

c) 抗体固相プレートの作製

抗体の固相化



- 抗体液を ELISA プレートに 100 μ L /well 分注しシールで密閉する
- 37 $^{\circ}$ C 1時間 静置 (または 4 $^{\circ}$ C 一晚)
- プレートウォッシャーで洗浄。設定は「5回」
- プレートをキムタオルなどに垂直に数回叩きつけて well 内の液を切る

ブロッキング



- ブロッキング液を 200 μ L /well 分注し、シールで密閉する
- 静置 37 $^{\circ}$ C 2時間 (または 4 $^{\circ}$ C 一晚)

乾燥



- プレートの液を捨て、キムタオルなどに叩きつけて液を切る
- 37 $^{\circ}$ C 2時間 静置 プレートを下向きにして乾燥させる

保管



- シールで密閉し、冷蔵

ASSAY



d) サンプルの調製

器具・試薬 EDTA2Na buffer1 buffer2 (PBST hapten・HRP) 蓋付チューブ
 採血用注射器 ピペット 水
 所要時間 採血後 30分

血液、Buffer、チューブは氷の上を立て、氷冷したまま作業する

採血



- 2mg の EDTA2Na をチューブに入れる
- 採血直後の血液 2mL をチューブに加え、上下に転倒させて攪拌する

1次希釈

× 10

- チューブに Buffer1 を 9mL 入れる
- ピペットで血液を 1mL 吸い取り、チップの外側に付いた血液をキムワイプなどで軽く拭き取る。
- チップの先端を buffer に浸けたまま数回静かにピペッティングして、チップ内の血液を buffer の中に洗い出す

2次希釈

× 20 (final × 200)

- buffer2 を調製する
PBST 20mL に hapten・HRP を 10 μ L 加え攪拌する
- buffer2 を 1.9mL 入れたチューブに 1次希釈血液を 0.1mL 加え、これを 200倍希釈の分析用サンプルとする



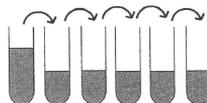
e) 検量線用標準サンプルの調製

器具・試薬 希釈液 BSH 標準液 ピペット
 希釈用チューブ
 所要時間 15分

Buffer、チューブは氷の上を立て、氷冷したまま作業する
 誤差を抑えるため、作業は慎重且つ迅速に行う



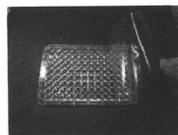
- ・希釈液を調製する
 buffer2 9.5mLに cont. 血液の1次希釈液を0.5mL加える
- ・7本の希釈用チューブを氷上に用意し、希釈液を、1本に1mL、6本に500 μ L分注する
- ・希釈液1mLにBSH標準液を8 μ L加え(800ng/mL)、ここから500 μ L取り、500 μ L入ったチューブに移し、静かにピペティングして攪拌、さらここから500 μ L次のチューブに移す。これを5回繰り返し、2倍6段の希釈列を作る。最後の1本はブランクとする。
 800、400、200、100、50、25、0ng/mL



f) Assay

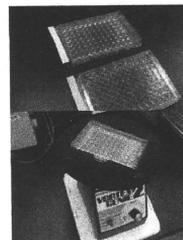
器具・試薬 乾燥プレート サンプル 検量線用 std
 ピペット ヴォルテックス プレートリーダー
 所要時間 1時間

- ・抗体固相プレートのシールをはがし、プレートウォッシャーで洗浄、設定は5回
- ・キムタオルなどに数回叩きつけて、well内の液を切る



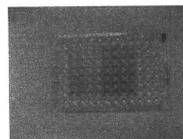
サンプル、標準液分注

- ・サンプルと検量線用Stdをプレートに100 μ L/well 分注する
 N-2、あるいはN-3とし、外周のwellは濃く発色するので使わない。空いたwellには水またはPBSを100 μ Lを入れる
- ・プレートにシールをはって密閉する
- ・ヴォルテックスにセットし、R.T 30min、
 振とう設定は「shake 3」
- ・プレートウォッシャーで洗浄 設定は5回
- ・プレートをキムタオルなどに数回叩きつけて、well内の液を切る



発色

- ・基質液を調製する
 20mLのCitricPhosphate Buffer (10mM pH5.2)に8mgのOPDを加え、遮光して攪拌する
 プレートに分注する直前にH₂O₂を4 μ L添加する
- ・プレートに200 μ L/well 分注し、シールで密閉する
- ・遮光して R.T 10min 静置
 1N H₂SO₄を50 μ L/well 加えて反応を停止させる



吸光度測定

O.D 490 を測定し、BSHの血中濃度を換算する

- * well間の時間差、温度差が誤差の一因になるので分注操作は速やかに行う。
- * サンプル調製はすべて氷上で行い、プレートへの分注は室温で行う。
- * 外周1段は濃く発色するので使わない。使わないwellには水またはPBSを入れる。
- * 定量範囲は50ng/mL~500ng/mL。調製後のサンプルの希釈にはStdと同様に

希釈液を用いる。

D. 考察

ELISAによる測定は本来、精度の良いものであるが簡便にすることが臨床BNCTの現場で用いるには不可欠な条件である。それをクリアしてキット化、分析マニュアルの完成に至ったことは今後の本法の利用に弾みが付くものと思われる。

E. 結論

BSHおよびBPAに対するモノクロナル抗体を使った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、臨床BNCTでは二種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。

F. 健康危険情報(あれば記入下さい)

無し

G. 研究発表

12. 論文発表

1. S. Tanimori, H. Kashiwagi, T. Nishimura, M. Kirihata, A General and Practical Access to Chiral Quinoxalinones with Low Copper-Catalyst Loading, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 352, 2531-2537 (2010)

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

「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 京都大学原子炉実験所・准教授

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(BNCT)の高度化のために、中性子束分布改善および照射技術改良について検討を行う。当該年度も、昨年度に引き続き、(1) BNCT用照射場の特性評価、および、(2) BNCT用線量評価手法の検討、を行った。また、京都大学研究炉(KUR)におけるBNCTの再開を踏まえて、(3) 実施された胸膜中皮腫BNCTの1症例に関する線量評価、を行った。

A. 研究目的

本分担では、悪性胸膜中皮腫に対するBNCTの高度化について、物理工学的な面から検討を行っている。特に、中性子束分布の改善および照射技術の改良に重点を置き、照射ビームの中性子エネルギー、方向性、照射野の大きさ、等に関する最適化を行うことを目的としている。当該年度も、昨年度に引き続き、まず、悪性胸膜中皮腫BNCTのために必要となる基礎データの評価を行った。特に、4年間休止していたKURの運転が再開し、同時にBNCT臨床も再開したことを踏まえて、KURに設置されているBNCT用設備である「重水中性子照射設備(HWNIF)」の照射特性の再評価を行った。また、サイクロトロンベース熱外中性子源(C-BENS)についても、照射特性評価を昨年度に継続して行った。さらに、胸膜中皮腫BNCTが1症例、KUR-HWNIFにおいて実施されたことに関連して、事前および事後の線量分布シミュレーション、ならびに、線量評価を行った。

B. 研究方法

当該年度はKURの運転とHWNIFにおけるBNCTが再開したことから、特性評価実験およびシミュレーション計算の双方で研究を進めた。

(1) KUR-HWNIFの照射特性評価：KUR-HWNIFは、様々なエネルギースペクトルを持つ中性子ビームが利用可能であり、主にBNCTに利用されてきた。2006年2月以降、燃料低濃縮化によるKURの休止にともない、本設備でのBNCTも休止していた。2010年5月、KURの運転再開とともに、BNCTも再開された。本設備は大型の設備であるため、KUR燃料の状況の影響を受けやすい。そこで、燃料低濃縮化後の本設備の照射特性の再評価を行った。基準熱外中性子照射モード、基準混合中性子照射モードそして基準熱中性子照射モードの代表的な3モードを主体に照射特性評価を行った。フリーインエアでのコリメータ出口における照射特性と、BNCT臨床を想定したファントム内での線量分布特性の評価を行った。BNCT時の熱外中性子ビーム強度の年間での変動に関する評価も行った。中性子束の評価には多重放射化箔を、 γ 線線量率の評価には熱中性子ルミネセンス線量計(TLD)を用いた。また、多重電離箱による吸収線量率評価も行った。

(2) C-BENSの照射特性評価：C-BENSは2008年10月に本実験所に設置された。設置後、照射特性向上のために、マイナーチェンジが数カ所施されている。KUR-HWNIFと同様に、フリーインエアでのコリメータ出口における照射特性、および、BNCT臨床を想定したファントム内での線量分布特性の評価を行った。中性子束については、金箔、インジウム箔、アルミニウム箔等を用いた放射化箔法により評価した。 γ 線線量率については、熱ルミネセンス線量計(TLD)を用いて測定した。また、多重電離箱を用いて、中性子および γ 線の吸収線量率の評価も行った。

(3) 胸膜中皮腫BNCTのシミュレーションおよび線量評価：2010年10月および11月、BNCT再開後初の胸膜中皮腫に対するBNCTが実施された。照射対象は、患者の右肺全体であった。BNCT用線量評価システムSERAを用いて事前シミュレーションを行い、照射体位および照射条件の決定を行った。BNCT当日は、患部表面照射野中心に金線およびマンガン線を配置し、照射開始後5分のときに引き抜いて、照射中の熱および熱外中性子束の評価を行った。照射中の ^{10}B 濃度は、照射直前に採取した血液試料から、即発 γ 線分析装置(PGA)を用いて評価した。

得られた実測データを用いて照射中の中性子束および¹⁰B濃度の補正を行い、事前シミュレーションで得られたDVHを参考に、トータル的正常右肺平均線量を5Gy-eq程度に抑えるという観点から、照射時間を決定した。照射後は、全時間照射用の金線およびマンガン線の測定データから中性子束を、照射直後に採取した血液試料から¹⁰B濃度を再評価し、事後シミュレーションに反映させて最終的な評価線量を得た。

C. 研究結果

(1) KUR-HWNIFの照射特性評価：各照射モードにおけるフリーインエアでのコリメータ出口の照射特性は、燃料低濃縮化前の公称値と比べて、数値上の変化は±10%程度に収まっていた。この変化は、BNCT臨床に影響を及ぼすほどではないと考えられる。BNCT臨床を想定したファントム内での線量分布特性に関しては、中性子束分布については、低濃縮化前後でほとんど変化していなかった。一方、γ線線量率分布については、表面近傍の数値が20%程度増加していた。これは、KUR本体側の影響ではなく、休止時に更新された患者輸送台車およびコリメータの影響であると考えられる。年間を通じた熱外中性子ビーム強度については、その変動は公称値の94%~113%であり、平均値に対して±10%に収まっていた。

(2) C-BENSの照射特性評価：フリーインエアの照射特性に関して、中性子強度についてはKURのもの約2倍であった。混在する高エネルギー中性子およびγ線については、KURに比べて、数倍程度大きかった。これら混在成分の低減対策を行った結果、昨年度に比べて、数10%程度低減した。ファントム内の分布については、C-BENSの方がKURよりも熱中性子束分布の平坦度は増していた。一方で、ファントム内でも、高エネルギー中性子およびγ線等の混在成分の寄与が大きくなり、実質的な相対分布としてはKURに近いものが得られた。今年度得られた再評価結果は、昨年度得られた評価結果をほぼ支持していた。

(3) 胸膜中皮腫BNCTのシミュレーションおよび線量評価：事前シミュレーションの結果を参考に、照射体位は「座位」と決定された。20cmの照射野で、①前方向上部、②前方向下部、③後方向上部、④後方向下部、の四門の分割照射により、最適な線量分布が得られると結論付けられた。実際には、10月21日に①と②、11月11日に③と④、と二日に分けて照射を行った。5分確認照射用の放射化線による中性子束は、事前シミュレーション時に想定したもの比べ、前方からの照射では15%程度大きく、後方からの照射では5%程度小さかった。¹⁰B濃度については、事前シミュレーション時に想定したもの比べ、1.3~1.6倍大きかった。照射終了後に評価した患部表面近傍の中性子束は、5分確認照射のものに比べて、前方からの照射については70~80%と小さく、逆に、後方からの照射については100~115%と大きかった。中性子束と¹⁰B濃度を補正してSERAによる事後評価を行った結果、右肺平均線量は4.8Gy-eq、肝臓平均線量は3.5Gy-eqと推定された。腫瘍線量については、最大58.5Gy-eq、最小5.5Gy-eq、平均21.3Gy-eqと推定された。

D. 考察

本分担の主なテーマとなっている胸膜中皮腫BNCTに関する中性子束分布改善および照射技術改良について考察する。昨年度、結論付けたように、胸膜中皮腫BNCTについては、熱外中性子照射による多方向照射が必要不可欠である。今年度の症例は、これを踏まえて、右肺全体に対して、前上、前下、後上、後下、からの四門照射で対応した。正常の右肺全体に対して平均5Gy-eqにおさえるという観点から照射時間が決定され、実際の照射もほぼ計画通りに行うことができた。しかしながら、腫瘍線量については、平均21.3Gy-eqであり、腫瘍領域の半分近くが20Gy-eq以下と、治癒に十分な線量が与えられなかった。腫瘍線量の増強、および、正常組織線量の低減、の2つの観点から、さらなる照射技術の改良が必要であると考えられる。

E. 結論

今年度より、KURの運転が再開したが、燃料低濃縮化後のHWNIFの照射特性の変化は、BNCT臨床に影響を及ぼすほどではないことが確認された。一方、C-BENSの照射特性に関しては、熱外中性子ビーム強度については昨年度と大きな変動がないことが確認された。高速中性子およびγ線の混在については、数10%程度低減されていることが確認された。本実験所では、近い将来、KUR-HWNIFおよびC-BENSの双方において、BNCTが実施される予定である。その対象として胸膜中皮腫も含まれている。胸膜中皮腫BNCTにおける中性子束分布改善、照射技術改良そして線量評価手法の高度化について、双方の照射場の照射特性を踏まえてさらなる検討を進める予定である。

F. 健康危険情報(あれば記入下さい)

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
6. 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.

3. 学会発表

1. 上田治明, 櫻井良憲, 田中浩基, 丸橋 晃, 小野公二, 「ボナーボールを用いた加速器中性子捕捉療法用照射場のスペクトル評価」, 日本医学物理学会 第 99 回学術大会 0-083 (2010. 4) 横浜。
2. 田中浩基, 櫻井良憲, 鈴木 実, 増永慎一郎, 密本俊典, 矢島 暁, 高田真志, 浅野智之, 小野公二, 丸橋 晃, 「サイクロトロンベース熱外中性子源のためのターゲットからの中性子スペクトル測定」, 日本医学物理学会 第 99 回学術大会 0-084 (2010. 4) 横浜。
3. 藤井孝明, 櫻井良憲, 田中浩基, 丸橋 晃, 小野公二, 「BNCT 用多重電離箱システムに関する検討(2) サイクロトロンベース熱外中性子照射場に対する電離箱の最適化」, 日本医学物理学会 第 99 回学術大会 0-085 (2010. 4) 横浜。
4. 櫻井良憲, 藤井孝明, 田中浩基, 鈴木 実, 劉 勇, 菓子野元郎, 木梨友子, 増永慎一郎, 小野公二, 丸橋 晃, 「硼素中性子捕捉療法における QA 用ファントムに関する検討」, 日本医学物理学会 第 99 回学術大会 0-086 (2010. 4) 横浜。
5. 櫻井良憲, 田中浩基, 小野公二, 丸橋 晃, 「京大炉運転再開後の重水中性子照射設備の照射特性」, 日本中性子捕捉療法学会 第 7 回学術大会 一般演題 09 (2010. 08) 東京。
6. 藤井孝明, 田中浩基, 丸橋 晃, 小野公二, 櫻井良憲, 「KUR 重水中性子照射設備およびサイクロトロ

ン中性子照射設備に対するBNCT用多重電離箱システムの最適化と応答特性評価」, 日本中性子捕捉療法学会 第7回学術大会 一般演題18 (2010.08) 東京。

7. 塚本智隆, 田中浩基, 吉永尚生, 密本俊典, 丸橋 晃, 小野公二, 櫻井良憲, 「サイクロトロンベース熱外中性子源における全身被曝線量評価のためのファントム実験」, 日本中性子捕捉療法学会 第7回学術大会 一般演題20 (2010.08) 東京。
8. 井本雅之, 田中浩基, 小野公二, 丸橋 晃, 櫻井良憲, 「BNCT照射室壁の放射性同位元素の生成量評価」, 日本中性子捕捉療法学会 第7回学術大会 一般演題21 (2010.08) 東京。
9. 田中浩基, 櫻井良憲, 藤本 望, 佐藤達彦, 鬼塚昌彦, 馬場大海, 鈴木 実, 増永慎一郎, 木梨友子, 菓子野元郎, 劉 勇, 密本俊典, 丸橋 晃, 小野公二, 「サイクロトロンベース熱外中性子源のマイクロドシメトリを用いた線質評価」, 日本中性子捕捉療法学会 第7回学術大会 一般演題33 (2010.08) 東京。
10. 櫻井良憲, 田中浩基, 小野公二, 丸橋 晃, 「燃料低濃縮化後の京大炉BNCT設備の照射特性(I)」, 日本医学物理学会 第100回学術大会 P-048 (2010.9) 東京。
11. 藤本 望, 田中浩基, 佐藤達彦, 遠藤 暁, 鬼塚昌彦, 高田真志, 馬場大海, 丸橋 晃, 小野公二, 櫻井良憲, 「サイクロトロンを用いたBNCT用熱外中性子源のマイクロドシメトリに関する研究」, 日本医学物理学会 第100回学術大会 P-051 (2010.9) 東京。
12. 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)”, 14th International Congress on Neutron Capture Therapy, AC-1-4 (2010.10) Buenos Aires.
13. T. Fujii, H. Tanaka, A. Maruhashi, K. Ono, and Y. Sakurai, “Study on optimization of multi ionization-chamber system for BNCT”, 14th International Congress on Neutron Capture Therapy, MP-2-1 (2010.10) Buenos Aires.
14. 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”, 14th International Congress on Neutron Capture Therapy, AC-2-4 (2010.10) Buenos Aires.
15. 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)”, 14th International Congress on Neutron Capture Therapy, RP-1-5 (2010.10) Buenos Aires.
16. 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”, 14th International Congress on Neutron Capture Therapy, Poster-2-AC-7 (2010.10) Buenos Aires.
17. 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”, 14th International Congress on Neutron Capture Therapy, MP-4-5 (2010.10) Buenos Aires.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

特に無し。

2. 実用新案登録

特に無し。

3. その他

特に無し。

成果刊行に関する一覧表

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nobuyuki HAMADA, Tatsuhiko 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
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
Usei Fujita, Naofumi Yamamoto, Itsuro Kato, Soichi Iwai, Koji Ono, Yoshinori Sakurai, Ken Ohnishi, Takeo Ohnishi,	Induction of multinucleation in oral squamous cell carcinoma tissue with mutated p53 surviving boron neutron capture therapy	Int. J. Radiat. Biol.	Vol. 87, N o. 3	293-301	2011

Yoshiaki Yura.					
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		177-180	2010
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,		254-256	2010
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,		265-268	2010
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,		447-450	2010
H. Ueda,	Spectral evaluation of	Proceedings of		459-462	2010

H. Tanaka, A. Maruhashi, K. Ono, and Y. Sakurai,	cyclotron-based epithermal neutron irradiation field for BNCT using Bonner sphere	the 14th International Congress on Neutron Capture Therapy, Comision Nacional de Energia Atomica,			
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		496-498.	2010,
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)	2053-2063	2010
Takeda M, Okamoto I, Fukuoka M, Nakagawa K.	Successful treatment with erlotinib after gefitinib-related severe hepatotoxicity	J Clin Oncol.	28(17)	:e273-274	2010.
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

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
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)	3739-3744	2010
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)	497-499,	2010
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) :	1075-1080	2010
Okamoto I, Yoshioka H,	Phase III Trial Comparing Oral S-1 Plus Carboplatin	J Clin Oncol.	28(36)	5240-5246	2010

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.	With Paclitaxel Plus Carboplatin in Chemotherapy-Naive Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Results of a West Japan Oncology Group Study				
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)	10402-10410	2010
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
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 angiotensin-converting enzyme inhibitor in malignant pleural mesothelioma	Eur Respir J.	36	1099-1105	2010
Akihiro Yasumitsu,	Clinical significance of serum vascular endothelial	J Thorac Oncol.	5	479-483	2010

Chiharu Tabata, Rie Tabata, Noriko Hirayama, Aki Murakami, Shusai Yamada, Takayuki Terada, Shinichiro Iida, Kunihiro Tamura, Kazuya Fukuoka, Kozo Kuribayashi, Takashi Nakano.	growth factor in malignant pleural mesothelioma				
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
Takahiro Yaguchi, Masakazu Muramoto, Takashi Nakano, Tomoyuki Nshizaki.	Urinary trypsin inhibitor suppresses migration of malignant mesothelioma	Cancer Lett	288	214-218	2010
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	762-768	2011
Ayuko S, Torii I, Okumura Y, Yamamoto T, Nishigami T, Tatsuki Kataoka, Misa Song, Seiki Hasegawa, Takashi Nakano, Toshiaki	Immunocytochemistry of CD146 is useful to discriminate between malignant pleural mesothelioma and reactive mesothelium	Modern Pathology	23	1458-1466	2010

Kamei, Tohru Tsujimura.					
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
Saito M, Yaguchi T, Yasuda Y, Nakano T, Nishizaki T.	Adenosine suppresses CW2 human colonic cancer growth by inducing apoptosis via A ₁ adenosine receptors	Cancer Lett.	290	211-215	2010
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
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
Takeda H, Fujimori Y, Kai S, Ogawa H, Nakano T.	CD318/CUB-domain-contains g protein 1 expression on cord blood hematopoietic progenitors	Exp Therapeutic Med.	1	497-501	2010
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
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

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.			2011 in press.
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)	1445-1449	2010
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	2037-2038.	2010
Maeda M, Nishimura Y, Kumagai N, Hayashi H, Hatayama T, Kato M, Miyahara N, Yamamoto S, Hirastuka J, Otsuki T.	Dysregulation of the immune system caused by silica and asbestos	J Immunotoxicol .	7(4)	268-278	2010
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.	24(1 Suppl)	5S-10S	2011
S. Tanimori, H. Kashiwagi, T. Nishimura, M. Kirihiata,	A General and Practical Access to Chiral Quinoxalinones with Low Copper-Catalyst Loading	Advanced Synthesis & Catalysis	352,	2531-2537	2010

Induction of multinucleation in oral squamous cell carcinoma tissue with mutated p53 surviving boron neutron capture therapy

YUSEI FUJITA¹, NAOFUMI YAMAMOTO¹, ITSURO KATO¹, SOICHI IWAI¹, KOJI ONO², YOSHINORI SAKURAI², KEN OHNISHI³, TAKEO OHNISHI³, & YOSHIKI YURA¹

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, ²Particle Radiation Oncology Research Center Laboratory, Research Reactor Institute, Kyoto University, Osaka, and ³Department of Biology, School of Medicine, Nara Medical University, Nara, Japan

(Received 1 April 2010; Revised 10 September 2010; Accepted 29 September 2010)

Abstract

Purpose: To clarify the role of p53 in boron neutron capture therapy (BNCT) for oral squamous cell carcinoma (SCC), the effect of BNCT on oral SCC xenografts with either wild-type or mutant-type p53 was examined.

Materials and methods: Oral SCC cells expressing either wild-type (SAS/neo) or mutant-type p53 (SAS/mp53) were used to produce nude mouse tumours. Tumour-bearing mice received boronophenylalanine (BPA) at a dose of 250 mg/kg and tumours were exposed to neutron irradiation.

Results: After BNCT, the growth of SAS/neo and SAS/mp53 tumours was suppressed remarkably and all tumours became undetectable within two weeks. However, three of six SAS/mp53 tumours showed regrowth in two months. Histological examination of BNCT-treated tumours revealed chromosomal condensation, micronucleation, nuclear segmentation and intra- and intercellular vacuolation. Notably, multinucleated giant cells appeared in SAS/mp53 tumours early after BNCT, suggesting mitotic catastrophe. In SAS/mp53 tumours treated with BNCT, a rapid decrease in phosphorylated cell division cycle 2 (cdc2) and a high level of cyclin B1, required for premature mitosis, were observed.

Conclusion: These results indicate that BNCT suppressed oral SCC xenografts in nude mice efficiently, but cells survived in mutant-type p53 tumours. BNCT induces multinucleation which represents prestage of apoptosis or necrosis in oral SCC with mutant-type p53, but it may be also associated with the recurrence of BNCT-treated tumours.

Keywords: boron neutron capture therapy, p53, mitotic cell death, multinucleation, oral squamous cell carcinoma

Introduction

The primary treatment of oral squamous cell carcinoma (SCC) consists of surgery and radiation therapy with or without chemotherapy, but there are a number of patients who show loco-regional recurrence (Wong et al. 2003, Palme et al. 2004). At more advanced stages, the radical removal of tumours results in severe deformities in the face and oral cavity. For patients whose cancers are considered inoperable and recur after primary therapy, new therapeutic strategies are required.

Boron neutron capture therapy (BNCT) is a binary system, involving the taking up of boron-10 (¹⁰B)-enriched compounds by tumour cells and irradiation with thermal neutrons. ¹⁰B absorbs a thermal neutron and yields an α (⁴He) particle and a

lithium (⁷Li) nucleus, which have high linear energy transfer (LET) and path lengths in water of 5–10 μ m. The success of BNCT is dependent on the selective uptake of sufficient amounts of ¹⁰B into tumour cells as compared with surrounding normal tissues (Coderre and Morris 1999, Barth et al. 2005). BNCT has been demonstrated effective in the treatment of brain tumours, melanoma of the skin, metastatic liver tumours and locally advanced head and neck carcinomas (Fukuda et al. 2003, Kato et al. 2004, Kankaanranta et al. 2007, Miyatake et al. 2009, Zonta et al. 2009).

The cytotoxic effect of ionising radiation (IR) is mediated through pleiotropic mechanisms, which include interaction and damage of genomic DNA followed by activation of DNA damage-induced signaling pathways in a p53-dependent as well as

p53-independent manner. These pathways culminate in cell cycle arrest and/or apoptosis, necrosis, autophagy or mitotic catastrophe (Debatin and Krammer 2004, Okada and Mak 2004).

Mitotic catastrophe, also known as mitotic death, has been widely described in cancer cells with mutant-type p53 in response to genotoxic damage and was initially characterised by chromosome missegregation followed by aberrant mitosis or imperfect cell division, leading to the formation of multinucleated cells (Erenpreisa and Cragg 2001). Most researchers considered that mitotic catastrophe represents a prestage of apoptosis or necrosis (Vakifahmetoglu et al. 2008). On the other hand, there is an opinion that it can be a mechanism of genotoxic resistance (Erenpreisa and Cragg 2001). Thus, mitotic catastrophe is controversial. Gamma ray irradiation, carbon-ion beams, iodine-131 and chemotherapeutic agents such as doxorubicin, cisplatin and paclitaxel have been shown to induce mitotic catastrophe (Ianzini et al. 2006, Vakifahmetoglu et al. 2008, Maalouf et al. 2009). With regard to BNCT, apoptosis has been detected in a small proportion of treated SCC cells (Masunaga et al. 2002, Kamida et al. 2006, Aromando et al. 2009), but other type of cell death such as mitotic catastrophe in response to BNCT has not. In the present study, we produced nude mouse tumours using oral SCC cells expressing wild- or mutant-type p53 with the same background and examined whether morphological alterations representing mitotic catastrophe can be induced by BNCT in a p53-independent manner. The results suggest that BNCT induces multinucleation in oral SCC with mutant-type p53, being accompanied by the recurrence of treated tumours.

Materials and methods

Cells

The oral SCC cell line SAS with the phenotype of wild-type p53 in IR-induced signal transduction was obtained from Japanese Collection of Research Bioresources (Tokyo, Japan). SAS cells were transfected with the plasmid pC53-248 containing an mp53 gene (codon 248, from Arg to Trp) to produce a dominant negative mp53 protein or with the control plasmid pCMV-Neo-Bam, which contains a neo-resistance marker. The stable transfectants SAS/mp53 and SAS/neo were used (Ota et al. 2000). These oral SCC cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Boron compounds and boron analysis

The boron compound boronophenylalanine (BPA) was purchased from Boron Biologicals, Inc. (Raleigh, NC, USA) and converted to a fructose complex to increase its solubility following the method reported by Coderre et al. (1994). The aqueous solution of BPA was prepared at a concentration of 250 mg/ml (21.28 mg ¹⁰B/ml) and injected into mice carrying oral SCC intraperitoneally. Tumours and facial skin were sampled for ¹⁰B measurements. Tissues were placed in Teflon tubes and ¹⁰B concentrations were measured by prompt gamma-ray spectrometry using a thermal neutron guide installed at the Kyoto University Reactor (KUR) (Obayashi et al. 2004, Kamida et al. 2006). Six samples were used to determine the concentrations of ¹⁰B.

BNCT for oral SCC xenografts in nude mice

To generate tumours, 1×10^6 SAS/neo or SAS/mp53 cells were inoculated subcutaneously into the back of the leg of 5-week-old female Balb/c nude mice (Clea Japan Inc., Tokyo, Japan). When the tumours were approximately 5 mm in diameter, the animals were used for experiments. The time from cell inoculation to BNCT was approximately 7 days in each group. Two hours after the intraperitoneal injection of BPA at a dose of 250 mg/kg, animals with either SAS/neo or SAS/mp53 tumours were given neutrons. Animals that received either SAS/neo or SAS/mp53 cells were also left untreated as a control.

Neutron irradiation was delivered via a neutron beam at 5 MW (thermal neutron mode 00-0011) in the KUR. During the irradiation for 70 min, the mouse was held stationary in a custom-designed acrylic resin box from which the tumour-bearing legs were pulled out through a narrow slit and fixed with adhesive. A LiF thermoplastic plate with a hole that defined the irradiation field was placed on the animal, so that only the tumour-bearing leg was exposed to the neutron beam. Neutron fluence was measured from the radioactivation of gold foil (3 mm in diameter, 0.05 mm thick) placed at the front and back of the tumours (Kamida et al. 2006). The average fluence of thermal neutrons was 8.19×10^{12} n/cm² and the average flux was 1.95×10^9 n/cm²/s. Thermoluminescent dosimeters placed at the back of the tumours were used to measure contaminated γ -ray dosimetry and the dose of γ -rays was 1.41 Gy. The irradiation dose components were described previously (Kamida et al. 2008). The experiment was started at the time of neutron irradiation. Tumour length (L) and width (W) were measured every 3–4 days. Tumour volume (V) was determined by the formula: $V = LW^2/2$. Six tumours

in each group were measured. Experiments using nude mice were performed with the approval of the Institute of Laboratory Animals, Osaka University Graduate School of Dentistry.

Histological examination and immunostaining

Tumour tissue fixed in 10% formalin was embedded in paraffin. Sections were deparaffinised, rehydrated and stained with hematoxylin and eosin (H-E). Multinucleated giant cells with more than six nuclei were counted in at least three samples taken from different time points and the mean values \pm standard deviation (SD) per 1,000 tumour cells were determined.

Immunoblot analysis

Tumour tissue was washed in phosphate-buffered saline (PBS) and homogenised in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% Triton-X-100, 1% sodium deoxycholate and a protease inhibitor cocktail. After sonication on ice and subsequent centrifugation at 15,000 g for 10 min at 4°C, the supernatant was collected and the protein concentration was determined using a Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Protein (20 μ g) was electrophoresed through a polyacrylamide gel and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane by electroblotting. The membrane was probed with antibodies and antibody-binding was detected using an enhanced chemiluminescence kit (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, USA) according to the manufacturer's instructions. Antibodies used were as follows: Mouse monoclonal antibodies against p53, p53 phosphorylated at serine-15, retinoblastoma (Rb), cyclin B1, and β -actin, and rabbit polyclonal antibodies against Wee1 (a nuclear kinase belonging to the serine/threonine family of protein kinases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*), Rb phosphorylated at serine-807/811, cell division cycle 2 (cdc2), and cdc2 phosphorylated at tyrosine-15. Antibodies against p53 and β -actin were obtained from Oncogene (San Diego, CA, USA) and Sigma (St Louis, MO, USA), respectively. Other antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA).

Results

^{10}B concentrations in tumour and normal skin after BPA administration

Nude mice carrying human oral SCC were given BPA intraperitoneally at a dose of 250 mg/kg body weight and the biodistribution of ^{10}B in the tumour

and surrounding skin was measured 2 h later. The ^{10}B concentration in the SAS/neo tumours was 16.56 ± 0.93 ppm, while that in skin was 4.35 ± 0.87 ppm. The ^{10}B concentration in SAS/mp53 tumours was 17.30 ± 1.25 ppm, while that in surrounding skin was 4.59 ± 0.98 . The tumour/skin ^{10}B ratio was 3.81 in SAS/neo and 3.77 in SAS/mp53 tumours.

Effect of BNCT on the growth of tumours

Tumour-bearing mice were given BPA at a dose of 250 mg/kg body weight and tumours were exposed to neutron irradiation 2 h later. The total dose for SAS/neo and SAS/mp53 tumours was 12.50 ± 0.57 and 12.95 ± 0.76 Gy, respectively. In untreated animals, both SAS/neo and SAS/mp53 tumours continued to grow and were 660 ± 310 mm³ and 910 ± 483 mm³ at 27 days after the start of the experiment (Figure 1). When tumours were subjected to BNCT, tumour growth was markedly inhibited, irrespective of p53 status. After two weeks, both SAS/neo and SAS/mp53 tumours became undetectable and all BNCT-treated SAS/neo tumours remained undetectable during the experimental period. However, three of six SAS/mp53 tumours increased in volume from 60 days after BNCT and grew to 320 ± 828 mm³ at 75 days.

Histological examination of BNCT-treated tumours

Tumour-bearing mice received BPA and neutron irradiation and were sacrificed 6, 12, 24, and 48 h after BNCT. Untreated and BNCT-treated tumours were subjected to histological examination (Figure 2). In SAS/neo tumours, chromosomal condensation, micronucleation, nuclear segmentation and intracellular vacuolation occurred throughout the tissue 6 h after BNCT (Figure 2C, 2D). Thereafter, intercellular vacuoles increased, indicating a rapid

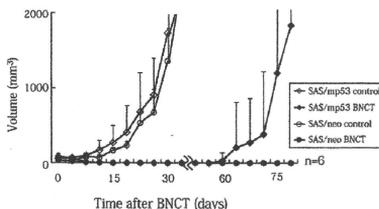


Figure 1. Effect of BNCT on the growth of tumours. Nude mice carrying SAS/neo (●) or SAS/mp53 (○) tumours received a BPA injection at a dose of 250 mg/kg and then neutron irradiation. Animals with SAS/neo (○) and SAS/mp53 (●) tumours were left untreated as a control. Data are means \pm SD of six tumours.

loss of viable cells (Figure 2E-H). In contrast, there was no damage of normal skin. In SAS/mp53 cells, chromosomal condensation, micronucleation, nuclear segmentation and vacuolation were also observed, but multinucleated giant cells appeared at 6 h (Figure 3C, 3D). In multinucleated giant cells, mitotic figures were observed. These cells were isolated from neighbouring cells by intercellular space, so that nests of giant cells were produced in

the tumour tissues. Thereafter, nuclear heterogeneity became more prominent, but the number and size of multinucleated cells were reduced (Figure 3E, 3F). At 48 h after BNCT, fibroblasts proliferated to form granulation tissue (Figure 3G, 3H).

In SAS/mp53 tumours, there were a number of multinucleated giant cells. Although the appearance of giant cells was peculiar to BNCT-treated tumours with mutant-type of p53, tetraploid cells

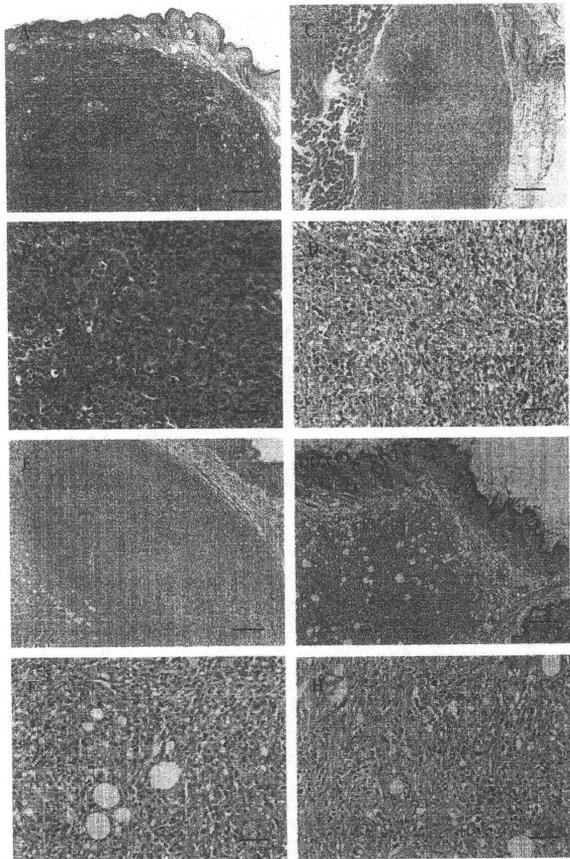


Figure 2. The histological findings of BNCT-treated SAS/neo tumours. Nude mice carrying SAS/neo tumours were treated as described in Figure 1 and sacrificed at 6 (C, D), 12 (B, F), and 48 (G, H) h after BNCT and the tumours were subjected to histological examination. Tumours in untreated control animals were also examined (A, B). Bars, 200 μ m in A, C, E and G, and 50 μ m in B, D, F and H.