

有機系飛跡検出器を用いた生体内ドシメトリー技術の開発に関する研究

小倉 紘一 (教養・基礎科学系)

1. はじめに

有機系飛跡検出器を用いた生体内ドシメトリー技術の開発を目的とする本研究^{1), 2)}は、重イオンを用いた癌治療や中性子捕捉癌治療の有効性を評価するための基礎研究として、

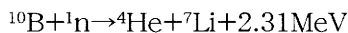
- 1) マウス腫瘍部及び臓器内の¹⁰Bの分布状況と濃度の定量^{1), 3), 4)}
- 2) マウス腫瘍部における *in vivo (in situ)* ドシメトリー^{2), 5)}
- 3) 高感度高分子飛跡検出器の開発²⁾⁻⁴⁾

を並行して行っている。

今年度は、1)の研究に関して進展が見られたので以下にその研究経過と成果を報告する。

2. 中性子捕捉癌治療とは

手術が困難な癌の治療法にホウ素中性子捕捉療法(Boron Neutron Capture Therapy: 略称 BNCT)がある。BNCTとは、腫瘍部に人為的に¹⁰B元素を注入し、原子炉から腫瘍部に熱中性子束を照射した際に生じる原子核反応



を利用する細胞内内部照射による癌治療法であり、一部の脳腫瘍には既に臨床適用されている。わが国では、日本原子力研究所のJRR-4が医療用原子炉として整備され、BNCTに利用されている。上記の核反応で放出されるエネルギー1.48MeVの α 粒子や0.83MeVの⁷Li粒子などの重荷電粒子は生体内での飛程が短く(10 μ m以下)、腫瘍部以外の正常組織を傷つけることなく効率良く悪性細胞を破壊することができる。一方で、熱中性子は生体内の窒素核との¹⁴N(n,p)¹⁴C反応で0.59MeVの陽子をも放出する。さらに、原子炉からの熱中性子束のなかに混入している速中性子は生体内の水素原子核と衝突して反跳陽子をたたき出す。窒素や水素は生体の主たる構成原子であるから、これら陽子の発生は無視することができず、その飛程が長いことと相まって、正常な組織に放射線損傷を与えることになる。したがって、BNCTによる癌治療が有効であるためには、まず、静脈注射により生体内に注入された¹⁰B元素が確実に患

部に運ばれ固定されている必要があるばかりでなく、BNCTの効果を厳密に評価するためには、患部ならびに他の正常な臓器内の¹⁰Bの分布状況と濃度を決定することが不可欠である。

現在、BNCTを脳腫瘍以外の臓器癌にも適用することが考えられている。今年度は、ヒト膵臓癌や大腸癌の細胞を背中に移植されたマウスに¹⁰B化合物を静脈から注入した場合、¹⁰Bを腫瘍部まで効率よく運び固定するのに最も有効な¹⁰Bデリバリードラッグの有効性を評価し、生体内¹⁰B濃度分布状況を把握する実験をBNCTの基礎研究として行った。

3. マウスの生体内¹⁰B濃度分布

3.1 中性子オートラジオグラフィ像の取得

マウスの背中にヒト膵臓癌もしくは大腸癌細胞を移植し、腫瘍部が直径約1cm、重さ300mg程度まで成長した時点で、マウスに¹⁰B化合物を静脈から注入し、¹⁰Bのマウス体内分布とその時間変化を調べた。マウスの腫瘍部及び臓器内での¹⁰Bの分布状況と濃度の定量は、CR-39プラスチック飛跡検出器を用いた中性子オートラジオグラフィ(Neutron Capture Autoradiography: NCAR)の手法を利用して行った。これは、CR-39が重荷電粒子に高感度であることと、化学エッチングにより円錐状の飛跡と呼ばれるエッチピットが生成されることを利用して、¹⁰Bと中性子との原子核反応で放出された α 、⁷Li粒子の飛跡を用いて¹⁰Bの分布状況をCR-39上に画像化する手法である。

本研究では、¹⁰B化合物をマウスに注入したのち適当な時間間隔においてマウスを冷凍固結させ、マイクローム切断により作成したマウス薄片をCR-39(10cm x 10cm)に貼り付け(図1)、原子炉から中性子束を照射する。照射後のCR-39プラスチック飛跡検出器を7規定70°C中性子の核反応で放出された α 粒子や⁷Li粒子のNaOH溶液中で2時間エッチングして取得したNCAR像の一例を図2に示す。NCAR中で白く濃い部分は組織内の¹⁰BとがCR-39中に残した大きな飛跡が多数存在する場所であるから、白く濃い部分は¹⁰B濃度が高いことを表し、そこには効率よく¹⁰Bが蓄積されているこ

とを意味している。

この標本は、マウス尾部から静脈注射により ^{10}B -liposome 溶液を注入してからそれぞれ 3 時間 (図 2 上)、12 時間 (図 2 中) 経過したマウスから薄片 (40 ミクロン厚) を採取したもので、時間の経過とともに ^{10}B 濃度が変化していく様子がわかる。また、 ^{10}B -liposome 溶液を注入してから 12 時間 (図 2 中) 経過したあとでも腫瘍部と肝臓 (三日月形状) には十分な濃度の ^{10}B が蓄積している様が見てとれる。

こうした NCAR 像は熱・冷中性子いずれの照射でも得られる。熱中性子照射で得られた像にはビーム中に含まれている速中性子による反跳陽子の飛跡が存在するため図 2 のようにマウスの全体像を見ることができ反の面、陽子の飛跡がバックグラウンドを形成し画質が悪くなる。一方、冷中性子照射で取得した像は鮮明で ^{10}B の分布状況がよく判別できることがわかり^{1), 3)}、冷中性子による NCAR 像は ^{10}B デリバリードラッグの有効性を調べるのに極めて有効であることがわかったが、冷中性子照射はたびたび行えるものではない (本研究では、スイスの PSI 研究所とフランスの Saclay 研究所に依頼して行った)。そこで、熱中性子を照射した CR-39 を PEW 溶液でエッチングすることにより NCAR 像を汚している陽子飛跡を縮退させてみたところ、冷中性子による像と同じくらい鮮明な NCAR 像を得ることができた。つまり、冷中性子照射か PEW エッチングかの 2 つの方法のいずれかを用いると、マウス組織内の ^{10}B の分布状況とおおよその濃度が NCAR 像を一目見ただけで判定できるので、多数の ^{10}B デリバリードラッグの候補の中から有効なものを選び出すことが可能になり、抽出された試料を光学顕微鏡下に置き、NCAR 像中の飛跡を精密測定することで、生体内 ^{10}B 濃度分布を決定することができることを報告した^{1), 3)}。

最近、セイコープレジジョン(株)と放射線医学総合研究所との共同研究により、エッチピット測定のための高速画像取得顕微鏡が開発された。この顕微鏡では、画像の撮り込みにラインセンサを用い、測定対象物の傾きに合わせて顕微鏡ステージにチルト機構を設け、シリンドリカルレンズを使用した光ピックアップ方式のオートフォーカス装置を導入することで従来のものより 50 倍以上速い画像撮り込み速度を実現し、広領域画像高速取得顕微鏡(HSP-1000)として製品化されている⁶⁾。この画期的なを使用

することにより、NCAR 中の飛跡の解析が迅速かつ容易になれば、飛跡密度を用いた NCAR

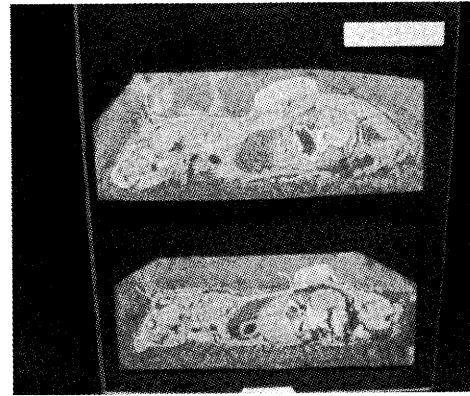


図 1 CR-39 上のマウス薄片。背中のコブが移植され成長したヒト膵臓癌細胞

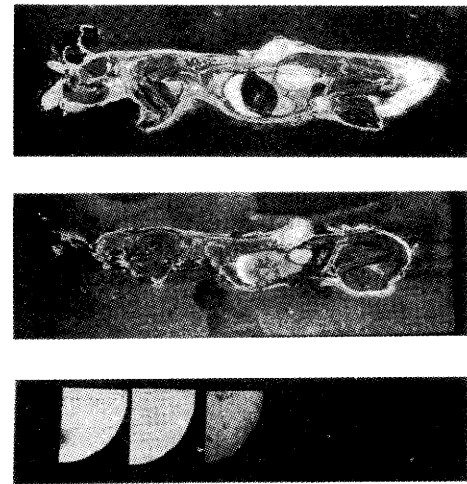


図 2 立教大学 TRIGA-II 型原子炉から熱中性子束 (強度: $1.8 \times 10^{12} \text{n/cm}^2$) を照射して取得したマウス組織と ^{10}B 濃度の異なるコントロール用濾紙 (下) の NCAR 像。

像の再構築、さらにはマウスの画像を中性子照射によって誘導された放射線吸収線量を用いて描き出すことも可能になる。そこで、今年度は上記の広領域画像高速取得顕微鏡の利用が可能になった場合に備えて、飛跡の解析を腫瘍部のみで試み、飛跡密度を用いて腫瘍部の NCAR 像を再構築することを試みた。以下にその結果の一部を報告する。

3.2 飛跡密度を用いたマウス腫瘍部中の ^{10}B 分布状況の測定

これまでの研究では、マウスに BSH

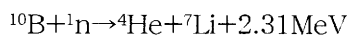
($\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$) もしくは ^{10}B -liposome 溶液を静脈注射して実験を行ってきたが、その後、さらに ^{10}B PEG-liposome, ^{10}B TF-PEG-liposome の薬剤も追加して (表 1), マウス腫瘍部への ^{10}B デリバリードラッグとして最も有効なものを選び出す実験に着手した。そのため、NCAR 像中の腫瘍部に存在する飛跡を顕微鏡画像自動解析装置で精密測定し、飛跡サイズ弁別法により α 粒子と Li イオンによって生成された飛跡のみを抽出して、その密度をマッピングして腫瘍部内の ^{10}B 濃度分布をコンピュータ上で再構築することを試みた。

ここで、飛跡の解析により生体中の ^{10}B 濃度分布が決定できる原理を述べておく。イオンがプラスチック板 (CR-39) を通過した後は、電離作用によりラジカルが密集した領域が次々に残される。したがって、粒子の移動した道筋に沿って高分子鎖の結合が破壊され、小分子片の密集した潜在トラックが残される。そのときの放射線損傷 (潜在トラック) の大きさは、入射イオンが物質中で失うエネルギー量、すなわち次式で与えられる REL 値に依存する。

$$\text{REL} = (2\pi nZ^2e^2/mc^2\beta^2) \times \ln\{(2mc^2\beta^2\gamma^2w_0/I^2) - \beta^2 - 2(C/Z_0) - \delta\}$$

ただし、 w_0 : δ 線の限定エネルギー、 m : 電子の質量、 c : 光速、 n : 物質の電子密度、 C/Z_0 : 内殻補正項、 I : 物質の平均電離エネルギー、 v : 入射イオンの速度、 c : 光速、 δ 物質の密度に対する補正項、 Z : イオンの原子番号であり、 $\beta = v/c$, $\gamma = (1-\beta^2)^{-1/2}$ である。

つまり、入射粒子の速度: β が遅いほど、またイオンの原子番号: Z が大きいほど REL 値が高くなり、検出器を化学エッチングしたときに形成されるエッチピット (飛跡) の形状が大きくなる。本実験において予想されるイオン種としては、2 で述べたように、



の核反応で放出される α 粒子と Li イオンの他に、 $^1\text{H}(n,n)p$ や $^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$ などの核反応で生じる陽子が考えられる。この陽子は前述したように ^{10}B の定量の際にバックグラウンドとなるが、REL 値は、 $\text{Li} > \alpha > p$ の関係にあるから、飛跡のサイズを分析することにより Li, α 飛跡と陽子による飛跡を弁別することができる。

表 1 使用した癌細胞と ^{10}B デリバリードラッグの種類

癌細胞	投与した薬剤
AsPC-1	Free BSH
Col26	Bare Liposome
	PEG Liposome
	TF-PEG Liposome

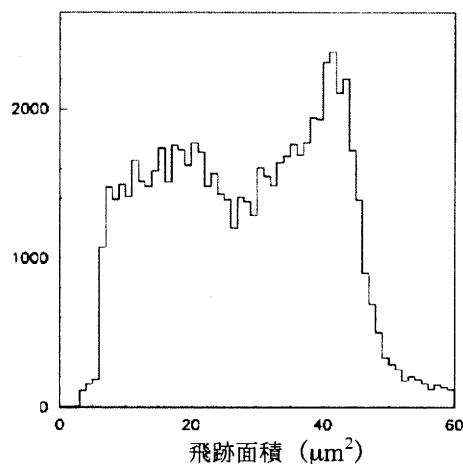


図 3 飛跡面積の度数分布

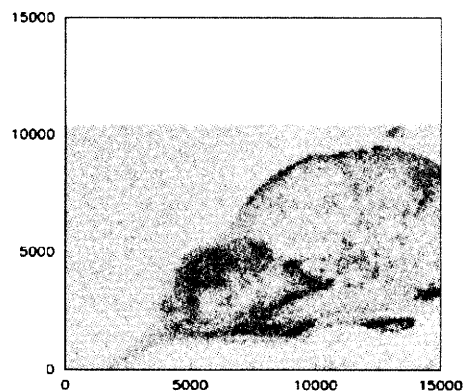


図 4 腫瘍部内の ^{10}B 濃度と分布 (x,y 軸ともに単位は μm)

図 3 は ^{10}B TF-PEG-liposome を静脈注射してから 60 時間経過後のマウスの腫瘍部で観測された飛跡の面積の度数分布を示したもので、2つのピークから成っている。ここで、分布の鞍部より左側の飛跡は陽子により、右側の飛跡は α 粒子と Li イオンにより生成されたものと考え、飛跡の大きさを限定することで測定

データから陽子による飛跡を除くことができる。そこで、図 3 から陽子の飛跡と考えられる面積 $26 \mu\text{m}^2$ 以下の飛跡を除き、残った飛跡群のそれぞれの位置を x, y 座標上にプロットすると、 α と Li イオンが観測された位置のマッピング (図 4) ができる。このマップは腫瘍部内の ^{10}B の分布状況を表すものであり、飛跡密度 (図の濃淡) は ^{10}B 濃度に他ならない。したがって、図 4 から、 ^{10}B は腫瘍部内で偏在しているものの、静脈から注入されてから 60 時間経過したあとでもマウスの腫瘍部には十分な量の ^{10}B の蓄積があったことが推察できる。図 5 は今回の試行実験で最も ^{10}B デリバリ効率が高く、腫瘍部への ^{10}B 定着率も良かった例である。つまり、 ^{10}B -TF-PEG-liposome は BNCT のための ^{10}B デリバリドラッグとして非常に有望なものであることが今回の実験でわかった。また、今回試みた飛跡密度マッピングにより生体内 ^{10}B 濃度分布をコンピュータ上で再構築する手法は、広領域画像高速取得顕微鏡の使用が可能になれば、 ^{10}B デリバリドラッグ開発の際に有効な手段となることを示している。

最後に、我々が現在進めている「原子間力顕微鏡と CR-39 を用いた細胞のイメージングと放射線量計測」に関する共同研究⁷⁾の成果の一部を図 5 に示しておく。この図は、 ^{10}B が注入された生体組織を貼り付けた CR-39 に中性子を照射後さらに軟 X 線を照射し、リソグラフィックな手法により細胞の X 線像を写し込んだ CR-39 の原子間力顕微鏡像である。図中に矢印で示した黒い小さな点が $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ 反応で

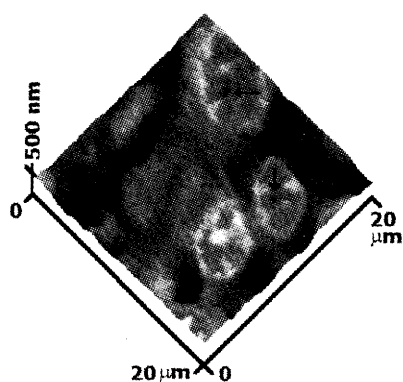


図 5 細胞のレリーフ像と細胞内 ^{10}B 分布

放出された α もしくは Li 粒子の飛跡、すなわち ^{10}B の細胞内分布状況を示している。図 5 の位置分解能は約 100nm であり、細胞レベルでの ^{10}B の局在を決定することが出来るので、本

手法 (高分解能 NCAR) が BNCT に有効な ^{10}B デリバリドラッグの開発に重要なデータを提供するものと思われる。

4. 参考文献

- 1) 小倉紘一, 有機系飛跡検出器を用いた生体内ドシメトリー技術の開発に関する研究, 日本大学生産工学部ハイテクリサーチセンター平成 12 年度研究報告書 (2001), pp. 2-27~2-30
- 2) 小倉紘一, 有機系飛跡検出器を用いた生体内ドシメトリー技術の開発に関する研究, 日本大学生産工学部ハイテクリサーチセンター平成 13 年度研究報告書, (2002), pp. 2-35~2-38
- 3) K.Ogura, A.Yamazaki, H.Yanagie, M.Eriguchi, E.H.Lehmann, G.Kuehne, G.Bayon, K.Maruyama and H.Kobayashi, "Neutron capture autoradiography for a study on boron neutron capture therapy" Radiation Measurements, 34, (2001), pp. 555-558
- 4) K.Ogura, M.Asano, N.Yasuda and M.Yoshida, "Properties of TNF-1 track etch detector" Nucl. Instr. and Methods B185, (2001), pp. 222-227
- 5) K.Ogura, H.Yanagie, K.Maruyama, M.Eriguchi, N.Yasuda, H.Kobayashi, "In vivo dosimetry of neutron-induced particles in the ^{10}B -infused tumor of mouse", 13th Symp. on Microdosimetry, Stresa, Italy, (2001), Abstract No.M18
- 6) 並木佳世子, 安田仲宏, 丸茂好春, 川本尚志, 本間義浩, 梅島洋介, 東又 厚, "ラインセンサを用いた高速顕微鏡の開発 (2)", 第 63 回応用物理学会学術講演会予稿集, No.1, (2002), p. 80
- 7) K. Amemiya, H. Takahashi, M. Nakazawa, H. Shimizu, T. Majima, Y. Nakagawa, N. Yasuda, M. Yamamoto, T. Kageji, M. Nakaichi, T. Hasegawa, T. Kobayashi, Y. Sakurai, K. Ogura, "Soft X-ray imaging CR-39 plastics with AFM readout", Nucl. Instr. and Methods B, 187, (2002), 361-366