

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22300182

研究課題名（和文）ミセル製剤ナノバブルと超音波を併用した新しい超音波がん薬物療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new micelle nanobubble and ultrasound combination cancer chemotherapy

研究代表者：立花 克郎 (TACHIBANA KATSURO)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40271605

研究成果の概要（和文）：プロスタグランジン E1 封入ナノ粒子製剤はナノ微粒子の中に PGE1 を封入しミセル製剤である。本研究ではミセル製剤を高速攪拌法でバブル化を試みた。攪拌前後を解析した結果、1000倍以上の粒子数増大が認められ、ミセル内部のガス封入さが強く示唆された。バブルは3ミクロン前後に集中していた。今後、さらに動物実験の検討が必要であるが、ミセル製剤を超音波造影剤や薬物投与促進剤としての応用に一步前進する情報が得られた。

研究成果の概要（英文）：Prostaglandin E1(PGE1)

Lipid is the medication of prostaglandin E1. This drug is a drug delivery system which is in the form of micelles. In the current experiments, a high speed mixing device was devised to entrap gas within its structure. Analysis measurement resulted in significant difference in size before and after treatment at least in the range of 3-10 μm. It was strongly suggested that this new air trapped micelles could act as a contrast agent for ultrasound imaging and for delivery of various drugs, including prostaglandin E1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2012年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：超音波、プロスタグランジン、マイクロバブル

## 1. 研究開始当初の背景

バイオテクノロジーの分野では、細胞に遺伝子を導入する技術を用いて研究が進められている。ウイルスを用いた方法やエレクトロポレーション法があるが、ともに局所的な細胞への導入に不適切である。近年、超音波

を用い細胞内に遺伝子を導入する方法が注目を集めている。細胞に超音波を照射すると一時的に薬物の細胞内への取り込みが促進されるという現象は古くから知られていた。最近その取り込みのメカニズムの概要が明らかにされつつある。超音波によって細胞周辺で微細泡が発生し、また非常に短時間で潰

れて消失するキャビテーションと呼ばれる物理運動が起こる。この微細な気泡（マイクロバブル）が細胞の周囲で破裂することによってジェット水流が起こり細胞膜に微細な穴を開ける (Tachibana K, et al. -Lancet (1999, 353: 1409))。この穴を通して細胞内への薬剤の取り込みが行われていると考えられている。この超音波照射による取り込み能は、脂質などから成るマイクロバブルと超音波照射を併用した場合さらに高まる。この現象が超音波遺伝子導入プースター剤の基本原則となっている。超音波による細胞穿孔とマイクロバブルを併用して遺伝子を細胞内へ取り込ませる方法（ソノポレーション法）は、標的細胞へのダメージも低く、効率よく遺伝子を導入できることがわかっており (Ohta S, Suzuki K, Tachibana K, Genesis 37: 91-101, (2003))、すでにこの方法は医学臨床分野において薬剤デリバリーシステムの一つとして有効であるとの研究成果がある (Yamaguchi K, et al. Journal of Medical Ultrasonics 36:3-8, 2009)。発生学、生化学、薬理学、分子生物学など幅広い生命科学分野において低侵襲で薬物、遺伝子を導入する研究に応用できる。また将来的にはヒトの脳神経疾患における薬物治療、遺伝子治療の基礎技術となりえる。上記のごとく超音波遺伝子導入または抗がん剤のプースター剤の需要は非常に高いものと予想される

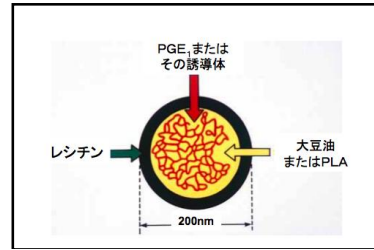
## 2. 研究の目的

プロスタグランジン E1 (PGE1) 封入ナノ粒子製剤（リプル注<sup>TM</sup>）は200nmの微粒子の中に末梢血管障害に有効なPGE1、または、その誘導体を封入したものである（ミセル製剤）。この粒子は障害血管部位にターゲットされるので、微量投与で有効、それゆえ全身性副作用が少ないのが特徴である。第1世代製剤（右図）：PGE1と大豆油を使用したものである。日本ではパルクス、リプルとして、また韓国・中国でも広く使われている。本課題は世界に先駆け、革新的なナノバブル作製方法を開発し、超音波がん薬物療法の臨床応用の可能性を早急に見いだすことである。

## 3. 研究の方法

(1) プロスタグランジン E1 製剤（リプル注）を軽量容器 Vial に分注し、容器本体をパーフロカーボンガス高圧下で超高速振盪5000-6000回/分で“8”の字に激しく振る。上記の処理を施すことで高濃度・高均一サイズのナノ・マイクロバブルを作成した。[ナノバブル製剤の材料] 販売名：プロスタグランジンE1製剤 リプル注 10 $\mu$ g (旧ミドリ十字開発) 一般名：アルプロスタジル、

Alprostadil ( JAN ) 化学名 :  
7-[(1R, 2R, 3R)-3-Hydroxy-2-[(1E, 3S)-3-hydroxyoct-1-en-1-yl]-5-oxocyclopentyl] heptanoic acid

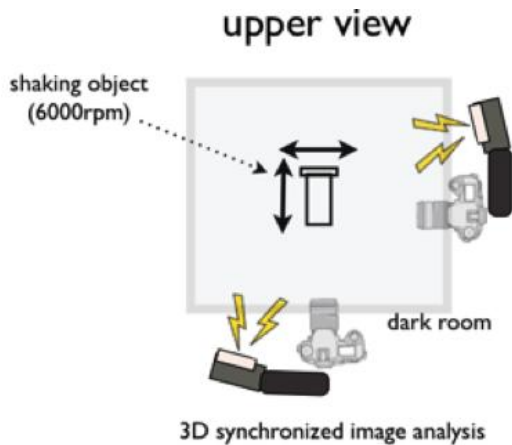


PGE1と大豆油を使用したものである。



特殊超高速振動装置 5000-6000/rpm  
（“8”の字振盪型）

(2) リポソームやミセル製剤がどのように微小気泡化するか観察装置を作成した。高速攪拌装置（回転数6000rpm）は安全上の理由で頑丈な閉鎖容器で保護され、高速回転で攪拌される容器内をリアルタイムで観察することは難しく、攪拌前後の溶液の微小気泡化状態を測定する必要がある。リポソームが攪拌中に微小気泡化する過程を視覚化するために高速攪拌装置に改良を加え、攪拌中の容器内を観察できる状態を作った。また、高速度カメラで容器内の液体の様子を記録し、画像イメージ解析で液体の微小気泡の挙動を詳しく観察した。今までに高解像度(2400万画素)・高速度カメラ(1/2.5万秒)で液体中のリポソームが微小気泡化する様子を光学的に観察した。高速度で移動する流体のイメージを2方向から同期させながらの撮影した。



2台のカメラでフラッシュと同期させながら2方向からの撮影

Nikon SB-900 distance range; 0.6 m to 20 m: Flash mode; TTL, Auto Aperture flash, Non-TTL auto flash:Guide number (20° C/68° F); 34/111.5 (ISO 100), 48/157.5 (ISO 200). lithium (1.5V), Oxyride (1.5V) or Ni-MH (2600 mAh) Flash duration; 1/880 sec. time 1/32000sec~ Micro-NIKKOR 105mm 1:2.8 x2 本 0.41m/1.34ft., Filter attachment 52mm, Hood HS-14. Image sensor: CMOS sensor, 36.0 x 23.9 mm

(3) ミセル製剤のバブル化の測定にベックマン・コールター社の粒子のわずかな形態変化を正確に定量化できる高分解能・小型・低コストのフローサイトメーター Cell Lab™ Quanta SC を使用した。レーザとコールター原理を同時に用いる光・電気ハイブリッド検出系を搭載し、高分解能な形態定量情報により正確な粒度分布測定を行った。また、粒度分布の同時測定で単位容積または単位表面積あたりの正確な蛍光量を解析した。

#### 4. 研究成果

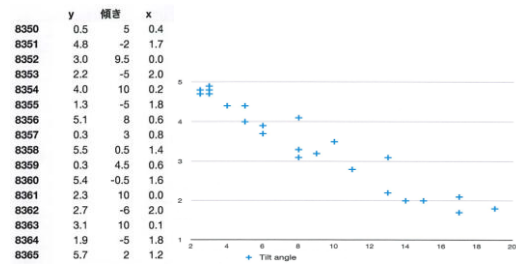
##### ミセル製剤マイクロバブル化



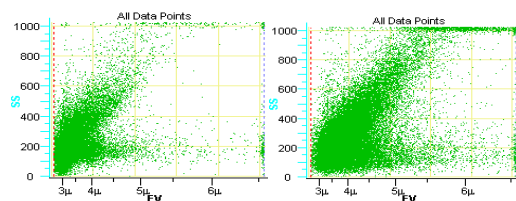
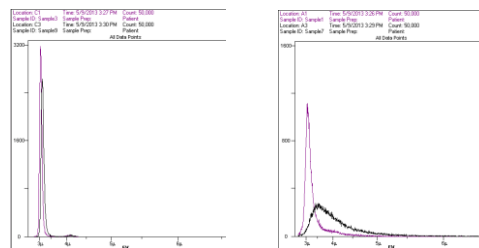
6000回転で攪拌している瞬間(左)。ミセル製剤リプルを攪拌した直後の写真(右)

上記の方法でリプル注を攪拌した結果、肉眼的な所見で乳白色の度合は変化は認められ

なかった。また、攪拌時間を延長したサンプル(1分、2分、5分)でも特に変化は認められなかった。



高速での攪拌中の容器対攪拌アームの角度と位置は下記のグラフに示す(表の左列は写真ID番号)

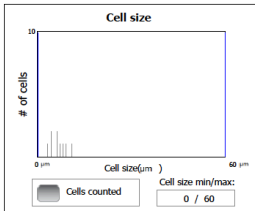
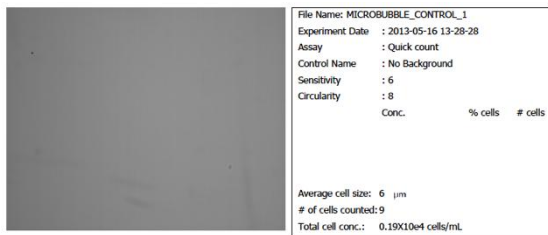


攪拌によってミセル製剤内にマイクロのガスが封入されると予想された。また、ミセル製剤そのものの崩壊は測定された範囲では検出されなかった。

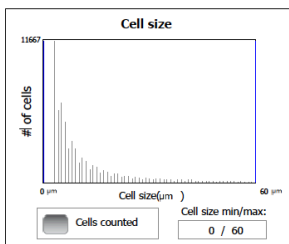
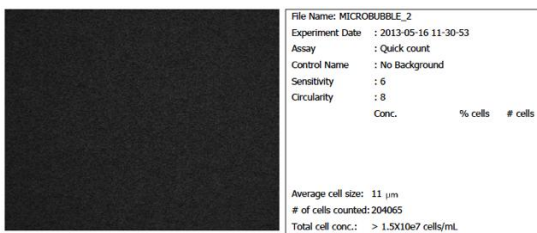
##### マイクロバブルの数と大きさの測定

フローサイトメーターで上記方法で作成したところ、コントロール群に比べ、ミセル製剤を高速で攪拌した方が優位に粒子直径の増大が認められた。下図の示されたようにコントロール群で3ミクロン以下の粒子直径のピークが攪拌後(左図)でピークが1から2マイクロメータへシフトしている。以上の結果から少なくともミセル製剤のサイズと数に変化が起こったことが示唆された。

Tali 細胞アナライザーによる結果  
顕微鏡画像によるデジタル画像解析でもフローサイトメトリーと同様の実験結果が得られた。



コントロール（ミセル製剤の攪拌する前）



パーフロカーボンガスを注入した直後のミセル製剤バブル

上記の実験を10倍、100倍で希釈したサンプルで測定した結果、10倍希釈でほぼ2倍の数のマイクロバブルが観察されたが、100倍希釈では全くマイクロバブルが検出されなかった結果、10倍希釈で最適な濃度があると推測された。

以上の実験結果でミセル製剤のバブル化が同作成方法で可能であることが証明された。また、ナノバブルの存在を示唆する所見も現在進行している実験で得られているのでさらに深く検討が必要である。現在、癌細胞株（リンパ腫、乳癌、子宮頸癌、メラノーマ細胞）におけるナノバブル/抗がん剤と超音波併用による殺細胞効果について判定中であり Apoptosis Detection Kit(CHEMICAL INTERNATIONAL)を用いてアポトーシスの評価をしている。上記の実験結果で示されなかったが、超音波造影剤としての特徴も十分、

示されたので薬物の促進剤のみでなく、造影剤としての可能性が期待される。

## 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 10 件）

- ① Toyama Y, Sasaki K, Tachibana K, Ueno T, Kajimoto H, Yokoyama S, Ohtsuka M, Koiwaya H, Nakayoshi T, Mitsutake Y, Chibana H, Itaya N, Imaizumi T., Ultrasound stimulation restores impaired neovascularization-related capacities of human circulating angiogenic cells, Cardiovasc Res, 査読有 1:95(4):448-59 2012. DOI:10.1093/cvr/cvs173
- ② Feril LB Jr., Tachibana K., Use of ultrasound in drug delivery systems: emphasis on experimental methodology and mechanisms, 査読有 Int J Hyperthermia, 28(4):282-289, 2012 DOI:10.3109/02656736.2012.668640
- ③ 立花克郎、脳血管内治療の新展開「超音波血栓溶解療法・血管内治療の現状と展望」、分子脳血管病、査読有 Vol.11(1)40-45, 2012
- ④ Moosavi N.S., Hosseini S.H.R., Akiyama H, Tachibana K, Optical observation of cell sonoporation with low intensity ultrasound, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有 413:218-223, 2011 DOI:10.1016/j.bbrc.2011.08.072.
- ⑤ Matsuo M, Yamaguchi K, Feril LB Jr., Endo H, Ogawa K, Tachibana K, Nakayama J, Synergistic inhibition of malignant melanoma proliferation by melphalan combined with ultrasound and microbubbles, Ultrasonics Sonochemistry, 査読有 18(5):1218-1224, 2011 DOI: 10.1016/j.ultsonch.2011.03.005.
- ⑥ Ikeda-Dantsuji Y, Feril LB Jr., Tachibana K, Ogawa K, Endo H, Harada Y, Suzuki R, Maruyama K, Synergistic effect of ultrasound

- and antibiotics against Chlamydia trachomatis-infected human epithelial cells in vitro, Ultrasonics Sonochemistry, 査読有 18(1):425-430, 2011 DOI: 10.1016/j.ultsonch.2010.07.015.
- ⑦ Choijants B., Emoto M, Naganuma Y, Nakajima K, Kawarabayashi T, Miyamoto S, Tachibana K, Metronomic irinotecan chemotherapy combined with ultrasound irradiation for a human uterine sarcoma xenograft, Cancer Sci, 査読有 102(2):452-459, 2011 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01807.x.
- ⑧ Yamaguchi K, Feril LB Jr., Tachibana K, Takahashi A, Matsuo M, Endo H, Harada Y, Nakayama J, Ultrasound-mediated interferon  $\beta$  gene transfection inhibits growth of malignant melanoma, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有 413:218-223, 2011 DOI:10.1016/j.bbrc.2011.06.115.
- ⑨ 江場久哲、庵原耕一郎、立花克郎、鈴木一吉、堀場直樹、中村 洋、中島美砂子、超音波とナノバブルを用いた薬剤導入による新しい根管内無菌化法の開発、日本歯科保存学雑誌、査読有 54(6):432-440, 2011
- ⑩ 立花克郎、超音波治療の最前線 はじめに、医学のあゆみ、査読有 238(2):149, 2011
- [学会発表] (計 15 件)
- ① (特別講演) 立花克郎、微小気泡を用いた超音波分子診断治療、平成 24 年度衝撃波シンポジウム、3/13-15, 2013、北九州市
- ② (招待講演) 立花克郎、超音波治療に新展開：再生医療から癌治療まで、第 45 回 NPO 法人日本口腔外科学会九州地方会 部会、11/23, 2012 福岡市
- ③ (シンポジウム) 立花克郎、シンポジウム 5 バブルを使った診断と治療：バブル技術の近未来医療への応用、日本超音波医学会第 85 回学術集会、5/25-27, 2012、グランドプリンスホテル新高輪
- ④ Tachibana K, Use of Nanobubbles in Medicine, 2012 Joint Congress of Medical Ultrasound in Seoul. 5/11-13, 2012 Coex, Seoul, Korea
- ⑤ Tachibana K, Optical Observation of Single Cell Sonoporation With Low Intensity Ultrasound, 2012 Joint Congress of Medical Ultrasound in Seoul. 5/11-13, 2012 Coex, Seoul, Korea
- ⑥ (シンポジスト) (パネリストセッション) 立花克郎、超音波画像造影剤システムを活用した分子イメージング、がん医療とイメージング、第 49 回日本癌治療学会学術総会、10/27-29, 2011、名古屋国際会議場
- ⑦ (オガナイズドセッション) 立花克郎、ナノバブル・マイクロバブルを用いた超音波分子診断治療、第 50 回日本生体医工学会大会、4/29-5/1, 2011、東京電気大学神田キャンパス
- ⑧ (シンポジスト) 立花克郎、マイクロバブルを用いた診断・治療、-過去・現在・未来-、第 3 回超音波とマイクロバブルの相互作用に関するシンポジウム (第 2 回超音波分子診断治療研究会) 1/22, 2011、慶応大学日吉キャンパス：横浜
- ⑨ (口演) 立花克郎、マイクロバブルを用いた診断・治療、-過去・現在・未来-、平成 22 年度第 2 回超音波分子診断治療研究会、1/22, 2011、慶応大学日吉キャンパス：横浜
- ⑩ (シンポジスト) Tachibana K、ナノバブルの医療への応用(英語名:Use of Nanobubble in Medicine)、第 12 回国際造影超音波シンポジウム、第 2 回国際造影超音波アジア会議、セッション 1「分子標的マイクロバブルの治療応用」、12/11-12, 2010、東京医科大学
- ⑪ (特別講演) 立花克郎、最先端の超音波治療の基礎と臨床、マイクロバブルから再生医療、第 13 回日本栓子検出と治療学会、11/19, 2010、アクロス福岡
- ⑫ (シンポジウム国際セッション) 立花克郎、Recent Advance in Ultrasound Imaging、シンポジウム 11:がんイメージング、第 69 回日本癌学会学術総会、

9/22-24, 2010、大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル

- ⑬ 立花克郎、Moosavi N. S., Hosseini S. H. R., 超音波照射下におけるマイクロバブルと細胞の高速カメラ観察、平成22年度第1回超音波分子診断治療研究会/基礎技術研究会、8/6, 2010、北海道大学 大学院情報科学研究科棟

- ⑭ (特別講演) Tachibana K, Recent views on the mechanism of sonoporation; is it a breakthrough technology, 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound 2010(ISTU10), 6/9-12, 2010, Tokyo Japan

- ⑮ (特別講演) 立花克郎、超音波治療の最前線、日本腹部造影エコー・ドプラ診断研究会、4/3, 2010、熊本市国際交流会館

[図書] (計 1 件)

- ① Saliev T, Feril LB Jr, Tachibana K, Campbell P, Influence of ultrasonic waveforms on micro-bubble suspensions, Microacoustics in Marine and Medical Research, Chapter 8, 2012 (頁数不明)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.fukuoka-u.ac.jp/research/data/researcher.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

立花 克郎 (TACHIBANA KATSURO)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40271605

(2) 研究分担者

Loreto B Feril (LORETO B FERIL)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：10435109

遠藤 日富美 (ENDO HITOMI)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：00435108

(3) 連携研究者

なし