

酸化チタンと超音波を併用した新しい口腔癌治療法の開発

光触媒による癌治療法開発チーム（課題番号：127104）

研究期間：平成 24 年 7 月 26 日～平成 27 年 3 月 31 日

研究代表者：大谷泰志（平成 24 年 9 月 1 日～平成 27 年 3 月 31 日）

高橋宏昌（平成 24 年 7 月 26 日～平成 24 年 8 月 31 日）

研究員：西尾 淳、永井 宏

①研究成果

背景と目的

チタニア(二酸化チタン)は、代表的な光触媒としてよく知られている。光触媒は日本で発見され、様々な分野で商品化が進んできたことから、「日本発のオリジナル技術」といわれ、現在も日本が世界の光触媒技術を牽引し続けている。チタニアに光を当てると、OHラジカルなどの活性酸素を生じる。OHラジカルは、120kcal/mol 相当の大きなエネルギーを持っており、有機物を構成する分子中のC-C、C-N、C-H、O-H、N-Hなどの結合エネルギー100kcal/mol 前後を大きく上回るため、有機物を完全に分解し、炭酸ガスや水などの無害な物質に変えることが可能である。また、OHラジカルは塩素、次亜塩素酸、過酸化水素などよりもはるかに強い酸化力を有しており、殺菌効果や抗腫瘍効果も報告されている。これは液体中の気泡が超音波によって気泡が圧壊したときに起こる発光、“ソノルミネッセンス”が関係しているとも考えられている。

本研究課題ではこの超音波の特殊な効果に着目し、キャピテーションを利用したり、微小気泡化チタニア・シリカ水溶液と高密度焦点式超音波(以下HIFU)を併用による新しいがん治療法の確立を目指した。ナノ粒子の酸化チタンだけでは粒子同士が凝集する性質があり、生体内で問題を起す可能性がある。酸化チタンは、フッ化水素酸、熱濃硫酸および溶融アルカリ塩には溶解するが、その他の酸、アルカリ、水および有機溶剤には溶解しない。また、酸化チタンはpH 6前後に等電点を有しているため、酸化チタン粒子は、中性付近の水溶液系中では凝集を生じてしまい、これを均一に分散させることは極めて難しい。そのため、酸化チタン自体を医薬品として使用することは非常に困難であるとされている。一方、チタニア・シリカ水

溶液(特許第2913257号)は、酸化チタンと酸化ケイ素が結合した過酸化結合を有するチタニア・シリカ複合体からなる高分散性の水溶液光触媒である。従来の酸化チタンのみの水溶液と違い、チタニア・シリカ複合体が溶液中で均一に分散し、沈殿しにくく、薬剤として物理・化学的に安定している。それゆえ静脈内注射、局所注射、塗布等、種々の投与方法が想定できる。また、通常使用されている薬物と併用することも可能である。我々は、超高速振動装置を利用して、このチタニア・シリカ水溶液をナノバブル化またはマイクロバブル化し、同物質を高密度焦点式超音波で励起しないかを考えた。

一方、口腔癌の治療は現在、手術、放射線治療、化学療法が主体であるが、発声、嚥下、咀嚼に影響しQOLを著しく損なうことも多い。口腔癌の治療においては低侵襲、機能温存さらに根治性を併せ持った新しい治療法の実用化が急務である。

現在、ナノサイズにコントロールされた光触媒微粒子が開発されている。癌細胞には多くの物質を取り込み保持するという特性がある。われわれはこの特性を利用し、癌細胞に光触媒粒子を取り込ませ、超音波エネルギー照射で光触媒(酸化チタン)を励起させ、その抗癌作用を発揮させる新しい口腔癌治療法実用化の第一歩を目指す。

酸化チタンは、白色塗料、絵具、顔料などの着色料、光触媒、オフセット印刷用の感光体、触媒担体、太陽電池の素材などとして広く使用されている。光触媒は日本で発見されたことから、“日本発のオリジナル技術”といわれ、日本が世界の光触媒技術を牽引している。光触媒とは、光を吸収して活性化することで、酸化力や還元力の強い物質を生成させ、それらの力で有機物を分解する物質である。現在、ポリマーで光触媒微粒子表面を処理し、凝集することなく、ナノサイズにコントロールされた光触媒

微粒子が開発されている。1980年代、福岡大学工学部中野研究室で世界に先駆けて酸化チタン粉末から、チタニア水溶液が調整された(1)。以後、チタニア応用研究会で性能評価、応用技術の開発が進展している。特にチタニア-シリカ水溶液は、酸化チタンと酸化ケイ素が結合した過酸化結合を有する光触媒であり、酸化チタン構造部分で光触媒機能を、酸化ケイ素構造部分で超親水性機能を、過酸化結合構造部分で可視光域吸収機能を、それぞれ発揮する画期的なインテリジェント光触媒として、海外でも大変注目されている。

近年、酸化チタンを光触媒として用いた新規がん治療の研究が進められている。酸化チタンに紫外光を当てると励起されて活性酸素種が発生し、その強い酸化力でがん細胞を破壊しようとするものである。さらに2006年、酸化チタンに超音波エネルギーを照射することによって光を照射した時と同様に活性酸素が生成されることが報告された(2)。超音波の高い回折能によって光の届かない場所にも光触媒反応と同様な効果が期待できる。すなわち紫外線に比べ超音波エネルギーは生体深達度が高いため、本課題の方法を用いると殺細胞効果が飛躍的に向上することが予想される。われわれは、C32細胞株(メラノーマ細胞)において、酸化チタンと超音波の併用による殺細胞効果について報告している(3)。超音波照射によるチタニアの励起メカニズムは、超音波照射時のチタニアの熱励起および、ソノルミネッセンスとよばれる発光現象によるものといわれている(4)。

診断用の超音波技術は目覚ましい進歩を遂げ、超音波診断画像から得られる情報量は飛躍的に増加し、心臓、頸部、腹部領域における一般診療の場で必要不可欠な診断手法となった。一方、超音波の治療への応用は50年以上の長い歴史を持ちながら、診断領域ほどの脚光を浴びることはなかった。この数年、今までになかった新しい超音波治療方法・装置が次々と臨床の場で使われるようになり、新たな分野が築かれようとしている。

古くから超音波エネルギーによって、熱を発生させられることは知られていたが、1950年代に癌に対する超音波温熱治療がはじめて臨床応用された。しかし、当時の診断技術では超音波本来の特徴を十分に発揮できなかった。現在は超音波、CT、MRIなどの画像診断技術があるため、リアルタイムで体内の様子を観察しながら、超音波を体外から数ミリ単位の正確さで患部に照射可能となっている(高密度焦点式超音波治療法、High Intensity Focused Ultrasound; HIFU)。超音波を一点に集めることにより、その焦点で高いエネルギーを作る。これは、前立腺癌、子宮筋腫の治療に広く臨床応用されつつある。HIFUは生体の外部から深部にまで到達することが可能であることから、非侵襲の状態で生体内深部に存在するターゲット部位にまで到達させることが可能である。目的病巣のみを破壊することが可能で周囲の正常な組織や臓器には影響がな

いとされる。

一方、1990年代に超音波の非温熱効果(機械的作用)と薬物を併用する全く新しい「超音波・薬物効果促進作用」が発見され、超音波治療の可能性がさらに拡大した(5)。近年、非温熱超音波を併用する、様々な薬物の効果促進作用が報告されている。超音波エネルギーはさまざまな生体組織で薬物の吸収・浸透を促進させる働きがあることから、血栓溶解療法(6)をはじめ、血管治療、再生医療、腫瘍化学療法など多くの分野へと広がりを見せている。特に、超音波エネルギーを利用したDDS (Drug Delivery System)で注目されている新しい技術が、超音波感受性マイクロバブルである。マイクロバブル併用することで薬物を血管壁または組織内へ容易に浸透させることができ、従来の薬物動態学的な概念を根本から覆す新しい手法が出現している。超音波エネルギーによる薬物透過促進のメカニズムは、まだ完全に解明されていないが、超音波により発生するキャビテーション(微小気泡の破裂)が関与しているとされる。超音波で発生する微細な気泡の複雑な物理運動は血栓や血管壁の表面で薬物透過性の促進をもたらしていると考えられる。一方、マイクロバブルは現在、超音波造影剤として既に臨床の場で使われている。この超音波造影剤(診断用マイクロバブル)は薄いタンパク質・脂質などの被膜を持つマイクロカプセル(直径1-10 μ)で、ガスで充満されている。通常では造影剤は血管内へ注射され、超音波画像の心腔・心筋・肝臓をより鮮明に映し出すために使用されている。超音波造影剤の存在下でキャビテーションの閾値が低下することが知られていたが、1995年に立花ら(7)は超音波造影剤と血栓溶解剤(ウロキナーゼ)を混合し、超音波血栓溶解実験を行った。その結果、超音波造影剤を混合した群がコントロール単独群に比べ有意に血栓溶解が促進されたことが解った。マイクロバブルがキャビテーション発生の核となり、ウロキナーゼの拡散をよりいっそう増幅したものと考えられた。超音波で崩壊されたマイクロバブルの周囲に時速600キロに達するマイクロ液体ジェット流を発生することが突き止められ、このジェット流とともに薬物が移動すると考えられている。最近、この微小気泡の発生とその崩壊の様子を超高速度ビデオカメラ(毎秒1,300万フレーム)で撮影することが可能となった(8,9)。顕微鏡下で微小気泡の崩壊を観測することで液体ジェット流がどのように薬物の拡散に関与しているか解明が進んでいる。

本課題では、扁平上皮癌細胞株に対する酸化チタン・超音波併用療法による殺細胞効果の確認およびメカニズムの解明並びに口腔癌に対する酸化チタン・超音波併用療法確立を目標とする。さらにマイクロバブルの機械的ダメージは、酸化チタンを加えることによって影響があるか検討する。

実験1：チタニアシリカ水溶液とHIFUを併用し、扁平細胞癌細胞株における殺細胞効果を検討した。

材料と方法

細胞および細胞培養

本実験には、口腔扁平上皮癌由来の細胞株であるHSC-2を使用した。細胞は10%ウシ胎児血清(Invitrogen社)およびMEM medium (Wako社)にて、37℃、5%CO₂存在下で培養した。

薬剤

薬剤として“凜光”(アサカ理研) R-A-TS (アナターゼ型)を使用した。福岡大学工学部中野研究室で開発された高分散性のチタニアシリカ水溶液である(Fig.1)。



Fig. 1

Properties of "RINKOH"	
Hydrogen ion concentration (pH)	6 ~ 9
Solid concentration	~ 1%
Average particle size	10-30nm

超音波

超音波発生装置はSonoPore KTAC-4000 (Nepagene社)、トランスデューサーとして、Fig.2に示すHIFUトランスデューサー (Nepagene社)を使用した。超音波を一点に集めることにより、その焦点で高いエネルギーを作る



トランスデューサー
(30mm 径)

Fig. 2

実験方法

In vitro

HSC-2の細胞懸濁液(2×10⁶cells/ml) 500μlを24wellの底がフィルムになったプレートに入れ、“凜光”を添加した場合と、しない場合でHIFU (frequency, 3.5 MHz; burst rate, 100Hz; duty cycle, 50%)を照射した(Fig.3)。超音波強度は30、40、50、60V の4種類、照射時間は0.1、1.0、3.0秒の3種類とした。“凜光”の濃度は1well中、5、10、15μlの3種類とした。細胞生存率の計測は、NucleoCounter (Chemometec社)を用いてヨウ化プロピディウム(PI)染色法で行った。

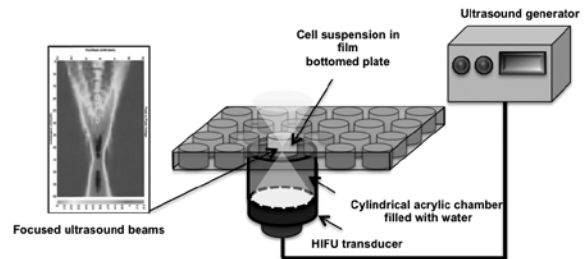


Fig. 3 In vitro実験系の略図

In vivo

5週齢メスのヌードマウス(BALB/c (nu/nu))を用いた。

①コントロール群②HIFU群③凜光群④凜光+HIFU群の4群で検討した。

HIFUはIntensity210 W/cm²、3秒照射とした。HIFU照射後すぐに病理組織学的検討を行った。

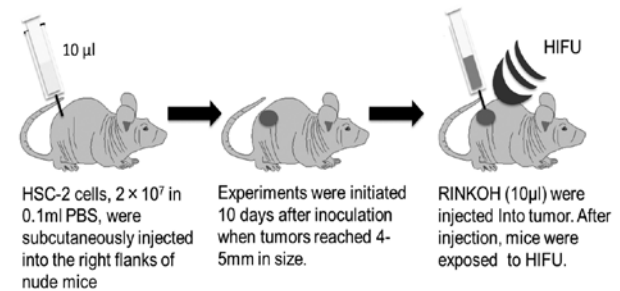


Fig. 4 In vivo実験系の略図

結果

In vitro

HSC-2に対する殺細胞効果は、“凜光”とHIFUを併用した群が最も高かった。細胞生存率は、チタニアシリカ水溶液の濃度、HIFUの強度、照射時間に依存して減少した。

濃度15μ / ml のチタニア・シリカ複合体水溶液に対する電圧を30V ~ 60Vに、またHIFU照射時間を0.1秒、1秒、3秒と変えた場合の細胞生存率(%)をP I 染色法で計測した結果を示している。この結果から、電圧が30Vであ

る場合、HIFU照射時間を変えても細胞生存率はほとんど変化しなかった。電圧が40Vの場合、HIFU照射時間を1秒または3秒に変えたとき、細胞生存率が約90%～85%に減少した。また電圧が50Vである場合、HIFU照射時間を0.1秒、1秒、3秒と変えた場合、細胞生存率が>90%、85%、>70%に減少した。電圧が60Vである場合、HIFU照射時間を0.1秒、1秒、3秒と変えた場合、細胞生存率が約90%、75%、60%に減少した。

In vivo

腫瘍の組織切片をHE染色した標本を光学顕微鏡で観察したところ、③凍光群④凍光+HIFU群において茶褐色の粒子が認められた。また②HIFU群④凍光+HIFU群において、出血が認められた。

実験2：マイクロバブルおよびチタニアシリカ水溶液とHIFUを併用し、扁平細胞癌細胞株における殺細胞効果を検討する。

薬剤

“凍光”(アサカ理研)R-A-TS(アナターゼ型)とR-P-TS(ペルオキソ型)を使用した。

マイクロバブル

Sonozoid (phospholipid shell encapsulating perfluorobutane gas; Daiichi-Sankyo, Tokyo, Japan)を使用した。

実験方法

HSC-2の細胞懸濁液(2×10^4 cells/ml) 500 μ lを24wellの底がフィルムになったプレートに入れ、“凍光” R-A-TS(アナターゼ型)とR-P-TS(ペルオキソ型)を添加した場合と、しない場合でHIFU (frequency, 3.5 MHz; burst rate, 100Hz; duty cycle, 50%)を照射した。HIFUはIntensity 210 W/cm², 0.5秒照射とした。①コントロール群、②R-A-TS群、③R-P-TS群、④HIFU+マイクロバブル群、⑤HIFU+マイクロバブル+R-A-TS群、⑥HIFU+マイクロバブル+R-P-TS群で検討した。光学顕微鏡で、処置直後の細胞形態を観察した。

結果

HSC-2に対する殺細胞効果は、“凍光”、マイクロバブル、HIFUを併用した群が最も高かった。細胞破壊率についても同様であった(Fig. 5, 6)

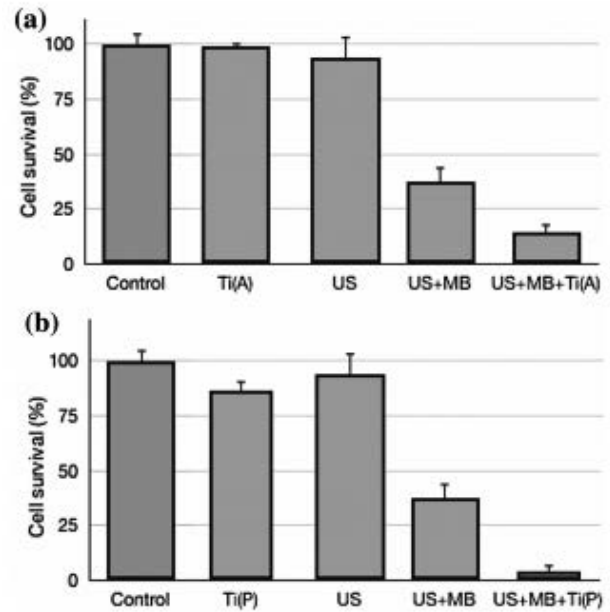


Fig. 5 各条件下での細胞生存率の比較

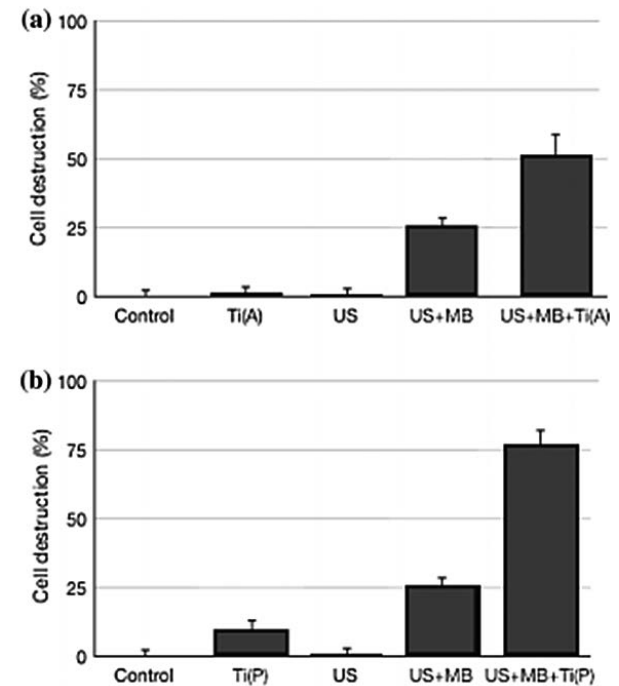


Fig. 6 各条件下での細胞破壊率の比較

光学顕微鏡で観察したところ、最も細胞膜にダメージを与えたのは、“凍光”、マイクロバブル、HIFUを併用した群であった。

光学顕微鏡所見でa. R-P-TS(ペルオキソ型)、マイクロバブル、HIFUを併用した群では多数の細胞の細胞膜が破壊されていた。b. R-P-TS(ペルオキソ型)、マイクロバブル、HIFUを併用した群では、HIFU照射直後から細胞膜の大きな破壊があった。c. 細胞膜に接する褐色の粒子は、TiO₂粒子の可能性はある。

結論

扁平上皮癌細胞株においてチタニアシリカ水溶液、マイクロバブル、高密度焦点式超音波(HIFU)の併用で、効率的な殺細胞効果が認められた。

考察

実験1より、チタニアシリカ水溶液とHIFUを併用すると、HIFUの強度と照射時間、またはチタニアシリカの濃度に比例して、殺細胞効果が高くなることが確認できた。HIFUによって、チタニアシリカ粒子が励起され、生成された活性酸素種により癌細胞が破壊されていると考えられる。

*In vivo*にてHIFUのみの治療群と、凜光+HIFU群で組織内の出血を確認した。HIFUのみでも、ある程度の殺細胞効果はあるが、“凜光”を併用することで、大きな相乗効果が得られると考えられる。

凜光+HIFU群でのみ、細胞質内にチタニアシリカ複合体粒子が取り込まれた。これは、HIFUがチタニアシリカ粒子を細胞内に通過させたと考えられる。そのメカニズムとして、HIFUによるキャビテーションジェットが細胞膜に一過性の微細孔を開けるソノポレーションが関与していると予想される。

実験2より、さらにマイクロバブルを添加することによってさらに効果的な殺細胞効果が確認できた。

実用化に向けた課題として、チタニアシリカ複合体水溶液は既に光触媒として商品化され、安価に大量生産が可能であるが、局所駐車、静脈内注射による生体への安全性は未解明である。また、現在入手可能な市販の超音波治療装置は口腔内での使用は形状的に適していないので、今後、専用の装置の開発研究が必要となる。口腔内または頸部から超音波をより効率的に照射するためには、超音波プローブの小型化が望まれる。

また、今後の展望としてチタニアシリカ複合体粒子がリポソームなどに内包または、吸着された形態の薬剤を開発することや、チタニアシリカ表面に標的細胞による認識と取り込みを促進させるパイロット分子を結合し、active targetingにつなげることが可能であれば、あらゆる部位の癌治療が可能になると想定される。本技術は、本来はすべてのがん種に有効な治療方法となることが期待されるが、まずはチタニアシリカ溶液の投与や超音波照射が局所で可能という口腔癌にターゲットをあわせている。局所的な治療という観点からは、既存の外科手術、化学療法、放射線療法に比べて、副作用のほとんど無い優しい治療法となることを示しており、他の新規な癌治療法の開発に比べて、非臨床および臨床試験の容易さも示唆している。コンセプトの検証が済んでいることと、まずは局所治療が意図されていることを考えると実用化の可能性は高いと言える。

参考文献

1. Katsuyuki Nakano et al.:Sol and Gel Formations in Reactions of Amorphous Titania with H₂O₂ and HN0₃. Journal of Corrosion Science, 31:407-412, 1990.
2. Dadjour MF et al.:Disinfection of Legionella pneumophila by ultrasonic treatment with TiO₂. Water Research, 40 (6) :1137-1142, 2006.
3. Harada Y, Ogawa K, Irie Y, Endo H, Feril LB Jr, Uemura T, Tachibana K. Ultrasound activation of TiO₂ in melanoma tumors. J Control Release. 149 (2) : 190-195, 2011.
4. Wang J, et al.: Sonocatalytic degradation of methyl orange in the presence of TiO₂ catalysts and catalytic activity comparison of rutile and anatase. Ultrason Sonochem. 2 (5) :331-337, 2005.
5. Tachibana K: Emerging technologies in therapeutic ultrasound: thermal ablation to gene delivery. Hum Cell. 17 (1) : 7-15, 2004.
6. Siegel R: Ultrasound Angioplasty, Kluwaer Academic Publishers, Boston, 1996, pp 1-2.
7. Tachibana K, Tachibana S: Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. Circulation 92: 1148-1150, 1995.
8. Prentice P, et al: Membrane disruption by optically controlled microbubble cavitation. Nature Physics 1:107-110, 2005.
9. Mitragotri S: Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. Nature Reviews Drug Discovery 4: 255-260, 2005

②研究業績

1. 高橋宏昌, 喜久田利弘, 立花克郎: 新しい超音波技術の医療利用. 検査技術: 18/12,1305-1307, 2013.
2. 高橋宏昌, 喜久田利弘, 立花克郎: 医療超音波技術の最前線. 化学工業: 64/1,29-34, 2013.
3. Katsuro Tachibana, Hitomi Endo, Loreto B. Feril Jr., Seyedeh Moosavi Nejad, Hiromasa Takahashi, Kyoichi Narihira, Toshihiro Kikuta. : Enhanced mechanical damage to in vitro cancer cells by high-intensity-focused ultrasound in the presence of microbubbles and titanium dioxide. J Med Ultrasonics (in press)

本研究は、福岡大学研究推進部の研究経費によるものである。(課題番号:127104)