

原 著

バルク高温超電導磁石を用いた磁気誘導ドラッグデリバリーシステムの
集積制御の可能性検討¹東京女子医科大学大学院医学研究科（指導：村垣善浩教授）²東京女子医科大学先端生命医科学研究所先端工学外科学分野³鉄道総合技術研究所材料技術研究部超電導応用研究室⁴大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻イリサワ 入澤 カク 覚¹・村垣 ムラガキ 善浩²・伊関 イセキ 洋²・富田 ヒロシ トミタ マサル 優³・西嶋 ニシジマ シゲヒロ 茂宏⁴

(受理 平成 24 年 7 月 10 日)

Feasibility Study of Magnetic Particle Accumulation with a Magnetic Drug Delivery System Using
a Bulk High-temperature Superconductive MagnetKaku IRISAWA¹, Yoshihiro MURAGAKI², Hiroshi ISEKI²,
Masaru TOMITA³ and Shigehiro NISHIJIMA⁴¹Graduate School of Medicine, Tokyo Women's Medical University²Faculty of Advanced Techno Surgery, Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science,
Tokyo Women's Medical University³Applied Superconductivity Laboratory, Materials Technology Division, Railway Technical Research Institute⁴Division of sustainable energy and environmental engineering, Graduate School of Engineering, Osaka University

Magnetic drug delivery systems (MDDS) using targeting magnetic responsive drugs and permanent magnets have been examined twice in clinical trials, but have yet to gain clinical use. One possible reason is the lack of availability of strong magnets. Accumulation of sufficient magnetic responsive drugs into the tumor region is central to MDDS. Recent technical progress has brought to attention a high magnetic field strength of 5.8 T and a steep magnetic field gradient of -480 T/m using bulk high-temperature superconductive (HTSC) magnets, compared with parameters of 0.6 T and -31 T/m using permanent magnets. The present study evaluated the accumulation performance of magnetic responsive drugs in an MDDS utilizing a bulk HTSC magnet. We adopted magnetic iron-oxide particles of 25, 80, 170 nm in diameter and magnetoliposomes as magnetic responsive drugs. The measured accumulation range to realize an accumulation rate $>50\%$ were 12, 48, 114, and 26 mm, respectively, 2.2 times longer than those measured using a permanent magnet. An in vivo experiment using swine liver was conducted to deliver iron-oxide particles of 100 nm in diameter. High accumulation of magnetic delivered drugs was shown in T2*-weighted magnetic resonance imaging, under microscopic observation of stained histological sections, and with use of a superconducting quantum interference device (SQUID).

Key Words: MDDS, HTSC, permanent magnet, magnetic field, magnetic responsive drug

緒 言

磁気に応答する薬剤を生体外から与える磁場により生体内の特定部位に誘導する磁気誘導ドラッグデリバリーシステム (drug delivery system : DDS) に関する研究は、1960 年頃よりアイデアが¹⁾出され、1970

年代後半から本格的な研究が始まっている²⁾。

磁気誘導 DDS では一般に 2 つの要素、すなわち、生体内の血管を通じて病変部に到達する磁気応答性薬剤と、生体外から磁気応答性薬剤に磁力を与えるための磁場発生装置が必要である。

薬剤については1990年代以降、薬剤をがん組織に効果的に到達させることを目的として、がん組織に栄養する血管に存在する孔の径より小さい400nm以下の薬剤サイズが適していること³⁾が明らかになり、また糖鎖を修飾することで血中の白血球およびタンパク質との相互作用を抑制して滞留時間を延ばし、その結果、病変部に薬剤が送達される確率を増加させることが試みられ、実用化されてきた。そして、これらの知見を磁気応答性薬剤に応用する研究が近年行われている⁴⁾。

磁気誘導DDSは、磁力を及ぼすことで薬剤を病変部に高濃度に集積させることが可能であり、また、磁力の及ばない他の臓器への蓄積や全身的副作用の低減⁵⁾が期待できる。一方で、がん細胞特異性を付与した薬剤を用いたDDSよりも病変部周辺の正常組織にも薬剤が集積し得ることや、放射線療法よりも局所的に集束できない等の静磁場集束の物理的限界に起因する短所を有する。

磁気誘導DDSをヒトへ応用した例としては、ドイツにおいて頭頸部がんへの適用⁶⁾と、アメリカにおいて肝臓がんへの適用⁷⁾の報告がある。これらの研究では、100nmオーダーの磁気応答性薬剤と0.8テスラの永久磁石を用いた場合に表在性がん⁶⁾、比較的大きい数 μm オーダーの磁気応答性薬剤と0.5テスラの永久磁石を用いた場合で肝臓がん⁷⁾がターゲットとされたが、実用化には至っていない。薬剤を病変部に送達させる際に磁気応答性薬剤に加わる磁力は、磁場勾配の大きさと磁気応答性薬剤の磁気モーメントの積で与えられる。これらの臨床試験の結果は、永久磁石で得られるような比較的弱い磁場勾配で生体深部に磁力を及ぼすためには、薬剤粒子のサイズを大きくして磁気モーメントを大きくする必要があることを示唆している。

しかしながら、上述のように薬剤粒子径は400nm以下が好ましい³⁾ことが明らかになっており、その場合薬剤粒子の磁気モーメントを大きくすることが困難であるため、磁場勾配を強くする必要がある。永久磁石ではネオジウム-鉄-ホウ素系(Nd-Fe-B)磁石が最も強力であるが、生体に与えられる磁場としては1.0テスラ未満である。また、金属線を用いた電磁石では最大2.3テスラ程度となり、磁場発生装置の大型化や発熱も避けられない⁸⁾。さらに、超電導線材を用いた電磁石においてはMRI(magnetic resonance imaging)で実現されているように7テスラ程度までは可能だが超電導コイル全体に超電導状態を

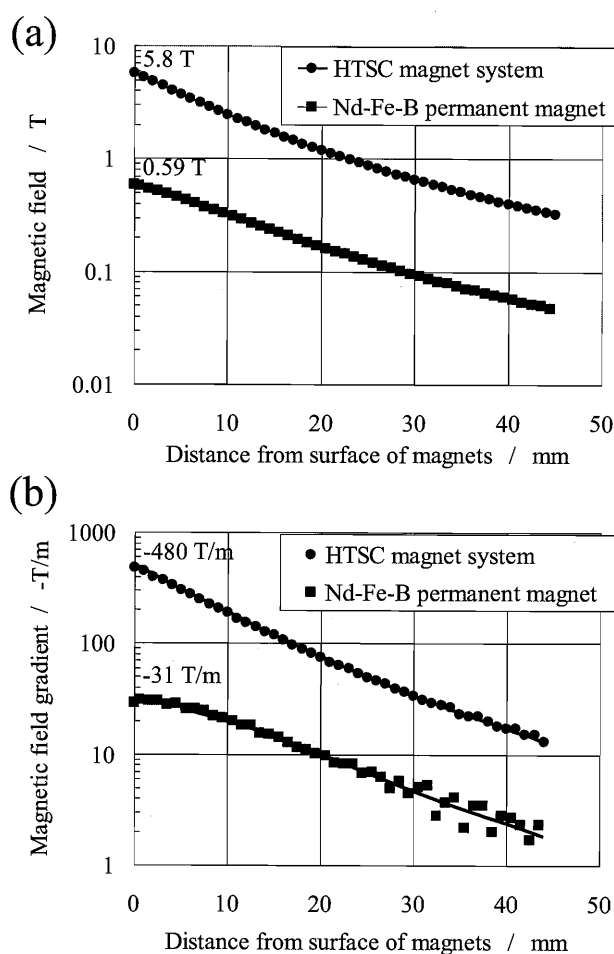


Fig. 1 Relationships between (a) magnetic field and (b) magnetic field gradient and distance from surface of magnets in an axial direction.

保つための冷凍機が必要となり装置が極めて大型化する。これまでに我々はより強力な磁場による磁気誘導DDSを実現すべく、最大9テスラ程度の磁場を発生し得るバルク高温超電導磁石⁹⁾に着目し、磁場発生装置を開発してきた¹⁰⁾。

本研究においては、バルク高温超電導磁石を用いた磁場発生装置と磁気応答性薬剤を利用した磁気誘導DDSの薬剤集積性能を評価することを目的として、in vitro環境での基礎実験と生体ブタの肝臓をターゲットにしたin vivo実験を行った。また得られた結果に基づき、磁気誘導DDSの適応範囲拡大の可能性を議論したので、以下に報告する。

対象および方法

1. バルク高温超電導磁石を用いた磁場発生装置の磁気特性

治療対象領域に効率良く磁気応答性薬剤を集積させるためには、より強力な磁場をピンポイントに実現することが重要である。本研究では、直径45mm

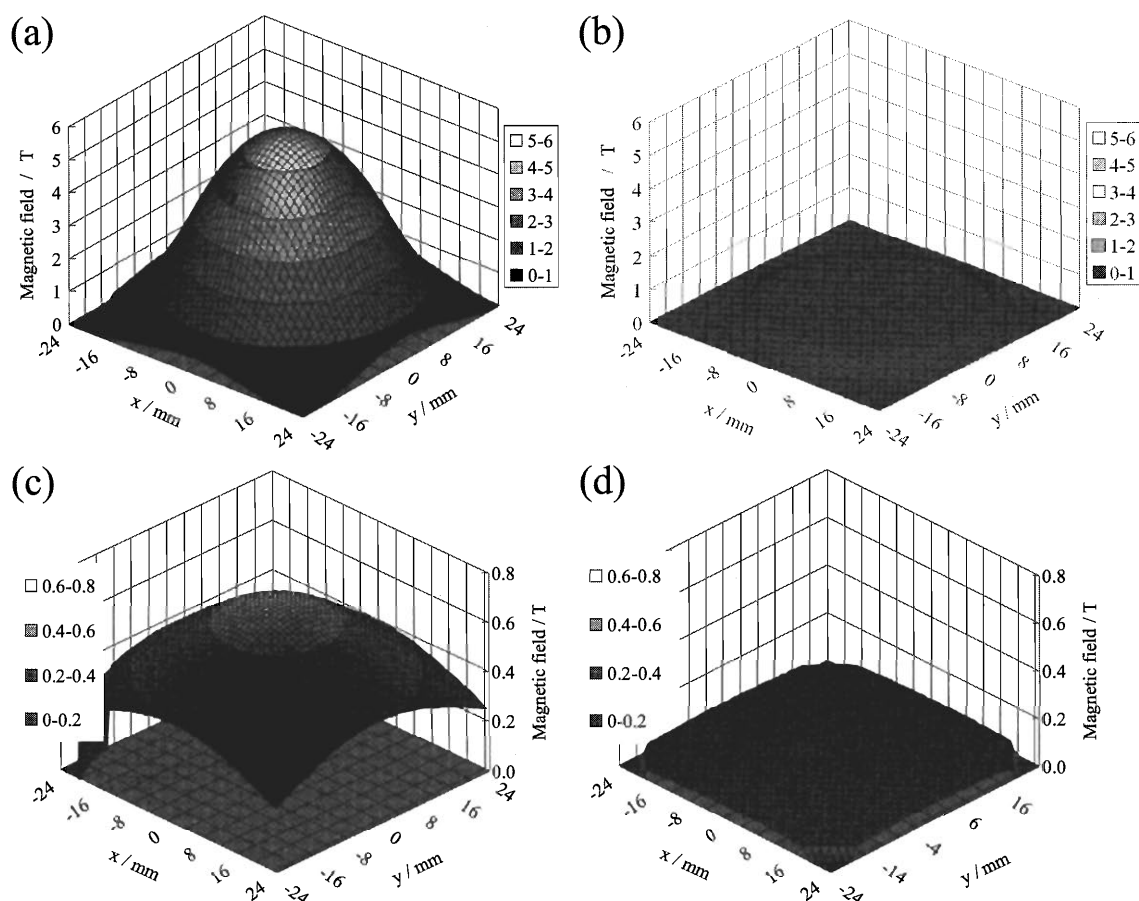


Fig. 2 Magnetic field distributions for (a) bulk high-temperature superconductive (HTSC) magnet and (b) permanent magnet at 1.5 mm from magnet surfaces, and (c) bulk HTSC magnet and (d) permanent magnet at 30 mm from magnet surfaces.

の円筒型バルク高温超伝導磁石を用いた。Fig. 1に円筒軸方向の磁場強度、磁気勾配の分布および比較のために、直径40mmの円筒型永久磁石の結果も示す。バルク高温超伝導磁石の方が、磁場強度と磁気勾配ともに1桁程度高い値を示している。またFig. 2にバルク高温超伝導磁石と永久磁石の、表面から円筒軸方向に1.5mm、30mm離れた面における2次元の磁場分布を示す。磁場の分布形状は、バルク高温超伝導磁石で山型であるのに対して永久磁石は平坦である。したがって、バルク高温超伝導磁石を用いることで、より局所的に磁場を集中させることが可能であり、また急峻な磁気勾配が得られることから、磁気応答性薬剤を集積させるのに適している。なお、本研究で用いたバルク高温超伝導磁石は磁場を発生させるために着磁プロセスを施す必要があり、着磁する毎に着磁条件の変化により磁場強度が変動するが、磁場強度は5.0~5.8テスラの範囲内であった。

2. 磁気応答性薬剤を模擬した磁気粒子による *in vitro* 実験

前述の通り磁気応答性薬剤に加わる磁力の強さは、磁石の磁場勾配と磁気応答性薬剤の有する磁気モーメントの大きさに依存する。また磁気モーメントは、磁気応答性薬剤の体積や内包する磁性粒子の密度に依存するため、磁気応答性薬剤を模擬した磁気粒子の径や種類を変えて、磁気粒子が応答する距離を求める *in vitro* 実験を行った。

ドイツで行われた臨床試験⁶⁾では凝集体に薬剤を吸着させるタイプの磁気応答性薬剤が検討されたが、本実験ではその薬剤を模擬して直径10nmの酸化鉄を凝集させた磁気粒子、およびリポソームの中に酸化鉄が内包されたマグネトリポソームを用いた。磁気粒子を水に分散させた場合の直径(磁気粒子径)は、DDSに適した薬剤サイズ400nm以下³⁾の範囲内から、25nm(EMG-1111, Ferrotec社, 日本, クエン酸修飾により分散), 80および170nm(fluidMAG-CT, Chemicell社, ドイツ)とした。水

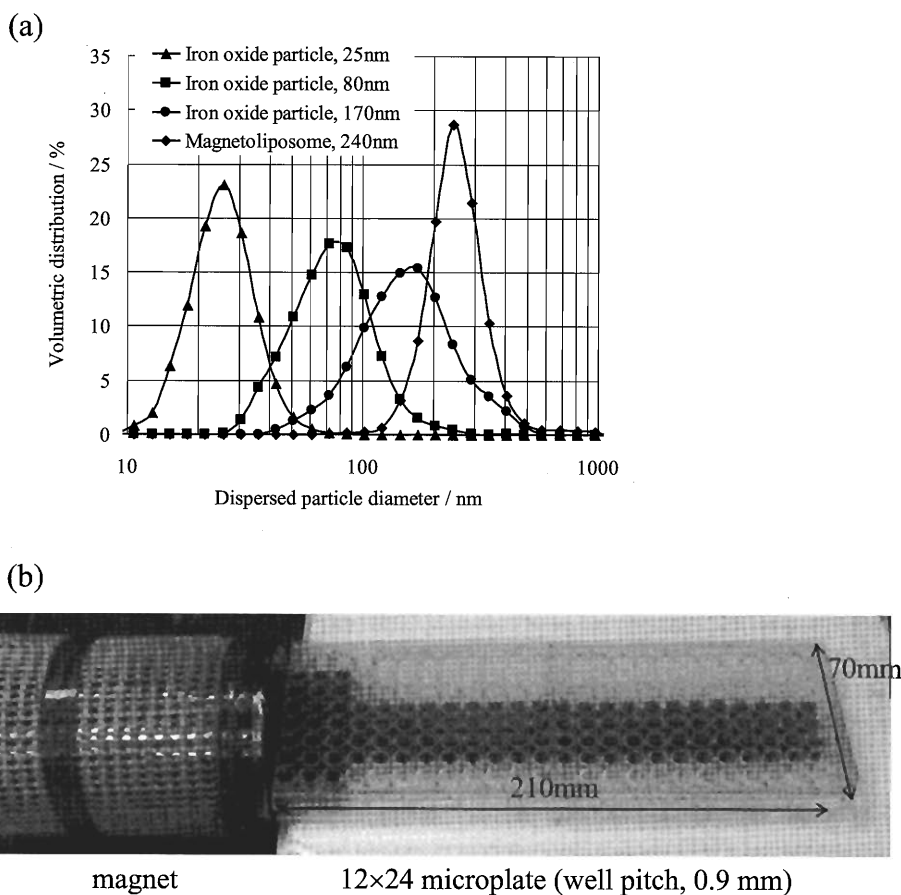


Fig. 3 (a) Volumetric distribution of water-dispersed magnetic particles. (b) Experimental arrangement of bulk HTSC magnet and 8×24 microplate.

分散径を揃えるための遠心分離およびろ過処理を行った。マグネトリポソムの作製にはFe濃度が2.5~3.0mol/l程度の水分散径25nmの磁気粒子分散液を用い、エクストルージョン法によりリポソムに酸化鉄粒子を内包させた¹³⁾。その後、ゲルろ過および遠心分離によりマグネトリポソムを分離した。それぞれの磁気粒子の水分散径の分布は、Fig. 3aに示すように単分散を示した。

8×12ウェルのマイクロプレートを連結して8×24ウェルとして、ウェルに上記磁気粒子がFe濃度0.3mg/ml含まれる液を0.33mlずつ入れ、バルク高温超伝導磁石をマイクロプレート横に配置した(Fig. 3b)。磁場により磁気粒子が集積される。1時間後に上澄み0.2mlを採取し、それぞれの光学濃度を測定し、初期の磁気粒子濃度との商を求め、集積率とした。同様の実験を永久磁石を用いた場合についても行い、比較した。磁場強度はバルク超伝導磁石で5.4テスラ、永久磁石で0.6テスラであった。

3. ブタ肝臓への磁気粒子の集積

バルク高温超伝導磁石を用いて局所集積の効果を

確認するため *in vivo* 実験を行った。ブタ(36kg, n=1)をツボクラリンによる筋弛緩、イソフルランによる吸入麻酔後、開腹し肝露出状態とし、バルク高温超伝導磁石を肝左葉表面に配置し、誘導部に電気メスによりマーキングを施した。また、バルク高温超電動磁石よりも遠い肝右葉をコントロールとした。その状態でFe濃度5mg/mlの100nm径の酸化鉄磁気粒子の分散液を3.2ml、ブタの肝門脈末梢より投与した。その後、肝臓を摘出しホルマリン固定した。マグネタイト粒子投与後、組織固定を行うまでの時間は4時間以内であった。摘出した肝臓はヒト用MRI装置(AIRIS II, 静磁場強度0.3テスラ, 日立メディコ)を用いて、プロトン強調画像(スピンエコー法, TR/TE=1200/25), T2強調画像(スピンエコー法, TR/TE=1200/60), T2*強調画像(グラディエントエコー法, TR/TE/FA=300/8.5/50°)を取得した。また、誘導部とコントロール部から切片を取得し、表面部をスライスしてベルリンブルー染色後、光学顕微鏡で観察した。また、誘導部とコントロール部の切片からさらに3mm角の切片各2個を切り

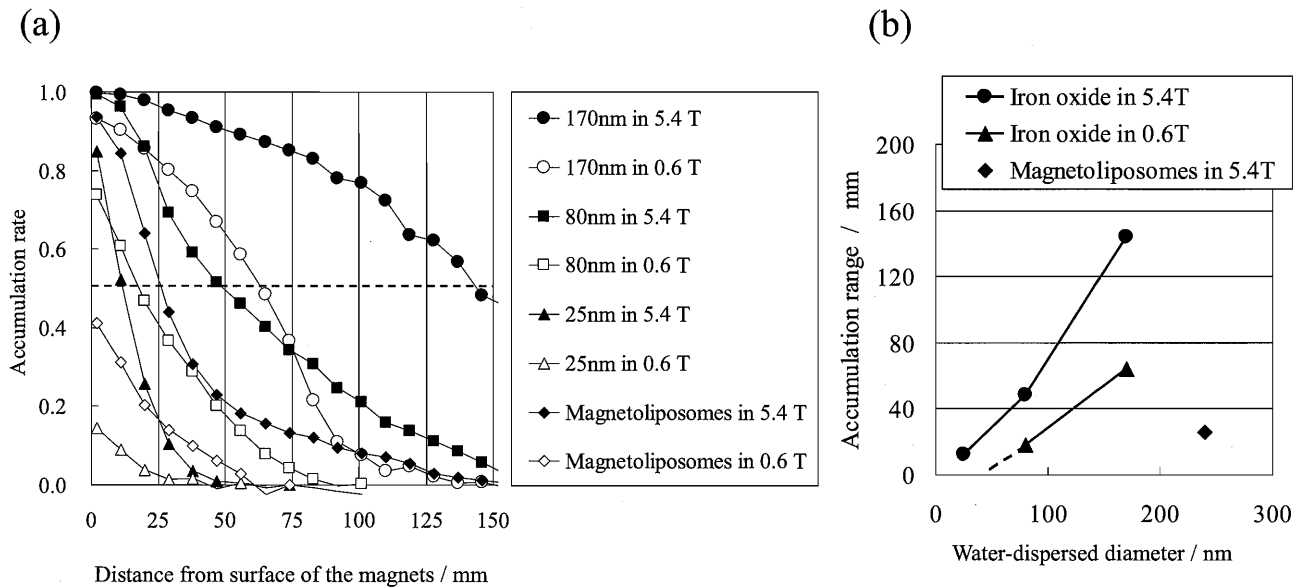


Fig. 4 (a) Distance dependence of accumulation rate in iron oxide particles of 25, 80, 170 nm in diameter and magnetoliposomes in magnetic fields of 5.4 T by bulk HTSC magnet and 0.6 T by Nd-Fe-B permanent magnet. (b) Relationship with water-dispersed diameter of magnetic particles and accumulation range.

出し、磁気粒子を高感度に検出可能な SQUID 素子を用いた超高感度免疫検査システムにより磁気粒子含有量を測定・比較した。

結果

1. バルク高温超電導磁石、永久磁石と磁気粒子の応答のサイズ依存性

磁場 5.4 テスラのバルク高温超電導磁石と 0.6 テスラの永久磁石を用いた場合の結果を示す (Fig. 4). 磁気粒子の集積率は、距離の増加とともに次第に減少し、また磁気粒子径あるいは磁場が大きいほど相互作用する距離が増加した。半数の磁気粒子が集積可能となる集積率 0.5 以上を十分とした場合、バルク高温超電導磁石と磁気応答性薬剤を組み合わせた場合には、最大 15cm まで薬剤が集積されることが示された。集積率 0.5 を示す距離を集積距離として、各磁気粒子の分散径と集積距離の関係を示す (Fig. 4b). 永久磁石を用いた場合よりもバルク高温超電導磁石システムを用いた場合の方が 2.2 倍程度深くまで磁気力を及ぼし、分散径が大きいほど距離が増加する。一方で、マグネトリポソームは、分散径の割に内包される磁気粒子の量が少なく、集積距離としては 26mm 程度となった。

2. ブタ肝臓への磁気粒子の集積

Fig. 5 に摘出したブタ肝臓の写真およびプロトン強調、T2 強調、T2* 強調の MR 画像を示す。プロトン、T2 強調像においては磁気誘導部とコントロール

部では、画像濃度の大きな差は見られない。一方、局所磁場の変動の影響を受けやすい T2* 強調像において磁気誘導部とコントロール部の画像濃度に顕著な差が生じたことから、磁気粒子の集積によるものと考えられる。Fig. 6 に組織切片の磁気誘導部とコントロール部の顕微像を示す。ベルリンブルー染色は溶血のヘモジデリンも染色する可能性があるためコントロール部においても染色が認められるが、磁気誘導した切片の方がより淡く染色された領域が広く観察されており、酸化鉄粒子がより多く分布していることが示唆される。酸化鉄粒子の集積を定量化するために、SQUID による検出信号波形を解析し切片の磁気モーメントの大きさを比較した。Fig. 7 に示すように磁気誘導を行った側の切片 1, 2 の信号レベルは、行っていない側の切片 3, 4 と比較して明らかに高く、それぞれおよそ 12 倍と 36 倍の値を示した。それぞれの切片から得られた信号波形は、SQUID 素子のノイズレベルよりも十分高いことから、磁気誘導部の切片 1, 2 の差異は局所的な磁気粒子の集積量の違いが反映されたものと推察される。

以上の画像、組織観察、および磁気測定における磁気誘導部とコントロール部の差異より、100nm 径の磁気粒子がバルク高温超電導磁石により in vivo でブタ肝臓で磁気誘導が実現された。

考察

磁気誘導 DDS においては、体内深部において十

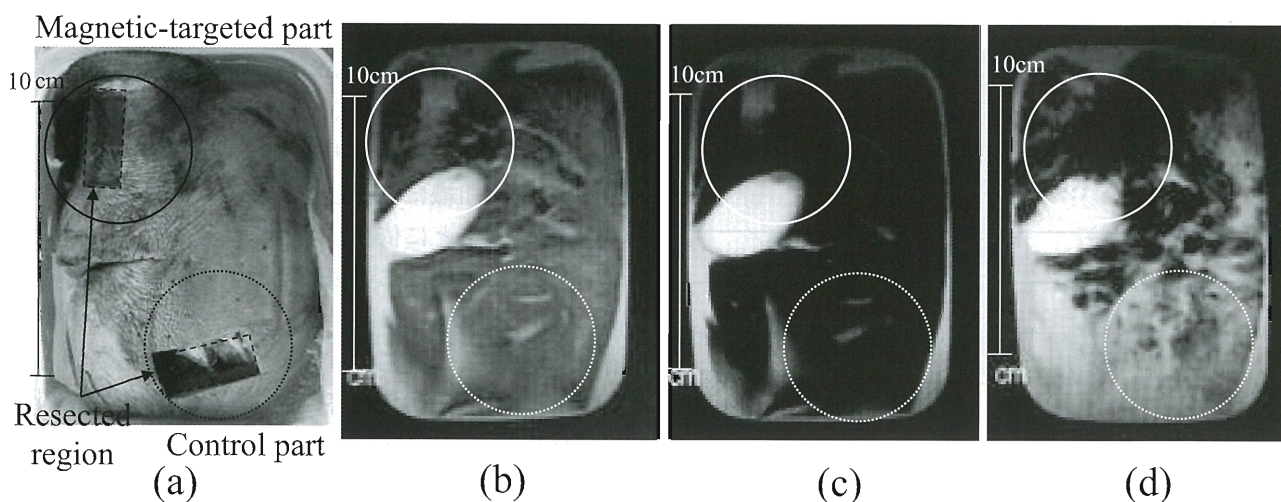


Fig. 5 (a) Swine liver after magnetic targeting by bulk HTSC magnet. The magnetic-targeted part and control part are shown as solid and dotted circles, respectively. Resected segments from each part are shown as dotted rectangle areas in which microscopic observation and magnetization measurements by SQUID were conducted. (b) Proton density-weighted, (c) T2-weighted, and (d) T2*-weighted images.

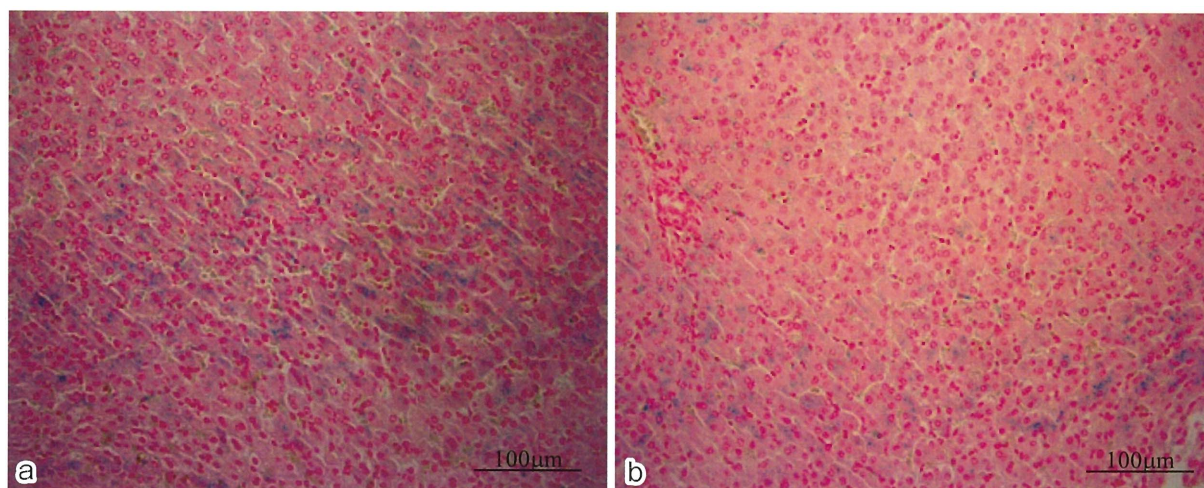


Fig. 6 Microscopic images of (a) magnetic-targeted and (b) control sections after Berlin blue staining.

分な磁力を発生し、磁気応答性薬剤を効果的に集積させることが1つの課題であった。バルク高温超伝導磁石を用いることで、永久磁石に比べ磁力の到達深さが増加し、80nm粒子の場合で30mm、170nm粒子の場合で80mm程度、より深く磁力が到達することが示された。実験は静水中で行ったため血流の影響に対する考察が十分ではないが、毛細血管等の流速が十分に遅い血管内に滞在する磁気粒子は磁場に応答し、その場に留まると推察される。またブタ肝臓を対象にした *in vivo* 実験により、バルク高温超伝導磁石を用いることで磁気応答性薬剤の集積量が12~36倍に増加することが示唆された。

磁気粒子に加えてリポソームを用いた評価も行った。磁気粒子の凝集体に薬剤を吸着させるタイプの磁気応答性薬剤は治療時間内に薬剤放出が顕著であり注入後60分で大部分が放出される¹²⁾。しかし、より薬剤放出速度が制御可能な薬剤形態としてリポソーム製剤が近年実用化されつつあることから、リポソームに酸化鉄を内包させることで、薬剤に磁気応答性を付与させ、磁気誘導DDSのターゲットとした。評価実験の結果、25nmと80nmの磁気粒子の中間程度の磁気応答距離を示すことから、リポソームに内包される磁気粒子量は50nmの磁気粒子相当であると推察された。

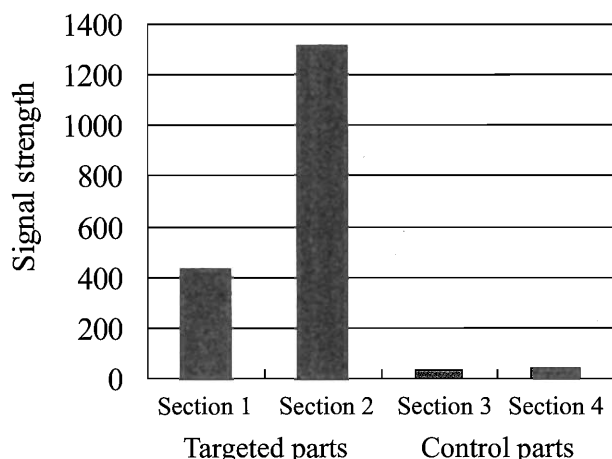


Fig. 7 Signal strength of sections from the magnetic-targeted part and control part in swine liver detected by SQUID.

これらの結果を参考に、170nm 粒子を用いた場合にはほぼ全ての臓器の深さにおいて磁力が到達する。80nm 粒子を用いた場合には50mm 深さの臓器まで磁力が到達すると考えられ、乳房や頭頸部はほぼ全領域適用可能であると推察される。また、マグネトリポソームでは、深さ25mm 程度まで相互作用が可能であり頭頸部や乳房の一部に適用可能と推察される。ただし、実際には体格が患者毎に異なり、臓器の深度も体格に応じて変化すると考えられる。したがって、薬剤量や処置時間等を変えて薬剤集積量を制御することが必要と想定される。その場合には処置前、および処置中に随時MR 画像を取得し、集積量をモニタリングすることで精度を維持することが期待される。

一方で、上記のように深部での磁力到達の実現とともに、別の観点では、表面近傍でより多くの薬剤を集積させたり、より磁気の弱い粒子をデリバリ可能にできる。つまり、がん組織に栄養する血管の孔を抜けて間質を拡散しやすい100nm 以下の微細な粒子や薬剤の割合を増やした粒子、より薬剤放出性能が高くなるように設計した粒子などの利用可能性も広がるものと考えられる。

処置時間の観点では、これまでの研究においては磁気応答性薬剤注入後15分⁷⁾あるいは1~2時間程度⁸⁾の間で永久磁石を設置しているが、バルク高温超電導磁石を用いてより強力な磁場を与えることで、より短い処置時間で集積効果が得られる効率的な磁気誘導DDSを実現できる可能性がある。

本研究においては、バルク超電導磁石による強力な磁場と磁気応答性薬剤を模擬した磁気粒子を組み

合わせた磁気誘導DDSの磁力の到達深度について評価を行った。しかしながら、磁力は病変部に特異的に集中する訳ではなく、病変部周囲にも及ぼされる。本磁気誘導DDSの病変部特異性は、血管の孔を通過し病変組織に移行しやすい磁気応答性薬剤の径を選択することに依存している。磁力によって病変部およびその周囲に集積した磁気応答性薬剤の磁場除去後の挙動は、組織に移行していない磁気応答性薬剤は徐々に血流によって磁気誘導部から流出し、組織に移行した磁気応答性薬剤は2時間程度滞留した後、徐々に病変部から流出すること等が報告されている¹³⁾。このような薬剤の動態を踏まえると、近年DDSの分野において研究が進められている病変細胞特異性を有する分子を修飾する技術¹⁴⁾を磁気応答性薬剤に応用することで、さらに病変部において組織移行した薬剤の病変部滞在時間を延長できる可能性がある。また、病変部位に磁気応答性薬剤をより多く誘導するために、静脈よりも動脈から導入した場合により腫瘍サイズが減少したとの報告¹²⁾がある。Interventional radiology 下で病変部の栄養動脈近傍においてカテーテル先端から磁気応答性薬剤を導入する等の手技も合わせることで位置選択性が高まり、さらに薬剤集積量を増加できる可能性がある。

また、病変部周囲に磁力が及んだ影響として、磁気誘導直後は肌が灰色に変色するものの48時間以内に外見上は異常が無くなり、その後の病変部周辺の組織観察において磁気粒子の沈着が見られたのみで顕著な副作用は現れなかったとの報告¹²⁾もあるが、本磁気誘導DDSのように強力な磁場を用いた場合の病変部周囲における薬剤の副作用の程度に関しては、今後検討がなされる必要がある。

結 論

バルク高温超電導磁石を使用することで、従来の永久磁石より高い磁気勾配、ブタ肝臓における高い磁気誘導効果、および平均2.2倍の磁気応答性薬剤の集積距離を示した。以上より、臨床応用可能な磁気誘導DDSの開発が期待できる。

謝 辞

本研究の一部は、平成21年度財団法人カシオ科学振興財団による研究助成「バルク超伝導磁石による強磁場を利用した薬剤送達システムの開発と治療応用検討」および独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)、次世代DDS型悪性腫瘍治療システムの研究開発事業、平成18年度「深部治療に対応した次世代

DDS 型治療システムの研究開発 (F/S) の支援を受けて行われた。

本研究において, in vivo 実験の遂行において大阪大学の三島史人先生, 京都大学再生医科学研究所の田畑泰彦先生, バルク高温超電導磁石の開発において日立製作所の佐保典秀氏, 日立メディコの佐々木明氏, 磁場発生装置および永久磁石のキャラクタリゼーションにおいて鉄道総合技術研究所の石原篤氏, リポソーム作製において早稲田大学の武岡真司先生にご支援頂きました。東京女子医科大学鈴木孝司助教, 坂寄隆司先生に論文をまとめるにあたり, 多くのご助言を頂きました。

利益相反はない。

文 献

- 1) **Freeman MW, Arrot A, Watson JHL**: Magnetism in medicine. *J Appl Phys* **31**: 404S-405S, 1960
- 2) **Widder KJ, Senyei AE, Scarpelli DG**: Magnetic Microspheres: A model system for site specific drug delivery in vivo. *Proc Soc Experiment Biol Med* **58**: 141-146, 1978
- 3) **Yuan F, Dellian M, Fukumura D et al**: Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res* **55**: 3752-3756, 1995
- 4) **Rivière C, Martina MS, Tomita Y et al**: Magnetic Targeting of Nanometric Magnetic Fluid loaded Liposomes to Specific Brain Intravascular Areas: A Dynamic Imaging Study in Mice. *Radiology* **244**: 439-448, 2007
- 5) **Alexiou C, Schmid RJ, Jurgons R et al**: Targeting cancer cells: magnetic nanoparticles as drug carriers. *Eur Biophys J* **35**: 446-450, 2006
- 6) **Lübbe AS, Bergmann C, Riess H et al**: Clinical experiences with magnetic drag targeting: A phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res* **56**: 4686-4693, 1996
- 7) **Wilson MW, Kerlan RK, Fidelman NA et al**: Hepatocellular carcinoma: Regional therapy with a magnetic targeted carrier bound to doxorubicin in a dual MR imaging/conventional angiography suite—Initial experience with four patients. *Radiology* **230**: 287-293, 2004
- 8) **Alexiou C, Diehl D, Henninger P et al**: A high field gradient magnet for magnetic drag targeting. *IEEE Trans Appl Supercon* **16**: 1527-1530, 2006
- 9) **Tomita M, Murakami M**: High-temperature superconductor bulk magnets that can trap magnetic fields of over 17 tesla at 29 K. *Nature* **421**: 517-520, 2003
- 10) **Saho N, Nishijima N, Tanaka H et al**: Development of portable superconducting bulk magnet system. *Physica C* **469**: 1286-1289, 2009
- 11) **Martina MS, Fortin JP, Ménager C**: Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging. *J Am Chem Soc* **127**: 10676-10685, 2005
- 12) **Alexiou C, Arnold W, Klein RJ et al**: Locoregional Cancer Treatment with Magnetic Drug Targeting. *Canc Res* **60**: 6641-6648, 2000
- 13) **Chertok B, Moffat BA, David AE et al**: Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials* **29**: 487-496, 2008
- 14) **Gupta AK, Gupta M**: Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**: 3995-4021, 2005