

平成 18 年度 修士学位論文

PIXE 分析法の医学への応用

—実験的マウス扁平上皮癌およびヒト生検組織への応用—

奈良女子大学大学院 人間文化研究科
博士前期課程 物理学専攻 P05-005
放射線物理学研究室

坂倉郁子

目 次

第 1 章	序論	1
	PIXE 分析法の特徴	1
第 2 章	実験装置	3
第 3 章	分析技術	7
	3.1 内殻電離と特性 X 線の発生	7
	3.2 バックグラウンド	9
	3.2.1 バックグラウンドの発生	9
	3.2.2 吸収体	10
	3.3 試料作成	10
	3.4 スペクトル測定・解析	10
	3.5 定量分析	11
	3.5.1 検出効率	11
	3.5.2 外部標準法	13
	3.5.3 内部標準法	13
第 4 章	医学への応用	15
	4.1 実験的マウス扁平上皮癌	15
	4.1.1 研究背景	15
	4.1.1.1 金ナノ粒子による悪性細胞の光熱破壊	15
	4.1.1.2 ターゲティング	16
	4.1.1.3 抗体	17
	4.1.1.4 抗原	18
	4.1.2 対象・方法	19
	4.1.2.1 実験動物	19
	4.1.2.2 抗体結合金ナノ粒子の作成	21
	4.1.2.3 方法	23
	4.1.2.4 結果	25
	4.1.2.5 考察	35
	4.2 ヒト生検組織への応用	36
	4.2.1 目的	36
	4.2.2 対象	36
	4.2.3 PIXE 分析	37
	4.2.4 結果	37
	4.2.5 考察	37

第5章 結語	39
謝辞	40
参考文献	41

第 1 章 序論

PIXE 分析法の特徴

PIXE 分析法とは Particle Induced X-ray Emission(粒子線励起 X 線)分析法のことで、高速のイオンで試料を衝撃し、その際に試料より発生する特性 X 線を分光することにより、試料内の元素組成を分析する方法である。[1-6]

歴史的には 1970 年ルンド大の Johansenn らが 1 日戸外に放置したカーボン膜を $2.5 \mu\text{A}$ の 5MeV 陽子で 1 時間照射し、特性 X 線を Si(Li)検出器を用いてナノグラム領域の P,S,Ca,Ti,V,Cr,Mn,Fe,Cu,Zn,Sr,Zr および Pb を同時に分析したという報告を契機に研究が世界各地で盛んに行われるようになった。PIXE 分析法の発展の大きな理由としては、その頃、X 線測定用の Si(Li)半導体検出器が開発され、非常に簡単に X 線のエネルギースペクトルを測定できるようになったことである。それまでは、結晶分光器による X 線スペクトルの測定が行われていた。結晶分光器はエネルギー分解能は良いが、1 回の測定で分析できる元素が限定されるため、多くの元素を同時に短時間で測定できない。

物質に加速器からの陽子やヘリウムイオンなどのビームを照射すると、その物質固有のエネルギーを持つ特性 X 線が発生する。特性 X 線のエネルギーから元素を同定し、収量から定量することが出来る。この X 線の発生断面積は非常に大きいので、微量の元素からの特性 X 線の測定が可能となる。

ビーム照射によって、特性 X 線のほかに連続 X 線も発生する。PIXE 分析法ではこの連続 X 線が主なバックグラウンドであり、検出限界を決定する。しかし、特性 X 線の強度は連続 X 線のそれよりきわめて大きく、PIXE 分析法では、信号対雑音比(S/N 比)が非常に大きいので微量の元素を感度よく検出することができる。電子ビーム照射によっても特性 X 線は発生するが、この場合は電子のターゲット原子核による制動放射が多量に発生し、S/N 比は大変低く微量元素分析には適していない。

PIXE 分析法の特徴をまとめると次の様を書くことができる。

- 1)高感度：ppm より高い感度で分析できる。
- 2)簡単さ：測定は試料を薄膜上に載せて、またはそのままをビームで照射し特性 X 線を測定すればよい。
- 3)Na から U までの多元素を同時に分析できる。
- 4)試料は少量で良い：数 μg の少量の試料でも分析できる。
- 5)大気中にビームを取り出すと液体の試料などを直接に分析できる。
- 6)数 μm のビームスポットを使うことによって、数 μm 程度の位置分解能で元素の分布を調べることができる。

このように PIXE 分析法では少量のサンプルを対象として多元素同時分析を行うことが可能であり、他の分析手段では代用できない特徴といえる。このため PIXE 分析法は医学、歯学、生物学、水産学、農学、地球科学、環境科学、考古学、材料科学などの非常に幅広い分野で活用されている。医学への応用では、臨床的に行われる生検組織などの少量のサンプルを対象とした分析や治療目的で腫瘍組織に取り込ませた種々の薬剤や微粒子の測定にも応用可能と考えられる。

今回筆者は、本学の PIXE 実験装置を用いた医学への応用研究 2 例を試みた。

第 2 章 実験装置

実験装置

本研究は奈良女子大学の最高ターミナル電圧 1.7MV のタンデム型バンデグラーフ静電加速器（米国 NEC 社ペレトロン 5SDH-2 型）を用いて実験を行った。図 2-1 は本研究に用いた PIXE の実験装置の概略図を示している。加速されたイオンビームは、エネルギー分析電磁石によってエネルギー分析され、PIXE チェンバーに入射する。コリメーターを通しビーム径 1.5mm に絞られ、試料を通過して、ファラデーカップに入る。ファラデーカップは電流計につながれており、ビーム電流が測定される。観測された全電荷量から入射粒子の数が評価される。元素分析に都合の良い特性 X 線の発生は、陽子ビームのエネルギーが 2 MeV から 4MeV の間が適している。試料から発生した X 線は、検出器に入射し、エネルギーに比例した電圧信号に変換され、多重波高分析器 (Multi-Channel Analyzer:MCA) でデジタル化されて X 線スペクトルとして記録される。

PIXE チェンバーは、内径 51cm のアルミニウム製散乱槽で、最大 40 個の試料がマウントできるサンプルホルダーを装備している。照射時には 10^{-6} Torr 程度の真空に保たれる。

X 線検出器として本研究においては高純度 Ge 半導体検出器を用いた。Mn の K_{α} -X 線(5.895KeV)に対する分解能は 135eV である。検出器の保護のために取り付けられている窓には厚さ 25.4 μ m の Be 膜が使用されている。[7]

図 2-2 に加速器とビームラインを、図 2-3 に PIXE チェンバーの外観を、図 2-4 に PIXE チェンバー内部を示す。

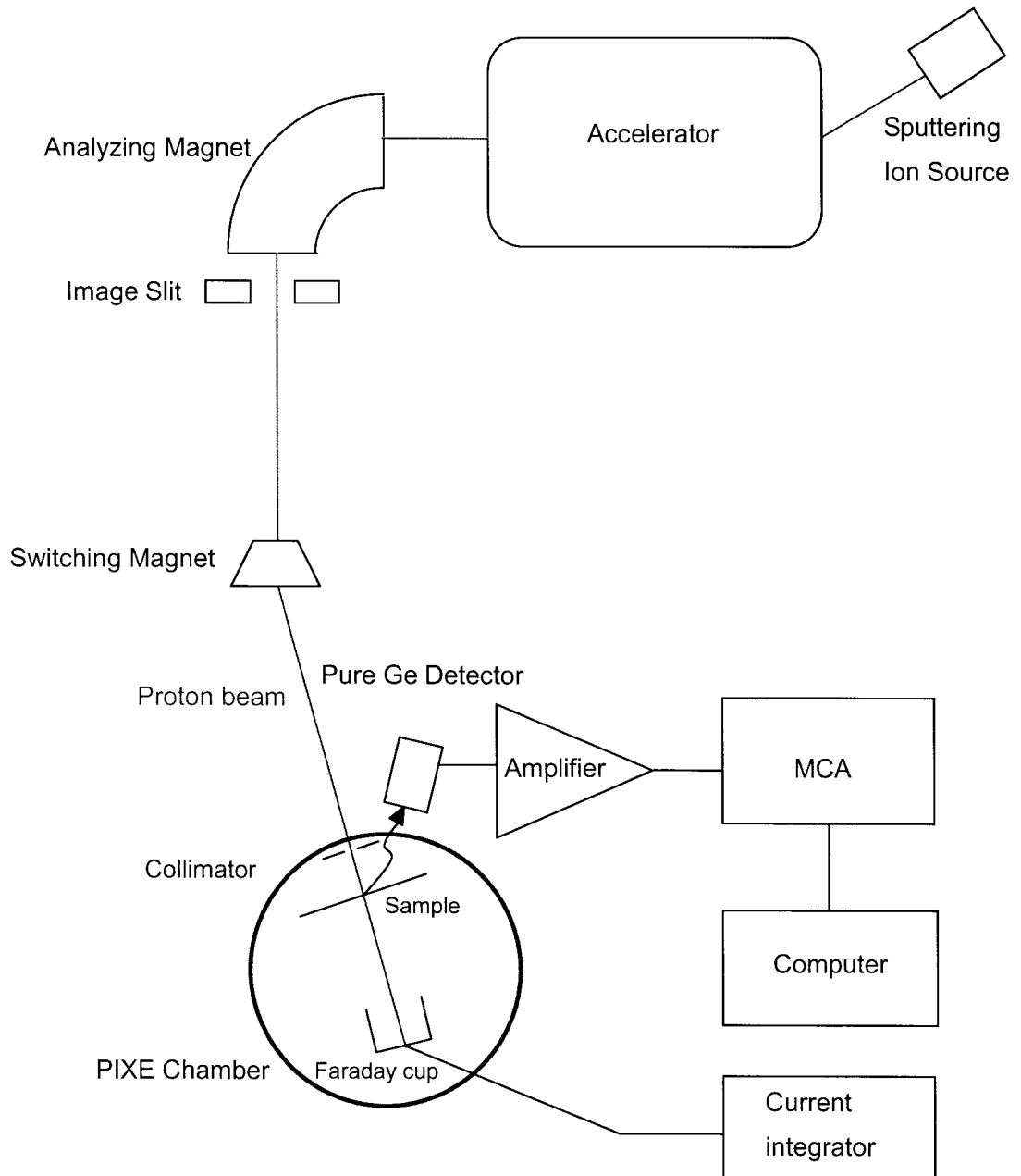


図 2-1 PIXE 実験装置の概略図

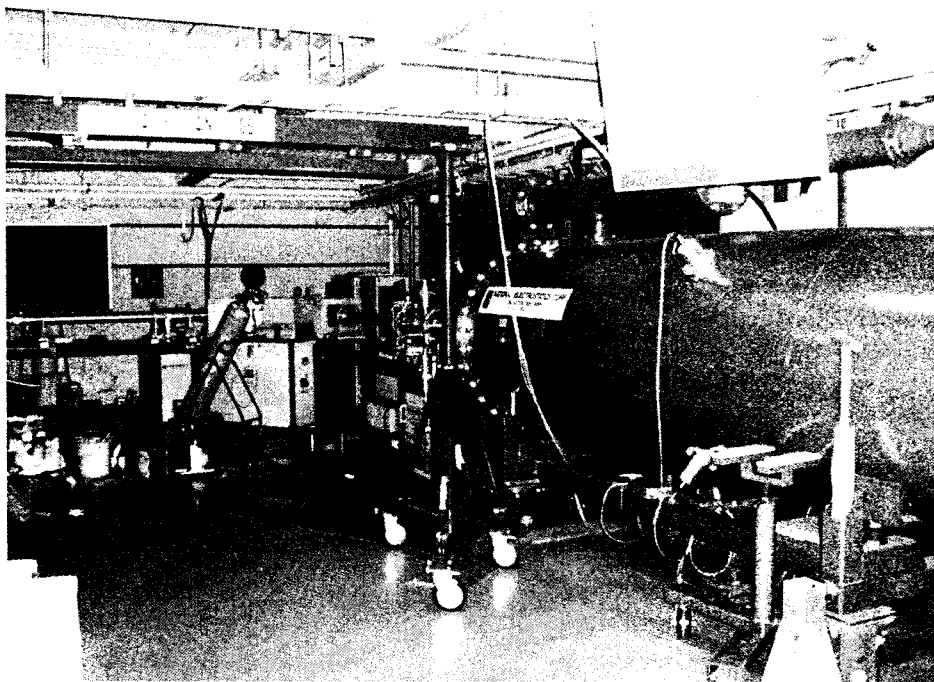


図 2-2 加速器とビームライン

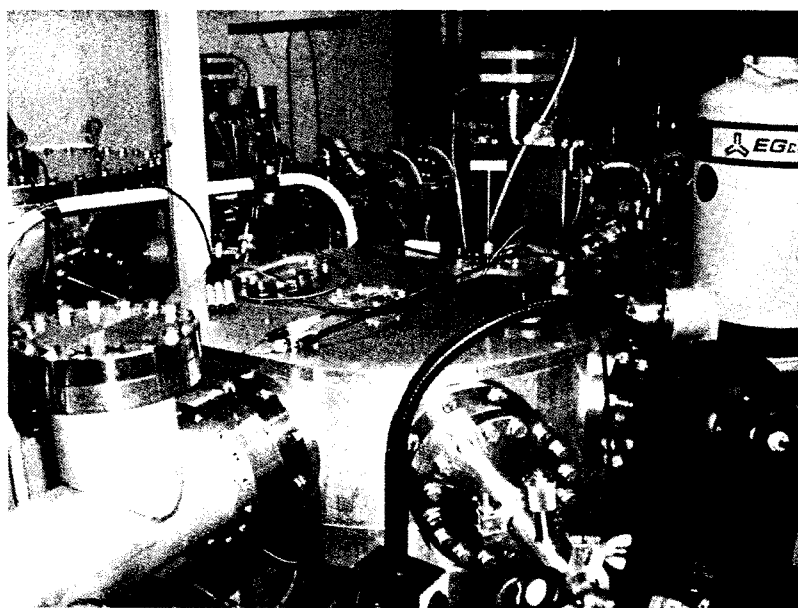


図 2-3 PIXE チェンバー外観

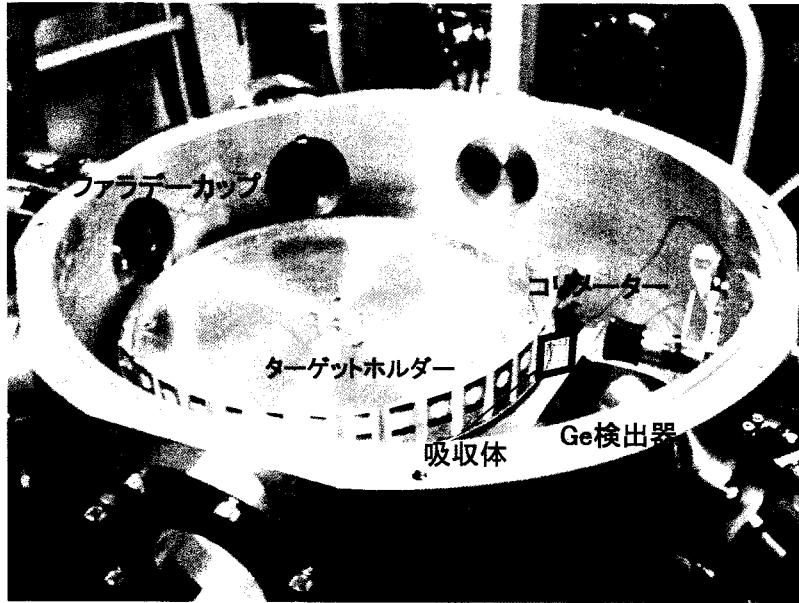


図 2-4 PIXE チェンバー内部

第3章 分析技術

3.1 内殻電離と特性 X 線の発生

原子内の電子軌道は束縛エネルギーの大きい内側から、K 殻、L 殻、M 殻、N 殻、…と呼ばれている。L 殻以上は、さらに副殻に分岐し、それらは $L_1 \sim L_3$ 、 $M_1 \sim M_5$ 、 $N_1 \sim N_7$ のように名付けられている。

イオンが原子と衝突すると、原子の内殻の電子は、クーロン相互作用を介して、入射イオンからエネルギーを得て電離される。電離後には、この殻に空孔が残りこの空孔を X 線遷移の選択則で許された外殻の電子が埋め、余分なエネルギーを X 線として放出する。この様にして発生する X 線が特性 X 線と呼ばれるもので、K 殻、L 殻、M 殻の空孔が埋められるとき発生する X 線を K-X 線、L-X 線、M-X 線、…と名付けている。さらにそれぞれの X 線の中で波長の長いほうから K_α -X 線、 K_β -X 線、 L_α -X 線、 L_β -X 線、 L_γ -X 線…のように呼ぶ。一方、外殻電子が余分なエネルギーを X 線として放出して内殻を埋める代わりに、同じ殻またはそれより外殻の電子にエネルギーを与えて、内殻を埋める過程がある。これは、オーージェ遷移と呼ばれ、このとき放出される電子をオーージェ電子と呼んでいる。図 3-1 に両過程の違いを示す。[8]

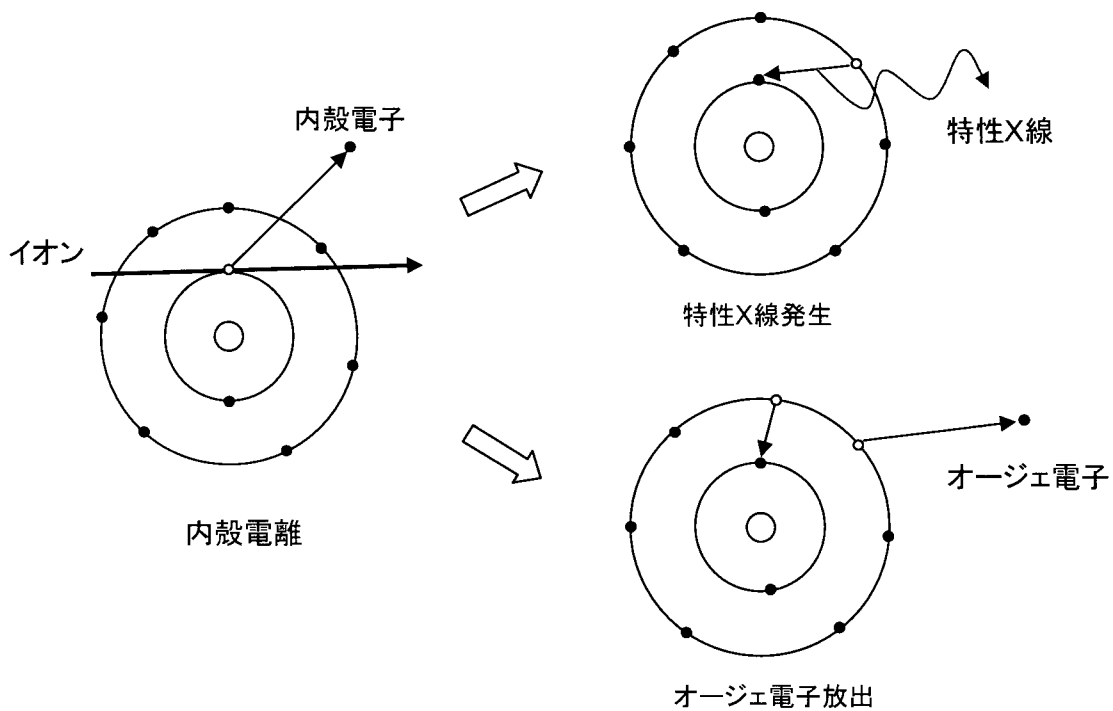


図3-1 特性X線発生とオージェ電子放出の違い

イオンとの衝突によって特性 X 線を発生させる確率に比例した量として X 線生成断面積 σ_x を用いる。 σ_x は内殻に空孔を生成する電離断面積 σ_I と、オージェ電子放出との競争過程で X 線の放出される割合である蛍光収量 ω との積として与えられる。

式で表すと

$$\sigma_x = \omega \cdot \sigma_I \quad (3.1)$$

である。割合 ω の値は、原子および殻によって異なるが、原子番号の増加とともに増加する性質を持っている。図 3-2 に原子番号と K 殻・L 殻の蛍光収量を示す。[1]

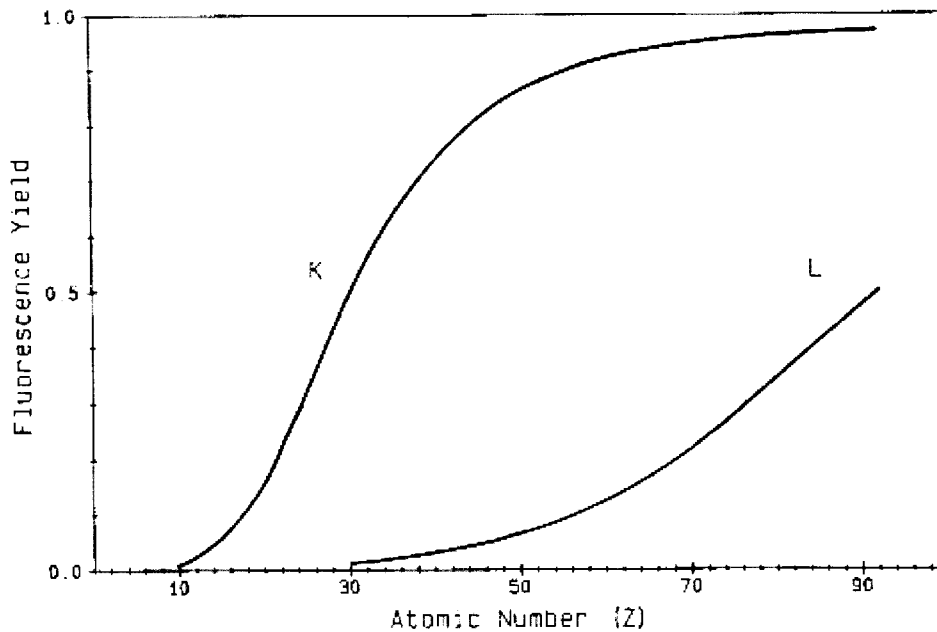


図 3-2 原子番号と K 殻・L 殻の蛍光収量

3.2 バックグラウンド

3.2.1 バックグラウンドの発生

PIXE 分析法におけるバックグラウンドの発生は、大きく二つに分けられる。一つは、入射イオンと標的原子核との核反応で発生する γ 線や、実験室内でのバックグラウンド γ 線が X 線検出器内部でコンプトン散乱を起こし、そのエネルギーの一部が X 線スペクトルに連続のバックグラウンドとして現れる。前者は衝撃粒子に軽イオンを用いたときに問題となるが、入射エネルギーが 3MeV 以下である場合は、さほど大きくない。もう一つは、イオン衝撃により試料中で起きる制動放射(Bremsstrahlung)であり、このバックグラウンドが検出限界を決定する主な原因となる。PIXE 分析法の場合、この制動放射 X 線の発生断面積は、電子衝撃の場合の約 1000 分の 1 以下である。この理由で、PIXE 分析法と電子衝撃 X 線では、内殻電離断面積が同程度でも、PIXE の方が圧倒的にバックグラウンドが小さいので、検出感度が高く微量元素分析できる。[4]

3.2.2 吸収体

PIXE 分析法における X 線測定で、10keV 以下の領域でバックグラウンドを高くするのは制動放射であり、この領域の元素 Al、Si、S などがバックグラウンドに隠されて検出できなくなることがある。また、C や O から発生する特性 X 線もバックグラウンドやパイルアップの原因となる。

そのため検出器の保護のために取り付けられている Be の窓のほかに、マイラーや Al のように低原子番号の元素で構成された薄膜を X 線の吸収体として試料と検出器の間に入れる。これによって低エネルギーの X 線が選択的に吸収除去される。[9]

3.3 試料作成

金属や鉱物などの試料で自己支持の標的が作れる場合はそのまま照射すればよい。溶液、生体試料、環境試料などは何らかのバックキング材を必要とする。バックキングがあると、これから生ずる特性 X 線と制動放射により S/N 比が悪くなる。

バックキング材としては、薄く、丈夫で熱伝導がよい軽元素で出来ていて、不純物を含まないものがよい。実際には、4~10 μ m 程度のマイラー膜がよく使用されている。

いかにバックグラウンドの少ないバックキング材を用いるかが、PIXE の検出感度を左右するので、バックキング材の検討が種々の面からなされている。

3.3 スペクトル測定・解析

半導体検出器に X 線が入射すると、検出器の有感領域内に入射 X 線のエネルギーに比例した電子-正孔対が生成される。これらの電荷担体は、検出器に印加した高電圧によって生じる内部電場により電極に収集され、検出器の外部に電流パルスとして出力される。この電流パルスを正確に増幅することにより、入射 X 線のエネルギーに比例し

た電圧信号パルスを得ることが出来る。この電圧パルスは、多重波高分析器(MCA)で計測される。多重波高分析器では、電圧信号をアナログ→デジタル変換器(Analog to Digital Converter:ADC)で入力パルス波高に相当するデジタル値に変換する。そして、その値をメモリー上のチャンネルとして扱い、チャンネル毎にそのイベント数を記録する。[8]

PIXE スペクトルから、各元素の量を定量的に評価する解析手法としては、バックグラウンドの連続 X 線スペクトルの形状と、Gaussian として近似される特性 X 線のピーク形状を重ね合わせ、Gauss-Newton 法や修正 Marquart 法などの非線形最小二乗法を利用してフィッティングを行う。本研究においては解析ソフト SAPIX[10]を利用した。

3.4 定量分析

3.4.1 検出効率

陽子ビームの分布が試料平面に対して一様で、定量しようとする元素 A が比較的試料の表面に分布していて陽子ビームのエネルギーの損失がその領域では無視できるような場合は、ビームスポット S 内の試料中の元素 A の個数 N_A は、検出される元素 A の特性 X 線のカウント数 Y_A と次式で関係づけられる。[4]

$$Y_A = N_A \cdot \Delta\Omega \cdot Q \cdot \text{eff} \cdot ab \cdot \sigma_X / (4\pi S) \quad (3.2)$$

ここで、 $\Delta\Omega$ は検出器の立体角、 Q はビームスポット S 内に照射された入射粒子の全個数、 eff は検出器の元素 A の特性 X 線に対する検出効率、 ab は試料から検出器までの間で特性 X 線が吸収された場合の吸収率である。(3.2)式によって、試料中の元素 A を定量分析することが出来る。本学の PIXE 実験装置において (3.2) 式の $\Delta\Omega \cdot \text{eff} / (4\pi S)$ を X_{eff} で表し立体角を含む検出効率とした。 Q は BI/e で与えられる。ただし、 BI は

ターゲットに入射する全電荷、 e は電気素量である。特性 X 線の吸収率は検出器の窓に使用された Be と吸収体のマイラーによるものをそれぞれ ab_{Be} 、 ab_{My} 、K-X 線の発生断面積 σ_K を $\omega_K \cdot \sigma_I$ で表すと(3.2)式は

$$Y_A = N_A \cdot BI / e \cdot X_{eff} \cdot ab_{Be} \cdot ab_{My} \cdot \omega_K \cdot \sigma_I \quad (3.3)$$

の様書き換えることが出来る。

表 3-1 に本学の PIXE 実験装置における Fe-K $_{\alpha}$, Fe-K $_{\beta}$, Cl-K $_{\alpha}$, K-K $_{\alpha}$ の検出効率 X_{eff} を求めるために使用した各測定値と内挿値および検出効率を、表 3-2 に Fe-K $_{\alpha}$, Fe-K $_{\beta}$, Cl-K $_{\alpha}$, K-K $_{\alpha}$ 各々の検出効率の平均値を示す。

表 3-1 検出効率計算のための各測定値と内挿値および検出効率

		Y_A	N_A (/cm 2)	BI (C)	ab_{Be}	ab_{My}	$\omega_K \cdot \sigma_I$ (cm 2)	X_{eff}
1	Fe-K $_{\alpha}$	31636	3.865E+17	1.137E-06	9.904E-01	9.136E-01	7.495E-23	1.70E-04
2	Fe-K $_{\beta}$	4102	3.865E+17	1.137E-06	9.929E-01	9.365E-01	1.015E-23	1.58E-04
3	Fe-K $_{\alpha}$	32387	3.865E+17	1.175E-06	9.904E-01	9.136E-01	7.495E-23	1.68E-04
4	Fe-K $_{\beta}$	4294	3.865E+17	1.175E-06	9.929E-01	9.365E-01	1.015E-23	1.61E-04
5	Fe-K $_{\alpha}$	19417	5.30E+16	4.723E-06	9.904E-01	9.136E-01	7.495E-23	1.83E-04
6	Fe-K $_{\beta}$	2549	5.30E+16	4.723E-06	9.929E-01	9.365E-01	1.015E-23	1.73E-04
7	Fe-K $_{\alpha}$	18071	5.30E+16	4.473E-06	9.904E-01	9.136E-01	7.495E-23	1.80E-04
8	Fe-K $_{\beta}$	2451	5.30E+16	4.473E-06	9.929E-01	9.365E-01	1.015E-23	1.76E-04
9	Cl-K $_{\alpha}$	12587	6.89E+16	4.723E-06	8.589E-01	2.630E-01	5.144E-22	5.33E-05
10	Cl-K $_{\alpha}$	12281	6.89E+16	4.473E-06	8.589E-01	2.630E-01	5.144E-22	5.49E-05
11	K-K $_{\alpha}$	32046	7.53E+16	4.723E-06	9.341E-01	5.284E-01	3.41E-22	8.58E-05
12	K-K $_{\alpha}$	30052	7.53E+16	4.473E-06	9.341E-01	5.284E-01	3.41E-22	8.49E-05

表 3-2 平均の検出効率

	X_{eff}
Fe- K_{α}	1.75×10^{-4}
Fe- K_{β}	1.67×10^{-4}
Cl- K_{α}	5.41×10^{-4}
K- K_{α}	8.54×10^{-4}

3.4.2 外部標準法

外部標準法とは、均一厚試料に対して、既知厚の標準試料と測定試料を同一条件で照射し、単位ビーム積算電流値あたりのピーク収量の比と、X線発生断面積、吸収体の透過曲線、検出器の検出効率曲線により、全元素の定量分析を行う方法である。元素密度は g/cm^2 の単位で得られる。

マイクロトームで切られたパラフィン切片、クリオスタットで切られた凍結生物試料切片は均一厚とみなす事ができ、厚さが見積もり可能であるため外部標準法による定量分析が可能である。[11]

3.4.3 内部標準法

内部標準法とは既知濃度の元素を一元素だけ試料に加え均一にし、その標準元素と試料中元素とのピーク収量値の比に、X線発生断面積、吸収体の透過曲線、検出器の検出効率曲線を考慮し、各元素の濃度を求める方法である。絶対定量分析を行う場合の多くの誤差要因が相殺されるため、精度の高い分析結果を供給するものである。均一化が容易な液体試料に関しては、その量が $10 \mu\text{l}$ 以上あれば内部標準法の適用が可能であり、

飲料水、河川水等の水試料、血液、尿等の体液試料などに対しては、内部標準法が採用される。標準元素 S の濃度を C_S とすれば、求める元素 A の濃度 C_A は次式で求められる。

$$C_A = C_S \times (Y_A \cdot \sigma^X_S(E) \cdot \text{eff}_S(\epsilon) \cdot ab_S(\epsilon)) / (Y_S \cdot \sigma^X_A(E) \cdot \text{eff}_A(\epsilon) \cdot ab_A(\epsilon)) \quad (3.4)$$

ただし Y はピーク収量、 σ^X は X 線発生断面積、 eff は検出効率、 ab は吸収体の透過率、 E は入射エネルギー、 ϵ は X 線エネルギーを表す。

この方法では、入射粒子数、検出器の立体角を測定する必要もなく、一様に分布したビームも必要とされない。

第4章 医学への応用

4.1 実験的マウス扁平上皮癌

本研究は奈良女子大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

4.1.1 研究背景

4.1.1.1 金ナノ粒子による悪性細胞の光熱破壊

PIXE分析法は、医学、歯学、生物学、環境科学などの様々な分野の試料分析に応用され、高い検出感度から1mg、1 μ l以下の超微量試料、粉末状生物試料などの分析も可能となっている。

光医療の分野では近年、種々の物質を用いた光線力学的療法(Photo Dynamic Therapy:PDT)が管腔臓器等における表在性腫瘍の診断及び手術治療や放射線治療に代わる治療方法のひとつとして注目されつつある。

2005年、Ivan El-Sayedら[12][13]は金ナノ粒子を抗体に結合させることにより、金ナノ粒子そのものを口腔癌の培養細胞に特異的に結合させることを可能にした。波長514nmのレーザー光を照射し、金ナノ粒子の発熱により悪性細胞が選択的に破壊されることを報告している。

El-Sayedらが考案した抗体結合金ナノ粒子は毒性が少なく、腫瘍に到達した後にレーザー照射を行うまでは細胞破壊をもたらさないため、正常細胞にとって非侵襲的な手段である。温熱による細胞破壊作用の利用は、薬剤のように耐性ができることもないため、くり返し試行することが可能である。

本研究では、El-Sayed、らが*in vitro*で報告した内容をふまえ、*in vivo*において、ヒト扁平上皮癌細胞nを皮下に移植したヌードマウス(BALB/cAJcl-nu/nu)に抗体結合

金ナノ粒子を腫瘍内に注射投与し、金ナノ粒子が扁平上皮癌組織に特異的に取り込まれるか否かを、PIXE分析法を用いて分析し、この分野における基礎的な知見を得ることをめざした。

4.1.1.2 ターゲティング

ターゲティングとは、薬物に生体内で標的部位に指向する性質を与え、選択的な薬物輸送を実現する試みである。薬物の体内挙動の制御を通じて、薬物投与の最適化を達成することを目的とするドラッグデリバリーシステムの考え方の中でも、最も基本的かつ重要な概念と考えられる。

癌化学療法においては、抗癌剤の効果増強と副作用の軽減を目的として、投与方法に関し種々の試みが行われている。抗癌剤の多くは、細胞毒作用を作用機序とし、標的である腫瘍組織以外の正常組織へ移行することにより重篤な副作用を引き起こすので、高い標的指向性を持つことが望まれる。

腫瘍ターゲティングの方法は、大きく局所投与によるものと全身投与によるものとに分けられる。局所投与によるターゲティングは腫瘍組織内注入法であり、全身投与によるターゲティングには腫瘍組織に対して何らかの親和性を有する受動的または能動的キャリアーを利用する。そのうちの能動的ターゲティングは、標的に特異的な親和性を有する物質を薬剤のキャリアーに用いる方法と、外部からの物理的な力により薬剤の選択的な送達あるいは放出を達成する方法とに大別される。

抗原-抗体反応あるいはホルモンとレセプター間の結合は、生体内で起こる各種物質間の相互作用の中でもきわめて特異性が高い。したがって、こうした相互作用を利用すれば、効率的なターゲティングが期待できる。代表的な例としては、癌細胞表面の抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体を能動的キャリアーとして用いる試みがあげられ、“免疫ミサイル療法”と呼ばれる。[14]

抗体は作用物質を腫瘍に特異的に結合させるためのキャリアーとして標的指向性薬剤に利用されている。毒性のある物質を結合させた場合は、標的細胞に到達するまで、体内での輸送中において非特異的結合を起こしたり、抗体と物質との結合が切断される

ことがあってはならない。標的細胞に到達した後には細胞に容易に取り込まれ、取り込まれてからは抗体との結合が切断されることをが望ましいが、作用物質自身は標的細胞に到達するまで分解されることなく、細胞障害性を十分に発現できなければならない。生体内輸送中に非特異的結合を起こしたり、抗体と物質との間の結合が切断すれば、期待する効果が得られないだけでなく、副作用を発現する。[15]

抗体結合金ナノ粒子はヒト細胞に対する毒性が少なく、悪性腫瘍に特異的に集積させた後、適切なエネルギーのレーザー光を照射することにより悪性細胞を選択的に破壊することが可能である。

本研究では抗 EGFR(epidermal growth factor receptor) [上皮増殖因子受容体]抗体を用いて金ナノ粒子を標的である扁平上皮癌組織に特異的に取り込まれるよう試みる。

なお、通常 PIXE 分析の試料作成においては他元素のコンタミネーションが常に問題となるが 本研究においては、金という単一元素の量のみ注目しているため、処理中の他元素の混入を問題にする必要がないといえる。

4.1.1.3 抗体

抗体の種類と構造[16]

抗体は B リンパ球から分化した形質細胞から分泌される分子群である。抗体分子は免疫グロブリンとして知られている一群の血清糖タンパクで、構造も機能も異なる 5 つのクラス、IgM、IgG、IgA、IgE、IgD がある。図 4.1-1 に示すように、すべての免疫グロブリンは基本的な構造として 2 本の相同な H 鎖(heavy chain)と 2 本の相同な L 鎖(light chain)をもち、それらは S-S 結合で結ばれて 1 つの Y 字型をした構造単位を形成している。IgG 分子は血清に含まれる主な免疫グロブリンのクラスで、ヒトでは免疫グロブリン全体の 70~75%を占める。

免疫グロブリン G の 2 本の腕の先端には 2 個の抗原結合部位(可変領域: variable region)があり、その後に変領域(constant region)が続いている。腕の付け根の部分には 2 個の S-S 結合があつて、ヒンジ部分(hinge region)と呼ばれる。

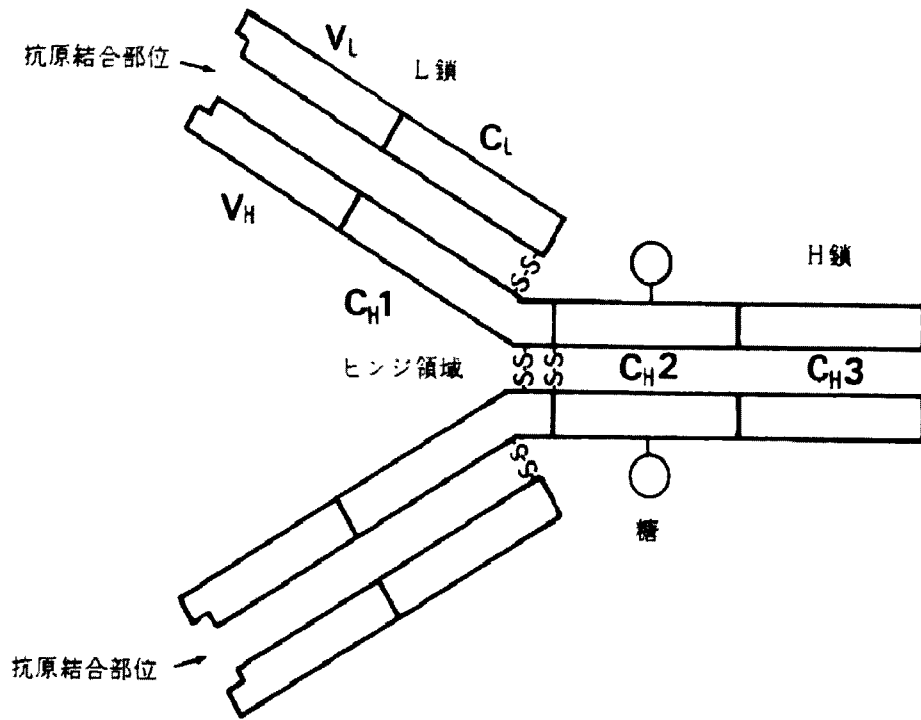


図 4.1-1 免疫グロブリン G の構造

4.1.1.4 抗原

B リンパ球の表面にある抗原レセプター(細胞表面免疫グロブリン)に抗原が結合すると、B リンパ球は刺激されて分裂増殖して形質細胞に分化し、抗原と結合した細胞表面免疫グロブリンと同じ特異性を持つ抗体を産生する。抗原と抗体の反応には厳密な特異性があり、それは抗原分子表面の三次元的構造で決定される。これをエピトープ(epitope)または抗原決定基と呼んでいる。抗原によって刺激された B リンパ球で産出される抗体はその抗原のエピトープとのみ結合する。この相補性は鍵と鍵穴の関係にたとえられる。

4.1.2 対象・方法

4.1.2.1 実験動物

ヌードマウス BALB/cAJcl-nu/nu, (5週齢♀)6匹と BALB/cAJcl-nu/(5週齢♀)6匹に対し、日本クレア(株)での委託実験において、ヒト類表皮癌 A-431 細胞(大日本住友製薬)を右腹側部皮下に移植後7日後に納品されたものを使用した。

ヌードマウス BALB/cAJcl-nu/nu の特性を表 4.1-1 に示す。[17]

表 4.1-1 ヌードマウス BALB/cAJcl-nu/nu の特性

特性	
遺伝様式(遺伝子記号)	nu chromosome11 単一劣性遺伝子
免疫細胞の異常	T細胞機能異常(NK活性正常)
免疫グロブリン産生	IgA:低い IgM:正常 IgG:個体差がある
免疫不全の要因	胸腺上皮の異常による
ヒト腫瘍細胞の移植と増殖	可能
解剖学・組織学的特徴	胸腺が欠損しているがリンパ節は存在する 毛包は存在するが外見的には無毛
血液学的所見	白血球数低い

日本クレア(株)における委託実験の詳細は以下の通りである。

①大日本住友製薬 カタログ No.09-1555 A-431 細胞を購入。

表 4.1-2 に A-431 細胞のデータを示す。

②細胞培養による増殖を開始した。(培養液：D-MEM10%FBS、37℃、5%CO₂)

③増殖させた細胞を BALB/cAJcl-nu/nu, (5 週齢♀)6 匹と BALB/cAJcl-nu/+(5 週齢♀)6 匹の右腹側部皮下に移植した。

移植細胞数は 1 匹当たり 1×10^7 個/100 μ lPBS である。

④移植後 1 週間後に出荷。

表 4.1-2 A-431 細胞データ

培養液	D-MEM+FBS(10%)
組織	ヒト類表皮癌(85 歳、♀)
腫瘍形成	免疫不全マウスにて可
バイオセイフティレベル	1

飼育管理

6 週齢で納品された後、奈良女子大学動物飼育施設の独立室内にて隔離飼育を行った。水は煮沸したイオン交換水を 1 回/日交換したものを、飼料は放射線滅菌飼料 CE-2(日本クレア)を自由摂取させた。

飼育ケージ・給水瓶はオートクレーブ滅菌を行い、床敷は放射線滅菌床敷を使用した。BALB/cAJcl-nu/nu のケージには浮遊菌落下防止のためフィルターキャップを使用した。

腫瘍形成

A-431 細胞の皮下移植後 19 日目(7 週齢)までに BALB/cAJcl-nu/nu,6 匹中 5 匹に腫瘍形成が確認できた。残りの BALB/cAJcl-nu/nu,1 匹と BALB/cAJcl-nu/+,6 匹のいずれにも腫瘍は形成されなかった。(図 4.1-2、図 4.1-3)



図 4.1-2 BALB/cAJcl-nu/nu



図 4.1-3 BALB/cAJcl-nu/+

4.1.2.2 抗体結合金ナノ粒子の作成

抗 EGFR 抗体と金ナノ粒子との結合は Ivan El- Sayed ら[12][13]の方法に準じた。

金ナノ粒子(粒子径 40nm EY Laboratories)溶液は 20mM HEPES バッファ (ナカライテスク、PH=7.4) で、分光光度計波長 520nm において光学密度 0.811 になるように希釈した。

40 μ l の抗 EGFR モノクローナル抗体 (マウス、シグマ) は同じ HEPES バッファで 400 μ l に希釈した。

金ナノ粒子溶液 8ml を希釈した抗体溶液に 20 分間混ぜた。

0.4ml の 1%ポリエチレングリコール(ナカライテスク、MW=7400~10200)水溶液を凝集を防ぐ為に加え、溶液を 6000rpm で 18 分間遠心分離機にかけた。

抗 EGFR/Au ペレットを注射用水(扶桑薬品工業)4ml 中に再分散した。(図 4.1-4)

抗体非投与群に使用する注射液の作成は、金ナノ粒子溶液に対し同じ割合で、HEPES バッファとポリエチレングリコール水溶液を加え、溶液を 6000rpm で 18 分間遠心分離機にかけた。Au ペレットを注射用水に再分散した。

後から実験を行ったヌードマウス(5)に対しては金濃度を高くするため以下のように抗体結合金ナノ粒子を作成した。

金ナノ粒子溶液 6ml を希釈せずに使用し、40 μ l の抗 EGFR モノクローナル抗体を HEPES バッファで 400 μ l に希釈したものと 20 分間混ぜた。この段階で金ナノ粒子が凝集を起し始め、液が紫がかった色になった。

0.4ml の 1%ポリエチレングリコール(ナカライテスク、MW=7400~10200)水溶液を凝集を防ぐ為に加え、溶液を 6000rpm で 30 分間遠心分離機にかけた。遠心管の側面に付着したペレットをかき集めて(100 μ l)、注射用水で 2 倍に希釈した。

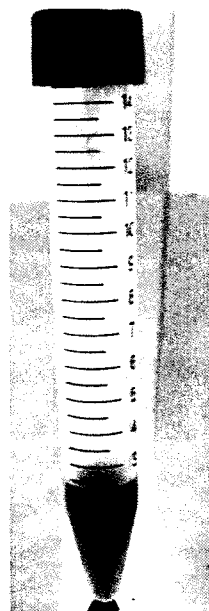


図 4.1-4 注射用水に分散した抗体結合金ナノ粒子

4.1.2.3 方法

抗体結合金ナノ粒子の投与

抗体投与群(I群、n=4)のうちヌードマウス(1、2、3)には、抗体結合金ナノ粒子を注射用水に分散させたもの(0.4ml)を腫瘍内注射投与した。

ヌードマウス(5)には抗体結合金ナノ粒子を注射用水に分散させたもの(0.2ml)を腫瘍内注射投与した。

抗体非投与群(II群、n=1)のヌードマウス(4)には、金ナノ粒子を注射用水に分散させたもの(0.4ml)を腫瘍内注射投与した。

腫瘍無しの群(III群、n=1)のヌードマウス(6)には、注射投与を行わなかった。

表 4.1-3 実験時(抗体結合金ナノ粒子溶液投与時のヌードマウスの体重、週齢

	個体識別番号	週齢	体重(g)
抗体投与群 I群	1	10	24.0
	2	10	23.6
	3	11	24.7
	5	15	26.7
抗体非投与群II群	4	11	23.9
腫瘍なしの群III群	6	16	25.8

臓器摘出

I群のうちのヌードマウス(1、2、3)では、腫瘍内に抗体結合金ナノ粒子溶液を注射投与してから1時間後、エーテル麻酔下において腫瘍とその周辺組織、肝臓、腎臓、皮膚を摘出した。金濃度を高くして実験を行ったヌードマウス(5)では、腫瘍内に抗体結合金ナノ粒子溶液を注射投与してから30分後、エーテル麻酔下において腫瘍とその周

辺組織、肝臓、腎臓、皮膚を摘出した。

Ⅱ群の金ナノ粒子のみを腫瘍内注射投与したヌードマウス(4)は注射後すぐに死亡した。そのため臓器の摘出は注射投与から 20 分後に行った。

Ⅲ群の腫瘍のないヌードマウス(6)には注射投与を行わず、エーテル麻酔下において肝臓、腎臓、皮膚を摘出した。

クリオスタットによる凍結切片の作製

ヌードマウス(1~4)から摘出した臓器に対し、以下の手順で凍結切片の作成を行った。[18]

後から実験を行ったヌードマウス(5、6)から摘出した臓器に対しては、処理による金の消失を考慮して③の工程を省略した。

- ①腫瘍と周辺組織、肝臓、腎臓、皮膚は 4%パラホルムアルデヒド中にて氷上、一晚固定を行った。
- ②冷 PBS で 3 回洗浄した。
- ③氷の結晶により組織の構造が壊れるのを防ぐため、固定した組織片を 10%ショ糖-PBS に、氷上、数時間~一晚振盪しながら浸漬し、さらに 20%ショ糖-PBS に、氷上、数時間~一晚振盪しながら浸漬した。
- ④クリオモルドに凍結組織包埋剤(OTC コンパウンド)を満たし、組織片を浸した。
- ⑤クリオモルドをディープフリーザー(-80℃)に 5 分乗せて組織片を凍結した。
- ⑥凍結させた組織片は-25℃で保存した。
- ⑦試料台に OTC コンパウンドを少量つけ、その上に凍結した組織を載せて、さらにクリオスタット内で凍結した。
- ⑧アームに試料台をセットし、固定した。
- ⑨切片の厚さを設定した。マウス(1、2)は 10 μ m、マウス(3~6)は 20 μ m とした。
- ⑩ハンドルを回して組織を薄切し、試料の面出しを行った。
- ⑪ターゲットホルダー上のバックリング膜(マイラー12 μ)上に切片を貼り付け自然乾燥させた。

PIXE 分析

奈良女子大学のタンデム型バンデグラーフ静電加速器を用い、試料に 2.0MeV の陽子を照射した。吸収体には、低エネルギー領域測定に 50 μ m のマイラーを、高エネルギー領域測定に 40 μ m のアルミニウム箔を使用した。

4.1.2.4 結果

Au 箔、抗体結合金ナノ粒子溶液、ヌードマウス(2)、ヌードマウス(5)の腫瘍と周囲の皮膚、腫瘍中心部、肝臓、腎臓、腫瘍から離れた皮膚、ヌードマウス(6)の皮膚、肝臓、腎臓の PIXE 分析結果のスペクトルを図 4.1-5 から図 4.1-17 に示す。

図に示したように、マイラー上に滴下した抗体結合金ナノ粒子溶液 10 μ l では金のスペクトルが検出されたが、ヌードマウス(2)、ヌードマウス(5)腫瘍と周囲の皮膚、腫瘍中心部、肝臓、腎臓、腫瘍から離れた皮膚のいずれからも金は検出されなかった。

また、半紙上に滴下し、にじませた抗体結合金ナノ粒子溶液 10 μ l から金は検出されなかった。

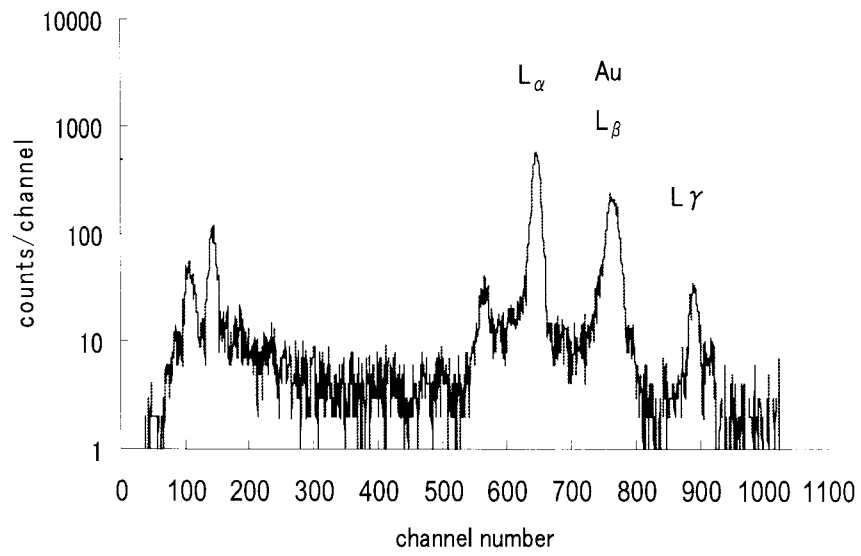


図 4.1-5 Au 箔 5.5 μ m 99.99%

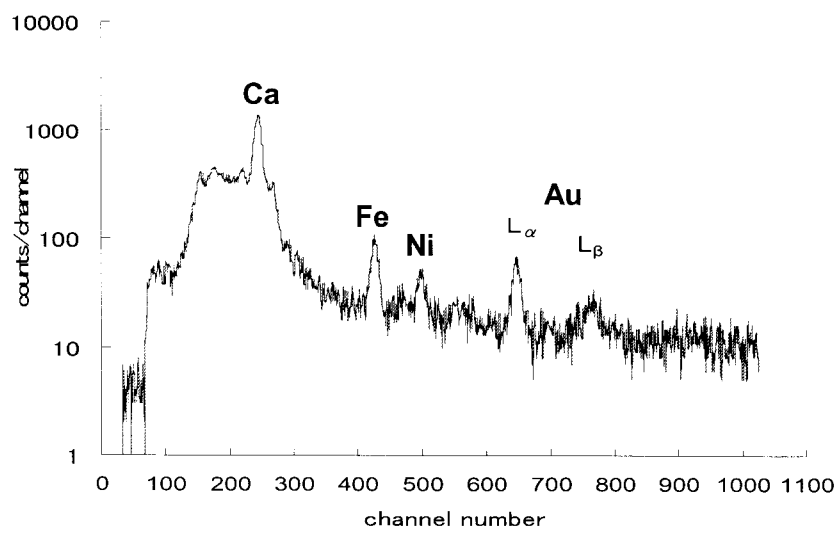


図 4.1-6 マイラー上の抗体結合金ナノ粒子溶液 10 μ l

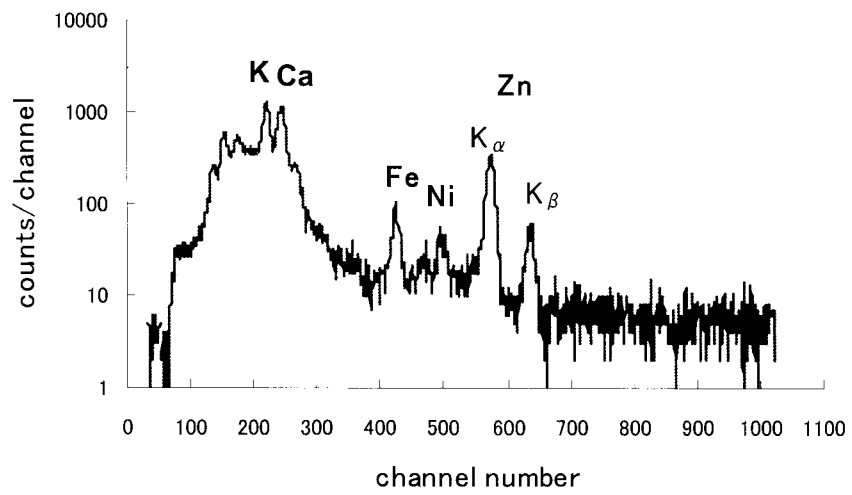


図 4.1-7 スードマウス(2)腫瘍と周囲の皮膚

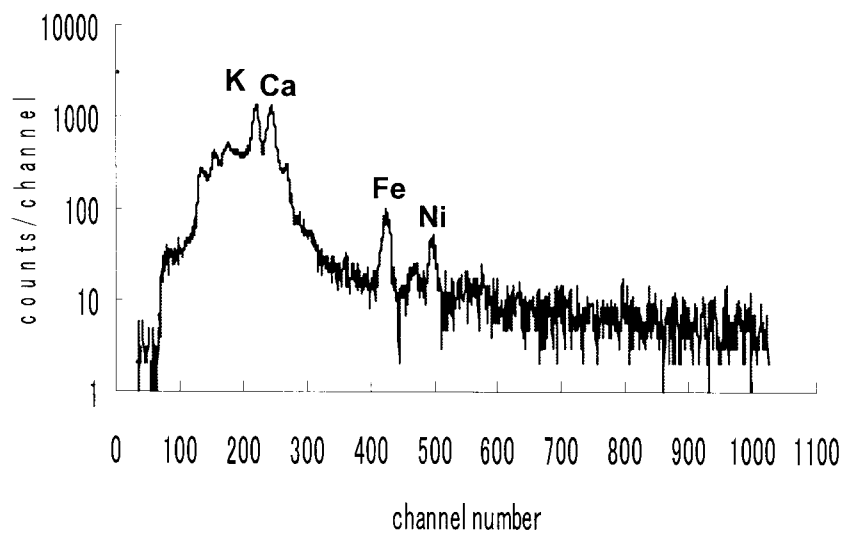


図 4.1-8 スードマウス(2)腫瘍中心部

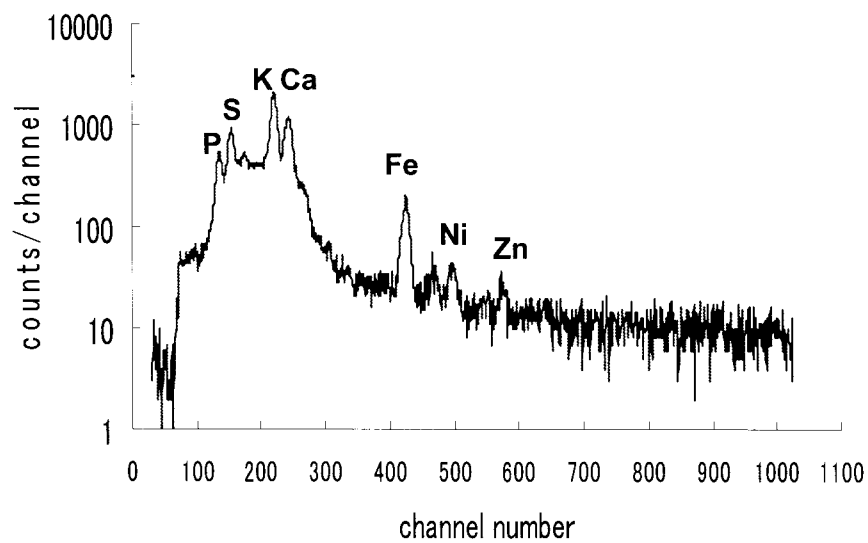


図 4.1-9 ヌードマウス(2)肝臓

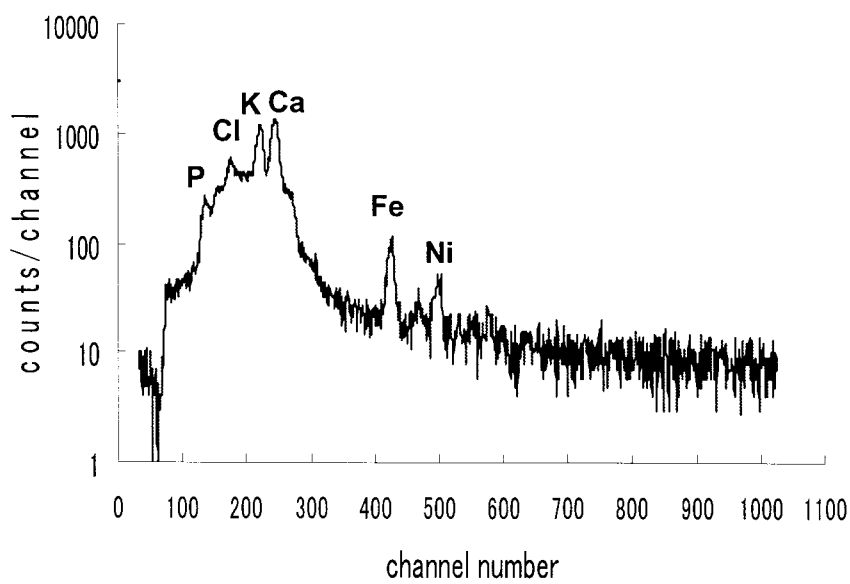


図 4.1-10 ヌードマウス(2)腎臓

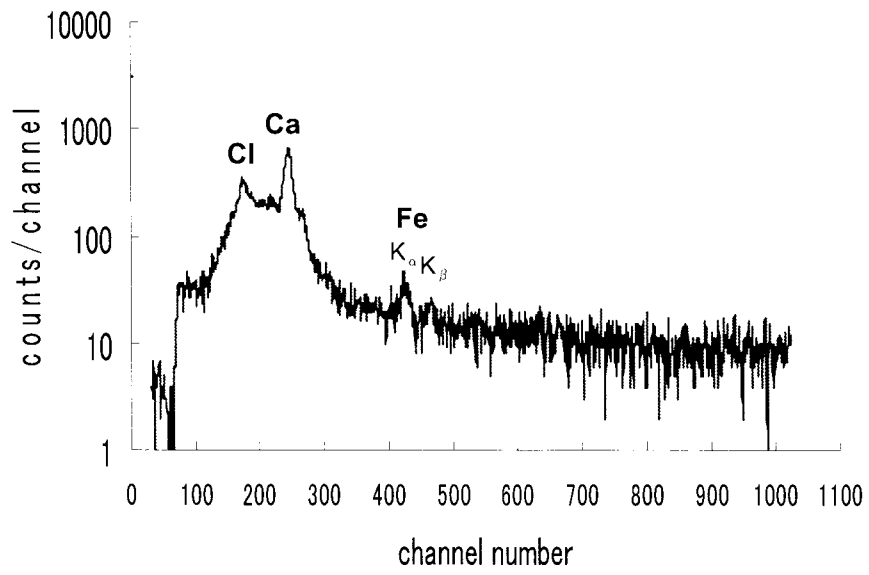


図 4.1-11 ヌードマウス(2)腫瘍から離れた皮膚

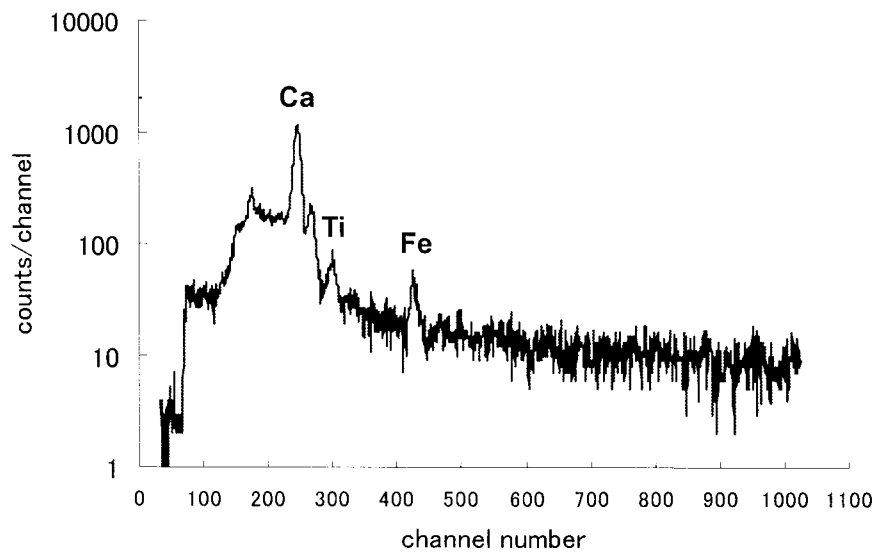


図 4.1-12 半紙上の抗体結合金ナノ粒子 10 μl

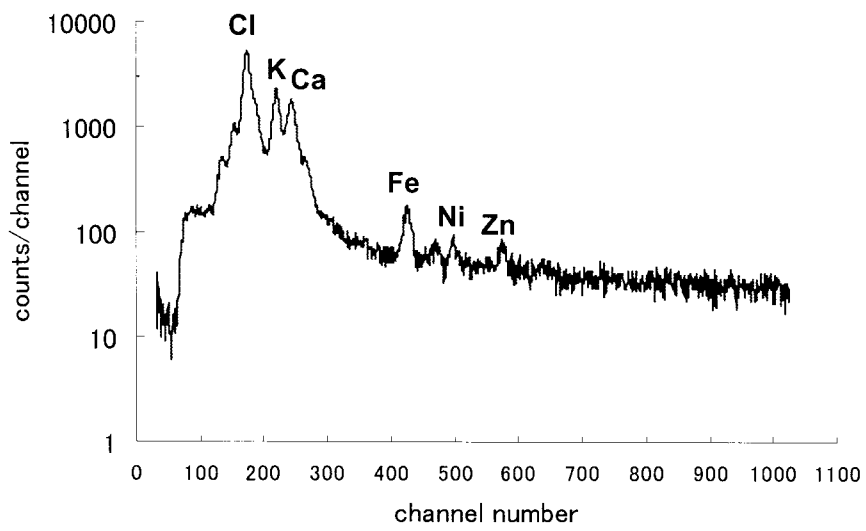


図 4.1-13 ヌードマウス(5)腫瘍中心部

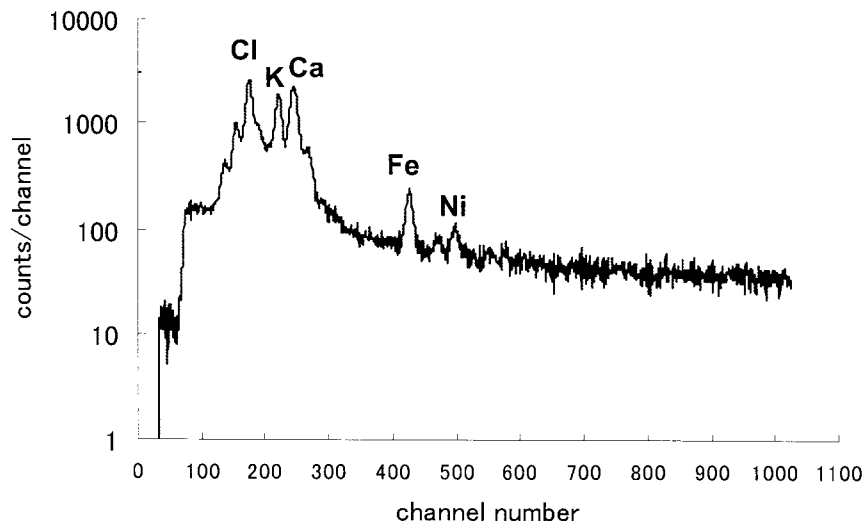


図 4.1-14 ヌードマウス(5)腫瘍に接した皮膚

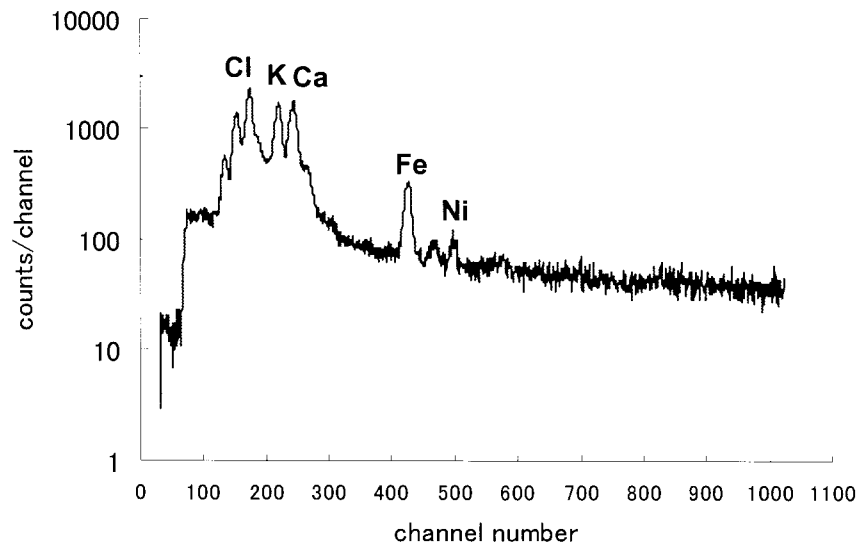


図 4.1-15 スードマウス(5) 肝臓

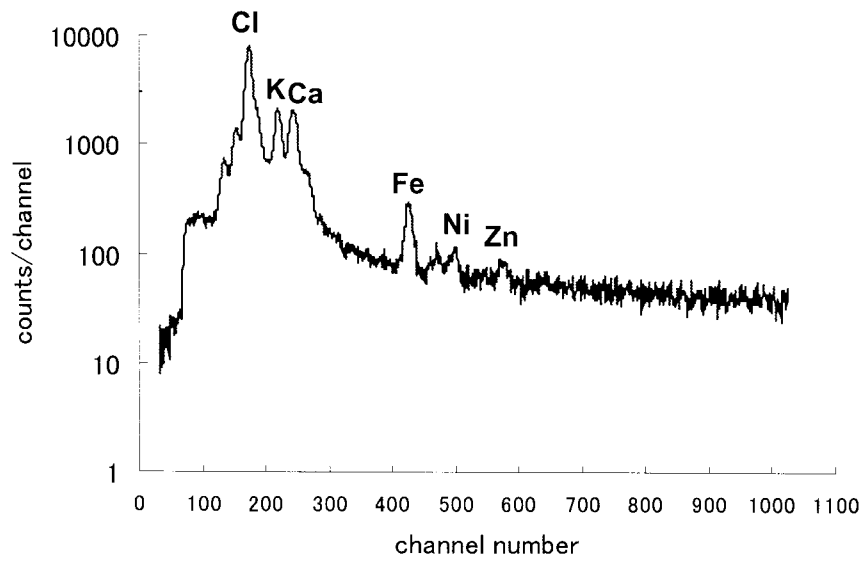


図 4.1-16 スードマウス(5) 腎臓

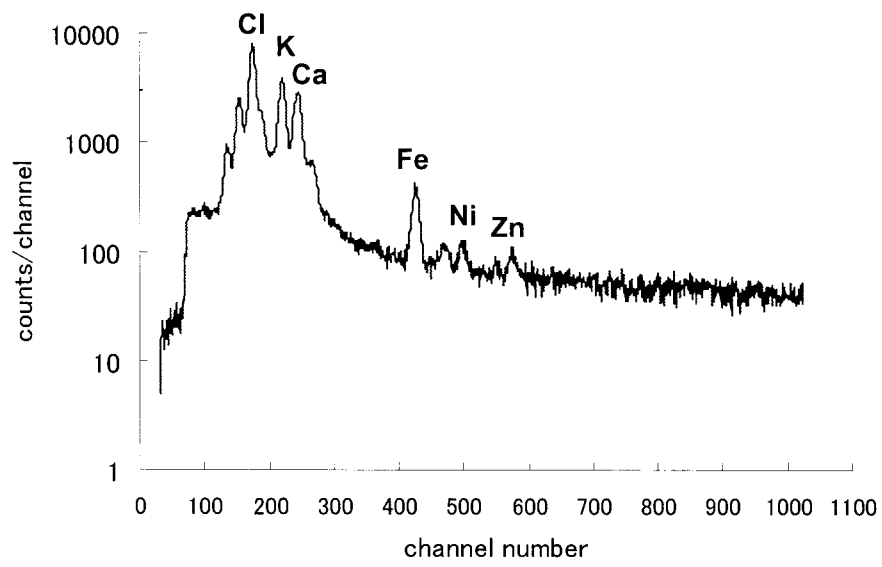


図 4.1-17 ヌードマウス(5)腫瘍から離れた皮膚

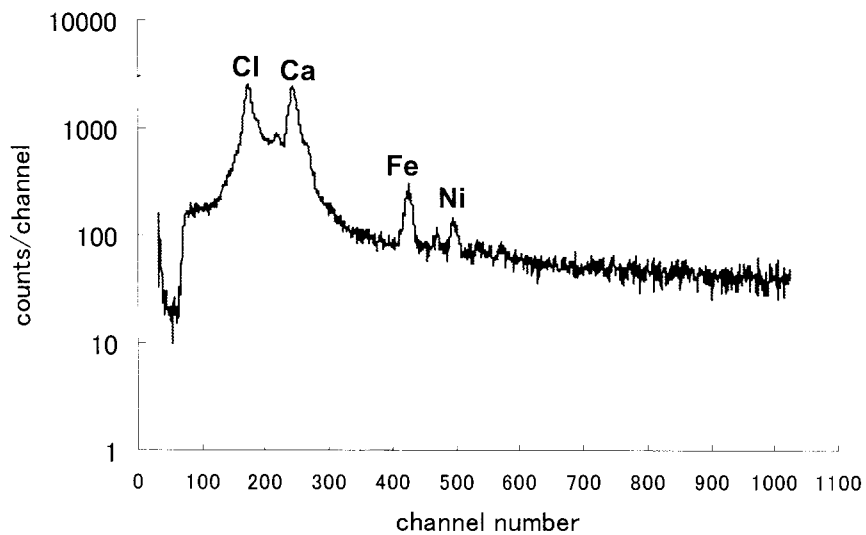


図 4.1-18 ヌードマウス(6)右腹側皮膚

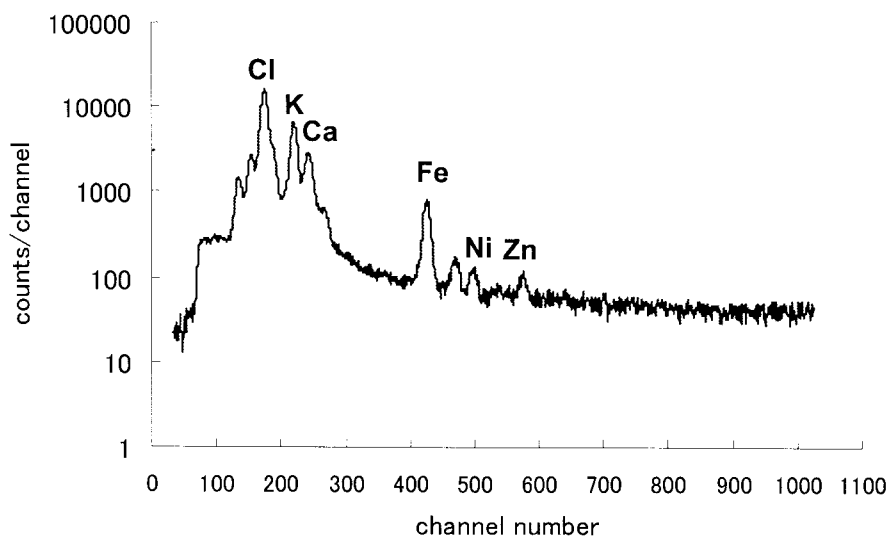


図 4.1-19 ヌードマウス(6)肝臓

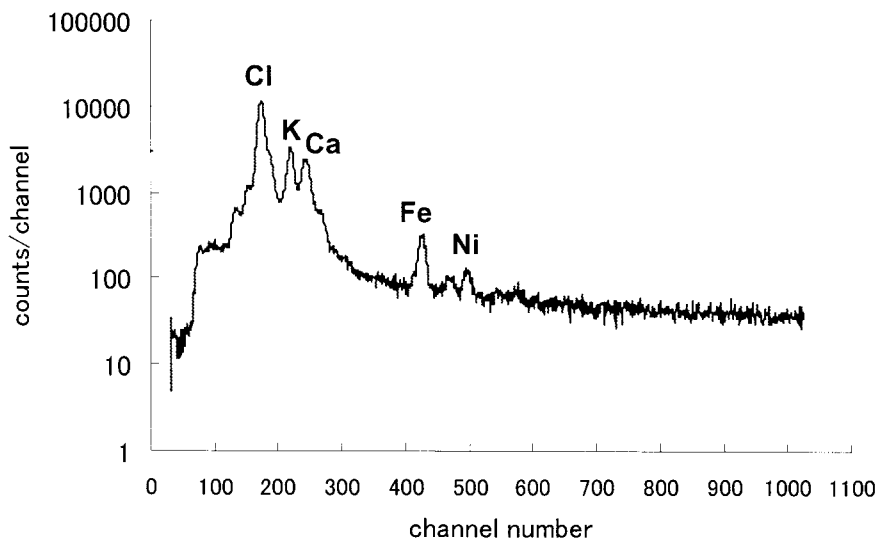


図 4.1-20 ヌードマウス(6)腎臓

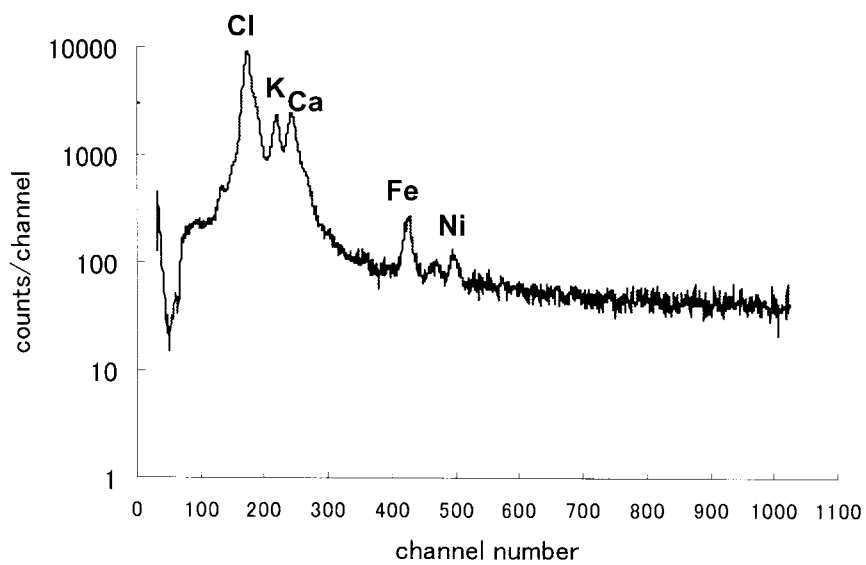


図 4.1-18 ヌードマウス(6)右大腿皮膚

4.1.2.5 考察

最初に実験を行った抗体投与群(1群)のヌードマウス(1、2、3)からの腫瘍中心部、腫瘍と周囲の皮膚、肝臓、腎臓、腫瘍から離れた皮膚を分析した結果、いずれからも金は検出されなかった。

また、半紙上に滴下しにじませた抗体結合金ナノ粒子溶液 10 μ l からも金は検出されなかった。一方、マイラー上に滴下し、ビームスポット ϕ 15mm の範囲内で乾燥させた抗体結合金ナノ粒子溶液 10 μ l からは金が検出されている。このことより、抗体結合金ナノ粒子溶液 10 μ l が ϕ 15mm の数十倍の面積に広がると、本研究の PIXE での検出限界以下になると考えられた。

各組織から金が検出されなかった原因としては、以下のようなことが考えられた。

1. 金ナノ粒子の濃度が薄い。
2. 薄切切片試料作成時に金ナノ粒子が失われた。
3. 金ナノ粒子が抗体と結合していない。
4. 注射投与後 1 時間以内に金ナノ粒子が身体の他の部位に広がった。

これらを検証する目的でヌードマウス(5)に対しては、以下の条件で実験を行った。

1. 金ナノ粒子の濃度を濃くした注射液を用いた。
2. 臓器摘出後の処理を減らした。

その結果ヌードマウス(5)の各組織からも金が検出されなかった。ただし、光学顕微鏡下(400 倍)に腫瘍組織内に金ナノ粒子の凝集塊が観察されることが確認できた。(図 4.1-19)

以上より、金ナノ粒子は試料作成時に一部が失われた可能性は否定できないが、腫瘍組織内には存在していることが確認された。それにも拘らず、これが PIXE 分析法で検出されなかったのは、金の濃度が PIXE の検出限界に達していなかった可能性やビームの照射部位に金粒子が集まっていなかったことなどが原因として推察される。

したがって、本研究でめざした、金ナノ粒子の腫瘍への特異的集積を検証するには至

らなかった。これらの点について今後さらなる検討が必要と考えられる。

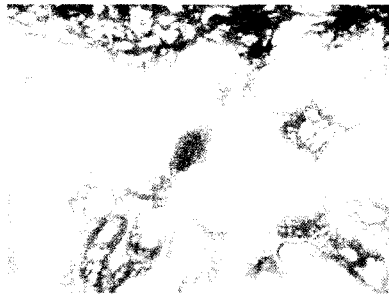


図 4.1-19 ノードマウス(5)の腫瘍の光学顕微鏡写真(400倍)

4.2 ヒト生検組織への応用

4.2.1 目的

ヒトの生検材料は種々の臨床検査に用いられているが、採取標本がごく微量に限られるため、化学構造を決める成分分析においても限界がある。PIXE法を用いて微量の標本から同時多元素分析を行い、ヒト子宮頸部の正常および病的組織における元素分析の有用性について検討を試みた。

4.2.2 対象

ヒトの生検組織（子宮頸部）

4.2.3 PIXE 分析

奈良女子大学のタンデム型バンデグラーフ静電加速器を用いて測定を行った。パラフィン包埋法で作成された薄切切片試料を直接ターゲットホルダーに固定し、2.0MeVの陽子を照射した。吸収体には厚さ 50 μm のマイラーを使用した。

4.2.4 結果

図 4.2-1、図 4.2-2 に示すように、子宮頸部正常部と子宮頸部ポリープ部の比較から、ポリープ部では、相対的に Zn が少なく、K+Ca/K,Fe が多く検出された。

4.2.5 考察

子宮の元素分析に関して、卵巣切除を行ったラットの実験において、Ca,Fe が増加して Mn,Se が減少したと Ynsa らが報告している[19]。また、ヒトにおいては、加齢により子宮動脈[20]、卵管[21]で Ca の増加していることが報告されている。

本実験の試料では年齢、病歴等を特定できないため、また 1 例だけの結果であるため、詳しい考察は出来ない。しかし K+Ca /K,Fe が増加したことにより、卵巣の機能との関連の可能性が示唆された。

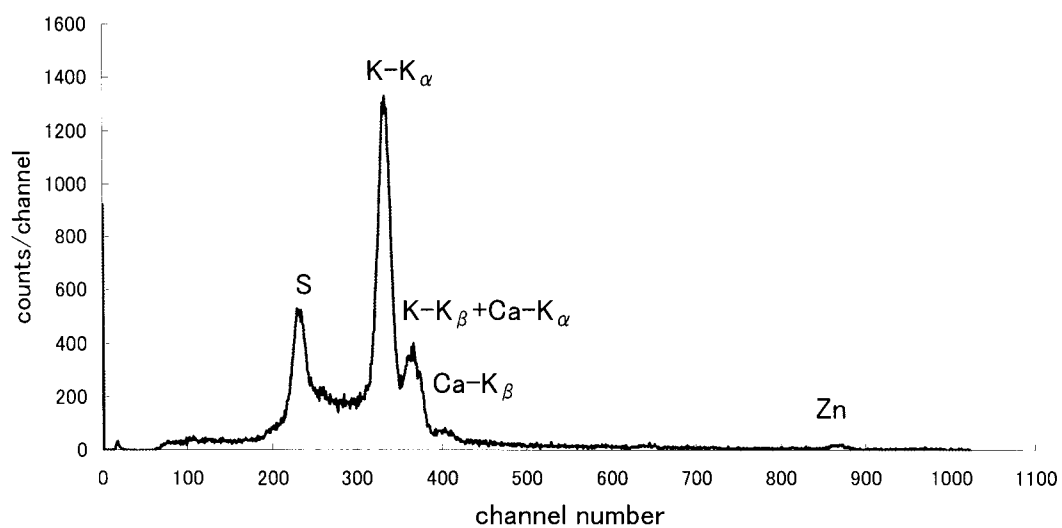


図 4.2-1 子宮頸部正常部

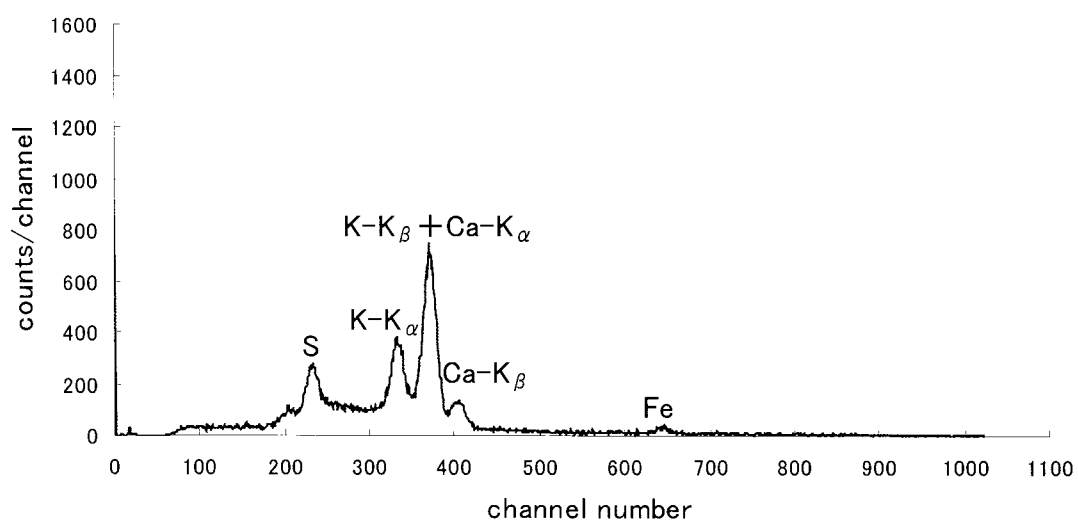


図 4.2-2 子宮頸部ポリープ部

第5章 結語

PIXE 分析法の医学への応用の可能性について検討した。

ヒト生検組織を対象として PIXE 分析法による元素分析を行い医学的な有用性が確認された。

本研究においては、「結果」を示した子宮頸部以外にも、種々の疾患における多数の臓器から得られたサンプルを対象に PIXE 分析法を実施している。全例で分析は可能であり、臓器ごと疾患ごとにそれぞれ特徴的なスペクトルが得られた。分析の結果、興味ある結果が子宮頸部のサンプルにおいて得られた。ただし子宮頸部については1例のみの結果であり、一般的考察を行うには、同一組織、同一疾患の試料を今後多数例で分析することが必要である。今回の結果から、PIXE 分析法の生検組織への応用は微量試料を対象とすることが可能であるため、患者から採取した少ないサンプルをもとに疾患の本態を基礎医学的に分析する手段としても、また補助診断法のひとつとして臨床応用していく上でもその有用性は非常に高いと考えられた。文献的には抗癌剤の動態分析[22]や解剖学的な基礎研究[19]の分野での報告が見られるが PIXE を行うための加速器を持つ施設が限られているため、一般的ではない。装置の共同利用や簡易型の小型装置の普及がすすめば、今後この領域はさらに発展すると考えられる。

実験的マウス扁平上皮癌組織に特異的に取り込まれる金ナノ粒子は、今回の PIXE 分析法では検出することが出来なかった。しかし、金という安定な単一元素は、生物医学の実験で常に問題となるコンタミネーションとも無縁とってよく PIXE 本来の検査対象として最も適する条件を備えている。また投与に当たっては人体への毒性も少ないとされている。実際、金製剤は以前から臨床的に治療のため使用されている。したがって、今回金ナノ粒子が検出できなかったのは「考察」に挙げたような種々の原因が考えられるが、概ね、金の腫瘍組織内濃度と PIXE の感度との問題としてとらえることができる。今後さらに細かい条件でのさらなる検討が必要と考えられる。

謝辞

本修士学位論文執筆にあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました、奈良女子大学 理学部物理科学科 坂本直樹教授に深く感謝の意を表します。本研究を進めるにあたり御指導を賜りました、奈良女子大学 理学部物理科学科 小川英巳教授、同 石井邦和助手、本研究遂行全般に亘り御指導と御助力を賜りました、狩俣順也技官に心より感謝を申し上げます。

本研究に対する御教示と御協力を賜りました、奈良女子大学 理学部生物科学科 荒木正介教授、奈良女子大学大学院 人間文化研究科 共生自然科学専攻 渡邊利雄教授、奈良女子大学 理学部化学科 塚原敬一教授、同 飯田雅康教授、同 高島 弘助手に心より感謝を申し上げます。

本研究に御協力賜りました、放射線物理学研究室の諸氏、生物科学科 神経発生研究室および化学科 塚原研究室の関係各位に感謝を申し上げます。

本研究には、これらの方々と書き記すことの出来ない多くの方からのご指導と御協力を賜りました。ここに改めて心よりの御礼を申し上げます。

参考文献

- [1] Seven A.E. Johansson, John L. Campbell PIXE : a novel technique for elemental analysis, 1988.
- [2] 石井慶造, イオンビームによる物質分析・物質改良, 内田老鶴圃, 2000.
- [3] 千葉 廉, PIXE による微量元素分析, 日本原子力学会誌, Vol.26, No.10, 1984.
- [4] 石井慶造, PIXE 分析法の基礎, 放射線, Vol.23, No4, 1997.
- [5] 鍛冶東海, 荷電粒子励起 X 線, 化学総説, No.29.
- [6] T.B.Johannsson, et al., Nucl.Instr.Meth., (1970), **84**, 141.
- [7] 津田直子, 坂本直樹, 小川英巳, 大気中 PIXE 法による遺跡出土遺物の産地分析, 1998.
- [8] 酒井卓郎, 2003 年博士学位論文(大阪大学).
- [9] 橋本芳一, 大歳恒彦, 放射化学分析法・PIXE 分析法, 共立出版, 1986.
- [10] 世良耕一郎, SAPIX マニュアル Ver3.3, 1997, 岩手医大サイクロトロンセンター.
- [11] 世良耕一郎, PIXE 法で定量分析可能な試料 -PIXE 全国共同利用 10 年の歩み-, 岩手医大サイクロトロンセンター.
- [12] Ivan H.El-Sayed et al., Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles, Cancer letters, (2005), **xx**, 1-7.
- [13] Ivan H.El-Sayed et al., Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in cancer Diagnostics: Applications in Oral Cancer, Nano Letters, (2005), **5**, 829-834.
- [14] 橋田 充, 高倉喜信, 生体内薬物送達学, 産業図書, 1994.
- [15] 金光 修, 抗体工学入門, ニューエンジニアリングライブラリー, 地人書店, 1994.
- [16] 横田貞記, 藤森 修, イムノゴールド法, ソフトサイエンス社, 1992.
- [17] 実験動物・飼料総合カタログ, 日本クレア株式会社.
- [18] 高田邦明, 斉藤尚亮, 川上速人, 実験医学別冊 染色・バイオイメージング実験ハンドブック, 2006.
- [19] Ynsa MD et al., Biological Trace Element Research, (2004), **101**(1), 37-46.
- [20] Takashi Naganuma et al., Biological Trace Element Research, (2004), **101**(3), 203-210.
- [21] Yoshiyuki Tohno et al., Biological Trace Element Research, (2001), **80**(1), 13-22.
- [22] B.Hietel, F.Schulz, K.wittmaack, Nucl.Instr.Meth., (1984), **B3**, 343.