

# 炭酸水による放射線感受性マイクロカプセル微細化と 初期転移巣検出と治療

原田 聡<sup>1</sup>、江原 茂<sup>1</sup>、石井慶造<sup>2</sup>、世良耕一郎<sup>3</sup>、後藤祥子<sup>4</sup>、佐藤隆博<sup>5</sup>

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>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

<sup>3</sup>岩手医科大学サイクロトロンセンター  
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

<sup>4</sup>日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター  
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

<sup>5</sup>日本原子力開発機構高崎量子応用研究所  
370-1292 群馬県高崎市綿貫町 1233 番

## 1 はじめに

現在まで我々は、抗癌剤を含むアルギン酸-ヒアルロン酸混合溶液を超音波破碎装置により、 $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Fe}^{2+}$ 溶液中に噴霧、アルギン酸-ヒアルロン酸を $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Fe}^{2+}$ で重合する事により、放射線照射に反応して抗癌剤を放出するマイクロカプセル（以下放射線感受性マイクロカプセルと記す）を作成、それらをマウス尾静脈より注射後、2回照射法を用いて、照射部位に薬剤を誘導する方法を研究してきた<sup>1)</sup>。すなわち、腫瘍に対して第1回目の照射を施行、腫瘍血管内皮にP-selectin 抗原を誘導後、P-selectin 抗体で標識したマイクロカプセルをマウス尾静脈より静注し、P-selectin の抗原抗体反応により照射部位にマイクロカプセルを集積させた後、集積したマイクロカプセルに対し、第2回目の照射を施行、腫瘍に集積したマイクロカプセルから抗癌剤を放出させ、抗癌剤と放射線との相乗効果により癌治療効果を高めるとともに、カプセルによる薬剤限局化作用により抗癌剤の副作用を軽減させるというものである。しかしながら、カプセルのサイズが大きいため、静脈されたマイクロカプセルが肺、肝、腎、脾にトラップされ、腫瘍へのカプセル到達が低下する欠点があった。

一方、炭酸水に超音波振動を加えると、炭酸水中にマイクロバブルが発生する事が知られている<sup>2)</sup>。今回、我々は、抗癌剤を含むアルギン酸-ヒアルロン酸混合溶液に炭酸水を添加後、超音波振動を加え、発生したマ

イクロバブルによりマイクロカプセルをさらに微細化し、静脈注射後の肺、肝、腎、脾へのマイクロカプセルのトラップの減少を試みた。さらに、肺転移を起こしたマウスを使用し、初期肺転移巣血管内皮に発現している $\alpha$ V $\beta$ 3 抗原<sup>3)</sup>の抗原抗体反応を利用した、マイクロカプセルによる、初期肺転移巣の CT 検出を試みた。次に、集中したマイクロカプセルに放射線を肺に照射し、マイクロカプセルから初期肺転移巣に抗癌剤を放出させ、放射線との相乗効果により初期転移巣を治療する事を試みた。

## 2 材料と方法

### 2.1 マイクロカプセルの作成

0.02 g アルギン酸と 0.01 g ヒアルロン酸溶液炭酸水（アサヒ飲料社製、炭酸濃度  $1512 \pm 16$  ppm）10 ml に溶解、1 g の L-アスコルビン酸と 50 mg のカルボプラチンを加え、混和後、カプセル溶液とした。同溶液を、厚さ 5 mm のオリーブオイルを上面に重層した、0.5 mmol/l  $\text{CaCl}_2$  と 0.5 mmol/l  $\text{FeCl}_2$  の混合溶液中に、超音波破碎装置（Branson SONIFIER 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  $\mu\text{m}$  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、 $1 \times 10^{10}$  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。

転移巣検出用のマイクロカプセルに関しては、カプセル溶液に P-selectin 抗原 5  $\mu\text{g}$  を添加、重合液中に 5  $\mu\text{g}$  の $\alpha$ V $\beta$ 3 抗原を添加し、P-selectin 抗原を含有した $\alpha$ V $\beta$ 3 抗体標識マイクロカプセルを作成した。転移巣治療用マイクロカプセルに関しては、カプセル溶液に白金系抗癌剤カルボプラチン 500 mg を添加し、重合液中に 5  $\mu\text{g}$  の P-selectin 抗体を添加することにより、カルボプラチンを含有し、P-selectin 抗体で標識したマイクロカプセルを作成した。

### 2.2 腫瘍モデル作成

マウス乳癌由来細胞で、高率に肺転移を起こす MM48 腫瘍を C3He/N マウス（6 週齢 ♂）の左下腿に移植し、腫瘍径が約 14 mm となった時点で実験に使用した。尚、腫瘍径が 14 mm 時点となった時の肺転移発生率が  $96.2 \pm 2.7\%$ であることを確認済みである。

### 2.3 初期転移巣検出と 1 回目の照射

マウス尾静脈から、 $\alpha$ V $\beta$ 3 抗体で標識され、P-selectin 抗原を含むマイクロカプセルを  $1 \times 10^{10}$  個注射し、 $\alpha$ V $\beta$ 3 の抗原抗体反応により、マイクロカプセルを転移巣に集積させた。集積したマイクロカプセルは静脈注射 9 時間後に CT を用いて検出し、初期転移巣の明瞭化を検討した。CT 施行後、肺に Softex 100 MV を用いて、100 KeV X 線、10、20 Gy（線量率 0.30 Gy/min）の第 1 回目の照射を施行、転移巣に P-selectin 抗原を沈着させた。

### 2.4 転移巣治療用マイクロカプセルの静脈注射と第 2 回目の照射による転移巣の治療

第 1 回目の照射 12 時間後に、カルボプラチンを含有し、P-selectin 抗体で標識したマイクロカプセル  $1 \times 10^{10}$  個を尾静脈より静脈から注射し、P-selectin 抗原抗体反応により肺転移巣にマイクロカプセルを集積させた。治療用マイクロカプセルが充分転移巣に集積した時点で、第 2 回目の照射（現在 10 Gy のみ）を肺組織に施行し、マイクロカプセルからカルボプラチンを放出させ、放射線とカルボプラチンの相乗効果により転移巣の治療を施行した。

第 2 回目照射直前前のマイクロカプセル集積度を計測するため、転移巣治療用マイクロカプセル静脈注射

後、一定の間隔でマウスから肺組織を採取し、組織切片（3 μm 厚）を作成、凍結真空乾燥を施行した。凍結真空乾燥した肺組織切片中を 3 MeV proton を用いた micro PIXE camera で観察し、その Ca、Fe 画像からマイクロカプセルを検出、マイクロカプセル集積度を計測した。Micro PIXE camera は日本原子力開発機構、高崎量子応用研究所にて施行した。

マイクロカプセルから放出されたカルボプラチンの定量と、照射後の体内カルボプラチン動態を検討するため、第2回目の照射後、肺、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 を 1000 μg/g 割合で添加、室温で乾燥することにより 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 肺転移治療効果の評価

肺転移治療効果は、第2回目の照射から2週間後、肺転移巣の数を剖出した肺中の結節数を数えることで評価した。

### 2.6 統計計算

ANOVA 法を使用し、P<0.05 をもって有意差判定を行った。計算は IBM 社製、SPSS Ver 21 を使用した。

## 3 結果

### 3.1 生成されたマイクロカプセル

制作されたマイクロカプセルを図1に示す。作成されたマイクロカプセルの径は  $0.52 \pm 0.029 \mu\text{m}$  であり、従来のマイクロカプセル ( $0.78 \pm 0.045 \mu\text{m}$ ) よりも有意に微細化された。

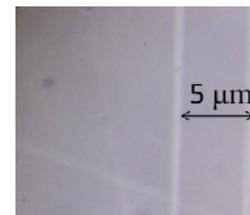


図1 生成されたマイクロカプセル

### 3.2 転移巣の検出効果の増強

転移検出用マイクロカプセル尾静脈注射前と注射後の肺 CT 画像を図2-A、Bに示す。転移巣検出用マイクロカプセル静脈注射前(図2-A)は、淡い斑状影として描出されていた転移巣が、静脈注射後は明瞭な結節影として描出された(図2-B、矢印)。

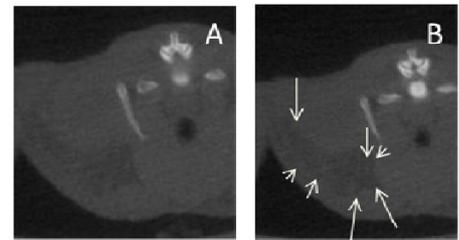


図2 CTによる肺転移巣の検出。A:マイクロカプセル静注前、B:マイクロカプセル静注後

CT上で検出可能な肺転移巣数を、転移巣検出用マイクロカプセル静脈注射前後において計測した(図3)。転移巣検出用マイクロカプセル静脈注射後は、肺転移巣の明瞭化の結果、検出可能な肺転移巣の数が有意に上昇した(図3)。

### 3.3 1回目照射と P-selectin 抗原抗体反応による転移巣治療用マイクロカプセルの集積

第1回目の放射線照射を肺組織に対して行い、P-selectin 抗原を血管内皮に沈着させ、照射12時間後に転移巣治療用マイクロカプセル  $1 \times 10^{10}$  個を尾静脈より静脈注射した。転移巣が見られたマイクロカプセル集積の経時的变化を図4に示す。各観測時点で、マイクロカプセルは放射線照射線量に依存して増加し、20 Gy 照射時の集積の方が、10 Gy 照射時の集積よりも有意に高い値を示した。経時的变化では、10 Gy、20 Gy 照射線量ともに、6時間

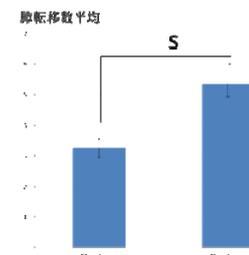


図3 CTにより検出された肺転移巣検出の変化

以前には集積は増加したが、それ以降は徐々に減少した。したがって、第2回目の照射（現在 10 Gy のみ）は、転移巣治療用マイクロカプセル静脈注射から 6 時間後に施行された。

### 3.4 第2回目照射後の肺転移巣、肺、肝、腎、脾へのカルボプラチン集積

第2回目照射後（現在 10 Gy のみ）の肺転移巣、肺、肝、腎、脾におけるカルボプラチン量に関して、マイクロカプセル微細化の影響を検討した（図5）。カプセル化による薬剤標的効果により、肺転移巣へのカルボプラチン量は、カプセル化しなかった時よりも有意に上昇した。マイクロカプセル微細化により、肺転移数内のカルボプラチン量は、有意差は認められなかったものの、上昇傾向が認められた。一方、腎、肝、脾においては、カプセル化による薬剤標的効果により、カルボプラチン量はカプセル化しなかった時よりも減少傾向が見られたが、有意差は見られなかった。しかし、微細化したマイクロカプセルにおいては、微細化しなかったマイクロカプセルよりも、肺転移巣、肺、肝、腎、脾のカルボプラチン含有量が有意に低下した。

### 3.5 肺転移巣の治療効果

第2回目の放射線照射1週間後（現在 10 Gy のみ）の肺転移数を治療別に示す（図6）。カプセル化していないカルボプラチン（薬剤標的無し）と放射線照射併用群は、治療を施さない群と比べて、有意に肺転移巣が減少した。微細化前のカプセル化したカルボプラチンにおいては、カプセル化していないカルボプラチンにくらべて有意に肺転移数が減少した。しかし微細化後のカプセル化したカルボプラチンに関しては、微細化前のカプセル化した同薬剤に比べ、肺転移巣の減少傾向が見られたが、有意な減少は見られなかった。

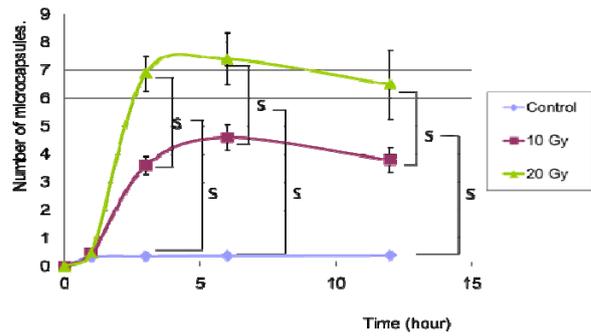


図4 第1回目照射により集積したカプセル数

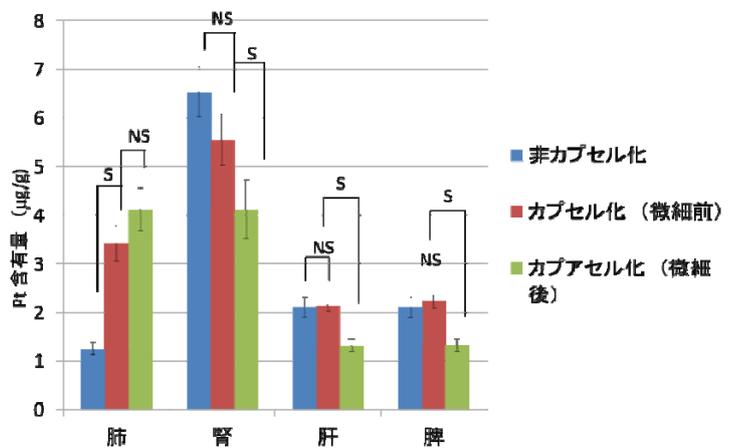


図5 肺、腎、肝、脾へのカルボプラチン沈着量を Pt 含有量 (μg) で表したもの

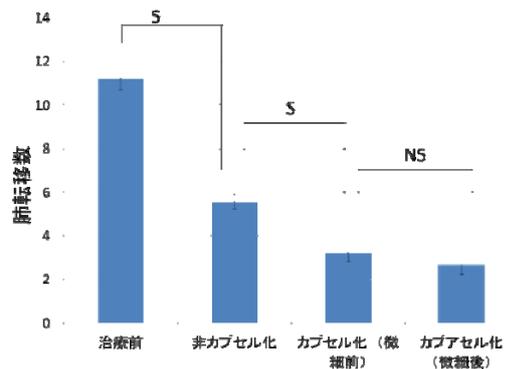


図6 転移巣への治療効果を肺転移巣の数で表したもの

## 4 考察

癌患者の生存率を左右する最大の因子として、癌転移の治療があげられる。癌転移治療には、癌転移巣の早期診断と治療が重要となり、発見された癌転移巣が確実に治療されることが必要となる。それには、癌転移発見と治療が一体化し、癌転移描出が治療に直接つながることが理想と考えられる、しかし現在まで、癌転移巣の診断は CT、MRI、PET 等で、治療は抗癌剤治療や放射線治療と、まったく別々に行われてきたのが現状である。また、抗癌剤治療に関しては、その甚大な副作用軽減するため、転移巣に抗癌剤を限局化させることが必要と考えられる。今回、我々は、初期転移巣の血管内皮に発現している $\alpha V\beta 3$  抗原に対する抗体でマイクロカプセルを標識し、それらを $\alpha V\beta 3$  の抗原抗体反応により転移巣にマイクロカプセル (含 P-selectin 抗原) を集積させ、それらを CT で検出する事により、CT 下における初期転移巣描出を試みた。続いて、第 1 回目の照射を施行し、転移巣に集中したマイクロカプセルから P-selectin 抗原を放出させ、P-selectin 抗原を転移巣に沈着、次に P-selectin 抗体で標識した転移巣治療用マイクロカプセル (含、白金系抗癌剤 carboplatin) を静脈注射し、それらを P-selectin 抗原抗体反応で転移巣に集積させた。最後に、集積した治療用マイクロカプセルに第 2 目の照射を施行し、治療用マイクロカプセルから carboplatin を放出させ、carboplatin と放射線との相乗効果により癌転移巣を治療する事を試みた。このような転移巣の描出と治療のためには、マイクロカプセルが微細化され、肺、肝、脳、腎、脾に捕捉されず、転移巣に到達する事が必要と考えられたため、炭酸水による微細化を試みた。

炭酸水添加により、マイクロカプセルは微細化され、その径は  $0.52 \pm 0.029 \mu\text{m}$  へと有意に微細化された。本マイクロカプセルを $\alpha V\beta 3$  で標識し、マウス尾静脈から注射したところ、 $\alpha V\beta 3$  の抗原抗体反応により、マイクロカプセルは転移巣に集積し、転移巣を CT 下でより明瞭に描出した。このことより、マイクロカプセルを使用した、転移巣の検出が可能と思われた。続いて、第 1、2 回目の照射によりカルボプラチンを転移巣に誘導すると、微細化により肝、腎、脾への集積が有意に低下し、肺転移巣への集積が上昇したが、有意な上昇とはならなかった。これに関しては、マイクロカプセルをより微細化する事と、肺転移巣への集積度を上昇させる必要があると考えられた。最後に、転移巣の治療効果であるが、カプセル化により転移巣の治療効果は増強されたものの、微細化による治療効果増強は見られなかった。これに関しては、治療用マイクロカプセルの集積の増強が課題として予測されるが、現在、2 回目の照射が 10 Gy までしか実験が進行しておらず、20 Gy 照射の実験が完了した時点で、最終的な結果を検討したいと考えている。

### 参考文献

- 1.) Satoshi Harada, Shigeru Ehara, Keizo Ishii, et. al. Imaging and Treatment of malignant metastatic tumors by using radiation-sensitive, Immunolabeled liquid-core microcapsules. Nuclear instrument and Methods in Physics Research B, Vol,318, 2013: 173-177.
- 2.) Hisashi Harada, Nashiro Iwata and Keisuke Shiratori. Observation of Multibubble Sonoluminescence from Water Saturated with Various Gases during Ultrasonic Atomization. Jpn. J. Appl. Phys. Vol 48 2009 07GH01
- 3.) Erica K Solan, Normand Pouliot, Kym L Stanley, et. al. Tumor-specific expression of  $\alpha V\beta 3$  integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. Breast cancer Research Vol 8 2006 R20.

## Micronization of radiosensitive microcapsules using carbonate water, and their ability to detect and treat metastasis

S. Harada<sup>1</sup>, S. Ehara<sup>1</sup>, K. Ishii<sup>2</sup>, K. Sera<sup>3</sup>, S. Goto<sup>4</sup> and T. Sato<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Iwate Medical University, School of Medicine, Department of Radiology  
19-1 Uchimaru, Morioka, Iwate 020-8505, Japan.

<sup>2</sup>Department of the Quantum Science and Energy Engineering, Tohoku University  
6-6 Aza Aoba, Aramaki, Aoba, Sendai, Miyagi 980-8579, Japan.

<sup>3</sup>Cyclotron Research Center, Iwate Medical University  
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

<sup>4</sup>Nishina Memorial Cyclotron Center (NMCC), Japan Radioisotope Association  
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

<sup>5</sup>Takasaki Institute of the Radiation Chemistry Research Establishment, JAERI  
1233 Watanuki, Takasaki, Gunma 370-1292, Japan

### Abstract

We report on microcapsular imaging and therapy of micrometastasis using micronized microcapsule by carbonate water, which releases their core contents with response to radiation, via 2 radiotherapy sessions. In the first session, computed tomography (CT)-detectable microcapsules containing P-selectin antigen were intravenously injected to detect metastasis via antibody-antigen accumulation of  $\alpha V\beta 3$ . The second session involved treatment of metastasis by carboplatin, released from microcapsules by radiation corresponding to P-selectin expression and P-selectin-P-SGL-1 antigen-antibody reactions.

The microcapsules were  $0.52 \pm 0.029 \mu\text{m}$  ( $\phi$ ). Anti- $\alpha V\beta 3$  microcapsules accumulated around metastasis sites and were detectable on CT. These microcapsules released P-selectin antigen in response to the first irradiation. In the second session, the microcapsules released carboplatin. The micronized microcapsules deposited more carboplatin, resulting in more reduction of metastases. However, they were not significantly different when compared with unmiconized microcapsules.