

令和元年6月18日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08046

研究課題名(和文)音響キャビテーション誘導による空間選択的抗癌剤取り込み技術の研究

研究課題名(英文) Spatially selective anticancer drug uptake by ultrasonically induced cavitation

研究代表者

佐々木 一昭 (SASAKI, KAZUAKI)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10421934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：パルス超音波を利用した低侵襲癌治療の開発を目指して、音響キャビテーションによる抗癌剤の取り込み促進効果に着目しその抗腫瘍効果の促進について検討した。その結果、総超音波照射時間や音響強度が同じでも、1パルスあたりの連続照射時間であるパルス長依存的に音響キャビテーションが促進され、抗癌剤の腫瘍培養細胞への抗腫瘍効果を顕著に促進することがわかった。マウス皮下腫瘍に対しても、カルボプラチンの抗腫瘍効果をパルス超音波照射が有意に増強した。以上の結果からパルス超音波照射により抗癌剤の腫瘍への取り込み促進効果が示され、音響キャビテーション効果を利用した抗癌剤併用療法の有用性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では低エネルギーのパルス超音波により音響キャビテーションを促進し抗癌剤による抗腫瘍効果を培養細胞およびマウス皮下腫瘍において促進できることを示した。この知見をさらに発展させることで、低侵襲な超音波照射によって局所的に抗癌剤の腫瘍への取り込みを促進し抗癌剤の全身投与量を増やすことなく治療効果を高めることが期待できる。低コストで手術に頼らない新しい低侵襲癌治療法を小動物診療施設に提供でき、小動物医療に大きな貢献ができる。さらに、この知見は獣医療にとどまらず人医の癌治療への波及効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Aiming at the development of minimally invasive cancer treatment using pulsed ultrasound, we focused on the effect of promoting the uptake of anti-cancer agents by acoustic cavitation and investigated the enhancement of anti-tumor effects of anti-cancer drugs. As a result, even if the total ultrasonic irradiation time and the acoustic intensity are the same, acoustic cavitation is promoted in a pulse length dependent manner, which is the continuous irradiation time per pulse, and the anti-tumor effect of the anticancer drug on the tumor culture cells is remarkably promoted. Pulsed ultrasound significantly enhanced the antitumor effect of carboplatin on mouse subcutaneous tumors. From the above results, the effect of promoting the uptake of anticancer agents into tumors was shown by pulsed ultrasound irradiation, and the usefulness of anticancer drug combination therapy using acoustic cavitation effect was clarified.

研究分野：獣医臨床薬理学

キーワード：キャビテーション 癌治療 抗癌剤

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19, CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

人医と同様に小動物医療においても、ペットの高齢化により腫瘍性疾患が急増している。その治療法としては、手術が大きな比重を占めるのは言うまでもないが、人医と同様、低侵襲的な治療法の普及が小動物医療においても動物のQOLを維持しながら腫瘍をコントロールするために、今後ますます重要となると考えられる。固形癌の治療では、手術以外では放射線治療が主たる治療方法であるが、その設備導入の高費用と放射線治療経験の豊富な獣医師の不足という難しい現実がある。一方、固形癌に対する抗癌剤化学療法では、リンパ腫のような血液系の腫瘍に比べて、顕著な治療効果が認められないという現状がある。固形癌への治療効果を高めながら全身への副作用を低減させるために、X線透視下でアドリアマイシンやカルボプラチンなどの抗癌剤を腫瘍栄養動脈へカテーテルにて直接高濃度投与する治療が複数の獣医療機関で試みられている。そこで応募者らは抗癌剤の全身投与量を多くすることなく、固形癌への効果を高める新手法として、生体深部へ局所的にエネルギーを投入できる超音波によって引き起こすことができる音響キャビテーション現象による抗癌剤の抗腫瘍効果の増強に着目した。

### 2. 研究の目的

低侵襲な固形癌治療の実現を目指して、超音波の照射による抗がん剤の抗腫瘍効果を利用した「超音波治療」に着目した。超音波エネルギーの作用で、細胞膜の透過性や流動性の変化、または細胞膜への微小な穴の形成といった細胞障害反応によって抗がん剤の取り込み量を増やそうとするものである。抗がん剤の取り込み促進が可能であれば、抗腫瘍効果を維持しながらも抗がん剤の投与量を減らすことができ、さらに副作用も軽減することができると期待している。まず、生体内で音響キャビテーション現象を制御している超音波条件を検討して、超音波パラメータをある程度絞るため、音響キャビテーションにより誘導されるヨウ化カリウム溶液の酸化反応速度を指標に超音波パラメータを調べた。音響キャビテーション発生を盛んにしつつ生体への不要な熱作用や過度な細胞障害を避けるできるだけバランスのとれた超音波条件をみつけつつ Sarcoma180 や MRMT1 といった培養腫瘍細胞に対する音響キャビテーションによる抗癌剤の効果促進効果を検討した。培養細胞への効果を踏まえた超音波照射条件をもとに実験動物の固形癌に対するパルス超音波による抗癌剤効果促進効果を検討することで本研究の有用性を評価した。

### 3. 研究の方法

電気信号を RF パワーアンプで増幅し、試作平面型超音波トランスデューサ に接着した 622 MHz に共振周波数を持つセラミックスを振動させることで超音波を発生させて、各実験を行った。まず、音響キャビテーションとパルス長の関係を調べるために音響強度 10 W/cm<sup>2</sup>, duty 比 30%, パルス長 0.3, 3, 30, 100, 300 msec, 総照射時間 5 分間/10 分間とし、ヨウ化カリウム溶液の酸化反応を調べた。次に超音波エネルギーと音響強度・パルス長の関係を調べるために 5.6, 10, 15.6 W/cm<sup>2</sup>, duty 比 10%, 0.3, 3, 30, 100, 300 msec, 総照射時間 10 分間とし、マウス腹水型腫瘍株 Sarcoma180 における細胞障害作用を比較した。その後、パルス超音波・抗がん剤併用による抗腫瘍効果について探るため、培養したラット乳腺腫瘍株 MRMT1 への超音波照射および抗がん剤カルボプラチンの処置を行い、細胞増殖抑制率の測定を行った。これらの *in vitro* の検討で音響キャビテーションの発生条件についての検討を進め、音響キャビテーションに有利かつ生体への副作用が多すぎない条件で *in vivo* 実験に進んだ。抗癌剤評価に古くより使われているマウス結腸がん株 colon26 の腫瘍片を皮下に移植した CD2F1 マウスにおいて、パルス超音波照射(10 W/cm<sup>2</sup>, duty 比 6%, 30 msec, 総照射時間 10 分間)、カルボプラチ

ン投与(33,100 mg/kg, iv)による固形癌へのパルス超音波による抗腫瘍効果促進効果を腫瘍成長を観察することで比較した。また 効であると考えられるイヌ肥満細胞腫への適応を視野に、イヌ肥満細胞腫由来細胞株を用いた検討も行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) パルス超音波による抗がん剤の抗腫瘍効果促進について

ヨウ化カリウム溶液への超音波照射ならびに Sarcoma180 に対する超音波照射実験において、総超音波照射時間や音響強度が同じでも1パルスあたりの連続照射時間であるパルス長を長くすると音響キャビテーションの発生および細胞障害性が有意に上昇することがわかった。また MRMT1 培養細胞への超音波および抗がん剤の処置実験では、超音波と抗がん剤を併用した際に細胞増殖抑制率が上昇する傾向があり、抗腫瘍効果の促進さらに処置時間の短縮による副作用リスクの減少が考えられる。マウスの皮下腫瘍に対する治療実験では、33 mg/kg, 100 mg/kg いずれの投与量においても超音波併用群の方が有意に腫瘍の成長が抑制されていることが分かり、パルス超音波照射により抗がん剤の腫瘍への取り込み促進が示唆された(図1)。

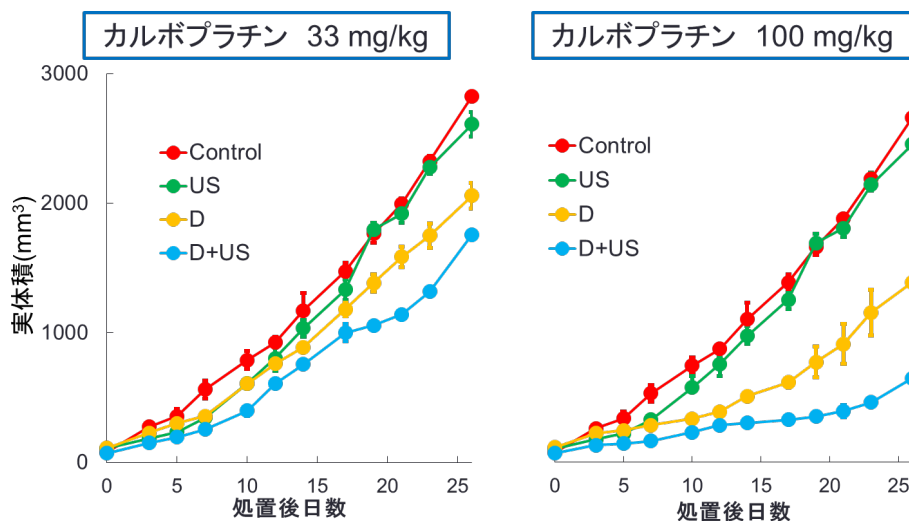
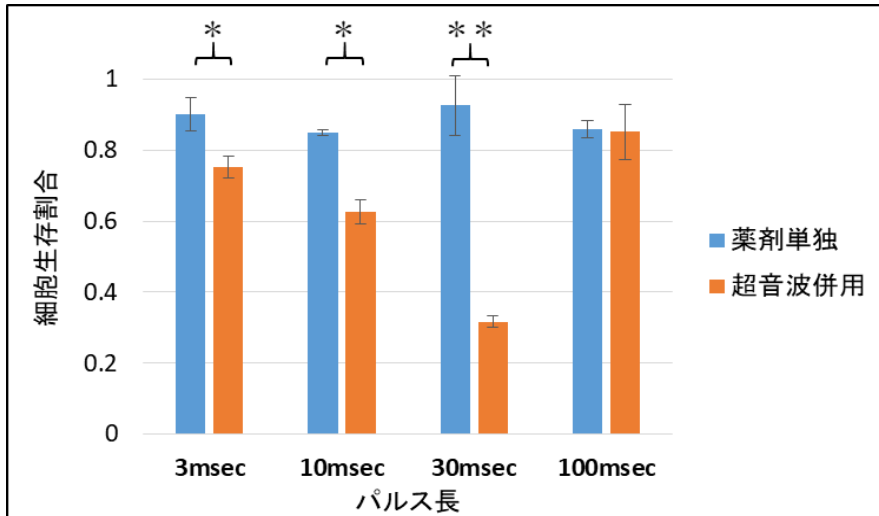


図1 マウス結腸癌 Colon26 皮下移植腫瘍に対するパルス超音波照射によるカルボプラチン抗腫瘍効果促進について

##### (2) 犬肥満細胞腫細胞株に対するパルス超音波による抗腫瘍薬の効果促進について

イヌ肥満細胞腫への適応を目指して、イヌ肥満細胞腫由来細胞を用いてパルス超音波による抗腫瘍薬の取り込み促進効果を検証した。肥満細胞腫に対する効果が期待できるビンブラスチン、プレドニゾロン、イマチニブの3薬について、パルス超音波併用における抗腫瘍効果を検討した。ビンブラスチンとプレドニゾロンについてはパルス超音波を併用することでは有意な抗腫瘍効果の上昇は認められなかったのに対し、図2に示したようにイマチニブについては、イマチニブ単独処置群と超音波イマチニブ併用処置群では細胞生存率に有意な差があった。イマチニブ単独処置群では細胞生存率が約90%であるのに対し、超音波イマチニブ併用群ではパルス長3, 10, 30msecでの細胞生存率は75%, 63%, 32%だった。パルス長依存的な細胞増殖抑制効果があり、パルス長依存的に発生するキャビテーション現象と分子標的薬の取り込み促進効果には正の相関が認められた。この結果は、外科手術のみでは根治しにくく再発が多い肥満細胞腫への効果的なイマチニブ治療を補助するのにパルス超音波が有効であることを示唆している。ビンブラスチンおよびプレドニゾロンで超音波による抗腫瘍効果促進は認められな

った理由については十分検討できていないが、特にプレドニゾロンは脂溶性が高く、薬自身の



細胞膜透過性が高く、音響キャビテーションによる物理的取り込み促進が十分に有意に寄与しなかった可能性が考えられた。今後はイマチニブだけでなく、類似薬であるマシチニブやトセラ

ニブ等の他の分子標的薬でも検討する必要がある。

図2 イマチニブ 25µM 単独 1 時間処置群と超音波・イマチニブ併用群でのパルス長ごとの 48 時間後における細胞生存割合の比較

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

田谷直人, 佐々木一昭, イヌ肥満細胞腫細胞株におけるパルス超音波による抗腫瘍薬の促進効果について, 第 30 回日仏獣医学会総会・第 60 回研究例会 2019 年  
山本晴, 臼井達哉, 東隆, 佐々木一昭, パルス超音波による抗癌剤の抗腫瘍効果促進について, 第 161 回日本獣医学会学術集会 2018 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 下田 実

ローマ字氏名: SHIMODA MINORU

所属研究機関名: 東京農工大学

部局名: (連合) 農学研究科 (研究院)

職名: 名誉教授

研究者番号 (8 桁): 50154323

研究分担者氏名: 臼井 達哉

ローマ字氏名: USUI TATSUYA

所属研究機関名: 東京農工大学

部局名: 農学部

職名: 特任講師

研究者番号 (8 桁): 80727652

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。