

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 13 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670574

研究課題名(和文) 感温性磁性体と薬剤含有基剤を併用した新しい温熱化学療法

研究課題名(英文) Thermosensitive ferromagnetic particles with absorption base which release anticancer agent by applying magnetic field.

研究代表者

齊藤 元 (SAITO, Hajime)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20323149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は従来から継続研究しているキュリー点で発熱が自動停止する感温性磁性体を用い、各キュリー温度に対応した融点を持つ薬剤封入基剤に含有させた多段階温度設定薬剤含有磁性体の開発を目的として当該研究期間で以下の成果を得た。

43℃, 44℃, 45℃の融点に対応する基剤にPTX, DTXは混入可能であり、各キュリー点を有する感温性磁性体を混合した結果、30分の磁場印可自動定温加温により各キュリー点で基剤の溶解が確認できた。また細胞培養実験において、感温性磁性体による自動定温加温と基剤放出PTX, DTX同等量との併用でも、磁場印可自動定温加温により各キュリー点で同様の温熱増感作用と抗腫瘍効果が確認できた。

研究成果の概要(英文)：We have developed a method of magnetically induced hyperthermia using thermosensitive ferromagnetic particles (FMPs) with low Curie temperature ( $T_c$ ) enough to mediate automatic temperature control. In this work, we evaluated the effect of our original hyperthermia system combined with the delivery of anticancer drug from absorption base in vitro. The result was that melting point (43℃, 44℃, 45℃) correspond to the concentration of agar was confirmed, and PTX or DTX was released significantly in appropriate temperature. The proliferation of cultured cancer cells was inhibited by PTX, DTX respectively combined with our original hyperthermia system. Further investigation, including in vivo experiment, was needed to making them ideal candidates for cancer thermo-chemotherapy.

研究分野：外科学

キーワード：磁性体 がん 温熱療法

### 1. 研究開始当初の背景

近年、切除困難な悪性腫瘍に対しラジオ波 (RF) 焼灼治療が行われるが、外科切除に比較し低侵襲ながらも熱傷関連合併症のリスクを有し、また治療毎に穿刺をその都度必要とする事も患者にとって負担となる。また外科的切除が不能の進行がんでは対症療法が中心となり、今後さらに患者の Quality of Life (QOL) を考慮した低侵襲治療の進歩が望まれる。一方、がん細胞は 43 近傍でアポトーシスが誘導されることが知られており、この特性を応用したのが温熱療法であり低侵襲治療の一つである。しかしがん細胞は 43 の厳密な温度管理をしないと熱耐性が生じるため、腫瘍内部の厳密な温度管理が必須である。そこで我々は一定温度 (キュリー温度:  $T_c$ ) に達すると磁性が失われ発熱が停止する感温性磁性体 (開発済み) を注入し、体外から磁場を印可し温度測定することなく自動温度制御可能な誘導加熱方法を考案し、その臨床応用を目的とし研究を継続している。また温熱療法は単独よりも温熱増感作用を持つ薬剤との併用で治療成績は向上する事が知られており、温熱併用化学療法の研究も広く行われているが、治療毎の薬剤穿刺注入は患者にとって極めて負担であるため、低侵襲を目的とする様々な薬剤導入方法、さらにそれらの臨床応用を目的とした研究も盛んにおこなわれている現状である。

### 2. 研究の目的

本研究は、43,44,45 にキュリー点を持つ感温性磁性体を、対応する温度に融点を持つ基剤 (薬剤封入) に含有させ 1 セットとした多段階温度設定薬剤含有磁性体ロッドを用い、磁場誘導温熱治療の毎に薬剤を放出する本システムのがん治療応用への可能性を追求することを目的とした。本法が臨床応用となれば、初回穿刺のみでその後は何回でも体外より磁場をあてるだけで各キュリー点での誘導加熱で対応する融点の油脂基剤が溶解し温熱増感作用を有する薬剤を放出する薬剤併用温熱治療を継続でき、かつ薬剤完全放出後は磁場誘導温熱療法に継続移行できる利点をもつ。

### 3. 研究の方法

#### (1) 基剤の融点最適解の評価:

43, 44, 45 の融点に対応する基剤として、安定性の高い agar を選択し、対応する融点における基剤濃度の最適解を評価した。300ml 三角フラスコにて、agar 2g/100ml 生食 (2%) を電子レンジで目視により徐々に沸騰させ溶解とした。室温まで冷却の後 2% から 0.01% までの濃度勾配の各サンプルを作成、1.5ml エッペンドルフチューブに入れ、室温で固化とした。その後、ヒートブロック (タイテック, Dry thermo unit, DTU-1B) にて 43, 44, 45 の各温度で 1hr 溶解した agar の全重量に対する固形質量比を測定し、融点濃

度として評価した。

#### (2) 基剤と感温性磁性体を併用した発熱特性の評価:

対応する感温性磁性体 (粒子径 150 $\mu$ m, 500mg,  $T_c$ : 43, 44, 45) を各融点特性の基剤 50ml polypropylene tube の中心部に注入、いったん 36 まで water bath 加温後、臨床応用を想定した直径 10cm ループ状コイルと誘導加熱電源 (Hot Shot 5, Ameritherm Inc) 500A, 189kHz の条件のもとに誘導加熱を行い、セラミック温度センサーで中心および周辺部の加温分布を計測した。

#### (3) 各基剤への薬剤の封入:

抗がん剤が基剤に封入可能かどうか、また設定温度で放出可能かどうかを、パクリタキセル (PTX), ドセタキセル (DTX) において検証した。DTX (MW: 807.88), PTX (MW: 853.91) のそれぞれ生体での有効濃度は 60mg/m<sup>2</sup> と考え、薬剤濃度が 30 $\mu$ M となるよう DMSO および基剤濃度と合わせ調合、実験 1 と同様にヒートブロックにて 43, 44, 45 の各温度で 1hr 溶解した agar の融点が変わらないか評価した。

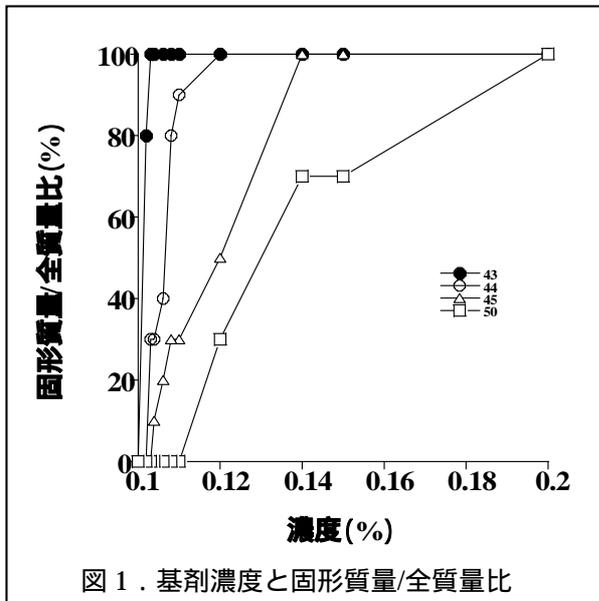
#### (4) 培養細胞を用いた抗腫瘍効果の検討:

マウスメラノーマ細胞 (B16) を 6 穴 well に培養、confluent となった時点で、それぞれ薬剤含有磁性体ロッド放出量として期待される PTX (30 $\mu$ M), DTX (30 $\mu$ M), または vehicle を加え、温熱群 (43, 44, 45) および非温熱群 (37) で 30 分 インキュベートとした。そして 37, 24 時間の recovery time の後、dish を洗浄、トリプシンにて細胞を剥がし、viable cell をカウントし、抗がん剤による抗腫瘍効果および温熱増感作用を比較評価した。

### 4. 研究成果

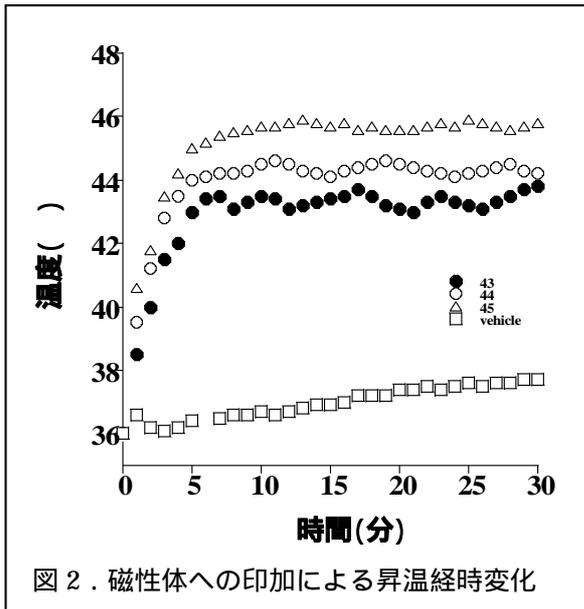
#### (1) 基剤の融点最適解の評価:

agar の濃度勾配サンプルを用いて各温度での最適解を評価したところ、43 で 0.100%, 44 で 0.102%, 45 で 0.103%, が概ね対応することが分かった (表 1)。また参考として 50 の融点も確認したが、0.11% であった。本融点はほぼ 100% 融解した時点での温度として評価しているが、実際の臨床応用においては基剤に含有した薬剤が溶出することを目標とすることから、基剤の完全融解でなくとも効果は出現すると考えられる。なお、agar の融点に関しては様々な報告があり、一定の見解には至っておらず、また室温や作成後経過時間も相当影響すると考えられる。今後は室温との関連も含め、さらに再現性のある融点最適解の解明が必要と思われる。一方、0.1% 未満の濃度では、室温で固化せず、0.1% ではないと融解すると最固化はしなかった。



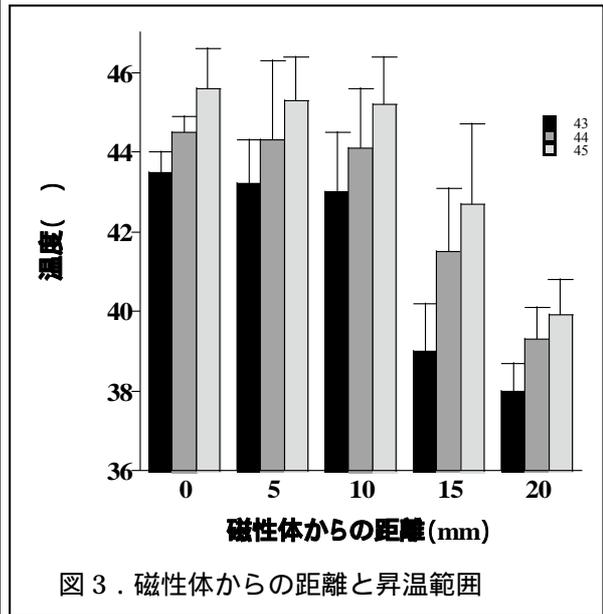
(2) 基剤と感温性磁性体を併用した発熱特性の評価:

各キュリー点 (各々43, 44, 45) を有する感温性磁性体と対応基剤において, 誘導加熱電源 (Hot Shot 5, Ameritherm Inc) 500A, 189kHz の条件のもとに誘導加熱を行い, 昇温および加温分布を計測した. その結果, 誘導加熱後約 5 分で全ての磁性体で Tc 付近に達し, 以後昇温はプラトーとなり Tc を保った (図 2). なお, vehicle でもわずかな昇温が時間の経過とともに観察されるが, これは磁場における NaCl の影響と考えられる. 一方で人体では透磁率が異なることより, 将来的に人体応用となっても有害となる程度の昇温は発生しないものと予測している.



また全群において, 昇温効果は磁性体半径 10mm までの範囲であった (図 3). それ以上の距離の場合, 一気に発熱効果が低減していた. なお実臨床においては, 腫瘍中心に磁

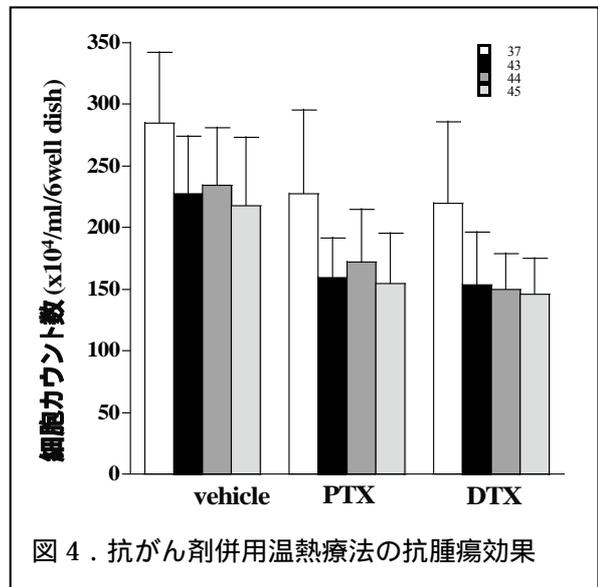
性体および薬剤含有機材を注入できれば最大径 20mm までの腫瘍が本法の適応となりうる. さらにそれ以上のサイズの腫瘍に対しては複数個所に磁性体を注入することで, 当該温熱療法システムが適用できると考えている. 最小限の磁性体注入操作でより良い抗腫瘍効果が得られるよう, 今後さらに効率的な発熱効果の改善が望まれる.



(3) 各基剤への薬剤の封入:

抗がん剤 (PTX, DTX) が基剤に封入可能かを検証した. PTX 30 $\mu$ M, DTX 30 $\mu$ M は生食のみでは溶解および基剤へ封入が困難であったが, DMSO の存在下では基剤への混入が可能であった. またそれぞれに対応するキュリー点を有する感温性磁性体を混合した結果, 磁場印可に引き続くキュリー点 (各々43, 44, 45) での自動定温加温により 30 分で各対応融点の基剤の溶解が確認できた.

(4) 培養細胞を用いた抗腫瘍効果の検討:



マウスメラノーマ細胞 (B16) を用いて PTX (30 $\mu$ M)、DTX (30 $\mu$ M) および温熱併用の抗腫瘍効果を評価した。その結果、vehicle に比較して PTX、DTX ではメラノーマ細胞において有意な抗腫瘍効果を認めた。また温熱群では有意な温熱増感作用も認めた (図 4)。

以上より、今回の研究では各融点を有する基剤から薬剤放出を可能とする加温能として、我々の保有する感温性磁性体の発熱効率は許容範囲であることがわかり、またその抗腫瘍効果を in vitro で確認できた。さらにマウスメラノーマ細胞においては DTX、PTX が抗腫瘍効果を示すこと、また温熱増感作用を有することも明らかとなった。

温度変化に伴う薬剤放出機能を有する多段階温度設定薬剤含有磁性体はドラッグデリバリーシステムの観点から新たな抗がん剤治療への応用が期待される。今後は感温性磁性体と各温度設定基剤の合体の創薬、そして薬剤封入効率の向上、さらに他がん種にも対応できるように、薬物性質として封入可能性のあるプラチナ製剤も対象として、研究を継続したいと考えている。

#### 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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

#### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

齊藤 元 (SAITO, Hajime)

秋田大学・医学部・准教授

研究者番号：20323149

#### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

#### (3)連携研究者

( )

研究者番号：