

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16810

研究課題名（和文）ポリマーゲル線量計と生物学的評価手法の組み合わせによる線量評価法の探索

研究課題名（英文）Exploration of new dosimetry methods using a combination of polymer gel dosimetry and biological assessment methods

研究代表者

今道 祥二（Imamichi, Shoji）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員

研究者番号：40761599

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、粒子線治療等による深部線量評価を可能とし、また生物学的手法による評価も同時に可能とする線量計開発を目指し、また細胞損傷評価についての基礎データ取得、立体への照射による線量評価手法についても探索した。細胞培養を可能とする組成によるポリマーゲル線量計の開発では、線量依存的な呈色反応を示すPBSを利用するポリマーゲル線量計候補を開発した。また、細胞を短時間培養可能とする可能性のあるポリマーゲル線量計も試作し、改良を進めた。マウス3匹の積層による深部線量評価方法と、炎症応答因子HMGB1の中性子線照射による変動を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した深部線量を可視化する新しいポリマーゲル線量計は今後の放射線治療の高精度化に資することが期待される。HMGB1による線量損傷応答反応は新しい放射線応答の指標になりうることが考えられる。また、小動物を積層する新しい評価系は任意深さに腫瘍組織を配置も可能とする新しい深部線量評価手法となりうることと、中型・大型動物の代替となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a dosimeter that enables deep dose evaluation by particle therapy and biological evaluation at the same time. In addition, basic data on cell damage evaluation and dose evaluation methods by irradiation of three-dimensional objects were also explored. In the development of a polymer gel dosimeter with a composition that enables cell culture, we developed a polymer gel dosimeter candidate that uses PBS, which shows a dose-dependent color reaction. In addition, a polymer gel dosimeter with the possibility of short-time cell culture was also developed and improved. A method for deep dose evaluation by stacking three mice and the variation of inflammatory response factor HMGB1 by neutron irradiation were clarified.

研究分野：放射線生物学

キーワード：中性子線 ポリマーゲル線量計

1. 研究開始当初の背景

細胞レベルで放射線影響評価を行うと、一般的にがん細胞において細胞死は 2 Gy で 30% 程度、4 Gy で 80% 程度誘導され、線量が高くなるほど殺細胞効果は飛躍的に高まる。がんの放射線治療では分割照射が主に行われ、正常組織の損傷を減らし、かつ総線量として大線量付与による効果が期待されている。近年では、陽子線・重粒子を用いた粒子線治療、そして中性子線を用いたホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) も行われている。陽子線や重粒子線を用いた粒子線治療では、加速エネルギーによる特定の深部位置でのエネルギー放出が生じる特徴を利用している。BNCT では中性子線外部照射とホウ素製剤の腫瘍内での核分裂反応を利用している。これら治療法は従来の X 線に比べて高い殺細胞効果が期待されると共に、粒子線治療の特徴から腫瘍への線量集中と正常組織の線量低減も可能である。正常組織への影響の減少に関しては、強度変調放射線治療や定位放射線治療も行われ、様々な手法の探索が行われている。いずれにしても、深部線量評価が重要であり、物理線量評価の手法は確立されている。一方で、生物学的影響評価として考えると、放射線治療機器の性能試験として細胞や動物実験は行われているが、深部線量評価をその手法については確立されていないと考える。

深部への線量集中が可能となる技術が多数開発されている現状においても、連続的に分布する領域、すなわち腫瘍組織とその周囲の正常組織に対する生物学的影響評価は困難である。その理由としては、(1) 人の深部腫瘍を模擬した立体的な模擬組織の作製、(2) 模擬組織への細胞の均一な分布、(3) 長時間に渡る細胞の維持、(4) 模擬組織全体の評価を実施するためには非常に多数のポイントにおける評価の実施が必要である。古典的かつ簡便な細胞生存率での評価を実施するにしても、上記のような課題を解決しなければならない。また、同時に物理線量を測定することはできないという問題もある。

照射方法が高精度化するにつれて、高線量率・高線量治療方法も開発が行われている。また、少数回の放射線治療も実施されつつある。そのため、付与線量の決定は治療の高精度化と患者の安全のために非常に重要である。しかし、線量の決定は物理測定によって行われている。確かに、これまでの知見から高精度な物理線量評価が可能となっている。しかし、腫瘍組織と正常組織の区別が難しい領域、放射線応答の異なる細胞の性質を考慮し、生物学的評価も行うことで安全性評価を行うことが、今後の放射線治療の発展に寄与すると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞・動物を用いた種々の放射線照射実験から、深部における物理線量評価と生物影響評価を求め、相互に評価できる系を確立することである。そのためにポリマーゲル線量計に細胞を組み合わせた、物理線量評価と生物影響評価を同時に可能とする新規ポリマーゲル線量計を開発に取り組む。

3. 研究の方法

新規ポリマーゲル線量計の開発

既存のポリマーゲル線量計の組成を利用し、物理学的線量測定と細胞培養に (一時的であれ) 適するポリマーゲル線量計の新しい組成を探索した。既存のポリマーゲル線量計の主な組成は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) または細胞培養培地、アガロース、ヨウ化カリウム (KI)、ポリビニルアルコール (PVA) であり、本研究でもこの組成をもとに細胞培養を可能とする条件検討を実施した。また、細胞をカプセルに封入し、その細胞カプセルを立体的に分布させる方法の検討も試みた。細胞カプセルは、培養した細胞を回収した細胞懸濁液とアルギン酸ナトリウム溶液を混ぜ、乳酸カルシウム水溶液に滴下することで作製した。

細胞及び細胞影響評価

細胞は HSG 細胞、ヒトメラノーマ由来 A375 細胞、ヒト扁平上皮がん由来 SAS 細胞、マウスメラノーマ由来 B16 細胞を用いた。

ホウ素製剤としては、BPA (boronophenylalanine) を用い、放射線照射の少なくとも 1 時間前に細胞培養液に加えた。細胞影響評価は細胞生存率での評価とした。さらに、放射線照射による培地中炎症応答因子である HMGB1 の mRNA レベルの変動を解析した。また、DNA 損傷応答関連因子である H2AX、53BP1 などを指標とした免疫蛍光染色法も試みた。さらには、長期的な影響として核小体に着目した老化因子の変動についての解析も計画した。

動物実験

マウスは C57BL/6J オスのマウスを用い、実験は京都大学複合原子力科学研究所の規定に基づいて実験を実施した。

BNCT による変動因子の解析のため、B16 細胞をマウス下肢に移植し、そのマウスに対してホウ素製剤を投与後に中性子線照射を行い、経時的な腫瘍体積測定と血液サンプル取得を実施

した。血液サンプルの解析は、炎症応答因子である HMGB1 について実施した。

また、マウスを用いた深部線量評価手法の探索のために、3 匹積層したマウスを 3 列並べ、垂直に中性子線照射を実施した。照射後約 3.5 日の空腸クリプト数から求めた中性子線照射による影響を求めた。また、中性子線照射時には各マウス背部と腹部に金線と TLD を設置し、物理線量評価も実施し、空腸クリプト数による評価と物理線量を比較した。

放射線照射

X 線照射は国立がん研究センター中央病院の LINAC を、ガンマ線照射は国立がん研究センター研究所の GammaCell140 を用いた。中性子線照射は国立がん研究センター中央病院に設置されているホウ素中性子捕捉療法用システムと、京都大学原子炉を用いて実施した。

4. 研究成果

PBS を利用したポリマーゲル線量計を作製したところ、X 線照射による線量依存的な呈色反応が確認された。呈色反応に重要な KI 濃度について検証も実施し、低線量照射での呈色を確認するために必要な KI 濃度は細胞培養に影響を及ぼすことも明らかとなった。低い KI 濃度でのポリマーゲル線量計を作製したが、20 Gy 以上の高線量でなければ呈色反応が確認できず、細胞生存率実験で用いる低線量域の測定は困難な結果となった。細胞培養培地を用いたポリマーゲル線量計も試作したが、PBS に比べて形状維持が困難な結果であった。アガロース割合を高めて培地を用いたポリマーゲル線量計も作製したが、高線量放射線照射を実施しても十分な呈色反応が確認できなかった。そのため、PBS を用いたポリマーゲル線量計に細胞を混ぜ、一時的な細胞維持を可能とした状況で、放射線照射も実施した。しかし、低線量での呈色反応が確認できず、深部組織位置の細胞を回収して実施した影響評価ができなかった。影響評価ができなかったことは、長時間の維持によることが原因と考えられた。今後、ポリマーゲル線量計の組成の改良、細胞回収方法の改良を検討する。

細胞カプセルを作製したところ、細胞を封入と一時的な細胞培養が可能であった。作製した細胞カプセルは培地に移して観察を行ったところ、24 時間程度の培養を確認した。しかし、細胞カプセルの粒径を一定とすることと、細胞カプセルを安定して移動させることが困難であり、立体的に均一に分布する手法を探索しつつある。

X 線照射、中性子線照射による細胞影響評価についても基礎データを取得した。高線量の放射線照射で HMGB1 レベルが上昇し、同程度の線量では BNCT の方が高い HMGB1 レベルを示すことを明らかとした。また、B16 移植マウスへのホウ素製剤投与後中性子線は、腫瘍細胞における BNCT の効果による損傷が影響していることも明らかとした。この結果については論文として発表した。

マウス積層による中性子線照射実験も実施し、10 cm 程度の深部線量評価を可能とする方法を確立した。影響評価はマウス空腸クリプト数から求めたが、同時に測定した中性子線線量とガンマ線線量から線量の推定も行った。この実験から、中性子線の入射部からの距離依存的に、損傷が減少することを明らかとした。また、入射部をアクリルプレートで調整することで任意の深さ位置における影響評価をマウスで行うことが可能と考える。この結果については現在論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Imamichi Shoji, Chen Lichao, Ito Tasuku, Tong Ying, Onodera Takae, Sasaki Yuka, Nakamura Satoshi, Mauri PierLuigi, Sanada Yu, Igaki Hiroshi, Murakami Yasufumi, Suzuki Minoru, Itami Jun, Masunaga Shinichiro, Masutani Mitsuko	4. 巻 11
2. 論文標題 Extracellular Release of HMGB1 as an Early Potential Biomarker for the Therapeutic Response in a Xenograft Model of Boron Neutron Capture Therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 420 ~ 420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biology11030420	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------