

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

メラノーマ標的ナノ微粒子 (NPrCAP/ML)
によるメラノーマ温熱免疫療法の開発
(H17-ナノ-一般-004) に関する研究

平成17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 神保 孝一

平成20 (2008) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

メラノーマ標的ナノ微粒子 (NPrCAP/ML)	1
によるメラノーマ温熱免疫療法の開発 神保 孝一	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
------------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	47
----------------------------	----

I . 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(医療機器開発推進研究事業)
総合研究報告書

メラノーマ標的ナノ微粒子 (NPrCAP/ML) による
メラノーマ温熱免疫療法の開発

主任研究者 神保孝一 札幌医科大学 名誉教授 皮膚病総合医学研究所 所長

研究要旨

メラノーマ(悪性黒色腫)は乳児からすべての年齢層に皮膚、粘膜、眼球、脳脊髄などの全身に発生し、早期より皮膚のみならず全身臓器の血行転移を起こし、現在有効な治療法がない。本疾患に対しメラノーマに特異な形質発現であるメラノジェネシスを分子標的とする DDS と oxidative stress を介し化学療法効果を有する薬剤を作成し、これに熱ショック蛋白産生を介し温熱免疫効果を有するマグネタイトを重合させた従来の概念とは異なる化学温熱免疫(CTI: chemothermoimmunotherapy)療法を開発する。

我々は過去3年厚生労働科学研究・医療機器開発推進研究事業:ナノメディシンの研究費補助を受け、①メラニン形成酵素チロシナーゼの基質であるシステアミニールフェノール(N-propionyl cysteaminyphenol: NPrCAP)を合成し、②NPrCAPにナノ磁気粒子(magnetite:M)に固定化し、③NPrCAP/Mがメラノーマ細胞に選択的に接着し取り込まれる事(選択的DDS)を証明した。この際、予備実験としてリポソームを用いた関連薬剤であるNPrCAP/ML(magnetoliposome)及びNPrCAP/CML(cationic magnetoliposome)を合成したが、薬剤の安定性、in vivo投与において問題があり、最終的にはNPrCAP/Mを用いて基礎実験を行った。また④NPrCAP自体、in vivoにおいて直接細胞殺化学療法効果とoxidative stressによる腫瘍免疫効果を有する事を見出した。更に⑤Mとの重合体であるNPrCAP/Mは、腹腔内(ip)投与をするとメラノーマ細胞の特異的形質であるメラニン生合成の場であるメラノソーム内にendosome系を介し選択的に集積することを電子顕微鏡下で確認した。⑥メラノーマ細胞に取り込まれたNPrCAP/Mは磁場照射(AMF)により温熱細胞殺効果と熱ショック蛋白(HSP)産生を産生し、選択的にメラノーマ細胞を壊死させ、腫瘍の増殖を阻害した。更に⑦in vivo melanoma re-challenge動物実験にて一側の腹部に移植したメラノーマをNPrCAP/MとAMFで加療後、反対側に新たにメラノーマを移植した所、これらre-challengeメラノーマは完全にホストマウスにより拒絶され、4ヶ月の%ILSが100%であった。⑧NPrCAP単独でも程度が低いと同様再移植腫瘍のre-challenge拒絶が観察された。⑨メラノーマ再移植拒否の機序としてTIL(Tumor Infiltrating Lymphocyte)を介した腫瘍免疫効果である事確認した。

実際のメラノーマの患者に対し⑩NPrCAP/MよりもPEG(polyethylene glycol)を用いた薬剤(NPrCAP/PEG/M)が薬剤と腫瘍細胞との親和性が高い事、GMP gradeの薬剤を合成するには最適である事を確認した。これら基礎研究をもとに、⑪企業との提携・指導下にて学内にGMP-grade-NPrCAP/PEG/M合成施設とAMP治療室を作った。⑫毒性実験、薬剤安定性を確認後倫理委員会の許可を受け、臨床試験(学内限定第I, II相)を平成19年3月より開始した。併せてCTIメラノーマ治療症例選定、評価委員会を作った。⑬臨床試験にてメラノーマ腫瘍内及び周囲に投与され、AMF照射を受けたメラノーマ組織はMHC I発現細胞周囲に多数のCD8陽性細胞浸潤を示した。

殊に⑭末期多発性皮膚転移巣を有するメラノーマ患者に NPrCAP/PEG/M:AMF CTI 療法を一箇所
のメラノーマ転移部位に治療すると未治療の他の皮膚転移巣を完全に消失させることを確認
した。⑮メラノーマ臨床試験における本 CTI 療法の有効性を世界で始めて 2007 年 11 月 4 日、
New York で開催された第 4 回国際メラノーマ研究学会で報告した。

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)

本多 裕之

(名古屋大学大学院工学研究科 教授)

井藤 彰

(九州大学大学院工学研究院 准教授)

山下 利春

(札幌医科大学皮膚科学講座 教授)

小野 一郎

(札幌医科大学皮膚科学講座 准教授)

佐藤 昇志

(札幌医科大学病理学第一講座 教授)

田村 保明

(札幌医科大学病理学第一講座 講師)

シナーゼの基質であるシステアミニール・フェ
ノール (cysteaminy phenol: CAP) (表 1、図
2) がメラノーマ細胞に選択的に接着し取り込
まれ、直接細胞殺効果を有する事 (国際特許取
得済み) を利用し、CAP が温熱細胞殺効果を有
するナノ磁気粒子 (M) に固定化する事により
新しい選択的ナノ・ドラッグ・デリバリー・シ
ステムを開発し、これにより従来の概念にない
特異的メラノーマ治療法を確立する。

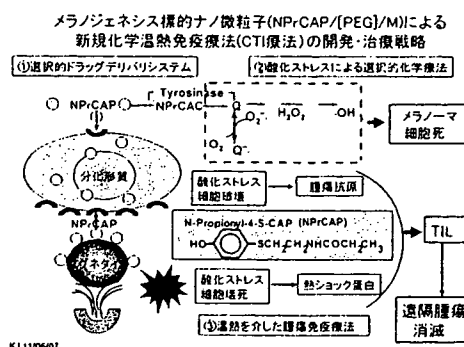


図 2

A. 研究目的

メラニン形成経路は全てのメラノーマ細胞にとり特異な分化形質であり、癌化と共に異常に亢進する。本研究はメラニン形成酵素チロ

表 1: システアミニールフェノール (CAP) 誘導体とチロシナーゼ親和性

	Km (μ M)	Vmax (μ mole/min/mg)
Tyrosine <chem>NC(Cc1ccc(O)cc1)C(=O)O</chem>	0.3	1.80
4-SCAP <chem>NC(Cc1ccc(O)cc1)S</chem>	117.0	7.97
N-Acetyl-4S-CAP (NAcCAP) <chem>CC(=O)N(C)C(Cc1ccc(O)cc1)S</chem>	375.0	9.28
N-Propionyl-4S-CAP (NPrCAP) <chem>CCC(=O)N(C)C(Cc1ccc(O)cc1)S</chem>	340.9	5.43

表 2: NAcCAP とメラノーマ組織との選択的共有結合

組織	(共有結合/mg)	
肺メラノーマ	0.330	+ 0.118
肺コントロール	0.010	+ 0.001
皮下メラノーマ	0.521	+ 0.076
正常肺	0.013	+ 0.003
正常腎	0.008	+ 0.001

メラノーマは日本を含め全世界的に発症頻度、死亡率が増加している。白人は90人に一人発生する。日本でも近い将来1000人に一人は発生すると予測される。日本人メラノーマは早期から転移を起こしやすく現在の化学、放射線、免疫療法は無効に等しい。新しいドラッグ・デリバリー・システムに基づく治療法の開発が急務である。

最終的には倫理委員会の許可を得、Phase I, II study を経、直接末期メラノーマ患者への臨床試験の基礎を得る。メラノーマ転移は皮膚癌のため全身の皮下転移が肝、肺、脳転移より早期に起こることが多い。

B/C. 研究方法・研究成果

研究方法・成果に関しては以下の5点の分担研究課題別に総合的に記載する。

- (1) 薬剤の合成とその新規結合型マグネタイトの開発；若松一雅、伊藤祥輔
- (2) 薬剤のデザインと合成法の開発；本多裕之、井藤 彰
- (3) 薬剤の選択的メラノーマ細胞移行性とオン温熱細胞死の誘導及び抗腫瘍効果；山下利春
- (4) 磁場発生装置の改良、化学温熱免疫(CTI) 治療室設置と学内臨床試験；小野一郎
- (5) メラノジェネシス標的化学温熱免疫(CTI) 両方における腫瘍免疫機構の解析；佐藤昇志、田村保明

1. 薬剤の合成とその新規結合型マグネタイトの開発

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%) (図1)。

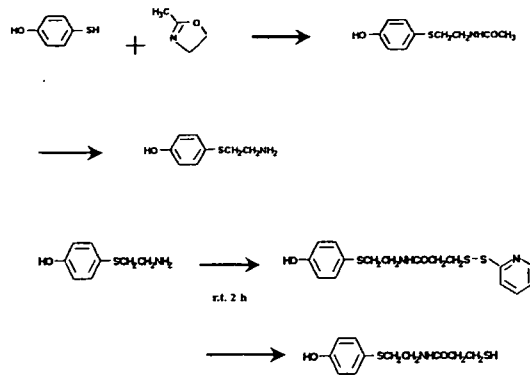


図1

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。HPLC条件：カラム(Silica gel Type MG, 10 μm, 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マスペクトルメトリーによるMS/MS法、((M+H)⁺: 258, 164, 153, 132, 125) (図2) および¹H-NMRスペクトル(CD₃COCD₃、400 MHz)により同定した。元素分析結果：理論値(C₁₁H₁₅N₁O₂S₂として)：C, 51.36；H, 5.84；N, 5.45；S, 24.90 測定値：C, 51.41；H, 5.78；N, 5.50；S, 24.83。

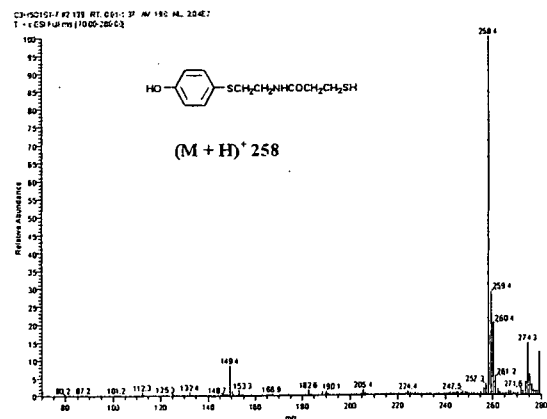


図2

2) 結合型マグネトリポソーム

N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-CAP
(NPrCAP/ML)の合成

名古屋大学大学院工学研究科本多研究室で合成されたマグネトリポソーム (ML) (40 mg/ml) 1ml に NPrCAP-SH (10 mg/ml メタノール溶液) 100 μ l を加えて、室温で 10 分間攪拌後、4℃の冷蔵庫で一晩放置した。その後、3000 rpm で 1 分遠心し、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。合成した NPrCAP-SH/ML を札幌医科大学へ郵送した (図 3)。

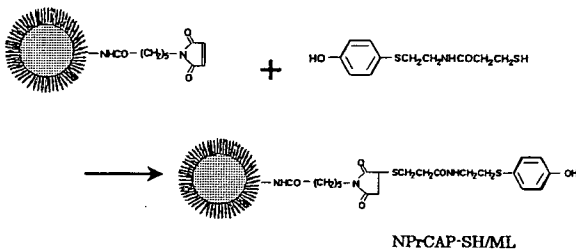


図3

3) NPrCAP-SH 直接結合型マグネタイト
(NPrCAP/M)の合成

名大本多研究室で合成された直接結合型マグネタイト (M) (40 mg/ml) 1ml に NPrCAP-SH (10 mg/ml メタノール溶液) 100 μ l を加えて、室温で 10 分攪拌後、4℃の冷蔵庫で一晩放置した。その後、3000 rpm/min で遠心、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。合成した NPrCAP/M を札幌医科大学へ郵送した (図 4)。

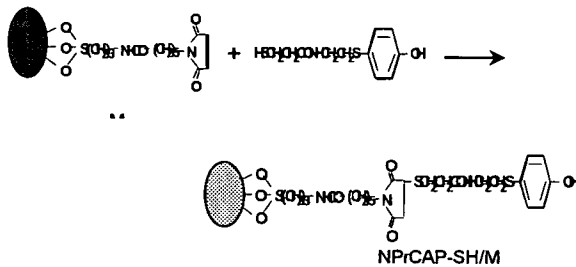


図4

4) マグネタイトのアミノシラン化

マグネタイト (40 mg/ml) を 50 ml 遠沈管に 5.0 ml 分注し、リン酸バッファー 5.0 ml で希釈する (最終濃度 20 mg/ml)。3-アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) 原液をフィルター滅菌して、2 ml 加え、vortex mixer で攪拌後、超音波で 60 分処理後、4,000 rpm で 40 分遠心後、上清を除き、リン酸バッファーを加えて、懸濁した。さらに超音波処理 5 分、vortex mixer で 1 分攪拌した (3 回繰り返す)。10 ml のリン酸バッファーを加え、超音波処理を 30 分行い、再分散した。

5) アミノシラン化マグネタイトと PEG との反応

SUNBright MA-050-HS (PEG) を 24 mg/200 mg マグネタイトになるように秤量し、1 ml のリン酸バッファーを加え、ろ過滅菌を行う。再分散が終わった遠沈管に PEG を全量加え、vortex mixer で攪拌する。超音波処理 60 分後、amicon チューブ 4 本に 2.5 ml ずつ分注し、4,000 rpm で 10 分遠心後、注射水 0.5 ml ずつ加え懸濁した。回収した懸濁液を一つの遠沈管に集め、超音波処理 30 分して再分散した。

6) PEG 修飾されたマグネタイトと NPrCAP-SH との反応

マグネタイト/PEG (20 mg/ml) 10ml にフィルター滅菌した NPrCAP-SH (12.5 mg/ml エタノール溶液) 1.0 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。Amicon チューブ 8 本に 1.25 ml ずつ入れ、4,000 rpm/min で 20 分遠心し、上清を分離した後、沈殿を蒸留水 0.5 ml で洗浄した。この操作を 3 回行った。Amicon チューブを逆さまにして、受け取りチューブに装着し、200 μ l の蒸留水を十字口に注ぎ、3,500 rpm で 2 分遠心した。8 本の Amicon チューブの試料を全量 2.5ml の蒸留水に懸濁して一つの遠心管に集め、超音波で 20 分間処理し、再分散させた (図 5)。合成したマグネタイト/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。

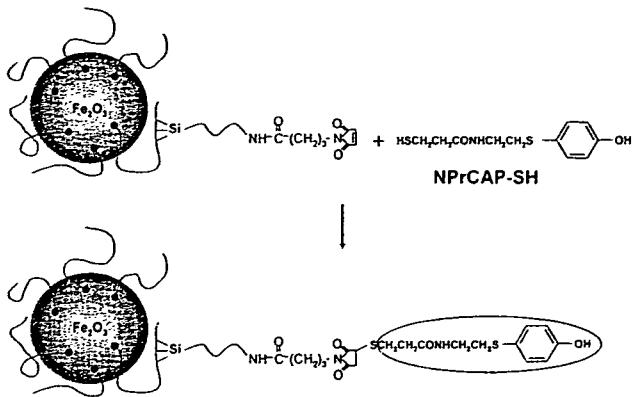


図 5

7) NPrCAP/M における NPrCAP-SH の結合量の測定

NPrCAP-SH のマグネタイトへの結合量は、NPrCAP/M を 6 M 塩酸で 110°C、1.5 時間反応させ、生成する 4-S-CAP 量を HPLC で定量することにより求めた。その結果、マグネタイト 1mg あたり 405 nmol の NPrCAP-SH が結合していることがわかった (図 6)。

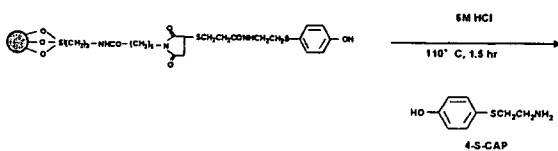


図 6

HPLC の分析条件：column：資生堂 Capcel pak (C₁₈)、移動相：メタノール：水：1M-HClO₄ (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

8) NPrCAP/PEG/マグネタイトにおける 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%)。しかしながら、この結合量はロットによるバラツキが見られた (図 7)。

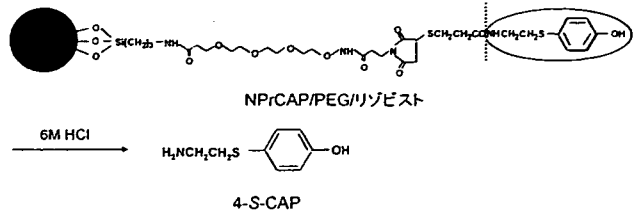


図 7

9) 4-S-CAP のチロシナーゼ酸化

NPrCAP/M のチロシナーゼ酸化による従来法のキノン体の生成量を測定する従来の比色法では、基質が黒色懸濁液のためでは使用できない。そこで、NPrCAP/M は 4-S-CAP 部分を含むので、NPrCAP/M のチロシナーゼ酸化を行なう前に、4-S-CAP のチロシナーゼ酸化を検討した。0.1 mM 4-S-CAP を 0.2 mM システイン共存下、マッシュルームチロシナーゼ (40 μg/ml) 酸化すると (図 8)、反応は 10 分で終了した。酸化により生成した 5-S-cysteaminy-3-S'-cysteinyl catechol は HPLC の分析より 7.9 分の保持時間であった。なお、初期濃度が半分になる時間は、4.2 分であった (図 9)。

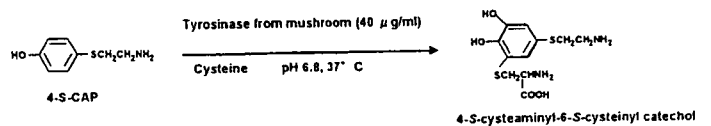
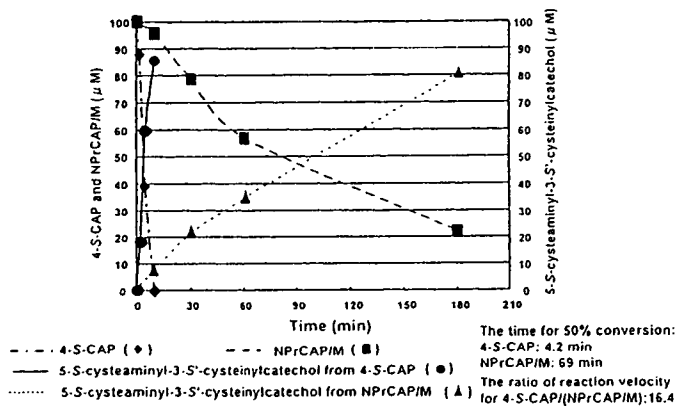


図 8



10) NPrCAP/M のチロシナーゼ酸化 (図 11)

NPrCAP/M 0.1 mM を 0.2 mM システイン共存下、マッシュルームチロシナーゼ (40 μg/ml) で酸化し、30 分、1 時間、3 時間反応させた。反応生成物を 6M 塩酸 (5% チオグルコール酸を含む) で 110°C、1.5 時間反応させ HPLC で分析後 (図 10)、残存する 4-S-CAP 量と生成する 5-S-cysteaminy-3-S'-cysteinyl catechol 量を測定した。NPrCAP/M の初期濃度が半分になる時間は、69 分であった。この結果から、4-S-CAP/(NPrCAP-SH/M) の反応速度の比は、16.4 になった。一方、生成した 5-S-cysteaminy-3-S'-cysteinyl catechol 量は時間とともに増加し、3 時間後、80 μM となった (図 10)。以上の事から、NPrCAP/M がチロシナーゼの基質になる事がわかった。

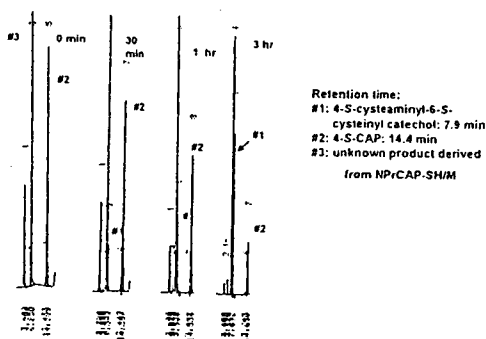


図 10

2. 薬剤のデザインと合成法の開発

研究方法

1) 4 種類の薬剤の合成

3 種類の薬剤の概略図を図 1 に示す。

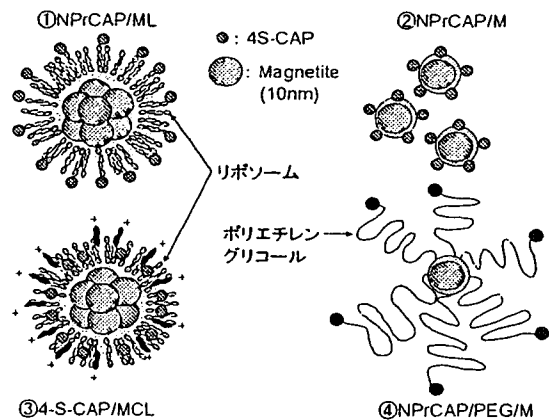


図 1 4 種類の薬剤

① NPrCAP/ML の作製

PC, PE, DPPE-propyl maleimide をクロロホルム中で溶解して、ナス型フラスコ内 40°C で 1 時間エバポレートすることでクロロホルムを揮発させ、さらに 4°C のデシケーター内で半日以上保存することで脂質膜を作った。さらに、予め洗浄して濃度を合わせた水分散マグネタイトを、ナス型フラスコの脂質膜に添加し、15 分かけて激しくボルテックスミキサーにかけ、さらに超音波処理を 20 分間行うことで、マレイミド基が突出したマグネトリポソーム (ML) を作製し、藤田保健衛生大学の研究分担グループに送った。

② NPrCAP/M の作製

10 nm の酸化鉄ナノ粒子 (Fe₃O₄) であるマグネタイト表面の水酸基に、アミノシランカップリング剤 (3-aminopropyltriethoxysilane) を結合させることでアミノ基を導入し、スクシンイミド基とマレイミド基を両端に持つ化合物 (Sulfo-GMBS) を反応させることで、マグネタイト表面にマレイミド基を導入し、結果として無機金属化合物であるマグネタイトの表面に有機化合物である CAP 化合物を結合させる方法を提案し、合成することに成功した。これを藤田保健衛生大学の研究分担グループに送った。

③ 4-S-CAP/MCL

DLPC, DOPE, TMAG, 4-S-CAP をメタノール中で溶解して、ナス型フラスコ内 40°C で 1 時間エバポレートすることでメタノールを揮発させ、さらに 4°C のデシケーター内で半日以上保存することで 4-S-CAP を含む脂質膜を作った。さらに、予め洗浄して濃度を合わせた水分散マグネタイトを、ナス型フラスコの脂質膜に添加し、15 分かけて激しくボルテックスミキサーにかけ、さらに超音波処理を 20 分間行うことで、4-S-CAP が包埋されたマグネタイトカチオニックリポソーム(MCL)を作製した。作製した 4-S-CAP/MCL を動的光散乱による粒径測定 (大塚電子) に供した。

④ NPrCAP/PEG/M の作製

40mg/ml のマグネタイトコロイド溶液 10ml にアミノシランカップリング剤である 3-Aminopropyltriethoxysilane(APTES) を 2ml 加え、超音波発生装置で超音波を当てた状態で 1 時間反応させた。その後、遠心分離 (4000rpm, 40min) をして上清を除き、10ml のリン酸緩衝液 (pH 7.5) を加えて攪拌した。その後、遠心分離 (4000rpm, 10 min) をして上清を除き、10ml のリン酸緩衝液 (pH 7.5) を加えて攪拌するといった洗浄の操作を 3 回繰り返し、マグネタイトの微粒子を洗った後、10ml のリン酸緩衝液に再懸濁した。続いて、ポリエチレングリコール (SUNBRIGHT MA-050TS) を 24 mg 秤量して 1ml のリン酸緩衝液に溶解させ、濾過滅菌した後、マグネタイトを含む溶液と混合させた。超音波発生装置で超音波を照射しながら 1 時間反応させた。反応終了後、Amicon tube 4 本に 2.5ml ずつ分注し、遠心分離 (4000rpm, 20min) をして上清を除き、0.5ml ずつの注射用蒸留水を加えて懸濁した。遠心分離 (4000rpm, 10min) をして上清を除き、0.5ml ずつの注射用蒸留水を加えて懸濁した。この操作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、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 20min 処理し再分散させた。作製した NPrCAP/PEG/M の粒子径は、動的光散乱法により測定した。

2) 4-S-CAP/MCL を用いたガン治療実験

① in vitro 実験

4-S-CAP 包埋型 ML を上述の方法で作製する際に、4-S-CAP の添加量を変えた薬剤を 25-400 μ M に変えて作製し、濃度の異なる 4-S-CAP 包埋型 ML を作製した。これらを B16 メラノーマ細胞に添加して、2 日後の細胞数をトリパンブルー色素排除法で測定することで、4-S-CAP 包埋型 ML としてリポソーム表面に固定化した 4-S-CAP の抗メラノーマ殺細胞活性を評価した。

B16 細胞内への 4-S-CAP 包埋型 ML の取り込み量測定は、150 pg-magnetite/cell (4S-CAP としては 100 μ M) の濃度で B16 細胞に添加し、24 時間培養後に細胞内鉄濃度をチオシアン酸カリウムによる比色法により測定した。

in vitro における磁場印可に伴う発熱実験は、マグネタイトを取り込んだ細胞を培養皿からはがして回収し、PBS で細胞を洗浄した後、細胞数を 3×10^7 cells に調製してペレットにした。このペレットに対して、高周波磁場発生装置を用いて磁場照射 (360kHz, 5kW) を 30 分間行った。磁場照射時の細胞ペレットの温度は、光ファイバー温度計で測定した。磁場照射後の細胞数の経時変化は、細胞を培養皿に再播種して、1 日後および 2 日後の細胞数をトリパンブルー色素排除法で評価した。

② in vivo 治療実験

B16 メラノーマ細胞を C57Bl/6 マウスに移植し、腫瘍径が 5 mm になった時、4-S-CAP 包埋型 ML (20 mg-magnetite/ml (0.15ml)) を

腫瘍に直接注入して、高周波磁場 (360kHz, 5kW) を 30 分間照射した (day 0)。さらに翌日、もう一度 4-S-CAP 包埋型 ML (20 mg-magnetite/ml (0.15ml)) を腫瘍に注入して、高周波磁場 (360kHz, 5kW) を 30 分間照射した (day 1) といった治療実験を行い、腫瘍径を 2 日ごとに計測していくことで治療効果を調べた。

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 PEG-Mag、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 Sulfo-GMBS/Mag)、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 細胞を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/Mag の水分散コロイド溶液を用意した。実験前日に、6 ウェルのマイクロプレートに 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 ウェル分ずつ作製した。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 μ l、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。

4) PEG-M の細胞内取り込み量測定と細胞毒性の評価

PEG-Mag, PEG 結合前の Aminosilane-Mag, およびコントロールとして未修飾のマグネタイトといった三種類の磁性ナノ粒子を用いて、三種類の細胞株 (ヒト表皮角化細胞 HaCaT, マウス線維芽細胞 NIH3T3, マウス筋芽細胞 C2C12) によって食食される量を測定した。実験前日に、ターゲット細胞を 60-mm dish に 5×10^5 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、ターゲット細胞が三種類、細胞に取り込ませる時間が 1 時間、2 時間の 2 条件、 $n=3$ で行った。一細胞当たりマグネタイト量が 100 pg 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それぞれの培地を作製した。培養皿から培地を除き、それぞれのマグネタイトを含んだ培地と交換した。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、トリプシン溶液を用いて細胞を回収し、細胞数をトリパンブルー色素排除法でカウントし、残りを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 0.2 ml 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を 1 ml 加え、4°C の冷蔵庫で 30 分間静置した。その後、遠心分離を行い、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 μ l、チオシアン酸カリウム 4 ml を加えて、比色法にて細胞内の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培養皿の細胞数で割ることで、一細胞当たりに取り込まれたマグネタイト量を算出した。

細胞毒性評価は、WST-8 アッセイを用いて行った。ターゲット細胞 (HaCaT, NIH3T3, C2C12 細胞) を 96-well plate に 5000 cells/well で播種し、それぞれのマグネタイト溶液が 0.1, 1 および 10 ng/cell の濃度の培地と交換した。48 時間後、WST 試薬を 10 μ l 培地に添加して、490 nm の吸光度を測定することで細胞の生存率を測定した。

(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。

研究結果

1) 3 種類の薬剤の合成

NPrCAP/ML, NPrCAP/M, 4-S-CAP/MCL, NPrCAP/PEG/M の 4 種類の薬剤の合成に成功した。薬剤の水分散性としては、NPrCAP/PEG/M が最も高かった。また、NPrCAP/ML, NPrCAP/M, MPrCAP/PEG/M に関しては、研究分担グループである藤田保健衛生大学によって完全に合成され、さらに札幌医科大学のグループにより、in vivo での抗腫瘍効果が確かめられた。4-S-CAP 包埋型 ML に関しては、本研究分担グループが全て合成を行った。動的光散乱による粒径測定の結果、4-S-CAP 包埋型 ML の平均粒子径は 403.8 ± 39.3 nm であった。

2) 4-S-CAP 包埋型 ML を用いたガン治療実験

① in vitro 実験

4-S-CAP 包埋型 ML を B16 の培養液中に添加したところ、4-S-CAP の殺細胞効果が濃度依存的に確認された (図 2)。

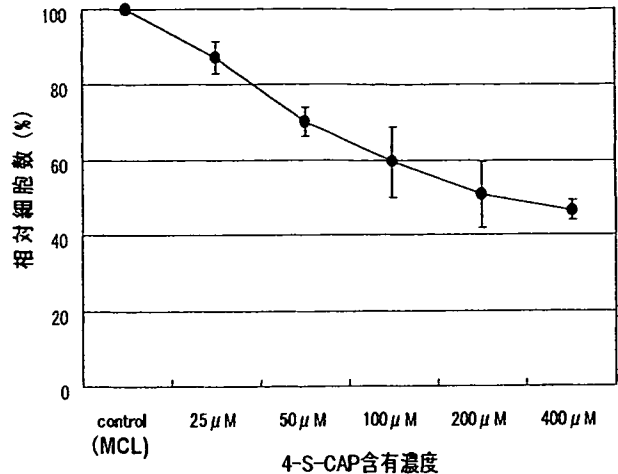


図 2 4-S-CAP/MCL の殺メラノーマ活性

また、4-S-CAP 包埋型 ML を B16 の培養液中に添加して、細胞内へのマグネタイトの取り込み量について調べたところ、18 pg/cell が細胞に取り込まれていた。さらに、その細胞に交番磁場を照射したところ、マグネタイトが発熱することで、ペレット全体が 43°C に加温された (図 3)。

さらに、磁場照射後の細胞を培養皿に再播種して、細胞数の経時変化を測定したところ、4-S-CAP 包埋型 ML における「4-S-CAP」のもつ殺細胞効果と「マグネタイト」による温熱療法による殺細胞効果に相加効果があることが分かった。これらの in vitro の結果から、4-S-CAP 包埋型 ML は CAP による

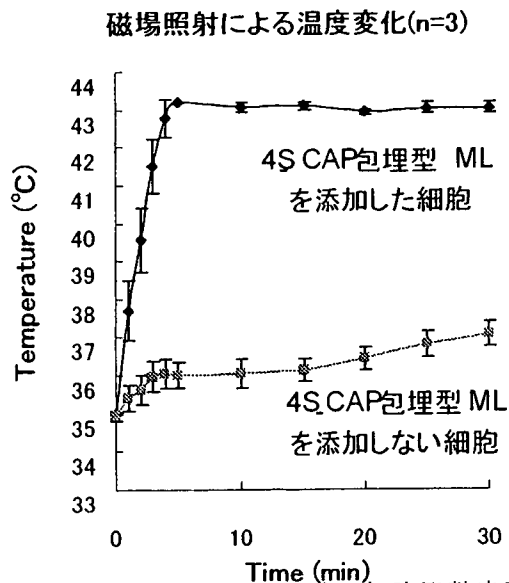


図 3 in vitro における細胞発熱実験

図3 in vitro における細胞発熱実験

化学療法とマグネタイトによる温熱療法を同時に可能にする素材であることが分かった。

② in vivo 治療実験

この薬剤の抗腫瘍効果を調べるために in vivo の実験を行った。B16 担癌マウスに 4-S-CAP 包埋型 ML を局注して、さらに交番磁場を照射したところ、腫瘍局所の温度は、磁場照射開始5分以内に 45℃まで上昇した。無治療のマウス、4-S-CAP 包埋型 ML を投与しただけのマウス、および 4-S-CAP を含まないマグネタイトカチオンリポソームによる温熱療法のみを施したマウスの腫瘍と比較して、有意に腫瘍体積増加を抑制し(図4)、6匹中の1匹の腫瘍は完全に退縮した。

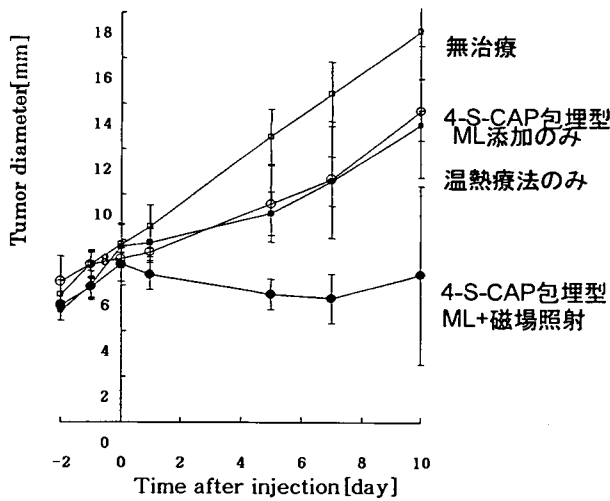


図4 in vivo における抗腫瘍効果

これらの結果から、CAP 化合物とマグネタイトを含むナノパーティクルは、メラノーマ治療において強い抗腫瘍効果を示すことが期待される。

3) PEG 化マグネタイトのマクロファージ食抑制効果

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貪食された。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。

4) PEG-M の細胞内取り込み量測定と細胞毒性の評価

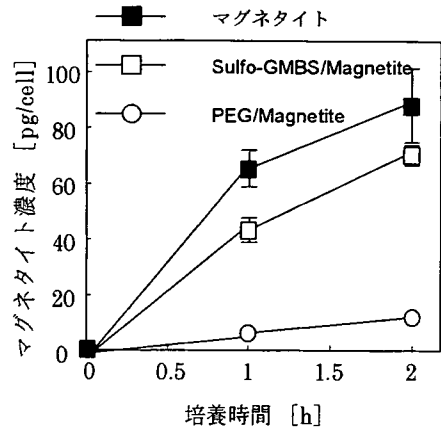


図5 PEG 化マグネタイトのマクロファージ食抑制効果

図6に PEG-Mag および Aminosilane-Mag を添加した後の細胞内マグネタイト量を示す。

図6に示すように、PEG-Mag の細胞内取り込み量は、Aminosilane-Mag の取り込み量と比較して、はるかに低く、添加した量のわずか 5-10%程度の取り込み量であるこ

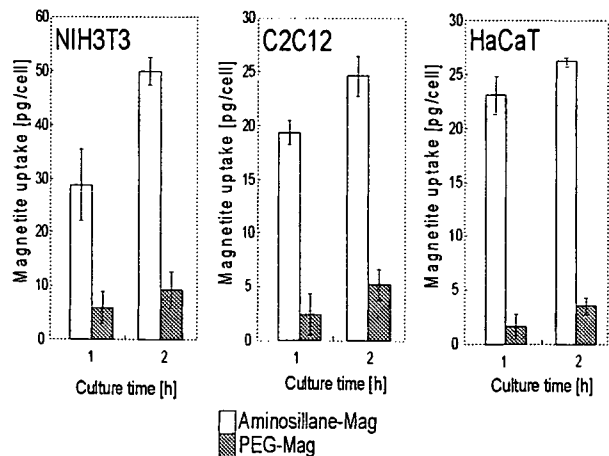


図6 PEG-Mag の細胞内取り込み量

とが分かった。

さらに、PEG-Mag および Aminosilane-Mag が 0.1, 1 および 10 ng/cell を添加した後

胞では 0.1 および 10 ng/cell の濃度で、NIH3T3 細胞では 10 ng/cell を添加した時、有意に PEG-Mag の生細胞率が高かった。このことは、PEG-Mag の細胞内取り込み量の低下 (図 6) に伴い、細胞毒性も低下したと考えられる。

3. 薬剤のメラノーマ細胞選択的移行性と温熱細胞死の誘導及び抗腫瘍効果

研究方法

1) 薬剤のメラノーマ細胞選択的移行性と温熱細胞死の誘導

細胞に対する親和性を検討するため、メラノーマ細胞 (B16F1、SK-mel-23、SK-mel-24、SK-mel-118、MM418、70W、TXM18、MMIV、AK-1、96E)、非メラノーマ細胞 (NIH3T3、LLC、T98G、HeLa、SaOS2、HaCaT、H1229、Caski) に NPrCAP/M を添加して培養し、細胞内のマグネタイト量を鉄定量により測定した。B16F1 メラノーマ細胞、RMA リンフォーマ細胞、EG7 リンフォーマ細胞を移植した C57/BL6 マウスに NPrCAP/M を腹腔内投与し、15 日目に腫瘍組織を切除し、鉄染色によって NPrCAP/M の移行を検討し、さらに電子顕微鏡で細胞内鉄粒子の観察を行った。NPrCAP/M 処理細胞に 43°C、30 分間の磁場照射を行い、48 時間後に生細胞数を計測した。同様に NPrCAP/M により温熱処理したメラノーマ細胞の DNA をフローサイトメーターで、細胞内カスパーゼ 3、8、9 の活性をアッセイキットにより測定した。

2) 薬剤のメラノーマ選択的抗腫瘍効果
次いでマウス B16F1 メラノーマ細胞 (3.0×10^5) を C57BL/6 マウスに移植しメラノーマの動物モデルとした。磁場発生装置は第一高周波コイル型 LTG-100-05 (118kHz、30.6kA/m) を使用した。安立計器蛍光式ファイバー FX-9020 を用いて腫瘍表面温度をモニターし治療温度を調節した。右側腹部に B16F1 細胞を移植後、NPrCAP/M 4 mg を局注し磁場照射による温熱療法を施行し、13 日後に切除した。術後 40 日目に左側腹部に 2 次腫瘍を移植した。その後 60 日間、生存マウスを追跡し、2 次腫瘍の腫瘍容積、生存率 (Kaplan-meier 法と logrank 検定)、

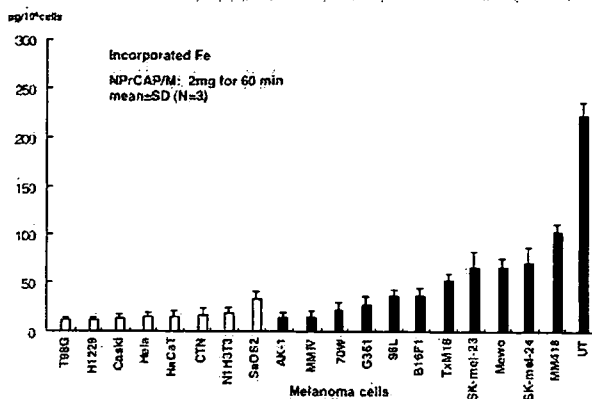
2 次腫瘍拒絶率、Cox 比例ハザード回帰モデルの 4 つのパラメーターで統計解析した。薬剤、局注回数、磁場照射の回数、間隔、治療温度、磁場照射時間、を組み合わせ以下の治療プロトコールに従って 1 次腫瘍に温熱療法を行い、2 次腫瘍の腫瘍容積と宿主の生存期間、生存率を検討した。【プロトコール 1】 NPrCAP をマグネタイトに結合させた効果を評価するため、磁場照射を隔日 3 回、治療温度 43°C、照射時間 30 分として、1) マグネタイト局注群、2) マグネタイト局注+磁場照射群、3) NPrCAP/M 局注群、4) NPrCAP/M 局注+磁場照射群を設定した。【プロトコール 2】 磁場照射の至適回数、治療間隔を決めるため、腫瘍表面温度 43°C、30 分間として 1) 1 回照射群、2) 隔日 2 回群、3) 3 日間隔 2 回群、4) 隔日 3 回群、5) 連日 3 回群、6) 連日 5 回群を設定した。【プロトコール 3】 至適治療温度と治療間隔を決定するため、1 回の治療時間を 30 分間として、1) 3 日間隔日 2 回 41°C 群、2) 隔日 3 回 41°C 群、3) 3 日間隔 2 回 43°C 群、4) 隔日 3 回 43°C 群、5) 3 日間隔 2 回 46°C 群、6) 隔日 3 回 46°C 群を設定した。【プロトコール 4】 治療温度、治療時間を決定するため、治療回数、間隔を隔日 3 回に固定し、1) 43°C 15 分間群、2) 46°C 15 分間群、3) 43°C 30 分間群、4) 46°C 30 分間群を設定した。各治療グループのコントロールには無治療マウス (n=10~11) を用いた。1 次腫瘍における HSP70 の誘導を ELISA キットを用いて定量した。2 次腫瘍における炎症細胞浸潤と T 細胞を HE 染色と免疫組織染色によって検討した。

研究結果

1) 薬剤のメラノーマ細胞選択的移行性と温熱細胞死の誘導

NPrCAP/M 添加培養細胞に磁場照射を行うと速やかに温度上昇し、10 分以内に 30°C から 50°C まで上昇した。各種細胞株に NPrCAP/M を添加して培養し、細胞内のマグネタイト量を鉄定量により測定した結果、メラノーマ細胞は非メラノーマ細胞に比べマグネタイトよりも NPrCAP/M をより多量に取り込む傾向を示した (Fig. 1)。

Fig. 1 Melanoma cells preferentially incorporate NPrCAP/M.
Cells exposed to NPrCAP/M were lysed and the incorporated Fe was measured.



腫瘍細胞を移植したマウス腹腔内に NPrCAP/M を投与し 2 週間後に腫瘍を切除して鉄染色を行うと、B16F1 メラノーマ細胞に鉄染色陽性細胞がみられた。一方、リンフォーマ細胞に鉄は検出されなかった。電子顕微鏡により B16F1 腫瘍細胞を観察すると、NPrCAP と結合している鉄粒子は細胞質内の後期メラノソームに局在していた。NPrCAP/M を添加して培養したメラノーマ細胞に磁場照射し、43℃で 30 分間温熱すると細胞死が誘導されたが、非メラノーマ細胞はほとんど障害されなかった (Fig. 2)。

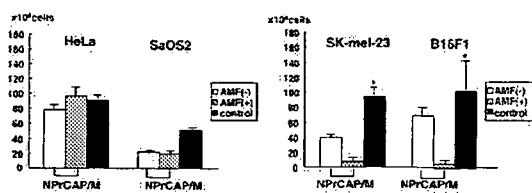


Fig. 2 NPrCAP/M treatment and AMF exposure induce melanoma-specific cell death.

NPrCAP/M 処理後に磁場照射したメラノーマ細胞を解析した結果、細胞 DNA の断片化は認められず、カスパーゼ 3、8、9 活性の亢進もみられなかった。

2) 薬剤のメラノーマ選択的抗腫瘍効果

次いで 治療法開発のための *in vivo* 動物実験では治療中の腫瘍表面温度は磁場照射開始後 1 分以内に設定温度 (41℃、43℃、46℃) に到達した。腫瘍中心部は表面温度より約 2℃高かった。上記各プロトコール 4-6 群における局所温熱療法による 2 次腫瘍および宿主の解析から以下の結果を得た。1) NPrCAP/M 局注+磁場照射は、マグネタイト局注+ 磁場照射に比べ、2 次腫瘍に

対する増殖抑制効果が強く 30%の生存マウスがみられた (プロトコール 1)。2) 43℃隔日 3 日間群が 2 次腫瘍の腫瘍抑制、生存率ともに、隔日 2 回群、連日 3 回群、連日 5 回群に比べ、優位に優れていた (プロトコール 2)。3) 3 日間隔日 3 回磁場照射の条件で治療温度を 41℃、43℃、46℃間で比較した結果、43℃隔日 3 回治療群が 41℃、46℃群に比べ、腫瘍サイズ、生存率のいずれにおいても優れていた (プロトコール 3)。4) 43℃、15 分間治療群と 43℃、30 分間治療群の間に優位差は認められなかったが、いずれの治療群も 46℃、15 分あるいは 46℃、30 分治療群よりも 2 次腫瘍抑制およびマウス生存率が優れていた (プロトコール 4)。46℃、30 分間治療群は 43℃、15 分間治療群に比べ 1 次腫瘍抑制効果が強かったが、2 次腫瘍抑制効果および生存率は逆に 43℃、15 分間治療群が優れていた。以上より、NPrCAP/M による温熱療法では、46℃よりも 43℃、15-30 分磁場照射が 2 次腫瘍拒絶効果が最も強いことが見出された。治療 24 時間後の 1 次腫瘍内の HSP70 の発現量は無治療腫瘍に対して 43℃30 分間群が 9.8 倍、46℃15 分間群が 9.6 倍であったが、NPrCAP/M 局注群 (磁場照射なし) でも 2.7 倍の亢進がみられた。NPrCAP/M 隔日 3 回 43℃、30 分間治療群における 2 次腫瘍では、一部壊死した腫瘍周囲に CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞の浸潤を認めた。

4. 磁場発生装置の改良、化学温熱免疫 (CTI) 治療室設置と学内臨床試験

研究方法

1) 臨床治療が可能な交番磁場発生装置開発、改造

従来、臨床治療用に設計され試作されていた交番磁場発生装置は動物実験用の磁場照射ヘッドがチューブ構造の機器と異なりテーブル状の治療コイルヘッドを持ち、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昇降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アームを追加し、30分以上の治療期間安定にその位置を維持可能な堅牢性を有することの2点である。また、治療用ヘッドが加熱することを防止するために治療用ヘッドを大型として冷却水の流量を増加させる改造も行った。

2) 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 μ T、2 m 離れば 1 μ T 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 μ T 以下、2 m 離れば 2 μ T 以下であることを踏まえ、現実的には 50 ないし 60cm 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た。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あるが、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、他の医療治療機器ないしコンピューター、電子カルテシステムへの影響、さらには治療にあたる医師の健康被害の可能性を可能な限り排除することを目的として完全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施行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 環境温度 10-35°C であるので以上を満たす電源と給排水、並びに冷暖房、照明装置を完備する治療室として設計依頼するとともに完成後に治療室の電磁波の遮蔽効果を RF attenuation meter aF-130L と 130D とを用いて検証した。測定は治療室の壁面、ドア、観察的などの 5 点を選択して低周波領域から高周波まで磁場の漏洩の程度を検討した。

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、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・均一化した 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二番目の目的とした。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 cm^3 程度の別の患者から採取した MM 腫瘍の一部分を筋膜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 MM 巣を作成した。本検討は当該患者の同意を得た上でおこなっている。次いで CAP/M 溶液 0.5 ml をシリンジポンプで 30 分かけて疑似腫瘍内に注入した。臨床例におけるのと同様 24 時間待機した後、光学式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。その際、磁場照射に伴う腫瘍中心部の温度上昇の経過と治療後の病理組織像を検討した。

4) 治療効果の判定

治療効果の判定は経時的に実施した超音波診断装置、CT、MRI の画像 Personal Computer に移植し、次いで Image J にて皮下腫瘍、遠隔転移腫瘍の大きさを測定、簡易的

に体積を計算して行った。具体的には超音波診断装置から画像dataをカラーBMP形式でCD経由でPCへ移植する。次いでPhotoshopでモノクロJPG dataへ変換保存。計測用softにより、距離を測定し、体積は長軸X単軸X厚さX $3/4X\pi$ で算出した。

5) 臨床例への応用

以上の治療環境の整備、治療手順の作成、動物実験の検討結果を踏まえて自主臨床研究として札幌医科大学附属病院のIRBの許可を得て、2007年3月からstage IIIc、IVのMM患者に対してCTI治療の臨床応用を開始した。治療にあたっては治療による利益と不利益とを詳細に患者並びに家族に説明し、患者本人の同意を得た上で治療を開始した。治療にあたっては札幌医科大学附属病院自主臨床研究の手引き書、日本国厚生労働省臨床研究手順書に従い、Hershinki宣言の精神を遵守して遂行した。治療は皮下腫瘍に注射針を超音波診断装置監視下に薬剤を30分かけて注入、その24時間後に腫瘍内温度を監視下に交番磁場発生装置による磁場照射を30分間行った。腫瘍内温度は腫瘍内に留置した光学式温度計により監視して45-6°Cとなるように、かつ腫瘍周辺で43°Cを越えないように交番磁場発生装置の出力を調整して治療した。その治療を連日3回繰り返す治療を1クールとした。溶液は3回の治療で腫瘍体積 cm^3 あたり0.5 mlとし、1クールの治療では最大量2.0 mlを越えないようにした。治療腫瘍は治療第1日から2-3週間後に患者の同意を得て全身麻酔下、あるいは局所麻酔下に切除し、各種の検討を行った。現在までに4例の臨床例に対して治療を開始しているが現在まで長期の経過観察が可能であった2症例の経過について報告する。

研究結果

1) 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を大型にし、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するとともに流量が低下したり異常な温度上昇が有ると機器が自動的に停止する安全装置も完備した。また、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た。治療に先立つ長時間に及ぶ試験運転でも装置には異常発熱は認められず、臨床治療が安全に遂行できる装置であることを確認できた。この際に計測した治療用固定コイルヘッドの温度上昇は軽微で冷却水温度(最高27°C前後)と同程度であり、治療時に患者に熱障害を与える可能性が全くないことが確認できた。

2) CTI治療室の設計・施工

従来の皮膚科外来の一角に3 x 2 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。点検窓は2枚のガラス間に金属製メッシュ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100V6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。また、CTI治療室のシールド効果を測定した結果、156 KHzの周波数ではおよそ20db以上の遮蔽効果があり、交番磁場発生装置から最も強く発生するのは150KHzの高周波磁場である事を勘案し、その倍数周波数も生ずるが次第に減弱すると考えられるので現状で十分な遮蔽効果が有ることが確認された。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、治療用木製ベッドを設置した(図1)。

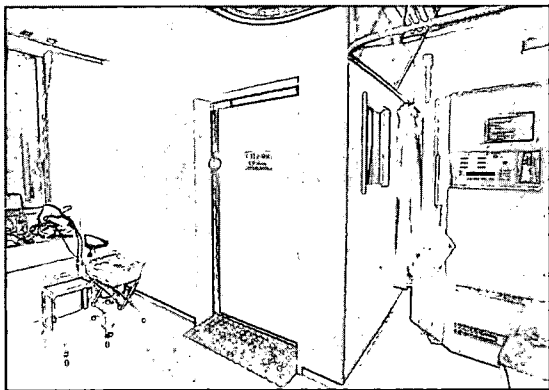


図1: CTI治療室

3) 臨床治療手順

手術時に採取したMMと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可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た。

治療に当たってはCAP/M溶液0.5mlを μ シリンジポンプで治療腫瘍に30分かけて注入、24時間後に磁場治療を行った。治療腫瘍内に確実に薬剤を注入するために超音波診断装置を用いて行う様にした(図2)。

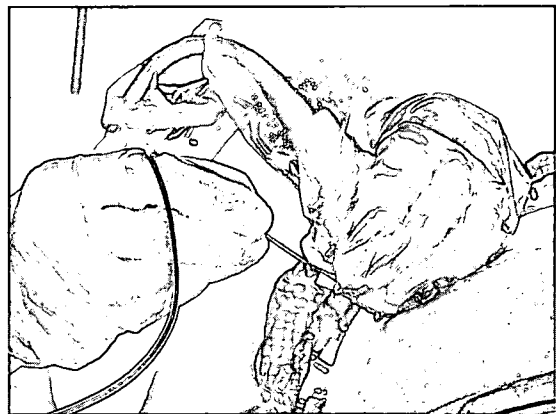


図2: 超音波診断装置を用いた薬剤注入。

その24時間後に磁場治療を行った、治療に当たっては腫瘍内と表面温度の測定を行い、腫瘍内温度を43度に30分間維持した。治療手順は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な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位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をとる。水が循環していることを確認してから治療部位にコイルヘッド部の位置決めをして無理なく治療可能であることを確認する。治療部位が水平でコイルヘッド部の中央に来るように体位を取りベッドの上、治療部位の下にタオルなどを挿入する。治療する腫瘍をマーキングし、その中心を基準に患者様の腫

瘍がコイルの中央にきちんと圧着されるように直行する照準線を描く。温度計のセンサーを腫瘍の直上に貼り付け、フィルム製被覆材で被覆固定する。腫瘍内温度を測定するには 18G サーフローを局麻下に腫瘍中心部と腫瘍辺縁まで挿入、内筒を除去した後に消毒した温度センサーを 2 本挿入しテープで固定する。交番磁場治療装置の治療ヘッドの中心が腫瘍の直上に 2-3mm 離れた状態で固定する。温度記録を開始し、機器の電源を ON とする。赤いボタンを 2 個左から順に(まず準備、次いで加熱)押してボリューム(レベル)を右(時計回り)に回してはじめだけ 150-200V 位で開始し、腫瘍内温度が 41 度を越えたら後は 50-100V 位にして腫瘍内温度が 45-6.0 度くらい、腫瘍周辺の温度が 43.0 度を越えないようにレベルを調整して保持する。その条件では次第に温度が上昇するので、43 度を絶対に越えないように調整する。転移腫瘍が皮膚の直下の場合には腫瘍内の温度計測は必ずしも必要ない。30 分の加熱治療が終了したらレベルを反時計回りに回して停止ボタンを押して shutdown する。機器が停止したことを確認して CTI 治療室の扉を完全に開放する。次いで交番磁場治療装置の治療ヘッドを患者から離脱させ、治療部位に異常がないかを確認する。10 分間程度ポンプを運転して機器が完全に cool down されたことを確認してからポンプの電源、次いで壁の電源ブレーカーを OFF にする(図 3)。

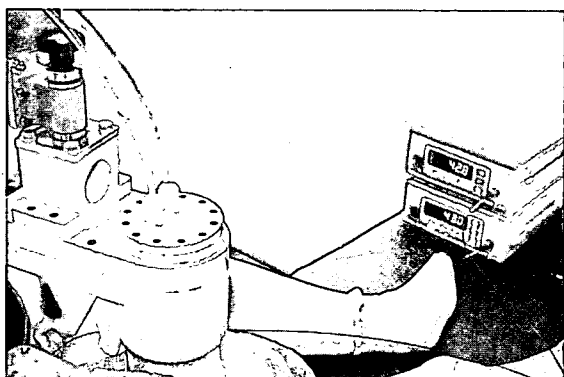


図 3: 腫瘍の中央と片雲の 2 箇所の温度上昇をモニターしながら磁場治療を行う。

4) 診断機器の画像情報を用いた治療効果の判定 超音波診断装置の画像 data を用いて計測用 software により、腫瘍の容積を算出して経時的に測定した結果、適切に治療された症例では治療効果を判定する皮下転移のモニター腫瘍の体積を性格に計測することが可能であることが明らかとなった。また、臓器内の MM 転移巣については CT の画像データを用いて同様に効果判定が可能であった。

5) 早期臨床例の結果

症例 1: 77 歳女性: 2006. 7. 11 初診。左第 1 趾の MM。術後左大腿左単径部に皮膚転移、リンパ節転移を来し、現在までに 3 回の手術を施行してきたが、さらに 2007 年 1 月になり、さらに同部に MM の再発を見た。CTI 治療を 3 月 28 日から開始した。治療腫瘍は左大腿部の皮下転移巣。治療に当たっては CAP/M 溶液 0.5 ml を 2 回注入、3 回隔日に磁場治療を行った。その際、腫瘍内と表面温度の測定を行い、腫瘍内温度を 43 度に 30 分間維持した。所定の CTI 治療後、15 日目に治療腫瘍を近接部の小皮膚転移巣とともに切除した(図 4a, b)。

図 4a: 摘出した治療腫瘍。

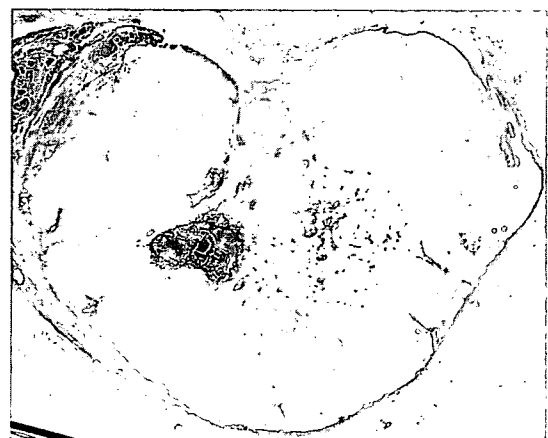


図 4b: 摘出した治療腫瘍の病理組織像。

その結果、一過的に若干の腫瘍縮小効果がみとめられたものの左の単径部の皮下腫瘍

(リンパ節)が治療に反応せず増大し続けたため6月29日から2回目のCTI治療を開始した。2回目の治療では左大腿部のリンパ節と考えられる腫瘍内に薬剤を3回に分けて2.0 ml注入、腫瘍内温度が45℃となるように隔日3回の磁場治療を行った。所定の治療を終了した後、7月20日に治療腫瘍を切除した。その結果、2回目の治療開始後60日の現在、全てのモニター腫瘍の縮小を見ている。

症例2は69歳男性：2006. 6. 14初診。原発巣不明の体表の多発性の転移性悪性黒色腫。現在までに2回の手術を施行してきたが、さらに2007年3月になり、体幹に5個の悪性黒色腫の再発を、左の単径部には2個のリンパ節転移巣を、さらに左乳房皮下に見た。CTI治療を4月11日から開始した。治療腫瘍は左上右腕背側部の皮下転移巣とした。治療に当たってはCAP/M溶液0.5 mlを3回注入、3回隔日に磁場治療を行った。その際、腫瘍内と表面温度の測定を行い、腫瘍内温度を45度に30分間維持した。所定のCTI治療後、15日目に治療腫瘍を切除した(図5a, b)。

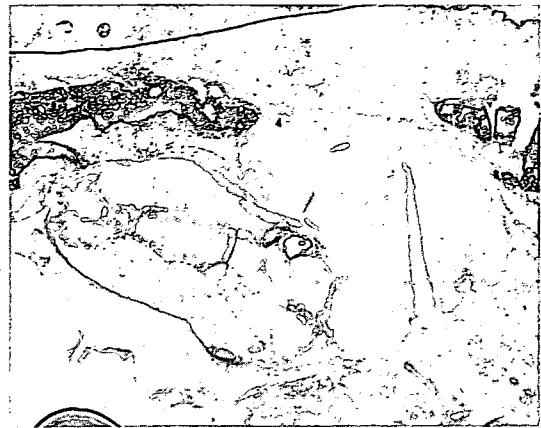
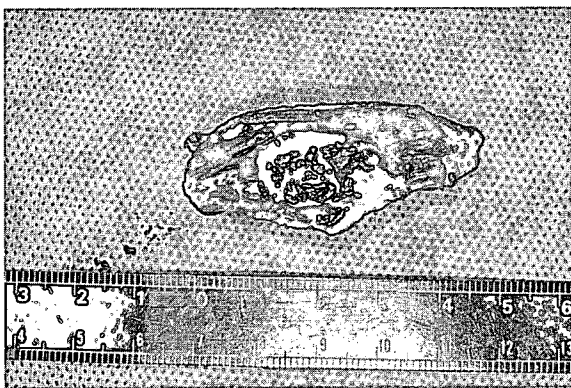


図5b: 治療腫瘍の病理組織像。

多くのモニター腫瘍で劇的な縮小効果が観察された。中でも体幹皮下に存在していたMM転移巣は治療後15日には劇的な縮小を見せ、その時点で体積が半分の症例も観察された。また、左乳頭部に存在した皮下腫瘍を治療開始後76日目に採取して病理組織学的に検討したところCD(陽性のCTLと考えられるリンパ球が多数観察された(図6))。

図6: 非治療腫瘍の免疫染色像。

なお、それらの皮下腫瘍はその後も順調に縮小を続けているが一部の腫瘍(単径リンパ節転移)の再増殖を認めため左単径部のリンパ節転移巣に9月5日から再治療を行った。2回目の治療では左大腿部のリンパ節と考えられる腫瘍内に薬剤を3回に分けて2.0 ml注入、腫瘍内温度が45℃となるように隔日3回の磁場治療を行った。所定の治療を終了した後、9月20日に治療腫瘍を切除した。現在経過観察中であるが確認できる全ての腫瘍の縮小が順調に認められ新たな腫瘍の発生は認められていない(図7)。