

粒子線治療効果を上げるための抗がん剤のがん細胞への集積度の研究

伊藤友紀¹、寺川貴樹¹、石井慶造¹、山崎浩道²、世良耕一郎³、松山成男¹、
船木善仁²、菊池洋平¹、藤原充啓¹、川村 悠¹、秋山久樹¹、大倉 暁¹、橋本悠太郎²、
藤川 誠¹、CatellaGuillaume¹、羽鳥悦脩¹、濱田尚希¹、藤木広太¹、
伊藤伸彦⁴、和田成一⁴

¹ 東北大学大学院工学研究科量子エネルギー工学専攻
980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-01-2

² 東北大学大学院 CYRIC
980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

³ 岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

⁴ 北里大学獣医学部
034-8628 青森県十和田市東二十三番町 35-1

1 はじめに

抗がん剤シスプラチンは X 線を用いた放射線療法において、放射線の治療効果を増強させる効果が報告されている^{1,2)}。この増強効果は粒子線治療でも期待できると考えられる。現在、陽子線または炭素線による粒子線治療が行われているが、陽子線の生物学的効果は X 線と同程度であるため、低酸素状態の腫瘍細胞の放射線抵抗性が問題となる。陽子線とシスプラチンの併用療法によって治療効果を上げることができれば、低酸素細胞の効果的な殺傷や副作用の低減が期待できる。一般的に併用治療では、併用するタイミングによって治療効果が異なる。陽子線照射の適切なタイミングを見極めるためには、腫瘍内でのシスプラチン動態を知る必要がある。そこで、本研究はコンベンショナル PIXE によって腫瘍内の薬剤濃度の定量を行い、PIXE カメラによって腫瘍内の薬剤分布を明らかにすることを目的とした。

2 材料と方法

2.1 材料

実験には C3H/HeSlc マウスの雄を用いた。両後肢大腿四頭筋に NFSa 繊維肉腫を移植し、実験時の腫瘍塊直径はノギスによる測定で約 10mm であった。シス-ジアンミンジクロロ白金 II (シスプラチン) は 1 mg/ml となるように生理食塩水に溶解し、5 mg/kg または 10 mg/kg を腹腔投与した。マウスはシスプラチン投与 1 時間または 6 時間後に頸椎脱臼にて屠殺され、腫瘍組織が摘出された。摘出された腫瘍はドライアイスにて急速凍結された。

本実験では薬剤投与量、薬剤投与から腫瘍摘出までの時間を各 2 条件と、薬剤無投与群を含む 5 群を用意し、各群 1 匹とした。本実験において作成された群の薬剤投与量、投与から腫瘍摘出までの経過時間を表 1 に示す。試料名は、シスプラチン 5 mg/kg 投与後 1 時間で腫瘍の摘出を行ったものを 5mg1h と示す。また、薬剤無投与群である sham には、薬剤 5 mg/kg 投与時と同量の生理食塩水を投与した。

動物実験に際しては東北大学の動物実験指針に従って行った。

試料名	投与量[mg/kg]	経過時間[h]
5mg1h	5	1
5mg6h	5	6
10mg1h	10	1
10mg6h	10	6
sham	0 (5mg/kg 投与時と同 量の生理食塩水)	1

表 1 試料名と試料条件

2.2 定量

NMCC の真空用 PIXE 分析システム³⁾を用いて、腫瘍内の Pt 濃度の定量を行った。ターゲットは 2.9MeV の陽子線により照射され、発生した X 線はそれぞれ低エネルギー・高エネルギーの X 線測定に有効な 2 台の検出器により同時に測定された。高エネルギー用の検出器には吸収体として 500 μm 厚のマイラー膜を使用している。

ターゲットには、2.1 で述べた腫瘍を硝酸灰化法⁴⁾により処理し、内部標準液として In を腫瘍に対して 1000ppm 添加し、その試料溶液 20 μl をバックリング膜(2 μm 厚マイラー膜/4 μm 厚プロレン膜)に滴下・乾燥させたものを用いた。混入物の有無や試料の均一性を確かめるため、同一の試料溶液から 3 枚または 2 枚のターゲットを作成した。

定量にあたっては、高エネルギー側検出器から得られた X 線スペクトルを用い、GeoPIXE II⁵⁾により解析を行った。シスプラチンの構成元素である Pt は、通常生体内には存在しない元素であるため、本実験では検出された Pt はすべて薬剤由来のものであると考えている。

2.3 分布測定

東北大学の 2 つの大気 PIXE カメラ、大気マイクロ PIXE カメラ⁶⁾と大気サブミリ PIXE カメラ⁷⁾を用いて、腫瘍内の Pt 分布の測定を行った。マイクロ PIXE カメラでは 100 μm 角の正方形の視野をとり、1 μm 程度のビーム径の陽子線で分析を行った。一方、サブミリ PIXE カメラでは腫瘍組織全体が含まれるように 1 cm 角の視野をとり、0.5 mm 程のビーム径のビームを用いて分析した。ターゲットは 3MeV の陽子線により照射され、X 線は低エネルギー用・高エネルギー用の 2 台の検出器によって測定された。吸収体として、マイクロ PIXE では高エネルギー用検出器のみに 200 μm 厚のマイラー膜を用い、サブミリ PIXE では低エネルギー用検出器に 10 μm 厚のマイラー膜、高エネルギー用検出器に 300 μm 厚のマイラー膜を用いた。

ターゲットの準備は以下のようにして行った。凍結した腫瘍の中央部分をクリオスタットにより薄切し、切片とした。切片は凍結したままバックリング膜(5 μm 厚ポリカーボネート膜)に載せ、氷解を利用して膜に貼付し、-20 $^{\circ}\text{C}$ で 2 日間凍結乾燥処理を行った。試料切片の厚さは、マイクロ PIXE 分析用には 14 μm 、サブミリ PIXE 用には 50 μm とした。

解析には定量時と同様に GeoPIXE II を用いた。

3 結果及び考察

3.1 腫瘍内 Pt 濃度定量結果

図 1 に 10mg6h 試料の測定によって得られた、高エネルギー用検出器からの X 線スペクトルの 1 つを示す。このスペクトルでは、9.4keV の Pt の L α 線は Zn の K β 線に埋もれてしまうが、11keV の L

β 線によるピークが確認できた。このような Pt によるピークはシスプラチンを 10mg/kg 投与したすべての試料で見ることができた。一方、5 mg/kg 投与したものと sham では Pt による有意なピークは確認できなかった。これらの Pt の検出限界量は平均で 1.2 ppm であった。

10mg1h と 10mg6h の Pt 濃度の定量結果を図 2 に示す。Pt 濃度は 10mg1h で 1.6 ± 0.3 ppm、10mg6h で 2.0 ± 0.6 ppm であった。これらの差は誤差の範囲内であり、シスプラチン投与後 1 時間から 6 時間にかけては腫瘍内の薬剤濃度はほぼ定常状態にある可能性が高いと考えられる。

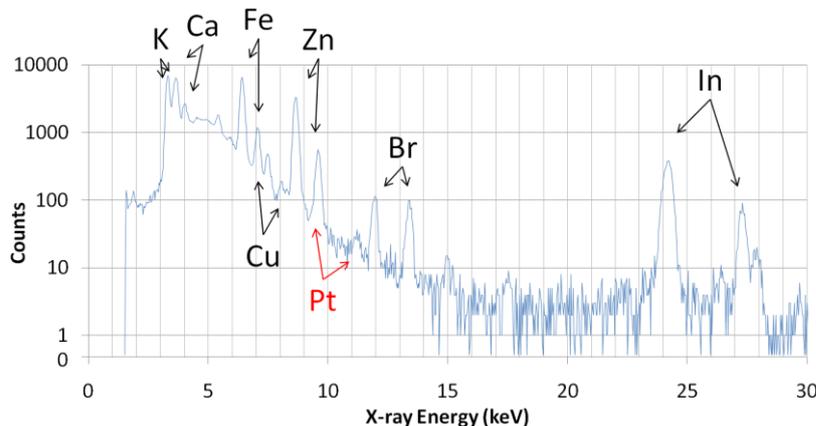


図 1 10mg6h 試料の X 線スペクトル

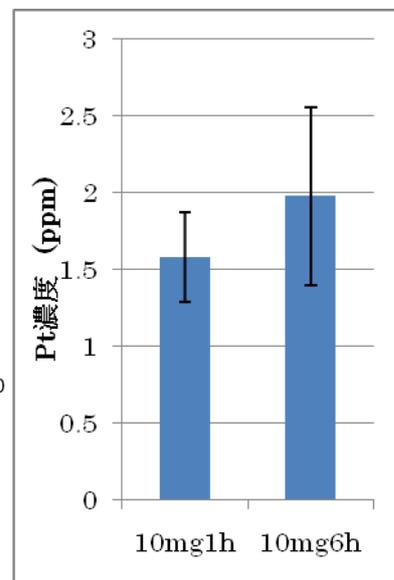


図 2 Pt 濃度定量結果

3.2 腫瘍内 Pt 分布測定結果

PIXE カメラを用いた測定では、マイクロ PIXE、サブミリ PIXE のどちらでも、いずれの試料からも Pt による有意なピークは確認されず、したがって薬剤の分布を画像化することはできなかった。腫瘍部での Pt 濃度の検出限界はマイクロ PIXE で平均 25 ppm、サブミリ PIXE で 2.3 ppm であった。

図 3 はマイクロ PIXE カメラによって得られた 10mg1h 試料の元素分布画像である。P の分布画像において、いくつもの点状の集積が確認される。BrdU を投与したウシ血管内皮細胞のマイクロ PIXE 分析より、P の高濃度集積点は細胞核に良く対応していることが確認されている⁸⁾。したがって本実験の P の集積部も細胞核に対応している可能性が高いと考え、この部分に関心領域 ROI を設定して解析を行った。しかし、X 線収量の大幅な減少により ROI 内の Pt 検出限界が 100 ppm を超えたこともあり、いずれの試料においても P 集積部に Pt の存在は確認されなかった。今後、マイクロ PIXE カメラによって細胞領域での薬剤分布を解析するためには、検出体系の改善により大幅に立体角を拡大し、Pt のピーク収量を増加させる必要がある。

図 4 はサブミリ PIXE カメラから得られた 10mg1h 試料の元素分布画像である。P、S および K などの、生体内に多く存在する元素の分布からは腫瘍組織の形状が明瞭に確認された。サブミリ PIXE の Pt 検出限界は 2.3 ppm 程であったが、図 2 に示した定量結果より、シスプラチンを 10 mg/kg 投与した試料には 2 ppm 程の Pt が存在することが確認されている。したがって、もし Pt が腫瘍組織の一部のみ局在しているのであれば、その領域での Pt 濃度は検出限界量を上回っている可能性が高い。そこで、K の元素分布を利用し、腫瘍辺縁部・中央部に ROI を設定し解析を行ったが、いずれの解析でも Pt は検出されなかった。したがって、腫瘍組織内でシスプラチンはほぼ一様に分布している可能性が高いと考えられる。

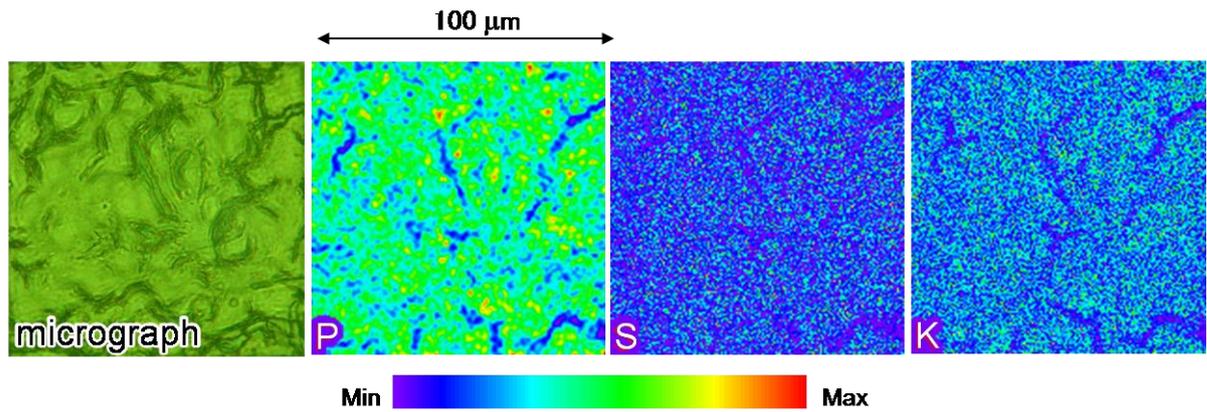


図3 マイクロPIXEカメラによる元素分布画像

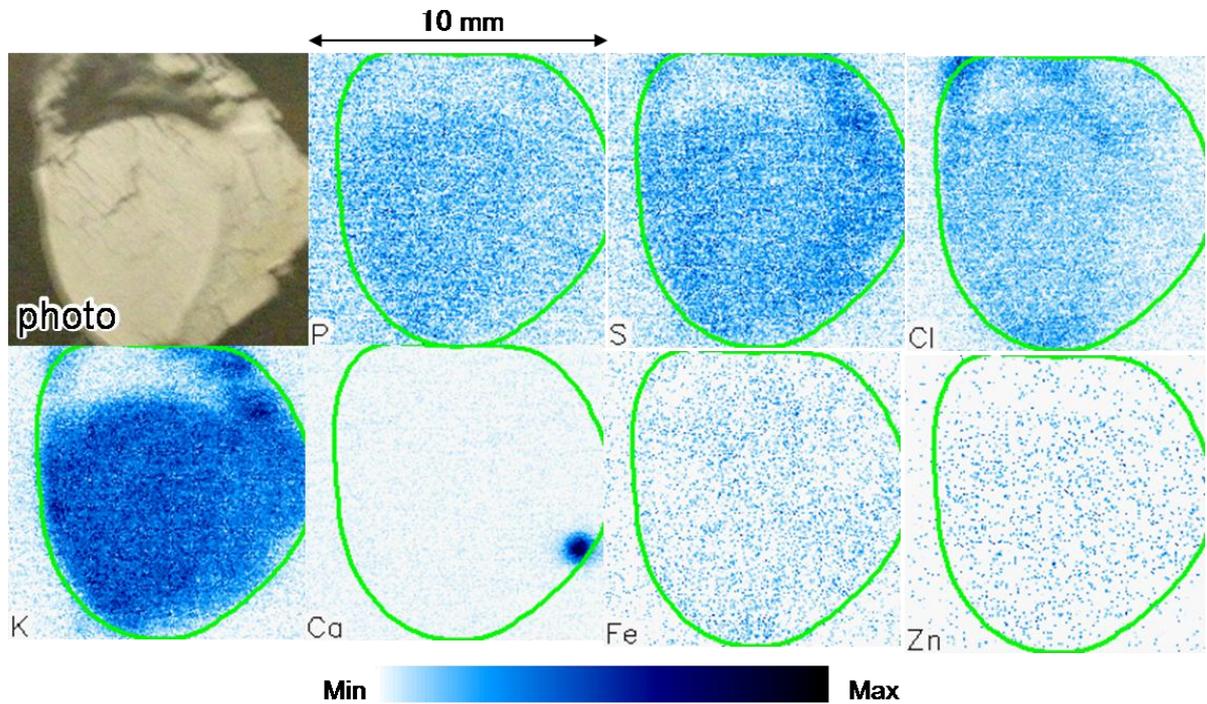


図4 サブミリPIXEカメラによる元素分布画像

4 まとめ

NMCCにおけるコンベンショナルPIXEと東北大学のPIXEカメラを用いて、シスプラチンの腫瘍内動態を調べた。コンベンショナルPIXEによるPtの定量結果から、シスプラチンを10 mg/kg投与したマウスの腫瘍では、投与1時間から6時間後にわたり薬剤濃度はほぼ一定であり、約2 ppmの集積があることが確認された。PIXEカメラを用いた測定ではPtのピークは確認されなかったが、その検出限界から腫瘍組織内には薬剤がほぼ一様に分布している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) M. Zak, and J. Drobnik, "Effect of cis-Dichlorodiammineplatinum(II) on the Postirradiation Lethality in Mice after Irradiation with X-rays." *Strahlentherapie* 142,1, 112-115 (1971)
- 2) 穎川晋, 李漢栄, 石橋晃, 小宮山寛機, 梅沢巖, "マウス固型腫瘍に対するシスプラチンと放射線との併用効果の検討" *北里医学* 16, 385-392 (1986)

- 3) S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh, and K. Sera, “Present status of NMCC and sample preparation method for Bio-samples” Int. journal of PIXE 3-4, 319-328 (1993).
- 4) K. Sera, T. Yanagisawa, H. Tsunoda, S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh, S. Suzuki and H. Orihara, “Bio-PIXE at the Takizawa facility (Bio-PIXE with a baby Cyclotron)” Int. journal of PIXE 2, 3, 325-330 (1992)
- 5) C. G. Ryan, E. van Achterbergh, C. J. Yeats, S. L. Drieberg, G. Mark, B. M. McInnes, T. T. Win, G. Cripps, and G. F. Suter, “Quantitative, high sensitivity, high resolution, nuclear microprobe imaging of fluids, melts and minerals”. Nucl Instrum Methods Phys Res B, 188 ,1-4, 18-27(2002)
- 6) S. Matsuyama, K. Ishii, H. Yamazaki, Y. Barbotteau, TS. Amartaivan, D. Izukawa, K. Hotta, K. Mizuma, S. Abe, Y. Ohishi, M. Rodriguez, A. Suzuki, R. Sakamoto, M. Fujisawa, T. Kamkiya M. Oikawa, K. Arakawa, H. Imaseki and N. Matsumoto, “Microbeam analysis system at tohoku university”, Int. journal of PIXE 14, 1-2, 9-18 (2004)
- 7) S. Matsuyama, K. Gotoh, K. Ishii, H. Yamazaki, T. Satoh, K. Yamamoto, A. Sugimoto, Y. Tokai, H. Endoh and H. Orihara, “Development of a Submilli-PIXE Camera”, Int. journal of PIXE 8, 2-3, 209-216 (1998)
- 8) 田中晃, ”マイクロPIXEによる細胞内元素分析法の開発” 東北大学大学院工学研究科量子エネルギー工学専攻修士論文 (2002)

Investigation of anticancer drug concentration on cancer cell to enhance therapeutic effect of particle radiotherapy

Y.Ito¹, A.Terakawa¹, K.Ishii¹, H.Yamazaki², K.Sera³, S.Matsuyama¹, Y.Funaki², Y.Kikuchi¹, M.Fujiwara¹, Y.Kawamura¹, H.Akiyama¹, S.Okura¹, Y.Hashimoto², M.Fujikawa¹, CatellaGuillaume¹, Y.Hatori¹, N.Hamada¹, K.Fujiki¹, N.Ito⁴ and S.Wada⁴

¹Department of Quantum Science and Energy Engineering, Tohoku University,
6-6-01-2 Aoba, Aramaki, Aoba, Sendai, Miyagi 980-8579, Japan

²Cyclotron Radioisotope Center, Tohoku University,
6-3 Aoba, Aramaki, Aoba, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan

³Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

⁴Kitasato University School of Veterinary Medicine,
35-1 Higashi-nizyusanbantyo, Towada 034-8628, Japan

Abstract

Concentrations of the chemotherapeutic agent, cis-diamminedichloro-platinum(II) (CDDP) in a solid murine tumor were investigated by submilli- and micro-PIXE analyses as well as a conventional PIXE analysis to study enhancement of antitumor effects caused by radiotherapy combined with CDDP treatment. The conventional PIXE analysis showed that the platinum concentrations of the tumors treated with CDDP at a single dose of 10 mg/kg were approximately 1.6ppm 1 hour after the injection, 2.0 ppm after 6 hours. The platinum distributions in the tissue or cells of the treated tumors could not be evaluated in the present submilli- and micro-PIXE analyses since the platinum concentrations might be nearly equal to or lower than their detection limits.