

令和元年6月24日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10344

研究課題名(和文) 肝動脈化学塞栓療法における抗癌剤担体ナノ粒子の磁力による集積方法に関する研究

研究課題名(英文) Research on accumulation method of anticancer nanoparticles by magnetic force in hepatic arterial chemoembolization

研究代表者

南 哲弥 (MINAMI, Tetsuya)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：60436813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：抗癌剤の担体であるドラッグデリバリーシステム(DDS)としてナノ粒子が使用されている。磁性を持つナノ粒子を磁力を用いて誘導することにより、効率的に腫瘍への抗癌剤の集積を高めることで治療成績を向上させる実験を行い検証した。インビトロ実験ではチューブに磁石を近接させて行った場合、セミウェッジ状態で注入することが有効であると示された。インビボ実験ではウサギ腫瘍モデルにおいて組織学的な鉄の沈着に差異を生じさせることが可能であった。磁場を用いたDDS注入においては薬剤集積のコントロールにカテーテルを用いた選択的血管造影を組み合わせることでより効率的に薬剤を分布させることが可能となると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌は従来より経動脈的塞栓術が有効な治療とされてきた。1987年の本邦からの報告以来、リピオドールの併用、抗癌剤の併用により治療成績の向上が得られている。近年抗癌剤担体としてのナノ粒子が注目を集めているが、本研究では磁性体ナノ粒子と磁石を用いて、腫瘍血管へより効率的に薬剤を分布させることによりさらに治療成績を向上させることが可能となり、正常組織へのダメージを減じることができる可能性を検証した。

研究成果の概要(英文)：Nano-particles are used as a drug delivery system (DDS) which is a carrier of an anticancer agent. This experiments were conducted to improve treatment results with enhancement of the accumulation of an effective anticancer agent in a tumor by inducing magnetized nanoparticles with magnetic force. In in-vitro experiments, it was found that injection in a semi-wedge state was effective when the magnet was placed close to the tube. The in-vivo experiments used a rabbit tumor model, and differences in iron deposition histologically occurred. Control of drug accumulation combined with selective angiography using a catheter for DDS injection using a magnetic field enables efficient drug distribution.

研究分野：放射線医学

キーワード：肝動脈塞栓術

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

従来より、我々は肝実質ならびに肝細胞癌の血行動態について種々の研究を行っており、肝動脈塞栓術についても技術的な側面から治療成績を向上させてきた。我々は動物実験においてナノメートル単位の担体(ナノ粒子)をドラッグデリバリーシステム(DDS)として使用しており、それらの知見を臨床に応用させることで、日常臨床の肝動脈化学塞栓術において腫瘍組織への抗癌剤の高度集積がある程度得られている。しかしながら、ナノ粒子をより選択的、効率的に腫瘍へ誘導する方法の開発がより治療成績を向上させ、抗癌剤の副作用を低減させると考えている。

本研究ではナノ粒子を物理的エネルギーによって標的部位へと誘導させることでさらに効果的な治療を行うことを目標とし、常磁性体ナノコロイド粒子を強力な磁場を用いて粒子誘導する事により非侵襲的に集積をコントロールし、より効率的なDDSを構築することが望ましい。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は血管造影用カテーテルを用いた経皮経動脈的ドラッグデリバリー手技の際に常磁性体ナノコロイド粒子を担体として用いることで従来の手技よりも選択的、効率的なDDSを構築することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) in-vitro

Y型に分岐する内径5mmのポリエチレンチューブの根元を水流ポンプと接続した水流モデルを作成。Y型分岐部にネオジム磁石を配置し、Y型チューブの根元からカテーテル(2.2Fr Progreat 3, Terumo, Tokyo)を挿入しそのカテーテルから大きさの異なる鉄粒子を注入した。ネオジム磁石の形状、配置方法と流す鉄粒子(<100、100-300、>300 $\mu$ mと磁性ナノ粒子(フェルカルボトラン(Rezovist, Fujifilm RI pharma, Tokyo) <100nm))を評価した。

#### (2) in-vivoでの観察、ラット

以下に示す動物を用いた全ての実験は本学動物実験規定に基づき、また、本学動物実験委員会に承認を得て、倫理的・愛護的に実施した。

対象としてオスのラット(Crlj:WI)を用いた。ラットは非担癌群(対照群)と下記の方法にて作成した担癌群とに分けた。担癌ラットは8週齢約300gより0.01% DEN(N-nitrosodiethylamine, Sigma-Aldrich, Sent Louis)溶水を3ヶ月間自由飲水させ、その後通常の飼育用水を3-4週間飲水させることで作成。腫瘍の発現にばらつきが生じないように飼育は1ケージ2匹とし、21週以降は動物用高精細エコー装置(Vevo770, Visualsonics, Tronto)で腫瘍の有無とサイズを観察した。腫瘍のサイズが5-10mmとなったところで評価に用いた。

実験は2-3%イソフルラン麻酔鎮静下ラットの左総頸動脈を20G穿刺針(SuperCath, Medikit, Tokyo)で穿刺し止血弁を設け動脈経路を確保。動物実験用に企業に特注依頼した1.7Fr 50cm長のマイクロカテーテル(Heal-ex Takumi, Technocrat, Nagoya)を挿入し、下行大動脈、腹腔動脈を経由し総肝動脈や固有肝動脈にアクセスした。総肝動脈、および固有肝動脈で、径の異なる鉄粒子やそれらを染料 Oil-Red-O を添加したヨード化ケシ油脂肪酸エステル(Lipiodol, Guerbet, Paris)と混和させエマルジョンやサスペンションとして動注し、肝両葉に配置したネオジム磁石の有無によって左右肝に粒子の集積が変化するかを評価した。担癌群では腫瘍内への鉄粒子の集積を Prussian Blue を用いた鉄染色や Oil-Red-O を漂白しないよう脂肪染色法を改変した特殊 Hematoxilin 染色を行い評価した。

#### (3) in-vivoでの観察、ウサギ

対象としてメスのイエウサギ (Slc:JW/CSK) を用いた。ウサギは癌細胞株として Shope papilloma 由来 SPV を接種させることで発生する扁平上皮癌 (VX2) 株を後肢大腿および肝臓内に移植し 3 週間経過させ腫瘍をゴルフボール大から鶏卵大に成長させた。

実験はケタミン 25mg/kg とメドトミジン 0.5mg/kg を混合させたものを筋注し麻酔鎮静させ行った。右鼠径部を切開し 3Fr シース (Supersheath, Medikit) を右大腿動脈に設置。その経路から 3F カテーテル (STA 西矢, Medikit, Tokyo) を用いて腹部大動脈、腹腔動脈を經由して固有肝動脈にアクセスした。固有肝動脈から肝右葉にかけてカスタムメイドしたネオジム磁石を血管の走行に沿わせて配置し、固有肝動脈にカテーテルの先端を置いた状態で、実験用 0.38T MRI 装置内に移動させウサギを安置させたその状態でカテーテルから鉄ナノ粒子フェルカルボトランを動注し、その動注前後で T2\*強調画像を撮像、MATLAB を用いて作成したソースコードにより T2\* map 画像を作成し、肝および腫瘍の信号強度を定量的に測定した。MRI の撮像および T2\*map の作成には金沢大学保健学域量子医療技術講座に協力を仰ぎ実施した。

#### 4 . 研究成果

In vitro 水流モデルを用いた実験では、鉄粒子が 100 $\mu$ m 未満の径やナノ粒子では水流によって流れることが確認された。100–300 $\mu$ m の群では水流の流速にもよるがチューブの軽度の蛇行部で容易にスタックした。300 $\mu$ m 以上の径ではカテーテル内でスタックしチューブに流すことも不可能であった。

ネオジム磁石を Y 字分岐部に配置し目的の方向への粒子誘導を測ったが、流速が高い場合は磁石による方向修正が難しく目的方向への粒子誘導は困難であった。ポンプを用いず、手圧で粒子を注入することで目的側への粒子誘導を達成した。このことから in vivo 環境においてはカテーテルをできるだけ目的血管に挿入、正常血流のほとんどを遮断させた状態、いわゆるセミウェッジとすることで粒子誘導が可能となると考えられた。<100 $\mu$ m 粒子とナノ鉄粒子では、<100 $\mu$ m 粒子がチューブ内で磁石に高度に引き寄せられ壁に沿って配列してしまうのに対し、ナノ鉄粒子では目的方向の反対側にも多少流れてはしまうもののそういった挙動を見せず、生体内での安定したドラッグデリバリーはナノ鉄粒子がより優れると推察された。

ラットを用いたモデルでは自家発癌に成功し、全数で肝多血性悪性腫瘍の導入が可能であった。カテーテル操作による肝動脈へのアクセス (総肝動脈、固有肝動脈、左右肝動脈) は健常群では 100、85、60%と比較的安定したが、肝動脈が細径であることや spasm を起こしやすいことから末梢に向かうにつれて手技の難度が増した。また、担癌群では動脈径の拡張を認めるものの、動脈の蛇行や分岐形状の複雑性から末梢到達性の難度は増加した。ラット担癌モデルではカテーテル 1.6Fr~1.7Fr のサイズ固有肝動脈でのセミウェッジ状態が得られた。そこからゆっくり薬剤を注入し、透視上や DSA 上で薬剤が両葉に分布していく様子を確認した。病理標本上では小葉間動脈や小葉間静脈といったグリソン鞘の細血管内や類洞にも Oil-Red-O の染料が分布していた他、腫瘍内にも多数の染料の集積を認めた。両葉においては明らかな集積の差異を認めず、リピオドールは担体としての注入が容易であったが、両葉に分け入れることが困難になると考えられた。

ウサギを用いた実験では、血管径がラットと比較しより大径となったため、カテーテルを用いた末梢到達性は向上した (100、92、72%)。フェルカルボトラン単体も X 線非透過性ではあるが、視認性確保のためにヨード造影剤と混和させ注入した。カスタムメイドした微小円筒状ネオジム磁石も肝動脈に沿って配置可能で注入操作も容易 (図 1) であった。

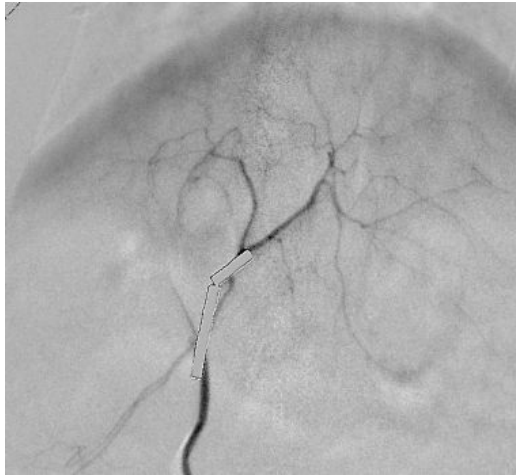


図 1-1 磁石設置状態での血管造影像



1-2 セミウェッジ状態での注入の結果造影像

透視上での入れ分けを確認し、T2\*強調画像(図2)での信号低下を確認した。T2\*map画像(図3)を作成し鉄濃度の定量的な測定を目指したが、作成画像では各種アーチファクトや画像のゆがみが多く、解釈困難な数値も算出され、今後の課題と思われた。標本上で鉄染色を行い、対象側により高度の鉄沈着を確認した。

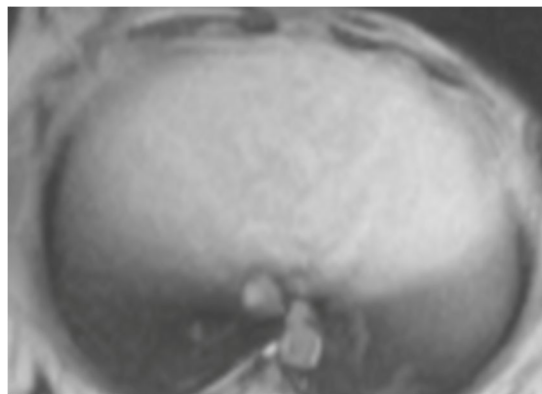
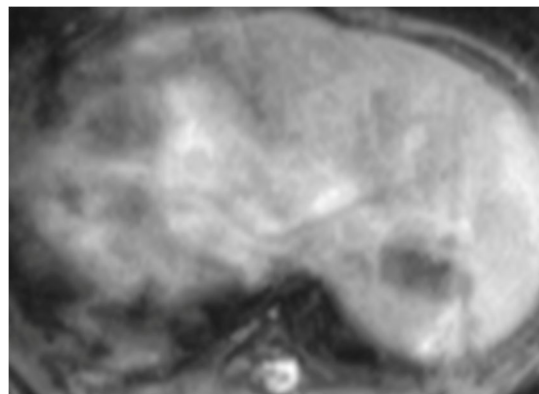


図 2 T2\* 強調画像

2-1 control



2-2 右肝動脈からの注入

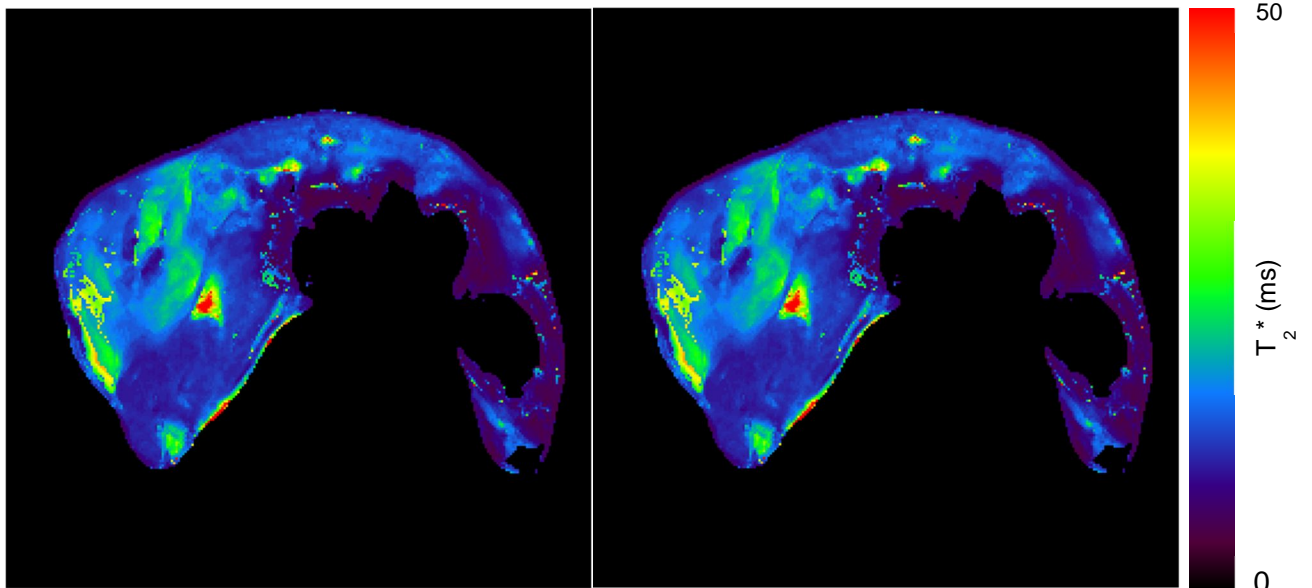


図3 T2\*map 画像 (左 Pre、右 Post)

特に腫瘍での集積が目立ち、血洞への薬剤の pooling が示唆された。

従来報告されている高磁場を用いた DDS 環境での薬剤集積のコントロールにカテーテルを用いた選択的血管造影技術を組み合わせることでより選択的、効率的に薬剤を分布させることが可能となることが示唆された。薬剤分布の向上は治療成績の向上や副作用軽減につながるため、今後ますますの期待がかかる。また、各種 in vivo モデル、粒子径の異なる DDS 担体、複数の評価方法を用いてその分布を評価できたことは今後の in vivo 実験系の発展にも寄与しうると考える。

傾斜磁場をかけることができるようなより高磁場な環境設備、均一な実験モデル、定量的な評価方法の確立が今後の課題と思われる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：蒲田 敏文

ローマ字氏名：(GABATA, toshifumi)

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：教授

研究者番号(8桁)：00169806

研究分担者氏名：小林 聡

ローマ字氏名：(KOBAYASHI, satoshi)

所属研究機関名：金沢大学

部局名：保健学系

職名：教授

研究者番号(8桁)：30313638

研究分担者氏名：香田 渉

ローマ字氏名：(KODA, wataru)

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30401920

研究分担者氏名：吉田 耕太郎

ローマ字氏名：(YOSHIDA, kotaro)

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：助教

研究者番号(8桁)：30645130

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。