

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08194

研究課題名(和文) BNCT用新規薬剤のホウ素分布条件に関する基礎的検討

研究課題名(英文) Boron distribution study for newly developed BNCT agents

研究代表者

中井 啓 (Nakai, Kei)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50436284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：1.血管内ホウ素の腫瘍増殖抑制効果について、非漏出Liposome投与群は、照射単独群とほぼ同様の腫瘍増殖を示し、血中のホウ素は、中性子照射によっても、腫瘍増殖抑制への寄与が少ないものと推察された。これは毛細血管よりも近位の血管においては、血管内皮に粒子線が到達していない、もしくは障害の程度が血流を阻止する程度に強くないなどの原因が考えられる。

2.CR39を用いたホウ素分布可視化においては、CR39に付着した細胞における、CR39面から5-10マイクロメートルの範囲で生じたアルファ線を可視化することができる。この結果をもとに、細胞内のホウ素分布を推定できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本結果をさらに発展させることによって、まず、ホウ素動態の細胞、間質における詳細を検討することが可能となり、また、領域ごとのホウ素濃度を加減して照射実験を行うことで、その効果を評価することが可能となる。その結果を詳細に検討することで、BNCT用の新規ホウ素薬剤の開発コンセプトを明確にすることができる。

研究成果の概要(英文)：1. Regarding the tumor growth inhibitory effect of intravascular boron, the non-leakage Liposome group showed almost the same tumor growth as the irradiation alone group, suggesting that boron in the blood contributes little to tumor growth inhibition even by neutron irradiation. This may be due to the fact that particle beams do not reach the vascular endothelium in blood vessels more proximal than capillaries, or the degree of damage is not strong enough to block blood flow.

2. In the visualization of boron distribution using CR39, alpha rays generated in the range of 5-10 micrometers from the CR39 surface can be visualized in cells attached to CR39. Based on this result, it is considered possible to estimate the intracellular boron distribution.

研究分野：放射線腫瘍学、粒子線治療

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 アルファ線 リポソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法(Boron Neutron Capture Therapy 以下 BNCT)は、研究段階の粒子線治療である。腫瘍に集積するホウ素(^{10}B)化合物を投与したうえで中性子を照射し、ホウ素と中性子の核反応で α 線を生じ、腫瘍治療に利用する。

高精度放射線治療や、抗腫瘍薬とは異なる機序で選択性を持ち、理論的に正常組織への傷害

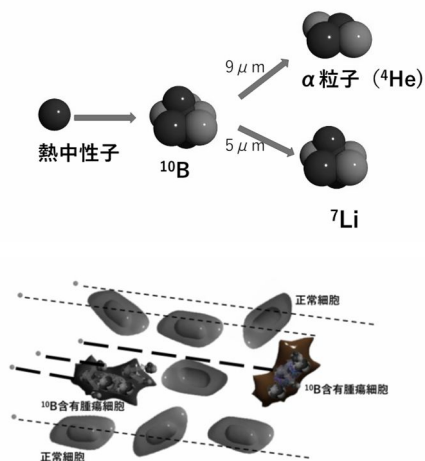
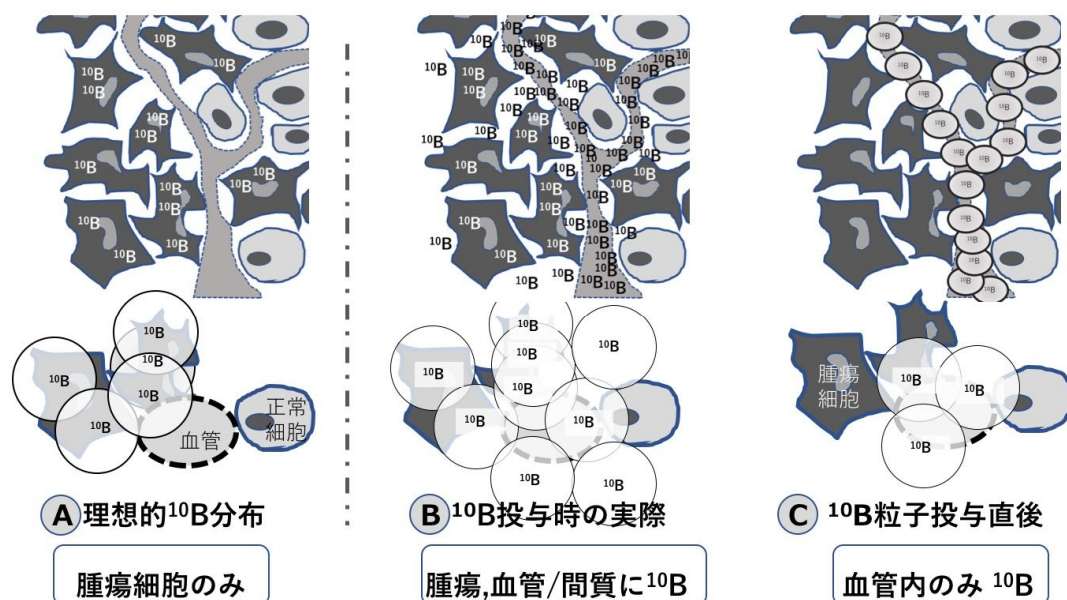


図1 BNCTの原理

が少ない事が特徴で、申請者らも原子炉線源を用いた臨床研究で有用性を報告した。(Nakai *et al*, 2014, Yamamoto *et. al* 2009)。新規線源として加速器が開発中で一部上市されたが、一方の新規ホウ素薬剤開発は難渋し、40年以上臨床応用には成功していない。その一因に、 ^{10}B の組織・細胞内動態の可視化が困難で、その知見に乏しい点がある。BNCTに用いるホウ素含有化合物は、 ^{10}B が腫瘍細胞に集積する必要があるとされており、B含有アミノ酸 *p*-boronophenylalanine (以下 BPA)が、基礎実験から臨床研究まで広く使用されている化合物である。BPAは、培養細胞に一定時間添加すると、細胞内にホウ素が存在していることは種々の検討により、明らか

である (Yoshida *et al.* 1998)。治療には、20-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度の ^{10}B が標的細胞内に存在する必要があるが実験的、経験的に示唆されており、実際の臨床研究では、BPAは250-500mg/kgの用量で照射直前、照射中のボラス~2時間持続静注投与が行われている。この投与方法では、血液中から間質への拡散、細胞外基質への拡散、腫瘍細胞に到達し、代謝などによって細胞膜の内部に取り込まれるまでに、どれほどの時間がかかり、どれほどの割合で取り込まれるのか。また、細胞内に取り込まれきれずに血中や間質に残された ^{10}B については、どの程度の関与が考えられるであろうか (図 2B)。詳細は未検討である。

図2 様々な様式のホウ素の腫瘍内分布(上)と、粒子線放出範囲の略図(下)



A 理想的 ^{10}B 分布
腫瘍細胞のみ

B ^{10}B 投与時の実際
腫瘍,血管/間質に ^{10}B

C ^{10}B 粒子投与直後
血管内のみ ^{10}B

2. 研究の目的

本研究は、BNCTの有用性に、細胞内への ^{10}B 取り込みだけでなく、腫瘍間質/血管内の ^{10}B 分布による寄与が存在する、と仮説し、実証することで、腫瘍間質/血管内 ^{10}B の寄与割合を検討し、新規BNCT薬剤開発の新しい方向性を見出すことを目的とする。

担癌マウスを用いた中性子照射実験を施行し、**図 2B, 2C**の条件で腫瘍増殖抑制効果を検証する。**図 2C** (すなわち血管内だけに ^{10}B が存在する条件)において生じる腫瘍抑制効果は、非ホウ素線量と、腫瘍間質/血管で生じたホウ素中性子反応の結果で、腫瘍細胞外の ^{10}B の寄与が推測できると考える。中性子照射実験は、京都大学実験原子炉またはいばらき中性子医療センターの加速器中性子線源を予定。血管および間質におけるホウ素の分布、これによるBNCT治療効果への寄与の割合を推測し、今後の新規ホウ素化合物(薬剤)の開発を推進することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

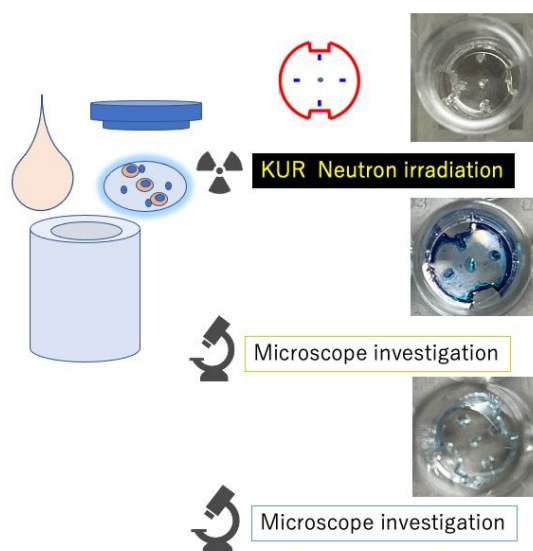
(1) 血管内から間質に移行しない ^{10}B 含有ナノ粒子の開発

上記仮説検討のためには、**図 2C**の状態を実現する血管内のみにとどまる ^{10}B 粒子が必要である。すなわち、血管透過性の低い、例えば粒径の大きい、またはPolyethylene Glycol (PEG)によって外殻の親水性の高いリポソームなどである。ドデカボラン化合物を封入するリポソームを共同研究者の白川によって作成され、用いた。担がんマウスモデルに、リポソーム懸濁液を常駐後、KURで照射をおこない、腫瘍増殖抑制試験を行った。

(2) 細胞内のホウ素分布可視化・中性子照射実験

CR39に二酸化炭素レーザー加工機によって、二次元位置情報のマーキングを施す。**図 3**放射化物飛散防止のため、96ウェルに適合したシリコンキャップを自作し、溶液およびCR39を密封する。CR39は、ポリリジンで前処理を行い、細胞接着性を高める。

図3 アルファオートラジオグラフィ実験概略図



シリコンキャップは、市販のシリコンおよび硬化剤を 80°C で2時間加温して作成した。照射は京都大学実験原子炉(KUR、京都大学複合原子力科学研究所、熊取)で行った。15分の中性子照射の後、エタノール固定し、室温保存。分析の際には、メチレンブルー染色および顕微鏡観察、画像撮影によって細胞の位置情報を取得する。のちに、CR39を従前の手法によってエッチングし、アルファピットを可視化する。

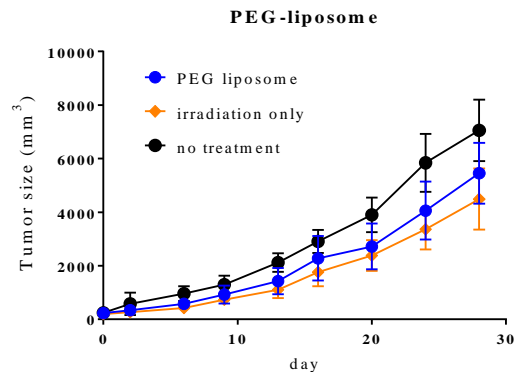
4. 研究成果

(1)

血管内ホウ素の腫瘍増殖抑制効果について**図 4**に示す通り、Liposome投与群は、照射単独群とほぼ同様の腫瘍増殖を示し、血中のホウ素は、中性子照射によっても、腫瘍増殖抑制への寄与が少ないものと推察された。これは毛細血管よりも近位の血管においては、血管内皮

に粒子線が到達していない、もしくは障害の程度が血流を阻止する程度に強くないなどの原因が考えられる。

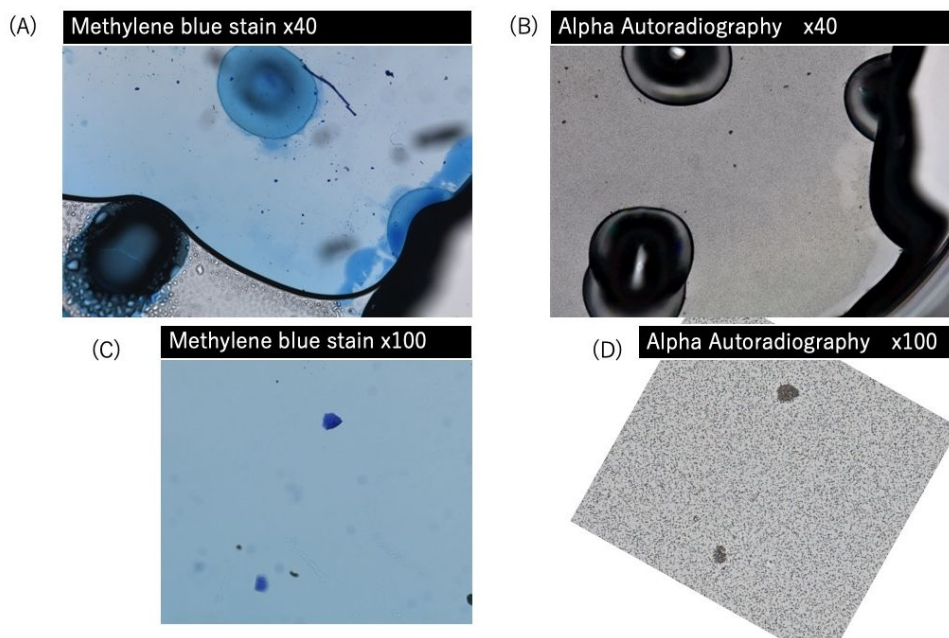
図4 血管内ホウ素投与群、中性子照射単独、無治療群における腫瘍増殖曲線



(2)

CR39 を用いたホウ素分布可視化においては、細胞付着状態、メチレンブルー染色の状態と、エッチング後、アルファピット可視化後の CR39 画像をキャリブレーション可能なマーキングが可能であることが判明した。この手法を用いることで、CR39 に付着した細胞における、CR39 面から 5-10 マイクロメートルの範囲で生じたアルファ線を可視化することができる。この結果をもとに、細胞内のホウ素分布を推定できると考えられる。ただし、性細胞の状態における細胞の厚みの計測、同じ条件での中性子照射が必要である。

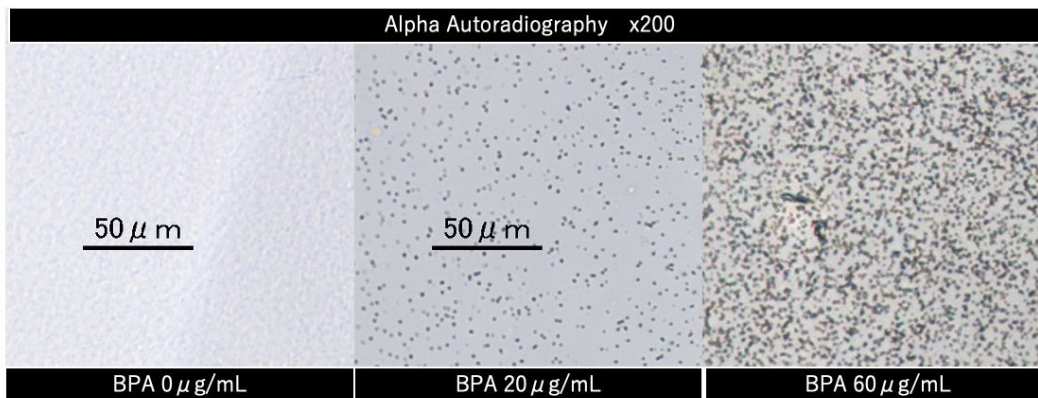
図5 メチレンブルー染色およびエッチング後の CR39 の顕微鏡画像



(A) and (C) are methylene blue stain image.
 (B) and (D) are etched pit image by light microscope.
 laser markers were useful for position matching.
 alpha particle pathway made pits on image (C) and (D).

さらに、CR39 面に接したホウ素溶液によって生じるアルファ線の可視化を試みた。これは濃度依存性にアルファピットの生成を確認でき、適切な濃度の溶液-CR39 を中性子照射することで、半定量的解析が可能になる可能性を示唆する。

図6 ホウ素溶液と接した CR39 面のアルファピットおよびホウ素濃度の関連



alpha pit on the CR39 with Boronophenylalanine solution. boron concentration were 0 μ g/mL (left), 20 μ g/mL (middle), 60 μ g/mL(Right).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakai Kei, Endo Keita, Yoshida Fumiyo, Koka Masashi, Yamada Naoto, Satoh Takahiro, Tsurubuchi Takao, Matsumura Akira, Matsumoto Yoshitaka, Sakurai Hideyuki	4. 巻 165
2. 論文標題 Boron analysis and imaging of cells with 2-hr BPA exposure by using micro-proton particle-induced gamma-ray emission (PIGE)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Radiation and Isotopes	6. 最初と最後の頁 109334 ~ 109334
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.apradiso.2020.109334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石川 仁、中井 啓、野中哲生、櫻井英幸	4. 巻 46
2. 論文標題 がん治療におけるparticle Therapy の現状と展望	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 癌と化学療法	6. 最初と最後の頁 1219-1225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中井啓, 吉田文代, 松村明, 江夏昌志, 山田尚文, 山縣諒平, 佐藤隆博, 松本孔貴, 櫻井英幸.
2. 発表標題 マイクロビームPIGEを用いた細胞内外ホウ素分布測定を試み NaI検出器とHPGeの検出器 の比較.
3. 学会等名 第16回日本中性子捕捉療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白川真、中井啓、大本拓実、重藤真希、吉田文代、竹内亮太、鈴木実、堀 均、松村明
2. 発表標題 新規薬剤 PEG 化ホウ素化合物(BAMP)の BNCT 応用に向けた 治療効果の評価
3. 学会等名 第 16 回日本中性子捕捉療法学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakai K, Kumada H, Matsumoto Y, Matsumura A, Sakurai H.
2. 発表標題 Study on Application of BNCT to skin malignant melanoma in Japan.
3. 学会等名 YBNCT to Helsinki 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakai K, Kumada H, Aihara T, Matsumura A, Sakurai H.
2. 発表標題 Feasibility of Newly constructed LINAC based BNCT for malignant melanomas.
3. 学会等名 PTCOG58 MANCHESTER 2019, (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉田 文代 (Yoshida Fumiyo) (30261811)	筑波大学・医学医療系・研究員 (12102)	
研究分担者	中村 浩之 (Nakamura Hiroyuki) (30274434)	東京工業大学・科学技術創成研究院・教授 (12608)	
研究分担者	白川 真 (Shirakawa Makoto) (40707759)	福山大学・薬学部・講師 (35409)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松本 孔貴 (Matsumoto Yoshitaka) (70510395)	筑波大学・附属病院・病院助教 (12102)	
研究分担者	鶴淵 隆夫 (Tsurubuchi Takao) (70778901)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関