

令和元年6月27日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03196

研究課題名(和文)超音波セラノスティクスを実現するバブル製剤の開発

研究課題名(英文)Development of bubble preparation for ultrasound theranostics

研究代表者

丸山 一雄 (Maruyama, Kazuo)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：30130040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究でセラノスティクスバブル製剤の開発に成功した。それはDSPC：DSPG：DSPE-PEG2000(30：60：10(モル比))にパーフルオロプロパンガスを封入した平均粒径1～2μmのバブル製剤である。無菌製造法と室温保存できる凍結乾燥製剤化を確立した。開発されたバブル製剤は、造影超音波による血流造影だけでなく、治療超音波照射によるオシレーションによって血管をオープニングさせ、薬物を送達できた。マウスの耳の毛細血管を用いたエバンスブルーの送達実験、甲状腺癌罹患犬に対するDOXILの送達実験から証明された。セラノスティクスバブル製剤の開発は世界でも本研究が最初である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国民の4人に1人が65歳以上となる超高齢化社会に入った我が国において、高齢者疾患の原因臓器・細胞を標的とする画期的な薬物治療法の開発は急務である。画期的なシステムとしてtherapeutics(治療)とdiagnostics(診断)の両機能を有するセラノスティクス(Theranostics)が注目されている。本研究でセラノスティクスバブル製剤の開発に成功した。開発されたバブル製剤は、造影超音波による血流造影だけでなく、治療超音波照射によるオシレーションによって、照射部位でのみ血管をオープニングさせ、薬物を送達出来る。セラノスティクスバブル製剤の開発は世界でも本研究が最初である

研究成果の概要(英文)：We succeeded in the development of theranostic bubble preparation in this research. The bubble formulation is composed of DSPC:DSPE-PEG2000(30:60:10 (molar ratio)) and contains perfluoropropane gas. The average particle size is 1 to 2 μm. Blood vessel permeability enhancement by bubble preparation and ultrasound was examined in the mouse ear. Evan's blue emission was observed. The therapeutic effect was obtained from the experiment of delivery of DOXIL to dogs with thyroid cancer. In addition to blood flow imaging with contrast-enhanced ultrasound, the developed bubble preparation was able to open the blood vessel by oscillation with therapeutic ultrasound irradiation and deliver the drug. This research is the first in the world to develop a theranostic bubble formulation.

研究分野：複合領域

キーワード：マイクロバブル 超音波 セラノスティクス 腫瘍新生血管 血液脳関門

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国民の4人に1人が65歳以上となる超高齢化社会に入った我が国において、高齢者疾患の原因臓器・細胞を標的とする画期的な薬物治療法の開発は急務である。画期的なシステムとして therapeutics (治療) と diagnostics (診断) の両機能を有するセラノスティクス (Theranostics) が注目されている。ここ4~5年の間に急速に展開している研究領域で、2011年には専門のジャーナル“Theranostics”が発刊されている。

我々は超音波とバブル製剤を組み合わせた超音波セラノスティクスの研究開発を推進している(文献1-5)。超音波には、診断用超音波(5~20MHz)と治療用超音波(0.5~3MHz)があり、両方の超音波に応答するバブル製剤があれば、診断と治療を可能とし、超音波セラノスティクスを構築できると考えた。

現在、国内外で臨床で使用されているマイクロバブルは、キャビテーションによる治療を想定していないので、新たなバブル製剤が必要である。一連のバブルリポソームの研究成果から、診断と治療を達成するためには、バブルの血管内および腫瘍内での滞留性と安定性が重要であることと治療用超音波に対する応答性の高さが重要であることが解った。この両方の特性を持ったバブルは現在まで開発されていない。また、多くの研究は、担癌マウスでの研究が主で、大型動物での有効性の検証が不可欠である。

2. 研究の目的

超音波セラノスティクスを実現するバブル製剤の開発

3. 研究の方法

①セラノスティクスバブル製剤の開発：臨床使用実績のある外殻素材と造影ガスについてバブルを調製し、マウス尾静注投与後の造影能の測定から最終処方への検討を行った。

②セラノスティクスバブル製剤の機能評価：凍結乾燥製剤を復水し、*In vitro* キャビテーション、マウスを用いて生体内安定性と滞留性、造影性能、ソノポレーションについて検討した。

③セラノスティクスバブル製剤の *in vivo* 検証実験：ミニブタ・イヌに静脈内投与し、ヒト用超音波造影装置を用いて、血管や主要臓器の造影の持続時間、鮮明性を評価した。治療用超音波で、温熱療法、薬物・遺伝子導入を実施し、病理学検査から治療効果および組織傷害性を検証した。特に、鳥取大学農学部の獣医師の協力を得て、甲状腺癌罹患犬に対する腫瘍血管オープニングによる DOXIL の治療実験を行った。

4. 研究成果

①セラノスティクスバブル製剤の開発：

既に特許申請(文献1)したバブルをプロトタイプとし、外殻素材について検討した。造影ガスには、国内で唯一臨床用に供給されるパーフルオロプロパンガス(PFPガス、bp -36.7°C)を用いることにした。PFP存在下ホモジナイザー(15,000rpm、5分)を用いてバブルを調製し、マウスの血流造影時間で比較検討した結果、DSPC:DSPE-PEG2000をベースにした組成にDSPGを添加した場合にパーフルオロプロパン(PFP)ガスの保持性を高め、安定性を高める事が判明した。PFPガスを内核とし、外殻素材として“DSPC:DSPE:DSPE-PEG2000=30:60:10(モル比)”から成る、平均粒径1~2 μ mのバブル製剤が最も安定な造影能を示し(図1)、最終セラノスティクスバブル製剤に決定した。

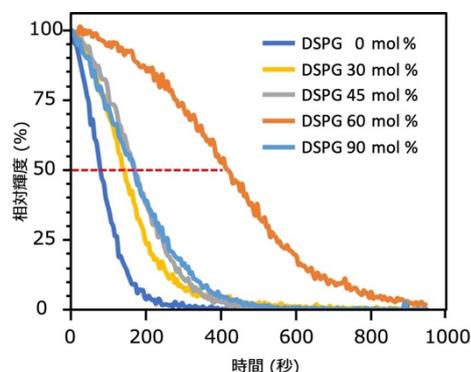


図1 *in vivo* におけるリピッドバブルの安定性評価

最終剤形は、室温で保存できる造影ガス充填凍結乾燥製剤でバイアル瓶で供給することが目標なので、等張量のスクロースを添加して凍結乾燥製剤化を検討した。常法に従って、-30度の冷蔵庫で事前に凍結し、凍結乾燥装置でバブルの凍結乾燥製剤化を行った。凍結乾燥直後の製剤について、特性を評価したところ、凍結乾燥前の特性を示し、バブル数も元の数だけほぼあった。ところが、約1ヶ月の室温保存中に、凍結乾燥製剤のケーキの縮みや割れる状態が出現した。このものを復水すると、バブルの数の減少が起きており、超音波造影能も低下してい

た。凍結乾燥を専門とする業者に相談し、この解決に取り組み、約半年以上の時間を費やしたが、凍結乾燥機の冷却装置で凍結することと、減圧と冷却速度などの微妙なコントロールが重要であることが判った。この様に、実用に耐える新しい凍結乾燥プロトコールを完成することができた。ケーキの縮みや割れを生じない凍結乾燥条件を見出すことができ、再現性のあるバブルの凍結乾燥製剤を得ることができるようになった。

外殻素材の無菌化と乳化操作を無菌的に行う必要があるが、オートクレーブ可能な装置を用いることで、解決できた。スケールアップの問題があるが、最終製剤処方、無菌的な製造法、室温保存できる凍結乾燥製剤化を完成した。特に、凍結乾燥操作で減圧と冷却温度の制御が重要である点を知れたことが大きな成果である。

②セラノスティクスバブル製剤の機能評価：

DSPC : DSPG : DSPE-PEG2000 = 30 : 60 : 10 (モル比) からなるバブル製剤は、パーフルオロプロパンガスの保持性が良い、つまりマウス体内でも、30分程度まで血流観測できる生体内安定性と滞留性をもつ組成比であることが判明した。

ルシフェラーゼ発現プラスミド DNA とバブル製剤を ddY マウスの静脈内に同時投与し、直ちに肝臓または心臓に向けて超音波(周波数：1 MHz、照射時間率：50%、照射強度：1 W/cm²、照射時間：1分、繰り返し周波数：2 Hz) を照射した。24時間後、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、肝臓または心臓に超音波を照射した群では、超音波のみを照射した群と比較し高いルシフェラーゼ活性が認められた(図2)。このことから、本バブル製剤と超音波を組み合わせることで、ソノポレーションが誘導され pDNA が導入されたと考えられ、*in vivo* 遺伝子デリバリー機能を確認した。また、100mm ディッシュにドキシソルビシン耐性細胞 K562/Adr を培養し、ドキシソルビシン送達を行った。その結果、本バブル製剤+超音波の組合せ群でドキシソルビシンによる高い細胞傷害性が認められた

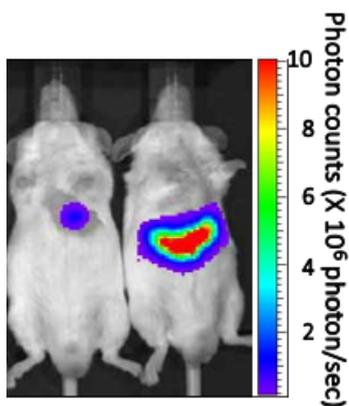


図2 非侵襲的*in vivo*遺伝子導入

③セラノスティクスバブル製剤の *in vivo* 検証実験：

③-1 ブタ腎臓の血流造影：ブタに復水したセラノスティクスバブル製剤を静注して、ヒト用超音波造影装置で腎臓の血流造影を行ったところ、投与直後から腎臓の血流が観測され、哺乳大動物でもセラノスティクスバブル製剤は超音波造影として使用できることが示された。

③-2 血管オープニングによる薬物送達実験：モデル薬物として青色色素であるエバンスブルーを用い、セラノスティクスバブル製剤と超音波による血管透過性亢進について検討した。エバンスブルーとセラノスティクスバブル製剤をマウス尾静脈から投与し、超音波造影用のゲル上に乗せたマウスの右耳に超音波を照射した。超音波照射10分後にマウスの左右の耳を観察したところ、超音波を照射した右耳のみにおいてエバンスブルーが血管外へ漏出している様子が観察できた(図3)。このことから、セラノスティクスバブル製剤と超音波を利用することで血管の透過性を亢進可能であり、今回の条件では1時間程度透過性の亢進効果が持続することが示唆された。



図3 EBとバブルを静注し
超音波照射したときのEBの漏出

③-3 甲状腺癌罹患犬に対する腫瘍血管オープニングによる治療実験: 甲状腺癌罹患 W コーギー犬 (雌、10 歳、10kg) に DOXIL 0.7mg/kg を 10 分間持続注入し、セラノスティクスバブル製剤 0.2mL をボラスで投与し 5 分後に医療用超音波 (1MHz、2W/cm²) を 15 分間照射した。この施術を 4 回繰り返した。その結果、腫瘍の大きさは縮小していき、造影 CT 検査でも、図 4 に示す様に明らかな縮小が確認された。

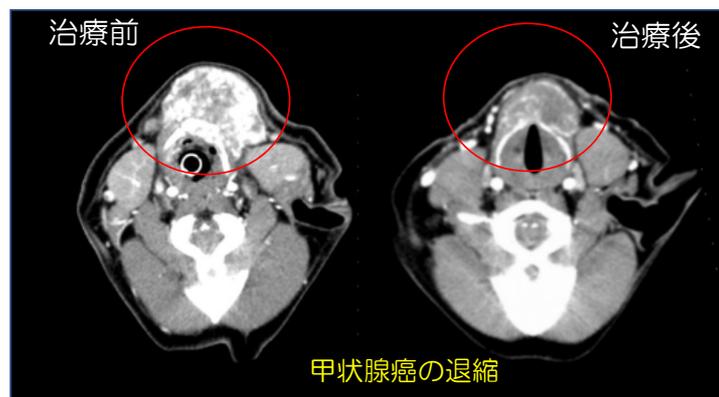


図 4 甲状腺癌罹患犬に対するセラノスティクスバブル+超音波による DOXIL の送達治療効果

④結論

以上のことから、本研究で新規に開発されたセラノスティクスバブル製剤は、造影超音波による血管の血流造影だけでなく、治療超音波照射によるオシレーションによって、照射部位でのみ血管オープニングを生じ薬物を送達出来ることが示された。この様に、本研究で開発されたバブル製剤はセラノスティクス機能を有したセラノスティクスバブル製剤として有用であることが示された。

<引用文献>

- ① セラノスティクス用のバブル製剤 (TB) 及びその使用方法 丸山一雄、鈴木亮、Johan Unga、小俣大樹、小田雄介 特願 2015-117793
- ② ソノポレーション用超音波送信装置 望月剛、丸山一雄、鈴木亮、小田雄介、小俣大樹 特願 2015-93764
- ③ バブルリポソームによる超音波セラノスティクスの開発 丸山一雄 医薬ジャーナル 50, 95-102, 2014 (査読有)
- ④ 超音波診断・治療システム (超音波セラノスティックス) 開発の現状と展望 鈴木亮、小田雄介、小俣大樹、澤口能一、根岸洋一、丸山一雄 INNEVISION 29 (7), 49-52. 2014 (査読無)
- ⑤ Ultrasound-mediated Gene Delivery Systems by AG73-modified Bubble Liposomes. Yoichi Negishi, Yuka Tsunoda, Nobuhito Hamano, Daiki Omata, Yoko Endo-Takahashi, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Motoyoshi Nomizu, and Yukihiko Aramaki. Biopolymers. 100 (4) . 402-407. 2013. (査読有)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Koki Ogawa, Yuki Fuchigami, Masayori Hagimori, Kazuo Maruyama, Shintaro Fumoto, Shigeru Kawakami. Ultrasound-responsive nanobubble-mediated gene transfection in the cerebroventricular region by intracerebroventricular administration in mice. Euro. J. of Pharma. and Biopharm. 173, 2019, 1-8 査読有
- ② Johan Unga, Daiki Omata, Nobuki Kudo, Soki Ueno, Lisa Munakata, Tadamitsu Shima, Ryo Suzuki and Kazuo Maruyama Development and evaluation of stability and ultrasound response of DSPC-DPSG-based freeze-dried microbubbles. J. Liposome Res. 10, 2018, 1-27 査読有 DOI: 10.1080/08982104.2018.1556294
- ③ Oitate Riki, Otsuka Takuya, Seki Masakazu, Furutani Asuka, Mochizuki Takashi, Masuda Kohji, Suzuki Ryo、Maruyama Kazuo Acoustic field sweeping for active induction of bubble-surrounded T-cells Japanese Journal of Applied Physics 57, 2018, 07LF10~07LF10 査読有 DOI: 10.7567/JJAP.57.07LF10

- ④ 丸山一雄 リピッドバブルと超音波によるセラノスティクスシステム 日本音響学会誌 73, 2017, 1-8 査読無
- ⑤ 丸山一雄 マイクロバブルを用いた超音波セラノスティクス 細胞 49, 2017, 581-584 査読無

〔学会発表〕(計 17 件)

- ① 丸山一雄 BUS-DDS (Bubble-Ultrasound mediated DDS) 血管壁を開口して薬の届かない所に届けて効かせる 第 4 回超音波分子診断治療研究会 2019 年 3 月 16 日 福岡
- ② Kazuo Maruyama, Ryo Suzuki Enhancement of EPR effect in drug delivery by the combination of lipid bubbles and ultrasound 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 27-29 日 大阪
- ③ 丸山一雄 リピッドバブルと超音波による血管透過性亢進に基づく EPR 効果促進 日本薬剤学会第 33 年会 2018 年 5 月 30 日-6 月 1 日 静岡
- ④ Kazuo Maruyama, Johan Unga, Daiki Omata, Tomohiro Osaki, Ryo Suzuki ENHANCEMENT OF EPR EFFECT AND DRUG DELIVERY BY THE COMBINATION OF NEW LIPID BUBBLES AND ULTRASOUND 18th International Symposium on therapeutic ultrasound (ISTU2018). (国際学会) May 14-17, 2018 Nashville, USA
- ⑤ 丸山一雄, 鈴木亮, 小俣大樹, 高橋葉子, 根岸洋一 リピッドバブルと超音波によるセラノスティクスと遺伝子デリバリー 日本薬学会第 138 年会 2018 年 3 月 26-28 日 金沢
- ⑥ 丸山一雄 超音波セラノスティクス—リピッドバブルと超音波による癌新生血管の造影と開口による EPR 効果の亢進— 日本薬学会関東支部第 42 回学術講演会(招待講演) 2017 年 12 月 7 日 東京
- ⑦ 丸山一雄, Johan Unga, 小俣大樹, 鈴木亮 超音波セラノスティクス用バブル製剤の開発 第 16 回日本超音波治療研究会 平成 29 年 10 月 28 日 札幌
- ⑧ Kazuo Maruyama Ultrasound Theranostics for Tumor 17th International Symposium on Therapeutic Ultrasound (ISTU 2017) May31-June 2, 2017 Nanjin, China
- ⑨ 大崎智弘、村端悠介、鈴木亮, 丸山一雄 新規マイクロバブルを用いたがんの診断/治療 日本超音波医学会第 90 回学術集会 2017 年 5 月 27-28 日 宇都宮
- ⑩ THERANOSTICS 12th France -Japan Drug Delivery Systems Symposium (招待講演) 2016 年 10 月 09 日~12 日 フランス

〔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：
 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：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.teikyo-dds-lab.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究分代表氏名：丸山 一雄
ローマ字氏名：MARUYAMA Kazuo
所属研究機関名：帝京大学
部局名：薬学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：30130040

(2)研究分担者

研究分分担氏名：鈴木 亮
ローマ字氏名：SUZUKI Ryo
所属研究機関名：帝京大学
部局名：薬学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：90384784

研究分分担氏名：小田 雄介
ローマ字氏名：ODA Yusuke
所属研究機関名：帝京大学
部局名：薬学部
職名：助手
研究者番号（8桁）：80505941

研究分分担氏名：高瀬 有加里
ローマ字氏名：TAKASE Yukari
所属研究機関名：帝京大学
部局名：中央実験動物施設
職名：教務職員
研究者番号（8桁）：80718057

研究分分担氏名：茅沼 秀樹
ローマ字氏名：KAYANUMA Hideki
所属研究機関名：麻布大学
部局名：獣医学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：10329196

研究分分担氏名：金井 詠一
ローマ字氏名：KANAI Eiichi
所属研究機関名：麻布大学
部局名：獣医学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：20632219

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。