

アスコルビン酸照射時の酸素発生によるマイクロカプセル破裂の促進と それを用いた薬剤標的療法

原田 聡¹、江原 茂¹、石井慶造²、世良耕一郎³、後藤祥子⁴

¹岩手医科大学医学部放射線医学講座
020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

²東北大学工学部量子工学専攻
980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6

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

⁴日本アイソトープ協会仁科記念サイクロtronセンター (NMCC)
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

1 はじめに

現在まで我々は、放射線に反応して抗がん剤を放出するマイクロカプセルを研究することで、放射線と同カプセルを用いた薬剤標的療法を研究してきた、すなわち、腫瘍周囲に放射線により抗がん剤を放出するマイクロカプセルを集積させ、放射線を照射、放出された抗がん剤と放射線との相乗効果により抗腫瘍効果を増強するとともに、カプセルによる薬剤限局化作用により、抗がん剤の副作用を軽減するというものである¹⁾。

これまで、我々は、ヒアルロン酸とアルギン酸を Ca^{2+} と Fe^{2+} により重合させそのマイクロカプセルを作成してきた。放射線照射に伴うカプセルの薬剤放出機構としては、放射線によるヒアルロン酸の分解と、放射線による Fe^{2+} から Fe^{3+} への変換に伴うアルギン酸 $\text{Ca}^{2+}\text{-Fe}^{2+}$ 重合形態の変化を使用してきた。しかし、その放射線による破裂率は、現在、 ^{60}Co 20 Gy 照射時で $62.6 \pm 3.4\%$ と低く、さらなる破裂率の向上が必要とされた²⁾。

L-ascorbic acid (AA)は、放射線によって酸化され、

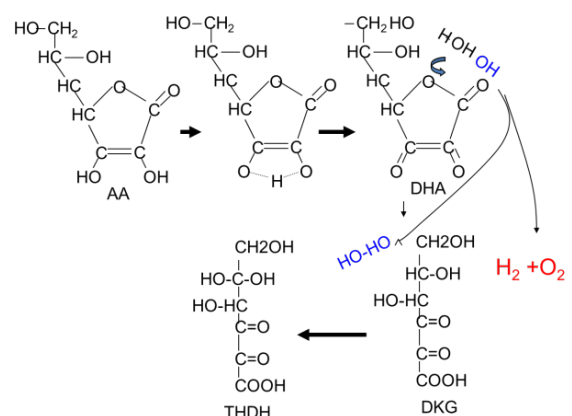


図-1 アスコルビン酸 (AA) の放射線による還元と酸素発生。AA: Ascorbic acid, DHA: Dehydroascorbic acid, DKG: 2-, 3- diketo glucuronic acid, THDH 4, 5, 5, 6- tetrahydroxy-2, 3-diketo hexanoic acid.

DHA (Dehydroascorbic acid), を経て DKG (: 2-, 3- diketo glucronic acid)から THDH , (4, 5, 5, 6-tetrahydroxy-2, 3-diketohexanoic acid)に酸化される際、酸素を発生することが知られている²⁾。もし、カプセル内に、L-ascorbic acid を封入すれば、放射線により酸化され、酸素を発生する際、カプセル内圧が酸素により高まり、カプセルの破裂率上昇につながる事が考えられる。

本実験では、マイクロカプセルに L-ascorbic acid (AA)を添加し、放射線を照射、発生した酸素により、破裂率上昇と抗がん剤放出上昇が起きるか否かを検討した。

2 方法と材料

2.1 マイクロカプセルの作成

0.2 % アルギン酸と 0.1%ヒアルロン酸溶液 10 ml に、1g の L-AA と 50 mg のカルボプラチンを加え、混合して、カプセル溶液とした。同溶液を、オリーブオイルを上面に重層 (厚さ 5 mm) した、0.5 mmol/l CaCl₂ と 0.5 mmol/l FeCl₂ の混合溶液中に、超音波破碎装置 (Branson SONIFIHER 150) を用いて噴霧することで、マイクロカプセルを作成した。マイクロカプセルの微細化のため、重合液には超音波振動装置 (SAKURA VF-5) を用いて、超音波振動を加えた。作成したマイクロカプセルは、5 μm 孔のフィルター (Nalgene disposable filter, 8-0301-84 DP591) で濾過することで精製し、1×10¹⁰ 個のカプセルを、10 ml の Tris-緩衝溶液中に浮遊させることによりカプセル浮遊液を作成した。

2.2 放射線照射、破裂率測定

カプセル浮遊液 1ml を Softex 100 MV を用いて、100 keV X 線、5、10、15、20 Gy (線量率 0.30 Gy/min) の一回照射を施行した。照射完了直後、カプセル浮遊液を光学的顕微鏡、400 倍下で観察し、(i) 輪郭の不整化と破断、(ii) 形態の著しい変形、の二つを呈したカプセルを破裂したカプセルとみなした。破裂率は、400 倍における顕微鏡視野中の全カプセル数に対する、破裂カプセル数の百分率を計測後、5 視野における平均百分率を算出した。

2.3 酸素濃度測定、AA 分解による DHAsA の測定

カプセル浮遊液 100 cc を用意し、上記 2.2 と同様に放射線を照射した。照射直後に、酸素濃度を電極型酸素計 (ハンナ HI-9142) を用いて測定した。測定後、カプセル浮遊液を 10 ml 採取し、DHAsA を、Daniel W.B の変法による比色分析法³⁾に基づいた Assay kit (Cosmobio, ROIKO2) を使用して、測定した。

2.4 マウス移植腫瘍内におけるマイクロカプセルからのカルボプラチン放出量の評価

マウス乳癌由来細胞、MM48 を C3He/N マウス (6 週齢 ♂) の左下腿に移植し、腫瘍径が約 8mm となった時点で実験に使用した。腫瘍周囲に 1×10¹⁰ 個のマウスを皮下注射し、Softex 100 MV を用いて、100 keV X 線、10、20 Gy (線量率 0.30 Gy/min) の一回照射を施行した。照射完了後、可及的迅速に腫瘍を採取し、-20C で冷凍保存後、保存一種間以内に、硝酸灰化法にて腫瘍を完全に消化し、消化液に定量用 In PIXE ターゲットを作成した。PIXE は 2.9 MeV Proton を使用した、NMCC で施行した。

2.5 統計計算

有意差検定は ANOVA (Analysis of Variance) を用いて、P < 0.05 を有意差ありと判定した。放射線により生じた DHAsA と発生した溶存酸素濃度との相関関係は Pearson's Linear Fitting を使用し、r² 0.7 以上を強い相関とした。

3 結果

3.1 生成されたマイクロカプセル (図-2)

生成されたマイクロカプセルは、辺縁平滑な円形を呈し、その横系は、0.78 ± 0.045 μm であった。

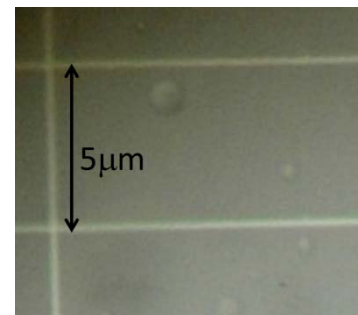


図-2 : 生成されたマイクロカプセル

3.2 放射線による、AA の DHAsA への還元と酸素発生

AA の還元作用で生じた DHAsA の放射線量に対する変化を図-3 に、酸素濃度の変化の放射線量に対する変化を図-4 に、DHAsA 発生量と酸素濃度との相関を図-5 に示す。AA は放射線照射線量依存性に DHAsA に分解し (図-3)、酸素も線量依存性に上昇した (図-4)。これらの間には、 $r^2 = 0.8991$ の強い相関関係 (図-5) が見られ、酸素濃度上昇が、AA 還元由来することが考えられた。

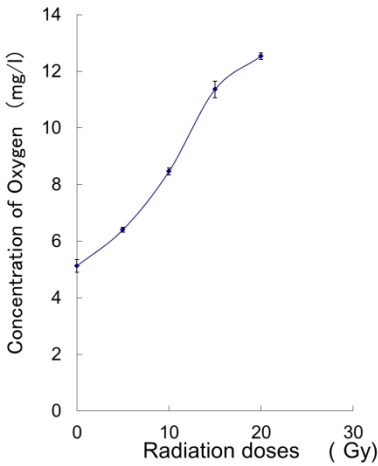


図-3 : 酸素濃度の照射線量に対する変化

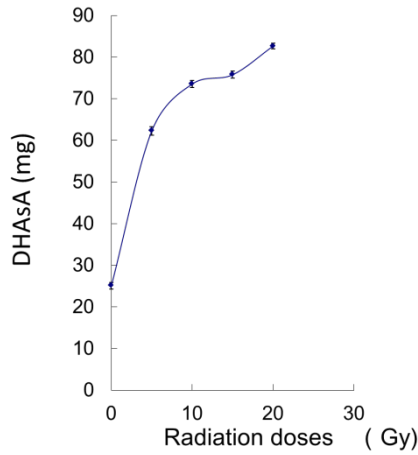


図-4 : 放射線照射に伴う DHAsA 量の変化

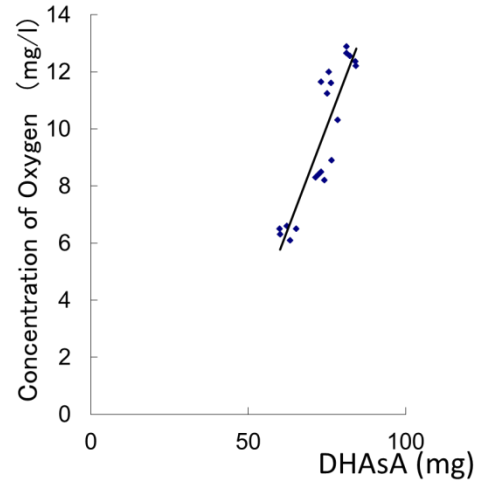


図-5 : 放射線照射に伴う DHAsA 量と酸素濃度との相関

3.3 マイクロカプセル破裂率の変化

上記 AA の添加に伴うマイクロカプセル破裂率の変化を図-6 に示す。AA 添加無しでは、カプセルは放射線照射線量依存性に破裂率が上昇し、 $70.21 \pm 3.4\%$ の破裂が観測された (図-6)。AA 添加群は、照射線量 15 Gy から 20 Gy 間では、破裂率は $86.7 \pm 3.5\%$ (15 Gy 照射時) から $82.7 \pm 3.6\%$ (20 Gy 照射時) に減少したものの、それ以外では、線量依存性に破裂率が上昇し、AA 無添加に対する AA 添加後の有意な破裂率上昇が、各照射線量で認められた (図-6)。

3.4 Pt 濃度に基づく カルボプラチン濃度

カルボプラチンに含まれる腫瘍内 Pt を、PIXE 法により検出、定量し、放射線 10、20 Gy 照射後における、AA 添加に伴う、腫瘍内 Pt 含有量の変化を観察した (図-7)。放射線照射を施行しなかった群では、腫瘍内のカルボプラチンは、ほとんど検出されなかったが、放射線照射により、10 Gy、20 Gy のいずれの群でもカルボプラチン濃度は有意に上昇し、20 Gy 照射時の方が、10 Gy 照射時よりも有意に高い値を示した。

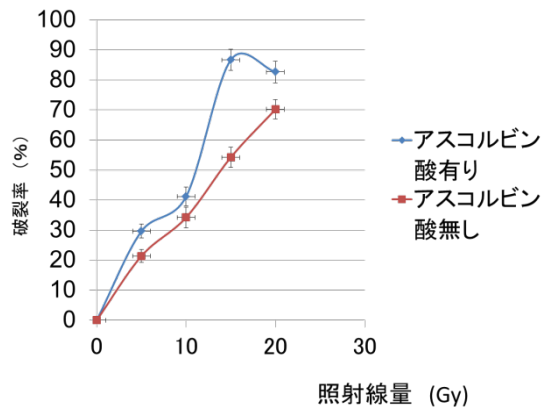


図-6 : 放射線によるマイクロカプセルの破裂率

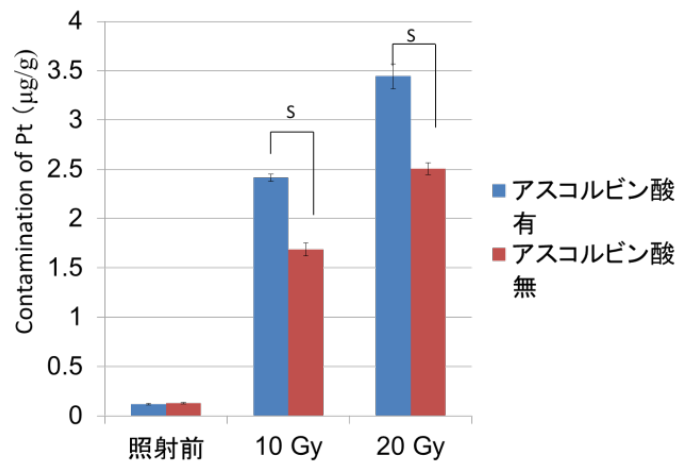


図-7：放射線によるカルボプラチン放出に関して。

4 考察

現在まで、我々は、放射線により内容を放出するマイクロカプセルを研究、開発してきた^{1,4)}。ヒアルロン酸の放射線による分解と、放射線による Fe^{2+} から Fe^{3+} の変化による、アルギン酸の Fe^{2+} 重合の破壊により、放射線によるカプセル破裂を検討してきたが、それらのみでは、放出率が 70% 台と低かったため、放射線に反応して、内圧を高める物質の添加が考えられた。2010 年に、我々は過酸化水素水の放射線照射による酸素発生による、カプセル破裂率上昇を試みたが、過酸化水素の持つ炎症作用により、カプセル皮下注射部位の潰瘍形成や炎症が発生したため、過酸化水素水添加による破裂率促進に関する実験を中止した⁴⁾。AA はビタミン C として知られ、食品添加剤や、注射液の参加防止作用として添加されており、安全性が確立された物質である。今回、我々は、AA の放射線照射による酸素発生とそれによる破裂率促進を研究した。結果、AA 添加により、放射によるマイクロカプセルの破裂率促進と内容の抗癌剤放出が有意に増加した。今後、本マイクロカプセルを使用した、担癌マウスによる *IN VIVO* 実験を施行し、抗腫瘍効果増強と副作用軽減を研究するつもりである。

参考文献

- 1) S. Harada, S. Ehara, K. Ishii, A. Tanaka, T. Satoh, S. Matsuyama, H. Yamazaki, Y. Komori, T. Kamiya, T. Arakawa, M. Saitoh, M. Oikawa, and K. sera. Targeted Delivery of Chemotherapeutic Agents by using Improved Radiosensitive Liquid-Core Microcapsules and Assessment of Their Antitumor Effect. *Int. J. Radiation Oncology, Biol. Phys.*, Vol 175, 2009, 455-462.
- 2) John C Deutch. Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* Vol 255, 1998, 1-7.
- 3) Daniel W. Bradley, Gladys Emery, James E. Marynard. Vitamin C in plasma: A comparative study of the vitamin stabilized with trichloroacetic acid or metaphosphoric acid and the effects of storage at -70° , -20° , 4° , and 25° on the stabilized vitamin. *Clinica Chimica. Acta.* Vol 44 (1), 1973, 47-52.
- 4) S. Harada, S. Ehara, K. Ishii, A. Tanaka, T. Satoh, S. Matsuyama, H. Yamazaki, Y. Komori, T. Kamiya, T. Arakawa, M. Saitoh, M. Oikawa, and K. sera. Improved radiosensitive microcapsules using H_2O_2 .

Improved rupturing of irradiated microcapsules, using O₂ generation by redox reaction of L-ascorbic acid (AA) by radiation, and targeted anticancer drug using those microcapsules

S. Harada¹, S. Ehara¹, K. Ishii², K. Sera³ and S. Goto⁴

¹ Department of Radiology, School of Medicine, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

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

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

⁴Takizawa Institute, Japan Radioisotope Association
348-1 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

Abstract

This study was to determine whether redox reaction of L-ascorbic acid by irradiation could generate oxygen and increase rupturing of irradiated microcapsule. The microcapsules were generated by spraying a mixture of 0.1% alginate, hyaluronic acid, and 10% L-ascorbic acid (AA) into a 0.3 mmol/l solution of CaCl₂ and FeCl₂. A 1.0 x 10¹⁰ / 1ml solution of microcapsules were irradiated, and oxygen concentration and rupturing of microcapsules were measured. We showed that the redox reaction of AA generated oxygen, which increased rupturing of microcapsules. We also showed the increased concentration of anticancer drug when they were subcutaneously injected around the MM4 tumors (mice breast cancer), which were inoculated in the left hind legs of C3He/N mice.