

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32643

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19939

研究課題名(和文) 治療用液滴バブル製剤の開発と低EPR癌に対する革新的な薬物送達法の構築

研究課題名(英文) Development of acoustic droplet formulation and construction of innovative drug delivery method for low EPR cancer

研究代表者

丸山 一雄 (Maruyama, Kazuo)

帝京大学・薬学部・特任教授

研究者番号：30130040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：ナイルレッド(NR)を疎水性薬物モデルとして組み込んだペルフルオロヘキサン(PFH)含有ナノ液滴(NR-PFH-ND)製剤を開発した。NR-PFH-NDは周波数1MHzと5W/cm²の強度の超音波によってナノ液滴からバブルに相変化した。培養皿のマウス腺癌細胞株C26に添加後、超音波照射(1MHz、5W/cm²)を行ったところ、NRの細胞取込みが見られた。マウス腺癌細胞株C26担がんマウスに尾静注し、腫瘍部位に超音波(1MHz、5W/cm²)を照射したところ、頸動脈について有意なコントラスト増強画像を得た。しかしながら、NRの移行性は僅かであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

例えば脾臓癌は、血流が乏しく間質が豊富で線維化が顕著なため、抗がん剤が十分に到達し難く有効な抗癌効果が得られない。そこで、非侵襲的に腫瘍新生血管を検出・確認し、その血管壁を一時的に開口させて薬剤の漏出を亢進させることができれば、薬剤を腫瘍深部にまで送達可能となる。本研究は、常温では液体であるパーフルオロヘキサンを用いたナノ液滴の調製法を開発し、超音波照射(1MHz、5W/cm²)でガスバブルに変化させ、その時の相変化を利用して、腫瘍内の血管壁を開口して薬物を漏出させる基礎検討を行った。この液滴によって、超音波照射部位のみ(腫瘍組織)で薬物送達が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed a perfluorohexane (PFH)-containing nanodroplet (NR-PFH-ND) formulation incorporating Nile Red (NR) as a hydrophobic drug model. NR-PFH-ND phase-changed from nano-droplets to bubbles by ultrasound with a frequency of 1 MHz and an intensity of 5 W/cm². After addition to the mouse adenocarcinoma cell line C26 in the culture dish, ultrasound irradiation (1 MHz, 5 W/cm²) was performed, and NR cell uptake was observed. When the tumor was irradiated with ultrasound (1 MHz, 5 W/cm²) by intravenous injection into a mouse adenocarcinoma cell line C26-bearing mouse, a significant contrast-enhanced image of the carotid artery was obtained. However, the transferability of NR was slight.

研究分野：DDS

キーワード：マイクロバブル 超音波 EPR効果 DDS

1. 研究開始当初の背景

細胞障害性抗癌剤、分子標的薬、DDS 微粒子製剤などの化学療法では、正常細胞には薬剤を到達させずに、どれだけ癌細胞だけに送達し癌細胞内の薬剤濃度を上昇させるかがポイントである。特に膵臓癌組織は、血流に乏しく間質が豊富で線維化が顕著なため、EPR 効果(Enhanced Permeability and Retention effect = 固型癌の血管からの漏出性と漏れ出した高分子のその場所での滞留性の亢進)の低い癌腫である。そのためゲムシタピンが十分に到達しないために、有効な抗癌効果が得られない結果となっている。そこで、非侵襲的に癌組織や転移性癌の腫瘍新生血管を検出・確認し、血管壁を一時的に開口させて薬剤の漏出を亢進させ、さらに血管外の間質組織内での薬剤の拡散性を向上させることができれば、EPR 効果の低い癌に対して薬剤を腫瘍深部にまで送達可能となる。この時、薬剤として分子標的薬と抗癌剤を同時に腫瘍深部に送達させることができれば、これまでの化学療法による治療効果をはるかにしのぐ革新的癌化学療法になる。

申請者は、世界で初めてリポソームに Perfluoropropane ガスを保持させたバブルリポソームの開発(特許第 5491067 号)に成功し、この研究で得た多くのノウハウをもとに、実用化を念頭においたリピッドバブルの開発(特願 2015-117793, PCT/JP2016/002810)にも成功した。現在、安全性試験、毒性試験を実施中である。これらの研究の中で、体積変化の大きいバブルを用いれば、血管壁の開口だけでなく間質組織の拡散性を高められると考えた。その場合、バブル自身がナノサイズで血管壁を通過し間質に漏出できなければならない。

常温では気体で、沸点 -1.7°C の Perfluoro butane (PFB)は沸点以下の温度で加圧すれば液化するので、常温でリピッドバブルを作成して、気密下で加圧すれば液化しナノサイズの液滴が作成できると考えた。本研究は、常温では気体である PFB (沸点 -1.7°C)を用いて、ガスバブルから液滴バブルを作成する新しい手法を開発し、腫瘍局所で液滴からガスバブルに転じるとき

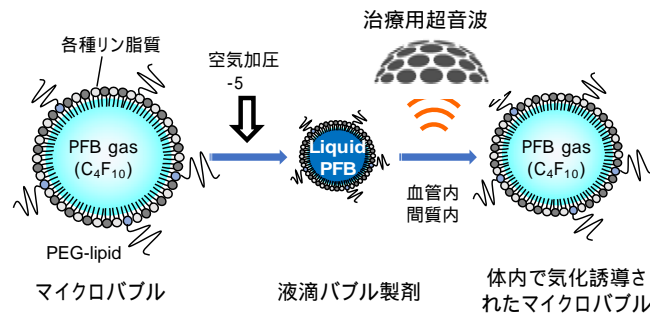


図1 治療用液滴バブル製剤

PFBと脂質でマイクロバブルを作成し、バイアル瓶に分注する。
沸点以下の温度で、空気を注入加圧して液滴バブルとする。
治療用超音波によって気化され再びマイクロバブルとなる。

の体積変化を利用して薬物送達を行うという全く新しいアイデアである(図1)。

2. 研究の目的

治療用液滴バブル製剤の開発と低 EPR 癌に対する革新的な薬物送達法の構築。非侵襲的に癌組織や転移性癌の腫瘍新生血管を検出・確認し、血管壁を一時的に開口させて薬剤の漏出を亢進させ、さらに間質組織内での薬剤の拡散性を向上させることができれば、EPR 効果の低い癌に対して薬剤を腫瘍深部にまで送達可能となる。本研究は、上記の問題解決に向けて、以下に示す革新的な送達法を提案し、動物実験でコンセプトを実証し、次のステップへの橋渡しを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 治療用液滴バブル製剤の開発

当初の計画ではペルフルブタンガスからリピッドバブルを調製しバイアル瓶に詰め、 -5 の氷浴に設置してバイアル瓶の中に空気を注射筒で注入加圧(600 kPa程度)し、PFBを液化させて液滴バブル(200 nm)とすることを目的としていた。しかしながら、加圧して液滴化する操作に大きな困難が生じ、また常に -10 前後を保持しなければならず、その後の実験が難しかった。そこで、常温常圧で液体であるペルフルオロヘキサン(PFH)を用いてナノ液滴(ND)を作る方法に変更した。NDの調製は2段階で行った。最初に、DSPCおよびDSPE-2000(94:6のモル比)を用いてリポソームを調製した。1 mLのリポソーム溶液を5 mLバイアル瓶に移し、60 μL のPFHを加えて密栓した。次いでバイアル瓶を氷浴に設置し、3~5分間浴槽型超音波処理してPFH-NDを得た。ナイルレッド(NR)を疎水性薬物モデルとしてPFH-NDに組み込んだNR-PFH-NDを調製した。

(2) ナノ液滴からバブルへの相転移

薄いゴムチューブに蒸留水を入れ、PFH-ND を注入して 1 MHz の周波数と 5 W/cm² の強度の治療用低強度超音波照射を行った。相転移によってナノ液滴からバブルとなった様子を超音波造影装置で確認した。

(3) 薬物の細胞取込み

培養皿のマウス腺癌細胞株 C26 に対して、NR-PFH-ND を添加後、1 MHz の周波数と 5 W/cm² の強度の治療用低強度超音波照射を行い、NR の細胞取込みについて検討した。

(4) 血流造影

NR-PFH-ND をマウス腺癌細胞株 C26 担がんマウスに尾静注し、腫瘍部位に治療用低強度超音波照射 (1 MHz、5 W/cm²) をを行い、頸動脈の超音波造影と腫瘍部位の NR 送達を調べた。

4. 研究成果

常温常圧で液体であるペルフルオロヘキサン (PFH) を用いて、約 200nm の粒子径を持つ PFH ナノ液滴 (PFH-ND) を開発した。PFH-ND の調製法は簡便で、扱いやすさがある。In vitro において、超音波造影装置で、周波数 1 MHz と 5 W/cm² の強度の超音波によってナノ液滴からバブルへ相変化することを確認した (図 2)。ナイルレッド (NR) を疎水性薬物モデルとして組み込んだ NR-PFH-ND をマウス腺癌細胞株 C26 に添加後、1 MHz の周波数と 5 W/cm² の強度の治療用低強度超音波照射を行ったところ、NR の細胞取込みが見られた。NR-PFH-ND をマウス腺癌細胞株 C26 担がんマウスに尾静注し、腫瘍部位に治療用低強度超音波 (1 MHz、5 W/cm²) を照射したところ、頸動脈について有意なコントラスト増強画像を得た。しかしながら、NR の移行性は僅かであった。

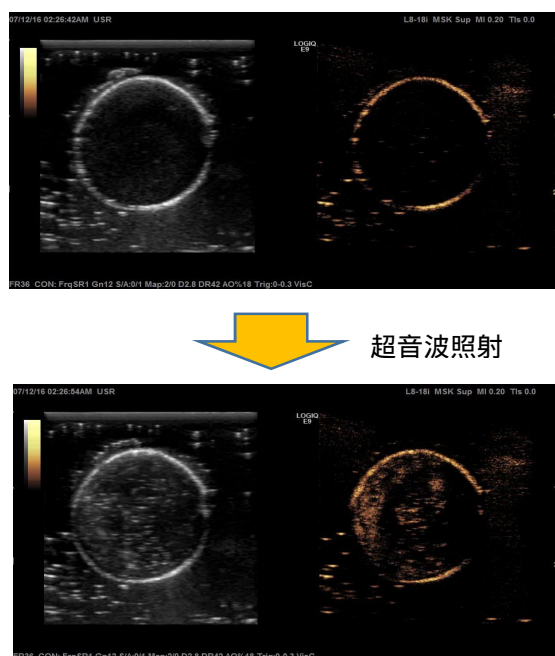


図 2 PFH-ND に対する超音波照射によるバブルへの相変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計0件

〔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	小俣 大樹 (Omata Daiki) (80803113)	帝京大学・薬学部・助教 (32643)	