



Title	腫瘍融解ウイルス療法へのソノポレーション導入に関する研究
Author(s)	奥長, 秀介
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/55532">https://hdl.handle.net/11094/55532</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

腫瘍融解ウイルス療法へのソノポレーション  
導入に関する研究

大阪大学大学院歯学研究科 統合機能口腔専攻  
顎口腔病因病態制御学講座 口腔外科第二教室

奥長 秀介

# 学位論文

## 腫瘍融解ウイルス療法へのソノポレーション 導入に関する研究

大阪大学大学院歯学研究科 統合機能口腔専攻  
顎口腔病因病態制御学講座 口腔外科第二教室

奥長 秀介

## 緒言

現在の口腔癌治療では、手術、放射線療法、化学療法を主体としたものが一般的である。しかし、近年の医療技術の進歩にも拘わらず、進行癌において十分な治療成績の向上はみられていない<sup>1, 2)</sup>。そのため、進行癌に対する新たな治療法が求められている。近年、遺伝子組換えウイルスを癌治療に応用する腫瘍融解性ウイルス療法が注目されている<sup>3-8)</sup>。これは変異により弱毒化した増殖性ウイルスを腫瘍細胞に感染させ、ウイルス複製に伴う細胞変性効果により腫瘍を破壊する治療法である。これまで、アデノウイルス、レオウイルス、ワクシニアウイルスなど様々なウイルスで検討されてきたが、特に単純ヘルペスウイルス 1 型 (**herpes simplex virus type 1; HSV-1**)を用いた研究が精力的に行われている<sup>3, 4, 8, 9)</sup>。多くの成人は幼少期に感染し終生免疫を獲得する。また、特異的な抗ヘルペスウイルス薬であるアシクロビルによりウイルス感染を中断できる。さらに、特定の株について遺伝子配列の決定や大半の遺伝子の機能が解明されている。よって、安全性を鑑みて、**HSV-1**はウイルスベクターとして適するとされている<sup>10)</sup>。**HSV-1**感染による重篤な疾患としてヘルペス脳炎が知られており、原因ウイルス遺伝子として神経毒性遺伝子 $\gamma_1$ **34.5**が同定されている<sup>11)</sup>。そのため、**HSV-1**ベクターの多くは $\gamma_1$ **34.5**遺伝子の欠失を基に構築されている。癌患者の

大多数が抗 HSV-1 抗体を保有することから、HSV-1 を用いた腫瘍融解性ウイルス療法では、全身投与よりも局所投与が有効である。この観点から、直視下でウイルスベクターを投与できる口腔癌は腫瘍融解ウイルス療法に適した対象といえる。

本研究で用いた HSV-1 ベクター RH2 は、野生型 F 株の  $\gamma_134.5$  を欠失させ、そこに Lac Z 遺伝子が挿入された R849 株<sup>12)</sup>と、実験室での継代過程で遺伝子変異を獲得した自然変異体である HF 株<sup>13,14)</sup>との組換え体であり、 $\gamma_134.5$  を欠失している<sup>15)</sup>。RH2 株をヌードマウスに形成されたヒト口腔扁平上皮癌に投与すると細胞融合をきたす。RH2 は、 $\gamma_134.5$  遺伝子を欠失することから、現在臨床研究段階にある HF のクローンウイルス HF10 と比較して脳腫瘍に適応できる利点を有する。また、最近では、RH2 株のゲノム DNA 配列も決定された<sup>16)</sup>。腫瘍融解性ウイルス療法の問題点は、HSV-1 感染が腫瘍組織内で十分に拡大しないことである。それ故、腫瘍細胞への感染効率をいかに高めるかが重要な課題となる。

低エネルギー超音波照射には薬物や遺伝子の標的細胞内へのデリバリー効果が認められている。超音波照射により生じるマイクロジェット流は一過性の小孔を標的細胞に形成し、細胞膜の透過性を向上させる。また、超音波造影剤であるマイクロバブル (MB) の併用により、デリバリー効果は格段に向上する<sup>17)</sup>。この一連の作用はソノポレーションと名付けられている<sup>18, 19, 20)</sup>。ソノポレーシ

ヨンは元来ウイルスベクターに代わる遺伝子導入法として研究されてきた。ウイルスを対象としたソノポレーションの研究は 2005 年のレトロウイルスの培養細胞への導入に始まり、アデノウイルスやアデノ随伴ウイルス(AAV)についても行われている<sup>22-27)</sup>。しかし、いずれの報告も非複製型ウイルスベクターによる遺伝子導入効率を検討したものであり、複製型の腫瘍融解性 HSV-1 とソノポレーションを併用した詳細な研究は未だ行われていない<sup>28)</sup>。そこで本研究では、ヘルペスウイルスを用いた腫瘍融解性ウイルス療法において、ソノポレーションが口腔扁平上皮癌(SCC)細胞への感染効率と抗腫瘍効果に及ぼす影響について検討した。

## 材料と方法

### 1. 細胞と培養法

細胞として、サル腎由来 Vero 細胞(Japanese Collection of Research Bioresources, Tokyo)とヒト口腔扁平上皮癌細胞 SAS (Japanese Collection of Research Resources)を用いた。Vero 細胞は Eagle の最小必須培地 minimum essential medium (MEM; 日水製薬, 東京)に 2 mM L-glutamine (和光純薬, 大阪)と 5%仔牛血清 calf serum (CS; JRH Biosciences, USA) を添加したものを培養液として、5%CO<sub>2</sub> 存在下に 37°C で培養した。SAS 細胞は 10%の牛胎児血清

fetal bovine serum (FBS; JRH Biosciences), 2mM L-glutamine, 100 µg/ml penicillin, および 100 µg/ml streptomycin を含む Dulbecco's modified essential medium (DMEM; 日水製薬)を用いて 37°Cで培養した。細胞は 0.1% trypsin (Gibco, USA)と 1% ethylene-diamine-tetra-aceticacid (EDTA; 和光純薬)で処理して細胞浮遊液を調製し, 継代培養を行った。

## 2. ウイルスのブラック形成法と感染力価の測定

HSV-1 として RH2 を使用した<sup>15, 16)</sup>。単層培養を行った Vero 細胞に RH2 を感染多重度(multiplicity of infection; MOI)を 0.1 で感染させた。細胞変性が顕著に認められる感染 48 時間後に, 細胞を回収し 3 回の凍結融解後, 1200×g で 5 分間遠心分離し, 細胞残渣を除去した。さらに, 4 °C で 9000×g 6 分間遠心を行い, 上清をウイルス液として回収し, -80°C で保存したのち実験に用いた。

ウイルスの感染力価は Vero 細胞を用いたブラック形成法にて測定した。まず, Vero 細胞を 6 well ポリスチレンプレートに  $1.0 \times 10^6$  cells/well で播種し, 48 時間培養し単層を形成させた。Phosphate-buffered saline(PBS(-); Nissui)で 10 倍段階希釈したウイルス液を Vero 細胞に接種し, 1 時間のウイルス吸着を行った。PBS(-)洗浄にて未吸着ウイルスを除去し, 0.3%メチルセルロース(和光純薬)を含有する培養液を重層し, 37 °C で培養した。細胞変性が明瞭となった時点で細

胞をエタノール固定し、1%クリスタルバイオレット(和光純薬)にて染色した。細胞変性部位に一致して形成された plaque を算定し、希釈倍率から感染力価 plaque forming unit (PFU)/ml を算出した。

ソノポレーションを併用する実験では、SAS 細胞を 24 well ポリスチレンプレートに  $2.0 \times 10^3$  cells/well で播種し、48 時間培養した。RH2 感染後、超音波照射を行い、細胞層を PBS で洗浄して未侵入ウイルスを除去した後、メチルセルロース含有培養液を重層して、ブラック形成を行った。あるいは、超音波照射後、経時的に RH2 を接種し、直ちに未侵入ウイルスを除去し、同様にブラック形成を行った。なお、ウイルス感染実験は大阪大学の遺伝子組換え実験安全委員会の承認(2700)を得て行った。

### 3. HSV-1 感染細胞に対するモネンシン処理

HSV-1 の細胞への感染には、エンドサイトーシスされた HSV-1 のエンベロープとエンドソーム膜が低 pH 環境下で膜融合することによって侵入する経路が知られている<sup>29)</sup>。モネンシンはエンドソームでの低 pH 環境を阻害する。モネンシン(和光純薬)は PBS に溶解し、最終濃度は 100  $\mu$ M, pH を 7.4 に調整した。SAS 細胞をモネンシン含有培養液で 30 分間、37°C で前処理した。そして 300 PFU の HSV-1 を接種して、モネンシン存在下で 30 分間の吸着を行い、細胞層

を PBS で洗浄し未吸着ウイルスを除去した。モネンシン含有培養液でさらに 5 時間培養したのち、メチルセルロース含有培養液に交換してプラック形成を行った。ソノポレーションを併用する実験では、モネンシン前処理後、 $1 \times 10^4$  PFU の RH2 を接種し、超音波照射を行い、細胞層を洗浄し、さらにモネンシン含有培養液で 5 時間培養したのち、メチルセルロース含有培養液に置換した。

#### 4. ソノポレーション

超音波遺伝子導入装置にはソニトロン 2000V (ネッパジーン, 千葉) を用いた。MB として Artison As0100 (ネッパジーン) を用いた。培養細胞に対するソノポレーションでは, SAS 細胞を 96 well ポリスチレンプレートに行う場合は  $2 \times 10^3$  cells を 1 well ごとに間隔を空けて播種し, 24 時間培養した。プレート底面よりゲル (LOGIQLEAN; 花王, 東京) を介して径 6 mm のトランスデューサーを接触させて超音波照射を行った。また, 24well ポリスチレンプレートに行う場合は  $2 \times 10^3$  cells を 1 well ごとに間隔を空けて播種し, 48 時間培養したものにプレート底面よりゲルを介して径 12mm のトランスデューサーを接触させて超音波照射を行った。照射条件は, 周波数 1 MHz, 出力 1.0~2.0 W/cm<sup>2</sup>, 20% duty cycle, 照射時間 5~60 秒とした。マイクロバブルを添加する場合, Artison ( $1 \times 10^9$ /ml) を 10%(V/V)の割合で添加した。ウイルス感染実験では, ソノポレ

ーション後、細胞層を PBS で洗浄し、メチルセルロース含有培養液を重層して  
ブラック形成を行った。ヌードマウス腫瘍に対するソノポレーションでは、  
PBS(-)あるいはMBを10%の割合で添加し50  $\mu$ lに調整した $1 \times 10^5$ PFUのRH2  
を27G注射針にて腫瘍内に投与した。その後、腫瘍直上の皮膚にゲルを介して  
径12 mmのトランスデューサーを垂直方向から接触させ、超音波照射を行った。  
出力を $1 \text{ W/cm}^2$ 、20% duty cycleとし、照射時間を10, 30, 60秒と変化させた。

## 5. 細胞傷害性の測定

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide(MTT)法を用  
いて測定した。96 wellで増殖させたSAS細胞にソノポレーションを行い48時  
間培養した後、MTT 50 mgをPBS(-)10 mlに溶解したMTT溶液を10  $\mu$ l/well  
加えた。さらに4時間培養した後、2-プロパノール(和光純薬)反応停止液を100  $\mu$ l  
加え、マイクロプレートリーダー(Benchmark Plus;Bio-Rad, Hercules, CA,  
USA)にて吸光度(630 nm 対照波長で570 nm 波長)を測定し、非照射の対照に対  
する比率から生細胞率を算出した。

## 6. 走査型電子顕微鏡用試料作製と細胞の観察

カバーガラスを浸漬した60 mmポリスチレンプレートにSAS細胞を $5.0 \times$

$10^6$  cells/plate で播種し、一晚培養した。細胞を PBS で 5% に調整したグルタルアルデヒドで一晩固定し、PBS(-)で洗浄したのち、エタノール脱水操作を行った。エタノール濃度 60, 70, 80, 90, 95, 99% で各 10 分、濃度 100% で 20 分を行った。その後、t ブチルアルコール(和光純薬)にて一晚置換したのち、真空乾燥機(JFD-320, JEOL, 東京)を用いて乾燥した。試料をカーボンテープで試料台に接着し、白金蒸着 (JFC-1600, JEOL, 東京)したのち、電界放射型走査型電子顕微鏡(JSM-6510LV, JEOL, 東京)を用いて、検鏡した。加速電圧 10 kV で観察した。

## 7. ヌードマウス腫瘍の形成と腫瘍内ウイルスの調整

5 週齢のメスヌードマウス Balb/c nu/nu (日本クレア, 東京)の背部皮下に PBS(-)で  $100\mu\text{l}$  に調整した  $1 \times 10^6$  個の SAS 細胞を接種し腫瘍を形成した。腫瘍径が 5 mm に達した時点で使用した。

腫瘍内ウイルス量を測定する実験では、 $1 \times 10^6$  PFU の RH2 を腫瘍内に投与し、ウイルス投与後から 3 日目に腫瘍を摘出し、腫瘍重量の 2 倍量の PBS(-)を加えて PELLET PESTLE (KONTES, USA) を用いてホモジナイズした。その後、3 回の凍結融解したのち、 $9000 \times g$  で 6 分間の冷却遠心を行い、上清をウイルス液とした。Vero 細胞上でのブラック形成法にて腫瘍内のウイルス感染力価 PFU/tumor (g) を求めた<sup>14)</sup>。なお、ヌードマウス腫瘍の実験は、大阪大学の動

物倫理委員会の承認(動菌-20-026-1)を得て行った。

## 8. 組織標本の作製と免疫組織化学染色

PBS で 50  $\mu$ l に調整した  $1 \times 10^6$  PFU の RH2 を腫瘍内に投与し、感染後 3 日目に腫瘍を摘出した。10%ホルマリン液で 24 時間固定後、パラフィン包埋を行い、5  $\mu$ m 厚の連続切片を作製し、シランコーティングを施したスライドガラス(松波硝子, 大阪)に貼付した。免疫組織化学染色では、切片の脱パラフィンと親水化を行った。0.3%過酸化水素水(和光純薬)に 10 分浸漬して内因性ペルオキシターゼを不活化し、4%bovine serum albumin (BSA)(ALBUMIN, BOVINE Fraction V, Sigma)で 10 分ブロッキングを行った後、1 次抗体として、10,000 倍希釈した抗 HSV-1 ウサギポリクローナル抗体 (DAKO, Denmark)を一晩反応させた。続いて Envision + System-HRP Labelled Polymer Anti Rabbit (DAKO) を常温で 30 分間反応させた。免疫反応物の可視化は 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)溶液 (DAKO)で行った。最後にヘマトキシリンにて核染色を施し MGK-S (松波硝子)にて封入し、Nikon Cool scope 顕微鏡 (Nikon, Tokyo)で観察した。免疫組織化学染色の定量化では、WinROOF(Mitani Corp, Tokyo)を用いて、拡大率 50 倍で HSV-1 抗原陽性領域を最低 3 視野以上で観察し、平均面積を求めた。

正常皮膚への感染では、5週齢のメスヌードマウス Balb/c nu/nu (日本クレア、東京)の背部皮下に  $1 \times 10^6$  PFU/100  $\mu$ l に調整した RH2 を接種し、感染3日目に皮下組織を切除し、固定後、組織標本を作製した。

## 9. ヌードマウス腫瘍に対する HSV-1 の抗腫瘍効果の測定

$1 \times 10^5$  PFU の感染力価を有する RH2 を MB 存在下もしくは非存在下で腫瘍内に1回投与した。その後、MB 存在下あるいは非存在下でソノレーションを行った。対照として PBS(-)を投与した。したがって、実験群は対照群、RH2 単独群(RH2)、RH2 接種後超音波照射を行う群(US)、RH2 接種後 MB 存在下で超音波照射を行う群(RH2+ MB+ US)の4群とした。腫瘍内投与後から24日間、経時的に腫瘍の長形と短径を測定し、体積 {長径 mm  $\times$  (短径 mm)<sup>2</sup>  $\times$  0.52} <sup>21)</sup>を算定した。

## 10. 統計解析

統計処理は SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)を用いた。2群間の比較は Student の *t*検定を、多重比較は Turkey 検定を用いた。また、有意水準は 0.05% とした。

## 結果

### 1. SAS 細胞に対するソノポレーションが細胞生存率に及ぼす影響

ソノポレーションが細胞の増殖能に及ぼす影響について SAS 細胞を用い MTT 法で検討した。PBS あるいは MB を加えた直後に超音波照射を行い、48 時間培養し、生細胞率を MTT 法にて算出した。超音波照射の出力を  $1 \text{ W/cm}^2$ 、20% duty cycle に固定し、照射時間を 5, 10, 30, 45, 60 秒と変化させたところ、未処理の対照と比較して生細胞率は 80% にまで低下したが、照射時間を 60 秒まで延長しても MB の存在に関わらず、生細胞率に変化はみられなかった(図 1A)。一方、出力  $2 \text{ W/cm}^2$  では、照射時間の延長に伴い生細胞率は低下し、MB 併用での 60 秒の照射により対照の 57% に生細胞率は低下した(図 1B)。

### 2. ソノポレーションが HSV-1 のプラック形成に及ぼす影響

ウイルスが感染するためには、細胞表層のレセプターにウイルス粒子表層のエンベロープ糖タンパク質が結合し細胞内に侵入することで成立する。SAS 細胞における RH2 吸着段階でのソノポレーションの影響について検討した。24 well ポリスチレンプレートに  $2 \times 10^3$  cells/well で接種し、48 時間単層培養させた SAS 細胞に 100 PFU の RH2 を接種し、30 分の培養によりウイルス吸着を施

したのち、 $1 \text{ W/cm}^2$ の超音波を異なる照射時間(5~60 秒)で照射し、プラック形成を行った。未処理の対照で形成されたプラック数が 16 であったのに対し、10 秒間の照射によりプラック数は 55 となり、3.4 倍に増加した。さらに、MB 存在下では、10 秒間の照射によりプラック数は 72 となり、対照の 4.5 倍に増加した(図 2)。以上の結果より以後の実験における超音波照射条件を出力  $1 \text{ W/cm}^2$ 、20% duty cycle, 照射時間 10 秒とした。

### 3. ソノポレーション直後の RH2 接種がプラック形成に及ぼす影響

ソノポレーションは一過性の小孔を形成するとされている<sup>20)</sup>。そこで、ウイルスの吸着時間がない状態でソノポレーションによる感染が成立するか否かについて検討した。24 well ポリスチレンプレートに  $2 \times 10^3 \text{ cells/well}$  で接種し、48 時間単層培養させた SAS 細胞に対し、MB 存在下あるいは非存在下で 100, 200, 500, 1,000 PFU の RH2 を接種し、直後に出力  $1 \text{ W/cm}^2$ 、20% duty cycle, 照射時間 10 秒で超音波照射を行った。その結果、1000 PFU のウイルスを感染させた未処理の対照群では、形成されたプラック数が 2.0 であったのに対し、超音波照射のみの群では 4.0、MB 存在下で超音波照射を行った群ではプラック数は 8.5 まで増加した(図 3)。

#### 4. ソノポレーションから RH2 接種までの時間がプラック形成に及ぼす影響

ソノポレーションでウイルスの侵入が可能な細胞膜表面の小孔形成の持続時間を知るため、超音波照射からウイルス接種までの時間を変化させプラック形成を行った。MB 存在下で超音波照射を行ったのち  $5 \times 10^3$  PFU の RH2 を接種するまでの時間を、0~1,200 秒後と変化させた。接種後、未侵入ウイルスを除去してプラック数を算定した。その結果、超音波照射の直後にウイルスを感染させた群ではプラック数は 67 であったが、ウイルス感染までの時間の延長によりプラック数は経時的に減少し、1200 秒後では、超音波照射を行っていない対照群と同様にプラック数は 1.0 まで減少した (図 4)。

#### 5. 走査型電子顕微鏡による細胞表面性状の観察

ソノポレーションによる細胞表面の変化を走査型電子顕微鏡で観察した。超音波照射した SAS 細胞では未処理の対照群では認められない小孔が形成された。さらに MB 存在下で超音波照射を行った場合、小孔形成が顕著となった(図 5)。小孔の径は 1-2  $\mu\text{m}$  であった。また、MB 存在下での超音波照射後 30 分経過した時点で観察すると、細胞周辺からプレートに接着する細胞突起は維持されるが、細胞表面全体に見られた隆起と陥凹は消失し、細胞表面は平滑化し、小孔もみ

られなかった(図 5)。

MOI=100 で RH2 を接種し、直後に出力  $1 \text{ W/cm}^2$ , 20% duty cycle, 照射時間 10 秒で超音波照射を行った後、30 分吸着させた SAS 細胞では、細胞表面に半球状の突起が多数認められた(図 6)。RH2 感染細胞に MB 存在下で超音波照射を行った場合、半球状突起はより顕著となったが、この部分も含めて細胞表面に小孔形成が観察された(図 6)。その 30 分後に観察すると突起は残存するが、細胞表面は平滑となり小孔は消失した(図 6)。

## 6. モネンシンがブラック形成に及ぼす影響

HSV-1 が宿主細胞で感染を成立させるためには、ウイルスのエンベロープが除去され、ヌクレオカプシドが核へ移行する必要がある<sup>29-31)</sup>。その過程で、HSV-1 ウイルスがエンドサイトーシスされ、エンベロープとエンドソームが低 pH 環境で膜融合する経路がソノポレーションによる直接的な RH2 の感染に関与するかを調べるために、エンドソーム環境の pH を上昇させる作用をもつモネンシン<sup>30)</sup>を用いて検討した。モネンシン存在下で RH2 を接種し、通常 30 分の吸着後に、ブラックは検出できないレベルまで強く抑制された。次に、モネンシン存在下で超音波照射によるウイルスの細胞内導入を行った場合も、ブラック形成は強く抑制され、ソノポレーションによって導入したウイルスでも感

染に低 pH 環境の必要性が示された (図 7)。

## 7. ソノレーションが腫瘍内ウイルス量に及ぼす影響

腫瘍内でのウイルス産生量を知るため、 $1 \times 10^6$  PFU の感染力価をもつ RH2 を腫瘍内に投与し、MB 存在下あるいは非存在下で超音波照射を行った。ウイルス接種後 3 日目に腫瘍を摘出し、腫瘍組織破砕液を調整し、vero 細胞へ感染させて感染力価を測定した。実験群としては、RH2 単独、RH2+US、RH2+MB+US であり、超音波照射時間を 10~30 秒間とした。腫瘍内感染ウイルス量は、RH2 単独接種群と比較して 10 秒間超音波照射を行った場合、1.9 倍に増加した。さらに、MB を加えて 10 秒間照射した場合、ウイルス量は 4.6 倍に増加した(表 1)。

## 8. 腫瘍細胞におけるウイルス抗原の検出

腫瘍組織での HSV-1 の局在を知るため、RH2 を腫瘍内投与し、MB 存在下あるいは非存在下で超音波照射を行い、接種後 3 日目に腫瘍組織を摘出し、抗 HSV-1 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。全ての RH2 投与群で HSV-1 抗原陽性細胞が検出されたが、MB 存在下で超音波照射を行った群で最も抗原陽性細胞数が多く、腫瘍の深部にまで認められた(図 8A)。さらに、抗原陽性領域の面積を算定したところ、MB 存在下で超音波照射を行った群で最も大きく、RH2 投与単独群と比較して有意差( $P < 0.05$ )が認められた(図 8B)。

次に、正常マウス皮膚で HSV-1 感染が成立し、ソノポレーションにより感染増悪が起こるかを検討した。ヌードマウス背部皮下に  $1 \times 10^6$  PFU の RH2 を感染させ、MB 存在下あるいは非存在下で超音波照射を行い、接種 3 日後の投与部位の皮膚について HSV-1 抗原の発現を検討した。その結果、全ての群で皮膚組織の変性やウイルス抗原の発現は認められなかった(図 9)。

## 9. RH2 投与が腫瘍体積に及ぼす影響

HSV-1 投与における抗腫瘍効果を検討するため、 $1 \times 10^5$  PFU の RH2 を感染させ、それぞれの処理を行ったのち、経時的に腫瘍体積を測定した。PBS 投与群では腫瘍体積の平均値が 24 日後で  $1990 \text{ mm}^3$  に達したが、RH2 単独群では  $1350 \text{ mm}^3$ 、RH2 接種後に超音波照射した群では  $955 \text{ mm}^3$ 、RH2 接種後に MB 存在下で超音波照射を行った群では顕著に腫瘍体積の増加が抑制され、 $386 \text{ mm}^3$  となった。(図 10)。

## 考 察

ソノポレーションの特徴は、侵襲で薬物や遺伝子を導入できることである。しかし、超音波には出力を増強すると温熱作用が生じるため、細胞傷害性が生じ

る可能性がある<sup>32)</sup>。細胞障害により腫瘍細胞の代謝が低下すると、ウイルス複製は抑制されるため、結果として、腫瘍融解性ウイルス療法におけるソノポレーションの併用効果は期待できない。したがって、腫瘍融解性ウイルス療法にソノポレーションを併用する際には、細胞傷害性を及ぼさない条件での照射が必須になる。出力を  $1 \text{ W/cm}^2$ ,  $20\% \text{ duty cycle}$  とし、照射時間を変化させ細胞障害性を検討したところ、 $10\%$ のMB存在下で照射した群の細胞生存率は非処理対照群の  $80\%$ であった。照射時間の延長は細胞生存率に影響しなかった。これに対して、出力を  $2 \text{ W/cm}^2$  とし、MB存在下で  $60$  秒の照射を行った場合、細胞生存率は対象の  $57\%$ にまで低下した。これらの結果から、出力や照射時間の違いにより細胞傷害性を示すことが明らかになった。そこで、以後の解析では、出力  $1 \text{ W/cm}^2$  の出力でウイルス感染に対する影響を検討した。

感染にともなって細胞の円形化をきたす HSV-1 の R849 株を Vero 細胞に感染させた過去の実験では、ソノポレーションによりブラック数の増加が認められている<sup>28)</sup>。本研究は細胞癒合をきたす RH2 を用いたものであり、ヒト口腔癌由来の SAS 細胞に  $100\text{PFU}$  の RH2 を感染させ、 $30$  分の培養により吸着を促進させ、ソノポレーションによりウイルス導入効率が亢進するかについて検討した。その結果、R849 の場合と同様に超音波単独ならびに MB 存在下の超音波照射でブラック数が有意に増加したことから、SAS 細胞への RH2 の導入がソノポ

レーションにより亢進したと考えられた。照射時間を延長するとブラック数は次第に減少したことから、ソノポレーションによって細胞の温度上昇をきたし、ウイルスの感染力価が低下した可能性が考えられる。

HSV-1 と宿主細胞との間で感染が成立するためには、ウイルスのエンベロープが除去され、ヌクレオカプシドが核へ移行する必要がある。HSV-1 の宿主細胞への接着には、エンベロープ糖タンパクである gB, gC, gD, gH および gL が重要である。特に gB と gD はウイルスレセプターとの結合に中心的な役割を果たしている。HSV-1 細胞侵入経路は大きく 2 つに分けられる。1 つ目の経路は宿主細胞上で、細胞膜とエンベロープが膜融合して侵入するものである。2 つ目の経路は、ウイルスがエンドサイトーシスされ、その後エンドソーム膜とエンベロープが膜融合して侵入するものである。後者には、膜癒合にエンドソームの低 pH 環境を必要とする経路と中性エンドソームで膜融合する経路がある<sup>29, 31)</sup>。

ソノポレーションは細胞表面のウイルスならびに細胞に近接するウイルスを小孔から細胞内へ導入すると推察された。そこで、RH2 を SAS 細胞に接種して、直ちに 10 秒間の超音波照射を行い、未侵入のウイルスを洗浄で除去し、ブラック形成を行った。ウイルスを接種し、超音波照射を行わず直ちに洗浄した対照の細胞ではブラックがほとんど形成されないが、超音波照射を行ったものではブラック数は顕著に増加した。吸着時間がない条件でも、ウイルス感染は成立したこ

とから、ソノポレーションによりウイルスは細胞表面のレセプターを介することなく細胞内に侵入すると考えられた。

ソノポレーションによる小孔形成は一過性とされており、Mehier-Humbertら<sup>33)</sup>は、蛍光色素標識したデキストランの分布をソノポレーション後 50 秒間観察したところ、細胞内のデキストランは対照群の 1%にまで低下すると報告している。HSV-1 が侵入可能な時間を明らかにするため、超音波照射から RH2 接種までの時間を変えてブラック形成を行ったところ、20 分後には、バックグラウンドレベルまで低下した。この結果から、SCC 細胞の系では HSV-1 が通過できる小孔は経時的に閉鎖し、超音波照射後 20 分で元の状態に戻ると考えられた。

小孔を通じてウイルス粒子が侵入可能であるとすれば、相当する孔が形成される筈である。これまでに、小孔の径は平均で 100~220 nm と報告されていた<sup>33, 34)</sup>。一方、Maeda ら<sup>35)</sup>はヒト歯肉癌細胞にソノポレーションを行ったところ、細胞表面に 2  $\mu\text{m}$  の小孔が形成されたと報告している。本研究では、まず非感染 SAS 細胞の変化を観察したところ、MB 存在下で超音波照射すると細胞の陥凹が顕著となり、1-2  $\mu\text{m}$  の小孔形成が観察された。細胞突起の形成も顕著であった。照射細胞を 30 分後に観察したところ、細胞表面は平滑となり、小孔も消失していた。同様の平滑化は乳癌細胞でも観察されている<sup>33)</sup>。ソノポレーションは単にジェット流を生じて小孔を形成するだけでなく、細胞表面の陥凹を消失させ

ており、小孔形成に加えて細胞の運動、代謝にも影響を及ぼすものと推察される。

HSV-1 感染細胞の走査型電子顕微鏡所見としては、細胞突起形成が報告されている<sup>36)</sup>。HSV-1 を高い MOI で感染させた細胞では、細胞表面には大きな半球状の突起を形成し、ウイルス感染は細胞形態を変化させた。感染後にソノポレーションを行うと、突起部を含めて細胞表面に 1-2  $\mu\text{m}$  径の小孔がみられ、30 分後には表面は平滑化した。HSV-1 粒子の径は 100-150 nm とされており<sup>37, 38)</sup>、ソノポレーションでウイルスが通過するために十分な小孔が形成されるものと考えられる。

次に細胞膜に形成された小孔を通過して侵入したウイルスが感染性を獲得する過程で低 pH 環境を必要とするか否かについて検討した。モネンシンで低 pH 環境を阻害したところ、ソノポレーションで侵入したウイルスによるプラック形成は抑制された。したがって、ソノポレーションで細胞内へ侵入した RH2 は、何らかの機構でエンドソームに取りこまれ、低 pH 依存的にエンベロープが除かれ、ウイルスカプシドが細胞質から核へ移送されると推察される。本研究の結果は、HSV-1 感染初期の機構を解析する上でも新しい研究システムを提供したともいえる。

このような培養細胞での結果を踏まえて、ヌードマウスに形成した腫瘍に対

する腫瘍融解性ウイルス療法とソノポレーションの併用効果について検討を行った。これまで、ソノポレーションによる薬剤や DNA の腫瘍組織への導入が報告されている。Matsuo ら<sup>39)</sup>はヌードマウスに形成したメラノーマに対して、ソノポレーション(0.064 W/cm<sup>2</sup>, 0.5 Hz, 50% duty cycle, 2 min 照射)により melphalan の導入を行っている。ウイルスでは、green fluorescent protein (GFP)遺伝子などを組み込んだウイルスベクターを用いて、遺伝子導入を行った報告がある<sup>26, 27)</sup>。Li ら<sup>27)</sup>はラットの角膜へアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて遺伝子導入する際に 5 分間の超音波照射を行っている。Bazan-Pererino ら<sup>40)</sup>は腫瘍融解性ウイルスとしてアデノウイルスを用いたソノポレーションによる遺伝子導入を行っているが抗腫瘍効果を調べたものではない。また、これらの研究は非複製可能型のウイルスを使用しているため、ソノポレーションとウイルス感染力価の関係は検討されていない。

本研究は複製可能型の腫瘍融解性ウイルス RH2 を用いてソノポレーションの効果を検討した新しい取り組みである。まず生体での腫瘍組織に複製可能型 HSV-1 を投与する実験に際して、適切なソノポレーション条件を得るため、ヌードマウス腫瘍に RH2 を接種し、様々な照射条件でソノポレーションを行い、3 日後の感染性ウイルス量を測定したところ、30 秒、60 秒と比較して、より短い 10 秒照射で感染性ウイルス量はより高くなることが明らかとなった。さらに、

MB 存在下で超音波照射した場合、ウイルス抗原が腫瘍の深部でも検出され、抗原陽性細胞の占める面積も増大することも分かった。したがって、超音波の照射条件を適正化すれば、ソノポレーションは腫瘍内での RH2 の感染効率を向上するものと考えられた。一方、正常マウス皮膚下では、細胞変性やウイルス抗原も認めず、ソノポレーションを行っても正常組織で RH2 による感染を惹起することはなかった。正常細胞に HSV-1 が感染すると二本鎖 RNA 依存性のプロテインキナーゼ **double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)** が活性化し、**eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  (eIF-2 $\alpha$ )** のリン酸化を介して、細胞のタンパク質合成自体が阻害され、ウイルスは増殖不能になる。しかし、HSV-1 ウイルスの  $\gamma_134.5$  遺伝子産物は **protein phosphatase 1 $\alpha$**  のリクルートによるリン酸化 **eIF-2 $\alpha$**  の脱リン酸化により、タンパク合成を可能とし、ウイルスは増殖可能となる<sup>41)</sup>。一方、増殖活性が旺盛な腫瘍細胞では **Ras** シグナル経路の下流に位置する **mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)** が抗 PKR 活性を示すため、 $\gamma_134.5$  欠失ウイルス感染細胞においても、翻訳は持続され、ウイルス複製が可能となる<sup>42, 43)</sup>。よって、 $\gamma_134.5$  遺伝子の欠失が腫瘍選択性に繋がるとされている<sup>42, 43)</sup>。

ヌードマウス腫瘍の系では、すでに  $1 \times 10^6$  PFU の RH2 投与で腫瘍は縮小することを確認しているため<sup>15)</sup>、ソノポレーションとの併用では、 $1 \times 10^5$  PFU の

実験条件を設定して1回投与を行ったが、RH2接種後に未処理の群と比較して、超音波照射単独群でも腫瘍径は縮小した。MB存在下で超音波照射した群では、より顕著な効果を認めたことから、ソノポレーションは腫瘍融解性ウイルス療法の治療効果を向上させると考えられた。他のHSV-1ベクターであるHF10を用いた報告では、 $1 \times 10^7$  PFUのウイルスが供試されており<sup>44)</sup>、Synco-2Dについても $2 \times 10^7$  PFUのウイルスが投与されている<sup>45)</sup>。また、Zhengら<sup>26)</sup>は、GFP遺伝子を組み込んだAAVを用いて、ヒト網膜色素上皮細胞に対して極めて高いウイルス量(MOI= $1 \times 10^3$ )を接種している。RH2の場合、投与ウイルス量が低いことが特徴であるが、ソノポレーションの併用でこの低投与量でもさらに効果を増強すると考えられた。

結論として、適切な条件下の低エネルギー超音波を用いたソノポレーションはヒト口腔SCCでのウイルスの感染効率を向上させ、抗腫瘍効果の増強に貢献することが示唆された。

## 結論

1. 超音波照射強度が  $1 \text{ W/cm}^2$  の場合、照射時間を 60 秒まで延長しても SAS 細胞の生存率の低下は認められなかった。HSV-1 を SAS 細胞に接種し、30 分間の吸着後に照射出力  $1 \text{ W/cm}^2$ , 20% duty cycle, 照射時間 10 秒で超音波照射を行ったところ、プラック数は増加し、感染効率の向上が認められた。
2. HSV-1 接種直後の超音波照射でもプラック形成が認められることから、ソノポレーションで細胞膜に小孔が形成され、ウイルスが直接細胞内に移行することが示唆された。超音波照射直後にウイルス接種を行うとプラック形成が認められるが、接種するまでの時間を延長していくと、プラック数はしだいに減少し、20 分後に対照レベルとなった。
3. 走査型電子顕微鏡で超音波照射による細胞表面の小孔が認められた。ソノポレーションによる HSV-1 のプラック形成、小孔形成は MB 存在下でより顕著となった。
4. モネンシン存在下に超音波照射によるウイルスの細胞内導入を行った場合、プラック形成は強く抑制され、ソノポレーションによって導入したウイルスでも感染に低 pH 環境の必要性が示された。
5. RH2 を接種した腫瘍内の感染性ウイルス量は、MB 存在下で 10 秒間の超音

波照射のソノポレーションで最も高値となった。免疫組織化学染色を行ったところ、ソノポレーションで腫瘍内でのウイルス抗原陽性細胞が増加した。ヌードマウスの正常皮下に RH2 を接種しても皮膚組織での細胞変性、ウイルス抗原の発現は認められなかった。

6. ヌードマウス腫瘍に RH2 を投与し、MB 存在下のソノポレーションを行うと、腫瘍抑制効果の増強がみられた。効果は MB 存在下でより顕著であった。

7. 低エネルギー超音波を用いたソノポレーションはヒト口腔 SCC 細胞での RH2 の感染効率を向上させたことから、口腔癌に対する腫瘍融解性ウイルス療法の増強に貢献すると考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う機会を与えて頂き，御指導，御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究家顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第二教室），由良義明 教授に謹んで感謝の意を表します。また，本研究に対し特別の御配慮，御協力を頂きました口腔外科学第二教室の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 文献

1. Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre JL, Greiner RH, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M, Cognetti F, Bourhis J, Kirkpatrick A, van Glabbeke M (2004): Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med*, 350, 1945-1952.
2. Genden EM, Ferlito A, Silver CE, Takes RP, Suárez C, Owen RP (2010): Contemporary management of cancer of the oral cavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 267, 1001-1017.
3. Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, Coen DM (1991): Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science*, 252, 854-856.
4. Yazaki T, Manz HJ, Rabkin SD, Martuza RL (1995): Treatment of Human Malignant Meningiomas by G207, a Replication-competent Multimutated Herpes Simplex Virus 1. *Cancer Research*, 55, 4752-4756.
5. Kaufman HL, Kim DW, DeRaffele G, Mitcham J, Coffin RS, Kim-Schulze S (2009): Local and Distant Immunity Induced by Intralesional

- Vaccination with an Oncolytic Herpes Virus Encoding GM-CSF in Patients with Stage IIIc and IV Melanoma. *Ann Surg Oncol*, 17, 718-730.
6. Prestwich RJ, Ilett EJ, Errington F, Diaz RM, Steele LP, Kottke T, Thompson J, Galivo F, Harrington KJ, Pandha HS, Selby PJ, Vile RG, Melcher AA (2009): Immune-mediated antitumor activity of reovirus is required for therapy and is independent of direct viral oncolysis and replication. *Clin Cancer Res*, 15, 4374-4381.
  7. Breitbach CJ, Burke J, Jonker D, Stephenson J, Haas AR, Chow LQM, Nieva J, Hwang T-H, Moon A, Patt R, Pelusio A, Boeuf J, Evgin L, Silva N, Daneshmand M, Bell JC, Kirn DH (2011): Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature*, 477, 99-104.
  8. Nakao A, Kasuya H, Sahin TT, Nomura N, Kanzaki A, Misawa M, Shirota T, Yamada S, Fujii T, Sugimoto H, Shikano T, Nomoto S, Takeda S, Koder Y, Nishiyama Y (2011): A phase I dose-escalation clinical trial of intraoperative direct intratumoral injection of HF10 oncolytic virus in

- non-resectable patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther*, 18, 167-175.
9. Russell SJ, Peng KW, Bell JC (2012): Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol*, 30, 658-670.
10. Campadelli-Fiume G, De Giovanni C, Gatta V, Nanni P, Lollini PL, Menotti L (2011): Rethinking herpes simplex virus: the way to oncolytic agents. *Rev Med Virol*, 21, 213-226.
11. Chou J, Kern ER, Whitley RJ, Roizman B (1990): Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to  $\gamma_134.5$ , a gene nonessential for growth in culture. *Science*, 250, 1262-1266.
12. Andreansky S, Soroceanu L, Flotte ER, Chou J, Markert JM, Gillespie GY, Roizman B, Whitley RJ (1997): Evaluation of Genetically Engineered Herpes Simplex Viruses as Oncolytic Agents for Human Malignant Brain Tumors. *Cancer Research*, 57, 1502-1509.
13. Wheeler C (1958): The effect of temperature upon the production of herpes simplex virus in tissue culture. *The Journal of Immunology*, 81, 98.

14. Ogawa F, Takaoka H, Iwai S, Aota K, Yura Y (2008): Combined oncolytic virotherapy with herpes simplex virus for oral squamous cell carcinoma. *Anticancer res*, 28, 3637.
15. Takaoka H, Takahashi G, Ogawa F, Imai T, Iwai S, Yura Y (2011): A novel fusogenic herpes simplex virus for oncolytic virotherapy of squamous cell carcinoma. *Virology*, 8, 294.
16. Takahashi G, Meshii N, Hamada M, Iwai S, Yura Y (2012): Sequence of a fusogenic herpes simplex virus RH2 for oncolytic virotherapy. *J Gen Virol*
17. Tachibana K, Tachibana S (1995): Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. *Circulation*. 92: 1148-1150.
18. Tachibana K, Uchida T, Tamura K, Eguchi H, Yamashita N, Ogawa K (2000): Enhanced cytotoxic effect of Ara-C by low intensity ultrasound to HL-60 cells. *Cancer Lett*, 149, 189-194
19. Frenkel V (2008): Ultrasound mediated delivery of drugs and genes to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, 1193-1208.
20. Hernot S, Klivanov AL (2008): Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 1153-1166.

21. Nakamori M. (2004): Destruction of nonimmunogenic mammary tumor cells by a fusogenic oncolytic herpes simplex virus induces potent antitumor immunity. *Molecular Therapy*. 9, 658-665.
22. Lee YH, Peng CA (2005): Enhanced retroviral gene delivery in ultrasonic standing wave fields. *Gene Ther*, 12, 625-633.
23. Howard CM, Forsberg F, Minimo C, Liu JB, Merton DA, Claudio PP (2006): Ultrasound guided site specific gene delivery system using adenoviral vectors and commercial ultrasound contrast agents. *J Cell Physiol*, 209, 413-421.
24. Wang Y, Yuan F (2006): Delivery of viral vectors to tumor cells: extracellular transport, systemic distribution, and strategies for improvement. *Ann Biomed Eng* 34, 114-127.
25. Taylor SL, Rahim AA, Bush NL, Bamber JC, Porter CD (2007): Targeted retroviral gene delivery using ultrasound. *J Gene Med*, 9, 77-87.
26. Zheng XZ, Wu Y, Li HL, Du LF, Wang HP, Gu Q (2009): Comparative analysis of the effects of ultrasound-targeted microbubble destruction on recombinant adeno-associated virus- and plasmid-mediated transgene

- expression in human retinal pigment epithelium cells. *Mol Med Report*, 2, 937-942.
27. Li HL, Zheng XZ, Wang HP, Li F, Wu Y, Du LF (2009):  
Ultrasound-targeted microbubble destruction enhances AAV-mediated gene transfection in human RPE cells in vitro and rat retina in vivo. *Gene Ther*, 16, 1146-1153.
28. Shintani M, Takahashi G, Hamada M, Okunaga S, Iwai S, Yura Y (2011):  
Effect of ultrasound on herpes simplex virus infection in cell culture. *Virology*, 8, 446.
29. Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM, Katz DR (2007):  
Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virology*, 17, 205-215
30. Nicola AV, McEvoy AM, Straus SE (2003): Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J Virology*, 77, 5324-5332.
31. Dollery SJ, Wright CC, Johnson DC, Nicola AV (2011):  
Low-pH-dependent changes in the conformation and oligomeric state of the prefusion form of herpes simplex virus glycoprotein B are separable from fusion activity. *J Virology*, 85, 9964-9973.

32. Hilgenfeldt S, Lohse D, Zomack M (2000): Sound scattering and localized heat deposition of pulse-driven microbubbles. *J Acoust Soc Am*, 107,3530-3539.
33. Mehier-Humbert S, Bettinger T, Yan F, Guy RH (2005): Plasma membrane poration induced by ultrasound exposure: implication for drug delivery. *J Control Release*, 104, 213-222.
34. Zhou Y, Kumon RE, Cui J, Deng CX (2009): The size of sonoporation pores on the cell membrane. *Ultrasound Med Biol*, 35,1756-1760.
35. Archer S, Morgan H, Rixon FJ (1999): Electrorotation studies of baby hamster kidney fibroblasts infected with herpes simplex virus type 1. *Biophys J*, 76, 2833-2842.
36. Maeda H, Tominaga K, Iwanaga K, Nagao F, Habu M, Tsujisawa T, Seta Y, Toyoshima K, Fukuda J, Nishihara T (2009): Targeted drug delivery system for oral cancer therapy using sonoporation. *J Oral Pathol Med*, 38, 572-579.
37. Schrag JD, Prasad BV, Rixon FJ, Chiu W (1989): Three-dimensional structure of the HSV1 nucleocapsid. *Cell*, 56, 651-660.
38. Zhou ZH, Prasad BV, Jakana J, Rixon FJ, Chiu W (1994): Protein subunit

- structures in the herpes simplex virus A-capsid determined from 400 kV spot-scan electron cryomicroscopy. *J Mol Biol*, 30, 242, 456-469.
39. Matsuo M, Yamaguchi K, Feril LB Jr, Endo H, Ogawa K, Tachibana K, Nakayama J (2011): Synergistic inhibition of malignant melanoma proliferation by melphalan combined with ultrasound and microbubbles. *Ultrason Sonochem*, 18, 1218-1224.
40. Bazan-Peregrino M, Arvanitis CD, Rifai B, Seymour LW, Coussios CC (2012): Ultrasound-induced cavitation enhances the delivery and therapeutic efficacy of an oncolytic virus in an in vitro model. *J Control Release*, 157, 235-242.
41. He B, Gross M, Roizman B (1997): The gamma(1) 34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1 alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:843-848.
42. Smith KD, Mezhir JJ, Bickenbach K, Veerapong J, Charron J, Posner MC, Roizman B, Weichselbaum R (2006): RActivated MEK suppresses

- activation of PKR and enables efficient replication and in vivo oncolysis by Deltagamma(1)34.5 mutants of herpes simplex virus 1. *J Virol*, 80,110-120.
43. Pan W, Bodempudi V, Esfandyari T, Farassati F (2009): Utilizing ras signaling pathway to direct selective replication of herpes simplex virus-1. *PLoS One*, 4, e6514.
44. Watanabe D, Goshima F, Mori I, Tamada Y, Matsumoto Y, Nishiyama Y (2008): Oncolytic virotherapy for malignant melanoma with herpes simplex virus type 1 mutant HF10. *J Dermatol Sci* 50,185-196.
45. Nakamori M, Fu X, Rousseau R, Chen S-Y, Zhang X (2004): Destruction of nonimmunogenic mammary tumor cells by a fusogenic oncolytic herpes simplex virus induces potent antitumor immunity. *Molecular Ther.*, 9, 658–665.

## 脚注

大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第二教室）

主任：由良義明 教授

本論文の要旨の一部は，第 66 回日本口腔科学会（2011 年，広島），

第 57 回日本口腔外科学会（2012 年，横浜），

第 60 回日本ウイルス学会（2012 年，大阪），

第 49 回日本口腔組織培養学会（2012 年，広島）において発表した。

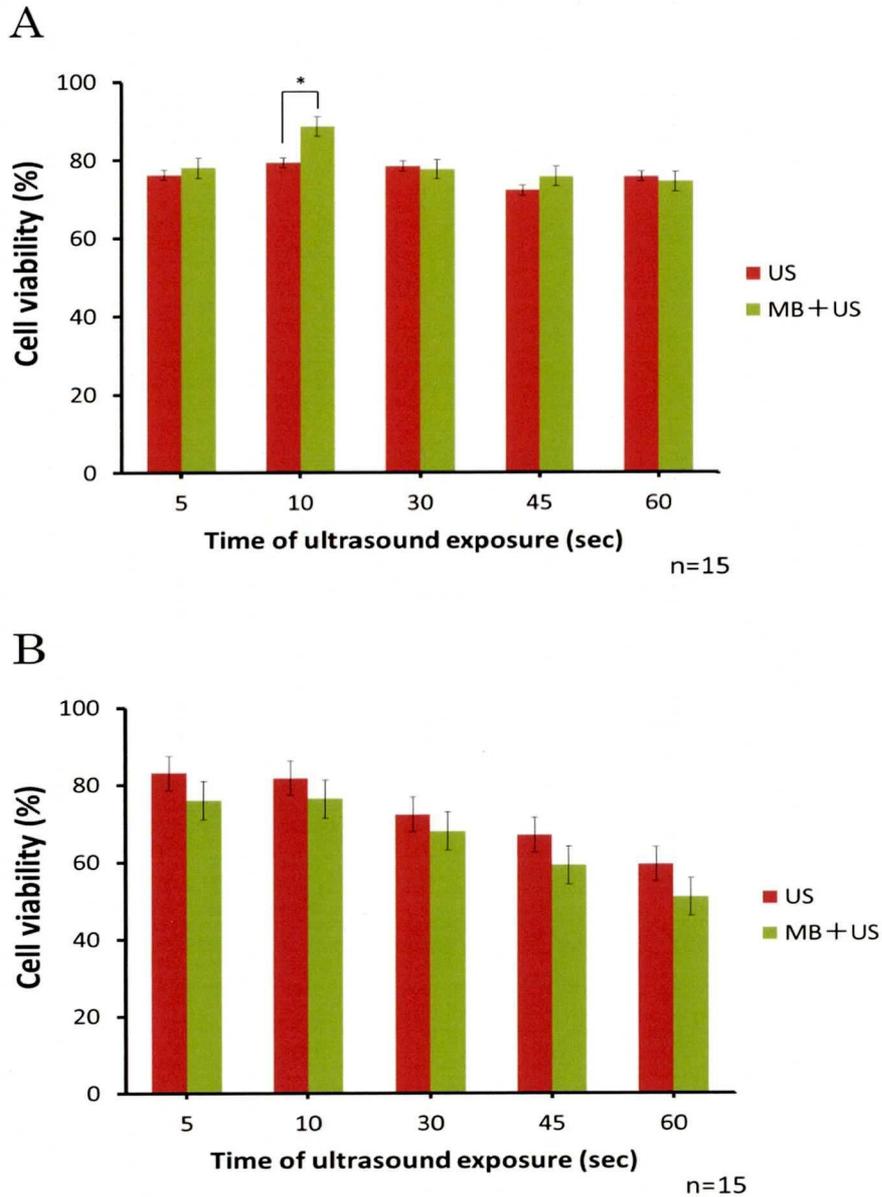


図1 ソノポレーションが SAS 細胞の生存率に及ぼす影響

Duty cycle を 20% に固定し、照射出力が  $1 \text{ W/cm}^2$  (A) あるいは  $2 \text{ W/cm}^2$  (B) の超音波を 5~60 秒間照射した。そして、48 時間後の細胞生存率を MTT 法を用いて算出した。図では超音波照射単独を US、マイクロバブル(MB)存在下の超音波照射を MB+US と表現した。値は mean  $\pm$  SD を示す。n=3, \* $P < 0.05$

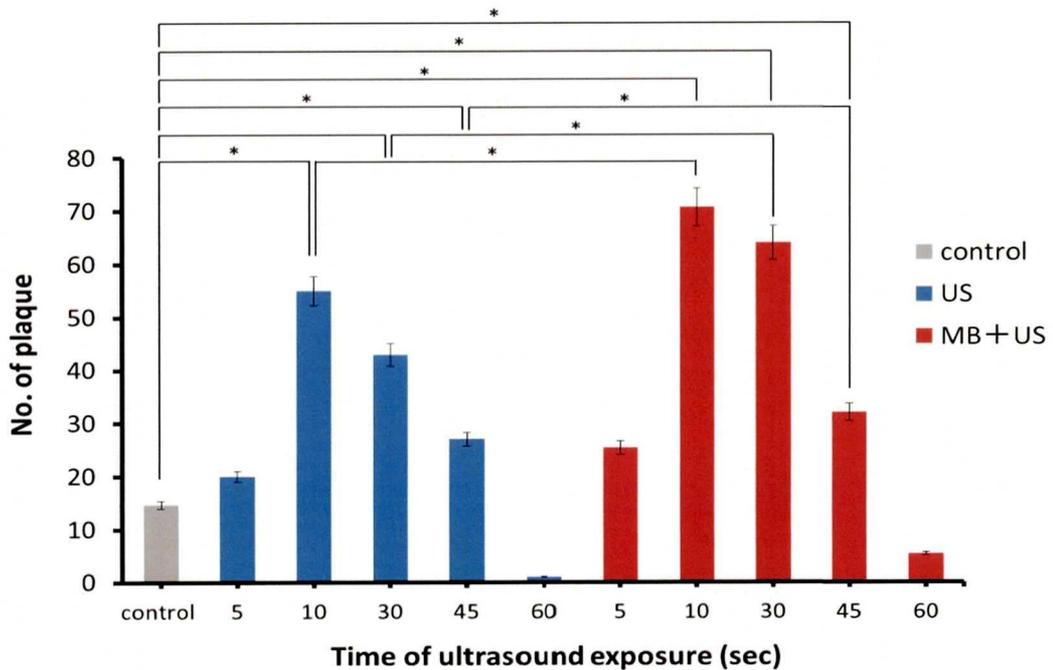


図2 ソノポレーションが RH2 吸着に及ぼす影響

24 well ポリスチレンプレートに  $2.0 \times 10^3$  cells/well で SAS 細胞を播種した。48 時間培養して形成させた細胞層に 100 PFU の RH2 を接種し、30 分間培養して、ウイルスの吸着を促した。その後、MB 存在下あるいは非存在下で、超音波照射(出力  $1 \text{ W/cm}^2$ , 20% duty cycle, 照射時間 5~60 秒)を行い、48 時間培養後にプラック数を算定した。Control では、30 分間培養し、ウイルス吸着を促したのち、超音波照射を行わなかった。値は mean  $\pm$  SD を示す。n=6, \* $P < 0.05$

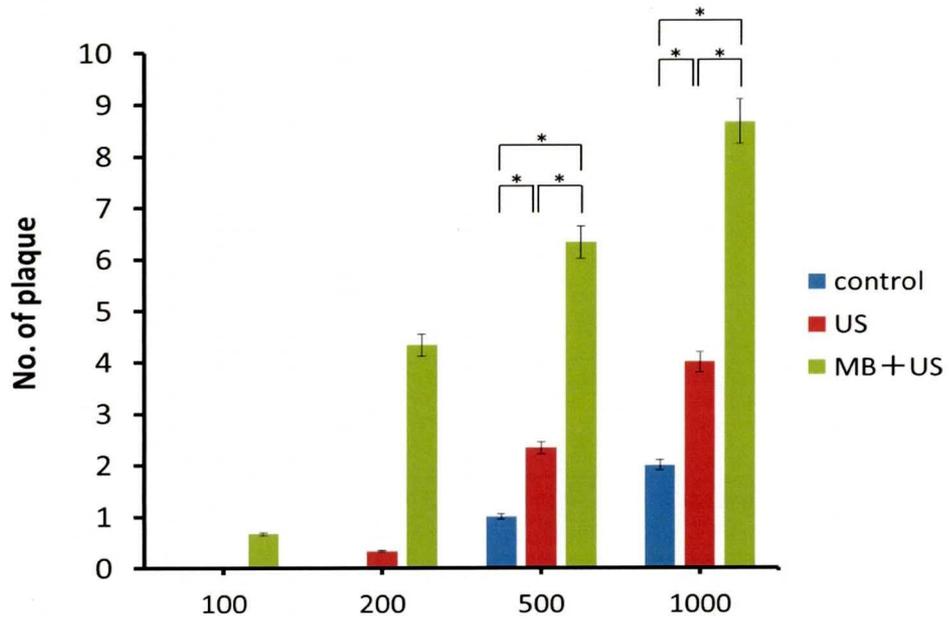


図3 RH2 接種直後のソノポレーションがウイルス感染に及ぼす影響

24 well プレートで単層を形成した SAS 細胞に RH2 を 100, 200, 500, 1000 PFU で RH2 を接種し, 超音波照射(出力 1 W/cm<sup>2</sup>, 20% duty cycle, 照射時間 10 秒)を行った。直ちに未侵入ウイルスを除去し, プラック形成を行った。値は mean ± SD を示す。n=3, \*P<0.05

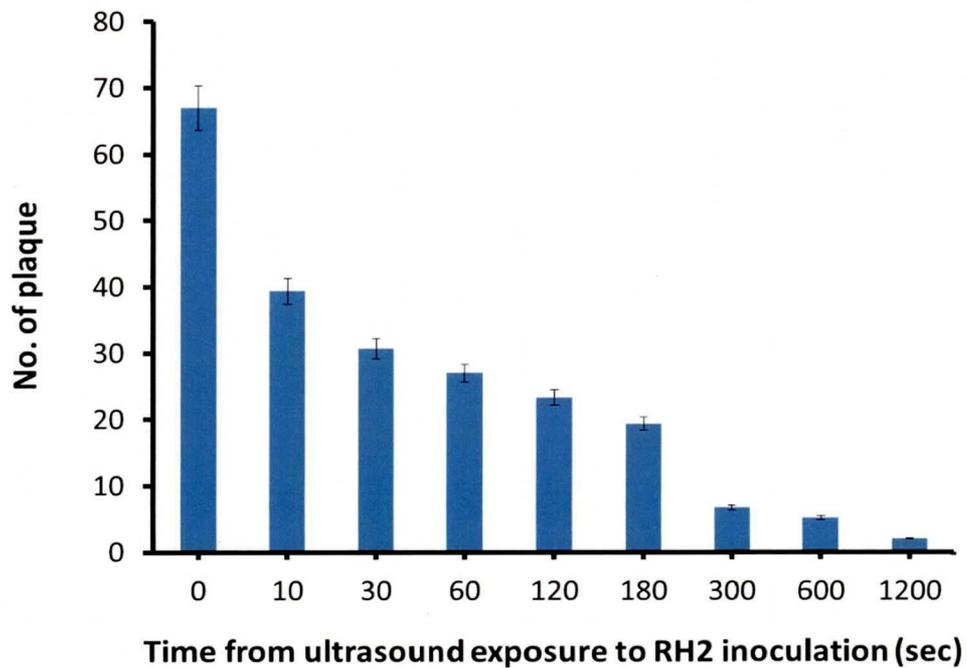


図4 ソノレーションから RH2 接種までの時間がウイルス感染に及ぼす影響

24wellプレートで単層を形成した SAS 細胞に MB 存在下で超音波照射を行った後、0~1200 秒の間隔をとり、 $5 \times 10^3$  PFU の RH2 を接種した。その後、直ちに未侵入ウイルスを洗浄で除去し、プラック形成を行った。値は mean  $\pm$  SD を示す。n=6

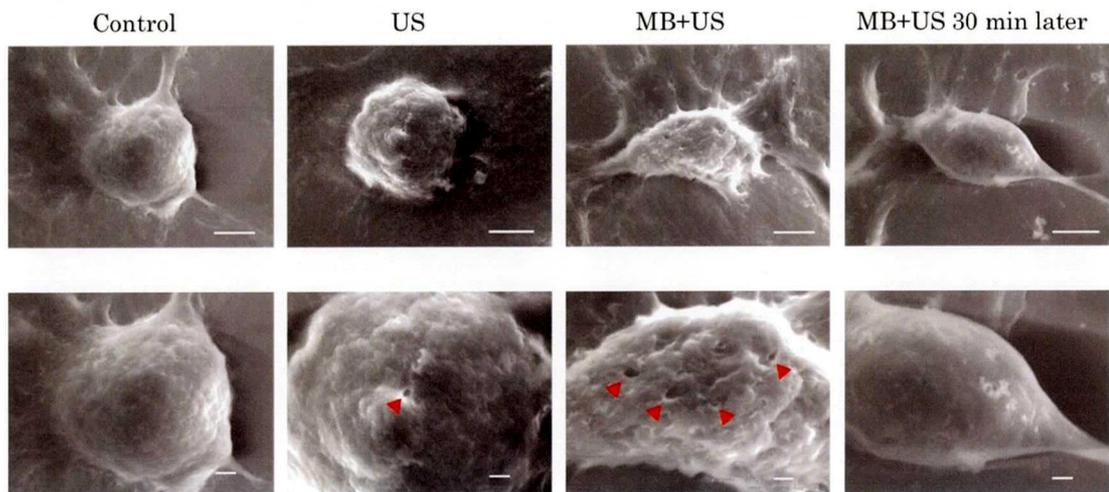


図5 走査型電子顕微鏡による細胞表面性状の観察

カバーガラス上に培養した SAS 細胞に MB 存在下あるいは非存在下で超音波照射(出力  $1 \text{ W/cm}^2$ , 20% duty cycle, 照射時間 10 秒)を行った。超音波単独の照射を行った細胞(US)と MB 存在下で超音波照射を行った細胞(MB+US)の表層には、陥凹と直径  $1\sim 2 \mu\text{m}$  の小孔(矢印)を認めた。また、超音波照射によって生じた小孔は超音波照射 30 分経過した細胞(MB+US 30 min later)では認められず、細胞表面は平滑化した。上段 Bar,  $5 \mu\text{m}$ , 下段 Bar,  $1 \mu\text{m}$

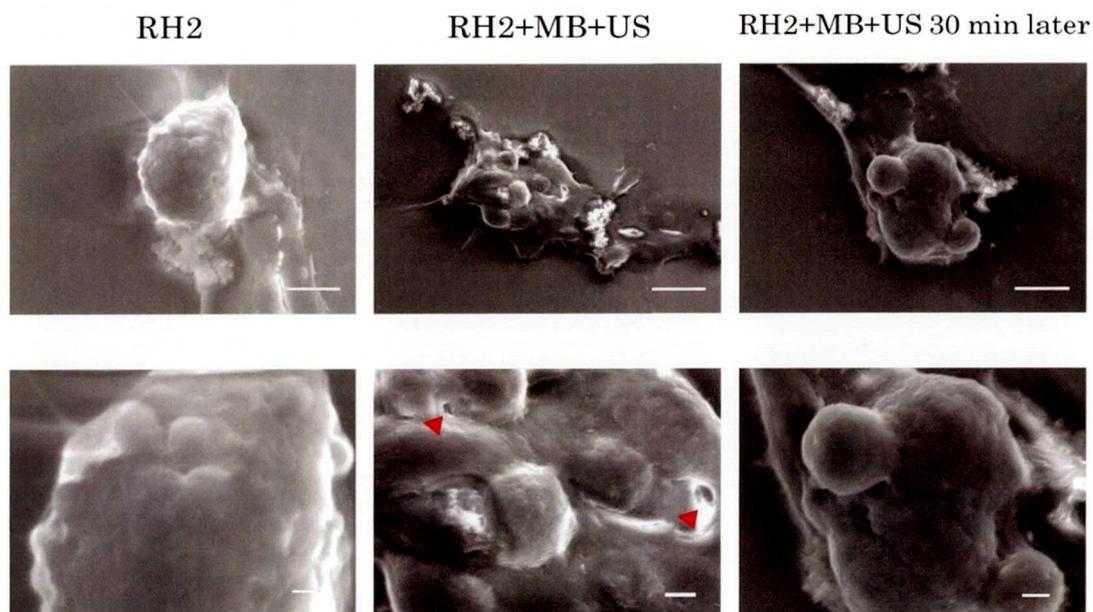


図 6 走査型電子顕微鏡による RH2 感染細胞の表面性状の観察

カバーガラス上に培養した SAS 細胞に RH2 を MOI=100 で接種した。接種 30 分後に固定し、走査型電子顕微鏡にて観察した。RH2 感染細胞(RH2)では、細胞膜の半球状の突起が認められた。RH2 接種 30 分後に、MB 存在下で超音波照射を行った細胞(RH2+MB+US)では、半球状の突起と小孔(矢印)が認められた。しかし、照射 30 分後の細胞(RH2+MB+US 30 min later)では小孔は消失し、表面は平滑化した。上段 Bar, 5  $\mu\text{m}$ , 下段 Bar, 1.5  $\mu\text{m}$

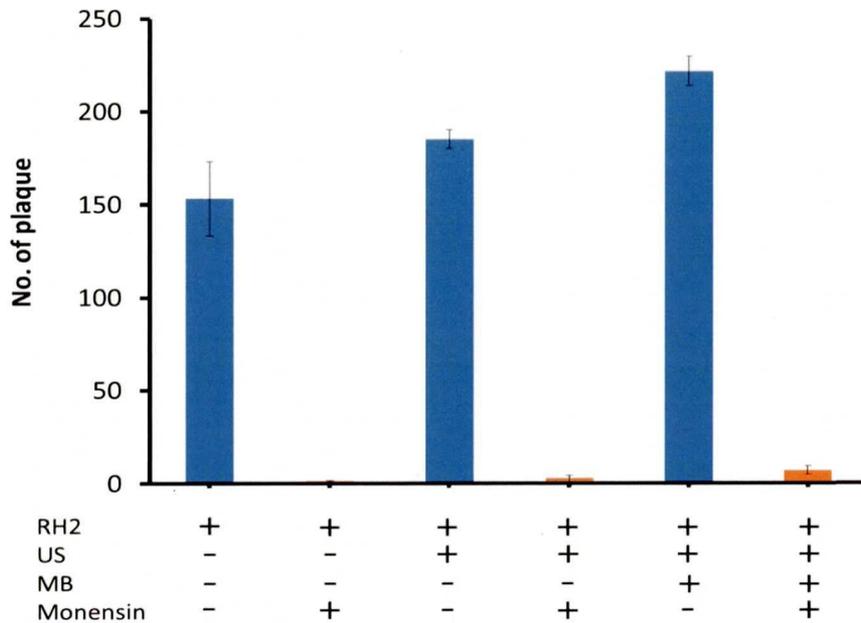


図 7 SAS 細胞への RH2 の感染に対するモネンシンの影響

24 well プレートに単層 SAS 細胞に 300 PFU の RH2 を接種し、30 分培養したのち、プラック形成を行った。モネンシン処理では、単層 SAS 細胞をモネンシンで 30 分前処理し、MB 存在下あるいは非存在下で超音波照射(出力 1 W/cm<sup>2</sup>, 20% duty cycle, 照射時間 10 秒)を行った。照射後、さらにモネンシン存在下で 5 時間培養し、プラック形成を行った。値は mean±SD を示す。n=3

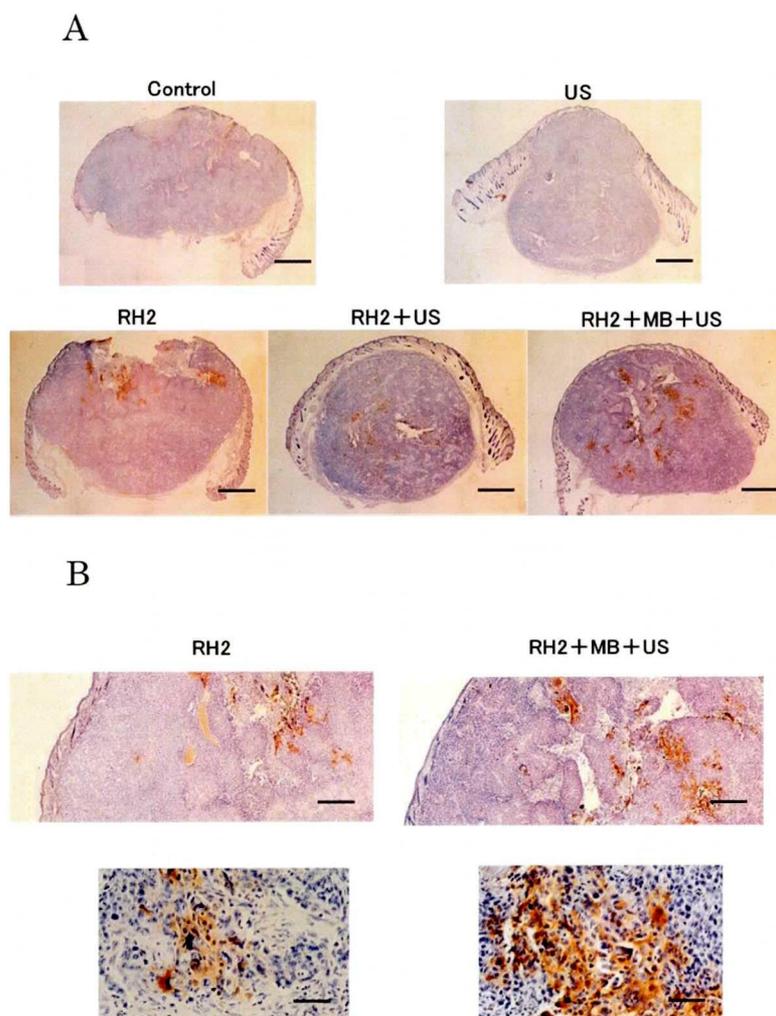


図 8 ソノレーションが腫瘍でのウイルス抗原発現に及ぼす影響

(A) SAS 細胞をヌードマウスへ接種し形成した腫瘍に、 $1 \times 10^6$  PFU の RH2 を接種し、MB 存在下あるいは非存在下で超音波を照射した。接種後 3 日目に腫瘍を摘出し、抗 HSV-1 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。その後、ヘマトキシリンにて核染色を施した。MB 存在下で超音波を照射した群(RH2+MB+US)では、広い範囲で褐色に染色されるウイルス抗原陽性細胞が検出された。

図 8A Bar, 500  $\mu$ m, 図 8B 上段 Bar, 100  $\mu$ m, 下段 Bar, 25  $\mu$ m

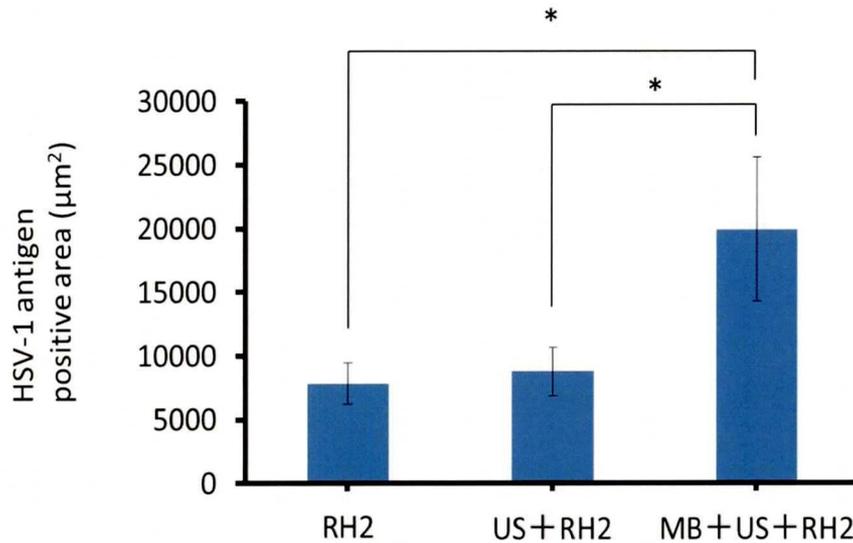


図 8 ソノポレーションが腫瘍でのウイルス抗原発現に及ぼす影響

(B) RH2 投与後に MB 存在下もしくは非存在下で超音波照射した腫瘍と RH2 接種後に未処置の腫瘍での HSV-1 抗原陽性領域の面積を Win-roof を用いて算出し, Turkey 検定を用いて比較検討した。RH2 投与後に MB 存在下で超音波照射を行ったものは RH2 接種後未処置の群と MB 非存在下で超音波照射した群との間に有意差を認めた( $P<0.05$ )。RH2 接種後に未処置の腫瘍と RH2 投与後に MB 存在下で超音波照射したものでは有意差を認めなかった。値は mean±SD を示す。n=3, \* $P<0.05$

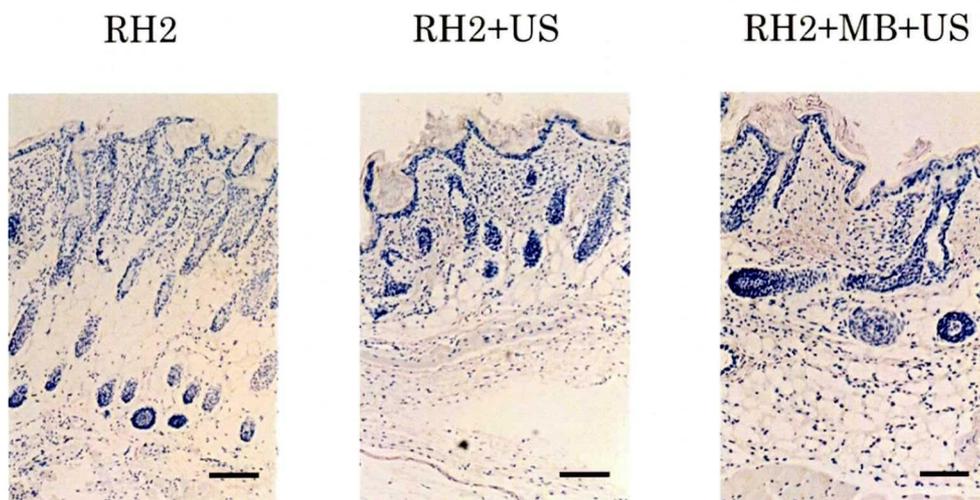


図9 ソノポレーションが皮膚でのウイルス感染に及ぼす影響

ヌードマウスの正常皮下に、 $1 \times 10^6$  PFU の RH2 を接種し、MB 存在下あるいは非存在下で超音波照射を行った。感染 3 日後に皮膚を切除し、ヘマトキシリンにて核染色を施した後、抗 HSV-1 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。いずれの条件でも褐色に染色される抗原陽性細胞は認められなかった。Bar, 40

$\mu\text{m}$

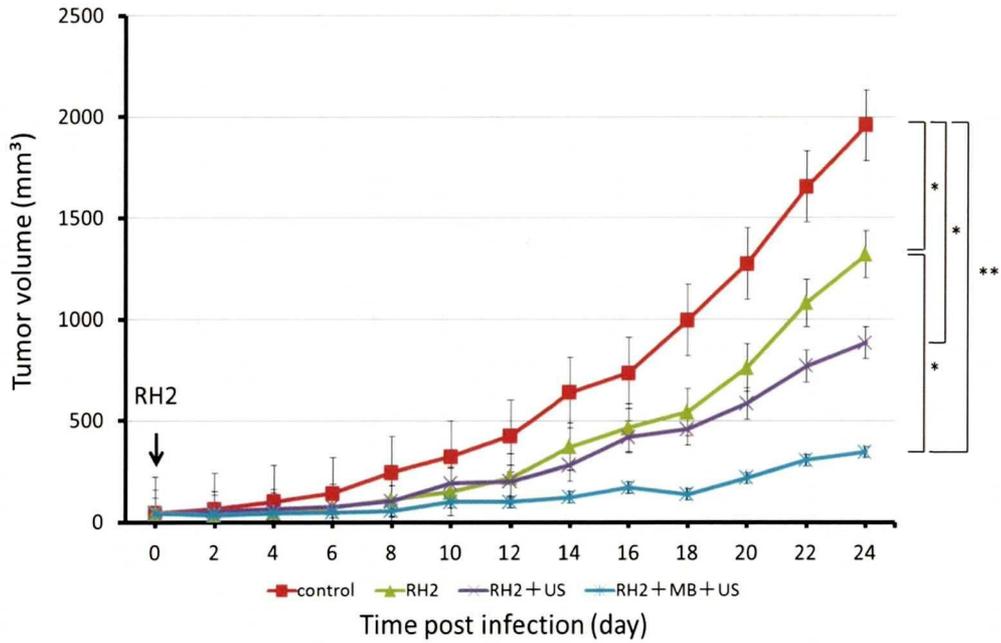


図 10 RH2 投与とソノポレーションが腫瘍体積に及ぼす影響

SAS を接種して形成したヌードマウス腫瘍に対し、RH2 投与後に未処置の群、RH2 投与後に超音波を照射した群(RH2+US)および RH2 投与後 MB 存在下で超音波照射を行った群(RH2+MB+US)を設定した。PBS 投与群を陰性斑照とし、各群での腫瘍体積を経時的に測定した後、Turkey 検定を用いて比較検討した。

値は mean±SD を示す。n=3, \*P<0.05, \*\*P<0.01

表1 ソノレーション後の腫瘍内ウイルス量

Treatment	Virus titer ( $\times 10^4$ PFU/g tumor)
Control	2.30 $\pm$ 0.70
US 10sec	4.38 $\pm$ 3.81
US 30sec	0.14 $\pm$ 0.10
US 60sec	0.12 $\pm$ 0.12
US+MB 10sec	10.5 $\pm$ 0.50
US+MB 30sec	0.46 $\pm$ 0.42
US+MB 60sec	0.29 $\pm$ 0.27

Control, RH2 injection ( $1 \times 10^6$ PFU); US, ultrasound (出力 1 W/cm<sup>2</sup>, 20% duty cycle, 照射時間 10 秒); MB, Artison 10% (v/v) n=4, \**P*<0.01 (vs control)

