

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
分担研究報告書

ラット急性脳梗塞モデルによるバブルリポソームの有効性安全性評価

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 帝京大学薬学部 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診断のみならず、ターゲティング分子を修飾することで特異的な薬物・遺伝子デリバリー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。前年度の成果を基に、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、活性化血小板および血栓への結合能を、ラット大腿動脈電気刺激誘発血栓モデルで評価した。その結果、RGD-BLは血栓に結合し、超音波診断装置下で血栓造影が可能であることが示された。

A. 研究目的

虚血性疾患の治療では、表1に示す様にt-PA、超音波、マイクロバブルの三者併用時に血流再開通率が最高値を示した臨床研究がある。三者併用による再開通率の向上のメカニズムは、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。

・脳梗塞治療における血流再開通率	
t-PA単独	23.9%
t-PA + TCD(経頭蓋超音波ドプラ)	40.8%
t-PA + TCD + マイクロバブル	54.5%

Reference・・・Molina CA et al. stroke, 2006.

表1 超音波、マイクロバブル併用による血栓溶解促進効果

バブルリポソームはパーフルオロプロパンを内封した超音波造影効果を有する小胞であり、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なツールである。さらにバブルリポソームには様々なターゲティング分子を容易に修飾可能であるため、標的組織・部位特異的

な診断・治療が可能になると期待される。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。図1に示す血栓標的型バブルリポソームを作製し、ラットに電気刺激誘発血栓を作製して結合性と超音波造影の評価を行った。本検討では、バブルリポソーム（BL）へ血栓集積能を付与すべく、ターゲティング分子として、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環状化RGDペプチドを用いた。

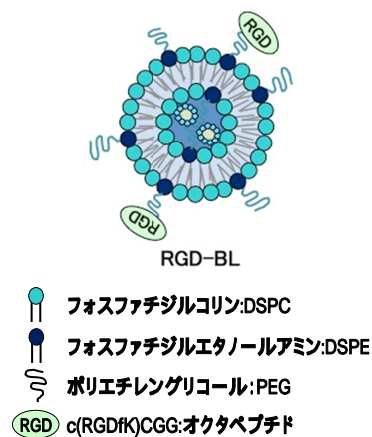


図1 RGD-BL模式図

## B. 研究方法

### (1) BL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、総脂質量100  $\mu\text{mol}$  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エマルジョン化を行った。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。これを凍結融解を3回繰り返した後、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 mmolのRGDペプチド (CGGc(RGDfK))溶液を加え、もう一方には12.5 mmolのコントロールペプチド (CGGc(DGRfK))溶液を加え、静かに攪拌しながら4 時間で一晚反応させた。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。C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>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) C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>ガス封入量の測定

BL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BLを採取した。このバブルリポソーム500  $\mu\text{L}$ 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C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>ガス封入量を測定した。

### (3) 粒子径の測定

BLの入ったバイアル瓶をバイアルオープナーで静かに開封し、常圧とした後に、PBSで100倍希釈した。このBL懸濁液の粒子径を動的光散乱法により測定した。

### (4) 電気刺激誘発血栓の作製

ラット大腿動脈の心臓側および抹消側を針金を挟み結紮し、血管の3/4程度をせん断。血管の切り口より陽極に繋いだ直径0.3 mmの針金を3~5 mm程度挿入し、陰極側の針金を皮膚に接触させ10分放置。針金を抜去後、血管の切り口より1 mm程度心臓側で結紮し、電気刺激以前に結紮しておいた心臓側の糸を切り、血流を再開通させる。

### (5) RGD-BLの血栓集積の評価

小動物用超音波画像診断装置 (VEV02100) にて閉塞動脈であることを確認後、バブルリポソーム投与前と投与後の血栓を撮像し、血栓の輝度をImage Jにて解析。Dose: 1 mg/mL, 500 mL

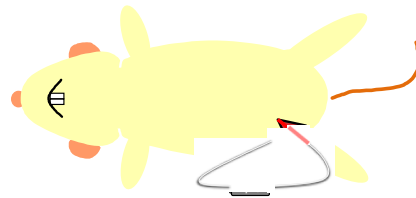


図2 電気刺激誘発血栓作製法

## C. 研究結果

### (1) バブルリポソームのC<sub>3</sub>F<sub>8</sub>ガス封入量の検討

バブルリポソーム中のC<sub>3</sub>F<sub>8</sub>ガス封入量をガスクロマトグラフィーで測定した。その結果、バブルリポソームのガス保持量は11.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、RGD修飾バブルリポソームのガス保持量は10.8  $\mu\text{L}/\text{mL}$ となった。C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>ガス封入量はペプチド修飾の有無にかかわらず同程度であり、バブルリポソームのガス保持量はRGDペプチド修飾に影響を受けないことが示唆された。

## (2) バブルリポソームの粒子径の測定

バブルリポソームの粒子径を動的光散乱法を用いて測定した。その結果、BL ( $591.5 \pm 230.3$  nm)、DGR-BL ( $647.2 \pm 342.7$  nm)、RGD-BL ( $613.8 \pm 107.5$  nm) となり、粒子径の変化は認められなかった。これらの結果から、バブルリポソームの平均粒子径はオリゴペプチド修飾による影響をほとんど受けないことが示唆された。

## (3) RGD-BLによる血栓造影効果

RGD-BLの血栓結合能を検討すべく、ラット大腿動脈に電気刺激誘発血栓を作製し、RGD-BL投与前後の血栓の輝度変化を超音波造影装置モニタリング下で観察することで評価した。その結果、図3に示す様にRGD-BLを投与した群では血栓の輝度上昇が確認された。

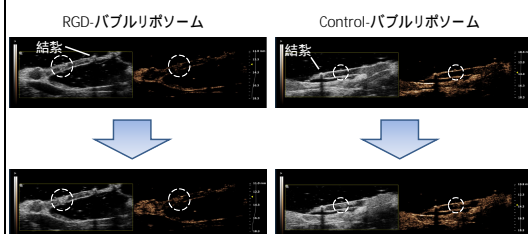


図3 バブルリポソームによる  
in vivo造影

## D. 考察

前年度の結果より、リポソームへRGDペプチドを修飾したことにより、RGD-BLへ活性化血小板結合能を付与出来たことがフローサイトメトリーおよび共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析により確認された。また、バブル化する際に超音波照射を行ってもRGDペプチドの活性は失われないことも確認され、製剤の高い安定性も示唆された。

電気刺激誘発血栓に対してRGD-BL投与すると、血栓の輝度上昇が確認された。輝度の上昇は血栓にバブルリポソームが結合したことが推察され、RGD-BLがin vivoでも機能することが確認出来た。今後検討数の追加、および投与量を変化させることで詳細に最適な血栓造影条件・超音波血栓溶解条件について検討していく予定である。

## E. 結論

BL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、ラット大腿動脈に電気刺激誘発で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。

また、今後はRGDペプチドのみならず、血栓を標的可能な抗体などのターゲティング分子を修飾したバブルについても検討していくことで、超音波血栓溶解療法に最適な血栓標的型バブルを開発する予定である

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

## 2. 学会発表

- 1) Yoshikazu Sawaguchi, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Daiki Omata, Hitoshi Uruha, Mutsumi Seki, Kohsuke Hagisawa, Kazuo Maruyama, 16th World Neurosonology Meeting, 2013.10.17-20, Sofia, Bulgaria, Development of thrombus-targeting bubble liposome for diagnostic and tPA thrombolysis acceleration

2) 澤口能一、鈴木 亮、小田雄介、小  
俣大樹、宇留賀仁史、関むつみ、萩  
沢康介、丸山一雄、第57回日本薬学  
会関東支部会、2013, 10, 26, 東京、  
血栓標的型パブルリポソームを用いた  
血栓 *in vivo*イメージング

H . 知的財産権の出願・登録状況  
なし