



Title	超音波を利用した腫瘍融解性ウイルス療法に関する研究
Author(s)	新谷, 素子
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/57590">https://hdl.handle.net/11094/57590</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	しん たに もと こ
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 23727 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 22 年 3 月 23 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	超音波を利用した腫瘍融解性ウイルス療法に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 由良 義明 (副査) 教授 丹羽 均 准教授 寺尾 豊 講師 福田 康夫

#### 論文内容の要旨

##### 【目的】

近年、超音波の治療応用への期待は大きく、超音波とマイクロバブル（微小気泡）を併用するソノポレーション（音響穿孔法）が注目を集めている。これは、超音波でマイクロバブルを破裂させ、発生するエネルギーで細胞膜に一過性の小孔を生じさせて、細胞膜の透過性をより向上させることで、DNA やタンパク質、薬剤などの細胞外の物質が細胞内に導入され易くする方法である。

単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)による腫瘍融解性ウイルス療法は、複製可能型の変異型 HSV-1 を感染させて腫瘍を破壊するもので、腫瘍内でのウイルスの効率的な感染が課題とされている。ソノポレーションはウイルスベクターに代わる遺伝子導入法として発展したため、感染性ウイルスを対象とした研究は少ない。しかし、マイクロバブルの破裂は一時的に細胞間や結合組織と細胞の間隙を拡大する効果を生み出すことが知られており、ウイルス感染に何らかの影響を与える可能性がある。そこで、ソノポレーションによる口腔扁平上皮癌の腫瘍融解性ウイルス療法を念頭において、HSV-1 感染に対するソノポレーションの影響について検討を行った。

##### 【材料と方法】

- 細胞として、ヒト OSCC 細胞由来の SAS 細胞およびサル腎由来 Vero 細胞を用いた。
- HSV-1 は神経毒性遺伝子  $\gamma$ -34.5 遺伝子を欠失した R849、細胞融合能を持つ自然変異型 HF を用いた。
- Vero 单層細胞に HSV-1 を感染し、plaques forming unit (PFU/ml) で表した。
- 超音波遺伝子導入装置としてソニートロン 2000V を用い、マイクロバブルは AS-0100 を用いた。
- 培養細胞に対

するソノポレーションでは、マイクロバブルと HSV-1 を混合して接種し、一定時間の吸着後に超音波照射を行った。その後、ブラック形成を行った。HSV-1 感染のみの対照群、マイクロバブル単独の MB 群、超音波単独の US 群、ソノポレーションを行った MB+US 群として設定した。6. ソノポレーション後に細胞を 96 well プレートに播種し、48 時間培養して細胞増殖能を 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 法を用いて測定した。7. SAS 細胞を BALB/c 雌ヌードマウスの背部皮下に接種し形成した腫瘍にマイクロバブルと R849 を投与し、超音波照射を行った。HSV-1 投与 3 日後に腫瘍組織を摘出し、ウイルスを回収した。8. 腫瘍組織からの H-E 染色標本を作成した。HSV-1 抗原は抗 HSV-1 ウサギポリクローン抗体を用いた免疫組織化学染色で検出した。

### 【結果】

1. マイクロバブルとウイルスを混合して、一定時間 4°Cで静置し、残存する感染性ウイルス量を測定したところ、感染力価の低下はみられなかった。
2. ポリスチレンプレートで培養した Vero 細胞に R849 を接種し、30 分間吸着させたのち、 $1\text{W}/\text{cm}^2$ , duty cycle 10%, 照射時間 20 秒で超音波照射を行ったところ、MB+US 群において、ブラック数が対照の 1.8 倍まで増加した。US 群でも増加傾向を認めた。ウイルスとして HF, 細胞として SAS を用いてもソノポレーションでブラック数は増加した。
3. ガス透過性フィルムを底面に固定した細胞培養 Lumox™ multiwell プレートを用いて Vero 細胞と R849 の感染系で、吸着 30 分後にソノポレーションを行った場合も、ブラック数は対照の 1.7 倍まで増加した。
4. HSV-1 吸着における照射条件につき、ワット数, duty cycle, 照射時間を変えて照射してブラック数の増加を比較したところ、ワット数  $0.5\text{ W}/\text{cm}^2$ , duty cycle 20%, 照射時間 10 秒が至適条件であった。
5. 非感染 SAS 細胞にソノポレーションを行い、MTT 法で生細胞率を求めたところ、W 数, duty cycle が高い場合、照射時間が長い場合に生細胞率は低下した。
6. ヌードマウス腫瘍に R849 を投与して、マイクロバブル存在下と非存在下で超音波照射を行った。超音波照射時間を 1 分間とし、ワット数を 1, 2W, duty cycle を 20, 30, 50%に変化させた。その結果、US 群と MB+US 群で、ワット数が 1, 2  $\text{W}/\text{cm}^2$  で duty cycle が 20, 30 %の場合に、対照よりも高値となった。
7. ヌードマウス腫瘍に R849 を投与する実験で、いずれの実験群の組織標本でも、細胞変性ならびにウイルス抗原の発現を認めた。腫瘍内ウイルス量は US 群あるいは MB+US 群では対照群と比較して高くなった。しかし、duty cycle を増やした場合には、低下了。

### 【考察と結論】

マイクロバブルとの反応で HSV-1 の感染力価に変化はなく、本研究で用いたマイクロバブルは HSV-1 粒子の感染性に影響を与えないと考えられた。ウイルス吸着時にソノポレーションを行うと、R849 と HF 株、Vero と SAS 細胞でブラック数が増加することから、ソノポレーションはヒト口腔扁平上皮癌細胞でも HSV-1 の吸着過程を促進すると考えられた。ただ、この効果がみられるためには一定の超音波照射条件を満たす必要があり、高いエネルギーでは逆に抑制されることも分かった。腫瘍組織でも、条件設定によって腫瘍内ウイルスがソノポレーションによって増加した。一方、超音波単独でも一定の効果がみられた。以上より、ソノポレーションは腫瘍融解性 HSV-1 の口腔扁平上皮癌細胞への感染効率を高める働きのあることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は超音波照射が腫瘍融解性単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) 感染に与える影響について検討したものである。

その結果、超音波照射が腫瘍融解性 HSV-1 の口腔扁平上皮癌細胞への感染効率を高める働きがあることが示唆された。

以上の結果は、今後の口腔扁平上皮癌治療の発展に重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。