

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791453

研究課題名(和文)パラメトリック単色X線(PXR)を用いた新たな光線力学療法(PDT)の開発

研究課題名(英文)Development of new photon activation therapy with use of parametric X-ray

研究代表者

零石 崇(Shizukuishi, Takashi)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：30570741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：日本大学電子線利用研究施設ではパラメトリックX線照射が利用可能で、現在放射源としてシリコン完全結晶が採用されている。将来の臨床応用を考慮すると高エネルギーが必要で、ダイヤモンド結晶の利用が有利と考え、実験を行った。その結果、従来のシリコン結晶では達成していない最高X線エネルギー61keVでのPXRの発生およびX線取得を達成した。

124I-HPPHは光線力学療法に対して開発されているが、124I-HPPH合成の中間産物である非放射性ヨード化合物127I-HPPH(717)が新たな放射線増感剤として使用可能か、T24ヒト膀胱癌細胞株を用いて実験を行った。その結果、腫瘍径の増大抑制が認められた。

研究成果の概要(英文)：The parametric X-ray radiation can use at LEBRA, Nihon University. The silicon crystal has been used as a radiation source. However, higher energy PXR is necessary for the future clinical application as medical images or treatments. We hypothesized that the use of diamond crystal as a radiation source could be useful for higher energy. As the results, tunable PXR beam from the diamond crystal was successfully observed and X-ray imaging was carried out using the PXR beam up to 60 keV.

124I-HPPH has been developed for photodynamic therapy. We hypothesize that HPPH with cold iodine (127I-HPPH, 717), which occurs as an intermediate product in 124I-HPPH synthesis, can act as a new specific and selective radiosensitizer, because iodine is used as a contrast agent in clinical X-ray imaging. In this study, we evaluated the radiosensitizing activity of 717 in a human bladder cancer cell line (T24). We revealed that Utilization of 717 has a advantages as a radio sensitizer.

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：光線力学療法 パラメトリックX線照射

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在医療の臨床で使用されている X 線は、様々な波長の様々な位相の混ざった白色 X 線である。この一世紀に渡って X 線の強度や輝度は飛躍的に増強され、様々な分野で名実ともに多大な社会的貢献をしてきた。2004 年、日本大学の電子線利用研究施設 (LEBRA; Laboratory for Electron Beam Research and Application) では、相対論的電子ビームで単結晶を照射することにより、波長が単一位相が揃っているパラメトリック X 線放射 (PXR) の実用化に成功した。現在日本大学の LEBRA では、PXR を直接分光器なしにイメージングや細胞への照射実験になどの研究に利用できる。

(2) 現在医療の臨床で行われている光線力学療法 (PDT; photodynamic therapy) は、腫瘍親和性のある高感受性物質を投与した後に、レーザー光で腫瘍を照射する治療法である。現在の PDT の問題点として、レーザー光の深達度が浅く深部癌や進行癌には適応がないことが挙げられている。

2. 研究の目的

(1) PXR は、集束させると陽子線や重粒子線による放射線治療に用いられるブラッドピークによる線量集束性に類似した極大特性を示すことから、非病変組織への影響が少ない、副作用の少ない放射線治療が期待されるが、将来の臨床応用を考慮すると、PXR の高エネルギー化が必要である。現在、PXR の放射線源としてシリコン完全結晶が採用されているが、格子定数が小さく、熱伝導率の良いダイヤモンド結晶は、PXR の高エネルギー化に有利な放射線源ではないかと考えた。

(2) 放射性ヨード化合物 ^{124}I -HPPH は、PDT や PET イメージングに対して開発利用されている。我々は、ヨード化合物が歴史的に放射線増感剤として研究されてきたこと、臨床的に X 線イメージングで造影剤として使用されていることに着目し、 ^{124}I -HPPH 合成の中間産物である非放射性ヨード化合物 ^{127}I -HPPH (717) が新たな放射線増感剤として使用可能ではないかと考えた。

3. 研究の方法

(1) LEBRA-PXR 線源の 2 結晶システムを用い、ダイヤモンド単結晶を PXR 線源として、様々なエネルギー強度における PXR の発生を確認し、さらに X 線イメージの取得を試みた。

(2) T24 ヒト膀胱癌細胞株に白色 X 線照射装置を用いて、X 線のピークエネルギーをヨードの K 吸収端である 33keV で照射し、717 の放射線増感効果を *in vitro* および *in vivo* で検討した。*In vitro* においては、WST assay および colony formation assay を使用して生

存率を評価し、717 の細胞内局在を organelle probe および高速液体クロマトグラフィーで確認した。さらに放射線増感効果の機序としての活性酸素の産生を確認するための定量測定を追加検討した。*In vivo* においては、マウス背部皮下に T24 を注射して腫瘍を作成し、腫瘍増大率について検討した。

4. 研究成果

(1) PXR イメージング実験

今回のダイヤモンドを用いた実験は、初めての試みであったため、従来使用されているシリコン単結晶を用いた実験で X 線ビームを供給する場合と同じ電子ビーム条件で行われた。具体的には、電子エネルギー 100MeV、マクロパルス電流 130mA、マクロマルス幅 5 μs 、パルス繰り返し 5pps である。図 1 に 40keV の PXR ビームを用い、放射線源のターゲット結晶から 7.3m 下流の X 線取り出し窓直後で撮像した結果を示す。第 2 結晶サイズの制約のために X 線ビームサイズでは直径 100mm の X 線窓より小さく、40keV の場合で 35mm x 85mm 程度の大きさであった。また、ダイレクトビーム自体に強度ムラがあり、結晶の均一性に関する問題が示唆された。これは、ターゲット結晶および第 2 結晶がともに小さいため、結晶の側面から放出したり、逆に側面から入射する X 線の割合が多いことが影響している可能性がある。また、撮像時間を 15 分に伸ばして X 線透過像の取得を試みた結果を図 2 に示す。この測定は、検出器であるイメージングプレートを用いて PXR 出力窓直後に置いて行ったため、ダクトストリーミングで運ばれた低エネルギー散乱 X 線の影響を受けている。また、PXR のエネルギーを 50keV に上げて取得した結果も同様に図 3 に示す。50keV でも X 線イメージは取得可能で、40keV に比べ第 2 結晶サイズ不足が顕著化したが、エネルギーが高くなって透過力が増した。なお、X 線のエネルギーについては、40keV では Ce の K 殻吸収端 (40.444keV) を、50keV では Gd の K 殻吸収端 (50.239keV) を用いて確認した。

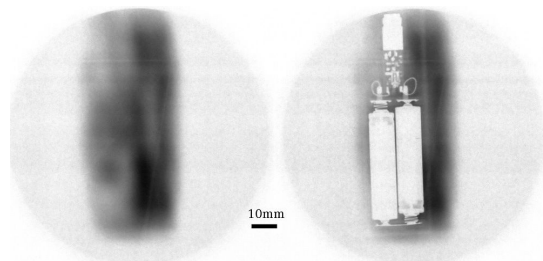


図1: 40 keV PXRビームを使用し、イメージングプレートを用いて撮像時間5分で得られたX線ダイレクトビーム (左) およびレーザーポインタ (右) 画像の結果。

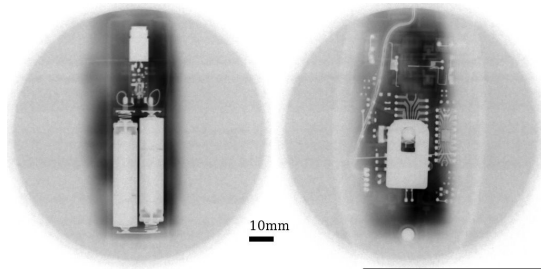


図2：40 keV PXRビームを使用し、イメージングプレートを用いて撮像時間15分で得られたレーザーポインタ（左）およびコンピュータマウス（右）のX線イメージ結果。

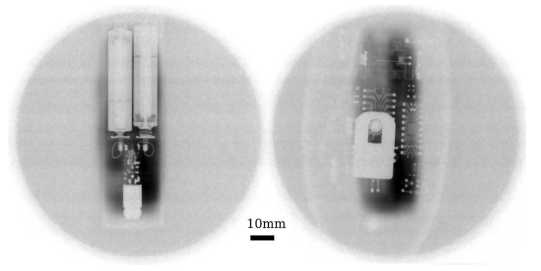


図3：50 keV PXRビームを使用し、イメージングプレートを用いて撮像時間15分で得られたレーザーポインタ（左）およびコンピュータマウス（右）のX線イメージ結果。

(2) ダイヤモンド結晶損傷とX線の不安定性エネルギー選択単色X線イメージングの実験には成功したが、ターゲット結晶の破損に起因すると思われるX線の不安定性に遭遇した。このPXRの不安定性は、破損したターゲット結晶が部分的に多結晶性となり、第2結晶の回折条件を満たさなくなる割合が増加した結果によるものと推察された。加速器のステアリングやゴニオメーターを調整して電子ビームが当たる箇所をずらすことにより、PXR強度はある程度は回復したが、一度亀裂の入ったダイヤモンド結晶は割れやすく、短時間で同様の事象が繰り返し発生した。しかしながら、最終的には60keVの単色X線発生と、イメージングの取得まで成功し、ダイヤモンド結晶が将来的にX線源として有用である可能性が示唆された。

(3) in vitroにおける717の放射線増感効果 T24細胞に対する717の放射線増感効果の評価は、WSTアッセイで行った。717併用で5Gyの照射を行った細胞は、照射単独よりも有意に細胞数が減少した($p=0.021$)。生存コロニー数は、717併用でやはり減少したが、統計学的有意差は、2Gy照射時のみであった(2Gy; $p=0.050$, 4Gy; $p=0.121$, 6Gy; $p=0.500$)。

(4) T24細胞内におけるHPPHの局在性 HPPHの細胞内局在を同定するために、717を

併用したX線照射後のT24細胞に対して、小器官特異性プローブおよび高速液体クロマトグラフィーを用いて共焦点干渉顕微鏡を使用し調査した。717は核内ではなく、主にゴルジ体やミトコンドリア内に局在していた。

(5) HPPHによる活性酸素種の生成

HPPHの放射線増感効果が活性酸素種によって生じているかを特定するために、蛍光試薬2-(6-(4-amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl) benzoic acid (APF)を用いて、照射単独および717併用照射後の細胞内活性酸素種生成の定量測定を行った。717を併用して5Gy照射で治療した細胞は、照射単独治療に比べ、有意な活性酸素種の増加が明らかとなった($p=0.02$)。

(6) 717のin vivoでの放射線増感効果

717のin vivoでの放射線増感効果は、xenograft model マウスを用いて評価した。皮下に2.0-2.5mm³のT24細胞をベアリングしたヌードマウスに100mg/kg体重の717を局注し、その後5GyのX線照射を行った。717局注照射群は、Phosphate Buffered Saline局注照射群および非治療群に比べて腫瘍増大率期間が延長し、照射後11日までの初期段階間においては、717局注照射群と非治療群との間で有意差が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Ishibashi N, Fujiwara K, Pandey K R, Kataba M, Oguni A, Igarashi J, Soma M, Shizukuishi T, Maebayashi T, Abe K, Abe O, Takahashi M and Tanaka Y: AN IODINE LABELED PORPHYRIN AS A NEW RADIATION SENSITIZER IN HUMAN BLADDER CANCER CELLS IN VITRO AND IN VIVO, COMBINATING PHOTODYNAMIC THERAPY (PDT) AND PHOTON ACTIVATION THERAPY (PAT). Journal of Nihon University Medical Association 査読有, 72(4), 2013, 212-219

〔学会発表〕(計2件)

早川恭史、雲石崇、石橋直也、早川健、稲垣学、中尾圭佐、野上杏子、堺武志、佐藤勇、田中俊成：2結晶型パラメトリックX線源におけるダイヤモンド単結晶の試験。日本加速器学会 2013.8.4(名古屋)

Ishibashi N, Fujiwara K, Shizukuishi T, Sakaguchi M, Aizawa T, Maebayashi T, Abe O and Nagase H. An Iodine-labeled Porphyrin as a New Radiosensitizer In Vitro and In Vivo, Combining Photodynamic Therapy (PDT) and Photon Activation Therapy (PAT). 米国放射線腫瘍学会議

2012.10.28 (ボストン)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.pasj.jp/cgi-bin/meetings/pasj10/pdf_get.cgi?SUP1%2FSUP111%2FSUP111.pdf

6 . 研究組織

(1)研究代表者

栗石 崇 (SHIZUKUISHI, Takashi)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：30570741