

2004 춘계학술발표회 논문집

한국원자력학회

피부암 유발 누드마우스 및 C57BL/6 mouse를 이용한 BNCT 효과

Effect of BNCT in hairless mouse and C57BL/6 mouse induced skin cancer

천기정, 유보경

한국 원자력 연구소, 동위원소 이용 연구부

### Abstract

We have carried out animal experiment with neutron irradiation since the completion of BNCT facility at HANARO research reactor recently. As a preliminary test regarding BNCT, skin cancer in hairless mouse was induced using two chemicals ; DMBA as an initiator and TPA as a promotor. Two chemicals were spreaded on the back below the head once a day during 15 weeks. Also skin cancer in C57BL/6 mouse was induced by transplanting with B-16 melanoma cells on the back below the head. BPA was administered by *i.p* injection with a dose of 750mg/kg body wt. 3hrs before irradiation and then BSH was administered by tail vein injection with a dose of 75mg/kg body wt. 1hr before irradiation. Neutrons were irradiated for 40 minutes in the BNCT facility. After that, we observed the cancer size with naked eyes and measured the size of it with ruler during the experimental period. BNCT treatment resulted in a decrease in the cancer size in the hairless mouse. However, the cancer in the C57BL/6 mouse did not show a decrease in size, even though it was smaller than that of the control. These results will make a great role for preclinical and clinical trials of BNCT. If the experiment is done in combination with various factors, better results can be obtained.

### 요 약

하나로 원자로에 BNCT시설이 완공되어 중성자 조사에 의한 동물실험을 실시할 수 있는 여건이 마련되었다. 따라서 BNCT 효능 예비실험으로 누드 마우스에 DMBA(dimethyl benzanthracene)를 initiator로 하고, TPA (12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate)를 promotor로 하여 1일 1회 등쪽 부위에 15주 동안 도포하여 피부암을 유발하고, 또한 C57BL/6 mouse를 이용하여 B-16

melanoma cell을 등쪽 피하조직에 이식하여 고형암을 유발한 후 붕소화합물 투여는 기존 붕소화합물인 BPA(750mg/kg body wt.)는 조사 3시간 전에 복강 주사하고, BSH(75mg/kg body wt.)는 조사 1시간 전에 꼬리 정맥에 투여하고 중성자 조사는 머리 방향으로 엎드린 자세로 40분간 조사하여 BNCT를 실시하였다. 누드 마우스는 1, 2주일간 피부암 크기 변화를 육안으로 관찰한 결과, 모든 실험군에서 눈에 띄일 정도의 암 크기의 감소를 확인할 수 있었다. 또한 C57BL/6 mouse는 고형암이 계속 모든 군에서 다소 증가함을 보였으나, 미조사군에 비해서는 암 크기의 증식이 다소 둔화됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 앞으로 BNCT를 위한 전임상 및 임상 연구에 많은 도움을 줄 것이며, 중성자 조사에 따른 여러 가지 요인을 검토 파악하여 실제 적용되면 현재의 결과보다도 훨씬 더 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

## 서론

붕소 중성자 포획법(BNCT, Boron Neutron Capture Therapy)은 과거의 방사선 치료법과 달리 정상세포에 적은 양의 방사선 영향만을 주고 암세포에만 선택적으로 제거할 수 있는 방사선 치료법이다(1,2.) BNCT의 장점은 보론 화합물의 존재하에만 적용할 수가 있다. 종양에 친화력이 있는 Boron10은 열중성자선을 조사하면 열중성자가 포획되면서 He과 Li으로 분해되고, 이 과정에서 방사생물학적 영향이 매우 큰 MeV 단위의 강력한 에너지를 가진 alpha선과 Li 그리고 prompt gamma 선이 나온다. B10은 중성자 흡수 단면적이 매우 크고, 알파 등의 원자핵은 전리작용이 매우 강하며 비적이 세포 반지름 정도이기 때문에 중성자 흡수 반응이 일어난 세포만 죽인다. 즉 이때 발생하는 에너지는 그 투과범위가 5내지 9 마이크로미터로 붕소를 함유하고 있는 종양세포에만 작용된다는 특징이 있다. 즉 붕소를 포함한 종양세포가 저속 중성자로 구성된 방사선에 노출되었을 때 종양이 함유하지 않은 주위 정상조직보다 선택적으로 많은 방사선을 조사 받게 된다는 것이다(3-7). 이러한 이유로 BNCT는 현재 여러 국가에서 연구가 되고 있으며, 우리나라 역시 BNCT의 활용을 위해 원자로내에 BNCT 시설이 완공되어 임상 활용을 위한 연구의 일환으로 우선 동물실험을 수행하였다. 본 실험은 누드마우스를 이용한 피부암과 C57BL/6 마우스에 B16-F10 melanoma 세포를 주입한 피부암 등 두 종류의 피부암을 실험 동물에 유발한 후 BNCT를 적용했을 때 암 크기 변화에 대한 예비 실험을 수행하여 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

생후 6주된 C57BL/6 수컷 생쥐는 바이오링크사로부터 제공받아 사용하였으며, 6

주 된 SKH-1 hairless mouse 수컷 생쥐는 Charles River Laboratories로부터 제공 받아 사용하였다. 일정 사육 조건 (온도  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 습도  $55\pm 5\%$ , 명암 교대시간 12시간)하에서 사육하였으며, 사료와 물은 자유 섭취토록 하였다.

## 2. 피부암 유발

### 2.1 DMBA-TPA two-stage mouse skin carcinogenesis

SKH-1 hairless mouse를 이용하여 Dimethylsulfoxide에 농도가 1mg/ml이 되도록 녹인 Dimethylbenzanthracene(DMBA)와 아세톤에 녹인 2uM의 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)를 머리 뒤쪽 피부에 매일 1회씩 15주 이상을 도포하여 피부암을 유발시켰다.

### 2.2 B16-F10 melanoma 세포 배양 및 고형암 유발

B16-F10 melanoma 세포는 American Type Culture Collection(ATCC)로부터 분양 받아 사용하였으며, 세포주기는  $14\pm 2$ 시간이다. 세포 배양액은 10% FBS와 penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 ug/ml을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)를 사용하였다. 배양된 세포는 2-3일마다 0.23% trypsin-0.03% EDTA 용액을 이용하여 계대 유지하였다.

고형암을 유발하기 위하여 생리 식염수로 희석된 B16-F10 melanoma 암세포  $1\times 10^5$  cells(200ul)를 평균 무게  $25.0 \pm 1.0$  g의 6-7 주령된 숫컷 C57BL/6 생쥐의 등쪽에 피하 이식하여 피부 고형암을 유발시켰다.

## 3. 보론 화합물 투여

보론 화합물은 BPA(Boronophenylalanine)와 BSH(Boron sulfhydryl hydride)를 사용하였다. BPA는 750mg/kg body wt.의 용량을 조사 3시간 전에 복강 주사로 단회 투여하였고, BSH는 75mg/kg body wt.의 용량으로 조사 1시간 전에 꼬리 정맥에 단회 투여하였으며, BPA와 BSH 병행 투여는 BPA를 복강 주사 투여한지 2시간 후에 BSH를 꼬리 정맥주사 투여하고 1시간 경과한 다음 중성자를 조사하였다.

## 4. 중성자 조사 및 암크기 변화 관찰

중성자 조사는 하나로 연구용 원자로의 BNCT 시설을 이용하여 beam collimator에서 중성자를 조사하였는데 이때 중성자 flux는  $1.036739\text{E} + 09$ 였다. 동물 조사 시 조사 자세는 엎드린 자세로 머리를 정면으로 한 상태에서 1% chloral hydrate(Fluka)용액으로 마취시켜 마취상태를 유지하면서 중성자를 40분간 조사하였다. 중성자 조사 후 사육실내에서 키우면서 피부암 크기 변화를 육안과 동시에 직접 측정하여 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

BNCT는 오랫동안 암 치료법으로 고려되어 온 방사선 치료법이다[8]. 선진외국에서는 지난 40년 동안 기초 연구를 수행하였으며, 1990년대 이르러서는 미국, 유럽을 위시한 많은 국가에서 임상 실험을 시도하여 현재에 이르고 있다. 특히 일본의 Hatanaka(1991)는 malignant glioma와 Mishima등(1989)은 melanoma에 BNCT를 도입하여 100명이상의 환자를 치료하였다고 보고하였다[9, 10]. 이러한 BNCT의 암 치유 효과를 관찰하기 위한 기초 예비 실험으로 피부암 유발시킨 누드마우스를 하나로 원자로내 BNCT시설에서 40분간 중성자 조사한 후 암 크기 변화를 관찰한 결과, 그림 1과 같이 BPA 투여군에서 1주일 후에 암 크기가 다소 줄어드는 것을 알 수 있었으며, 2주일 후에도 육안으로 암 크기가 상당히 감소되어 있는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 그림 2(BSH투여군) 및 그림 3(BPA + BSH 투여군)에서도 비슷한 양상을 보여주고 있다. 암 유발 동물에 대한 BNCT 효능 예비실험으로 첫 번째 시도한 실험 결과로 BNCT를 위한 동물의 기초 자료로 비교적 양호한 결과를 나타내 주고 있다. 또한 C57BL/6 mouse의 고형암을 유발한 후 같은 방법으로 BNCT를 실시하여 암 크기 변화를 직접 측정된 결과는 그림 4와 같다. 그림 4에서와 같이 중성자 조사 후 암 크기가 감소되지 않고 계속 다소 증식되는 경향이 있었으나, BNCT를 적용한 실험군은 미조사군에 비해 암 크기 증가가 다소 둔화됨을 보여주고 있다. 본 실험에서는 여러 조건이 적용되지 않고 보론 화합물을 한농도로 한정하여 투여하고 40분이라는 조사시간만을 고려하여 실험하였다. 이러한 결과는 여러 가지 조건을 감안하지 않은 것으로서 BNCT에 대한 미래의 좋은 결과를 얻을 수 있는 초석이 될 수 있으며, 본 BNCT시설에 대한 희망을 안겨 줄 수 있는 결과로 해석할 수 있다. 앞으로 여러 가지 요인을 참작하고 정확한 dosimetry가 되어 암 부위만을 정교하게 조사할 수 있는 기술을 확보한다면 지금보다 훨씬 좋은 임상 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

- [1] D.N. Slatkin, A history of boron neutron capture therapy of brain tumours. Postulation of a brain radiation dose tolerance limit. *Brain* 114, 1609 - 1629(1991)
- [2] R. Barth, A.H. Soloway, R.G. Fairchild and R.M. Brugger, Boron neutron capture therapy for cancer. Realities and prospects. *Cancer* 70, 2995 - 3007(1992)
- [3] Y. Mishima, C. Honda, M. Ichihashi, H. Obara, J. Hiratsuka, H. Fukuda *et al.*, Treatment of malignant melanoma by single thermal neutron capture therapy with melanoma-seeking  $^{10}\text{B}$ -compound. *Lancet* 12, 388 - 389(1989)
- [4] H. Hatanaka and Y. Nakagawa, Clinical results of long-surviving brain

tumor patients who underwent boron neutron capture therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 28, 1061 - 1066(1994)

[5] J.A. Coderre, G.M. Morris, P.L. Micca, C.D. Fisher and G.A. Ross, Comparative assessment of single-dose and fractionated boron neutron capture therapy. *Radiat. Res.* 144, 310 - 317(1995)

[6] J.A. Coderre, E.H. Elowitz, M. Chadha, R. Bergland, J. Capala, D.D. Joel *et al.*, Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme using *p*-boronophenylalanine and epithermal neutrons: trial design and early clinical results. *J. Neurooncol.* 33, 141 - 152(1997)

[7] M. Chadha, J. Capala, J.A. Coderre, E.H. Elowitz, J. Iwai, D.D. Joel *et al.*, Boron neutron-capture therapy (BNCT) for glioblastoma multiforme (GBM) using the epithermal neutron beam at the Brookhaven National Laboratory. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 40, 829 - 834(1998).

[8] Farr LE; Sweet WH; Robertson JS; Foster CG; Locsley HB; Sutherland DL. Neutron capture therapy with boron in the treatment of glioblastoma multiforme. *Am. J. Radiol*, 71: 279-91(1954)

[9] Hatanaka H. Boron neutron capture therapy for tumors. In: Karim, ABMF; LawE, eds. Glioma. Berlin: Springer Verlag, 233-49(1991)

[10] Mishima Y; Honda C; Ichihashi M; Obara H; Hiratsuka J; Fukuda H; Karashima H; Kobayashi T; Kanda K; Yoshino K. Treatment of malignant melanoma by single thermal neutron capture therapy with melanoma-seeking <sup>10</sup>B compound. *Lancet II*, 338-339(1989)



조사 전

1주 경과

2주 경과

그림 1. 피부암 유발 누드 마우스의 BPA-BNCT 효능 예비 관찰



조사 전

1주 경과

그림 2. 피부암 유발 누드 마우스의 BSH-BNCT 효능 예비 관찰



조사 전

1주 경과

2주 경과

그림 3. 피부암 유발 누드 마우스의 BPA+BSH-BNCT 효능 예비 관찰

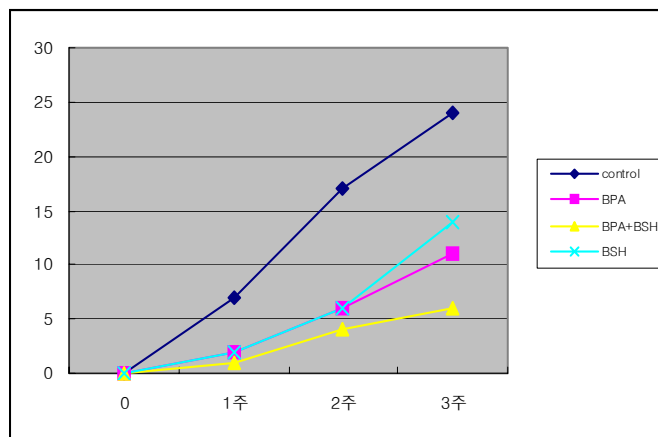


그림 4. B-16 melanoma cell 주입 C57BL/6 mouse의 암크기 변화