

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701034

研究課題名(和文) 金属ナノ粒子と外部エネルギー励起を用いた肝細胞癌に対する新規肝動脈注入療法の開発

研究課題名(英文) The development of novel hepatic artery injection therapy for the hepatocellular carcinoma using metal nanoparticle with irradiation of external energy in animal model

研究代表者

藤村 知賢 (FUJIMURA, TOMONORI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30594634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌治療はウイルスや肝炎などの障害肝をベースに病変が発生するため、初回治療後も、転移/再発とその再治療を考慮する必要がある。その治療は、根治性が高くかつ低侵襲な治療が望ましい。本研究の目的は、体外エネルギー(磁場および超音波)を用いた金属ナノ粒子による抗腫瘍療法の開発である。肝癌モデルは移植モデル及びDEN発癌モデルを作製し、dynamic CTでDEN発癌モデルでの動脈優位性を確認した。また、ラットを用いた肝動注の手技を確立した。磁性体ナノ粒子を磁場で励起しての発熱、二酸化チタンを超音波で励起してのフリーラジカル発生を確認し、二酸化チタンでは皮下腫瘍モデルでの腫瘍増殖抑制効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：Because the hepatocellular carcinoma usually is developed based on the obstacle liver such as virus infection or the alcohol hepatitis, it is necessary to consider a metastasis, a recurrence and the re-treatment. Therefore, its treatment should have high curability and be less invasive. The purpose of this study is to develop the new therapy for the hepatocellular carcinoma using metal nanoparticles such as magnetite or titanium dioxide with irradiation (magnetic field or supersonic wave). The cancer transplant model and the DEN carcinogenesis model were used. The artery predominance of the tumor in the DEN carcinogenesis model was confirmed by dynamic CT. The surgical procedure of hepatic artery injection in rat was established. The generation of heat by magnetic field with magnetic nanoparticles and free radical by a supersonic wave with titanium dioxide were confirmed. The suppression of tumor growth was observed in the subcutaneous tumor model with titanium dioxide.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：肝癌 肝動注 外部エネルギー

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 肝動脈塞栓化学療法

現在肝細胞癌に対する治療は、手術、焼灼療法(ラジオ波、マイクロ波、凍結)、肝動脈塞栓化学療法を中心としたカテーテル治療の3つが主に用いられている。肝細胞癌治療の大きな特徴は、ウイルスやアルコール肝炎などの障害肝をベースに病変が発生するため初回治療後も、転移のみでなく新生発生を加えた再発とその再治療を考慮する必要があるということである。したがって、根治性が高くかつ低侵襲な治療が望ましいと言える。焼灼療法は低侵襲で局所制御力90%台と高いが、腫瘍の局在、大きさに制限がある。手術は局所制御力が最も高いが侵襲が大きい。またともに肝両葉に散らばる多発病変には適応がない。肝動注塞栓化学療法はリピオドールを用いることで抗がん剤を高濃度に長期間腫瘍内に停留させることができる。既に日常臨床で確立したDDSの成功例である。一方肝動注塞栓化学療法は、低侵襲でかつ多発病変にも対応可能であるが、局所制御力は奏効率30-50%といまだ不十分なため、現在は手術、焼灼療法が不可能な場合の次の選択肢の治療にとどまる。しかし、もしその局所制御力が他の治療法と同等まで引き上げられることができれば、その低侵襲性や多発病変への適応などから第一選択治療の一つとなり、患者への大きな福音となる。

### (2) 体外エネルギー

腫瘍の局所制御には化学放射線療法や温熱療法の有用性が示唆されている。しかし従来の温熱療法では侵襲性が大きく、装置が高価で大型であった。そこで東工大阿部名誉教授や上田特任教授らが発明した、安価で小型化された超高性能高周波磁界発生装置を使用し、肝動注患者に対する温熱療法を開発する着想に至った。超音波は、放射線よりも副作用や正常組織への影響がはるかに少ないと考えられ、また臨床の現場では診断装置として身近なものである。超音波装置を治療用に改良することは、比較的容易に可能と考えられ、それはベットサイドでの使用も可能と思われる。

### (3) 高機能性鉄磁性体微粒子

東工大畠山教授との共同研究(平成19年度JST育成研究)により、単粒子状態で高い親水性を維持できる鉄磁性体粒子(径20nm)を開発した。毒性試験も行われ安全性が確認されており、センチネルリンパ節生検にも利用するために開発されたが、これを肝動注し、磁場を発生させ温熱療法による抗腫瘍効果を得る。

### (4) 二酸化チタン・ナノ粒子

二酸化チタン粒子は超音波を照射することによりフリーラジカルが発生することが金沢大学、清水研究室より報告された。フリーラジカルは強力な殺細胞効果を有し、光線力学療法などで既に眼科領域で実臨床に用いられている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、体外エネルギー(超高性能高周波発生装置、超音波)を用いた金属ナノ粒子による抗腫瘍療法の開発である。本研究の治療対象は肝細胞癌であり、金属ナノ粒子は局注および肝動注により腫瘍に選択的に集積させる。具体的には(1)高機能性鉄磁性体微粒子肝動注後の超高性能高周波発生装置を用いた磁場発生による温熱療法(2)二酸化チタンナノ粒子肝動注後の超音波照射によるフリーラジカル発生を利用した抗腫瘍療法である。

## 3. 研究の方法

### (1) 肝癌モデルの作製

移植モデル: 肝癌細胞株としてラットの腹水肝癌細胞株(AH-130)を使用した。T細胞機能欠如マウス(BALB/cAJcl-nu/nu, 6週齢雄)の背部皮下にラット腹水肝癌細胞(AH-130,  $1.0 \times 10^6$ 個/0.1ml)を注入した。注入後約1週間で腫瘍は触知可能となり、その大きさが約5mm×5mm以上になった時点で腫瘍を取り出した。取り出した腫瘍を、約2mm×2mmの大きさにし、T細胞機能欠如ラット(F344/NJcl-rnu/rnu, 8週齢雄)の肝左葉外側区の肝実質下に移植し、2週間の観察期間を置いた。

DEN発癌モデル: 135mg/lのDiethylnitrosamine(DEN)を3週齢のSDラットに飲水として与えた。

### (2) 肝動注モデルの作製

4.0% イソフルレン吸入麻酔 4.0%導入し、3.5% 2.7%にて調整した。

left lateral lobe、left medial lobe、right lateral lobeを脱転し、視野の邪魔にならないようにコットンで固定した。

胃小弯側と癒着したcaudate lobeを剥離した

肝十二指腸間膜から胆管、門脈を剥離し、動脈のみを露出させた。

胃十二指腸動脈をなるべく末梢分岐部の近くで結紮し、血管を確保した。

固有肝動脈、総肝動脈をブルドック鉗子(小)で把持、末梢側の結紮系を把持、血管壁にはさみで穴をあけた後にピンセットでカテーテルを把持して血管穿刺を行った。

### (3) 皮下腫瘍モデル作製

1X10<sup>6</sup>個のA431(類上皮細胞株)を免疫不全マウスの皮下に移植し、ゼノグラフトモデルを作製した。

### (4) 鉄磁性体微粒子

鉄磁性体粒子(径20nm)の交流磁場下での温度変化の確認を行った。

### (5) 二酸化チタンナノ粒子

Aminophenyl Fluorescein(APF)法によりフリーラジカル発生の確認を行った。

### (6) 超音波による治療

皮下腫瘍モデルを用いてチタンを注入した腫瘍に超音波を照射し、治療を行った。超音

波装置はアロカのものを使用した。

#### 4. 研究成果

本研究に用いる肝細胞癌担癌動物モデルは、超音波照射が確実に可能であるために単結節でかつ実際の肝細胞癌と同様に動脈優位の血行動態をもつことが望ましい。移植モデルではまず、腫瘍動態を評価するために、腫瘍移植後4日目、6日目、8日目、10日目、15日目に肝臓を取り出し、腫瘍体積の測定、ラットの体重測定を行った。腫瘍体積は、G.Carlssonらの報告を参考にし(J Cancer es Clin Oncol 1983,105:20-23)、 $V=a \times (b)^2/2$  (largest(a) and smallest(b) superficial visible diameters)にて算出した。その結果、腫瘍は移植後8日目より腫瘍体積の増加速度が速くなる傾向を認め(図1)

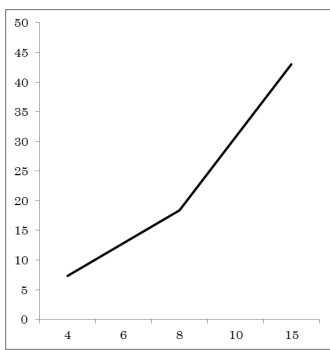


図1

ラットの体重移植後10日目より減少に転ずる傾向を認めた。また、8日目にCD31(新生血管)の増加を認めた(図2)。動脈優位性に関しては、肝動脈を結紮することで腫瘍

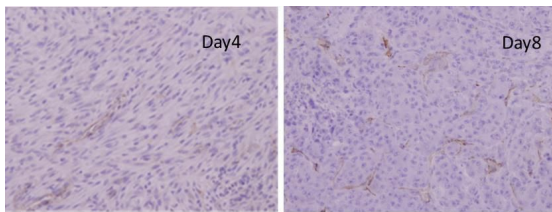


図2

縮小効果が得られれば、腫瘍の動脈優位性を証明することができる。8日目のモデルを用いて hepatic arterial ligation を施行したが、再現性低く動脈優位性は確認できなかった。移植することにより血行動態が変化する可能性を考慮し、他の肝癌モデルとして DEN を投与して発癌させるモデルを試みた。DEN



図3

発癌モデルでは2~3カ月後に発癌が確認された(図3)。ただし、死亡率が高い傾向もみられた(図4)。このDEN発癌モデルを用いて Rigaku 実験動物

用3DマイクロX線CT R\_mCT2にてCT撮像を行ったところ、イオパロミンを用いた動脈相のDynamicCTにより動脈優位性が確認できた。これにより、臨床に近い動脈優位な肝癌を持

ったラットモデルが確立された。

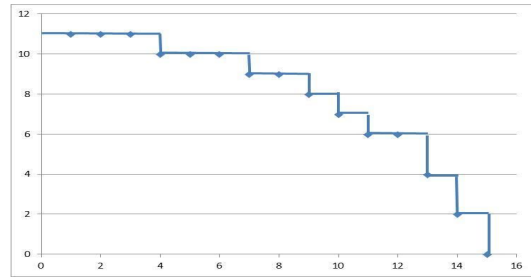


図4

単粒子高分散性の磁性体微粒子(径20nm、図5)に交流磁場を照射したところ、発熱が確認された(図6)

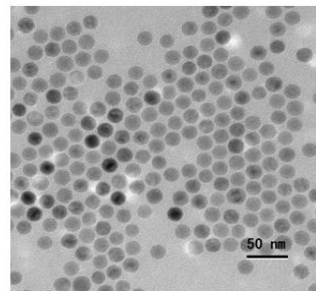


図5

しかしながら東工大の超高性能高周波磁界発生装置を使用するには至らなかった。二酸化チタンナノ粒子ではAPF法によりフリーラジカルの発生が確認された。

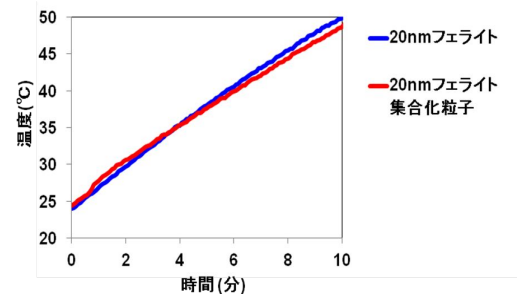


図6

皮下腫瘍モデルを用い、局所に二酸化チタンナノ粒子を投与、超音波照射を行ったところ、腫瘍増殖抑制効果が確認された(図7)

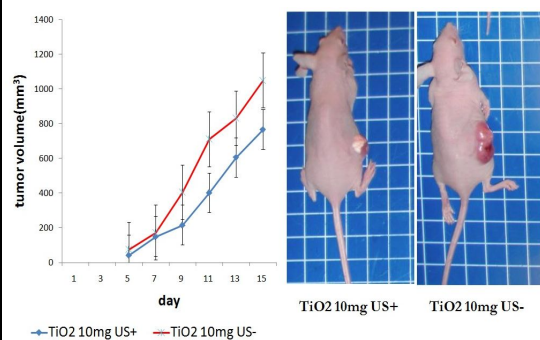


図7

磁性体微粒子、二酸化チタンナノ粒子において、励磁あるいは超音波照射で、熱あるいはフリーラジカルが発生することが証明され

た。これら微粒子はより末梢に届き、現在欧米で使われているビーズより塞栓効果が高いと考えられる。肝動注モデルは非常に繊細な手技を必要とするもので、残念ながら肝臓での治療実験にはいたらなかったが、皮下腫瘍モデルでは二酸化チタンと超音波による治療効果が確認された。本法は日常臨床に応用可能であり、本治療併用による効果の上乗せも期待でき、また磁場、超音波による治療は際限なく繰り返し使用可能であることから今後治療効果確認まで続けていきたい。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤村 知賢 (Tomonori Fujimura)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30594634