

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660240

研究課題名(和文) 生体深部腫瘍に対する低侵襲ラジオ波誘導温熱療法の開発

研究課題名(英文) Development of low invasive radio-induced hyperthermia against the deep part tumor

## 研究代表者

岡本 芳晴 (OKAMOTO, Yoshiharu)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：50194410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究により、オンコサーミアはファントムおよび動物実験結果から腫瘍組織を特異的に加温することが確認された。またラット胎児の脳の器官形成にオンコサーミアは影響を及ぼさない可能性が示された。担癌マウスを用いた実験結果より、本治療法はアポトーシスを誘導する事が示唆された。さらに本治療法は単独では動物の自然発症腫瘍に対して縮小は得られなかったが、低容量の抗癌剤と併用することにより、より効果的となることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we recognized oncothermia heat selectively tumor tissue. In vivo study using pregnant rat, it was found that oncothermia did not have effect on organogenesis of the brain. In addition, it was found that oncothermia induced apoptosis in mouse model. Furthermore, it was found that oncothermia did not decrease the volume of the animal spontaneous tumors. However, by combination of low dose chemotherapy, this therapy became to be effective for the tumors.

研究分野：獣医外科学

キーワード：がん 温熱療法 ラジオ波 胎児 自然発症動物 犬猫

## 1. 研究開始当初の背景

小動物獣医療における腫瘍疾患は、発症数の増加とともに高度な治療を望む飼い主の増加から、その重要性がますます高まってきた。固形腫瘍の治療原則は、基本的に手術であるが、十分な周辺切除ができない場合には、化学療法や放射線療法が併用治療されている。しかしながら、手術以外のこれらの方法には設備の問題や副作用の問題から逃れられず、動物と飼い主の両者から容易に受け入れられる治療法とはいい難い。申請者はこれまで表在性腫瘍に対しては、インドシアニングリーンを用いた光線温熱療法を開発し、臨床的にも効果を確認してきた。しかし転移性肺腫瘍等の深部に発生した腫瘍に関しては、医学も含めて決定的な治療法がないのが現状であり、予後不良として扱われる場合がほとんどである。2001年、ハンガリーのDr. Szaszは非侵襲性でかつ低出力のラジオ波誘導温熱療法を開発し、「オンコサーミア」と命名した。本治療法は現在医学領域で手術不応の主に表在性腫瘍症例に対して実験的治療として実施されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、オンコサーミアの非侵襲性と温熱効果に注目し、犬猫の自然発症深部腫瘍に対するオンコサーミアの応用を確立させることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)ファントムを用いたオンコサーミ

ア加温のシュミレーション。

- a. 5cm 角の腫瘍組織を準備した。
- b. 上下に電極板を備えた容器内 (直径 16cm、高さ 10cm) に豚の肝臓を入れ、肝臓組織の中心部に直径 5cm の孔を作製した。孔の中に腫瘍組織を設置して通電し、組織中の温度を測定した。

(2) 胎児を用いた本治療法の正常組織に及ぼす影響。

着床前期曝露群、器官形成期初期曝露群、器官形成期後期曝露群、胎児期曝露群を設定した (下記)。

実験動物: Wistar Imamichi ラット (9 週齢)、雌

- ・妊娠 0 - 3 日オンコサーミア処置群 (着床前期曝露群)
- ・妊娠 7-10 日オンコサーミア処置群 (器官形成期初期曝露群)
- ・妊娠 14-17 日オンコサーミア処置群 (器官形成期後期曝露群)
- ・妊娠 18-20 日オンコサーミア処置群 (胎児期曝露群)
- ・コントロール群 (オンコサーミア無処置群)

オンコサーミア処置は吸入麻酔下において 1 回につき 30 分間実施した。各群とも、妊娠 21 日目に胎児と胎盤を採材し、胎児致死率、胎児重量 (胎児発育不全の有無の評価)、胎児奇形の有無、胎児の脳の病理組織学的所見 (HE 染色)・TUNEL 染色陽性率・免疫組織化学的所見 (細胞増殖マーカー Phospho-Histone H3 およびアポトーシ

ス関連因子 Bax、 Fas の発現率)、 によ  
って、 オンコサーミアの胎児組織への影  
響を評価した。

( 3 ) 実験動物を用いた本治療法の有効  
性の確認。

Balb/c マウス(5-7 週齢)の両大腿皮下に  
colon26 を  $10^6$  個接種した。 2 週間後、 腫瘍が  
直径 5mm 大に生長した段階で実験に供した。  
全身麻酔下で右後肢腫瘍にオンコサーミア  
(1-2 W) を 30 分間処置した( 図 1 )。

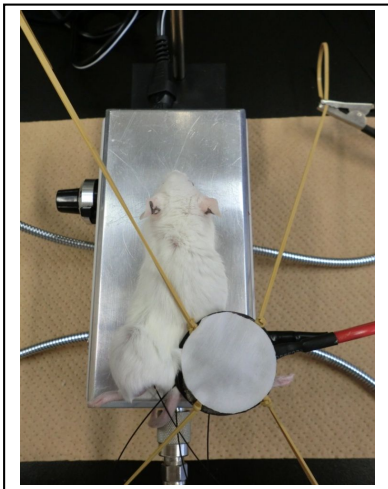


図 1 . 実験風景

処置中は腫瘍内温度、 腫瘍表面温度、 コン  
トロール腫瘍内温度、 直腸温度を測定した。  
処置後 6 , 24 , 72 , 120 時間後にマウスを安  
楽殺し、 腫瘍組織を採材した。 採材した組織  
はホルマリン固定後、 組織学的観察をおこな  
った。 組織学的観察として、 HE 染色、 TUNEL  
染色、 Ki-67 染色を施した。

( 4 ) 犬猫の自然発症深部腫瘍に対する  
本治療法の有効性の検証。

非臨床シュミレーションを基にした至適照射条

件により初期段階として本治療を腫瘍に施行し  
( 図 2 )、 その結果を集計した。 また集計結果より  
腫瘍の大きさ変化、 QOL、 有害事象の有無を分析し  
た。

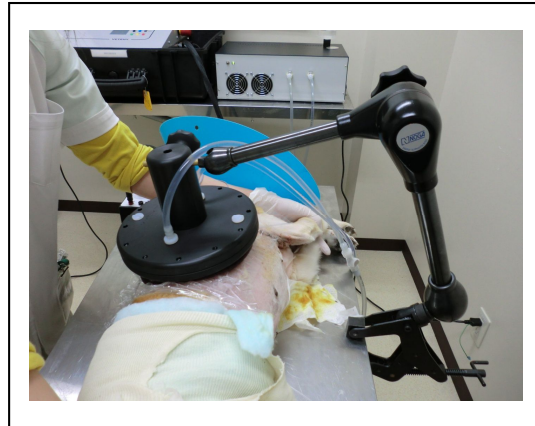


図 2 . 治療風景

#### 4 . 研究成果

( 1 ) ファントムを用いたオンコサーミ  
ア加温のシュミレーション。

正常組織および腫瘍組織の温度変化を図 3  
に示した。 正常豚肝臓組織に比べて、 腫瘍組  
織は温度が 4 上昇することが判明した。

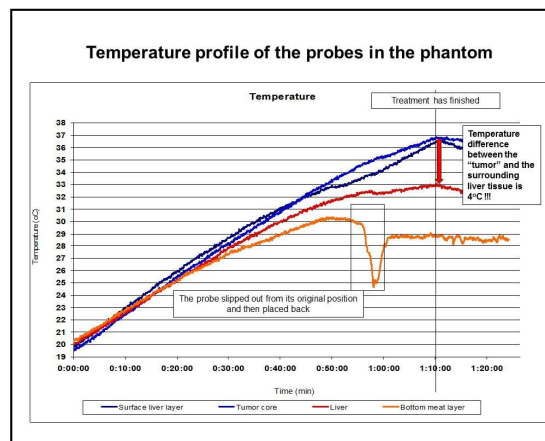


図 3 . 正常組織と腫瘍組織の温度変化

( 2 ) 胎児を用いた本治療法の正常組織  
に及ぼす影響。

妊娠 10 日目(ラット器官形成期前期)照射

群、妊娠 13 日目(器官形成期中期)照射群、妊娠 16 日目(器官形成期後期)照射群、各照射群に対するコントロール群を設定し、胎児の当該発達ステージにおけるオンコサーミアが脳に及ぼす影響を病理組織学的に解析した。いずれの照射群においても照射後 24 時間後に胎児を採材し、胎児脳のパラフィン包埋切片を作製し、HE 染色を施した。いずれの照射群の胎児脳においてもコントロール群に比較し、明らかな病理組織学的変化は認められなかった。本実験によって、ラット胎児の脳の器官形成にオンコサーミアは影響を及ぼさない可能性が示された。

### (3) 実験動物を用いた本治療法の有効性の確認。

温度変化に関しては、オンコサーミアを処置した腫瘍(処置群)では、腫瘍組織の表面及び腫瘍内のみならず温度上昇がみられた(図4)。

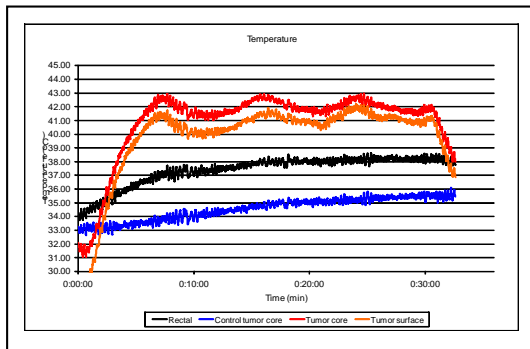


図4．各部位の温度変化

壊死面積に関しては、未処置の腫瘍(対照群)では、壊死面積は時間経過と共にほとんど変化がなかった。いっぽう、処置群では、処置後 6 時間では壊死面積が 8.7%だったが、24 時間後には 62.3%に急速に増加し、その後は 120 時間まで変化なかった(図5)。TUNEL

染色では、処置後 72 時間において対照群では壊死組織周辺に染色された腫瘍細胞はあまり観察されなかった。処置群では、壊死組織周辺に染色された腫瘍細胞が多数観察された。Ki-67 染色では、処置後 6 時間で対照群では、染色された腫瘍細胞が多数観察されたが、処置群ではわずかであった。

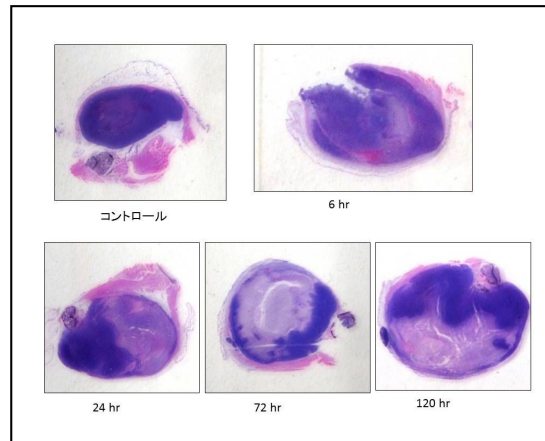


図5．経時的壊死病変の変化

### (4) 犬猫の自然発症深部腫瘍に対する本治療法の有効性の検証。

これまでに 42 症例に対してオンコサーミアを実施した。腫瘍部位の内訳は胸腔 19 例、腹腔 12 例、脳脊髄 7 例、その他 4 例であった。胸腔については 19 例中 18 例が転移症例であった。いずれの症例も手術不可能な症例であった。このうち 9 例については週 3 回で計 6 回オンコサーミア単独を実施して治療前後で CT 検査を行い、腫瘍の大きさを計測した。その結果、腫瘍の大きさは 7 例で不変、2 例で増加だった(表1)。他の 28 例については治療間隔が 1 週間から 1 ヶ月と幅があった。低容量化学療法を併用することにより、腫瘍体積の増加が抑制される症例が多かった(表2)。

No.	名前	頻度(週)	回数	腫瘍の体積変化率(%)	効果判定 <sup>1)</sup>	pre	post
1	石原テツヤ	3	9	18.1	SD	176.00	207.80
2	三好ロン	3	6	ND	SD	ND	ND
3	奥西らん丸	3	11	70.7	PD	2432.00	4152.00
4	青木ゲン	3	5	13.4	SD	445.15	504.89
5	遠藤ダックス	2	8	ND	SD	ND	ND
6	岩本ミーシャ	3	5	29.2	PD	13.95	18.03
7	竹下テン	2.5	5	14.0	SD	259.04	295.19
8	深津ヒット	2	5	7.6	SD	161.78	174.10
9	山中ダイスケ	2	8	ND	SD	ND	ND

1) 効果判定：治療後1ヶ月時

表1. オンコサーミア単独で治療した結果

No	部位	腫瘍	種	品種	性別	年齢	体重(kg)	回数	頻度	結果
1	胸腔	リンパ腫	犬	G. 499 <sup>W</sup> -	去勢雄	9	27.3	20	1W-1M	PR
2	胸腔	リンパ腫	猫	Mix	去勢雄	9	5.4	15	2W-1M	CR
3	胸腔	軟骨肉腫肺転移	犬	キャバリア	避妊雌	9	6.5	5	4W	PD
4	胸腔	メラノーマ肺転移	犬	L. 499 <sup>W</sup> -	雄	10	28.4	12	2w	PD
5	胸腔	骨肉腫肺転移	犬	ヨーキー	避妊雌	10	3.8	14	1/M	SD
6	胸腔	乳癌肺転移	犬	柴	雌	7	8	7	1/W	PD
7	胸腔	乳癌肺転移	猫	Mix	雌	13	3.2	8	1/W	SD
8	胸腔	乳癌肺転移	犬	Mix	雌	9	12.8	10	3/W	SD
9	胸腔	メラノーマ肺転移	犬	Am. コッカー	雄	8	18.7	11	3/W	CR
10	頸部	顎腺腫	犬	ダックス	雄	11	5.5	9	1~2w	CR
11*	頸部	扁平上皮癌	犬	キャバリア	雌	13	5.5	7	1/M	PD
12	胸腔	肝臓癌	犬	Mix	雄	13	20.5	18	2w	PR
13	腹腔	インスリノーマ	犬	M. ダックス	去勢雄	9	6.8	10	1/3W	SD
14*	腹腔	胃腺癌	犬	499 <sup>W</sup> -	雄	8	31	12	1~2w	SD

1) 抗がん剤：カルボプラチン(通常量の1/3量)  
\*：免疫療法(丸山ワクチン)併用

表2. 低容量抗がん剤を併用した結果

以上の結果より、オンコサーミアは獣医領域でも有用であることが示唆された。今後さらなる改良を加えることにより、より効果的な治療が可能となると思われる。

## 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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

岡本芳晴、アンドチ・ガボール、東 和生、大崎智弘、伊藤典彦、村端悠介、柄 武志、今川智敬。獣医領域でのオンコサーミアの使用。第1回オンコサーミア研究会 富山国

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡本 芳晴 (OKAMOTO, Yoshiharu)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：50194410

### (2) 研究分担者

田村 裕 (TAMURA, yutaka )

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：50263174

粟津 邦男 (AWAZU, Kunio)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：30324817

浅沼 武敏 (ASANUMA, Taketoshi)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：40332473

杉山 昌彦 (SUGIYAMA, Masahiko)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00432609

### (3) 連携研究者

大崎 智弘 (OSAKI, Tomohiro)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：40421332

柄 武志 (TSUKA, Takeshi)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号： 30432610

東 和生 (AZUMA, Kazuo)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号： 50721841