

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791539

研究課題名（和文） 磁力を用いた新たな温熱化学療法の開発

研究課題名（英文） The development of chemohyperthermia using magnetoliposomes in magnetic field

研究代表者

山本 祐司（ Yamamoto Yuji ）

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80403830

研究成果の概要（和文）：本研究では、マグネタイトを包埋させたマグネトリポソームを磁力により腫瘍部に集積させ、高い抗腫瘍効果を目指した。磁力を用いた集積の有無により、抗腫瘍効果の差を検討したが、有意差は観察されなかった。しかしながら、磁力集積を行った群ではマグネトリポソーム投与3日後でも腫瘍部にマグネトリポソームが残留しており、再温熱治療が可能であった。以上の結果から、磁力を用いた温熱療法は、マグネトリポソームの患部への残留を高め、高い抗腫瘍効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In a previous study, we investigated electromagnetic heating with magnetite-loaded liposomes for the purpose of mild ablation in cancer treatment. The principal aim of this study was to determine whether the therapeutic efficacy of magnetite-loaded liposomes could be enhanced by attracting our liposomes containing magnetite to the tumor with magnet. Nude mice with TE-8 cells mimicking human esophageal cancer were treated by induction heating. To investigate the influence of this method on tumor growth, nude mice were assigned to 3 experimental groups: heating group (magnet), heating group (no magnet), and control group. In the heating group (magnet), magnetite-loaded liposomes were attracted to the tumor with a magnet and tumor-bearing mice placed for 10 min under an alternating magnetic field (AMF) after magnetite-loaded liposomes injection, while in the heating group (no magnet), magnetite-loaded liposomes were injected into each animal in absence of magnet and AMF treatment was administered. Tumor volume was significantly different between the control group and the other groups. Furthermore, the magnetite-loaded liposomes could be detected clearly in the tumor 3 days after treatment in heating groups (magnet). Thus, this new ablation method may be a feasible technique for cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：リポソーム、マグネタイト、ドラッグデリバリー、がん温熱治療

1. 研究開始当初の背景

現在リポソームは種々の方法で臨床応用されており、がん治療における選択肢の拡大に寄与している。マグネタイト (FeFe_2O_4) は磁力を有しており、さらに磁場をかけることにより発熱することを確認している。マグネタイトと抗癌剤を同時に包埋したリポソームを作製し、磁石を用いて患部に集積させ、さらに磁場を加えることによりリポソームを崩壊させ、患部に効果的に薬剤を放出させることを考えた。現在までにこの実験報告はなく、重要な意義があると考えられる。

2. 研究の目的

今回、我々はマグネタイトを包埋させたリポソーム (マグネトリポソーム) を患部に集積させることに注目した。磁石を用いることにより、マグネトリポソームを患部に効率良く集積させることが出来れば、投与量の減少につながる。さらに残留率が高ければ、繰り返しの温熱治療が可能となる。この治療法が確立されれば、今後のがん温熱療法の方向性が大きく転換しうると思われる。

3. 研究の方法

(1) 磁場発生装置

実験には交流磁場を発生する交流磁場発生装置 (400kHz) を用いた。マグネトリポソームに交流磁場を加えて、得られた磁気エネルギーを熱エネルギーに変換することにより患部の温熱治療を実現する。患部の温度は熱電対により 1 秒ごとに計測され、交流磁場を ON/OFF 制御することにより正確に制御した。

(2) マグネタイトの作製

マグネタイトは合成温度 35、50、80、100°C の逆共沈法で作製した。100°C で合成したマグネタイトが最大の発熱能を示したので、実験に用いた。粒子径は約 10nm であった。

(3) マグネトリポソームの作製

マグネトリポソームは、薄膜法により TMAG (5 μmol)、DLPC (10 μmol)、DOPE (10 μmol) の組成で調整した。得られた脂質膜をマグネタイト溶液で溶解し、超音波法によりリポソームにマグネタイト粒子を包埋させた。マグネトリポソームはエクストルーダー法により、粒子径を 100nm に整えた。

(4) 担がんマウスの作製

実験には雌性 BALB/C ノードマウス (5 週齢) を用いた。ヒト食道がん細胞 TE-8 を BALB/C ノードマウスの皮下に移植し、担がん

マウスを作製した。

(5) マグネトリポソームの毒性評価

担がんマウスを用いて in vivo でのマグネトリポソームの毒性評価を行った。担がんマウスにマグネトリポソーム (鉄 20mg) を投与し、磁場を印加せずに腫瘍体積を経時的に測定した。

(6) 抗腫瘍効果の評価

担がんマウスを用いて in vivo での抗腫瘍効果の検討を行った。担がんマウスを以下の群に分けて腫瘍体積を経時的に測定した。1. コントロール群 2. 温熱処理群 (磁石集積有り) 3. 温熱処理群 (磁石集積無し)。温熱処理は 45°C で 10 分間行った。さらに、温熱処理群 (磁石集積有り) は温熱処理 3 日後でも再び温熱処理が可能であった。これを繰り返し群とした。腫瘍体積の計算は次式に従った。
体積 (mm^3) = $(\pi/6) \times \text{短径}^2 \times \text{長径}$

(7) 組織染色による評価

温熱処理後の担がんマウスの腫瘍部を摘出した。その後、マイクロトームを用いて 4 μm の切片を作製した。ベルリンブルー染色 (対比染色: ケルンエヒトロート) および、TUNEL 染色 (対比染色: ヘマトキシリン) を行った。

4. 研究成果

(1) マグネトリポソームの毒性評価

担がんマウスを用いて in vivo でのマグネトリポソームの毒性評価を行った。磁場を印加せずにマグネトリポソームそのものの毒性を評価した。マグネトリポソーム自体には著しい毒性は認められなかった (図 1)。

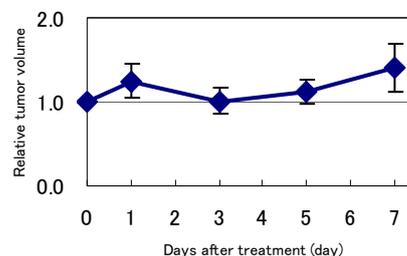


図 1 マグネトリポソームの毒性評価

(2) 抗腫瘍効果の検討

ヌードマウス皮下にヒト食道がん細胞 TE-8 を移植後、腫瘍体積が 150mm³ を超えた時点で温熱処理を行い腫瘍体積を測定した。コントロール群と温熱処理群(磁石集積有り)で有意差があった。同様にコントロール群と温熱処理群(磁石集積無し)でも有意差があった。温熱処理群(磁石集積有り)と温熱処理群(磁石集積無し)では有意差はなかったが、腫瘍温度が 45℃ に達するまでの時間は温熱処理群(磁石集積有り)の方が早かった。温熱処理 3 日後に再び温熱処理を行った繰り返し群は、温熱処理群(磁石集積有り)と温熱処理群(磁石集積無し)に対して有意傾向があった(図 2)。

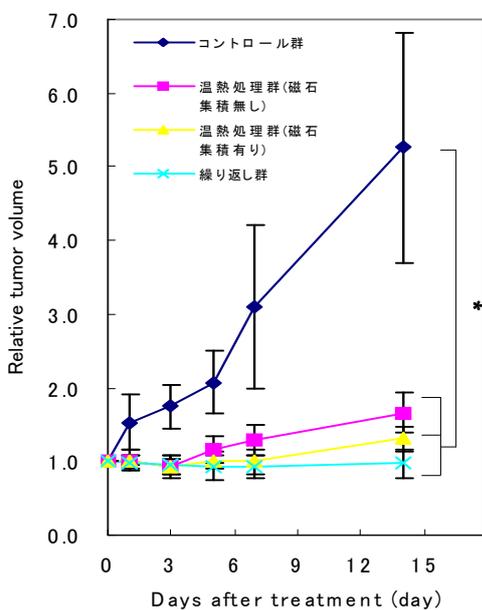


図 2 各群における腫瘍体積の推移

(3) 組織染色による検討

温熱処理後の担がんマウスの腫瘍部を摘出し、ベルリンブルー染色(対比染色:ケルンエヒトロート)および、TUNEL 染色(対比染色:ヘマトキシリン)を行った。ベルリンブルー染色で比較すると、温熱処理 1 日後において、磁石集積をした群の方が、磁石集積を行わない群よりも、患部におけるマグネトリポソームの残留が多く観測された(図 3A, B)。7 日後においても磁石集積を行った群には患部への残留が観測された(図 3C)。一方、磁石集積を行わなかった群では 7 日後にはマグネトリポソームの残留は確認できなかった(図 3D)。このマグネトリポソームの残留の差が、磁石で集積した群において再度の温熱処理を可能にしたと考えられる。

次に、温熱処理後のアポトーシスの誘発を検討した。細胞死はネクローシスとアポトーシスに大別されるが、42~45℃ 付近ではアポトーシスを伴う細胞死を起こすことが知られている。温熱処理 1 日後ではマグネトリポソームの残留部がネクローシスし、その近傍でアポトーシス部位が観測された(図 4A)。温熱処理 3 日後では、マグネトリポソームの周辺部までアポトーシス部位は拡張した(図 4B)。温熱処理 7 日後では、腫瘍部の周縁部でもアポトーシスが確認できた(図 4C)。

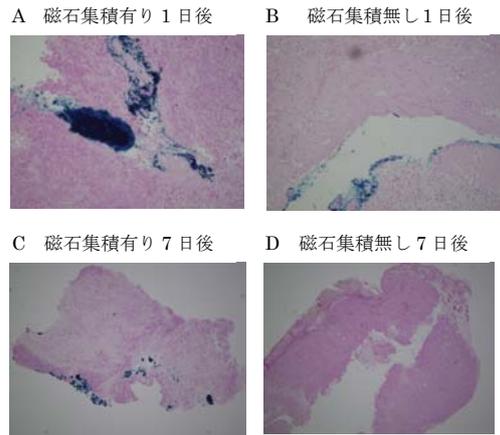


図 3 温熱処理後のマグネトリポソームの分布

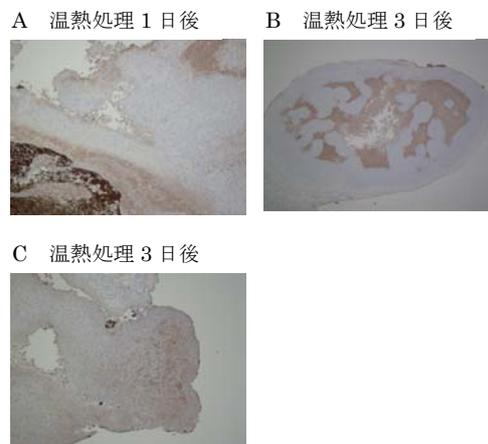


図 4 温熱処理後の TUNEL 染色

本研究の成果から、マグネトリポソームを磁力を用いて腫瘍部に集積させることにより、高濃度のマグネトリポソームを腫瘍内に残留させることができると考えられる。マグネトリポソームの残留率を高めれば、繰り返しの温熱治療が可能となり、有用ながん治療法になると期待できる。現在、マグネタイト

と抗癌剤を同時に包埋したリポソームを作製し、患部で効果的に薬剤を放出させる研究を遂行中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 祐司 (Yamamoto Yuji)
愛媛大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80403830

(2) 研究分担者

なし