

[H27-3]

## 細胞、組織におけるホウ素元素分布測定の中性子捕捉療法への応用

### Boron analysis and imaging of cells and tissues by using Micro-Particle Induced X/Gamma-ray Emission

中井啓<sup>#A,B)</sup>, 遠藤圭汰<sup>B)</sup>, 栗田正<sup>B)</sup>, 吉田文代<sup>B)</sup>, 松村明<sup>B)</sup>, 山田尚人<sup>C)</sup>, 江夏昌志<sup>D)</sup>, 佐藤隆博<sup>C)</sup>  
Kei Nakai<sup>#A,B)</sup>, Keita Endo<sup>B)</sup>, Fumiyo Yoshida<sup>B)</sup>, Akira Matsumura<sup>B)</sup>, Naoto Yamada<sup>C)</sup>, Masashi Koka<sup>C)</sup>, Takahiro Satoh<sup>C)</sup>

<sup>A)</sup> Department of Neuro-rehabilitation, Ibaraki prefectural University hospital

<sup>B)</sup> Department of neurosurgery, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

<sup>C)</sup> Takasaki Advanced Radiation Research Institute, National Institutes of Quantum and Radiological Science and Technology

<sup>D)</sup> Beam Operation Co., Ltd.

#### Abstract

Boron Neutron Capture Therapy has been a particle radiotherapy and developed for treatment of malignancies. Boron existence and thermal neutron penetration into the target tissues are required. In this study, we used micro ion beam particle induced gamma-ray emission (PIGE) to confirm the boron distribution of immediate phase in vitro.

U251 human glioma cell line was used. p-boronophenylalanine (BPA) and fructose were dissolved as previously described. 160 and 800 $\mu$ g/10B/mL BPA dissolved in culture medium were prepared. Micro particle-induced X-ray emission (PIXE) and micro particle-induced gamma-ray emission (PIGE) analysis was performed at Takasaki Ion Accelerators for Advanced Radiation Application (TIARA, Takasaki, Japan). The freeze-dried cellular samples were mounted and took elements (Potassium, Phosphate and Boron) distribution images and whole spectrum.

The ratio of boron counts to total (%) was control group:  $1.35 \pm 0.073\%$ , 2hr boron exposure group:  $2.33 \pm 0.35\%$ , boron exposure and wash group:  $1.58 \pm 0.095\%$ . boron distribution image of boron exposure group was matched up with cellular element (P,S,K), but distribution image of boron exposure and wash group became invisible boron.

**Keyword:** micro-beam PIXE PIGE boron BNCT

#### 1. はじめに

Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)は組織内で発生するアルファ線を利用した悪性腫瘍に対する粒子線治療であり、同位元素ホウ素 10 がもつ高い中性子反応断面積を用いる。理論上、ホウ素が存在する領域に限局的に粒子線を生じることができるため、細胞内外や、腫瘍・正常組織のホウ素存在比が問題となる。

患者に投与されたホウ素動態を知ることは、照射線量や治療時間を決定する上で非常に重要であり、中性子照射の際の放射線生物学的効果に影響を及ぼす。

ホウ素濃度測定には、誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP-AES)を用いることが一般的であるが、原子炉を用いた BNCT では、即発ガンマ線分析も簡便であり、用いられていた。二次元画像やホウ素の分布を見る手法としてはアルファトラッキングや、抗体を用いた方法、二次イオン質量分析法などが知られているが、いずれも臨床照射の最中に結果を得て線量決定に用いられるものではない。

本研究では、Micro-Particle Induced X-ray Emission (粒子励起 X 線放出: PIXE) / Particle Induced Gamma-ray Emission (PIGE)を用いて、細胞におけるホウ素原子の分布を確認する。

#### 2. 対象と方法

培養細胞におけるホウ素分布を Micro-PIXE/PIGE を用いて測定し、プラズマ発光分析 (ICP-AES) によって測定したホウ素濃度と合わせて検討する。

培養細胞はヒトグリオーマ細胞の U251 を使用した。U251 は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、10% Fetal Bovine Serum (FBS)、Penicillin-Streptomycin、5% CO<sub>2</sub>、温度 37°C、湿度 95%の条件下で維持培養した。あらかじめ培養した U251 をトリプシン処理し、細胞懸濁液とした。1000rpm、5 分間室温で遠心し、上清を吸引して培地で再懸濁した。1 穴あたり 10000 cells を播種し、300  $\mu$ L の培地を入れ、48 時間培養した。

ホウ素化合物として p-boronophenylalanine (BPA) (Interpharma Praha,a.s., Czech Republic)を BPA フルクトース錯体溶液 (f-BPA)として使用した。BPA は水溶性が低く、フルクトース錯体として水に溶解する方法が知られている。f-BPA の作成法は以下の通りである。蒸留水 149.8 mL、1 M NaOH 27.7 mL、フルクトース 11.1 g、BPA 5g を加熱攪拌溶解し、その後、1 M HCl を少量ずつ滴下し、pH7.2 に調整した。

試料固定用の polycarbonate 膜上に細胞付着させるコーティング剤として Poly-L-Lysine Hydrobromide (PLL) (SIGMA-ALDRICH)を使用した。厚さ 5 mm のアクリル板に直径 10 mm の穴を開け、試料固定用の 5  $\mu$ m

[27-03]

厚のポリカーボネート膜を貼付した。膜上で細胞を付着培養させるため、Poly-L-Lysine Hydrobromide(PLL)を 300  $\mu$ L 添加して 5 分間静置し、膜をコーティングした。5 分後、PLL を吸引除去し、同量の蒸留水により 2 回洗浄を行い、紫外線光下で 2 時間乾燥した。

培地を除去し、ホウ素濃度 160、800  $\mu$ g/mL のホウ素化合物(f-BPA)を含む培地と交換し、2 時間静置した。コントロールはホウ素が含まれていない培地を用いた。2 時間後、吸引除去した後にそのまま凍結乾燥したものと、リン酸緩衝液(PBS)で 2 回洗浄した後に凍結乾燥したものを用意した。専用のサンプルホルダーに膜を貼り付けてサンプルとした。

PIXE/PIGE は高崎量子応用研究所(量子科学技術研究開発機構)のシングルエンド加速器を用いた Micro-PIXE/PIGE 装置で計測を行った。同所より提供されている解析ソフト PIXEana を用いてスペクトラムの取得、各元素の二次元分布の画像化を行った。

ICP-AES は、あらかじめ希硝酸(10% HNO<sub>3</sub>)、濃硝酸を用いて湿性灰化したサンプルを筑波大学分析センターにおいて装置(ICP-8100、株式会社島津製作所)を用いてホウ素濃度を測定した。検量線用試料も併せて測定し、検量線を作成した。

### 3. 結果

Micro-PIXE/PIGE 同時測定が可能であり、リン、カリウムの分布が多い部分に細胞が位置していることが確認された<sup>[1][2]</sup>。

Figure 1 に、細胞に添加した f-BPA の濃度ごとに Micro-PIXE/PIGE 測定で得られた二次元分布図の一例を示す。いずれも f-BPA を含む培地を除去後、洗浄を行っていないサンプルである。視覚評価で添加したホウ素濃度が高いサンプルでホウ素カウントが上昇していることが確認され、800  $\mu$ gB/mL の高濃度 f-BPA を添加したサンプルでは、リンとカリウムの分布が示す細胞領域内にホウ素も多く分布していることが確認された(Figure 1 (C))。

Figure 2 には、f-BPA を含む培地を除去後、洗浄をしていないサンプルと PBS によって 2 回洗浄したサンプルの二次元分布図の一例を示す。いずれも添加した f-BPA 濃度は 800  $\mu$ gB/mL である。

PIGE によって得たホウ素のカウント数の割合を求めた。コントロール群では、ホウ素カウントの割合が  $1.35 \pm 0.073\%$  であった。洗浄なし群では、 $2.33 \pm 0.35\%$ 、PBS 洗浄群では、 $1.58 \pm 0.095\%$  であり、洗浄なし群は PBS 洗浄群と比べて 1.47 倍を示した。

ICP-AES を用いて Micro-PIXE/PIGE と同じ条件で測定した結果を Figure 3 に示す。ホウ素化合物を添加していないコントロールではホウ素は検出されなかった。洗浄なし群では、ホウ素濃度は  $22.12 \pm 1.78 \mu\text{g}/10^7 \text{cells}$ 、PBS 洗浄群では、 $3.90 \pm 0.43 \mu\text{g}/10^7 \text{cells}$  であり、洗浄なし群は PBS 洗浄群と比べて 5.67 倍高い濃度を示した。

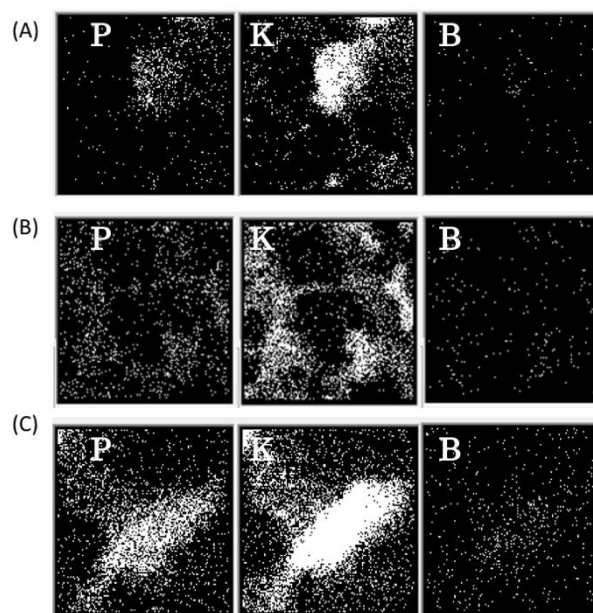


Figure 1. Micro-PIXE and PIGE Image of U251 Cells with Boron (A) control (normal medium only). (B) 160  $\mu$ gB/mL BPA containing medium, 2hr exposure. (C) 800  $\mu$ gB/mL BPA containing medium, 2hr exposure. P and K images were from PIXE, B were from PIGE.

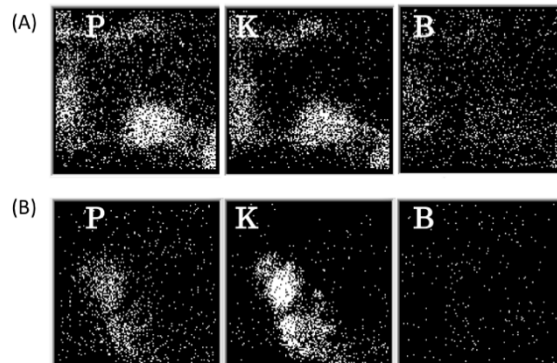


Figure 2. Micro-PIXE and PIGE Image of U251 Cells with/without Medium Wash (A) Medium were only aspirated after 800  $\mu$ gB/mL BPA containing medium, 2hr exposure. (B) Wash with PBS after boron exposure. 800  $\mu$ gB/mL BPA containing medium, 2hr exposure. P and K images were from PIXE, B images were from PIGE.

[27-03]

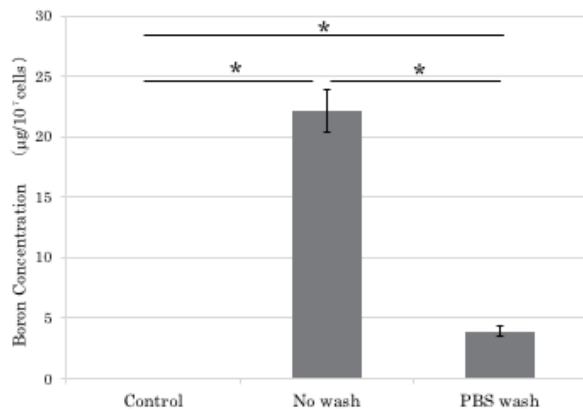


Figure 3. Boron Concentration of U251 cells with/without Medium Wash. No wash meant medium were only aspirated after 800µgB/mL BPA containing medium, 2hr exposure. PBS Wash with PBS after boron exposure. 800µgB/mL BPA containing medium, 2hr exposure.

#### 参考文献

- [1] Endo K et al., Demonstration of inter- and intracellular distribution of boron and gadolinium using micro-proton-induced X-ray emission (Micro-PIXE). *Oncology research*. 16(2):57-65, 2006
- [2] Nakai K, et al., Boron analysis for neutron capture therapy using particle-induced gamma-ray emission. *Appl Radiat Isot*. 106:166-170, 2015