

液中レーザー溶解法により合成された炭化ホウ素粒子のホウ素中性子捕捉療法への応用

鈴木 実

京都大学原子炉実験所・粒子線腫瘍学研究分野

## はじめに

がん治療は、ロボット工学を駆使した手術、新たな抗がん剤の開発、最先端な放射線治療、癌ワクチンをはじめとする免疫療法など着実に進歩している。しかし、その一方で3人に1人は癌により死亡しているという現実がある。最先端の癌治療の成果が喧伝される一方で、癌の再発に苦しんでいる患者が多数存在するという現実がある。このことが社会問題として取り上げられたのが、「がん難民」の問題である。その背景は複雑であるが、医師からこれ以上有効な治療方法がないと告げられたときに、さらなる新しい治療方法を求めて、複数の医療施設を渡り歩くという癌患者の存在が問題となっている。

がん難民に対する抜本的対策の1つが、患者に有効な新たな治療方法を提示することである。我々、京都大学原子炉実験所附属粒子線腫瘍学研究センターが、取り組んでいるのがホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy, 以下 BNCT) という原子炉から取り出される中性子を利用した放射線治療である。この治療の特長は癌細胞選択的重粒子線治療である。近年の放射線治療の進歩はめざましく、サイバーナイフ、粒子線治療、強度変調放射線治療 (IMRT) など、マスコミに取り上げられることも多い。これらの放射線治療は、CT や MRI といった医用画像で描出された腫瘍の形状にあわせて、放射線を集中して照射し、周りの正常な組織や臓器へできる限り放射線を当てないようにすることを可能にする領域選択的放射線治療である。しかし、皮膚直下にある腫瘍、消化管に接している腫瘍に対しては、腫瘍と接する正常組織は等量の放射線が照射されてしまう。そのため、放射線治療後の再発腫瘍に対しては、腫瘍と接する正常組織が過線量となり、最先端の放射線治療においても対応困難である。

BNCT においては、がん細胞選択的重粒子線治療であることから、放射線治療後の再発腫瘍に対しても原則対応可能である。現在まで 500 例近い治療実績があるが、約 8 割近くは、放射線治療後の再発腫瘍である。がん難民の患者の多くは、既に標準治療をうけており標準治療に放射線治療が含まれている場合、放射線治療は追加実施できないことが多い。その観点から、BNCT は、がん難民の多くの患者に、新たな治療法として提示できる可能性がある。

本研究は、新規ホウ素化合物の基礎研究である。BNCT の成功の鍵は、いかにして高い選択性をもって、かつ高濃度にホウ素薬剤を腫瘍あるいは腫瘍細胞に集積させるかである。そのため新規ホウ素薬剤の開発研究は、今後の BNCT の発展にきわめて重要である。本研

究では、液晶レーザー照射法で合成された炭化ホウ素ナノ粒子が新規ホウ素化合物として応用可能か否かを検討した。このナノ粒子の合成に使用した液相レーザー照射法とは、液相中の粉体または基板状ターゲットにレーザー光を照射することによってナノ粒子を合成する手法であり、高価な真空装置や大量の化学薬品が不要であることから一般的なナノ粒子合成方法と比較して簡便な手法である<sup>1)</sup>。さらに、レーザー照射条件によっては一般的な手法では実現が困難な瞬間的な高温・高圧の特殊な反応場を生み出すことが可能であり、新しいナノ材料創製が期待されている。

## 背景

### 1. ホウ素中性子捕捉療法の原理

硼素(Boron, B)の安定同位体である<sup>10</sup>B (天然存在比: 19.9%) は、エネルギーの低い中性子である熱中性子 (<0.5 eV) を捕獲する確率 (中性子捕獲断面積) が非常に大きい。熱中性子を捕獲した<sup>10</sup>B は、ヘリウム原子核 (α 粒子) と反跳リチウム原子核に分裂する。この反応を中性子捕獲反応という (図 1)。

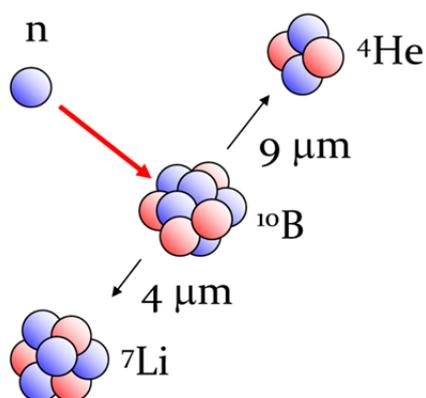


図 1 硼素中性子捕捉反応

硼素原子は、エネルギーの低い熱中性子(n)を取り込んだ後、直ちに、ヘリウム原子核(<sup>4</sup>He、飛程:9μm)とリチウム原子核(<sup>7</sup>Li、飛程4μm)に分裂する。

中性子捕獲反応は、下記の式であらわされる。



この反応によって生じるヘリウム原子核、リチウム原子核は、分裂後それぞれ 9 μm、4 μm と細胞 1 個の大きさ以下の距離 (飛程) を動き停止し、その間に全運動エネルギーを放出する high-linear energy transfer (高 LET) 放射線であり、殺細胞効果が大きい<sup>2)</sup>。

ホウ素中性子捕獲反応を、癌治療に応用したのが BNCT である。あらかじめ、腫瘍に集

まりやすい性質を有するホウ素化合物を患者に投与し、その後に中性子を患部に照射する。その結果として引き起こされる中性子捕獲反応により放出される high-LET 放射線であるヘリウム原子核、リチウム原子核の飛程は、癌細胞の大きさを超えないため癌細胞周囲の正常組織への損傷を与えずに、癌細胞のみが死滅する（図2）。

## Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)

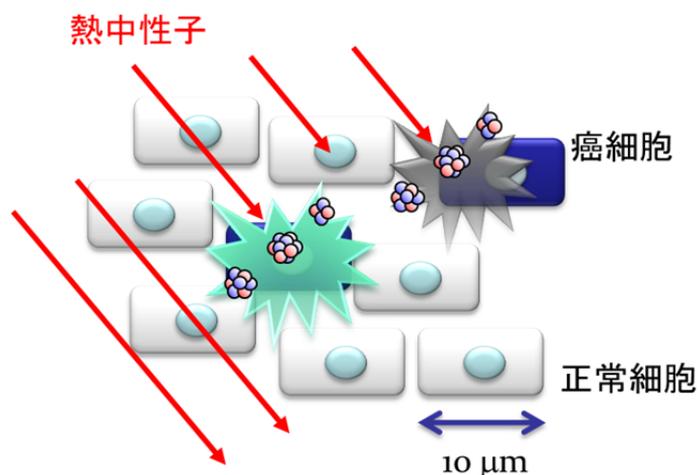


図2 硼素中性子捕捉療法 (BNCT) の原理

硼素原子を癌細胞に選択的に取り込ませた後に、熱中性子線を照射すると癌細胞の部位でのみ硼素中性子捕捉反応がおこり、癌細胞のみが死滅する。熱中性子線はエネルギーが低く、硼素を取り込んでいない正常細胞には致命的な損傷を与えない。

## 2. 炭化ホウ素ナノ粒子の Drug delivery system

BNCT の照射効果をより増強させるためには、ホウ素薬剤を高濃度にかつ腫瘍選択的に集積させることが必要であり、通常の全身点滴投与以外のホウ素薬剤の Drug delivery system (DDS) に関しての基礎、臨床研究も精力的に進められている。本基礎研究では、炭化ホウ素ナノ粒子のターゲットとして、膀胱上皮内癌と頭頸部腫瘍を想定して基礎研究を進めた。

膀胱上皮内癌は、筋層浸潤をせずに粘膜表面に広がっていく腫瘍であり、上皮内がんではあるが、悪性度が高い腫瘍である。標準治療は Bacille de Calmette et Guérin (BCG) ワクチンの膀胱内投与療法であるが、再発率が高く、再発腫瘍は筋層浸潤を伴う進行膀胱癌になるリスクが高いといわれている。本腫瘍に対して炭化ホウ素ナノ粒子を膀胱内投与することにより、粘膜表面の腫瘍細胞に直接、炭化ホウ素ナノ粒子が暴露されることにより細胞表面に接着することが期待される。

また、頭頸部癌に対しては、炭化ホウ素ナノ粒子を動脈内投与し、さらに超音波衝撃波を与えることにより腫瘍細胞内に炭化ホウ素ナノ粒子を取り込ませるソノポレーションを応用する治療法を想定して基礎研究を進めた。

## 研究方法

### 1. 膀胱上皮内がん想定 of 基礎研究 (膀胱内直接投与法を想定して)

#### 1-1. 腫瘍細胞

HeLa 細胞を使用した。96 穴マイクロプレートに中性子照射前日に 10,000 個/well 巻き込んだ。

#### 1-2. 中性子照射

中性子照射は、京都大学原子炉実験所研究炉 (Kyoto University Reactor: KUR) の重水照射設備にて、熱中性子ビームを 20 分間照射した。

#### 1-3. 処置群

処置を以下の 5 群にわけて実験を実施した。

1. 非処置群 (対照群)
2. 炭化ホウ素ナノ粒子暴露群 (薬剤単独処置対照群)
3. 中性子照射群 (中性子照射単独処置対照群)
4. 炭化ホウ素ナノ粒子 (no wash) + 中性子照射群
5. 炭化ホウ素ナノ粒子 (wash) + 中性子照射群

5 群は、臨床応用を考えた際に膀胱を洗浄して照射することを考えて設定した。

#### 1-4. 細胞生存アッセイ

照射後の各処置群における細胞増殖能は WST-1 アッセイを用いて検討した。

### 2. 頭頸部腫瘍の基礎研究 (動注+ソノポレーションを想定)

#### 2-1. 腫瘍細胞

ヒト舌がん細胞の Cell line である SAS 細胞を使用した。

#### 2-2. 中性子照射

中性子照射は、KUR の重水照射設備にて、熱中性子ビームを照射した。

#### 2-3. ソノポレーション

ソノポレーションは、その効果と効率を高めるマイクロバブル剤の併用の有無による効果の差異も検討項目とした。

#### 2-4. 処置群

処置を以下の 4 群にわけて実験を実施した。

1. 中性子照射群
2. 炭化ホウ素ナノ粒子+ 中性子照射群
3. 炭化ホウ素ナノ粒子+ソノポレーション (マイクロバブルなし) + 中性子照射群
4. 炭化ホウ素ナノ粒子+ソノポレーション (マイクロバブルあり) + 中性子照射群

4 の群では、炭化ホウ素ナノ粒子を含む細胞浮遊液をフレッシュな PBS に置換した後に照射を実施した

#### 2-5. 細胞生存アッセイ

照射後の各処置群における細胞増殖能は MTT アッセイを用いて検討した。

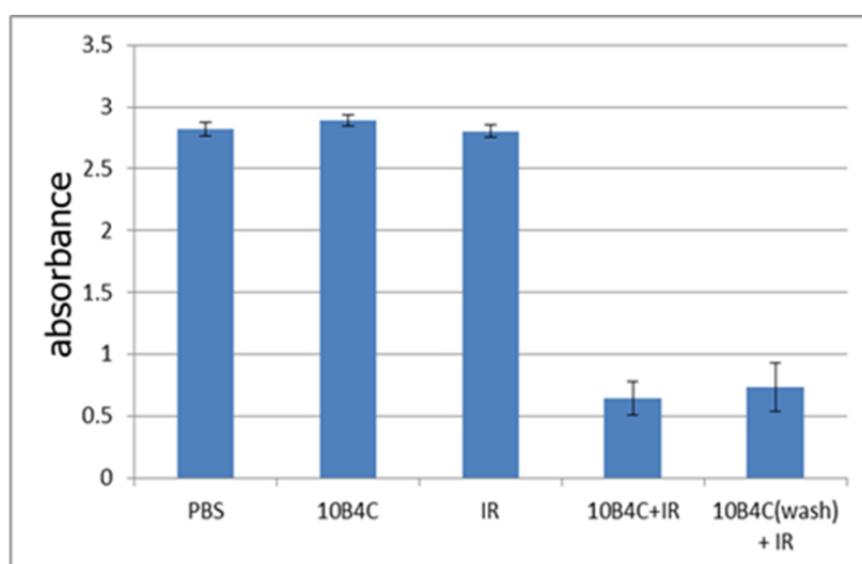
## 結果

### 1. 膀胱上皮内がん想定 of 基礎研究

各処置群の WST-1 アッセイの結果を図 3 に示す。炭化ホウ素ナノ粒子暴露群(10B4C)、中性子照射群(IR) は非処置群(PBS) と同程度の細胞増殖を示した。一方炭化ホウ素ナノ粒子+中性子照射群(10B4C+IR, 10B4C(wash)+IR) は、照射前に細胞を洗浄する処置の有無にかかわらず、同程度の強い殺細胞効果、細胞増殖の抑制効果を示した。

細胞を洗浄することにより細胞表面に付着した炭化ホウ素ナノ粒子の多くは除去されていたが、顕微鏡下で少量の粒子の細胞表面の付着があり、少量の炭化ホウ素ナノ粒子による強い殺細胞効果の結果が想定された。

図3

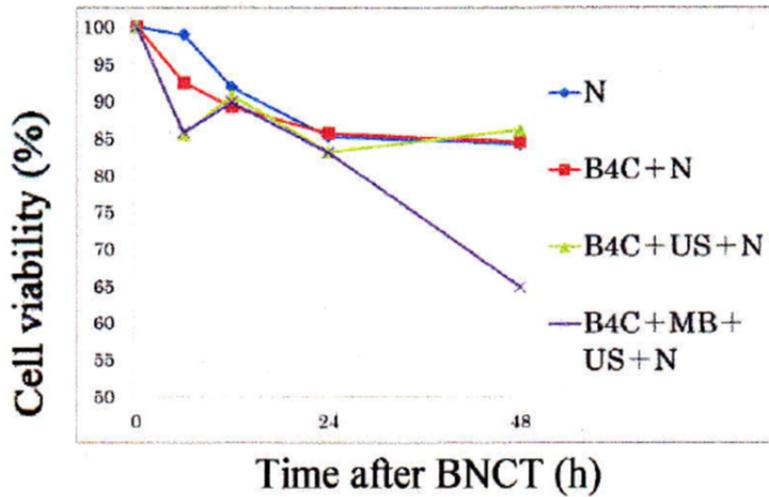


### 2. 頭頸部腫瘍の基礎研究

各処置群の生存率を時間経過で示す。(図 4)

マイクロバブル存在下でソノポレーション実施した BNCT 群のみが、対照群と比較して生存率の低下を認めた。

図4



### 考察

炭化ホウ素ナノ粒子は、1個の粒子に対象のホウ素原子を含むというユニークな特徴を有している。しかし、最初に示したようにホウ素原子核と熱中性子が反応して生じる重粒子であるヘリウム原子核とリチウムの原子核の飛程は  $10 \mu\text{m}$  以下であることから、その重粒子が殺細胞効果をもたらすためには、炭化ホウ素ナノ粒子が腫瘍内あるいは腫瘍に付着した位置にあることが重要である。

そのため、膀胱上皮内癌を想定した実験では、膀胱粘膜に露出した癌細胞を対象とすることから、膀胱内に直接、炭化ホウ素ナノ粒子を注入することを想定して、マイクロプレートに癌細胞が接着した状態で、炭化ホウ素ナノ粒子を暴露させた。炭化ホウ素ナノ粒子は、曝露時間中に沈降していくことから、細胞表面へ炭化ホウ素ナノ粒子が高濃度で接着することが確認された。本実験の結果では、照射直前に細胞を洗浄した結果でも強い細胞増殖抑制を示した。この結果は、1個の炭化ホウ素ナノ粒子に大量のホウ素原子を含むことから、1個の細胞あたり少量の炭化ホウ素ナノ粒子の付着でも強い殺細胞効果を示す可能性が示唆された。

また、頭頸部癌に対する BNCT を想定した基礎実験では、マイクロバブル存在下でソノポレーション実施することにより、細胞内に炭化ホウ素ナノ粒子が取り込まれることが、殺細胞効果に重要であることが示された。

今回使用した炭化ホウ素ナノ粒子自体には、腫瘍細胞をターゲティングする付加的な操作は加えていない。膀胱上皮内癌においては、癌以外の正常膀胱粘膜表面には glycosaminoglycan (GAG) 層が存在することから、炭化ホウ素ナノ粒子の正常膀胱粘膜細胞への付着が阻害される可能性がある。そのことにより、炭化ホウ素ナノ粒子の癌細胞選択的分布が得られる可能性がある。また、頭頸部腫瘍に対するソノポレーションを応用した BNCT では、超選択的に腫瘍への栄養動脈に留置したカテーテルから投与することにより、頭頸部腫瘍にできる限り選択的に炭化ホウ素ナノ粒子を到達させ、さらにソノポレーション

実施により、殺細胞効果を高める方法が臨床的には実施可能と考えられる。

現在、京都大学原子炉実験所では、住友重機械工業と共同開発したサイクロトロン加速器を中性子源とした BNCT 照射システムとホウ素薬剤の薬事承認をめざした治験が 2012 年 10 月から再発悪性脳腫瘍を対象疾患として開始されている。この照射システムは、非常にコンパクトであることから既存の病院に併設可能である。加速器 BNCT 照射システムの普及を考えると、より多くの癌患者に対しての BNCT の実施が可能となる。そのことから、現在薬事承認を目指しているホウ素薬剤以外にも、癌の存在部位、あるいは癌固有の生物学的特徴をターゲットとする新規ホウ素薬剤の開発が重要であり、本研究の炭化ホウ素ナノ粒子もそのユニークな特徴から有望な化合物と考えられ、基礎研究をさらに進めていく予定である。

## 謝辞

本研究は、中山科学振興財団の平成 24 年度研究助成を得て行われました。ここに心より御礼申し上げます。また、本研究の共同研究者である炭化ホウ素ナノ粒子の合成を担当いただいた北海道大学工学部、越崎直人先生、産業技術科学総合研究所、石川善恵先生、頭頸部腫瘍の実験を担当いただいた大阪大学歯学部、岩上隆紀先生に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Ishikawa Y, Shimizu Y, Sasaki T, Koshizaki N. Boron carbide spherical particles encapsulated in graphite prepared by pulsed laser irradiation of boron in liquid medium. *Applied Physics Letters* 91. 161110 (2007)
2. 鈴木 実、菓子野元郎、木梨友子、他. 硼素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) の現状と将来展望 -癌細胞選択照射がもたらす Whole Organ Radiotherapy の可能性- 映像情報 Medical 39;1126-1135 (2007)