

パーティクル化したヒアルロン酸-プロタミンパーティクルの静脈注射時の 体内動態と、放射線による薬剤標的療法

原田 聡¹、瀬川 昂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岩手医大サイクロトンセンター
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、放射線に反応して抗癌剤を放出するパーティクル（以下、放射線感受性パーティクルと表記）を作成し、放射線照射部位に抗癌剤を標的化する事を研究して来た。すなわち、1) 放射線感受性パーティクルを腫瘍表面に配置、2) 配置された放射線感受性パーティクルと腫瘍への放射線照射、および放射線照射によるパーティクルからの抗癌剤放出、3) 放出された抗癌剤と放射線との相乗効果による抗腫瘍効果増強、4) パーティクルによる抗癌剤限局化作用による抗癌剤副作用軽減の4点である^{1,2}。

現在まで我々は、放射線感受性パーティクルをマウス左下腿に移植した腫瘍表面に皮下注射後、腫瘍に放射線を照射することにより、抗癌剤を腫瘍表面に放出させてきた。しかし、本方法では体表表面の腫瘍にできた腫瘍にしか適応が無く、肺、肝臓、脳等の深部臓器に対しては適応できない欠点があった^{1,2}。

一方、腫瘍血管は血管の構造が粗雑で、血管内皮管の隙間が大きく、nanoparticleを透過しやすい性質があることが知られている。したがって、放射線感受性パーティクルを微細化すれば、粗雑な腫瘍血管から放射線感受性パーティクルが漏れ出し、腫瘍に集積することが考えられる³。

今回、われわれは、Coatsome-EL-010 に封入したヒアルロン酸-プロタミンパーティクルを使用した放射線感受性パーティクルをナノメートルのオーダーまで微細化し⁴、静脈注射後、腫瘍にパーティクルを集積させた後、放射線を照射し、抗癌剤を放出させた。これにより、放射線と抗癌剤の相乗効果による抗腫瘍効果増強と、抗癌剤限局作用による副作用軽減を試みたので報告する。

2. 材料と方法

2.1 ヒアルロン酸-プロタミンパーティクル生成

2.0 mg プロタミン、1.6 mg ヒアルロン酸を 0.1 mmol/l Tris buffer 10 ml に溶解し、0.5 $\mu\text{mol/l}$ の 1 mg carboplatin (Pt 含有抗がん剤) を添加、室温にて 30 分間静置することでパーティクルを生成した。作成した particle 1 ml を Coatsome-EL-010 (日油) 1 バイアル中に注入し、用手的に数回浸透後、室温にて 15 分間静置し、Lipid 内に封入した。

2.2 担癌マウス作成

C3He/N マウス (6 週令♂) の左下腿に、乳がん細胞 (MM48) 百万個を移植し、径 8 mm 大になった時点で実験に使用した。

2.3 パーティクル尾静脈注入後の腫瘍、肺、脳、肝臓、腎臓への捕捉

2.1 で作成したパーティクル 1×10^{10} 個をマウス尾静脈から注射した。尾静脈注射 9 時間後に、腫瘍、肺、脳、肝臓、腎臓を剖出、パーティクルのカルボプラチンに含まれた Pt を PIXE 法で定量する事により、パーティクル尾静脈注入後の腫瘍、肺、脳、肝臓、腎臓への捕捉を観測した。

2.4 放射線照射

上記 2.3 の実験と並行し、担癌マウスに、パーティクル 1×10^{10} 個を尾静脈より注入した 9 時間後、140 keV 軟 X 線を 0.301 Gy / 1 min の線量率で、左下腿に対して、10 あるいは 20 Gy を照射した。

2.5 PIXE 用ターゲット調製

放射線照射後、直ちに腫瘍組織を剖出、 -20°C で冷凍保存した。冷凍保存 5 日以内に腫瘍を秤量、細切後、試料を 1) 捕捉されたパーティクル測定用と、2) 放出されたカルボプラチン測定用の 2 つに分割し、以下の 2 つの手技により、1) 捕捉されたパーティクルと、2) 放出されたカルボプラチン測定用のターゲットを作成した。

1) 捕捉されたパーティクル測定：細切された腫瘍を硝酸灰化法で消化、液状とした後、腫瘍 1 mg に対し 1000 μg を混入し、マイラー膜上に滴下、室温で乾燥後ターゲットとした。

2) 放出されたカルボプラチン測定：細切された腫瘍を 0.8 μm のフィルター濾過を施行、ろ液に関し、In を腫瘍 1 mg に対し 1000 μg を混入し、マイラー膜上に滴下、室温で乾燥後ターゲットとした。

2.6 PIXE 分析

PIXE 分析は、岩手医科大学サイクロトロンセンター/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にて施行した。ターゲットを 2.9 MeV プロトンビームで照射、発生した特性 X 線を Si-Li 検出器で検出後、マルチチャンネルアナライザーで分析した。定量は、内部標準として添加した In の含有量を基に、定量解析用ソフトウェア“SAPIX”を用いて定量した。

2.7 抗腫瘍効果、副作用

上記 PIXE 実験と並行して、上記パーティクル、および放射線処置後のマウス左下腿の腫瘍径を毎日計測することで、抗腫瘍効果を評価した。治療による副作用は、処置開始より 3 週間後のマウス腎臓を採取し、その重量減少により評価した。

2.8 統計計算

統計計算は ANOVA (analysis of variance) を用い、 $P < 0.05$ をもって、有意差ありと判定した。

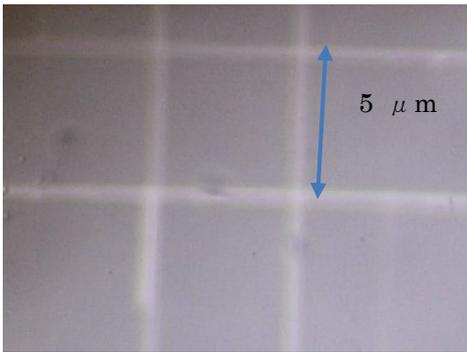


図-1 精製されたパーティクル。
血球計算版上 400倍

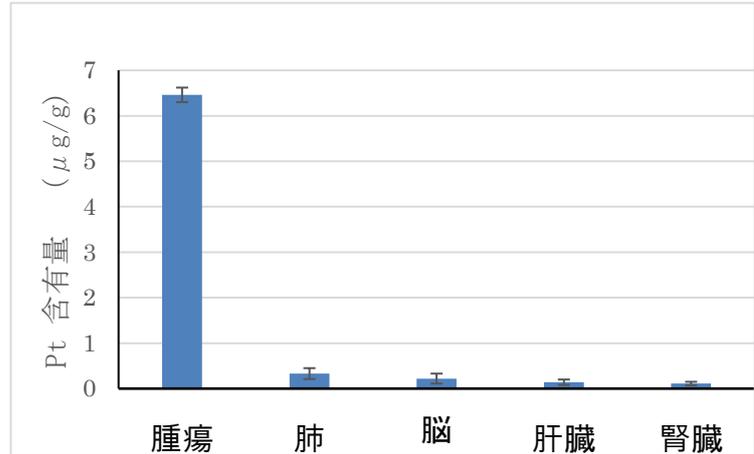


図-2 捕捉されたパーティクル中の Pt 量

3. 結果

3.1 Particle の形態

照射前の形態を図-1 に示す。生成された Particle の直径は 643 ± 34 nm であった。

3.2 捕捉された Nanoparticle

腫瘍、パーティクル尾静脈脈注入 9 時間後における腫瘍、肺、脳、肝臓、腎に捕捉されたパーティクルを、パーティクル中のカルボプラチンに含まれる Pt 量で示す (図-2)。最も高い Pt 含有量が観測されたのは腫瘍であり、その値は 6.46 ± 0.16 μg/g であった。肺、脳、肝臓、腎に検出された Pt 量は、腫瘍の Pt 量よりも有意に低く、 $0.11 \sim 0.33$ μg/g の含有量であった。

3.3 放出された carboplatin

腫瘍に集積したパーティクルに対して、放射線 10 Gy、または 20 Gy を照射し、放射線照射によって放出されたカルボプラチン量をカルボプラチンの中に含まれる Pt 量で表した (図-3)。

10 Gy、および 20 Gy の放射線照射により、パーティクルはカルボプラチンを放出。放出量は 10 Gy で 3.22 ± 0.36 μg/g、20 Gy で 4.66 ± 0.33 μg/g であり、20 Gy 放射線照射により放出されたカルボプラチンは、10 Gy 放射線照射により放出されたカルボプラチンよりも有意に高い値を示した。また、放出されたカルボプラチン量が、抗腫瘍効果を示す最小量 3 μg/g よりも、いずれの放射線照射線量においても高い値であるため、放出されたカルボプラチンによる抗腫瘍効果が期待された。

一方、放出されなかったカルボプラチンは、10 Gy で 2.43 ± 0.32 μg/g、20 Gy で 2.12 ± 0.34 μg/g で、20 Gy 照射時で若干低い値を呈していたが、これは 20 Gy でより多くのカルボプラチンが放出されたためと考えられた。

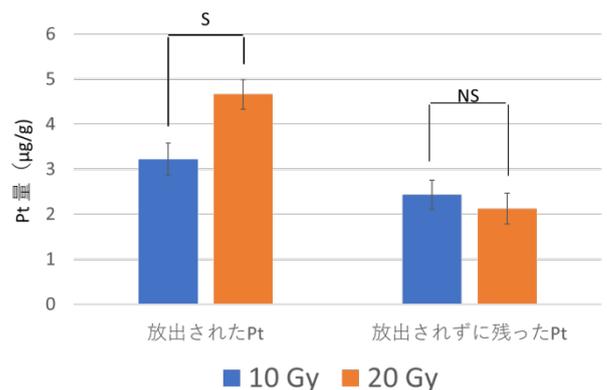


図-3：放出されたカルボプラチン量 (Pt) 量
S: 有意差あり、NS: 有意差無し

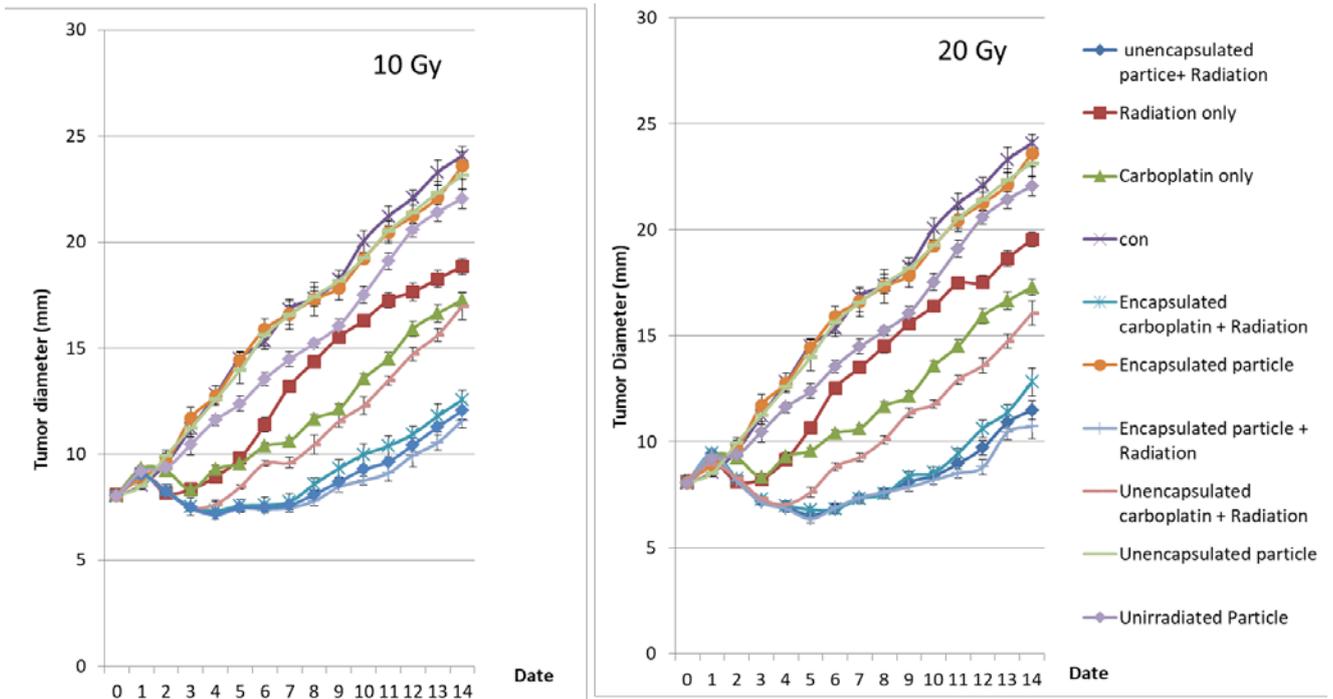


図-4 抗腫瘍効果：抗腫瘍効果の強さを腫瘍径の経日的変化で示す。

3.4 抗腫瘍効果

マウス処置後の腫瘍径の経時的変化を図-4に示す。抗腫瘍効果が強かったのは、Coatsome EL-010に封入したカルボプラチン(×)、ヒアルロン酸-プロタミンパーティクル化したカルボプラチン(◆)、Coatsome EL-010に封入したカヒアルロン酸-プロタミンパーティクル(+)¹の3種類であった。最も抗腫瘍効果が強かったのは、Coatsome EL-010に封入したカヒアルロン酸-プロタミンパーティクル (+)であったが、上記3種類の治療間に明らかな有意差は見られなかった。

3.5 副作用軽減作用：

抗腫瘍効果で強い抗腫瘍効果を示した Coatsome EL-010に封入したカルボプラチン、ヒアルロン酸-プロタミンパーティクル化したカルボプラチン、Coatsome EL-010に封入したカヒアルロン酸-プロタミンパーティクルの3種類間の副作用の強さを腎重量の減少で表した(図-5)。

Coatsome EL-010に封入したカルボプラチン、ヒアルロン酸-プロタミンパーティクル化したカルボプラチンの2種類の治療では、腎重量が有意に減少し、副作用の強さが観測されたが、Coatsome EL-010に封入したカヒアルロン酸-プロタミンパーティクルでは、有意な腎重量の現象は見られず、Coatsome EL-010に封入したカヒアルロン酸-プロタミンパーティクルによる副作用軽減が観測された。

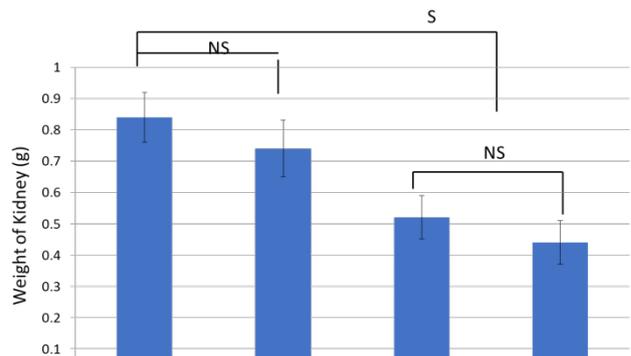


図-5 副作用軽減：副作用の強さを腎重量の減少にて観測。S: 有意差あり NS: 有意差無し

4. 考察

高齢化社会の到来とともに、癌患者も高齢化し、患者が副作用の強い治療に耐えられないケースが増加している。今後の癌治療の課題として、抗癌作用を増強するとともに、副作用を軽減する治療法が必要と思われる。我々は、この課題を解決するため、放射線照射により抗癌剤を放出するパーティクルを研究して来た。すなわち、1) 放射線照射に反応してパーティクルから放出された抗癌剤と、放射線の相乗効果による抗癌作用増強、2) パーティクルの抗癌剤限局化作用による抗癌剤副作用軽減、の2点である。本治療法を実現するパーティクルとして、Lipid 封入したヒアルロン酸とプロタミンパーティクルが考えられた。ヒアルロン酸はプロタミンと抗癌剤溶液中で静電的に抗癌剤を取り込みながら結合し、Particle を生成、放射線照射によりヒアルロン酸がアセチルグルコサミンに分解することで、放射線により取り込んだ抗癌剤を放出、さらに Particle 周囲の Lipid が抗癌剤を徐放することで、抗癌剤の副作用を軽減するというものである。また、Lipid 封入したヒアルロン酸-プロタミンの直径がナノメートルのオーダーであり、静脈注射後、腫瘍血管の粗雑な内皮から漏れ出す可能性があることから、パーティクルの静脈注射後の腫瘍集積に関しても興味を持たれた。

パーティクル静脈注射後、パーティクルの腫瘍への集積が認められた(図-2)。これは、腫瘍血管内皮構造が粗雑なため、パーティクルが腫瘍組織周囲に漏出したためと考えられた。集積したパーティクルによる腫瘍 Pt (カルボプラチン) 含有量は $6.46 \pm 0.16 \mu\text{g/g}$ であり(図-2)、放射線照射に反応して放出された Pt は 10 Gy で $3.22 \pm 0.36 \mu\text{g/g}$ 、20 Gy で $4.66 \pm 0.33 \mu\text{g/g}$ であった(図-3)。カルボプラチンが抗腫瘍効果を発揮する $3 \mu\text{g/g}$ よりも高い値を示したため、抗腫瘍効果を腫瘍径計測により測定したところ、Coatsome EL-010 に封入したカルボプラチン(図-4 ×)、ヒアルロン酸-プロタミンパーティクル化したカルボプラチン(図-4 ◆)、Coatsome EL-010 に封入したカヒアルロン酸-プロタミンパーティクル(図-4 +)の3種類であり、これら間に有意さは見られなかったが、Coatsome EL-010 に封入したカルボプラチン、ヒアルロン酸-プロタミンパーティクル化したカルボプラチンでは、腎重量が有意に低下し、副作用が認められたのに対し、Coatsome EL-010 に封入したカヒアルロン酸-プロタミンパーティクルでは腎重量の有意な低下は見られず、明らかな副作用は見られなかった。これは、Coatsome EL-010 から、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カルボプラチンが徐々に放出されたことによる変化と考えられ、本研究が目的としていた、抗腫瘍効果増強と副作用軽減が達成されたものと考えられた。

参考文献

- 1) S. Harada, S. Ehara et.al. Biomedicine & Pharmacotherapy 70 (2015) 196.
- 2) S. Harada, S. Ehara et.al. IJ PIXE 24, Nos. 3 & 4 (2014) 137.
- 3) Xiaoyang Xu, William Ho, et. al. Trends in Molecular Medicine, 21 (2015) 223
- 4) T. Segawa, S. Harada, IJ PIXE IN PRESS.

Kinetics of hyaluronic acid-protamine nanoparticles under intravenous injection, and targeted delivery of anti-cancer drug directed by radiation

Satoshi Harada¹, Takashi Segawa¹, Shigeru Ehara¹, Koichiro Sera² and Shoko 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

The particles consisted from hyaluronic acid (HA) and Protamine (P), which release carboplatin with response to radiation, were generated and encapsulated into Coatsome EL-010. And their ability to targeted delivery to tumors, to increase antitumor effect and to reduce adverse effect was tested IN VIVO in C3He/N mice.

Hyaluronic acid and Protamine were mixed into the solution, containing carboplatin, and placed in room temperature for 30 minutes. Finally, solution of the generated particles was injected into vial bottle of Coatsome EL-010, and placed in room temperature for 30 min. In this way, particles for tumor treatment were generated. Those particles were intravenously injected through tail vein of C3He/N mice with MM 48 tumor in the left hind leg. The kinetics of particles were evaluated basing on the Pt contamination in tumors, liver, brain, lungs, and spleen, which was measured by PIXE. Nine hours after injection, single doses of 10 or 20 Gy 140 KeV soft X-rays was given to the tumors. The release of carboplatin was measured by means of Pt contamination, using PIXE. The antitumor effect was tested by measuring tumor diameter, and strength of adverse effect was tested by alteration of weight of kidneys.

The particles were accumulated to the tumor on nine hours after injection. The particles released carboplatin with response to irradiation. The released carboplatin gradually passed through membrane of coatsome EL 010 and reached to tumor, which increased antitumor, synergistically with radiaton. The localization of carboplatin by particles with coatsome EL-010 decreased adverse effect. Our encapsulated particles led to increased anti-tumor effect and decreased adverse effect.