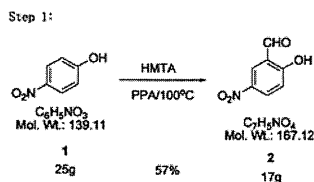
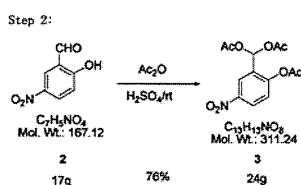


15. Nakao K, O.Y. *et al.* The synergistic effects of hyperthermia and anticancer drugs on induction of apoptosis. *Med Electron Microsc* **33**, 44-50 (2000).
16. Ansari, K.I., Kasiri, S., Grant, J.D., Woldemariam, G.A. & Mandal, S.S. Fe(III)-Salen and salphen complexes induce caspase activation and apoptosis in human cells. *J Biomol Screen* **16**, 26-35 (2010).

5) 鉄サレン錯体化合物の合成方法 (参照文献: 日本国登録特許 4446489号、「鉄サレン錯体」発明者、江口晴樹、石川義弘)

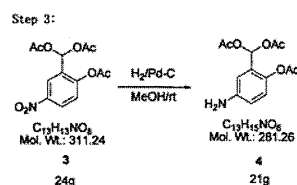


4-nitrophenol (ニトロフェノール) (25g, 0.18mol)、hexamethylene tetramine (ヘキサメチレン テトラミン) (25g, 0.18mol)、polyphosphoric acid (ポリリン酸) (200ml)の混合物を1時間100°Cで攪拌した。その後、その混合物を500mlの酢酸エチルと1Lの水の中に入れ、完全に溶解するまで攪拌した。さらにその溶液に400mlの酢酸エチルを追加を加えたところその溶液は2つの相に分離し、水の相を取り除き、残りの化合物を塩性溶剤で2回洗浄し、無水MgSO₄で乾燥させた結果、compound (化合物) 2が17g (収率57%) 合成できた。

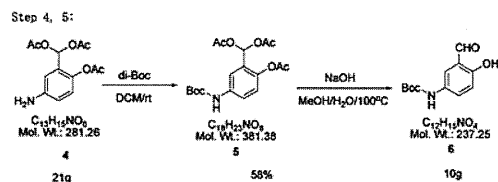


Compound (化合物) 2 (17g, 0.10mol), acetic anhydride 無水酢酸(200ml), H₂SO₄ (少々)を室温で1時間攪拌させた。得られた溶液は、氷水 (2L) の中に0.5時間混ぜ、加水分解を行った。得られた溶液をフィルターにかけ、大気中で乾燥させたところ白い粉末状のものが得られた。酢酸エチルを含む溶液を使ってその粉末を再結晶化させたところ、24gのCompound (化合物)

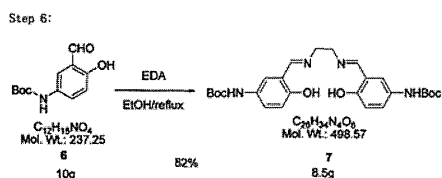
3 (収率76%) の白い結晶を得ることができた。



compound (化合物) 3 (24g, 77mmolとメタノール(500ml)に10%のパラジウムを担持したカーボン(2.4g)の混合物を一晚 1.5気圧の水素還元雰囲気です還元した。終了後、フィルターでろ過したところ茶色油状のcompound (化合物) 4 (21g)が合成できた。

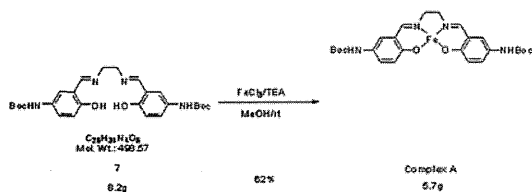


無水ジクロロメタン(DCM) (200ml)にcompound (化合物) 4 (21g, 75mmol), di(tert-butyl) dicarbonate (ジ(ターシャリブチル)ジカーボネート) (18g, 82mmol)を窒素雰囲気です一晚攪拌した。得られた溶液を真空中で蒸発させた後、メタノール(100ml)で溶解させた。その後、水酸化ナトリウム(15g, 374mmol)と水(50ml)を加え、5時間還流させた。その後冷却し、フィルターでろ過し、水で洗浄後、真空中で乾燥させたところ茶色化合物が得られた。得られた化合物は、シリカゲルを使ったフラッシュクロマトグラフィーを2回行うことで、10gのcompound (化合物) 6 (収率58%) が得られた。



無水エタノール 400ml の中に compound (化合物) 6 (10g, 42mmol) を入れ、加熱しながら還流させ、無水エタノール 20ml にエチレンジアミン (1.3g, 21mmol) を 0.5 時間攪拌しながら数滴加えた。そして、その混合溶液を氷の容器に入れて冷却し 15 分間かき混ぜた。その後、200ml のエタノールで洗浄しフィルターをかけ、真空中で乾燥させたところ compound (化合物) 7 が 8.5g (収率 82%) で合成できた。

Step 7



無水メタノール (50ml) の中に compound 7 (化合物) (8.2g, 16mmol)、triethylamine (トリエチルアミン) (22ml, 160mmol) をいれ、10ml メタノールの中に FeCl₃ (2.7g, 16mmol) を加えた溶液を窒素雰囲気下で混合した。室温窒素雰囲気下で 1 時間混合したところ茶色の化合物が得られた。その後、真空中で乾燥させた。得られた化合物はジクロロメタン 400ml で希釈し、塩性溶液で 2 回洗浄し、真空中で乾燥させたところ complex A (複合体 A) が得られた。得られた化合物を、ジエチルエーテルとパラフィンの溶液中で再結晶させ高速液クロマトグラフィーで測定したところ、純度 95% 以上の complex A (鉄サレン錯体) 5.7g (収率 62%) を得た。

6) ベストシステム社高周波誘導加熱装置仕様

概要

本装置は、横浜市立大学に設置する、高周波誘導加熱装置である。

設備環境

標高：1000m 以下

周囲温度：10～40℃の範囲

湿度：20～80%の範囲

電 源

本装置用として下記の電源を貴社にて御用意願えるものとする。

高周波装置

3相・AC 200/220V (180～240V) ・
50/60Hz ・ 1.5KVA (約 7A)

電源変動率は 10% 以内とする。

電源周波数変動率は 1% 以内とする。

接 地

第 1 種接地アース

コイル仕様

コイル種：

- ①内径 φ 50～60 で 2～3 ターン位 (スパイラルコイル)
- ②外径 φ 50～60 で 5～6 ターン位 (カトリコイル)

冷却水

当装置の自己発熱防止に冷却水で冷却する。
冷却水回路方式は、高周波装置及び整合器、加熱コイルの循環方式とする。

冷却水:

高周波装置本体 3 L/min 以上 (給水部)

発振: 自励発振方式

給水圧力:

0.3 MPa 以上(本体部の給水/排水の差圧で)

通電:

誘導加熱方式

給水温度:

26℃～32℃以下 (結露無きこと)

以上

冷却能力:

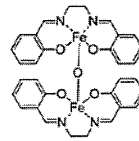
800 Kcal/h 以上

7) EI236 (鉄サレン錯体) の治験原薬製造法検討、ナード研究所

給排水の接続径:

冷却水の水質は下記のものを使用する。

EI236(鉄サレン錯体)の治験原薬製造法検討



株式会社ナードケミカルズ
株式会社ナード研究所

蒸発残留物: 120 ppm以下

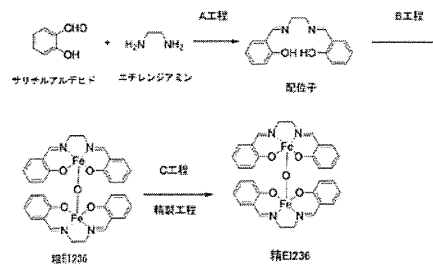
浮遊物: 100 ppm以下

全硬度: 100 ppm以下

塩素イオン: 100 ppm以下

EI236治験原薬製造法検討

・ 合成フロー



PH: 6.5～7.5

全鉄 (Fe) : 0.3 ppm以下

比抵抗: 4 KΩ 以上

イオウイオン: 不検出

アンモニウムイオン: 不検出

装置方式

電圧・電力調整:

トランジスター位相制御方式

EI236治験原薬製造検討

治験原薬製造に際して遵守事項

治験薬(原薬)法規制 : 薬食発 第0709002号(平成20年7月9日)

品質試験結果(COA)のみではなく

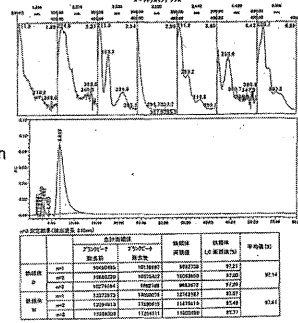
- 原料入手・保管・管理
- 製造(処方、場所、管理)
- 品質試験、
- 出荷判定

等々全ての面から総合的に最終原薬の品質保証を行う。

EI236治験原薬製造検討

住化分析センター法
HPLC条件
L-column
MeOH/H2O 4:1

Isocratic condition



EI236治験原薬製造検討

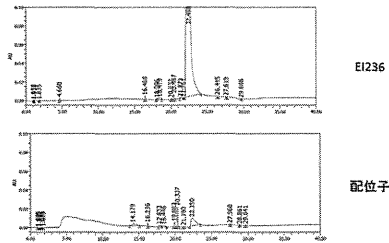
治験原薬製造法設定の方針(治験薬GMP遵守)

1. スケールアップ可能な、各工程の製造条件を確定する。
2. 品質保証を含めた各工程の製造を実施するため、工程管理条件(分析法)を設定する。
3. 試験法の検討を行い、EI236品質規格及び原料の受入規格を作成する(P1治験用原薬として)
4. 1~3の結果を基に製品標準書を作成する。
5. 製品標準書を遵守し、原薬を製造する。

EI236治験原薬製造検討

HPLC条件 Graduant 法

Column: XBridge C18 3.5um 4.6mm x 150mm
Mobile Phase: solv. A: 20mM リン酸緩衝液(pH 11) solv. B: CH3OH
solv. A / solv. B = 90/10 → 20min 10/90 → 25min 10/90 → 25.01min 90/10 → 35min 90/10
Flow Rate: 1.0mL / min Dect.: 254nm Temp.: 40°C



EI236治験原薬製造検討

分析法設定: 品質確認(不純物確認)、工程管理

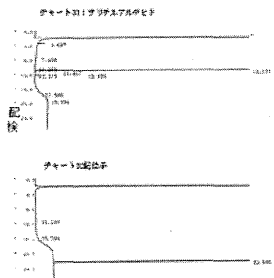
従来、EI236本体のHPLCによる測定法(含不純物)の検討を実施されていたが、いずれもピーク形状(ブロード)、目的物の分解ピークを検出等、不純物(類縁物質)を含めて測定できる分析法が無かった

治験原薬では、開発段階に応じた不純物(類縁物質)の管理が求められるため、不純物も測定できる分析条件(HPLC条件)設定が必要(グラデュエント法)

EI236治験原薬製造検討

配位子分析条件(GC)

カラム: DB-1 0.53mm x 30m, 1.00um
カラム温度: 50°C(5min)→20°C/min
→300°C(10min.)
注入部温度: 250°C 検出器温度: 300°C
入口圧: 25kPa スプリット比: 1:5
保持時間: 9リチルアルキル 11.2 min
位置: 22.6 min 錯体 & エチレンジアミン
出せり



EI236治験原薬製造検討

工程試験法

- A工程: GCによるサリチルアルデヒドの消失及び配位子形成確認
 B工程: 錯体形成は、GCによる配位子消失、及びHPLCによる不純物量(類縁物質)の状況
 C工程: HPLCによる不純物量(類縁物質)の状況、残留溶媒の測定

EI236治験原薬製造検討

製造法検討 C工程精製

- 粗体(基準)をDMSO(x70v/w)に溶解する
 - 加温した精製水(20v/w)中に、1の粗体DMSO溶液を滴下する。
 - 室温まで冷却し、析出結晶を濾過する。
 - 減圧乾燥し、精EI236を得る
- 収率 95%
 品質
 類縁物質(HPLC ほぼ1ピーク)、
 残留溶媒(DMSO 1000ppm以下、規格 5000ppm以下)

EI236治験原薬製造検討

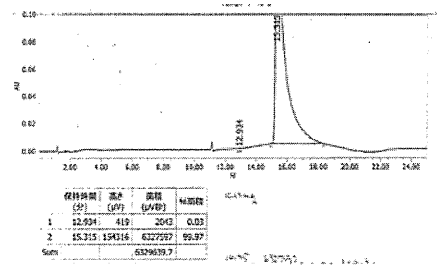
製造法検討

- A工程(配位子形成)
- サリチルアルデヒド(基準)をエタノール(20v/w)に溶解する
 - エチレンジアミン(x0.5M)のエタノール(2v/w)溶液を室温で滴下する
 - 同温で2時間反応し、5°C以下に冷却する
 - 析出結晶を濾取、乾燥し配位子を得る

工程管理: 反応GC サリチルアルデヒド0.5%以下
 収率 92%、品質(GCチャート、NMR)、

EI236治験原薬製造検討

精結晶 品質(HPLC測定)

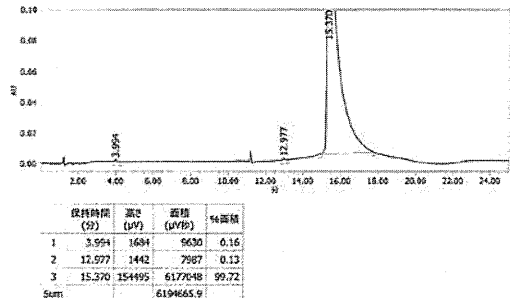


EI236治験原薬製造検討

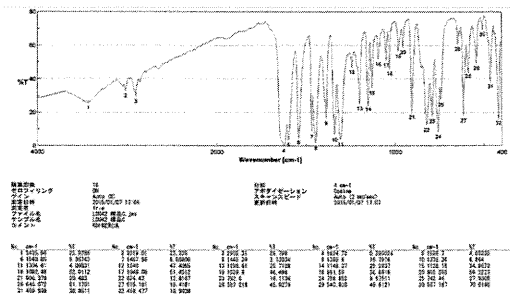
製造法検討 B工程(錯体形成 粗EI236)

- 配位子(基準)をメタノール(x6v/w)に懸濁する。
 - トリエチルアミン(x10M)を追加する。
 - FeCl₃(x1M)のメタノール溶液を滴下する(スラリーの色が変化する)。
 - GCにて配位子が検出されなくなるまで攪拌する
 - 析出結晶を濾過する
 - 湿結晶をDMSO(x70v/w)に溶解する(加熱)
 - 冷却後、水を滴下する。
 - 析出結晶を濾過する。
 - 減圧下乾燥し、粗EI236を得る。
- 工程管理: GCにて配位子のピーク検出されず
 収率 72% 品質(HPLC ほぼ1ピーク)
 以上、収率、品質(不純物等)は問題は無かったが、磁性が発現せず、検討を実施中。

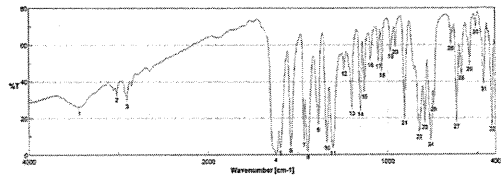
EI236GLP原薬HPLC(TCI品)



EI236GLP原薬IR(TCI品)



EI236GLP原薬HPLC(検討品)



検体番号	13	34	24
溶媒	メタノール	メタノール	メタノール
検体名	13-01	34-01	24-01
検体重量	0.1000g	0.1000g	0.1000g
検体濃度	10.0000%	10.0000%	10.0000%
検体性状	白色粉末	白色粉末	白色粉末
検体用途	原料	原料	原料
検体製造	2014.02.27 17:21	2014.02.27 17:21	2014.02.27 17:21

No.	Wavenumber (cm⁻¹)	Intensity (AU)	No.	Wavenumber (cm⁻¹)	Intensity (AU)
1	3445.84	1.24196	17	1035.30	1.24196
2	3143.85	1.24196	18	1017.31	1.24196
3	2941.86	1.24196	19	999.32	1.24196
4	2739.87	1.24196	20	981.33	1.24196
5	2537.88	1.24196	21	963.34	1.24196
6	2335.89	1.24196	22	945.35	1.24196
7	2133.90	1.24196	23	927.36	1.24196
8	1931.91	1.24196	24	909.37	1.24196
9	1729.92	1.24196	25	891.38	1.24196
10	1527.93	1.24196	26	873.39	1.24196
11	1325.94	1.24196	27	855.40	1.24196
12	1123.95	1.24196	28	837.41	1.24196
13	921.96	1.24196	29	819.42	1.24196
14	719.97	1.24196	30	801.43	1.24196
15	517.98	1.24196	31	783.44	1.24196
16	315.99	1.24196	32	765.45	1.24196

EI236治験原薬製造検討

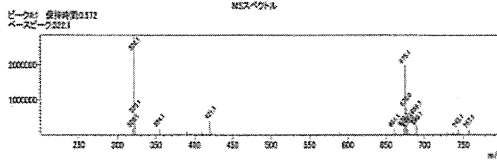
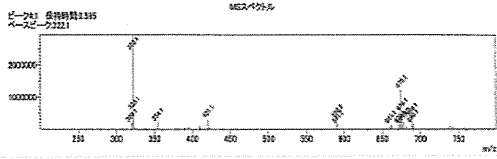
結語

医薬品の治験原薬(GMP製造)に求められる一般の要件(工程管理、品質向上)はクリア出来る処方を設定した。

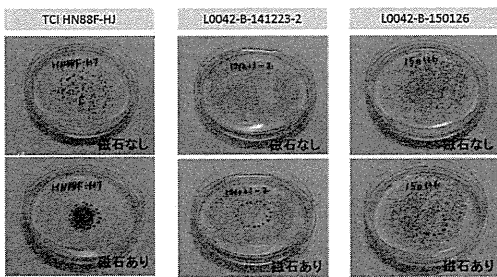
ただ、本品は磁性錯体であるため、磁性向上に向けた検討を実施していく。

EI 236 ESI Mass確認(ESI)

TCI品



2015.2.3 GMP基準のEI236の磁性強度比較



磁性測定値(固体2mg):
 3.356×10^{10}
 ⇒従来品と同等

(ESRでは磁性測定不可) (ESRでは磁性測定不可)

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
（分担） 研究報告書

磁性抗がん剤を用いた医療機器の開発

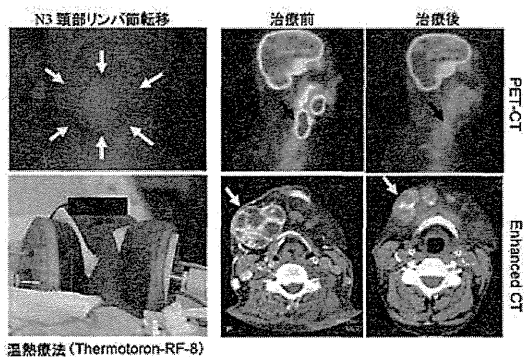
研究分担者 藤内祝 横浜市立大学大学院医学研究科 口腔外科学 教授

研究要旨

進行口腔癌に対する治療は外科的療法が主体となるが、術後の機能・審美障害など抱える問題は多く、新たな治療法の開発が必要とされている。近年、様々な分子標的薬剤が開発され、乳癌、大腸癌、悪性リンパ腫などで画期的な成績が報告されている。頭頸部癌においても、抗 EGFR 抗体薬（セツキシマブ）の臨床への導入が予定されており高い期待を集めている。本研究では、安全性が高くかつより高い抗腫瘍効果が得られる治療法を開発を目的に、EGFR 阻害薬に温熱療法を加えることにより標的分子の発現誘導と腫瘍抑制に対する相乗効果、さらに早期の臨床応用を目指し、トランスレーショナル研究を行う。

A. 研究目的

現在の口腔癌の治療における大きな問題点としては、①領域再発や後発転移をきたした患者に対する根治的治療が困難であること、②腫瘍の進展度や患者の全身状態、手術拒否など様々な理由により、手術不適応患者の予後が極めて不良であること③治療後の著しい審美的および機能的障害などがあげられる。これらの問題点を解決するためには化学療法、放射線療法、手術を主体とした従来の方法に加え、新たな治療法の開発が必要である。我々は、口腔癌 N3 頸部リンパ節転移を有する患者に対し、動注化学放射線治療と温熱療法を併用し、その治療効果を報告してきた (Mitsudo K et al, Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2012)。この併用療法により、患者の5年生存率ならびに局所制御率が向上し良好な成績 (図1)



(図1) 動注化学放射線治療と温熱療法併用による治療効果

を治めているが、しかし依然として同時化学放射線治療による粘膜障害、骨髄毒性、口腔乾燥症などの合併症が存在している。そこで我々は、現在多くの領域で注目され、研究・開発が進められている分子標的薬に

着目した。これまでの抗癌剤による化学療法や放射線療法は、癌細胞のみならず正常細胞までもダメージを与えてしまう副作用が存在していたが、この分子標的治療は癌細胞に特異的に発現する分子をターゲットとするため、副作用を最小限に抑えることが可能となる。近年、頭頸部癌に対してはEGFRをターゲットにした分子標的薬剤の臨床試験が進んでいる。その結果、EGFR阻害薬は再発/転移症例やCCDDPによるCCRTの施行が困難な高齢者に対する標準的治療としての役割を担いつつある。上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) は、HER-1としても知られる膜貫通性糖蛋白である。80~90%の頭頸部扁平上皮癌においてEGFRの過剰発現が認められている。またEGFRの過剰発現は、腫瘍のサイズの増大、stageの進行、再発リスク増加、放射線感受性、予後不良にも関与している。以上の理由から、EGFRは頭頸部癌の治療のターゲットとなっている。現在は、抗EGFRキメラ抗体とEGFR tyrosine kinase 阻害剤の二つが臨床開発されている。温熱療法とは血管系の温度調節機構の違いを利用して、癌の局所を42-43℃に加温することによって、正常組織に影響を与えずに癌細胞のみを死滅させようとする局所療法の一つで、一般的に放射線や化学療法の補助療法として用いられている。その歴史は古く、現在は保険治療として臨床応用されているが、深部の温度調節など手技に熟練を要することや煩雑さなどからあまり普及していないのが現状である。また生物学的効果に関してはいまだ解明されていない部分も多い。我々は現在までに、

口腔癌に対する温熱療法について研究および臨床応用を行ってきたが、ごく最近の知見で、加温により癌細胞の EGFR の発現レベルが上昇するという興味深い事実を見出している（未発表データ）。つまり、温熱療法に EGFR 阻害薬を用いた分子標的療法を組み合わせることにより、従来から知られている温熱療法の効果（血流上昇に起因する癌細胞へのドラッグデリバリーを高める作用）だけでなく、標的分子の発現上昇を図ることで EGFR 阻害薬に対する癌細胞の感受性を高める効果も期待できる。これまでに頭頸部領域において温熱療法により EGFR の発現上昇を認めた報告はなく、非常に画期的な方法であると同時に、それぞれ副作用が少ないことから早期の臨床応用が期待できる。これは口腔癌に対する従来の治療法のデメリットを極力回避し、低侵襲かつより安全で、患者の QOL 向上が期待される新たな治療法の確立となり得る。

B. 研究方法

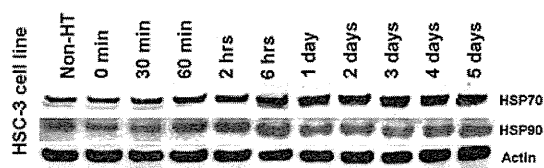
まず温熱作用による EGFR の上昇が癌細胞において普遍性のあるものかどうか検討を行う。次に、EGFR 阻害薬との併用効果について口腔扁平上皮癌細胞株を用いた *in vitro* および療法が *in vivo* マウスモデルにおいて、腫瘍抑制効果およびそのメカニズムについて検討する。また臨床応用を視野に入れて、最も効果的な温熱の治療時間、EGFR 阻害薬を開始するタイミング、投与量、投回数などの条件を検討するために、温熱により HSP70 と HSP90 の発現を検討した。また申請者はこれまでに、HSP は時

に癌の治療にネガティブに作用するといった報告も散見する。HSP と EGFR の相関関係、また EGFR 阻害薬の併用療法によって、HSP の発現にどう変化があるかも今後検討を行う予定である。また、マウスモデルによる温熱療法の検討のため、「高周波式誘電加温装置 研究用 THERMOTRON-RF I.V」(山本ビニター株式会社)を使用した。

温熱装置「THERMOTRON-RF I.V」は、相対向する 2 枚の平板電極で身体を挟み、電磁波(ラジオ波)エネルギーを利用して、浅部がんはもとより深部がんを選択的に 42°C 以上に加温し、がんを死滅させる装置である。電磁波によってがん細胞の中の水分子が急速に動き、摩擦熱が発生する仕組みで、電子レンジと同じ原理である。

C. 研究結果

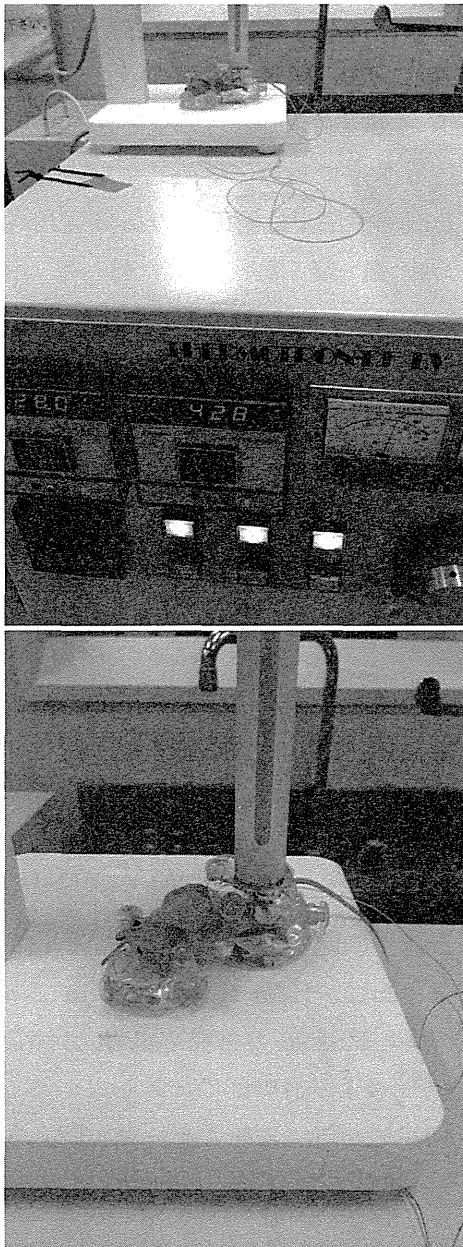
扁平上皮癌細胞株である HSC-3 を 43°C で加温した際に、Heat shock protein である HSP70 と HSP90 の発現を認め、かつ加温後 2 時間後より計時的に上昇していることを見出している（未発表データ、図 2）。



(図 2) 43°C、1 時間加温後の HSP70、HSP90 の計時的変化

マウスモデルによる温熱療法の検討のため、「高周波式誘電加温装置 研究用 THERMOTRON-RF I.V」を用いて腫瘍局所が約 43°C まで温度上昇することを確

認した (図3)。



(図3)「高周波式誘電加温装置 研究用 THERMOTRON-RF I.V」による腫瘍局所の温熱

D. 考察

EGFR の発現レベルは癌の種類や細胞株によって異なり、そのため EGFR 阻害薬の

抗腫瘍効果にも相異がみられる。EGFR の発現レベルが低く、EGFR 阻害薬の抗腫瘍効果が低い癌においても、温熱療法を併用することにより EGFR の発現が上昇し、EGFR 阻害薬の親和性が高まることにより抗腫瘍効果の増強が期待される。本研究ではすでに臨床応用されている温熱療法を用いる事で標的分子の誘導を行うことから、より安全性が高く、臨床応用への可能性はより高いと思われる。また、温熱療法自身にも抗腫瘍効果があり分子標的薬と併用することで相乗効果も期待できる。さらに本研究により、温熱効果で誘導される新たな標的分子の候補をスクリーニングすることも可能で、将来的な研究の発展を望むことができる。

E. 結論

本研究により温熱療法を用いた口腔癌研究の向上に大きく貢献するだけでなく、他領域の癌への応用も考えられ、学術的観点からも大変意義深いと思われる。

F. 健康危険情報

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iida M, Takayama E, Naganawa K, Mitsudo K, Adachi M, Baba J, Fujimoto-Muto M, Motohashi M, Mizuno-Kamiya M, Kawaki H, Kioi M,

- ichinose M, Sumitomo S, Muramatsu Y, Shikimori M, Tohnai I, Kondoh N. Increase of peripheral blood CD57+ Y-cells in patients with oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 34:5729-5734, 2014.
2. Mitsudo K, Koizumi T, Iida M, Iwai T, Nakashima H, Oguri S, Kioi M, Hirota M, Koike I, Hata M, Tohnai I. Retrograde superselective intra-arterial chemotherapy and daily concurrent radiotherapy for stage III and IV oral cancer: Analysis of therapeutic results in 112 cases. *Radiother Oncol* 111:306-310, 2014.
 3. Sato I, Umemura M, Mitsudo K, Kioi M, Nakashima H, Iwai T, Feng X, Oda K, Miyajima A, Iwai M, Fujita T, Yokoyama U, Okumura S, Sato M, Eguchi H, Tohnai I, Ishikawa Y. Hyperthermia generated with ferucarbotran (Resovist®) in an alternating magnetic field enhances cisplatin-induced apoptosis of cultured human oral cancer cells. *J Physiol Sci* 64:177-183, 2014.
 4. Iwai T, Maegawa J, Matsui Y, Mitsudo K, Tohnai I. Variable oral device for measuring oral lesions. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 66: 314-315, 2014.
 5. Iwai T, Fuwa N, Hirota M, Mitsudo K, Tohnai I. Secure surgical method for catheter placement via the occipital artery to achieve retrograde superselective intra-arterial chemotherapy for advanced oral cancer: Alternative to approach via the superficial temporal artery. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 66: 205-207, 2014.
 6. 寺嶋廣美, 大栗隆行, 今田 肇, 藤内 祝, 櫻井英幸, 武田 力, 照沼 裕, 谷川啓史, 近藤元治, 田中良明, 大西武雄. ハイパーサーミア現況調査(2012)報告書. *Thermal Medicine* 30 : 89-98, 2014.
- ## 2. 学会発表
1. 光藤健司, 小泉敏之, 飯田昌樹, 大屋貴志, 岩井俊憲, 中島英行, 小栗千里, 來生 知, 廣田 誠, 藤内 祝. 進行口腔癌に対する逆行性超選択的動注化学放射線療法は頸部リンパ節転移に有効か?. 第38回日本頭頸部癌学会, 東京, 2014, 6.
 2. 小栗千里, 光藤健司, 小泉敏之, 大橋伸英, 柴崎麻衣子, 飯田昌樹, 岩井俊憲, 中島英行, 廣田 誠, 來生 知, 藤内 祝. 進行舌癌に対する逆行性超選択的動注化学療法の治療効果—副咽頭間隙への効果—. 第38回日本頭頸部癌学会, 東京, 2014, 6.
 3. 北島大朗, 岩井俊憲, 大原良仁, 矢島康治, 光藤健司, 藤内 祝. 流体解析を用いた動注化学療法の抗癌剤分配シミュレーション. 第38回日本頭頸部癌学会, 東京, 2014, 6.
 4. 中島英行, 藤澤聡郎, 來生 知, 光藤健司, 藤内 祝. マウス肉腫に対する Histone Deacetylase (HDAC) 阻害剤と Immunotoxin IL13-PE の併用療法の開

- 発. 第38回日本頭頸部癌学会, 東京
2014, 6.
5. 小栗千里, 岩井俊憲, 松井義郎, 中島英行, 廣田 誠, 來生 知, 光藤健司, 藤内 祝. 口腔内病変の切除マージンを正確に決定するための口腔内メジャーの使用経験. 第38回日本頭頸部癌学会, 東京, 2014, 6.
 6. 大橋伸英, 岩井俊憲, 中島英行, 小栗千里, 廣田 誠, 來生 知, 光藤健司, 藤内 祝. 口腔顎顔面領域に転移したneuroendocrine carcinomaの2例. 第38回日本頭頸部癌学会, 東京, 2014, 6.
 7. 飯田昌樹, 高山英次, 長縄鋼亮, 足立誠, 中島英行, 來生 知, 一瀬雅夫, 近藤信夫, 藤内 祝. 口腔扁平上皮癌患者の末梢血におけるCD57+ T細胞亜集団の検討. 第38回日本頭頸部癌学会, 東京, 2014, 6.
 8. 佐藤 格, 光藤健司, 梅村将就, 宮島章嘉, 中島英行, 來生 知, 石川義弘, 藤内 祝. MRI造影剤フェルカルボトランを用いた新しい温熱化学療法の開発. 第38回日本頭頸部癌学会, 東京, 2014, 6.
- 3. 知的財産権の出願・登録情報**
- 1. 特許所得**
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（医療機器開発推進研究事業）
（分担） 研究報告書

磁性抗がん剤を用いた医療機器の開発

研究分担者 川原信隆 横浜市立大学大学院医学研究科脳神経外科学 教授

研究要旨：

IHI(株)と横浜市立大学との医工連携の中で有機磁性体化合物でありなお且つ抗がん活性をもつものが発見された。発見した化合物(EI236)はプラチナ製剤に類似する抗がん作用を有しており、EI236を用いた有効かつ安全ながん治療の開発が進められている。

現在EI236を用いた新しいGlioblastoma(GB)治療に関する研究を行っている。EI236は磁性を持っているため、交流磁場をかけることで熱を発する特徴を持つ。そのため、EI236による治療は1剤で「抗がん作用+温熱作用」の2つ効果を同時に期待することができる。EUで施行されているMagforceは、磁性体粒子を腫瘍内に注入し交流磁場をかけることで温熱作用を加えるGBの新しい治療法であるが、Stuppらの報告と比較しprimary OS 14.6m → 23.2m, recurrent OS 9.2m → 16.4m (Phase II study, 2011)と有意な延長を認めている。本研究で使用するEI236は、Magforceで使用した磁性体粒子のように磁性を持ちなお且つ抗がん作用も併せ持つため、更なる予後延長効果が期待される。

GB細胞株を用いてEI236による抗腫瘍効果、温熱効果について検討した結果を報告する。

A. 研究目的

1. グリオーマとは

脳腫瘍は、原発性脳腫瘍と全身の癌が脳に転移した転移性脳腫瘍に分類される。脳腫瘍は悪性度に応じて grade I～IVまでに分類される。髄膜腫の大部分や下垂体腺腫、神経鞘腫などの良性腫瘍は grade I であり、手術で全摘出することで治癒可能なものが多い。grade II～IVの腫瘍が悪性腫瘍であり、手術だけでなく化学療法や放射線療法が必要となる。国内には原発性脳腫瘍の患者が約2万人程度いるとされる。原発性脳腫瘍における全年齢を対象とした解析では、髄膜腫が最も頻度が高く (26.4%)、次いで神経膠腫 (gliomas; 22.5%)、下垂体腺腫 (18.3%)、神経鞘腫 (10.4%)、頭蓋咽頭腫 (3.5%) が続く。一方年齢別解析では、14歳以下の小児では、glioma (57.2%) が最多である。逆に70歳以上の高齢者では髄膜腫 (46.3%) が最多であり、glioma (28.7%) がこれに続く (1999)。原発性脳腫瘍の患者数を2万人と見積もると、年間の glioma 患者数は約5600人となる。(Dolecek et al., 2012)。

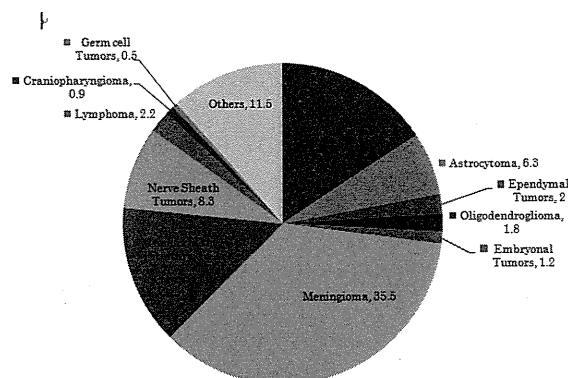


図1 脳腫瘍の発生頻度
(CBTRUS 2005-2009 より改変)

2007年に改訂されたWHO分類規約では、中枢神経系に発生する腫瘍のうち、神経細胞とグリア細胞及び、それらと同じ組織起源を持つ細胞から由来する腫瘍を、神経外胚葉に由来する神経上皮性腫瘍 (Tumors of Neuroepithelial tissue) と呼称している (Louis et al., 2007)。神経上皮性腫瘍の大半はグリア系腫瘍であり、これらの腫瘍を広義の glioma と定義している。グリア細胞は更に4種類 (星細胞、乏突起膠細胞、上衣細胞、小膠細胞) に分類され、小膠細胞以外の細胞から発生する腫瘍を狭義の glioma としている。この多くは星細胞系腫瘍 (astrocytic tumor) 及び傍突起膠細胞系腫瘍 (oligodendroglial tumor) に大別され、その病理学的悪性度に準じて WHO grade I～IVに分類される。組織学的には、外科治療単独で根治が期待される grade I glioma を除く、grade II以上の glioma を悪性腫瘍と定義し、更に grade II glioma を low-grade

gliomas (LGG), grade III, IV glioma を high-grade gliomas (HGGs) と呼称している (Louis et al., 2007). Glioma の組織別頻度として, 神経膠芽腫 (glioblastoma; GB; WHO grade IV) が 54.0%, 星細胞腫 (astrocytoma; WHO grade II) が 9.5%, 退形成性星細胞腫 (anaplastic astrocytoma; AA; WHO grade III) が 5.9% である (Dolecek et al., 2012).

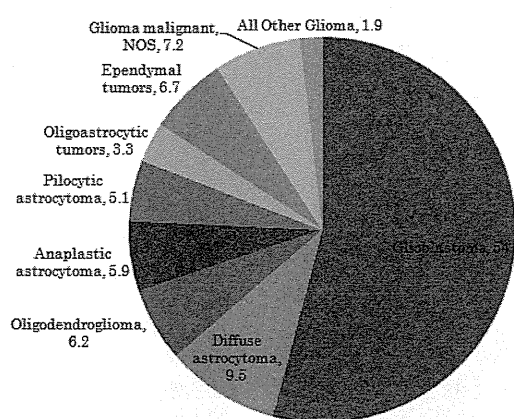


図2 Glioma の発生頻度 (CBTRUS 2005-2009 より改変)

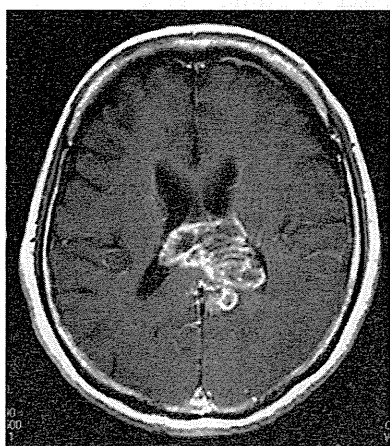


図3 Glioblastoma (Grade IV) 造影 MRI (T1WI) 画像

Grade II glioma は, astrocytic 系腫瘍である diffuse astrocytoma (DA), oligodendroglia 系腫瘍である oligodendroglioma (OD), oligoastrocytoma (OA) に細分化されている. Astrocytic 系腫瘍は神経外胚葉性腫瘍の 81.4% を占める. DA は組織学的に正常脳実質より細胞密度が高く, そこに異型を示す核と好酸性の細胞質を持ち, 繊細な突起を星芒状に伸ばす腫瘍細胞がびまん性に増殖する像を示す. Oligodendroglia 系腫瘍は神経外胚葉性腫瘍の 6.2% を占め, 成人の大腦半球に好発し特に前頭葉で頻度が高い. OD は中心性の類円形核と淡明な細胞質を持つ細胞が均一に分布する. 一方 OA は oligodendroglial tumor 成分と astrocytic tumor 成分からなる腫瘍であり, 両者が互いに混在している症例と, それぞれがある領域を占めている症例がある (Louis et al., 2007).

Grade III glioma は, grade II と比較して退形成所見と増殖能の亢進を示し, 同様に astrocytic 系の anaplastic astrocytoma (AA), oligodendroglial 系の anaplastic oligodendroglioma (AOD), anaplastic oligoastrocytoma (AOA) と細分化されている (Louis et al., 2007). Grade II, III とともに astrocytic 系において TP53 変異, oligodendroglial 系において 1 番染色体短腕 (1p) 及び 19 番染色体長腕

(19q)の欠失(1p/19q全欠失)が多く認められ、近年 glioma の組織診断において、これらの分子マーカーは診断に寄与する指標として注目されている。

GradeIVに相当するGBは、組織学的に異型細胞の増殖、核分裂像、微小血管増殖とともに壊死を有することが定義上示されており、脳実質内に浸潤性破壊性に増殖する傾向を有する(Louis et al., 2007)。GBの発生様式として、初発からGBが出現するprimary GB (pGB)と、先行するgrade II～IIIから悪性転化の結果生じるsecondary GB (sGB)に分類される(Ohgaki and Kleihues, 2007, 2009)。pGBMは中高年者に発生し、急速な進行と極めて不良な予後を特徴とし、GBの約90%を占める。

2. グリオーマの治療の現状

Gliomaの治療には手術による広範囲腫瘍切除がgradeを問わず、生命予後延長効果の観点から重要視されている。Glioma、特にHigh grade gliomaは浸潤性に発育する傾向が強く、GBMの生存期間中央値は14.6カ月、5年生存率はわずか6%であり、初期治療の重要性は極めて高い。外科的切除の目的は、組織診断を得ることに加え、腫瘍体積並びに腫瘍細胞数を減少させ、

放射線放射線治療や化学療法などへの治療反応性を高める上でも重要である。近年、MRIを用いた定量的画像解析の結果、広範囲切除はgrade II、IIIのみならずGBMにおいても治療成績を向上するとした手術切除の意義が明らかになりつつある(Sanai and Berger, 2008; Sanai et al., 2011)。特にGBMではMRI造影領域だけではなく腫瘍細胞が周囲の正常脳組織へ広く浸潤しているため、Methionine PETなどの各種画像を用いた手術戦略が重要となるが、それでも全摘出は困難であり、術後の集学的治療が必須である。

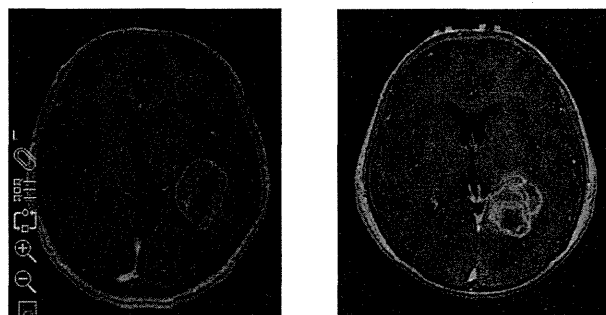


図4 手術計画：Methionine PETと造影MRIのfusion画像

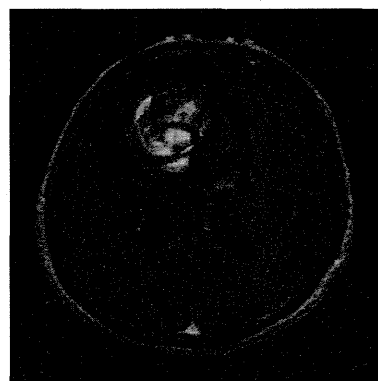


図5 腫瘍の立体画像
(Navigation StealthStation – Medtronic, Inc)

3. グリオーマの手術治療

Gliomaの手術では、できる限りの摘出を行うことと術後の神経脱落症状を可能な限り予防する、といった両極端の目標を目指さなければいけない。そのため、術中脳機能マッピング、覚醒下手術の重要性が指摘されている。Gliomaはその浸潤性特徴により、術中肉眼的に正常脳との境界を同定することは極めて困難である。実際、腫瘍周辺部では腫瘍細胞と神経組織が混在しているため、明確な境界は存在しない。しかし、境界領域の中でも腫瘍細胞密度の高い部分を確認し、同部位の摘出を行うことは腫瘍細胞の摘出率を向上させる上でも重要である(Sanai and Berger, 2008)。この目的のために、術中迅速病理診断やナビゲーションシステムなど多くの方法が用いられているが、近年使用頻度の増えている方法に Photodynamic diagnosis (PDD) がある。PDDは術中に腫瘍細胞を赤色に光らせることで、正常脳との境界が判別困難な部位で腫瘍を同定することに役立っている。PDDに使用する Hematoporphyrin 誘導体の中でも、内因性物質であり経口投与が可能な 5-ALA は 2013 年に保険適応となり、現在最も広く使用されている。5-ALA は腫瘍細胞内に取り込まれた後、ヘムの合成過程で Protoporphyrin IX まで代謝されて蓄積され、405nm の励起光照射によって 635nm の赤色光を発する。5-ALA は血

液脳関門を通過しないという意見が多く、造影効果のある High grade glioma に有用と考えられている (Stummer W, et al., 2006)。PDD と似た手段を用いた術中治療法に Photodynamic therapy (PDT) がある。腫瘍組織や新生血管に集積する光感受性物質(タラポルフィンナトリウム/レザフィリン[®])を患者に投与し、術中にレーザー光を照射することで光化学反応を引き起こし、細胞を壊死させる治療法である。この細胞壊死は、特定の波長(664nm)のレーザー光と光感受性物質との光化学反応で産生される活性酸素によるものである。活性酸素の寿命が 0.04-4 μ 秒と短いため、効果が照射された部位に限られる局所療法であり、正常組織への侵襲も少ない。本邦で行われた単群第II相探索試験では、悪性脳腫瘍において 12 カ月生存率 95.5%、6 ヶ月無増悪率 91%と従来の治療法と比較し好成績を示し、2013 年 9 月に悪性脳腫瘍に対して保険適応が承認された (Muragaki Y, et al., 2013)。また、術中に行う治療法として、BCNU ウェーハー脳内留置用剤が 2012 年に High grade glioma に対して適応となった。BCNU ウェーハー(商品名: ギリアデル脳内留置用剤 7.7mg)は、BCNU 7.7mg を含有した直径 14mm、厚さ 1.3mm の円盤状の脳内留置用徐放性製剤であり、術中に grade III ~IV の glioma と診断された場合、摘出腔に留置する局所治療である。初発膠芽腫に対する有用性は、外国第III相試験(T-301 試験)で検討された。2003

年, 2006年の2回に分けて報告されているが, 2006年の報告によると, 生存期間中央値はプラセボ留置群の11.6ヶ月に対し BCNU ウェーハー留置群では13.8カ月と, 有意な延長がみられた. GBMに限定した短期追跡の比較では, 生存期間中央値に有意な差は見られなかったが, 90%以上切除した GBM 症例では生存期間中央値がプラセボ留置群の12.5ヶ月に対し, BCNU ウェーハー留置群では14.6カ月であり, 有意に延長していた($p=0.0191$). 浸潤性が高く全摘出が困難とされる glioma の性格上, 残存腫瘍細胞をたたく方法であるこの治療法は非常に期待が持てるものである.

このように, できる限り手術成績を向上させるために, 手術中にも様々な工夫や新しい追加治療が試みられている (Westphal M, et al., 2003).

4. グリオーマの化学放射線治療

集学的治療の指針として, Grade II glioma に関して, 手術による広範囲切除に加え, 放射線治療あるいは化学療法 (Procarbazine, CCNU, Vincristine; PCV 療法), またはアルキル化剤である temozolomide (TMZ) 内服療法, 更には経過観察と多岐に渡り, 明確な指標は存在しない (Louis et al., 2007). この背景には長期間の follow up を要することから

randomized control study のデザインが困難なことが要因として挙げられる. また Grade III glioma の治療指針として, 手術による広範囲切除に, 放射線療法または化学療法, あるいはその併用療法が推奨されているが, grade II 同様に標準治療としての確立された指針は存在しない (Louis et al., 2007). しかしながら grade II, grade III glioma とともに, 自然歴の中で悪性転化をきたすことが知られており, 最終的には腫瘍死に至るとされる.

GB に対する治療指針は, European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) 及び National Cancer Institute of Canada (NCIC) が共同で施行した第 III 相多施設共同ランダム化比較試験結果を元に, 70歳以下の成人初発 GB 患者に対して, 手術による切除に加え, 拡大局所照射 60 Gray (Gy) 及び TMZ 内服の併用療法が標準療法として現在推奨されている (Stupp et al., 2009; Stupp et al., 2005). しかしながら併用療法による生存期間延長効果は, 平均生存期間 12.1ヶ月から 14.6ヶ月と, 僅か 2.5ヶ月の延長効果に留まるように, 現時点での GB に対する根治性は乏しく, 極めて予後不良な疾患と位置づけられている (Stupp et al., 2009). 近年, 高齢者 GB 患者に対して, NOA-08 と Nordic trial の, 放射線単独治療と TMZ 単独治療を比較した 2 つの RCT が施行され, NOA-08 (65歳以上)

では dose dense TMZ 療法の放射線治療 60Gy に対する非劣勢が示された (Wick W, et al., 2012). Nordic trial (60 歳以上) では, 標準放射線群 (60Gy/6 週間), 低分割照射群 (34Gy/2 週間), TMZ 群 (5 日投与/28 日) との比較で, 全生存期間において, TMZ 群が 8.3 カ月と他 2 群に優越性を示し, 特に 70 歳以上では他 2 群と比較して劣勢を示した標準放射線群は推奨されないとしている (Malmstrom A, et al., 2012). 現在 70 歳以上の GB 患者における低分割照射群と TMZ 群の比較試験が進行中であり, 結果が待たれる.

その後続々と TMZ と拡大局所照射 (RT) 併用の標準治療への上乗せ効果を目指した新薬の臨床試験が行われている. 2013 年に保険適応となった分子標的薬のベバシツマブ (BEV) も代表例である. TMZ+RT の治療歴を有する再発悪性 glioma における BEV 単独投与での有効性と安全性を検討した国内第 II 相試験である J022506 では, 6 ヶ月無増悪が 33.9%, 平均無増悪生存期間が 3.3 カ月であった. 同様に再発悪性 glioma を対象とした海外での第 II 相試験である BRAIN 試験においても, 平均無増悪期間 4.2 カ月, 平均生存期間 9.2 カ月と, 従来の再発悪性 glioma で報告されている平均無増悪期間 2-3 カ月, 平均生存期間 5-11 カ月と比較しても良好な成績を示したと考えられる. 初発 GB に対する国際多施設 RCT (AVAglio) も施行された. RT+TMZ+BEV 群と RT+TMZ+プラセボ群の無

増悪生存期間はそれぞれ 10.6 カ月, 6.2 カ月と BEV 群が有意に延長していたが, 全生存期間は 16.8 カ月, 16.7 カ月と有意差は認められなかった (Chinot OL, et al., 2011). 同時期に行われた類似プロトコルの RTOG0825 でも全生存期間で有意差を認めず, さらに無増悪生存期間も設定有意水準に達さないという結果であった. 再発に対しては期待される結果を示した BEV であるが, 全生存期間を重視した場合, 初発に対する使用は検討が必要である (Weller M, et al., 2013). また, TMZ の増強効果を期待した IFN β の初発 GB 治療での併用について現在 RCT (JCOG0911) を施行しており, 解析結果が待たれる.

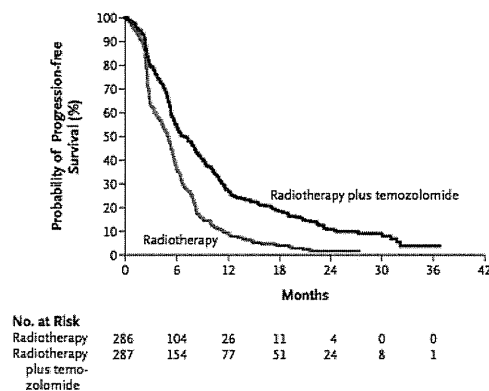


図6 Glioblastoma の標準治療 (Stupp et al. N Engl J Med, 2005 より改変) 放射線治療単独群と比較して TMZ 併用群では有意な生存期間の延長効果を認めた