

氏名(本籍)	なか い けい (茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第3816号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	コメットアッセイを用いた硼素中性子捕捉療法におけるDNA損傷の検討
主査	筑波大学教授 医学博士 原 晃
副査	筑波大学教授 博士(医学) 秋根康之
副査	筑波大学助教授 医学博士 徳植公一
副査	筑波大学講師 歯学博士 鬼澤浩司郎

## 論文の内容の要旨

### (目的)

悪性神経腫に対する硼素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy; BNCT) は、中性子照射前に硼素担体化合物を投与し、正常脳神経細胞への傷害を少なくして照射による治療効果を上げようとするものである。このBNCTにおける細胞障害の程度、殊にDNA損傷の程度を簡便に測定する方法をみつけることを目的としている。また、現在用いられている2種類の硼素担体化合物である sodium borocaptate (BSH) ならびに p-boronophenylalanine (BPA) のDNA損傷に与えるそれぞれの効果、および相乗効果についても検討した。

### (対象と方法)

細胞実験として9L gliosarcoma細胞、V79チャイニーズハムスターラット肺線維芽細胞を用い、これらの細胞を小チューブに充填し、回転照射装置を用いて日本原子力研究所4号炉において熱中性子照射を行った。硼素担体化合物を投与しない群、BSHあるいはBPAを<sup>10</sup>B濃度で5μg/g、10μg/g、30μg/gを単独前投与した群、さらにBSH10ないし30μg/gにBPA5～30μg/gを併用前投与した群で、細胞浮遊液をスライドガラス上にゲル包埋し、細胞膜溶解、アルカリ処理ののち(アルカリコメットアッセイ)あるいは中性のまま(中性コメットアッセイ)電気泳動を行って標本作製した。蛍光顕微鏡でDNAのfragmentationを観察し、画像解析によりそれぞれの細胞障害の程度をTail Moment(TM)として表し、アルカリコメットアッセイでは一重鎖切断(single strand break; ssb)および二重鎖切断(double strand break; dsb)を、中性コメットアッセイではdsbを評価した。動物実験ではFisher344ラットに9L gliosarcoma細胞を大腿部皮下に接種した皮下腫瘍動物モデルを用い、細胞実験と同様の実験を行った。

### (結果)

1) V-79細胞に対してBSHを投与した群では濃度依存性にTMすなわちDNA障害が中性子単独照射群に比較して増加したが、アルカリTMすなわちssbおよびdsbの総和は増加が頭打ちになるのに対して、中性TMすなわちdsbは直線的に増加した。また、BPAを投与した群ではその濃度による差は小さいもの

の TM の増加は BSH より大きく、アルカリ TM, 中性 TM いずれも直線的に増加した。

- 2) 9L 細胞に対して BSH を用いた BNCT 群ではアルカリ TM の増大は認められたが、中性 TM は増大傾向は認めるものの中性子線単独照射群と有意差は認めなかった。BPA 投与群ではアルカリ TM, 中性 TM とともに増大傾向を認めるものの、有意差は認められなかった。
- 3) 9L 細胞に対して BSH 10あるいは30 $\mu\text{g/g}$ に BPA を併用すると BPA の用量依存的にアルカリ TM は減少し、中性 TM は増加したが、その増加率は BSH 10 $\mu\text{g/g}$  群の方が大きかった。
- 4) 動物実験においては、硼素濃度および中性子線量が一定せず、傾向を示すことは困難であったが、BSH, BPA の併用によって dsb の増大が認められた。また、ガンマ線で行った同様の実験結果から、BNCT の方が dsb の割合が大きいことが示された。

#### (考察)

BSH は濃度勾配で細胞内に取り込まれ、BPA は能動輸送により腫瘍細胞内に選択的に取り込まれるとされている。また、現在臨床 BNCT で用いられている原子炉における放射線場は、硼素の非放射性同位元素  $^{10}\text{B}$  が中性子と反応し  $^{10}\text{B} (n, \alpha) ^7\text{Li}$  反応によって生じるアルファ線の硼素線量の他に、速中性子線、ガンマ線などを含む高 LET および低 LET の混在した照射である。線量評価は硼素の分布、線量の分布が関連しており複雑である。また施設間での生物学的効果の比較も困難である。本研究における手法は、簡便であること、細胞傷害の結果を総じて測定することが可能であることから、硼素担体化合物の細胞内動態などの結果を一元的に示す特徴があり、このため薬物動態、DNA 修復の検討などへの応用が可能であると考えられる。また、BSH と BPA を併用した実験では、BSH の濃度によって加えた BPA による影響が異なり、何らかの相互作用が存在することを示唆する。これは臨床照射前の線量評価シミュレーションにおいて BSH と BPA を併用する場合、単純にそれぞれの線量を加える仮定が適切でない可能性を示している。

#### (結論)

コメットアッセイは、簡便に細胞傷害を示す手法として、BNCT の評価に用いられ得る手法である。特に中性コメットは dsb を示し、有用である。硼素担体化合物の投与方法の検討や、新規硼素担体薬剤の開発、照射設備の検討などに応用可能と思われる。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

BNCT は悪性神経膠腫のみならず頭頸部腫瘍等その臨床応用範囲は広く、有用性をさらに高める開発が待たれている。本論文は BNCT における硼素担体化合物の特長と有用性について細胞実験ならびに動物実験で検証し、その評価方法としてコメットアッセイを用いたところに新知見がある。照射線量とコメットアッセイの結果が必ずしも比例しない等、アッセイ自体の不確実性が指摘されたが、また、今後細胞内の硼素濃度ならびに中性子線量分布の不均一性の解明を要するが、BNCT のさらなる発展にむけた極めて有用な論文と考えられる。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。