

	あおき ひろし
氏名	青木 洋
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第1175号
学位授与の日付	平成16年 9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Therapeutic efficacy of targeting chemotherapy using local hyperthermia and thermosensitive liposome: evaluation of drug distribution in a rat glioma model (脳局所加温と熱感受性リポソームを用いた温熱化学療法の治療効果に関する研究:ラットグリオーマモデルにおける薬剤分布の検討)
論文審査委員	主査 教授 高橋 均 副査 教授 田中 隆一 副査 教授 西澤 正豊

## 博士論文の要旨

我々の施設では、悪性グリオーマに対して radiofrequency (RF) 組織内加温による温熱療法を開発し、多くの症例においてその優れた治療効果を認めている。しかし、この方法では腫瘍周囲脳組織内に浸潤する腫瘍細胞を効果的に加温することは困難である。そこで、脳内に浸潤した腫瘍細胞を治療する目的で、我々は一定の温度になると加温局所に封入された抗癌剤を放出する熱感受性リポソームを用いた温熱化学療法を開発した。本研究では、我々が作成した 40°C で封入アドリアマイシン (ADR) を放出する熱感受性リポソームを用い、実験脳腫瘍の局所温熱化学療法における ADR の組織内分布と抗腫瘍効果を検討した。

【方法】実験にはラット C6 グリオーマ細胞移植脳腫瘍モデルを用いた。加温は針電極による RF 組織内加温法を用い、熱電対温度センサーにより腫瘍および脳の温度をモニターしながら加温した。腫瘍辺縁部の設定温度を 37°C、38~40°C、40~42°C、43°C 以上の 4 群に分け、それぞれの温度に達した時点でリポソームに封入した ADR (liposomal ADR) 5 mg/kg を尾静脈より 30 分間かけて持続注入した。1) 治療 24 時間後に腫瘍を摘出し、凍結切片を作成した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて ADR の組織内分布を検討した。ADR 濃度は蛍光強度による検量線により定量化した。2) ADR+加温 (40~42°C) 群と liposomal ADR+加温 (40~42°C) 群の組織内 ADR 濃度を定量化し、比較検討した。3) 無治療群、liposomal ADR 単独群、liposomal ADR+加温 (38~40°C) 群、ADR+加温 (40~42°C) 群、liposomal ADR+加温 (40~42°C) 群、liposomal ADR+加温 (43°C 以上) 群の 6 群について生存日数を比較検討し、Wilcoxon's test にて検定した。

【結果】1) 加温温度による組織内 ADR 濃度は、37°C 群で  $7.2 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$ 、38~40°C 加温群で  $11.2 \pm 2.0 \mu\text{g/ml}$ 、40~42°C 加温群で  $21.1 \pm 4.4 \mu\text{g/ml}$ 、43°C 以上加温群で  $22.6 \pm 5.4 \mu\text{g/ml}$  であり、40°C 未満の領域に比べ 40°C 以上に加温された領域で有為 ( $p < 0.05$ ) 高い組織内 ADR

濃度を示した。40～42℃加温群と 43℃以上の加温群間では腫瘍内 ADR 濃度に有意差を認めなかった。2) ADR 群と liposomal ADR 群との比較を 40～42℃加温群について比較検討してみると、組織内 ADR 濃度は、ADR 投与群で  $12.5 \pm 1.8 \mu\text{g/ml}$ 、liposomal ADR 投与群で  $21.1 \pm 4.4 \mu\text{g/ml}$  であり、liposomal ADR 投与群では ADR 投与群に比し、有為に ( $p < 0.05$ ) 高い ADR の集積を認めた。3) 各治療群の平均生存日数は、無治療群で 21.3 日、liposomal ADR 単独群で 22.1 日、liposomal ADR+加温 (38～40℃) 群で 24.0 日、ADR+加温 (40～42℃) 群で 24.0 日、liposomal ADR+加温 (40～42℃) 群で 39.7 日、liposomal ADR+加温 (43℃以上) 群で 33.1 日であり、liposomal ADR+加温 (40～42℃) 群における生存日数が他の治療群に比べ有為に ( $p < 0.05$ ) 長く、最長生存日数は 55 日を観察した。

【考察】本実験において、熱感受性リポソームと局所加温の併用により、40℃以上に加温された領域において抗癌剤が高濃度に集積することが確認された。すなわち、40℃以上に加温されれば腫瘍部分のみならず、腫瘍細胞が浸潤する周囲脳組織内にも抗癌剤を分布させることができ、その結果、高い抗腫瘍効果が得られた。局所加温と熱感受性リポソームを用いる温熱化学療法は、これまで治療の対象となくかった腫瘍周囲脳内に浸潤する腫瘍細胞にも顕著な抗腫瘍効果を発揮でき、悪性グリオーマに対する効果的な targeting chemotherapy となり得ることが期待できる。

## 審査結果の要旨

我々の施設では、悪性グリオーマに対して radiofrequency (RF) 組織内加温による温熱療法を開発し、多くの症例においてその優れた治療効果を認めている。しかし、この方法では腫瘍周囲脳組織内に浸潤する腫瘍細胞を効果的に加温することは困難である。そこで、脳内に浸潤した腫瘍細胞を治療する目的で、申請者らは一定の温度になると加温局所に封入された抗癌剤を放出する熱感受性リポソームを用いた温熱化学療法を開発した。本研究では、申請者らが作成した 40℃で封入アドリアマイシン (ADR) を放出する熱感受性リポソームを用い、実験脳腫瘍の局所温熱化学療法における ADR の組織内分布と抗腫瘍効果を検討した。

【方法】実験にはラット C6 グリオーマ細胞移植脳腫瘍モデルを用いた。加温は針電極による RF 組織内加温法を用い、熱電対温度センサーにより腫瘍および脳の温度をモニターしながら加温した。腫瘍辺縁部の設定温度を 37℃、38～40℃、40～42℃、43℃以上の 4 群に分け、それぞれの温度に達した時点でリポソームに封入した ADR (liposomal ADR) 5 mg/kg を尾静脈より 30 分間かけて持続注入した。1) 治療 24 時間後に腫瘍を摘出し、凍結切片を作成した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて ADR の組織内分布を検討した。ADR 濃度は蛍光強度による検量線により定量化した。2) ADR+加温 (40～42℃) 群と liposomal ADR+加温 (40～42℃) 群の組織内 ADR 濃度を定量化し、比較検討した。3) 無治療群、liposomal ADR 単独群、liposomal ADR+加温 (38～40℃) 群、ADR+加温 (40～42℃) 群、liposomal ADR+加温 (40～42℃) 群、liposomal ADR+加温 (43℃以上) 群の 6 群について生存日数を比較検討し、Wilcoxon's test にて検定した。

【結果】1) 加温温度による組織内 ADR 濃度は、37℃群で  $7.2 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$ 、38～40℃加温群で  $11.2 \pm 2.0 \mu\text{g/ml}$ 、40～42℃加温群で  $21.1 \pm 4.4 \mu\text{g/ml}$ 、43℃以上加温群で  $22.6 \pm 5.4 \mu\text{g/ml}$  であり、40℃未満の領域に比べ 40℃以上に加温された領域で有為に ( $p < 0.05$ ) 高い組織内 ADR 濃度を示した。40～42℃加温群と 43℃以上の加温群間では腫瘍内 ADR 濃度に有意差を認めなかった。2) ADR 群と liposomal ADR 群との比較を 40～42℃加温群について比較検討してみると、組織内 ADR 濃度は、ADR 投与群で  $12.5 \pm 1.8 \mu\text{g/ml}$ 、liposomal ADR 投与群で  $21.1 \pm 4.4 \mu\text{g/ml}$  であり、liposomal ADR 投

与群では ADR 投与群に比し、有為に ( $p < 0.05$ ) 高い ADR の集積を認めた。  
3) 各治療群の平均生存日数は、無治療群で 21.3 日、liposomal ADR 単独群で 22.1 日、liposomal ADR+加温 (38~40°C) 群で 24.0 日、ADR+加温 (40~42°C) 群で 24.0 日、liposomal ADR+加温 (40~42°C) 群で 39.7 日、liposomal ADR+加温 (43°C 以上) 群で 33.1 日であり、liposomal ADR+加温 (40~42°C) 群における生存日数が他の治療群に比べ有為に ( $p < 0.05$ ) 長く、最長生存日数は 55 日を観察した。

【考察】本実験において、熱感受性リポソームと局所加温の併用により、40°C 以上に加温された領域において抗癌剤が高濃度に集積することが確認された。すなわち、40°C 以上に加温されれば腫瘍部分のみならず、腫瘍細胞が浸潤する周囲脳組織内にも抗癌剤を分布させることができ、その結果、高い抗腫瘍効果が得られた。局所加温と熱感受性リポソームを用いる温熱化学療法は、これまで治療の対象となりにくかった腫瘍周囲脳内に浸潤する腫瘍細胞にも顕著な抗腫瘍効果を発揮でき、悪性グリオーマに対する効果的な **targeting chemotherapy** となり得ることが期待できる。

以上本研究は、脳組織に安全な 40°C の加温で封入 ADR を局所的に放出する熱感受性リポソームを作成し、実験脳腫瘍モデルにおいて熱感受性リポソームを用いる **targeting thermo-chemotherapy** の有用性を明らかにした点に学位論文としての価値を認める。