

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

ナノメディシン研究

研究課題：ホウ素ナノデバイス型中性子
捕捉治療

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中村 浩之

平成21（2009）年4月

目 次

I. 総括研究報告

ホウ素ナノデバイス型中性子捕捉治療に関する研究 ----- 1

中村 浩之

II. 分担研究報告

1. ホウ素ナノデバイスの脳腫瘍適応に関する研究 ----- 8

松村 明

2. ホウ素ナノデバイスの中皮腫適応に関する研究 ----- 12

李 千萬

3. ホウ素ナノデバイスの膀胱がん適応に関する研究 ----- 16

鈴木 実

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 20

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 23

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進事業）
総括研究報告書

ホウ素ナノデバイス型中性子捕捉治療に関する研究

研究代表者 中村 浩之 学習院大学理学部・教授

研究要旨

中性子捕捉療法（BNCT）は、低エネルギーである熱・熱外中性子がホウ素との核反応により生ずる強力な粒子線を用いるものであり、低毒性のホウ素化合物を用いるため化学療法のような重篤な副作用はなく、また放射線療法のような照射場内の正常組織へのダメージもきわめて低い治療法で、治療後の患者への負担が極めて小さい特徴をもつ。現在、世界的にBNCT用加速器の開発が行われており、近い将来病院併設型加速器中性子捕捉療法が実現することにより本治療法は一般的放射線療法の1つとなると考える。本研究では、BNCT適応拡大を指向し、各腫瘍に最適なホウ素ナノデバイスの開発研究を進めてきた。本年度は、粒子サイズと脂質構造に飽和結合だけでなく、不飽和結合を導入した様々なホウ素脂質を合成し、それらのホウ素ナノデバイスの血中滞留性、生体内安定性について確立した。MRI造影剤内封によるリアルタイムで生体内分布追跡可能なホウ素ナノデバイスを開発し、生きたマウスの腫瘍内ホウ素ナノデバイス集積性をMRIで追跡した結果、生体内で安定に腫瘍に集積することを確認した。また、膀胱内直接注入できるトランスフェリン結合型ホウ素ナノデバイスを開発するとともに、ホウ素ナノデバイスの原料であるホウ素脂質の安定供給体制を整えた。

研究分担者

松村 明 筑波大学大学院人間総合科学研究科・
教授、筑波大学付属病院副院長
李 千萬 大阪大学医学部付属病院未来医療
センター・助教
鈴木 実 京都大学原子炉実験所・特任准教授

A. 研究目的

BNCTは、低エネルギーである熱・熱外中性子がホウ素との核反応により生ずる強力な粒子線を用いるものであり、がん部位へホウ素デリバリーと中性子線照射のダブルターゲティングが可能である。使用するホウ素化合物は低毒性であることから化学療法のような重篤な副作用はなく、また放射線療法のような照射場内の正常組織へのダメージもきわめて低

い治療法で治療後の患者への負担が極めて小さい特徴をもつ。高い治療効果を得るためには、腫瘍内ホウ素濃度が30 ppm以上、腫瘍/血液内ホウ素濃度比が5以上を満たす薬剤の開発が目標とされている。本研究ではアクティブターゲティング型多機能性ホウ素ナノデバイスを開発し、BNCT適用拡大を検討する。具体的には、ホウ素ナノデバイスにターゲティング機能リガンドを導入し、膀胱がん、脳腫瘍、肝臓がん、中皮腫を対象とし、これらの動物モデルで腫瘍内ホウ素濃度と治療効果に関して調べ、上記に示した目標値をクリアする適正なホウ素ナノデバイスを検討するとともに、BNCTへの実用化を目指す。

研究開始初年度である20年度は、(1)ホウ素脂質とPEG化リン脂質、コレステロールの構成比を制御することで、血中滞留性の高い安定なホウ素ナノデバイスの最適化、(2)膀胱がんターゲティングトラ

ンスフェリン結合型ホウ素ナノデバイスの確立、(3)MRI造影剤内封によるリアルタイムで生体内分布追跡可能なホウ素ナノデバイスの開発、(4)ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスの構成成分・ヒアルロン酸脂質開発のため合成条件の確立を目的として研究を進めた。

B. 研究方法

1. ホウ素脂質の検討

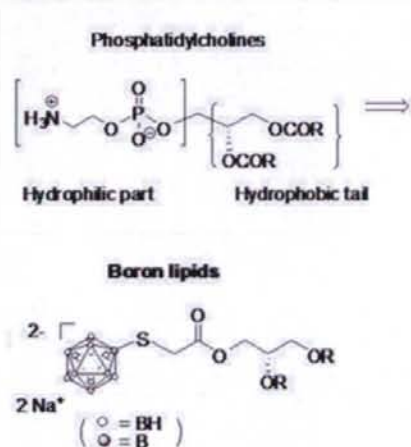


図1 ホウ素脂質の構造

生体リン脂質の構造に着目し、その水溶性部位にホウ素イオンクラスターを導入することでホウ素脂質の開発を行った。脂肪酸部位には、飽和脂肪酸であるステアリル酸(DSBL)だけでなく、不飽和脂肪酸であるオレイン酸(DOBL)、エライジン酸(DEBL)、オクタデク-9-イノイル酸(DTBL)から誘導したホウ素脂質の合成を検討した。

2. 血中滞留性の高いデバイスの最適化

これらの合成したホウ素脂質、DSBL・DOBL・DEBL・DTBLの組成比をDSPCに対し5~25%の範囲でホウ素ナノカプセル(組成比:ホウ素脂質/DSPC/コレステロール/PEG-DSPE=0.1/0.9/1.0/0.1)を調整しマウスを用いて血中滞留性を調べた。

3. 膀胱がんターゲットトランスフェリン結合型ホウ素ナノデバイスの確立

トランスフェリンと活性型 PEG2000-DSPE 脂質をあらかじめ結合させ、DSBL25%ホウ素ナノデバイス(組成比:ホウ素脂質/DSPC/コレステロール/PEG-DSPE=0.1/0.9/1.0/0.1)に対し、ポストインサージョン法によりトランスフェリンの導入を検討した。

4. RI 造影剤内封によるリアルタイムで生体内分布追跡可能なホウ素ナノデバイスの開発

ホウ素ナノカプセルの血中安定性とEPR効果による腫瘍内集積性の可視化を目的とし、MRI 造影剤マグネスクープを封入したホウ素ナノデバイスを作成し、colon 26 マウス大腸癌細胞を移植した Balb/c マウスに対して、Gd 濃度 2400ppm で投与し、生きたマウス腫瘍内分布をMRI 測定により追跡した。

5. ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスの開発

ヒアルロン酸(1,100kDa)に対し、エチレンジアミンを重量比1:1で混合し、得られたカチオンニックヒアルロン酸をホウ素ナノデバイスと様々な混合比で処理した後、その膜ゼータ電位を測定した。

C. 研究結果

1. ホウ素脂質の検討

飽和脂肪酸から誘導されるステアリル酸(DSBL)を効率よく合成する手法を確立した。最後の合成変換過程であるシアノエチル基の脱離反応には、従来用いていた水酸化テトラアンモニウムからナトリウムt-ブトキシドに変えることでイオン交換ステップを経ることなく最終生成物を高収率で得ることができ、大量供給のための製造プロセスの改良に成功した。また、飽和脂肪酸であるステアリル酸(DSBL)だけでなく、不飽和脂肪酸であるオレイン酸(DOBL)、エライジン酸(DEBL)、オクタデク-9-イノイル酸(DTBL)の合成も同様のプロセスにより効率良く合成することができた。

合成したホウ素脂質 DSBL から調整したホウ素ナノ

デバイスの形成を電子顕微鏡分析により解析した。その結果、図2に示すように100nmのサイズのホウ素ナノデバイスが形成されていることが確認された。

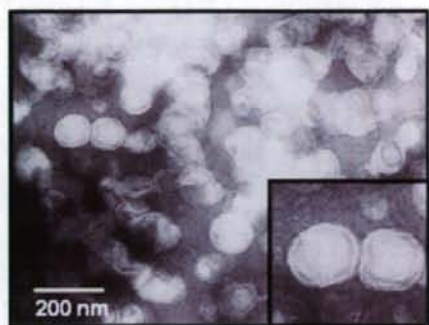


図2 ホウ素ナノデバイスの電子顕微鏡写真

2、血中滞留性の高いデバイスの最適化

合成したホウ素脂質、DSBL・DOBL・DEBL・DTBLから調整したホウ素ナノカプセルのマウス大腸癌細胞 colon26 に対する細胞毒性を調べた。図3に示すように、50%細胞増殖阻害濃度はいずれのホウ素脂質ナノカプセルにおいても、10 mM 以上であり、極めて細胞毒性が低いことが分かった。

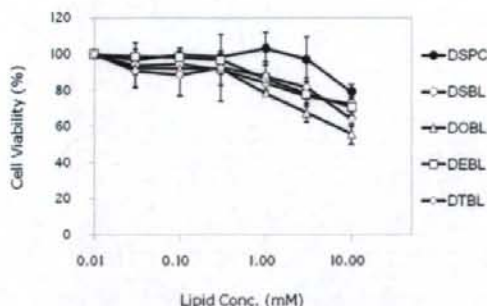


図3 ホウ素ナノデバイスの細胞増殖阻害曲線

また、ホウ素脂質 DSBL を 5~25%の混合比で調整した PEG 修飾ホウ素ナノカプセルに関して、マウスを用いた血中滞留性を図4に示した。DSBL15%以下の混合比で調整したホウ素ナノカプセルにおいて良好な血中滞留性を見出した。

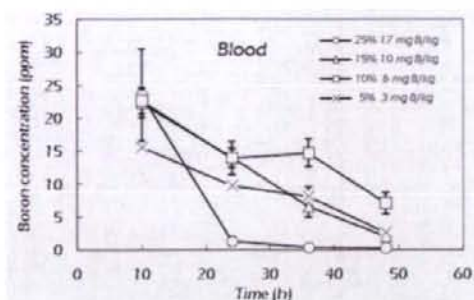


図4 DSBL-ホウ素ナノデバイスの血中濃度変化

次に、DSBL・DOBL・DEBL・DTBL をそれぞれ10%から調整したホウ素ナノカプセルについて、血中濃度の時間変化を調べたところ、図5に示すように不飽和結合を有するホウ素脂質から調整したホウ素ナノカプセルより飽和脂質を有する DSBL から調整したホウ素ナノカプセルの方が血中滞留性が良いことが分かった。

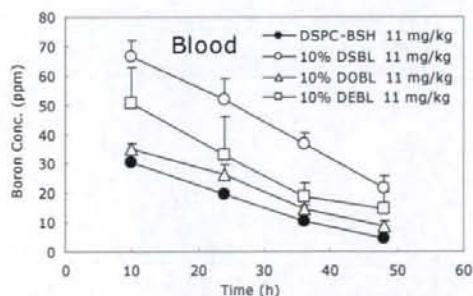


図5 不飽和ホウ素脂質から調整したホウ素ナノデバイスの血中濃度変化

そこで、ホウ素薬剤 BSH 内封 PEG リポソームを調整し、10%DSBL ホウ素ナノカプセルと同じホウ素濃度で (11 mg/kg) colon 26 移植マウスに投与し、腫瘍内のホウ素濃度を測定した。結果を図6に示したが、いずれも36時間で腫瘍内集積量が最大となった。また興味深いことに、BSH 内封 PEG リポソームよりも10%DSBL ホウ素ナノカプセルの方がホウ素集積量は高く、本研究のホウ素ナノカプセルがホウ素デリバリーに有効であることが示された。

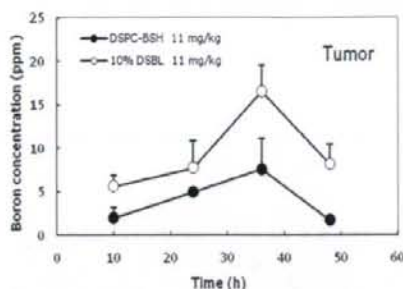


図6 BSH内封PEGリポソームとホウ素ナノデバイスの腫瘍内ホウ素集積性の比較

3. 膀胱がんターゲットイングトランスフェリン結合型ホウ素ナノデバイスの確立

BSH内封PEG-DSPCリポソーム、BSH内封DSBLホウ素ナノデバイス、トランスフェリン結合型DSBLホウ素ナノデバイスをそれぞれ34 mgB/kg, 40 mgB/kg, 25 mgB/kgの濃度でcolon 26移植マウスに投与し、時間経過による腫瘍内ホウ素濃度変化を調べた。図7に示すように、トランスフェリン結合型DSBLホウ素ナノデバイスにおいて、他のリポソームよりも投与ホウ素濃度が低いにもかかわらず、高濃度で腫瘍内に集積していることが分かった。さらに、48時間後においても腫瘍内ホウ素濃度が増加していることが分かった。

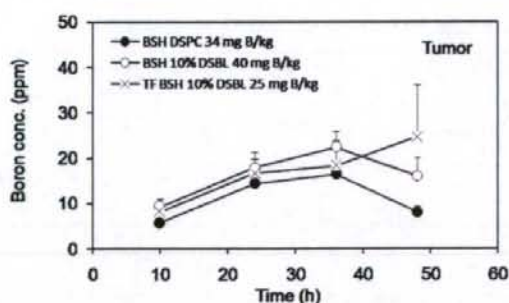


図7 トランスフェリン修飾型ホウ素ナノデバイスの腫瘍内ホウ素集積

4. RI造影剤内封によるリアルタイムで生体内分布追跡可能なホウ素ナノデバイスの開発

MRI造影剤マグネスクープを封入したホウ素ナノ

デバイスのcolon 26移植マウス投与後の時間経過によるコントラスト効果を図8に示す。マグネスクープは投与後速やかに排出されるのに対し、ホウ素ナノカプセルは血中において安定であるため内封されたマグネスクープは排出されずEPR効果により腫瘍周辺に集積していることが分かる。また、腫瘍内においてコントラスト効果が得られたことから、マグネスクープを内封したホウ素ナノデバイスは、マウス血中内で安定に存在し、EPR効果により腫瘍に蓄積していることが明らかとなった。また、投与後36時間で最もコントラスト効果が見られていることから、図5や図6でも見られた36時間後にホウ素集積濃度が最大になることをMRI追跡でも確認された。

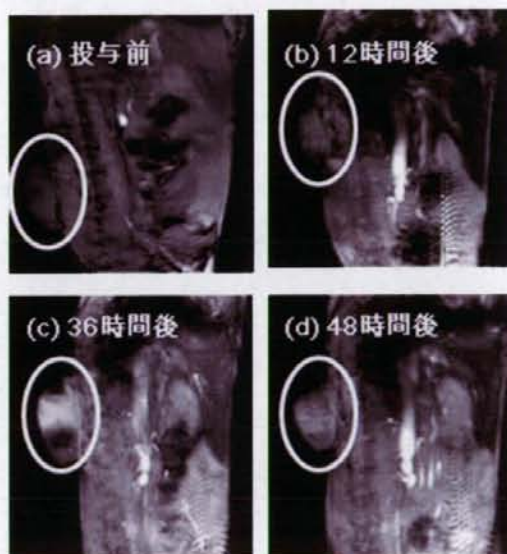


図8 MRIによるマウス腫瘍内造影効果

5. ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスの開発

ヒアルロン酸のゼータ電位はナトリウム塩で-16.8 mV、エチレンジアミンをヒアルロン酸に対して0.3当量加えたもので、-18.6 mVであった。一方、エチレンジアミンを1当量以上加えたものは、ゼータ電位の値は一定せず、もっとも低いもので-38.8 mVであった。この際、遠心分離を行うと沈殿が生じたことからヒアルロン酸に対しエチレンジアミンが0.5当量以上の場合、会合体が生成する可能性が示唆さ

れた。実際に、ヒアルロン酸-エチレンジアミン (1:1) 複合体をホウ素ナノカプセルに作用させると沈殿が生じた。

D. 考察

ホウ素脂質は不飽和脂肪酸を導入することで、分子間相互作用を高め血中内でより安定なホウ素ナノカプセルが得られると予想したが、実際は飽和脂肪酸から誘導した DSBL が最も適していることが分かった。また、リン脂質 DSPC に対するホウ素脂質 DSBL の混合比も血中滞留性に大きく影響し、検討の結果 DSBL を 10~15% 混合することで最も効率のよいホウ素デリバリーが行えることが分かった。さらに、ホウ素薬剤内封型 DSPC リポソームと我々のホウ素薬剤のリポソーム膜封入型のホウ素ナノカプセルを比較すると、図 6 にも示したように、明らかに腫瘍へのホウ素デリバリーには我々が開発したホウ素ナノカプセル型デバイスが優れていることが明らかとなった。また、がんへのアクティブターゲティングとしてトランスフェリンをリガンドとして導入したホウ素ナノデバイスを作成した。トランスフェリンは鉄を運ぶ分子量 88kDa のタンパクでヒト血液において、2.5 g/mL 含まれている。多くのがん細胞はこのトランスフェリンレセプターが高発現していることから、トランスフェリンをリガンドとして導入したホウ素ナノデバイスは腫瘍血管から染み出し、レセプターを介したエンドサイトーシスによってがん細胞内に取り込まれることが期待される。実際に、本研究で図 7 に示したように、トランスフェリン修飾した場合、48 時間経っても腫瘍内ホウ素濃度が増加していることから、アクティブターゲティングにより効果的にホウ素をがん細胞内に送達できることを見出した。これは、悪性度が高いほどトランスフェリンレセプターが高発現していることが報告されている膀胱がんへの適応が有望であることを示唆するものであり、21 年度は実際の膀胱がんモデルマウスでホウ素集積性と中性子照射実験を行い、高い治療効果を得ると同時に、臨床応用を検討したい。

一方、MRI 造影剤マグネスクープを封入したホウ素ナノデバイスでは、リアルタイムでホウ素蓄積量を追跡することが可能となることが示唆された。このことから、腫瘍内への集積性の診断だけでなく、中性子照射のタイミングをあらかじめ、MRI によって見積もることができる。現在の BNCT では、¹⁸F-BPA を用いた PET 診断によりホウ素薬剤の集積率を計算し、各患者に適した照射時間を算出している。本研究の結果は、この照射計画が、MRI によって行える可能性を示唆するものである。

ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスは、エチレンジアミンの添加量を 0.5 当量以下に抑えることが重要であることが分かった。アスベストにより発症する中皮腫の患者数は今後増加することが予想される。中皮腫に高発現している CD44 のリガンドがヒアルロン酸であることから、ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスは、非常に有効な治療法を提供できると考えられるため、中皮腫モデル動物での有効性を明らかにしてゆきたい。

E. 結論

本年度は、生体内で安定なホウ素ナノデバイスの最適化はほぼ確立し、またトランスフェリン修飾型ホウ素ナノデバイスによるアクティブターゲティングの具体的成果も得た。一方で、CD44 をターゲットとしたヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスの基礎的物性データも得た。21 年度は、京都大原子炉ならびに原研 JRR4 がいずれも稼働することから、各分担研究者と討議を重ね、動物の中性子照射実験による有効性データの検証と臨床化への道筋を立てたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Development of Boron Nano Capsules for Neutron

- Capture Therapy. H. Nakamura, M. Ueno, H. S. Ban, K. Nakai, K. Tsuruta, Y. Kaneda, A. Matsumura, **Appl. Radiat. Isotope**, in print.
- 2) がん中性子捕捉療法と次世代ホウ素デリバリーシステム. 中村浩之、臨床血液、49(5) 294-301 (2008).
 - 3) Synthesis of *closo*-Dodecaboryl Lipids and their Liposomal Formation for Boron Neutron Capture Therapy. H. Nakamura, J.-D. Lee, M. Ueno, Y. Miyajima, H. S. Ban, **NanoBiotechnology** (invited), 3(2), 135-145 (2008).
 - 4) Development of Boron Delivery System for Neutron Capture Therapy of Cancer. H. Nakamura, **Progress in Drug Delivery System XVII**, 19-24 (2008).
 - 5) Liposomal Boron Delivery System for Neutron Capture Therapy. H. Nakamura, **YAKUGAKU ZASSHI** (Review) 128, 193-208 (2008).
 - 6) Synthesis and Characterization of Polar Functional Group Substituted Mono- and Bis-(*o*-carboranyl)-1,3,5-triazine Derivatives. C.-H. Lee, G. F. Jin, J. H. Yoon, Y. J. Jung, J.-D. Lee, S. Cho, H. Nakamura, S. O. Kang, **Tetrahedron Lett.** 49(1), 159-164 (2008).
 - 7) 中性子捕捉治療に向けたホウ素ナノキャリア設計. 中村浩之、機能性DDSキャリアの製剤設計、監修：岡田弘晃、シーエムシー出版、279-288 (2008).
2. 学会発表
- 1) Boronic Acid as an Alternative Functional Group for Drug Design. H. Nakamura, Exploratory Workshop-BioBor, 招待講演、Lodz (ポーランド) 2008年5月9-11日
 - 2) ホウ素を基軸とした創薬アプローチ. 中村浩之、第12回がん分子標的治療研究会総会、招待講演、東京、2008年6月26-27日
 - 3) ホウ素ナノカプセルの開発と中性子捕捉治療効果. 中村浩之、上野学、潘鉉承、中井啓、金田安史、松村明、第24回日本DDS学会、東京、2008年6月29-30日
 - 4) Boron Nano Capsules for neutron Capture Therapy of Cancer. H. Nakamura, M. Ueno, H. S. Ban, K. Nakai, K. Tsuruta, Y. Kaneda, A. Matsumura, XXIII International Congress on Organometallic Chemistry, Rennes (フランス)、2008年7月13-18日
 - 5) Boronated Liposomes for Neutron Capture Therapy of Cancer. H. Nakamura, M. Ueno, H. S. Ban, K. Nakai, K. Tsuruta, Y. Kaneda, A. Matsumura, 11th Liposome Research Days Conference, 横浜、2008年7月19-22日
 - 6) DDS型ホウ素デリバリーシステムの現在地. 中村浩之、第5回日本中性子捕捉療法学会学術大会、教育講演、倉敷、2008年7月25-26日
 - 7) ホウ素リポソームの血中安定性向上を目指した新規ホウ素脂質の開発. 上野学、野村直裕、潘鉉承、中村浩之、第5回日本中性子捕捉療法学会学術大会、倉敷、2008年7月25-26日
 - 8) 中性子捕捉がん治療のための次世代ホウ素デリバリーシステム. 中村浩之、第17回DDSカンファレンス、特別講演、静岡、2008年9月20日
 - 9) Design and Synthesis of *closo*-Dodecaborate Lipids: Application to Liposomal Boron Delivery System for Neutron Capture Therapy. H. Nakamura, International Conference on Boron Chemistry IMEBORON XIII, 招待講演、Platja d'Aro (スペイン) 2008年9月21-25日
 - 10) Development of Boron Nano Capsules for Neutron Capture Therapy. H. Nakamura, M. Ueno, H. S. Ban, K. Nakai, K. Tsuruta, Y. Kaneda, A. Matsumura, 13th International Congress on Neutron Capture Therapy, Florence (イタリア)、2008年11月2-7日
 - 11) BNCTにおける薬剤開発の現状と展望. 中村浩之、第2回放射線・粒子線応用研究会、招待講演、東京、2008年11月13日
 - 12) 腫瘍血管新生を標的とした創薬アプローチ. 中村浩之、第2回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム、特別講演、岡山、2009年2

別紙 3

月 5 日

- 13) ホウ素中性子捕捉療法～次世代の細胞選択的放射線療法を目指して～ 中村浩之、学際生命科学東京コンソーシアムシンポジウム 第1回 『限りなく広がる「いのち」の科学』招待講演、東京、2009年3月14日
- 14) 中性子捕捉療法のためのホウ素デリバリーシステムの開発. 上野学、「多分野で応用される新規DDS技術」、院生シンポジウム、日本薬学会第129回年会、京都、2009年3月26-28日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進事業）
分担研究報告書

ホウ素ナノデバイスの脳腫瘍適応に関する研究

研究分担者 松村 明 筑波大学人間総合科学研究科・教授

研究要旨

中性子捕捉療法は、細胞選択性を有する放射線治療の概念であり、近年、原子炉中性子線源を用いた臨床研究から、実用化に向けた研究段階にある。実用化に必要な装置のひとつは医療に用いることが可能な加速器中性子線源である。さらに新規ホウ素化合物の治療用医薬品としての開発が今後の適応拡大、治療効果の向上のためには必須である。悪性脳腫瘍におけるホウ素中性子捕捉療法の臨床研究は、本邦が世界に先がけて良好な成績を報告したものの、なお治癒には至っていない。悪性脳腫瘍の浸潤性及び放射線抵抗性によるものであり、ホウ素化合物代謝への介入的治療効果改善の基礎的検討、さらに浸潤型脳腫瘍モデルの作成と、ホウ素ナノ粒子の薬物動態、治療成績検討を見据えた実験系の確立を目指す。

A. 研究目的

神経膠腫に代表される悪性脳腫瘍は、その浸潤性と放射線抵抗性により、手術およびこれに継続した放射線治療、化学療法をもってしても治癒は得難い。ホウ素中性子捕捉療法は、浸潤する腫瘍細胞に対して選択性をもち、臨床研究ではその生存期間の延長効果が本学を含め、本邦でも数施設から報告されている。しかし、いずれも治癒には至らず、再発や播種を生じている。ホウ素化合物の細胞選択性をさらに高めることが実用できればさらに効果のたかい中性子捕捉療法を提供できるものと考えている。新規ホウ素化合物を用いた実用化研究を行うに当たり、現時点でのおもな問題点は、①現行のホウ素化合物のみでは、腫瘍/正常ホウ素濃度比率が十分でないこと、②このような検討を行う場合に、浸潤能を有するラットやマウスの脳腫瘍モデルが十分確立されていないこと、③さらに浸潤部分での薬物動態を腫瘍塊をわけて解明することが難しいことである。そこで、本研究平成20年度においては、thiol化合物であるグルタチオンを用いたホウ素化合物代謝の修飾により、腫瘍/血液比の向上を図る手段の探索、

これまで確立したラット脳腫瘍モデルを中心に、ホウ素化合物の検出方法を合わせて検討した。また、新規ホウ素ペプチドの合成についても検討した。

B. 研究方法

B1. ホウ素化合物代謝

中性子捕捉療法のホウ素キャリアーとして現在臨床で用いられる薬剤は、Sodium borocaptate (BSH) および Boronophenylalanine (BPA) の2つである。このうち BSH は、血液脳関門 (blood brain barrier, BBB) による腫瘍選択性に優れることから主に脳腫瘍に使われてきたが、細胞周期依存性が低いことが明らかになった (Yoshida et. al. Cancer Letters 187 (2002) 135-141) ことなどから、近年 boronophenylalanine (BPA) との併用など、使用範囲が広がりつつある。しかし、BPA に比べ取り込みの総量が少ないという欠点を持つため、我々は BSH の特徴である sulfhydryl 基に着目し、代表的 sulfhydryl 化合物であるグルタチオン合成阻害剤を併用することにより、BSH の取り込みを増強させることができないかを検討した。

下肢に皮下腫瘍を作成した担癌ラット (フィッシャー

344) の腹腔内に BSO を 5 nmol/kg 投与し、同時に尾静脈より BSH を、100mg/kg 投与して、3, 6, 12 時間後に、血液、脳、皮膚、筋肉、肝臓、腎臓を採取し、それぞれに含まれるホウ素量を ICP 発光分光分析装置を用いて測定する。BSO を投与せず、BSH のみ投与した群をコントロールとして比較検討する。

sulfhydryl 基を含まないホウ素化合物である $B_{12}H_{12}-Na_2$ 、 $B_{12}H_{11}-Na_2$ についても、BSO 投与群、非投与群について同様の実験を行い、比較検討する。

B2. ラット脳腫瘍モデルを用いたホウ素ナノデバイスの動態検討

ラット脳腫瘍モデルは、Wister rat および Fisher rat に定位的に脳表から 4mm の深さで細胞懸濁液 1×10^6 の細胞を注入し作成する。7-10 日後に、脳圧亢進症状の出る前に、ホウ素化合物を尾静脈より静注し、経時的に組織を抽出する。抽出組織は、あらかじめ重量を測定し、ホウ素濃度および蛍光強度などの測定に供する。

B3. ホウ素ペプチドを有するナノデバイスの開発
細胞内移行ドメイン TAT 配列およびホウ素アミノ酸 BPA を複数結合したりポペプチドを合成し、これを含有した liposome の作成を行った。合成経路は次図に示すごとく、TGS-RAM resin 上での固相法を用いた合成である。Liposome 作成は、脂質薄膜法により作成し、エクストルーダーでサイジングを行った。

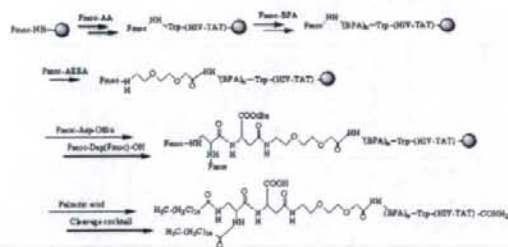


Fig1. 合成経路

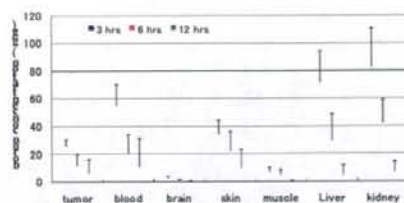
C. 研究結果

C1 ホウ素化合物代謝

BSH については、BSO 投与群、非投与群で Fig. 2 に示すようにホウ素取り込みに非常に大きな差が見られた。Mann-Whitney の U 検定の結果、脳の 6 時間、12 時間後

のサンプルを除いたすべての組織で、 $p < 0.001-0.05$ で有意に BSO 投与群の取り込みが多かった。

a. BSO 投与群 ホウ素濃度経時変化



b. BSO 非投与群 ホウ素濃度経時変化

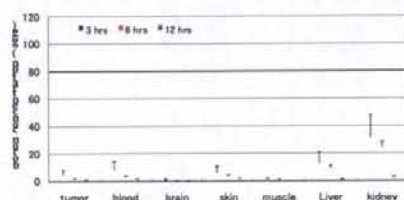


Fig. 2 BSO 投与群(a)、非投与群(b)のホウ素取り込みの違い

一方、sulfhydryl 基を含まないホウ素化合物である $B_{12}H_{12}-Na_2$ 、 $B_{12}H_{11}-Na_2$ では、BSO 投与群、非投与群にほとんど差は認められなかった (Fig. 3)。図は、投与後 3 時間の皮下腫瘍内ホウ素濃度の比較である。

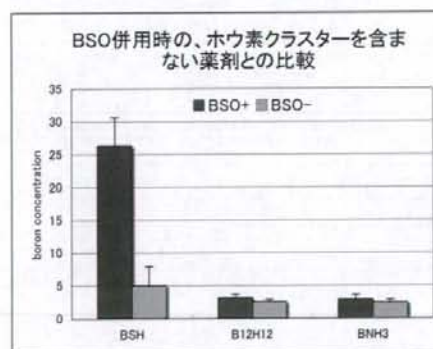


Fig. 3 sulfhydryl 基を含まないホウ素化合物との比較

C2. ラット脳腫瘍モデルを用いた動態検討

9L 細胞を Fisher rat に移植した群では、全例で平均 47mg の腫瘍形成を認めた。また C6 細胞を Wistar rat に移植した群では、全例で平均 41mg の腫瘍形成をみとめ、一部浸潤性に発育を示した。これらに対して、ホ

ウ素化合物を投与し、組織を抽出し、ICP-AES を用いた手法で組織内の平均ホウ素濃度測定を行うことができた。Fig4 に正常脳と腫瘍におけるホウ素濃度測定結果の一例を示す。腫瘍/正常比が測定できることが示された。

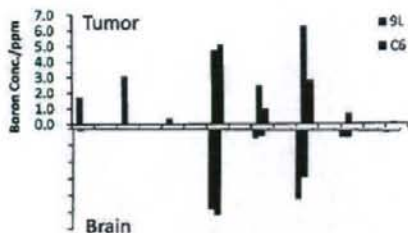


Fig. 4 ラット脳腫瘍および正常脳ホウ素濃度の例 (9L および C6、それぞれにホウ素化合物は異なる)

C3. ホウ素ペプチド含有Liposome の開発

作成したLiposome は液相クロマトグラフィーによって分離精製を行った。HPLC および MALDI-TOFMS、¹H NMR analysis (JEOL JMN-AL400)によって合成および liposome の形成を確認した。

D. 考察

D1 ホウ素化合物代謝

先行研究から、*In vitro* の系では、BSO を併用することにより BSH 取り込みは増加し、中性子照射による細胞障害も増強される (Yoshida et. al. Cancer Letters 215 (2004) 61-67) ことが明らかになっている。一方 *in vivo* の系では、BSH と BSO の同時投与により、生体内ホウ素濃度が長時間、高濃度のまま維持されることが明らかになった (Yoshida et. al Cancer Letters, 263 (2008) 253-258)。さらに、sulfhydryl 基を含まないホウ素薬剤ではこの現象は見られないことから、BSH の代謝に、合成アミノ酸である BSO とグルタチオンが関わる何らかのメカニズムが存在すると思われる。このメカニズムを明らかにすることにより、BNCT の治療効果改善が期待できると考えている。

D2. ラット脳腫瘍モデルを用いた動態検討

ラットモデルは、安定して麻酔、定位脳手術が可能で比較的容易に作成できる反面、動物実験に必要な化合物がマウスに比較して約 10 倍必要となり、合成条件によっては実験に支障をきたす。今回の検討では C 6 により浸潤性が認められたことにより、さらに *in vivo* selection を介して高浸潤株の回収を試みるとともに、浸潤部分のホウ素動態の検討を行う予定である。具体的には、蛍光を有するホウ素ナノデバイス、たとえば蛍光修飾リポソームを投与したのち、凍結切片による検討を行う予定である。またマウス同系セルラインによる脳腫瘍、高浸潤株の取得に向けた検討を引き続き行う。

D3. ホウ素ペプチド含有Liposome の開発

合成法が確立したところで今後、生物学的検討を行うべく。細胞毒性試験、動物を用いた急性期毒性試験を予定する。

E. 結論

現段階では、動物実験の基礎的検討であるが、現行ホウ素化合物の腫瘍選択制向上、浸潤脳腫瘍モデルにおけるホウ素動態いずれも臨床に結びうる要素であると考え。現時点で動物に中性子照射可能な施設が稼働していないため、今後の中性子照射実験に向けた安全性試験、治療実験に向けてさらに検討を進める。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Shirakawa M, Yamamoto T, Nakai K, Aburai K, Kawatobi S, Tsurubuchi T, Yamamoto Y, Yokoyama Y, Okuno H, Matsumura A: Synthesis and evaluation of a novel liposome containing BPA-peptide conjugate for BNCT. Proc. 13th International Congress on Neutron Capture Therapy "A new option against cancer", pp. 212-214 (2008)

- 2) Shirakawa M, Yamamoto T, Nakai K, Aburai K, Kawatobi S, Tsurubuchi T, Yamamoto Y, Yokoyama Y, Okuno H, Matsumura A.: Synthesis and evaluation of a novel liposome containing BPA-peptide conjugate for BNCT. *Applied Radiation and Isotope*, (2009 in printing)
- 3) Yamamoto T, Nakai K, Matsumura A: Boron neutron capture therapy for glioblastoma. *Cancer letters* 262, 143-52 (2008)
- 4) Yoshida F, Yamamoto T, Nakai K, Kumada H, Shibata Y, Tsuruta W, Endo K, Tsurubuchi T, Matsumura A: Combined use of sodium borocaptate and buthionine sulfoximine in boron neutron capture therapy enhanced tissue boron uptake and delayed tumor growth in a rat subcutaneous tumor model. *Cancer letters* 263, 253-8(2008)

2. 学会発表

- 1) Nakai K, Nakamura H, Chunman Lee, Kaneda Y, Matsumura A: Development of Boron Nano-Capsules for Neutron Capture Therapy. Particle 2008USA, Orlando, USA, 10-14 May 2008
- 2) 白川真, 山本哲哉, 中井啓, 油井研一, 鶴淵隆夫, 横山祐作, 奥野洋明, 松村明: Synthesis and evaluation of a novel liposome containing BPA-peptide conjugate for BNCT. 第5回日本中性子捕捉療法学会学術大会, 倉敷, 2008年7月.
- 3) Shirakawa M, Yamamoto T, Nakai K, Aburai K, Kawatobi S, Tsurubuchi T, Yamamoto Y, Yokoyama Y, Okuno H, Matsumura A.: Synthesis and evaluation of a novel liposome containing BPA-peptide conjugate for BNCT. 13th International Congress on Neutron Capture Therapy (Florence, Italy, UK), 2008年11月
- 4) 白川真, 山本哲哉, 中井啓, 横山祐作, 奥野洋明, 松村明: ホウ素中性子補足療法 (BNCT) における新規薬剤ホウ素リポソームの開発と評価. 日本薬学会第129年会, 京都, 2009年3月
- 5) 中井啓, 鶴淵隆夫, 白川真, アレクサンドルザボロノフ, 山本哲哉, 松村明: ホウ素中性子捕捉療法のための新規ホウ素ポルフィリンを用いた細胞内動態の基礎的検討. 日本薬学会第129年会, 京都, 2009年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進事業）
分担研究報告書

ホウ素ナノデバイスの中皮腫適応に関する研究

研究分担者 李 千萬 大阪大学医学部附属病院未来医療センター・助教

研究要旨

ホウ素中性子捕捉療法（BNCT）は、ホウ素製剤の細胞選択性に依存した細胞選択的放射線治療である。本研究では、BNCT を労働災害疾患として社会的関心が高い中皮腫への画期的治療法とするために、中皮腫を標的とした分子標的ナノデバイス製剤の開発研究を進めてきた。本年度は、中皮腫細胞上に発現する CD44 を標的とし、CD44 のリグンドであるヒアルロン酸を用いたカチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソームの合成法を確立した。カチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソームの中皮腫細胞への結合性を検討することで、カチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソーム中のヒアルロン酸の至適分子量ならびに至適カチオン化率の検討を行った。また、ヒト中皮腫細胞株を用いたマウスモデルを作製し、*in vivo* の実験体制を整えた。

ドマウスならびに CB-17/SCID マウスの右胸腔内（右壁

A. 研究目的

中皮腫は、アスベスト暴露後に発症する腫瘍で、労働災害疾患としてだけでなく、2005 年の工場周辺住民への被害報告以降非常に社会的関心の強い、悪性腫瘍である。治療は化学療法を基本とする集学的治療を行うが、手術可能例は少なく、また、放射線療法は肺臓炎を惹起することから限定されており、予後不良である。これまでに京都大学原子炉実験所にて中皮腫に対するホウ素中性子捕捉療法（BNCT）が 1 例行われており、呼吸器障害などを認めなかったことから、中皮腫に対する画期的治療法となる可能性が分担研究者である鈴木らにより報告されている。本研究においては、中皮腫に対する BNCT の効果を向上させ、BNCT の中皮腫への適応拡大を進めるために、中皮腫細胞を標的とした分子標的ナノデバイス製剤の開発研究を行う。

B. 研究方法

1. 中皮腫マウスモデルの作製

5 x 10⁶ 個のヒト中皮腫細胞株 MSTO-H211 を ICR ヌー

側胸膜）に打ち込み、マウスの経過を観察した。

2. カチオン化ヒアルロン酸（カチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソーム）の合成

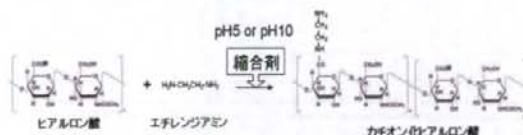


図1 カチオン化ヒアルロン酸の合成方法

ヒアルロン酸とホウ素ナノデバイスとの電荷的結合のために、エチレンジアミンを用い、カチオン化ヒアルロン酸を合成し、そのゼータ電位を Sysmex 社製ゼータサイザーナノを用いて測定した。

3. カチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソームの中皮腫細胞への結合性

カチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソームの中皮腫

細胞への結合性を定量化するために、フルオロセインアミン標識ヒアルロン酸ナトリウムと中皮腫細胞との結合のカチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソームによる阻害の程度を Flow cytometry を用い測定した。

C. 研究結果

1. 中皮腫マウスモデルの作製

腫瘍細胞注入後約 28 日で、マウスは悪液質の状態にあり、胸腔内を観察すると、右胸壁に沿う腫瘍と縦隔リンパ節への転移を著明に認め、進行したものでは左側胸腔や横隔膜への浸潤を認め、臨床で遭遇する中皮腫の進展様式と酷似したモデルを作製できることを確認した。

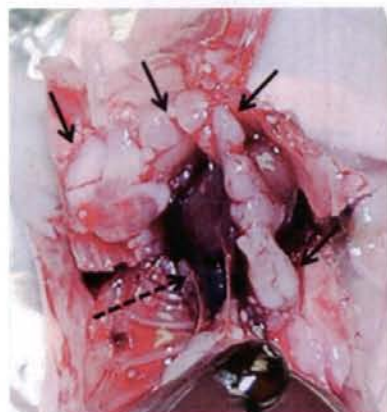


図2 マウス胸膜中皮腫胸膜炎モデルの胸膜内矢印は胸腔内全体に進展した中皮腫を示し、破線矢印はリンパ節の腫大を示す。

2. カチオン化ヒアルロン酸 (カチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソーム) の合成

ヒアルロン酸のカルボキシル基をエチレンジアミンで置換することでカチオン化ヒアルロン酸を合成し、そのゼータ電位を測定すると、ヒアルロン酸は-41.3 mV、合成条件を pH10 にて行った時のカチオン化ヒアルロン酸は-37.3 mV、pH5 で合成したカチオン化ヒアルロン酸は-0.924 mV と電荷が陽性に偏移したため、カチオン化ヒアルロン酸の合成は pH5 の条件で行った。

3. カチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソームの中皮

腫細胞への結合性

中皮腫細胞 MSTO-H211 上の CD44 の発現を PE 標識 CD44 抗体にて、またフルオロセインアミン標識ヒアルロン酸ナトリウム (FAHA) と MSTO-H211 との結合性を Flow cytometry により確認後、学習院大学で合成されたホウ素ナノデバイス (ホウ素ナノリポソーム) とカチオン化ヒアルロン酸を合成し、中皮腫細胞への結合性をフルオロセインアミン標識ヒアルロン酸ナトリウムへの阻害活性にて検討すると、MSTO-H211 細胞表面上には CD44 が豊富に発現しており、FAHA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ との結合は、その蛍光強度が 448 であった。この FAHA との結合性は、CD44 の中和抗体である BRIC235 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ にて前処置を行うことで、ほぼ完全に阻害された。同様に 1, 100 kDa ヒアルロン酸 2 mg/mL による前処置でも FAHA の結合は阻害された。

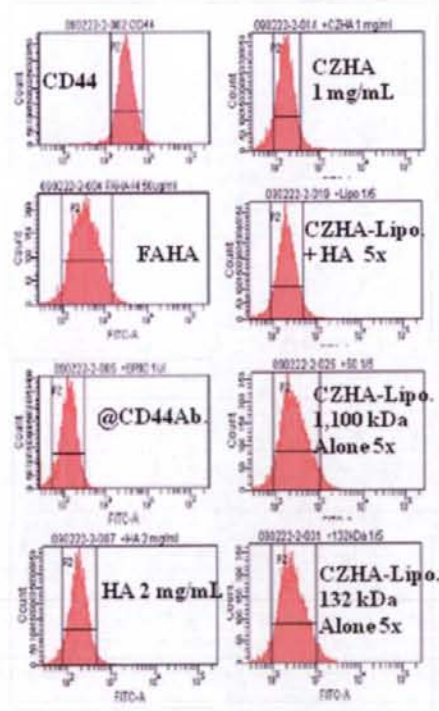


図3 Flow cytometry による FAHA の MSTO-H211 細胞への結合性の変化

次に合成されたカチオン化ヒアルロン酸による阻害を基に、結合阻害率と含有ヒアルロン酸濃度との検量

線を作成し、合成したカチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソームの含有ヒアルロン酸濃度を算出した(表1)。遠心(-)の1,100 kDa ヒアルロン酸を用いたカチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソームには、遠心分離を行わなかったために遊離したヒアルロン酸も含まれるため、FAHA の MSTO-H211 への結合を他のカチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソームよりも阻害し、結果として含有するヒアルロン酸濃度は7.60 mg/mL と高く算出された。他のカチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソームのヒアルロン酸濃度の検討からヒアルロン酸は1,100 kDa でエチレンジアミンの付加率は50%のもので5.01 mg/mL と比較的高い濃度のヒアルロン酸を含有する化合物を合成できた。

ヒアルロン酸 分子量 (kDa)	エチレンジアミン 付加率 (%)	ヒアルロン酸 濃度 (mg/mL)
1,100(遠心-)	100	7.60
1,100	70	4.54
1,100	50	5.01
1,100	30	4.68
132	25	4.52

表1 カチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソームのヒアルロン酸濃度

D. 考察

動物モデルは、基礎実験と臨床応用との橋渡し研究を行う上で大切な役割を果たしており、特に臨床経過に酷似したモデルは、貴重なものと考えられる。我々の作製したモデルは、初期には片側胸壁に局限し、終末期には胸腔内に播種し、更には対側の胸腔やリンパ節への転移を引き起し、臨床経過に酷似した動物モデルであり、今後の治療実験に重要な役割を果たすと考えられる。

カチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソームの合成に際して、カチオン化ヒアルロン酸の合成条件を検討することで、より陽電荷のカチオン化ヒアルロン酸を合成することが可能となった。このことにより、今後各種ホウ素ナノデバイスとの結合の検討がすすめやすくなったと考えられる。

これまでに我々が作製したカチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソームのヒアルロン酸含有率を検討すると、1,100 kDa, エチレンジアミンの付加率が50%のもので比較的高いヒアルロン酸含有率を示したが、今後は更にカチオン化ヒアルロン酸、ホウ素リポソームの配合比を検討し、*in vitro*でのMSTO-H211へのホウ素の取り込み率を検討し、より取り込みの高い配合比を検討し、*in vivo*での生体内分布を検討し、BNCTの治療効果を明らかにしたいと考える。

E. 結論

本年度は、中皮腫細胞へ高い結合性を有するカチオン化ヒアルロン酸ホウ素リポソームを合成した。今後更に基礎データを蓄積し、よりホウ素の腫瘍細胞内濃度の高いホウ素ナノデバイスを開発、*in vivo*のデータを蓄積し、BNCT治療実験を行い、有効性のデータを検証したいと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Involvement of chondroitin sulfate E in the liver tumor focal formation of murine osteosarcoma cells. Basappa, S. Murugan, K. Sugahara, C. M. Lee, G. B. Dam, T. H. Kuppevelt, M. Miyasaka, S. Yamada, K. Sugahara *Glycobiology*, in press
- 2) Creation of a rich subcutaneous vascular network with implanted adipose tissue-derived stromal cells and adipose tissue enhances subcutaneous grafting of islets in diabetic mice. Y. Fumimoto, A. Matsuyama, H. Komoda, H. Okura, C. M. Lee, A. Nagao, T. Nishida, T. Ito, Y. Sawa *Tissue Engineering*, in press
- 3) Comparison of Postoperative Morphological

Changes in Remnant Pancreas Between
Pancreaticojejunostomy and Pancreaticogastrostomy
After Pancreaticoduodenectomy. Y. Tomimaru, Y.
Takeda, S. Kobayashi, S. Marubashi, C. M. Lee, M.
Tanemura, H. Nagano, T. Kitagawa, K. Dono, K.
Umeshita, K. Wakasa, M. Monden *Pancreas* 38(2), 203
-207 (2009)

2. 学会発表

- 1) Targeting CD44 with hyaluronan for BNCT: A novel strategy for malignant pleural mesothelioma. C.M. Lee, H. Fujii, Y. Kaneda, Y. Sawa, American Association for Cancer Research, Annual Meeting (San Diego, USA)、2008年4月11日
- 2) Boron Neutron Capture Therapy for Malignant Mesothelioma. C.M. Lee, Fujii, Y. Kaneda, Y. Sawa, The 9th international conference of the International Mesothelioma Interest Group (Amsterdam, Netherlands)、2008年9月25日
- 3) Targeting CD44 with hyaluronan for BNCT: A novel strategy for malignant pleural mesothelioma. C.M. Lee, Fujii, Y. Kaneda, Y. Sawa, The 9th international conference of the International Mesothelioma Interest Group (Amsterdam, Netherlands)、2008年9月27日
- 4) Molecular targeting of CD44 for Mesothelioma. C.M. Lee, Fujii, Y. Kaneda, Y. Sawa, 13th International Congress of Neutron Capture Therapy (Florence, Italy)、2008年11月4日
- 5) 癌に対する分子標的治療の最先端 李千萬, 藤井仁, 北川透, 菰田弘, 塩野裕之, 西田俊朗, 澤芳樹 第108回日本外科学会定期学術集会(長崎)、2008年5月16日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進事業）

分担研究報告書

ホウ素ナノデバイスの膀胱がん適応に関する研究

研究分担者 鈴木 実 京都大学原子炉実験所附属粒子線腫瘍学研究センター・特定准教授

研究要旨

現在、国内外において悪性脳腫瘍、再発頭頸部腫瘍においてホウ素中性子捕捉療法の臨床試験が実施され、一定の治療効果が報告されている。本研究の目的は、膀胱上皮内癌がホウ素中性子捕捉療法の適応疾患になり得ると考え、本研究で開発されたトランスフェリン修飾ホウ素脂質ナノカプセルの有用性を検討することである。

ホウ素中性子捕捉療法の成功するためには、ホウ素化合物が腫瘍細胞に高濃度かつ選択的に集積することが必要である。本研究では、ホウ素脂質ナノカプセルを膀胱内に直接注入することにより、全身点滴投与と比較して極めて高濃度のホウ素濃度溶液で腫瘍細胞を曝露することが可能である。腫瘍細胞選択性は、ホウ素脂質ナノカプセルをトランスフェリン修飾することにより、癌細胞に高発現しているトランスフェリンリセプターを介する腫瘍細胞探索性かつ細胞内取り込み能力の向上を期待した。

初年度である本年度は、ホウ素脂質ナノカプセルをトランスフェリン修飾することの rationale の確認として、マウス膀胱癌細胞 (MBT-2) がトランスフェリンリセプターを発現していること、MBT-2 細胞、ラット膀胱癌細胞 (NBT-L2b)、ラット膀胱正常粘膜細胞 (RBLAK) を用いたトランスフェリン取り込み試験を行い、正常細胞と比較して、膀胱癌細胞が約 2 倍トランスフェリンを取り込むことを確認した。また、ホウ素脂質ナノカプセルの癌細胞内への取り込みの確認手法として、ホウ素脂質に取り込まれたホウ素薬剤 borocaptate sodium (BSH) に対する抗 BSH 抗体を用いた免疫細胞染色が使用できることを明らかにした。

A. 研究目的

膀胱上皮内癌は、癌細胞が膀胱粘膜内に限局し腫瘤を形成せずに粘膜横方向に進展するという特徴をもつ。癌細胞の浸潤範囲は境界不明瞭のため、膀胱鏡直視下でもその進展範囲の同定が困難なことがある。癌細胞が膀胱粘膜に露出していることから、尿細胞診により発見されることもある。

膀胱上皮内癌の標準治療は、BCG 膀胱内注入療法であり奏効率も高いが、問題点は再発率が 40-60% と高率なことである。膀胱上皮内癌の特性として、悪

性度が高く、進行癌に進展する率が高いということがある。従って、膀胱上皮内癌の再発症例に対しては、膀胱全摘術が選択される症例も多い。しかし、膀胱全摘による患者の Quality of Life (QOL) の著しい低下は大きな問題点である。そのため、再発膀胱上皮内癌に対しては、抗癌剤膀胱内注入療法、Photo-dynamic therapy、Gene therapy などが試験的に実施されている。

我々は、再発膀胱上皮内癌に対するホウ素中性子捕捉療法による新規治療方法の開発に取り組んでい

る。本研究の目的は、膀胱上皮内癌のホウ素中性子捕捉療法において、ホウ素化合物としてトランスフェリン修飾ホウ素ナノカプセルの利用が可能か否かを明らかにすることである。

B. 研究方法

1. Cell line

膀胱癌の Cell line として、マウス膀胱癌細胞 MBT-2 細胞、ラット膀胱癌細胞として NBT-L2b 細胞、ラット膀胱正常上皮粘膜細胞として RBLAK-1 を使用した。

2. ホウ素ナノデバイス

実験に使用したホウ素ナノデバイスは、主任研究者である中村浩之教授より提供された。2 種類のホウ素化合物を使用した。1 つは、硼素化合物である borocaptate sodium (以下、BSH) をリポソーム内に内封したホウ素薬剤内封型リポソームと BSH を脂質に取り入れたホウ素脂質ナノカプセルである。両リポソームとも表面をトランスフェリン修飾がされている。

3. トランスフェリン取り込み試験

トランスフェリン修飾リポソームによる腫瘍細胞へのターゲティングが可能か否かを明らかにするため、蛍光物質で修飾したトランスフェリンの取り込み試験を実施した。膀胱癌細胞と、正常膀胱粘膜細胞におけるトランスフェリンの取り込みの差異を明らかにするため、マウス膀胱癌細胞 (MBT-2)、ラット膀胱癌 (NBT-L2b)、ラット正常膀胱粘膜細胞 (RBLAK-1) に対して、Alexa Fluor 594 Conjugate Transferrin の取り込み試験を実施した。

実験方法は、使用説明書に準じ、各培養細胞の培

地を無血清培地に交換し、2時間後に25 µg/mlの濃度になるように、Alexa Fluor 594 Conjugate Transferrinを培地に添加し40分間incubationした。Ice-cold 10mM酢酸で2回wash、Ice-cold PBSで2回wash後トリプシンで細胞をはがし、遠沈後、2 mlのIce-cold PBSを添加し、Flowcytometryで測定を実施した。

3. 免疫細胞染色

ホウ素ナノデバイスが細胞内に取り込まれていることの確認として、抗 BSH 抗体 (大阪府立大学、切畑光統教授よりご提供頂いた) を用いて、免疫細胞染色を実施した。MBT-2 細胞を用い、トランスフェリン修飾ホウ素脂質ナノカプセル、トランスフェリン修飾ホウ素薬剤内封型リポソームを 100 ppm (10-B)に調整し、15分曝露後、抗 BSH 抗体を用いて蛍光免疫細胞染色を実施した。

(倫理面への配慮)

動物実験計画は、京都大学原子炉実験所動物実験倫理委員会の認可をうけ、取扱指針に従い、適切に実験を行う。

C. 研究結果

1. トランスフェリン取り込み試験

Flowcytometer の結果で、蛍光強度の平均値の比較で、膀胱正常粘膜細胞 RBLAK-1 が 80.9、マウス膀胱癌細胞 MBT-2 が 161.5、ラット膀胱癌細胞 NBT-L21b が 145.8 の値を示し、約2倍、癌細胞が正常粘膜と比較してトランスフェリンを細胞内に取り込むことが明らかになった。

2. 免疫細胞染色

トランスフェリン修飾ホウ素脂質ナノカプセル、

トランスフェリン修飾ホウ素薬剤内封型リポソームに曝露された MBT-2 細胞は、抗 BSH 抗体により染色され、両ナノデバイスの細胞内局在が明らかになった。

D. 考察

国内における中性子捕捉療法の基礎実験に利用可能な研究用原子炉は、京都大学原子炉実験所研究炉 (KUR) と日本原子力開発機構研究炉 (JRR4) の 2 基である。KUR に関しては、ウラン燃料の低濃縮化による計画的停止であるが、JRR4 は炉の反射板のトラブルによる予期せず停止のため、予定していた中性子照射実験が、本年度は不可であった。

膀胱上皮内癌に対するホウ素中性子捕捉療法の適応において、他の治療部位と異なったユニークな方法は、ホウ素薬剤を膀胱内に注入する Drug delivery system (DDS) を使用するということである。この方法は、腫瘤を形成する進行膀胱癌には、適用できず、膀胱粘膜に限局して横方向に進展し癌細胞が膀胱内腔に露出している膀胱上皮内癌に限って使用できる。この DDS の利点は、ホウ素薬剤が全身循環に入らないことから、膀胱周囲の放射線感受性が高い腸管のホウ素濃度が 0 であり、正常組織の線量を低く抑えることが可能である。もう 1 つの利点は、ホウ素薬剤の原液そのものを膀胱内投与することが可能であり、全身投与の場合と比較して、極めて高濃度のホウ素薬剤で腫瘍細胞を曝露することが可能である。

BSH は、極めて水溶性が高いことから高濃度の BSH 溶液を準備することが可能であり、リポソーム作成に適している。しかし、BSH 自体は、腫瘍細胞探索性の性質を有しないことから、Carrier となるリポソームにリガンド修飾して腫瘍細胞探索性を付加

することが必要である。トランスフェリン修飾 BSH 内封リポソームのホウ素中性子捕捉療法における有用性は、既に帝京大学の丸山らが報告している。本年度は、同所性移植膀胱癌マウスを作成に使用するマウス膀胱癌細胞 MNT-2 細胞が、正常膀胱粘膜細胞よりも、トランスフェリンの取り込みが昂進していることを明らかにした。MBT-2 細胞にトランスフェリンリセプターが発現していることは抗トランスフェリンリセプター抗体を用いた免疫細胞染色ですでに確認しており、膀胱上皮内癌におけるホウ素中性子捕捉療法において、トランスフェリン修飾ホウ素ナノデバイスを用いる正当性が確認できた。来年度は、中性子照射による殺細胞効果により、トランスフェリン修飾の有用性を明らかにしていく予定である。

ホウ素薬剤の組織内および細胞内における micro-distribution の解析は、ホウ素中性子捕捉療法において、殺細胞効果を有する α 粒子、リチウム反跳核の飛程距離が、細胞 1 つの大きさに相当することから、治療効果に直接影響し極めて重要である。ホウ素脂質ナノカプセルはホウ素薬剤 BSH をナノカプセル内に取り込んでいることから、ナノカプセルが細胞内に取り込まれた後、抗 BSH 抗体による認識が問題かと思われたが、本年度の検討で、問題なく認識することが明らかになり、来年度の in vivo でのホウ素脂質ナノカプセルの組織内分布の検討にも、抗 BSH 抗体による免疫組織染色の手法を利用する予定である。

E. 結論

膀胱上皮内癌に対するホウ素中性子捕捉療法の DDS としてトランスフェリン修飾ホウ素脂質ナノカプセルの膀胱内注入は有望である。来年度は、細胞照射実験、同所性膀胱癌移植モデルマウスを使用