

令和元年5月7日現在

機関番号：32643

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07119

研究課題名(和文) 脳に対する超音波薬物送達システム構築に向けたマイクロバブルの開発

研究課題名(英文) Development of microbubbles for ultrasound-triggered drug delivery to brain

研究代表者

小俣 大樹 (Omata, Daiki)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：80803113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)： 脳への薬物送達システム構築を実現するマイクロバブルの開発を目的として、内包ガスのマイクロバブルの安定性および血液脳関門オープニングへの影響を検討した。その結果、高い血中滞留性を示し、効率的に物質を脳内に送達可能であるパーフルオロプロパンまたはパーフルオロブタンを内包するマイクロバブル開発に成功した。これらのマイクロバブルを用いることで、効率的な血液脳関門オープニングが可能になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超音波とマイクロバブルを利用した脳への薬物送達技術が注目され、超音波デバイスの開発や超音波照射条件の最適化などが精力的に進められているが、マイクロバブルの影響は十分に評価されているとは言えない。研究成果は、脳への薬物送達のために最適化したマイクロバブルの開発につながると期待される。また、本研究は、マイクロバブルの開発により脳への薬物送達技術の構築を目指すものであり、最終的に脳疾患治療に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)： We developed several gas-loaded microbubbles (MBs) with identical shell compositions and assessed their stability by ultrasound (US) imaging. In addition, we assessed the effects of gas encapsulated in MBs on brain-targeted drug delivery. Perfluoropropane and perfluorobutane-loaded MBs (MB-C3F8 and MB-C4F10) showed sustained US imaging in vitro and in vivo compared with sulfur hexafluoride-loaded MBs (MB-SF6). The treatment of MB-C3F8 and MB-C4F10 with non-focused US efficiently delivered Evans blue, which was used as a model drug, to the brain to a greater extent than MB-SF6. In these treatments, notable damage to brain was not observed which was assessed by HE staining and denatured neuron staining. Our results suggested that perfluoropropane and perfluorobutane could be useful for the production of MBs with high stability to allow for brain-targeted drug delivery.

研究分野：薬剤学

キーワード：マイクロバブル 超音波 脳 ドラッグデリバリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病やハンチントン病などの脳疾患は患者の Quality of Life を著しく低下させるだけでなく、介護者にも多大な負担を与える。そのため、脳疾患の進行を抑制することや症状を改善することが重要であり、治療法の開発が求められている。しかし、血液と脳の間物質移動を厳密に制御する血液脳関門 (Blood brain barrier; BBB) が存在するため、脳への薬物移行が制限されてしまい医薬品開発の進展・治療の足かせとなる。そのような背景から、脳を標的とした薬物デリバリーシステムの開発が望まれている。近年、薬物を脳内へ送達するために血液脳関門の透過性を亢進する超音波とマイクロバブルを利用した技術が注目され、効率的かつ安全な BBB オープニングを誘導可能なマイクロバブルの開発は、脳疾患治療の実現に向けて重要である。これまでに申請者は、血中滞留性が高く、長期保存が可能な凍結乾燥マイクロバブル製剤の開発を進め、超音波診断や薬物デリバリーに利用できることを報告してきた。そこで申請者は、研究を進めてきたマイクロバブルを基にし、BBB オープニングを目的として最適化したマイクロバブルを開発することで、効率的に BBB オープニングが誘導できると考えた。さらには、超音波とマイクロバブルを利用した効率的かつ安全な脳への薬物デリバリーシステムの構築に繋がることを期待される。

2. 研究の目的

薬物を脳内へ送達するために BBB の透過性を亢進する超音波とマイクロバブルを利用した技術が注目されている。臨床で診断に使用されている超音波の周波数帯は 3-15 MHz 程度であるが、脳への薬物送達のために研究されている超音波の周波数帯は 0.5-3 MHz 程度である。そのため、脳への薬物送達に使用される超音波条件において、効率的かつ安全に BBB オープニングを誘導可能なマイクロバブルの開発が重要である。マイクロバブルは気体を脂質などで安定化した気泡であるが、内包ガスの BBB オープニングへの影響は十分評価されていない。そこで本研究では、これまで進めてきたマイクロバブル研究を基盤として、内包ガスについて検討し、BBB オープニングのために最適化したマイクロバブルを開発する。

3. 研究の方法

(1) 異なるガスを内包したマイクロバブルの調製

1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC)、1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DSPG)、N-(carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE-PEG2000) を 30:60:10 (モル比) の割合で混合し、リピッドフィルムを作製後、100 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.4) で再水和し、リポソーム懸濁液を調製した。リポソーム懸濁液を含むチューブにホモジナイザー (IKA T 25 Digital Ultra-Turrax) を挿入し、パラフィルムで密閉した。気相部分の空気をパーフルオロプロパン (C₃F₈)、パーフルオロブタン (C₄F₁₀)、または六フッ化硫黄 (SF₆) に置換し、各ガスを 12 mL/min で注入しながら、リポソーム懸濁液を高速攪拌 (15,000 rpm、5 分) することでマイクロバブルを調製した。マイクロバブルを 18%スクロース溶液と 1:1 (v/v) の割合で混合し、混合液 (2 mL) を 5 mL バイアルに移し凍結した。凍結乾燥機 (Eyela FDU-1100, DRC-1100) を使用して、凍結乾燥した後、真空状態で密栓した。その後、各ガスを注射針とシリンジを用いて注入することでバイアル内を常圧にした。実験前に、超純水で復水し使用した。

(2) マイクロバブルの *in vitro* での安定性評価

500 mL の脱気した Phosphate buffered saline (PBS) (37 °C)、攪拌子、超音波反射防止板をビーカーに入れた。マグネチックスターラー上で PBS を攪拌しながら、マイクロバブルを添加した。超音波造影装置 (LOGIQ E9, GE Healthcare) (プローブ ML6-15) を用いて、コントラストモードの超音波造影を行った。得られた結果を Image J を使用して輝度解析した。最高輝度を 100% として、相対輝度を算出し、50% となる時間を造影半減期とした。

(3) マイクロバブルの *in vivo* での滞留性評価

麻酔下のマウス (ddY, 雄, 6 週齢) の右脇腹を除毛し、マイクロバブルを静脈内投与した。右腎臓を超音波造影装置 (LOGIQ E9, GE Healthcare) (プローブ ML6-15) を用いて、コントラストモードの超音波造影を行った。得られた結果を Image J を使用して輝度解析した。最高輝度を 100% として、相対輝度を算出し、50% となる時間を造影半減期とした。

(4) マイクロバブルと超音波による脳内へのエバンスブルー送達効率の評価

麻酔下のマウス (ddY, 雄, 6 週齢) の頭部を除毛し、超音波プローブ (Sonitron 2000V, NepaGene, プローブ径 6 mm) を右頭部に設置した。モデル薬物としてエバンスブルー (100 mg/kg) をマイクロバブルと混合し、静脈内に投与した。直ちに、超音波 (周波数 3 MHz, 照射強度 0.5 W/cm², 照射時間 3 分) を経頭蓋的に照射した。1 時間後、血液灌流を行い、脳を回収した。実体顕微鏡で脳を観察後、1 mm 厚の冠状断切片を作製し観察した。その後、ホルムアミドでエバンスブルーを抽出し、620 nm の吸光度を測定し定量した。

(5) マイクロバブルと超音波の脳に対する傷害性評価

麻酔下のマウス (ddY, 雄, 6 週齢) の頭部を除毛し、超音波プローブ (Sonitron 2000V, NepaGene, プローブ径 6 mm) を右頭部に設置した。マイクロバブルを静脈内に投与し、直ちに、超音波 (周波数 3 MHz, 照射強度 0.5 W/cm², 照射時間 3 分) を経頭蓋的に照射した。1 日後、血液灌流を行い、脳を回収した。パラフィン切片 (6 μm) をヘマトキシリン-エオシン染色 (HE 染色) し、バーチャルスライドスキャナ (NanoZoomer XR, 浜松フォトニクス) を用いて観察した。また、凍結切片を Fluoro Jade C 染色し、共焦点顕微鏡 (A1, Nikon) を用いて観察した。

(6) マイクロバブルと超音波による脳への薬物デリバリーに関する特性評価

麻酔下のマウス (ddY, 雄, 6 週齢) の頭部を除毛し、超音波プローブ (Sonitron 2000V, NepaGene, プローブ径 6 mm) を右頭部に設置した。モデル薬物として異なる分子量の蛍光標識デキストラン (3,000 Da または 70,000 Da) (2 mg/mouse) をマイクロバブルと混合し、静脈内に投与した。直ちに、超音波 (周波数 3 MHz, 照射強度 0.5 W/cm², 照射時間 3 分) を経頭蓋的に照射した。1 時間後、血液灌流を行い、脳を回収した。凍結切片を anti-CD31 抗体を用いて蛍光免疫染色し、共焦点顕微鏡 (A1, Nikon) で観察した。なお、(3)~(6) の動物実験は帝京大学動物実験に関する倫理委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) 異なるガスを内包したマイクロバブルの調製と物性評価

内包ガスとして C₃F₈、C₄F₁₀、SF₆ を用いて 3 種類のマイクロバブル (MB-C₃F₈、MB-C₄F₁₀、MB-SF₆) を調製した。これらはそれぞれ、臨床で使用されているマイクロバブル (Definity、Sonazoid、SonoVue) に内包されているガスであるため使用した。調製したマイクロバブルの個数濃度および粒子サイズをコールターカウンター法で測定した結果、MB-C₃F₈ と MB-C₄F₁₀ は高い個数濃度を示した。また、調製した 3 種類のマイクロバブルの平均粒子サイズはいずれも約 2.5 μm であったが、Sonazoid と SonoVue は大きな平均粒子サイズを示した (表 1)。マイクロバブルの安定性は気泡のサイズの影響を受けることが知られているが、調製したマイクロバブルの平均粒子サイズに大きな違いはなく、マイクロバブルを構成する外殻成分も同じであるため、3 種のマイクロバブルを用いて、内包ガスの影響を評価した。

表 1. マイクロバブルの個数濃度と粒子サイズ

Microbubbles	MB-C ₃ F ₈	MB-C ₄ F ₁₀	MB-SF ₆	Sonazoid	SonoVue
MBs Number (× 10 ⁹ particle/mL)	1.6 ± 0.6	1.6 ± 0.3	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Average Size (μm) ¹	2.46 ± 0.14	2.51 ± 0.67	2.73 ± 0.14	4.30 ± 2.01	5.70 ± 0.80

Data were shown as mean ± S.D. (n = 3).

¹Data were shown as volume average size on volume distribution.

(2) マイクロバブルの *in vitro* での安定性評価

超音波造影輝度を指標にマイクロバブルの *in vitro* での安定性を評価した。造影半減期を算出した結果、Sonazoid が最も高い値を示した (図 1)。続いて、MB-C₄F₁₀、MB-C₃F₈、SonoVue、MB-SF₆ の順に高い値を示した。この結果から、C₄F₁₀ を内包したマイクロバブルは *in vitro* において安定性が高いことが明らかとなった。この原因として、各ガスの水への溶解度が異なることが考えられる。実際に、C₄F₁₀ は C₃F₈、SF₆ と比べて、水への溶解度が低いことを確認した。また、各ガスを溶解させた PBS を用いて、マイクロバブルの超音波造影を行ったところ、造影半減期の延長が認められた。これらの結果から、溶解度の低いガスを内包することで、マイクロバブルの内部から外相への溶出が抑制され、安定性が向上することが明らかとなった。一方で、C₄F₁₀ を内包した MB-C₄F₁₀ と Sonazoid では造影半減期が異なることから、外殻成分やサイズも安定性に影響を与える要因と考えられた。

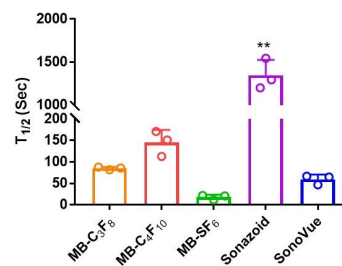


図 1. マイクロバブルの造影半減期 (*in vitro*)

** $p < 0.01$ compared with other groups.

(3) マイクロバブルの *in vivo* での血中滞留性評価

マウス腎臓における超音波造影輝度を指標にマイクロバブルの血中滞留性を評価した。腎臓における超音波造影輝度を解析し、造影半減期を算出した。その結果、MB-C₄F₁₀ が最も高い値を示した (図 2)。続いて、MB-C₃F₈、Sonazoid、MB-SF₆、SonoVue の順に高い値を示した。この結果から、MB-C₄F₁₀ および MB-C₃F₈ は *in vivo* において血中滞留性が高いことが明らかとなった。Sonazoid は C₄F₁₀ を内包するが、外殻成分としてホスファチジルセリンを含有する。ホスファチジルセリンは "eat me" シグナルとして知られ、肝臓のクッパー細胞などから認識される。そのため、Sonazoid

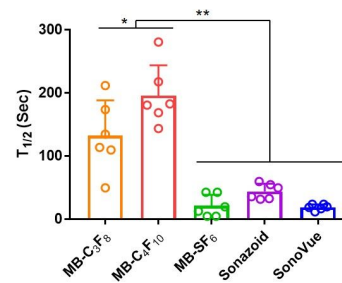


図 2. マイクロバブルの造影半減期 (*in vivo*)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

はクッパー細胞などに取り込まれたため、血中から速やかに消失したと考えられた。

(4) マイクロバブルと超音波による脳内へのエバンスブルー送達効率の評価

エバンスブルーとマイクロバブルを静脈内投与し、超音波を脳右半球に経頭蓋的に照射し、エバンスブルーの送達効率を検討した。その結果、いずれのマイクロバブルにおいても、超音波を照射した脳右側でエバンスブルーの移行が観察された (図 3A)。脳に移行したエバンスブルーを定量した結果、MB-C₃F₈ および MB-C₄F₁₀ を投与した際に、超音波照射した脳右側で有意に高いエバンスブルー移行量であった (図 3B)。MB-SF₆ を投与した群では、脳右側で若干のエバンスブルー移行が認められた。

これらの結果から、MB-C₃F₈ または MB-C₄F₁₀ を用いることで、効率的にエバンスブルーを脳内へ送達可能であることが明らかとなった。血中滞留性が高いマイクロバブルを用いることで、効率的に BBB オープニングが誘導されると考えられた。水への溶解度が低い C₃F₈ または C₄F₁₀ を内包したマイクロバブルは BBB オープニングに有用であることが示された。

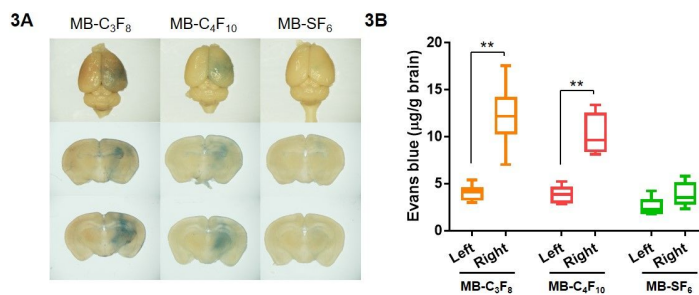


図 3. マイクロバブルと超音波による脳へのエバンスブルーデリバリー
** $p < 0.01$.

(5) マイクロバブルと超音波の脳に対する傷害性評価

マイクロバブルと超音波の脳に対する傷害性を HE 染色により評価した結果、超音波を照射していない脳左側と照射した脳右側で大きな違いは認められなかった (図 4)。脳実質への赤血球の漏出なども認められなかった。さらに、Fluoro Jade C 染色により、変性神経細胞の存在を評価したところ、超音波を照射していない脳左側と照射した脳右側で大きな違いはなく、変性神経細胞の顕著な増加は認められなかった。これらの結果から、本研究で使用した 3 種類のマイクロバブルと超音波照射条件において、脳への傷害は誘導されないことが示された。

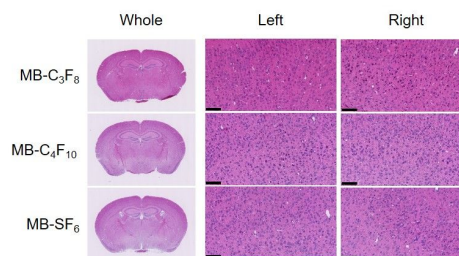


図 4. 脳冠状切片の HE 染色

(6) マイクロバブルと超音波による脳への薬物デリバリーに関する特性評価

マイクロバブルと超音波による脳への薬物デリバリーに関する特性を評価した。まず、脳への薬物デリバリーに及ぼす薬物の分子量の影響について検討した。モデル薬物として分子量 3,000 Da または 70,000 Da の蛍光標識デキストランとマイクロバブルを投与し、超音波を経頭蓋的に脳右側に照射した。その結果、超音波を照射した脳右側において、デキストランの蛍光が観察された (図 5A)。分子量 70,000 Da と比べて、3,000 Da のデキストランは、脳内のより広範囲への分布が観察された。これらの結果から、マイクロバブルと超音波により BBB オープニングが誘導され、分子量 70,000 Da の物質までは脳内へデリバリー可能であることが示された。次に、血管内皮細胞のマーカーである CD31 を染色して、70,000 Da の蛍光標識デキストランの分布を観察した。その結果、赤色で示される血管内皮細胞とは異なる部位でデキストランの蛍光が観察された (図 5B)。この結果から、マイクロバブルと超音波により BBB オープニングが誘導され、デキストランが脳実質へとデリバリーされていることが示された。

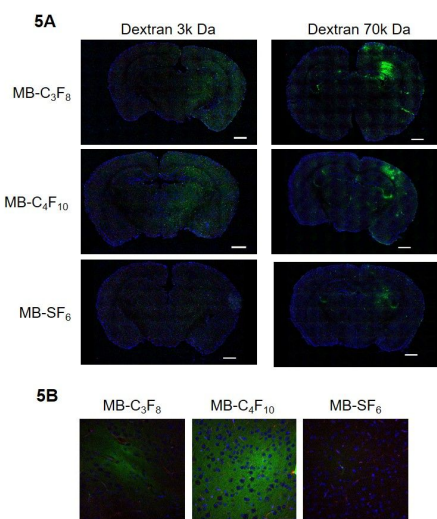


図 5. 脳のデキストラン分布
(5A)青: 核、緑: デキストラン、スケールバー: 1 mm (5B)青: 核、緑: デキストラン、赤: 血管内皮細胞、スケールバー: 50 µm

これらの検討から、適切な外殻から構成され、C₃F₈ または C₄F₁₀ を内包したマイクロバブルは高い安定性と血中滞留性を持つことを明らかにした。また、BBB オープニングの研究で使用されている超音波周波数帯の 3 MHz において、C₃F₈ または C₄F₁₀ を内包したマイクロバブルは顕著な脳への傷害を伴わずに効率的に BBB オープニングを誘導可能であることを明らかにした。本研究では、効率的かつ安全に BBB オープニングを誘導するために、C₃F₈ または C₄F₁₀ を内包したマイクロバブルを開発し、有用であることを明らかにした。本研究で得られた成果は、様々な

脳疾患に対する薬物治療を実現するための、デリバリーシステムの開発に貢献する有用な知見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Unga J., Omata D., Kudo N., Ueno S., Munakata L., Shima T., Suzuki R., Maruyama K. Development and evaluation of stability and ultrasound response of DSPC-DSPG-based freeze-dried microbubbles. *J. Liposome Res.* 査読有, *in press*, 2018, 1-8, DOI:10.1080/08982104.2018.1556294

鈴木 亮、小俣 大樹、ウंगा ヨハン、丸山 一雄、マイクロバブルの調製および特性評価、*Jpn. J. Med. Ultrasonics.* 査読有, 45 (4), 2018, 429-432

〔学会発表〕(計8件)

小俣 大樹、鈴木 亮、Johan Unga、丸山一雄、超音波とマイクロバブルを用いた脳内薬物送達法の開発、日本薬学会第139年会、(2019年3月、千葉)

丸山 保、小俣 大樹、鈴木 亮、Johan Unga、宗像 理紗、影山 彩織、Emma Marin、丸山 一雄、超音波診断治療システムに向けたマイクロバブルの開発、第17回日本超音波治療研究会 (2018年11月、東京)

Omata D., Suzuki R., Unga J., Munakata L., Shima T., Kageyama S., Marin E., Maruyama K. Brain targeting drug delivery with lipid bubble and ultrasound. 6th International Symposium on Focused Ultrasound 2018 (2018.10, Reston, Virginia, USA)

丸山 保、小俣 大樹、鈴木 亮、Johan Unga、宗像 理紗、影山 彩織、Mostafa Solyeman、丸山 一雄、マイクロバブルの安定性に及ぼす内包ガスの影響、第62回日本薬学会関東支部大会 (2018年9月、東京)

小俣 大樹、鈴木 亮、萩原 芙美子、Johan Unga、宗像 理紗、島 忠光、影山 彩織、丸山 一雄、マイクロバブルと超音波を用いた脳標的薬物デリバリーに関する基礎的検討、第27回日本バイオイメージング学会学術集会 (2018年9月 つくば)

丸山 保、小俣 大樹、鈴木 亮、ウंगा ヨハン、宗像 理紗、ソレイマン モスタファ、丸山 一雄、安定性の優れたマイクロバブルの開発に向けた基礎的検討、日本薬剤学会第33年会 (2018年5月 静岡)

小俣 大樹、丸山 保、鈴木 亮、Johan Unga、萩原 芙美子、宗像 理紗、丸山 一雄、異なる気体を内包したマイクロバブルの特性評価、日本薬学会第138年会 (2018年3月、金沢)

小俣 大樹、鈴木 亮、Johan Unga、丸山 一雄、脳を標的とした超音波 DDS の開発に向けて、第61回日本薬学会関東支部大会 (2017年9月、東京)

〔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)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。