

5、グリオーマの新規治療戦略

新規治療戦略として癌免疫療法が注目されている。体外もしくは体内で腫瘍を殺傷するキラーリンパ球を誘導するというものである。EGFRvariant III のペプチドワクチンが初発 GB に対して上乘せ効果を RCT で検討中である。日本でも、再発 GB を対象とした混合ペプチドワクチン ITK1 や、初発 GB を対象とした術後放射線と自家腫瘍ワクチンの併用療法の研究では、全生存期間中央値が 19 カ月という良好な成績を残した。さらに自家腫瘍ワクチンに TMZ を追加した研究では 22.2 カ月と更なる延長を認め、化学療法と免疫療法の併用効果を示唆するものである (Muragaki Y, et al., 2011)。現在 RCT を実施中であり、その結果が待たれる。

医療機器では、再発 GB を対象とした、変動磁場を持続的に与える NovoTTF 治療が RCT で化学療法群と同等の全生存期間中央値を示した (Stupp R, et al., 2012)。NovoTTF は頭部に装着する機器で、頭皮上から非常に弱い交流磁場を持続的に腫瘍に対して発生させるものである。この磁場は腫瘍治療磁場 (Tumor Treating Field : TTF) と呼ばれており、細胞分裂中に作用させることで分離を停止させると言われる。機器は 3kg ほどのショルダーバッグになっており、通常通りの生活を送りながら連続して治療を継続することが可能である。再発

GB 患者に対し、有効性と安全性が確認され、米国、EU 加盟国とスイスで承認を得ている。現在初発 GB を対象とした国際共同 RCT が進行中である。

温熱療法も悪性 Glioma に対する治療選択肢の一つとして注目されている。温熱療法は単独でもがん細胞を殺傷し、正常細胞の感受性よりも高いため選択的な治療が可能である。さらに、腫瘍の血流、酸素状態、pH などの環境が熱感受性を増加させると言われている。また、温熱は耐性腫瘍細胞の抗がん剤に対する細胞毒性を増強するとされている (Harn GM, et al., 1982; Takahashi S, et al., 1999)。そのため、温熱と放射線、化学療法を併用することでより高い効果があげられることが報告されている。本邦でも再発 GB に対して温熱療法単独で、初発 GB に対しては放射線と併用することで良好な成績が得られている。十分な加温を行うためには正確な温度分布の把握が重要であり、脳血流や腫瘍、脳浮腫の影響を治療前にシミュレーションを行うことで治療計画を立てている。加温後には 43°C 以上に加温された部位で壊死を認めたという報告もあるが、周囲神経組織保護のためには 42°C 60 分以上の加温は好ましくなく、温度や時間を含め更なる検討が必要とされている。また、TMZ との併用効果についてはまだ報告がなく、現在の標準治療との併用についても報告が期待される。

再発 GB に対する治療法の一つに Magforce がある。MagForce 社 (Germany) は脳腫瘍に対するナノ粒子を使用した治療法 (NanoTherm therapy) の開発を進めており、2005 年～2009 年に行われた GB 患者 59 人に対する臨床試験 (Phase II) において、診断からの平均生存期間が 23.2 ヶ月、再発後の平均生存期間が 13.4 ヶ月と、従来の 14.6 ヶ月、6.2 ヶ月 (EORTC) を大きく上回る結果を示している ($P < 0.01$) (Klaus, et al., 2011)。Nano therapy はアミノ酸でコーティングされた酸化鉄から成る直径 15nm の磁性ナノ粒子を生検の要領で直接腫瘍に注入する。脳内への粒子注入量は平均 4.5cc (0.5-11.6)、平均で 0.28cc/1cc tumor volume とされる。その際同時に温度測定カテーテルを留置する。アミノ酸でコーティングすることでナノ粒子が発熱しやすくなっている。注入した状態で交流磁界に入るとナノ粒子は熱を発する。頭部にかける磁界は腫瘍の局在や大きさに合わせて NanoPlan を用いて作成し、腫瘍から 2mm margin を取り、腫瘍外側が 43°C 以上にならないよう磁場強度を調整する。治療では定位放射線治療 (Novalis) を併用する。副作用は全体的に mild level であり、従来の放射線、化学療法と比較しても重症度に有意差は認められず許容範囲内であった。温熱により腫瘍細胞が破壊されるとともに、化学療法と放射線療法に対する感受性も高くなり、生存期間延長に繋がると考えられて

いる。ナノ粒子の活性化と放射線治療による影響について現在臨床試験が続けられている。TMZ との併用により更なる全生存期間の延長が期待される。

6、磁性抗がん剤を用いた治療

以上のように、GB は現在も特に治療が困難な脳腫瘍であり、全世界で新たな治療が模索されている。

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 で施行されている前述の 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 (図 6) 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。

抗がん剤としての TMZ, 温熱効果を期待する Magforce, 交流磁場を当てることのみで治療する NovoTTF は, 現行の GB 治療として注目されている治療であるが, EI236 はこれらの治療の腫瘍に対する作用を合わせた治療法となる可能性を秘めている. 患者数は少なくないにも関わらず, 非常に予後の悪い脳腫瘍である GB に対する治療の新たな切り口となることを期待して, 現在 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 vitro, vivo それぞれで検討を進めている. 同時に EI236 が理想的な抗腫瘍効果, 温熱効果を示しうる磁場機器開発に必要な条件を検討していく.

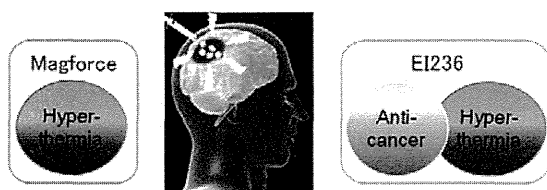


図 7 治療方法の比較

B. 研究方法

実験材料

■ヒトグリオブラストーマ細胞株

YKG-1 (53 years, F, unknown, Sugano H, 1991), U251 MG (75 years, M, Caucasian, Takeshita I, 1991), U87 MG (44 years, M, Caucasian, J Ponten, 1966)

■使用培地

DULBECCO' S MODIFIED EAGLE' S

MEDIUM (SIGMA D6429)

■培養方法

YKG, U251, U87 は, 10%非働化牛血清 (EQUITECH-BIO. INC, TEXAS FETAL BOVINE SERUM) 100units/ml ペニシリン・ストレプトマイシン (Wako penicillin-streptomycin solution×100) を添加した DULBECCO' S MODIFIED EAGLE' S MEDIUM (DMEM) で 37°C、5%CO₂条件下で培養した.

■実験動物

Mice : Female balb/c nu/nu mice (17-23g) (Japan SLC, Inc. Shizuoka, Japan)

Rats : Crl:CD(SD) male rats (190-299g) (Charles River Laboratories International, Inc. U. S. A)

1、EI236 の GB 細胞株に対する抗腫瘍効果の検討

I. XTT assay

EI236 による抗腫瘍効果を XTT proliferation assay kit (XTT assay, ATCC)による細胞数の計測により評価した. 37°C、5%CO₂条件下で YKG、U251、U87 を 10 cmディッシュで数日間培養した. 細胞を回収し, cell counter (BIO-RAD TC10™ Automated cell counter) で細胞数を計測し, 96 穴プレートに各細胞を 1 穴あたり 5.0×10^3 個播種した. 37°C、5%CO₂条件下で 2

時間培養し生着後, control として一つ培地を加え, EI236 刺激群として 3.8 ~ 960 μM で細胞を刺激した. 37°C, 5% CO_2 条件下で 72 時間培養後, XTT 試薬を添加し, 37°C, 5% CO_2 条件下で 2 時間培養後, 吸光度を測定し細胞数を評価した.

II. Flow Cytometry

BD FACSCanto™ II フローサイトメーターシステム (FACS) を用いてアポトーシスによる抗腫瘍効果の評価を行った. 5cm ディッシュを用いて, 細胞を EI236 刺激群として「3.8 μM », 「7.5 μM », 「15 μM », 「30 μM 」の濃度に分類した. 細胞は 0.8×10^5 個/dish となるように播種した. 3 時間後細胞が完全に接着したことを確認し, EI236 刺激群に各濃度の EI236 を投与し, 37°C, 5% CO_2 条件下で 48 時間培養した. 培養後, 細胞を回収し, binding buffer 100 μl で懸濁した. EI236 刺激群と negative control に Annexin V (BD Pharmingen™) と 7AAD (BD Pharmingen™) を各 5 μl 加え, positive control は, 50 μl ずつ 2 本に分けて Annexin V のみと, 7AAD のみを 2 本作り, 緩やかに混和し, 室温で 15 分間インキュベーションした. FACS 測定の前直前に Binding Buffer をフィルターを通して各 400 μl 加え, 1 時間以内に測定を行った. 評価方法は P1 の細胞を 100% として, 初期のアポトーシスと後期のアポトーシスを合計して数値を算定した.

2、GB 細胞株, 正常脳細胞に対する温熱効果の検討

研究用倒立顕微鏡 (ECLIPSE Ti, Nikon) を用いて温熱刺激による GB 細胞株への殺傷効果, 正常脳細胞への影響について検討を行った. 37°C, 5% CO_2 条件下で培養した U251 を回収し, 4well plate に 0.5×10^5 個/well になるよう細胞を播種した. 正常脳細胞は mouse astrocyte (ICR mouse E17, Cosmo Bio Co., Ltd) を専用培地 (ATSM, Cosmo Bio Co., Ltd) で 37°C, 5% CO_2 条件下で 1 週間培養したものを使用し, 同様の細胞数で播種した. 細胞を 43°C 30 分, 1 時間, 2 時間インキュベーターで刺激した. 37°C 刺激群をコントロールとした. 刺激後 24 時間 37°C, 5% CO_2 条件下で培養し, 生細胞を Calcein AM (green), 死細胞の核を Propidium Iodide (red) で染色し, 蛍光顕微鏡で観察した.

3、マウス臀部に GB 細胞を注入した皮下モデルの検討

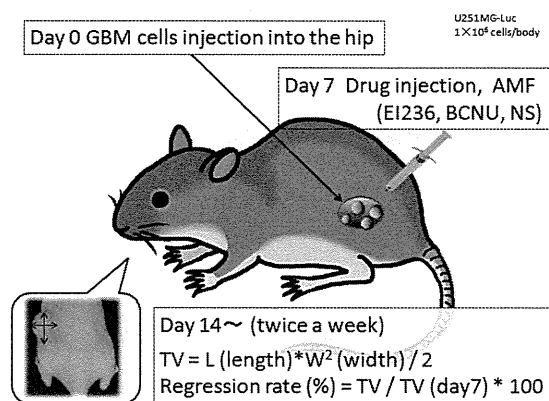


図 8 皮下モデルの実験計画

6 週齢マウスに tribromoethanol と isoflurane を用いて全身麻酔をかけた。37°C, 5%CO₂条件下で培養した U251 を 1.0×10⁶個/100 μl になるようにマトリゲル(CORNING LIFE SCIENCE)を用いて調整し, 1cc シリンジと 27G 針を用いてマウスの左臀部皮下に緩徐に 100 μl 注入した。逆流を防ぐために注入部位をピンセットで約5分間圧迫し, 逆流がないことを確認して処置を終了とした。注入1週間後に図8に示した方法で腫瘍径, 腫瘍体積を測定。腫瘍内に下記表の如く腫瘍体積の30%の volume で薬剤(EI236, BCNU: 各500mM)を注入した。EI236 注入群は交流磁場刺激 (Alternating Magnetic Field Stimulation; AMF)を加える群(330.8A, 280kHz, 30分)(A)と加えない群(B)に分類した。薬剤を注入しない群(C, D)については, EI236 の溶媒である生理食塩水を同量注入し, C 群には AMF 刺激を加えた。コントロール群として, GBM に対する局所治療の標準薬剤である BCNU: Carmustine 注入群(E)を作成した。

	EI236	AMF	BCNU	n	Cells
A	○	○	×	2	1*10 ⁶
B	○	×	×	2	1*10 ⁶
C	×	○ (Ns)	×	2	1*10 ⁶
D	×	×	×	2	1*10 ⁶
E	×	×	○	2	1*10 ⁶

注入後3-4日間隔で腫瘍体積を測定し, 薬剤注入前を基準とした体積の退縮率で腫瘍の大きさを比較した。

4、マウス脳内に GB 細胞を注入した脳内モデルの検討

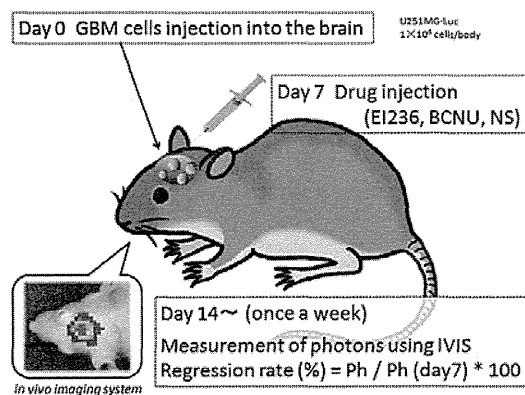


図9 脳内モデルの実験計画

a. IVIS (In Vivo Imaging System)
 脳内注入に使用する GBM 細胞株である U251 は, ホタルの成分 (Luciferase 遺伝子) を標識した細胞である。Luciferin をマウスの腹腔内に注入し, IVIS を用いて特殊な撮影を行うことで, 深部の脳腫瘍を視覚的に確認することに成功した。また, 大きさを光量 (photons/sec) に換算することで定量的に評価することも可能となった。本実験では, Luciferin 4.7g を phosphate buffered saline (PBS, Wako 10×D-PBS (-) 048-2985) で 150 μl に調製したものをマウス腹腔内に注入して光量の評価を行った。評価は1週間おきに施行し, Luciferin 注入後5分おきに測定を行い, 最大の光量を示した時点の数値で比較検討を行った。

b. 脳内モデルの作成

37°C, 5%CO₂条件下で培養した U251 を 1.0×10^6 個/10 μ l になるようにマトリゲル(CORNING LIFE SCIENCE)を用いて調製して使用した. 6 週齢マウスに tribromoethanol と isoflurane を用いて全身麻酔をかけた. 頭部固定器(SR-5M, NARISHIGE)を用いてマウスの頭部を固定し, 頭頂から頸部にかけて 2cm 程の皮膚切開をおいた. 顕微鏡下に骨膜を剥離し, Bregma を基準に前方 0-0.2mm, 側方 2mm の部位に穿頭器を用いて直径 0.5mm 程の burr hole を設けた. 50 μ l シリンジ(705N, HAMILTON)を burr hole より 3.5mm 垂直に刺入し, 調製した溶液を約 10 分かけて脳内に注入した. 逆流を防ぐため, 約 5 分針を静置した後, ゆっくりと針を抜去した. Burr hole を骨膜で被覆した後, 皮膚は全層 3-0 ナイロンを用いて縫合し終刀した. 処置後 6 時間マウスに異常反応がないことを厳重に監視した.

c. 薬剤刺激

細胞を脳内に注入 1 週間後に IVIS を用いて腫瘍生着を確認. 腫瘍作成部位と同じ座標へ EI236 (0.06mg/body), BCNU(mg/body), 溶媒である生理食塩水を注入する 3 群を作成した. 注入量は腫瘍作成時と同様 10 μ l とし, 約 10 分かけて脳内に注入した. 逆流を防ぐため, 約 5 分針を静置した後, ゆっくりと針を抜去した. 以後, 1 週間おきに IVIS を用いて腫瘍光量を測定し, 薬剤注入前を基準とした体積の退縮率で腫瘍の大きさを比較した.

5、EI236 ラット脳内注入後 MRI 撮影

MRI(1.5T, TOSHIBA)を使用し, EI236 (1mM)を脳内注入直後に撮影した. 画像は TI Weighted Image, T2 Weighted Image, T2 star Image の 3 つの sequence で行い, 必要に応じて axial, sagittal, coronal 画像の撮影を行った. 使用動物は画像条件の関係上, ラットを使用した. ラットを isoflurane を用いて全身麻酔し, 頭部固定器でラットの頭部を固定し, 頭頂から頸部にかけて 3cm 程の皮膚切開をおいた. 顕微鏡下に骨膜を剥離し, Bregma を基準に前方 0.2mm, 側方 3mm の部位に穿頭器を用いて直径 1.0mm 程の burr hole を設けた. 50 μ l シリンジ(705N, HAMILTON)を burr hole より 5.0mm 垂直に刺入し, EI236(0.6mg/body, 10 μ l)を約 10 分かけて脳内に注入した. コントロールは生理食塩水とし, 同量脳内に注入した. 逆流を防ぐため, 約 5 分針を静置した後, ゆっくりと針を抜去した. Burr hole を骨膜で被覆した後, 皮膚は全層 3-0 ナイロンを用いて縫合し終刀した. 術直後に MRI を撮影し, EI236 の局在判定を行った. 処置後 6 時間ラットに異常反応がないことを厳重に監視した.

6、EI236 脳内注入後の体内動態

EI236 を脳内に注入した後の体内動態を評価するために, EI236 に ¹⁴C を標識し, Autoradioluminography(ARG)を

用いて体内分布を評価した。¹⁴C-EI236 は比放射能 0.116MBq/mg, 放射化学的純度 98.69%, 投与量 10 μl, 投与濃度 0.12mg/body, 0.6mg/body として投与後 3.5-5.5 時間で体内分布を評価した。実験動物はラットを使用し, 薬剤の注入部位はMRI と同じ座標とした。

EI236 によるヒト GB の抗腫瘍効果をアポトーシスを用いて示すことで, 抗腫瘍効果の更なる検討を行った。U251, YKG, U87 を用いて実験を行い, 初期と後期のアポトーシスを起こしている細胞を計測し検討を行った。EI236 投与 3.8 μM, 7.5 μM, 15 μM, 30 μM の時のアポトーシスを起こしている割合は, 濃度依存的に増加することが示された。

C. 研究結果

1、EI236 の GB 細胞株に対する抗腫瘍効果の検討

I. XTT assay

YKG, U251, U87 の全ての細胞株において, EI236 は既存の標準治療薬剤である TMZ, BCNU と比較してより低い濃度で抗腫瘍効果を示した。特に治療域濃度である 15-120 μM での生細胞率は有意な差をもって EI236 の抗腫瘍効果が強く認められる結果となった。

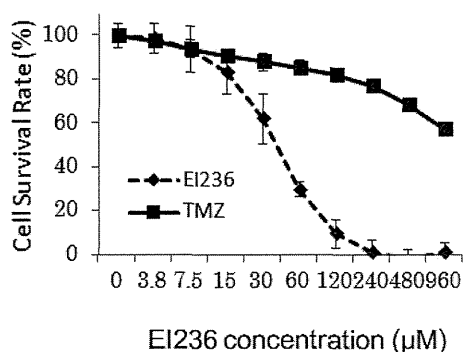


図 10 U251 に対する抗腫瘍効果

II. Flow Cytometry

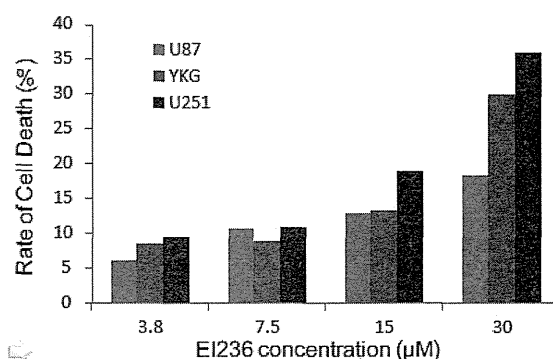
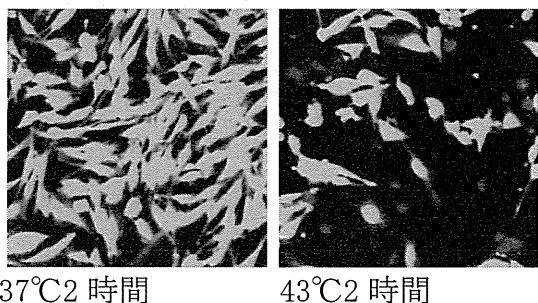


図 11 濃度依存性のアポトーシス増加

2、GB 細胞株, 正常脳細胞に対する温熱効果の検討

U251, マウスアストロサイトをそれぞれ 43°C 刺激を 30 分, 1 時間, 2 時間行い, 37°C をコントロールとして生細胞数の比較を行った。生細胞は Calcein AM (green), 死細胞の核は Propidium Iodide (red) で染色し蛍光顕微鏡で観察した。U251 は図 12 に示すように, 37°C では特に死細胞の増加は見られ

なかったが、43℃では有意に死細胞の増加と生細胞の減少を認めた。また、43℃では時間依存性に生細胞が減少することも示された。



37°C 2 時間

43°C 2 時間

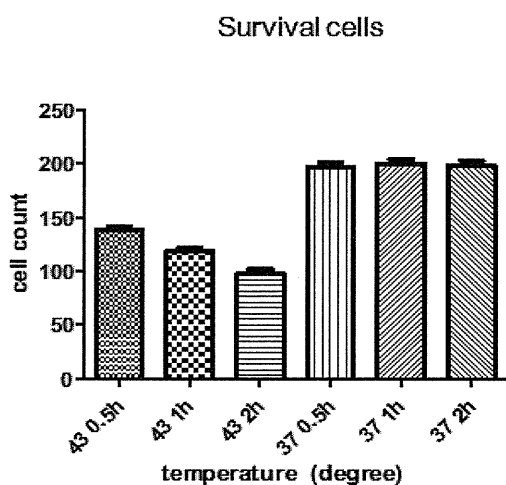


図 12 温熱刺激後の生細胞数

一方、マウスアストロサイトをを用いた検討では、37℃、43℃いずれも特に生細胞数に差は認められず、死細胞はほとんど見られなかった。腫瘍細胞の殺傷効果が増大する 43℃でも正常細胞には大きな影響がないことが示された。

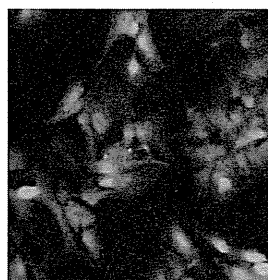


図 13
43℃温熱 2 時間
(astrocyte)

3、マウス臀部に GB 細胞を注入した皮下モデルの検討

マウスの臀部に GB を作成し、約 1 ヶ月間腫瘍の大きさを追跡した。腫瘍は刺激直後は一時的に大きくなる傾向を示した。刺激なし群は基準時の 130% 近くまで腫瘍の増大を認めた。AMF 刺激のみの群に関しても、刺激なしと比較して腫瘍が縮小する結果であった。EI236、BCNU の薬剤を加えた群は、両群ともほぼ同等の腫瘍縮小を認めた。EI236 に AMF 刺激を加えた群では、EI236 単独刺激群と比較して更なる腫瘍縮小を認めた。

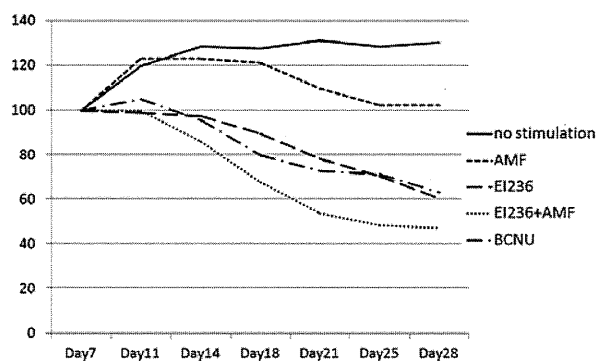


図 13 皮下モデルにおける腫瘍退縮率比較

4、マウス脳内に GB 細胞を注入した脳内モデルの検討

マウス脳内に脳腫瘍を作成し、薬剤刺激による腫瘍縮小を IVIS による光量換算で比較検討した。脳内への腫瘍生着については、IVIS での確認と同時に脳組織切片を作成し IVIS 所見との相関を検討した。HE 染色では脳実質内に異型性が強く細胞分裂の認める腫瘍像が確認され、GB に特徴的とされる pseudopalisading も認められた。Ki-67 染色を行ったところ、約 20% 近い陽性率を認め、組織所見からも腫瘍の生着が確認された。IVIS による評価は薬剤刺激後 1 週間おきに 3 週間施行した。現時点では EI236, BCNU, 刺激なし(溶媒である生理食塩水のみ注入)の 3 群での比較結果となる。刺激なし群では皮下モデル同様、徐々に腫瘍が増大する傾向であったが、EI236, BCNU で刺激した群は、双方とも有意に腫瘍が縮小する結果となった。また、皮下モデルと同様、EI236 と BCNU の比較では、腫瘍退縮率からみた抗腫瘍効果には有意な差はみられない結果となった。現在マウス脳腫瘍モデルに適した交流磁場装置を開発中であり、完成次第 AMF 刺激を印加した際の腫瘍縮小率についても検討する予定である。

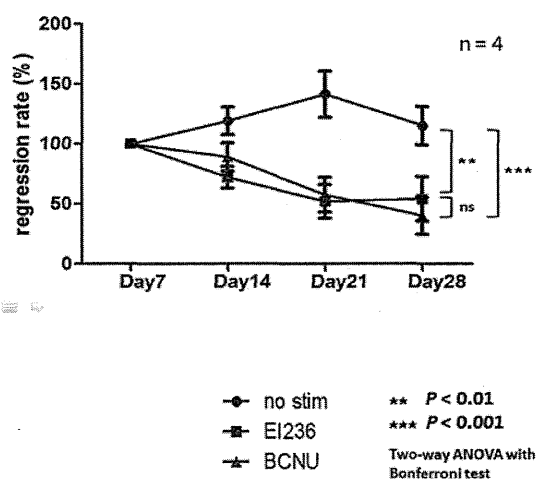


図 14 脳内モデルにおける腫瘍退縮率比較

5、EI236 ラット脳内注入後 MRI 撮影

EI236 は鉄成分を含有しており, T2WI, T2 star 画像で low intensity となることが我々の先行研究で判明している. また, 濃度依存性に intensity が変化するため, MRI で追跡可能な抗がん剤としても期待されている. ラット脳内に EI236 を注入し, 直後に MRI 撮影を行った. 注入部位に一致して T2, T2 star で low intensity を認めた.

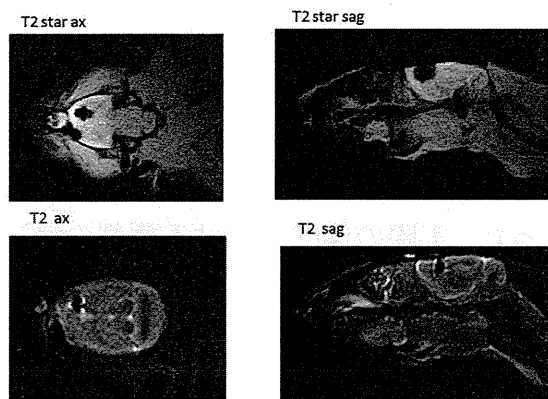


図 15 ラット脳内 EI236 注入後 MRI

6、EI236 脳内注入後の体内動態

EI236 を脳内に注入した場合, 一部は髄液へ移行して排泄されることが考えられるが, 注入後の体内動態について ^{14}C -EI236 を用いて ARG で評価検討を行った. 脳内注入後, くも膜下腔への薬剤漏出を認め, 脊髓に沿って髄腔内への移行を確認した. さらに, 腎臓と膀胱に強い集積を認め, 大部分が腎

で排泄されることが示唆される結果となった. また, 肝臓も淡く集積を認めており, 程度に差はあるが肝代謝も一部行われていることが考えられた.



Midline section

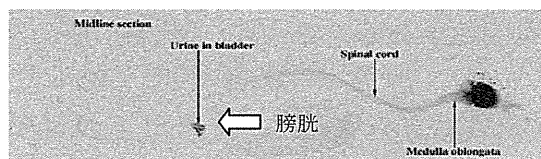


図 16 Autoradioluminography

D. 考察

今回の実験結果により、EI236 が既存の GB 治療薬である TMZ, BCNU よりも低い濃度で高い抗腫瘍効果を得られることが示された。特に TMZ の治療域とされる 50-100 μM で比較しても、EI236 が有意に効果が高い結果となっている。EI236 は抗腫瘍作用と温熱作用による相乗効果が期待される薬剤であるが、抗腫瘍作用のみに関しても、既存の薬剤を上回る効果を発揮する可能性がある。さらに、温熱作用について、過去の報告では 42.5 $^{\circ}\text{C}$ (42-43 $^{\circ}\text{C}$) を境界に、それ以上の温度で腫瘍殺傷効果を発揮すると言われている。そのため、今回は 43 $^{\circ}\text{C}$ を検討温度としたが、43 $^{\circ}\text{C}$ においても時間依存性に十分な腫瘍殺傷効果が示されることが分かった。さらに、同温度における正常脳細胞に対する悪影響について検討したが、正常脳細胞は 43 $^{\circ}\text{C}$ 刺激で特に生細胞数に変化は見られなかった。正常脳細胞は腫瘍細胞と違い、周囲の栄養血管が温度上昇時に拡張し熱エネルギーを逃がす作用を有している。そのため、腫瘍細胞と比較して正常脳細胞は熱耐性が高いとされる。腫瘍細胞に対する殺傷効果を有し、かつ正常脳細胞には悪影響がない温度が重要な境界ラインと考えられるが、43 $^{\circ}\text{C}$ で差が認められたことから、同温度が臨床応用に向けて重要な境界となることが示唆された。

これらの *vitro* の結果を元に、マウス、ラットを用いて実際に腫瘍を作成

した上で EI236 の効果を検討する実験を行った。臀部に腫瘍を作成した皮下モデルにおいて、刺激なし群、交流磁場刺激のみ群、EI236 投与群、BCNU 投与群、EI236+交流磁場刺激群の 5 群に分けて比較検討を行った。交流磁場刺激のみでもわずかな腫瘍縮小効果を得られたが、すでに交流磁場による GBM 腫瘍縮小について、前述のように NovoTTF という機器を用いた治療が海外では認可されている。条件は異なるにせよ、NovoTTF の効果を示唆する結果と考えられる。EI236 は BCNU とほぼ同等の抗腫瘍効果を示した。XTT assay では EI236 は BCNU と比較してより高い抗腫瘍効果を示していたが、実際の腫瘍モデルではほぼ同等の効果となった。実際の体内における薬剤の浸透率、濃度の違いなどが原因と考えられる。EI236 に交流磁場刺激を加えた群では、最も腫瘍が縮小する結果となった。しかし、交流磁場刺激による温度上昇は最高で 41.4 $^{\circ}\text{C}$ と 43 $^{\circ}\text{C}$ に満たない結果となっており、今回の結果は単に抗腫瘍効果に交流磁場自体による腫瘍縮小効果が加わった結果のみと考えることもできる。温熱作用を期待するのに必要な 43 $^{\circ}\text{C}$ に達することができなかつたため、現在動物モデルでも十分な温度上昇を得られる交流磁場機器を開発中である。

マウスの脳内に腫瘍を作成した脳内モデルでは、マウスが生存した状態で深部腫瘍の大きさを測定することが難点であった。我々はルシフェラーゼ遺伝子を導入した GBM 細胞株を用い

て実験を行い、IVIS で評価することにより、マウスを生存させたまま脳腫瘍を定量的に測定することに成功した。また、IVIS で視認できた腫瘍が実際に脳内に生着していることを組織所見と造影 CT でそれぞれ確認した。この方法を利用し、マウス脳内に生着した脳腫瘍を生存下で追跡し、腫瘍の退縮率の比較を行った。刺激なし群、EI236 投与群、BCNU 投与群の 3 群で比較検討した。なお、交流磁場刺激を印加した検討も行う予定であるが、2015 年 3 月時点で、マウス脳内で十分な発熱を得ることのできる交流磁場装置が完成しておらず、現在条件を検討した上で新たな機器を製造中である。3 週間上記 3 群を追跡した結果、皮下モデルと同様、EI236 投与群、BCNU 投与群では刺激なし群と比較して有意に腫瘍が縮小する結果となった。また、薬剤投与群間での腫瘍縮小には有意差がない結果であったが、この結果は皮下モデルにおける結果と一致するものであった。このことから、EI236 は薬剤のみの抗腫瘍効果としても、既存の GBM 局所治療薬である BCNU と同等の効果を得ることができると示された。

次に、EI236 の画像所見について検討を行った。EI236 は鉄成分を含むことから、MRI T2EI で low intensity に撮像される。濃度依存性に色調が変化することは、すでに先行論文で明らかとなっており、今後 MRI で追跡可能な抗がん剤という新たな側面も期待されている。しかし、脳内投与の場合、

微小な薬剤の移動が正常脳細胞に与える影響を考えると、EI236 の脳内局所投与後に MRI 撮影が可能であるかどうか議論が必要なところである。

脳内局所投与後の EI236 の体内分布について、 ^{14}C -EI236 を用いて ARG で評価した。注入時の髄液移行に伴い、脊髄周囲の髄腔内への薬剤移行が認められた。実臨床における手術時にも十分起こりうる現象と思われる。注入薬の一部は主に腎臓から排泄されることが示唆された。さらに、肝臓にも淡く集積を認めることから、全てが腎排泄ではなく、一部肝代謝も行われていることが示唆される結果であった。

E. 結論

脳腫瘍の中でも最も悪性度の高い神経膠芽腫(GB)に対し、最近は新たな抗がん剤や分子標的薬の臨床への導入が進み、治療の選択肢は増しつつある。しかし、これらの新たな治療をもってしても、その 5 年生存率は 20%以下と極めて不良である。EI236 は抗腫瘍効果のみならず、温熱作用の相乗効果を期待することができる画期的な薬剤であり、今回の報告により GB に対して *vitro*, *vivo* における効果が確認された。体内での発熱をきたすべく理想的な磁場機器を開発し、温熱作用を含め早期の結果を求めた実験進行が望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Tateishi K, Tateishi U, Nakanowatari S, Ohtake M, Minamimoto R, Suenaga J, Murata H, Kubota K, Inoue T, Kawahara N :
62Cu-Diacetyl Bis (N4-methylthiosemicarbazone) PET in human gliomas: Comparative Study with 18F-fluorodeoxyglucose and L-Methyl-11C-Methionine PET
Am J Neuroradiol 35 : 278-284, 2014
- Hino-Shishikura A, Tateishi U, Shibata H, Yoneyama T, Nishii T, Torii I, Tateishi K, Ohtake M, Kawahara N, Inoue T:
Tumor hypoxia and microscopic diffusion capacity in brain tumors: A comparison of 62Cu-Diacetyl-Bis (N4-Methylthiosemicarbazone) PET/CT and diffusion-weighted MR imaging
Eur J Nucl Med Mol Imaging. 41:1419-1427, 2014
- Tateishi U, Tateishi K, Hino-Shishikura A, Torii I, Inoue T, Kawahara N:
Multimodal Approach to Detect Osseous Involvement in Meningioma: Additional Value of (18)F-Fluoride PET/CT for Conventional Imaging
Radiology 273:521-528, 2014
- Suenaga J, Tateishi K, Takase H, Kanno H, Kawahara N: Oculomotor Nerve Schwannoma presenting as an Entirely Cystic Homogeneous Mass on Magnetic Resonance Imaging: Case Report
Austin J Neurosurg 1(3):5, 2014
- 川原信隆: 大孔-頸静脈部病変への到達法
脳神経外科ジャーナル 23 : 204-211, 2014
- 川原信隆: 後頭蓋窩底腫瘍(斜台部腫瘍、大孔部腫瘍、頸静脈孔腫瘍)神経症候群 (第2版)
別冊日本臨床 28:517-521, 2014

2. 学会発表

川原信隆：頭蓋底腫瘍の手術 -中頭蓋窩から側頭下窩腫瘍の手術-
第 41 回上中越脳神経外科医会
長岡, 2014. 6 (特別講演)

川原信隆：頭蓋底手術の基本と応用
第 12 回神奈川脳神経外科集談会
横浜, 2014. 7 (教育講演)

川原信隆：後頭蓋窩腫瘍に対する頭蓋底到達法
第 9 回香川大学手術セミナー
高松, 2014. 7 (招待講演)

川原信隆、大竹誠：頭蓋底 3D 脳神経外科領域における 3D 軽井沢セミナー
軽井沢, 2014. 10 (招待講演)

Kawahara N: Surgical Approaches to the Jugular Foramen Course in Microscopic and Endoscopic Approaches to the Skull Base
IRCAD Taichun, Taiwan, 2014. 9 (国際学会教育講演)

Kawahara N: Petrous Bone Malignancy Course in Microscopic and Endoscopic Approaches to the Skull Base
IRCAD Taichun, Taiwan, 2014. 9 (国際学会教育講演)

Nobutaka Kawahara: Skull Base Surgery for Infratemporal Fossa Tumors 4th
Japan Russia Neurosurgical Symposium, Hiroshima, 2014. 10 (国際学会シンポジウム)

川原信隆：後頭蓋窩腫瘍の手術-頭蓋底部を中心に-
第 18 回吉備脳神経外科手術フォーラム
岡山, 2014. 10 (特別講演)

川原信隆：ここまで変わった脳腫瘍手術
第 29 回熊本脳神経外科懇話会
熊本, 2014. 11 (特別講演)

川原信隆：頭蓋底悪性腫瘍の外科治療
第 22 回広島頭蓋底外科研究会
広島, 2015. 1 (特別講演)

H. 知的財産権の出願・登録情報

170, 1445-1453.

1. 特許所得

なし

Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci* 100, 2235-2241.

2. 実用新案登録

なし

Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2011). Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathol* 28, 177-183.

3. その他

引用文献

Dolecek, T.A., Propp, J.M., Stroup, N.E., and Kruchko, C. (2012). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* 14 Suppl 5, v1-v49.

Nakamura, H., Makino, K., Yano, S., and Kuratsu, J. (2011).

Epidemiological study of primary intracranial tumors: a regional survey in Kumamoto prefecture in southern Japan--20-year study. *Int J Clin Oncol* 16, 314-321.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Weistler, O., and Cavenee, W.K. (2007). WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System, 4th ed. IARC Press, Lyon, 2007.

Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*

Ichimura, K. (2012). Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas. *Brain Tumor Pathol* 29, 131-139.

Ichimura, K., Pearson, D.M., Kocialkowski, S., Backlund, L.M., Chan, R., Jones, D.T., and Collins, V.P. (2009). IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol* 11, 341-347.

Ichimura, K., Pearson, D.M., Kocialkowski, S., Backlund, L.M., Chan, R., Jones, D.T., and Collins, V.P. (2009). IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol* 11, 341-347.

- Ichimura, K., Pearson, D.M., Kocialkowski, S., Backlund, L.M., Chan, R., Jones, D.T., and Collins, V.P. (2009). IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol* *11*, 341-347.
- Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., *et al.* (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* *360*, 765-773.
- Weller, M., Stupp, R., Hegi, M.E., van den Bent, M., Tonn, J.C., Sanson, M., Wick, W., and Reifenberger, G. (2012). Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro-oncology* *14 Suppl 4*, iv100-iv108.
- Reifenberger, J., Reifenberger, G., Liu, L., James, C.D., Wechsler, W., and Collins, V.P. (1994). Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* *145*, 1175-1190
- Sanai, N., and Berger, M.S. (2008). Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery* *62*, 753-764; discussion 264-756.
- Sanai, N., Polley, M.Y., McDermott, M.W., Parsa, A.T., and Berger, M.S. (2011). An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *Journal of neurosurgery* *115*, 3-8.
- Oligodendroglioma: Long-Term Results of RTOG 9402. *J Clin Oncol.*
- Cairncross, G., Wang, M., Shaw, E., Jenkins, R., Brachman, D., Buckner, J., Fink, K., Souhami, L., Laperriere, N., Curran, W., *et al.* (2012). Phase III Trial of Chemoradiotherapy for Anaplastic Oligodendroglioma: Long-Term Results of RTOG 9402. *J Clin Oncol.*
- Ceysens, S., Van Laere, K., de Groot, T., Goffin, J., Bormans, G., and Mortelmans, L. (2006). [11C]methionine PET, histopathology, and survival in primary brain tumors and recurrence. *AJNR Am J Neuroradiol* *27*, 1432-1437
- Stummer W, et al (2006): Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma : a randomized

- controlled multicenter phase III trial. *Lancet Oncol*, 7, 392-401.
- Muragaki Y, Akimoto J, et al (2013): A phase II clinical study on photodynamic therapy (PDT) with talaporfin sodium and semiconductor laser in patients with malignant brain tumor. *J Neurosurg*, 119(4), 845-852.
- Westphal M, et al (2003): A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro oncol*, 5 (2), 79-88.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., *et al.* (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10, 459-466.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., *et al.* (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987-996.
- Wick W, et al (2012). Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly : the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 13, 707-715.
- Chinot OL, et al (2011) . AVAglio : Phase 3 trial of bevacizumab plus temozolomide and radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Adv Ther*, 28, 334-340.
- Weller M, Yung WK (2013) . Angiogenesis inhibition for glioblastoma at the edge : beyond AVAGlio and RTOG0825. *Neuro Oncol*, 15, 971.
- Muragaki Y, et al (2011). Phase I /IIa trial of autologous formalin-fixed tumor vaccine concomitant with fractionated radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma. *Clinical article. J Neurosurg*, 115, 248-255.
- Stupp R, et al (2012). Novo TTF-100A versus physician' s choice chemotherapy in recurrent glioblastoma : a randomized phase III trial of a novel treatment modality.

Eur J Cancer, 48, 2192-2202.

Harn GM, et al (1982). Hyperthermia and cancer. Plenum Press, New York, pp84.

Takahashi S, Tanaka R, Watanabe M, Takahashi H, Kakinuma K, Suda T and Yamada M (1999). Effects of wholebody hyperthermia on the canine central nervous system. Int

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 中山智宏
日本大学生物資源科学部獣医学科 教授

研究要旨：

抗癌活性を有する新規磁性体有機化合物（以下EI236）のラット脳内MRI画像所見を探索した。ラットの脳は、1.5T MRIで良好な画像所見が得られた。脳内に注入されたEI236は、T2、T2*強調画像において低信号を示し、特にT2*強調画像上でもっとも明瞭なコントラストが得られた。

EI236の組織内分布は、MRI画像上で確認することが可能であると判明したが、今後は薬剤注入時の出血との鑑別や経時的なEI236の脳内分布・拡散および時間的な残存を観察する必要がある。

A. 研究目的

本実験で用いる抗がん物質は、新規に開発されたシスプラチン類似有機化合物 (EI236) である。EI236は強い抗がん作用を有するだけでなく、強磁性を持つことから、磁石にて腫瘍へ薬剤を集積させることができる (Drug deliveryへの応用が期待される)。さらに高周波磁場下においては、EI236自体が発熱するため、がんに対して併せて温熱療法 (ハイパーサーミア) も行える画期的な化合物である。

神経膠芽腫 (glioblastoma) は、脳腫瘍の中で最も頻度が高い難治性悪性腫瘍で、2年生存率は約10%と言われている。本研究では神経膠芽腫の新しい治療法の開発にEI236に注目した。本実験計画では、その基礎的研究としてラット脳内にEI236を局所注入し、MRIを用いて薬物の画像性状、拡散・浸潤の状態を経時的に観察することを立案した。本研究は生体の脳内に局所注入されたEI236の分布および時間的な残存を観察することが目的である。

B. 研究方法

MRI撮像には、医療用の1.5テスラ装置を使用した (東芝メディカルシステムズ、Exelart Vantage)。MRI撮像には、2個のフェイスド・アレイコイルを使用し、T1、T2、T2*強調画像を撮影した。なお、各撮像方法におけるスライス厚は2.5mmに設定した。T2*強調画像のシーケンスは、東芝メディカルシステムズ社のFe_fcを使用し、TRを500ms、TEを15ms、マトリクスを320x320、FOVを10x10、フリップ角を30°、積算撮像回数を3に設定した。

正常ラットを塩酸メデトミジン (0.15mg/kg、0.15mL/kg)、ミダゾラム (2mg/kg、0.4mL/kg)、酒石酸ブトルファノール (2.5mg/kg、0.5mL/kg) を使用した三種混合麻酔薬を26G注射針で腹腔内投与し、全身麻酔を施す。測定は、薬物注入前、注入直後、24時間後、7日後にMRIを使用して、薬物の分布および残存を調べる。なお、EI236は磁性体であることから、物理特性により、MRI (T2*強調画像) において、in vitro で低信号に描出されることが分かっている。本実験はEI236 (1M) の注入量として10 μ L、20 μ L、およびコントロール (EI236の溶媒のみ) の3群 (ラットは各群10頭、SD (CD)、日本チャールスリバー) に分けて実施する。雄の個体を使用する理由は、雌と比較して体格が大きく、手術および脳内投与の手技に適しているからである。また、血流中にEI236の一部が注入されてしまうと、MRI画像上でEI236によるコントラストが低下し、結果に大きなバラツキが生ずると予想される。そのため、各群の頭数を10頭とした理由は、統計上、十分な有意差を得るために必要な頭数と判断したためである。

ラット頭部を頭部固定装置 (Narishige製 SR-5R) で固定し、皮膚を切皮する。マイクロドリルを用いて頭蓋骨頂部に直径2mmの穴をあけ穿頭する。その穴から頭蓋骨に対して直角に5mmの深さまで26GのHamiltonシリンジ刺入し、マイクロインジェクター (Narishige製 IMS-3) を用いて、EI236を10 (3.16mg)、20 μ L (6.3mg)、EI236の溶媒10ないし20 μ Lを注入する (表)。注入する際には、薬