

でマグネタイトの微粒子を洗った。最後に 0.5ml ずつの注射用蒸留水を加えて再懸濁し、超音波処理を 30min 行い、マグネタイト濃度の測定を行った。

その後、Filter 滅菌された 1ml NPrCAP-SH (12.5 mg/EtOH ml) を加え、超音波処理を 30 分間行ない、室温にて 6 時間放置した。Amicon tube 8 本に 1.25ml ずつ入れ、4,000rpm で 20min 遠心し、沈殿に注射用蒸留水 0.5ml ずつを加え懸濁した。遠心 4,000rpm, 10min 後、注射用蒸留水 0.5ml ずつを加え懸濁した。この操作を引き続きもう 1 回行った。Amicon tube を逆さにして受け取り tube に装着し 200 μ l 注射用蒸留水を十字口に注ぎ、3500rpm, 2min で遠心した。8 本の amicon tube の試料を全量 2.5ml の注射用蒸留水に懸濁して一つの遠心管に集め、超音波

置 (大塚電子社製) を用いて測定した。

B-3 PEG 化マグネタイトのマクロファージ食食抑制効果

この実験では、三種類の微粒子を用いて、マクロファージによって食食される量を測定した。一つ目は、PEG を結合したマグネタイトで、NPr-CAP を結合させる直前のもの (以下 PEG/M)、二つ目は、PEG 以外のリンカーとして Sulfo-GMBS を結合したマグネタイトで、NPr-CAP を結合させる直前のもの (以下 Sulfo-GMBS/M)、三つ目はコントロールとして未修飾のマグネタイトである。実験の前日までに Macrophage-like cell である J774-1 細胞に必要な細胞数を準備した。また、実験日までに、同じ濃度に揃えたマグネタイト、PEG/M、Sulfo-GMBS/M の水分散コロイド溶液を用意した。実験前日に、6 ウェ

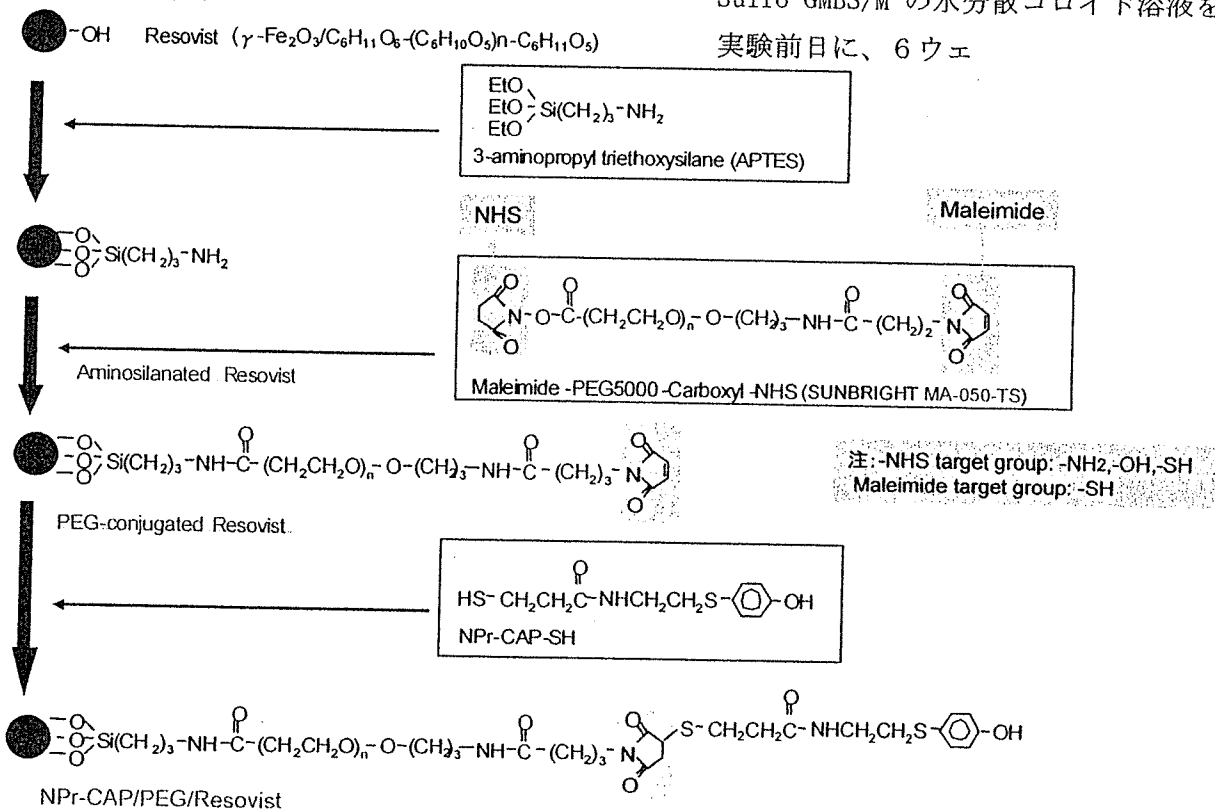


図1 NPrCAP/PEG/リゾビスト合成経路

20min 処理し再分散させた。作製した NPrCAP/PEG/リゾビストの粒子径は、動的光散乱法により、装

ルのマイクロプレート (旭テクノグラス社製) に 1 ウェル当たり、 1.8×10^6 細胞となるように播種を

した。実験は、コロイド溶液が三種類、細胞に取り込ませる時間が1時間、2時間の2条件、n=3で行い、セルカウント用のウェルも含めて、計28ウェル分の細胞を用意した。

準備したプレートの1ウェルの細胞をセルスクレイパーで剥がし、セルカウントをして1ウェル当たりの細胞数を求めた。一細胞当たりマグネタイト量が100pgとなるような濃度となるように、三種類のコロイド溶液をそれぞれ培地に添加し、マグネタイトコロイドを含んだ三種類の培地を20ml作製した。全てのウェルから培地を除き、三種類の培地含んだウェルをそれぞれ9ウェルずつ作製した。培地量は1ウェル当たり2mlずつ添加した。

培地を添加してから、1時間後、2時間後にそれぞれの培地を取り除き、PBSを加えて一回洗った後、2mlのPBSを加えて、セルスクレイパーを用いて細胞を15mlの遠沈管(旭テクノグラス社製)に回収した。2mlの細胞懸濁液のうち、0.1mlを別のマイクロ遠心チューブに移し、セルカウントに用い、残りは細胞内鉄濃度測定に用いた。細胞内鉄濃度測定に用いる液を、遠心分離(1000rpm, 5min)し、上清を捨てた。回収した細胞のペレットに12Nの塩酸を0.2ml加え、ペレットとマグネタイトを溶解させた。溶解したサンプルに、5%のトリクロロ酢酸溶液(和光純薬工業社製)を1ml加え、4°Cの冷蔵庫で30分間静置した。その後、1遠心分離(10000g, 20min)を行い、タンパク質、および脂質を除去した。その後、上清を別のマイクロチューブに移し、過酸化水素水10・1、チオシアン酸カリウム4mlを加えて、比色法にてマグネタイト量を測定した。

最後に、測定したマグネタイト量を同じウェルの細胞数で割ることで、一細胞当たりの食食されたマグネタイト量を算出した。

(倫理面への配慮)

ヒトに関連した実験ではないので、特に倫理面への配慮は必要ないと考えられる。

C. 研究結果

C-1 デキストランマグネタイト(リゾビスト)の発熱特性

リゾビストと従来使用していたマグネタイト(戸田工業社製)を用いて、高周波磁場照射下における発熱特性を調べた(図2)。

Controlとして使用した寒天では、発熱は全く見られなかった。従来使用していたマグネタイトでは、磁場照射5分後に30°C上昇するといった良好な発熱がみられたが、リゾビストは45°C以上のさらに高い発熱能がみられた。

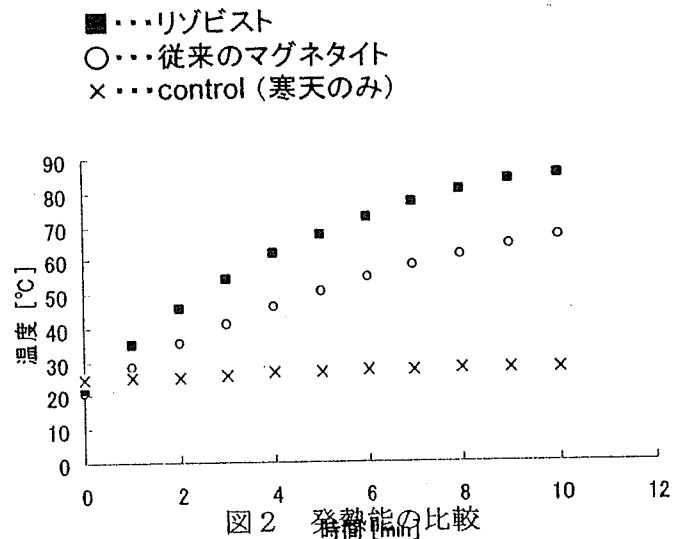


図2 発熱能の比較

C-2 NPrCAP/PEG/リゾビストの合成

C-1で、リゾビストが良好な発熱能を示したことから、リゾビストを原料として、NPrCAP/PEG/リゾビストを合成した。リゾビストは血中投与剤であるので、分散安定が非常に高かったが、合成のためにアミノシランカップリング剤を添加したところ、粒子の沈殿がみられた。そこで、リン酸緩衝液を用いて粒子を洗浄して過剰なアミノシラ

ンカップリング剤を除去し、超音波処理しながら PEG を添加させたところ、分散性の非常に高い粒子が生成した。

粒子径を測定したところ、平均粒子径は 75.7nm であった。さらに、粒子の分散安定性を評価するために、4℃の冷蔵庫内に保管した場合の粒子径の経時変化を測定した。図3に結果を示す。少なくとも9週間までは、平均粒子径が75-80nmに維持されているということがわかった。

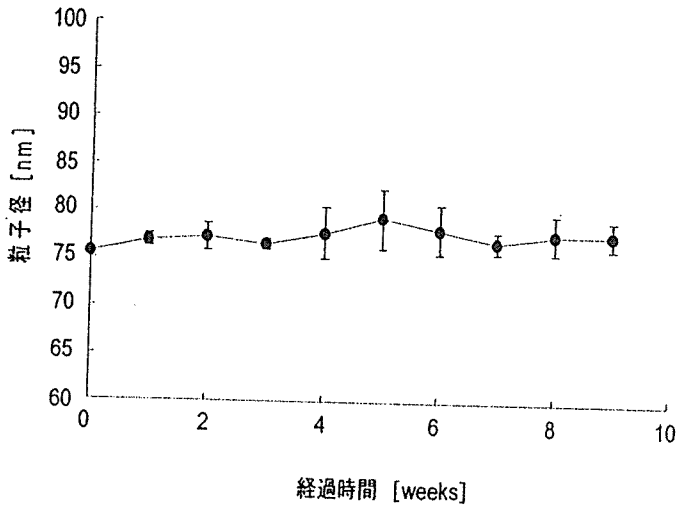


図3 NPrCAP/PEG/リゾビストの粒子径経時変化

C-3 PEG 化マグネタイトのマクロファージ食食抑制効果

マグネタイトを 100pg/cell で J774-1 細胞に添加したところ、マグネタイトは迅速に細胞に取り込まれ、添加 2 時間で 90%のマグネタイトが細胞に食食された。リンカーとして Sulfo-GMBS を用いた場合でも、添加 2 時間後には 70%が取り込まれた。一方、PEG を結合させることで、マグネタイト粒子は、2 時間後でも 20%以下のマグネタイトしか取り込まれなかった。

- マグネタイト
- Sulfo-GMBS/Magnetite
- PEG/Magnetite

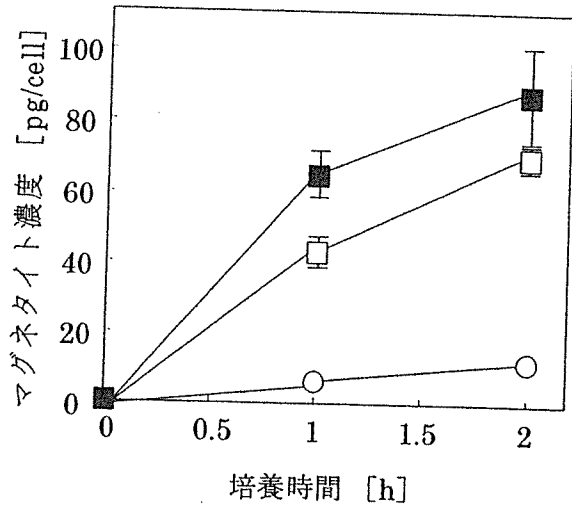


図4 PEG 化マグネタイトのマクロファージ食食抑制効果

D. 考察

D-1 デキストランマグネタイト(リゾビスト)の発熱特性

本研究では、臨床応用のための最終的な薬剤の剤形決定のために、核になる磁性ナノ粒子は、MRI の造影剤であることから用途は異なるが、すでに臨床で使用されており、安全性の確認されているデキストランマグネタイト(商品名:リゾビスト)の利用を検討した。興味深いことに、リゾビストは従来我々が使用していたマグネタイトよりも高い発熱能を示した。マグネタイトが高周波磁場中で発熱するメカニズムは、ヒステリシス損による発熱が考えられる。ヒステリシス損は磁性体の粒子径に依存するが、従来我々が使用していたマグネタイトとリゾビストの核にある酸化鉄粒子の粒子径は、約 10nm でほとんど変わらない。本実験で観察された発熱量の相違については、酸化鉄結晶の組成比の相違によるものと考えられるが、メカニズムは不明である。しかし、医療用のグレードで生産されたリゾビストは、不純物が非常に少ないと考えられるため、それに加えて良好な発熱特性が得られたということは、臨床応用に有利

であると考えられる。

D-2 NPrCAP/PEG/リゾビストの合成

NPrCAP/PEG/リゾビストの合成にあたって、問題になったのは、粒子の分散安定性であった。いかに粒子を分散させた状態で反応を行うことができるかで、反応による結合量が変わってくる。粒子の分散性を高めるためには、プローブ型の超音波破碎機が有効だが、臨床応用にあたっての薬剤生産の量産化にはプローブ型の超音波破碎機の利用は不都合だと考えられた。ここで、PEG を使用したことで、粒子の分散安定性が飛躍的に向上し、プローブ型超音波破碎機による強力な破碎処理が必要なくなり、粒子の合成プロセスが容易になったといった利点があった。

また、合成した NPrCAP/PEG/リゾビストの分散安定性は、2ヶ月以上安定であることが分かった。臨床応用に向けて、さらに長期間の安定性について検討する予定である。

D-3 PEG 化マグネタイトのマクロファージ食食抑制効果

薬剤の PEG 化による利点は、粒子の分散安定性だけではない。今後、最終目標である血中投与において、メラノーマ細胞に集積させるドラッグデリバリーシステムを完成させるには、血中での安定性および細網内皮系への取り込みの回避を考える必要がある。本研究で示した通り、マグネタイトを PEG 化することによって、細網内皮系細胞の一つであるマクロファージの食食を低下させることができた。このことから、将来的に NPrCAP/PEG/リゾビストの静脈投与による治療の可能性も示された。

E. 結論

臨床応用を念頭において、CAP 化合物とマグネ

タイトを含む新しいナノメディシンを設計し合成することに成功した。また、この合成法はスケールアップが可能で、GMP も視野に入れた合成プロセスを構築した。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ito A, Fujioka M, Yoshida T, Wakamatsu K, Ito S, Yamashita T, Jimbow K, Honda H. 4-S-Cysteaminylphenol-loaded magnetite cationic liposomes for combination therapy of hyperthermia with chemotherapy against malignant melanoma.

Cancer Sci. 98(3), 424-430 (2007)

2) Ito A, Honda H, Kobayashi T. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of "heat-controlled necrosis" with heat shock protein expression. Cancer Immunol Immunother. 55(3), 320-328 (2006)

3) Kawai N, Ito A, Nakahara Y, Honda H, Kobayashi T, Futakuchi M, Shirai T, Tozawa K, Kohri K. Complete regression of experimental prostate cancer in nude mice by repeated hyperthermia using magnetite cationic liposomes and a newly developed solenoid containing a ferrite core.

Prostate. 66(7), 718-727 (2006)

2. 学会発表

1) Ito A, Nakahara Y, Fujioka M, Kobayashi T,

Takeda K, Nakashima I, Honda H “Complete regression of hereditary melanoma in a mouse model by repeated hyperthermia using magnetite cationic liposomes” Japanese Journal of Hyperthermic Oncology Vol. 22, Supplement, 2006. The 4th ASHO & the 23rd JCHO (Nara), September, 2006.

- 2) 吉田達郎 藤岡正剛 井藤 彰 若松一雅
伊藤祥輔 山下利春 神保孝一 本多裕之
「4-S-CAP 包埋型 MCL による悪性黒色腫に対する温熱化学療法」 日本生物工学会第 58 回大会 (大阪) 2006 年 9 月 12 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
(萌芽的先端医療技術推進研究事業)
分担研究報告書

GMP grade の N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-CAP-SH
結合型リゾビスト (NPrCAP/PEG/リゾビスト) の合成
とその結合量の測定

(分担) 研究者 若松 一雅 (藤田保健衛生大学衛生学部教授)
伊藤 祥輔 (藤田保健衛生大学衛生学部教授)

研究要旨

本年度は、メラノーマ細胞特異的親和性を有するシステアミニール・フェノール (cysteaminy phenol: CAP) と細胞内温熱効果を有する磁気ナノ鉄微粒子を結合させた薬剤の設計、作製を目的として、N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-cysteaminyphenol (NPrCAP-SH) を標的ドラッグ・デリバリー剤としたリゾビスト直接結合型薬剤 NPrCAP/PEG/リゾビストを合成することを目的とした。文献既知の方法で 4-S-cysteaminyphenol (4-S-CAP) を合成後、ついで2段階 75%の収率で目的物質 NPrCAP-SH を合成した。この化合物を分担研究グループである名古屋大学大学院工学研究科本多教授の研究室で合成された PEG 結合型リゾビストと反応させて、NPrCAP/PEG/リゾビストを合成した。さらに GMP grade 薬剤調製のために、GMP grade リゾビストを新規に合成し、同様な操作で GMP grade NPrCAP/PEG/リゾビストを合成した。ついで、NPrCAP-SH のリゾビストに対する結合量を測定した。

A. 研究目的

本研究を遂行するために必要な N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-cysteaminylphenol (NPrCAP-SH) を大量かつ純度の高い物質として得られる化学合成ルートおよび精製法の構築を目的とした。さらに、すでに MRI 用肝臓造影剤として臨床で用いられている「リゾビスト」と NPrCAP-SH との結合法の改良を行い、結合量を向上をめざした。これらの薬剤の合成は、動物・臨床実験をスムーズに進行できるように最重要である。さらに GMP grade による生産を念頭に入れたプロセスの構築を行った。

B. 研究方法および結果

1) NPrCAP-SH の合成

Padgett らの文献 (J. Med. Chem., 27: 1354-1357, 1984) に従い、4-mercaptophenol と 2-methyl-2-oxazoline を 2 時間還流させ、再結晶後 70% の収率で N-アセチル-4-S-CAP を得た。これを 6M 塩酸で 3 時間還流させ、再結晶後、目的物の 4-S-CAP を 80% の収率で得た。つづいて、4-S-CAP を N-succinimidyl-3-[(2-pyridyl)dithio]propionate (SPDP) とピリジン中、室温で 2 時間反応させた後、カラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:n-ヘキサン (1:1、2:1、3:1)) で精製後 (94%、油状物質)、メタノール中ジチオトレイトール (DTT) と室温で 2 時間反応させ、得られた目的物質 N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-CAP (NPrCAP-SH) をカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:n-ヘキサン (2:1)) で精製後、さらに再結晶 (酢酸エチル-エーテル) し無色結晶を得た (80%)。つぎに GMP grade の NPrCAP-SH を得るために、分取 HPLC によりさらに精製を行った (図 1)。

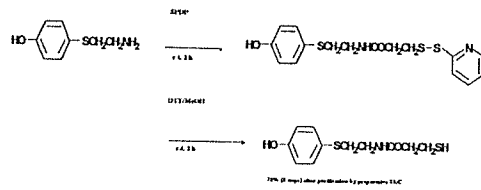
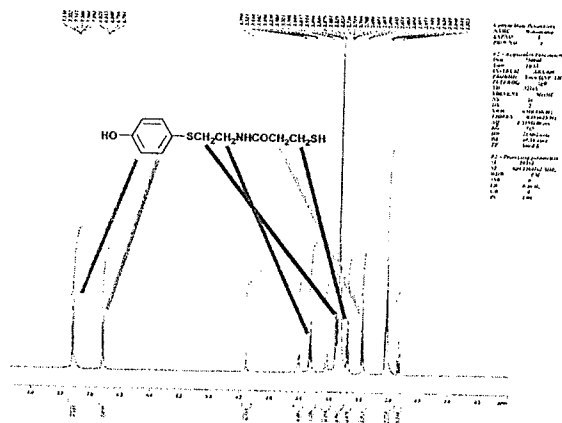


図1

HPLC 条件: カラム (Silica gel Type MG, 10 μ m, 15 x 250 mm)、移動相 (酢酸エチル:n-ヘキサン、2:1)、検出器 (紫外線検出器、250 nm)、測定温度 (室温)、流速 (4.0 ml/min)

得られた目的物質は、ESI マススペクトルメトリーによる MS/MS 法、 $(M+H)^+$: 258, 164, 153, 132, 125) および 1 H-NMR スペクトル (CD_3COCD_3 、400 MHz) により同定した (図 2)。



2) 4-S-CAP 結合型リゾビストの合成

リゾビスト (一般名フェルカルボトラン) はカルボキシデキストランで被覆された超常磁性酸化鉄 Fe_2O_3 の親水性コロイド溶液である。まず、pilot study として、4-S-CAP とリゾビストをジイソプロピルカルボジイミド (DIC) 存在下、縮合反応を行った。得られた懸濁液を 6M 塩酸による加水分解後、生成する 4-S-CAP を HPLC で定量したところ、結合量は 20 nmol/mg であった。HPLC の分析条件: column: Capcel pak (C_{18})、移動相: メタノール: 水: 1M- $HClO_4$ (10:90:1.5 by vol.)、流速: 0.7 ml/min、検出器: UV (250 nm)、カラム温度: 50°C

3) NPrCAP-NH₂ との結合型リゾビストの合成
 図3の合成スキームにしたがい合成した NPrCAP-NH₂ を DIC 存在下リゾビストと反応させた。6M塩酸による加水分解 (110°C、4h) 後、生成する 4-S-CAP を HPLC で定量し、結合量を測定した結果、結合量は 5 nmol/mg であった。

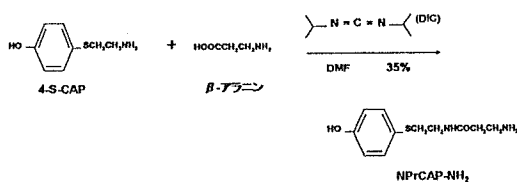


図3

4) リゾビストの精製

カルボキシデキストランは末端部分が開環した構造部分を持ち、このカルボキシレート基が鉄磁性体 Fe₂O₃ と結合していると推測されている (図4)。従来から製品化されているリゾビスト (シェーリング社) は、リゾビストの安定化のために結合していないカルボキシデキストランを 50%ほど含有している。この製品は、本実験の合成法では使用できないため、遊離のカルボキシデキストランを取り除いたリゾビストの調製を新たに製造元会社に依頼した。上記の結合量が低い理由として、この未結合のカルボキシデキストランが原因と推測された。

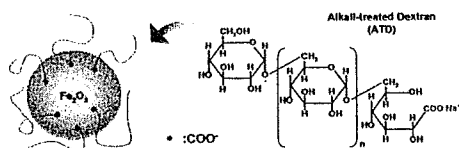


図4

5) PEG 修飾されたリゾビストと NPrCAP-SH の反応

未結合のカルボキシデキストランを含まないリゾビストから調製されたリゾビスト

/PEG (40 mg/ml) 10ml に NPrCAP-SH (10 mg/ml メタノール溶液) 1 ml を加えて、室温で 30 分間超音波処理した後、室温で 6 時間放置した。その後、3000 rpm/min で遠心 5 分、上清を分離し MilliQ-水による洗浄を 3 回繰り返した後、MilliQ-水 10 ml で懸濁させた (図5)。合成したリゾビスト/PEG/NPrCAP-SH は化合物安全性研究所へ郵送し、安全性試験を行った。

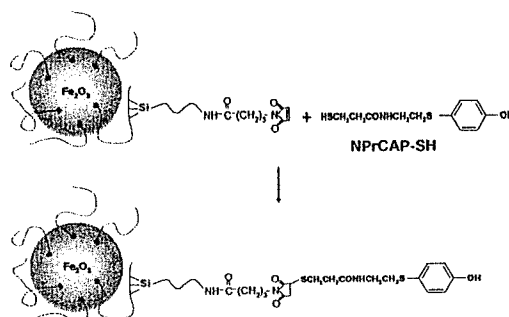


図5

6) GMP grade リゾビストの合成

将来のヒトへの投与のためには、GMP grade のリゾビストが不可欠である。したがって、製造元会社に GMP grade のリゾビストとの調製を依頼した。

7) GMP grade NPrCAP/PEG/リゾビストの調製

名大本多研究室にて GMP grade リゾビストを PEG 処理した GMP grade PEG/リゾビストにザルトリウス minisart filter (0.20 μm) にて減圧滅菌処理した 500 μl NPrCAP-SH (50 mg/MeOH ml) を 10 ml PEG/M (40 mg/ml) に加え、Vortex mix を 30 分間行なった。その後、室温にて 6 時間放置した。3,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を除き、注射水 5 ml を加え、さらに Vortex mix を 1 分間行なった。再度、3,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を除き、注射水 5 ml を加え、Vortex mix を 1 分間行なった。3,000 rpm で遠心後、上清を除き、注射水 10 ml を加え、Vortex mix を 1 分間後、減圧ろ過滅菌した。

8) NPrCAP/PEG/リゾビストにおける NPrCAP の結合量の測定

懸濁液を 6M 塩酸で加水分解 (110°C、4h) し、生成する 4-S-CAP を HPLC で測定したところ、結合量は 176 nmol/mg (添加した

NPrCAP-SH の 42%) であった。3 回目の水洗により水洗中の溶液には、NPrCAP-SH はほとんど含まれていなかった (未結合の NPrCAP-SH 総量は添加した NPrCAP-SH の 50%)。

C. 考察

臨床応用に視野を向けてすでに MRI 用肝臓造影剤として使用されているリゾビストに PEG 処理したものと NPrCAP-SH との反応を検討したところ、NPrCAP との結合量が低いことがわかった。この原因は、未結合のカルボキシデキストランと考えられた。これを打開するためにリゾビストの製造元会社に遊離のカルボキシデキストランを含まないリゾビストの合成を新たに依頼し、そのリゾビストを使って NPrCAP-SH との反応を行なったところ、結合量の改善が見られた。つぎに GMP grade PEG/リゾビストを合成し、GMP grade NPrCAP-SH との反応により目的の GMP grade NPrCAP/PEG/リゾビストを合成できた。

D. 結論

リゾビスト製造元会社との連携により、NPrCAP-SH と反応できるリゾビストを合成した。さらに、新たに調製した GMP grade リゾビストを用いて GMP grade NPrCAP/PEG/リゾビストの合成を達成できた。今後は、GMP grade の NPrCAP/PEG/リゾビストの安定した供給が必要になる。さらに GMP grade のより up した薬剤を調製を念頭にいたシステム構築が必要である。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ito A, Fujioka M, Yoshida T, Wakamatsu K, Ito S, Yamashita T, Jimbow K, and Honda H. 4-S-cysteaminylphenol-loaded magnetite cationic liposomes for combination therapy of hyperthermia with chemotherapy against malignant melanoma. *Cancer Sci.* 2007, **98**(3): 424-430.

2) D' Orazio JA, Nobuhisa T, Cui R, Arya M, Spry M, Wakamatsu K, Igras V, Kunisada T, Granter S, Nishimura EK, Ito S, Fisher DE. Topical drug rescue strategy and skin protection based on the role of Mc1r in UV-induced tanning. *Nature*, 2006, **443**: 340-344.

3) Wakamatsu K, Kavanagh R, Kadakaro AL, Terzieva S, Sturm R, Leachman S, Abdel-Malek A, Ito S. Diversity of pigmentation in cultured human melanocytes is due to differences in the type as well as quantity of melanin. *Pigment Cell Res*, 2006, **19**: 154-162.

4) Wakamatsu K, Takasaki A, Kågedal B, Kageshita T, Ito S. Determination of eumelanin in human urine. *Pigment Cell Res*, 2006, **19**: 163-169.

5) Wakamatsu K, Ito S. Evaluation of melanin-related metabolites as markers of solar ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res*, 2006 **19**: 460-464.

6) Ito S. Encapsulation of a reactive core in neuromelanin. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 2006 **103**: 14647-14648.

7) Gautam R, Novak EK, Tan J, Wakamatsu K, Ito S, Swank RT. Interaction of Hermansky-Pudlak syndrome genes in the regulation of lysosome-related organelles. *Traffic*, 2006, **7**: 779-792.

2. 学会発表

1) 吉田達郎、藤岡正剛、井藤 彰、若松一雅、伊藤祥輔、山下利春、神保孝一、本多裕之。「4-S-CAP 包埋型 MCL による悪性黒色腫に対する温熱化学療法」、日本生物工学会第 58 回大会 (大阪) 2006 年 9 月 12 日

3) 高田知明、山下利春、佐藤牧人、酒本亜紀子、松坂英信、小野一郎、田村保明、佐藤昇志、井藤彰、本多裕之、若松一雅、伊藤祥輔、神保孝一。「NPrCAP/M によるメラノーマ標的 DDS と化学温熱免疫療法」、第 65 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2006 年 9 月 28-30 日。

4) 佐藤牧人、山下利春、小野一郎、田村保明、佐藤昇志、若松一雅、伊藤祥輔、井

藤彰、本多裕之、神保孝一。「マグネタイト結合型システアミニルフェノール(NPrCAP/M)のメラノーマ細胞親和性と細胞死誘導」、第65回日本癌学会学術総会(横浜)2006年9月28-30日。

- 5) 酒本亜紀子、田村保明、佐藤昇志、山下利春、高田知明、小野一郎、井藤彰、本多裕之、若松一雅、伊藤祥輔、神保孝一。

「メラノーマ標的ナノパーティクルNPrCAP/Mを用いた化学温熱免疫(CTI)療法における腫瘍免疫機構の解析」、第65回日本癌学会学術総会(横浜)2006年9月28-30日。

- 6) Wakamatsu K, Ito S, Hu D-N. Characterization of melanin in human iridal and choroidal melanocytes for eyes of various colors. XIIIth Annual Meeting of the PanAmerican Society for Pigment Cell Research, Cincinnati, Ohio, USA, September 7-10, 2006.

- 7) Ito S, Murakami K, Wakamatsu K, Nakanishi Y, Takahashi H, Sugiyama S. Melanogenesis and oxidative stress are both elevated in patients undergoing hemodialysis. 13th meeting of the European Society for Pigment Cell Research, Barcelona, Spain, 24-24 September, 2006.

- 8) 若松一雅、伊藤祥輔、Dan-Ning Hu。「ヒトの虹彩および脈絡膜中のメラニンの定量」、第20回日本色素細胞学会年次学術大会(松本)、2006年11月25-26日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし

厚生労働科学研究補助金
(萌芽的先端医療技術推進研究事業)
分担研究報告書

メラノーマ標的ナノパーティクルNPrCAP/Mを用いた
化学温熱免疫 (CTI)療法における腫瘍免疫機構
の解析

分担研究者 佐藤昇志 札幌医科大学病理学第1講座 教授
田村保明 札幌医科大学病理学第1講座 講師

研究の要旨

我々はメラノーマ細胞に選択的にとりこまれ細胞内発熱効果をもつNPrCAP/Mを用いて選択的にメラノーマ細胞を温熱する Chemo-Thermo-Immuno (CTI) Therapy の確立を目指している。本治療法における腫瘍免疫機構を解析した。マウスにメラノーマ細胞を移植しNPrCAP/M をとりこませ磁場照射を行ったところ、腫瘍は縮小し再移植した腫瘍も拒絶された。腫瘍が拒絶されたマウスではメラノーマ細胞に特異的な細胞障害性 T 細胞の誘導が確認された。NPrCAP/M を取り込ませたのち、磁場照射により加温した培養メラノーマ細胞の抽出液では Heat shock protein (HSP) が増加していた。さらにこの抽出液でパルスした樹状細胞と CD8+Tcell との反応性が増加し、この反応は HSP の除去により低下した。以上より NPrCAP/M が HSP の up-regulation を介して腫瘍免疫を誘導することが示唆された。

A. 研究目的

本研究は NPrCAP を発熱体であるナノ微粒体に結合した複合体を合成し、培養メラノーマ細胞、担癌マウスに対する発熱による抗腫瘍効果、免疫誘導効果を検討し、腫瘍免疫機構のメカニズムを解析することである。

1) NPrCAP/M を用いた温熱療法の治療効果および免疫誘導効果の検討

メラノーマ担癌マウスを用いて NPrCAP/M による温熱治療を行い、腫瘍縮小および拒絶効果を検討する。また治癒したマウスにおいてメラノーマ特異的細胞障害性 T 細胞が誘導されているかを ^{51}Cr release assay を用いて検討する。

2) Heat shock protein (HSP) 発現の検討

NPrCAP/M による温熱治療を行った培養メラノーマにおける HSP 発現量を ELISA 法で測定する。

3) NPrCAP/M を用いた温熱療法後のメラノーマ細胞抽出液でパルスした樹状細胞と特異的 CD8⁺T cell 反応性の検討

NPrCAP/M による温熱療法後腫瘍細胞抽出液により樹状細胞をパルスし CD8⁺T cell との反応性を検討した。さらに抽出液から HSP を除去した場合の反応も検討する。

B. 研究方法

1) NPrCAP/M を用いた温熱療法の治療効果および免疫誘導効果の検討

モデル癌抗原として Ovalbumin を発現する B16F1 メラノーマ細胞 (B16OVA) を用いて実験を行った。B16OVA を C57BL/6 マウスの皮下に移植し、担癌マウスを作成した。第7, 9, 11, 13日目に腫瘍内に NPrCAP/M を局所注射し、2 4 時間後に磁場照射を行った。さらに B16OVA を再移植し、腫瘍拒絶効果を検討した。腫瘍径は1日おきに測定した。次に治癒したマウスから脾臓を摘出し、放射線照射した B16OVA メラノーマ細胞と一緒に5日間培養した。5日後、 ^{51}Cr release

assay を行った。標的細胞は B16OVA、B16F1、EL4、YAC-1 そして OVA 由来のペプチドである SL8 をパルスした EL4 を用いた。

2) Heat shock protein 発現の検討

培養 B16OVA メラノーマ細胞に NPrCAP/M を添加し、30 分間静置後、細胞ペレットに磁場照射を行い、7 2 時間培養した。7 2 時間後、培養細胞を集め、液体窒素による急速凍結、解凍を繰り返して細胞抽出液を作成した。細胞抽出液中の HSP 発現量を ELISA 法と Western blot 法で測定した。

3) NPrCAP/M を用いた温熱療法後のメラノーマ細胞抽出液でパルスした樹状細胞と特異的 CD8⁺T cell 反応性の検討

C57BL/6 マウスの骨髄より採取した樹状細胞に細胞抽出液を添加し2時間培養した。その後、OVA 由来のペプチドである SL8 に特異的に反応する CD8⁺T cell である B3Z を培養液に加え、24 時間培養した。24 時間後、CPRG 液を加え、OD595nm を測定した。さらに細胞抽出液から HSP70, 90, KDEL 抗体とプロテインビーズを用いて HSPs を除去し、同様の実験を行った。このとき得られた免疫沈降物をマウスのフットパッドに注射し、4 時間後膝窩リンパ節を摘出し、B3Z とともに培養し2 4 時間後に CPRG 液を加え OD595nm を測定した。

C. 研究結果/D. 考察

1) NPrCAP/M を用いた温熱療法の治療効果および免疫誘導効果の検討

B16OVA メラノーマに NPrCAP/M を局所注射し、磁場照射を行ったところ、腫瘍が縮小し治癒した(図1)。さらに治癒したマウスに B16OVA を再移植すると、腫瘍が拒絶された(図2)。腫瘍が拒絶されたマウスにおいては B16OVA および OVA 由来のペプチドである SL8 をパルスした EL4 に特異的な細胞障害性 T 細胞の誘導が確認され(図3)、治療マウスの腫瘍拒絶には腫瘍特異的な免疫によるものと考えられた。

2) Heat shock protein 発現の検討

一方培養細胞において NPrCAP/M を取り込ませた B160VA メラノーマ細胞に磁場照射し得られた細胞抽出液中には Hsp70 放出量の増加がみられたが Hsp90 の発現量は変化がなかった (図 4)。

3) NPrCAP/M を用いた温熱療法後のメラノーマ細胞抽出液でパルスした樹状細胞と特異的 CD8⁺T cell 反応性の検討

NPrCAP/M による加温後細胞抽出液でパルスした樹状細胞は CD8⁺Tcell との反応性の上昇がみられた (図 5)。さらにこの細胞抽出液から HSP 抗体で immunodepletion を行うと反応の低下がみられた (図 6)。またこのとき得られた免疫沈降物をマウスのフットパッドに注射し、4 時間後膝窩リンパ節から樹状細胞を分離し、B3Z とともに培養したところ B3Z の反応がコントロールにくらべて増加した (図 7)。この事実は、細胞内の HSP には抗原ペプチドが結合しており、生体内においても HSP-抗原ペプチド複合体が樹状細胞によりクロスプレゼンテーションされ、T 細胞を活性化することを示すものである。以上の結果から NPrCAP/M が HSP の up-regulation を介して腫瘍免疫を誘導することが示唆された。

E. 結論

NPrCAP と磁場照射によるメラノーマの抗腫瘍効果は、HSP の発現誘導と HSP 結合腫瘍抗原ペプチドによる CTL 誘導によることが示された。マウスを用いた前臨床試験では特に副作用を認めず、CTL 誘導を伴う優れた抗腫瘍効果を確認しえた。今後、臨床試験においても HSP を介する免疫効果を確認していく予定である。

図1 治療後の腫瘍

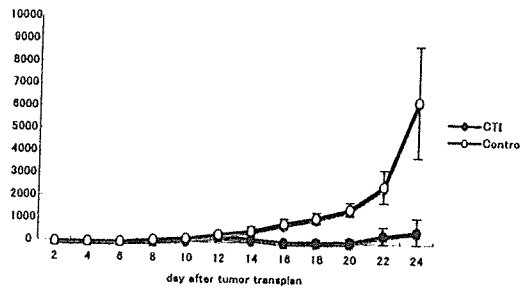


図2 再移植後の腫瘍径

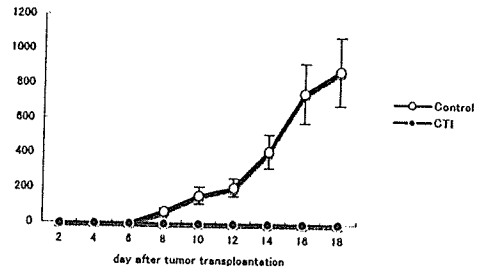


図3 腫瘍障害性T細胞の

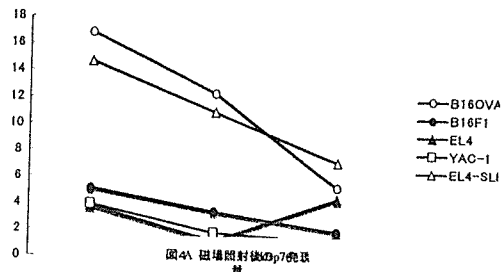


図4A 磁場照射後のHsp70発現量

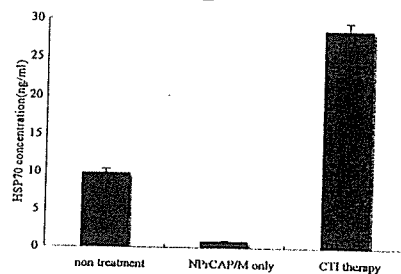


図4B 磁場照射後のHsp90発現量

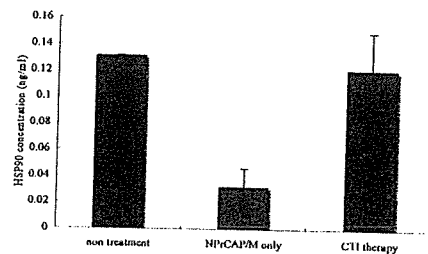


図6 磁場照射後の細胞抽出液で処理した樹状細胞に対するCD8陽性T細胞の反応性

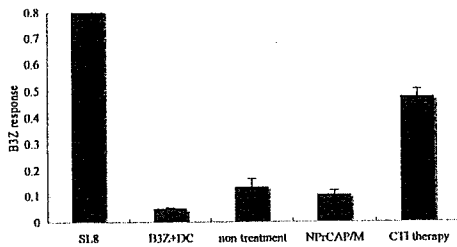
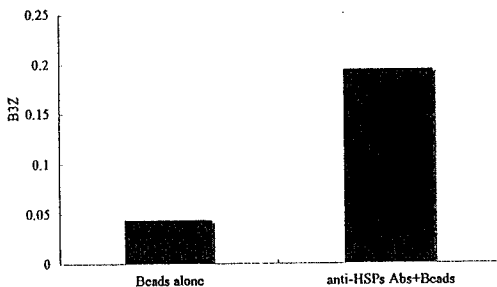
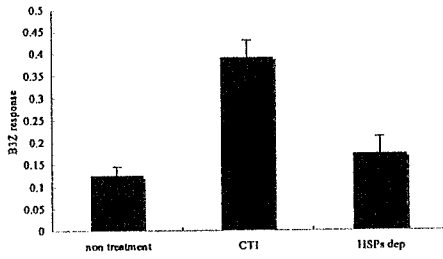


図8 HSPs除去後の変化



G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsukahara, T., Kawaguchi, S., Ida, K., Kimura, S., Tamura, Y., Ikeda, T., Torigoe, T., Nagoya, S., Wada, T., Sato, N. and Yamashita, T. : HLA-restricted specific tumor cytolysis by autologous T-lymphocytes infiltrating metastatic bone malignant fibrous histiocytoma of lymph node. *J. Orthop. Res.*, 24: 94-101, 2006
2. Hatakeyama, N., Tamura, Y., Sahara, H., Suzuki, N., Suzuki, K., Hori, T., Mizue, N., Torigoe, T., Tsutsumi, H. and Sato, N. : Induction of autologous CD4- and CD8-mediated T-cell responses against acute lymphocytic leukemia cell line using apoptotic tumor cell-loaded dendritic cells. *Exp. Hematol.* 34: 197-207, 2006
3. Ueda, G., Sunakawa, H., Nakamori, K., Shinya, T., Tshako, W., Tamura, Y., Kosugi, T., Sato, N., Ogi, K. and Hiratsuka, H. : Aberrant expression of β - and γ -catenin is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oral Maxillofacial Surg.*, 35: 356-361, 2006
4. Kitamura, H., Torigoe, T., Asanuma, H., Tamura, Y., Hisasue, S., Suzuki, K., Tsukamoto, T., Sato, M. and Sato, N. : Cytosolic overexpression of p62 sequestosome 1 in neoplastic prostate tissue. *Histopathology*, 48: 157-161, 2006
5. Kitamura, H., Torigoe, T., Honma, I., Asanuma, H., Nakazawa, E., Shimozawa, K., Hirohashi, Y., Sato, E., Sato, N. and Tsukamoto T. : Expression and antigenicity of survivin, an inhibitor of apoptosis family member, in bladder cancer: implications for specific immunotherapy. *Urology*, 67: 955-959, 2006
6. Kitamura, H., Torigoe, T., Honma, I., Sato, E., Asanuma, H., Hirohashi, Y., Sato, N. and Tsukamoto, T. : Effect of human leukocyte antigen class I expression of tumor cells on outcome of intravesical instillation of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for bladder cancer. *Clin. Cancer Res.*, 12: 4641-4644, 2006
7. Tsukahara, T., Kawaguchi, S., Torigoe, T., Asanuma, H., Nakazawa, E., Shimozawa, K., Nabeta, Y., Kimura, S., Kaya, M., Nagoya, S., Wada, T., Yamashita, T. and Sato, N. : Prognostic significance of HLA class I expression in osteosarcoma defined by anti-pan HLA class I monoclonal antibody, EMR8-5. *Cancer Science*, 97: 1374-1380, 2006
8. Komori, H., Nakatsura, T., Senju, S., Ikuta, Y., Yokomine, K., Yoshitake,

- Y., Motomura, Y., Beppu, T.; Matsui, M., Torigoe, T., Sato, N., Baba, H., and Nishimura, Y. : Identification of HLA-A2- or -A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 12: 2689-2697, 2006
9. Hirohashi, Y., Wang, Q., Liu, Q., Xiulian, Du., Zhang, H., Sato, N. and Greene, M. I. : p78/MCRS1 forms a centrosomal protein complex with NudE and plays an essential role in mitosis. *Oncogene*, 25: 4937-4946, 2006
 10. Hirohashi, Y., Wang, Q., Liu, Q., Li, B., Du, X., Zhang, H., Furuuchi, K., Masuda, K., Sato, N. and Greene, M. I. : Centrosomal proteins Ndel and Su48 form a complex regulated by phosphorylation. *Oncogene*, 25: 6048-6055, 2006
 11. Tamura, Y., Torigoe, T. and Sato, N. : Extracellular heat shock proteins in immune response: A guide for cross-presentation. *Heat Shock Proteins in Biology and Medicine*, 119-130, 2006
 12. Maeda, N., Kokai, Y., Ohtani, S., Sahara, H., Kuriyama, I., Kamisuki, S., Takahashi, S., Sakaguchi, K., Sugawara, F., Yoshida, H., Sato, N. and Mizushima, Y. : Anti-tumor effects of dehydroaltenusin, a specific inhibitor of mammalian DNA polymerase α . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352: 390-396, 2007
 13. Imai, A., Sahara, H., Tamura, Y., Jimbow, K., Saito, T., Ezoe, K., Yotsuyanagi, T. and Sato, N. : Inhibition of endogenous MHC class II-restricted minor histocompatibility antigen presentation by tacrolimus (FK506) via FKBP51. *Eur. J. Immunol.*, in press
 14. Kurotaki, T., Tamura, Y., Ueda, G., Oura, J., Kutomi, G., Hirohashi, Y., Sahara, H., Torigoe, T., Hiratsuka, H., Sunakawa, H., Hirata, K. and Sato, N. : Hsp90 as a super-guide for the exogenous antigenic peptide cross-presentation to MHC class I molecules. *J. Immunol.*, in press
- 和文
1. 奥村康、平野俊夫、佐藤昇志編集: Annual Review 免疫 2006、東京、中外医学社、2006
 2. 大浦淳、田村保明、佐藤昇志 : Hsp90-癌ペプチド複合体ワクチンの高 CTL 誘導性機構の解析. *Annual Review 免疫*、中外医学社、190-195、2006
 3. 伊東恭悟、佐藤昇志、西村泰治、小幡裕一 : 発がん防御機構、9. ヒトキラーT細胞および抗体により認識されるがん関連抗原. *がん研究のいま① 発がんの分子機構と防御*、東京大学出版会、162-177、2006
 4. 佐藤昇志 : 癌免疫療法の具現化と展望-免疫病理学者としての視点から-. *泌尿器外科*、6月号 : 721-726、2006
 5. 佐藤昇志 : ヒト癌免疫、癌ペプチドワクチン開発と熱ショックタンパク質の関わり-癌免疫療法の具現化に向けて-. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 54: 75-80, 2006
 6. 佐藤昇志、田村保明、鳥越俊彦 : ヒトがんのペプチド免疫療法. *バイオサイエンスとインダストリー*、64: 487-493、2006
 7. 山蔭道明、相馬仁、宮本篤、平田公一、*Surgery Frontier 特集 : 癌ワクチン療法の現状と展望*、特集によせて、13 : 5-7、2006
 10. 奥村康、平野俊夫、佐藤昇志編集: Annual Review 免疫 2007、東京、中外医学社
 11. 重原克則、田村保明、佐藤昇志、四十坊
8. 山本和利、神保孝一、佐藤昇志、今井浩三 : 本学医学部 PBL テュートリアル教育に対する学生の評価とその解析. *札幌医学雑誌*、75 : 7-12、2006
 9. 平田公一、鶴間哲弘、鳥越俊彦、佐藤昇志 : 癌ワクチン療法の概念と現状.

典晴：結核病巣と T 細胞免疫応答。
Annual Review 免疫 2007、中外医学社、
231-239、2007

4. 田村保明, 大浦 淳、鳥越俊彦、佐藤昇志：アレルギー性疾患の予防・治療薬。特願 2007-050811, 平成 19 年 2 月 28 日

2. 学会発表

1. Sakemoto A, Tamura Y, Soto N, Yamashita T, Takada T, Sato M, Okura M, Ono I, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K. Characterization of Tumor Immunity in melanoma chemo-thermo-immunotherapy (CTI Therapy) using NPrCAP-magnetite (NPrCAP/M) nano-particles. Pigment Cell Res. 2006. 19; 470-548
2. Tamura, Y., Oura, J., Kutomi, G., Sahara, H., Torigoe, T. and Sato, N. : A fate of Hsp90 chaperoned antigen: the impact of form of antigen on crosspriming by dendritic cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan, June 21, 2006
3. Tamura, Y., Oura, J., Kutomi, G., Torigoe, T. and Sato, N. Efficient Cross-presentation by Heat Shock Protein (HSP)-Antigen Complex-Loaded Dendritic Cells. Cancer Immunotherapy. Cancer Immunotherapy 2006. New York, USA, Oct. 4-6, 2006

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 佐藤昇志、鳥越俊彦、廣橋良彦、原田健司：新規腫瘍抗原ペプチド。特願 2006-86820、3月28日、2006
2. 鳥越俊彦、佐藤昇志、浅沼広子、下澤久美子、中澤恵実理：変性ヒト癌抗原に特異的なマウスモノクローナル抗体。特願 2006-260696、9月26日、2006
3. 佐藤昇志、鳥越俊彦、上口権二郎、伊藤規絵：ポリグルタミン凝集体形成阻害活性を有するポリペプチド。特願 2006-314987、11月、2006

厚生労働科学研究費補助金
(萌芽的先端医療技術推進研究事業)
分担研究報告書

メラノーマ標的ナノ微粒子 (NPrCAP/Rizobist) による
メラノーマ温熱免疫治療の臨床応用
～CTI 治療室の設計・施工、交番磁場発生装置改造と臨床治療手順の確立～

分担研究者 小野一郎 札幌医科大学医学部皮膚科 講師

研究要旨

本年度は、臨床応用のための温熱免疫治療(Chemo-Thermo-Immuno: CTI therapy)治療室の設計並びに施工と交番磁場発生装置改造と治療手順の確立を行った。メラノーマ標的ナノ微粒子 (NPrCAP/Rizobist) によるメラノーマ温熱免疫治療においては交番磁場発生装置によって発生される磁場により標的ナノ微粒子 (NPrCAP/Rizobist) に含有される磁性体である鉄が発生する熱により治療を行う。そのため、発生するマイクロ波・磁場が人体、精密電子機器などに与える影響を可能な限り排除しながら、効果的に治療が可能なCTI治療室の設計・施工が大変に重要である。また、小型動物を治療するのは全く異なり、患者の治療部位に患者に無理な体位を取らせることなく磁場発生コイルを圧縮して治療するための装置の開発、改良がもう一点重要な点である。本研究では機器製造メーカーから提供された機器仕様書と同装置を用いた際の治療コイルヘッド周辺の磁場強度測定結果を参考にしてCTI治療室を設計し、札幌医科大学附属病院皮膚科外来に施工・竣工させた。また、磁場発生コイルに可動アームを特別に設計し、改良したことで臨床治療が可能な機器開発、改造を実施した。その機器をCTI治療室に設置し、磁場発生装置により、模擬皮膚腫瘍にNPrCAP/Rizobistを注入後に磁場による加熱試験を行い、極めて満足な結果が得られた。その際、治療室内に異常発熱などの問題点は認められず、マイクロ波、磁場の遮断もほぼ完全であることが判明した。これらの結果を踏まえ、臨床治療を開始するための手順を確立、安全で効果的なCTIの臨床治療が可能な環境と治療手順を確立できた。より現実的な治療環境と治療手順を完成でき、臨床例での治療を開始させることが可能と考えられた。今後はより安全で効果的かつ均一化したメラノーマに対するCTI治療が可能となるものと期待される。

A. 研究目的

メラノーマ標的ナノ微粒子 (NPrCAP/Rizobist) によるメラノーマ温熱免疫療において交番磁場発生装置によって発生される磁場により標的ナノ微粒子 (NPrCAP/Rizobist) に含有される磁性体である鉄が発生する熱により治療を行う。そのため、発生するマイクロ波・磁場が人体、精密電子機器に与える影響を可能な限り排除しながら効果的な治療が可能な CTI 治療室の設計・施工が極めて重要である。また、小型動物を治療するのは全く異なり、患者の治療部位に患者に無理な体位を取らせることなく磁場発生コイルを圧縮して治療するための装置の開発、改良がもう一点重要な点である。本研究では機器製造メーカーから提供された機器仕様書と同装置を用いた際の治療コイルヘッド周辺の磁場強度測定結果を参考にして CTI 治療室を設計し、札幌医科大学附属病院皮膚科外来に施工することを目的とした。また、ヒト治療用に特別に設計し、改良したことで臨床治療が可能な交番磁場発生装置開発、改造を実施すること、並びにそれらを用いて CTI 治療の臨床応用を可能とする本環境下での治療手順を作成することを目的とした。

B. 研究方法

B-1 CTI 治療室の設計・施工

本研究では CTI 治療の臨床応用が可能な完全にシールドされた治療室を設計、施工することを目的とした。本研究に先立ち、既に機器の治療コイル部分の高さを床面から 1 m とした場合に水平方向ではおよそ 3-8 μT 、2 m 離れば 1 μT 以下、さらに床面から 10 cm でも水平方向で 1 m 離ればおよそ 2-5 μT 以下、2 m 離れば 2 μT 以下であることを踏まえ、現実的には 50 ないし 60cm 程度、機器の治療コイル部分から離れば国際非電離放射線防護委員会が 1998 年 4 月に作成した時間変化する電界、磁場および電磁界による暴露を制

限するためのガイドライン(300GHZ まで)の推奨値よりも低値となることが製造業者の検討で明らかになっている。この点のみからは通常の治療室での CTI 治療も可能であるとの考え方も有るが、外来という実験環境とは全く異なる環境であること、ペースメーカーなどを装着した患者が機器のそばを通過する可能性、治療機器ないし電子カルテシステムへの影響などを完全に排除することを目的として十分にシールドされた治療室を設計し施工した。設計・施工に当たっては MRI などの強力な磁場発生機器の設置室の設計施工に経験の有る業者の専門家と協議の上、設計施工を進めた。なお、交番磁場発生装置の設置条件としては電源 3 相 200 V、13kVA、冷却水、水圧 0.35MPa Max.、流量 7L/min 推奨温度 10-35 $^{\circ}\text{C}$ であるので以上を満たす電源と給排水、並びに冷暖房、照明装置、磁場防止ガラス使用観察窓を完備するものとして設計依頼した。

B-2 臨床治療が可能な交番磁場発生装置開発、改造

従来、臨床治療用に試作されていた 2 号機は 1 号機よりも加熱性能が高いことが予備動物実験で確認されていたものの、本体が 3 ピースに分かれている上、治療コイルヘッドが固定式であり、臨床治療には困難を伴うことが予想された。つまり、患者の治療部位に患者に無理な体位を取らせることなく磁場発生コイルヘッドを圧縮して治療するための装置の開発、改良がもう一点重要な点である。その点を改良することが臨床治療には極めて重要である認識で機器の改造を行った。基本的な改造点は機器の一体化と治療用磁場発生コイルヘッドに自在に稼働するフレキシブルアームを追加すること、冷却ポンプの強力化の 3 点である。

B-3 臨床治療手順の確立

これらの治療環境を整備することに加えて、臨床治療を開始するための手順を確立することが、

安全で効果的なCTIの臨床治療を遂行するために必要であるので、本研究では疑似腫瘍を用いてより現実的な治療手順を作成することを目的とした検討を行った。具体的には手術時に採取した余剰皮膚(単径部皮膚)の脂肪織内に2 cm³程度の鶏肉を鶏皮で包み縫合して作成した疑似腫瘍を縫着して皮下転移を持つ、疑似皮下転移メラノーマ巣を作成。次いでNPrCAP/ Rizobist溶液0.5 mlをシリンジポンプで30分かけて腫瘍内に注入した。加熱前に温度センサーを疑似腫瘍内中心に挿入、皮膚表面にも温度センサーを設置した上でフィルム製被覆材で被覆して腫瘍直上皮膚に貼り付け磁場治療を行った。

(倫理面への配慮)

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

C. 研究結果

C-1 CTI 治療室の設計・施工

従来の皮膚科外来の治療室の一角に 3 x 2.4 x 2.4 m の CTI 治療室を新設した。CTI 治療室の壁面、天井、床面には全面金属製メッシュ(ラビット金網)をパネル板の間に挟み込み、表面はクロス仕上げとした。換気口、点検口などは銅製枠並びに銅製メッシュで全て被いシールドした。観察窓は2枚のガラス間に金属製メッシュ(ラビット金網)を挟み込み挿入固定した。その際、ガラス間の金属メッシュと壁面の金属メッシュが接触するように固定、アースした。また、ガラスと固定枠の間にはスポンジの周りに金属を巻き付けた素材で密封、磁場の漏洩を完全に防止した。開閉ドアは吊り構造とし、内部には壁と同様、金属製メッシュ(ラビット金網)をパネル板に挟み込んで作成、強固な金属製の枠で補強した。ドアの上方、側方には窓枠の際と同様スポンジの周りに金属を巻き付けた素材で密封、下方(ドア枠下)との面は弾性のある銅製金属板により磁場の漏洩を完全に防止し

た。給排水口の内壁は金属製管で被覆した上でパイプを貫通させた。パイプと金属管との間もスポンジの周りに金属を巻き付けた素材で密封した上で保護処理を施行した。このようにして設計施工した CTI 治療室には蛍光灯照明、冷暖房、煙熱感知器、電源(3相 200V1口、2相 100V 6口)を装備させ、ドアの段差にはスロープを設置し、バリアフリー構造とした。治療室内には交番磁場装置本体、冷却ポンプ装置、光学式温度計 2 台、記録用コンピューターを設置した。なお、本治療室のシールドは 40-50db である。

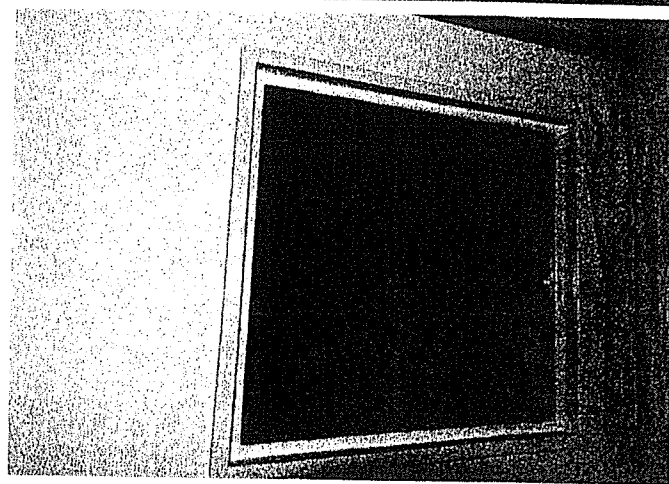
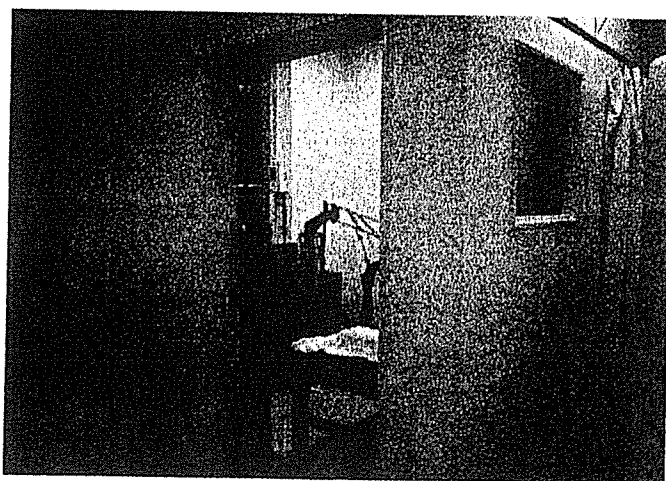


図 1: 治療室と観察窓

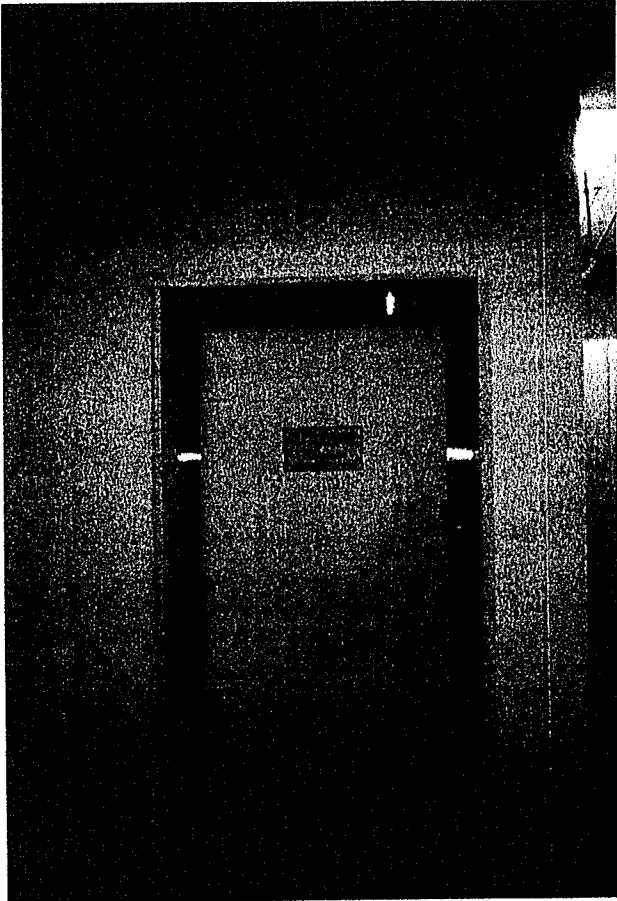


図2 完成したCTI治療室の遮蔽扉

C-2 臨床治療が可能な交番磁場発生装置開発、改造

固定型であった治療用固定コイルヘッドを可変型フレキシブルアーム型へと変更、設置した位置に自動的に固定可能な自動位置固定装置を内蔵させた。治療用固定コイルヘッドが大型になったことへの対応として、冷却量を増大させて、患者への治療時の熱障害の可能性を軽減させた。それに伴い、冷却水循環装置のポンプを大型として長時間の治療にも余裕を持ったものと設計し直したものを追加した。従来は3ピース構造であった装置を一体化させ省スペース化させ、操作性も向上させた装置として改良し、試験運転を行い初期の出力が30-1時間の連続運転で維持可能であることを確認した。

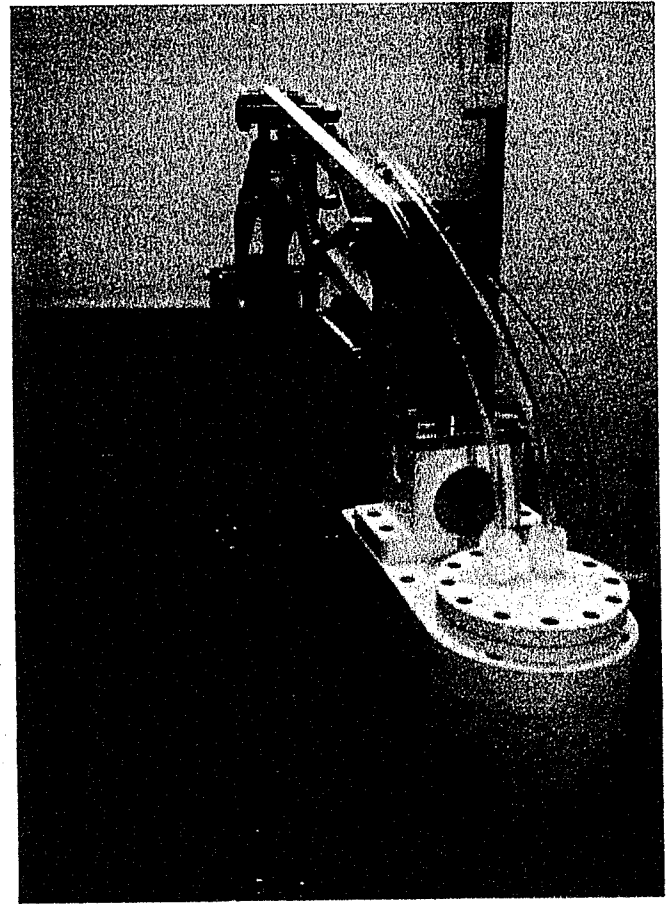


図3 改造後の交番磁場発生装置

C-3 臨床治療手順

鶏肉と手術時に採取した余剰皮膚を用いた予備実験で治療開始時は電圧200V、電流40Aで開始したが、模擬腫瘍内温度は迅速に上昇、ほぼ3-4分程度で腫瘍内温度は43.1度、皮膚表面温度は26.7度となった。その後は電圧100V、電流20Aでその温度を維持することが能であることが確認された。

この際の経験から以下に示した治療手順を作成している。給水バルブを最大に開いて、10分くらい待機する。貯水タン内が満水に成っていることを確認する。その後、壁の電源ブレーカーをONにして、さらにポンプの電源もONに入れる。治療室内の木製のベッドに患者の治療部医が交番磁場治療装置の治療ヘッドの下で水平となるように体位