

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24年 5月 7日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300170

研究課題名（和文）水素発生源として水素貯蔵合金を使った新規ピンポイント癌治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a New Pin-point Treatment of Cancer Cells Using Hydrogen Storage Alloy as Hydrogen Supplier

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

研究成果の概要（和文）：水素貯蔵合金(HSA)を水素発生源としたピンポイント癌治療技術の実用化を図るために、水素の放出挙動や生体細胞への効果に及ぼすHSAの組成や形状（円筒、角筒、針状、粉末状等）の影響を調べ、次の結果が得られた。1) Pd-Ni系HSAにおいて、Niの添加量を調整することで水素ラジカル、水素ガス、水素イオンの放出挙動をコントロールすることが可能である。2) 癌細胞と一部の正常細胞において死滅効果が認められたことから放出水素の細胞死滅効果は細胞種に依存する。3) Pd-Ni系HSAからの放出水素は試料の形状に依らず、試料から2～2.5mmの範囲において癌細胞に対して選択的な死滅効果を示す。4) ESR実験及び蛍光試薬実験から、水素ラジカル、ヒドロキシラジカル、過酸化水素が検出された。これより、癌細胞の死滅にはこれらの水素種が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To develop a pin-point treatment of cancer cells, hydrogen discharging behavior of hydrogen storage alloy (HSA) and the effect of hydrogen discharged from the HSA with different alloy composition and sample shape on biological cells have been studied. The results obtained are summarized as follows. 1) The amount of gaseous hydrogen and hydrogen ions as well as hydrogen radicals varied depending upon alloy composition. It is, therefore, possible to control the hydrogen discharging behavior by adjusting the alloy composition. 2) From the observation of the probability - of - survival (POS) measurement, a reduction in the POS was observed in cancer cells and a part of normal cell, and it was found that the influence of discharged hydrogen depends on the kind of cells. 3) A selective cancer cell death was observed in the region of approximately 2~2.5 mm outside the samples, independent of sample shape. 4) From the ESR experiment and the detection of hydrogen peroxide using fluorescent reagent, hydrogen radical, hydroxyl radical and hydrogen peroxide were detected and it was suggested that these hydrogen species would affect to cancer cell death.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学，医用生体工学・生体材料学

キーワード：金属物性，細胞・組織，水素，癌

1. 研究開始当初の背景

近年、水素による疾病の治療効果についていくつかの注目すべき研究が報告されている。大沢らは、脳梗塞のマウスに水素ガスを吸入させることにより症状の改善が見られたとして、現在、癌発生の原因の一つと考えられている生体内の活性酸素種の除去にも水素が有効であると報告している。

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。研究代表者らは、平成18-19年度の萌芽研究「活性水素噴射マイクロニードルの作製とピンポイント癌治療への応用」において、水素貯蔵合金からの放出水素により合金近傍のHeLa細胞(子宮頸癌細胞)およびH1299細胞(肺癌細胞)が死滅する現象を見出した。

2. 研究の目的

水素貯蔵合金を水素発生源としたピンポイント癌治療技術の実用化を図るために、水素貯蔵合金の合金組成や形状等が水素の放出挙動や生体細胞への効果に及ぼす影響を調査し、新規なピンポイント癌治療法を開発するための基礎的な知見を得ることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、1)パラジウム系水素貯蔵合金の水素吸蔵・放出挙動に及ぼす合金組成及び試料形状の影響の解明、2)生体細胞の細胞種による水素感受性の解明、3)癌細胞の死滅機構の解明、4)医療用水素貯蔵合金としての合金組成の最適化及び水素貯蔵合金を水素発生源として用いたピンポイント癌治療技術の実用化を図るための基礎技術の確立を目指した。1)の合金組成の最適化においてはニッケル濃度の異なるPd-Ni系合金を用いて放出水素種(水素ガス、水素イオン)の同定を行った。水素ガス放出量は水上置換法により、水素イオン量は溶液のpH値を測定して評価した。2)の生体細胞の細胞種による水素感受性の違いを調べるために、癌細胞にはHeLa(子宮頸癌細胞)、H1299(肺癌細胞)、DLD-1(大腸癌細胞)、SW480(大腸癌細胞)、正常細胞にはMDCK(腎上皮細胞)、NIH3T3(線維芽細胞)、GP8(脳血管細胞)を用いて生存率を測定した。その際、死細胞の判定はトリパンプルーを用いた。また、癌治療への適用に最適と思われる代表的な合金組成のパラジウム系水素貯蔵合金を用いて、種々の正常細胞および癌細胞を混合して培養し

た生体細胞に対して水素の放出実験を行った。3)の癌細胞の死滅機構を解明するために仮説を立て、水素ラジカル、スーパーオキシドラジカル等のラジカルの検出を紫外可視吸光光度法ならびに電子スピン共鳴法(ESR)により行った。

4)の医療用水素貯蔵合金としての合金組成の最適化については細胞実験とPdとNiの溶出実験を行った。また、水素貯蔵合金を水素発生源として用いたピンポイント癌治療技術の実用化を図るための基礎技術を確立するために、針状および粉末状試料を用いて細胞実験を行った。

4. 研究成果

4.1 パラジウム系水素貯蔵合金の水素吸蔵・放出挙動に及ぼす合金組成及び試料形状の影響

図1に示すように、合金中の水素は合金表面で原子状水素(水素ラジカル)となり、その後、水素分子になるか、溶液中に溶け出して水素イオンになる。

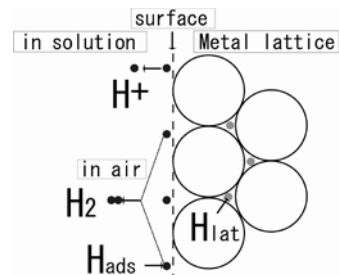


図1 金属格子からの水素の放出過程

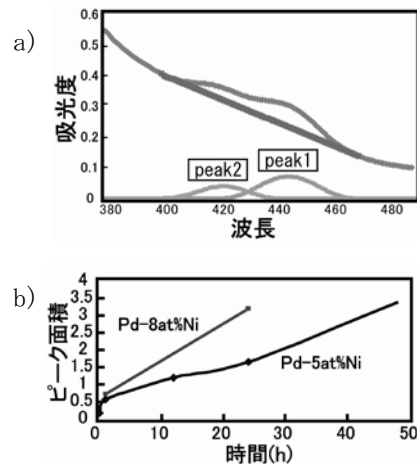


図2 紫外可視吸光光度法による水素ラジカルの測定結果

図2aは紫外可視吸光光度計を用いて水素ラジカルを測定した結果で、ピーク1の面積を算出し、水素ラジカル量として図2bに示した。これより放出水素ラジカル量は時間とともに直線的に増加し、高Ni合金ほど放出速度が大きくなることがわかった。

図3にa)HSAからの放出水素ガス量とb)水素イオン濃度の変化を示す。水素ガスの放出量の積算値は実験開始から4-5時間ではほぼ一定になる。一方、溶液のpH変化は、水素放出初期のpHが減少する段階(領域Ⅰ)では合金表面でTafel反応($2H_{1at} \rightarrow 2H_{ads} \rightarrow 2H^+ + e^-$ or H_2)が進み、pHが上昇する領域(領域Ⅱ)では、 $H_{ads} \rightarrow 2H^+ + e^-$, $O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$, $2H^+ + e^- + O_2^- \rightarrow H_2O_2$ の反応がⅠの反応に比べて優先的に起ったと考えられる。これより水素イオンの溶出は48時間にわたり継続することがわかった。

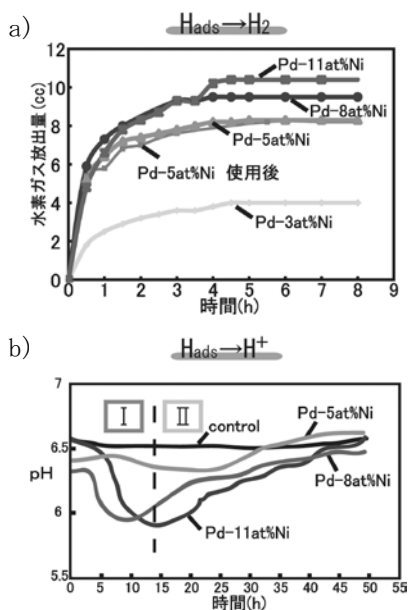


図3 水素ガス量と水素イオン濃度の変化

図4に円筒状試料を配置してから24時間後の癌細胞HeLaの実体顕微鏡写真を示す。図4の濃色部分がトリパンブルーで死滅した細胞が染色された部分であり、その領域を測定することで死滅範囲とした。

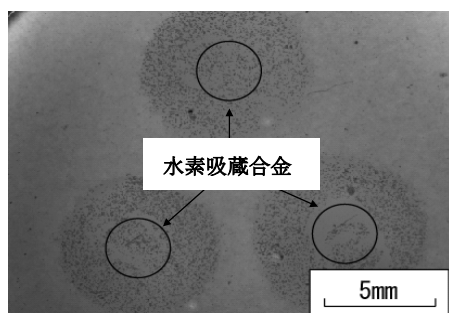


図4 水素吸蔵合金近傍の死滅した癌細胞

生体細胞に及ぼす試料形状の影響を調べるために、対称性の高い試料として図5に示すような円筒型を標準試料として作製した。また、比較の対象として標準試料を、体積2倍、半径2倍にしたもの、さらには形状を四角筒にしたもの及び針状試料(直径1mm、長

さ5mm)を作製した。また、注射針を利用した癌治療器具を想定して粉末状($\sim 20 \mu m$)試料を作製した。

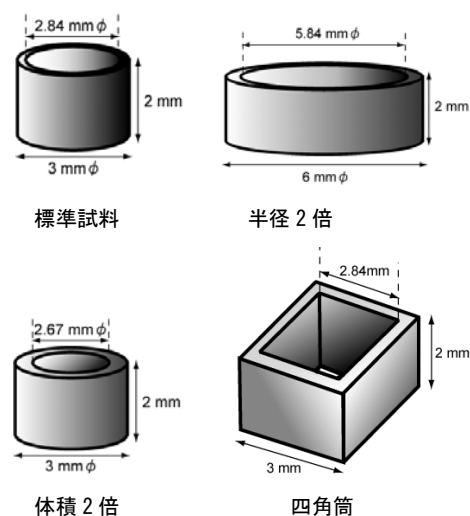


図5 細胞実験に用いた種々の水素貯蔵合金試料の形状

表1に示すように、HeLa癌細胞の死滅範囲は図5の試料形状に依らず、試料内部は全域死滅しており、試料外部は約2.0~2.5mmに渡って死滅が確認された。また死滅範囲は角筒試料の角部等の特出した効果は見られず、標準試料と殆ど変わらない死滅範囲を示した。

表1 種々の形状を有する試料における癌細胞の死滅範囲

試料形状	試料内部	試料外部(mm)
標準試料	全域	2.0~2.5
半径2倍	全域	2.0~2.5
四角筒	全域	2.0~2.5
体積2倍	全域	1.5~2.0
針状	-	2.0~2.5

一方、針状試料では先端部の死滅範囲は小さくなった(図6:試料は転がらないように“く”の字に折り曲げている)。

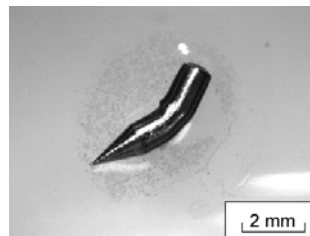


図6 針状試料における癌細胞の死滅範囲

円筒試料外部2.5mmの領域における死滅率の時間依存性を調べた結果、図7に示すように、試料配置後、約8時間で細胞の死滅が見られ、24時間後で死滅率は約70%、48時間後では100%であった。

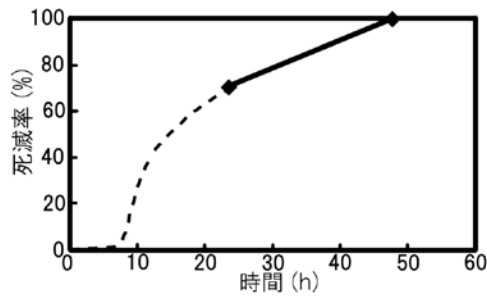


図7 癌細胞の死滅率の時間依存性

4.2 生体細胞の細胞種による水素感受性
 種々の正常細胞と癌細胞にPd-5at%Ni合金の水素未吸蔵試料(H⁻)と水素吸蔵試料(H⁺)を配置して、48時間後の生存率を測定した結果を図8に示す。各細胞で放出水素への影響は異なったが、ほとんどの癌細胞で死滅が確認された。また、生存率を測定する範囲は35mmシャーレ全体であるため生存率の減少は小さく見えるが、試料近傍のみを観察するとほぼ100%の死滅が確認でき、t検定により有意差が認められた。

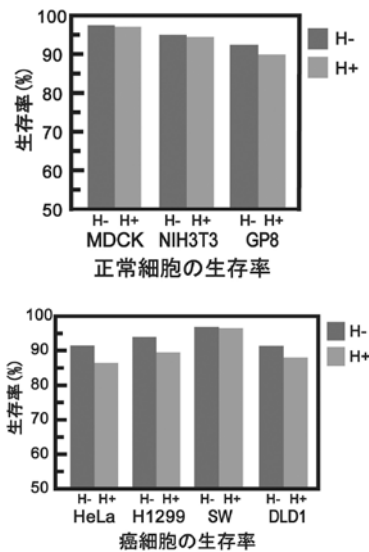


図8 正常細胞と癌細胞の生存率

図9は癌細胞(HeLa)と正常細胞(MDCK)を混合培養した35mmシャーレ中に円筒試料を配置した24時間後の合金近傍の細胞の状態を観察した結果である。正常細胞には放出水素の影響は見られないが、癌細胞のみに細胞の剥離、萎縮が観察された。

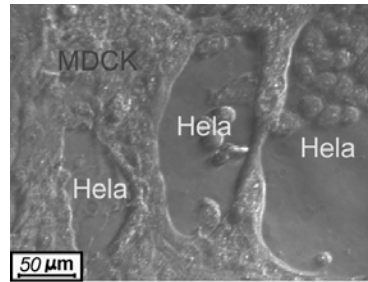
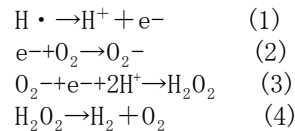


図9 混合培養した正常細胞(MDCK)と癌細胞(HeLa)に及ぼす水素貯蔵合金からの放出水素の選択的癌細胞死滅効果

4.3 癌細胞の死滅機構

活性酸素は体内の酵素で分解できなかった場合、癌を引き起こす原因となることは広く知られている。そこで、水素貯蔵合金から放出される活性水素による活性酸素の発生機構と癌細胞の選択的死滅機構として以下の仮説を立てた。



(1)式の水素ラジカルの発生は図2の紫外可視吸光度法および図10のESR測定により確認された。(1)式の電子放出の反応に続いて(2)式のスーパーオキシドラジカルが発生するとしたが、図10では水素ラジカル以外にヒドロキシルラジカルの発生が見られ、

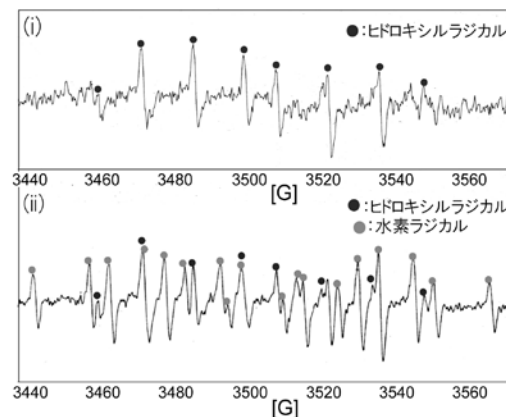


図10 ESR測定結果

スーパーオキシドラジカルは検出できなかった。これはラジカルトラップ剤が水素ラジカルと優先的に反応したためと考えられる。また、(2)式のスーパーオキシドラジカルが酵素(SOD)により過酸化水素に分解される(3)式の反応では、図11に示すように、死滅した癌細胞から過酸化水素が発生することをDCDHF蛍光試薬を用いて検証した。(4)

式の過酸化水素は正常細胞では酵素カタラーゼにより水と酸素に分解されるが、癌細胞にはこの酵素が少ないために(4)式の反応が進行せず、死滅に至ったために選択性が現れたと考えられる。

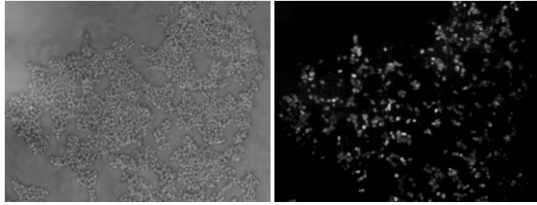


図 11 水素貯蔵合金投入 6 h 後の HeLa 細胞から検出された過酸化水素 (右図の白色部)。

4.4 医療用水素貯蔵合金としての合金組成及び試料形状の最適化

前述の図 2b に示したように、Pd-5at%Ni 合金に比べて Pd-8at%Ni 合金の方が水素ラジカルの放出速度が大きいことがわかった。これは圧力-組成等温線 (PCT 曲線) の脱蔵プラトー圧が Ni の添加量が増加するにつれて高くなることに対応している。細胞実験においては、高ニッケル合金 (Pd-8at%Ni 及び Pd-11at%Ni) では水素放出速度が大きすぎるために、試料の内部及び外部において癌細胞のみならず正常細胞の剥離が観察された。このことから癌細胞のみを死滅させ、正常細胞には影響を与えない水素貯蔵合金の最適組成は Pd-5at%Ni であると考えられる。

図 6 に示した針状試料においては患部に直接針状試料を打ち込む際に、患部の大きさによっては複数本打ち込む必要がある等の問題がある。患者の QOL を向上するためには、粉末状試料を使って注射により試料を導入する方が適切であると考えられる。また、粉末状試料を使うことで表面積が増え、より効率的に水素を放出でき、注射針を用いることで、より低侵襲の治療ができる等の利点が期待できる。

図 13 に癌細胞 HeLa 上に粉末状試料を配置して 24 時間後にトリパンブルーを用いて染色した様子 (図 13 a) を示す。粉末状試料を配置した領域において死滅が起こっていることがわかる。また、図 13b より、癌細胞の死滅領域は粉末試料が配置された範囲に限

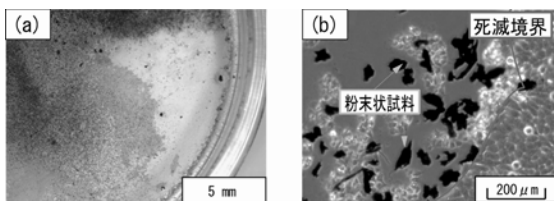


図 13 粉末状水素貯蔵合金近傍の死滅癌細胞

定されることが知られた。生体適合性の観点から、Pd-5, 8at%Ni 合金に水素を吸蔵させて生理食塩水 (0.9%NaCl) 中に浸漬し、1 週間後と半年後に ICP 分析を行った結果、1 週間後では Pd と Ni の溶出量は 0.01ppm 以下であったが、半年後では 0.1ppm オーダーのパラジウムとニッケルの溶出が認められた。ニッケルは人体に有害であることから、水素吸蔵合金としてはニッケルを含まない合金の設計が望ましいと考えられる。

4.5 今後の展開

癌細胞の死滅機構の解明及び水素吸蔵合金アクチュエーターを利用した患部への水素吸蔵合金試料の導入法の確立により低侵襲型ピンポイント癌治療法の開発を目指す。

図 14 は水素吸蔵合金アクチュエーターの曲げモジュールの構造と圧力制御による変形挙動の例を示したもので、現在、ねじれ挙動を示す回転モジュールの開発研究を行っている。図 14 の水素吸蔵合金アクチュエーターの利点は、構造が簡単で小型化が容易な点である。水素圧による曲げ・回転挙動を示す水素吸蔵合金アクチュエーターを利用した患部への試料の導入法に関しては、図 15 に示すような水素貯蔵合金マイクロアクチュエーターの先端に癌治療用の水素貯蔵合金を組み込んだピンポイント癌治療器具を試作し、動物実験において、その死滅効果ならびに操作性を検証する予定である。

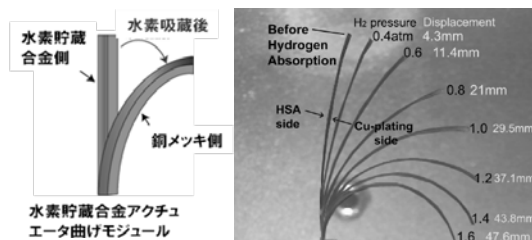


図 14 水素吸蔵合金アクチュエーターの曲げモジュールの構造と圧力による変形の制御

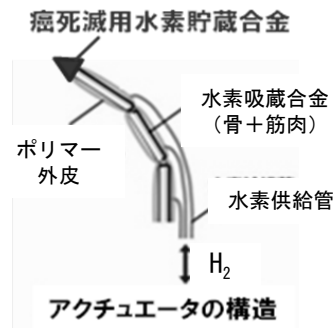


図 15 水素吸蔵合金アクチュエーター先端部に癌死滅用水素吸蔵合金を組み込んだピンポイント癌治療器具

以上、本研究では水素貯蔵合金を水素発生源としたピンポイント癌治療技術の実用化を図るために、水素の放出挙動や生体細胞への放出水素の効果に及ぼす水素貯蔵合金の組成や形状の影響を調べ、次の結果が得られた。

1) Pd-Ni 系 HSA において、Ni の添加量を調整することで水素ラジカル、水素ガス、水素イオンの放出挙動をコントロールすることが可能である。

2) 癌細胞と一部の正常細胞において死滅効果が認められたことから放出水素の細胞死滅効果は細胞種に依存する。

3) Pd-Ni 系 HSA からの放出水素は試料の形状に依らず、試料から 2~2.5mm の範囲において癌細胞に対して選択的な死滅効果を示す。

4) ESR 実験及び蛍光試薬実験から、水素ラジカル、ヒドロキシラジカル、過酸化水素が検出された。これより癌細胞の死滅にはこれらが関与していることが示唆された。

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. Kagawa, K. Katsura, M. Mizumoto, Y. Tagawa and Y. Masiko, "Influence of Hydrogen Discharged from Palladium Base Hydrogen Storage Alloys on Cancer Cells", Mater. Sci. Forum, (Trans Tech Pub., Switzerland), 審査有, Vol.706-709, 2012, pp.520 - 525.

2) A. Nakai, M. Mizumoto and A. Kagawa, "Bending and Rotation Movement Control of a Novel Actuator Utilizing Hydrogen Storage Alloys", Advanced Materials Research, 審査有, Vols.156-157, 2011, pp.1170 - 1175.

[学会発表] (計 3 件)

1) 松崎真実, 水本将之, 香川明男, 大貝 猛, "生体細胞に及ぼす水素吸蔵合金からの水素放出の影響", 日本金属学会秋季大会, 講演概要集, pp. 221, 沖縄(2011. 11. 7).

2) 桂 啓志, 水本将之, 大貝 猛, 香川明男, 田川 泰 "生体細胞への水素放出効果に及ぼす水素吸蔵合金の形状の影響", 日本金属学会・日本鉄鋼協会・日本軽金属学会九州支部平成 22 年度合同学術講演会, 講演概要集, p. P4, 熊本 (2010. 6. 5).

3) 梅木宣明, 水本将之, 大貝 猛, 香川明男, "水素吸蔵合金からの放出水素が生体細胞に及ぼす影響", 日本金属学会秋期(第 145 回)大会, 講演概要, p. 507, 京都(2009. 9. 15).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 水素吸蔵合金部材を備えた癌治療装置

発明者: 香川明男, 大貝 猛, 水本将之,
田川 泰

権利者: 長崎大学

種類: 特許

番号: 特願 2008-43560, 特開 2009-196968

出願年月日: 平成 20 年 2 月 25 日 出願

平成 21 年 9 月 3 日 公開

国内外の別: 国内

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: 00093401

(2) 研究分担者

田川 泰 (TAGAWA YUTAKA)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 20206907

(3) 連携研究者

大貝 猛 (OHGAI TAKESHI)

長崎大学・工学研究科・准教授

研究者番号: 60253481

水本 将之 (MIZUMOTO MASAYUKI)

長崎大学・工学部・助教 (H21)

岩手大学・工学部・准教授 (H22-23)

研究者番号: 90325671