

## 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24年 5月15日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22656053

研究課題名（和文） 組織に熱的損傷を与えない細胞膜電壊治療技術

研究課題名（英文） Irreversible electroporation as a medical treatment without thermal damage to extracellular matrix

研究代表者

高松 洋 (TAKAMATSU HIROSHI)

九州大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：20179550

研究成果の概要（和文）：本研究は、細胞にパルス電圧を印加して細胞膜を破壊するエレクトロポレーションを癌などの組織に適用する新しい治療法の開発に関するものである。この方法の最大の特長は、細胞外基質を正常なまま保つことができるので、組織が再生しやすいことにある。そのためには、穿刺した2本の電極間の細胞が確実に破壊され、かつ、ジュール発熱による組織の熱的損傷が生じない条件を決定することが重要である。そこで、本研究では、三次元数値解析により電位および温度分布の予測を行うとともに、その実験的検証を目的として、感温性インクを用いた極短時間温度上昇の検出法を確立した。

研究成果の概要（英文）：The irreversible electroporation (IRE) is a novel method to ablate abnormal cells by applying a high voltage between two electrodes that are stuck into abnormal tissues. One of the advantages of the IRE is that the extracellular matrix (ECM) may be kept intact, which is favorable for healing. For a successful IRE, it is therefore important to necrotize cells between electrodes without thermal damage to ECM resulted from the Joule heating within the tissue. In the present study, three-dimensional (3-D) analyses were conducted to predict temperature rise during the IRE. A new method for measuring instant temperature rise using temperature-sensitive ink was also developed for validating the simulated results.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キーワード：不可逆エレクトロポレーション、細胞膜電壊療法、低侵襲治療、三次元解析、電場解析、熱伝導解析、温度検出法、生体疑似組織

## 1. 研究開始当初の背景

エレクトロポレーションは、細胞にパルス電圧を印加して細胞膜に穿孔する技術であ

る。適当な電圧を選択すれば、印加後に可逆的に孔が塞がるため、細胞内に巨大分子や遺伝子を導入する手法として用いられてきた。

一方、パルス電圧が過大であれば不可逆的な穿孔が生じ、細胞は破壊される。近年、Rubinsky らはこの不可逆的な穿孔を利用して癌などの細胞を破壊する新しい治療法を提案した。この方法では、パルス電圧の印加条件を調整すれば生体内部のジュール発熱による温度上昇が制御でき、その結果、タンパク質の熱変性を避けて細胞だけを破壊することが可能となる。このように生体組織の熱的損傷が回避できると、細胞外基質が健全に保たれるためその後の組織の再生が容易になる。したがって、この不可逆電極ポレーション (IRE, 本研究者が細胞膜電壊療法と命名) では、組織の過大な温度上昇を避けて、かつ、電極間の細胞を確実に壊死させることが重要となる。これに関して Rubinsky らは、二本の電極を組織に穿刺してパルス電圧を印加する場合を想定し、二次元の電場と温度上昇を数値解析により求めた。しかし、実際には三次元的な電場と温度場が形成されるため、熱的損傷を防ぐ条件が二次元解析で得られた結果と大きく異なる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下のとおりである。

- (1) 生体組織に穿刺した電極プローブまわりに生じる電場と温度場を三次元解析より求め、二次元解析結果との違いを明らかにする。
- (2) 解析結果の妥当性を検証するため、極短時間温度上昇の検出法を開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) 三次元電場・温度場解析

図1に物理モデルを示す。直径  $d$  の電極プローブ2本を生体組織に軸間距離  $l$  で平行に穿刺し、プローブ間に電位差  $E$  がステップ状に印加される場合を考える。そして、プローブ先端から長さ  $h$  の部分が導電部であり、それ以外のプローブ表面は電気的に絶縁されているものとする。組織内の電場の式は電位を  $\phi$  とすると次式で表される。

$$\frac{\partial}{\partial x} \left( \frac{\partial \phi}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left( \frac{\partial \phi}{\partial y} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left( \frac{\partial \phi}{\partial z} \right) = 0 \quad (1)$$

そして、局所の電流密度  $i$  は、次式で求められる。

$$i = \sqrt{i_x^2 + i_y^2 + i_z^2} \quad (2)$$

ここに、

$$i_x = -\frac{1}{\gamma} \frac{\partial \phi}{\partial x}, \quad i_y = -\frac{1}{\gamma} \frac{\partial \phi}{\partial y}, \quad i_z = -\frac{1}{\gamma} \frac{\partial \phi}{\partial z} \quad (3)$$

である。ここに、 $\gamma$  は比抵抗である。境界条件は、二本のプローブ導電部表面でそれぞれ  $\phi = -E/2$  と  $\phi = +E/2$ 、絶縁部で法線方向の電

位の勾配が0、プローブから十分に離れた位置で  $\phi = 0$  である。

一方、組織内のエネルギー式は次式となる。

$$\rho c \frac{\partial T}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left( \lambda \frac{\partial T}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left( \lambda \frac{\partial T}{\partial y} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left( \lambda \frac{\partial T}{\partial z} \right) + \gamma i^2 \quad (4)$$

ここに、 $\rho$  は密度、 $c$  は比熱、 $\lambda$  は熱伝導率である。本研究では、系の三次元性を明らかにすることを第一の目的とするため、血液灌流項を含む生体熱輸送方程式ではなく、通常の熱伝導方程式を解いた。解析には汎用有限要素法解析ソルバーCFdesignを用い、半円筒状の領域を四面体要素で節点数866,978、要素数4,971,990にメッシュ分割した(図2)。そして、式(1)を解いて電場を求めた後、式(4)を解いて温度場を求めた。

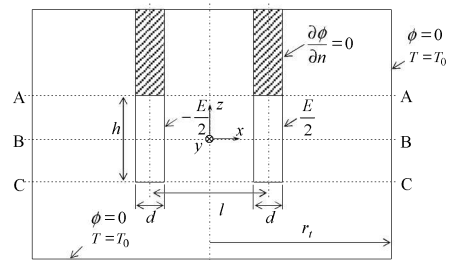


図1 物理モデル

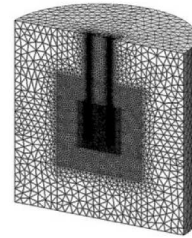


図2 有限要素モデル

### (2) 温度上昇の検出

精製水に4 wt%寒天粉末および0.9 wt% NaClを加えて加熱溶解し、これに赤色の感温性インク(LFBRF-12EF, Pilot)を1 vol%混合して冷却固化させたものを生体ファントムとして用いた。感温性インクはある閾値温度に達すると分子構造が変化しインクの色が消失する性質を持つ。

感温性インクの温度特性を調べるために、白金短細線プローブ(直径50 μm, 長さ13 mm)を用いた実験を行った。予め温度と電気抵抗値との関係を検定したプローブをテスト容器に固定し、容器を生体ファントムで満たした。これを恒温槽に浸けて50°Cに保ち、加熱電流(0.50 mA)を20秒間通電した。そして四端子法により電気抵抗値を計測してプローブ温度を求めるとともに発熱量を算出した。加熱後、生体ファントムをテスト容

器から取り出し、プローブ中央位置における水平断面で厚さ 1mm の薄切試料を得た。実体顕微鏡とデジタルマイクロスコープを用いてこの試料を観察し、断面画像を記録した。そしてプローブ中心から半径  $r$  方向の輝度分布を求めるため、幅 20 pixels の領域の輝度を計測した。

プローブ周りの温度分布は、一様発熱する白金短細線まわりの非定常熱伝導の数値解析 (二次元円筒座標系) より求めた。そして、プローブ中央の半径  $r$  方向の温度分布を、前述の画像解析より求めた輝度分布と比較して温度と輝度の関係を定式化した。

この輝度-温度検定式を用いて、生体ファントムに電界パルスを印加した後の電極周囲の温度上昇を評価した。プラスチック容器 (内径 20 mm, 深さ 42 mm) にステンレス鋼製電極 (図 3, 直径 1 mm, 通電部長さ 10 mm, 電極間距離 10 mm) を固定し、容器を生体ファントムで満たした。冷却固化させた後、恒温槽内で 37°C に保ち、パルス電圧発生装置を用いて 250 V の矩形波パルスを印加した。印加条件は、パルス幅 0.1 ms, 印加回数 90 回 (条件 A), あるいは、パルス幅 1 ms, 印加回数 9 回 (条件 B) とした。パルス間隔はいずれも 100 ms とした。パルス印加後、生体ファントムを取り出し、電極と直交する断面の薄切試料 (厚さ 1 mm) を作製した。電極絶縁部と通電部の境界を通る断面を観察対象とし、先と同様に電極中心から外周に向かって  $r$  方向の輝度変化を計測した。そして輝度-温度検定式を用いて、電極周囲の温度分布を求めた。

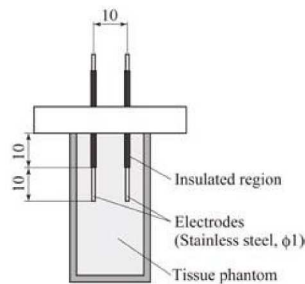


図 3 生体疑似組織試料と電極

#### 4. 研究成果

##### (1) 三次元電場・温度場解析

図 4 に電極間距離  $L (=l/d) = 10$  の場合の無次元電位の勾配  $\nabla\phi$  ( $\phi = 2\phi/V$ ) の分布を示す。電位の勾配は電極近傍で大きく、電極から離れるとともに小さくなるため、電位勾配の等値面は鞍型に中央が凹んだ形となる。したがって、電極で挟んだ領域全体の細胞を破壊するには、電極の先端および根元の電極間中央部の電位勾配が細胞膜の不可逆損傷に必要な値以上になる必要がある。一般に細胞膜の不可逆損傷には 1 V が必要とされているので、

直径が 50  $\mu\text{m}$  の細胞には 40V/mm の電位勾配が必要となる。この条件を満足する印加電圧を  $L$  に対して示したのが図 5 である。電極間が大きくなるほど高い電圧を印加する必要がある、この図から最低必要電圧が推定できる。

図 6 は図 1 に示す 3 つの断面 (AA, BB, CC) の右側プローブ近傍の  $X (=x/d)$  方向の温度上昇を示している。いずれの断面でもプローブ表面で温度上昇は最大となり、その値は AA 断面では BB 断面の約 8 倍に達している。この原因は、プローブの絶縁部と導電部の境界で電流の集中が生じ、結果として局所的な発熱が大きくなっていることにある。したがって、図 6 の結果は、組織内の最大温度上昇の値が、二次元解析と三次元解析では著しく異なることを表わしており、最適な電圧印加条件の決定には三次元解析が不可欠である。

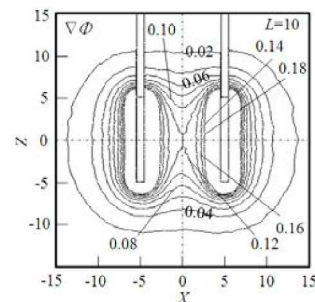


図 4 電界分布 ( $L=10$  の場合)

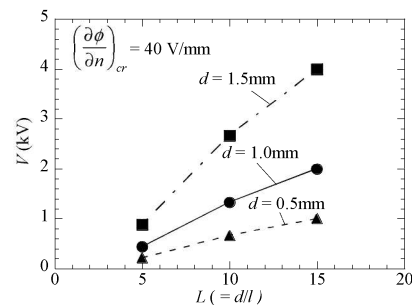


図 5 電極間のすべての細胞を壊死させるのに必要な電圧

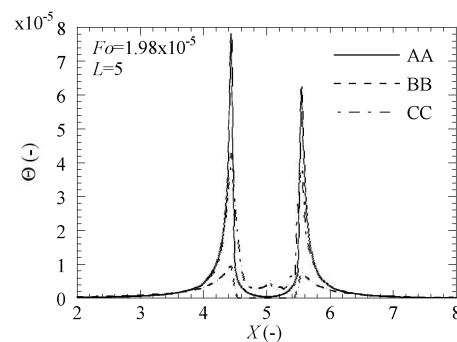


図 6 無次元温度上昇の分布



図7は組織内の最高温度の時間変化を示している。最高温度は時間とともにほぼ直線的に上昇する。また、温度上昇は印加電圧が大きいほど高くなる。

図8は図7に示した温度上昇に対する生体組織の熱損傷の程度

$$\Omega = \int_0^t Ae^{-E/RT} dt \quad (5)$$

を三種類の組織（ラット尾部の腱(RTT)、表皮、ヒト大動脈）について推算したものである。ここに、 $\Omega$ は損傷の程度を表すパラメータ、 $A$ は頻度因子、 $E$ は活性化エネルギー、 $R$ は一般気体定数であり、 $\Omega = 1.0$ では約64%が熱損傷を受けることになる。熱損傷の程度はパルス電圧印加後、ある時間経過後から急激に増加する。そして、組織の種類に大きく依存し、3つの中では腱が最も熱損傷を受けやすい。電極直径が1 mmの場合、図5によると電極間距離を15 mmにすると細胞の破壊には約2 kVの電圧が必要である。この場合、上皮と同様な熱的耐性を有する組織の場合には100  $\mu$ s以上のパルスでは損傷が生じることが図8から推定される。

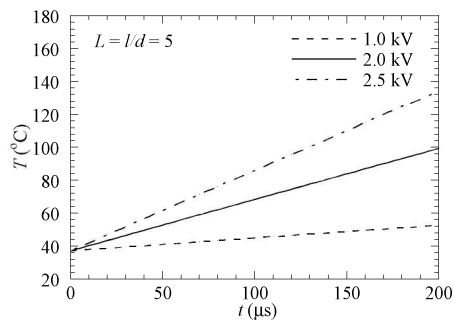


図7 最大温度上昇

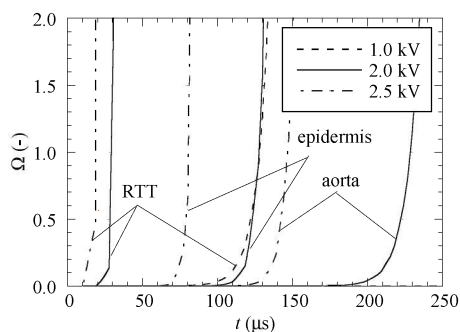


図8 組織の熱的ダメージとパルス長さの関係

## (2) 温度上昇の検出

白金短細線プローブを通電加熱した後、生体ファントムの $r$ 方向の輝度変化を画像解析した結果を図9に示す。プローブに隣接した

領域で輝度は145以上の高値を示した。中心から離れるにつれて輝度はなだらかに減少し、約0.8 mm以上離れたところでは130以下でほぼ一定であった。

熱伝導解析より求めたプローブ周囲の温度分布を図10に示す。プローブ表面温度は67.3°Cであり、プローブ近傍における温度勾配が大きかった。中心から半径0.5 mm以内で約20 Kの温度上昇が認められた。

図9, 10を比較して得られた輝度と温度の関係を図11に示す。輝度は55°Cから58°Cの狭い温度範囲で急変し、この閾値以下では134、閾値以上では154で一定であった。この輝度 $I$ と温度 $T$  [°C]の関係を以下のように定式化できた。

$$\begin{aligned} T &> 58.0 && (I > 153.5) \\ T &= 0.147 \times I + 35.4 && (133.9 < I < 153.5) \\ T &< 55.1 && (I < 133.9) \end{aligned} \quad (6)$$

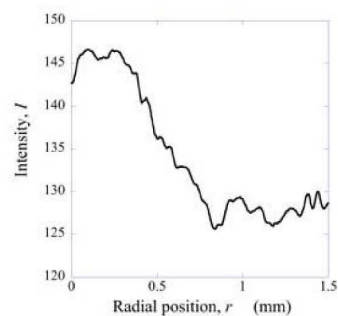


図9 単細線法で加熱したあとの試料断面における $r$ 方向輝度分布

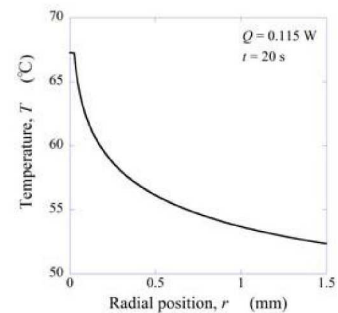


図10 単細線法で加熱したあとの試料断面における $r$ 方向温度分布の計算値

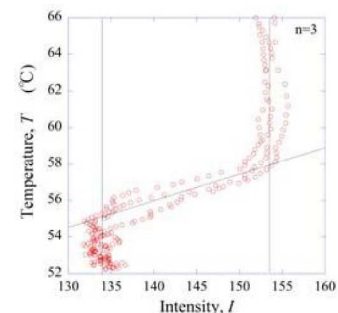


図11 輝度と温度の関係

電界パルスを印加した後の生体ファントム断面画像を図 12 に示す。印加条件 A では感温性インクの明らかな色変化は認められなかったが、条件 B では電極周囲で色が消失していた。図中に示した帯状領域に対して画像解析を行い、輝度-温度検定式を用いて求めた温度分布を図 13 に示す。条件 A では温度上昇は閾値以下であった。一方、条件 B では電極表面から 0.35 mm 以内 ( $r < 0.85$  mm) で 18 K、0.2 mm 以内 ( $r < 0.7$  mm) で 20 K の温度上昇が認められた。

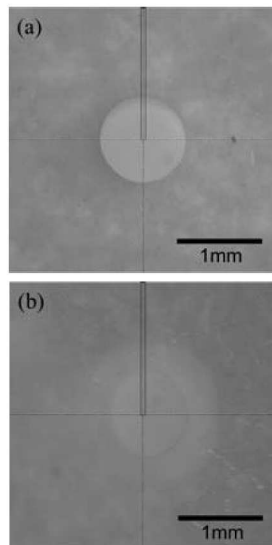


図 12 エレクトロポレーション後の生体ファントム断面の顕微鏡写真;(a)印加条件 A, (b)印加条件 B

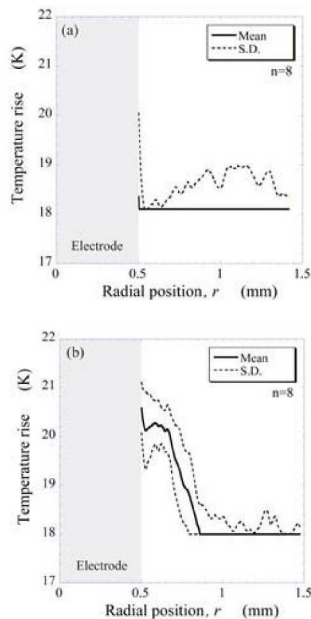


図 13 電極周りの温度上昇;(a)印加条件 A, (b)印加条件 B

本研究では、55~58℃に閾値を有する感温性インクを用いることにより、初期温度 37℃ の生体ファントムが極短時間パルスの印加に起因して 18 K 以上の温度上昇に曝されることが明らかになった。ECM を構成するタンパク質の変性温度は約 60℃であるから、電界パルスによる ECM の温度上昇で熱的損傷が生じる可能性がある。

本法と類似した手法に、感温性液晶を試料中に分散させてその色変化を計測する方法がある。しかし、感温性液晶は温度の上昇、下降のいずれに対しても反応するために試料内部の温度分布を計測するためには透明な試料を用いてリアルタイム計測を行う必要がある。したがって、不透明な生体ファントムを対象に電極周囲の温度分布を計測するには適用が難しい。一方、ヒト角質層に数~数百 ms 長さの電界パルスを与え、その温度変化を赤外線カメラによってリアルタイム計測した例もあるが、得られる温度分布が試料表面に限られるだけでなく、含水する生体試料では赤外光が大きく吸収されるという問題がある。これに対して本研究の方法は感温性インクが経験した最高到達温度の情報を試料に留めておいて後から計測するものである。したがって温度履歴を得ることはできないが、電界パルス印加による生体組織の熱変性の予測が最も重要であるので、本法は非常に有用である。

パルス印加条件 A, B は、パルス幅と印加回数が異なるが、生体ファントムに与えられるエネルギー総量は同じである。しかし、タンパク質の熱変性を引き起こすに足る温度上昇は、パルス幅の長い条件 B だけで認められた。この結果は、パルス幅の短いパルスを生体組織に連続的に印加したほうが、同じエネルギーを有する長いパルスを印加するよりも電極周囲の温度上昇が小さくなった有限要素解析結果の妥当性を証明する直接的な証拠を示している。

## 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 1 件)

- ① S. Nomura, K. Kurata, H. Takamatsu, Effect of Three-Dimensional Electric Field and Heat Conduction to Electrodes on the Temperature Rise During Irreversible Electroporation, Proc. The 8th ASME-JSME Thermal Eng. Joint Conf., AJTEC2011-44214, 1-8 (査読有) .

[学会発表] (計 4 件)

- ① 吉井峻, 藏田耕作, 内田悟, 福永鷹信, 高松洋, 感温性インクを用いた生体擬似組織の極短時間温度上昇の計測, 日本機械学会

熱工学コンファレンス 2011, 2011.10.30, 静岡.

- ② 野村征爾, 藏田耕作, 高松洋, 細胞膜電壊療法における組織の凍結シミュレーション, 第 48 回日本伝熱シンポジウム, 2011.6.3, 岡山.
- ③ S. Nomura, K. Kurata, H. Takamatsu, Effect of Three-Dimensional Electric Field and Heat Conduction to Electrodes on the Temperature Rise During Irreversible Electroporation, The 8th ASME-JSME Thermal Eng. Joint Conf. 2011.3.17, Honolulu, USA.
- ④ 野村征爾, 藏田耕作, 内田悟, 高松洋, エレクトロポレーションを用いた組織の細胞膜電壊療法に関する研究, 第 47 回日本伝熱シンポジウム, 2010.5.26, 札幌.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高松 洋 (TAKAMATSU HIROSHI)  
九州大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号：20179550

### (2) 連携研究者

藏田 耕作 (KURATA KOSAKU)  
九州大学・大学院工学研究院・准教授  
研究者番号：00368870  
内田 悟 (UCHIDA SATORU)  
九州大学・大学院工学研究院・助教  
研究者番号：80038041  
福永 鷹信 (FUKUNAGA TAKANOBU)  
九州大学・大学院工学研究院・技術職員  
研究者番号：60591196