磁気温熱療法の定温加熱制御システムを用いた動物実験

Animal Experiment with PID-based Automatic Temperature Control System for Magnetic Hyperthermia

鹿野晃弘 a)t・トンタット・ロイ a)・桑波田晃弘 a)・アリウンブヤン・スフバートル b)・

小玉哲也 a) b) · 薮上信 a) b)

◎東北大学大学院工学研究科,宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-05 (〒980-8579)
◎東北大学大学院医工学研究科,宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-05 (〒980-8579)

A. Shikano^{a)†}, L. Tonthat^{a)}, A. Kuwahata^{a)}, A. Sukhbaatar^{b)}, T. Kodama^{a) b)}, and S. Yabukami^{a) b)} ^{a)} Graduate School of Engineering, Tohoku Univ., 6-6-05 Aramaki Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

^{b)} Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku Univ., 6-6-05 Aramaki Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

Magnetic hyperthermia (MH) is a promising cancer therapy in which the heating temperature is expected to be a key determinant for its success. A therapeutic system with high-accuracy temperature control is of vital importance to avoid overheating in normal tissues surrounding a tumor. We previously developed a PID-based temperature control system and verified its validity *in vitro*. In this study, we validate our control system *in vivo*. First, we investigated both the improvement in heat generation by high-density Resovist[®] (Ferucarbotran) and the optimal PID tuning method for the high-density Resovist[®] *in vitro*. Next, we injected the high-density Resovist[®] into mice and then performed PID-based temperature control *in vivo*. We demonstrate that by using our PID-based control system, it is possible to accurately control the therapeutic temperature (e.g., 50°C) *in vivo* with a standard deviation of 0.05°C in the steady-state. Our system has the potential to be used for MH either alone or together with other cancer treatment modalities for basic and clinical studies.

Keywords: magnetic hyperthermia, magnetic nanoparticle, PID-based control, Resovist®, animal experiment

1. はじめに

がんに対する治療法として、温熱療法(ハイパーサーミア)が注 目されている.この治療法ではがん組織が正常組織よりも温熱に 弱いことを利用して、がん組織のみを選択的に壊死や縮退させる ことができる.そのため、現在一般的ながん治療法である手術療 法、薬物療法、放射線療法に比べ、患者への負担が少ない低侵襲 な治療法として期待できる.温熱療法の主な加熱方式には RF 誘 電加熱法¹⁰や超音波加熱法²⁰などがあり、医療現場でがん治療に 用いられている.しかし、これらの方式では加熱領域の制御が難 しく、がん組織のみを選択的に加熱できない場合がある.そこで、 磁性体を発熱体としてがん組織に埋め込み、磁気により局所的な 加熱を可能とする磁気温熱療法が盛んに研究されている.

温熱療法を成功させるには、がんが死滅しうる温度までの加熱 を一定時間継続しておこなう必要がある。治療温度を高めれば、 がんをより確実に死滅させることができる。しかし、その周囲の 正常組織も高温環境へ晒し、損傷させる危険性がある。したがっ て、温熱療法の確立には、正常組織には害を及ぼさず、がん組織 のみを治療できる温度と加熱時間の解明や温度制御システムの開 発が求められる。

磁気温熱療法においては、感温磁性体と呼ばれる低キュリー温 度の磁性材料を生体内に埋め込み、材料の温度に対する磁気特性 の変化から加熱温度を制御するソフトヒーティング法³⁴が提案 されている.しかし、この手法では感温磁性体がµm~mmオー ダーになるため治療後の取り出しが困難である.また、熱耐性の 異なる様々ながん細胞への細やかな温度制御も難しい課題もある. そこで、動物実験では nm オーダーの磁性ナノ粒子を患部へ埋め

責任著者: 鹿野晃弘 (e-mail: shikano.akihiro.p6@dc.tohoku.ac.jp)

時間が治療効果に及ぼす影響を詳細に評価しにくくなり、同じ条件の治療を施した間でも再現性も取りにくくなることが危惧される. 本研究では、これまでに開発した定温加熱制御できる磁気加熱システム[®]を使い、生体内での磁性流体の定温加熱制御の検討をした。また、医用磁性流体の発熱特性の向上並びに温度制御方式について検証をおこなった。マウスを用いた動物実験では、磁気温熱療法の治療温度の50℃での定温加熱制御に取り組んだ。

2. 磁性流体の発熱特性の改善

込み、サーモグラフィや光ファイバー温度計による温度計測をお こないながら、印加磁界の強度を操作する方式がとられている.

しかし, 先行研究 56 では, マニュアルによるフィードバックによ

り ±1 ℃程度の温度ぶれのある制御がおこなわれてきた. 治療温

度が1℃ずれると治療効果を得るための加熱時間が2倍になる 7

ため、磁気温熱療法ではより精密な温度制御が課題である.動物

実験においては、温度ぶれが生じることにより、治療温度と加熱

磁気温熱療法において使用する磁性体は、生体内に留置するため医薬品としての安全性が求められる.したがって、磁性体を選択する上では、前臨床試験や治験などで承認された医薬品であることが望ましい.新規に承認を得るには上記の手続きをおこなうために多額の費用と長期の開発期間が必要となる.そのため、本研究では既に医薬品として承認されており、磁気温熱療法の研究にて利用されている医用磁性流体の Resovist®(共和クリティケア、東京)を選択した.Resovist®は、カルボキシデキストランで被覆された液中粒径が約57 nm の酸化鉄からなる磁性流体である.しかし、生体内では注入部位の体積から定まる投与量の限界と生体への磁界の照射量の制限があり、Resovist®による発熱では磁気





Fig. 1 PID-based automatic heating-temperature control system. (a) Block diagram and (b) photo of system.

温熱療法の治療温度である 43 ~ 50 ℃まで温度を上昇させること が難しい⁹¹⁰. そこで,磁性流体の発熱特性を改善する必要がある. Resovist®の発熱特性を改善する方法としては磁気分離装置による 磁気分画が提案されている¹¹⁾が,本研究では Resovist®に含まれ る磁性体の数を増やすことで発熱特性の向上を目指した.使用し た Resovist®について問い合わせ,鉄換算で24.8 mg/mLの磁性ナ ノ粒子が分散されていると確認し、この粒子数を 99.2 mg/mL ま で増加させた試料を作製した.2 つの磁性流体について,ゼータサ イザー (Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK) により評価した. Resovist®の液中の平均粒径とゼータ電位は それぞれ 59.6 nm, -41.5 mV であり,作製したサンプルでは 53.4 nm, -39.6 mV とほぼ同等であるため磁性ナノ粒子は分散してい ると考えられる.また,振動試料型磁力計 (PV-M10-5,東栄科学 産業,宮城)を用いた磁気特性の測定では,作製した試料が超常磁 性を示しており,磁気特性が変化していないことを確認した.

次に,磁性ナノ粒子の数を増加させたことによる発熱特性の変 化を Fig. 1 (a) に示す磁気加熱システムで測定した.本システムは, チラー (FLOWMAX, Miller Electric MFG, Appleton, Wisconsin, US),誘導加熱電源 (EasyHeat 2.4 kW, Ambrell, Rochester, New York, US),光ファイバー温度計 (FL-2000,安立計器,東京),PC で構成される.温度計測を基に,LabVIEW 2020 (National Instruments, Austin, Texas, US)を用いた PID 制御によって,コ イルに流す交流電流を操作し,磁性流体の温度を制御することが 可能である.コイルは、内径 70 mm,外径 85 mm,ピッチ7 mm の2巻である.誘導加熱電源はLC 共振を用いて周波数 260 kHz による励磁を維持している.この電源の最大出力である電流 400 A を流したときのコイル中心における磁界強度は 14 kA/m であり, 磁界強度と周波数の積は生物医学的な制限の5×10⁹ Am⁻¹s⁻¹未満¹⁰



Fig. 2 Temperature rise in stock and high-density Resovist[®] under applied AC magnetic field of 7 kA/m, 260 kHz.

であるため、磁界が生体へ与える影響は小さいと考えられる. 磁性ナノ粒子の数を増加させたことによ磁性流体の発熱特性は 断熱環境にて測定した.まず、各磁性流体 200 µL を発泡スチロー ルで作った断熱材の中へ入れ、Fig.1 (b) に示すように磁性流体が コイル中央へ来るように設置した.そして、各磁性流体に対して、 7 kA/m、260 kHz の交流磁界を印加し、その時の発熱応答を光フ ァイバー温度計にて測定した.

Fig. 2 に7 kA/m, 260 kHz の交流磁界を印加した際の各磁性流体の発熱応答を示す.作製した試料では,磁性体の総量が増えたことで昇温が早くなっている.温度上昇の傾きに注目すると,作製した試料は Resovist[®]に比べ約4倍の上昇率であり,磁性ナノ粒子の増加量に比例している.以上のように,磁性ナノ粒子の数に比例して高発熱化する磁性流体を得た.

3. 定温加熱制御方式の検討

これまで Fig. 2 に示すような磁界の変化に対する磁性流体の 発熱挙動が、無駄時間要素と一次遅れ要素または積分器に近似で きると考え、ジーグラニコルスのステップ応答法より求めた PID パラメータでの定温加熱制御に取り組んだ⁸. ここでは、同じくス テップ応答から PID パラメータを求める Chien-Hrones-Reswick (CHR) 法との比較を Resovist[®]と作製した試料でおこない、パラ メータのチューニング法に関する検討をおこなった.

Table 1 に各 PID チューニング法¹²⁰を示す. ジーグラニコルス のステップ応答法は、無駄時間要素と一次遅れ要素または積分器 に近似できる系に対するチューニング法である. CHR 法は無駄時 間要素と一次遅れ要素に近似できる系に対して有効なチューニン グ法で、対象がより限定的となる.

はじめに、各磁性流体の磁界に対する発熱のステップ応答を取 得した. Fig. 1 (a) の磁気加熱システムにて、磁性流体 200 µL を コイル中心の中空に配置した. この時、断熱材は用いずに非断熱 環境で磁性流体が40 ℃ー定温となるまで加熱した. 次にコイルに 流れる交流電流をステップ状に変化させた. その時の磁性流体の 発熱応答からプログラムにて取得した各磁性流体のパラメータを Table 2 に示す. これらのパラメータと Table 1 の換算式から、各

Tuning rules		PID parameters		
		Kc	T_{I}	T_{D}
Ziegler-Nichols reaction curve		1.2 T/KL	2L	0.5L
CHR	Set-point regulation (overshoot 0%)	0.677KL	Т	0.5L
	Disturbance (overshoot 0%)	0.95 <i>TIKL</i>	2.4L	0.42L

Table 1PID parameter tuning rules
based on *K*, *T*, and *L*.

Table 2	Step response parameters for		
	stock and high-density Resovist®		

	Parameters			
Resovist®	Gain	Time constant	Dead time	
	K	$T(\min)$	$L(\min)$	
Stock	0.0772	0.461	0.249	
High-density	0.199	0.78	0.372	



Fig. 3 Comparison of different PID parameter tuning rules using the current range of 0 ~ 300 A (i.e. 0~10.5 kA/m) with a fixed frequency of 260 kHz. (a) Stock Resovist[®] and (b) High-density Resovist[®].

チューニング法の PID パラメータを得た.そして,各磁性流体を 室温から磁気温熱療法の治療温度である 45 ℃まで3 通りの PID パラメータで周波数 260 kHz の交流電流出力を0~300 A で操作 し,加熱制御した.この時の磁性流体が配置されるコイル中心の 磁界強度は0~10.5 kA/m である.

Fig. 3 (a) にジーグラニコルスのステップ応答法と2つの CHR 法より決定した PID パラメータで Resovist®を加熱制 御した結果を示す. 過渡応答のオーバーシュートに注目す ると,ステップ応答法が 1.3 ℃と最も小さく,CHR 法の 外乱抑制型では 1.5 ℃,目標値追従型にいたっては 2.9 ℃ であった. 2%整定時間を比較するとそれぞれ 182, 213, 328 sec であった.CHR 法の目標追従型の整定時間が長い のは,比例ゲインが小さいことで応答性が落ち,減衰が小 さくなったためである.定常特性を加熱開始 360~600 sec までの標準偏差で比較すると,それぞれ 0.07,0.10,0.12 ℃ であった.

Fig. 3 (b)には作製した試料での加熱制御の結果を示した. この磁性流体では Resovist®に比べ発熱量が高いため、電流 の操作量に対する応答が大きく、オーバーシュートも大き くなっている.オーバーシュート、2%整定時間、定常時の 温度の標準偏差のいずれにおいてもステップ応答法が優れ ており、それぞれ 2.7 ℃, 193 sec, 0.05 ℃である.

以上より,過渡特性と定常特性の両方でステップ応答法 より求めた PID パラメータの制御性が優れていたと言える.一般 的にCHR法はオーバーシュートが小さいという特徴を持つが, 得られた結果は異なるものであった.その原因として, PID チューニング時の磁性流体の発熱挙動が一次遅れ要素では なく,積分器に近い挙動であったことが考えられる.その ため,磁気温熱療法の温度制御においては,磁性流体の発 熱特性のモデリングが可能なジーグラニコルスのステップ 応答法が適していると言える.

また、今回の結果より、作製した高発熱の試料ではオー バーシュートは大きくなってしまうが、定常特性は同等の 結果が得られた. すなわち、異なる発熱特性を持つ磁性流 体へ対しても、本システムを適応することで定温加熱制御 が可能であることを確認した.

4. 生体内での定温加熱制御

4.1 マウス MXH10/Mo-*lpr/lpr*

動物実験では、全身のリンパ節の短径が生後約3カ月でヒトの リンパ節と同程度の大きさ (10 mm) まで腫脹する MXH10/Mo-*Ipr/Iprマ*ウス2匹(週齢12~13)を使用した、本実 験でマウスの腸骨下リンパ節(SiLN: Subiliac Lymph Node) に 作成した試料を注射する.

4.2 生体内における定温加熱制御

マウスを麻酔下におき SiLN の表皮を切開した. 次に、カテー



Fig. 4 Photo of injecting high-density Resovist® into SiLN.

テルを SiLN に刺入し、カテーテルを通して光ファイバー温度計 のプローブを SiLN 内に留置した.作製した試料 200 μL を SiLN に注射し、Fig. 4 に示すとおり SiLN をコイル中心に配置した.

次に磁気加熱システムで260 kHz の交流による励磁をおこない, SiLN を 40 °Cまで加熱した.そして,交流電流 50 A のステップ 信号を与えた.この時の SiLN の発熱応答からジーグラニコルス のステップ応答法を用いて PID チューニングをおこなった.そし て, PID パラメータ K_{C} =24.08, T_{I} =0.60 min, T_{D} =0.15 min を 得た.

次に別固体のマウスを準備し、得られた PID パラメータを用い て、生体体温から磁気温熱療法の治療温度とされている 50 ℃まで 周波数 260 kHz の交流電流出力を 0~400 A で操作し、PID 加熱 制御した.この時のコイル中心の磁界強度は 0~14 kA/m であり、 周波数との積は生物医学的な制限の 5×10⁹ Am⁻¹s⁻¹ 未満¹⁰である.

Fig. 5 にマウスの SiLN ヘ PID 加熱制御した結果を示す. 過渡 応答に注目すると、2%整定時間は 137 sec である.また、オーバ ーシュートは0.7 ℃、その継続時間は 109 sec であった.生物の正 常細胞は 51 ℃で 180 sec 加熱されるとネクローシスが起きる¹³⁰ ため、オーバーシュートによる正常細胞への侵襲は少ないと考え る.オーバーシュートが *in vitro* に比べ大きく低減したのは生体内 の放熱しやすい環境が寄与したものである.目標温度を維持して いる 300 sec 間における温度変化の標準偏差は、0.05 ℃である. この標準偏差は *in vitro* にて得られたものと同等であり、*in vivo* においても磁性流体の温度を正確に制御することに成功した.以 上のことから本研究で示した定温加熱制御を実装した磁気温熱療 法システムは生体へも適応が可能だと考えられる.

本実験では医用磁性流体の Resovist®から作製した試料を使用 して、SiLN の温度を50 ℃まで加熱することにも成功した.また、 Resovist®の磁性ナノ粒子を99.2 mg/mL に増やすことで生体内で 十分に発熱が得られることを明らかとした. Fig. 5 の電流値に注目 すると、定常状態では200 A 程度である.誘導加熱電源の最大出 力が400 A であることを考えると、投与量を減らすなどの発熱体 の最適化の余地がある.本実験においては、光ファイバープロー ブ先端の局所的な温度を制御できることを示した.しかし、治療 における温度計測は、光ファイバープローブの挿入位置のばらつ きや腫瘍内外で温度勾配 14050 などから容易ではない.そのため、



Fig. 5 PID-based temperature control in SiLN_using the current range of 0 ~ 400 A (i.e. 0~14 kA/m) with a fixed frequency of 260 kHz.

本加熱制御技術やプローブの挿入法が、治療効果や正常組織への 侵襲にどのような影響をもたらすかを調べる必要がある。今後は、 動物実験でのHematoxylin-Eosin (HE) 染色や Prussian Blue 染 色による病理組織学的検査から、がん細胞と正常細胞、磁性流体 の分布を調べ、治療効果と侵襲性について明らかにしていく。

4. まとめ

生体での定温加熱制御での検討を目的として,はじめに 医用磁性流体 Resovist[®]の発熱特性の向上について調べた. Resovist[®]の体積当たりの粒子数を増やした試料を作製し, 発熱特性が向上することを確認した.その発熱量は粒子数 に比例して増加する.

次に、磁性流体の加熱制御に関して、ジーグラニコルス のステップ応答法と CHR 法の比較をおこなった.ステッ プ応答を用いることで磁性流体の発熱特性をモデリングで き、制御性に優れた PID パラメータを取得できることを示 した.また、本研究で用いた定温加熱制御システムが発熱 特性の異なる磁性流体を制御可能であることがわかった.

さらにマウスを用いた動物実験にて、生体内での定温加 熱制御に取り組み、定常状態での温度の標準偏差が0.05 ℃ という定温加熱制御を確立した.本システムを用いること で生体内の細やかな温度制御が望める.今後は、発熱体の 最適化や動物実験を通してがんや正常細胞がダメージを受 ける加熱時間と治療温度の詳細な調査など磁気温熱療法へ の基礎検討を進める.

動物実験 本実験(承認番号 2020BeA-020)は「東北大学 における動物実験等に関する規定」に従って実験を実施した.

謝辞 本研究の一部は, JSPS 科研費 (19K23597, 20K20210) および東北大学卓越大学院プログラムの助成 を得たものである.

References

- H. Kato, T. Takasugi, R. Tanaka, and Y. Yamamoto: *Therm.* Med., 36(2), 59 (2020).
- H. P. Kok, E. N. K. Cressman, W. Ceelen, C. L. Brace, R. Ivkov, H. Grüll, G. t. Harr, P. Wust, and J. Creezee: *Int J Hyperthermia*, **37**(1), 711 (2020).
- T. Takura, S. Kajiwara, H. Kikuchi, and H. Matsuki: J. Magn. Soc. Jpn., 43, 99 (2019).
- H. Saito, K. Mitobe, A. Ito, Y. Sugawara, K. Maruyama, Y. Minamiya, S. Motoyama, N. Yoshimura, and J. Ogawa: *Cancer Sci.*, 99(4), 805 (2008).
- T. Morino, S. Tanoue, S. Miyata, K. Hirayama, A. Ito, T. Etani, T. Naiki, N.Kawai, and T. Yasui: *Therm. Med.*, **36**(2), 47 (2020).
- A. S. Garanina, V. A. Naumenko, A. A. Nikitin, E. Myrovali, A. Y. Petukhova, S. V. Klimyuk, Y. A. Nalench, A. R. Ilyasov, S. S. Vodopyanov, A. S. Erofeev, P. V. Gorelkin, M. Angelakeris, A. G. Savchenko, U. Wiedwald, A. G. Majouga, and M. A. Abakumov: *Nanomedicine*, 25, 102171 (2020).

- W. C. Dewey, L. E. Hopwood, S. A. Sapareto, and L. E. Gerweck: *Radiology*, **123**, 463 (1977).
- A. Shikano, L. Tonthat, and S. Yabukami: *IEEJ Trans.* Electr. Electron. Eng., 16, 807 (2021).
- H. Tseng, C. Lee, Y. Shih, X. Lin, and G. Lee: Proc.7th IEEE International Conference on Nanotechnology, Hong Kong, 2007, 969 (IEEE, 2007).
- 10) R. Hergt, and S. Dutz: J. Magn. Magn. Mater., 311(1), 187 (2006).
- H. Nagae, S. Yamada, Y. Ikehata, S. Yagitani, and I. Nagano: *IEEJ Trans. Fundam. Mater.*, **133**(6), 366 (2013).
- 12) F. A. Salem, and A. A. Rashed: Int J Eng Sci, 2(5), 191 (2013).
- M. W. Dewhirst, B. L. Viglianti, M. Lora-Michiels, M. Hanson, and P. J. Hoopes: *Int J Hyperthermia*, **19**(3), 267 (2003).
- 14) A. Candeo, and F. Dughiero: *IEEE Trans. Magn.*, **45**(3), 1658 (2009).
- 15) J. A. Pearce, A. A. Petryk, and P. J. Hoopes: *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 64(12), 2813 (2017).

2021年11月09日受理, 2021年12月17日採録