

論文の内容の要旨

論文題目

Study on Microdosimetric Detection Method using CR-39 with AFM Readout and its Application to Medicine and Biology

(CR-39 と AFM を用いたマイクロシメトリ手法とその医学・生物学的応用に関する研究)

氏名 雨宮 邦招

1. はじめに

硼素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy: BNCT)¹ は、腫瘍集積性硼素化合物と外部から照射する熱中性子との $^{10}\text{B} (n, \alpha) ^7\text{Li}$ 反応で生ずる短飛程 ($10\ \mu\text{m}$: 細胞一個分) の荷電粒子を利用して腫瘍細胞を選択的に死に至らしめるという治療法で、浸潤の激しい腫瘍、特に脳腫瘍や悪性黒色腫の治療として期待されている。ここで重要なのは硼素薬剤の分布特性であることは言うまでもなく、実験的には免疫染色蛍光顕微鏡観察と並んで α オートラジオグラフィによる組織内・細胞内硼素分布測定が行われてきた²。しかし従来法では光学顕微鏡による観察のため分解能は悪く ($1\ \mu\text{m}$)、細胞内構造レベルでの硼素分布測定は難しかった。近年では原子間力顕微鏡 (AFM) を用いることで数 10nm という微小な荷電粒子の飛跡をも測定可能になった³ ため、この技術を応用して細胞内硼素薬剤分布測定・マイクロシメトリのための高分解能 α オートラジオグラフィ法の開発を行った。粒子飛跡の検出に用いている CR-39 プラスチック飛跡検出器は密着型 X 線顕微鏡⁴ 用の X 線感光材料としても利用でき、同一の CR-39 上で粒子飛跡と細胞の X 線透過像とを同時に高分解能に観察することができる。図 1 に本手法の模式図を示す。

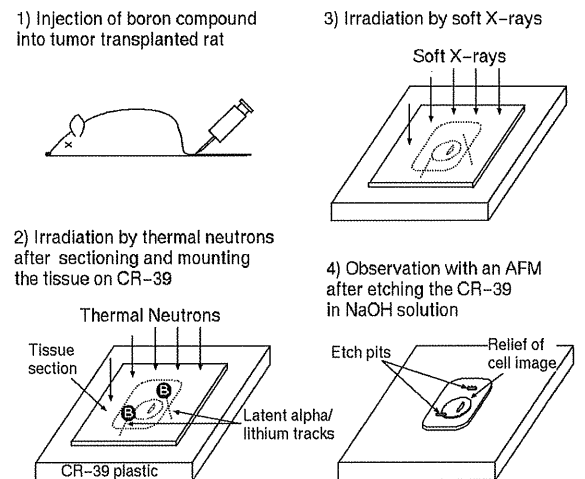


図 1 : 高分解能 α オートラジオグラフィ手法の模式図。

2. 手法の基礎特性

2. 1. 撮像の分解能

AFM を用いて粒子飛跡像及び細胞 X 線透過像観察を行う際の分解能を調べる実験を行った。CR-39 小片に静電加速器からの 1MeV の He イオンを照射した。照射後の CR-39 は 70°C の 7N NaOH 水溶液中で 2 分間エッチングし、He イオンによる微小なエッチピットを AFM で観察したところ、開口部の直径およそ 80nm であったが、粒子入射位置は開口の中心もしくは円錐形状のエッチピットの先端であるから、入射位置測定は CR-39 の表面粗さ~数 nm 程度の精度まで行えるものと考えられる。

次にCR-39を用いたX線顕微鏡の分解能測定のため、CR-39小片に17 μm グリッド、厚さ3.7 μm の銀メッシュ越しに軟X線を10mJ/cm²程度照射した。軟X線はYAGレーザの2倍高調波パルス(幅3ns)をイットリウムターゲット上で50 μm 程度に集光させて生じるレーザプラズマから得られる。照射後のCR-39は上述の条件でエッチングし、CR-39上に生じた段差をAFMにて観察した。分解能の指標となる、エッジの広がりはおよそ100nmであった。もしX線吸収分布が階段関数的で、エッチングが損傷量に応じて等方的に進むのであればエッジの広がり50nm程度と考えられるが、実際にはX線源たるレーザスポットの大きさと、観察対象たる銀メッシュの厚さに起因する半影ボケが100nm程度になることがエッジの広がりを大きくしている原因と考えられる。BNCTでの細胞内硼素分布測定に際しては実験に使う試料の厚さが1 μm 程度であるため、細胞のX線透過像の分解能は100nm以下になるものと考えられる。

2.2. 硼素濃度校正線

BNCTにおける α オートラジオグラフィを行うにあたっては α トラック密度が硼素の絶対濃度と十分な線形性を保っている必要がある。そこで α トラック密度と硼素濃度との校正線を得るため、標準濃度の硼素を含有したゲル(ゼラチン:窒素濃度を生体と同等(2%)に調整)をクリオスタット中で3 μm 切片にしてCR-39上に用意し、一定量の中性子照射(4 $\times 10^{13}/\text{cm}^2$)による α トラック密度と硼素濃度との関係を得(図2)、高い線形性を有していることが確認された。校正線の切片はバックグラウンドプロトン数に対応する。

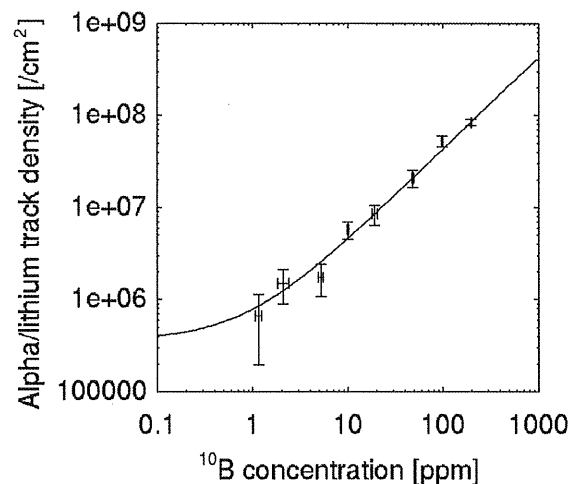


図2: α トラック密度と硼素濃度の校正線。

2.3. プロトンバックグラウンドの除去

BNCTにおいては生体中の窒素原子との $^{14}\text{N}(n, p)^{14}\text{C}$ 反応によるプロトンや、照射中性子に含まれる高速中性子による標的中の反跳プロトンがバックグラウンドとして存在する。BNCTの治療効果や線量分布を評価する上ではこれらのプロトンの測定も必要であるが、こと硼素分布の測定を行う場合はプロトンの飛跡をカウンタから除去する必要がある。後の細胞内硼素分布測定実験と同じ中性子照射量(4 $\times 10^{13}/\text{cm}^2$)においてバックグラウンドピット数を測定した結果が表1にまとめられている。二酸化炭素雰囲気中で照射することにより、空気からのバックグラウンドは大幅に低減できるが、試料からのバックグラウンドはなお存在するため、 α トラックとの弁別・除去が必要となる。CR-39上に生成するエッチピットは、入射粒子のLETの増大に応じてサイズも大きくなるため、BNCTの治療条件ではLET値の

表1 バックグラウンドプロトンのピット数。

サンプル条件	プロトンピット数 ($\times 10^5/\text{cm}^2$)
細胞なし、空气中	60.0 \pm 8.7
細胞なし、CO ₂ 中	1.25 \pm 0.88
細胞あり、CO ₂ 中	4.17 \pm 1.86

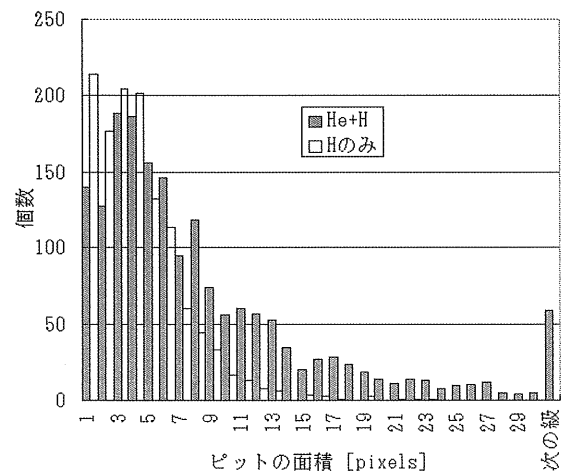


図3: エッチピットサイズの分布。

大きく異なるプロトンと α とをピットサイズによって弁別できる。確認実験として、CR-39 小片の全面にあらかじめ 200keV のプロトンを $3 \times 10^8/\text{cm}^2$ 程度照射しておき、続けて 1 MeV の He を $5 \times 10^8/\text{cm}^2$ 程度照射したのち、先述と同様の条件でエッチングした。ピットサイズの分布をとったものが図3である。プロトンのみを照射したサンプルのピットサイズ分布から、ピット面積 9 ピクセル (1 ピクセル=40nm) 近辺で弁別することによりプロトンと He とを分離できると考えられる。実際、9 ピクセルより大きい/小さいピット数密度はそれぞれ He/プロトンの照射量に相当していることが確認された。

2. 4. 粒子入射角度の測定

エッチピットの形状からは、荷電粒子の入射角度も測定可能である。ことに α オートラジオグラフィを行う際は粒子の飛来方向を与え、試料の厚み分の位置ずれがどの程度かを知ることができるので粒子飛跡位置決定の実質の分解能向上に役立つ。入射角度測定の精度を確認するため、CR-39 小片に放医研の HIMAC から 500MeV/n Fe イオンを 90° , 75° , 60° , 45° , 30° の角度をつけて $10^7/\text{cm}^2$ 程度照射し、 70°C 7N NaOH 水溶液で 10 分間エッチングした後、AFM でエッチピット形状を観察した。

従来法では、エッチピット開口部の楕円形状 (長径 D , 短径 d) 及びバルクエッチング量 (エッチングによる溶出厚) B から、式

$$\theta = \frac{\pi}{2} - \cos^{-1} \left(\frac{4B^2 + d^2}{\sqrt{16D^2B^2 + (4B^2 - d^2)^2}} \right)$$

によって入射角度を求めているが、上式を用いた計算法では 90° 入射に近いほど誤差が大きくなる傾向がある。AFM 測定ではエッチピットの 3 次元形状が測定可能であり、エッチピットの頂角 δ および緩やかな方の勾配の傾斜角 ϕ から $\theta = \delta + \phi$ として算出できる。

一方 500MeV/n の Fe イオンは CR-39 (1mm 厚) を貫通するので表裏両面にできたエッチピットの位置ずれを光学顕微鏡で測定すれば、その値と CR-39 の厚さから入射角度を算出できる。この方法では入射角度を 0.1° の精度で求められ、上記ピット形状から算出した結果と比較した。

図4に Fe イオンの入射角度測定の結果を示す。横軸に上述の位置ずれから求めた入射角度を取り、縦軸に AFM 測定により得られた入射角度をとっている。エッチピットの 3 次元形状を利用すると 90° 照射近辺においても数度の精度で入射角度が得られていることがわかる。本研究で α オートラジオグラフィを行う際の細胞切片試料は $1\mu\text{m}$ 程度の厚みであるため、角度誤差による位置決め誤差は 100nm 程度に抑えられる。

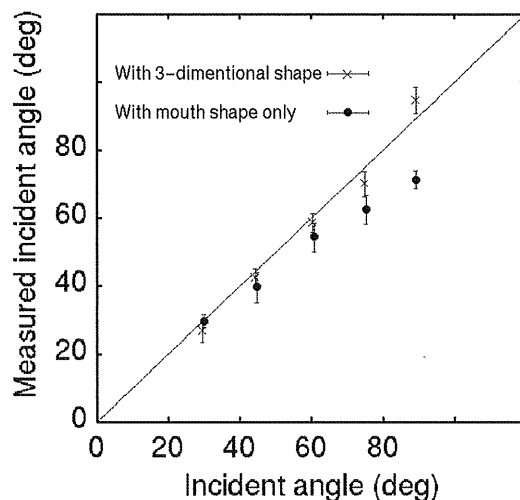


図4：粒子入射角度測定の結果。

3. BNCT における細胞内硼素分布測定

これまでに述べた手法を応用して、BNCT における高分解能 α オートラジオグラフィにより、細胞内硼素分布測定を行なった。あらかじめラットの脳に C6 glioma cell を移植しておき、1 週間後にラットに硼素薬

剤を投与した。2 時間後にラットを安楽死させて脳組織を取り出しエポキシ樹脂に包埋した後、ミクロトームにより $1\mu\text{m}$ 厚に薄切して CR-39 小片に載せた。試料はまず熱中性子を $4 \times 10^{13}/\text{cm}^2$ 程度照射した。その後先述のレーザプラズマ軟 X 線を照射し細胞の X 線像を CR-39 に写し込んだ。試料は 70°C 7N NaOH 水溶液で 2 分間エッチングし、AFM にて観察した。図 5 は現在 BNCT の臨床で用いられている代表的な硼素薬剤、BSH, BPA について得られた結果の例である(エッチピットを緑色の点として表示)。

図 6 に細胞内構造ごとの硼素薬剤 (α トラック) の分布を示した。細胞内取り込み機構の違いから BPA は BSH に比べ数倍多く取り込まれること、BSH は核膜や細胞膜近辺に、BPA は細胞内全体に分布することが報告されており、それを支持するデータを得た。

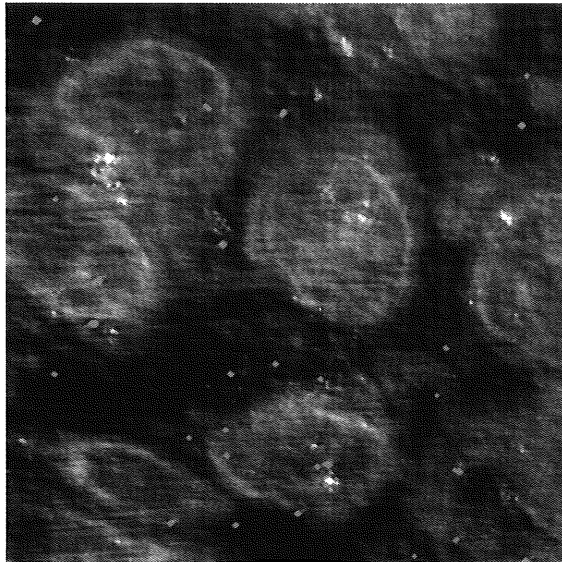


図 5 (a) : 硼素薬剤 BSH の細胞内分布。

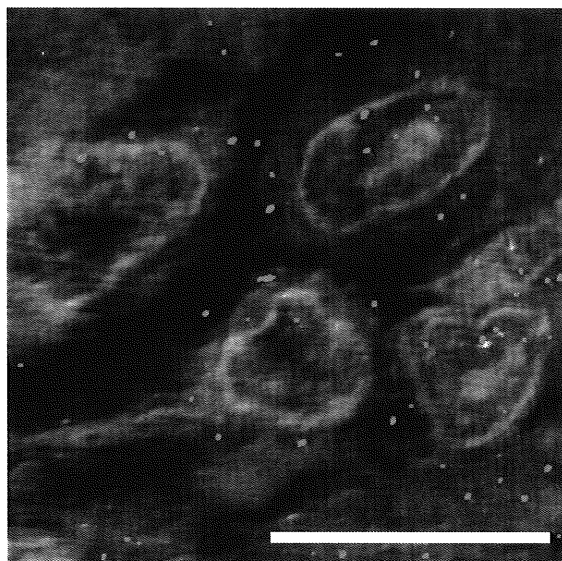


図 5 (b) : 硼素薬剤 BPA の細胞内分布。

スケールバーは $10\mu\text{m}$ 。

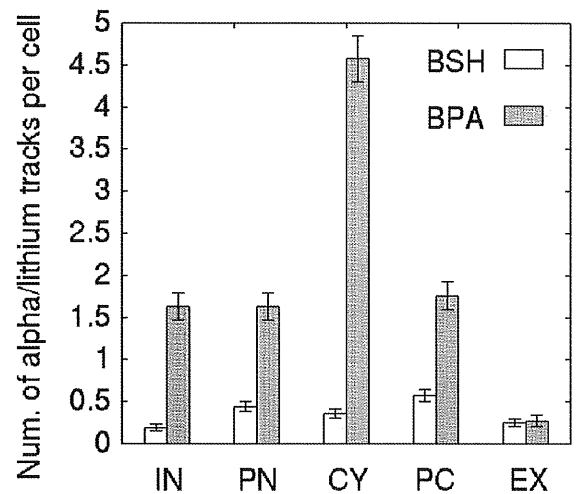


図 6 (a) : 等投与量での各硼素薬剤の細胞内分布。

IN : 細胞核内、PN : 細胞核周、
CY : 細胞質内、PC : 細胞膜周辺、
EX : 細胞外領域。

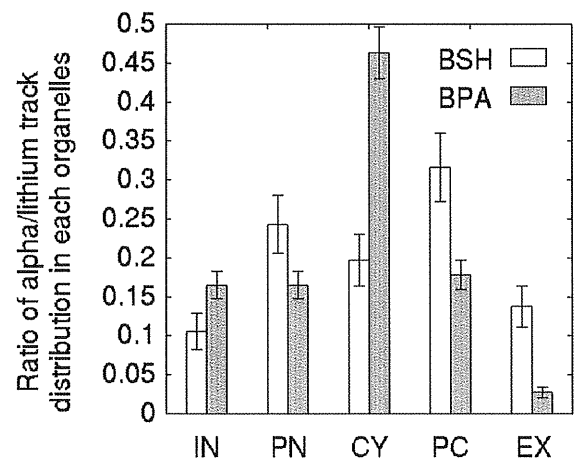


図 6 (b) : 各硼素薬剤の細胞内分布割合。

IN : 細胞核内、PN : 細胞核周、CY : 細胞質内、
PC : 細胞膜周辺、EX : 細胞外領域。

4. まとめ

BNCTにおける細胞内硼素分布測定のための高分解能 α オートラジオグラフィ手法を開発し、分解能 100 nm 程度を得ることができた。本手法は定量的に、かつ BNCT において直接治療に関わる粒子を検出できる点が、他の硼素分布測定手法にはない最大の特長である。今後検討を要する具体的な課題としては、大量データ処理のための画像処理法や、図7に挙げられるような紫外線による簡便な細胞イメージング法を用いた細胞内物質分布測定法の確立などが挙げられる。

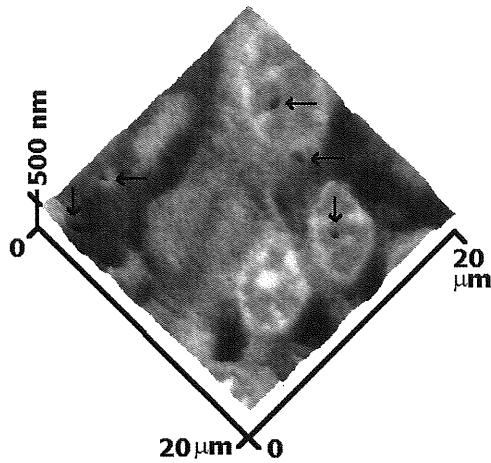


図7(a)：細胞の紫外線透過イメージングによって得られたCR-39上のレリーフ。矢印で示すように α トラックとの同時観察も確認された。

文献

- 1) H. Hatanaka, Y. Nakagawa, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **28** (1994) 1061.
- 2) G. R. Solares, R. G. Zamemhof, *Radiat. Res.*, **144** (1995) 50.
- 3) R. V. Coleman, et al., *Surf. Sci.*, **297** (1993) 359.
- 4) T. Tomie, et al., *Science*, **252** (1991) 691.

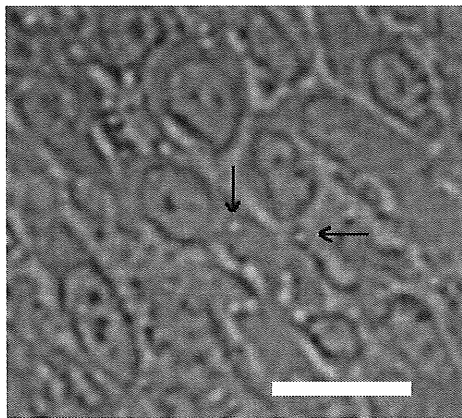


図7(b)：上記レリーフの光学顕微鏡画像。矢印は α トラックの例。スケールバーは10 μ m。