

# 中性子捕捉療法に応用するボロンデリバリーシステム開発の経験と今後の展望



柳衛 宏宣<sup>\*1,2</sup>  
Yanagie Hironobu



小林 久夫<sup>\*3</sup>  
Kobayashi Hisao



小倉 紘一<sup>\*4</sup>  
Ogura Koichi



丸山 一雄<sup>\*5</sup>  
Maruyama Kazuo



高橋 浩之<sup>\*1</sup>  
Takahashi Hiroyuki

## 1 はじめに

中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy ; BNCT) とは、腫瘍部にボロン ( $^{10}\text{B}$ ) 元素を集積させ、熱中性子照射で生じる原子核反応 ( $^{10}\text{B} + \text{n} \rightarrow \text{He} + \text{Li} + 2.31 \text{ MeV}$ ) で放出される  $\alpha$  粒子及び  ${}^7\text{Li}$  粒子で、効率よく悪性腫瘍を破壊する細胞内内部照射によるがん治療法である。BNCT が腫瘍部以外の正常組織を障害することなく有効であるためには、生体内に投与された  $^{10}\text{B}$  原子が確実に腫瘍局所に送達され、かつ限定されるような  $^{10}\text{B}$  デリバリー薬剤の開発が必要であり、腫瘍部並びに他の正常臓器内の  $^{10}\text{B}$  の分布状況とその濃度を決定しておくことが不可欠である。

筆者らは、CR-39 プラスチック飛跡検出器 (物質名としては PADC (Polly Allyl Diglicol Carbonate)) を用いて取得した中性子ラジオグラフィ (Neutron Capture Auto-Radiography : NCAR) 像を形成する飛跡 (エッチピット) の解析から、生体中の  $^{10}\text{B}$  の分布状況とその濃度の定量や腫瘍部内の線量計測等を行い  $^{10}\text{B}$  デリバリーシステムの検討を重ねてきた<sup>1,5)</sup>。

今回、筆者らが開発を行ってきた Drug Delivery System (DDS) について解説し、臨床研究に向けた今後の展望を述べる。

## 2 DDS の開発

筆者らは、消化器系癌及び乳癌に対する集学的治

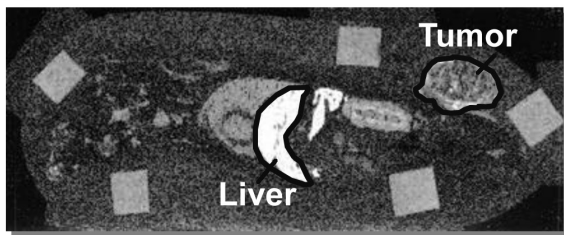
療の 1 つとして中性子捕捉療法の応用を考え、種々のボロンデリバリーシステムの開発研究を展開している<sup>6)</sup>。その一部は、以下のものである。

### 2.1 リポソーム

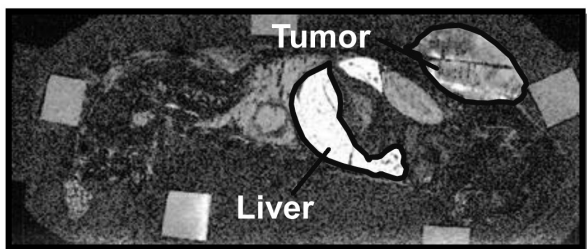
(1) 筆者らは、 $^{10}\text{B}$  化合物を封入させた Immunoliposome が、BNCT において腫瘍細胞を標的とする  $^{10}\text{B}$  原子の選択的で効率的なキャリアの働きをすることができることを報告した。大腸癌や膵臓癌等の腺癌で分泌される胎児性抗原の 1 つである Carcinoembryonic antigen (CEA) に対するモノクローナル抗体 (2C-8) を作製し、 $^{10}\text{B}$  化合物を封入した封入抗 CEA -Immunoliposome を CEA 産生性ヒト膵臓癌細胞と反応させ、熱中性子照射により細胞障害を示した。更に、腫瘍内投与後の熱中性子照射により腫瘍増殖抑制効果を示した<sup>7,8)</sup>。

(2) 筆者らは、リポソームの表面をポリエチレングリコールで修飾し、細網内皮系 (RES) による捕捉を回避し、血中滞留性が著しく向上する Stealth Liposome を開発した<sup>5,9)</sup>。また、Stealth Liposome の一部のポリエチレングリコール末端にトランスフェリン (TF) を修飾したトランスフェリン修飾ポリエチレングリコール結合リポソーム (TF-PEG-liposome) を開発した<sup>10)</sup>。TF-PEG-liposome は、リポソームにつき約 25 の TF 分子を結合しており、癌細胞表面のレセプターに結合するとエンドサイトーシスによって細胞に内在化されることが明らかになった<sup>11)</sup>。その結果、腫瘍組織への中性子捕捉剤の送達が促進され、BNCT を用いて腫瘍増殖抑制効

(a)  $^{10}\text{B}$  Bare-liposome



(b)  $^{10}\text{B}$  PEG-liposome



(c)  $^{10}\text{B}$  TF-PEG-Liposome

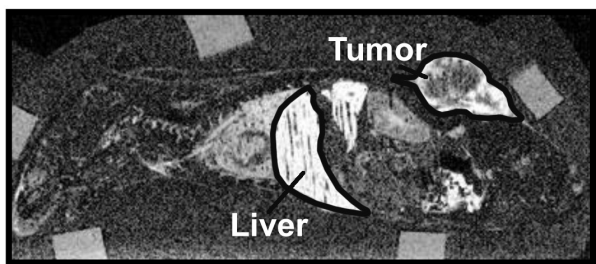


図1  $^{10}\text{B}$ SH 封入 PEG リポソーム静脈投与後の担癌マウスにおける中性子ラジオグラフィ

Colon 26 腫瘍においてはボロンの集積が、単リポソーム (a) よりも PEG 化したリポソーム (b) において増加している。またトランスフェリン結合 PEG リポソーム (c) において更に増加している。

果の増強を認めた<sup>5,9,10)</sup>。DDS においては、CR39 を用いた NCAR を用いることにより、前臨床試験において効果的な  $^{10}\text{B}$  キャリアを選ぶことが容易になった。特に、図 1, 2 に示すように TF-PEG-liposome では、投与 60 時間後でも十分量の  $^{10}\text{B}$  が腫瘍組織に蓄積する一方  $^{10}\text{B}$  血中濃度が低く、高い Tumor/Blood 比を示す理想的なボロンデリバリーシステムが開発できた。

## 2.2 Water-in-Oil-in-Water (WOW) エマルション

肝細胞癌は、手術、化学療法、放射線療法を駆使しても治療が困難な癌の 1 つである。ヨード化ケシ

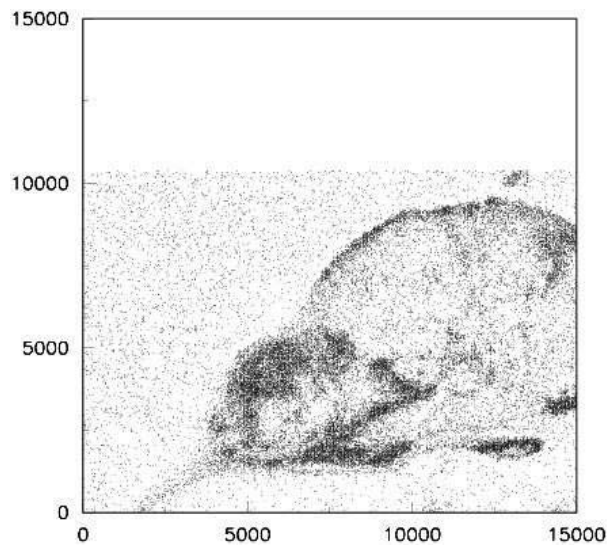


図2  $\alpha$  飛跡密度による腫瘍内  $^{10}\text{B}$  原子分布

図は、 $^{10}\text{B}$ SH 封入トランスフェリン修飾 Polyethylene glycol 結合 Liposome 静脈投与 60 時間後のマウスの腫瘍部において観測された  $a$  と  $Li$  の飛跡の位置を  $x, y$  座標上にマッピングしたもので、腫瘍部内の  $^{10}\text{B}$  の分布を表している。濃淡 (飛跡密度) が  $^{10}\text{B}$  濃度を示している。 $^{10}\text{B}$  は腫瘍部内で偏在しているが、静脈投与 60 時間後も十分量の  $^{10}\text{B}$  が蓄積していることが判かる。オートフォーカス機構の付いた広領域画像高速取得顕微鏡を用いることで大量の飛跡を迅速に解析できるので、NCAR 像を図のように飛跡位置のマッピングによりコンピュータ上に再構築できる ( $x, y$  軸共に単位は  $\mu\text{m}$ )。

油 (商品名: リピオドール) は、脂質自体が選択的に肝臓癌に沈着する性質を有しており、肝臓癌の検出及び治療に有効であることが報告されている。鈴木らは、ラットの肝腫瘍モデルにおいて Mercapoundecahydro-closo-dodecaborate ( $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ ) ( $^{10}\text{B}$ SH) とリピオドールのエマルジョンを肝動脈より投与し有効性を証明した。肝腫瘍における  $^{10}\text{B}$  濃度及び腫瘍/正常肝組織  $^{10}\text{B}$  濃度比 (T/L) は、 $^{10}\text{B}$ SH リピオドールエマルジョン投与後 1, 6 時間後においてそれぞれ  $479.2 \text{ pp+m} : 4.0$ ,  $197.3 \text{ ppm} : 14.9$  であった<sup>12)</sup>。

筆者らは、肝臓癌に対する肝動注法を用いた  $^{10}\text{B}$  化合物封入 WOW エマルジョンの応用について報告した。WOW エマルジョンでは、シラス多孔質ガラス膜を用いた二段膜乳化法により、従来のリピオドールを均一なサイズと封入効率を格段に高めることができる (図 3)<sup>13)</sup>。VX-2 腫瘍担癌ウサギモデルを用いて  $^{10}\text{B}$ SH 封入 WOW エマルジョンを動脈投与後、腫瘍組織内に選択的にボロン原子を集積できることを中性子ラジオグラフィを用いて証明できた (図 4)。また、WOW エマルジョンによる VX-2 腫瘍内の  $^{10}\text{B}$  化合物の集積及び保持能力は、従来型の

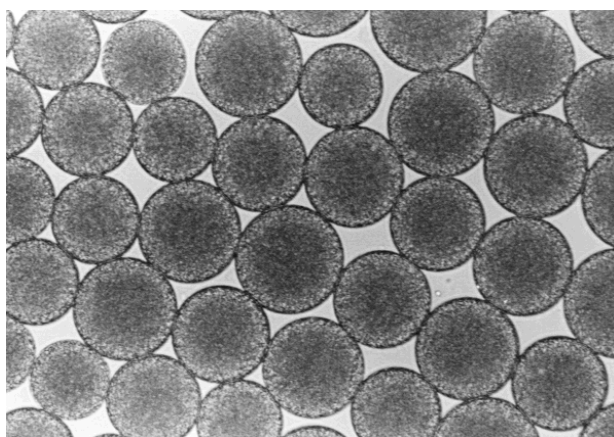


図3 シラス多孔質ガラス膜を用いて二段膜乳化法により作成した WOW エマルジョン

WOW エマルジョンにおいてはサイズが均一でありボロン水溶液を内封できる<sup>13)</sup> 筆者らは、<sup>10</sup>BSH 封入 WOW エマルジョンを作成し、ウサギ肝腫瘍モデルにおいて、腫瘍選択的に<sup>10</sup>B 原子を送達することができた。

<sup>10</sup>BSH-Lipiodol エマルジョン又は<sup>10</sup>BSH 溶液と比較して優れていた。WOW エマルジョンの電子顕微鏡を用いた解析により、構成脂質の microdroplets の細胞内集積も認められ、BNCTにより腫瘍増殖抑制効果を確認し、原発性肝臓癌への WOW エマルジョンによるボロンデリバリーを確立した(図3, 4, 5)<sup>14, 15)</sup>。

筆者らは、再発原発性肝臓癌症例において、<sup>10</sup>BSH 封入 WOW エマルジョンを肝動注し、京都大学原子炉実験所にて熱中性子による BNCT の医療照射を施行し、約3ヶ月の腫瘍増殖抑制効果を示すことができた(図5)。今後、更に臨床経験を蓄積し、治療方法を改善していきたい<sup>16)</sup>。

### 3 BNCT への応用に関する展望

BNCT においては、熱/熱外中性子照射時間内に腫瘍組織内に<sup>10</sup>B 原子が 20 μg/g 以上は必要と計算されている。このために<sup>10</sup>B デリバリーシステムが必要になるが、DDS においては、腫瘍局所に送達する1次デリバリーと、腫瘍局所から癌細胞内に送達する2次デリバリーの少なくとも2つ以上の方法若しくは融合されたデリバリーシステムが必要と考えている。

筆者らが開発している WOW エマルジョンに関しては、腫瘍血管に富む腫瘍組織であれば応用可能と考えているが、封入する<sup>10</sup>B 化合物に、エンドサイトーシスを誘導する腫瘍指向性の抗体、ペプチド、

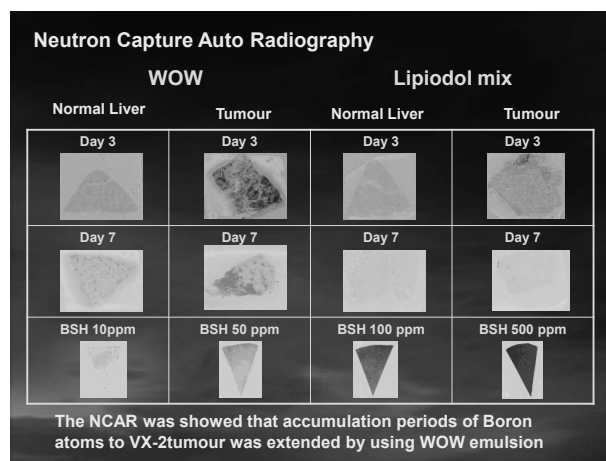


図4 中性子ラジオグラフィーによるボロン (<sup>10</sup>BSH) 封入 WOW エマルジョンによる腫瘍集積性の確認

VX-2 肝腫瘍モデルにおいて<sup>10</sup>BSH 封入 WOW エマルジョンを肝動注し、投与3日、7日後の腫瘍集積性を検討すると、<sup>10</sup>BSH 溶液と臨床で用いられているリピオドールとの混合液投与群と比較して、<sup>10</sup>BSH 封入 WOW エマルジョン投与群は、優位に腫瘍内の貯留性を示した。最下段に、種々の濃度の<sup>10</sup>BSH 溶液をしみ込ませたる紙を用いた中性子ラジオグラフィイメージを付記し、腫瘍組織における<sup>10</sup>B 原子の集積の参考とした。

核内受容体リガンド、等を結合させることにより、腫瘍細胞への2次デリバリーが可能になると思われる。また、TF-PEG-liposome に関しては、癌組織まで、EPR 効果でデリバリーされ、TF-TR 受容体のエンドサイトーシスにより癌細胞に取り込まれるという癌選択性を獲得している<sup>10)</sup>。

しかしながら、実臨床に応用できるように、更に照射時間中の癌細胞内<sup>10</sup>B 原子濃度を高めるには、第3の外部刺激の有用性が提唱されている。また、難治性癌である膵臓癌や進行性乳癌等の場合は、癌細胞の周囲を繊維組織等により囲まれており、DDS キャリアが EPR 効果でも腫瘍細胞に到達しづらい場合には、外部刺激により腫瘍間隙を開き腫瘍細胞に<sup>10</sup>B 化合物を送達することは非常に重要と思われる。

近年の超音波技術の進展に伴い、医療における超音波の利用が診断だけでなく治療にも応用され、その中で、超音波エネルギーの非温熱効果を利用した薬物・遺伝子のデリバリーに関する研究が進められている。丸山らは、薬物・遺伝子キャリアとしての可能性・安全性・汎用性等の観点から新たなバブル素材としてリポソームに着目し、パーフルオロプロパンガスを封入した新規マイクロバブル(リピッドバブル)の調製に成功した<sup>17-19)</sup>。マイクロバブルへの超音波照射はバブル崩壊(キャビテーション)を

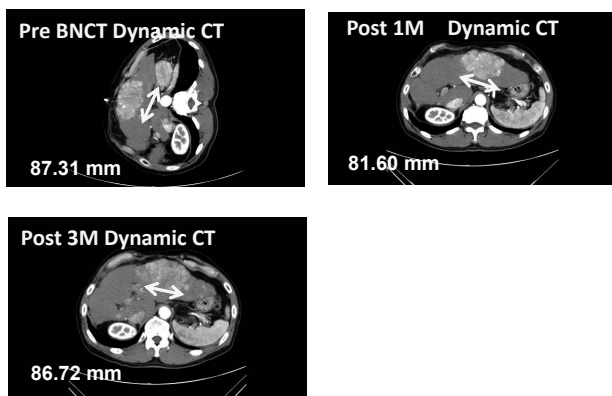


図5 再発性原発性肝臓癌に対する中性子捕捉療法の経験

原発性肝臓癌の摘出手術施行後の肝内再発腫瘍に対して<sup>10</sup>BSH封入WOWエマルジョン肝動注後に中性子捕捉療法を実施し、腫瘍の増殖抑制を認めた(宏仁会 メディカルシティ東部病院 東 秀史博士, 瀬口浩司博士, 公益財団法人結核予防会 新山手病院 江里口正純博士, 京都大学原子炉実験所 鈴木 実 博士, 増永慎一郎博士, 櫻井良憲博士, 田中浩基博士, 近藤夏子博士, 木梨友子博士, 丸橋 晃博士, 小野公二博士との共同研究)。腫瘍径においては、BNCT後に縮小傾向を認めた。腫瘍マーカーの20%減少をBNCT後1カ月で認めた。BNCT後3カ月において最大径が照射前と同じであり、Stable Diseaseと考えられた。

誘導し、同時に生じたジェット流が細胞に一過性の小孔を開け細胞外の物質を細胞内に導入する。このキャビテーションを利用した薬物・遺伝子デリバリーは、生体への影響の無い強度の超音波照射で可能である。すなわち、肝臓癌等の腫瘍血管に富む腫瘍においては、WOWエマルジョンによる<sup>10</sup>BSHの細胞内2次デリバリーが可能になり、膵臓癌等の間質組織の多い腫瘍におけるTF-PEG-liposomeを用いた癌細胞への送達増強効果も期待される。具体案を挙げると、<sup>10</sup>BSH封入TF-PEG-liposomeを点滴静注しながら、新規マイクロバブルを7~8回に分けて静注し、その都度超音波照射し腫瘍新生血管壁を開口させて<sup>10</sup>BSH封入TF-PEG-liposomeを腫瘍組織へと放出させることが可能である。この方法によりEPR効果を促進させることができ、実際に、甲状腺癌や耳垢腺癌罹患犬に対してDOXIL®を効かせることに成功している(未発表データ)。

担癌動物を用いた組織学的非臨床試験において、CR-39プラスチック飛跡検出器を用いて良質なNCAR画像が得られるようになると、輸送性と固着性に優れた<sup>10</sup>Bデリバリー薬剤の検索が容易になると考えられる。また、オートフォーカス機構の付いた広領域画像高速取得顕微鏡<sup>20)</sup>を用いることで大量の飛跡を迅速に解析できるので、図2に見られるように腫瘍部の飛跡位置のマッピングによりNCAR像をコンピュータ上に再構築することもできる<sup>5)</sup>。

両宮らは、マイクロシメトリーに繋がる手法を開発した<sup>20)</sup>。すなわち、<sup>10</sup>Bが注入された腫瘍細胞切片を貼りつけたCR-39に熱中性子を照射し、更に軟X線を照射して化学エッチングを行うと、X線照射量によりCR-39のバルクエッチング速度が変化するので、細胞のX線像がリソグラフィックにCR-39上に写し込まれ、それを原子間力顕微鏡で観察すると、黒い小さな点が $\alpha$ もしくはLi粒子の飛跡、すなわち<sup>10</sup>Bの細胞内分布状況を示す、というものである。位置分解能は約100nmであり、細胞レベルでの<sup>10</sup>Bの局在を決定することができる。NCARを用いて、目的の<sup>10</sup>Bデリバリー薬剤が<sup>10</sup>B原子を細胞内のどの部位に送達できるのかという、細胞レベルでの<sup>10</sup>Bのマイクロシメトリーへの道を拓き、今後の臨床に向けての<sup>10</sup>Bデリバリーシステムの更なる開発が期待される。

## 謝辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究補助金(国11691202, 11557092, 13470190, 18390360)の助成を受けて実施いたしました。また、東京大学大学院工学系研究科原子力専攻の原子力機構施設利用総合共同研究制度、日本原子力研究開発機構の施設供用制度、京都大学原子炉実験所共同利用研究により実施されました。この場を借りて共同研究者及び関係者の方々に厚く御礼申し上げます。

## 文献

- 1) H. Yanagie, *et al.*, *Nucl. Instr. & Method A*, **424** (1), 122-128 (1999)
- 2) K. Ogura, *et al.*, *Radiat Meas.* **34**, 555-558 (2001)
- 3) J. Skvarc, *et al.*, *Cell Mol Biol Lett.* (1), 162-4 (2002)
- 4) H. Kobayashi, *et al.*, *Appl Radiat Isot.* **61** (4), 573-8 (2004)
- 5) H. Yanagie, *et al.*, *Biomed. Pharmacother.* **60** (1), 43-50 (2006)
- 6) H. Yanagie, *et al.*, *Expert Opin Drug Deliv.* **5** (4), 427-43 (2008)
- 7) H. Yanagie, *et al.*, *British Journal of Cancer.* **63** (4), 522-526 (1991)
- 8) H. Yanagie, *et al.*, *British Journal of Cancer.* **75** (5), 660-665 (1997)
- 9) H. Yanagie, *et al.*, *Appl Radiat Isot.* **61** (4), 639-46 (2004)
- 10) K. Maruyama, H. Yanagie, *et al.*, *J Control Release.* **98** (2), 195-207 (2004)

- 11) O. Ishida, *et al.*, *Pharm Res.* **18** (7) :1042-1048 (2001)
- 12) M. Suzuki, *et al.*, *Appl Radiat Isot.* **61** (5) :933-937 (2004)
- 13) I. Ikushima, *et al.*, *Br J Radiol.* **85**(1017) :e584-9(2012)
- 14) H. Yanagie, *et al.*, *Br J Radiol.* **90** (1074) : 20170004. doi: 10.1259/bjr.20170004. Epub 2017 May 25. in press. (2017)
- 15) S. Mikado, *et al.*, *Nucl. Instr. & Methods A*, **605** (1-2), 171-174 (2009)
- 16) H. Yanagie, *et al.*, *Appl Radiat & Isot.* **88**, 32-37 (2014)
- 17) R. Suzuki, *et al.*, *Methods Mol Biol*, **605**, 473-486(2010)
- 18) R. Abdalkader, *et al.*, *Acta Biomater.* **19**, 112-118(2015)
- 19) R. Suzuki, *et al.*, *Cancer Sci.* **107** (3), 217-23 (2016)
- 20) N. Yasuda, *et al.*, *Radiat. Meas.* **40**, 311-315 (2005)
- 21) K. Amemiya, *et al.*, *Radiat Meas.* **40**, 283-288 (2005)
- (\* 1 東京大学大学院工学系研究科原子力国際専攻,  
\* 2 新潟薬科大学 健康・自立総合研究機構,  
\* 3 立教大学 (原子力研究所),  
\* 4 日本大学生産工学部,  
\* 5 帝京大学薬学部)