The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト口腔扁平上皮癌におけるホウ素中性子捕捉療法に対するソノポレーション併用効果に関する研究
Author(s)	山本, 直典
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58455
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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

【12】

氏　　名	山　本　直　典（やま もと なお ふみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２４４６９　号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学　位　論　文　名	ヒトロ腔扁平上皮癌におけるホウ素中性子捕捉療法に対するソノポレーション併用効果に関する研究
論文審査委員	（主査） 教　授　由良　義明 （副査） 教　授　古川　惣平　　講　師　前田　隆史　　講　師　佐伯万騎男

論文内容の要旨

【背景】ホウ素中性子捕捉療法（boron neutron capture therapy : BNCT）はあらかじめ腫瘍にホウ素を取り込ませ，ホウ素が中性子線を捕捉することで高い線エネルギーを有するα粒子と^{7}Li反跳粒子を発生させて，腫瘍を破壊する治療法である。発生した荷電粒子の飛程距離は短いため，ホウ素を取り込んだ腫瘍に選択的とされている。BNCT では，腫瘍組織のホウ素濃度を高めることが重要である。ソノポレーションは超音波を照射し細胞膜に一過性の小孔を形成して，細胞外物質を細胞内に導入する技法である。ソノポレーションでは，マイクロバブル存在下で導入効率が格段に向上する。本研究では，ヒトロ腔扁平上皮癌細胞に対して，マイクロバブル存在下あるいは非存在下のソノポレーションが，ホウ素化合物の細胞内取り込みを介して，BNCT に影響を及ぼすか否かについて検討した。

【材料と方法】

1. ホウ素化合物として boronophenylalanine(BPA)，borocaptate sodium(BSH)を，細胞はヒト扁平上皮癌細胞 SAS を使用した。ホウ素濃度 50 ppm の BPA あるいは BSH を含む培養液を用いて細胞懸濁を 37℃で旋回培養した。細胞を 0.95 モル硝酸で融解し，高周波誘導結合質量分析装置（ICP-MS）を用いて細胞内ホウ素濃度を測定した。
2. 超音波照射装置はソニトロン 2000V，マイクロバブルは SV-25 を用いた。BPA あるいは BSH と培養した SAS 細胞に対してマイクロバブル存在下と非存在下に超音波照射を行った。照射条件は 1 MHz，0.5 W，duty cycle 20%，照射時間を 10 秒とした。
3. 中性子照射は出力 1 MW で運転中の研究用原子炉から発生する熱中性子線を用いた。

BPA あるいは BSH と培養した SAS 細胞に対してマイクロバブル存在下で超音波照射を行い，その後に中性子線照射を行った。
4. BNCT を行った細胞に経時的に 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrasodium bromide(MTT)を加えたのち可溶化して 570 nm で吸光度を測定した。BNCT を行った細胞をプレートに播種し，7 日間培養してエタノール固定後クリスタルバイオレットで染色し，コロニーをカウントした。
5. ヌードマウスの皮下に SAS 細胞を接種し，腫瘍を形成した。ヌードマウス腫瘍におけるホウ素濃度測定に際しては，250 mg/kg の BPA あるいは 75 mg/kg の BSH を腹腔内に投与した。2 時間後にマイクロバブルを腫瘍内に注射し，腫瘍に対して超音波照射を行った。腫瘍サンプルを調製して，ホウ素濃度を測定した。BNCT 後のヌードマウスより腫瘍組織を採取し組織切片を作成して H-E 染色を施した。
6. 有差検定は Tukey の多重比較，生存期間は Kaplan-Meier 法にて有意差 0.05 で検定を行った。

【結果】
1. SAS 細胞内のホウ素濃度を測定したところ，BPA ではホウ素濃度は上昇し，2 時間後に 14.64 ppm となった。3 時間後でも同等のレベルを維持した。BSH では培養による明らかなホウ素濃度の上昇はみられなかった
2. BPA と培養後マイクロバブル存在下で超音波照射した群で細胞内ホウ素濃度が 27.89 ppm まで上昇した。超音波単独群では，ホウ素濃度の上昇はみられなかった。BSH でもマイクロバブル存在下に超音波照射した群では，細胞内ホウ素濃度は上昇した。
3. MTT assay を行ったところ，BPA と培養後にソノポレーションを併用して中性子線照射を行った BPA＋S+N 群では 48 時間に対照の 57.9%となった。BSH にソノポレーションを併用して中性線を照射した群は，対照の 70.2%であった。コロニー形成法でも， BPA+S+N 群で最も低下した。
4. 坦癌ヌードマウスに BPA あるいは BSH を腹腔内投与し，2 時間後にマイクロバブルを併用したソノポレーションを行ってホウ素濃度を測定した。得られたホウ素濃度値をもとに，2 時間の中性子線照射を行った場合の物理線量を計算したところ，BPA あるいは BSH のいずれの場合も，ソノポレーションを行った方が物理線量は上昇した。
5. PBS 投与のみの対照群の腫瘍体積は経時的に増加したが，ソノポレーションを併用した BPA+S+N 群では腫瘍は縮小し，照射 18 日後には肉眼的に腫瘍を認めない動物もみられた。平均生存日数は対照群 40.1 日であったが，BPA+S+N 群では，111.5 日にまで延長した。対照となる PBS 投与腫瘍の組織像を観察すると，腫瘍細胞の緊密な増殖がみられたが，BPA+S+N 群では空胞変性が出現し，核は大きさの不均一化や断裂化を顕著に認めた。

【考察及び結論】
培養 SAS 細胞においてマイクロバブル存在下で超音波照射を行うと BPA, BSH 共に細胞内ホウ素濃度は上昇し，マイクロバブル存在下のソノポレーションで細胞増殖ならびにコロニー形成も抑制されることが分かった。ヌードマウス腫瘍でもソノポレーションを併用すると腫瘍体積は減少し，動物の生存率は延長することから，ソノポレーションは細胞分裂停止期にある細胞に対しても BPA の取り込みを促進し，BNCT の物理線量を増加させると考えられる。
以上より，ヒトロ腔扁平上皮癌細胞に対して細胞内ならびに腫瘍内のホウ素濃度を上昇させるマイクロバブル存在下のソノポレーションは，BPA を用いた BNCT の治療効果を増強するうえで有用な方法と考えられる。

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の治療効果を向上させるために、音響穿孔法（ソノポレーション）の影響を検討したものである。その結果、マイクロバブル存在下のソノポレーションは boronophenylalanine を用いたホウ素中性子捕捉療法において、腫瘍内のホウ素濃度を上昇させ、ヌードマウス腫瘍を縮小し、マウスの生存日数を延長することが示された。

以上の結果は、ホウ素中性子捕捉療法を発展させる上で重要な知見を与えるものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。