

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22360040

研究課題名（和文） 準単色 LCS-X線と標的指向性 DDS を組み合わせた相乗的癌治療効果に関する研究

研究課題名（英文） Research on cancer treatment by combination of target-oriented drug delivery system and quasi-monochromatic LCS-Xrays.

研究代表者

小池 正記（KOIKE MASAKI）

独立行政法人産業技術総合研究所・計測フロンティア研究部門・研究グループ長

研究者番号：00356958

研究成果の概要（和文）：本研究は、将来の低侵襲の新たな癌治療システムの構築を目指し、薬剤と X 線の相乗効果を利用した癌治療法の開発を行うことを目的としている。そのため、X 線源として、高繰り返し再生増幅器型レーザー共振器とマルチパルス電子ビームを用いた、マルチパルス・レーザーコンプトン散乱による準単色 X 線源を開発した。さらには治療用の薬剤運搬のため、金コロイドや白金抗癌剤（シスプラチン）などの重金属を内包し、癌細胞に集積させる標的指向性（アクティブターゲティング）Drug Delivery System（AT-DDS）を開発した。この AT-DDS 薬剤と X 線照射による治療効果の検証として、細胞培養液中に金ナノ粒子を付加して低エネルギー X 線を照射したところ、活性酸素の産出量が約 2-3 割増加することがわかった。また、悪性脳腫瘍細胞（U251）に金ナノ粒子（粒径 8nm）を細胞培養液にそれぞれの濃度で添加して低エネルギー X 線を照射して colony forming assay を施行した結果、照射線量 8Gy、添加金ナノ粒子 30mg/mL（培養液中濃度）以上でコントロールに比して有意な細胞増殖抑制効果が観られることがわかった。最終的に両者の成果を融合させ、AT-DDS 薬剤と単色 X 線ピンポイント集光照射による計算機シミュレーションを実施することで、薬剤と X 線の相乗効果実証の目処を立てることができた。

研究成果の概要（英文）：Target of this research is construction of a new cancer treatment system with invasive drugs and X-rays. For this purpose, quasi-monochromatic multi-pulse compton scattering using electron beam and repeating regenerative amplifier cavity laser resonator are developed for the x-ray source. To accumulate in cancer cells, ATT-DDS which contain heavy metals such as colloidal gold or Platinum anticancer has been developed. This AT-DDS showed the effects of x-ray irradiation about 2-3% of production of reactive oxygen species increase. Also malignant brain tumor cells (U251) to gold nanoparticles (diameter 8 nm) added to the cell culture medium at concentrations of each low energy X-ray irradiation and colony forming assay results were the irradiation dose 8Gy, Addition of gold nano-particles 30mg/mL (nutrient solution in density) showed significant cell growth inhibitory effects.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|----------|---------|----------|
| 2010 年度 | 7200000 | 2160000 | 9360000 |
| 2011 年度 | 5600000 | 1680000 | 7280000 |
| 2012 年度 | 2300000 | 690000 | 2990000 |
| 総計 | 15100000 | 4530000 | 19630000 |

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎 応用物理学一般

キーワード：標的指向性 DDS、レーザーコンプトン散乱 X 線源、相乗的癌治療効果、マルチパルス電子ビーム、金コロイド

1. 研究開始当初の背景

癌治療における放射線治療は、古くから金・白金複合体抗癌剤との組み合わせ治療には相加的治療効果があることが経験的に知られてきた[1]。それ以後、基礎研究・臨床研究で放射線療法と白金化合物であるシスプラチン化学療法の相加的治療効果が数多く報告され、この相加的治療効果はシスプラチンが含む白金に放射線が吸収され二次電子線が癌細胞内で発生しているためと考えられている。この相加的効果を本提案手法を用いることにより相乗的効果へと強めることで、癌治療の革新的進歩をもたらすことが期待できる。それらを実現するため、癌病巣での金・白金濃度を効率的に上げることが出来る標的指向性 AT-DDS の開発、及び金・白金元素に吸収効率の高い小型の単色 X 線源の開発が求められる。申請者のチームは、これらを実現するために十分な知見を有しており、新たな癌治療システムの着想に至った。この手法では、重金属の L 殻吸収端近傍の単色 X 線を、DDS によって効率よく、薬剤を集積させた癌病巣に集光照射することにより、図 2 に示す様な擬似的なブラッグピークを作ることができ、エネルギー付与の集中性を高め、より低侵襲な治療法を提供できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、将来の低侵襲の新たな癌治療システムの構築を目指し、薬剤と X 線の相乗効果を利用した癌治療法の開発を行うことを目的とする。高繰返し再生増幅器型レーザー共振器とマルチパルス電子ビームを用いた、マルチパルス・レーザーコンプトン散乱による高収量の（準）単色 X 線源を開発する。さらには金コロイドや白金抗癌剤（シスプラチン）などの重金属を内包し、癌細胞に集積させる標的指向性（アクティブターゲティング）Drug Delivery System (AT-DDS) を開発する。それらを融合させ、重金属の吸収端近傍を狙った（準）単色 X 線（約 20keV）を用いたピンポイント集光照射により、擬似的なブラッグピークを形成し、癌細胞へのエネルギー付与を高め、薬剤との相乗効果を生み出す原理実証を行う。

このため、以下に示す 3 つの項目を達成する。

(1) 高収量レーザーコンプトン散乱単色 X 線源の開発

・再生増幅器型レーザー共振器を用いたマル

チパルス・レーザーコンプトン散乱の実証

・キャピラリー素子を用いた X 線の集光・照射系の開発

(2) 標的指向性 DDS (AT-DDS) の開発

・糖鎖修飾リポソームを用いた金コロイド・シスプラチン等の重金属製剤 AT-DDS 開発

・上記 AT-DDS を用いた癌組織への集積度評価

(3) AT-DDS 薬剤集積細胞への単色 X 線ピンポイント集光照射による照射効果の検証

・In vitro、In vivo サンプルにおける照射効果の検証・分析

3. 研究の方法

(1) 単色 X 線源開発

産総研 S バンド小型加速器を用いたレーザーコンプトン散乱 (LCS) X 線源の高収量化を行う。その際、重金属（金やプラチナ）を内包した AT-DDS 製剤を用いた癌治療に最適な X 線のエネルギーを選定すると、人体（水等価）と重金属の線減弱係数比の大きい L 殻吸収端近傍の X 線エネルギーが効果的で、尚且つ、治療効果のメリット値（重金属 10 μm 厚での吸収率と水との吸収比を乗じたもの）を定義した時、約 20keV のエネルギーが最適であることがわかる。更に、重金属元素への高吸収高コントラストの照射を行うため、図 2 に示す手法で、LCS-X 線源のマルチパルス化・高繰返し化を行うことにより 20keV の単色 X 線源として高収量化する。

具体的な手法としては、まず、10 Hz 以上の繰返しのマクロパルス内に 10 ns 程度の間隔でマイクロパルスを 100 パルス含むマルチパルス電子ビームを発生する。更に、マルチパルス電子ビームと、薄厚の Ti:Sapphire 結晶（もしくは Yb 系 Thindisk 結晶）を用いた再生増幅器型レーザー共振器を開発する。レーザーパルス列と電子ビームのマイクロパルスの周期を一致させ、再生増幅器型レーザー共振器内に電子ビームとレーザーとの衝突点を置き、10Hz 以上の高繰返しのマルチパルス X 線を生成する。X 線の単位時間当たりの収量を約 2 桁以上増強し、109 photons/sec の X 線を発生させる。更に、照射密度をあげるための、ガラスキャピラリー X 線集光素子の検討を開始し、レーザーコンプトン散乱 X 線（LCS-X 線）源に適したキャピラリーの設計を行う。

(2)AT-DDS 薬剤の開発

固形癌における新生血管内皮細胞表面に発現するレクチン蛋白質 (selectin) に特異的親和性を持つ AT-DDS 粒子の開発を行う。具体的には、内部に金コロイド、及び白金製剤のシスプラチン (抗癌剤) 等を内包したリポソームに、糖鎖 (シアリルルイス X (SLX)) を修飾した AT-DDS 粒子を開発する。図 3 のように癌組織内へ効率よく集積させるため、リポソームのサイズを最適化する。この AT-DDS におけるリポソーム製造法では脂質等の混合比率の調節によってリポソームをセルフアセンブリさせており、この時に内包薬物を溶液中に混在させておくことでリポソーム内部に薬剤を内包している。内包薬物のリポソーム内濃度が最大になり、かつ作製されたリポソームが体内を循環して血管内皮細胞から漏出できるサイズである 100nm - 300nm になるような作製条件をトライ&エラーで探索する。尚、リポソームに表面に糖鎖を修飾する方法は既に確立している (特願 2005-512589、特願 2005-512602)。

4. 研究成果

準単色 LCS-X 線源の開発に関しては、悪性腫瘍細胞への単色 X 線照射を実現するため、レーザーコンプトン散乱 (LCS) X 線収量の増強は不可欠であり、10Hz 以上の高繰返しのマルチパルス LCS-X 線を生成する必要がある。このため、Ti:sapphire 結晶ベースの再生増幅型エネルギー蓄積レーザー共振器の開発を行った。再生増幅器へ導入する種光生成用の各モジュール製作を行い、加速器に同期した種パルス列を生成した。種光を蓄積するための共振器は、共振器長 $L=3.8\text{m}$ において繰返し 10Hz での自己発振を達成し、種光を導入することで、パルスの増幅蓄積が行える見通しである。また、パルスエネルギー増強を更に効率化するため、パルスの伸張と圧縮を一つの共振器内で行える構造を提案し、同時に高繰返し化が可能な Yb:YAG 結晶を用いた高平均出力化技術の可能性調査を行い、その有用性を確認した。

さらに Ti:sapphire 結晶ベースの再生増幅型エネルギー蓄積レーザー共振器へ、加速器と同期した種パルス列を導入しビルドアップ増幅を行い、100 パルス以上のレーザー蓄積に成功した。また、同時に計算機シミュレーションにより共振器長、凹面鏡半径等の最適パラメータをサーベイし、集光サイズ $50\ \mu\text{m}$ 以下を達成できることを確認した。電子ビームに関しては、昨年度に引き続き、マクロパルス内に 10 ns 程度の間隔で 50 パルス以上のマルチパルス電子ビームを安定に発生させることに成功した。また、照射密度をあげるためピンポイント X 線集光光学系に関しては、ガラス・ポリキャピラリーと X 線管

球を用いた集光テストを行い、約 10 倍弱の輝度増強を確認した。光軸調整を含め、単色光源を用いた際には更なる増強が見込まれる。

金コロイドを添加した悪性腫瘍細胞に対する X 線照射の研究に関しては、まず、U251MG 悪性脳腫瘍細胞の培養液に金コロイド (粒子径 8nm) を最終濃度 15, 30, 45 $\cdot\ \text{g/mL}$ 濃度で添加して 24 時間培養した。これに低エネルギーレベルの X 線を照射してコロニーフォーミングアッセイを施行した。8Gy 照射、金コロイド 30 $\cdot\ \text{g/mL}$ で悪性脳腫瘍細胞の生き残りコロニー数は、コントロール群 (金コロイド添加しなで X 線照射した群) と比較して 10 分の 1 に低下した。金粒子が細胞表面および内部に存在している場合、金の吸収率のよい低エネルギー X 線を照射すると、放射線の抗腫瘍効果が増強されることが確認された。この増強効果を得るための金濃度は、培養液中の濃度で 15-30 $\cdot\ \text{g/mL}$ 程度であると考えられる。照射 X 線を単色化して金の吸収率のよいエネルギーレベルに局限すれば、更なる増強効果も得られるものと思われる。

AT-DDS 薬剤の開発と単色 X 線ピンポイント集光照射による照射効果の検証としては、細胞培養液中に金ナノ粒子を付加して低エネルギー X 線を照射したところ、活性酸素の産出量が約 2-3 割増加したことが確認された。X 線源は 1.0mm アルミフィルター、1.0mm アルミ + 0.5mm 銅フィルター、又は 1.5mm 銅フィルターでエネルギー分布を調整した。細胞培養溶液中には粒径 8nm と 50nm の 2 種類の金ナノ粒子が、100mg/mL になるように加えた。悪性脳腫瘍細胞 (U251) に金ナノ粒子 (粒径 8nm) を細胞培養液にそれぞれの濃度で添加して低エネルギー X 線 (1.0mm アルミフィルター使用) を照射して colony forming assay を施行した結果、照射線量 8 Gy、添加金ナノ粒子 30 mg/mL (培養液中濃度) 以上でコントロールに比して有意な細胞増殖抑制効果が観られた。

以上の通り、将来の低侵襲の新たな癌治療システムの構築を目指し、薬剤と X 線の相乗効果を利用した癌治療法の開発を行うことを目的とし、そのため、X 線源として、高繰返しの再生増幅器型レーザー共振器とマルチパルス電子ビームを用いた、マルチパルス・レーザーコンプトン散乱による準単色 X 線源を開発した。さらには治療用の薬剤運搬のため、金コロイドや白金抗癌剤 (シスプラチン) などの重金属を内包し、癌細胞に集積させる標的指向性 (アクティブターゲティング) Drug Delivery System (AT-DDS) を開発した。この AT-DDS 薬剤と X 線照射による治療効果の検証として、細胞培養液中に金ナノ粒子を付加して低エネルギー X 線を照射した

ところ、活性酸素の産出量が約2-3割増加することがわかった。また、悪性脳腫瘍細胞(U251)に金ナノ粒子(粒径8nm)を細胞培養液にそれぞれの濃度で添加して低エネルギーX線を照射してcolony forming assayを施行した結果、照射線量8Gy, 添加金ナノ粒子30mg/mL(培養液中濃度)以上でコントロールに比して有意な細胞増殖抑制効果が観られることがわかった。最終的に両者の成果を融合させ、AT-DDS薬剤と単色X線ピンポイント集光照射による計算機シミュレーションを実施することで、薬剤とX線の相乗効果実証の目処を立てることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計18件)

①著者名: Oyane A, Wang X, Sogo Y, Ito A, Tsurushima H, Calcium phosphate composite layers for surface-mediated gene transfer
雑誌名: Acta Biomaterialia
査読: 有, 巻: 8(6), 発行年: 2012
ページ: 2034-2046.

DOI: 10.1016/j.actbio.2012.02.003

②著者名: Yazaki Y, Oyane A, Araki H, Sogo Y, Ito A, Yamazaki A, Tsurushima H
標題: Fabrication of DNA-antibody-apatite composite layers for cell-targeted gene transfer

雑誌名: Sci Technol Adv Mater

査読: 有, 巻: 13, 発行年: 2012

ページ: 064204-1-8

DOI: 10.1088/1468-6996/13/6/064204

③著者名: 黒田、小池 他

表題: Quasi-monochromatic hard X-ray source via laser Compton scattering and its application

雑誌名: Nucl. Instrum. Meth. A

査読: 有, 巻: 637, 発行年: 2011

ページ: S183-S186

DOI: 10.1016/j.nima.2010.04.001

[学会発表] (計18件)

①発表者: 黒田隆之助

発表課題:

Development of quantum radiation sources using S-band compact electron linac at AIST

学会等名: Asian Core Workshop 2013

発表年月日: 2013/03/08

発表場所: KAERI、デジョン (韓国)

②発表者: 黒田隆之助

発表課題: 超短パルス電子ビーム施設におけるテラヘルツ・準単色X線源の開発と利用研究の紹介

学会等名: CEREBA 技術交流セミナー

発表年月日: 2012/07/09

発表場所: つくば

③発表者: 黒田、小池、鶴嶋 他

表題: Development of quasi-monochromatic LCS X-ray source for novel combination cancer radiotherapy with drug delivery system

学会名: ICRR2011

発表年月日: 2011/9/1

発表場所: コンベンションセンター (ワルシャワ・ポーランド)

[図書] (計1件)

①著者名: 松村明、鶴嶋英夫

論文標題: 脳梗塞、神経・筋疾患の病態と診断・治療 (I)

雑誌名: 医学と薬学

査読: 有

巻: 68巻1号,

発行年: 2012年

ページ: 11-16

DOI: なし

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

①名称: 生体内留置物可視化装置

発明者: 鶴嶋英夫 他

権利者: 筑波大、産総研、高エネ研

種類: 特許

番号: 特願 2011-203448

出願年月日: 2011/9/16

国内外の別: 国内

②名称: 骨誘導性生体材料

発明者: 鶴嶋英夫 他

権利者: 産総研

種類: 特許

番号: 特願 2010-00559

出願年月日: 2010/4/27

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 正記 (KOIKE MASAKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・計測フロンティア研究部門・研究グループ長

研究者番号: 00356958

(2) 研究分担者

三浦 永祐 (MIURA EISUKE)

独立行政法人産業技術総合研究所・エネルギー技術研究部門・主任研究員

研究者番号: 10358070

鶴島 英夫 (TSURUSHIMA HIDEO)
筑波大学大学院・人間総合科学研究科・准
教授
研究者番号：50315470

黒田 隆之助 (KURODA RYUUNOSUKE)
独立行政法人産業技術総合研究所・計測フ
ロンティア研究部門・主任研究員
研究者番号：70350428