

# 発育鶏卵を用いた5-Aminolevulinic acidおよび Tin Chlorin e6の薬物動態と超音波増感活性の評価

宇都義浩<sup>1</sup>, 玉谷 大<sup>1</sup>, 水木佑輔<sup>1</sup>, 遠藤良夫<sup>2</sup>, 大久保 敬<sup>3</sup>, 中西郁夫<sup>4</sup>,  
石塚昌宏<sup>5</sup>, 田中 徹<sup>5</sup>, 口池大輔<sup>1, 6</sup>, 久保健太郎<sup>6</sup>, 乾 利夫<sup>1, 6</sup>, 堀 均<sup>1</sup>

<sup>1</sup>徳島大学大学院STS研究部

<sup>2</sup>金沢大学がん進展制御研究所

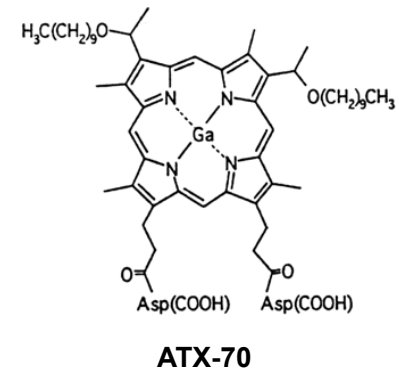
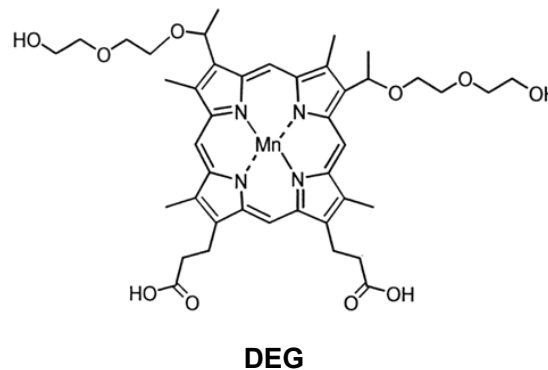
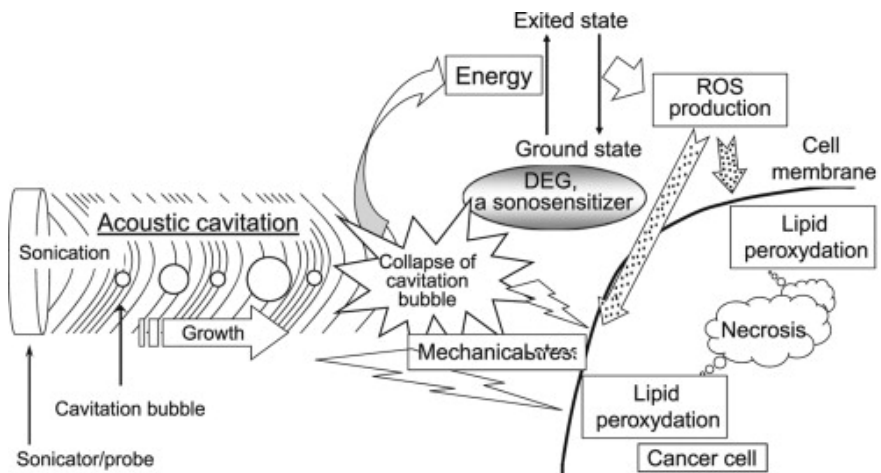
<sup>3</sup>大阪大学大学院工学研究科

<sup>4</sup>放射線医学総合研究所

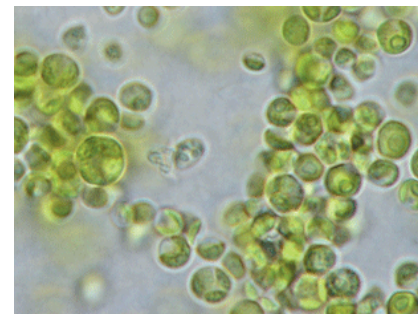
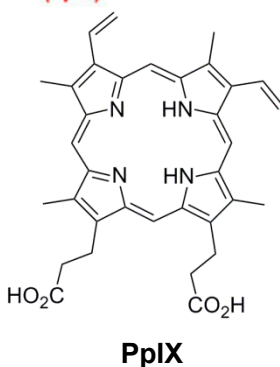
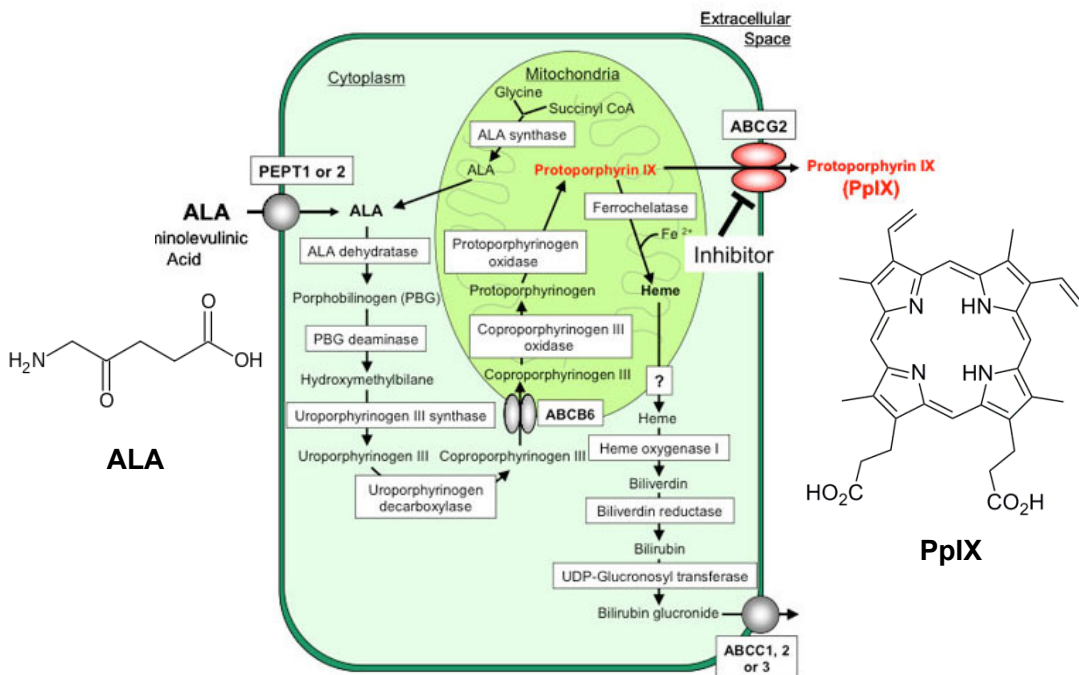
<sup>5</sup>SBIファーマ

<sup>6</sup>医療法人再生未来

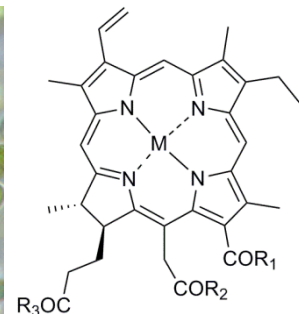
# 超音波療法 (SDT) と超音波増感剤



Tsuru H, *et al.*, *Free Radic. Biol. Med.* 53(3), 464-72, 2012.



サン・クロレラHPより



**Chlorin e6 derivatives**

Yumita N, *et al.*, *Anticancer Res.* 31(2), 501-6, 2011.

Canaparo R, *et al.*, *Anticancer Res.* 26(5A), 3337-42, 2006.

Ohmura T, *et al.*, *Anticancer Res.* 31(7):2527-33, 2011.

# SDT・免疫併用療法（医療法人再生未来での実施例）

## 癌（がん）の局所破壊

超音波ダイナミック療法

光ダイナミック療法

放射線・温熱療法

## 免疫療法

マクロファージ療法

ハイパーT・NK療法

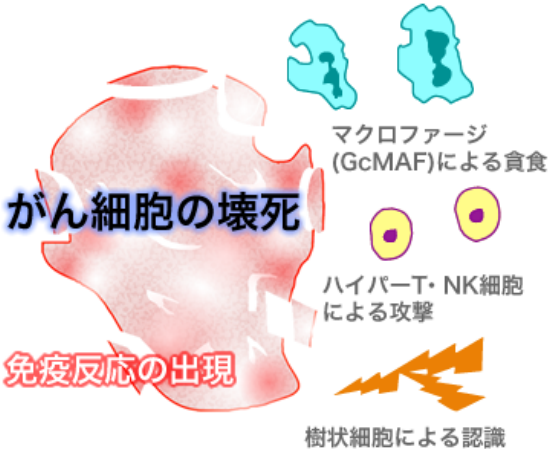
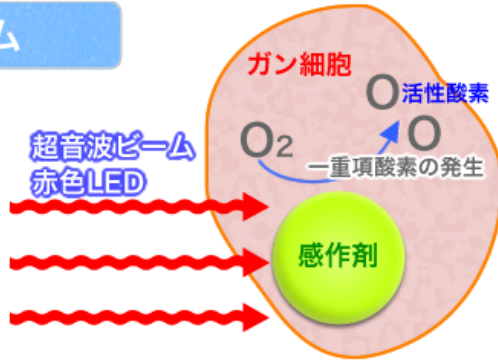
樹状細胞療法

**併用治療で効果を最大限に高める**

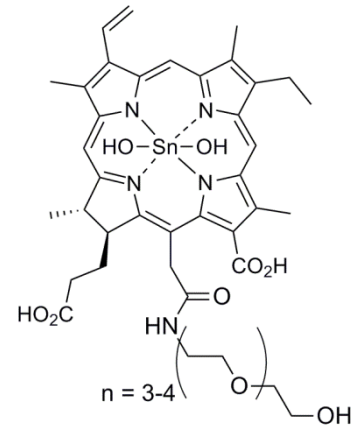
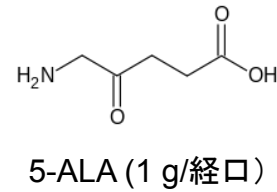
当院では最先端の治療と温熱療法を併用することにより効果を最大限にまで高めることを目的としています。

## 治療のメカニズム

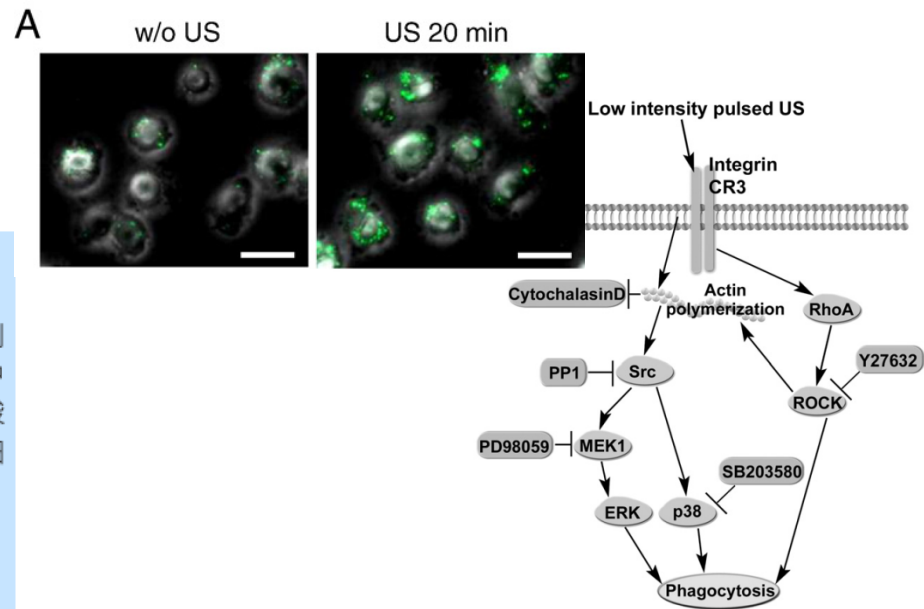
まず感作剤はガン細胞のみに取り込まれます。  
そして超音波ビームまたは赤色発光ダイオードによる光エネルギーを照射します。



超音波ビームや赤色発光ダイオードによる光エネルギーが、ガン細胞に取り込まれた感作剤に照射されると、ガン細胞の中にのみ一重項酸素などの活性酸素が生じます。その結果ガン細胞のみに壊死が出現します。



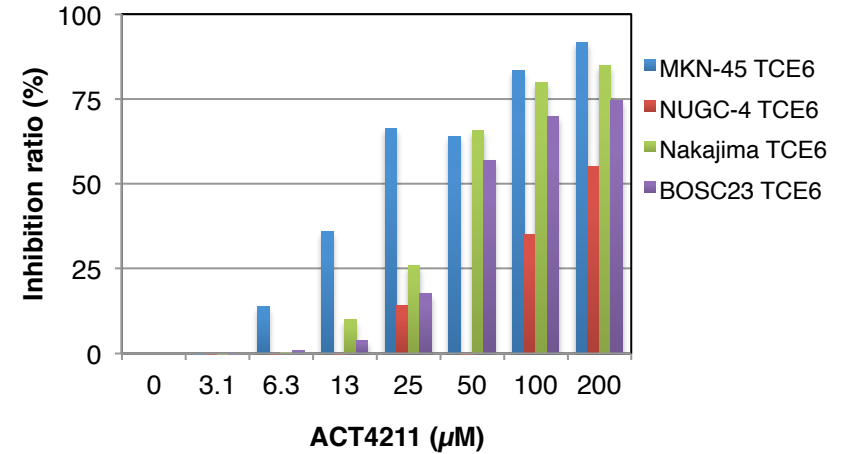
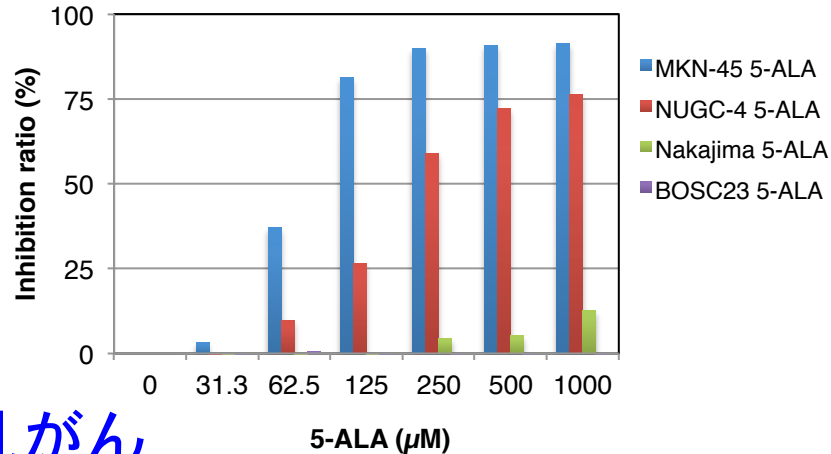
Wang X, *et al.*, Integr. Cancer Ther. 7(2), 96-102, 2008.  
Wang X, *et al.*, Integr. Cancer Ther. 8(3):283-7, 2009.



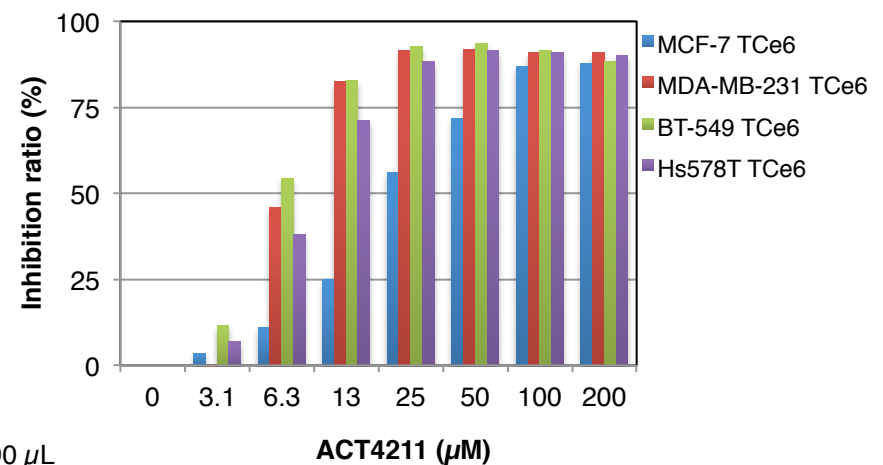
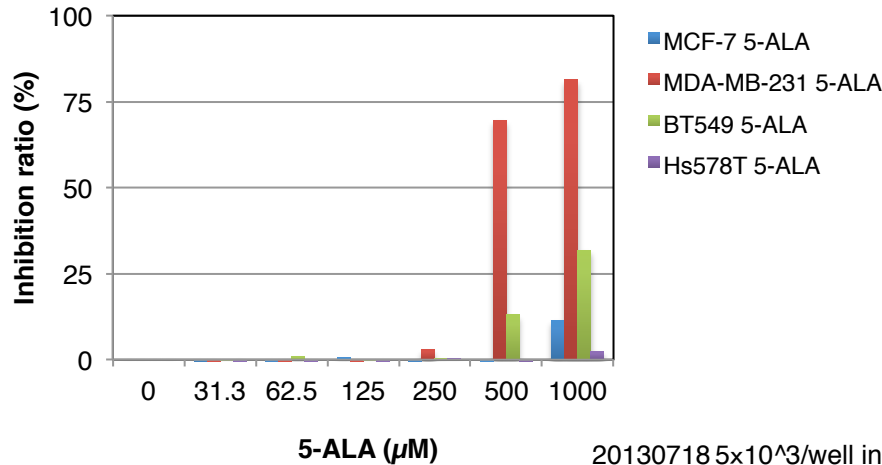
Zhou S, *et al.*, Cell Signal. 20(4), 695-704, 2008.

# ALAとACT4211によるPDT抗腫瘍効果の違い

## 胃がん



## 乳がん

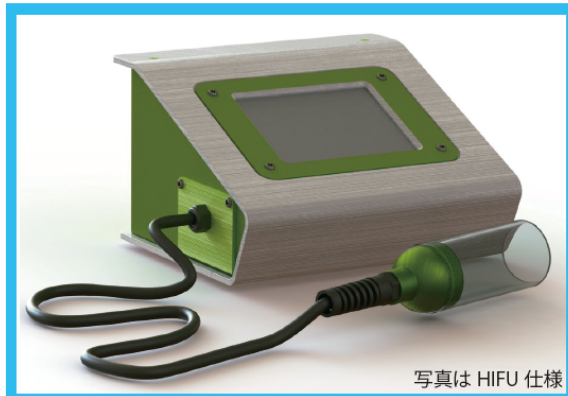


20130718  $5 \times 10^3$ /well in 190 μL  
 20130719 Added 10 μL ALA or ACT4211  
 | 4-h incubation  
 | MC to growth medium 200 μL  
 | 5-min PDT  
 V 72-h incubation  
 20130722 WST-8 MTT

# 目的

ALAおよびTin Chlorin e6の超音波増感剤としての可能性を検証するために、動物モデルである発育鶏卵を用いて両薬剤の薬物動態と超音波増感による*in vivo*抗腫瘍活性を評価した。

## Sonitron GTS



写真は HIFU 仕様

### Application

- DNA・RNA・薬剤・ウイルス導入
- HIFU 研究
- 光増感剤との併用効果
- 細胞増殖

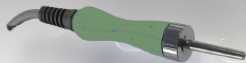
### Feature

- Probe 取替可能
- 豊富な Probe Size (1,3,6,12,20mm,HIFU)
- 1台で *in vitro*&*in vivo* 実験可能
- 非侵襲的に導入可能

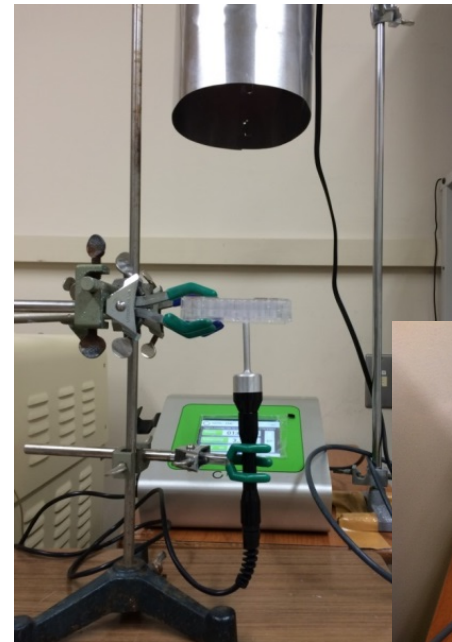
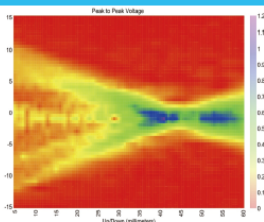
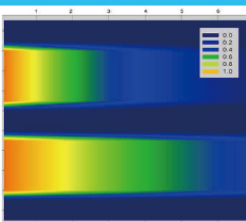
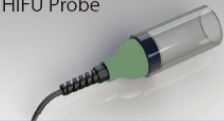
### Specification

周波数	Standard : 1MHz HIFU : 2/3.5MHz
超音波強度	Low : 0.01 ~ 0.50W/cm <sup>2</sup> Standard : 0.1 ~ 5.0W/cm <sup>2</sup> High : 100 ~ 2000W/cm <sup>2</sup>
Duty cycle	On : 1 ~ 20 Off : 0 ~ 20 (msec/sec 切替)
Probe size	Plane wave : 1/3/6/10/20mmΦ HIFU : 20mmΦ,2MHz,19mm 深度 30mmΦ,3.5MHz,50mm 深度
時間	0 ~ 20分

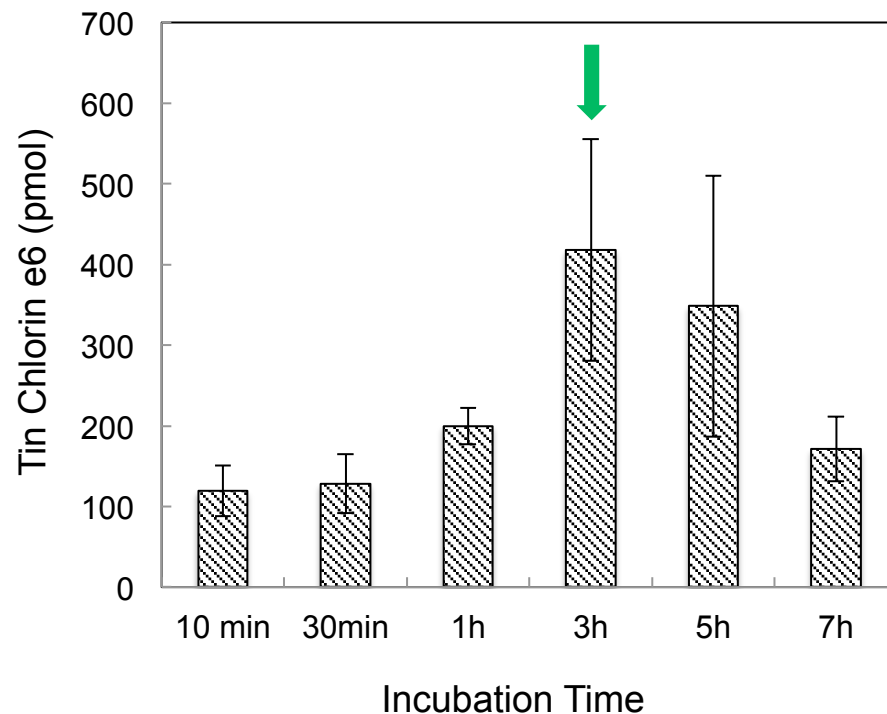
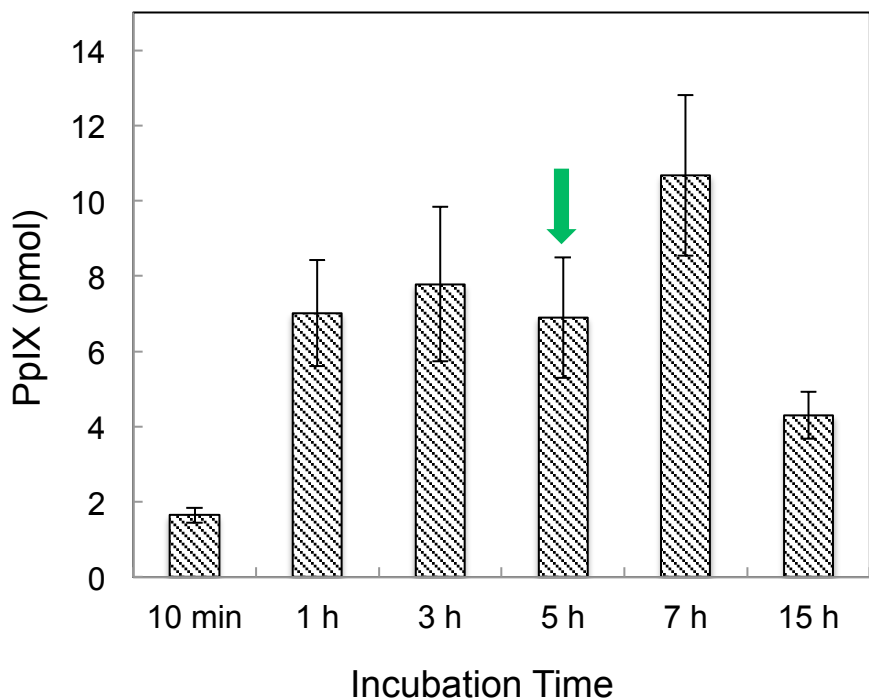
6mm Φ Probe



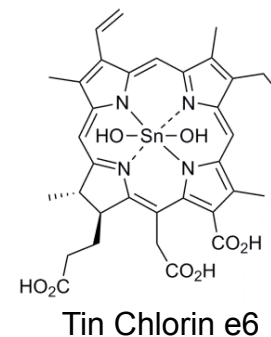
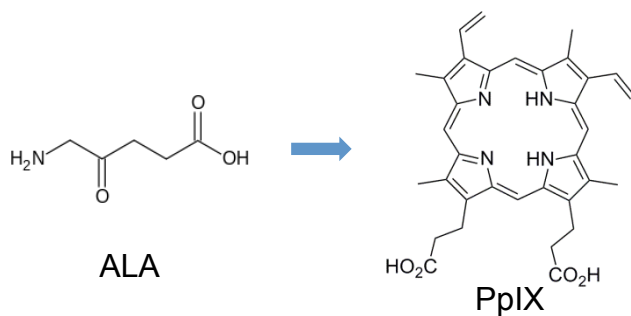
HIFU Probe



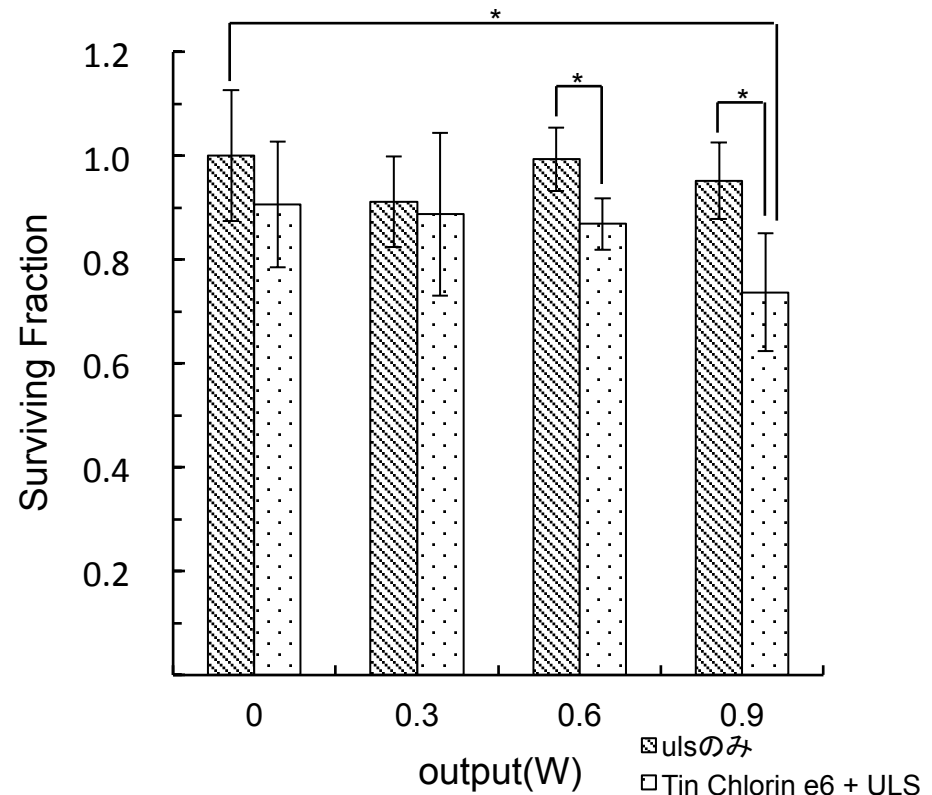
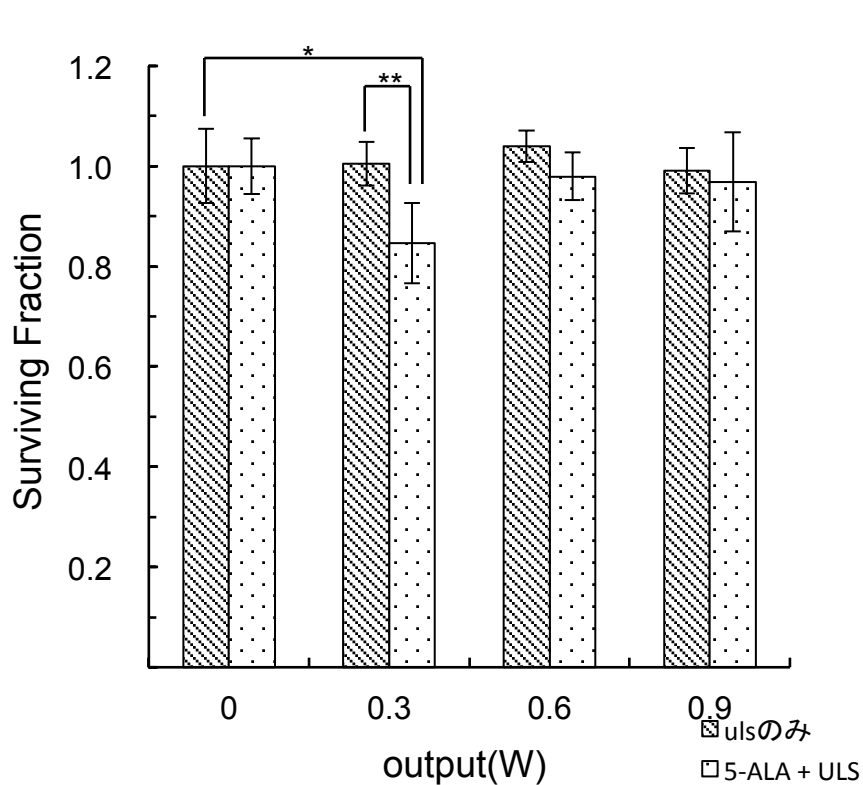
# EMT6/KU細胞に対する5-ALA & Tin Chlorin e6の取込量の経時変化



- 1)  $7.5 \times 10^4$  cellsを $\phi 6$ シャーレに播種し24 h培養
- 2) 24 h培養後( $3.0 \times 10^6$  cells)、ALA (1 mM, 5  $\mu$ mol)またはTin Chlorin e6(100  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ mol)を添加
- 3) PBSで洗浄し2%-Triton X-100で細胞をホモジナイズして薬剤を抽出
- 4) 15,000rpm, 10minで遠心分離を行い上清(100  $\mu$ l)を蛍光測定 (excitation : 410 nm emission : 630 nm)

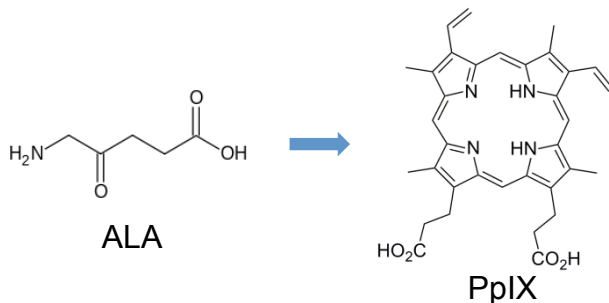


# ALAおよびTin Chlorin e6の超音波増感による抗腫瘍活性

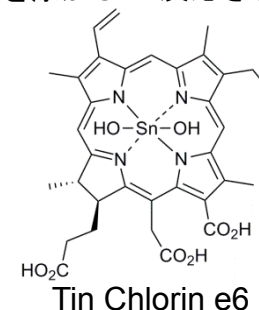


- 1) 96wellプレートに $2.5 \times 10^2$  cells/wellのEMT6/KU細胞を播種
- 2) 5 h培養後、生食もしくは5-ALA (1 mM)を添加
- 3) 5 h培養後、PBSでwashし遠赤外光で保温しながら超音波を照射
- 4) 72 h培養後、WST-1試薬を添加し1.5 h反応させて吸光度測定

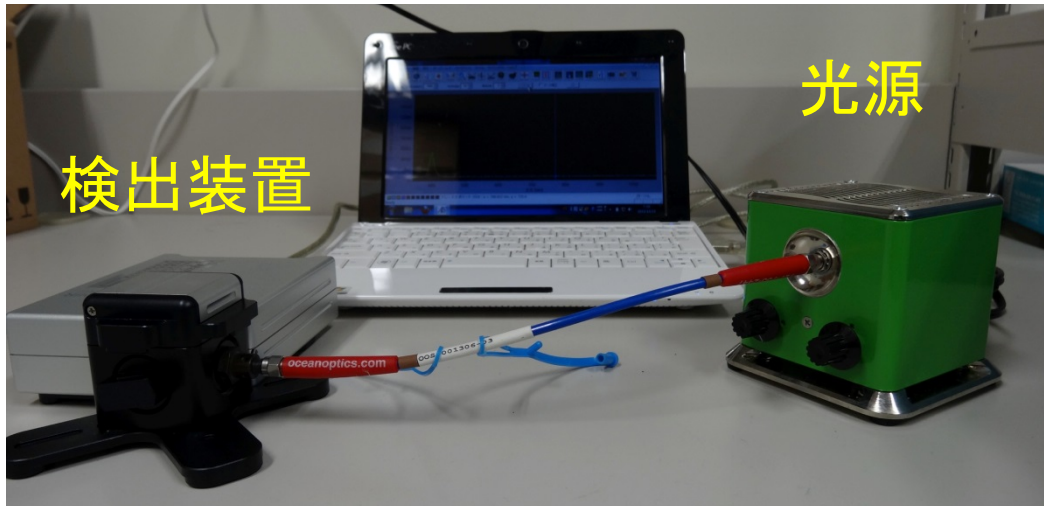
- 1) 96wellプレートに $1.0 \times 10^3$  cells/wellのEMT6/KU細胞を播種
- 2) 24 h培養後、メイロンもしくはTin Chlorin e6 (0.5 mM)を添加
- 3) 3 h培養後、PBSでwashし遠赤外光で保温しながら超音波を照射
- 4) 24 h培養後、WST-1試薬を添加し3 h反応させて吸光度測定



Probe: 6mm (0.184cm<sup>2</sup>)  
 Frequency: 986 kHz  
 Duty Cycle: 20%  
 Irradiation time: 1 min



# 腫瘍移植鶏卵モデルによる薬物動態解析



光源: LLS-405 VIS LED光源 (BAS社)  
検出装置: SEC2000-VIS/NIR スペクトロメーター  
SLIT200 蛍光測定装置 (BAS社)

Day15の腫瘍移植鶏卵にALAorTCe6  
(1 mg/egg)を静注



摘出した腫瘍に2% Triton X-100 in  
DWを添加



ホモジナイズして抽出



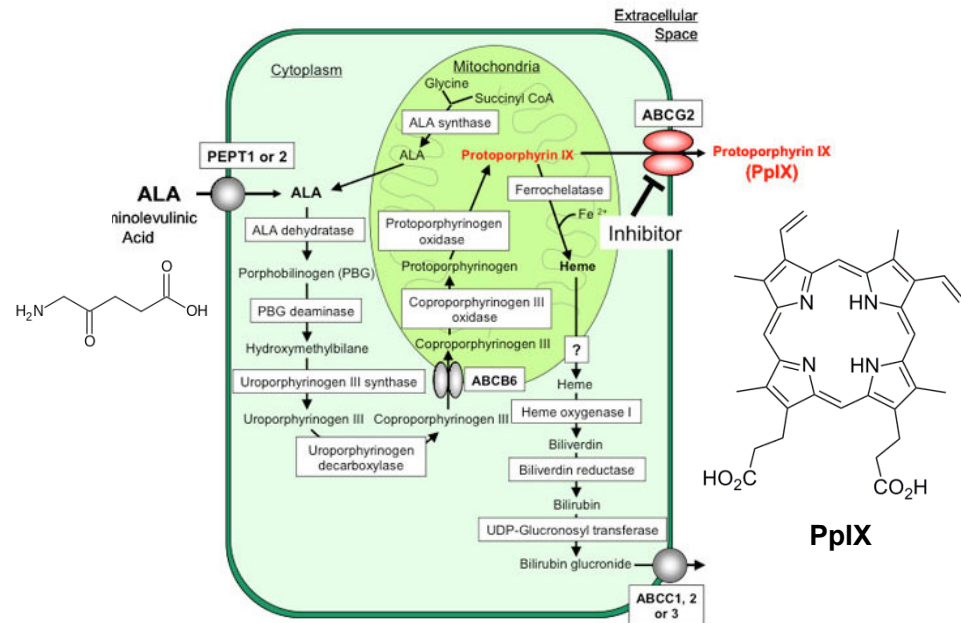
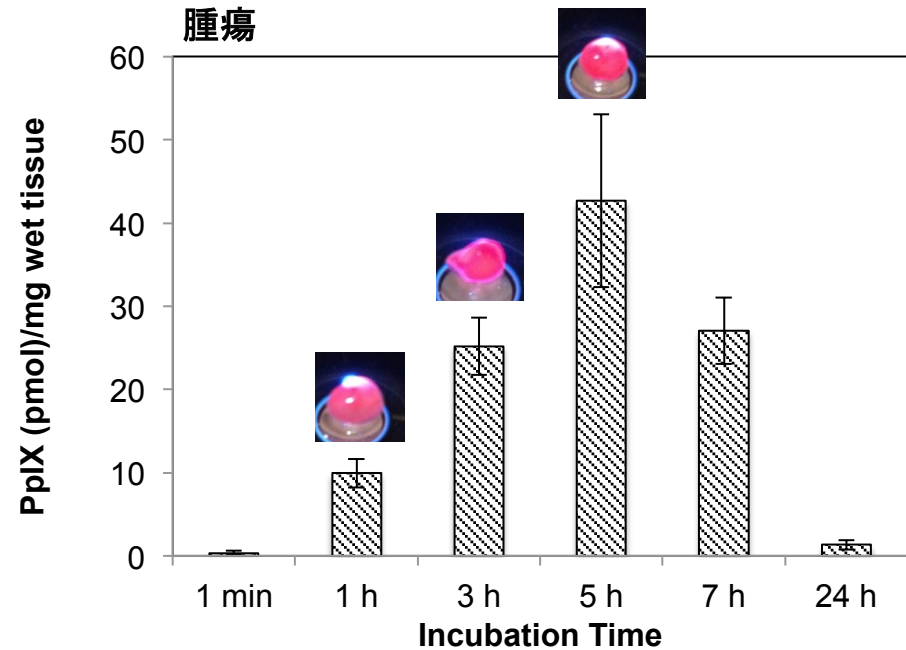
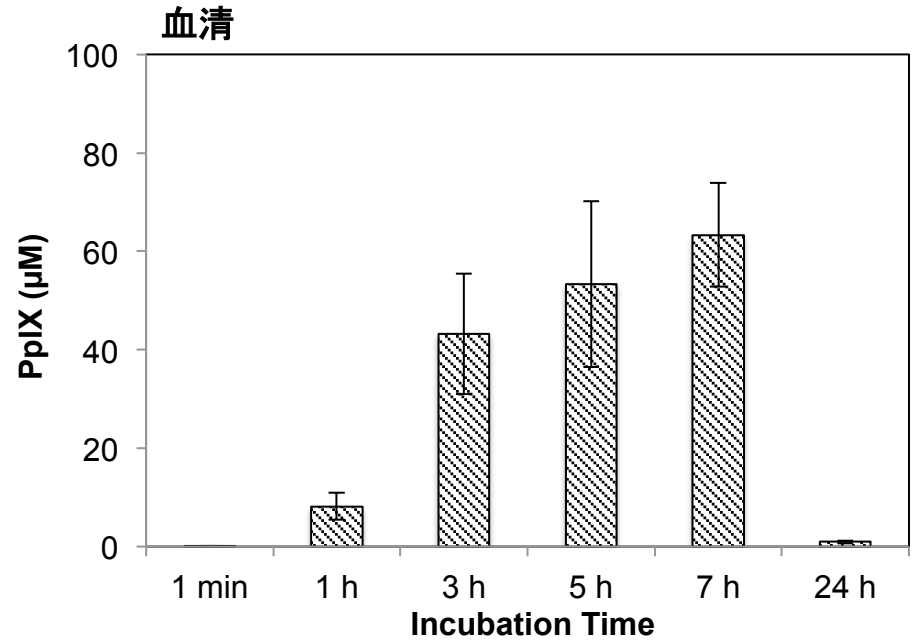
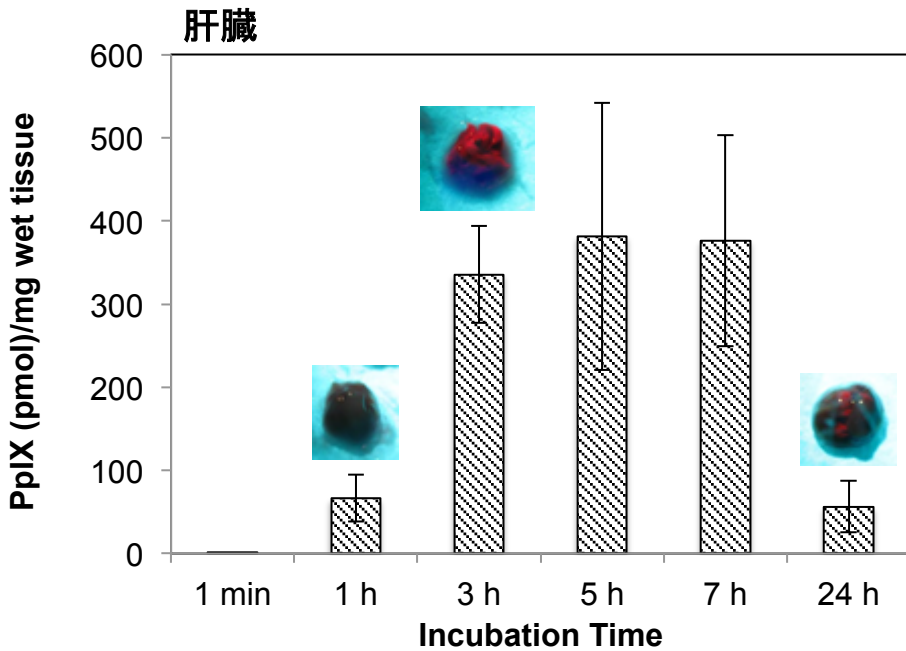
15,000 rpmで15分間遠心



上清400  $\mu$ Lを蛍光強度の測定に使用

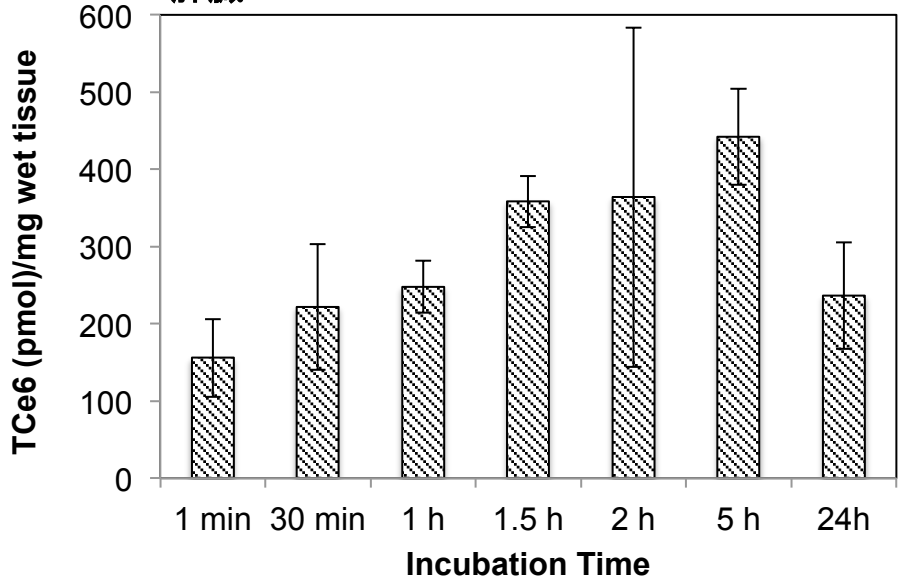


# ALA投与後の肝臓・血中・腫瘍内PpIX量の経時変化

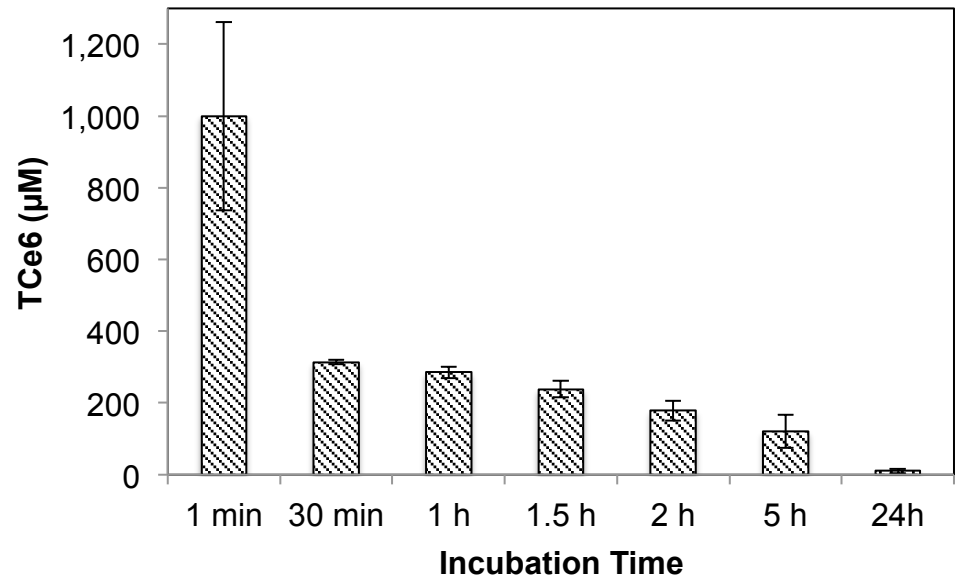


# 肝臓・血中・腫瘍内のTin chlorin e6量の経時変化

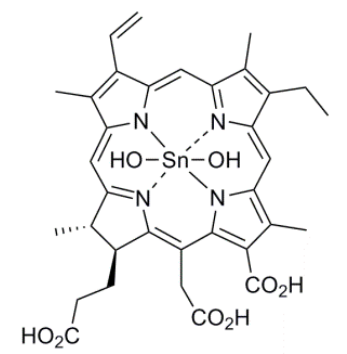
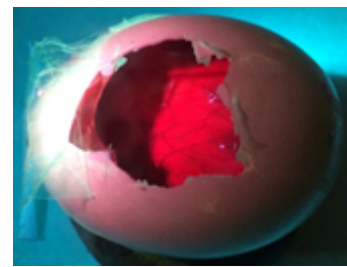
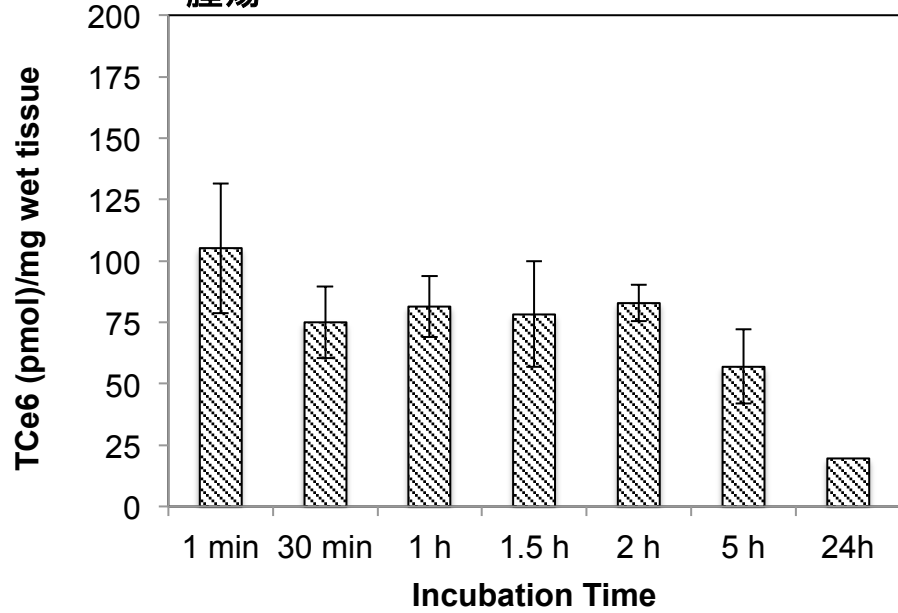
肝臓



血清



腫瘍



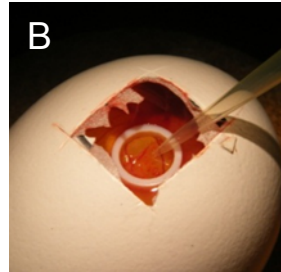
Tin Chlorin e6 (TCe6)

# 腫瘍移植鶏卵を用いた超音波増感活性の評価法

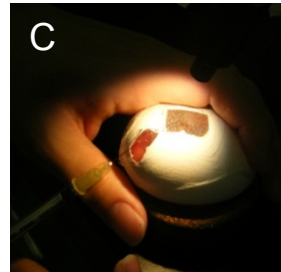
Day1: 孵卵開始 (37°C)



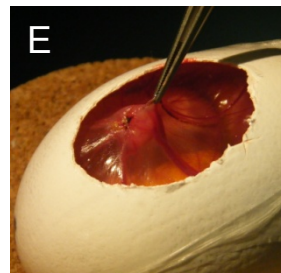
Day11: EMT6/KU細胞添加  
( $2.5 \times 10^5$  cells)



Day13: リング外し



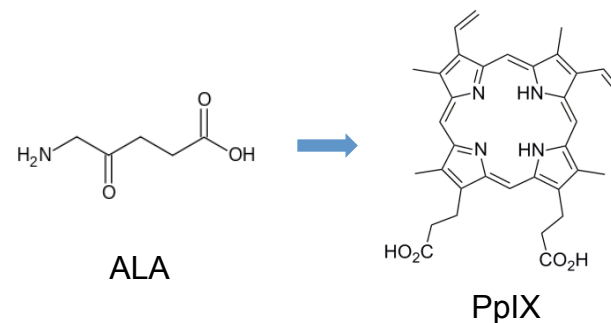
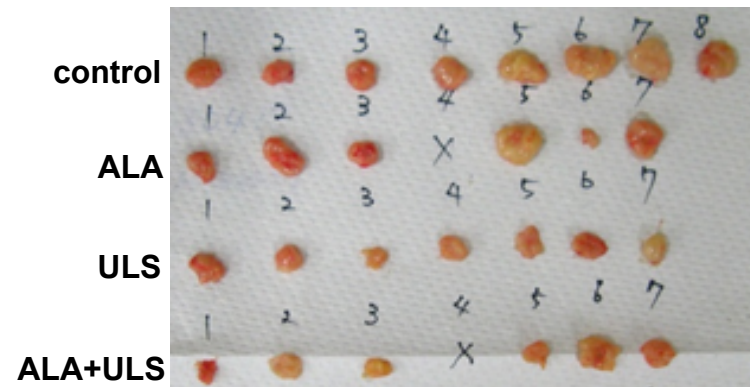
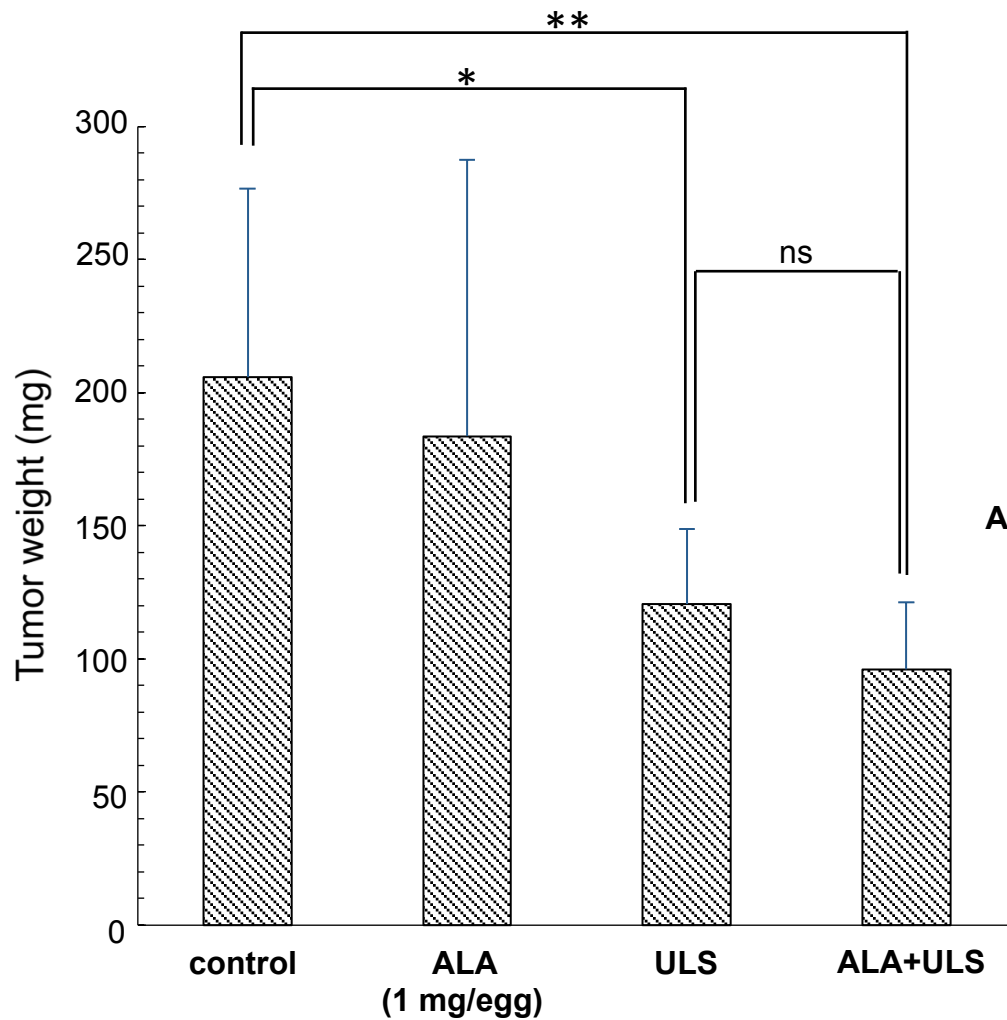
Day15: ALA (1 mg/egg) を静注して3時間後超音波照射



Day18: 腫瘍摘出

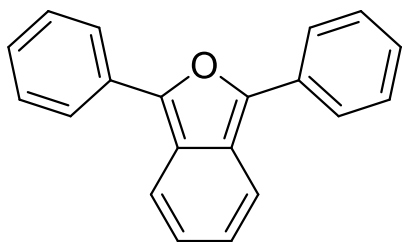


# ALAの超音波増感による*in vivo*抗腫瘍活性

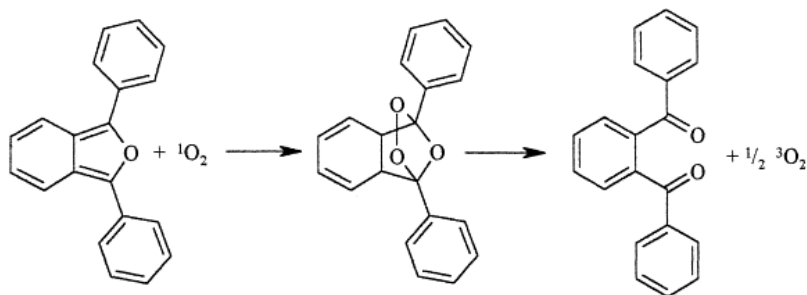


Power: 2.5 W; Frequency: 986 kHz; Duty Cycle: 80%; Irradiation time: 10 min

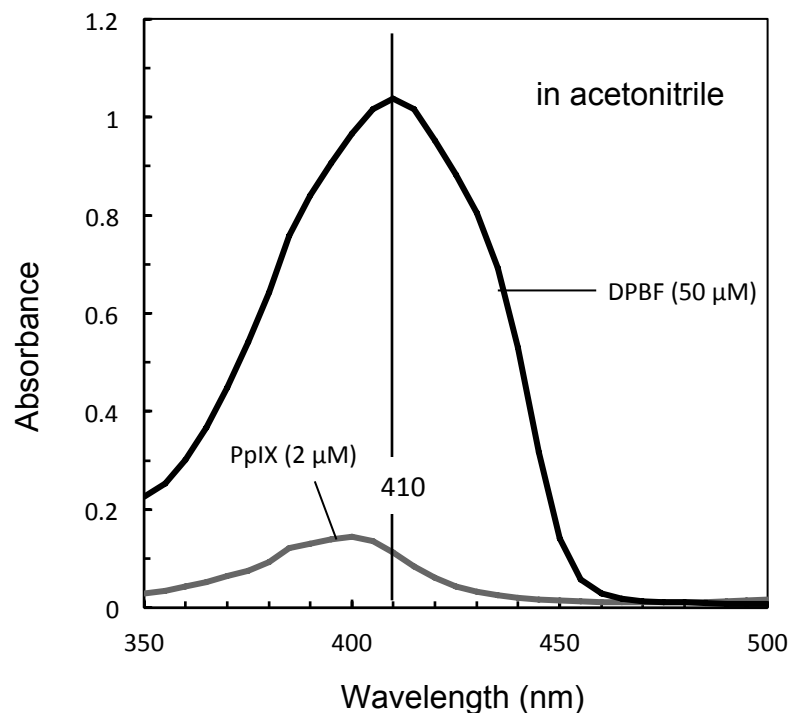
# DPBF法による一重項酸素の検出



1,3-Diphenylisobenzofurane (DPBF)

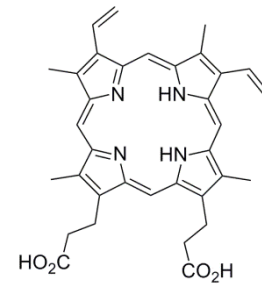
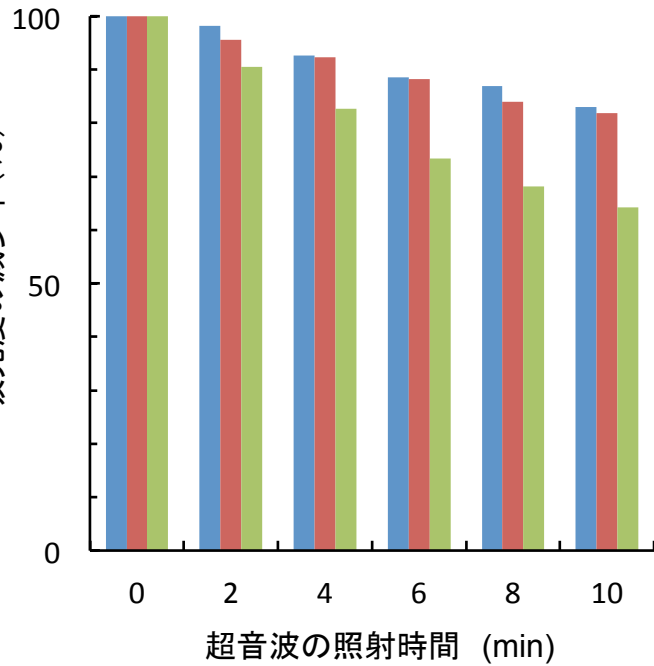
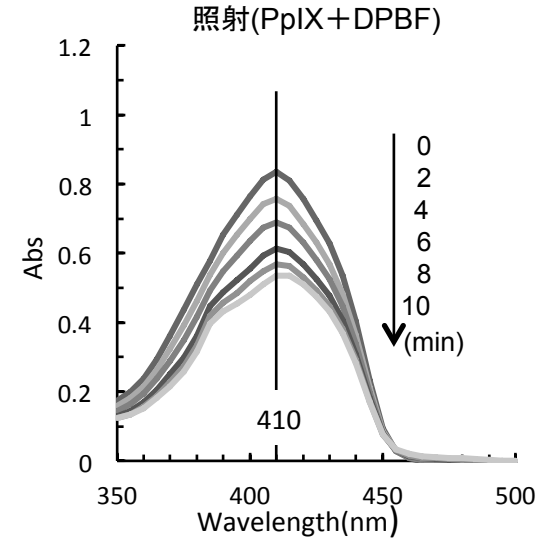
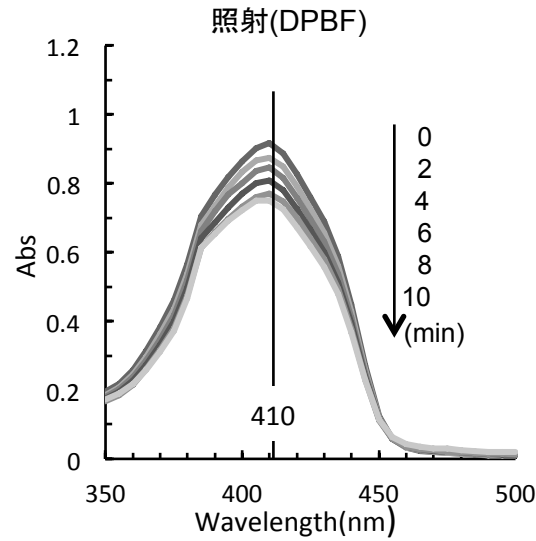
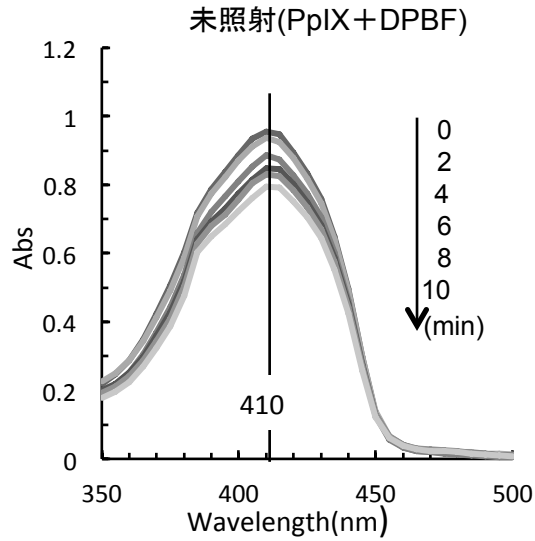


M. A. Caine, *et al.*, *Dyes and Pigments*, 52, 55–65, 2002.

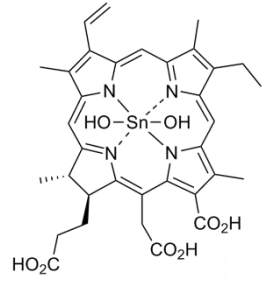
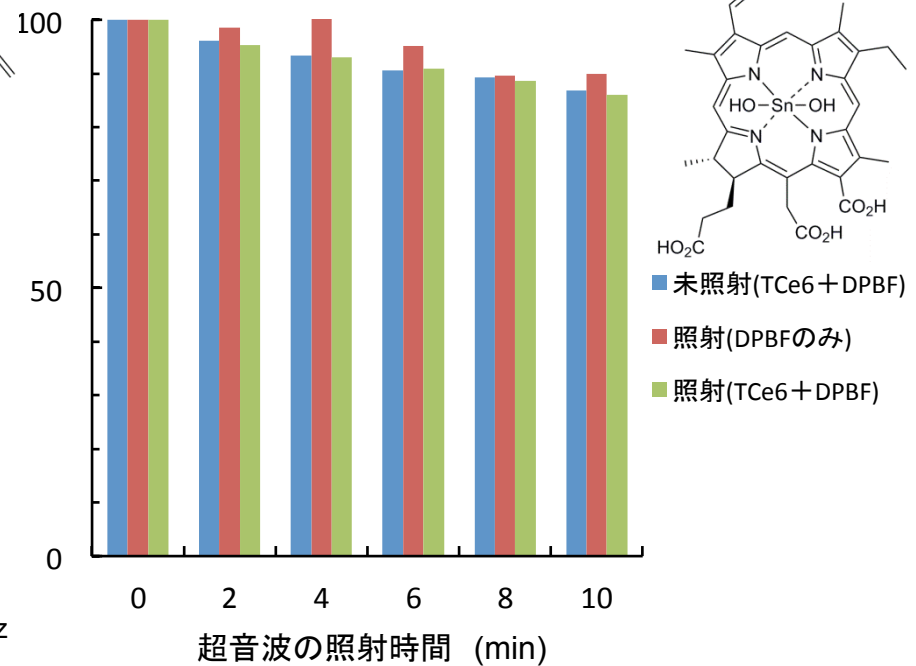


DPBFは一重項酸素と選択的に反応して酸化分解されることで410 nmの吸光度が低下する。

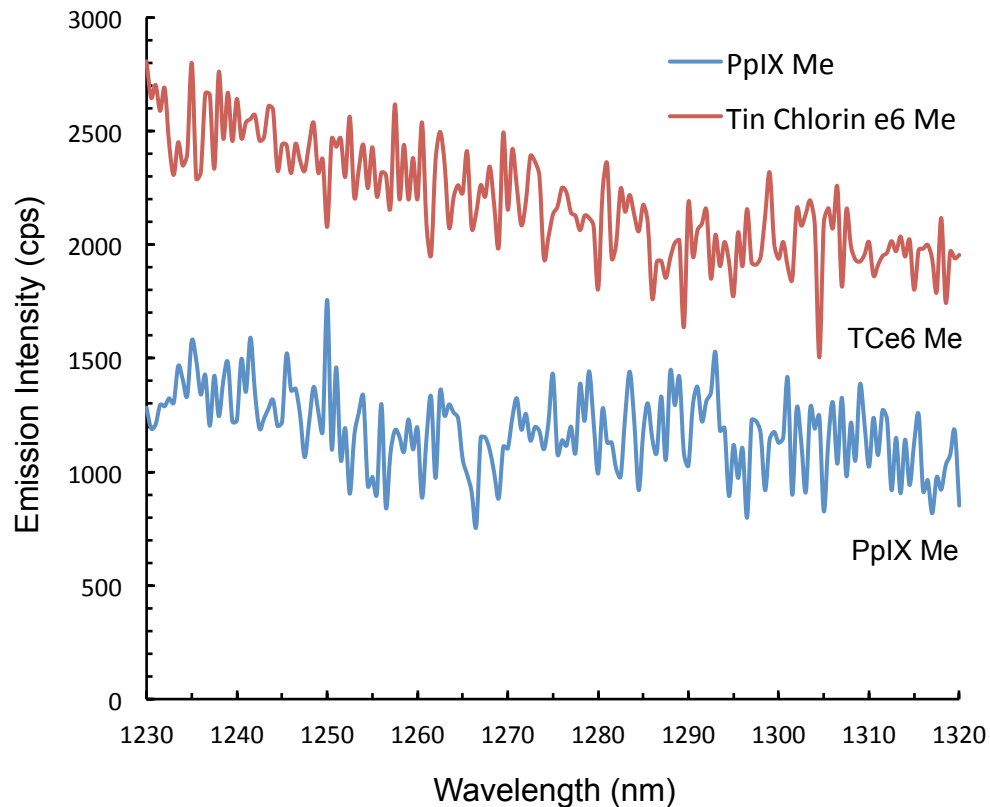
# PpIX & Tin Chlorin e6の超音波照射による一重項酸素の生成



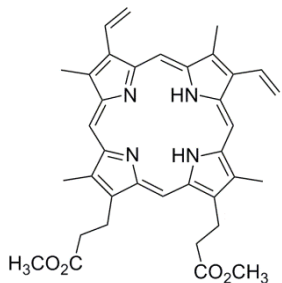
Power: 2.5 W  
Frequency: 986 kHz  
Duty Cycle: 80%



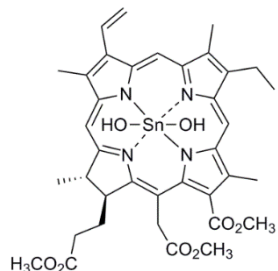
# 近赤外発光法による一重項酸素の検出



Power: 0.0283 W; Frequency: 986 kHz; Duty Cycle: 100%



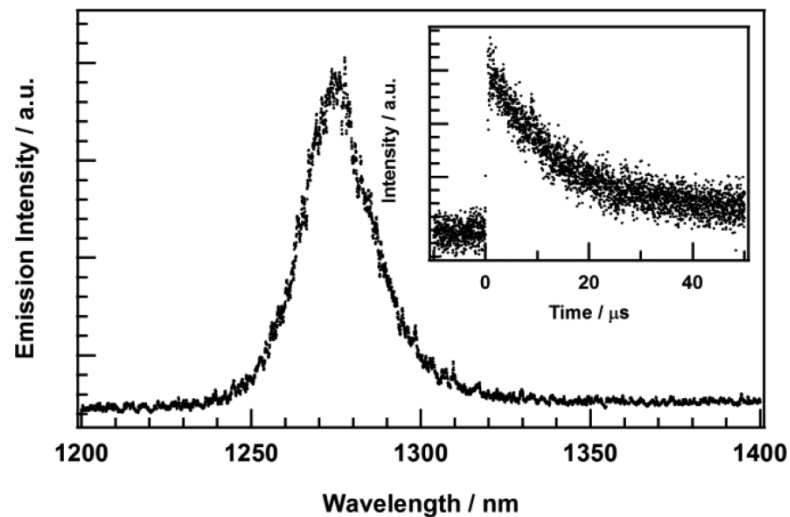
PpIX Me (2.25 mM/benzene-d<sub>6</sub>)



Tin Chlorin e6 Me (4.22 mM/benzene-d<sub>6</sub>)



近赤外分光測光装置(浜松ホトニクス社)



Kikuchi A, *et al.*, J. Phys. Chem. A, 117, 1413-7, 2013.

# まとめ

ALAおよびTin Chlorin e6は超音波との併用により有意なin vitro抗腫瘍活性を示した。また、腫瘍細胞への取込については、ALAはEMT6/KU細胞への取込効率が低いか、もしくはPpIXの排出作用によりTin Chlorin e6に比べて3オーダー低い取込率を示した。一方、腫瘍移植鶏卵モデルにおいては、ALAはTin Chlorin e6と比較して約1/2の腫瘍への取込量であり、腫瘍血管への集積が示唆された。超音波増感によるin vivo抗腫瘍活性については、超音波単独群およびALA+超音波群が有意な抗腫瘍活性を示したが、ALAによる増感作用は認められなかった。なお、PpIXおよびTin Chlorin e6は超音波照射による一重項酸素の生成がDPBF法によって示唆されたが、1,270 nm付近の発光スペクトルは検出されなかった。

以上の結果より、発育鶏卵を用いたin vivo評価系は超音波増感剤の薬物動態と抗腫瘍活性の評価に有用であることが示された。ただし、ALAおよびTin Chlorin e6は全く異なる細胞内取込および薬物動態を有するため、腫瘍細胞の選択が大変重要である。