

[H30-1]

大気マイクロPIXEの臨床応用による新たな診断・治療・予防戦略の開発

Development of new diagnostic, therapeutic and preventive strategies by clinical application of in-air micro PIXE

土橋邦生^{#, A)}, 古賀康彦^{B)}, 笠松哲光^{A)}, 奥山克史^{C)}, 松田康裕^{D)}, 山本洋子^{E)}, 佐藤隆博^{F)}, 解良恭一^{G)}, 久田剛志^{A)}, 村上博和^{A), H)}, 内藤克昭^{E)}, 櫻井雅彦^{D)}, 齊藤隆史^{D)}, 林美加子^{E)}, 玉置幸道^{C)}, 江夏昌志^{F)}, 山田尚人^{F)}

Kunio Dobashi^{#, A)}, Yasuhiko Koga^{B)}, Tetsuhiro Kasamatsu^{A)}, Katsushi Okuyama^{C)}, Yasuhiro Matsuda^{D)}, Hiroko Yamamoto^{E)}, Takahiro Satoh^{F)}, Kyoichi Kaira^{G)}, Takeshi Hisada^{A)}, Hirokazu Murakami^{A), H)}, Katsuaki Naito^{E)}, Masahiko Sakurai^{D)}, Takashi Saito^{D)}, Mikako Hayashi^{E)}, Yukimichi Tamaki^{C)}, Masashi Koka^{F)}, Naoto Yamada^{F)},

A) Gunma University Graduate School of Health Sciences

B) Department of Respiratory Medicine, Gunma University Graduate School of Medicine

C) Asahi University School of Dentistry,

D) School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido,

E) Graduate School of Dentistry, Osaka University,

F) Takasaki Advanced Radiation Research Institute, Japan Atomic Energy Agency

G) Saitama Medical University International Medical Center, Department of Respiratory Medicine

H) Gunma University of Health and Welfare

Abstract

In H30-1 project, micro-particle induced X/gamma-ray emission (μ -PIXE) analysis using MeV-class proton microbeams found wider application in various field of medicine by the development of the sample preparation and the analytical method in the 2019 fiscal year. The details of the four research projects conducted in fiscal 2019 are described below.

1. Collagen disease is a systemic disease in which connective tissue abnormalities of systemic organs such as the skin, kidneys, lungs, and lymph nodes are caused by abnormal functions of the immune system. The cause of collagen disease has not been clarified yet, but it has been suggested that exposure to heavy metals and silica may be the cause of vasculitis and scleroderma. There is also a report that the concentration of silica in blood is high. Therefore, we performed elemental analysis of surgically resected lung tissue complicated with collagen-vascular associated lung disease (CVD) by in-air micro particle induced X-ray emission and compared the accumulated elements in the lungs between control and CVD patients.

2. Doxorubicin (DXR) is an anthracycline antibiotic with antineoplastic activity and intercalates between base pairs in the DNA helix. To evaluate influence of the doxorubicin, we analyzed the elemental change in acute myelogenous leukemia (AML) cell HL-60, KG-1, and THP-1. We added DXR of 0 nM, 850 nM in HL-60, 100 μ M in KG-1 and 1.4 μ M and cultured 24 hours. Compared to multiple myeloma cell, AML cell lines showed higher level of K. The level of K in HL-60 treated with 850 nM DXR was lower than 0 nM DXR. Similarly, the level of K in THP-1 treated with 1.4 μ M DXR was lower than without DXR. However, the decrease in K level was not observed in KG-1.

3. The purpose of this study is to assess the effect of c pH of titanium fluoride (TiF4) solution for elements distribution and demineralization on root dentin surface. 1% TiF4 (pH 1), and 1% TiF4 solution adjusted to pH 4, 5, 6, and 1.35% sodium fluoride (NaF) solution, which has same fluoride concentration as TiF4, were applied root dentin surface. Then, each specimen was subjected into pH cycling (pH:4.5-7.0) for 20 weeks. After that, demineralization depth and fluorine and titanium distribution were evaluated. Low pH TiF4 solution provides lower demineralization depth, or higher fluorine and titanium distribution into dentin than NaF solution. pH 4, 5, and 6 TiF4 show similar demineralization depth and fluorine distribution as NaF. This limited study suggested that TiF4 has better ability of inhibition of demineralization than NaF.

4. The purpose of this study evaluated the fluorine (F) uptake into the sound dentin surface of the human tooth. Four extracted human molars were used. The new dentin surface was exposed, and the 300 μ m thickness samples with exposed surfaces were obtained. All surfaces of the samples, except the new dentin surface, were covered with wax. Hys-Block-Gel (HS) was applied to the new dentin surface and stored in a phosphate-buffered saline (PBS) solution (pH 7.5) at 37°C

[H30-1]

for 24 hours. Untreated specimens were used as a control. The fluorine and calcium distributions in each specimen were evaluated using In-air μ PIXE/PIGE analysis. HS resulted in significant fluoride uptake in the root surface compare with control. The gel form fluoride-containing hypersensitivity restraint material is expected as preventive materials of the root caries and could supply fluorine to the deeper part quickly.

As described above, in two-dimensional analysis of element distribution in tissue, in-air μ PIXE has been shown to be remarkably effective measuring device for elucidating the pathophysiology and diagnosis of diseases, and for developing new drugs.

Keyword: Asbestos, Idiopathic Pulmonary Fibrosis, Silica, Acute myelogenous leukemia, Anthracycline, Titanium fluoride, Titanium fluoride, Inhibition of demineralization, Element distribution, Dentin hypersensitivity, Root caries, PIXE/PIGE analysis

1. はじめに

我々は、大気 μ PIXE/PIGE 分析技術を使い、医学・生物学的現象の解明で多くの成果を出してきた。今回、その中でも臨床に直結する課題を取り上げ、肺、血液、歯牙の分野で新たな診断・治療・予防戦略を確立し、国民の健康や環境改善に寄与することを目的としている。本プロジェクトでは、各種疾患における微量元素の関与の調査および薬剤や医療材料の効果の検証をおこなってきた。肺では、吸入粉塵による肺線維症や石綿肺の発症や予後に与える影響、吸入粉塵による肺線維症の病態解明、原因不明の肺線維症に潜む吸入粉塵が原因の肺線維症の同定による労災認定の手助け、血液では、骨髓異形成症候群(MDS)における無効造血および白血化の機序解明と新規治療薬の開発、歯牙では、各元素を含有した歯科材料によるう蝕進行への影響を評価し、う蝕進行抑制におけるフッ素と各元素との相互関係を解析し、新たなう蝕の進行を抑制する方法を開発してきた。2019 年度報告書においては、「In-air micro-PIXE を用いた膠原病肺組織の元素解析」、「大気 Micro-PIXE 法を用いた急性骨髄性白血病細胞株の微量元素動態解析」、「フッ化チタン溶液による歯質脱灰抑制と元素の浸透」、「フッ素含有知覚過敏抑制材から健全象牙質へのフッ素分布測定」について詳述する。いずれも人体の局所領域に分布する複数微量元素を高感度で高い空間分解能で同時に画像化できる μ PIXE の特徴を生かした研究である。

2. In-air micro-PIXE を用いた膠原病肺組織の元素解析

2.1 背景

膠原病は免疫機構の機能異常により皮膚、腎臓、肺、リンパ節などの全身臓器の結合組織異常を来す全身性疾患である。膠原病の原因は未だ明らかになっていないが、血管炎や強皮症においては重金属やシリカの暴露が発症原因となっている可能性が示唆されており、血中のシリカ濃度が高くなっているという報告も見られている。そこで今回我々は、当院で外科的に切除された膠原病肺組織の元素解析を行い、肺内の元素分布の臨床経過に及ぼす影響について検

討を行った。

2.2 方法

2008 年から 2014 年までに胸腔鏡下肺生検で外科的に切除された強皮症、シェーグレン症候群、皮膚筋炎の肺組織標本の元素解析を行った (n=5)。パラフィン切片を用いて肺内元素解析を in-air microparticle induced X-ray emission (micro PIXE)で行い[1]、パラフィン切片内の Al, Mg, Si, S, P, Fe, Ca, Zn の元素濃度を測定した。コントロールとして早期肺癌症例の正常肺部分の元素解析も行った(n=5)。コントロール肺と膠原病肺との元素分布を Graphpad Prism software を用いて統計学的に比較検討した。

2.3 結果

In-air micro-PIXE を利用した元素解析において膠原病肺組織中の微量の Al, Mg, Si, Fe などの元素沈着を検出した。これらの検出濃度は、Ca, P などより相対的に低かった(Fig. 1A)。また検出された元素の内、Si, Zn において有意に膠原病肺の集積量が多かった(Fig. 1B)。

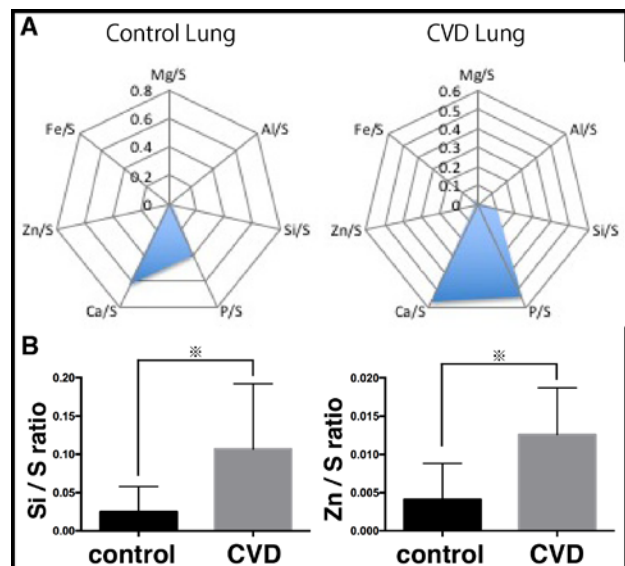


Figure 1. Comparison of accumulated elements in the lungs between control (n=5) and collagen-vascular associated lung disease (CVD) (n=5) patients.

A. Rader chart of accumulated elements in the lungs of control (left) and CVD (right) patients.

[H30-1]

B. Significant elevation of silica/silicates (Si) and zinc (Zn) in the CVD lungs compared to the control lungs (※ $P<0.05$).

2.4 考察

膠原病肺においては、シリカや亜鉛の肺組織への沈着が膠原病肺の成因に関わっている可能性が示唆された。

3. 大気 Micro-PIXE 法を用いた急性骨髄性白血病細胞株の微量元素動態解析

3.1 背景

急性骨髄性白血病 (AML) は 分化・成熟能が障害された幼若骨髄系細胞のクローナルな自律性増殖を特徴とする多様性に富む血液腫瘍である。AML は世界保健機構 (WHO) 分類や 1976 年に提唱された French-American-British (FAB) 分類により病型分類される。FAB 分類では、好中球系統の未熟な細胞の白血病化で分化の傾向が認められない AML-M1 や分化傾向の認められる AML-M2、単球系細胞の白血病化の AML-M5 など、顕微鏡による細胞形態に基づき、細胞の分化段階やどの細胞系統が白血病化したかによって分類される。大気 micro-Particle Induced X-ray Emission (PIXE) 法は元素固有の X 線のエネルギースペクトルを測定することで、試料に含まれる元素の種類を特定し、単一細胞内の微量元素の二次元分布を、 $1\ \mu\text{m}$ という高空間分解能で測定することが可能な測定法である。今研究では、AML の病態解明および新たな疾患の病型分類・治療法の開発へと結びつけることを目的とし、大気 micro-PIXE 法を用いた AML 細胞内の微量元素を検討した。

3.2 対象と方法

AML 由来細胞株 HL-60 (AML-M2 由来)、KG-1 (AML-M1 由来)、THP-1 (AML-M5) を用いて、アントラサイクリン系抗腫瘍薬ドキソルビシン (DXR) を添加し (HL-60; $0\ \mu\text{M} \cdot 0.85\ \mu\text{M}$, KG-1; $0\ \mu\text{M} \cdot 100\ \mu\text{M}$, THP-1; $0\ \mu\text{M} \cdot 1.4\ \mu\text{M}$) 24 時間培養を行った。細胞は TRIS-HNO₃ (pH 7.4) にて洗浄後、 2×10^6 個/mL に再懸濁し、集細胞遠心装置にて 500 rpm、15 分遠心して $0.5\ \mu\text{m}$ 厚のポリカーボネート膜に細胞を接着、その後真空蒸着させた。高崎量子応用研究所のシングルエンド加速器にて、分析試料を順次測定し、AML 細胞内微量元素を解析した。

3.3 結果

1 細胞あたりのヒストグラムを比較すると、DXR 処理の HL-60 および THP-1 では未処理に比べ、K のピークが低くなっていた (Fig.2)。一方、DXR 処理の KG-1 では K のピークに未処理との差は認められなかった。1 細胞あたりの K の分布は、未処理および DXR 処理共に分布の偏りは認められなかった。他の元素では DXR 処理および DCB 処理による明らかな違いは認められなかった。

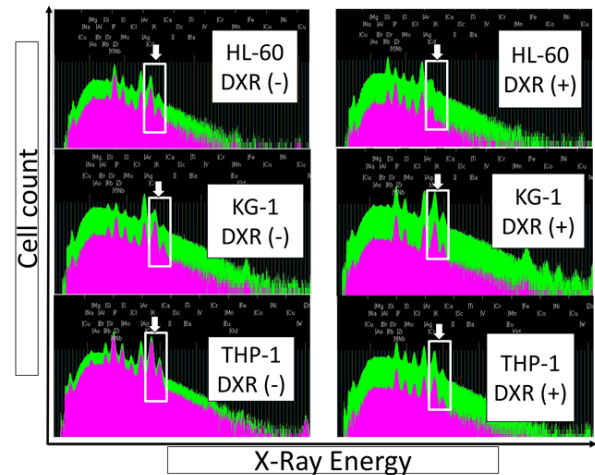


Figure 2. The histogram of AML cells. The Pink color indicates distribution per cell.

3.4 考察

腫瘍細胞では K の濃度が細胞の増殖や細胞死に影響するとされている[2]。DXR は腫瘍細胞の DNA と複合体を形成することによって、DNA polymerase や RNA polymerase 反応を阻害し、DNA 複製、RNA の合成や蛋白合成を阻害し、腫瘍細胞の増殖を抑制する。今回の結果より、DXR による AML 細胞への作用機序に K の動態が直接的または間接的に関与し、また細胞株により差があったことより、細胞の分化段階も関係する可能性が示唆された。

4. フッ化チタン溶液による歯質脱灰抑制と元素の浸透

4.1 背景

フッ化物による蝕抑制効果として、フッ化チタンが優れた抗蝕作用を示すことも示されているが、酸性度が強く、国内での使用は見られない。そのため局所的応用において安全かつ効果的な酸性度、およびフッ化チタン (TiF₄) 濃度を確定することを目的とし、そのはじめとして、任意の濃度、および pH に調製したフッ化チタン溶液を歯質に作用させ、う蝕発生環境に 8 週間置いた後のフッ素、チタンの浸透を検討したところ、各元素の浸透は溶液の濃度に依存し、低い pH ほど多く元素が浸透していることを前年度報告した。

[H30-1]

本研究では試験期間をさらに延ばし、任意の pH に調製した TiF_4 溶液を歯質に作用させ、う蝕発生環境に供した後の脱灰程度と各元素の歯質への浸透を評価、検討した。

4.2 材料と方法

ヒト抜去歯を歯軸に平行に頬舌的に厚さ約 $300\mu\text{m}$ に薄切し、試料の頬側面のエナメル質とセメント質の境目を中心に幅 3mm の範囲を除き、ワックスで被覆した。試料を pH4.5 と 7.0 を一定のサイクルで繰り返す自動 pH サイクル装置に供し、う蝕負荷のシミュレーションを 20 週間行った。サイクルの間に 1% TiF_4 水溶液を 5M KOH にて pH を 4, 5 および 6 に調製したものと、調製を行わない溶液 (pH:1) を 1 週間に 1 度 5 分間浸漬し、その後水洗する処理を行った。同様に 1% TiF_4 と同じフッ素濃度を含む 1.35% NaF 溶液も使用した。フッ化物処理を行わない群をコントロール (Cont) とした。

pH サイクル後の試料について、偏光顕微鏡により各試料を観察、撮影し、得られた画像より表層からの脱灰深さを測定した。その後、表層からのフッ素、カルシウムおよびチタンの分布をマイクロ PIXE/PIGE 装置にて測定、分析を行った。フッ素とカルシウムは標準試料を測定することで濃度 (ppm) を算出し、チタンはビーム照射時のビーム量比較のため、同時に測定される銅のカウント数との比 (counts/Cu counts) を用いて比較した。得られたデータは Kruskal-Wallis test および Steel-Dwass test にて危険率 5% で統計解析を行った。

4.3 結果および考察

Fig. 3 に各群の脱灰深さを示す。Cont 群が他の群よりも有意に大きい脱灰深さを認めた。また、NaF 群と P1 群の間にのみ有意差を認めた。

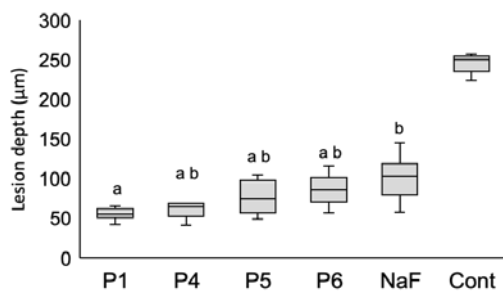


Figure 3. Lesion depth of each specimen (μm). Same letters no indicate significant differences ($p>0.05$).

Fig. 4 にフッ素の取り込み量を示す。P1 群が他の群と比較し有意に高いフッ素取り込みを認め、P4, P5, P6, NaF 群間には有意差を認めなかった。Cont 群が他の群と比べ有意に低いフッ素量であった。

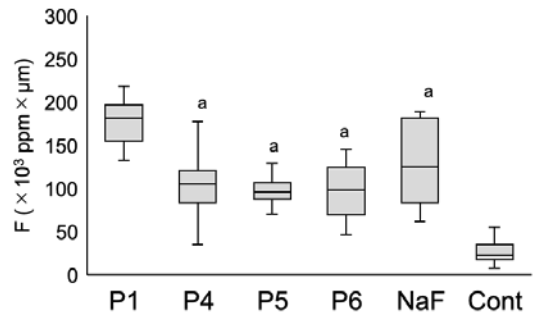


Figure 4. Concentration of penetrated fluorine into dentin at $100\mu\text{m}$ depth area from superficial surface ($\text{ppm} \times \mu\text{m}$). Same letters no indicate significant differences ($p>0.05$).

Fig. 5 にチタンの取り込みを示す。P1 群が有意に高いチタン取り込みを認め、P4, P5 は P6 群よりも高いチタン取り込みを示した。NaF および Cont ではほとんどチタンは検出されなかった。

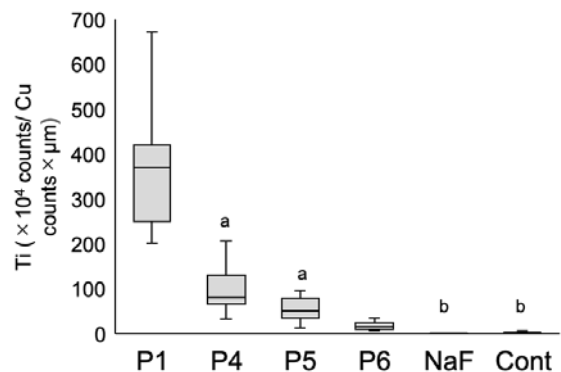


Figure 5. Concentration of penetrated titanium into dentin at $100\mu\text{m}$ depth area from superficial surface ($10^4 \text{ counts/Cu counts} \times \mu\text{m}$). Same letters no indicate significant differences ($p>0.05$).

これらの結果より、低い pH の溶液で高いフッ素およびチタンの取り込みが認められたのは、低 pH により象牙質の脱灰多く、そのため多くの元素が浸透していったことが考えられる。また前回の報告ではフッ素浸透が pH 間であまりさを認めなかったが、実験期間を長くすることで、pH1 が有意に大きいフッ素浸透を認めることとなった。

脱灰深さにおいて P1 が NaF よりも低い脱灰深さを示した。溶液フッ素濃度は同じであるが、フッ素取り込み量の差もあるが、チタンを取り込むことで脱灰抑制に関わる層が形成されたものと考えられる。NaF が TiF_4 溶液使用群よりも高い脱灰深さを示す傾向からも、チタン溶液の有用性があらためて示唆さ

[H30-1]

れた。

5. フッ素含有知覚過敏抑制材から健全象牙質へのフッ素分布測定

5.1 背景

歯面にフッ素を塗布・供給して、知覚過敏を抑制するフッ化物を含有した水溶液やゲルが広く臨床で使用されている。フッ素含有知覚過敏抑制材である MS コート HyS ブロックジェル (サンメディカル) を露出象牙質に塗布すると、スルホン酸基を有する共重合体とシュウ酸が同時に歯質の Ca 成分と化学反応してシュウ酸 Ca 結晶を含む高分子保護皮膜を象牙質表面に形成する。これにより知覚過敏を抑制するが、この被膜はフッ化物を含んでおり象牙質へのフッ化物の供給源として期待される。我々はこれまでにフッ化物ゲルが脱灰象牙質に対してフッ化物を供給し脱灰抑制効果を示すことを報告した。しかしながら、フッ化物ゲルの健全象牙質に対するフッ素の供給効果についてはこれまで検討されていない。そこで今回、MS コート HyS ブロックジェルを塗布した健全象牙質における材料からのフッ素供給について検討を行った。

5.2 材料と方法

データ 本研究では健全ヒト抜去臼歯計 4 本を使用した。これらをアイソメット(Isomet, Buehler, USA) を用いて、歯軸に平行に矢状断・冠状断を行って 4 等分し、四つ割りの切片を得た。これらの切片のエナメル象牙質境界層部を #600~#1000 の耐水ペーパーにて研磨し象牙質を露出させた後、露出面を含むように切片から厚さ約 300 μ m の薄片を作製した。薄片の両面をスティッキーワックスで被覆し、残った露出面に材料(MS Coat Hys Block Gel, SUN MEDICAL) (HYS)を塗布した物と、塗布していない Control を用意した。それぞれの試料は PBS 緩衝液 (pH7.5) に 37°C で 24 時間保存した。

得られた薄片を国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構、量子ビーム科学研究部門高崎量子応用研究所にある 3MV 級シングルエンド加速器を用いて In-air μ PIGE/PIXE 解析法を用い、薄片試料表面の露出象牙質に於ける表層から 100 μ m の深部までのフッ素の取り込みを測定した。

5.3 結果および考察

Fig.6 に各群におけるフッ素の取り込み量を示す。HS 群はコントロール群と比較して、有意に多いフッ素の取り込みを認めた。

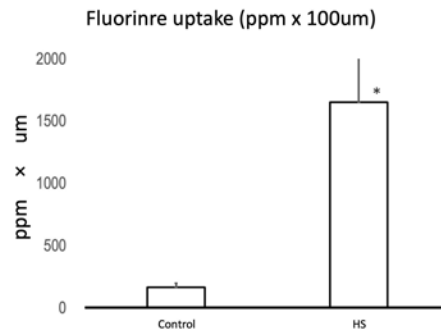


Figure 6. The F uptake for HS group had significantly higher value comparing to that for Control group ($p < 0.05$, t-test).

μ PIGE/PIXE を用いた Ca と F の分布イメージを示す。HS 群ではフッ素のシグナルが象牙質表層に強く認められた。

以上の結果から、HYS 群がコントロール群と比較

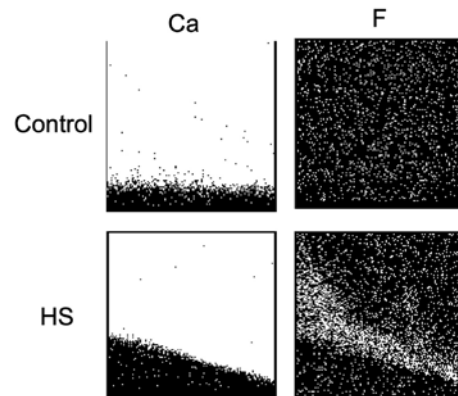


Figure 7. The white dots represent PIGE signals from calcium and fluorine in transverse images.

して有意にフッ素含有量が多く、歯質表面へのフッ素の取り込みが認められた。また、得られた画像からも歯質表層に帯状に分布するフッ素が視覚的にも確認出来た。このことから、Hys ブロックジェルからフッ素が歯質に取り込まれたことが確認された。

今回の結果から、Hys ブロックジェルの歯面塗布によって歯質へのフッ素取り込みが示され、同材のフッ化物局所応用としての有効性が示唆された。Hys ブロックジェルはフッ素による歯質強化の他に、スルホン酸基を有する共重合体とシュウ酸が同時に歯質の Ca 成分と化学反応してシュウ酸 Ca 結晶を含む高分子保護皮膜を形成することで知覚過敏を抑制することから、知覚過敏抑制の他にう蝕予防や脱灰抑制といった予防的作用を併せ持つ多機能う蝕予防材料として期待される。

参考文献

Fig.7 に HS 群とコントロール群の In-air

[H30-1]

- [1] Y.[Koga](#), T.[Satoh](#), M.[Koka](#), K.[Dobashi](#) et al. Elemental and immunohistochemical analysis of the lungs and hilar lymph node in a patient with asbestos exposure, a pilot study.[Environ Health Prev Med](#). 21(6):492-500. 2016
- [2] Wang Z, Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Arch*. 448, 274-86, 2004.