

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20591435

研究課題名（和文）Y-90 標識抗 CD20 抗体治療におけるリンパ球の放射性組織障害に関する検討

研究課題名（英文）Evaluation of radiotoxicity to lymphocytes after Yttrium-90-labelled monoclonal anti-CD20 antibody therapy.

研究代表者

渡邊 直人（WATANABE NAOTO）

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：40210926

研究成果の概要（和文）：悪性リンパ腫に対するY-90を用いた放射線内部療法の場合に、放射線の感受性が最も高いリンパ球にどの程度の放射線障害が出現するか評価した。DNAの損傷部位に集積する $\gamma$ -H2AX抗体をリンパ球に反応させると、実際にリンパ球の核内に焦点としてDNAの損傷部位が描画される。上記治療患者より採血して測定すると治療後にDNAの損傷部位が計測された。この方法は、上記治療の放射線障害評価法として一般に確立できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of our study was to evaluate the degree of radiotoxicity to lymphocytes in malignant lymphoma after Y-90 therapy using  $\gamma$ -H2AX foci immunodetection. This study focused on a patient who underwent Y-90 therapy for malignant lymphoma. Venous blood samples were collected from each patient. Lymphocytes were isolated from the blood samples and subjected to  $\gamma$ -H2AX immunofluorescence staining. The number of foci per lymphocyte nucleus was increased after Y-90 therapy.  $\gamma$ -H2AX foci immunodetection in lymphocytes may detect radiation-induced DNA damage associated with Y-90 therapy of malignant lymphoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：放射線医学・核医学

科研費の分科・細目：医歯薬学・放射線医学

キーワード：イットリウム90、標識抗体治療、リンパ球、放射性組織障害、小核試験

## 1. 研究開始当初の背景

（1）悪性リンパ腫の腫瘍細胞表面にCD20が発現しているB細胞リンパ腫に有効と考えられているY-90標識抗CD20抗体（ゼバリン）が欧米で先行して臨床で使用されていたが、本邦でも漸く保険認可された。

（2）Y-90標識抗CD20抗体を用いて、B細胞リンパ腫患者に放射線内部照射治療した場合には、臨床的に白血球数減少、血小板減少などの骨髄抑制を伴う様々な重大な副作用が生じる可能性があることが現在までに多数報告されている。

(3) 投与された放射性医薬品の Y-90 標識抗 CD20 抗体は、骨髄、血液中に体内分布する存在する Y-90 によって、血液中、骨髄中の様々な細胞が Y-90 から放出される  $\beta$  線の放射線の影響を受けて、放射線障害が起きると推定されている。しかし、それぞれの細胞自体には  $\beta$  線の放射線で、どのような副作用としての放射線障害が生じるのか、詳細については、現在まで詳細には解明されていないと考えられる。

(4) 保険適応のある B 細胞リンパ腫に対して、Y-90 標識抗 CD20 抗体を用いた放射線内部照射治療について、人において血液の中で最も放射線感受性が高いと考えられているリンパ球に対して、治療後にどの程度の放射性組織障害が出現するのか、小核試験を用いて基礎的に解明しようと考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 小核試験は、一般に発癌性や突然変異を評価することが可能な検査法で、幅広く用いられている。現在までに小核試験を用いた **In vitro** 及び **In vivo** のリンパ球の放射性組織障害に関する研究は数多くある。ホジキン病、食道癌などの放射線外部照射治療では、リンパ球の放射性組織障害が出現した報告がある。

(2) 甲状腺癌などの放射線内部照射治療では、リンパ球の放射性組織障害が出現した報告は極限られている。以前より我々は、放射性ヨード治療 (N. Watanabe, et al. J Nucl Med 1998;39:436-440) 及び放射性ストロンチウム治療 (N. Watanabe, et al. J Nucl Med 1998;39:2077-2079) に小核試験を用いて、リンパ球に対する放射性組織障害に関する検討を重ねて報告してきた実績がある。さらに、放射性ヨード治療 (N. Watanabe, et al. J Nucl Med 2004;45:608-611) の放射性組織障害では、小核試験を用いて評価すると、リンパ球の中では B 細胞が放射線感受性がより強いと報告した。

(3) 最近では、科学研究費補助金基盤研究 (C) (平成 17 年～平成 19 年) で、褐色細胞腫に対する I-131 MIBG 治療におけるリンパ球の放射性組織障害に関して、小核試験を用いて検討している。しかし、我々が用いてき

た小核試験は DNA の損傷を小核出現として間接的に検出する評価方法であり、DNA 損傷検出としては感度がやや低いと考えられる。

(4) 小核試験は、実際にリンパ球を培養液中で 4 日間細胞培養する必要がある。研究代表者の研究施設の移動 (富山大学医学部から金沢医科大学医学部に移動) により小核試験の細胞培養が簡便な手法として施行自体が困難になって、新しい評価法導入が必要な状況であり、新しい正確な簡便法の確立が待たれた。

(5) DNA 損傷検出の点ではより感度の高い手法であると考えられる  $\gamma$ -H2AX を用いる評価法を、新たな検討方法として確立を試みた。 $\gamma$ -H2AX は DNA 損傷部位に集積することが知られており、同蛋白質に対する抗体で細胞の免疫染色を行うと、DNA 損傷部位が核内の点として染色され、光学顕微鏡で DNA 損傷の個数を数えることができる。

(6) 上記方法を用いて、Y-90 標識抗 CD20 抗体における放射線内部照射治療前後の末梢血リンパ球に発生する DNA 損傷数を定量する。治療によるリンパ球の被曝線量は、正常リンパ球を外部照射してできる DNA 損傷数と照射量との関係から求めた標準線より推定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 基本的方法

① Y-90 標識抗 CD20 抗体を用いた放射線内部照射療患者で、治療患者より治療前後で採血する。ヘパリン含有採血管にて 10 ml 程度の血液を得る。

② 採血した血液から、リンパ球分離用溶液に血液を乗せて、1700 回転で 30 分間遠心分離する。遠心分離されて得られたリンパ球を PBS 溶液にて 3 回洗浄する。分離したリンパ球を特殊スライドガラス上にホルマリン固定する。

③ 固定したリンパ球に抗  $\gamma$ -H2AX 抗体で免疫染色し、光学顕微鏡下で DNA 損傷の個数

を dot として数える。DNA 損傷数を治療前後で比較する。

④正常者より採血し正常リンパ球を分離して、in vitro で段階的に X 線照射を行い、それぞれの DNA 損傷数を数える。X 線被曝と DNA 損傷数の相関から標準直線を作成し、被曝量を推定する。

⑤患者治療前後で採血して、分離したリンパ球に対して、上記方法でそれぞれの DNA 損傷数を数える。

## (2) 基礎的検討

正常者（7名）から採血して、In vitro で X 線外部照射する。それぞれ 0.5Gy, 1Gy, 1.5Gy, 2Gy, 3Gy を段階的に外部照射する。照射後、リンパ球を上記と同様な方法にてリンパ球を遠心分離する。分離したリンパ球に対して、同様な方法で DNA 損傷数を蛍光顕微鏡にて測定する。照射量と DNA 損傷数の関係を標準線として作製する。

## (3) 臨床的検討

Y-90 標識抗 CD20 抗体を用いた放射線内部照射療法の治療前、治療後 1 日の研究に同意した患者（1名）より採血した血液のリンパ球に対して、上記方法を用いて、蛍光顕微鏡にて DNA 損傷数計測を施行する。近年新たな分子標的治療薬が開発されて、当該患者に保険適応が認められたために、高額な治療費を要する Y-90 標識抗 CD20 抗体療法は著明に減少している状況にある。当該期間で検討する患者が激減して、予期できない限定される対象数となってしまった。

## (4) 追加臨床検討

上記状況が発生したために、急遽甲状腺癌に対する放射性ヨード I-131 用いた放射線内部照射療法の治療前、治療後 4 日の患者（4名）を追加検討した。研究に同意した患者より採血した血液のリンパ球に対して DNA 損傷数計測を同様に施行した。

## 4. 研究成果

- (1)  $\gamma$ -H2AX を用いる評価法を、新たな検討方法として確立：

今回の我々の検討にて、実際にリンパ球を用いて DNA の損傷程度を蛍光顕微鏡下で肉眼観察可能性であった。蛍光染色されたリンパ球の細胞の核内の点状の dot として DNA の損傷が計測可能であった。放射線内部照射治療でのリンパ球の放射性組織障害を評価する上で、リンパ球の DNA の損傷を肉眼的に簡便な方法として評価可能であった。（下図 1～2.）

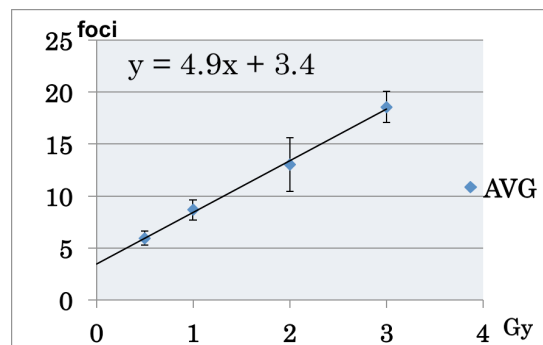
- (2) 基礎的検討：

分離リンパ球にそれぞれ 0.5Gy, 1Gy, 1.5Gy, 2Gy, 3Gy を段階的に X 線外部照射した結果、DNA 損傷の個数と外部照射数量との間には正の相関がみられた。従って、本研究のリンパ球に対する放射性組織障害の基本的評価法として、我々の新しい評価方法が確立できたと考えられる。

- (3) 照射量推定目的の標準線作成：

外部 X 線照射されたリンパ球の DNA 損傷の個数と外部照射数量との関係は正の相関から、DNA の損傷数を Y として、照射量と X とすると  $Y = 4.9X + 3.4$  として近似され求められた。（図 3）

図 3



(4) 臨床的検討：

Y-90 標識抗 CD20 抗体を用いた放射線内部照射療患者 2 例のみ検討可能だったが、その内、計測可能だったのは一例のみであった。治療後一日のみの採血可能であった。計測細胞 30 個の細胞当たりの平均では治療前の DNA 損傷の個数は 0 だった。治療後 1 日では 8 個で、DNA 損傷が有意に増加していることが解明された。上記標準線を基準に X 線外部照射を用いて推定する照射量は約 0.9Gy として求められた。

(5) 追加臨床的検討：

比較対象として、I-131 大量治療 4 名も検討したが、リンパ球 30 個の細胞当たりの平均では治療前の DNA 損傷の個数は 0 だった。治療後 4 日では平均 6.8 と計測され、DNA 損傷が有意に検出された。照射量は 0.7Gy として求められた。

(6) 従って、本研究のリンパ球に対する放射性組織障害の基本的評価法として、我々の新しい評価方法が確立できた。今後はさらに患者数を増やし検討することで、詳細な放射線内部照射療における生物学的被曝量評価が可能であると考えられる。

(7) 総括

DNA の損傷部位に集積する  $\gamma$ -H2AX を用いた方法により、Y-90 標識抗 CD20 抗体治療におけるリンパ球の放射性組織障害を評価することが可能であると考えられる。

図 1

蛍光顕微鏡下

倍率 1000 倍

DAPI (4'-6-diamino-2-phenylindole) にて蛍光染色。リンパ球の細胞核が染色されている。

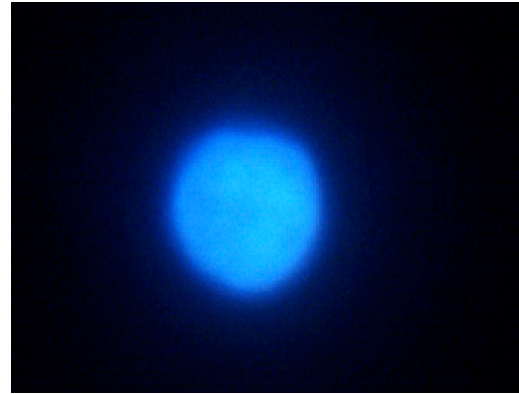
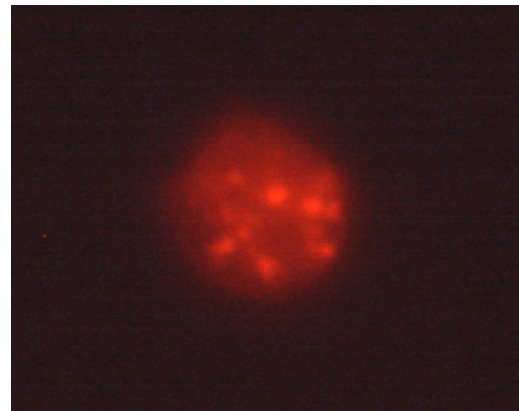


図 2

蛍光顕微鏡下

倍率 1000 倍

Anti-mouse IgG-TRITC にて蛍光染色。DNA の損傷部位がリンパ球の細胞核内の dot として染色されている。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計3件)

- ① 道合万里子、渡邊直人、高橋知子、谷口充、利波久雄、絹谷清剛。アイソトープ治療におけるリンパ球の放射線組織障害評価に関する検討。茨城県つくば市つくば国際会議場。第51回日本核医学会総会。平成23年10月29日
- ② 道合万里子、渡邊直人、高橋知子、谷口充、利波久雄、絹谷清剛。アイソトープ治療におけるリンパ球の放射線組織障害評価に関する検討。日本核医学会第73回中部地方会。富山県富山市富山大学医学部。平成23年6月25日
- ③ 道合万里子、高橋知子、谷口充、渡邊直人、利波久雄、絹谷清剛。アイソトープ治療におけるリンパ球の放射線組織障害評価に関する基礎的検討。第50回日本核医学会総会。埼玉県さいたま市大宮ソニックシティ。平成22年11月11日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 直人 (WATANABE NAOTO)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40210926

### (2) 研究分担者

絹谷 清剛 (KINUYA SEIGO)  
金沢大学・医学部・教授  
研究者番号：20281024

小川 心一 (OGAWA SHINICHI)  
富山大学・大学病院・助教  
研究者番号：60377265  
(H20→H22)