

癌中性子捕捉療法のための増感原子送達用ナノ粒子の開発

神戸学院大学薬学部／ライフサイエンス産学連携センター
福森義信

1. はじめに

X線やγ線を用いた癌の放射線療法は、外科的手術を行わずに腫瘍細胞を殺傷できる可能性を持つため汎用されているが、これら放射線で殺傷できないかあるいは殺傷困難な腫瘍が存在すること、さらには、照射野内の全細胞が等しく傷害を受けるため、腫瘍細胞を選択的に殺傷するのは困難である。また、外部照射された放射線は、体表付近でそのエネルギーが最大となるため、腫瘍組織が体表面から離れた深部に存在する場合、腫瘍部位に有効に放射線を集中させるには特別な工夫が必要となる。一方、加速したプロトンや炭素原子核などを用いる陽子線治療では、これら粒子のエネルギー（速度）に応じた深度で放射線量が最大となり、このブラッグピークの先では急速に線量がゼロになるという特徴を持ち、この特徴生かした治療の実用化が進められている。この場合でも標的照射野内の全細胞が等しく傷害を受けることに変わりはない。これに対して、targeting radiotherapyの代表的な例では、がん病巣に特異的に放射性物質を送達するが、放射性物質そのものを用いることに多くの困難と限界が存在するものと考えられる。

本稿では、これらとは異なる癌の放射線療法である中性子捕捉療法について、ナノ粒子が果たす役割について概略を述べる¹⁾。

2. 中性子捕捉療法の原理

中性子捕捉療法 (NCT) は、1936年にLocherにより提唱された²⁾。本法では、まず、それ自体では放射活性を持たない熱中性子捕捉断面積の大きい元素（放射線増感元素、放射線増感剤）を腫瘍内に集積させ、続いて腫瘍部位に生体障害性が極めて低い熱中性子を生体外から照射する。このとき熱中性子捕捉断面積の大きい放射線増感元素がもつばら熱中性子と核反応（中性子捕捉反応、NCR）を起こし、その際放出される放射線で癌治療を行う。この方法は、腫瘍での増感元素の量と中性子線量の両方で治療をコントロールすることになるため、binaryな治療法と言うことができる。この際に送達が必要とされるのは、放射活性元素や制癌剤とは異なり生理的に不活性な元素や化合物であり、大量投与により全身に増感元素含有化合物を分布させた後で腫瘍でのその残留性を狙うことによっても腫瘍蓄積が可能になるという大きな利点を有する。さらには、生成する放射線は、用いる増感元素を選ぶことにより、α線の9 μmからγ線のように100 μm以上の飛程を持つものまで、治療目的に応じた選択が可能である。例えば、α線を生成する増感元素を用い

れば、理論的には放射線の照射範囲を細胞レベルに局限することが可能である。

現在まで、臨床試験では熱中性子の増感元素としてホウ素 (B) が用いられてきた。これは、表 1³⁾に示すように¹⁰Bの熱中性子に対する断面積が

表 1 代表的な原子の熱中性子捕捉断面積

原子	捕捉断面積 (barn)	反応
¹⁶ O	0.00019	
¹² C	0.0035	
¹ H	0.333	¹ H(n, γ) ² H
¹⁴ N	1.83	¹⁴ N(n, p) ¹⁴ C
¹⁰ B	3840	¹⁰ B(n, α) ⁷ Li
¹⁵⁷ Gd	254000	¹⁵⁷ Gd(n, γ) ¹⁵⁸ Gd

3840 barn であり、通常の生体構成成分の水素、炭素、酸素などの中性子捕捉断面積が 1.0 barn 以下であるのと比較すると非常に大きいためである。このホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) では、中性子捕捉反応により、飛程がそれぞれ $9 \mu\text{m}$ 、 $5 \mu\text{m}$ の細胞の大きさにほぼ等しい α 線と ${}^7\text{Li}$ が放出される⁴⁾。従って、ホウ素化合物を腫瘍細胞に特異的に送達できれば、中性子照射により細胞内(特に核内)に ${}^{10}\text{B}$ を取り込んだ細胞だけを選択的に殺傷することが可能である。

一方、ガドリニウム (${}^{157}\text{Gd}$) はあらゆる安定な元素の中で最も熱中性子捕捉断面積が大きく (表 1)、 ${}^{10}\text{B}$ の 66 倍の 254,000 barn である。 ${}^{157}\text{Gd}$ は、 ${}^6\text{Li}$ などと共に中性子捕捉療法の開発の初期段階で増感剤の候補にあげられたが、中性子捕捉反応により飛程の長い γ 線を大量に放出するため、腫瘍細胞だけでなく腫瘍細胞近傍の正常細胞も殺傷することから増感剤として不適切とされた。しかし、この ${}^{157}\text{Gd}$ が ${}^{10}\text{B}$ の欠点を補う可能性がある増感剤として検討が続けられている。これは、ガドリニウム中性子捕捉療法 (GdNCT) では、(1) 中性子捕捉反応により飛程 $100 \mu\text{m}$ 以上の γ 線等が放出されるため、 ${}^{157}\text{Gd}$ が腫瘍細胞内だけでなく、腫瘍組織内に存在していれば、腫瘍細胞を殺傷することが期待できること、(2) 同時に発生するオージェ電子による局所的な腫瘍殺傷が期待できること、(3) ガドリニウムが MRI 造影能を有することから治療と診断が同時に行えることによる。

3. ホウ素クラスター-BSH とそのナノ粒子キャリアー

前述の原理から明らかなように、中性子捕捉療法の大きな課題の一つは増感元素の腫瘍への選択的な蓄積である。現在までに多くのホウ素化合物がこの目的のために合成され、腫瘍蓄積性が評価されてきたが、蓄積性が高くても化学的安定性や生体内での毒性の発現のため多くの化合物が臨床に供されることはなかった。その中で、ホウ素クラスターである disodium undecahydro-mercapto-closo-dodeca-carborate (BSH) が汎用されてきた (図 1)。

中性子捕捉療法は、その脳腫瘍への適用が現在最大の研究目標になっている。ヨーロッパの中心的治疗センターになっているオランダの Petten では BSH が用いられており、Gabel らを中心に動態の研究が行われてきた⁵⁾。BSH には血液脳関門 (BBB) 透過性はなく、腫瘍によって BBB が欠損している場合にのみ脳内に移行する。腫瘍-血液濃度比は 1.3:1 から 2:1 程度であり、細胞内で核に特別な蓄積があるかどうかは現在のところ定かではない。

ホウ素の送達のために微粒子キャリアーを用いた研究は、主にリポソームについてなされてきた。Shelly らは⁶⁾、BSH のようなホウ素クラスターを 2 個 (20 個の B) 持つ水溶性の二価アニオンである closo-decahydro-decarborate 等を、distearoyl phosphatidylcholine とコレステロールからなる 70 nm 以下の粒子径のリポソームに含有させて、ETM6 担癌マウスに $15 \text{ mg/kg body weight}$ で静脈注射した。肝への蓄積は初期には高いもののその後速やかに消失し、腫瘍内では滞留性があり $>15 \mu\text{g B/g tumor}$ の濃度と 3 以上の腫瘍-血液濃度比を示すことを報告している。その後、同じグループの Feakes らは⁷⁾アミノ基を持つ同様の水溶性の B_{20} 化合物を封入し、この化合物が酸化して細胞内のタンパクと結合することによって $30\text{--}40 \mu\text{g B/g tumor}$ の濃度と約 5 の腫瘍-血液濃度比を示すこと、

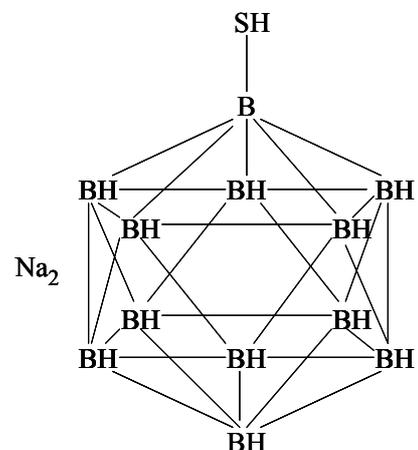


図 1. 臨床に用いられているホウ素クラスター-BSH

polyethylene glycol conjugated distearoyl phosphatidylethanolamine (PEG-DSPE)を加えることにより血中滞留性が上がり、腫瘍内 B 濃度は投与 48 時間後には $47 \mu\text{g B/g tumor}$ に達することを示した。さらに別途リン脂質膜中に保持可能な疎水性の B_{10} 化合物を合成し、これを膜中に付加することにより $50 \mu\text{g B/g tumor}$ の濃度と約 6 の腫瘍-血液濃度比を達成できたことを報告している⁸⁾。

Yanagie らは⁹⁾膵臓癌への適用を目的にホウ素キャリアーとして多重層膜 immunoliposome を用い、腫瘍内へ直接投与することにより有意な腫瘍成長抑制効果が得られることを報告している。また Maruyama らは¹⁰⁾、PEG リポソームを静脈注射することにより血中滞留性が上昇し腫瘍内ホウ素濃度が顕著に高くなること、さらに PEG 末端に transferrin を結合させることにより腫瘍内滞留性が 72 時間以上に渡って維持されることを示し、これが顕著な腫瘍成長抑制効果につながることを示した。

一方、Laster らは¹¹⁾、低密度リポ蛋白質 (LDL) を、そのコレステロールを carborane carboxylic acid の脂肪族アルコールとのエステルで置き換えて、ホウ素キャリアーとして用いた。In vitro での腫瘍細胞内取込み量は治療有効濃度の 10 倍に当る $240 \mu\text{g } ^{10}\text{B/g cells}$ に達したことを報告している。

4. ガドリニウム中性子捕捉療法へのナノ粒子の適用

Gd イオンは重金属毒性を示すため、GdNCT ではキレート化合物だけが使用されてきた。MRI 造影剤である Gd-DTPA のジ・メグルミン塩が代表的なものであるが、これらは造影剤として設計されているため腫瘍蓄積性が乏しい。徳植らは¹²⁾、GdNCT において有効な抗腫瘍効果を得るには約 100 ppm の腫瘍内 ^{157}Gd 濃度が必要であると推定している。著者らは、できるだけ単純な製剤によって、100 ppm の腫瘍内 Gd 濃度を達成するべく、ナノキャリアー粒子による Gd の動態制御を行ってきた。

4. 1. 体循環経路での腫瘍内へのガドリニウムの送達

静脈注射用脂肪乳剤はすでに実用化されており、近年疎水性薬物のキャリアーとして注目を集めている。そこで、体循環系経路での Gd の送達のため、このリピッドエマルジョンを採用した (図 2)^{13, 14)}。

周知のように腫瘍の新生血管は血管内皮の発達が未熟なことから、直径 100 nm 以下の粒子は血管外へ漏出可能であると考えられる。そこで、粒子径 100 nm 以下で製剤中の Gd 含量が高いリピッドエマルジョン製剤の調製、ならびに、血中滞留性延長を目的とした表面改質を検討した。更に、調製したエマルジョンの腹腔内投与後の体内動態を担がんハムスターを用いて検討した。

静脈用脂肪乳剤の基本処方である大豆油とレシチンを用いた (図 2)。このエマルジョンに Gd を保持させるべく、油滴表面のレシチン層に、類似の構造を持つように合成した両親媒性 Gd 誘導体 (Gd-DTPA-SA) を挿入させた (図 2, 図 3)。リピッドエマルジョンは、リポソームの基本的な調製法である薄膜法に

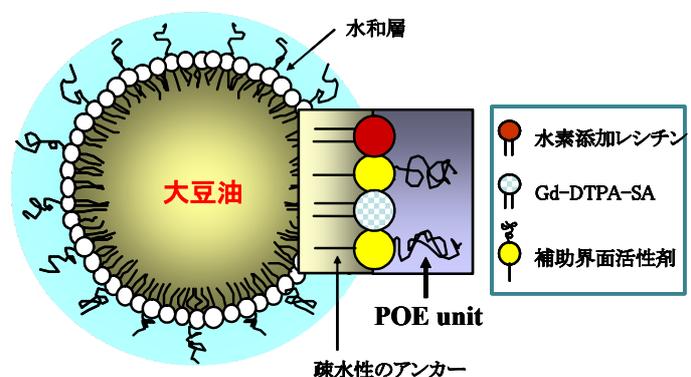


図 2. がん中性子捕捉療法用脂質ナノ粒子の構造

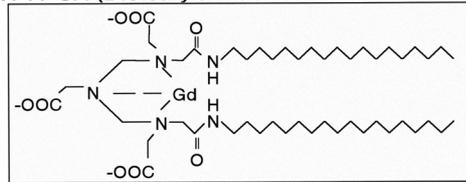
準じて粗エマルジョンを調製後、水浴式超音波装置で粒子径を微細化した。大豆油、水、水素添加卵黄ホスファチジルコリン (HEPC), Gd-DTPA-SA の重量比 7.36:92:2:1 の標準処方で調製した plain エマルジョンの粒子径は 250 nm であった。ここへ補助界面活性剤として HCO-60, ポリオキシエチレン (POE)-エーテル (Brij) 類または POE-エステル (Myrj) 類 (図 3) を添加することにより、粒子径を 100 nm 以下にする処方を確立した。

悪性黒色腫細胞 (D₁-179) を移植したハムスターをモデル動物とし、調製したエマルジョン製剤の体内動態試験を行った (図 4)。腫瘍直径が約 10 mm となる腫瘍移植 10 日目にエマルジョンを腹腔内投与した。投与量は 2.0 ml (標準 Gd 処方の場合

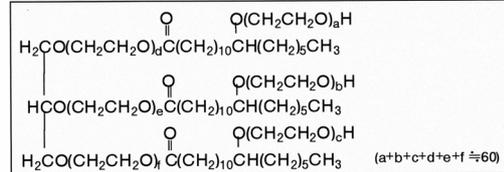
3.0 mg Gd, 高 Gd 処方の場合 6.0 mg Gd)/hamster とした。HCO-60 および Brij 700 エマルジョン投与群の血中および腫瘍内 Gd 濃度は plain および Myrj 53 エマルジョン投与群より有意に高くなった。HCO-60 や Brij 700 エマルジョン投与時には長期にわたり高い血中 Gd 濃度を維持し、腫瘍内への蓄積も高かった (図 4)。この結果をもとに、高 Gd 含量の HCO-60 エマルジョンを開発し、腫瘍内 Gd 濃度を 107 μg Gd/g tumor (wet) にまで高めることができた。

このように、Brij700 や HCO-60 エマルジョンが血中滞留性を示したのは、表面の安定な親水性 POE 鎖 (エーテル結合) が RES 回避に有効だったことを示唆している。それは POE 鎖がエステル結合しているため分解されやすい Myrj 系では血中滞留性が認められなかったためである。また、Gd-DTPA に疎水基であるステアシル基を導入する際、本研究では比較的安定なアミド結合としたが、これをエステル結合にすると、おそらく加水分解されやすいために

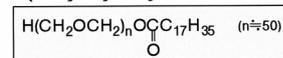
1 Gd-DTPA-SA (Distearylamine derivative of Gd-DTPA)



2 HCO-60 (Polyoxyl 60 hydrogenated castor oil)



3 Myrj53 (Polyoxyethylene 50 stearate)



4 Brij700 (Polyoxyethylene 100 stearylether)

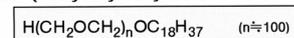


図 3 ガドリニウム誘導体と補助界面活性剤の構造

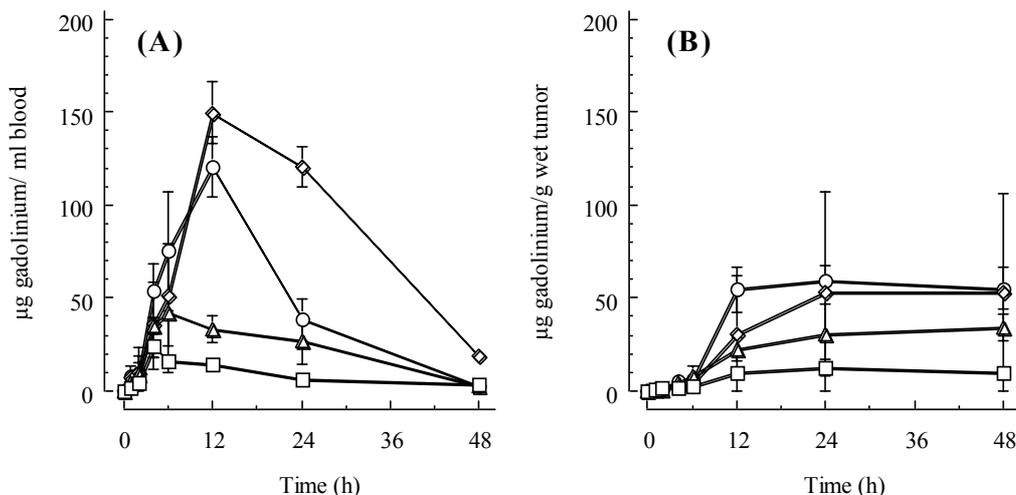


図 4 エマルジョンの腹腔投与後の血中 (A)および腫瘍内 (B) Gd 濃度に及ぼす補助界面活性剤の効果

□補助界面活性剤なし, △Myrj53, ◇Brij700, ○HCO-60

投与量: 3 mg Gd/hamster; 腫瘍: D₁-179 melanoma. 値は平均±標準偏差 (n=3-9)

Gd-DTPA が表面から遊離し、散逸したため、Gd の腫瘍内蓄積性は著しく低いものであった。

その後の検討で、この腹腔内投与時の生物学的利用率は 57% であり、高濃度 Gd 処方 of エマルジョン 1 ml の静脈への二回投与でも、同レベルの腫瘍内 Gd 蓄積が可能であることがわかった¹⁵⁾。

4. 2. 腫瘍内直接投与のためのキトサン粒子の設計と調製

血管系から粒子を腫瘍内に送り込むのとは逆に、腫瘍内投与で粒子を滞留させるには、粒子径は 100 nm 以上であることが必要である。また、腫瘍細胞に粒子を食作用で取り込ませるためには、粒子径は 300 nm–3 μm であり、粒子表面は細胞表面とは逆に正に帯電している方が有効である。このような考えに基づいて、腫瘍組織又は細胞内に Gd を滞留・送達させるべく設計、調製した微粒子製剤 (Gd-nanoCP) について以下に述べる。

製剤素材には生体適合性・分解性を有する陽イオン性多糖類であるキトサンおよび MRI 造影剤マグネビスト®の主成分で生体内安定性・安全性に優れた高水溶性の Gd-DTPA を選択し、新規に開発したエマルジョン液滴融合法 (図 5) により調製し評価を行った¹⁶⁻¹⁸⁾。

Gd 含量が最も高かった Gd-nanoCP は、脱アセチル化度 100% キトサンと 15% Gd-DTPA 溶液から調製したもので、平均粒子径は 452 nm、Gd 含量は 13.0% (Gd-DTPA にして 45.3%) であった。ナノサイズであるにも関わらずこの異例に高い Gd-DTPA 含量をもたらした本調製法の Gd-nanoCP 生成メカニズムについてはまだ未知の部分が多いが、粒子内への Gd の固定は Gd-DTPA 分子の 2 つのフリーのカルボキシル基とキトサン分子のアミノ基との間の強い静電的相互作用であることが予想される。またキトサンを含むエマルジョン A の粒子径は 4 μm、エマルジョン B の粒子径は 2 μm であることから、Gd-nanoCP は水滴内で生成し、水滴のサイズを反映したものではなかった。

試験液に等張リン酸緩衝液 (PBS) と人血漿を用い *in vitro* の Gd-nanoCP からの Gd-DTPA の溶出特性を調べた。PBS 中では、7 日間 (37°C) にわたりほとんど溶出は認められず (1.8%)、キトサンとの水不溶性の強固な複合体形成を支持する結果であった。一方、37°C ヒト血漿中では 3 時間で 55%、24 時間で 91% 溶出し、PBS 中とは大きく異なる挙動を示した。

Gd 1200 μg 相当の各製剤を腫瘍組織内に投与した結果、ガドペンテト酸ジメグルミン水溶液では、腫瘍内 Gd 量は腫瘍内投与直後で平均 451.7 μg (37.6%)、24 時間後で 5.3 μg (0.4%) であったのに対し、Gd-nanoCP では投与直後で 891.7 μg (74.3%)、24 時間後で 820.6 μg (68.4%) であった。このように、腫瘍内注射において Gd-nanoCP は腫瘍組織内に注入された Gd を長期にわたり保持することが示され、中性子照射中の急速な腫瘍組織内 Gd 量の低下を

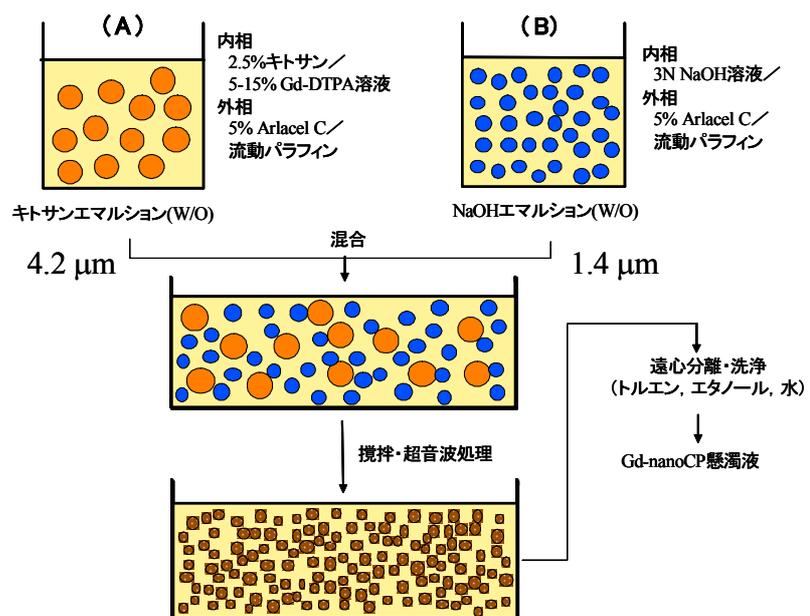


図 5 ガドリニウム含有キトサンナノ粒子の調製

克服するデバイスとして非常に有用であり、治療効果を増強させる可能性を示した。

ここで開発した Gd-nanoCP を培養した L929 fibroblast とインキュベートすると、粒子が細胞表面に付着し、一部は細胞内に取り込まれているのが TEM で観察された¹⁹⁾。さらに、4℃に比べて 37℃では顕著に細胞への取り込みが増加したことから、食作用が強く関与していることが示唆された。また、この取り込みの程度は細胞種によって非常に異なることもわかった。

放射線抵抗性メラノーマ皮下担癌マウスにおいて、Gd-nanoCP 懸濁液の腫瘍内投与 (Gd 2400 μg) による GdNCT 腫瘍増殖抑制効果は、Gd 未投与群およびマグネビスト水溶液投与群に比べて顕著に大きく、有意な生存期間延長が認められた (図 6)。また、Gd-DTPA ジメグルミン水溶液投与群は全く抗腫瘍効果を示さなかった。本結果は、従来の GdNCT 研究と比べ、1/5 以下の Gd 投与量と投与から中性子照射までの時間間隔が大幅に大きかったにも関わらず得られたもので、Gd-nanoCP の GdNCT 用製剤としての有用性が示された。また Gd-nanoCP を投与し中性子を未照射の場合には腫瘍増殖抑制効果は全く認められず、中性子と Gd-nanoCP 中の Gd との核反応 (γ 線又は電子線の放射) により腫瘍増殖を抑制したことを証明した。本結果は、GdNCT 単独試験として放射線抵抗性のマウスメラノーマモデルに対して顕著な抗腫瘍効果を示した数少ない事例となった。

ここで調製した Gd-nanoCP は、食作用を受けやすい粒子径であり、表面のアミノ基も調製仕上げ段階の繰り返し洗浄によって正に帯電し、注射用溶媒中では全く漏出、溶出が起らず、腫瘍組織内では緩和な徐放性を示すものであった。しかし、その生成メカニズムは不明であり、より最適化を行い、さらには投与ルートの変更等に耐えられるようにするにはその解明が必要であろう。

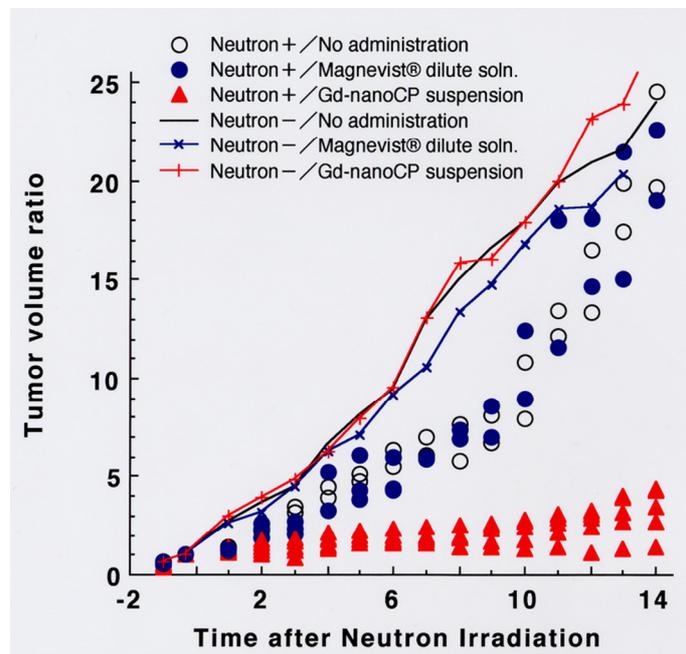


図 6. Gd-nanoCP を用いた B16F10 Melanoma 担持 C57BL/6 マウスの中性子捕捉療法における腫瘍成長抑制効果

4. 3. その他の試み

GdNCT の研究は多くはなく、MRI 造影剤との関係で報告が見られる。Hofmann ら²⁰⁾は Sherring が開発した MRI 造影剤である Gd のキレート化合物である水溶性の Gadobutrol を用いて、Sk-Mel-28 melanoma に対する *in vitro*, *in vivo*での GdNCT の結果を報告している。*In vivo* 実験では、腫瘍内に MRI での許容量の 4 倍の 3760 μg Gd/200 μl tumor が投与され、投与直後に中性子照射が行われた。著者らの経験から、これは十分効果が得る投与量であると推定されるが、実際顕著な腫瘍成長抑制効果が報告されている。一方、最近、Kobayashi らが²¹⁾、腫瘍細胞内への特異的取り込みを促進させる avidin, Gd をキレート化する DTPA 誘導体、それらを多数表面に結合させる dendrimer からなる conjugate を合成し、優れた腫瘍選択的な Gd 蓄積を報告している。また、Stasio らは²²⁾、Gd-DTPA 溶液とインキュベートした glioblastoma multiforme 患者 (NCT の重要なターゲットである) 由来の細胞への Gd の取り

込みと細胞内分布を調べている。培養液中の Gd 濃度は最高 20 mg/ml と著しく高いが, Gd-DTPA の細胞内取り込みが起こること, 細胞質より核により多く蓄積することを報告している。

5. おわりに

現在, 中性子捕捉療法に関する研究はホウ素化合物を用いた脳腫瘍の臨床試験に向けて全力投球の感がある。日本での臨床試験の多くの経験は今日にいたる研究を大いに勇気付けてきたが, 必ずしも十分に validate されたものでなかったため, 現在のプロトコル作りには新たな検証が必要とされてきた。その中で, リポソーム, エマルジョン, 高分子などのナノ粒子を用いた薬物送達技術は一定の評価を得てきたが, それらが実際に臨床に適用されるのは, BSH などのホウ素化合物溶液を使った現在の戦略が一段落し, 適用腫瘍の拡大やより高い生存率や治癒率が求められるであろう次のフェーズに入ってからであろう。ここで述べた増感元素の体内動態制御の課題は, DDS 全般に共通のものが多いが, 次世代の期待に応えられる技術として磨きをかける必要がある。

文献

- 1) 福森義信ら, *Drug Delivery System*, 17, 355 (2002).
- 2) G. L. Locher, *Am. J. Roentgenol.*, 36, 1 (1936).
- 3) J. A. Coderre *et al.*, *Radiat. Res.*, 151, 1 (1999).
- 4) J. Carlson *et al.*, *Acta Oncol.*, 31, 803 (1992).
- 5) D. Gabel *et al.*, *Acta Neurochir.*, 139, 606 (1997).
- 6) K. Shelly *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 9039 (1992).
- 7) D. A. Feakes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 3029 (1994).
- 8) D. A. Feakes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 1367 (1995).
- 9) H. Yanagie *et al.*, *Bri. J. Cancer*, 75, 660 (1997).
- 10) K. Maruyama *et al.*, *J. Controlled Release*, 98, 195 (2004).
- 11) B. H. Laster *et al.*, *Cancer Res.*, 51, 4588 (1991).
- 12) K. Tokuyue *et al.*, *Advances in Neutron Capture Therapy*, Plenum Press, New York, 1993, pp. 245-248.
- 13) M. Miyamoto *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 47, 203 (1999).
- 14) M. Miyamoto *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, 22, 1331 (1999).
- 15) T. Watanabe *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 54, 119 (2002).
- 16) H. Tokumitsu *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 47, 838 (1999).
- 17) H. Tokumitsu *et al.*, *Pharm. Res.*, 16, 1830 (1999).
- 18) H. Tokumitsu *et al.*, *Cancer Lett.*, 150, 177 (1999).
- 19) F. Shikata *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 53, 57 (2002).
- 20) B. Hofmann *et al.*, *Invest. Radiol.*, 34, 126 (1999).
- 21) H. Kobayashi *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 12, 587 (2001).
- 22) G. De Stasio *et al.*, *Cancer Res.*, 61, 4272 (2001).