血液関門細胞における薬剤輸送、ホウ素中性子捕捉療法及び放射線による抗癌 剤標的療法への大気マイクロ PIXE 分析の応用"

Application of PIXE Analysis for Three Biological Researches: Drug Transport in Microvascular Endothelial Cells, Boron analysis for neutron capture therapy, and Targeted Anticancer Drug Delivery Directed by Radiation.

原田 聡 #A), 櫻井 映子 B),中井 啓 C), 佐藤 隆博 D)

Satoshi Harada #,A), Eiko Sakurai B), Kei Nakai C), Takahiro Satoh D)

^{A)} Department of Radiology, School of Medicine, Iwate Medical University,

^{B)} School of Pharmacology, Iwaki Meisei University.

^{C)} Department of Radiation Oncology, School of Medicine, University of Tsukuba.

^{D)} Takasaki Advanced Radiation Research Institute,

National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology.

Abstract

With the aim of improving radiotherapy, a micro-particle-induced X-ray emission (micro-PIXE) camera has been used to study the following: 1) the interaction of trace elements with brain microvascular endothelial cells (BMECs) during drug transport, in association with chlorpheniramine (CP), fexofenadine (Fex), nicotine (N), and/or antihistamine (HA); 2) the utility of a micro-PIXE camera in boron neutron capture therapy (BNCT); and 3) targeted delivery of carboplatin using particles that release their contents upon radiation.

To study the interaction of trace elements with BMECs during drug transport, the kinetics of Mg, Al, Fe, Mn, Zn, Cu, and Ni in BMECs of rats administered CP, Fex, N, and/or HA were observed using a micro-PIXE camera. Nicotine stimulation increased the kinetics of Fe, Ni, Cu, Zn, and Mn. Fex seemed to increase nicotine intake in BMECs in the presence of Zn and S.

To investigate the utility of the micro-PIXE camera in BNCT, imaging of intracellular and extracellular borocaptate sodium (BSH) in rat C6 and human U251 glioma cells was tested in vitro. Micro-PIXE imaging was performed by imaging the 2.124 MeV characteristic X-ray of B¹⁰ using a NaI detector system. This micro-PIXE system did not have sufficient sensitivity to detect B¹⁰; therefore, the system was optimized by changing the NaI detector to a HPGe detector. To study the targeted delivery of carboplatin, the nanoparticles were prepared by spraying a mixture of hyaluronic acid and alginate supplemented with carboplatin into a solution of CaCl₂ and FeCl₂ through a 0.8- μ m pore stainless mesh filter. The nanoparticles peaked. The nanoparticles accumulated around the tumors, with maximum accumulation observed 9 h after injection. Subsequently, 10–40 Gy of radiation was administered. The accumulated nanoparticles released carboplatin, and their outer shells gelatinized, which prolonged the intratumoral localization of carboplatin and increased the antitumor effect via a synergistic effect with radiation. The localization of carboplatin by nanoparticles significantly reduced the adverse effects of the anticancer drug.

Keyword: Pharmaceutical transport, Microvascular endothelial cells, 4-10B-Borono-2-18F-fluoro-l-phenylalanine (f-BPA), Boron neutron capture therapy (BNCT), Microcapsule, Drug delivery systems, radiation

1. はじめに

1.1 研究の概要

抗化学療法、およびホウ素中性子捕捉療法は、抗癌 剤、あるいはホウ素が毛細血管血液関門を通過後 (Figure 1 A)、腫瘍に作用する事で抗腫瘍効果を発 揮する(Figure 1 B、C)。本実験では、癌化学療法、 およびホウ素中性子捕捉療法の増強を目的に,以下 の研究を施行している。すなわち、① 毛細血管の 血液関門細胞と薬剤輸送(Figure 1 A、櫻井班),②





細胞膜融合粒子による細胞内ホウ素分配促進(Figure 1 B、中井班) ③ 放射線に反応して抗癌剤を放出 する particle を用いた放射線による抗癌剤デリバリ ーシステム(Figure 1 C,原田班)の3項目である。 以下に、各班の2019年度における研究目的を記す。

尚、2019年8月より、櫻井班のプロジェクトが櫻井 映子トロント留学のため、中止となったため、①の 櫻井班に関しては、2019年度達成分の報告となる。

1.2 各班の研究目的

 毛細血管の血液関門細胞と薬剤輸送(担当櫻井 班)(Figure 1 A)

微小血管内皮細胞は、栄養素や生体に必要な物質な どを選択的に血管内に取り込む役割を持っている。

生態の生命維持に関係ない物質にとっては、他取れ それが治療目的の薬剤であっても、最初の関門とな って、排除する機能を有している。

脳には脳毛細血管内皮細胞(Brain Blood Barrier 略して BBB と呼ばれる)があり、血液脳関門の機能の役割を担っている輸送たんぱく等についての報告はあるが、それらが機能するための微量元素の存在は不明である。

2019年度は、BBBを通過しやすい薬物と通過しにくい薬物を加えた時に微量元素の動態を明らかにすることを目的とした。[1]

② 細胞内ホウ素分配促進 による中性子捕捉療法
 の効果増強(担当:中井班) (Figure 1 B):

ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、2020年6月より、 頭頚部がんで保険収載となり、一般治療への歩みを 始めたところである。加速器中性子線源が確立し、

新規ホウ素化合物の実用化が次世代 BNCT の課題で ある。しかし、現在の臨床条件におけるホウ素化合 物ですら、腫瘍細胞内、腫瘍血管、間質などでどの ような分布、経時変化を取るのか、詳細には検討さ れていない。本班の研究では、Micro-PIXE /PIGE 同 時測定によって、微小環境におけるホウ素分布およ び動態を解明し、BNCT の線量評価、臨床効果のた めの放射線生物学的裏付けを研究する[2]。

③ 放射線に反応してPt含有抗癌剤を放出と腫瘍細胞への到達による、放射線による抗癌剤デリバリーシステムの開発(担当 原田班):

放射線に反応して抗癌剤を放出する Particle を作成

し、放出された抗癌剤と放射線の相乗作用による抗 腫瘍効果増強、および Particle による薬剤原曲化作用 による抗癌剤副作用軽減を研究して来た。

2018 年度までには、Particle の径が 23µm と大きく、 腫瘍周囲に直接注入する事ができたものの、経静脈 的に注入すると、肺、脳、腎に Particle が塞栓を形成 し、肺梗塞、脳梗塞、腎梗塞を起こしていた。

2019 年度は、経静脈投与時のこれら障害を無くすと 同時に、血管内皮の結合が粗雑な腫瘍血管から主要 組織への促進の移行を促進する目的で、Particleの微 細化を行い、経静脈的に Particle を注入、抗腫瘍効果 増強と、抗癌剤副作用軽減を検討した。[3,4]

2. 各班における研究方法と現時点での研究 成果 :

<u>2.1 ①毛細血管の血液関門細胞と薬剤輸送 (担当 櫻井班):</u>

脳微小血管内皮細胞採取:

3週令のC57BL/6マウスを日本SLC株式会社から購入した。Magee らの方法を応用して、マウス血液関 門細胞より採取した。細胞は、DMEM/F-12 でコラ ーゲンコートした培養フラスコを使用して、CO2 イ ンキュベーター内で培養し、使用まで液体窒素内で 冷凍保存した。

<u> 脳微小血管内皮細胞に対する、クロルフェニラミン:CP、フェキソフェナジン:Fexの影響:</u>

コラーゲンコートした PIXE 分析用膜上に DMEM/F-12で培養した。PIXE 分析用膜上で細胞に ニコチンまたは薬物 (クロルフェニラミン:CP、フェ キソフェナジン:Fex)または両方を作用して凍結乾燥 後、高崎量子応用研究所で元素分析を行った。

2.1.2 結果、および考察:

<u>主要血管における血液関門細胞の微量元素の有無と、</u> 微量元素と薬剤輸送動態との関連:

血液関門細胞にニコチン 0.2, 2, 20, 200 µg をそれぞ れ 5 分間作用させた micro PIXE 画像を Fig. 2.1.2.1 に、フェキソフェナジン FEX:クロルフェニラミン: CP, ニコチン:N を作用させた時の各微量元素動態 を Fig. 2.1.2.2 に示す。









Fig. 2.1.2.2

Fig. 2.1.2.3.

脳微小血管内皮細胞(Brain microvascular endothelial cells: BMECs) に微量金属元素が検出さ れた。ニコチンの刺激で、脳血液関門で活性酸素が 発生している可能性が示唆された。(Fig. 2.1.2.1.)

フェキソフェナジンと Zn と S により、ニコチンは BBB へ取り込みが阻止されている可能性が見出さ れた。(Fig. 2.1.2.1.2)

抗ヒスタミン剤 (HA) の脳血管関門通過に対する フェキソフェナジン FEX:クロルフェニラミン: CP の影響を Fig. 2.1.2.3 に示す。

HA は BBB を通過しにくいと言われていたが、今回 BBB への取り込みが少ないことが明らかとなった。 BBB を通過しやすい CP の併用では、HA は BBB に 取り込まれ易くなっている可能性が、Fex の併用で は、S が HA の併用により下がっていることから HA の BBB の取り込みがさらに阻止されている可能性 が示唆された。

2.22細胞内ホウ素分配促進	による中性子捕捉療法
の効果増強(担当:中井班):	

2.2.1 材料、および方法

 5μ m 厚の polycarbonate 膜上で細胞培養する専用 容器を開発し利用している。また、薄膜上での細胞 付着性向上のため、ポリリジン・コラーゲンコート を行っている。CT26 murine colon cancer、U251 human glioma を 膜 上 で 培 養 し 、 ホ ウ 素 化 合 物 boronophenylalanine(BPA) も し く は borocaptate Sodium(BSH) 800 μ gB/mL を 2 時間暴露させる。作 用後、PBS/MEM で洗浄、凍結真空乾燥処理後、micro PIXE/PIGE の同時測定検体とし、微量元素分析を施 行した。

今回は検出器として Nal 検出器の利用を試みるため、

Natural boron 由来 BPA を利用した検体も作成し、 NaI 検出器によって、2.124MeV のホウ素由来ガンマ 線の検出可否を検討した。その際には、加速器を 3MeV 運転とし、ゲルマニウム半導体検出器にかえ て、NaI シンチレーションスペクトロメーターを設 置し、同位元素が天然存在比のホウ素化合物を用い て、計測を行った。。

U251 human glioma に、800ugB/mL の f-BPA/BSH を 2 時間作用させた後、PIXE/PIGE 分析を施行した ところ、細胞の形状と B の分布がおおよそ一致する 条件も見出すことができた。(BSH、無洗浄で凍結 乾燥)細胞の存在についてリン、硫黄の元素位置画 像を計算によって可視化し、ホウ素存在位置に重ね 合わせて可読性の高い画像を取得した。(Figure 2.2.2.1)



Fig. 2.2.2.1

NaI 検出器によるホウ素検出は、ホウ素窒素固体 サンプルではピークが検出され、全体のカウントに 対するホウ素カウントで推測すると、HPGe につい ては 634/5845 (10.8%)、一方で NaI においては、 965/5860 (16.5%)と検出可能性が期待された。しかし、 この試料は天然組成ホウ素であり、B10 は含有率約 20%であるため実際には HPGe のほうが約3 倍検出 効率がよい。実際に行われた細胞検体では天然組成 ホウ素を用いてもピークはわずかにしか確認できず、 多元素が混入する生体試料における S/N 比の不足が 考えられた (Figure 2.2.2.2)

したがって現状のシステムでは、NaI 検出器を用いた、BNCT 条件での試料については、ホウ素分布検出は不適と考えられた。



Fig. 2.2.2.2

 2.3 ③ 放射線に反応して Pt 含有抗癌剤を放出と腫 瘍細胞への到達による、放射線による抗癌剤デリバ リーシステムの開発(担当 原田班):
 2.3.1 材料と方法
 2.3.1.1 パーティクル精製: **10ml**の0.2% (weight/volume) アルギン酸,0.1% ヒ アルロン酸混合溶液に and 10 mg carboplatin を混和 した後、 超音波破砕装置 (Branson SONIFIIER 150、出力9ワット)を用いて、径0.8 µm 孔のステ ンレスメッシュフィルターを介して、0.3 mMol/1の CaCl₂と FeCl₂に噴霧した。

2.3.1.2 パーティクル径測定: 同パーティクル浮遊 液をターゲットホールダーのマイラー膜上に滴下、 凍結真空乾燥した Lipid 封入型ヒアルロン酸-プロ タミンパーティクル 100 個を micro PIXE camera で 観察し、その平均径で表した。

<u>2.3.1.3 担癌モデル作成とパーティクル注入、および放射線照射:</u>

C3He/N マウス(6週令、♂)に、マウス乳がん細胞 MM46 1 ×10⁶個を注入し、径 8 mm 大となった時点 で実験に使用した。作成したパーティクル 1 ×10¹⁰ 個を生理的食塩水 0.1 ml に浮遊させ、担癌マウス尾 静脈から注入、注入後、腫瘍へのパーティクル集積 が最大となった時点で、100 KeV 軟 X-線を、10、20、 30 あるいは 40 Gy を照射した。

2.3.1.4. 静脈注入後の組織剖出;放射線照射 1,3,6,9, 12 24 時間後に、CO₂ チェンパーを使用して、マウ スを安楽死させた直後に、肺、脳、腎肝臓、脾臓、 腫瘍を剖出し、-20℃で組織を保存した。

2.3.1.5. micro PIXE camera のターゲット作成、および。 上記組織を凍結したまま、マイクロトームを用いて、 厚さ3 μ m に薄切後、1 μ m 厚のマイラー膜上に静置 し、1 × 10⁻³ Torr の真空度で凍結真空乾燥後、 micro PIXE camera のターゲットとした。各組織から、 5 つのターゲットを作成し、これを 8 匹のマウスに 関して行った。Micro PIXE camera は各々のターゲッ トに、3 MeV proton beam(径 2 μ m)を照射し、発生 した特性 X 線画像を画像化する事で行った。(Fig. 2.3.1.1 A, B, C)



2.3.16 破裂率測定: Micro PIXE camera を用いて、剖 出した組織切片用検体中の Pt (カルボプラチンに含 まれる元素)分布を5×5 μ m の範囲で画像化す る事でパーティクルを観察後、それらの形態を I か ら III の 3 つのタイプに分類した。タイプ I (Fig. 2.3.1.6 A): 表面が滑らかで、中心部に Pt の高集積が観察さ れるもの。タイプ II (Fig. 2.3.1.6 B): Particle の形態が 不整で、周囲に Pt の放出が見られるもの、タイプ III: パーテイクルの形態が観察されず、周囲に放出され た Pt(Fig. 2.3.1.6 C) の分布が認められるもの。これ ら I~III の内、タイプ II と III を破裂したパーティク ルとみなした。破裂率は5×5 μ m の 10 視野中の 破裂したパーティクルの平均百分率で表した。

2.3.1.7 抗腫瘍効果測定、副作用評価: C3He/N マ抗 腫瘍効果は、処置後、毎日腫瘍径を測定する事で評 価し、副作用の程度は処置 21 日後のマウス死亡、体 重減少、体毛の毛羽立ちによって評価した。抗腫瘍 効果測定、副作用測定とも、各処置群に関して、8 匹のマウスを使用した。

<u>2.3.1.7 統計計算:</u> ANOVA (analysis of variance) に より分析を行い、P < 0.05 を有意差ありと判定した。

2.3.2 結果

2.3.2.1.:micro PIXE camera によるパーティクル観察とその破裂率:micro PIXE camera を使用した Pt 画像によるパーティクルを、前途の如く、Figure 2.3.
1.6A, B, C に示す。照射前、パーティクルの殆どはタイプ I(Fig. 2.3.1.6A)であり、その長径は547±0.3 nm 大であった。照射後、パーティクル表面は不整となり、中心部のPt集積が不明瞭化し、破裂した、タイプ II, III (Fig. 2.3.1.6B, C)の割合が線量依存性に増加し、最大は40 Gy 照射時の67%であった。(Fig. 2.3.2.1)



<u>ティクルの体内動態</u>:静脈注射後における、パーティクルの体内動態を、肺、脳、腎肝臓、脾臓、腫瘍 中の経時的パーティクル数の変化を、微細化していないパーティクル(Fig. 2.3.2.2 A)と微細化したパー ティクル(Fig. 2.3.2.2 B)に分けて比較した。

微細化前のパーティクル(径 23 μm 前後)では、腫 瘍組織よりも、脳、腎肝臓、脾臓へのパーティクル 集積が有意に高く、最大の集積は肺組織への集積で あった。(Fig. 2.3.2.2 A)反面、微細化後では腫瘍へ のパーティクル集積が、脳、腎肝臓、脾臓有意に高 く、その経時的最大値はパーティクル静脈注射後 9 時間後に観測された。(Fig. 2.3.2.2 B)





Fig. 2.3.2.2

2.3.2.3 放射線照射と抗腫瘍効果 (Fig. 2.3.2.3): 微細 化されたパーティクルの集積が、静脈注射9時間後 に認められたため、パーティクル静脈注射9時間後 に、腫瘍に対して、100 KeV X 線、10, 20, 30, あるい は40 Gyを照射して、抗腫瘍効果を測定した。 非パーティクル化したカルボプラチンの抗腫瘍効果 (●)は、放射線照射単独 (●、10, 20, 30, あるいは 40 Gy のいずれも)よりも抗腫瘍効果が強く、放射線 とカルボプラチン併用では、パーティクル化しなか ったカルボプラチン(●)とパーティクル化したカ ルボプラチン (●) のいずれにおいても、カルボプ ラチン単独よりも強い抗腫瘍効果が生じた。パーテ ィクル化しなかったカルボプラチンとパーティクル 化したカルボプラチン間の比較においては、パーテ ィクル化したカルボプラチン(●)の方が、パーテ ィクル化しなかったカルボプラチン(●)よりも長 期に抗腫瘍効果が持続し、放射線照射3日後で、パ ーティクル化した抗腫瘍効果が、パーティクル化し なかった抗腫瘍効果よりも有意に強く作用した。



Fig. 2. 3. 2. 3

<u>2.3.2.4</u> パーティクル化による抗癌剤副作用軽減。 (Table-1)

副作用の強さを、マウス死亡、体重減少、体毛の毛 羽立ちを表したマウスの数で示す。各項目ともにパ ーティクル化による副作用軽減が観察され、特に、 カルボプラチン投与によるマウス死亡に関しては、 パーティクル化されいないカルボプラチン投与群の 死亡が、2.6 匹~4 匹だったのに対して、パーティク ル化されたカルボプラチンを投与された群に関して は、いずれも0であった

	MM46 tumor		
	body weight loss	fuzzy hair	dead
10 Gy	0.4±0.2	0.6 ± 0.2	0.0 ± 0.0
20 Gy	0.8±0.2	1.8±0.2	0.0 ± 0.0
30 Gy	1.2 ± 0.3	2.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0
40 Gy	1.6±0.6	3.0 ± 0.4	0.0 ± 0.0
Unencapsulated carboplatin only	3.6±0.2	4.2±0.2	2.6±0.4
10Gy + Unencapsulated Carboplatin	4.4±0.4	5.0 ± 0.0	3.2 ± 0.5
20Gy + Unencapsulated Carboplatin	4.4 ± 0.4	5.0 ± 0.0	3.8 ± 0.5
30Gy + Unencapsulated Carboplatin	4.4±0.2	5.0 ± 0.0	3.8 ± 0.3
40Gy + Unencapsulated Carboplatin	4.8±0.2	5.0 ± 0.0	4.0 ± 0.3
Encapsulated Carboplatin	0.0±0.0	0.6±0.2	0.0 ± 0.0
10 Gy + Encapsulated Carboplatin	1.2±0.2	1.6 ± 0.4	0.0 ± 0.0
20 Gy + Encapsulated Carboplatin	1.2±0.3	2.0 ± 0.6	0.0 ± 0.0
30 Gy + Encapsulated Carboplatin	1.8±0.5	3.0 ± 0.4	0.0 ± 0.0
40 Gy + Encapsulated Carboplatin	2.2 ± 0.5	3.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0



3. 総括、および今後の展望

櫻井班より、BBB (脳血管関門)において、Fex (フ ェキソフェナジン)と Zn と S により、N(ニコチン) は BBB へ取り込みが阻止されている可能性が見出 された。

HA(抗ヒスタミン剤)はBBBへの取り込みが少 なかったが、BBBを通過しやすいCP(クロルフェ ニラミン)の併用では、HAはBBBに取り込まれ易 くなっている可能性が、Fexの併用では、SがHA の併用HAのBBBの取り込みがさらに阻止されて いる可能性が示唆された。これより、BBBにおける 薬剤通過と微量元素との関連がさらに明らかにさ れ、薬剤の脳への効率的な輸送が期待できる。

中井班では、現状のシステムでは、BNCT(ホウ素中性子捕捉療法)条件での資料に関しては、方お 分布検討が不適である事が明らかにされ、今後、装 置の適正化による micro PIXE camera の BNCT 資料 測定の必要性が示唆された。

原田班では、放射線によってカルボプラチンを放 出するパーティクルの微細化に成功し、静脈注射時、 腫瘍組織への集積が観測され、腫瘍に放射線を照射 するとカルボプラチンが腫瘍に集中する事が観測 された、さらに、放射線とカルボプラチンとの相乗 効果により抗腫瘍効果が増強し、パーテイクルによ るカルボプラチン限局化作用により、カルボプラチ ン副作用軽減に成功した。今後、放出される薬剤を、 抗癌剤から免疫療法剤に幅を広げて、放射線治療の 範囲を照射部位のみから、免疫系を介した、照射部 位以外へのがん治療(abscopal effect)に発展させる つもりである。

本研究プロジェクトは、micro PIXE camera を用い た薬剤動態観察により、micro PIXE camera の医学利 用を目的としている。BNCT への応用に関しては、 micro PIXE camera 装置の適正化が求められているが、 本装置の成熟化に繋がると考えられる。

本プロジェクトはおおむね、micro PIXE camera の医 学利用にむけて前進していると考えられる。

4. 追記:

原田班の成果の詳細は、Radiat. Res. 193, P 263–273 2020. [4]にて発表した。原田班の研究の一部には、 文部科学省科学研究費基盤研究 C No. 17K16489 (原 田 聡)を使用した。

参考文献

[1] Sakurai E, et al., Flavin-Containing Monooxygenase (FMO) Protein Expression and Its Activity in Rat Brain Microvascular Endothelial Cells., Pharmacology & Pharmacy, 4, pp.1-6 2013.

[2] E Sato, et.al. Radiobiological response of U251MG, CHO-K1 and V79 cell lines to accelerator-based boron neutron capture therapy..J Radiat Res, 59(2), pp.101-107, 2018.

[3] S Harada, et. al. Targeted concurrent

chemoradiotherapy, by using improved microcapsules that release carboplatin in response to radiation, improves detectability by computed tomography as well as antitumor activity while reducing adverse effect in vivo Biomed. & Phalmacother, 70, P 196-205 2015

[4] Takafumi Segawa, Satoshi Harada, Takahiro Sato, and Shigeru Ehara, Delivery and Effectiveness of Carboplatin via Targeted Delivery Compared to Passive Accumulation of Intravenously Injected Particles Releasing,Carboplatin upon Irradiation. Radiat. Res. 193, P 263–273 2020.