

学 位 論 文 題 名

Development of diagnostic ultrasound and ultrasound  
contrast agent microbubbles mediated cisplatin delivery  
in cancer therapy

(超音波診断装置および超音波造影剤を用いたシスプラチンデリバリーに  
よるがん治療法の開発)

学位論文内容の要旨

Ultrasound is one of the most promising candidates for the next generation of cancer therapeutic modality. Among several ultrasonic therapies, drug delivery system by the combination of diagnostic ultrasound (US) and microbubbles (MBs) is a promising tool because of convenience and real-time guidance. Therefore, a series of experiments, from *in vitro* to *in vivo*, was conducted in order to investigate feasibility and efficacy of cisplatin delivery by diagnostic US and US contrast agent MBs.

Diagnostic US consists of fewer wave cycles with lower time average intensity compared to other US. Hence, characteristics of anticancer drug delivery by diagnostic US and MBs were investigated *in vitro* to improve delivery efficiency. Several physical parameters, including MB concentration, cisplatin concentration, interaction of MBs and cells, and US exposure time, were examined in order to produce maximum enhanced cytotoxic effect of cisplatin with minimum side effects. It was demonstrated that (i) high MB concentration caused negative side effects such as US attenuation and cell loss; (ii) higher cisplatin concentration showed cytotoxic effect without US and MBs; (iii) direct interaction between a cell and only a few MB was the most efficient and had least undesirable effects; (iv) short periods of US exposure were sufficient to enhance cytotoxic effect of cisplatin. Therefore, the strategy for maximum efficiency of anticancer drug delivery by diagnostic US and MBs was suggested that a few MBs adjacent or attached to every target cells were exposed diagnostic US for short time with low concentration of anticancer drug.

Based on the strategy from *in vitro* study, antitumor effect of cisplatin delivery by diagnostic US and MBs was investigated in a xenograft mouse model. The treatment protocol was employed an intratumor injection of MBs and cisplatin

concurrently with diagnostic US exposure for 15 sec. In addition, the treatment was repeated four times every two days. Diagnostic US exposure for 15 sec and an intratumor injection of MBs and cisplatin synergistically enhanced antitumor effect of cisplatin, and thus significantly delayed tumor growth. Moreover, there were no observable local and systemic adverse effects. Even though tumors were not eradicated, it was predicted that some modifications of treatment protocol may improve efficacy.

Anticancer drug delivery using diagnostic US and an intratumor injection of MBs is a promising cancer therapy because of its non-invasiveness, convenience, and less adverse effects. In the future, highly efficient and minimally invasive cancer therapy using diagnostic US may be applied not only in animals but also in human medicine.

# 学位論文審査の要旨

主 査	教 授	滝 口 満 喜
副 査	教 授	稲 波 修
副 査	准教授	工 藤 信 樹 (情報科学研究科)
副 査	准教授	山 崎 真 大

## 学位論文題名

### Development of diagnostic ultrasound and ultrasound contrast agent microbubbles mediated cisplatin delivery in cancer therapy

(超音波診断装置および超音波造影剤を用いたシスプラチンデリバリーによるがん治療法の開発)

がんの3大療法は手術、化学療法および放射線療法であるが、治療の侵襲性や副作用が問題点である。超音波は非侵襲的検査法として獣医療ならびに医療で汎用されているが、近年は治療にも臨床応用されつつあり、第4のがん治療法として期待されている。Ultrasound-targeted microbubble destruction (UTMD)は超音波と微小気泡（マイクロバブル；MB）によるドラッグデリバリー法である。UTMDでは超音波のエネルギーによってMBを破壊し、細胞膜の透過性を亢進させて遺伝子や薬剤導入を行う。UTMDには高エネルギーの超音波が使用されてきたが、低エネルギーの超音波診断装置も超音波造影剤に代表されるMB存在下ではUTMDが可能とされる。超音波のエネルギーはUTMDの効率に影響するが、低エネルギーの診断装置を用いる利点には治療のリアルタイムモニタリングが挙げられる。しかし、診断装置を用いるUTMDによる抗がん剤のデリバリーに関する基礎的検討は不足しており、そのためデリバリー効率および治療効果は未だ低い現状にある。そこで、本研究ではデリバリー効率および治療効果を高め、診断装置および造影剤による抗がん剤のデリバリーを非侵襲的で簡便ながん治療法として確立することを目的とした。

第1章では*in vitro*でデリバリー効率に関する基礎的検討を行った。96穴プレートに犬甲状腺癌株細胞を $2 \times 10^4$  個/wellずつ播き8時間単層培養した。超音波造影剤ソナゾイドのMBおよびシスプラチン添加後、プレートを裏返してインキュベーションすることでMBを細胞近くに上昇させ、プレートを裏返したまま超音波を下から照射した。デリバリー効率はUTMD 24時間後にシスプラチンの殺細胞効果増強によって評価した。まずMB濃度を最適化し、至適MB濃度でインキュベーション時間を最適化した。併せて至適条件下での細胞とMBの位置関係を検討した。続いて、至適MB濃

度およびインキュベーション時間を用い、シスプラチン濃度と超音波照射時間を最適化した。その結果、MB濃度およびインキュベーション時間の至適条件は $2 \times 10^5$  個/mlおよび5分であった。この条件では1つの腫瘍細胞の近くに数個のMBが存在しており、またシスプラチンの至適濃度は1  $\mu\text{g/ml}$  だった。MBおよびシスプラチンが至適濃度の場合、デリバリー効率は超音波照射時間によって変化しなかった。

第2章では第1章の成果を基に *in vivo* 腫瘍モデルでの抗腫瘍効果を評価した。ヌードマウス背部に犬甲状腺癌株細胞を $5 \times 10^6$  個接種し、腫瘍径5 mmに達した時点でソナゾイド10  $\mu\text{l}$  (MB  $1 \times 10^7$  個) およびシスプラチン1  $\mu\text{g}$  を腫瘍内投与しながら超音波を15秒間照射した。この治療を1日おきに合計4回行い、その後は無治療で腫瘍体積の変化、皮膚の外観および体重変動を観察した。治療開始24日目にマウスを安楽殺に処し、腫瘍組織をHE染色にて評価した。超音波、MBおよびシスプラチン併用群の腫瘍体積は治療開始後24日目まで無治療群に比較して有意に小さかった。その他の群の腫瘍体積は無治療群と変わらなかった。すべての治療群で治療による皮膚および皮下の炎症や出血は見られず、体重変動に群間差は認めなかった。一方、腫瘍組織には超音波、MBおよびシスプラチン併用群でも腫瘍細胞が残存していた。

*in vitro*での最適化から超音波診断装置を用いたUTMDによる抗がん剤のデリバリーでは、標的細胞の近くに数個のMBがある状態で超音波照射することによりデリバリー効率を高められると示された。このことから *in vivo*ではMBを腫瘍細胞のより近くに位置させるために、MBを腫瘍内へ局所投与しながら超音波を照射した。その結果、シスプラチンの抗腫瘍効果は顕著に増強され、腫瘍成長が遅延した。また、局所ならびに全身に明らかな副作用は認められなかった。一方で、1回15秒を4回の治療ではすべての腫瘍細胞にシスプラチンをデリバリーできなかったことが示唆された。しかし、超音波照射時間や治療回数の最適化を行うことによりさらに抗腫瘍効果を高めることが可能と考えられた。

本研究により、超音波診断装置および造影剤を用いる抗がん剤のデリバリーは、非侵襲的かつ副作用の少ないがん治療法として非常に有望であることが示された。これは、超音波が診断のみならず第4のがん治療法としてより臨床応用に近づく大きな一歩である。今後の研究により本法は獣医療のみならず医療においても、患者の生活の質を保ち高い治療効果を持つがん治療法として期待される。

よって審査員一同は、上記博士論文提出者佐々木東氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。