

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 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591383

研究課題名（和文）がんの放射線治療によるヒト正常組織の線維化抑制の研究

研究課題名（英文）Protection from human normal tissue fibrosis induced by radiotherapy

研究代表者

本行 忠志 (Hongyo Tadashi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90271569

研究成果の概要（和文）：

がんの放射線治療の晩発性障害として、照射部位やその周辺組織に線維化が進行して、QOL 低下につながり、また、がんの発生頻度も高くなるため、その線維化を抑制する意義は大きい。

特に肺や腎臓は他の組織より低い線量で線維化が発生することが知られているため、マウスに放射線を照射し、同時に線維化を抑制すると考えられる薬剤の投与を行ったところアスコルビン酸および AHCC (Active Hexose Correlated Compound 活性化植物性多糖類関連化合物) により肺や腎組織の線維化の抑制が認められた。

研究成果の概要（英文）：

Irradiation in radiation therapy or bone marrow transplantation is known to cause damage to normal tissues. Although some substances are reported to suppress the damage(=radioprotectors), most of them have strong side effects and are not applicable *in vivo*. However, ascorbic acid and AHCC (Active Hexose Correlated Compound) are known as safe radioprotectors with antioxidant activity. While examining some radioprotectors using mice, we found that ascorbic acid and AHCC suppress fibrosis of lung and kidney caused by irradiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1300000	390000	1690000
2011 年度	1000000	300000	1300000
2012 年度	1000000	300000	1300000
年度			
年度			
総計	3300000	990000	4290000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線による線維化、放射線治療の晩発性障害、Sircol assay、Cystatin C assay、アスコルビン酸、AHCC、線維化抑制効果、マッソン・トリクローム染色

1. 研究開始当初の背景

放射線治療の後、早期障害が一時的なもの

であるのに対して、ある線量（閾値）以上、正常組織が被曝すると、数ヶ月から数年の潜伏期を経て不可逆性に、被曝組織の線維化、委縮、血管障害、神経障害、内分泌障害や成長障害等が起こり、しかもより重篤に進展していく傾向があり、QOL の低下をきたすことが多い。

放射線治療に限らず、放射線診断、原子力事故や核テロ等によっても同様の晩発性障害が起こり得るため、正常組織の線維化を防止あるいは軽減することが求められており、さらに、線維化からがんへの進行も認められるので、それらを防護できる薬剤の研究は非常に重要である。

放射線防護剤の研究は古くからなされ、Amifostine (WR-2721) 等製品化されているものもあるが、生体への毒性が強すぎるため、その使用は特殊な事態（核戦争時での兵士の防護等）に限られている。また、最近開発されたCBLB502 という防護剤は急性毒性は少ないと言われているが晩発影響については不明で、現在のところ、放射能被曝から正常人を防護するものは存在しないため、防護材の実用化は急務である。

2. 研究の目的

がん放射線治療の晩発性障害として主にがん遺伝的影響が怖れられ、広く研究されているが、より多く発生する線維化の研究はあまり進んでいない。特に肺や腎組織は比較的低い線量から線維化が始まり進行していくのでその抑制が重要となる。また、被曝組織の線維化からがんが発生することが知られており、線維化を抑制することはその組織の機能温存のみならず、がんの予防にもつながる可能性がある。

そこで、マウスの正常（特に肺・腎）組織に放射線を照射することにより、線維化を導くとともに、現在臨床で利用できる薬剤を投与することにより、がん放射線治療の際の正常組織の障害（線維化）を抑制し、最終的にがんの発生を抑制することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) X線照射

生後約4-6週のC57BL/6JマウスにX線（線量率0.88Gy/分）の照射を行った。照射は、マウスの肺、腎のみに部分照射（他の部位は遮蔽。遮へいのための位置決定にはガドリニウム造影下にMicroPet/MRI装置を使用した。）

①分割照射(2Gyx10, 2Gyx20)、

②一括照射(10Gy, 15Gy, 20Gy)

③全身一括照射(4Gy)を施行した。

それぞれの実験に8匹以上のマウスを使用

(2)ブレオマイシン(BLM)投与

肺の障害を放射線によるものと比較するため、B6マウスにBLM投与群を作り、肺の線維化を試みた。

(3)薬剤投与

放射線あるいはBLM投与前後に線維化を抑制し得ると考えられる薬剤（表1）を図3のようなタイミングで投与（皮下注射あるいは腹腔内注射）し、生食投与群、非照射群（sham radiation）と比較した。線維化は放射線による活性酸素等の刺激によって生じる慢性炎症反応の最終結果であるため抗酸化作用や抗炎症作用を有する薬剤を選んだ。

(4)マウスの観察

すべてにおいて経時的にマウスの体重を測定や毛の観察（肺や腎組織に照射するためその表面にある皮膚や毛も被曝するため）を行い、放射線照射群は6-8ヶ月後、BLM投与群は2ヶ月後にmicro CT、採血、採尿、各組織の採取を行った。

(5)HEおよびマッソン・トリクローム(MT)染色

肺および腎組織の形態学的変化や線維化の程度を観察した。

(6) Sircol assay および Cystatin C assay

マウスの肺と腎組織のSircol assay および血液、尿のCystatin C assay を行い、肺や腎の線維化や腎機能の評価を行った。

(7) ヒト正常組織の scid マウスへの移植

最終的にはヒトの正常組織での効果を確認することが重要なため、肺の手術で切除されたヒトの正常肺組織を scid マウスの両大腿部に移植して放射線照射を行った。

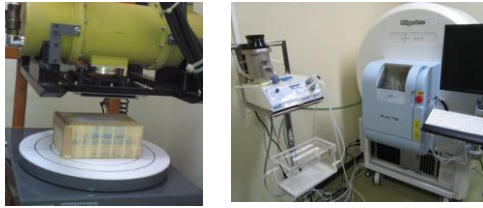
図1 マウスを入れたプラスチックチューブと遮へい鉛



照射部位以外を
1mm厚の鉛板で
巻いたチューブ

チューブの上をさ
らに3mm厚の鉛板で
遮へい

図2 X線発生装置とmicro CT



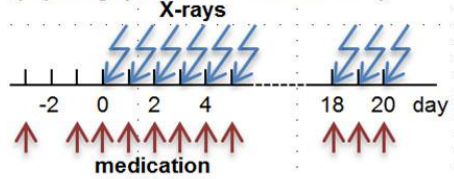
SHIMADZU
180kVp 15mA
0.5mmCu+1.0mmZn
40cm 0.88Gy/min

RIGAK UR_mCT2

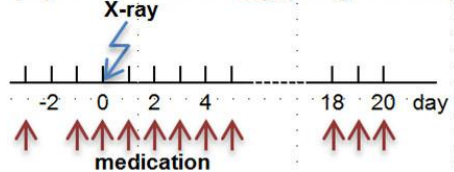
表1 線維化抑制のため使用した薬剤

商品名	一般名	販売メーカー	主な作用	1回投与用量
アスコルビン酸	ビタミンC	タケダ	抗酸化	500 μ g/gBW
AHCC	担子菌抽出エキス末	アミノアップ	免疫活性	150 μ g/gBW
SAC	S-Allyl-L-Cystein	東京化成	抗酸化	300 μ g/gBW
アンサー	結核菌熱水抽出物	ゼリア新薬	免疫活性	0.1 μ g/gBW
ピレスパ	ピルフェニドン	塩野義	抗線維化	100 μ g/gBW
リンデロン	ベタメタゾンリン酸	塩野義	抗炎症	20 μ g/gBW
ノイトロピン	ワグニアウイルス接種家 兔炎症皮膚抽出液	日本臓器	抗炎症	0.006単位/gBW
トランサミン	トラネキサム酸	タイヨー	抗炎症	500 μ g/gBW
コルヒチン	コルヒチン	塩野義	抗炎症	0.25 μ g/gBW
強オミファゲン	グリチルリチン酸	エーザイ	抗炎症	100 μ g/gBW
タチオン	グルタチオン	タイヨー	抗酸化	200 μ g/gBW

図3 放射線と薬剤投与のタイミング
(A) 2Gy (x10 or 20 fractions)



(B) 10 or 15 or 20 Gy (single dose)



4. 研究成果

図4 放射線による白髪化

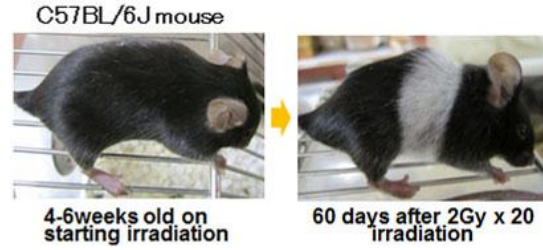


図5 腎組織のマクロ所見とミクロ所見
20Gy x 1

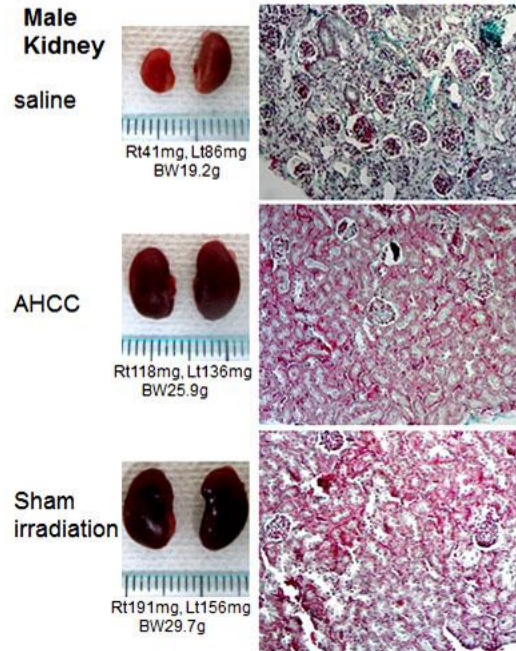


図6 肺組織のMicro CT像とMT染色

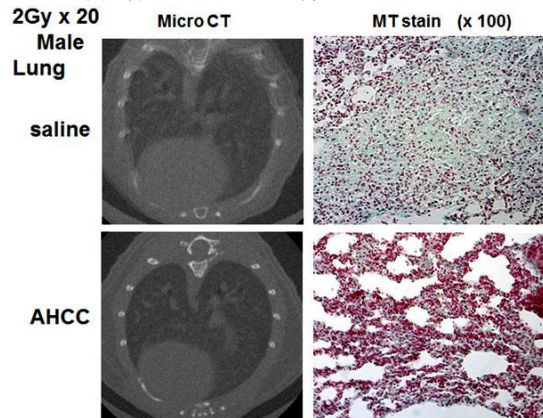


表2 腎組織の形態学的変化

Morphologic changes of the kidney

		Macroscopic change						Microscopic change					
		saline			AHCC			Asc			sham		
		D	C	B	D	C	B	D	C	B	D	C	B
2Gy x 20 (240d)	F	D	C	B	D	C	B	D	C	B	D	C	B
	M	D	B	B	D	B	B	D	B	B	D	B	B
20Gy x 1 (195d)	F	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	M	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
15Gy x 1 (195d)	F	D	C	C	D	C	C	D	C	C	D	C	C
	M	D	B	B	D	B	B	D	B	B	D	B	B
10Gy x 1 (195d)	F	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	M	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
4Gy x 1 (180d)	F	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	M	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

A: not changed compared with sham radiation cases
 B: changed slightly
 C: changed moderately
 D: changed severely

表3 肺組織のSircol assay

Sircol assay for the lung (soluble collagen (μg/mg lung))

		radiation			
		saline	AHCC	Asc	sham radiat.
2Gy x 20 (240d)	F	41.23±2.95 n=6 **	34.84±3.92 * n=8 **	35.28±3.72 * n=8 **	20.68±4.12 n=8
	M	39.20±2.55 n=7 **	33.14±3.09 * n=8 **	32.99±3.98 * n=8 **	19.33±3.84 n=8
20Gy x 10 (240d)	F	29.26±3.84 n=8 *	26.05±4.05 n=8 *	27.75±2.50 n=8 *	19.28±3.60 n=8
	M	28.30±5.69 n=8 *	24.86±2.39 n=8 *	23.20±3.28 n=8 *	18.78±2.98 n=8
20Gy x 1 (195d)	F	36.50±1.88 n=6 **	33.96±0.97 n=8 **	35.46±1.14 n=8 **	17.75±1.32 n=8
	M	35.37±1.62 n=8 **	30.50±0.61 * n=8 **	30.79±0.93 * n=8 **	16.85±1.11 n=8
15Gy x 1 (195d)	F	30.22±4.13 n=8 **	28.35±3.46 n=8 **	29.87±3.31 n=8 **	17.98±3.02 n=8
10Gy x 1 (195d)	F	21.67±4.05 n=8 **	20.23±3.85 n=8 *	18.98±2.88 n=8 **	17.56±3.12 n=8
	M	20.88±3.60 n=8 **	19.65±3.96 n=8 *	17.78±3.14 n=8 *	16.43±3.46 n=8
4Gy x 1 (180d)	F	20.31±4.15 n=8	18.79±4.01 n=8	18.22±3.58 n=8	16.20±2.98 n=8
	M	19.62±3.88 n=8	17.48±3.43 n=8	17.77±3.11 n=8	16.11±3.22 n=8

mean ±SD
 * n=N *
 left side*: significantly lower level compared with saline cases p<0.05
 left side**: significantly lower level compared with saline cases p<0.01
 right side*: significantly higher level compared with saline cases p<0.05
 right side**: significantly higher level compared with saline cases p<0.01

表4 腎組織のSircol assay

Sircol assay for the kidney (soluble collagen (μg/mg kidney))

		radiation			
		saline	AHCC	Asc	sham radiat.
2Gy x 20 (240d)	F	42.67±5.92 n=6 **	37.91±2.44 n=8 **	39.89±2.71 n=8 **	21.03±2.61 n=8
	M	41.00±10.25 n=7 **	27.13±3.70 ** n=8 **	32.16±3.69 * n=8 **	20.15±3.31 n=8
20Gy x 10 (240d)	F	34.26±3.84 n=8 **	26.05±4.05 n=8 **	27.75±2.50 n=8 **	20.38±3.80 n=8
	M	30.30±7.69 n=8 **	19.86±2.39 n=8 **	23.20±3.28 n=8 **	19.89±3.35 n=8
20Gy x 1 (195d)	F	48.23±4.99 n=8 **	44.45±5.65 n=8 **	46.88±3.38 n=8 **	24.05±7.36 n=8
	M	30.00±2.95 n=8 **	25.08±3.75 * n=8 **	24.51±2.89 * n=8 **	20.94±4.31 n=8
15Gy x 1 (195d)	F	47.51±4.75 n=8 **	37.26±3.67 n=8 **	38.63±3.61 n=8 **	21.14±3.92 n=8
10Gy x 1 (195d)	F	31.55±4.85 n=8 **	26.05±4.05 * n=8 *	27.75±2.50 n=8 **	20.38±3.80 n=8
	M	29.55±3.90 n=8 **	24.25±3.96 n=8 **	25.76±3.34 n=8 **	19.03±3.76 n=8
4Gy x 1 (180d)	F	25.33±4.66 n=8	25.21±4.21 n=8	23.54±3.56 n=8	22.23±4.53 n=8
	M	23.64±4.08 n=8	23.45±3.85 n=8	21.45±3.21 n=8	20.22±4.22 n=8

図7 腎組織のSircol assayのグラフ

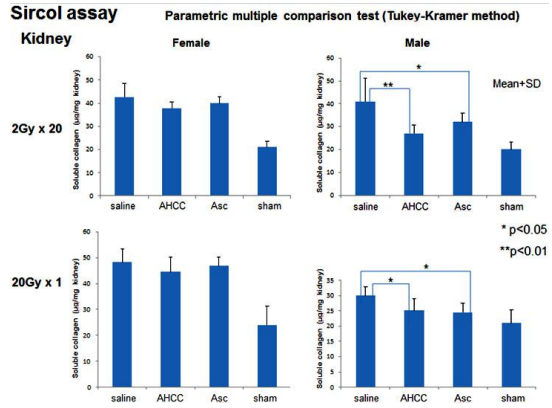


表5 血漿中のCystatin C assay

Cystatin C plasma assay (pg/ml)

		radiation			
		saline	AHCC	Asc	sham radiat.
2Gy x 20 (240d)	F	568.37±17.15 n=6 **	545.15±17.04 n=8 **	551.43±11.78 n=8 **	359.90±19.57 n=8
	M	592.3±19.93 n=7 **	561.36±17.51 ** n=8 **	563.06±14.12 * n=8 **	376.28±17.99 n=8
20Gy x 10 (240d)	F	407.6±26.25 n=8 **	393.76±19.06 n=8	392.14±21.75 n=8 **	366.15±19.92 n=8
	M	431.59±20.81 n=8 **	423.58±18.84 n=8 **	426.38±18.69 n=8 **	382.66±20.04 n=8
20Gy x 1 (195d)	F	484.94±19.89 n=6 **	479.1±16.87 n=8 **	476.08±20.67 n=8 **	347.64±19.31 n=8
	M	507.03±39.47 n=8 **	489.75±23.16 n=8 **	495.36±22.77 n=8 **	364.90±21.19 n=8
15Gy x 1 (195d)	F	437.36±30.47 n=8 **	422.28±28.11 n=8 **	424.30±23.65 n=8 **	332.94±21.53 n=8
10Gy x 1 (195d)	F	335.48±31.45 n=8	332.73±22.28 n=8	329.83±24.91 n=8	311.695±20.99 n=8
	M	356.89±27.64 n=8	354.31±31.76 n=8	351.89±25.87 n=8	343.45±21.18 n=8
4Gy x 1 (180d)	F	309.30±25.37 n=8	307.09±25.41 n=8	306.14±21.06 n=8	295.18±20.82 n=8
	M	334.21±28.99 n=8	321.84±24.68 n=8	327.98±27.76 n=8	312.91±23.03 n=8

(1) 全体的変化

- ①放射線照射群では、被曝線量が多いほど体重の増加が少ない傾向が見られた。また、被曝線量が多いほど生存率が低下した。
- ②全身投与群には胸腺および脾臓の萎縮やリンパ球数の著明な減少が見られた。

(2) 皮膚、毛の変化

総被曝線量が多くなるに従い、毛の脱顆粒(白髪)化の割合が増したが(図4)、アスコルビン酸やAHCCで軽減された。

(3) 肺、腎組織の変化

- ①15Gy以上照射群では、肺、腎組織の破壊が著明に見られた。
- ②腎組織では、被曝線量が多いほど一方の腎の萎縮が顕著に見られた。(図5)
- ③Micro CTでは、7ヶ月以上経過した肺組織において、アスコルビン酸やAHCC投与群以外の群で全肺野にわたるすりガラス様陰影や一部数珠状に拡張した気管支陰影が見られ、線維化の進行と考えられた。(図6)
- ④また、7ヶ月以上経過した肺や腎組織にはMT染色により、線維化が認められた。(図6)

⑤さらに、肺、腎組織のSircol値および血液、尿のCystatin-C値は10Gy照射以上で高値を示した。(表3、表4)

(4) 薬剤による線維化抑制効果

①放射線による線維化を抑える目的で使用した薬剤11種類(表1)のうちアスコルビン酸とAHCC以外の9種類の薬剤では、すべての項目において生食投与群と比較して有意な差を認めなかった。

②肺組織：2Gyx20 回照射群、20Gyx1 回照射群(雄のみ)においてアスコルビン酸およびAHCC投与群でSircol値の低下が見られた。

③腎組織：2Gyx20 回照射群(雄のみ)、2Gyx10 回照射群(雄のみ)、15Gyx1 回照射群(雌のみ)、10Gyx1 回照射群(雌のみ)においてアスコルビン酸およびAHCC投与群でSircol値の低下が見られた。2Gyx20 回照射群(雄のみ)、10Gyx1 回照射群(雌のみ)においてアスコルビン酸およびAHCC投与群でCystatin-C値の低下が見られた。

(5) ブレオマイシンによる変化

放射線により見られたような明らかな線維化は認められなかった。

(6) ヒト正常肺組織の scid マウスへの移植
移植片の生着は良好で、放射線照射後の継代移植も順調だが匹数制限のため効果判定に至らなかった。

結語

放射線による肺や腎組織の線維化による腎機能低下はアスコルビン酸やAHCCで抑制可能なことが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

(1) Evaluation of Human Risk in Space Environment and Its Protection ; Protection of Radiation Late Effects. Nomura T, Adachi S, Ryo H, Hatanaka E, Kikuya R, Tokita Y, Horike N, Nakajima H, Hongyo T, Fujikawa K, Itoh T, Ochiai T, Gyotoku J, Wakame K, Parida DK, Bersimbay RI. Space Utiliz Res, 28 (2012) 126-129

(2) A rapid and easy method for the qualitative detection of intracellular deposition of inhaled nanoparticles. H Nakajima, K Ozaki, T Hongyo, I Narama, T Todo. Nanomedicine. 6 (2011) 881-888.

(3) Evaluation of Human Risk in Space Environment and Its Protection. T Nomura, H Ryo, S Adachi, Y Tokita, N Horike, E Hatanaka, R Kikuya, H Nakajima, T Hongyo, K Fujikawa, T Itoh, T Ochiai, J Gyotoku, K Wakame. Space Utiliz Res, 27 (2011) 107-110.

(4) Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Tadashi Hongyo, Hiroo Nakajima, Rei Tsuboi-Kikuya, Yoriko Tokita, Fumio Matsuzuka, Keizo Hiramatsu, Kazuo Fujikawa, Tetsuo Itoh, and Taisei Nomura. Effects of fission neutrons on human thyroid tissues maintained in SCID mice, Mutation Research, 696, 107-113, 2010.

[学会発表] (計7件)

(1) Ascorbic acid and AHCC suppress fibrosis of lung and kidney caused by irradiation. T Hongyo, H Nakajima. 39th Annual Meeting of the European Radiation Research Society. pp238, Vietri sul Mare, Italy, 15-19 Oct, 2012.

(2) アスコルビン酸およびAHCCによる放射線線維化の抑制. 本行忠志, 中島裕夫 pp154 第55回日本放射線影響学会 2012年9月6日~8日仙台

(3) Taisei Nomura, Rie Kikuya, Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Eiko Hatanaka, Momoyo Kaji, Koujun Yasuda, Hiroo Nakajima,

Tadashi Hongyo, D. K. Parida, Kouji Wakame, Prevention of Cancer and Radiation Induced Disorders by Active Hexose Correlated Compound, AHCC in Mice and Humans. 第20回総合医療機能性食品国際会議 (ICNIM) (2012年7月21日、北海道)

(4) Ascorbic acid suppresses hair depigmentation caused by irradiation. T Hongyo, H Nakajima, T Todo, T Nomura. 14th Int. Cong. Radiat. Res. (ICRR), pp209, Warsaw-Poland, 28 Aug - 1 Sep, 2011.

(5) In vivo distribution of radionuclides, tumorigenicity and genome stress in mice after Chernobyl catastrophe. H Nakajima, T Saito, T Hongyo, H Ryo, T Todo, T Nomura. 14th Int. Cong. Radiat. Res. (ICRR), pp231, Warsaw-Poland, 28 Aug - 1 Sep, 2011.

(6) 吸入暴露による細胞内ナノ粒子の迅速簡便同定検出法. A rapid and easy method for the qualitative detection of intracellular deposition of inhaled nanoparticles. 中島裕夫、尾崎清和、本行忠志、奈良間功、藤堂剛、日本環境変異原学会第40回大会 要旨集 p062, (2011. 11. 21~22, 東京)

(7) 宇宙環境の人体影響評価. 野村大成、梁治子、足立成基、大平充宣、本行忠志、中島裕夫、伊藤 哲夫、藤川和男、落合俊昌、行徳淳一郎、桂 洋介、時田偉子、堀家なな緒. 宇宙利用シンポジウム (第26回)、宇宙航空研究開発機構・相模原キャンパス (相模原)、2010. 1. 25-26

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本行 忠志 (Hongyo Tadashi)
研究者番号 : 90271569

(2) 研究分担者

中島 裕夫 (Nakajima Hiroo)
研究者番号 : 20237275