

[22034]

## 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), 島添健次 A)E), 梨本正之 C), 杉原多公通 C), 小野 稔 B)F), 高橋浩之 A)B)  
Hironobu Yanagie #A)B)C), Masashi Yanagawa D), Kenji Shimazoe A)E), Masayuki Nashimoto C), Takumichi Sugihara C),  
Minoru Ono B)F), and Hiroyuki Takahashi A)B)E)

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 Bioengineering, School of Engineering, The University of Tokyo,

F) Dept. of Cardiovascular Surgery, The University of Tokyo Hospital, Tokyo, JAPAN

#### Abstract

The selective accumulation of  $^{10}\text{B}$  atoms or  $^{157}\text{Gd}$  atoms is necessary to achieve effective optimum cancer cells killing without affecting adjacent healthy cells on neutron-capture therapy (NCT).

In this study, we performed neutron capture autoradiography to the sliced tumor tissues after intra-venous injection of  $^{10}\text{B}$ SH entrapped Transferrin binding Polyethylene coated Liposome (TF-PEG-Lip) in AsPC-1 mouse pancreatic cancer model for evaluating the feasibility of TF-PEG-Lip as boron delivery system in Boron neutron-capture therapy (BNCT) NCT, and also evaluating the accumulation of Metaroboronate in tumor, as novel boron compound. We performed neutron capture autoradiography (NCAR) of  $^{10}\text{B}$  biodistribution in sections of subcutaneous pancreatic tumor samples of AsPC-1 tumor bearing mice using CR-39 (polyallyldiglycol carbonate) plastic track detectors using an PEW etching method. The images using NCAR of AsPC-1 subcutaneous tumors in mice after injection of  $^{10}\text{B}$ SH entrapped TF-PEG-Lip have shown selective accumulation of  $^{10}\text{B}$  atoms in AsPC-1 tumor until 48hours after injection. The  $\alpha$ -track densities of normal liver and kidney were also detected at 3 days after intravenous injection. The images using NCAR of novel B compound; Polyoxoborate ( $\text{B}_{32}$ ) entrapped TF-PEG-Lip have shown lower accumulation of  $^{10}\text{B}$  atoms in AsPC-1 tumors, because of the low concentration of  $^{10}\text{B}$  in original compound. These results indicates that selective delivery of  $^{10}\text{B}$  compound to AsPC-1 tumors was achieved with TF-PEG-Lip according to the  $^{10}\text{B}$  concentrations.

We also performed planning to detect the localization of  $^{157}\text{Gd}$  atoms in cancer tissues using prompt gamma rays detectors.

**Keyword:** Neutron Capture Therapy, Neutron Capture Autoradiography, CR39,  $^{10}\text{B}$ SH entrapped TF-PEG-Lip, Polyoxoborate, Pancreatic Cancer

## 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 (Neutron Capture Therapy ; NCT) において、効率的に誘導放射線を発生させ得る熱中性子の捕獲効率の高い、すなわち Cross section の高い元素として、ボロン( $^{10}\text{B}$ )元素とガドリニウム( $^{157}\text{Gd}$ )元素がある。BNCTにおいては、 $^{10}\text{B}$ 元素と熱中性子との反応で放出される  $\alpha$  粒子および  $^7\text{Li}$  粒子を用いて、また、GdNCTにおいては、 $^{157}\text{Gd}$ 元素と熱中性子との反応で放出される Auger 電子と Converting electron および  $\gamma$  線を用いて、悪性腫瘍を破壊する。

このために、 $^{10}\text{B}$ 原子あるいは  $^{157}\text{Gd}$ 原子が確実に腫瘍局所に送達されるような  $^{10}\text{B}$  /  $^{157}\text{Gd}$  デリバリー

薬剤の開発が必要である。

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 Autoradiography : NCAR)像を形成する飛跡 (エッチピット) の解析から、生体中の  $^{10}\text{B}$  の分布状況とその濃度の定量などを行い  $^{10}\text{B}$  デリバリーシステムの検討を重ねている[1, 2, 3, 4, 5]。

また、 $^{157}\text{Gd}$  原子の腫瘍内局在の同定イメージングは困難であり、我々は、Laser-ablation Nasserpectroscopy の手法を用いて[6]、腫瘍内の  $^{157}\text{Gd}$  イメージングを取得できた。

### 1.2 Transferrin binding Polyethylene glycol coated

[22034]

## Liposome (TF-PEG-Lip)について

我々は、ボロン化合物を封入した  $^{10}\text{B}$ SH 封入抗 CEA Immunoliposome を CEA 産生性ヒト膵癌細胞と反応させ、中性子捕捉療法を用いて選択的な腫瘍増殖抑制効果を認めた[7, 8]。静脈内投与にて全身投与に対応するために、Liposome の表面を Polyethylene glycol (PEG) で修飾することにより、ステルスリポソームを作製した。さらに、ステルスリポソーム表面に Transferrin を結合させ、腫瘍表面の Transferrin 受容体に positive targeting を行い、中性子捕捉療法を用い腫瘍増殖抑制効果の増強を認めた[5, 9]。

## 1.3 Water-in-Oil-in-Water emulsion (WOW エマルジョン)について

ヨード化ケシ油 (商品名: リピオドール) は、脂質自体が選択的に肝細胞癌(HCC)に沈着する性質を有しており、HCC の検出および治療に有効であることが報告されている。我々は、Mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate ( $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\cdot\text{SH}$ ;  $^{10}\text{B}$ SH) 封入 WOW エマルジョンを作成し、ウサギ VX-2 肝腫瘍モデルに対して肝動注を行い、VX-2 腫瘍内の  $^{10}\text{B}$  化合物の集積および保持能力は、従来型の  $^{10}\text{B}$ SH-Lipiodol エマルジョンまたは  $^{10}\text{B}$ SH 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た[10]。

今回、我々は、JRR3 における熱中性子照射を用いて、ボロンデリバリーシステム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。

## 2. 方法

### 2.1 AsPC-1 マウス皮下腫瘍モデルへの静脈投与

① Balb/c nu/nu ノードマウスの廃部皮下に、ヒト膵臓癌 AsPC-1 細胞を移植した。

② 2週間後に、AsPC-1 皮下腫瘍モデルに対して、尾静脈より  $^{10}\text{B}$ SH 封入 TF-PEG-Lip を静脈投与した ( $^{10}\text{B}$ SH 150 $\mu\text{g}/\text{body}$ )。また、新規ボロン化合物である Polymetaroborate ( $^{10}\text{B}_{32}$ ) 封入 TF-PEG-Lip を静脈投与した。

### 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  $^{10}\text{B}$ SH 封入 WOW エマルジョンを肝動注した ( $^{10}\text{B}$ SH 75mg/kg)。また、Gadoteridole 封入 WOW エマルジョンを肝動

注した。

## 2.3 中性子ラジオグラフィ

① ボロンデリバリーシステムを投与した AsPC-1 皮下腫瘍モデルにおいては、マウスを麻酔下にドライアイス下の冷アセトンに浸し冷凍固結させる。マウスを冷凍固結させ、ミクロトーム切断によりマウス薄片 (40 $\mu\text{m}$ 厚) を作成した。

② ガドリニウム封入 WOW エマルジョンを肝動注した VX-2 肝腫瘍においては、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させ、同様の手技にて腫瘍薄片 (40 $\mu\text{m}$ 厚) を作成した。

③ 作成した薄片 (40 $\mu\text{m}$ 厚) を CR-39 に密着させ、原子炉から熱中性子束を照射した (熱中性子フルーエンス:  $2 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$ )。

④ 熱中性子照射後に、PEW65 溶液 (15 wt% KOH + 65 wt%  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  + 20 wt%  $\text{H}_2\text{O}$ ) で CR-39 をエッチングすることにより陽子飛跡を縮退させ、 $\alpha$  粒子や  $^7\text{Li}$  粒子の飛跡のみによる NCAR 像を形成させた。

⑤ Laser-ablation ICP Massspectroscopy と同様な考えにて、Gd 切片に対して、熱中性子を照射し、生じる即発  $\gamma$  線の分布を計測することによる  $\gamma$  線強度分布を示すことにより Gd 原子分布を推定できると考えられる。今回は、計測機器の設定を行った。

## 3. 結果

### 3.1 中性子ラジオグラフィを用いた腫瘍組織と $^{10}\text{B}$ 原子集積性の解析

中性子ラジオグラフィによる  $^{10}\text{B}$ SH 封入 TF-PEG-Lip の腫瘍集積性の確認: AsPC-1 ヒト膵臓癌マウス皮下腫瘍モデルにおいて、 $^{10}\text{B}$ SH 封入 TF-PEG-Lip を静脈内投与し、投与 3 時間と 48 時間後の腫瘍集積性を確認できた (図 1.A, B)。TF-PEG-Lip を用いることにより腫瘍への選択的な集積性を確認できた。Long circulation システムのため、肝臓への集積性の高度に見られたが、熱中性子照射を腫瘍局所に制御できれば、副作用としての正常組織への障害効果を減少できると考えられる。

新規ボロン化合物である Polyoxoboronate ( $\text{B}_{32}$ ) においては、Preliminary な実験として実施し、ナチュラルボロンにて化合物合成を行ったため、 $\text{B}_{32}$ ; 150 $\mu\text{g}$  では、推定 6ppm と想定され、静脈投与 3 時間後の腫瘍内の部分的な集積としてイメージされ、48 時間後の滞留性の減少が見られた (図 1.C, D)。

さらに、 $^{10}\text{B}$ SH-WOW および  $\text{B}_{32}$ -WOW の腫瘍内投与においては、弱いながらも、腫瘍のみの集積が見られ、ボロン化合物の  $^{10}\text{B}$  enrich な化合物合成

[22034]

により、腫瘍選択的な集積が期待できる (図 1.E, F)。

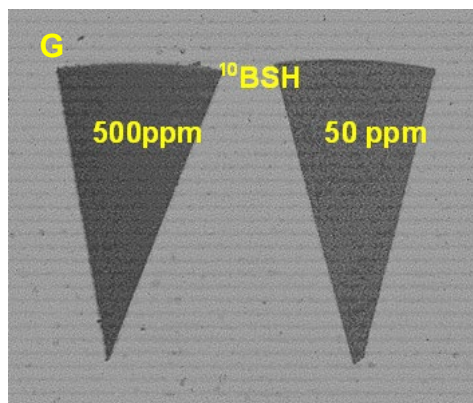
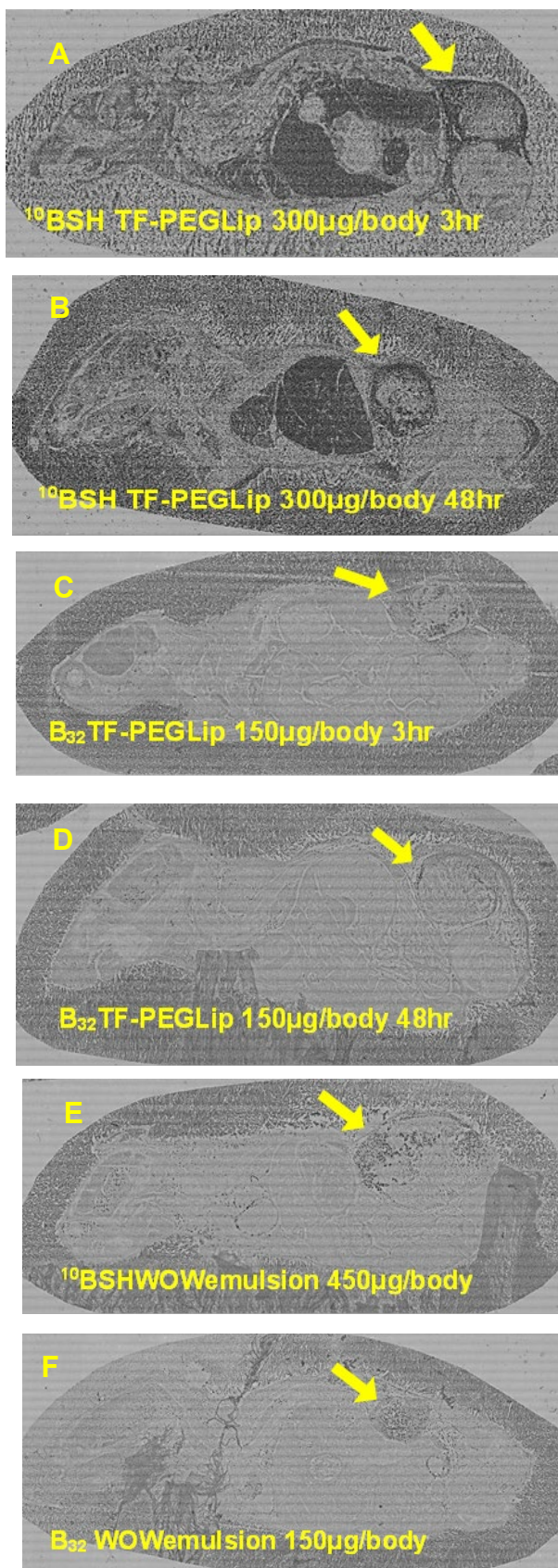


図 1. A:  $^{10}\text{BSH TF-PEGLip } 300\mu\text{g/body } 3\text{hr}$ , B:  $^{10}\text{BSH TF-PEGLip } 300\mu\text{g/body } 48\text{hr}$ , C:  $\text{B}_{32}\text{TF-PEGLip } 150\mu\text{g/body } 3\text{hr}$ , D:  $\text{B}_{32}\text{ TF-PEGLip } 150\mu\text{g/body } 48\text{hr}$ , E:  $^{10}\text{BSH WOW emulsion } 450\mu\text{g/body}$ , F:  $\text{B}_{32}\text{ WOW emulsion } 150\mu\text{g/body}$ , G: Control  $^{10}\text{BSH}$  filter paper (500ppm, 50ppm)

### 3.2 ガドリニウム原子集積性のイメージングに向けて

Gd 化合物を封入したエマルジョンをウサギ肝腫瘍モデルに肝動注し、24 後、72 時間後に腫瘍組織を取り出し、凍結切片を作成した。

3M メンディングテープに張り付けた  $10\mu\text{m}$  の厚さの切片を作成し凍結乾燥させた。腫瘍組織は  $1\text{cm} \times 1\text{cm}$  大である (図 2)。腫瘍部の切片を検出器に張り付けて、熱中性子を照射して Gd イメージングを取るため、セッティングの予備実験を行った。

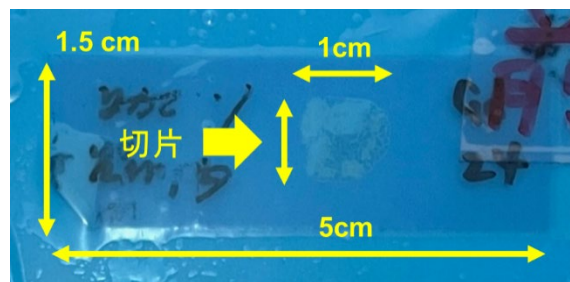


図 2. ウサギ X-2 肝腫瘍凍結乾燥切片; Gadoteridole 封入 WOW エマルジョンを担癌モデルにおいて、肝動注後 24 時間にて、主要部を摘出し、作成した。切片サイズは  $1\text{cm}$  大であり、厚さ  $40\mu\text{m}$  である。

Gd 原子検出システムは、INTPIX4 SOI センサーを用いた (1 ピクセル:  $17 \times 17\mu\text{m}$ ,  $512 \times 832\text{ pixels}$ ) [11, 12]。熱中性子照射により、サンプルの Gd 原子と反応し、2 次的に生じた  $\gamma$  線を検出し、Gd 原子の容量依存的にイメージを構築するシステムである。今回は、JRR3 熱中性子照射装置における設置の確認を実施した。シグナルは、電気信号に変換し、Ethernet 読み出しとして、PC へ送られる。

[22034]

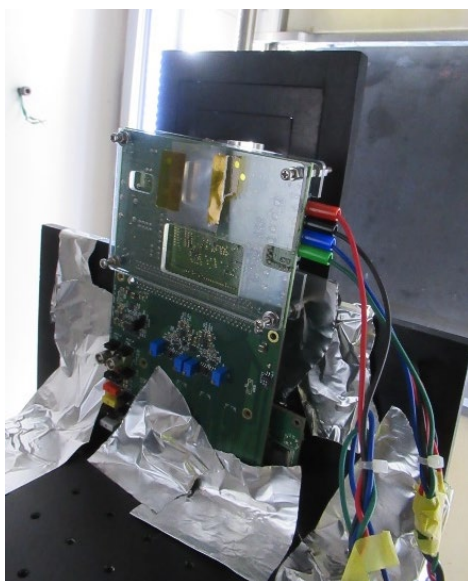


図2. A: ボロンシールド後面へのセンサーの設置状態、B: センサー設置状態(側面)、C: ボロンシールド前面における熱中性子照射孔

センサー設置により、10mのEthernet用ケーブルが必要となり、JRR3 照射施設の熱中性子孔と反対の開放孔から外に出し、PCに接続できることを確認できた。熱中性子照射するセンサーにおいては、金属部分が多いため、放射化するため、長期に持ち出しが困難になるため、本照射時には、長期保存可能なセンサーを用意する必要がある、ことが判明した。

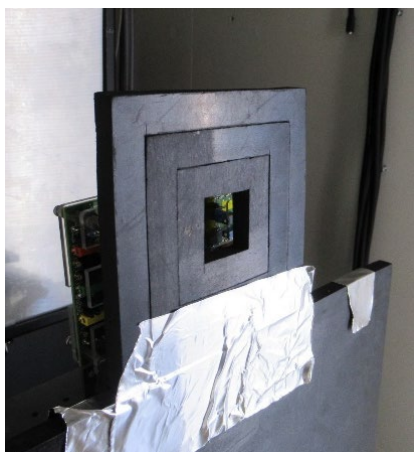
#### 4. 考察

中性子捕捉療法においては、熱/熱外中性子照射時間内に腫瘍組織内に $^{10}\text{B}$ 原子が $20 \mu\text{g/g}$ 以上、 $^{157}\text{Gd}$ 原子が $100 \mu\text{g/g}$ 以上、は必要と計算されている。このために、腫瘍組織選択的および癌細胞選択的な $^{10}\text{B}$ 化合物/ $^{157}\text{Gd}$ 化合物のDrug Delivery System (DDS)デリバリーシステムが必要になる[8]。効率的な細胞内 DDS において、我々は、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次デリバリーの融合されたデリバリーシステムが必要であることを提唱している。

我々が開発している Transferrin 結合 Polyethylene-glycol (PEG)修飾 Liposome に関しては、PEG が結合されており Long circulation 的で血中滞留性を維持でき、癌細胞表面に Transferrin 受容体が多いことより、積極的に癌細胞内へのエンドサイトーシスを誘導することより、癌細胞内へのデリバリーが可能になる[9, 13]。今回、PEW 溶液を用いてエッチングすることに入り、recoiled proton の pit を縮退させ得るため、 $^{10}\text{B}$ 原子の濃度依存的に、NCAR のイメージを作成することができた。

我々は、さらに、Liposome の構成脂質にボロン化合物を組み込むことにより、腫瘍組織により高濃度の $^{10}\text{B}$ 原子を送達させ、肝腫瘍モデルに対し、内封型ボロン脂質組み込みリポソームの肝動注と中性子捕捉療法により腫瘍増殖抑制の増強を得ており[14]、NCAR を用いることにより、NCT の適応拡大に貢献したいと考えている。

また、我々は、GdNCT の臨床研究への応用も検討したい。そのために、 $^{157}\text{Gd}$ 原子の腫瘍組織のイメージングを目指している。我々は、ウサギ VX-2 肝腫瘍モデルに対して、 $^{157}\text{Gd}$ 封入 WOW エマルジョンの肝動注後の腫瘍切片を用いて、Laser-ablation ICP Massspectroscopy 法にて[6]、腫瘍組織内の hypervascular 領域の $^{157}\text{Gd}$ 原子の集積イメージを得ることができた。今回、我々は、SOIセンサーを用いて、熱中性子と $^{157}\text{Gd}$ 原子の反応により生じる $\gamma$ 線を検出することにより $^{157}\text{Gd}$ 原子の集積強度と分布イメージングを得られると考え、計測機器の設定を行った。熱中性子照射するセンサーが放射化するため、長期に持ち出しが困難になるため、本照射



[22034]

実験時には、長期保管可能なセンサーの準備を考慮することが必要である。

## 5. 結語

ヒト膵臓癌 AsPC-1 皮下腫瘍モデルに対して、Transferrin 結合 Polyethylene-glycol 修飾 Liposome の有用性を NCAR を用いて確認できた。今後、腫瘍組織・癌細胞内への  $^{10}\text{B}$  原子デリバリーにおいて、内封型ボロン脂質組み込みリポソームの開発を進め、NCAR を用いることにより、新規 Boron DDS の NCT の適応拡大に貢献したいと考えている。

また、Gd 化合物は実臨床においても、MRI 診断に利用されており、診断から治療の連続的なシーケンスとしての Theranostics の概念からも GdNCT も注目されている。Gd 原子の腫瘍内・細胞内イメージングは重要であり、NCAR のより精度の高い検出を目指したい。

## 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. Yanagie et al., Cell Mol Biol Lett. 7(1), 162-4, 2002
- [4] H. Kobayashi, 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] E. Tanaka, T. Matsukawa, M. Suzuki, T. Hirata et al, Anal Sci. 38(4):695-702, 2022.
- [7] H. Yanagie, T. Tomita, H. Kobayashi, et al., Br. J: Cancer 3 (4): 522 - 526, 1991
- [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] H. Yanagie, K. Ogura, H. Kobayashi et al., Br J Radiol. 90(1074): 20170004. doi: 10.1259/bjr.20170004, 2017
- [11] M. Uenomachi, K. Shimazoe, H. Takahashi et al, Sci Rep, 11(1):13330. 2021. doi: 10.1038/s41598-021-92583-4.
- [12] H. Tomita, K. Shimazoe, H. Takahashi et al, Sensors (Basel), 7;22(12):4325, 2022, doi: 10.3390/s22124325.
- [13] O. Ishida, K. Maruyama, H. Yanagie, et al, Jpn J Cancer Res, 91(1):118-26, 2000.
- [14] H. Yanagie, M. Yanagawa, H. Takahashi et al, In Vivo. 35(6): 3125-3135, 2021