

201011004B

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

：低侵襲・非侵襲医療機器

（ナノテクノロジー）研究

ホウ素ナノデバイス型中性子捕捉治療

平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 中村 浩之

平成23（2011）年3月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

：低侵襲・非侵襲医療機器

（ナノテクノロジー）研究

ホウ素ナノデバイス型中性子捕捉治療

平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 中村 浩之

平成23（2011）年3月

目 次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----62

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----68

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進事業）
総合研究報告書

ホウ素ナノデバイス型中性子捕捉治療

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いるが、わが国ではすでに原子炉と同等の中性子線量が得られる加速器開発が進んでおり、保健医療に向けた治験が始まろうとしている。近い将来病院併設型加速器BNCTの実現により、患者にとっては中性子線源の前で20～30分横たわっているだけで治療できる負担の少ない画期的な細胞選択的放射線療法を提供できる。本研究では、BNCT適応拡大のために新たなDDS技術を開発し、各腫瘍に最適なホウ素ナノデバイスの開発研究を進め、大腸がん移植マウス、胸膜中皮腫モデルマウス、肝腫瘍モデルウサギに対し高いBNCT抗腫瘍効果を見出すことに成功した。

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）

李 千萬

（大阪大学大学院医学研究科・准教授）

鈴木 実

（京都大学原子炉実験所・特定准教授）

丸山一雄

（帝京大学薬学部・教授）

柳衛宏宣

（東京大学大学院工学系研究科・特任准教授）

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3以上を満たす薬剤の開発が目標とされている。

現在、脳腫瘍、悪性黒色腫、頭頸部がんに対してBNCT 適応疾患として原子炉から得られる中性子源を利用してすでに臨床研究がおこなわれているが、今研究では、治療効果の向上および適応疾患の拡大を目的として次世代DDS型ホウ素薬剤の開発を行う。

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

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

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。

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。

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。膀胱がんの多くには、アクティブターゲティング型DDSの標的の一つとなっているトランスフェリン(TF)受容体が高発現している。トランスフェリン(TF)修飾PEG-リボソームが研究分担者・丸山により開発されてきた。TF修飾PEG-リボソームは様々ながん種に過剰発現しているトランスフェリン(TF)レセプターをターゲット可能であることから種々のがんに適応可能なDDSキャリアとして期待される。

薬害肝炎および性交渉に代表されるB型肝炎・C型肝炎ウイルスの感染に基づく肝硬変により高頻度で発生する原発性肝臓癌や、欧米化による脂質摂取量の増加や食生活の変化に起因する大腸癌の発生および肝転移は、病期の進んだものにおいては治癒が非常に困難な病態を呈してくる。このため手術療法、化学療法、放射線治療、免疫療法を合わせた集学的治療をいかにオーダーメイド医的に組み合わせられるかが重要なカギとなってくる。新規粒子線治療のひとつである中性子捕捉療法は難治性肝腫瘍治療の有効な治療方法の一つと考えられている。

本研究では高集積化ホウ素ナノデバイスを開発するとともに、トランスフェリンをはじめとする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、上に挙げた大腸がん、脳腫瘍、中皮腫、膀胱がん、肝臓がんを対象とし、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、リボソームのGMP製造に向けたプロセス開発を行い、BNCTへの実用化を目指すことを目的とし研究を行う。

B. 研究方法

I. 高集積化ホウ素ナノデバイスの開発と生体内挙動解明・大腸がん移植マウスへの BNCT 効果に関する研究

平成20年度

(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。

(1) ホウ素脂質の検討

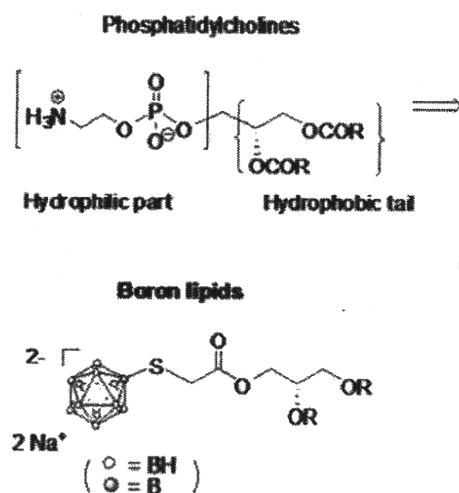


図1 ホウ素脂質の構造

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ン酸 (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

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、ポストインサクシ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。

平成 21 年度

ホウ素ナノデバイスの細胞および組織レベルでの挙動を詳細に調べることに重点を置き、次に示す4つの課題に対して研究を進めた。

(1) 蛍光標識ホウ素脂質の開発とナノデバイス化の検討、(2) 蛍光標識化ホウ素ナノデバイスの開発と生

体内挙動解明、(3) ホウ素ナノデバイス封入用ホウ素薬剤の開発、(4) ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスの開発。

(1) 蛍光標識ホウ素脂質の開発とナノデバイス化の検討

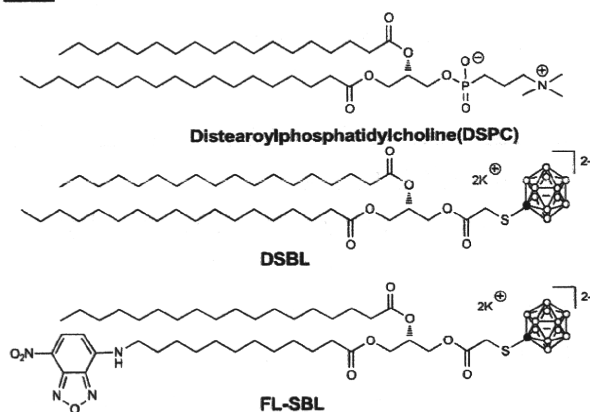


図2 蛍光ホウ素脂質の構造

図2に示すように、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。既に20年度において、脂質の親水性部位に水溶性ホウ素クラスターを導入したホウ素脂質を開発し、そのナノデバイス化に成功している。そこで、21年度は、ホウ素脂質の生体内での代謝機構を解明するために、蛍光標識化したホウ素脂質の合成および可視化を目的とした。蛍光標識剤には、NBD-Clの他にピレンやダンシルクロライド、フルオレセインなどがある。これらの中でも、蛍光がヒトの眼にとって最も観察しやすい緑色であること、分子サイズが小さいこと、そして脂質に導入しやすいことを考慮し、蛍光標識剤はNBD-Clを用いることとした。具体的な逆合成解析を図3に示す。

(2) 蛍光標識化ホウ素ナノデバイスの開発と生体内挙動解明

蛍光標識化ホウ素ナノデバイスの調製は、逆相蒸発法(REV法)で行った。まず、モル比がDSPC :

DSBL (25%) : Cholesterol = 0.75 : 0.25 : 1になるように各試薬を秤量し、ナスフラスコに入れた。そこに、クロロホルム : ジイソプロピルエーテル (1 : 1, 体積比) を加えて脂質を溶解させた後に、二つの溶媒と同じ体積のミリQ水を、溶液が二層になるように静かに入れた。次に、ULTRA SONIC HOMOGENIZER UH-50 を用いて、超音波処理することで溶液をエマルジョンにした。その後、約50℃の水浴上で、ロータリーエバポレーターを用いて有機溶媒を除去することで、エマルジョンを転相させ、リポソーム懸濁液とした。

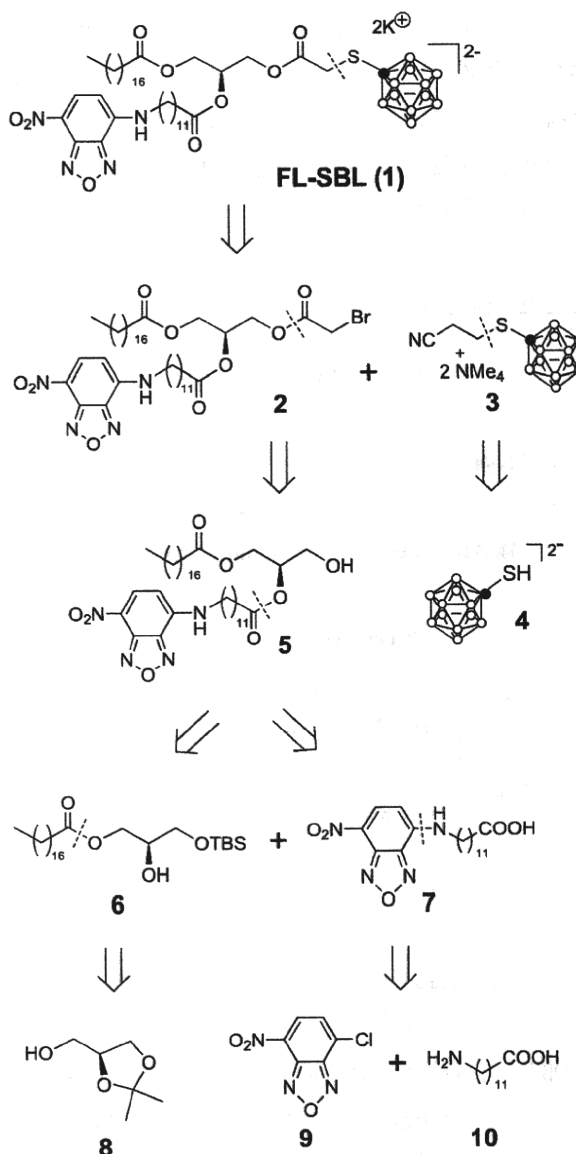


図3 蛍光ホウ素脂質 (FL-SBL) の逆合成解析

調製したリポソームは、エクストリューダーを用いてフィルターを加圧通過させ粒子径を約 100 nm にした。その後超遠心分離機にかけ完成とした。次に、ポストインサージョン法を用いて 25% DSBL リポソームに蛍光ラベル化を行った。エッペンに 25% DSBL リポソーム (500 μ l) と蛍光ホウ素脂質 (10 μ l) を入れて混ぜたものを、遠心管に移しミリ Q 水を八分目まで入れた。超遠心分離機 (50000 rpm, 1 時間, 4°C) に三回かけて蛍光ホウ素ナノデバイスの完成とした。

また、マウスを用いた生体内イメージングを行うためにホウ素ナノデバイス表面を PEG (polyethylene glycol) で修飾した、PEG 修飾ホウ素ナノデバイスを同様の方法で調製した。PEG 修飾リポソームは、膜表面の PEG により形成される水和層およびその立体障害により補体系タンパク質の吸着が抑えられ、単核食細胞系に認識されにくく、血中での安定性、滞留性に優れている。結果的に EPR 効果によって腫瘍組織に集積していくことになる。PEG 修飾リポソームは、各試薬のモル比が DSPE : DSBL (25%) : Cholesterol : PEG DSPE-O20CN = 0.75 : 0.25 : 1 : 0.11 になるように秤量し調製に用いた。その後、同様のラベル化法で PEG 修飾リポソームに蛍光ホウ素脂質をラベル化し、蛍光ホウ素ナノデバイスの完成とした。同様に、比較として蛍光脂質 PKH を用いてポストインサージョン法により調整した。

蛍光ホウ素ナノデバイスをマウス大腸がん由来細胞 Colon 26 をマウスに移植した担がんマウスモデルに静脈注射した。今までに DSBL リポソームにおけるホウ素の腫瘍内蓄積濃度が一番高かったのは 36 時間後であることを見出している。このことより静脈注射をしてから 36 時間後に臓器を取り出し、組織切片 (厚さ 10 μ m) を作製した。まず、ビーカーにヘキサンを入れ、液体窒素が入った容器に入れた。一方では、プラスチックの容器 (25 mm $\times$ 30 mm $\times$ 5 mm) に透明で粘着性のある凍結コンパウンドを少し入れた。そこにマウスから取り出した臓器を置き、その

上から再び、空気や毛が入らないように注意しながら凍結コンパウンドを入れた。そして、プラスチックの容器ごと冷えているヘキサンに入れ凍結コンパウンドごと臓器を凍らせた。そして、クリオスタット HM560M を用いて切片を作製し、スライドガラスに乗せ観察に用いた。観察に使わない試料は冷凍庫に保存した。

(3) ホウ素ナノデバイス封入用ホウ素薬剤の開発

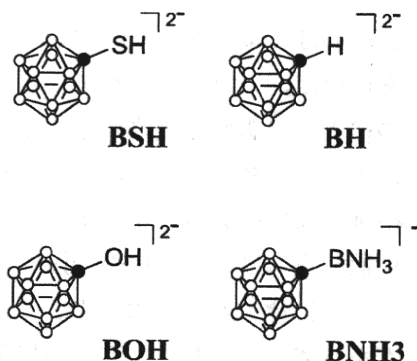


図4 ホウ素ナノデバイス内封ホウ素薬剤の構造

20 年度の研究結果から、ホウ素脂質 DSBL を 10% 含有のホウ素ナノデバイスが最も高い血中滞留性を示すことが分かったため、より高濃度ホウ素デリバリーのためには、さらにホウ素薬剤の内封が重要であること唆された。したがって、図4に示すようなホウ素イオンクラスターについて合成を行い、それぞれの薬理活性について検討した。

(4) 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、得られたカチオン性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。得られた、ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスに対し、ヒアルロン酸レセプターである CD44-IgG chimera をプレートに固相化し、各種ホウ素薬剤の FITC 標識ヒアルロン酸とプレートの結合の阻害率を測定した。

次にマウス中皮腫細胞株 AB22 を 8E6 個/100mL マ

ウス胸腔内に接種し、7 日目に各種ホウ素製剤 10 mgB/kg を胸膜中皮腫モデルマウスの胸腔内に注入し、24 時間後の血液、腫瘍、患側肺のホウ素濃度を測定し、各種ホウ素製剤の濃度を算出した。

平成 22 年度

最終年度は、実用化を踏まえて、ホウ素ナノデバイスの総投与用量をできるだけ減らすための超効率的ホウ素デリバリーを達成するために、特にナノデバイスへのホウ素の高濃度集積化を検討した。具体的には、次に示す4つの課題に対して研究を進めた。(1)ナノデバイスのホウ素高集積化の検討、(2)調整した高集積化ホウ素ナノデバイスのがん移植マウスへの投与と各臓器内分布の検証、(3)高集積化ホウ素ナノデバイスのがん移植マウスに対する中性子照射とBNCT効果の検証、(4)標的がんへのアクティブターゲティングを可能とするリガンドの高集積化ホウ素ナノデバイスへの導入法の開発とBNCT抗腫瘍効果の検証。

(1) ナノデバイスのホウ素高集積化の検討

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てきた。21 年度において、脂質の親水性部位に水溶性ホウ素クラスターを導入し、蛍光発光団を脂質二本鎖の一方に導入した蛍光標識化したホウ素脂質 FL-SBL の合成に成功し、そのナノデバイス化に成功している。この蛍光ホウ素脂質 FL-SBL と調製したリポソームを用いて、腫瘍組織内での分布について調べた。その結果、蛍光標識リポソーム低酸素状態にある部位にまで到達していないことが分かってきた。腫瘍組織においては、増殖が盛んなため、常に栄養・酸素を必要としている。そのような条件下では、腫瘍血管から離れた部位は、低酸素状態となっており、そのような条件で活性化される HIF (低酸素誘導因子) -1 は、新生血管などを誘導し、がんの悪性化や転移に深くかかわっている。し

たがって、低酸素状態にあるがん細胞を如何にして効率よく殺傷するかががん治療には重要となっている。このことは、ホウ素脂質ナノデバイスにさらにホウ素薬剤を内封させることで、間質などを経由してホウ素薬剤を低酸素領域まで送達させる必要性があることを示唆するものであった。

そこで、22 年度は、ホウ素内封薬剤を種々検討することとした。高集積化評価法には、ホウ素ナノデバイスの超遠心により分離・精製後、ホウ素濃度とリン濃度を測定することにより、リン脂質に対するホウ素分子の集積性についてホウ素/リン濃度比により算出し、比較することとした。

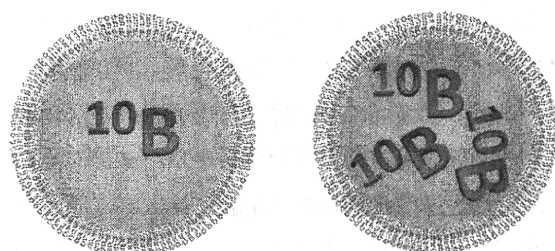


図5 高集積化ホウ素ナノデバイスのイメージ
左は従来のホウ素リポソーム、右は高集積化したホウ素ナノデバイス

高集積化ホウ素ナノデバイスの調製は、逆相蒸発法 (REV 法) で行った。さまざまな試薬原料を、混合比を変えながら各試薬を秤量し、ナスフラスコに入れた。そこに、クロロホルム：ジイソプロピルエーテル (1 : 1, 体積比) を加えて脂質を溶解させた後に、二つの溶媒と同じ体積のミリ Q 水を、溶液が二層になるように静かに入れた。次に、ULTRA SONIC HOMOGENIZER UH-50 を用いて、超音波処理することで溶液をエマルジョンにした。その後、約 50℃ の水浴上で、ロータリーエバポレーターを用いて有機溶媒を除去することで、エマルジョンを転相させ、リポソーム懸濁液とした。調製したリポソームは、エクストリューダーを用いてフィルターを加圧通過させ粒子径を約 100 nm にした。この際、フィルとレーションの操作は 10 回行った。その後超遠心分離機に

よって 240,000 g 条件下精製し、高集積化ホウ素ナノデバイスをペレット上で得た。このペレット状の高集積化ホウ素ナノデバイスを生理食塩水にて溶液化し、その粒子径を動的光散乱法 (DLS) により測定した。また、ホウ素／リン濃度比は誘導プラズマ発光分析法 (ICP) を用いてそれぞれの元素の濃度を測定し、算出した。

得られた高集積化ホウ素ナノデバイスの生理食塩水中における安定性に関しては、4℃保存で一定の時間ごとにその溶液を超遠心分離機によって 240,000 g 条件下上澄を取り除き、再度新鮮な生理食塩水に溶かした後、ホウ素およびリン濃度を ICP 法により測定することでホウ素／リン濃度比を求めた。また、粒子径を DLS 法によって測定し、高集積化ホウ素ナノデバイスの粒子径が変化していないかどうか観察した。この操作を 14 日間行った。

(2) 調整した高集積化ホウ素ナノデバイスのがん移植マウスへの投与と各臓器内分布の検証

Balb/c マウス (female, 5 weeks old) の左腿部に、Colon 26 (5×10^7 cells/ml PBS solution) を 50 μ L 植え付け、1 週間育てたマウスを使用した。サンプルを尾静脈投与後、任意の時間毎に Avertin を用いて十分に麻酔をかけた後、血液、臓器、肝臓、肺、腎臓、脾臓、筋肉、脳、腫瘍の組織を取り出し、生理食塩水 (0.9% NaCl) で洗った (血液以外)。水分を十分に拭き取った後、各臓器の重量を測定した。各臓器の灰化作業では、まず超微量分析用硝酸を 1 mL ずつ各臓器の入ったチューブに入れて専用のブロックヒーターを用いて 90℃ で 2 時間温めながら溶解した。溶解した後、血液、肝臓、脾臓のサンプルでは Milli Q water で 6 mL にメスアップし、心臓、肺、腎臓、筋肉、脳では 4 mL、腫瘍は 3 mL にメスアップした。その後、各サンプルを 500 nm の疎水フィルターに通した。この溶液のホウ素濃度を ICP により測定した。測定の際には特に希釈はせずそのままの状態での測定した。

(3) 高集積化ホウ素ナノデバイスのがん移植マウスに対する中性子照射と BNCT 効果の検証

Balb/c マウス (female, 5 weeks old) の左腿部に、Colon 26 (5×10^7 cells/ml PBS solution) を 50 μ L 植え付け、1 週間育てたマウスを使用した。腫瘍の大きさが直径およそ 5 mm になったマウスを学習院大学動物実験施設においてホウ素ナノデバイスを尾静脈投与した後、空輸にて京都大学原子炉実験所へ搬入し、投与 36 時間後、麻酔をかけ中性子照射を行った。中性子照射は、京都大学原子炉実験所の原子炉 KUR にて 1 MW 運転において行った。照射時間は 50 分、中性子照射線量 $1.5\text{--}1.8 \times 10^{12}$ n/cm² とした。このとき、 γ 線量は $4.4\text{--}5.4 \times 10^{-1}$ Gy であった。左腿部の腫瘍部位以外は、遮蔽した。

中性子照射後、京都大学原子炉実験所の動物実験施設にて観察し、腫瘍の大きさおよび体重を約 3 週間観察した。

(4) 標的がんへのアクティブターゲティングを可能とするリガンドの高集積化ホウ素ナノデバイスへの導入法の開発と BNCT 抗腫瘍効果の検証

高集積化ホウ素ナノデバイスに対し、ヒアルロン酸 (1, 100kDa) を我々が開発した手法により導入した。得られたヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスに対し、ゼータ電位を測定した後、胸膜中皮腫モデルマウスへ胸腔内注射により投与し、中性子照射を行った。詳細は研究分担者・李千萬の報告書を参照。また、多くのがん細胞表面でその受容体が高発現しているトランスフェリンをポストインセクション法にて高集積化ホウ素ナノデバイスへ導入した。スクシンイミドでポリエチレングリコール鎖の末端が活性化されているジステアシルフォスファチジルエタノールアミン (DSPE) に対し、トランスフェリンを作用させた後、(1) で製造した高集積化ホウ素ナノデバイスを作用させ導入した。得られた高集積化ホウ

素ナノデバイスに対し、鉄イオンを作用させトランスフェリンを活性化させた後、超遠心分離機によって 240,000 g 条件下精製し、高集積化ホウ素ナノデバイスをペレット上で得た。このペレット状の高集積化ホウ素ナノデバイスを生理食塩水にて溶液化し、その粒子径を動的光散乱法 (DLS) により測定した。得られたトランスフェリン修飾高集積化ホウ素ナノデバイスをウサギ VX-2 肝腫瘍モデルに対して全身麻酔下に肝動注し、投与 24 時間後、48 時間 72 時間、120 時間後における肝腫瘍内・正常肝組織内・血中ボロン濃度および各種臓器内ボロン濃度を ICP-Massspectroscopy を用いて測定した。ウサギ肉腫腫瘍 VX-2 を In vitro において培養した。VX-2 細胞をまずウサギ足部に注射後、腫瘍を形成した。その腫瘍を、麻酔下にウサギ肝臓に接種し、2 週間経過観察し、移植肝腫瘍モデルを形成した。このように調整したトランスフェリン修飾高集積化ホウ素ナノデバイスを肝動注し、投与 3 日後に、京都大学原子炉において熱中性子 $2 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$ を照射し、腫瘍増殖抑制効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、いずれもあらかじめ実験計画書を、学習院大学理学部に申請し、動物実験審査委員会の承認を得て行われた。

II. ホウ素ナノデバイスの脳腫瘍適応に関する研究 平成 20 年度

研究開始初年度は、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。

(1) ホウ素化合物代謝

中性子捕捉療法のホウ素キャリア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 mmol/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、比較検討した。

(2) 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、経時的に組織を摘出する。摘出組織は、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。

(3) 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 を複数結合したリポペプチドを合成し、これを含む liposome の作成を行った。合成経路は次

別紙 3

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。

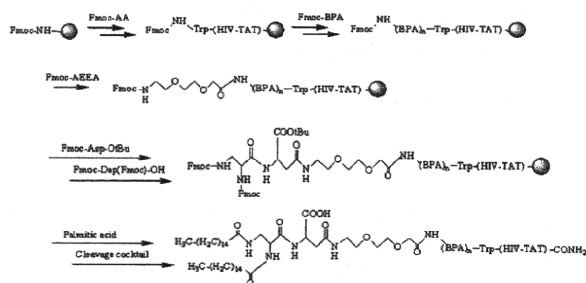


図6. 合成経路

平成 21 年度

(1) 新規ナノ粒子の腫瘍内動態の解析

まずマウスグリオーマ細胞を用いた皮下腫瘍モデルで解析を行った。20mg/kg 40mg/kg の投与を尾静脈より行い、24, 36, 48, 72 時間で各組織の濃度を ICP-AES で計測した。

(2) 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

ラット (フィッシャー344) 腹腔内に BSO を 5 mmol/kg 投与し、0, 3, 6, 12, 24 時間後の組織内 GSH を測定した。同様に、尾静脈より BSH を 100mg/kg 投与し、組織内 GSH の経時変化を測定した。各組織 (脳、筋肉、肝臓) は 5% スルホサリチル酸 (SSA) 0.8 ml 中でホモジナイズし、8000×g、4℃ で 10 分間遠心し、上清をサンプルとした。血液は、ヘパリン採血し、1000×g、4℃で 10 分間遠心して血球を分離し、4倍量の 5% SSA を加えて溶血させ、8000×g、4℃ で 10 分間遠心した上清をサンプルとした。(n=3) グルタチオン測定は、Total Glutathione Quantification Kit ((株) 同仁化学研究所) を使用した。

(3) 蛍光を用いたホウ素ポルフィリン化合物の検出方法 (細胞実験)

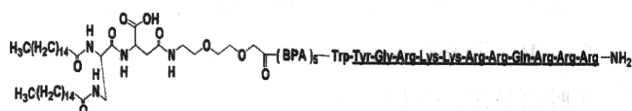
ヒトおよびラットグリオーマ細胞をあらかじめ滅

菌した 96well 黒プレートで培養する。ホウ素ポルフィリン化合物 (EC032) を培地中に添加し、経時的に細胞破碎液を回収した。これをプレートリーダーで計測した。また同一サンプルを、細胞計数のうねプラズマ発光分析を行い、ホウ素濃度を測定した。これらの値は相対蛍光強度と、ホウ素濃度の相関を検討した。(組織濃度測定実験) ラット脳腫瘍移植モデルを用い、9 L、C6 ラットグリオーマ細胞をラット脳内に移植した。ホウ素ポルフィリンを投与し、24 時間後に組織を摘出し、超音波破碎ののち遠心し、破碎上清を得て、蛍光測定および ICP ホウ素濃度測定を行った。

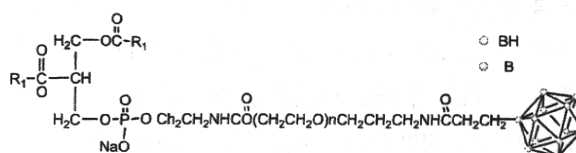
(4) 新規ホウ素化合物の合成

3 種類の異なるアミノ酸誘導体と 2 つの脂肪酸から成る新規リン脂質類似体 (リポペプチド) を Fmoc 固相合成法により合成し、さらに優れた膜透過性を有する HIV-TAT を表面修飾したホウ素含有のペプチド修飾リポソームの開発を行った。

a. B5-TAT-lipopeptide



b. DSPE-PEG-BSH



c. DSPE-B10-PEG

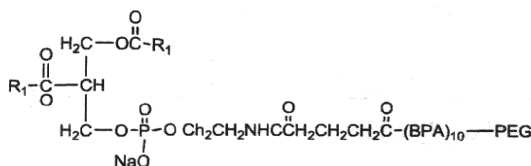


図7. 新規リン脂質類似体の化学構造

(5) リポソームへの新規脂質アナログの修飾

B5-TAT-lipopeptide を下記処方 で混合し、作製した Liposome をサイズ排除クロマトグラフィーにより、Liposome 画分、micelle 画分、単分子画分に分離し Lipopeptide の含量を定量した。蛍光分光光度計により Lipopeptide の指標である Trp を測定した。

	DSPC	Cholesterol	DSPE-PEG2000	Bn-TAT-peptide
B5-TAT5% PEG-liposome	45	45	5	5
B5-TAT10% PEG-liposome	42.5	42.5	5	10

(6) マウス大腸がん細胞を用いたホウ素濃度の検討

マウス大腸癌細胞を 24 時間培養後、各種処方 のリポソームを添加し、37℃、2 時間培養後上清を除き、ICP-AES によりホウ素イオン濃度を測定した。

	DSPC	Cholesterol	DSPE-PEG2000	Bn-TAT-peptide
PEG-liposome	47	47	6	-
B5-TAT5% PEG-liposome	45	45	5	5
B5-TAT10% PEG-liposome	42.5	42.5	5	10

平成 22 年度

(1) 新規ナノ粒子の脳腫瘍内動態の解析

マウスグリオーマ細胞 GL261 を用いた脳腫瘍モデルで解析を行った。あらかじめ、全身麻酔下に脳内 (1×10^5) に定量的に腫瘍細胞を接種し、さらに皮下にも 1×10^7 個の細胞懸濁液を接種する。そののち、皮下腫瘍がおよそ 10mm 大になるまで一定期間飼育し脳腫瘍モデルとした。新規ホウ素ナノデバイスを、ホウ素濃度 40mg/kg の用量 で尾静脈より経静脈投与を行い、24, 36, 48, 72 時間で血液 (全血)、脳、皮下腫瘍、肝臓、腎臓、脳腫瘍を経時的に採取し、各組織のホウ素濃度を湿性灰化の後、inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES, HORIBA, Japan) で計測した。各群は $n=5$ として平均を求めた。脳腫瘍は 2 例に認められた。

(2) 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

ラット (フィッシャー 344) 腹腔内に BSO を 5 mmol/kg および BSH 100mg/kg を同時、ないりは連続投与し、6 時間後の組織内 GSH を測定した。

薬剤の投与順を、以下のように設定した。

1. BSO 投与後 3 時間で BSH 投与
2. BSH 投与後 1 時間で BSO 投与
3. BSH, BSO 同時投与
4. BSO 非投与群

投与後の各組織 (脳、筋肉、肝臓) は 5% スルホサリチル酸 (SSA) 0.8 ml 中でホモジナイズし、8000 × g、4℃ で 10 分間遠心し、上清をサンプルとした。血液は、ヘパリン採血し、1000 × g、4℃ で 10 分間遠心して血球を分離し、4 倍量の 5% SSA を加えて溶血させ、8000 × g、4℃ で 10 分間遠心した上清をサンプルとした。(n=3) グルタチオン測定は、Total Glutathione Quantification Kit ((株) 同仁化学研究所) を使用した。

(3) 新規ホウ素ペプチドの合成

3 種類の異なるアミノ酸誘導体と 2 つの脂肪酸から成る新規リン脂質類似体 (リポペプチド) を Fmoc 固相合成法により合成し、さらに優れた膜透過性を有する HIV-TAT を表面修飾したホウ素含有のペプチド修飾リポソームの開発を行った。さらに、DSPE-PEG-BSH の較正からなるホウ素脂質の合成を試みた。

(4) リポソームへの新規脂質アナログの修飾

B5-TAT-lipopeptide を DSPC 45%, cholesterol 45%, DSPE-PEG 5% で混合し、脂質白膜法で作製した。作製した Liposome をサイズ排除クロマトグラフィーにより、Liposome 画分、micelle 画分、単分子画分に分離し Lipopeptide の含量を定量した。蛍光分光光度計により Lipopeptide の指標である Trp を測定した。合成のスケールアップをすることで動物での腫瘍内動態の測定を行った。

B5-TAT-liposome の in vivo における毒性評価、腫瘍細胞取り込みを確認する目的で、CT26 マウス大腸

癌細胞株 (5×10^6 cells) を $100 \mu\text{L}$ をマウス (Balb/c mice) 腹部に皮下注射し、モデルマウスとした。リポソームを脂質濃度 100 mmol/L に PBS を用いて調製し、リポソーム $100 \mu\text{mL}$ を尾静注により添加後、2, 24, 48 時間ののちに解剖し、各種臓器を採取した。組織のホウ素濃度を経時的に確認した。

Ⅲ. ホウ素ナノデバイスの中皮腫適応に関する研究 平成 20 年度

(1) 中皮腫マウスモデルの作製

5×10^6 個のヒト中皮腫細胞株 MSTO-H211 を ICR マウスならびに CB-17/SCID マウスの右胸腔内 (右壁側胸膜) 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

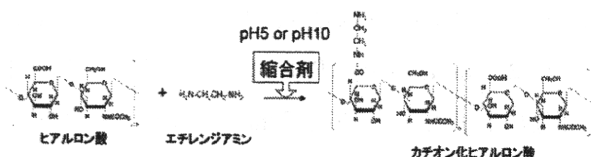


図 8. カチオン化ヒアルロン酸の合成方法

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。

平成 21 年度

(1) ホウ素ナノデバイスの機能評価 (CD44 への結合性)

これまでにヒアルロン酸ホウ素ナノデバイス中のヒアルロン酸含有量を測定し、至適作製法を検討した。しかしながら、胸膜中皮腫細胞への蛍光標識ヒアルロン酸の結合阻害率を検討すると、ヒアルロン酸含有量と阻害率に相関が認められなかった。そのため、今回 CD44 との結合性に着目し、CD44-IgG chimera を固相化したプレートへの蛍光標識ヒアルロン酸の結合阻害率から、至適ヒアルロン酸結合ホウ素ナノデバイスを検討した。

Recombinant human CD44 Fc chimera を $0.05 \mu\text{g}/\text{well}$ で丸底 96 well プレートに固相化。Fc receptor Blocking Kit にて前処置後、 $17.5 \mu\text{g}$ の FITC 標識ヒアルロン酸 FAHA ($100 \sim 300 \text{ kDa}$) と BRIC 235 (CD44 中和抗体) $0.5 \mu\text{g}$ 、 321 kDa ヒアルロン酸 $80 \mu\text{g}$ ないしは各ホウ素ナノデバイス製剤を希釈し、10 分間混入後洗浄、蛍光強度を測定した。

(2) ホウ素ナノデバイスの胸膜中皮腫モデルにおける腫瘍集積性

マウス胸膜中皮腫細胞株 AB22 8×10^6 個/ $100 \mu\text{L}$ を BALB/c マウスの右胸腔に注入し、7 日目に既存のホウ素製剤 (BSH)、ヒアルロン酸ホウ素ナノデバイス (HA-BSH)、ホウ素脂質 DSBL 10 mgB/kg を患側胸腔に注入。24 時間後にマウスを犠牲死させ、血液を採取後、生理食塩水にて灌流後に腫瘍塊ならびに患側肺を摘出、均質化後、ICP にてホウ素濃度を測定した。

平成 22 年度

(1) ホウ素ナノデバイスの開発ならびに胸膜中皮腫細胞への結合性の検討

マウス胸膜中皮腫細胞株を 96 well flat plate に培養後パラフォルムアルデヒドにて固定し、HA-DSBL-BSH や新規に開発した HA-BND-S BSH などの各ヒアルロン酸製剤、BSH との結

合性を Fluorescein 標識ヒアルロン酸の胸膜中皮腫細胞への結合阻害率より検討した。

(2) マウス胸膜中皮腫モデルに対するヒアルロン酸結合型ホウ素ナノデバイスも用いた BNCT 効果の検討

BALB/c マウスの胸腔にマウス中皮腫細胞株 5x10⁶ 個注入後、5 日目にヒアルロン酸結合型ホウ素ナノデバイスを胸腔に、6 日目に BSH を腹腔に注入、JRR-4 において、1 時間後に 0.7 ~ 1.1x10¹² n/cm² の熱中性子を照射し、各ホウ素製剤投与群を飼養・経過観察し、その生存期間を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、いずれもあらかじめ実験計画書を、大阪大学に申請し、動物実験審査委員会の承認を得て行われた。

IV. ホウ素ナノデバイスの膀胱がん適応に関する研究

平成 20 年度

(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ッ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。

(4) 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。

平成 21 年度

(1) ホウ素ナノデバイスおよび至適濃度の検討

3 種類のトランスフェリン結合型ホウ素ナノデバ

イス、Tf-ホウ素脂質、BSH-Tf-リン脂質、BSH-Tf-ホウ素脂質の3種類のホウ素化合物をそれぞれ 100, 500, 1,000 ppm を使用した。

対象とする細胞には、マウス膀胱癌細胞である MBT-2 細胞を使用した。細胞毒性の検討は、WST-1 assay を用いて検討した。

(2) 膀胱癌 BNCT 線量分布の検討

骨盤部 CT 画像を BNCT 治療計画装置に取り込み、膀胱壁を target として線量分布を検討した。計算条件 Target (膀胱壁) の硼素濃度 : 80.5 ppm (ボロノフェニルアラニン 1,300ppm 膀胱内投与の細胞内取り込み試験結果を使用した。周囲組織の硼素濃度を 0 ppm、コリメーターサイズは 14 cm とした。京都大学原子炉実験所研究炉(以下、KUR)の熱外中性子ビーム使用とした。

照射条件は、以下の4条件、Condition 1: 膀胱内を空気に置換 前方1門 1h 照射、Condition 2: 膀胱内に尿が貯留 前方1門 1h 照射、Condition 3: 膀胱内を空気に置換 後方1門 1h 照射、Condition 4: 膀胱内を空気に置換 前後2門 1h x 1h 照射とした。

平成22年度

(1) ホウ素ナノデバイスのヒト膀胱がん細胞への取り込みの検討

平成21年度の研究結果で、1,000 ppm の高濃度で細胞毒性を示さなかった2種類のトランスフェリン結合型ホウ素ナノデバイスである Tf-ホウ素脂質リポソーム (以下、Tf-DSBL Liposome)、BSH-Tf-リン脂質リポソーム(以下、Tf-DSPC Liposome+BSH)を使用した。

対象とする細胞には、ヒト膀胱癌細胞である KU-7 細胞に蛍光タンパク GFP を発現させた KU7-GFP 細胞

を使用した。各ホウ素ナノデバイスの KU7-GFP 細胞への取り込みと細胞内の局在について検討した。実験方法は、KU7-GFP 細胞を接着させた dish に 10, 30, 100, 300, 1000 ppm のホウ素ナノデバイスを 60 分間、曝露した後に、PBS で 3 回リンスした後、ICP にて細胞内ホウ素濃度を計測した。対象として BSH についての検討を加えた。また、ホウ素ナノデバイスの細胞内取り込みを確認する目的で、蛍光物質である PKH26 を封入したホウ素脂質リポソーム (PKH26-DSBL Liposome) を用いて、細胞内取り込み試験と同様の条件で実験を施行した。

(2) マウス膀胱に対する照射実験

1. と同じホウ素ナノデバイスである 1,000 ppm の濃度の Tf-DSBL Liposome と Tf-DSPC Liposome+BSH、100 μ を 24 ゲージのカテーテルを用いて経尿道的に投与し、60 分間保持し、その後 PBS で 2 回洗浄後、直ちに京都大学原子炉実験所研究炉重水設備で 30 分間中性子を照射した。対照群として、ホウ素を含まない Tf-DSPC Liposome 投与+照射群と非照射群として、Tf-DSPC-Liposome+BSH 投与のみと Tf-DSPC 投与のみの 2 群を加えた。照射後 3 カ月の時点でマウスを犠牲死させ膀胱を切り出し、マウス膀胱壁の線維化の有無を検討する目的にて、HE 染色およびマッソントリクローム染色を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、いずれもあらかじめ実験計画書を、京都大学に申請し、動物実験審査委員会の承認を得て行われた。

V. ホウ素ナノデバイスの肝腫瘍適応に関する研究 平成21年度

(1) ウサギ肝動注モデル

ウサギ肉腫腫瘍 VX-2 を *In vitro* において培養した。VX-2 細胞をまずウサギ足部に注射後、腫瘍を形成した。その腫瘍を、麻酔下にウサギ肝臓に接種し、2 週間経過観察し、移植肝腫瘍モデルを形成した。

(2) ボロン封入 Stealth Liposome 投与における肝腫瘍への集積性の検討

ボロン封入 Stealth Liposome(脂質結合型、内封型)(学習院大学作成)を、肝動注し、投与 24 時間後、48 時間後における肝腫瘍内ボロン濃度、正常肝組織内ボロン濃度、血中ボロン濃度および各種臓器内ボロン濃度を ICP-Massspectroscopy を用いて測定した。

(3) ボロン封入 Stealth Liposome 肝動注後の肝腫瘍および正常肝組織における病理学的検討

ボロン封入 Stealth Liposome を肝動注し、投与 24 時間後、48 時間後における肝腫瘍および正常肝組織の変化を病理学的に検討した。

平成 22 年度

(1) ウサギ肝動注モデル

ウサギ肉腫腫瘍 VX-2 を *In vitro* において培養した。VX-2 細胞をまずウサギ足部に注射後、腫瘍を形成した。その腫瘍を、麻酔下にウサギ肝臓に接種し、2 週間経過観察し、移植肝腫瘍モデルを形成した。

(2) ボロン封入トランスフェリン結合ボロン脂質結合型ステルスリポソーム投与における肝腫瘍への集積性の検討

肝腫瘍への選択的集積性を増強するために、ボロン封入 Stealth Liposome の脂質結合型と内封型を融合させたボロン封入トランスフェリン結合ボロン脂質結合型ステルスリポソームを調整した。上記

Liposome(脂質結合型+内封型)(学習院大学作成)をウサギ VX-2 肝腫瘍モデルに対して全身麻酔下に肝動注し、投与 24 時間後、48 時間 72 時間、120 時間後における肝腫瘍内・正常肝組織内・血中ボロン濃度および各種臓器内ボロン濃度を ICP-Massspectroscopy を用いて測定した。

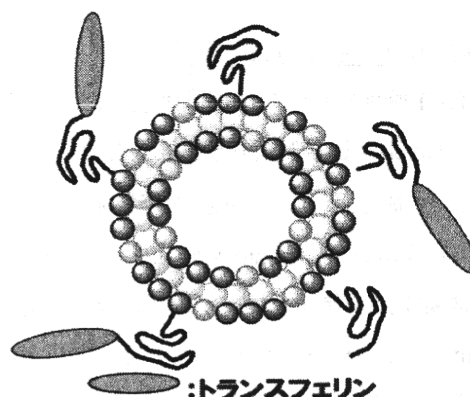


図9. ボロン封入トランスフェリン結合ボロン脂質結合型ステルスリポソームのシェーマ

(3) 中性子捕捉療法の治療実験

このように調整した Stealth Liposome を肝動注し、投与3日後に、京都大学原子炉において熱中性子 $2 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$ を照射し、腫瘍増殖抑制効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、いずれもあらかじめ実験計画書を、大阪大学に申請し、動物実験審査委員会の承認を得て行われた。

VI. トランスフェリン型ホウ素ナノデバイスの作成 平成 21 年度

(1) BSH 封入 TF 修飾 PEG-リポソームの調製

1,2-distearoyl-sn-glycero-phosphatidylcholine (DSPC) 18.7 mg Cholesterol 9.2 mg 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-hydroxysuccin

imidylpolyethyleneglycol (DSPE-PEG-NHS) 15.8 mg をエタノール 500 μ L に溶解させ、80 $^{\circ}$ C に加温した 125mM BSH 溶液 5 mL に加えた。その後、速やかに氷冷し、TF 7.24 mg を加え、室温にて 2 時間放置することでリポソームへの結合を行った。

(2) リポソームの精製

流速を 20 mL/分となるよう調節し、限外ろ過膜(分子量分画 500 kDa)を用いて discontinuous diafiltration-Sequential Dilution method により精製し、5 分間隔で廃液をサンプリングした。この廃液中に含まれるリポソーム未結合の TF を 280 nm の吸光を指標に測定した。さらに、廃液中に含まれるエタノールをガスクロマトグラフィにて測定した。

(3) TF のリポソーム表面修飾の確認

リポソーム懸濁液をリン酸緩衝液 (PBS) で 100 倍希釈し、rabbit-anti-human TF (10 mg/mL) を 10 μ L 加え、室温で 1 時間放置した後に動的光散乱法にてリポソームの凝集を確認した。

(4) TF 修飾 PEG-リポソームの機能評価

脂質 60 mg に対して 1.6 mg の C18 DiO を加えることでリポソームを蛍光ラベルした。このリポソームを Colon26 細胞 (マウス大腸がん細胞) に加え、30 分間培養した。この細胞を PBS で洗浄し、フローサイトメトリーにて解析を行った。

平成 22 年度

(1) BSH 封入 TF 修飾 PEG-リポソームの調製

1,2-distearoyl-sn-glycero-phosphatidylcholine (DSPC) 18.7 mg、Cholesterol 9.2 mg、1,2-distearoyl-

sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-hydroxysuccinimidylpolyethyleneglycol (DSPE-PEG-NHS) 15.8 mg をエタノール 500 μ L に溶解させ、80 $^{\circ}$ C に加温した 9% ショ糖溶液 5 mL に加えた。その後、速やかに氷冷し、TF 7.24 mg を加え、室温にて 2 時間放置することでリポソームへの結合を行った。

(2) リポソームの精製

ポンプの流速を 20 mL/分となるよう調節し、限外ろ過膜(分子量分画 500 kDa)を用いて discontinuous diafiltration-Sequential Dilution method により TF 修飾 PEG-リポソームを精製した。

(3) TF 修飾 PEG-リポソームの凍結乾燥製剤化

5mL のバイアル瓶に脂質濃度として 5mg/mL の TF 修飾 PEG-リポソームを 1mL 入れ、液体窒素により凍結した。これを凍結乾燥機に入れ、減圧下で一晩放置することで凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リポソームとした。

(4) 復水による粒子径変化の検討

凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リポソーム内への封入物として BSH, BNH, BSH と添加剤 (BSH+Ad), BNH と添加剤 (BNH+ Ad), 添加剤を封入してから BSH を封入 (Ad $\rightarrow$ BSH), 添加剤を封入してから BNH を封入 (Ad $\rightarrow$ BNH) を用いて、凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リポソームの凍結乾燥前後の粒子径変化を動的光散乱法により測定した。

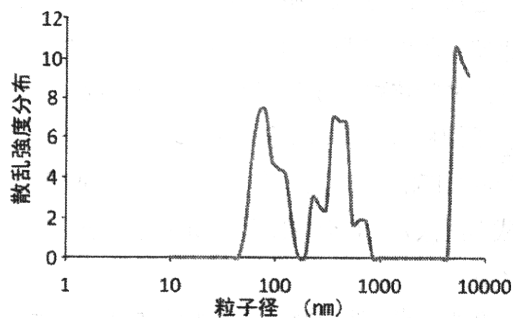


図 10. 粒子径の変化

5. ホウ素化合物内封率の検討

凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リポソームに上述のホウ素化

合物で復水し、超遠心 ($327,000 \times g$, 30 分) を 2 回繰り返してリポソーム外のホウ素化合物を除去した。残ったリポソーム懸濁液に含まれるホウ素濃度を ICP-MS により測定した。

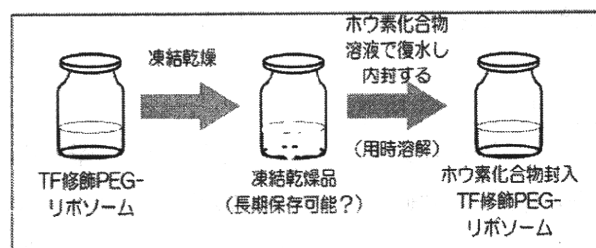


図 11. リポソーム製剤への工夫

長期保存可能で、使用直前にホウ素化合物を内封できる。

C. 研究結果

I. 高集積化ホウ素ナノデバイスの開発と生体内挙動解明・大腸がん移植マウスへの BNCT 効果に関する研究

平成 20 年度

(1) ホウ素脂質の検討

飽和脂肪酸から誘導されるステアシル酸 (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トートキン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シル酸 (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 12 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。

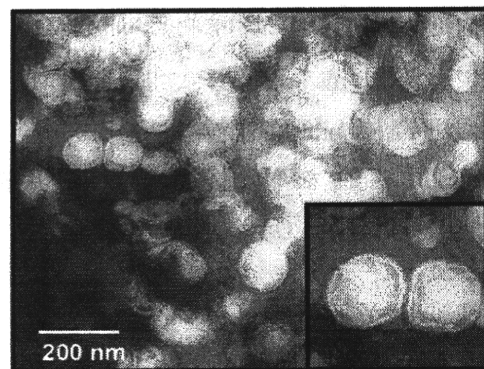


図 12. ホウ素ナノデバイスの電子顕微鏡写真

(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 coclon26 に対する細胞毒性を調べた。図 13 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。

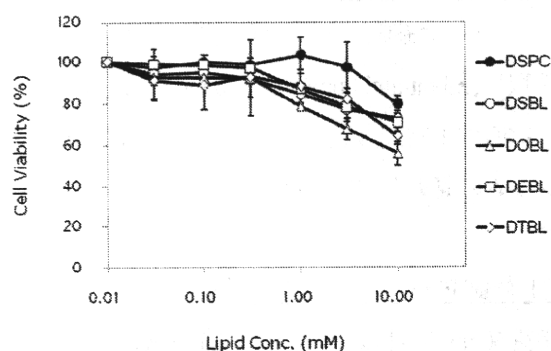


図 13. ホウ素ナノデバイスの細胞増殖阻害曲線

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 14 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。

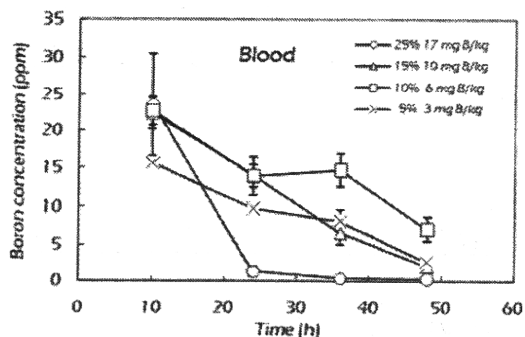


図 14 DSBL-ホウ素ナノデバイスの血中濃度変化

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 15 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。

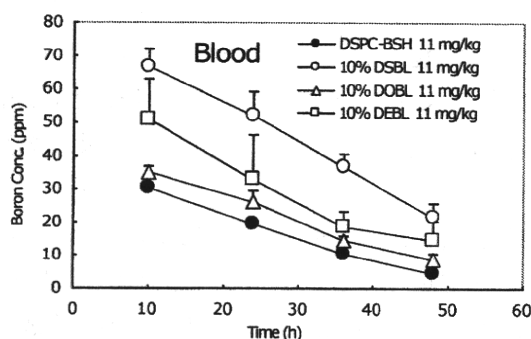


図 15 不飽和ホウ素脂質から調整したホウ素ナノデバイスの血中濃度変化

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 mgB/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 16 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。

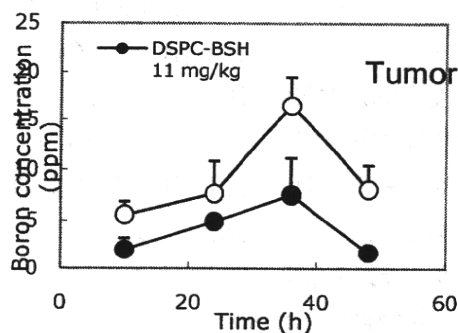


図 16 BSH 内封 PEG リポソームとホウ素ナノデバイスの腫瘍内ホウ素集積性の比較

(3) 膀胱がんターゲット転送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 17 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。

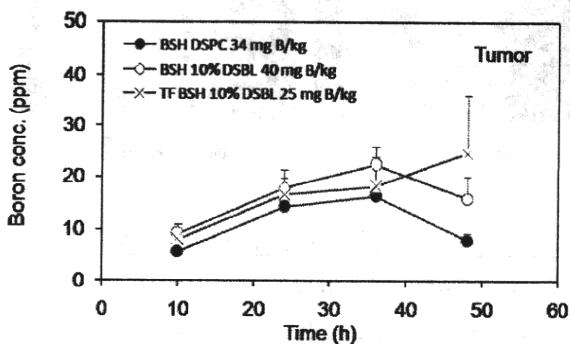


図 17 トランスフェリン修飾型ホウ素ナノデバイスの腫瘍内ホウ素集積

(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