

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	https://hdl.handle.net/11094/55532
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【目的】

腫瘍融解性ウイルス療法は複製可能型の弱毒化ウイルスを腫瘍細胞に感染させ、細胞変性効果によって細胞を破壊する治療法である。単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) はこの療法で研究が進んでいるウイルスのひとつである。腫瘍融解性ウイルス療法の課題は投与ウイルスの腫瘍内での感染効率をいかにして高めるかという点である。

近年、遺伝子導入法として超音波を用いた音響穿孔法(ソノポレーション)が注目されている。これは、低出力の超音波を細胞に照射して細胞膜に一過性の小孔を形成して、細胞外の遺伝子や薬剤を細胞内に導入する技術で、細胞や組織への侵襲性が低い。マイクロバブル(MB)が存在すると効果は格段に向上するとされている。複製可能型のウイルスを用いたソノポレーションの研究はほとんど行われていない。そこで、本研究ではソノポレーションがRH2による腫瘍融解性ウイルス療法における口腔扁平上皮癌(SCC)細胞への感染効率ならびに抗腫瘍効果に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】

1. 細胞として、ヒト口腔扁平上皮癌由来であるSAS細胞、サル腎由来Vero細胞を用いた。ウイルスとしては、HSV-1の神経毒性遺伝子 $\gamma_134.5$ を欠失し細胞融合能を持つRH2を用いた。ウイルス感染力価はVero単層細胞にHSV-1を接種し、60分の吸着後に未吸着ウイルスを除去し、メチルセルロースを含む培養液を重層して培養し、形成されるブラック数を算定して plaque forming unit (PFU)/mlを求めた。
2. 超音波照射装置としてソニトロン 2000V、MBとしてAS-0100を用いた。培養細胞では培養プレート下面に、ヌードマウス腫瘍では腫瘍直上の皮膚にゲルを介してトランスデューサーを接触させ、超音波を照射した。細胞生存率はMTT法にて測定した。
3. 走査型電子顕微鏡の試料作成では、SAS細胞をカバーガラス上に増殖させ2%グルタルアルデヒドで一晩固定し、エタノール、tブチルアルコール処理し、凍結後真空乾燥し、イオンコートにて白金蒸着した。4. 5週齢Balb/c雌ヌードマウスの背部皮下にSAS細胞を 1×10^6 接種し、腫瘍径が5mmに達した時点で実験に用いた。腫瘍内にRH2を 1×10^6 PFU接種したのちソノポレーションを行い、経時的に腫瘍径を測定した。
5. RH2の投与した腫瘍を3日後に摘出し、HE染色および抗HSV-1抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

【結果】

1. 超音波照射条件を周波数1MHz、出力を 1 W/cm^2 、20% duty cycleとして、時間を60秒まで変化させて培養SAS細胞に照射したところ、照射時間に応じた生細胞率の低下はみられなかった。出力 2 W/cm^2 では、照射時間に依存して低下し、MB存在下で60秒照射すると、対照の57%まで低下した。
2. SAS細胞にRH2を接種し、30分の吸着後に 1 W/cm^2 、10秒の超音波照射を行ったところ、形成されるブラック数は対照の3.4倍に増加した。MB存在下の超音波照射では、対照の4.5倍となった。ウイルス接種の直後にMB存在下で超音波照射を行った場合も、ブラック数の増加がみられた。

【2】

氏名	奥長秀介
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第25765号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	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
論文審査委員	(主査) 教授 由良 義明 (副査) 教授 野田 健司 准教授 大倉 正也 准教授 中田 匡宣

3. 超音波照射後のSAS細胞を走査型電子顕微鏡で観察したところ、細胞表面に小孔がみられた。RH2感染細胞では細胞表面に球状の突起物と小孔の形成が認められた。
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、ブラック形成は強く抑制された。
5. 腫瘍にRH2を投与し超音波照射を行って、3日後に腫瘍をホモゲナイズして腫瘍内ウイルス量を測定した。その結果、ウイルス量はRH2投与単独と比較して超音波照射で1.9倍、マイクロバブル存在下の超音波照射で4.6倍に増加した。免疫組織化学染色では、マイクロバブル存在下に超音波照射を行った腫瘍でHSV-1抗原陽性細胞の増加がみられた。
6. スードマウス腫瘍にRH2を投与し経時的に腫瘍径を測定したところ、対照と比較して超音波照射によって腫瘍径が減少し、マイクロバブル存在下の超音波照射ではその抑制効果がより顕著となった。

【考察と結論】

培養細胞に対する細胞傷害性はみられない条件下で30分のウイルス吸着後にソノポレーションを行うと、10秒という短時間照射でブラック形成は顕著に増加し、ウイルスの吸着過程を促進させるものと考えられた。ウイルス接種直後に超音波照射を行った場合でもブラック形成がみられることから、ソノポレーションはウイルスの吸着過程を経ずに感染を成立させることが示唆された。実際、走査型電子顕微鏡でもウイルスの侵入が可能な径の小孔が細胞表面に形成された。経時的な検討から、小孔は20分後には元の状態に戻ると考えられた。ソノポレーションによって侵入したウイルスの感染がモネンシンで阻害されることから、その感染は低pH環境に依存するものといえる。動物実験でも腫瘍内ウイルスはソノポレーションで増加し、ウイルス抗原陽性細胞も腫瘍の広範囲で認められた。腫瘍抑制効果もMB存在下の超音波照射で最も顕著であった。ソノポレーションは腫瘍でのHSV-1感染の効率を高め、感染腫瘍細胞を増加し、融解作用で強い抗腫瘍効果を示すことといえる。

以上より、ウイルスの感染効率を向上させるソノポレーションは、RH2を用いた腫瘍融解性ウイルス療法において、腫瘍増殖抑制効果を増強するために有用と考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、腫瘍融解性ウイルスである単純ヘルペスウイルス1型、RH2の口腔扁平上皮癌細胞への感染に対する音響穿孔法（ソノポレーション）の効果を、*in vitro* と *in*

Vivo で検討したものである。

その結果、ソノポレーションは細胞表面の小孔形成を介してウイルスの感染効率を向上させること、腫瘍内投与ウイルスによる感染細胞を増加させて抗腫瘍効果を増強することが示された。さらに、マイクロバブルによってソノポレーションの効果は向上した。

以上の結果は、RH2を用いた口腔癌の腫瘍融解性ウイルス療法におけるソノポレーシ

ョン併用の有用性について重要な知見を与えるものであり、本研究は、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。