様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ５ 月 ２４ 日現在

機関番号：１１３０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2015
課題番号：２６５６０２５２

研究課題名（和文）薬剤伝達技術を併用した化学粒子線治療技術の開発および最適化

研究課題名（英文）Development and optimization of ion-beam therapy combined with drug-delivery system

研究代表者
寺川　貴樹（Terakawa, Atsuki）

東北大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：１０２５０８５４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：シスプラチン内包高分子ミセル（CDDP）を用いた化学療法と陽子線治療を融合した化学粒子線治療技術の開発を目的として、担がんマウスによる治療実験を実施した。実験の結果、陽子線の単独治療やCDDPの単独治療に比べて、併用治療では、腫瘍増殖遅延効果を増強することが示された。また、その効果は相加的であることが認められた。一方、腫瘍組織および正常組織内におけるCDDP薬剤濃度を、粒子誘起X線放射（PIXE）法を用いて分析し評価した結果、CDDPの正常組織へ送達は抑制的であり、腫瘍血流を通じて腫瘍組織へCDDPが選択的に送達され、併用治療において顕著な増殖遅延をより低副作用で誘発することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We performed therapeutic experiments using tumor-bearing mice to develop proton therapy combined with chemotherapy using cisplatin incorporated polymeric micelles (CDDP). The experimental results showed that the combined-treatment increased the tumor growth delay additively compared to proton therapy alone or chemotherapy with CDDP alone. The concentrations of CDDP in the samples of the tumor and normal tissues were evaluated using particle-induced X-ray emission (PIXE) analysis. We found that the concentration of CDDP in the tumor tissue was much higher than that in the normal tissue. Judging from the results of the therapeutic experiments and the PIXE analysis, it is suggested that CDDP was selectively delivered to the tumor tissue by the tumor blood flow, and that proton therapy combined with chemotherapy with CDDP induced the significant tumor growth delay with lower side-effects.

研究分野：放射線医工学

キーワード：粒子線治療　PIXE分析

１．研究開始当初の背景

近年、放射線治療において、X 線よりも腫瘍への線量集中性がすぐれ細胞致死効果が高い粒子線治療が注目されている。粒子線治療には、現在、炭素線治療と陽子線治療があり、特に炭素線治療により、放射線抵抗性の難治癌の治療が可能となったが、大型加速器や照射装置など大規模な治療施設が必要となり、普及への大きな問題となっている。陽子線治療は比較的小型の加速器・照射システムにより経費を抑えることができるが、生物学的効果は X 線をやや上回る程度で、放射線抵抗性腫瘍に対する治療には、X 線同様に限界がある。

一方、化学療法では、抗がん剤を腫瘍組織にのみ効率的に伝達して、抗腫瘍効果を低副作用で誘発するナノサイズの高機能薬物運搬体（ドラッグキャリア）を用いる、ドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発が注目されている。しかしながら、一般に、腫瘍細胞には薬剤耐性の問題や、腫瘍血管が未発達な腫瘍組織部分へ必ずしも十分な薬剤伝達が行われないなど、抗がん剤単独での完治が困難な状況は解決されたわけではない。

したがって、それぞれの単独治療法の特性を最大限に活用し、同時にそれらの問題点を克服しうる集学的な治療技術の開発が望まれている。

２．研究の目的

上記の研究背景をもとに、本研究では、ブラッグピークによる深部線量分布をもとに、腫瘍への線量集中が可能な陽子線による高精度照射技術と、ナノメートルサイズの薬物運搬体を用いて腫瘍組織内の抗がん剤濃度を低副作用で高めることができる DDS 技術を併用した集学的治療法により、放射線抵抗性腫瘍にも適用可能な新規化学陽子線治療技術の開発を目指す。陽子線照射は、腫瘍の３次元形状に一致した高線量域を形成するためにスポットビームスキャニング照射技術と、照射位置を実時間で１ミリ以下の高精度でモニター可能な新規ビームモニター技術を開発する。また、DDS としては、正常血管と腫瘍血管の構造上の違いを利用して、抗がん剤の正常組織への送達を抑制し、さらに EPR(Enhanced Permeability Retention)効果を利用して腫瘍組織に選択的に運搬・集積されるように設計された、抗がん剤シスプラチンを含有したナノメートルサイズのミセル製剤を用いる。治療実験は、腫瘍を移植したマウスを用いた動物実験を実施し、治療効果の検証を行う。

３．研究の方法

本研究の治療実験は、東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター（CYRIC）にて行われた。治療実験は、CYRIC の大型サイクロトロンによって加速された 80 MeV の陽子線と、マウス等の小動物を用いた粒子線治療実験装置を用いて実施された。スポットビームスキャニング法による陽子線照射では、約１㎝程度の大きさのマウス腫瘍を１㎜以下の精度で高精度に照射する。その精度に対応した実時間ビームモニターシステムを開発する。粒子線治療のビームモニターは、通常はマルチワイヤー型のガス検出器であるが、高空間分解能、高ガス増幅に対応可能な Gas electron multiplier (GEM)を用いたマイクロパターンガス検出器（MPGD）方式による新規粒子線治療モニターを開発し、陽子線照射によるビームテストを実施した。

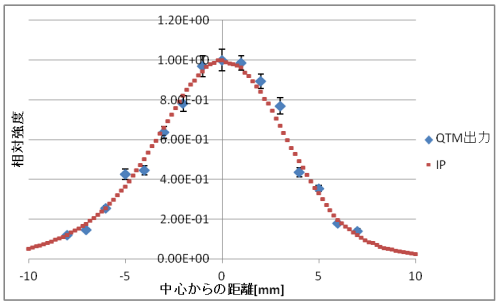
治療実験では、C3H/HeSlc マウスの 8 から 12 週齢のオスの後脚に、マウス由来 NFSa 線維肉腫細胞 1×10^6/50 μL を移植した。治療条件は、比較対照の無治療コントロール群、陽子線単独治療群、抗がん剤単独治療群、陽子線と抗がん剤併用治療群を設定した。抗がん剤としては、シスプラチンを内包した高分子ミセル型の DDS 製剤（CDDP）を使用した。DDS のサイズは、約 50 ナノメートルである。移植腫瘍の直径が約 10 mm に到達を確認し実験を実施した。陽子線線量は、コントロールと有意な腫瘍増殖遅延効果がある 15 Gy とその２倍高線量の 30 Gy のいずれも単回照射を、CDDP については、尾静脈からの単回投与（10 mg/kg）を行った。治療後の腫瘍体積計測をもとに、腫瘍縮小による増殖遅延を評価し、各治療群における抗腫瘍効果を比較した。

また、腫瘍内の抗がん剤濃度分布を、Particle-induced X-ray emission（PIXE）法を用い評価した。PIXE 法では、薬剤濃度の定量のため内部標準法を用いた通常の PIXE 分析と、0.5 mm 径のビームスキャンによって薬剤の組織内空間分布を評価するサブミリ PIXE 分析を行った。分析試料として、薬剤投与 24 時間後に当該治療群のマウスから摘出された腫瘍を用いた。内部標準法による元素濃度定量評価のため、腫瘍サンプルに内部標準元素としてインジウム(1000 ppm)を加えて硝酸灰化法により通常 PIXE 分析による定量用サンプルを作成した。一方、サブミリ PIXE 用のサンプルとして、250 μm 厚の腫瘍切片がクライオスタットを用いて作成された。通常 PIXE 分析は、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のサイクロトロン加速器および真空 PIXE 分析システムを用いて行われた。サブミリ PIXE 分析は、東北大学　高速中性子実験施設のダイナミトロン加速器およびサブミリ PIXE 分析システムを用いて行われた。

さらに、ナノサイズの DDS 製剤が狙い通りに腫瘍血管を経由して腫瘍内に伝達されることを事前に確認するために、100 nm 以下のサイズの量子ドットを用いた模擬実験を実施し、腫瘍内の量子ドットを蛍光顕微鏡で観察した。

４．研究成果

図１に MPGD 粒子線モニターによる陽子線のビームプロファイル測定結果とイメージングプレート（IP）による測定結果の比較を示す。この結果は陽子線の 2 次元ビーム強度分布の X（水平方向）成分を示しており、Y（垂直方向）成分も同様に得られている。粒子線モニターの結果は IP の結果と一致し、治療に用いる陽子線の照射位置と照射によって付与される線量の分布を実時間で高精度に評価可能であることが確認された。よって、MPGD 粒子線モニターの出力データを用いることで、高精度に陽子線照射を制御可能となった。



QTMの積算出力による相対強度分布とIPから得た相対強度分布(補正後)

図１　MPGD 粒子線モニターによるガウス分布状の陽子線ビームプロファイル測定結果（QTM 出力）。IP は比較のためのイメージングプレートを用いた測定結果である。

図２に各治療群の腫瘍体積変化を示す。治療効果は、腫瘍増殖遅延効果に基づいて評価した。本研究では、腫瘍増殖遅延は単回治療後に腫瘍体積が治療開始時の体積の 4 倍に到達するまでの日数とした。陽子線の単独治療（15 Gy と 30Gy 照射）では、線量依存的に増殖遅延効果は増大し、CDDP 治療と陽子線治療（30Gy）の併用治療では、陽子線単独治療の腫瘍増殖遅延をさらに増大させる効果が確認された。また、CDDP 10 mg/kg の単独治療の結果も含めて評価すると、併用治療における腫瘍増殖遅延効果は相加的なものと判断された。

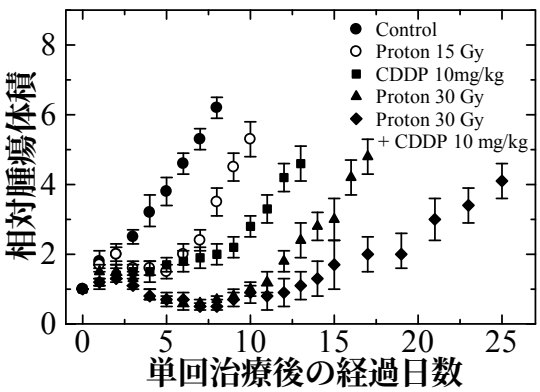


図２　各治療群における腫瘍増殖遅延効果の比較。単回治療日を 0 日とする。各治療群の腫瘍数はいずれも 5 である。データ点と誤差棒は、腫瘍体積の平均値と標準誤差をそれぞれ表す。

腫瘍組織内の DDS 製剤が送達されることを事前に確認するために実施した、量子ドットの腫瘍組織への送達実験腫瘍サンプルの蛍光顕微鏡画像を図３に示す。100 nm 以下のサイズの量子ドットが腫瘍血管を通して腫瘍組織内に送達されることが確認された。

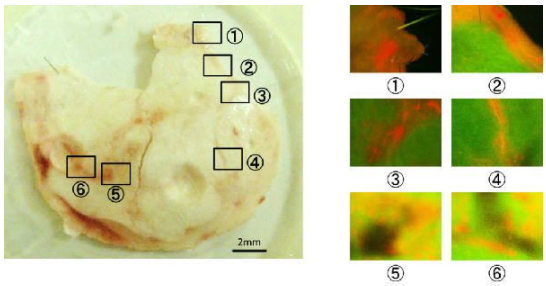


図３　腫瘍組織内に送達された量子ドットの蛍光顕微鏡画像。腫瘍の写真および蛍光画像の番号はそれぞれ対応する領域を示す。赤い蛍光を発している領域に量子ドットが存在する。

腫瘍組織および正常組織サンプルの PIXE 分析から評価された CDDP の空間濃度分布を図４に示す。腫瘍組織では CDDP が一様に高濃度で分布しており、一方、正常組織では CDDP の濃度が低いことが確認された。この結果は、DDS の狙い通り、CDDP が腫瘍組織に選択的に送達されていることを示し、その結果、抗がん剤による副作用が従来よりも低減されることが期待される。

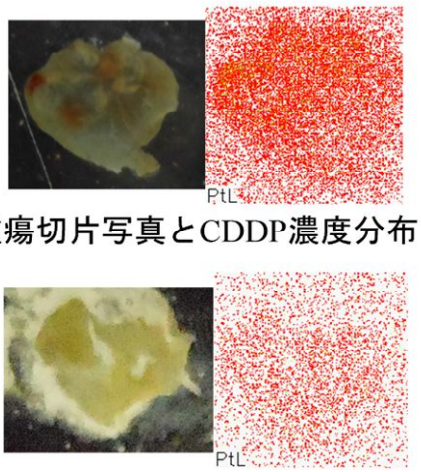


図４　腫瘍組織切片と正常組織切片内のサブミリ PIXE 法により取得された抗がん剤の濃度分布画像。

本研究の治療実験で得られた腫瘍増殖遅延効果と、腫瘍および正常組織の PIXE 分析結果を総合的に評価すると、DDS 製剤の CDDP と陽子線治療の集学的治療では、各々の単独治療よりも治療効果を相加的に増強するとともに、従来の抗がん剤治療の副作用が低減されることが期待される。

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２件）

1. A. Terakawa, K. Ishii, S. Matsuyama et al., A micro-pattern gaseous detector for beam monitoring in ion-therapy, 査読有, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 365 (2015) 606-610.

2. A. Terakawa, K. Ishii, S. Matsuyama, Y. Kikuchi et al., Concentration of cisplatin-incorporated polymeric micelles in a murine solid tumor evaluated using PIXE analysis, 査読有, International Journal of PIXE, 24 (2014) 41-47.
DOI:10.1142/S0129083514500053

〔学会発表〕（計１件）

1. TERAKAWA Atsuki, ISHII Keizo, MATSUYAMA Shigeo, TOGASHI Takanori et al. A micro-pattern gaseous detector for beam monitoring in ion-therapy, Swift heavy ion in matter 2015, 2015年５月18～21日、ダルムシュタット市、ドイツ

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
寺川　貴樹（TERAKAWA,ATSUKI）
東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：10250854

(2)研究分担者
松山　成男（MATSUYAMA,SHIGEO）
東北大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：70219525

(3)連携研究者
（　　）

研究者番号：