

ことがわかった。また、リポソームを肝動注した場合において、肝臓の部位により濃度差は生じておらず、均一に肝動注できていることが分かった。

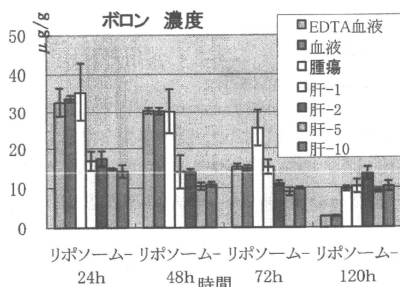


図 66. ボロン封入トランスフェリン結合ボロン脂質結合型ステルスリポソームの肝動注後の VX-2 ウサギ肝腫瘍モデルにおける腫瘍および正常肝組織のボロン濃度 ($\mu\text{g/g}$)

(3) 中性子捕捉療法における腫瘍増殖抑制効果

全身麻酔下に、担癌ウサギを照射用に作成したホルダーに固定し、京都大学原子炉実験所重水照射炉において、熱中性子 $2 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$ を照射した。2 週間後にウサギを犠牲死させ、肝腫瘍および腹腔内の状態を観察した。

図 4 のように、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 3 日後に熱中性子照射を行うと著明な腫瘍増殖抑制効果を認めた。熱中性子のみの照射では腫瘍の増殖抑制は認められず、BNCT の効果を確認できた。さらに、BNCT による、正常肝組織の壊死などの障害および全身臓器不全は認められなかった。

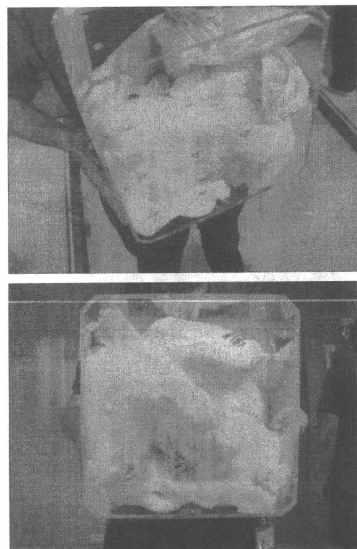
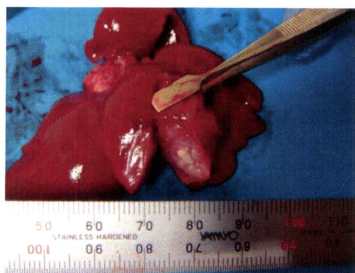


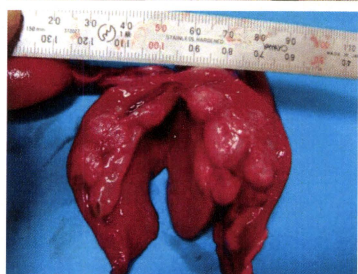
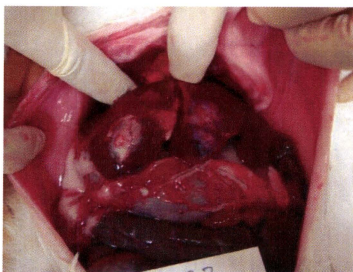
図 67. トランスフェリン結合 ^{10}B SH 脂質結合および封入 PEG Liposome の VX-2 ウサギ肝腫瘍モデルに対する京都大学原子炉実験所における熱中性子照射による BNCT の照射体位





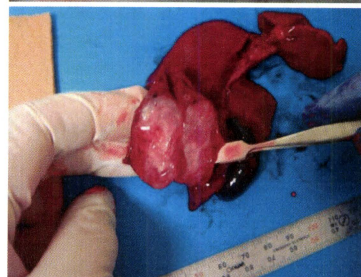
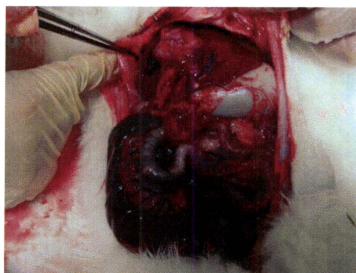
BNCT 治療群(10B-Lip 5ml I.A.)

(BNCT 治療群は、著明な腫瘍の縮小を認めている)



熱中性子照射コントロール

(熱中性子照射群は、肝右葉および左葉に腫瘍の増殖を認め、癌性腹膜炎の転移性結節を認める)



熱中性子非照射コントロール

(非照射群は、肝右・左葉に腫瘍の増殖を認め、癌性腹膜炎の転移性結節を認める)

図 68. 中性子捕捉療法における腫瘍増殖抑制効果

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、エタノールインジェクション法による TF 修飾 PEG-リポソーム調製法の確立

GMP 対応の TF 修飾ホウ素ナノデバイスを調製するにあたり、人体に有害な有機溶媒を使用しない調製法が必要である。そこで、エタノールインジェクション法によりリポソームを調製後、限外ろ過法によりリポソームの精製を行った。

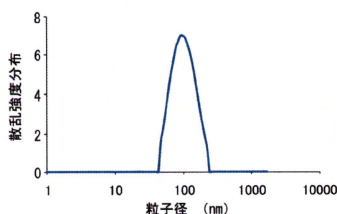


図 69. エタノールインジェクション法により調製したリポソームの粒子径 (106.5 ± 40.8 nm)

リポソームの調製・粒子径の調整には脂質の相転移温度 (DSPC: 55℃) 以上に加熱する必要があるが、一方で、NHS は熱に不安定である。様々な条件を検討した結果、エタノールインジェクションのみで平均粒子径が約 100 nm の均一なリポソーム調製が可能となった (Fig. 1)。粒子径が 200 nm 以下の PEG-リポソームは腫瘍集積性を示す (EPR 効果) ことから、腫瘍を標的とするホウ素デバイスに最適な粒子径が容易に調製可能となった。

次に、TF のリポソーム表面への修飾を確認するため、rabbit-anti-human TF を加えることによる、リポソームの凝集を確認した。

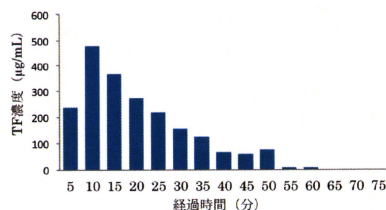


図 70. TF の修飾の確認

その結果、TF 修飾 PEG-リポソームの凝集が確認された (図 70)。このことから、リポソーム表面に TF を修飾可能であることが示された。このように TF を修飾できたのは、エタノールインジェクション法のみで速やかにリポソーム調製可能になったことで NHS の活性が失われなかったためと考えられた。

2. 限外ろ過法による TF 修飾 PEG-リポソームの精製

GMP 対応の TF 修飾ホウ素ナノデバイスを調製するにあたり、作業工程を簡略化するため、カラム、超遠心を用いない方法を確立することが望ましい。そこで、限外ろ過法による TF 修飾 PEG-リポソームの精製を試みた。

Fig. 3a 限外ろ過廃液中の TF 濃度

その結果、限外ろ過廃液中の TF は 60 分間 (循環した液量 1.2 L) の限外ろ過により完全に除去された (図 71)。このことから、リポソーム未結合の TF は 60 分 (1.2 L) の限外ろ過で除去可能であることが示された。次に、エタノール濃度について検討したところ、75 分経過時点においても完全には除去できなかった (図 71)。

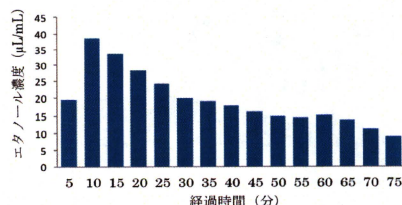


図 71. 限外ろ過廃液中のエタノール濃度

しかし、限外ろ過後の TF 修飾 PEG-リポソーム中に残存しているエタノール濃度を測定したところ、1 μL/mL (初期濃度 91 μL/mL) であったことから使用したエタノールの 99% 以上を除去できた。以上の結果から、限外ろ過 (分子量分画 500kDa) により TF 修飾 PEG-リポソームの精製が可能であることが示された。

3. 調製した TF 修飾 PEG-リポソームの機能評価

今回確立した調製法ではリポソーム調製時に 80℃ まで加熱する。その後、直ちに TF を加えるため、熱変性に伴い TF が失活する恐れがある。そこで、TF 修飾 PEG-リポソームの腫瘍細胞への取り込みを

指標に TF の機能を評価した。その結果、PEG-リポソームと比較して、TF 修飾 PEG-リポソームにおいて高い取り込みが認められた (図 72)。このことから、今回確立したリポソーム調製法は TF の活性を失うことなく修飾可能であると考えられる。さらに、平均蛍光強度を解析したところ、TF 修飾 PEG-リポソームにおいて高い平均蛍光強度を示した (図 73)。このことから、従来と同様に TF はがん細胞に対する有用なアクティブターゲティング分子であることが示された。

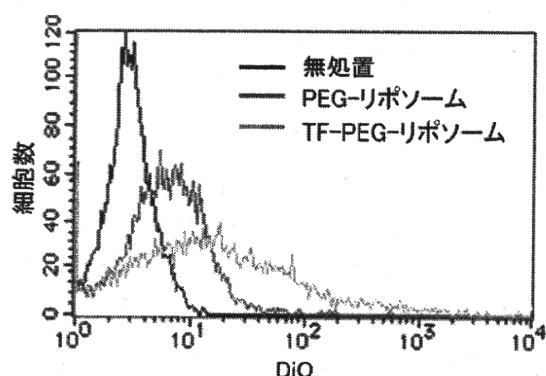


図 72. フローサイトメトリー解析

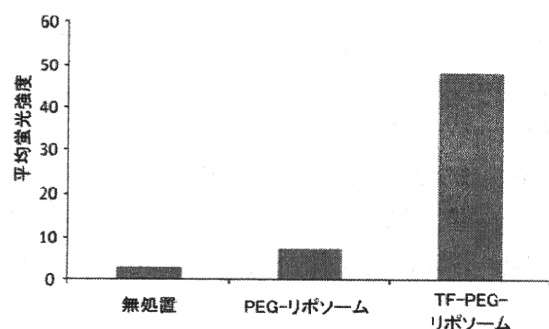


図 73. 平均蛍光強度

平成 22 年度

1. 凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リポソームの復水による粒子径変化

TF 修飾 PEG-リポソームのがん組織集積メカニズムは、がん組織における血管透過性の亢進を利用したパッシブターゲティングと TF レセプターを介したがん細胞内へのアクティブターゲティングによるも

のである。それゆえ、効率よくがん組織に移行させるためには正常血管からはリポソームが組織へ移行せず、がん組織では血管から漏出する粒子径 (100 ~ 200 nm) にコントロールすることが重要である。そこで、ホウ素化合物で復水することによる凍結乾燥前後の粒子径変化を検討した。

表 6. 凍結乾燥前後の TF 修飾 PEG-リポソームの粒子径変化

	粒子径 (nm)
凍結前	135.9 ± 65.1
水	145.9 ± 70.8
BSH	157.1 ± 76.9
BNH	163.8 ± 79.6
BSH+Ad	147.1 ± 71.1
BNH+Ad	140.4 ± 61.1
Ad→BSH	158.1 ± 82.3
Ad→BNH	139.5 ± 59.7
	1320.2 ± 263.4

その結果、凍結乾燥前と比較して、BSH, BNH, BSH+Ad, BNH+Ad, Ad→BSH では顕著な粒子径変化は認められなかった。また、このときの粒子径はパッシブターゲティングを効率よく誘導可能な 100 ~ 200 nm であった。一方、Ad→BNH では一部が 1000 nm を超える粒子径となった。これはリポソームの一部が凝集したことによるものと考えられた。

2. ホウ素化合物の TF 修飾 PEG-リポソーム内封率の検討

凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リポソームは、ホウ素化合物の水溶液で復水するだけでリポソーム内にホウ素化合物を封入可能と考えられる。そこで、凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リポソームをホウ素化合物溶液で復水することによるホウ素化合物の内封率について検討した。

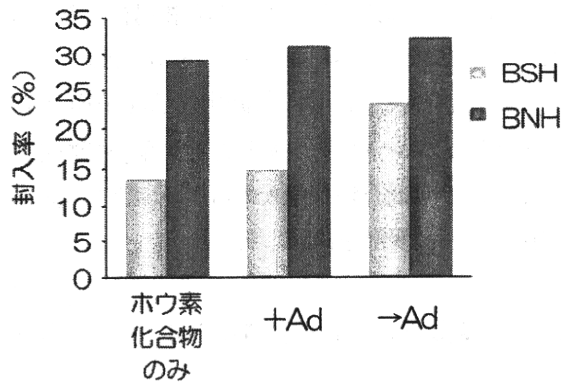


図73. ホウ素化合物のTF修飾PEG-リポソーム内封率

その結果、ホウ素化合物はBSHよりもBNHで高い封入率を示した。また、添加剤を用いた場合には、封入率は向上する傾向が認められた。これらのことから、凍結乾燥TF修飾PEG-リポソームは使用時にホウ素化合物溶液で復水するだけで簡便にホウ素化合物を封入可能なリポソーム製剤として期待される。

D. 考察

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

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、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、本研究では、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

明らかにする。

平成 21 年度

ホウ素ナノデバイスの生体内挙動および分布を組織学的に追跡することは、臨床応用を視野に入れた場合非常に重要となる。21 年度は、蛍光標識化ホウ素ナノデバイスの作成として、蛍光標識部位を有するホウ素脂質 (FL-SBL) ならびに一般的にリポソーム蛍光標識脂質である PKH を用いて研究を進めた。

ホウ素脂質は蛍光発色部位を導入することで、生体内で追跡可能であることが、*in vitro* および *in vivo* 実験で明らかとなった。しかしながら、FL-SBL は蛍光寿命が PKH に比べて短いため、免疫染色による組織学的分析には適していないことが分かった。しかし、FL-SBL はその脂質分子内にホウ素クラスター部位と蛍光部位を有することから、生体内におけるホウ素脂質の代謝機構について解明できる可能性がある。

蛍光標識リポソームを用いた組織学的解析の結果、ホウ素ナノデバイスはそれ自身では、腫瘍血管周辺組織へ集積するものの、がんの悪性化に深くかかわっている低酸素領域へは送達されていないことが明らかとなった。20 年度の研究結果より、ホウ素脂質リポソームの方が BSH 内封 DSPC リポソームよりも効率よく腫瘍組織に集積することが分かっている。このことから、ホウ素脂質とホウ素薬剤内封によるホウ素ナノデバイスを新たに開発検討することで、ホウ素薬剤のコントロールリリースによりこれらの低酸素領域へのホウ素デリバリーが可能となると考える。また、これまでは、リポソーム内封薬剤には BSH が主に検討されてきたが、21 年度の研究の結果、アミン体である BNH3 が、毒性が最も低く有効であることが見出されたことは、重要である。

ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスは、20 年度に開発検討を行い、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。21 年度は、このヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスを用いて *in vitro* ならびに *in vivo* 実験を

行ったが、*in vitro* では CD44 受容体依存的にヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスが取り込まれることを明らかにした。さらに、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た結果では、ホウ素濃度で 10mg/kg 投与において、腫瘍内ホウ素濃度が 24.41 ppm、正常肺との T/N 比は 6.43、さらに血液中ホウ素濃度との T/B 比は 17 と目標値の 5 以上をいずれも達成した。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 BNCT 効果を明らかにする。

平成 22 年度

ホウ素ナノデバイスの生体内挙動および分布を組織学的に追跡することは、臨床応用を視野に入れた場合非常に重要となる。21 年度では、蛍光標識化ホウ素ナノデバイスの作成として、蛍光標識部位を有するホウ素脂質 (FL-SBL) により生体内で追跡可能となった。蛍光標識リポソームを用いた組織学的解析の結果、ホウ素ナノデバイスはそれ自身では、腫瘍血管周辺組織へ集積するものの、がんの悪性化に深くかかわっている低酸素領域へは送達されていないことが明らかとなった。22 年度では、それを克服すべく研究の結果、高集積化ホウ素ナノデバイスを新たに開発することに成功した。マウス大腸がん移植マウスにおけるパッシブターゲティング (がん細胞と親和性をもつリガンドを修飾していない) ホウ素ナノデバイスにおいて、腫瘍への高濃度集積性と照射後腫瘍の完全な消失を達成できたこと、さらにヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスにおいて、胸膜中皮腫モデルマウスへの中性子照射によって 5 匹中 3 匹において腫瘍の消失を達成できたことは、腫瘍血管から離れた腫瘍組織へのホウ素デリバリーが上手く行っていることを示唆するものである。

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

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。

(2) 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 C6 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。

(3) 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、生物学的検討を行ってゆく。細胞毒性試験、動物を用いた急性期毒性試験を予定する。

平成 21 年度

(1) 新規ナノ粒子の腫瘍内動態の解析

BSH を内包することで、血中濃度を高く保つことには成功しているが、グリオーマ細胞の腫瘍塊では、治療濃度にはいたらなかった。正常脳濃度との比 T/N(brain) で検討すると、40mg/kg 群の TN 比は 772 時間で 12 であった。20mg/kg では 36 時間では 7 と高値を示し、passive targeting の効果を見ているものと考えられた。一方で BSH は培養細胞に溶液を添付した場合、細胞中から早期 (30 分から一時間程度) で一定濃度まで wash out される。(data not shown) このため、ナノカプセルが組織内で degradation された場合には、蓄積されずに wash out されることも考えられ、BSH 内封の利点が薄れる可能性がある。

(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

いずれも肝臓では 24 時間値は正常に復する傾向となった。BSH 添加時の GSH 変化は、24 時間でほぼ 0 時間と同等に復した。これらは、BSH の細胞内での wash out が早いことを示唆する。

(3) 蛍光を用いたホウ素ポルフィリン化合物の検出方法

細胞実験においては、培地を洗浄することで、比較的良好な蛍光の検出が可能であった。一方組織あるいは生体における分布を蛍光で検出するためには、バックグラウンドの自家蛍光と、検出波長を検討する必要がある。また、絶対濃度を計算するには、その都度コントロールとして組織破碎上清を用いる必要がある。

(4) 新規ホウ素化合物の合成

今回 B5-TAT-liposome の開発により、臨床へと応用可能な新たな新規ホウ素化合物となる可能性を見出すことができた。今後 *in vivo* における安全性、薬物動態を明らかにし、さらなる検討の必要があると考えている。また、腫瘍選択性を持たせた化合物・リポソームの開発により幅広い腫瘍へと応用が可能である。

以上より本リポソームが BNCT において良好な治療効果を期待でき、様々な応用が可能な薬剤であるこ

とが示唆された。

平成 22 年度

(1) 新規ナノ粒子の腫瘍内動態の解析

BSH を内包することで、血中濃度を高く保つことに成功しているが、脳に接種したグリオーマ細胞のホウ素濃度は検出不可能であった。BSH の単独投与と比較し、血中のホウ素濃度は高値である。皮下腫瘍のホウ素濃度は血液に比較して濃度の低下が緩やかであるため、T/B 比で検討すると、48 時間で 1.21 と血中よりも濃い値となる。したがって、腫瘍選択性を重視した照射タイミングは、本ナノデバイスにおいては、48 時間以降であることが推察される。実験脳腫瘍においてホウ素濃度が検出できなかったことについては、liposome の主たる腫瘍選択性にかかわるパッシブターゲティング、すなわち脆弱な腫瘍血管からの漏出というメカニズムが十分にはたらかなかったためと推察される。腫瘍周囲の環境の違いによる増殖過程の差によるものかは今後の検討を要する。

(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

BSO 投与により、グルタチオンが枯渇する。今回の実験結果では、BSO 投与後に BSH 投与した群のみが、いずれのホウ素濃度も上昇がみられた。SH-基の動態に関連していると推察されるが詳細な機序については今後の検討を要する。このような手法で既存のホウ素化合物を用いた治療においても、さらにホウ素濃度の向上ないしは腫瘍/正常組織比が上昇することによって、治療効果の増強あるいは、正常組織の線量低下による副作用の減弱が期待できる。

(3) 新規ホウ素ペプチドリガンドの合成

今回 B5-TAT-liposome の開発により、臨床へと応用可能な新たな新規ホウ素化合物となる可能性を見出すことができた。動物実験においては、比較的高い腫瘍/血液比を示したものの、ホウ素濃度上昇が十分でなかった。このことは、Liposome 粒子が、血液中に投与された場合の安定性、および血管内での安定

性ないしは他臓器でのトラップなどが考えられる。結果として EPR 効果が不十分であると考えられ、安定して腫瘍血管から漏出するサイズおよび脂質組成、表面修飾をさらに検討する必要がある。今後さらに *in vivo* における安全性、薬物動態を明らかにすることで最適化が可能であると考ええる。

DSPE-PEG-BSH の合成については、6 分付近のあるブロードのピーク (†) は、原料(DSPE のみ)のピークがその付近に全く検出されないため、おそらくこのピークが目的物ではないかと考えられる。しかし親水性が強いためにシャープなピークが得られにくかったのだと推察される。

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

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、貴重なものであると考えられる。我々の作製したモデルは、初期には片側胸壁に限局し、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。

平成 21 年度

ヒアルロン酸含有ホウ素ナノデバイスは、*in vitro* の蛍光標識ヒアルロン酸の競合阻害実験により、CD44 へヒアルロン酸と同等の結合性を示した。また、ホウ素脂質 DSBL は、CD44 に特異的な結合性を示さなかった。

一方、*in vivo* の腫瘍集積性に関する実験においては、ホウ素脂質 DSBL の方が、ヒアルロン酸含有ホウ素ナノデバイスに比し、高い集積性を示した。

また、T/N 比、T/B 比を比較すると、ヒアルロン酸ホウ素ナノデバイスは、ホウ素脂質 DSBL に比し、T/N 比が低く、DSBL に比し正常肺組織への集積が高い可能性が示唆された。胸膜中皮腫は正常胸膜に比し、有意に高く CD44 を発現している。一方正常肺組織における CD44 は、多くが肺泡に存在するマクロファージで発現しており、また臓側胸膜に覆われた肺組織にヒアルロン酸ホウ素ナノデバイスが、CD44 を介して結合したとは考え難く。以上より、ヒアルロン酸ホウ素ナノデバイスの正常肺組織への集積は、他の要因で亢進しているものと考えられた。

平成 22 年度

ヒアルロン酸結合型ホウ素ナノデバイスは、胸膜中皮腫細胞表面に豊富に発現する CD44 を標的としたナノデバイス製剤であり、これまでの実験結果より、胸膜中皮腫細胞への高い親和性を有すること、ならびに胸膜中皮腫モデルに

において高い腫瘍特異性を示すことが明らかとなった。

我々は、各種ヒアルロン酸ホウ素ナノデバイスを開発したが、これまでの実験結果においては、HA-BND-S BSH がマウス胸膜中皮腫モデルを用いた BNCT 実験において著明な治療効果を示し、コントロールに比し、有意に高い生存率を示した。残念ながら、経過観察期間に限度があったため、最終的に照射後何日目まで生存可能であったかは不明であるが、5 匹中 3 匹には、照射後 22 日目で明らかな腫瘍を認めず、ほぼ治癒せしめることができた。

しかしながら、残り 2 匹では腫瘍細胞を認めたため、今後は、複数回の照射や、免疫療法との併用療法など、現在胸膜中皮腫治療でも臨床に応用できる方法を模索する必要があると考えられた。

いずれにしても、これまでの治療実験において、本モデルは腫瘍細胞注入後 15 日で死亡する激烈なモデルにも関わらず、腫瘍細胞注入後 28 日目でも全例生存するという、非常に治療効果の高い結果を示した。

今後は、毒性試験など GLP 試験を含めた前臨床試験を行い、現在行われている conventional なホウ素製剤による胸膜中皮腫に対する BNCT の臨床研究を注視しつつ、臨床研究への準備を進めす予定である。

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

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、腫瘍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 をナノデバイスの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。

平成 21 年度

現在まで臨床試験が実施されている BNCT においては、硼素化合物は、静脈より点滴にて全身投与されている。現在、臨床試験で使用されているボロノフェニルアラニン（以下、BPA）を 500mg/kg 投与した場合の血中硼素濃度は、20-30ppm であり、この濃度に、生体内で腫瘍、腫瘍細胞が曝露されていることになる。我々は、すでに深部腫瘍である肝腫瘍に対しては、より高濃度での硼素化合物の投与が必要であると考え、肝動脈よりの動注により、硼素化合物の腫瘍内集積が向上することを既に報告しており、臨床試験も実施している。

本研究で対象疾患としている膀胱上皮内癌は膀胱上皮に癌細胞が拡がり、膀胱内腔に直接癌細胞が表出している状況である。従って、BCG 膀胱療法と同じ考え方で、膀胱内に直接高濃度の硼素化合物を投与することにより、癌細胞に高濃度の硼素を集積させることが可能である。また、全身循環に、硼素化合物が入らないことから、周囲の腸管、皮膚の硼素濃度は 0 であるとみなせるので、有害事象発生の可能性を低く抑えることが可能である。

本研究で明らかになったように、高濃度のホウ素ナノデバイスにより腫瘍細胞内に高濃度のホウ素濃度が達成可能であれば、膀胱上皮内癌に対して BNCT は有効な治療法の 1 つの選択肢としてなり得ると思われる。

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

本研究で対象疾患としている膀胱上皮内癌は膀胱

上皮に癌細胞が拡がり、膀胱内腔に直接癌細胞が露出している状況である。従って、今回の dish に接着したヒト膀胱がん細胞に高濃度のホウ素ナノデバイスを曝露させる条件は、膀胱内に尿道カテーテルを用いて直接高濃度のホウ素ナノデバイスを投与し一定時間保持した状態を再現しているといえる。Dish 上のがん細胞の実験結果が、実際の膀胱がんの取り込みを検討する上で、大変重要かつ有意義な情報を提供することになる。

今回、2 種のホウ素ナノデバイス、Tf-DSPC Liposome+BSH, Tf-DSBL Liposome 1,000 ppm の曝露で $3-4 \mu\text{g}/1 \times 10^6 \text{cells}$ という極めて高い細胞内濃度が達成された。現在まで報告された同種の細胞内取り込み試験と比較して、10 倍以上の高濃度である。その最大の理由は、通常の細胞内取り込み試験では、臨床で用いられることを想定して、ホウ素化合物は全身静脈内投与されることから血中のホウ素濃度を想定した濃度 10-100 ppm で曝露されることが多い。今回の膀胱上皮内癌に対して、ホウ素化合物を膀胱内に直接投与することにより、癌細胞が極めて高濃度のホウ素化合物に曝露される状況というのは、他の部位の癌ではあり得ない。従って、今年度の研究により、高濃度のホウ素ナノデバイスを曝露することにより、腫瘍細胞内に高濃度のホウ素濃度が達成可能であったことから、膀胱上皮内癌に対して BNCT は有効な治療法の 1 つの選択肢としてなり得る重要な知見が得られた。

2. マウス膀胱に対する照射実験

膀胱癌に対する放射線治療で最も問題となるのは、晩期有害事象とされる萎縮膀胱である。この有害事象は、放射線により膀胱壁に線維化が起こり膀胱容量が小さくなってしまい、状況によっては膀胱を全摘することにつながってしまう有害事象である。

我々が想定する膀胱上皮内癌の戦略は、高濃度のホウ素ナノデバイスを膀胱内直接投与することであり、当然、正常膀胱粘膜も高濃度のホウ素ナノデバイスに曝露されることになる。しかし、BNCT における照射の中心となるアルファ線と反跳リチウム原子核の飛程は細胞 1 個分であり、反応は膀胱粘膜でとどまることから、急性期の粘膜反応は出現しても、晩期の有害事象は発生しないことを予想していた。1,000 ppm の Tf-DSPC-Liposome+BSH 群、Tf-DSBL Liposome 群の照射実験において、3 カ月の時点で全く膀胱壁に線維化が認められなかったことは、我々の予想を裏付ける結果であり、臨床試験に向けて極めて重要な知見が得られたといえる。

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

我々は、臨床において肝動注の手技を実際に行うことを考え、確実に肝動注が行える肝腫瘍モデルの実験動物として、今回はウサギ VX-2 腫瘍を選択した。この腫瘍は hypervascular な腫瘍であり、原発性肝臓癌および病期の進行した転移性肝腫瘍を想定できる優れたモデルであり、治療実験を含めた前臨床試験に有用であると思われる。

今回 2 つのタイプの Stealth Liposome(脂質結合型、内封型)を用いて肝腫瘍モデルへの集積性を検討した。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 倍の送達量を示した。また、ボロン内封型においては、投与 2 4 時間後において、正常肝組織の約 2 倍の集積(平均 31ppm)を認めた。脾臓において著明なリボソームの貯留を認めた。さらに、病理学的な検討より、リボソームの腫瘍内への集積を認め、このリボソーム投与量では正常肝組織の病理的なダメージは

認められなかった。これらの実験結果より、照射範囲と照射時期を最適化できれば、正常肝組織へのダメージを軽減し治療効果を上げれる可能性があると思われる。さらに、正常肝組織を回避でき、かつ腫瘍選択性のあるターゲティングが期待される。

平成 22 年度

H21 年度の実験結果より、PEG Liposome を用いては網内系の発達している肝臓において腫瘍と正常肝組織のボロン濃度差を増加させるためには、腫瘍選択的な投与などの工夫が必要と思われた。そのために H22 年度は、PEG Liposome の表面をトランスフェリンで修飾することにより、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 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 倍に維持できることがわかった。

本年度は、熱中性子照射により腫瘍増殖抑制効果も確認できた。このようなインテリジェント化により正常肝組織を回避でき、かつ腫瘍選択性のあるターゲティングが期待される。

VL 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、エタノールインジェクション法による TF 修飾 PEG-リポソーム調製法の確立

GMP 対応のリポソームを調製するためには、クロロホルムを使用しない、もしくは完全な除去を求められる。したがって、従来のリポソーム調製法である逆相蒸発法は使用困難である。今回確立したエタノールインジェクション法は人体に有害な有機溶媒を用いることなく TF 修飾 PEG-リポソームを調製可能であった。また、従来法では約 2 日要した調製時間もリポソーム精製まで含めて約 4 時間で完了でき

ようになり、TF 修飾 PEG-リポソームの大量調製に有利になると考えられた。さらに、エタノールインジェクション法のみで平均粒子径約 100 nm のリポソームを調製可能になったことから、粒子径のコントロールが不要になり、作業工程の簡略化に寄与できるものと考えられた。

2、限外ろ過法による TF 修飾 PEG-リポソームの精製

従来、TF 修飾 PEG-リポソームの精製にはカラムによる分離と超遠心による濃縮が必要であった。リポソームを大量調製することを考慮すると、これらの操作には容量に限度があるため、適した方法とは言えない。そこで、今回は限外ろ過法による TF 修飾 PEG-リポソームの精製を行った。その結果、リポソーム未結合の TF をわずか 1 時間で完全に除去可能であり、迅速かつ簡便に TF 修飾 PEG-リポソームの精製が可能になった。

3、調製した TF 修飾 PEG-リポソームの機能評価

今回調製した TF 修飾 PEG-リポソームのがん細胞への取り込みを評価したところ、TF の修飾により細胞内取り込み量が増加したことから、TF ががん細胞に対する有用なアクティブターゲティング分子であることが示された。BNCT に適したホウ素キャリアの特性として、優れた腫瘍集積性と腫瘍細胞への選択的なデリバリーが必要と考えられる。PEG-リポソームの特性である腫瘍集積性と TF による腫瘍細胞への選択性を兼ね備えた TF 修飾 PEG-リポソームは BNCT に適したホウ素キャリアになるものと期待される。

平成 22 年度

Ad→BNH は最も高い封入率を示したものの、リポソームの凝集が認められたことから、凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リポソームの復水方法としては不適であ

ると判断した。次に高い封入率を示した BNH+ Ad は、がん組織への集積が期待される粒子径であったことから、凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リポソームの復水方法として、適していると考えられる。また、添加剤を用いて高分子化していることから、リポソーム外への漏出を抑制可能と期待される。

今回検討を行った TF 修飾 PEG-リポソームの凍結乾燥製剤化と復水によるホウ素化合物封入の技術は、BNCT を目的としたホウ素化合物に適用可能であるのみならず、薬物などの封入にも適用可能と考えられる。したがって、ホウ素化合物と抗がん剤の水溶液で復水することで、がんに対する化学療法と BNCT を同時に実行可能なハイブリッド療法用の DDS キャリアにもなり得ると期待される。

E. 結論

本研究の目指す BNCT では、DDS により腫瘍組織に運ばれたホウ素のみが中性子と核反応を起こし、細胞致死効果の高い α 線ががんを破壊する組織選択的な放射線療法である。現在、日本では世界に先駆け BNCT 用加速器の開発が行われている。2010 年には、京都大学原子炉実験所内に BNCT 用加速器が完成し、動物実験により安全性試験が行われてきた。BNCT には、BPA と BSH の 2 つのホウ素薬剤が臨床に用いられているが、2011 年度中には、BPA の治験が始まる予定であり、近い将来病院併設型加速器 BNCT 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。高い治療効果および適応がん拡大のためには、BPA のみでは万能ではないことから、本研究によって、開発した高集積化ホウ素ナノデバイスは、BPA が認可された後に候補となる有力なホウ素薬剤の一つとなりうると考えられる。

本研究で開発したホウ素ナノデバイスは、リガンド非修飾でも高濃度ホウ素デリバリーが可能である

ことから、肉腫系の腫瘍への応用が期待される。

一方、リガンド修飾型アクティブターゲティングホウ素直デバイスでは、中皮腫、膀胱がん、肝臓がんへの適応が期待される。

今後、臨床研究を目指し非臨床試験に向けた安全性試験およびホウ素ナノデバイスの GMP 製造を計画して行く。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

【著書】

1. 中村浩之、中性子捕捉治療に向けたホウ素ナノキャリア設計・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. H. Nakamura, Liposomal Boron Delivery for Neutron Capture Therapy. In *Methods Enzymology, Liposomes, Part G*; Nejat, D. Ed. Academic Press, Vol. Volume 465, 179-208 (2009)
3. K. Maruyama, Application of transferrin-liposomes for intracellular drug delivery. In *Drug Delivery Systems for Targeted Drug Therapy* (Ed by Y. Park, J. Liang, J. Balthasar, V. Yang) American Association of Pharmaceutical Science, Washington D.C. in press.
4. H. Nakamura, Liposomal Boron Delivery System for Neutron Capture Therapy of Cancer. In *Boron Science: New Technologies and Applications*, N. Hosman Ed. CRC Press, Danvers, Chapter 8, 163-177 (2011)

【原著論文】

5. 中村浩之、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、臨床血液、49(5)

- 294-301 (2008)
6. H. Nakamura, Development of Boron Delivery System for Neutron Capture Therapy of Cancer. Progress in Drug Delivery System XVII, 19-24 (2008).
7. H. Nakamura, Liposomal Boron Delivery System for Neutron Capture Therapy. YAKUGAKU ZASSHI (Review) 128, 193-208 (2008).
8. C.-H. Lee, G. F. Jin, J. H. Yoon, Y. J. Jung, J.-D. Lee, S. Cho, H. Nakamura, S. O. Kang, Synthesis and Characterization of Polar Functional Group Substituted Mono- and Bis-(o-carboranyl)-1,3,5-triazine Derivatives. Tetrahedron Lett. 49(1), 159-164 (2008).
9. 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)
10. Yamamoto T, Nakai K, Matsumura A: Boron neutron capture therapy for glioblastoma. *Cancer letters* 262, 143-52 (2008)
11. 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)
12. 丸山一雄、鈴木亮、小田雄介、宇都口直樹、リポソーム技術を基盤とする”デリバリーシステムと免疫療法”の構築, *Drug Delivery System* 23(6), 657-665, 2008.
13. Fuwa N, Suzuki M, Sakurai Y, Nagata K, Kinashi Y, Masunaga S, Maruhashi A, Imahori Y, Kodaira T, Tachibana H, Nakamura T, Ono K. Treatment results of boron neutron capture therapy using intra-arterial administration of boron compounds for recurrent head and neck cancer. *Br J Radiol.* 2008;81:749-52.
14. Suzuki M, Endo K, Satoh H, Sakurai Y, Kumada H, Kimura H, Masunaga S, Kinashi Y, Nagata K, Maruhashi A, Ono K. A novel concept of treatment of diffuse or multiple pleural tumors by boron neutron capture therapy (BNCT). *Radiother Oncol.* 2008; 88:192-195.
15. Miyatake SI, Kawabata S, Yokoyama K, Kuroiwa T, Michiue H, Sakurai Y, Kumada H, Suzuki M, Maruhashi A, Kirihata M, Ono K. Survival benefit of boron neutron capture therapy for recurrent malignant gliomas. *J Neurooncol.* 91:199-206 (2009)
16. 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 Comparison of Postoperative Morphological Changes in Remnant Pancreas Between Pancreaticojejunostomy and Pancreaticogastrostomy After Pancreaticoduodenectomy. *Pancreas* 38(2), 203-207 (2009)
17. M. E. El-Zaria, H. Nakamura, New Strategy for Synthesis of Mercapto undecahydrododecaborate Derivatives via Click Chemistry: Possible Boron Carriers and Visualization in Cells for Neutron Capture Therapy. *Inorg. Chem.* 48(24), 11896-11902 (2009).
18. H. Nakamura, M. Ueno, H. S. Ban, K. Nakai, K. Tsuruta, Y. Kaneda, A. Matsumura, Development of Boron Nano Capsules for Neutron Capture Therapy. *Appl. Radiat. Isotope*, 67, S84-S87 (2009).
19. 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. *Appl Radiat Isot* 67: 88-90 (2009)
20. Tsurubuchi T, Yamamoto T, Nakai K, Zaboronok A, Yoshida F, Miyakawa M, Shirakawa M, Yamamoto Y, Matsuda M, Matsumura A. Intracellular uptake of a new boronated porphyrin EC032. *Appl Radiat Isot*. Jul;67(7-8 Suppl):S94-6 (2009)
 21. Basappa, Murugan S, Sugahara KN, Lee CM, ten Dam GB, van Kuppevelt TH, Miyasaka M, Yamada K, Sugahara K. Involvement of chondroitin sulfate E in the liver tumor focal formation of murine osteosarcoma cells. *Glycobiology* 19(7): 735-742, (2009)
 22. Kim A, Enomoto T, Serada S, Ueda Y, Takahashi T, Ripley B, Miyatake T, Fujita M, Lee CM, Morimoto K, Fujimoto M, Kimura T, Naka T. Enhanced expression of Annexin A4 in clear cell carcinoma of the ovary and its association with chemoresistance to carboplatin. *International Journal of Cancer* 125(10): 2316-2322, (2009)
 23. Okura H, Komoda H, Fumimoto Y, Lee CM, Nishida N, Sawa Y, Matsuyama A. Transdifferentiation of human adipose tissue-derived stromal cells into insulin-producing clusters. *Journal of Artificial Organs* 12(2): 123-130 (2009)
 24. Fumimoto Y, Matsuyama A, Komoda H, Okura H, Lee CM, Nagao A, Nishida T, Ito T, Sawa Y. 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. *Tissue Engineering Part C Methods* 15(3): 437-444 (2009)
 25. Suzuki M, Tanaka H, Sakurai Y, Kashino G, Yong L, Masunaga S, Kinashi Y, Mitsumoto T, Yajima S, Tsutsui H, Sato T, Maruhashi A, Ono K. Impact of accelerator-based boron neutron capture therapy (AB-BNCT) on the treatment of multiple liver tumors and malignant pleural mesothelioma. *Radiother Oncol*. 92:89-95 (2009)
 26. Sakurai Y, Tanaka H, Suzuki M, Kinashi Y, Masunaga S, Maruhashi A, Ono K.. A feasibility study of the post-irradiation dose estimation with SPECT technique for BNCT. *Appl Radiat Isot*. 67(7-8 Suppl):S218-21 (2009)
 27. Kato I, Fujita Y, Maruhashi A, Kumada H, Ohmae M, Kirihata M, Imahori Y, Suzuki M, Sakurai Y, Sumi T, Iwai S, Nakazawa M, Murata I, Miyamaru Effectiveness of boron neutron capture therapy for recurrent head and neck malignancies. H, Ono K. *Appl Radiat Isot*. 67(7-8 Suppl):S37-42 (2009)
 28. Kawabata S, Miyatake SI, Nonoguchi N, Hiramatsu R, Iida K, Miyata S, Yokoyama K, Doi A, Kuroda Y, Kuroiwa T, Michiue H, Kumada H, Kirihata M, Imahori Y, Maruhashi A, Sakurai Y, Suzuki M, Masunaga SI, Ono K.. Survival benefit from boron neutron capture therapy for the newly diagnosed glioblastoma patients. *Appl Radiat Isot*. Jul;67(7-8 Suppl):S15-8 (2009)
 29. Kimura Y, Ariyoshi Y, Shimahara M, Miyatake S, Kawabata S, Ono K, Suzuki M, Maruhashi A Boron neutron capture therapy for recurrent oral cancer and metastasis of cervical lymph node. *Appl Radiat Isot*. Jul;67(7-8 Suppl):S47-9 (2009)
 30. Miyatake SI, Kawabata S, Yokoyama K, Kuroiwa T, Michiue H, Sakurai Y, Kumada H, Suzuki M, Maruhashi A, Kirihata M, Ono K.. Survival benefit of boron neutron capture therapy for recurrent malignant gliomas. *Appl Radiat Isot*. Jul;67(7-8 Suppl):S22-4 (2009)
 31. Tanaka H, Sakurai Y, Suzuki M, Takata T, Masunaga S, Kinashi Y, Kashino G, Liu Y, Mitsumoto T, Yajima S, Tsutsui H, Takada M, Maruhashi A, Improvement of dose distribution in phantom by

- using epithermal neutron source based on the Be(p,n) reaction using a 30MeV proton cyclotron accelerator. Ono K. *Appl Radiat Isot.* Jul;67(7-8 Suppl):S258-61 (2009)
32. Kinashi Y, Suzuki M, Masunaga S, Ono K. Bystander effect-induced mutagenicity in HPRT locus of CHO cells following BNCT neutron irradiation: Characteristics of point mutations by sequence analysis. *Appl Radiat Isot.* Jul;67(7-8 Suppl):S325-7 (2009)
 33. Tanaka H, Sakurai Y, Suzuki M, Masunaga S, Kinashi Y, Kashino G, Liu Y, Mitsumoto T, Yajima S, Tsutsui H, Maruhashi A, Ono K. Characteristics comparison between a cyclotron-based neutron source and KUR-HWNIF for boron neutron capture therapy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 267, 1970–1977 (2009)
 34. Kashino G, Fukutani S, Suzuki M, Liu Y, Nagata K, Masunaga SI, Maruhashi A, Tanaka H, Sakurai Y, Kinashi Y, Fujii N, Ono K. A simple and rapid method for measurement of (10)B-para-boronophenylalanine in the blood for boron neutron capture therapy using fluorescence spectrophotometry. *J Radiat Res.* 50:377-382 (2009)
 35. Liu Y, Nagata K, Masunaga S, Suzuki M, Kashino G, Kinashi Y, Tanaka H, Sakurai Y, Maruhashi A, Ono K. Gamma-ray irradiation enhanced boron-10 compound accumulation in murine tumors. *J Radiat Res (Tokyo).* Nov;50(6):553-7 (2009)
 36. Fujita Y, Kato I, Iwai S, Ono K, Suzuki M, Sakurai Y, Ohnishi K, Ohnishi T, Yura Y. Role of p53 mutation in the effect of boron neutron capture therapy on oral squamous cell carcinoma. *Radiat Oncol.* Dec 11;4:63 (2009)
 37. ホウ素の中性子捕捉反応を利用した低侵襲細胞選択的放射線療法 中村浩之、*Yakugaku Zasshi.* 130, 1687-1694 (2010)
 38. 上野学、潘鉉承、中村浩之、リポソームを用いる中性子捕捉治療 *Drug Delivery System.* 25(5), 474-482 (2010)
 39. A. R. Genady, H. Nakamura, Undecahydro-closo-dodecaborates as good leaving groups in organic synthesis: Generation of substituted styrenes via elimination of aryethyl dodecaborates, *Org. Biomol. Chem.* 8, 4427-4435(2010)
 40. 中村浩之, 中性子捕捉治療のためのナノカプセル型ホウ素薬剤送達システム (BDS) の開発 *Pharm. Tech. Japan (invited)* 26, 1005-1012 (2010)
 41. M. Ueno, H. S. Ban, K. Nakai, Y. Kaneda, A. Matsumura, H. Nakamura, closo-Dodecaborate Lipid Liposomes as New Boron Delivery Vehicles for Neutron Capture Therapy of Cancers. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 3059-3065 (2010)
 42. Komoda H, Okura H, Lee CM, Sougawa N, Iwayama T, Hashikawa T, Saga A, Yamamoto A, Ichinose A, Sawa Y, Matsuyama A. Reduction of Neu5GC Xenoantigen on human ADSC/MSCs lead to them as safer and more useful cell sources for realizing various stem cell therapies. *Tissue Engineering Part A* 2010 Apr; 16(4):1143-1155
 43. Okura H, Matsuyama A, Lee CM, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Nagao A, Sougawa N, Sekiya N, Takekita K, Shudo Y, Miyagawa S, Komoda H, Okano T, Sawa Y. Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve left ventricular dysfunction and survival in a rat myocardial infarction model. *Tissue Engineering Part C Methods* 2010 Jun; 16(3): 417-425
 44. Okura H, Komoda H, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Hamada Y, Fumimoto Y, Lee CM, Ichinose A, Sawa Y, Matsuyama A. Properties of Hepatocyte-like Cell Clusters Derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part*

- C Methods 2010 Aug; 16(4): 761-770
45. Inoue M, Lee CM, Ono K, Suzuki M, Tokunaga T, Sawa Y, Okumura M. Clinical Effectiveness of Boron Neutron Capture Therapy for a Recurrent Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor in the Mediastinum. *J Thorac Oncol.* 2010 Dec; 5(12): 2037-2038
 46. Fujii H, Matsuyama A, Komoda H, Sasai M, Suzuki M, Asano T, Doki Y, Kirihaata M, Ono K, Tabata Y, Kaneda Y, Sawa Y, Lee CM. Cationized gelatin-HVJ envelope with sodium borocaptate improved the BNCT efficacy for liver tumors *in vivo*. *Radiat Oncol.* 2011 Jan 20; 6: 8
 47. Inoue M, Lee CM, Ono K, Suzuki M, Tokunaga T, Sawa Y, Okumura M. Clinical effectiveness of boron neutron capture therapy for a recurrent malignant peripheral nerve sheath tumor in the mediastinum. *J Thorac Oncol.* 2010;12:2037-8.
 48. Kinashi Y, Tanaka H, Masunaga S, Suzuki M, Kashino G, Yong L, Takahashi S, Ono K. Ascorbic acid 2-glucoside reduces micronucleus induction in distant splenic T lymphocytes following head irradiation. *Mutat Res.* 2010 Jan;695(1-2):69-74.
 49. Endo K, Yamamoto T, Nakai K, Kumada H, Shibata Y, Matsumura A, JRR-4 facility for animal irradiation experiments, etherap. *Proceedings of 14th International Congress of Neutron Capture Therapy*, pp427-429 (2010)
 50. Shirakawa M, Yamamoto T, Nakai K, Yoshida F, Tsurubuchi T, Matsude M, Yamamoto Y, Yokoyama Y, Matsumura A. Development of a functional liposome modified a novel lipid analog for BNCT. *Proceedings of 14th International Congress of Neutron Capture Therapy*, pp335-338 (2010)
 51. Yoshida F, Nakai K, Isobe T, Inomata R, Zaboronok A, Yamamoto Y, Shirakawa M, Yamamoto T, Matsumura A, Nakamura H. Biodistribution of BSH-encapsulated boron liposome in mouse glioma. *Proceedings of 14th International Congress of Neutron Capture Therapy*, pp339-340(2010)
 52. H. Yanagie, H. Kumada, T. Nakamura, S. Higashi, I. Ikushima, Y. Morishita, A. Shinohara, M. Fujiwara, M. Suzuki, H. Sugiyama, T. Kajiyama, R. Nishimura, K. Ono, M. Eriguchi, H. Takahashi, Feasible Evaluation of Neutron Capture Therapy for Hepatocellular Carcinoma using Selective Enhancement of Boron Accumulation in Tumour with Intra-arterial Administration of Boron-Entrapped Water-in- Oil-in-Water Emulsion. *Proceedings of 14th International Congress of Neutron Capture Therapy*, pp 157-160 (2010)
 53. 柳衛宏宣、高橋浩之、中性子捕捉療法におけるドラッグデリバリーシステムの応用。柳衛宏宣、高橋浩之、日本 AEM 学会誌, 18(1), 12-20, 2010 中性子捕捉療法におけるドラッグデリバリーシステムの応用。日本 AEM 学会誌, 18(1), 12-20, (2010)
 54. Okazaki F, Matsunaga N, Okazaki H, Utoguchi N, Suzuki R, Maruyama K, Koyanagi S, Ohdo S. Circadian Rhythm of Transferrin Receptor 1 Gene Expression Controlled by c-Myc in Colon Cancer-Bearing Mice. *Cancer Res.* 70 (15), 6238-6246 (2010)
 55. Dosimetric evaluation for neutron capture therapy to hepatocellular carcinoma using intra-arterial administration of boron-entrapped water-in-oil-in-water emulsion. Yanagie H, Kumada H, Nakamura T, Higashi S, Ikushima I, Morishita Y, Shinohara A, Fujiwara M, Suzuki M, Sugiyama H, Kajiyama T, Nishimura R, Ono K, Eriguchi M, Takahashi H. *Proceedings of 7th International Conference on Biomedical Engineering*, Hierlemann edt, IASTED, pp126-130 (2010)
 56. H. S. Ban, Y. Uto, H. Nakamura, Hypoxia-Inducible Factor Inhibitors: A Survey of Recent Patented Compounds (2004-2010), Expert Opinion on

Therapeutic Patents, 21(2), 131-146 (2011).

57. Okura H, Saga A, Fumimoto Y, Soeda M, Moriyama M, Moriyama H, Nagai K, Lee CM, Yamashita S, Ichinose A, Hayakawa T, Matsuyama A. Transplantation of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells reduced serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Tissue Engineering Part C Methods* 2011 Feb; 17(2): 145-154
58. Fujii H, Matsuyama A, Komoda H, Sasai M, Suzuki M, Asano T, Doki Y, Kirihata M, Ono K, Tabata Y, Kaneda Y, Sawa Y, Lee CM. Cationized gelatin-HVJ envelope with sodium borocaptate improved the BNCT efficacy for liver tumors in vivo. *Radiat Oncol.* 2011;20;6:8.
59. Iwahori K, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Osaki T, Lee CM, Mizuguchi H, Takahashi T, Ripley B, Okumura M, Kawase I, Kishimoto T, Naka T. Overexpression of SOCS3 exhibits preclinical antitumor activity against malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer*, in press (2011)
60. K. Maruyama, Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects, *Advanced Drug Delivery Rev.*, 63, 161-169 (2011)

【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. 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
3. Development of Boron Nano-Capsules for Neutron Capture Therapy. Nakai K, Nakamura H, Chunman

Lee, Kaneda Y, Matsumura A: Particle 2008USA, Orlando, USA, 10-14 May 2008

4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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 25-26 日
12. 肺腫瘍, 肝腫瘍の現在地. 鈴木 実, 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

13. 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
14. 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
15. 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
16. 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
17. 悪性胸膜中皮腫に対する硼素中性子捕捉療法 (BNCT): 加速器 BNCT と原子炉 BNCT の比較. 鈴木 実、田中浩基、櫻井良憲、劉勇、菓子野元郎、木梨友子、増永慎一郎、丸橋 晃、小野公二、日本放射線腫瘍学会第 21 回学術大会、札幌、2008 年 10 月 16-18 日
18. IGRT 時代における硼素中性子捕捉療法 (BNCT) の役割 (シンポジウム 癌の粒子線治療・各療法の特徴とその将来を展望する). 鈴木 実、菓子野元郎、劉勇、木梨友子、増永慎一郎、田中浩基、櫻井良憲、丸橋 晃、小野公二、第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、2008 年 10 月 28-30 日
19. 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
20. Synthesis and evaluation of a novel liposome containing BPA-peptide conjugate for BNCT. Shirakawa M, Yamamoto T, Nakai K, Aburai K, Kawatobi S, Tsurubuchi T, Yamamoto Y, Yokoyama Y, Okuno H, Matsumura A.: 13th International Congress on Neutron Capture Therapy (Florence, Italy) 2008 年 11 月 2-7 日
21. 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 2-7 日
22. Boron neutron capture therapy (BNCT) for diffuse or multiple pleural tumors: Case reports of two cases. Suzuki M, Endo K, Satoh H, Sakurai Y, Kumada H, Kimura H, Masunaga S, Kinashi Y, Nagata K, Maruhashi A, Ono K. 13th International Congress on Neutron Capture Therapy, Florence (イタリア)、2008 年 11 月 2-7 日
23. 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
24. IGRT, IGRT era における BNCT-加速器中性子源開発後の先に描く将来展望. 鈴木 実、第 105 回関西 Cancer therapist の会. 教育講演、大阪、2008 年 12 月 3 日
25. Work in progress at Medical center for Translational Research, Osaka University Hospital. Lee CM, Myoi A, Sawa Y. Translational Research Symposium in Pavia University Pavia, Italy 2009 年 2 月 2-4 日
26. 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 月 5 日
27. 中井 啓、鶴淵隆夫、白川 真、山本哲哉、吉田文代、松村 明、中村浩之:ホウ素ポルフィリン化合物の組織内濃度測定 専門研究会「中性子線と粒子線の総合的医療利用」2009 年 2 月 7 日

28. Hyaluronan for CD44 targeting therapy of Mesothelioma. Lee CM, Sougawa N, Tanaka H, Myoi A, Kaneda Y, Sawa Y. 12th Annual San Diego Glycobiology Symposium San Diego, CA, US 2009年3月12-14日
29. 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
30. 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
31. ホウ素中性子補足療法 (BNCT) における新規薬剤ホウ素リボソームの開発と評価. 白川真, 山本哲哉, 中井啓, 横山祐作, 奥野洋明, 松村明: 日本薬学会第129年会, 京都, 2009年3月26-28日
32. ホウ素中性子捕捉療法のための新規ホウ素ポリフィリンを用いた細胞内動態の基礎的検討. 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: 日本薬学会第129年会, 京都, 2009年3月26-28日
33. 代謝拮抗剤を含む生体内吸収性ファイバーの抗腫瘍効果. 宇山 浩、美濃貴之、李 千萬、澤 芳樹 第25回日本医工学治療学会 大阪 2009年4月10-12日
34. Vaccination with increased immunogenicity of tumor antigen MUC1 engineered to express α -gal epitopes elicited significant inhibition of tumor growth. Degichi T, Sawa Y, Ito T, Mori M, Doki Y, Tanemura M, Miyoshi E, Machida T, Kobayashi S, Marubashi S, Lee CM, Takeda Y, Nagano H. 100th American Association for Cancer Research, Annual Meeting 2009 Denver, CO, US 2009年4月18-22日
35. 加速器中性子源導入による硼素中性子捕捉療法 (BNCT)の臨床的品質保証体制 鈴木 実、田中浩基、櫻井良憲、劉勇、菓子野元郎、木梨友子、増永慎一郎、小野公二、丸橋 晃、第68回日本医学放射線学会総会、横浜、2009年4月19日
36. Experimental study of Boron Neutron Capture Therapy for Malignant Mesothelioma. Lee CM, Sougawa N, Tabata Y, Kaneda Y, Sawa Y. International symposium on malignant mesothelioma 2009 Washington DC, US 2009年6月25-27日
37. がん中性子捕捉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4回 医薬品原料 国際展 ファーマジャパン、招待講演、東京、2009年7月1-3日
38. 次世代 DDS 型中性子捕捉治療に向けたホウ素ナノデバイスの開発
中村浩之、第25回 DDS 学会学術集会、招待講演、東京、2009年7月3-4日
39. BNCT が肺腫瘍、肝腫瘍に対して果たす役割. 鈴木 実、日本放射線腫瘍学会第22回学術大会 京都、2009年9月18日
40. ホウ素ナノカプセルの生体内イメージング中村浩之、上田記子、田崎理沙、潘 鉉承、白石貢一、横山昌幸、米谷芳枝 第6回日本中性子捕捉療法学会学術大会、京都、2009年9月19-20日
41. 不飽和アシル鎖ホウ素脂質による新規 DDS ナノキャリアーの開発
猪俣竜、上野学、Mohamed E.、潘 鉉承、鈴木亮、丸山一雄、中村浩之
第6回日本中性子捕捉療法学会学術大会、京都、2009年9月19-20日
42. 膜透過性ペプチド修飾リボソームのBNCTへの展開 白川 真、松村 明: 第6回日本中性子捕捉療法学会 2009年9月19-20日
43. 加速器中性子源による硼素中性子捕捉療法 (BNCT)の治療手順 (案) 鈴木 実、劉勇、菓子野元郎、木梨友子、増永慎一郎、小野公二、