

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23750168

研究課題名(和文)新規界面活性剤を用いた超音波分子イメージング用分子標的ナノバブル造影剤の開発

研究課題名(英文)Molecular-targeted nanobubbles for ultrasound contrast agents using a newly synthesized surfactant

研究代表者

土屋 好司(TSUCHIYA, Koji)

東京理科大学・理学部・助教

研究者番号：50398822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：分子標的超音波診断用造影剤として新規界面活性剤であるシクロアミロース修飾界面活性剤を基盤材料とした生体安定性の高いナノバブルの開発を行った。その結果、新規界面活性剤にポリエチレングリコール(PEG)化リン脂質を混合させることで微小かつ安定性の高いナノバブルの調製に成功した。また、微小気泡に葉酸またはガラクトースを標識させることで、ターゲット分子への集積性に優れたナノバブルを調製できることが分かった。本研究で開発した微小気泡は、生体内での安定性と癌細胞などへの集積性に優れた新規超音波診断用造影剤として期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study aims to develop molecular-targeted ultrasound contrast agents (nanobubbles) using a newly synthesized cycloamylose-modified surfactant (CA-LA). Nanobubbles with high dispersion stability in blood serum can be obtained using mixed CA-LA and a polyethylene glycol (PEG)-modified phospholipid as the dispersion agents. The labeling of folic acid to the nanobubbles enhances their accumulation to KB cells having folate receptors. Galactose-labeled nanobubbles are selectively accumulated to human liver tumor cells (HepG2), in which asialoglycoprotein receptors are generated. The results reveal that the nanobubbles obtained in the present study can be a useful ultrasound contrast agent having high stability in blood and high accumulation ability to tumor cells.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・機能物質化学

キーワード：ナノバブル 超音波診断 造影剤 分子認識 シクロアミロース修飾界面活性剤 リン脂質

1. 研究開始当初の背景

超音波診断は、超音波を体内に発信し目的部位から反射された音波を検出して画像化する「安全」、「迅速」、「簡便」、「安価」な医療診断機器であり、一般クリニックにも広く普及している。このような観点から、超音波診断技術が普及・拡大すれば患者の負担を軽減できるだけでなく、医療費削減につながる事が期待される。

微小気泡は超音波を強く反射するため、超音波造影剤として応用されているが、現在、使用・認可されている造影剤は、気泡サイズが大きい(数 μm)ため、体外に容易に排出されやすく、また血管外にある癌組織への集積は期待できない。このため、さらに微小で、生体安定性が高く、分子標的能力を付与した「ナノバブル造影剤」の開発が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、超音波分子イメージング用分子標的ナノバブル造影剤の開発のため、新規に開発した界面活性剤であるシクロアミロース修飾界面活性剤(CA-LA)を材料とした生体安定性の高いナノバブルを開発することを目的とする。この目的を達成するために、下記の(1)から(3)について検討した。

(1) 生体環境下においても分散安定性の高いナノバブルの調製を界面化学的観点から検討する。具体的には、バブルの微小化(ナノサイズ化)と安定性向上のため、新規界面活性剤とポリエチレングリコール(PEG)を付与したリン脂質との最適調製条件を検討した。

(2) 癌細胞に過剰発現する葉酸受容体をターゲットとし、リガンド分子として葉酸を標識した超音波造影ナノバブルを開発し、葉酸受容体陽性細胞への集積性について検討した。

(3) 肝癌などの肝疾患に対する超音波診断用造影剤の開発を目指して、肝細胞への集積性に優れたナノバブル造影剤を開発する。肝実質細胞はアシアロ糖蛋白質受容体が過剰発現しており、末端シアル酸基が消失したアシアロ糖蛋白質のガラクトース残基を特異的に認識することが知られている。そこで、リガンド分子としてガラクトース標識ナノバブルを開発し、肝癌細胞への集積性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 生体環境下でも安定性の高いナノバブルの開発

これまでの研究から、新規に開発したシクロアミロース修飾界面活性剤(CA-LA)は気泡の微小化(ナノサイズ化)に適しているとの知見が得られている。ナノバブルの生体内安定性の向上を図るため、新規界面活性剤にア

ニオン性リン脂質(DPPS)およびPEG化リン脂質(PEG-PSPE)を混合した混合バブルを調製し、リン酸緩衝液(PBS)および血清中における気泡サイズと安定性について評価した。内包ガスには生体内で安全な不溶性の六フッ化硫黄(SF_6)ガスを用いて気泡の分散安定性の向上を図った。

(2) 葉酸標識微小気泡の開発と葉酸受容体陽性癌細胞への集積性評価

アミン末端PEG化リン脂質と葉酸(FA)をアミドカップリングさせることにより葉酸標識PEG化リン脂質(FA-PEG-DSPE)を合成した。これをCA-LAおよびDPPSと混合させることにより、葉酸標識微小気泡を調製し、気泡サイズおよび分散安定性について検討した。また、葉酸標識バブルの集積性については、葉酸受容体陽性のヒト口腔癌(KB)細胞と陰性のヒト肺腺癌(A549)細胞を用いて、共焦点レーザー顕微鏡観察により評価した。

(3) ガラクトース標識微小気泡の開発と肝癌細胞への集積性評価

アミン末端PEG化リン脂質とラクトースを還元的アミノ化させることにより、ガラクトース標識PEG化リン脂質(Gal-PEG-DSPE)を合成した。これをCA-LA/DPPS混合気泡に混合させることによりガラクトース標識微小気泡を調製し、気泡サイズおよび分散安定性について評価した。また、ガラクトース標識微小気泡の集積性については、アシアロ糖蛋白質受容体陽性のヒト肝癌細胞HepG2を用いて、蛍光顕微鏡観察により評価した。

4. 研究成果

(1) 生体環境下でも安定性の高いナノバブルの開発

まず、CA-LAにDPPSを混合して微小気泡を調製した。図1にCA-LA/DPPS(25/75)混合気泡の水中およびPBS中における粒子径経時変化を示す。

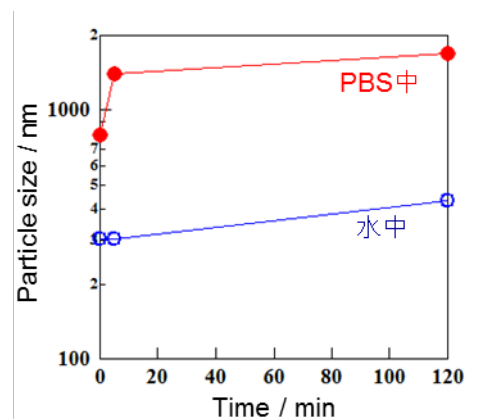


図1 CA-LA/DPPS混合気泡の粒子径経時変化

その結果、水中では $1\mu\text{m}$ 以下の微小な気泡(ナノバブル)が調製できたが、PBS中では調製直後から粒子径が大きく、時間経過に伴い粒

子径が増大したことから安定性に乏しいことが分かった。この原因について検討するためゼータ電位測定(図2)を行ったところ、水中におけるゼータ電位は負の大きな値を示したが、PBS 中においてはゼータ電位の絶対値は減少することが分かった。

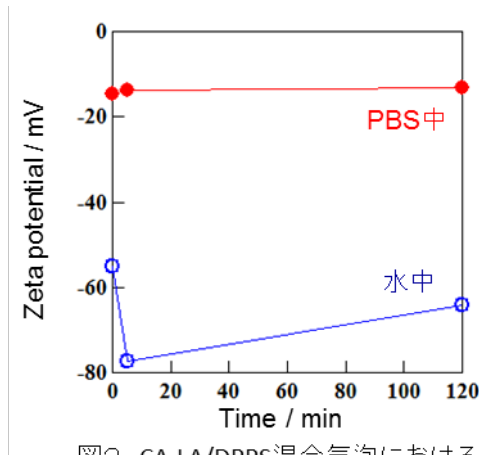


図2 CA-LA/DPPS混合気泡におけるゼータ電位の経時変化

従って、PBS 中において気泡の分散安定性が低下したのは、PBS 中に含まれる電解質により、気泡の表面電位が遮蔽され、気泡同士の凝集が促進されたためと考えられる。そこで、PEG 鎖の立体排除体積効果による気泡の凝集抑制効果を期待して、CS-LA/DPPS 混合気泡に PEG 化リン脂質(PEG-DSPE)を添加した混合気泡を調製した。

図3に10%ウシ胎児血清(FBS)中におけるCA-LA/DPPS/PEG-DSPE 混合気泡の粒子径経時変化を示す。

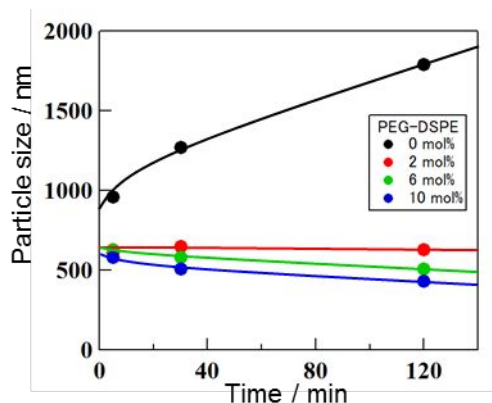


図3 血清中におけるCA-LA/DPPS/PEG-DSPE 混合気泡の粒子径経時変化(37°C)

その結果、PEG-DSPE 無添加系では粒子径が1 μ mと大きく、不安定であったが、PEG-DSPEを添加すると、粒子径は数100nmでほぼ一定となることが分かった。図4は血清中における気泡の数密度を測定した結果である。PEG-DSPE 無添加系では、気泡の数が時間経過に伴い急激に減少するのに対して、PEG-DSPEを添加した系では、気泡の数はほとんど減少せず、かつ無添加系と比較して2桁以上多いことが分かった。

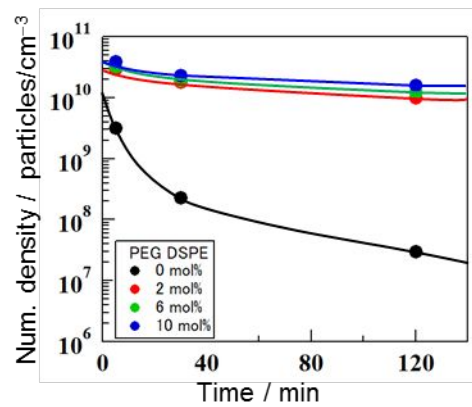


図4 血清中におけるCA-LA/DPPS/PEG-DSPE 混合気泡の数密度経時変化(37°C)

以上より、CA-LA/DPPS 気泡に PEG-DSPE を添加させることにより、生体環境下においても微小かつ分散安定性の高いナノバブルを調製できることが分かった。

(2) 葉酸標識微小気泡の開発と葉酸受容体陽性癌細胞への集積性評価

葉酸(FA)とアミン末端PEG化リン脂質をアミドカップリングさせることにより合成した葉酸標識PEG化リン脂質(FA-PEG-DSPE)を用いて微小気泡に葉酸を標識させた。

図5に37°C、PBS中で調製したCA-LA/DPPS/FA-PEG-DSPE(25/75/10)混合バブルの粒子径経時変化を示す。

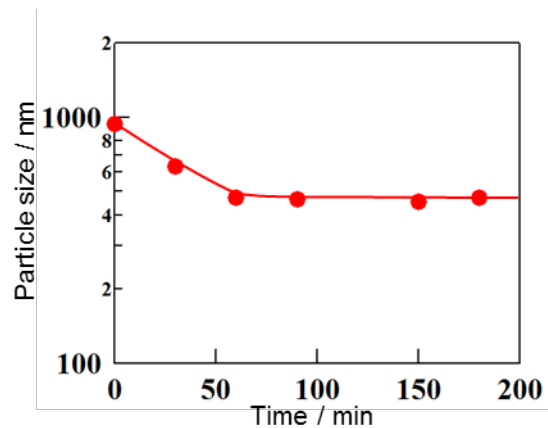


図5 PBS中におけるCA-LA/DPPS/FA-PEG-DSPE 混合気泡の粒子径経時変化(37°C)

その結果、気泡調製直後の平均粒子径は大きい時間が経過に伴い減少し、調製後60分以降はほぼ一定となることが分かった。これは、調製直後は小さな気泡に加えて大きな気泡も混在するため平均粒子径は大きい、大きな気泡は浮力により上昇して消失するため、分散安定性の高い小さな気泡(ナノバブル)のみが残存するためと考えられる。

次に気泡の数密度について測定した結果を図6に示す。粒子径の経時変化と同様に、調製後から徐々に気泡の数は減少するが、60分以降において気泡の数密度はほぼ一定となった。以上より、気泡に葉酸を標識させても、微小かつ分散安定性の高いナノバブルが

調製できることが分かった。

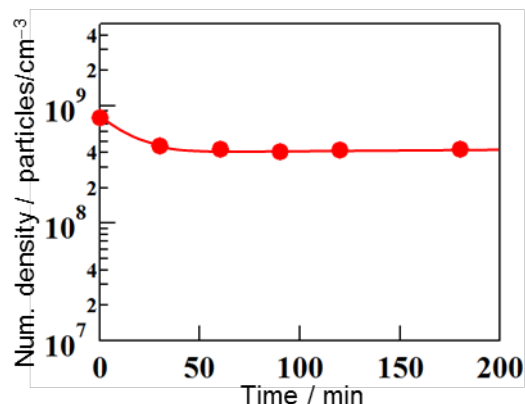


図6 PBS中におけるCA-LA/DPPS/FA-PEG-DSPE混合気泡の数密度経時変化(37°C)

次に葉酸受容体陽性の KB 細胞および陰性の A549 細胞に対する細胞生存率について MTT アッセイにより求めた結果を図 7 に示す。

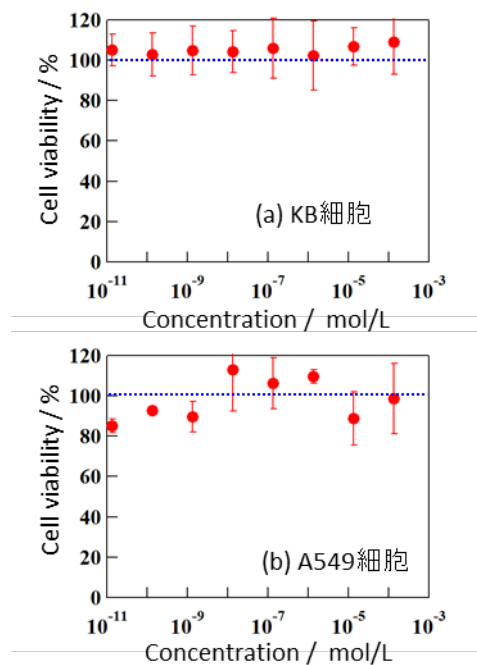


図7 CA-LA/DPPS/FA-PEG-DSPE混合気泡の細胞生存率

その結果、いずれの細胞においても 1.3×10^{-4} mol/L 以下の濃度において顕著な細胞毒性を示さないことが分かった。

そこで次に KB 細胞および A549 細胞への集積性について、共焦点レーザー顕微鏡観察により評価した結果を図 8 に示す。なお、細胞核は DAPI により染色し、葉酸標識微小気泡は FITC により蛍光ラベルした。

その結果、葉酸標識微小気泡は葉酸受容体陰性の A549 細胞にはほとんど集積しなかったが、葉酸受容体陽性の KB 細胞に対しては細胞核付近に特異的に集積することが分かった。

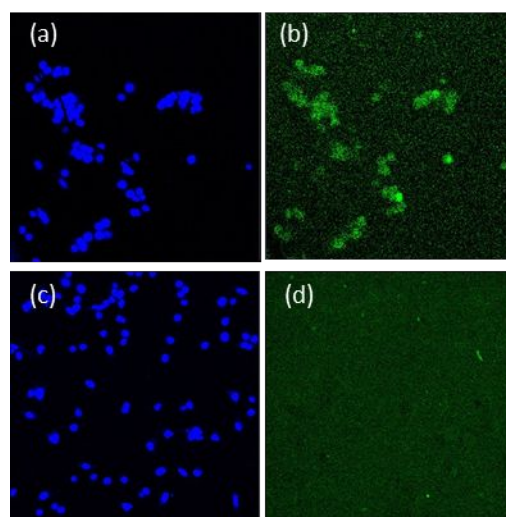


図8 共焦点レーザー顕微鏡観察像
(a), (b) KB細胞、(c), (d) A549細胞
(a), (c) DAPI(青)、(b), (d) FITC(緑)

以上より、本研究で開発した葉酸標識微小気泡は、生体環境下においても微小かつ高い安定性を示し、葉酸受容体陽性細胞への集積性の高いことが分かった。

(3) ガラクトース標識微小気泡の開発と肝癌細胞への集積性評価

ラクトースとアミン末端 PEG 化リン脂質を還元的アミノ化させることにより合成したガラクトース修飾 PEG 化リン脂質 (Gal-PEG-DSPE) を用いてガラクトース標識微小気泡を作製した。図 9 (a) に 37°C、PBS 中における粒子径の経時変化を、図 9 (b) に数密度の経時変化をそれぞれ示す。

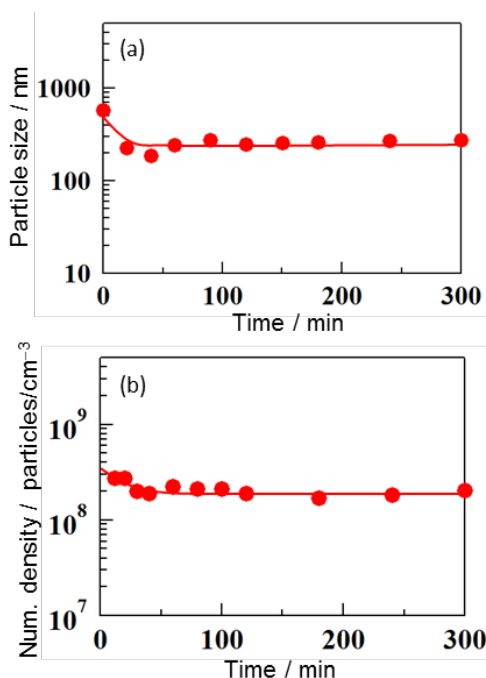


図9 PBS中におけるCA-LA/DPPS/Gal-PEG-DSPE混合気泡の(a)粒子径および(b)数密度の経時変化(37°C)

その結果、ガラクトース標識微小気泡においても、調製 60 分後以降において粒子径および数密度はほぼ一定となったことから、微小かつ安定な気泡が調製できることが分かった。

次にガラクトース標識微小気泡における細胞生存率について、MTT アッセイにより評価した結果を図 10 に示す。

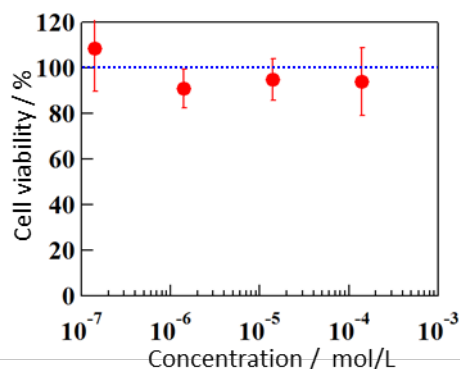


図10 CA-LA/DPPS/Gal-PEG-DSPE 混合気泡の細胞生存率(A549細胞)

その結果、ガラクトース標識微小気泡は 1.3×10^{-4} mol/L 以下の濃度において顕著な細胞毒性を示さないことが分かった。

次にガラクトース標識微小気泡と未標識の微小気泡を用いて、アシアロ糖蛋白質受容体陽性の HepG2 細胞に対する集積性について検討した。なお、いずれの微小気泡に対しても FITC を用いて蛍光ラベルした。図 11 に蛍光顕微鏡観察像を示す。

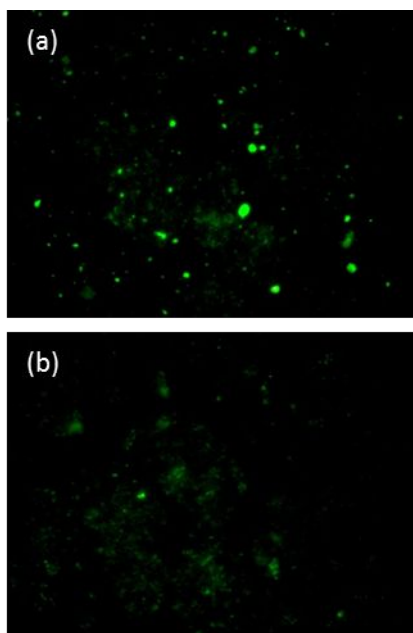


図11 蛍光顕微鏡によるHepG2細胞への集積性評価

- (a)ガラクトース標識微小気泡
- (b)ガラクトース未標識微小気泡

その結果、ガラクトース未標識バブルと比較してガラクトース標識バブルは HepG2 細胞に対して顕著な集積性を示すことが分かった。

本研究で開発した分子標的微小気泡は、現在医療認可されている超音波造影剤よりも、一桁小さいサイズを有し、生体環境下でも安定で、かつアクティブターゲティング能も高いなど、既存の造影剤には見られない優れた特徴を有しており、新規超音波診断用造影剤として超音波診断技術の発展に貢献できると期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Toshiyuki Tanaka, Yoshiaki Suzuki, Koji Tsuchiya, Hirofumi Yajima, Improvement of cell attachment capabilities of poly-l-lactic acid films by modification of surface properties with ion-beam irradiation, *Surface and Coatings Technology*, Vol. 218, pp. 162-166, 2013 (査読有)

DOI: 10.1016/j.surfcoat.2012.12.047

Toshiyuki Tanaka, Yoshiaki Suzuki, Koji Tsuchiya, Hirofumi Yajima, Surface characterization and assessment of cell attachment capabilities of thin films fabricated by ion-beam irradiation of poly(l-lactic acid) substrates, *Applied Surface Science*, Vol. 265, pp. 281-285, 2013 (査読有)

DOI: 10.1016/j.apsusc.2012.10.196

Kenichi Sakai, Hironori Nishiyama, Kosuke Ogura, Yuhei Kuroki, Takeshi Endo, Koji Tsuchiya, Hideki Sakai, Masahiko Abe, Effects of polymerizable groups on aqueous phase behavior of monomeric and gemini cationic surfactants, *Shikizai Kyokaishi*, Vol. 85, pp. 317-320, 2012 (査読有)

DOI: 10.4011/shikizai.85.317

〔学会発表〕(計23件)

土屋好司、超音波分子イメージング用マイクロ・ナノバブルの開発、日本超音波医学会関東甲信越地方会 第 25 回学術集会(招待講演)、2013年10月19日~2013年10月20日、ビックサイト TFT ホール

土屋好司、早期医療診断に向けた超音波造影微小気泡の開発、第 12 回「微小気泡の応用技術」講演会(招待講演)、2013年6月28日~2013年6月28日、千葉工業大学

土屋好司、ナノバブルとその医療分野への応用、色材協会関係コロイド化学セミ

ナー(招待講演)、2012年6月18日、東京塗料会館

土屋好司、がんの早期診断に向けた界面活性剤が形成する微小気泡の利用、第43回洗浄に関するシンポジウム(招待講演)、2011年10月26日~2011年10月27日、タワーホール船堀

Koji Tsuchiya (他10名)、Nanobubble Preparation of Mixed Cycloamylose-Modified Surfactants and PEGylated Phospholipids for Ultrasound Contrast Agents, 85th ACS Colloid and Surface Science Symposium, 2011年6月19日~2011年6月22日, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 好司 (TSUCHIYA, Koji)

東京理科大学・理学部・助教

研究者番号：50398822