

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670857

研究課題名(和文)炭化ホウ素球のホウ素中性子補足療法への応用

研究課題名(英文)Application of boron carbide particles to boron neutron capture therapy

研究代表者

由良 義明(YURA, YOSHIAKI)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00136277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)ではホウ素化合物として主にパラボロノフェニルアラニン(BPA)が使用されている。BPAの取り込みがみられない腫瘍細胞に対しては、高ホウ素化合物を局所投与する方法が考えられる。炭化ホウ素(B4C)球はナノ粒子で、中性子を効率的に捕捉する。B4C球を腫瘍内に投与後に中性子照射を行うことで、中性子単独と比較して腫瘍抑制効果がみられた。親水性の2-メタクロイルオキシホスホリルコリンunitと疎水性のn-ブチルメタクリレートunitからなるPurebright MBでB4C球を可溶化できた。B4C球は腫瘍投与する化合物としてBNCTに有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Boronophenylalanine (BPA) is a major boron compound used in boron neutron capture therapy (BNCT) for cancer patients. Boron-rich boron carbide (B4C) nanoparticles are novel compounds containing a large number of boron molecules. The tumor volume was smaller in B4C-mediated BNCT group than in neutron group. Purebright MB was found to solubilize B4C particles. This suggests that B4C particles injected intratumorally act as boron compounds for BNCT.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平上皮癌 中性子 ホウ素化合物 炭化ホウ素球 超音波照射 溶媒

## 1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は新規の放射線治療である。あらかじめ腫瘍にホウ素化合物を取り込ませておき、中性子を照射しこれを捕捉したホウ素から発生する跳程距離が短い粒子、Li 反跳核によって腫瘍細胞を選択的に破壊する治療法で、正常組織への傷害が少ない。放射線治療を受けたことのある患者にも使用でき、進展例、再発例に有効な治療法とされている。中性子は原子炉から発生するものであり、わが国で利用できるのは京都大学原子炉のみで、中性子源の確保が課題となる。この問題を解決するため、中性子を発生する加速器が開発され全国的に設置が進められようとしている。われわれは10年前からヒト頭頸部悪性腫瘍を対象としてBNCTの基礎・臨床研究を行っている。一方、腫瘍内にGd含有キトサンナノ粒子を投与して中性子線を照射する中性子捕捉療法(NCT)、カーボンナノチューブに高周波を照射する温熱療法、ならびに光感受性物質を結合させた金ナノ粒子を用いた光力学療法など腫瘍に直接投与した物質に中性子、温熱、光などを加えて治療効果を発揮する治療法の開発も進んでいる。

## 2. 研究の目的

ホウ素化合物としてパラボノフェニールアラニン(BPA)を全身投与する現在のBNCTでは、ホウ素の取り込みを制御するトランスポーターの発現が低下した細胞や細胞周期がG0期にある細胞では、BPAの取り込みが期待できず、治療効果を得ることが困難となる。解決策として、高いホウ素濃度の化合物を局所的に投与して中性子照射を行う方法が考えられる。そのためには、高濃度ホウ素を含有する化合物と腫瘍選択的なドラッグデリバリーシステムが必要となる。炭化ホウ素( $B_4C$ )球は $B_4C$ が集合したナノ粒子で、中性子を効率的に捕捉する。本研究は新規ホウ素化合物である $B_4C$ 球をBNCTへ応用することを目指したものである。

## 3. 研究の方法

### (1)新規ホウ素化合物としての $B_4C$ 球

$B_4C$ 球は直径平均200 nmでホウ素含有量の高い球状粒子である。細胞の中心から3 mmの位置に2個の $B_4C$ 球が存在すれば、BPA 30 ppmと同等の効果が得られると予測される。 $B_4C$ 球は液相中または基板状ターゲットにレーザー光を照射して合成する。 $B_4C$ 球の表面構造の観察には走査型電子顕微鏡を用いる。なお、 $B_4C$ 球は北海道大学大学院工学研究院の越崎博士、産業技術総合研究所の石川博士より供与される。

### (2)細胞培養ならびに超音波照射

口腔扁平上皮癌細胞株SAS細胞を分散させて細胞懸濁液を調整する。超音波発生装置はソニトロン2000Vで、超音波照射による音響穿孔法(ソノレーション)の効率を向上させるため、外殻が脂質で内部にヘキサフッ化硫黄を含有するマイクロバブルSV-25を用いる。細胞懸濁液をエッペンチューブに入れ、平坦なキャップ面を下にしてゲルを介してトランスデューサーを接触させて超音波照射を行う。細胞の生細胞率はMTT assayにて測定する。

### (3)培養細胞におけるホウ素濃度の測定

ホウ素濃度測定には、京都大学原子炉実験所における即発ガンマ線ホウ素濃度測定装置を用いる。中性子を試料に照射し、ホウ素、窒素との反応により生じるガンマ線の比からホウ素濃度を算出する。

### (4)培養細胞に対するBNCT

中性子源としては京都大学原子炉実験所の研究用原子炉KURから発生する熱中性子線を用いる。中性子フラックスは照射と同時に金線を用いて測定する。

### (5)ヌードマウス腫瘍の形成と超音波照射

4週齢の雌Balb/cヌードマウスの後足大腿部皮下にSAS細胞を接種し、腫瘍径が5mmに達したのち実験に使用する。50ppmに調整した $B_4C$ 球とマイクロバブルをリン酸緩衝液(PBS(-))に懸濁し、ヌードマウス腫瘍に投与する。その直後に、腫瘍直上の皮膚にゲルを介してトランスデューサーを接触させて超音波照射を行う。各種臓器を採取してテフロンチューブに移し、組織内ホウ素濃度の測定に使用する。

#### (6)ヌードマウス腫瘍に対するBNCT

$B_4C$ 球とマイクロバブルをPBS(-)に懸濁し、ヌードマウス腫瘍に投与し、超音波照射を行う。その後、腫瘍に対して20分間の中性子照射を行い、経時的に腫瘍体積を測定する。

#### (7) $B_4C$ 球の溶解

Purebright MB-37(PMB)は親水性の2-メタクロイルオキシホスホリルコリン(MPC)unitと疎水性のn-ブチルメタクリレート(BMA)unitからなる非刺激性、非毒性の溶媒で、疎水結合を介して難水溶性の薬剤を可溶化する。難水溶性の抗悪性腫瘍薬パクリタキセルに使用される。PMBを25mg/mlとなるようにPBS(-)に加え、70℃で溶解させる。次に $B_4C$ 球を0.1mg/mlとなるように加え、超音波10秒間を3回照射して懸濁液を調整し、70℃に加熱して溶解する。

### 4. 研究成果

#### (1)超音波照射による $B_4C$ 粒の細胞内移行

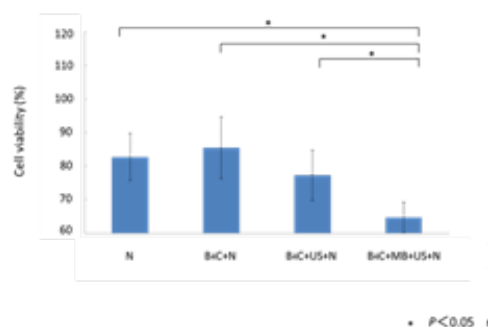
$B_4C$ 球の細胞内移行を知るため、SAS細胞に50ppmの濃度で $B_4C$ 球を添加したが、細胞内に取り込まれる像はみられなかった。そこで、周波数1MHz、出力0.5W/cm<sup>2</sup>、duty cycle 20%、照射時間10秒で超音波照射を行った。spin-xで遊離の $B_4C$ 球を除去したのち、位相差顕微鏡で観察したところ、細胞内で $B_4C$ 球の集積像がみられた。

SAS細胞の培養液に $B_4C$ 球を添加しマイク

ロバブルの存在下あるいは非存在下に超音波照射を行い、遊離の $B_4C$ 球を除去後に細胞内ホウ素濃度を測定したところ、 $B_4C$ 球のみの群では1.4ppm、 $B_4C$ + (超音波)US群は2.0ppm、 $B_4C$ +マイクロバブル(MB)+US群は4.4ppmであり、マイクロバブル存在下の超音波照射で対照の3.1倍にまで細胞内ホウ素濃度は上昇した。

#### (2) $B_4C$ 球使用BNCTが細胞増殖に及ぼす影響

$B_4C$ 球を含む培養液にSAS細胞を懸濁し、マイクロバブル存在下に超音波照射後、中性子を照射し、MTT assayを行った。中性子照射時に細胞外の $B_4C$ 球を除去していない実験では、 $B_4C$ 球を含有する場合、経時的に生細胞率は低下した。細胞外の $B_4C$ 粒の除去したのち中性子を照射する実験では、48時間後、中性子照射のみのN群で対照の82.8%、 $B_4C$ +中性子(N)群で85.5%、 $B_4C$ +US+N群と $B_4C$ +MB+US+N群で、それぞれ77.3%、64.8%まで低下した(図1)。 $B_4C$ +N群と超音波併用群の間で差があり、超音波照射で細胞に移行した $B_4C$ 球がホウ素化合物として働くことが示唆された。



〔図1  $B_4C$ 球使用BNCTが細胞生存率に及ぼす影響-48時間後-。N, neutron; US, ultrasound; MB, microbubble〕

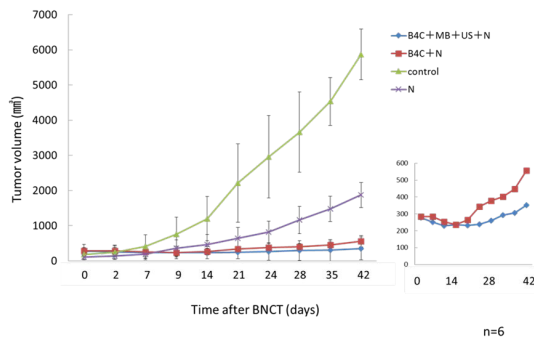
#### (3)腫瘍内ホウ素濃度

ヌードマウス腫瘍に $B_4C$ 球とマイクロバブルの混合液を投与し、さらに超音波照射を行った。超音波照射直後と24時間後に腫

瘍内ホウ素濃度を測定した結果、超音波照射直後での腫瘍内ホウ素濃度は、 $B_4C$  球単独群で 18.6 ppm であり、24 時間後には 12.7 ppm となった。 $B_4C$  球と超音波併用群では、超音波照射直後は 31.5 ppm であり、24 時間後は 29.1 ppm であった。超音波照射併用でホウ素濃度は上昇し、24 時間後も高いレベルを維持した。腫瘍局所に投与した  $B_4C$  球の全身的な分布を知るため、投与 24 時間後に肝臓、腎臓、脾臓のホウ素濃度を測定したが、ホウ素は検出されなかった。

#### (4) $B_4C$ 球使用 BNCT がヌードマウス腫瘍に及ぼす影響

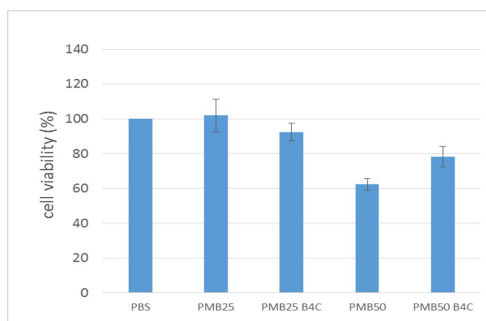
ヌードマウス腫瘍に  $B_4C$  球とマイクロバブルの懸濁液を投与、さらに超音波照射し、直後から中性子照射を行った。PBS 投与のみの対照群、中性子単独の N 群を含め、BNCT を行った実験群においても、動物の体重は実験群の間で差を認めなかった。PBS 投与の対照群では、腫瘍体積が経時的に増加した。N 群でも対照群と比較して、腫瘍増殖が抑制されたが、 $B_4C+N$  群、 $B_4C+MB+US+N$  群では、さらに腫瘍増殖が抑制された。BNCT 後 42 日目の腫瘍の体積は、非処理対照と比較して、N 群は 37.6%、 $B_4C$  球投与後に N 照射した群は 11.1%、 $B_4C$  球と MB を投与し、超音波照射、N 照射した群は 7.0% にまで低下した(図 2)。 $B_4C$  球を用いた BNCT によって腫瘍体積は減少し、中性子単独群との間で差を認めた。



〔図2  $B_4C$ 球を用いたBNCTが腫瘍体積に及ぼす影響。N, neutron〕

#### (5) PMB を用いた $B_4C$ 球の可溶化

$B_4C$  球は PBS(-) 中で、しだいに凝集する。凝集体のなかには  $\mu m$  に達するものもみられた。PMB 液で  $B_4C$  球を溶解すると、暗黒色で透明性の溶液となり、滅菌用フィルターで濾過して培養細胞に使用できた。PMB 液を 25 mg/ml の濃度で SAS の培養に用いても、細胞傷害性はみられなかった(図 3)。細胞への毒性が見られない PMB 濃度で  $B_4C$  球溶液を調整でき、ホウ素化合物を局所投与する BNCT に利用できると考えられた。



〔図 3 PMB が細胞増殖に及ぼす影響〕

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Yamamoto N, Masunaga S, Kato I, Iwai S, Nakazawa M, Ono K, Yura Y. Enhancing effect of ultrasound on boron concentrations in an oral squamous cell carcinoma cell line SAS for boron neutron capture therapy Journal of Oral Maxillofacial Surgery Medicine and Pathology 27: 487-492, 2015. 査読有。
2. Okunaga S, Takasu A, Meshii N, Imai T, Hamada M, Iwai S, Yura Y. Ultrasound as a method to enhance antitumor ability of oncolytic herpes simplex virus for head and neck cancer. Cancer Gene

- Therapy 22:163-188, 2015. 査読有 ,doi: 10.1038/cgt.2015.3.
3. Iwagami T, Ishikawa Y, Koshizaki N, Yamamoto N, Tanaka H, Masunaga S, Sakurai Y, Kato I, Iwai S, Suzuki M, Yura Y. Boron carbide particle as a boron compound for boron neutron capture therapy. Journal of Nuclear Medicine and Radiation Therapy 5:2, 2014. 査読有 , doi.org/10.4172/2155-9619.1000177
  4. Yamamoto N, Iwagami T, Kato I, Masunaga S, Sakurai Y, Iwai S, Nakazawa M, Ono K, Yura Y. Sonoporation as an enhancing method for born neutron capture therapy for squamous cell carcinomas. Radiation Oncology 8:280, 2013. 査読有 , doi: 10.1186/1748-717X-8-280.
  5. Yura Y, Fujita Y. Boron neutron capture therapy as a novel modality of radiotherapy for oral cancer: principle and antitumor effect. Oral Science International 10:9-14, 2013. 査読有 .

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 多田晋也、加藤逸郎、岩上隆紀、岸本聡子、岩井聡一、由良義明。ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)における組織注入型ホウ素化合物 B4C 粒の溶解性に関する検討。第 69 回日本口腔科学会学術集会、2015.5.14、大阪国際会議場、大阪市。
2. 多田晋也、加藤逸郎、岩上隆紀、高須彩子、榎井敦史、岩井聡一、由良義明。ホウ素中性子捕捉におけるホウ素化合物としての炭化ホウ素粒の検討。第 39 回日本頭頸部癌学会・第 4 回アジア頭頸部癌学会合同大会、2015.6.5、神戸国際会議場、神戸市。
3. 多田晋也、岩上隆紀、石川善恵、越崎直人、加藤逸郎、岩井聡一、田中浩基、櫻井良憲、増永慎一郎、鈴木実、小野公二、

由良義明。組織注入型ホウ素化合物 B4C 粒の溶解性に関する検討。平成 26 年度京都大学原子炉実験所専門研究会、2014.9.30、京都大学原子炉実験所事務棟大会議室、大阪府熊取町。

4. 岩上隆紀、石川善恵、越崎直人、山本直典、加藤逸郎、多田晋也、田中浩基、櫻井良憲、増永慎一郎、鈴木実、由良義明。炭化ホウ素粒のホウ素中性子捕捉療法への応用。第 11 回日本中性子捕捉療法学会学術大会、2014.7.6、大阪大学コンベンションセンター、吹田市。
5. 由良義明、藤田祐生、加藤逸郎、岩上隆紀、多田晋也、岩井聡一、中澤光博、増永慎一郎、櫻井良憲、小野公二、鈴木実。ホウ素中性子捕捉療法によるヒト口腔扁平上皮癌の細胞死形態に関する検討。第 11 回日本中性子捕捉療法学会学術大会、2014.7.6、大阪大学コンベンションセンター、吹田市。
6. 岩上隆紀、山本直典、加藤逸郎、多田晋也、岩井聡一、中澤光博、由良義明。ホウ素中性子捕捉療法に対する炭化ホウ素粒の応用に関する研究。第 38 回日本頭頸部癌学会、2014.6.13、東京ファッションタウンビルホール、東京都。
7. 岩上隆紀、山本直典、加藤逸郎、奥長秀介、竹下彰範、岩井聡一、中澤光博、由良義明。炭化ホウ素粒を用いたホウ素中性子捕捉療法に対するソノポレーションの効果。第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2013.10.11、福岡国際会議場、福岡市。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~surg2/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

由良 義明 (YURA YOSHIAKI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：00136277

### (2) 研究分担者

( 0 )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( 0 )

研究者番号：