

プロジェクト 2

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は、重イオンを用いた癌治療や中性子捕捉癌治療 (Boron Neutron Capture Therapy: BNCT) の術中に飛跡検出器を生体内に直接挿入して放射線量を測定する、いわゆる生体内ドシメトリー技術と ^{10}B デリバリードラッグを評価する手法の開発を目的とし、

1) マウス腫瘍部および臓器内の ^{10}B の分布状況と濃度の定量

2) マウス腫瘍部における *in vivo* ドシメトリー

に関する研究を主としたが、同時に、

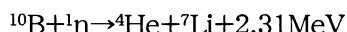
3) 高感度高分子飛跡検出器の開発

もテーマのひとつとし、検出器を生体内に挿入した場合に、生体内の放射線場を出来るだけ乱すことのないよう、その組成が生体組織とほぼ等価である高感度なプラスチック飛跡検出器の開発を行った。

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 ^{10}B 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。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 μm 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。しかし、この治療法が有効であるためには、 ^{10}B 原子が確実に患部に運ばれ固定されている必要がある。本研究では、ヒト膵臓癌細胞 (AsPC-1) もしくは大腸癌細胞を移植されたマウスに ^{10}B 化合物を静脈から注入した場合、 ^{10}B を腫瘍部まで効率よく運び固定するのに最も有効な ^{10}B デリバリードラッグを評価する方

法と吸収線量の生体内 *in situ* 測定技術 (*in vivo* ドシメトリー) の確立をめざした。そのための検出器として有機系飛跡検出器 CR-39 を選択した理由は、その組成が生体組織とほぼ等価であること、重荷電粒子に高感度であること、形状を細く小さくして容易に生体内に挿入できること、検出器以外に付属する電子回路等を必要としないからである。

3. マウス腫瘍部および臓器内の ^{10}B の分布状況と濃度の定量^{1), 2)}

3.1 中性子オートラジオグラフィー像の取得

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 ^{10}B 化合物を静脈から注入し、 ^{10}B 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 ^{10}B 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ー (Neutron Capture Auto-Radiography: 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、 ^{10}B 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 ^{10}B 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、 ^{10}B 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、ミクロト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)、原子炉から熱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 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 ^{10}B と中性子の核反応で放出された α 粒子や ^7Li 粒子が 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 ^{10}B 濃度が高いことを表し、そこには効率よく ^{10}B 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 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 3 時間(図 2 上),

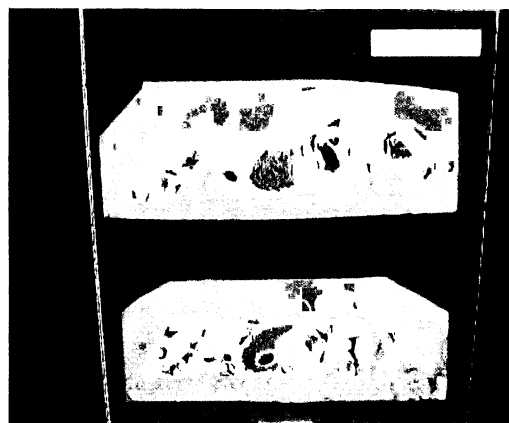


図 1 CR-39 上のマウス薄片。背中のコブが移植され成長したヒト肝臓癌細胞

12 時間(図 2 中)経過したあとも腫瘍部と肝臓(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ない反面、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 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(図 2)。本研究では、冷中性子照射はスイスの PSI 研究所とフランスの Saclay 研究所に依頼して行ったが、たびたび行えるものではない。そこで、熱中性子を照射した CR-39 を PEW_{65} 溶液でエッチングすることにより NCAR 像を汚しているプロトントラックを縮退させ、冷中性子照射で得られるものと同じくらい鮮明な NCAR 像を得ることに成功した。この手法により、多数の ^{10}B デリバリードラッグ候補の中から有効な薬剤として ^{10}B -PEG-liposome, ^{10}B -bare-liposome および ^{10}B -TF-PEG-liposome を容易に選びだすことができた。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簡単に選ぶことが可能になった。



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。

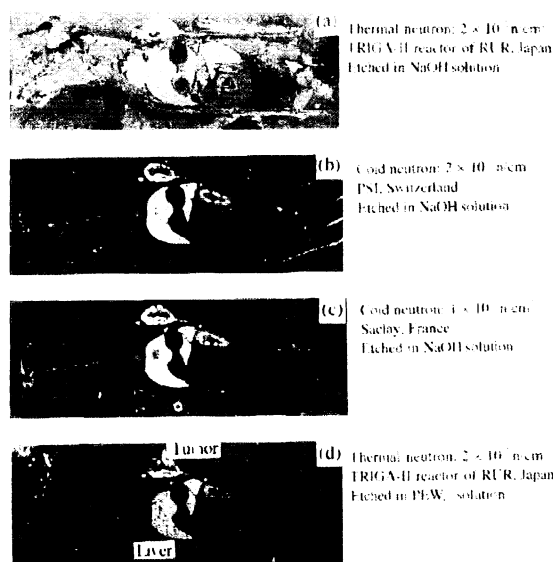


図 3 NCAR 像。(a) 熱中性子で取得 (b) 冷中性子(PSI)で取得 (c) 冷中性子(Saclay)で取得 (d) 熱中性子で取得。ただし、(a)~(c)は NaOH 溶液でエッチングし、(d)は PEW 溶液でエッチングしたもの

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

上記の実験で選り出した ^{10}B -PEG-liposome, ^{10}B -bare-liposome, ^{10}B -TF-PEG-liposome の 3 種の薬剤のうち、腫瘍部への ^{10}B 定着率の優れたものを選び出すためには、マウス腫瘍部及び臓

器内の ^{10}B 濃度を決定する必要がある。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、飛跡の位置座標マッピングにより、腫瘍部内の ^{10}B の濃度分布を飛跡密度で表す方法を開発した。

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。

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

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、CR-39 中の飛跡の大きさは、入射イオンが物質中で失うエネルギー量、すなわち REL 値に依存する。本実験において予想されるイオン種として

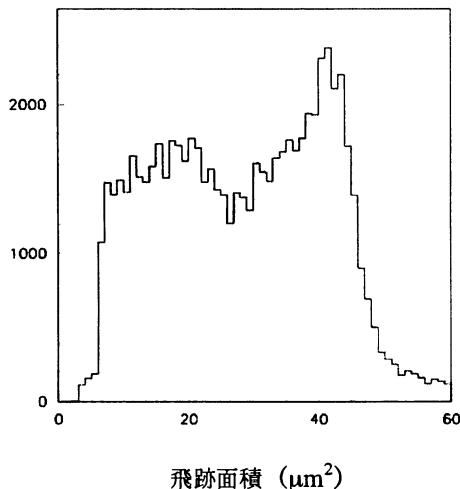


図 4 飛跡面積の度数分布

は、2 で述べたように $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ 反応で放出される α 粒子と Li イオンの他に、 $^1\text{H}(n, n^+)\text{p}$ 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、 $\text{Li} > \alpha > \text{p}$ 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。

図 4 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 5) 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。この図から、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 デリバリー効率が良く、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 デリバリー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。

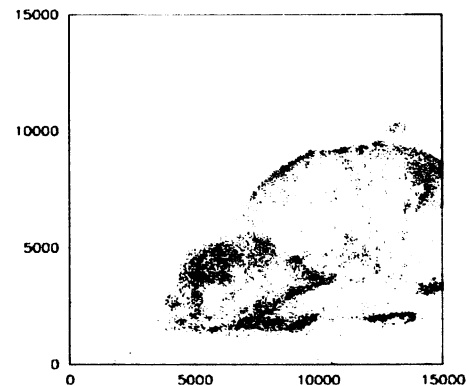


図 5 腫瘍部内の ^{10}B 濃度と分布 (x, y 軸ともに単位は μm)

4. マウス腫瘍部における *in vivo* ドシメトリ

BNCT で用いる熱中性子は $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ 反応以外に生体内の窒素核にも補足され、 $^{14}\text{N}(n, p)^{14}\text{C}$ 反応で陽子を放出する。窒素は生体の主たる構成原子であるから、これら患部外で発生した陽子は

飛程が長いため、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 の効果を厳密に評価するためには、放射線検出器を腫瘍部に入れて、術中における放射線量を直接測定する、いわゆる *in vivo* (*in situ*) ドシメトリーが不可欠である。本研究ではヒト膵臓癌細胞(AsPC-1)を背中に移植されたマウスを *in vivo* ドシメトリーの標本として用いた。

本研究では、CR-39 細片を直接マウスの腫瘍部に挿入して熱中性子を照射したのち、飛跡の計測データから 3.2 で示した REL 値を計算し、熱中性子照射で発生した重荷電粒子の微分 LET (Linear Energy Transfer) スペクトル (図 6) を求めた。図中で 200keV/μm 付近に現れたピークはα粒子によるものであり、また、106ppm の ^{10}B が注入された腫瘍部で観測されたスペクトルとコントロールサンプルのスペクトルとは LET 値が 100keV/μm 以上の領域で酷似している。スペクトル中で 100keV/μm 以下の LET 領域で見られるコントロールサンプルとの差異は $^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$ 反応で生じた陽子によるものである。さらに、 ^{10}B を 10.6ppm もしくは 106ppm 含有する腫瘍部で観測された二つのスペクトルとを比較すると、200keV/μm 付近に現れたα粒子によるピークの強度比は腫瘍中の ^{10}B 濃度を反映している。

図 6 の微分 LET スペクトルを用いて、腫瘍部内の吸収線量 D ならびに線量当量 H を推定した。このとき、LET 値が 100keV/μm 以下をプロトン線量 D_p 、プロトン線量当量 H_p と、また 100keV/μm 以上は $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ 反応によるものであるからボロン線量 D_B 、ボロン線量当量 H_B と定義して、全吸収線量 D_T は $D_T = D_p + D_B$ として求めた。その結果をコントロールサンプルで得られた線量と比較して表 1 に示す。ちなみに、 ^{10}B を load していない腫瘍部 (Sample No. 4) における吸収線量 D_p 、 D_B 、 D_T 、線量当量 H_p 、 H_B 、 H_T は腫瘍部内のバックグラウンドであるから、これを差し引いて腫瘍部での平均のボロン線量率を求めると、ボロン線量率は 5.5×10^{-14} Gy/ppm/neutron となる。この値は今までに報告されているモンテカルロシミュレーション¹⁾が予測する種々の推定値、 $2.7 \sim 8.6 \times 10^{-14}$ Gy/ppm/neutron の範囲に入っている。

対象がマウスではあったが、本研究は BNCT 術中に腫瘍内の吸収線量を *in vivo* に測定したはじめての例となった。さらに今回の実験では、表 1 に見られるように、腫瘍への ^{10}B の load 量が 10 ppm 程度では D_p が D_B と同程度となり、BNCT としての効

果が期待できないように見える。しかし、生体を与えるダメージを考える場合には、放射線質を考慮した線質係数 (quality factor) で吸収線量に重みを付けた線量当量で評価するべきであろう。したがって表 1 から、腫瘍への ^{10}B の load 量が 10 ppm 程度であっても、 H_B は H_p の約 2 倍の値が得られていることから、腫瘍部に僅か 10ppm 程度の ^{10}B を付加することができれば、BNCT としての治療効果を十分に発揮するものと推察される。

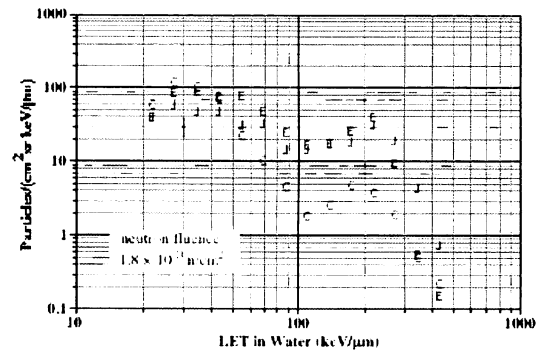


図 6 BSH溶液中ならびに腫瘍中で発生した荷電粒子の微分LETスペクトル
J コントロール (^{10}B 濃度 106ppm)
E 腫瘍中 (^{10}B 濃度 106ppm)
C 腫瘍中 (^{10}B 濃度 10.6ppm)

表 1 熱中性子照射により放出された陽子、α粒子および Li 粒子による吸収線量と線量当量

Sample Number	Absorbed dose (mGy)	Dose equivalent (mSv)
1 BSH solution ^{10}B :106ppm	D_T 105.5 ± 5.2	H_T 2040 ± 98
	D_p 11.6 ± 1.0	H_p 196 ± 20
	D_B 94.0 ± 5.1	H_B 1844 ± 98
2 Tumor ^{10}B :106ppm	D_T 99.6 ± 5.0	H_T 1944 ± 102
	D_p 20.0 ± 1.4	H_p 342 ± 28
	D_B 79.6 ± 4.8	H_B 1652 ± 98
3 Tumor ^{10}B :10.6ppm	D_T 23.5 ± 1.4	H_T 388 ± 26
	D_p 10.7 ± 0.6	H_p 132 ± 8
	D_B 12.9 ± 1.2	H_B 258 ± 24
4 Tumor (non ^{10}B -infusion)	D_T 7.9 ± 2.6	H_T 115 ± 13
	D_p 3.2 ± 0.3	H_p 59 ± 6
	D_B 4.8 ± 2.6	H_B 56 ± 11

5. 高感度高分子飛跡検出器の開発⁴⁾

2. で述べたように、CR-39 のような高分子飛跡検出器は組成が生体組織とほぼ等価であること、電子回路を使用しないことならびに検出器の微小化が容易で生体内に埋め込むことができることから、BNCT や重イオン照射癌治療時の *in vivo* dosimetry に有用な検出器である。しかし、従来の CR-39 は BNCT 術中に放出される高エネルギー反跳陽子や重イオン癌治療時に生じる核破砕片などの therapeutic ion 以外の荷電粒子に対する検出効率があまり良くない。これら therapeutic

ion 以外の荷電粒子は飛程も長く、生体内のどこでも発生して正常細胞にダメージを与えるため、それらの粒子に対する *in situ* dosimetry も必要である。そこで、我々が宇宙線観測用に開発した高感度検出器 (CR-39 と NIPAAm との共重合体で、TNF-1 と命名されている) ²⁾ を *in situ* dosimetry の観点から検討し直してみた。

まず、高エネルギー陽子に対する TNF-1 の飛跡生成感度について通常の CR-39(TD-1)と比較して評価した。図 7 は陽子のエネルギーにたいする両検出材の飛跡生成感度を比較したもので、

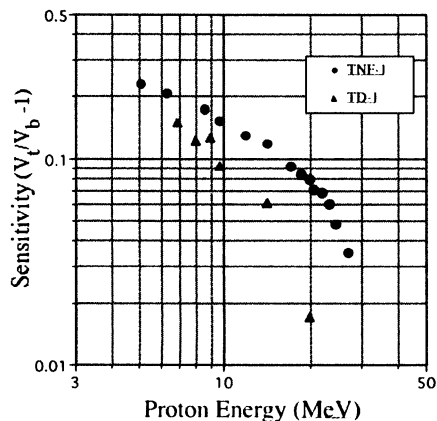


図 7 陽子のエネルギーと飛跡生成感度の関係

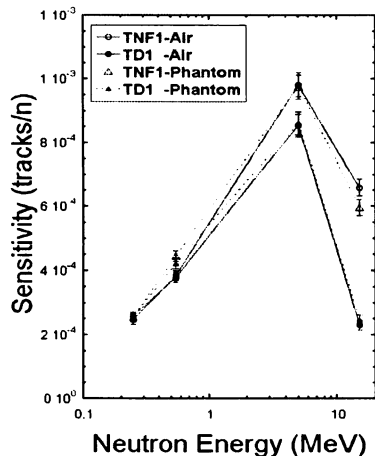


図 8 中性子に対する TNF-1 の感度

TD-1 に比べ我々の開発した TNF-1 は 10MeV 以上の陽子に対し圧倒的に高感度であることが判った。このことが、TNF-1 は 15MeV の中性子に対して検出感度が TD-1 より 3 倍近く高いことにつながっている (図 8)。また、CR-39 では観測できない相対論的速度の Li イオンに対しても、我々の開発した TNF-1 は 10MeV 以上の陽子に

対し TD-1 に比べ圧倒的に高感度であることが判った。このことが、TNF-1 は 15MeV の中性子に対して検出感度が TD-1 より 3 倍近く高いことにつながっている (図 8)。また、CR-39 では観測できない相対論的速度の Li イオンに対しても TNF-1 は感度があり (図 9)、重イオンを用いた癌治療時に生じる核破砕片の線量計測に有用な検出器であることがわかった。

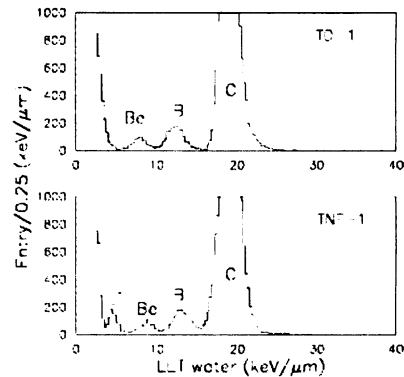


図 9 入射イオンと核破砕片ヒストグラム

高エネルギー陽子に対する感度が高く、相対論的速度の Li イオンに対しても感度を有するという特徴は、宇宙環境において宇宙飛行士が被爆する宇宙放射線線量の計測においても TNF-1 は従来の飛跡検出器より有用であることが期待される。我々は宇宙開発事業団が行ってきたスペースシャトルやミール宇宙船を利用した一連の宇宙線生物影響実験に CR-39 (TD-1) スタックを搭載して宇宙放射線線量計測に従事してきたが、その際ミール宇宙船に試験的に搭載しておいた TNF-1 検出器を解析して、宇宙線 HZE(High Z and Energy) 粒子の積分 LET(Linear Energy Transfer)分布を求め、TD-1 で得られた結果とを比較してみた (図 10)。二つの検出器で得られた宇宙線 HZE 粒子の LET スペクトルは、LET 値が 5 keV/μm 以上領域ではほぼ一致していた。しかし、TNF-1 は低 LET 粒子 (この場合は放射線帯の南大西洋異常域 SAA から落ち込んでくる高エネルギー陽子) に対する検出効率が TD-1 に比べ極めて高いため、図 10 に示したように LET 値が 5 keV/μm 以下の領域では、TNF-1 で観測された HZE 粒子のフラックスが TD-1 のものより大きく、検出 LET 限界も 2 keV/μm 近くまで引き下げられている。また、検出器に記録された飛跡の数で比べてみても、TNF-1 は TD-1 の 1.

4 倍もの飛跡数密度を示しており、TNF-1 は宇宙環境における HZE 粒子のドシメトリー用検出器として極めて有用なものであることが検証された。

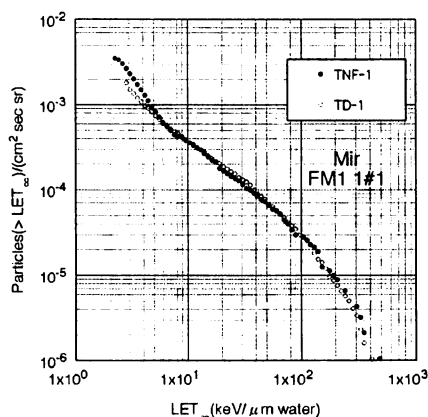


図 10 ミール搭載の TNF-1 と TD-1 高分子飛跡検出器で観測された宇宙線 HZE 粒子の積分 LET 分布の比較

6. 今後の展望

実際の BNCT 治療では脳腫瘍を除き、患部への ^{10}B の注入は静脈注射で行われるであろう。そのため、実験対象をマウスから大型動物やファントム実験に切り替え、本研究で開発した手法、即ち、飛跡密度マッピングによる生体内 ^{10}B 濃度の定量、CR-39 細片を用いた clinical *in vivo* dosimetry、および ^{10}B -TF-PEG-liposome の ^{10}B デリバリードラッグとしての有効性などを大型動物でも確認をする必要がある。これらの手法の唯一の難点は飛跡の計測に時間がかかることであるが、この問題は最近開発された広領域画像高速取得顕微鏡をまた、我々は、原子間力顕微鏡と CR-39 を用いた

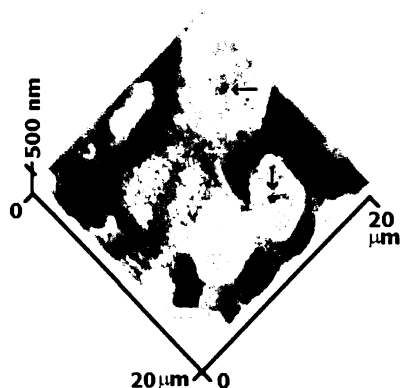


図 10 細胞のレリーフ像と細胞内 ^{10}B 分布

細胞のイメージングとマイクロドシメトリーに関する研究⁵⁾を進めている。その成果の一部を図 10

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 10 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 デリバリー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。

7. 参考文献

- 1) 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
- 2) K.Ogura, H. Yanagie, M.Eriguchi, E.H.Lehmann G.Kuehne, G.Bayon, H.Kobayashi, "Neutron capture autoradiographic study of the biodistribution of ^{10}B in tumor-bearing mice", Applied Radiation and Isotopes, Vol.61, pp. 585-590 2004
- 3) 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
- 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. 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