The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	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
Author(s)	岩上, 隆紀
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34344
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　岩上隆紀　　）	
論文題名	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

論文内容の要旨

【目的】

ホウ素中性子捕捉療法（boron neutron capture therapy：BNCT）は、あらかじめホウ素化合物を腫瘍に取り込ませておき、熱中性子線をホウ素が捕捉して、4～9 μmと極めて飛程距離の短いLi反跳核とα粒子を発生させて腫瘍を破壊する放射線治療である。このBNCTで使用されているホウ素化合物がboronophenylalanine（BPA）、borocaptate（BSH）で、ホウ素原子をそれぞれ1個、12個含んでいる。これに対して、新規のホウ素化合物である炭化ホウ素(B_4C)粒は、B_4Cの集合体であり、ホウ素含有量の高いナノ粒子である。しかし、腫瘍細胞や腫瘍組織におけるホウ素化合物としての役割、投与経路や生体への影響といった点など多くの検討課題がある。

ソノポレーションは低出力の超音波を細胞に照射し、細胞膜に一過性の小孔を作成して、細胞外の物質を細胞内に導入する技術で、マイクロバブル存在下でその導入効率は格段に向上する。本研究では、ヒトロ腔扁平上皮癌に対するBNCTにおけるB_4C粒のホウ素化合物としての有用性、超音波照射の併用効果について検討を行った。

【材料及び方法】

1. 細胞として、ヒトロ腔扁平上皮癌細胞 SAS を使用した。細胞増殖能は 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrasodium bromide（MTT）assay にて測定した。腫瘍は SAS 細胞を雌 Balb/c ヌードマウスの下肢皮下に接種して作成した。B_4C 粒は、直径の平均は 200 nm の球状粒子で、ホウ素原子を 4×10^8 個含む。
2. 超音波遺伝子導入装置としてソニトロン 2000V、マイクロバブルとして SonoVue（5×10^8 個/ml ）を用いた。細胞懸濁液をマイクロチューブに入れ、蓋にゲルを介してトランスデューサーを密着させて 1 MHz、1 W/cm^2、20% duty cycle、10 秒間の超音波照射を行った。腫瘍に対しては、表面皮膚にゲルを介してトランスデューサーを密着させて、培養細胞と同じ条件で超音波照射を行った。
3. 培養細胞の懸濁液にホウ素濃度が 50 ppm になるように B_4C 粒を添加し、遊離の B_4C 粒を除去したのちチューブに移した。B_4C 粒を腫瘍内に注入したのち、腫瘍組織、肝臓、腎臓、脾臓を摘出し、京都大学原子炉実験所の即発γ線装置を用いて ^{10}B 濃度を測定した。
4. B_4C 粒を含む細胞懸濁液の入ったマイクロチューブの側面から、1 MW で運転中の京都大学原子力実験所の原子炉(KUR)より発生する熱中性子線を 40 分間照射した。その後、MTT assay で生細胞率を求めた。マウス腫瘍に対しては、50 ppm 濃度の B_4C 粒を腫瘍内に投与したのち 5 MW で運転中の KUR から発生する熱中性子線の照射を 20 分間行った。その後、腫瘍体積を経時的に測定した。
5. ヌードマウスより摘出した腫瘍はパラフィン切片を作成してヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色を行った。

【結果】

1. B_4C 粒を添加した細胞懸濁液に超音波照射を行い、遊離の B_4C 粒を除去したのち、位相差顕微鏡で観察したところ、細胞内に B_4C 粒が検出された。超音波照射を行わなかった細胞では検出されなかった。位相差顕微鏡にて観察された B_4C 粒を含む細胞の数の割合を算出したところ、B_4C 粒群では 1.3%、B_4C+MB+US 群では 42.3%であった。
2. B_4C 粒を添加した細胞懸濁液から遊離の B_4C 粒を除去し、細胞内ホウ素濃度を測定したところ、1.42 ppm であったが、B_4C 粒とマイクロバブルを添加し超音波を照射した場合は、4.45 ppm であった。
3. B_4C 粒を添加した細胞懸濁液に超音波照射を行い、B_4C 粒が存在する状態で中性子線を照射したのち MTT assay を行った。48 時間後の生細胞率は中性子線（N）単独群と比較して B_4C 粒を添加し超音波照射した B_4C+マイクロバブル(MB)+超音波(US)+N 群では、対照の 74%まで低下した。超音波照射を行わなかった B_4C+N 群と比較して明らかな差はなかった。次に超音波照射後に遊離の B_4C 粒を除去し、B_4C 粒が存在しない状態で中性子線照射を行った B_4C+MB+US+N 群では、生細胞数は対照の 65%まで低下し、N 群との間で有意差を認めた。
4. ヌードマウス腫瘍に B_4C 粒を投与して、腫瘍内濃度を測定したところ、18.57 ppm であり、24 時間後には 12.71 ppm となった。B_4C 粒とマイクロバブルを投与し超音波照射した群では 31.48 ppm であり、24 時間後は 29.12 ppm であった。24 時間後の肝臓、腎臓、脾臓におけるホウ素は検出されなかった。
5. ヌードマウス腫瘍に対して、B_4C 粒を投与して中性子線照射を行い、腫瘍体積を経時的に測定した結果、42 日目の腫瘍の体積は、非処理対照と比較して、N 群は 38%、B_4C 粒投与後に N 照射した B_4C+N 群は 11%、B_4C+MB+US+N 群では 7%にまで低下した。いずれの実験群でも体重の減少は認めなかった。
6. B_4C 粒投与後、BNCT を行い、摘出した腫瘍組織の H-E 染色像を観察したところ、48 時間後では、B_4C 粒は腫瘍内で分散しており、壊死巣の周辺で黒色を呈した B_4C 粒の集簇像がみられた。

【考　察】

B_4C 粒は BPA のように膜のアミノ酸トランスポーターを使った能動的な取り込みは期待できない。しかし、含有するホウ素原子が多いことから、少量の B_4C 粒が作用しても BNCT の効果につながる可能性がある。この効果はホウ素化合物が細胞内に取り込まれ核に近接するほど高くなると推察される。マイクロバブル存在下で超音波照射を行うと細胞内に B_4C 粒が観察され、全細胞に対する B_4C 粒を取り込んだ細胞の割合も上昇した。さらに、B_4C 粒を加えてすぐに洗浄した細胞ではほとんどホウ素が検出されなかったが、超音波照射群ではホウ素濃度が上昇しており、超音波照射によって B_4C 粒の細胞内移行は促進されると考えられた。まず培養液中に B_4C 粒を存在させた状態で培養細胞に対する BNCT を行ったところ、細胞増殖は抑制され、B_4C 粒が BNCT のホウ素化合物としての役割を果たすことが分かった。超音波照射の有無で大きな差はなかったことから、細胞外の B_4C 粒が重要と考えられた。これに対して、超音波照射後に遊離の B_4C 粒を除去し中性子線照射したものでは、中性子線照射単独群と比較して超音波照射併用群で生細胞数は低下し、細胞内に取り込まれた B_4C 粒がホウ素化合物としての役割を果たすことが確認された。

動物実験で腫瘍局所に B_4C 粒を投与した場合も、超音波照射で組織内ホウ素濃度の上昇傾向がみられた。腫瘍体積は B_4C 粒を投与した群では、対照やＮ群と比較して、早期から腫瘍体積の増加は抑制され、B_4C 粒はホウ素化合物として働き抗腫瘍効果を発揮した。超音波照射群で最も抑制されたが、超音波照射の有無で有意差はなく、腫瘍内に注入した B_4C 粒は、細胞内に取り込まれない状態でもホウ素化合物として BNCT に貢献するものと考えられた。近年、BNCT に用いる中性子線を発生する加速器の開発が進んでおり、将来は複数回の照射が容易になると期待できる。超音波照射併用群で 24 時間後でも高い腫瘍内ホウ素濃度が維持されていることから、超音波照射の併用は複数回のＮ照射に適している可能性がある。

以上より、B_4C粒は口腔扁平上皮癌細胞に対するBNCTにおいてホウ素化合物としての役割を果たすことが明らかとなった。超音波照射によるソノポレーションはB_4C粒を細胞内に導入するために有効な手段であることが示唆された。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　岩上　隆紀　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　大阪大学教授	由良　義明
	副 査　大阪大学教授	古川　惣平
	副 査　大阪大学准教授	舘村　卓
	副 査　大阪大学講師	石濱　孝二

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒトロ腔扁平上皮癌に対するホウ素中性子捕捉療法における B_4C 粒のホウ素化合物としての有用性ついて、B_4C 粒単独あるいは超音波照射との併用で検討を行ったものである。

その結果、細胞培養系ならびにヌードマウス腫瘍において、B_4C 粒を用いたホウ素中性子捕捉療法による細胞傷害性が明らかとなった。超音波照射は、B_4C 粒の細胞内移行を促進する効果を示した。

以上の研究成果は、ホウ素中性子捕捉療法の発展につながるものであり、本研究は博士(歯学)の学位授与に値するものと認める。