

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目： 基礎研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591711

研究課題名 (和文) 脳腫瘍に対する音響化学療法の臨床応用に向けた基礎的研究

研究課題名 (英文) Basic Study for Clinical Application to the Photodynamic Therapy to Malignant Brain Tumor

研究代表者

福島 武雄 (FUKUSHIMA TAKEO)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：10078735

研究成果の概要：悪性脳腫瘍はいかなる治療に対しても抵抗性で予後不良である。我々は新たな治療法として音響化学療法を開発した。ラット C6 グリオーマ細胞および人グリオーマ株細胞を用い *in vitro* および *in vivo* (ラットおよびヌードラットで実験脳腫瘍を作成) で音響化学療法を行ってきた。音響化学活性物質としてフォトフィリンおよびローズベンガルを用い超音波の増強効果を確認することができた。今回は音響化学物質として新たに開発された 5aminolevulinic acid (5-ALA) を用い、次にタラポルフィリンを計画した。5-ALA はヘムの前駆体でありプロトポルフィリン IX により代謝され悪性神経膠腫に親和性あるため臨床応用が期待される物質である。まずラット C6 グリオーマ細胞を雌 Wistar rat 脳に移植し実験脳腫瘍を作成した。移植後 1 週間目に再開頭を行い硬膜表面より定位的に収束型超音波照射を行った。超音波照射条件は、基礎実験で確定した 25W/cm²、5 分間とし、5-ALA 投与量は 100mg/kg とした。コントロールとして生理食塩水を投与した。超音波照射は 5-ALA 投与 3 時間後に行った。照射後 1 週間後に断頭し、大脳を摘出し、冠状断に切り薄切標本作製し組織学的に検討した。未処置群では、基底核、海馬、側脳室下角に進展する腫瘍がみられた。超音波単独群の腫瘍の長計は 9.3 ± 0.6 mm、長径と短径の積は 58.0 ± 11.3 mm² で、5-ALA 投与群では 8.8 ± 2.5 mm、 44.6 ± 11.3 mm² で有意差はないものの腫瘍の縮小傾向があった。また 5-ALA 投与後超音波照射群では、腫瘍内に空洞化がみられた症例があった。C6 グリオーマに集積した 5-ALA と超音波の相乗効果を示唆する所見と考えられた。今後超音波照射後の観察および生存日数の検討も行う必要がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：脳神経外科・脳腫瘍学

キーワード：1. 音響化学療法 2. 集束型超音波 3. ラット C6 グリオーマ 4. 実験脳腫瘍 5. 5-aminolevalinic acid (5-ALA) 6. 音響化学活性物質

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は音響化学療法による実験脳腫瘍治療として、in vivoにてWister ratに rat C6 glioma を移植し、集束型超音波を用いて抗腫瘍効果を確認した。また、in vitroにおいては C6 glioma 及びヒト glioma 細胞株である U251、U105 細胞に対し、平行超音波を用いて有効性を検討し、細胞株の種類により音響化学療法の感受性が異なることを明らかにした。

2. 研究の目的

以上の結果を踏まえ、今回、新たな音響化学的活性物質としてヘムの前駆体でありプロトポルフィリンIXにより代謝される 5 aminolevulinic acid(ALA) を投与して in vivo における音響化学療法の有効性について検討した。

3. 研究の方法

実験動物は、雌性 Wister rat (体重 250-300g: 九動) を使用した。ラットグリオーマ細胞株である C6 を用いた。これらを 10%ウシ血清 (Calf serum, CS; Hyclone lab., USA) に抗生物質 (100U/ml penicillin, 100mg/ml Streptomycin) を添加した DMEM (SIGMA) 培地

を用い 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。継代操作は単層培養中の細胞にトリプシン処理 (0.1% trypsin-0.02% EDTA) を行い、細胞をフラスコ底面より剥離し、3-4 日毎の操作にて維持した。移植脳腫瘍モデルの作成：

雌性 Wister rat (体重 250-300g: 九動) をソムノペンチル (40mg/kg) 腹腔内投与による全身麻酔を施した後に、頭部を定位脳手術装置に固定した。剃毛のうえアルコールで消毒した後に頭頂部正中に 1.5cm の皮膚切開を行い、左側頭筋、骨膜を頭蓋骨より剥離した次に顕微鏡下にデンタルドリルを用いて、bregma より 2mm 尾側、4mm 外側に約 1.5mm の骨窓を設けた。C6 グリオーマ細胞懸濁液 (5 × 10⁵ cells/5 μl) をハミルトンシリンジに吸引し、定位的に脳実質深部に対し 6mm 刺入し 1mm 引き上げた位置で約 1 分間かけて注入した。処置後はケージに戻して引き続き飼育した。

音響化学的活性物質：ヘムの前駆体でありプロトポルフィリンIXにより代謝される 5 aminolevulinic acid (ALA) を用いた。5-ALA を 100mg/kg 経口投与し、投与 3 時間後に超音波照射を行った。

超音波照射装置：集束型超音波アレイトランスデューサー(直径 10mm、日立製作所製)を用いた。超音波の発生は、起動器(model 210 L, ENI, USA)によって周波数 1.03MHz の正弦波として駆動させ、接続したオシロスコープでモニタリングした。また内部には加熱を防止する冷却用のパイピングが備わっている。また本装置の音場の検討で、最大音圧場はトランスデューサー・リムより 7mm の深さにあり、進行方向の幅は約 2-3mm で、トランスデューサーと平行面の音場の広がり は 1mm であった。

超音波照射法：ラットをソムノペンチル (40mg/kg) 腹腔内投与による全身麻酔を行った後に、頭部を定位脳手術装置に固定した。剃毛のうえイソジンで消毒し、頭頂部正中に 2cm の皮膚切開を行ない、左側頭筋、骨膜を頭蓋骨より剥離し骨を露出させた。顕微鏡下にデンタルドリルを用いて左側頭頭頂骨に直径 10mm の開頭を行った。硬膜表面に超音波トランスデューサーを密着させ、その隙間に空気を混入させないため超音波用ゼリーを充填し、5-ALA 経口投与後それぞれ 3 時間に大脳深部へ定位的に超音波照射を行った。

超音波照射条件の検討：正常脳組織に確実に損傷を引き起こす照射量及び絶対に損傷を与えない照射量を確定するための予備実験として以下の検討を行った。

1) 方法

照射強度を 25, 100, 150W/cm² とし、これに照射時間を 10, 30 秒, 1, 2, 3, 5 分間とした条件で照射を行った。照射 24 時間後に、ネンブタール大量腹腔内投与により断頭し大脳を摘出した。脳組織の破壊の有無を肉眼的に判定し、超音波の照射強度と時間との関係を検討した。

2) 結果

強度 150W/cm² では 30 秒間の照射で全例に破壊巣が確認できた。強度 100W/cm² の場合、

照射時間が 1, 2, 3, 5 分と長くなるにしたがい、破壊巣の形成率は 0, 0, 33.3, 83.3%と増加した。強度 25W/cm² では 5 分間の照射でも破壊巣はみられなかった。このように破壊巣の発生頻度は超音波の照射強度と時間に比例する結果が得られた。

組織学的検討

1) 方法

実験 1 の結果より照射強度を 25W/cm²、照射時間は 5 分に設定して超音波照射を行った。5-ALA 投与量は 100mg/kg とし、照射単独群には同量の生理食塩水を投与した (各 4 匹)。照射 1 週間後に断頭し大脳を摘出した。取り出した脳を照射中心部で冠状方向に切りだして 10%ホルマリンで固定した。固定 3 日後にパラフィン包埋を行い、5 μ m の薄切標本をシランコートのスライドグラスに作成し、各々hematoxyline-eosin 染色、Luxol fast blue 染色し組織学的検討を行った。

3) 結果

超音波照射単独、5-ALA 投与群のいずれにおいても脳内に組織学的変化はみられなかった。

実験脳腫瘍に対する音響化学療法:C6 glioma 細胞を脳内に移植後 1 週間目に、骨窓を中心に直径 10mm の再開頭を行い硬膜表面から大脳深部の移植脳腫瘍に対して定位的に超音波照射を行った。音響化学的活性物質は、5 aminolevulinic acid(ALA)を用い 100mg/kg 経口投与し、投与 3 時間後に超音波照射を行った。超音波照射装置として集束型超音波アレイトランスデューサー(直径 10mm、日立製作所製)を用いた。照射強度を 25W/cm²、照射時間は 5 分に設定した。照射単独群には同量の生理食塩水を投与した (各 4 匹)。照射 1 週間後に断頭して大脳を摘出し、照射中心部で冠状方向に切りだして 10%ホルマリンで固定し、固定 3 日後にパラフィン包埋を行い、

5 μ m の薄切標本をシランコートのスライドガラスに作成し、Hematoxyline-eosin 染色を行い治療効果について組織学的検討を行った。

4. 研究成果

未処置群では左基底核の外側に海馬から側脳室下角へ進展する楕円形の腫瘍像がみられた。未処置群(n=3)の腫瘍長径は 8.9 \pm 1.0mm、長径と短径の積をとると 61.5 \pm 18.8mm²であった。超音波照射単独群(n=4)の腫瘍長径は 9.3 \pm 0.6mm、長径と短径の積をとると 58.0 \pm 11.3mm²、5-ALA 経口投与単独群(n=5)の腫瘍長径は 8.6 \pm 0.6mm、長径と短径の積をとると 55.2 \pm 10.7mm²であった。一方、5-ALA 経口投与後に超音波を照射した群(n=4)の腫瘍長径は 9.0 \pm 3.6mm、長径と短径の積をとると 40.5 \pm 17.9mm²で、腫瘍長径と短径の積は有意差こそないものの小さい傾向であった。また、そのうちの1例は超音波照射後に一旦右片麻痺が増悪したものの、照射1週間後には著明な改善がみられた。この症例では腫瘍内の大部分が空洞化していた。Gliomaに集積した5-ALAと超音波の相乗効果が示唆された。

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 4 件)

1. Nonaka M, Yamamoto M, Yoshino S, Umemura S, Sasaki K, Fukushima T. *Sonodynamic Therapy of Focused Ultrasound and a Photosensitizer Causes a Selective Antitumor Effect in a Rat Intracranial Glioma Model. Anticancer Research 29:943-950(2009)査読有
2. Hayashi S, Yamamoto M, Tachibana K, Ueno Y., Bu G., Fukushima T. :Mechanism of Photofrin-induced Ultrasound-induced Human Glioma Cell Death. Anticancer Research 29:897-906, (2009)査読有
3. Yoshino S., Fukushima T., Hayashi S., Nonaka M., Ogawa K., Sasaki K., Umemura S.: Effects of Focused Ultrasound Sonodynamic Treatment on the Rat Blood-Brain Barrier. Anticancer Research 29:889-896 (2009)査読有
4. Oshiro S., Tsugu H., Komatsu F., Ohmura T., Ohta M., Sakamoto S., Fukushima T., Inoue T.: Efficacy of Temozolomide Treatment in Patients with High-grade Glioma. Anticancer Research 29(911-918 (2009)査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. 吉野 慎一郎、福島武雄 : 音響化学療法における血液脳関門に与える影響についての検討、第 11 回バイオ治療法研究会、平成 19 年 12 月 1 日、東京理科大学森戸記念館
2. 林 修司、福島武雄 : 悪性神経膠腫細胞に対するポルフィマーナトリウムを用いた音響化学療法の効果。平成 19 年 12 月 1 日東京理科大学森戸記念館
3. 野中 将、福島武雄 : Sonodynamic Therapy Consisting of Focused Ultrasound and a Photosensitizer Causes a Selective Anti-Tumor Effect in a Rat Intracranial Glioma Model. H 生成 19 年 12 月 1 日東京理科大学森戸記念館

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 武雄 (FUKUSHIMA TAKEO)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号 : 10078735

(2) 研究分担者

継 仁 (TSUGU HITOSHI)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号 : 80279273

大城 真也 (OSHIRO SHINYA)

福岡大学医・学部・講師

研究者番号 : 40309901

小松 文成 (KOMATSU FUMINARI)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号 : 70412591

(3) 連携研究者

なし