[課題番号] 21022

中性子ラジオグラフィーを用いたボロンデリバリーシステムの癌集積性の解析

Analysis of Boron Accumulation in Cancer Tissues by Boron Delivery System using Neutron Capture Autoradiography

柳衛宏宣#,A)B)C), 柳川将志 D), 森下保幸 E), 篠原厚子 F), 梨本正之 C), 杉原多公通 C), 小野　稔 B)G)、中島　淳 B)H)、高橋浩之 A)B)
Hironobu Yanagie #,A)B)C), Masashi Yanagawa D), Yasuyuki Morishita E), Atsuko Shinohara F), Masayuki Nashimoto C), Takumichi Sugihara C), Minoru Ono B)G), Jun Nakajima B)H), and Hiroyuki Takahashi A)B)

A) Institute of Engineering Innovation, School of Engineering, The University of Tokyo,
B) Cooperative Unit of Medicine and Engineering, The University of Tokyo Hospital,
C) Research Institute of Healthy Living, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences,
D) Veterinary Medical Center, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,
E) Dept. of Human and Molecular Pathology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo,
F) Research Institute for Cultural Science, Seisen University
G) Dept. of Cardiovascular Surgery, The University of Tokyo Hospital, Tokyo,
H) Department of Thoracic Surgery, The University of Tokyo Hospital, Tokyo

Abstract

It is necessary to accumulate ^{10}B atoms effectively to achieve optimum cancer cells killing without affecting adjacent healthy cells on boron neutron-capture therapy (BNCT).

In this study, we performed neutron capture antoradiography to the sliced tumor tissues after intra-arterial injection of ^{10}BSH entrapped water-in-oil-in-water (WOW) emulsion in VX-2 rabbit hepatic tumor model for evaluating the feasibility of WOW emulsion as boron delivery system in BNCT. Electron microscopy images of the WOW emulsion showed accumulation of fat droplets of WOW emulsion in the tumor cells, while there was no accumulation of fat droplets observed in the group of intra-arterial injection of ^{10}BSH solution as control. We performed neutron capture autoradiography (NCAR) of ^{10}B biodistribution in sections of hepatic tumor samples of VX-2 tumor bearing rabbits using CR-39 (polyallyldiglycol carbonate) plastic track detectors using an NaOH etching method. The images using NCAR of VX-2 tumors in rabbit livers after injection of ^{10}BSH-containing WOW emulsion have shown selective accumulation of ^{10}B atoms in VX-2 tumor until 7 days after injection. The α-track densities of normal livers were not detected at 3 days after intra-arterial injection, suggesting the rapid clearance of WOW emulsion and IPSO mix solution in healthy tissue.

These results indicates that selective delivery of ^{10}B compound to the VX-2 tumors was achieved with ^{10}BSH-containing WOW emulsion.

Keyword: Boron Neutron Capture Therpay, Neutron Capture Autoradiography, CR39, ^{10}BSH entrapped WOW emulsion, Liver Cancer, Intra-arterial Injection

1. はじめに

1.1 中性子捕捉療法について

中性子捕捉療法（Boron Neutron Capture Therapy；BNCT）とは、腫瘍部にボロン(^{10}B)元素を集積させ、熱中性子照射で生じる原子核反応（^{10}B＋^{1}n→^{4}He+^{7}Li+2.31MeV）で放出される α 粒子および^{7}Li 粒子を用いて、悪性腫瘍を破壊する細胞内内部照射がん治療法である。BNCT が腫瘍部以外の正常組織を障害することなく有効であるためには、生体内に投与された ^{10}B 原子が確実に腫瘍局所に送達され、かつ限定されるような ^{10}B デリバリー薬剤の開発が必要である。このために、腫瘍部ならびに他の正常臓器内の ^{10}B の分布状況とその濃度を決定しておくことが不可欠である。

我々は、CR-39 プラスチック飛跡検出器（CR39; Polly Allyl Diglicol Carbonate）を用いて取得した中性子ラジオグラフィー(Neutron Capture Auto-Radiography：NCAR)像を形成する飛跡（エッチピット）の解析から、生体中の ^{10}B の分布状況とその濃度の定量や腫瘍部内の線量計測などを行い ^{10}B デリバリーシステムの検討を重ねてきた[1, 2, 3, 4, 5]。

1.2 Water-in-Oil-in-Water emulsion (WOW エマルション)について

肝細胞癌は、手術、化学療法、放射線慮法を駆使しても治癒が困難な癌のひとつである。ヨード化

[課題番号] 21022

ケシ油（商品名：リピオドール）は、脂質自体が選択的に肝臓癌に沈着する性質を有しており、肝臓癌の検出および治療に有効であることが報告されている。鈴木らは、ラットの肝腫瘍モデルにおいて Mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate ($Na_2{}^{10}B_{12}H_{11}$-SH) (^{10}BSH)とリピオドールのエマルションを肝動脈より投与し有効性を証明した[6]。我々は、肝臓癌に対する肝動注法を用いた ^{10}B 化合物封入 WOW エマルションの応用について報告した。WOW エマルションでは、シラス多孔質ガラス膜を用いた二段膜乳化法により、従来のリピオドールを均一なサイズと封入効率を格段に高めることができる(図 1)。また、WOW エマルションによる VX-2 腫瘍内の ^{10}B 化合物の集積および保持能力は、従来型の ^{10}BSH-Lipiodol エマルションまたは ^{10}BSH 溶液と比較して優れており、さらに、BNCT により腫瘍増殖抑制効果を確認し、原発性肝臓癌への WOW エマルションによるボロンデリバリーの可能性を示した（図 2）[7]。

今回、我々は、JRR3 における熱中性子孔照射再開に際し、再発肝臓癌への応用に向けたボロン封入 Water-in-Oil-in-Water emulsion (WOW エマルション)の腫瘍内集積性のイメージングを行い、癌集積性を検討したので報告する。

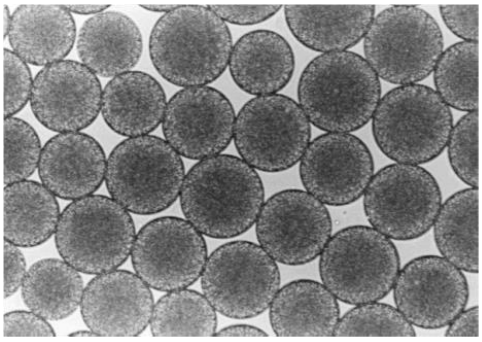


Figure 1. Microphotograph. Inner water droplets containing drug are observed as countless small dots in each oil particle.

2. 方法

2.1 WOW エマルションの作成

南九州に存在するシラスを用いて熱および酸処理することによりシラス多孔質ガラスフィルター（Shirasu controlled pore glass membrane；SPG 膜）が開発されている。この SPG 膜を用いて、WOW エマルションを作製した。

① まず、300mg の ^{10}BSH を 5%ブドウ糖溶液 5mL に溶解し、SPG 膜を透して膜乳化し、5mL の界面活性剤入りのリピオドール(IPSO)に注入し Water-in-Oil emulsion (WO エマルション)を作成した。

② 次に、WO エマルションを SPG 膜を透して再度膜乳化し、5mL の界面活性剤入りの生理食塩水に注入し、^{10}BSH 封入 WOW エマルションを作成した。

③ WOW エマルションの粒子径と粒径分布は Laser-diffraction particle-size analyzer : SALD-2000 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)をもちいて決定した。さらに、WOW emulsion に封入される ^{10}B 原子濃度は順天堂大学の ICP-Masspectroscopy をもちいて決定した。

2.2 VX-2 ウサギ肝腫瘍モデルへの動注

① 全身麻酔下に開腹し、ウサギ肝左葉に VX-2 細胞(Shope-virus derived Squamous Cell Carcinoma cell line)を移植した。

② 2 週間後に、再度全身麻酔下に開腹し、VX-2 肝腫瘍モデルに対して、固有肝動脈より ^{10}BSH 封入 WOW エマルションを肝動注した(^{10}BSH 75mg/kg)。腫瘍における ^{10}B 原子濃度は順天堂大学の ICP-Masspectroscopy を用いて決定した。

2.3 中性子ラジオグラフィー

① 肝動注後に、経時的に肝腫瘍組織と正常肝組織を摘出し、ドライアイス下の冷アセトン＋ノルマルヘキサンを用いて OCT コンパウンドに凍結固定する。②ミクロトームにより３M メンディングテープに張り付け作成したマウス薄片（40μm 厚）を－20 度にて、２週間凍結乾燥させた。③この凍結サンプルを CR-39 に密着させ、JRR3 において 熱中性子を照射した（熱中性子フルーエンス：2×10^{12} n/cm^2）。④照射後に、7mol/L 70℃の NaOH 溶液中で 2 時間エッチングを行い、エッチピットを観察し、ウサギ肝腫瘍内の ^{10}B の濃度分布を反映する NCAR 像を取得した。⑤連続切片において、HE 染色を実施した。

3. 結果

3.1 ^{10}BSH 封入 WOW エマルションサイズと封入 ^{10}B 濃度

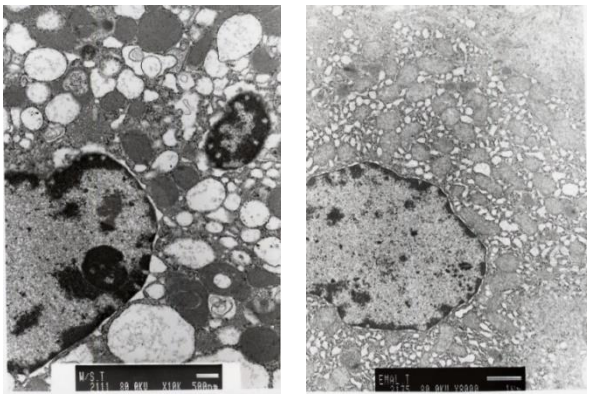
WOW エマルションに封入された平均 ^{10}B 濃度は、13000ppm であった。WOW エマルションのサイズは 50μm に調整されていた。

3.2 電子顕微鏡を用いた腫瘍内 WOW エマルションの集積性の確認

VX-2 肝腫瘍モデルに対して、固有肝動脈より ^{10}BSH 封入 WOW emulsion を肝動注し(^{10}BSH 75mg/kg)、エポン樹脂にて封入後、電子顕微鏡にて、WOW エマルションの集積性を確認した。電子顕微鏡により、対照の ^{10}BSH 水溶液群においては、腫瘍細胞の変性等の変化は見られなかったが、^{10}BSH 封入 WOW エマルション動注群においては、腫瘍細胞の細胞質内にエマルションの取り込みと思われる脂肪滴の集積

[課題番号] 21022

を認めた。



^{10}BSH WOW　　^{10}BSH solution

Figure 2. Electro-microscopic figures of WOW emulsion. The figure showed the accumulation of fat droplets of WOW emulsion in the tumour site (Left), but there was no accumulation of fat droplets in the group of ^{10}BSH solution (Right).

3.3　中性子らジオグラフィーを用いた腫瘍組織と10B 原子集積性の解析

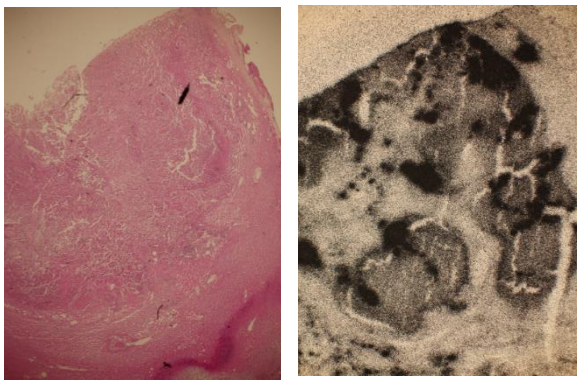
中性子ラジオグラフィーによるボロン(^{10}BSH)封入 WOW エマルションによる腫瘍集積性の確認　：VX-2 肝腫瘍モデルにおいて ^{10}BSH 封入 WOW エマルションを肝動注し、投与３日、７日後の腫瘍集積性を検討すると、^{10}BSH 封入 WOW エマルション投与群は、優位に腫瘍内の貯留性を示した。投与 3 日目以降の正常肝組織でのエッチピットは少なく、フラッシュアウトされ集積は少ないと考えられた。

4. 考察

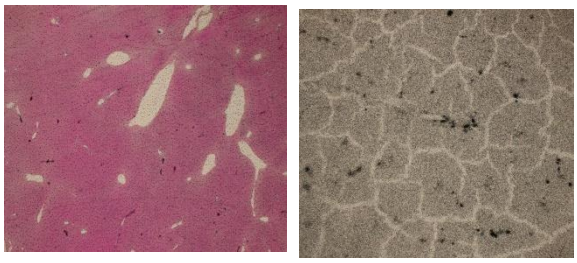
BNCT においては、熱/熱外中性子照射時間内に腫瘍組織内に ^{10}B 原子が 20 μg/g 以上は必要と計算されている。このために、腫瘍組織選択的な ^{10}B 化合物の Drug Delivery System (DDS)デリバリーシステムが必要になる[8]。DDS においては、腫瘍局所に送達する 1 次デリバリーと、腫瘍局所から癌細胞内に送達する 2 次デリバリーの少なくとも 2 つ以上の方法、もしくは融合されたデリバリーシステムが必要と考えている[9]。

我々が開発している WOW エマルションに関しては、腫瘍血管に富む腫瘍組織であれば応用可能と考えているが、封入する ^{10}B 化合物に、エンドサイトーシスを誘導する腫瘍指向性の抗体、ペプチド、核内受容体リガンド、等を結合させることにより、腫瘍細胞への 2 次デリバリーが可能になると思われる。

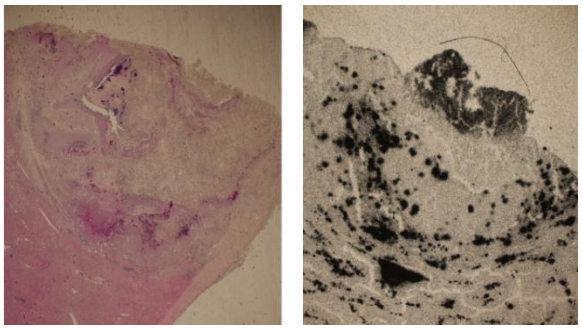
実臨床に応用できるように、さらに照射時間中の癌細胞内 ^{10}B 原子濃度を高めるには、第３の外部刺激の有用性が提唱されている。また、難治性癌である膵臓癌や進行性乳癌等の場合は、癌細胞の周囲



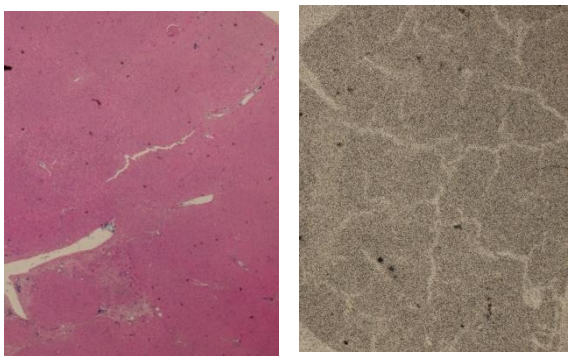
Tumor : Day 3 post IA of BSH-WOW



Normal Liver : Day 3 post IA of BSH-WOW



Tumor : Day 7 post IA of BSH-WOW



Normal Liver : Day 7 post IA of BSH-WOW

Figure 3. Neutron capture Auto-radiography and HE staining of VX-2 tumor tissues and normal liver tissues after intra-arterial injection of ^{10}BSH entrapped WOW emulsion (^{10}BSH-WOW). The magnitude is x12.5.

[課題番号] 21022

を繊維組織などにより囲まれており、DDS キャリアーが EPR 効果でも腫瘍細胞に到達しづらい場合には、外部刺激により腫瘍間隙を開き腫瘍細胞に ^{10}B 化合物を送達することは非常に重要と思われる。

丸山らは、薬物・遺伝子キャリアーとしての可能性・安全性・汎用性などの観点から新たなバブル素材 としてリポソームに着目し、パーフルオロプロパンガスを封入した新規マイクロバブル（バブルリポソーム）の調製に成功した[10]。マイクロバブルへの超音波照射はバブル崩壊（キャビテーション）を誘導し、同時に生じたジェット流が細胞に一過性の小孔を開け細胞外の物質を細胞内に導入する。このキャビテーションを利用した薬物・遺伝子デリバリーは、生体への影響のない強度の超音波照射で可能である。

バブルリポソームを併用することにより、肝臓癌などの腫瘍血管に富む腫瘍においては、WOW エマルションによる ^{10}BSH の細胞内 2 次デリバリーが可能になると思われる。

CR-39 を用いて良質な NCAR 画像が得られるようになると、送達性に優れた ^{10}B デリバリー薬剤の検索が容易になると考えられる。また、オートフォーカス機構の付いた広領域画像高速取得顕微鏡[11]を用いることで大量の飛跡を迅速に解析できるので、腫瘍部の飛跡位置のマッピングにより NCAR 像をコンピュータ上に再構築することもできる[11, 12]。

天野らは、光学顕微鏡レベルでの ^{10}B 原子のエッチピットと腫瘍組織内の病理組織増を重ね合わせる Superimpression 法を開発実施し、腫瘍組織内の癌細胞への ^{10}B 原子の集積性を証明した[13]。雨宮らは、^{10}B が注入された腫瘍細胞切片を貼りつけた CR-39 に熱中性子を照射し、さらに軟 X 線を照射して化学エッチングを行い、細胞の X 線像がリソグラフィックに CR-39 上に写し込まれ、それを原子間力顕微鏡で観察すると、黒い小さな点が α もしくは Li 粒子の飛跡として ^{10}B の細胞内分布状況を観察するマイクロドジメトリーの手法を開発した[14]。

今回、我々も病理組織像と NCAR 像を比較することにより、腫瘍組織内の線維組織ではなく、集簇する腫瘍細胞の部位においてのエッチピットの増加を観察することができた。今後は、NCAR を用いて、目的の ^{10}B デリバリー薬剤が ^{10}B 原子を細胞内のどの部位に送達できるのかという、細胞レベルでの解析を進めていきたい。

5. 結語

VX-2 腫瘍担癌ウサギモデルを用いて ^{10}BSH 封入 WOW エマルションを動脈投与後、腫瘍組織内に選択的にボロン原子を集積できることを中性子ラジオグラフィーを用いて証明できた。今後、原発性肝細胞癌に対する ^{10}B 化合物封入 WOW エマルションの肝動注を用いた中性子捕捉療法を展開するにあたり、癌細胞への 2 次ボロンデリバリーが可能な新規 ^{10}B 化合物・複合体を NCAR を用いて検討していきたい。

参考文献

[1] H. Yanagie, K. Ogura, H. Kobayashi et al., Nucl. Instr. & Method A 424(1), 122- 128, 1999
[2] K. Ogura, H. Yanagie, H. Kobayashi et al., Radiat Meas. 34, 555-558, 2001
[3] J. Skvarc, H. Y H anagie et al., Cell Mol Biol Lett. 7(1), 162-4, 2002
[4] H. Kobyashi K. Ogura, H. Yanagie et al., Appl Radiat Isot. 61(4), 573-8, 2004
[5] H. Yanagie, K. Maruyama, K. Ogura, H. Kobayashi et al., Biomed. Pharmacother. 60(1), 43-50, 2006
[6] M. Suzuki, et al., Appl Radiat Isot. 61(5):933-937, 2004
[7] H. Yanagie, K. Ogura, H. Kobayashi et al., Br J Radiol. 90(1074): 20170004. doi: 10.1259/bjr.20170004, 2017
[8] H. Yanagie, T. Tomita, H. Kobayashi, et al., Br. J: Cancer 75: 660 -665, 1997.
[9] K. Maruyama, H. Yanagie et al., J Control Release. 98(2), 195-207, 2004
[10] R. Suzuki, Y. Oda, K. Maruyama, et al., Cancer Sci. 107(3), 217-23, 2016
[11] N. Yasuda et al., Radiat. Meas. 40, 311-315, 2005 [2]K.
[12] S. Mikado, H. Yanagie, H. Takahashi, et al., Nucl. Instr. & Methods A 605(1-2), 171-174, 2009
[13] 天野数義、脳と神経 33(7), 693-701, 1981
[14] K. Amemiya, H. Takahashi, H. Yanagie et al., Radiat Meas. 40, 283-288, 2005