

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591853

研究課題名(和文) 重粒子(炭素)線が生成する活性酸素の制御：重粒子線癌治療の高度化を目指して

研究課題名(英文) Regulation of reactive oxygen species induced by heavy-ion (carbon) beam; Pursuing the sophistication of heavy-ion cancer therapy

研究代表者

松本 謙一郎(Matsumoto, Ken-ichiro)

独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・チームリーダー

研究者番号：10297046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：電子常磁性共鳴(EPR)スピントラッピング法で、放射線によって生成するヒドロキシルラジカルの生成密度を解析することに成功した。EPRスピンプローブ法でスーパーオキシドのおよその発生量を予測できた。EPRスピンプローブ法で比較的簡便に過酸化水素を定量できるようにした。その結果、高LET放射線の生じるヒドロキシルラジカルは生成密度が高すぎて制御不可能であるが、その他の活性酸素種は抗酸化剤で制御可能という予測を得た。マウスの大腿部にX線あるいは炭素線を照射して生じる筋の線維化に対してTEMPOLが有効に抑制するか否かを検討した。予想に反し、重粒子線による線維化にも抑制効果が見られた。

研究成果の概要(英文)：Density of radiation induced hydroxyl radical could be measured by electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping method. Superoxide could be measured by EPR spin probing method. Hydrogen peroxide could also be measured by EPR spin probing method. Results from those measurements gave a prediction that the very dense hydroxyl radical generation by high LET radiation can not be regulated by biologically available antioxidants concentration. Other reactive oxygen species including low density hydroxyl radical could possibly be regulated or partly regulated using antioxidants. Inhibitory effect of TEMPOL to the radiation induced fibrosis caused by carbon-ion beam on mouse leg muscle was tested. Administration of TEMPOL dose affect to the fibrosis contrary to expectations.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：重粒子線がん治療 抗酸化剤 レドックス制御 活性酸素 フリーラジカル 放射線

## 1. 研究開発当初の背景

放射線医学総合研究所の医療用大型加速器(HIMAC: Heavy-Ion Medical Accelerator in Chiba)における重粒子(炭素)線癌治療が1994年6月に開始されてから既に16年が経過した。これまでの登録患者数は、2010年7月の統計で5497人に達している。1997年3月に重粒子医科学センター病院が開設されて本格的な臨床試験が始まり、これまでに数多くの重要な知見が蓄積されてきた。2003年10月には、重粒子線癌治療は高度先進医療として厚生労働省の承認を受けた。重粒子線癌治療の普及をめざし、HIMACでの研究成果を基礎として開発された普及小型化装置が群馬大学に建設され、2010年3月から実際に治療が開始された。最近では高度先端医療費の自己負担分を考慮した保険商品も売り出され、その例として重粒子線癌治療がしばしば引き合いに出されており、重粒子線癌治療が一般にも広く認知され始めてきた。このような背景に基づき、重粒子線癌治療は、これまで以上の治療効果と患者のQOLの向上が求められ始めている。

我々はこれまで、放射線癌治療に広く用いられてきたX線やγ線に比べて重粒子線がなぜ有効なのかを生物学的に解明するとともに、更に有効な重粒子線癌治療の方法の開発を進めてきた。そのための手段として、癌治療の効果を増強する放射線増感剤や、正常細胞への障害を減らす放射線防御剤の開発を行ってきたが、その中で、放射線により生じる活性酸素の生成を制御することがその鍵と考えて研究を進めてきた。

水に放射線を照射すると、水分子が電離あるいは励起されて活性な化学種が生じ、更に次の段階ではそれら同士が反応して水和電子

や水素イオンやヒドロキシルラジカル( $\cdot\text{OH}$ )などが生じる。これらの活性な化学種と水中に溶けている酸素との反応によってスーパーオキシド( $\cdot\text{O}_2^-$ )や過酸化水素( $\text{H}_2\text{O}_2$ )などが生じる。X線やγ線の作用は、約70%がこれらの活性酸素を介する間接作用であると考えられており、実際にX線やγ線は試料中の酸素濃度とその効果に大きく影響し、酸素濃度が高いとその細胞致死効果も大きくなるが、逆に酸素濃度が低いとX線やγ線の効果は小さくなる。重粒子線の作用は、X線やγ線に比べて酸素効果が少ないと考えられており、重粒子線によるフリーラジカル種および活性酸素の生成はこれまであまり問題視されてこなかった。しかし将来的な重粒子線癌治療の高度化を考えた場合には、重粒子線が生じるフリーラジカル種や活性酸素種を無視することは出来なくなる。

患者の苦痛を減らしQOLを向上させるには、分割照射回数を減らし治療期間を短縮することが先ず考えられる。しかし分割回数を減らすためには一回の照射線量を大きくする必要が生じる。照射線量が大きくなれば良好な局所制御率が期待できるが、同時にフリーラジカル種や活性酸素種の生成量も増加し、病変組織周囲の正常な組織に対する有害な作用を考慮してこれを制御する必要が生じる。そのためには、重粒子線によって生じる各フリーラジカル種および活性酸素種の生成量を知っておく必要があるが、その生成量を定量的に測定した例はこれまで無かった。また重粒子線の場合にはそのLETと線量が試料内部で急激に変化し、その分布が特徴的であるため、各フリーラジカル種および活性酸素の生成量もこれに付随して変化するものと予想されるため、擬似生体試料を使ってそれぞれの生成

の分布を把握しておくことも重要であると言える。

これまで、ニトロキシルラジカルを酸化還元プローブあるいは酸化還元感受性造影剤として用い、これを電子常磁性共鳴 (EPR) 法で検出することによって、重粒子線を照射したゼラチン試料内で生じるフリーラジカル反応の検出を行い、また核磁気共鳴イメージング (MRI) 法と組み合わせる事によってその分布の解析も行ってきた。しかし、個々のフリーラジカル種および活性酸素種を定量的に測定するには至っていなかった。

## 2. 研究の目的

活性酸素種と呼ばれる分子種のうち、放射線の効果を考える上で重要なものは $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の 3 種と言える。即ち、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の 3 種を定量的に捉えることが出来れば、放射線による正常な組織に対する有害な作用を積極的に制御することが可能になると考えられる。そこで本研究においては、まず、この 3 種の活性酸素種の生成量を定量的に測定することを試みる。少なくともそれらの生成の割合を明らかにし、擬似生体試料内でのそれぞれの生成の分布を把握する。重粒子線の場合は、軌跡周辺にのみ非常に高密度に電離が起こると予想されているので、分布を解析するに当たっては、個体レベルのマクロな環境、細胞あるいは分子レベルのミクロな環境を区別して検討すべきである。そこで本研究ではまず、濃度の異なるスピンプローブ剤 (酸化還元分子プローブ) またスピントラップ剤を使って、個々のフリーラジカル種および活性酸素種の生成量を定量的に捉え、分子レベルでの生成の様子を解析した。得られた情報に基づいて、重粒子線における活性酸素生成の

制御が可能か否かを評価。得られた知見に基づいて、実際に生体影響を制御するために使用する抗酸化剤あるいは抗酸化酵素の選択とその濃度の選定を行った。

重粒子線で生じる活性酸素種を制御するに当たって、重粒子線の癌細胞への殺傷効果を損なってはならない。重粒子線の細胞致死効果は主に直接作用によるところが大きいと考えられ、活性酸素種を介する間接効果は少ないと予想しているが、動物実験により実際にこのことを確かめておく必要がある。そこで本研究では、マウス大腿部に放射線を照射したときに生じる筋組織の線維化によって足の長さが短縮することを利用して、X線および LET の異なる炭素線の生物影響を物理的な測定で数値化したうえで、これに対する抗酸化剤の影響を評価した。

## 3. 研究の方法

### (1) $\cdot\text{OH}$ の定量

150 mM の燐酸バッファー (pH7、0.05 mM の DTPA を含む) にスピントラップ剤である 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) を様々な濃度 (0.5~1685 mM) で加え反応溶液とした。これに X 線あるいは炭素線を 32 Gy 照射し、照射終了後直ちに X-band EPR で反応溶液を測定し、反応溶液中に生じた DMPO のヒドロキシルラジカルアダクト (DMPO-OH) の EPR 信号の 10 分間の経時変化を追った。照射後の DMPO-OH の減衰曲線を照射終了時 ( $t = 0$ ) に外挿して、照射終了時点での DMPO-OH 濃度を求めた。更に照射後の DMPO-OH の減衰速度  $k$  を求め、照射中も  $k$  によって減衰が起こると仮定し、この減衰量を加味して DMPO-OH の生成量を補正して正味の DMPO-OH 生成量をシミュレーションにより求めた。正味の DMPO-OH

生成量を反応溶液に元々加えてあった DMP0 密度(ある濃度の DMP0 の 1 分子が占める体積を正立法体と考えた時の 1 辺の長さの逆数)に対してプロットし、DMP0-OH の生成量が飽和に達する時の DMP0 の濃度を求めた。

#### (2) $\cdot O_2^-$ の定量

150 mM の燐酸バッファー (pH7、0.05 mM の DTPA を含む) に 0.1 mM の TEMPOL と 1 mM の GSH を加えたものを反応溶液とした。反応溶液は氷中に保存し、照射中も可能な限り冷却するよう試みつつ、これに X 線または炭素線を照射した。反応溶液は照射後直ちに氷中に戻し、続いて X-band EPR で測定した。反応溶液中の TEMPOL の減衰量を求め、これに基づいて  $\cdot O_2^-$  生成量を評価した。

#### (3) $H_2O_2$ の定量

150 mM の燐酸バッファー (pH7、0.05 mM の DTPA を含む) に 0.1 mM の TEMPOL を加えた物を反応溶液とした。これに X 線を照射し、照射後直ちに反応溶液を X-band EPR で測定した。X 線照射時に生じる  $H_2O_2$  依存的な TEMPOL の還元反応の量と、従来法 ( $H_2O_2$  とフェノールと 4-アミノアンチピリンがペルオキシダーゼの働きで 505 nm に吸収極大を持つ化合物を生成する反応を利用して測定する方法) によって測定された  $H_2O_2$  量との間の相関性を予め求めておき、この関係に基づいて、0.1 mM TEMPOL 水溶液に炭素線を照射したときの TEMPOL 量の減衰から  $H_2O_2$  量を評価した。

#### (4) X 線の照射

試料および動物への X 線照射は、PANTAK 320S (島津製作所) で行った。照射条件は、管電圧が 200 kV、管電流が 20 mA、プレフィ

ルターは 0.5 mm 厚の Cu 板と 0.5 mm 厚の Al 板、X 線管と試料の距離は 300 mm で行った。この時の実行エネルギーは 80 keV、線量率は 3.3 Gy/min であった。

#### (5) 炭素線用ゼラチン試料の調整

炭素線照射用の試料は、150 mM の燐酸バッファー (pH7、0.05 mM の DTPA を含む) を約 80 に加温し、3.5%W/V のゼラチンを加えて溶かした後、室温まで冷却する。これに適宜、ニトロキシラジカルまたスピントラップ剤などを加えて溶かし、加工した細胞培養フラスコに分注し、冷蔵庫 (約 2 ) で 2~3 時間固めた。

#### (6) 炭素線が生成する活性酸素種の定量

酸化還元プローブあるいはスピンラベル剤等を含むゼラチン試料に、放医研の HIMAC で 290 MeV/n の炭素線モノビームを照射した。ゼラチン試料表面における線量は 32 Gy で一定とし、表面における LET を 20 ~ 180 keV/um の間で変えながら実験を繰り返した。照射後は直ちに試料表面のゼラチンをキャピラリーに採り、X-band EPR で測定した。得られたデータを基に重粒子線が生成する活性酸素の量と分布を定量的に解析した。

#### (7) 放射線の生物影響に対する抗酸化剤の抑制効果の評価

マウスを麻酔して専用の照射用の板に紙製粘着テープで固定し、左後肢大腿部以外に遮蔽を施した後、左後肢大腿部 (正常筋肉組織) に X 線または炭素線を 32 Gy 照射した。その後毎週、左右の足の長さをそれぞれノギスを用いて測定した。筋肉の線維化に伴う足の長さの短縮に基づいて放射線の生物影響を

数値化した。照射していない右足をコントロールとして比較を行った。更に抗酸化剤を予め投与したマウスに対して同様の照射を行い、線維化に対して抗酸化剤の効果が得られるか否かを調べた。

#### 4. 研究成果

一定の濃度の DMP0 を含む反応溶液に X 線を照射すると照射線量に応じて DMP0-OH の生成量が増加した。また一定の照射線量の X 線を濃度の異なる DMP0 溶液に照射すると、ある程度までは直線的な DMP0-OH の増加が見られるが、ある濃度から DMP0-OH の生成量の増加が飽和してプラトーを形成した。 $\cdot\text{OH}$  のディテクターである DMP0 を増やしていった時に、DMP0-OH の生成量に飽和が見られたディテクターの密度が  $\cdot\text{OH}$  の生成密度と考えられる。飽和の見られた DMP0 濃度は 3.3 mM であった。更に DMP0 濃度を濃くしていくと、DMP0 濃度が 600 mM を超えたあたりで再び DMP0-OH 濃度と DMP0 密度の間に原点を通る直線的な関係が見られ、本実験で用いた最高濃度の 1.7 M より更に直線関係が続くように見えた。これらのことから、3.3 mM 程度の薄い  $\cdot\text{OH}$  生成と、1.7 M を超える非常に密な  $\cdot\text{OH}$  生成が予想された。3.3 mM の DMP0 の 1 分子が占める体積を正立方体と考えると、その一辺の長さは約 8 nm であるので、3.3 mM の DMP0 の各分子間の距離は約 8 nm 程度と考えられる。同様に計算すると 1.7 M の場合は分子間距離は 1 nm となる。X 線、そこから発生する二次電子、更に X 線の発生が考えられ、その軌跡上で 8 nm くらいの間隔で  $\cdot\text{OH}$  が生成しており、X 線の発生する辺りで密な  $\cdot\text{OH}$  が生成が在るのではないかと考えられた。

重粒子線の場合にも 8 nm くらいの間隔で

生成することを示す成分と、1 nm かそれより以下の間隔で生成していることを示す成分とが見られた。しかし重粒子線の場合には、その LET に応じてプラトーの DMP0-OH 濃度が変化し、低 LET では高く、高 LET では低い事が分かった。プラトーの DMP0-OH 濃度は X 線の場合が一番高く、LET が低くなるほど 3.3 mM 程度の「疎」な  $\cdot\text{OH}$  生成が増加することが示唆された。

最高濃度の 1.7 M の DMP0 で生じる DMP0-OH 濃度は X 線も炭素線にも違いが無く、一定の線量で生じる  $\cdot\text{OH}$  の総量はほぼ一定であると考えられた。比較的大きなボリュームで見ると  $\cdot\text{OH}$  生成は、1  $\mu\text{mol/L/Gy}$  程度だが、実際には局所的に 3.3 mM 程度または 1.7 M より高濃度で生じているものと考えられた。3.3 mM の  $\cdot\text{OH}$  であれば、抗酸化物質で完全に制御することは困難であるが、一部を抑制することは可能と思われた。しかし「密」な  $\cdot\text{OH}$  生成は、その濃度に匹敵する抗酸化剤を与えることが出来ないため、制御することは不可能と考えられた。

炭素線による  $\cdot\text{O}_2^-$  と  $\text{H}_2\text{O}_2$  の生成は、一定の線量を与えた場合には LET が大きくなるほど少なくなる傾向があった。しかし生体に炭素線を照射することを考えた場合、線量および LET は生体内で変化するので、これを加味すると、 $\cdot\text{O}_2^-$  でも  $\text{H}_2\text{O}_2$  でも表面からブラッグピーク付近まではほぼ均一な生成量が予想された。ブラッグピーク付近で若干多くなると考えられるが、浅い部分の 2 倍程度と思われる。X 線および炭素線で予想された活性酸素種の生成量を Table 1 にまとめた。

$\cdot\text{O}_2^-$  と  $\text{H}_2\text{O}_2$  の生成には溶存酸素が深くかわっており、そのため生体内では十分に少ないと考えられ、また局所的に高濃度で生じて

いる可能性も低いので抗酸化剤等をもって制御可能と思われる。

制御しきれない・OHの存在は否めないの、これによって生じた(酸化)反応による分子上の傷の修復(還元)が必要になるだろう。また反応性の違う $\cdot O_2^-$ や $H_2O_2$ の生成も考慮すれば、単独の抗酸化物質による放射線防護は難しく、むしろ・OHの消去剤、 $\cdot O_2^-$ の消去剤、過酸化水素の消去剤、および還元剤の組み合わせにより制御できるようになると考えられた。

最後に、マウスの大腿部にX線あるいは炭素線を照射して生じる筋の線維化に対してTEMPOLが有効に抑制するか否かを検討した。予想に反し、重粒子線による線維化にも抑制効果が見られた。TEMPOLは・OHよりも $\cdot O_2^-$ と反応しやすいため、重粒子線による線維化に・OHよりもむしろ $\cdot O_2^-$ が深くかかわっている可能性が予想された。

Table. 1 放射線による活性酸素種の生成量

	X-ray	Carbon ion beam	
		(LET: 20 keV/ $\mu$ m)	(LET: 80 keV/ $\mu$ m)
Hydroxyl radical $\cdot OH$	1 $\mu$ mol/L/Gy (3.3 mM)	1 $\mu$ mol/L/Gy (1700 mM)	1 $\mu$ mol/L/Gy (1700 mM)
		0.34 $\mu$ mol/L/Gy (3.3 mM)	0.26 $\mu$ mol/L/Gy (3.3 mM)
Superoxide $\cdot O_2^-$	< 3 $\mu$ mol/L/Gy	< 1.3 $\mu$ mol/L/Gy	< 0.66 $\mu$ mol/L/Gy
Hydrogen Peroxide $H_2O_2$	0.2 $\mu$ mol/L/Gy	0.57 $\mu$ mol/L/Gy	0.35 $\mu$ mol/L/Gy
Oxygen consumption	0.4 $\mu$ mol/L/Gy	0.39 $\mu$ mol/L/Gy	0.15 $\mu$ mol/L/Gy

Concentrations in parentheses are local concentrations estimated.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Ueno M, Nyui M, Nakanishi I, Anzai K, Ozawa T, Matsumoto K, Uto Y. Scavenging of reactive oxygen species Induced by hyperthermia in biological fluid. J. Clin. Biochem. Nutr. 54, 75–80, 2014. 査読有  
Ueno M, Nakanishi I, Matsumoto K. Method

for Assessing X-ray-Induced Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Biological Compounds/Materials. J. Clin. Biochem. Nutr. 52, 95–100, 2013. 査読有

Matsumoto K, Nyui M, Kamibayashi M, Ozawa T, Nakanishi I, Anzai K. Temperature-Dependent Free Radical Reaction in Water. J. Clin. Biochem. Nutr. 50, 40–46, 2012. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

Matsumoto K, Ueno M, Nakanishi I. Effects of TEMPOL to the Biological Results of Heavy-Ion (Carbon). HITSRS2013, Chiba, May 15–18, 2013. (ポスター)

Matsumoto K, Nakanishi I, Ueno M, Anzai K. Density of hydroxyl radical generated in an aqueous solution irradiated by carbon ion beam. Society for Free Radical Research International 16th Biennial Meeting, London, Sep.6–9, 2012. (ポスター)

Matsumoto K, Nakanishi I. Distribution and Density of Hydroxyl Radical Generated by Heavy-Ion (Carbon) Beam Irradiation to Aqueous Sample, SPIN 2011 (6th International Conference on Synthesis, Properties and Implications of Nitroxides), Marseille, France, Sep. 26–29, 2011. (ポスター)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 謙一郎 (MATSUMOTO, Ken-ichiro)  
独立行政法人 放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・チームリーダー  
研究者番号：10297046