

特 集 ドラッグデリバリー

X線を活用した薬品送達システム

X-ray Assisted Drug Deliverer System

上坂 充^{*1}(正員), 水野 和恵^{*1}, Jade Dungao Trono^{*1}

Mitsuru UESAKA (Mem.), Kazue MIZUNO, Jade Dungao TRONO

Synergy effect between Drug Delivery System (DDS) and X-rays enables non-invasive inspection and treatment of deep cancers. We are trying gold nano-particle DDS and cisplatin-miselles for the two purposes, respectively. Especially, pinpoint X-ray fluorescence analyses give μm -resolved mapping of the drug uptake into tumors and cells. We have also developed the pinpoint 6 MeV linear-accelerator-based-X-ray source.

Keyword: X-ray Drug Delivery system, radiation therapy, gold nano-particle, cisplatin-miselle, X-ray fluorescence analysis, PIXE.

1 緒言

最先端のポリマーナノテクノロジーを駆使した薬品送達システム (Drug Delivery System; DDS) では、数 nm 程度の薬剤を包含してサイズを制御し、また修飾子をその表面に付着して患部への集積性を高める。特にがん組織での毛細血管の組織への孔の大きさが正常の組織の 20nm 程度に比べ、100nm 以上と大きい。この場合薬剤をポリマーで包含してサイズを 100nm 程度にできれば、がん組織のみに集積することができる。これは EPR (Enhanced Permeability and Retention, 透過・滞留向上)効果といわれている。さらに近年その DDS 薬剤に電磁波、赤外線、可視光、紫外線、X線、 γ 線、中性子線、 α 線などの物理エネルギーを印加して、薬剤との物理・化学相互作用によって、がん細胞殺傷効果を高める研究開発が活発化している[1]。

MRI (Magnetic Resonance Imaging)用に、周波数が数 MHz のラジオ波とガドリニウム(Gd)や鉄(Fe)の数 nm の微粒子の DDS 剤を使って高感度造影剤として使用する研究開発がある。陰性造影剤としては、デキストラン修飾酸化鉄コロイド(フェリデックス)が広く用いられ、陽性造影剤としてはガドリニウム(Gd)錯体が用いられている。金ナノシェル(絶縁体の芯を金属シェルで覆ったナノ粒子)は、近赤外光を熱に変換できるデバイスとして、近年、高い注目を集めている。金ナノシ

連絡先： 上坂 充, 〒319-1188 茨城県那珂郡東海村白方白根 2-22, 東京大学大学院工学系研究科原子力専攻,
e-mail: uesaka@nuclear.jp

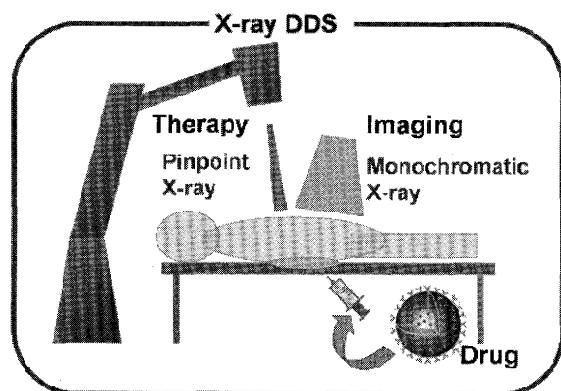
^{*1} 東京大学

エルは、がん治療に応用することが可能であり、がん組織にデリバリーし、近赤外光を照射することにより、局所に熱を発生させ、温熱療法(がん組織は 42°C以上で死滅する)を行うことができる。その DDS 化の研究が開始されている。光線力学療法(Photo-Dynamic Therapy, PDT)は、悪性腫瘍などの低侵襲的治療法として、現在、臨床応用されている。PDT は、ポルフィリンやフタロシアニンなどの光増感剤が可視光照射下で産生する一重項酸素(活性酸素の一種)の強い酸化力により悪性腫瘍を死滅させる治療法である。DDS としてデンドリマー型光増感剤が開発されている。一方、エネルギーの高い X 線、 γ 線、中性子線を活用すると深部組織で透過でき深部疾患への適用が期待できる。中性子線と中性子を捕獲して α 線を発するボロン(B)剤とその α 線でがん細胞を局所的殺傷する中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) も物理エネルギー DDS 相乗効果と言える。BNCT については、[2]で解説する。

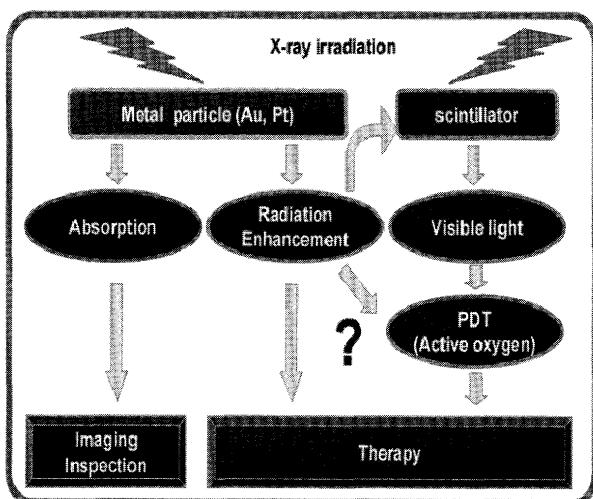
本稿では東大工学系研究科原子力専攻・マテリアル工学専攻・医学系研究科にて共同開発している X 線 DDS について解説する。

2 X 線 DDS の原理

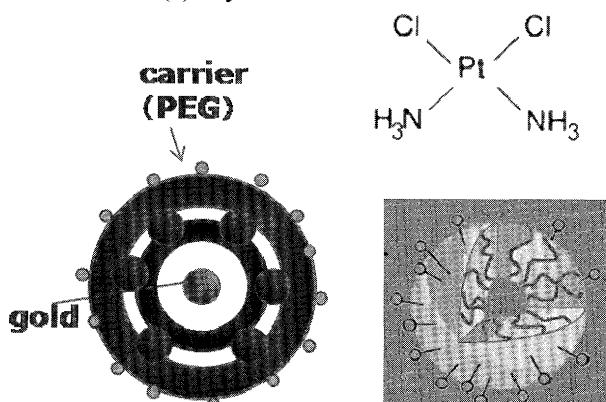
X 線 DDS の物理と機能を Fig.1 に示す。金やプラチナなど原子番号の大きい(それぞれ 79,78)原子は、原子当たりの電子数が多いため、X 線との相互作用の度合いが大きく、吸収も大きい。数十 1 nm の粒径の金粒子は生体への悪影響の小さく、重量濃度が適切であれ



(a) Image of X-ray DDS therapy system



(b) Physics and mechanism



(c) Schematic of gold-DDS and Pt-DDS

Fig.1 Physics and mechanism of X-ray DDS.

ば造影材として使用が期待できる[3]。また広く臨床に使われているシスプラチンという抗がん剤はプラチナ原子一個の中心とした金属錯体である。本特集の中の[1]でも解説されているように、ミセルという球形のポリマーで包含したシスプラチンミセルというDDSが開発され、動物実験にまで達している[4]。この場合、患

部への集積は向上しているが、プラチナ自身の濃度は大きくなく造影効果は期待できない。一方、高原子番号原子は、KエッジなどでX線を選択的に吸収したあと、オージェ電子や高準位の電子が空きの低準位に落ちる時に発する複数の特性X線が発せられる。これにより、原子の周辺のがん細胞のみ選択的に殺傷することができるという治療効果が期待できる。さらに、東大院原子力国際専攻高橋浩之・柳衛宏宜らが研究中のX線PDT型の治療DDSもある。ここは前述のPDT剤と、X線を感じて可視光を発するシンチレータをDDSして、シンチレータからの可視光で以後PDT治療を狙うものである。

PDTでは外部エネルギーは可視光レーザーを使うため、表面にしか吸収されない。皮膚がんや、光ファイバを使った膀胱がんなどに適用できる。一方X線は体内深部にまで浸透できるため、深部がんへの適用が期待できる(Fig.2参照)。

	energy	Laser	keV X-ray	MeV X-ray
DDS				
PDT type				
		Bladder carcinoma (膀胱がん)	Higher Photon Energy	
Au-colloid PEG				Deeper Cancer pancreatic (すい臓がん)
Cisplatin				renal (肝臓がん)
Scintillator			gallbladder (胆のうがん)	Colon (大腸がん)

Fig.2 PDT (Photodynamic Therapy) and X-ray DDS.

治療型X線DDSの課題は、X線感受性をもつDDS薬剤の開発である。放射線増倍効果の高い重金属元素が有力視されており、これまでに金ナノ粒子や白金製剤とX線を併用することにより治療効果が高まるとの報告がある[3]。

3 治療型シスプラチンミセル DDS の X 線蛍光分析

東京大学工学系研究科上坂研究室では、重金属元素を含むDDS薬剤として、臨床試験段階のDDS化白金製剤であるシスプラチンミセル[2]（東京大学工学系研究科マテリアル専攻片岡研究室開発、株式会社ナノキヤリア製造）の有効性の評価を行ってきた。シスプラチニンミセルは抗がん作用をもつシスプラチニン(cis-diamminedichloro-platinum(II))が、ポリエチレンジリコール(PEG)とポリグルタミン酸から成る高分子ミ

セルに内包された構造になっており、シスプラチニンのみと比べて血中滞留性が高く腫瘍部に蓄積しやすい。高分子ミセルは塩化物イオン存在下で置換反応により徐々に崩壊し、放出されたシスプラチニンが腫瘍細胞に取り込まれて抗腫瘍効果を発揮する。

シスプラチニン自体は既に臨床でも用いられている抗がん剤であり、放射線との併用療法（化学放射線治療）では、投与後一時間以内に放射線を照射すると治療効果が高まるとの報告がある。シスプラチニンミセルやその他の DDS 化薬剤を化学放射線治療用の薬剤として用いて放射線増倍効果の最大化を図るために DDS 化薬剤の腫瘍への集積性やキャリアの崩壊特性を把握し、X 線のエネルギーや照射のタイミングなど、最適な条件を見つける必要がある。しかしながら、シスプラチニンは分子量約 300 と小さな分子であり、蛍光タンパクを付加すると薬剤動態が変化してしまう可能性がある。したがって、生体組織や細胞への分布を確認するには、白金元素そのものの集積を検出する方法が有効である。本節ではシスプラチニンミセルの細胞や組織への集積の研究に用いられている蛍光 X 線分析法を紹介する。

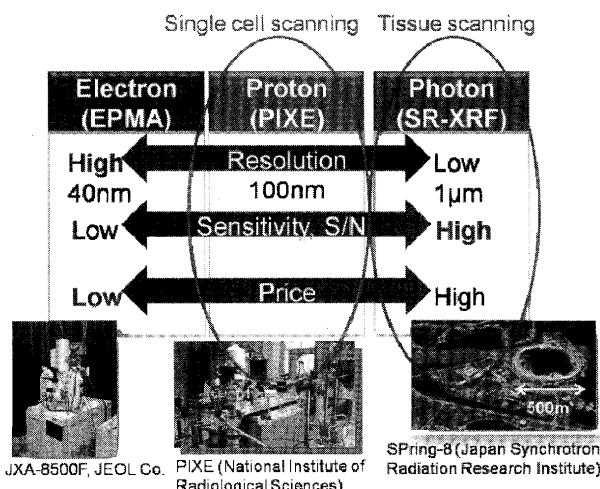


Fig.3 Different types of X-ray Fluorescence Spectrometry.

物質に高エネルギーの粒子を照射すると、連続 X 線と特性 X 線が発生する。特性 X 線を調べることで物質中に含まれる元素を同定する手法を蛍光 X 線分析と呼ぶ。入射粒子として、電子、陽子、X 線などが用いられており (Fig.3 参照)、本節では、陽子を用いた PIXE (Particle Induced X-ray Emission) と、放射光を用いた SR-XRF (Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence Spectrometry)について述べる。

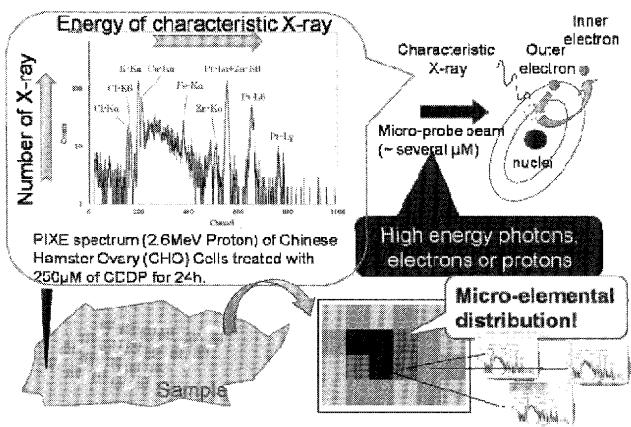


Fig.4 Mechanism of X-ray Fluorescence Spectrometry.

Fig.4 は放射線医学総合研究所の PIXE (Particle Induced X-ray Emission) 分析の様子を示す。タンデム型加速器で加速した陽子をビーム輸送系を通してサンプルチェンバーまで導き、真空中もしくはヘリウムに置いたサンプルに照射する。放出される特性 X 線は半導体検出器で検出され、エネルギーと強度が記録される。これにより、サンプル中に含有されている元素をナトリウムからウランまで、定量的に評価することができる。Fig.4 の左上に、シスプラチニンで処理した Chinese Hamster Ovary(CHO)細胞の PIXE スペクトルを示す。各元素に対応するピークの面積値を比較することにより、細胞内の元素濃度を知ることができる。元素によってはピークが重なっているものもあるため (図の白金 L_α線と亜鉛 K_β線)，解析ソフトを使用するか、異なる条件のサンプルを準備するなどの工夫が必要である。さらに、サブミクロンの分解能をもつマイクロビームスキヤニング PIXE を用いることにより、ヒトの毛髪や魚の鱗、さらには一つの細胞内の元素分布など、小さな領域の分析が可能となっている。東京大学工学系研究科上坂研究室では、この装置を用いてヒトがん細胞内の白金含有量およびその分布を測定することに成功した[5]。

また、DDS 化薬剤は EPR 効果により腫瘍に集積すると考えられるため、細胞への取り込み評価に加え、血管構造をもつ生体組織の評価も同時に行う必要がある。生体組織の分析には、PIXE よりもさらに感度が高い SR-XRF が適している。シスプラチニンおよびシスプラチニンミセルを投与したマウスの腫瘍切片を、高輝度光科学研究センターの大型放射光施設 SPring-8 の SR-XRF システムで測定し、腫瘍組織内、特に血管周辺の元素分布情報を得ることを試みている[6]。腫瘍組

織だけでなく、腎臓や肝臓などの正常組織における白金分布を調べることにより、副作用低減に向けた薬剤開発が可能となる。今後、異なるサイズまたはリガンドをもつミセルを用いて、取り込みの速度や分布の比較を行い、放射線との組み合わせに最適な条件を調べる予定である。

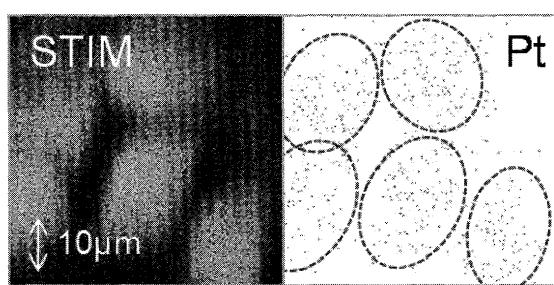


Fig.5 Images of Scanning Transmission Ion Microscope (STIM) and Pt distribution measured by Micro-beam scanning PIXE (μ -PIXE) of PK-1 (human pancreatic cancer) cells treated with 1mM of CDDP for 6 hours.

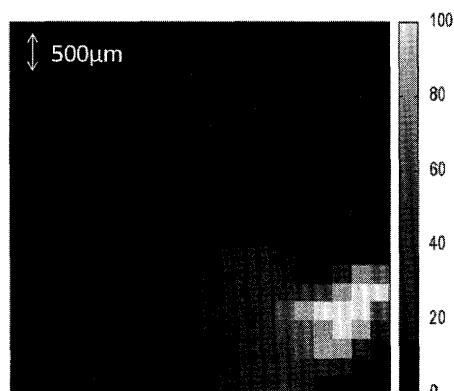


Fig.6 Pt distribution of a kidney treated with CDDP for 4 hours measured by SR-XRF.

以下の分析結果の数例を示す。Fig.5 は放射線医学総合研究所のマイクロビームスキャニング PIXE で測定した、シスプラチニン 1mM で 6 時間処理した PK1 細胞（ヒト肺腺癌細胞）の STIM 画像と白金の分布画像である。STIM は厚みを示している。厚みのある部分、つまり細胞のある部分に白金が分布しており、薬剤が均一に細胞内に取り込まれている様子が観察された。

Fig.6 は放射光蛍光 X 線分析 (SR-XRF) で撮影した、シスプラチニン投与 4 時間後のマウスの腎臓切片の白金分布である。腎孟と尿管に高い白金の集積が見られることから、周辺の腎臓の細胞に取り込まれ、腎毒性の

原因となると考えられる。実はもっと鮮明で 1 μ m 以下の空間分解能をもつ多数のデータがすでに得られている。それらを含み詳細な分析を加えた論文を投稿中である故、本稿では掲載していない事情をご理解いただきたい。

4 造影型金コロイド DDS 開発

金コロイドは化学的に最も安定な金属ナノ粒子であり、DDS 薬剤に含有させる重金属として前節で紹介された白金と同様に注目が高まってきている。本節では、金コロイド及びその X 線との相互作用に関する研究を紹介する。

我々は、未だその機序が明らかにされていない金コロイドと X 線の相互作用が及ぼす生体効果の解明を目的としてヒト正常細胞を用いた検証を行った。DNA 一本鎖切断(Single-Strand Breaks, SSBs)をアルカリコメット法（電気泳動法の一種）、DNA 二本鎖切断(Double-Strand Breaks, DSBs)の数を γ -H2AX 免疫染色法で測定し、個々の細胞について DNA 損傷の定量化を行った結果が報告されている[7,8]。Fig.7,8 に結果の一例を示す。

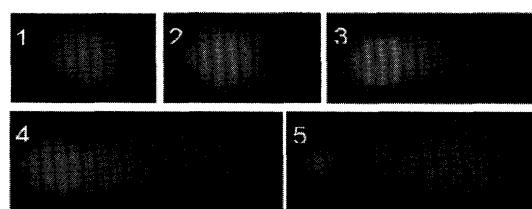


Fig.7 Images of PI-stained nuclei, exhibiting different degrees of DNA damage after electrophoretic migration. Each image represents one class of damage as indicated in each panel. DNA damage level increases from class 1 to 5.

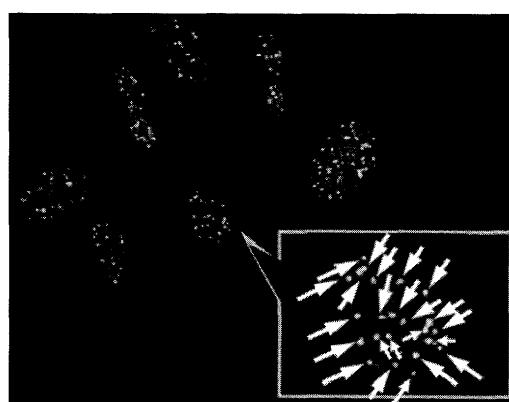


Fig.8 Double-strand breaks by g-H2AX immunofluorescent staining assay.

Fig.7は、細胞内のSSBsが多いほどコメットの尾としてDNAが流れ出ている様子を示している。これらの結果からは、ヒト正常細胞では、金コロイドの存在下で形成された二本鎖切断が放射線照射のみのものと同程度にまで修復され、細胞死には直接結びついていない可能性が大きいと考えられる。これまでに確認されている放射線増感効果は細胞種によって異なるか、生体内特有のものである可能性が示唆されている。Fig.8において赤い部分が細胞の核であり、その中の斑点は γ -H2AX免疫染色されたDSBひとつひとつを表している。共焦点顕微鏡を用いて各条件下でのDSBsの数を観測することで、従来の手法より高精度での検証が可能である。

以上のように、金コロイドとX線の生体内相互作用およびそれによって生ずる生体効果に関しては明らかになっていない面が多く、放射線治療時の増感剤として金コロイドが有用であるか否かの検討には、さらなる研究が不可欠であると考えられる。

一方、増感剤としてではなく、X線診断時の造影剤として金コロイドを利用する試みもこれまでに行われてきている。金は生体との親和性が高く、またその高い原子番号(79)のため、特に80keV以上の高エネルギー光子に対する反応断面積が大きいという特徴がある。例えば90keV光子の質量減弱係数は、従来主として用いられている造影剤の主成分であるヨウ素の $2.57\text{cm}^2/\text{g}$ 、生体主成分である水の $0.30\text{cm}^2/\text{g}$ に対して、金は $6.74\text{cm}^2/\text{g}$ である。よって、特に高エネルギー光子を用いた診断時に、金コロイドは有効な造影剤となりうるものであることが期待される。

当研究室では、20nm程度の大きさの金粒子にDDS材としてPEG(Polyethylene Glycol)を付着させた金コロイド DDSを開発中で、マウスに静脈注射して動物in vivo試験の段階に入っている。Fig.9はマイクロCTで撮影したマウスの断面図である。金コロイド存在下では腎臓、肝臓にてコントラストが高くなっていることが明らかとなった。現在、将来の経静脈注射によるがん造影材応用を目指して[9]、金コロイド DDSの粒径の制御と把握、肺臓がん、大腸がん、肝臓がんへの選択的集積を調べている。

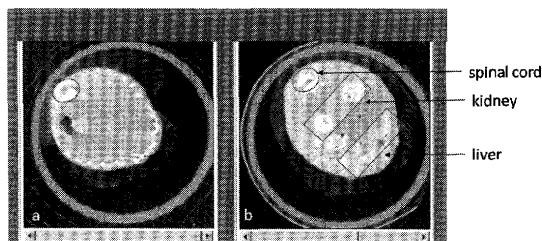


Fig.9 In-vivo imaging with Gold nanoparticles.

Cross section of mouse a) without gold nanoparticles b) one hour after injection with 20nm gold nanoparticles (2.5mg/mL). Better contrast is observed in kidney and liver

5 ピンポイントがん治療システム

Fig.1に模式的に示した、より小さな、また、複雑な形状のがん組織への集中的なX線照射を可能とするために、細いX線ビームを成形してピンポイントで照射する加速器装置の開発を進めている。照射野形成においては機械的ではなく、スキャン照射することにより高速化を図る。また正常な組織を避け、がん組織を選択的に照射することが重要であるが、これをさらに推

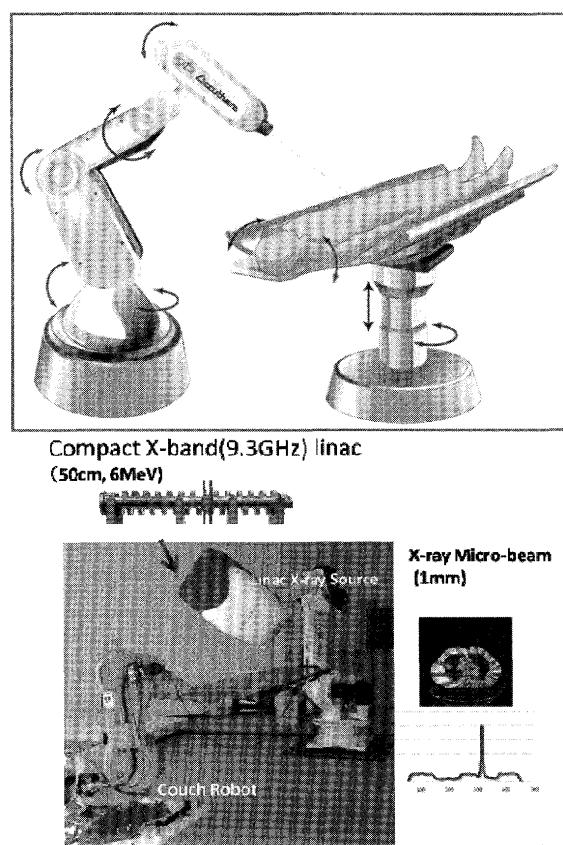


Fig.10 X-ray micro-beam pinpoint 4-dimensional therapy system.

し進めるために2次元平面でなく3次元空間であらゆる方向からがん組織を照射する装置の開発も進めている(Fig.10 参照)。

現在これらの技術を生かし東京大学、北海道大学、(株)アキュセラ、およびがん研究所とともに、直径1cm以下の早期がんや直径1~5cm以下の定位放射線治療対象のがんを、超高速スキャンが出来るX線マイクロビーム加速器装置と、微小がんの位置をリアルタイムに検出してフィードバックをかける放射線治療装置、微少X線束を体幹部に集中照射させる多軸ロボット照射制御システムの研究・開発をNEDO(新エネルギー産業技術総合開発機構)の健康安心プログラムの中の‘基礎研究から臨床研究への橋渡し促進開発’プロジェクト「基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発/X線マイクロビーム加速器による次世代ミニマムリスク型放射線治療システムの研究開発」の一環として進めている。

6 まとめ

本特集全体を含め、まとめたいと思う。最新鋭のバイオ生体ポリマー技術と、物理エネルギー(電磁、量子ビーム、超音波、熱)との相乗効果による、低副作用非侵襲ピンポイントがん治療システムが構築されようとしている。X線DDSの部分についても、5年ほど前研究開始時に描いたFig.1(a)のシステムイメージ図が、DDSは動物実験に達し、装置もFig.10のように第1号機完成を見た。しかしながら基礎研究の“魔の川”を渡る最中と認識している。これから実用化に至る“死の谷”があり、実用化にしても普及には“ダーウィンの海”で勝ち残らなければならない。バイオ医療技術で山中伸弥教授のiPS細胞の注目度ナンバーワンである。それに続ける戦略技術になれるよう、上記プロセスを我慢と忍耐で経ていく必要もある。日本AEM学会の皆様のご理解、ご協力を得られることを期待しつつ、特集の筆を置きたいと思う。

参考文献

- [1] 西山伸宏, 日本AEM学会誌(2010), 本特集
- [2] 柳衛宏宜, 日本AEM学会誌(2010), 本特集
- [3] J F Hainfeld, et al, British Journal of Radiology, 79, 248-253 (2006)
- [4] N. Nishiyama et al, Cancer Research, 63, 7876-7882 (2003)
- [5] K Mizuno, et al, Proc of 8th Asia-Oceania Congress of Medical Physics, 210-11 (2008)
- [6] K Mizuno, et al, Proc of 3rd International Symposium on Nanomedicine 2009, 51 (2009)
- [7] Mori A, et al.: DNA damage induced by colloidal gold or its combined effect with X-rays, proc. 10th IWRDD, 2008, Urabandai, Japan, PS-50
- [8] Mitsuru Uesaka, Hiroki Taguchi, Azusa Mori, Noritaka Yusa, “Application of monochromatic keV X-ray source to X-ray drug delivery system”, Nucl. Instrum. Meth. in Phys. Res. Sec. B: Beam Interactions with Materials and Atoms, Vol.608(2009) 47-50
- [9] Yusa N, Jiang M, Mizuno K, Uesaka M.: Numerical evaluation of the effectiveness of colloidal gold as a contrast agent. Radiol Phys Technol, Vol. 2 (2009), p. 33.

謝辞

本研究は、東大院工・医学系研究科片岡一則教授・西山伸宏特任講師、放射線医学総合研究所岡安隆一氏、加藤宝光氏、小西輝昭氏、及川将一氏、高輝度光科学研究中心寺田靖子氏、東北大学院量子エネルギー工学専攻遊佐訓孝准教授、(株)アキュセラ田辺英二氏、中村直樹氏、山本昌志氏、草野譲一氏らの研究協力によって成り立っている。ここに深く感謝いたします。