

表在性膀胱がんに対する  
超音波・酸化チタンナノ粒子併用療法の開発

東京大学大学院 新領域創成科学研究科  
先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野

学生証番号 76503

荒川 寛茂

## [目次]

要旨	4
Summary	7
略語	9
第1章 序論	
1. 正常膀胱の働きと調節	11
2. 膀胱がんの発生動向	11
3. 膀胱がんの Stage (病期)	13
第2章 背景	
1. 膀胱がん治療法の現状と問題点	15
2. US×TiO <sub>2</sub> 療法	17
3. 本研究の膀胱がんへの適用	18
第3章 目的	
1. 本研究の目的と治療原理	20
第4章 実験方法	
1. 細胞培養	22
1) 継代方法	
2) 細胞保存法	
2. 膀胱がん細胞株への Luciferase 遺伝子導入	23
1) Luciferin-Luciferase 反応	
2) Luciferase vector の導入と Luciferase 発現細胞株の樹立	
3. 免疫化学染色 -Cultureslide-	24
4. FCM による抗原発現解析	25
5. 超音波照射装置および照射原理	26
6. 活性酸素発生測定	27
7. 殺細胞効果測定	28
1) WST-8 法について	28
2) 殺細胞効果の検討	29
8. 細胞死形態の評価	30
9. Scavenger 処理による活性酸素発生抑制と殺細胞効果抑制	31
10. 膀胱がん細胞皮下注入による膀胱がん皮下移植モデルマウスの作製	32
1) 皮下移植モデルマウスの腫瘍体積測定	32

11. TiO <sub>2</sub> ナノ粒子の膀胱内注入および尾静脈投与による 生体への安全性確認	33
1) 膀胱内注入	
2) 尾静脈投与	
12. <i>in vivo</i> 治療実験における超音波照射方法	33
13. 膀胱がん細胞膀胱内注入による膀胱がん同所移植モデルの作製	34
14. Luciferin-Luciferase 反応による定量法	35
1) <i>in vitro</i>	
2) <i>in vivo</i>	
15. 膀胱組織凍結切片による免疫組織化学染色法	36
16. 統計分析	37

## 第5章 結果

1. 膀胱がん細胞株の選択	39
2. 膀胱がん細胞株 RT112 への Luciferase 遺伝子導入と Luciferase 発現細胞株の樹立	41
3. Luciferase強制発現膀胱がん細胞株RT112 <sup>LUC</sup> の 細胞数・腫瘍体積と Luciferase 活性との相関性確認	41
4. 活性酸素発生確認	42
5. US×TiO <sub>2</sub> ナノ粒子併用療法での <i>in vitro</i> における殺細胞効果検討	42
6. US×TiO <sub>2</sub> ナノ粒子併用療法による細胞死形態評価	43
7. Scavenger 処理による活性酸素発生抑制実験	45
8. Scavenger 処理による殺細胞効果抑制実験	45
9. TiO <sub>2</sub> マウス膀胱内注入による生体への安全性確認	46
10. TiO <sub>2</sub> マウス尾静脈投与による生体への安全性確認	46
11. 蛍光標識-TiO <sub>2</sub> 溶液尾静脈投与による生体内TiO <sub>2</sub> 動態解析	48
12. 皮下腫瘍モデルマウスへのTiO <sub>2</sub> 局所投与×US照射による <i>in vivo</i> 治療実験	48
13. 表在性膀胱がん同所移植モデルの作製および Luciferin-Luciferase 反応による膀胱内腫瘍の定量化	49
14. 免疫組織化学染色による評価	50

## 第6章 考察

## 第7章 総括

1. 本研究の結論	60
2. 今後の展望	60

参考文献 . . . . . 62

謝辭 . . . . . 66

# 要旨

## 表在性膀胱がんに対する超音波・酸化チタンナノ粒子併用療法の開発

学生証番号 76503 がん先端生命科学分野

荒川寛茂

### 【背景】

膀胱がんは腫瘍が粘膜層にのみ存在する表在性膀胱がん、筋層にまで浸潤し、転移・浸潤する可能性のある浸潤性膀胱がんの2つに大別される。初期診断において約8割が表在性膀胱がんとして発見されるため、現行の膀胱がん治療は表在性膀胱がんに対するものが主となっている。現在、表在性膀胱がんの標準的治療法には、尿道からカテーテルを挿入し外科的手術により腫瘍を取り除く経尿道的切除術（TUR-BT：Transurethral resection-bladder tumor）が主として行われ、追加治療としてTUR-BT後にmitomycin・doxorubicin等の抗がん剤膀胱内注入、さらに結核菌（BCG：Bacillus Calmette-Guerin）の膀胱内注入が行われている。しかし、追加治療を行っても高頻度で再発を繰り返し、より悪性度の高い浸潤性膀胱がんに進行する事が多い。また、BCGの膀胱内注入においては炎症や発熱などの副作用が起こることも問題となっている。初期治療後、膀胱がんが高頻度に再発・進行した際の根治術は腫瘍を含めた膀胱全摘術のみであり、その術後には患者は自己排尿が不可能になるため尿路の再建として尿路変向術（回腸導管造設術・自排尿型新膀胱造設術・導尿管型新膀胱造設術）が必要となる。そのどれもが煩わしさや機能不安定等の問題があり患者の生活の質（QOL：Quality of life）が著しく低下してしまう。

以上のことから、表在性膀胱がんに対する治療法として既存のものに比べて副作用を軽減し、より効果的に再発を防止出来るものの開発が求められている。

### 【目的】

本研究では、光触媒として知られている酸化チタン（TiO<sub>2</sub>）に超音波（US：Ultrasound）を照射することにより細胞に対して毒性を持つ活性酸素を発生させ、それにより、がん細胞を殺すという全く新しい表在性膀胱がん治療法の開発を目指している。光触媒とは紫外線（UV：Ultraviolet）照射によって励起されることで粒子表面に活性酸素を発生させ、その酸化作用により有機物分解能や脱色作用を持つ材料のことである。この光触媒作用を持つTiO<sub>2</sub>が超音波照射によっても活性酸素を発生させるという新たな知見が得られたので、その作用を再発率の高いがん種として知られる表在性膀胱がんの治療法に応用しようと考えた。この治療方法確立の利点としてUSがUVに比べて生体内到達深度が深いということ、皮膚表面での火傷などの副作用が低いということ、そして、US照射のON/OFFにより活性酸素発生の制御が容易である点が挙げられる。さらに、膀胱は他の臓器と比べて尿道を介して外部からのアクセスが比較的容易であり、かつ閉鎖的空間であるため、臨床応用するにあたり全身投与に不向きなTiO<sub>2</sub>粒子などの金属を用いた治療を局所で効果的に行うことが可能な部位である。

## 【結果と考察】

TiO<sub>2</sub>にUSを照射することで活性酸素の一種である1重項酸素が発生することを、活性酸素検出用蛍光試薬を用いて明らかにし、膀胱がん細胞株であるRT112のUS×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法による殺細胞効果を*in vitro*において確認した。また、活性酸素のScavengerであるL-histidine処理を行うことで、1重項酸素の発生が抑制され、さらに、US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法による殺細胞効果がキャンセルされるということを明らかにした。以上のことから、US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法により引き起こされる殺細胞効果は活性酸素種に依存しているということが示唆された。

効率的に腫瘍組織に活性酸素を作用させることを目的としたTiO<sub>2</sub>粒子のactive targetingを達成するため、immuno-TiO<sub>2</sub> nanoparticleを考え、そのtarget分子として、腫瘍マーカーとして用いられているEpCAM・CD44v6という2種類の抗原がRT112に発現しているか解析を行い、共に強発現していることを確認した。

TiO<sub>2</sub>ナノ粒子のマウス膀胱内注入および尾静脈投与後の、血清生化学検査・腎臓と肝臓のHE染色標本における生化学的・病理学的評価により、TiO<sub>2</sub>ナノ粒子の生体への急性毒性は低いことが示唆された。

皮下腫瘍モデルマウスを用いてUS×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法によるIn vivo治療実験を行い、治療効果を実証した。

膀胱がん細胞株であるRT112にLuciferaseを強制発現させたRT112<sup>LUC</sup>を作成・単離し、その細胞株を用いて体外から膀胱内腫瘍体積を非侵襲的に評価可能な表在性膀胱がん同所移植モデルマウスを作成した。

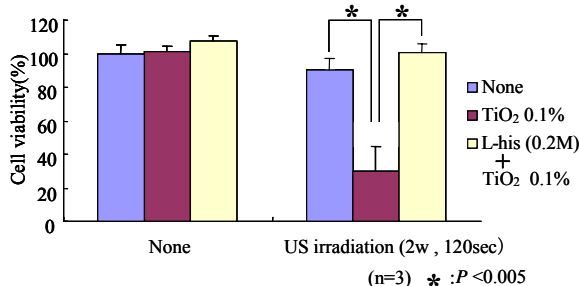


図1 活性酸素による殺細胞効果検証実験 (*in vitro*)  
膀胱がん細胞株RT112を用いてUS出力0.2w, 照射時間120secにて無処理群・TiO<sub>2</sub>×US・TiO<sub>2</sub>×US×Scavenger処理の3群を比較 (Student's *t*-test : mean ± SD)

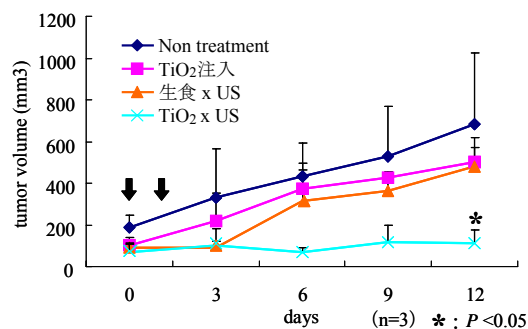


図2 *in vivo* 治療実験  
膀胱がん細胞株RT112を用いて皮下腫瘍モデルを作成し、US出力0.2w, 照射時間120secにて無処理群・TiO<sub>2</sub>注入のみ・生理食塩水×US・TiO<sub>2</sub>×USの4群を比較 (Student's *t*-test : mean ± SD)

今後、TiO<sub>2</sub>粒子表面に腫瘍特異的に発現する抗原に対する抗体を修飾したimmuno-TiO<sub>2</sub> nanoparticleが完成し、その粒子を使用することで、副作用が低く効果的な治療が行えるよう、より一層の努力を続けるとともに、この研究がさらに進み表在性膀胱がんの標準治療法として確立し、臨床の現場で広く使用されることで、患者にとって副作用の少ない有意な治療法となることを期待する。

## **Anti-tumor effect of oxygen radicals produced from TiO<sub>2</sub> nanoparticles by ultrasound irradiation against superficial bladder cancer**

### **Introduction**

Approximately 80% of bladder cancers are in the superficial stage at initial diagnosis. In the case of superficial bladder cancer (SBC), the standard treatment is transurethral resection of bladder tumor. Nevertheless, about 50% of SBC recurs even after complete resection. To prevent recurrence, Bacillus Calmette-Guerin (BCG) and several anti-tumor drugs (e.g., mitomycin, doxorubicin) are commonly used. However, the intravesical instillation of BCG and anti-tumor drugs causes several adverse effects such as fever and cystitis. Therefore, a new modality for treating SBC is desired. In this context, we have developed a new local therapy for SBC using the combination of ultrasound (US) and TiO<sub>2</sub> nanoparticles. The principal mechanism of this combination therapy is the production of oxygen radicals from TiO<sub>2</sub> by US irradiation, and the exertion of cytocidal effect by the generated radicals.

### **Methods**

The production of oxygen radicals from TiO<sub>2</sub> nanoparticles by US irradiation was analyzed using the oxygen radical indicator singlet oxygen sensor green with or without L-histidine, a scavenger of reactive oxygen species (ROS). To evaluate the in vitro cytotoxic effect of the generated radicals, RT112 human bladder tumor cells suspended in phosphate buffered saline containing 0.1% TiO<sub>2</sub> with or without L-histidine were exposed to different US intensities (0.75+1.5 MHz, 0-2 w, 120 sec). Moreover, the in vivo anti-tumor effects of the combination of TiO<sub>2</sub> and US irradiation were investigated against an RT112 xenograft model in mice. TiO<sub>2</sub> (30μl of 0.1%) was injected directly into the tumor followed by US irradiation for 120 sec at 5 w.



## **Results**

Singlet oxygen, one of the oxygen radicals, was produced from TiO<sub>2</sub> by US irradiation. On the other hand, its production was inhibited by L-histidine. To achieve the strongest cytotoxic effect, the optimal condition of the TiO<sub>2</sub>×US combination therapy was determined and was found to be a final concentration of 0.1% TiO<sub>2</sub> and US for 120 sec at 2 w. On the other hand, the cytocidal effect of oxygen radicals was completely inhibited by the presence of L-histidine. Renal and hepatic dysfunctions were not observed after local instillation in the bladder cavity and intravenous injection of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. The growth of the RT112 tumor xenograft was significantly inhibited by TiO<sub>2</sub>×US combination therapy.

## **Conclusion**

The induction and suppression of ROS generation by the TiO<sub>2</sub>×US combination therapy were easily controlled. Also, this therapy appeared to exert significant anti-tumor effect against an RT112 human bladder tumor xenograft in mice, warranting further preclinical investigation.

## 略語

TUR-BT : Transurethral resection-bladder tumor

BCG : Bacillus Calmette-Guerin

QOL : Quality of life

UV : Ultraviolet

US : Ultrasound

TiO<sub>2</sub> : Titanium dioxide

PEG : Polyethylene glycol

PAA : Polyacrylacid

EpCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule

UICC : Unio Internationalis Contra Cancrum

SDT : Sonodynamic therapy

PBS : Phosphate buffered saline

DAB : 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride

B · E · PBS : BSA + EDTA + PBS

BSA : bovine serum albumin

EDTA : ethylenediamineteraacetic acid

PBS : phosphate buffered saline

FCM : flow cytometry

FACS : fluorescence activated cell sorter

cpm : count per minutes

i.v : intravenous injection

HE : Hematoxylin-Eosin

BUN : Blood urea nitrogen

Cre : creatinine

T-Bil : Total bilirubin

GGTP :  $\gamma$ -glutamyltranspeptitase

ALP : Alkaline phosphatase

GFP : green fluorescent protein

SOSG : singlet oxygen sensor green

# 第 1 章 序論

人間は誰しも病気に罹る可能性を有し、今日までに様々な病気が確認され、その治療方法が研究開発され続けている。数多くある病気の中で、日本人の全死因のうち約 6 割を占めるのが三大成人病と呼ばれるがん（肺がん・大腸がん等）・脳血管疾患・心疾患である。その中でもがんは全死因の約 3 割を占める最も死亡率の高い疾病であり、その治療法の研究・開発はさらに注力して行われなければならない領域である。

## 1. 正常膀胱の働きと調節

膀胱は骨盤内にある臓器で、腎臓で作られた尿が腎盂・尿管を経て一時的に貯蔵される場である。膀胱が尿によって伸展されることで尿意を感じ、筋肉の収縮により排尿して膀胱から尿を出し切るという作用がある。尿失禁や上部尿路の障害を起こさず、しかも円滑な排尿を行うための膀胱排尿筋と尿排出路との協調性は、脳幹部の橋排尿中枢より下位の自律神経系により反射制御されているが、さらに大脳による反射の制御がなされており、随意的な排尿の調節が可能である。膀胱の表面は移行上皮という名の上皮で覆われ、伸縮性に富む特徴がある<sup>[1]</sup>。

## 2. 膀胱がんの発生動向

膀胱がんは全悪性腫瘍の中でも比較的再発頻度の高い腫瘍であり、そのほとんどは、移行上皮が悪性化した移行上皮がんである。膀胱がんの特性として、尿路における同時性・多発性がある。これは、尿路上皮が全体として前がん状態にあるためとする考え方と、先に発生したがんが尿を介して別の場所に播種されることによるとする考え方があり、どちらの仮説も支持する報告がある<sup>[1]</sup>。

統計的には尿路がん（腎盂、尿管、膀胱）の中で膀胱がんが最も死亡数が多く、7 割以上を占めている。罹患数でも膀胱がんが最も多く、尿路がん全体の約半数を占める。年齢別にみた膀胱がんの罹患率は男女とも 60 歳代から増加し、40 歳未満の若年では低い傾向に

ある。また、男性のほうが女性より膀胱がん罹患率が高く、女性の約4倍である。

罹患率の国際比較では、膀胱がんは欧米白人で高く日本人を含む東アジア系民族では、本国在住者・アメリカ移民ともに低い傾向がある<sup>[1]</sup>。

### 3. 膀胱がんの Stage (病期)

病期分類はUICC (Unio Internationalis Contra Cancrum, International Union against Cancer, 国際対がん連合) によるTNM分類が全世界的に使用されている。日本においては2001年に「膀胱癌取り扱い規約第3版」が出版され、病期分類が改訂され、TNM分類と膀胱癌取り扱い規約の間の病期分類が同一のものとなったので、以下に組織学的深達度を示す(表1, 図1) [2]。

表1 膀胱がんの組織学的深達度

組織学的深達度	
膀胱壁において脈管系を介さない腫瘍の深達度の程度 (Staging) を次のように表す。	
Tis	: 癌組織が非乳頭状で、粘膜上皮にとどまって深部浸潤を示さないもの。
Ta	: 乳頭種および乳頭状非浸潤癌。
T1	: 粘膜固有層あるいは茎部間質に癌浸潤の及んだもの。
T2	: 癌浸潤が筋層に及ぶもの。
T2a	: 筋層のなかば以上には及んでいないもの。
T2b	: 深在筋層に浸潤するもの。
T3	: 膀胱周囲組織への浸潤を示すもの。
T3a	: 顕微鏡的に膀胱周囲組織への浸潤が確認できるもの。
T3b	: 肉眼的に膀胱周囲組織への浸潤が確認できるもの。
T4	: 前立腺、子宮、膣、骨盤壁または腹壁に浸潤を示すもの。
T4a	: 前立腺、子宮あるいは膣への浸潤。
T4b	: 骨盤壁あるいは腹壁への浸潤。
TX	: 深達度の評価が不可能なもの。

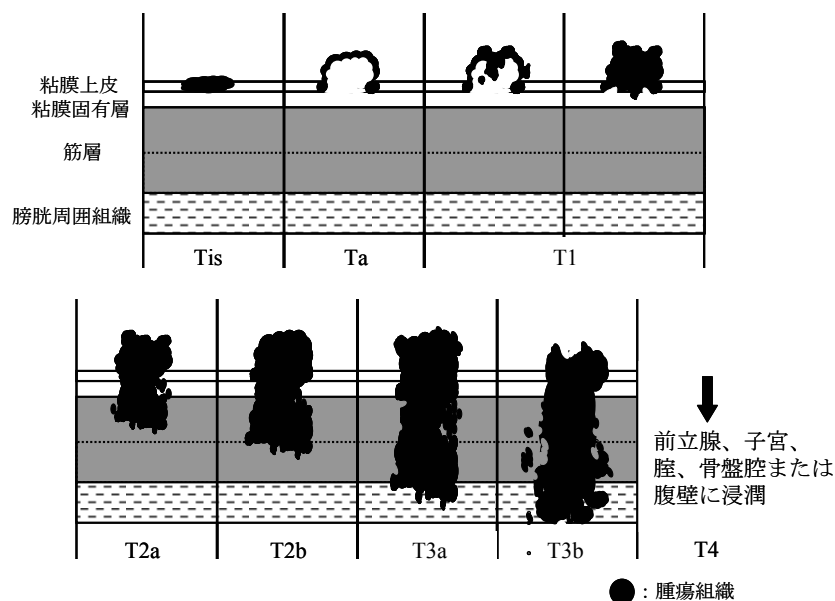


図1 膀胱がんの組織学的深達度

## 第 2 章 背景

## 1. 膀胱がん治療法の現状と問題点

膀胱がんに対する治療法としては手術療法、化学療法、放射線療法などがある。手術療法には内視鏡的手術と開腹手術があり、化学療法には膀胱内注入療法、全身的化学療法、動注療法がある。実際の治療においては、深達度、異型度などの腫瘍側因子のみならず、年齢、全身状態などの患者側因子も考慮し、これらの治療法の中から選択されている。膀胱がんの治療は、筋層に浸潤を認めない表在性がんと筋層に浸潤を認める浸潤がん、および遠隔転移を有する進行がんでは大きく異なる。従って、術前に正確な病期判定を行うことが治療方針を決定するうえできわめて重要となる。

膀胱がんの約 80%は表在性 (Tis, Ta, T1) であり、そのうちTa腫瘍は最も頻度が高く、全膀胱がんの約 50%を占めている。Ta腫瘍の標準的治療法はTUR-BT (Transurethral resection-bladder tumor) である。初発で単発のlow grade腫瘍ではTUR-BTのみでの経過観察も可能であるが、多発性や再発性の腫瘍では治療後の再発率が高いため、TUR-BT後に補助療法として抗がん剤 (doxorubicin・mitomycin等) やBCG (Bacillus Calmette-Guerin) の膀胱内注入療法が行われる。T1腫瘍の標準的治療法もTUR-BTである。特にhigh grade腫瘍は再発率が高いばかりでなく、筋層に浸潤するリスクが高い。TUR-BT後に抗がん剤やBCGの補助療法が行われるが、それらの注入療法に反応が悪い場合は膀胱全摘術が適応となっている。Tis腫瘍に対する治療はBCG膀胱内注入療法が第一選択となっている。その奏成功率は約 70%といわれているが、10年間の経過観察で、初期治療で有効であった腫瘍の 45%程度が浸潤がんに行進すると報告されている<sup>[3]</sup>。

浸潤性膀胱がん (T2~) の治療法は元来、膀胱全摘術が標準治療であったが、最近では化学療法、放射線療法、膀胱部分切除術、TUR-BTなどを併用し、膀胱を温存する治療も行われるようになってきた。膀胱全摘術を行った浸潤がんの 5 年生存率が必ずしも良好でないのは、浸潤がんでは診断時に画像上明らかでない微小転移がすでに存在するためと考えられている<sup>[1, 3-5]</sup>。



上記のように膀胱がんは、膀胱内に多発し、再発を繰り返すという特徴を持つ。膀胱温存を目的とする膀胱がん治療法には TUR-BT、抗がん剤・BCG の膀胱内注入が行われているが、そのどれも副作用を伴ううえに、再発率も高い。再発を繰り返す場合の処置として膀胱全摘術が選択されるが、その術後には尿路の再建として尿路変向術（回腸導管造設術・自排尿型新膀胱造設術・導尿管型新膀胱造設術）が必要となる。そのどれもが煩わしさや機能不安定等の問題があり患者の生活の質（QOL：Quality of life）が著しく低下してしまう。

以上のことから表在性膀胱がんの再発予防法として、抗がん剤・BCG の膀胱内注入療法に替わる、より効果的で副作用の低い治療法の開発が必要であると考えられる。

## 2. US×TiO<sub>2</sub>療法

従来、TiO<sub>2</sub>は紫外線（UV：Ultraviolet）励起により水溶液中で活性酸素を発生させる光触媒として知られている<sup>[9-11]</sup>。その殺菌・抗菌、空気清浄、妨汚、脱臭、親水性等の機能効果は既に実用化され、日常生活に取り入れられている<sup>[12,13]</sup>。近年、このTiO<sub>2</sub>がUVのみならず、超音波（US：Ultrasound）照射によっても触媒作用を示し、活性酸素を発生させることが明らかになってきた。その詳細なメカニズムについては未だ解明に至っていないが、USとTiO<sub>2</sub>により発生する活性酸素での殺菌・抗菌、汚染物質分解などに関する報告も散見されている<sup>[13-15]</sup>。

現在までに明らかとなっていることとして、液相へのUS照射のみによってもキャビテーション（cavitation：液体中の圧力が部分的に極度に低下し、そこでは瞬間的に飽和蒸気圧を下回ることで沸騰して気泡を生じる現象）によって生じた気泡の破壊が起き<sup>[16]</sup>、そのときのエネルギーにより活性酸素（OHラジカル）発生が起こるとされている<sup>[14]</sup>。活性酸素の一般的特徴として、自然発生率が極めて低いということ・発生した活性酸素の寿命が短く拡散距離が短いということが挙げられる<sup>[17]</sup>（表2）。そこで、十分な汚染物質の分解能を得るためには活性酸素の発生量を増加させることより、活性酸素を高濃度に保つことが重要になる。この試みを、最も効果的に促進する目的で研究されているのがUS×TiO<sub>2</sub>システムであった<sup>[13-15, 18, 19]</sup>。

表2 活性酸素の平均寿命・拡散距離

活性酸素種	平均寿命	平均拡散距離
1重項酸素 ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> )	2μs	100nm
OHラジカル	70ns	20nm
スーパーオキシド (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	5s	100μm

### 3. 本研究の膀胱がんへの適用

本研究はUSとTiO<sub>2</sub>ナノ粒子を用いた併用療法により抗腫瘍効果を得られるかどうかを検討したものである。将来の臨床利用を念頭に投与経路を考えると、臨床の現場において使用されていない、ナノスケール（粒子径 30~80nm）のTiO<sub>2</sub>という金属を使用しており、生体内での吸収・排泄機構などがはっきりしていないため、静脈投与が可能かどうかは不明であるという問題がある。一方で、TiO<sub>2</sub>粒子は表面に抗体等のパイロット分子を修飾でき、active targetingが可能であるという利点をもつ。序論でも記述したが、膀胱は骨盤内にあり、腎臓で作られた尿が腎盂・尿管を経て一時的に貯蔵される場である。膀胱は臓器の中で最も閉鎖的な空間であり、かつ、尿道を介した外部からの低侵襲的アクセスが可能であるため、膀胱がんを治療対象とし、膀胱内投与や局所投与することでTiO<sub>2</sub>の生体への副作用を最小限に抑えることが出来ると考えた。

さらに、膀胱がんの再発率が高い理由としてTUR-BT後の膀胱内に、肉眼では発見不可能ながん細胞が浮遊・播種することが知られている<sup>[6-8]</sup>。この微小がん細胞に対する補助療法として抗がん剤やBCGの膀胱内注入療法が一般的に行われているが、その再発抑制効果は不十分である。そこで、がん特異的抗体を修飾したTiO<sub>2</sub>ナノ粒子を用いることで、TiO<sub>2</sub>が腫瘍組織選択的に近傍に集積し、正常細胞への副作用を極力抑え、がん細胞のみに作用する効率的な治療法になるのではないかと考えた。

## 第3章 目的

## 1. 本研究の目的と治療原理

本研究では、光触媒として知られるTiO<sub>2</sub>にUSを照射することにより細胞に対して毒性を持つ活性酸素を発生させ、その強い酸化力によりがん細胞を殺すという全く新しい表在性膀胱がん治療法の開発を目指している（図 2）。また、本方法で危惧される点として臨床の現場で使用されていない金属であるTiO<sub>2</sub>粒子を使用していることが挙げられる。そのため本研究はTiO<sub>2</sub>粒子の毒性試験も兼ねており、TiO<sub>2</sub>粒子を治療に用いた臨床試験を目指すための前臨床試験として意味合いも含んでいる。

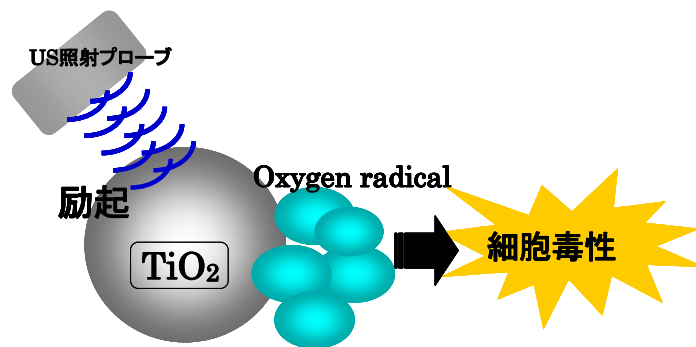


図 2 TiO<sub>2</sub>×USシステムによる殺細胞効果概略図

水溶液中に存在するTiO<sub>2</sub>粒子にUSを照射することで、TiO<sub>2</sub>粒子を励起し、活性酸素種を発生させる。その活性酸素種の強酸化力にて細胞毒性を得ることを目的としている。

USを使用する利点として、UVに比べて生体内到達深度が深いこと、皮膚表面での火傷などの副作用が低いこと、そして、US照射のON/OFFにより活性酸素発生が制御が可能であることが挙げられる。さらに、TiO<sub>2</sub>粒子使用の利点として、粒子表面に抗体等のパイロット分子が修飾可能であることからactive targetingにつなげる事が可能である点も挙げられる。また、膀胱は他の臓器と比べて尿道を介した外部からのアクセスが容易であり、かつ閉鎖的空間であるため臨床に応用する際、静脈内注入による全身投与に不向きなTiO<sub>2</sub>粒子のような金属を用いた治療を局所で効果的に行うことが可能な部位である。

## 第4章 実験方法

## 1. 細胞培養

本研究では膀胱がん細胞株を中心に、各種がん細胞株を用いて実験を行った。各種細胞株の由来組織・増殖性状・培養液組成を以下に示す（表 3）。

表 3-1 膀胱がん細胞株

### 膀胱がん細胞株

Designations	Organ	Growth properties	Propagation
RT112	Urinary bladder	adherent	D-MEM , 10% fetal bovine serum , 2mM L-glutamin
UMUC3	Urinary bladder	adherent	MEM , 10% fatal bovine serum , 2mM L-glutamin 0.1mM non-essential amino acids , 1mM sodium pyruvate
TSSCUP	Urinary bladder	adherent	MEM in Eargle's BSS with non-essential amino acids , 10% fatal bovine serum , 1mM sodium pyruvate
5637	Urinary bladder	adherent	RPMI 1640 , 10% fatal bovine serum , 2mM L-glutamin 1mM sodium pyruvate , 10% HEPES
J-82	Urinary bladder	adherent	MEM , 10% fatal bovine serum , 2mM L-glutamin 0.1mM non-essential amino acids , 1mM sodium pyruvate
T24	Urinary bladder	adherent	McCoy's 5a medium (modified) with 1.5mM L-glutamin 2.2g/L sodium bicarbonate , 10% fatal bovine serum

表 3-2 各種がん細胞株

### その他 各種がん細胞株

Designations	Organ	Growth properties	Propagation
HT29	colon	adherent	D-MEM , 10% fatal bovine serum , 2mM L-glutamin
Alexander	liver	adherent	RPMI 1640 , 10% fatal bovine serum , 2mM L-glutamin 1mM sodium pyruvate , 10% HEPES
U251 MG	brain	adherent	E-MEM , 10% fatal bovine serum , 2mM L-glutamin
SBC3	lung	adherent	E-MEM , 10% fatal bovine serum , 2mM L-glutamin

上記の細胞株を 37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養し、必要に応じ継代・保存した。

### 1) 継代方法 (φ150mm dish の場合)

位相差顕微鏡にてコンフルエント状態であることを確認し、クリーンベンチ内にて medium 上清を除去した後 PBS (-) (DPBS , Invitrogen 社) を 10ml 加え、再度除去することで残った medium を洗い流した。Trypsin-EDTA (0.25 w/v % Trypsin-1mmol/l , 0.2% EDTA , Wako 社) を 1ml 加え 37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内に戻し、数分後に位相差顕微鏡にて細胞接着が剥がれていることを確認した後、9ml の medium を加え、細胞懸濁液を 15ml centrifuge tube (Corning 社) に回収した。細胞懸濁液は 1200rpm, 4min, 4°C の条件で遠心し、上清を除去した後、medium で再懸濁し適当希釈倍率 (細胞懸濁 : medium = 1 : 4 程度) にて新しい φ150mm dish に細胞を播種した。

## 2) 細胞保存方法 (φ150mm dish の場合)

位相差顕微鏡にてコンフルエント状態であることを確認し、上述の方法で細胞を剥がし、9ml の medium を加えて遠心分離、上清の除去を行った。その後、セルバンカー (細胞凍結保存液 血清タイプ セルバンカー 1 , Malsgene 社) を 5ml 加え懸濁し、細胞保存用 tube (Cryotube Vials , nunc 社または Cryogenic Vial , Conring 社) に 1ml ずつ分注しバイセル (日本 Freezer 社) にて  $-80^{\circ}\text{C}$  にて一晩保存後、液体窒素に移して保存した。

## 膀胱がん細胞株への Luciferase 遺伝子導入

ホタル (*Photinus pyralis*) からとったホタルルシフェラーゼは、61 kDa の一量体酵素であり、ルシフェリンの酸化を触媒して約 560 nm の光を放出する (図 3)。

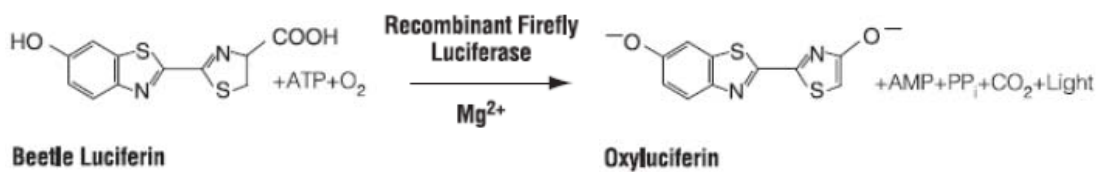


図 3 Luciferin-Luciferase 反応

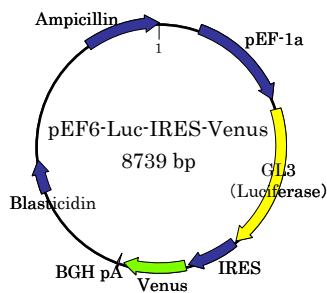


図4 Luciferase vector map

当研究室作製した Luciferase と Venus<sup>[20]</sup> (改変 GFP : green fluorescent protein) を共発現する expression vector (pEF6-Luc-IRES-Venus) の vector map を図 4 に示す。大腸菌培養時に Ampicillin (Invitrogen 社) にて selection し、plasmid DNA の抽出は Plasmid maxi kit (Qiagen 社) にて行った。6well plate

に播種した膀胱がん細胞株 RT112 に lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を用いて plasmid DNA を導入した。最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Blastcidin (Invivogen 社) を添加した medium にて 2 週間培養して selection を行った。さらに、Venus (GFP) の蛍光を利用して FACS Aria (BD 社) にてソーティング・単離し、RT112<sup>LUC</sup> monoclonal cell line を樹立した。



### 3. 免疫化学染色 —CultureSlide—

各種がん細胞株をCultureSlide (BD Falcon社) 4 Chamberの1wellあたり  $1 \times 10^5$  個播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内にて24時間培養した。細胞播種24時間後、上清を除去し、各wellをPBS (-) 500μlで洗浄した。PBS (-) を除去後4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (Wako社) を1ml加え氷上で10分間固定した。固定液を除去し、1mlのPBS (-) を加え4°Cにて保存した。細胞を固定し、保存していたslideをmilliQ水で洗浄後、wellを構成する仕切りを取り除き、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wako社) とMethanol (Wako社) にて作製した3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in MeOH溶液にslideを20分間浸漬し、流水洗浄2分間、PBS (-) の洗浄5分間を3回行った後、Dakoペン (Dako社) でslideを囲み、3% スキムミルク in PBS (-) を添加し25min湿潤器内にて静置した。3% スキムミルク in PBS (-) を除き、3% スキムミルク in PBS (-) にて適当な希釈倍率 (表4) で希釈した一次抗体を300μl添加し、1時間静置した (湿潤器内)。PBS (-) 洗浄5分間を3回行い、一次抗体を除去した後、二次抗体を300μl添加し、30分間静置した (湿潤器内)。PBS (-) 洗浄5分間を3回行った後、DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride : Dako社) を調整し、適量を添加した (湿潤器内)。染色を確認したらmilliQ水にて洗浄 (洗浄後のmilliQ水は専用バットに移し、次亜塩素酸ナトリウムにて無毒化处理した)。slideをヘマトキシリン (武藤化学社) に浸し2分間染色後、10分間流水洗浄した。余分な水分を除き、Ethanol (99.5) (Wako社) にて5分間3回の脱水を行った後、Xylene (Wako社) にて5分間の透徹を3回行った。カバーガラス24×24mm (Matsunami社) にMOUNT-QUICK (大道産業社) を適量のせ、空気が入らないよう注意して封入し、平坦な場所で十分に乾燥させた。

表4 各種抗体の至適希釈倍率及び二次抗体対応表

一次抗体	希釈倍率	二次抗体
mouse anti-EpCAM (VU-1D9, IgG1 : Serotec社)	250倍希釈	anti-mouse/HRP (Dako社)
mouse anti-CD44v6 (VFF18, IgG1 : Chemicon社)	1000倍希釈	anti-mouse/HRP (Dako社)
rabbit anti-luciferase (Firefly) (polyclonal antibody : Cortex社)	100倍希釈	anti-rabbit/HRP (Dako社)

#### 4. FCM による抗原発現解析

各種抗原の発現はflow cytometry (FCM) でも解析を行った。細胞をCell dissociation solution (Sigma社) にて剥がし、mediumにて回収、遠心分離の後、上清を除去した。B・E・PBS (0.5% BSA+2mM EDTA[Sigma社]+D-PBS) にて懸濁し、 $2 \times 10^5$  個分を 5ml Polystyrene Round-Bottom tube (BD Falcon社) に分注した。1500rpm, 5min, 4°Cにて遠心し、上清をデカントで除去した後、キムタオル上に押し付けて水滴を取り除き、Zenon Alexa Fluor-647 Mouse IgG1 Labeling kit (Invitrogen社) にて蛍光ラベルした抗体 0.2 $\mu$ g分加え、vortexし、遮光状態で30分間氷上にて静置した。30分後、B・E・PBSを3ml/tube加え遠心分離により未結合抗体を除去した。上清をデカントで捨て、B・E・PBSを200 $\mu$ l/tube加えて細胞を懸濁し、フィルタ付 5ml Polystyrene Round-Bottom tube (BD Falcon社) のフィルタを通した後、Propidium Iodide (Invitrogen社) を0.5 $\mu$ l/tubeで加え、核染色を行った。上記の細胞懸濁液をFACS caliber (BD社) にて、対象とする細胞において抗原発現の有無を解析した。

## 5. US 照射装置および照射原理

### US照射装置 概要図

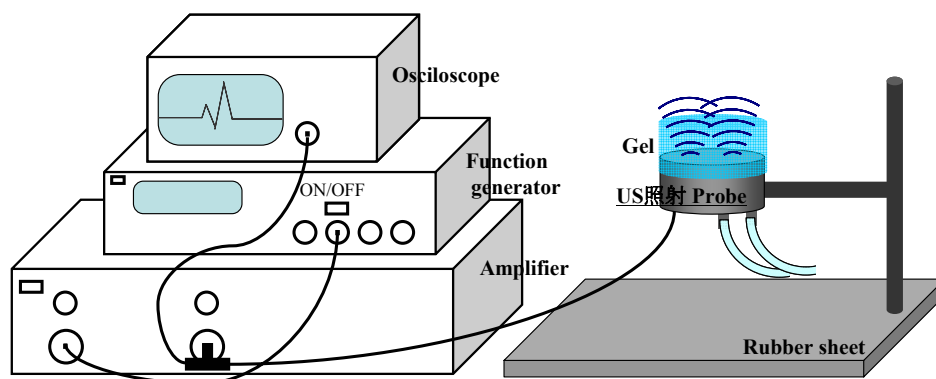


図5 US 照射装置 (TOTO 社) 概略図

US の出力は 0w～最大 5w まで照射可能で、照射時間は任意に決定することが出来る。ファンクションジェネレーターで US の出力および照射の ON/OFF を制御し、アンプで増幅した信号を US 照射プローブに送り、US を照射する。US 照射プローブは 0.75+1.5MHz という 2つの異なる周波数の US を照射する。また、アンプからの信号はオシロスコープにも送られ、US 照射を波形データとして確認可能である (図 5)。

US 照射プローブ上にはポリアクリル酸 (PAA) のゲルを置き、適切な距離にて効率的に US を照射できるようになっている。US 照射プローブにはチューブが繋がれ、US 照射によって発生した熱を流水により冷却する仕様である。

*in vitro* 実験では US 照射プローブの US 照射面を上向きに設置し、その上に sample が入った plate を置いて使用したが、*in vivo* 実験においては、US 照射面を下向きに設置して US を照射した。*in vivo* 実験時、US を吸収するラバーシートを下に敷くことで、US が反射するのを抑制している。

## 6. 活性酸素発生測定

48well plate (Corning社) の 1wellにPBS (-)、TiO<sub>2</sub>粒子 (図 6)、活性酸素検出用蛍光試薬を含めたsample溶液 (表 5) を調整し、BlankとしてUS未照射溶液 100μlを 96well plate (PerkinElmer View plate – Black : PerkinElmer社) にsamplingした。

Sample 溶液が入った 48well plate をアルミ箔にて遮光し、US 照射プローブの中央部分にsample 溶液の入った well を設置し、ゲル (GELSUPEUM : 栄社) にて圧着した後、2w のUS 出力で 2 分間超音波を照射した。US 照射後、100μl を 96well plate に sampling し蛍光測定装置 (Fluoroskan Ascent : Labsystems 社) にて蛍光を測定した (Ex / Em = 485 / 538 nm)。

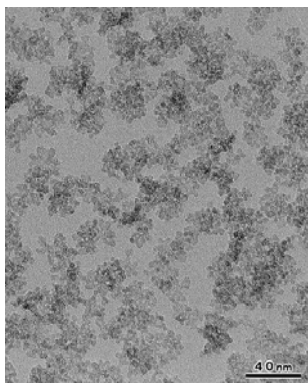


図 6 TiO<sub>2</sub>粒子の電子顕微鏡画像 (TOTO社 提供)

TiO<sub>2</sub> in DW (distilled water) を電子顕微鏡にて撮影した。

このTiO<sub>2</sub>粒子は粒子径が 30~80nmで表面をPEG (Polyethylene glycol) またはPAA (Polyacryl amide) で修飾されている。

本研究においてはPEG修飾したTiO<sub>2</sub>粒子 (TiO<sub>2</sub>-PEG) を用いて実験を行った。

表 5 活性酸素発生実験 sample 組成

sample組成

Negative control			TiO <sub>2</sub> 0.1%		
50μM SOSG	50	(final conc. 5μM)	0.5% TiO <sub>2</sub>	100	(final conc. 0.1%)
PBS	450		50μM SOSG	50	(final conc. 5μM)
total	500	(μl)	PBS	350	
			total	500	(μl)

TiO<sub>2</sub>-PEG溶液 : TOTO社

1 重項酸素検出用試薬 : SOSG (Singlet oxygen sensor green : Invitrogen 社)

## 7. 殺細胞効果測定

本研究では、US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法における細胞毒性効果を比較検討する必要があった。そのため細胞増殖及び細胞毒性測定用に、一般的に広く用いられているWST-8 法による評価を行った。

### 1) WST-8 法について

WST-8 法とは、Cell Counting Kit-8 (同仁化学社) を用いた評価法であり、水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 を発色試薬として用いている。WST-8 は電子メディエーター存在下において、細胞中の脱水酵素により還元され、橙色の生成物であるホルマザン (吸光度 450nm) を生じる (図 7)。細胞内脱水酵素に応じて産生されるホルマザン色素の量は生細胞に比例するため、吸光度の値により殺細胞効果を定量的に評価できるものである。

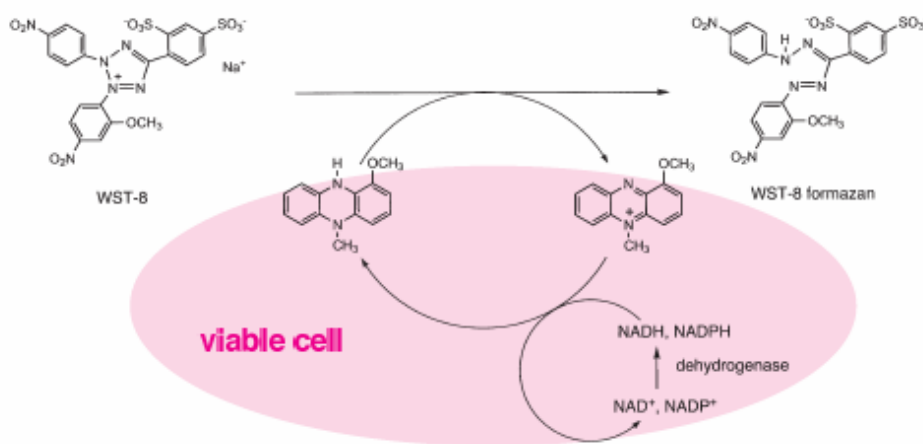


図 7 WST-8 とホルマザンの構造、および WST-8 反応原理

## 2) 殺細胞効果の検討

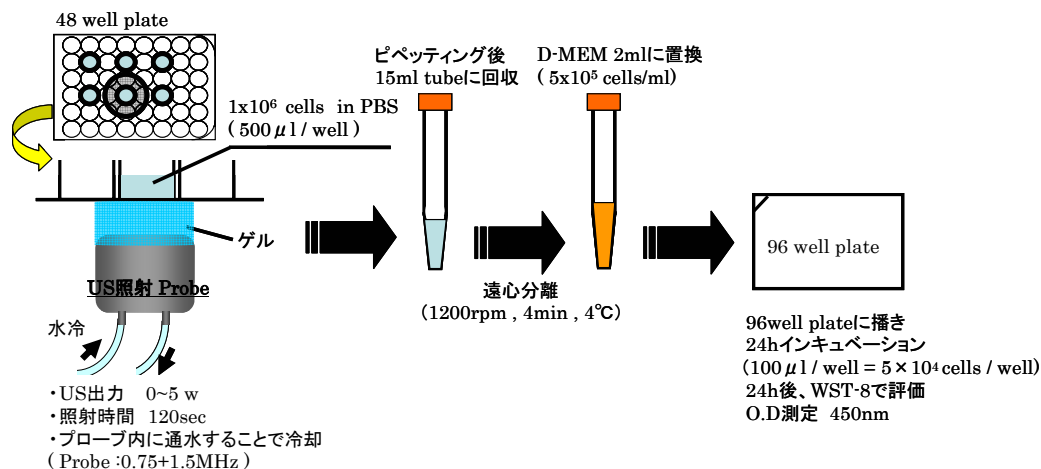


図 8 殺細胞効果検討実験 Protocol

膀胱がん細胞株である RT112 を PBS (-) 中に懸濁したものを Cell suspension として実験に用いた。48well plate に sample 溶液 (表 6) を調整し、48well plate をアルミ箔で覆い遮光した状態で US 照射プローブの中央部分に sample が入った well を設置し、ゲルにて圧着した後、0~2w の出力で 2 分間 US を照射した。また、Non treatment 群は sample 溶液を調整し、US を照射しなかった群である。

その後、各wellに 500 $\mu$ lずつPBS (-) を加え、十分にピペッティングしてから 15ml tube に回収、遠心後に上清を除去して 2ml の D-MEM に置換した。それを 8 連マルチピペット (FINNPIPETTE : Thermo社) で 96well plate に播種し、24 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーターにてインキュベーションした。細胞播種 24 時間後に上清を除去し、WST-8 溶液を D-MEM で 10 倍希釈したものを 100 $\mu$ l 添加し 1 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーターにてインキュベーションした。また、Blank として 10 倍希釈 WST-8 溶液のみも 100 $\mu$ l 加えた well を用意した。その後、plate の蓋を外し、吸光度計 (SPECTRAMax190 : 日本モレキュラーデバイス株式会社) にて 450nm の波長で吸光度を測定した (図 8)。

表6 殺細胞効果検討実験sample組成  
 sample組成

Negative control			TiO <sub>2</sub> 0.1%		
Cell suspension	100	(final $1 \times 10^6$ cells)	0.5% TiO <sub>2</sub>	100	(final conc. 0.1%)
PBS	400		Cell suspension	100	(final $1 \times 10^6$ cells)
<b>total</b>	<b>500</b>	( $\mu$ l)	<b>PBS</b>	<b>300</b>	
			<b>total</b>	<b>500</b>	( $\mu$ l)

## 8. 細胞死形態の評価

上述したprotocol (図 8) にて膀胱がん細胞株RT112 にUSを照射した後、Annexin-V-FLUOS Staining kit (Roche社) を用いて細胞死の形態を評価した。比較対照群は無処理群、US照射のみの群、そして、US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子群の3群とした。

US照射後、6well pate に播種し、US照射直後、6時間後、12時間後に Cell dissociation solution で細胞を剥がし、Annexin-V-FLUOS Staining kit を用いて Annexin-V-Fluos と Propidium iodide の混合溶液で細胞を懸濁させた。室温で15分間静置した後、FCMにて評価を行った。グラフ内をゲートにより4分割し、それぞれの区画を upper left (UL)、upper right (UR)、lower left (LL)、lower right (LR) として表記した。

## 9. Scavenger 処理による活性酸素発生抑制と殺細胞効果抑制

活性酸素発生測定および殺細胞効果測定と同じ実験方法を用い、さらに、活性酸素の Scavenger である L-histidine<sup>[14, 21, 22]</sup> (最終濃度 200mM : Sigma 社) を加えた群を追加して実験を行った。L-histidine は PBS (-) 中に溶解した後、10N NaOH で中和させ、400mM で pH 7.4 に調整したものを使用した (表 7)。

表 7-1 活性酸素発生抑制実験 sample 組成

sample組成			sample組成		
Negative control			TiO <sub>2</sub> 0.1%		
50?M SOSG	50	(final conc. 5μM)	0.5% TiO <sub>2</sub>	100	(final conc. 0.1%)
PBS	450		50?M SOSG	50	(final conc. 5μM)
<b>total</b>	<b>500</b>	(μl)	<b>PBS</b>	<b>350</b>	
			<b>total</b>	<b>500</b>	(μl)
TiO <sub>2</sub> 0.1% + Scavenger					
0.5% TiO <sub>2</sub>	100	(final conc. 0.1%)			
400mM L-histidine	250	(final conc. 200mM)			
50?M SOSG	50	(final conc. 5μM)			
<b>PBS</b>	<b>100</b>				
<b>total</b>	<b>500</b>	(μl)			

表 7-2 殺細胞効果抑制実験 sample 組成

sample組成			sample組成		
Negative control			TiO <sub>2</sub> 0.1%		
Cell suspension	100	(final 1 × 10 <sup>6</sup> cells)	0.5% TiO <sub>2</sub>	100	(final conc. 0.1%)
PBS	400		Cell suspension	100	(final 1 × 10 <sup>6</sup> cells)
<b>total</b>	<b>500</b>	(μl)	<b>PBS</b>	<b>300</b>	
			<b>total</b>	<b>500</b>	(μl)
TiO <sub>2</sub> 0.1% + Scavenger					
0.5% TiO <sub>2</sub>	100	(final conc. 0.1%)			
400mM L-histidine	250	(final conc. 200mM)			
Cell suspension	100	(final 1 × 10 <sup>6</sup> cells)			
<b>PBS</b>	<b>50</b>				
<b>total</b>	<b>500</b>	(μl)			



## 10. 膀胱がん細胞皮下注入による膀胱がん皮下移植モデルマウスの作製

Luciferase遺伝子導入膀胱がん細胞株RT112<sup>LUC</sup>をD-MEMで懸濁し、 $2 \times 10^7$  cells/mlに調整した。29G×1/2”マイジェクター（Terumo社）に細胞懸濁液を採り 6 週齢のヌードマウス雌（BALB/c slc-nu/nu：日本SLC社）の右背部分皮下に 50 $\mu$ l注入した（ $1 \times 10^6$  個を皮下移植した）。

### 1) 皮下移植モデルマウスの腫瘍体積測定

膀胱がん細胞株皮下移植後、ヌードマウス右背部分に腫瘍が形成されていることを確認し、ノギスを用いて腫瘍体積を計測した。腫瘍の縦幅（L）と横幅（W）を測定し、以下の公式にて腫瘍体積の算出を行った。

腫瘍体積算出公式

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = 1/2 \times L \times W^2$$

## 11. TiO<sub>2</sub>ナノ粒子の膀胱内注入および尾静脈投与による生体への安全性確認

1) 膀胱内注入. サーフロー留置針 24G×3/4” (Terumo社) の外筒をカテーテルの代替品として、pentobarbiturate 12.5mg / bodyを 29G×1/2”マイジェクターにて麻酔をかけた後、ヌードマウスの膀胱内に尿道から挿入し、そのカテーテルを介して 0.1~0.5%(w/v) TiO<sub>2</sub>溶液を 100μl注入し 4 時間結紮した後、結紮を解き 1 週間放置した。比較対照として無処理群を用意した。膀胱内注入の 1 週間後に全採血を行い血清生化学検査、および腎臓・肝臓を 10%ホルマリンにsamplingし、パラフィン切片からHE (ヘマトキシリン・エオジン：武藤化学社) 染色標本を作製した。

2) 尾静脈投与. ヌードマウスの尾静脈に 30G×19mmの針 (エムエス社) と 1mlシリンジを用いて 0.1~0.5%(w/v) TiO<sub>2</sub>溶液を 100μl投与した。比較対照として無処理群を用意した。投与1週間後に全採血を行い血清生化学検査、および腎臓・肝臓を 10%ホルマリンにsamplingし、パラフィン切片からHE (ヘマトキシリン・エオジン) 染色標本を作製した。

## 12. *in vivo* 治療実験における US 照射方法

膀胱がん細胞株RT112 を用いてヌードマウスに皮下腫瘍を作成した。1 週間後に皮下腫瘍形成を確認し、無処理群、TiO<sub>2</sub>ナノ粒子溶液注入群、生理食塩水注入×US照射群、TiO<sub>2</sub>ナノ粒子溶液注入×US照射群の 4 群を用意した。TiO<sub>2</sub>ナノ粒子溶液注入群は 10 倍希釈した pentobarbiturate 12.5mg / bodyにて麻酔をかけたマウスの皮下腫瘍に 29G×1/2”マイジェクターを用いて直接 0.1% (w/v) TiO<sub>2</sub>ナノ粒子を 30μl注入したのみのも、生理食塩水注入×US照射群は麻酔したマウス皮下腫瘍に直接、生理食塩水を 30μl注入し、さらにUSを 5w、120sec照射したもの、TiO<sub>2</sub>ナノ粒子溶液注入×US照射群は麻酔したマウス皮下腫瘍に直接 0.1% (w/v) TiO<sub>2</sub>ナノ粒子を 30μl注入し、さらにUSを 5w、120sec照射したものである。day0 から 2 日おきにday12 まで皮下腫瘍体積を測定し、day0、day 1 で溶液注入×US照射の各処理を行った。

### 13. 膀胱がん細胞膀胱内注入による膀胱がん同所移植モデルの作製

6週齢ヌードマウス雌に、pentobarbiturate 12.5mg / bodyを29G×1/2”マイジェクターにて、麻酔をかけた後、キムタオル上にてマウスの四肢をビニールテープで固定した。カテーテルをマウス尿道から膀胱内に挿入し、余分な尿を1mlシリンジ（Terumo社）及び27G×3/4”の針（Terumo社）にて除去した。新しい1mlシリンジに0.25%トリプシンを採り100μl膀胱内に注入し、30分間静置後、シリンジを外してトリプシンを除去しカテーテルを尿道に挿入した状態で激しく動かすことで膀胱内を慎重に擦過し、出血させた。1mlシリンジにPBS（-）を採り、膀胱内にPBS（-）を注入して出血を洗い流し、PBS（-）を取り除いた後、カテーテルを挿入した状態で3-0ナイロン縫合糸（ネスコスーチャー：アルフレッサファーマ社）で尿道を結紮した（図9）。1mlシリンジにLuciferase遺伝子導入膀胱がん細胞株RT112<sup>LUC</sup>のD-MEM懸濁液（ $4 \times 10^7$  cells/mlに調整）を採り、50μl膀胱内注入（ $2 \times 10^6$  cells注入）し、カテーテルを抜いてマウス飼育ゲージの給水筒を外し、結紮したまま4時間放置した。4時間後、disposableのメス（FEATHER DISPOSABLE SCALPEL：フェザー安全剃刀社）にて結紮解除し予後観察した。

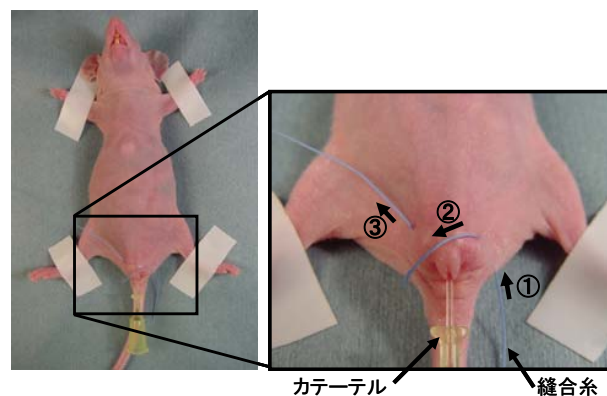


図9 マウス尿道結紮方法

ネンブタール麻酔を施したマウスの四肢を固定し、尿道にカテーテルを挿入した後、円形丸針手術用縫合糸にて尿道の周囲を結紮した。

## 14. Luciferin-Luciferase 反応による定量法

### 1) *in vitro*

Luciferase遺伝子導入膀胱がん細胞株RT112<sup>LUC</sup>を96well plateに段階希釈にて播種した。各wellに生理食塩水で0.25mg/mlの濃度に調整したD-Luciferin (SynChem OHG社)を100 $\mu$ l加え、5分間静置した。Luciferin投与の5分後にLuciferase発光を測定する装置であるPhoton imager (Φ-IMAGER : Biospace社)内に96well plateを設置し、5分間に発光した回数と場所を測定した。Luciferin-Luciferase反応により発光した回数はcpm (count per minutes)として数値化することができ、生体内の腫瘍の大きさを蛍光強度として非侵襲的に可視化・定量化することが可能である。

### 2) *in vivo*

Luciferase遺伝子導入膀胱がん細胞株RT112<sup>LUC</sup>をヌードマウスに移植した動物移植モデル(皮下移植モデル・膀胱内同所移植モデル)を気化麻酔であるフォーレン(イソフルラン : アボットジャパン社)のBoxに入れて麻酔をかけた。十分に麻酔が効いた状態で、生理食塩水にて25mg/ml濃度に調整したD-Luciferinを、マイジェクターを用いて100 $\mu$ l腹腔内投与した。

気化麻酔 Boxに戻し、5分間放置した後、Luciferin投与の5分間後にPhoton imager内にマウスを仰向けにセットし、5分間に発光した回数と場所を測定した。

## 15. 膀胱組織凍結切片による免疫組織化学染色法

膀胱内同所移植モデルマウスを頸椎脱臼にて安楽死させた。サーフロー留置針外筒を尿道から膀胱内に挿入し、余剰な尿を除去、PBS (-) にて洗浄した後、1mlシリンジにOCTコンパウンド (Tissue-Tek社) を採り、膀胱内に 100 $\mu$ l 注入した。その後、メツェンバウム剪刀と無鉤鑷子を用いて開腹し、膀胱をsampling後、トリミングしてケース (Tissue-Tek クリオモルド 3 号) に入れ、さらに上からOCTコンパウンドにて十分に満たし、ドライアイス上にて凍結・包埋した (-80°C保存)。膀胱凍結ブロックをクライオスタット (Tissue-Tek Cryo3) にて5 $\mu$ mの厚さにスライスし、スライドガラス (MICRO SLIDES GLASS : Moto Pure Chemicals社) に貼り付けた。凍結切片を貼り付けたスライドガラスをドライヤーの冷風で3時間風乾し、氷上にて10%中間緩衝ホルマリン溶液に10分間浸し固定した。milliQにて洗浄した後、3% $H_2O_2$  in MeOH溶液にslideを20分間浸漬し、流水洗浄2分間、PBS (-) 洗浄5分間3回の工程を行った後、Dakoペンで膀胱組織周囲を囲み、3% スキムミルク in PBS (-) を添加し25分間湿潤器内にて静置することでブロッキングした。

一次抗体が rabbit IgG の場合は、3% スキムミルク in PBS にて100倍に希釈した一次抗体を300 $\mu$ l 添加し、1時間静置 (湿潤器内)。PBS (-) 洗浄5分間を3回行い、一次抗体を除去した後、二次抗体として anti-rabbit / HRP を300 $\mu$ l 添加し、30分間静置 (湿潤器内) した。一次抗体が mouse IgG の場合は Polymer immuno-complex 法を用い、3% スキムミルク in PBS (-) にて適当な希釈倍率 (表8) で希釈した一次抗体と、二次抗体 (HRP 標識した anti-mouse IgG goat Ab) を混合し1時間反応させ、その後、正常マウス血清 (Mouse Serum Normal : Dako 社) を total volume の 1/20 量添加し、1時間の静置により、一次抗体との非結合部位となる余剰な二次抗体反応基をブロッキングしたものを膀胱組織切片に300 $\mu$ l 添加し、1時間静置した (湿潤器内)。

PBS (-) 洗浄5分間を3回行い、DAB を調整し、適量を滴下した (湿潤器内)。染色を確認したら milliQ 水にて洗浄した。slide をヘマトキシリンに浸し2分間染色後、10分間流水

洗浄した。余分な水分を除き、Ethanol (99.5) にて脱水を 3 度行った後、Xylene にて透徹を 3 度行った。カバーガラス 24×24 に MOUNT-QUICK を適量のせ、空気が入らないよう注意して封入し、平坦な場所で十分に乾燥させた。

表8 一次抗体がmouse由来の場合における抗体希釈比率

	一次抗体	希釈溶液	二次抗体
250倍希釈	mouse anti-EpCAM	: 3%スキムミルク in PBS (-)	: anti-mouse/HRP = 1 : 124 : 124 (μl)
1000倍希釈	mouse anti-CD44v6	: 3%スキムミルク in PBS (-)	: anti-mouse/HRP = 1 : 499 : 499 (μl)

## 16. 統計分析

本論文に示した数値はすべて平均 (mean) ± 標準偏差 (SD) にて表示し、標本間での有意差検定には Student's *t*-test を用いた。両側検定にて  $P < 0.05$  を統計学的有意とした。

## 第 5 章 結果

本研究では、*in vitro*におけるEpCAM・CD44v6の2つの抗原発現解析にて、実験に使用する膀胱がん細胞株選択及びLuciferase遺伝子強制発現株の作成・単離から始まり、US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用による活性酸素の発生確認、US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用での殺細胞効果検討実験、細胞死の形態評価、そして、活性酸素のScavengerを用いた活性酸素発生抑制実験を行った。*in vivo*における実験ではヌードマウスを用いたTiO<sub>2</sub>ナノ粒子の生体毒性有無の確認、TiO<sub>2</sub>ナノ粒子の生体内動態解析、皮下腫瘍モデルを用いた*in vivo*治療実験、そして、膀胱がん同所移植モデルの作成を行った。

**1. 膀胱がん細胞株の選択.** ヒト膀胱がん細胞株である RT112、5637、UMUC-3 を用いて抗EpCAM抗体及び、抗CD44v6抗体にて cultureSlide による細胞での免疫化学染色、及びFCMを行い膀胱がん細胞株における抗原発現解析を行った(図10,11)。免疫化学染色における解析において、RT112及び5637の細胞株では、EpCAM・CD44v6が共に発現していたが(図10a,b,d,e)、UMUC-3ではEpCAMの発現が確認できず、また、CD44v6の発現も弱いことが観察された(図10c,f)。FCMにおける解析も同様に、RT112及び5637の細胞株では、EpCAM・CD44v6が共に発現し(図11a,b)、UMUC-3ではCD44v6は発現しているが、EpCAMの発現は確認できなかった(図11c)。そこで、一般的な腫瘍マーカーとして知られるEpCAM(Epithelial Cell Adhesion Molecule)及びCD44v6の2つの抗原が強発現している膀胱がん細胞株としてRT112を選択し、以降の実験に用いることとした。



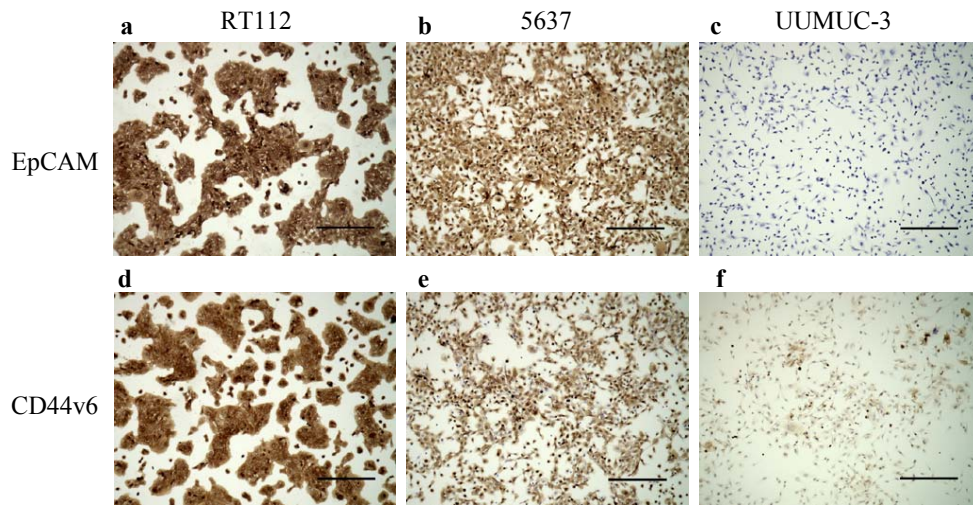


図10 CultureSlideを用いた細胞の免疫化学染色写真  
 抗EpCAM抗体、抗CD44v6抗体を用いて免疫化学染色により膀胱がん細胞株での抗原発現解析を行った。  
**a.**RT112におけるEpCAM発現 **b.**5637におけるEpCAM発現 **c.**UUMUC-3におけるEpCAM発現  
**d.**RT112におけるCD44v6発現 **e.**5637におけるCD44v6発現 **f.**UUMUC-3におけるCD44v6発現  
 (bar : 300  $\mu$  m)

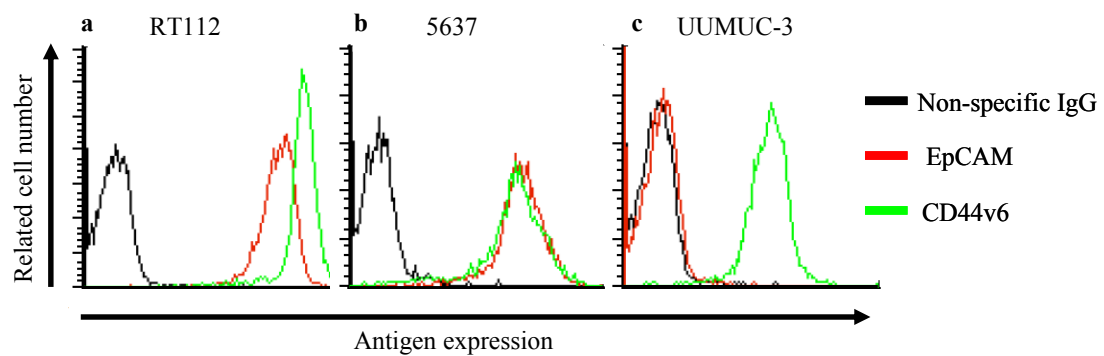
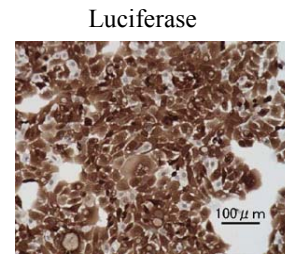


図11 FCMによる抗原発現解析  
 抗EpCAM抗体、抗CD44v6抗体及びNon-specific抗体を用いてFCMによる抗原発現解析を行った。Non-specific抗体は黒線、抗EpCAM抗体は赤線、そして抗CD44v6抗体は緑線です。  
**a.**RT112におけるEpCAM・CD44v6発現 **b.**5637におけるEpCAM・CD44v6発現  
**c.**UUMUC-3におけるEpCAM・CD44v6発現

## 2. 膀胱がん細胞株RT112 へのLuciferase遺伝子導入と

**Luciferase発現細胞株の樹立.** 膀胱がん細胞株RT112 を用いた*in vivo*モデル作製時に、非侵襲的に可視化できるようにLuciferase遺伝子を恒常的に発現している細胞株を作製することとした。免疫化学染色によるEpCAM・CD44v6 の抗原発現解析において選択した膀胱がん細胞株RT112 に、当研究室において作製したプラスミド



Luciferase  
図12 CultureSlideを用いた細胞の免疫化学染色写真  
抗Luciferase抗体を用いて免疫化学染色により膀胱がん細胞株T112LUCでの抗原発現解析を行った。

(図 4) を用いてLuciferase遺伝子を導入しLuciferase活性を持った膀胱がん細胞株RT112<sup>LUC</sup>を樹立した。

RT112<sup>LUC</sup>をcultureSlideによる細胞の免疫化学染色法にて抗Luciferase 抗体にて染色したところ細胞質が染色されていることが観察でき、RT112 にLuciferase遺伝子が導入され強制発現されていることが確認された (図 12)。

## 3. Luciferase強制発現膀胱がん細胞株RT112<sup>LUC</sup>の細胞数・腫瘍体積とLuciferase活性との相

**関性確認.** Luciferase遺伝子導入膀胱がん細胞株RT112<sup>LUC</sup>を用いて*in vitro*における細胞数とLuciferase活性との相関性の有無を確認した。96well plateにRT112<sup>LUC</sup>を段階希釈にて播種し、各wellにLuciferinを加え一定時間後のLuciferase活性 (cpm) を*in vivo* imaging system (photon imager) にて測定した。その結果、両者の間には強い正の相関性があることが確認された (図 13a)。さらに、RT112<sup>LUC</sup>をヌードマウスの皮下に移植した*in vivo*における皮下腫瘍モデルでの腫瘍体積とLuciferase活性との相関性確認も行った。RT112<sup>LUC</sup>皮下移植の 1 週間後にLuciferinを腹腔内投与し、一定時間でのLuciferase活性 (cpm) を*in vivo* imaging system (photon imager) にて測定した。その結果、*in vitro*における細胞数とLuciferase活性ほどの相関性は無かったものの、*in vivo*においても腫瘍体積とLuciferase活性は正の相関関係にあることが確認できた (図 13b)。

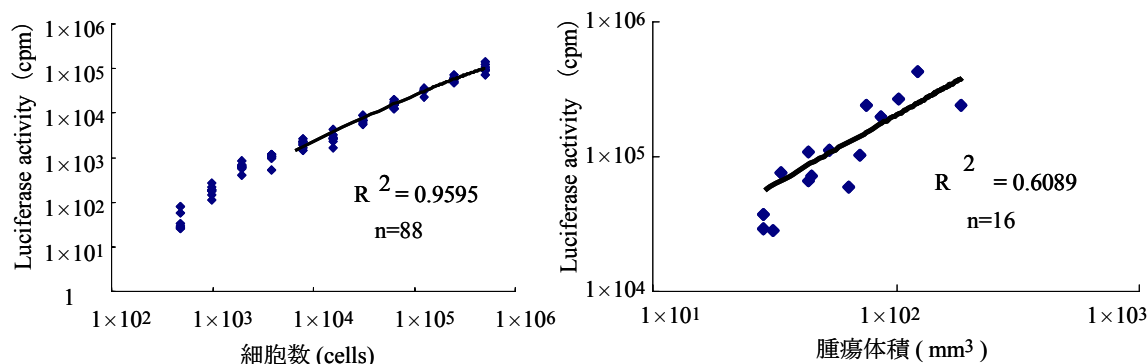


図13 Luciferase強制発現膀胱がん細胞株RT112<sup>LUC</sup>の細胞数・腫瘍体積とLuciferase活性との相関性確認  
 a. in vitroにおける細胞数とLuciferase活性との相関性確認  
 b. in vivoにおける皮下腫瘍体積とLuciferase活性との相関性確認

4. 活性酸素発生確認. US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法による活性酸素発生を確認するため、活性酸素検出用蛍光試薬であるSinglet Oxygen Sensor Green (SOSG) を用いて活性酸素種の1つである1重項酸素 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) の発生確認を行った。Negative controlとしてTiO<sub>2</sub>ナノ粒子を含まない (TiO<sub>2</sub> 0%) 群を比較対象とし、最終濃度 TiO<sub>2</sub> 0.1% (w/v) を含んだ群の2群にUS (2w, 120秒間) を照射した。活性酸素 (1重項酸素) の発生を蛍光値の上昇として検出でき、US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法にて活性酸素が発生すること確認した (図14)。

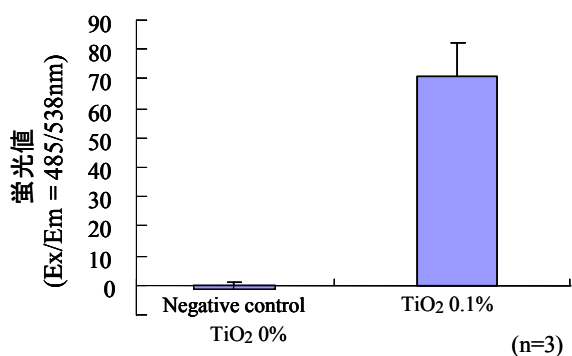


図14 活性酸素発生確認  
 US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用による活性酸素発生検出に活性酸素検出用蛍光試薬であるSOSGを用いて活性酸素種の1つである1重項酸素 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) の発生確認を行った。  
 Negative control群 (TiO<sub>2</sub> 0%) とTiO<sub>2</sub> 0.1%群にUS (2w, 120sec) を照射した。

5. US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法でのin vitroにおける殺細胞効果検討. US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法にて活性酸素の発生を確認したので、次にUS×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法が殺細胞効果を有するか検討を行った。PBS (-) 中に膀胱がん細胞株であるRT112 を懸濁させた状態でTiO<sub>2</sub>粒子を加えた群と加えなかった群のそれぞれに0~2wのUS出力条件で120秒間、USを照射し

た。USを照射していない無処理群のNegative controlの値を100%として相対値で示している。2w、120秒間の超音波出力条件においてのみTiO<sub>2</sub>粒子の有無の違いにより有意 ( $P<0.05$ ) な腫瘍細胞生存率の低下が確認された。対照的に0~1wのUS出力条件ではTiO<sub>2</sub>粒子の有無に関わらず腫瘍細胞の生存率に差は見られなかった (図15)。

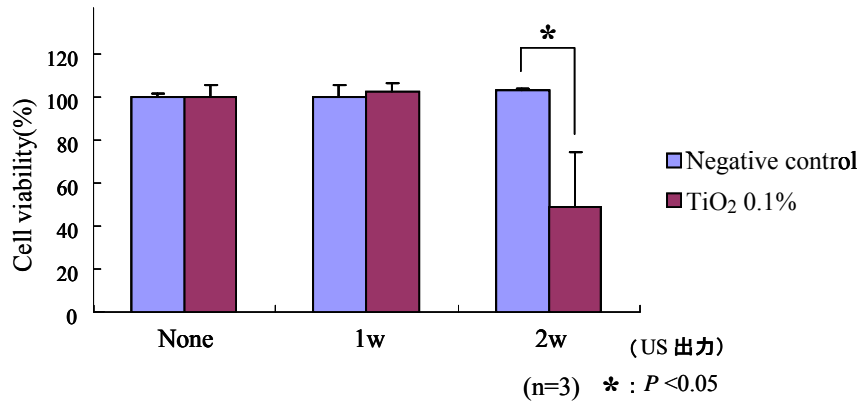


図15 殺細胞効果検討

US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用による殺細胞効果の検討を行った。Negative control群 (TiO<sub>2</sub> 0%) とTiO<sub>2</sub>最終濃度 0.1% (w/v) 群にUSを0~2w, 120secの条件で照射した。(mean±SD; Student's *t*-test)

**6. US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法による細胞死形態の評価.** US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法にて引き起こされた細胞死が、アポトーシスであるかネクローシスであるかを検証する目的で、アポトーシス検出用kitであるAnnexin-V-FLUOS Staining kitにて評価を行った。

無処理群、US照射のみの群、そして、US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用の群を用意し、2wのUS出力条件で120秒間、USを照射した。US照射直後(0時間後)、6時間後、12時間後にFCMにて評価した。UL・URの区画に含まれるのは死細胞の分布であり、LLは生細胞、LRはアポトーシスを起こした細胞の分布である。

無処理群、US照射のみの群では、US照射後の時間に関係なくLLの区画に80%以上の細胞が分布し、残りの細胞はULまたはURに分布していた。また、LRの区画では細胞分布が0%であった(図16a,b,c,d,e,f)。US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用群では、US照射直後(図16g)はLLに80%以上の細胞分布を確認できたが、6時間、12時間(図16h,i)と時間が経過するにつれてLL

からULへと細胞の分布が移動することが確認でき、US照射 12 時間後ではLL区画の細胞分布が 19.18%、UL区画及びUR区画の細胞分布が合計 80.82%となった。また、LR区画の細胞分布はいずれも 0%であった。

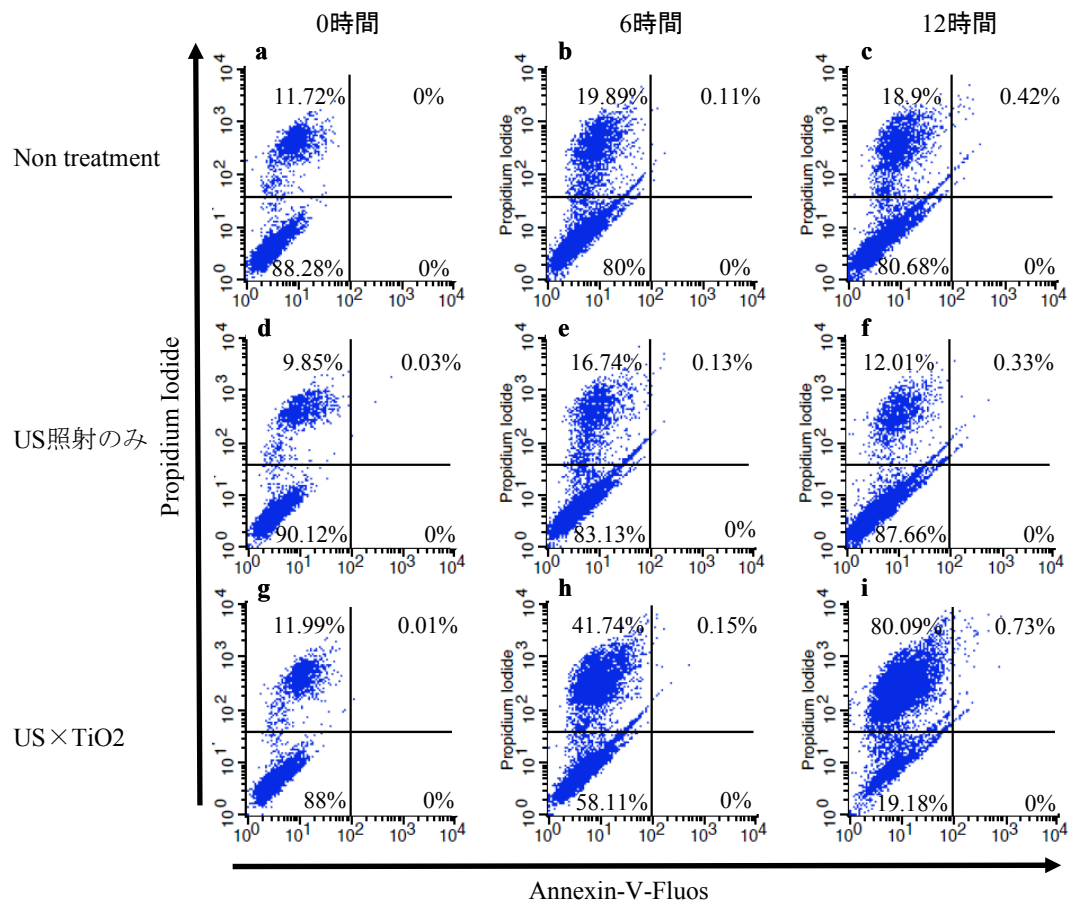


図16 US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用による細胞死の形態検討  
Annexin-V-FluosとPropidium Iodideによる染色をFCMにて評価した。  
a-cは無処理群 d-fはUS照射群 g-iはUS×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用群を示している。  
US照射の0時間後、6時間後、12時間後にFCMにて評価した。  
UL. 死細胞の分布を示す (Annexin-V-Fluos- / Propidium Iodide+)  
UR. ネクロシスを起こした細胞の分布を示す (Annexin-V-Fluos+ / Propidium Iodide+)  
LL. 生細胞の分布を示す (Annexin-V-Fluos- / Propidium Iodide-)  
LR. アポトーシスを起こした細胞の分布を示す (Annexin-V-Fluos+ / Propidium Iodide-)

7. Scavenger処理による活性酸素発生抑制実験. PBS (-) 中に、活性酸素種の1つである1重項酸素の検出用蛍光試薬 (SOSG) を加え、さらに活性酸素のScavengerであるL-histidineを加えた群を追加した。それぞれの群に 2wのUS出力条件で 120 秒間、USを照射した。図14と同様にTiO<sub>2</sub>粒子を含まない群には1重項酸素の発生が認められず、TiO<sub>2</sub>粒子を含んでいる群では1重項酸素の発生が確認できた。さらに、pH7.4に調整したL-histidineを最終濃度0.2Mで添加した群に同条件でUSを照射した結果、1重項酸素の発生が有意に ( $P<0.001$ ) 抑制されていることが確認できた (図17)。

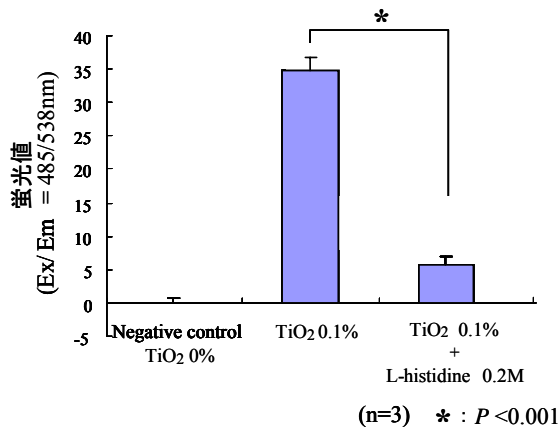


図17 Scavenger処理による活性酸素発生抑制試験  
US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用による殺細胞効果の検討を行った。Negativecontrol群 (TiO<sub>2</sub> 0%) とTiO<sub>2</sub>最終濃度0.1% (w/v) 群、さらに、pH7.4に調整したL-histidineを最終濃度0.2Mで添加した群にUSを0~2w, 120secの条件で照射した。(mean±SD ; Student's *t*-test)

8. Scavenger処理による殺細胞効果抑制実験. PBS (-) 中に膀胱がん細胞RT112を懸濁させた状態でTiO<sub>2</sub>粒子を加えなかった群 (0%) と加えた群 (0.1% (w/v))、さらに活性酸素のScavengerである

L-histidineを添加した群を追加し、それぞれの群に 2wのUS出力条件で 120 秒間、USを照射した。

図15と同様、2wのUS出力条件においてのみTiO<sub>2</sub>粒子の有無の違いによって有意な

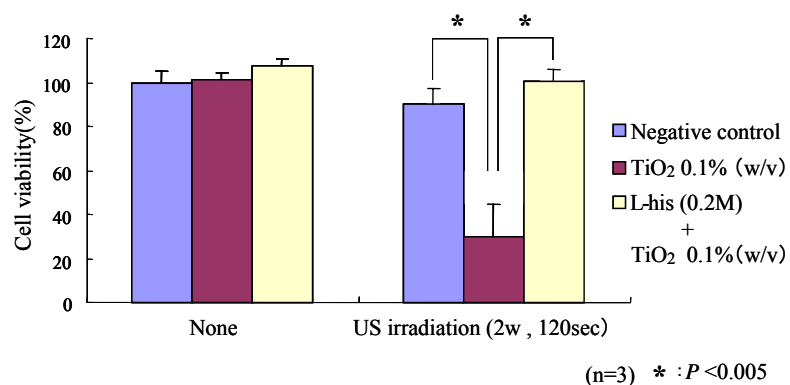


図18 Scavenger処理による殺細胞効果抑制試験  
US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子×Scavenger併用による殺細胞効果抑制の検討を行った。Negativecontrol群 (TiO<sub>2</sub> 0%) とTiO<sub>2</sub>最終濃度0.1% (w/v) 群、さらに、pH7.4に調整したL-histidineを最終濃度0.2Mで添加した群にUSを0~2w, 120secの条件で照射した。(mean±SD ; Student's *t*-test)

( $P<0.005$ ) 腫瘍細胞生存率の低下が確認された。さらに、L-histidineを添加した群に同条件でUSを照射した結果、腫瘍細胞生存率の有意な ( $P<0.005$ ) 向上が認められた。対照的にUSを照射しなかった群ではTiO<sub>2</sub>粒子の有無、L-histidine添加の有無に関わらず腫瘍細胞の生存率に差は見られなかった (図 18)。

**9. TiO<sub>2</sub>マウス膀胱内注入による生体への安全性確認.** 膀胱内に 0.1~0.5% (w/v) のTiO<sub>2</sub>溶液を 100μl注入し 4 時間結紮した後、結紮を解き 1 週間放置した。膀胱内注入の 1 週間後に全採血を行い血清生化学検査および腎臓のsamplingを行い、パラフィン切片からHE染色標本作製した。血清生化学検査において無処理群とTiO<sub>2</sub>溶液注入群との間で、腎機能を評価する指標であるBUN (尿素窒素) 及びCre (クレアチニン) の各項目において有意な変化は見られず(表 9)、さらにHE染色標本による病理所見においても変化は見られなかった(図 19)。

表9 血清生化学検査 腎臓 (mean±SD)

	Non treatment	0.1% TiO <sub>2</sub>	0.5% TiO <sub>2</sub>
BUN (mg/dl)	33.8 ± 3.86	36 ± 4.62	29.8 ± 3.59
Cre (mg/dl)	0.5 ± 0.21	0.3 ± 0.05	0.5 ± 0.26

(BUN : Blood urea nitrogen • Cre : Creatinine)

n=4 each

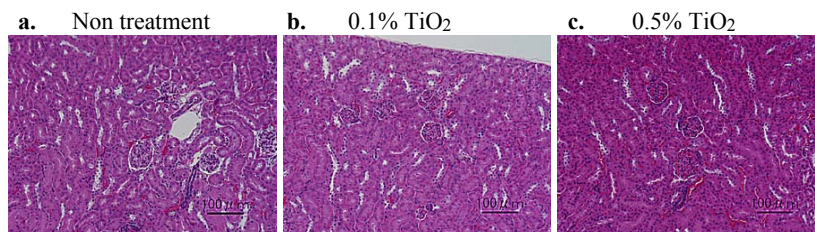


図19 TiO<sub>2</sub>溶液マウス膀胱内注入後のマウス腎臓のH・E染色切片写真  
マウス膀胱内に0.1~0.5% (w/v) のTiO<sub>2</sub>溶液を100μl注入し4時間結紮した後、結紮を解き1週間放置した。膀胱内注入の1週間後に腎臓のパラフィン切片からHE染色標本作製した。

a. 無処理群 b. 0.1% TiO<sub>2</sub>膀胱内注入群 c. 0.5% TiO<sub>2</sub>膀胱内注入群

**10. TiO<sub>2</sub>溶液マウス尾静脈投与による生体への安全性確認.** 局所投与からは逸れるが、TiO<sub>2</sub>溶液の全身投与による急性毒性の有無を確認する目的で、マウス尾静脈投与による全身投与を追加実験として行った。マウス尾静脈に 0.1~0.5% (w/v) のTiO<sub>2</sub>溶液を 100μl投与しTiO<sub>2</sub>溶液の全身投与を行った。比較対照群として無処理群を用意した。投与 1 週間後に全採血を行い血清生化学検査および腎臓・肝臓をsamplingし、パラフィン切片からHE染色標本作製した。

作製した。血清生化学検査において無処理群と比べて 0.1% TiO<sub>2</sub>溶液注入群では腎機能・肝機能の各項目において有意な変化は見られなかったが（表 10,11）、0.5% TiO<sub>2</sub>溶液注入群の肝機能での全項目において、有意差は無いものの、数値の上昇が確認された（表 11）。腎臓・肝臓におけるHE染色標本による病理切片においては、無処理群・0.1% TiO<sub>2</sub>溶液注入群・0.5% TiO<sub>2</sub>溶液注入群の間で変化は見られなかった（図 20）。

表10 血清生化学検査 腎臓 (mean±SD)

	Non treatment	0.1% TiO <sub>2</sub>	0.5% TiO <sub>2</sub>
BUN (mg/dl)	22.7 ± 4.73	20.3 ± 2.1	20.7 ± 4.5
Cre (mg/dl)	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.2	under 0.3

n=3 each

表11 血清生化学検査 肝臓 (mean±SD)

	Non treatment	0.1% TiO <sub>2</sub>	0.5% TiO <sub>2</sub>
T-Bil (mg/dl)	0.97 ± 0.61	0.833 ± 0.4	1.67 ± 0.47
GGTP (IU/L)	18.3 ± 9.1	13.3 ± 3.51	45.3 ± 22.9
ALP (IU/L)	282.7 ± 11.6	270.3 ± 15	334 ± 76.2

n=3 each

T-Bil : Total bilirubin  
GGTP :  $\gamma$  - glutamyltranspeptitase  
ALP : Alkaline phosphatase

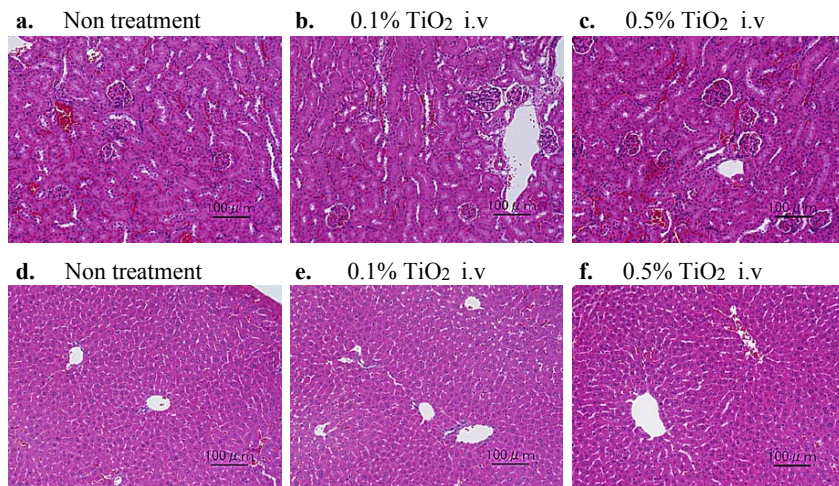


図20 TiO<sub>2</sub>溶液マウス尾静脈注入後のマウス腎臓と肝臓のHE染色切片写真  
マウス尾静脈に0.1~0.5% (w/v) のTiO<sub>2</sub>溶液を100  $\mu$ l投与し、1週間後の腎臓・肝臓のパラフィン切片からHE染色標本作製した。

a. 無処理群 腎臓 b. 0.1% TiO<sub>2</sub>尾静脈投与群 腎臓 c. 0.5% TiO<sub>2</sub>尾静脈投与群 腎臓  
d. 無処理群 肝臓 e. 0.1% TiO<sub>2</sub>尾静脈投与群 肝臓 f. 0.5% TiO<sub>2</sub>尾静脈投与群 肝臓



11. 蛍光標識-TiO<sub>2</sub>溶液 尾静脈投与による生体内TiO<sub>2</sub>動態解析. TiO<sub>2</sub>溶液全身投与におけるTiO<sub>2</sub>粒子代謝経路を解析する目的で蛍光標識-TiO<sub>2</sub>溶液を尾静脈投与し、in vivo imaging systemにて経時的に観察した。蛍光色素（Cy-7 NHS Ester : GE Healthcare : MW=900、Ex / Em = 743 / 767

nm) をTiO<sub>2</sub>ナノ粒子表面に修飾したものをマウス尾静脈より投与し、経時的にin vivo imaging system (OV 110 : Olympus)

にてマウス腹側から蛍光を測定した。蛍光測定条件はExposure time 3000 msec、minimum-maximum : 0-300にて測定した。投与直後は蛍光標識-TiO<sub>2</sub>粒子が全身を巡っているため、全身から蛍光が観察された。投与後 3 時間までに膀胱に集積が見られ、その後 6 時間以降は肝臓付近に蛍光が観察され、徐々に減少していく様子が観察された (図 21)。

12. 皮下腫瘍モデルマウスへのTiO<sub>2</sub>局所投与×US照射によるin vivo治療実験. US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法のin vivoにおける効果の有無を確認する目的で皮下腫瘍モデルを用いたin vivo治療実験を行った。ヌードマウスの右背に膀胱がん細胞株RT112を1×10<sup>6</sup> cells注入し、1週間後に皮下腫瘍の形成を確認した。この皮下腫瘍に0.1% (w/v) TiO<sub>2</sub>溶液を30μl直接注入し5w、120秒のUS条件にてday0、day1にUS照射実験を行った (図 22)。比較対照群として、無処理群・皮下腫瘍にTiO<sub>2</sub>溶液を30μl直接注入し、USを照射しなかった群・そして皮下腫瘍に生理食塩水を30μl直接注入し5w、120秒の条件でUSを照射した群の3群を用意した。無処理群とTiO<sub>2</sub>溶液注入群では一定した腫瘍増殖が確認されたのに対し、生理食塩水注入×US照射群ではday0～day3にかけて一時的に腫瘍増殖が弱まり、その後、増殖が確認された。一方、TiO<sub>2</sub>注入×US照射群では腫瘍体積の増加がみられず、day12での無処理群・TiO<sub>2</sub>溶液

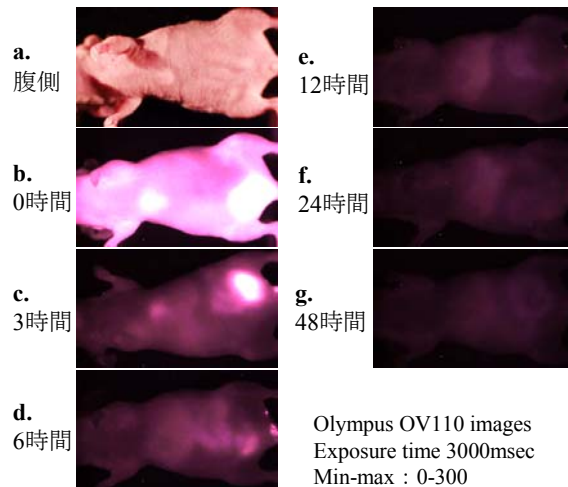


図21 in vivo imaging system (OV110) 画像 蛍光標識TiO<sub>2</sub>溶液をマウス尾静脈に100μl注入後のTiO<sub>2</sub>ナノ粒子の生体内動態を経時的に観察した。 a. 腹側からの写真 b. 投与直後 c. 投与3時間後 d. 投与6時間後 e. 投与12時間後 f. 投与24時間後 g. 投与48hr後

直接注入群・生理食塩水注入×US照射群の3群とTiO<sub>2</sub>注入×US照射群との間での腫瘍体積に有意な ( $P<0.05$ ) 差が見られた (図 22)。

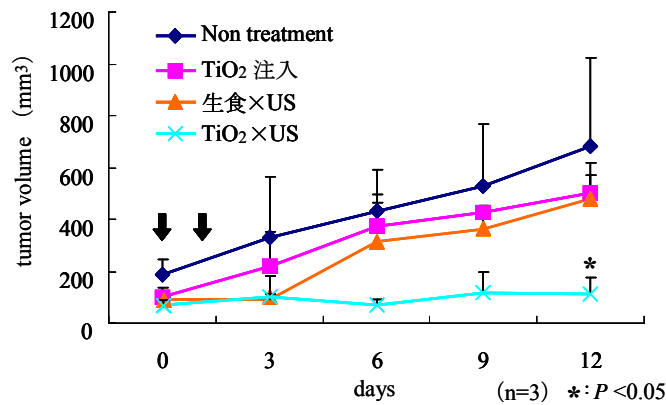


図22 皮下腫瘍でのin vivo治療実験  
膀胱がん細胞株RT112皮下移植モデルマウスでのUS×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法の効果検証実験。直径5mm程度の皮下腫瘍を作成し、無処理群・TiO<sub>2</sub>溶液 (0.1% (w/v)) 注入群・生理食塩水注入×US照射群・TiO<sub>2</sub>溶液 (0.1% (w/v)) 注入×US照射群の4群を比較した。US出力は5w、120secの条件で、day0・day1 (↓) のUS照射スケジュールにて実験を行った。(mean±SD ; Student's *t*-test)

13. 表在性膀胱がん同所移植モデルの作製及び Luciferin—Luciferase 反応による膀胱内腫瘍の定量化. 将来の臨床応用を視野に入れた pre-clinical study として膀胱がん同所移植モデルを用いた *in vivo* 治療実験を予定している。その前段階として膀胱がん同所移植モデルの作製を行った。in vivo imaging system (Photon imager) にて膀胱内同所移植モデルマウスの膀胱内腫瘍の経時的変化を観察した。膀胱内腫瘍の増殖が Luciferase 活性の強度 (cpm) で定量化され、経時的に増殖している様子が観察できた (図 23)。

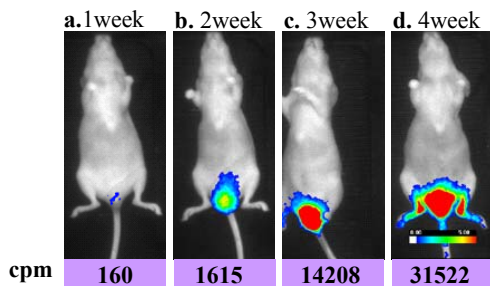


図23 Photon imager images  
ヌードマウス膀胱内に、膀胱がん細胞株RT112<sup>LUC</sup>を注入し、膀胱がん同所移植モデルマウスを作成した。RT112<sup>LUC</sup>膀胱内注入後、経過時間的にin vivo imaging system (Photon imager) で測定した。  
a. 膀胱内注入1週間後 (cpm : 160) b. 膀胱内注入2週間後 (cpm : 1615) c. 膀胱内注入3週間後 (cpm : 14208) d. 膀胱内注入4週間後 (cpm : 31522)

**14. 免疫組織化学染色による評価.** 膀胱がん細胞株RT112<sup>LUC</sup>を膀胱内に移入し、移入4週間後の膀胱内同所移植モデルマウスの膀胱組織凍結切片を作製し、免疫組織化学染色法を行った。抗EpCAM抗体・抗CD44v6抗体・抗Luciferase抗体の、それぞれの抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、いずれも腫瘍が粘膜層にのみ存在し、筋層にまで達していないことが確認できた（図24）。

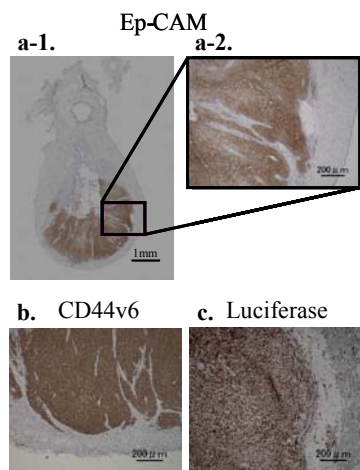


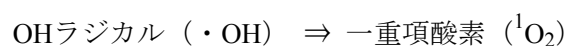
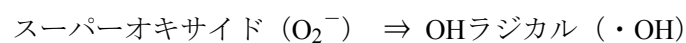
図24 膀胱がん同所移植モデルマウス膀胱免疫組織化学染色写真  
RT112<sup>LUC</sup>膀胱内注入の4週間後に膀胱を採取し、凍結切片作製した後、各種抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

- a-1. 抗EpCAM抗体による免疫染色写真（低倍率）
- a-2. 抗EpCAM抗体による免疫染色写真（高倍率）
- b. 抗CD44v6抗体による免疫染色写真
- c. 抗Luciferase抗体による免疫染色写真

## 第 6 章 考察

**活性酸素発生.** 酸素はあらゆる元素の中で最もエネルギー効率がよく、生物はこの酸素を利用して摂取した栄養分を分解し、エネルギーを生成することによって生命活動を維持している。酸素の中でも特に酸化力が強い酸素を活性酸素と呼ぶ。基底状態の酸素分子 ( $^3\text{O}_2$ ) は三重項である特異な電子配列をもつため、 $^3\text{O}_2$ の反応性は低い。そのため酸素障害は反応性の高い酸素の還元分子種 ( $\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$ ) および励起分子種 ( $^1\text{O}_2$ ) によって標的分子が酸化されることで生じる。この反応性の高い酸素の分子種をまとめて活性酸素 (狭義) と呼ぶが、細胞成分とくに不飽和脂質の酸化物 ( $\text{LOO}\cdot$ 、 $\text{L}\cdot$ 、 $\text{LOOH}$ 、 $\text{LO}\cdot$ ) も同様の作用を示すことから、これらも含めて活性酸素 (広義) と呼ぶこともある<sup>[17]</sup>。

USを液相 (PBS等) に照射することのみによってもキャビテーションの作用により活性酸素種の一つであるOHラジカルが発生するという報告もあるが<sup>[11]</sup>、今回の研究においては一重項酸素の発生を確認できたものの、OHラジカルは確認できなかった (data not shown)。その理由として、活性酸素の検出に操作が簡便な活性酸素検出用蛍光試薬を用いて間接的に測定したために感度が低くなっていた可能性が考えられる。しかし、活性酸素は非常に反応性の高い分子であり、ひとつの活性酸素種から連鎖的に反応が起き他の活性酸素種を生成することが知られているので、1種類でも活性酸素種発生が確認できればその他の活性酸素種も発生している可能性は十分にあると考えられる<sup>[21, 23]</sup>。以下にその一例を示す。



また、一般的にスーパーオキシド・OHラジカル・一重項酸素の3種は特に酸化力の強い活性酸素種とされている。

図 15 におけるUS×TiO<sub>2</sub>での殺細胞効果検討実験で、溶液中にTiO<sub>2</sub>ナノ粒子が存在している状態で2w, 120秒間照射のUS照射条件でのみ腫瘍細胞生存率が有意に低下しているとい

う結果が得られ、さらに、同じ条件において活性酸素（特に一重項酸素とOHラジカル）の ScavengerであるL-histidine<sup>[14, 21, 22]</sup>を添加することで腫瘍細胞生存率の著しい向上が見られた（図 18）。これらの結果から、TiO<sub>2</sub>ナノ粒子が水溶液中に存在している状態でUSを照射し、ある一定のUS出力条件（今回は 2w , 120 秒）を満たすことで、膀胱がん細胞株RT112 に対して十分な殺細胞効果が得られ、それが活性酸素種の 1 つである一重項酸素に由来していることが示唆された。

今回の実験における活性酸素による酸化ストレスは、細胞毒性を引き起こし、殺細胞効果を得られたが、極微量の活性酸素による酸化ストレスは逆に細胞の活性を高める作用を示す（ホルミシス効果）という報告もある<sup>[24, 25]</sup>。また、活性酸素種が寄与する殺細胞効果の細胞死形態はApoptosis・Necrosisの両方を支持する論文がある<sup>[26-31]</sup>。本研究における Annexin-V-FLUOS Staining kitを用いたUS×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法での細胞死形態検証実験では、アポトーシスを起こした細胞が分布する区画であるLR区画の分布が 0%であり、UL・URの区画に分布が偏っていた。このことから早期Apoptosisでは無いことが示唆された為、US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法による細胞死はNecrosisによるものであると考えられる（図 16）。

#### **膀胱がん細胞株 RT112 の抗原発現解析及び Luciferase 遺伝子強制発現株の作成。**

最終目標である正常細胞に副作用の少なく腫瘍にのみ特異的・能動的に集積する active targetingを達成するため、TiO<sub>2</sub>ナノ粒子の表面に修飾する抗体を決定することを目的として、腫瘍に広く発現している抗原であるEpCAMとCD44v6 という 2 つの抗原をtarget分子として着目した。EpCAM（Epithelial Cell Adhesion Molecule：上皮細胞接着因子）とCD44v6 は各種癌組織に発現が認められている抗原である（表 12）<sup>[32-35]</sup>。

表12 がん種別EpCAM・CD44v6の陽性率及び症例数

がん種	EpCAM	症例数	CD44v6	症例数
膀胱がん	33-67%	97	86%	49
非小細胞性肺がん	86-94%	592	65%	150
大腸がん	100%	91	68%	60
膵がん	92-96%	63	—	—
卵巣がん	—	—	57-86%	113
肝細胞がん	15-28%	126	—	—

固相面に抗体を修飾するには、高価な抗体を大量に使用することが必須となる。この 2 種類の抗原に対する抗体のクローンは、当研究室にて大量に産生できる体制が整っていたため、EpCAM・CD44v6 の 2 種類を target 分子として選択した。免疫化学染色法および FCM により抗原発現解析を行った結果、本研究に使用した膀胱がん細胞株である RT112 には EpCAM・CD44v6 の両方が高発現していることを確認することができた。

このRT112 に当研究室において作製したプラスミド (図 4) を用いてLuciferase遺伝子を導入し、Luciferase強制発現細胞株であるRT112<sup>LUC</sup>を作製・単離した。RT112<sup>LUC</sup>の単離には、プラスミドにLuciferase遺伝子と共に組み込まれているVenusの蛍光を用いてFACS Ariaにて sortingを行った。Venusとは、オワンクラゲ由来の改変GFP (約 240 アミノ酸) の 46 番目のフェニルアラニンをロイシンに置換することで、その発色団形成反応が、ほ乳類細胞の最適培養条件である 37°Cで飛躍的に促進されている蛍光たんぱく質である<sup>[20]</sup>。このRT112<sup>LUC</sup>を用いた*in vitro*における細胞数とLuciferase活性 (cpm) 及び、*in vivo*での皮下腫瘍モデルマウスにおける腫瘍体積とLuciferase活性 (cpm) は強い正の相関関係にあり (図 13)、RT112<sup>LUC</sup>の*in vivo* モデルは、Luciferin-Luciferase反応を利用した非侵襲的な腫瘍体積評価に十分耐え得るものであると考えられる<sup>[36]</sup>。

**TiO<sub>2</sub>粒子の生体への安全性.** 本研究で使用しているTiO<sub>2</sub>ナノ粒子の結晶構造は正方晶系のアナターゼ型で、粒子径が 30~80nmであり粒子表面に適切な濃度のポリエチレングリコール (PEG) が修飾されている。粒子表面にPEG修飾を施すことで、水溶液中で水和させることが可能となり、粒子同士が必要以上に凝集することを防いでいる。また、PEG修飾によ

るストレス化により生体内への取り込みを抑制し、毒性を抑える働きも知られている<sup>[37-41]</sup>。ナノスケールの材料は凝集しやすい性質を持つことが知られているが<sup>[39]</sup>、毒性が形状や性質といった物理的性質にも関係することから凝集の程度も大きな要因となることが考えられる。

今回の実験に使用しているTiO<sub>2</sub>ナノ粒子溶液の生体への安全性を検証する目的で、マウス膀胱内に尿道を介して注入したマウスを用いて、膀胱と尿管により繋がっている腎臓の機能障害を対象とした血清生化学検査、および腎臓のHE染色組織切片により生化学的・病理学的に評価を行った。血清生化学検査の検査項目であるが、腎機能障害の指標としてBUN（尿素窒素）とCre（クレアチニン）について測定した。各項目の詳細は以下に示す（表 13）。血清生化学検査、および腎臓のHE染色組織切片評価の結果、無処理群とTiO<sub>2</sub>ナノ粒子溶液を膀胱内に注入した群との間に有意な差が見られなかったことから、TiO<sub>2</sub>ナノ粒子膀胱内注入における、尿管から腎臓への逆流、および膀胱内腔壁からのTiO<sub>2</sub>ナノ粒子取り込みによる生体への影響は低いということが示唆された。さらに、このTiO<sub>2</sub>ナノ粒子溶液をマウス尾静脈から注入することによる全身投与実験も追加実験として行った。TiO<sub>2</sub>ナノ粒子溶液マウス尾静脈投与実験では腎臓に加え、排出系として重要な役割を持つ肝臓の機能障害についても検討を行った。肝機能障害の指標としてはT-Bil（ビリルビン）、GGTP（ $\gamma$ -GTP）そして、ALP（アルカリホスファターゼ）について測定した。（表 13）<sup>[42]</sup>。

表13 腎機能・肝機能検査項目

腎機能	BUN（尿素窒素）	: タンパク質の代謝産物で、腎障害による腎臓の排泄機能低下に伴い数値が上昇。
	Cre（クレアチニン）	: 老廃物の一種、腎不全や糸球体腎炎などによる腎臓の機能低下に伴い数値が上昇。
肝機能	T-Bil（ビリルビン）	: 肝・胆道系疾患に伴いビリルビンの排泄障害が起こり、血液中のビリルビンが上昇。
	GGTP（ $\gamma$ -GTP）	: 肝臓・腎臓・膵臓等に含まれる酵素、肝・胆道系疾患に伴い数値が上昇。
	ALP（アルカリホスファターゼ）	: 肝臓・胆管・骨・腸管等に含まれる酵素、肝障害や胆道閉塞の他、骨疾患・甲状腺機能亢進症等でも数値が上昇。

血清生化学検査、腎臓・肝臓のHE染色組織切片において、無処理群と比較して0.1%（w/v）TiO<sub>2</sub>ナノ粒子投与群では変化は見られなかったが、0.5%（w/v）TiO<sub>2</sub>ナノ粒子投与群では血



清生化学検査の数値に差が見られた。このことから、TiO<sub>2</sub>ナノ粒子を、ある一定濃度以上投与することにより、特に肝臓への機能障害による生体毒性を引き起こす可能性があると考えられる。しかし、今回の実験系で用いた 0.1%濃度であればマウスにおけるTiO<sub>2</sub>ナノ粒子の全身投与でも生体への急性毒性の可能性は低いということが示唆された。

TiO<sub>2</sub>ナノ粒子溶液の尾静脈注入により全身投与されたTiO<sub>2</sub>ナノ粒子の生体内動態を解析する目的で、蛍光色素 (Cy-7: MW=900、Ex / Em = 743 / 767 nm) をTiO<sub>2</sub>ナノ粒子 (0.1% (w/v)) に標識したものをマウス尾静脈から 100μl注入し、経時的に測定を行った。投与直後はTiO<sub>2</sub>ナノ粒子が全身を巡っているために全身から蛍光発光が観察されたが、0~3 時間の間に蛍光色素が膀胱に集積し、尿として排泄されていることが確認できた。また、投与 3 時間以降には粒子が肝臓に集積し始めているのが確認され、腸管からの蛍光も観察できた。その後、時間の経過とともに蛍光の減少が認められた (図 21)。

腎臓の構造的・機能的な基本単位はネフロンであり、ネフロンは腎小体と尿細管から成る。腎小体は主として血液濾過の場所として知られ、糸球体と、糸球体を包み尿細管に連なるBowman嚢から構成されている。糸球体での濾過は、普通の濾紙では分別できないようなコロイド分子や比較的大きな分子を溶媒から分別する限外濾過であり、血漿に溶解しているが蛋白質とは結合していない、分子量約 7 万まで、分子直径約 3nmまでの物質を通過させる。また、肝臓の機能には炭水化物・蛋白質・脂肪・ビタミン・ホルモンの代謝、胆汁の生成・分泌、尿素の生成によるアンモニア処理、アルコール分解などの解毒機能、そして、血中異物の除去と処理がある。この中で特に、血中異物の除去・処理ではクリアランス機能とKupffer細胞の貪食能が知られている<sup>[43]</sup>。

今回の研究で用いているTiO<sub>2</sub>ナノ粒子の粒子径は 30~80nmであり、3nmより大きいこと、また、蛍光標識酸化チタンナノ粒子尾静脈投与実験の結果から、0~3 時間の間に膀胱に集積し、尿として排泄されているのはTiO<sub>2</sub>ナノ粒子に標識されていない未標識の蛍光色素であると考えられ、尾静脈投与により体内に取り込まれたTiO<sub>2</sub>ナノ粒子は主に肝臓を介して代謝

されている可能性が示唆された。

**in vivo治療実験.**ヌードマウスを用いた皮下腫瘍モデルによる治療実験では、US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法において治療効果があるという結果であった。*in vitro*での実験においてUSとTiO<sub>2</sub>ナノ粒子の組み合わせによる細胞毒性が活性酸素に由来するという結果（図 15）が得られているので、*in vivo*での治療効果も活性酸素が腫瘍増殖抑制に関与していることが考えられる。

生理食塩水注入×US照射群では、day0～day3にかけて腫瘍の増殖が弱まっているが、これはUS照射のみの影響がでた為と考えられる。この結果は、液相にUSを照射しただけでも微量ながら活性酸素が発生するという知見から、微量の活性酸素種が腫瘍増殖に一時的に影響したものと考えられる。今回の実験ではUS照射のみでも腫瘍増殖に一時的な影響が確認されたが、day6以降は無処理群と遜色ない増殖を示していることから、US照射のみでは決定的な腫瘍増殖抑制には関与しないことが考えられ、*in vivo*でのUS×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法の有意性が示唆された（図 22）。

本実験は、皮下腫瘍にTiO<sub>2</sub>ナノ粒子溶液を直接注入しているため、臨床応用の観点からすると現実的な手法とは言えない。しかしながら、US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子局所投与治療実験として*in vivo*での効果の有無を検討する目的で行ったものである。

**表在性膀胱がん同所移植モデル.**Luciferase強制発現細胞株であるRT112<sup>LUC</sup>を、トリプシン処理したヌードマウス膀胱内に注入することで、表在性膀胱がん同所移植モデルマウスの作成を行った<sup>[44]</sup>。先に記述したように、RT112<sup>LUC</sup>は腫瘍体積とLuciferase活性との間に正の相関関係があることを確認できている細胞株である（図 13）。この細胞を用いて作成した膀胱がんモデルマウスは、腹腔内にLuciferinを投与することによりLuciferin-Luciferase反応を起こし、膀胱内の腫瘍増殖を発光の数値（cpm）として非侵襲的に定量化することが可能なモデルマウスである<sup>[36]</sup>。さらに、この表在性膀胱がんモデルマウスの膀胱を採取し、免疫組織化学染色法により腫瘍形態の評価を行ったところ、腫瘍が膀胱内粘膜層にのみ存在して

おり、筋層にまで達していないことが確認できたことから、適切な表在性膀胱がんモデルであると見なすことができる（図 24）。

しかし、この同所移植モデルマウス作成における問題点として、技術的に難しく 1 匹作成するのに手間がかかり過ぎること、膀胱がん細胞の定着率が高くないこと、そして、Luciferase 活性（cpm）値の増加率に差が出やすいことが挙げられる。今後、同所移植モデルマウスを用いた膀胱内局所投与実験を行っていく際、安定したモデルマウスを大量に作成する為にも、これらの問題を解決することは重要であると考えられる。

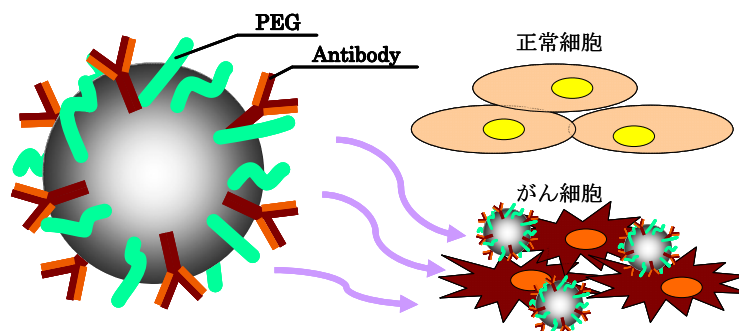
## 第7章 総括

## 本研究の結論

US×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法において、活性酸素の一種である1重項酸素の発生を確認し、それが*in vitro*・*in vivo*での実験系において細胞毒性に関与することを示唆した。また、TiO<sub>2</sub>ナノ粒子のマウス膀胱内注入及び尾静脈投与による毒性確認実験において、ある一定の濃度であればTiO<sub>2</sub>ナノ粒子の生体への毒性は低いことを示唆した。以上のことから、本研究のメインテーマであるUS×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法は表在性膀胱がんに対する新規治療法として、抗がん剤やBCGの膀胱内注入のような既存の再発予防治療法と同様、膀胱内局所投与における効果的な治療法となり得る可能性を示した。

## 今後の展望

TiO<sub>2</sub>ナノ粒子に腫瘍特異的な抗体を修飾したimmuno-TiO<sub>2</sub> nanoparticleの作成を検討中である。immuno-TiO<sub>2</sub> nanoparticleを用いた治療法のschemeを以下に示す。



Scheme1 immuno-TiO<sub>2</sub> nanoparticleを用いたactive targeting概略図

この粒子を膀胱内局所に投与した状態でUSを照射することにより、抗腫瘍効果の効率を更に高めたいと考えている。この抗体修飾TiO<sub>2</sub>は粒子表面に、腫瘍特異的に発現している抗原に対する抗体を修飾したものである。この抗体をパイロット分子として腫瘍組織近傍にTiO<sub>2</sub>ナノ粒子を集積させ、正常細胞への副作用を出来る限り抑えた治療を行うことが可能である。この方法により、TUR-BTによっても除去しきれなかった微小な腫瘍組織や、膀胱内

に浮遊しているがん細胞を選択的に攻撃・消滅させることが期待できる。現在、腫瘍特異的な抗体には、EpCAMとCD44v6 の二つを候補として考えており、そのどちらも今回の研究に用いた膀胱がん細胞株であるRT112 に高発現していることを確認済みである。加えて、その他の抗原に対する抗体もパイロット分子としてTiO<sub>2</sub>ナノ粒子表面に修飾できることから、腫瘍の抗原発現に対応した最適な組み合わせで治療を行うことが可能である。

本研究においてUSは重要な要素を占めるものであるが、臨床の現場で既に実用化されているUS利用法の1つに、医療用音波診断装置がある。これは超音波エコーにより生体内の様子を観察するものだが、これを今回の治療法と組み合わせることも可能ではないかと考えられる。USの波長を使い分けることで膀胱内腫瘍の位置を超音波診断により正確に把握し、診断結果をもとにUS×TiO<sub>2</sub>ナノ粒子併用療法により治療を行うことも技術的には可能である。

また、表在性膀胱がん以外でも肝臓がん（標準治療は外科的切除に加え、局所凝固療法、抗がん剤の動脈注入などの局所療法が行われている。さらに他臓器に転移しにくいがんである）や表在性の胃がん<sup>[45-50]</sup>、そして、腹膜播種を起こしたがんなど、局所投与が可能であり、かつUVの届かない臓器のがんに対しても応用が可能な治療法になり得るのではないかと考えている。

## 参考文献

- 1.内藤誠二. 膀胱癌のすべて 基礎から実地診断まで: 株式会社メジカルビュー社; 2005.
- 2.日本泌尿器科学会. 膀胱癌取り扱い規約 第3版. 東京: 金原出版株式会社; 2001.
- 3.Josephson D, Pasin E, Stein JP. Superficial bladder cancer: part 2. Management. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2007 Apr;7(4):567-81.
- 4.Hirao Y, Ozono S, Momose H, Okajima E, Hiramatsu T, Yoshida K, et al. Prospective randomized study of prophylaxis of superficial bladder cancer with epirubicin: the role of a central pathology laboratory. Nara Uro-oncology Research Group. (NUORG). *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994;35 Suppl:S36-40.
- 5.Herr HW, Laudone VP, Badalament RA, Oettgen HF, Sogani PC, Freedman BD, et al. Bacillus Calmette-Guerin therapy alters the progression of superficial bladder cancer. *J Clin Oncol.* 1988 Sep;6(9):1450-5.
- 6.Witjes JA, Vriesema JL, Brinkman K, Bootsma G, Barentsz JO. Mycotic aneurysm of the popliteal artery as a complication of intravesical BCG therapy for superficial bladder cancer. Case report and literature review. *Urol Int.* 2003;71(4):430-2.
- 7.Cheng CW, Ng MT, Chan SY, Sun WH. Low dose BCG as adjuvant therapy for superficial bladder cancer and literature review. *ANZ J Surg.* 2004 Jul;74(7):569-72.
- 8.Witjes JA. Management of BCG failures in superficial bladder cancer: a review. *Eur Urol.* 2006 May;49(5):790-7.
- 9.Zuluaga MF, Lange N. Combination of photodynamic therapy with anti-cancer agents. *Curr Med Chem.* 2008;15(17):1655-73.
- 10.Kennedy JC, Marcus SL, Pottier RH. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results. *J Clin Laser Med Surg.* 1996 Oct;14(5):289-304.
- 11.Shimizu N, Ogino C, Dadjour MF, Ninomiya K, Fujihira A, Sakiyama K. Sonocatalytic facilitation of hydroxyl radical generation in the presence of TiO<sub>2</sub>. *Ultrason Sonochem.* 2008 Sep;15(6):988-94.
- 12.Wang J, Sun W, Zhang Z, Xing Z, Xu R, Li R, et al. Treatment of nano-sized rutile phase TiO<sub>2</sub> powder under ultrasonic irradiation in hydrogen peroxide solution and investigation of its sonocatalytic activity. *Ultrason Sonochem.* 2008 Apr;15(4):301-7.
- 13.Wang J, Guo B, Zhang X, Zhang Z, Han J, Wu J. Sonocatalytic degradation of methyl orange in the presence of TiO<sub>2</sub> catalysts and catalytic activity comparison of rutile and anatase. *Ultrason Sonochem.* 2005 Apr;12(5):331-7.
- 14.Hachimine K, Shibaguchi H, Kuroki M, Yamada H, Kinugasa T, Nakae Y, et al. Sonodynamic therapy of cancer using a novel porphyrin derivative, DCPH-P-Na(I), which is devoid of photosensitivity. *Cancer Sci.* 2007 Jun;98(6):916-20.
- 15.Rosenthal I, Sostaric JZ, Riesz P. Sonodynamic therapy--a review of the synergistic effects of drugs

- and ultrasound. *Ultrason Sonochem.* 2004 Sep;11(6):349-63.
16. 安藤常世. 基礎工学 流体の力学 三訂版: 培風館.
  17. 中野稔 浅, 大柳善彦. 活性酸素 生物での生成・消去・作用の分子機構: 共立出版; 1993.
  18. Tangestaninejad S, Moghadam M, Mirkhani V, Mohammadpoor-Baltork I, Salavati H. Sonochemical and visible light induced photochemical and sonophotochemical degradation of dyes catalyzed by recoverable vanadium-containing polyphosphomolybdate immobilized on TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Ultrason Sonochem.* 2008 Jul;15(5):815-22.
  19. Dias JM, Alvim-Ferraz MC, Almeida MF, Rivera-Utrilla J, Sanchez-Polo M. Waste materials for activated carbon preparation and its use in aqueous-phase treatment: a review. *J Environ Manage.* 2007 Dec;85(4):833-46.
  20. Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol.* 2002 Jan;20(1):87-90.
  21. Kukreja RC, Kearns AA, Zweier JL, Kuppusamy P, Hess ML. Singlet oxygen interaction with Ca<sup>2+</sup>-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ Res.* 1991 Oct;69(4):1003-14.
  22. Huang D, Okada K, Komori C, Itoi E, Suzuki T. Enhanced antitumor activity of ultrasonic irradiation in the presence of new quinolone antibiotics in vitro. *Cancer Sci.* 2004 Oct;95(10):845-9.
  23. Feix JB, Kalyanaraman B. Production of singlet oxygen-derived hydroxyl radical adducts during merocyanine-540-mediated photosensitization: analysis by ESR-spin trapping and HPLC with electrochemical detection. *Arch Biochem Biophys.* 1991 Nov 15;291(1):43-51.
  24. Basavaraju SR, Easterly CE. Pathophysiological effects of radiation on atherosclerosis development and progression, and the incidence of cardiovascular complications. *Med Phys.* 2002 Oct;29(10):2391-403.
  25. Bonner WM. Phenomena leading to cell survival values which deviate from linear-quadratic models. *Mutat Res.* 2004 Dec 2;568(1):33-9.
  26. Li JH, Song DY, Xu YG, Huang Z, Yue W. In vitro study of haematoporphyrin monomethyl ether-mediated sonodynamic effects on C6 glioma cells. *Neurol Sci.* 2008 Sep;29(4):229-35.
  27. Kim D, Miyazaki Y, Nakashima T, Iwashita T, Fujita T, Yamaguchi K, et al. Cytotoxic action mode of a novel porphyrin derivative isolated from harmful red tide dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *J Biochem Mol Toxicol.* 2008;22(3):158-65.
  28. Chen S, Cheng AC, Wang MS, Peng X. Detection of apoptosis induced by new type gosling viral enteritis virus in vitro through fluorescein annexin V-FITC/PI double labeling. *World J Gastroenterol.* 2008 Apr 14;14(14):2174-8.
  29. Suzuki N, Okada K, Chida S, Komori C, Shimada Y, Suzuki T. Antitumor effect of acridine orange under ultrasonic irradiation in vitro. *Anticancer Res.* 2007 Nov-Dec;27(6B):4179-84.
  30. Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL, et al. Free radical biology and



- medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006 Sep;291(3):R491-511.
31. Wehlin L, Lofdahl M, Lundahl J, Skold M. Reduced intracellular oxygen radical production in whole blood leukocytes from COPD patients and asymptomatic smokers. *Chest.* 2005 Oct;128(4):2051-8.
32. Trzpis M, Bremer E, McLaughlin PM, de Leij LF, Harmsen MC. EpCAM in morphogenesis. *Front Biosci.* 2008;13:5050-5.
33. Rodrigo JP, Rinaldo A, Devaney KO, Shaha AR, Ferlito A. Molecular diagnostic methods in the diagnosis and follow-up of well-differentiated thyroid carcinoma. *Head Neck.* 2006 Nov;28(11):1032-9.
34. Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol.* 2004 Jan;35(1):122-8.
35. Heider KH, Kuthan H, Stehle G, Munzert G. CD44v6: a target for antibody-based cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2004 Jul;53(7):567-79.
36. Edinger M, Sweeney TJ, Tucker AA, Olomu AB, Negrin RS, Contag CH. Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models. *Neoplasia.* 1999 Oct;1(4):303-10.
37. Elbayoumi TA, Torchilin VP. Tumor-Specific Anti-Nucleosome Antibody Improves Therapeutic Efficacy of Doxorubicin-Loaded Long-Circulating Liposomes against Primary and Metastatic Tumor in Mice. *Mol Pharm.* 2008 Dec 2.
38. Mastrobattista E, Crommelin DJ, Wilschut J, Storm G. Targeted liposomes for delivery of protein-based drugs into the cytoplasm of tumor cells. *J Liposome Res.* 2002 Feb-May;12(1-2):57-65.
39. Moghimi SM. The effect of methoxy-PEG chain length and molecular architecture on lymph node targeting of immuno-PEG liposomes. *Biomaterials.* 2006 Jan;27(1):136-44.
40. Matsumura Y, Gotoh M, Muro K, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y, et al. Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer. *Ann Oncol.* 2004 Mar;15(3):517-25.
41. Maruyama K. PEG-immunoliposome. *Biosci Rep.* 2002 Apr;22(2):251-66.
42. 金井正光 奥. 臨床検査法提要 改訂第 32 版: 金原出版株式会社; 2005.
43. 飯島修一 影, 石川栄世, 島峰徹郎. 組織病理アトラス: 文光堂; 1994.
44. Watanabe T, Shinohara N, Sazawa A, Harabayashi T, Ogiso Y, Koyanagi T, et al. An improved intravesical model using human bladder cancer cell lines to optimize gene and other therapies. *Cancer Gene Ther.* 2000 Dec;7(12):1575-80.
45. Jiang Z, Teng GJ, Chen BA, Xu ZF, Hu J, Shao ZY. Local effects of retrovirally transduced endostatin-expressing human umbilical cord blood CD34+ cells on transplanted malignancy in a mouse model of hepatic cancer. *Cell Transplant.* 2008;17(8):969-75.
46. MacDonald WC, Owen DA. Gastric carcinoma after surgical treatment of peptic ulcer: an analysis of morphologic features and a comparison with cancer in the nonoperated stomach. *Cancer.* 2001 May 1;91(9):1732-8.

47. Moser C, Lang SA, Kainz S, Gaumann A, Fichtner-Feigl S, Koehl GE, et al. Blocking heat shock protein-90 inhibits the invasive properties and hepatic growth of human colon cancer cells and improves the efficacy of oxaliplatin in p53-deficient colon cancer tumors in vivo. *Mol Cancer Ther.* 2007 Nov;6(11):2868-78.
48. Nishimura M, Fujiyama Y. A successful treatment for metastatic liver tumors from endocrine carcinoma of the stomach. *Oncol Rep.* 2007 May;17(5):1077-81.
49. Otsuji E, Kuriu Y, Okamoto K, Ochiai T, Ichikawa D, Hagiwara A, et al. Outcome of surgical treatment for patients with scirrhus carcinoma of the stomach. *Am J Surg.* 2004 Sep;188(3):327-32.
50. Sun L, Ye HY, Zhang YH, Guan YS, Wu H. Epidermal growth factor receptor antibody plus recombinant human endostatin in treatment of hepatic metastases after remnant gastric cancer resection. *World J Gastroenterol.* 2007 Dec 7;13(45):6115-8.

## 謝辞

国立がんセンター東病院臨床開発センターがん治療開発部部长 兼 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻がん先端生命科学分野准教授、松村保広先生に心から感謝いたします。大変やりがいのあるテーマを与えて頂き、大きな責任を持って研究に取り組むことが出来ました。また、がん治学開発部の安永正浩先生、黒田順一郎先生、釘持広知先生、古賀宣勝先生、永野達也先生、三好千香先生、椎名薫さん、進藤博子さん、大津美沙さん、三江直子さん、阿部恵子さんには、研究を始め多くのことを指導して頂き、心から感謝しています。

共同研究をさせて頂いた TOTO 株式会社の曾根崎修司博士、金平幸輝博士に深く感謝いたします。至らない点が多々あったにも関わらず、多くの時間を割いて丁寧に教えて頂きました。

また、同研究科の空閑亘さん、厚海奈穂さん、稲塚歩佳さん、小野塚博子さん、金原左京さん、齋藤洋平さん、藤澤優さん、星野歩子さん、齋藤万里江さん、鈴木丞君、鷺見美幸さん、常田啓太君、相垣英さん、橋本侑季さん、大和田賢君にも心から感謝しています。みなさんがいたからこそ研究室での生活が有意義で楽しいものになりました。

この 2 年間で最も多くの時間を過ごしたがん治療開発部には、松村先生の穏やかな人柄の下、素晴らしい方々が集まっており、短い間でしたがその一員として大変充実した研究生生活を送れたことを嬉しく思っています。

最後になりましたが、常に支えてくれた両親、兄妹にも心から感謝の意を表して謝辞と致します。

2009 年 1 月 30 日

荒川 寛茂