

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 18 に示す。マグネスコ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コープは排出されず 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、マグネスコ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 15 や図 16 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。

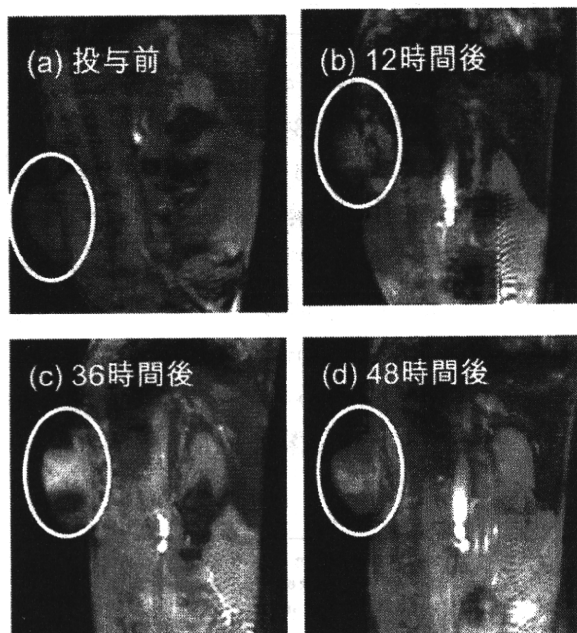


図 18 MRI によるマウス腫瘍内造影効果

(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。

平成 21 年度

(1) 蛍光標識ホウ素脂質の開発とナノデバイス化の検討

BSH 誘導体の合成は文献既知法に従って合成を行った。チオウレア **11** に臭素、塩酸を反応させて化合物 **12** とし、合成しておいた $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{12}$ を入れ、塩化セシウムと反応させることによりセシウム塩の化合物 **13** を合成した。続いて水素化ホウ素ナトリウム、水酸化ナトリウムと反応させた後、塩化セシウムを用いてセシウム塩の BSH **14** とした。そして、ナトリウム塩の BSH **15**、テトラメチルアンモニウム塩の BSH **4** を経た後、プロモプロピオンニトリルを用いて二つのニトリル鎖が導入された化合物 **16** を合成した。最後にテトラメチルアンモニウムヒドロキッドで一つのニトリル鎖を除いて目的化合物 **3** を得た(図 4)。

また、化合物 **6** の合成は 20 年度に報告した不飽和ホウ素脂質の合成法に従って行った。試薬である (S)-(+)-1, 2- イソプロピリデングリセロールを出発物質とし、この化合物とステアリン酸のエステル化を行い、続いてアセタール保護を脱保護とした後、第一級アルコールを TBS 保護した化合物 **6** の合成に成功した。

蛍光色素の導入は次のように行った。12-アミノラウリン酸 **10** と NBD-クロリド **9** を反応させ化合物 **7** を得た。この化合物と先に合成した化合物 **6** とのエステル化を行い、そして TBS 保護の脱保護を行った後、プロモアセチルプロマイドと反応させてプロモアセテート体 **2** を合成した。そして BSH の誘導体 **3** とカップリングさせたのち、最後にカリウム t -ブトキシドでニトリル鎖を除いて、蛍光標識ホウ素脂質 FL-SBL の合成に成功した。

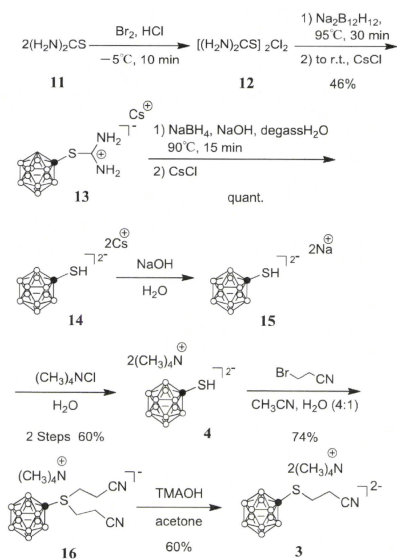


図 19 活性化 BSH の合成

(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

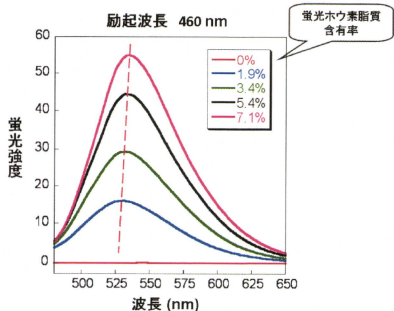


図 20 蛍光ホウ素脂質の各含有率における蛍光強度

蛍光ホウ素脂質の含有率依存的に蛍光強度は変化し

た。また、各含有率における蛍光強度の極大値を見ると、蛍光ホウ素脂質の含有率が高いほど、長波長側にシフトしていることがわかる。これは、含有率が高いほど脂質二分子膜の密度が高くなり、分子間相互作用が大きくなっていることが考えられる。その結果、励起エネルギーに影響を与えていると推測される。

次に、PKH 脂質のみをヒト子宮頸がん由来の細胞である HeLa 細胞に処理 (1 時間) し、蛍光顕微鏡で観察した。図 21 に示すように、PKH のみでは細胞膜上に存在することがわかった。そして、PKH を用いて調製したリポソームを HeLa 細胞に処理 (12 時間) したところ、細胞質に粒子の状態が存在することが観察できた。

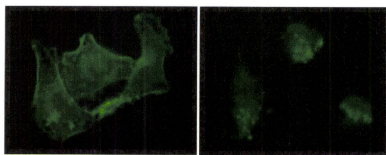


図 21 細胞膜に存在する PKH (左) と細胞質に取り込まれた蛍光リポソーム (右)

この細胞内への取り込みがエンドサイトーシスによるものかどうか確かめるために、熱的にエンドサイトーシスが起らない条件であるナトリウムアジド存在下、4 度で同様に PKH を用いて調製したリポソームを colon26 細胞に曝露したところ、図 22 (右) に示すように細胞膜上に蛍光が見られた。37 度では、細胞質に蛍光が見られることから、蛍光ホウ素リポソームは、エンドサイトーシスにより細胞質に取り込まれていることが分かった。

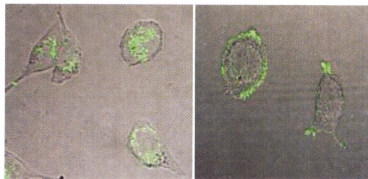


図 22. ホウ素ナノデバイスの細胞内取り込み機構
Colon 26 細胞:37 度 (左) と 4 度 + ナトリウムアジド (右)

そこで、腫瘍深部の切片を蛍光顕微鏡で観察した(図 23)。図の左が蛍光顕微鏡で観察したもの、右が明視野顕微鏡で観察した図と左の図を重ね合わせたものである。蛍光リポソームが Colon 26 移植マウスの腫瘍内で観察することができた。

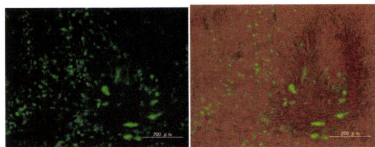


図 23 大腸がん細胞 Colon 26 移植マウスの腫瘍深部切片

次に、蛍光ホウ素脂質 FL-SBL と調製したリポソームをそれぞれ HeLa 細胞に処理 (脂質; 1 時間、リポソーム; 12 時間) し蛍光顕微鏡で観察した(図 24)。PKH のときと同様に、脂質のみでは細胞膜上に存在するのにに対し、蛍光ホウ素ナノデバイスは細胞質に粒子の状態で見ることが見られた。

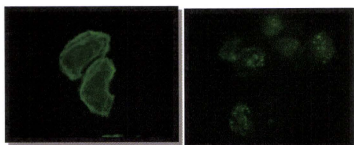


図 24 細胞膜に存在する蛍光ホウ素脂質(左)と細胞質に取り込まれた蛍光ホウ素ナノデバイス(右)

また、蛍光ホウ素リポソームにおいても同様の方法で切片を作製し、腫瘍深部を蛍光顕微鏡で観察した(図 25)。図の左が蛍光顕微鏡で観察したもの、右が明視野顕微鏡で観察した図と左の図を重ね合わせたものである。蛍光ホウ素リポソームが Colon 26 移植マウスの腫瘍内に存在していることが観察できた。

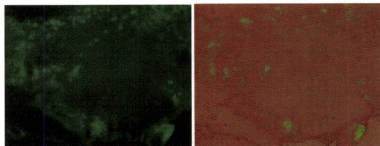


図 25 大腸がん細胞 Colon 26 移植マウスの腫瘍深部切片

しかしながら、蛍光寿命が短いため、より詳細な組織学的検討には FL-SBL を使用することは適していないことが示唆されたため、蛍光脂質 PKH を用いてモデル実験にて検討した。PKH 標識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、図 26 に示すように、PKH 標識リポソーム (緑) は血管内皮細胞マーカーである PECAM-1 (赤) の周辺に局在化していることが明らかとなった。このことから、腫瘍組織内で血管から漏れ出て、その周辺に分布していることが分かる。

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。そこで、低酸素条件下で集積する HIF-1 タンパクを免疫染色した。図 27 に示すように、PKH 蛍光リポソームは、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。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、間質などを經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る。

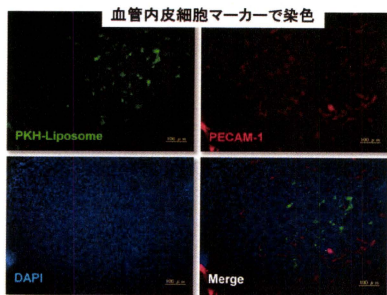


図26 大腸がん細胞Colon 26 移植マウスの腫瘍深部切片。
血管内皮細胞マーカー(PECAM-1)で免疫染色

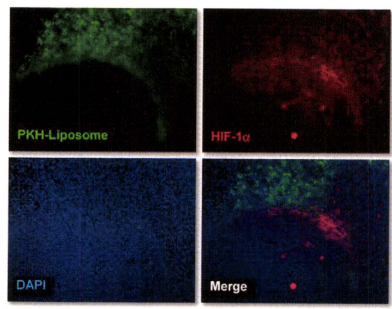


図27 大腸がん細胞 Colon 26 移植マウスの腫瘍深部切片
低酸素マーカー(HIF-1)で免疫染色

(3) ホウ素ナノデバイス封入用ホウ素薬剤の開発

図 28 に示した各種ホウ素イオンクラスターについてマウス大腸がん細胞 (colon 26) に対する細胞成長阻害活性をMT T法にて調べた。図 28 に示すように、ホウ素クラスターアミンである BNH3 がもっとも低毒性であり、その 50%細胞成長阻害濃度は 32.9 ml と、現在臨床に用いられている BSH の 2.4 ml に対し、約 10 倍以上毒性が低いことが分かった。

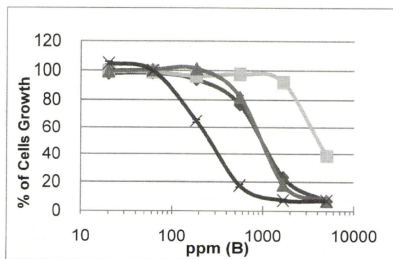


図 28 内封ホウ素薬剤のマウス大腸がん細胞に対する細胞成長阻害活性、×=BSH; ▲=BH; ◆=BOH; ■=BNH3

(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 2 mg/ml や CD44 の中和抗体である BRIC235 をこの実験系でFITC 標識ヒアルロン酸と混合すると CD44-IgG chimera との競合がおり、BRIC235 やヒアルロン酸では標識ヒアルロン酸のプレートへの結合性は阻害される。そこで、各種ホウ素製剤を標識ヒアルロン酸とともに CD44-IgG chimera 固相化プレートに添加すると、2mg/ml のヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスは、他のホウ素製剤に比し、有意に標識ヒアルロン酸と CD44-IgG chimera との結合を阻害した。

次に各種ホウ素製剤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。腫瘍内ホウ素濃度は、DSBL で 24.41 ppm、ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスで 8.38 ppm と高い値を示した。一方、T/N 比は、ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスで 6.46 と非常に高い値を示した。

平成 22 年度

(1) ナノデバイスのホウ素高集積化の検討

内封ホウ素薬剤の合成は文献既知法に従って合成を行った。高集積化ホウ素ナノデバイスの調製においては、逆相蒸発法(REV 法)で行い、添加剤を種々検討した。添加剤なしでは、ホウ素薬剤の内封率は、

ホウ素／リン比で 1.0 であるのに対し、本研究で見出した添加剤では、ホウ素／リン比が 2.3 以上へと飛躍的に向上させることに成功した。さらに、最終的なホウ素ナノデバイス溶液のホウ素濃度は、10,000ppm 以上を達成した。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℃保存で調整 1 日後、3 日後、7 日後、14 日後にそれぞれその溶液を超速心分離機によって上澄を取り除き、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が、ほとんど低下することはなく、安定であることが分かった。

(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

マウス大腸がん細胞を左腿部に移植したマウスに対し、このホウ素ナノデバイス（ホウ素濃度 10,000ppm）を尾静脈注射により 200 μ L 投与したところ、この濃度（ホウ素濃度 100mg/kg）でも毒性は全く見られず、腫瘍内ホウ素濃度も従来の 8~10 倍と前例のない高濃度集積性を達成した。

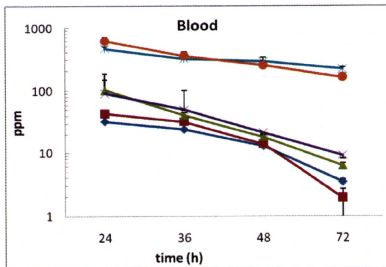


図 29. 血中ホウ素濃度の時間変化

その一方で、血中滞留性も高く、24 時間後では、~600ppm、72 時間後でもおよそ 200ppm であった。高い蓄積を示したのは、肝臓、腎臓、脾臓で 72 時間後においてもそれぞれ 400、200、900ppm であった（図 30）。

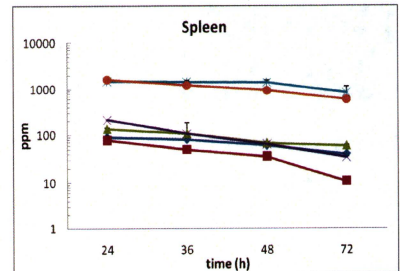
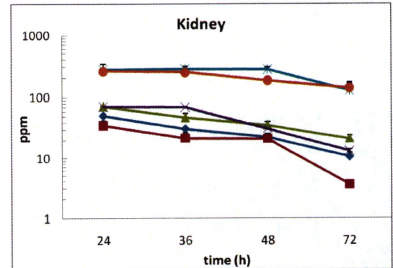
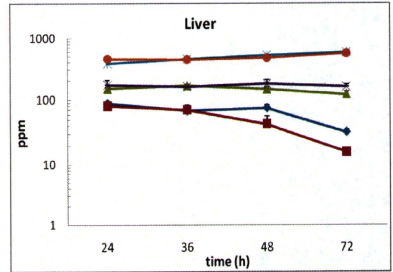


図 30. 各臓器内ホウ素濃度の時間変化

(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

マウス大腸がん細胞を左腿部に移植したマウスに対し、このホウ素ナノデバイス（ホウ素濃度 10,000ppm）を尾静脈注射により 200 μ L 投与し、36 時間後中性子照射を行った。左腿部の腫瘍部位以外は、遮蔽し、京都大学原子炉実験所の原子炉にお

けるレーベル照射設備により行った。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。照射後の時間経過と腫瘍体積の変化を図 31 のようにグラフに示した。照射のみを行った群およびホウ素ナノデバイス（ホウ素濃度で 100mg/kg）のみを投与した腫瘍移植マウス群では、腫瘍の増殖に対し阻害効果は全くみられなかったのに対し、ホウ素ナノデバイスをホウ素濃度で 100mg/kg 投与し中性子照射を行った腫瘍移植マウス群では、照射 8 日後には腫瘍の委縮がみられ、約 2 週間後には全てのマウスにおいて腫瘍が完全に消失した。

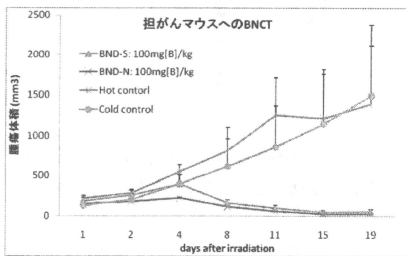


図 31. 中性子照射後のマウス腫瘍の大きさの変化
2 種のホウ素ナノデバイス (BND-S, BND-N) において腫瘍の完全な消失が認められた。

(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

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結果、ヒアルロン酸修飾前比比べて正電荷の方に大きくシフトしていることが分かった。ヒアルロン酸結合型ホウ素ナノデバイスを用い、胸膜中皮腫モデルマウスに BNCT 治療実験を JRR-4 ならびに KUR にて行った。BALB/c マウスの胸腔にマウス中皮腫細胞株を 5×10^6 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注入し、

24 時間後に $0.7\text{--}1.1 \times 10^{12}$ n/cm² の熱中中性子を照射した。各群の平均生存期間、コントロールが 15.1 日、中性子照射のみが 15.3 日であり、BSH 10,000 ppm 群が 19.8 日、HA-BSH DSBL 2,000 ppm と HA-BND-S BSH 2,000 ppm がともに 18.2 日であり、コントロールと差を認めなかったのに対し、HA-BND-S BSH 10,000 ppm 群は 28 日間の観察期間において 5 匹全例が生存しており、有意に生存率の延長を認めた ($p < 0.001$)。また、28 日目にその胸腔内を観察すると 5 匹中 3 匹において腫瘍を認めず、ほぼ治癒させることに成功した。詳細は研究分担者・李千萬の報告書を参照。トランスフェリン修飾ホウ素ナノデバイスでは、ウサギの肝腫瘍モデルを用いて肝動注することにより腫瘍内ボロン濃度を正常肝組織より高めることができた。すなわち投与 72 時間後に、腫瘍ボロン濃度 25ppm、正常肝濃度 10~15ppm と腫瘍内ボロン濃度を正常肝組織より高めることができた。投与 72 時間までであれば、腫瘍ボロン濃度と正常肝ボロン濃度の濃度比を 2 倍に維持できることがわかった。ホウ素ナノデバイスの肝動注による臨床応用へ向けた BNCT 抗腫瘍効果の検証した結果、ホウ素ナノデバイス投与群では顕著な肝腫瘍萎縮効果を見出した。詳細は研究分担者・柳衛宏宣の報告書を参照。また、ヒト膀胱がん細胞を KU7 細胞に対して、トランスフェリン修飾ホウ素ナノデバイスを 10, 30, 100, 300, 1,000 ppm を 1 時間曝露後 2 回洗浄後、ICP により細胞内ホウ素濃度を測定した結果、ヒト膀胱癌細胞の極めて高い細胞内への取り込み ($3.5, 5.0 \cdot \text{g}/10 \times 10^6$ cells) が確認された。また、細胞実験と同条件で施行したマウス膀胱照射実験において、照射 3 カ月後の時点でマウス膀胱に線維化の所見は確認されなかった。詳細は研究分担者・鈴木木の報告書を参照。

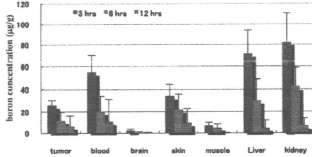
II. ホウ素ナノデバイスの脳腫瘍適応に関する研究 平成 20 年度

(1) ホウ素化合物代謝

BSH については、BSO 投与群、非投与群で図 32 に示

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

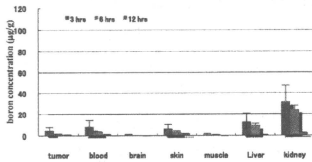


図 32. BSO 投与群 (a)、非投与群 (b) のホウ素取り込みの違い

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 (図 33)。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。

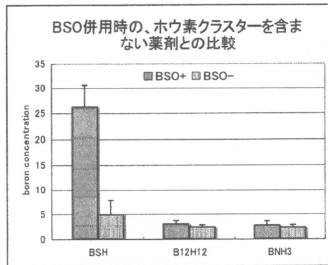


図 33. sulfhydryl 基を含まないホウ素化合物との比較

(2) 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 の腫瘍増形成を認めた。また C6 細胞を Wishter 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、組織を摘出し、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。

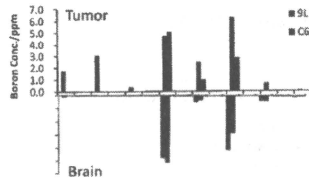


図 34. ラット脳腫瘍および正常脳ホウ素濃度の例 (9L および C6、それぞれにホウ素化合物は異なる)

(3) 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。

平成 21 年度

(1) 新規ナノ粒子の腫瘍内動態の解析

新規ナノ粒子は、安全性は少なくとも 40mg/kg の用量で急性期毒性は観察されなかった。また、血液滞留性は 1 時間から 24 時間までは 20mg/kg 投与で少なくとも 70 ppm の血中ホウ素濃度を維持しており、また 40mg/kg 投与群では 200ppm をこえる濃度を得た。一方で腫瘍内ホウ素濃度は、20mg 投与群の 24 時間値で 20ppm 前後と高値をしめたものの、その後は数 ppm まで速やかに低下する様子が見て取れた。

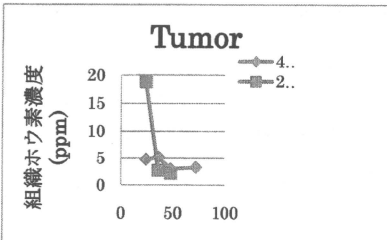
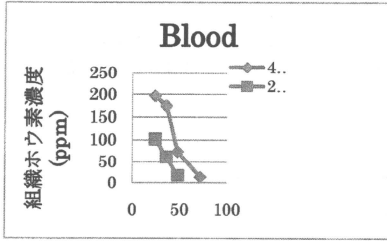


図 35. 新規ナノ粒子の血中および腫瘍内濃度変化

(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:

図のように、BSH 添加後、組織中グルタチオン濃度が上昇する傾向が見られた。また BSO 添付によって組織中グルタチオン濃度は低下する傾向を示した。血球中グルタチオン濃度には、あまり大きな変化が見られなかった (data not shown)。

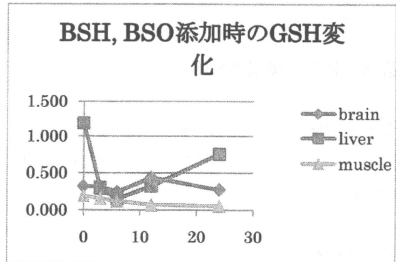
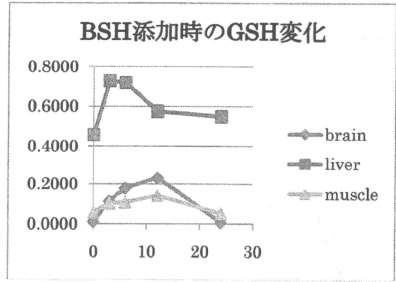
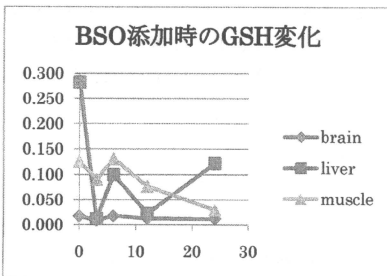


図 36. BSO および BSH の GSH に与える影響

(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)

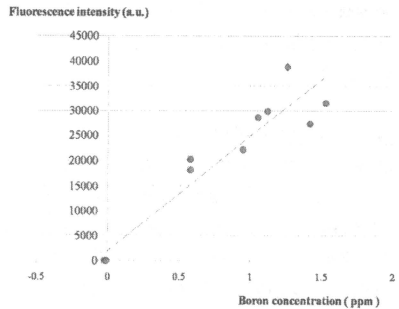


図 37. 蛍光相対強度 (Y軸) とホウ素濃度 (ppm, X軸)

相関係数 $R=0.95$ と良好な相関を示した。したがって比較的簡便な蛍光測定法でホウ素ポルフィリン化

化合物の動態観察が可能であると考えられる。

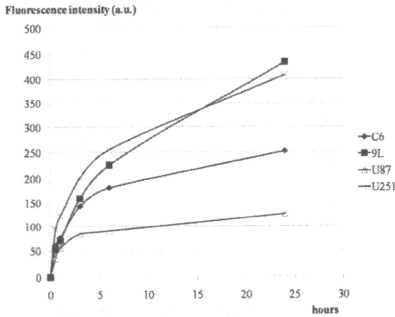


図 38. 蛍光強度の経時変化

また、各種細胞で蛍光強度の経時変化をみたところ、24 時間までは細胞内でのポルフィリン化合物濃度を示すと思われる蛍光強度の上昇をみとめた。

(組織実験)

比較対象としたポルフィリン化合物の Talaporfin Sodium (ホウ素は含有されていない) では、コントロールと比較して鋭敏な化合物由来と考えられる蛍光が観察されたが、他のホウ素化合物では、自家蛍光 (500nm) および長波長側での蛍光がより強く観測され、化合物由来と考えられる蛍光をうまく検出できなかった。

(4) 新規ホウ素化合物の合成

Liposome は EPR 効果により腫瘍に集積する。癌組織は正常組織と異なり、血管透過性が亢進しており、EPR 効果により、サイズを 100nm 前後に調整することで腫瘍血管からは漏出し、腫瘍へと集積する。このメカニズムを利用し、血中滞留性をあげることで、腫瘍内ホウ素濃度を向上させる目的で開発を行った。

・ B5-TAT-lipopeptide の合成

上記新規脂質アナログの合成に mg 単位、純度 90% 以上で成功した。同定は¹H-NMR、ESI-MS により行っ

た。B5-TAT-lipopeptide をヒドロホウ素化により過酸化水素で処理し、BPA 部分がチロシンの化合物と比較することで検討した。結果、同様に3個のピーク 1128 を得た。



図 39. B5-TAT-lipopeptide の ESI-TOF 質量分析

ペプチドの特徴的のシグナルであるチロシン位の 2H に対するアシル鎖末端メチル基の 6H の比よりカップリング収率を算出することで同定を行った。

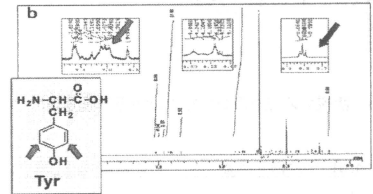


図 40. B5-TAT-lipopeptide の ¹H-NMR スペクトル

その他 2 種類の脂質アナログに対しては、現在合成中ではあるが、mg 単位での合成を目指した量的問題から引き続き試行中である。

・ リポソームへの新規脂質アナログの修飾

約 70% の収率で Lipopeptide がミセル、単分子状態に優先して Liposome 中に存在することが明らかとなり、ペプチド修飾 Liposome が構築されていると考えられた。

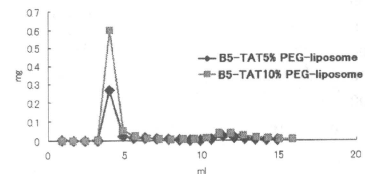


図 41. B5-TAT PEG-liposomes の粒子径

また、Lipopeptide を 5~10mol% で修飾し得られた liposome の粒子径とゼータ電位を測定した。粒子径は 100nm 前後を示し、ゼータ電位はカチオン性ペプチドである TAT の修飾率増加に相関して増加したことより、lipopeptide の存在を確認された。

表 1. Liposome の粒子径とゼータ電位

DSPC:Chol:DSPC-PE-G-D-TAT (molar ratio)	Particle size (nm, n=52)	Zeta potential (mV)
Plain liposome	50.70 ± 0.0	-40
PEG liposome	47.47 ± 6.0	-15
B5-TAT lipopeptide liposome	45.45 ± 5 42.5 ± 5.5 ± 10	17.5 50.7
B5-TAT lipopeptide liposome	45.45 ± 5 42.5 ± 4.2 ± 5.5 ± 10	105.9 147.8

・マウス大腸がん細胞を用いたホウ素濃度の検討

B5-TAT5% で調整された liposome は control として用いた BSH 溶液の 156 倍の取り込み効率およびホウ素濃度向上が見られた。

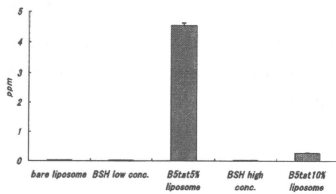


図 42. B5-TAT5% で調整された liposome の取り込み

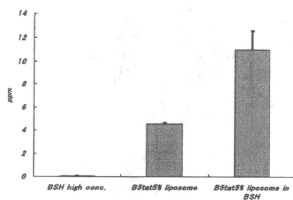


図 43. BSH 内封 B5-TAT5% liposome の取り込み

また、B5-TAT5% liposome に BSH を封入したリポソームにおいては、さらなるホウ素濃度向上が見られ

た。

平成 22 年度

(1) 新規ナノデバイスの腫瘍内動態の解析

新規ナノデバイスは、少なくとも 40mg/kg の用量で静脈投与を行った限りでは、観察される限り急性期毒性は示さなかった。手技に伴う死亡や、明らかな深頸脱落症状は認めなかった。ホウ素濃度の経時変化を図 44 に示す。血中濃度は 24 時間で $114.27 \pm 47.19 \cdot \text{g/g}$ 、36 時間で $68.95 \pm 22.30 \cdot \text{g/g}$ 、48 時間で $26.37 \pm 17.44 \cdot \text{g/g}$ と、血液滞留性は 36 時間までは 40mg/kg 投与で少なくとも 70 ppm の血中ホウ素濃度を維持しており、良好な血液滞留性を示した。

皮下腫瘍濃度については、24 時間、36 時間、48 時間、72 時間でそれぞれ、 $29.86 \pm 10.61 \cdot \text{g/g}$ 、 $27.91 \pm 11.48 \cdot \text{g/g}$ 、 $29.57 \pm 17.64 \cdot \text{g/g}$ and $7.08 \pm 6.45 \cdot \text{g/g}$ を示した。脳腫瘍については、有鉤検出濃度限界以下で、測定不能であった。

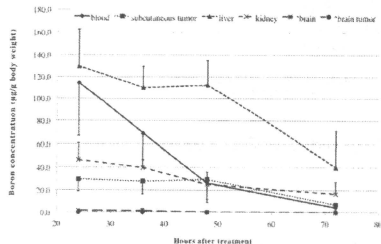


図 44. 各臓器のホウ素濃度の経時変化

腫瘍のホウ素濃度は低下するが、腫瘍選択性の指標となる腫瘍血液比は、経時的に増加する傾向を認め、72 時間でも平均 1 を超えている。

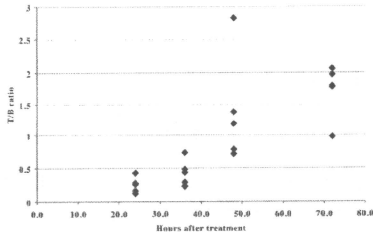


図 45. 腫瘍/血液 比

(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

各組織におけるホウ素濃度を図 46 に示す。グループ 1 でのみホウ素濃度の向上が認められ、グルタチオン枯瘍が BSH 集積増強をもたらすことが示された。

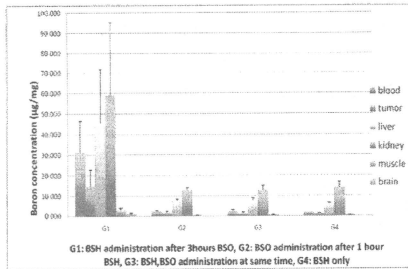


図 46. 各組織におけるホウ素濃度

(3) 新規ホウ素化合物の合成

B5-TAT-liposome の動物投与実験結果、24 時間後に T/B 比は約 2.5 となったが、腫瘍集積濃度は 10ppm 程度と治療可能域に至らなかった。48 時間後にはさらに濃度は低下し、細胞実験で認められた選択的ホウ素濃度上昇が持続しない結果であった。

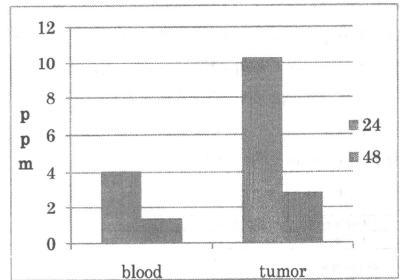


図 46. 腫瘍内および血液中のホウ素濃度

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

腫瘍細胞注入後約 28 日で、マウスは悪液質の状態にあり、胸腔内に観察すると、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膈膜への浸潤を認め、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。

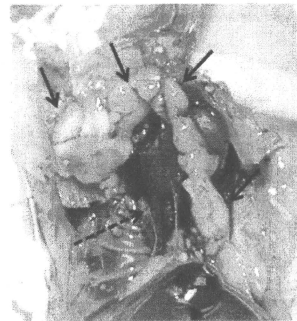


図 47. マウス胸膜中皮腫胸膜炎モデルの胸膜内矢印は胸腔内全体に進展した中皮腫を示し、破線矢印はリンパ節の腫大を示す。

(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 µg/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 µg/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。

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2)。

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。

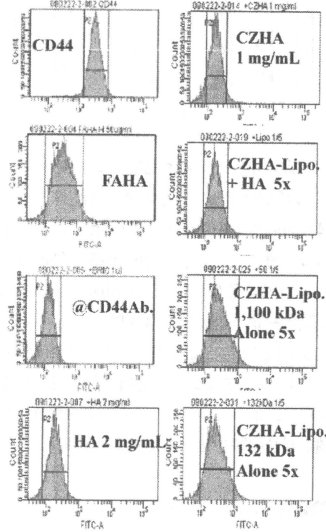


図 48. Flow cytometry による FAHA の MSTO-H211 細胞への結合性の変化

表 2. 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

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

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)

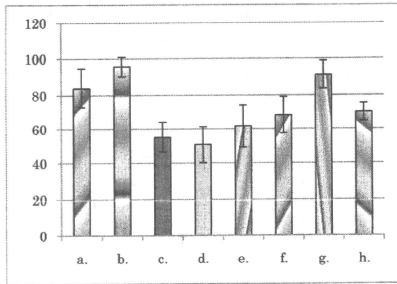


図 49. CD44-IgG chimera 固相化プレートへの

FITC 標識ヒアルロン酸の結合阻害率

a. CD44 中和抗体 BRIC235 12.5 μg/mL, b. 321 kDa ヒアルロン酸 (2 mg/mL), c. ホウ素脂質 DSBL (5 倍希釈), d. ホウ素脂質 DSBL (50 倍希釈), e. 8% ヒアルロン酸含有 BSH (2 mg/mL), f. 8% ヒアルロン酸含有 BSH (0.2 mg/mL), g. 38% ヒアルロン酸含有 BSH (2 mg/mL), h. 38% ヒアルロン酸含有 BSH (0.2 mg/mL) を各 40 μL/well で 17.5 μg の FITC 標識ヒアルロン酸と競合阻害させ、蛍光強度を測定。

FITC 標識された低分子量 (100~300 kDa) のヒアルロン酸と CD44-IgG chimera 固相化プレートとの結合は、38% ヒアルロン酸含有ホウ素ナノデバイス (2 mg/mL) を競合させると 91.1% の結合阻害率を示し、CD44 中和抗体 BRIC235 (83.9%) や 321 kDa ヒアルロン酸 (95.7%) と同等の CD44 結合能を示した。一方、8% ヒアルロン酸含有ホウ素ナノデバイスやホウ素脂質 DSBL の希釈製剤では、有意な阻害活性を示さなかった。

(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

ホウ素ナノデバイス製剤の腫瘍集積性を検討するために、図 2 の如く AB22 マウス胸膜中皮腫細胞株

による胸膜中皮腫モデルを作製した。

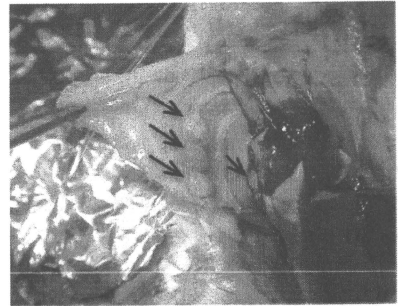


図 50. マウス胸膜中皮腫細胞株による胸膜中皮腫モデル

マウス胸膜中皮腫細胞株 AB22 8×10^6 個/100 μL を BALB/c マウス右胸腔に注入後 8 日目の胸腔内腫瘍。胸郭を頭側に反転した図で、壁側胸膜ならびに胸腔肺尖部近傍に腫瘍が形成されている。

腫瘍塊ならびに患側正常肺組織を摘出後、均質化後 ICP にてホウ素濃度を測定すると、ホウ素脂質 DSBL ならびに 38% ヒアルロン酸含有ホウ素ナノデバイスは、既存のホウ素製剤 BSH よりも腫瘍への高い集積性を認めた (24.4, 8.4 vs 3.6 ppm)、特に DSBL は、非常に高い腫瘍内ホウ素濃度を維持した (図 51)。

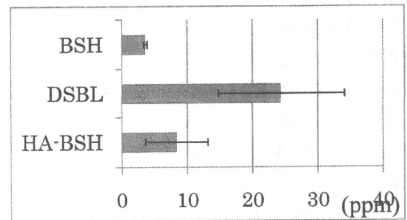


図 51. 腫瘍内ホウ素濃度

また腫瘍/正常組織 ホウ素濃度比も、腫瘍内ホウ素濃度と同様の傾向を示し、DSBL が 6.5, 38% ヒアルロン酸含有ホウ素ナノデバイスが 1.5, BSH が 0.8 であった (図 52)。

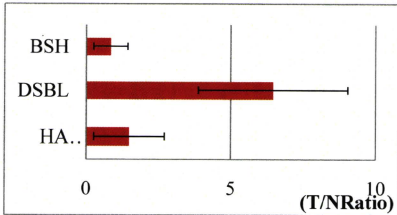


図 52. 腫瘍/正常組織ハロウ素濃度比

腫瘍/血液ハロウ素濃度比も同様の傾向を示し、DSBL が 17.7、38%ヒアルロン酸含有ハロウ素ナノデバイス が 15.4、BSH が 6.9 であった(図 53)。

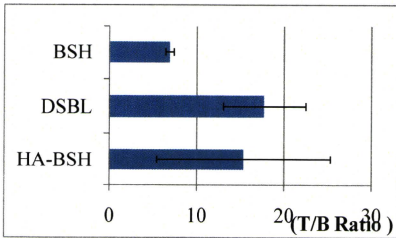


図 53. 腫瘍/血液ハロウ素濃度比

平成 22 年度

(1) ハロ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

ヒアルロン酸結合型ハロウ素ナノデバイスは、free のヒアルロン酸と同程度に標識ヒアルロン酸の腫瘍細胞への結合を阻害し、ハロウ素ナノデバイス製剤の腫瘍細胞への親和性が BSH 等に比し、高いことが明らかとなった。また、HA-BND-S BSH や HA-DSBL-BSH の標識ヒアルロン酸の腫瘍細胞への結合の阻害率は、濃度依存的に上昇した(図 54)。

(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ハロウ素ナノデバイスも用いた BNCT 効果の検討

各群の平均生存期間を図 55 に示したが、コントロールが 15.1 日、中性子照射のみが 15.3 日であり、BSH 10,000 ppm 群が 19.8 日、HA-BSH DSBL 2,000 ppm (data not shown) と HA-BND-S BSH 2,000 ppm がともに 18.2 日であり、コントロールと差を認めなかったのに対し、HA-BND-S BSH 10,000 ppm 群は 28 日間の観察期間において 5 匹全例が生存しており、有意に生存率の延長を認めた ($p < 0.05$)。また、28 日目に HA-BND-S BSH 10,000 ppm 群の胸腔内に観察すると、図 56 に示すように、5 匹中 3 匹において腫瘍を認めず、ほぼ治癒させることに成功した。

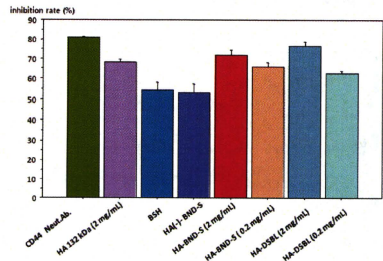


図 54. ハロウ素ナノデバイスの機能評価 (マウス胸膜中皮腫細胞への結合性)

横軸左より CD44 Neutralizing Ab., HA132 kDa (2 mg/mL), BSH, D: HA(-)BND-S, HA-BND-S (2 mg/mL), HA-BND-S (0.2 mg/mL), HA-DSBL (2 mg/mL), HA-DSBL (0.2 mg/mL)

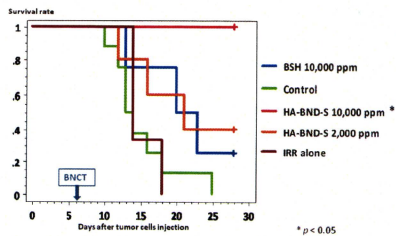


図 55. グラフ横軸は、腫瘍細胞注入後の日数を示し、

縦軸は生存率を示す。BVCT を細胞注入後 7 日目に施行後の各ホウ素薬剤投与マウスの生存率を示す。

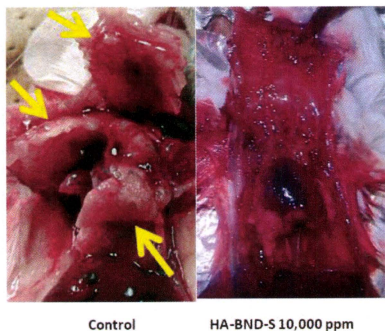


図 56. Control 群、HA-BND-S BSH 10,000 ppm 投与群の胸腔内腫瘍の進展状態を示す。Control 群は、死亡直後のマウスの胸腔内で、矢印に示す胸膜中皮腫瘍が両側胸腔内から縦隔・心臓を覆い尽くしている。一方、HA-BND-S BSH 10,000 ppm 投与群では、腫瘍細胞注入後 28 日目 (BVCT 後 22 日目) の胸腔内においては、生存 5 匹中 3 匹で肉眼的に明らかかな腫瘍を認めなかった。

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. 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。

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

Tf-ホウ素脂質、BSH-Tf-リン脂質は、濃度依存性はなく約 85-95% の viability であり、低い毒性であったが、BSH-Tf-ホウ素脂質では、濃度依存性に毒性を示す傾向があり、1,000 ppm の投与では 74% の viability まで低下した (図 57)。

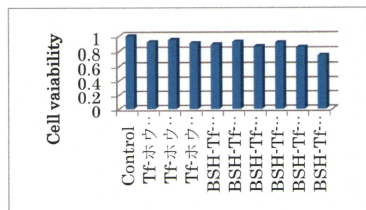


図 57. Cell Viability

2. 膀胱癌 BVCT 線量分布の検討

結果は表 3 にまとめた。

表 3

Table 1. Summary of DV10 parameters for the tumor by various irradiation methods

Irradiation methods	Irradiation time	Tumor (Bladder wall)		
		Minimum dose (Gy-Eq)	Mean dose (Gy-Eq)	Maximum dose (Gy-Eq)
I Ant. Port (Air-filled bladder)	1 hr	3.1	9.1	24.9
I Ant. Port (Water-filled bladder)	1 hr	1.1	7.9	29.2
I Post. Port (Air-filled bladder)	1 hr	0.9	2.2	6.4
A-P Ports (Air-filled bladder)	2 hr (1 h x 1h)	6.0	11.3	25.9

膀胱は腹側に偏して位置しており、背側からの照射による benefit は小さい。膀胱を空気で置換し、かつ体積を小さめに調節することにより、前方 1 門照射で比較的均一に膀胱壁全体を照射できる可能性がある。

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

BSH, Tf-DSPC-Liposome+BSH, Tf-DSBL Liposome 全ての群において、投与する濃度依存性に細胞内へのホウ素ナノデバイスの取り込みが増加することがかくにんされた。1,000 ppm の高濃度の曝露で、BSH 群は $3.18 \mu\text{g}/1 \times 10^6 \text{ cells}$ 、Tf-DSPC-Liposome+BSH 群は $3.47 \mu\text{g}/1 \times 10^6 \text{ cells}$ 、Tf-DSBL Liposome は最も取り込みが大きく、 $4.97 \mu\text{g}/1 \times 10^6 \text{ cells}$ であった (図 58)。

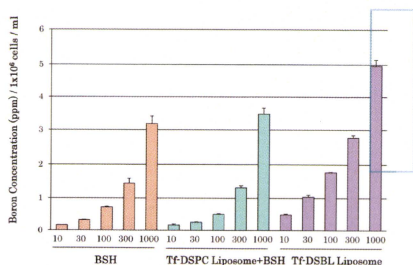


図 58. 細胞内ホウ素濃度

また蛍光物質を封入した PKH26-DSBL Liposome を用いた検討で、ホウ素ナノデバイスは、図 58 に示すように、Endocytosis により細胞室内に局在することが明らかになった。

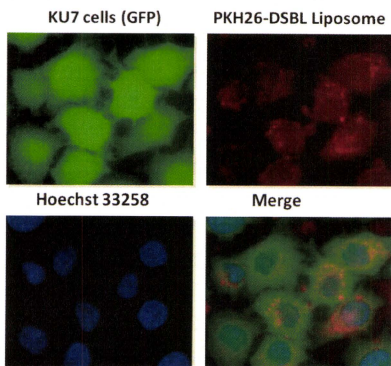


図 58. 細胞内ホウ素局在

2. マウス膀胱に対する照射実験

結果は表 4 にまとめた。

表 4

照射群	非照射群				照射群			
	10	30	100	1000	10	30	100	1000
非照射群								
Tf-DSPC-Liposome								
Tf-DSBL Liposome								
BSH								
Tf-DSPC-Liposome+BSH								
Tf-DSBL Liposome+BSH								

〇: 膀胱上皮の線維化、△: 膀胱上皮の炎症、□: 膀胱上皮の脱落、◇: 膀胱上皮の増殖、+ : 膀胱上皮の増殖、- : 膀胱上皮の減少、* : 膀胱上皮の増殖、** : 膀胱上皮の減少、*** : 膀胱上皮の増殖

非照射群において、リポソーム投与単独においては、特に病理組織学的に異常所見は認められなかった。

照射群においては、BSH を含む Tf-DSPC-Liposome+BSH 群、Tf-DSBL Liposome 群、BHS を含まない Tf-DSPC Liposome 群において、全ての個体において特に異常所見なく、マッソントリクローム染色においても膀胱壁の線維化の所見は認められなかった。

以下、Tf-DSPC Liposome BSH 群 (図 59) と Tf-DSBL Liposome 群 (図 60) の病理組織写真を提示する。

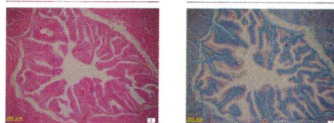


図 59. Tf-DSPC Liposome BSH 群の病理組織

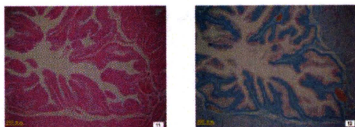


図 60. Tf-DSBL Liposome BSH 群の病理組織

両群の個体ともに、粘膜固有層の膠原線維量に増減を認めなかった。また、筋層の平滑筋束間の膠原線維量の増減も認められなかった。

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. リポソームの調整

ボロン封入Stealth Liposome を学習院大学中村研究室において作成していただき供与を受けた。

ボロン封入Stealth Liposome (ボロン脂質結合型 25% DSBL Liposome : Liposome 1 と表記)

Liposome 1 の構成成分比は以下のとおりである。
(DSPC:DSBL:Cholesterol:PEG-2000 = 0.75 : 0.25 : 1.0 : 0.11 (mol ratio))

このリポソームに封入されたボロン濃度は 2700 ppm である。

ボロン封入 Stealth Liposome (ボロン内封型 DSPC+BSH entrapped liposome : Liposome 2 と表記)

Liposome 2 の構成成分比は以下のとおりである。
(DSPC:Cholesterol:PEG-2000 = 1.0:1.0:0.11 (mol ratio)+BSH (125m mol/l))

このリポソームに封入されたボロン濃度は 4700ppm である。

2. 肝動注モデルの作成

2-1 ウサギ肝動注モデル：移植肝腫瘍として 2 週間の経過観察後に形成された腫瘍は、腫瘍径が 1.5 cm サイズであり、中心壊死は軽度生じているが、肝細胞癌と同様に周辺の血管に富んでおり、モデルに適していると考えられる。また、VX-2 ウサギ肝腫瘍は

腹水の貯留を認めなかった。VX-2 ウサギ肝腫瘍モデルは、腫瘍サイズおよび肝動注手技においても、適したモデルと思われた。

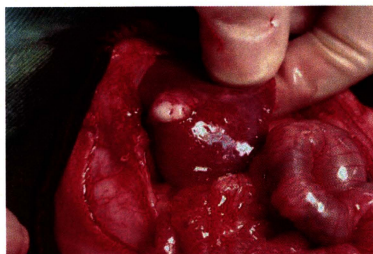


図 61. VX-2 細胞を用いた肝腫瘍形成。肝左葉に白色調の VX-2 腫瘍が認められる。

2-2 肝動注の実際：肝動注手技としては、全身麻酔下で開腹し、肝臓に向かう固有肝動脈を見出し、カテーテルあるいは注射針を挿入して、Stealth liposome の肝動注を行った。

肝動注において 6ml 投与の時点で動脈の攣縮が生じ、最大しか投与できないことが判明した。そのため担癌ウサギあたりボロン(BSH)濃度 15mg / kg の投与量で投与することにした。Liposome 1 は 5.6ml、Liposome 2 は 3.3ml 投与した。

3. Stealth Liposome の肝動注を用いた肝臓癌モデルにおける集積性の検討

Stealth Liposome の癌集積性を調べるために、我々が中性子捕捉療法で用いている ICP-Massspectroscopy を用いたボロンの定量法を用いることにした。

3-1 肝臓における腫瘍と正常肝組織においては、ボロン脂質結合型および内封型のいずれのリポソームにおいても、腫瘍への優位なボロン集積に関する差はなかった。Tumor/Blood ratio は Lip1-24:2.33, Lip1-48:11.73, Lip2-24:1.21, Lip2-48:1.37, Tumor/Normal liver ratio は

Lip1-24:0.79, Lip1-48:1.04, Lip2-24:1.95, Lip2-48:1.18 であった。

- 3-2 肝臓におけるボロン原子の投与絶対量を合わせた場合、肝臓に対するボロンのデリバリー量としては、脂質結合型の方が内封型と比較して約2倍多かった。ただし、内封型のリポソームのボロン濃度が1.74倍高いために、投与脂質量は半分となるため、動脈-門脈系の血管内に単純に流れるのみで組織にリポソームが到達していないものがあるために濃度が低いと思われた。
- 3-3 ボロン内封型においては、投与24時間後に於いて、正常肝組織の約2倍の集積(平均31ppm)を認めた。
- 3-4 脾臓において著明なリポソームの貯留を認められた。

表5. Measurement of boron concentration of tumour and each organ after intra-arterial injection of boron entrapped stealth liposome in VX-2 hepatic cancer bearing rabbit model

	Blood	Liver	Tumour
Cont	0.19±0.01	0.17±0.002	0.42±0.04
Lip1-24	22.29±0.54	66.09±10.54	52.14±12.07
Lip1-48	5.17±0.34	58.30±12.04	60.62±23.89
Lip2-24	26.29±1.83	16.38±3.10	31.92±14.23
Lip2-48	16.84±1.63	19.57±7.816	23.02±3.47

	Lung	Heart	Kidney
Cont	0.20±0.02	0.36±0.02	0.47±0.03
Lip1-24	16.58±0.39	3.25±0.46	8.49±5.63
Lip1-48	9.26±1.44	1.10±0.10	4.65±0.57
Lip2-24	5.52±0.75	3.10±0.42	8.47±1.00
Lip2-48	3.79±0.60	2.07±0.21	7.25±2.75

	Spleen
Cont	0.18±0.06
Lip1-24	532.31±46.01
Lip1-48	492.58±70.05
Lip2-24	227.02±11.68
Lip2-48	325.94±53.07

Cont	0.18±0.06
Lip1-24	532.31±46.01
Lip1-48	492.58±70.05
Lip2-24	227.02±11.68
Lip2-48	325.94±53.07

The boron concentration of tumor and organs were measured by ICP-Massspectroscopy at Jyuntendo University

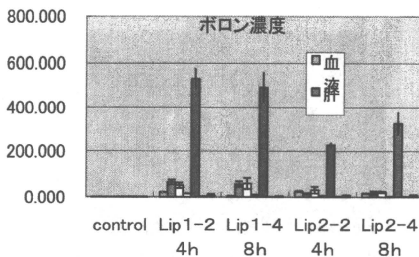


図62. ボロン封入 stealth liposome 肝動注後の VX-2 担癌ウサギも出るにおける腫瘍および各種臓器のボロン濃度(ppm) (Lip-1:ボロン脂質結合型、Lip-2:ボロン内封型)

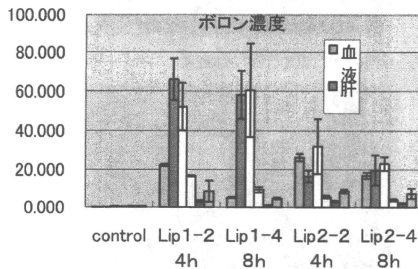


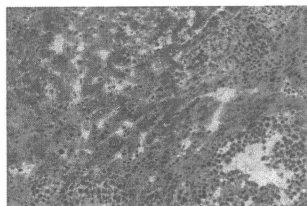
図63. ボロン封入 stealth liposome 肝動注後の VX-2 担癌ウサギも出るにおける腫瘍および各種臓器(脾臓を除く)のボロン濃度(ppm) (Lip-1:ボロン

脂質結合型、Lip-2 : ボロン内封型)

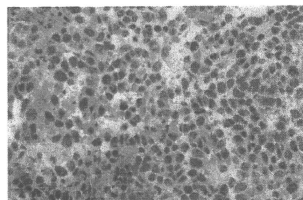
4. 病理組織学的検討

光学顕微鏡的および電子顕微鏡的観察により、リボソーム1、リボソーム2のいずれのリボソームを投与した場合も正常肝組織障害を認めなかった。

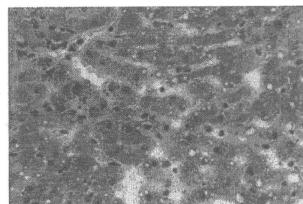
また、投与24時間後においては腫瘍と正常肝組織との境界部分においてもリボソームと思われる脂肪滴の空胞を認めたが、48時間後においては肝小葉の肝静脈周囲にのみ認められ、ドレナージが進んでいると思われる。



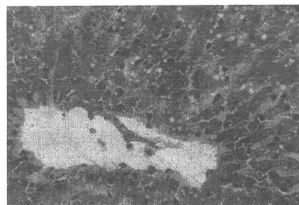
BSH Lip1 24hr x200 Normal liver / tumour border



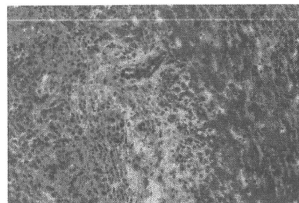
BSH Lip1 24hr x400 tumour



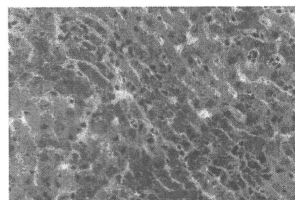
BSH Lip1 24hr x400 Normal liver / tumour border



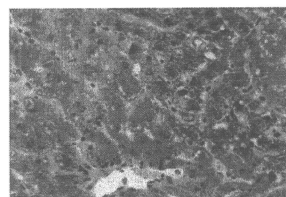
BSH Lip1 24hr x400 Normal liver (hepatic vein site)



BSH Lip1 48hr x200 Normal liver / tumour border

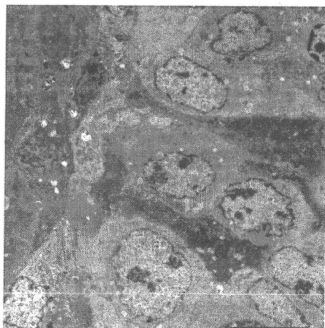


BSH Lip1 48hr x400 Normal liver / tumour border

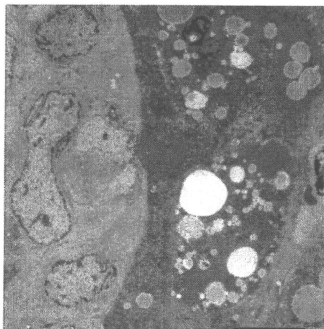


BSH Lip1 48hr x400 Normal liver (hepatic vein site)

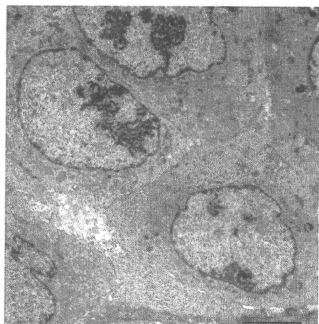
図 64. HE 染色



BSH Lip1 24hr



BSH Lip1 24hr



Control

図 65. 電子顕微鏡像

電子顕微鏡的観察においては、BSH Stealth liposome (ボロン脂質結合型)の肝動注 24 時間後において、対照群と比較して肝腫瘍内にリポソームを思わせる脂質の空胞を認めた。

平成 22 年度

(1) リポソームの調整

ボロン封入Stealth Liposome を学習院大学中村研究室において作成していただき供与を受けた。

① ボロン封入トランスフェリン結合ボロン脂質結合型Stealth Liposome リポソーム組成比は以下のとおりである。

DSPC : DSBL : Cholesterol : PEG=0.9 : 1.0 : 1.0 : 0.08 (mol ratio)

今回の動注実験のために、DSPC : 2840 mg、DSBL : 336 mg、Cholesterol : 1546 mg、PEG : 928 mg、BSH : 2740 mg、トランスフェリン:839.68mg (20wt% total lipid)、PEG-NHS : 223.42mg (3mol% lipid) を使用してリポソームを調整した。

このリポソームに封入されたボロン濃度は 3500ppm である。

(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の肝動注を用いた肝臓癌モデルにおける集積性の検討

Stealth Liposome の癌集積性を調べるために、我々が中性子捕捉療法で用いている

ICP-Massspectroscopy を用いたボロンの定量法を用いることにした。

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の肝動注後の VX-2 ウサギ肝腫瘍モデルにおける腫瘍および正常肝組織のボロン濃度を測定すると、PEG Liposome の表面をトランスフェリンで修飾することにより、投与 72 時間後に、腫瘍ボロン濃度 25 ppm、正常肝濃度 10~15ppm と腫瘍内ボロン濃度を正常肝組織より高めることができた。また、投与 72 時間までであれば、腫瘍ボロン濃度と正常肝ボロン濃度の濃度比を 2 倍に維持できる