

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501355

研究課題名(和文)超音波励起ラジカル生成を利用したチタン合金ステント内再狭窄抑制法の開発

研究課題名(英文)A novel prevention method for re-obstruction using titanium alloy stent with ultrasonic irradiation

研究代表者

板野 理 (Itano, Osamu)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90265827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍による閉塞性黄疸に対しての金属性ステントを用いた姑息的減黄術はtumor ingrowthによるステント閉塞の問題が増加している。本研究では、チタン合金ステントに超音波を照射し、ラジカルの産生を利用したステント内再閉塞を予防・改善するための無侵襲的治療法の確立を目的とした。

チタン合金に対し1MHzの超音波を30秒0.3 W/cm<sup>2</sup>照射し超音波のみと比較したところ、チタン合金で高いフリーラジカルの発生が確認され殺細胞効果も最も高かった。悪性腫瘍ステントモデルでは、1MHz、0.3W/cm<sup>2</sup>、10分の超音波照射を行った。超音波照射群でステントへのingrowth抑制が確認された。

研究成果の概要(英文)： Palliative biliary drainage using a metallic stent is performed for biliary obstruction by unresectable biliary carcinoma. The biggest issue of biliary stenting therapy is re-obstruction due to tumor ingrowth. The generation of hydroxyl radical was reported during ultrasonic irradiation (US) in the presence of TiO<sub>2</sub>. The metal stent for biliary drainage is made of titanium alloy, and it could generate hydroxyl radicals with US. The aim of this study was to investigate a novel prevention method for re-obstruction using ultrasonic irradiation.

Higher free radical generation and cytotoxic action were observed with titanium alloy with US than US alone. The stent re-obstruction nude mice model which were a stent implanted to the neighborhood of tumor were given 10 minutes US of 1000 KHz, 0.3W/cm<sup>2</sup>; once a day for 14 days. Tumor ingrowth to the stent was seen in the non-irradiation group and it was inhibited in the irradiation group.

研究分野：外科学

キーワード：金属ステント フリーラジカル 超音波

## 1. 研究開始当初の背景

現在臨床において、悪性腫瘍による胆管、消化管狭窄（閉塞性黄疸やイレウス）、動脈硬化による血管狭窄（狭心症や閉塞性動脈硬化症）に対し、低侵襲治療として、狭窄部位に対して金属製ステントを挿入・留置する治療が盛んに行なわれている。しかしこのステント療法において、腫瘍細胞や血管平滑筋細胞の増殖による再狭窄が、長期成績および患者のQOLを低下させている最大の要因である（Levy MJ *et al.* Clin Gastroenterol Hepatol. 2004;2(4):273-85. Bosiers M *et al.* J Cardiovasc Surg. 2010;51(4):591-8）。

二酸化チタンは光触媒として認知されており、390nm以下の紫外線や放射線照射によってフリーラジカルを生成することが既に知られていたが、酸化チタンに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連携研究者である金沢大学、清水研究室にて発見された（二酸化チタン・超音波触媒法; Shimizu, *et al.* Ultrason. Sonochem. 2008;15, 988-994.）。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用いられている。今回我々は実臨床で用いられている金属製ステントがチタン合金製であることに着目し、同様の超音波励起によるフリーラジカルの発生、および治療への応用が可能であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、悪性腫瘍や動脈硬化の治療のために胆管や消化管、血管に挿入・留置するステントについて、その内部の再狭窄を予防・改善するための新規な非侵襲治療法を確立することを目的とした。この新規治療法のポイントは、実臨床で用いられている金属製ステントがチタン合金製であることに着目し、チタン合金製ステントを留置した患部に対して超音波を照射することにより、ステン

ト近傍のみにフリーラジカルを発生させ、その細胞障害作用を利用してがん細胞や血管平滑筋細胞の異常増殖を抑制する点である。

## 3. 研究の方法

(1) ラジカル生成および細胞障害効果に及ぼす超音波強度・周波数・照射時間の影響の検討

ラジカル生成の評価(*in vitro*試験)

AFP酸溶液中にて、チタン合金に対し1000 kHzの超音波を種々の強度0 - 5 W/cm<sup>2</sup>にて30秒間照射し、生成したラジカルの量を測定した。

細胞に対する傷害効果の評価(*in vitro*試験)

モデル培養細胞として、類上皮がん細胞株A431を用いた。チタン合金上で、1000 kHzの超音波を、種々の強度0 - 5 W/cm<sup>2</sup>にて39秒間照射した後、細胞の死滅率を測定した。

(2) ステント留置モデル動物の作製

血管ステント留置モデル動物：遺伝性高脂血症により大動脈に動脈硬化を自然発症するWHHL (Watanabe heritable hyperlipidemic) ウサギ (薬理と治療 2005;33(7):713-722.) を用いる。動脈内腔にバルーンカテーテルを挿入し、擦過障害で内膜肥厚を誘導した後、動脈内にステントを挿入・留置し、1か月後及び6か月後の血管を採取、樹脂標本作製した。

悪性腫瘍ステントモデル動物 I：免疫不全マウス (BALB/ cAJcl-nu/nu) の背部皮下に固形腫瘍細胞 (A431 cells, 1.0 × 10<sup>6</sup>) を注入、ここに金属ステントを埋め込み、腫瘍の成長に伴いステント内にがん細胞が進展し、ステント閉塞をきたすモデルを作製した。

悪性腫瘍ステントモデル動物 II：悪性腫瘍による消化管狭窄モデルは、同じ部位に一か所だけ狭窄が起きること、ステントが挿入可能な径の部位であることが必要である。金沢

大学の大島が作製した Gan mouse (K19-Wnt1/C2mE マウス、Oshima H et al. Gastroenterology. 2011;140:596-607.)は、100%の確立で胃癌が発生し、その狭窄による摂食障害にて約 60 週で死に至る。このマウスを繁殖させ実験に用いている慶應義塾大・佐谷研究室から提供を受け、本手法の悪性腫瘍に対する生存期間への影響を検討することとした。生後 30 週目の Gan mouse の腫瘍部位にステントを挿入した。

#### 4. 研究成果

(1) ラジカル生成および細胞障害効果に及ぼす超音波強度・周波数・照射時間の影響の検討

ラジカル生成の評価(*in vitro*試験)

AFP 溶液中にて、チタン合金に対し 1000 kHz の超音波を強度 0 - 5 W/cm<sup>2</sup> にて 30 秒照射し、生成したラジカルの量を測定した。強度 0 - 5 W/cm<sup>2</sup> では大きな変化は見られなかった(図 1)。

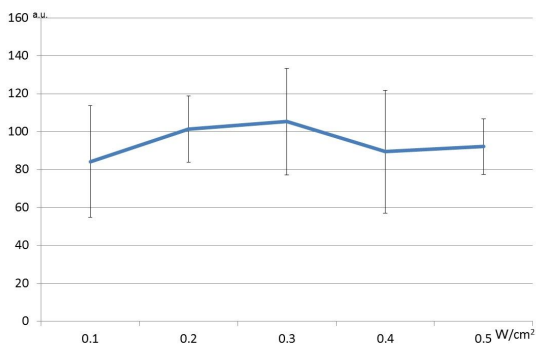


図1 1000 kHz 強度0-5 W/cm<sup>2</sup> 30秒におけるフリーラジカルの発生

0.3 W/cm<sup>2</sup> にて超音波のみと比較したところ、チタン合金ありの場合に高いフリーラジカルの発生が確認された(図 2)。

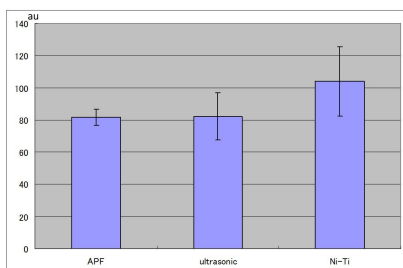


図2 0.3W/cm<sup>2</sup> におけるフリーラジカルの発生

細胞に対する傷害効果の評価(*in vitro*試験)

チタン合金上で、1000 kHz の超音波を、0.3 W/cm<sup>2</sup> にて 30 秒間照射した後、細胞の死滅率を測定した。チタン合金ありの場合で最も高い殺細胞効果を確認した(図 3)

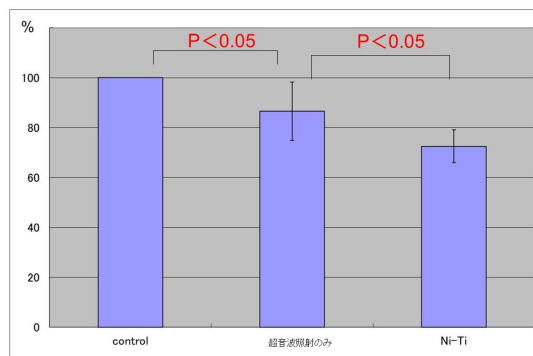


図3 殺細胞効果の検討

(2) モデル動物を用いた本手法の有効性の実証

血管ステント留置モデル動物: WHHLMI ウサギの大動脈をフォガティーカーテールで擦過し、2 週間後に大動脈を観察したところ強度の狭窄が確認された。擦過後 2 週間目にナイチノールステントを挿入し、1 か月後の大動脈を採取、樹脂包埋切片を作製しての検討では再狭窄はいまだ見られず、6 カ月後の標本でも著しい再狭窄は見られなかった(図 4)。

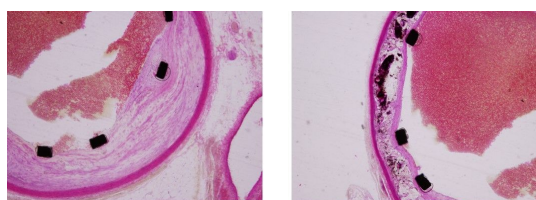


図4 ステント挿入後6か月樹脂包埋HE染色標本  
肥厚している部分(左)と肥厚が軽微な部分(右)

悪性腫瘍ステントモデル動物 I: 腫瘍の成長に伴ったステント内へのがん細胞が進展及びステント閉塞を観察するモデルでは、伊藤超短波の US-710 を用いて 1000 KHz、0.3W/cm<sup>2</sup>、10 分の超音波照射によりステントへの ingrowth が抑制された(図 5)。

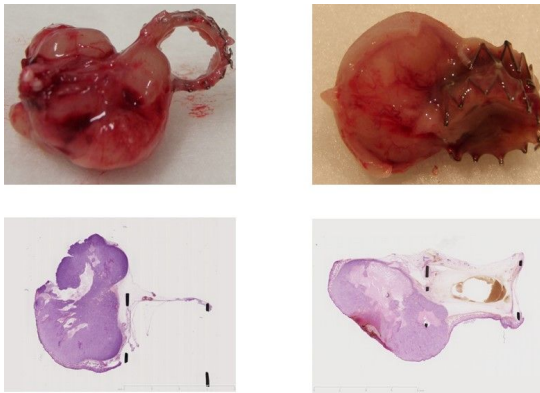


図5 チタン合金ステントによる in growth モデル  
超音波照射あり(左)と超音波照射なし(右)

ingrowthした面積を測定すると、コントロール群では  $4.84 \pm 7.58\text{mm}^2$  であったのに対し、超音波照射群では  $0.88 \pm 1.89\text{mm}^2$  であった。

悪性腫瘍ステントモデル動物II:Gan mouseの腫瘍部位にステントを挿入し、生存期間への影響を検討した。ステント挿入後5か月間生存することを確認した。

#### 5. 主な発表論文等

〔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)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

板野 理 (ITANO, Oasmu)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90265827

##### (2)研究分担者

松田 祐子 (MATSUDA, Sachiko)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：90534537

##### (3)連携研究者

清水 宣明 (SHIMIZU, Nobuaki)

金沢大学・学内共同施設等・教授

研究者番号：50019634

荻野 千秋 (OGINO, Chiaki)

神戸大学・工学(系)研究科(研究院)・  
准教授

研究者番号：00313693

藤村 智賢 (FUJIMURA, Tomonori)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30594634

佐谷 秀行 (SAYA, Hideyuki)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：80264282

大島 正伸 (OOSHIMA, Nobuyuki)

金沢大学・医学(系)研究科(研究院)・  
教授

研究者番号：40324610