

nyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium inner salt (XTT) assay を行った。OSC-19 細胞を 96 穴プレートに 1×10^3 cells/well で播種した。37° C、5% CO₂ の条件下で 3 時間培養した。シスプラチンは、1.9 μM、3.8 μM、7.5 μM、15 μM、30 μM、60 μM の濃度で使用した。シスプラチン投与では 37° C、5% CO₂ の条件化で 24 時間刺激した。シスプラチンと温熱併用では、シスプラチンの 24 時間刺激のうち最後の 1 時間を 42.5° C、5% CO₂ 条件下でインキュベーターによる温熱刺激を行った。その後、50 μl の XTT Solution を各穴に加えた。3 時間後に吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した (wavelength 490 nm, 655 nm) (Bio Rad, Model1680, Japan)。以下の計算式に従って比吸光度求めた。吸光度を 100% 生細胞率で換算した。

比吸光度 = A490nm (sample) - A490nm (blank) - A655nm (sample)

シスプラチンと交流磁場下でのフェルカルボトランを用いた温熱併用によるアポトーシス誘導の検討では、シスプラチンと交流磁場下でのフェルカルボトランを用いた温熱併用によるアポトーシス誘導をフローサイトメトリーで評価した。OSC-19 細胞を 6cm プレートに 6×10^4 cells/well で播種した。37° C、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した。シスプラチンは、7.5 μM、15 μM の濃度で使用した。シスプラチン投与では 37° C、5% CO₂ の条件化で 12 時間刺激した。シスプラチンとフェルカルボトラン温熱併用では、シスプラチンの 12 時間刺激のうち最後の 1 時間を交流磁場下で温熱刺激を行った。PBS で洗浄し細胞を 1×10^5 cells/ml に調整した。その後、5 μl APC Annexin V と 5 μl 7-AAD (BD Biosciences, CA, U.S.A.) を加えた。室温 (25°C) 15 分間 暗闇下で静置後、400 μl 1×10^5 cells/ml binding buffer

を加えフローサイトメトリー (BD FACS Canto II, BD Biosciences) で測定した。交流磁場は、HOT SHOT で周波数 308 KHz 電流 250A の条件で行った。

C. 研究結果

ヒト由来扁平上皮癌細胞でのシスプラチンと温熱併用における抗腫瘍効果を XTT アッセイで検討した。XTT アッセイにおいて、ヒト由来扁平上皮癌細胞である OSC-19 細胞につき検討を行った (図 2)。OSC-19 細胞において、シスプラチンを 1.9 μM、3.8 μM、7.5 μM、15 μM、30 μM、60 μM の濃度で 24 時間、37° C の条件で投与した。図 2 に示す通り、シスプラチンのみ投与した群では、濃度依存的に抗腫瘍効果を示した。シスプラチンに 42.5° C で最後の 1 時間を温熱刺激行った群においても、濃度依存的に抗腫瘍効果を示した。シスプラチンと温熱併用群では、シスプラチンのみ刺激した群に比べて、シスプラチンの濃度において 1.9 μM、3.8 μM、7.5 μM、30 μM で明らかに抗腫瘍効果が増強した。

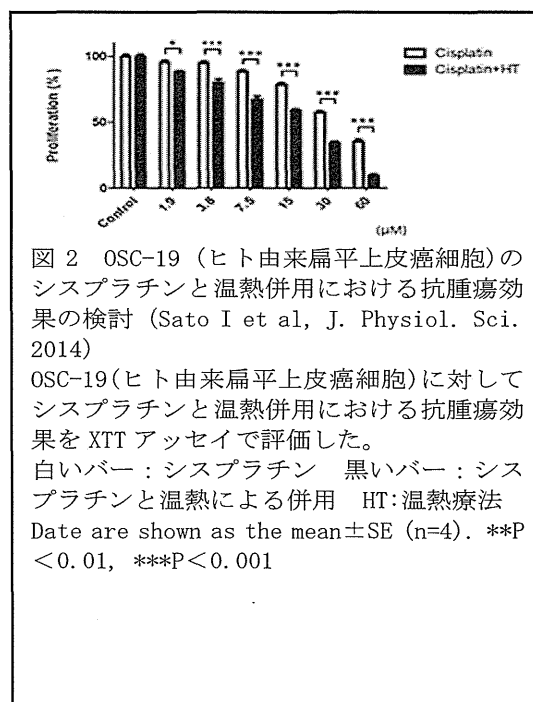


図 2 OSC-19 (ヒト由来扁平上皮癌細胞) のシスプラチンと温熱併用における抗腫瘍効果の検討 (Sato I et al, J. Physiol. Sci. 2014)

OSC-19 (ヒト由来扁平上皮癌細胞) に対してシスプラチンと温熱併用における抗腫瘍効果を XTT アッセイで評価した。白いバー: シスプラチン 黒いバー: シスプラチンと温熱による併用 HT: 温熱療法 Data are shown as the mean \pm SE (n=4). **P < 0.01, ***P < 0.001

フェルカルボトランを温熱療法に用いるため、交流磁場下でフェルカルボトランによる温度上昇の条件検討を行った(図3)。磁性を持つ物質は交流磁場下で温度が上昇する。よって、フェルカルボトランも交流磁場下で温度が上昇すると報告されている。我々が開発した交流磁場発生装置を使用しフェルカルボトランの温度上昇を検討した。サーモグラフィーにおいて交流磁場内に静置した培地に溶解したフェルカルボトランは、10分後に42°Cに達することを確認した。

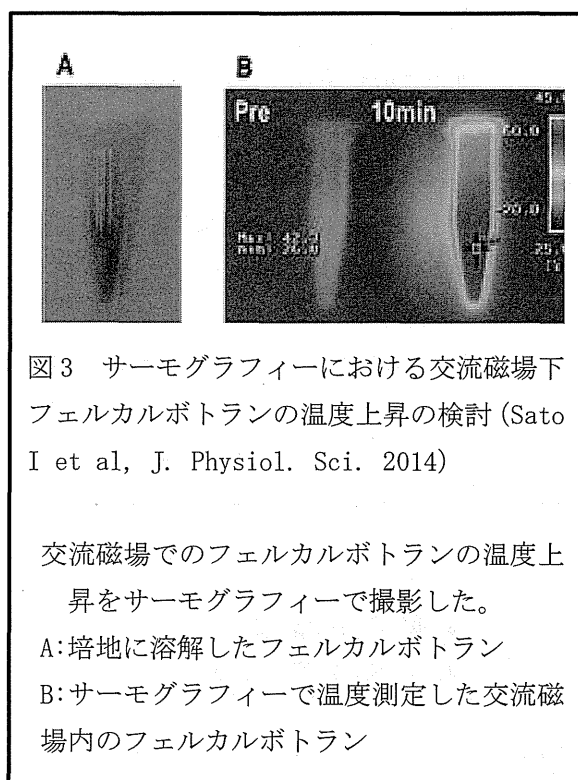


図3 サーモグラフィーにおける交流磁場下フェルカルボトランの温度上昇の検討 (Sato I et al, J. Physiol. Sci. 2014)

交流磁場でのフェルカルボトランの温度上昇をサーモグラフィーで撮影した。

A:培地に溶解したフェルカルボトラン

B:サーモグラフィーで温度測定した交流磁場内のフェルカルボトラン

ヒト由来扁平上皮癌細胞である OSC-19 細胞のシスプラチンと交流磁場下でのフェルカルボトラン温熱併用におけるアポトーシス誘導の増強作用を検討した(図4)。シスプラチンは、ヒト由来扁平上皮癌細胞である OSC-19 細胞に対して濃度依存的にアポトーシスの割合を増加させた。また、シスプラチンに交流磁場下でのフェルカルボトランによる温熱を併用することで、明らかにシス

プラチンに交流磁場下でのフェルカルボトランによる温熱を併用することで、明らかにシスプラチンのアポトーシス誘導作用が増強した。

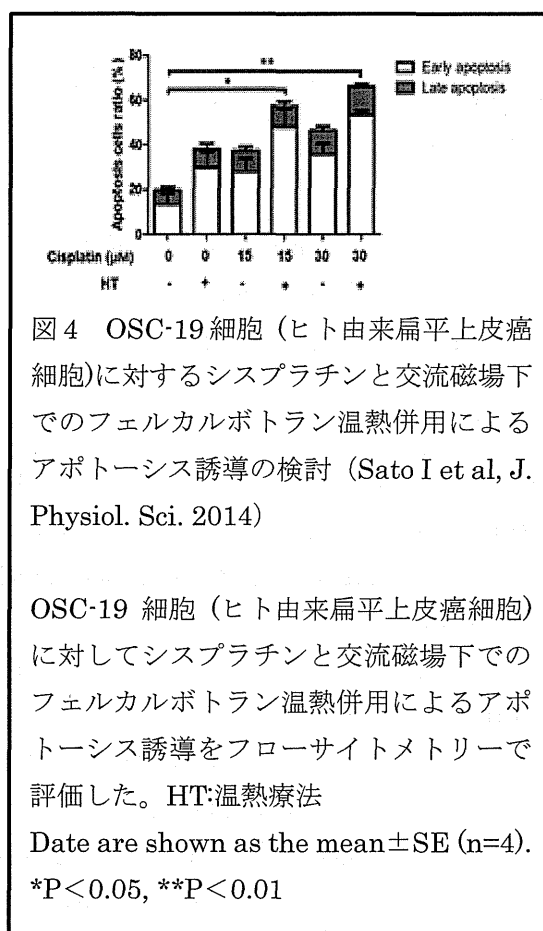


図4 OSC-19細胞(ヒト由来扁平上皮癌細胞)に対するシスプラチンと交流磁場下でのフェルカルボトラン温熱併用によるアポトーシス誘導の検討 (Sato I et al, J. Physiol. Sci. 2014)

OSC-19細胞(ヒト由来扁平上皮癌細胞)に対してシスプラチンと交流磁場下でのフェルカルボトラン温熱併用によるアポトーシス誘導をフローサイトメトリーで評価した。HT:温熱療法

Date are shown as the mean ± SE (n=4). *P<0.05, **P<0.01

D. 考察

われわれの治療対象としている口腔領域は、消化器および呼吸器の入り口として多くの機能を有している。口腔の機能は、咀嚼、嚥下、構音や呼吸に大きく関わっていて豊かな人間生活を営むうえで重要な器官である。口腔癌の治療法は早期癌の場合、手術単独や放射線療法が一般的であり、治療成績も優れている。しかし、進行した口腔癌の場合は放射線療法、化学療法、手術の併用療法が行われているが、治療成績は必ずしも満足しうるものではない。また、手術で治療する場合、癌の進行程度によって切除範囲は異なる。切除範囲が小さければ、審美的にも問題なく

機能を温存することが可能である。しかし、進行した癌に対する手術では切除範囲が増えるため、顔面の変形や咀嚼、発音、嚥下などの機能が損なわれる。よって、これらの治療法以外の併用療法などが必要とされている。

現在臨床における温熱療法は、RF 誘電加装置を一般的に用いている。誘電加温は人体を平行な円盤状の一对の電極ではさみ、その間に数～数十 MHz の RF 波を流す方法である。誘電加温は比較的簡単な加温方法であるが、実際使用するさいにはインピーダンスマッチングの問題と、さらには脂肪層および骨の過熱、呼吸器や消化器など空気がある部分でのその周辺部位の強い加温などに注意しなければならない。また、口腔癌のように複雑な解剖部位には機械の構造上、適していない。よって、頭頸部領域での温熱療法は、誘導加温装置の構造から頸部リンパ節転移を中心に温熱療法の適応とされてきた。頸部リンパ節転移において化学療法と温熱療法の集学的治療にて著効を示す症例が報告されている。そこで、患部付近に標的物質を挿入して選択的に加温する組織内加温法で誘導加温での問題点を克服しようと考えた。本研究は、局所加温するための標的物質の開発とその化合物を用いて新しい温熱化学療法での口腔癌治療の開発を検証した。局所加温するための標的物質として、現在 MRI 造影剤として使用されているフェルカルボトラン (Resovist®) に着目した。フェルカルボトランは、超常磁性体であることより、IH クッキングヒーターと同様の原理により交流磁場下で速やかに温度上昇を示し、組織内加温が可能な薬剤である。臨床において、フェルカルボトランを用いたハイパーサーミアはまだ行われていない。本研究において、条件検討から交流磁場下にてフェルカルボトランの温度上昇を、42.5℃に維持することに成功

した。よって、フェルカルボトランは組織内加温が可能な薬剤であることを示唆した。フェルカルボトランは、既に臨床においては MRI 造影剤として承認されている。生体において十分に安全性が確立されており、温熱療法としての臨床応用がしやすいと考える。フェルカルボトランに含まれている鉄の量である 0.45 mg/kg の濃度で、交流磁場内で温熱療法に必要な温度上昇は可能であった。以上より、フェルカルボトランは温熱療法の薬剤として安全かつ有用であることが示唆された。

温熱は放射線の殺細胞作用を増強させることは周知のとおりであるが、抗癌剤における温熱による増強作用は、当然薬剤の種類によって異なってくる。Hahn によれば、その機序について、①修復機序の抑制、②細胞膜への薬剤透過性の増大、③共通の作用標的での温熱と抗癌剤の相互作用などをあげている (Hahn, G. M., Cancer Research, 1979)。本研究では、温熱療法の抗腫瘍効果を増強させる抗癌剤として頭頸部癌での適応があるシスプラチンを使用した。シスプラチンは、DNA 分子のグアニン塩基と反応し架橋形成を形成し抗癌効果を発揮する。温熱との併用では比較的低温から抗腫瘍効果の増強が認められる。43℃になると架橋形成の急増が確かめられているが、温熱による効果増強の機序で細胞内シスプラチンの増加によるか、架橋をするのか明らかではない。

シスプラチンにおいては副作用に、腎毒性、悪心・嘔吐、聴器毒性があることが知られている。また、本研究においてシスプラチンとフェルカルボトラン温熱併用することで、シスプラチンの投与量を減少させ治療効果を増強し副作用を軽減できる可能性があることが示唆された。

今回、結果は示していないがシスプラチンとフェルカルボトランを用いた温熱併用で

の細胞周期の変化を検討した結果から、温熱療法によりS期で細胞周期の進行を停止する傾向がみられた。シスプラチン投与では、G0/G1期の細胞の減少に伴い、S期とG2/M期で細胞周期の進行を停止させた。温熱刺激のS期での細胞周期停止傾向に伴い、シスプラチンに温熱を併用した群では、G2/M期の細胞減少の傾向がみられた。細胞周期と熱感受性の関連について、S期およびM期は熱感受性が高いことが知られている(Jäckel and Köpf-Maier, Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 1991)。よって、シスプラチンによってG2/M期で細胞周期の進行を停止した細胞が増加することは、温熱療法に優位になることが示唆された。シスプラチンと交流磁場下でのフェルカルボトラン温熱併用による抗腫瘍効果の増強は、細胞周期依存性が大きく関与していることが示唆された。

また、われわれが同定した新規磁性体抗癌剤(以下EI236)の口腔癌治療への応用も検討している。EI236は、IHI(株)との医工連携に基づいた共同研究により、新たな温熱療法の開発と発展のために、新規磁性体を300万個の化合物のデータベースよりコンピュータ解析によって探索した。その結果、磁性と抗腫瘍効果を併せ持つ数個の新規磁性体の候補化合物を見出し、正確な磁性測定機である超伝導磁束量子干渉計(SQUID)と電子スピン共鳴(ESR)での磁性評価のほか、EI236の磁石への集積を検討した。その結果、特に1つの化合物の磁性が強いことが明らかになった。さらに、磁性体が外部磁場からエネルギーを受けることにより磁性体が発熱するか否かを評価するヒステリシスループを調べた結果、EI236は温熱効果を発揮する可能性を有することが判明した。そこで、EI236が交流磁場下で温度上昇を270秒で100°C近くに上昇することを明らかにした。次に、細胞実験にてEI236自体の抗腫瘍効果を検討し、濃

度依存的な抗腫瘍効果が示された。すなわち、EI236は抗癌剤として利用可能であることが見出された。そこで、本来の目的である温熱療法への応用として、細胞実験での交流磁場印加による殺細胞効果を検討し、EI236存在下で磁場印加を行った時、死細胞は顕著に増加した。さらに、EI236は永久磁石にくっつく性質を有することから、磁石を利用してEI236を腫瘍組織に集積可能であれば磁石を利用した薬剤送達も可能にする。そこで、われわれは磁石を利用して腫瘍モデル動物の腫瘍の効果的な縮小を試みた。その結果、EI236のみでの抗腫瘍効果に比べ、腫瘍に磁石を当てた場合の方が腫瘍の縮小が認められた。

E. 結語

EI236の抗腫瘍効果におけるメカニズムの1つとして、ROSを介して作用するという面でシスプラチンに似ている。本研究から頭頸部癌細胞に対して、シスプラチンによる抗腫瘍効果とフェルカルボトランの温熱効果での併用による抗腫瘍効果の増強を確認した。よって、EI236を用いた頭頸部癌細胞への抗腫瘍効果も有用であると示唆され、将来的に臨床応用されれば治療における後遺症や副作用を最小限に抑える事のできる新たな治療法となると考えられ、本研究は非常に意義があると考えられる。

F. 健康危機情報

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kenji Mitsudo, Toshiyuki Koizumi, Masaki Iida, Toshinori Iwai, Hideyuki Nakashima, Senri Oguri, Mitomu Kioi, Makoto Hirota, Izumi Koike, Masaharu

2. Itaru Sato, Masanari Umemura, Kenji Mitsudo, Mitomu Kioi, Hideyuki Nakashima, Toshinori Iwai, Takayuki Fujita, Utako Yokoyama, Satoshi Okumura, Xianfeng Feng, Kayoko Ito, Akiyoshi Miyajima, Ayako Makino, Maki Iwai, Haruki Eguchi, Iwai Tohnai, Yoshihiro Ishikawa. Hyperthermia generated with ferucarbotran (Resovist®) in an alternating magnetic field enhances cisplatin-induced apoptosis of cultured human oral cancer cells. *J. Physiol. Sci.* 2014, 64, 177-83.
3. 岩井俊憲, 柴崎麻衣子, 北島大朗, 矢島康治, 中島英行, 小栗千里, 廣田 誠, 光藤健司, 藤内 祝. 口腔癌患者の上部消化管領域における同時性重複癌のスクリーニング. —上部消化管内視鏡検査と、F-FDG-PET/CT の比較—. *口腔腫瘍* 26 卷 2 号 31~36 頁 2014.
4. 南山周平, 岩井俊憲, 馬場隼一, 青木紀昭, 藤内 祝. 術後感染症に対する抗菌薬により生じた薬剤熱の 1 例. *日口診誌* 第 27 卷 第 2 号:177~181 頁, 2014, 6 月.
5. 光藤健司. Head and Neck Cancer 頭頸部癌 I. 進行口腔癌に対する逆行性超選択的動注化学放射線治療. *Jpn J Cancer Chemother* 第 41 卷 第 7 号 2014 年 7 月 833-836.
2. 学会発表
 1. 光藤健司, 小泉敏之, 飯田昌樹, 大屋貴志, 岩井俊憲, 中島英行, 小栗千里, 來生 知, 廣田 誠, 藤内 祝. 進行口腔癌に対する逆行性超選択的動注化学放射線療法は頸部リンパ節転移に有効か?. 第 38 回日本頭頸部癌学会, 東京, 2014, 6.
 2. 小栗千里, 光藤健司, 小泉敏之, 大橋伸英, 柴崎麻衣子, 飯田昌樹, 岩井俊憲, 中島英行, 廣田 誠, 來生 知, 藤内 祝. 進行舌癌に対する逆行性超選択的動注化学療法の治療効果—副咽頭間隙への効果—. 第 38 回日本頭頸部癌学会, 東京, 2014, 6.
 3. 北島大朗, 岩井俊憲, 大原良仁, 矢島康治, 光藤健司, 藤内 祝. 流体解析を用いた動注化学療法の抗癌剤分配シミュレーション. 第 38 回日本頭頸部癌学会, 東京, 2014, 6.
 4. 中島英行, 藤澤聡郎, 來生 知, 光藤健司, 藤内 祝. マウス肉腫に対する Histone Deacetylase (HDAC) 阻害剤と Immunotoxin IL13-PE の併用療法の開発. 第 38 回日本頭頸部癌学会, 東京 2014, 6.
 5. 小栗千里, 岩井俊憲, 松井義郎, 中島英行, 廣田 誠, 來生 知, 光藤健司, 藤内 祝. 口腔内病変の切除マージンを正確に決定するための口腔内メジャーの使用経験. 第 38 回日本頭頸部癌学会, 東京, 2014, 6.
 6. 大橋伸英, 岩井俊憲, 中島英行, 小栗千里, 廣田 誠, 來生 知, 光藤健司, 藤内 祝. 口腔顎顔面領域に転移した

neuroendocrine carcinoma の 2 例. 第 38 回日本頭頸部癌学会, 東京, 2014, 6.

7. 飯田昌樹, 高山英次, 長縄鋼亮, 足立誠, 中島英行, 來生 知, 一瀬雅夫, 近藤信夫, 藤内 祝. 口腔扁平上皮癌患者の末梢血における CD57+ T 細胞亜集団の検討. 第 38 回日本頭頸部癌学会, 東京, 2014, 6.

8. 佐藤 格, 光藤健司, 梅村将就, 宮島章嘉, 中島英行, 來生 知, 石川義弘, 藤内 祝. MRI 造影剤フェルカルボトランを用いた新しい温熱化学療法の開発. 第 38 回日本頭頸部癌学会, 東京, 2014, 6.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

口腔がんに対する磁性抗がん治療薬の実用化に関する研究（MR I 技術開発）

担当責任者 青木伊知男 放射線医学総合研究所 チームリーダー

研究要旨

舌がんによる磁性抗がん剤の動態・集積を評価する為に必要な舌のMR I 撮像の最適化を行った。高磁場MR I と冷却コイルを用い BALB/c マウスの舌が、体動によるアーティファクト無く撮像できることが示された。磁性抗がん剤を舌内に投与し撮像したところ、抗がん剤の分布を示す信号変化が観察され、撮像技術基盤が確立した。

A. 研究目的

本研究で使用される磁性を持つ抗がん剤は、抗がん剤そのものが、MRIにおいて信号低下をもたらす陰性造影剤として機能しうる。さらに腫瘍近傍に磁石を設置する事で、抗がん剤を物理的に誘引して集積させることが可能であり、治療と診断を同時に行うtheranosticsのプラットフォームになり得る。とりわけ、磁性抗がん剤は、抗がん剤と標識剤の分離を考慮する必要が無いため、生体内において高精度で動態追跡可能と考えられる。

放医研では高磁場MRIによる分子イメージング技術により、がんの早期診断システムの構築をおこなっており、これまでの研究では磁性抗がん剤EI236の緩和能などMRIに対する特性を活用したイメージング技術を開発してきた。本イメージング技術を口腔がんに応用するにあたり、適切な画像解析を行うために、まずげっ歯類における「舌」の撮影条件検討を行い、次にEI236にて基礎的な検討を行う。最終的な目的としては磁性抗がん剤を用いた生体内での計測と定量性の最適化を行い、本研究で蓄積された知見をヒトMRI定量技術へと応用検討する。本年度は、げっ歯類の舌部位の撮影技術を検討し、安定した撮像条件を見いだすと共に、MRIによって磁性抗がん剤の患部への薬剤集積を評価する手法を開発、薬剤集積量の客観的な決定方法を開発する。

B. 研究方法

In vitro MRI実験

PCRチューブ内に開発中の複数種類の磁性抗がん剤を、その濃度を変えて分注し、MRIの撮像条件による信号の変化を調べた。親水性が低い候補薬剤が存在したため、水溶性を変化させる複数の分散化手法を試みた(詳細は特許申請の可能性があるため未記載)。

高磁場 7T MRI (Biospec, AVANCE-III, Bruker BioSpin 社製) およびマウス用 2ch 冷却コイル (Bruker BioSpin) にて、T1 強調画像、T2 強調画像、T2*強調画像、T1 定量マップ、T2 定量マップを撮像した。撮像の詳細は、下記の通り。T1 強調画像：スピンエコー法、TR/TE = 400/9.6 msec; FOV = 38.4 x 38.4 mm²; Matrix = 256 x 256; スライス厚 = 2.0 mm; 加算回数 = 1。

T2 強調画像および T2 マップ：マルチエコー・スピンエコー法を使用、TR/TE = 3000/10 msec; FOV = 38.4 x 38.4 mm²; Matrix = 256 x 256; スライス厚 = 2.0 mm; エコー数 = 10; 加算回数 = 1。

T2*強調画像：グラディエントエコー法、3D-Flash 法を使用、TR/TE = 75/7 msec; Flip angle = 25; FOV = 38.4 x 25.6 x 11.2 mm³; Matrix = 256 x 172 x 72; 加算回数 = 4。

T1 定量マップ：反転回復法・スピンエコー法、TR/TE = 10sec/10msec、FOV = 38.4 x 38.4 mm²; Matrix = 256 x 256; スライス厚 = 2.0 mm; TI = 8 ポイントに変化; 加算回数 = 1。

In vivo MRI 実験

1 舌の撮像条件の検討：BALB/c マウスを3%イソフルラン麻酔で導入し、2%で維持、頭部を固定した後に、呼吸などの変化により舌が動いていないことを確認して、高感度冷却コイルを固定した。その後、高磁場 7T MRI (Bruker Biospin) に設置して撮像を行った。

2 磁性抗がん剤の舌での撮像試験：
BALB/c マウスを 3%イソフルラン麻酔で導入し、舌内に EI236 (4.65 mM, 10 μ l) を投与し、2%で維持した。頭部を固定した後に、呼吸などの変化で舌が動いていないことを確認して、高感度冷却コイルを固定した。その後、高磁場 7T MRI に設置して撮像を行った。

撮像法の詳細は、In vitro の方法とほぼ同一のため割愛する。

3 担がんモデルでの予備実験：

大腸がん皮下移植モデル (colon-26, balb-c nude) による舌MRI のテスト撮像、および本モデルに対する磁性タキソールの舌局所投与に対する予備的な撮像を行った (追加資料を参照)。

(倫理面への配慮) 本研究は、独立行政法人放射線医学総合研究所、動物実験委員会にて承認され、撮像の全過程において麻酔薬により苦痛が最小化された。

C. 研究結果

In vitro MRI 実験

開発中の複数の磁性抗がん剤を測定した。EI236 に類似する構造の抗がん剤では良好な横緩和能を持つことが示されたが、タキソールを磁性化した構造を持つ化合物の幾つかは、EI236 に比べて十分な横緩和能を持たないため、その結果を、開発のための参考資料として開発担当者に提供した。特許申請の可能性があるため詳細なデータは割愛するが、今後、より高い横緩和能を持つ磁性抗がん剤についてのデザインと、磁性を保つ安定的な製造法の改良が必要と考えられた。

In vivo MRI 実験

1 上皮細胞がんの移植を予定している BALB/c マウスの微小な舌を、体動の影響な

く可視化するための予備実験を実施した。呼吸などによる動きの影響を排除できない場合は、気管挿管による撮像も検討対象であるが、今回はより侵襲性が少ないマスクによる自発呼吸による方法を検討した。頭部を固定し、2%イソフルレン麻酔を使用した結果、口腔内における舌の形態が良好に描出できた。

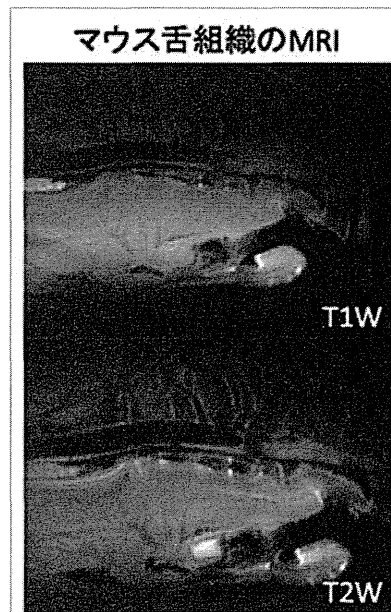


図1 高磁場 7T MRI を用いた BALB/c nude マウスにおける舌イメージング。上段 T1 強調画像、下段 T2 強調画像。

2 高磁場MRIによるマウス舌の可視化に成功したため、舌内にEI236を投与し、その描出を確認した。舌は空気に接しているため、強い磁化率アーティファクト等の出現や、投与された磁性抗がん剤との混交も予想されたが、選択した濃度と投与量においては、抗がん剤が存在する領域に特異的な信号変化が観察された。

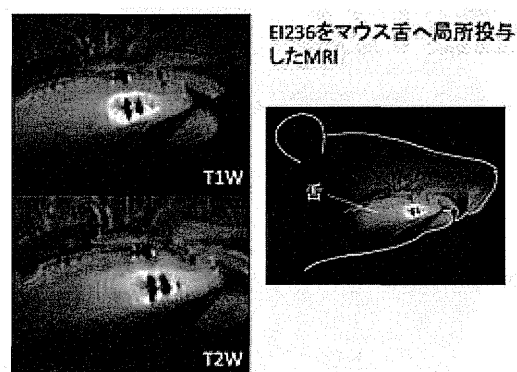


図2 磁性抗がん剤 EI236 を局所投与した舌のMRイメージング。

左上：T1強調画像、左下：T2強調画像。

3 担がんモデルでの予備実験として、大腸がん皮下移植モデル (colon-26, BALB/c nude) による舌MRIのテスト撮像を行い、T2強調画像法にて信号増強が観察された。加えて、および本モデルに対する磁性タキソールの舌局所投与に対する予備的な撮像を行い、顕著な信号低下が観察された。これらの結果は、追加資料として記載した。

D. 考察

舌がんは表面からの観察も可能であるが、どの程度深部に浸潤しているかを評価するにはMRIなどの断層撮像法が有用となる。さらに、磁気誘引によって、磁性抗がん剤がどの程度局所に集積したかを評価する為には、MRIの定量マップによる動態評価や局所濃度の推定が必要である。

本年度は、晩秋より口腔がんに対する磁性

抗がん治療薬の適用に向けて、舌のMRIに関する予備的な実験を中心に検討を行った。非常に小さな臓器であるマウスの舌の可視化については、高感度を誇る冷却コイルを活用することで、実用的な品質のMR画像が得られた。

また、舌内への薬剤投与による磁性抗がん剤の可視化の試験を行い、高濃度の投与局所に信号低下が観察され、その周囲に高信号領域が観察された。この高信号は、薬剤が浸潤した結果、T1強調画像において信号上昇を引き起こす濃度に到達したと考えられるが、抗がん活性による浮腫・炎症の可能性もあるため、今後、コントラストメカニズムの検討が必要である。

これらの結果から、舌がんに応用するためのイメージング基盤が確立したと考えられ、来年度からの舌がんモデルへの適用が滞りなく実施出来ると考えられた。

E. 結論

高磁場7T MRIおよび冷却コイルを使用して、BALB/cマウスの舌のMRイメージングが、大きな体動によるアーティファクト無く撮像できることが示された。また、磁性抗がん剤EI236を舌内に投与し、舌を撮像したところ、抗がん剤の分布を示す信号変化が得られた。磁性抗がん剤を用いて舌がんに応用するために必要な生体イメージング法の基盤を確立した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Gündüz S, Nitta N, Vibhute S, Shibata S, Mayer ME, Logothetis NK, Aoki I, Angelovski G. Dendrimeric calcium-responsive MRI contrast agents with slow in vivo diffusion. Chem Commun (Camb). 2014 Nov 10. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25383973.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

口腔がんに対する磁性抗がん治療薬の実用化に関する研究（磁性設計の検討）

担当責任者 江口晴樹 横浜市立大学大学院医学研究科 客員准教授

研究要旨

パクリタキセル (paclitaxel) は、がん化学療法において用いられる有糸分裂阻害剤の一つであり卵巣がん、乳がん、頭頸部がんに使われる。本報告ではパクリタキセルを第一原理解析法により側鎖修飾することで化合物そのものに磁性を付与し、その解析結果に基づき磁性パクリタキセルの合成を行った。

A. 研究目的

パクリタキセル (paclitaxel) は、がん化学療法において用いられる有糸分裂阻害剤の一つである。タキサン系に類する抗悪性腫瘍剤 (抗がん剤) 一種である。パクリタキセルの作用効果としては細胞の骨格を形成する微小管という細胞内の繊維に結合する。そしてそれが微小管に結合すると細胞は分裂が止まり、やがて死滅する。

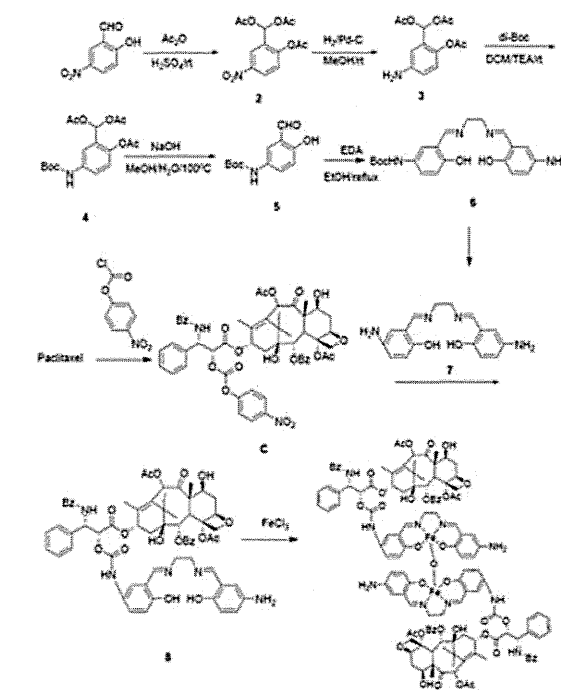
本研究では、卵巣がん、乳がん、頭頸部がんに用いられるパクリタキセルを第一原理解析法により側鎖修飾して磁性化し、その化合物を合成することが目的である。

B. 研究方法

パクリタキセルの磁性化には (特願 2005-251190・薬、薬の誘導装置および薬の設計法) に基づき設計を行った。その化合物についての合成結果を「C. 研究成果」に述べる。

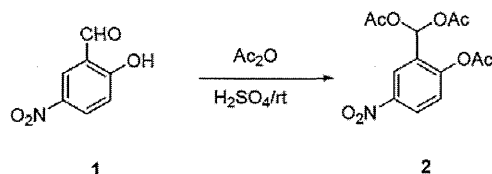
C. 研究結果

磁性化パクリタキセルの全合成ルート 9 ステップであり下記の通りである。



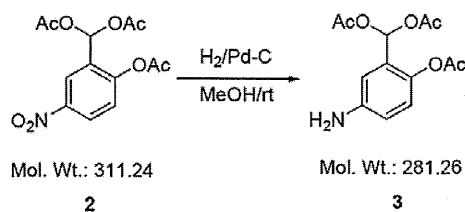
磁性化パクリタキセル合成の詳細は下記の通りである。

Step 1



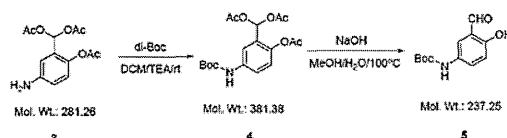
化合物 1、無水酢酸 (acetic anhydride)、 H_2SO_4 を室温で 1 時間混合した。混合中の反応は、薄層クロマトグラフィー (TLC: Thin-Layer Chromatography) で確認した。詳細確認、酢酸エチル (EtOAc) / ホスファチジルエタノールアミン (P. E.) で再結晶化した後、化合物 2 を得た。化合物 2 であることは質量分析で分子量を測定し確認した。

Step 2



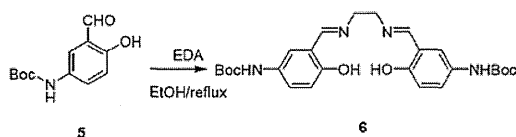
メタノール (MeOH) 中で化合物 2 と 10% のパラジウムを含む炭素を、水素雰囲気中で 2 時間の水素化処理を行った。得られた化合物をろ過したところ化合物 3 が得られた。化合物 3 であることは質量分析で分子量を測定して確認した。

Step 3, 4



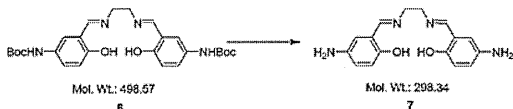
ジクロロメタン (DCM) 中で、化合物3と二酸化ジ-tert-ブチル (di (tert-butyl) dicarbonate) を溶液化し、一晚攪拌した。真空中でその溶媒を気化させて反応させた後、付着した油をメタノールで落とし、NaOH水溶液を加え、得られた溶液を5時間還流させた。詳細確認後、原料をシリカゲルを用いたフラッシュクロマトグラフィーで精製して化合物5を得た。

Step 5



EtOHで化合物5の溶液を作り、還流し、エチレンジアミン (ethylenediamine) を数滴添加し、温浴中でした。エチレンジアミン添加後、0.5時間還流させながら混合した。ろ過を行ったところ、薄い黄色で針状のShift基をもつ配位子である化合物6を得た。

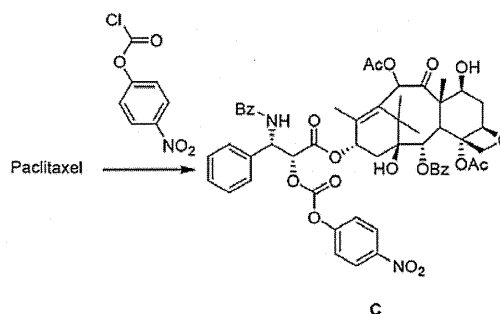
Step 6



ジク

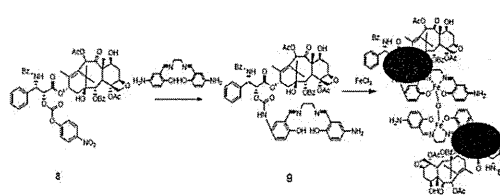
ロロメタン (DCM) で化合物6の溶液を作るために、エーテルに塩酸を入れた溶液を加えた。その溶液は、室温で5時間攪拌し、DCMとエーテルを使ってろ過、洗浄し化合物7を得た。化合物7であることを¹H NMRで確認した。

Step 7



DCMに溶かしたパクリタキセル (Paclitaxel) にDCMに溶解させたクロロギ酸4-ニトロフェニルを数滴添加した。その溶液は、-50°Cで3時間攪拌させた。反応後、溶媒を蒸発させた。得られた固形物はシリカゲルを用いたフラッシュクロマトグラフィーにより精製を行ったところ収率68%で化合物Cが得られた。この化合物を質量分析で確認した。

Step 8, 9



(論文準備中のため構造式は一部とする)

DMF (N, N-ジメチルホルムアミド: N, N-dimethylformamide) に化合物8とK₂CO₃を添加した溶液に、化合物7を添加した。その混合溶液を、3時間、-20°Cで攪拌し、その後反応した溶液をろ過し、濃縮した。得られた原料をメタノールに溶解させFeCl₃を添加した。FeCl₃添加後、得られた混合溶液を再び30分攪拌した。

得られた溶媒は真空中で気化して、固形原料を得た。得られた固形原料はメタノールとジエチルエーテルの混合溶液を用いて再結晶化し、茶色の固形物を得た。質量分析で測定したところ目的

の化合物であることを確認した。

D. 考察

パクリタキセルは水に対する溶解性が極めて低い
ため、同剤の溶解度を高めるため Cremophor
EL/エタノールが用いられている。分散剤
Cremophor EL に起因する生体影響で最も広く報
告されているのはアレルギー症状である。また溶
媒として用いられる無水エタノールを含有してい
るため、アルコールの中樞神経系への影響が強
くあらわれるおそれがあり、アルコール過敏症（不
耐症）の患者に対しては投与が制限される問題が
ある。したがって、磁性タキソールについても水
に対する溶解性が低くなることが懸念されるため
適切な分散剤、あるいはリポソーム等の内包し水
への溶解性を向上させる必要がある。

E. 結論

第一原理解析を用いてパクリタキセルを磁性化
し、実際に合成を行った。今後は水溶性が乏しい
磁性パクリタキセルの溶解性を高めるため分散剤、
ミセル等の製剤の検討を行う。

F. 健康危険情報

（総括研究報告書に記入）

G. 研究発表

1. 論文発表

全 1 件

1) Haruki Eguchi, Masanari Umemura, Reiko
Kurotani, Hidenobu Fukumura, Itaru Sato,
Jeong-Hwan Kim, Yujiro Hoshino, Jin Lee,
Naoyuki Amemiya, Motohiko Sato, Kunio Hirata,
David J. Singh, Takatsugu Masuda, Masahiro
Yamamoto, Tsutomu Urano, Keiichiro Yoshida,
Katsumi Tanigaki, Masaki Yamamoto, Mamoru
Sato, Seiichi Inoue, Ichio Aoki, and Yoshihiro
Ishikawa, “A magnetic anti-cancer compound for

magnet-guided delivery and magnetic resonance
imaging”, Scientific Reports, *in press*

2. 学会発表

全 9 件

1) Masanari Umemura, Ayako Makino, Itaru
Sato, Xianfeng Feng, Maki Iwai, Kayoko Ito,
Akiyoshi Miyajima, Makoto Otake, Akane
Nagasako, Kousuke Matsuo, Haruki Eguchi and
Yoshihiro Ishikawa, “A novel treatment for
triple-negative breast cancer using intrinsic
magnetized paclitaxel”, AACR Annual Meeting
2014, San Diego, USA, April 2014

2) Itaru Sato, Masanari Umemura, Kenji
Mitsudo, Xianfeng Feng, Hideyuki Nakashima,
Mitomu Kioi, Haruki Eguchi, Iwai Tohnai and
Yoshihiro Ishikawa, “Development of
thermochemotherapy using cisplatin and
ferucarbotran (Resovist) in head and neck
cancer”, AACR Annual Meeting 2014, San Diego,
USA, April 2014

3) 松尾光祐、福村英信、梅村将就、佐藤格、FENG
Xianfeng、江口晴樹、石川義弘、齋藤知行、抗がん
活性を持つ新規磁性体有機化合物を用いた温
熱・化学同時療法、第 41 回日本生体電気・物理
刺激研究会、横浜、2014 年 4 月

4) Ayako Makino, Masanari Umemura, Itaru
Sato, Kayoko Oda, Makoto Otake, Akane
Nagasako, Haruki Eguchi and Yoshihiro
Ishikawa, “A novel paclitaxel with intrinsic
magnetism”, 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、
2014 年 9 月

5) 江口晴樹、梅村将就、牧野紋子、佐藤格、小田香世子、大竹誠、永迫茜、石川義弘、自己有機化合物による磁場誘導ドラッグ・デリバリー：コンピュータ解析による市販有機化合物の磁性化、2014年度 日本生体医工学会 分子デリバリー研究会、横浜、2014年12月

6) Mayumi Katsumata, Masanari Umemura, Itaru Sato, Makoto Ohtake, Kayoko Oda, Akane Nagasako, Ayako Makino, Haruki Aoyama, Haruki Eguchi and Yoshihiro Ishikawa, "A novel methotrexate derivative with intrinsic magnetism", 第92回 日本生理学会大会、神戸、2015年3月

7) Ayako Makino, Masanari Umemura, Itaru Sato, Mayumi Katsumata, Akane Nagasako, Kayoko Oda, Makoto Ohtake, Haruki Aoyama, Haruki Eguchi and Yoshihiro Ishikawa, 第88回 日本薬理学会年会、名古屋、2015年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願特許は全120件。

1. 薬、薬の誘導装置及び薬の設計方法、2005-251190(2005/08/31)、江口晴樹、石川義弘
2. 評価対象化合物の活性度評価方法、2005-251189(2005/08/31)、江口晴樹、石川義弘、【日本特許登録済】特許4216277号
3. 薬、薬の誘導装置、磁気検出装置及び薬の設計方法、2006-177971(2006/06/28)、江口晴樹、石川義弘

4. 抗がん剤、2006-301564(2006/11/07)、江口晴樹、石川義弘、谷垣勝己、【日本特許登録済】特許5167481号
5. 磁性材料、磁性材料の誘導装置及び磁性材料の設計方法、2006-300604(2006/11/06)、江口晴樹、石川義弘、谷垣勝己、【日本特許登録済】特許4774536号
6. 薬、薬の誘導装置、磁気検出装置及び薬の設計方法、2007-056624(2007/03/07) 江口晴樹、石川義弘
7. MRIシステム、2007-316941(2007/12/07)、江口晴樹、石川義弘、【日本特許登録済】特許4279335号 (スーパー早期審査を経て特許登録済)
8. 鉄サレン錯体、2007-338928(2007/12/28)、江口晴樹、石川義弘
9. 磁性を有する薬剤、薬剤の誘導システム、並びに磁気検出装置、2008-038502(2008/02/20)、江口晴樹、石川義弘、【日本特許登録済】特許5325427号
10. 磁性を有する薬剤、薬剤の誘導システム、並びに磁気検出装置、2008-038458(2008/02/20)、江口晴樹、石川義弘
11. 磁性を有する薬剤、薬剤の誘導システム、並びに磁気検出装置、2008-038476(2008/02/20)、江口晴樹、石川義弘
12. 磁性を有する薬剤、薬剤の誘導システム、並びに磁気検出装置、2008-105917(2008/04/15)、江口晴樹、石川義弘

13. 磁性を有する薬剤、薬剤の誘導システム、並びに磁気検出装置、2008-105912(2008/04/15)、江口晴樹、石川義弘
14. 磁性体化合物のスクリーニング方法、2008-137885(2008/5/27)、江口晴樹、石川義弘、【日本特許登録】特許 5339777 号
15. 抗体又は抗原の定量方法、2008-137888(2008/5/27)、江口晴樹、石川義弘、【日本特許登録】特許 5408905 号
16. スイッチング素子、2008-137895(2008/5/27)、江口晴樹、石川義弘
17. 鉄サレン錯体、磁性を有する薬剤、薬剤の誘導システム、並びに磁気検出装置、2008-125202(2008/05/12)、江口晴樹、石川義弘
18. 薬の誘導装置、磁気検出装置、2008-160794(2008/6/19)、江口晴樹、石川義弘
19. 局所麻酔剤、局所麻酔剤の誘導装置とその設計方法、2008-297065(2008/11/20)、江口晴樹、石川義弘
20. 鉄サレン錯体化合物、又はその誘導装置、2008-299482(2008/11/25)、江口晴樹、石川義弘
21. 鉄サレン錯体、2008-298128(2008/11/21)、江口晴樹、石川義弘、【日本特許登録済】特許 4446489 号(早期審査を経て特許登録済)
22. 薬、薬の誘導装置、磁気検出装置および薬の設計方法、2008-280773(2008/10/31)、江口晴樹、石川義弘
23. DRUG, DRUG GUIDANCE SYSTEM, MAGNETIC DETECTION SYSTEM, AND DRUG DESIGN METHOD, PCT/JP2006/317027(2006/08/23)、江口晴樹、石川義弘、(2010/10/19 ミュンヘンにあるヨーロッパ特許庁で oral proceedings を行い特許査定の評決)、【EU 特許登録済】EP1920370B1
24. ACTIVITY EVALUATION METHOD FOR EVALUATION TARGET COMPOUND, US11/442,478(2006/05/26)、江口晴樹、石川義弘、【米国特許登録済】US7,337,073B2
25. 薬、薬の誘導装置、磁気検出装置及び薬の設計方法、PCT/JP2007/63011(2007/06/28)、江口晴樹、石川義弘、【米国特許登録済】US8246975B2 (米国特許庁直接説明することにて特許登録)
26. IRON-SALEN COMPLEX, US12/146,624 (2008/7/17)、江口晴樹、石川義弘
27. 演算装置及び局所治療薬、2007-170909(2007.6.28)、江口晴樹、石川義弘、【日本特許登録済】特許 4279330 号 (スーパー早期審査を経て特許登録済)
28. 自己磁性金属サレン錯体化合物、2009-177112 (2009/7/29)、江口晴樹、石川義弘
29. 鉄サレン錯体 2008-297048、(2008/11/21)、江口晴樹、石川義弘
30. 自己磁性金属サレン錯体化合物、2009-177112(2009/7/29)、江口晴樹、石川義弘

31. 鉄サレン錯体、2009-264213(2009/11/19)、
江口晴樹、石川義弘、【日本特許登録済】
特許 5461968 号
32. 磁石及び磁石を用いたドラッグデリバリー制
御装置、2009-294451(2009/12/25)、
江口晴樹、石川義弘
33. 自己磁性金属サレン錯体化合物、
PCTIB2009/007525(2009/11/19)、
江口晴樹、石川義弘、【ロシア特許登録済】
2495045
34. 金属サレン錯体誘導体およびその製造方法、
2010-088113(2010/4/26)、江口晴樹、石川義弘
35. 抗脳腫瘍薬剤、2010-102897(2010/4/28)、
江口晴樹、石川義弘
36. 磁石及び磁石を用いたドラッグデリバリー制
御装置、2010-126021(2010/06/01)、
江口晴樹、原正一、石川義弘
37. 金属サレン錯体誘導体及びその製造方法、
2010-285075(2010/12/21)、
江口晴樹、石川義弘
38. 磁石および磁石を用いたドラッグデリバリー
制御装置、PCT/JP2010/007516(2010/12/24)、
江口晴樹、原正一、石川義弘
39. 自己磁性金属サレン錯体化合物、
2011-030056(2011/02/15)、
江口晴樹、石川義弘
40. 金属サレン錯体化合物、
2011-040233(2011/02/25)、
江口晴樹、石川義弘
41. 金属サレン錯体誘導体及びその製造方法、
PCT/JP2011/002056(2011/4/6)、
江口晴樹、石川義弘
42. 金属サレン錯体誘導体、局所麻酔薬剤、及び抗
悪性腫瘍薬剤、2011-131239(2011/6/13)、
江口晴樹、石川義弘
43. 自己磁性金属サレン錯体化合物、
2010-539038(2011/6/8)、江口晴樹、石川義弘
【日本特許登録】特許 5513405 号
44. 新規な金属サレン錯体化合物、
2011-163621(2011/7/26)、江口晴樹、石川義弘
45. 温熱治療用材料および温熱治療システム、
2011-193270(2011/9/5)、江口晴樹、石川義弘
46. 金属サレン錯体化合物応答性薬剤、
2011-220449(2011/10/4)、江口晴樹、石川義弘
47. ドラッグデリバリー用のキャリア化合物、当該
キャリア化合物が薬剤を内包する脂質膜に結
合した薬剤、及び、当該薬剤を用いたドラッグ
デリバリーシステム、2011-203497(2011/9/16)、
江口晴樹、石川義弘
48. 磁性組成物及びその製造方法、
2011-222354(2011/10/6)、江口晴樹、石川義弘
49. ラジカル生成抑制剤、
2011-236486(2011/10/27)、
江口晴樹、石川義弘
50. 紫外線吸収剤及びこれを用いた化粧品、
2012-0253318(2012/2/8)、江口晴樹、石川義弘

51. 抗脳腫瘍剤、PCT/JP2011/002118(2011/4/11)、
江口晴樹、石川義弘
52. 蛍光色素材料およびその使用方法、
PCT/JP2011/002651(2011/5/12)、
江口晴樹、石川義弘 【日本特許登録】
特許 5554408 号
53. 無機化合物、無機化合物を含む薬剤、薬剤の誘
導システム、及び磁気検出装置、並びにがん温
熱治療法装置、2012-033960(2012/2/20)、
江口晴樹、石川義弘
54. 自己磁性金属サレン錯体化合物、
PCT/JP2012/062301(2012/5/14)、
江口晴樹、石川義弘
55. 磁石および磁石を用いたドラッグデリバリー
制御装置、2011-547329(2012/6/22)、
江口晴樹、石川義弘 【日本特許登録済】
特許登録 5372178 号
56. 金属サレン錯体誘導体及びその製造方法、
2012-509317(2012/8/6)、江口晴樹、石川義弘
57. 抗脳腫瘍薬剤、2012-512639(2012/8/13)、
江口晴樹、石川義弘
58. 蛍光色素材料及びその使用方法、
2012-518218(2012/8/13)、江口晴樹、石川義弘
59. 薬、薬の誘導装置、体内動態検知器及び薬の設
計方法、2012-185940(2012/8/24)、
江口晴樹、石川義弘 【日本特許登録】
特許 5533960 号
60. 温熱治療用発熱半導体、
61. 自己磁性金属サレン錯体、
PCT/JP2012/072612(2012/9/5)、
江口晴樹、石川義弘
62. 新規抗がん剤解毒剤、
PCT/JP2012/072794(2012/9/6)、
江口晴樹、石川義弘
63. ラジカル生成抑制剤、
PCT/JP2012/074938(2012/9/27)、
江口晴樹、石川義弘
64. 磁性体、及び、磁性体の製造方法、
2012-273951(2012/12/14)、
江口晴樹、石川義弘
65. 薬、薬の誘導装置、体内動態検知器及び薬の設
計方法、2012-246307(2012/12/13)、
江口晴樹、石川義弘
66. 磁性薬の適正投与形態提供システム、
2012-285824(2012/12/27)、
江口晴樹、石川義弘
67. 磁性体、2013-020939(2013/02/05)、
江口晴樹、石川義弘
68. 持続性磁性抗がん剤、2013-088559(2013/4/19)、
江口晴樹、石川義弘
69. 薬、薬の誘導装置、磁気検出装置及び薬の設計
方法、2013-200483(2013/9/26)
江口晴樹、石川義弘
70. 鉄サレン錯体、2014-006299(2014/1/16)、

- 江口晴樹、石川義弘
71. 磁性薬誘導システム、
PCT/JP2007/063011(2007/6/28)、
江口晴樹、石川義弘、【日本特許登録済】
特許 5378792 号
72. 金属サレン錯体化合物、
PCT/JP2011/079630(2011/12/21)、
江口晴樹、石川義弘
73. 自己磁性金属サレン錯体化合物、
PCT/JP2012/051079(2012/1/19)、
江口晴樹、石川義弘
74. 自己磁性化合物、
PCT/JP2013/083519(2013/12/13)、
江口晴樹、石川義弘
75. 自己磁性化合物の治療パターン、
PCT/JP2013/084712(2013/12/26)、
江口晴樹、石川義弘
76. Drug, Drug Guidance System, magnetic
detection system, and drug design method、
12/306,706(2012/08/21)、江口晴樹、石川義弘
【米国特許登録】US8,246,975 B2、(有機磁性
体による造影剤コンセプト特許)
77. 新規抗がん剤解毒剤、
2013-537462(2013/11/27)、
江口晴樹、石川義弘
78. 自己磁性金属サレン錯体化合物からなる水分
散粒子およびその製造方法、
2013-537456(2013/02/04)、
江口晴樹、石川義弘
79. 新規な金属サレン、2014-017416(2014/02/04)、
江口晴樹、石川義弘
80. 薬、薬の誘導装置、磁気検出装置及び薬の設計
方法、2013-253116(2013/12/21)、
江口晴樹、石川義弘
81. 鉄サレン錯体、2014-006299(2014/01/17)、
江口晴樹、石川義弘
82. 鉄サレン錯体、磁性を有する薬剤、薬剤の誘導
システム、並びに磁気検出装置、
2014-046808(2014/03/11)、
江口晴樹、石川義弘
83. 薬、薬の誘導装置、磁気検出装置及び薬の設計
方法、201210279332.3(中国出願特許)
(2013/10/17)、江口晴樹、石川義弘
84. 金属サレン錯体誘導体、2012142654(ロシア出
願特許)(2014/03/05)、江口晴樹、石川義弘
85. 金属サレン錯体誘導体、2013-0029399(米国出
願特許)(2014/03/19)、江口晴樹、石川義弘
86. 金属サレン錯体化合物、201180068119.7(中
国出願特許)(2013/11/19)、
江口晴樹、石川義弘
87. 金属サレン錯体化合物、11850943.9(ヨーロッ
パ出願特許)(2013/10/03)、
江口晴樹、石川義弘
88. 金属サレン錯体化合物、2304/KOLNP/2013(イ
ンド出願特許)(2013/12/12)、
江口晴樹、石川義弘
89. 金属サレン錯体化合物、2013133683(ロシア出