

## 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21日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650120

研究課題名（和文）酸化チタンと超音波を併用した新しい癌治療への挑戦

研究課題名（英文）A new cancer therapy combining ultrasound and titanium dioxide

研究代表者

立花 克郎 (TACHIBANA KATSURO)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40271605

研究成果の概要（和文）：

近年、抗癌剤と超音波を併用する新しい治療法（音響化学療法）が期待されている。本課題では広く光触媒として使われている酸化チタンの生体応用に着目した。光エネルギーに替わりに超音波で酸化チタンを励起し、その抗腫瘍効果の有無を検討した。対照群に比べ、酸化チタン・超音波併用群は殺細胞数の増加が認められた。また、殺細胞効果は超音波強度・酸化チタン濃度に依存した。酸化チタンの音響化学抗腫瘍効果が確認された。

研究成果の概要（英文）：

Sonodynamic therapy is a new modality using ultrasound (US) to activate certain chemical sensitizers for cancer therapy. In this study, the effect of US combined with a nanoparticle titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) on melanoma cell was investigated in vitro and in vivo. The cell viability was significantly decreased only after US irradiation in the presence of TiO<sub>2</sub>. In vivo results showed significant inhibition of tumor growth in groups treated with TiO<sub>2</sub> and US.

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 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,000,000 | 330,000 | 3,330,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学

キーワード：超音波、酸化チタン、がん治療

## 1. 研究開始当初の背景

酸化チタンは光触媒として様々な分野で応用されている。光によって励起された酸化チタンの抗腫瘍効果を報告されているが、光は組織深達度が低いため実用化に至っていない。

一方、超音波エネルギーは低侵襲的に深部組織まで到達でき、かつエネルギーを標的腫瘍部位に収束できることから、腫瘍内に取り込ませた酸化チタンの励起には適していると考えられる。今後、酸化チタンが有効な超音波

癌治療法として使われる可能性が高く、基礎実験が進められている。本研究で酸化チタンをなどの材料を併用し、新しい超音波治療法のプロトコル構築を試みた。

酸化チタンは380nm以下の短波長の光を照射することで活性酸素を生成する。また、酸化チタンは安定な化合物で、生体には毒性がないことが知られており、薬剤における着色材や光遮断のためのコーティング材としても頻用されている。生体に無害の酸化チタンに、低侵襲な超音波エネルギーを照射することによっても、光を照射した時と同様に高濃度のヒドロキシラジカルが生成されることが報告された(Mahmoud et al; 2006、清水宣明ら2006)。しかし、ナノサイズの酸化チタンだけでは酸化チタン同士が凝集するという問題があった。そこで、Drug Delivery Systemとして注目されているリポソーム内に酸化チタンを封入することで、凝集を防ぐことを考えた。超音波を併用した際の殺細胞効果を飛躍的に向上させることが出来ると予想された。

## 2. 研究の目的

酸化チタン・マイクロバブルと超音波併用実験

- (1)酸化チタンの細胞内取り込みの評価
- (2)酸化チタンと超音波併用、酸化チタンバブルと超音波併用との効果の比較
- (3)アポトーシスの評価
- (4)最適な超音波条件(強度、周波数、Duty 比、Burst rate、照射時間)

## 3. 研究の方法

酸化チタン：粒子径6nmの酸化チタンを濃度0.500%(w/w)に調整したものを用いた。

細胞：メラノーマ細胞株C32を使用した。

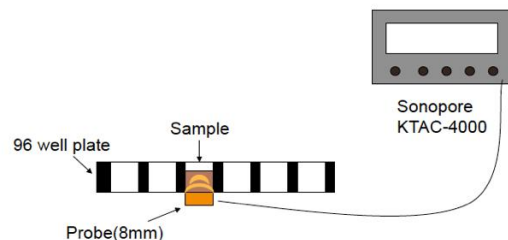
10%FBS、1%NEAAを添加したMEN培養液を用い、細胞濃度 $5 \times 10^5$  cell/mlに調節した。

動物:Balb/c athymic nude miceを使用した。

超音波：In vitroでは、超音波発生装置SONIDEL SP100を用い、周波数：1MHz、強度：0.5、1.0W/cm<sup>2</sup>、照射時間：10秒間とした。In vivoでは、Sonitron 1000を用い、周波数：1MHz、強度：1.0W/cm<sup>2</sup>、照射時間：2分間とした。

実験① (in vitro) : C32細胞懸濁液に酸化チタンを加え(最終濃度:0.025、0.050%(w/w))超音波を照射した。照射後、生存率をトリパンブルー色素排除試験、及びMTS assayにて評価した。また、超音波照射6時間後、アポトーシス細胞をApopNexin™ FITC Apoptosis Detection Kit (CHEMICON, CA, USA)で評価した。さらに治療後の細胞を固定し、細胞の形態学的変化を走査型電子顕微鏡 (S-900; Hitachi) にて観察した。

実験② (in vivo) : C32細胞を移植した担癌マウスの腫瘍径が5mm前後となったところで、コントロール群、酸化チタンのみ、超音波のみ、酸化チタンと超音波併用群の4群に分けた。酸化チタンと超音波併用群では、酸化チタン(10 $\mu$ l)を腫瘍に注射し、超音波を照射した。同治療を隔日に計5回繰り返した。腫瘍の大きさを測定し(3回/週)、体積(長径 $\times$ 短径<sup>2</sup>/2)を算出した。治療終了後、腫瘍を摘出し病理学的に検討した。さらに透過型電子顕微鏡(JEM 1200 EX II)・エネルギー分散型X線分析装置(Voyager)で腫瘍細胞内の酸化チタンの評価を行った。



サンプル200 $\mu$ lを底がフィルム状となっている96well plateに入れ、超音波素子の上に超音波ゼリーを塗り、下から超音波を照射した。



超音波発生装置: Sonitron1000  
周波数: 1MHz、強度: 1W/cm<sup>2</sup>、Duty比: 50%、照射時間: 2分間

#### 4. 研究成果

実験① (in vitro) : 酸化チタン (0.050%) 添加と、超音波強度0、0.5、1.0 W/cm<sup>2</sup> における生存率は、それぞれ

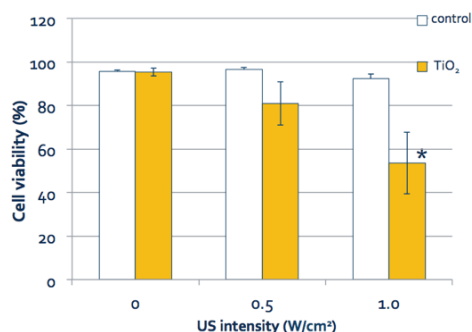
95.3 ± 0.4%、80.9 ± 9.5%、53.6 ± 1.8%

と殺細胞効果は超音波強度に依存した。超音波強度1.0 W/cm<sup>2</sup>、酸化チタンの濃度

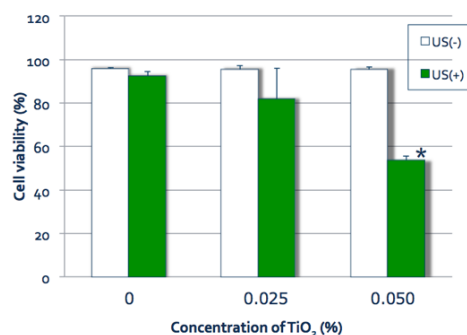
0.025%、0.050% において、生存率はそれぞれ 81.3 ± 14.2%、53.6 ± 1.8%と酸化チタンの濃度に依存した。またアポトーシスを起こした細胞数は、酸化チタンのみ、超音波のみではコントロール群と優位な差は認めなかったが、酸化チタンと超音波併用群では、コントロールの2.73倍のアポトーシス細胞が検出された。走査型電子顕微鏡では、酸化チタンのみとコントロール群で明らかな形態学的変化は認めなかった。一方、超音波照射のみではmicrovilliの減少を認めた。酸化チタンと超音波併用群では、細胞質が突出したような著明な細胞膜変形を認めた。

実験② (in vivo) : 酸化チタン投与群、超音波照射群では、コントロール群と比較し腫瘍体積に明らかな差は認められなかった。一方、酸化チタンと超音波併用群では、コントロール群と比較し、優位に腫瘍増殖が抑制された。治療終了後、ヘマトキシリン・エオジン染色では、酸化チタン投与群、酸化チタンと超音波併用群の細胞内に褐色粒子状物質の沈着が認められた。さらに透過型電子顕微鏡で腫瘍細胞、マクロファージ内に電子密度の高い粒子が観察され、エネルギー分散型X線分析装置で、この粒子を分析した結果、チタンであることが確認された。

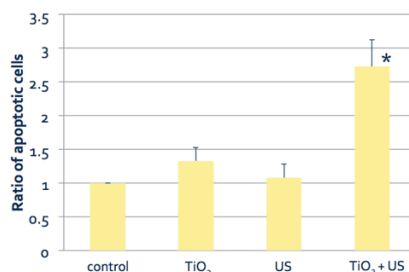
### 結果① Cell viability



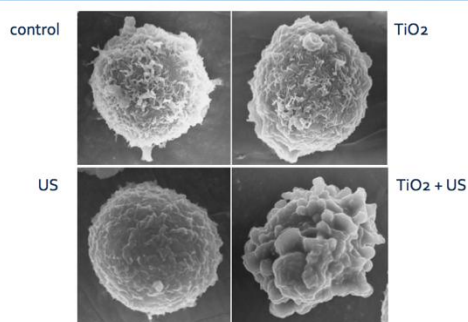
### 結果② Cell viability

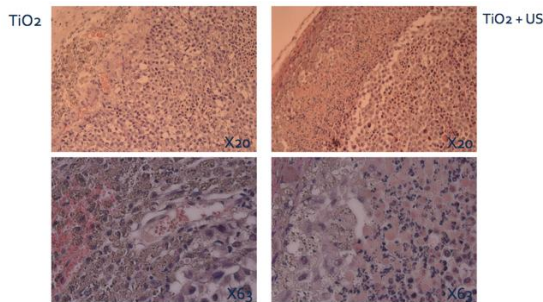
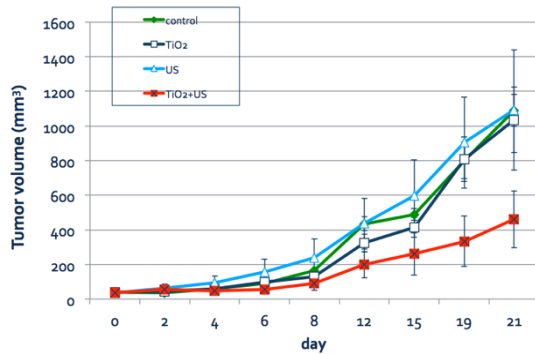


### 結果③ Change of ratio of apoptosis cells



### 結果④ SEM





## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

- ① Harada Y, Ogawa K, Irie Y, Endo H, Feril LB Jr., Uemura T, Tachibana K.,  
Ultrasound activation of TiO<sub>2</sub> in melanoma tumors, J. Controlled Release  
査読有、2011, 149 : 190-195、  
10.1016/j.jconrel.2011.10.012
- ② Yurika Ikeda-Dantsuji Loreto B. Feril Jr., Katsuro Tachibana, Koichi Ogawa, Hitomi Endo, Yoshimi Harada, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Synergistic effect of ultrasound and antibiotics against Chlamydia trachomatis-infected human epithelial cells in vitro, Ultrasonics Sonochemistry、査読有、2011, 18:425-430
- ③ Mariame A. Hassanl, Loreto B. Feril, Jr., Nobuki Kudo, Katsuro Tachibana, Takashi Kondo, Peter Riesz, The Sonochemical and Biological Effects of Three Clinically-Used Contrast Agents, Japanese Journal of Applied Physics、査読有、2010, 49:07HF23
- ④ Nishikawa T, Yoshida A, Khanal A, Habu M, Yoshioka I, Toyoshima K, Takehara T, Nishihara T, Tachibana K, Tominaga K.、  
A study of the efficacy of ultrasonic waves in removing biofilms、  
Gerodontology、査読有  
2010, 27(3) 199-206
- ⑤ Loreto B. Feril Jr., Katsuro Tachibana, Takashi Kondo, Ryohei Ogawa, Qing-Li Zhao, Kazuki Yamaguchi, Koichi Ogawa, Hitomi Endo, Yutaka Irie, Yoshimi Harada, Hypotonia-induced cell swelling enhances ultrasound-induced mechanical damage to cancer cells, Journal of Medical Ultrasonics、査読有、2010, 37:3-8
- ⑥ Loreto B. Feril Jr., Katsuro Tachibana, Takashi Kondo, Therapeutic High Intensity Focused Ultrasound, Philippine Physics Journal、査読有、2010, 32:45-51

〔学会発表〕 (計 20 件)

- ① 内藤玲子、遠藤日富美、Seyedeh Moosavi Nejad、立花克郎、中山樹一郎、メラノーマ細胞に対する verteporfrin の HIFU 誘導音響化学作用の検討、第 10 回日本超音波治療研究会、査読有、2011, 11/26、東京医科大学病院
- ② 遠藤日富美、内藤玲子、入江 豊、小川皓一、フェリル ロト、立花克郎、メラノーマ細胞株に対する酸化チタンと超音波の抗腫瘍効果の検討、第 30 回日本脳神経超音波学会総会、査読有、2011.7/7-7/9 (発表 7/8)、長崎市
- ③ Naito R, Feril B.L., Harada Y, Nakayama J, Tachibana K.、Gene delivery to C32 cells by combination of ultrasound and phospholipid nanobubbles、第 12 回国際造影超音波シンポジウム/第 2 回国際造影超音波アジア会議、査読有、2010, 12/11、東京医科大学
- ④ 立花 克郎、Recent Advance in Ultrasound Imaging、第 69 回日本癌学会学術総会、2010, 9/24、大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル
- ⑤ Tachibana Katsuro、Recent Advance in Sonodynamic Therapy、アジアハイパーサーミア腫瘍学会第 5 回大会・日本ハイパーサーミア学会第 27 回合同大会、2010, 9/11、九州大学医学部百年講堂
- ⑥ Harada Yoshimi, Ogawa Koichi, Irie Yutaka, Endo Hitomi, Feril Loreto B. Jr., Noosavi - Nejad, S. F., Tachibana

Katsuro, Sonodynamic therapy with titanium dioxide in vitro and in vivo、20<sup>th</sup> International Congress on Acoustics(ICA) 査読有、2010, 8/23、Australia

- ⑦ Hitomi Endo, Katsuro Tachibana, Loreto B. Feril, Jr., Yoshimi Harada, Koichi Ogawa, Yutaka Irie、Comparative analysis of gene transfer efficiency to CHO cells by echo contrast agent BR14 under different ultrasound conditions.、International Congress on Acoustics(ICA), Sydney, 査読有、2010, 8/23, Australia
- ⑧ Harada Y, Endo H, Ogawa K, Tachibana K、Sonodynamic melanoma cell killing with verteporfin、10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound 2010(ISTU10)、査読有、2010, 6/11, Tokyo University
- ⑨ Tachibana K, Recent views on the mechanism of sonoporation: is it a breakthrough technology? 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound 2010(ISTU10), 2010, 6/11, Tokyo University
- ⑩ Feril LB. Jr., Tachibana K., Low intensity ultrasound inhibits melanoma cell growth in vitro and tumor growth in vivo, 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound 2010(ISTU10), 2010, 6/11, Tokyo University
- ⑪ 立花 克郎, マイクロバブルを用いた単細胞マニピュレーションの新しい試み、日本超音波医学会第83回学術集会、2010, 5/31, 国立京都国際会館

[図書] (計1件)

- ① Feril LB Jr., Tachibana K, Kondo T, Campbell PA., Sonodynamic therapy. Chapter 12, Therapeutic ultrasound: mechanisms to applications., Nova Publishing, Hauppauge NY, USA. 2011, 279-295

[その他]

ホームページ等

<http://www.fukuoka-u.ac.jp/research/d ata/researcher.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

立花 克郎 (TACHIBANA KATSURO)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号：40271605

### (2) 研究分担者

Loreto B Feril (LORETO B FERIL)  
福岡大学・医学部・講師  
研究者番号：10435109

遠藤 日富美 (ENDO HITOMI)  
福岡大学・医学部・講師  
研究者番号：00435108

### (3) 連携研究者

なし