神戸学院大学大学院食品薬品総合科学研究科学位論文

明細胞肉腫をターゲットとする ホウ素中性子捕捉療法に関する前臨床研究

2014 年 1 月



神戸学院大学大学院食品薬品総合科学研究科学位論文

明細胞肉腫をターゲットとする ホウ素中性子捕捉療法に関する前臨床研究

2014 年 1 月

安藤 徹

目 次

1

7

19

略語一覧

序論

本論

第1章	CCS 細胞株における <i>in vitro</i> での BPA-Fr 暴露時の ¹⁰ B 取込
	評価
第1節	序

- 第2節 CCS 細胞株の EWSR1/ATF1 融合遺伝子の確認 7
- 第3節 CCS 細胞株での BPA-Fr 暴露時の毒性試験 11
- 第4節 CCS 細胞株での BPA-Fr 暴露時の¹⁰B 取込試験 15
- 第5節 小括
- 第2章 BPA-Fr を用いた CCS 皮下担がん動物に対する BNCT の検
 討

第1節 序 20 第2節 CCS 皮下担がん動物の作成 20 第3節 BPA-Fr 投与後の体内動態評価 25 第4節 抗 L-BPA 抗体を用いた腫瘍内 L-BPA 分布評価 32 第5節 BNCTによる腫瘍縮小効果の評価 35 第6節 小括 41 第3章 BPA-Fr を用いた CCS 筋肉内担がん動物に対する BNCT の

用 3 草 BPA-Fr を用いた CCS 肋肉内担かん動物に対する BNCT の 検討

第1節	序		42
-----	---	--	----

	第2節	異なる CCS 細胞株を用いた筋肉内担がん動物における	42
		BPA-Fr 投与後の体内動態評価	
	第3節	BNCT による腫瘍縮小効果の評価	49
	第4節	小括	55
総	活		56
謝	辞		57
弓	用文献		59
È	論文		66

略語一覧

Anti-BPA MAb	anti-BPA monoclonal antibody
AUC _{tumor}	area under the tumor concentration time curve
Вр	base pair
BNCT	boron neutron capture therapy
L-BPA	<i>p</i> -borono-L-phenylalanine
BPA-Fr	L-BPA fructose complex
BSH	disodium undecahydro-mercapto-closo-dodecacarborate
Cl _{tumor}	tumor clearance
CCS	clear cell sarcoma
DMEM	dullbecco's modified eagle medium
FBS	fetal bovine serum
HE	hematoxylin-eosin
ICP-AES	inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry
KURRI	kyoto university research reactor institute
PBS	phosphate buffered saline
PET	positron emission tomography
RNA	ribonucleic acid
RPMI	roswell park memorial institute
P/S	penicillin/streptomycin
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
T/B	tumor/blood
T/M	tumor/muscle
T/S	tumor/skin

序 論

厚生労働省の統計によると、本邦の疾病による死亡の最大原因は"がん"で あり,昭和56年にそれまでの脳血管疾患にかわり第1位となって以来,そ の割合は一貫して上昇を続けている.本邦におけるがん患者数は約150万人 (2008年)で、年間約75万人(2008年)が新たにがんを発症し、約35万 人(2011 年)が死亡していると推計されており¹⁾,国民の約3人に1人がが んで死亡し、今後は2人に1人ががんに罹患するとされている. 一般的に初 期のがんに対する治療は、外科手術、放射線療法、化学療法のいわゆる3大 療法が基本であり、発生率の比較的高い肺癌や消化器癌などの上皮性の悪性 腫瘍については,3大療法のいずれかもしくは組み合わせによる集学的治療 に基づいて標準治療が定められている場合が多い.しかし,筋肉や皮下組織 などに生じた非上皮性の悪性軟部腫瘍,いわゆる軟部肉腫については,その 発生頻度が全悪性腫瘍の中で1% にも満たず非常に稀な疾患であること, ま た, 軟部肉腫はその疾患の種類が非常に多く多種多様の組織形態を呈するこ と,さらには,多くの軟部肉腫が放射線療法および化学療法に抵抗性である ことなどの理由から、ほとんどが手術による全切除以外に有効な治療方法が 無いのが現状であり,今後の新たな治療方法の開発が切望されている ²⁻³⁾.

このような悪性腫瘍に対する新たな治療法として有望視されているホウ 素中性子捕捉療法(Boron Neutron Capture Therapy, BNCT)は、従来の放射 線療法とは異なり、それ自体は生理活性をもたない熱中性子捕獲断面積(エ ネルギー準位の低い熱中性子を捕捉する確率)の大きい元素の一つである ¹⁰Bを含有する化合物をあらかじめ腫瘍に蓄積させておき、そこへ外部から 熱中性子を照射し、照射された熱中性子と腫瘍内の¹⁰Bの核反応によりはじ めて発生する放射線を利用するがん放射線療法である.¹⁰Bの中性子捕獲反 応の際に放出される α 線と⁷Li原子核は細胞殺傷性が極めて高い重荷電粒子 であり、放射線抵抗性の腫瘍を治療できる可能性を持つ.さらに、その生体 内飛程はそれぞれ 9 µm, 4-5 µm であり、細胞 1 個分の大きさとほぼ等しい. そのため、理論的には腫瘍細胞内に¹⁰Bを局在化させることで、正常組織を 損傷させることなく腫瘍細胞のみを選択的に治療できるという従来の放射

線療法にはない特徴を有している(Fig. 1, Table 1). この治療法の最大の利 点は,放射活性元素や抗がん剤のような強い生理活性を持つ化合物を用いる のではなく,それ自体は放射活性をほとんど持たない¹⁰Bを用いることから, ¹⁰B 含有化合物に強い生理活性がなければ,全身に分布しても重篤な副作用 が生じないため,大量投与により,腫瘍内での絶対濃度を高めることができ る点である.実際,BNCT の臨床研究に用いられている¹⁰B 含有化合物の disodium undecahydro-mercapto-closo-dodecacarborate (BSH, Fig. 2) や *p*-borono-L-phenylalanine (L-BPA, Fig. 2) はそれぞれ 100 mg BSH/kg および 500 mg L-BPA/kg という通常の化学療法では例を見ないレベルの高投与量に おいてもその毒性は著しく低い⁴⁾

	Neutron-capture element
	$^{10}\mathbf{B}$
Reaction	$^{10}B(n, \alpha)$ ⁷ Li
Thermal neutron cross-section (σ)	3833 barn
Emitted radiation	α -rays, ⁷ Li
Range of emitted radiation	4-9 µm
To induce cell inactivation	intracellular

Table 1. Characteristics of ¹⁰B as a Neutron Capture Element in Neutron Capture Therapy



Fig. 1. Scheme of Boron (¹⁰B) Neutron Capture Therapy







BSH (Disodium undecahydromercapto-closo-dodecacarborate $Na_2B_{12}H_{11}SH$) L-BPA (*p*-Borono-Lphenylalanine) BPA-Fr (L-BPA-fructose complex)

MW 210.3 12 Boron atoms and an SH group Cage-shaped compound Highly water-soluble MW 208.2 Phenylalanine derivative Water-solubility 1.6 g/L (20°C) Infused as water-soluble fructose complex (BPA-Fr)

Fig. 2. Chemical Stuctures and Characterstics of Boron Compounds Being Used in Clinical BNCT

BNCT の成否はその原理からわかるように、腫瘍内 ¹⁰B の絶対濃度ならび に腫瘍内の ¹⁰B 濃度と周辺組織の ¹⁰B 濃度の比をいかに高めることができる かにかかっている.そこで、臨床研究においては ¹⁸F-BPA-PET イメージング により、腫瘍内に対する周辺組織の L-BPA 濃度比をあらかじめ BNCT 施行 前に計測することが重要である ⁵⁾.この濃度比が高いほど治療効果が認めら れやすくなり、これまでの臨床研究における経験より、腫瘍内 ¹⁰B 濃度は 20-30 μ g ¹⁰B/g wet tissue (ppm) 以上⁶⁾、周辺組織との ¹⁰B 濃度比は 3 以上⁷⁾ となれば、周辺組織への損傷が少なく、選択的な抗腫瘍効果を示すと報告さ れている.これに加えて、BNCT では熱中性子照射を受けた ¹⁰B が発する種々 の放射線の飛程は細胞の大きさとほぼ等しいことから、¹⁰B が腫瘍細胞内に 取り込まれ、なおかつ腫瘍組織全体に均一に分布していることが望ましく、 ¹⁰B の分布に偏りがあれば、腫瘍細胞が残存してしまう可能性があることか ら、これは治療の成否を決める重要な条件といえる.そのため、前臨床研究 においては、使用するホウ素化合物またはホウ素キャリアが *in vitro* におい て標的とする腫瘍細胞内に取り込まれるか, in vivo において腫瘍組織へ選択 的に蓄積するか,また,その蓄積は腫瘍組織全体において均一か,さらには 熱中性子を照射した後にどのような抗腫瘍効果が得られるかを調査するこ とが今後の臨床研究に結びつく重要な要件となる.

BSH および L-BPA を用いた BNCT の臨床研究は,これまでに治療が困難 であった悪性腫瘍に対して行われており,悪性脳腫瘍⁸⁾や悪性黒色腫⁹⁾にお いて,すでに優れた治療実績を示してきている.特に後者では 22 例の臨床 例の中で 18 例に完治を認めたと報告されている.さらに,近年では,再発 の頭頸部癌¹⁰⁻¹¹⁾,悪性中皮腫¹²⁾などへの適用拡大が試みられている.このよ うな BNCT の臨床研究に用いられる中性子源は,広大な敷地が必要かつ維持 管理が困難な原子炉であり,現在 BNCT を施行できる医療用原子炉施設は, 日本国内で京都大学原子炉実験所(Kyoto University Research Reacter Institute, KURRI)のみである.法令上,病院に併設して原子炉を建設することは不可 能であるため,原子炉とは異なる方式での中性子源の確保を目指して,加速 器駆動の中性子源を用いた BNCT の研究・開発が進められており¹³⁻¹⁴⁾,現在 は頭頸部領域の悪性腫瘍に対して治験が始まっている.この新たな装置を使 用することにより病院単位での BNCT が可能になり,今後 BNCT の臨床研 究が飛躍的に増え,適応拡大に向けた臨床研究がさらに進展すると予想され る.

非上皮性の悪性腫瘍,いわゆる肉腫に対する BNCT の基礎検討は骨肉腫に 対する検討が多い. 1985 年,Takeuchi¹⁵⁾が行った犬の骨肉腫に対する BNCT の基礎検討において,初めて悪性骨腫瘍で BNCT の有用性が報告された.そ の後,基礎検討ではあるが,骨肉腫に対して BNCT の有用性を示すいくつか の報告がなされた¹⁶⁻²⁰⁾.それに対して,軟部肉腫では線維肉腫²¹⁾,血管肉腫 ²²⁾や肝癌由来とされる吉田肉腫²³⁾において BNCT の有用性が指摘されている が,報告例が少なく,基礎研究は不十分である.これらの基礎検討に先んじ て臨床研究では,加藤ら²⁴⁾が他に治療方法のない再発した頭頸部悪性腫瘍に 対して,2001 年から 2007 年の間に BNCT を施行し,この中に骨肉腫,血管 肉腫,悪性線維性組織球腫の 3 例を含む 26 症例を報告した.骨肉腫の症例で は、手術および放射線療法後に再発した末期状態の骨肉腫に対して,L-BPA

と BSH を併用した BNCT を施行したところ,照射後半年で腫瘍が半分に縮小 し,照射後 8 カ月まで延命が可能となった.また,血管肉腫の再発症例では BNCT 施行で腫瘍の消失を認めた.その他,縦隔内に再発した悪性末梢神経 鞘腫瘍についても 2 回の BNCT 施行にて腫瘍が消失したとの報告²⁵⁾もあり, 基礎検討のみならず数少ない臨床研究からも BNCT が悪性軟部腫瘍に対して, 十分に効果のある治療方法の一つとなり得る可能性が示されている.さらに, 本研究にて BNCT が治療困難である悪性軟部腫瘍の治療方法の一つとなり得 る可能性をより詳しく解析し,提示することができれば,これまでにない軟 部肉腫に対する新たな治療戦略として提案できると考える.

上述のような治療困難である悪性軟部腫瘍の一つとして明細胞肉腫(clear cell sarcoma, CCS)が挙げられる. CCS は 1965 年に Enzinger²⁶⁾により,「Clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses」として初めて提唱された稀な悪性軟部腫瘍である. CCS は臨床的には 20-40 歳の若年成人に多く発症し²⁶⁾,四肢の特に足膝関節周囲に好発する. その発生率は悪性軟部腫瘍のうちの約1%と極めて稀である. CCS は深在性で腱あるいは腱膜と癒着して徐々に増大するため臨床経過は比較的長いが,化学療法や放射線療法による治療に抵抗性の腫瘍であるため,外科的切除術以外に有効な治療法が確立されていない. このため,外科的切除術での治療が困難な進行例や術後再発例,あるいはリンパ節,肺,骨などの転移例の予後は 5 年生存率が 47-54%, 10 年生存率が 33-36% と極めて不良であり²⁷⁻²⁹,手術による切除以外の新たな治療法の確立が切望されている.

CCS はその半数でメラニン色素の沈着を認め、また、免疫組織化学による 組織評価では悪性黒色腫の鑑別に用いられメラノサイトへの分化を示す HMB-45, Melan-A, そして S-100 が陽性であることから、Chung と Enzinger により軟部に発生した悪性黒色腫(malignant melanoma of soft parts)と報告 された³⁰⁾. さらに、BNCT に用いられる¹⁰B 含有化合物の L-BPA が、メラニ ンの生合成原料であるチロシンと類似の化学構造を有するため、¹⁰B の悪性 黒色腫細胞への選択的集積をもたらすこととの関連性が報告されている⁶⁾. つまり、CCS においても L-BPA の取込が確認できれば、BNCT による治療 効果が得られる可能性が大いに期待できるが、これまでにそのような検討例

はなく治療効果は未だ不明である.

こうした背景から,本研究では CCS に対する新たな治療方法として BNCT の前臨床検討を行うことを目的とした.まず4種類のヒト由来明細胞肉腫の 培養細胞株を用いて, CCS 細胞株における L-BPA の溶液製剤である L-BPA fructose complex (BPA-Fr)の取込能を評価した.次に,明細胞肉腫の担がん 動物モデルを作成し, BPA-Fr を静脈内投与した後の体内動態を調べた.さ らに BPA-Fr 静注後の BNCT による CCS 担がん動物の短期および長期の治療 効果について評価した.

本 論

第1章 CCS 細胞株における *in vitro* での BPA-Fr 暴露時の¹⁰B 取込評価

第1節 序

本章では、序論でも述べたように、メラニン産生機構により L-BPA を高度 に取り込む悪性黒色腫と同様に、CCS 細胞株も BPA-Fr 暴露時に実際に BNCT での治療効果を期待できる濃度の ¹⁰B 取込を示すか否かの検討を行った.ま ず、CCS に特有な EWSR1/ATF1 融合遺伝子の発現を検討し、その後、CCS 細 胞における ¹⁰B の取込を CCS 細胞に対する BPA-Fr 含有培地の暴露実験によ り確認した.

第2節 CCS 細胞株の EWSR1/ATF1 融合遺伝子の確認

【目的】

悪性軟部腫瘍の病理組織診断は,形態学的・免疫組織化学的に特徴が乏し い場合には,診断に難渋する場合が多い.悪性軟部腫瘍の中には,染色体相 互転座を中心とする特徴的な染色体異常と,それらに由来する融合遺伝子(キ メラ遺伝子)と称される遺伝子異常を伴う腫瘍が存在することが知られてい る.このような融合遺伝子の多くは腫瘍の組織型に特異的であり,病理組織 学的所見と組み合わせて診断を行うことにより,より正確な診断を下すこと が可能となる³⁵⁾.

CCS と鑑別を要する腫瘍としては、悪性黒色腫、滑膜肉腫や悪性末梢神経 鞘腫瘍があげられ、特に悪性末梢神経鞘腫瘍の類上皮型は、細胞形態や増殖 様式が CCS と類似し、CCS との鑑別が困難となる場合がある.現在、このよ うな病理組織診断の難しい悪性軟部腫瘍の鑑別では、腫瘍特異的な染色体異 常などを利用した遺伝子診断が診断補助に寄与している.CCS では Fig.3 で 示すように特有の染色体相互転座を t(12;22)(q13;q12)に認め、EWSR1 遺伝子 と ATF1 遺伝子とが融合した EWSR1/ATF1 融合遺伝子を形成する³⁶⁾.この融

合遺伝子によって生じる融合タンパクは、転写活性に関与する bZIP domain を有する一方で、EWSR1 に存在する RNA-binding domain は喪失し、ATF1 の regulatory PKA domain も異常をきたすため、恒常的に転写活性を有するよう になり、CCS の腫瘍発生に関与するものと考えられている.また、本研究で 用いた 4 種の CCS 細胞株のうち、MP-CCS-SY および SU-CCS-1 の 2 種につい てはすでに EWSR1/ATF1 融合遺伝子の発現が確認されている³⁷⁾.そこで本研 究を始めるにあたり、これら 2 種の CCS 細胞株とともに残りの 2 種の CCS 細胞株についても EWSR1/ATF1 融合遺伝子の発現を RT-PCR にて確認した.



Fig. 3. Expression Pathway of EWSR1/ATF1 Fusion Gene

【試料】

Dullbecco's modified eagle medium (DMEM, Invitrogen, Tokyo, Japan), Roswell park memorial institute medium 1640 (RPMI medium 1640, Invitrogen, Tokyo, Japan), Fetal bovine serum (FBS, Bio West, France), Penicillin/streptomycin (P/S, 和光純薬株式会社, Osaka, Japan) は細胞培養液として使用した. 組織培養 用ディッシュは 10 cm dish (IWAKI, Tokyo, Japan) を使用した. Phosphate buffered saline (PBS, 日水製薬, Tokyo, Japan) は細胞の洗浄に、トリプシン

(Invitrogen, Tokyo, Japan) は細胞継代に使用した. RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) は細胞からの total ribonucleic acid (RNA) の抽出に使用した. PrimeScript[®] 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ株式会社, Shiga, Japan) は total RNA から融合遺伝子を増幅する Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) に使用した.

【細胞株】

CCS 細胞株には, MP-CCS-SY (宮崎大学医学部の盛武 浩 博士より分譲) ³⁷⁾, SU-CCS-1 (University of Southern California の Alan Epstein 教授より分譲) ³⁸⁾, KAS (がん研有明病院より分譲)³⁹⁾, HS-MM (高知大学の竹内 保 博士 より分譲)⁴⁰⁾のそれぞれ異なる患者から樹立された4種の細胞株を使用した. 培養は 37°C, 5% CO₂条件下で行った. 培地として, MP-CCS-SY と KAS には 10% FBS と 1% P/S 含有 RPMI Medium 1640 を, SU-CCS-1 には 15% FBS と 1% P/S 含有 RPMI Medium 1640 を, HS-MM には 10% FBS と 1% P/S 含有 DMEM をそれぞれ使用した. 細胞継代は常法に従い, PBS で洗浄後にトリプシン処 理することで細胞を回収し, 再び播種・培養することによって行った.

【方法】

適当数の各 CCS 細胞株を 10 cm dish に播種し,各細胞が 70% コンフルエント (細胞が dish の 70% を占有している状態)程度になるまで培養を行った後に, RNeasy Mini Kit を用いて,10 cm dish 内の細胞を直接溶解することで, それぞれの細胞株の total RNA を抽出した.続いて,これらの total RNA を用いて,盛武らの報告³⁷⁾と同様の EWSR1/ATF1 融合遺伝子と相補的なプライマ ーを設定した RT-PCR を行って EWSR1/ATF1 融合遺伝子を増幅した. EWSR1/ATF1 融合遺伝子の形成は電気泳動後, 泳動に用いたゲルを EtBr によ って染色することで確認した.

【結果】

各 CCS 細胞株の total RNA 濃度は MP-CCS-SY: 3.06 µg/mL, SU-CCS-1: 3.77 µg/mL, KAS: 0.94 µg/mL, HS-MM: 0.93 µg/mL であった. RT-PCR を行う際 はこの total RNA を各 CCS 細胞株につき濃度が同等になるように希釈し, RNA として 1 µg 相当を用いた. 電気泳動後の EWSR1/ATF1 融合遺伝子を Fig. 4 に 示す. 各 CCS 細胞株から抽出・逆転写・増幅された EWSR1/ATF1 融合遺伝子 はそれぞれ 950-1000 base pair (bp) 付近に認めた.

【考察】

EWSR1/ATF1 融合遺伝子は 950-1000 bp 付近に認め, これは盛武らが報告し ている MP-CCS-SY と SU-CCS-1 の泳動結果 (950 bp 付近への泳動)³⁷⁾と同様 の結果であり, 今回実験に用いた 4 種の CCS 細胞株は全て EWSR1/ATF1 融合 遺伝子を発現していることが確認された.また, Wang らの報告⁴¹⁾では, EWSR1/ATF1 融合遺伝子の転写産物の分析から, EWSR1/ATF1 融合遺伝子に は大きさの異なる 4 亜種が存在することが示されており,本検討においても 4 種の CCS 細胞株の転写産物に僅かな差を認めた.



Fig. 4. Electrophoretic Patterns Indicating Expression of EWSR1/ATF1 Fusion Gene in Each CCS Cell Line 1, MP-CCS-SY; 2, SU-CCS-1; 3, HS-MM; 4, KAS.

第3節 CCS 細胞株での BPA-Fr 暴露時の毒性試験

【目的】

BNCT ではその治療原理上, BPA-Fr 自体に抗腫瘍効果はなく, 腫瘍細胞に 対して作用させた後に熱中性子照射を行わない限り, 無毒性であることが求 められる. そこで,本節では BPA-Fr の CCS 細胞への毒性を評価する目的で, BPA-Fr の含有濃度を段階的に上昇させた培地に CCS 細胞株を暴露し,その細 胞毒性を WST assay により確認した.

【試料】

細胞培養には第1章第2節と同じ試料を使用した.Fructose (Fr),過塩素酸(HClO₄, 60%),過酸化水素(H₂O₂, 30%)とホウ素標準溶液(1000 µg¹⁰B/mL) はナカライテスクからの購入品を用いた.超純水は日本ミリポア株式会社

(Tokyo, Japan)の Simpli Lab を用いて作成した. Cell Counting kit-8 (WST-8, 1-Methoxy PMS 混合溶液,和光純薬工業株式会社,Osaka,Japan)は細胞毒 性測定用試薬として使用した.¹⁰B 含有化合物である L-BPA (¹⁰B enriched, Lot. RP-090709)は、ステラファーマ株式会社 (Osaka,Japan)からの供与品 を用いた. BPA-Fr 水溶液 (4000 μ g¹⁰B/mL)は、吉野らの方法⁴²⁾に従い、次 の手順で調製した. L-BPA (1g)と Fr (2.224 g)を、マグネティックスター ラーを用いて超純水 6.0 mL に分散させた.その後、2 M NaOH を徐々に添加 し、全固形物が溶解するまで撹拌した後、適量の超純水を添加することで全 量を 10 mL とした.最終的に、調製した BPA-Fr の¹⁰B 濃度は、 (^{10}B) 濃度の測 定]に記載した ICP-AES 法にて測定したところ 4000 μ g¹⁰B/mL であった.ま た、BPA-Fr 含有培地は各細胞株の培養に使用する培地に BPA-Fr を添加する ことで調製した.最終的に、調製した BPA-Fr 含有培地の¹⁰B 濃度は、ICP-AES 法にて測定したところ 50、100、200、400 μ g¹⁰B/mL であった.

【細胞株】

各 CCS 細胞株の培養については、第1章第2節と同様の方法で行った.

【方法】

各 CCS 細胞株を 96 穴マイクロタイタープレート(IWAKI, Tokyo, Japan)の 各ウェルに5×10³個/100 μL/well で播種し,24 時間培養した.細胞がウェル の底面に十分に付着したことを確認した後、各ウェルに所定濃度の BPA-Fr 含有培地(50, 100, 200, 400 µg¹⁰B/mL)を 100 µL 添加し, 全量を 200 µL とすることで、¹⁰B 濃度が 25,50,100,200 µg¹⁰B/mL の BPA-Fr 含有培地に 細胞を暴露し, 37°C, 5% CO2インキュベータ内にて4時間の培養を行った. この時の¹⁰B濃度は臨床研究における患者の血中¹⁰B濃度が20µg¹⁰B/mL前後 を2時間程維持することを目標としていることから、それを上回るように設 定した. 暴露後, 各ウェルの培地をマルチピペット (Pipet-lite, L8-200, RAININ, Tokyo, Japan) で除去し, PBS で1回洗浄を行った後, BPA-Fr を含有しない 培地を 200 µL 添加し, さらに 72 時間の培養を行った. BPA-Fr 無添加の群を コントロール群,細胞無播種の群をブランク群とした.培養後, Cell Counting kit-8 溶液を各ウェルに 20 µL 添加し、さらに1時間の培養を行うことで呈色 反応を行った.吸光マイクロプレートリーダー(MULTISKAN JX,サーモフ ィッシャーサイエンティフィック株式会社, Kanagawa, Japan) を用い, 450 nm (参照波長: 630 nm, WST-8 ホルマザンの吸収スペクトル外の波長であり, この波長での値を0とし、450 nmの波長のバックグラウンド補正を行う.) の吸光度を測定した. WST assay は生細胞数を計測する試験であり, WST-8 が細胞内脱水素酵素によって還元されることで,発色基質であるホルマザン

ホルマザンの定量を行うことで、細胞数を数値的に計測できるという特徴を 持っている.そこで細胞生存率は、各濃度でのコントロール群の吸光度に対 する各群の吸光度の比率として定義した.

を生成し、この生成するホルマザン量と細胞数が比例関係にあることから、

【¹⁰B 濃度の測定】

BPA-Fr 水溶液, BPA-Fr 含有培地中の¹⁰B 濃度は, 誘導結合プラズマ発光分 光分析 (ICP-AES) 法を用いて測定した⁴³⁾. 所定液量の BPA-Fr または BPA-Fr 含有培地を 15-mL polypropylene centrifuge tube (CORNING[®], Corning Incorporated, NY, USA) に入れ, そこに灰化溶媒として HClO₄ (0.6 mL) と $H_2O_2(1.2 \text{ mL})$ をマイクロピペット (Pipet-lite, L-1000 および L-5000, RAININ, Tokyo, Japan) でそれぞれ加え, Heating Block (HF200, Yamato Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 75°C の閉鎖的環境下で,48 時間の灰化を行っ た. それぞれのサンプルの発光強度は,ICP-AES (SPS3100, SII NanoTechnology Inc., Tokyo, Japan) を用いて波長 249.773 nm にて測定した.別途,¹⁰B 標準 溶液 (1000 μ g¹⁰B/mL) を希釈し,0.2—10 μ g¹⁰B/mL の範囲で作成した検量線 を用いて,各サンプルの発光強度から¹⁰B 濃度を算出した.

【結果】

各 CCS 細胞株の細胞生存率を Fig. 5 に示す. BPA-Fr 暴露後の細胞生存率は 90-115% の間であった. 各 CCS 細胞間での差はなく, BPA-Fr 濃度を 200 μg ¹⁰B/mL まで上昇させても, 無添加のコントロールと比較して細胞生存率に大 きな違いは見られなかった.

【考察】

BPA-Fr 濃度を上昇させても,各 CCS 細胞株の細胞生存率に大きな影響認め ず,BPA-Fr は 200 μ g¹⁰B/mL までの濃度範囲では,CCS に対する毒性を持た ないことが示された.この結果を踏まえ,本節以降に行った *in vitro*, *in vivo* 実験では,本節における最大 BPA-Fr 濃度である 200 μ g¹⁰B/mL 以下となるよ うに実験条件を設定することで,細胞毒性が認められない条件で検討を行っ た.



Fig. 5. Effect of ¹⁰B Concentration on Viability of Each CCS Cell after Exposure to BPA-Fr under 5% CO₂ Atmosphere at 37°C for 4 hours Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

第4節 CCS 細胞株での BPA-Fr 暴露時の¹⁰B 取込試験

【目的】

*In vivo*でのBPA-Fr投与実験を行う前段階として,4種のCCS細胞株がBNCT における抗腫瘍効果の発現に必要とされる量の¹⁰B 取込を示すかどうかを確 認した.また,CCS細胞の¹⁰B 取込挙動を他の腫瘍細胞株の¹⁰B 取込と比較 検討した.

【試料】

細胞培養には第1章第2節と同じ試料を使用した.細胞移植には第2章第2節と同じ試料を使用した. BPA-Fr の調製,¹⁰B濃度測定には第1章第3節と同じ試料を使用した.また,L-BPA は第1章第3節と同様の方法で,BPA-Fr

(4000 μ g¹⁰B/mL) として使用した.また,BPA-Fr 含有培地は各細胞株の培養に使用する培地に BPA-Fr を添加することで調製した.最終的に,調製した BPA-Fr 含有培地の¹⁰B 濃度は,ICP-AES 法にて測定したところ 10, 20, 30 μ g¹⁰B/mL であった.

【細胞株】

各 CCS 細胞株の培養については,第1章第2節と同様の方法で行った.また,本節ではコントロールとして,メラニンを産生するヒト由来悪性黒色腫細胞株 G-361⁴⁴⁾,ヒト由来肺線維芽細胞株 MRC-5(共に文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して,理研 BRC より購入)を使用した. G-361には 10% FBS と 1% P/S 含有 McCoy 5A を, MRC-5 には 10% FBS, 1% P/S 含有 MEM を使用して培養した.

【方法】

適当数の各 CCS 細胞株を 10 cm dish に播種し,各細胞が 100% コンフルエ ント程度になるまで培養を行った後に,トリプシン処理により,細胞を回収 し,その重量を 1 mL 容量のマイクロチューブ(透明タイプ,1.5 mL, BIO-RAD) を用いて測定した. 適当数の各 CCS 細胞株を 10 cm dish に播種し,各細胞が 70% コンフルエ ント程度になるまで培養を行った後に,各 dish の培地をアスピレーター (DAP-15, ULVAC, Miyazaki, Japan) で吸引除去し,10,20,30 μg¹⁰B/mL の BPA-Fr 含有培地を 10 mL 添加し,37°C,5% CO₂ インキュベータ内にて 2 時間暴露した.先述の臨床研究における患者の血中濃度が 20 μg¹⁰B/mL 前後 を 2 時間程維持することを踏まえ,本検討における BPA-Fr 含有培地の濃度を 10,20,30 μg¹⁰B/mL の濃度幅とし,2 時間作用させた.暴露後,各 dish の培 地をアスピレーターで吸引除去し,PBS で細胞を 2 回洗浄した後,トリプシ ン処理し,細胞全量を回収した.回収した細胞の個数は血球計算盤 (Burker-Turk deep, Erma, Tokyo, Japan) を用いて測定した.

【¹⁰B 濃度の測定】

BPA-Fr 水溶液, BPA-Fr 含有培地および各細胞中の¹⁰B 濃度は,第1章第3 節と同様に ICP-AES 法を用いて行った.各細胞は細胞数測定後,15-mL polypropylene centrifuge tube に入れ,1200 rpm で5分間遠心分離(Centrifuge 5702, Eppendorf, Tokyo, Japan) することでペレットを得た.次に上清をア スピレーターで吸引除去し,灰化溶媒を加えて同様に灰化処理を行った.灰 化終了後,総容量が5 mL となるように超純水を加えた後に,0.45 µm disposable syringe filter unit (DISMIC-13HP, hydrophilic PTFE, ADVANTEC, Tokyo, Japan) を用いてろ過したものを ICP-AES 測定用サンプルとした.

【結果】

各細胞株の1×10⁸個あたりの重量は, MP-CCS-SY:0.42g, SU-CCS-1:0.24g, KAS:0.29g, HS-MM:0.55g, G-361:1.00g, MRC-5:1.25gであった.

各 CCS 細胞株の ¹⁰B 取込量の比較結果を Fig. 6, 各細胞株の ¹⁰B 取込量の値 を Table 2 に示す. 正常組織由来細胞である MRC-5 を除いた各腫瘍細胞株に おいて,いずれの場合も濃度依存的な ¹⁰B 取込が見られた.ただし, ¹⁰B の取 込量には細胞株依存性がみられ,4 種の株のうち, MP-CCS-SY と SU-CCS-1 が比較的大きい ¹⁰B 取込を示した.一方, Table 2 に示すとおり,メラニンを 産生する悪性黒色腫である G-361 の ¹⁰B 取込は,4 種の CCS 細胞株の中で最 も小さい¹⁰B 取込量を示した KAS とほぼ同等であり, CCS 細胞株での¹⁰B 取 込能は, BNCT による優れた治療成績を持つ悪性黒色腫細胞株と比較して同 等以上であることが判明した.

【考察】

各 CCS 細胞株での¹⁰B 取込は、濃度依存的かつ高濃度で大きくなることが 示された(Fig. 6). これはメラニン産生機構を持つ悪性黒色腫と同様に CCS でも BPA-Fr 暴露時に高度な¹⁰B 取込が確認された初めての知見となった.そ れに対して, MRC-5 の¹⁰B 取込は他の細胞株と比較して低い取込能を示した. これは肺由来の正常細胞である MRC-5 が, がん細胞と比較して増殖が活発で ないため、細胞を構築するために必要なアミノ酸要求量が低いことが一因と 考えられる.がん細胞では,その急速な細胞増殖や亢進した細胞内代謝を維 持するために、糖やアミノ酸などの栄養トランスポーターの発現が高まって いることが明らかになっている.アミノ酸トランスポーターは LAT-1 $(SLC7A5) \succeq LAT3 (SLC43A1)^{45} \succeq ASCT2 (SLC1A5)^{46}$, $ATB^{0,+} (SLC6A14)^{47}$ が,がん細胞で高発現している. その中でも LAT-1 はロイシン, イソロイシ ン,バリン,フェニルアラニン,チロシン,トリプトファン,メチオニン, ヒスチジンといった必須アミノ酸を含むアミノ酸に対して高親和性を示す. L-BPA についても、その構造がアミノ酸類似体であることから、LAT-1 を介 する L-BPA の取込では LAT-1 の発現が亢進している腫瘍細胞により多く取り 込まれると考えられている⁴⁸⁻⁴⁹⁾. これらの理由から各 CCS 細胞株およびG-361 においても、このアミノ酸取込機構の活性化が関与している可能性があると 考えられる.これはメラニン産生機構を持たない脳神経膠腫についても. L-BPA が積極的に取り込まれることを示した宮武らの報告からも支持される ところである⁸⁾. また, 各 CCS 細胞株間において生じた BPA-Fr 暴露時の¹⁰B 取込の差は、メラニン産生機能による取込の増強の程度や、アミノ酸取込機 構活性化の程度の差が表れていると推察される.これらの点については CCS 細胞株で生成するメラニン量の定量,および LAT-1 の定量や細胞内での代謝 機構解明の調査などの、今後のさらなる検討が必要であると考える.



Fig. 6. Uptake of Boron in Human CCS Cell Lines 2 hours after Exposure

to BPA-Fr-Containing Cell Culture Media under 5% $\rm CO_2$ Atmosphere at $\rm 37^oC$

Each value represents the mean \pm S.D. (n=5).

Table 2. Numerical 1	Data of ¹⁰ B	Concentration	in Each	Cell Line	after	Exposure
to BPA-Containing (Cell Culture	Medium				

Concentration (µg equiv. of boron)								
Cell line	10 μg ¹⁰ B/mL medium	20 μg ¹⁰ B/mL medium	30 μg ¹⁰ B/mL medium					
HS-MM	15.4 ± 1.4	20.2 ± 1.7	25.6 ± 3.2					
MP-CCS-SY	21.8 ± 2.9	31.5 ± 1.0	43.6 ± 4.2					
SU-CCS-1	32.6 ± 2.9	45.6 ± 4.0	56.3 ± 4.4					
KAS	8.7 ± 1.0	15.0 ± 1.0	22.7 ± 1.6					
G-361	11.7 ± 1.2	16.2 ± 1.8	22.7 ± 1.3					
MRC-5	3.1 ± 0.3	3.8 ± 0.3	4.3 ± 0.4					

Each value represents the mean \pm S.D. (n=5).

第4節 小括

本章では, CCS 細胞株の *in vitro* における評価として, EWSR1/ATF1 融合遺 伝子の確認, BPA-Fr 暴露時の¹⁰B 取込評価を実施した.得られた結果を以下 にまとめる.

- ・ 本研究で用いた 4 種の異なる患者より樹立された CCS 細胞株において, CCS の診断で有用である EWSR1/ATF1 融合遺伝子の発現を認めた.
- BPA-Fr は CCS 細胞に対して, 200 µg¹⁰B/mL までの濃度範囲では毒性を示 さないことが確認された.
- BPA-Fr 暴露によって¹⁰B は各 CCS 細胞株に濃度依存的かつ高濃度で取り 込まれた. 比較対照に用いた G-361 の¹⁰B 取込結果から, CCS は BNCT で良好な治療結果が報告されている悪性黒色腫と同等以上の高度な¹⁰B 取込が確認された

以上の結果より、CCS 細胞株に対する BPA-Fr 暴露によって、 10 B は濃度依存的かつ他の細胞株と比較して高濃度で取り込まれることが示された. *In vivo*での BPA-Fr 投与後の 10 B の体内動態評価を行う上で、その足がかりとなる有用な知見が得られたといえる.

第2章 BPA-Fr を用いた CCS 皮下担がん動物に対する BNCT の検討

第1節 序

本章では, *in vivo* での熱中性子照射試験を行う前段階として, *in vitro* で見 られた CCS 細胞株に対する BPA-Fr 暴露による ¹⁰B の高度な取込が *in vivo* で も認められるかどうかを検討する目的で, CCS 担がん動物モデルを用いて, BPA-Fr 投与後の ¹⁰B の体内動態を評価した.そこで,まず CCS 担がん動物モ デルの作成を行った.担がん動物モデルでの腫瘍の再現性は,その組織学的 評価によって確認した.次に BPA-Fr を CCS 担がん動物モデルに投与して, その腫瘍内および非腫瘍部内における ¹⁰B 集積と,腫瘍組織内での ¹⁰B 分布を 評価した.

第2節 CCS 皮下担がん動物の作成

【目的】

CCS 担がん動物モデルは HS-MM と KAS の 2 種の細胞株で報告されている ³⁹⁻⁴⁰⁾.まず,試験的に 4 種の異なる CCS 細胞株をヌードマウスへ移植し,腫 瘍塊形成能の比較検討を行った.その結果,MP-CCS-SY 細胞株がもっとも速 い腫瘍塊形成を示すことが判明した.また,第1章第4節にて MP-CCS-SY の *in vitro* における ¹⁰B 取込が他の CCS 細胞株と比較して高濃度であったこと から, CCS 担がん動物モデルとして MP-CCS-SY を用いた担がん動物モデル を作成することとした.

本節では、MP-CCS-SY を用いた担がん動物モデルについて、形成された腫 瘍塊が CCS であることを組織学的に評価し、またその腫瘍塊のメラニン産生 の有無を確認した.

【試料】

細胞培養には第1章第2節と同じ試料を使用した.22G注射針(S・B, NN-2232S)と1mLシリンジ(中口, SS-01T)はテルモ株式会社からの購入

品を細胞移植に用いた. 10% リン酸緩衝ホルマリン溶液, ジェチルエーテル はナカライテスクからの購入品を用いた. HMB-45 抗体, S-100 抗体は Dako Japan (Tokyo, Japan) からの購入品を用いた. Melan-A 抗体は株式会社ニチ レイバイオサイエンス (Tokyo, Japan) からの購入品を用いた. 1% glutaraldehyde, 4% カコジル酸緩衝ホルマリン溶液は株式会社協同病理 (Hyogo, Japan) からの提供品を使用した. 1% 四酸化オスミウム溶液, 酢

酸ウラニル,クエン酸鉛は株式会社協同病理における透過型電子顕微鏡観察用の標本作成に用いた.

【細胞株】

CCS 細胞株として, MP-CCS-SY を使用した. 細胞培養は第1章第2節と同様の方法で行った.

【方法】

動物実験は、神戸学院大学動物実験委員会および兵庫県立がんセンター倫理委員会の承認を受けて実施した.実験動物には、4週齢の雌性 BALB/cAJcl-nu/nu ヌードマウス(日本クレア株式会社, Tokyo, Japan)を用いた. CCS 皮下担がん動物モデルは、MP-CCS-SY 細胞を1×10⁷個/100 µL culture medium の濃度で細胞懸濁液とし、これをヌードマウスの背部または左 大腿部に皮下移植して作成した.

移植4週後,腫瘍最大直径が10mmを超えたことを確認してから,担がん 動物モデルをジエチルエーテルにより安楽死させ,腫瘍塊を摘出した.兵庫 県立がんセンターにて摘出した腫瘍塊の半分を10%リン酸緩衝ホルマリン 溶液で固定し,パラフィン包埋した後,薄切標本(厚み4µm)を作成した. この薄切標本について,Hematoxylin-Eosin(HE)染色,Fontana-Masson 染色 による組織学的評価,ならびにHMB-45 抗体(希釈倍率1:75),Melan-A 抗体 (希釈倍率1:10),S-100 抗体(希釈倍率1:2000)を用いて免疫組織学的評価 を行った.HMB-45 は細胞内のプレメラノソームに,Melan-A はメラノソーム

に, S-100 はメラニン産生細胞に存在するタンパクである.また, Fontana-Masson 染色はメラニン顆粒を染色する染色法である.これらの染色 により、CCS 細胞の確認とメラニン産生についての評価を行った. 染色には 全て自動スライドガラス染色装置(Ventana BenchMark XT, Roche Diagnostics Japan, Tokyo, Japan)を使用した.

残りの腫瘍塊は 1% glutaraldehyde と 4% カコジル酸緩衝ホルマリン溶液で 固定した.その後,株式会社共同病理において,腫瘍塊は 1% 四酸化オスミ ウム溶液で後固定し,一般的な方法でエポキシ樹脂に包埋した後,極薄に薄 切した.薄切後,酢酸ウラニルとクエン酸鉛による二重染色を施行し,電子 顕微鏡 (JEM-100S/SX,日本電子株式会社,Tokyo, Japan)によるメラニン顆 粒の観察を行った.

【結果】

MP-CCS-SY 皮下担がん動物モデルは,移植後4週で背部ならびに左大腿部 皮下へ直径 10 mm 大の腫瘍を形成した(Fig.7A,B). 生じた腫瘍は周辺組織 との癒着が少なく境界明瞭な弾性軟の充実性腫瘍であった(Fig.7C,D). し かし,これらの腫瘍塊では肉眼的に黒色調を呈したメラニン色素は確認でき なかった.

背部皮下担がん動物モデルでの病理組織学的検査の結果を Fig. 8 に示す.
HE 染色では, CCS の特徴である円形の核と細胞質の乏しい紡錘形の細胞の集
蔟²⁾を認めた (Fig. 8 A, B). Fontana-Masson 染色において,メラニン顆粒は確
認されなかった (Fig. 8 C). 免疫組織学的評価において, Melan-A, HMB-45,
S-100 はそれぞれ陽性であった (Fig. 8 D, E, F).

背部皮下担がん動物モデルの腫瘍組織断面の電子顕微鏡写真を Fig. 9 に示す. 細胞質にわずかではあるが, Fontana-Masson 染色において確認することのできなかったメラニン顆粒が確認された.

【考察】

MP-CCS-SY 皮下担がん動物モデルの背部ならびに左大腿部において形成 された境界明瞭な充実性の腫瘍は、HE 染色では CCS 組織の特徴である円形 の核と細胞質の乏しい紡錘形の細胞集蔟を認めた. メラニン産生については、腫瘍塊の肉眼的な評価, Fontana-Masson 染色に よる組織学的評価においてはメラニン顆粒の確認はできなかったが、免疫組 織化学では HMB-45, Melan A, S-100 が陽性となり、メラニン産生機構の存 在が示された.そこで、より詳細な検討として、腫瘍組織の電子顕微鏡観察 を行った.その結果、Fig.9に示したように、わずかではあるがメラニン顆粒 を確認した.この結果より、今回作成した MP-CCS-SY 皮下担がん動物モデ ルはメラニン産生機構が存在するが、その機能は低く、メラニン顆粒をわず かに産生する CCS 皮下担がん動物モデルであると判定した.



Fig. 7. A Well-Defined Tumor Mass Formed under the Skin

A, dorsally CCS-inoculated model; B, femorally CCS-inoculated model; C, resected solid tumor mass; D, cross-sectional view of the tumor mass.



Fig. 8. Histological and Immunohistochemical Examination of Tumor Resected from Dosally Tumor-bearing Mice

A, H.E. staining (x 40) of the CCS tumor mass; B, High magnification of H.E. staining (x 200); C, Fontana-Masson stain (x 100); D, Immunohistochemical examination by melan-A (x 200); E, Immunohistochemical examination by HMB-45 (x 200); f, Immunohistochemical examination by S-100 (x 200).



Fig. 9. Transmission Electron Micrograph of the MP-CCS-SY Tumor The cytoplasm contained mature melanosomes (x 6,000). Inset: High magnification of mature melanosome (x 15,000). Scale bar: 400 nm.

第3節 BPA-Fr 投与後の体内動態評価

【目的】

BNCT を行う上で,腫瘍内の ¹⁰B 濃度ならびに周辺組織との ¹⁰B 濃度比は BNCT による治療効果を得るために極めて重要であり,その基準値は腫瘍内 ¹⁰B 濃度が 20-30 ppm 以上 ¹⁰,周辺組織との ¹⁰B 濃度比は 3 以上が必要とされ ている ¹¹.

本節では,第2章第2節で作成した MP-CCS-SY の背部ならびに大腿部皮 下担がん動物モデルを用いて, BPA-Fr 投与後の腫瘍内¹⁰B 濃度と周辺組織と の¹⁰B 濃度比が BNCT での治療効果が期待できるレベルであるか否かを確認 した.

【試料】

細胞培養には第1章第2節と同じ試料を使用した.細胞移植には第2章第2節と同じ試料を使用した.BPA-Frの調製,¹⁰B 濃度測定には第1章第3節と同じ試料を使用した.また,L-BPA は第1章第3節と同様の方法で,BPA-Fr (4000 µg¹⁰B/mL) として使用した.21 G 注射針 (S・B, NN-2138S), 25 G 注射針 (R・B, NN-2525R), 27 G 注射針 (S・B, NN-2719S), 1 mL シリンジ (中口,SS-01T), 20 mL シリンジ (横口,SS-20ESZ) はテルモ株式会社からの購入品を使用した.ヘパリンナトリウム注 (1 万単位/10 mL) は味の素ファルマ株式会社 (Tokyo, Japan) からの購入品を使用した.

【細胞株】

CCS 細胞株として, MP-CCS-SY を使用した. 細胞培養は第1章第2節と同様の方法で行った.

【方法】

CCS 皮下担がん動物として第2章第2節と同様の方法で背部または大腿部 皮下担がん動物モデルを作成した.また、本節では、コントロールとして無 移植のヌードマウスへの投与も同時に行った.ジエチルエーテル麻酔下で、 BNCTの臨床研究と同投与量^{4,8-10}の BPA-Fr (500 mg L-BPA/kg = 24 mg¹⁰B/kg) を担がん動物の右大腿静脈から,針先を 90°に曲げた 27 G 注射針と 1 mL シ リンジを用いて投与した. 投与 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 時間後に,まず,ヘパ リン処理した 25 G の注射針と 1 mL のシリンジを用いて各マウスの心臓から 血液サンプルを採取し,ジエチルエーテルで安楽死させた後に右心房の一部 を切除した.次に 21 G の注射針と 20 mL のシリンジを用いて,左心室から生 理食塩水 20 mL を注入することにより全身脱血を行った. 肝臓,脾臓,腎臓, 肺,脳,腫瘍などの組織サンプルは脱血後すぐに採取した. 各組織サンプル を生理食塩水で洗浄し,水分を除去するためにキムワイプ (S-200,日本製紙 クレシア株式会社, Tokyo, Japan)で軽く拭った. 皮膚と筋肉はマウスの右 臀部から採取した. 肝臓,腎臓,脳,腫瘍は高速ホモジナイザー (Physcotron[®] NS-50, Niti-on Irikaki, Chiba, Japan)でホモジネートした.

【¹⁰B 濃度の測定】

各サンプルの¹⁰B 濃度測定は第1章第3節と同様に ICP-AES 法を用いて行った. 重量測定した担がん動物の組織もしくはホモジネートを 15-mL polypropylene centrifuge tube に入れ,第1章第3節と同様に灰化処理した後に 各灰化サンプル中の¹⁰B 濃度を測定した.

【統計処理】

投与後の¹⁰Bの血中および各組織内動態に関して,背部および大腿部皮下 担がん動物モデル間の¹⁰B濃度について有意差を調べるため,サンプリング 時間ごとに Studentのt検定を用い,統計処理を行った.

【結果】

背部または大腿部皮下担がん動物モデルの各組織中および血液中の¹⁰B 濃 度の経時的推移の比較を Figs. 10-11, その値を Table 3 に示した.両モデルに おいて,血液,脾臓,肝臓,腎臓の¹⁰B 濃度の経時的変化は類似した挙動で あった.投与後 0.5 時間の時点では背部皮下担がん動物モデルが高値であり, その後¹⁰B 濃度が時間依存的に低下した.それに対して,肺,皮膚,筋肉, 脳,腫瘍における¹⁰B濃度は,投与直後よりも後に最高値が表れる体内動態 を示した.

両モデルにおける腫瘍内¹⁰B 濃度は最高値に到達する時間が異なり,それ ぞれ背部皮下担がん動物モデルが投与1時間後に74 ppm,大腿部皮下担がん 動物モデルが投与1.5時間後に45 ppmの最高値を得た.これらの値はBNCT での最小必要¹⁰B 濃度である20-30 ppmを上回る値であった.この時の腫瘍対 血液濃度(T/B)比,腫瘍対皮膚濃度(T/S)比は,背部皮下担がん動物モデ ルが9.7と4.9,大腿部皮下担がん動物モデルが7.7と7.9であり,BNCTにお いて治療の可否となる周辺組織との¹⁰B 濃度比3以上を満たした.また,担 がん動物と無移植ヌードマウスにおける皮膚の¹⁰B 濃度の変化は,背部皮下 担がん動物モデルの0.5時間における値が他の2群の値と比べて高い傾向にあ ることを除き,ほぼ同様であった.

【考察】

背部または大腿部皮下担がん動物モデルにおける腫瘍への¹⁰Bの集積性は, 腫瘍の¹⁰B 濃度ならびに周辺組織との¹⁰B 濃度比の高さから支持される通り, 十分高度かつ選択的であり,量的にみて熱中性子照射による BNCT 治療が期 待できる値が得られた.これは悪性黒色腫と同様に CCS 皮下担がん動物モデ ルでも腫瘍部への高濃度かつ選択的な¹⁰B 蓄積を認めた初の知見となった. この高濃度かつ選択的な¹⁰B 蓄積は,第1 章第4 節でも述べたように,第2 章第2 節で確認されたメラニン産生機構による取込の増強と,LAT-1 などの アミノ酸取込機構の亢進による能動的な L-BPA 取込の増強が関与しているも のと推察される.

それぞれの皮下担がん動物モデルでの腫瘍内¹⁰B 濃度の経時的変化における最高値の違いは,投与初期の血中¹⁰B 濃度に起因するものと考えられる. 投与 0.5 時間後において,血中¹⁰B 濃度は背部皮下担がん動物モデルが有意に高値であり,腫瘍への¹⁰B の供給が大腿部皮下担がん動物モデルと比較して多くなり,最高値が投与初期に現れたと考えられる.さらに,腫瘍における栄養血管形成の違いも¹⁰B 濃度の経時的変化の違いに関与するものと推察される.Fig. 12 に示したように,大腿部皮下担がん動物モデルに比べて,背部

皮下担がん動物モデルの腫瘍周辺には豊富で太い栄養血管の形成が観察された.これは、より末梢に近い大腿部では、周囲の血管系が乏しいため、栄養血管が形成されにくくなるのに対して、正中線に沿って移植を行った背部では周囲の血管系からの栄養血管の形成が行われやすいものと推察される.このような腫瘍周囲の皮下における豊富な栄養血管の形成は、腫瘍組織のみならず、その周辺組織にも豊富な血流を与えることとなり、結果として大腿部皮下担がん動物モデルに比べて背部皮下担がん動物モデルでは周辺組織の濃度が高まることで、T/S 比の低下を生じた(Table 3).これは Fig. 11 の投与 0.5時間後の背部皮下担がん動物モデルの皮膚における¹⁰B 蓄積が他の2 群よりも高い傾向にあることからも示唆される.さらに、これらの事実は血流豊富な腫瘍周囲では、BNCT 施行時に皮膚障害の発生を考慮しなければならないことを意味する.



Fig. 10. Time-course Changes of ¹⁰B Concentration in Blood and Tissues after Intravenous Administration of BPA-Fr (24 mg ¹⁰B/kg) to Nude Mice Having MP-CCS-SY in Dorsal Region (●) and Those in Femoral Region (○)

*: p < 0.05, **: p < 0.01, significantly different from the ¹⁰B concentration of dorsal region. Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).



Fig. 11. Time-course Changes of ¹⁰B Concentration in Tumor and Skin after Intravenous Administration of BPA-Fr (24 mg ¹⁰B/kg) to Nude Mice Having MP-CCS-SY in Dorsal Region (●), Those in Femoral Region (○) and Normal Nude Mice (■)

*: p<0.05, **: p<0.01, significantly different from the ¹⁰B concentration of dorsal region. Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).



Fig. 12. Photographs Showing CCS Formation under the Skin

A, dorsal region model; B, femoral region model.

Significant angiogenesis can be seen especially in the dorsal region.

			Conc	entration (µg	equiv. of boro	n/g)	
Tissue		0.5 hr	1 hr	1.5 hr	2 hr	2.5 hr	3 hr
Dlood	Dorsal	20.7 ± 3.4	8.0 ± 2.4	5.3 ± 0.9	5.0 ± 1.4	3.8 ± 0.5	1.2 ± 0.8
BIOOU	Femoral	12.7 ± 2.4	12.5 ± 6.2	5.9 ± 0.1	5.1 ± 0.8	3.3 ± 0.6	3.0 ± 0.3
Splaap	Dorsal	24.7 ± 3.6	10.8 ± 5.8	5.4 ± 1.7	2.7 ± 1.7	2.4 ± 0.7	1.1 ± 0.5
Spleen	Femoral	14.1 ± 1.8	12.6 ± 3.1	5.2 ± 1.5	4.7 ± 0.5	2.6 ± 0.7	2.8 ± 0.5
Luna	Dorsal	8.8 ± 4.8	7.9 ± 6.6	2.0 ± 0.4	1.5 ± 1.0	0.3 ± 0.6	0.5 ± 0.2
Lung	Femoral	5.3 ± 4.5	11.0 ± 7.4	2.0 ± 1.4	2.8 ± 0.7	0.7 ± 0.5	0.7 ± 0.4
Mussla	Dorsal	14.2 ± 1.4	14.5 ± 1.4	8.6 ± 0.5	9.0 ± 5.1	5.7 ± 1.2	3.2 ± 0.3
wiuscie	Femoral	9.6 ± 2.4	11.5 ± 2.1	8.5 ± 0.5	7.8 ± 1.0	5.7 ± 0.6	5.5 ± 1.3
Strin	Dorsal	24.2 ± 6.8	16.4 ± 6.7	10.5 ± 2.3	8.9 ± 1.9	8.1 ± 1.1	0.5 ± 0.3
SKIII	Femoral	15.5 ± 5.3	18.1 ± 5.1	5.8 ± 0.8	7.1 ± 2.0	5.3 ± 2.5	3.9 ± 1.2
Vidnov	Dorsal	123.6 ± 14.6	31.3 ± 24.0	8.6 ± 2.6	5.4 ± 2.3	0.1 ± 0.2	0.5 ± 0.4
Klulley	Femoral	56.0 ± 16.1	36.4 ± 28.8	4.5 ± 1.5	2.4 ± 0.7	0.6 ± 0.7	2.6 ± 0.7
Liver	Dorsal	14.7 ± 1.9	4.6 ± 1.7	2.7 ± 0.7	1.9 ± 0.4	1.1 ± 0.5	0.2 ± 0.4
Liver	Femoral	7.9 ± 2.0	6.8 ± 3.8	1.5 ± 1.4	2.0 ± 0.1	0.5 ± 0.4	1.5 ± 0.4
Droin	Dorsal	N.D. ^{a)}	0.7 ± 0.6	1.3 ± 0.2	1.8 ± 0.6	N.D. ^{a)}	N.D. ^{a)}
Diam	Femoral	1.3 ± 0.4	0.6 ± 0.8	0.8 ± 0.5	1.3 ± 0.5	1.3 ± 1.1	1.5 ± 0.5
Tumor	Dorsal	48.6 ± 2.2	74.0 ± 9.9	43.1 ± 8.9	37.4 ± 4.9	44.7 ± 3.2	21.9 ± 7.0
Tunioi	Femoral	27.5 ± 2.9	32.7 ± 5.7	45.4 ± 2.7	41.8 ± 5.0	30.6 ± 2.0	24.3 ± 2.8
T/B ratio	Dorsal	2.4 ± 0.6	9.7 ± 2.6	8.2 ± 0.3	7.6 ± 1.2	12.0 ± 0.8	20.1 ± 6.3
1/1/1/1/10	Femoral	2.2 ± 0.4	2.9 ± 1.0	7.7 ± 0.5	8.2 ± 0.6	9.5 ± 1.3	8.0 ± 1.3
T/S ratio	Dorsal	2.2 ± 0.9	4.9 ± 1.4	4.1 ± 0.1	4.3 ± 0.4	5.6 ± 0.7	54.7 ± 35.5
1/S ratio	Femoral	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.4	7.9 ± 1.6	6.0 ± 1.0	8.6 ± 3.5	6.4 ± 1.2

Table 3. ^{10}B Concentration-time Profiles in Blood and Tissues after Intravenous Administration of BPA-Fr (24 mg $^{10}B/kg)$

Dose: L-BPA, 24 mg 10 B/kg b.w.. Each value represents the mean ± S.D. (n=3).

a) Not detected (below limit of detection).

第4節 抗 L-BPA 抗体を用いた腫瘍内 L-BPA 分布評価

【目的】

BNCT での治療効果の発現には、前節でも述べたように、腫瘍内 ¹⁰B 濃度と 周辺組織との ¹⁰B 濃度比が重要である.これに加えて、BNCT では熱中性子照 射を受けた ¹⁰B が発する種々の放射線の飛程が細胞の大きさとほぼ等しいこ とから、 ¹⁰B が腫瘍細胞内に取り込まれ、なおかつ腫瘍組織全体に均一に分布 していることが治療の成否を決める重要な要件となる.

前節の検討では、MP-CCS-SY 皮下担がん動物モデルが高濃度かつ腫瘍組織 選択的な¹⁰B 蓄積を示すことを確認したが、その腫瘍内分布は明らかにされ ておらず、¹⁰B の分布に偏りがあれば、腫瘍細胞が残存してしまう可能性があ る. そこで本節では、切畑らが開発した anti-BPA monoclonal antibody (Anti-BPA MAb)⁵¹⁾を用いて免疫染色を行うことで、MP-CCS-SY 皮下担がん動物モデ ルにおける腫瘍内 L-BPA 分布を評価した.

【試料】

細胞培養には第1章第2節と同じ試料を使用した.細胞移植には第2章第2 節と同じ試料を使用した.BPA-Frの調製,¹⁰B 濃度測定には第1章第3節と 同じ試料を使用した.また,L-BPA は第1章第3節と同様の方法で,BPA-Fr (4000 µg¹⁰B/mL)として使用した.投与には第2章第3節と同じ試料を使用 した.薄切標本の作成には2章第2節と同じ試料を使用した.Anti-BPA MAb は大阪府立大学の切畑研究室から提供を受けた抗体を使用した.LSAB2 kit/HRP (DAB)はDAKO Japan からの購入品を免疫組織化学に使用した.

【細胞株】

CCS 細胞株として, **MP-CCS-SY** を使用した. 細胞培養は第1章第2節と同様の方法で行った.

【方法】

CCS 担がん動物として,第2章第2節と同様の方法で背部皮下担がん動物 モデルを作成した.投与は第2章第3節と同様の方法で行った.投与1時間 後,担がん動物をジエチルエーテルで安楽死させ,腫瘍塊を摘出した.この 腫瘍塊に対して第2章第2節と同様の方法で,ホルマリン固定,パラフィン 包埋,薄切を行い,薄切標本を作成した.得られた薄切標本について,HE染 色および anti-BPA MAb 抗体とLSAB2 kit/HRP (DAB) にて免疫染色による評 価を行った.Anti-BPA MAb 抗体を用いた免疫染色は,中川らの方法を参考に して行った⁵²⁾.この方法では,L-BPA は anti-BPA MAb (希釈倍率1:100) と 結合した後にLSAB2 kit/HRP (DAB)の試薬と反応し,褐色に染色されるこ とで同定される.陰性コントロールには BPA-Fr を投与しない担がん動物から 摘出した腫瘍組織を用いた.

【結果】

背部担がん動物モデルの腫瘍内L-BPA分布を評価した結果をFig. 13に示す. HE 染色した組織切片では、薄い線維性の被膜に覆われた腫瘍組織を認めた

(Fig. 13 A). BPA-Fr 未投与の動物で免疫染色を行った組織切片標本では,陰 性であった(Fig. 13 B). これに対して, BPA-Fr を投与した後に免疫染色を行 った組織切片標本では,腫瘍周辺の正常組織は陰性であり,腫瘍細胞のみに 比較的均一な陽性となった(Fig. 13 C). また腫瘍組織部の拡大像から,腫瘍 細胞の細胞質を中心に陽性となることが確認された(Fig. 13 D).

【考察】

BPA-Fr 未投与の動物で免疫染色を行った組織切片標本が陰性であったことから、本実験系の免疫染色では anti-BPA MAb の腫瘍組織に対する非特異的な反応を認めなかったといえる.一方、BPA-Fr 投与後の背部担がん動物モデル内の免疫染色では腫瘍周辺の正常組織は陰性であり、腫瘍組織に比較的均一な陽性となったことから、L-BPA 分布は腫瘍選択的かつ腫瘍内で比較的均一であること示唆された.また、細胞質を中心に陽性となることから、L-BPA の取込が細胞質内に及んでいる可能性が示された.これらの結果は、第1章

第3節の in vitro での高度の 10 B の腫瘍内蓄積を認めた結果と合わせて, BNCT により腫瘍細胞選択的な殺傷効果が得られることを予見させた.



Fig. 13. Micrographs (x 100) Showing Tumor Sections (T) with the Surrounding Normal Tissues (N) Resected from Mice with (A, C, D) and without (negative control, B) Administration of BPA-Fr

A, Hematoxylin-Eosin staining; B-D, immunostaining with anti-BPA MAb. D represents a magnified image (x 400) of C.

第5節 BNCTによる腫瘍縮小効果の評価

【目的】

前章までの結果から, BPA-Fr を静注した後の MP-CCS-SY 皮下担がん動物 モデルにおいて,高濃度かつ選択的な腫瘍内¹⁰B 蓄積を認め,その分布は比 較的均一であった.この結果より,BNCT による CCS に対する抗腫瘍効果が 十分期待できると判断し,熱中性子照射実験を行い,その抗腫瘍効果を評価 した.

本節の検討では、熱中性子照射による腫瘍の周辺組織ならびに胸部および 腹腔内臓器への副作用の少ない状態で、抗腫瘍効果を得ることを目的として、 BPA-Fr 投与後の最高値における T/S 比が高く、熱中性子の照射野を下肢に限 局できる MP-CCS-SY 大腿部皮下担がん動物モデルを実験に用いた.

【試料】

細胞培養には第1章第2節と同じ試料を使用した.細胞移植には第2章第2節と同じ試料を使用した. BPA-Fr の調製,¹⁰B濃度測定には第1章第3節と同じ試料を使用した.また,L-BPA は第1章第3節と同様の方法で,BPA-Fr

(4000 μg¹⁰B/mL)として使用した.投与には第2章第3節と同じ試料を使用 した.薄切標本の作成には2章第2節と同じ試料を使用した.

【細胞株】

CCS 細胞株として, **MP-CCS-SY** を使用した. 細胞培養は第1章第2節と同様の方法で行った.

【方法】

熱中性子照射実験は、京都大学原子炉実験所(KURRI)にて行った.大腿 部皮下担がん動物モデルは、第2章第2節と同様の方法で作成した.BPA-Fr の投与は、第2章第3節と同様の方法で行った.投与1時間後より、熱中性 子ビーム(出力:1 MW,照射時間:50分間,物理線量:7.4 Gy)を照射した (Table 4).実験はBNCT 群(24 mg¹⁰B/kg にて BPA-Fr 投与,熱中性子照射), Hot control 群 (生理食塩水投与,熱中性子照射), Cold control 群 (24 mg¹⁰B/kg にて BPA-Fr 投与のみ), Double control 群 (生理食塩水投与のみ)の4 群とし, 各群 n=4 で行った.照射後,各群の観察ならびに腫瘍サイズの計測を所定期間行い,腫瘍の短径と長径から腫瘍体積を次式により算出した.

Tumor volume (mm³) = $(4/3)\pi \times \{\text{minor axis (mm)/2}\}^2 \times \text{major axis (mm)/2}$

熱中性子照射を行った担がん動物は所定期間観察後にジエチルエーテルで 安楽死させ,腫瘍塊を摘出した.この腫瘍塊に対して第2章第2節と同様の 方法で,ホルマリン固定,パラフィン包埋,薄切を行い,薄切標本を作成し た.薄切標本は HE 染色を行い,組織学的に評価した.

Table 4. Absorbed Doses in Tumor and Skin of CCS-bearingMice in Hot Control Group and BNCT Group

Group	Absorbed dose (Gy)				
	Tumor	Skin			
Hot control (Neutron)	1.0	1.0			
BNCT	7.4	2.6			

【結果】

熱中性子照射後の各群の腫瘍体積変化を Fig. 14, BNCT 群の腫瘍縮小効果 を肉眼的に評価した画像を Fig. 15, その組織学的評価の画像を Fig. 16 にそれ ぞれ示す.

BPA-Fr または生理食塩水投与のみを行った非照射コントロール群では,投 与後いずれも腫瘍がほぼ同様の速度で増殖し,照射 18 日後には腫瘍体積比で 照射 1 日後の 5.2-9.4 倍となった.また,生理食塩水投与と熱中性子照射を 行った Hot control 群では,7 日後に腫瘍が増殖し始め,照射 23 日後には腫瘍 体積比で照射 1 日後の 5.8-8.0 倍となった.なお,これら3 群の腫瘍増殖曲 線の線形近似曲線(R 値は 0.93 以上)の傾きは,それぞれ Cold control 群:17.3,

Double control 群: 13.0, Hot control 群: 14.0 (照射7日以降)であり, 腫瘍増 殖速度はほぼ同程度であることが判明した.これに対して, BPA-Fr 投与と熱 中性子照射の両方を施行した BNCT 群では, 腫瘍が経時的に縮小し, 照射23 日後には腫瘍体積比で照射1日後の0-5.3% となった.

肉眼的評価において, BNCT 群の腫瘍は照射 1 日後ではその形状が確認で きる(Fig. 15 A)が, 照射 23 日では 2 匹で消失, 2 匹で皮膚の色がわずかに 異なり瘢痕形成を認めた(Fig. 15 B). Fig. 15 B に示すマウスを解剖したとこ ろ, その皮下に小腫瘤を認めた(Fig. 15 C).

組織学的評価において, Hot control 群の皮下に残存していた腫瘤 (Fig. 16 A, C) には腫瘍組織を認め, 熱中性子照射単独では腫瘍殺傷効果が認められない ことが明らかとなった. それに対して, BNCT 群の皮下に残存していた腫瘤 (Fig. 16 B, D) は, 腫瘍細胞のみが選択的に死滅し, 肉芽組織に置換した組 織像を認めたが, その周囲の表皮および皮下組織には損傷を認めなかった.

【考察】

Hot control 群にて,照射後に時間をおいて認めた腫瘍の増殖には,照射時 の動物へのストレスの影響や熱中性子照射の際に僅かに混在する速中性子の 関与が考えられる.速中性子は熱中性子に比ベエネルギーが高く,生体に照 射されると水素原子核(陽子)と衝突し,この運動エネルギーを付与された 反跳陽子が,DNAの二重鎖を切断して細胞を死滅させる⁵³⁻⁵⁶.しかし,照射 7 日後の腫瘍の増殖速度は他の 2 群の非照射コントロール群とほぼ同様であ り、速中性子の影響はほぼないものと考えられる. さらに、組織学的評価に より、Hot control 群の皮下に形成した腫瘍組織には壊死組織を認めず、熱中 性子照射単独では腫瘍殺傷効果が得られないことが明らかとなった. 一方、 BNCT 群の皮下に認めた腫瘤の組織標本では、その周囲の僅か 200 μm 程度の 厚さの表皮および皮下組織には全く損傷を認めずに、腫瘍細胞のみが選択的 に死滅し、肉芽組織を形成していることが判明した. これには、前述したよ うに CCS 担がん動物モデルでの高濃度かつ選択的な腫瘍内¹⁰B 蓄積と腫瘍内 の比較的均一な L-BPA 分布が大きく寄与している. 以上の結果は、BNCT が CCS に対して抗腫瘍効果を示した初めての実証例となった. さらに、腫瘍周 囲の正常組織部分には損傷が見られなかったことは、腫瘍選択的な殺傷効果 を特徴に持つ BNCT の有用性を裏付ける結果となった.



Fig. 14. Time-course Changes of Tumor Volume in Femorally MP-CCS-SY-Bearing Nude Mice after Thermal Neutron Irradiation Followed by Intravenous Administration of BPA-Fr (n=4)

Thermal neutrons: open symbols, irradiated; closed symbols, not irradiated. Circles, BPA-given groups; squares, saline-given groups.



Fig. 15. Macroscopic Appearance of Tumor Sites after BNCT Trial Using BPA-Fr

A, 1 day after neutron-beam irradiation in BNCT group; B and C, 23 days after neutron-beam irradiation in BNCT group. Circle in the photographs indicates location of the tumor.



Fig. 16. Micrographs (x 100) Showing Tumor Sections Resected from Mice without (Hot Control, A, C) and with (BNCT, B, D) Administration of BPA-Fr after BNCT Trial

A and B, Hematoxylin-Eosin staining; C and D represent a magnified image (x 400) of A and B, respectively.

第6節 小括

本章では, *in vivo* での MP-CCS-SY 皮下担がん動物モデルへの BPA-Fr 投与 後の¹⁰Bの腫瘍組織に対する集積を評価し,さらに, MP-CCS-SY 大腿部皮下 担がん動物モデルへの BPA-Fr 投与後の熱中性子照射実験による *in vivo* での 抗腫瘍効果を評価した.得られた結果を以下にまとめる.

- MP-CCS-SY 細胞の皮下移植により作成した担がん動物は、組織学的評価および透過型電子顕微鏡による評価から、わずかなメラニンの産生を認める CCS 担がん動物であることが確認された.
- MP-CCS-SY 皮下担がん動物モデルを用いた BPA-Fr 静注後の体内動態評価は, BNCT による治療効果が期待できるレベルの高濃度かつ選択的な腫瘍内 ¹⁰B 蓄積を認めた. これは先の *in vitro* での BPA-Fr の取込の結果と同様の結果であった.
- BPA-Fr 静注後の MP-CCS-SY 皮下担がん動物モデルにおける anti-BPA MAb を用いた免疫染色によって,腫瘍組織に比較的均一かつ腫瘍細胞選択的で細胞質優位な L-BPA 分布が確認された.
- MP-CCS-SY 皮下担がん動物モデルでの、非照射群ならびに熱中性子照射 コントロール群の腫瘍は、それぞれ、照射 18、23 日後には腫瘍体積比で 照射 1 日後の 5.2-9.4 倍となり、顕著な増大を認めた。
- MP-CCS-SY 皮下担がん動物モデルへの BPA-Fr 投与後の熱中性子照射 (BNCT 群)により、0-5.3% まで腫瘍が縮小し、顕著な抗腫瘍効果を認 めた.
- ・ BNCT 群の皮下に残存した組織塊の組織学的評価では, 腫瘍細胞が選択的 に死滅し, 肉芽組織に置換された組織像を認めた.

第3章 BPA-Fr を用いた CCS 筋肉内担がん動物に対す る BNCT の検討

第1節 序

前章までの検討でヒト由来 CCS 細胞株 (MP-CCS-SY) を皮下移植したモデ ルでは、高い腫瘍内への¹⁰B 取込と BNCT による抗腫瘍効果の発現が明らか となった.本章では、さらに臨床研究に向けて BNCT 後の長期成績を評価す る目的で、従前の CCS 皮下担がん動物モデルとは異なり、下肢深部の筋肉に 異なる種類の CCS 細胞を移植した担がん動物モデルを作成し、BPA-Fr 投与後 の体内動態評価ならびに BNCT 後の長期間の抗腫瘍効果を評価した.

第2節 異なる CCS 細胞株を用いた筋肉内担がん動物における BPA-Fr 投与 後の体内動態評価

【目的】

前章までの検討結果は、第1章の細胞内 ¹⁰B 取込試験において最も ¹⁰B 取込 量の高い細胞である MP-CCS-SY の大腿部皮下担がん動物モデルを用いた実 験であり、 ¹⁰B 取込量が少ない他の細胞においても、同様に BNCT による抗腫 瘍効果が期待できるほどの腫瘍内 ¹⁰B 取込が得られるかどうかは明らかでは ない. このことから、他の CCS 細胞株においても ¹⁰B の体内動態を掌握して おく必要がある.

第1章で用いた4種の CCS 細胞のうち,SU-CCS-1は、細胞内¹⁰B 取込試 験において比較的高い細胞内¹⁰B 取込を示すが細胞増殖速度が遅く,HS-MM は、細胞取込試験で比較的低い細胞内¹⁰B 取込を示すものの、腫瘍成長速度 が速いという性質を持つ.このような特性の違いが *in vivo* における¹⁰B の動 態へどのように反映されるかを確認することは、CCS に対する BNCT の前臨 床段階の検討として極めて重要と考えられる.

さらに,前章までの検討においては BNCT 後の長期成績については検討し ていないため,腫瘍が増大しても長期間の経過観察が可能な動物モデルが必 要となる.しかし,皮下に腫瘍を移植した担がん動物モデルは,長期間の経

過観察中にその腫瘍の増大により体外に腫瘍が露出する可能性があるため, BNCT 施行後の腫瘍の長期経過観察には適当ではない.そこで、下肢深部の 筋肉内に腫瘍を移植した担がん動物モデルの作成を企図した.

本節では, MP-CCS-SY に加えて SU-CCS-1 と HS-MM を用いて合計 3 種の CCS 筋肉内担がん動物モデルを新たに作成し, BPA-Fr 投与後の¹⁰B 体内動態 を評価した.

【試料】

細胞培養には第1章第2節と同じ試料を使用した.細胞移植には第2章第2節と同じ試料を使用した.BPA-Frの調製,¹⁰B濃度測定には第1章第3節と同じ試料を使用した.また,L-BPAは第1章第3節と同様の方法で,BPA-Fr

(4000 μg¹⁰B/mL)として使用した.体内動態評価には第2章第3節と同じ試 料を使用した.

【細胞株】

CCS 細胞株として, **MP-CCS-SY**, **SU-CCS-1** および **HS-MM** を使用した. 細胞培養は第1章第2節と同様の方法で行った.

【方法】

CCS 筋肉内担がん動物として第2章第2節の移植方法を改変し、それぞれの CCS 細胞株を1×10⁷個/100 µL culture medium の濃度で細胞懸濁液とし、これをヌードマウスの左大腿部深部の筋肉内に移植して作成した.ジェチルエーテル麻酔下で、BNCT の臨床研究と同投与量の BPA-Fr (24 mg¹⁰B/kg)を担がん動物の右大腿静脈から、針先を90^oに曲げた27G注射針と1 mLシリンジを用いて投与した.投与0.5、1、1.5、2時間後に、まず、各マウスの心臓からへパリン処理した25Gの注射針と1 mLのシリンジを用いて血液サンプルを採取し、ジェチルエーテルで安楽死させた後に右心房の一部を切除した.次に21Gの注射針と20 mLのシリンジを用いて、左心室から生理食塩水20 mLを注入することにより全身脱血を行った.肝臓、脾臓、腎臓、肺、脳、腫瘍などの組織サンプルは脱血後すぐに採取した.各組織サンプルを生理食塩

水で洗浄し,水分を除去するためにキムワイプで軽く拭った.皮膚と筋肉は マウスの右臀部から採取した. 肝臓,腎臓,脳,腫瘍は高速ホモジナイザー でホモジネートした.

【¹⁰B 濃度の測定】

各サンプルの ¹⁰B 濃度測定は第1章第3節と同様に ICP-AES 法を用いて行った. 重量測定した担がん動物の組織もしくはホモジネートを 15-mL polypropylene centrifuge tube に入れ,第1章第3節と同様に灰化処理した後に 各灰化サンプル中の ¹⁰B 濃度を測定した.





A, whole view of intramuscularly CCS-bearing nude mouse; B, Tumor tissue under the skin; C, cross-sectional view of the tumor mass.

【結果】

CCS 筋肉内担がん動物モデルは、どの細胞株においても移植後4週で左大腿部筋肉内に直径10mm大の腫瘍を形成した(Fig. 17A, B).生じた腫瘍は周辺の筋肉組織との癒着が少なく境界明瞭な弾性軟の充実性腫瘍であった(Fig. 17C).

筋肉内担がん動物モデルの各組織中および血液中の¹⁰B 濃度の経時的変化 の比較を Fig. 18, その値を Table 5, 測定値より算出した腫瘍対濃度比, 薬物 速度論的パラメーター(腫瘍内¹⁰B 濃度一時間曲線下面積 AUC_{tumor}および腫 瘍における¹⁰B のクリアランス Cl_{tumor})を Table 6 に示す.3種の異なる CCS 筋肉内担がん動物モデルにおいて,血液,肺,脾臓,皮膚,腎臓,肝臓の¹⁰B 濃度の経時的変化は類似した挙動であり, BPA-Fr の静脈投与直後から急速に ¹⁰B 濃度が低下した.それに対して,筋肉,脳,腫瘍においては,投与 0.5 時 間後から概ね一定の¹⁰B 濃度を維持し,腫瘍においては最高値を呈する¹⁰B 濃 度の経時的変化を示した.

3種の異なる CCS 筋肉内担がん動物モデルにおける ¹⁰B 濃度の経時的変化 は,腫瘍を除いてほぼ同様であった.腫瘍内 ¹⁰B 濃度については最高値を示 す時間が異なり,それぞれ MP-CCS-SY が投与 1.5 時間後に 41 ppm, SU-CCS-1 が投与1時間後に 31 ppm, HS-MM が投与1時間後に 33 ppm の最高値を得た. また,この時の T/B 比, T/S 比,腫瘍対筋肉濃度 (T/M) 比は, MP-CCS-SY が 3.9, 2.4, 2.7, SU-CCS-1 が 3.4, 2.7, 3.4, HS-MM が 3.4, 1.9, 2.8 であっ た. さらに, Table 6 に示したとおり, AUC_{tumor} は MP-CCS-SY における値が 他の 2 種の値より有意に高く, Cl_{tumor} は MP-CCS-SY の値が他の 2 種の値より 有意に低くなった.

【考察】

3種の異なる筋肉内担がん動物モデルにおける腫瘍の¹⁰B 濃度は,十分高度 かつ選択性も比較的高いものであり,熱中性子照射による BNCT 治療が期待 できるレベルであった.

それぞれの筋肉内担がん動物モデルにおける腫瘍の¹⁰B 濃度の経時的変化 の違いは、それらの腫瘍における排泄速度の違いから生じるものと考えられ

る. Table 6 に示したように、取込の高い MP-CCS-SY に比べて、SU-CCS-1 と HS-MM の Cl_{tumor} は高い値であった.これは、L-BPA がアミノ酸類似体である ことにより、腫瘍組織に誤認されて取り込まれた後に、腫瘍組織より排泄さ れるまでの過程に違いが存在するのではないかと考えられる.例えば Mishima らの報告⁹⁾では、悪性黒色腫細胞内に取り込まれた L-BPA はメラニン合成経 路の一部である DOPA 合成経路に組み込まれることで、腫瘍細胞内に保持さ れると記されている.また、各々の細胞株において栄養血管の形成による違 いなどの要因も考えられる.詳細については今後の更なる検討が必要である.



Fig. 18. Time-course Changes of ¹⁰B Concentration in Blood and Tissues after Intravenous Administration of BPA-Fr (24 mg ¹⁰B/kg) to Nude Mice Having HS-MM (○), MP-CCS-SY (□) and SU-CCS-1 (△) Each value represents the mean ± S.D. (n=3).

	Accumulation (µg equiv. of boron/g)					
Tissue	Cell line	0.5 hr	1 hr	1.5 hr	2 hr	
	MP-CCS-SY	18.9 ± 3.7	10.5 ± 1.0	10.6 ± 0.4	8.6 ± 1.3	
Blood	SU-CCS-1	19.1 ± 2.9	12.3 ± 0.6	6.4 ± 2.3	6.7 ± 1.0	
	HS-MM	15.2 ± 2.5	9.6 ± 0.6	7.5 ± 1.4	7.7 ± 2.0	
	MP-CCS-SY	23.9 ± 3.1	32.7 ± 5.2	40.9 ± 1.3	27.9 ± 18.5	
Tumor	SU-CCS-1	25.4 ± 6.6	31.1 ± 4.4	18.6 ± 8.6	22.4 ± 0.4	
	HS-MM	21.6 ± 9.7	32.6 ± 1.8	29.1 ± 10.5	26.2 ± 3.8	
	MP-CCS-SY	15.6 ± 1.1	6.6 ± 2.2	5.5 ± 1.1	5.1 ± 0.5	
Liver	SU-CCS-1	11.6 ± 6.8	7.4 ± 1.6	3.2 ± 1.8	2.2 ± 0.1	
	HS-MM	9.9 ± 2.3	5.6 ± 2.0	4.2 ± 2.2	4.2 ± 1.9	
	MP-CCS-SY	22.4 ± 1.8	13.6 ± 2.8	11.7 ± 1.1	6.9 ± 2.7	
Spleen	SU-CCS-1	19.3 ± 2.8	14.5 ± 0.9	5.6 ± 2.7	6.3 ± 0.8	
	HS-MM	17.2 ± 1.9	12.7 ± 1.9	8.3 ± 2.4	8.0 ± 2.8	
	MP-CCS-SY	13.9 ± 7.7	4.1 ± 1.2	4.0 ± 1.4	1.7 ± 0.4	
Lung	SU-CCS-1	15.2 ± 7.3	9.6 ± 2.6	2.4 ± 1.1	3.2 ± 0.9	
	HS-MM	10.4 ± 5.3	4.6 ± 2.2	3.9 ± 2.3	3.2 ± 1.6	
	MP-CCS-SY	78.2 ± 8.6	24.5 ± 8.8	15.1 ± 3.9	14.0 ± 3.4	
Kidney	SU-CCS-1	89.8 ± 45.1	23.0 ± 5.6	18.8 ± 5.2	5.3 ± 3.0	
	HS-MM	69.8 ± 16.1	17.8 ± 3.5	11.8 ± 3.0	9.6 ± 1.8	
	MP-CCS-SY	16.1 ± 3.2	10.1 ± 0.1	10.8 ± 1.3	5.9 ± 4.3	
Muscle	SU-CCS-1	14.6 ± 4.7	13.6 ± 2.7	15.2 ± 7.0	8.2 ± 1.5	
	HS-MM	12.9 ± 0.3	13.9 ± 1.4	10.9 ± 2.9	10.3 ± 2.6	
	MP-CCS-SY	15.3 ± 1.9	13.4 ± 3.7	15.5 ± 2.3	8.8 ± 3.5	
Skin	SU-CCS-1	23.7 ± 1.4	15.9 ± 1.0	15.2 ± 4.6	11.9 ± 0.5	
	HS-MM	34.6 ± 13.2	20.7 ± 0.5	12.1 ± 3.4	16.4 ± 3.4	
	MP-CCS-SY	6.2 ± 0.3	5.7 ± 1.4	6.9 ± 1.5	7.5 ± 1.0	
Brain	SU-CCS-1	4.2 ± 1.9	3.5 ± 1.5	3.3 ± 2.6	2.3 ± 1.7	
	HS-MM	3.8 ± 0.5	5.5 ± 0.6	29.1 ± 1.2	5.8 ± 1.2	

Table 5. ¹⁰B Concentration-time Profiles in Blood and Tissues after Intravenous Administration of BPA-Fr (24 mg ¹⁰B/kg)

Dose: L-BPA, 24 mg 10 B/kg b.w.. Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

Table 6. Tumor-to-blood and Tumor-to-normal Tissue Ratios of the BoronConcentration and Pharmacokinetic Parameters of ¹⁰B after IntravenousInjection of BPA-Fr

Cell line	T/B	T/S	T/M	AUC_{tumor} (µg×h/mg)	Cl _{tumor} (mL/hr/kg)
MP-CCS-SY	3.6	2.7	3.4	100.0 ± 14.8	243.3 ± 33.5
SU-CCS-1	3.4	1.9	2.8	$*66.3 \pm 9.3$	$*366.6 \pm 47.8$
HS-MM	3.9	2.4	2.7	$*82.9 \pm 13.0$	$*293.8 \pm 42.6$

*:*p*<0.05, significantly different from MP-CCS-SY.

第3節 BNCT による腫瘍縮小効果の評価

【目的】

3種の異なる筋肉内担がん動物モデルにおける腫瘍の¹⁰B濃度は十分高度か つ選択性も比較的高いものであり,熱中性子照射による BNCT 治療が期待で きる値であった.この結果をより,BNCT による抗腫瘍効果が十分期待でき ると判断し,実際に熱中性子照射実験を行い,その抗腫瘍効果を評価した.

本節の検討では,¹⁰Bの体内動態の検討と同様に CCS 細胞株が異なってい ても腫瘍成長抑制効果が得られるかを明らかにするために MP-CCS-SY に加 えて, SU-CCS-1, HS-MM に 3 種の異なる CCS 細胞株を用いた筋肉内担がん 動物モデルを実験に用いた.

【試料】

細胞培養には第1章第2節と同じ試料を使用した.細胞移植には第2章第2 節と同じ試料を使用した. BPA-Fr の調製,¹⁰B 濃度測定には第1章第3節と 同じ試料を使用した.また,L-BPA は第1章第3節と同様の方法で,BPA-Fr (4000 μg¹⁰B/mL)として使用した.投与には第2章第3節と同じ試料を使用 した.薄切標本の作成には2章第2節と同じ試料を使用した.

【細胞株】

CCS 細胞株として, **MP-CCS-SY**, **SU-CCS-1**, **HS-MM** を使用した. 細胞培養は第1章第2節と同様の方法で行った.

【方法】

熱中性子照射実験は,第3章第2節と同様に京都大学原子炉実験所(KURRI) にて施行した.3種の異なる筋肉内担がん動物モデルは,前節と同様の方法で 作成した.BPA-Frの投与は,第2章第3節と同様の方法で行った.投与1時 間後より,熱中性子照射(出力:1 MW,照射時間:60 分間,物理線量: MP-CCS-SY;6.8 Gy, SU-CCS-1;7.1 Gy, HS-MM;7.2 Gy)を行った(Table 7).実験はBNCT 群(24 mg¹⁰B/kg にて BPA-Fr 投与,熱中性子照射),Hot control 群(生理食塩水投与,熱中性子照射)の2群とし,各群 n=3 で行った.照射後,各群の観察ならびに腫瘍サイズの計測を所定期間行い,腫瘍の短径,長 径と高さから腫瘍体積を次式により算出した.

Tumor volume (mm³) = $(4/3)\pi \times (mm)/2 \times (mm)/2 \times (mm)/2 \times (mm)/2 \times (mm)/2$

熱中性子照射を行った担がん動物は,所定期間観察後にジエチルエーテル で安楽死させ,腫瘍塊を摘出した.この腫瘍塊に対して第2章第2節と同様 の方法で,ホルマリン固定,パラフィン包埋,薄切を行い,薄切標本を作成 した.薄切標本は HE 染色を行い,組織学的に評価した.

【統計処理】

照射後の各群の腫瘍体積において, BNCT 群とコントロール群間の統計的な有意差を調べるため,照射 20,45 日後に Student の t 検定を行った.

【結果】

各群の熱中性子照射後の腫瘍体積変化を Fig. 19, 腫瘍を肉眼的に評価した 画像を Fig. 20, その組織学的評価の画像を Fig. 21 にそれぞれ示す.本検討で は, BNCT 施行後の長期間の経過観察中にその腫瘍の増大により体外へ腫瘍 が露出することなく,長期成績の評価が可能であった.

生理食塩水投与と熱中性子照射を行った Hot control 群では,全ての CCS 細胞株の全個体において腫瘍の増殖を認めた. 照射 45 日後には腫瘍体積比で照射 1 日後の 5.9-33.1 倍となった. それに対して, BNCT 群では照射後より全個体において徐々に腫瘍の縮小を認め, MP-CCS-SY では照射後 17 日目に腫瘍体積が照射前の 1.5%, SU-CCS-1 では照射後 26 日目に 3.6%, HS-MM では照射後 20 日目に 57.1% にまで縮小した. その後,全個体において再成長が認められた. また,Hot control 群と BNCT 群の腫瘍体積の比較では,照射後 20 日目にはどの CCS 細胞株においても有意に腫瘍体積が縮小していることが示された. この有意な腫瘍成長抑制効果は,照射後 45 日目においても,MP-CCS-SY と SU-CCS-1 の 2 種で継続していた.

組織学的評価において,各 CCS 細胞株の BNCT 群において再成長してきた 組織塊 (Fig. 21)は CCS と同様の腫瘍組織像を認め,再成長した腫瘍塊は CCS であることが判明した.

【考察】

Figs. 19, 20 に示す通り, 3 種の異なる CCS 筋肉内担がん動物モデルにおい て, BNCT を施行することにより, CCS 皮下担がん動物モデルと同様に BNCT 後 3 週前後まで腫瘍縮小効果ならびに腫瘍成長抑制効果がもたらされること が示された. このことから,本モデルにおいて腫瘍が筋肉内に存在していて も体表部の腫瘍と同様に BNCT の治療効果が得られることが判明した.

その後の長期成績では、徐々に腫瘍が再増大することが明らかとなった. この原因には、CCS 皮下担がん動物モデルと異なり、まず、腫瘍がより深部 に形成されていることによる影響が考えられる. BNCT で用いられる熱中性 子ビームは熱中性子にエネルギー準位の高い熱外中性子を混合したビームで あり、熱外中性子は体外から照射されると組織に浸透してエネルギーを失う 過程で熱中性子となるため、深部組織に到達する熱中性子は体表部分と比較 するとエネルギーを失い、よりエネルギー準位の低い低速中性子に近づくも のと考えられる⁵⁷⁾.よって CCS 皮下担がん動物モデルと比較して、CCS 筋肉 内担がん動物モデルは腫瘍が深部に存在するために治療効果が得られにくく なり、腫瘍が再成長したのではないかと考えられる.

別の理由として, BNCT は照射前に個々の腫瘍細胞に¹⁰B を集積させ照射を 行うという腫瘍細胞を標的とした治療であるため,個々の腫瘍細胞について 着目すれば、¹⁰B 濃度が治療基準以下の細胞が存在しうることが示唆される. このような細胞として,休止期細胞⁵⁸⁾や低酸素状態の細胞が挙げられる. Masunaga らの検討ではこれらの細胞が BNCT 後の再発の原因になると報告さ れており⁵⁹⁾,本検討における再発の原因の一因と考えられる.これらの¹⁰B 濃度が治療基準以下の細胞の存在に対する対策については,今後のさらなる 検討が必要である.

腫瘍縮小効果ならびに腫瘍成長抑制効果には CCS 細胞株間に差が生じた. この理由の一つとして,照射時の腫瘍体積の違いが関係すると考えられる. 照射時の腫瘍体積は BNCT による治療において重要であり,基礎検討⁵⁶⁾,臨 床検討⁶⁰⁾の両面において,照射時の腫瘍体積が大きい症例では深部や辺縁部 において熱中性子が減弱し,治療効果が得られにくいことが報告されている. 本検討においては HS-MM の筋肉内担がん動物モデルが他の 2 種と比較して 照射時の腫瘍が大きく,全て同一条件で照射を行ったために治療効果が弱く なったものと考えられる.個々の腫瘍に合わせた照射量の設定が必要である.

本検討において認められた腫瘍の再成長は、先に述べたように個々の腫瘍 細胞において¹⁰Bの取込が低い腫瘍細胞が存在することがその大きな理由の 一つであるが、BNCTの臨床研究ではその様な状況を考慮して複数回照射に よる対応がなされる場合もある¹⁰⁰.また、宮武らは腫瘍殺傷効果の増強を目 的とした治療として、アルキル化薬であるテモゾロマイドを用いた薬剤併用 のBNCTや、L-BPAやテモゾロマイドが取り込まれにくい低酸素領域の細胞、 休止期細胞に向けたX線照射との併用のBNCTを考案し、後者においては BNCT単独、テモゾロマイドとX線照射の併用療法と比較して、平均生存期 間が有意に延長するという結果を報告している⁸⁾.本検討においても単回照 射によって腫瘍の縮小がみられたことから、複数回照射や薬剤治療の併用な どの治療オプションの選択が腫瘍殺傷効果の増強をもたらす可能性を持って いると考えられる.

			Absorbe	d dose (Gy)		
Cell line	Tumor		Skin		Muscle	
	BNCT	Neutron	BNCT	Neutron	BNCT	Neutron
MP-CCS-SY	6.8	1.1	3.4	1.1	4.1	1.1
SU-CCS-1	7.1	1.2	3.8	1.2	4.2	1.2
HS-MM	7.2	1.2	3.7	1.2	5.0	1.2

Table 7. Absorbed Doses in Tumor, Skin and Muscle of CCS-bearing Mice



Fig. 19. Time-course Changes of the Tumor Volume after Neutron Irradiation to BNCT Groups (°; HS-MM, □; MP-CCS-SY, △; SU-CCS-1) and Control Groups (•; HS-MM, ■; MP-CCS-SY, ▲; SU-CCS-1)

*: p < 0.05, **: p < 0.01, significantly different from the corresponding control group at day 20 and 45. Each value represents the mean \pm S.D. (n = 3).



Fig. 20. Macroscopic Appearance of Tumor Sites of Intramascularly CCS-bearing Mice after BNCT Trial Using BPA-Fr



Fig. 21. HE Staining of CCS Tumor Masses Resected from Nude Mice in BNCT Groups on Day 90

(A, B and C) Scale bar: 5 mm. Tumor cells were observed in the intramuscular area.

(D, E and F) Scale bar: 50 μ m. High magnification of the corresponding HE staining. Each CCS was composed of nests of monotonous polygonal cells with clear cytoplasm.

第4節 小括

本章では、3種の異なる CCS 細胞株を用いた筋肉内担がん動物モデルでの BPA-Fr 投与後の体内動態評価ならびに熱中性子照射実験による *in vivo* での抗 腫瘍効果を評価した.得られた結果を以下にまとめる.

- ・ 3種の異なる CCS 筋肉内担がん動物モデルを用いた BPA-Fr 静注後の体内 動態評価では, BNCT 治療効果が期待できるレベルの高濃度かつ比較的選 択的な腫瘍内¹⁰B 濃度蓄積を認めた.
- 3 種の異なる CCS 筋肉内担がん動物モデルにおける熱中性子照射コント ロール群の腫瘍は照射後も増殖を認め、照射 45 日後には腫瘍体積比で照 射1日後の 5.9-33.1 倍となった.
- 3種の異なる CCS 筋肉内担がん動物モデルへの BPA-Fr 投与後の熱中性子 照射(BNCT)によって,全ての個体で皮下担がん動物モデルと同様に抗 腫瘍効果を認めた.そして,腫瘍の縮小後に再成長を認めた. CCS 筋肉 内担がん動物モデルは BNCT 後の腫瘍の長期観察が可能であり,また筋 肉内の深部に生じた腫瘍でも BNCT の単回照射によって腫瘍のコントロ ールが可能であることが示唆された.

総 括

本研究では, CCS の新たな治療方法としての BNCT の検討を目的とし,4 種類のヒト由来 CCS 細胞株を用いて, BPA-Fr 暴露による¹⁰B の細胞内取込評 価, CCS 担がん動物モデルにおける BPA-Fr 静注後の¹⁰B の体内動態評価なら びに, BPA-Fr 投与後の BNCT による CCS 担がん動物の治療効果を評価した.

CCS 細胞株における BPA-Fr 暴露後の¹⁰B の細胞内取込評価において, BPA-Fr は CCS 細胞株に対して,細胞増殖能に影響を与えず,また¹⁰B は濃度 依存的かつ正常組織由来細胞や悪性黒色腫細胞のそれに比べて高濃度に取り 込まれることが示された.

CCS 皮下担がん動物モデルにおける BPA-Fr の体内動態評価において, MP-CCS-SY 皮下担がん動物での高濃度かつ選択的な腫瘍内¹⁰B 蓄積を認めた. また,比較的均一な L-BPA 分布を腫瘍細胞内に認めた.

熱中性子照射による CCS 皮下担がん動物モデルの治療効果の評価において, BPA-Fr 投与後の熱中性子照射(BNCT)は腫瘍細胞を選択的に死滅させるこ とが示された.

CCS 皮下担がん動物モデルと比較してより深部に腫瘍を作成した CCS 筋肉 内担がん動物モデルは BNCT 後の腫瘍の長期観察に有用であった. 同モデル での BPA-Fr の体内動態評価では, HS-MM, MP-CCS-SY, SU-CCS-1 は MP-CCS-SY 皮下担がん動物と同様に高濃度かつ選択的な腫瘍内¹⁰B 蓄積を認 めた. さらに熱中性子照射による CCS 筋肉内担がん動物モデルの治療効果の 評価において,全ての個体で CCS 皮下担がん動物モデルと同様に抗腫瘍効果 を認めた. そして,一度,腫瘍が縮小した後に再成長を認めた.

このように、本研究で見出した知見は、L-BPA を用いる BNCT が CCS の新 たな治療法と成りえる可能性を示した.このことは外科的切除術以外に確立 された治療法のない CCS の治療法の発展に少なからず寄与するものと考える.

謝 辞

稿を終えるに臨み,学部4回生から博士課程に至るこの6年間にわたり若 輩者である私に対し,惜しみないご指導ご鞭撻を賜りました神戸学院大学薬 学部 市川秀喜 教授ならびに福森義信 教授に深甚なる謝意を表します.

本稿の査読を賜り, 適切なご助言を頂きました神戸学院大学薬学部 福島昭 二 教授, 屋山勝俊 准教授ならびに同大学栄養学部 水品善之 准教授に厚く 御礼申し上げます.また, 屋山准教授には動物実験手技のご指導も賜り, 重 ねて御礼申し上げます.

本研究を遂行するにあたり,研究の立案から実施,さらには研究資金獲得 にいたるまで研究全般にわたって数々の多大なるご助力を賜りました兵庫県 立がんセンター整形外科 藤本卓也 先生に心から感謝いたします.また,ご 支援を賜りました同センター整形外科 藤田郁夫 先生ならびに今堀正也 先 生に心から感謝いたします.

本研究を遂行するにあたり,実験全般にわたって懇切丁寧なご指導ならび に数々の有益なご助言を賜りました兵庫県立がんセンター研究部 須藤 保 先生ならびに牛尾 伊佐子 研究員に心から感謝いたします.

病理組織診断に対する有益なご助言を賜りました兵庫県立がんセンター病 理部 佐久間 淑子 先生に心から感謝いたします.

熱中性子照射実験において,多大なご助力を賜りました京都大学 原子炉実 験所 小野公二 教授,鈴木 実 教授,櫻井良憲 准教授,田中浩基 准教授に 心から感謝いたします.

Anti-BPA MAb のご供与ならびに有益なご助言を賜りました大阪府立大学 大学院 21 世紀科学研究機構 切畑光統 特任教授,服部能英 助教,椋本麻里 研究員,また,anti-BPA MAb を用いた免疫染色実験について有益なご助言を 賜りました大阪医科大学 脳神経外科 宮武伸一 特任教授,川端信司 講師な らびに平松 亮 助教に厚く御礼申し上げます.

本研究に対するご支援を賜りました神戸大学大学院 医学研究科 整形外科 学分野 黒坂昌弘 教授ならびに秋末敏宏 講師に厚く御礼申し上げます.

L-BPA をご供与賜りました, ステラファーマ株式会社 浅野智之氏ならびに 上原幸樹氏に厚く御礼申し上げます.

MP-CCS-SY 細胞株は宮崎大学医学部 小児科 盛武 浩 先生より, SU-CCS-1 細胞株は Department of Pathology, USC Keck School of Medicine, Alan L. Epstein 先生より, HS-MM 細胞株は岐阜大学大学院 医学研究科腫瘍制御学 講座 免疫病理学分野 竹内 保 先生より, KAS 細胞株はがん研有明病院より ご供与賜りました. ここに厚く御礼申し上げます.

数々の有益なご助言と叱咤激励を賜りました神戸学院大学薬学部製剤学研 究室の学生,研究員ならびに卒業生の皆様に心から感謝いたします.

本研究を遂行する上で、その尊い生命を捧げてくれた実験動物に畏敬の念 を表します.

最後になりましたが、常に暖かく見守り、時に激励の言葉をかけてくれた 家族の多大なる理解と支援に対して心より感謝いたします.

引用文献

- 1) 若尾文彦, 西本 寛, 片野田 耕太, 津熊秀明, 三上春夫, がんの統計'12, 1-104 (2012).
- 長谷川 匡,小田義直, *腫瘍病理鑑別診断アトラス 軟部腫瘍*,文光堂, 1-276 (2011).
- 3) 藤本卓也, 鈴木 実, 市川秀喜, 悪性骨・軟部腫瘍におけるホウ素中性子捕 捉療法 (BNCT), *臨床整形外科*, 46 (6), 534-541 (2011).
- 4) 小野公二,鈴木 実,中性子捕捉療法の現状と将来, 放射線生物研究, 45, 70-78 (2010).
- Imahori Y., Ueda S., Ohmori Y., Kusuki T., Ono K., Fujii R., Ido T., Fluorine-18-labeled fluoroboronophenylalanine PET in patients with glioma, J. Nucl. Med., 39, 325-33 (1998).
- Barth R.F., Soloway A.H., Fairchild R.G., Burugger R.M., Burugger R.M., BNCT for cancer-realities and prospects, *Cancer*, **70**, 2995-3007 (1992).
- Barth R.F., Soloway A.H., Brugger, R.M., Boron neutron capture therapy of brain tumors: Past history, current status and future potential, *Cancer Invest.*, 14, 534-560 (1996).
- 8) 宮武伸一,悪性脳腫瘍に対する最新放射線治療とその成績: 放射線治療 における外科治療の役割, 脳外誌, 19, 899-906 (2010).
- Mishima Y., Kondoh H., Dual control of melanogenesis and melanoma growth: overview molecular to clinical level and the reverse, *Pigment Cell Res.*, 13, 10-22 (2000).
- Kato I., Ono K., Sakurai Y., Ohmae M., Maruhashi A., Imahori Y., Kirihata M., Nakazawa M., Yura Y., Effectiveness of BNCT for recurrent head and neck malignancies, *Appl. Radiat. Isot.*, **61**, 1069-73 (2004).
- Barth R.F., Vicente M.G., Harling O.K., Kiger W.S. III, Riley K.J., Binns P.J., Wagner F.M., Suzuki M., Aihara T., Kato I., Kawabata S., Current status of boron neutron capture therapy of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer, *Radiat. Oncol.*, 7(146), 1-21 (2012).

- Suzuki M., Sakurai Y., Masunaga S., Kinashi Y., Nagata K., Maruhashi A., Ono K., A preliminary experimental study of boron neutron capture therapy for malignant tumors spreading in thoracic cavity, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **37**, 245-249 (2007).
- 13) 古林 徹, 加速器 BNCT 照射システムの必要性, エネルギーレビュー, 31(11), 7-10 (2011).
- 14) 小野公二,世界初の加速器中性子源を用いたホウ素中性子捕捉療法
 (BNCT)の治験第1相の開始,月刊新医療,39(12),70-73 (2012).
- 15) Takeuchi A., Possible application of boron neutron capture therapy to canine osteosarcoma, *Nihon Juigaku Zasshi*, **47(6)**, 869-78 (1985).
- Lemmen P., Weissfloch L., Auberger T., Probst T., Uptake and distribution of the boron-containing ether lipid B-Et-11-OMe in tumor-bearing mice, *Anticancer Drugs*, 6(6), 744-8 (1995).
- 17) Weissfloch L., Bremer M., Lemmen P., Probst T., Wagner M., Peller M., Auberger T., Senekowitsch-Schmidtke R., Tempel K., Molls M., New drugs for BNCT: an experimental approach, *Strahlenther Onkol.*, **175**, 118-20 (1999).
- 18) Tjarks W., Barth R.F., Rotaru J.H., Adams D.M., Yang W., Kultyshev R.G., Forrester J., Barnum B.A., Soloway A.H., Shore S.G., *In vivo* evaluation of phosphorous-containing derivatives of dodecahydro-closo-dodecaborate for boron neutron capture therapy of gliomas and sarcomas, *Anticancer Res.*, 21, 841-6 (2001).
- Mitin V.N., Kulakov V.N., Khokhlov V.F., Sheino I.N., Arnopolskaya A.M., Kozlovskaya N.G., Zaitsev K.N., Portnov A.A., Comparison of BNCT and GdNCT efficacy in treatment of canine cancer., *Appl. Radiat. Isot.*, **67**, S299-301 (2009).
- 20) Ferrari C., Zonta C., Cansolino L., Clerici A.M., Gaspari A., Altieri S., Bortolussi S., Stella S., Bruschi P., Dionigi P., Zonta A., Selective uptake of *p*-boronophenylalanine by osteosarcoma cells for boron neutron capture therapy, *Appl. Radiat. Isot.*, **67**, S341-4 (2009).
- 21) Gregoire V., Begg A.C., Huiskamp R., Verrijk R., Bartelink H., Selectivity of

boron carriers for boron neutron capture therapy: pharmacological studies with borocaptate sodium, L-boronophenylalanine and boric acid in murine tumors, *Radiother. Oncol.*, **27(1)**, 46-54 (1993).

- 22) Yamada Y., Toda K., Kahl S.B., Ichihashi M., Enhanced therapeutic effect on murine melanoma and angiosarcoma cells by boron neutron capture therapy using a boronated metalloporphyrin, *Kobe J. Med. Sci.*, **40**(1), 25-37 (1994).
- 23) Pignol J.P., Oudart H., Chauvel P., Sauerwein W., Gabel D., Prevot G., Selective delivery of 10B to soft tissue sarcoma using 10B-L-borophenylalanine for boron neutron capture therapy, *Br. J. Radiol.*, **71(843)**, 320-323 (1998).
- 24) Kato I., Fujita Y., Maruhashi A., Kumada H., Ohmae M., Kirihata M., Imahori Y., Suzuki M., Sakrai Y., Sumi T., Iwai S., Nakazawa M., Murata I., Miyamaru H., Ono K., Effectiveness of boron neutron capture therapy for recurrent head and neck malignancies, *Appl. Radiat. Isot.*, **67**, S37-42 (2009).
- 25) Inoue M., Lee C.M., Ono K., Suzuki M., Tokunaga T., Sawa Y., Okumura M., Clinical effectiveness of boron neutron capture therapy for a recurrent malignant peripheral nerve sheath tumor in the mediastinum, *J. Thorac. Oncol.*, 5, 2037-2038 (2010).
- 26) Enzinger M.F., Clear-cell sarcoma of tendons and aponeuroses. An analysis of 21 cases, *Cancer*, 18, 1163-1174 (1965).
- 27) Deenik W., Mooi J.W., Rutgers L.J., Hart A.A., Kroon B.B., Clear cell sarcoma (malignant melanoma) of soft parts: A clinicopathologic study of 30 cases, *Cancer*, 86, 969-975 (1999).
- 28) Kawai A., Hosono A., Nakayama R., Matsumine A., Matsumoto S., Ueda T., Tsuchiya H., Beppu Y., Morioka H., Yabe H., Clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses: a study of 75 patients, *Cancer*, 109, 109-116 (2007).
- 29) Lucas R.D., Nascimento G.A., Sim H.F., Clear cell sarcoma of soft tissues. Mayo Clinic experience with 35 cases, Am. J. Surg. Pathol., 16, 1197-1204 (1992).
- 30) Chung, E.B., Enzinger, F.M., Malignant melanoma of soft parts: a reassess- ment

of clear cell sarcoma. Am. J. Surg. Pathol., 7, 405–413 (1983).

- 31) Fujimoto T., Andoh T., Sudo T., Fujita I., Imabori M., Moritake H., Sugimoto T., Sakuma Y., Takeuchi T., Sonobe H., Epstein L.A., Akisue T., Kirihata M., Kurosaka M., Fukumori Y., Ichikawa H., Evaluation of BPA uptake in clear cell sarcoma (CCS) *in vitro* and development of an *in vivo* model of CCS for BNCT studies. *Appl. Radiat. Isot.*, **69**, 1713-1716 (2011).
- 32) Andoh T., Fujimoto T., Sudo T., Fujita I., Imabori M., Moritake H., Sugimoto T., Sakuma Y., Takeuchi T., Kawabata S., Kirihata M., Akisue T., Yayama K., Kurosaka M., Miyatake S., Fukumori Y., Ichikawa H., Boron neutron capture therapy for clear cell sarcoma (CCS): Biodistribution study of *p*-borono-_L-phenylalanine in CCS-bearing animal models. *Appl. Radiat. Isot.*, **69**, 1721-1724 (2011).
- 33) Andoh, T, Fujimoto T., Sudo T., Suzuki M., Sakurai Y., Sakuma T., Moritake H., Sugimoto T., Takeuchi T., Sonobe H., Epstein L.A., Fukumori Y., Ono K., Ichikawa H., Boron neutron capture therapy as new treatment for clear cell sarcoma: Trial on different animal model. *Appl. Radiat. Isot.*, in press.
- 34) Fujimoto T., Andoh T., Sudo T., Fujita I., Moritake H., Sugimoto T., Sakuma T., Akisue T., Kawabata S., Kirihata M., Suzuki M., Sakurai Y., Ono K., Fukumori Y., Kurosaka M., Ichikawa H., Boron neutron capture therapy (BNCT) selectively destroys human clear cell sarcoma in mouse model. *Appl. Radiat. Isot.*, **73**, 96-100 (2013).
- 35) 長谷川 匡, 軟部腫瘍の遺伝子診断, *臨床病理*, 58, 371-381 (2010).
- 36) Zucman J., Delattre O., Desmaze C., Epstein L.A., Stenman G., Speleman F., Eletchers M.D.C., Aurias A., Thomas G., EWS and ATF-1 gene fusion induced by t(12;22) translocation in malignant melanoma of soft parts, *Nat. Genet.*, 4, 341-345 (1993).
- 37) Moritake H., Sugimoto T., Asada Y., Yoshida M.A., Maehara Y., Epstain A.L., Kuroda H., Newly established clear cell sarcoma (malignant melanoma of soft parts) cell line expressing melanoma-associated Melan-A antigen and overexpressing C-MYC oncogene, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 135, 48-56

(2002).

- 38) Epstein L.A., Martin A.O., Kempson R., Use of a newly established human cell line (SU-CCS-1) to demonstrate the relationship of clear cell sarcoma to malignant melanoma, *Cancer Res.*, 44, 1265-1274 (1984).
- Jishage M., Fujino T., Yamazaki Y., Kuroda H., Nakamura T., Identification of target genes for EWS/ATF-1 chimeric transcription factor, *Oncogene*, 22, 41-49 (2003).
- 40) Sonobe H., Furihata M., Iwata J., Ohtsuki Y., Mizobuchi H., Yamamoto H., Kumano O., Establishment and characterization of a new human clear-cell sarcoma cell-line, HS-MM, *J. Pathology*, **169**, 317-322 (1993).
- 41) Wang W.L., Mayordomo E., Zhang W., Hernandez V.S., Tuvin D., Garcia L., Lev D.C., Lazar A.J., López-Terrada D., Detection and characterization of EWSR1/ATF1 and EWSR1/CREB1 chimeric transcripts in clear cell sarcoma (melanoma of soft parts), *Mod. Pathol.*, 22, 1201-1209 (2009).
- 42) Yoshino K., Suzuki A., Mori Y., Kakihana H., Honda C., Mishima Y., Kobayashi T., Kanda K., Improvement of solubility of *p*-boronophenylalanine by complex formation with monosaccharides, *Strahlenther Onkol.*, 165, 127-129 (1989).
- 43) Tamat S.R., Moore D.E., Allen B.J., Determination of boron in biological tissues by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Anal. Chem.*, 59, 2161-2164 (1987).
- 44) Utsumi H., Tano K., Mizuma N., Kobayashi T., Ichihashi M., Cellular effect of thermal neutron capture treatment using ¹⁰B₁-para-boronophenylalanine: lethal effect on melanoma cells with different degrees of X-ray sensitivity, *J. Radiat. Res.*, **37(3)**, 193-198 (1996).
- 45) Babu E., Kanai Y., Chairoungdua A., Kim D.K., Iribe Y., Tangtrongsup S., Jutabha P., Li Y., Ahmed N., Sakamoto S., Anzai N., Nagamori S., Endou H., Identification of a novel system L amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters, *J. Biol. Chem.*, **278**, 43838-43845 (2003).
- 46) Witte D., Ali N., Carlson N., Younes M., Overexpression of the neutral amino

acid transporter ASCT2 in human colorectal adenocarcinoma, *Anticancer Res.*, **22**, 2555-2557 (2002).

- 47) Gupta N., Miyauchi S., Martindale R.G., Herdman A.V., Podolsky R., Miyake K., Mager S., Prasad P.D., Ganapathy M.E., Ganapathy V., Upregulation of the amino acid transporter ATB^{0,+} (SLC6A14) in colorectal cancer and metastasis in humans, *Biochim. Biophys. Acta*, **1741**, 215-223 (2005).
- 48) Detta A., Cruickshank S.G., L-amino acid transporter-1 and boronophenylalanine-based boron neutron capture therapy of human brain tumors, *Cancer Res.*, 69, 2126-2132 (2009).
- 49) Wittig A., Sauerwein W.A., Coderre J.A., Mechanisms of transport of *p*-borono-phenylalanine through the cell membrane *in vitro*, *Radiat. Res.*, 153, 173-180 (2000).
- 50) 大野招伸, 浅田 祐士郎, 佐藤信也, 日野浦 雄之, 作 良彦, 田島直也, 住 吉昭信, アキレス腱に発生した明細胞肉腫の1例, J. Jpn. Soc. Clin. Cytol., 35, 500-503 (1996).
- 51) Kirihata M., Asano T., JP patent pending 2008-94729.
- 52) 中川修宏, 悪性グリオーマに対する硼素中性子捕捉療法の治療効果の検討: ラット C6 glioma モデルを用いた基礎研究, 近畿大医誌, 31, 215-224 (2006).
- 53) Faião-Flores F., Coelho P.R., Arruda-Neto J., Maria D.A., Boron neutron capture therapy induces cell cycle arrest and DNA fragmentation in murine melanoma cells, *Appl. Radiat. Isot.*, 69(12), 1741-4 (2011).
- 54) Kinashi Y., Takahashi S., Kashino G., Okayasu R., Masunaga S., Suzuki M., Ono K., DNA double-strand break induction in Ku80-deficient CHO cells following boron neutron capture reaction, *Radiat. Oncol.*, 6(106), 1-8 (2011).
- 55) Okumura K., Kinashi Y., Kubota Y., Kitajima E., Okayasu R., Ono K., Takahashi S., Relative biological effects of neutron mixed-beam irradiation for boron neutron capture therapy on cell survival and DNA double-strand breaks in cultured mammalian cells, *J. Radiat. Res.*, 54(1), 70-5 (2013).
- 56) Dagrosa A.M., Viaggi M., Longhino J., Calzetta O., Cabrini R., Edreira M.,

Juvenal G., Pisarev A.M., Experimental application of boron neutron capture therapy to undifferentiated thyroid carcinoma, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **57**, 1084-1092 (2003).

- 57) Kobayashi T., Sakurai Y., Kanda K., Fujita Y., Ono K., The remodeling and basic characteristics of the heavy water neutron irradiation facility of the Kyoto University research reactor, mainly for neutron capture therapy, *Nuclear Technology*, **131**, 354-378 (2000).
- 58) Yoshida F., Matsumura A., Shibata Y., Yamamoto T., Nakauchi H., Okumura M., Nose T., Cell cycle dependence of boron uptake from two boron compounds used for clinical neutron capture therapy. *Cancer lett.*, **187**, 135-141 (2002).
- 59) Masunaga S., Ono K., Significance of the response of quiescent cell populations within solid tumors in cancer therapy, *J. Radiat. Res.*, **43**, 11-25 (2002).
- 60) Fairchild R.G. and Bond V.P., Current status of 10B-neutron capture therapy: enhancement of tumor dose via beam filtration and dose rate, and the effects of these parameters on minimum boron content: a theoretical evaluation, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **11(4)**, 831-40 (1985).

主論文

- Fujimoto T., <u>Andoh T.</u>, Sudo T., Fujita I., Imabori M., Moritake H., Sugimoto T., Sakuma Y., Takeuchi T., Sonobe H., Epstein L.A., Akisue T., Kirihata M., Kurosaka M., Fukumori Y., Ichikawa H., Evaluation of BPA uptake in clear cell sarcoma (CCS) *in vitro* and development of an *in vivo* model of CCS for BNCT studies. *Appl. Radiat. Isot.*, **69**, 1713-1716 (2011).
- <u>Andoh T.</u>, Fujimoto T., Sudo T., Fujita I., Imabori M., Moritake H., Sugimoto T., Sakuma Y., Takeuchi T., Kawabata S., Kirihata M., Akisue T., Yayama K., Kurosaka M., Miyatake S., Fukumori Y., Ichikawa H., Boron neutron capture therapy for clear cell sarcoma (CCS): Biodistribution study of *p*-borono-_L-phenylalanine in CCS-bearing animal models. *Appl. Radiat. Isot.*, 69, 1721-1724 (2011).
- Fujimoto T., <u>Andoh T.</u>, Sudo T., Fujita I., Moritake H., Sugimoto T., Sakuma T., Akisue T., Kawabata S., Kirihata M., Suzuki M., Sakurai Y., Ono K., Fukumori Y., Kurosaka M., Ichikawa H., Boron neutron capture therapy (BNCT) selectively destroys human clear cell sarcoma in mouse model. *Appl. Radiat. Isot.*, **73**, 96-100 (2013).
- <u>Andoh T.</u>, Fujimoto T., Sudo T., Suzuki M., Sakurai Y., Sakuma T., Moritake H., Sugimoto T., Takeuchi T., Sonobe H., Epstein L.A., Fukumori Y., Ono K., Ichikawa H., Boron neutron capture therapy as new treatment for clear cell sarcoma: Trial on different animal model. *Appl. Radiat. Isot.*, in press.