

口内炎



分子標的薬による口内炎の特徴



1 どの薬剤で起こりやすいか

イマチニブ、スニチニブ、ソラフェニブ、セツキシマブとも、単剤で用いた場合の口内炎の頻度は20%未満であり^{2,5)}、従来型抗がん剤での頻度(20~40%)と比較すると低いです。口内炎の発現頻度をまとめたものを表2に示します。ただし、ペバシズマブやセツキシマブに関しては併用療法として口内炎の頻度が高いフルオロウラシルが用いられることが多いため注意する必要があります。

2 なぜ起こるか?

口内炎の原因としては①分子標的薬の直接作用により口腔粘膜や唾液中の活性酸素が産生され、粘膜破壊、炎症、粘膜再生障害を引き起こす ②免疫力が低下するため口腔内の常在菌による局所感染が起こる——などが考えられます。

3 症状の特徴

従来型抗がん剤と比べて分子標的薬に特徴的な症状は認められません。口腔粘膜の細胞周期は7~14日であることから、投与開始から7~14日が抗がん剤の作用を受けやすい時期です。前回の抗がん剤投与時に口内炎を起こした患者さんは、次回も口内炎を起こすリスクが高いとされています。



予防のポイント



抗がん剤による口内炎は、いったん発症すると治療が困難であり、積極的な予防が重要です。

1 口腔ケア

抗がん剤治療を開始する前から口腔内の状態を確認し、口腔内清潔を保つことにより、口腔内の局所感染を防止することが最も重要となります。そのために、抗がん剤治療を開始する前に、感染源となりうるう・歯、^{しそくのうろう}歯槽膿漏の

表2 分子標的薬単剤における口内炎の発現頻度

	イマチニブ	スニチニブ	ソラフェニブ	セツキシマブ
	発現頻度 (括弧内は CTCAE v3.0 でグレード3以上)			
口内炎	—	16% (1%)	4% (0.3%)	15% (0.3%)

処置、義歯の調整や清潔ケアや歯のブラッシングの指導を行います。

2 食事内容の工夫

抗がん剤投与中は硬い食事や熱い食事は避けるようにします。

3 クライオセラピー(冷却療法)

口内炎に対して確立された予防法はありませんが、急速静注法で用いるフルオロウラシルとの併用療法においては、口腔内冷却の有効性が報告されています⁶⁾。



モニタリングの注意点・早期発見のためのポイント



1 モニタリング項目

悪心・嘔吐の場合と同様で、症状の有無、出現状態、持続期間、頻度、症状の程度、患者さんの苦痛レベルをモニタリングし、原因をアセスメントすることが必要となります。

2 患者さんに伝えること

外来化学療法が主体となっており、セルフモニタリングが必要になるため患者さん自身の参画が必要不可欠です。早期に症状の報告をすることなどの教育・指導も重要です。

患者さんには①口内炎の可能性・時期 ②予防における口腔ケアの重要性 ③治療中の具体的な生活(特に食事)のしかた ④起こった場合の対処法——などを事前に説明します。



口内炎が生じたときの対応方法



1 抗がん剤の継続と対応

症状観察とアセスメントに基づき、軽度の場合は以下に述べる対症療法を行いながら治療継続します。中等度の場合は休薬・減量を考慮し対症療法を行います。重度の場合は投与中止を考慮します。

2 口腔ケア

発症後も口内炎の増悪を防ぐため継続することが勧められます。

3 食事内容の制限

口内炎が起きている場合の食事の注意として、水分を多めに摂取し、口腔内乾燥を防ぎます。口腔粘膜を刺激する極端に硬いものや熱いものや冷たいもの、大量の^{なま}生野菜、香辛料、アルコールなどを避けるように指導します。

4 薬物療法

口内炎に対する標準的治療は確立されていません。粘膜改善の促進を目的としてアズレンでの含嗽、粘膜のコーティングとして水酸化アルミニウム

ゲルの投与、粘膜の修復促進を目的としてフィブリノリジン・デオキシリボスクレアーゼパウダー（エレース[®]）での含嗽、疼痛コントロールにはキシロカイン[®]ビスカスをベースに、局所麻酔、非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）、重症例には麻薬系鎮痛薬（モルヒネなど）の投与が一般的に行われています。看護師は治療で使用される薬剤の特徴をよく知り、処方された薬剤を効果的に使用できるように患者さんに指導します。



【当院での工夫】 口腔ケア対策

当院には歯科医師、看護師、薬剤師を中心とした口腔ケアチームがあります。消化器がん患者さんでは、化学療法の導入決定時に口腔ケアチームへの紹介を行い、化学療法が開始される前からリスクをアセスメント（図2）し、予防的ケアの実践につなげています。患者指導には口腔ケア対策用のパンフレットを作成し用いています（図3）。

食事の工夫としては、前述の「抗がん剤対策食」（p.227図1）のなかに口内炎・歯肉炎用の「漱石食」という名前の献立を設け、患者さんに提供しています。

図2 口腔ケアアセスメントシート

お口の中をきれいにしましょう

独立行政法人国立がん研究センター
がん対策部 口腔ケアチーム
2007.11 作成
2009.01 改訂

☆ もくじ ☆

1. お口の手入れ（口腔ケア）が必要な理由 3
2. がん治療にともなって引き起こされるお口の中の合併症 4
 - 口腔粘膜炎（口内炎）
 - 口内乾燥
 - 虫歯
 - 歯肉炎（歯槽膿漏）
 - 肺炎（誤嚥性肺炎）
 - 敗血症
3. お口の中の細菌によって引き起こされる全身的な合併症 6
4. お口の手入れを始める時 7
5. お口の手入れによる効果 8
6. お口の手入れ（口腔ケア）の方法 9
 - 歯ブラシの選び方
 - 歯みがき（ブラッシング）
 - 義歯（入れ歯）の洗浄方法
 - お口のお手入れ（口腔ケア）の補助用品
7. 口腔粘膜炎（口内炎）、乾燥の症状が出てしまったら... 13
8. お口のチェックポイント 14

図3 口腔ケアパンフレット

分子標的薬による下痢の特徴

1 どの薬剤に注意するか・起きやすいか

イマチニブ、スニチニブ、ソラフェニブを用いた場合の下痢の発現頻度は30~40%前後です^{2,4)}。それに比べセツキシマブ単剤は20%弱であり頻度がやや低めです⁵⁾。それぞれの薬剤での頻度を表3に示します。ペバシズマブやセツキシマブは、併用療法として、下痢の頻度が高いフルオロウラシルや塩酸イリノテカンが用いられることが多いため、注意が必要です。

2 なぜ起こるか

分子標的薬に伴う下痢の原因としては、分子標的薬の直接作用による腸粘膜の障害のため、水分吸収が阻害されることが一つの要因であると考えられます。セツキシマブは直接作用が主に関連するものと考えられます。

イマチニブ、スニチニブ、ソラフェニブは、腸管の運動性を調整するペースメーカー細胞(cajal細胞)に多く発現するc-kitを阻害する作用があるため下痢が出現することが考えられています⁷⁾。

3 発症時期・症状

イマチニブ、スニチニブ、ソラフェニブ、セツキシマブとも、単剤使用における発症時期については不定期とされています。

従来型抗がん剤と比べて分子標的薬に特徴的な症状は認められません。分子標的薬単剤で用いた場合は、多くは止痢薬のみで十分対処が可能です。

予防のポイント

確立された予防法はありませんが、下痢が発現した場合は、食事内容の工夫として消化が良く栄養価の高い食品を勧め、逆に消化の悪い食物繊維の多い食事、脂肪の多い食事、刺激の強い食品などを控えることを勧めます。

表3 分子標的薬単剤における下痢の発現頻度

	イマチニブ	スニチニブ	ソラフェニブ	セツキシマブ
	発現頻度 (括弧内は CTCAE v3.0 でグレード3以上)			
下痢	40% (1%)	29% (3%)	39% (8%)	18% (1%)

1 モニタリング項目

症状の有無、便の性状、排便回数、持続期間、患者さんの苦痛レベルをモニタリングし、原因をアセスメントすることが必要となります。

2 患者さんに伝えること

下痢は症状が長期化すると、さまざまな随伴症状が起りやすいため、早期に症状の報告を行うことなど患者さんへの教育・指導も重要となります。

①下痢の可能性・時期について ②治療中の具体的な生活(特に食事)のしかた ③下痢の症状が出たまま放置しておく、脱水や低栄養状態などを引き起こす可能性があるため、早めに病院に連絡が必要になること ④起こった場合の対処法——などを事前に説明します。

1 抗がん剤の継続と対応

症状観察とアセスメントに基づき、軽度の場合は以下に述べる対症療法を行いながら抗がん剤治療を継続します。中等度の場合は対症療法を行いつつ、治療に関しては休薬・減量を考慮します。重度の場合は十分な対症療法を行い、症状がなくなるまで投与中止し回復後は減量を考慮します。

2 食事の工夫

食事としては水分の補給を十分に行う、消化が良く栄養価の高い食品をとる、逆に消化の悪い食物繊維や脂肪の多い食事、刺激の強い食品などを控えるなどの工夫を行います。

3 薬物療法

薬物療法としては緩下剤を含む使用中の薬剤変更・中止の検討、止痢薬(腸管運動抑制薬：抗コリン薬や塩酸ロペラミド)の投与、整腸薬(乳酸菌製剤、収れん薬など)の投与、栄養状態の低下・脱水がある場合は十分な補液、感染が考えられる場合は抗菌薬の開始を考慮します。

参考文献

- 1) National Comprehensive Cancer Network[®]. Practice Guideline in Oncology[™]. Antiemesis. Version3. 2009.
- 2) Demetri, GD. et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. N. Engl. J. Med. 347 (7). 2002. 472-80.
- 3) Demetri, GD. et al. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib : a randomised controlled trial. Lancet. 368 (9544). 2006. 1329-38.
- 4) Llovet, JM. et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. N. Engl. J. Med. 359 (4). 2008. 378-90.
- 5) Jonker, DJ. et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. N. Engl. J. Med. 357(20). 2007. 2040-8.
- 6) Rocke, LK. A randomized clinical trial of two different durations of oral cryotherapy for prevention of 5-fluorouracil-related stomatitis. Cancer. 72 (7). 1993. 2234-8.
- 7) 大西一功. イマチニブの有害事象と対策. 血液フロンティア. 14 (S1). 2004. 57-64.

3

部

2

章

分子標的薬の副作用マネジメント

9

消化器症状

10
消化管穿孔

独立行政法人国立病院機構四国がんセンター消化器内科 医師 仁科智裕 にしな・ともひろ

同 臨床研究部長 井口東郎 いくち・はるお

はじめに

消化管穿孔は分子標的薬の特徴的な副作用です。発現頻度は低いですが、いったん発症すると抗がん剤治療の継続を困難にし、緊急手術の適応となる場合が多く、患者さんの予後を左右することもあり迅速・慎重な対処が重要となります。本稿では2009年11月現在、消化器腫瘍に保険承認があり一般臨床で使用可能である分子標的薬(特にベバシズマブ)における消化管穿孔の詳細について述べます。



どの薬剤で起こりやすいか？ なぜ起こるか？



1 どの薬剤で起こりやすいか

消化管穿孔は、現在がん治療に広く用いられている血管内皮細胞増殖因子(VEGF)阻害薬であるベバシズマブに特徴的で、重大な副作用です。スニチニブ、ソラフェニブ、イマチニブ、セツキシマブにおいては消化管穿孔の発現は非常にまれです。

結腸・直腸がん患者における欧米での大規模な観察研究の結果では、ベバシズマブにおける消化管穿孔の発現率は0.9%~2.0%と報告されています^{1,2)}。日本におけるベバシズマブの「特定使用成績調査」(2,698例)での消化管穿孔の発現頻度は0.9%と、欧米の報告と同様の結果が報告されています(表1)。また、12,294例の症例を含むさまざまな固形がんの17のランダム化比較試験のメタアナリシスの結果が報告され、消化管穿孔の発現率はベバシズマブによる治療を受けた症例では0.9%、その死亡率は21.7(11.5~37.0)%でした。結腸・直腸がんにおいては、ベバシズマブによる治療を受けた症例では受けていない症例に比べ、消化管穿孔のリスクが3.1倍高いとの結果でした³⁾。

表1 大腸がんに対するペバシズマブ使用患者を対象とした大規模観察研究における消化管穿孔

調査名	登録症例数	消化管穿孔の発生頻度
特定使用成績調査(日本)	2,698例	0.9%
BRITE試験(海外)	1,953例	1.7%
First-BEAT試験(海外)	1,914例	2%

2 なぜ起こるか

明確な機序は示されていませんが、抗がん剤治療中の消化管穿孔は多くの要因が重なって起こることが考えられています。主な要因としては①抗がん剤やがん性腹膜炎などによる粘膜障害が起こった後に創傷治癒が遅延することにより起こる ②抗腫瘍効果が発揮されたことによる腫瘍部の穿孔 ③併用剤であるコルチコステロイドによるもの——などが報告されています^{4, 5)}。



症状の特徴



1 発現時期

ペバシズマブで発現時期について検討がなされていますが、初回投与後2日から16.1カ月と多岐にわたります。中央値は1.5~2.4カ月で、6カ月以内に約80% (発症例中) が発症し、1年以上での発現はまれ(3%)とされています¹⁾。

2 発現症状

激しい、それまでに感じたことのないような腹痛が特徴的であり、発熱、悪寒、吐き気、動悸、口渇などとともに、突然の便意を伴うこともあります。胃・十二指腸穿孔の場合、高齢者、糖尿病患者では腹部所見がはっきりしない場合があります、注意を要します。下部消化管穿孔の場合は細菌感染症による発熱がみられることがあります。

3 発現部位

穿孔の部位としては、胃・十二指腸・小腸・大腸のすべての部位での報告がありますが、日本の「特定使用成績調査」の結果では主に小腸・大腸に発現しています(表2)。

表2 消化管穿孔の発現部位

穿孔部位	発生数
食道	0例
胃	0件
十二指腸	3例
空腸	1例
回腸	3例
盲腸	2例
虫垂	3例
結腸	2例
直腸	6例
部位不明	3例

アバステン[®]点滴静注 特定使用成績調査の集計(2,698例)による結果

1 消化管穿孔のリスク因子を考慮した症例選択による予防

ペバシズマブを使用した症例における臨床試験や大規模な観察試験の結果より、消化管穿孔のリスク因子としては、大腸切除術の既往歴（ペバシズマブ投与前2カ月以内）、消化性潰瘍⁶⁾、大腸憩室症⁷⁾、腫瘍壊死、腫瘍関連大腸炎⁸⁾、未治療の原発巣、大腸内視鏡検査の既往歴（ペバシズマブ投与前1カ月以内）、術前・術後骨盤内への放射線治療の既往歴などが挙げられます。

上記に挙げたリスク因子はまだ確立されたものではありませんが、ペバシズマブを使用するかどうかの選択時には背景因子を十分に調査し、ペバシズマブ使用において問題とならないか考慮することが重要です。

明らかに腹腔内の炎症が疑われる場合はペバシズマブの投与は避けることが推奨されます。また、内視鏡検査はペバシズマブの治療前や終了後までは可能なかぎり遅らせることが推奨されます。

2 薬剤による予防

消化性潰瘍については穿孔リスクと関連があるかはまだ明らかになっていませんが、活動性である場合は、ペバシズマブ治療中はプロトンポンプ阻害薬あるいはH₂ブロッカーを併用することが推奨されています。

モニタリングの注意点・早期発見のためのポイント

前項でも示したように、未治療の原発巣がある患者さん、消化管などの腹腔内の炎症がある患者さん、骨盤内への放射線治療の既往歴がある患者さんで投与する場合には消化管穿孔が発現する可能性が高いため、穿孔の徴候を注意深くモニタリングする必要があります。

徴候がみられた場合にはなるべく早く病院に連絡し来院するように、患者教育を行います。

診察時は急性腹症に準じた問診、診察（脈拍・血圧測定、体温測定、腹部触診）および血液検査、腹部単純X線（立位および臥位）検査、腹部CT検査を施行し、消化管穿孔の有無および消化管穿孔の部位を精査することが重要となります。

消化管穿孔が生じたときの対応方法

消化管穿孔に対する治療は、部位・重篤度に応じて実施されます。炎症が局限されていれば保存的に様子をみることが出来る場合もありますが、状態の悪化が予測される場合は緊急手術の適応です。

緊急手術の際は、ペバシズマブによる創傷治癒遅延や、化学療法や消化管穿孔による全身状態の悪化を考慮しなければなりません。ペバシズマブ投与中に手術を行うと10%の頻度で創傷治癒遅延または出血をきたすとされています⁷⁾。過去の報告例のレビューにおいて5例の手術症例のうち腸管吻合を行った1例で縫合不全をきたし⁹⁾、また、横行結腸切除術・1期的吻合の報告¹⁰⁾においても術後に腸管皮膚瘻をきたしており、創傷治癒遅延の可能性を考慮すると、腸管吻合する場合は口側に一時的なストーマを置く方法が安全と考えられています。また、消化管穿孔が治った後のペバシズマブを再投与はするべきでないとされています⁸⁾。

また、消化管穿孔による開腹手術は不測の事態でもあるため、患者さんと家族の意思を尊重し、十分な説明を繰り返し行い、信頼関係を形成することが重要となります。



患者さんに伝えること



ペバシズマブの治療を受ける患者さんには、分子標的薬の副作用である消化管穿孔について、以下の内容を説明します。

- 副作用として1～2%の人に消化管に穴が開く可能性が示唆されていること
- 消化管穿孔が起こった場合の治療として開腹術が必要になる場合が多く、特に小腸や大腸の穿孔の場合はストーマが必要になる可能性があること
- 出現が予測される時期として多くは60日以内に発症するが、1年間投与した後も認められることもあり、発症時期も定まっておらず個人差があること
- 出現が予測される症状として、これまでにない激しい腹痛が認められること
- 激しい腹痛が認められたときには、我慢したり自己判断で様子を見たりしないで、早急に病院へ連絡し、痛み止めなどの服用や病院受診についての指示を受けること

消化管穿孔のリスクが高い薬剤について、医師だけでなく、患者指導や外来で対応する可能性のあるすべてのコメディカルに対して、院内講義などで教育を行っています。

消化管穿孔を含む抗がん剤治療時の電話トリアージでは、治療を必要とするものであるかなどを的確に判断し、トリアージ結果に応じた適切な指示・説明を行う必要があります。そのため、ペバシズマブ投与にかかわらず抗がん剤治療を受けている患者さんでは、緊急時の連絡先を決め（日勤中はがん相談支援・情報センター、夜間・休日は当直師長）、抗がん剤治療中の患者さんに対応するために作成している電話対応用トリアージシートの内容に従い対応します。

当科では内科が化学療法を担当しているため、消化器外科医との有機的な連携を絶えず行っています。大腸がん原発巣を有する症例でペバシズマブ使用の可能性がある場合については、消化管穿孔のリスクがあるため、必ずカンサーボードにて原発巣の切除の必要性について議論し、治療方針を決定しています。

参考文献

- 1) Kozloff, M. et al. Clinical Outcomes Associated with Bevacizumab-Containing Treatment of Metastatic Colorectal Cancer : The BRITE Observational Cohort Study. *Oncologist*. 14. 2009. 662-70.
- 2) Van Cutsem, E. et al. Safety and efficacy of first-line bevacizumab with FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and fluoropyrimidines in metastatic colorectal cancer : the BEAT study. *Ann. Oncol.* 20. 2009. 1842-7.
- 3) Hapani, S. et al. Risk of gastrointestinal perforation in patients with cancer treated with bevacizumab : a meta-analysis. *Lancet Oncol.* 10 (6). 2009. 559-68.
- 4) Giantonio, B.J. et al. Gastrointestinal perforation and cancertherapy : managing risk to achieve benefit. *Onkologie*. 28. 2005. 177-8.
- 5) Saif, M.W. et al. Incidence and management of bevacizumab-related toxicities in colorectal cancer. *Expert Opin. Drug Saf.* 5. 2006. 553-66.
- 6) Hurwitz, H. et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 350. 2004. 2335-42.
- 7) Kabbinavar, FF. et al. Addition of bevacizumab to bolus 5FU/leucovorin in firstline metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J. Clin. Oncol.* 23. 2005. 3697-705.
- 8) Kabbinavar, FF. et al. Guidelines for the management of side effects of bevacizumab in patients with colorectal cancer. *Cancer Therapy*. 6. 2008. 327-40.
- 9) Badgwell, BD. Management of bevacizumab-associated bowel perforation : a case series and review of the literature. *Ann. Oncol.* 19 (3). 2007. 577-82.
- 10) Heinzerling, J.H. Bowel perforation from bevacizumab for the treatment of metastatic colon cancer : incidence, etiology, and management. *Curr. Surg.* 2006. 63 (5). 334-7.

診断と治療

(8) 電解質異常

四国がんセンター消化器内科

井口 東郎

Haruo Iguchi

電解質異常による oncologic emergency として頻度が高いものは高カルシウム (Ca) 血症と低ナトリウム (Na) 血症であり、本稿では、これらについて最近の動向を概説する。

悪性腫瘍に伴う高Ca血症 (MAH)

A. 成因

MAH (malignancy-associated hypercalcemia) は、その成因から癌細胞で産生される液性因子 (humoral hypercalcemia of malignancy : HHM) によるものと、広範な骨転移に伴う高度な骨破壊 (local osteolytic hypercalcemia : LOH) によるものに分類される (図1)。

HHM では、骨転移のあるなしにかかわらず、癌細胞で産生された液性因子 (主に PTHrP) が骨と腎に作用して高Ca血症が誘導される。すなわち、PTHrP が全身的 (endocrine) に作用することで、骨では破骨細胞活性化を介して骨から血中へ Ca^{2+} が動員され、また腎で遠位尿管管における Ca^{2+} 再吸収を促進するため、この両者が相まって高Ca血症が誘導されることになる。

一方、LOH は広範な骨転移 (骨

破壊) によって骨から血中に流出した Ca^{2+} が、腎の処理能力を超えた場合に惹起される高Ca血症を意味している。ただ、骨転移でみられる骨破壊には癌細胞で産生される液性因子による破骨細胞活性化が深くかかわっており、骨への作用メカニズムという点では HHM との違いは明確でなく、腎への作用 (Ca^{2+} 再吸収亢進) のあるなしが HHM と LOH との相違点である。

B. 診断

MAH は癌末期に発症するケースが多く、その症状には特徴的なものがないため (表1)、癌の進行に伴う症状あるいは抗癌剤やモルヒネといった癌治療関連の症状と

して片づけられていることもある。

高Ca血症の診断はルチーンの血液検査さえ施行していれば見逃されることは少ないと思われるが、これにはいくつかの落とし穴があり、以下の点に注意が必要となる。まず、「ルチーンの血液検査」として血清電解質では Na, K, Cl はいずれの施設でも測定されているが、Ca および P については測定されていない施設が見受けられる。癌患者の診療を担当するドクターには「癌末期には高Ca血症を合併することがある」といった認識をもっていただき、ルチーン検査として Na, K, Cl に加えて Ca および P を測定することが肝要である。

また、高Ca血症として実際に

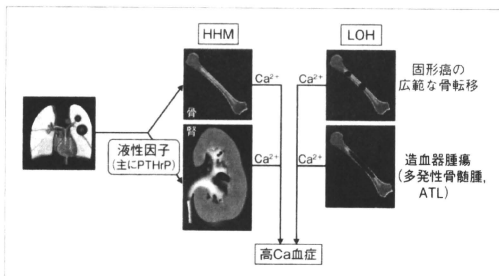
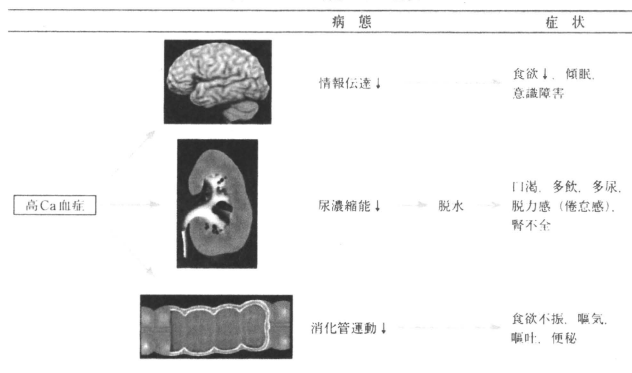


図1 MAHの発症機転

表1 MAHの病態および症状



問題になるのは血清イオン化Ca (Ca²⁺) 濃度であるが、ルチーン検査で測定された血清Ca値は[アルブミンと結合したCa]+[イオン化Ca (Ca²⁺)]の総和として表示されるため、低アルブミン血症を伴う患者では血清イオン化Ca濃度が高いにもかかわらず実測値が正常域にとどまっていることがあり、MAHが見逃されるケースがしばしば経験される。MAHが末期癌患者に多くみられることは先述したが、末期癌患者では低アルブミン血症を伴っているため、実測値の解釈に際しては注意が必要で、補正式(表2)で補正した血清Ca値を算出し、高Ca血症の診断に臨まなければならない。

もうひとつ注意すべき点として、癌患者では化学療法などによる腎機能障害から高Ca血症が招来されるケースがあり、MAHによって惹起された腎機能障害とは治療法が異なるため、その鑑別が必要となる(表3)。ルチーン検査では血清CaおよびP値から、ある程度の鑑別が可能であり、また血清PTHrP値も鑑別の一助と

表2 血清Ca値のアルブミンによる補正

Payneの補正式(血清アルブミン値が4g/dl未満のときに用いる)
 補正血清Ca値 (mg/dl) = 実測Ca値 (mg/dl) + (4 - 実測アルブミン値 (g/dl))

表3 高Ca血症の鑑別診断

	MAH		骨機能障害による高Ca血症
	HHM	LOH	
Ca	↑	↑	↑
P	↓	~	↑
PTHrP	↑	~ or ↑	~

なるが、PTHrPの測定は外注検査で回数もかかるため、筆者らは血清CaおよびP値から鑑別を行っている。

C. 治療

高Ca血症は、一般的に補正Ca値が11mg/dlを超えた場合と定義されているが、症状発現には個人差があり、10mg/dl台でも口渇や嘔気によるQOL低下を招来している場合があり、治療の是々非々についてはケースバイケースである。高度の高Ca血症では意識障害や腎機能低下によって生命の危険を伴うため、緊急症としての対応が必要となる。ただ、固形癌に

伴う高Ca血症で意識障害をきたした場合は、意識障害によってかえって疼痛などの苦しみから解放された状態となっており、予後にも長期生存を見込めるケースは少ないため、緩和ケア的な見地から高Ca血症に対する治療を施さないといった選択肢もある。ただ造血器腫瘍や固形癌のなかで乳癌にみられるMAHでは、高Ca血症の治療後に原疾患の治療(化学療法、他)を導入できる場合があるため、高Ca血症による意識障害に対しては緊急症としての対応が必要となる。

治療の基本はCaフリーの輸液(生理食塩液など)と薬剤として

は、ビスホスホネート (BP) が第一選択となる。ただ、MAHは末期癌患者における合併が多いため、末期癌では胸・腹水貯留によって輸液量の制限が必要となるケースもあり、BPの併用が推奨される。BP製剤でもっとも力価の高いゾレドロン酸 (商品名ゾメタ) が2006年4月にわが国に導入され、従来のBP製剤に比較して的確な効果が期待できる¹⁾。なお、BPはその効果発現までに3~4日を要するため、高Ca血症が緊急症と判断された場合には、速効性を期待してエルシトニウムを併用することもある。

MAHの子後は、乳癌や造血管腫瘍を除けばきわめて不良であり、その治療目的は、あくまでも“palliation”であることに留意しなければならない。

悪性腫瘍に伴う低Na血症

A. 成因

低Na血症は、高Ca血症とともに oncologic emergency として遭遇する機会が多く、その成因を表4に示す。悪性腫瘍に伴発する低Na血症として抗利尿ホルモン不適合分泌症候群 (SIADH) がよく知られているが、この他にも抗癌剤の副作用 (嘔吐、下痢、腎不全、心不全) や癌性腹膜炎に伴う腸閉塞など、悪性腫瘍の治療経過中には、さまざまな原因による低Na血症が招来されることを念頭におかねなければならない。

SIADHは、癌細胞が自律性に抗利尿ホルモン (ADH) を産生・分泌することで正常の浸透圧調節機構が破綻し、体液量増加による希釈性低Na血症を呈する病態である (図2)。つまり、生理的狀態におけるADHの産生・分泌は血

表4 低Na血症の成因

1. Naと水分がともに喪失するが、Na喪失が大きい場合	: 嘔吐、下痢、腸閉塞
2. 水分のみが増加する場合	: SIADH
3. Naと水分がともに増加するが、水分増加が大きい場合	: 腎不全、心不全

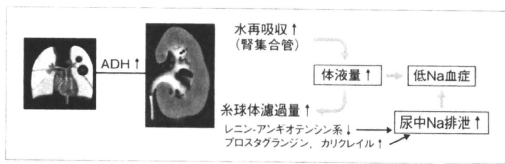


図2 SIADHにおける低Na血症の発症機転

表5 SIADHの診断基準

1. 低Na血症 (<135 mEq/l)
2. 低浸透圧血症 (<270 mOsm/kg)
3. 20 mmol/l < の尿中Na排泄持続
4. 高張尿 (300 mOsm/kg <)
5. 浮腫や脱水がない
6. 腎機能および副腎機能は正常
7. 血漿レニン活性および血清尿酸値は低値を示す場合が多い
8. 血清ADH値は、低血漿浸透圧にもかわかわらず、相対的に高値となる

SIADHの原因としては悪性腫瘍 (とくに肺小細胞癌) によるものが多いが、抗癌剤や抗精神薬によっても生じることがある

漿浸透圧によって調節されているが、SIADHでは血中のADHレベルが血漿浸透圧値に比較して相対的に高値となり、腎集合管における水の再吸収増大によって体液量が増加し、希釈性低Na血症が招来される。この体液量増加は腎における糸球体濾過量増大を介してレニン-アンジオテンシン系を抑制し、その結果、低Na血症にもかかわらず尿中Na排泄が持続することにつながる。また、ADHは腎においてプロスタグランジンやカリクレインの生合成を促進させるが、これら因子は腎尿細管からのNa排泄作用を有しており、SIADHでみられる持続的な尿中Na排泄との関連が示唆されている。

B. 診断

低Na血症による症状として、軽度 (120mEq/l以上) の場合は倦怠感、食欲不振、悪心・嘔吐、脱力、頭痛、高度 (110mEq/l以下) になると傾眠、痙攣、意識障害などの中核神経症状を呈してくるが、特徴的なものはない。また、これら症状の発現は低Na血症の進行速度にも関係しており、急速に出現したものでは120mEq/l前後で痙攣や意識障害を呈することもあるし、緩徐に出現したものでは110mEq/l前後でも軽微な症状しか呈さないこともある。

低Na血症の診断は、その臨床症状に特徴的なものはみられないが、血清電解質がルーチン検査で測定されている限りは見落とされることがはない。また、その低Na

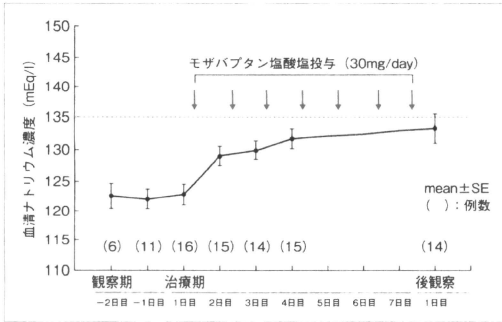


図3 モザバプタン塩酸塩 (フィズリン®) によるSIADHの治療経過

(mean ± SE) は治療前 (1日目) の122.0 ± 1.7mEq/lから治療後2日目には129.1 ± 1.5mEq/lまで上昇しており、その後も緩やかな上昇を続け、治療後8日目には133.3 ± 2.2mEq/lと、ほぼ正常域に到達している³⁾。本剤はSIADH治療の第一選択薬となるものと考えられ、2006年よりオーファンドラッグとしての使用が可能となっている。本剤の使用に際してもCPMの発症には留意しなければならず、血清Na値のモニタリングが必要となる。

血症がSIADHであるか否かについては表5に示すような診断基準が必要となる。

C. 治療

SIADHによる低Na血症を改善させてから原疾患の治療を行うが、本症は進行癌に合併することが多いため、原疾患の治療にまでは至らない場合もある。

水分制限 (500~1000ml/day) が治療の基本となるが、血清Na値が110mEq/l前後の高度の低Na血症あるいは中枢神経症状を伴う場合は緊急症としての対応が必要となる。この場合には、高張食塩水でNaを補充するとともに水分過剰を防ぐためにループ系利尿薬

を併用し、尿中排泄Na量を計算しながら補充することで短期間の血清Na値の回復を図らなければならない。なお、急速な血清Na値の補正は重篤な中枢神経障害〔橋中心髄鞘崩壊: central pontine myelinolysis (CPM)〕を招来する危険があるため、補正速度 (1mEq/l/hr あるいは10mEq/l/day) に注意しなければならない。

緊急症でない場合には水制限 (飲水制限、輸液量の制限) が基本となるが、近年、SIADH治療薬として腎の遠位尿管におけるADHV₂受容体拮抗薬 (モザバプタン塩酸塩、商品名フィズリン) が開発された²⁾。本剤によるSIADHの治療経過を図3に示すが、血清Na値

● 文献

- 1) Major P, et al: Zoledronic acid is superior to pamidronate in the treatment of hypercalcemia of malignancy: A pooled analysis of two randomized, controlled clinical trials. J Clin Oncol 19: 558~67, 2001.
- 2) Decaux G, et al: Non-peptide arginine-vasopressin antagonists: The vaptans. Lancet 371: 1624~32, 2008.
- 3) 山口健: 低ナトリウム血症改善薬フィズリン: 異所性ADH症候群での臨床応用. Pharm Stage 8: 30~4, 2008.

Application of a Novel Boronated Porphyrin (H₂OCP) as a Dual Sensitizer for Both PDT and BNCT

Ryo Hiramatsu, MD,¹ Shinji Kawabata, MD, PhD,^{1*} Shin-Ichi Miyatake, MD, PhD,¹ Toshihiko Kuroiwa, MD, PhD,¹ Michael W. Easson, PhD,² and M. Graça H. Vicente, PhD²

¹Department of Neurosurgery, Osaka Medical College, Osaka 569-8686, Japan

²Department of Chemistry, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana 70803

Background and Objective: Boronated porphyrins have emerged as promising dual sensitizers for use in both photodynamic therapy (PDT) and boron neutron capture therapy (BNCT), by virtue of their known tumor affinity, low cytotoxicity in dark conditions, and easy synthesis with high boron content. Octa-anionic 5,10,15,20-tetra[3,5-(nido-carboranyl)methyl]phenyl porphyrin (H₂OCP) is a boronated porphyrin having eight boron clusters linked to the porphyrin ring. To evaluate H₂OCP's applicability to both PDT and BNCT, we performed an in vitro and ex vivo study using F98 rat glioma cells.

Materials and Methods: We examined the time-dependent cellular uptake of H₂OCP by measuring the boron concentration over time, and compared the cellular uptake/clearance of boron after exposure to H₂OCP in conjunction with boronophenylalanine (BPA) and sodium borocaptate (BSH), both of which are currently used in clinical BNCT studies. We evaluated the cytotoxicity of H₂OCP-mediated PDT using a colony-forming assay and assessed the tumorigenicity of the implantation of pre-treated cells using Kaplan–Meier survival curves. Fluorescence microscopy was also performed to evaluate the cellular uptake of H₂OCP.

Results: H₂OCP accumulated within cells to a greater extent than BPA/BSH, and H₂OCP was retained inside the cells to approximately the same extent as BSH. The cell-surviving fraction following laser irradiation (8 J/cm², 18 hours after exposure to 10 µg B/ml H₂OCP) was <0.05. The median survival times of the pre-treated cell-implanted rats were longer than those of the untreated group (*P* < 0.05). The fluorescence of H₂OCP was clearly demonstrated within the tumor cells by fluorescence microscopy.

Conclusions: H₂OCP has been proven to be a promising photosensitizer for PDT. H₂OCP has also been proposed as a potentially effective replacement of BPA or BSH, or as a replacement of both BPA/BSH. Our study provides more evidence that H₂OCP could be an effective novel dual sensitizing agent for use in both PDT and BNCT. *Lasers Surg. Med.* 43:52–58, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

Key words: boron neutron capture therapy; boronated porphyrin; F98 rat glioma cells; H₂OCP; photodynamic diagnosis; photodynamic therapy

INTRODUCTION

The prognosis of patients with malignant glioma, especially glioblastoma (GB), is poor. The median survival of GB patients is <2 years after the initial diagnosis [1], with most recurrence occurring at the site of the original tumor. Therefore, more aggressive local therapies are necessary to eradicate unresectable tumor cells that invade adjacent normal brain tissue. Two adjuvant therapies with the potential to destroy these cells are photodynamic therapy (PDT) [2–4] and boron neutron capture therapy (BNCT) [5–8]. Both are bimodal therapies, the individual components of which are non-toxic in isolation but tumoricidal in combination. Boronated porphyrins have emerged as promising dual sensitizers for both PDT and BNCT by virtue of the following characteristics: tumor affinity by the porphyrin ring; ease of synthesis with a high boron content; low cytotoxicity in dark conditions; and desirable photophysical properties, including strong light absorption in the visible and near infrared regions, the ability to generate singlet oxygen upon light activation, and fluorescence properties [9,10]. Several boronated porphyrins have been synthesized and evaluated in cellular and animal studies [9,10]. Among these, boronated porphyrins BOPP [11,12] and CuTCPH [13], each containing four boron clusters, have been extensively investigated. This type of boronated porphyrin was found to selectively deliver therapeutic concentrations of boron into tumor cells with low cytotoxicity in dark conditions and with long retention times within tumors. Boronated porphyrins having high boron content (up to 16 boron clusters) have been reported, [9,14] and it has been postulated that this type of compound could potentially deliver higher amounts of boron to tumors at the same dose.

There is no conflict of interest with any of the authors.
Contract grant sponsor: Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT); Contract grant number: 20340549; Contract grant sponsor: United States National Institutes of Health; Contract grant number: R01 CA 098902.
*Corresponding to: Shinji Kawabata, MD, PhD, Department of Neurosurgery, Osaka Medical College, 2-7 Daigaku-machi, Takatsuki, Osaka 569-8686, Japan.
E-mail: neu046@poh.osaka-med.ac.jp
Accepted 16 November 2010
Published online 15 January 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
DOI 10.1002/lsm.21026

In particular, the synthesis and cellular evaluation of the octa-anionic 5,10,15,20-tetra[3,5-(nido-carboranyl-methyl)phenyl] porphyrin (H₂OCP), containing eight boron clusters (38% boron by weight), have been reported previously by the authors [15]. In that study, H₂OCP was shown to deliver high amounts of boron to human glioma T98G cells with low cytotoxicity in dark conditions. In this study, we evaluated the potential of H₂OCP as a dual sensitizer for both PDT and BNCT using F98 rat glioma cells. Although several boronated porphyrins have been proposed as boron delivery agents for BNCT, only a few have been investigated as dual sensitizers for both PDT and BNCT of tumors [9,16].

MATERIALS AND METHODS

Boron Delivery Agents

The H₂OCP was prepared as previously described [15]. Boronophenylalanine (BPA) (1-isomer) was kindly supplied by the Stella Chemifa Corporation (Osaka, Japan) and was prepared as a fructose complex [17]. Sodium borocaptate (BSH) was purchased from Katchem Ltd. (Katchem, Prague, Czech Republic) and dissolved in sterile saline.

Cell Culture

F98 rat glioma cells produce infiltrating tumors in the brains of Fischer rats [18]. The tumors have been shown to be refractory to a number of treatment modalities, including radiation therapy [19]. Based on their *in vivo* histology, the F98 rat glioma cells have been characterized as anaplastic or undifferentiated glioma [20]. In the present study, F98 rat glioma cells were kindly obtained from Dr. Barth (Department of Pathology, the Ohio State University, Columbus, OH). They were routinely cultivated in our laboratory in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. All the materials for the culture medium were purchased from Gibco Invitrogen (Grand Island, NY).

Cellular Uptake/Clearance of Boron

The F98 rat glioma cells were seeded in 100 mm dishes (BD Falcon™, Franklin Lakes, NJ), and the culture medium without H₂OCP was exchanged for the H₂OCP-containing culture medium just before confluence. In all cellular studies, three 100 mm dishes for each cellular study were used. H₂OCP was dissolved in DMSO prior to dilution into the culture medium; the final DMSO concentrations never exceeded 1%. After the completion of exposure, the H₂OCP-containing culture medium was removed and the cells were washed twice with 4°C phosphate-buffered saline (PBS). Finally, the cells were retrieved using trypsin and fed 60% nitric acid in the cellular solution to extract intracellular boron. In order to evaluate the time-dependent boron uptake, the cells were exposed to 20 µg B/ml of H₂OCP for 6, 12, or 18 hours. Cellular uptake/clearance experiments were conducted using culture media containing 20 µg B/ml boron from either the H₂OCP, BPA, or BSH stock solutions and were exposed to the cells for a 12-hour period, followed by clearance times of 0, 2, and 6 hours. The boron concentrations were analyzed by inductively coupled

plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) using an iCAP6000 emission spectrometer (Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan). PBS and trypsin were purchased from Gibco Invitrogen, and the 60% nitric acid was purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan).

Colony-Forming Assay

F98 rat glioma cells were incubated in culture media with two different doses of H₂OCP (5 and 10 µg B/ml) and without H₂OCP (control) for 18 hours in 150 cm² flasks (TPP®; Zollstrasse, Trasadingen, Switzerland). Following incubation, the cells were retrieved from the flasks, seeded onto 60 mm dishes (BD Falcon™) with 10⁴ cells each and irradiated with visible light of 405 nm from a diode laser (Ball Semiconductor, Frisco, TX). The cells were evenly irradiated at powers of 0 (control), 2, 4, and 8 J/cm². Following laser irradiation, the cells were seeded into dishes; each with the same predetermined number of cells, iteratively. After 7 days, all of the colonies (>50 cells) were counted and assessed by calculating the cell-surviving fraction.

Tumorigenesis of In Vitro Pre-Treated Tumor Cells

In the treated group, F98 cells were exposed to 20 µg B/ml H₂OCP for 12 hours at 37°C prior to laser irradiation (4 J/cm²), after which the tumor cells were implanted into 10 male Fischer rats. As a control study, untreated F98 cells were prepared and implanted in five male rats. Dead cells were stained with trypan blue just before implantation, counted under microscope, and expressed as a percentage of total cells per field-of-view segment. Viable cells were counted and were implanted into the rat brains. All male Fischer rats (200–250 mg) were anesthetized with an intraperitoneal injection of Nembutal (50 mg/kg) and placed in a stereotactic frame (Model 900, David Kopf Instruments, Tujunga, CA). A mid-line scalp incision was made and the bregma was identified. A 1 mm burr hole was made in the right frontal region of the skull and a 22-gauge needle attached to a 25 µl syringe was inserted into the caudate nucleus using the same stereotactic coordinates, with the needle tip inserted 5 mm into the dura. An injection of 10⁶ cells in 10 µl of serum free medium was administered at a rate of 1 µl/minute. After the infusion, the needle was left in place for 3 minutes and the burr hole was then covered with bone wax. After implantation surgery, the body weight and neurological function of the rats were monitored daily. One day before death became imminent (defined by significant weight loss and a lack of activity or severe neurological deficits), the rats were euthanized and Kaplan–Meier survival curves were plotted and analyzed.

Cytotoxicity of H₂OCP in Dark Conditions

We examined the cytotoxicity of H₂OCP in the dark with a viable cell-counting method and a colony-forming assay. F98 rat glioma cells were seeded in 100 mm dishes and were incubated in culture media containing two different concentrations of H₂OCP (0, 20 µg B/ml) for cell counting. After exposure to H₂OCP for 24 hours, the cells were counted

using the trypan blue dye exclusion method. This assay was performed in triplicate. The cytotoxicity in the cell count was assessed by the percentage of viable of cells. For the colony-forming assay, F98 rat glioma cells were seeded in 100 mm dishes and were incubated in culture media containing five different concentrations of H_2OCP (0, 5, 10, 20, 40 μg B/ml). After exposure to H_2OCP for 24 hours, the cells were retrieved from the dishes and were seeded onto 100 mm dishes, each with the same predetermined number of cells. This assay was also performed in triplicate. After 7 days, all of the colonies (>50 cells) were counted and assessed by calculation for the cell-surviving fraction.

Fluorescence Microscopy

F98 rat glioma cells were seeded in a two-well chamber mounted on glass slides with a cover (Nalge Nunc International, Rochester, NY) and the culture medium without H_2OCP was exchanged for the H_2OCP -containing culture medium just before confluence. The cells were exposed to 20 μg B/ml H_2OCP for 24 hours. After exposure, the glass slides were washed with 4 CPBS and the two-well chamber was removed. The nucleus-specific hoechst dye (Hoechst 33342, Lonza, Maryland, MD) was added (10 μg /ml) and the glass slides mounted onto cover glasses using DPX Mountant for histology (44581, Fluka Biochemika, Darmstadt, Germany). The two-well chamber slides were observed using an inverted fluorescence microscope system (BZ-8000, Keyence, Tokyo, Japan).

RESULTS

Cellular Uptake/Clearance of Boron

The measured cellular boron concentrations obtained by in vitro cellular delivery using H_2OCP were 158.2 ± 3.8 , 272.2 ± 15.3 , and 405.1 ± 22.6 ng B/ml 10^6 cells after 6, 12, and 18 hours of exposure, respectively. Nearly three times more boron was found within cells after 18 hours of exposure than after 6 hours of exposure (Fig. 1). The determined cellular boron concentrations for in vitro cellular uptake/clearance of boron in response to exposure to H_2OCP , BPA, and BSH for 12 hours were 272.2 ± 15.3 ,

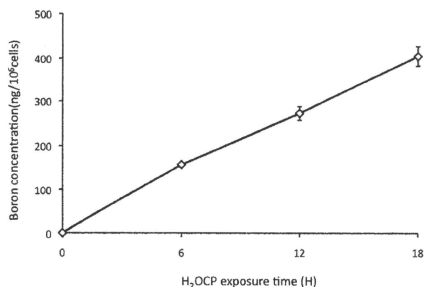


Fig. 1. Cellular uptake of boron (ng B/ml 10^6 cells) after 6, 12, and 18 hours of exposure to 20 μg B/ml H_2OCP .

239.7 ± 12.3 , and 85.2 ± 2.0 ng B/ml 10^6 cells, respectively. In contrast, at 6 hours after exposure the cellular boron concentrations were 246.7 ± 14.6 , 84.9 ± 0.7 , and 67.0 ± 4.6 ng B/ml 10^6 cells, respectively. At the same boron dose, H_2OCP delivered significantly higher amounts of boron to cells than did BPA or BSH (log-rank test, $P < 0.05$). Furthermore, while BPA cleared rapidly from cells, both H_2OCP and BSH showed high cellular retention of boron for up to 6 hours (Fig. 2).

Colony-Forming Assay

The cytotoxicity of H_2OCP determined by laser irradiation using a colony-forming assay showed that the surviving fraction of cells following exposure to H_2OCP (10 μg B/ml for 18 hours) and laser irradiation was 0.326 ± 0.031 , 0.246 ± 0.037 , and 0.045 ± 0.001 using 2, 4, and 8 J/cm² light dose, respectively. Under the same conditions, the surviving fractions of the laser-only control (without H_2OCP) were 0.861 ± 0.182 , 0.776 ± 0.035 , and 0.299 ± 0.023 , respectively. The most efficient PDT-induced tumoricidal effect was achieved when the cells were irradiated with 8 J/cm², 18 hours after exposure to H_2OCP (<0.05) (Fig. 3).

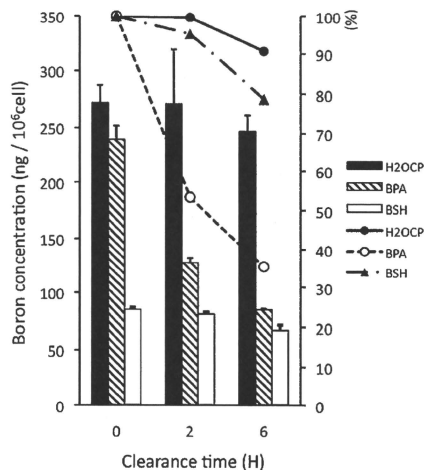


Fig. 2. Comparison of cellular uptake/clearance of boron (ng B/ml 10^6 cells) after exposure to 20 μg B/ml of either H_2OCP , BPA, or BSH under identical conditions. Left and right Y-axes show the measured value (ng B/ml 10^6 cells) and percentage of boron concentration, respectively. The cellular uptake of boron using H_2OCP showed values higher than those for BPA and BSH ($P < 0.05$), and the cellular retention of boron using H_2OCP showed values similar to those obtained using BSH.

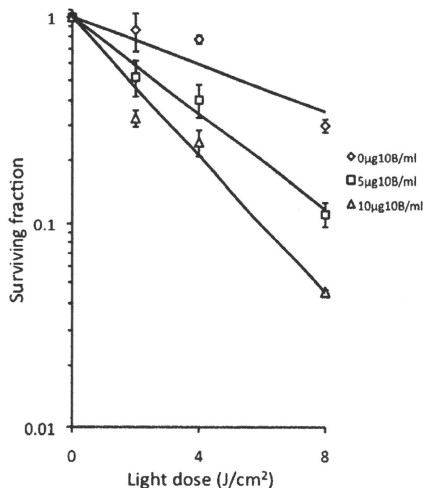


Fig. 3. Colony-forming assay using F98 rat glioma cells exposed to 0 (control), 5, and 10 μg B/ml of H₂OCP and irradiated with light doses of 0, 2, 4, and 8 J/cm^2 , respectively. The cell-surviving fraction following laser irradiation (8 J/cm^2 , 18 hours after exposure to 10 μg B/ml H₂OCP) was <0.05 .

Tumorigenesis of In Vitro Pre-Treated Tumor Cells

The observed tumorigenicity of the implanted pre-treated cells using Kaplan–Meier survival curves revealed median survival times of 12 and 14 days in the untreated and the treated groups, respectively, and mean survival times of 11.8 and 14.6 days after implantation, respectively. In Kaplan–Meier survival curve analysis, these survival times demonstrated a significant difference (log-rank test, $P < 0.05$) (Fig. 4).

Cytotoxicity of H₂OCP in Dark Conditions

The viable cell-counting method revealed the following results. The percentage of cell viability with exposure of 20 μg B/ml H₂OCP was $98.0 \pm 1.4\%$ (mean \pm SD), while that of cell viability without H₂OCP was $98.0 \pm 0.9\%$. The colony-forming assay showed the following: the surviving fractions with each boron concentration (0, 5, 10, 20, 40 μg B/ml H₂OCP) were 1, 0.99 ± 0.04 (mean \pm SD), 0.98 ± 0.05 , 0.98 ± 0.01 , and 0.98 ± 0.03 , respectively. These results showed no significant differences (Welch's *t*-test, $P > 0.05$).

Fluorescence Microscopy

The fluorescence microscopy showed the intracellular porphyrin fluorescence and images from the co-localization

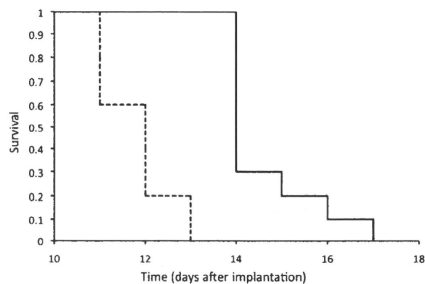


Fig. 4. Kaplan–Meier survival curves following in vitro pre-treated F98 cells using H₂OCP-mediated PDT. Rats were implanted i.c. with F98 cells and were either untreated (dotted line) or treated with PDT (continuous line). Cells were exposed to 20 μg B/ml of H₂OCP for 24 hours at 37 $^{\circ}\text{C}$ prior to laser irradiation. After laser irradiation (4 J/cm^2), the tumor cells were implanted into the rats. Cell viability was determined by trypan blue exclusion staining and 10^5 viable cells were implanted stereotactically into the caudate nucleus. The median survival times of the untreated control and the treated group were 12 and 14 days, and the mean survival times were 11.8 and 14.6 days after implantation, respectively ($P < 0.05$).

experiment using the nucleus-specific Hoechst dye. These results showed that H₂OCP was taken up into the cells and also localized in the nuclei (Fig. 5B–D). Although the cells showed evidence of cytotoxic damage, the cytotoxicity of H₂OCP in dark conditions was not found at twice the concentration of H₂OCP used in this fluorescence microscopy experiment. (Fig. 5A).

DISCUSSION

BNCT is a targeted chemo-radiation therapy that significantly increases the therapeutic ratio relative to conventional radiotherapeutic modalities. In BNCT, a ^{10}B -labeled compound delivers therapeutic concentrations of ^{10}B ($\sim 30 \mu\text{g } ^{10}\text{B}/\text{g}$ tumor) to the target tumor, with high tumor-to-blood and tumor-to-normal-tissue ratios and low cytotoxicity [5,6]. Subsequently the tumor is irradiated with epithermal neutrons that become thermalized at a certain depth within the tissues. The short range ($<10 \mu\text{m}$) of the α and ^7Li high linear energy transfer (high-LET) particles released from the $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ neutron capture reaction makes the tumor microdistribution of ^{10}B critically important in BNCT [21]. Since the high-LET particles are highly cytotoxic, their killing effect depends on the site of generation. These characteristics contribute to the tumor selectivity and strong tumoricidal activity of BNCT, with negligible damage to normal tissue. Therefore, if sufficient quantities of boron can be selectively delivered to tumor tissues, BNCT could be an ideal tumor-selective particle

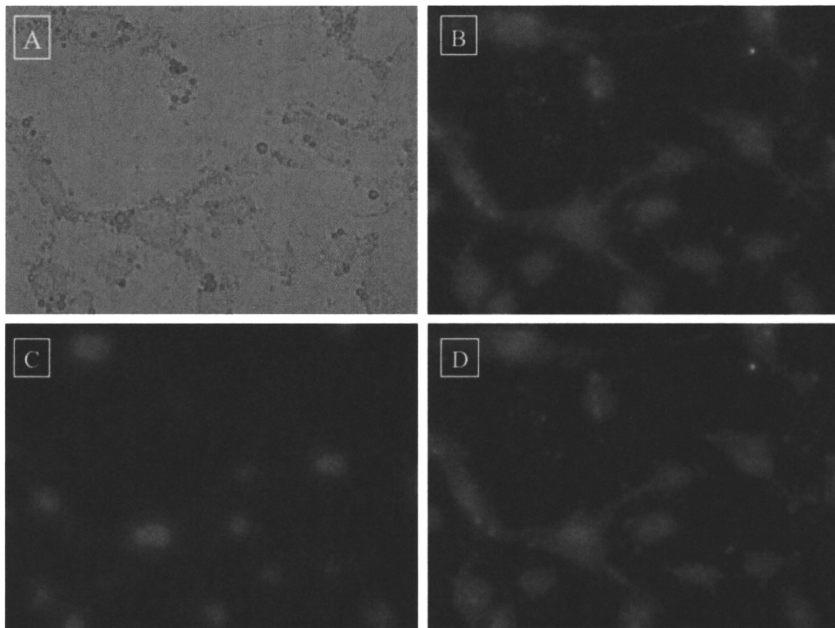


Fig. 5. Images obtained using an inverted fluorescence microscope. **A:** Bright field image. Although the cells showed evidence of cytotoxic damage, the cytotoxicity of H_2OCP in dark conditions was not found at twice the concentration of H_2OCP used in this fluorescence microscopy experiment. **B:** Fluorescence of porphyrin H_2OCP . **C:** Nuclear fluorescence by Hoechst dye (excitation wavelength was 340–380 nm). **D:** Merged image. (Magnification of all images: $\times 600$).

beam irradiation local therapy for malignant gliomas. Clinically, BPA and BSH are currently available for BNCT as boron delivery agents. BPA is a boronated derivative of an essential amino acid (*t*-phenylalanine) that is actively taken up by tumor cells, presumably via the amino acid transport mechanism [22]. BSH, on the other hand, is believed to preferentially accumulate within tumor tissue via a partially destroyed or leaky blood brain barrier, and is thought to be retained longer than BPA due to its higher hydrophobic character [23]. We have used both of these boron delivery agents in combination in clinical BNCT studies, and have previously been reported on the survival benefit from BNCT for newly diagnosed GB patients [7] as well as for recurrent malignant glioma patients [8]. However, the present results using BPA and BSH are far from satisfactory, and the use of more effective boron delivery agents should provide enhanced clinical outcomes for BNCT. The so-called third-generation of boron delivery

agents [6], including boronated porphyrin derivatives, molecular-targeted agents (e.g., to EGFR), and liposome-linked boron delivery agents could potentially greatly increase the efficacy of BNCT in the clinical setting. Among these boron delivery agents, boronated porphyrins are particularly promising because they contain a porphyrin ring with tumor affinity, and they are also excellent photosensitizers for PDT [9]. In a similar fashion to BNCT, PDT is a localized therapy that relies on the specific uptake of a photosensitizer in the tumor relative to the surrounding normal tissue, followed by laser irradiation for activation of the photosensitizer [2,24]. The photoactivation of the sensitizer causes oxidative damage to a variety of cellular targets via the release of singlet oxygen and other reactive oxygen species, with subsequent tumor necrosis. To date, the clinical trials with PDT employed as an adjuvant treatment for human gliomas have used the poorly defined heterogeneous porphyrin mixture hematoporphyrin derivative (HpD) or its more enriched