

201015028A

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業

ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)を用いた
悪性胸膜中皮腫に対する効果的治療法の開発研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小野公二

平成 23 年 (2011) 3 月

研究報告書目次

I. 総括研究報告	
ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) を用いた悪性胸膜中皮腫に対する 効果的治療法の開発研究	1 - 5
小野 公二	
II. 分担研究報告	
肺中皮腫に対する BNCT 効果および抗癌剤併用効果の検索	
中川 和彦	6 - 9
肺中皮腫に対する BNCT 効果および抗癌剤併用効果の検索	
中野 孝司	10 - 12
BNCT の肺中皮腫および正常肺組織に対する効果の検索	
奥村 明之進	13 - 14
BNCT の肺中皮腫および正常肺組織に対する効果の検索	
平塚 純一	15 - 16
簡便なホウ素濃度測定技術の開発と組織内ホウ素分布の検索	
切畑 光統	17 - 21
肺における中性子分布の改善と照射技術の改良の研究	
櫻井 良憲	22 - 26
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27 - 34
IV. 研究成果の刊行物・別刷	35 - 109
V. 「悪性胸膜中皮腫に対するホウ素中性子捕捉療法の多施設臨床試験」 試験実施計画書	111 - 214

厚生労働科学研究費補助金(医療技術実用化総合研究事業)

総括研究報告書

ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)を用いた悪性胸膜中皮腫に対する効果的治療法の開発

研究代表者 小野公二 京都大学原子炉実験所・教授

研究要旨

悪性胸膜中皮腫はその病巣進展の三次元形状が複雑で、高精度 X 線治療や荷電重粒子線治療でも巧く治療することはできない。BNCT は細胞選択的放射線照射が可能な治療法で斯うした腫瘍は良い標的になると考えられる。これまでの BNCT の経験や X 線治療の経験に基づいて臨床研究の計画書を略纏め上げ、倫理委員会より実施の承認を得た。また、既承認の研究計画に基づき試験的に BNCT を実施し、腫瘍マーカーの低減、症状の緩和を得た。外、X 線治療例での正常肺組織に対する損傷の観察から耐容線量の推定を行った。更に、ホウ素化合物に対するモノクロナル抗体による ELISA 法で簡便、正確に血漿中のホウ素化合物濃度を測定するシステムを確立した。次世代の中性子源として加速器(サイクロトロン)中性子源の開発を進め、検証可能な強度に到達したビームの物理学的・放射線生物学的特性を確認した。RBE は 2.5 と原子炉中性子 (3.0) よりやや小さく、生体内での分布は同等以上であること等が分かった。

研究分担者 中川和彦 (近畿大学医学部内科学腫瘍内科部門・教授)
研究分担者 中野孝司 (兵庫医科大学内科学呼吸器 RCU 科・主任教授)
研究分担者 平塚純一 (川崎医科大学医学部放射線医学(治療)・教授)
研究分担者 奥村明之進 (大阪大学大学院医学系研究科外科系臨床医学・教授)
研究分担者 切畑光統 (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科・教授)
研究分担者 櫻井良憲 (京都大学原子炉実験所放射線生命科学研究部門・准教授)

A. 研究目的

悪性胸膜中皮腫はアスベストの主に工業的使用に伴う暴露に起因して発症し、今後 40 年間に 10 万人に及ぶ犠牲者が予測されながら十分に有効な治療法が開発されていない。進行期には三次元的に複雑な病巣形状を呈するため、今日の高精度放射線治療の技術をもってしてもその応用が困難な為、X 線治療の役割は限定的である。すなわち、全肺胸膜摘出の症例に対し、強度変調 X 線治療を応用する試みがあるが、前提となる全肺胸膜摘出術自体、可能な患者が極めて限られている点と侵襲度の高い点で適応は極々狭い。斬新なアイデアの放射線治療が切望されている所以である。

ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)ではホウ素(B-10)原子核が中性子を捕獲する反応に伴い細胞径を超えない飛程の α 粒子が放出される。従って、ホウ素化合物が癌細胞に選択的に集積すれば選択的に癌細胞に線量を集中できる。更に α 粒子の生物効果は非常に大きく、 α 粒子が細胞核に届けば細胞破壊は確実である。腫瘍のホウ素濃度と到達中性子数が分かれば腫瘍制御の可否も予測可能である。斯かる効果予測の確実さは通常 X 線治療と異なり BNCT の特色でもある。京大炉では腫瘍細胞で亢進しているアミノ酸輸送により腫瘍に高濃度で集積するホウ素化合物 BPA を用いて高度進展の悪性胸膜中皮腫に対する BNCT を実施し、腫瘍の縮退と速やかな症状(激しい肋間神経痛)の消失が得られた症例を経験した。また、達成可能な腫瘍中のホウ素濃度を想定した上で BNCT 線量分布をシミュレーションすると、

肺線量を耐容線量以下に抑えても抗腫瘍効果を生むに足る線量を腫瘍に投与できると予想されている。BPA の腫瘍での集積の程度は 18F-BPA PET で事前に検索できる。正常肺の X 線耐容線量と体積の関係は解明されており、血中ホウ素濃度と中性子数から計算できる物理線量を X 線等価生物線量に変換する係数も報告されている。以上から、これらの実績と諸報告を踏まえて本研究を推進し、スーパー特区の課題である悪性胸膜中皮腫を対象にした加速器中性子 BNCT の治験の基礎を固めることを目的とする。また、本研究を通じて同様に複雑な腫瘍形状を呈する、有効な治療法の見出されていない他の進行期癌に対する治療法の開拓にも繋げることも目的とする。

B. 研究方法

BNCT 研究は臨床研究者、放射線生物学に精通した研究者、ホウ素化合物に係る有機化学者、医学物理学者による学際的共同研究により始めて効果的な研究体制が構築できる。そこで、研究代表者は放射線腫瘍学・生物学の視点から「肺中皮腫に対する BNCT 効果とホウ素化合物集積及びその向上の研究ならびに研究の総括」の研究を進めた。また、呼吸器学・腫瘍内科学を専門とする研究分担者は「肺中皮腫に対する BNCT 効果および抗癌剤併用効果の検索」を行う。放射線腫瘍学を専門とする研究分担者は呼吸器外科学の専門とする研究分担者と協力して「肺中皮腫および正常肺組織に対する効果を検索」を行う。更に、BNCT では腫瘍や正常肺の放射線の線量推定が必須であるが、基礎となるのは血中ホウ素濃度であるので有機合成化学を専門とする研究分担者は「ホウ素化合物 BPA と BSH の簡便なホウ素濃度測定技術の開発」を研究する。また、ホウ素化合物の分布と共に、中性子の分布は非常に重要な要素である。「肺における中性子分布の改善と照射技術の改良の研究」の課題は医学物理を専門とする研究分担者が分担する。

上記の基本的な研究分担を踏まえて、臨床研究者を中心に、悪性胸膜中皮腫の BNCT 臨床試験研究(多施設共同)計画を作成する。まず、本研究課題を分担する臨床研究者のこれまでの経験、特に京都大学原子炉実験所で行った胸部悪性腫瘍に対する BNCT の経験や基礎研究に基づいて、研究者 G が治療プロトコルの骨格を定め、神戸市の臨床研究情報センター(CTRI)に作業を委託し、共同での討論を経て、臨床試験研究計画書に纏め上げる。

ホウ素化合物の腫瘍集積の程度の予測、特に血中濃度に対する比は重要である。これまでの経験では悪性胸膜中皮腫に対する 18F-BPA PET の経験の蓄積は極めて少ない。そこで、前述の臨床研究へのエントリー基準を考える上でも、決める上でも集積能の実態を把握することは不可欠である。18F-BPA PET は国内に辛うじて 2 箇所、西日本では京都の病院でのみ実施可能である。従って、ここに依頼し検査を実施しデータを集積する。

又、棚素化合物(BPA)の簡便な測定法の評価は実際の BNCT を実施する際に非常に重要である。これまでの手法はホウ素原子の濃度を測定する方法であった。しかし、もし生体内でホウ素化合物が分解するとホウ素原子の分布とホウ素化合物の分布には差が生まれる。そこで、ホウ素化合物自体を測定する手法を考案した。研究ではその実験動物での精度を検証する。特に、これまでの検証が *in vitro* で調整した試料やマウスへ投与して得た血液の様な試料であったので、特にマウスの血液試料はマウスの個体が小さく我々の手法を適応するには十分量の血液を採取できないため、この研究では実験犬や再稼働した KUR での BNCT 患者(脳腫瘍、頭頸部癌)の試料で有用性を確認する。

BNCT は遠くない将来に原子炉ではなく加速器中性子源によって承認された実医療とする必要がある。現在、京都大学原子炉実験所では加速器(サイクロトロン)中性子源と照射システムの開発を企業との共同で進めており、ビーム強度は物理・生物実験が可能なレベルを既に達成している。そこで、培養細胞とマウス(担癌および非担癌)を用いて、コロニー形成能、微小核形成能、マウス放射線口腔死、骨髄損傷、腫瘍の増殖遅延などを指標として中性子の生物特性を評価する。

(倫理面への配慮)

本研究で対象とする進行悪性胸膜中皮腫は今日の発達した高度放射線治療技術の応用が困難で、十分に有効な治療法が見出せない疾患である。京大炉 BNCT 研究グループは進行悪性胸膜中皮腫のような

症例を含む包括的な内容で BNCT 臨床試験研究の実施の承認を京大医学部医の倫理委員会から得ている(平成 19 年 10 月 11 日承認)。ここで承認された試験計画を基に、本研究に参加予定の臨床 G がその所属機関に試験研究計画を提出し、実施の許可を各々の倫理委員会から得て研究を開始する。さらに、個別症例の実施に当たっては京都大学子炉実験所の原子炉医療委員会に設置された BNCT に係る症例審査委員会の承認を得て実施する。このシステムはこれまでも運用してきたものであるが、本研究においてもこのシステム用い、対象者に十分な倫理的配慮を行うとともに、不利益の及ばないようにする計画である。

C. 研究結果

本研究の目的は、進行悪性胸膜中皮腫をホウ素中性子捕捉療法(BNCT)によって効果的かつ安全に治療する手法を開発することにある。平成 22 年度は京都大学原子炉が再稼働し、既承認の別試験研究のプロトコルに基づいて悪性胸膜中皮腫例の BNCT を実施することが出来た。その症例は先行した化学療法に抵抗性となった患者であったが、当初は FBPA PET で予測される BPA 濃度の腫瘍：血液比が小さく、しばらくの待機を余儀なくされた。この値は前年度の腫瘍と正常肺組織に対するシミュレーション研究の成果で得られた放射能比 2.25 に達しない値であった。その約 6 ヶ月後、予測比が上昇し BNCT が可能と判断され、BNCT が実施された。その結果、腫瘍マーカーの顕著な低減、症状の緩和が得られた。予測の如く正常肺の損傷は出現しなかった。これはこれまでの X 線治療における肺損傷を改めて解析した結果とも矛盾しなかった。

この経験、基礎実験、文献的調査に基づいて、臨床試験研究の最終計画書(プロトコル)が完成し、京都大学医学研究科・医学部の医の倫理委員会に審査をお願いし、実施の承認が得られた。23 年度には本格的な多施設共同の臨床試験研究を開始できる状況になっている。

BPA の血中濃度を簡便に測定する手法を開発し、その利便性と特に BPA とは異なる棚素化合物が併用された時の分別測定の有用性をイヌと KUR での BNCT 患者(脳腫瘍、頭頸部癌の症例が中心)で確認した。ただ、BPA は投与後の時間と共に血漿分画からの他分画へ移行する様で、当初の予期とは異なり全血のホウ素濃度の把握には困難が伴うことも明らかになった。方やホウ素化合物に対するモノクロナル抗体を用いた ELISA 法による濃度測定の手法も開発でき、キット化も完成しその精度と有用性を確認した。

原子炉の再稼働と並行してサイクロトロン中性子源による BNCT 照射システムの開発も進めている。この中性子ビームの物理特性及び生物学的特性についても細胞やマウスを用いて検討した。中性子 RBE を 2.5 で確定した。これは原子炉中性子照射システムのそれ(RBE=3.0)よりもやや低い値である。中性子のエネルギーが高いことを勘案すると妥当な値である。全身の総被曝線量が原子炉中性子照射の場合よりも大きくなるデータが、物理測定と生物試料(培養細胞)によるバイオドジメトリーによって得られた。

D. 考察

悪性胸膜中皮腫を対象とした BNCT 臨床試験研究の計画書や治療プロトコルは出来れば平成 22 年度には開始する本研究計画の中核を成す部分であったが諸般の事情にて遅れた、しかし、23 年度の医療照射には間に合うように完成し倫理委員会の承認を得たので 23 年度の試験研究開始とその成果が待たれる。また、このプロトコルは公開され、BNCT あるいは悪性胸膜中皮腫の治療研究者の参考になることを期待している。18F-BPA PET によるホウ素化合物 BPA の集積の腫瘍：肺あるいは血液比が症例や同一症例でも先行した抗癌化学療法の時期によって大きく変わることは、悪性胸膜中皮腫の BNCT 研究にとって 18F-BPAPET の実施が必須であることを示すものであると共に、個々の症例についての BNCT の適否判断のみならず、病勢の緩急の変動の指標にもなる可能性もあり、本研究でも注視して解析しなければならない。紫外励起蛍光光度測定による BPA の簡便な測定の有用性と問題点(有用性の

制限) がイヌでの実験やヒト脳腫瘍・頭頸部腫瘍の BNCT 症例の血液試料で確認できたことは悪性中皮腫 BNCT においても将来の複数の棚素化合物を併用した場合に役立つと考えられる。また、ホウ素化合物に対するモノクロナル抗体を用いた ELISA 法を確立できたことによって測定法の多様化が達成出来たと。

加速器中性子照射システムのビーム特性に係るデータは、悪性胸膜中皮腫の BNCT に限らず、BNCT が一般的に承認された医療にある上で必須の中性子源開発に資するもので、23 年度に開始予定の加速器中性子源による BNCT 治験計画に資する。被曝線量に関するデータも又同様である。

E. 結論

平成 22 年度の研究によって、試験研究のプロトコールが完成、倫理委員会の承認も得たことで平成 23 年度からの悪性胸膜中皮腫の BNCT 臨床研究に向けての準備が基本的に完成した。平成 23 年度の前半には多施設共同の臨床研究を開始できる。福島原発事故で懸念された研究炉（この場合は KUR）も予定から殆ど遅れることなく 6 月上旬には医療照射の運転が再開できる。

一方、原子炉中性子による BNCT の次に段階で想定されている加速器中性子源による BNCT に関しては、物理学的・放射線生物学的なビーム特性を把握することが略できた。また、BNCT 臨床研究の現場で必要なホウ素化合物 BPA の簡便で比較的迅速な特異的測定法もその精度を含めて確立できたと考えられる。以上より、悪性胸膜中皮腫に対する BNCT 臨床研究と将来の研究の方向と体制が略整った。

F. 健康危険情報(あれば記入下さい)

無し

G. 研究発表

1. 論文

1. Nobuyuki HAMADA, Tatsuhiro IMAOKA, Shin-ichiro MASUNAGA, Toshiyuki OGATA, Ryuichi OKAYASU, Akihisa TAKAHASHI, Takamitsu A. KATO, Yasuhiko KOBAYASHI, Takeo OHNISHI, Koji ONO, Yoshiya SHIMADA and Teruki TESHIMA, Recent Advances in the Biology of Heavy-Ion Cancer Therapy. J. Radiat. Res., 51, 365-383, 2010.
2. Shin-ichiro MASUNAGA, Keizo TANO, Jun NAKAMURA, Masarni WATANABE, Genro KASHINO, Akihisa TAKAHASHI, Hiroki TANAKA, Minoru SUZUKI, Ken OHNISHI, Yuko KINASHI, Yong LIU, Takeo OHNISHI and Koji ONO, Usefulness of Hexamethylenetetramine as an Adjuvant to Radiation and Cisplatin in the Treatment of Solid Tumors: its Independency of p53 Status. J. Radiat. Res., 51, 27-35, 2010.
3. Yuko Kinashi, HirokiTanaka, Shinichiro Masunaga, Minoru Suzuki, Genro Kashino, Liu Yong, Sentaro Takahashi, Koji Ono, Ascorbic acid 2-glucocide reduces micronucleus induction in distant splenic T lymphocytes following head irradiation. Mutation Research 695, 69-74, 2010.
4. Shin-ichiro Masunaga, Ryoichi Hirayama, Akiko Uzawa, Genro Kashino, Takushi Takata, Hiroki Tanaka, Minoru Suzuki, Yuko Kinashi, Yong Liu, Sachiko Koike, Koichi Ando, Koji Ono, Inf uence of manipulating hypoxia in solid tumors on the radiation dose-rate effect in vivo, with reference to that in the quiescent cell population.

Jpn J Radiol. 28(2), 132-42, 2010.

5. Usei Fujita, Naofumi Yamamoto, Itsuro Kato, Soichi Iwai, Koji Ono, Yoshinori Sakurai, Ken Ohnishi, Takeo Ohnishi, Yoshiaki Yura. Induction of multinucleation in oral squamous cell carcinoma tissue with mutated p53 surviving boron neutron capture therapy. Int. J. Radiat. Biol. Vol. 87, No. 3, 293-301, 2011
6. T. Fujii, H. Tanaka, A. Maruhashi, K. Ono, and Y. Sakurai, "Study on optimization of multi ionization-chamber system for BNCT", Proceedings of the 14th International Congress on Neutron Capture Therapy, Comision Nacional de Energia Atomica, 2010, pp. 177-180.
7. Y. Sakurai, T. Fujii, H. Tanaka, M. Suzuki, Y. Liu, G. Kashino, Y. Kinashi, S. Masunaga, K. Ono, and A. Maruhashi, "A study on QA-phantom for boron neutron capture therapy", Proceedings of the 14th International Congress on Neutron Capture Therapy, Comision Nacional de Energia Atomica, 2010, pp. 254-256.
8. T. Tsukamoto, H. Tanaka, H. Yoshinaga, T. Mitsumoto, A. Maruhashi, K. Ono, and Y. Sakurai, "A phantom experiment for the evaluation of whole body exposure during BNCT using cyclotron-based epithermal neutron source (C-BENS)", Proceedings of the 14th International Congress on Neutron Capture Therapy, Comision Nacional de Energia Atomica, 2010, pp. 265-268.
9. H. Tanaka, Y. Sakurai, M. Suzuki, S. Masunaga, T. Mitsumoto, K. Fujita, G. Kashino, Y. Kinashi, Y. Liu, M. Takada, K. Ono, and A. Maruhashi, "Experimental demonstration of beam characteristics for cyclotron-based epithermal neutron source (C-BENS)", Proceedings of the 14th International Congress on Neutron Capture Therapy, Comision Nacional de Energia Atomica, 2010, pp. 447-450.
10. H. Ueda, H. Tanaka, A. Maruhashi, K. Ono, and Y. Sakurai, "Spectral evaluation of cyclotron-based epithermal neutron irradiation field for BNCT using Bonner sphere", Proceedings of the 14th International Congress on Neutron Capture Therapy, Comision Nacional de Energia Atomica, 2010, pp. 459-462.
11. M. Imoto, H. Tanaka, K. Fujita, T. Mitsumoto, K. Ono, A. Maruhashi, and Y. Sakurai, "Evaluation for activities of component of cyclotron-based epithermal neutron source (C-BENS) and the surface of concrete wall in irradiation room", Proceedings of the 14th International Congress on Neutron Capture Therapy, Comision Nacional de Energia Atomica, 2010, pp. 496-498.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金(医療技術実用化総合研究事業)

分担研究報告書

「肺中皮腫に対するBNCT効果および抗癌剤併用効果の検索」

中川和彦 近畿大学医学部内科学腫瘍内科学部門 教授

研究要旨

「悪性胸膜中皮腫に対するホウ素中性子捕捉療法の多施設臨床試験」において、本臨床試験に適合した悪性胸膜中皮腫患者を登録し、プロトコル治療実施後の経過観察を行う。また、経過観察期間中に出現した有害事象、有効性評価、生存期間の調査報告を実施する。

A. 研究目的

有効な治療手段の無い進行悪性胸膜中皮腫 (malignant pleural mesothelioma = MPM) を対象として、ホウ素中性子捕捉療法 (boron neutron capture therapy; BNCT) の安全性および臨床効果を評価する。

B. 研究方法

以下に示す主な適格規準に適合する症例を抽出する。

- 1) 病理組織学的に悪性胸膜中皮腫の診断が得られている患者
- 2) 手術、X線治療、抗がん化学療法の効果が期待しがたい進行症例、再発例
- 3) 18F-BPA PET における18F-BPA の腫瘍：正常肺の集積比が、 >7.0
- 4) 同意取得時年齢が20 歳以上75 歳以下の患者
- 5) KPS \geq 60%の患者
- 6) 3 ヶ月以上の生存が期待される患者
- 7) 臨床検査値が以下の基準を満たす。

- ①白血球数 $\geq 3 \times 10^3 / \mu\text{L}$ ②ヘモグロビン $\geq 8.0\text{g/dL}$ ③血小板数 $\geq 10 \times 10^4 / \mu\text{L}$
④AST (GOT) $\leq 100 \text{ IU/L}$ ⑤ALT (GPT) $\leq 100 \text{ IU/L}$ 以下 ⑥血清クレアチニン $\leq 1.5 \text{ mg/dL}$

本試験について患者説明同意書を用いて説明した上で、試験参加について患者本人から文書同意を得る。同意の得られた患者について登録を行い、プロトコル治療を行うために京都大学原子炉に紹介する。照射後の急性期毒性の危険性も考慮して、最初の数例は照射後1週間程度入院で様子を見る。

(倫理面への配慮)

本プロトコルの実施に関しては院内IRBおよび倫理審査委員会にて承認を受ける。また、登録患者からは文書による本人からの同意が必須とされている。原子炉で行われる治療に関する経費はすべて本研究費より賄われる。また、原子炉までの交通費に関しても実費が支払われる。

C. 研究結果

現在、本臨床試験開始に向けて実施計画書およびCRFの作成され、倫理審査委員会で審議中である。

D. 考察

治療方法の少ない進行悪性胸膜中皮腫においてBNCTは期待される治療法である。臨床試験プロトコル、患者説明文書が作成されており、すでに京都大学での倫理審査が終了した。今後、近畿大学を含めて参加施設の倫理審査委員会への申請、審査を迎えるが、一刻も早く臨床試験実施可能な状況を作り実施したいと考える。

E. 結論

進行悪性胸膜中皮腫におけるBNCTの臨床試験を早期に開始するべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okamoto I, Munakata M, Miyazaki M, Satoh T, Takahata T, Takamatsu Y, Muto O, Koike K, Ishitani K, Mukaiyama T, Sakata Y, Nakagawa K, Tamura K. Disturbance of the Growth Hormone-Insulin-like Growth Factor-1 Axis Associated with Poor Performance Status in Patients with Solid Tumors. *Jpn J Clin Oncol.* 40(3):222-6, 2010.
2. Kaneda H, Arao T, Tanaka K, Tamura D, Aomastu K, Kudo K, De Velasco M A, Mastumoto K, Fujita Y, Yamada Y, Tsurutani J, Okamoto I, Nakagawa K, Nishio K. FOXQ1 is overexpressed in colorectal cancer and enhances tumorigenicity and tumor growth. *Cancer Research.* 70(5):2053-63, 2010.
3. Kubota K, Sakai H, Yamamoto N, Kunitoh H, Nakagawa K, Takeda K, Ichinose Y, Saijo N, Ariyoshi Y, Fukuoka M. A Multi-Institution Phase I/II Trial of Triweekly Regimen with S-1 Plus Cisplatin in Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 5(5)702-6, 2010.
4. Takeda M, Okamoto I, Fukuoka M, Nakagawa K. Successful treatment with erlotinib after gefitinib-related severe hepatotoxicity. *J Clin Oncol.* 28(17):e273-4, 2010.
5. Takeda M, Okamoto I, Makimura C, Fukuoka M, Nakagawa K. Successful treatment with erlotinib after gefitinib-induced severe interstitial lung disease. *J Thorac Oncol.* 5(7):1103-4, 2010.
6. Kunitoh H, Tamura T, Shibata T, Takeda K, Katakami N, Nakagawa K, Yokoyama A, Nishiwaki Y, Noda K, Watanabe K, Saijo N; JCOG Lung Cancer Study Group. A phase II trial of dose-dense chemotherapy, followed by surgical resection and/or thoracic radiotherapy, in locally advanced thymoma: report of a Japan Clinical Oncology Group trial (JCOG 9606). *Br J Cancer.* 103(1):6-11, 2010.
7. Takezawa K, Okamoto I, Tanizaki J, Kuwata K, Yamaguchi H, Fukuoka M, Nishio K, Nakagawa K. Enhanced anticancer effect of the combination of BIBW2992 and thymidylate synthase-targeted agents in non-small cell lung cancer with the T790M mutation of epidermal growth factor receptor. *Mol Cancer Ther.* 9(6):1647-56, 2010.
8. Kurata T, Yamamoto N, Komiya T, Tsurutani J, Miyazaki M, Tamura K, Takeda K, Nakagawa K, Fukuoka M. A Phase I Study of Gemcitabine Plus Irinotecan for Advanced NSCLC: Japan Clinical Oncology Group Trial (JCOG9904). *Jpn J Clin Oncol.* 40(10):992-4, 2010.
9. Iwasa T, Okamoto I, Takezawa K, Yamanaka K, Nakahara T, Kita A, Koutoku H, Sasamata M, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K, Fukuoka M, Nakagawa K. Marked anti-tumour activity of the combination of YM155, a novel survivin suppressant, and platinum-based drugs. *Br J Cancer.* 103(1):36-42, 2010.

10. Tanizaki J, Okamoto I, Takezawa K, Tsukioka S, Uchida J, Kiniwa M, Fukuoka M, Nakagawa K. Synergistic antitumor effect of S-1 and HER2-targeting agents in gastric cancer with HER2 amplification. *Mol Cancer Ther.* 9(5):1198-207, 2010.
11. Okamoto W, Okamoto I, Yoshida T, Okamoto K, Takezawa K, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K, Arao T, Yanagihara K, Fukuoka M, Nishio K, Nakagawa K. Identification of c-Src as a potential therapeutic target for gastric cancer and of MET activation as a cause of resistance to c-Src inhibition. *Mol Cancer Ther.* 9(5):1188-97, 2010.
12. Yamamoto N, Nakagawa K, Nishimura Y, Tsujino K, Satouchi M, Kudo S, Hida T, Kawahara M, Takeda K, Katakami N, Sawa T, Yokota S, Seto T, Imamura F, Saka H, Iwamoto Y, Semba H, Chiba Y, Uejima H, Fukuoka M. Phase III Study Comparing Second- and Third-Generation Regimens With Concurrent Thoracic Radiotherapy in Patients With Unresectable Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer: West Japan Thoracic Oncology Group WJTOG0105. *J Clin Oncol.* 28(23):3739-4, 2010.
13. Takezawa K, Okamoto I, Tsukioka S, Uchida J, Kiniwa M, Fukuoka M, Nakagawa K. Identification of thymidylate synthase as a potential therapeutic target for lung cancer. *Br J Cancer.* 103(3):354-61, 2010.
14. Masuda N, Matsui K, Negoro S, Takeda K, Kudoh S, Nakagawa K, Mukaiyama A, Arase H, Yoshida P, Ijima T, Takada M, Fukuoka M. Phase I and pharmacologic study of weekly bolus topotecan for advanced non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 11(4):271-9, 2010.
15. Okamoto W, Okamoto I, Tanaka K, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K, Yamaguchi H, Arao T, Nishio K, Fukuoka M, Janne PA, Nakagawa K. TAK-701, a humanized monoclonal antibody to HGF, reverses gefitinib resistance induced by tumor-derived HGF in non-small cell lung cancer with an EGFR mutation. *Mol Cancer Ther.* 9(10):2785-92, 2010.
16. Okamoto I, Kaneda H, Satoh T, Okamoto W, Miyazaki M, Morinaga R, Ueda S, Terashima M, Tsuya A, Sarashina A, Konishi K, Arao T, Nishio K, Kaiser R, Nakagawa K. Phase I safety, pharmacokinetic, and biomarker study of BIBF 1120, an oral triple tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced solid tumors. *Mol Cancer Ther.* 9(10):2825-33, 2010.
17. Hayashi H, Okamoto I, Ichikawa Y, Miyazaki M, Yoshioka H, Kunimasa K, Nakagawa K. Retreatment of recurrent malignant pleural mesothelioma with cisplatin and pemetrexed. *International Journal of Clinical Oncology.* 15(5):497-9, 2010.
18. Kobayashi M, Matsui K, Iwamoto Y, Ebi N, Oizumi S, Takeda K, Sawa T, Shibata K, Saka H, Imamura F, Seki N, Saito H, Goto I, Nakagawa K; West Japan Oncology Group. Phase II study of sequential triplet chemotherapy, irinotecan and cisplatin followed by amrubicin, in patients with extensive-stage small cell lung cancer: West Japan Thoracic Oncology Group Study 0301. *J Thorac Oncol.* 5(7):1075-80, 2010.
19. Okamoto, I., Miyazaki, M., Morinaga, R., Kaneda, H., Ueda, S., Hasegawa, Y., Satoh, T., Kawada, A., Fukuoka, M., Fukino, K., Tanigawa, T., Nakagawa, K. Phase I clinical and pharmacokinetic study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs,* 28(6):844-53, 2010.

20. Okamoto I, Takeda K, Daga H, Miyazaki M, Yonesaka K, Kiyota H, Tsurutani J, Ueda S, Ichikawa Y, Takeda M, Sekiguchi R, Tominaga K, Enatsu S, Nambu Y, Nakagawa K. Dose-escalation study of pemetrexed in combination with carboplatin followed by pemetrexed maintenance therapy for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 70(2):168-73, 2010.
21. Okamoto I, Yoshioka H, Morita S, Ando M, Takeda K, Seto T, Yamamoto N, Saka H, Asami K, Hirashima T, Kudoh S, Satouchi M, Ikeda N, Iwamoto Y, Sawa T, Miyazaki M, Tamura K, Kurata T, Fukuoka M, Nakagawa K. Phase III Trial Comparing Oral S-1 Plus Carboplatin With Paclitaxel Plus Carboplatin in Chemotherapy-Naive Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Results of a West Japan Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 28(36):5240-6, 2010.
22. Okamoto K, Okamoto I, Okamoto W, Tanaka K, Takezawa K, Kuwata K, Yamaguchi H, Nishio K, Nakagawa K. Role of survivin in EGFR inhibitor-induced apoptosis in non-small cell lung cancers positive for EGFR mutations. *Cancer Res*. 70(24):10402-10, 2010.
23. Takeda K, Negoro S, Tanaka M, Fukuda H, Nakagawa K, Kawahara M, Semba H, Kudoh S, Sawa T, Saijo N, Fukuoka M. A Phase II Study of Cisplatin and Irinotecan As Induction Chemotherapy Followed by Concomitant Thoracic Radiotherapy with Weekly Low-dose Irinotecan in Unresectable, Stage III, Non-Small Cell Lung Cancer: JCOG 9706. *Jpn J Clin Oncol*. 41(1):25-31, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

「肺中皮腫に対する BNCT 効果および抗癌剤併用効果の検索」

中野孝司 兵庫医科大学内科学・呼吸器 RCU 科・呼吸器内科学 主任教授

研究要旨

MPM の予後を的確に反映する分子指標として angiopoietin-1、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor) の血清のみならず胸水中のレベルが指標になることを明らかにした。Urinary Trypsin Inhibitor が PDGF-DD/PDGF- β R-mediated transduction を介して、腫瘍細胞の遊走・播種を阻害できることを明らかにした。また Arsenic trioxide による中皮腫細胞のアポトーシス誘導、極めて難しい中皮腫と中皮細胞過形成との鑑別に CD146 が有用であることを示した。

A. 研究目的

BCNT の臨床応用に際して、まず第一に、登録患者の予後を予測しておく必要がある。そこで、予後に関与する分子指標を検索する。また、胸壁浸潤は疼痛、播種の原因となるので、これを予防法を開発する。さらに、極めて難しい中皮腫と中皮細胞過形成との鑑別法を明らかにする。

B. 研究方法

我々は中皮腫の予後を血管新生に係る分子の面から解析した。また、胸壁浸潤・播種については中皮腫細胞の遊走に関与する分子に着目し、これらの関与を検索した。更に、中皮腫細胞にアポトーシスを誘導する分子や中皮細胞過形成を鑑別する細胞表面マーカーを検索した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヘルシンキ宣言 (ソウル修正版、2008 年) の精神を遵守し、実施計画書に沿って実施する。また、被験者のプライバシー保護に関しては、本研究では被験者のすべてのデータは症例登録番号 (連結可能匿名化) で行われる。個人情報とは十分保護される。

C. 研究結果

血管新生の面から解析し、angiopoietin-1 が中皮腫細胞の増殖・遊走に大きく関与し、MPM の予後を反映する指標になること、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor) の血清のみならず胸水中のレベルが予後を反映する指標になることを明らかにした。

Urinary Trypsin Inhibitor が PDGF-DD/PDGF- β R-mediated transduction を介して、中皮腫細胞の遊走を阻害できることを明らかにした。また、Arsenic trioxide が中皮腫細胞にアポトーシスを誘導することを示した。

CD146 が中皮腫との鑑別が極めて難しい中皮細胞過形成との鑑別に有用であることを示した。

D. 考察

悪性胸膜中皮腫 (MPM) に対する新たな治療戦略である BCNT の臨床応用に際して、登録患者の予後を予測しておく必要があるが、そのための指標として angiopoietin-1 および vascular endothelial growth factor の血清・胸水中のレベルが同定された。これは、BNCT 効果の評価の精度を高める上で必須である。

MPM は胸腔穿刺部位に腫瘍細胞が遊走、高率に播種巣を形成、胸壁浸潤・高度のがん性疼痛の原因にな

る。そこで、穿刺部に予防照射が試みられたことがあるが、腫瘍播種に関する予防照射の有効性は得られなかった。我々の得た Urinary Trypsin Inhibitor が PDGF-DD/PDGF- β R-mediated transduction を介して、中皮腫細胞の遊走を阻害する、また、Arsenic trioxide が中皮腫細胞にアポトーシスを誘導する等の知見は BCNT 後の予後や後治療の可能性を拓く一歩となるものと考えられる。また、正確に中皮腫を拾い上げる意味で CD146 が中皮細胞過形成との鑑別に有用であることが分かったことの意義も大きい。

E. 結論

進行悪性胸膜中皮腫に対する正確な BNCT の臨床試験を開始できる条件が整った。早急に臨床研究を開始しなければならない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tabata C, Hirayama N, Tabata R, Yasumitsu A, Yamada S, Murakami A, Iida S, Tamura K, Fukuoka K, Kuribayashi K, Terada T, Nakano T : A novel clinical role for angiopoietin-1 in malignant pleural mesothelioma, *Eur Respir J.* 36:1099-105, 2010
2. Akihiro Yasumitsu, Chiharu Tabata, Rie Tabata, Noriko Hirayama, Aki Murakami, Shusai Yamada, Takayuki Terada, Shinichiro Iida, Kunihiro Tamura, Kazuya Fukuoka, Kozo Kuribayashi, Takashi Nakano. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol.*, 5:479-483, 2010
3. Hirayama N, Tabata C, Tabata R, Maeda R, Yasumitsu A, Yamada S, Kuribayashi K, Fukuoka K, Nakano T. Pleural effusion VEGF levels as a prognostic factor of malignant pleural mesothelioma. *Respir Med.* 105:137-42, 2011
4. Takahiro Yaguchi, Masakazu Muramoto, Takashi Nakano, Tomoyuki Nishizaki. Urinary trypsin inhibitor suppresses migration of malignant mesothelioma. *Cancer Lett*, 288:214-218, 2010.
5. Eguchi R, Fujimori Y, Takeda H, Tabata C, Ohta T, Kuribayashi K, Fukuoka K, Nakano T. Arsenic trioxide induces apoptosis through JNK and ERK in human mesothelioma cells. *J Cell Physiol.* 226:762-8, 2011
6. Ayuko S, Torii I, Okumura Y, Yamamoto T, Nishigami T, Tatsuki Kataoka, Misa Song, Seiki Hasegawa, Takashi Nakano, Toshiaki Kamei, Tohru Tsujimura. Immunocytochemistry of CD146 is useful to discriminate between malignant pleural mesothelioma and reactive mesothelium. *Modern Pathology*, 23:1458-1466, 2010.
7. Yang Dongqin, Yaguchi Takahiro, Lim Chun-Ren, Ishizawa Youhei, Nakano Takashi, Nishizaki Tomoyuki. Tuning of apoptosis-mediator gene transcription in HepG2 human hepatoma cells through an adenosine signal. *Cancer Lett.* 291:225-229, 2010.
8. Saito M, Yaguchi T, Yasuda Y, Nakano T, Nishizaki T. Adenosine suppresses CW2 human colonic cancer growth by inducing apoptosis via A₁ adenosine receptors. *Cancer Lett.* 290:211-215, 2010.

9. Yang Dongqin, Yaguchi Takahiro, Nakano Takashi, Nishizaki Tomoyuki. Adenosine-induced caspase-3 activation by tuning Bcl-X_L/DIABLO/IAP expression in HuH-7 human hepatoma cells. *Cell Biol Toxicol.* 26:319-330, 2010
10. Takahiro Yaguchi, Masaru Saito, Yoshiyuki Yasuda, Takeshi Kanno, Takashi Nakano, Tomoyuki Nishizaki: Higher Concentrations of Extracellular ATP Suppress Proliferation of Caco-2 Human Colonic Cancer Cells via an Unknown Receptor Involving PKC Inhibition. *Cell Physiol Biochem*, 26:125-134, 2010
11. Takeda H, Fujimori Y, Kai S, Ogawa H, Nakano T. CD318/CUB-domain-containing protein 1 expression on cord blood hematopoietic progenitors. *Exp Therapeutic Med.* 1:497-501, 2010
12. Eguchi R, Fujimori Y, Ohta T, Kunimasa K, Nakano T. Calpain is involved in cisplatin-induced endothelial injury in an in vitro three-dimensional blood vessel model. *Int J Oncol.* 37: 1289-1296, 2010
13. Yang Dongqin, Yaguchi Takahiro, Nakano Takashi, Nishizaki Tomoyuki. Adenosine activates AMPK to phosphorylate Bcl-X_L responsible for mitochondrial damage and DIABLO release in HuH-7 cells. *Cell Physiol Biochem* 27:71-78, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

「BNCT の肺中皮腫および正常肺組織に対する効果の検索」

奥村明之進 大阪大学・呼吸器外科教授

研究要旨

画像診断技術の飛躍的向上で小型の非小細胞肺癌の発見機会が増加し、治療成績も向上しているが、肺癌は悪性度が高く再発・転移の可能性が高い。切除肺静脈から検出される癌細胞は予後の悪い指標であるので、CD45 negative selection 法と濃度勾配遠心法を用いた新たな癌細胞検出法を導入し、その存在の有無を明らかにし、予後との関連、術後治療法の個別化に資する研究を実施した。肺癌患者の約 80% という高率で肺静脈血内に癌細胞が検出され、特に cluster を形成している場合には再発率が有意に高く、生存率も低いことが明らかにされた。

A. 研究目的

本邦では疫学的に肺癌の発症が増加していることが知られている。臨床医学の分野ではCT scanを中心に肺の画像診断技術が飛躍的に向上し、小型の非小細胞肺癌の発見機会が増加し、肺癌の治療の機会が急増している。小型の肺癌病変は外科的切除で根治できる可能性が高く、縮小手術によりQOLを保ちながら治癒を得る可能性が見込まれる。しかしながら肺癌は悪性度が高く、治療後の再発の可能性も高く、治癒のためには適切な手術適応と集学的治療の応用が求められる。

近年、血中に循環する癌細胞、いわゆる Circulating cancer cell が注目されており、各種の癌で研究が進められている。肺癌でも切除された肺の肺静脈から癌細胞（遊離癌細胞、isolated tumor cell）が検出されることは古くから知られており、これらの遊離癌細胞の存在と予後の関連性が示唆されてきた。

我々は、肺静脈血中の遊離癌細胞を新たな癌細胞検出方法を用いて検討し、これらの遊離癌細胞の有無と予後との関連を明らかにし、術後の再発ハイリスク症例の選別と術後補助療法法の個別化医療への応用を検討した。

B. 研究方法

肺癌患者の切除された肺組織の肺静脈から血液（肺静脈血）を採取して、その中の癌細胞の有無と形態を観察する。癌細胞の検出のために、CD45 negative selection 法と濃度勾配遠心法を用いた新たな癌細胞検出法を導入した。

肺静脈血中の遊離癌細胞と術後の生存・再発の有無を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヘルシンキ宣言（ソウル修正版、2008年）の精神を遵守し、実施計画書に沿って実施する。また、被験者のプライバシー保護に関しては、本研究では被験者のすべてのデータは症例登録番号（連結可能匿名化）で行われる。個人情報情報は十分保護される。

C. 研究結果

肺癌患者の約 80% という高率で肺静脈血内に癌細胞が検出された。形態的に single cell として検出された場合には再発の頻度は低かった一方、cluster を形成している場合には再発率が有意に高く、生存率も低いことが明らかにされた。

D. 考察

肺静脈内の遊離癌細胞の中でも特に cluster を形成するものが転移しやすいことが明らかにされた。

E. 結論

肺癌の切除術が肉眼的に完全切除と判断される場合にも、肺静脈血を介した遊離癌細胞の全身への散布の可能性が示唆された。肺静脈血中の遊離癌細胞の検出とその形態的評価を行うことは、再発の予知につながり、術後補助療法の適応決定に応用可能であると考えられる。すなわち、遊離癌細胞の概念を臨床的に応用することは、肺癌の個別化医療に発展することが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Funaki S, Sawabata N, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Kadota Y, Minami M, Okumura M. Novel approach for detection of isolated tumor cells in pulmonary vein using negative selection method: morphological classification and clinical implications. *Eur J Cardiothorac Surg.* [Epub ahead of print], 2011 in press.
2. Inoue M, Minami M, Sawabata N, Utsumi T, Kadota Y, Shigemura N, Okumura M. Clinical outcome of resected solid-type small-sized c-stage IA non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 37(6):1445-9. 2010
3. Inoue M, Chun Man Lee, Ono K, Suzuki M, Tokunaga T, Sawa Y, Okumura M. Boron-neutron capture therapy, a novel, tumor cell-targeted irradiation, for a recurrent malignant peripheral nerve sheath tumor in the mediastinum. *J Thorac Oncol* 5: 2037-8. 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

「BNCTの胸部腫瘍および正常肺組織に対する効果の検討」

平塚純一 川崎医科大学放射線科（治療）・教授

研究要旨

中皮腫BNCTの臨床を始めるに際して、正常肺組織の耐容線量を検討する。検討するための材料としては、最近臨床で行われている「肺がんに対する定位放射線治療」時の正常肺に当たる線量と照射体積との関係を参考に調べた。20Gy以上照射される正常肺が、正常肺全体の体積に占める割合を V_{20} と規定した場合、 V_{20} を20%以下にすることが肺障害を減少させることである事を昨年の報告書で示した。今年度は、検討症例数を増やし結果の正当性を補完した。

A. 研究目的

中皮腫BNCTの臨床で肺の障害（放射線肺臓炎の発生）の頻度、重症度を減らすための体積・耐容線量を決定することを目的に肺がんに対する定位放射線治療を参考に検討した結果20Gy以上照射される正常肺が、正常肺全体の体積に占める割合を V_{20} と規定した場合、 V_{20} を20%以下にすることが肺障害を減少させることである事を昨年報告した。今年度は、検討症例数を増やし昨年出した結果の正当性を補完する事を目的とする。

B. 研究方法

今年度、当院で行われた肺がん定位放射線治療症例10例についてその後の正常肺の変化と線量分布、線量配分を比較検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヘルシンキ宣言（ソウル修正版、2008年）の精神を遵守し、実施計画書に沿って実施する。また、被験者のプライバシー保護に関しては、本研究では被験者のすべてのデータは症例登録番号（連結可能匿名化）で行われる。個人情報十分保護される。

C. 研究結果

20Gy以上照射される正常肺が、正常肺全体の体積に占める割合を V_{20} と規定した場合、 V_{20} を20%以下にすることが肺障害を減少させることである事を示した（定位放射線治療の場合）。

D. 考察

中皮腫BNCTでは、正常肺に高線量域が生じることは考え難く、むしろ低～中線量域が広範囲に生じると思われる。このような条件は、肺がんに対する定位放射線治療時にも認められることで、定位放射線治療時の肺障害を検討しておくことは、将来の中皮腫BNCTでの肺障害減少に繋がる。

E. 結論

加速器を使った中皮腫BNCTが、2門照射で行われるとき、治療計画で、 V_{20} を20%以下にするように努めなければならない。もし、それが不可能なら照射門数の変更も含め可能になるような治療計画にする必要がある。

F. 健康危険情報(あれば記入下さい)

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 森田倫正, 粟飯原輝人, 平塚純一, 小野公二, 原田保
鼻副鼻腔悪性黒色腫に対するホウ素熱中性子捕捉療法の治療効果(原著論文) 臨床放射線
(0009-9252)55 巻 8 号 Page1009-1017(2010.08)
2. Maeda M, Nishimura Y, Kumagai N, Hayashi H, Hatayama T, Katoh M, Miyahara N, Yamamoto S, Hirastuka J, Otsuki T. Dysregulation of the immune system caused by silica and asbestos. J Immunotoxicol. 2010 Oct-Dec;7(4):268-78. Epub 2010 Sep 20.
3. Nishimura Y, Kumagai N, Maeda M, Hayashi H, Fukuoka K, Nakano T, Miura Y, Hiratsuka J, Otsuki T. Suppressive effect of asbestos on cytotoxicity of human NK cells. Int J Immunopathol Pharmacol. 2011 Jan-Mar;24(1 Suppl):5S-10S.

2. 学会発表

1. 粟飯原輝人, 森田倫正, 平塚純一, 宇野雅子, 小野公二, 原田保
頸部癌に対する新規粒子線治療の試み 加速器中性子捕捉療法
第 35 回日本頭頸部癌学会 2010.6.10-11 東京
頭頸部癌(1349-5747)36 巻 2 号 Page178(2010.05)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

分担研究報告書

「簡便なホウ素濃度測定技術の開発と組織内ホウ素濃度分布の検索」

切畑光統 大阪府立大学大学院・教授

研究要旨

BSHおよびBPAに対するモノクローナル抗体を作成し、それを用いてELISA法により、両化合物を精度良く、かつ、簡便に測定できる手法が確立できた。これによって二種のホウ素化合物を同時併用した場合の血中のそれぞれの濃度を分別測定できるようになった。臨床BNCTでは各々のホウ素化合物の弱点を補完すべく併用が行われているが、その際の測定に本法は有用と思われる。

A. 研究目的

現在、硼素中性子捕捉療法（BNCT）においては、BSH（ドデカボランチオール）およびBPA（パラポロノフェニルアラニン）の2つの硼素薬剤が、状況に応じて単独あるいは両剤併用で用いられている。一方、BNCTの線量計画は、即発γ線分析やICP分析等によって測定される血液中の全硼素濃度を基盤として策定されている。このため、体内動態の異なるBSH、BPAの個別血中濃度を簡便に測定し得る分析法の開発が待たれている。

本研究では特異性の高い抗原抗体反応を利用したELISA（Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay）法により、BSHおよびBPAを個別定量する分析法の確立する。

B. 研究方法

抗BSHおよび抗BPAモノクローナル抗体の作製し、これを使ってELISA分析系を構築する。更に分析のより困難なBSHを対象に、分析マニュアル、分析キットの作製を行い、更に分析時間の短縮、簡便化を図る。

C. 研究結果

1. 抗BSHおよび抗BPAモノクローナル抗体の作製

高等動物において、化合物が抗原（異物）として認識され、抗体産生が行なわれるには、一定以上の分子量（>4000-6000）が必要であるとされている。このため、低分子化合物のBSHおよびBPA（分子量；BSH：173.6、BPA：208.8）をスペーサーを介して、キャリアー蛋白（ヘモシアニン、分子量160万）と共有結合させた免疫抗原を合成し、これらをマウスに免疫して常法によりハイブリドーマを作製、複数個の目的とするモノクローナル抗体を得た。得られた抗体をスクリーニングに附して、目的に適う次の2つの抗体を選抜した。また、マウス腹水によるこれらの大量生産を確立した。

ア) 抗BSH抗体 A-9H3； 解離定数 $K_d = 50 \text{ nM}$ （BSH）、

認識化学構造 チオドデカボラン構造

イ) 抗BPA抗体 7E5； 解離定数 $K_d = 7 \text{ nM}$ （BPA）、

認識化学構造 p-（ジヒドロキシボリル）フェニル構造

2. ELISA分析系の構築

血液中に混在するBSHおよびBPAの分別定量法の構築を最終目的として、両抗体A-9H3および7E5を用いたELISA分析を検討した。特に、両抗体の交差反応性、抗原-抗体反応における濃度依存性、再現性、添加回収性等を検討して、これらの抗体を用いたELISA分析がBSHおよびBPAの定量分析法として有効である事を確認した。ここでは、分析のより困難なBSHを対象に、分析マニュアル、分析キットの作製を行った。

3. 分析時間の短縮化

現行の分析時間（約40分）では、臨床現場への応用が難しいため、マイクロチップに抗体を固定化したマイクロ流路方式によるELISAシステムを検討している。装置の改良が進めば、十数分まで分析時間を短縮

できると考えられる。

4. 血中 BSH 濃度分析マニュアル

血中 BSH 下記の様な分析マニュアルを作成した。また、汎用性の高い分析用キットも作製した。

a) 器具・機器

プレートウォッシャー、プレートリーダー、インキュベーター、ヴォルテックス、スターラー、ELISA プレート、シール、ピペット、蓋付きチューブ (5.0mL、1.5mL、1.5mL)、採血用

b) 溶液の調製

抗体液	4 μ g/mL	PBS10mL に抗 BSH 抗体を 40 μ g 加える	抗体の固相化	
BSH 標準液	100 μ g/mL	PBS1mL に BSH を正確に 100 μ g 溶かす	検量線用 Std	
Hapten・HRP	100 μ g/mL		アッセイ	
Buffer 1	25mM リン酸 buffer	100mL に Tween20 を 50mg 加える pH7.5	1次希釈用	
洗浄液	PBS	5L に Tween20 を 2.5g 加える	プレートウォッシャー	
ブロッキング液	4%BlockAce	・水 25mL に BlockAce 粉末を 1g 加え、スターラーで攪拌 1% BSA	・水で 2 倍に希釈した PBS20ml に BSA を 0.2g 加え、スターラーで攪拌	ブロッキング
停止液	1N H ₂ SO ₄	5ml	反応停止用	

使用直前に調製

Buffer 2	PBST	20mL に hapten・HRP (100 μ g/mL) を 10 μ L 添加する pH7.2	サンプル調製用
希釈液	Buffer 2	9.5mL に Control 血液の 1次希釈液を 0.5mL 添加する	標準液希釈用
基質液	20mL の CitricPhosphate Buffer (10mM pH5.2) に 8mg の OPD を加え、遮光して攪拌	ELISA プレートに分注する直前に H ₂ O ₂ を 4 μ L 添加する	発色用

PBS : 25mM リン酸緩衝整理食塩水

PBST : PBS+0.05%Tween20

OPD : o-Phenylendiamine (要遮光)

*Tween20 は粘性があるので、水または buffer で 5 倍に希釈しておく扱いやすい

*Buffer1 で 10 倍に希釈すると、血液はほぼ清澄な液になる

*Cont. 血液も血液サンプルと同様に Buffer 1 で希釈する

*hapten・HRP は 100 μ L に分注、凍結保存。解凍後、冷蔵で 1 ヶ月使用可

凍結・融解の繰り返しは不可