(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5329978号
(P5329978)
(45)発行日　平成25年10月30日(2013.10.30)　(24)登録日　平成25年8月2日(2013.8.2)

(51)Int.Cl.　F I
A61N 1/32 (2006.01)　A61N 1/32

請求項の数 5　(全 17 頁)

(21)出願番号	特願2008-556458 (P2008-556458)
(86)(22)出願日	平成19年2月26日 (2007.2.26)
(65)公表番号	特表2009-532077 (P2009-532077A)
(43)公表日	平成21年9月10日 (2009.9.10)
(86)国際出願番号	PCT/US2007/004844
(87)国際公開番号	WO2007/100727
(87)国際公開日	平成19年9月7日 (2007.9.7)
審査請求日	平成22年2月17日 (2010.2.17)
(31)優先権主張番号	60/776,215
(32)優先日	平成18年2月24日 (2006.2.24)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　507136648
イースタン　バージニア　メディカル　スクール
アメリカ合衆国　バージニア州　ノーフォーク　フェアファックス　アヴェニュー　７２１
(73)特許権者　506020104
オールド　ドミニオン　ユニバーシティー
アメリカ合衆国　バージニア州　ノーフォーク　ハンプトン　ブールバード
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】メラノーマの自己破壊を引き起こすナノ秒パルス電界

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
パルス発生器を含む、メラノーマ処置用のナノ秒パルス電界（nsPEF）送達装置であって、
該パルス発生器が、少なくとも1 nsPEFをメラノーマ細胞を含む組織に印加するものであり、かつ該少なくとも1 nsPEFのそれぞれが、少なくとも300ナノ秒～1マイクロ秒以下のパルス持続時間と、少なくとも20 kV/cm～40 kV/cm以下の電界パルス強度とを有し、
該少なくとも1 nsPEFの印加が、少なくとも100 nsPEFの印加であり、
該少なくとも100 nsPEFの印加が、1回または複数回繰り返される、
装置。
【請求項２】
インサイチューで実施される、請求項１記載の装置。
【請求項３】
少なくとも100 nsPEFの印加が複数回繰り返される、請求項１または２記載の装置。
【請求項４】
カスパーゼ活性を有意に上昇させることなくメラノーマ細胞を含む組織中の血流を阻害してメラノーマが処置される、請求項１～３のいずれかに記載の装置。
【請求項５】
高圧電源、およびnsPEFを標的細胞に導くための手段を有する、請求項１～４のいずれかに記載の装置。

【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
発明の背景
複数の異なる種類の癌療法において、電界が用いられている。これらの一部には、高熱療法によって細胞を死滅させるために43℃より高くまで腫瘍を加熱する、無線周波またはマイクロ波の装置が必要である（K.K.Tanabe, S.A.Curley, G.D.Dodd, A.E.Siperstein, S.N.Goldberg (2004) Cancer. 100:641-650; D.Haemmerich, P.F.Laeseke (2005) Int.J. Hyperthermia. 21:755-760）。その他のものは、腫瘍細胞を透過処理して毒性の薬物またはDNAの導入を可能にするために、パルス電界を使用する（M.L.Lucas, R.Heller (2003) DNA Cell Biol. 22:755-763; Y.Kubota, Y.Tomita, M.Tsukigi, H.Kurachi, T.Motoyama, L.M.Mir (2005) Melanoma Res. 15:133-134; A.Gothelf, L.M.Mir, J.Gehl (2003) Cancer Treat.Rev. 29:371-387）。インサイチューにおいてナノ秒パルス電界で処置された線維肉腫腫瘍が、同じ動物における対照腫瘍と比較して増殖速度の減少を示したことが、過去の研究によって示されている（S.J.Beebe, P.Fox, L.J.Rec, K.Somers, R.H.Stark, K. H.Schoenbach (2002) IEEE Transactions on Plasma Science. 30:286-292）。
【０００２】
ナノ秒パルス電界（nsPEF）の主な特徴とは、ごくわずかな熱の発生しかもたらさない低エネルギーと、細胞内部まで貫通して細胞内小器官を透過性にし（K.H.Schoenbach, S. J.Beebe, E.S.Buescher (2001) Bioelectromagnetics. 22:440-448; E.S.Buescher, K.H. Schoenbach (2003) IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation. 10 :788-794）かつ小胞体からカルシウムを放出させる（P.T.Vernier, Y.H.Sun, L.Marcu, S .Salemi, C.M.Craft, M.A.Gundersen (2003) B B R C. 310:286-295; E.S.Buescher, R.R .Smith, K.H.Schoenbach (2004) IEEE Transactions on Plasma Science 32:1563-1572; J.A.White, P.F.Blackmore, K.H.Schoenbach, S.J.Beebe (2004) J.Biol.Chem. 279:2296 4-22972）能力とを有することである（J.A.White et al. (2004) J.Biol.Chem）。これによって、以下を含む多くの用途で細胞内小器官を物理的に標的とするための新たなアプローチが提供される：培養細胞（S.J.Beebe, P.M.Fox, L.J.Rec, E.L.Willis, K.H.Schoenb ach (2003) FASEB J. 17:1493-1495; S.J.Beebe, J.White, P.F.Blackmore, Y.Deng, K.S omers, K.H.Schoenbach (2003) DNA Cell Biol. 22:785-796; S.J.Beebe, P.F.Blackmore , J.White, R.P.Joshi, K.H.Schoenbach (2004) Physiol Meas. 25:1077-1093）および腫瘍（S.J.Beebe et al. (2002) IEEE Transactions on Plasma Science）におけるアポトーシスの開始、遺伝子トランスフェクション効率の増大（S.J.Beebe et al. (2003) DNA Cell Biol; S.J.Beebe et al. (2004) Physiol Meas.）、ならびに、腫瘍増殖の低下（S. J.Beebe et al. (2002) IEEE Transactions on Plasma Science）。
【０００３】
細胞膜を破裂させるために生体細胞に対して電界を使用することは、非生理学的タイプの細胞破壊である壊死による細胞死をもたらすことができるが、細胞内小器官を透過性にするために生体細胞に対してnsPEFを使用することは、アポトーシスによる細胞死を開始させることができる。インサイチューにおいて組織内部の生体細胞を処置する場合、アポトーシスによって細胞死を開始できることは、壊死により通常観察される炎症および瘢痕によって体内の周囲または近傍の組織に非特異的損傷を生じることなく、インサイチューにおける特定の望ましくない細胞の破壊を可能にすると考えられる。超短波で高強度のパルス電界またはナノ秒パルス電界（nsPEF）が哺乳動物細胞に与える効果の調査によって、伝統的な形質膜エレクトロポレーションと比較して、細胞構造および機能における明確な違いが実証された。HL-60細胞を含む複数のヒト細胞系において、nsPEFが、アポトーシスカスケードを開始させるシグナル伝達機構を引き起こすことは、以前に実証された（Be ebe, S. J., et al. (2002) IEEE Trans. Plasma Sci. 30, 286-292; Beebe, S.J., et a l. (2003) FASEB J. 17, 1493-1495）。
【０００４】

このnsPEF処置の効果は、2つの別々の電界パラメータであるパルス持続時間およびパルス振幅に基づくと考えられている。パルス持続時間の影響は、細胞を電界内に配置した場合の膜荷電の過程を考慮することによって理解できる。細胞内部のイオンは、電界方向に移動し、かつさらなる力を受けなくなるまで高抵抗性の膜を荷電することによって、電界に応答する。定義上、これは、その再分布によって細胞内部の正味の電界がゼロになるような等価かつ反対の電界が確立される場合にしか起こらないと考えられる。しかしこの再分布は、形質膜の荷電時定数（charging time constant）により特徴付けられる一定の時間を要し、これは典型的には0.1～1マイクロ秒の範囲である。nsPEFがこの荷電時間よりも短い場合、内部電荷が再分散して強制電界を相殺するには時間が足りないと考えられ、これらは、細胞内部まで貫通して、ある持続時間にわたって全ての小器官膜を荷電すると考えられるが、該持続時間は、細胞の形質膜と小器官膜の両方の荷電時定数に依存する（K.H.Schoenbach, R.P.Joshi, J.F.Kolb, N.Chen, M.Stacey, P.F.Blackmore, E.S.Buescher, S.J.Beebe (2004) Proc. IEEE. 92:1122-1137）。

【０００５】

第二の重要なnsPEFパラメータとは、パルスの振幅である。電荷に対し発揮される力および脂質膜のエレクトロポレーションのどちらも、電界強度に左右される。細胞膜を介する電界が約1ボルト（直径10μmの細胞に対して2 kV/cm）を上回る場合、水で満たされた孔が膜の脂質二重層内に生じるが、これらの孔のサイズおよび寿命は、電界パルスの強度および持続時間に左右される。2 kV/cmを上回る振幅およびミリ秒範囲のパルス持続時間の場合には大きな孔が形成され、これによって、通常は不透過抗癌剤を標的組織内部に導入するために使用されている、膜のエレクトロポレーションが起こる（M.L.Lucas et al (2003) DNA Cell Biol.; Y.Kubota et al (2005) Melanoma Res.; A.Gothelf et al (2003) Cancer Treat.Rev.; J.Teissie, M.Golzio, M.P.Rols (2005) Biochim.Biophys.Acta 1724:270-280）。これらの長パルスでは、熱影響を避けるためにパルス振幅は約2 kV/cmに制限される。加熱はパルス持続時間と電界強度の二乗とに比例するので、パルスがナノ秒範囲で短くなればなるほど電界強度を高くすることができるが、一方で同じ低レベルの熱エネルギーが組織に送達される。20倍高い電界強度である40 kV/cmを用いて形質膜に構造的変化を生じさせることができるが、これは、パルスの持続時間の間、細胞小器官にわたってより小さな電気的障壁およびより大きな電圧勾配をもたらす（Q.Hu, S.Viswanadham, R.P.Joshi, K.H.Schoenbach, S.J.Beebe, P.F.Blackmore (2005) Phys.Rev.E Stat.Nonlin.Soft.Matter Phys.71:031914-1-031914-9）。直径10μmの典型的な腫瘍細胞核は、各パルスの間、その直径にわたってほぼ40 Vの電圧勾配を受けると考えられる。この電界は、電気的変形（electrodeformation）を生じるのに十分なほど大きい（R.P.Joshi, Q.Hu, K.H.Schoenbach, H.P.Hjalmarson (2002) Phys.Rev.E Stat.Nonlin.Soft.Matter Phys. 65:021913）。

【０００６】

以前の研究によって、nsPEFの直接的または間接的な標的としての細胞DNAに関する直接の証拠が提供された。コメットアッセイ法を用いて、Staceyら（M.Stacey, J.Stickley, P.Fox, V.Statler, K.Schoenbach, S.J.Beebe, S.Buescher (2003) Mutat.Res. 542:65-75）は、60 kV/cmの60 nsパルス10回によって、Jurkat細胞抽出物におけるDNA電気泳動跡（DNA electrophoresis track）の平均画像長が迅速に2.6倍増加し、HL60細胞抽出物によるコメットアッセイ法では1.6倍増加したことを見出した。どちらの場合においても、これは非常に有意な変化であった（$p<0.001$）。DNA電気泳動跡におけるこの伸長は、通常、DNAがアポトーシス細胞死に関連するより小さな断片へと断片化したことを示すと解釈されている。nsPEF処置後のDNAにおける変化の指標は、DNAとRNAの間に介在する生体蛍光色素であるアクリジンオレンジ、Chenら（N.Chen, K.H.Schoenbach, J.F.Kolb, S.R.James, A.L.Garner, J.Yang, R.P.Joshi, S.J.Beebe (2004) Biochem.Biophys.Res.Commun. 317:421-427）で標識された核の画像から得られる。26 kV/cmの10 nsパルス1回によって、核における蛍光強度の劇的な低下が起こったが、これはパルス後5分間程度の早さで明らかになった。この変化は、DNAの流出またはDNAの立体構造変化による可能性がある。

【０００７】
アポトーシスをもたらす様式で特定の細胞を選択的に改変できる能力により、周囲の組織に対する副作用を最小限に抑えながら望ましくない組織（たとえば、癌細胞、脂肪細胞、または軟骨細胞）を選択的に破壊するための新しい方法が提供される。温熱療法、薬物、または有意な副作用も伴うことなく、腫瘍増殖阻害だけでなく完全な腫瘍退縮までももたらす電気的処置法は、癌療法およびその他のインサイチュー療法の分野における大変な進歩である。本発明の1つまたは複数の態様は、少なくとも部分的に、これらおよび様々なその他の需要に取り組むものである。
【発明の開示】
【０００８】
発明の簡単な概要
本発明の1つまたは複数の局面によって、組織中の標的細胞においてアポトーシスを選択的に開始させる方法を提供する。本方法は、少なくとも1 nsPEFを該組織に印加する段階を含む。少なくとも1 nsPEFとは、少なくとも約10ナノ秒～約1マイクロ秒以下のパルス持続時間と、少なくとも約10 kV/cm～約350 kV/cm以下の電界パルス強度とを有する。本発明の1つまたは複数の態様において、本方法はインサイチューで実施される。
【０００９】
一局面において、少なくとも1 nsPEFとは、約300ナノ秒のパルス持続時間と、少なくとも約20 kV/cm～約40 kV/cm以下の電界パルス強度とを有する。
【００１０】
本発明の1つまたは複数の態様において、少なくとも100 nsPEFを組織に印加する。一局面において、少なくとも300 nsPEFを組織に印加する。別の局面において、少なくとも400 nsPEFを組織に印加する。本発明のさらに別の態様において、少なくとも1 nsPEFの処置法を繰り返す。
【００１１】
本発明の1つまたは複数の局面において、標的細胞は脂肪細胞である。本発明の1つまたは複数の局面において、標的細胞は骨細胞である。本発明の1つまたは複数の局面において、標的細胞は血管細胞である。本発明の1つまたは複数の局面において、標的細胞は筋肉細胞である。本発明の1つまたは複数の局面において、標的細胞は軟骨細胞である。本発明の1つまたは複数の局面において、標的細胞は幹細胞である。本発明の1つまたは複数の局面において、標的細胞は上記細胞の組み合わせである。
【００１２】
組織中の血流を阻害するための方法も、本発明において提供される。本方法は、少なくとも1 nsPEFを組織に印加する段階を含む。少なくとも1 nsPEFとは、少なくとも約10ナノ秒～約1マイクロ秒以下のパルス持続時間と、少なくとも約10 kV/cm～約350 kV/cm以下の電界パルス強度とを有する。本発明の1つまたは複数の態様において、本方法はインサイチューで実施される。
【００１３】
また本発明は、腫瘍退縮を誘導するための方法も提供する。本方法は、少なくとも1 nsPEFを該組織に印加する段階を含む。少なくとも1 nsPEFとは、少なくとも約10ナノ秒～約1マイクロ秒以下のパルス持続時間と、少なくとも約10 kV/cm～約350 kV/cm以下の電界パルス強度とを有する。本発明の1つまたは複数の態様において、本方法はインサイチューで実施される。
【００１４】
発明の詳細な説明
本発明の原理の理解を促進するために、ここで好ましい態様に対する言及を行い、その説明のために特定の用語を使用する。これによって本発明の範囲の制限を意図しているわけではないことは、言うまでもなく理解されよう。むしろ、本発明が関連する技術分野の当業者により意図されるであろう、本発明のそのような改変およびさらなる修正ならびに本明細書で説明される本発明の原理のさらなる適用は、本発明の一部となることが意図さ

れている。

【００１５】

例えば、ある態様の一部として例示または説明された特徴をその他の態様に対して用いて、またさらなる態様を得ることができる。加えて、特定の特徴を、同じまたは類似の機能を発揮することが言及されないままの同様の装置または特徴と置換することができる。したがって、そのような修正および変更は本発明の全体に含まれることが意図される。

【００１６】

生体細胞は、膜で囲まれた細胞質からなる。細胞質は導電性であるが、一方膜は、脂質二重層で構成されており、誘電体とみなすことができる。生体細胞に電界を印加すると、細胞膜に電荷が蓄積され、したがって、膜を介する電圧が変化する。真核細胞の場合、平衡状態下での膜間電圧は約70 mVである。外部電界によって膜突起に影響を与えるためには、これら電界の振幅（「E」）は、少なくとも静止電位と同じ程度の電位差（「Vm」）が発生するような振幅でなければならない。電界の振幅は、

$$E = V_m/fa \qquad (1)$$

であり、式中、aは細胞の半径であり、fは細胞の形状に依存する形状因子である。球形の細胞に関してはfが1.5であり；両端部における半球の直径がdである長さlの円柱細胞に関しては、形状因子は

$$f = l/(l-d/3) \qquad (2)$$

である。

【００１７】

約5μmの推定半径および球形形状を有する生体細胞に関しては、膜を介した静止電位と同じ振幅の電圧を発生させるために必要な外部電界は、約100 V/cmである。

【００１８】

膜電位の変化が静止電位と類似するような規模の外部電界に関しては、膜におけるチャネルの電圧誘導性開口によって、膜を介したイオンの流動が引き起こされる。これによって、細胞膜近傍のイオン濃度の変化が引き起こされ、かつしたがって、細胞ストレスが引き起こされる。このストレスはミリ秒のオーダーで続くが、一般には、恒常的な細胞損傷を引き起こすことはない。細胞膜を介した電圧が約1ボルトのレベルに達するように電界強度が上昇する場合、膜透過性は、細胞の回復に数秒～数時間要する（可逆的破壊）か細胞死が起こりうるようなレベルまで上昇する。膜破壊の機構は十分に理解されていない。一般的な仮説は、膜内に孔が作製されるというものである。孔は、巨大分子の交換を可能にするサイズであってもよい。膜間電圧が十分に高い場合、孔が閉鎖されることはもはやない。可逆的破壊作用の使用は、エレクトロポレーションおよび生物付着防止の分野で報告されている。不可逆的作用は、水および食品の細菌除去（debacterialization）の分野で使用されている。

【００１９】

生体細胞に対する電界の作用は、単に印加電界の規模に依存するだけでなく、その持続時間にも依存する。細胞に電圧パルスが印加されると、膜に電荷が蓄積し、膜電圧が上昇する。

【００２０】

本明細書で用いる「nsPEF」すなわち「ナノ秒パルス電界」とは、約10 kV/cm～約350 kV/cmの電界強度を有するナノ秒範囲（約100ピコ秒～約1マイクロ秒）の電気パルスとして定義される。nsPEFを細胞に送達するために、少なくとも約100ピコ秒～約1マイクロ秒以下のパルス持続時間と少なくとも約10 kV/cm～約350 kV/cm以下の電界強度とを有する短い電気パルスを送達できるパルス発生器を備えた任意の装置を使用することができる。本発明の別の局面において、パルス発生器は、少なくとも約100ピコ秒～約1マイクロ秒以下のパルス持続時間と少なくとも約10 kV/cm～約40 kV/cm以下の電界強度とを有する短い電気パルスを送達できる。本発明の別の局面において、パルス発生器は、少なくとも約100ピコ秒～約1マイクロ秒以下のパルス持続時間と少なくとも約20 kV/cm～約125 kV/cm以下の電界強度とを有する短い電気パルスを送達できる。本発明の別の局面において、パルス

発生器は、少なくとも約10ナノ秒～約300ナノ秒以下のパルス持続時間と少なくとも約20 kV/cm～約45 kV/cm以下の電界強度とを有する短い電気パルスを送達できる。本発明の別の局面において、パルス発生器は、少なくとも約10ナノ秒～約350ナノ秒以下のパルス持続時間と少なくとも約20 kV/cm～約125 kV/cm以下の電界強度とを有する短い電気パルスを送達できる。本発明の別の局面において、パルス発生器は、約10ナノ秒のパルス持続時間と約125 kV/cmの電界強度とを有する短い電気パルスを送達できる。本発明の別の局面において、パルス発生器は、約300ナノ秒のパルス持続時間と約40 kV/cmの電界強度とを有する短い電気パルスを送達できる。

【００２１】

nsPEF送達のための装置はまた、高圧電源、および、nsPEFを標的細胞に導くための手段も備える。好ましくは、標的細胞はインサイチューであり、nsPEFをインサイチュー標的細胞に導くための任意の適切な手段を用いることができる。好ましくは、nsPEFを導くための適切な手段は、組織内で、高電圧で持続時間の短い、例えばナノ秒範囲の電気パルスを可能にする。例としては、平板電極、針、または針アレイなどの電極システムが挙げられる。本発明の1つまたは複数の態様において、組織の一部として存在する細胞にnsPEFを直接印加する。

【００２２】

本発明のnsPEFパルスは、米国特許第6,326,177号およびBeebe et al. FASEB J. 17, 1493-1495 (2003)において以前に記載された発生器などのパルス発生器によって、細胞に投与することができる。上述のパルス発生器より前には、表面の荷電時間と同等か更にそれを下回る時間規模で大きな細胞内電界を発生させることが困難であるために、これらの高周波細胞内作用の適用は制限されていた。しかし、米国特許第6,326,177号およびBeebe et al. (2003)に記載のように、本発明者らは、細胞の懸濁物中または組織内でMV/cm近傍の電界を発生させるのに適した電圧振幅を有するナノ秒範囲の電気パルスを生じることを可能にする、高圧で持続時間の短い電気パルスを発生させるための技術を開発した（Mankowski, J., Kristiansen, M. (2000) IEEE Trans Plasma Science 28:102-108）。そのナノ秒持続時間のために、これらのパルスによって細胞/組織に伝達される平均エネルギーは理論的には無視することができ、それにより、熱影響を伴わずに電気的効果が得られる。

【００２３】

細胞に印加されるべきnsPEFパルスの電界強度（または電界の強さ）とは、印加電圧を電極間の距離で割ったものであり、これは一般に少なくとも約10 kV/cmであるが、該細胞を含む懸濁物または組織の破壊電界を上回るべきではない。破壊電界はパルス持続時間が短くなるにつれて増大し、実験的に決定することができる。しかし、本発明において一般的に用いられる条件下では、破壊電界は一般に500 kV/cmを上回らない。本発明の1つまたは複数の局面において、約300ナノ秒の持続時間を有する電界パルスは典型的に、立ち上がり時間30ナノ秒で、20 kV/cmを上回る電界強度を有する。

【００２４】

好ましくは、パルスの持続時間は、1マイクロ秒を下回るが約100ピコ秒を上回るべきである。本発明の1つまたは複数の局面において、パルス持続時間は約1ナノ秒～約300ナノ秒である。最適なパルス持続時間は、その他の要素の中でも特に、細胞型、組織の種類、および所望の処置に依存して変動する。

【００２５】

nsPEFパルスの回数および組織に印加されるべき任意の連続的な処置の回数は、望ましくない組織の完全な退縮、例えば完全な腫瘍退縮を誘導するのに十分なものである。この回数は、意図される効果、nsPEFの投与様式、および処置されるべき細胞を含む様々な要素に基づいて変動しうる。

【００２６】

とりわけ、その一時的かつ電気的な特徴、ならびに細胞全体および組織に対するその影響に基づくと、nsPEFはエレクトロポレーションパルスとは異なる。比較目的で、エレク

トロポレーションパルスとnsPEFはそれぞれ、異なる電界強度（1～5 kV/cmに対して10～350 kV/cm）；異なるパルス持続時間（0.1～20ミリ秒に対して1～300ナノ秒）；異なるエネルギー密度（ジュール/ccに対してミリジュール/cc）；および、異なる電力（500 Wに対して180 MW）を示す。したがって、nsPEFはエレクトロポレーションパルスよりも5～6桁小さく、電界および電力は桁違いに大きく、エネルギー密度は大幅に低い。独特な短い持続時間および迅速な立ち上がり時間に加えて、非常に低いエネルギーおよび極めて高い電力を有するので、nsPEFはひときわ優れている。パルス持続時間の低下につれ、これらの違いに起因して、nsPEFは形質膜をバイパスして、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、核、または任意の細胞内貯蔵などの細胞内構造を標的化し、形質膜を無傷に保つ。パルス持続時間が十分に短くかつ電界強度が十分に高い場合には細胞内構造が標的化されるので、これらのパルスは、エレクトロポレーションパルスとは予想外に異なる効果を有する。細胞に対するnsPEFの効果は、細胞型、パルス持続時間および立ち上がり時間、電界強度、ならびに/またはその他の要素に応じて異なる。

【００２７】

さらに、nsPEFおよびエレクトロポレーションパルスは細胞に対して異なる効果を有する。例えば、伝統的なエレクトロポレーションパルス（例えば、100μs）に曝露されたJurkat細胞は迅速なヨウ化プロピジウム（「PI」）取り込みを示したが、60または300 nsに曝露された場合は、アポトーシス誘導と整合するずっと遅い時点でPIを取り込んだ（Deng, J., et al. (2003), Biophys. J. 84, 2709-2714）。さらに、大きな細胞は小さな細胞よりも容易にエレクトロポレーションされるという伝統的なエレクトロポレーション効果とは対照的に、nsPEFは、大きな細胞（例えば単球）よりも小さな細胞（例えばT細胞）に対して大きな形質膜効果を有する。形質膜エレクトロポレーションに非依存的な条件下では、nsPEFは、細胞運命を決定するシグナル伝達機構を改変することが示されている。nsPEFを用いると、アポトーシスを誘発することができる（Beebe, S.J., et al. (2002), IEEE Trans. Plasma Sci. 30:1 Part 2, 286-292; Beebe, S.J., et al. (2003), FASEB J (online, June 17, 2003) 10.1096//fj.02-0859fje; Vernier, P.T., et al. (2003), Biochem. Biophys. Res. Comm. 310, 286-295）。nsPEFは、以下を含む、十分に特徴決定された複数のアポトーシスマーカーを誘導した：無傷の形質膜、アネキシン-V-FITC結合、カスパーゼ活性化、細胞収縮、細胞質へのチトクロームc放出、および最終的に、食作用非存在下でのインビトロにおける形質膜の破裂として定義される後期の二次的壊死（Beebe et al., 2003）。

【００２８】

本発明の1つまたは複数の態様は、完全な腫瘍寛解を導くための2回目のまたは複数の処置によってメラノーマを処置する方法に向けられている。

【００２９】

本発明のその他の態様には、腫瘍血流を停止させるための患者におけるnsPEFの使用が含まれる。別の態様において、患者におけるnsPEFの使用により、任意の特定の組織に向けた血流の阻害が起こる。

【００３０】

ここで、完全な腫瘍退縮の誘導におけるnsPEFの使用を説明する特定の実施例に言及する。好ましい態様を説明するために実施例が提供されていることおよびそれによって本発明の範囲の制限が意図されるわけではないことが、理解されるべきである。

【００３１】

実施例1： メラノーマを処置するためのnsPEFの印加

材料および方法

細胞組織培養

マウスメラノーマB16-F10細胞をATCC（Manassas, VA）から入手し、使用時まで液体窒素中で凍結保存した。これらを37℃の湯浴中で融解させた後、10%ウシ胎児血清（FBS, Atlanta Biologicals）、4 mM L-グルタミン（Cellgro）、および2%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液（Cellgro）を追加したDMEM（ダルベッコ改変イーグル培地）を含む培養フ

ラスコに移した。5% CO_2/95%大気/100%加湿インキュベータ中で、37℃で細胞を増殖させた。

【００３２】

メラノーマ誘導

10^6 B16-F10マウスメラノーマ細胞を含む2～10μlを疎性輪紋状組織（loose areolar tissue）の皮膚の直下に注射することにより、雌性SKH-1マウス（免疫適格性の無毛アルビノ種、Charles River, Wilmington, MA）120匹内で2～4つの腫瘍を誘導した。数日以内にメラノーマ腫瘍が注射部位で見られる。5日以内に、腫瘍は典型的には3 mm幅となり、血管新生を表す。未処置の腫瘍は典型的に、数週間以内に10 mm以上の幅まで成長する。全ての動物試験について、1.6%イソフルラン含有酸素を用いた吸入麻酔下で、マウスを維持した。マウス#4～#63内の腫瘍を5針電極アレイで処置し、#64～#120を平行平板電極で処置した。典型的な実験において、2つの腫瘍を対照として用い、同一マウスにおける残りの2つをnsPEFで処置した。

【００３３】

インビボ画像化

徹照および倍率1.2の表面写真撮影の両方によってメラノーマを毎日画像化し、マウス50から超音波画像撮影も始めた。Visualsonics Vevo 770（Visualsonics Inc., Toronto, Canada）を用いて、インサイチューにおける腫瘍を画像化した。30μmの空間分解能を提供するステッピングモータースキャナ（stepper motor scanner）を備えた55 MHzの708モデルスキャンヘッドを用いた（Visualsonics Inc., Toronto, Canada）。パワードプラモード（power Doppler mode）により、各腫瘍について血流画像を得た。

【００３４】

組織学

マウスを安楽死させた直後かつ腫瘍切開15分前に、リン酸緩衝ホルマリン（10%）を腫瘍部位の皮下の疎性輪紋状層内部に注射した。腫瘍を、室温で24～48時間、ホルマリン固定液（最低で20×腫瘍体積）中に置いた。腫瘍および周囲の皮膚を切りそろえて、外側と内側両方の表面を写真撮影した。固定された腫瘍を、標準的な30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%×3エタノールシリーズを用いて脱水し、100%×2キシレン中で透明にし、60℃において溶融パラフィン浴中で2回浸潤させ（それぞれ1時間）、その後、パラフィンブロックに包埋した。7μm厚の切片を切り出し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。

【００３５】

パルス発生器

インピーダンス75Ωのパルス形成ネットワークを用いた。図1に示すように、これは、ブルームライン構成で配置された30対の高電圧コンデンサおよび30個の誘導子からなり、300 ns長の高電圧パルスを生じる（J.F.Kolb, S.Kono, K.H.Schoenbach (2006) Bioelectromagnetics. 27(3):172-87）。パルスは最初は火花ギャップによって引き起こされたが、これは後に、マイクロコントローラにより制御される水銀置換リレー（mercury displacement relay）と交替させた。対象にかかる電圧は高圧プローブ（P6015A、Tektronix, Beaverton, CA）を用いてモニターし、電流はPearsonコイル（2877モデル、Pearson Electronics Inc., Palo Alto, CA）で測定した。電流および電圧は、デジタルオシロスコープ（TDS3052、Tektronix, Beaverton, OR）を用いて同時に記録した。

【００３６】

電界印加のための電極

以下の3種類の電極を用いた：5針アレイ、2針アレイ、および平行平板。Teflon基板から2 mm延びた30ゲージ皮下針（直径300μm）を用いて、5針アレイ（図2）を作製した。中心針は陽極であり、中心電極から4 mm間隔を空けて配置された周囲の針4本は、互いに接続されて陰極を形成した。皮膚に沿って破壊電界強度を増大させるため、および、パルス電界印加の際の針間のフラッシュオーバーの可能性を減少させるために、針挿入の前に植物油を皮膚に塗った。平行平板電極（図6A）はステンレス鋼製であり、処置対象の腫瘍の

サイズに応じて3～5 mmの直径を有した。電極から皮膚を分離するために、0.5 mm厚の導電性の寒天層（1 M NaClを含む2%寒天）でこれらの電極を被覆した。処置のために、0.5～1 mm離した2枚の平板の間に各腫瘍を配置し、一方で、立ち上がり時間が約30ナノ秒で、持続時間300 nsおよび振幅4～8 kVの100パルスを周波数0.5 Hzで印加した。

【００３７】

インビトロにおけるカスパーゼ活性化の測定

nsPEFへの曝露後に、インビトロにおいてメラノーマ腫瘍抽出物からカスパーゼ活性を測定した。メラノーマをマウスから切り出し、液体窒素中で凍結させた。融解させた組織ホモジネートから抽出物を調製し、以前に記載されたとおりに（L.K.Parvathenani, E.S. Buescher, E.Chacon-Cruz, S.J.Beebe (1998) J.Biol.Chem. 273:6736-6743）蛍光発生基質Ac-DEVD-AFC（Alexis Biochemicals, San Diego, CA）を用いて、カスパーゼ活性を分析した。このペプチド配列は、カスパーゼ1、3、4、および7に関するPARP切断部位であるAsp216に基づき、これは切断の際に蛍光の増大を示す。簡潔には、抽出物を50μM DEVD-AFC（Asp-Glu-Val-Asp-AFC）と共にインキュベーションし、蛍光（励起400 nmおよび発光505 nm）を測定した。カスパーゼ単位は、抽出タンパク質1ミリグラムあたりの、1分あたりに切断された基質（pmol）として定義した。

【００３８】

結果および考察

2つの異なる電極構成を用いて電界を印加した。第1のものは5針電極アレイ（図2A）であり、ここで針はマウス皮膚内部に約2 mm挿入された。マウス59匹において、中心針を処置されるべきメラノーマの中央に配置し、外側の針4本はメラノーマの境界縁の外側とした。この電極アレイは鋭く非均一な電界を示し、その力線は、皮膚の表面に対して平行でありかつ中心電極の近傍で最も強い（図2B）。針アレイがメラノーマ内部に2～3分間挿入されて除去される場合、メラノーマは正常に増殖し続ける（図3H～M）。しかし、除去前に100パルス（8 kV、300 ns、0.5 Hz）を針アレイに与えると、メラノーマは2日以内に収縮しはじめる（図3O～T）。腫瘍周囲の毛細血管から赤血球が漏出するので、パルス後に腫瘍への血流が妨害される（図3P）。局所的血流は通常、約2週間のあいだ回復しない。パルスから2日後、角質層は、表皮の表在性びらんを伴う壊死および出血の徴候を示し、腫瘍は暗くなる（図3Q）。これは、腫瘍細胞に加えて、電極間の皮膚の表皮細胞（角質層へと分化する）が300 nsパルス電界（nsPEF）により損傷を受けていることを示唆する。メラノーマの存在しない皮膚領域を処置し、同じ期間にわたって同様の表在性びらんを観察することによって、これらの結果が確認された（図3A～F）。表皮と接触する針上方の軸を絶縁することで、この損傷は低減されうる。

【００３９】

この腫瘍応答は、電界強度およびパルス数の両方に依存する。4 kVパルスを用いることによって電界強度を半分にしても（平均電界10 kV/cm）、処置済みの腫瘍と対照腫瘍の増殖速度の間に有意な違いは見られない（図4A）。これは、10および100パルスの印加の両方について当てはまる（図4B）。8 kVパルス（電界20 kV/cm）についてはパルス数依存性がより明らかであり、ここで、100パルスの場合の応答は10パルスの場合よりも強く（図4C、D）、かつ、100パルスの処置を2回行った場合にはさらに強い（図4E）。この後者の条件下では、腫瘍は8日以内に約75%収縮する。

【００４０】

使用した第2の電極構成は、2枚の平行平板の間に腫瘍を配置することを必要とした（図6A）。平板の間の全細胞が同じ電界強度に曝露されるように、2枚の平行平板の間の電界は縁を除いて均一である。マウス48匹を処置する場合に、メラノーマを含む皮膚の襞を持ち上げてマウスから離し、腫瘍全体が平板の間に位置するような様式で電極間にこれを配置することによって、これらの電極を用いた。したがって、電界は、針電極と同様に皮膚表面に対して平行というより、むしろ垂直に向けた。平板間の距離は、腫瘍の厚さに応じて、典型的には0.5～1 mmであった。針電極を用いた本発明者らの以前の結果に基づいて電界強度40 kV/cmを用いたが、この電極構成を伴うナノ秒パルスに対する典型的な応答を

、図5に示す。2種類の電極タイプの間の違いの1つは、処置から2日後に始まる皮膚の外観である。パルス領域内の角質層上に黒いかさぶたが現れ、角質層が再生されるにしたがって約2週間残存する（図5B）。このかさぶたの組織学的実験によって、これが凝固した赤血球で構成されていることが示されている。平板電極を用いた4回の100パルス処置（0日目に3回、4日目に1回）の後2週間以内に、腫瘍は典型的に90%収縮した（図6B）。しかし、退縮から約2週間後には全腫瘍が再度増殖し始め、本発明者らはその際、組織学のために腫瘍を固定および切開できるようにマウスを屠殺した。

【００４１】

完全な腫瘍寛解をもたらす多重処置

腫瘍が初回処置から2～3週間後に収縮を停止した場合に、2回目の100パルス3日間のシリーズで該腫瘍を処置した。3種類のそのような場合において、腫瘍の完全な寛解が観察され、一例を図7に示す。初回処置から2か月以内に、メラノーマは、徹照法でも、超音波でも、または連続切片組織学的調査でも検出不可能となった。

【００４２】

腫瘍温度を3℃しか上昇させないnsPEF

5 mm平板の間の組織に送達されるエネルギーは、平板間の距離が1 mmである場合、0.2 Jである。特定の水温とすると、これは2～3℃しか組織温度を上昇させない。ごく小さな熱電対を腫瘍内部に挿入することによってこの温度上昇を直接測定し、100パルス後に到達した最大温度が33℃であったことを確認した（図8）。これは温熱療法効果に必要な最低温度よりも10℃低く、したがって、nsPEFが腫瘍増殖に与える効果が温熱療法によるものである可能性は非常に低い。

【００４３】

nsPEF効果に関する標的および可能性のある機構

腫瘍退縮の原因であり得る電界パルスの印加後に、以下2つの、腫瘍における即時的な変化を同定した：(a) 腫瘍細胞核が迅速に核濃縮（pyknotic）となること；および (b) 腫瘍への血流が停止すること。未処置の腫瘍細胞は、染色の薄い（lightly staining）多形核および、微細分散メラニン顆粒を含む大量の細胞質を示した（図9）。処置済みの腫瘍は、染色の濃い収縮核、および個々の細胞の脱接着（dyshesion）を示し、これらは粗い細胞内メラニン顆粒および拡大間質腔内に凝集した細胞外メラニン顆粒を有した。腫瘍細胞核はパルス後数分間以内に54%収縮し、3時間以内に68%収縮する。腫瘍サイズが90%減少したため（図9E）、その後2週間の間にさらなる核収縮は起こらなかった。腫瘍核の一部は電界軸に沿って伸長したが、これは必ずしも観察されるとは限らない。処置後1および3時間では細胞密度が高いので、この期間中に腫瘍細胞自体も収縮する。パルス印加後の核濃縮は、以前に観察されたいずれの核濃縮的な応答よりも速く起こり（S.M.Albarenque, K.Doi (2005) Exp.Mol.Pathol. 78:144-149）、かつこれは、電気的変形（electrode formation）[18]に、または、細胞の核ラミナに会合して核の伸長および収縮を生じる細胞骨格要素との直接電界相互作用（P.K.Wong, W.Tan, C.M.Ho (2005) J.Biomech. 38:529-535; Y.Gruenbaum, A.Margalit, R.D.Goldman, D.K.Shumaker, K.L.Wilson (2005) Nat. Rev.Mol.Cell Biol. 6:21-31）に、起因しうる。

【００４４】

直ちに明らかになる第二の主要な変化とは、腫瘍への血流の減少である。徹照法およびパワードプラ超音波再構成によって、パルス後約15分以内に血流が停止することが示されている（図10）。メラノーマ腫瘍の内部および周囲に赤血球が散乱して見つかることが、組織学によって確認されている。これは、局所的な血管が漏出性となっていることおよび赤血球が周囲の組織中に漏れ出ていることを示す。通常は、腫瘍への血流は約2週間のあいだ回復しない。血流が戻ると、腫瘍は通常、増殖を再開する。メラノーマへのこの血流欠損は、その退縮に確実に寄与する。

【００４５】

伝統的なアポトーシスマーカーであるカスパーゼ活性における全ての変化も測定した。カスパーゼの活性は、3回の実験において100パルスの処置から0、3、6、および9時間後に

蛍光発生基質Ac-DEVD-AFCを用いて測定された。カスパーゼ活性が増加しているように思われる唯一の時点は、3時間後であり、このとき平均活性は2.6倍増加した。しかし、この小さな変化は正規性t検定およびマン-ホイットニー順位和検定では見られず、このことは、これが統計学的に有意な違いではなかった（P＝0.1）ことを示すものである。アポトーシスプログラムは開始されるが、アポトーシスがエネルギー要求プロセスであるために腫瘍への血液供給の妨害によってアポトーシス機構の完了は阻害されうる、という可能性がある。

【００４６】

以前に報告された、nsPEF後のDNAの変化

観察された迅速な核濃縮は、細胞DNAがnsPEFの直接的または間接的な標的であり得ることを示唆するものである。この損傷が誘導される正確な機構は未だ明らかではない。2つの可能性のある機構としては、アポトーシス経路におけるDNaseの活性化、または、機械的に誘導されるDNA切断が挙げられる。直径10μmの典型的な腫瘍細胞核は、各パルスの間、その全体にわたって約40 Vの電圧勾配を受けると考えられる。この電界は、核の迅速な電気機械的変形を引き起こすのに十分な程大きく、これによって、核膜に付着したDNAに対して機械的なショックが生じ、これはDNAを損傷させる可能性がある。

【００４７】

これらのnsPEFは、迅速な核濃縮を引き起こして、カスパーゼ活性を有意に上昇させることなく血流を減少させることにより、マウスメラノーマを刺激して自己破壊させる。腫瘍への血流減少は電気化学療法後にも観察されたが、ブレオマイシン流入によって内皮細胞が破壊されていた場合には、処置から24時間後までこれは起こらない（G.Sersa, M.Cemazar, C.S.Parkins, D.J.Chaplin (1999) Eur.J.Cancer 35:672-677）。対照的に、nsPEFは、この劇的な腫瘍血流減少を達成するために薬物を必要としない。新しいナノ秒時間領域（time domain）のパルス電界印加に対するこの細胞応答は、新規かつ致死的である。この技術はまだヒトについて試験されていないが、真皮を貫く切開は治癒後の皮膚に瘢痕を残すことが多いので、皮膚病変の外科的除去よりも優れている可能性がある。nsPEFは、瘢痕が残りにくいように、真皮を破壊することなく腫瘍に影響を与える。nsPEFはまた、体内深くに位置するその他の腫瘍タイプにも有効であり、ここではカテーテル電極が腫瘍へと導かれる。この高度に局在化された薬物不要の物理的技術により、腫瘍治療のための有望な新規療法が提供される。

【００４８】

完全な腫瘍退縮を誘導するためのnsPEFの印加の長期試験

各々がメラノーマ腫瘍を1個ずつ有するマウス27匹（実験用13匹および対照14匹）を用いて試験を開始した。各実験用マウスを、持続時間300 nsおよび振幅40 kV/cmの300パルスで処置した。処置済みの腫瘍全てが24時間以内に収縮を始め、2週間のあいだ収縮し続けた。これらのうち11個がこの時点で増殖を再開し、同じパルスパラメータで2回目の処置を受けた。腫瘍のうち2個が収縮し続け、もはや検出不可能である。2回処置した腫瘍11個のうち3個は、2回目の処置から約3週間後に3回目の処置を受けた。13個の実験用腫瘍は全て、完全な寛解を示している（図11）。対照的に、対照14匹のうち11匹は、本発明者らのプロトコールに明記されたとおり、その腫瘍が1.3 cmまで成長した時点で安楽死させねばならなかった。対照のうち3個は、このサイズに到達する前に増殖を停止したので、未だ生存している。これらのマウスはB16メラノーマ細胞の注射の際に6ヶ月齢であり、その免疫応答は、これらマウス3匹においてメラノーマを十分に抑えられるほどに強い可能性がある。実験用マウスのうち9匹の1回目の処置から120日目、および残り4匹の1回目の処置から90日目に、これらのマウスは腫瘍非含有のままであった。

【００４９】

UV誘導メラノーマの処置

重要な問題には、動物に注射された癌細胞ではなく天然の表皮細胞から生じた皮膚腫瘍の応答が必要である。UV誘導メラノーマを背中に有するトランスジェニックマウス2匹が、300パルス、300 ns、40 kV/cmの処置に対して十分に応答したことが、予備試験により

示されている。これらのマウスの暗い色素沈着のために、徹照データの入手は不可能であった。しかし、超音波画像および表面画像の両方により、これらのメラノーマの迅速な収縮が示されている（図12）。

【００５０】

2針挿入電極構成

「同心型」構成を用いる以外は図2に示すのと同じ、2針システムを使用したメラノーマ処置も成功した。腫瘍に沿って連続的に2針が配置されたメラノーマ腫瘍では、図13に示すとおり24時間の期間内に腫瘍がかなり収縮した。同心型アレイではなく線形アレイの、2つまたはそれ以上からなるユニットの針システムの利点とは、針を腫瘍内部に直接挿入する必要がないという事実であり、したがって、汚染および/または転移の可能性が回避される。

【００５１】

前述の詳細な説明には、多くの特定の詳細が含まれる。そのような詳細を含めることは例示の目的のためのみであって、本発明を制限すると理解されるべきではない。さらに、一態様における特徴を、本発明のその他の態様における特徴と組み合わせてもよい。添付の特許請求の範囲において定義された本発明の範囲から逸脱することなく、様々な変更を加えてもよい。さらに、本明細書において引用された全ての非優先権特許およびその他の参考文献は、当業者のレベルを示すものであり、その全文が参考により本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【００５２】

【図１】本実験において使用されたパルス発生器を示す。(A) ブルームライン構成の300 nsパルス形成ネットワーク。(B) 腫瘍全体に発生した典型的な電圧および電流パルス。

【図２】針アレイ電極および電界パターンを示す。(A) 第一の実験のために使用した5針アレイの写真。(B) 中心電極上に8 kVを配置し外側電極4本をアースさせて維持した場合に発生した電界の三次元プロット。

【図３】マウス#56における、5針アレイ電極を用いた100パルスの1または2回の印加に対する皮膚およびメラノーマの典型的な応答を示す。各対応対の写真は、左が皮膚のインサイチュー徹照、右が表面概観を表す。左端の数字は、右の3つの対応対全てを撮影したパルス後の日数を示す。(A～F) 0日目に送達された100パルス（300 ns長、20 kV/cm、0.5 Hz）に対する正常皮膚の典型的な応答。Bにおける小さな表在性びらんはC～Eにおいて成長し、一部または全ての表皮の喪失を示す。(H～M) 0日目に電極アレイをこの腫瘍内部に挿入したが、パルスは送達しなかった。(O～T) 0日目および1日目に100パルス（300 ns長、20 kV/cm）を0.5 Hzで送達した。壊死は2日目に明らかになり、時間が経つにつれてより激しくなっている。A～Tのスケールバーは1 mmであり、所与の列における全ての写真は同じ倍率である。

【図４】5針アレイを用いた所与の処置後のメラノーマ合計23個におけるサイズ変化の概要を提供する。徹照画像から腫瘍面積を毎日測定し、標準化面積を得るために、0日目に測定した面積で割った。異なる動物に由来する腫瘍2～3個の平均応答を対数目盛にプロットし、エラーバーは標準誤差を示す。パルスは周波数0.5 Hzで印加した。(A～B) 中心針と4 mm間隔の外側針との間に4 kVを印加し、平均電界10 kV/cmを得た。C～E：中心針と外側針の間に8 kVを印加し、平均電界20 kV/cmを得た。

【図５】マウス#102に対して直径5 mmの平行平板電極を用いた、0日目における30分間隔の100パルス（300 ns、40 kV/cm、0.5 Hz）の印加3回および4日目における印加1回に対するメラノーマの典型的な応答を示す。同一腫瘍の画像の対応セット7組の集団は全て、徹照画像の左下に示した日に撮影した。A段は徹照画像；B段は表面概観；C段は腫瘍中央における超音波切片；D段は腫瘍全体にわたる100個の連続超音波切片から作成した三次元再構成。各段について倍率は一定であり、各段上部のスケールバーは1 mmを示す。

【図６】(A)は、イソフルラン吸入麻酔下の平行平板電極で処置されているSKH-1無毛マウスの写真を示す。挿入写真：平行平板電極の平板のうち1つの接写写真であり、これが、

導電性の寒天ゲルを配置するための空間を設けられるように0.5 mm凹んでいることを示す。(B) 同じ4×100パルス印加（0日目に3×100および4日目に1×100）を用いて、平行平板電極で処置したマウス3匹由来の腫瘍6個の徹照画像の標準化面積変化の平均値。0.5 Hzにおける、40～80 kV/cm、300 nsパルス。エラーバーは標準誤差を示す。

【図７】1回目の処置から65日後には明らかとなった、メラノーマの完全な退縮を示す。300 nsおよび40 kV/cmの100パルスを、0、1、2、および21、22、23日目に印加した。各対の写真は、左に示した日に撮影したものであり、左が徹照、右が表面概観である。左上のスケールバーは1 mmを表し、これは全画像について同じである。

【図８】nsPEF印加の際のメラノーマ内部の温度の測定値を示す。(A) コンスタンタン（constantine）から作製されたワイヤと銅線を融合させることによって作製された熱電対の顕微鏡写真。(B) パルス印加の際の、メラノーマ内部に配置された熱電対からの温度の記録。赤いドットは、各パルスを印加した時点を示す。

【図９】nsPEF作用の標的および機構を示す。(A～D) 対照および処置済みのメラノーマの7μm厚パラフィン切片を、100パルス（300 ns、40 kV/cm、0.5 Hz）による処置後の所与の時点で固定し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。最も明確な核をコピーして、サイズ比較を補助するために各切片の右側に配した。(A) 対照腫瘍切片；(B) 処置後10分間；(C) 処置後1時間；(D) 処置後3時間。スケールバー：10μm。(E) 100～200パルス印加後の時間に対する平均核面積。各時点について少なくとも2匹のマウスから測定した細胞核の数を、各段の隣に示し、バーは標準誤差を表す。時間の切れ目は330時間である。0時間のパルス前対照とその他の時点全てとの間（$p<0.001$）、および、1時間と3時間の間（$p<0.001$）には有意な違いが存在する。0.1時間と1時間の間には有意な違いはない。

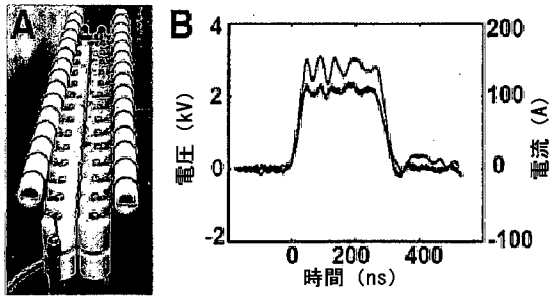
【図１０】nsPEF印加の前後のメラノーマにおける血流を示す。(A) メラノーマの体積の三次元再構成；(B) 電界印加前の血流のパワードプラ再構成；(C) 100パルス（300 ns、40 kV/cm、0.5 Hz）から約15分後に作成した、Aにおいて示されたのと同じメラノーマの体積の三次元再構成；(D) 100パルス（300 ns、40 kV/cm、0.5 Hz）から約15分後に作製した、Bにおいて示されたのと同じ腫瘍における血流のパワードプラ再構成。

【図１１】各段の上部に示した日数における1つの対照および3つの処置済みの腫瘍の徹照図を示す。0日目の写真は、1回目のnsPEF印加の直前に撮影した。300パルスの2回目の印加は、15日目に行った。その他の処置は不要であったが、これらの動物は今日まで腫瘍非含有のままである。

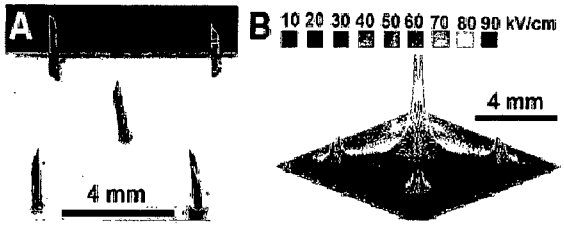
【図１２】300ns長および振幅40 kV/cmの300パルスで0日目に処置されたHGF/SFトランスジェニックマウスにおける、UV誘導メラノーマを示す。連続切片の三次元再構成；超音波画像（上列）および表面顕微鏡写真（下列）により、これまでに試験した19日間の期間にわたって、腫瘍が迅速に収縮していることが示されている。

【図１３】（線形アレイ中の2針電極構成システム用の任意のユニットにおける）コンピュータ電界分布を示す。右側の一連の写真は、腫瘍の時間的な発達を示す。

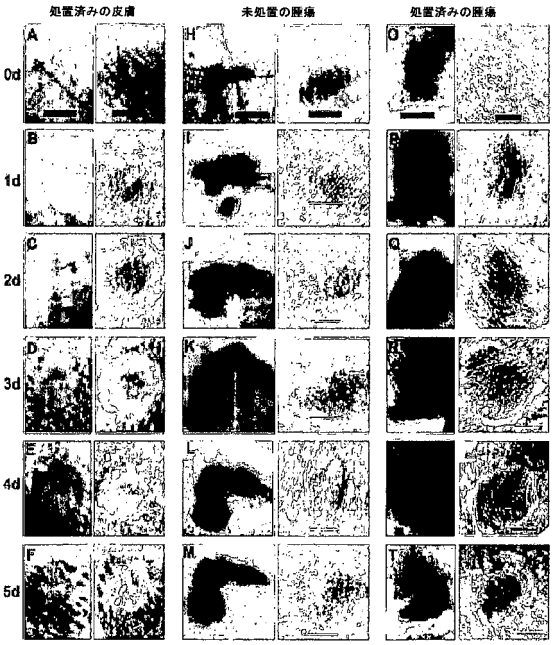
【図１】


A
B
電圧（kV）
電流（A）
時間（ns）
4
2
0
-2
200
100
0
-100
0
200
400

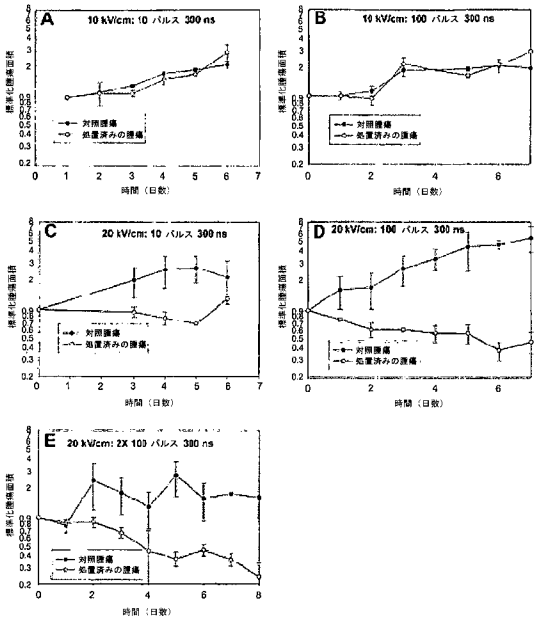
【図２】


A
B
10 20 30 40 50 60 70 80 90 kV/cm
4 mm
4 mm

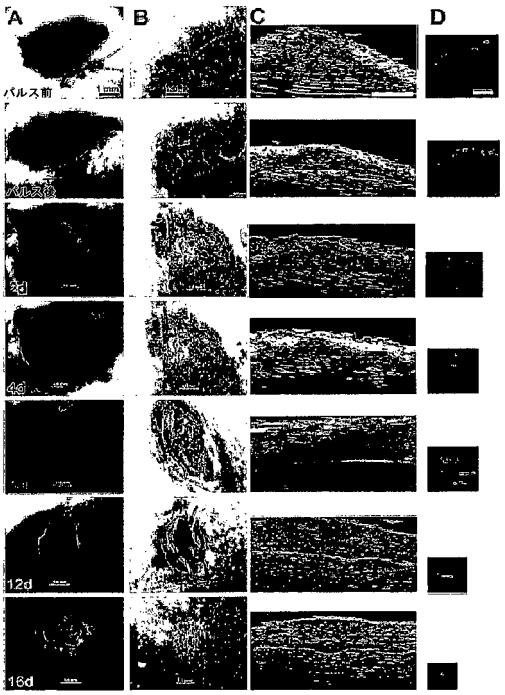
【図３】


処置済みの皮膚
未処置の腫瘍
処置済みの腫瘍
0d
1d
2d
3d
4d
5d

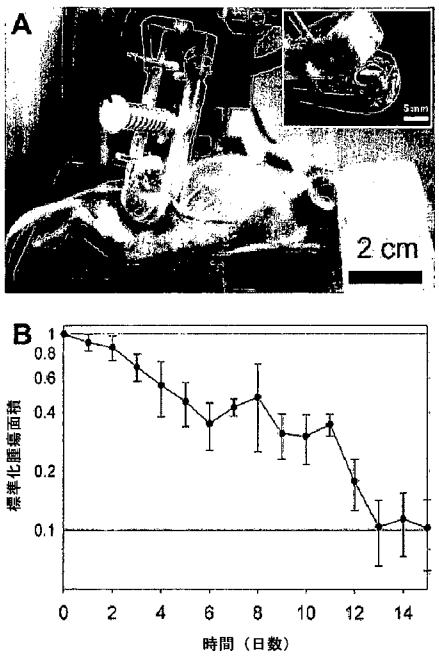
【図４】


A 10 kV/cm; 10 パルス 300 ns
B 10 kV/cm; 100 パルス 300 ns
C 20 kV/cm; 10 パルス 300 ns
D 20 kV/cm; 100 パルス 300 ns
E 20 kV/cm; 2X 100 パルス 300 ns
対照腫瘍
処置済みの腫瘍
時間（日数）

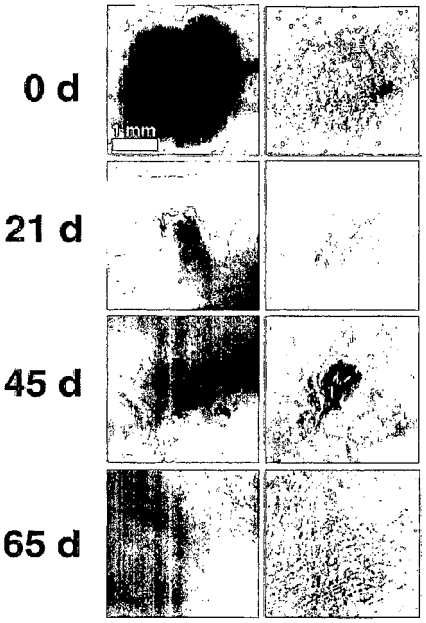
【図５】


A
B
C
D
パルス前
パルス後
2d
4d
12d
16d

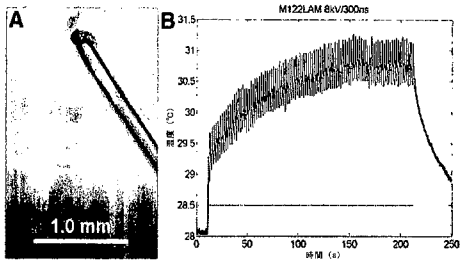
【図６】



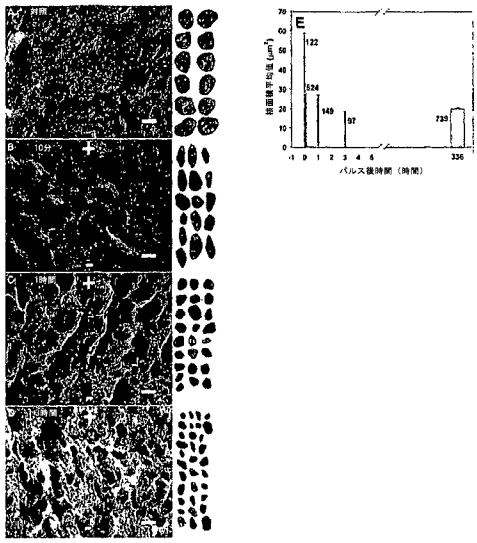
【図７】



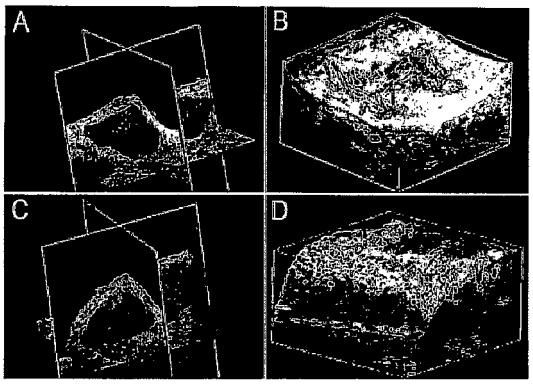
【図８】



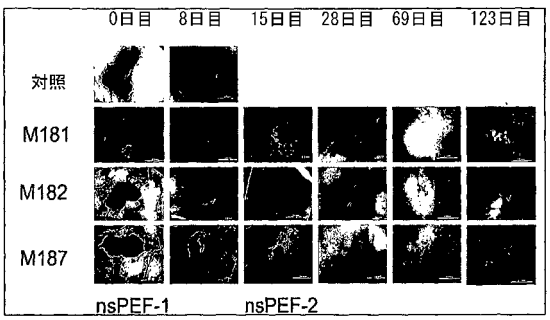
【図９】



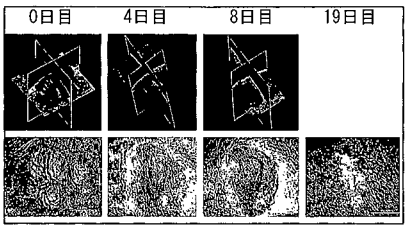
【図１０】



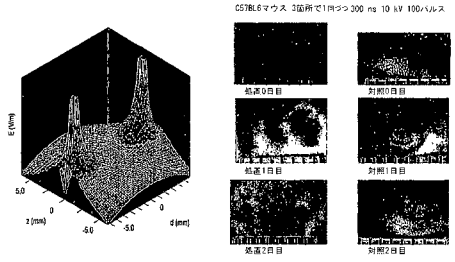
【図１１】



【図１２】


0日目
4日目
8日目
19日目

【図１３】


C57BL6マウス 3箇所で1秒づつ 300 ns 10 kV 100パルス
照射0日目
対照0日目
照射1日目
対照1日目
照射2日目
対照2日目
E (V/m)
5.0
0
-5.0
z (mm)
d (mm)

フロントページの続き

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邉 伸一
(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(72)発明者 ヌッチテッリ リチャード
アメリカ合衆国 バージニア州 ノーフォーク ハンプトン ブールバード
(72)発明者 ビービ シュテファン ジェー.
アメリカ合衆国 バージニア州 ノーフォーク グリーンウェイ コート ９０２ ＃５
(72)発明者 シェーンバッハ カール エイチ.
アメリカ合衆国 バージニア州 ノーフォーク ラニミード ロード １５１０

審査官 小宮 寛之

(56)参考文献 特表２００３－５０６０６４（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００５／０３２６４６（WO，Ａ２）
国際公開第２００５／０６５２８４（WO，Ａ２）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｎ １／００－１／４４