

[H27-3]

カプセル化したヒアルロン酸—プロタミンパーティクルの体内動態 Kinetics of Encapsulated Hyaluronic acid- Protamine Particle after intravenous injection

原田聡^{#A)}, 瀬川昂^{A)}, 佐藤隆博^{B)}

Satoshi Harada^{#A)}, Takashi Segawa^{A)}, Takahiro Satoh^{B)}

^{A)}Iwate Medical University, School of Medicine, Department of Radiology.

^{B)} Takasaki Advanced Radiation Research Institute, National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

Abstract

Encapsulated hyaluronic acid-protamine nanoparticles were prepared, and their kinetics was analyzed after intravenous administration IN VIVO in C3He mice inoculated with MM48 tumor in their left hind leg.

These nanoparticles were prepared by mixing 1 ml of a solution of 3.2 mg/ml-hyaluronic acid and 4.0 mg/ml-protamine with 2 ml of a solution of carboplatin (1 mg/ml). The reaction was allowed to proceed at room temperature for 30 min. Two milliliters of generated nanoparticles of hyaluronic acid-protamine, containing carboplatin, were poured into Coatsome-EL-010, and incubated in room temperature for 30 min and then used for experiments. In total, 1×10^{10} nanoparticles were administered intravenously. After 1, 3, 6, 8, 12, and 24 h, the tumor, lung, brain, liver, and spleen were excised and routinely processed to targets of micro PIXE camera. The trapped nanoparticles were imaged on the basis of Pt distribution, using the micro PIXE camera. The kinetics of trapped nanoparticles in the tumor, lung, brain, liver, and spleen were assessed on the basis of a mean number of nanoparticles in 10 views of micro-PIXE camera within a $12 \times 12 \mu\text{m}^2$ scanned area.

The mean diameter of encapsulated hyaluronic acid-protamine nanoparticles was 743.2 ± 21.4 nm. Upon intravenous administration of the encapsulated nanoparticles, they were preferentially delivered to tumors. Maximum delivery (4.6 ± 0.3) was observed in the tumors 6 h post-injection, which was significantly greater than that in the lung, brain, liver, and spleen. Preferential delivery of encapsulated hyaluronic acid-protamine nanoparticles is expected to target the delivery of carboplatin to tumors.

Keyword: Drug delivery system, micro PIXE camera, Protamine, Hyaluronic acid

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 Particle (以下、放射線感受性パーティクルと記す) を研究し、放射線による抗癌剤標的療法を研究して来た。すなわち、1) 放射線感受性パーティクルを腫瘍周囲に配置、2) パーティクルへの放射線照射と、それに反応した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薬剤限局化作用による抗癌剤副作用軽減、の 4 点である。

パーティクルの腫瘍周囲への配置に関しては、腫瘍周囲の皮下組織に直接注入してきたが、本法では皮膚癌等の体表表面の癌種しか治療対象とはならない欠点が存在する。この欠点の解決法として、パーティクルを静脈より注入し、肺、肝臓、腎臓等の深部臓器にできた腫瘍周囲に配置するのが考えられる。

ヒアルロン酸は抗癌剤溶液中でマイナスに帯電し、同溶液中でプラスに帯電したプロタミンと、静電的に抗癌剤を取り込みながら微細なパーティクルを形成する。本パーティクルに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事で、放射線に反応して抗癌剤を放出する事が知られている。一方、Coatsome-EL-010 (日油) はこれらパーティクルを取り込み、静脈注射可能なパーティクルを形成する事が知られている。

今回我々は、静脈注射下での放射線を使用し抗癌剤標的療法の第一段階として、静脈注射後の coatsome EL010 に封入したヒアルロン酸-プロタミンパーティクルの体内動態を、高崎量子応用研究所の micro PIXE camera を使用して検討した。

2. 材料と方法

2.1 パーティクル作成

プロタミン溶液 (4.0 mg/ml) 1ml とヒアルロン酸溶液 (3.2 mg/ml) 1ml をカルボプラチン溶液 (1mg/ml) 2 ml に静か添加し 40 分間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。同パーティクル溶液 2 ml を coatsome-EL010 (日油) に注入し、30 分静置することで、パーティクルを作成した。

2.2 実験動物への注入。

上記 2.1 で作成したパーティクル 1.0×10^{10} 個を、左下腿に MM48 腫瘍 (乳癌腫瘍) を移植したマウス (C3He/M 6 週令♂) の尾静脈より注入した。

2.3 micro PIXE camera のターゲット作成

パーティクルの静脈注入 1, 3, 6, 9, 12, 24 時間後にマウスを屠殺し、肺、脳、肝臓、脾臓、腫瘍を剖出、ドライアイスにて凍結させた後、ミクロトームを用いて $3 \mu\text{m}$ 厚に薄切した。薄切切片をターゲットホー

[H27-3]

ルダール上のマイラー膜上に静置し、真空乾燥 (1×10^{-3} Torr, 48 時間)後に micro PIXE camera のターゲットとした。

2.4 micro PIXE camera 画像の評価と体内動態測定

micro PIXE camera を使用して、抗癌剤カルボプラチンに含まれる Pt 分布を画像化することで、Particle を画像化した。Micro PIXE camera の視野を $12 \times 12 \mu\text{m}$ に設定し、マウス一匹からの肺、脳、肝臓、脾臓、腫瘍に関し、10 視野に関してパーティクル数を計測、1 視野中の平均パーティクル数を算出することで、上記組織に捕捉されたパーティクル数とした。この評価を 8 匹のマウスに関して繰り返し、平均値と標準誤差を算出した。

3. 結果

3.1 精製された Particle

精製されたパーティクルの光学顕微鏡写真と、micro PIXE camera 像を、それぞれ、Figure 1 A, B に示す。Particle の径は $743.2 \pm 21.4 \text{ nm}$ であり、micro PIXE 画像では中心部に Pt の hot spot が観察された。

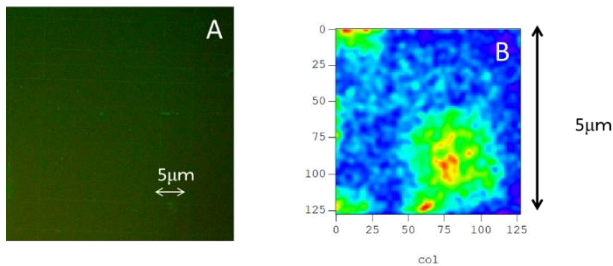


Figure 1. Generated Particles. A: Observed by optical microscope at 400 X magnification, B: Observed by micro PIXE camera.

3.2 静脈注射後の Particle の体内動態

Particle 静脈注射後の腫瘍、肺、脳、肝臓、脾臓に捕捉されたパーティクル数の経時的変化を Figure-2 に示す。捕捉数は、腫瘍、肺、脳、肝臓、脾臓の順に高く観測された。腫瘍と肺に関しては、捕捉数上昇のピークが静脈注射後 6 時間後に観測され、腫瘍では 4.6 ± 3.2 個、肺では 1.1 ± 0.1 個であった。脳、肝臓、脾臓に関しては、漸増傾向が認められ、その個数は 1 個以下とわずかであった。

4. 考察

腫瘍細胞の血管内皮は正常の血管内皮に比べ、内皮細胞と内皮細胞の間隔が広い事が知られており、パーティクルを静脈注射した時、パーティクルが腫瘍表面に優先的に分布する事が知られている[2]。我々の実験においても、静脈注射したパーティクルが、正常細胞よりも腫瘍細胞周囲に優先的に分配されることが証明された。

今後、腫瘍細胞表面に分配されたパーティクルに放射線を照射し、パーティクルから抗がん剤を放出させ、放射線と放出された抗癌剤との相乗作用によ

る抗腫瘍効果増強作用。パーティクルによる薬剤限局化作用による副作用軽減を検討するつもりである。

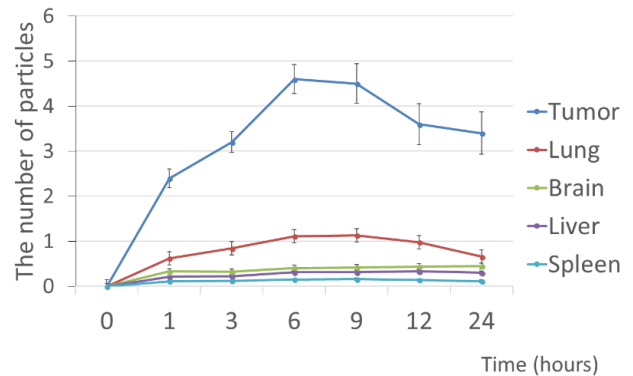


Figure 2. The number of trapped particles in tumors, lung, brain, liver, and spleen were plotted versus time (hours)

参考文献

- [1] S. Harada et. al. Biomed. & Pharmacother. 70: 196-205, 2015
- [2] Xiaoyang Xy, et. al. CellPress 21 (4): 223-232, 2015