

膵臓癌細胞への超音波照射による アポトーシス誘導に関する基礎研究

Basic research on the effect of ultrasound irradiation
on the survival rate of pancreatic cancer cells

佐藤貴亮¹、菅俣浩明¹、西村裕之²、吉田薫³、
萩原啓実²、竹内真一¹

¹ 桐蔭横浜大学大学院工学研究科、² 桐蔭横浜大学医用工学部、³ 桐蔭横浜大学医用工学センター

(2016年3月28日 受理)

1. 背景

膵臓癌とは、原発性膵腫瘍のうち外分泌系における上皮性悪性腫瘍を指す。その大部分は、膵管上皮から生じる浸潤性膵管癌である。膵臓癌は初期にはほとんど自覚症状がなく、しかも進行が早いために、早期発見が非常に難しいという特徴がある。また、膵臓自体が小さいため、癌が膵臓外に出やすく、周囲のリンパ節や臓器に転移しやすいという特徴もある。そのため、膵臓癌が発見された段階ではすでに進行していることが多く、摘出手術が行えない事例も多々ある。遠隔転移はないが、周辺重要臓器への浸潤のため切除が困難な局所進行例では化学療法、又は化学放射線療法があり、肝臓や肺への転移や腹膜播種がある遠隔転移例では化学療法が用いられる^[1]。残念ながら、治療が行えたとしても3年以内に再発する可能性が極めて高く、5年後生存率は10~20%程度とされている。

当研究室では超音波が非侵襲的で体内透過

性に優れ、超音波エネルギーを集中させることで治療手段にもなることから、超音波を用いた癌治療法に着目してきた。周囲の正常細胞に影響を与えずに細胞が死に至るアポトーシスを膵臓癌細胞に起こすことが可能であれば、従来技術で摘出手術が行えない膵臓癌に対する追加療法として、低侵襲な超音波を利用した治療が適応だと考えている。

2. 培養方法

超音波による膵臓癌細胞のアポトーシス誘導を目的とする本研究では、膵臓癌細胞の一種である、ヒト膵臓癌細胞株 MIA-PaCa2 で WHO グレードⅢの細胞であり実験対象として使用した^[2]。MIA-PaCa2 はシャーレ底面に接着し、増殖していく付着細胞である。MIA-PaCa2 の特徴として懸濁液中で自由成長し他の細胞の上へ増殖する傾向がある。そして、L-アスパラギナーゼに敏感である^[3]。

MIA-PaCa2 を市販のシャーレに播種し、

SATOU Takaaki¹, SUGAMATA Hiroaki¹, NISHIMURA Hiroyuki², HAGIWARA Hiromi², YOSHIDA Kaoru³ and TAKEUCHI Shinichi¹

¹ Graduate School of Engineering, Toin University of Yokohama; ² Department of Medical Technology, Toin University of Yokohama; ³ Biomedical Engineering Center, Toin University of Yokohama; 1614 Kurogane-cho, Aoba-ku, Yokohama, Kanagawa, 225-8502, Japan

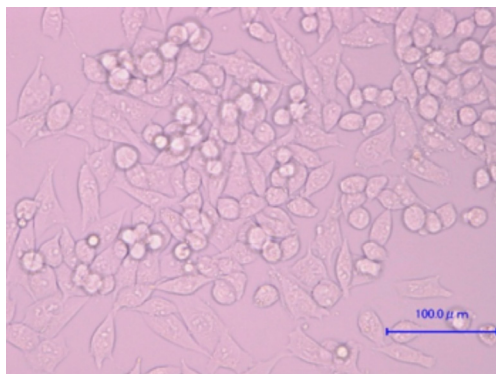


図1 当研究室にて培養した、MIA-PaCa2の位相差顕微鏡写真

DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) に 10 % FBS (牛胎児血清)、1 % P/S (ペニシリンストレプトマイシン)、4 mM グルタミンを加えた培地を 5~10 ml 入れ、CO₂ インキュベータ (5 % CO₂, 37°C) 内に静置して培養する。当研究室にて培養した、MIA-PaCa2 の位相差顕微鏡写真を図 1 に示す。

3. 実験システム

膵臓腺癌細胞株 MIA-PaCa2 への超音波照射に伴い、当研究室の渡邊晶子先輩が作製した周波数 150 kHz 定在波型超音波照射システムを使用した^[4]。照射システムの水槽底部に円形の音響窓 (φ120 mm) があり、その下部にフッ素製の Oリングを介してステンレス振動板 (φ180 mm) が装着されている。ステンレス振動板の裏側に共振周波数 40 kHz のランジュバン振動子 (Honda Elec、HEC-45402) が装着しており、ランジュバン振動子でステンレス振動板を振動させることにより、定在波超音波を水槽中 (140×140×170 mm²) に発生させる構造となっている。

本実験では、ファンクションジェネレータ (Tektronik、AFG3022C) とパワーアンプ (2100L、E&I) を使用して、連続波超音波を照射する。ステンレス振動板から高さ 45 mm における音場のピーク位置に、容器の中心が位置するように固定し、照射システムの

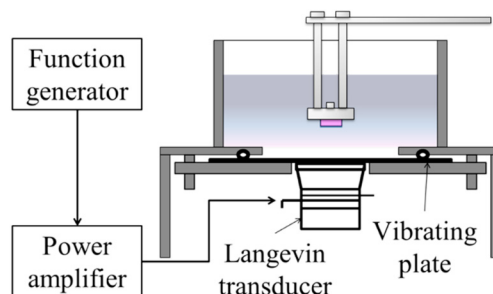


図2 定在波型超音波照射システムのブロック図

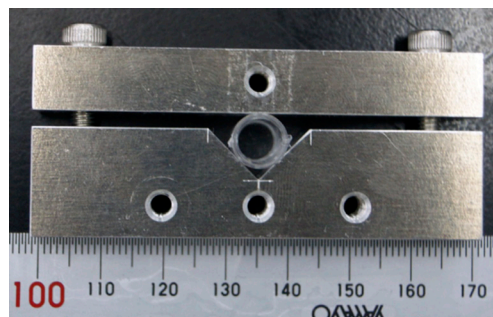


図3 サンプル固定治具の写真

水槽内に高さ 100 mm の位置まで蒸留水で満たしている^[5]。本実験で使用した、定在波型超音波照射システムのブロック図を図 2 に示し、サンプル固定治具の写真を図 3 に示す。

4. 超音波照射前実験

本実験では、細胞サンプルへの超音波照射に伴い照射実験の再現性を向上の為、水槽内の音場分布と超音波照射用容器底部の振動速度の測定を行った。

4.1 超音波照射システムの水槽内の音場測定

本実験には超音波照射システムの水槽内の膵臓癌細胞株 MIA-PaCa2 を設置するステンレス製振動板から高さ 45 mm の平面音場をニードル型マイクロホンを用いて計測した^[5-6]。測定には、超音波照射システムのランジュバン振動子へ周波数 150 kHz、電圧 185 V_{p-p}、波長 10 波、DTY 比 0.1 % のパルス正弦波の信号を印加し、堅牢型マイクロホ

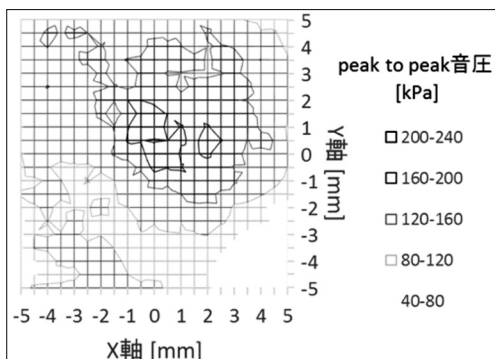


図4 超音波照射システムの水槽中心付近の音場をステージコントローラー (SHOT-204MS、シグマ光機) で1 mm ステップで走査させながらオシロスコープ (TDS2022B、Tektronix) で測定した。超音波照射システムの水槽中心付近の音場を図4に示す。

4.2 超音波照射用容器の振動速度の測定

本実験には超音波照射システムの水槽内の膵臓癌細胞株 MIA-PaCa2 を設置するステンレス製振動板から高さ 45 mm の位置に市販の 96 ウェルプレート 1 穴をレーザードップラー振動計を用いて計測した^[5]。測定には、超音波照射システムのランジュバン振動子へ F.G. から周波数 150 kHz、電圧 100 m~800 mV_{pp}、波連長 10 波、DTY 比 0.1 % のバースト正弦波の信号をパワーアンプで 50 dB 増幅して印加し、裏面をスパッタ法で金蒸着させた 96 ウェルプレート 1 穴をオシロスコープ (TDS2022B、Tektronix) に接続したレーザードップラー振動計 (LV-1710、小野測器) で測定した。ファンクションジェネレータの設定電圧と培養容器底部の振動速度の関係を図5に示す。

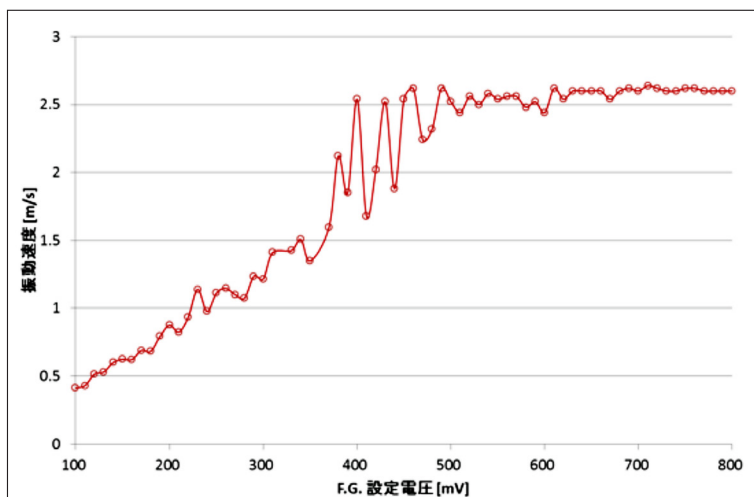


図5 ファンクションジェネレータの設定電圧と培養容器底部の振動速度の関係

表1 自動照射プログラム (LabVIEW) を用いた超音波照射実験の照射条件

条件	
波形	連続正弦波
駆動周波数	150 KHz
印加電圧	185 V _{p-p}
照射時間	30, 60 s
水位	100 mm
サンプルの位置	水底 45 mm
水温	室温

5. 超音波照射実験

5.1 実験の設定条件

膵臓癌細胞株 MIA-PaCa2 を 96- ウェルプレートに 3×10^4 cells/well で播種し、48 時間 CO₂ インキュベータにて培養を行う。その後、96- ウェルプレートの一穴を超音波照射システムにて超音波照射を行う。自動照射プログラム (LabVIEW) を用いた超音波照射実験の照射条件を表1に示す。

5.2 蛍光顕微鏡によるアポトーシス評価

膵臓癌細胞株 MIA-PaCa2 へ超音波照射後、CO₂ インキュベータにて 24 時間培養を行った。その後、Annexin V-FITC / PI 染色を

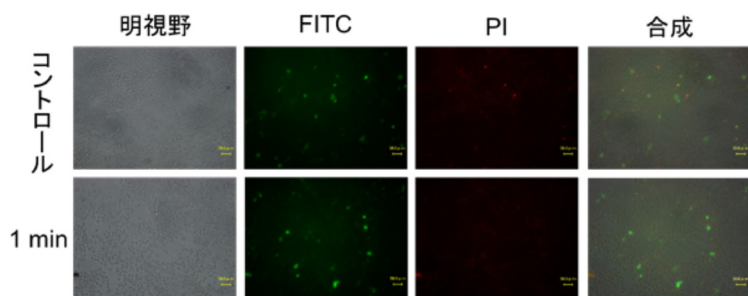


図6 96-ウェルプレート一穴での蛍光顕微鏡写真

たサンプルでは Annexin 陽性から Annexin 陽性 / PI 陽性への途中経過らしき細胞が多数あることから後期アポトーシス反応の傾向が観察出来た。フローサイトメーターによる Annexin V-FITC / PI 評価を図7に示す。

行い蛍光顕微鏡 Bio ZERO (BZ-8100、KEYENCE) を用いて観察を行った^[7-8]。実験結果として、超音波照射時間1分のサンプルが FITC の蛍光が強く PI の蛍光が弱いことから初期アポトーシス反応の傾向が観察出来た。96-ウェルプレート一穴での蛍光顕微鏡写真を図6に示す。

5.3 フローサイトメトリーによるアポトーシス評価

膵臓癌細胞株 MIA-PaCa2 へ超音波照射後、CO₂ インキュベータにて72時間培養を行った。その後、Annexin V-FITC / PI 染色を行いフローサイトメーター (FACS Vantage、BECTON DICKISON) を用いて観察を行った^[7-8]。実験結果として、超音波照射を行っ

6. まとめと今後の課題

超音波照射システムの測定では、印加電圧 185 V_{p-p} での水槽内の音場は空間ピーク音圧は 239 kPa であり、水槽の中心から X 方向に約 2 mm、Y 方向に約 1 mm ずれており、-3 dB ビーム幅の大きさは X 方向に約 4 mm、Y 方向に約 5 mm、-3 dB ビーム面積は 11.3 mm² であった。培養容器底部中心の振動速度は 96-ウェルプレート一穴の底部が 2.5 m/s の振動速度を確認した。

超音波照射実験では、印加電圧 185 V_{p-p} で超音波照射時間 30~60 秒で Annexin V-FITC / PI 染色によって超音波照射 24 時間では初期アポトーシス反応を確認することが出来た。そして、超音波照射 72 時間では後期アポト

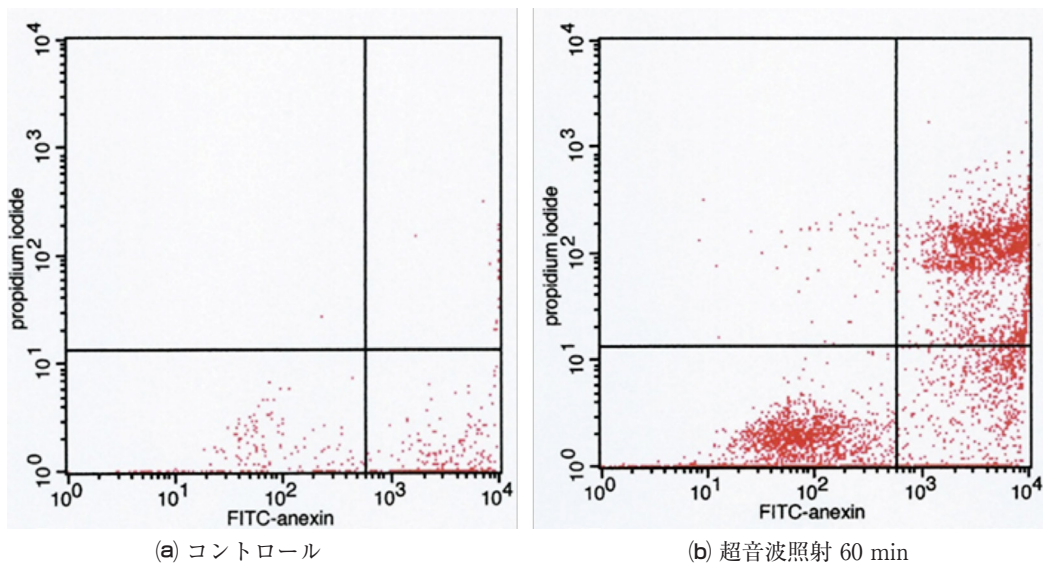


図7 フローサイトメーターによる Annexin V-FITC / PI 評価

ーシス反応を確認することが出来た。

gy 485, 2004

今後の課題は、アポトーシス評価において印加電圧 185 V_{p-p} で超音波照射時間 30~60 秒で Annexin V-FITC / PI 染色によってアポトーシス初期反応を確認することが出来たがアポトーシスを起こしている細胞の割合と細胞数が少ないことから他の検出方法では困難であった。今後は少ない細胞数でもアポトーシス評価を行える方法の検討を行う必要があると考えている。

【参考文献】

- [1] 医療情報科学研究所, 病気がみえる vol. 1 消化器 第4版, メディックメディア, 2010.
- [2] Daruka Mahadevan and Daniel D. Von Hoff, Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Mol Cancer Ther*, 2007
- [3] General Cell Collection: MIA-Pa-Ca-2, http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85062806&collection=ecacc_gc
- [4] 平成 25 年度 博士学位論文 渡邊晶子
- [5] 平成 26 年度 修士学位論文 田中祐介
- [6] Michihisa Shiiba *et al.*, Estimation of Cavitation Sensor with Hydrothermally Synthesized Lead Zirconate Titanate Film on Titanium Cylindrical Pipe: Spatial Distribution of Acoustic Cavitation Field and Basic Characteristics of Cavitation Sensor, *JJAP*, 2011
- [7] G Bocci *et al.*, Fluvastatin synergistically enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in human pancreatic cancer MIA PaCa-2 cells, *British Journal of Cancer*, 2005
- [8] Michitaka Notoy *et al.*, Quercetin, a flavonoid, inhibits the proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblasts in vitro, *European Journal of Pharmacology*