

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22978

研究課題名（和文）光音響と超音波応答性ナノバブルによる革新的セラノスティクスシステムの開発

研究課題名（英文）Development of novel theranostics system using photoacoustic and ultrasound-responsive nanobubbles

研究代表者

根岸 洋一（Negishi, Yoichi）

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50286978

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：現在、血管病変の早期診断を目的として、光音響（PA）イメージング法に基づいた高精度なPA造影剤の開発が求められている。本研究では、超音波（US）造影ガス封入ナノバブル（NBs）の基盤技術に光音響技術を新たに融合し、PA法とUS併用による非侵襲的なセラノスティクスシステムの創製を目指した。本研究の遂行により、カルボシアニン系色素であるDiRを搭載した新規光音響応答性NBsの開発に成功し、血管病変部位の検出が可能となる新規光音響造影剤となることが示された。更に本NBsは蛍光イメージングや超音波イメージングなど複数のイメージングモダリティを有することから、より正確な診断ツールとなることが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究の遂行により、カルボシアニン系色素であるDiRを搭載した新規光音響応答性NBsの開発に成功し、血管病変部位の検出が可能となる新規光音響造影剤及び蛍光イメージングや超音波イメージングなどマルチモーダルイメージング剤としての可能性を示した。本成果は、これまでの超音波応答性NBsに光音響技術を融合した新たなツールであり、病変部位に対するより正確な診断造影剤の開発に繋がることから、学術的に意義深い。本基盤技術を応用することで、がん領域など血管病変を有する疾患への応用や治療用超音波と本NBsを併用した場合の新たな治療法の開発も期待される。

研究成果の概要（英文）：Currently, there is a need to develop highly accurate PA contrast agents based on photoacoustic (PA) imaging methods for the early diagnosis of vascular lesions. In this study, we newly combined photoacoustic technology with the platform technology of ultrasound (US) contrast gas-filled nanobubbles (NBs) to create a noninvasive theranostics system using a combined PA and US method. In this study, we developed DiR-loaded photoacoustic-responsive nanobubbles (DiR-PANBs). It is suggested that the DiR-PANBs could detect the vascular lesion. In addition, this NBs have multi-imaging modalities including near-infrared fluorescence imaging and ultrasound imaging. Thus, the DiR-PANBs might be more precise and accurate diagnostic agents.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：光音響 ナノバブル 超音波

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管を高精度にイメージングする技術開発は、様々な発病(がん、循環器疾患等)を未然防止するための重要課題であり、高い治療効果に直結しうる非侵襲的診断法の開発が急務とされている。現在、光音響イメージングに基づいた高感度診断を目的として、特定波長の光照射により熱効果および高い光吸収レベルのために超音波を発生する光音響造影剤の研究開発が進められているが、病変部位を診断できる有効な造影剤は開発されていない。申請者らは、血中滞留性の高いリポソームに超音波造影ガスを封入したナノバブル(NBs)を開発し、超音波造影剤として、またNBsの崩壊に伴うキャビテーション誘導を利用する新規の薬物・遺伝子導入剤となることを示し、更にセラノスティクス(診断と治療の一体化)の構築が可能となることを報告してきた。これらの背景を踏まえ申請者らは、これまでのNBsの基盤技術に光音響技術を融合させることで高感度に深部病変部位のイメージングが可能となり、更に治療用超音波照射により、両者の特性を生かした革新的セラノスティクスの構築が実現可能と考えた。

2. 研究の目的

本研究では、NBsの研究基盤を生かし、血管病変の診断及び治療に資する光音響造影剤と超音波造影ガスを搭載した光音響NBsを開発し、光音響法と超音波照射併用による非侵襲的なセラノスティクスシステムの基盤構築を目指す。血管病変(がん、虚血性疾患、炎症性疾患等)部位に移行するリポソームに光音響造影剤(近赤外化合物等)と超音波造影ガスを内封した光音響NBsの新規開発を行い、血管病変モデルマウスを用いて、光音響法に基づく高精度な診断イメージングを実施することで新規光音響NBsの有用性を検証し、革新的セラノスティクスシステムの創製に向けた基盤構築を目指す

3. 研究の方法

(1) DiR 搭載ナノバブルの調製

基本脂質として 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC)、distearoylphosphatidylethanolamine-PEG2000-OMe (DSPE-PEG2000-OMe)を用い脂質組成が DPPC: DSPE-PEG2000 = 94: 6 (molar ratio)となるように REV 法にてリポソームを作製した。光音響応答性物質として、脂溶性カルボシアニン色素である 1,1'-di-octadecyl-3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide (DiR)を用いた。DiR をエタノール溶液とし脂質と混合後、リポソームを作製することで DiR 搭載リポソームとした。DiR 搭載リポソームをガラスバイアルに注入した後に、超音波造影ガスであるパーフルオロプロパンガス(C3F8)を充填した。これをバス型ソニケーターにて超音波処理することで DiR 搭載ナノバブルを作製した。DiR 搭載ナノバブルの粒子径は Aggregates Sizer (島津製作所)を用いて測定した。

(2) DiR 搭載ナノバブルの光音響応答性評価

DiR 搭載ナノバブルの光音響応答性を、リアルタイム光音響イメージングシステム Acoustis X (CYBERDYNE Inc.)を用いて評価した。光音響波を発生させる光源として High Density High Power LED を用いた。また、生体内において正確に血管病変部位の検出を行うため、ヘモグロビンに由来する血液を可視化できる 850 nm 及び DiR に応答する 750 nm 波長を同時に照射する LED を用いた。DiR 搭載リポソーム及びナノバブルを 100 µg (100 µL)シリコンチューブ内に充填しイメージングした。DiR 搭載リポソーム/NBs の比較対象として、DiR と同じ脂溶性カルボシアニン色素である 1,1'-di-octadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate (DiI)を搭載したリポソーム/ナノバブルを用い、光音響イメージング造影剤として最適か否かについても検討した。

(3) 炎症モデルマウスの作製

血管病変モデルとして炎症に着目し、ホルボールエステルであるホルボール 12-ミリストート 13-アセタート (PMA, 富士フィルム和光純薬)をマウス (ICR, オス, 5-7 weeks)耳部 (片耳、あるいは両耳)に塗布し、24 時間後のマウスを炎症モデルマウスとした。アセトン塗布したマウスをコントロールマウスとした。モデルマウスにルミノールナトリウム塩溶液 (50 mg/mL)を 200 mg/kg となるよう腹腔内投与し 10 分後、in vivo imaging system (IVIS Lumina[®], Exposure time: 3 min)を用いて発光強度を測定することで、炎症度合いを評価した。

(4) 光音響応答性 NBs の炎症部位に対する集積性の評価

DiR 搭載ナノバブルを炎症モデルマウスに投与し、経時的に (投与後 15 分、30 分、60 分、120 分、180 分) in vivo imaging system (IVIS Lumina[®], Excitation: 740 nm, Emission, 790 nm, Exposure time: 1 sec)を用いて撮影した。

(5) 炎症部位における光音響応答性 NBs の光音響イメージング及び超音波イメージングに関する

る検討

DiR 搭載ナノバブルを炎症モデルマウスに投与し、Acoustic X を用いて炎症部位の光音響イメージングを行なった。超音波イメージングにおいては、DiR 搭載ナノバブルを炎症モデルマウスに投与し、超音波診断装置 (Aplio80, 東芝)を用いて炎症部位の超音波造影を行なった。

4. 研究成果

(1) 光音響応答性ナノバブルの開発と光音響応答性の評価

生体組織に光を照射すると、血液や組織などが瞬間的に熱膨張を起こし光音響波を発生する。この光音響波を超音波プローブで捕捉し画像化した手法が光音響イメージングである。蛍光イメージングを代表とする光イメージングと比較し、光音響イメージングでは生体で散乱しにくい音波を検出するため深部のイメージングが可能である。また捕捉される光音響波は、血液 (ヘモグロビン)や光音響造影剤など、各々の光吸収特性によって変化するため、造影剤を利用することで、より病変部位の検出に適したイメージングが可能となる。そこで本項では、光音響造影剤としてカルボシアニン系色素の1つである DiR に着目し、DiR を脂質ナノ粒子であるリポソームに組み込み、更に超音波造影ガスを封入することで、光音響応答性ナノバブルを作製した。はじめに、DiR 搭載リポソームにおける DiR の最適な添加量について検討した。脂質に対し 1-5 mol%の割合で DiR を加え、DiR 搭載リポソームを作製した。結果 DiR を 3 mol%以上組み込んだ場合では、DiR の搭載量にバラつきが大きくなり粒子の不安定化が示唆された。この結果より、以降の検討では DiR の添加量を脂質に対し 2 mol%として検討を進めた。

DiR の添加量を 2 mol%とした DiR 搭載リポソームに超音波造影ガスを封入することで、DiR 搭載ナノバブルとした。DiR 搭載ナノバブルの粒子径を Aggregates sizer (株式会社島津製作所)で測定したところ、平均粒子径 190 ± 9 nm ($n = 3$)を示した。DiR 未搭載 NBs の平均粒子径は 195 ± 1.4 nm ($n = 3$)であることから、DiR の NBs への搭載は粒子径に対して影響はないことが明らかとなった。

更に DiR 搭載 NBs の光音響応答性を検討する為、光音響イメージングシステム (Acoustix X: CYBERDYNE)を用いて DiR 搭載 NBs の光音響イメージングを行った。光音響イメージングは、照射した光と光に対する吸収特性によって変化する為、2 種の光源を用いて評価した。750 nm 波長のレーザー光を照射した場合で DiR-NBs のみ光音響シグナルを検出した。一方で、血液中に存在するヘモグロビンに反応する 850 nm 波長のレーザー光を照射した場合は、DiR-NBs のシグナルが観察されなかった。また、得られたシグナルが DiR 由来であるか否かを検討するため、DiR と同じ脂溶性カルボシアニン色素である DiI を搭載した DiI-NBs で同様の検討を行なったところ、いずれの波長においても光音響シグナルは検出されなかった。

以上本結果から今回新たに作製した DiR 搭載ナノバブルは、生体内において NBs のみを検出することが可能な光音響応答性 NBs であることが示唆された。

(2) 炎症モデルマウスの作製と評価

炎症はがんや神経変性など多くの疾患を誘引する要因となる。また、炎症部位は血管新生などにより血管分布や構造が正常とは異なることから、血管病変モデルとして炎症モデルマウスに着目した。炎症モデルマウスは、PMA をマウス耳部に塗布することで作製した。はじめに、マウスの耳に異なる量の PMA (2.5, 5, 10, 20 μ g)を塗布し、炎症モデルとして最適な PMA 塗布量を決定した。急性炎症時に増加する好中球内のミエロペルオキシダーゼとルミノール溶液によって生じる発光強度から炎症度合いを評価した。In vivo imaging system (IVIS : PerkinElmer)の結果より、PMA 5 μ g を塗布した群において最も高い発光強度を示した。5 μ g 以上を塗布した場合は発光強度の減弱とばらつきが大きかったため、PMA 5 μ g を塗布したマウスを炎症モデルマウスとした。

(3) 炎症部位における DiR 搭載 NBs の光音響イメージング能及び超音波イメージング能の評価

次に今回開発した DiR 搭載 NBs が、光音響イメージングにて血管病変部位を検出可能か否かについて検討した。炎症モデルマウスに DiR 搭載 NBs を投与し、経時的に観察した。コントロールとして DiR 未搭載 NBs を投与した群と比較して、DiR 搭載 NBs を投与した群にのみ、投与後 30 秒から 750 nm 波長由来の光音響シグナルが検出され、更にそのシグナルは投与後 30 分後まで維持された。炎症部位における DiR 搭載 NBs の集積性を in vivo imaging system による蛍光イメージングにて評価したところ、投与後 30 分から炎症部位への集積が確認でき、時間依存的に炎症部位にのみ集積することが示された。蛍光イメージングの結果からも、光音響イメージングによって検出されたシグナルが DiR 由来のシグナルであることが示唆され、蛍光イメージング法よりも迅速に炎症部位を描出可能であることが示唆された。

更に NBs の利点を生かし、DiR 搭載 NBs の超音波イメージング能に関しても評価した。炎症モデルマウスに DiR 搭載 NBs を投与し炎症部位を超音波造影した結果、投与後 10 秒後から速やかにエコーシグナルが検出された。

既報において光音響造影剤として、金属ナノ粒子やインドシアニンググリーンなどが用いられてきた。しかしながら、インドシアニンググリーンを用いた場合、インドシアニンググリーンの検出レーザー波長である 850 nm を用いると、ヘモグロビン由来のシグナルと区別することが難しく、血中など病変部位の状態を観察しながら、造影剤のみのシグナルを検出することは困難であ

った。今回の結果より、DiR 搭載 NBs を造影剤として用いることで、血管病変部位のヘモグロピンをモニタリングしつつ、造影剤の検出が可能となり、血管病変部位の描出できることが示唆された。更に今回開発した NBs は超音波イメージング及び蛍光イメージングなどマルチモードイメージングに適応可能であることから、より高精度な診断イメージングが可能となり得ることが示唆された。今後、本 NBs に薬物もしくは治療用核酸を搭載することで、光音響応答性 NBs と治療用超音波照射の併用は血管病変部位に対するセラノスティクスシステムに貢献する手法となり得ることが期待できる。

以上、本研究より、カルボシアニン系色素である DiR を搭載した新規光音響応答性 NBs の開発に成功した。DiR 搭載光音響応答性 NBs を用いることで、血管病変部位をモニタリングしつつ、血管病変部位の検出が可能となる光音響造影剤となり得ることが示唆された。更に本 NBs は蛍光イメージングや超音波イメージングなど複数のイメージングモダリティを有することから、より正確な診断ツールとなることが期待できる。本研究で得られた知見並びに基盤技術は、新規イメージング技術の開発に寄与するだけでなく、治療用超音波との併用によるセラノスティクスシステムの開発やがん領域など血管病変を有する疾患の多くに応用できる可能性を秘めたものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平沼佑太、濱野展人、高橋葉子、根岸洋一
2. 発表標題 血管炎症部位の検出を可能とする超音響・超音波応答性ナノ粒子の開発とイメージング能の評価
3. 学会等名 日本薬剤学会第37年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 葉子 (遠藤葉子) (Takahashi Yoko) (30453806)	東京薬科大学・薬学部・助教 (32659)	
研究分担者	濱野 展人 (Hamano Nobuhito) (80708397)	東京薬科大学・薬学部・助教 (32659)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------