原 著

リポソーム性強磁性体微粒子の作製と高周波磁場照射による加温

山口 哲 馬場 正博 鈴木 恵史*

久代 裕史* 福島 元彦* 村上 雅彦*

新井 一成* 小池 正*

持田製薬株式会社試薬研究所

昭和大学医学部外科学教室*

Preparation of Liposomal Ferromagnetic Particles and Application of High Frequency Magnetic Fields

Satoshi Yamaguchi, Masahiro Baba, Satoshi Suzuki*,

Hiroshi Kushiro*, Motohiko Fukushima*, Masahiko Murakami*,

Kazushige Arai*, Tadashi Koike*

Research Laboratory of Diagnostic Reagent, Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., 1-1-1 Kamiya, Kita-ku, Tokyo 115.

*Department of Surgery, Showa University School of Medicine, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142.

Abstract

Lipid- filmed magnetite particles associated with tumor-localizing hematoporphyrin (hematoporphyrin liposomal magnetite: HP-LM) were prepared by sonication of hematoporphyrindimethylester-associated liposome solution with ferromagnetic magnetite(Fe_3O_4) particles(ca. 150 Å). The HP-LM solution was fully suspended. HP-LM is expected to be small enough to get through the blood capillary and to have no immunogenicity. The HP-LM solution can be inductively heated by the magnetic hysteresis loss with the application of a high frequency magnetic field(HFMF). Temperature rises, with applications of HFMF(2MHz), of the HP-LM solution and the homogenized mouse liver tissue with addition of HP-LM showed linear increase with HP- LM concentrations. BALB/c mice implanted with Meth- A tumor were intravenously administrated with HP- LM and HP- free LM. Removed, at 24, 48 and 72 hours after administration, tumors and tissues(liver, kidneys, spleen and lungs) were applied with HFMF(2MHz), and temperature rises were measured. Tumor tissues of the mice administrated with LM's, especially with HP- LM, had some temperature rises, which suggested that LM's were distributed to tumor tissues. Liver and spleen, as well, of the mice administrated with LM's had high temperature rises, showing that LM's were highly uptaken by the reticuloendothelial system.

Key words:

リポソーム性マグネタイト	Liposomal magnetite
高周波磁場	High frequency magnetic field
強磁性体微粒子	Ferromagnetic particle
誘導加温	Inductive heating
ヘマトポルフィリン	Hematoporphyrin

1. はじめに

高周波磁場による誘導加温は皮下脂肪が加温されにくい利点があり、強磁性体と組み合わせれば磁気ヒステリシス損の効果により強磁性体を移植または注入した部分のみを加温することができる¹⁾。したがって深部加温に適しているが、局所的に温度が不均一になることは避けられない。磁性体塞栓法では、磁性体粒子を多糖類に懸濁して用いている。また、磁性体を細胞に取り込ませる試みもなされている²⁾。完全に懸濁し毛細血管を容易に通過でき免疫原性のない強磁性体粒子を作製して静脈投与し腫瘍部位に取り込ませることができれば、高周波磁場による誘導加温により腫瘍部位を容易に加温することができる³⁾。

最近、リポソームがドラッグキャリアーとして用いられ⁴⁻⁸⁾、またハイパーサーミアとの組み合わせも試みられている⁹⁾¹⁰⁾。リポソームは細胞膜の成分で構成され、免疫原性および毒性は存在しないと考えられている⁵⁾。四三酸化鉄(マグネタイト、 Fe_3O_4)微粒子をリポソームの脂質分子膜で覆ったものは加温媒体となり得る。また、そのようなリポソーム性マグネタイト(LM)には免疫原性は存在しないと考えられる。さらにリポソームには腫瘍親和性物質等の機能性分子を結合することが可能である。本研究では、腫瘍親和性物質であるヘマトポルフィリンを結合させたリポソームを作製し¹¹⁾¹²⁾、平均粒径 $150\text{\AA}$ のマグネタイト微粒子とともに超音波照射してマグネタイトをリポソーム膜で覆った粒径約 $250\text{\AA}$ のヘマトポルフィリンを結合させたLM(HP-LM)を作製した。こうして作製したHP-LMを高周波磁場を照射し、温度上昇の、照射時間依存とHP-LM濃度依存性を調べた。さらにヘマトポルフィリンを含まないLM(F-LM)をも作製し、HP-LMと併せて担癌マウスに静脈投与し、摘出した腫瘍ならびに主要臓器に高周波磁場を直接照射し温度上昇を測定して、HP-LMとF-LMの腫瘍ならびに臓器への分布を調べた。

2. 材料および方法

2. 1. ヘマトポルフィリンを含むリポソーム性マグネタイト(HP-LM)の作製

卵黄レシチン(和光)100mg、ヘマトポルフィリンジメチルエステル(Mid-century)9mgをクロロホルム-メタノール(9:1, v/v)200mlに溶解し、ロータリーエバポレーターを用いて窒素雰囲気下よく攪拌のち、 33°C でアスピレーターを用いて溶媒を吸引し、フラスコ内壁に脂質分子膜を形成させ、さらに30分間吸引を続けた。つぎに、真空ポンプ(10^{-3} Torr)を用いて3時間吸引し、溶媒を完全に除去した。フラスコを窒素で充填し、蒸留水10mlを加えてリポソーム膜を懸濁させた。超音波照射用のセルに全量の懸濁液と粒径 $80-250\text{\AA}$ (平均粒径 $150\text{\AA}$)のマグネタイト微粒子(松本油脂製薬)50mgを入れ、窒素雰囲気下、 4°C で超音波照射器(大岳製作所5202PZT)を用いて超音波(周波数20KHz, 出力120-140W)を40秒毎にon-offして1時間照射した。照射後の溶液を磁石上に保持し、LMを形成しなかったマグネタイト粒子を沈殿させ取り除いた。さらに、 $0.22\mu\text{m}$ のミリポアフィルターを用いて濾過滅菌精製した。以上の操作を繰り返しておこない試料を作製した。

ヘマトポルフィリンを含まないリポソーム性マグネタイト(F-LM)も同様の方法で作製した。

2. 2. 高周波磁場照射と温度上昇測定

高周波磁場の発生は周波数2MHz, 出力1kWの高周波誘導加熱装置(日本高周波RWN-1)に内径 18ϕ , 3ターンのワークコイルを装着しておこなった。高周波磁場による温度上昇測定は、検体を温度測定用セル(内径 9ϕ の真空二重管)に入れ、高周波磁場照射の前後に銅-コンスタンタン熱電対を刺し起電力を測定しておこなった。

試料について、温度上昇の高周波磁場照射時間依存および濃度依存について調べた。また、ホモジネートしたマウス正常肝組織に試料を添加していき高周波磁場を照射した時の温度上昇を調べた。

2. 3. 動物実験

BALB/cマウスの腹腔中で継代している

Meth- A 細胞を遠心洗浄し、 10^6 個/0.1ml Saline を6週齢の BALB/c マウス(♂)の腋下部皮下に移植した。移植12日後に、マウス27匹を9群に分け、0.25mlずつ、生理食塩水(3群)、9% F-LM (3群)、10% HP-LM (3群)を尾静脈投与した。投与24, 48, 72時間後に各群3匹のマウスを脱血屠殺し、高周波磁場を照射して温度上昇を測定した。

3. 結果

3. 1. *in vitro* 実験

作製した HP-LM の模式図を Fig.1 に示した。直径約150 Å のマグネタイトの中心核がホスファチジルコリンとヘマトポルフィリンジメチルエステルとから成るリポソーム膜で覆われた構造である。

Fig. 1 Model of a lipid-filmed magnetite particle. The magnetite core is coated with a liposomal membrane which consists of phosphatidylcholine and hematoporphyrin-dimethylester(HP-LM).

HP-LM の1%溶液0.6mlに高周波磁場を照射した時の、照射時間による温度上昇の変化を Fig. 2 に示した。照射時間を一定以上とすると上昇温度が飽和してくる傾向にあった。HP-LM の0.25, 0.5, 0.75, 1%溶液0.6mlに高周波磁場を10分間照射した時の HP-LM 濃度と温度上昇の関係を Fig.3 に示した。HP-LM の濃度に比例して高い温度上昇を示した。

Fig. 2 Temperature rise, by a high frequency magnetic field(2MHz, 1kW), of 0.6ml solution of 10% HP-LM/saline 10- times diluted with distilled water. The abscissa is the application period of a magnetic field. The room temperature is 20°C.

Fig. 3 Temperature rise, by a high frequency magnetic field(2MHz, 1kW, 10min), of 0.6ml solution of 10% HP-LM/saline diluted with distilled water. The room temperature is 20°C.

ホモジネートした正常マウスの肝組織に HP-LM を添加していき、高周波磁場を照射した時の HP-LM 濃度と温度上昇の関係を Fig.4 に示した。HP-LM の添加量に比例して高い温度上昇を示した。

3. 2. *in vivo* 実験

試料をマウスに投与し摘出した腫瘍および臓器に高周波磁場を照射した時の温度上昇を Fig.5 に示した。腫瘍では LM 投与マウス群がコントロール群に比べて (特に HP-LM 投与群で) 温度上昇が高い傾向を示した。

Fig. 4 Temperature rise, by a high frequency magnetic field (2MHz, 1kW), of 555mg homogenized liver tissue with addition of 10% HP-LM/saline. ○ : 10minutes application of a high frequency magnetic field, □ : 5minutes application. The abscissa is the ratio in weight of HP-LM to liver tissue. The room temperature is 20°C.

Fig. 5 Temperature rise, by a high frequency magnetic field(2MHz, 1kW, 5min), of tumors, livers, kidneys, spleens and lungs of mice killed at 24, 48 and 72hours after the administrations of physiological saline(C), F-LM(F) and HP-LM(H). The room temperature is 25°C.

4. 考 察

マグネタイト微粒子は約150Åという粒径を考えると単磁区構造をとり小さな磁石になっている

と考えられる。裸のマグネタイト微粒子は若干個が集り互いに磁性を打ち消しあっている。当初、磁歪型超音波照射器を用いて LM の作製を試みたが、マグネタイト微粒子を懸濁させることはできなかった。一方向に磁気が揃って粒子が連なり合い懸濁できなかったものであろう。LM の作製は電歪型超音波照射器を用いて可能であった。

ドラッグキャリアーとして用いられているリポソームは、その安定性に問題があるが、LM のように固体の中心核を設けることにより安定化をはかることが出来るものと考えられた。直径約250 Å の LM は分子量約 4×10^6 の球状蛋白質に相当する。試料は0.22 μm のフィルターを通して用いているので、毛細血管を十分通過できるものが得られたと考えられる。リポソーム膜自身は免疫原性がなく無毒であり、また四三酸化鉄は化学的に安定で不活性な物質であって酸にも溶け難い。LM 試料の高周波磁場照射による温度上昇の照射時間依存 (Fig.2) で、照射時間が長くなるにつれて上昇温度が飽和してくる傾向にあることは、温度上昇した試料からの放熱量と加熱量とが平衡状態になってくるからであろう。これは血流による放熱を考える場合に関連し、放熱量と釣り合う LM の組織内分布密度および高周波磁場出力が存在するものと考えられる。LM 濃度と温度上昇との関係はほぼ比例関係にあり (Fig.3), LM を腫瘍に集積させればさせる程より高く加温することが出来ることを示している。

ホモジネートした肝組織に LM を添加していった時、高周波磁場による温度上昇は LM の密度と線形関係となる (Fig.4)。また、LM 無添加時 (Fig.4) や、コントロールマウス群の組織 (Fig.5) でも、高周波磁場照射により温度上昇がみられる。高周波磁場が2 MHz という周波数を考えると、組織中のイオン等が、電磁誘導により、誘導電流となって温度上昇に寄与しているものと考えられる。

Yoshida hepatoma を移植したラットにヘマトポルフィリンジメチルエステルを含有したリポソームを腹腔内投与した実験で腫瘍への集積が認め

られている¹³⁾。今回の LM 投与マウス群、特に HP-LM 投与マウス群の腫瘍でも、高周波磁場照射で温度上昇が高い傾向がみられ、LM の腫瘍への分布が示唆される。一方、LM 投与マウス群の肝臓や脾臓でも高周波磁場照射で高い温度上昇がみられたことは (Fig.5), LM がリポソームと同様網内系に高度に取り込まれることを示している⁴⁻⁶⁾¹³⁾。

LM を腫瘍に直接投与する注入法¹⁴⁾に用いることも考えられるが、この場合は強磁性体の単磁区構造をとる最大の径400-500 Å のものを用いる方が磁気ヒステリシス損の効果が大きくなり加温が容易になる。さらに、磁性体として導体の性質を併せ持つ粒子を用いれば、高周波磁場により磁気ヒステリシス損の効果だけでなく渦電流による発熱が有効となり、粒径が大きいものほど効果的であると考えられる。

謝 辞

マグネタイト微粒子の提供をいただいた松本油脂製薬の寺井俊夫氏に深く感謝致します。

文 献

- 1) 小林達也, 木田義久, 太田昌幸, 田中孝幸, 景山直樹, 小林弘明, 雨宮好文: 感温磁性体を用いた磁場誘導加温法による脳腫瘍の治療: 皮内移植脳腫瘍に対する効果. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 26: 116-121, 1986.
- 2) Gordon, R. T., Hines, J. R. and Gordon, D.: Intracellular hyperthermia: A biophysical approach to cancer treatment via intracellular temperature and biophysical alterations. *Med. Hypotheses* 5: 83-102, 1979.
- 3) 持田信夫: 癌治療用組成物および癌治療装置. 公開特許公報 昭55-160720, 1980.
- 4) Gregoriadis, G., Neerunjun, D. E. and Hunt, R.: Fate of a liposome-associated agent injected into normal and tumour-bearing rodents. Attempts to improve localization

- in tumour tissues. *Life Sci.* 21: 357-370, 1977.
- 5) 曾根三郎, 螺良英郎, Fidler, I. J.: 癌転移治療としてのマクロファージ活性化: 人工脂質膜粒子リポソームを用いた新しい試み. 免疫薬理 2: 378-384, 1984.
 - 6) Jonah, M. M., Cerny, E. A. and Rahman, Y. E.: Tissue distribution of EDTA encapsulated within liposomes of varying surface properties. *Biochim. Biophys. Acta* 401: 336-348, 1975.
 - 7) Juliano, R. L. and Stamp, D.: The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63: 651-658, 1975.
 - 8) Rustum, Y. M., Dave, C., Mayhew, E. and Papahadjopoulos, D.: Role of liposome type and route of administration in the antitumor activity of liposome-entrapped 1- β -D-arabinofuranosylcytosine against mouse L1210 leukemia. *Cancer Res.* 39: 1390-1395, 1979.
 - 9) Yatvin, M. B., Mühlensiepen, H., Porschen, W., Weinstein, J. N. and Feinendegen, L. E.: Selective delivery of liposome-associated *cis*-dichlorodiammineplatinum (II) by heat and its influence on tumor drug uptake and growth. *Cancer Res.* 41: 1602-1607, 1981.
 - 10) Weinstein, J. N., Magin, R. L., Cysyk, R. L. and Zaharko, D. S.: Treatment of solid L1210 murine tumors with local hyperthermia and temperature-sensitive liposomes containing methotrexate. *Cancer Res.* 40: 1388-1395, 1980.
 - 11) Jori, G., Tomio, L., Reddi, E., Rossi, E., Corti, L., Zorat, P. L. and Calzavara, F.: Preferential delivery of liposome-incorporated porphyrins to neoplastic cells in tumour-bearing rats. *Br. J. Cancer* 48: 307-309, 1983.
 - 12) Spikes, J. D., Matis, W. and Rodgers, M. A. J.: The photochemical behavior of porphyrins in solution and incorporated into liposomal membranes. *Studia Biophys.* 94: 19-24, 1983.
 - 13) 夏目秀視, 杉林堅次, 森本雍憲: 癌化学療法におけるアルブミン小球体の利用. 最新医学40: 1825-1830, 1985.
 - 14) 熊井浩一郎, 高橋孝行, 壺内泰二郎, 吉野肇一, 石引久彌, 阿部令彦: 抗がん剤封入リポソームによる肝動注療法. 癌と化学療法12: 1946-1948, 1985.