



Effect of Boron Neutron Capture Therapy for Melanotic and Amelanotic Melanoma Transplanted into Mouse Brain

岩倉, 昌岐

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2001-12-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2416

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002416>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 6 1 】

氏 名・(本 籍) 岩倉 昌岐 (和歌山県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1383号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成13年12月31日

【学位論文題目】

**Effect of Boron Neutron Capture Therapy for Melanotic and
Amelanotic Melanoma Transplanted into Mouse Brain**

(高メラニン生成性および乏メラニン生成性マウス脳内
黒色種モデルへの熱中性補足療法の効果)

審 査 委 員

主査 教授 黒田 嘉和

教授 尾原 秀史

教授 伊東 宏

脳内転移性悪性黒色腫は、未だ有効な治療法が開発されておらず、その予後は絶望的である。我々は、その最有望候補の治療法が熱中性子捕捉療法 (BNCT) であると考えた。その理由は、1) 共著者である三嶋らが、すでに皮膚悪性黒色腫に対する *p*-boronophenylalanine (BPA) を用いた BNCT を確立し、18 例のヒト症例に施行し、良好な結果を得ていること、2) 現在も脳腫瘍 (主として悪性グリオーマ) に対して国内外で行われ、その有効性と安全性が、すでに確立しているということ、であった。つまり、悪性黒色腫に十分な特異性があり、かつ脳という極めて放射線に弱い特殊環境に対して施行する安全性が確立されている訳である。しかし、いまだ脳内転移性悪性黒色腫に対する BNCT の研究は、2 報告しかなく (Matalka *et. al.*: Cancer Res. 1993, Barth *et. al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1994)、もちろん、臨床応用は一例も報告されていない。

今回、マウス脳内移植悪性黒色腫モデルを作成し、その Boron biodistribution と BPA dose escalation study を行い、その結果と従来の皮膚悪性黒色腫のデータとの比較検討を踏まえて、BNCT 照射実験を行った。同時に、より治療抵抗性とされている乏メラニン生成性悪性黒色腫においても、高メラニン生成性と同様に評価した。

(対象と方法)

細胞は乏メラニン生成性の A1059 細胞と、高メラニン生成性の B16B15b 細胞を用いた。マウス (6 週齢の C57BL/6 マウス) の脳内右尾状核に定位的に上記細胞を移植して *in vivo* モデルを作成した (A1059 brain model, B15b brain model)。研究項目は以下の通りである。

1) *in vitro*, *in vivo* の両細胞のメラニン生成関連パラメーターの評価

各々の *in vitro*, *in vivo* での黒色腫の BPA 集積量 (投与後 1.5 時間)、メラニン量、DOPA oxidase 活性を測定した。また、皮下移植モデルも作成し、上記項目を同様に測定して、脳内移植モデルの結果と比較検討した。

2) BPA biodistribution

両脳内移植モデルに BPA 250 mg/kg body weight を *i.p.* し、投与後 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 時間で、サンプル (腫瘍、正常脳、血液、皮膚、肝臓) を採取し、それぞれの Boron 量を ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry) を用いて測定し、BPA の経時的 Biodistribution を評価した。

3) BPA dose escalation study

両脳内移植モデルに、BPA 250, 400, 800 mg/kg body weight を *i.p.* し、投与後 1.5hrs で、サンプル (腫瘍、正常脳、血液) を採取して、それぞれの Boron 量を測定し、BPA の Dose escalation study を評価した。

4) *In vivo* 腫瘍増殖能評価

両腫瘍の *in vivo* モデルでの増殖能を評価するため、皮下移植モデルを作成し、その腫瘍増殖スピードを経時的に測定し、比較検討した。

5) BNCT 照射実験

両脳内移植モデルに対して BNCT 照射実験を行い、その生存を評価した。さらに、%ILS(% Increase of Life Span: 計算式は以下に示す) の概念を用いて、両脳内移植モデルに対する BNCT 効果を再度評価した。

(治療群の生存中央値-非治療群の生存中央値)

× 100

(非治療群の生存中央値)

(結果)

1) in vitro, in vivo のメラニン生成関連パラメーター

B16B15b 細胞の BPA 取り込み能は A1059 細胞の 3.5 倍であった。in vitro でのメラニン生成と BPA 集積の性質は、十分 in vivo brain model においても保持されていた。

皮下移植モデルと比較して、脳内移植モデルは、BPA の集積が若干高値であった。また、黒色腫/正常組織の BPA 集積比 (Mm/T ratio) は、脳血管関門により、正常組織への BPA 集積が脳の方が低いため、数値はより高くなった。対して、黒色腫/血液の BPA 集積比 (Mm/Bl ratio) は、ほぼ同等の数値を示した。

2) BPA biodistribution

B15b brain model では、黒色腫への BPA の集積のピークが長時間保持されていたのに対して、A1059 brain model では、短時間しか認められず、至適な照射時間の設定は困難であった。Mm/T ratio を経時的に計算したところ、両脳内移植モデルとも、至適照射タイミングは、BPA i.p. 後 1.5 時間と決定した (B15b brain model: 7.6, A1059 brain model: 5.6)。同時に、同条件で Mm/Bl ratio は、B15b brain model で 4.3、A1059 brain model で 2.6 であった。

3) BPA dose escalation study

B15b brain model における黒色腫の BPA 集積は、その投与量 (250, 400, 800mg/kg. body weight) に比例して上昇した。しかし、A1059 brain model では、400 と 800mg/kg. body weight での集積はほとんど変わらず、その時点ですでに、BPA 取り込み能が飽和状態に達していたものと考えられた。

4) in vivo の腫瘍増殖スピード

皮下移植モデルにおける、in vivo の腫瘍増殖スピードを評価した。B16B15b 細胞皮下移植モデルの方が、A1059 のそれに比して、圧倒的に速い増殖を示した。

5) RBE-Gy, BNCT 効果の評価

以上の評価から、RBE (Relative Biological Effectiveness) equivalent dose を計算し、その結果を Fig.5 に示した。同条件の照射（同量 BPA、同時間照射）で B15b brain model は、1.4~1.7 倍の RBE-Gy を、A1059 brain model に比して得た。

次に、BNCT 施行後のマウス生存を評価した。両脳内移植モデルとも、中性子照射のみでは、非治療群と比較して、生存に有意な延長は見られなかったが、BNCT 群は、すべて、有意な延長が認められ、いずれも照射された RBE-Gy の増加に平行して延長していた。

また、すべての照射マウスモデルは、早期放射線障害やその他の予期せぬ原因で死亡したものはなく、解剖して、死因が腫瘍増殖による脳圧上昇であることを確認した。

(考察)

1) BPA biodistribution よりの考察

B15b brain model は十分の、A1059 brain models も BNCT が可能な程度の BPA 集積は見られた。また、BNCT 開発初期に大きな問題になった血管系への損傷も、Mm/Bl ratio が十分安全な値であるため問題がなかった。A1059 brain model に対する BNCT は可能であるが、より高い効果を得るためには、メラニン生成関連遺伝子導入によるメラニン生成能の獲得や脳血管関門の一過性破壊による BPA 集積増加などの手技を計画する必要がある。

2) 悪性黒色腫の脳内移植モデルと皮下移植モデルの比較

BPA 集積能には大きな差はないが、脳内移植モデルの方が、脳血管関門により正常脳への BPA 集積が少ないため、結果的に Mm/T ratio が高くなり、皮膚よりも、有利でかつ安全であると考えられた。Mm/Bl ratio はほぼ同等であった。

3) 悪性黒色腫脳内移植モデルと文献上の脳内グリオーマ移植モデルの比較

高メラニン生成性 B15b brain model は、文献上報告されている脳内グリオーマ移植モデルよりも、十分良好な結果を示している。対して、乏メラニン生成性 A1059 brain model も、脳内グリオーマ移植モデルよりは高い Mm/T, Mm/Bl ratio を示したが（A1059 brain model: Mm/T=5.6, Mm/Bl=3.1, グリオーマ移植モデル: Mm/T=4~5, Mm/Bl=3~3.5）、これは、A1059 細胞が、グリオーマ細胞にはないメラニン生成能に関係する能力を有するためと考えられた。

4) BNCT 治療効果

生存曲線からは、B15b brain model よりも A1059 brain model の方が、一見 BNCT 効果が高いように見える。

BNCT による腫瘍殺傷能の評価は、マウスの様な小動物の脳内病変の推移は体外的には評価ができない。我々は、高メラニン生成性 B15b brain model の方が BNCT 効果は高いと考えるが、それには以下の二つの理由が考えられる。1) B15b 腫瘍は A1059 腫瘍に比して圧倒的に速い増殖スピードをしているにも関わらず、延命率(%ILS)で評価すると、同程度の RBE-Gy 照射では、B15b brain model も A1059 brain model と、ほぼ同じ程度の延命率を示していること、2) 放射線治療効果に直接比例する RBE-Gy については、B15b 腫瘍は、A1059 腫瘍の 1.4~1.7 倍であること。

(結論)

脳内移植悪性黒色腫モデルは、皮下移植モデルと同様のメラニン生成関連のパラメーターのパターンを示した。BNCT 効果としては、B15b brain model の RBE-Gy は A1059 brain model に比して 1.4~1.7 倍であり、治療効果もそれに比例して有効な延長を示した。

神戸大学大学院医学系研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1384 号	氏 名	岩倉昌岐
論文題目	Effect of Boron Neutron Capture Therapy for Melanotic and Amelanotic Melanoma Transplanted into Mouse Brain 高メラニン生成性および乏メラニン生成性マウス脳内黒色腫モデルへの熱中性子捕捉療法の効果		
審査委員	主 査 黒田嘉和 副 査 伊東 弘 副 査 尾原 勇史		
審査終了日	平成 13 年 11 月 27 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

脳内悪性黒色腫の治療成績は現在なお手術、放射線治療とも極めて不良である。

皮膚原発悪性黒色腫については、メラニンの前駆物質である Phenylalanine と硼素の化合物である BPA (p-boronophenylalanine) を投与し熱中性子を照射して治療する熱中性子 (BNCT) の有効性が申請者等のグループから報告されている。

申請者は脳内悪性黒色腫に対する BNCT の有効性を証明するため実験のマウス脳内移植悪性黒色腫モデルを作成し、Boron biodistribution と dose escalation study、BNCT 実験を行った。

対象は、C57BL6 マウス、乏メラニン生成性 A1059 細胞、高メラニン生成性 B16B15b 細胞とした。定位的脳内移植でモデルを作成し、メラニン生成関連因子、BPA (*p*-boronophenylalanine) biodistribution と dose escalation、腫瘍増殖能、BNCT 実験を評価した。

結果として、B16B15b 細胞の BPA 集積は A1059 細胞の 3.5 倍であり、メラニン生成能と BPA 集積能は、移植モデルでも保持されていた。また脳内移植モデルは、皮下と比し、黒色腫/正常脳組織の BPA 集積比は高かった。

次に、BPA biodistribution study では、B15b brain model の黒色腫への BPA 集積のピークは、長時間保持されていたが、A1059 では、短時間しか認めなかった。BPA dose escalation study では、B15b brain model の黒色腫への BPA 集積は、投与量に比例して上昇したが、A1059 では、途中で飽和状態に達した。また B16B15b 腫瘍は、A1059 より、圧倒的に速い増殖を示した。

最後に、BNCT 効果を評価した。B15b brain model は、A1059 の 1.5 倍の RBE (Relative Biological Effectiveness) -Gy を呈した。BNCT 後の生存は、中性子照射のみでは、有意な延長はないが、BNCT 群は、すべて RBE-Gy に比例した有意な延長を認めた。

本実験の結果より、B15b brain modelは十分の、A1059もBNCTが可能な程度のBPA集積は見られ、照射実験にても有意な効果を示した。

本研究では、マウス悪性黒色腫脳内移植モデルを作成し、BPA 集積と BNCT 効果を評価したが、過去にはほとんど知見はなく、また、乏メラニン生成性の研究までは言及されていない。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。

本研究では、マウス悪性黒色腫脳内移植モデルを作成し、BPA 集積と BNCT

効果を評価したが、過去にはほとんど知見はなく、また、乏メラニン生成性の研究

までは言及されていない。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があ

ると認める。

123456789101112131415161718192021222324252627282930313233343536373839404142434445464748495051525354555657585960616263646566676869707172737475767778798081828384858687888990919293949596979899100

[illegible][illegible][illegible]

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 104

[illegible]

10

Figure 1. The effect of the number of iterations on the accuracy of the proposed algorithm. The accuracy of the proposed algorithm increases with the number of iterations. The accuracy of the proposed algorithm is 100% when the number of iterations is 1000.

1

8

4

© 2006 The Authors
Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Ltd

8
