

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月12日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700581

研究課題名（和文） 超音波一酸化窒素産生による非侵襲的腫瘍治療

研究課題名（英文） Non-invasive tumor therapy by using ultrasound NO generation

研究代表者

遠藤 怜子 (ENDO REIKO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40433982

研究成果の概要（和文）：

超音波による一酸化窒素（NO）産生を用いて、非侵襲的に腫瘍縮退効果を得ることを目標に、本研究では、NO産生測定実験系を確立し、正常組織における超音波照射中のNO産生量の上昇を確認した。正常組織における超音波NO産生量の上昇は腫瘍組織におけるそれよりも低かった。また、ラット腫瘍モデルを作製し、腫瘍血管にNOが与える影響の検討を行った。その結果、超音波照射中にNOは一時的に上昇するが、同時に、腫瘍内の血管透過性を一時的に高めることを発見した。

研究成果の概要（英文）：

Our goal is non-invasive tumor therapy by using ultrasound Nitric Oxide (NO) generation. In this study, we established a measurement model of NO generation with a normal tissue. The ultrasound NO generation with a normal tissue was lower compared with a tumor. Tumor-bearing rats were prepared, and the influence on tumor vessels by the ultrasound NO generation was investigated. As the results, we found that tumor vascular permeability temporarily increased at the same time as the NO generation in the inside of the tumor increased temporarily by the ultrasound irradiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：超音波医用生体工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：低侵襲治療システム、超音波NO産生

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素（NO）は、生理的に重要な役割を担い、神経伝達や血管弛緩、炎症性サイトカインなどに関係する因子である。その一方で、高濃度のNOは細胞毒性作用を示ことが知られている。しかしながら、高濃度NO

の抗腫瘍効果を使った腫瘍治療に関する研究は、国内外を問わず非常に少ない。これは、局所的にNO産生量を上昇させることが難しく、全身的なNO産生量の上昇は貧血症を引き起こすなどの問題があるためと考えられる。本研究では、局所的に所望の強度の超音波を照射して、超音波によって腫瘍局所に抗

腫瘍効果を得ることを目標としている。局所的に NO が産生できれば、他の NO を利用した腫瘍治療研究 (NO の血管弛緩作用を利用して腫瘍内低酸素状態を改善し、X 線療法の効果を向上させるなど) にも応用できる可能性もあり、腫瘍における超音波 NO 産生の研究は腫瘍治療に大変有用なものであると考えられる。

超音波による一酸化窒素 (NO) 産生の研究に関しては、正常組織 (ウサギ大腿筋、申請者らの報告) や正常細胞 (培養血管内皮細胞) に超音波を照射すると NO 産生量が増えることが報告されている。しかしながら、国内外において、腫瘍に超音波を照射した際の NO 産生量を評価した研究は見当たらない。超音波 NO 産生を腫瘍治療に応用するためには、超音波照射条件と腫瘍内 NO 産生の関係および腫瘍に与える影響を調べる必要がある。

現在、非侵襲的腫瘍治療法として、超音波を集束させて、 1000 W/cm^2 を超えるほどの強力な超音波で患部を加熱壊死させる方法 (HIFU ; High-Intensity Focused Ultrasound) が、国外の臨床で用いられている。国内でも、子宮筋腫や前立腺がんなどに臨床適用されている。一方、HIFU は、強力超音波を使うために超音波照射側の皮膚が火傷をしてしまう可能性がある。これを防ぐために、超音波照射の口径を大きくしようとすると、超音波は骨で反射するため、体表から超音波を照射する部分が限定され、治療の対象となる臓器も限られてしまうという問題がある。これに対し、本研究は生体組織に熱的傷害を与えない弱い超音波強度で、腫瘍の NO 産生量を増やし、高濃度 NO の抗腫瘍効果を期待するものである。研究者は、腫瘍に 1 W/cm^2 程度の弱い超音波照射によって、腫瘍で NO が産生することを見出しており、これを応用することによって、HIFU よりも非常に弱い超音波強度で安全な腫瘍治療法を実現できる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本邦の国民死亡原因の第一位である悪性腫瘍 (がん) の新規の非侵襲的治療法として、超音波 NO 産生による腫瘍治療法の確立を目標とする。一酸化窒素 (NO) は生体内で重要な生理的役割を担うが、その一方で、転移性の悪性腫瘍細胞の増殖を抑えるほどの細胞毒性作用を持つことが報告されている。このような背景のもと、研究者はこれまでに、超音波照射によって腫瘍内に NO が産生する現象を見出し、さらに、一条件下ではあるが、超音波照射による腫瘍縮退効果の可能性を実験的に得ている。そこで本研究では、安全且つ効果的な腫瘍治療法の確立を目標とし

て、超音波照射条件と腫瘍内 NO 産生量との関係を明らかにすることを目的としていたが、超音波 NO 産生による腫瘍縮退効果のメカニズムを解明することが重要と判断し、腫瘍内の超音波 NO 産生量と抗腫瘍効果の関係について調べた。具体的には、NO 測定実験系の確立を行い、超音波によって産生された NO が腫瘍に与える影響を調べた。

3. 研究の方法

(1) NO 測定実験系の確立

NO を直接的かつ定量的に実時間計測するために、本研究では、電極法を用いた NO 測定を行った。正常ラットの大腿筋組織に超音波を照射した際の NO 産生量の変化を測定した。

超音波は周波数 500 kHz 、強度 1 W/cm^2 の連続波で 10 分間照射した。超音波プローブと大腿筋組織の間には stand-off を置き、超音波プローブからの熱が大腿筋に伝わらないように注意した。また、照射側の反対側には超音波吸収材を置き、透過した超音波が生体表面で反射して大腿筋組織に戻らないように工夫した。超音波プローブ、stand-off、大腿筋組織、超音波吸収材のそれぞれの接合面にエコーゲルを塗り、超音波の反射を防いだ。

NO 産生量は、一酸化窒素測定装置を用いて測定した。正常ラット大腿筋組織に一酸化窒素電極を刺入して固定してから 10 分後、測定値が安定していることを確認して測定を開始した。

(2) ラット脳腫瘍モデルの作製

腫瘍中心部は腫瘍辺縁部と比べて低酸素状態となることが知られている。さらに、腫瘍成長に伴い、腫瘍内部に壊死巣が生じ易くなる。本実験では電極法を用いた NO 測定を行うため、電極先端が壊死領域にあるか実質領域にあるかが測定結果に大きな影響を与える。そこで、本研究の遂行に当たり、ラット脳腫瘍モデルを作製し、その成長過程を観察し、NO 電極を用いた測定が可能な時期を調べた。さらに、作製したモデルの腫瘍内酸素分圧の分布を調べた。

本研究では、一般的に広く用いられているラット脳腫瘍細胞 (9L-gliosarcoma) を使ってラット大腿皮下腫瘍モデルを作成した。9L-gliosarcoma (10^6 cells) をラット ($n=3$) の両側大腿皮下に移植して、10 日目から 32 日目までの腫瘍体積を小動物用超音波診断装置で計測した。また、実験終了日の 32 日目に、腫瘍内の酸素分圧の分布を確認した。

皮下腫瘍を上から見て中心部、頭側、尾側の三か所に酸素分圧測定用の電極刺入し酸素分圧を測定した。

(3) 超音波 NO 産生が腫瘍血管に与える影響の調査

本研究は、超音波 NO 産生による腫瘍縮退効果を狙うが、NO は血管新生因子の一つであり、腫瘍成長に関与する一方で、血管透過性にも関与することが知られている。腫瘍血管においては、NO によって血管透過性が亢進し、血中高分子は血管外に漏出する。そこで、超音波 NO 産生が腫瘍内の血管透過性に与える影響を調べた。血管透過性が亢進すると血中高分子が血管外に漏出する。そこで、各組織における高分子の集積量を Evans Blue(EB)濃度で評価した。EB は血中アルブミン(高分子)と速やかに結合するため、EB 濃度は高分子の動態を示すものと考えられる。

ラットの右側大腿皮下に 9L-gliosarcoma を移植して9日目から10日目に EB(10 mg/kg)を尾静脈投与した。投与5分後から60分間、超音波(周波数 500 kHz, 振動子径φ10, PRF 100 Hz, Duty比 50%)を 0.7 W/cm²の強度で照射した。EB 投与80分後(n=8)、または125分後(n=12)に腫瘍および正常組織を摘出し、各摘出組織の EB 濃度[μg/g]を、分光法を用いて算出した。

4. 研究成果

(1) NO 測定実験系の確立

超音波 NO 産生量を実時間的に測定できることを確認した。500 kHz の連続波超音波を照射すると、NO 産生量は超音波照射前の 1 μM から超音波照射後 10 分後には 1.5 μM まで線形に上昇した。過去の実験的検証では、ラット皮下腫瘍組織 6 例において NO 産生量は超音波照射前 8 μM から超音波照射後 30 分の間に極大値 12 μM まで上昇した。今回の結果から、正常組織においても超音波照射による NO 産生量の上昇を確認できた。その上昇量は腫瘍組織よりも小さかったが、超音波 NO 産生による腫瘍治療を行う上で、患部腫瘍周囲における NO 産生が正常組織に与える影響を考慮する必要があるものと考えられた。

(2) ラット脳腫瘍モデルの作製

図1に、腫瘍移植後日数と腫瘍体積を示す。腫瘍細胞を移植してから10日目に腫瘍長径は5 mm から1 cm 程度に成長したため、電極法を用いた一酸化窒素測定が可能と考え

られた。さらに観察を続けると、24日目以降、腫瘍の成長は遅くなった。これは腫瘍内に壊死巣が生じたことが原因として考えられる。また、図2に示すように、32日目に腫瘍内の酸素分圧を計測すると腫瘍中心部の酸素分圧は腫瘍辺縁部よりも低かった。

現行の放射線腫瘍治療においては、低酸素領域で治療効果が低くなり、遺残腫瘍による再発が問題となっている。本研究は、超音波によって産生した NO が腫瘍組織に与える影響を調べるものであり、腫瘍組織内の NO 産生能の分布を調べることが必須であると考えられる。今回は腫瘍内の NO 産生分布を計測していないが、NO は酸素と反応し易いことが知られていることから、超音波によって産生した NO は腫瘍中心部辺縁部ほど消失しやすい可能性がある。今後、腫瘍内の超音波 NO 産生量の分布も検討する必要があると考えられる。

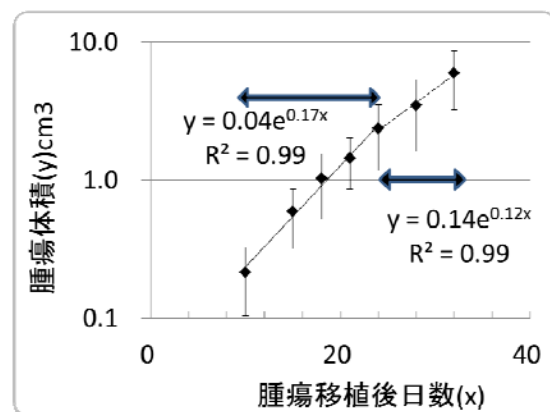


図1 腫瘍移植後日数と腫瘍体積

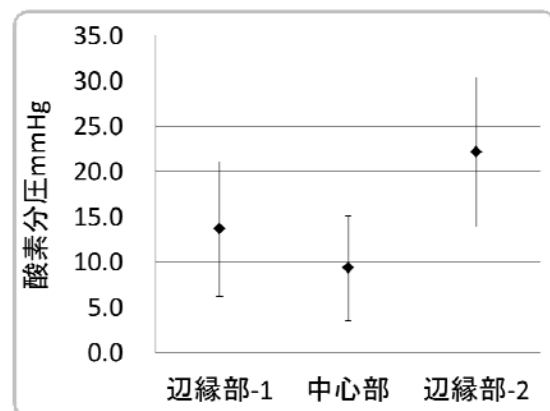


図2 腫瘍内酸素分圧の分布
(腫瘍移植後 32 日目)

(3) 超音波 NO 産生が腫瘍血管に与える影響の調査

NO は腫瘍成長に関与する血管新生因子の一つであり、作用の一つとして血管透過性を

高め、血管内の高分子が血管外に漏出することが知られている。図3および図4に示すように、腫瘍部および腫瘍周辺の正常組織のEB濃度は、照射終了15分後（EB投与80分後）では非照射時よりも低く、照射終了60分後（EB投与125分後）に非照射時よりも高くなった。これは、照射終了後15分では超音波NO産生の影響で血管透過性が亢進しており、血管外に漏出した高分子が血中に戻ってしまうが、超音波NO産生は一時的な上昇であるために、照射終了後60分程度では血管外の高分子が血中に戻ることができなかつたためと考えられる。一方、過去の知見から、RT2ラット脳腫瘍に超音波を60分間照射すると超音波照射中に一時的にNO産生量は高まり、照射終了後10分程度で照射前と同程度になる。本研究では、超音波照射によって一時的にNOが産生されたことが、高分子の血管透過性の検証からも示唆された。

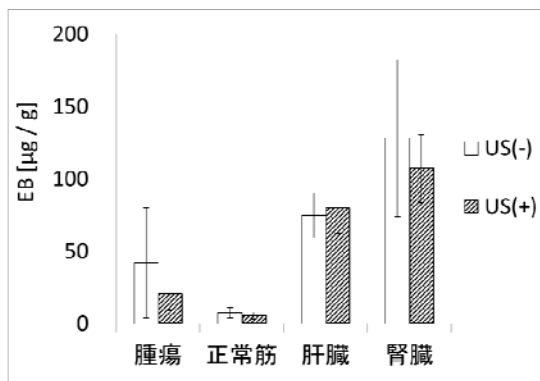


図3 EB投与80分後の各組織のEB濃度

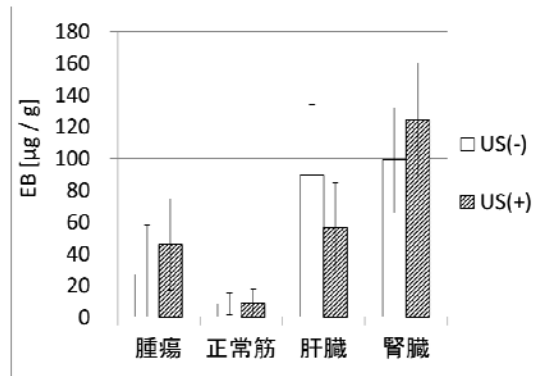


図4 EB投与125分後の各組織のEB濃度

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）

〔学会発表〕（計1件）
 遠藤 怜子、超音波によるEPR効果促進、第85回日本超音波医学会、2012年5月27日、品川

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
 遠藤 怜子 (ENDOUI REIKO)
 東京慈恵会医科大学・医学部・助教
 研究者番号：40433982