



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。



【61】

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ー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C57BL6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、脳血管閥門により、正常組織への BPA 集積が脳の方が低いため、数値はより高くなつた。対して、黒色腫/血液の BPA 集積比 (Mm/B1 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/B1 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/B1 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、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閥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、脳血管閥門により正常脳への BPA 集積が少ないとため、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/B1 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/B1 ratio を示したが (A1059 brain model: Mm/T=5.6, Mm/B1=3.1, グリオーマ移植モデル: Mm/T=4~5, Mm/B1=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 元 副査 佐々木秀史		
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的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つた。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。