

主論文の要旨

**Intraperitoneal Administration of Plasma-Activated
Medium: Proposal of a Novel Treatment Option for
Peritoneal Metastasis From Gastric Cancer**

胃癌腹膜播種治療の新規治療手段としての
プラズマ照射培地の腹腔内投与

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 消化器外科学分野

(指導：小寺 泰弘 教授)

武田 重臣

【緒言】

プラズマとは、固体、液体、気体の物質の3態よりさらにエネルギーの高い第4の状態とされ、電離した気体と定義される。プラズマは高エネルギー状態であるがゆえに反応性が高く、他の分子と反応して副次的にラジカルを産生するなどの反応を引き起こす性質を持つことが知られている。近年、プラズマは医学領域においても研究が進み、血液凝固、創傷治癒、抗菌滅菌作用等に関連した実用化もなされているが、特にプラズマを悪性腫瘍の治療に利用しようとする試みは盛んに研究がなされている。

胃癌治療において、腹膜播種の制御は非常に重要な課題である。これまで我々は、細胞培養用培地にアルゴンプラズマを照射し作成したプラズマ照射培地（plasma-activated medium: PAM）が抗腫瘍効果を持つことを報告し、新規の腹膜播種治療の手段となり得る可能性を示唆してきた。一方、生体内では PAM の効果が減弱するため、より強力な抗腫瘍効果を持つ PAM の作成が必要となることが課題として残されていた。今回我々は、PAM 作成時のプラズマの照射条件や投与方法を変化させ、より強力な抗腫瘍効果が得られる条件を検討し、さらに胃癌腹膜播種マウスモデルに PAM を腹腔内投与しその抗腫瘍効果について検討した。

【対象及び方法】

2種のヒト胃癌細胞株（SC-2-NU、AGS）を用いて *in vitro* の実験を行った。培地は RPMI1640 を用い、これにアルゴンプラズマを照射することにより PAM を作成した。プラズマの照射時間（T）、照射距離（L）、一度に処理する培地の体積（V）を変化させた PAM を胃癌細胞株に 24 時間暴露した際の増殖抑制効果について、MTS アッセイを行い比較検討した。さらに、同一の条件で作成した PAM を 24 時間毎に反復暴露した際の腫瘍増殖抑制効果についても MTS アッセイを行い比較検討した。

次に PAM 暴露による細胞機能に対する影響を検証する目的で、細胞遊走能に関しては scratch wound healing assay を行い、細胞接着能については adhesion assay を行い、PAM 暴露群と control 群の比較を行った。

最後に、BALB/c ノードマウスを用い、EGFP を産生する細胞株（GCIY-EGFP）を腹腔内投与することにより腹膜播種モデルを作成し、PAM の腹腔内投与治療を行った治療群と control 群における、腹膜播種の形成状況を *in vivo* イメージングの手法を用いて、経時的に観察を行った。治療スケジュールは、day 1 に GCIY-EGFP を 2×10^6 個腹腔内に注入し、治療群では day 1 から day 4 及び day 8 から day 11 に PAM 2 ml / 日を腹腔内投与し、control 群ではプラズマ未照射の RPMI1640 培地を同様に腹腔内投与し、day 15 に全個体を開腹し、蛍光励起下に腹膜播種の形成状況の観察を行った。

【結果】

プラズマの照射距離について、V = 6 ml に固定し、L = 9 mm, 14 mm の条件で作成した PAM を用いた場合、T = 3 min 以上とすることで増殖抑制効果を認めた。L = 5

mm の条件では T = 20 sec としても強力な増殖抑制効果を認め、作成した PAM を希釈してもその効果は残存した(Figure 1)。 PAM の作成条件を T= 20 sec、L = 5 mm に固定した場合、V = 12 ml、24 ml の条件では希釈を行うと増殖抑制効果が明らかでなくなった。一方 V = 3 ml、6 ml の条件では希釈しても増殖抑制効果が保たれた(Figure 2)。

弱い増殖抑制効果を持つ PAM を 24 時間毎に交換し、1 回から 3 回反復的に暴露すると暴露回数が多いほど増殖抑制効果が増大した(Figure 3)。

Scratch wound healing assay では PAM 暴露下では胃癌細胞株のコンフルエントモノレイヤーに作成したギャップへの細胞の遊走が抑制された(Figure 4)。 Adhesion assay では PAM 中に懸濁した胃癌細胞株はプラズマ未照射培地に懸濁したものと比較して、コラーゲンコーティングプレートへの接着能が著明に低下した(Figure 5)。

動物実験では、day 8 及び day 15 にマウス腹部の蛍光強度を *in vivo* イメージングで定量的に測定すると Control 群では経時的な蛍光強度の増強を認めたのに対し、PAM ip 群では増強は見られなかった(Figure 6)。 Day 15 に開腹下に蛍光励起下に観察を行うと長径 1mm 以上の播種結節の個数の中央値は、Control 群 10 個に対して PAM 腹腔内投与群においては 0 個であった。今回の実験期間中において、両群間に食餌摂取量や体重減少に差は認められず、腹腔内の観察においても炎症や、臓器障害の所見は認めなかった。

【考察】

本研究により、プラズマを培地に対して、より近接した距離から、より長時間照射することによって、より強力な PAM の作成が可能となることが示された。さらに、一度に処理する培地の量をより少なくすることによっても、従来我々が使用してきたものよりもさらに抗腫瘍効果の高い PAM を作成することが可能となることが示された。また、過去の報告で PAM の抗腫瘍効果はプラズマ照射から常温下で時間が経過すると減弱することが示されていたが、今回の実験で、24 時間毎に新しい PAM に反復的に暴露することにより、その抗腫瘍効果も加算的に増大することが示された。これはプラズマの照射条件による PAM の強度だけでなく、投与方法の工夫によっても抗腫瘍効果を増大させることができる可能性があることを示す結果であると考えられた。

腹膜播種の形成及び進展には、細胞の遊走能や接着能も強く関与するとされるが、本研究では胃癌細胞株に PAM を暴露することによりこれらの機能が低下することが示された。これは腹膜播種の制御に PAM が有効である可能性が *in vitro* においてより強く裏付けられた結果であると考えられた。

これらの *in vitro* での結果をふまえ、マウスモデルを用いて PAM の腹腔内投与を行った。これまでのプラズマ照射液を用いた *in vivo* での有効性の報告は、マウス皮下腫瘍モデルによるもののみで、過去にプラズマ照射液の腹腔内投与を行った報告は皆無であったが、今回の実験では、明らかな有害事象の発生は認めず安全に予定の治

療を完遂可能であった。今回の実験プロトコールでは、腹膜播種の形成に至る前から PAM の投与を開始している為、既に形成された腹膜播種の治療に有効となるかは明らかではないが、少なくとも腹膜播種の形成の阻止に寄与したものと考えられる。

【結語】

マウス腹膜播種モデルにおいて、PAM の腹腔内投与が腹膜播種形成を抑制することを報告した。プラズマ照射液の腹腔内投与は、胃癌腹膜播種治療において有望な治療法となる可能性がある。