

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500512

研究課題名(和文)水素貯蔵合金から放出される活性水素を利用した低侵襲型ピンポイント癌治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a minimally invasive pin-point-treatment of cancer cells utilizing active hydrogen discharged from hydrogen storage alloys

研究代表者

香川 明男(KAGAWA, akio)

長崎大学・工学研究科・教授

研究者番号：00093401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、(1)癌死滅効果に及ぼす合金組成や試料形状の影響、(2)癌細胞の死滅機構、(3)水素貯蔵合金マイクロアクチュエーターの動作特性の評価について調査した。最適合金組成はPd-5at.%Niであり、バルク状試料では試料から2-3 mmの範囲が死滅する。Pd-7at.%Fe合金は癌細胞ならびに正常細胞ともに死滅が見られたが、Pd-5at.%Fe合金では、明瞭な選択的癌死滅効果が見られた。癌細胞の死滅機構に関しては蛍光試薬を用いて検証を行った。さらに薄板状水素吸蔵合金表面へのPdコーティング、銅メッキ厚及び試料形状の最適化により曲げ変形特性が飛躍的に改善されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Three subjects have been investigated in the present work.(1) effects of composition and sample shape on the death of cancer cells, (2) the mechanism of cell death and (3) evaluation of bending motion of hydrogen storage alloy(HSA) micro-actuator. The optimum alloy composition is Pd-5at.%Ni and HeLa cancer cell death was observed in the region 2-3 mm apart from the HSA sample. In Pd-7at.%Fe alloy, the death of HeLa cancer cells and MDCK normal cells by anoikis was detected, while a selective cancer cell death was observed in Pd-5at.%Fe alloy specimen. The mechanism of the selective death of cancer cells is clarified on the basis of experiments using fluorescent reagents. The selective death of cancer cells is attributed to a lack of the enzyme, "catalase" in the cancer cells. The bending motion of micro-actuator utilizing HSA is extensively modified by Pd-sputtering and choosing an optimum sample shape.

研究分野：生体機能材料

キーワード：水素貯蔵合金 パラジウム ニッケル 鉄 癌細胞 正常細胞

1. 研究開始当初の背景

水素貯蔵合金から水素が放出される際には、合金表面において原子状水素となり、2つの原子状水素が結合して水素分子になる。このとき合金表面に現れる原子状水素は「活性水素」と呼ばれ、非常に不安定だが強い還元力を示すことが知られており、癌細胞に対して何らかの影響を及ぼすことが期待された。水素による疾病の治療効果については脳梗塞の治療に関する研究が報告されている。これは、マウスに直接水素を含むガス(2%水素)を吸入させたものであり、これまで、水素貯蔵合金を水素の発生源と捉え、癌治療技術として応用した研究は国内外に例を見ない。研究代表者らは、水素貯蔵合金から放出される水素により癌細胞が死滅する現象を見出した。水素を貯蔵させた水素貯蔵合金を HeLa 細胞(子宮頸癌細胞)および H1299 細胞(肺癌細胞)に接触させる実験を行った結果、24 時間後には水素貯蔵合金近傍の癌細胞が死滅する現象を見出した。水素を貯蔵させていない合金を用いて同様の実験を行った場合には死滅した癌細胞は観察されなかったことから、この現象は水素貯蔵合金から放出された水素が原因と考えられた。そこで、本研究では、(1) 癌死滅効果に及ぼす合金組成や試料形状の影響を明らかにするとともに、(2) 癌細胞の死滅機構の解明及び(3) 水素貯蔵合金アクチュエーターを利用した低侵襲型ピンポイント癌治療法における患部への試料の導入法としての水素貯蔵合金マイクロアクチュエーターの動作特性の評価を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 癌死滅効果に及ぼす合金組成及び試料形状の影響

アーク溶解により Pd-5,8,11at.% Ni 合金を溶製し、800 15時間の熱処理を施したのち、バルク試料は針状に加工し、粉末状試料は研

削機で削って10-30 μm の粉末状にした。ジーベルツ型平衡水素圧測定装置で圧力組成等温線(PCT曲線)を測定した。粉末試料に800 , 2 h の条件で歪取焼鈍を施し、活性化処理後、水素吸脱蔵時の水素圧の時間変化を測定して、歪取焼鈍前後の吸蔵・放出速度を比較した。放出水素の生体細胞への影響を調べるため、直径35 mmディッシュに培養した HeLa 細胞(癌細胞)および MDCK 細胞(正常細胞)に水素吸蔵合金粉末を投入し、24 h 後の細胞の変化を光学顕微鏡で観察した後、トリパンブルーで死細胞を染色し、死滅範囲を観察した。また、試料投入24, 48 h 後の癌細胞および正常細胞の生存細胞数を Cell Counting Kit-8 を用いて吸光度により測定した。また、96 wellマイクロプレートに培養した HeLa 細胞、MDCK 細胞に水素吸蔵合金粉末を投入し、24, 48 h 後の細胞生存率を CCK-8を用いて吸光度により測定した。

(2) 癌細胞の死滅機構の解明

これまでの研究から、水素貯蔵合金表面において活性水素(水素ラジカル)が発生することを吸光光度法ならびに電子スピン共鳴(ESR)法により明らかにした。また、死滅した癌細胞からは過酸化水素が発生することを蛍光試薬を用いて検証した。

これらの実験結果をもとに死滅機構に関する以下のような仮説をたて、ESRや蛍光試薬を用いて癌細胞の死滅機構の解明を試みた。

機構 $H \cdot O_2 + H_2O_2$ (細胞外)

水素吸蔵合金から放出される水素ラジカルと、生体細胞外の液体中に溶存している酸素が反応して過酸化水素を生成する。

機構 H_2O_2 (細胞外) H_2O_2 (細胞内)

過酸化水素が細胞内へ浸透する機構を考えた。一般的に、過酸化水素は細胞膜を容易に浸透して細胞内に入り込むことが知られている。ここで、水素吸蔵合金から放出される水素が生体細胞に及ぼす影響の中で、特徴

的なこととして、正常細胞と癌細胞を選択的に死滅させる効果を有することが挙げられる。そこで、正常細胞と癌細胞とを分けて死滅機構の検討を行った。

機構 -1 $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (正常細胞内で起こる反応)

正常細胞は細胞内に過酸化水素や他の活性酸素種を無毒化する酵素を有していることが知られている。そのため機構 -1 によって細胞内に入り込んだ過酸化水素は、カタラーゼのような分解酵素によって無害な水と酸素に分解されると考えられる。

機構 -2 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$

正常細胞は機構 -1 で説明したように、細胞内に酵素を有しており、活性酸素種を無毒化するが、癌細胞にはこれらの活性酸素種を無毒化する酵素を有しないことが知られている。そのため、機構 -2 に示したようにフェントン反応が起こることによって、細胞にとって最も有毒なヒドロキシルラジカルを生成し、細胞を死滅に至らしめる。

(3) ピンポイント治療のための水素貯蔵合金アクチュエーターの動作特性の評価

パラジウム (純度 99.9wt%) 及びニッケル (純度 99.99wt%) を用い、Pd-13 at.%Ni の組成に配合し、真空アーク溶解によりボタン状試料を作製した。これを圧延して厚さ 20 μm 、幅 2~5mm の薄板状に加工した。水素吸蔵合金の体積膨張を曲げ変形に変換するため、電気めっき装置で圧延試料の片面のみに銅めっきを行った。さらに、水素吸蔵合金表面を活性化させるため、20 mA、3 分間の条件で Pd スパッタコーティングを行った (厚さ約 580 \AA)。この試料を高圧ジーベルツ型平衡水素圧測定装置に接続した形状変化測定装置内に垂直に設置し、試料の変形挙動をビデオカメラを用いて観察し、試料先端の変位を読み取った。

4. 研究成果

(1) 癌死滅効果に及ぼす合金組成及び試料形状の影響

Pd-8at%Ni 及び Pd-11at%Ni の合金組成では P-C 等温線の脱蔵平衡圧が高く、水素放出圧ならびに水素放出速度が大きすぎるため癌細胞と正常細胞ともにアノイキスにより死滅することがわかった。そこで、合金組成として、Pd-5at%Ni 合金を選定した。次に、バルク試料と粉末試料の水素吸蔵・脱蔵特性を比較したところ、粉末試料の吸蔵・脱蔵速度の方が遅いことがわかった。これは、粉末試料には切削により板状試料よりも大きい加工ひずみが生じ、水素の拡散を阻害したためであると考えられる。歪取焼鈍を行うことによって水素吸蔵合金粉末の水素吸蔵・放出特性が改善されることがわかった。バルク状試料では試料から約 2 mm の範囲が死滅しているのに対し、粉末試料は試料の近傍の細胞のみが死滅することがわかった。また、針状試料では針の先端部近傍は死滅効果が見られなかった。粉末試料の細胞実験では、HeLa は 48 h では生存細胞数が減少したが、MDCK では 24, 48 h とともに H(-) (水素未吸蔵試料) よりも生存細胞が増加しており、放出水素には癌細胞のみに死滅効果があるが、正常細胞には悪影響を及ぼさないという選択的死滅効果があることが知られた。粉末のように回収が困難な形状であると、人体に有害な Ni の溶出が懸念される。水素吸蔵合金試料をメディウム溶液に半年浸漬した後の溶液の ICP 分析よりニッケルイオンの溶出が見られた。そこで Ni の代替元素として、生体適合性の点から人体での許容量の大きい Fe を選定し、Pd-Fe 合金の癌細胞ならびに正常細胞への効果を細胞実験により調べた。Pd-7at.%Fe 合金は水素の放出速度が大きく、容器底からの細胞の剥離によるアノイシスにより両細胞ともに死滅が見られた。水素放出圧を低下

させた Pd-5at.%Fe 合金では，癌細胞のみが死滅する明瞭な選択的癌細胞死滅効果が見られた。

(2) 癌細胞の死滅機構の解明

蛍光試薬を用いて，癌細胞の死滅機構の検証を行った。それより，次の機構が明らかになった。まず，水素吸蔵合金からの水素ラジカルと溶存酸素の反応により過酸化水素が細胞外で発生し，それが細胞中に取り込まれる。正常細胞では酵素（カタラーゼ）により過酸化水素は分解されるため影響を受けないが，カタラーゼ活性が低い癌細胞では過酸化水素あるいはそれから生じるヒドロキシルラジカルが癌細胞を死滅させる。

(3) ピンポイント治療のための水素貯蔵合金アクチュエーターの動作特性の評価

水素貯蔵合金表面へのPdコーティングにより，曲げ変形速度は飛躍的に増大した。また，銅メッキ厚が薄いほど，曲げ変形速度は増大することがわかった。次に，最適試料形状について検討した。長さ/幅比が小さくなると，幅方向の変形が長さ方向の曲げ変形を阻害するようになる。図12より，幅方向の変形の影響を受けない短冊状試料の臨界アスペクト比は約5であることがわかった。また，導入水素圧の調整により変位の制御が可能であることを明らかにした。サイクル特性は初期に変位量の減少が見られたが，サイクル数の増加とともに一定になる傾向が見られた。これより，マイクロ化の指針が得られた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計3件）

M. Matsuzaki, A. Kagawa, A. Motoishi, K. Tanaka, M. Yamamoto and Y. Tagawa, Mechanism of Cancer Cell Death Induced by Hydrogen Discharged from Palladium Base Hydrogen Storage Alloy, Adv. Mater.

Res, Vol.699, pp.284-290 (2013). 査読有

A. Motoishi, A. Kagawa, M. Matsuzaki, K. Tanaka, M. Yamamoto and Y. Tagawa, Influence of Active Hydrogen Discharged from Palladium-Nickel Alloy Powder on Biological Cells, Adv. Mater. Res, Vol.699, pp.273-278 (2013). 査読有

A. Kagawa, K. Taniguchi and M. Yamamoto, Designs for miniaturization of bending actuator utilizing hydrogen storage alloy, J. Alloy. Compd., Vol.563, pp.203-206 (2013). 査読有

〔学会発表〕（計9件）

香川明男，水素吸蔵合金の応用 - 水素駆動アクチュエータと水素を利用した新規癌治療法の開発 - ，日本金属学会九州支部 秋期講演会 本多記念講演会，長崎大学（長崎県・長崎市），2013年10月

久保昇之，本石藍子，山本将貴，大貝 猛，香川明男，Pd-Fe水素吸蔵合金からの放出水素の生体細胞への影響，日本金属学会 第153回秋期講演大会，金沢大学（石川県・金沢市），2013年9月

久保昇之，山本将貴，大貝 猛，香川明男，“Pd-Fe水素吸蔵合金からの放出水素による生体細胞への影響”平成25年度日本金属学会・日本鉄鋼協会・軽金属学会九州支部合同学術講演大会，講演概要集A15，くまもと県民交流館パレア（熊本県・熊本市），2013年6月

M. Matsuzaki, A. Kagawa, A. Motoishi, K. Tanaka, M. Yamamoto, Y. Tagawa, “Mechanism of Cancer Cell Death Induced by Hydrogen Discharged from Palladium

Base Hydrogen Storage Alloy”, MSCE 2013, Singapore (Republic of Singapore), February 2013.

A. Motoishi, A. Kagawa, M. Matsuzaki, K. Tanaka, M. Yamamoto, Y. Tagawa, “Influence of Active Hydrogen Discharged from Palladium-Nickel Alloy Powder on Biological Cells”, MSCE 2013, Singapore (Republic of Singapore), February 2013.

本石藍子, 山本将貴, 大貝 猛, 香川明男, “パラジウム系水素吸蔵合金粉末からの放出水素の癌細胞死滅効果” 日本金属学会 第151回秋期講演大会, 愛媛大学(愛媛県・松山市), 2012年9月

高田慎也, 山本将貴, 大貝 猛, 香川明男, パラジウム系水素吸蔵合金アクチュエータ用回転モジュールの動作特性, 日本金属学会 第151回秋季講演大会, 愛媛大学(愛媛県・松山市), 2012年9月

本石藍子, 山本将貴, 大貝 猛, 香川明男, “パラジウム系水素吸蔵合金粉末の生体細胞への影響” 平成24年度日本金属学会日本鋼協会・軽金属学会九州支部合学会・日本鉄鋼協会・軽金属学会九州支部合同学術講演大会, 講演概要集p.17, 北九州国際会議場(福岡県・北九州市), 2012年6月

A. Kagawa, K. Taniguchi, Y. Kubo, Mizumoto and T. Ohgai, Bending Motion of a Miniature Actuator Utilizing Hydrogen Storage Alloy, Proc. ACTUATOR 2012, pp.700-703, Bremen (Germany), June 2012.

{ その他 }
ホームページ等

<http://www.cms.nagasaki-u.ac.jp/lab/soshiki/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

香川明男 (KAGAWA, Akio)

長崎大学・工学研究科・教授

研究者番号 : 0 0 0 9 3 4 0 1

(4)研究協力者

山本将貴 (YAMAMOTO, Masataka)

長崎大学・工学研究科・助教