

ヒアルロン酸-プロタミンパーティクルの Lipid への封入による Particle の微細化

原田 聡¹、瀬川昂史¹、江原 茂¹、世良耕一郎²、後藤祥子³

¹岩手医科大学医学部放射線医学講座
020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

²岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

³日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

1 はじめに

現在まで我々は、放射線照射に反応して内容（抗癌剤、あるいは免疫療法剤）を放出するマイクロパーティクルを P-selectin 抗原で標識し、それを用いて、放射線照射部位に抗癌剤、あるいは免疫療法剤を集積させる動物実験（左下腿に MM48 腫瘍を移植した C3He/N マウス使用）を行ってきた。すなわち、1)腫瘍部に第一回目の放射線を照射、腫瘍血管内皮に P-selectin 抗原を誘導、2)マウス尾静脈から P-selectin 抗体で標識したマイクロパーティクルを注入、3)P-selectin の抗原抗体反応により照射部位にマイクロパーティクルを集積、4)集積したマイクロパーティクルに第二回目の放射線照射を施し、パーティクルから抗がん剤、あるいは免疫療法剤を放出させる、5)放出された抗がん剤、あるいは免疫療法剤と放射線照射の相乗効果により、抗腫瘍効果を増強、なおかつ、それら薬剤の限局化作用により、薬剤の副作用を軽減するというものである¹。

昨年度、我々は、マウス左下腿に移植した MM48 乳がん第一回目の照射を施行後、anti-CD 47 siRNA を封入した上記パーティクルをマウス尾静脈より注入し、マウス左下腿腫瘍にマイクロパーティクルを集積させる実験を施行した。しかし、パーティクルが、腫瘍に到達する前、脳、肺、脾臓に捕捉され、腫瘍に到達するパーティクル数が減少していることが判明した。この原因として、パーティクル径が 0.7 μm と大きいことが考えられ、さらなるパーティクルの微細化が必要と考えられた。

現在まで、Protamine-Hyaluronic acid パーティクル作成を、Hyaluronic acid 水溶液と Protamine 水溶液を混和し、Protamine-Hyaluronic acid パーティクルを液体中で生成させた後、0.8 μm 孔のセルロースフィルターでパーティクルを精製することで行ってきた²。これまでの実験で、パーティクルが大きくなる (4.3 \pm 0.2 μm) 原因として、パーティクルの精製中、セルロースフィルター上でパーティクル同士が重合する事が、主要な要因として挙げられた。

この現象を抑えるため、フィルターによる精製を停止し、パーティクルを直接 Lipid 内に封入し、パーティクル同士が重合することを抑えた後、遠心分離法によって、パーティクルを生成することを試行したので報告する。

2 材料と方法

2.1 Lipid 封入型ヒアルロン酸-プロタミンパーティクル生成

1.6 mg プロタミン と 1.28 mg ヒアルロン酸を、それぞれ別々に、2.0 ml of 1mg/ml のカルボプラチン溶液 (Pt 含有抗癌剤) に溶解後、これら 2 種類の溶液を混和し、15 分間室温で静置し、ヒアルロン酸-プロタミンパーティクルを析出させた。析出したパーティクル浮遊液 1 ml を、Lipid カプセル機材 Coatsome EL-1-01 (日油)のバイアル中に混和し、15 分間静置し、ヒアルロン酸-プロタミンパーティクルを Lipid 中に封入した。

2.2 パーティクルの実験動物への投与、サンプル剖出、および PIXE 検体作成

左下腿に乳がん細胞 MM46 を移植したマウス (C3He/N ♂ 6 週齢)に、パーティクル 1 億個を尾静脈より注入し、6 時間後に、腫瘍、肺、肝臓、腎臓、脳、脾臓を剖出した。これら組織を硝酸灰化法により完全に液体化したのち、マイラー膜上に滴下、自然乾燥後、PIXE 検体とした。

2.3 PIXE による腫瘍、肺、肝臓、腎臓、脳、脾臓へのパーティクル集積の評価

上記組織に捕捉されたパーティクルの評価は、パーティクル中に含まれるカルボプラチン (Pt 含有抗癌剤) を、その Pt 含有量として PIXE 法で定量する事により検出した。

3 結果

3.1 パーティクルの形態、および直径

生成されたパーティクルの位相差顕微鏡像 (40 倍) を図-1 に示す。各々のパーティクルの表面は平滑で、円形を呈し、その直径は 574 ± 23 nm (平均 \pm 標準誤差) であり、従来のパーティクル (4.3 ± 0.2 μ m) よりも有意に微細化した。

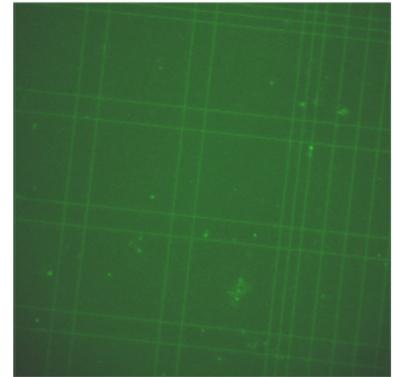


図-1

3.2 腫瘍、肺、肝臓、腎臓、脳、脾臓へのパーティクルの捕捉

上記臓器中への Particle 捕捉を、カルボプラチン (Pt 含有抗癌剤) 集積による、組織中の Pt 含有量として示す。各臓器において、従来型(■)の集積よりも、微細化した改良型のパーティクルの集積(■)は有意に低下した (図-2)。一方、腫瘍への集積は、微細化した改良型の集積が、従来型よりも、有意に多く集積した (図-3)。

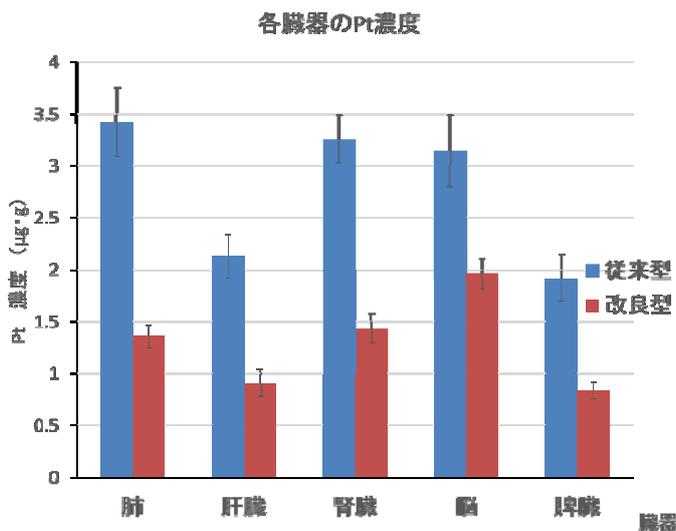


図-2

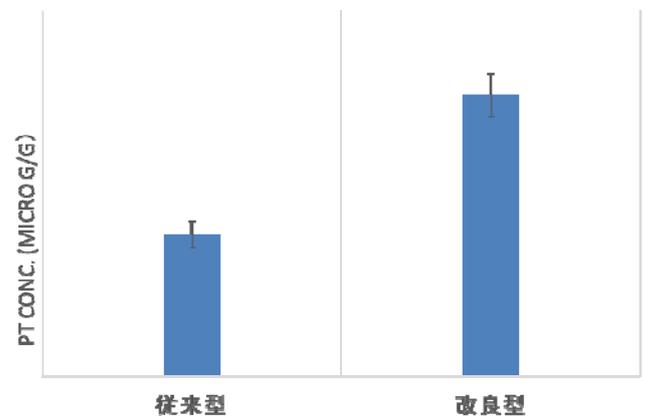


図-3

4 考察

ヒアルロン酸-プロタミンパーティクルは、それら 2 者間の静電氣的結合により生成するため、生成時は 30 nm 前後の非常に微細なパーティクルである。しかし、パーティクル精製時、パーティクル同士が精製フィルター上で重合するため、その径が大きくなっていた。今回の実験では、フィルターを使用せず、Lipid カプセルにて包み込んだ後、遠心分離をすることにより精製する事を実験した。

実験に使用した Coatsome-EL-01 はアンプルに封入された粉末状の Lipid であり、1) 内容の透過性に富み、放射線に反応してヒアルロン酸-プロタミンパーティクルから放出された抗がん剤の散布を妨げない、2) パーティクル浮遊液をアンプル中に注入した後、混和するだけでパーティクルの Lipid への封入が完了する、の 2 点の特徴があるため、本実験に使用した。

Lipid に封入したヒアルロン酸-プロタミンパーティクルは互いに重合する事なく分離され、Particle は微細化された。微細化されたパーティクルは、肺、肝臓、腎臓、脳、脾臓へのパーティクルの捕捉を低下させ、腫瘍へのパーティクル捕捉を増加させたと考えられる。

今後、放射線照射時の Lipid 封入化パーティクルからのカルボプラチンを定量化し、投与するパーティクル量を検討していきたいと考えている。

参考文献

- 1) Satoshi Harada, Shigeru Ehara, Keizo Ishii, Takahiro Sato, Masashi Koka, Tomihiro Kamiya, Koichiro Sera, Shoko Goto. Imaging and treatment of malignant metastatic tumors by using radiation-sensitive immunolabeled liquid-core microcapsules. Nucl. Inst. and Meth. Phys. Res. B 2014; 318 :173-177
- 2) Innovation of hyaluronic acid-protamine microparticles and their kinetics in vivo. S. Harada, S. Ehara, T. Segawa, K. Ishii, T. Sato, T. Kamiya, K. Sera, S. Goto. International Journal of PIXE 2016; 26: 45-51

Micronization of hyaluronic-protamine particles by encapsulation into lipid capsules

S. Harada¹, T. Segawa¹, S. Ehara¹, K. Sera² and S. Goto³

¹Department of Radiology, School of Medicine, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

²Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

³Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

Abstract

Purpose: Micronization of Hyaluronic acid-Protamine particles were tested by encapsulating them into lipid capsules, aiming to reduce their trapping to lungs, kidneys, brain, and spleen in order to increase their delivery to tumors to be treated.

Materials & Methods: 1.6 mg protamine and 1.28 mg hyaluronic acid were added to 2.0 ml of 1mg/ml solution of carboplatin (Pt containing anticancer drugs), then reacted for 30 min in room temperature. The particles were generated by electrostatistical reaction between protamine and hyaluronic acid. 1.0 ml -solution of these particles was mixed in the ample of coatsome 01-EL-1 (Nichiyu corporation) and placed for 15 min. Finally, encapsulated particles were centrifuged for 1500 rpm for 20 min, and resuspended in 1.0 ml of distilled water. In this way, we got the solution of encapsulated particles.

The solution was injected intravenously through tail vein of C3He/N mice, associated with MM46 tumors in their left hind leg. Injected particles were allowed to circulate in mice for six hours, then their lungs, kidneys, brain, spleen, and tumors were excised. These tissues were digested by heated nitrogen-acid and dropped onto the Mylar-film and dried in room temperature, then used as targets for PIXE study. The trapped particles into lungs, kidneys, brain, spleen, and tumors were assessed in the contamination of Pt, which was contained in carboplatin in particles.

Results: By encapsulating hyaluronic acid-protamine particles into lipid capsules, the average size of particles was significantly reduced, which was 574 ± 23 nm. The downsizing of particles resulted in decreased trapping of particles into lungs, kidneys, brain, spleen, and increased delivery of those in tumors.

Conclusion: The downsizing of particles by encapsulating hyaluronic acid-protamine particles into lipid capsules will lead to better delivery of particles under the intravenous injection to body.