

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K12086

研究課題名(和文)超音波の音響化学的作用による難吸収性薬物の生体内新規薬物送達システムの開発

研究課題名(英文)Development of poorly absorbable drug delivery system in vivo by sonodynamic action

研究代表者

岩瀬 由未子(Iwase, Yumiko)

横浜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00521882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：周波数3 MHzの超音波照射は、溶液中の気泡にエネルギーが蓄積により収縮と膨張の繰り返し、一時的な高温状態を伴うジェット流を生成するキャビテーションを引き起こしにくく、細胞へのダメージを与えにくい。この条件の超音波照射は細胞間隙経路を介した薬物送達を増大させる可能性が示唆された。超音波照射は分子量が小さくても吸収率の低かった薬物の吸収を増大させた。さらに、分子量が大きく吸収経路が制限される薬物の吸収率を増大させることが確認できた。以上のことから、周波数3 MHzの超音波照射は生体に対し、安全に薬物送達を増大させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医薬品の投与経路として経口投与は利便性が高く安全性も高い。また、用量や剤型を比較的自由に選択できる利点があることから依然として信望されている。しかし、経口投与される医薬品は消化管から吸収されなければ全身への効果が期待できない。そのため、消化管から効率よく吸収されることが必須となる。これまでは、医薬品に対し個々の対応がとられるため、医薬品開発費や時間がかかっていた。本研究では生体側へアプローチすることで難吸収性薬物の吸収を改善する手法の開発を試みた。この手法の確立は薬物の特性にとらわれず薬効を重視した医薬品開発を実現できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ultrasound irradiation with a frequency of 3 MHz is less likely to cause cavitation that repeatedly contracts and expands due to the accumulation of energy in bubbles in the solution and produces a jet flow accompanied by a temporary high temperature state. That conditions allowed us to minimize cells and tissues damage. It was suggested that ultrasonic irradiation under this condition may increase drug delivery through the intercellular pathway. Ultrasound irradiation increased the absorption of drugs with low absorption ratio even with a small molecular weight. Furthermore, it was confirmed that the absorption of drugs with a large molecular weight, whose absorption pathway is limited, was increased. From the above, it was suggested that ultrasonic irradiation with a frequency of 3 MHz may safely increase drug delivery to tissues through the gastrointestinal membrane permeation.

研究分野：薬物動態学

キーワード：薬物送達 音響化学的作用 超音波 難吸収性薬物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医薬品開発において、医薬品候補化合物となっても、難吸収性を示すものは、膜透過性が悪く、消化管からの吸収性が低くなり、バイオアベイラビリティが低くなるため、候補から外れることがある。また、候補化合物として開発されても、これまでは、標的部位に必要な時、必要な量を送達させる技術であるドラッグデリバリーシステムを応用し難吸収性薬物の吸収改善に対する研究・開発が行われている。主な改善法としては、難水溶性薬物の水溶性改善、プロドラッグ化、ナノ粒子化などがあげられるが、どれも個々の薬物に対応する方法であるため開発に時間および費用がかかると考えられる。

超音波 (ultrasound, US) の音響化学的作用は、液体に超音波を照射すると微小気泡を産生し、超音波のエネルギーをこの気泡内に蓄積しながら、収縮と膨張を繰り返し、ある閾値を超えると気泡が崩壊するという音響キャビテーション現象を引き起こす。このとき、崩壊した気泡周辺では一時的に数千度の高温状態が生じると同時に、周辺の細胞表面に細孔を生じさせ、細胞膜透過性の無い薬物の細胞内送達を可能とする。この細胞表面の細孔は数分程度、維持される一時的な現象であり、この細孔形成効果は細胞表面に限局されていると報告されている¹⁾。超音波を用いた研究として国内外の研究者らが主に行っている研究は経皮吸収システムの開発であった²⁾。難吸収性薬物の吸収システム開発に関する消化管に対する研究は行われていない。

2. 研究の目的

超音波は生体に対する安全な使用が確立されていることから、超音波の音響化学的作用を利用することにより生体側への働きかけにより特徴にとらわれず吸収を改善させる手法の確立を目指し、超音波による音響化学的作用の利用を検討した。超音波を消化管に照射し難吸収性薬物の吸収性を増加させる、新規薬物送達システムの開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 超音波照射によるモデル薬物の細胞内移行の確認

モデル細胞としてマウス肉腫由来の sarcoma180 およびヒト T リンパ腫由来 HUT78 を用いた。細胞液中に 1 mg/mL となるようメチレンブルー (MB) を添加し、超音波あり/なしで MB の細胞内移行率を評価した。超音波照射条件は 1 MHz, 2 W/cm² または 3 MHz, 1 W/cm² を使用した。

(2) 腸管膜透過性改善

ラット小腸を用いて反転腸管を作成し、反転腸管の両端は結紮した。反転腸管内は pH6.8 のバッファーを充填した。この反転長官は、0.02 mg/mL のサリチルアミド溶液を入れた超音波照射容器につけ、超音波を照射した。反転腸管内への薬物移行を経時的に評価した。超音波照射により腸管膜を移行した薬物は蛍光光度計で蛍光強度を測定することにより腸管内液に含まれる薬物濃度を見積もった。超音波照射条件は 3 MHz, 1 W/cm² を使用した。

(3) 薬物送達メカニズムの解明

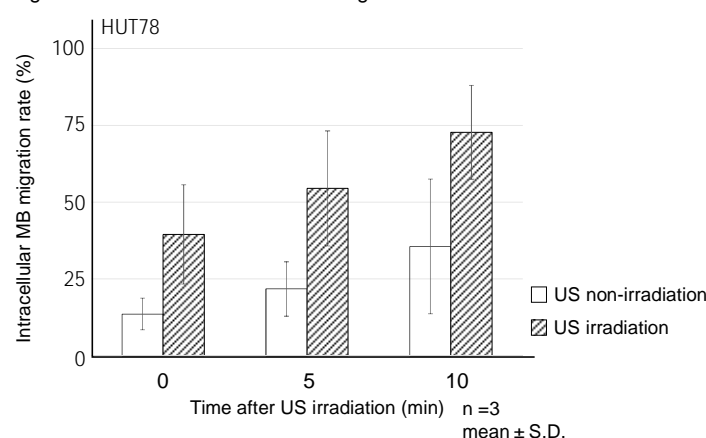
トランスウェル[®]上に培養した Caco-2 を用いた。Apical 側に hanks' balanced salt solution (HBSS, pH6.0) に溶解したフルオレセインイソチオシアネート-デキストラン (FD4, Mw =4,000, 励起波長; 490 nm、蛍光波長; 520 nm) の溶液を入れ、basal 側に HBSS (pH7.4) を入れ、薬物の basal 側への移行率を調べた。超音波照射条件は 3 MHz, 1 W/cm² を使用した。

4. 研究成果

(1) 超音波照射によるモデル薬物の細胞内移行の確認

最初に超音波照射による細胞生存率を確認した。この結果、1 MHz, 2 W/cm² は 30 sec 照射で細胞生存率は約 50%であった。10 sec 照射では 90%の細胞生存率が確認された。3 MHz, 1 W/cm² は 30 min まで超音波を照射しても細胞生存率は 90%であった。次に、sarcoma180 細胞への MB の超音波照射による細胞内移行率を調べた結果、1 MHz, 2 W/cm² の超音波照射において 30 sec で 80%、10 sec で 60%の移行が確認された。細胞内移行率は超音波照射時間が 30 sec の方が 10

Fig.1 Effect of US on intracellular migration of MB on HUT78

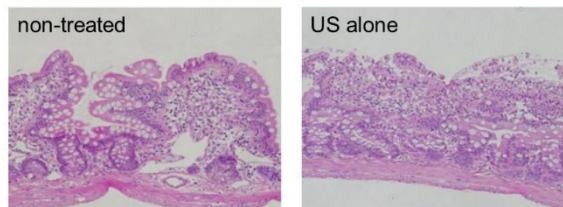


sec に比べ 1.3 倍高かった。超音波非照射時に比べると MB の細胞内移行率は 23%増加していた。細胞生存率および細胞内薬物移行率を考えると、1 MHz, 2 W/cm² の超音波照射では 10 sec が超音波照射強度としては最適と考えられた。超音波照射条件 3 MHz, 1 W/cm² における MB の細胞内移行率は HUT78 を用いて評価した。3 MHz, 1 W/cm², 10 min の超音波照射終了直後で超音波非照射時の 3 倍多く移行していた (Fig.1)。照射後 30 min まで確認したが、非照射時と比較した細胞内 MB 移行率は照射直後が最も高かった。

(2) 腸管膜透過性改善

腸管膜透過実験には 0.5 mg/mL サリチルアミドを用いた。この結果、超音波非照射時は腸管内の薬物濃度が 7 μg/mL であったが超音波照射 (8 min) では腸管内の薬物濃度が 80 μg/mL と超音波非照射時の約 10 倍に増加した。3 MHz, 1 W/cm² の超音波照射は腸管に損傷を与えなかった。

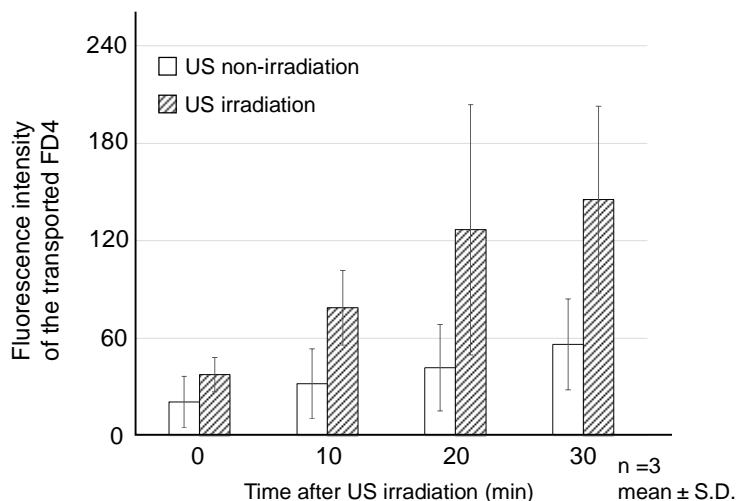
Fig.2 Intestinal tissue damage after ultrasound irradiation



(3) 薬物送達メカニズムの解明

トランズウェル上に培養した Caco-2 細胞を使用して超音波照射により単層培養された細胞が受ける影響について調べた。超音波照射により経上皮電気抵抗 (transepithelial electrical resistance, TEER) は約 30 Ohm · cm² 低下し、超音波照射終了後約 30 分をかけて超音波照射開始前の TEER に近い値まで戻った。TEER が超音波照射により変化することから、超音波照射は細胞間隙経路に作用することが示唆された。そこで、分子量が大きく、一般に細胞間隙経路から吸収される FD4 を用いて超音波照射による吸収性が增大するか調べた。この結果、超音波照射ありが超音波照射なしに比べ約 2.7 倍、送達されることが確認できた。また、細胞内蓄積量については超音波照射の影響はほとんどみられなかった。以上の結果より、超音波照射は少なくとも細胞間隙経路を介した薬物送達を増大させる可能性が示唆された。

Fig.3 Changes in the amount of FD4 transported from the apical side to the basal side after ultrasonic irradiation through the Caco-2 cell monolayer over time



< 引用文献 >

- 1) ROBYN K. SCHLICHER et al., MECHANISM OF INTRACELLULAR DELIVERY BY ACOUSTIC CAVITATION, *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 32, 2006, 915-924
- 2) Huang B, et al., Dendrimer-coupled sonophoresis-mediated transdermal drug-delivery system for diclofenac. *Drug Des Devel Ther.*, Vol. 9, 2015, 3867-3876.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishi K, Suzuki M, Yamamoto N, Matsumoto A, Iwase Y, Yamasaki K, Otagiri M, Yumita N.	4. 巻 38
2. 論文標題 Glutamine Deprivation Enhances Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitor-induced Death of Human Pancreatic Cancer Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 6683-6689
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13036.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinada H, Watanabe T, Okudaira K, Iwase Y, Nishi K, Yumita N.	4. 巻 39
2. 論文標題 Apoptosis Induced by Ultraviolet A Exposure in the Presence of Enoxacin in HL-60 Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 687-693
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13164.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yumiko Iwase, Koji Nishi, Nagahiko Yumita
2. 発表標題 Involvement of singlet oxygen in apoptosis induced by UVA exposure in the presence of enoxacin
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yumiko Iwase, Koji Nishi, Nagahiko Yumita
2. 発表標題 Involvement of Reactive Oxygen Species in Apoptosis Induced by Combination of UVA and Enoxacin
3. 学会等名 The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤愛美、西弘二、岩瀬由未子、梅村晋一郎、弓田長彦
2. 発表標題 膵がん治療における超音波照射によるドラッグデリバリーの研究
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 品田春佳、岩瀬由未子、弓田長彦
2. 発表標題 UVAおよびエノキサシン併用による一重項酸素産生のESRIによる研究
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019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	弓田 長彦 (Yumita Nagahiko) (40191481)	横浜薬科大学・薬学部・教授 (32723)	
研究分担者	西 弘二 (Nishi Koji) (00398249)	崇城大学・薬学部・准教授 (37401)	
研究分担者	梅村 晋一郎 (Umemura Shinichiro) (20402787)	東北大学・医工学研究科・学術研究員 (11301)	

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
---------	---------