

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289075

研究課題名(和文) In vivo実験の加速によるパルス高電界がん治療法の確立と技術開発

研究課題名(英文) Establishment of Cancer Therapy Using Pulsed High Electric Fields and the Development Based on Acceleration of In Vivo Experiments

研究代表者

下村 直行 (Shimomura, Naoyuki)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号：90226283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：パルス高電界を用いた新たながん治療法の確立に向けた技術の研究開発を行った。プログラムされた細胞死であるアポトーシスをパルス電界により誘導するもので、低侵襲な治療法につながる可能性がある。受精鶏卵上に固形腫瘍を形成する方法を採用したことで、通常研究コストの大きい動物実験を加速できた。パルス電界印加による固形腫瘍の成長抑制効果が確認され、それが電界強度に依存することも分かった。またこれがアポトーシスによることが大きいことも確認された。最終的には3つの実験系を確立できたので、今後の研究発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To establish a new cancer therapy, techniques using pulsed high electric fields were studied. It has a potential to achieve a minimally invasive treatment because pulsed electric fields would induce programmed cell death as apoptosis.

By adopting the method of forming a solid tumor in a fertilized chicken egg, large number of animal test, which was usually high research cost, were performed. The growth suppression effect of the solid tumor by pulsed electric field was confirmed, and the effect was found to be dependent upon electric field strength. Moreover, the effect was mainly based on apoptosis. Three experiment systems were established eventually. Therefore, future research development is favorable.

研究分野：高電圧パルスパワー工学，パルスパワー応用

キーワード：パルスパワー がん治療 パルス高電界 アポトーシス 発育鶏卵法

1. 研究開始当初の背景

パルス高電界により細胞にアポトーシスが誘導されることが確認され、多くの研究機関でこの現象を新たながんの治療方法に結びつけようという研究が開始している。さらに、がん細胞にもパルス高電界によりアポトーシスを誘導できることが確認されている。

このような研究での実験の過程としては、*in vitro* における実験から、*in vivo* における実験、すなわち動物実験、次に人体に対する実験の順に進んでいく。(*in vitro* とは「試験管の中で」の意で、試験管内などの人工的に構成された条件下での試験などを表す。 *in vivo* とは「生体内で」の意で、生体内での試験を表す。) ここで用いるパルス高電界とはナノ秒パルス電界(nsPEF)といわれるもので、周波数帯域では 100MHz 以上のものが必要とされる。*In vitro* の実験は比較的多くの機関で実施されており、必要な高電圧パルスに関する技術の難しさはあっても、パルス高電界によるアポトーシス誘導の機構についてある程度解明されつつある。一方、*in vivo* 実験を実施しているところは極めて少ない。これは、法令等による実施の制限もあるが、このような実験段階においては、多くの実験を行う必要があり、多くに試料を用意しなければならないことが障害となっている。実際のがん組織の状態は、*In vitro* における試料の状態とは全く異なり、最適な実験条件の探索、実験技術や実験装置の開発など、独立して行わなければならないことは多く、必然として実験動物などが多数必要となる。

パルス高電界による新たながんの治療方法の開発には、多数の *in vivo* 実験を実施できることが非常に効果的で、それはパルス高電界の印可技術の開発に対してもいえる。

2. 研究の目的

パルス電界を用いたがん治療法の確立が目的である。そのために、まず発育鶏卵法を用いたパルス電界印加の実験系を確立する。この実験系を用いて、固形腫瘍に対して様々な実験条件を試行し、固形腫瘍の成長の抑制効果の高い条件を探索する。実験のなかで、高電圧パルスパワー発生装置の動作安定性やパルス電界印加装置などがん治療方法を見据えた上で全体的な技術開発を進める。

次に、発育鶏卵法を用いた実験により、得られた有効な実験条件に関する知見、および開発された全体技術を、実験動物(マウス)の腫瘍に対するパルス電界印加実験に適用する。これにより、実験動物に対する腫瘍の縮小効果を確認するとともに、実験動物に適した実験条件や装置技術の開発を行う。

これらの実験を通して、実際のがん治療技術のある程度見据えた技術開発を進めていく。

3. 研究の方法

発育鶏卵法の採用・拡大により、多数の *in*

vivo 実験を可能とする。これにより、印加パルス電界に関する様々な実験条件に対する試験を実現し、最適な条件を探索する。すでに 1 ナノ秒のパルス幅の高電圧パルスを発生するナノ秒パルスパワー発生装置の開発は行っているが、さらに、この実験過程の中でパルス高電界印加技術を開発する。

(1) 発育鶏卵法を用いた固形腫瘍へのパルス電界印加

発育鶏卵法により、マウス乳がん由来細胞(EMT6)を細胞試料として用いて固形腫瘍を生成し、パルス電界印加実験を行う。まずこの実験研究を安定して実施するために、発育鶏卵法を用いてパルス電界印加を行う実験系の確立を行う。これには発育鶏卵法自体の手続きの検討も含まれる。

実験条件としては、印加電圧、印加パルス幅、パルス印加回数などのパルス電界の電気的なパラメータに加え、パルス電界印加装置(電極)やその設置方法などを変化させて行う。これにより効果が最大化する条件を探索する。実験効果は、パルスの印加を除いて同等の実験過程が施されるシャムコントロールに対して、有意検定による統計的処理に基づいて確認される。

EMT6 以外の細胞種の実験を検討する。細胞種が異なれば当然異なった応答や感受性が考えられるので、細胞種を変えて実験を行うことは重要である。ただし、発育鶏卵法による固形細胞の形成にはどのような細胞種も使えるというわけでもなく、また使っても実験手続きが同じとは限らない。いくつかの細胞種を検討し、実験系の確立を進める。

これらの実験を通じて、実験に要求されるパルスパワー発生装置、パルス印加技術の開発を進める。

(2) 細胞懸濁液に対するパルス電界印加 (*in vitro* 実験)

細胞懸濁液を対象として機序の解明に向けた予備的な実験を実施する。細胞懸濁液に対するパルス電界印加に必要な装置や技術を開発する。

印加パルス電界のパラメータを変えて、パルス電界印加実験を行う。細胞生存率の測定およびフローサイトメトリーを用いた解析を実施し、機序の解明に向けて研究を進める。フローサイトメトリーは試薬によって様々な分析が可能であるが、ここではアポトーシス解析を中心に行う。

ここで得られる知見は、発育鶏卵法を用いる実験およびパルス電界印加技術の開発にフィードバックされる。

(3) 固形腫瘍に対するフローサイトメトリー解析

発育鶏卵法により得られる固形腫瘍に一定の処理を加えることで、細胞懸濁液としてフローサイトメトリーによる解析が可能に

なる。これは解析手法としては ex vivo 解析に分類されるものであるが、固形腫瘍に対するパルス電界の影響を評価する上において非常な有効な手段になり、また技術開発の促進もつながる。

この実験系の確立を行う。フローサイトメトリーは、アポトーシス解析を中心に行う。

この実験系を含めて3つの実験系が整えば、それぞれの実験系の不足点を補完することが可能になる。

4. 研究成果

(1)パルスパワー印可技術の開発

医療技術の装置としても、本研究の発展のためにも、パルス電界印可技術の開発は重要である。パルス電界印可技術は、ナノ秒パルスパワーの発生技術、がん腫瘍へのパルス印可技術、その間のパルス伝送技術に分けられる。これらに共通して、非常に短いパルスでありしかもそれが高電圧であることが、技術開発上のポイントである。

スイッチの再設計を行って、パルスパワー発生装置の動作安定性の向上を図った。生体を対象にする実験では、その動作の再現性・安定性が重要である。

パルスパワー発生装置から負荷である腫瘍までのパルスの伝送方法として、種々のケーブルを試験した。伝搬された電圧パルスの評価し、パルスパワー発生装置の出力インピーダンスより大きな特性インピーダンスを有するケーブルを採用した。これを用いることで、パルス反射により振動的な出力波形が得られた。これは特定の周波数を強化する意味がある。

腫瘍へのパルス電界印可装置については、電界分布の数値計算を行って、これまでの2本の針型電極(1本×2極)から4本の針型電極(2本×2極)へ変更した。これにより、沿面放電の発生をある程度抑制して、安定して電界印加ができるようになったと考える。また針と腫瘍の配置に関して試行錯誤した結果、鶏卵内の出血を抑制することができた。

(2)発育鶏卵法を用いた固形腫瘍へのパルス電界印可

本実験では、がん細胞種としてマウス由来乳腺癌細胞(EMT6)を用いた。インキュベータで鶏卵の成長を開始した日を1日目として、11日目にがん細胞を移植し、15日目に生成された固形腫瘍にパルス電界を印加する。18日目に腫瘍を鶏卵から取り出して、質量等の観測を行う。腫瘍質量の測定値に関しては、棄却検定、F検定、t検定の統計処理を行う。

実験により得られた腫瘍質量の平均値を図1に示す。パルス印可と示されたものが、パルス電界を印可したものの腫瘍質量の平均値を示し、296はサンプル数を示す。Controlとはパルス電界を印可しなかったものの平均値を示す。本実験では、パルス電界

を印可しないことは除いて、パルス印可電極を腫瘍にあてたり、パルス電界の印可時間にあたる時間を放置するなど、そのほかの処理はパルス電界印可のものと同じの手続きを行ったものであり、いわゆるシャムコントロールといわれるものである。これにより、パルス電界印可以外の腫瘍および鶏卵に対するストレスを同じにすることができ、パルス電界印可の効果を確かに評価することができる。このような実験においては重要な手続きである。コントロールに比べてパルス電界を印可した腫瘍質量の平均値が小さくなっている。なお、有意差検定の結果、この差に有意性が確認されている。したがって、パルス電界印可により腫瘍の成長を抑制できたといえる。

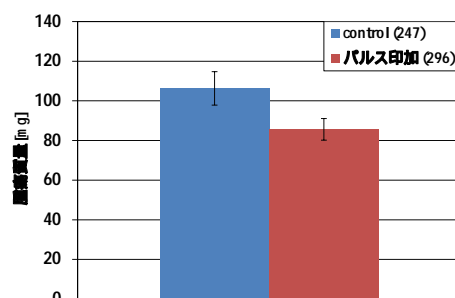


図1 腫瘍質量の平均値

図1を得た実験では様々な実験条件を含んでいる。そこで以下に実験条件ごとに整理する。図2は、パルスパワー発生装置の充電電圧で腫瘍の平均質量を整理したものである。実験設定で異なるが、電極間に印可される電圧は充電電圧の十倍程度であり、印可電圧の大小に対応していると考えて差し支えない。実験条件の範囲では、充電電圧が大きい方が腫瘍の平均質量は小さくなっている。有意差検定の結果、この差に有意性が確認されている。したがって、印可電界が大きくなるほど腫瘍の成長は抑制されると考えられる。次に図3は、腫瘍に対する印可電界パルスの数で腫瘍の平均質量を整理したものである。コントロールから、300~1200回、1500~3000回と印可パルス数が増加するに従い、腫瘍の平均質量は減少し、それ以上はほぼ一定になった。ただし有意差検定の結果、この差に有意性は確認されなかった。しかし、あるパルス数まではパルス数と腫瘍質量には関連がありそうであり、この点についてはさらに検討を要する。パルス電界を用いる In vivo 実験(動物実験)で、このような統計処理ができるサンプル数の研究は例を見ず、実験結果の信頼性、精度を高める意味で重要な研究であると考えられる。

このように実験を進める中で、当初の計画のように発育鶏卵法により十分な数の実験に有効な腫瘍が得られないという問題に直面した。その原因には、購入する受精鶏卵の状態と天候などの環境、移植する細胞の状態

など考えられる。いくつかの対策を行ったが、研究の期間内では十分な改善が得られなかった。そこで EMT6 に加えて、マウス由来メラノーマ細胞 (B16-F10) の使用を検討した。実験を行うと EMT6 に比べて B16-F10 使用時に鶏卵自体の死亡率が著しく増えた。パルス印加の影響とは考えにくく、検討を進めたところ、腫瘍成長の速さと高い転移能が原因と結論付けられた。これをもとに実験手続きを調整した結果、安定して腫瘍を得られるようになった。パルス電界印加実験を用いて十分にデータを得ることはできなかったが、今後に向けて実験系を確立できたことは重要である。また、複数の細胞腫に対して影響を検討できることは研究としての意味は大きい。

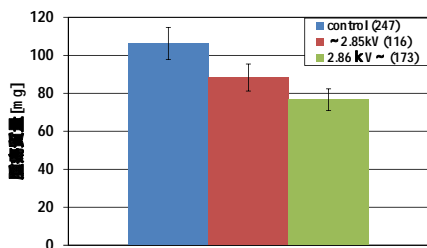


図2 腫瘍質量の平均値 (電圧)

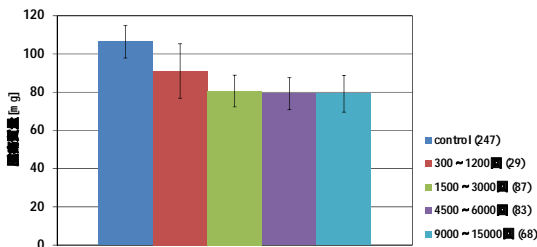


図3 腫瘍質量の平均値 (パルス数)

(3)細胞懸濁液に対するパルス電界印加 (in vitro 実験)

本研究は、固形腫瘍に対するパルス印加実験 (in vivo) を中心にするが、細胞懸濁液に対する実験 (in vitro 実験) は、実験の容易性も高くまた生体のばらつきも比較的小さいので、実験条件の最適化や機序の解明などではある程度までは有効な手段である。本研究でも、細胞懸濁液を対象として機序の解明に向けた予備的な実験として実施した。

細胞懸濁液に対するパルス電界印加には、エレクトロポレーション用のキュベットを用いる。パルスパワー発生装置の負荷としてみたとき、腫瘍用の針電極とは大きく異なるため、装置を修正適用して実験を行った。

まず、実験条件を絞り込むために、WST-1 試験により細胞生存率を調べた。印可回数が増えるほど生存率は下がった。ただし機序の解明を目的にした実験では、生存率が低ければよいというわけではなく、その変化が大きい 9000 回や 15000 回が選ばれることになる。

次にフローサイトメトリーを用いたアポ

トーシス検査を行った。フローサイトメトリーとは、細管中を流れる細胞一つ一つにレーザー光を当ててその前方散乱光と側方散乱光を観測し、その情報により細胞を仕分けする。用いる試薬により測定したい細胞の状態を選択することができる。図4および図5にパルス電界印可後24時間と48時間のアポトーシス検査解析結果を示す。緑 (P3) の領域に現れるシグナルがアポトーシスを起こした細胞によるもので、その左側のシグナルが正常細胞によるものである。24時間後の結果 (図4) よりアポトーシスの発生が確認される。一方、48時間後 (図5) では24時間後に確認されたアポトーシスが確認されない。これは、アポトーシスの進行による凝縮や貪食による消失が考えられる。また、パルス電界による貪食活性化の可能性を述べた報告も存在する。

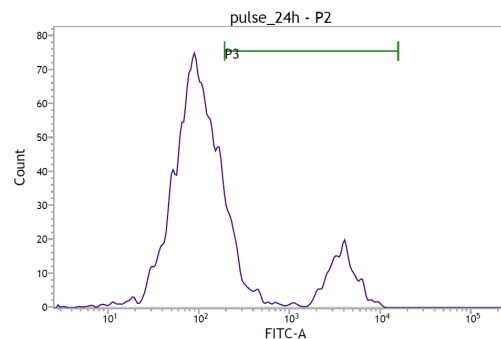


図4 印加24時間後の解析結果

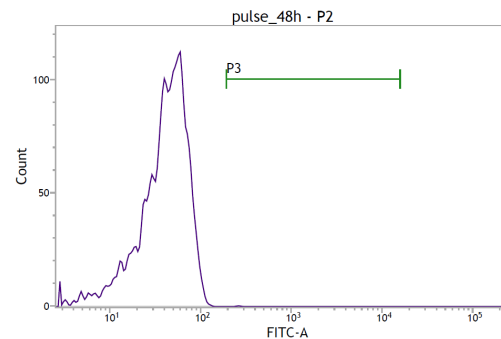


図5 印加48時間後の解析結果

同様にフローサイトメトリーを用いたアポトーシス - ネクローシス検査の解析結果を図6, 7に示す。解析結果は4つの領域に分けて判断される。左下が生細胞で、左上がネクローシスを起こした細胞を表す。右下が早期アポトーシス、右上が後期アポトーシスを表す。図6はパルス電界印可後1時間の解析結果で、細胞の分布は生細胞から早期アポトーシスの領域に広がり、同時に後期アポトーシスも多数確認される。なお解析時間を遅らせると、早期アポトーシス減少する。コントロールに対する解析結果では、ほとんどは生細胞であり、ネクローシス、後期アポトーシスのものがわずかに確認されるに留まっている。次に図7は、パルス電界は印可せずにアポトーシス誘導試薬 (アノソマイシン)

を添加した場合の解析結果を示す。早期アポトーシスおよび後期アポトーシスが確認されるが、その比率は図6に比べて多くはない。これらの結果を通して、パルス電界を印可したことにより、アポトーシスが誘導されることが確認される。

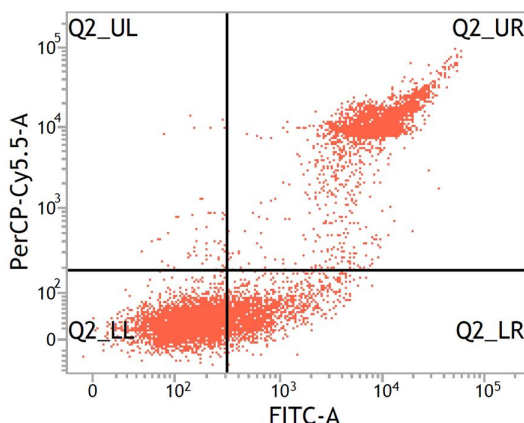


図6 解析結果 (パルス処理 1 時間後)

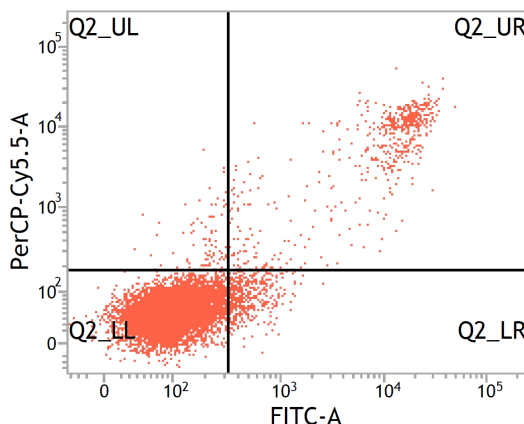


図7 解析結果 (アニソマイシン)

(4) 固形腫瘍に対するフローサイトメトリー解析

前項の細胞懸濁液に対する実験は、実験の容易性から有効な手段ではあるが、実際の腫瘍で全く同じ現象が生じるとは限らないし、形状の違いも大きい。また治療に向けた技術開発を行うことはできない。そこで、発育鶏卵法により得られる腫瘍にパルス電界を印可した後取り出し、そこから細胞懸濁液を生成することで、フローサイトメトリー等の解析が可能になる。

図8、図9はこのようにして得られたアポトーシス解析の結果を示す。コントロールやパルス処理2時間後ではあまり現れないアポトーシス細胞の割合が、6時間後(図8)で大きくなり、24時間後(図9)ではさらに大きくなっている。細胞懸濁液に対するパルス電界印可と同様に、パルス電界印可によりアポトーシスの発生が確認された。ただし前述の発育鶏卵法における腫瘍形成の問題で実験数が少なく、今後、実験数を増やして再現性などの確認を行う必要がある。

前項までの2つの手法に本項の手法が加わり、同一の細胞腫に対する3つの実験系が確立できたことの研究上の意味合いは大きい。3つの実験系を併進することで、機序の解明、最適条件の設定、パルス電界印可技術の開発を相互に検討しながら効率的に進めることが可能になった。特に本研究では発育鶏卵法を採用したことで、飛躍的に実験数が増加できる。該当の分野の研究報告においては、動物実験の実施は少なくまた限定的であるが、それに対して今後の研究進展が期待される。

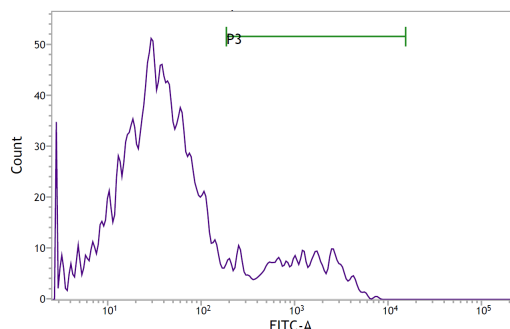


図8 解析結果 (パルス処理 6 時間後)

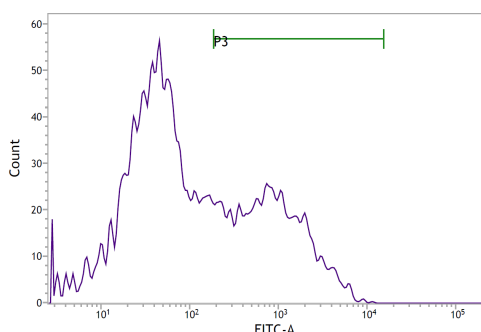


図9 解析結果 (パルス処理 24 時間後)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Shuzo Matsubara, Akito Nakagawa, Shota Kuniyasu, Kenji Teranishi, Yoshihiro Uto, Naoyuki Shimomura, Investigation of Effect of Applied Nanosecond Pulsed Electric Fields on Tumor, Proceedings of the 20th IEEE Pulsed Power Conference, 査読無, 2015, pp.374-378
DOI: 10.1109/PPC.2015.7296945

Hiroshi Fukuda, Masato Miyake, Hiroto Hirai, Kenji Teranishi, Naoyuki Shimomura, Seiichi Oyadomari, Effects on Endoplasmic Reticulum Stress Response of Applying Nanosecond Pulsed Electric Fields, Proceedings of the 20th IEEE Pulsed Power Conference, 査読無, 2015, pp.370-373
DOI: 10.1109/PPC.2015.7296943

Akito Nakagawa, Masataka Nagahama, Kenji Teranishi, Yoshihiro Uto, Naoyuki Shimomura, Effects of Applied Ultrashort Pulsed Electric Fields on Solid Tumor, Proceedings of the 2014 IEEE International Power Modulator and High Voltage Conference, 査読有, 2014, pp.45-48

DOI: 10.1109/IPMHVC.2014.7287203

Hiroto Hirai, Masato Miyake, Akihiko Nagano, Kenji Teranishi, Naoyuki Shimomura, Seiichi Oyadomari, Investigation About Effects on Endoplasmic Reticulum Stress Responses by Applying Nanosecond Pulsed Electricfields, Proceedings of the 2014 IEEE International Power Modulator and High Voltage Conference, 査読有, 2014, pp.419-422

DOI: 10.1109/IPMHVC.2014.7287300

Masataka Nagahama, Naoyuki Shimomura, Akito Nakagawa, Kenji Teranishi, Yoshihiro Uto, Hitoshi Hori, In Vivo Experimental Study of Nanosecond Pulsed Electric Field Effects on Solid Tumors, IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation, 査読有, Vol.20, No.4, 2013, pp.1266-1272

DOI: 10.1109/TDEI.2013.6571443

[学会発表](計6件)

Shuzo Matsubara, Akito Nakagawa, Shota Kuniyasu, Kenji Teranishi, Yoshihiro Uto, Naoyuki Shimomura, Investigation of Effect of Applied Nanosecond Pulsed Electric Fields on Tumor, 20th IEEE Pulsed Power Conference, 2015年6月2日, Austin, TX (USA)

Hiroshi Fukuda, Masato Miyake, Hiroto Hirai, Kenji Teranishi, Naoyuki Shimomura, Seiichi Oyadomari, Effects on Endoplasmic Reticulum Stress Response of Applying Nanosecond Pulsed Electric Fields, Proceedings of the 20th IEEE Pulsed Power Conference, 2015年6月2日, Austin, TX (USA)

松原 修三, 中川 晃登, 國安 翔太, 寺西 研二, 下村 直行, 宇都 義浩, ナノ秒パルス電界印加による鶏卵の死亡率の検討, 平成26年度電気関係学会四国支部連合大会, 2014年9月13日, 徳島大学(徳島県・徳島市)

Hiroto Hirai, Masato Miyake, Akihiko Nagano, Kenji Teranishi, Naoyuki

Shimomura, Seiichi Oyadomari, Investigation About Effects on Endoplasmic Reticulum Stress Responses by Applying Nanosecond Pulsed Electricfields, Proceedings of the 2014 IEEE International Power Modulator and High Voltage Conference, 2014年6月3日, Santa Fe, NM (USA)

Akito Nakagawa, Masataka Nagahama, Kenji Teranishi, Yoshihiro Uto, Naoyuki Shimomura, Effects of Applied Ultrashort Pulsed Electric Fields on Solid Tumor, Proceedings of the 2014 IEEE International Power Modulator and High Voltage Conference, 2014年6月2日, Santa Fe, NM (USA)

中川 晃登, 永濱 匡高, 寺西 研二, 宇都 義浩, 下村 直行, 極短パルス電界の固形腫瘍への効果に関する研究, 平成25年度電気関係学会四国支部連合大会, 2013年9月21日, 徳島大学(徳島県・徳島市)

[その他]

ホームページ等

<http://jemez.ee.tokushima-u.ac.jp/lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下村 直行 (SHIMOMURA Naoyuki)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号: 90226283

(2) 研究分担者

宇都 義浩 (UTO Yoshihiro)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号: 20304553

寺西 研二 (TERANISHI Kenji)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 80435403

山中 建二 (YAMANAKA Kenji)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号: 40641155