

## PIXE 分析法を用いたマウス固形腫瘍内のシスプラチン含有高分子ミセル の集積評価

寺川貴樹<sup>1</sup>、草野 薫<sup>1</sup>、川村太冴<sup>1</sup>、石井慶造<sup>1</sup>、松山成男<sup>1</sup>、菊池洋平<sup>1</sup>、菅井裕之<sup>1</sup>、  
三浦勇一<sup>1</sup>、平石信吾<sup>1</sup>、山口大輔<sup>1</sup>、片野元晴<sup>1</sup>、唐橋昌宏<sup>1</sup>、能澤雄一郎<sup>1</sup>、山崎浩道<sup>2</sup>、  
船木善仁<sup>2</sup>、水野和恵<sup>3</sup>、和田成一<sup>4</sup>、伊藤伸彦<sup>4</sup>、世良耕一郎<sup>5</sup>

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター  
980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

<sup>3</sup>東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター  
113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

<sup>4</sup>北里大学獣医学部  
青森県十和田市東二十三番町 35-1

<sup>5</sup>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 348-1

### 1 はじめに

腫瘍血管の構造的、機能的な異常性は、がん治療における重要な標的の一つである。一般に、腫瘍血管は正常組織の血管に比べて物質透過性が高いため、分子サイズの大きな高分子化合物が腫瘍組織に透過・移行すると考えられている。その一方で、腫瘍組織ではリンパ管による高分子化合物の回収機構が不完全であるため、高分子化合物が腫瘍組織内に滞留する傾向があると理解されている。このような現象は、**Enhanced Permeability Retention (EPR)** 効果と呼ばれ、体内の薬剤伝達をコントロールし患部に効率的に薬剤を伝達させる技術であるドラッグデリバリーシステム(DDS)の足がかりとなっている。

近年、**EPR** 効果に基づいてナノスケールで設計された薬物運搬体の **DDS** 研究開発が精力的に行われている。抗がん剤がねらい通りに腫瘍組織へ首尾良く送達されているかどうか、正常組織の濃度の低減はなされているか等の体内での薬剤濃度の評価は、**DDS** 薬剤の研究開発において不可欠である。したがって、組織レベルや細胞レベルでの高感度・高分解能の薬剤濃度分布評価技術の開発は、**DDS** 研究分野に大きく貢献する

ことが期待される。

本研究では、生体内薬剤濃度分布の評価技術として、PIXE 元素分析手法を用い、白金系 DDS 抗がん剤を投与した担がんマウスの腫瘍組織および正常組織内の薬剤濃度分布の評価を試み、DDS 研究分野における PIXE 分析の有用性について検討することを目的とした。PIXE 分析では、内部標準法を用いた従来の元素分析方法と、サブミリ径のビームスキャンによって組織レベルでの薬物の空間分布を評価するサブミリ PIXE 分析を用いた。

## 2 材料と方法

本実験では、EPR 効果を利用する白金系 DDS 薬剤として、ナノキャリア (株) により開発されたナノプラチン (NC-6004) を用いた。NC-6004 は直径が数十ナノメートルの高分子ミセルで、その内部が薬物リザーバとして機能しシスプラチン(CDDP)を封入する<sup>1-3</sup>。また、NC-6004 は、生体内において CDDP の徐放性を示す。

マウス腫瘍モデルとして、マウス骨肉腫細胞 (LM8 細胞) を用いた。5×10<sup>6</sup> 個の LM8 細胞を C3H/He Slc (10~12 週齢、オス)の後脚に移植し、腫瘍径が約 8 cm に達した時点で、10 mg/kg または 20 mg/kg の NC-6004 を尾静脈より単回投与した。薬剤の投与量は、PIXE 分析における統計精度を上げるため臨床における投与量より多く設定した。また、通常の CDDP 10 mg/kg 投与の比較条件も設定した。投与 24 時間後にマウスから腫瘍を摘出し、粉末状のドライアイス中で急速凍凍した。摘出された腫瘍は PIXE 分析のためのサンプル調整までは -80℃で保存された。

サブミリ PIXE 用のサンプルとして、250 μm の厚さ (凍結切片作成時) の腫瘍切片をクライオスタットを用いて作成した。サンプルは厚さ 4 μm のプロレンフィルムにマウントし、乾燥させたものを使用した。凍結切片厚は、以前の実験結果よりプラチナ等重元素の X 線収量が最大となることを根拠として決定した。サブミリ PIXE 分析は、東北大学 高速中性子実験施設において行われた。3 MeV の陽子ビームを大気中でサンプルに照射し、X 線の測定では高エネルギーと低エネルギーの領域を Si(Li)検出器 3 台を用いた。得られたスペクトルを GeoPIXE ソフトウェア<sup>4</sup>を用いて解析し各種主要元素マップを作製した。

元素濃度定量評価のための PIXE 分析は、仁科記念サイクロトロンセンターの PIXE 分析システムを用いて行われた。腫瘍サンプルを硝酸灰化し、灰化溶液を 4 μm 厚プロレンフィルムに滴下・乾燥させ、2.9 MeV の陽子ビームで分析を行った。なお、サンプル調整では内部標準元素としてインジウム(1000 ppm)を加えた。高エネルギー及び低エネルギー X 線測定用に 2 台の Si(Li)検出器を使用した。得られた X 線スペクトルは SAPIX<sup>5</sup>を用いてピーク分離され、内部標準法により各種元素を定量評価した。なお、高エネルギー用の検出器には低エネルギー X 線吸収体として 500 μm 厚マイラーを使用した。

## 3 結果および議論

図 1 に、CDDP または NC-6004 投与による腫瘍組織と正常組織における白金濃度について、内部標準法による PIXE 分析より評価した結果を示す。NC-6004 投与群では、正常組織と腫瘍組織の白金集積に関して、腫瘍組織内により高濃度に集積することが確認された。さらに投与量を 10 mg/kg から 20 mg/kg にすると、腫瘍内の白金濃度が約 2 倍に増加するのに対して、正常組織においては顕著な変化は見られなかった。したがって、NC-6004 は腫瘍組織に効果的に伝達され、薬効をもたらすと同時に従来の CDDP 投与における重篤な副作用を軽減できる可能性が示唆された。

サブミリ PIXE 分析により評価された腫瘍切片内の各種元素の空間分布を図 2 に示す。CDDP の直接投与により白金が腫瘍組織全体に分布しているのと同様に、ナノ粒子化された NC-6009 投与の場合でも白金は腫瘍組織全体に分布していることが認められた。また、白金以外の各種主要元素に関して、LM8 株の腫瘍組織では、カリウムがほぼ様な分布を示す一方で、カルシウム、亜鉛および鉄が局所的に高集積することが観察された。これらの元素の局所的集積の原因について、本研究において説明することは現時点で出来ない。

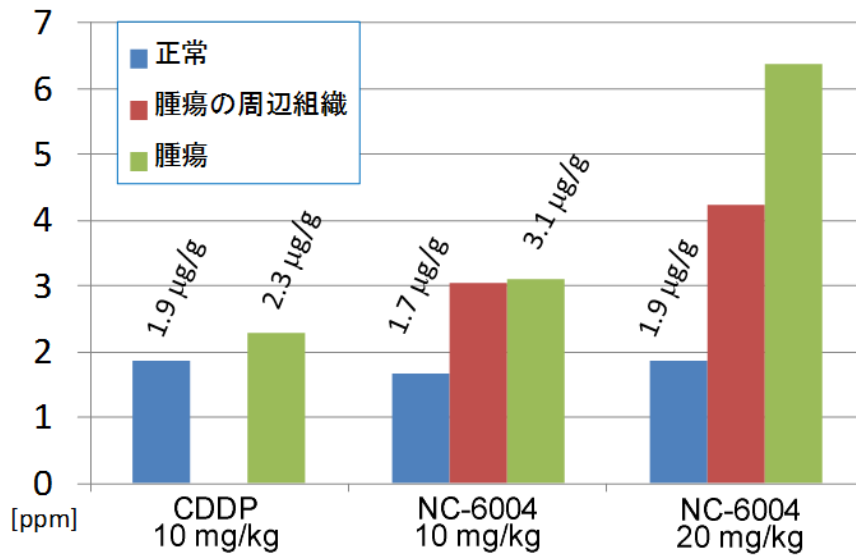


図1 CDDP または NC-6004 投与による腫瘍組織および正常組織における白金濃度

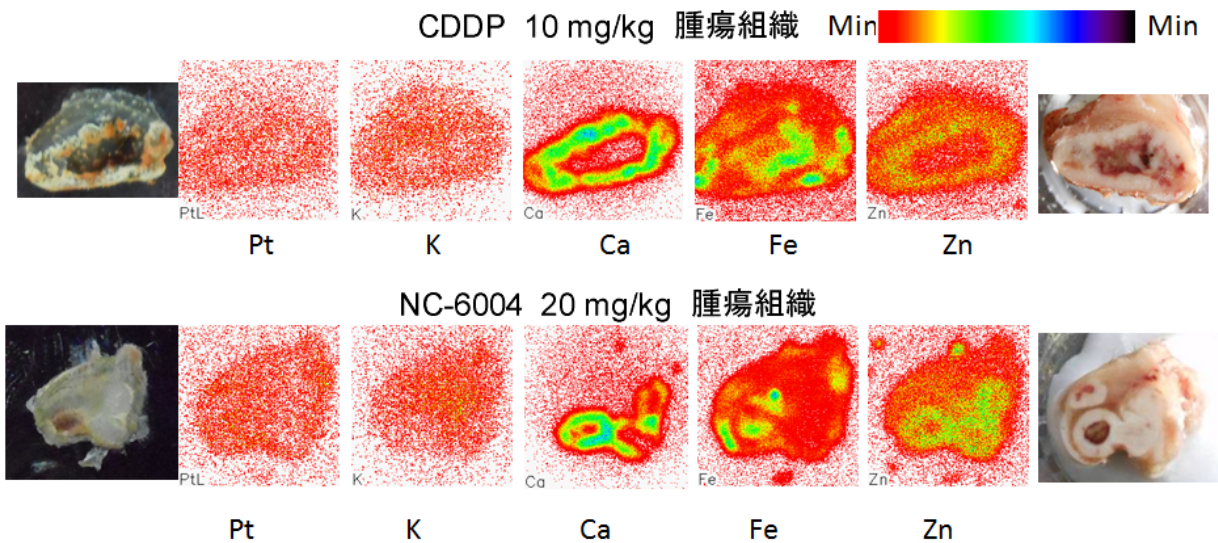


図2 サブミリ PIXE 分析により評価された CDDP または NC-6004 投与による腫瘍切片内の各種元素分布

#### 4 結論

本研究において行われた従来 PIXE 分析およびサブミ PIXE 分析の結果は、NC-6009 が腫瘍血管を透過して腫瘍組織に効率的に運搬され、徐放効果により腫瘍組織全体に CDDP が送達された可能性を支持するものと考えられる。また、PIXE が DDS 基礎研究分野において有用な分析手段の一つであることが実証された。

## 参考文献

- 1) N. Nishiyama, S. Okazaki, H. Cabral, M. Miyamoto, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Nishio, Y. Matsumura, and K. Kataoka, "Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice", *Cancer Res.* 63 (24) (2003) 8977.
- 2) N. Nishiyama, Y. Kato, Y. Sugiyama and K. Kataoka, "Cisplatin-loaded polymer-metal complex micelle with time-modulated decaying property as a novel drug delivery system", *Pharm. Res.* 18(7) (2001) 1035.
- 3) H. Uchino, Y. Matsumura, T. Negishi, F. Koizumi, T. Hayashi, T. Honda, N. Nishiyama, K. Kataoka, S. Naito, and T. Kakizoe, "Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats", *Br. J. Cancer* 93 (6) (2005) 678.
- 4) 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. Instr. and Meth. B* 188 (2002) 18.
- 5) K. Sera and S. Futatsugawa, "Personal Computer Aided Data Handling and Analysis for PIXE", *Nucl. Instr. and Meth.*, B109/110, (1996), 99-104.

## Concentration of cisplatin-incorporated polymeric micelles in a murine solid tumor evaluated using PIXE analysis

A. Terakawa<sup>1</sup>, K. Kusano<sup>1</sup>, T. Kawamura<sup>1</sup>, K. Ishii<sup>1</sup>, S. Matsuyama<sup>1</sup>, Y. Kikuchi<sup>1</sup>, Y. Sugai<sup>1</sup>, Y. Miura<sup>1</sup>, S. Hiraishi<sup>1</sup>, D. Yamaguchi<sup>1</sup>, M. Katano<sup>1</sup>, M. Karahashi<sup>1</sup>, Y. Nozawa<sup>1</sup>, H. Yamazaki<sup>2</sup>, S. Furumoto<sup>2</sup>, Y. Funaki<sup>2</sup>, K. Mizuno<sup>3</sup>, S. Wada<sup>4</sup>, N. Ito<sup>4</sup> and K. Sera<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Quantum Science and Energy Engineering, Tohoku University  
6-6-01-2 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

<sup>2</sup>Cyclotron and Radioisotope Center, Tohoku University  
6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan

<sup>3</sup>Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine  
The University of Tokyo  
2-11-16, Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-0032, Japan

<sup>4</sup>Kitasato University School of Veterinary Medicine  
31-1 Towada, Aomori 034-8628, Japan

<sup>5</sup>Cyclotron Research Center, Iwate Medical University  
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

### Abstract

Elemental analysis of a murine solid tumor treated with cisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) was performed to evaluate not only concentration of the drug in the tumor tissue using the conventional PIXE analysis but also its spatial distribution in the tumor section using the submilli-PIXE analysis. The results showed higher platinum concentration for the tumor treated with NC-6004 compared to treatment with cisplatin whereas no significant difference in platinum concentration between NC-6004 and cisplatin was observed for the normal tissue. This finding suggests that NC-6004 can both provide therapeutic efficacy and reduce side effects caused by conventional treatment with cisplatin. It is demonstrated that PIXE analysis is one of the powerful tools for research fields of drug delivery systems.