor cortex of contralesional hemisphere does not increase after cerebral infarction. 16th International WCPT Congress. Amsterdam. Holland. 2011. June 20-23
- 2) 大谷拓哉, 前島洋, 武本秀徳, 鳥山実, 島田昇, 飛松好子, 出家正隆: 脳梗塞ラットの非梗塞側一次運動野におけるシナプス可塑性について. 第45回日本理学療法学会大会. 岐阜. 2010. 5. 27-29

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出家 正隆 (DEIE MASATAKA)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号: 30363063

(2) 研究分担者

森山 英樹 (MORIYAMA HIDEKI)

広島大学・大学院保健学研究科・講師

研究者番号: 10438111

(H22~H23)

(3) 連携研究者

()

研究者番号: