

図 1. 矩形振動子 (30×30) 2ch PVDF 厚さ2.5mm

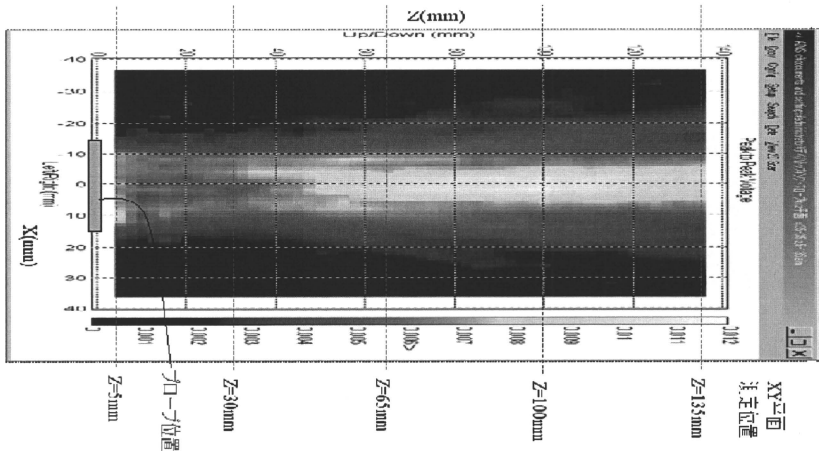
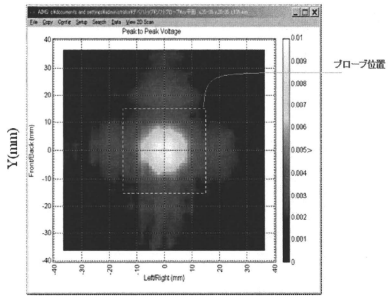
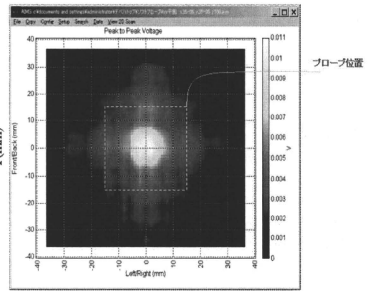


図 2. 矩形振動子 (30×30) 2ch PVDF の音場分布 (図 1 参照)

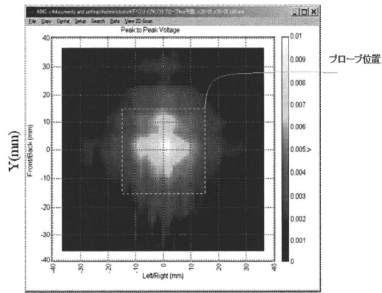
振動子から発射されるビームの長軸方向の音場分布をAIMSで測定した結果である



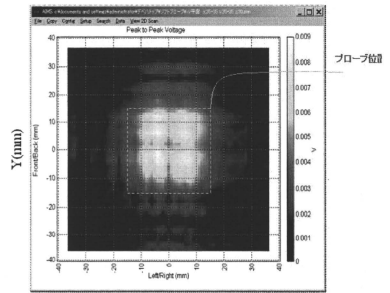
$Z = 135\text{mm}$



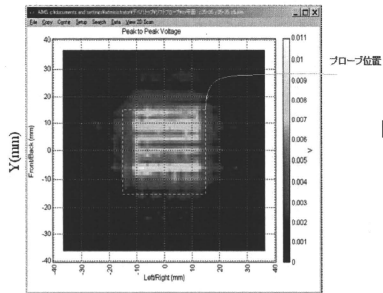
$Z = 100\text{mm}$



$Z = 65\text{mm}$



$Z = 30\text{mm}$



$Z = 5\text{mm}$

図3. 矩形振動子 (30×30)
 ビーム横断面の分布 (図1参照)
 振動子から135、100、65、30、5mmの
 横断面内音場分布 AIMSにて測定

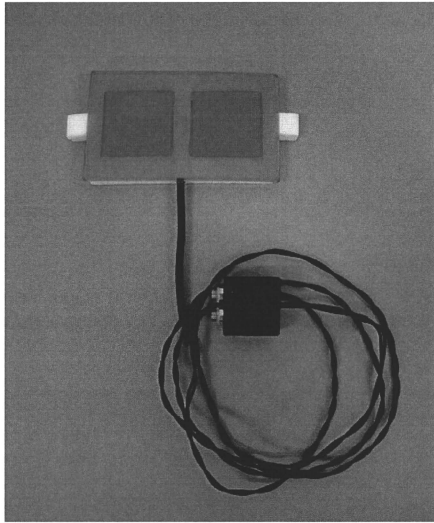


図 4. 矩形振動子 (30 × 30) 500KHz2ch (PZT)

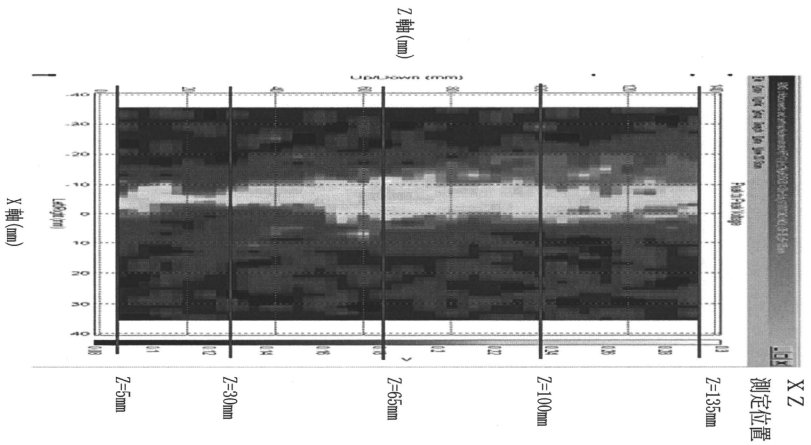


図 5. 矩形振動子 (30 × 30) 500KHz2ch (PZT) の音場分布 (図 4 参照)
振動子から発射されるビームの長軸方向の音場分布をAIMSで測定した結果である

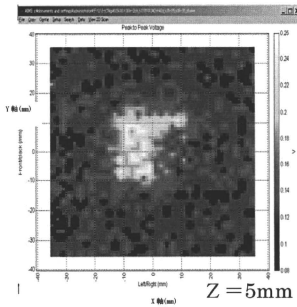
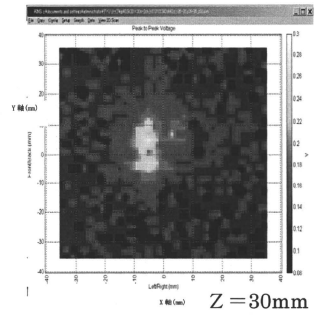
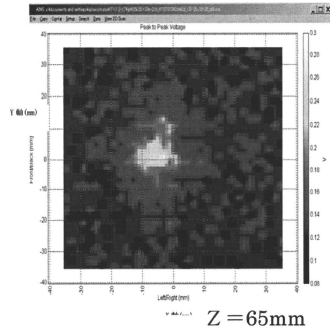
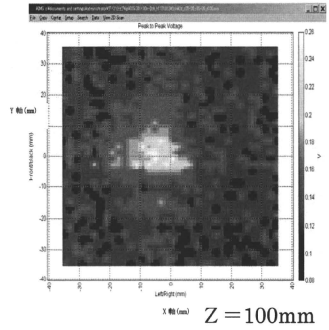
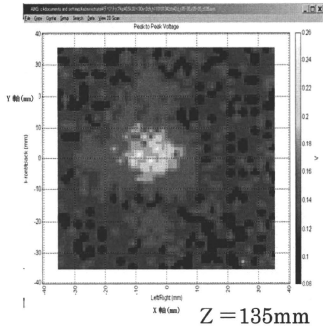


図 6. 矩形振動子 (30 × 30) 500KHz2ch (PZT) ビーム横断面の分布 (図 5 参照) 振動子から135、100、65、30、5mmの横断面内音場分布 AIMSにて測定

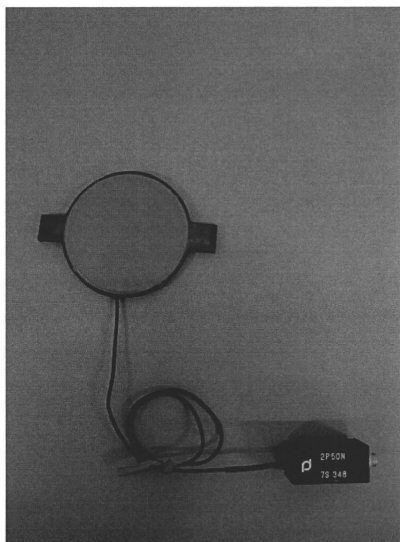


図7. 円形振動子(直径50mm)PVDF 2.5MHz 厚さ1.5mm

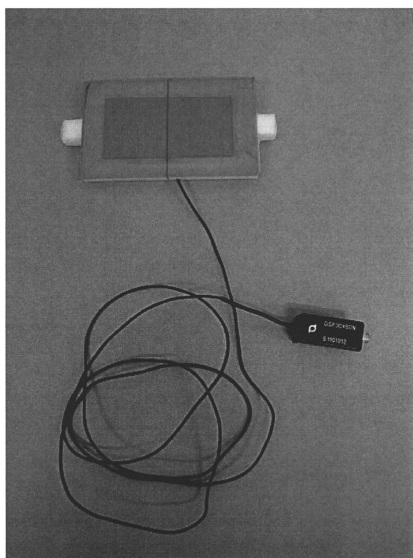


図 8. 矩形振動子 (30 × 60) PVDF 500kHz

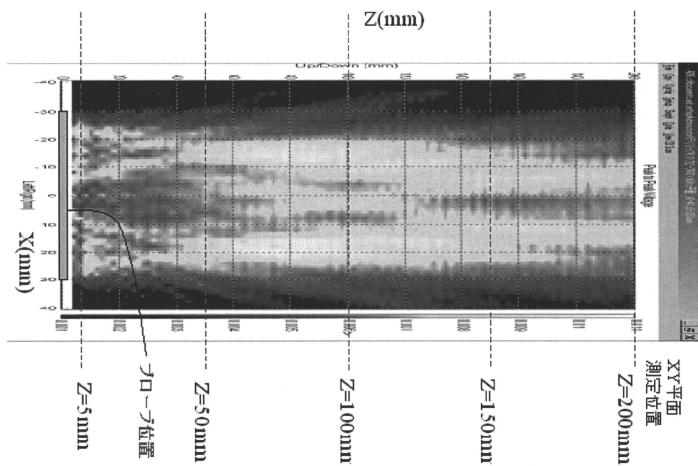


図 9. 矩形振動子 (30 × 60) PVDF 500kHzの音場分布
振動子から発射されるビームの長軸方向の音場分布をAIMSで測定した結果である

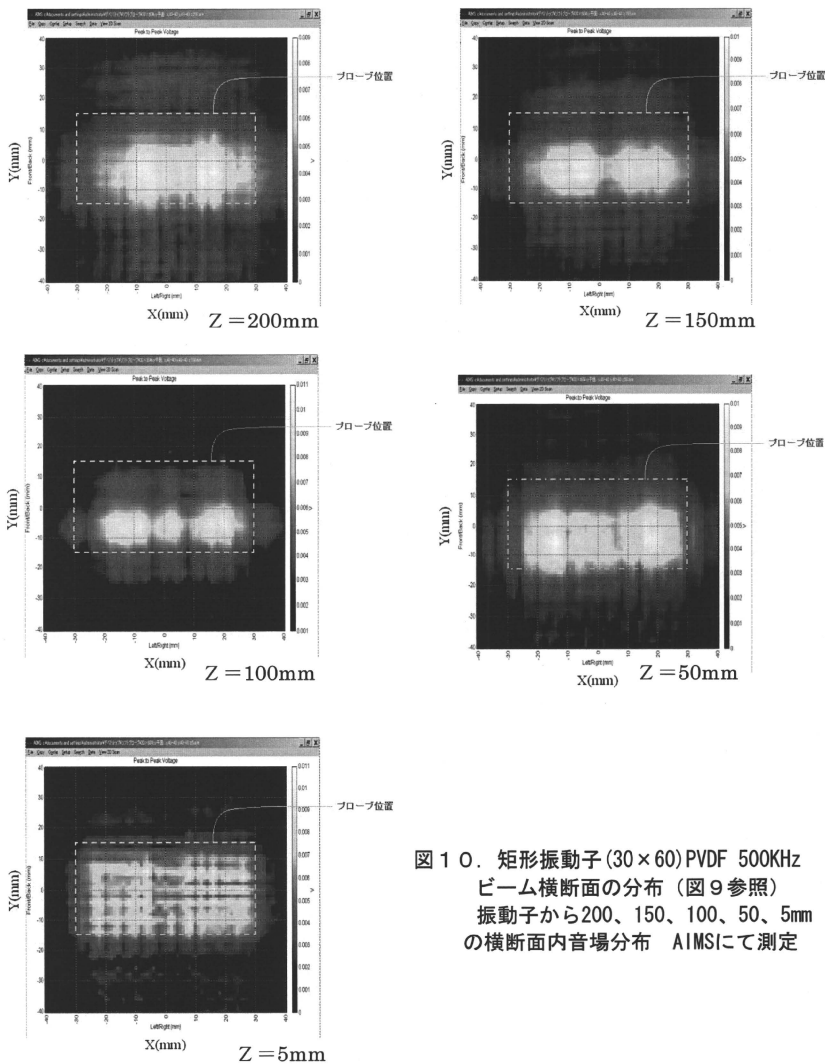


図 10. 矩形振動子 (30×60) PVDF 500kHz
 ビーム横断面の分布 (図 9 参照)
 振動子から 200、150、100、50、5mm
 の横断面内音場分布 AIMSにて測定

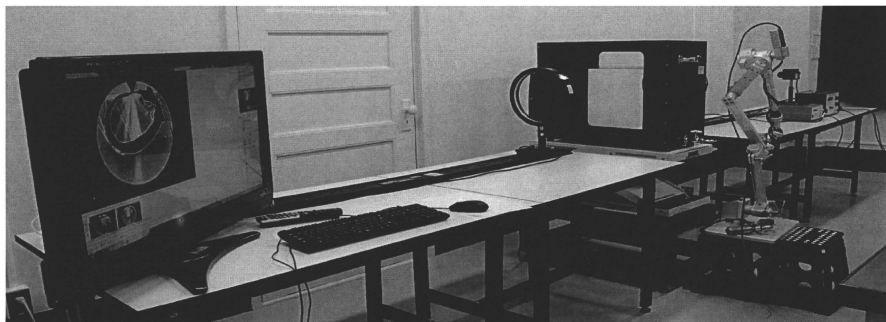


図 1 1. 大型シュリーレン装置
(東京慈恵会医科大学スーパー特区共同利用実験施設Ⅱ)

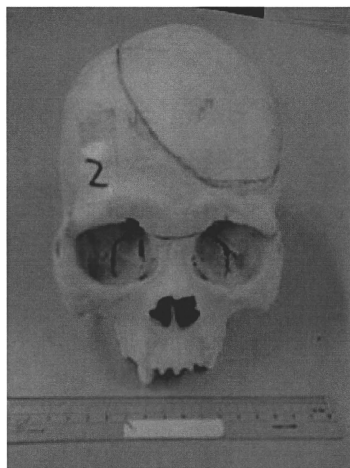
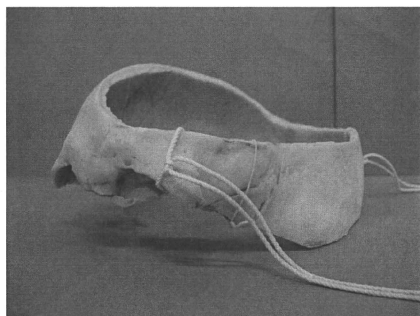


図 1 2. ヒト頭蓋骨の水平切断スライス写真

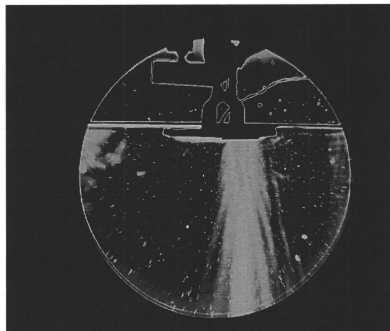
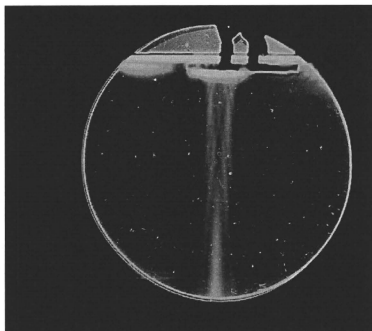
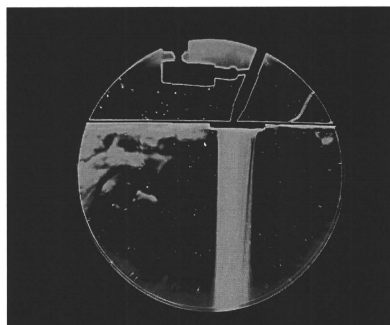
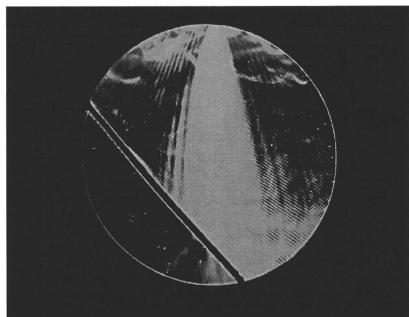


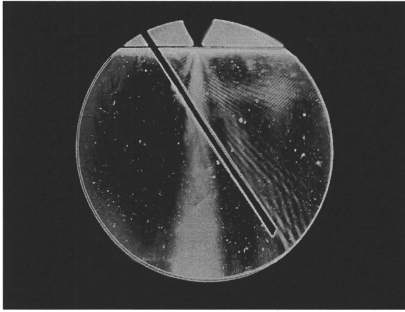
図 13. シュリーレン法による音場分布の比較
 正方形振動子 (30×30) のPVDFとPZTの差
 音場分布の形状には大差ないが、駆動電圧としてはPVDF素材の方が高電圧を要した



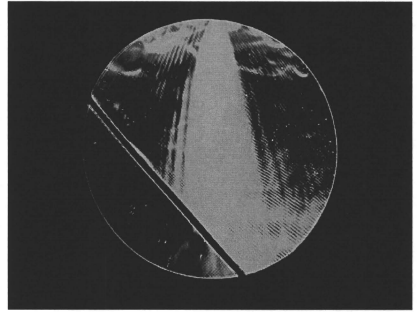
円形振動子 5ΦPZTによる音場

円形振動子50ΦPVDF2.5MHzによる音場分

図 14. シュリーレン法による音場分布の比較
 口径5Φ500KHzではビームの広角化が著しい。
 一方2.5MHz50Φではビームは広がることなく振動子口径とほぼ同計の
 ビーム幅が長距離持続した。



円形振動子10Φ500KHzのビームの反射



円形振動子5Φ500KHzのビームの反射

図15. シュリーレン法による超音波ビームの比較
口径5mmと10mmの円形振動子が形成する音場ビームの差を示した。
また反射板による反射によって形成される定在波が存在している。

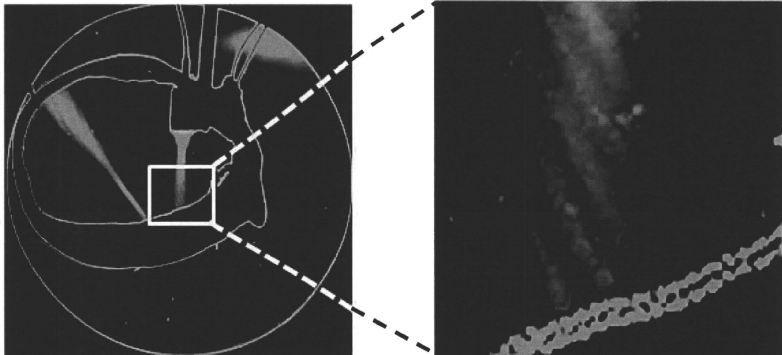


図16. ヒト頭蓋骨内面での超音波が形成する定在波の例
矩形10×10振動子 駆動条件500KHz連続波固定
頭蓋骨内面近傍に強い定在波の存在を認めた

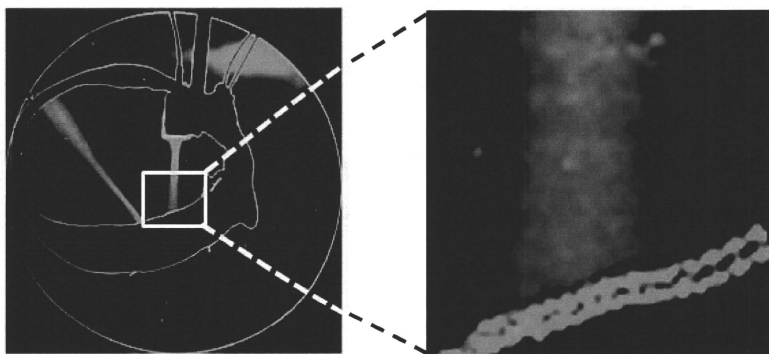


図17. ヒト頭蓋骨内面での超音波が形成する定在波の例
 矩形10×10振動子 駆動条件500KHzを中心に±200KHzのSWEEP変調
 頭蓋骨内面近傍で定在波が存在する。
 図16に比べその強度は弱まっている傾向を示したが、完全消失にはならなかった。

表1 新開発TST法と従前のTST法の比較

比較項目	TCT-LoFUT (旧)	次世代TST
《技術》		
標的性	有	やや有
診断画像	有	無
画像誘導	有	無
実時間監視	可	ドプラ (検討中)
STW回避	可	可
《臨床現場の操作》		
プローブ固定	要	要
プローブ保持	要	不要
患者拘束	要	無
《適用対照》		
t-PA適用患者	約10%	ほぼ全員

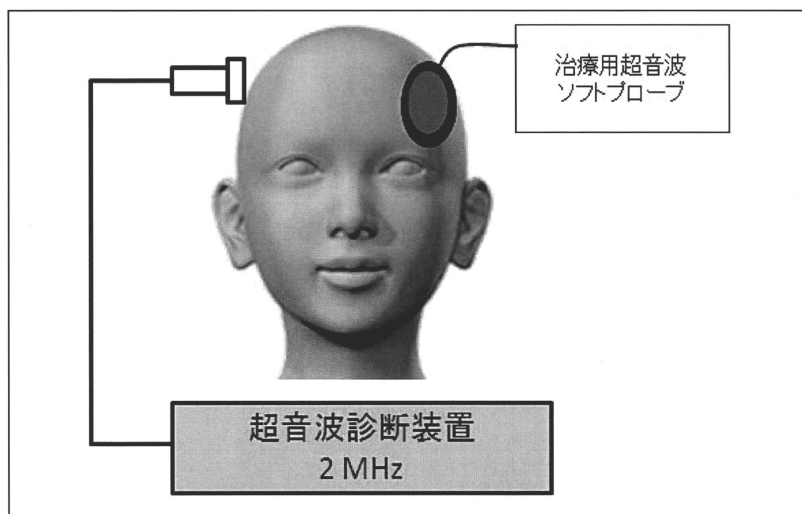


図 1 8 貼付型ソフトUS振動子を用いる
次世代経頭蓋超音波脳血栓溶解システムの概念図

バブルリポソーム併用超音波血栓溶解療法の研究

研究分担者 丸山一雄 帝京大学薬学部・教授

研究協力者 澤口能一 東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター
医用エンジニアリング研究室 研究員

研究要旨

我々が独自に開発したバブルリポソームは超音波出力や周波数をコントロールすることにより、超音波診断のみならず、薬物・遺伝子デリバリー、発熱による温熱療法にも応用可能である。このように様々な機能を有するバブルリポソームは疾病の診断から治療まで包括的に行うことのできる優れたツールになり得る。そこで、本研究ではバブルリポソームに血栓集積能を付与すべく、バブルリポソームの膜表面に血栓（活性化血小板）特異的結合能を有するRGDペプチドを修飾（RGD-BL）し、超音波診断装置下にてRGD-BLの投与後に血栓の輝度が上昇するか否かについて検討を行った。また、このバブルリポソームは超音波造影ガスとそれを覆う外殻から構成されるリポソーム様のナノバブルであるが、超音波造影ガスと外殻成分の違いによる特性についての情報が少ないのが現状である。そこで、本研究ではバブルリポソームの改良を目的として、バブル外殻の素材にフッ化脂質を導入することによる超音波造影ガス封入量の向上、安定性の向上についても並行して検討を行った。

A. 研究目的

①虚血性疾患の治療では、t-PA、超音波、マイクログラブルの三者併用時に血流再開通率が最高値を示す。そのメカニズムは、血栓を形成しているフィブリンの網目構造が超音波の振動作用と超音波によるバブルの振動作用によって開口し、t-PAの血栓浸潤を促進させるためである。その際、バブルを血栓に集積させることが出来れば、より効率的に血栓溶解を促進できると推察される。そこで、パーフルオロプロパンを内封した超音波造影剤であるバブルリポソーム（BL）の血栓への集積を高めるため、ターゲティング分子で修飾した新規造影剤の有効性について検討した。ターゲティング分子には、血栓

（活性化血小板）に高発現するGPIIb/IIIa分子と高親和性を持つRGDペプチドを修飾したバブルリポソーム（RGD-BL）を用いた。

②分子中に多くのフッ素原子を有する化合物は、一般に親水性溶媒・疎水性溶媒の双方に対し、

溶解し難い性質を持つ。超音波造影ガスに汎用されているパーフルオロプロパン（ C_3F_8 ）やパーフルオロブタン（ C_4F_{10} ）、さらに、近年注目を集めている超音波感受性相変換型ナノ粒子に使用されるパーフルオロペンタン（ C_5F_{12} ）は多くのフッ素原子を有するフッ素化合物である。実際に、液体である C_5F_{12} は水、エタノール、クロロホルムなどと混和できない。このような性質から、リポソーム中に C_3F_8 からなる

ナノバブルを封入したバブルリポソームの安定性とガスの封入効率率は低いものと考えられる。したがって、超音波造影ガスを安定かつ効率よく封入するためには、フッ素化合物と水相間の界面活性剤が必要になると推察される。このような背景のもと、リポソームの主要構成成分であるリン脂質にフッ素原子を導入したフッ化リン脂質を利用して、超音波造影ガス封入量、粒子径やバブルとしての機能の観点からバブルリポソームの改良を試みた

B. 研究方法

①-1、バブルリポソームの調製

脂質組成を DSPC: DSPE-PEG (2k)-OMe:

DSPE-PEG (3k)-Mal:cholesterol = 64: 1: 5: 30 (モル比) とし、脂質 100 μ mol をクロロホルム 4 mL に溶解させ、ジイソプロピルエーテル 4 mL と PBS 4 mL を加え、バス型ソニケーターで攪拌した。その後、エバポレーターを用いて逆相蒸発法によりリポソームを調製した。これを凍結融解し、エクストルージョン法により粒子径を 100-200 nm に調整した。調製したリポソームを二等分し、一方には 12.5 nmol の RGD ペプチド (c(RGDFK)ggc) 溶液を加え、もう一方には 12.5 nmol のシステイン (Cys) 溶液を加え、4°C で一晚反応させた。各種リポソームを 1 mg/mL となるように PBS で希釈し、このリポソーム懸濁液 2 mL を 5 mL バイアル瓶に入れた。C₂F₆ ガス 7.5 mL で置換・加圧し、バス型ソニケーターで 5 分間超音波照射することでバブルリポソームとした。

①-2、RGD-リポソームの活性化血小板結合能の確認

ラットより採血した血液 4.5 mL に 3.2 % のクエン酸溶液 0.5 mL を添加し、0.2 mM の ADP 溶液を 500 μ L 添加し、血小板の活性化を行った。そこへ、血小板の活性化マーカーである CD62P に対する蛍光色素 (PerCP) 修飾抗体を添加し、室

温にて 30 分間反応後、蛍光色素 (DiO) を内封した RGD-リポソームを 500 μ L 添加し、Flowcytometry 法にて、活性化血小板への RGD-リポソームの結合能について解析した。

①-3、RGD-BL の血栓結合能の評価
イソフルラン麻酔科でラットの総頸動脈を剥離後、総頸動脈の下部にパラフィルムを敷き、総頸動脈とパラフィルムの間に 40 % の第二塩化鉄をしみ込ませたる紙を挟み込み、10 分間刺激することで総頸動脈に塩化鉄誘発血栓を作製した。血栓作製後、塩化第二鉄のろ紙を除去、生理食塩水で 3 回洗浄し、10 分間放置した。血栓を小動物用超音波画像診断機 (VEVO 2100) でモニタリングしながら、尾静脈より RGD-BL を投与し、10 分後に RGD-BL の投与前後での血栓の輝度変化を画像解析ソフト (Image J) で解析した。

②-1、フッ化リン脂質導入リポソームの調製
脂質組成を DSPC: DSPE-PEG (2k)-OMe: F-DPPC = 44: 6: 50 (モル比) とし、脂質 100 μ mol をクロロホルム 4 mL に溶解させ、ジイソプロピルエーテル 4 mL と PBS 4 mL を加え、バス型ソニケーターで攪拌した。その後、エバポレーターを用いて逆相蒸発法によりリポソームを調製した。これを凍結融解し、エクストルージョン法により粒子径を 100-200 nm とした。なお、コントロールとして通常のバブルリポソームの脂質組成 (DSPC: DSPE-PEG (2k)-OMe = 94:6 (モル比)) のリポソームとフッ化リン脂質導入リポソームと同様の脂質組成でフッ素原子を含まないリポソーム (DSPC: DSPE-PEG (2k)-

OMe: DPPC = 44: 6: 50 (モル比)) も同様に調製した。

DSPC:

1, 2-distearoyl-sn-glycero-phosphatidyl
choline

DSPE-PEG (2k)-OMe:

1,2-distearoyl-sn-glycero-
3-phosphatidylethanolamine
-
methoxypolyethyleneglycol
F-DPPC: Phosphocholine, 1-palmitoyl-2-(16-
Fluoropalmitoyl)-sn-Glycero-3-
DPPC:
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidyl
Choline

②-2、バブルリポソームの調製

各種リポソームを1 mg/mLとなるようにPBSで希釈し、このリポソーム懸濁液2 mLを5 mLバイアル瓶に入れた。C₃F₈ガス7.5 mLで置換・加圧し、バス型ソニケーターで5分間超音波照射することでバブルリポソームとした。

②-3、C₃F₈ガス封入量の測定

バブルリポソームの入ったバイアル瓶を開封し、常圧とした後に、ガスタイトシリンジを用いてバブルリポソームを採取した。このバブルリポソーム500 µLを測定用のバイアル瓶に移し、ガスクロマトグラフによりC₃F₈ガス封入量を測定した。

②-4、粒子径の測定

バブルリポソームの入ったバイアル瓶を開封し、常圧とした後に、PBSで100希釈した。このバブルリポソーム懸濁液の粒子径を動的光散乱法により測定した。

②-5、バブルリポソームによる超音波造影効果
PBS5 mLの入ったゴムチューブを脱気した水中に入れ、超音波診断装置(9 MHz)を用いて観察した。

C. 研究結果

①血栓への指向性を付与したBL、すなわち

RGD-BLを調製し、RGD-BLの活性化血小板結合能およびラット総頸動脈に作製した塩化鉄誘発血栓への結合能を併せて検討した。

①-1、RGD-リポソームの血栓結合能の評価
血小板は血栓を形成する際に、活性体となりその際にフィブリンと結合するドメインであるGP1Ib/111aを高発現する。本検討で調製したRGD-リポソームは、このGP1Ib/111aを特異的に標的としたものであるため、活性化血小板への結合率をFlowcytometry法にて検討することで、RGD-BLの結合能を評価した。その際、対照として、RGDの代わりにシステインを修飾したリポソームを(Cys-リポソーム)を用いた。その結果、Cys-リポソームを処置した群では活性化血小板への結合率は7.1%であったのに対し、RGD-リポソームを処置した群では33.7%となり、Cys-リポソーム処置群と比較し、約5倍もの結合率を示した (Fig. 1 参照)。

①-2、RGD-BLの血栓集積能

RGD-BLの血栓結合能を検討すべく、ラット総頸動脈に塩化鉄誘発血栓を作製し、RGD-BL投与前後の血栓の輝度変化を観察することで評価した。その結果、対照として用いたCys-BLを投与した際にはほとんど血栓造影増強効果を得ることができなかったのに対し、RGD-BLを投与した群では血栓の輝度上昇が確認された (Fig. 2 参照)。

②本研究においてフッ化リン脂質導入バブルリポソーム(F-BL)に使用したフッ化リン脂質はDPPC1分子中に1原子のフッ素を導入した化合物(F-DPPC)を使用した。そこで、コントロールとして同様の脂質組成でフッ素のないバブルリポソーム(OP-BL)を調製し、比較検討した。すなわち、既存のバブルリポソーム(normal BL)から改善された点を検討するとともに、フッ素原子が入ることによる効果についても検討した

②-1、バブルリポソームの C_3F_8 ガス封入量の検討

低出力の超音波照射時のナノ/マイクロバブルの振動は超音波診断に利用されており、出力を上げた時に生じるナノ/マイクロバブルの圧壊は薬物・遺伝子デリバリーや発熱による温熱療法に応用される。ナノ/マイクロバブルの有するこれらの機能はナノ/マイクロバブル中のガスによるものである。このことから、多くのガスを含むバブルリポソームが開発できれば、さらに効率の良い診断・治療システムの構築に大いに貢献できるものと期待される。そこで、フッ化リン脂質導入バブルリポソーム中の C_3F_8 ガス封入量を測定した。その結果、normal BLと比較して、F-BLにおいて、 C_3F_8 ガス封入量が向上した (Fig. 3 参照)。一方、DP-BLの C_3F_8 ガス封入量は変化しなかった。これらの結果から、フッ化リン脂質の導入により、フッ素化合物である C_3F_8 ガスを効率よく封入可能であったと考えられた。

②-2、バブルリポソームの粒子径の測定

現在、本邦において上市されているバブル製剤にはレボピストとソナゾイドがある。これらのマイクロバブルの粒子径は2-4 μm とされており、超音波造影に用いられている。一方、薬物・遺伝子デリバリーへの応用を考えた場合、組織深部まで到達できる、さらに小さなバブル製剤が有利であると考えられる。このような背景のもと、バブルリポソームは0.4-1 μm の新規ナノバブル製剤として開発を進めてきた。そこで、本研究において開発したフッ化リン脂質導入バブルリポソームについて、その粒子径を測定した。その結果、normal BL (547.2 \pm 342.7 nm)と比較して、F-BLでは粒子径の変化は認められなかった (591.5 \pm 230.3 nm)。一方、DP-BLでは粒子径が増加する傾向にあった (927.6 \pm 495.2

nm)。(Fig. 4 参照) これらの結果から、フッ化リン脂質導入バブルリポソームは既存のバブルリポソームと同程度の粒子径を持ち、サイズの小さなナノバブルであることから、組織深部まで到達可能なバブル製剤になり得るものと期待される。

②-3、バブルリポソームによる超音波造影効果

バブルリポソームの機能のひとつに超音波造影効果があり、この効果を利用することで病変部位の超音波診断が可能になると期待される。そこで、超音波診断装置を用いて造影効果を確認した。(Fig. 5 参照)

その結果、normal BL, DP-BL, F-BLの全てのバブルリポソームにおいて同様の超音波造影効果が認められた。このことから、フッ化リン脂質導入バブルリポソームは既存のバブルリポソームと同様に診断と治療を同時に行えるツールになるものと期待される。

D. 考察

①リポソームへRGDペプチドを修飾したことにより活性化血小板への結合率がCysを修飾したときの約5倍に上昇し、また、*in vivo*の血栓においてもCys-BLを投与した際には血栓造影増強効果が得られなかったのに対し、RGD-BLを投与した際には血栓の輝度上昇が観察されたことから、このRGD-BLは血栓の血小板に結合し、血栓内部に保持されたことが示唆された。

②フッ化リン脂質導入バブルリポソームは既存のバブルリポソームと同様の粒子径および造影効果を有しながら、2倍以上の C_3F_8 ガスを封入可能であった。このように多くのガスを封入可能であったのは、導入したフッ化リン脂質がリポソーム中の水相とガスのフルオラス相の間で界面活性剤として作用したためと考えられる。今回調製したフッ化リン脂質導入バブルリポソ

一ムの脂質組成は、半分のリン脂質にわずか1原子のみのフッ素原子を持つ。これにより、ガス封入量の向上が認められたことから、バブル製剤の外殻にフルオラス相と水相間の界面活性剤を用いるコンセプトが証明されたと考えられる。今後は脂質組成のみならず、様々なフッ化リン脂質を用いて検討することで、さらに効率よく超音波造影ガスを封入可能なバブル製剤になるものと期待される。

バブルリポソームの問題点のひとつに、ガスの封入操作後の粒子径コントロールが困難であることが挙げられる。Fig. 4の結果で、DP-BLが約1 μ mの粒子径を示したことから、リポソームの構成脂質を変化させることでバブルリポソーム粒子径がコントロールできる可能性が示唆された。この結果は、診断と治療を同時に行う上で最適な粒子径さえ設定できれば、それに合わせてバブル粒子径をコントロールできるという有益な基礎的情報になるものと考えられる。

E. 結論

①BLにRGDペプチドを修飾することで、活性化血小板への結合能の付与が可能であり、さらにラット総頸動脈に作製した血栓に集積することが確認された。このRGD-BLは超音波診断機での血栓の検出を容易にさせるだけでなく、脳梗塞の際に超音波と併用することでt-PAによる血栓溶解作用の促進にも利用できる可能性が期待された。

②フルオラス相と水相の界面活性剤としてフッ化リン脂質を導入することで多くの超音波造影ガスを封入可能であった。この、フッ化リン脂質導入バブルリポソームは既存のバブルリポソームと同程度の粒子径を持ち、超音波造影効果が認められたことから、多くの超音波造影ガスを有する新規ナノバブル製剤になるものと期待される。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

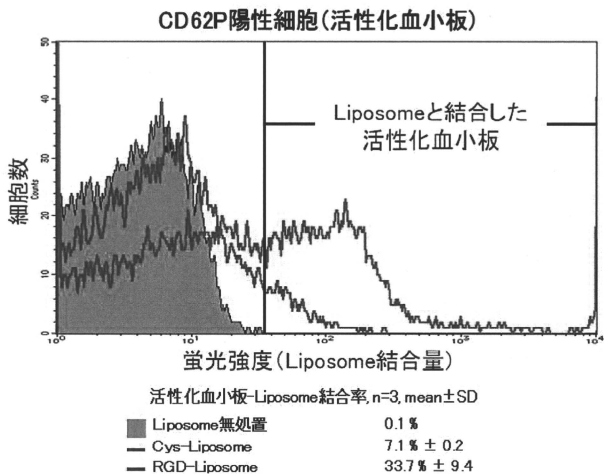


Fig.1 RGD-リポソームの血栓結合能 (カラー画像掲載あり P156)

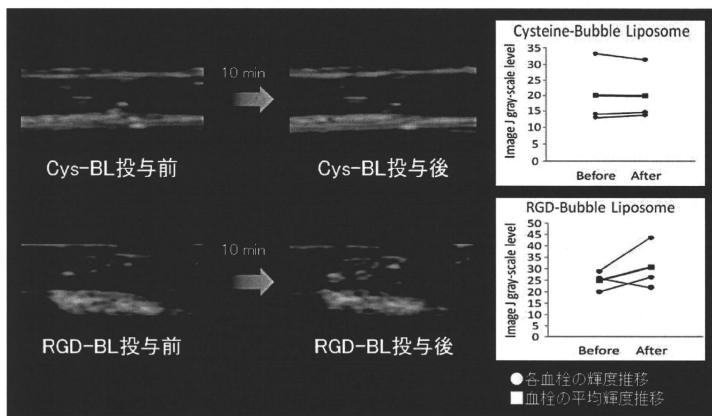


Fig.2 RGD-BL の血栓造影増強効果

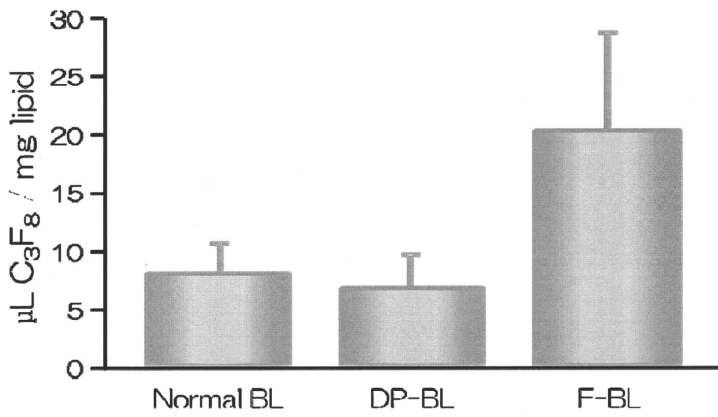


Fig. 3 バブルリポソーム中の C_3F_8 ガス封入量

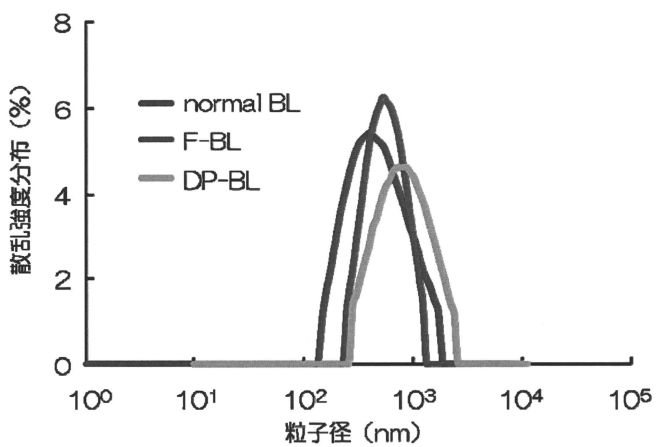
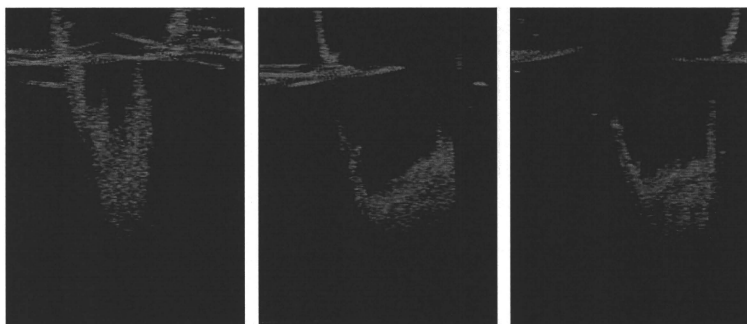


Fig. 4 バブルリポソームの粒子径分布 (カラー画像掲載あり P156)



normal BL

DP-BL

F-BL

Fig. 5 バブルリポソームの超音波造影効果