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 Neutron Capture Therapy, and Targeted Anticancer Drug Delivery Directed by Radiation

櫻井 映子 ^{A)}, 中井 啓^{,B)}, 原田 聡 ^{C)}, 佐藤 隆博 ^{D)}, Eiko Sakurai ^{A)}, Kei Nakai ^{B)}, Satoshi Harada ^{C)}, Takahiro Satoh^{D)}

^{A)} School of Pharmacology, Iwaki Meisei University.
^{B)} Department of Radiation Oncology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba.
^{C)} Department of Radiology, School of Medicine, Iwate Medical University,
^{D)} Takasaki Advanced Radiation Research Institute, QST.

Abstract

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

To study the interaction between trace elements and BMECs during drug transport, the kinetics of Mg, Al, Fe, Mn, Zn, Cu, and Ni in BMECs of rats under administration of CP, Fex, N, and/or HA was observed using the micro-PIXE camera. The kinetics of Fe, Ni, Cu, Zn, and Mn were increased by N stimulation. The uptake of N by BMECs seemed to be increased by Fex under Zn and S.

To investigate the feasibility of using the micro-PIXE camera for BNCT, imaging of intracellular and extracellular sodium mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate in human glioma U251 cells was performed in vitro. Micro-PIXE imaging successfully showed boron distribution in U251 cell. Moreover, count rate of PIXE strongly correlated with the intracellular boron concentration measured using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy.

To confirm the targeted delivery of carboplatin in a MM46 tumor model, which was observed in the study of 2019, the MM48 tumor model was added in the 2019 study. The nanoparticles were prepared by spraying a mixture of hyaluronic acid and alginate, supplemented with carboplatin, on a solution of CaCl₂ and FeCl₂ through a 0.8-m pore stainless mesh filter. Nanoparticles (1×10^{10}) were injected intravenously. The intravenously injected nanoparticles accumulated around MM46 and MM48 tumors. Maximum accumulations were observed 9 hours after injection in MM46 and MM48 tumors. Subsequently, radiation of 10–40 Gy was administered. The accumulated nanoparticles released carboplatin and gelatinized their outer shells, which prolonged the intra-tumor concentration of carboplatin and increased the antitumor effect via a synergistic effect with radiation in MM46 and MM48 tumors. The localization of carboplatin by nanoparticles significantly reduced the adverse effects of the anticancer drug in the MM46 and MM48 tumor models.

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

1.はじめに

1.1 研究全体の概要

癌化学療法、およびホウ素中性子捕捉療法では、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.

(Figure 1 A)、腫瘍に到達する必要がある(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、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項目を研究している。このうち、櫻井班は班長の櫻井映子がトロント留学のため、2019年度で実験を終了、中井班と原田班は2020年度期間中、COVID-19蔓延による日本原子力研究所、高崎量子応用研究所への来所不能のため、2020年度の研究進展はあまり見られなかった。以下に、上記3グループの研究について記す。

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]

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、 頭頚部癌で保険収載となり、加速器中性子線源も確 立した現在、新規ホウ素化合物の実用化が次世代 BNCTの重要課題として残されている。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、間質における分布、経時変化です ら、詳細には検討されていないのが現状である。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のを目的とする。

2020 年度では、高濃度ホウ素 B(800ug/mL)・短時間 (2時間暴露)での、U251 腫瘍細胞における、micro PIXE camera による検出を目標とした。[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が、 2020 年度に Particle を 500nm まで微細化する事に成 功し、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事に成功した。[3] [4] 2020 年度では、本 Particle を静脈注射した時の、抗 腫瘍効果増強、副作用軽減について、乳がん由来の MM46 と、MM48 の二つの腫瘍に関して研究を加え る。

 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</u> 櫻井班):

櫻井班は 2019 年度に研究を終了したため、2019 年 度の報告と重複して報告する。

2.1.1 材料と方法:

脳微小血管内皮細胞採取:

3週令のC57BL/6マウスに対して(日本SLC株式会) Magee らの応用法を使用し、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)または両方を作用させ、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:

主要血管における血液関門細胞の微量元素の有無と、 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 Figure. 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 Figure. 2.1.2.2 に示す。

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。(Figure. 2.1.2.1.)

[H30-2]



Figure. 2.1.2.1.



Figure. 2.1.2.2.





Figure. 2.1.2.3.

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。(Figure. 2.1.2.2)

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 Figure. 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:5µm 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。U251 human glioma を膜上で培養し、ホウ素化合物 800µgB/mL の f-BPA/BSH を 2 時間作用させた後 PBS/MEM で洗 浄、凍結真空乾燥処理後、micro PIXE/PIGE による微 量元素分析を施行した。

結果、細胞形態と一致た Boron の分布が可視化され (Figure. 22.1.1.)、その PIGE count rate は、ICP-AES に よるホウ素測定との関連性が認められ、両者間には $r^2 = 0.9964$ の強い正の相関が認められた (Figure. 2.2.1.2.)。



Figure. 2.2.1.1



Figure. 2.2.1.2

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</u> 放射線照射:

C3He/N マウス(6週令、♂)に、マウス乳がん細胞 MM46,あるいは MM48 を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。(Figure. 2.3.1.1. A, B, C, D)

23 .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 (Figure. 2.3.1.1 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 (Figure. 2.3.1.1 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(Figure. 2.3.1.1 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



(Figure. 2.3.1.1. A, B, C, D)

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 パーティクルの体内動態:

MM46 と MM48 の担癌マウスの体内動態を 5×5 μm の 5 視野中の平均パーティクル数で表し、それぞれ、 Figure. 2.3.2.1 A と B に示した。

2019 年度に施行したパーティクルの微細化により、 MM46、および MM48 腫瘍へのパーティクル集積が、 脳、肝、腎、脾、肺よりも有意に高値を示した。集 積のピークは、両腫瘍ともに、静脈注入 9 時間後に 認められ、MM46 では 4.3±0.7 個、MM48 では 4.2 ±0.4 個であった。



(Figure. 2.3.1.2. A, B,)

2.3.2.2.:micro PIXE camera によるパーティクル観 <u>察とその破裂率</u>: 実験 2.3.2.1 で、静脈注入 9 時間 後にパーティクルの集積ピークが認められたため、 その時点で 100 KeV 軟 X-線を、10、20、30 あるい は 40 Gy を照射した。照射前と各線量照射後におけ るパーティクル画像を micro PIXE camera を使用し た Pt 画像により、Figure 2.3.1.3 A, B, C に示す。照 射前、パーティクルの殆どはタイプ I (Figure. 2.3.1. 1 A)であり、その長径 は 547 ±0.3 nm 大であった。

[H30-2]



(Figure. 2.3.1.3 A, B,)

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 (Figure. 2.3.1.1 B, C)の割合が, MM46、MM48の各腫瘍内 ともに、線量依存性に増加し、腫瘍組織の違いによ る破裂率の有意な変化は認められなかった。破裂率 は 40 Gy 照射時で最大となり、MM46 では 68.4 ± 4.3%, MM48 では 68.6 ± 3.9%であった。 2.32.

2.3.2.3 放射線照射と抗腫瘍効果 (Figure. 2.3.2.3):

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。

2019年度の報告では、測定対象組織が MM46 のみで

あったが、その結果の真偽を検証するため、今回、 MM48 腫瘍組織を新たに加え、2 種類の腫瘍組織か ら、総合的に判定した。

MM46 (Figure. 2.3. 1. 4 A-D)、 MM48(Figure. 2.3. 1. 4 E-H)のいずれの腫瘍組織においても、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 MM46, MM48 のい ずれも腫瘍組織の腫瘍組織においても長時間持続し、 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(Figure. 2.3. 1.4 A-D & E-H)。最 大の抗腫瘍効果は、MM46 腫瘍、MM48 腫瘍ともに、 照射 40 Gy 時に観察された(Figure. 2.3. 1. 4 D & H)。



(Figure. 2.3.1.4 A-H)

		MM46 tumor			MM48 tumor	
	body weight loss	fuzzy hair	dead	body weight loss	fuzzy hair	dead
10 Gy	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.6±0.2	0.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0
20 Gy	0.8 ± 0.2	1.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
30 Gy	1.2 ± 0.3	2.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.3	2.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0
40 Gy	1.6 ± 0.6	3.0 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.4±0.5	2.8 ± 0.3	0.0 ± 0.0
Unencapsulated carboplatin only	3.6 ± 0.2	4.2±0.2	2.6 ± 0.4	3.4 ± 0.2	4.4±0.2	2.4±0.2
10Gy + Unencapsulated Carboplatin	4.4 ± 0.4	5.0 ± 0.0	3.2 ± 0.5	4.2 ± 0.3	5.0 ± 0.0	3.0 ± 0.6
20Gy + Unencapsulated Carboplatin	4.4 ± 0.4	5.0 ± 0.0	3.8 ± 0.5	4.0 ± 0.4	5.0 ± 0.0	3.6 ± 0.5
30Gy + Unencapsulated Carboplatin	4.4 ± 0.2	5.0 ± 0.0	3.8 ± 0.3	4.2 ± 0.3	5.0 ± 0.0	3.6 ± 0.5
40Gy + Unencapsulated Carboplatin	4.8±0.2	5.0 ± 0.0	4.0 ± 0.3	4.6 ± 0.4	5.0 ± 0.0	3.8 ± 0.3
Encapsulated Carboplatin	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0
10 Gy + Encapsulated Carboplatin	1.2 ± 0.2	1.6 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.4 ± 0.2	1.8 ± 0.4	0.0 ± 0.0
20 Gy + Encapsulated Carboplatin	1.2 ± 0.3	2.0 ± 0.6	0.0 ± 0.0	1.4 ± 0.2	2.2 ± 0.5	0.0 ± 0.0
30 Gy + Encapsulated Carboplatin	1.8 ± 0.5	3.0 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.6 ± 0.4	2.8 ± 0.3	0.0 ± 0.0
40 Gy + Encapsulated Carboplatin	2.2 ± 0.5	3.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0	2.0 ± 0.5	3.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0

(Table-1)

2.3.2.4 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。MM46、MM48 のいずれの担癌マウスにおいても、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て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

総括

2020年度では、櫻井班班長、櫻井映子のカナダ留学 に伴うグループ離脱のため、2019年度からの進展が みられていない。中井班、原田班においても、C OVID-19蔓延に伴う、高崎量子応用研究への来所が 不可能となり、わずかな進展しか認められなかった。 そのため、本項では、各班における現在までの実験 結果をまとめて記入する。

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された。

中井班では、micro PIXE camera を用いた Boron 分 布の可視化に成功し、その PIGE count rate は、 ICP-AES によるホウ素測定との強い関連性がある事 を突き止めた。 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た。今回、 MM46、MM48 の2種の担癌マウスに常住しても、 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 ィ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が起こることを観測した。 今後、臨床応用を検討するつもりである。

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。

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] Kei Nakai, et al. Boron analysis and imaging of cells with 2-hr BPA exposure by using micro-proton particle-induced gamma ray Emission (PIGE). Applied Radiation and Isotopes 165 166-170 2020.

[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, Targeted delivery of carboplatin via passive accumulation of intravenously injected particles releasing carboplatin upon irradiation. Radiat. Res. 193 P 263-273 2020.