

おり、リンカー部位にエステル基(脂質4)またはカルバメート基(脂質5)を有し、BSHとSを介して結合している。これらのホウ素脂質から調整したリボソームは、正常マウスに対しホウ素濃度が20 mg/kgでは急性毒性は見られなかった。現在、NEDO「次世代DDS型悪性腫瘍治療システム」開発事業(平成17~19年度、プロジェクトリーダー:松村明教授・筑波大学)にて実用化に向けて研究を進めている。

6.3. 今後の展望

BNCTのためのホウ素キャリアーの開発には、いわゆるナノモルレベルで薬理効果が要求される抗がん剤のようなドラッグデザインではなく、ミリモルレベルで投与できるのに十分な低毒性であり、なおかつ腫瘍細胞に集積することが必要とされる。そのために、ここ数十年で低毒性小分子ホウ素化合物の開発だけでなく、本稿でも紹介したようにリボソームを用いたホウ素デリバリーシステムの開発が盛んに研究されてきた。BNCTにおいて1950年代に開発されたBSH、BPAという2剤以外には、まだ臨床応用されたホウ素薬剤は残念ながら登場してない。現在、核燃料の問題からBNCTに適応できる小型加速器の開発が精力的に行われている。熱中性子源が原子炉から加速器に移行できれば都市部病院併設型加速器によるBNCTが可能となることから、将来放射線療法の一般的治療法の一つになるであろう。そのためにも治療効果の高いホウ素デリバリーシステムの開発が期待される。

文 献

- Barth RF, Coderre JA, Vicente MG, Blue TE. Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects. *Clin Cancer Res.* 2005; **11**: 3987-4002.
- Soloway AH, Tjarks W, Barnum BA, et al. The Chemistry of Neutron Capture Therapy. *Chem Rev.* 1998; **98**: 1515-1562.
- Friedlander G, Kennedy JW, Macias ES, Miller JM. *Nuclear and Radiochemistry*, 3rd ed. New York: John Wiley & Sons; 1981: 610.
- AVID M, BROWNELL GL, SWEET WH. The possible use of neutron-capturing isotopes such as boron 10 in the treatment of neoplasms. II. Computation of the radiation energies and estimates of effects in normal and neoplastic brain. *J Clin Invest.* 1952; **31**: 604-610.
- Locher, GL. Biological effects and the therapeutic possibilities of neutrons. *Am J Roentgenol.* 1936; **36**: 1-13.
- FARR LE, SWEET WH, ROBERTSON JS, et al. Neutron capture therapy with boron in the treatment of glioblastoma multiforme. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.* 1954; **71**: 279-293.
- Hatanaka H, Nakagawa Y. Clinical results of long-surviving brain tumor patients who underwent boron neutron capture therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1994; **28**: 1061-1066.
- Mishima Y, Ichihashi M, Hatta S, Honda C, Yamamura K, Nakagawa T. New thermal neutron capture therapy for malignant melanoma: melanogenesis-seeking 10B molecule-melanoma cell interaction from *in vitro* to first clinical trial. *Pigment Cell Res.* 1989; **2**: 226-234.
- Imahori Y, Ueda S, Ohmori Y, et al. Fluorine-18-labeled fluoroboronophenylalanine PET in patients with glioma. *J Nucl Med.* 1998; **39**: 325-333.
- Kato I, Ono K, Sakurai Y, et al. Effectiveness of BNCT for recurrent head and neck malignancies. *Appl Radiat Isot.* 2004; **61**: 1069-1073.
- Miyatake S, Kawabata S, Kajimoto Y, et al. Modified boron neutron capture therapy for malignant gliomas performed using epidermal neutron and two boron compounds with different accumulation mechanisms: an efficacy study based on findings on neuroimages. *J Neurosurg.* 2005; **103**: 1000-1009.
- Suzuki M, Sakurai Y, Hagiwara S, et al. First attempt of boron neutron capture therapy (BNCT) for hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2007; **37**: 376-381.
- Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 1986; **46**: 6387-6392.
- Mumtaz S, Ghosh PC, Bachhawat BK. Design of liposomes for circumventing the reticuloendothelial cells. *Glycobiology.* 1991; **1**: 505-510.
- Yanagië H, Tomita T, Kobayashi H, et al. Application of boronated anti-CEA immunoliposome to tumour cell growth inhibition in *in vitro* boron neutron capture therapy model. *Br J Cancer.* 1991; **63**: 522-526.
- Yanagië H, Tomita T, Kobayashi H, et al. Inhibition of human pancreatic cancer growth in nude mice by boron neutron capture therapy. *Br J Cancer.* 1997; **75**: 660-665.
- Shelly K, Feakes DA, Hawthorne MF, Schmidt PG, Krusch TA, Bauer WF. Model studies directed toward the boron neutron-capture therapy of cancer: boron delivery to murine tumors with liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; **89**: 9039-9043.
- Feakes DA, Shelly K, Knobler CB, Hawthorne MF. Na3[B2OH17NH3]: synthesis and liposomal delivery to murine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; **91**: 3029-3033.
- Pan XQ, Wang H, Shukla S, et al. Boron-containing folate receptor-targeted liposomes as potential delivery agents for boron neutron capture therapy. *Bioconjug Chem.* 2002; **13**: 435-442.
- Antony AC. Folate receptors. *Annu Rev Nutr.* 1996; **16**: 501-521.
- Bohl Kullberg E, Carlsson J, Edwards K, Capala J, Sjöberg S, Gedda L. Introductory experiments on ligand liposomes as delivery agents for boron neutron capture therapy. *Int J*

- Oncol. 2003; **23**: 461-467.
- 22) Allen TM, Brandeis E, Hansen CB, Kao GY, Zalipsky S. A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 1995; **1237**: 99-108.
 - 23) Maruyama K, Ishida O, Kasaoka S, et al. Intracellular targeting of sodium mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) to solid tumors by transferrin-PEG liposomes, for boron neutron-capture therapy (BNCT). *J Control Release*. 2004; **98**: 195-207.
 - 24) Suzuki M, Sakurai Y, Nagata K, et al. Impact of intra-arterial administration of boron compounds on dose-volume histograms in boron neutron capture therapy for recurrent head-and-neck tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006; **66**: 1523-1527.
 - 25) Feakes DA, Shelly K, Hawthorne MF. Selective boron delivery to murine tumors by lipophilic species incorporated in the membranes of unilamellar liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; **92**: 1367-1370.
 - 26) Nakamura H, Miyajima Y, Takei T, Kasaoka S, Maruyama K. Synthesis and vesicle formation of a *nido*-carborane cluster lipid for boron neutron capture therapy. *Chem Commun*. 2004; **7**: 910-1911.
 - 27) Miyajima Y, Nakamura H, Kuwata Y, et al. Transferrin-loaded *nido*-carborane liposomes: tumor-targeting boron delivery system for neutron capture therapy. *Bioconjug Chem*. 2006; **17**: 1314-1320.
 - 28) http://nano.cancer.gov/news_center/natcnotech_news_2006-09-05a.asp
 - 29) Li T, Hamdi J, Hawthorne MF. Unilamellar liposomes with enhanced boron content. *Bioconjug Chem*. 2006; **17**: 15-20.
 - 30) Lee JD, Ueno M, Miyajima Y, Nakamura H. Synthesis of boron cluster lipids: *closo*-dodecaborate as an alternative hydrophilic function of boronated liposomes for neutron capture therapy. *Org Lett*. 2007; **9**: 323-326.

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

学学院大学理学部化学科

1. はじめに

高齢化の進む我が国の死亡原因の第一位はがんであり、その年間死亡者数はおよそ 30 万人である。がん検診の普及、早期診断・早期治療、さらには初期治療としての手術・放射線・化学療法の進歩によって、ある程度治癒率の改善がみられるものの、化学療法では全身的な副作用との戦い、放射線治療では照射野内の正常組織損傷の問題が常に存在する。このような中で、化学療法と放射線療法との両方の原理を上手く利用したホウ素中性子捕捉療法 (BNCT: boron neutron capture therapy) が注目されている。

熱中性子は人体には無害であるが、ホウ素 10 と反応することにより、リチウムとヘリウム (α 線) を生じる。これらの粒子エネルギーは 2.79MeV とおよそ 1 つの細胞を破壊するのに十分なエネルギーである (式 1)。この核反応を利用しがんを殺傷するのが BNCT である。BNCT は、世界に先駆け日本で初めて臨床应用到成功を収めて以来、世界をリードしてきた分野であるが、原子炉からの熱・熱外中性子線を利用しているため、対応できる治療患者数および地域が限られている。現在、病院内設置可能な BNCT 用加速器の開発が日本をはじめ全世界で進められており、加速器から十分な熱中性子が得られるようになれば、都市型病院への併設が可能となることから BNCT は細胞選択的放射線療法として一般に普及することが期待される。



では、なぜホウ素分子なのか？ 中性子を原子核に照射した際に、中性子を捕捉する大きさ“中性子捕捉断面積”を主な元素について比較した (Table 1)。中性子捕捉断面積はバーン (1 barn = 10^{-24} cm²) という単位で表される。¹³⁵Xe, ¹⁴⁹Sm, ¹⁵¹Eu, ¹⁵⁷Gd などがきわめて大きい値を示している。¹⁰B の中性子捕捉断面積は 3837 バーンとそれほど大きな値は示していないのに、中性子捕捉療法に有望であるのは主に次に挙げる 4 つの理由からである。(i) ¹⁰B は非放射性で天然のホウ素に約 20% 含まれるため入手容易である。(ii) 上で述べたように核反応の際の α 線の飛程が 1 個の細胞内に限られる。(iii) ホウ素の広範な化学反応性と安定性により種々の生物活性分子や生体関連物質への導入が可能である。(iv) 重金属のような高い毒性を示さない。一方、生体中の元素も中性子を捕捉して放射線を生じるが、その中性子捕捉断面積は ¹⁰B よりも数桁小さな値なので (Table. 1) 通常は無視できる。しかしながら水素と窒素は生体中に高濃度に存在するため、中性子の照射線量に大きく影響す

る。したがってこれらの影響を最小限にするためにも、腫瘍組織内の ^{10}B 濃度が $20\sim 35\mu\text{g/g}$ 、もしくは ^{10}B 原子が 10^9 個/細胞であれば、放射線量のおよそ85%が ^{10}B の中性子捕捉反応から生じると計算されている¹⁾。最終的には照射できる中性子線量の上限は、水素と窒素が中性子を捕捉して出す放射線に周囲の正常組織がどれほど耐えられるかに依存する。このためにも ^{10}B ががん細胞に選択的に集積することが必要であり、実際に臨床上の立場から腫瘍組織内 ^{10}B 濃度が $30\mu\text{g/g}$ 以上、 ^{10}B 濃度の腫瘍組織/血液および腫瘍組織/正常組織の比がいずれも5以上が望ましいとされている。

Table 1. Capture Cross Section Values of Various Nuclides for Thermal Neutrons

| nuclide | cross section capture value ^a | nuclide | cross section capture value ^a |
|-------------------|---|---------|---|
| ^6Li | 942 | H | 0.332 |
| ^{10}B | 3838 | C | 0.0037 |
| ^{113}Cd | 20,000 | N | 1.75 |
| ^{135}Xe | 2,720,000 | O | <0.0002 |
| ^{149}Sm | 41,500 | P | 0.19 |
| ^{151}Eu | 59,002 | S | 0.52 |
| ^{157}Gd | 240,000 | Na | 0.536 |
| ^{174}Hf | 400 | K | 2.07 |

^aCross section capture values in barns.

2. ホウ素デリバリーシステム

近年、ホウ素のがん組織への有効な送達法としてドラッグデリバリーシステムの利用が注目されている²⁾。リポソームDDSを用いたホウ素デリバリーの方法として、大きく2つの戦略に分けられる (Figure 1)。一つは、ホウ素薬剤をリポソーム内に封入する方法である。この方法は、一般的なリポソームを用いたDDSを応用するものであり、BSHなどのホウ素化合物を封入する³⁻⁵⁾。もう一つの方法として、我々はホウ素をリポソーム膜に埋め込む方法を考えた。この方法では、リポソーム内にさらに抗がん剤などの薬剤を封入することができるため、化学療法との複合治療が期待できる。いずれの場合も、リポソーム膜をPEG化することでEPR (enhanced permeability and retention) 効果を高めたり、さまざまな分子をリポソーム膜に結合させることにより、能動的にターゲティングできるような機能を持たせることが可能となってきた。

リポソーム膜内にホウ素を導入したホウ素リポソームの最初の報告は、Hawthorne らによって開発された一本鎖ホウ素イオンクラスター脂質1 (Figure 2) を用いたものであった⁶⁾。この化合物は炭素鎖16の脂溶性部位と水溶性のnido型カルボラン部位からなる両親媒性分子である。彼らは、DSPC、コレステロール、nido型カルボラン脂質1からリポソームを調製した。EMT6細胞を移植

したマウスを用いて生体内ホウ素分布を調べたところ、投与ホウ素濃度 6 mg/kg では腫瘍内ホウ素濃度が投与後 6 時間で 22 ppm、その後 16~30 時間はおおよそ 34 ppm で一定であった。48 時間後には 25 ppm に低下したものの T/N 比は 8.4 であった。

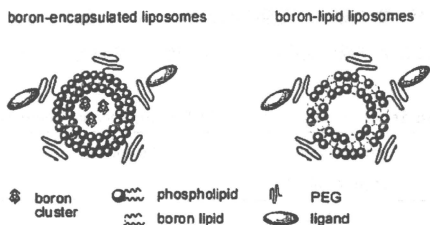


Figure 1. Boron-encapsulated liposomes and boron-lipid liposomes.

一方、我々はリポソーム膜へ効率良くかつ安定に生成するためには、二分子膜を形成しているリン脂質のように脂溶性部位が二本鎖であれば良いと考えた。そこで、二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質 2 を設計した⁷⁾。電子顕微鏡で確認したところ、合成したイオン性ホウ素クラスター脂質 2 から 150~200 nm の大きさのベシクルが形成していることが分かった。これは世界で初めてのホウ素脂質ベシクルである。このホウ素イオンクラスター脂質 2 と DSPC、コレステロールを用いて、能動的ターゲティングを指向した TF 結合型ホウ素クラスターリポソームを合成し、担癌マウスを用いた体内分布ならびに中性子捕捉治療を行った⁸⁾。左足に Colon 26 細胞を移植した BALB/c マウス（生後 6 週間、16~18 g）にトランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリポソームをホウ素濃度で 7.2 mg/kg 投与したマウスでは、72 時間後、筋肉・心臓・脳ではホウ素蓄積はほとんど見られなかった。肺・血液ではおおよそ 10 ppm、脾臓・肝臓では非常に高いホウ素蓄積が見られた。腫瘍内ホウ素蓄積量を見てみると 7.2 mgB/kg 投与した場合は 22 ppm、14.4 mgB/kg 投与の場合では 40 ppm であった。最近、Hawthorne らも同様な二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質 3 を開発している⁹⁾。

このように、二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質は安定なホウ素リポソームを形成し、腫瘍へも効率よく集積することが分かった。しかしながら、ホウ素濃度で 14.4 mg/kg 投与した場合に急性毒性が一部のマウスに見られたことから、我々はより低毒性なホウ素脂質の開発を目指し次世代ホウ素イオンクラスター脂質 4 および 5 を設計した¹⁰⁾。この脂質は、脂溶性部位に生体リン脂質 (Phosphatidylcholines) と同じ立体構造を有しており、リンカー部位にエステル基(脂質 4)またはカルバメート基(脂質 5)を有し、BSH と S を介して結合している。これらのホウ素脂質から調整したリポソームは、正常マウスに対しホウ素濃度で 20 mg/kg では急性毒性は見られなかった¹¹⁾。

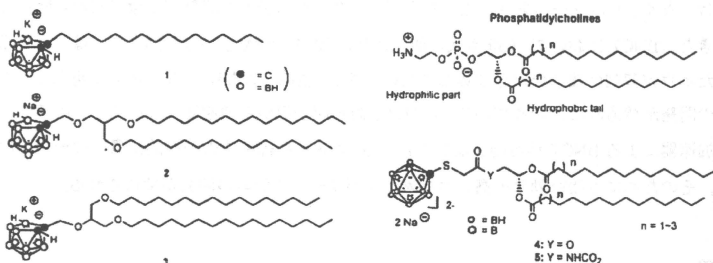


Figure 2. Structures of nido-carborane lipids 1-3 and closo-dodecaborate lipids 4 and 5

3. BNCT 効果

ホウ素脂質 4 ($n = 16$)、DSPC、DSPE-PEG2000、コレステロール（それぞれ 0.25:0.75:0.1:1.0）から調整したホウ素リポソームを用いて上記と同様に Colon 26 細胞を移植した BALB/c マウスに尾静脈より投与し (20 mgB/kg) ホウ素分布を調べたところ、投与 24 時間後に腫瘍内ホウ素濃度が 22 ppm であった (Figure 3)。そこで、投与 24 時間後に中性子照射を行い腫瘍の経時的変化を調べたところ、Figure 4 に示すようにホウ素リポソームを投与したマウスでは、中性子照射 1 週間後には腫瘍の委縮が見られ増殖抑制が見られた。

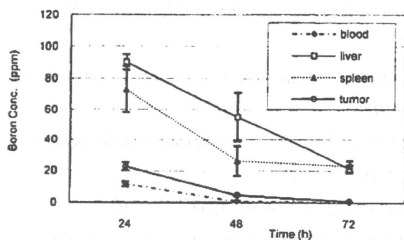


Figure 2. Time course of biodistribution of boron liposomes prepared from 4c in tumor-bearing mice.

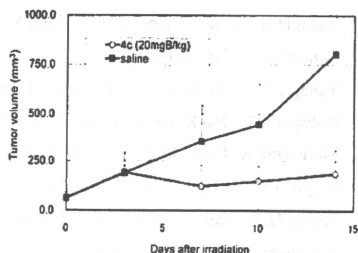


Figure 3. Tumor growth curve of mice bearing colon 26 tumors after injection of 20mg ¹⁰B/kg of boron liposomes, thermal neutron irradiation with $0.9-1.4 \times 10^{12}$ n/cm².

4. おわりに

BNCT のためのホウ素キャリアーの開発には、いわゆるナノモルレベルで薬理効果が要求される抗がん剤のようなドラッグデザインではなく、ミリモルレベルで投与するのに十分な低毒性であり、なおかつ腫瘍細胞に集積することが必要とされる。そのために、低毒性小分子ホウ素化合物の

開発だけでなく、リポソームを用いたホウ素デリバリーシステムの開発が十数年前から盛んに研究されてきた。BNCTにおいて1950年代に開発されたBSH、BPAという2剤以外には、まだ臨床応用されたホウ素薬剤は残念ながら登場してない。現在、核燃料の問題からBNCTに適応できる小型加速器の開発が精力的に行われている。熱中性子源が原子炉から加速器に移行できれば都市部病院併設型加速器によるBNCTが可能となることから、将来放射線療法の一般的治療法の一つになるであろう。そのためにも治療効果の高いホウ素デリバリーシステムの開発が期待される。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました京都大学原子炉実験所小野公二教授、京都大学薬学部丸山一雄教授、大阪大学大学院医学研究科金田安史教授、筑波大学大学院人間総合科学研究科松村明教授、中井啓講師に感謝いたします。また、本研究の一部はNEDO「次世代DDS型悪性腫瘍治療システムの開発事業」(平成17~19年度)により行われたものであり、ここにお礼申し上げます。

6. 参考文献

- (1) Javid M, Brownell G. L, Sweet W. H. *J. Clin. Invest.* 31, 604-610 (1952).
- (2) 中村浩之、*臨床血液*、49, 294-301 (2008).
- (3) Yanagie H, Tomita T, Kobayashi H, Fujii Y, Takahashi T, Hasumi K, Nariuchi H, Sekiguchi M. *Br. J. Cancer*, 63, 522-526 (1991).
- (4) Yanagie H, Tomita T, Kobayashi H, Fujii Y, Nonaka Y, Saegusa Y, Hasumi K, Eriguchi M, Kobayashi T, Ono K. *Br. J. Cancer*, 75, 660-665 (1997).
- (5) Maruyama K, Ishida O, Kasaoka S, Takizawa T, Utoguchi N, Shinohara A, Chiba M, Kobayashi H, Eriguchi M, Yanagie H. *J. Control. Release*, 98, 195-207 (2004).
- (6) Feakes D. A, Shelly K, Hawthorne M. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92, 1367-1370 (1995).
- (7) Nakamura H, Miyajima Y, Takei T, Kasaoka S, Maruyama K. *Chem. Commun.* 1910-1911 (2004).
- (8) Miyajima Y, Nakamura H, Kuwata Y, Lee J. D, Masunaga S, Ono K, Maruyama K. *Bioconjugate Chem.* 17, 1314-1320 (2006).
- (9) Li T, Hamdi J, Hawthorne M. F. *Bioconjugate Chem.* 17, 15-20 (2006).
- (10) Lee J. D, Ueno M, Miyajima Y, Nakamura H. *Org. Lett.* 9, 323-326 (2007).
- (11) Nakamura H, Lee J.-D, Ueno M, Miyajima Y, Ban H. S. *NanoBiotechnology*, 3, 135-145 (2008).

Development of Boron Delivery System for Neutron Capture Therapy of Cancer

Hiroyuki Nakamura

Department of Chemistry, Faculty of Science, Gakushuin University,
Mejiro, Toshima-ku, Tokyo 171-8588, Japan

Boron neutron capture therapy (BNCT) is a binary cancer treatment based on the nuclear reaction of two essentially nontoxic species, ^{10}B and thermal neutrons. The neutron capture reaction by ^{10}B produces an α -particle and a lithium-7 ion bearing approximately 2.4 MeV, and these high linear energy transfer particles afford precise cell killing. Therefore, the marked accumulation and selective delivery of boron into tumor tissues are the most important requirement to achieve an effective BNCT of cancers. We focused on a liposomal boron delivery system. Accumulation of boron in the liposomal bilayer is highly potent, because drugs can be encapsulated into the vacant inner cell of a liposome. Furthermore, functionalization of liposomes is possible by combination of lipid contents. Therefore, boron and drugs may be simultaneously delivered to tumor tissues for both BNCT and chemotherapy. We recently developed the *nido*-carborane lipid, which has a double-tailed moiety conjugated with *nido*-carborane as a hydrophilic function. The longer survival of tumor-bearing mice injected with the boronated liposomes was observed after BNCT. However, significant toxicity was also observed in the mice injected at higher boron concentrations. In this paper, we report synthesis of *closo*-dodecaborate containing boron lipids. Our design of the boron lipids is based on biomimetic composition of phosphatidylcholines. Mercaptoundecahydrododecaborate ($\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}^2$, BSH) was chosen as an alternative hydrophilic function of boron lipids. BSH is a water-soluble divalent anion cluster and significantly lowered toxicity, and has thus been utilized for clinical treatment of BNCT. We prepared the boronated liposomes from diacylphosphatidylcholines and boron lipids and examined their BNCT effect using tumor bearing mice. Suppression of tumor growth was observed in the mice injected with the boronated liposomes two weeks after neutron irradiation.

中性子捕捉治療のためのリポソーム型ホウ素デリバリーシステム

中村 浩之

Liposomal Boron Delivery System for Neutron Capture Therapy

Hiroyuki NAKAMURA

Department of Chemistry, Faculty of Science, Gakushuin University,
1-5-1 Mejiro, Toshima-ku, Tokyo 171-8588, Japan

(Received September 18, 2007)

Boron neutron capture therapy (BNCT) is a binary cancer treatment based on the nuclear reaction of two essentially nontoxic species, ^{10}B and thermal neutrons. High accumulation and selective delivery of boron into tumor tissue are the most important requirements to achieve efficient neutron capture therapy of cancers. This review focuses on the liposomal boron delivery system (BDS) as a recent promising approach that meets these requirements for BNCT. BDS involves two strategies: (1) encapsulation of boron in the aqueous core of liposomes and (2) accumulation of boron in the liposomal bilayer. Various boronated liposomes have been developed and significant boron accumulation into tumor tissue with high tumor/blood boron ratios has been achieved by BDS.

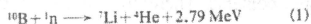
Key words—boron neutron capture therapy (BNCT); boron delivery system (BDS); liposome; polyethylene glycol; boron cluster

1. はじめに

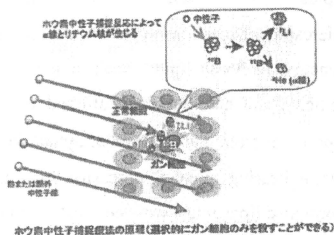
がん検診の普及、早期診断・早期治療、さらには初期治療としての手術・放射線・化学療法が進歩によって、ある程度治療率の改善がみられるものの、化学療法では全身的な副作用との戦い、放射線治療では照射野内の正常組織損傷の問題が常に存在する。このような中で、化学療法と放射線療法の両方の原理をうまく利用したホウ素中性子捕捉療法 (BNCT: boron neutron capture therapy) が注目されている。^{1,2)}

低エネルギーの熱中中性子はエネルギーの高い高速中中性子とは異なり、人体には無害である。しかしながら熱中中性子とホウ素 ^{10}B との反応は、リチウムとヘリウム (α 線) を生じ、これらのエネルギーは 2.79 MeV とおおよそ細胞 1つを殺傷するのに十分であり、その飛程は細胞 1つの直径 (5-9 μm) である (Eq. 1)。したがって、あらかじめホウ素分子をがん細胞のみ選択的に取り込ませそこへ中性子照

射を行えば、がん細胞のみを選択的に破壊することができる (Fig. 1)。これを利用するのが BNCT である。



BNCT の概念は、1936 年に Locher によって最初に提唱された。³⁾ その後、1950 年代にはアメリカにおいて悪性神経膠腫を対象とした最初の試験治療研究が行われたが、硼素化合物の腫瘍選択性と中性子遮蔽の不十分さゆえに成功しなかった。⁴⁾ 1968 年、



ホウ素中性子捕捉療法は腫瘍(選択的にがん細胞のみを殺すことができる)

Fig. 1. Concept of BNCT
(authorized by FFAG-DDS Research Organization).

学習院大学理学部化学科 (〒171-8588 東京都豊島区目白 1-5-1)

e-mail: hiroyuki.nakamura@gakushuin.ac.jp

本誌説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム S6 で発表したものを中心に記述したものである。

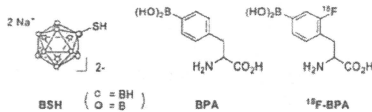


Fig. 2. Structures of BSH, BPA, and ^{19}F -BPA

帝京大学の(故) 島中らは、Fig. 2 に示すように非常に低毒性であるホウ素イオンクラスター (BSH: mercaptoundecahydrodecaborate) を用いて世界で初めて脳腫瘍の BNCT に成功した。⁹⁾ それ以来、日本はこの分野をリードしてきており、現在まで脳腫瘍の治療実績は 250 症例を超えている。一方、1987 年神戸大学の三島らはアミノ酸誘導体である BPA (β -boronophenylalanine) を用いて悪性黒色腫の BNCT に成功した。⁶⁾ 1994 年には、今堀らにより ^{19}F -BPA を用いた PET (positron emission tomography) 診断法が開発され、あらかじめ腫瘍部位のホウ素蓄積量を見積もることができるようになった。⁷⁾ また、大阪府立大の切畑らはステラケミワフェ糖と共同で、ホウ素-10 濃縮した BSH と L 体 BPA の国産化に成功し、現在ではこの 2 つのホウ素薬剤を用いて様々ながんへの適応拡大研究が京都大の小野らによって進められている。⁸⁻¹⁰⁾ さらに、川崎医科大の平塚らは、術前照射を行い BNCT と外科手術の組み合わせで高い治療効果を報告している。

BNCT に用いる熱中性子は現在のところ原子炉から得ているが、加速器から十分な熱中性子が得られるようになれば、都市型病院への併設が可能となることから BNCT は放射線療法の一つとして一般に普及することが期待される。この病院併設型加速器 BNCT の開発が吹米を始め、日本でも京都大・森らによって NEDO「次世代 DDS 型悪性腫瘍治療システムの開発」プロジェクト (プロジェクトリーダー: 筑波大・松村 明、平成 17-19 年度) により進められている。

さて、BNCT においてホウ素 10 を含む分子をいかにしてがん細胞にのみ選択的に高濃度で送り込むかが治療効果の決め手となる訳であるが、具体的には、腫瘍内ホウ素濃度が 30 ppm 以上でなおかつ腫瘍・血液のホウ素濃度比並びに腫瘍/正常組織のホウ素濃度比が 5 以上が目標値となっている。これを

達成するために、様々なホウ素薬剤の開発研究が行われてきた。本稿では、最近注目されているリボソーム DDS (drug delivery system) を用いた新しいホウ素デリバリーシステム [以下“BDS (boron delivery system)”と略す] について紹介する。

2. リボソームを用いたホウ素デリバリー (BDS)

リボソーム DDS を用いたホウ素デリバリーの方法として Fig. 3 に示すように、大きく 2 つの戦略に分けられる。1 つは、ホウ素薬剤をリボソーム内に封入する方法である。この方法は、一般的なリボソームを用いた DDS を応用するものであり、BSH などのホウ素化合物を封入する。もう 1 つの方法として、ホウ素をリボソーム膜に埋め込む方法である。この方法では、リボソーム内にさらに抗がん剤などの薬剤を封入することができるため、化学療法との複合治療が期待できる。いずれの場合も、リボソーム膜を PEG 化することで EPR (enhanced permeability and retention) 効果を高めたり、^{11,12)} 様々な分子をリボソーム膜に結合させることにより、能動的に標的細胞に取り込ませるような機能を持たせることが可能となってきた。

2-1. ホウ素内封型 BDS

2-1-1. リボソームを用いた初めての BDS アプローチ リボソームを用いた BDS は、1991 年に柳原らによって最初に報告された。¹³⁾ 彼らは、エッグ PC (phosphatidylcholine)、コレステロール、DTP-DPPE [3-(2-pyridylidithio) propionyl-dipalmitylphosphatidylethanolamine] (1 : 1 : 0.05) からリボソームを調製し、BSH を封入したのち、そのリボソームを anti-human CEA (carcinoembryonic antigen) モノクローナル抗体と SPDP [*N*-hydroxysuccinimidyl-3-(2-pyridylidithio) propionate] を存在下、反応させて BSH 内封イムノリボソームを合成した。BSH 濃度で 250 mM から得られたリボソームを分析した結果、1 つのモノクローナル抗体に対し



中村浩之

学員院大学院理学部教授。1967 年神戸市生まれ。東北大学理学部卒業。同大学院理学研究科博士前期課程修了。1995 年九州大学有機化学基礎研究センター助手。1997 年東北大学大学院理学研究科助手。この間、ビッツバーグ大学化学科に留学。2002 年学員院大学院理学部助教授。2006 年より現職。1999 年日本化学会進歩賞、2007 年がん分子標的治療研究会奨励賞受賞。

て 1.3×10^5 個のホウ素原子を含むと見積もられている。AsPC-1 (ヒト膵臓がん) 細胞にこのイムノリポソーム溶液を接触させ中性子照射を行ったところ、60%以上の高い細胞致死効果が得られた。さらに、AsPC-1 細胞を移植したヌードマウスを用いて BNCT 効果を調べたところ、BSH を封入していないイムノリポソームを投与した群に比べて、BSH 封入イムノリポソームをホウ素濃度およそ 7.8 mg/kg (マウスの体重 20 g と仮定して計算) 投与し 1 時間後に中性子照射したマウスでは、腫瘍増殖が 50%以下に抑えられた。¹⁴⁾

2-1-2. PEG 化リポソームによる受動的ターゲティング 1992 年 Hawthorne らは、DSPC (distearoyl phosphatidylcholine) とコレステロールを用いて、BSH だけでなく $\text{Na}_2\text{B}_{10}\text{H}_{10}$, $\text{Na}_2(n\text{-B}_{20}\text{H}_{18})$, $\text{Na}_2(f\text{-B}_{20}\text{H}_{18})$, $\text{K}_2\text{B}_{20}\text{H}_{17}\text{H}$, $\text{Na}_3\text{B}_{20}\text{H}_{19}$ といった様々なホウ素イオンクラスター (Fig. 4) を封入したりポソームを報告した。右わき腹にあらかじめ EMT6 細胞を移植した BALB/c マウスに対し、ホ

ウ素薬剤を封入したリポソーム溶液 (200 μl) を静脈注射し、経時的なホウ素の生体内分布を調べた。¹⁵⁾ BSH, $\text{Na}_2\text{B}_{10}\text{H}_{10}$ を封入したリポソームをそれぞれホウ素濃度で体重に対して 6 mg/kg, 7 mg/kg 投与した場合、いずれも実際の治療に必要なレベルの腫瘍内ホウ素濃度は得られなかった。例えば Table 1 に示すように BSH の場合、30 時間後でも腫瘍/血液 (T/B) ホウ素濃度比は 2 であり、腫瘍内ホウ素濃度は 8.8 ppm であった。また、20 個のホウ素原子からなるクラスター $\text{Na}_2(n\text{-B}_{20}\text{H}_{18})$ では、予想通りリポソーム内封ホウ素濃度が高めることができ、投与ホウ素濃度は 15 mg/kg で 48 時間後には 13.6 ppm, T/B 比は 3.3 であった。興味深いことに、 $\text{Na}_2(n\text{-B}_{20}\text{H}_{18})$ の異性体である $\text{Na}_2(f\text{-B}_{20}\text{H}_{18})$ の場合、投与ホウ素濃度 11 mg/kg で 48 時間後には 13.9 ppm と同じ濃度レベルを保ちながら、T/B 比は 12 を示した。言うまでもなく、 $\text{Na}_2(f\text{-B}_{20}\text{H}_{18})$ のバッファー溶液のみを投与しても腫瘍への高い蓄積はみられず、24 時間後腫瘍内ホウ素濃度は 1.9 ppm で T/B 比はおおよそ 1 であったことから、リポソームにより腫瘍選択的にホウ素デリバリーが達成

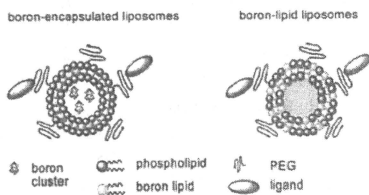


Fig. 3. Boron-encapsulated Liposomes and Boron-lipid Liposomes

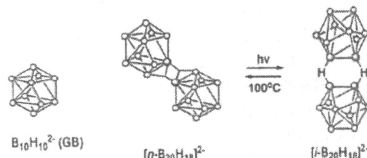


Fig. 4. Isomerization of $\text{B}_{20}\text{H}_{18}^{2-}$

Table 1. Murine Tissue Boron Concentrations from Delivery of Borane Salts by Liposomes^{a)}

| Boron salts-vehicle | Injected boron dose (mg/kg of body weight) | Boron conc. in tumor (ppm) | Tumor/Blood ratio |
|--|--|----------------------------|-------------------|
| BSH-liposome | 7 | 8.8 ^{b)} | 2 ^{b)} |
| $\text{Na}_2(n\text{-B}_{20}\text{H}_{18})$ -liposome | 15 | 13.6 | 3.3 |
| $\text{Na}_2(f\text{-B}_{20}\text{H}_{18})$ -liposome | 11 | 13.9 | 12 |
| $\text{Na}_3[1\text{-}(2\text{-B}_{10}\text{H}_9)\text{-}2\text{-NH}_2\text{B}_{10}\text{H}_{13}]$ -liposome | 11 | 25.4 | 5.3 |
| $\text{Na}_3[1\text{-}(2\text{-B}_{10}\text{H}_9)\text{-}2\text{-NH}_2\text{B}_{10}\text{H}_{13}]\text{-PEG-liposome}$ | 22 | 46.7 | 2.4 |
| Unencapsulated $\text{Na}_3[1\text{-}(2\text{-B}_{10}\text{H}_9)\text{-}2\text{-NH}_2\text{B}_{10}\text{H}_{13}]$ | 10 | 4.4 | 5.0 |
| Lipid 1-liposome | 6 | 25 | 8.4 |
| $\text{Na}_3[1\text{-}(2\text{-B}_{10}\text{H}_9)\text{-}2\text{-NH}_2\text{B}_{10}\text{H}_{13}]\text{-lipid 1-liposome}$ | 18 | 32 | 6.0 |

a) Tissue boron concentrations were determined by ICP-AES (inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy) and the 48 h-tumor boron concentrations and tumor/blood ratios are shown in the table. b) At 30 h-time point.

されていることが分かる。この高い腫瘍蓄積性は、これらの2つの $B_{20}H_{10}^-$ イオンによるものでこれらが腫瘍細胞内に取り込まれたのち、細胞内様々な要素と反応して結合を形成しているのではないかと考えられている。

また、彼らは Fig. 5 に示すように $B_{20}H_{10}^-$ イオンが塩基存在下、液体アンモニアと反応しユニークなアピカル-エカトリアル異性体イオン、 $[1-(2'-B_{10}H_9)-2-NH_3B_{10}H_9]^{3-}$ を生成することを見出した。このナトリウム塩を DSPC リポソームに封入し、担がんマウス内のホウ素分布を調べたところ、投与ホウ素濃度 11 mg/kg において腫瘍内ホウ素濃度は、30 時間後で 32.3 ppm, 48 時間後でも 25.4 ppm であり、T/B 比は 5.3 を達成した。¹⁶⁾ コントロールとして $[1-(2'-B_{10}H_9)-2-NH_3B_{10}H_9]^{3-}$ イオンのパップァー溶液 (ホウ素濃度 10 mg/kg) を投与した場合では、16 時間後に腫瘍内ホウ素が最大値 8.4 ppm となり、その後徐々に低下し 48 時間後には 4.4 ppm となった。リポソームを用いた DDS では、PEG をリポソーム表面に結合させることにより、細胞内皮系によるリポソームの取り込みを避けることができ、その結果リポソームの血中滞留性を高めることが既に知られている。そこで、彼らは PEG 2000 を結合した DSPE (distearoyl phosphatidylethanolamine) を DSPC に対して 10% 用いて $Na_3 [1-(2'-B_{10}H_9)-2-NH_3B_{10}H_9]$ を内封した PEG 化リポソームを調製した。このリポソームをホウ素濃度 22 mg/kg で投与したところ、これまでのホウ素イオンクラスター封入りリポソームよりも血中滞留性が向上し、血液内ホウ素濃度は 6 時間後で 87.2 ppm, 48 時間後でも 19.3 ppm であった。一方、腫瘍内ホウ素濃度は、6 時間後で 27.4 ppm であったのに対

し、48 時間後では 46.7 ppm と時間の経過とともに EPR 効果によりホウ素が蓄積することが分かった。また 48 時間後の T/B 比は 2.4 であった。

2-1-3. 葉酸結合型リポソーム このように、リポソーム表面を PEG 化することに、血中滞留性が向上し、EPR 効果により効率的に腫瘍組織にホウ素が蓄積することが見出されたが、Lee らはさらに腫瘍組織部位に集積したホウ素封入りリポソームを細胞選択的にかつ能動的に取り込ませるために、表面に葉酸修飾したホウ素封入りリポソームを開発した。¹⁷⁾ 葉酸結合タンパクである folate receptor (FR) は正常組織では非常に限られた部位でのみ発現している糖タンパクである。一方、FR は多くのがんにおいて過剰発現が認められている。¹⁸⁾ 葉酸はこの FR に対し、非常に高い結合力 ($K_3 = -10^{10} M^{-1}$) を有するため、表面に葉酸が結合したリポソームは FR を過剰発現している卵巣がんなどに選択的に取り込まれることが報告されている。そこで、彼らは、エッグ PC (phosphatidylcholine)、コレステロール、PEG-コレステロール、葉酸-PEG-DSPE (60 : 35 : 4.5 : 0.5) から調製した葉酸結合型ホウ素内封型リポソームを調製した。まず、BSH をリポソーム内に封入し、培養細胞である KB 細胞に 2 時間接触させたところ、細胞内ホウ素濃度は培地中のホウ素濃度依存的に高くなり、BSH (ホウ素濃度 4 μM) では 231 $\mu g / 10^6$ cell であった。一方、同条件下 1 mM の葉酸を加えた場合、細胞内ホウ素濃度は 53 $\mu g / 10^6$ cell であった (Table 2)。このことから、葉酸結合型ホウ素リポソームの細胞内取り込みが、葉酸受容体である FR を介していることが示唆され、葉酸存在下ではその取り込み機構が競合し、その結果ホウ素蓄積濃度が低下していることが明らかとなった。同様の方法で、Hawthorne らが開発した $Na_3 [1-(2'-B_{10}H_9)-2-NH_3B_{10}H_9]$ を封入した葉酸結合型ホウ素リポソームを KB 細胞に接触させたところ、細胞レベルの実験では、その腫瘍細胞蓄積性は BSH より低下した。また、彼らは Fig. 6 に示すように、カルボラン骨格を有する様々なポリアミン誘導体を合成し、それらの塩酸塩を封入した葉酸結合型ホウ素リポソームを調製し、細胞内蓄積性について検討した。その結果、Table 2 に示すように SPD-5 や ASPD-5 では BSH を封入した葉酸結合型ホウ素リポソームのおよそ 3 倍程度の

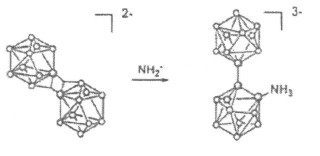


Fig. 5. Conversion of $(n-B_{20}H_{10})^{2-}$ into $[1-(2'-B_{10}H_9)-2-NH_3B_{10}H_9]^{3-}$.

Table 2. Uptake of Liposomal Boron Compounds by Cultured KB Cells^{a)}

| Boron compounds | f-L-[Boron] | t-L-[Boron] | f-L-[Boron] + 1 mM folic acid |
|--|-------------|-------------|-------------------------------|
| BSH | 231 | 14 | 53 |
| Na ₃ [1-(2'-B ₁₀ H ₉)-2-NH ₃ B ₁₀ H ₈] | 108 | 2.2 | 18 |
| SPD-5 | 671 | 76 | 297 |
| ASPD-5 | 770 | 75 | 352 |
| SPM-5 | 132 | 17.6 | 33 |
| ASPM-5 | 154 | 67 | 132 |
| SPM-5,10 | 1584 | 154 | 1331 |

a) Cellular uptake of boron, following a 2 h incubation at 37°C with a variety of boronated agents, each containing 4 μM total boron, entrapped in either FR-targeted (f-L-[boron]) or nontargeted control liposomes (t-[boron]). The values indicated were micrograms of boron per 10⁶ cells.

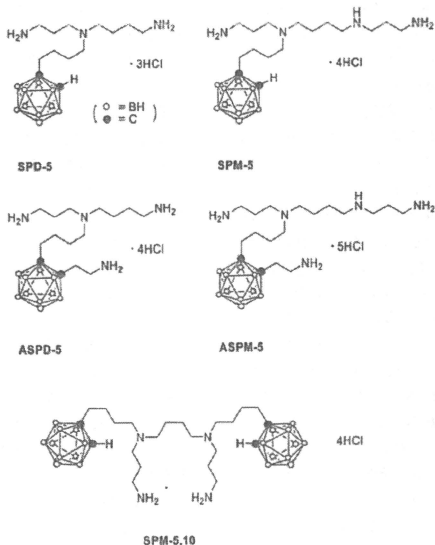


Fig. 6. Structures of Boronated Polyamine Derivatives

腫瘍細胞内蓄積効果がみられた。さらに、SPM-5, 10 を封入した葉酸結合型ホウ素リポソームでは、驚くことに細胞内ホウ素濃度は 1584 μg/10⁶ cell と BSH を封入した葉酸結合型ホウ素リポソームのおよそ 7 倍となった。ところが、葉酸を加えた競合実験では BSH や Na₃[1-(2'-B₁₀H₉)-2-NH₃B₁₀H₈] を封入した葉酸結合型ホウ素リポソームほど高い細胞内取り込み競合阻害効果はみられないものの、ある程度の競合阻害効果(50%程度)はみられたのに対し、

SPM-5,10 を封入した葉酸結合型ホウ素リポソームではその競合阻害効果がほとんどみられていないことから、ホウ素化合物 SPM-5,10 は、葉酸受容体を介して取り込まれているのではなく、リポソームから漏れ出て直接細胞内に取り込まれている可能性も考えられる。

2-1-4. EGF 結合型リポソーム 細胞増殖因子の 1 つである EGF (上皮細胞増殖因子) は、細胞表面に発現しているその受容体と結合して、細胞増

殖シグナルを伝達する。この EGF 受容体は多くの腫瘍細胞表面で高発現している。そこで、EGF をリポソーム表面に結合させることにより、この EGF-EGF 受容体の相互作用を利用して、腫瘍細胞への能動的なターゲティングが研究されている。¹⁹⁾ Kullberg らは、Fig. 7 に示すようなホウ素化合物、WSP1 及び WSA1 をリポソームに封入した EGF 結合型ホウ素リポソームを開発した。²⁰⁾ WSP1 は炭素原子 2 個とホウ素原子 10 個からなる安定で lipophilic なホウ素クラスターであるカルボランと phenanthridine からなり、WSA1 はカルボランと acridine からなり、いずれも水溶性のホウ素化合物である。In vitro 実験では、Table 2 に示すようにリポソームに封入された WSP1、WSA1 はいずれも細胞内ホウ素取り込み量が、それぞれ 1.80 ppm、0.29 ppm と低いのに対し、EGF 結合型リポソームでは、2.21 ppm、6.29 ppm と特に WSA1 封入型で非常に高い腫瘍細胞蓄積性がみられた。

2-1-5. TF 結合型リポソーム Transferrin (TF) は、血液中に 2.5 mg/ml 含まれている鉄輸送タンパクである。1つのトランスフェリンには2つの鉄イオンが結合でき、細胞表面に発現している TF 受容体と結合することにより、細胞内に鉄を送り込む。腫瘍細胞の多くでこの TF 受容体が高発現している。丸山らは、この TF-TF 受容体の相互作用を利用して、TF をリポソーム表面に結合させた TF-PEG リポソームを開発し、腫瘍細胞への能動

的なターゲティングに成功した。²¹⁾ 1つのリポソームにはおよそ 20 個の TF が結合していると思われていた。さらに、この技術を BDS に応用し、BSH を TF-PEG リポソーム内に封入し in vitro で細胞内ホウ素取り込みを検討したところ、Fig. 8 に示すように TF-PEG リポソームの方が PEG-リポソームよりも 10 倍以上高いホウ素集積性が見られた。²²⁾ また、培地中に TF に添加した競合条件下では、このホウ素の集積性が阻害された。Colon 26 マウス大腸がん細胞を移植したマウスを用いた生体内分布実験では、血中ホウ素濃度は BSH 封入した TF-PEG リポソーム及び TF-PEG リポソームの両方とも経時的に低下した。一方、腫瘍内ホウ素濃度は PEG リポソームでは 48 時間後は 35 ppm に到達し、その後時間の経過とともに低下していき、72 時間後には 20 ppm となったのに対し、TF-PEG リポソームの場合 72 時間後においてもおよそ 35 ppm と高い蓄積性を示した。また、ホウ素濃度の T/N 比は、PEG リポソームでは 48 時間で 2.0、72 時間後で 2.5 であった。TF-PEG リポソームでは 48 時間でホウ素濃度の T/N 比は 2.5 と PEG リポソームの場合とほとんど変わらなかったが、72 時間後では 6.0 と非常に高い値が得られた。このように、腫瘍内ホウ素濃度及びホウ素濃度の T/N 比とも、目標値を達成した初めての報告例である。さらに、丸山らは Colon 26 細胞を移植したマウスを用いて BNCT 効果を調べた。上で述べたように 72 時間後

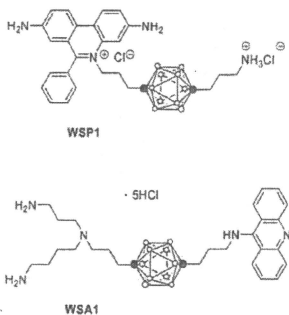


Fig. 7. Schematic Structure Formula of A, WSP1 (water soluble boronated phenanthridine, upper) and B, WSA1 (water soluble boronated acridine, lower)

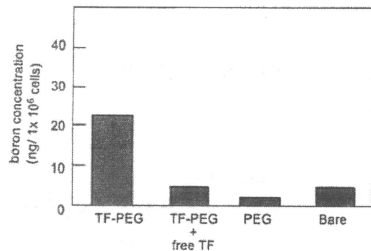


Fig. 8. Receptor Specific Binding and Internalization of TF-PEG Liposome to Colon 26 cells

Colon 26 cells (1×10^6 cells) were incubated with TF-PEG liposomes with an average of 20 TF molecules per liposome, PEG liposomes or bare liposomes, containing 30 μg in ^{10}B concentration, respectively, for 1 hr at 4°C. Blocking tests of TF-PEG liposomes-cell binding were performed with excess dose (50 μg) of free TF.

の血中ホウ素濃度が十分低いことから、ホウ素リポソームを投与してから72時間後に中性子照射を中性子束 2×10^{12} thermal neutrons/cm² で37分間行った。ホウ素濃度35 mg/kg投与した場合、PEGリポソーム、TF-PEGリポソームともに非常に高いBNCT効果が得られ、マウス腫瘍は中性子照射後萎縮し始め、10-14日後にはいずれの場合も消失した。中性子照射後5週間観察したが、再発はみられなかった。また、ホウ素濃度35 mg/kg投与した場合は照射後120日間、死亡はみられなかった。一方、ホウ素濃度20 mg/kg投与した場合は、BNCT効果はやや低下し、中性子照射100日後ではPEGリポソームを投与したマウスの生存率は20%であったのに対し、TF-PEGリポソームを投与したマウスの生存率は70%とTFを結合したことによる能動的ターゲティング効果が顕著に見い出された。このように、リポソームを用いたホウ素デリバリーシステムをBNCTに応用することで、非常に高い治療効果が期待されることが実証された。

また、増永・小野らはこのTF-PEGリポソーム技術を応用して、Na₂B₁₀H₁₀を封入したTF-PEGリポソームのSCC VIIマウス扁平上皮がん細胞に対するBNCT効果を検討した。²³ 彼らは、増殖期にある細胞(P-cell)だけでなく静止状態の細胞

(Q-cell)に対するBNCT効果を*in vitro*で検討したところ、TF-PEGリポソームの方がPEGリポソームよりも効果的であり、Q-cellにも有効性が見い出された。さらに、SCC VII細胞を移植したマウスを用いてdecahydrodecaborate (GB)及びBSHを封入したTF-PEGリポソームの生体内ホウ素分布を調べたところ、腫瘍内ホウ素濃度は投与後(投与ホウ素濃度:35 mg/kg)24時間で蓄積量が最大となり、BSH封入TF-PEGリポソームでは21.1 ppmであったのに対し、GB封入TF-PEGリポソームでは35.6 ppmとGB封入リポソームの方が腫瘍集積性が高いことが分かった。しかしながら、T/B比はいずれの場合もおよそ0.5であり、血中の方がホウ素濃度が高いことが分かった。GB封入TF-PEGリポソームを投与したマウスのT/B比が2.5となった72時間後では、12.6 ppmと腫瘍内蓄積量も低下した。

2-1-6. 抗体結合型リポソーム LeeらはFig. 9に示すようにPEG-コレステロールにマレイン酸イミドを結合した化合物、Mal-PEG-Cholを新たに合成し、これを含むリポソームに対し、EGFRモノクロナール抗体を結合させたCetuximab-PEGリポソームを開発した。²⁴ 彼らは、HSPC (hydrogenated bsoy phosphatidylcholine)、コレステロー

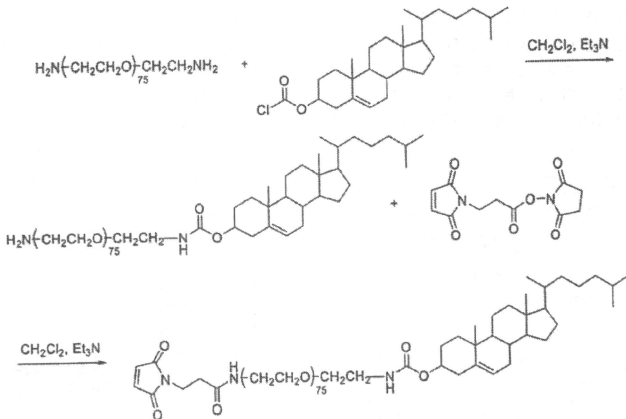


Fig. 9. Synthetic Scheme for Mal-PEG-Chol

ル、PEG-DSPE, Mal-PEG-Chol (60 : 35 : 5 : 0.5) から調製した PEG-リポソームに対し、Cetuximab を直接作用させリポソーム表面にチオエーテル結合により修飾した。脂質 1 μM 当たり、25–35 μg の抗体が結合していると思われていた。 *In vitro* の蛍光ラベル実験では、この Cetuximab-PEG リポソームは EGFR を発現している細胞 (F98_{EGFR}) において取り込みがみられたが、EGFR を発現していない野生型細胞 (F98_{WT}) では取り込みがみられなかった。このことにより EGFR が発現している細胞選択的にターゲティングできることが示された。

2-2. ホウ素脂質型 BDS このように、多面体構造のホウ素クラスターイオンを封入したリポソームを用いて、高い治療効果を得られる BDS が達成できる可能性が示されてきた。しかしながら、使用されているホウ素封入リポソームは非常に高いイオン濃度であり高浸透圧的な溶液であることから、これ以上の高濃度化は困難であると同時に、このような条件下でのリポソーム膜安定性の問題が生じている。さらに、このような高いホウ素クラスターイオン濃度のリポソームを調製する際には、封入効率の低さが無視できなくなってくる。リポソームの脂質二分子膜は、分子間相互作用により自己集合化しているため密度が高く、この二分子膜へホウ素分子を導入できれば、非常に高濃度でホウ素をデリバリーできると考えられる。さらに、リポソーム膜内にホウ素を導入させることで、リポソーム内に抗がん剤など様々な薬剤が封入できることから、BNCT と化学療法のコンビネーション治療が可能となる。ここでは、Hawthorne らによる初めての一本鎖ホウ素イオンクラスター脂質によるホウ素リポソームの開発研究と、われわれが初めて開発した二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質とこれらから合成したリポソームを用いた BDS について紹介する。

2-2-1. 一本鎖ホウ素イオンクラスター脂質 リポソーム膜内にホウ素を導入した BDS の最初の報告は、Hawthorne らによって開発された一本鎖ホウ素イオンクラスター脂質 1 (Fig. 10) を用いたものであった。²⁵⁾ Figure 11 に示すように、デカボランに 1-octadecyne を反応させ、*closo* 型カルボラン誘導体としたもの、エタノール溶液中水酸化カリウムと処理することによりイオン性の *nido* 型カルボ

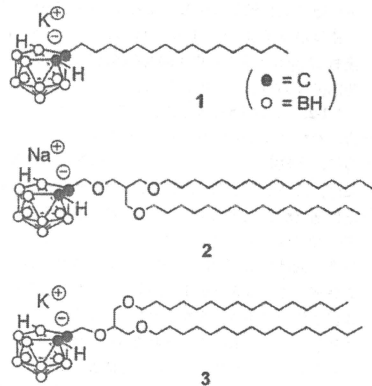


Fig. 10. Structures of *nido*-Carborane lipids

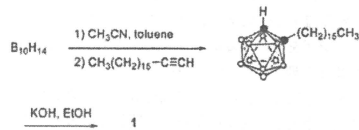


Fig. 11. Synthesis of the Carborane Lipid 1

ラン脂質 1 を合成した。この化合物は炭素鎖 16 の脂溶性部位と水溶性の *nido* 型カルボラン部位からなる両親媒性分子である。彼らは、DSPC、コレステロール、*nido* 型カルボラン脂質 1 (3 : 3 : 1) からリポソームを調製した。この際、*nido* 型カルボラン脂質 1 のリポソーム封入効率はおおよそ 80% であった。EMT6 細胞を移植したマウスを用いて体内ホウ素分布を調べたところ、Table 1 に示すように投与ホウ素濃度 6 mg/kg では腫瘍内ホウ素濃度が投与後 6 時間で 22 ppm、その後 16–30 時間はおおよそ 34 ppm で一定であった。48 時間後には 25 ppm に低下したものの T/N 比は 8.4 であった。一方、DSPC、コレステロール、*nido* 型カルボラン脂質 1 (1 : 1 : 1) から調製したリポソームでは、脂質 1 の封入効率は 53% と低下し、ホウ素濃度 10 mg/kg で投与したところ、最大腫瘍内ホウ素濃度は 17 ppm と低下した。さらに、彼らが既に見出したイオンクラスター、 $\text{Na}_3[1-(2'-\text{B}_{10}\text{H}_9)-2-\text{NH}_2]$

$B_{10}H_{18}$] を内封したリポソームを DSPC、コレステロール、*nido*型カルボラン脂質 1 (1 : 1 : 0.6) から調製した。このリポソームを投与しホウ素濃度 18 mg/kg と高い濃度で投与したところ、腫瘍内ホウ素濃度が 30 時間後には 48 ppm に到達し、48 時間後も 32 ppm と高いホウ素濃度を維持した。また 48 時間後の T/N 比は 6.0 であった。

2-2-2. 二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質 一方、われわれはリポソームの二分子膜へ効率よくさらに、そのホウ素リポソームが安定に生成するためには、二分子膜を形成しているリン脂質のように脂溶性部位が二本鎖であればよいと考えた。そこで、

Fig. 10 のように二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質 2 を設計した。²⁶⁾ ホウ素イオンクラスター脂質 2 の合成スキームを Fig. 12 に示す。まず、C17 の炭素鎖を持つアルコールをジクロリドと反応させ、2 本鎖脂質部分をエーテル結合で合成しオレフィン 4 としたのち、ヒドロホウ素化反応によりオレフィン 4 をアルコール 5 と変換した、プロパルギルプロミド及び水素化ナトリウムを用いてアセチレンを導入しプロパルギルエーテル 6 としたのち、トルエン加熱還流下でアセチレン部分に対しデカボランカップリングを行い、カルボラン誘導体 7 としたのち、塩基と処理することにより、イオン性ホウ素クラスター脂質 2 を得ることに成功した。合成したイオン性ホウ素クラスター脂質 2 に関してそのベシクル形成について検討した。ホウ素クラスター脂質 2 (1.0

mg)、蛍光物質であるカルセイン (0.5 mg) を水 (5 ml) に加え、溶液が透明になるまで熱して溶かした。冷却後、Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。得られたフラクションをそれぞれ電子顕微鏡で測定しベシクル形成を確認した。電子顕微鏡は JEOL 100c を用いた。その結果、Fig. 13 に示すように、フラクション 1 からは 400–600 nm の大きさのベシクルが、フラクション 2 からは 150–200 nm の大きさのベシクルが形成していることが分かった。

次に、イオン性ホウ素クラスター脂質 2 から得られたベシクルの血液中での安定性を調べるため、血清中における封入されたカルセインの蛍光強度の変化を観測した。血清中に加えて得られたベシクル溶液を体積比で血清/ベシクル溶液=9/1 になるように加え、37°C でマグネチックスターラーを用いてかく拌し、0–18 時間各時間における蛍光強度を測定した。また、各時間におけるベシクル溶液の蛍光強度を測定後、Triton X-100 でベシクルを破壊し、ベシクルからリリースされたカルセインの蛍光強度を同時に測定した。結果を Fig. 14 に示した。カルセインを封入したホウ素クラスターベシクルの血清溶液の蛍光強度が 0–18 時間の測定時間内では、ほとんど変化しないことが分かった。また、Triton X-100 でベシクルを破壊し、ベシクルからリリースされたカルセインの蛍光強度も測定時間内では一定であることから、カルセインを封入したホウ素クラスターベシクルは、37°C では血清中では安定であることが分かった。実際に DDS で用いられている

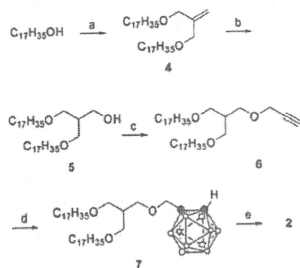


Fig. 12. Synthesis of the Carborane Lipid 2

Reagents: (a): (1) NaH, THF, (2) $CH_2=C(CH_2Cl)_2$, 93%, (b): (1) $BH_3 \cdot Me_2S$, (2) H_2O_2 , NaOH, 71%, (c): (1) NaH, THF, (2) propargyl bromide, 58%, (d): $B_{10}H_{14}$, CH_3CN , toluene, 80%, (e): NaOMe, MeOH, 57%.

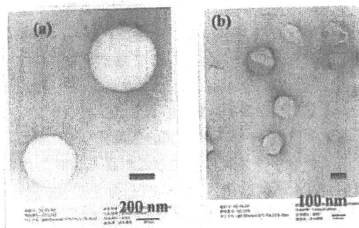


Fig. 13. Transmission Electron Micrographs of the Vesicle Formation Prepared from the *nido*-Carborane Lipid 2 in the Fractions 1 (a) and 2 (b) after Sephadex G-75 Column Chromatography

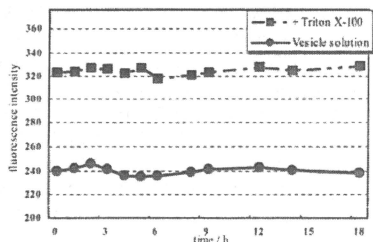


Fig. 14. The Fluorescence of the Vesicle of the Fraction 2, in which Calcein was Encapsulated by the *nido*-Carborane Lipid 2, in a Bovine Serum Albumin (BSA)

The square plot shows the fluorescence intensity of the BSA solution containing the vesicle fraction 2 and the circle plot shows that of the solution after destruction of vesicles by the addition of Triton X-100.

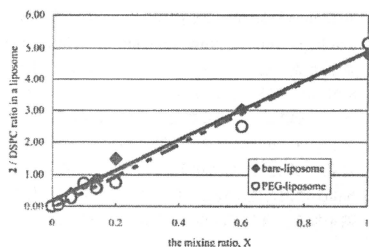


Fig. 15. Incorporation of the *nido*-Carborane Lipid 2 into Liposome Membranes

The bare-liposome was prepared from DSPC, CH, and 2 (the mixing ratio of 1 : 1 : X, X=0-1), and the PEG-liposome was prepared from DSPC, CH, 2, and PEG-DSPE (the mixing ratio of 1 : 1 : X : 0.11, X=0-1).

DSPC リポソームへのイオン性ホウ素クラスター脂質 2 の取り込み濃度について検討した。まず、DSPC (distearoylphosphatidylcholine; COATSOME MC-8080)、コレステロール (CH)、ホウ素クラスター脂質 2 を 1 : 1 : X で X の値を 0-1 の範囲で混合し、リポソームを調製したのち、そのリン脂質とホウ素の濃度を定量した。ホウ素の定量には ICP-AES 法を用いた。同様に、DSPC、CH、ホウ素クラスター脂質 2、PEG-DSPE (distearoylphosphatidylethanolamine; COATSOME ME-8080) を 1 : 1 : X : 0.11 で X の値を 0-1 の範囲で混合し、PEG-リポソームを調製したのち、そのリン脂質とホウ素の濃度を定量した。結果を Fig. 15 に示す。DSPC (distearoylphosphatidylcholine; COATSOME MC-8080)、コレステロール (CH)、ホウ素クラスター脂質 2 から調製した bare-リポソームでは、混合するホウ素クラスター脂質 2 の割合を 0-1 に増加するに従って得られるリポソーム内のホウ素濃度も比例して増加することが分かった。また、興味深いことに DSPC とホウ素クラスター脂質 2 のリポソーム中の組成比は 1 : 5 でリポソームを形成することが分かった。DSPC、CH、ホウ素クラスター脂質 2、PEG-DSPE から調製した PEG-リポソームでも同様の傾向がみられた。混合するホウ素クラスター脂質 2 の割合を 0-1 に増加するに従って得られるリポソーム内のホウ素濃度も比例して増加し、その DSPC とホウ素クラスター脂質 2 のリポソーム中の

組成比は 1 : 5 であった。

2-2-3. TF 結合型ホウ素脂質リポソームと BDS

このように、このホウ素イオンクラスター脂質は、安定なリポソームを形成し、蛍光物質であるカルセインを封入したリポソームでは血清中におけるカルセインのリリースはみられなかったので、このホウ素イオンクラスター脂質 2 とジステアロイルホスファチジルコリンリン脂質、さらに共同研究者の丸山らが開発したトランスフェリンを修飾したがん細胞標的型リポソームを応用し、トランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリポソームを合成し、坦がんマウスを用いた体内分布並びに中性子捕捉治療を行った。²⁷⁾ 中性子捕捉治療のためにホウ素-10 濃縮型イオンクラスター脂質の合成を Fig. 12 に示す合成ルートに従って行った。

DSPC (distearoylphosphatidylcholine; COATSOME MC-8080)、コレステロール、DSPE-PEG-OME (distearoylphosphatidylethanolamine-polyethyleneglycol-OME; DSPE-020C)、DSPE-PEG-CO₂H (DSPE-034GC)、合成したイオン性ホウ素クラスター脂質 2 を 1 : 1 : 0.11 : 0.021 : 0.25 の比率で調整し、これら脂質 150 mg を、クロロホルムとジイソプロピルエーテルの 1 : 1 溶液 2 ml に溶かした。ヨウ素 125 でラベルしたイヌリン溶液を加え、得られたエマルジョンを 1 分間超音波に通したのち、減圧下有機溶媒を溜去した。得られた脂質ゲルをエクストルーダーを用いて 100 nm のポリカーボネート膜を通してサイズを整え、超遠心 (200000 g) 20 分

で精製し、PBS buffer に加え懸濁液とした。このようにして得られたホウ素クラスターリポソームを Mes buffer にけん濁させ (およそ $5 \mu\text{mol/ml}$)、ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC; $21 \mu\text{mol}$)、*N*-hydroxysulfosuccinimide (S-NHS; $28 \mu\text{mol}$) を加えた。混合物を室温で 15 分間かく拌し、Sephadex G25 カラムを通してリポソームフラクションを分離した。得られたリポソーム溶液にトランスフェリンを加え室温で 3 時間かく拌した。反応混合物を超速心 (200000 g) 20 分で精製し、PBS buffer に加え懸濁液とした。この懸濁液に塩化鉄溶液を加え、再び超速心 (200000 g) 20 分で精製し、

PBS buffer に加え懸濁液とした。

上で調製したホウ素クラスターリポソーム及びトランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリポソームを用いてマウス内での各臓器における分布を測定した。ヨウ素 125 でラベルしたイヌリンを含むホウ素クラスターリポソームを雄 BALB/c マウス (生後 6 週、体重 16-18 g) に注射したのち、1-48 時間においてマウスの血液、肺、肝臓、腎臓、心臓、脾臓を各々取り出し、各組織の放射活性を測定した。結果を Fig. 16 に示した。横軸には投与後の時間、縦軸には投与量に対する各臓器内濃度 (% Dose) を示した。濃度はヨード 125 ラベルイヌリンの放射能測

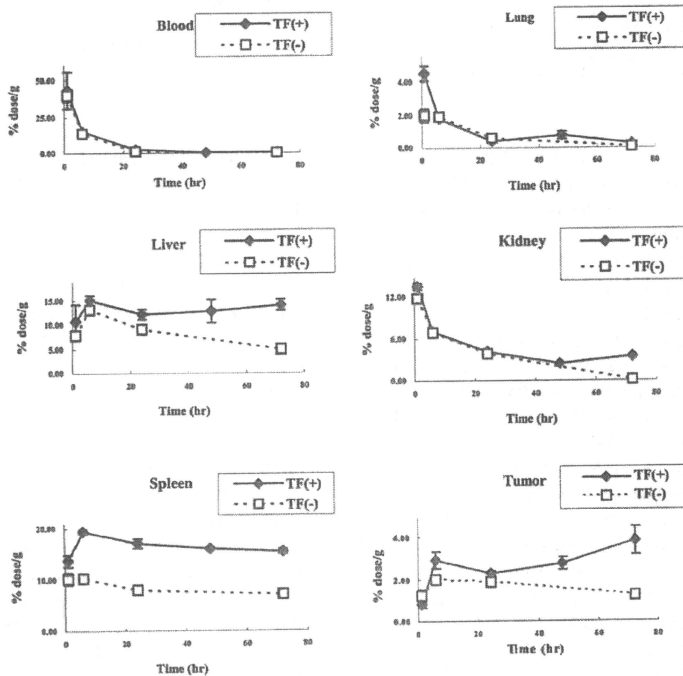


Fig. 16. Time Course of Biodistribution of TF(-)-PEG-CL Liposome (TF(-)) and the TF(+)-PEG-CL liposome (TF(+)). Liposomes encapsulating ^{125}I -tyraminyl inulin ($500 \mu\text{g}$ lipid/ $200 \mu\text{L}$) were injected into male BALB/c mice (7 weeks old, weighing 20-25 g) via the tail vein. The distribution of liposomes was measured by determining the radioactivity of each tissue. The percent dose/g in each tissue is plotted on the vertical axis and the time (h) after administration is plotted on the horizontal axis.

定により算出した。血液中の濃度変化は、トランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリポソーム及び非修飾型ホウ素クラスターリポソームともに速やかに低下した。一方、肝臓・腎臓・脾臓ではトランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリポソームの方がより高濃度で蓄積していることが分かった。肺では両者とも血中濃度の低下に伴って低下することが分かった。興味深いことに、腫瘍ではトランスフェリン非修飾型ホウ素クラスターリポソームが時間に伴って濃度が減少しているのに対し、トランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリポソームでは時間経過と関係なく蓄積しており、72時間後でもトランスフェリン非修飾型ホウ素クラスターリポソームのおよそ3倍の濃度であることが分かった。

次に、坦がんマウスを用いて中性子捕捉治療効果について検討した。左足に Colon 26 細胞を移植した BALB/c マウス (生後 6 週間, 16-18 g) にトランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリポソームをホウ素-10 濃度で 7.2 mg/kg, 14.4 mg/kg それぞれ静脈投与し、72 時間後各臓器を分離しホウ素濃度をプロンプト法により測定した。各臓器内ホウ素濃度を Fig. 17 に示した。ホウ素-10 濃度で 7.2 mg/kg, 14.4 mg/kg 投与したマウスでは、72 時間後、筋肉・心臓・脳ではホウ素蓄積はほとんどみられなかった。肺・血液ではおよそ 10 ppm, 肺では投与濃度に比例して 14.4 mg/kg 投与の場合、およそ 35

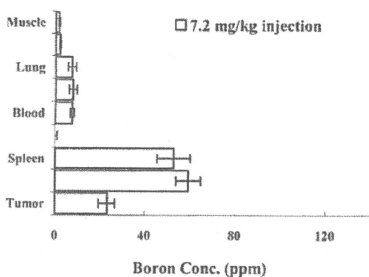


Fig. 17. ^{10}B Concentration in Various Tissues 72 h after Injection of TT(+)-PEG-CL Liposomes into Tumor-bearing Mice

^{10}B -enriched TT(+)-PEG-CL liposomes were injected into tumor-bearing mice, in which colon 26 cells were transplanted into the left thigh, via the tail vein at a dose of 7.2 mg ^{10}B /kg (200 μl of liposome solution).

ppm ホウ素蓄積がみられた。一方、Fig. 15 では肺・血液でほとんどイオソリンの蓄積がみられないことから、ホウ素クラスターリポソームが分解しホウ素イオンクラスター脂質が蓄積したと考えられる。脾臓・肝臓では非常に高いホウ素蓄積がみられ、その濃度は投与量に比例している。腫瘍内ホウ素蓄積量をみてみると 7.2 mg/kg 投与した場合は 22 ppm, 14.4 mg/kg 投与の場合では 40 ppm であった。

さらに、トランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリポソームをホウ素-10 濃度で 7.2 mg/kg 投与した坦がんマウスを 72 時間後、麻酔しアクリル製マウスホルダーに入れ、左足部分を中性子照射した。中性子照射は京都大学原子炉において行い 2×10^{12} neutrons/cm 2 で 37 分間照射した。コントロール実験としてホウ素クラスターリポソームを投与していないマウスも同様に中性子照射した。照射後の生存曲線を Fig. 18 に示した。ホウ素クラスターリポソームを投与していないマウスでは、中性子照射後の平均寿命が 22 日であったのに対し、ホウ素クラスターリポソームをホウ素濃度で 7.2 mg/kg 投与したマウスでは、平均寿命 32 日とおよそ 1.5 倍延命効果がみられた。

これらの結果は、米国 NCI (National Cancer Institute) の Nanotech News for Cancer Therapy で紹介された。²⁸⁾ しかしながら、さらに腫瘍内ホウ素濃度を高めるために、このホウ素クラスターリポソームを 14 mg/kg 投与したところ、50%のマウスに急性毒性がみられた。

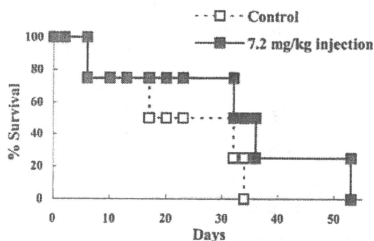


Fig. 18. Survival Curve of Tumor-bearing Mice after Neutron Irradiation for 37 min in KUR Atomic Reactor

The mice were injected with 7.2 mg ^{10}B /kg of the TT(+)-PEG-CL liposome and incubated for 72 h before irradiation. Control indicates survival rates of tumor-bearing mice after neutron irradiation without administration of TT(+)-PEG-CL liposomes.