

令和元年5月16日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19798

研究課題名(和文)放射線肺臓炎の新たな予測方法の開発

研究課題名(英文)Development of new methods to predict occurrence of radiation pneumonitis

研究代表者

高橋 重雄(Takahashi, Shigeo)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90635773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：前向き臨床研究として「健常ボランティアにおける呼気凝縮液採取に関する研究」を実施した。全例に必要な量の呼気凝縮液を採取でき、採取前後のバイタルサインに大きな変動はなく、安全に研究を実施できた。

探索的な前向き観察研究として「呼気凝縮液中のTGF- β 1濃度と放射線肺臓炎の発生状況に関する調査」を実施している。最終結果ではないため参考値にはなるが、肺癌患者においても呼気凝縮液を安全に採取できる可能性、放射線治療によって呼気凝縮液内の総タンパク質濃度やTGF- β 1濃度が上昇する可能性、呼気凝縮液内のTGF- β 1濃度高値とGrade 2の放射線肺臓炎が関連している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

直接的に肺や気道のTGF- β 1を測定できる検体として気管支肺胞洗浄液があるが、放射線肺臓炎に関連する臨床研究の近年の報告はなく、採取の侵襲性の高さが一因ではないかと推察される。一方、しんどい思いをせずに気道の炎症物質を測定できる検体として呼気凝縮液があるが、放射線肺臓炎に関連する研究で呼気凝縮液が用いられた報告はない。今回はじめて、放射線治療によって呼気凝縮液内の総タンパク質濃度やTGF- β 1濃度が上昇する可能性、呼気凝縮液内のTGF- β 1濃度高値とGrade 2の放射線肺臓炎が関連している可能性が示唆されたため、本研究の成果は新たな知見として意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I performed a prospective clinical study entitled 'Exhaled breath condensate (EBC) collection in normal healthy volunteers'. An adequate amount of EBC was collected from all subjects. Changes in vital signs were little among the collection in all subjects. Therefore, EBC collection in my procedures seems to be feasible and safe. Then, a prospective observational study entitled 'Relationship between radiation pneumonitis and TGF- β 1 concentration in EBC' is under way. In an interim analysis, it seems that (1) EBC collection in my procedures may be feasible and safe in patients with lung cancer, (2) total protein and TGF- β 1 concentration in EBC may increase by radiation therapy, and (3) a high value of TGF- β 1 concentration in EBC may relate to occurrence of Grade 2 radiation pneumonitis.

研究分野：放射線科学

キーワード：放射線肺臓炎 呼気凝縮液

1. 研究開始当初の背景

局所進行肺癌に対する標準治療は化学放射線療法であるが、未だ満足する治療成績を得られていない。理由として肺癌の特性だけでなく、有害事象の中でも致死的な転帰をとり得る放射線肺臓炎の影響が挙げられる。本邦からの2014年の報告では、化学放射線療法を受けた肺癌患者の11.4%が重症な、2.5%が致死的な放射線肺臓炎を発症している(Tsujino K, *J Thorac Oncol*, 2014)。同報告では重症放射線肺臓炎を発症した患者の71.4%が(1)年齢 68歳、(2)治療前の蜂窩肺の存在、(3)20Gy以上照射される正常肺の体積 26%、(4)5Gy以上の照射を免れた正常肺の体積 < 1500cc の4つの因子を有しており、これらの因子を組み合わせることで重症放射線肺臓炎の予測能が向上するかもしれないと結論付けられている。上記の知見に異なるアプローチとして肺や気道から産生される炎症物質の因子を加えることができないかと考え、本研究を着想した。

放射線肺臓炎の経過において、炎症物質であるTGF- β 1が中心的に関与している。直接的に肺や気道のTGF- β 1を測定できる検体として気管支肺胞洗浄液があり、ステロイド治療を要する放射線肺臓炎患者の気管支肺胞洗浄液中でTGF- β 1濃度が高かったと報告されている(Barthelemy-Brichant N, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004)。しかしながらこの報告以降、動物実験レベルの研究は進められているが、患者を対象とした臨床研究の報告はなく、気管支鏡検査を要する気管支肺胞洗浄液採取の侵襲性の高さが一因ではないかと推察される。そこで、患者がしんどい思いをせずに気道の炎症物質を測定できる検体があれば気管支肺胞洗浄液の知見を発展させていくことが可能ではないかと考え、その条件に合致する検体として呼気凝縮液に着目し(Horvath I, *Eur Respir J*, 2005)本研究に用いることとした。

呼気凝縮液は安静換気時の呼気を冷却し凝縮した液体を採取したもので、呼吸により気道に生じる乱流によりエアロゾル化された気道被覆液が含有され、気管支肺胞洗浄液の約1/10の濃度の物質が含有される。呼気凝縮液中の物質の検出に関しては、TGF- β 1、IL-6、IFN- γ 、TNF- α をはじめとする種々の炎症物質の測定が可能であり(Kubán P, *Anal Chim Acta*, 2013)呼気凝縮液はTGF- β 1を用いた本研究の遂行に耐え得る検体であると考えた。

2. 研究の目的

放射線肺臓炎患者を対象とした研究で呼気凝縮液が用いられた報告はないため、放射線肺臓炎患者における呼気凝縮液中のTGF- β 1濃度が測定可能かどうかを確認し、呼気凝縮液中のTGF- β 1濃度の推移と放射線肺臓炎の発症に関連があるかどうかを調査し、従来の予測因子と組み合わせることで、より確実に発症を予測できる方法を探索することを、本研究の目的とする。

3. 研究の方法

3つの段階に分けて、順に研究を遂行した。

(1) 安定して呼気凝縮液を採取するための実験系の確立

呼気凝縮液採取時間として推奨されている10分間で、呼気凝縮液採取器具のアールチューブ(Respiratory Research社)を用いて採取される呼気凝縮液の量は1.4-1.7cc(中央値1.6cc)であった。1cc以上を採取できており、採取時間の延長や採取器具の変更は不要であると判断した。

唾液採取器具としてSaliva collection aid(Salimetrics社)を用いて唾液採取を試みたが、採取困難であった。採取器具をサリベットコットン(Sarstedt社)に変更し、唾液を採取できるようになった。EnzyChromTM-Amylase Assay Kit(BioAssay System社)を用いて唾液内のアミラーゼ活性が測定可能であった。呼気凝縮液にアミラーゼ活性はなく、本研究の採取方法で呼気凝縮液内に唾液の混入がないことを確認した。

Nano Orange Protein Quantitation Kit(Life technologies社)を用いて呼気凝縮液内の総タンパク質濃度の測定を試みた。コントロールの総タンパク質濃度は測定可能で再現性をもって検量線を作成できたが、呼気凝縮液内の総タンパク質濃度は測定できなかった。試薬をBradford Reagent(Sigma-Aldrich社)に変更し、本試薬でも同様に再現性をもって検量線を作成できたが、呼気凝縮液内の総タンパク質濃度は1度測定できたのみ(1.36 μ g/mL)で、再現性がなかった。試薬キットをQuantiPro BCA Assay Kit(Sigma-Aldrich社)に変更し、コントロールの総タンパク質濃度は測定可能で、再現性をもって検量線を作成できた。呼気凝縮液内の総タンパク質濃度も測定できたが、再現性がなかった。インキュベーション方法を変更し、再現性をもって呼気凝縮液内の総タンパク質濃度を測定できるようになった。

既に香川大学医学部倫理委員会承認されていたが、上記の通り再現性の確立に難渋していたため実施できていなかった「健常ボランティアにおける呼気凝縮液採取に関する研究」の研究期間延長を申請し、承認されたため、前向き臨床研究として実施した。

(2) 呼気凝縮液中の TGF- β 1 濃度の測定に関する実験系の確立

Human Transforming Growth Factor Beta Detection ELISA Kit (Chondrex 社) を用いて呼気凝縮液内の TGF- β 1 濃度の測定を行った。再現性をもって検量線を作成でき、呼気凝縮液内の TGF- β 1 濃度を測定できた。

(3) 呼気凝縮液中の TGF- β 1 濃度と放射線肺臓炎の発症に関連があるかどうかを調査し、従来の予測因子と組み合わせることで、より確実に発症を予測できる方法の探索

探索的な前向き観察研究として「呼気凝縮液中の TGF- β 1 濃度と放射線肺臓炎の発生状況に関する調査」の研究計画書を作成し、香川大学医学部倫理委員会の承認を得て、予定症例数 10 例の登録を開始した。現在、5 例から研究参加の文書同意を得ており、1 例が呼気凝縮液の採取前、4 例が採取を完了し経過観察中の状況である。今後も予定症例数に到達するまで登録・採取・経過観察を継続し、確実に研究を完了する所存である。

4. 研究成果

「健常ボランティアにおける呼気凝縮液採取に関する研究」

呼気凝縮液の量は全例で 1cc 以上を採取できた(平均 1.4cc、中央値 1.3cc、範囲 1.2-1.9cc)。呼気凝縮液内の総タンパク質濃度を 9 例で測定でき、1 例で検出されなかった(平均 1.1 μ g/ml、中央値 0.66 μ g/ml、範囲 0.33-5.03 μ g/ml)。

全例で呼気凝縮液内に唾液の混入はなかった。

呼気凝縮液採取前後の収縮期血圧(変化量の平均-1mmHg、中央値-1mmHg、範囲-7-+8mmHg)、拡張期血圧(変化量の平均 \pm 0mmHg、中央値-1mmHg、範囲-5-+10mmHg)、脈拍(変化量の平均+1bpm、中央値-1bpm、範囲-2-+9bpm)および経皮的酸素飽和度(SpO₂)(変化量の平均 \pm 0%、中央値 \pm 0%、範囲-3-+2%)に大きな変動はなく、全例で安全に研究を実施できた。

「呼気凝縮液中の TGF- β 1 濃度と放射線肺臓炎の発生状況に関する調査」

採取を完了し経過観察中の 4 例に関する成果を記す。

放射線治療開始前(以下、開始前)と照射完遂 1 ヶ月後(以下、1 ヶ月後)に呼気凝縮液を採取した。開始前の呼気凝縮液の量は平均 1.2cc、中央値 1.2cc、範囲 0.8-1.4cc であった。1 例で 1cc を下回ったが、TGF- β 1 濃度や総タンパク質濃度の測定に可能な量を採取できていた。1 ヶ月後の呼気凝縮液の量は平均 1.3cc、中央値 1.3cc、範囲 0.9-1.6cc であった。開始前と同様に 1 ヶ月後においても 1 例で 1cc を下回ったが、TGF- β 1 濃度や総タンパク質濃度の測定に可能な量を採取できていた。

開始前の呼気凝縮液採取前後の収縮期血圧(変化量の平均-21mmHg、中央値-20mmHg、範囲-31--12mmHg)、拡張期血圧(変化量の平均-7mmHg、中央値-7mmHg、範囲-14-+1mmHg)、脈拍(変化量の平均-6bpm、中央値-6bpm、範囲-13- \pm 0bpm)および経皮的酸素飽和度(SpO₂)(変化量の平均-1%、中央値-1%、範囲-1- \pm 0%)であった。1 ヶ月後の呼気凝縮液採取前後の収縮期血圧(変化量の平均-1mmHg、中央値+2mmHg、範囲-13-+6mmHg)、拡張期血圧(変化量の平均+5mmHg、中央値+3mmHg、範囲-2-+14mmHg)、脈拍(変化量の平均-4bpm、中央値-3bpm、範囲-8- \pm 0bpm)および経皮的酸素飽和度(SpO₂)(変化量の平均 \pm 0%、中央値 \pm 0%、範囲-1- \pm 0%)であった。開始前・1 ヶ月後ともに呼気凝縮液採取前後のバイタルサインの数値の変動は健常ボランティアよりも大きかったが、バイタルサインの数値自体は許容範囲内であり、最終結果ではないため参考値にはなるが、肺癌患者においても呼気凝縮液を安全に採取できる可能性が示唆された。

開始前の総タンパク質濃度を全例で測定でき、平均 1.9 μ g/ml、中央値 1.8 μ g/ml、範囲 1.1-2.8 μ g/ml であった。1 ヶ月後の総タンパク質濃度も全例で測定でき、平均 5.5 μ g/ml、中央値 3.6 μ g/ml、範囲 1.0-13.9 μ g/ml であった。1 ヶ月後の総タンパク質濃度の平均が健常ボランティアの最大値を超えており、最終結果ではないため参考値にはなるが、放射線治療によって呼気凝縮液内の総タンパク質濃度が上昇する可能性が示唆された。

TGF- β 1 濃度に関しては、開始前・1 ヶ月後ともに全例で測定でき、開始前は平均 172.7pg/mL、中央値 197.9pg/mL、範囲 0.1-295.1pg/mL で、1 ヶ月後は平均 275.0pg/mL、中央値 273.1pg/mL、範囲 72.1-481.7pg/mL であった。1 ヶ月後の TGF- β 1 濃度の平均や中央値が開始前の最大値に近く、最終結果ではないため参考値にはなるが、放射線治療によって呼気凝縮液内の TGF- β 1 濃度が上昇する可能性が示唆された。

現時点で 1 例に Grade 2 の放射線肺臓炎を認めている。この症例の TGF- β 1 濃度は開始前・1 ヶ月後ともに被験者中最高値を呈しており、最終結果ではないため参考値にはなるが、呼気凝縮液内の TGF- β 1 濃度高値と Grade 2 の放射線肺臓炎が関連している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- (1) Takahashi S, Go T, Anada M, et al. Comparison between stereotactic and conventional radiotherapy for solitary lung tumor after resection of lung cancer. *Anticancer Res.* 2019. 査読有.
- (2) Takahashi S, Anada M, Kinoshita T, et al. Differences in gross tumor volumes for pancreatic cancer: A comparison of ungated positron emission tomography and contrast-enhanced four-dimensional computed tomography. *Jpn J Radiol.* 2019;37(4):336-340. doi: 10.1007/s11604-019-00812-8. 査読有.
- (3) Takahashi S, Tarumi S, Nakano J, et al. Definitive concurrent chemoradiotherapy in a patient with stage IV non-small cell lung cancer due to cervical lymph node metastases. *Int Cancer Conf J.* 2018; 7(4):131-133. doi: 10.1007/s13691-018-0335-0. 査読有.
- (4) Takahashi S, Anada M, Kinoshita T, et al. Respiratory motion of lymph node stations in pancreatic cancer: analyses using contrast-enhanced four-dimensional computed tomography. *Radiother Oncol.* 2018;128(3):569-574. doi: 10.1016/j.radonc.2018.05.007. 査読有.
- (5) Takahashi S, Go T, Kasai Y, et al. Relationship between dose-volume parameters and pulmonary complications after neoadjuvant chemoradiotherapy followed by surgery for lung cancer. *Strahlenther Onkol.* 2016;192(9):658-667. doi: 10.1007/s00066-016-1021-9. 査読有.
- (6) Takahashi S, Murakami Y, Imano N, et al. Long-term results after 12-year follow-up of patients treated with whole-breast and boost irradiation after breast-conserving surgery. *Jpn J Radiol.* 2016; 34(9):595-694. 査読有.
- (7) Takahashi S, Miyashita T, Hoshikawa H, et al. Accelerated hyperfractionated radiotherapy for small cell carcinoma of the nasopharynx. *Head Neck.* 2015; 37(5):E63-E65. doi: 10.1002/hed.23888. 査読有.

〔学会発表〕(計15件)

- (1) Takahashi S, et al. Feasibility of Hippocampal Dose-Volume Parameters Associated with Cognitive Decline in Intensity-Modulated Radiation Therapy for Supratentorial Tumors. 第78回日本医学放射線学会総会. 2019.
- (2) 高橋重雄ら. 非小細胞肺癌に対する術前化学放射線療法中の腫瘍体積縮小と病理学的完全奏功に関する検討. 第59回日本肺癌学会学術集会. 2018.
- (3) Takahashi S, et al. Feasibility of Hippocampal Dose-volume Parameters Associated with Memory Decline in Volumetric Modulated Arc Therapy for Supratentorial Tumors. American Society for Radiation Oncology 60th Annual Meeting. 2018.
- (4) 高橋重雄ら. Visual feedback法を用いた呼吸停止時の標的位置再現性に関する検討. 日本放射線腫瘍学会第31回学術大会. 2018年
- (5) Takahashi S, et al. Correlation of Tumor Volume Reduction During Neoadjuvant Chemoradiotherapy with Pathological Complete Response of Lung Cancer. 19th World Conference on Lung Cancer of the International Association for the Study of Lung Cancer. 2018.
- (6) Takahashi S, et al. Relationship between Dose-Volume Parameters of Neural Plexus and Loco-Regional Recurrence after Neoadjuvant Chemoradiotherapy followed by Surgery for Ductal Adenocarcinoma of the Pancreatic Head. 103rd Scientific Assembly and Annual Meeting (Radiological Society of North America). 2017.
- (7) 高橋重雄ら. 膵癌に対する術前化学放射線療法における神経叢の線量と局所領域再発に関する検討. 日本放射線腫瘍学会第30回学術大会. 2017.
- (8) Takahashi S, et al. Comparison between Stereotactic and Conventional Radiotherapy for Solitary Lung Tumors after Resection of Lung Cancer. 18th World Conference on Lung Cancer of the International Association for the Study of Lung Cancer. 2017.
- (9) Takahashi S, et al. Dosimetric comparison between anisotropic analytical algorithm and Acuros XB in stereotactic body radiotherapy for lung tumors. 5th Japan-Taiwan Radiation Oncology Symposium. 2017.
- (10) Takahashi S, et al. Radiotherapy for solitary pulmonary nodules after resection of lung cancer: A comparison between stereotactic body radiotherapy and conventionally fractionated radiotherapy. 第76回日本医学放射線学会総会. 2017.
- (11) Takahashi S, et al. Respiratory motion of lymph node stations for pancreatic cancer: Analyses using contrast-enhanced four-dimensional computed tomography. American Society for Radiation Oncology 58th Annual Meeting. 2016.
- (12) Takahashi S, et al. Differences in gross tumor volumes for pancreatic cancer: A

comparison of ungated positron emission tomography and contrast-enhanced 4-dimensional computed tomography. 2016.

- (13) Takahashi S, et al. Analysis of the respiratory motion of lymph node regions in patients with pancreatic cancer using contrast-enhanced 4-dimensional computed tomography. 日本放射線腫瘍学会第 28 回学術大会. 2015.
- (14) Takahashi S, et al. Clinical experience of definitive radiotherapy for synchronous head and neck and esophageal cancer. Joint meeting of 4th Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology & 39th Annual Meeting of Japanese Society for Head and Neck Cancer. 2015.
- (15) Takahashi S, et al. Patterns of failure out of gross tumor volume for high-grade glioma: analyses using deformable image registration approach. 15th International Congress of Radiation Research. 2015.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。