

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目 :	若手研究 (B)
研究期間 :	2008 ~ 2009
課題番号 :	20791022
研究課題名 (和文)	診断治療薬同時包埋リポソームによる悪性脳腫瘍に対する治療効果改善に関する研究
研究課題名 (英文)	transferrin targeting liposomes encapsulating both boron and iodine contrast agent by CED to F98 rat glioma for boron neutron capture therapy
研究代表者	
池田 直廉 (Ikeda Naokado)	
大阪医科大学・医学部・助教	
研究者番号 :	50434775

研究成果の概要 (和文) :

悪性脳腫瘍特に神経膠芽腫は手術および放射線照射という標準治療をおこなっても、その治療成績は十分なものではない。本研究ではホウ素中性子捕捉療法における「ホウ素分布」に焦点を当て、腫瘍への直接注入をおこなうことでより高濃度のホウ素を腫瘍細胞内に蓄積させることを達成した。またホウ素分布の可視化を目的とし、ホウ素化合物とヨード造影剤をリポソーム内に同時包埋させることでCT画像での可視化を実現した。

研究成果の概要 (英文) :

Abstract: Objective: To augment the therapeutic efficacy of boron neutron capture therapy, we used transferrin (TF)-conjugated polyethylene-glycol (PEG) (TF-PEG) liposome encapsulating a sodium borocaptate and Iomeprol, an iodine contrast agent, with intratumoral convection-enhanced delivery (CED) in a rat glioma tumor model. Methods: The in vitro boron-10 (10B) concentration of F98 rat glioma cells was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) after incubation with either TF-PEG or PEG liposomes. For in vivo biodistribution studies, 10B concentrations within blood, normal brain tissue, and intracerebrally transplanted F98 cells were measured with ICP-AES after CED of the compounds, and computed tomography (CT) scanning was performed at selected time intervals.

Results: 10B concentrations of F98 cultured glioma cells in vitro 6 h after exposure to PEG and TF-PEG liposome were 16.1 and 51.9 ng 10B/10⁶ cells, respectively. 10B concentrations in F98 glioma tissue 24 h after CED were 22.5 and 82.2 μ g/g, by PEG and TF-PEG liposome, respectively, with lower 10B concentrations in the blood and the normal brain. Iomeprol provided vivid and stable enhanced CT imaging of the transplanted tumor even 72 h after CED by TF-PEG liposome. Conversely, tissue enhancement had already washed out at 24 h after CED of the PEG liposomes.

Conclusion: The combination of TF-PEG liposome encapsulating BSH and Iomeprol and intratumoral CED enables not only a precise and potent targeting of boron delivery on the tumor tissue but also the ability to follow the trace of boron delivery administered intratumorally by real-time CT imaging.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学・脳腫瘍学

キーワード：悪性神経膠腫、硼素中性子捕捉療法、トランスフェリン結合リポソーム、

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍の中でも神経膠芽腫はその生命予後が極めて不良であり、現在標準治療とされている手術および放射線照射をおこなっても治癒に至ることは稀である。当施設では従来より神経膠芽腫に対するホウ素中性子捕捉療法を臨床応用しており、標準治療に遜色ない成績を残してきた。この治療法は腫瘍細胞内ホウ素量と正常細胞内ホウ素量の比が大きいほど有効であり、生物学的選択性が得られる根拠となっている。これまでにホウ素化合物の投与経路や担送システムに関する研究が数多く報告されてきたが、腫瘍細胞選択的なホウ素蓄積は良好な結果も出ている。しかしながら中性子照射に際し、定量的な線量計画が十分でないのも事実である。われわれは投与したホウ素化合物の分布を可視化することができれば画像からのホウ素量の定量化が可能になるのではないかと推定し本研究を立案した。

2. 研究の目的

前述の背景を踏まえ、本研究の第一の目的は腫瘍細胞内ホウ素量を高濃度に維持し、かつ腫瘍細胞内ホウ素量と正常細胞内ホウ素量比をいかに大きくするかということである。第二の目的は生体内におけるホウ素分布の画像化およびホウ素濃度を検証することである。本研究ではホウ素化合物の担送システ

ムとして分子標的が可能なトランスフェリン結合リポソームを用い、内部にホウ素化合物およびヨード造影剤を同時包埋した。

3. 研究の方法

(1)F98 ラット神経膠芽腫細胞へのホウ素の取り込み実験

①ホウ素化合物担送システムの作成

ホウ素化合物としてBSHを、ヨード造影剤としてイオメプロールを同体積比にて同時包埋したリポソームを用いた。分子標的能の検証のため一方はトランスフェリン結合リポソームとし、他方はトランスフェリン非結合リポソームとした。

②腫瘍細胞への投与とホウ素濃度測定

F98培養細胞に上記リポソーム溶液をそれぞれホウ素濃度が10ppmとなるように調整して6時間暴露させた。6時間後に十分に洗浄して回収後、それぞれの細胞内ホウ素濃度を誘導結合プラズマ発光分光法により測定した。

(2)F98 ラット神経膠芽腫モデルにおけるホウ素分布の画像化および腫瘍内ホウ素濃度の検証

①ラット脳腫瘍モデルの作成

10,000個のF98培養細胞をラット脳に移植し

た。移植後 10 日で腫瘍が一定の大きさとなることが既知であり、これを脳腫瘍モデルとした。

②ホウ素担送システムの腫瘍内注入と CT 画像作成

前述のトランスフェリン結合リポソームおよびトランスフェリン非結合リポソームを定位的にラット脳腫瘍内に直接注入した。注入したホウ素量はいずれも ^{10}B 量で $20\ \mu\text{g}$ とした。注入後 0 時間、24 時間、48 時間、72 時間後に頭部 CT を撮影した。

③組織採取およびホウ素濃度測定

前述の時間毎のモデルから腫瘍、正常脳、血液等の組織を採取し 1N-硝酸で溶解、組織別のホウ素濃度を誘導結合プラズマ発光分光法により測定した。

4. 研究成果

(1) F98 ラット神経膠芽腫細胞へのホウ素の取り込み実験

腫瘍細胞 100 万個あたりのホウ素量で測定した結果、トランスフェリン結合リポソーム群 $51.9 \pm 6.8\ \text{ng}$ に対し、トランスフェリン非結合リポソーム群は $16.1 \pm 4.8\ \text{ng}$ であった。統計学的有意差をもってトランスフェリン結合リポソーム群でより高濃度のホウ素が細胞内に取り込まれることが分かった。トランスフェリンによる分子標的能のみに依存する結果とまでは言えないが、生体内でも腫瘍細胞選択的な取り込みを十分期待できる結果であると考えられる。

(2) F98 ラット神経膠芽腫モデルにおけるホウ素分布の画像化および腫瘍内ホウ素濃度の検証

トランスフェリン結合リポソーム群、トランスフェリン非結合リポソーム群いずれも投与後 0-72 時間まで 24 時間毎に頭部冠状断 CT 撮影をおこなった。トランスフェリン結合リポソーム群では投与後 0 時間から 72 時間まで安定して腫瘍の造影効果を認めたのに対し、トランスフェリン非結合リポソーム群では投与後 0 時間のみ腫瘍造影効果を認めたが、24 時間後には既に消失していた。これは

in vitro の実験結果と同様、生体内においても分子標的による腫瘍選択的な取り込みが可能であることを示唆する結果である。

次に腫瘍、正常脳、血液のサンプルを採取し、それぞれのホウ素濃度を測定した。その結果、腫瘍内ホウ素濃度に関してはトランスフェリン結合リポソーム群では投与後 24 時間でホウ素濃度がピーク値を示しその値は腫瘍 1g あたりのホウ素量で $82.2 \pm 18.6\ \mu\text{g}$ であった。同じ時間でのトランスフェリン非結合リポソーム群での値は $22.5 \pm 6.1\ \mu\text{g}$ であり、約 4 倍の取り込みを示した。正常脳および血液中のホウ素量はいずれも $1.0\ \mu\text{g/g}$ 以下であり、腫瘍内ホウ素量と正常脳ホウ素量比はそれぞれ 274、22.5 と極めて高い数値を示した。心臓、肺、脾臓、肝臓、腎臓、皮膚に関しても組織内ホウ素量は $1.0\ \mu\text{g/g}$ 以下であり、脳腫瘍内局所注入の利点が生かされた結果となった。

当施設では以前、ヒト神経膠芽腫細胞株である U87 Δ のラット脳腫瘍モデルを用い、トランスフェリン結合リポソーム全身投与下における中性子照射実験をおこない、その治療効果について報告した。その実験での投与方法は静脈注射による全身投与であったが、腫瘍内ホウ素量と正常脳ホウ素量比は最大で 18 を示した。細胞株は異なるが、本研究における値は十分な治療効果が得られる可能性を示唆している。

本研究ではホウ素化合物とヨード造影剤を同時包埋しており、CT 画像上の造影領域の CT 値と測定ホウ素量の間に関連があることが予想された。しかしトランスフェリン結合リポソーム群では投与後 0-72 時間まで造影効果が安定しており CT 値も維持されたのに対し、実際のホウ素量は経時的に低下を示し有意な相関関係は見られなかった。生体内におけるホウ素化合物・ヨード造影剤包埋リポソームの挙動、代謝経路などは不明であり、今後の課題である。

本研究期間中、日本では原子炉実験施設がいずれも改修中または原料交換中であり使用不能であった。従って中性子照射による治療実験まではおこなっていない。本研究で得られたデータから推定すると、中性子照射により相当の治療効果が期待できると考えられる。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 直廉 (Ikeda Naokado)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：50434775