

電気刺激を用いた腫瘍血流の制御について

小倉隆英¹, 根城信仁¹, 半田康延²

¹ 東北大学大学院医学系研究科 保健学専攻 画像情報学分野

² 東北大学 名誉教授

The Controlling to Tumor Blood Flow Using by Electrical Stimulation

Takahide OGURA¹, Shinji NEJO¹ and Yasunobu HANDA²

¹Department of Medical Imaging and Applied Radiology, Health Sciences,

Tohoku University Graduate School of Medicine

²Professor Emeritus, Tohoku University

Key words : blood flow, tumor, electrical stimulation

One of the problem in radiation and chemo therapy is the existence of a hypoxic region with a low oxygen partial pressure in the tumor. Therefore, improving hypoxia in the tumor is thought to improve therapeutic outcomes. There is a treatment method to decrease blood flow of the tumor such as artery embolization. In any case, controlling the tumor blood flow is very important for treating cancer. In contrast, the electrical stimulation has the effect to control the blood flow.

In this study, we decided to investigate whether the tumor blood flow can be increased or decreased by using electric stimulation. C3H/HeJ mice and SCC-VII tumor cells were used. The tumor was transplanted to outside of the thigh. The Surface electrical stimulation method was used. The stimulation site was decided lumber-sacral area (Th12-S4) considering the femoral dermatome.

As a result, stimulus voltage ± 40 V, stimulation frequency 30 Hz, pulse width 200 μ sec, bipolar-waveform was able to achieve 22% ($p < 0.01$) increase tumor blood flow. On the other hand, stimulus voltage -100 V, stimulation frequency 1 Hz, pulse width 100 msec, monopolar-waveform was able to achieve 22% ($p < 0.01$) decrease tumor blood flow.

1. はじめに

近年における癌の治療法は、主として、病巣を切除する外科的療法、薬剤を用いて病巣を攻撃する化学療法、放射線を用いて病巣を照射する放射線療法などがあり、これらを組み合わせることで治療効果を引き出す集学的治療が行われることが一般的である。しかし、その治療効果が今一つ上

がらない原因のひとつとして、腫瘍内低酸素細胞の存在があげられる。癌組織は腫瘍の中心部において、細胞組織の低酸素化が起こることが知られている。2002年 Harris らは、このような低酸素化が起こった腫瘍細胞組織、すなわち低酸素細胞の存在そのものが放射線感受性を低下させる原因であると述べている。また、低酸素状態におかれた場合、組織に対し栄養や酸素を運搬する血流も

減少するため、化学療法における薬剤のデリバリーも低下し、総じて癌の治療効果が低減する原因となると報告している¹⁾。さらに、低酸素細胞の存在そのものが癌細胞の転移を惹起し、治療を難しくするとも報告している。このことから、集学的治療において治療成績を低下させている最大の要因は、腫瘍内に存在する低酸素細胞そのものであると言え、これに対する対策が集学的治療の治療成績向上のための近道であると考えられる。

一方、リハビリテーションやペインクリニック領域で主に用いられる電気刺激に注目すると、2008年 Inoue らは、電気刺激には血管を拡張させる物質の分泌を促す効果があると報告している²⁾。また、2006年に我々は、電気刺激による血流の増加現象や循環改善効果について報告しており³⁾、電気刺激によって腫瘍の血流をコントロールできる可能性は十分ある。

そこで本研究においては、集学的がん治療成績の向上を図ることを大目標に、電気刺激を用いて血流を自由にコントロールし、放射線照射時など腫瘍内を再酸素化したいときには血流を増加させ、治療間期で腫瘍の成長を抑制したいときには血流を減少させるといった新しい癌治療法を提案すべく、血流の自由な増減を可能とする電気刺激条件について検討したので報告する。

2. 方 法

C3H/HeJ (7週齢♀ SLC Inc., Japan) を用いた In vivo 実験を行った。腫瘍細胞はマウス由来の扁平上皮癌株 SCC-VII とした。90%D-MEM+10%FBS を用い、37°C 5.0% CO₂ 調整のインキュベータ内で培養し実験に使用した。

培養した腫瘍をマウスに移植後、腫瘍体積が 750 mm³ となった時点で刺激条件を変え電気刺激を行い、腫瘍の血流を測定した。腫瘍血流の観察測定には2次元レーザー血流画像装置 OMEGA ZONE OZ-1 (オメガウェーブ株式会社) を使用した (図1)。

電気刺激装置にはポータブル電気刺激装置のどか (リンテック株式会社 周波数3もしくは30 Hz で刺激電圧≤80 V) および、汎用電気刺激装置「SEN-3401」(日本光電工業株式会社 周波数任意) を用いた。汎用電気刺激装置には、アイソレータ「SS-203J」(日本光電工業株式会社, Japan) を組み合わせて用いた。

実験は全てイソフルラン吸入による全身麻酔にて行った。使用した麻酔器は小動物用麻酔器 The Univentor 400 Anaesthesia Unit (バイオリサーチセンター株式会社) である。なお、本研究は東北大学大学院医学系研究科動物実験専門委員会の承認を受け、国立大学法人東北大学における動物実験に関する規定に則り実施した。

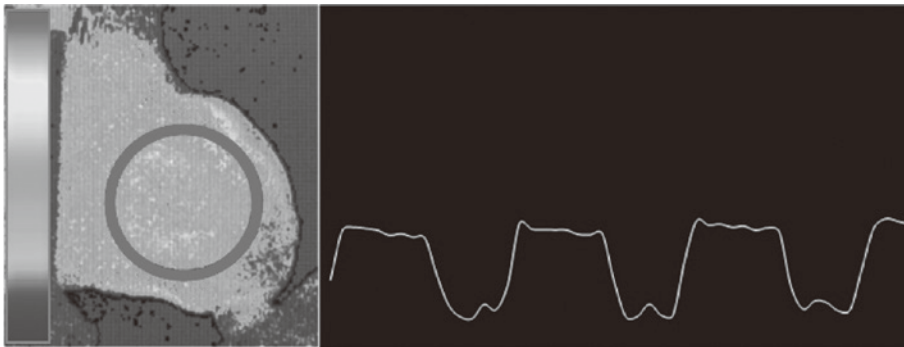


図1. 血流画像と ROI およびその血流波形得られた血流画像の腫瘍部分の拡大像 (左) を示す。赤色の円が血流画像上に設定した関心領域 (ROI) を表わす。この ROI に含まれる全ピクセルに与えられる血流値の平均値を経過時間に対する血流波形とし (右) 解析に用いた。

3. 結 果

3-1. 血流増加について

3-1-1. 血流増加刺激時の代表的血流波形

図2に30 Hzでの血流増加刺激時の代表的な相対血流波形を示す。電気刺激前の血流値の平均値が1となるように正規化して表わしている。電気刺激中は刺激パルスに同期して血流値が大きく変動しており、最大で約2倍まで血流が増加している。一方刺激後は刺激中に比べ血流値は小さくなるが、刺激前と比較すると血流値が増加した。30 Hz血流増加刺激時でも周波数が異なるだけで血流の増減は同様であった。

3-1-2. 血流増加刺激の前後における相対血流値の違い

図3に30 Hz血流増加刺激の前後における相対血流値の違いを示す。刺激後の血流値は相対値で 1.22 ± 0.05 となり、 $p < 0.01$ で刺激前に比較して有意に増加した。血流増加の電気刺激によって腫瘍の血流が22%有意に増加した。この結果は周波数3 Hzにおいても、30 Hzにおいても差異は無かった。

3-2. 血流減少について

3-2-1. 血流減少の刺激条件

表1に血流減少のために試行した刺激条件とその結果を示す。電圧や周波数、パルス幅、極性を変化させたが、血流を減少できたのは電圧が高め、周波数は低め、パルス幅は広め、極性はマイナスのモノポーラーであった。特に検討 No. 11, 刺激電圧-100 V・刺激周波数1 Hz・パルス幅100 msec・負極性のモノポーラー波形で血流の減少が顕著であったため、今後血流減少刺激の刺激条件にはこれを採用することとした。この刺激波形を図4に示す。

3-2-2. 血流減少刺激時の代表的血流波形

図5に血流減少刺激時の代表的な相対血流波形を示す。電気刺激前の血流値の平均値が1となるように正規化して表わしている。電気刺激中は刺激パルスに同期して血流値が大きく変動しており、最大で約0.7倍まで血流が減少している。一方刺激後は刺激中に比べ血流値は大きくなるが、刺激前と比較すると血流値が減少していることがわかる。減少した血流は徐々に回復したが、電気刺激以前のレベルに戻るまでに約15分間を要し

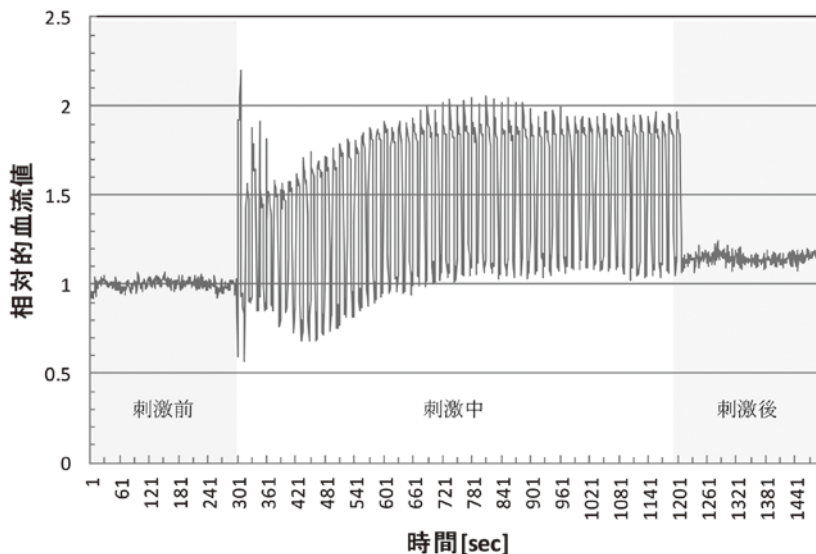


図2. 30 Hz 血流増加刺激時の代表的な相対血流波形を示す。電気刺激前の血流値の平均値が1となるように正規化して表わしている。

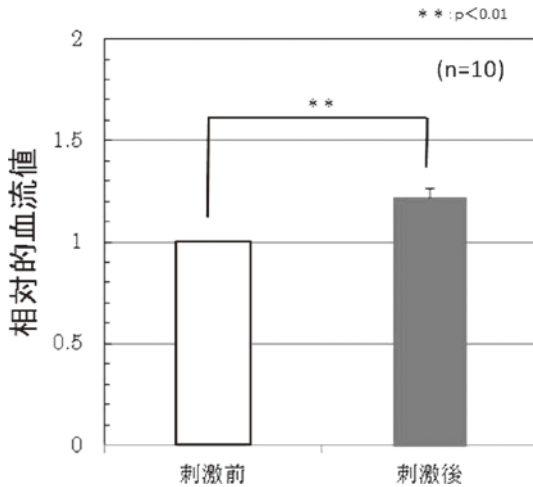


図3. 30 Hz 血流増加刺激の前後における相対血流値の違い

30 Hz 血流増加刺激の刺激前後における相対血流値の違いを示す。刺激後の相対血流値が、刺激前に比較して有意に増加した ($p < 0.01$)。

た。

3-2-3. 血流減少刺激の前後における相対血流値の違い

図6に血流減少刺激の前後における相対血流値の違いを示す。刺激後の血流値は相対値で 0.78 ± 0.09 となり、 $p < 0.01$ で刺激前に比較して有意に減少した。血流減少の電気刺激によって腫瘍の

血流が約 22% 有意に減少したことになる。

4. 考 察

4-1. 血流増加電気刺激について

刺激電圧 40 V, 刺激周波数 3 Hz および 30 Hz, パルス幅 200 μsec のバイポーラーパルスを用いることで、マウスに植えた腫瘍細胞 SCC-VII で 22% の血流増加を認めた。レーザードップラー血流計は比較的浅部の血流を描出するため、得られた血流値は移植した SCC-VII 腫瘍の表面近傍の血流値である。

一般的には、電気刺激において刺激電圧や刺激周波数が高くなると血流の増加率は大きくなると言われている⁴⁾。しかし、今回の我々の研究ではこのような差異、特に刺激周波数の違いにおける血流の増加率に違いは認められなかった。

3 Hz を用いた刺激と、30 Hz を用いた電気刺激において、いずれでも同程度の血流増加を認めたことは大変重要である。電気刺激は周波数が高いほど電極貼付部の痛みを強く感じるようになる。がん治療、すなわち人体への電気刺激を前提とした場合には、同程度の血流値が得られるならば、より低い周波数で刺激を行った方が痛みが少なく、患者に対する侵襲性も低いものと考えられ、今後の臨床応用への一つの方向性が示せたものと考ええる。

表1. 電圧や周波数・パルス幅・極性を任意に調節し血流の増減を計測した。代表的試行条件を表にした。

検討 No.	電圧 (V)	周波数 (Hz)	パルス幅 (μsec)	極性	血流の増減
1	50	30	200	±	↑↑
2	50	100	200	±	↑↑↑
3	100	100	200	±	↑↑↑
4	100	1,000	200	±	↑↑↑
5	100	2,000	200	±	↑↑↑
6	50	1	200	—	—
7	50	1	200	—	—
8	100	1	1,000	—	↓
9	100	1	200	—	—
10	100	1	2,000	—	↓↓↓
11	100	1	100,000	—	↓↓↓

電気刺激を用いた腫瘍血流の制御について

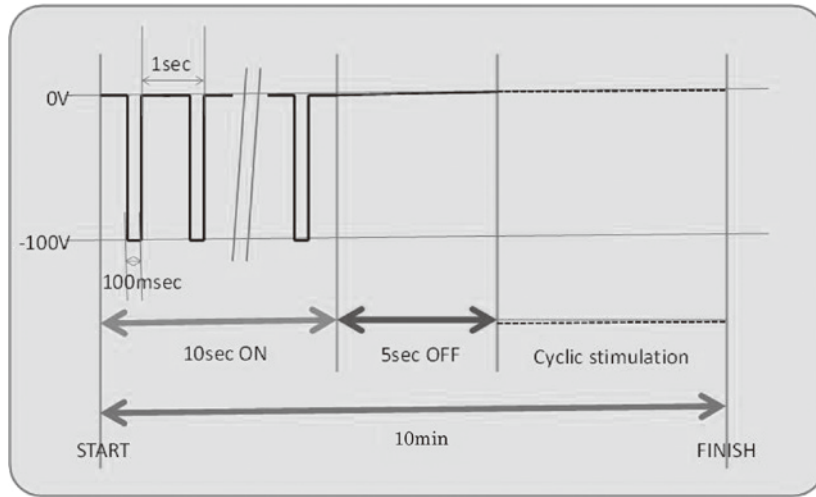


図 4. 血流減少のための電気刺激波形
刺激周波数 1 Hz, 刺激電圧 100 V 以下, パルス幅 100 msec のマイナスモノポーラーパルスを用い, 10 sec 通電 5 sec 休止を 10 分間繰り返すサイクリック刺激波形である。

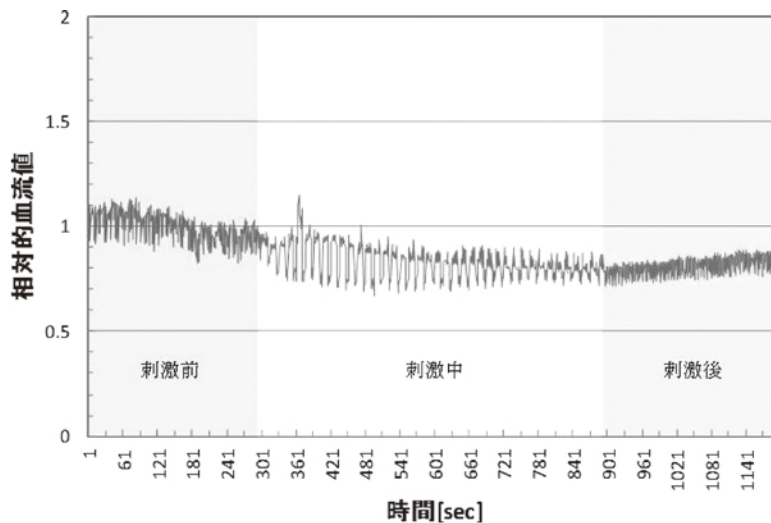


図 5. 血流減少刺激時の代表的な相対血流波形
血流減少刺激時の代表的な相対血流波形を示す。電気刺激前の血流値の平均値が 1 となるように正規化して表わしている。

4-2. 血流減少電気刺激について

刺激電圧 100 V, 刺激周波数 1 Hz, パルス幅 100,000 μ sec すなわち 100 msec の負極性モノポーラーパルスを用いることで, マウスに植えた腫瘍

細胞 SCC-VII で 22% の血流減少を認めた。レーザードップラー血流計は比較的浅部の血流を描出するため, 得られた血流値は移植した SCC-VII 腫瘍の表面近傍の血流値を表わしていると考えら

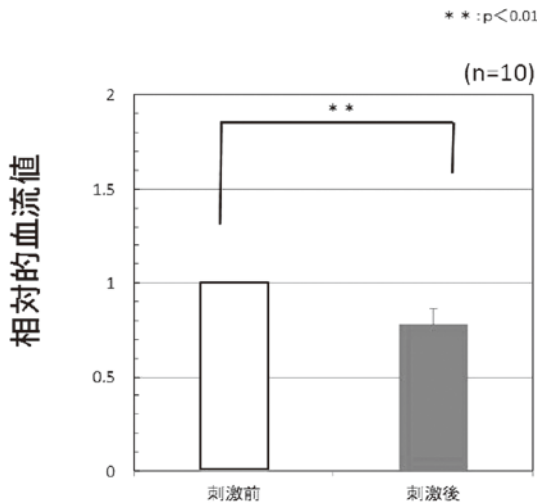


図 6. 血流減少刺激の前後における相対血流値の違い
血流減少刺激の刺激前後における相対血流値の違いを示す。刺激後の相対血流値が、刺激前に比較して有意に減少した ($p < 0.01$)。

れる。

先行研究においては、刺激電圧 640～1,200 V、刺激周波数 1 Hz の電気刺激を用い、大変効果的に腫瘍の血流を減少できたという報告がある⁵⁾。

我々が研究に用いた汎用電気刺激装置「SEN-3401」は、最大 100 V までしか出力できず、これ以上の高い電圧での試行は行うことができなかった。また、人体への適用を前提とした場合、640～1,200 V という電圧は電撃の可能性が大きく非現実的であろうと考えた。そこで、刺激電圧を装置定格一杯の 100 V に抑えたうえで、パルス幅を大きく延長し、生体に対する通電負荷を大きくする方法を採用した。高い電圧で血流が減少するのは、高電圧によって腫瘍近傍筋組織の強収縮が起り、筋によるポンプ効果の作用が生じるためと考えている⁵⁾。したがって、低い電圧であっても十分幅のあるパルスを採用することによって腫瘍近傍筋組織に強収縮を起こすことは可能で、筋によるポンプ効果を生じさせることは十分可能であろうと考えている。今回はこのような理論・手法によって、刺激電圧を低い範囲に抑えながら、血

流の減少を実現することができたと推定する。

もちろん、我々の刺激条件の方が電圧が低いことから、人体への侵襲性が小さいことは自明である。

電気刺激終了後、減少した血流は徐々に回復し、約 15 分ほど経過した後、電気刺激以前のレベルに戻った。このことから、電気刺激による血流減少は、現時点では、エンボリゼーションのように長期にわたって血流を途絶させる事は難しいものとする。先に述べた電気刺激による血流減少機序が、筋によるポンプ効果と推測されることを考えても、電気刺激単体による兵糧攻めは難しいと考える。

4-3. レーザードップラーでの血流値と腫瘍中心にある低酸素領域の酸素分圧について

細胞組織は拡散によって毛細血管から酸素を供給される⁶⁾。しかし腫瘍組織は正常組織に比べて血管支配が乏しく、酸素が欠乏するために腫瘍の中心で壊死が始まり、その周囲は低酸素領域におかれる。一方で腫瘍組織の表面から 200 μm を超えない部分では酸素が欠乏することなく、放射線に対して高い感受性を示す¹⁾。

今回の研究においては、レーザードップラー血流計によって、腫瘍表面近傍の血流量を評価しており、腫瘍の中心部分、すなわち腫瘍の低酸素領域における酸素分圧は測定できていない。

腫瘍近傍の腫瘍栄養血管は、血管壁が脆弱で他の臓器に分布する正常な血管と同様とは考えることができないと言われている¹⁾。しかし、腫瘍を含む全ての細胞組織が、拡散によって毛細血管から酸素を供給されている⁶⁾ことを考えると、腫瘍近傍の血流値が増加すれば、腫瘍中心部分の低酸素領域も必ず酸素分圧が上昇するはずであり、腫瘍近傍の血流値が減少すれば、腫瘍中心部分の低酸素領域も必ず酸素分圧が下降するはずである。

我々のこれまでの研究では、レーザードップラーによって測定される腫瘍近傍の血流の上昇に対し、腫瘍中心部にある低酸素領域の酸素分圧が、30～50 分遅れて上下することが観測できており、腫瘍近傍の血流増減と低酸素領域の酸素分圧の上下はほぼ等価と考えてよいものと考えている。た

だし、両者に時差があることは指摘しておかなければならない。この点は臨床応用を考える際に、タイミングという点で十分考慮する必要がある。

4-4. リミテーション

本研究において、血流増現の電気刺激を行うタイミングをどのようにすべきかは検討していない。「血流を増加させ→X線照射または薬剤投与→血流を減少させ兵糧攻め」という治療サイクルが今後の念頭にあるのだが、その機序が「低酸素領域の再酸素化による放射線治療効果または薬剤治療効果の上昇」と、「腫瘍細胞分裂サイクルの同期とその時点での兵糧攻め」のダブル効果にあるとすれば、血流の増減を制御する刺激を与えるタイミングをどのようにするかは非常に重要である。この点に関しては検討しておらず、今後の重要な検討課題であろうと考えている。

5. 結 語

電気刺激によって、腫瘍近傍の血流値を増加させたり、減少させたりする制御が可能となった。このことは、集学的治療の治療成績向上のための一つのブレイクポイントになるのではと考える。電気刺激を用いて血流を自由にコントロールし、放射線照射時など腫瘍内を再酸素化したいときには血流を増加させ、治療間期で腫瘍の成長を抑制

したいときには血流を減少させるという新しい癌治療法を提案できる可能を見出すことができた。

文 献

- 1) Harris, A.L. : Hypoxia-A key regulatory factor in tumor growth, *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 38-47, 2002
- 2) Inoue, M., Hojo, T., Nakajima, M., et al. : The effect of electrical stimulation of the pudendal nerve on sciatic nerve blood flow in animals, *Acupunct. Med.*, **26**(3), 145-148, 2008
- 3) Ogura, T., Murakami, T., Ozawa, Y., et al. : Magnetic resonance imaging of morphological and functional changes of the uterus induced by sacral surface electrical stimulation, *Tohoku J. Exp. Med.*, **208**, 65-73, 2006
- 4) Hasegawa, S., Kobayashi, M., Arai, R., et al. : Effect of early implementation of electrical muscle stimulation to prevent muscle atrophy and weakness in patients after anterior cruciate ligament reconstruction, *J. Electromyogr. Kinesiol.*, **21**(4), 622-630, 2011
- 5) Sersa, G., Cemazar, M., Parkins, C.S., et al. : Tumour blood flow changes induced by application of electric pulses, *Eur. J. Cancer*, **35**(4), 672-677, 1999
- 6) Honig, C.R., Connett, R.J., Gayeski, T.E. : O₂ transport and its interaction with metabolism—a systems view of aerobic capacity, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **24**(1), 47-53, 1992