

「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」

事業原簿【公開】

担当部室	バイオテクノロジー・医療技術部
------	-----------------

—目次—

概要

プロジェクト用語集

I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性 I - 1
 - 1.1 NEDO が関与することの意義 I - 1
 - 1.2 実施の効果（費用対効果） I - 2
2. 事業の背景・目的・位置づけ I - 3

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標 II - 1
2. 事業の計画内容 II - 6
 - 2.1 研究開発の内容 II - 6
 - 2.2 研究開発の実施体制 II - 3 0
 - 2.3 研究の運営管理 II - 3 1
 - 2.4 研究開発成果の実用化、事業化に向けたマネジメントの妥当性 II - 3 2
3. 情勢変化への対応 II - 3 3
4. 中間評価結果への対応 II - 3 3
5. 評価に関する事項 II - 3 7

III. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果 III - 1
2. 研究開発項目毎の成果 III - 6

IV. 実用化、事業化の見通しについて

1. 実用化、事業化の見通し IV - 1

(添付資料)

- ・イノベーションプログラム基本計画 添付 - 2
- ・プロジェクト基本計画 添付 - 1 6
- ・事前評価関連資料（事前評価書、パブリックコメント募集の結果） 添付 - 2 4
- ・特許論文リスト 添付 - 2 7

概要

	作成日	2010年12月16日	
プログラム名	健康安心イノベーションプログラム		
プロジェクト名	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	プロジェクト番号	P06042
担当推進部/担当者	バイオテクノロジー・医療技術部 主査 貴志 治夫		
0. 事業の概要	<p>体内における薬物の挙動（体内動態）を精密に制御し、選択的かつ望ましい濃度・時間パターンのもとに薬物を作用部位に送り込むことによって、薬物治療の最適化を実現することを目的とするドラッグデリバリーシステム（DDS）と人体の深部まで届く様々な外部エネルギーを組み合わせ、治療の効果及び効率を飛躍的に高める新たながん治療を可能とする「次世代DDS型悪性腫瘍治療システム」の開発を行うことを目的として本事業を実施する。</p>		
I. 事業の位置付け・必要性について	<p>悪性腫瘍（がん）は、現在、日本の死亡要因の第1位を占めており、死因全体の約30%にも達する。また、疾患の発生数も高齢化社会の進展とともに増加しつつある。近年、PET健診などに代表されるがん検診が行われているにも拘わらず、がんによる死亡数は増加してきているのが現状である。このようながんの治療法として、これまでに手術、放射線治療、化学療法、免疫治療などの集学的治療などが行われてきたが、がんを根治することはいまだできておらず、特に再発や転移をきたした場合の治療は困難であり、死にいたる症例も数多く見られる。一方、これらの治療法は長期間にわたって繰り返し実施されることが多いため、副作用が高頻度に発生し、適用可能な治療法はおのずと限定されてくる。また、治療による拘束やその副作用によって患者のQOL（Quality of Life）は著しく低下し、本人や家族の経済的損失は多大し、加えて国の医療コストを増大させている。QOLを低下させることなくがんを根絶させるためには、薬剤等ががん細胞のみへピンポイントに輸送し、光、超音波、磁場などの外部エネルギーを利用して薬剤効果を局所的かつ高効率に発現させる技術が必要となってくる。</p> <p>また、本プロジェクトは「技術戦略マップ（平成18年4月経済産業省策定）においてライフサイエンス分野中、診断・治療機器分野の技術マップにおいて、「診断・治療一体化」のうち、「放射線以外の低侵襲標的治療」に位置付けられる。</p>		
II. 研究開発マネジメントについて			

事業の目標	光増感剤をがん細胞選択的に送達する DDS と患部に対する光照射システムの開発を行い、悪性腫瘍治療光線を可能とする力学治療(PDT)を実現する。また、相変化ナノ液滴を用いる新規超音波 DDS とナノ液滴の体内動態制御技術とを組み合わせ、がんの早期診断と治療を可能とするシステムを開発する。						
事業の計画内容	主な実施事項	H19	H20	H21			
	光線力学治療	←————→					
	超音波診断治療	←————→					
開発予算 (会計・勘定別に実績額を記載) (単位：百万円) 契約種類： (委託(○) 助成()) 共同研究(負担率())	会計・勘定	H19	H20	H21	総額		
	一般会計	271	329	348	948		
	特別会計 (電多・高度化・石油)						
	総予算額	271	329	348	948		
開発体制	経産省担当原課	商務情報局 サービス産業課 医療・福祉機器産業室					
	プロジェクトリーダー	京都大学大学院薬学系研究科 教授 橋田充をプロジェクトリーダー、東京女子医科大学先端生命医学研究所 所長 岡野光夫をサブプロジェクトリーダーとして、研究開発を実施した。					
	委託先	東京大学・(株)日立製作所・東北大学・京都大学 (財) 神奈川科学技術アカデミー・東京慈恵会医科大学 帝京大学					
情勢変化への対応	平成 19 年 12 月実施体制を変更し、研究開発項目が円滑に進むように十分な知識・経験を持つ機関を追加した(東北大学を帝京大学の再委託先、防衛医科大学校を東京大学の共同実施先)。						

<p>Ⅲ. 研究開発成果について</p>	<p>1) 革新的DDSと光ファイバー技術を融合した光線力学治療システム</p> <p>1)-1. 光増感剤を内包した腫瘍特異的DDS製剤の開発</p> <p>1)-2. 患部に対する効果的な光照射を可能にする照射システムの開発</p> <p>1)-3. 難治性がんに対する光線力学療法システムの開発</p> <p>1)-3-1. 疾患モデルを用いた固形がんの光線力学治療(PDT)システムの開発</p> <p>1)-3-2. PDTと化学療法を融合した革新的がん治療システムの開発</p> <p>1)-3-3. PDTと免疫療法を融合した革新的がん治療システムの開発</p> <p>2) 相変化ナノ液滴を用いる超音波診断・治療統合システム</p> <p>(1) 造影・増感作用を有するマイクロバブルの液体前駆体(相変化ナノ液滴)の開発</p> <p>2)-1-1 相変化能を有するパーフルオロカーボン(PFC)液滴</p> <p>(2) 上記液体前駆体の活性化用超音波照射方法及び診断用プローブの開発</p> <p>2)-2-1 相変化用超音波シーケンス</p> <p>2)-2-2 相変化用超音波および照射システム</p> <p>2)-2-3 相変化用超音波および照射システムの中・大動物による効果検証</p> <p>2)-2-4 相変化用超音波および照射システムの小動物による安全性検証</p> <p>(3) 相変化ナノ液滴と診断用プローブを組み合わせる治療用照射装置の開発</p> <p>2)-3-1 治療用超音波照射シーケンス</p> <p>2)-3-2 治療用超音波照射装置</p> <p>2)-3-3 中・大動物による治療効果検証</p> <p>2)-3-4 治療用超音波および照射システムの小動物による安全性検証</p> <p>(4) 多機能化相変化ナノ液滴(長時間滞留、複メカニズムによる治療)の開発</p> <p>2)-4-1 ゼラチン誘導体系キャリアを用いる相変化ナノ液滴体内動態制御</p> <p>2)-4-2 液晶性高分子キャリアを用いる相変化ナノ液滴体内動態制御</p> <p>2)-4-3 トランスフェリン修飾バブルリポソームの開発</p>	
	<p>投稿論文</p>	<p>「査読付き」17件、「その他」12件</p>
	<p>特許</p>	<p>「出願済」9件</p>

<p>IV. 実用化、事業化の見通しについて</p>	<p>DDSという薬剤と医療機器を開発し、両者の融合システムとして実用化を目指す新しい取り組みであり、前臨床試験を可能とする薬剤および装置を完成或いは前臨床試験を開始し、治療効果および安全性を確実なものであることを確認することにより、次世代型悪性腫瘍治療の早期臨床応用技術の実現を目指し、実用化・事業化の可能性は高いと予想される。</p> <p>1)革新的DDSと光ファイバー技術を融合した光線力学治療システム</p> <p>本研究期間（3年）内にDDSと光照射装置のそれぞれの最適化を図り、動物実験によって、本システムの有効性と安全性を明らかにする事で、プロジェクト終了後に臨床試験に進むための基盤を整える。臨床試験は、本成果をもとに、3年以内に国内外の大手化学メーカーおよび製薬メーカーを決定して提携して実施していく。ナノキャリア株式会社は、高分子ミセルのGMP適合の製造に関して受託製造者に委託し、製造を実施している実績があり、製品製造をこなっていく。実用化時期に関しては、プロジェクト終了後2年以内に非臨床試験と臨床試験（非臨床試験、p 1/p 2/p 3で5年を予定）を実施し、承認申請を経て、平成27～29年に実用化、販売というタイムスケジュールとする。販売は、大きな組織と的確な情報伝達能力が必要とされるため、提携する大手化学メーカーおよび製薬メーカーが行う予定である。</p> <p>2)相変化ナノ液滴を用いる超音波診断・治療統合システム</p> <p>超音波診断装置および超音波治療装置と薬剤との開発からなっている。特に診断および治療装置において、一部ベースとなる装置構成に関しては、日立製作所とグループ会社である日立メディコとで共同開発を行っており、生体と超音波との相互作用およびそれを応用した診断・治療に関してはノウハウが蓄積されており、装置に関する実用化の可能性は高い。日立メディコでは現在画像診断装置、低侵襲治療装置を開発販売しており、日立グループとして診断・治療装置に関する事業化に必要な体制を備えている。薬剤（ナノ液滴及びキャリア）については、最適な構造の薬剤構造を動物実験にて決定し、前臨床試験を開始できる見通しをつけることを目標としている。前臨床試験以降のプロセスをスムーズに行うため、本研究開発の途中より製薬機関関係者にプロジェクト参画あるいはアドバイスを受けながらプロジェクトを遂行した。</p>	
<p>V. 評価に関する事項</p>	<p>事前評価</p>	<p>H18年度にFS事業を実施</p>
<p>VI. 基本計画に関する事項</p>	<p>作成時期</p>	<p>平成19年3月策定</p>
	<p>変更履歴</p>	

プロジェクト用語集

	プロジェクト用語	解説
1	光線力学療法 (PDT)	光増感剤を患部に集積させ、光を照射することにより光増感剤より産生される一重項酸素をもって患部を破壊する治療法
2	光増感剤	自らが光を吸収して得たエネルギーを基底三重項状態の酸素分子に渡すことで、反応性の高い一重項酸素を産生する物質。PDT においてはポルフィリンやフタロシアニン誘導体を使用される。
3	PDD(Photodynamic diagnosis)	光増感剤の有する蛍光を利用した患部の蛍光イメージング法。
4	高分子ミセル	性質の異なる 2 種類の高分子が連結されたブロック共重合体の自己集合によって形成されるコア-シェル型のナノ粒子
5	dendリマー	中心から規則的に分岐した構造を持つ樹状高分子
6	PEG	エチレングリコールが重合した構造を持つポリエーテル。タンパク質やナノキャリアをPEGで修飾することによってその血中滞留性が延長される。
7	環状RGDペプチド	腫瘍血管の内皮細胞や一部のがん細胞の表面に特異的に発現している $\alpha V\beta 3$ インテグリンに特異的に結合するペプチド。
8	膀胱がん	泌尿器系がんのなかでは、罹患率と死亡率ともに、男性で二番め(一番目は前立腺がん)、女性では一番高い。罹患患者数は、1.6 万人で、全罹患総数(57 万人)の約 3%である。がんの中でも最も再発率が高く、再発率は 50%以上である。
9	樹状細胞 (DC)	抗原提示細胞として機能する免疫細胞の一種であり、哺乳類の免疫系の一部を担っている。抗原提示細胞とは自分を取り込んだ抗原を、他の免疫系の細胞に伝える役割を持つ。
10	細胞障害性T細胞 (CTL)	リンパ球T細胞のうちのひとつで、宿主にとって異物になる細胞(移植細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞など)を認識して破壊する。
11	クロスプレゼンテーション	抗原提示細胞が外来性抗原を取り込み、プロセッシングしたのちMHCクラスI分子とともに細胞障害性T細胞へ提示し活性化させる抗原提示機構

	プロジェクト用語	解説
1 2	パーフルオロカーボン	炭化水素 C_nH_{2n+2} (n:正数)の水素が全てフッ素に置き換えられた化合物で C_nF_{2n+2} (n:正数)の形をとる。n が 1~4 の場合は常温で気体、それ以上で液体となる。一般に生体に対して不活性であり、n が 4 以下の気体が超音波診断装置用の造影剤として用いられている。また n が 8 以上のものが人口血液の成分として用いられたことがある。
1 3	相変化ナノ液滴	上記パーフルオロカーボンの n が 5 ないし 6 の化合物を界面活性剤共存下で高圧乳化処理を行うことで得られる、サブミクロンサイズの液滴。超音波パルス照射することによりパーフルオロカーボンが気化し、液体と気体との密度の違いによりミクロンサイズの気泡を形成する。
1 4	超音波診断装置	エコーと呼ばれることが多い。MHz 帯の超音波パルスを生体に照射し、生体から反射してきた信号(エコー)を画像化するものである。生体中の音響インピーダンス(音速×密度)の違いを可視化することができる。画像診断装置の中では低侵襲であるとされ、胎児の診断にも用いられる。低侵襲であること、リアルタイムに画像が得られること、および装置が小型・低価格であることが特徴である。近年は超音波造影剤と組み合わせ肝癌などの診断に用いられることが多くなってきている。
1 5	超音波造影剤	超音波診断装置において着目する部位のコントラストを向上させる目的で用いられる。特に上述の音響インピーダンスが生体と大きく異なる気体を主成分とすることが多く、特に MHz 帯の超音波に共振させるためにミクロンサイズのもの(マイクロバブル)が好まれる。結果、血管が主たる造影の対象となっている。
1 6	超音波加熱凝固治療 (High Intensity Focused Ultrasound therapy: HIFU)	がんなどの加温治療の一種で、ハイパーサーミア等と違い、組織をタンパクの凝固温度以上に数秒暴露させることにより組織変性を生じ治療効果を得るものである。他の加手段に比較して超音波は加熱領域と非加熱領域との間温度勾配を大きく取れることから加熱凝固治療にはもっぱら超音波が用いられている。子宮筋腫、前立腺肥大といった良性的疾患での適用がまず進み、現在低侵襲な乳がん

		治療として第三相治験が世界規模で行われている。
17	超音波治療増感剤	上述の超音波造影剤であるマイクロバブルは MHz 帯の超音波に共振するため、超音波照射時には激しく振動を行うことになる。この振動エネルギーの一部は熱となって近傍の温度を上昇させる働きをもつ。このため、マイクロバブル共存下に上記 HIFU 治療を行うことにより超音波単独よりも効率よく温度上昇が生じることが期待される。このことからマイクロバブルを超音波治療 (HIFU 治療) の増感剤として用いることが研究されている。
18	キャビテーション (cavitation)	超音波を液体 (生体軟組織を含む) に照射した際に見られる、気泡核が生成し、成長した後に圧壊する現象 (厳密には inertial cavitation と呼ばれる)。最後の圧壊の際に数千度・数気圧の特異な場が形成され、衝撃波などの機械的作用あるいは活性酸素の生成などの化学的作用、また温度上昇といった熱的作用が生じる。一般に超音波の周波数が低いほどキャビテーションに必要な音響強度は低い。
19	液晶性高分子	液晶性 (結晶状態のような配向性 (異方性) と液体のような流動性) を示す高分子化合物。温度などの外部刺激に対する応答性を示し、低分子液晶と比べ高分子としての強固さを残しながら、流動性のある自己組織構造を取る。この性質を利用し、パーフルオロカーボンの封入用キャリアとして開発を行った。
20	フッ化アルキル化ポリマー	パーフルオロカーボンを効率良く封入するために、疎水性領域にフッ化アルキル基をエステル結合でアスパラギン酸に結合させたポリマー。親水部にポリエチレングリコールを持つ両親媒性高分子。
21	ポリイオンコンプレックス	イオン性高分子のイオンに対して、それと対となるイオンを持つ高分子を混合することにより形成されるイオン性の高分子複合体。対イオンによりそれぞれの親水性が打ち消されることにより全体として疎水性の複合体を形成する。本研究ではポリアスパラギン酸 (カルボキシル基) に対して、ポリリジン (アミノ基) を複合化させて、ポリイオンコンプレックスを形成している。

2 2	ゼラチン誘導体	ゼラチンは、コラーゲンを酸およびアルカリ処理により変性、水可溶化した天然高分子である。ゼラチンは、アミノ基、カルボキシル基、およびヒドロキシル基などの反応性官能基をもっているため、化学反応により容易にその物理化学的性質を変化させることができる。ゼラチン誘導体の例として、正電荷を付与したカチオン化ゼラチン、負電荷を付与したアニオン化ゼラチン、あるいは疎水性を付与した疎水化ゼラチンなどがある。
-----	---------	--

I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性

1.1 NEDO が関与することの意義

本プロジェクトは、健康で安心して暮らせる社会を実現するため、高度医療機器や高齢者等の健康で積極的な社会参加を支援する機器等の開発、疾患関連遺伝子やタンパク質等の生体分子の機能・構造の解明に基づくテーラーメイド医療・予防医療・再生医療の実現に寄与する「健康安心プログラム」の一環として実施する。

悪性腫瘍（がん）は、現在、日本の死亡要因の第1位を占めており、死因全体の約30%にも達する。また、疾患の発生数も高齢化社会の進展とともに増加しつつある。近年、PET健診などに代表されるがん検診が行われているにも拘わらず、がんによる死亡数は増加してきているのが現状である。このようながんの治療法として、これまでに手術、放射線治療、化学療法、免疫治療などの集学的治療などが行われてきたが、がんを根治することはいまだできておらず、特に再発や転移をきたした場合の治療は困難であり、死にいたる症例も数多く見られる。一方、これらの治療法は長期間にわたって繰り返し実施されることが多いため、副作用が高頻度に発生し、適用可能な治療法はおのずと限定されてくる。また、治療による拘束やその副作用によって患者のQOL（Quality of Life）は著しく低下し、本人や家族の経済的損失は多大し、加えて国の医療コストを増大させている。

上記の従来型治療法では、薬剤が全身に行き渡るために生じる激しい副作用や、放射線被爆による正常細胞へのダメージ等が避けられないため、昨今の研究では、放射線等の使用を極力抑えつつ、薬剤等をがん細胞のみにピンポイントに届け、局所的に効かせる技術（ドラッグデリバリーシステム、以下、「DDS」と言う）の開発が行われてきつつある。

このため、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下、「NEDO技術開発機構」という。）は、QOLを低下させることなくがんを根治させるために、薬剤等をがん細胞のみにピンポイントに輸送し、光、超音波、磁場などの外部エネルギーを利用して、薬剤効果を局所的かつ高効率に発現させる技術の開発を行う。本プロジェクトは、体内における薬物の挙動（体内動態）を精密に制御し、選択的かつ望ましい濃度-時間パターンのもとに薬物を作用部位に送り込むことによって、薬物治療の最適化を実現することを目的とするドラッグデリバリーシステム（DDS）と人体の深部まで届く様々な外部エネルギーを組み合わせ、治療の効果及び効率を飛躍的に高める新たながん治療を可能とする「次世代DDS型悪性腫瘍治療システム」の開発を行うことを目的とする。

1.2 実施の効果（費用対効果）

（１）革新的DDSと光ファイバー技術を融合した光線力学治療システム

①費用:4.8億円(3年間)

②効果:本事業では、表在性膀胱がんのPDTを目指しており、フェーズがTis(上皮内癌)、Ta(上皮結合組織への浸潤)の多発型、T1(筋層への浸潤)の膀胱がん患者年間4千人(罹患者数の30%)と再発膀胱癌患者年間3-4千人(罹患者数の20-30%)が対象となり、年間6-7千人に対する適応が見込まれる。また、本事業で開発されたPDTシステムは、現在PDT適応の肺がん(罹患者数:6.3万人)、食道がん(1.5万人)、胃がん(10.4万人)、子宮頸がん(1.8万人)にも適応可能である。現状のPDTと比較して、本システムは、優れたがん特異性を有しており、PDTにおいて問題となる光過敏症を示さないことから、広く普及することが見込まれ、さらに他の治療法と比較しても初回治療で臓器機能が温存できるために、がん患者の入院期間の短縮や早期の社会復帰が期待でき、その経済効果は計り知れない。また近年、高性能で小型のレーザーも開発されており、その取り扱いも容易であることから、本システムは、広く普及し、地域医療にも大きく貢献することが期待される。現在、国内における抗がん剤および医療機器の市場規模はそれぞれ約5000億円および約2兆円であり、本技術によって少なくとも国内だけで数十億円の市場創出が見込まれる。

2) 相変化ナノ液滴を用いる超音波診断・治療統合システム

①費用:4.7億円(3年間)

②効果:本事業は、元々原理的に低侵襲治療に適し、かつ深部まで到達可能な超音波治療の問題点を解消し次世代型の超音波治療装置を開発するためのものである。超音波の収束性のみでなく増感剤との相乗的な選択性を用いる、超音波単体よりも部位選択性に優れ、さらに、従来の超音波治療の泣き所であった、超音波の効果がどの部位に適用されるかが治療前にわかる安全性に優れた超音波治療装置のベース開発を行った。本事業の手法は、特に既存の超音波治療に比べた制限はないため、潜在的な適用部位は、表在部(乳房、甲状腺等)から深部(肝臓、腎臓、膵臓)に渡る。このため、適用が見込まれる患者数は100万人以上(生涯罹患率より算出)と推定される。本事業と同様の目的で、粒子線治療や中性子線捕捉療法等が検討されており、特に前者については世界に類を見ない数の建設計画が立てられている。これらの治療法は、しかしながら、加速器・施設という大型・高価なものであり、収益性に関する議論が常につきまとう。本事業の成果は部分的にこのような治療法の置き換えを可能とするものでありながら、部屋から部屋へ移動可能なほど小型で、かつ超音波診断装置をベースとする安価なものである。経済的な費用対効果に関してはいうまでもなく、拠点病院以外の中小施設でのフォローアップ治療などを含め、より多くの数の国民が低侵襲治療の恩恵に浴することができる未来への礎を作ったという観点で、本事業の費用対効果は非常に高い。

2.事業の背景・目的・位置づけ

悪性腫瘍（がん）は、現在、日本の死亡要因の第1位を占めており、死因全体の約30%にも達する。また、疾患の発生数も高齢化社会の進展とともに増加しつつある。近年、PET健診などに代表されるがん検診が行われているにも拘わらず、がんによる死亡数は増加してきているのが現状である。このようながんの治療法として、これまでに手術、放射線治療、化学療法、免疫治療などの集学的治療などが行われてきたが、がんを根治することはいまだできておらず、特に再発や転移をきたした場合の治療は困難であり、死にいたる症例も数多く見られる。一方、これらの治療法は長期間にわたって繰り返し実施されることが多いため、副作用が高頻度に発生し、適用可能な治療法はおのずと限定されてくる。また、治療による拘束やその副作用によって患者のQOL（Quality of Life）は著しく低下し、本人や家族の経済的損失は多大化し、加えて国の医療コストを増大させている。

上記の従来型治療法では、薬剤が全身に行き渡るために生じる激しい副作用や、放射線被曝による正常細胞へのダメージ等が避けられないため、昨今の研究では、放射線等の使用を極力抑えつつ、薬剤等をがん細胞のみにピンポイントに届け、局所的に効かせる技術（ドラッグデリバリーシステム、以下、「DDS」と言う）の開発が行われてきつつある。

このため、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下、「NEDO技術開発機構」という）は、QOLを低下させることなくがんを根治させるために、薬剤等をがん細胞のみにピンポイントに輸送し、光、超音波、磁場などの外部エネルギーを利用して、薬剤効果を局所的かつ高効率に発現させる技術の開発を行う。本プロジェクトは、体内における薬物の挙動（体内動態）を精密に制御し、選択的かつ望ましい濃度-時間パターンのもとに薬物を作用部位に送り込むことによって、薬物治療の最適化を実現することを目的とするドラッグデリバリーシステム（DDS）と人体の深部まで届く様々な外部エネルギーを組み合わせ、治療の効果及び効率を飛躍的に高める新たながん治療を可能とする「次世代DDS型悪性腫瘍治療システム」の開発を行うことを目的とする。

1) 革新的DDSと光ファイバー技術を融合した光線力学治療システム

【当初の研究開発の必要性】

PDT（光線力学療法）は、早期肺がんなどの低侵襲治療法として、現在、臨床応用されている。PDTの最大の問題は、光増感剤が皮膚に集積し、太陽光を浴びることにより惹起される光過敏症等の副作用であり、がん組織特異的に光増感剤をデリバリーするDDSの開発が強く望まれている。しかしながら、凝集性の高い光増感剤を薬剤キャリアに内包させることは必ずしも容易ではなく、光増感剤の高い活性を維持しつつがん細胞選択的に集積するDDSの開発が必要である。また、体内のがん組織に対するPDTを実現するためには、患部に対して低侵襲な照射を実現する一方で、標的組織に対して効率的に光照射を行う光ファイバー及び光照射装置の開発が必要である。膀胱がんなどの多発性かつ再発率の高いがんに対する有効なPDTを行うためには腫瘍選択的DDSと患部に効率的に光照射を行うことのできる照射システムを融合した治療システムを確立する必要がある。また、難治性がんの根絶のためには、本システムと化学療法剤内包

DDSを併用し、お互いの治療効果を相乗的に高める治療法を開発する必要がある。

【修正後の研究開発の必要性】

胃、大腸、食道、口腔内、気管、膀胱などの粘膜上のがんは、再発性が高いことが知られているが、これは高度異形(severe dysplasia)を含めた前がん状態や微小がんを検出し、取り除くことが困難であることに起因するものと考えられる。これが最も顕著であるのが膀胱がんであり、膀胱粘膜中に潜む微小がんは、経尿道的膀胱腫瘍切除術(TUR)や抗がん剤およびBCGの膀胱内注入療法では根絶することができないため、膀胱がんは最も再発率が高く、50-90%が再発することが知られている。そこで本事業では、光増感剤をがん組織に選択的に送達するDDSと粘膜全体に均質光を照射する光照射システムを組み合わせることによって、正常粘膜を傷害することなく粘膜上の微小がんを根絶できる光線力学治療(PDT)システムを開発する。また、微小がんの検出のために、DDSキャリアを蛍光色素で標識することによって、微小がんを蛍光イメージング(Photodynamic Diagnosis (PDD))で描出でき、診断と治療を同時に行うことができるシステムを開発する。一般的に、多くの光増感剤は、蛍光も有しているが、励起光と蛍光の波長差(ストークスシフト)が短く、PDDにおいては励起光の漏れ込みが問題となるが、本システムでは蛍光色素と光増感剤の励起波長の切り換えによって診断と治療を容易に切り替えることができ、任意の蛍光色素の選択によってバックグラウンドの低い蛍光像が得られるものと考えられ、微小がんの検出ができるものと考えられる。このような技術は、膀胱がんだけでなく、内視鏡的粘膜切除術(EMR)で完治が困難な胃がん、食道がん、大腸がんなどのあらゆる粘膜がんをターゲットにできるので、臨床的に非常に価値が高いものと思われる。

現状のPDTにおいて、最も大きな問題は、光増感剤が正常組織に集積することに起因する光傷害の惹起である。レザフィリン等の光過敏症が低減された第二世代の光増感剤製剤においても正常組織への僅かな集積のために正常組織への光照射は光傷害を惹起するために、腫瘍に対するピンポイントの光照射が必要となる。一方、上記の微小がんを標的としたPDTにおいてはピンポイントの光照射は困難であり、正常組織を傷害することなくがん組織を根絶することが難しい。一方、DDSは、Enhanced Retention and Permeability (EPR)効果によるがん選択的な集積に加えて、正常組織の血管壁は通過しないために正常組織への光増感剤の集積を顕著に抑制することができ、その結果、正常組織への光照射による光傷害を著しく抑制できるものと考えられる。この結果、DDSと患部全体に光照射を行う光照射システムを組み合わせることによって、検知が困難な微小がんにも適応でき、さらに正常組織を傷害することなくがん組織を根絶することのできる新しいコンセプトのPDTが実現されるものと考えられる。また、PDTでは、光増感剤の皮膚への集積により光過敏症が惹起されるために、その解決が望まれている。光過敏症が低減されたレザフィリンの場合においても患者は2週間の暗室での生活を強いられることが知られており、このため現在は、体外に速やかに排泄される光増感剤の開発がトレンドとなっているが、皮膚への集積を完全に回避することは困難である。これに対して、本事業で開発する高分子ミセル型DDSは、正常組織の血管内皮細胞のtight junctionを通過しないために、皮膚には集積せず、血管の透過性が亢進しているがん組織に選択的に集積することによって、高い腫瘍組織/皮膚の集積比を達成することが可能であり、優れた治療効果を示す一方で、光過敏症等の光毒性を大幅に低減もしくは回避することができるものと考えられる。

このように、腫瘍選択的な DDS と均質光を照射する光照射システムの組み合わせによって、他の治療法では完治が困難な多発性かつびらん性の微小粘膜がんの根治を目指す試みは、本事業が世界で初めてであり、新規性および独創性に優れ、診断-治療を同時に行えるなど先進性にも優れ、すべての粘膜がんが標的になることから汎用性も高いものと思われる。さらに、PDT は、ボロン中性子捕捉療法 (BNCT) の加速器のような高額で大型の機器を必要とせず、近年、高性能で小型のレーザーの開発が進んでいることや取り扱いが容易であることなどによって、広く普及し、地域医療にも貢献できるものと考えられる。

【変更することになった背景】

・平成 20 年 8 月 6 日に癌研有明病院で実施された出口ミーティングにおいて、本事業の開発委員の山口俊晴氏より、「本事業で開発を進めている DDS と光照射システムを融合した PDT システムが、高度異形 (severe dyslasia) を含めた前がん状態や微小がんの治療において臨床的に高い優位性を有している」という助言を受け、事業の背景・目的・位置づけに反映させた。

2) 相変化ナノ液滴を用いる超音波診断・治療統合システム

超音波は、体の外から体内の特定部位に物理エネルギーを収束させ、そのエネルギーを用いて部位選択的な治療を行うという手法に極めて適している。例えば電磁波と比較すると、可視光のような波長の短い電磁波では使用がほぼ体表に限られるのに対し、超音波では原理的に肝臓などの深部領域への適用も可能である。電磁波においてもマイクロ波・ラジオ波等を用いると深部へも適用可能であるが、その場合波長が長いことによる制限から、部位選択性を得ることが困難である。これに対し、超音波であれば、一辺 1cm 程度の領域への限局性を得ることは比較的容易である。また、深部に適応可能かつ部位選択的な治療効果が得られるという観点では、日本で特に積極的に建設計画が進行している粒子線治療⁵⁾ (陽子線、炭素線など) がある。この粒子線治療と比較すると、超音波の方が装置規模および価格が極めて小さい。超音波は、小型・安価でありながら、生体深部への適用が可能という希有な存在なのである。

しかしながら、現状の超音波治療装置は、このような原理的な特長を生かし切れていないといわざるを得ない。複数の、既に人体に適用されている装置があるものの、以下のような問題点を抱えているのである。

1. 治療適用部位の事前予測が難しい
2. 治療用の強度が高く副作用の恐れあり (1kW/cm² 以上の高強度が必要)
3. 治療時間が長い (場合によっては数時間必要とする)

これらの問題点が解決できれば、超音波治療装置の普及が進み、より多くの人が低侵襲治療の恩恵に浴することができるようではないかと期待される。

上記問題点を解決するための方策として、我々が考案したものが相変化ナノ液滴 (以下 PCND) と超音波とを用いる治療法である。図 1 に PCND を用いる超音波治療の概念を示す。まず薬剤前駆体である PCND を投与する。次に、PCND が腫瘍に到達した頃を見計らって超音波のパルス波 (相変化パルス) を腫瘍に照射する。相変化パルスにより PCND はミクロンサイズの気泡 (マイ

クロバブル) へと変化 (相変化) する。PCND は超音波診断画像上可視化できないのに対し、マイクロバブルは画像上高輝度で観察されるため、どの部位にマイクロバブルが生成したかが超音波診断装置により確認できる。このマイクロバブルは超音波照射により生じる温度上昇を促進する効果があるため、マイクロバブルを目的部位に生成することは薬剤 (=超音波治療の増感剤) の *in situ* 調製と等価であると考えられる。相変化パルス照射に続いて、適切な部位にマイクロバブルが生成したことを確認した上で治療用超音波を照射し、マイクロバブルが存在する部位のみで温度を治療温度まで上昇させ選択的な治療を行う。以上のような手順を可能とする PCND が存在すれば、上記3つの問題は解決可能である。

本事業の位置づけは、このような PCND と超音波とを用いた治療を実現するため、

- 1) 図1に示すような仕組みが実際に生体中で働くかどうか
 - 2) 臨床を想定したプロトタイプを設計・開発し、その動作検証を行う
- の二点を行うことがその位置づけである。

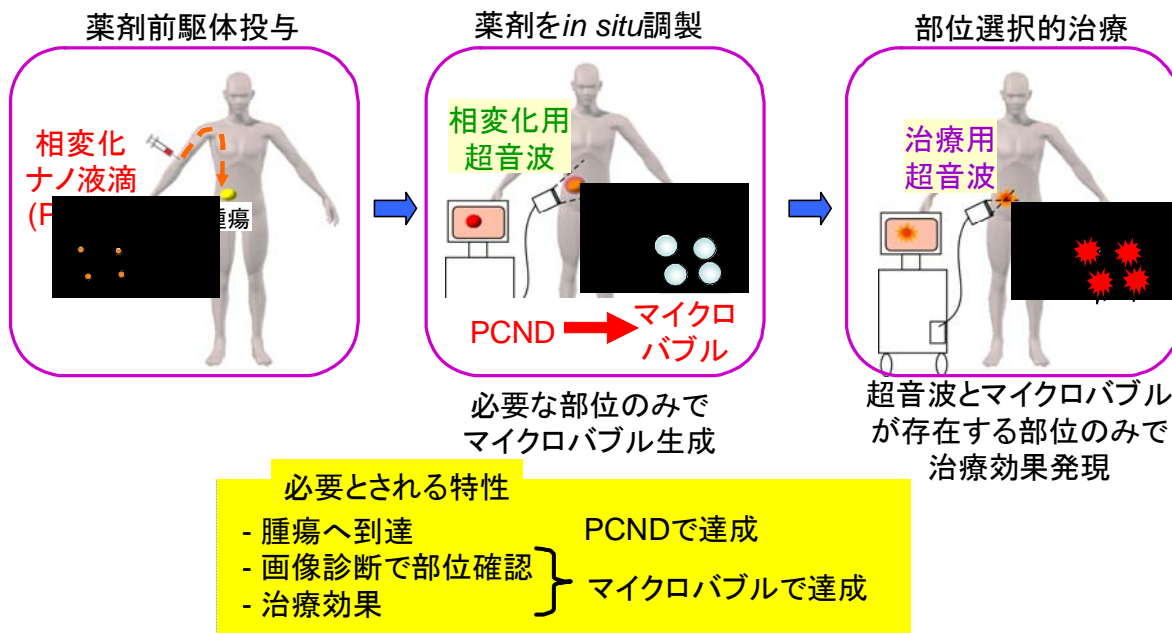


図1 相変化ナノ液滴と超音波とを用いた低侵襲治療の概念

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

1) 革新的DDSと光ファイバー技術を融合した光線力学治療システム

【当初の目標】

光線力学治療（PDT）は、表在性の早期がん（肺がん、食道がん、胃がんなど）の低侵襲的治療法として臨床応用されており、その有効性が実証されてきている。また、PDTは、多発がんを発見する機会の多い現在において、初回治療で臓器機能を温存できることから非常に有用であると考えられている。しかしながら、従来型のPDTは、サイズの大きい腫瘍や深部がんに対して適応することが困難であり、さらに光増感剤の皮膚への集積に基づく光過敏症などの副作用を示すことが知られており、これらの問題の解決が強く望まれている。そこで本事業では、光増感剤をがん細胞に選択的に送達するDDSと体内の腫瘍に対して効率的な光照射を行うことのできる光学ファイバーの開発を行い、光過敏症などの副作用を回避しつつ、従来型のPDTよりも優れた治療効果を実現することを目指す。

本事業では、光増感剤のDDSとして、ブロック共重合体の自己会合によって形成される粒径数十ナノメートルの高分子ミセルを開発する。具体的には、光増感剤内包高分子ミセルの血中滞留性と腫瘍集積性を高めることを目的として、ブロック共重合体の組成の最適化、内核への化学架橋の導入、分岐状ポリエチレングリコール（PEG）の利用によるミセル表面の高密度化やミセル表面への新たなPEG鎖の導入（PEGの重層化）を行う。さらに、PDTの効果と腫瘍選択性を高めるために、がん細胞に特異的なリガンド分子を表面に導入した高分子ミセルを開発する。

本事業では、光増感剤内包高分子ミセルを用いて表在性膀胱がんのPDTを行う。多発性の膀胱がんに対して有効なPDTを実現するためには、膀胱内に均質な光照射を行う必要があり、この目的において、膀胱内腔への均質な光を照射できる（照射むらのない）光学ファイバーの開発を行う。高分子ミセル型DDSと均質な光照射を可能にする光学ファイバーを利用することによって、膀胱萎縮などの副作用を惹起することなく従来型の光増感剤よりも優れたPDTの治療効果を達成する。また、本技術を食道がんなどのその他の上皮系がんのPDTへと展開する。さらに、PDTの新しい展開として、光増感剤内包高分子ミセルによるPDTと制がん剤内包高分子ミセルによるがん化学療法との併用ならびにPDTと樹状細胞ワクチンの腫瘍内投与の併用について検討を行い、PDT単独では治療が困難な腫瘍モデルに対しても有効な革新的がん治療法を開発する。

各開発テーマごとの具体的な目標は以下のように定める。

1)-1. 光増感剤を内包した腫瘍特異的DDS製剤の開発

光増感剤をキャリアへ搭載後、90%以上の一重項酸素産生効率を示す光増感剤を開発する。また、皮膚などの正常組織への集積を最小限にすることで皮膚毒性などの副作用を回避する一方で、従来型光増感剤の10倍以上の腫瘍選択的な集積を実現し、革新的治療効果を実現する。さらに、従来型光増感剤の1/10の濃度、及び1/10の光エネルギー密度で従来

型 P D T と同等以上の抗腫瘍効果を達成する。

1)-2. 患部に対する効果的な光照射を可能にする照射システムの開発

膀胱内腔全体を均質に照射することができ、粘膜面いずれの場所においても 150 mW/cm^2 以上の照射強度を達成する。さらに、照射部位の熱凝固を回避し、照射組織面での温度上昇を 30°C 以内に抑えるファイバー先端の造作を実現する。

1)-3. 難治性がんに対する P D T（光線力学療法）の開発と化学療法及び免疫療法を融合した治療システムの開発

膀胱萎縮を惹起することなく膀胱がんを根治できる治療システムを開発する。特に、膀胱がんモデルに対して、膀胱萎縮を 10% 以下に抑制し、光過敏症などの皮膚毒性を完全に回避する一方で、 50% のマウスに対しがんを根治できる P D T を確立する。最終的に治療対象をその他の上皮系がんに応用し、前臨床試験を実施する。P D T 及び化学療法単独では治療困難な腫瘍モデルに対して、両者の併用による有効な治療法を確立する。また、P D T と樹状細胞（D C ; Dendritic Cell）の腫瘍内投与によって、末梢及び肺転移モデルに対する P D T と免疫療法を融合した治療効果を確認する。

【修正後の目標】

光線力学療法（P D T）は、表在性の早期がん（肺がん、食道がん、胃がんなど）の低侵襲的治療法として臨床応用されており、その有効性が実証されてきている。また、P D T は、多発がんを発見する機会の多い現在において、初回治療で臓器機能を温存できることから非常に有用であると考えられている。しかしながら、従来型の P D T は、サイズの大きい腫瘍や深部がんに対して適応することが困難であり、さらに光増感剤の皮膚への集積に基づく光過敏症などの副作用を示すことが知られており、レザフィリン等の第二世代型の光増感剤の場合においても治療後に二週間の暗室での生活を強いられることが知られている。一方、P D T は、膀胱がん、食道がん等の粘膜がんにおける外科的には切除が困難な微小がんの治療法として有効であるものと考えられるが、正常膀胱粘膜を傷害することなく、がん細胞を選択的に死滅させるためには、がん細胞に特異的な光増感剤の集積を実現しなくてはならない。このため、がん組織に対して特異的に光増感剤を送達できる DDS の開発が強く望まれている。そこで本事業では、光増感剤をがん細胞に選択的に送達する DDS と体内の管腔臓器内に均質光を照射するための光学ファイバーの開発を行い、正常粘膜を傷害することなく、粘膜内の微小がんを治療できる新しい概念の P D T の開発を行う。

本事業では、光増感剤の DDS として、ブロック共重合体の自己会合によって形成される粒径数十ナノメートルの高分子ミセルを開発する。具体的には、光増感剤内包高分子ミセルの血中滞留性と腫瘍集積性を高めることを目的として、ブロック共重合体の組成の最適化、内核への化学架橋および疎水性基の導入、分岐状ポリエチレングリコール（PEG）の利用やミセル表面への新たな PEG 鎖の導入によって PEG の高密度化を行う。さらに、P D T の効果と腫瘍選択性を高めるために、がん細胞に特異的なリガンド分子を表面に導入した高分子ミセルを開発する。

本事業では、具体的な粘膜がんとして、多発性かつびまん性に進展し、(粘膜内の微小がんを治療することが困難であるために)再発率が非常に高いことが知られている表在性膀胱がんに対するPDTを実現することを目指す。膀胱がんに対して有効なPDTを実現するためには、膀胱内に均質な光照射を行う必要があり、この目的において、膀胱内腔への均質な光を照射できる(照射むらのない)光学ファイバーの開発を行う。高分子ミセル型DDSと均質な光照射を可能にする光学ファイバーを利用することによって、膀胱萎縮などの副作用を惹起することなく従来型の光増感剤よりも優れたPDTの治療効果を達成する。また、蛍光色素を導入した高分子ミセル型DDSとサブミリサイズの微小腫瘍検知可能な内視鏡イメージングシステムによって、粘膜内の微小がんを蛍光イメージングによって検出し、励起光の波長の切り替えによって同時にPDTを行うことができる診断-治療機能一体型PDTシステムの構築も行う。さらに、PDTの新しい展開として、光増感剤内包高分子ミセルによるPDTと制がん剤内包高分子ミセルによるがん化学療法との併用効果の検討を行い、PDT単独では治療が困難な腫瘍モデルに対しても有効ながん治療法を開発する。

各開発テーマごとの具体的な目標は以下のように定める。

1)-1. 光増感剤を内包した腫瘍特異的DDS製剤の開発

光増感剤をキャリアへ搭載後も、90%以上の一重項酸素産生効率を示す光増感剤を開発する。また、皮膚などの正常組織への集積を最小限にすることで皮膚毒性などの副作用を回避する一方で、従来型光増感剤の10倍以上の腫瘍選択的な集積を実現し、革新的治療効果を実現する。さらに、従来型光増感剤の1/10の濃度、及び1/10の光エネルギー密度で従来型PDTと同等以上の抗腫瘍効果を達成する。

1)-2. 患部に対する効果的な光照射を可能にする照射システムの開発

膀胱内腔全体を均質に照射することができ、粘膜面いずれの場所においても150 mW / cm²以上の照射強度を達成する。さらに、照射部位の熱凝固を回避し、照射組織面での温度上昇を30℃以内に抑えるファイバー先端の造作を実現する。また、サブミリサイズの微小腫瘍を検知できる内視鏡イメージング技術を確立する。

1)-3. 難治性がんに対する光線力学療法システムの開発

多発性かつ、びまん性に進展する膀胱がんに対して、膀胱萎縮を惹起することなくがん組織を根絶できるPDTシステムを開発する。具体的には、ラット膀胱がんモデルに対して、膀胱萎縮を10%以下に抑制し、光過敏症などの皮膚毒性を完全に回避する一方で、50%のマウスに対しがんを根治できるPDTを確立する。最終的に治療対象をその他の上皮系がんに適用し、前臨床試験を実施する。PDT及び化学療法単独では治療困難な腫瘍モデルに対して、両者の併用による有効な治療法を確立する。

【変更することになった背景】

・平成 21 年 1 月 16 日に実施された本事業に対する中間評価により、1)-3. 難治性がんに対する P D T（光線力学療法）の開発と化学療法及び免疫療法を融合した治療システムの開発における「免疫療法」にかかる開発は H 2 0 年度をもって中止することになった

2) 相変化ナノ液滴を用いる超音波診断・治療統合システム

本研究開発では、早期腫瘍の安全な診断・治療を実現するための、超音波診断用造影剤および治療用増感剤として優れた特性を有するマイクロバブルの液体前駆体である相変化ナノ液滴、ナノ液滴の診断・治療効果発現用の超音波照射装置、および液滴の体内動態制御用高分子キャリアを用いる次世代ドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発を行うことを目的とする。なお、対象として想定する腫瘍部位は、超音波診断・治療に適する消化器もしくは・泌尿器科の表財部である。

従来の超音波造影剤は、共振性に優れ造影能が高く、かつ、治療用増感剤としての機能も有するが、血管から腫瘍組織へ漏出することのできないマイクロバブル系と、血管から腫瘍組織へ漏出することが可能ではあるが、造影能がマイクロバブルに劣り、かつ治療用増感剤としての機能を有しないナノ微粒子系に分けられる。腫瘍の選択的な診断・治療を行うには、両者の長所を併せ持つ造影・増感剤が必要である。このため、液-気相変化型のナノ液滴系造影・増感剤の開発を行う。

具体的には従来の超音波造影剤では両立が難しかった、1)血管から腫瘍組織への漏出性、2)画像化の容易さ、3)治療用超音波の効果増強という3つの特長を併せ持つ新規な相変化ナノ液滴型超音波造影・増感剤について、低沸点フルオロカーボンのコアとし、難水溶性物質を可溶性可能な物質系をシェルとするアプローチでの開発を行う。沸点の異なる難水溶性物質を添加することで、体内で1時間程度の滞留性を確保しながら診断用超音波としての安全域内（Mechanical Index: 1.9 以下、Thermal Index: 1.0 以下）の音響条件で、相変化によるマイクロバブルを生成できるナノ液滴を開発する。さらに、製剤化を念頭においた調製方法の確立を行う。

合わせて、相変化ナノ液滴の活性化用シーケンスおよび診断用プローブの開発を行う。通常の超音波診断装置は、生体組織からの反射信号およびマイクロバブルからの反射信号の画像化用に最適化されており、ナノ液滴の相変化によるマイクロバブル生成用の超音波照射は想定されていない。これまでの基礎検討により、相変化を生じるには、通常よりも高い音響負圧と長いパルス長が必要であることがわかっており、新規にシーケンスおよびプローブを開発する必要がある。

具体的には上記ナノ液滴を相変化させ、マイクロバブルを得るための活性化用超音波シーケンスの最適化（周波数、波形、波数）を行い、その最適シーケンスを実際に照射可能な超音波診断プローブの設計を行う。必要に応じて熱対策などの耐久性を考慮した構成とする。最適化は周波数：1-10MHz、波数：20波程度以下の範囲で Mechanical Index: 1.9 以下、Thermal Index: 1.0 以下の安全域内で行う。その設計を元にプローブ試作を行い、さらに動物実験などによるフィードバックを行い、より効率の高いプローブの開発を行う。

さらに上述相変化ナノ液滴と組み合わせて用いる治療用超音波照射システムの開発も合わせて行う。従来の超音波を用いた治療としては、43℃程度の加温を数時間継続して行うハイパーサーミアと65℃以上のタンパク凝固温度以上での加熱を数秒間行う加熱凝固治療とが挙げられる。本開発は後者の加熱凝固治療に属するものの、ナノ液滴が相変化した結果生成したマイクロバブルが存在する部位のみを選択的に加熱する新規な治療法である。従来の治療装置で想定している超音波照射条件とは異なり、また、相変化によりマイクロバブルを生成する過程と連動する機構が必須であることから、新規に治療に適した超音波の照射条件および治療用トランスデューサを中心とする治療システムの開発が必要である。

具体的には、相変化によりマイクロバブルを生じた後に治療用に照射する超音波の最適化(周

波数、波形、波数、およびモニタリング手法)を行う。最適化はまず計算機シミュレーションをベースとした理論的検討を行い、その結果に基づき、超音波トランスデューサの設計を行う。設計に基づき、まず固定焦点型のトランスデューサを試作し、動物実験等により性能チェックを行う。さらに、可変焦点型のトランスデューサの設計、試作も行う。また、ナノ液滴の相変化用用いる超音波診断プローブとの操作上の統合に関するソフトウェア開発も行う。

並行して、更なるナノ液滴の安定化を図るために、多機能化相変化ナノ液滴（長時間滞留、複メカニズムによる治療）を行う。相変化ナノ液滴を用いる診断・治療システムにおいては、ナノ液滴をエマルションの形態で用いる。一般にエマルションは体内では短時間滞留するため、本診断・治療システムは投与後1時間以内での短期型の処置を基本とする。この短期型の処置に加え、腫瘍部位や状態の詳細な観察を行う、あるいは大きく成長してしまった腫瘍の治療を行うといった適用範囲の拡大のためには、ナノ液滴を長時間体内で滞留できる造影前駆体の構造が必要となる。また、本システムではマイクロバブルの治療増感作用を活用して加熱凝固治療を行うが、マイクロバブルはキャビテーションの核としても機能することから、キャビテーションにより抗腫瘍効果を発現する音響化学活性物質との共存により加熱作用以外に化学的作用を併用する集学的な治療が考えられる。このためには、どのような音響化学活性物質が適切であるかを探索し、かつ造影剤に導入する手法を確立する必要がある。

具体的に、相変化ナノ液滴の体内安定性を向上させ診断・治療オプションを増やすため、ナノ液滴の外殻（シェル）として、温度で硬さの変化する液晶性高分子を用いる、あるいはゼラチン誘導体を用いるナノ液滴の開発を行う。

2)-4-3 トランスフェリン修飾バブルリポソームの開発（帝京大学）

高い体内安定性を持ち、加熱凝固治療以外に化学的作用により抗腫瘍効果を発揮する音響化学活性物質を共存できる構造を持つ相変化ナノ液滴を開発する。

本研究では、音響化学的抗腫瘍活性物質としてドキシソルビシン、相変化ナノ液滴として難水性低沸点化合物であるパーフルオロペンタンとパーフルオロプロパンの混合物（以後、パーフルオロカーボン（PFC））、腫瘍組織標的リガンドとしてトランスフェリンを用い、これらが共存できる形態としてリポソームとする。リポソームは、深部治療に対応するために、また体内での安定性を確保し長時間滞留させるために、サイズを200nm以下とし、ポリエチレングリコール被覆する（PEG-リポソーム）。リポソーム内部はドキシソルビシンのゲルで満たされ、PFCのナノ液滴がその中に分散した形態とする。

生体に投与された本リポソームは、血中滞留型であるため深部固形がん組織の新生血管から漏れ出て、トランスフェリンによってがん細胞に特異的に結合することができる。収束超音波照射するとリポソーム内のPFCの液滴が相変化を起こしガス化して気泡（バブル）を形成する。この気泡は、超音波診断装置用の造影剤として働き診断が可能となる。また、治療用収束超音波照射によって気泡の強力なキャビテーションによるホットスポットが生じ、腫瘍部位のみが局所的に加熱され、ドキシソルビシンと相まって選択的な殺細胞効果が得られる。本リポソームを用いて収束超音波音場と超音波増感効果に基づく非侵襲的な腫瘍治療システムを構築する。

2. 事業の計画内容

2.1 研究開発の内容

京都大学大学院薬学系研究科 教授 橋田充をプロジェクトリーダー、東京女子医科大学先端生命医科学研究所 所長 岡野光夫をサブプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施する。

研究開発項目1) 革新的DDSと光ファイバー技術を融合した光線力学治療システム

【当初の研究内容】

1)-1. 光増感剤を内包した腫瘍特異的DDS製剤の開発(東京大学、ナノキャリア株式会社)

光増感剤のデリバリーのためのDDSとして、ブロック共重合体の自己会合によって形成される粒径数十ナノメートルの高分子ミセルを開発する。光増感剤としては、フタロシアニンを中心分子とする樹状高分子(デンドリマーフタロシアニン(DPc)(励起波長680nm))を使用し、アニオン性のDPcと反対電荷を有するPEG-ポリカチオンブロック共重合体との静電相互作用を利用して、ポリイオンコンプレックス(PIC)型高分子ミセルに内包させる。このようなDPc内包高分子ミセルに関して、以下のa)~c)の項目について検討を行い、腫瘍集積性とPDTの治療効果の向上を図る。

a) 血中滞留性に優れたDPc内包高分子ミセルの構築(東京大学)

血中滞留性に優れたDPc内包高分子ミセルの構築を目指して、ブロック共重合体の組成の最適化、高分子ミセル内核へのジスルフィド(SS)架橋の導入、分岐状PEGの利用によるPEGの高密度化やミセル表面のPEGの重層化を行う。これらの分子設計によって開発されたDPc内包高分子ミセルは、物性評価と培養がん細胞を用いたPDT活性(光毒性)の評価を行い、マウスを用いた動物実験により血中滞留性を評価することによって、分子設計の有効性を確認する。これらの研究と平行して、DPc内包高分子ミセルの固形がんに対するPDTの有効性を担がんマウス(皮下移植モデル)を用いた動物実験により検証する。これらの研究を通じて、DPc内包高分子ミセルの最適化を行い、腫瘍集積性とPDTの治療効果の向上を図る。

b) 表面にリガンド分子を導入したDPc内包高分子ミセルの構築(東京大学)

リガンド分子として、多くのがん細胞や血管新生部位の血管内皮細胞に発現する $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに結合する環状RGDペプチドを表面に配置したDPc内包高分子ミセルの構築を行い、そのPDTにおける有効性の検証を行う。調製した高分子ミセルに関しては、がん細胞による取り込み量と光毒性の評価を行い、ミセル表面のリガンドの効果を確認する。さらに、担がんマウスを用いた制がん活性評価を実施し、リガンドを導入していないDPc内包高分子ミセルより優れた治療効果を達成することを目標とする。

c) DPc内包高分子ミセルの製造プロセスの構築(東京大学、ナノキャリア株式会社)

上記のa)b)の項目において最適化された高分子ミセルに関して実用化に向けた製造プロセスの構築を行う。具体的には、グラムスケールでブロック共重合体の合成を行い、高純度のブロック共重合体を得るための合成条件(溶媒、温度、反応時間等)の最適化を行う。さらに、100mLスケールでのDPc内包高分子ミセルの大量調製を行い、高分子ミセルの保存安

定性についても検討を行う。

1)-2. 患部に対する効果的な光照射を可能にする照射システムの開発 (ファイバーテック株式会社)

a) 光分散プローブの設計と開発

深部がんに対して有効なPDTを実現するためには、優れたDDSの開発に加え、生体内に低侵襲的かつ効率的に光照射を行うことができる光ファイバープローブならびに光学系システムの開発が必要である。

管腔臓器（たとえば膀胱）内腔での光照射の際、臓器に到達した光の組織内分布に空間的ムラがあると、確実なPDT効果が担保されない。逆に、組織内における光強度分布をできる限り均質になるよう、光を照射してやることができれば、組織内での光エネルギーを高い精度で推定でき、その結果、高い信頼性をもって治療効果を予測することができる。また、膀胱粘膜に多発性に発生してびまん性に浸潤する膀胱がんに対して、膀胱組織への均質光照射を実現することができれば、同時多発的に発生・増殖するがん病変に対して確実なPDT効果が期待できる。そこで、本研究開発では、組織内光強度分布が均質となるよう光照射できる光分散プローブの設計ならびに開発を進める。組織内への均質光照射を実現するのに、対象とする臓器の内腔や組織内部における光の散乱特性を加味した光強度分布を予測することが重要である。生体組織での光散乱は、波長、組織厚などのパラメータによって異なることより、光学路追跡法やモンテカルロシミュレーション法を駆使し、光強度分布を予測する。その上でシミュレーションに基づいて光分散プローブを設計し、均質光照射に関して最適化を図ったレーザーファイバープローブの開発を行う。他方、光ファイバーとして石英系ファイバーを用いるのが一般的であるが、開口数（NA）が0.35と狭い上、レーザー光はコヒーレンス性が高く照射時に十分な照射角を持たない。そのため光分散プローブの開発に加え、レーザーファイバーへの入射光を光学的に分散光に変換することで出射光を均質化する技術の併用も行う。

b) 臨床使用に資する安全性、信頼性を有する光分散プローブの確立

工業用途の光分散プローブの加工・製造技術は可能と言えるが、医療用途のそれは確立されていない。その理由としては、（1）細径で、機械的強度が十分なものを作ることは困難であり（生体深部治療の場合、内視鏡下での使用が前提となるために、光分散プローブの最大径は1mm程度であることが必要である）、さらに（2）生体にintactな材料で、しかも安全率の高い（壊れにくい）ものを作ることは困難であること、などが挙げられる。このため本研究開発では、光分散プローブのコート剤および被覆材料などを検討することによって、最大径が1mm以下のファイバーを開発する。加えて、臨床使用に高い安全性をもって供するために、日本工業規格（JIS）の要求基準に適合した仕様を具備させる。すなわち、光学及び光学器械－医用内視鏡及び内視鏡用処置具の一般的要求事項（JIS T 1553）ならびに、医用電気機器 第2部の内視鏡装置の安全性に関する特別要求事項（JIS T 0601-2-18）に準拠した光分散プローブを開発する。また、臨床的にPDTを行う際、レーザー照射中に組織と光分散プローブが接触してしまうことがあり、このような状況が続

くとプローブ先端部温度が上昇し炭化する。その結果、機械的強度が低下し、光伝達能力も低下する。また、組織の熱凝固が惹起されると、光が凝固部位より深く浸透せず、十分な治療効果が得られない。したがって、本研究開発では、照射部位の熱凝固を回避するために、照射組織面での温度上昇を30℃以内に抑える光照射システムを実現する。

1)-3. 難治性がんに対する光線力学療法の開発と化学療法及び免疫療法を融合した治療システムの開発（東京大学）

a) 疾患モデルを用いた固形がんの光線力学治療（PDT）システムの開発（東京大学）

本研究開発では、光増感剤内包高分子ミセルを用いたPDTの具体的な対象疾患として、表在性膀胱がんを選定する。膀胱がんは、尿路がん（腎盂、尿管、膀胱）の中で、最も死亡率が高く、罹患数でも膀胱がんが最も多く、尿路がん全体の約半数を占めている。また、膀胱がんは、再発率が高く、10-30%が浸潤性のがんに進行することが知られている（浸潤性膀胱がんに対しては膀胱全摘出術がとられ、排尿障害や性的不能が問題となる）。さらに、膀胱がんは、膀胱内全体に同時多発することが知られており、治療の標的は膀胱全体にせざるを得ないために、その治療法として化学療法剤やBCGの膀胱内注入がとられるが、これは必然的に正常膀胱粘膜の障害（膀胱萎縮）を招き、患者のQOLを低下させることが知られている（国立がんセンター がん情報サービス(http://ganjoho.ncc.go.jp/pub/med_info/cancer/010225.html); J. Gee et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 43: 277-286 (2002); M.S Cookson et al., J. Urol. 158: 62-67 (1997))。そこで本研究開発においては、1)-1の項目において開発する腫瘍特異的な光増感剤内包高分子ミセルと、1)-2の項目において開発する膀胱内に均一な光を照射できる光学ファイバーを利用することによって、膀胱がんに対し選択的かつ効率的なPDTを実現することを目指す。

本研究では、ラットの正所性膀胱がんモデルを作成し、光増感剤内包高分子ミセルを全身投与した後に、尿道からカニューラを介して光ファイバーと細径内視鏡を挿入し、内視鏡で病巣を確認しながら膀胱内に光照射を行う。治療効果は、一定期間後にラットを犠牲死させ、腫瘍サイズの測定と病理切片の観察によって確認し、副作用である膀胱萎縮は、膀胱容量と膀胱内圧（Leak point pressure）の測定によって評価する。また、PDTに伴う光過敏症（皮膚毒性）は、ラット皮膚に疑似太陽光照射を行い、皮膚の炎症の有無によって評価することを計画している。これらの検討においては、欧米で臨床研究がなされているフタロシアニンや我が国において既に実用化されているフォトリンを対照光増感剤製剤として用い、それらの既存の製剤との比較において光増感剤内包高分子ミセルの有用性を明らかにする。また、これらの治療効果と副作用の検討に加えて、本研究開発では、光増感剤の組織分布の評価法を確立し、腫瘍/正常膀胱粘膜および腫瘍/皮膚の集積比を評価し、光増感剤内包高分子ミセルの腫瘍に対する選択的集積性も明らかにする。本研究開発に関しては、研究期間内に十分な検討を重ね、プロジェクト終了後の臨床試験開始を目指す。

b) PDTと化学療法を融合した革新的がん治療システムの開発（東京大学）

PDTの単独治療では全てのがん細胞を死滅させることが困難な腫瘍に対して、制がん剤を内包するDDSの併用は極めて有効であると考えられる。そこで本研究では、光増感剤内

包DDSとして、項目1)-1で開発する光増感剤内包高分子ミセルと制がん剤内包高分子ミセルの併用効果を担がんマウス（皮下移植モデル）を用いて検討する。この検討においては、各々のDDSの投与の順序や光照射のタイミングを最適化し、単独治療や低分子薬剤の併用療法よりも優れた治療効果を実現することを目指す。

c) PDTと免疫療法を融合した革新的がん治療システムの開発（東京大学）

PDTは、早期がんの低侵襲的治療法として有効であるが、組織浸透性の低い可視光を利用するためにサイズの大きい腫瘍に対しては適用することができない。また、PDTは、局所療法であるために、転移がんに対して有効ではない。PDTとがん免疫治療の併用は、再発や転移を抑制することでがんを根治できる治療法として大きな可能性を秘めている。そこで本研究開発では、PDTと樹状細胞(DC)の腫瘍内投与の可能性を検討する。具体的には、DPc内包ミセルによる樹状細胞の細胞障害性T細胞(CTL; Cytotoxic T Lymphocyte)の誘導能の増強効果を検証するために、マウスを用いて *in vivo* でCTLの誘導能を検証する。PDT処理を加えたDCを用いて腫瘍特異的なCTLが誘導できるかどうかを検証し、PDTを用いた免疫療法の検証を行う。

【修正後の研究内容】

1)-1. 光増感剤を内包した腫瘍特異的DDS製剤の開発（東京大学、ナノキャリア株式会社）

光増感剤のデリバリーのためのDDSとして、ブロック共重合体の自己会合によって形成される粒径数十ナノメートルの高分子ミセルを開発する。光増感剤としては、フタロシアニンを中心分子とする樹状高分子(デンドリマーフタロシアニン(DPc) (励起波長680nm))を使用し、アニオン性のDPcと反対電荷を有するPEG-ポリカチオンブロック共重合体との静電相互作用を利用して、ポリイオンコンプレックス(PIC)型高分子ミセルに内包させる。このようなDPc内包高分子ミセルに関して、以下のa)~c)の項目について検討を行い、腫瘍集積性とPDTの治療効果の向上を図る。

a) 血中滞留性に優れたDPc内包高分子ミセルの構築（東京大学）

血中滞留性に優れたDPc内包高分子ミセルの構築を目指して、ブロック共重合体の組成の最適化、高分子ミセル内核へのジスルフィド(SS)架橋の導入および疎水性基の導入、分岐状PEGの利用やミセル表面への新たなPEG鎖の導入によるPEGの高密度化を行う。これらの分子設計によって開発されたDPc内包高分子ミセルは、物性評価と培養がん細胞を用いたPDT活性(光毒性)の評価を行い、マウスを用いた動物実験により血中滞留性を評価することによって、分子設計の有効性を確認する。これらの研究と平行して、DPc内包高分子ミセルの固形がんに対するPDTの有効性を担がんマウス(皮下移植モデル)を用いた動物実験により検証する。これらの研究を通じて、DPc内包高分子ミセルの最適化を行い、腫瘍集積性とPDTの治療効果の向上を図る。

b) 表面にリガンド分子を導入したDPc内包高分子ミセルの構築（東京大学）

リガンド分子として、多くのがん細胞や血管新生部位の血管内皮細胞に発現する $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに結合する環状RGDペプチドを表面に配置したDPc内包高分子ミセルの構築を行い、そのPDTにおける有効性の検証を行う。調製した高分子ミセルに関しては、が

ん細胞による取り込み量と光毒性の評価を行い、ミセル表面のリガンドの効果を確認する。さらに、担がんマウスを用いた制がん活性評価を実施し、リガンドを導入していないD P c 内包高分子ミセルより優れた治療効果を達成することを目標とする。

c) D P c 内包高分子ミセルの製造プロセスの構築（東京大学、ナノキャリア株式会社）

上記のa) b)の項目において最適化された高分子ミセルに関して実用化に向けた製造プロセスの構築を行う。具体的には、グラムスケールでブロック共重合体の合成を行い、高純度のブロック共重合体を得るための合成条件(溶媒、温度、反応時間等)の最適化を行う。さらに、100mLスケールでのD P c 内包高分子ミセルの大量調製を行い、高分子ミセルの保存安定性についても検討を行う。

1)-2. 患部に対する効果的な光照射を可能にする照射システムの開発（ファイバーテック株式会社、防衛医科大学校）

a) 光分散プローブの設計と開発

深部がんに対して有効なP D Tを実現するためには、優れたD D Sの開発に加え、生体内に低侵襲的かつ効率的に光照射を行うことができる光ファイバープローブならびに光学系システムの開発が必要である。

管腔臓器（たとえば膀胱）内腔での光照射の際、臓器に到達した光の組織内分布に空間的ムラがあると、確実なP D T効果が担保されない。逆に、組織内における光強度分布をできうる限り均質になるよう、光を照射してやることができれば、組織内での光エネルギーを高い精度で推定でき、その結果、高い信頼性をもって治療効果を予測することができる。また、膀胱粘膜に多発性に発生してびまん性に浸潤する膀胱がんに対して、膀胱組織への均質光照射を実現することができれば、同時多発的に発生・増殖するがん病変に対して確実なP D T効果が期待できる。そこで、本研究開発では、組織内光強度分布が均質となるよう光照射できる光分散プローブの設計ならびに開発を進める。組織内への均質光照射を実現するのに、対象とする臓器の内腔や組織内部における光の散乱特性を加味した光強度分布を予測することが重要である。生体組織での光散乱は、波長、組織厚などのパラメータによって異なることより、光学路追跡法やモンテカルロシミュレーション法を駆使し、光強度分布を予測する。その上でシミュレーションに基づいて光分散プローブを設計し、均質光照射に関して最適化を図ったレーザーファイバープローブの開発を行う。他方、光ファイバーとして石英系ファイバーを用いるのが一般的であるが、開口数（NA）が0.35と狭い上、レーザー光はコヒーレンス性が高く照射時に十分な照射角を持たない。そのため光分散プローブの開発に加え、レーザーファイバーへの入射光を光学的に分散光に変換することで出射光を均質化する技術の併用も行う。

一方、本開発研究では、1)-3で後述するように、ラットの正所性膀胱がんモデルに対するPDTを行い効果検証を進める。膀胱がんの治療においては、微小がんを確実に消滅させることが再発を防止する上できわめて重要である。そのためには、微小がん、特に粘膜内癌のレベルでも検知できる診断測定システムを構築していく必要がある。そのために、1)-2で前述した、蛍光標識したD P c 内包高分子ミセルを導入し、微小がんの蛍光イメージン

グを可能にする観察測定システムを構築する。その際、観察システムが、膀胱内イメージを取得する細径内視鏡下で機能することができるよう、設計・開発を進める。また、ヒトへの適用を前提にすると、がん診断とがん治療を同時に実施することが望まれるので、蛍光イメージング用細径内視鏡に治療用光照射ファイバースコープを挿入できる造作に構築する。

b) 臨床使用に資する安全性、信頼性を有する光分散プローブの確立

工業用途の光分散プローブの加工・製造技術は可能と言えるが、医療用途のそれは確立されていない。その理由としては、(1) 細径で、機械的強度が十分なものを作ることは困難であり(生体深部治療の場合、内視鏡下での使用が前提となるために、光分散プローブの最大径は1mm程度であることが必要である)、さらに(2) 生体にintactな材料で、しかも安全率の高い(壊れにくい)ものを作ることは困難であること、などが挙げられる。このため本研究開発では、光分散プローブのコート剤および被覆材料などを検討することによって、最大径が1mm以下のファイバーを開発する。加えて、臨床使用に高い安全性をもって供するために、日本工業規格(JIS)の要求基準に適合した仕様を具備させる。すなわち、光学及び光学器械—医用内視鏡及び内視鏡用処置具の一般的要求事項(JIS T 1553)ならびに、医用電気機器 第2部の内視鏡装置の安全性に関する特別要求事項(JIS T 0601-2-18)に準拠した光分散プローブを開発する。また、臨床的にPDTを行う際、レーザー照射中に組織と光分散プローブが接触してしまふことがあり、このような状況が続くとプローブ先端部温度が上昇し炭化する。その結果、機械的強度が低下し、光伝達能力も低下する。また、組織の熱凝固が惹起されると、光が凝固部位より深く浸透せず、十分な治療効果が得られない。したがって、本研究開発では、照射部位の熱凝固を回避するために、照射組織面での温度上昇を30℃以内に抑える光照射システムを実現する。

1)-3. 難治性がんに対する光線力学治療システムの開発(東京大学、防衛医科大学校)

a) 疾患モデルを用いた固形がんの光線力学治療(PDT)システムの開発(東京大学、防衛医科大学校)

本研究開発では、光増感剤内包高分子ミセルを用いたPDTの具体的な対象疾患として、表在性膀胱がんを選定する。膀胱がんは、尿路がん(腎盂、尿管、膀胱)の中で、最も死亡率が高く、罹患数でも膀胱がんが最も多く、尿路がん全体の約半数を占めている。また、膀胱がんは、再発率が高く、10-30%が浸潤性のがんに進行することが知られている(浸潤性膀胱がんに対しては膀胱全摘出術がとられ、排尿障害や性的不能が問題となる)。さらに、膀胱がんは、膀胱内全体に同時多発することが知られており、治療の標的は膀胱全体にせざるを得ないために、その治療法として化学療法剤やBCGの膀胱内注入がとられるが、これは必然的に正常膀胱粘膜の障害(膀胱萎縮)を招き、患者のQOLを低下させることが知られている(国立がんセンター がん情報サービス(http://ganjoho.ncc.go.jp/pub/med_info/cancer/010225.html); J. Gee et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 43: 277-286 (2002); M.S Cookson et al., J. Urol. 158: 62-67 (1997))。そこで本研究開発においては、1)-1の項目において開発する腫瘍特異的な光増感剤内包高分子ミセルと、1)-2の項目

において開発する膀胱内に均一な光を照射できる光学ファイバーを利用することによって、膀胱がんに対し選択的かつ効率的なPDTを実現することを目指す。

本研究では、ラットの正所性膀胱がんモデルを作成し、光増感剤内包高分子ミセルを全身投与した後に、尿道からカニュラを介して光ファイバーと細径内視鏡を挿入し、内視鏡で病巣を確認しながら膀胱内に光照射を行う。膀胱内多発性腫瘍モデルでは、微小な腫瘍の検知が困難であることより、腫瘍に対するPDT効果を定量的に評価することが難しい。したがって、微小腫瘍、特に粘膜内癌のレベルでも検知できる診断測定システムを構築していく必要がある。そのためには、微小腫瘍でもイメージングできる技術的方法論を構築することが不可欠である。そこで、腫瘍細胞に蛍光タンパク（GFP）を導入し、それを膀胱内に播種し、微小腫瘍レベルのイメージングを可能にする動物モデルを確立する。この動物モデルと1)-2)で前述した蛍光イメージング観察測定システムを使って、微小がん検知技術の向上を図る。同時に、蛍光標識したDPc内包高分子ミセルを投与し、微小腫瘍へのDPc内包高分子ミセルの集積性を評価していく。すなわち、GFPの導入された微小腫瘍から発する蛍光と、蛍光標識DPc内包高分子ミセルから発する蛍光の分布一致度を測定する。そして、この指標を高めるようDPc内包高分子ミセルの改良を行う。

本研究では、治療効果を判定するため、経時的に超音波イメージングや内視鏡イメージング等で評価する一方、一定期間後にラットを犠牲死させ、腫瘍サイズの測定と病理切片の観察によって確認する。また、治療効果は、一定期間後にラットを犠牲死させ、腫瘍サイズの測定と病理切片の観察によって確認し、副作用である膀胱萎縮は、膀胱容量と膀胱内圧（Lak point pressure）の測定によって評価する。また、PDTに伴う光過敏症（皮膚毒性）は、ラット皮膚に疑似太陽光照射を行い、皮膚の炎症の有無によって評価することを計画している。これらの検討においては、欧米で第一世代の光増感剤製剤であるフォトフリンと第二世代の光増感剤であるレザフィリンを対照光増感剤製剤として用い、それらの既存の製剤との比較において光増感剤内包高分子ミセルの有用性を明らかにする。また、これらの治療効果と副作用の検討に加えて、本研究開発では、光増感剤の組織分布の評価法を確立し、腫瘍／正常膀胱粘膜および腫瘍／皮膚の集積比を評価し、光増感剤内包高分子ミセルの腫瘍に対する選択的集積性も明らかにする。本研究開発に関しては、研究期間内に十分な検討を重ね、プロジェクト終了後の臨床試験開始を目指す。

b) PDTと化学療法を融合した革新的がん治療システムの開発（東京大学）

PDTの単独治療では全てのがん細胞を死滅させることが困難な腫瘍に対して、制がん剤を内包するDDSの併用は極めて有効であると考えられる。そこで本研究では、光増感剤内包DDSとして、項目1)-1)で開発する光増感剤内包高分子ミセルと制がん剤内包高分子ミセルの併用効果を担がんマウス（皮下移植モデル）を用いて検討する。この検討においては、各々のDDSの投与の順序や光照射のタイミングを最適化し、単独治療や低分子薬剤の併用療法よりも優れた治療効果を実現することを目指す。

【変更することになった背景】

・平成19年11月1日付の計画変更において、本事業を効率的に推進するために、各種光源照射装置、光計測装置、高機能顕微鏡などの東京大学にはないPDT研究のための充実した設備とノ

ウハウを有している防衛医科大学校が共同実施機関として本事業に参画することになった。

・平成 21 年 1 月 16 日に実施された本事業に対する中間評価の結果に基づく実施方針の修正によって、1)-3. 難治性がんに対する P D T（光線力学療法）の開発と化学療法及び免疫療法を融合した治療システムの開発における「免疫療法」にかかる開発は H 2 0 年度をもって中止することになった。また、研究開発内容に関して以下の変更を行った。

- 機器開発に関して、既存の機器に対する優位性を明確にしたスペックの設定とその実現のための研究開発内容を追加した。
- DDS に関して、レザフィリン等の既存のに対する優位性を明確にしたスペックの設定とその実現のための研究開発内容を追加した。

2) 相変化ナノ液滴を用いる超音波診断・治療統合システム

① ナノ液滴の相変化を用いる超音波 DDS 用照射シーケンス・装置

低沸点パーフルオロカーボン（PFC）を含むナノ液滴を前駆体として、高感度な超音波造影剤であるマイクロバブルを目標部位にて生製するための超音波照射技術の開発に関わるものであり、以下の要素からなる。これらを購入予定の超音波診断装置 EUB8500 に搭載しプロトタイプとする予定である。

① ナノ液滴の相変化を用いる超音波 DDS 用照射シーケンス・装置

低沸点パーフルオロカーボン（PFC）を含むナノ液滴を前駆体として、高感度な超音波造影剤であるマイクロバブルを目標部位にて生製するための超音波照射技術の開発に関わるものであり、以下の要素からなる。

①-1 相変化能を有するパーフルオロカーボン液滴の開発（株式会社日立製作所）

本開発において部位選択的な診断・治療を可能とする薬剤のコアとなる部分である。難水溶性の低沸点化合物を過熱状態で安定に存在させた上で、超音波照射時には過熱を解消させ気体（マイクロバブル）へと変化させることが要件となる。この要件を満たすため、既に造影剤として用いられ毒性に関する特性がある程度わかっているパーフルオロカーボン（PFC）を用いるアプローチを中心とする。これまでにほぼ確立した、パーフルオロペンタン（PFP, 沸点 30℃）を基本構成要素とし、リン脂質を中心とする界面活性剤によりエマルジョン化した後に高圧乳化処理を 4℃下で加える（保冷チャンバーを購入予定）ことで、約 200nm の直径（DLS 測定による）を有する液滴を調製する手法を基とした。ガスクロマトグラフィ用オートサンブラ装置を用いて、より正確な薬剤中に内包された PFC の定量を行なう。また、PFC 量だけではなく、高圧処理後のリン脂質など界面活性剤量を定量する必要があるため、本研究で購入予定のプレートリーダーを用いて行なう。さらに、複数の分布を持ったエマルジョンの粒度分布も正確に測定するため、粒度分布を測定できるレーザ回析法粒度分布測定装置による分析を行う。これらの装置を用いた実験系を立ち上げた上で、最適な体内動態分布を有する薬剤構造の決定をおこなう。さらに、シェルの安定性に関する加速試験（実際に想定される保存条件よりも厳しい環境下での安定性試験）の手法を確立し、十分な安定性（37℃で同条件におけるマイクロバブル造影剤と同等以上）を有するシェル構造を選択する。また、単体では不安定な PFP に類似の構造を有する化合物を微量添加して安定化する手法により、安定性と活性との両立を達成できる組成の最適化を行う。そのようにして選択した候補物質系を小・中動物に投与し、安定性と超音波感受性を両立することを確

認する

さらに、これまでの開発でほぼ最適と思われる組成の相変化ナノ液滴の効果をより大きな動物にて検証し、必要に応じて薬剤及び薬剤中に内包量について微調整を行い、体内動態および安全性に関する基礎検討を行う。具体的にはウサギを用いて、これまでマウスおよびラットと同等の超音波強度とナノ液滴濃度相変化を用いて体内で相変化を生じることが可能かどうかを農工大と共同で調べる。なお、この動物実験の効果検証を精度よく行うため、得られた結果に基づき、必要に応じて特に相変化を生じる主体であるパーフルオロペンタンの組成の調整を行う。さらに必要に応じて微調整として二成分系であるパーフルオロカーボンの多成分系化も検討する。また、シェルフライフ向上の検討も行い、ナノ液滴の凍結時の温度履歴および解凍時の温度履歴に関する依存性を調べる。

最終目標（平成21年度）：

- ・体内で一時間程度の滞留性を確保しながら診断用超音波としての安全域内（Mechanical Index: 1.9 以下、Thermal Index: 1.0 以下）の条件で、相変化によるマイクロバブルを生製できるナノ液滴の開発（目的とする腫瘍内に概ね 2×10^3 個 / mm^3 以上集積）

①-2 相変化用超音波シーケンス開発（東北大）

①-1 に記載したナノ液滴を相変化させる物理刺激として適する超音波条件の決定に関する検討であり、生体により安全でかつ相変化をより確度高く生じるための照射シーケンスの開発を行う。また、相変化が生じたことを検出し画像化するのにも超音波診断装置を用いることから、相変化の選択的な可視化に適する画像処理および画像表示手法についても検討を加える。特に相変化が超音波焦点域各部位でカオス的に生じる性質を最大に活用できる積算的な画像処理方法について広く検討を行う。なおこのシーケンスの開発と、①-3 で開発するシステムの開発においては、片方の要素技術の進捗が他方の要素技術の要求仕様を低減させる関係にある。

最終目標（平成21年度）：

- ・①-1 の相変化ナノ液滴と組み合わせて用いる診断用超音波シーケンスの開発（1-10 MHz, Mechanical Index: < 1.9, Thermal Index: < 1.0）

①-3 相変化用超音波照射システムの開発（株式会社日立製作所）

①-2 におけるシーケンスを実行可能な超音波照射装置特に超音波発生用のプローブの開発であり、従来のプローブよりも高強度の超音波照射に対応可能なプローブを設計、試作する。これまでにわかっているプローブの劣化はプローブ内部に溜まった熱によるものと考えられるため、相変化用の超音波シーケンスの最適化を行うと同時に、十分な放熱を可能とするプローブ構造の設計を行い、相変化用のプローブの開発を目指す。超音波プローブにおいては、感度と帯域幅がトレードオフの関係にあり、これに製造工程上の限界を把握して、極めて微妙なバランスの上で設計を行ってきた。今回この微妙なバランスを保ったまま、放熱という新しい最適化項目も満たすために、熱伝播及び振動特性に関するシミュレーション検討を行う。シミュレーション結果に基づき、高分解能なイメージングと高出力化を同時に実現出来る市販プローブの改造ベースで人体への適用を想定したプローブのプロトタイプ（周波数帯域 3 - 8 MHz、最大出力負圧 3MPa）を試作し、音響特性を検証しナノ液滴からのマイクロバブルの生製を①-4 の中動物で確認する。

最終目標（平成21年度）：

- ・①-2 の相変化ナノ液滴と組み合わせて用いる診断用超音波シーケンスを照射可能な診断プロ

ブ（ナノ液滴相変化用トランスデューサ）の開発。（4-10MHzの周波数範囲において、Mechanical Index 1.9以下でかつ波数100以下の条件で診断用超音波を照射可能とし、診断装置としての分解能は1mm以下）

①-4 相変化用超音波および照射システムの中・大動物による効果検証（東京農工大）

①-1から①-3に記載された開発要素の原理確認が済んだ後の動物実験での生体での効果の検証を行う。本開発は体内に投与する薬物と体外から照射する超音波とを組み合わせるものであり、前者は動物種およびがん種によって効果が変動する可能性があり、また後者は動物の大きさおよび部位によって狙った部位に焦点領域をあわせることの容易さが変動する可能性がある。これらの要素を加味し、本開発では、マウスなどの小動物におけるがん種の違いによる相変化効果の影響およびラット、ウサギを用いた動物種での効果の違いを検証する。また、前臨床試験に進むためのステップとして、臓器の大きさがヒトに比較的近いイヌなどの大動物を用いて、小中型動物だけでなく、大型の動物の組織においても超音波によるナノ液滴の相変化効果が得られるかも検討する。超音波診断装置を用いて各種サイズの動物種に応じた最適な超音波撮像手法の検討を行いながら、前記の相変化造影の実証を日立製作所と共同して遂行する。同時に、様々な動物種の体内での相変化造影剤の挙動や分布の情報を得ることで、相変化造影に適した部位や撮像タイミングの検討を行う。これらの検討に基づき、①-1に記載された薬剤最適化により選択した候補物質系を用いて、中動物を用いた場合の投与後薬剤有効時間を検討を行なう。

最終目標（平成21年度）：

上記開発要素①-1および①-3による相変化をウサギなどの中動物およびイヌなどの大動物にて相変化を検証する。相変化の検証とは、開発要素①-1および①-3を使いウサギ、イヌ等の中大型動物標的組織中において、十分相変化部位を認識できることであり、すなわち、標的組織中の相変化部位とそれ以外の部位のエコー輝度がS/N比10dB以上であることを本開発要素の最終目標とする。

①-5 相変化用超音波及び照射システムの小動物による安全性の検証（学校法人 慈恵大学）

①-4における効果検証は、本システムの有効性を確認する上で重要なプロセスである。しかし、今回の開発が、治療増感剤を体内で局所的に生製して、その局所的な増感剤を外部からの物理的刺激に限定して発現させるものであることから、その効果が目的部位に限局され他の臓器などに影響を及ぼさないことを確認することもシステムの実用上重要であると考えられる。このため、本開発においては、マウス、ラットなどの小動物固形がんモデルを使用して、①-2の超音波シーケンスにより①-1のナノ液滴を相変化させた際その他臓器における副作用、及び、がん周囲正常組織に及ぼす影響の程度を検証する。即ち、他臓器及びがん周囲組織への無害性などを実証することで、本開発の目的である標的部位での局所的な造影剤生製の実現状態を確認する。なお、安全性の検証法としては、腫瘍モデルを作成し、腫瘍の成長状態、新生血管の増殖の程度を小動物に適した超音波診断装置（リース）を用いて経時的に監視し、その3次元的数据を基準にし、相変化型造影剤の気相化に伴う効果を気相化後に病理組織学的に評価する。さらに、日立製作所および東京農工大と協力し、①-4の動物実験による効果検証と対応させた病理学的な検証を行なう。効率的に解析作業を行うために、超音波診断装置のオフライン解析システムを使用してPC上で行う。相変化型造影剤の気相化に伴う効果は気相化後に組織標本を作成し、デジタル顕微鏡を使用して評価をする。また、ナノ液滴を相変化させた際その他臓器における副作用およびがん周囲正常組織におよぼす影響の程度を検証する。即ち、ラットを対象として相変化型ナノ液滴投与量とこれの循環による各臓器（肝・腎・脾・肺）の組織変性の程度の評価、および日立製作所と共同でウサギVX2担がんモデルを対象として、開発中の超音波照射装置を使用した腫瘍造影による

腫瘍周囲正常組織の損傷の程度を検討する。相変化用超音波条件と気相化後の正常組織の変性の程度を病理組織学的に評価する。

最終目標（平成21年度）：

動物固形がんモデルを使用して①-2の超音波シーケンスにより①-1のナノ液滴を相変化させた際の腫瘍周囲正常組織及び他臓器における副作用の程度の検証（投与から24時間後の脾臓及び肝臓における残存率が、腫瘍周囲正常組織における残存率の2倍以下、投与量の2%以下であることをガスクロマトグラフィーにより検証。1週間後の多臓器（肝・腎・脾・肺）の組織損傷の程度および腫瘍造影による腫瘍周囲正常組織損傷の程度が可逆的損傷であることの検証。）

②マイクロバブルの存在部位を対象とする治療用超音波照射シーケンス・装置

②-1 マイクロバブルの存在部位を対象とする治療用超音波照射シーケンス（株式会社日立製作所）

本開発では、ナノ液滴の相変化により生じるマイクロバブルをマーカとして治療対象をあらかじめ超音波画像上で確認し、かつマイクロバブルを治療増感剤として用いる低侵襲治療を行うための超音波照射シーケンスおよび治療装置の開発を行う。本開発における超音波治療は、加熱作用とキャビテーションによる作用の双方について検討を行う。

1) 加熱凝固作用：本開発では、ナノ液滴の相変化により局所的に生じたマイクロバブルによる超音波吸収係数の高い領域を選択的に加熱するための超音波照射シーケンスの開発を行う。

2) キャビテーションによる作用：本開発においては、治療用超音波を照射中あるいは照射直後の患部におけるキャビテーション生製状況あるいは温度上昇さらには患部のダメージに関するモニタリングを超音波で行うための新たな計測方式に関する基礎検討を行う。特にこれまで通常の超音波診断画像で用いられることの少なかった超音波の位相情報などの温度や組織変性に起因する信号をも考慮した新たな計測手法に関して治療時のモニタリングに必要な要件の検討を行う。また、本開発におけるナノ液滴が相変化によってマイクロバブルとなった状態は、この三つの過程の成長が終わった段階に相当する。このため、あとは圧壊するだけでキャビテーションの作用を得ることが可能であり、生体においては数 kW/cm^2 の超高強度の超音波が必要となる場合もあるキャビテーションを低い超音波強度で安定して生じることが可能である。本研究開発では、ナノ液滴の相変化によるマイクロバブルによりキャビテーションを生製して治療効果を得るための超音波照射シーケンスの開発を行う。第二高調波重畳法をナノ液滴と組み合わせて治療効果の向上が可能かどうかの基礎検討を行い、加熱凝固治療との相乗的な治療効果を目指す。また、低周波超音波を用いたキャビテーション作用を主に用いる治療法についてさらに検討を行う。

最終目標（平成21年度）：

・①-1の相変化ナノ液滴と組み合わせて用いる、最適化された加熱凝固用超音波シーケンスの開発。

(1-10 MHz, 強度(SPTA): $300 \text{ W}/\text{cm}^2$ 以下で照射後1秒以内(照射時間換算)に対象組織温度を65度以上に上昇せしめ1分程度持続可能)

②-2 マイクロバブルの存在部位を対象とする治療用超音波照射装置（国立大学法人 東北大学）

②-1に述べたような、マイクロバブルの存在下での加熱凝固作用およびキャビテーション作用を用いた治療を行う超音波シーケンスを実現するためには、適切な周波数および強度の超音波を目標部位に収束させることが重要である。このような患部への超音波の収束を可能とするための超音波照射装置の開発を行う。開発の要素技術としては高出力ビームフォーマ（焦点部位制御

部) と、高出力フェーズドアレイ (電子式可変焦点治療用超音波トランスデューサ) からなる。通常の可変フォーカスの撮像システムに比べ、治療用システムの場合、取り扱う信号のエネルギーが100から1000倍に大きくなるため、材料選定の見直しや耐熱性の向上など、大きな変更が必要となる。特に、②-1にてスプリットフォーカス法および第二高調波重畳法の効果が検証された場合には、その結果を取り込み最適な組み合わせで照射できるような配置の照射装置の開発を行う。超音波マルチアンプシステムを購入・製作する。周波数特性分析器およびシャント抵抗、スペクトラムアナライザを用いて、照射装置の評価を行なう。また、マイクロバブルの存在を超音波診断装置で確認し、その部位と治療用超音波の焦点とを合わせることは選択的な治療を行う上で重要であり、方式検討を行った上で超音波診断装置と治療装置との統合を行い、プロトタイプ開発を行う。

さらに、治療用超音波照射装置の基本動作の検討結果にもとづいて、治療用超音波を生体に照射する直径4~8cmの球面状で0.5~4MHzの周波数において液滴より生製したマイクロバブルと組み合わせて加熱凝固治療あるいは音響キャビテーション生製を可能とするための超音波アレイトランスデューサの仕様を決定し、さらにアレイトランスデューサに電気エネルギーを供給する超音波マルチアンプシステムの性能を強化して、両者を組み合わせさらに焦点制御回路を組み込んだ治療用超音波照射装置を製作する。また、診断治療統合のため、治療目的領域の照準・観察に用いる超音波診断装置を組み込み、超音波診断・治療統合システムのプロトタイプを完成する。最終目標 (平成21年度) :

- ・②-2の加熱凝固用超音波シーケンスを照射可能で、診断プローブと診断装置と組み合わせて用いることのできる治療用超音波照射装置の開発。
- a) ナノ液滴の相変化により生じるマイクロバブルとの相互作用により、0.5~4.5MHzの周波数範囲でかつ強度(SPTA)が300 W/cm²以下において、照射後1秒以内 (照射時間換算) に対象組織温度を65度以上に上昇せしめ1分程度持続可能あるいは照射後10秒以内 (照射時間換算) に音響キャビテーションを生製せしめ、1分程度持続可能とする。
- b) 電子捜査により最大±0.5cmの焦点移動を可能とする。
- c) ①-2のナノ液滴相変化用トランスデューサと超音波治療用トランスデューサはシステム上統合され、ナノ液滴相変化用トランスデューサにより生製させたマイクロバブルが生じた部位に超音波治療用トランスデューサをターゲット可能とする。
- d) 超音波照射部位のリアルタイム (毎秒10 frame以上での表示) での超音波診断装置観察を可能とする。

なお、上記最終目標における超音波周波数および強度は音響化学治療および加熱凝固治療に関するこれまでの研究を基に設定したものである。また、超音波の焦点移動距離に関しては直径1cmの腫瘍を対象とすることを目標として設定した。

②-3 治療用超音波及び照射システムの中・大動物による治療効果検証 (国立大学法人 東京農工大学)

②-1から②-2に記載された開発要素を組み合わせ効果を検証する際の原理確認が済んだ後の動物実験にて生体での効果を検証する。本開発は体内に投与する薬物と体外から照射する超音波とを組み合わせるものであり、前者は動物種およびがん種によって効果が変動する可能性があり、また後者は動物の大きさおよび部位によって狙った部位に焦域を合わせることの容易さが変動する可能性がある。これらの要素を加味し、本開発では、マウスなどの小動物におけるがん種の違いによる治療効果の差異、およびラット、ウサギを用いた動物種での治療効果の違いを検証する。また、前臨床試験に進むためのステップとして、臓器の大きさがヒトに比較的近いイヌなどの大動物を用いて、相変化造影剤と組み合わせた治療用超音波照射の効果も検討する。

治療シーケンスおよび治療用超音波照射装置による効果をウサギなどの中動物および犬などの大動物を用いたナノ液滴の相変化によるマイクロバブル生製およびマイクロバブル生製箇所への治療用超音波照射による組織障害を検証し、本開発終了後に前臨床試験へ進むための薬剤・超音波の条件の提示を行う。

最終目標（平成21年度）：

- a) マウスあるいはラットでの実験腫瘍の縮退効果(対象群に比較し腫瘍の体積を30%以下に減少)を検証する。
- b) ②-1および②-2による治療シーケンスおよび治療用超音波照射装置による効果をウサギなどの中動物および犬などの大動物を用いたナノ液滴の相変化によるマイクロバブル生製およびマイクロバブル生製箇所への治療用超音波照射による組織障害を検証し、本開発終了後に前臨床試験へ進むための薬剤・超音波の条件の提示。

②-4 治療用超音波及び照射システムの小動物による安全性の検証（学校法人 慈恵大学）

②-3における効果検証は、本システムの有効性を確認する上で重要なプロセスである。しかし、今回の開発が、治療増感剤を体内で局所的に生製して、その局所的な増感剤を外部からの物理的刺激に限定して発現させるものであることから、その効果が目的部位に限局され他の臓器などに影響を及ぼさないことを確認することはシステムの実用上極めて重要である。このため、本開発においては、ラットなどの小動物固形がんモデルを使用して、②-1および②-2の治療用超音波照射装置を用いて壊死を生じたがんの周囲正常組織での急性期損傷と後遺症状をデジタル顕微鏡を使用して組織学的に評価して安全性を検証する。この安全性と治療効果とを両立させる超音波照射条件を明らかにする。尚、全ての小動物実験は、小動物用イソフルレン麻酔器を使用して最適な麻酔条件下で行う。

動物固形がんモデルを対象に、開発中の治療用超音波照射装置を用いて壊死を生じさせたがんの周囲正常組織での損傷の程度を病理組織学的に評価する。

最終目標（平成21年度）：動物固形がんモデルを使用して、②-1および②-2の治療用超音波照射装置を用いて壊死を生じたがん周囲正常組織損傷の組織学的評価および免疫化学的評価による安全性と治療効果とを両立させる以下の要件を満たす超音波照射条件を探索し、その臨床適用可能範囲を決定する。

- a) 照射時に焦点範囲の3倍以上離れた領域では温度上昇10度未満であること
- b) 経時的追跡を行い、2日目以降には焦点範囲の3倍以上離れた領域における温熱細胞毒性壊死の消失

③ ナノ液滴キャリアシステム

相変化能を有するパーフルオロカーボン（PFC）ナノ液滴のがん組織への送達を最適化するために、高分子を用いるナノ液滴の各種修飾を行う。

天然及び合成高分子を積極的に用いて、血液内投与後に比較的長時間（2時間～48時間）で画像化と治療を目的とする。血液中の半減期が2時間～24時間と長く、EPR効果を利用したターゲティング効率を高めた造影剤を作製する。ターゲティング効率を高めることは、投与量に対するがん集積割合が高まることであり、①-1のナノ液滴に比べてより少量の造影剤による画像取得が可能となるとともに、より小さながん部位の検出を可能とする。この長時間型のキャリアシステムは、ゼラチンあるいは合成高分子（液晶性高分子）を利用した2つの系統の検討を行う。また、これらによって得られたキャリア構造を応用することで加熱凝固治療以外に化学的作用により抗腫瘍効果を発現する音響化学活性物質を共存させた相変化ナノ液滴を開発する。音響化学活性物質と超音波とによる活性酸素を用いた治療は加熱凝固治療と異なる機序によるものであり、

血流の豊富さ等腫瘍の性質により使い分けることを想定している。

なお、両系統の目指すところは上記のように共通したものであり、最終目標も同一なところに設置されている。但し、両系統にはこれまでに得られている結果、材料特性上に大きな違いがある。よって、同一の目標を目指しながら、異なるアプローチを取ることで目標達成をより確実にするとともに、それぞれの材料特性を生かして目標値を超えて性能の高いキャリアシステムを得ることが可能になると考えられる。ゼラチン誘導体のシステムは、これまでに各種ナノ粒子の安定化の研究実績があり、その結果を適用することで長時間安定なシステムを得ることは比較的容易と考えられる。ただし、天然材料であることから化学修飾を施すことによっても、その物理化学的性質を大きく変えることは容易でない。これとは反対に、合成高分子を利用したシステムでは、低分子薬物を封入したキャリアシステムの研究実績はあるものの、疎水性液体を封入するシステムへの応用は初めてである。よって、長時間安定なPFCナノ液滴を形成する高分子組成を求めることが、ゼラチン誘導体に比べて困難と考えられる。一方、一度その組成が見つければ、合成高分子なのでその物理化学的性質を大きく変えて高い安定性の組成を求めることは容易である。また、この両系統に共通する物理化学的性質等の情報交換をしてより高い性能を得ることに役立てることも、両系統が併存する利点である。

③-1 ゼラチン誘導体を用いるナノ液滴の体内動態制御用キャリア (国立大学法人 京都大学・再生医科学研究所)

a) 保存安定性向上のためのゼラチン誘導体の作製と評価 (短時間型キャリア)

ゼラチンにポリ乳酸、コレステロール、フッ素化合物などの疎水性鎖を化学導入し、種々のゼラチン誘導体を作製する。得られたゼラチン誘導体とパーフルオロカーボン (PFC) とを混合することにより、購入予定の高圧ホモジナイザを用いて、ゼラチン誘導体により表面修飾されたナノ液滴を得る。このナノ液滴の作製条件の最適化を図るとともに、ポリ乳酸の分子量と導入率、コレステロールの導入率、ゼラチンの分子量、フッ素化合物の疎水性鎖の導入率 (購入予定のガスクロマトグラフなどにより検討する) などがナノ液滴表面修飾およびそのサイズに与える影響についても調べる。作製した表面修飾ナノ液滴を37℃で静置、そのサイズ変化について検討する。サイズ変化を購入した暗視野顕微鏡で観察、詳細な検討のために顕微鏡に取り付け可能な高感度カメラを購入する。血液模倣液 (アルブミン) 中での保存安定性の向上を目標として、得られたゼラチン誘導体表面修飾ナノ液滴の作製条件の最適化および改良を行う。加えて、ゼラチン誘導体表面修飾ナノ液滴をバイアルに密封し、4℃で所定時間静置、作製直後のゼラチン誘導体表面修飾ナノ液滴のサイズおよびPFC封入量と比較する。密封方法あるいは添加剤を変化させることにより、4℃で長期間 (2ヶ月以上) 保存可能なゼラチン誘導体表面修飾ナノ液滴の最適化および改良を行う。また、高圧ホモジナイザを用いない表面修飾ナノ液滴の作製する。

b) 血中半減期延長のためのゼラチン誘導体の作製と評価 (長時間型キャリア)

ゼラチンにポリ乳酸、コレステロール、フッ素化合物などの疎水性鎖、およびPEGを化学導入し、種々のゼラチン誘導体を作製する。得られたゼラチン誘導体とパーフルオロカーボンとを混合することにより、ゼラチン誘導体により表面修飾されたナノ液滴を得る。このナノ液滴の作製条件の最適化を図るとともに、ポリ乳酸の分子量と導入率、コレステロールの導入率、ゼラチンの分子量、PEGの分子量および導入率、フッ素化合物の疎水性鎖の導入率などがナノ液滴表面修飾およびそのサイズに与える影響について調べる。表面修飾ナノ液滴をマウス尾静脈より投与、血中半減期を調べる。また、表面修飾ナノ液滴を担がんマウス尾静脈より投与、ナノ液滴のがん集積量を調べる。このとき、購入予定の化学発光画像解析装置を用いる。これらの一連の動物実験を繰り返すことにより、血中半減期延長のための表面修飾ナノ液滴の最適化を行う。動物実験の進

行を円滑にするため、最適な麻酔条件を提供する小動物用イソフルレン麻酔器を購入する。また、②-2の超音波照射装置と組み合わせ②-3において抗腫瘍効果を確認する。

最終目標（平成21年度）：

b) 血中半減期延長のためのゼラチン誘導体の作製と評価（長時間型キャリア）。

- ・ゼラチン誘導体を用いた PFC 含有量 10wt%以上、封入率 20%以上を満たすキャリアシステム。（血中半減期 2 時間以上、がん集積量 2%dose/g 以上）

③-2 合成高分子を用いるナノ液滴の体内動態制御用キャリア（(財) 神奈川科学技術アカデミー、国立法人 京都大学理学部）

a) 合成高分子を用いるナノ液滴の体内動態制御用キャリアの作製（(財) 神奈川科学技術アカデミー）

ブロックコポリマーより形成される高分子ミセルなどの会合体は、低分子脂質からなるミセル構造よりも格段に安定であるため、薬物キャリアとして用いられている。本研究開発では PFC を安定に含有するキャリアシステムとしてブロックコポリマーより成る高分子ミセルおよびポリゾームを検討する。

高分子ミセルは、従来、低分子疎水性薬物を封入する目的で、本研究開発の研究者横山らによって研究されてきた。よって液体の PFC の封入は新しい課題である。よって、3つの方法によってこの課題を達成する。

- (1) フッ素化合物を含む様々な疎水性鎖構造
- (2) 液晶性疎水ブロックの利用
- (3) ポリマーゾーム構造の利用

この中で、液晶性疎水ブロックを含む高分子ミセルおよびポリマーゾーム作製には高圧と温度調節の施せる特殊は限外ろか(エクストルーダ)装置が必要となり、機械装置をリースで導入する。平成19年12月～平成20年3月にかけてエクストルーダ装置の条件最適化を行う。

アドリアマイシン等の薬物を用いたモデル封入を通して、PFC封入に好ましい高分子のスクリーニングを行う。PEG誘導体の精製度を高め、合成する液晶性ブロックポリマーの不純物（ポリエチレングリコールホモポリマー）含有量を10%以下まで下げる。

平成20年度までの開発で、液晶性高分子と非液晶性高分子の両者を用いて、PFCの封入をおこなった。液晶性高分子については、技術的に困難であったナノサイズのみセルでの液晶性を確認することに成功したが、PFCの封入は中間目標を満たすほど良好なものではなかった。一方、フッ化アルキルを導入した非液晶性高分子を用いた場合には、良好なPFC封入効率が得られた。当初液晶性高分子について設定していたPFC封入に関する中間目標が、非液晶性高分子を用いた場合にはすべて満たすことができた。このことから、平成21年度は非液晶性の高分子に絞って開発を行う。これに伴って当初の最終目標での「液晶性高分子」を「合成高分子」に変更する。ポリエチレングリコール-b-ポリアスパラギン酸ブロックコポリマーのアスパラギン酸側鎖に約10%フッ化アルキルを導入したもの(前年度の検討で最も高いPFC封入率を示した組成)を用い、PFC含量、ナノ粒子作製条件を変化させて、PFC含有ナノ液滴の諸物性(粒径、保存安定性、疑似体液中での安定性)を最適化する。さらに、ポリリシンなどのポリカチオンでナノ液滴を安定化して、その疑似体液中での安定性、血液中循環性、がんへのターゲティング性能を最適化する。

b) 合成高分子を用いたナノ液滴の物性測定・評価（国立大学法人 京都大学理学部）

b)-1 濃厚系・希薄系におけるマイクロ相分離構造のX線構造解析と粘弾性測定、および動的光散乱測定

フッ素鎖低分子液晶および液晶ジブロック共重合体と P F C を液晶リッチな状態で混合し、形成されたマイクロ相分離構造を購入予定の X 線回折装置用顕微鏡で改良した装置で、同時に試料状態を観察しながら X 線構造解析すると共に、購入予定のデジタルオシロスコープを組み込んだ粘弾性測定を行って液滴界面の粘弾性を定量的に計測・評価するシステムを構築する。また、希薄系における P F C 包含ナノ液滴の動的光散乱法による、液晶ジブロックを用いたナノ液滴のサイズ、分布に関して、温度依存性、濃度依存性を測定し安定性を検証する。液晶性の無いナノ液滴や、液晶性の低いナノ液滴の計測には、ナノ液滴に蛍光分子を混合し、レーザ励起蛍光顕微鏡観察を用いて行う。

b)-2 動的光散乱法によるマイクロ相分離構造内の液晶状態の観測・評価

一般に狭い空間に閉じ込められた場合、液晶状態は大きな影響を受けてその物性が変化する。そこでナノ液滴内での液晶状態を定量的に評価できる方法を確立する。具体的には微弱光の偏光解消動的光散乱法を用いてこれを実現することにより、温度依存性、濃度依存性を測定してナノ液滴の安定性を検証する。その後、液晶ジブロック共重合体を用いて作られたナノ液滴を測定し、その分子構造と液晶相転移の関係を調べ、最適なジブロック共重合体の分子設計にフィードバックする。液晶性の無いナノ液滴や、液晶性の低いナノ液滴内部の P F C 安定性については、レーザ励起蛍光顕微鏡による液滴内部の蛍光分子のダイナミクスを測定して評価する。

b)-3 液晶相転移によるナノ液滴の構造変化の評価

購入予定の精密温度制御装置を用いた温度変化や、紫外線落射照明装置による光照射により液晶相転移を起こすことでナノ液滴の構造変化や不安定化が起こるようなキャリアシステムを構築するため、ジブロック液晶の化学構造や P F C の混合比パラメータとしてナノ液滴システムを解析する。前年度の知見に基づき、特に平成 20 年度においては超音波照射による高分子シェルの液晶-液体相変化を用いたナノ液滴の安定性制御の前段階として、アゾ基を有する試験化合物への光照射による液晶-液体相変化を評価する。光散乱、X 線回折装置などにより、ナノ液滴に起こる状態変化を観測し、液滴の破壊、形状変化、ダイナミクスなどの基礎的なメカニズムを理解する。

最終目標（平成 21 年度）：

a) 液晶性高分子を用いるナノ液滴の体内動態制御用キャリアの作製（神奈川科学技術アカデミー）

- ・合成高分子を用いたキャリアシステムで P F C 含有量 10wt.% 以上、封入率 20% 以上を得てマウスにおいて血中半減期 2 時間以上を達成。
- ・マウスがんにてがん集積量を 2%dose/g 以上を得て、正常組織に対して 10dB 以上の輝度比で超音波画像を得る。

b) 合成高分子を用いたナノ液滴の物性測定・評価（京都大学理学部）

- ・合成高分子を用いたキャリアシステムの P F C 含有量と封入率の実測。
- ・環境変化、経過時間、および液晶相変化に伴うキャリアシステムの安定性変化の定量的検証。

2)-4-3 トランスフェリン修飾バブルリポソームの開発（帝京大学）

悪性腫瘍の治療を行う上で、安全でかつ効率のよい腫瘍細胞の殺傷は不可欠であり、深部の腫瘍組織に対する治療システムの開発は極めて重要である。本研究で開発を目指す音響化学的抗腫瘍活性物質（ドキシソルピシン）とパーフルオロカーボン（PFC）のナノ液滴を封入したトランスフェリン修飾リポソームは生体親和性が高く、しかも細胞内器官の単位（ナノスケール）までサイズ

ダウン（200nm 以下）するため、これと超音波照射とのハイブリッドは、正常組織の傷害を小さくし、効率よくがん細胞を殺傷する機能を有する。つまり、生体に投与された本リポソームは、血中滞留型であるため深部固形がん組織の新生血管から漏れ出て、トランスフェリンによってがん細胞に特異的に結合することができる。収束超音波を照射するとリポソーム内の PFC の液滴が相変化を起こし、気化して気泡（バブル）を形成する。この気泡は、日立グループが開発する超音波診断装置用の造影剤として働き診断が可能となる。また、同様に日立グループが開発する治療用収束超音波照射によって気泡の強力なキャビテーションによるホットスポットが生じ、腫瘍部位のみが局所的に加熱され、ドキシソルビシンと相まって選択的な殺細胞効果が得られる。

平成 19 年度～平成 20 年度

本研究では、次の I と II のプロセスで研究開発を行う。

I. ドキシソルビシンと PFP の液滴を内封したトランスフェリン修飾バブルリポソームの調製

①PFP のミセル液滴の調製を行い、ドキシソルビシンと共に②トランスフェリン修飾 PEG-リポソームに内封する。③リポソームのサイズダウンを行って、100 nm 前後のバブルリポソームを調製する。出来たりポソームの④トランスフェリンの修飾率、細胞結合性を評価し、その構造確認を電子顕微鏡観察で行う。⑤腫瘍組織に見立てたスフェロイドやアクリルアミドゲルを用いて、PFP 気泡の発生と腫瘍組織固化に適したキャビテーションを生じる収束超音波照射条件の検討（*in vitro* 実験）を行う。

超高压ホモジナイザー（高压乳化機）を購入し、本バブルリポソームの調製を検討する。気泡発生および腫瘍組織固化の検討に治療用収束超音波発生装置（増幅アンプ、パルス波発生装置、バースト波発生装置、オシロスコープ）、超音波音響強度測定ハイドロホン、熱電子対温度計入力装置ロガー、熱電子対プローブ、ファントム（HIFU、多目的ゲルタイプ）を購入し、プローブを東北大に再委託して作成する。

II. 担がんマウスにおける、PFP ミセル液滴内封トランスフェリン修飾バブルリポソームの体内動態と腫瘍集積特性の評価および抗腫瘍効果

①内封されているドキシソルビシンを指標に血中滞留性と腫瘍部位集積性を調べ、②腫瘍組織に向けて収束超音波照射した時に、PFP から形成される気泡で超音波造影可能であることを検討する。さらに、③気泡のキャビテーションによる腫瘍部位のみの局所的加熱を調べ、その抗腫瘍効果を検討する。

治療用収束超音波発生装置一式を購入し、担がん小動物における気泡発生と局所加熱を確認する。また、照射精度や加熱効率を上げるために、ハイドロホンによる超音波条件の校正と熱電対プローブによる局所温度の測定を行う。トリガー用プローブ（2、4、8、10 MHz の 4 種類）と気化・キャビテーション用プローブ（0.5、1 MHz の 2 種類）の製作を東北大に再委託して開発する。これらの新たな両プローブを用いて、本バブルリポソームのヒトへの適用条件を見出す。

現有のSonoPore3000、ソニトロン2000では、収束超音波照射したとしても 2 W/cm^2 が限界で、本研究課題の超音波照射（ $5\text{--}300 \text{ W/cm}^2$ ）は不可能であるため、再委託先である東北大と共同

で新たな収束超音波発生装置の開発を行う。その場合、超音波発生装置（パルス波発生装置、バースト波発生装置）、実効出力校正のためのヒドロホン、発生温度測定のための熱電対プローブとその入力装置ロガーを購入し、プローブに関して新規に開発を行う。

以上の検討より、本システムが深部のがん組織の造影診断と治療を非侵襲で可能であることを示す。

平成19-20年度の成果： 超音波造影、加熱作用、音響化学療法の作用を有する「PFCの液滴とドキシソルビシンを内封したサイズが200nm以下のトランスフェリン修飾バブルリポソーム」の調製法を開発した。本法については、帝京大学と日立製作所と共同で特許申請を準備中である。再委託先の東北大で作製された収束超音波プローブを用いて、液滴のガス化による造影、キャビテーションに伴う20度前後の温度上昇と腫瘍組織の固化、その時ドキシソルビシンから生じる一重項酸素をそれぞれ検出し、本バブルリポソームが機能していることを確認した。担がんマウスに対して、本バブルリポソームを腫瘍部位局所に投与して超音波照射による効果を観察したところ、腫瘍組織の固化と壊死が見られ、*in vivo*でも機能していることを確認した。がん細胞との結合性、造影、発熱と腫瘍組織の熱凝固等、当初の目的をほぼ達成した。

本研究の新規性について： 本研究で完成されるPFC液滴内封トランスフェリン修飾バブルリポソームは、20℃以下に保った環境下でPFCの液滴がドキシソルビシンのゲル中に分散安定化してリポソーム内に封入されている構造形態をとり、200nm以下のサイズで深部組織に十分到達できる。トリガー用プローブによる収束超音波照射（7 MHz、10 W/cm²程度）で、本リポソームから気泡が形成され体外から造影可能になる。造影によって腫瘍部位が特定でき、そこに向けて気化・キャビテーション用でプローブにより局所的に治療用収束超音波照射（1-3 MHz、100W/cm²）することによってバブルの圧壊（キャビテーション）により生じるホットスポットで、腫瘍部位のみが局所的に70℃（±10℃）に加熱される。同時に送達されるドキシソルビシンと相まって選択的な殺細胞効果が得られる。本リポソームによって収束超音波音場と超音波増感効果に基づく非侵襲的な腫瘍治療システムを築ける。

平成21年度

本研究では、平成19-20年度の成果をもとに次のⅠとⅡのプロセスで研究開発を行う。

Ⅰ. 新規開発ドキシソルビシンとPFCの液滴を内封したトランスフェリン修飾バブルリポソーム調製法に対するGMP製剤に向けた規格化と長期保存化

①ドキシソルビシンとPFCの液滴を内封したトランスフェリン修飾バブルリポソームのGMP製剤化と②長期保存法について検討する。本バブルリポソームの規格設定に、保持されているPFCの定量は必要不可欠であるため、ガスクロマトグラフィー一式を購入し、保持されているPFCの定量し、その評価を行う。

Ⅱ. 担がんマウスにおける、PFCミセル液滴内封トランスフェリン修飾バブルリポソームの体内動態と腫瘍集積特性の評価および抗腫瘍効果

①内封されているドキシソルビシンとパーフルオロカーボン（PFC）濃度を指標に血中安定性、血

中滞留性と腫瘍部位集積性を調べ、②腫瘍組織に向けて収束超音波照射した時に、PFC から形成される気泡で超音波造影可能であることを検討する。さらに、③気泡のキャビテーションによる腫瘍部位のみの局所的加熱を調べ、その抗腫瘍効果を検討する。

既購入の治療用収束超音波発生装置一式を用い、担がん小動物における気泡発生と局所加熱を確認する。ガスクロマトグラフィー一式を用い、本システムを適用したときのPFCバブルの血中やがん組織での濃度を評価する。特にがん組織へのPFCの到達量と抗がん効果の関性を評価し、がん組織到達性の高いバブルリポソームの設計や投与量の最適化を行う

以上の検討より、本システムが深部のがん組織の造影診断と治療を非侵襲で可能であることを示す。

(3) 事業内容

平成 19 年度～平成 20 年度

I ドキソルビシンとPFPの液滴を内封したトランスフェリン修飾バブルリポソームの調製
平成 20 年度年に国際リポソーム学会（例年 12 月にロンドン大学で開催される国際リポソーム学会主催の会議）とコントロールドリリース学会（7 月、ニューヨーク）に参加して PFP ミセル液滴を内封したトランスフェリン修飾バブルリポソームの調製法と機能評価について、また、国際超音波治療学会（Int. Symp. Therapeutic Ultrasound (ISTU)、ミシガン大）に参加してトランスフェリン修飾バブルリポソームの造影と機能に関して、本研究での成果を発表し、さらに本研究を加速する目的で他研究機関の研究動向および類似研究の調査・技術討論する予定である。

国内で開催される、国際造影シンポジウム（平成 20 年；福岡）と日本がん学会（平成 19、平成 20 年；横浜）に参加して、本研究の一部の発表と情報収集を行う。

① PFPのミセル液滴の調製

PFP は沸点が 29℃で、難水溶性化合物である点を利用して、各種界面活性剤を用いて 20℃以下で乳化を行う。このとき、超高压ホモジナイザー（高压乳化機）を用い、50 nm 程度の可能な限り小さな液滴（ミセル）とする。

界面活性剤には、安全性の補償されている各種界面活性剤を検討するが、温度、濃度、混合比等の条件を検討して、ヒトに適用できるものを数種類最終的に決定する。

超高压ホモジナイザーによって、PFPの液滴の平均粒子径が、20℃以下で50 nm前後になるように、選択された界面活性剤の添加量、全体の容量、ホモジナイズ回数などの条件を変えて、最適パラメータ値を確立する。大量生産時の条件設定を考察する。

② トランスフェリン修飾バブルリポソームの調製

リン脂質：DPPE-PEG-CONHSとPFPのミセル液滴および硫酸アンモニウム水溶液から、超高压ホモジナイザーを用いて粗リポソームを調製する。脂質、PEG脂質、ミセル液滴の混合容量、ホモジナイザーの流速を調節しながら、サイズにこだわらずに、粗リポソームを作製する。リポソームに、PFPのミセル液滴を内封することが目的なので、低圧・低速の条件下でホモジナイザーを運転する。出来上がるリポソームは、500nm前後の大きなリポソームになる。PFPのミセル液滴がリポソーム内に内封されることを確認する。

ここに、ドキソルビシン水溶液を加えて、リモートローディング法でリポソーム内部にドキ

ソルビシンを導き内封する。経験的にドキシソルビシンは100%封入され、リポソーム内で硫酸アンモニウム塩となってゲル化する。このゲルが、PFPPのミセル液滴をリポソーム内に保持するように働き、PEF液滴封入リポソームが作製され则认为している。

その後、トランスフェリンを添加してPEG末端のCONHSに結合させる。トランスフェリンの添加量を従来の1/10に抑えても従来のリポソームの修飾率が得られるよう、反応条件を検討する。この時点では、リポソームのサイズは大きくても、不揃いでも構わない。

③ トランスフェリン修飾バブルリポソームのサイズダウン (200nm以下にする)

超高压ホモジナイザーで、100nm前後のリポソームに粒径を落とす。1回の操作で出来上がるように圧力・温度条件を検討する。この方法で可能となれば、高いコストパフォーマンスが得られる。

別法として、段階的サイズダウンも検討する。200nmから50nmのポリカーボネートメンブラン装着のリポソーム整粒装置でリポソームのサイズを段階的に小さくしていく。リポソーム整粒装置は氷上で冷却して使用する。200nmのポリカーボネートメンブランについて10~20回繰り返し通過させ、次に100nmのポリカーボネートメンブランについても同様に10~20回繰り返し通過させる。最終的にサイズが100nm±40nmになるまで、50nmのポリカーボネートメンブランを用いて繰り返し通過させる。ゲル化されたドキシソルビシンがPFPPのミセル液滴を安定化するため、100nm前後のバブルリポソームが調製可能となる。

現在上市されているリポソーム製剤、DOXILとAmBisomeはいずれも平均粒子径が100nm以下であるが、血中に安定に滞留存在し一度に薬物を放出しないことが求められている。DOXILの場合、サイズが小さすぎると抹消の毛細血管に蓄積して副作用の発現が現れることも報告されている。本リポソームの場合、がん組織の新生血管から漏出してがん細胞に結合するまで、内封したPFPPのミセル液滴を保持する必要がある、漏出と安定性の両方を具備させるためにリポソームのサイズを100nm±40nmとする。本リポソームは、超音波照射でガス化して消失するため、また脂質組成も100nm付近に出来るか未知な部分が多く、ポリカーボネートメンブラン、ろ過回数他にI-①で調製する界面活性剤の影響が出てくる可能性があり、その場合には、遡って界面活性剤を再検討し目標値に近づける。

④ トランスフェリン修飾バブルリポソームの構造確認と機能評価 (*in vitro*実験)

ドキシソルビシンはリポソーム内で硫酸アンモニウム塩としてゲル化して存在するので、PFPPの液滴がリポソーム内のゲルによって固定化され、漏れにくくなり安定して存在できるようになると考えられる。得られるリポソームについて、冷蔵庫(4℃)保存で、最低半年またはそれ以上の期間、リポソームの形状を保持しPFPPの液滴がリポソームの内部に存在出来ることを目標とする。方法は、収束超音波照射の照射による気泡の発生で評価する。ドキシソルビシンを封入しないリポソームと比較して、ドキシソルビシンの硫酸アンモニウム塩ゲルの重要性を示す。

リポソームの形状と構造について、電子顕微鏡撮影の専門会社に外注して透過型電子顕微鏡写真を撮影し、リポソームの2分子膜構造を確認する。また、温度を上昇させて少量の気泡が生じた状態などを撮影し、リポソーム内またはリポソーム外部にPFPPから生じた気泡の存在を確認する。

トランスフェリンが機能することを、K562細胞やColon26細胞に結合している顕微鏡写真で示す。トランスフェリンの修飾率は、腫瘍細胞への結合に重要な因子なので、HPLCで求める。HPLC条件等は既に保有している。従来のリポソームの研究結果から、本リポソームが機能するためには1個のリポソームに約20分子のトランスフェリンが修飾されている必要がある。修飾率が低い場合、DPPE-PEG-CONHSの割合を変動させて1個のリポソームに約20分子のトランスフェリンが修飾されるように、I-①-③を再検討する。がん細胞のトランスフェリンレセプターと結合することを、既に当研究室で実績のある細胞種、K562細胞とColon26細胞を用いて調べる。従来のトランスフェリンリポソームでは、相対的な結合率として80%以上がこれら細胞に結合するので、本リポソームについては、80%以上の結合率を目標とする。これらの細胞への結合性を評価することによって、当研究室の過去のデータと比較でき、体内動態の予測も可能となる。

⑤超音波プローブの開発（再委託；東北大）

超音波発生装置については、既存の装置を購入する。構成としては、0.5MHzから10MHzまでを増幅できるアンプと、パルス波とバースト波を発生する超音波発生装置および確認のためのオシロスコープとなる。また、実効出力を測定し校正するために hidroホンを必要とする。プローブに関して、平成19年度ではトリガー用プローブ（2、4、8、10 MHzの4種類）と気化・キャビテーション用プローブ（0.5、1 MHzの2種類）の開発を行う。平成20年では、平成19年度の結果を基にトリガー用プローブと気化・キャビテーション用プローブの再設計を行い最終仕様を確定させる。

⑥気泡の発生と腫瘍組織固化に適した収束超音波照射条件の検討（*in vitro*実験）

生体組織に見立てたゲルファントム、腫瘍組織に見立てたスフェロイドやアクリルアミドゲル中で、超音波発生装置によって収束超音波照射した時、PPFの液滴は相変化しマイクロオーダーの気泡（マイクロバブル）が生じることを、超音波造影装置で確認する。HIFU用ファントムを用いて、新規開発されるプローブの超音波照射深度・領域を調べる。HIFU用ファントムは、実際にHIFU治療の事前チェックに使用されており、HIFU照射の立体的位置決め用いられる。さらに、ゲルファントムを用いて、収束超音波照射の照射によってその気泡の圧壊（キャビテーション）を生じさせ、ホットスポットの発生と温度上昇を熱電対プローブで測定する。

ゲルスフェロイドやアクリルアミドゲルを用い、バブルリポソームをがん組織中の閉鎖系に封じ込めた状態を再現し、透明で外部から容易に観察できる特性を生かして、収束超音波照射の照射によってその気泡の圧壊（キャビテーション）によるホットスポットの発生を、熱電対プローブによる温度上昇およびサーモグラフィーで測定する。

気泡の発生およびキャビテーション条件を詳細に検討する。気泡の発生について、トリガー用プローブを用いて、超音波発生装置でパルス波とバースト波を調整しながら気泡の発生を行う。強度についても5-30W/cm²可変させて、hidroホンで実効出力を確認しながら最適な気泡発生条件を見出す。キャビテーション効果によるがん組織の固化のためには、70-100℃程度の温度を必要と考えられ、気化・キャビテーション用プローブを用いて、超音波発生装置でパルス波とバースト波を調整しながら超音波強度を50-300W/cm²の範囲で可変させて腫瘍組織固化に適した温度上昇が見られる条件を見出す。hidroホンで実効出力を確認し、熱電対プローブで実効温度を

測定する。⑤と連動して研究を進める。

II 担がんマウスにおける、PFPミセル液滴内封トランスフェリン修飾バブルリポソームの体内動態と腫瘍集積特性の評価および抗腫瘍効果

平成21年に、国際リポソーム学会（場所未定）とコントロールドリリース学会（場所未定）に参加してPFPミセル液滴を内封したトランスフェリン修飾バブルリポソームの体内動態と腫瘍集積特性について、また国際超音波治療学会（場所未定）・欧州超音波造影シンポジウムに参加して、トランスフェリン修飾バブルリポソームの診断造影と治療効果に関して、本研究での成果を発表し、さらに本研究を加速する目的で他研究機関の研究動向および類似研究の調査・技術討論する予定である。国内では、平成21年に国際造影超音波シンポジウムとがん学会で本研究での成果を発表し、類似研究の調査・技術討論を行う予定である。

① 各種担がんマウスを用いて、血中滞留性と腫瘍部位集積性の検討

リポソームの動態は、血液・腫瘍組織および腫瘍臓器中のドキソルビシンを定量して行う。場合によっては、RI標識して行う。摘出組織からドキソルビシンを抽出して、血中滞留性の定量解析と腫瘍集積性のキネティック解析を行う。その解析結果を踏まえ、リポソームのサイズ、PEG添加量の加減の再調整を行い、腫瘍部位への集積量の向上を図る。

リポソームは3時間以内に腫瘍組織に移行し、48時間後でも腫瘍組織中の濃度が高く維持されることを確認する。トランスフェリンが付いていると腫瘍組織に長時間滞留することが知られているので、血中濃度が低下しても腫瘍組織中の濃度が高く維持される。

② 腫瘍部位の造影化の検討

I-⑥で得られた条件で腫瘍部位に向けて、2、4、8、10 MHzのトリガー用プローブで収束超音波照射した時、PFPの液滴が相変化し気泡（バブル）が生じ、超音波造影装置で造影できる条件を見出す。造影を得るために、強度を5～30 W/cm²可変させて、最適な気泡発生条件を見出す。ハイドロホンで、実効出力を確認し、微調整を行う。

③ 抗腫瘍効果の検討

②で得られた生体に適する条件で、各種担がんマウスを用いて、腫瘍部位に向けてトリガー用プローブで収束超音波照射し造影を確認したのち、気化・キャビテーション用プローブで治療用収束超音波照射によって腫瘍内で気泡の圧壊（キャビテーション）により生じるホットスポットを熱電対プローブとサーモグラフィーで確認する。局所的な高熱（70℃～100℃）による腫瘍組織の固化およびその状態を組織学的に検証しながら、最適な治療用収束超音波照射条件を再検討する。最終的には、治療用収束超音波照射の条件を確立して、腫瘍体積の縮小とサバイバルの延長を検討する。これらの検討過程で、治療のために収束領域をより精密に制御できる気化・キャビテーション用プローブを開発し、腫瘍部位のみの局所的加熱の精度を上げた治療効果を検討する。本システムは、ドキソルビシンと熱固化の相乗作用が期待できるので、市販のドキソルビシンリポソームDOXILより有効性が高いことを、腫瘍体積の縮小効果とサバイバル効果で示す。

平成21年度

I. 新規開発ドキシソルビシンとPFCの液滴を内封したトランスフェリン修飾バブルリポソーム調製法に対するGMP製剤に向けた規格化と長期保存化

①ドキシソルビシンとPFCの液滴を内封したトランスフェリン修飾バブルリポソームのGMP製剤化の検討

GMP製造を念頭に本バブルリポソームの調製過程を再検討する。既購入の超高压ホモジナイザー（高压乳化機）と、ガラスフィルター法による、本バブルリポソームの調製を最適化し規格化する。ガスクロマトグラフィーで保持されているPFCの定量を行う。本バブルリポソームの規格設定に、保持されているPFCの定量は必要不可欠である。

②長期保存法について検討

ドキシソルビシンはリポソーム内でゲル化して存在するように工夫するので、これによってPFCの液滴が安定して存在できるように作用すると考えられるが、この点について評価する。また、このように調製された本バブルリポソームについて、凍結乾燥、高压下バイアル瓶保存など現実的な保存方法について検討する。ガスクロマトグラフィーで保持されているPFCの定量を行い、保存安定性を評価する。

II 担がんマウスにおける、PFCミセル液滴内封トランスフェリン修飾バブルリポソームの体内動態と腫瘍集積特性の評価および抗腫瘍効果

①各種担がんマウスを用いて、バブルリポソームの血中滞留性と腫瘍部位集積性の検討

リポソームの動態を、血液・腫瘍組織および主要臓器中のドキシソルビシンとPFC濃度を定量して評価する。場合によっては、RI標識して行う。摘出組織からドキシソルビシンを抽出して、血中滞留性の定量解析と腫瘍集積性のキネティック解析を行う。同様に、摘出組織中のPFC濃度をガスクロマトグラフィーにより定量する。バブルリポソームが少なくとも3時間程度は、PFC液滴を保持して、腫瘍組織に移行することを確認する。トランスフェリンが付いていると腫瘍組織に長時間滞留することが知れているので、血中濃度が低下しても腫瘍組織中の濃度が高く維持されることを確認する。

②腫瘍部位の造影化の検討

腫瘍部位に向けて、7 MHzのトリガー用プローブで収束超音波照射した時、PFCの液滴が相変化し気泡（バブル）が生じ、超音波造影装置で造影できることを証明する。造影を得るために、強度を5～30 W/cm²可変させて、最適な気泡発生条件を見出す。

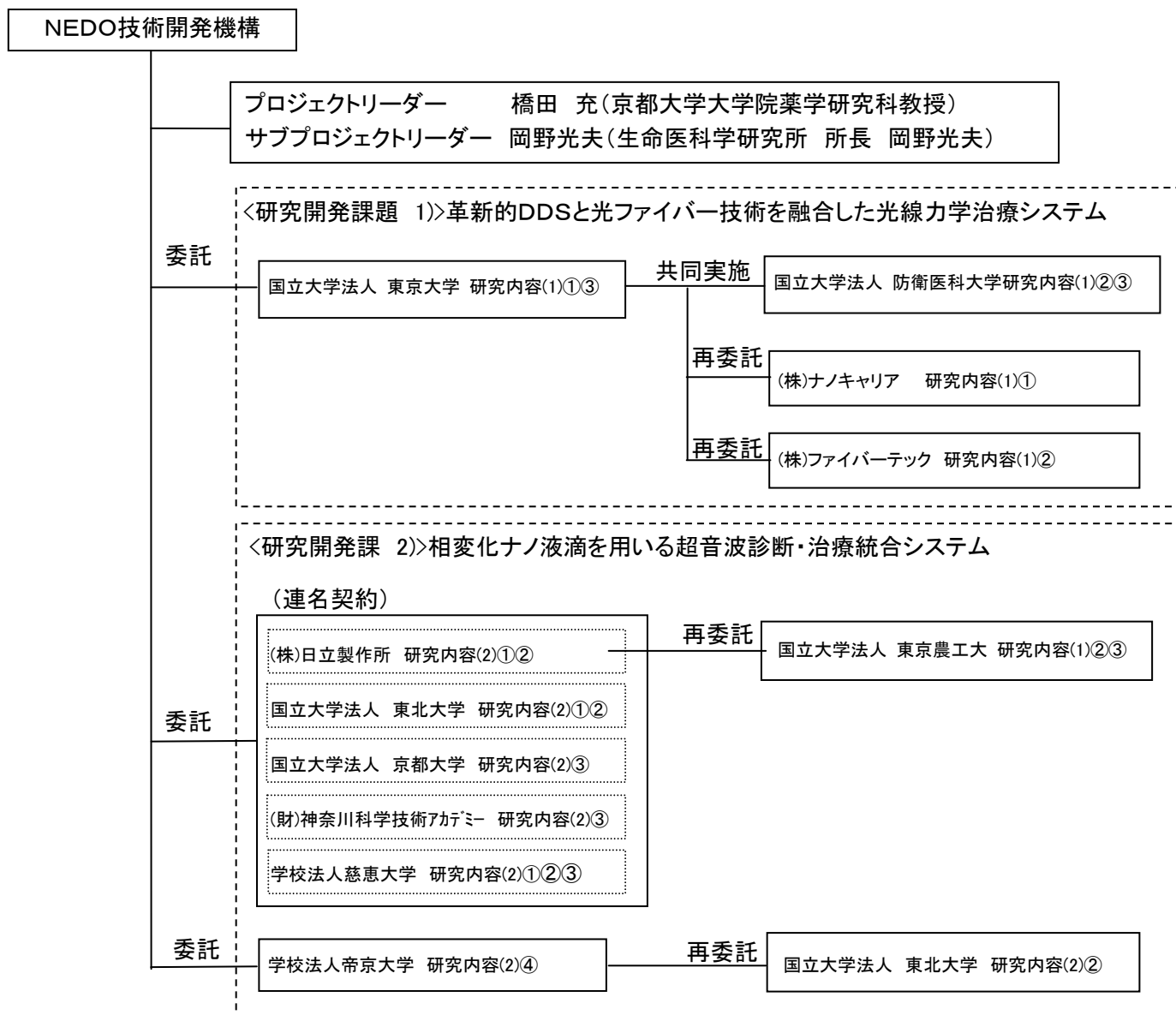
③抗腫瘍効果の検討

②で得られた生体に適する条件で、各種担がんマウスを用いて、腫瘍部位に向けてトリガー用プローブ（7 MHz）で収束超音波照射し造影を確認したのち、気化・キャビテーション用プローブ（1～3 MHz）で治療用収束超音波照射によって腫瘍内で気泡の圧壊（キャビテーション）により生じるホットスポットを熱電対プローブで確認する。局所的な高熱（60℃～80℃）による腫瘍組織の固化およびその状態を組織学的に検証する。最終的には、日立グループが開発する収束超音波照射装置を用いて、条件の確立後、腫瘍体積の縮小とサバイバルの延長効果を検討する。これらの検討過程で、日立グループと共同で治療のために収束領域をより精密に制御できる気化・キャビテーション用プローブのチューニングを行い、腫瘍部位のみの局所的加熱の精度を上

げた治療効果を検討する。本システムは、ドキシソルビシンと熱固化の相乗作用が期待できるので、市販のドキシソルビシンリポソーム DOXIL より有効性が高いことを、腫瘍体積の縮小効果とサバイバル効果で示す。

平成21年に、国際超音波医学会（オーストラリア）と国際超音波治療学会（フランス）に参加して PFC ミセル液滴を内封したトランスフェリン修飾バブルリポソームの体内動態と腫瘍集積特性について、本研究での成果を発表し、さらに本研究を加速する目的で他研究機関の研究動向および類似研究の調査・技術討論する予定である。国内では、平成21年に国際造影超音波シンポジウムとがん学会で本研究での成果を発表し、類似研究の調査・技術討論を行う予定である。

2.2 研究開発の実施体制



- 研究開発項目**
- (1)革新的DDSと光ファイバー技術を融合した光線力学治療システム
- ①光増感剤を内包した腫瘍特異的DDS製剤の開発
 - ②患部に対する効果的な光照射を可能にする照射システムの開発
 - ③【当初の開発項目】難治性がんに対する光線力学療法の開発と化学療法及び免疫療法を融合した治療システムの開発
 - 【修正後の開発項目】難治性がんに対する光線力学治療システムの開発
- (2)相変化ナノ液滴を用いる超音波診断・治療統合システム
- ①ナノ液滴の相変化を用いる超音波DDS用照射シーケンス・装置の開発
 - ②マイクロバブルの存在する部位を対象とする治療用超音波照射シーケンス・装置
 - ③液滴の体内動態を制御するナノ液滴キャリアーシステム
 - ④トランスフェリン修飾バブルリポソームの開発

2.3 研究の運営管理

研究開発の管理・執行に責任を有するNEDOは、経済産業省と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標並びに本プロジェクトの研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。このため、NEDOは、必要に応じ、NEDOに置かれる技術審議委員会を通じて外部専門家の意見を運営管理に反映させ、研究開発の進捗状況について報告を受ける等の措置を講ずる。NEDOは、プロジェクトリーダーとも密接な関係を維持するものとする。

DDS開発委員会における登録委員は以下とする。

ア. 開発委員会における登録委員（○印；委員長 / △印；副委員長）

氏名	所属・役職
○橋田 充	京都大学大学院薬学研究科・教授
河野 茂	長崎大学医学部・教授
木村 聡城郎	岡山大学薬学部・教授
高後 裕	旭川医科大学医学部・教授
米倉 義晴	放射線医学総合研究所・所長
永澤 清	GE 横河メディカルシステムズ株式会社 マーケティング本部 画像応用技術センター長
△岡野 光夫	東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 所長
岡田 弘晃	東京薬科大学教授
山口 俊晴	癌研究会有明病院消化器外科部長
増原 宏	大阪大学院工学研究科教授
田倉 智之	A. T. カーニー株式会社統括マネージャ
段 孝	中外製薬株式会社元副部長

イ. 有識者からの指導・助言等

氏名	所属・役職
浅沼 宏	東京都立清瀬小児病院 泌尿器科・医長
佐藤 裕之	東京都立清瀬小児病院 泌尿器科・医員

2.4 研究開発成果の実用化、事業化に向けたマネジメントの妥当性

- よりよいシステムの組み合わせを行うためにF SにてDDS薬剤と装置の組み合わせを考慮し本プロジェクトの検討材料とした結果、光治療・超音波治療が組み合わせとなった。
- 中間評価にてハードウェアの遅れに関しての指摘がありP Lと共に光治療超音波治療の中心となっている東北大にP Lと共にサイトビジットを行い作業の進捗を確認した、また超音波装置の専門家を開発委員に加わってもらい、評価を充実させた。
- 本プロジェクトと共に次世代DDS特別講座を実施しその中で本プロジェクトの指導者に講義いただき、DDS治療に関しての新規技術として公開した。

3. 情勢変化への対応

- ・平成 19 年 11 月 1 日付の計画変更において、本事業を効率的に推進するために、各種光源照射装置、光計測装置、高機能顕微鏡などの東京大学にはない P D T 研究のための充実した設備とノウハウを有している防衛医科大学校が共同実施機関として本事業に参画することになった。
- ・平成 20 年 8 月 6 日に癌研有明病院で実施された出口ミーティングにおいて、本事業の開発委員の山口俊晴氏より、「本事業で開発を進めている DDS と光照射システムを融合した P D T システムが、高度異形(severe dyslasia)を含めた前がん状態や微小がんの治療において臨床的に高い優位性を有している」という助言を受け、事業の背景・目的・位置づけに反映させた。
- ・平成 21 年 1 月 16 日に実施された本事業に対する中間評価の結果に基づく実施方針の修正によって、1)-3. 難治性がんに対する P D T (光線力学療法)の開発と化学療法及び免疫療法を融合した治療システムの開発における「免疫療法」にかかる開発は H 2 0 年度をもって中止することになった。また、研究開発内容に関して以下の変更を行った。
 - 機器開発に関して、既存の機器に対する優位性を明確にしたスペックの設定とその実現のための研究開発内容を追加した。
 - DDS に関して、レザフィリン等の既存のに対する優位性を明確にしたスペックの設定とその実現のための研究開発内容を追加した。

4. 中間評価結果への対応

平成 21 年 1 月 16 日に本事業に対する中間評価が実施された。以下に外部評価委員により本事業に対して提言されたコメントとそれに対する実施者の対応を記述する。

研究開発項目1) 革新的 D D S と光ファイバー技術を融合した光線力学治療システム

1)-1. 光増感剤を内包した腫瘍特異的 D D S 製剤の開発

- ・抗がん剤封入のナノパーティクルではなく、P D T でやる意義はどこにあるのかとの質問に対し、抗がん剤の場合、がんにはしか集積しないわけではなく、肝臓や脾臓等にもある程度集積してしまい、投与量を増やしていくと副作用の問題が考えられる。今回の場合、光を当てた部分以外に P D T は作用しないという点でより安全かつ低侵襲の治療ができると考えており、そのエビデンスはこれから示していかなければならないとの回答があった。
- ・一般的にコロイド粒子はコロイド浸透圧を示すものと考えられるが、コロイド粒子が毛細血管に入った場合、生理的な機能がかなり阻害されるのではないかと。また、ポリエチレングリコールには毒性があるのではないかと。質問に対し、それほど高濃度のコロイド粒子を体内に投与しているわけではなく、実際にコロイド浸透圧が変化するほどの投与はしていない。例えば高分子ミセル臨床試験にも応用されているが、今までそういった副作用等は報告されていないので、大丈夫だと考える。また、ポリエチレングリコールは現在、臨床にも使われ

ており、体内に投与してもいい高分子としてFDAからも認可を受けているとの回答があった。

- PDTの治療効果として、細胞自体を殺す場合と血管に対するPDTによって血管を遮断することによる効果が考えられるが、後者についてどう見ているのかとの質問に対し、その可能性は十分に考えられるが、現在のところ明らかではないとの回答があった。DDSを使う場合、組織に対する浸透性は低分子の場合と比べて遅くなっている点がある一方で、PDTでは一重項酸素の寿命が短く、細胞死を誘導するためには光増感剤が細胞の中に取り込まれる必要があるため、DDSががんの深部に如何に到達させるかは今後の課題である。しかし、発表者らのDDS浸透性の研究により、既に臨床応用されているドキシル等の100nmのリポソームの場合、血管の周囲に集積するが、50ナノメートルの高分子ミセルの場合はがん組織の深部にまで浸透できることがわかってきているとの回答があった。
- 発見できないような微小がんでもちゃんとEPR効果があるという保証の有無はどの質問に対し、単なる皮下移植モデルだけではなく転移モデルも使っているが、そういった場合にもDDSはよく集積するというデータも既に得られている。微小がんの場合でも、がんが生着するときに炎症反応が起こり、血管透過性が非常に高まっているためであると考えられるとの回答があった。
- 血中滞留性が上がれば、照射したときに血管内での活性酸素が産生されることが考えられるが、*in vivo*実験で得られた治療効果はがん細胞に対するものなのかとの質問に対し、腫瘍と正常組織との比率は非常に重要なので、十分に血中濃度が下がった段階で光照射を行っているが、腫瘍血管に対するPDT効果によって制がん活性が得られている可能性はあるとの回答があった。
- 非架橋型ミセルは60分程度で血中濃度がほぼゼロになってしまうということであったが、架橋によって安定化を行った場合、血中における安定性と細胞内におけるDPcの放出を両立するための最適架橋率を見つけることが研究の中心になると思うが、このあたりを今後やっていくということなのかとの質問に対し、今後は詳細に体内動態を評価し、*in vivo*における治療効果を評価する一方で、*in vivo*におけるPDT効果のメカニズムもこれから証明していかなければいけないとの回答があった。
- *in vitro*と*in vivo*の間の相違を明確にし、*in vitro*実験での仮説を主張するためには、今後は*in vivo*実験を中心に行っていくべきではとの質問に対し、*in vivo*で評価を行うこと、特に正所モデルで評価を行うことは非常に重要であると考えている。現在は、基本的には、*in vivo*実験を中心に行っているが、その一方で、高分子ミセルの調製や、それが物理化学的に安定化されているかどうか、さらにミセルが光毒性を示すかどうかは*in vitro*実験で確認しなくてはならないとの回答があった。
- 照射時間が60分や1,000秒と書いてあるが、実際にはどのぐらいなのかとの質問に対し、実際にレーザーを使った場合はもっと短く、10分ぐらいであるとの回答があった。
- 光ファイバーか何かで患部に光照射を行うと思われるが、10分程度というのは、患者が我慢できるような時間なのかとの質問に対し、他の委員から、レーザーはとても時間がかかり、ギャップを感じる場所があると思われる。また、血管がどれだけ発達しているかによって

かなり違うため、人に投与したときの風景がどうなるかという実験を前臨床のところでもかなり詰めておかないとならないのではとのコメントがあった。

- ・ほとんど内視鏡でもわからないような、microscopicなレベルで粘膜内に隠れていて1～2年の間に再発してくると思われるスキルスを果たして検出できるのかとの質問に対し、まさしくそこが証明できるかどうか、このシステムが実用化できるかどうかのポイントで、前がん状態のものや内視鏡等で検知できない微小がんを検出して治療ができれば、この技術はすごく価値のあるものだと思うとの回答があった。
- ・生体内のディストリビューションが悪いのではないか。生体にこの薬を投与したときの体内分布は、脾臓と肝臓にたまるだけで、腫瘍には余りたまらないと思う。現在ちゃんとがん細胞のワンセルに入る薬があるので、そこの検討は慎重にやってもらいたいとのコメントがあった。

1)-2. 患部に対する効果的な光照射を可能にする照射システムの開発

- ・ラットと人間では大きさが違うが、人間に当てはめてのシミュレーションや具体的な計算などを行っているのかとの質問に対し、数をこなしてNをとるためラットを用いた実験をしているが、大きさに関しては、スケールダウンしていくことのほうが工学技術的には難しいと考えており、これをスケールアップすることで大きな動物、最終的には人間に適用できるのではないかと考えている。研究の最終ゴールに到達できるようなスキームができれば大型動物や人間に移行していくことは考えているとの回答があった。
- ・強度分布のあらかし方が非常にわかりにくい。レーザーの分野では、ラストをとり、ガウシアンに対してどれだけ均一になるかということで評価するべき。また、不均質でやった場合の温度の上昇に関しては、in vitroで良いので実験を行って、温度の均質性はこれだけだという保証をしないと実際の臨床には使えないのではないかと。照射システムについては定量性を大事にして、データがあれば出してほしいとのコメントがあった。
- ・昔、膀胱のPDTをやった際、どうしても光が偏ってしまい、効くところと効かないところが顕著に出てしまったが、表面に当たる光は補正できるのかとの質問に対し、最終的にはオートマチックにしたいと考えているが、現時点では、モニタリングしながらできるだけ均質に固定するような方法を人の手で行っている。超音波のイメージと組み合わせることによって均質性は大分保証できるようになったとの回答があった。
- ・微小腫瘍検知のための極細内視鏡の開発の意義がよくわからない。細胞1個のレベルやある程度の固まりまでそれを見つけることの意味は何かとの問いに対し、最終的な大きさについての目標値はないが、治療前の検知とともに、治療後に増殖や多発の部分が漏れなく見るなど、治療と組み合わせて増殖や縮退を観察するための技術として開発した。スケールアップした際は、数ミリの尿道から通常の気管支のファイバー等が使えるので、この技術は使えると思うとの回答があった。
- ・高画質と書いてあるが、レンズの収差についてはある程度考えてつくられているのかとの質問に対し、レンズ2枚の間に錘を入れて、収差をできるだけとるようにしたとの回答があった。

1)-3. 難治性がんに対するPDT（光線力学療法）の開発と化学療法及び免疫療法を融合した治療システムの開発

・免疫療法を組み入れたい気持ちはよくわかるが、「ネイチャーレビューキャンサー」はCTLが上がるエビデンスを示していないと思う。むやみやたらとDCを加えたらいいといったことは、お金を有効に使っていないという感じがする。また、免疫細胞が浸潤してきているので、血管は確かに働いているのかもしれないが、最近の論文では、腫瘍の血管をシャットダウンすることは逆に免疫系を落とすと言われており、免疫を上げるためにも腫瘍血管を正常化する治療が望ましいといったこともあるので、そういうことも総合的に考えたほうがいいとのコメントがあった。

・臨床側のニーズがどこにあるかという感覚と、開発しているハイレベルなところに入っている部分が必ずしも合っていない。照射の技術とかDDSの技術を用いて粘膜下層に入った腫瘍まで果たしてレーザーで焼けるのかという心配もあるし、お金や時間がかかり過ぎるのという懸念もあるとのコメントがあった。

・コンプライアンスを見ていたモデルのラットにはがんを移植していないが、がんを入れていなかったらDDSが作用しないのは当たり前なのではないかとの問いに対し、従来の光増感剤は腫瘍のみに取り込まれるわけではなく、正常部分にも不可避的に取り込まれてしまうものがあり、光化学反応により粘膜の浮腫、炎症、繊維化が起きてしまう。それをコンプライアンスとして測定したのが今回の結果で、腫瘍があって測る方法論はこれからやっていくとの回答があった。

以上の評価コメントを受けてNEDOでは、H21年度の実施方針を以下のように決定した。

①「難治性がんに対するPDTの開発と化学療法及び免疫療法を融合した治療システムの開発」において、「免疫療法」にかかる開発はH20年度をもって中止する。

②PDTおよび超音波システム開発において、各機器装置の開発が遅れているのではないかと、既存の機器と比べてどのように優位か不明瞭、といった指摘に対し、各機器装置が実用化するために必要な目標設定をする。

- ・例えば、既存の機器（海外の状況も踏まえ）と比べて、どの程度優位性のある機械となるか、といったことがスペック（数値）として目標設定できないか。
- ・また、各機器の開発状況について、現状と課題を整理し、人体に対する実用化に向けた具体的な取り組み等、機器の技術内容や実用化の方向等に詳しい新たなアドバイザーを開発委員会に追加する等して、しっかり練った上で研究計画を立て直す。
- ・各機器に関する専門部会を開催する。

③PDTおよび超音波システム開発における対象疾患を、臨床ニーズを十分踏まえて絞り込む（既存のPDT、超音波システムの対象疾患も踏まえて）。

- ・臨床医にヒアリングする等して現実的な対象疾患を選定する。

◎その他検討事項

-DDS側の開発において、レザフィリン等の既存の薬剤に対してどの程度優位性が示せるかを明確にする。前臨床に必要なデータをどのように取っていくか、研究計画を立て直す。

-EPR効果（生体内動態を含む）の整理が必要。

-次の開発委員会（年度内に実施）では、中間評価の結果を踏まえた今後の方針について議論する。その際、委員会であがった宿題に対する回答をもちより検討する。

5. 評価に関する事項

中間評価

①2009年1月16日

②自主中間評価（NEDO外の有識者による評価）

③バイオテクノロジー・医療技術開発部

④評価項目

評価項目・評価基準

1. 事業の位置付け、必要性について

(1)NEDOの事業としての妥当性

- ・ 健康安心プログラムの目標達成のために寄与しているか。
- ・ 民間活動のみでは改善できないものであること、又は公共性が高いことにより、NEDOの関与が必要とされる事業か。
- ・ 当該事業を実施することによりもたらされる効果が、投じた予算との比較において十分であるか。

(2)事業目的の妥当性

- ・ 内外の技術開発動向、国際競争力の状況、市場動向、政策動向、国際貢献の可能性等から見て、事業の目的は妥当か。

2. 研究開発マネジメントについて

(1)研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。

(3)研究開発実施者の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4)情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1)中間目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2)成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながるものが期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3)特許等の取得

- ・ 知的財産権等の取り扱い（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

(5) 成果の最終目標の達成可能性

- ・ 最終目標を達成できる見込みか。
- ・ 最終目標に向け、課題とその解決の道筋が明確に示され、かつ妥当なものか。

4. 実用化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 実用化イメージ・出口イメージが明確になっているか。
- ・ 実用化イメージ・出口イメージに基づき、開発の各段階でマイルストーンを明確にしているか。それを踏まえ、引き続き研究開発が行われる見通しは立っているか。

(2)波及効果

- ・ 成果は関連分野への技術的波及効果等を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

⑤評価委員 別添

	氏名	所属、肩書き
委員長	はるな まさみつ 春名 正光	国立大学法人大阪大学 大学院医学系研究科保健学専攻 教授
委員	あいざわ かつお 會沢 勝夫	早稲田大学 理工学総合研究センター 客員教授
委員	えんどう のぶゆき 遠藤 信行	神奈川大学 工学部・電子情報フロンティア学科 教授
委員	かねだ やすふみ 金田 安史	国立大学法人大阪大学 大学院 医学系研究科 遺伝子治療学 教授
委員	たけうち ひろふみ 竹内 洋文	岐阜薬科大学 薬学部 薬物送達学大講座 製剤学研究室 教授
委員	たちばな かつろう 立花 克郎	学校法人福岡大学 医学部医学科 解剖学講座 教授
委員	とびす けんいち 鳶巣 賢一	静岡県立静岡がんセンター 病院 病院長

III. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

1) 革新的DDSと光ファイバー技術を融合した光線力学治療システム

本事業では、光増感剤をがん組織に選択的に送達するDDSと粘膜全体に均質光を照射する光照射システムを組み合わせることによって、正常粘膜を傷害することなく粘膜上の微小がんを根絶できる光線力学治療(PDT)システムの開発を行った。①光増感剤を内包した腫瘍特異的DDS製剤の開発においては、DDSとして、デンドリマーフタロシアン(DPc)を内包した高分子ミセルの開発を行った。生体内におけるミセル構造の安定化を目的として、ミセル内核にジスルフィド架橋やコレステロール基を導入したところ、酸素消費効率の向上、血中滞留期間の長期化、がん組織への集積性の向上、制がん活性の増強が確認された。これらのシステムは、現在臨床応用されているフォトリンやレザフィリンよりも優れた制がん活性を有しており、皮膚等の正常組織に対する光毒性も示さないことが明らかになった。また、DPc内包ミセルの大量調製法と凍結乾燥法を確立し、凍結乾燥製剤が3ヶ月以上の保存安定性を有することが確認された。②患部に対する効果的な光照射を可能にする照射システムの開発においては、患部に対して均一な光照射を可能にする光照射プローブの開発を行った。開発された均質照射用光分散プローブ(以下、HIP)は、プローブ先端にねじり加工が施され、さらに円錐形状に仕上げられた上に石英製保護キャップを装着されたもので、最大外径0.7mm、先端チップ長5.0mmとラット尿道を介して膀胱内に挿入できるサイズに設計されており、HIP射出光空間分布特性を評価したところ、十分な均質性を示した。このHIPを用いてラット膀胱内へ光照射したところ、膀胱内粘膜面全体の60-80%に光が到達していることがわかり、生体内への均質照射が実現できた。さらに、大型動物(犬)への光照射のための20Wクラスの照射用レーザーとHIPを試作し、犬膀胱内への挿入および光照射実験において、その優れた操作性、安全性が確認された。③難治性がんに対するPDT(光線力学療法)の開発と化学療法及び免疫療法を融合した治療システムの開発に関しては、ラットの正所性膀胱がんモデルに対してPDT効果を検証したところ、DPc内包ミセルは、既存の光増感剤よりも優れた治療効果を示し、正常膀胱粘膜への光傷害に起因する膀胱萎縮も示さないことが確認された。また、微小がんを検知できる診断システムとして、蛍光標識DPc内包ミセルと細径内視鏡による蛍光分光測定システムを構築し、小動物用超音波イメージングシステムでも検知の困難な、サブミリサイズの微小腫瘍を検出することができた。一方、PDTと化学療法の融合治療に関しては、DPc内包ミセルと制がん剤(カンプトテシン)内包ミセルの併用によって、固形がんモデルに対して単独治療よりも有意に優れた制がん活性を確認することができた。また、PDTと免疫療法の融合治療に関しては、皮下腫瘍に対するPDT後の免疫応答を解析したところ、PDTを受けた動物で免疫系が活性化されていることが明らかになった。これによりPDT後の腫瘍に樹状細胞を投与することで腫瘍特異的な免疫応答が誘導できる可能性が示唆された。

事業全体の成果

目標	研究開発成果	達成度
<p>1) 革新的DDSと光ファイバー技術を融合した光線力学治療(PDT)システム</p> <p>1)-1. 光増感剤を内包した腫瘍特異的DDS製剤の開発</p> <p>1)-1-a) 光増感剤をキャリアへ搭載後、90%以上の一重項酸素産生効率を達成</p> <p>1)-1-b) 既存の光増感剤の10倍以上の腫瘍選択的な集積を実現</p> <p>1)-1-c) 従来型光増感剤の1/10の濃度、及び1/10の光エネルギー密度で従来型PDTと同等以上の抗腫瘍効果を達成</p> <p>1)-2. 患部に対する効果的な光照射を可能にする照射システムの開発</p> <p>1)-2-a) 膀胱内腔全体を均質に照射することができ、粘膜面いずれの場所においても150mW/cm²以上の照射強度を達成</p> <p>1)-2-b) 照射部位の熱凝固を回避し、照射組織面での温度上昇を30℃以内に抑えるファイバー先端の造作を実現</p> <p>1)-2-c) サブミリサイズの微小腫瘍を検知できる内視鏡イメージング技術を確立</p> <p>1)-3. 難治性がんに対するPDTの開発</p> <p>1)-3-a) 膀胱萎縮を10%以下に抑制し、光過敏症などの皮膚毒性を完全に回避</p> <p>1)-3-b) 50%のマウスに対しがんを根治できるPDTを確立</p> <p>1)-3-c) 膀胱がん以外の上皮系がんに適応し、前臨床試験を実施</p> <p>1)-3-d) PDT及び化学療法単独では治療困難な腫瘍モデルに対して、両者の併用による有効な治療法を確立</p>	<p>1)-1-a) 光増感剤のSS架橋ミセルへの内包によって一重項酸素産生速度が1/2に低下したが、光増感剤の退光を抑制することによって2倍以上の酸素消費量を実現した。</p> <p>1)-1-b) 正常組織に対する腫瘍組織への選択性は10倍以上の数値を達成したが、フォトフリンおよびレザフィリンとの比較においてはそれぞれ3.6倍および2.7倍であった。</p> <p>1)-1-c) 従来型光増感剤の1/8の濃度で従来型PDTと同等以上の抗腫瘍効果を達成した。</p> <p>1)-2-a) 膀胱内を均質に照射し、粘膜面への照射強度として150mW/cm²以上を送達可能な光ファイバークラウドデバイスを構築できた。</p> <p>1)-2-b) 大型動物実験(成犬)による検証において、膀胱内での温度上昇を10℃以内に抑えてPDTを行うことに成功。</p> <p>1)-2-c) 蛍光分光法を原理とする内視鏡イメージング技術を確立し、ラット膀胱内における1mm以下の腫瘍を検知することに成功した。</p> <p>1)-3-a) 膀胱萎縮を完全に抑制し、光過敏症などの皮膚毒性を完全に回避した。</p> <p>1)-3-b) 60%のマウスに対しがんを根治できるPDTを確立した。</p> <p>1)-3-c) 膀胱がん以外の上皮系がんに対するPDTは実施できなかった。</p> <p>1)-3-d) PDT単独では治療効果が得られない条件において、PDTと制がん剤内包ミセルの併用による優れた治療効果をin vivoで確認した。</p>	<p>1)-1-a) 達成度90% 当初の仕様とは多少異なるが、DDSの機能としては当初目標以上の性能を実現</p> <p>1)-1-b) 達成度50% 光増感剤内包ミセルのがん集積性の向上のためには、ミセルの血中滞留性のさらなる長期化が必要である(達成見込み2011年6月)。</p> <p>1)-1-c) 達成度80% 上記のミセルのがん集積性の向上により目標値を達成する(達成見込み2011年6月)。</p> <p>1)-2-a) 達成度100%</p> <p>1)-2-b) 達成度100%</p> <p>1)-2-c) 達成度100%</p> <p>1)-3-a) 達成度100%</p> <p>1)-3-b) 達成度100%</p> <p>1)-3-c) 未達成 (達成見込み2012年3月)。</p> <p>1)-3-d) 達成度100%</p>

2) 相変化ナノ液滴を用いる超音波診断・治療統合システム

本事業では、1)超音波パルスにより液体から気体へと相変化を生じるナノ液滴、2)ナノ液滴を相変化させマイクロバブルを生成し腫瘍を可視化(造影)するための超音波シーケンス・装置、さらには3)対象部位で局所的に生じさせたマイクロバブルを用いて、選択的な超音波治療を行うための超音波シーケンス・装置の開発、を目標とした研究開発を実施した。なお、内包物とシェル(キャリア)からなるナノ液滴の開発においては、シェルとして、薬剤として認可されている化学物質のみを用いる第一世代と、新規な組成物を用いることで安定性・体内動態を高めた第二世代それぞれについて検討した。

本事業で得られた結果は、相変化ナノ液滴と収束超音波を組み合わせる高選択性・高安全性がん治療の有効性が動物実験での検証できたことと、人体を想定して開発された照射装置プロトを完成させたことであり、より具体的には以下に示すとおりである。

- ① 第一世代のナノ液滴の組成を、マウス実験を元に決定し、効果検証をウサギおよびイヌにて行った。また、前臨床相当環境での安全性試験を行い、毒性が発現する濃度が、造影・増感剤として有効な濃度よりも一桁上であることが明らかになった。これらの結果から、相変化ナノ液滴の安全性に関し、特に問題ないと考えられる。
- ② ナノ液滴を相変化させ生じたマイクロバブルを、高感度で可視化するための超音波撮像シーケンス(高速差分法)を開発し、マウス皮下腫瘍においてS/N20dBを得ることができた。
- ③ ナノ液滴相変化に必要な超音波強度・波数を確保するため、従来比40倍のエネルギーが送波可能な専用水冷式探触子の設計を行い、プロト試作を完了した。
- ④ ナノ液滴の造影効果の検証用にウサギを用いた実験系を確立し、腎臓内に移植された腫瘍を、体外から選択的に可視化することが可能であることがわかった。
- ⑤ ナノ液滴単体および相変化により生成するマイクロバブルの安全性の検討を行うため、動物実験系を確立し、相変化に伴う病理的変化の有無を調べた。相変化による有意な障害を認めなかった。
- ⑥ ナノ液滴から生成したマイクロバブルの超音波治療増感剤としての効果検証を行い、マウス腫瘍において温度上昇促進およびキャビテーション効果促進を確認した。特に後者においては超音波強度を従来の1/10程度まで低下させることが可能であることがわかった。これは、キャビテーションの機械・化学的作用と温度上昇による加温作用の複メカニズムによる治療効果促進によると思われる。治療効果のリアルタイムモニタリングへの展望も開けたことから、安全性の高い治療法の可能性が示唆された。
- ⑦ ナノ液滴と組み合わせて用いる、相変化と治療双方に用いることのできる超音波トランスデューサを開発した。焦点位置を電子的に走査可能であり、当初目標としていた±5mmの焦点移動を達成した。このことにより、機械的な移動を最小限に抑えたままで広範囲の治療が可能なシステムが実現できた。
- ⑧ ナノ液滴と超音波とを組み合わせた治療効果を中大動物で検討するため、ウサギおよびイヌを用いた実験系を確立し、腎臓を仮想ターゲットとして実験を行った。体表からの超音波照射により、腎臓内に設定した焦点領域に選択的に超音波画像上顕著な変化が得られ、さらに摘出臓器の該当部位に選択的ダメージを認めた。この結果よりナノ液滴と超音波とを組み合わせた治療法の

原理的有効性が確認できた。

- ⑨ 第二世代のナノ液滴用のキャリアとして、ゼラチン誘導体、合成高分子系界面活性剤のスクリーニングを行い、最適化を行った第一世代のキャリアと同等の安定性を得るための要件がわかった。さらに、調製法も含めた検討を行い、高圧乳化を用いない汎用性の高い新規調製法として、封入したナノ液滴原材料を超音波洗浄機にて処理する簡便な手法を開発した。フッ素鎖を有する高分子共重合体をシェルとすることで、粒径200nm程度の小さいナノ液滴調製を可能とした。また、動的散乱により調製した液滴の特性を解析可能であることがわかった。

以上の結果のうち、特に⑥は診断と治療との統合という観点からは大きな成果であり、従来よりも低い強度での治療を可能とすると共に、これまで重要でありながらほとんど実現できていない低侵襲治療におけるリアルタイムでの効果モニタリング(治療が必要十分行われたかどうかの確認)への道を拓くものと考えられる。

2)-4-3 トランスフェリン修飾バブルリポソームの開発 (帝京大学)

超音波造影、加熱作用、音響化学療法的作用を有する「PFP の液滴とドキソルビシンを内封したトランスフェリン修飾バブルリポソーム」の調製法を開発した。

パーフルオロペンタン (PFP) (沸点 29°C) とパーフルオヘキサン (PFH) (沸点 56°C) が、難水溶性化合物である点を利用して、Poly(ethylene glycol)-*block*-polylactide methyl ether (PEG-*b*-PLA) と超高压ホモジナイザー (高圧乳化機、ナノマイザー) を用いて、約 70 nm の液滴ミセルとした。この液滴ミセルをガラスフィルターハイドレーション法によってリポソーム化した。大量生産する場合には、ガラスフィルターの直径を大きくして厚みを増加させれば可能であることを示した。リポソームの脂質組成は POPC:Cholesterol:DSPE-PEG(2000):DSPE-PEG-NHS=63:31:1:5 m/m である。このときの封入効率は約 70~80% で、700 nm 前後のリポソームとなった。これをナノマイザーで再度整粒して平均 200nm のリポソームにした。リモートローディング法によってドキソルビシンを封入し、ヒトトランスフェリンを NHS 基に反応さ、「パーフルオロペンタンの液滴とドキソルビシンを内封したトランスフェリン修飾バブルリポソーム」の開発に成功した。その構造を電子顕微鏡撮影によっても確認した。

東北大工学部、梅村教授に再委託して、4種類の超音波プローブを開発し、以後の実験に用いた。4種類のプローブは、0.790MHz、1.66MHz、3.35MHz、8.25MHz で、集束超音波の発生が可能である。

作製された集束超音波プローブを用いて、液滴のガス化による造影、キャビテーションに伴う 20 度前後の温度上昇と腫瘍組織の固化、その時ドキソルビシンから生じる一重項酸素をそれぞれ検出し、本バブルリポソームが機能していることを確認した。

Colon 26 担癌マウスに対して、本バブルリポソームを腫瘍部位局所に投与して超音波照射による効果を観察したところ、造影効果が得られ、さらに腫瘍組織の固化と壊死も得られたので、生体内で機能していることを確認できた。尾静注によって、腫瘍組織の血管造影が可能であることを確認し、キャビテーションの発熱による抗腫瘍効果も得られた。

しかしながら、生体内での安定性が十分でなく、腫瘍組織への分布、血中滞留性については、さらに改良する必要がある。

2. 研究開発項目毎の成果

1) 革新的DDSと光ファイバー技術を融合した光線力学治療システム

1)-1. 光増感剤を内包した腫瘍特異的DDS製剤の開発 (東京大学/ナノキャリア株式会社)

1)-1-a) デンドリマーフタロシアニン内包高分子ミセルの開発

本事業では、腫瘍選択的に集積し、光照射によってがん細胞に効率的な細胞死を誘導するDDSとして、デンドリマーフタロシアニン(DPc)(図1-1(A))とPEG-ポリカチオンの静電相互作用に基づいて形成される高分子ミセル(図1-1(B))の開発を行っている。一般的に、PDTに利用されるポルフィリンやフタロシアニンなどの光増感剤は、疎水性相互作用や π - π 相互作用によって容易に凝集する為に、DDSキャリアへの搭載が困難であり、さらにキャリア内で濃度消光が惹起されることによってPDTの効率が著しく低下するが、DPc内包ミセルは1ミセル当たり約77分子のDPcを搭載できる一方で、デンドリマー構造に基づく中心色素の凝集抑制効果によって濃度消光を低減できることが期待される。そこで、DPc内包ミセルの担ガンマウスのPDTにおける有用性を検証するために、既に臨床応用されている光増感剤製剤であるフォトフリンとの比較実験を行った。本実験では、フォトフリンとDPc内包ミセルを用いたPDTによる腫瘍増殖抑制効果を評価するため、雌の6週齢Balb/c nu/nuマウスの左側背部皮下にA549細胞(3×10^6 cells)を移植し、移植後15日目に、各光増感剤の全身投与によるPDTを施行した。その結果、DPc内包ミセルは、フォトフリンと比較して光増感剤換算で1/8モルの投与量でより優れた治療効果をもたらすことが明らかになった(図1-2(A))。さらに、光増感剤の投与1、2、4日後に皮膚に対してハロゲンランプを用いて白色光を照射したところ、フォトフリン投与群では激しい炎症が認められたが、DPc内包ミセル投与群では皮膚に対する光毒性は認められなかった(図1-2(B))。

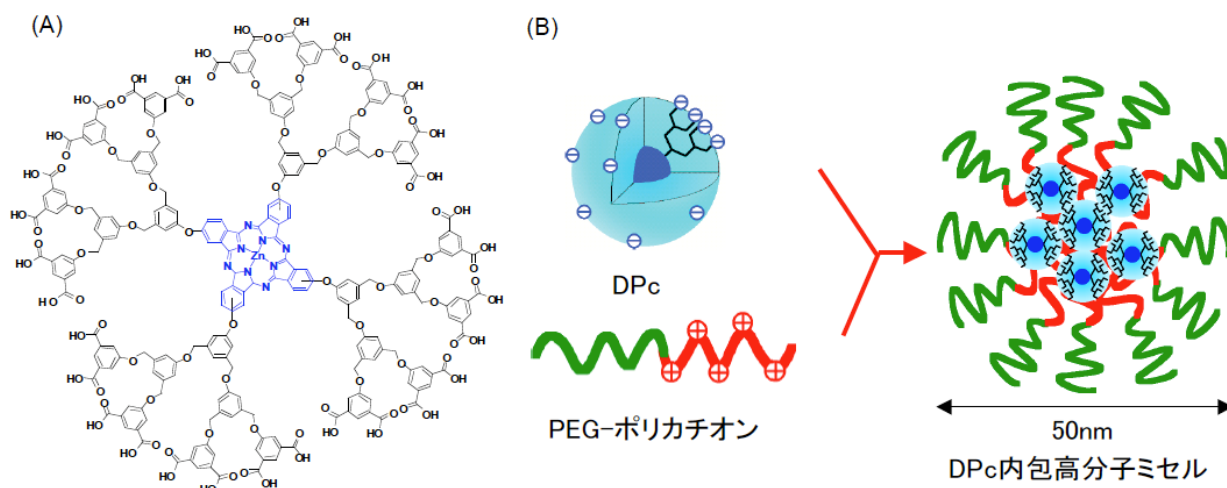


図 1-1. (A) デンドリマーフタロシアニン(DPc)の化学構造, (B) DPc 内包高分子ミセルの模式図 (1ミセル当たり約 77 分子の DPc を内包)

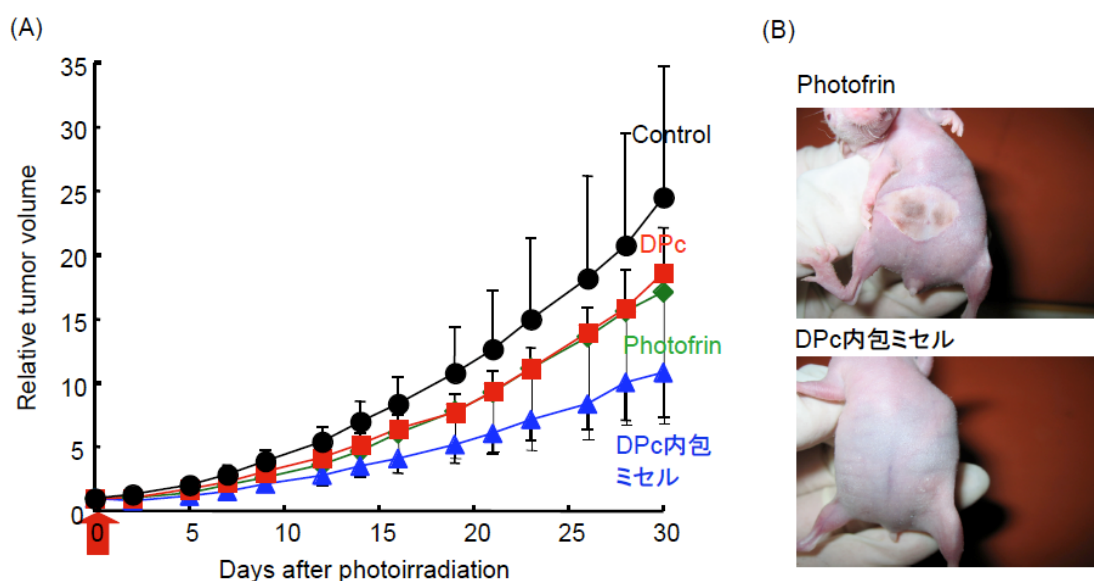


図 1-2. (A) ヒト肺がん A549 細胞の皮下移植モデルに対する PDT 効果, (B) Photofrin および DPc 内包高分子ミセルの光毒性の評価

このように、DPc内包ミセルは、in vivoにおいても実際に臨床応用されているフォトフリンよりも優れた治療効果を示し、さらに PDTにおいて問題となる光過敏症も回避しうるものと思われた。しかしながら、DPc内包ミセルは、血中で比較的速やかに消失していることが血中滞留性に評価によって示唆され(図1-7(A))、DDSとして改善の余地があるものと思われた為に、本事業ではDPc内包ミセルの安定化のための新しい分子設計を行った。

1)-1-b) 内核にジスルフィド(SS)架橋を導入した DPc 内包ミセルの開発

DPc 内包ミセルが血流中で不安定化を受ける要因として、血中のタンパク質等の生体成分がミセル内核と相互作用することによるポリイオンコンプレックス(PIC)内核の不安定化が考えられる。そこで本項目では、ポリエチレングリコール-ポリ(L-リシン)(PEG-PLL)の側鎖に 2-iminothilane (Traut 試薬)を反応させることによってポリカチオンの側鎖にアミジン基を介して SH 基が導入された PEG-PLL-IM を合成した(図 1-3(A))。PEG-PLL-IM は、DPc と静電相互作用によって約 50nm のミセルを形成する一方で、SH 基を酸化させることによって内核でジスルフィド(SS)結合を形成させることができ、SS 架橋による PIC 内核の安定化が期待できる。そこで、SS 架橋型 DPc 内包ミセルの安定性を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を利用して評価した。その結果、架橋を導入していない DPc 内包ミセルの HPLC クロマトグラムではミセルに相当するピークがブロード化し、28-29 分に解離したミセルであると推察されるピークが確認された(図 1-3(B))。この結果は、DPc 内包ミセルが、ミセル成分と DPc とポリマーの低分子量コンプレックスの 2 成分存在することを示唆する結果である。そこで、DPc 内包ミセルに SS 架橋を導入したところ、ミセルに相当するピークが大きくかつシャープになり、ミセル以外のピークも確認されなかった(図 1-3(B))。このように、SS 架橋の導入によって DPc 内包ミセルの構造が安定化されているものと思われる。この結果を定量的に取り扱う為に、HPLC クロマトグラムのミセルに相当するピークの RI 検出による面積および RI 検出と UV-vis 検出の比を算出した[図 1-3(C)および(D)]。その結果、

図 1-3 (C)では、SH 基導入率の増大に伴い RI 面積が増大しており、SS 架橋の導入によってミセルがカラムと相互作用することなく溶出していることが示唆された。一方、図 1-3 (D)では、SH 基導入率の増大によって RI/UV-vis 面積比が増大しており、これは架橋を導入していないミセルでは PEG-PLL が一部にミセルから脱離しているが、SS 架橋の導入によってポリマーの脱離を抑制することができることを示唆しているものと思われる。一方、PIC は、高濃度のイオンの存在によって不安定化することが知られているために、DPc 内包ミセルの NaCl 濃度に対する安定性評価を静的光散乱測定における散乱光強度の変化によって、評価した。その結果、DPc 内包ミセルは 250mM の NaCl 濃度において散乱光強度の減少を示したが、SS 架橋型 DPc 内包ミセルは同条件においれも散乱光強度の減少を示さず、SS 架橋によるミセル構造の安定化が示唆された (data not shown)。

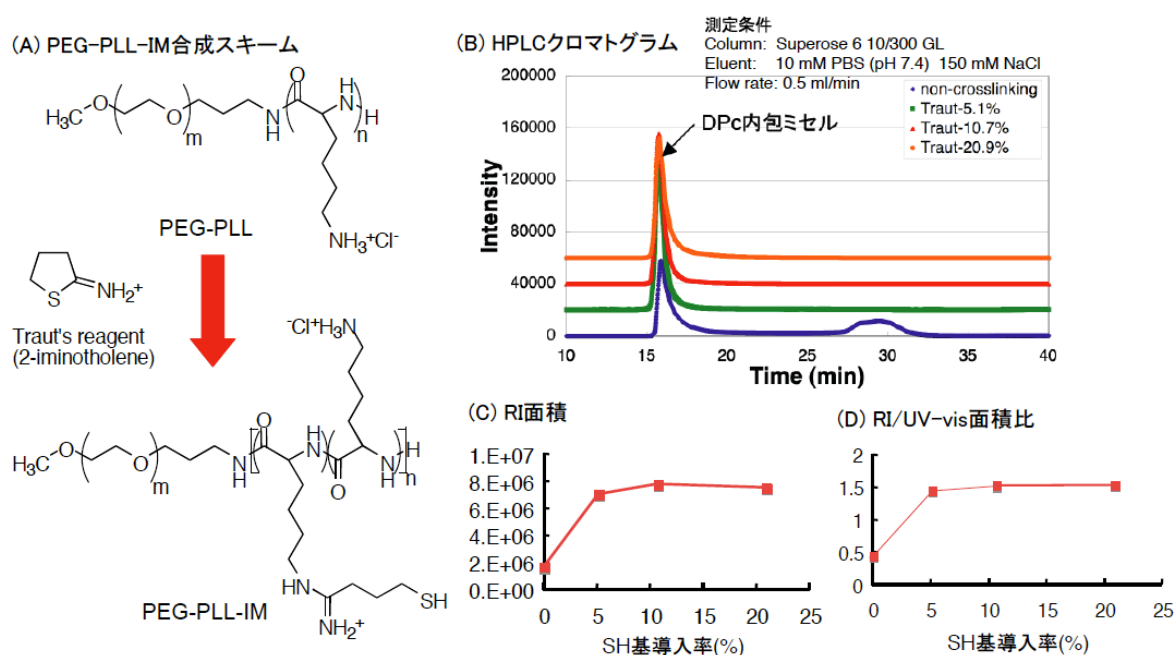


図 1-3. (A) SH 基導入 PEG-ポリカチオン(PEG-PLL-IM)の合成スキーム, (B, C, D) HPLC による DPc 内包ミセルの安定性評価, (C) HPLC クロマトグラム(示唆屈折率計(RI)による検出)のミセルのピークの面積, (D)ミセルのピークの示唆屈折率計による検出(RI)と 680nm での吸光度による検出(UV-vis)の面積比[RI は PEG-PLL-IM と DPc の両者の量を反映し、UV-vis は DPc の量のみを反映]

次に、SS 架橋型 DPc 内包ミセルの酸素消費特性を評価した(図 1-4(A))。本実験では、DPc にレーザー光照射(685nm)を行うことによって産生された一重項酸素が血清タンパクと反応することにより溶液中の酸素分圧が減少する過程について酸素電極を用いて評価している。ここで 10%の酸素消費までは、溶存酸素濃度の微分値が酸素初期濃度に対して比例関係にあることから

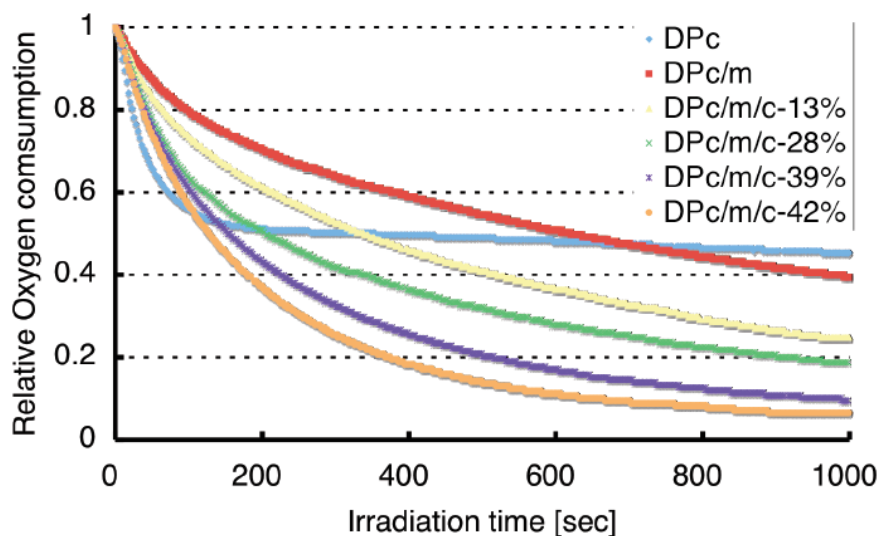
$$-dO_2/dt = k[O_2]_i$$

上記の関係式が満たされており、得られた比例定数 k を一重項酸素産生効率として表す。

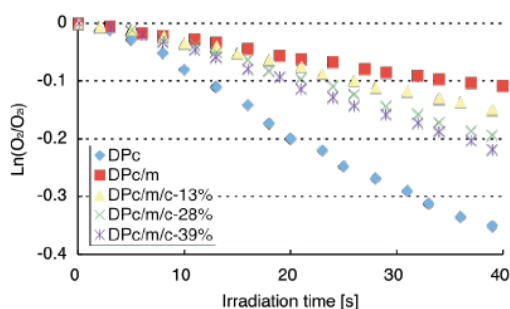
この k の値はレーザーの強さ、モル吸光係数、一重項酸素量子収率、及び光増感剤の濃度に比例する。従って、図 1-4(A)を Log plot にして表し(図 1-4(B))、近似直線より k の値を求め、図 1-4(C)にまとめた。その結果、DPc の酸素消費効率は、ミセルへの内包によって 1/3 まで低下したが、

SS 架橋の導入によって改善することが明らかとなった(図 1-4(C))。この原因に関して、SS 架橋型 DPc 内包ミセルの UV-vis 測定を行ったところ、monomeric state 示唆する 685nm と aggregate state を示唆する 630nm の吸光度の比(685/630)が、DPc のミセルへの内包によって大きく減少するが、SS 架橋の導入によって改善(増加)することが確認された。この結果より、DPc 内包ミセルはその内核において DPc の濃度消光が惹起されるが、SS 架橋の導入によって DPc 同士の色素間相互作用が抑制され、結果的に DPc から酸素分子へのエネルギー移行効率の向上したものと考えられる。

(A) 酸素消費プロファイル



(B) 酸素消費プロファイル の log plot



(C) 酸素消費効率

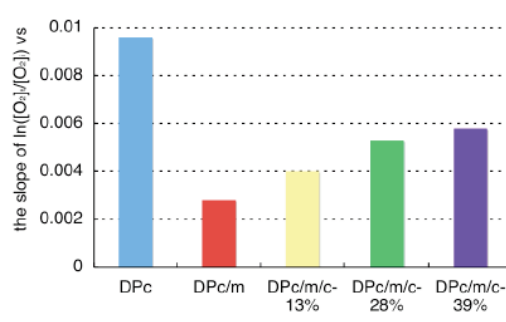


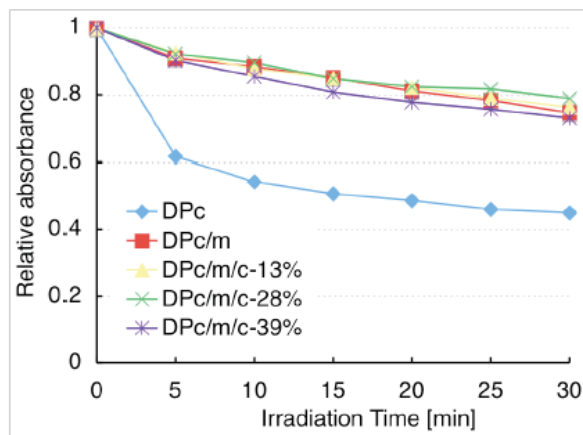
図 4. DPc、DPc 内包ミセル (DPc/m) および SS 架橋型 DPc 内包ミセル (DPc/m/c) の酸素消費量の測定 [10 mM PBS (pH 7.4) + 150 mM NaCl + 10%血清中におけるレーザー照射下での酸素分圧の減少を酸素電極により検出した。本実験では、血清が一重項酸素の quencher の役割を果たしており、血清非存在下では酸素は消費されない。]

一方、上記の図 4 における酸素消費量に関しては、DPc 単独は 200 秒以内に plateau に達したが、DPc 内包ミセルは酸素消費速度は DPc 単独と比較して劣るものの持続的に酸素が消費されることが確認され、SS 架橋の導入によって DPc 内包ミセルの酸素消費量が大幅に増大することが明らかになった(図 1-4(A))。このような酸素消費量の差は、上述の酸素消費効率の差のみでは説明

することができないために、本項目では、DPc にレーザー照射(685nm)を行うことによって DPc の Q-band 由来の 500-800nm の波長範囲の吸光度の減少を評価することによりレーザー照射の DPc の退光への影響を検討した(図 1-5)。その結果、飽和酸素濃度下では、DPc 単独は速やかな退光を示したが、DPc 内包ミセルは架橋の有無に拘わらず、退光が非常に遅いことが確認された(図 1-5(A))。この結果より、図 1-4 における DPc 単独の酸素消費速度の低下は DPc の退光に起因するものと考えられ、ミセル化によって DPc の退光が抑制されるものと思われる。一方、溶存酸素の無い Ar ガス下でレーザー照射を行い DPc の退光を評価したところ、DPc 単独が短い照射時間で強く退光している結果は飽和酸素濃度下における結果と同じであったが、DPc 内包ミセルが緩やかな退光を示すのに対して、SS 架橋型 DPc 内包ミセルはほとんど退光を示さないことが確認された(図 1-5(B))。

以上の結果より、DPc 内包ミセルが退光を示さない理由は以下のように考えられる。すなわち、DPc 単独の場合、DPc は血清タンパク質と相互作用しやすい環境下であり、DPc から基質となる血清タンパク質への電子・プロトンなどの受け渡しが容易であるために Type I photochemical reaction によって DPc が退光するものと考えられる。このことは、溶存酸素の無い Ar ガス下において、DPc の退光が起こったことに一致する。一方、DPc 内包ミセルは内核の DPc が外殻の PEG で覆われているために、血清タンパク質と DPc と相互作用が抑制され、Type II photochemical reaction が優先的に起こり、その結果として DPc 内包ミセル中の DPc は退光しないものと思われる。特に、架橋型 DPc 内包ミセルは、ミセルとユニマーの平衡が無く、DPc がミセルに安定に内包されているために、Type I photochemical reaction による DPc の退光を効果的に抑制できたものと考えられる。この結果は、Ar 下において、SS 架橋型 DPc 内包ミセルがほとんど退光を示さなかった結果に一致する。以上の結果より、架橋型 DPc 内包ミセルは、SS 架橋によりミセル内核における DPc の色素間相互作用を抑制することによって DPc の一重項酸素産生効率を高める一方で、ミセル表面の PEG により血清蛋白質と DPc の相互作用が抑制され Type II photochemical reaction が優先的に起こることによって、DPc の退光を抑制できるものと考えられる。以上のように、DPc 内包ミセルは、DPc の photochemical reaction の効率を高める新しいナノキャリアシステムであることが明らかとなった。

(A) 飽和酸素濃度下



(B) Ar ガス下 (溶存酸素のない状態)

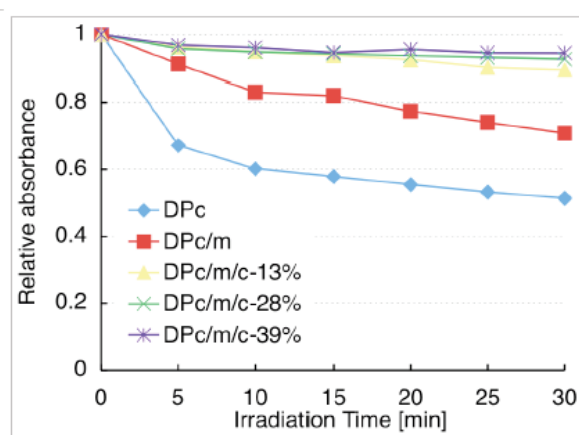
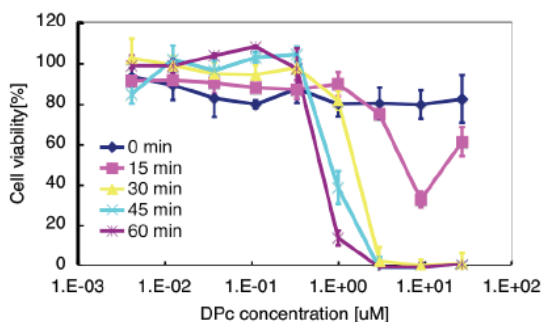


図 1-5. DPc、DPc 内包ミセル (DPc/m) および SS 架橋型 DPc 内包ミセル (DPc/m/c) のレーザー照射

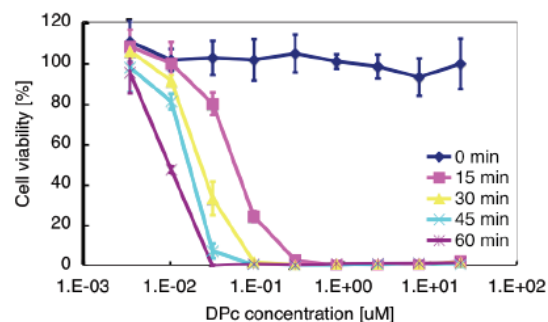
による退光の評価 [10 mM PBS (pH 7.4) + 150 mM NaCl + 10%血清中におけるレーザー照射下で 500-800nm 波長範囲における DPc 由来の吸光度の減少を可視光吸収スペクトル測定により評価した]

上記のように、SS 架橋の導入によって DPc 内包ミセルの安定化および酸素消費効率の向上が認められた為に、SS 架橋型 DPc 内包ミセルの培養がん細胞に対する *in vitro* 光毒性を評価した(図 1-6)。その結果、DPc 内包ミセル(B)は DPc 単独(A)の 50 倍の光毒性を示し、SS 架橋型 DPc 内包ミセル(C, D)はさらにその数十倍(すなわち DPc の数千倍)の光毒性を示すことが明らかとなった。DPc 内包ミセルが臨床応用されているフォトフリンの 4 倍程度の光毒性を有することを考えると、SS 架橋型 DPc 内包ミセルはフォトフリンの数十倍から数百倍の極めて高い光毒性を有しているものと思われる。SS 架橋型 DPc 内包ミセルの光毒性のメカニズムに関しては、現在、検討中であるが、DPc の取り込み量の増大や細胞内における効率的な一重項酸素の産生に加えて、一重項酸素に感受性の高いミトコンドリア等の細胞小器官に光傷害を与えた結果であると考えている[N. Nishiyama et al. J. Control. Release 133 (3) 245-251 (2009)]。すなわち、DPc 内包ミセルは、局所に高濃度の一重項酸素を産生することができ、そのような効果が高い PDT 効果をもたらしているのかも知れない。一方、図 1-6 には示していないが、SS 架橋型 DPc 内包ミセルの SH 基導入率が 40-50%以上の場合は光毒性が顕著に低下することも分かっている。従って、SS 架橋の導入によって細胞内におけるミセルの安定性を向上させることによって DPc 内包ミセルの光毒性が顕著に増大するが、その機能発現の為に細胞小器官との相互作用のために細胞内で適度な不安定化を受ける必要があり、過度の安定化は逆にミセルの PDT 効果を低下させるのではないかと考えられる。

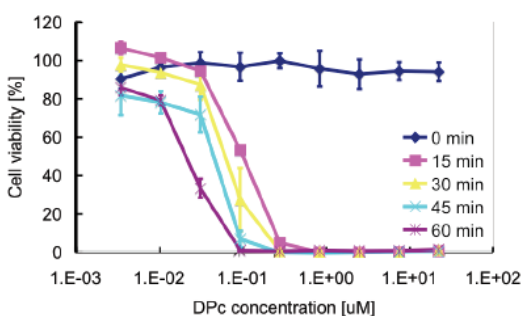
(A) DPc 内包非架橋ミセル



(B) DPc 内包 13%SS 架橋ミセル



(C) DPc 内包 28%SS 架橋ミセル



(D) DPc 内包 39%SS 架橋ミセル

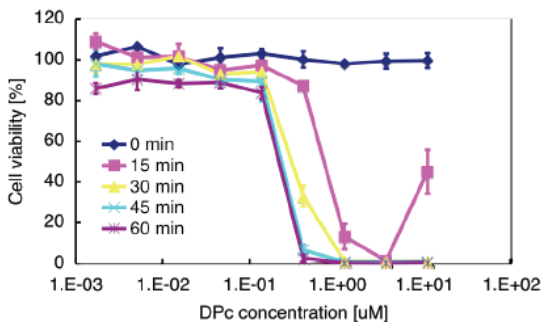


図 1-6. DPc 及び DPc 内包ミセル(架橋無し、SS 架橋導入)の A549 細胞に対する *in vitro* 光毒性の評価[24 時間培養後に光照射(fluence rate: 3.0 mW/cm²)を行い、48 時間後の細胞生存率を MTT アッセイ

によって評価した]

DPc 内包ミセルの血中滞留性を評価するために、PEG-PLL および PEG-PLL-IM のリシン側鎖のアミノ基に蛍光色素 (Alexa488) を導入した。このような蛍光標識ポリマーは、血中滞留性の評価のみならず蛍光イメージングによる微小がんの検出 [Photodynamic diagnosis (PDD)] にも有用であると考えられる。本実験では、Alexa488 標識 DPc 内包ミセルのマウスへの静脈内投与 1 時間後の血中滞留性を評価したところ、SH 導入率依存的に SS 架橋型 DPc 内包ミセルは高い血中滞留性を示すことが明らかになった (図 1-7(A))。この結果は、SS 架橋の導入によるミセルの PIC 内核の安定化に基づくものと思われる。次に、ラット膀胱がん (AY-27) 細胞のマウス皮下移植モデルに対する in vivo PDT 効果を評価したところ、SS 架橋型 DPc 内包ミセルは DPc 内包ミセルよりも優れたがん増殖抑制効果を示した (図 1-7(B))。そこで、Alexa488 標識ポリマーを利用して、DPc 内包ミセルのがん組織への集積性を組織切片の蛍光観察によって評価したところ、SS 架橋型 DPc 内包ミセルは架橋を導入していない DPc 内包ミセルよりも効果的にがんを集積していることが明らかになった (図 1-7(B))。

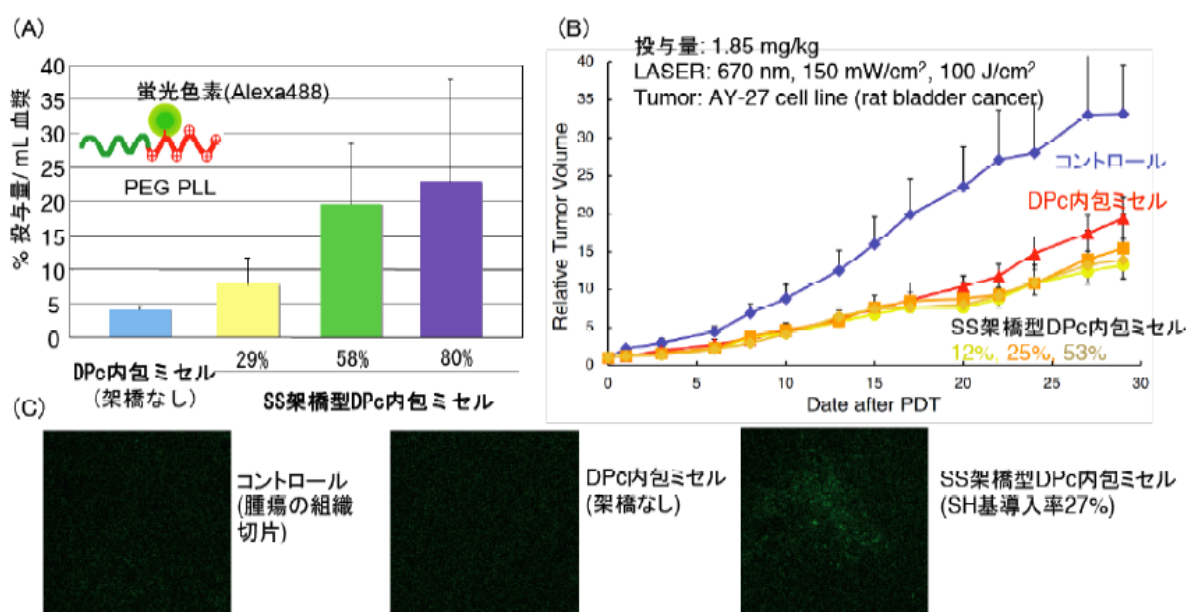


図 1-7. (A) SS 架橋型 DPc 内包ミセルの BALB/c ヌードマウス (♀, 6w) における尾静脈投与後 1 時間の血中滞留性評価 (ポリマーを Alexa488 で標識して蛍光によって評価), (B) SS 架橋型 DPc 内包ミセルのラット膀胱がん (AY-27) 細胞の皮下移植モデルに対する PDT 効果, (C) Alexa488 標識 DPc 内包ミセルの固形がんへの集積

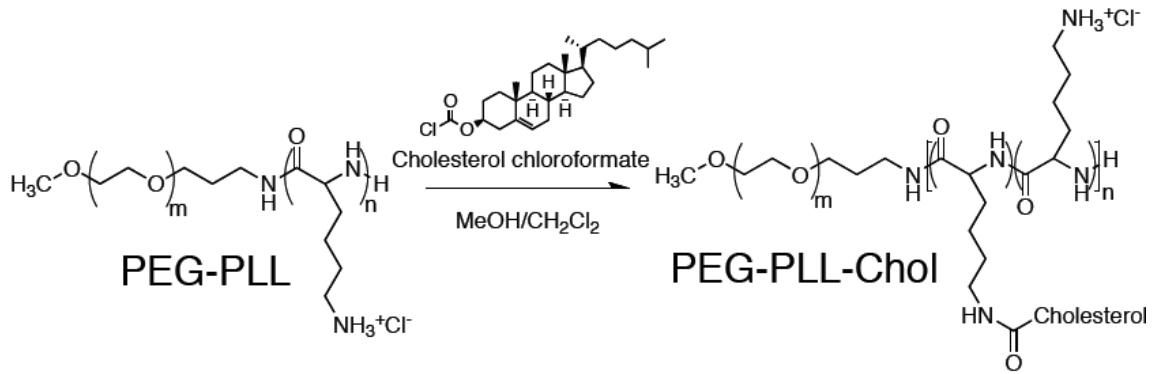
以上のように、SS 架橋型 DPc 内包ミセルは内核 PIC の安定化によって血中滞留性の長期化とがん組織への集積性の向上を示した。このような効果に加えて、図 1-6 における SS 架橋型 DPc 内包ミセルの非常に高い光毒性を考えると、図 1-7 (B) の抗腫瘍効果は改善の余地があると思われる。特に、in vivo PDT 効果においては光照射のスケジュールが重要であると考えられ、腫瘍への酸素の供給が PDT 効果に重要であることを考えると fluence rate の低い光を長時間もしくは数回に分けて照射することが望ましいと考えられる。この点においては、低分子の光増感剤は腫瘍

組織から速やかに消失する為に光照射のタイミングはおのずと決まってくるが、DPc 内包ミセルは EPR 効果によって腫瘍内に長期滞留するために数回に分けて光照射を行うのに適していると思われる。

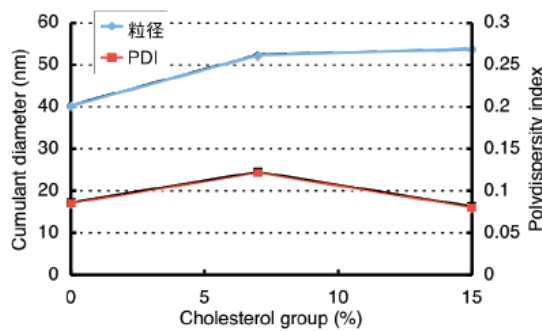
1)-1-c) 内核にコレステロール(Chol)基を導入した DPc 内包ミセルの開発

DPc 内包ミセルの PIC 内核の安定化の為に異なるアプローチとして、疎水性相互作用を利用することも可能である。そこで、PEG-PLL の側鎖一級アミノ基に凝集性の高いコレステロール基を導入した PEG-PLL-Chol を合成し(図 1-8(A))、DPc と混合することによって疎水性相互作用で PIC 内核が安定化された Chol 導入 DPc 内包ミセルを調製した。動的光散乱(DLS)測定によって、Chol 導入 DPc 内包ミセルは約 50nm の粒径を有することが確認された(図 1-8(B))。塩に対する安定性を静的光散乱測定によって行ったところ、Chol 基の導入によって DPc 内包ミセルの塩に対する安定性が向上することが確認された(図 1-8(C))。また、500-800nm の波長範囲で可視光吸収スペクトル測定を行ったところ、Chol 導入率が高くなるとともに、monomeric state を示唆する 685nm 付近の吸光度が増大していることが分かった(図 1-8(D))。さらに、酸素消費効率を調べたところ、Chol 基の導入によって DPc 内包ミセルの酸素消費効率が向上することが確認された(図 1-8(E))。これは、Chol 基の導入により、685nm の吸収の増加やミセルコアの DPc 同士の色素間相互作用の抑制による DPc から酸素分子へのエネルギー移行効率の向上が寄与しているものと考えられる。次に、Chol 導入 DPc 内包ミセルの培養がん細胞に対する *in vitro* 光毒性を評価したところ、SS 架橋型 DPc 内包ミセルと同様に Chol 導入 DPc 内包ミセルは DPc 内包ミセルよりも高い光毒性を示すことが明らかになった(図 1-8(F, G))。一方、Chol 導入 DPc 内包ミセルの場合も、Chol 導入率が約 30%以上において光毒性の顕著な低下が認められ(data not shown)、SS 架橋型 DPc 内包ミセルと同様にミセルの過度の安定化は光毒性を低下させることが示唆された。このような結果に基づいて、Chol 導入 DPc 内包ミセルの AY-27 細胞のマウス皮下移植モデルに対する *in vivo* PDT 効果を評価したところ、Chol 導入 DPc 内包ミセルは DPc 内包ミセルよりも優れたがん増殖抑制効果を示した(図 1-9(A))。興味深いことに、Chol 導入 DPc 内包ミセル(Chol 導入率 28%)は、*in vitro* においては光毒性を示さなかったが、*in vivo* においては最も優れた抗腫瘍効果を示した。この結果は、*in vivo* 環境が *in vitro* 実験での培養条件よりも過酷である為に生じた差であると考えられる。すなわち、*in vivo* でも過度の PIC 内核の安定化は PDT 効果を低下させるが、より過酷な *in vivo* 環境では最大の PDT 効果を示す Chol 導入率が高い値にシフトしているものと思われる。また、非常に重要なことに、Chol 導入 DPc 内包ミセルは、肺がんの PDT に臨床応用されているレザフィリンよりも優れた *in vivo* PDT 効果を示すことが明らかになった(図 1-9(A))。さらに本実験では、腫瘍部位に強いレーザー光を照射した場合、レザフィリン投与群では光照射部位を中心に激しい火傷が認められ、6 匹中 3 匹のマウスが死亡したが、DPc 内包ミセル投与群ではそのような毒性は認められなかった(図 1-9(B))。この結果は、DPc 内包ミセルは腫瘍以外の正常組織には集積しないことによるものと思われる。すなわち、DPc 内包ミセルによる PDT は、高いがん治療効果をもたらす一方で、正常組織に対しては光毒性を示さず、有効性と安全性を兼ね備えているものと考えられる。

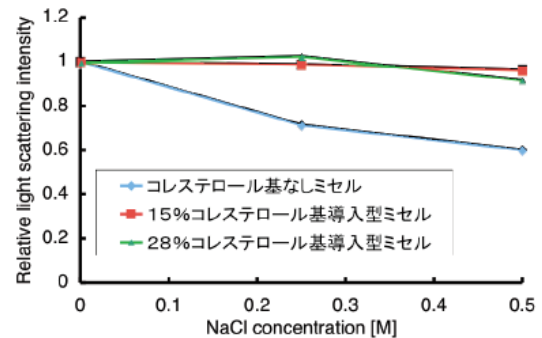
(A) コレステロール基導入合成スキーム



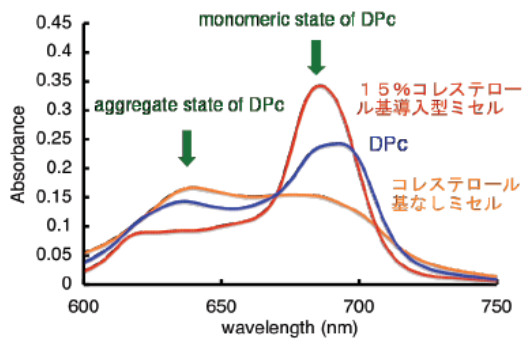
(B) 粒径



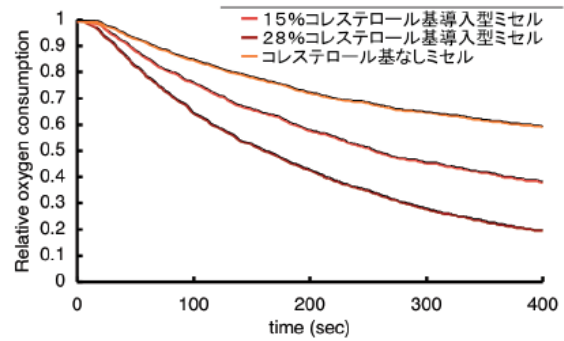
(C) 塩に対する安定性評価



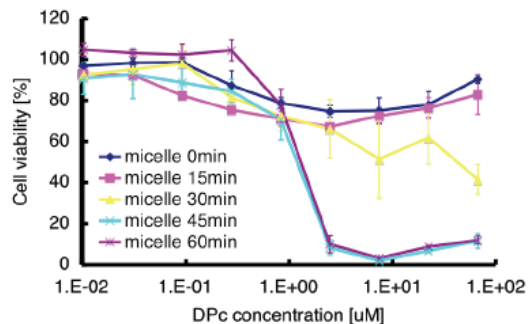
(D) 可視光吸収スペクトル



(E) 酸素消費効率



(F) DPc 内包ミセルの光毒性



(G) 16%Chol 導入 DPc 内包ミセルの光毒性

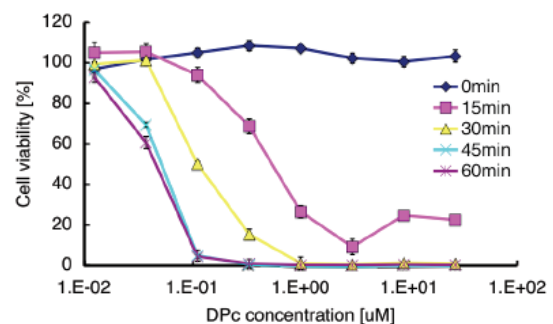


図 1-8. (A)コレステロール基(Chol)の PEG-PLys の Lys 側鎖への導入スキーム、(B)Chol 導入 DPc 内包ミセルの粒径、(C)Chol 導入 DPc 内包ミセルの塩に対する安定性評価、(D)Chol 導入 DPc 内包ミセルの

可視光吸収スペクトル (E) Chol 導入 DPc 内包ミセルの酸素消費効率の測定、(F)(G)ラット膀胱ガン細胞 (AY-27)に対する in vitro 光毒性

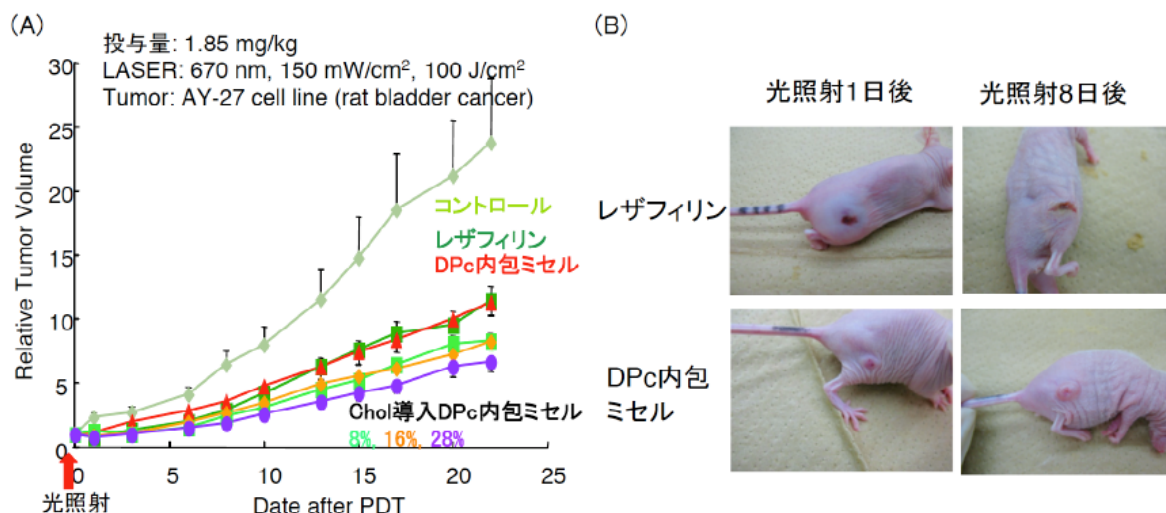


図 1-9. (A) Chol 導入 DPc 内包ミセルのラット膀胱ガン(AY-27)細胞の皮下移植モデルに対する PDT 効果, (B) レザフィリンと DPc 内包ミセルの光毒性の比較[レザフィリンの場合は、5mg/kg で光照射部位を中心に激しい火傷が認められ、6 匹中 3 匹が死亡したが、DPc 内包ミセルではそのような毒性は認められなかった]

1)-1-d) PEG-NHS の添加によって PEG 密度を高めた SS 架橋型 DPc 内包ミセルの開発

DPc 内包ミセルの血中滞留性のためには、PIC 内核の安定化に加えて、血中でのステルス性を高めることも重要であり、その為にはミセル表面の PEG 密度を高める必要がある。そこで本項目では、ミセル表面の PEG 密度を高めるアプローチとして、SS 架橋型 DPc 内包ミセルに PEG 活性エステル(PEG-NHS)を反応させた。ここでは、SH 基導入率が 29%および 58%の SS 架橋型 DPc 内包ミセルに分子量が 2,000 および 5,000 の PEG-NHS を反応させることによって、PEG 高密度化 SS 架橋型 DPc 内包ミセルを調製した。この PEG 高密度化 SS 架橋型 DPc 内包ミセルの培養がん細胞に対する光毒性を評価したところ、SH 基導入率が 29%の SS 架橋型 DPc 内包ミセルの場合には PEG の分子量依存的に光毒性が低下したが、SH 基導入率が 58%の SS 架橋型 DPc 内包ミセルの場合には逆に PEG の分子量依存的に光毒性が増加した(図 1-10(A))。すなわち、高い光毒性を示す SH 基導入率が 29%の SS 架橋型 DPc 内包ミセルにおいては PEG の高密度化は細胞への取り込み量を減少させる可能性があり、これによって光毒性が低下するものと考えられるが、過度の PIC 内核の安定化によって光毒性が著しく低下している SH 基導入率が 58%の SS 架橋型 DPc 内包ミセルの場合には、PEG-NHS が PIC 内核の PLL と反応することによって PIC 内核が適度に不安定化され、光毒性を示すようになったものと思われる。そこでこれらの PEG 高密度化 SS 架橋型 DPc 内包ミセルのマウスへの静脈内投与 1 時間後の血中滞留性をポリマーの Alexa488 標識を利用して評価したところ、PEG の高密度化によって SS 架橋型 DPc 内包ミセルの血中滞留性が飛躍的に向上することが明らかになった(図 1-10(B))。このように、PEG 高密度化 SS 架橋型 DPc 内包ミセルは、優れた血中滞留性と適度な細胞に対する光毒性を兼ね備えたシステムとして、in vivo における有効性が期待される。

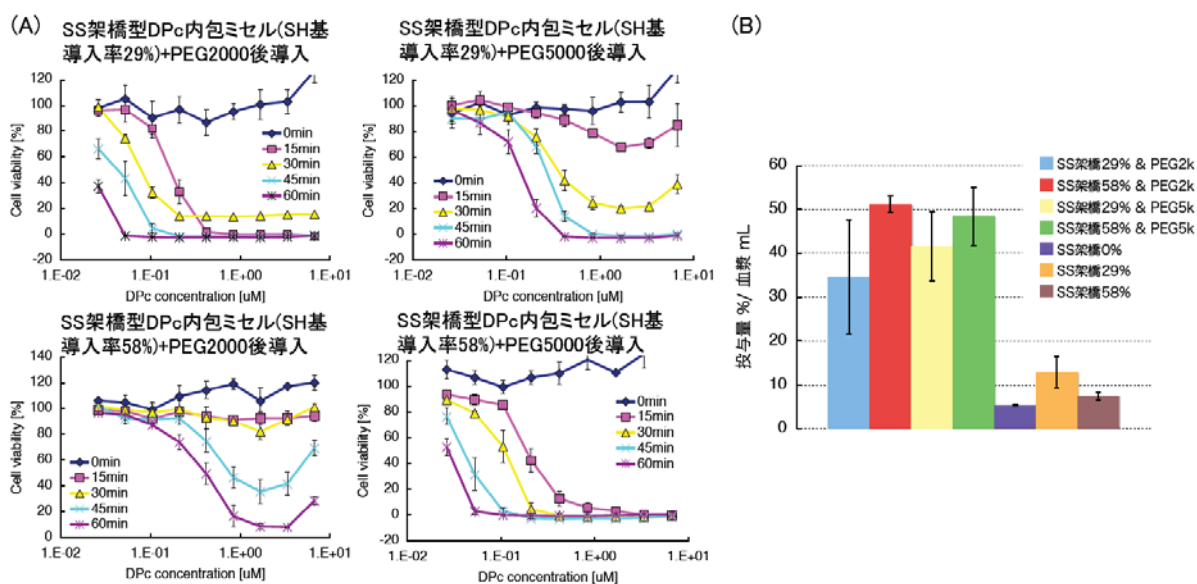


図 1-10. (A) PEG-NHS 導入 SS 架橋型 DPc 内包ミセルの膀胱ガン(AY-27)細胞に対する in vitro 光毒性, (B) PEG-NHS 導入 SS 架橋型 DPc 内包ミセルの BALB/c ノードマウス(♀, 6w)における尾静脈投与後 1 時間の血中滞留性評価

1)-1-e) PEGasus-b-PLL によって PEG 密度を高めた DPc 内包ミセルの開発

DPc 内包ミセルの PEG 密度を高める異なるアプローチとして分岐状の PEG (PEGasus) を持った PEG-ポリカチオンからのミセル調製が考えられる。そこで本項目では、分岐点に一級アミノ基を有する PEGasus-NH₂ より Lys (TFA)-N-カルボン酸無水物を重合することによって、PEGasus-b-PLL を合成した。PEGasus-b-PLL は、DPc と混合することによって約 40nm の高分子ミセルを形成することが確認された為、培養がん細胞に対する光毒性を検討した。その結果、PEGasus 型 DPc 内包ミセルの光毒性は PEG-PLL から形成される DPc 内包ミセルと比較して弱いことが確認された(図 1-11)。この結果は、PEGasus 型 DPc 内包ミセルが高密度の PEG 層を表面に有する為とその細胞内への取り込み量が減少したことに起因するものと思われる。しかしながら、PEGasus 型 DPc 内包ミセルは光照射量に依存した光毒性を示すことから、血中滞留性の長期化と十分ながん組織への集積が達成されれば、高い in vivo P D T 効果が得られるものと考えられる。

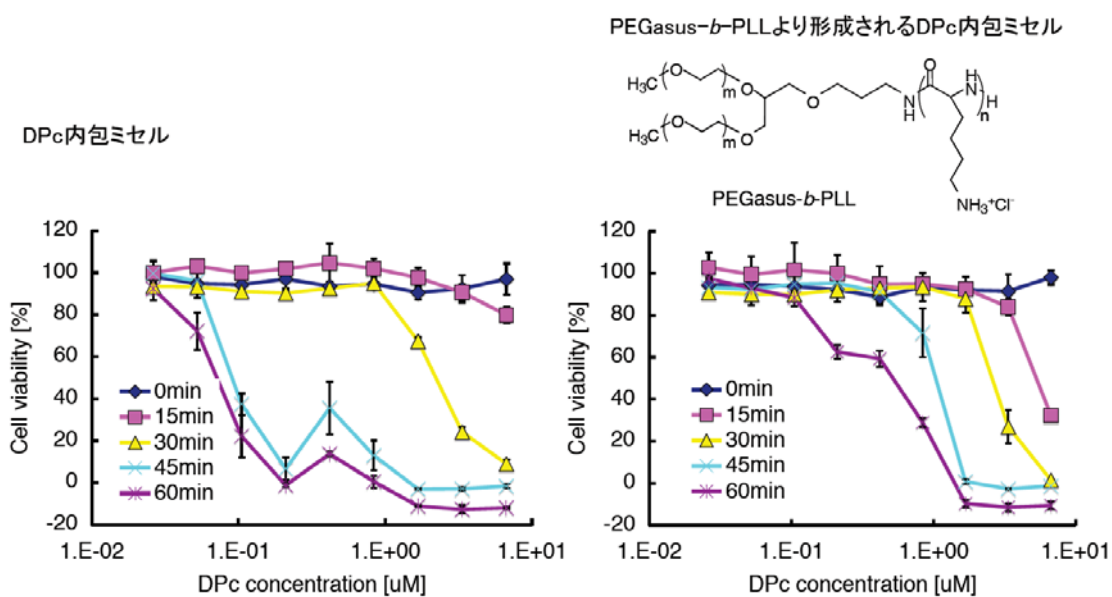
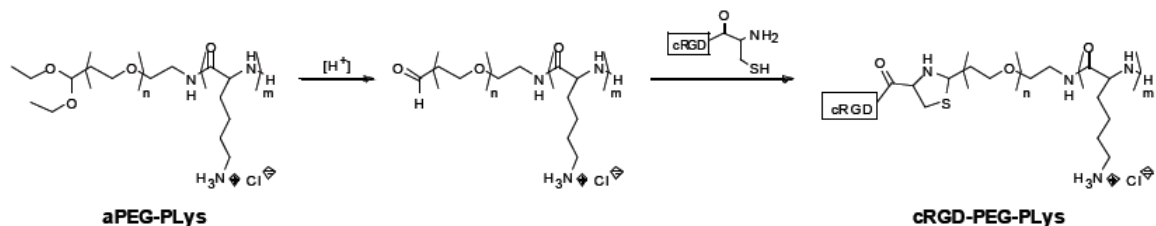


図 1-11. PEGGasus-*b*-PLL より形成される DPc 内包ミセルの膀胱ガン(AY-27)細胞に対する in vitro 光毒性

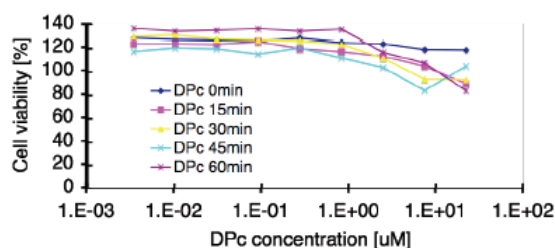
1)-1-f) リガンド分子を導入したDPc内包ミセル

DPc内包ミセルの標的選択性を高め、標的細胞による取り込み量を向上させる方法として、ミセル表面へのリガンド分子の導入は有効な戦略であると考えられる。そこで本項目では、腫瘍血管の内皮細胞および多くのがん細胞で過剰発現が認められる $\alpha v \beta 3$ インテグリンレセプターに対して特異的に結合する環状RGD (cRGD) ペプチドを表層に導入したDPc内包ミセルを開発した。cRGD結合ミセルは、標的細胞による取り込みの増加に基づくPDT効果の向上に加えて、がん組織の血管壁を治療ターゲットにすることにより、血管新生部位への栄養供給を阻害し、がん組織の成長を抑制する、抗血管新生治療としての応用も期待される。リガンド導入の方法としては、初めに、acetal基を α 末端に導入したPEG-PLLブロック共重合体を作製し、acetal基をアルデヒド化したのち、N末端にCys残基を有するcRGDペプチドと反応させ、thiazolidine環形成を介してcRGDペプチドを導入したPEG-PLL (cRGD-PEG-PLL) を作製した (図1-12(A))。その後、2-iminothiolaneとPEG-PLLのLys側鎖を反応させLys側鎖に2級アミンとSH基を100%導入し(cRGD-PEG-PLL-IM)、DPcと混ぜることにより、cRGDを表層に有したSS架橋型DPc内包ミセルを作製した。調製されたミセルの平均粒径は42.5nmであり、cRGDペプチドの導入率は43%、架橋導入率はほぼ100%であった(data not shown)。このcRGD結合DPc内包ミセルに関して、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンレセプターが過剰発現しているHeLa細胞を用いて、光毒性を検討した。しかしながら、本実験では、光毒性は確認されず(図1-12(B-E))、架橋導入率の最適化が必要であるものと思われた。

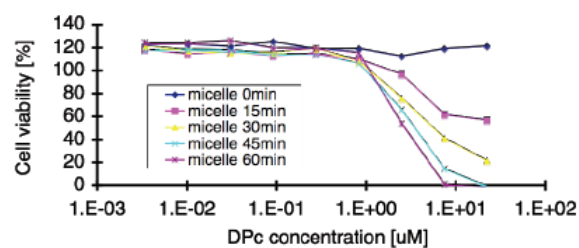
(A)環状 RGD ペプチドの導入スキーム



(B)DPc の光毒性



(C)DPc 内包ミセルの光毒性



(D)acetal 基装着 DPc 内包ミセルの光毒性

(E) 環状 RGD ペプチド装着 100%SS 架橋 DPc 内包ミセルの光毒性

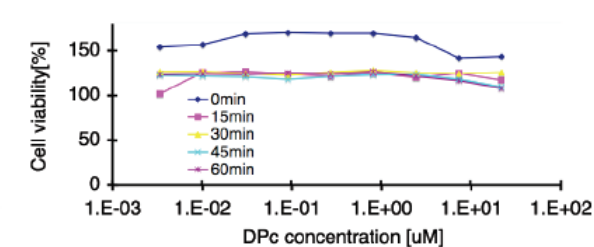
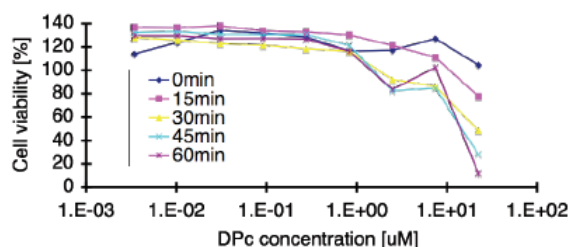


図 1-12. (A)PEG-PLL の α 末端への環状 RGD ペプチド導入合成スキーム(B-E)HeLa 細胞に対する in vitro 光毒性

以上のように、本事業では、DPc 内包ミセルの構造安定性、photochemical reaction、細胞による取り込み、PDT 効果を向上させるためのキャリア設計を行ってきたが、2009 年 1 月の中間評価の結果を受けて、開発委員会より「DDS に関して、色々な付加ファクターを追求せずに動物実験で使用するものを絞り込む」との助言を受けたため、以下においては、DPc 内包ミセルならびに SS 架橋型 DPc 内包ミセルに絞り、大量製造プロセスならびに保存安定性を検討し、項目 1)-3 の in vivo 応用を行った。

1)-1-g) DPc内包高分子ミセルの大量製造プロセスの開発

研究レベルでは、例えばマウスを用いる動物実験に必要なミセル(ポリマーとDPcの固形分)の量は数十匹に投与するとしてもせいぜいmgオーダーである。一方で実用化を考えるならば、100g~kgオーダーの量が必要となる。例えばレザフィリンは100mgの製剤が販売されているが、DPc内包ミセルも同程度の投与量であるとするならば、1000本製造するためには100gスケールの製造プロセスを考えなければならない。大学の研究室の設備の問題と原料の価格の問題から、現段階でそのスケールで製造することは現実的ではなく、またGMPレベルの製造も不可能であるが、可能な範

囲でスケールアップの検討を実施した。また実用化を考える上でもう一つ重要なことは、製造の再現性と製品の品質が適切な分析手段により保証されること、すなわち製品規格が立つということである。そこで、各段階での分析項目の抽出と分析手段の確立を行った。

本事業では、様々な構造、組成のポリマーを製造したが、最も重点的に検討したのは、ポリエチレングリコール(PEG)-ポリ(L-リシン)(PLL)ブロック共重合体で、PEGの分子量が12000、PLLの重合度が約45のもの(12-45と表記)である。このポリマーの製造法の概略は以下の通りである。 α -メトキシ- ω -アミノ-ポリエチレングリコール(MeO-PEG-NH₂)のジメチルスルホキシド(DMSO)溶液に、アミノ基に対して50当量のN^ε-トリフルオロアセチル-L-リシン-N-カルボン酸無水物(Lys(TFA)-NCA)のDMSO溶液を加え、35℃で1~2日間反応させ、エーテル再沈、乾燥によりPEG-PLys(TFA)ブロック共重合体を得た(重合反応)。メタノールと1N水酸化ナトリウム水溶液の10:1混合溶液に溶解し35℃で12時間反応させ、0.01N塩酸、水に対して透析した後、凍結乾燥によりPEG-PLLを塩酸塩の形で得た(脱保護反応)。

原料のMeO-PEG-NH₂は、日油(株)より購入したものであるが、すでに臨床試験で使用されている製剤の原料として用いられているものであり、大量製造法、分析法も確立されている。また、Lys(TFA)-NCAは、フランスのメーカーより購入したものであるが、kg単位での製造が可能であり、さらに国内にも製造委託が可能なメーカーが存在しており供給に不安はない。

重合反応は最大でMeO-PEG-NH₂の仕込み9.6gスケールまで行ったが、スケールアップによる問題は特になかった。脱保護反応は最大でPEG-PLys(TFA)の仕込み5.0gスケールまで行ったが、特に問題はなかった。ポリマーの品質チェックはGPC、NMRで行った。PEG-PLLの組成は合成スケールによらず12-45~47の範囲であり、重合及び脱保護反応の再現性は良好であった。数%のPLLホモポリマーが含まれていたが、従来のサンプルとの再現性の観点から特に精製除去はしなかった。最近ホモポリマーをほとんど生成しない重合法も確立した(後述)。

分子量の異なるMeO-PEG-NH₂、二本鎖であるPEGasus-NH₂、リガンド導入が可能なAcetal-PEG-NH₂についても、仕込み2~3gのスケールまで行ったが、重合、脱保護反応に問題はなかった。PLLの重合度を変えた場合も特に問題はなかったが、重合度の増加に従いホモポリマーの比率が増大する傾向があった。

重合溶媒を1M濃度のチオウレア(TU)を溶解させたN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)に変え、20℃で3~4日間反応させることにより、分子量分布が狭く、ホモポリマーをほとんど含まないブロック共重合体を得ることができた。図1-13に示すように、PEG-PLys(TFA)段階でのGPC(DMF系)において明らかにピークがシャープになっており、分子量分布の指標となるMw/Mnの値も1.11から1.04に減少した。PEG-PLL段階でのGPC(水系)ではホモポリマーのピークがほとんど見られなかった(図1-14)。

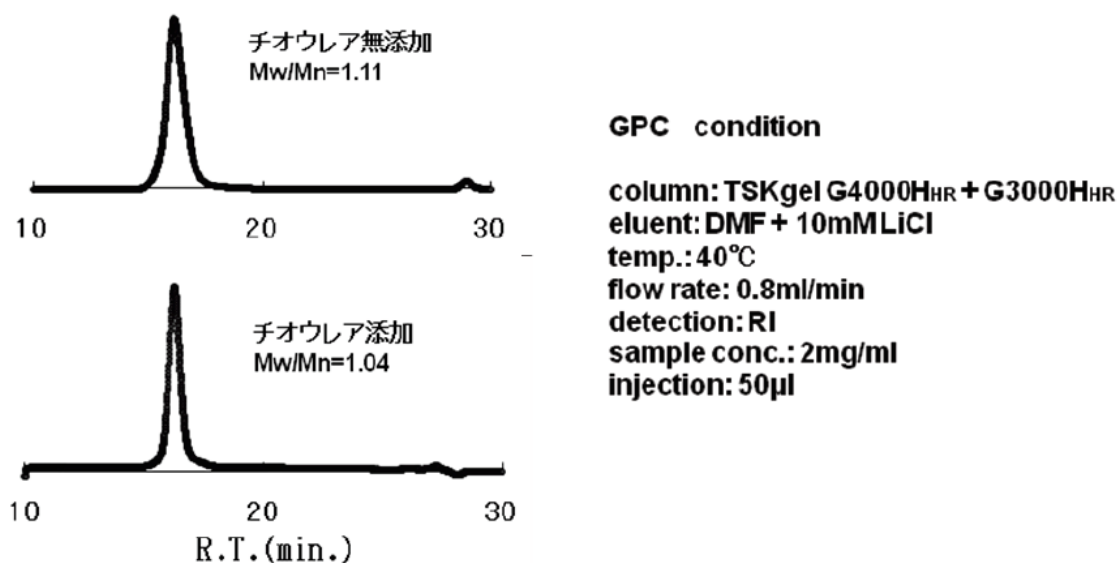


図 13. PEG-PLys(TFA)の GPC クロマトグラム

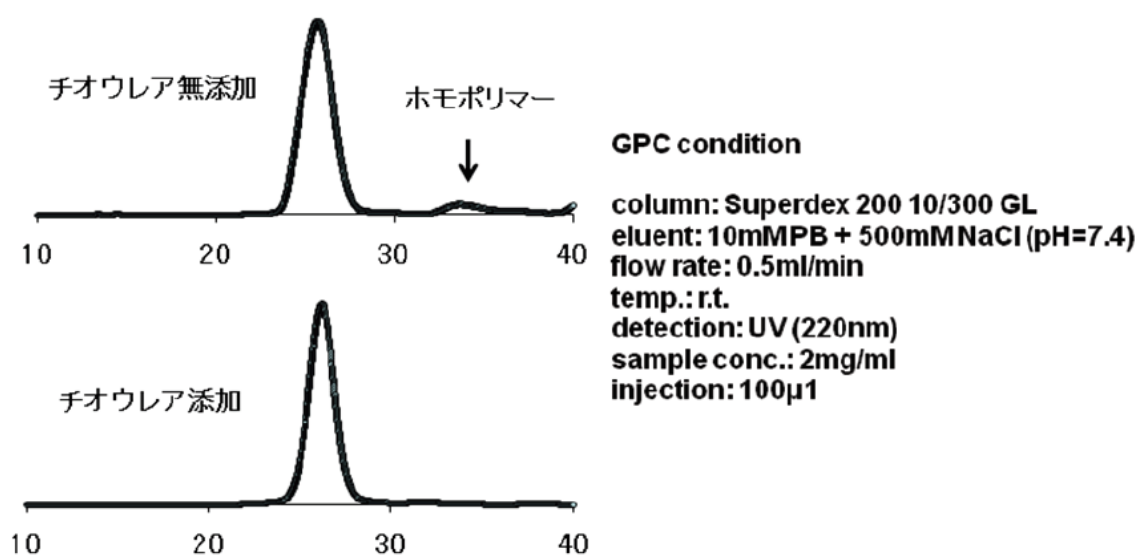


図 1-14. PEG-PLL の GPC クロマトグラム

以上から、ブロック共重合体については、不純物の少ないものを再現性良く製造する手法をほぼ確立できた。また、PEG-PLLと同じPEG-ポリアミノ酸ブロック共重合体であるPEG-ポリアスパラギン酸(PAsp)、PEG-ポリグルタミン酸(PGlu)は、すでに日本化薬(株)やナノキャリア(株)により臨床試験に用いられるレベルの品質のポリマーの製造法が確立されている。製造法で共通する部分も多く、さらなるスケールアップや規格化についても十分対応できるものと考えられる。ただ、架橋、コレステロール、リガンド等の導入については、再現性やスケールアップについてまだ十分なデータはなく、今後の検討課題である。

次にポリマーとDPcを混合してミセルを調製するプロセスのスケールアップを検討した。従来はDPcとして3mg、溶液として1ml程度の小スケールでミセル化を行っていたので、ポリマーの溶液中にDPcの溶液を一気に加え混合するという方法で調製していた。しかしこの方法ではスケールが大

きくなると両方の溶液が瞬時に混合することは困難と考えられた。そこでサンプル管に撈拌子を入れ撈拌しながら両方の溶液を同じペースで注ぎ込んでいく方法を採用した。得られたミセルは従来のものと粒径、UV-Visスペクトルに差は見られず、同等の品質のものが得られた。DPcとして30mgスケールまでしか検討していないが、方法的にはさらに大きなスケールになっても対応できるはずである。将来的にはY字型の流路を使用する等の方法も検討する価値があると思われる。

1)-1-h) DPc内包ミセルの凍結乾燥及び保存安定性の検討

実用化に向けてのもう一つの大きな課題は製剤の安定性である。そこでまずDPc内包ミセル溶液が凍結乾燥できるかどうかを検討した。PEG-PLL12-45を用いた非架橋ミセル、架橋ミセル(13, 28, 39%)について凍結乾燥を行い、前後の粒径、UV-Visスペクトル、細胞毒性(光毒性)を比較した。その結果、細胞毒性はほとんど変わらず(図1-15, 1-16)、UV-Visスペクトルも変化しなかったが、粒径は若干大きくなり、また架橋度の高いものほど再溶解性が悪くなる傾向があった。そこで、非架橋ミセルと架橋ミセル(28%)にサンプルを絞り、賦形剤の添加を検討した。賦形剤としてラクトースを用いたところ、ラクトースは還元糖であるので架橋ミセルとの相性が悪く粒径が大きく変化してしまった。そこで10mMPB+1%トレハロース溶液から凍結乾燥を行うこととした。凍結乾燥したサンプルは冷暗所に保存し、経時的に再溶解して粒径とUV-Visスペクトルを測定した。非架橋ミセルは2ヶ月後くらいから凍結乾燥品の形態がくずれスポンジ状を維持できないものが出てきた。そうしたものは再溶解性も悪かった。一方、架橋ミセルは約半年後でもスポンジ状の形態を維持しており、再溶解性も良好であった。UV-Visスペクトルはスペクトルの形状も吸光度も半年間でほとんど変化しなかった。粒径は多少凝集体と思われるものが見られたケースもあったが、やはりほとんど変化しなかった。以上のように、DPc内包ミセルは凍結乾燥製剤とすることが可能であり、安定性もある程度のレベルには達していると考えて良いものと思われる。

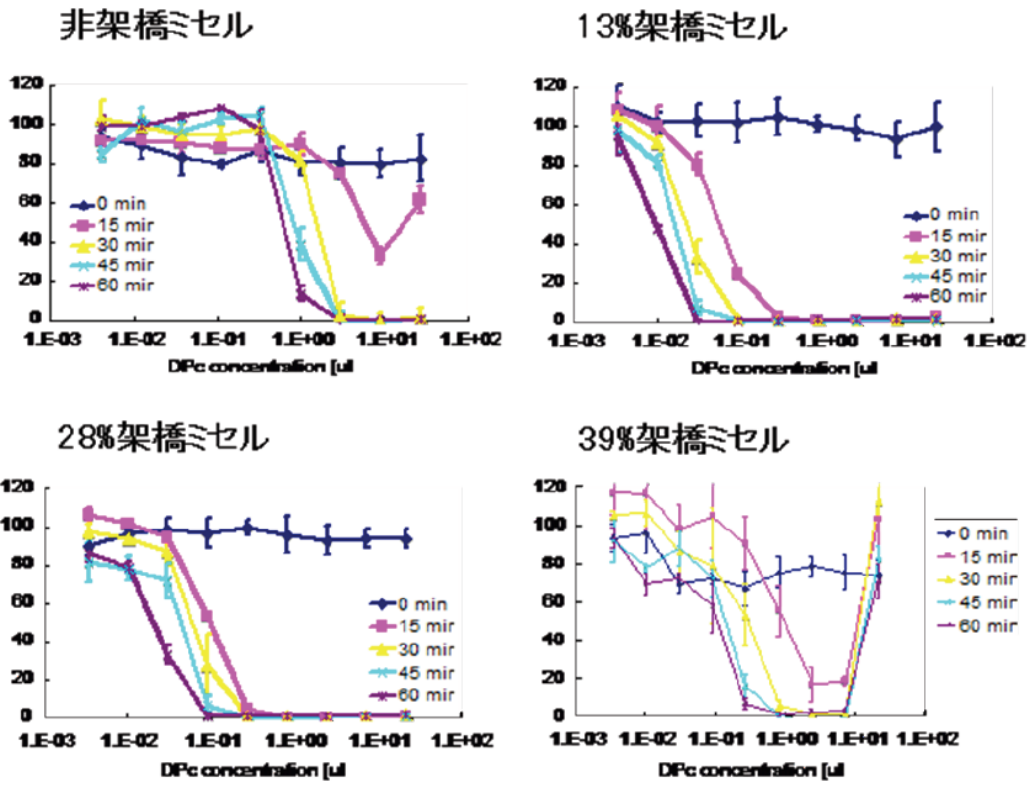


図 1-15. 凍結乾燥前の DPc 内包ミセルの光毒性(A549 細胞) [縦軸は細胞生存率(%)]

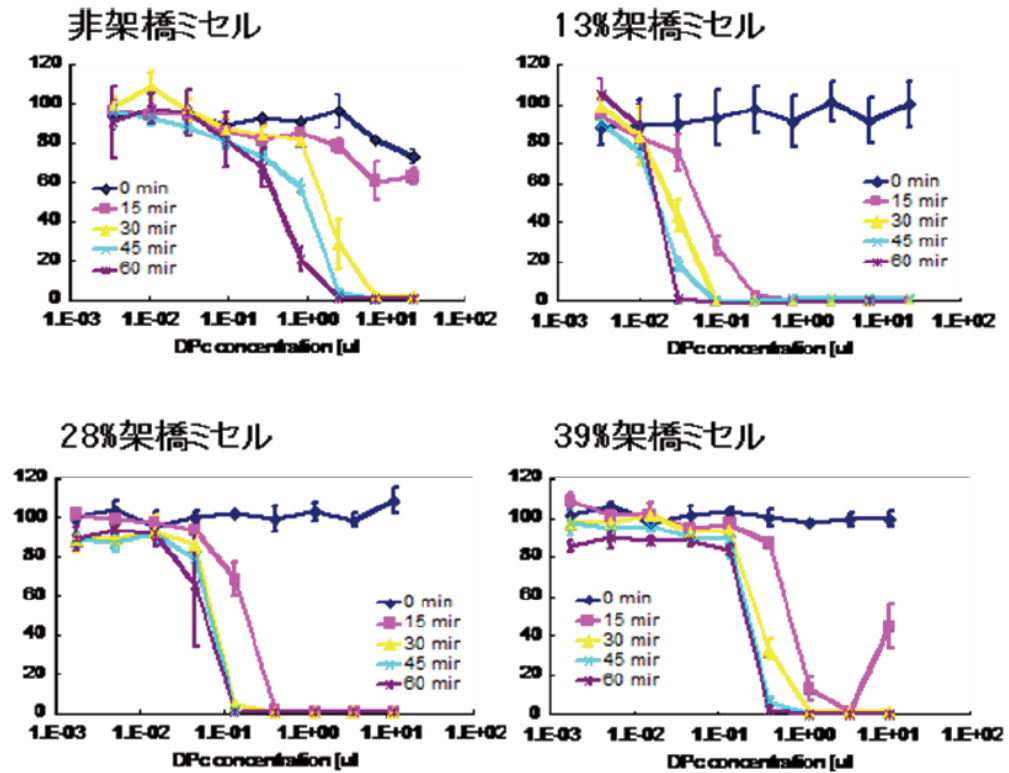


図 1-16. 凍結乾燥後の DPc 内包ミセルの光毒性(A549 細胞) [縦軸は細胞生存率(%)]

1)-2. 患部に対する効果的な光照射を可能にする照射システムの開発（東京大学／ナノキャリア株式会社）

1)-2-a) 光分散プローブの設計と開発

優れたPDT効果を発揮するのに、光照射方法は極めて重要である。膀胱がんは多発・びまん性に増殖する傾向をもつことより、存在するすべての腫瘍に対して腫瘍全体を覆うべく光を照射することが、取りこぼしをなくPDTを行う要件となる。

この目的に照らして、光を膀胱内に均質照射することができるよう最適化を図ったレーザーファイバースコープの開発を進め、2種類を試作した。ひとつは、腫瘍が比較的限局して存在する場合に用いることを想定したプローブで、膀胱を楕円体と仮定した場合、膀胱頂部を中心に半球内腔面を照射する用途を想定して設計した（広角型）。他方、腫瘍が膀胱全体に存在する場合を想定したプローブで、全球内腔面をまんべんなく照射すること意図して作製を進めた（拡散型）。

まずは、設計開発に資する仮想膀胱を構築するため、10匹のラットの膀胱サイズを超音波イメージングを用いて測定したところ、平均長半径が7.5 mm、平均短半径5.0 mmの楕円体と等価であることが分かった（図1-17）。ここを起点に2種類のファイバースコープの理想の光照射範囲を算出した。（図1-18、1-19の左）

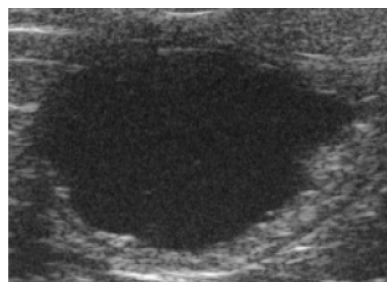


図1-17. ラット膀胱の超音波エコー像（左側：膀胱頂、右側：内尿道口、上側：腹側、下側：背側）

理想の照射分布に近似させることができるよう配慮する一方で小型化を目指して開発を進めた。照射範囲を広げるための方策として、下記の工夫・改良を行い、理想とする光分布に近くなるよう最適化を図った。

- ① ファイバー出射端のねじり加工
- ② ファイバー出射端の円錐研磨加工
- ③ ファイバー先端特殊加工

その結果、現在までに、挿入部最大外径1.05mm、先端チップ長 5.0 mmの広角照射型プローブと、挿入部最大外径0.66mm、先端チップ長 5.0 mmの拡散照射型プローブを作製することができた。試作品の照射分布特性を図1-18、1-19に示すが、H20年度試作品において、広角型では理想の分布に極めて近似した均質照射特性を有するプローブを作成することができた。

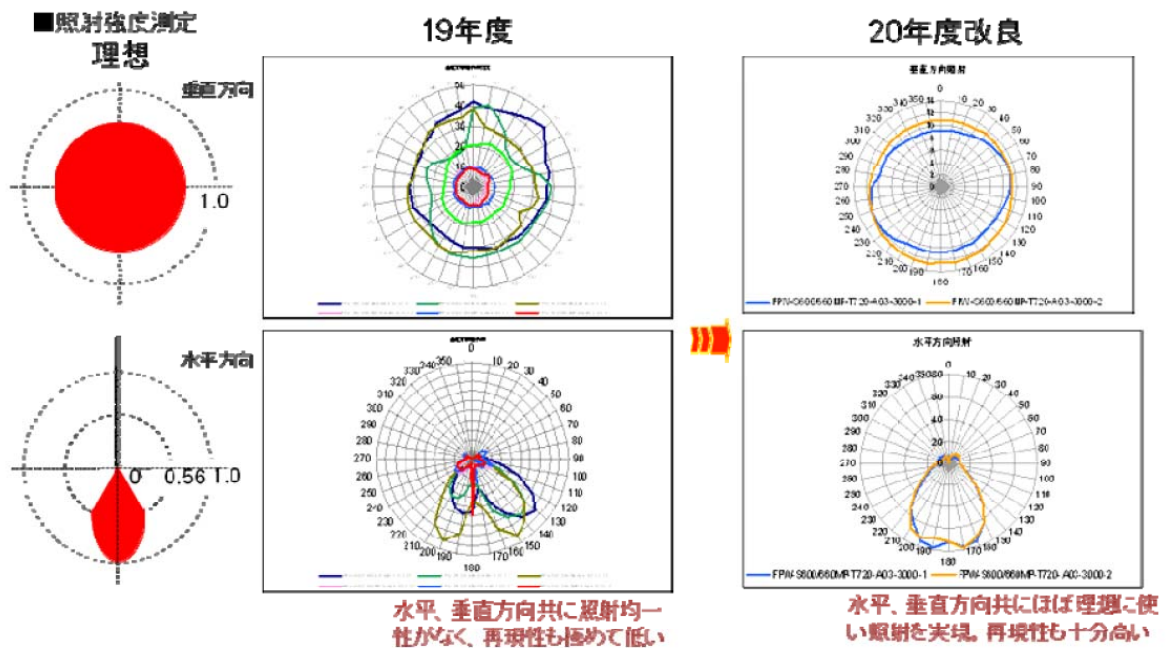


図1-18. 広角型ファイバプローブ(左図は、理想とする光照射分布。中図は、H19年度試作品の光照射分布の実測。右図は、H20年度試作品の光照射分布の実測。)

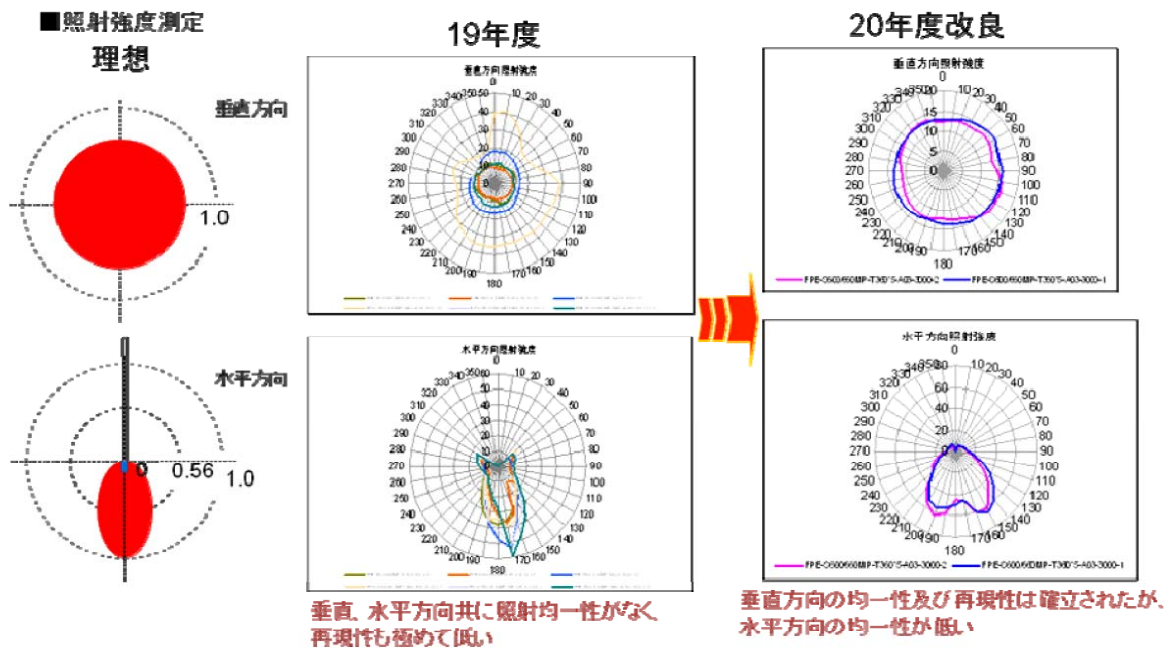


図1-19. 拡散型ファイバプローブ(図の配列は、図18と同様)

次に、広角型ファイバプローブに関して、ラット膀胱内腔に対する均質照射性の証明のためにさらなる検証を行った。ラット膀胱内腔の三次元形状を模擬した楕円体フラスコ（パイレックス製、厚さ1mm、市橋理化器械製作所）(図1-20)を作製した。この楕円体フラスコに対して、フラスコの内尿道口位置に相当する部位にファイバプローブを留置して光照射した。光の強度分布を視覚化するため、フラスコ内壁につや消し白色のエナメル塗料を塗布した。その結果、コント

ロールファイバー（先端無処理）で光照射した場合、フラスコ底部（疑似膀胱の頭側）に光が集中した。一方、広角型ファイバープローブを用いた場合では、フラスコ内壁全体を均質に照射することが観察できた（図1-20）。

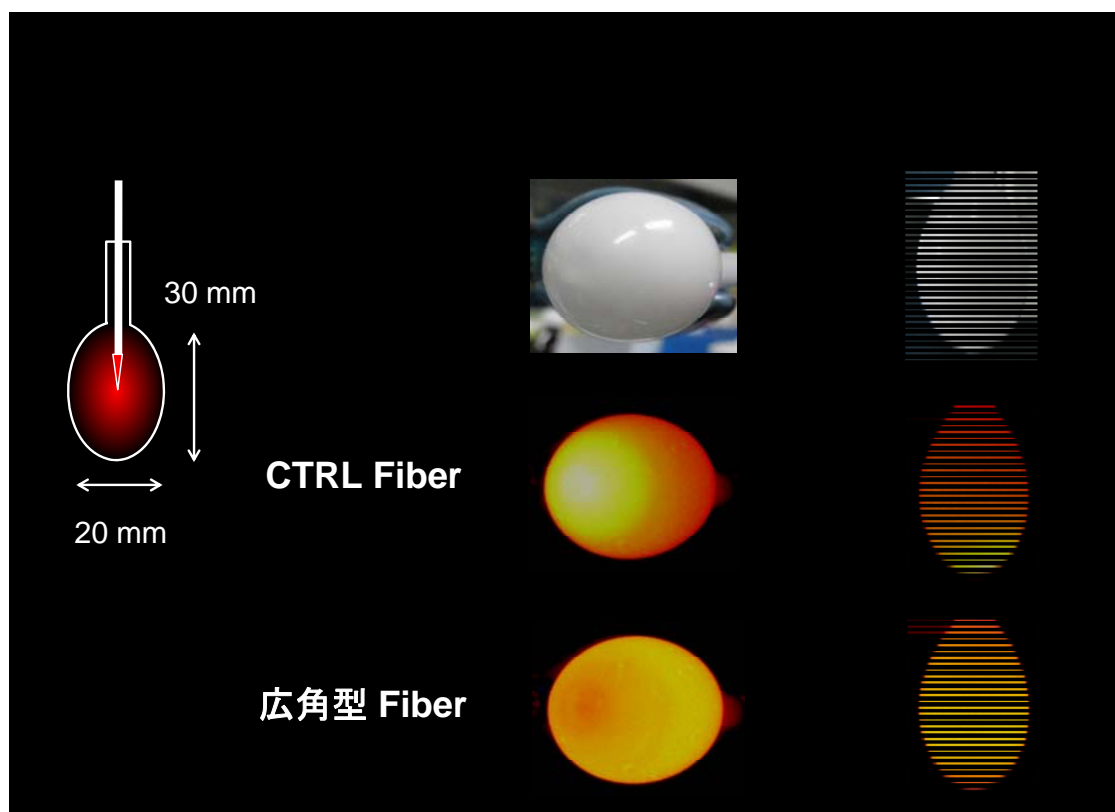


図1-20. 膀胱内広角照射用ファイバープローブによる疑似膀胱への光照射効果

図1-20の結果に基づいて、次に、実際に膀胱内光照射を行い、照射分布特性につき評価した。フォトフリンを経静脈投与（2 mg/kg）されたラットの膀胱内に広角型プローブを挿入して630 nm 光照射し（照射密度100 mW/cm²，照射時間1000 s）、その後、膀胱摘出して展開した（図1-21）。その結果、膀胱内腔表面積の50%以上に浮腫が生じたことから光が照射されていることが示唆され、設計コンセプトに合致した分布を得ることができた。

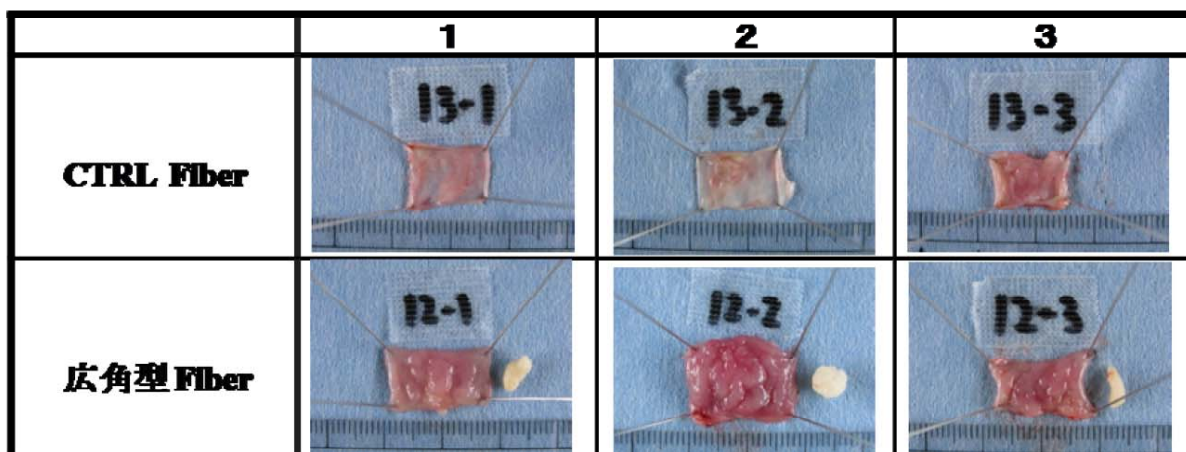


図1-21. 光照射された膀胱粘膜部位は浮腫を呈する。先端無加工(CTRL)のファイバー(開口数 0.22) 経由で光照射された場合、光の広がり角が小さいため(最大受光角:約25度)、膀胱粘膜の一部のみしか浮腫を起こしていない(上図)。一方、広角型ファイバーを用いた場合、膀胱粘膜の広い範囲で浮腫が認められる(下図)。

さらに広角型ファイバークローブをPDT用の光照射に用いた場合の抗腫瘍効果に関する検証を行った。ラット正所性膀胱がんモデルを作製(1)-3-a)に後述)したのち、フォトリンを経静脈投与(2 mg/kg)した。その24時間後に膀胱内にファイバークローブを挿入して630 nmの光照射(照射密度100 mW/cm², 照射時間1000 s)を行い、経腹壁的膀胱内超音波イメージングによって腫瘍体積を計測した。その結果を図1-22に示す。コントロールファイバーを用いた場合には、膀胱腫瘍の一部にしか(膀胱腫瘍面積の40%以下)光が照射されなかった(矢頭)のに対して、広角型ファイバークローブを用いた場合には、膀胱腫瘍面積の80%以上の範囲に照射できることができた。腫瘍体積の定量比較も行ったところ(表1-1)、未治療群の腫瘍サイズに比して、PDT群では有意に腫瘍体積が減少していたが、PDT群の中でも、広角型ファイバークローブを用いた場合の方が、コントロールファイバーを用いた場合に比して抗腫瘍効果は増強し、腫瘍体積の比較で約3倍の縮小効果を認めた。

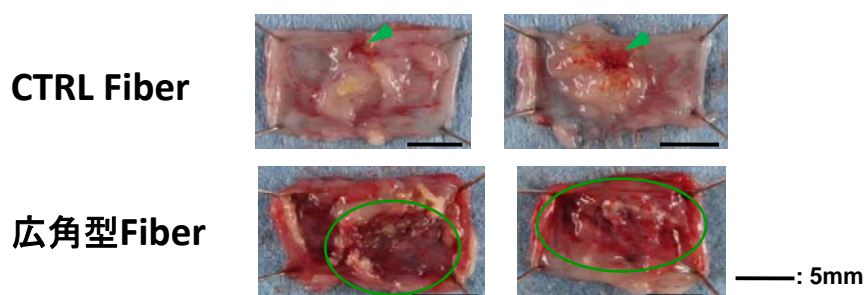


図1-22. PDTにおけるファイバークローブの違いによる照射面積の相違

表1-1. PDTにおけるファイバークローブの違いによる抗腫瘍効果の相違

	未治療	CTRL Fiber	広角型Fiber
腫瘍サイズ (mean±SD cm ³)	59.2±57.0	11.2±3.3	3.9±8.3

1)-2-b) 臨床使用に資する安全性、信頼性を有する光学系システムの開発

①光源

上記2種類の光分散プローブと光照射用光源を組み合わせた光照射のためのシステムを構築した。光照射用光源は、685 nmのCW半導体レーザー (2W) を使用した。結果、ファイバークラウドからの出力は実測で1.5W以上あり、これは、先の理想膀胱内腔面 (表面積4.2 cm²) のいずれの部位も最大350 mW/cm²の照射密度で照射することができることを意味する。

② 照射用プローブの先端保護

開発したプローブは前述のとおり、円錐形状であるため、生体傷害性が高い。膀胱への非侵襲性・非傷害性を担保するため、先端を丸めた石英キャップでプローブをカバーした。現在までにラット膀胱内腔への照射実験を20匹以上実施したが、膀胱穿通・穿孔を起こした例はない。また、照射密度100 mW/cm²で使用する範囲では、プローブの焦げ付きや損傷はまったく見られなかった。

③ファイバークラウドの位置コントロール

膀胱内腔への光照射を内視鏡下に行うとき、膀胱内におけるファイバークラウドの空間的座標を知ることはできない。これは、プローブと膀胱内腔間の距離は不可知であることを意味する。すると、光照射面の単位面積当たりの照射強度 (照射密度) も正しく知ることはできない。他方、PDT効果を定量的に評価するのに、照射密度の多寡はきわめて重要である。もし、プローブの膀胱内相対的空間座標を知ることができれば、照射密度の算出が可能となり、PDT効果と照射密度の定量的相関を知ることができる。そこで本研究開発において、光分散プローブの膀胱内位置のリアルタイムモニタリングするためのシステムを案出しこれを確立した (図1-23)。すなわち、小動物用超音波イメージングシステム (Vevo 770, VisualSonics) により膀胱内腔、腫瘍塊を明確に描写することができ、さらに光照射を行うための光ファイバークラウドの3次元的位置をリアルタイムに知るようになるようになった。このシステムにより、腫瘍における光照射密度をより正確に推定できるようになった。

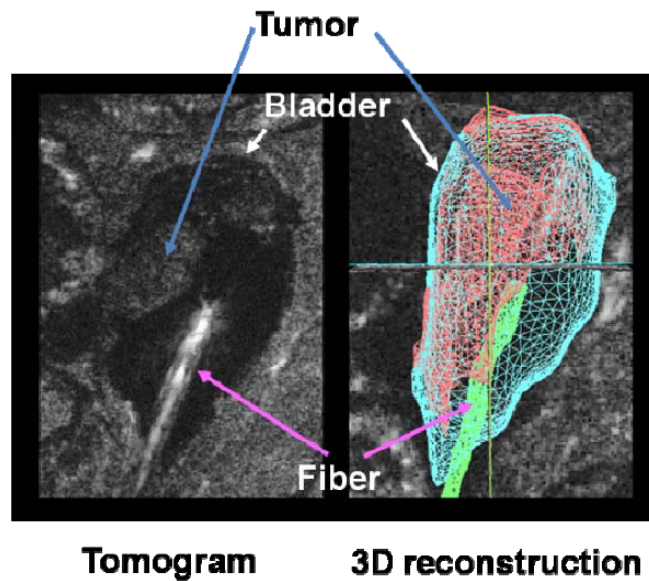


図1-23. 超音波エコーにて膀胱内腔、腫瘍が観察でき、さらに光照射用ファイバープローブの位置を30 f/s以上の時間分解能でモニタリングできる。

④ 蛍光観察可能な細径内視鏡イメージングシステム

多発・びまん性に増殖・進展する傾向の強い膀胱がんにおいては、微小ながんを早期に見つけ、迅速に治療をおこなうことが重要であり、加えて、治療後のモニタリングにおいても、がんの縮退あるいは再増殖・再発やあらたな微小がん発生等に関わる追跡も必要である。本開発では、蛍光色素(Alexa-488)結合DPc内包ミセル(DPc/m-A488)を新たに開発し、微小腫瘍の検知ならびに増殖・縮退等経過観察を行うための蛍光分光観察システムを構築した。DPc/M-A488の開発に関しては研究開発(3)において後述する。後者の観察システムの概要は図1-24のとおりである。また、本システムでは、ラット膀胱を観察できるようイメージング用細径内視鏡も併せて開発した(図1-25)。

試作品の外観は、図1-26に示した通りであり、内視鏡先端からの照明光は観察状況に応じて、三種類の光(白色光(通常の明視野観察用)、488nm光(488nm励起による蛍光観察用)、546nm(546nm励起による蛍光観察用))を照射することができる。本試作品の光学系システムの特長として、下記が挙げられる。

- 蛍光強度を強くするため、180Wキセノンランプ光源を採用した。
- 蛍光物質(この場合はAlexa488)に対する特異度を高めるため、励起・蛍光用バンドフィルターの最適化を検討した結果、帯域幅10 nmのフィルターのときに、コントラストが最も良かったので、この特性を有するフィルターを採用した。
- 蛍光に対する感度を高めるため、高感度カラー3 CCDカメラを採用した。
- 蛍光像と実写像をモニター上で同時に見ることができるシステムを構築した。すなわち、カメラ前置フィルターの(フットスイッチによる)切り替えにより、観察対象の部位同定を容易に行えるシステムにした。
- イメージング用細径内視鏡スコープの最大外径を0.8 mmまで低減することができた。こ

れは16Gのカテーテルを容易に通過できるので、ラット尿道に負荷をかけることなく挿入、進展させることができる。一方でスコープ内に15,000画素ものマイクロファイバーを組み込み、さらに組みレンズ採用により、細径でありながら高空間分解能画像を得ることが実現できた。

なお、上述の蛍光分光イメージングシステムとDPc/M-A488をもちいた微小腫瘍の観察に関しては、研究開発1)-3)において後述する。

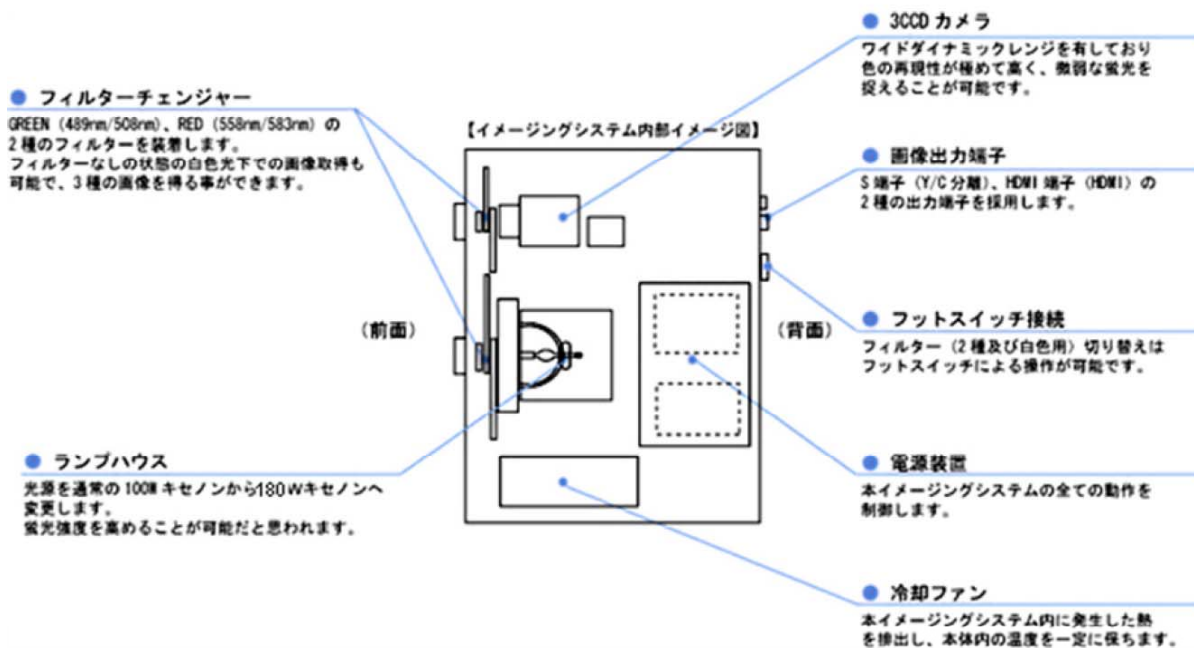


図1-24. 開発した蛍光イメージングシステム(内視鏡部分を除く)

	外径 (mm)	画素数	全長 (mm)	有効長 (mm)	焦点深度 (mm)	視野角
HighEnd type/5.0	0.8	15,000	2,000	500	5.0	75° 以上
HighEnd type/7.5					7.5	

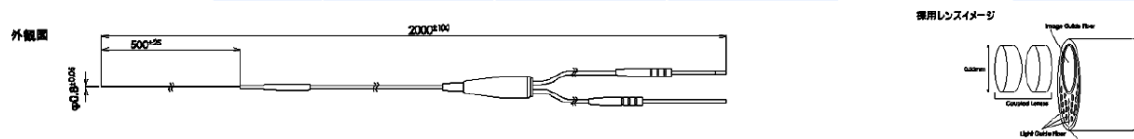


図1-25. 内視鏡イメージング用ファイバースコープ

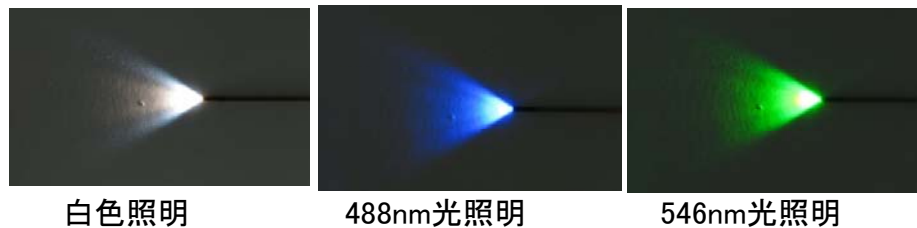


図1-26. 蛍光イメージングシステムの外観(上)とファイバーからの照射光の種類(下)

⑤ 大型動物を用いたPDTシステム運用における操作性、安全性の検証

本開発治療技術の臨床適用における安全性を保証するために、大型実験動物を用いた検証を行った。実験では、体重10kg超のビーグル犬を用いたが、膀胱容積は小児のそれに匹敵する約150mLを有する。その際、PDT効果を十分に発揮できる照射光強度(約150mW/cm²)を供給するためには、光出力として20Wクラスの出力を持つレーザーが必要であったため、本研究開発においてはこれを試作した。10Wの出力をもつエミッターバー3つを搭載することによって、ファイバースコープ先端で20Wの出力を確保できた。さらに、高出力に対応する広角型ファイバースコープも開発した。20Wの出力がファイバースコープ先端に集中することでプローブの熱損傷が懸念されたために、下記3つの改良を加えこの問題を克服した。(i)光入射側にサファイアキャピラリを入れて、不要な光を放射させた。(ii)プローブ先端放射側のファイバー被膜樹脂を除去した。(iii)プローブ防護石英キャップの固定に高屈折率/透明の接着剤(シリコン系)を用いた。試作品は、後述するファイバースコープのプローブ用チャンネルを通過できるサイズ(外径1.2mm、プローブ長5mm)に仕上げた。

さらに、膀胱用内視鏡システムを構築した。これは、膀胱観察のためのファイバースコープ(ライトガイドを含む)と上述の照射用ファイバースコープを搭載でき、あわせて、犬尿道を通過できるという2つの条件を満たすよう設計、試作された。試作されたシステムの外観と諸元を図1-27に示す。システム全体の外径は4mm、膀胱観察用ファイバースコープの外径は3mmで、この径ではクラス最高水準の画素数30,000のものを搭載した。また、十分な視野を得られるよう視野角を80°にした。



図 1-27. 大型動物用膀胱用内視鏡システムの外観と諸元

上述の 20W レーザー装置、高出力対応広角型ファイバースコープおよび内視鏡システムを用いて、運用操作性と安全性について検証した。ビーグル雌成犬の膀胱内観察では、臨床用内視鏡システムと同等の精細性をもって細血管の血管網を明瞭に描出できた(図 1-28 左)。泌尿器科専門医に操作を行ってもらったところ、臨床用内視鏡と同等の操作性と画質を有する、との評価を得た。次に、PDT用の光照射における諸動作につき検証した。照射出力 20W、照射時間 15 分で、膀胱内を生理食塩水でかん流しながら光照射を行ったところ(図 1-28 右)、ファイバースコープ先端の損傷はみられず、膀胱内生理食塩水の温度上昇は 10°C 以内に抑えられ、膀胱粘膜の熱損傷も観察されなかった。ただし、膀胱の自動運動(蠕動や収縮など)によって、膀胱内におけるファイバースコープ先端の 3 次元的位置が光照射中に変位し、膀胱粘膜面への光照射強度を光照射の間つねに一定に保つことは困難であった。モニターを見ながら手動によってファイバースコープ位置の微修正を行うことで、ある程度補正することはできたが、今後は、ファイバースコープの膀胱内 3 次元的位置を自動的に保持するための機構が望まれる。

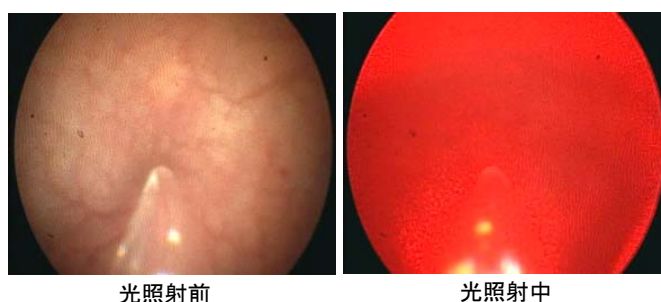


図 1-28. 大型動物用膀胱ファイバースコープによる膀胱内観察像。左図は PDT 用光照射を行う前の状態で、照射用ファイバースコープが視認できる。右図は PDT 用光照射中の状態。

さらに、DPc/M を用いた PDT における副作用の有無について評価した。比較のために、レザフィリン(NPe6)を用いた PDT も行い比較検証を行った。実験方法としては、PDT 後 7 日目に膀胱内を内視鏡にて観察し、そののち膀胱を摘出して病理学的に観察した。NPc6 を用いた群では、

肉眼的観察によって膀胱粘膜の委縮および変性壊死が認められ、腹部皮膚の発赤も見られた。さらに顕微鏡的観察では、膀胱粘膜の浮腫、炎症、単球および好中球の浸潤が顕著にみられ、一部出血も確認された（図 1-29 右）。これらのことは、NPe6 の正常膀胱粘膜への蓄積量が無視できないほどに大きいため、光化学的損傷の回避が困難であることを物語る。他方 DPc/M を用いた群では、上述の損傷を示唆する所見はほとんど認められず、膀胱粘膜や筋層の構造は保たれた（図 1-29 左）。

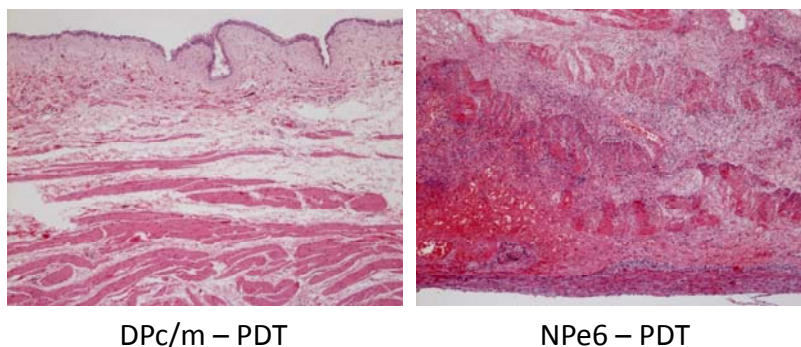


図 1-29. PDT 後の犬膀胱のヘマトキシリン・エオジン染色像

以上より、大型動物用光照射システムならびに DPc/M を用いた PDT は、施術に関する操作性も良好で、なおかつ膀胱への副作用を惹起しない優れた方法論であることが証明できた。

1)-3. 【当初の開発項目】難治性がんに対する光線力学療法の開発と化学療法及び免疫療法を融合した治療システムの開発（東京大学／防衛医科大学校）

【修正後の開発項目】難治性がんに対する光線力学治療システムの開発（東京大学／防衛医科大学校）

1)-3-a) 疾患モデルを用いた固形がんの光線力学治療（PDT）システムの開発

① PDT 治療システムと周辺技術の開発

正所性膀胱がんモデルを確立し、光増感剤内包高分子ミセルを静脈投与後、膀胱内光照射による PDT を実施し、さらに膀胱内腫瘍縮退・増殖を超音波イメージングにより非侵襲的かつ経時的に観察できるシステムを確立した。

・正所性膀胱がんモデル

正所性膀胱がんラットモデルを作成する際、がん細胞の膀胱内注入を行うが、がん細胞の膀胱粘膜への生着を促進させるため、がん細胞注入前に膀胱粘膜の薬液処理を行う。この処理方法として、H19 年度においては、従来より我々が採用していた酸アルカリ処理を行っていた。しかし、この方法では、

- 酸処理による正常膀胱粘膜傷害による膀胱萎縮が誘発される
- その結果、PDT 効果の判定に影響が生じる可能性がある
- 膀胱周辺組織への癒着が観察されることがある

などの欠点があることがわかり、より自然発生のがん病態に近いラットモデルの作成法を再検討した。

検討法としては、4つの薬液前処理（酸アルカリ、トリプシン、ポリLリジン、未処理（無薬液））を行ったのがん細胞を注入し、膀胱がんの生着・増殖状態をみた（図1-30）。

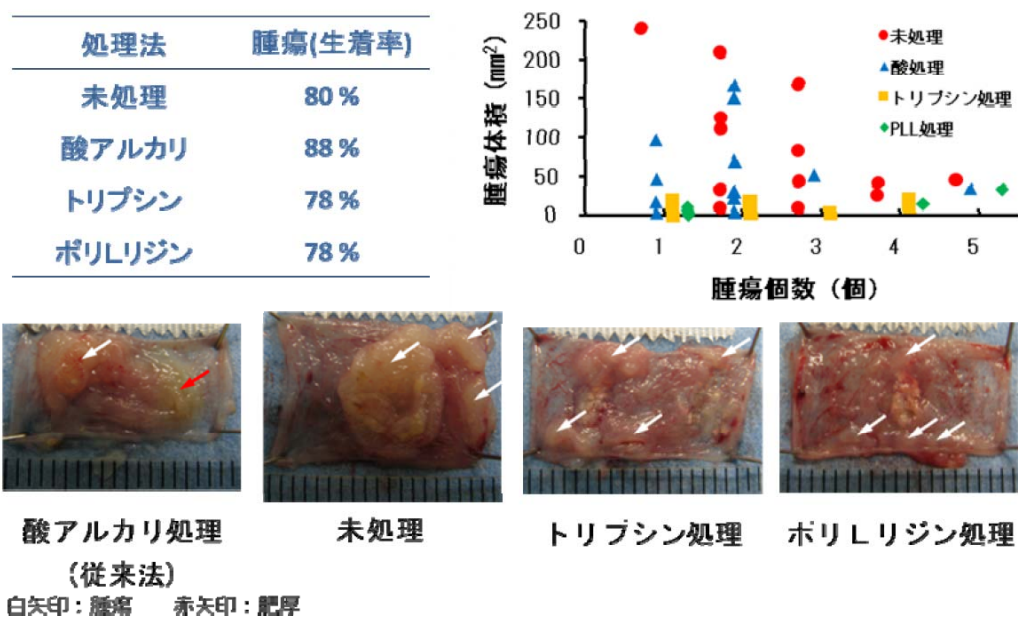


図1-30. 正所性膀胱がんモデルにおける薬液前処理の腫瘍増殖に対する影響

その結果、腫瘍生着率は、前処理法の違いによって若干のばらつきが見られたものの、約80%と高く、前処理法の違いによる有意な差異を認めなかった（図1-30 左上の表）。一方、腫瘍の大きさに関しては、酸アルカリ、未処理による前処理法を行った方が、トリプシン、ポリLリジンによる前処理法を行った場合に比して大きくなる傾向を認めた（図1-30 右上のグラフ、下のマクロ写真）。なお、腫瘍塊の数は、前処理法の違いによる相違はとくに認めなかった。また、腫瘍病理において、処理方法の違いによる差異も見られなかった。以上の結果より、比較的に大きな腫瘍が必要な実験では、未処理による前処理を行い、比較的小さな腫瘍が必要な実験では、トリプシンかポリLリジンによる前処理を行えばいいことが明らかとなった。

・超音波イメージング

従来は犠牲死させて測定するほか方法論がなかった正所性膀胱がんラットモデルにおける腫瘍体積測定を、超音波イメージングシステムにより、非侵襲かつ繰り返し測定できる方法論として確立した。本システムにより、膀胱内腔、腫瘍形状をリアルタイムに観察でき、3Dイメージとして再構成することができる（図1-31左）。その上、50 μ mの分解能で画像描出ができ、その結果、腫瘍体積は1 mm^3 の分解能で算出できる（図1-31右）。

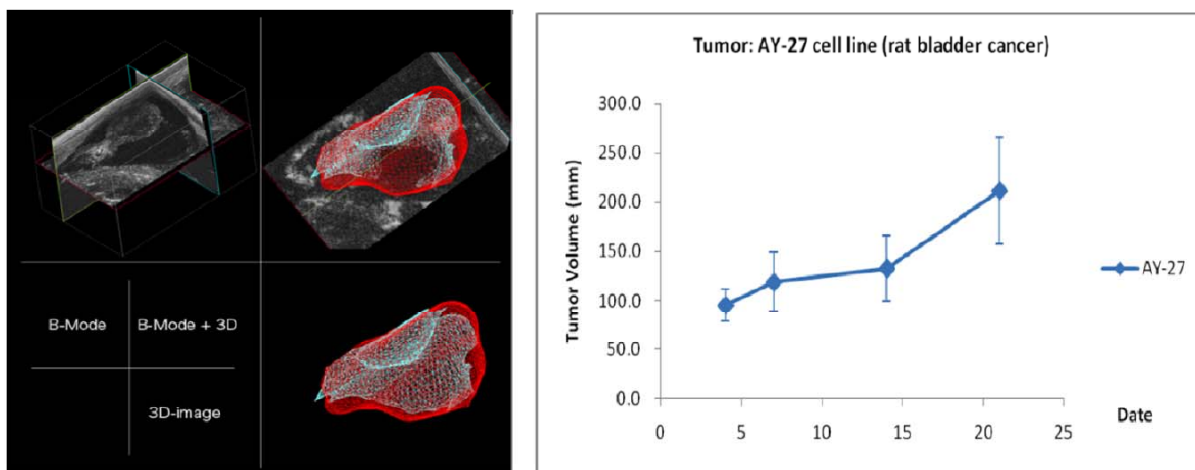


図 31. 超音波イメージングによる腫瘍描出(左)、正所性膀胱がんラットモデルにおける全腫瘍体積の経時変化(右)

さらなる腫瘍描出の精度向上を図るとともに、腫瘍の質的評価（たとえば内部壊死など）を行うため、超音波イメージングにおいて、腫瘍を増強させるコントラスト薬剤を投与し、リアルタイムイメージ解析する技術も確立した。この方法を適用することにより、体積のみならず、腫瘍の病態生理的な状態を追跡し、腫瘍描出の精度を向上させることができる（図 1-32）。

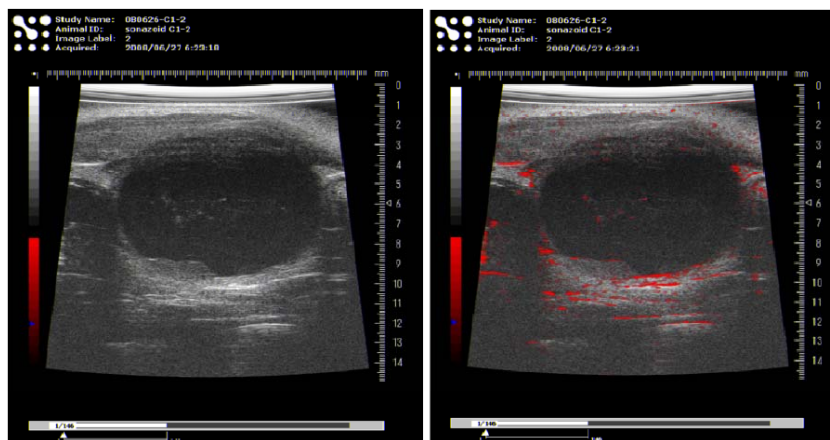
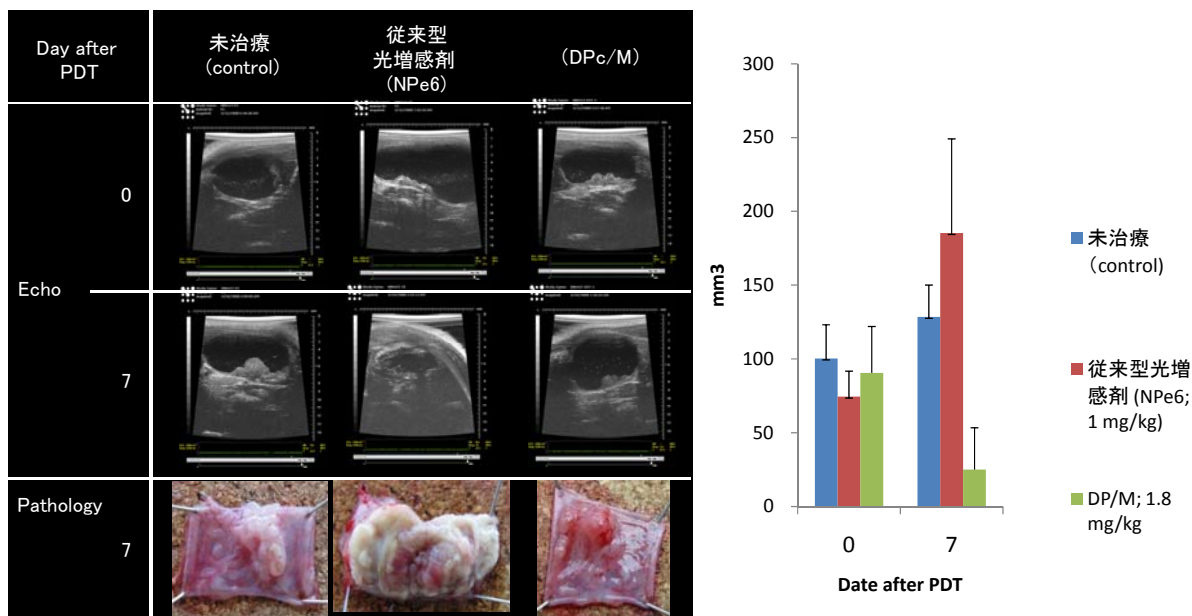


図 32. ラット膀胱腫瘍の、超音波イメージングとコントラスト剤の組み合わせによる病態生理学的観察。右図は、ソナゾイド(血管を描出させるためのマイクロバブル)静脈投与後の画像で、細血管が描出(赤)されている。

・抗腫瘍効果

研究開発(1)において開発された DPc 内包高分子ミセル(DPc/M)を用いた P D T の効果検証を行った。なお、対照実験として本邦において保険収載されている光増感剤であるレザフィリン(NPe6)を用いた P D T も行った。実験方法としては、まず先述の方法によってラット正所性膀胱がんモデルを作製した。細胞播種後 3-5 日目に光増感剤を経静脈的に投与して、その 24 時間後に (NPe6 では、臨床使用に資する条件である薬剤投与後 4 時間後に)、経尿道的に広角型ファイバースコープを膀胱内へ挿入し光照射(150mW/cm²)を行った。その結果を図 1-33 に示す。未治療群においては、

腫瘍は経時的に増大し、7日間で約1.2倍の大きさになった。DPc/Mを用いたPDT群では、腫瘍サイズはPDTによって縮退し、元のサイズの約1/3程度まで減少した。病理学的観察では、正常粘膜への影響はほとんど見られず、優れた抗腫瘍効果を膀胱内副作用なしに発揮した。他方、NPe6を用いたPDT群においては、膀胱粘膜に高度の炎症と浮腫が見られ、腫瘍と炎症の区別ができなくなった。超音波イメージによる腫瘍体積の計測においては、腫瘍と炎症の境が不明瞭による誤差を含むが、少なくとも腫瘍の縮小は認められなかった。



PDT後膀胱の超音波イメージングと病理写真

PDT後の腫瘍体積の変化

図 1-33. ラット正所性膀胱がんモデルにおける DPc/M を用いた PDT による抗腫瘍効果

・膀胱萎縮の評価系

PDTによって惹起しうる膀胱萎縮を評価するため、ラット膀胱容量・膀胱内圧 (Leak point pressure) 測定法を確立した。方法としては、外尿道口よりカテーテルを挿入して膀胱内にまで誘導し、生理食塩水をカテーテル経由で膀胱内へ一定のスピードで注入していき、その注入圧を圧トランスデューサーで持続的にモニタリングし(図 1-34)、外尿道口より液逆流があった時点での注入液容積総量と圧力により膀胱コンプライアンス (=注入液容積総量/圧力) を計算した。図 1-35(左)は、PDT後経時的に膀胱コンプライアンスを測定した結果である。無処理コントロール群 (緑線) では時間経過とともに膀胱コンプライアンスが増大した。これは、ラット成長に伴う膀胱容積の増大に起因すると推定された。本邦において保険収載されている光増感剤 (レザフィリン : NPe6) を用いた PDT (赤点線) では、PDT施行後の膀胱コンプライアンスが時間とともに低下し、膀胱萎縮を来していることが示された。これは、上記の抗腫瘍効果の結果を反映すると推定される。同様の結果がフォトフリン (PHP、保険収載薬剤) (橙点線) を使用した場合にも観察された。これに対して DPc/M を用いた PDT (青線) では、PDT施行後の膀胱コンプライアンスは時間とともに増大し、膀胱萎縮は軽微であることが示された。図 1-35(右)は PDT後のラット生存率である。無処理コントロール群、DPc/M 群において、ラット死亡はほとんど

認められなかった。一方、NPe6 群、PHP 群においては、PDTを行った動物の半数以上がPDT後20日以内に死亡した。死亡後ラットの膀胱では、著明な出血性炎症および浮腫が見られ、膀胱壊死の状態を呈していたが、さらに一部の動物においては、膀胱に隣接する腸管にも炎症性壊死が見られた。これらの結果より、NPe6 や PHP は正常膀胱粘膜に蓄積する量が多く、光照射の結果、正常膀胱粘膜へのPDTが起こっていたことが推測される。一方 DPc/M は、正常膀胱粘膜にはほとんど蓄積せず、光照射による正常粘膜へのPDTは惹起されなかったと推測される。

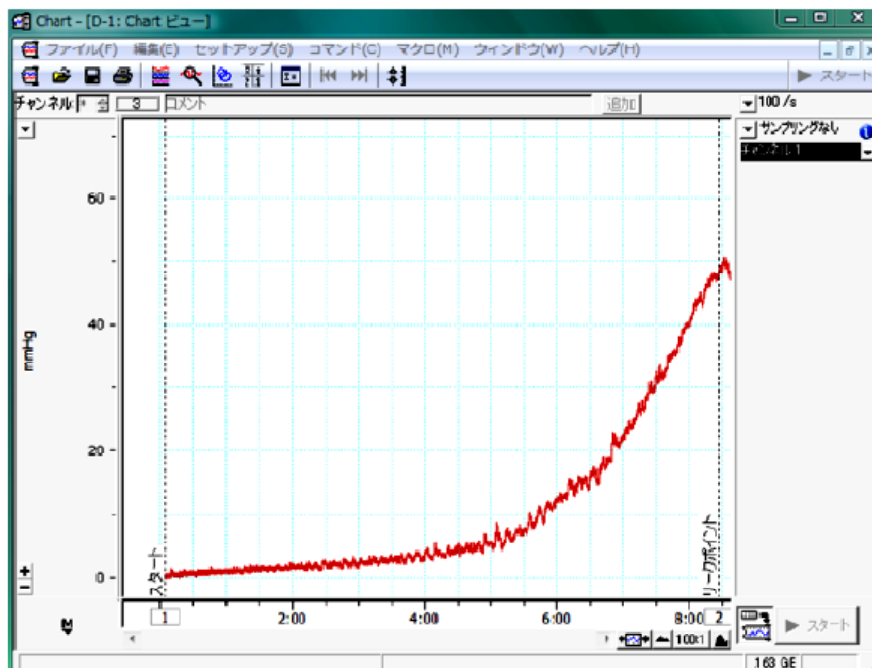


図 1-34. 膀胱内への生理的食塩水注入による膀胱内圧上昇曲線

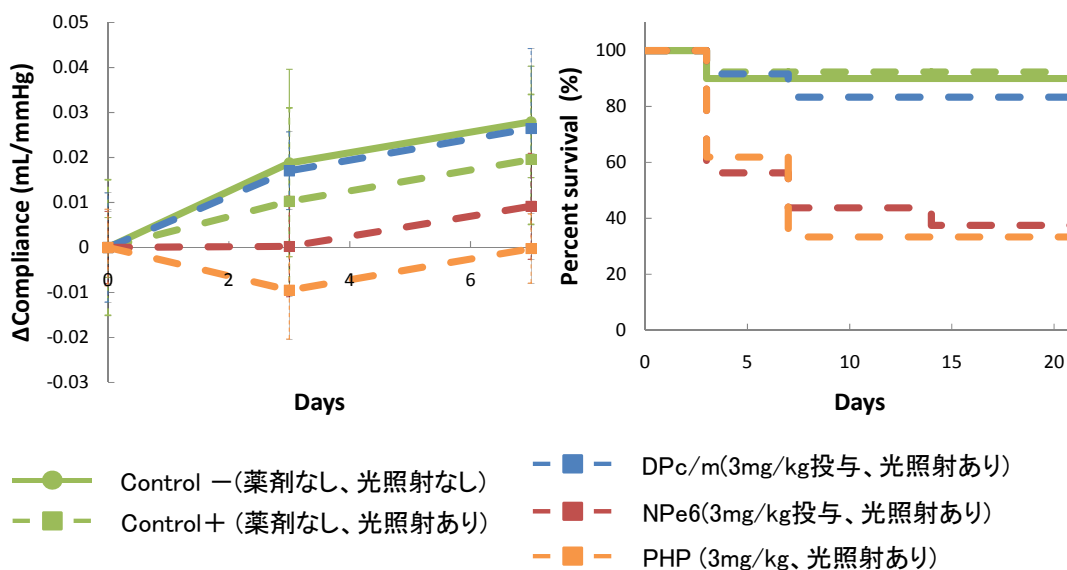


図 1-35. 膀胱コンプライアンス(左)とPDT後のラット生存率(右)

② 微小腫瘍検知・追跡システムの開発

・GFP 導入膀胱がん細胞

膀胱がんのように多発性に発生する性質をもつ腫瘍においては、微小な腫瘍の検知が困難であり、腫瘍に対するPDT効果を定量的に評価することが難しい。したがって、微小腫瘍、特に粘膜内がんのレベルでも検知できる診断測定システムの確立が期待される。その実現のためには、微小腫瘍でもイメージングできる技術的方法論を構築することが不可欠である。そこで、腫瘍細胞に蛍光標識物質としてGFPを導入し、実験動物にそれを播種し、微小腫瘍レベルのイメージングが可能であるか否かを検証した。

最初に、ラット膀胱がん細胞 (AY-27) へ、エレクトロポレーション法により、GFPベクターあるいはRFPベクターを導入し、蛍光タンパク導入率の最大化を図った。細胞数、ベクター量、エレクトロポレーションのプログラムなどの最適化を図ることで、図1-36に示す蛍光タンパク導入率が得られた。

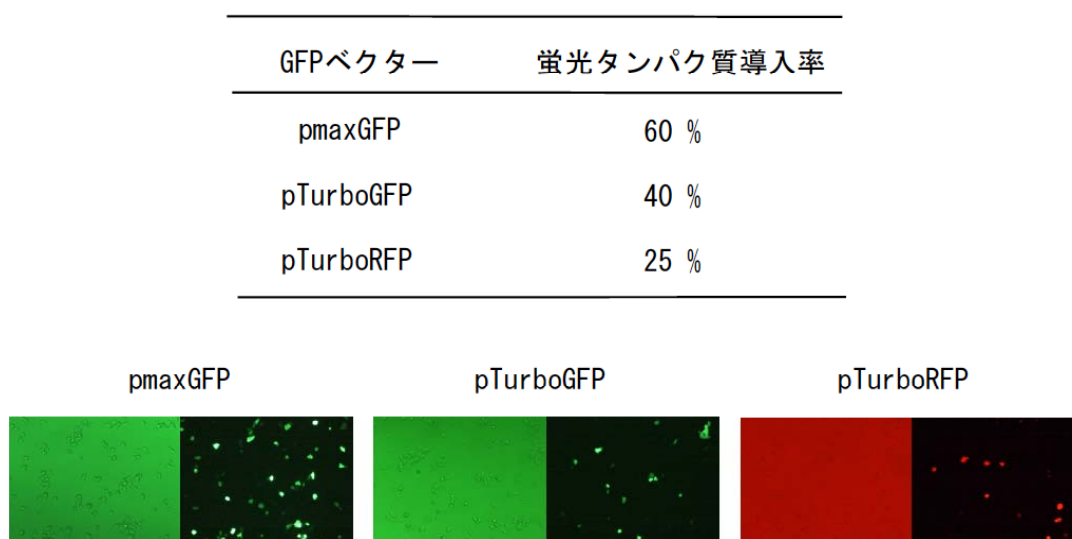


図1-36. ラット膀胱がん細胞(AY-27)への蛍光タンパク質導入

しかしながらエレクトロポレーション法では導入効率が悪く、蛍光タンパク (FP) 安定発現細胞株を樹立できなかった。そこで化学的導入法を採用した。GFPに関しては最初にGFPベクター (pTurboGFP) とトランスフェクション試薬 (FuGENE® HD) 混合液を細胞に添加して遺伝子導入を行った。そして耐性薬剤geneticin (G418) を加えた培地にて選択培養を行ったところ、GFP発現率ほぼ100%の単クローンからなる安定株AY27-tGFPを得ることができた(図1-37 左)。RFPに関しても同様の方法を試みたが、RFPの導入数 (コピー数) が少なかつたため、マルチコピーのクローンを收拾するため次の方法を試した。すなわち、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子ベクター (pcDNA™ 3.1/Hygro(+)) とRFPベクター (pTurboGFP) を細胞に添加して両遺伝子の共導入を行った。これは、遺伝子導入された細胞がハイグロマイシン耐性を得るまでの間にRFP遺伝子が複数組み込まれることを期待した戦略である。その後、RFP発現率の高いRFP導入細胞をハイグロマイシン添加培

地で選択培養を行うことによって、RFP発現効率がほぼ100%の単一クローンからなる、RFPを安定に発現する細胞株AY27-tRFP-Hygroを樹立した(図1-37 右)。

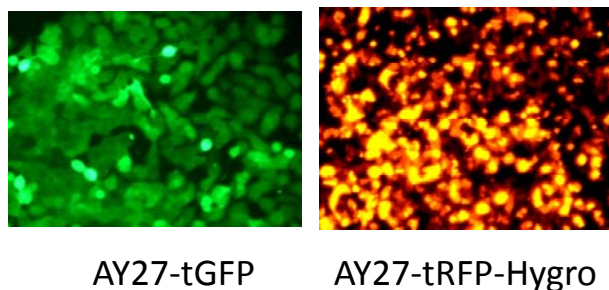


図1-37. FP安定発現株

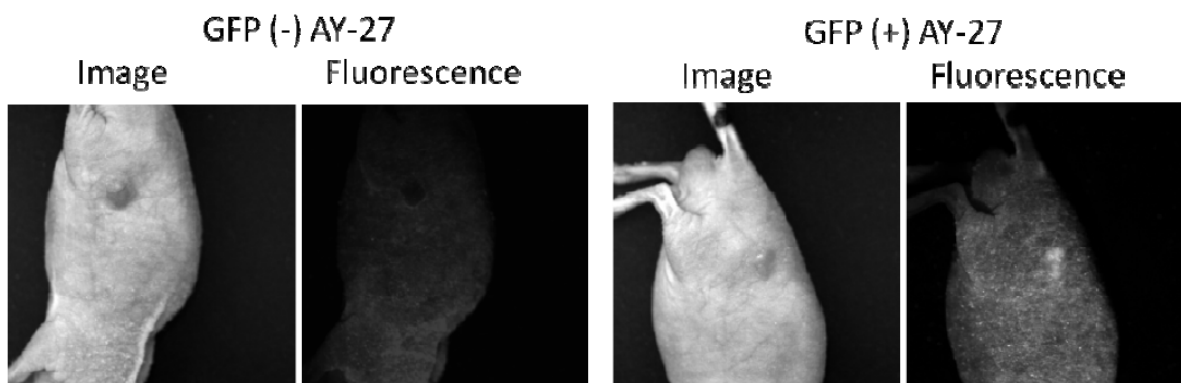


図1-38. GFP導入AY-27播種ヌードマウス

次に、蛍光タンパク導入がん細胞を動物へ播種し、蛍光イメージングを行った。AY27-tGFPをヌードマウスに播種し、高感度冷却CCDを用いて蛍光イメージングを試行したところ、図1-38に示すように播種して増殖した腫瘍塊に一致した蛍光が得られた。その後検討を重ねた結果、1 mm大腫瘍の蛍光イメージングが取得できることがわかった。

・ 蛍光色素導入 DPc 内包ミセル (DPc/M)

微小腫瘍への光増感剤取り込みを可視化するため、蛍光色素を導入したDPc内包ミセル (DPc/M) を開発した。

PEG-PLLブロックコポリマーに蛍光色素であるAlexa488 (励起波長 490nm、蛍光波長 520nm) を結合させ、その後、DPcと混合し、PICを形成させることによって、Alexa488導入DPc/M (DPc/M-A488) を作製した。Alexa488の導入がミセル形成に与える影響に関して、動的光散乱法などを用いて確認したところ、DPc/M-A488の物理的性状は、DPc/Mのそれと変わらないことが示された。

次に、DPc/M-A488を用いて、DPc内包ミセルのAY-27細胞による取り込みを共焦点顕微鏡観察によって評価した(図1-39)。その結果、DPc/M-A488は、すべてのがん細胞により取り込まれることが確認された。この結果より、DPc/M-A488を利用することによって、その組織および細胞内分布

が評価できることが明らかとなった。

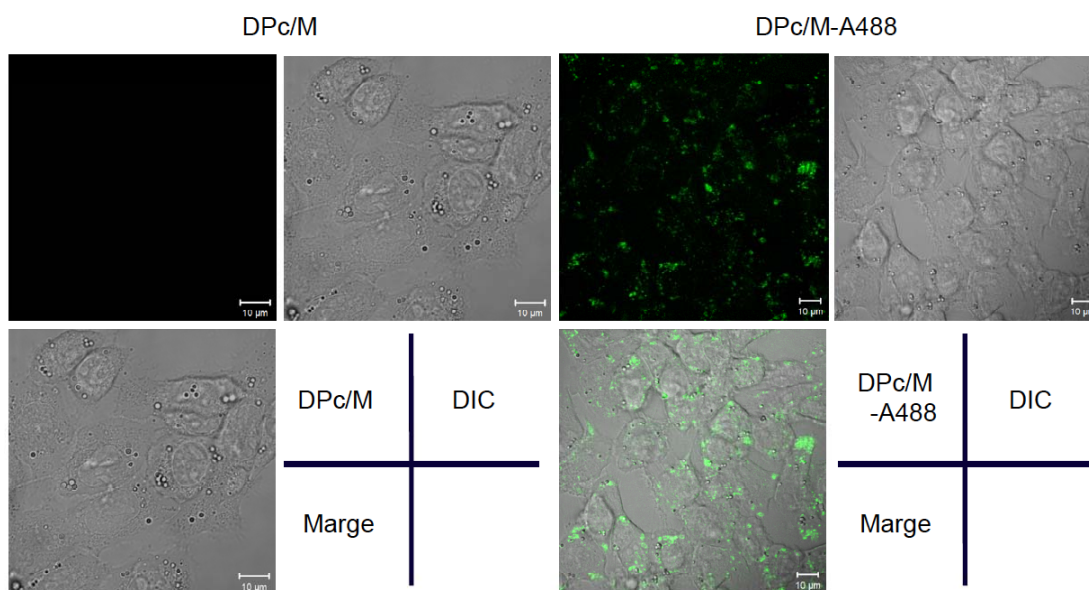


図1-39. AY-27培養細胞へのDPc/M-A488の取り込み

次に、正所性膀胱がんラットモデルを用いた検証を行った。

AY-27がん細胞を膀胱内に播種されたラットに、DPc/M-A488を静脈投与し、24h後に犠牲死させたのち膀胱を摘出して、高感度冷却CCDを用いて蛍光イメージングを施行した。その結果、腫瘍塊に一致した蛍光像を得られた（図1-40）。

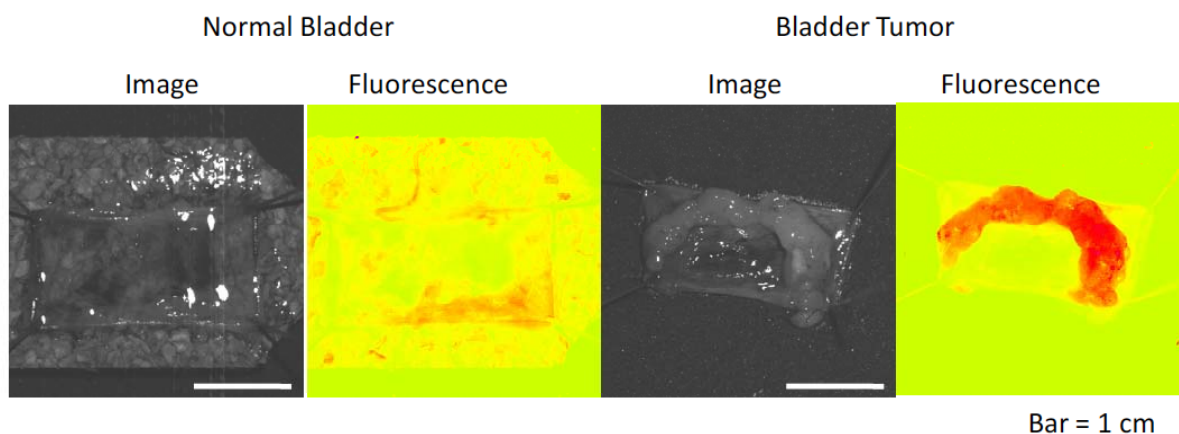


図1-40. 正所性膀胱がんモデルを用いたDPc/M-A488による蛍光イメージング

なお、後述するイメージングの研究に供するために、DPc/M-A488同様の方法を用いて、Alexa488とは異なる蛍光色素を付加したDPc/Mも作製した。すなわち、Alexa488より長波長よりの蛍光を発するAlexa546（励起波長 550 nm、蛍光波長 575 nm）をPEG-PLLブロックコポリマーに結合させ、Alexa546導入型DPc/M（DPc/M-A546）を作製した。

次に、上述したDPc/M-A488もしくはDPc/M-A546と正所性膀胱がんラットモデルを用いて、細径内視鏡による蛍光イメージングを行い、生体内微小腫瘍のリアルタイム観察を施行した。

本検討では、微小膀胱腫瘍の膀胱内位置同定のためのイメージングを容易にするため、蛍光タンパクを導入したがん細胞（先述のAY27-tGFPもしくはAY27-tRFP-Hygro）を用いて正所性膀胱がんモデルを作製した。そして、DPc/M-A546もしくはDPc/M-A488を静注して、先述の蛍光観察可能な細径内視鏡イメージングシステム1)-2-b)④)を用いて蛍光観察を行った。その結果を図1-41に示す。蛍光タンパク導入がん細胞を膀胱内に播種してやることで、腫瘍サイズとして1mm以下すなわちサブミリサイズの微小腫瘍を作ることができた（図1-41中列2枚）。そして、腫瘍確認できた位置に一致する部位に、DPc/Mが集積することが確認できた（図1-41右列2枚）。これらのことより、DPc/Mは、ブロックコポリマーに結合させた蛍光色素の種類に関係なく、効果的に正所性ラット膀胱がんモデルに集積することが確認された。そして、新たに調製した蛍光標識導入DPc内包ミセル(DPc/M)によってサブミリサイズの腫瘍の輪郭を明確に描出できることが証明された。

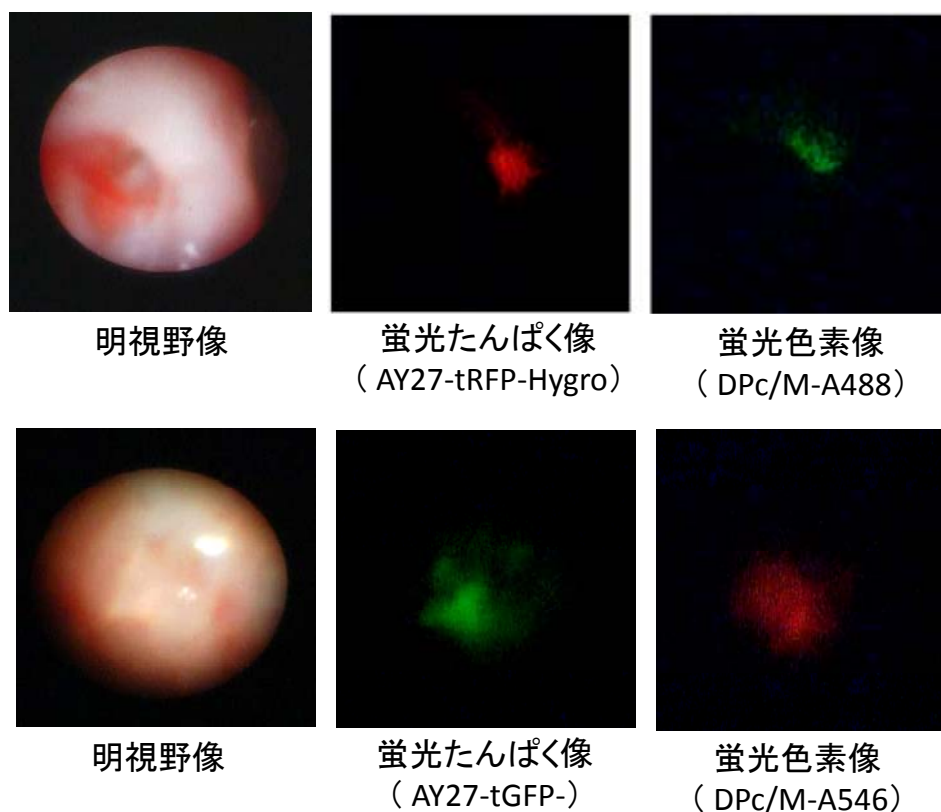


図 1-41. 細径内視鏡によるリアルタイム蛍光イメージング

DPc内包ミセルの腫瘍への選択的集積性に関して、上記の細径内視鏡イメージングシステムによる評価に加えて、別検討によって検証した。蛍光タンパク導入がん細胞の膀胱内への播種により微小腫瘍を形成した正所性膀胱がんモデルラットに対して蛍光色素導入DPc/M(DPc/M-A488もしくはDpc/M-A546)を静脈注射して24時間経過したのち、膀胱を摘出して展開した。そして、高感度CCDカメラによって腫瘍部位と非腫瘍部位からの蛍光強度を測定した。その結果、DPc/Mの腫瘍部位に

おける集積濃度は、非腫瘍部位における集積濃度の10倍以上に達していることがわかり、DPcは優れたがん選択的集積性を示すことが確認された（図1-42）。

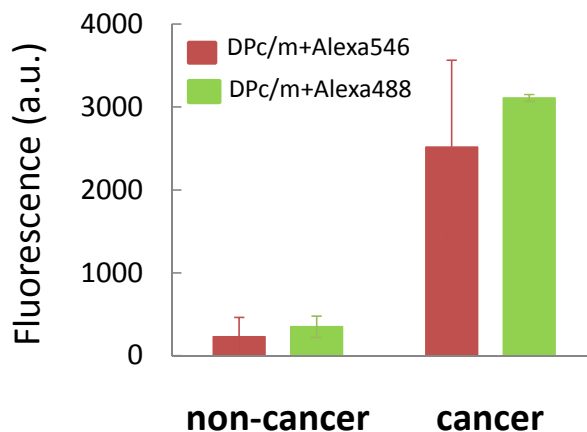


図 1-42. DPc/M の膀胱腫瘍および正常膀胱粘膜への集積性の比較

以上一連の実験検証が示しているとおり、蛍光導入DPc/Mと細径内視鏡による蛍光イメージング技術を組み合わせることにより、サブミリサイズの微小腫瘍検知システムを確立することができた。

1)-3-b) PDTと化学療法を融合した革新的がん治療システムの開発

PDTは、光の組織浸透性の限界のために、サイズの大きい腫瘍に対しては適用が困難である。一方、DDSは光増感剤のみならず制がん剤の腫瘍特異的なデリバリーにおいて極めて有効であるが、腫瘍への集積と同時に肝臓や脾臓等の比較的ポアサイズの大きい血管壁を有する臓器への集積を完全に抑制することは困難であり、腫瘍組織を特異的に死滅させる治療戦略が望まれている。そこで本事業では、制がん剤を内包した高分子ミセルと DPc 内包高分子ミセルを同時に全身投与し、患部に選択的に光照射を行うことによって、PDT効果を発揮する一方で、制がん剤内包ミセルからの薬剤放出の促進に基づく制がん剤の治療効果を発揮することのできる、PDTと化学療法を融合した革新的がん治療システムの開発を行った。

まず、制がん剤内包高分子ミセルとしては、カンプトテシン (CPT) に 3-(2-pyrinyldithio)propionic acid を反応させることによって SH 基を導入し、側鎖に SH 基を導入した PEG-poly(glutamic acid) と反応させることによって、ジスルフィド(SS)結合を介して CPT を導入した高分子ミセルを開発した(図 1-43)。CPT 内包ミセルからの CPT のリリースを評価したところ、3mM の dithiothreitol (DTT) の存在下において CPT が速やかにリリースされたことから、本システムは細胞外およびエンドソーム/リソソーム内においては CPT を安定に保持し、細胞質内の還元的環境下において効率的に CPT をリリースするものと思われる(図 1-43)。従って、CPT 内包ミセルと DPc 内包ミセルを同時に細胞に作用させた場合、両者共にエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、エンドソーム/リソソームに局在するものと考えられるが、ここで光照射を行うことによって DPc 内包ミセルがエンドソーム膜に光傷害を与え、CPT 内包ミセル

をエンドソーム／リソソームから細胞質内へ移行させることができるものと思われる。すなわち、本システムでは、CPT 内包ミセルの細胞質移行とそれに伴う CPT のリリースを光照射によって制御することができ、制がん剤の治療効果を光照射によって限局させることができるものと考えられる(図 1-43)。そこで、実際にマウス大腸がん C-26 細胞に対して、DPc 内包ミセル単独では細胞死が誘導されない条件において DPc 内包ミセルと CPT 内包ミセルを同時に作用させ、光照射下および非照射下で細胞毒性試験を実施したところ、DPc 内包ミセルの細胞毒性は光照射によって飛躍的に向上することが確認された(図 1-43)。

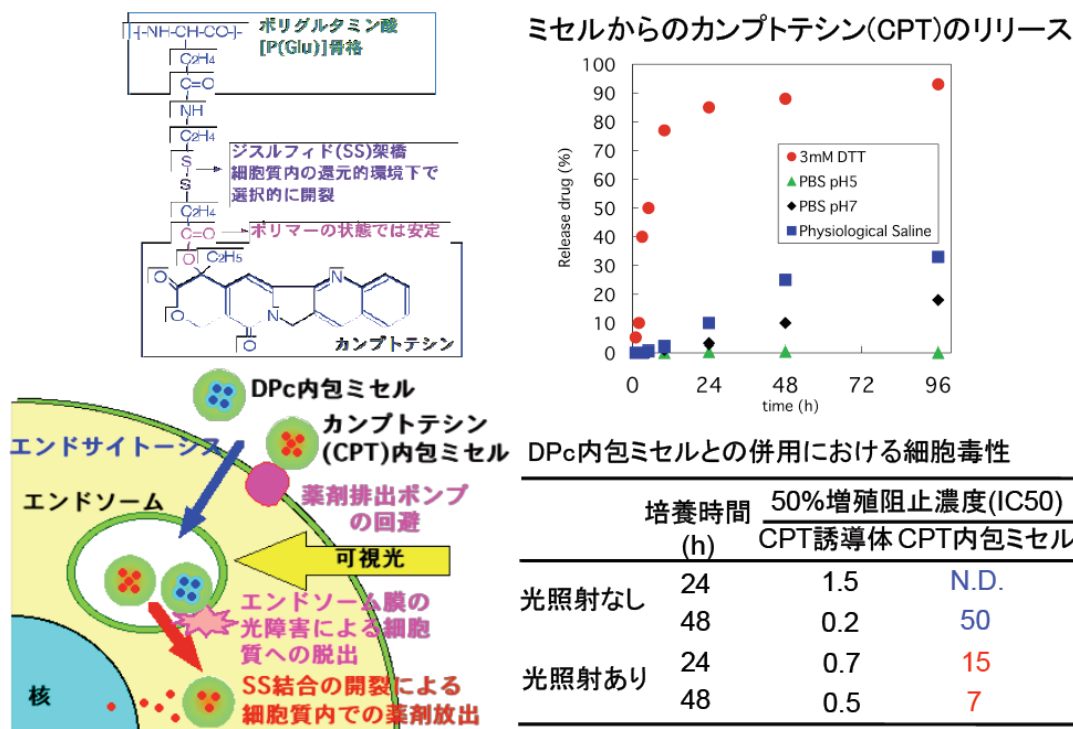


図 1-43. CPT 内包ミセルの設計と異なる条件におけるミセルからの CPT のリリース挙動(上); DPc 内包ミセルと CPT 内包ミセルを併用した光選択的がん治療戦略と C-26 細胞に対する光照射／非照射下における細胞毒性(下)

次に、本システムの in vivo における有効性を C-26 細胞のマウス皮下移植モデルを用いて検証した。具体的には、DPc 内包ミセルと CPT 内包ミセルをマウスに対して同時に 2 日おきに静脈内投与し、投与 24 時間後に DPc 内包ミセルによる PDT において必要な照射量(100J/cm²)の 1/4 の照射量(25J/cm²)で固形がんに対して光照射を行った(図 1-44)。その結果、フリーの薬剤である CPT は DPc 内包ミセルによる PDT の有無に拘わらず、一定の制がん活性を示した。また、DPc 内包ミセル単独による PDT では有意な制がん活性は確認されなかった。一方、DPc 内包ミセルと CPT 内包ミセルを併用した場合には、光照射を行っていない条件では有意な制がん活性は認められなかったが、光照射を行った場合に CPT 単独よりも優れた制がん活性が確認された。

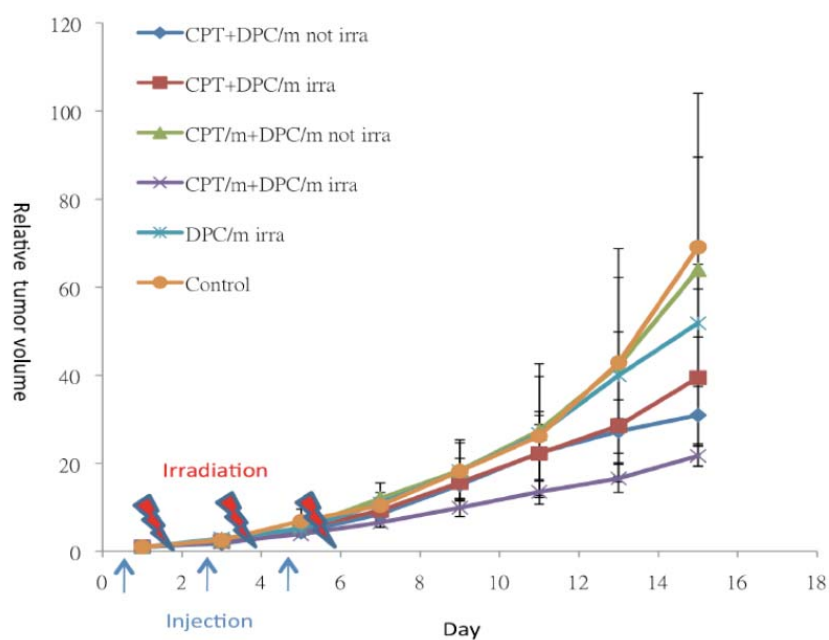


図 1-44. C-26 皮下腫瘍モデルに対する DPc 内包ミセル/CPT 内包ミセル併用システムの制がん活性 [光照射量: 25J/cm²]

以上の結果に関して、光照射選択的に CTP 内包ミセルから CTP がリリースされることを確認するために、光照射 1 時間後および光照射を行っていないマウスからがん組織および肝臓を採取し、病理切片を作成した。作成した病理切片の蛍光顕微鏡観察を行い、CPT の蛍光を観察することによって CPT のリリースを評価したところ、CPT のリリースが光照射を行ったがん組織においてのみ起こっていることが確認された(図 1-45)。以上のように、本システムを利用すれば、DDS に搭載された制がん剤を光照射部位のみで活性化することができ、安全性に優れたがん治療が実現されるものと考えられる。さらに、本システムでは、PDT と比較して、はるかに低い光照射量で制がん剤を活性化することができ、さらに死滅したがん細胞から制がん剤が周囲の細胞へと浸透する bystander 効果が期待できるために、可視光の組織浸透性に起因する PDT の限界を越えた光選択的がん治療が実現できるものと期待される。

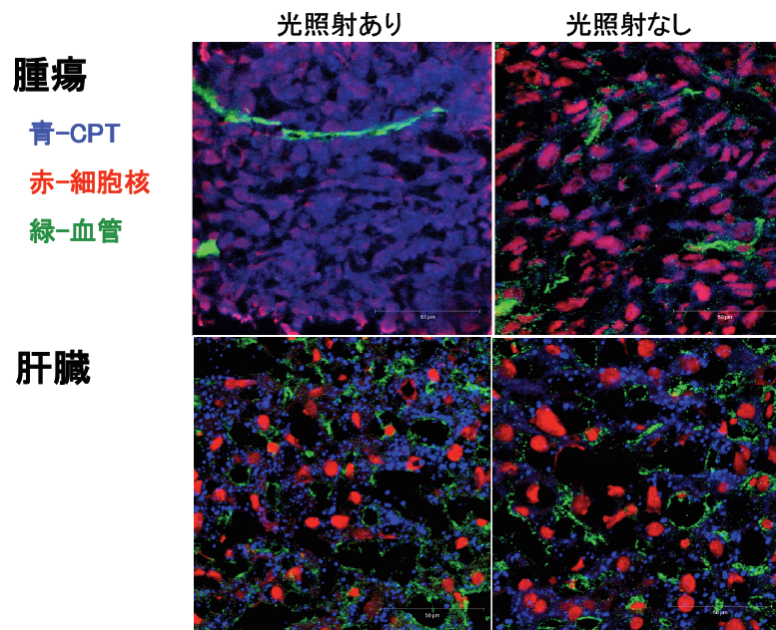


図 1-45. 腫瘍および肝臓における CPT 内包ミセルからの CPT のリリース [C-26 皮下移植モデルマウスに対して DPc 内包ミセルと CPT 内包ミセルと同時に投与し、24 時間後に光照射を行った。光照射 1 時間後に腫瘍と肝臓を採取し、病理切片の蛍光顕微鏡観察を行った]

1)-3-c) PDT と免疫療法を融合した革新的がん治療システムの開発

PDT による抗腫瘍効果を効果的に増強し、さらに局所治療である PDT の限界を超えて、遠隔地に転移した腫瘍に対する全身性の抗腫瘍効果を誘導するためには、生体の免疫応答を介した抗腫瘍効果が必要である。そこで、樹状細胞などの細胞治療を併用するために、まず PDT が生体の免疫系に及ぼす影響を検討した。

・ラット同所性膀胱がんモデルを用いた検討

AY-27 ラット膀胱がん細胞を膀胱粘膜内に接種して作成したラット同所性膀胱がんモデルを用いて、PDT 後の免疫応答を検討した。12 週令のラットの膀胱粘膜内に AY-27 を移入し 3 週間後、腫瘍の生着と増殖を超音波で確認し、膀胱がんモデルラットを作成した。3.7mg/Kg の DPc 内包ミセルを経静脈投与し、DPc 内包ミセルが腫瘍に集積したと思われる 24 時間後に内視鏡下にラットの膀胱がんに対して PDT (100mW/cm², 100J/cm²) を実施した。PDT 後 2 週間後にラットを犠牲死させ、治療効果を観察するとともに脾細胞を採取して免疫応答を検討した (図 1-46)。ラット 8-1, 9-2 では、肉眼的に腫瘍が消失していた。脾細胞を AY-27 とともに共培養して、AY-27 に対して特異的に反応するリンパ球の誘導を検討した。腫瘍接種を受けていないラット (6-1, 6-2, 6-3, 6-4, 7-1, 7-2, 7-3) に DPc 内包ミセルの投与後 PDT を行ったコントロールの脾細胞は活性化されておらず、培養増殖が認められなかった。7 日間 in vitro で培養したのち、AY-27 に対する反応を IFN- γ の産生で検討したが、コントロールのラット由来の脾細胞では IFN- γ の産生は認められなかった。ラット正常膀胱粘膜には DPc は集積せず、PDT を受けても何ら組織傷害を受けていないことが間接的に証明される結果である。一方、PDT を受けた担がんラット (8-1, 8-2, 8-3, 9-1, 9-2, 9-3) 由来の脾細胞は、IL-2 の存在下で活発に増殖し、PDT を受けた

生体内では、PDTによる腫瘍のネクロシスやアポトーシスによって免疫系が活性化されていたことが確認された。AY-27 膀胱癌細胞に対する特異的な免疫応答の誘導を検討したところ、脾細胞は、AY-27 細胞による抗原刺激の有無にかかわらず強い IFN- γ を産生した。PDTにより、生体の免疫系は非特異的に活性化されるが、AY-27 腫瘍特異的な免疫応答の誘導は認められなかった。

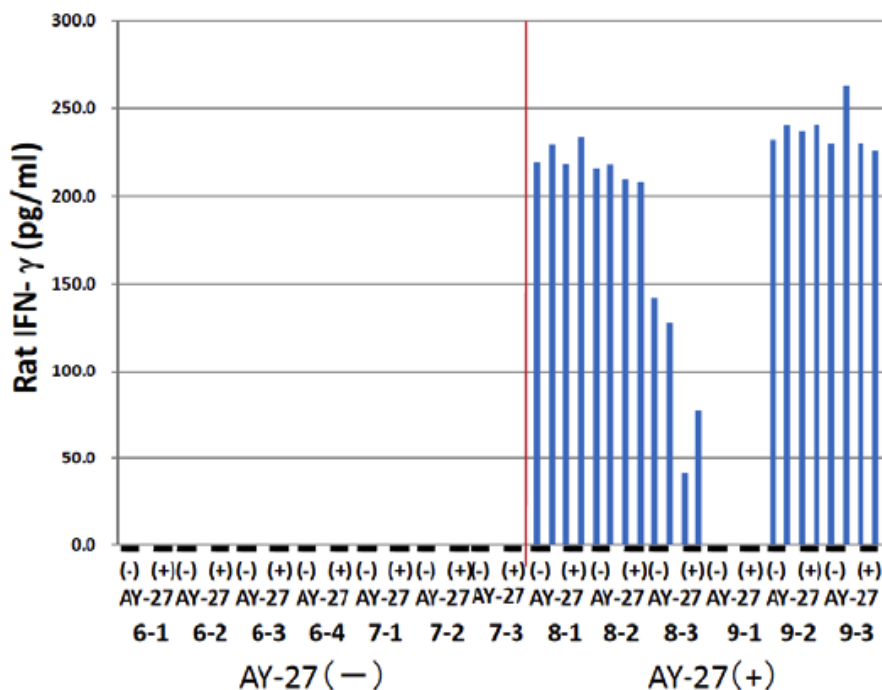


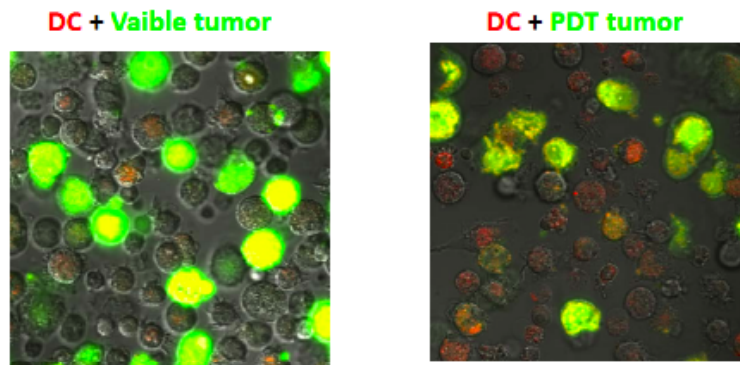
図46. ラット同所性膀胱がんモデルに対するPDT後の脾細胞の免疫応答

・ in vitroにおける検討

PDTによる細胞傷害を、効率よく腫瘍特異的な免疫応答に結びつけ、全身の腫瘍に対する効果を誘導するためには、樹状細胞（DC）による抗原の取り込みと抗原提示による細胞傷害性T細胞（CTL）の誘導が必要である。ラットの同所性膀胱癌モデルでは、PDTは、腫瘍の増殖を抑制すると同時に、免疫系の活性化をきたすが、腫瘍特異的な免疫応答の誘導は検出することができなかったことから、腫瘍特異的な免疫応答がCTLエピトープペプチドの分子レベルまで詳細に解明されているマウスの腫瘍モデルを用いて検討した。B16メラノーマ細胞株をCFSEで蛍光標識したのち、DPC内包ミセルを16時間取り込ませた後、光照射してアポトーシスを誘導した。光照射後24時間にDCを1：1で加えてともに16時間培養した。その結果、図1-47に示すように、CFSEで緑色に蛍光標識された腫瘍細胞は、DCと接触して存在し取り込まれることはなかった。PDTによりアポトーシス/ネクロシスに陥った腫瘍細胞は、効率よくDCに取り込まれた。

Lysotracker-Redを用いてDCのlate endosomeを赤く染色したところ、CFSEで緑色に蛍光標識された腫瘍由来の蛋白がlate endosomeに局在し、両者の共存で橙色に変化していた。以上のことから、PDTによって傷害された腫瘍細胞は、DCによって取り込まれ処理される事が可能であることが明らかになった。

Immunogenic cell death induced by PDT



光線力学療法によりアポトーシスを誘導された腫瘍細胞は、効率よく樹状細胞(DC)に取り込まれる。

☆樹状細胞を用いた免疫細胞治療との併用が期待される。

図47. 蛍光(CFSE)標識B16メラノーマ細胞の樹状細胞(DC)による取り込み

・ PDTによるDC機能の障害

腫瘍に対する免疫応答を誘導するためには、腫瘍抗原をとりこんだDCが、腫瘍局所から所属リンパ節へ遊走して抗原特異的なT細胞を刺激し増殖活性化させるダイナミックな反応が重要である。ラットの膀胱がんモデルにおいて、PDT後に、免疫応答を活性化することができたにもかかわらず、腫瘍特異的な免疫応答が誘導できなかった原因を究明するために、PDTがDCの遊走能に与える影響を検討した。Ly-5.1⁺とLy-5.2⁺のcongenicマーカーをもった2種類のC57BL/6マウスを利用した。Ly-5.1⁺マウスからDCを誘導した。光照射後16時間のDCをLy-5.2⁺マウスの皮下に投与し、24時間後にリンパ節を摘出し、DCのリンパ節への遊走能を検討した。その結果、下図に示す通り、光刺激を受けていないDC(図1-48左 CD11c⁺, Ly-5.1⁺;0.3%)は効率よく所属リンパ節へ移動していたが、光刺激を受けたDC(図1-48右 CD11c⁺, Ly-5.1⁺;0.1%)のリンパ節への移動は1/3に減少していた。

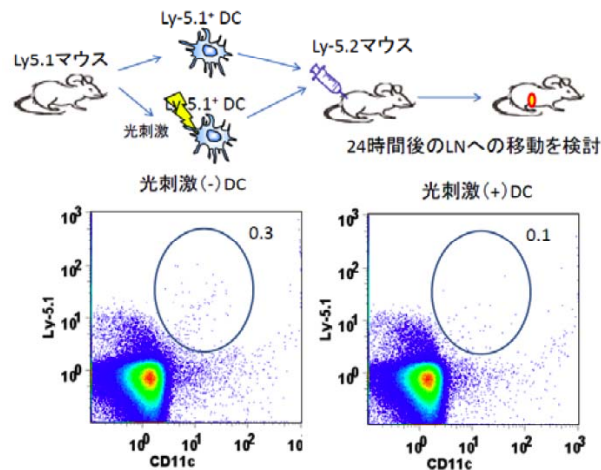


図1-48. 樹状細胞の所属リンパ節への遊走能におけるPDTの影響

以上のように、PDTは腫瘍局所でDCの抗原の取り込みを促進するが、PDTによる光傷害がDCのT細胞を活性化する場である所属リンパ節への遊走を妨げることが明らかとなり、その結果として、腫瘍特異的なCD8⁺T細胞の誘導が認められないものと考えられた。

・マウス皮下腫瘍モデルを用いた免疫応答の解析

PDTと免疫療法の併用療法を開発するためには、上記の検討で見られた問題点を解決する必要がある。そこでまず、腫瘍局所における免疫制御性の環境と腫瘍内での免疫担当細胞の相互作用を解析するために、マウス大腸癌細胞株C-26をBALB/cマウスの皮下に接種して担癌マウスを作成した。尾静脈からDPc内包ミセルを投与した後、24時間後にレーザー照射を行いPDTを行った。PDTを1回実施または3日ごとに3回PDTを実施した後5日後に腫瘍を摘出した。カラーゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、DNaseを用いて腫瘍から腫瘍浸潤リンパ球(Tumor Infiltrating Lymphocyte;TIL)を単離し、Flowcytometerを用いて解析した(図1-49)。

無治療(PDT(-))のコントロールマウスの腫瘍から得られたTILの特徴は、CD11b⁺Gr-1⁺の骨髄由来抑制性細胞(Myeloid derived suppressor cell:MSDC)が79.3%を占める非常に抑制性の強い環境であることであった。CD25⁺CD4⁺の抑制性T細胞(regulatory T cell:Treg)は0.25%であり、この腫瘍モデルはMSDCによる抑制が優勢である。腫瘍内で抗腫瘍活性を担うと考えられるリンパ球は、CD4⁺(1.5%)、CD8⁺(0.6%)、CD49b⁺NK細胞(1.5%)はわずかに認められず、CD11b⁺CD11c⁺DC(0.0%)を検出することはできなかった。PDT治療前の腫瘍は、抑制性の環境が強く腫瘍に対する免疫応答は強く抑制されていることが確認された。

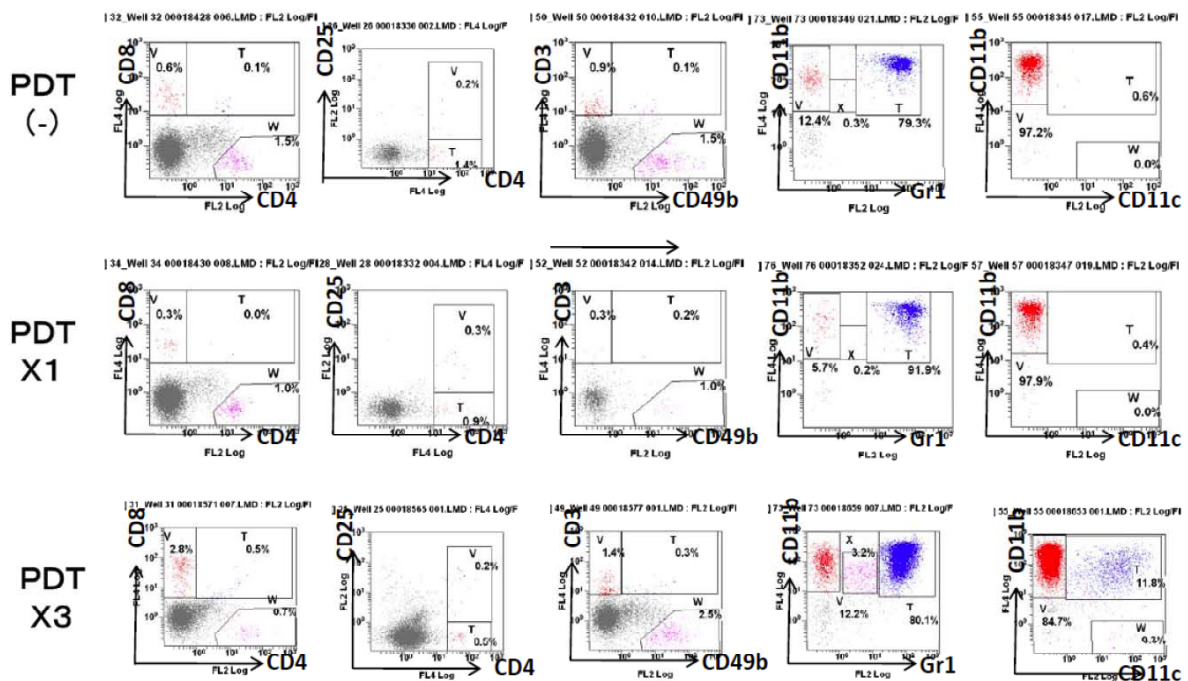


図1-49. PDT後の腫瘍浸潤リンパ球の表面マーカーの解析

PDT治療(1回照射)後5日目には大きな変化を認めることはできなかった。PDTを3回

連続して実施したのち、5 日後の腫瘍から得られた T I L を解析したところ、CD11b⁺Gr-1⁺の M S D C は 80.1% を占め、強い抑制性の環境は継続しているが、腫瘍内には抗腫瘍免疫応答を担う CD8⁺ (2.8%), CD49b⁺NK 細胞 (2.5%) の浸潤が認められた。さらに CD11b⁺CD11c⁺の myeloid DC (11.8%) が認められた。P D T を強力に繰り返した後、アポトーシスやネクローシスに陥った腫瘍細胞を貪食し抗原提示を行い腫瘍特異的な免疫応答を誘導する能力をもった DC が腫瘍内に浸潤することが明らかになった。以上のことから、P D T によって抗腫瘍免疫応答が誘導されうる可能性が認められた。

次に P D T 後に摘出した腫瘍から、R N A を抽出し、R T - P C R 法を用いて免疫応答にかかわる遺伝子発現を解析した (図 1-50)。その結果、P D T にかかわらず、腫瘍は免疫応答を抑制する因子である IL-6, TGF β , VEGF を強く発現しており、P D T 後もこれらの因子の発現が継続していた。*印で示すように、P D T 後の腫瘍内では TNF- α 遺伝子の発現が認められ、P D T による細胞傷害に伴い、免疫応答が活性化されていることが示唆された。このことは、(a) ラット同所性膀胱癌モデルを用いた検討において認められた P D T 後の非特異的な免疫活性化と矛盾しない。

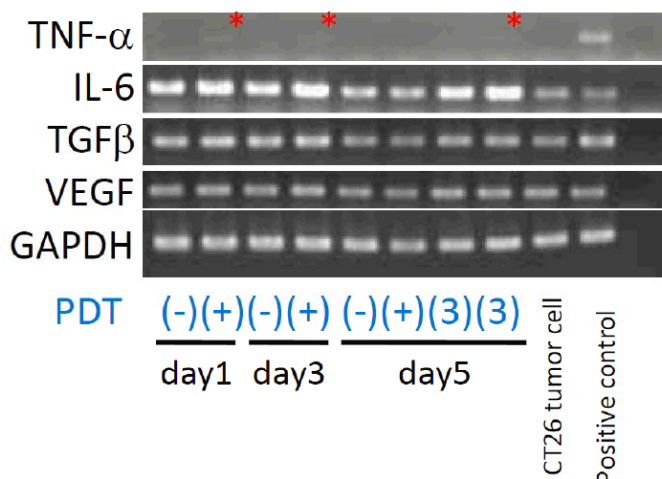


図 49. PDT 後の腫瘍における免疫応答に係る遺伝子の発現解析

以上のことから、現状でも P D T により生体の免疫応答は活性化されることが確認できたが、腫瘍特異的な免疫応答を誘導し、転移病変の治療や再発防止を目指した治療法の開発のためには、P D T 後の腫瘍内へ機能を傷害されていない DC を直接投与することに、より強い腫瘍特異的な免疫応答を誘導することが必要であるものと考えられた。なお、項目 1)-3-c) は 2009 年 1 月の中間評価の結果を受けて、中止となった為、H20 までの研究成果である。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表 (プレス発表)
	国内	外国	PCT 出願	査読付き	その他	
H19FY	0 件	0 件	0 件	4 件	0 件	0 件
H20FY	0 件	0 件	0 件	0 件	0 件	0 件
H21FY	0 件	0 件	0 件	3 件	1 件	0 件

[特許]

なし

[受賞実績]

1. 西山伸宏 平成21年7月 日本DDS学会 第一回日本DDS学会奨励賞(基礎)
2. 宮崎幸造 平成21年12月 第30回日本レーザー医学会 総会賞 「新規開発した均質照射型光ファイバーによるPDT効果の向上」

[その他特記事項]

なし

相変化ナノ液滴を用いる超音波診断・治療統合システム

相変化能を有するパーフルオロカーボン（PFC）液滴

背景

本研究開発においては、生体投与時はナノサイズの液滴であり、超音波パルス照射時に液相から気相への相変化を生じてマイクロバブルを形成する相変化ナノ液滴を超音波造影・増感剤として用いる。特に今回、低沸点のパーフルオロカーボンを複数組み合わせることで、安定性と超音波感受性との両立を図るというアプローチをとっている。そもそもの相変化のしくみは、ケルビンの気泡の蒸気圧に関する式 2)-1-1-1 に基づく、低沸点化合物の微粒子化に伴う蒸気圧の変化を利用するものである。

$$\log(p_{\gamma}/p) = -2\gamma M/\rho rRT \quad \text{式 2)-1-1-1}$$

(p は水平表面の蒸気圧、 p_{γ} は半径 r の気泡の蒸気圧、 M はモル質量、 γ は表面張力、 ρ は液体の密度、 T は絶対温度)

界面活性剤が関与すると微粒子が完全に式 2)-1-1-1 に従うとは限らないが、微粒子化を行うことにより、低沸点のパーフルオロカーボンはその見かけの沸点が上昇し過熱状態になる。この過熱状態を物理的的刺激により解くことにより沸点が元の状態に戻る。本研究開発ではこの現象、および液体から気体へ相変化が生じると密度差により体積が約 3 桁を大きくなる（直径が約 1 桁大きくなる）ことを利用する。すなわち沸点が体温以下であって水に不溶な液体を、界面活性剤で数 100nm のサイズの微粒子とすることにより過熱状態にして見かけの沸点を上昇させたものをつくり、その後、体内に投与して超音波パルスにより過熱状態を解くことにより、超音波パルスを照射した部位のみで液体からの相変化によりミクロンサイズの気泡を生成することを目指すものである。

ここで、相変化前のサイズが数 100nm で、相変化後のサイズ数ミクロンであることは大変重要である。まず、相変化前すなわち体内投与時に数 100nm であることは、血管から腫瘍組織への漏出に重要である。微粒子系の腫瘍へのターゲティングにおける一手法として粒子径のコントロールがあり、直径を数 100nm にして表面を適切に修飾することにより腫瘍への集積性を得ることができていることが報告されている。また、現在、超音波診断用造影剤として用いられているのはミクロンサイズの安定化気泡であり、各社からマイクロバブルを選択的に可視化するための超音波シーケンスが開発されているため、超音波診断装置によりミクロンサイズの気泡を高感度に検出することは容易である。これらのことから、本相変化を用いる超音波感応型ナノ微粒子を用いることにより、腫瘍組織に集積し、かつ超音波パルスを照射した部位のみで選択的に超音波診断装置で検出可能なイメージングシステムを構築することが可能となる。

我々はこれまでに、パーフルオロペンタン（沸点 30℃）を基本構成要素とし、リン脂質を中心とする界面活性剤によりエマルジョン化した後に高圧乳化処理を加えることで、約 200nm の直径を有する微粒子を調製する手法を確立した。さらに、パーフルオロヘキサン（沸

点 60℃) を混合することにより、微粒子の制御不可能な突沸を抑えることに成功した。得られた微粒子は数 10W/cm² の比較的低強度の超音波照射により水中および体内にて相変化を生じ超音波診断画像上で検出できた。マウス皮下に移植された Colon26 腫瘍に 3MHz の超音波を照射した際の結果を示すものであり、相変化用超音波の焦域のみにおいて、気泡化による輝度上昇が認められることがわかった。

本開発では、これまでの研究成果をもとに、超音波に感応する特性を有しつつ、かつ薬剤を患部に送達する DDS キャリヤとしての機能を併せ持つ薬剤の基本構成に関する基礎検討を行うことを目的とする。

コアはシェルがないと安定して存在できないため、シェルに関する検討も必要である。本開発においてはシェルを第一世代（既存の薬剤に用いられている成分のみを用いる）と第二世代（新規に超音波 DDS 用に開発する高機能性のもの）とに分けて開発を行っており、本項では、第一世代の開発について記述する。第一世代は市販超音波造影剤に用いられているポリエチレングリコール修飾リン脂質をベースとして、より粒子の安定化をねらった組成の最適化を行った。ポリエチレングリコールは薬剤の内包用として有望であると共に、微粒子表面に存在させることにより体内投与時に微粒子が肝臓などの網内系に取り込まれ目的部位への移行が妨げられるのを予防する効果も知られている。また、

また、前述のように PFC6 を一定量混入することで熱的な安定性と超音波の感受性が両方影響を受けることが今までの検討から得られており、特に制御不可能な突沸を抑える効果がわかっていた。今回の開発では、実用化に向けて、診断治療に最適な混合比率を目指し、治療に用いる周領域での超音波感受性をより詳細に検討した。

本ナノ液滴を用いた診断治療技術の実用化に向けた開発を進めるにあたって、中・大動物を用いた効果の検証、および多数の小動物を用いた安全性試験が不可欠であるが、そのためには同じ品質をもつ液滴を安定して比較的大量に供給する必要がある。同じ理由から薬剤調整を中大動物実験と同日に同じサイトで行うだけではなかったため、長期安定して保存できる方法が必要である。そこで、本開発では大量調整の技術を確立するとともに、長期間保存可能な方法を考案した。

最終的に、シェル部、コア部、調製・保存技術の 3 つの点から最適化され、最終実現形態にもっとも近づいた液滴の超音波感受性、薬物動態、および薬剤毒性を評価した。

方式の提案および検討

1) 第一世代ナノ液滴のシェル部組成の最適化

本研究開発における超音波感応型相変化型ナノ微粒子では、コアの基本成分であるパーフルオロカーボンが水不溶性の物質であるために、水中で存在するには何らかの安定化成分、界面活性成分を有する物質によるシェルが必要である。本開発前まではリン脂質を基本成分とした低分子シェル成分を用いてきたが、以下の理由から最適とは言いかねた。

1. 何の官能基も有さないため、シェルに腫瘍特異的分子などを付加することが困難。
2. 体内投与時に微粒子が肝臓などの網内系に取り込まれ目的部位への移行が妨げられるため、目的部位へ達しにくい。

3. 微粒子内部で安定化されない、親油性ではない抗がん剤などの薬剤が共存させられない。

そこで、本開発では液晶性高分子を携えることにより、構造の最適化を図ることを最終目的としている。今回、ポリエチレングリコール（PEG）を含む高分子界面活性剤をシェルとした微粒子系の検討を行った。具体的には、高分子界面活性剤を用いたとき、サイズ分布が狭く中心粒径 500 nm 以下のパーフルオロカーボンを含んだエマルジョン化が可能であるか、またリン脂質を主成分としたときに得られていたのと同等の超音波感応性を維持しているかどうかについて詳細に検討した。

【実験方法】

本実験で使用する相変化ナノ液滴の調製法は以下のとおりである。クロロフォルムに溶解した脂質、または高分子界面活性剤を含む試験管を 30°C の恒温槽にいれ減圧下で乾固した。そこへリン酸緩衝食塩水を加え、超音波ホモジナイザで 1 秒パルスを 5 分間加えることにより、リン脂質リポソームを得た。この溶液に 3.75% (v/v) 量のパーフルオロカーボンを加え、氷温下におき 9500rpm で 1 分間ホモジナイズしてエマルジョンを得た。このエマルジョンを Emulsiflex-C5 (Avestin, Ottawa Canada) を使用し 20-25MPa にて高压乳化処理を 5 分間行った。

上記手順にして相変化ナノ液滴を調製し、さらにポアサイズ 1.2 μ m のメンブレインフィルターを通してサイズの大きい狭雑物を排除した。また、造影剤の粒度分布はレーザー回折光散乱粒度分布測定装置 (LS13-320, ベックマンコールター社 (図 2) -1-1-1) を用いて行った。



図 2)-1-1-1 レーザー回折光散乱 粒度分布装置 LS 13-320

造影剤内の活性成分であるパーフルオロカーボンの定量には日立ガスクログラフ G-6000 を用いた。今回検討した相変化型ナノ微粒子の成分は表 2)-1-1-1 のとおりである。

表2)-1-1-1 シェル成分表

サンプル名	乳化剤濃度 (mM)			
	PC*	DPPA**	Chol***	PEG-PE****
PCのみ	4.4	—	—	—
DPPAのみ	—	4.4	—	—
PEG-PEのみ	—	—	—	4.4
PC/Chol 混合	2.94	—	1.46	—
PC/DPPA 混合	3.9	0.5	—	—
PC/DPPA/Chol 混合	2.57	0.5	1.33	—
PC/DPPA/PEG-PE 混合	3.5	0.4	—	0.5
PC/PEG-PE 混合	3.9	—	—	0.5

* Phosphatidylcoline (大豆由来) **Dipalmitoyl Phosphatidate, *** コレステロール、**** Phosphatidyl ethanolamine-PEG MW5000

さらに、以下に述べる方法でこれらの液滴の溶液中安定性を評価した。ナノ液滴を PFC 5 量で 0.4% (v/v) になるように、アルブミン 4% 含む PBS 溶液中に希釈した。通気孔のあいたバイアルに入れ、37℃下で攪拌しながらインキュベーションを行い、30 分ごとに溶液中 PFC 量をガスクロマトグラフにて測定した。

【結果と考察】

すべての造影剤は、平均粒径が 300-400 になるように調整された。代表的な粒度分布を図 2)-1-1-2 に示す。

PFC 量を固定しシェル用乳化剤濃度を変化させて調製したナノ液滴の平均粒径を LDS で測定した結果を図 2)-1-1-3 に示す。これらの粒度分布は全て単分散であり、かつ内包率の変化もほとんど無かった。ただし、乳化剤濃度を 0.3mM 以下にした場合、多分散系のナノ液滴が調製され、また内包率も低下した。乳化剤濃度 0.325mM から 10.4mM、平均粒径では 0.1 μm から 0.6 μm の範囲においては、加える乳化剤濃度と調整されるナノ液滴のサイズの間に相関があり、乳化剤の量を調節することで粒子径が制御できることが確認された。

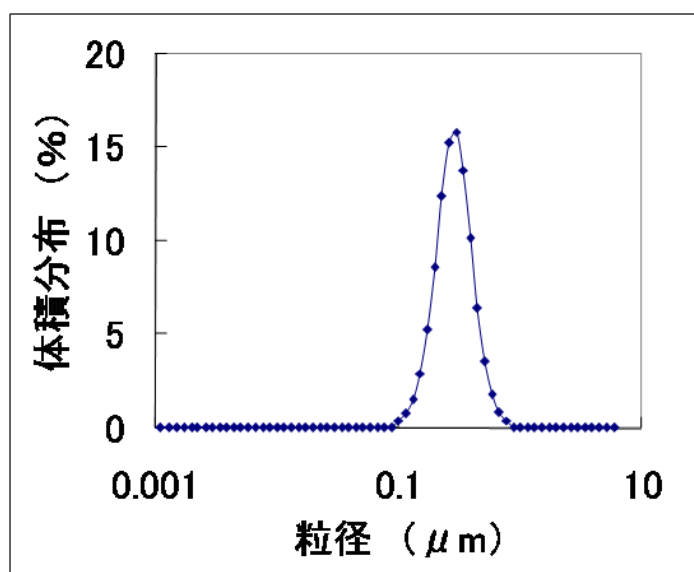


図 2)-1-1-2 ナノ微粒子の粒度分布

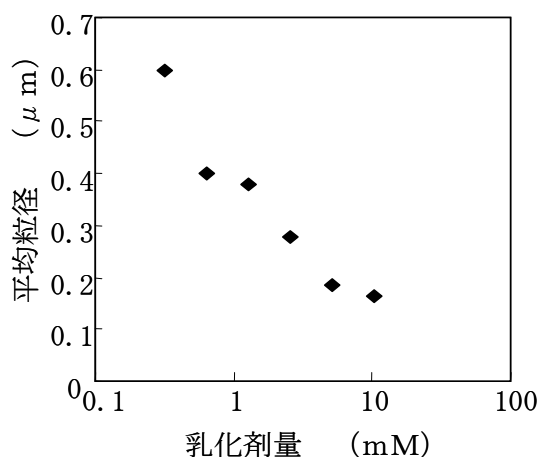


図 2)-1-1-3 乳化剤量の変化による平均粒径の推移

異なる種類の乳化剤を、トータル量で同じだけ加えナノ液滴を作成した場合に、高压乳化処理後に溶液中に存在する P F C 5 濃度を測定し、仕込み量に対する割合を P F C 5 の内包率として示した結果を図 2)-1-1-4 に示す。

乳化剤として最もシンプルなホスファチジルコリン (P C) のみの系では、仕込み量に対し 2 割程度の濃度の P F C しか回収できていないことがわかった。これに対し、 P C にホスファチジル酸 (D P P A) を混合した系、および高分子のポリエチレングリコール付ホスファチジルエタノールアミン (P E G - P E) においては 5 割以上の P F C 5 を回収できることがわかった。 P C 単独に比べて約 2.5 倍多い。 P C 単体、および P C ・ D P P A 混合系に高分子の P E G - P E を追加したときの回収率の変化量はそれぞれプラス 3 % とマイナス 4.5 % であったが、これは高压乳化処理装置によるばらつきの範囲内である。コレステロール (C h o l) を P C に混合してナノ液滴を作成しても、回収率に差は見られなかった。また、コレステロールを内包率の高かった P C ・

DPPA混合系に添加した場合には、回収率が4割未満に下がった。また、DPPAを単体で用いた場合には、残存率は1割未満である。なお、PCとして、卵白由来、大豆由来、および生成DPPCいずれを用いても結果に差異は見られない。

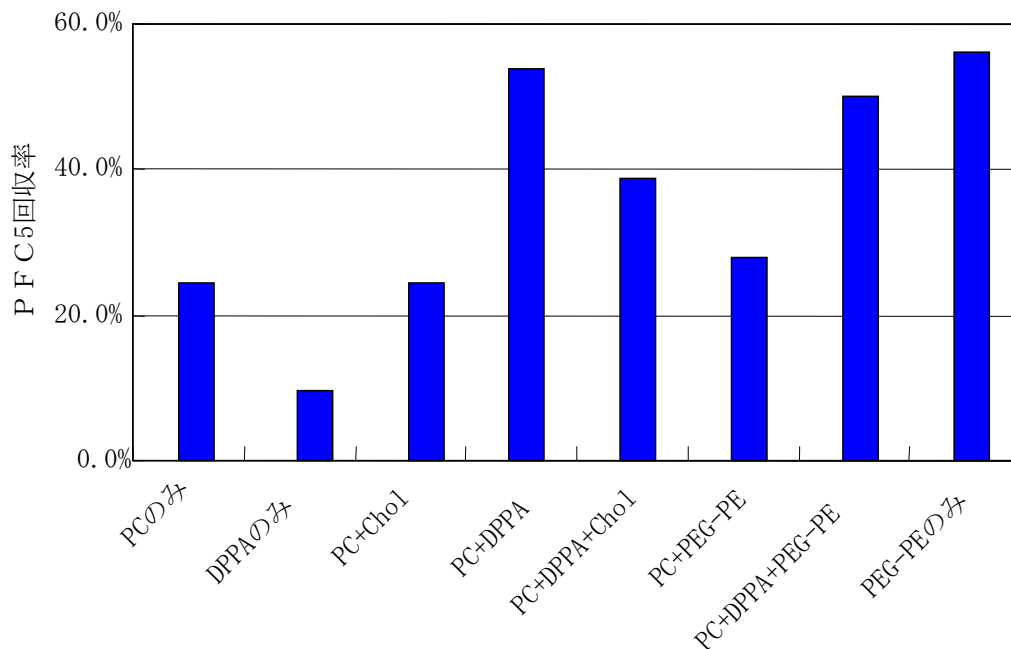


図2)-1-1-4 異なる乳化剤を使用して作成したナノ液滴のPFC5残存率

これらの液滴の in-vitro での溶液中の安定性を評価した結果を図2)-1-1-5に示す。PCとDPPAを用いた液滴中のPFC5が一番遅く消失しており、in vitro 溶液中での安定性が高い。順にPCのみ、PC+CHOL、PEG-PEとPFC5の消失スピードが速くなっている。PEG-PEのみで構成された高分子系は、薬剤調製時のPFC5の回収率が一番高かったが、一番早く消失した。これは、高分子をたくさん含む界面活性剤で構成された粒子は構造が比較的柔軟であり、内包物(PFC5)を取り込みやすく、輩出しやすいからだと推察される。

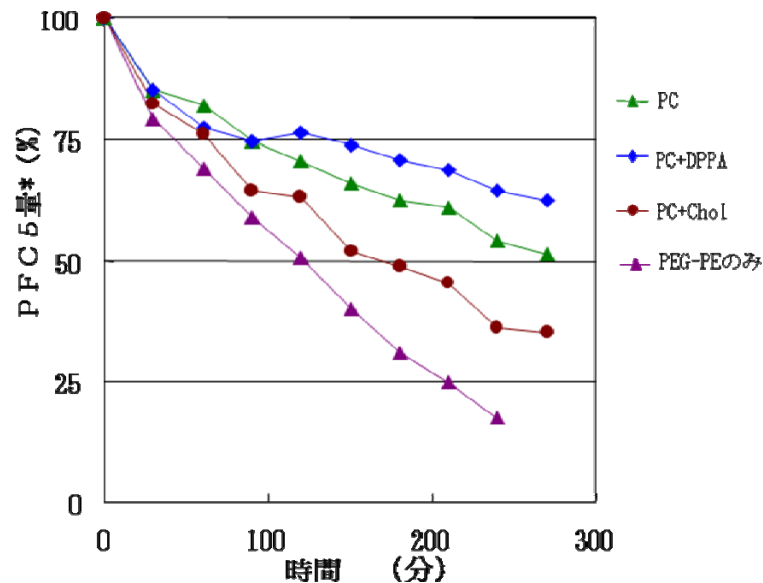


図 2)-1-1-5 溶液中 P F C 5 量 経時変化

相変化ナノ液滴造影剤のシェル部の組成を検討するに当たって、特に PC/DPPA 混合系は Unger らによる Definity®, パーフルオロプロパンを脂質 1 重膜に内包したマイクロバブル造影剤を、PC/Chol 混合系は丸山らによるバブルリポソームの組成を参考にした。PEG の追加は血中安定性を得るために有用とされるステルス性付加のためである。特に PC/Chol 系では PFC 5 回収率、および *in vitro* 溶液中での安定性が低く、逆に PC/DPPA では両方が顕著に高かったことから、相変化ナノ液滴の安定化には、後者のほうが有用であることが示唆された。

この違いは液滴の安定性（不安定性）の基序に起因するものと考えられる。液滴の不安定性は 1) 個々の微粒子が単体でその形態を保てなくなることと 2) 粒子間の相互作用により凝集・会合等が生じ元の単体としての特性から変化するものの二つが考えられる。PC を基本とした脂質一重膜構造のなかでの Chol と DPPA の役割は異なり、Chol は 1) に DPPA は 2) に主に関与する。

脂溶性の高い Chol は、PC を基本とした膜構造のうち分散相側の疎水基の間に入り楔のような役目をする事で、粒子の内側から作用し膜構造の安定化を図ると考えられているが本検討において有用性は全く見られなかった。これはコレステロールがリン脂質の疎水着同士の結びつきを強くするために、コレステロールが存在すると、脂質 2 重膜構造を持つリポソームとして存在するほうが PFC を包むナノ液滴として存在するよりもエネルギー的に安定であるためであるから考えられる。これは -20°C で保存したときはエマルション構造を保っていないと思われる 100 nm 以下の粒子が生じていることから示唆される。さらに、Chol 混合系に見られたナノ液滴調製時の PFC 残存率が低いのも、本研究での相変化ナノ液滴の調整法では、最初に脂質 2 重膜構造のリポソームを作ってから PFC を混合しエマルションを作成するが、熱エネルギー的に不安定な脂質一重膜により移行しにくくして

いることからと考えられる。これらのことから、個々の微粒子を安定するアプローチとして、Chol のように膜構造の安定化を図りつつ、PFC とのが親和性を高いフッ素系脂溶性物質などを粒子の内側に介入させるなど新しいアプローチを考える必要があると考える。

一方 DPPA は荷電されている親水基を持つため、PC を基本とする脂質一重膜構造に加えられた際、特に粒子間の相互作用による凝集・会合等の発生を防ぐ働きがあると考えられる。一般的に相変化ナノ液滴のような難水溶性物質が水性分散媒に分散されたエマルジョン溶液中では、微粒子同士の衝突によって凝集が生じて粒子径の増大がおこる。しかし、粒子表面が荷電されていれば、粒子同士の反発が働くことから、衝突を防ぐ効果があると考えられる。

2) 第一世代ナノ液滴のコア部組成の詳細な超音波感受性の検討と組成の最適化

相変化ナノ液滴を用いた超音波による腫瘍の診断・治療では、モニタリング用・相変化用・治療用という 3 種類の超音波を照射することになる。これまでは主に腫瘍の位置をナノ液滴により確認するという状況を想定したモニタリングと相変化とを統合するための検討を行っており、超音波診断装置および診断用超音波パルスをベースとした相変化に注力してきた。しかしながら、早期実用化を考えると、腫瘍の位置確認は造影 MRI など既存の装置により行い、相変化ナノ液滴は治療時の焦点のモニタリングおよび治療用増感剤として用いるという手法も有効であると考えられる。このようなアプローチにおいては、治療用超音波トランスデューサにより相変化を生じることとなり、診断用超音波よりも低周波でかつ長パルスでの相変化が必要となる。そのため、診断治療によりてきた組成のための最適化として、ナノ液滴の熱的な特性と治療用帯域の超音波による相変化の生じやすさとの関係を詳細に調べることとした。

【実験方法】

治療に用いる周波数帯域である、1.1 MHz, 2.18 MHz, 3.35 MHz における超音波感受性と温度安定性との関係を、治療用トランスデューサと生体模擬体を用いて調べた結果を述べる。

本検討においては、沸点が 29 °C のパーフルオロペンタン (PFC5) , 57 °C のパーフルオロヘキサン (PFC6) , 96 °C のパーフルオロオクタン (PFC8) のみを含むコントロール液滴、及び PFC6 と PFC5 を混合した液滴を、全てが同じパーフルオロカーボン濃度、粒度分布になるように調製したものをを用いた。相変化の閾値実験は生体模擬体としてのポリアクリルアミドゲル中に行ない、気泡生成が超音波診断装置画面上にて観察される最低超音波強度を閾値として定義した。実験系は図 2)-1-1-6 に示すとおりである。また、これら液滴の温度安定性については、温度上昇による気泡の生成を、相変化を生じうる強度よりも 2 桁以上低い観察用超音波パルスを用いて評価した (図 2)-1-1-7) 。

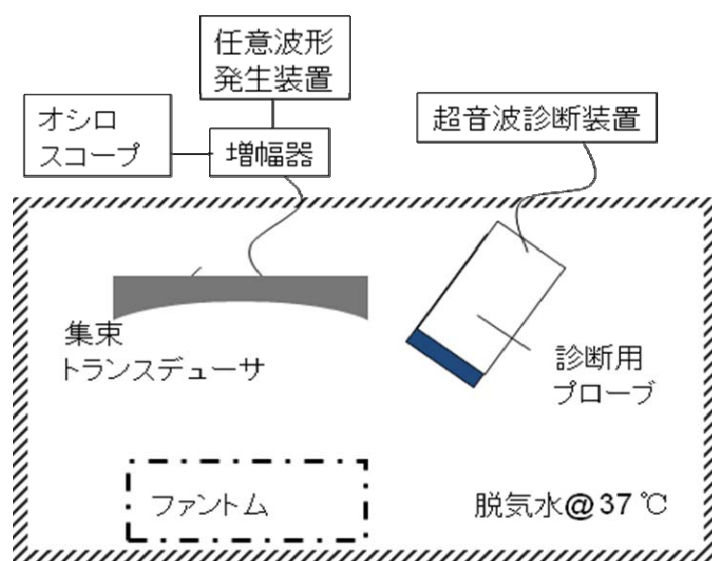


図 2)-1-1-6 相変化閾値実験セットアップ

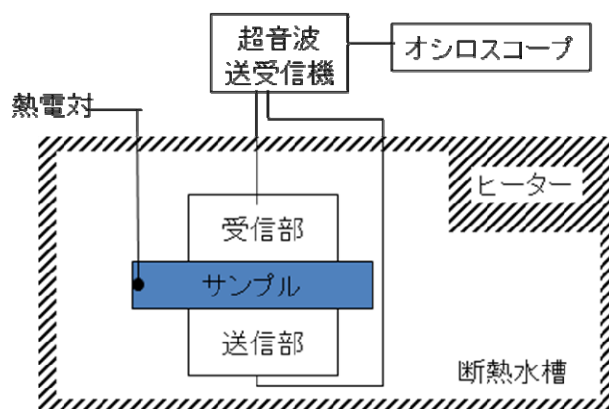


図 2)-1-1-7 温度上昇による気泡の生成の観察系

【結果と考察】

超音波閾値の試験結果より、低周波領域においても、高沸点化合物を混合することにより、超音波閾値を制御しうることを示唆された。図 2)-1-1-10 に示されるように、PFC6・5 混合系液滴の超音波閾値は PFC6 単体液滴の閾値よりも低く、PFC5 単体液滴のそれよりも高い。単成分液滴の低周波領域における閾値は、内包した PFC の沸点の上昇に伴い高くなっていることから、混合することによる閾値の変化は、液滴の温度特性が変化したことによるものと考えられる。これは温度安定性の評価 (図 2)-1-1-8) によっても示唆されており、即ち混合系は PFC5 と 6 それぞれの沸点ではなく、一つの沸点を有することから、沸点上昇などの機序により温度的に安定していると考えられる。

PFC6 の割合が多くなればなるほど温度安定性は増す傾向にある。同時に、これまでの高周波領域での検討においては、超音波閾値は上昇する傾向にあり、今回の検討においても 3.35 MHz では PFC6 の割合に応じて超音波閾値が変化した。しかし 2.18 MHz と 1.10 MHz

において、高沸点化合物の混合比率の変化に関わらず相変化閾値は一定の値を示した（図2)-1-1-9, 図2)-1-1-10)。これは温度特性以外の何らかの機序が相変化に関わっているからと考えられる。全ての組成の液滴の相変化閾値が 1.10 MHz において最も低く、3.35 MHz において最も高いことから、熱的要因以外が関わっている可能性が示唆される。ひとつの仮説としては、本現象は低周波領域で特に顕著であることから、これまで高周波において主要因であった負圧によるものよりも、キャビテーション現象が支配的に関わっていると考えられる。

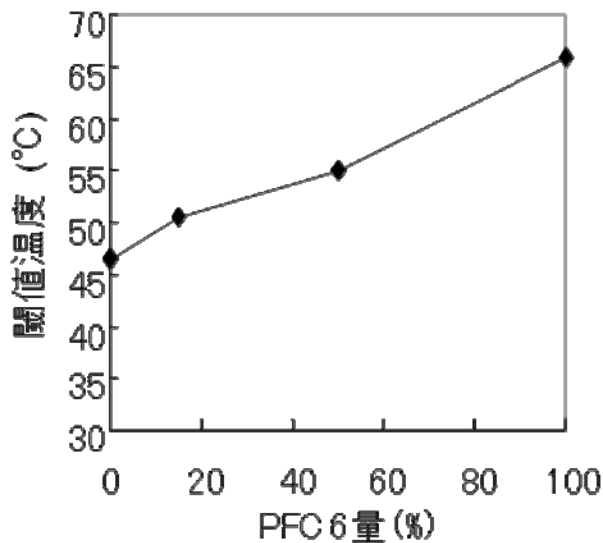


図2)-1-1-8 PFC6 量による液滴の温度安定性の変化

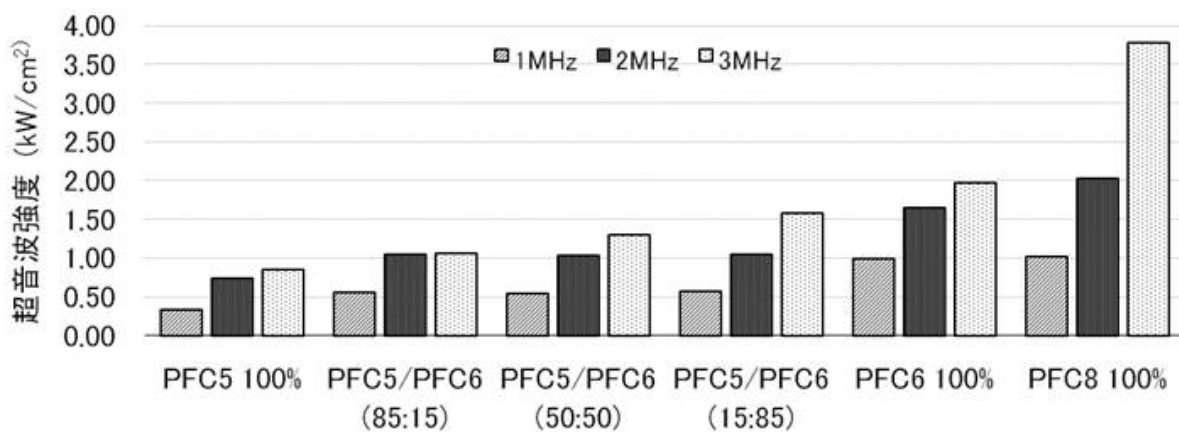


図2)-1-1-9 異なる組成の液滴における相変化に必要な超音波強度 (1-3MHz)

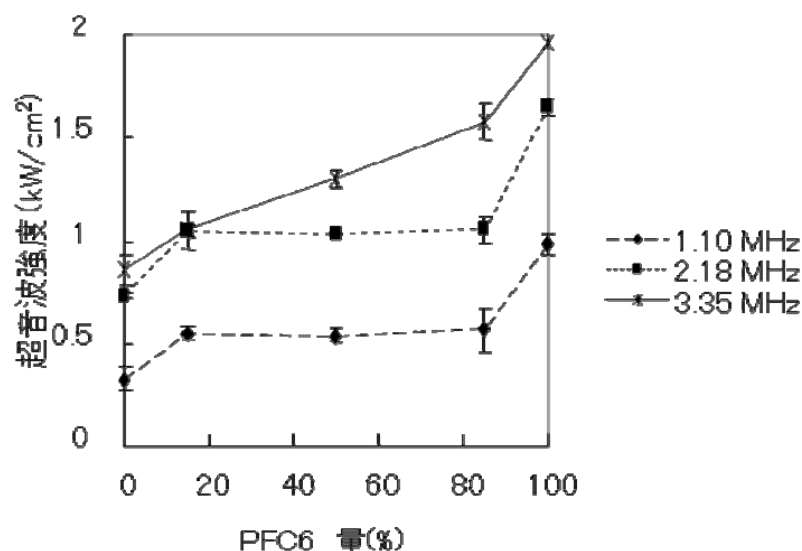


図 2)-1-1-10 PFC6 量による液滴の超音波閾値の変化

相変化ナノ液滴の医用応用を行なう上で理想的な液滴の組成は、生体内では液滴のまま安定しており、超音波を照射時のみ効率的に気化するものである。現在までの検討では、高沸点化合物を添加することより液滴の熱的安定性と相変化閾値の両方を同時に制御していたために、両者のバランスを考慮しながら高沸点化合物の添加割合を最適化する必要性があった。しかし本検討から、特に 2.2 MHz 以下の領域においては、高沸点化合物の添加の割合を増やしても相変化閾値は一定であることから、治療用のナノ液滴においては診断用液滴よりも更に高沸点化合物を増した組成が有用であると考えられる。今後、キャビテーション現象が支配的にかかわる低周波領域における最適組成を、更に熱的安定性が高いと思われる高沸点化合物を使用することも視野に入れつつ行なっていく。

3) ナノ液滴の大量調整技術および保存技術の確立

基本的な造影剤調整のプロトコルは一章で述べたとおりであるが、大量・安定調整のために以下の点で改善を行った。

ロータリーエバポレーター (図 2)-1-1-11) の導入による最大 300mL の脂質二重膜一斉調整

冷却チャンバーおよび冷却装置 (図 2)-1-1-12, 図 2)-1-1-13) の導入による、高圧乳化処理装置の長時間連続運転後バラつきの低減

低温冷蔵チャンバー (-80°C) の導入による長時間安定保存の実現

以下に実験方法および詳細を述べる。



図 2)-1-1-11 ロータリーエバポレーター (BUCHI Laboratory, R-215 B-491)



図 2)-1-1-12 冷却チャンバー (日本フリーザー)



図 2)-1-1-13 高圧乳化処理装置用冷却ユニット

【実験方法】

基本的な造影剤調整方法は上述の通りであるが、以下の点で変更を行った。クロロフォルム／メタノール／エタノール溶液（2：1：1）にトータル 1.4g の混合リン脂質を溶解し、ロータリーエバポレーターを用いて 50℃下で約 2 時間減圧し、脂質薄膜層を得た。また、高圧乳化処理は 50mL ずつ、10 分の処理時間をかけて行った。さらに、完成したエマルションは、グリセリン 20%溶液中に分散し、-25℃以下で保存した。

【結果と考察】

上記の方法を用いることで、一回の乳化処理で約 30mL のナノ液滴を調整することが可能となり、すべての工程を合わせて一日（8 時間）でおよそ 150mL 液滴を調整しえる。

調製時安定性に影響を与えうる要因として、高圧乳化時のばらつきがある。図 2)-1-1-14 に、同一組成で複数回調製した際の PFC 回収率のばらつきを示す。図 2)-1-1-14 中右は冷却チャンバー等のメンテナンス措置を行った場合、左は行わなかった場合の 4 回の実験結果をプロットしたものである。平均回収率がそれぞれ 50, 62%, また標準偏差がそれぞれ 15, 5%であった。このときに使用したナノ液滴は乳化剤として PEG-PE を含む。本結果から、冷却措置をはじめとするメンテナンス措置は安定したエマルションの提供に非常に有効であることが分かった。

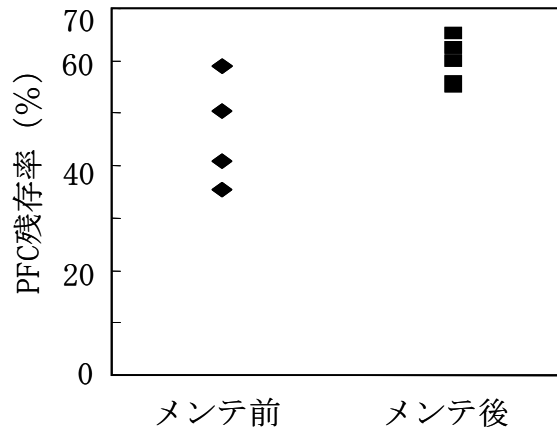


図 2)-1-1-14 高圧乳化処理後 PFC 回収率のバラツキ

図 2)-1-1-15 に 20%グリセリン溶液に分散後、 -28°C で保存したナノ液滴の粒度分布を示す。すべてのサンプルは、 4°C 下で解凍したのち 2 時間以内に計測を行った。調整後、60 日たってもほぼ粒度分布に変化が見られない。一度 4°C 下で解凍した後再凍結したサンプルについても同様に差が見られない。さらに、ドライアイスを用いて、ナノ液滴調整 2 日後と 24 日後に 2 回運搬したケースにおいても、ほぼ粒度分布に変わりがない。

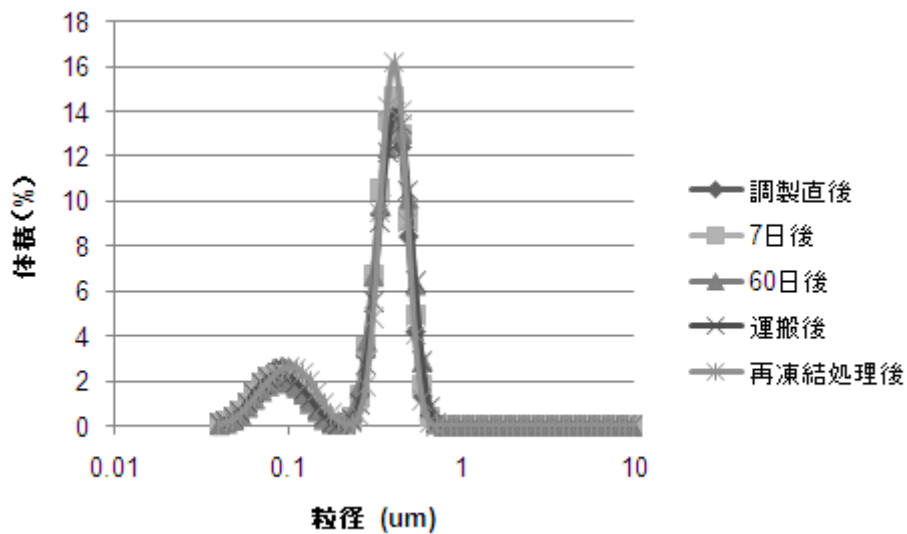
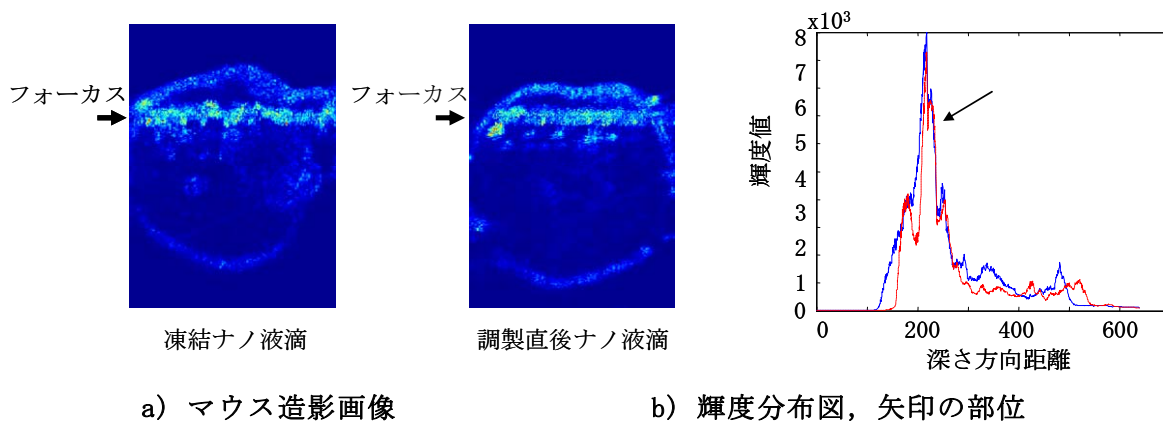


図 2)-1-1-15 粒度分布推移

次に、30 日間上述の方法で保存した液滴を用いて、皮下移植マウス腫瘍の可視化試験により、3 凍結保存による超音波感受性の変化を調べた。凍結前および凍結後再分散を行ったナノ液滴をそれぞれ別固体のマウス尾静脈より投与し、相変化用超音波を照射し、相変化画像を取得した。得られた画像を図 2)-1-1-16 a に示す。これらの図は全て深度 0.5 cm で行なわれたもので、凍結のありなしによる造影輝度の変化は特にみられない。これは、図 2)-1-1-16 b に示した輝度分布図からも明らかである。この結果より、凍結するこ

とによって生体での超音波感受性の違いおよび体内分布への影響などを左右する相変化ナノ液滴の性質の変化が、観察されうる範囲では無いことが示唆された。



a) マウス造影画像

b) 輝度分布図，矢印の部位

図 2)-1-1-16 マウス造影画像

本研究により，特に PC/DPPA/PEG 系の第一世代相変化ナノ液滴に関して，グリセリンを用いた凍結保存が有効であり，かつ粒径が同じである調製直後のナノ液滴とほぼ同等の超音波感受性を有することが動物実験により確認された。本章の製造方法および保存方法で調製されたものであり、均質な薬剤の供給が可能になった。

ただし，凍結保存の欠点として，術者が行なう解凍作業の個人差によって薬剤の性質が変化してしまう危険性が排除しきれないことがあげられる。直近の対策としては詳細なプロトコルを指定することで個人差を少なくすることを目指すのが、実用化をにらんだ長期的対応としては，専用の再分散キットおよび簡易フィルタシステムなどとともに提供することが有用であると考えられる。

4) 第一世代ナノ液滴 薬剤血中濃度推移および組織分布の評価

本開発項目は、生体内での相変化ナノ液滴の薬物動態を測定・解析することにより、相変化ナノ液滴の薬剤としての特性を把握し、早期実用化を図るための検討を行うことを目的としている。

これまでの検討において、小動物実験において安定した気泡生成、および腫瘍組織へのダメージが見られるのは、投与 3-45 分後に超音波照射を行った場合であり、また投与 45 分以上経過した個体への超音波照射による気泡生成は確認されていない。本薬剤が比較的速いスピードで体内から消失しているからか、または体内には滞留しているものの何らかの機序により不活化し、超音波に対する感受性が失われたからだと考えられる。前者の場合には、体内での薬の濃度が超音波によってモニタリングできることを意味する為、むしろ治療薬としては扱いやすく、実用時の広い適用範囲が期待されるが、後者の場合には、薬剤各成分あるいはそれらの体内代謝物の副作用などの検討が必要となる可能性がある。

以上のことを踏まえ、本研究では、まず本造影剤が体中でどのような動きをするのかを

薬剤学的な観点から検討して基本性質を明らかにすることを目的とした。

薬の体の中での挙動としては、大きく分けて吸収、分布、代謝、排泄の四つがある。吸収とは薬物投与から体循環への移動を表し、本造影剤は静脈内投与することを前提としているために吸収される割合は 100%である。また本造影剤の主成分であるパーフルオロカーボン(PFC)は、より一般的に体内に存在するハイドロカーボンよりも安定であり、また体内でほぼ不活性である。このため、ほとんど代謝されずに肺からの呼気によって排泄されると考えられる。このことから、本造影剤においては分布と排泄の過程を調べるのが重要である。本実験においては、マウスを用いて腫瘍臓器について組織内濃度の時間変化を調べ、分布特性を評価した。なお、ウサギの血中濃度推移については後ほど別章において述べる。

【実験方法】

組織濃度の検討においては、CDF1 マウスのオスを三京ラボサービスより購入し使用した。マウス結腸癌由来 Colon26 を皮下移植しおおむね 2~3 週間後に実験を行った。ドミトールおよびドルミカムの腹腔内投与により麻酔下に導入し、尾静脈から液滴 B を PFP 量で 20mg/kg 投与した。投与 0, 2, 15, 30, 45, 60, 90 分後に心臓から血液を採取することによる放血致死に至らしめたのち、肺、腎、脾、肝、腫瘍を採取した。組織はそれぞれ計量した後、細かく切り刻み、0.8mL の生理食塩水を含むヘッドスペース測定用バイアルに密封し、測定時まで 4℃で保管した。

上記サンプルの PFP および PFH 濃度をヘッドスペースガスクロマトグラフィー法により測定した。測定にはフォーカスオートサンプラー (GL サイエンス (図 2)-1-1-17)) を用いた。バイアルを 80℃にて 10 分攪拌処理した後、上部ガスをガスクロマトグラフに注入し分離したピークを得た。代表的なクロマトグラフを図 2)-1-1-18 に示す。



図 2)-1-1-17 オートサンプラーとガスクロマトグラフ装置

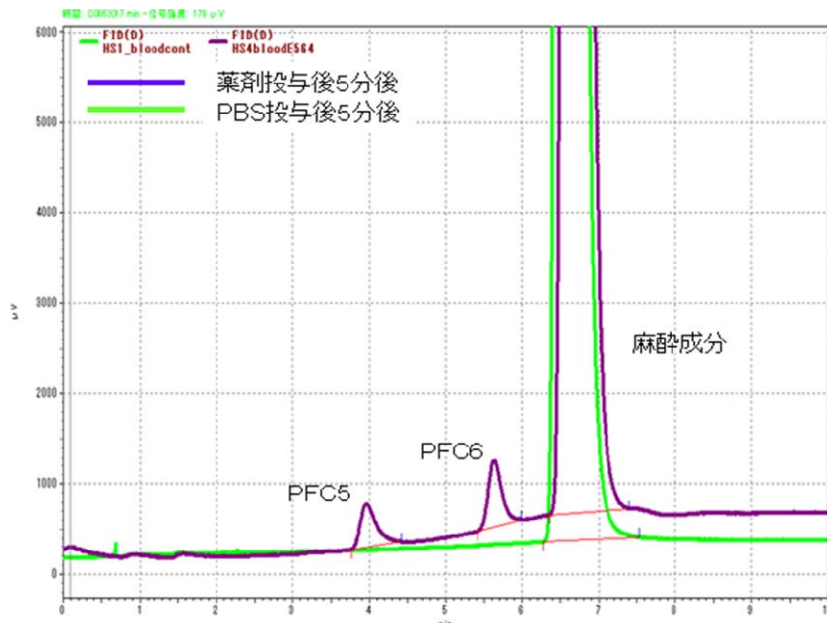


図 2)-1-1-18 クロマトグラフ例

ピーク値のエリアを、既知の濃度のサンプルを用いて得られた校正曲線に当てはめ PFP および PFH の濃度を求めた。

【結果と考察】

図 2)-1-1-19 にマウスの組織中 PFP および PFH の濃度推移を示す。90 分後にすべての臓器での濃度が定量検出限界 (LOQ) 以下に達した。また、脾臓を除いて、PFP と PFH それぞれの濃度推移 (平均値の経時的増減) は共に同じ傾向を示した。血液、肝臓、腎臓では、PFP、PFH とともに投与 2 分後の濃度が一番高く、投与後時間がたつとともに減少をしていく傾向が見られた。一方、脾臓においては、PFP は血液と同じような傾向が見られたのに対し、PFH 濃度は投与直後から 45 分後にかけて平均 $63\mu\text{g}/\text{mL}$ から $146\mu\text{g}/\text{mL}$ とほぼ 2 倍の増加が見られた。肺では、PFP、PFH とともに似たような傾向を示しており、投与直後か初期値から個体差の範囲内の緩やかな減少傾向を示した。腫瘍内濃度推移の傾向は多臓器との類似が見られない。投与 2 分後の腫瘍内 PFP 濃度は $3.3\mu\text{g}/\text{mL}$ と血中濃度の $127.6\mu\text{g}/\text{mL}$ に比べ 2% であるが、30 分後には腫瘍内 PFP 濃度は $2.6\mu\text{g}/\text{mL}$ と血中濃度の $12.5\mu\text{g}/\text{mL}$ に比べ 20% に上昇している。

図 2)-1-1-20 に 2, 30, 60 分後の PFP および PFH の組織分布量の推移を示す。PFP、PFH とともに、肺に最も多く分布しており、次に脾臓に多く分布していることがわかった。

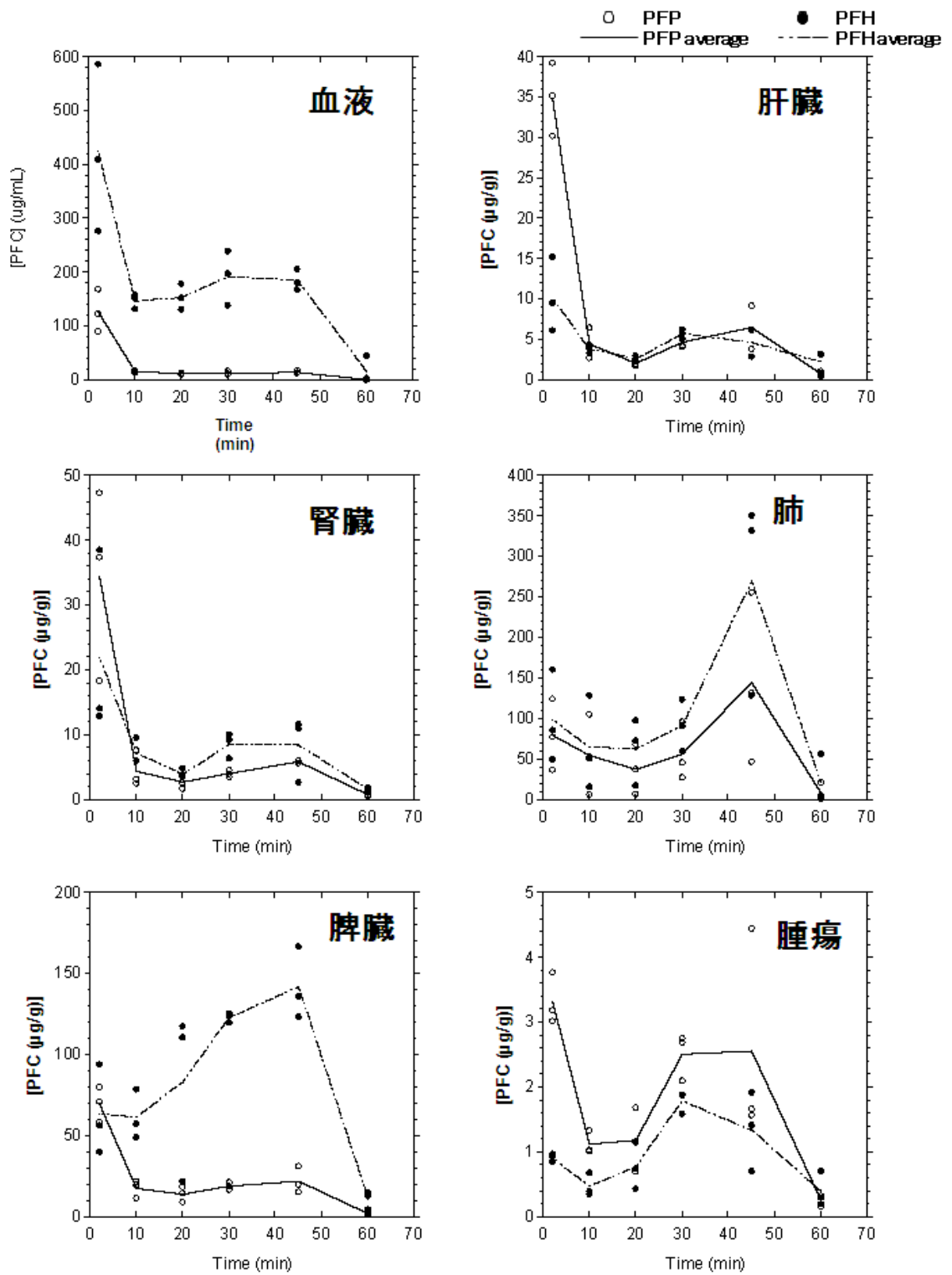


図 2)-1-1-19 マウスの組織中 PFP および PFH の濃度推移

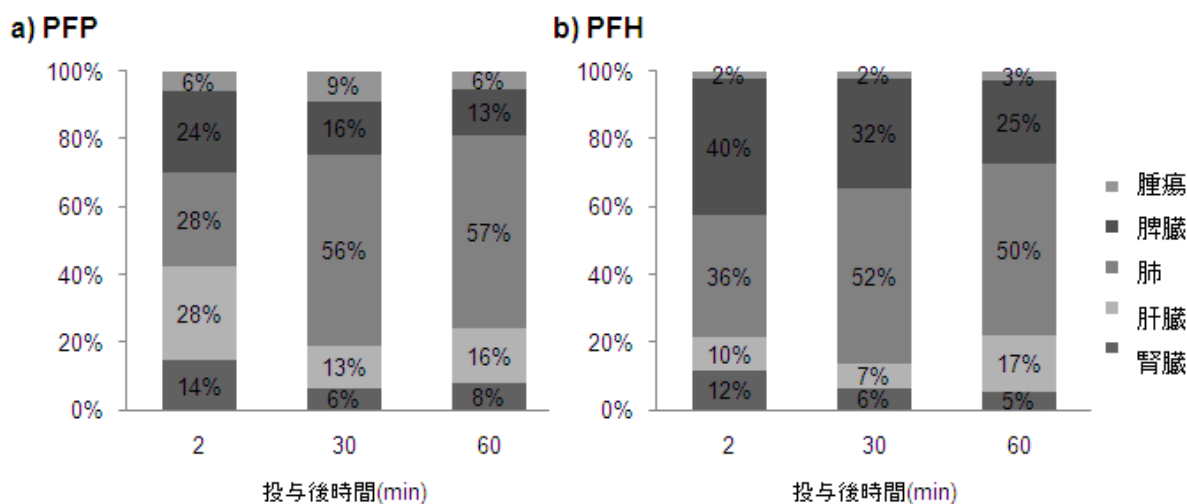


図 2)-1-1-20 PFP および PFH の組織分布量の推移

マウスを用いた組織濃度検討の結果から、液滴中の PFP および PFH は血中から肺に移行し、呼気として排出されていることが示唆される。液滴投与直後から、PFC 循環血量が豊富な主な組織の中では肺に最も多くの PFC が分布しており、投与 30 分後には 50%を超えている。PFH の沸点は 59℃であるにも関わらず、肺から多く検出されている理由としては、PFP と混合することにより共沸的な現象が起これり、PFP と PFH の中間的な物性が混合物に与えられたからと考えられる。肺の次に薬剤が多く分布しているのは脾臓であり、特に PFP はより多く取りこまれている。ほかの主要臓器は脾臓を除き血液濃度と同じ傾向を示しており、顕著な薬剤の取り込みは見られない。脾臓は組織内に存在するマクロファージにより肝臓と同様に微粒子などの異物を捕捉することから、このマクロファージの機能により脾臓内の液滴濃度が他の臓器よりも高いのではと考えられる。肝臓にもマクロファージの機能は存在するが、高分子でステルス化された 200 nm 以上の粒子の脾臓による取り込みは、肝臓のクッパー細胞による取り込みに比べて一桁程度高いことから、本結果は妥当であると考えられる。

また、特に脾臓における結果で顕著なように、PFP に対する PFH の重量比が時間経過と共に著しく変化していることから、相変化ナノ液滴は必ずしも投与時の状態を保ったまま血中に存在しているのではないということが示唆される。血中での PFP と PFH の他の存在形態として考えられるのは、部分的なガス化による液体・気体混在液滴、界面活性剤と分離したフリーな PFC (液体あるいは気体) およびそれらが血中成分により安定化されたもの、血中に溶け込んだフリーな PFC, などが考えられる。このような形態の変化による PFP と PFH との組織内濃度比の変化については、一度 *in vitro* に立ち返り、各形態における過熱状態の変化等のデータを取得した上で議論する必要がある。例えば体内での過熱状態の変化により、(ガスを含む) サイズの大きな微粒子が生成し、それが脾臓に蓄積され、さらに徐々に血液中に拡散していき、最後に肺から体外に排出されるといった機序が考えられる。

なお、マウス皮下腫瘍の治療時に、相変化ナノ液滴投与後 45 分に超音波を照射した場合には一定の治療効果が見られるのに対し、投与後 1 時間に超音波照射した場合、治療効果は見られないことから、治療有効限界濃度は血中濃度で 14.5 μ g/mL から 1.1 μ g/mL の間に、腫瘍組織濃度相当で 2.6 μ g/g から 0.2 μ g/g の間にあると推察される。

6) 第一世代ナノ液滴 液滴毒性の評価

前臨床試験、さらに実用化に進むにあたって、半数致死濃度、最大耐用量等を知る必要性がある。

一般症状の観察と組織の病理学的検証

今後製薬メーカー等と共同で開発していくことが必要不可欠になると考えられるが、この際、提示するデータは客観性が高くなければならない。このような理由から、実績のある安全性受託機関（株式会社 ボゾリサーチセンター、本社東京）に毒性試験を外注依頼した。以下に報告書（英語）からの抜粋を記載する。

In this study, acute toxicity of this article by single injection was investigated in rats. Test article at a single dose of 200, 80, 32 and 12.8 mg/kg was intravenously infused at a rate of 1 mL/minute into male and female Sprague-Dawley (SD) rats. In the animals treated with 200 mg/kg, 7 of 10 males and 3 of 10 females died on the day of administration. Animals treated with 200 and 80 mg/kg showed acute symptoms related to respiration such as increased respiration and/or labored respiration soon after administration. Subsequently, most of these animals showed decreased activity, prone position, pale skin and partially closed eye. In the animals treated with 32 and 12.8 mg/kg of test article, any abnormalities were not observed. In the necropsy, there were test article-related gross changes which included marked distension with gas of the lung in all found dead rats, and foamy fluid in the trachea of one female found dead rat. The gross findings in the lung were correlated with histomorphologic findings of marked diffuse distension of alveoli with or without focal congestion, and these findings were considered related to the cause of deaths. Another test article-related histomorphologic change was observed in the kidney of one female rat, and was characterized by eosinophilic proteinaceous casts in the tubules. Toxicokinetic analysis revealed that perfluoro-n-pentane (test article) was disappeared from blood very rapidly with biphasic manner with peak blood concentration at 5 minutes. More than dose proportional increases were observed in both AUC and Cmax. Significant sex difference was not observed in toxicokinetics of perfluoro-n-pentane.

In conclusion, LD50 values of phase change nano droplet (PCND) by single intravenous injection were estimated as 80 mg/kg < LD50 \leq 200 mg/kg in males and 200mg/kg \leq LD50 in females. Maximum tolerated dose were 80 mg/kg in which no death and no test article related histomorphologic changes were observed although some transient clinical signs

were shown. Toxic clinical sign and test article related histomorphologic change were not observed at 32 mg/kg. There was no apparent gender difference in single dose toxicity of PCND in SD rats.

まとめ

ナノ液滴の主成分であるパーフルオロカーボンを包むシェル部のPEG化リン脂質の組成を、現在人体への利用が承認されている化合物の中から最適化した。検討の結果、PEG付リン脂質、レシチンに加え、脂肪酸を10mol%程度含む組成を用いることにより、平均粒径が300-400nmで、かつPFC内包率が83%の液滴を得た。ロータリーエバポレーターや高圧入荷装置用冷却装置を導入し、高圧乳化装置の定期メンテナンスを図ることにより、大動物実験や安全性試験用に必要なナノ液滴を一日（8時間）で最大150mL調製しうる環境を整えた。さらに、調製した液滴はグリセリン20%溶液中で-25度以下で保存することにより、約2か月間という長期保存安定性を実現し、実験先へ安定して供給することが可能となった。上述の液滴をマウス体内に静脈投与したとき、投与直後から45分程度の時間、診断用の超音波パルス照射したときに、腫瘍内で気泡化することが確認された。さらにガスクロマトグラフィーで観測された腫瘍内（含む血液）のPFC5濃度は2ug/mL（液滴換算で 5.5×10^6 個/mL）存在することになり、目標値であった治療に必要とされる液滴個数（ 2×10^3 個/mL）を 10^6 個/mL大きく上回る。

相変化用超音波シーケンス

背景

一般的に医用超音波(周波数:2~10MHz)と組み合わせて用いられる造影剤は、ミクロンサイズの気泡を界面活性剤で安定化した直径1~5 μm のマイクロバブルである。マイクロバブルは、超音波照射に対して特徴的な非線形応答を示したり、共振したりすることから造影効果が高い。しかし、粒径が大きすぎるため、血管の造影には優れているものの、組織への透過が困難であり、腫瘍の造影には不適である。また、血管透過性をもつまでにマイクロバブルの粒径を小さくした場合、超音波に対する応答性が極めて低くなり、十分な造影能は得られない。そこで、腫瘍到達性を持つ上に、十分な超音波応答性を持つことを目的として、相変化ナノ液滴を開発している。相変化ナノ液滴は、液状パーフルオロカーボン(PF)を界面活性剤によって安定させ、直径200nm程度のエマルジョン粒子にしたものであり、概念図を図2)-1-2-1に示す。このナノ液滴の主成分である低沸点の水難溶性物質は、一種の過熱状態にあり、ナノ微粒子化により1気圧における沸点より高い温度において液体状態に準安定化されている。この過熱状態を超音波刺激で解消して沸点を本来に戻し、マイクロバブルへ相変化させる。また、マイクロバブルは、その共振周波数域の超音波エネルギーを、治療効果に利用可能な不可逆変化を引き起こすエネルギーに、効率的に変換することができる。そこで、刺激により腫瘍部位にマイクロバブルを発生させた後、より高エネルギーの治療用超音波を照射することによって、マイクロバブルによる超音波エネルギー変換に起因する治療効果を発生させることができる。

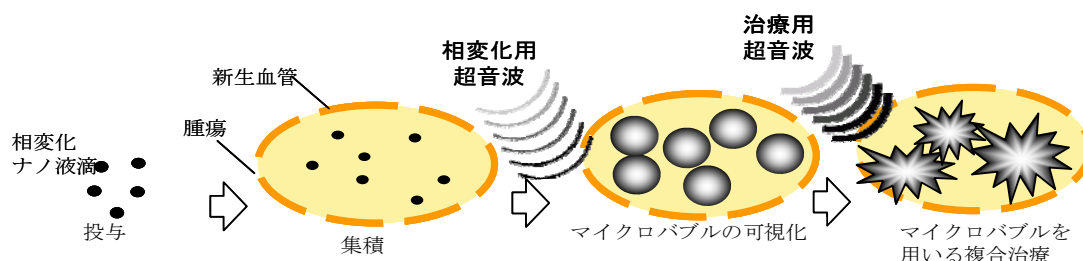


図2)-1-2-1 相変化型ナノ液滴の概念図

ナノ液滴を相変化させる物理刺激としての超音波に関しては、日立製作所による研究以前にはほとんど検討が進んでおらず、特に、本研究開発のように複成分系を用いる系に関してはまったく研究例がなかった。本開発以前の研究においては、相変化型ナノ液滴からのマイクロバブル生成を行うための超音波照射は、まず、基礎検討としてもつぱら数10W/cm²程度の比較的低強度超音波を用いる照射シーケンスにより行ってきた。しかしながら、このような低強度超音波では、相変化を生じるのに超音波を連続で10ms以上照射する必要があった。

相変化型ナノ液滴の医療応用形態として、そのEPR効果にもとづく腫瘍選択性を利用した超音波撮像モードと、相変化により生成されるマイクロバブルの超音波生体作用増幅効果を利用する超音波治療モードの両方を念頭におくと、前者では、相変化用超音波は、

超音波診断装置とそれに付属する撮像用超音波探触子により照射されることが望ましい。一方、後者では、通常、治療目的腫瘍を照準するための超音波撮像を行う超音波診断ユニットに、治療用強力超音波を発生する超音波治療ユニットが組み合わせられて構成された装置を用いるので、相変化用超音波照射は、超音波診断ユニットにより照射される形態に限られず、超音波治療ユニットによる形態であってもよい。

超音波診断ユニットと超音波治療ユニットとを超音波照射能力について比較すると、照射可能な超音波周波数帯域幅あるいは短パルス性においては超音波診断ユニットが優れるものの、超音波の瞬時強度および定格出力においては超音波治療ユニットが優れている。相変化が可能であるかどうかを決定する要素としては、後者がより重要であると予想されたので、相変化に適したシーケンスを超音波診断ユニットによって照射するという制限の下で開発しておけば、そのシーケンスを、超音波治療ユニットによる照射に応用するのは容易であると考えられた。そこで、本開発では、その順番に従って相変化に適した超音波照射シーケンスを開発した。本章では、日立製作所中央研究所と共同して同研究所の設備を用いて行った超音波診断ユニットによる相変化照射シーケンスの研究開発について記す。

研究開発の目的

相変化型ナノ液滴を相変化させるにあたり、物理刺激を与え、相変化が生じたことを検出し画像化するために、超音波診断装置を用いる。これには、相変化に適した照射シーケンスだけでなく、相変化により生成されたマイクロバブルの選択的な可視化に適する画像処理および画像表示手法についての検討が必要となる。

図 2)-1-2-2(a)に通常のBモードで得られる相変化超音波照射時エコー画面の一例を示す。フォーカス上(矢印)で相変化によって生成した泡由来の高輝度の信号が観察されるにもかかわらず、周囲の組織由来の信号との区別が非常に付きにくい。即ち、図 2)-1-2-2(a)の撮像条件では、組織境界などの強いエコー源からの信号レベルと、相変化により生成されたマイクロバブルをエコー源とする信号レベルがほとんど等しいため、両者の峻別が困難になっている。一方、相変化型ナノ液滴が低濃度で患部に存在する場合には、組織由来の信号に埋もれてしまい診断に必要な感度が十分に得られないことも考えられる。したがって、本ナノ液滴の実用化に当たっては、まず相変化によって生成したマイクロバブル由来の信号を効率的に抽出することが必要となる。さらに、加熱凝固治療用増感剤として作用させるためには相変化型ナノ液滴が患部に集積していることが必須であり、十分に薬剤が集積したタイミングを見計らうために、輝度と薬剤濃度の相関性が取れていることが必要である。

これまでの研究では相変化によって生成したマイクロバブルの濃度に対して定量性をもった画像を得るために、ある一定時間のフレーム間輝度差分ピークホールド値を使用した(以下、フレーム差分法と呼ぶ)。図 2)-1-2-2(a)と同じ画像をフレーム差分法で処理したものを図 2)-1-2-2(b)に示す。この方法はフィルタおよびシーケンスに工夫をして相変化マイクロバブル成分と組織成分を区別しているわけではないが、時間方向に積算することによって図 2)-1-2-2(a)では不明瞭であった組織境界部位と相変化部位の区別がやや明瞭にな

っている。フレーム差分法にて得られた相変化由来の信号強度は、そこに存在するナノ液適量と線形の関係にあることが *in vitro* で確認されているが、本手法では体動による影響が無視できない上に、時間方向に加算することで S/N 比を改善しているため、リアルタイム性が損なわれてしまうという問題がある。また仮に高エコーな組織部位（図 2）-1-2-2(b) 中矢印部位）で相変化が起きた場合には、相変化由来の信号を区別することは困難であり、組織成分を取り除いているわけではないため、組織からの信号が混在する部位では相変化由来信号の定量的評価ができない。

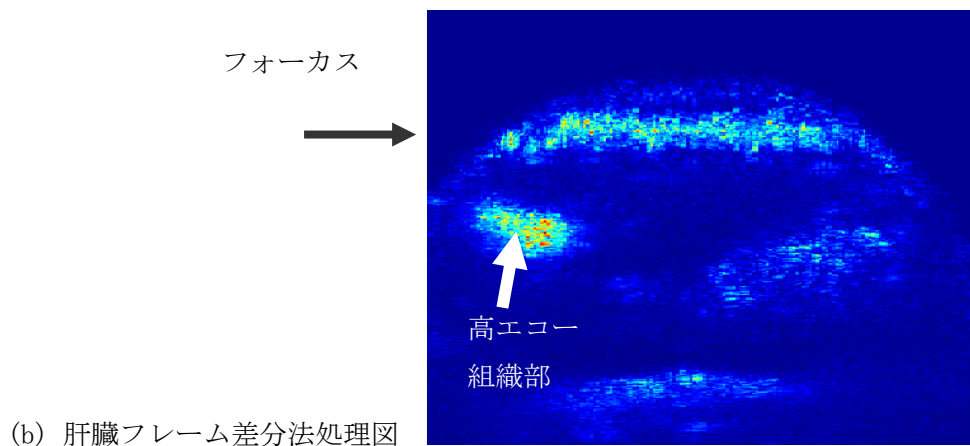
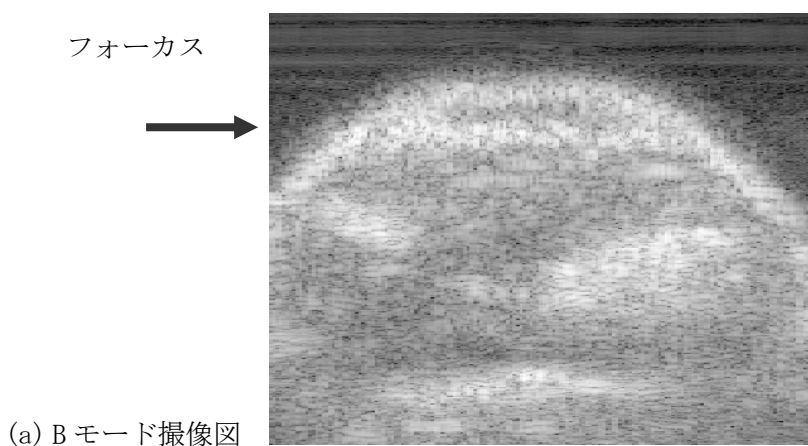


図 2)-1-2-2 相変化型ナノ液滴投与マウス肝臓

これらの問題点を踏まえ、本研究開発では、リアルタイム性を保持しながら、相変化ナノ液滴の到達しているところのみを確実に区別して画像化する手法を確立することを目的とした。

方法

1) 撮像手法

上述目的を達成するために、我々は相変化の生じるスピードに着目して検討を行なった。相変化型ナノ液滴に相変化用超音波が照射されて液相から気相へと変化した際、液滴の物理的变化に伴った音響的变化がカオス的に生じる。その相変化に起因する変化スピードは20~100kHz であり、人間および実験動物の生体由来の動きに対して数千倍のスピードを持つ。従来法では20~60Hz フレーム間差分を基本としているため、生成もしくは消失した泡の変化も捉えるが、それと共に体動の影響も十分に受けている。kHz オーダーの動きのみの画像化手法が得られれば、相変化起因の信号の差別化が可能と考えた。

超音波のBモードでは2次元の断層像が得られるが、これは、パルス超音波ビームを送信し、対象から戻ってきたエコー信号を受信し、送信から受信までの時間を元にパルス照射方向について距離とエコー信号強度分布との関係を算出するという一連の操作を、パルスの送信方向を走査することで実現している(図2)-1-2-3(a)) [5]。そのため1枚の2次元画像表示に必要な時間は、走査するビームの本数(約100~300本)に比例する。相変化の可視化のために2次元画像同士の差分情報を用いる方法では、同一の部位に着目するとき、ある時間のエコー情報と、その後パルス超音波が照射されてからビームの走査本数分の時間が経過してからのエコー情報とを比較することになる。この方法に対し、パルス超音波を続けて2度同じ方向に送信してエコー信号を受信し、それらの差分をとる方法を比較すると、ビームの本数分の時間が短縮されるため、後者は前者の1/100~1/300の短い時間での変化を追うことが可能である(図2)-1-2-3(b))。前者が2次元画像(フレーム)単位の差分であるのに対し、後者はフレームを構成するビーム単位の差分であり、表記上ビーム方向をラスタ方向と呼ぶため、ラスタ差分と呼ぶことができる。本報告ではこのラスタ差分法の有効性をファントムおよび動物を用いて実験的に検証する。

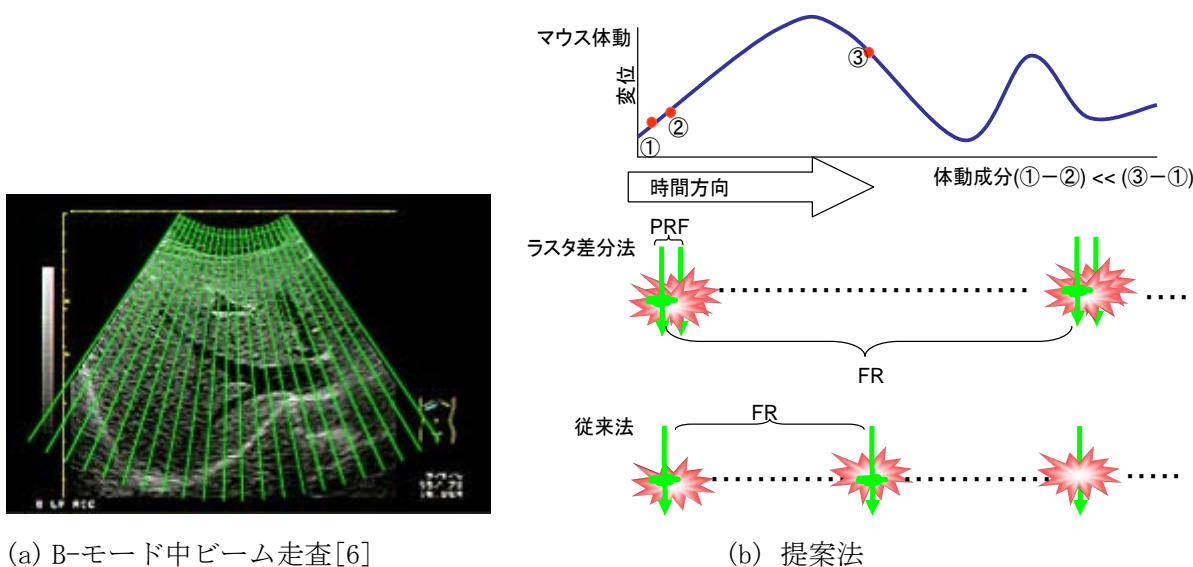


図2)-1-2-3 撮像手法

2) 試薬

ナノ液滴調製に用いた大豆由来ホスファチジルコリン、ポリエチレングリコールまたは

PEG 化ジステアрилホスファチジルエタノールアミンは日本油脂から、コレステロールは和光純薬工業から入手した。内包したフルオロカーボンには Fluorochem 社製の製品を利用した。

ファントム評価に用いたゲルの原料であるアクリルアミド、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、過硫酸アンモニウム、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミンはすべて和光純薬工業から入手した。使用した粉末酸化チタン (MT-150W) はテイカコーポレーションのものを利用した。

3) ナノ液滴の調製、ファントム評価

本実験に用いられた相変化型ナノ液滴は以下の成分を含む。

Phosphatidylcoine (soybean)	4.4 mM
Cholesterol	2.2 mM
Distearoylphosphatidylethanolamine - 5000 Peg 付	2.8 mM
Perfluoro-n-pentane (PFC5)	3.75 % (v/v)
Perfluoroheptane (PFC7)	1.25 % (v/v)
PBS pH 7.4	20 mL

調製の概略を以下に示す。クロロフォルムに溶解した脂質を含む試験管を 35℃の水槽に入れ減圧下でクロロフォルムを除去し脂質の薄膜を得る。PBS20mL を加え、超音波ホモジナイザ処理により脂質リポソーム溶液を得る。このリポソーム溶液にさらにパーフルオロカーボンを加え常圧ホモジナイザでエマルジョン化した後、高圧ホモジナイザによる 150kpsi の圧力での高圧乳化処理により、サブミクロンサイズのエマルジョンが作成される。得られたエマルジョンは使用前に 1.2 μm メンブレインフィルターを通した。ナノ液滴の主成分であるパーフルオロ-n-ペンタン (PFC5) の濃度はガスクロマトグラフィーにより測定した。

生体を用いた評価に先立ち、アクリルアミドゲルを使用したファントム実験を行った。ファントムの組成は以下の通りである。

アクリルアミド	4.7%
N,N'-メチレンビスアクリルアミド	0.12%
過硫酸アンモニウム	0.36%
N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン	0.36% (v/v)
希釈エマルジョン溶液	35.4nM
TiO ₂ (*)	6%
脱気済み milliQ 水	

(*) 対照実験において、組織からの音響信号の模擬用にエマルジョンに代えて使用

また、相変化に伴う音響的変化の定量的評価を行う際には、希釈エマルジョン溶液濃度を 17.7nM、70.8nM、141.6nM に変化させて実験を行った。

4) *in vivo* 実験法

今回生体中の相変化型ナノ液滴の評価として、雄性 CDF1 マウスを用いた動物実験を行った。肝臓での造影能評価では約 5~8 週令のマウスを用いた。腫瘍での造影能評価で使用

したマウスは5週令のときに colon 26 を移植し、2~3週間後の腫瘍直径が約2cmとなった時に実験に用いた。麻酔下のマウスの尾静脈に、生理食塩水を用いて167 μ M (PFC5量を基準とする)に希釈したナノ液滴を投与した後、投与約10分以内に37 $^{\circ}$ Cに維持された脱気水中にて超音波を照射した。また、相変化に伴う音響的変化の定量的評価を行なう際には、投与濃度を83.5 μ M、167 μ M、334 μ Mにそれぞれ調製して、同様に照射、撮像を行なった。

5) 撮像・画像化方法および解析方法

ラスタ差分画像法を実験的に評価するためには、同一ラスタ方向に対して2つの同じ波形を送信したのち、受信信号間の差分情報を画像化する必要がある。このような画像化の実現方法として、超音波診断機装置(日立メディコ社製 EUB-8500)の照射シーケンスを以下に述べる2通りの方法で改造し、実験に使用した。

① 送波多段フォーカスマードの改変:

送波多段フォーカスマードとは、ラスタ毎に、深さが異なる2~4点にフォーカスして順に送波を行うものである。通常異なった深さに設定するところをあえて同一にすることで、1ラスタ毎に複数の同じ波形を送信することが可能となる。今回、2回同一の波形を送波し、目的を達した。受信波はオフラインで信号処理を行なった。ラスタ差分をとるためには、複素数により表された受信信号振幅の実部・虚部について以下の計算を行なった。

$$\sum \sqrt{(\text{real}_{2n+1} - \text{real}_{2n})^2 + (\text{imag}_{2n+1} - \text{imag}_{2n})^2}$$

② パルスインバージョンのモード変更:

通常のパルスインバージョンモードでは同一ラスタ方向に対して位相の反転した2つの波形を送信し、受信信号を加算処理して画像化する。これは装置上でTPI(Transmitting Pulse Inversion:送波パルスインバージョン)と設定されている。これとは異なり、同一波形の2波を送受信後、一方の受波を反転し加算するRPI(Receiving Pulse Inversion: 受波パルスインバージョン)が内部的に用意されており、ラスタ差分と実質的に同じである。今回このRPIモードを使用した。

なお、本実験では日立メディコ製超音波診断装置 EUB-8500 およびリニアプローブ EUP-L53Sを用いてデータの取得を行い、専用RF出力基盤より出力し、PC上のMatrox Meteor II Digital Inputボードで取り込んだ。送波超音波出力条件は周波数7.81MHz、波数4波、振幅85~60V、パルス照射時間は1秒、PRF8.0kHzである。オフラインの信号処理、画像解析にはMATLAB[®]を使用した。実験装置のセットアップは図2)-1-2-4に示す通りである。

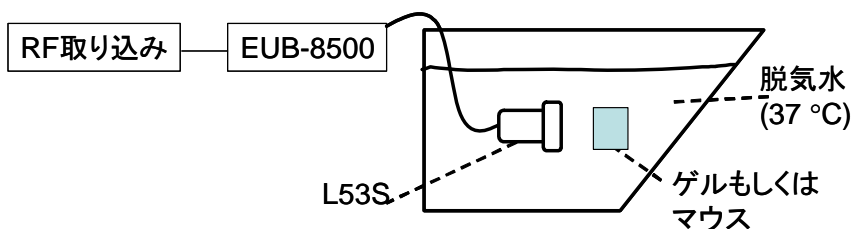


図2)-1-2-4 実験セットアップ

結果

1) ラスタ間差分イメージング原理検証

初めに、ラスタ間の差分により相変化型ナノ液滴由来の信号が残り、かつ他の組織由来の信号を消去することが可能かをファントム実験にて検証した。相変化型ナノ液滴を封入したファントムゲル、および組織を模擬したファントムゲルを水槽に固定した状態で、多段フォーカスモードを使用して超音波を照射し、データを取得した。差分前の生データのRF信号強度分布図(非差分像)と拡大図、隣接ラスタ間差分を行った後の信号強度分布図(差分像)、隣り合ったラスタ間の受波波形とその差分を図2)-1-2-5に示す。

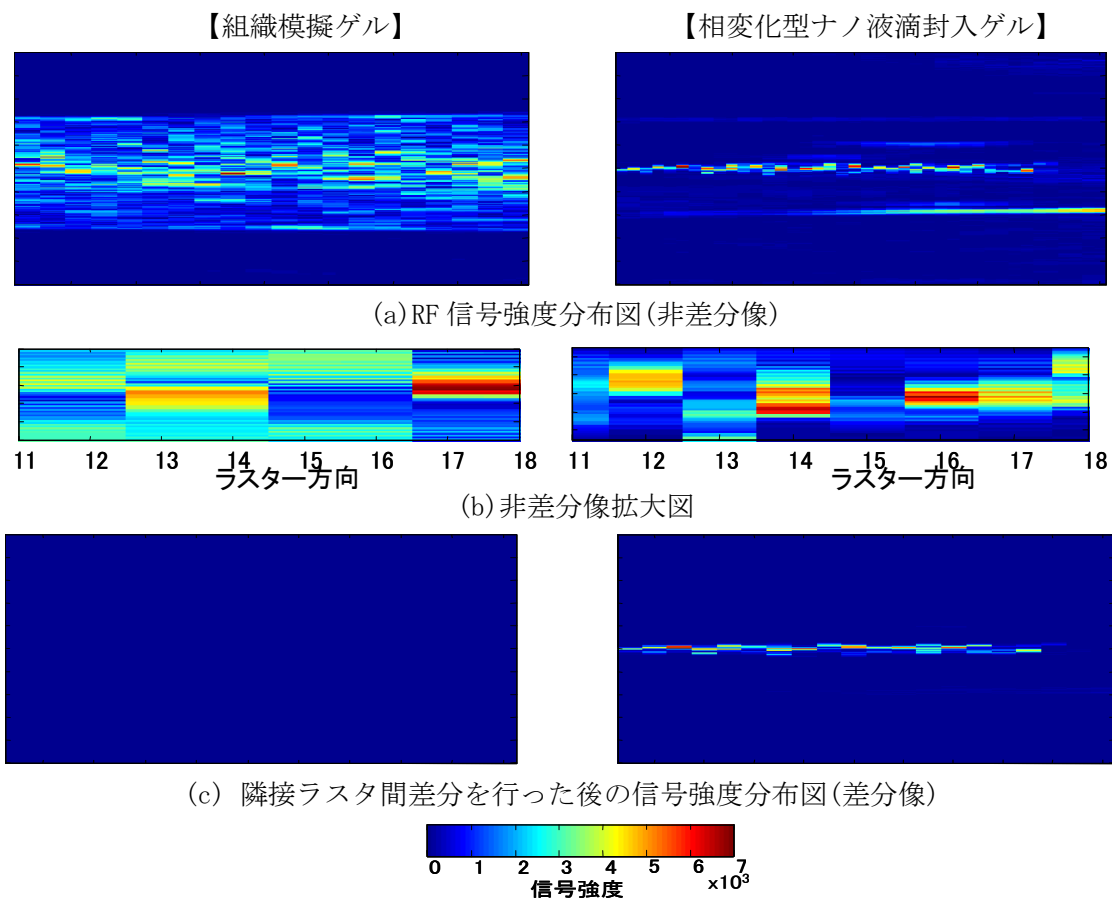
まず、組織模擬ゲルについて見ると、非差分像ではエッジ部の輪郭から中身まではっきりと見えているが、差分像ではほぼ消えている。また、非差分像拡大画像において、ラスタ番号 $2n-1$ と $2n$ が全く同じ応答を示している。ラスタ番号9と10における実際の受波の実数成分およびその差分を図2)-1-2-5(d)に示すが、ラスタ番号9と10が全く同じ波形を持ち、差分はほぼゼロであることがわかる。

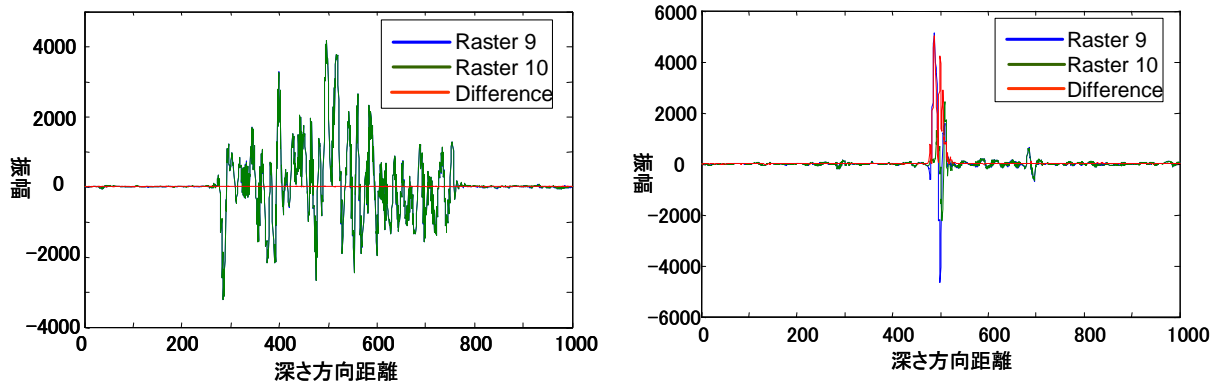
一方、相変化型ナノ液滴封入ゲルの非差分像では水とほぼ同じ音響特性を持つ透明なアクリルアミドゲルの境界線がうっすらと観察され、さらに焦点線上(画面中央)では相変化によって生成した気泡が観察される。相変化部位を拡大したところ、隣り合ったラスタ間でも違った応答を示しており、同一ラスタの2回のパルス間(PRF8.0kHz)に何らかの信号強度変化を伴う現象が起こったことが示唆され、この現象はナノ液滴の相変化による「動き」であると考えられる。ラスタ差分画像ではこの「動き」のあった相変化部位のみが抽出され、ゲルの輪郭はほぼ消えている。これは隣り合ったラスタ間の受信波形を見ても明らかであり、輪郭成分である深さ方向約630の位置付近では差分がほぼゼロに等しいのに対し、深さ方向約500の焦点部位では有意な差分信号が観察された。さらに、差分成分の振幅は信号の振幅の絶対値と同程度の大きさであった。これらの結果から、ラスタ差分法によれば「動き」のない反射体からの信号はお互いに打ち消しあって画像化されない一方で、相変化成分はほぼ同じ輝度値を保った状態で画像化することが確認された。

2) マウス実験結果

前節で述べたラスタ差分画像化手法の生体での有効性を、マウスを用いて検証した。実験系は前記の通りであり、前節のファントムがマウスに置き換わった形になっている。差分前の生データのRF信号強度分布図(非差分像)と組織部位と相変化部位それぞれの拡大図、隣接ラスタ間差分を行った後の信号強度分布図(ラスタ差分像)、隣り合ったラスタ間の受波波形とその差分を図2)-1-2-6に示す。図2)-1-2-6(a)中にはプローブのフォーカス位置も矢印で合わせて示してある。非差分像では、体表の輪郭部位からの信号と相変化に由来する信号とが重なって見えていることがわかる。一方ラスタ差分画像においては、フォーカス部位のみで信号が得られており、ナノ液滴成分のみが選択的に表示されていると考えられる。非差分像の拡大図(図2)-1-2-6(c)および(d))において顕著に見られるように、組織部位は隣接ラスタが同じ応答を示しているのに対して、相変化部位は違う応答を示して

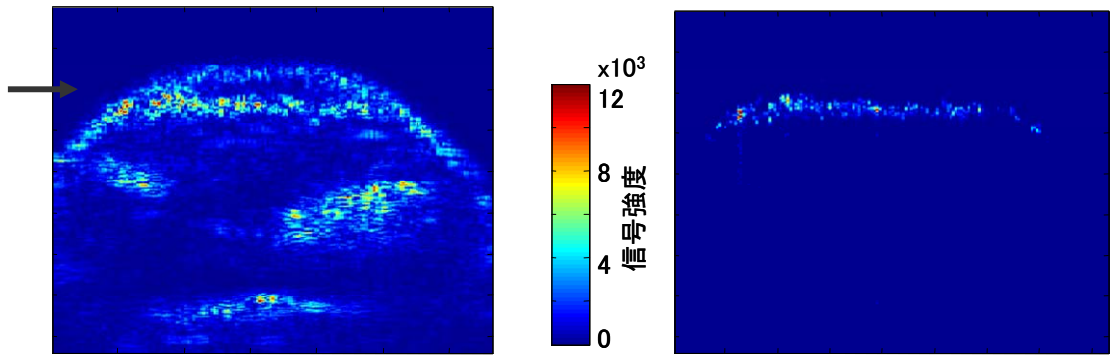
おり、このような応答の違いが図 2)-1-2-6(a), (b)に現れていることになる。また、図 2)-1-2-6(e)に示す隣接ラスタの受信波差分においても、深さ方向約 200 付近の焦点部位でのみ明らかな信号が観察されている。これと対照的なのが、深さ方向 700~800 付近の位置に存在する相変化部位よりも高い振幅を示した組織部位の信号であり、ラスタ差分によってほぼ打ち消されている。さらに、相変化部位の差分成分の振幅は信号の振幅の絶対値と同程度である。これらの結果から、ラスタ差分法によれば、激しい体動を伴うマウス肝臓部位においても、組織成分はお互いに打ち消しあい画像化されない一方で、造影成分はほぼ同じ輝度値を保った状態で画像化することが確認された。





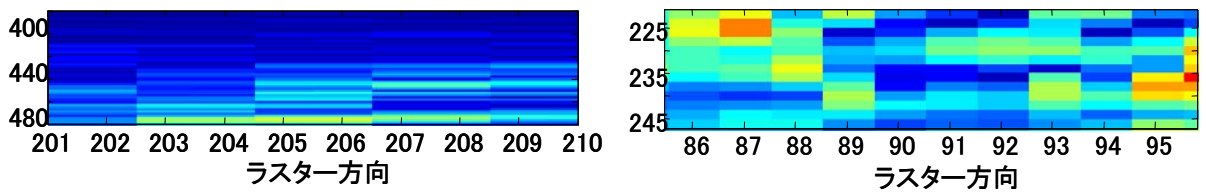
(d) 隣接ラスタ受信波形比較とその差分

図 2)-1-2-5 ナノ液滴、組織ファントムゲル結果

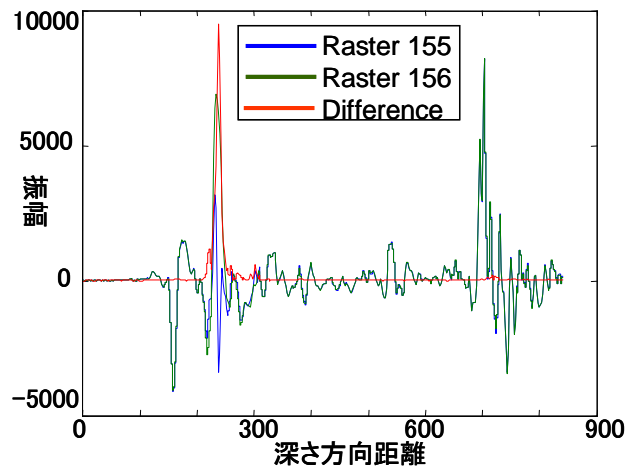


(a) RF 信号強度分布図(非差分像)

(b) 隣接ラスタ間差分を行った後の
信号強度分布図(差分像)



(c) 非差分像拡大図



(d) 隣接ラスタ受信波形比較とその差分

図 2)-1-2-6 相変化型ナノ液滴投与マウス結果

図 2)-1-2-7 に非差分像、ラスタ差分像、従来法であるフレーム差分像で表示したマウス肝臓図と白点線で示したラスタのクロスセクション輝度値の分布を示す。使用超音波プローブのビームパターンから、フォーカスの最大値から 6dB 以内の信号強度を持つフォーカス領域は、短軸方向に約 2mm 程度であり、これはサンプリング周波数を 31.25MHz、音速を 1500m/s と仮定したとき、深さ方向距離 90 に相当する。そこで、深さ方向で 200~290 までを焦点領域とし、領域内で得られた最大値を相変化由来の信号値、それ以外の領域で一番高く得られた値を組織および体動由来のノイズ値として S/N 比を計算したものを表 1 に示す。Single Raster は図 2)-1-2-7 に示したラスタ単体での S/N 比、Average では画面すべての領域の S/N 比をとったものである。

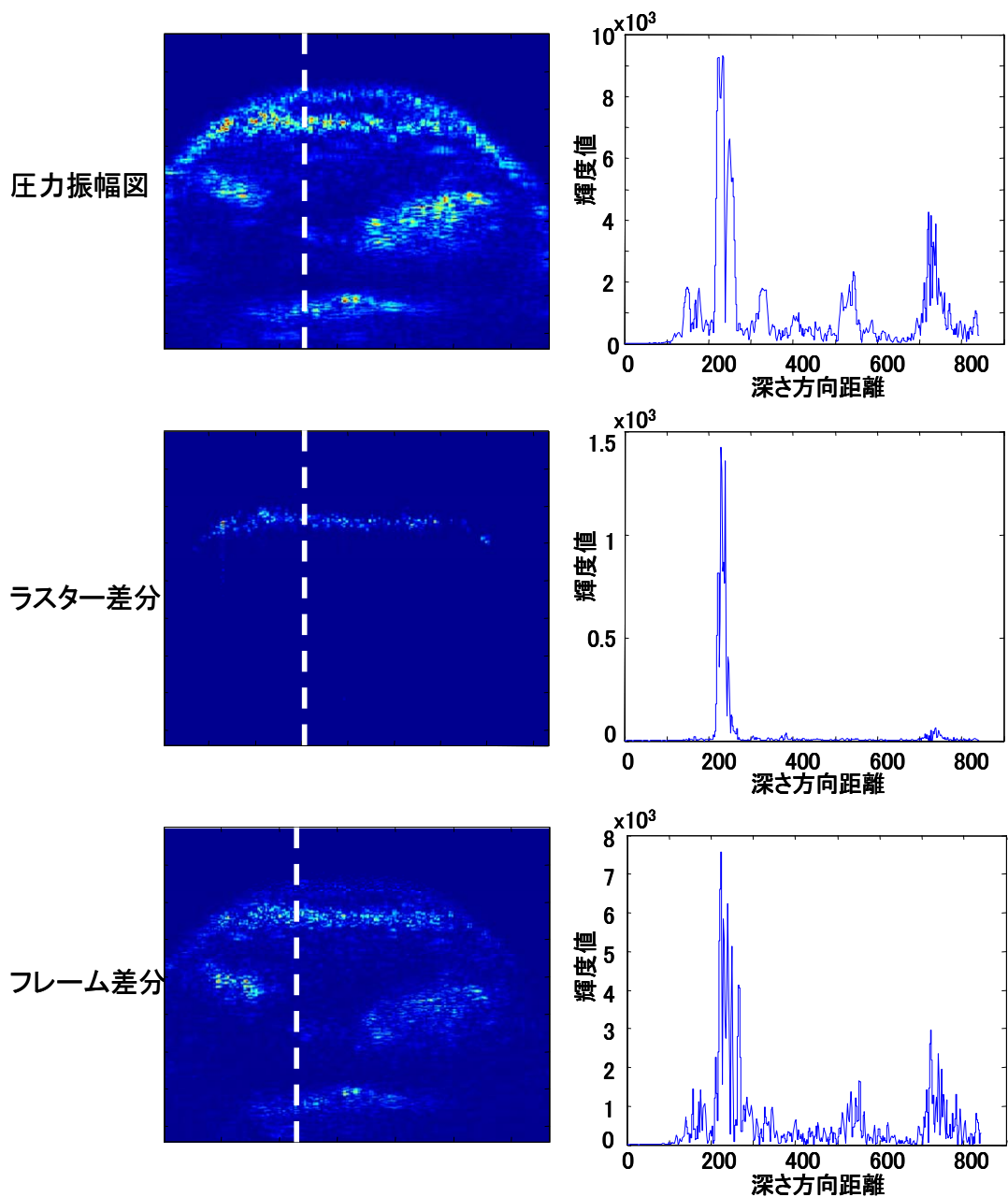


図 2)-1-2-7 画像化手法による S/N 比の違い

もともとの非差分像では S/N 比が約 2 倍であり、フレーム差分により S/N 比は約 20% 上昇した。これに対しラスタ差分を適用した場合の効果は著しく、非差分像に比較して 10.6 倍 (Single Raster)、フレーム差分と比べても 9.1 倍の S/N 比向上が見られた。表 1 に示す非差分像と差分像との輝度絶対値を比較すると、シグナル成分が 1/7 に減少しているものの、それ以上にノイズ成分が約 1/70 に抑えられている。すなわち今回の S/N 比向上はナノ液滴信号を感度よく検出した (Signal の増加) のではなく、ノイズ成分を極端に抑えたことに起因すると言える。

表 2)-1-2-1 画像化手法による S/N 比の違い

画像解析手法	Single Raster			Average		
	Signal	Noise	S/N	Signal	Noise	S/N
圧力振幅図	9929	4264	2.18	8367	4935	1.70
ラスタ振幅差分 法	1425	62	23.14	978	46	21.29
フレーム差分法	7563	2963	2.55	5267	2774	1.9

3) 定量性に関する検討

相変化ナノ液滴の「動き」に由来する信号成分を抽出していると考えられるラスタ差分によって得られる信号強度と、実際に着目領域に存在する相変化ナノ液滴の濃度に相関関係が成り立つかどうかの基礎検討をゲルファントムおよびマウスを用いて行なった。なお、本節においては、ラスタ差分信号強度は、相変化部位 (ROI) における信号強度からサンプル (ゲルあるいはマウス) 領域外に設定したノイズ領域の平均値を引いた値を用いている。

検討を行うにあたり考慮した、ラスタ差分信号強度の時間推移に関する 2 つのパターンのそれぞれの典型例を図 2)-1-2-8 に示す。図 2)-1-2-8(a) は、ゲル中相変化ナノ液滴の濃度が濃いか、または照射電圧が高く、激しく相変化が起こる代表例であり、図 2)-1-2-8(b) は逆にまばらにしか相変化が起こらない場合の代表的な例である。図上に時間方向に積算したラスタ差分像を、図下に領域内の各点における差分値を積算した値をフレーム毎に示した図をそれぞれ配置してある。激しく相変化が起こる場合 (図 2)-1-2-8(a)) には、照射 1 フレーム目から爆発的に相変化が生じる。このような爆発的な相変化は、超音波画像上では相変化部位が個々に泡として観察されるのではなく、全体が白い塊として観察される現象として観察される。差分信号強度は、時間の経過に従い減っていき、10 フレーム目には個々の泡が散発的に生成する状態に収束していく。一方、まばらにしか相変化が起こらない場合 (図 2)-1-2-8(b)) には、時間的にランダムに泡が生成したフレームでのみ散発的に輝度積算値が上がるという現象が生じる。

定量的解析の手法はこれら両方の現象を網羅することが望ましい。今回の検討では、1 フレーム目 (激しい相変化の最初の爆発的な変化)、30 フレーム目 (初期の爆発的な相変化が収まったあとのランダムなフレームを代表) の各差分信号値および 1~50 フレーム目までの差分信号値のピークホールド値を積算したものを指標として用い、それぞれのナノ液滴濃度との関係を調べた (図 2)-1-2-9 参照)。各データは 4 測定の平均値である。ナノ液滴濃度を変化させたときの 1 フレーム目と 30 フレーム目の信号値の応答を比較すると、全般に 30 フレーム目のデータはナノ液滴濃度に対して明確な依存性をもたず、1 フレーム目のデータでは相変化が激しい場合 (85V) を除き、ほぼナノ液滴濃度に比例して信号強度が増加している。85V においても、1 フレーム目のデータは濃度に対してほぼ正の相関を示している。また、ピークホールド値を指標とした場合には、ナノ液滴濃度に関する依存性はほぼ 1 フレーム目を用いた場合と同じであるが、全体的に見てピークホールド値の方がばらつきが少ないため、指標として優れていると考えられる。

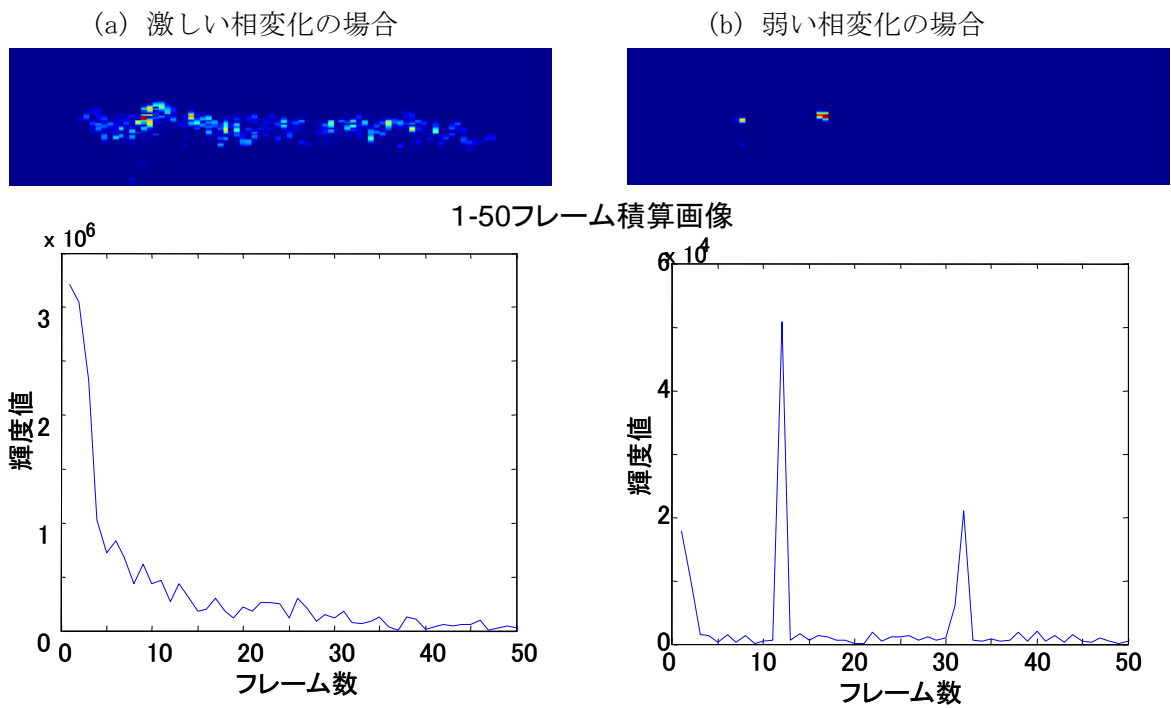


図 2)-1-2-8 定量法検討

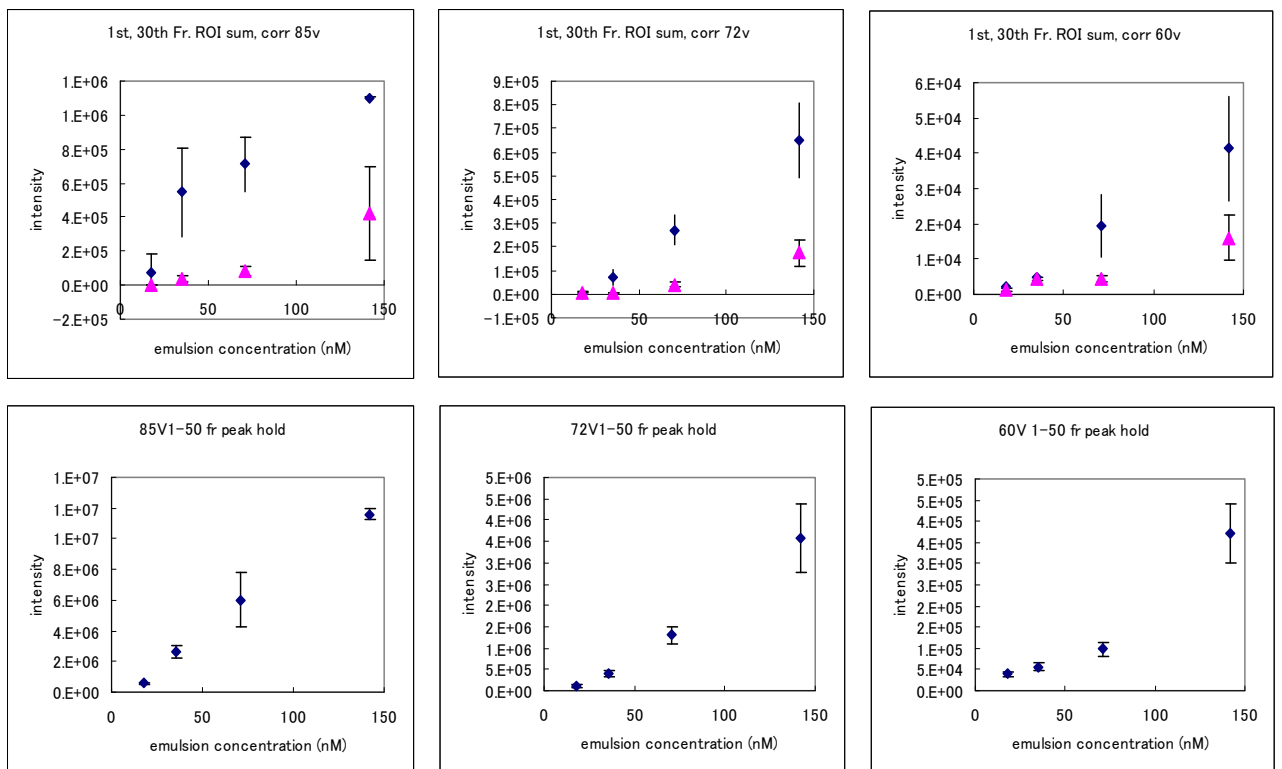


図 2)-1-2-9 輝度値の相変化液滴濃度依存性 (ゲル)

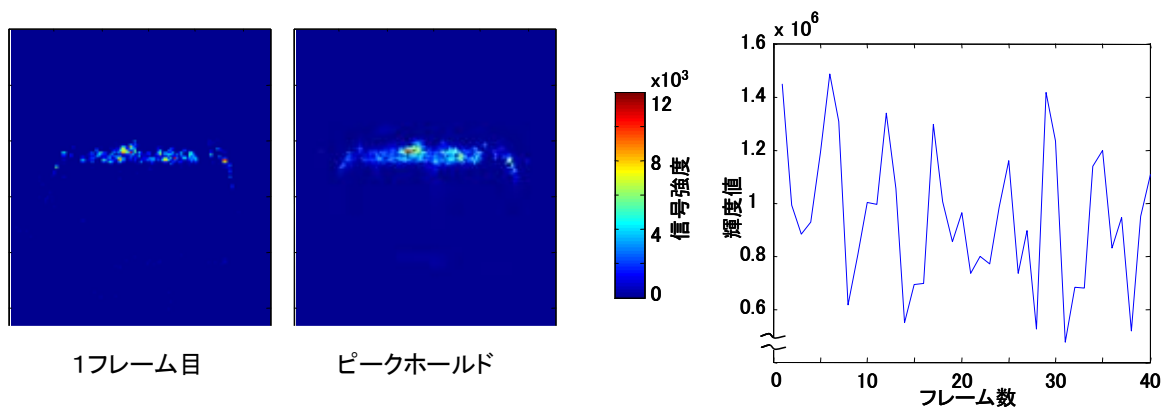


図 2)-1-2-10 マウス定量法検討

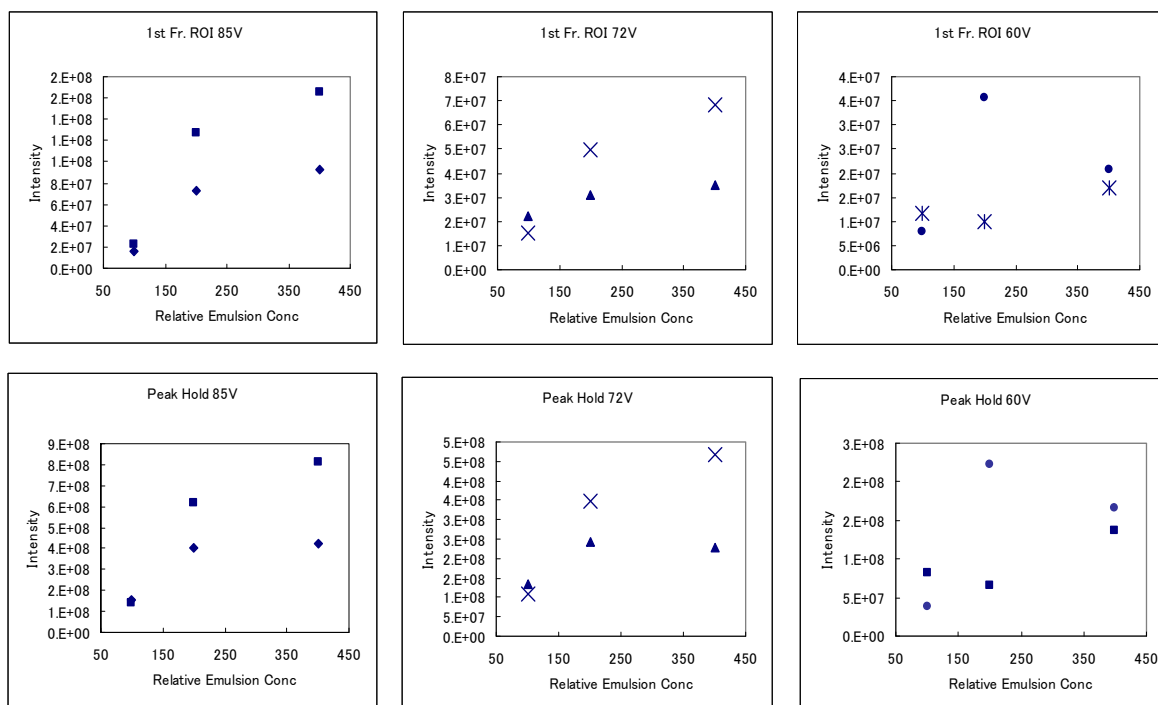


図 2)-1-2-11 輝度値の相変化液滴濃度依存性 (マウス)

以上のファントムでの結果を元に生体内での相変化に関して同様の検討を行った。今回は、マウス肝臓内での相変化に関して、上記ファントムでの検討で良好な結果が得られた 1 フレーム目および 1~30 フレーム間のピークホールド値を指標とした。なお、典型的な 1 フレーム目差分像とピークホールド像ならびに図 2)-1-2-8 下部に相当する信号の時間変化を図 2)-1-2-10 に示す。ゲルファントムとは異なり、時間変化は周期的な変動を示した。

考察

1) ラスタ間差分法とフレーム間差分法の比較

ゲル、動物実験両方の結果から、ラスタ間差分法ではフレーム間差分に比べて 1/100~1/300 の短時間での差分をとることにより、S/N 比が約 10 倍高いナノ液滴イメージングが

実現可能であることがわかった。今回の実験では診断機のソフトの都合上 PRF を 8.0kHz に固定して行なったが、さらに短いパルス間隔で差分を取ることができれば、より相変化以外に起因した成分が減ぜられ、S/N 比を更にあげることが可能であろう。また本研究では波形差分の振幅成分のみを使用して相変化成分を抽出しており、位相情報を有効に使うことによって更に感度の高い画像化が可能になる可能性もあり、今後検討を進めていく予定である。

今回、ラスト間差分法を用いることにより相変化以外の組織由来成分の抑制が可能であることがわかったが、図 2)-1-2-7 のノイズ成分に見られるようにすべての組織由来信号が消されたわけではない。とくにマウスの肝臓部位に相変化用超音波を照射し診断機上で観察した場合の画像では組織成分がかなり目立っていた。この打消し残りは、二つの波の差分を取って画像化する場合、波長の 1/16 以上の動きがあった場合に起こると考えられる。本実験で使用した超音波条件は中心周波数 7.81 MHz, PRF が 8.0KHz であり、生体中の音速を 1500m/s とすると波長は $200\mu\text{m}$ 、2 回の送受波の間隔は約 $125\mu\text{s}$ となる。すなわち波長の 1/16 である 0.1m/s の動きが問題になりうる。マウスの拍動の周期 6.8Hz、拍動による運動距離を 0.7cm と仮定した場合[8]およそ 0.095m/s の動きになると考えられ許容限界にかかるためであると推察される。ただし、これはあくまでも人間の拍動の 6~8 倍のスピードを持つマウスの、しかもより心臓の影響を受けやすい肝臓部位での話であり、人間やその他大動物に限って言えば臓器の動きは問題にならないと考えられる。創薬目的で小動物を使った実験を行なう場合はこの体動の影響を十分考慮する必要がある。

2) 定量性評価

今回のゲル定量性評価の結果から、50 フレーム分のピークホールド値を使用することによってゲル中濃度が 17.7nM から 146nM まで、プローブ印加電圧が 85V~60V の範囲では濃度依存性と輝度値の間にほぼ線形の関係が得られることがわかった。本ナノ液滴を用いる診断、治療に関してどの濃度レンジでの定量性が求められるのかは、治療に最低限必要な濃度によって決定される。梅村らの報告によれば、マイクロバブル濃度が $4000\text{個}/\text{cm}^3$ であれば、原理的および実験的にマイクロバブルを用いた加熱凝固治療を行なうことが出来る。相変化型ナノ液滴中に含まれる PFC5 がすべて気化し、なおかつ理想気体と仮定した場合、必要な濃度は約 68nM であり、本検討で得られた定量性のレンジの範囲内である。フレームレート 24Hz で撮像し 50 フレーム分のピークホールド値を使用したわけであるが、計算に必要なフレーム数は少なければ少ないほどリアルタイム性があがるので、時間方向にもっと狭めていき、どれだけばらつきの少ない定量性が得られるかも検討する意味がある。しかし、今回の検討でも約 2 秒で十分な定量性を得ていることから、準リアルタイムに近い定量性表示が可能であるといえる。これらの結果からラスト間差分を用いた定量的評価は原理的に可能であり、なおかつ必要な濃度レンジもカバーしていることがわかった。

マウスの結果(図 2)-1-2-10)からもおおよその濃度依存と輝度値の間に相関得られた。より確実なデータにするためには肝臓、および腫瘍部位照射の個体数を増やしていく必要がある。また、今後、得られた輝度値と、実際に患部に到達した薬剤の濃度の対応をつけ検

量線を引く予定である。

マウス肝臓部位の結果で、図 2)-1-2-10 のフレームごとの ROI 積算値の移り変わりのグラフでは常に顕著なシグナルの起伏が見られると述べた。これは撮像フレームレート 24Hz で超音波を照射した場合、3 フレーム毎の周期を持って起こる現象であり、マウスの拍動は 6.8Hz 程度とほぼ同期するため、体動が原因で起こると考えられる。すなわち、対象臓器が動き、フレッシュな状態の相変化型ナノ液滴が存在する部位に焦点が当たるたびに、ゲルで観察されたような爆発的な相変化が起こるためだと推察する。ピークホールド値を使用した輝度変化値の解析では、この周期的な動きは考えていない。今回大まかな濃度依存性は得られたものの、今後マウスの肝臓で検討を進める際にはこの体動による影響をどう計算するかを再検討する必要がある。しかし、前述の体動による影響と同じく、他の大動物および人間ではでは問題にならない程度の現象だと考える。

3) 画像表示法

本報告で検討したラスタ差分法は組織成分を極端に低減するため、従来の B モードと組み合わせて使用することが理想的と考える。すなわち、2 回の送受信で得た 1 回目の波形だけで構築した B モード像に差分を重ねて表示し、それぞれについて画像調整を築した B モード像に差分を重ねて表示し、それぞれについて画像調整を別に行なうことで、最適な画像が得られると考える。また、ラスタ差分のみを積算表示することによって低濃度のナノ液滴存在部位もより簡単に描出することが可能である (図 2)-1-2-12)。

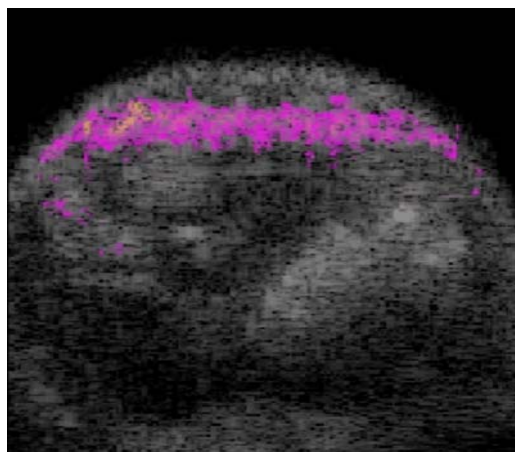


図 2)-1-2-12 画像表示案

結論

相変化型ナノ液滴を選択的に峻別し描出できるリアルタイム画像化手法として、従来法の 1/100~1/300 の短時間における差分情報を画像化するラスタ差分画像処理法に関し、ファントムおよびマウスを使用して実験的に検討を行い、以下の結論を得た。

① ラスタ差分法によって、相変化型ナノ液滴に由来する信号成分と組織に由来する信号成分の峻別表示が、従来法より S/N 比で 20dB 向上できる。

② 相変化型ナノ液滴濃度とラスト差分値の間には相関があり、本手法では、約 2 秒以内に定量的な存在液滴濃度を表示可能である。

相変化用超音波および照射システム

背景

ナノ液滴の相変化は、対象となる部位とその周辺の生体内部構造を観察しながら相変化を行うことが望ましい。これによって望ましいタイミングで望ましい部位に相変化を起こすことが出来る。このため、ナノ液滴の相変化用超音波プローブは液滴を気泡化するための高音圧長バースト送波と共に、高分解能撮像のための広帯域超音波送受波を行う必要がある。これを実現するための一つの方法としては、従来から超音波断層像撮像に用いられている広帯域超音波プローブと、相変化に特化した狭帯域高出力トランスデューサを並置した複合型トランスデューサを用いる方法がある。狭帯域高出力トランスデューサは単板単焦点の圧電セラミックもしくはコンポジットセラミックスが用いられる。この複合型トランスデューサの場合、すでに確立した二つの技術を組み合わせれば良いので、実現は容易である。しかし単純に二つ並べた場合には、主に以下の二つの欠点がある。

1. 相変化ビームの伝搬経路のすべてが撮像視野の中に入らないことが多い。特に、体表面など、火傷のリスクを抑えるために常にモニタリングを行うことが望ましい部位が撮像視野から外れてしまうことは、撮像プローブを備えるメリットを大きく損なってしまう。

2. 相変化とイメージングを組み合わせた撮像シーケンスを構成するには、二つのアレイが完全に一体化しており、同じ装置での相変化と撮像の電子走査が可能であることが望ましい。

以上の観点から、本検討においては、従来の広帯域撮像用超音波プローブの高出力化を行い、一つの超音波プローブで撮像と相変化が実現できるデバイスを開発することを目標とする。特に従来の撮像専用超音波プローブを用いて相変化を行った場合、相変化には出力が足りないため、送波焦点位置でしか相変化が出来なかったことと、使用しているうちに経時的に感度が低下してしまうことが課題であった。以下、まず感度低下のメカニズムを調べ、これを解決することで高出力化を実現し、相変化と撮像が可能な超音波探触子を開発する。

方式の提案および検討

図 2)-1-3-1 に、典型的な診断用超音波探触子の構造を示す。チタン酸ジルコン酸鉛 (PZT) のアレイの上面に二層整合層、下面に金属酸化物を混入し、音響インピーダンスを調整したゴムからなるバッキング材を用いている。5-10 MHz の周波数帯域を持つリニア探触子としては、振動子幅は 100 μm 程度、素子厚みは数 100 μm 程度である。感度が徐々に低下する原因には、振動子の上面（整合層との界面）もしくは下面（バッキング材との界面）の接着層の剥離や、PZT 素子のデポーリングなどの可能性がある。今回まず破壊のメカニズムを調べるため、実験とシミュレーションによる検討を行った。

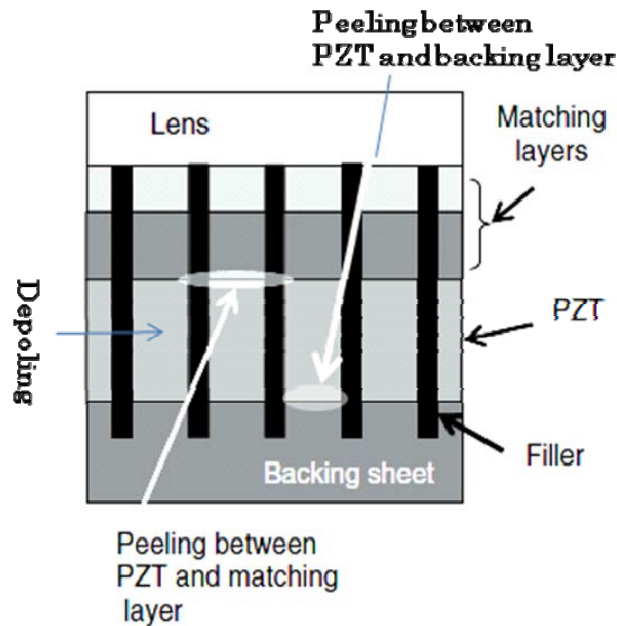


図 2)-1-3-1 超音波探触子の断面図と可能性のある破壊要因

図 2)-1-3-2 に破壊メカニズムを調べるための実験系を示す。トランスデューサを水中でアルミニウム反射板と正対させて固定、スイッチを介して①高出力アンプ (ENI 2100L)、②インピーダンスアナライザ (Agilent 4294A)、③パルスレシーバ (Panametrics 5900PR) を接続した。

まず、高出力の送波を行う前に、インピーダンスアナライザ及びパルスレシーバにより、素子のインピーダンスとパルス応答の周波数特性を調べる。次に高出力アンプにより中心周波数 7.5MHz、振幅 60V、バースト波にて PRF1kHz、3 分間の駆動を行い、その後に再びインピーダンスとパルス応答の測定を行った。この手順でバースト長を 300 サイクルから 100 ずつ増やし 700 サイクルまでバースト波の印加とインピーダンスとパルス応答の測定を繰り返した。実験は水温 37℃に保った。

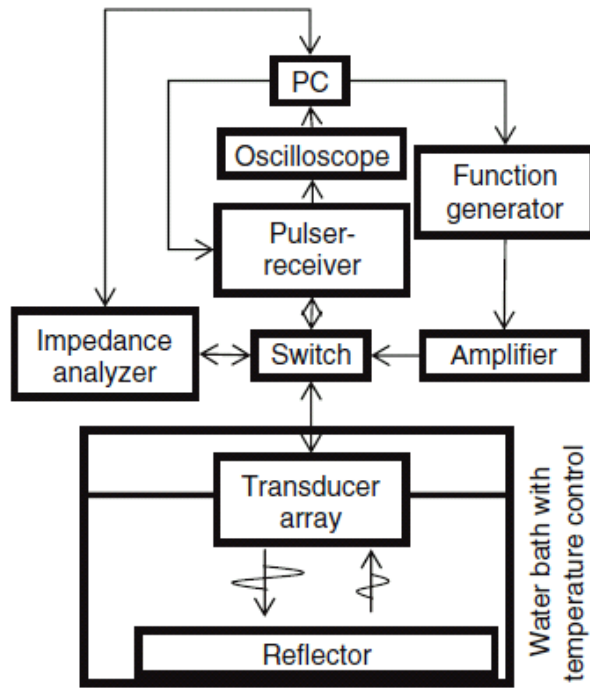


図 2)-1-3-2 素子破壊過程の測定系

一方、シミュレーションは圧電波動方程式ソルバである PZFlex を用いた。測定に用いた素子構造を二次元でモデリングを行い、剥離による破壊を模擬するために、剥離が起きる部分（PZT 素子と整合層の間、もしくはバッキング材の間）の接着層を徐々に空気に変えてインピーダンスとパルス応答の計算を行った。

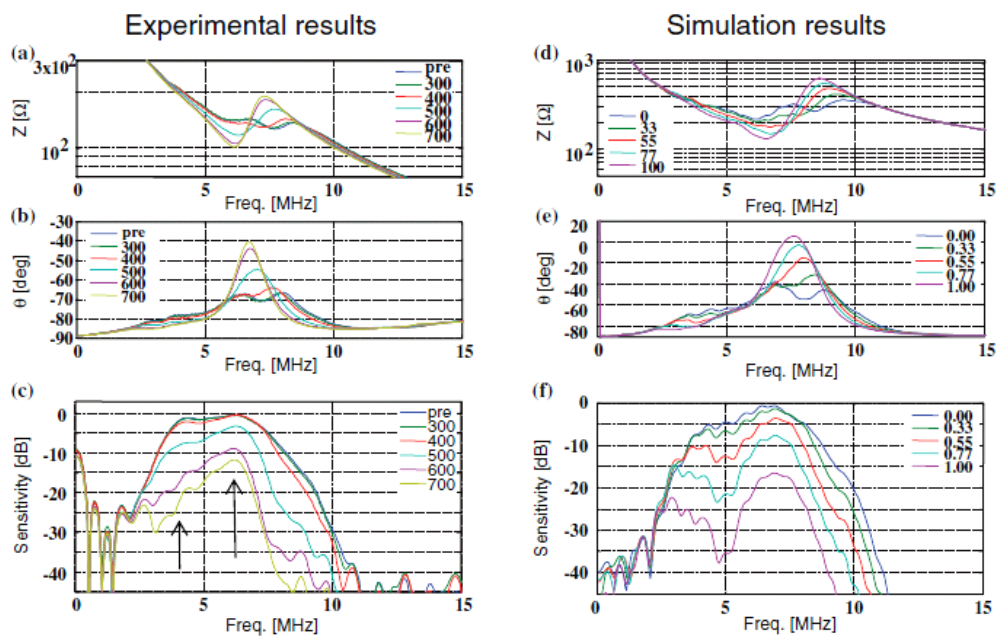


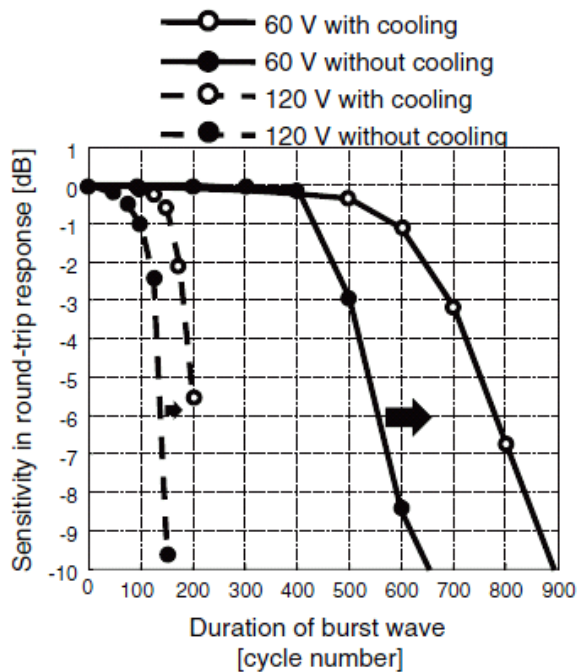
図 2)-1-3-3 素子破壊過程の実験結果（左）とシミュレーション結果（右）

図 2)-1-3-3 に実験結果とシミュレーション結果（剥離が整合層と PZT 振動子の間で起きた場合）を示す。(a)、(d)はインピーダンスの絶対値、(b)、(e)はインピーダンスの位相、それぞれ周波数特性を示す。(c)、(f)はパルス特性を示す。まず実験結果においては、少なくともバースト駆動を行う前には二組以上の共振と反共振点が観察されているが、バースト長の増大に伴い、徐々に一組の共振と反共振点を持つインピーダンスカーブへと変化していく。一方、パルス応答をフーリエ変換した周波数特性からは、まず相対的に短いバースト長の時から 4 MHz 近辺の感度の低下が始まり、相対的に長いバースト長で 7 MHz 近辺の感度の低下が起きている。これらの結果は、いずれもバースト長を長くするのに伴い、振動子と整合層の接着層が剥がれ、整合層と振動子が一体となった振動から、振動子単体の振動へ変化していると考えたと説明がつく。シミュレーション結果も実験と同じ傾向を示した。すなわち、整合層と振動子間の接着層中の空気の割合が増えるにつれて、インピーダンスとパルス特性共に、バースト長を長くした時の実験結果と同様な変化を示している。このことから、やはり整合層と振動子間の剥離が長いバースト駆動の結果引き起こされる感度低下の原因として説明できることがわかる。

ここまでの検討で整合層と振動子間の接着層の剥離が感度低下の原因として疑われることが分かった。次に、この剥離の原因が熱に起因するものかを調べるため、アレイの背面に水冷機構を備え実験を行った。図 2)-1-3-4 に示すようにバック材の裏面にラジエータ構造を備えたアルミニウムハウジングを接着し、ラジエータ内に 0℃の水を循環させて実験を行った。図 2)-1-3-5 に示すように、水冷によって感度低下が始まるバースト長が長くなっていることが確認できる。駆動波形の振幅が 120 V の場合は、50 サイクル程度、60 V の場合は 100 から 200 サイクル程度、感度低下の程度が同じ場合のバースト長が長くなっている。この実験結果から、接着層の剥離には温度が大きく影響を与えていることがわかる。つまり整合層と振動子の熱膨張率の違いによる熱応力、もしくは温度上昇による接着強度の低下が剥離の原因として考えうる。

次に、高出力化の限界を調べるためアレイトランスデューサ内の温度上昇のシミュレーション検討を行う。まず温度上昇のシミュレーションの前に、実験とシミュレーションの結果を比較することで温度上昇シミュレーションの精度検証を行う。





まず実験方法を説明する。図 2)-1-3-6 に実験に用いた圧電セラミックス板とフェライトゴムを接着した複合体の構造を示す。圧電セラミックスの材料は PZT であり、寸法は幅 18mm、奥行き 4.7mm、厚み 0.14mm である。フェライトの厚み以外の寸法は圧電セラミックス板と同じであり、厚みは 8.5 mm である。二次元シミュレーションの結果と比較するために、幅が他の寸法に比べて大きい、非等方的な形状とした。二層の間の接着はアラルダイトを用いた。圧電セラミックスは両面全面に電極がついており、電極には高出力広帯域アンプ (ENI 2100L) を介してファンクションジェネレータ (Wavetek 195) で駆動した。電圧波形は 12.2 MHz の連続波、振幅 5 V であり、25 秒間駆動した。この周波数は圧電セラミックスの共振周波数である。二つの K 熱電対 (Omega 5sc-TT-K-36-36) をフェライトゴムに空けた直径 0.3mm の穴に埋め込んだ。それぞれの穴の深さが異なるように設定し、片方の熱電対は圧電セラミックスとフェライトゴムの接着面近傍、もう片方は熱電対はフェライトゴムの真ん中辺りに埋め込んだ。熱電対の電圧はデジタルマルチメータ (Kethley 2700) で測定した。

シミュレーションモデルは実験と同じく図 2)-1-3-6 に示す構造を用いた。ただし、幅方向は他の寸法に比べて十分に大きいとみなし、シミュレーションは厚み方向 (フェライトゴムが 8.5 mm の方向) と奥行き方向 (フェライトゴムが 4.7 mm の方向) の二次元で PZFlex を用いて計算を行った。まず音響的な計算、つまり電圧の印加から超音波の発生と伝搬までを一度計算し、超音波吸収の空間分布をグリッド毎に計算して保存した。その後、吸収されたエネルギーを熱源として熱伝導方程式を再度 PZFlex で計算することによって、温度の空間分布の時間変化を計算した。音響と熱伝導で二回に分けるのは、計算に必要な時間ステップと時間範囲が超音波と熱で大きく異なるからである。寸法、条件、材質は**エラー! 参照元が見つかりません**。に示したとおりである。なお、測定試料とシミュレーションの境界の間には、実際と同じく空気の層をモデルに入れた。今回の実験のように 25 秒という

時間スケールでは、空気を熱的に取り扱う場合に対流の影響を考える必要がある。今回の検討においては対流を方程式で解くのではなく、固定の温度境界までの空気層の厚みを調節することで対流の影響を表現した。具体的には、シミュレーション結果が実験結果を最も良く再現する空気層の厚みを探索し、この寸法が対流の効果を反映しているものとして扱うこととした

図 2)-1-3-7 にシミュレーションと実験の結果を示す。二か所の熱電対の位置で、温度上昇過程、冷却過程ともにシミュレーションは実験結果を良く再現している。この結果は空気層の厚みを 0.5 mm としたときの結果である。圧電セラミックスから 6.5 mm の熱電対の測定データが相対的に精度が低いのは、6.5 mm という位置の精度が、正確でないからであると考えられる。いずれにせよ、音響及び熱シミュレーションによって、アレイトランスデューサ内の温度上昇を相対誤差 10% 程度の精度で見積もることが出来ると考えられる。

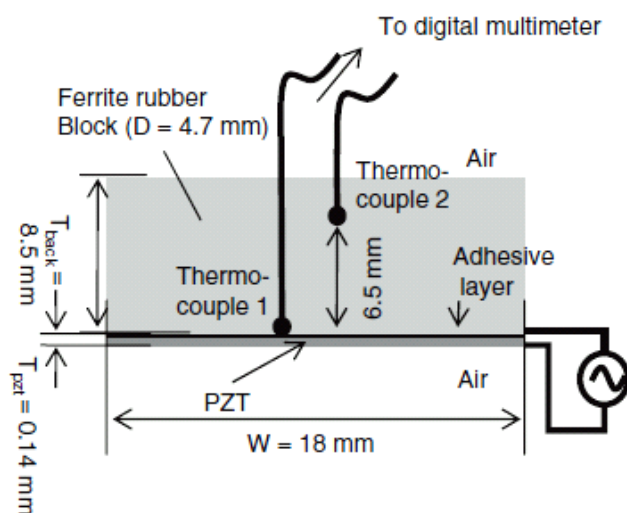


図 2)-1-3-6 温度上昇シミュレーションの精度検証実験の実験系

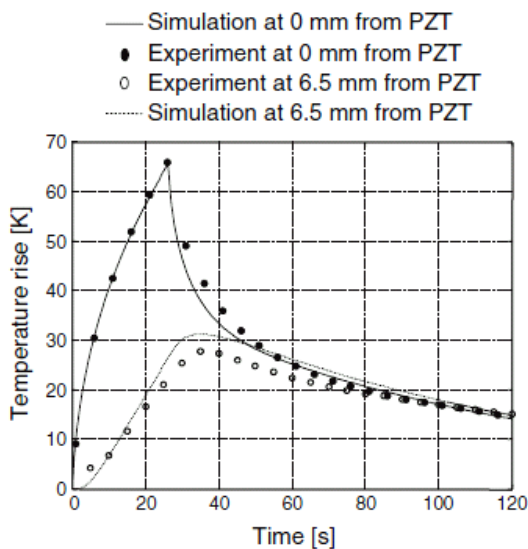


図 2)-1-3-7 温度上昇シミュレーションの精度検証実験の結果

前節での検討の結果、冷却することで気泡化用超音波の送波が可能となることが分かった。この節ではより、長いバースト波、もしくは大振幅の送波を可能とするために、冷却効率を改善した振動子構造の検討を行い、定量的に高出力化の見積もりを行うこととする。

提案構造においては、バッキング材の熱伝導率及び、厚みの最適化により、パルス特性を損なわない（比帯域幅を狭くしない）範囲で熱抵抗を小さくする。熱伝導率の改善と水冷によって、駆動中の探触子内の温度上昇を抑え、より大出力の超音波送波が可能な素子構造の検討を行う。市販の探触子のバッキング材では、タングステンやフェライト粉末などの金属や金属酸化物などの比重の大きい粒子をゴムに混ぜて、音響インピーダンスを 5 から 8 MRayl としている。例えばフェライト入りのゴムでは熱伝導率は $1 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ である。エポキシなどの一般的な樹脂の熱伝導率は $0.3 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ であり、これに銅 ($400 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$)^[5]、シリコン ($150 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$)^[5]、グラファイトファイバー ($900 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$) を混ぜることで熱伝導率の大きな樹脂材料を作製することが出来る。しかし、アレイ探触子としての帯域幅を損なわないためには、音響インピーダンスを 5 から 8 MRayl からずらすことが出来ないため、比重の大きな高熱伝導材料の体積分率をあまり大きくすることが出来ない。この点においてグラファイトファイバーは、図 2)-1-3-8 に示すように比重が元々大きくないことと、繊維状の構造のため熱が伝導するパスが作られやすいため、比較的少ない混合比率でも高い熱伝導率を実現しやすい。

実際、山下らはドップラ撮像時に探触子内で発生した熱が生体中の温度上昇をもたらすことを防ぐためグラファイトファイバー入り的高分子樹脂をバッキング材に用いた超音波探触子を提案している^[6]。この材料では音響インピーダンスが 6.6 MRayl、熱伝導率が $16 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ である。このグラファイトファイバー入りのバッキング材を、今回検討の水冷式リニアアレイ探触子のバッキング材として活用し、パルス特性を損なわない程度に薄くした場合に、温度上昇がどこまで低減出来るかを、圧電波動方程式と熱伝導のシミュレータである PZFlex を用いて検討した。検討モデルを図 2)-1-3-9 に示す。

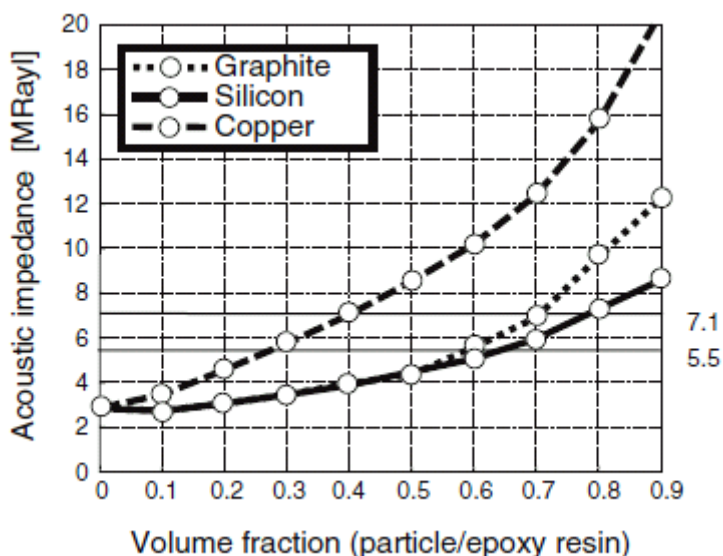


図 2)-1-3-8 樹脂中の高熱伝導材の配合率と音響インピーダンス

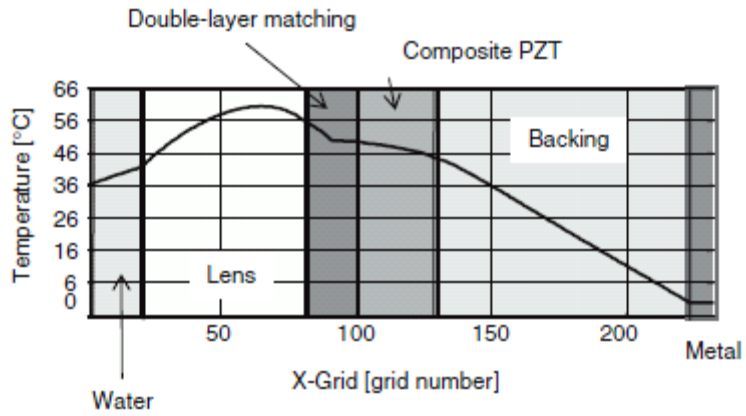


図 2)-1-3-9 温度上昇シミュレーションのモデル

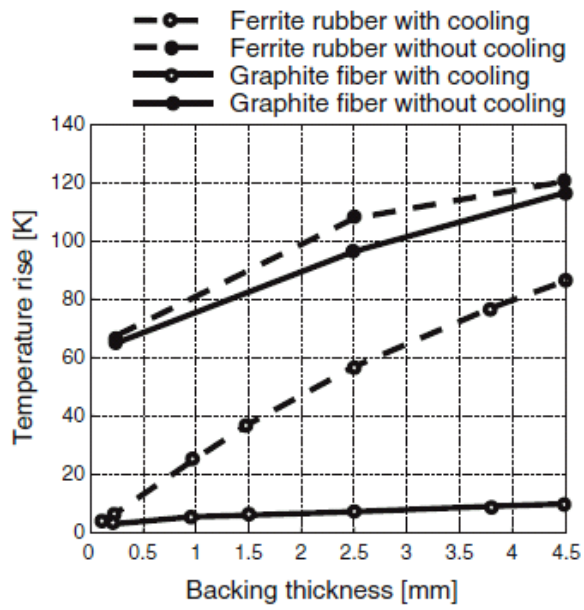


図 2)-1-3-10 温度上昇シミュレーションの結果

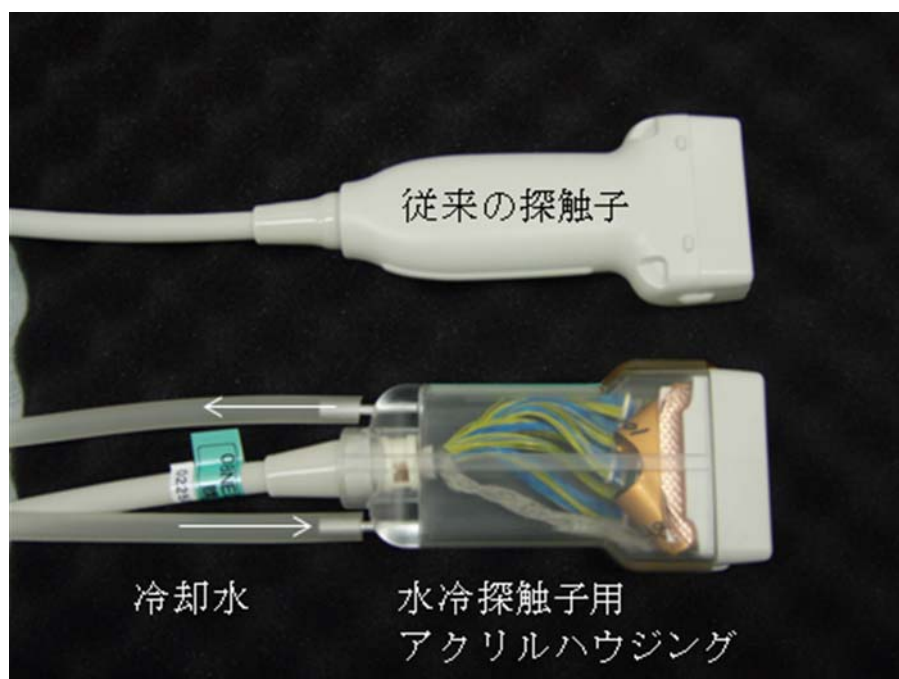


図 2)-1-3-11 試作水冷探触子

図 2)-1-3-9 の構造にて、バースト波で駆動中のアレイ探触子内の振動分布から減衰分布を計算し、最終的に温度分布を計算した。図 2)-1-3-10 に計算結果を示す。横軸にバックキング材の厚み、縦軸に探触子内の最大温度を示す。バックキング材はフェライトゴムを用いた場合とグラファイトファイバ入りの樹脂を用いた場合、それぞれの水冷有無で比較を行った。別途パルス特性を計算し、バックキング材の厚みを 240 μm より薄くするとパルス特性が劣化してくることが分かった。今回の検討の結果、バックキング材をグラファイトファイバ入りの樹脂に変えることで温度上昇が 1/12、厚みを 4.5 mm から 240 μm にすることで 1/3.5 になることが分かった。二つの効果を合わせると同じ温度上昇で、42 倍エネルギーが大きい送波を行うことが可能になる。

これまでの検討結果を踏まえ、図 2)-1-3-11 に示す水冷探触子を試作し、従来と同等の画質が得られることを確認した。

まとめ

液滴の相変化用超音波送波と撮像用広帯域超音波の送受波を両立するアレイプローブを実現するための撮像用広帯域アレイプローブの送波パワーの高出力化の検討を行った。まず、現状の広帯域探触子において、造影剤の気泡化のための超音波を送波した時に起きる感度低下の原因をシミュレーションと実験により検討を行なった。この結果、熱応力もしくは温度上昇による接着強度の低下に起因する整合層と振動子との間の接着層の剥離が、感度低下の原因として考えられることがわかった。またバックキング材裏面での水冷と、グラファイトファイバ樹脂を用いた高熱伝導バックキング材の採用により、超音波送波出力が、40 倍程度高められることがわかり、液滴の相変化用超音波送波と撮像用広帯域超音波の送受波を両立するアレイプローブの設計指針を確立した。これにより、-20dB 帯域幅が 2.5 か

ら 9 MHz、M. I. 1.9 の駆動における最大送波サイクル数 100 のトランスデューサ(図 2)-1-3-5 参照) を実現した。

相変化用超音波および照射システムの中・大動物による効果検証

背景

本研究開発においては、生体投与時はナノサイズの液滴であり、超音波パルス照射時に液相から気相への相変化を生じてマイクロバブルを形成する相変化ナノ液滴を超音波造影・増感剤として用いる。

これまで、マウス腫瘍を用いた評価系により、相変化造影および治療効果の原理的な検討を行ってきた。しかしながら、動物種により相変化造影剤の体内挙動や治療効果(組織変性などの生体作用)が異なる可能性がある。また、動物のサイズやターゲット臓器の部位により、超音波の減衰や散乱の影響が大きく異なり、相変化超音波の条件が異なる可能性がある。これらの要素を加味し、本開発では、マウス、ラットおよびウサギの腫瘍を用いて、動物種および動物サイズの違いによる相変化造影効果および治療効果の影響を検討する必要がある。特に、最終的に人のような大きなサイズの動物を対象とした相変化造影を想定すると、実験腫瘍が作成できる最大の動物であるウサギにおいて、腫瘍に対する造影実験を安定的に施行することのできる実験系を構築することが極めて重要である。

腫瘍モデルにおける相変化造影

日本白色種ウサギ雌を麻酔し、VX2 腫瘍株(凍結保存)を開腹下で腎臓へ移植した。2, 3 週間経過後、エコーおよび剖検下にて確認し、1 センチ前後の固形腫瘍として生着していることを確認後、相変化実験へ供した。麻酔導入として、メドトミジンとミダゾラムを筋肉内投与して、十分な沈静が得られた後にイソフルレンの吸入麻酔に切り替えた。適切な麻酔深度の維持が可能になったら、気管切開をして、3.3F の気管チューブを挿管し、ベンチレータにて呼吸管理を行った。

また、薬物投与用ルートとして耳静脈に 20G のサーフローを留置し、神経筋遮断薬により自発呼吸を抑制し、ベンチレータにて人工的な管理呼吸を行った。神経筋遮断薬としては、ツボクラリン、パンクロニウム臭化物、臭化ベクロニウムのいずれかを使用した。3 種類とも必要十分な呼吸筋抑制作用が得られた。いずれも、作用持続時間が短いので、自発呼吸再開の兆候が見られたら、追加投与を行った。必要に応じて、ベンチレータを止め、無呼吸状態にして、腹部の体動が抑制された状態で、相変化実験を施行した。最大呼吸停止時間は 3 分とした。

図 2)-1-4-1 は、上記麻酔管理を行った横臥位腹部左腎臓のエコー走査を行った際の撮像写真である。エコー像からわかるようにプローブより約 5 ミリの皮膚および筋層を経て厚さ 2 センチ弱で長さが約 4 センチ程度の腎臓を認知できる。図 2)-1-4-1 のエコー像では、プローブの遠位置の皮質と髓質の境界を中心に直径約 1 センチ前後の VX2 腫瘍塊がみとれる。

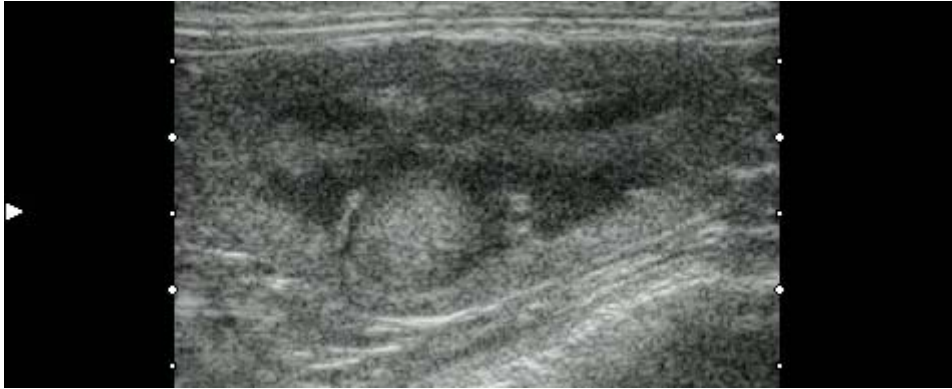


図 2)-1-4-1 相変化前の VX2 移植腎臓の経皮的エコー像

図 2)-1-4-2 は、左端に白三角印で示した深さ（プローブ表面より 1.5 センチ）に相変化用超音波の焦点を設定して相変化用超音波を照射した際に受信した腎臓のコントラストエコー像である。相変化超音波の焦点の深さ（プローブ表面より 1.5 センチ）の部分で、VX2 腫瘍の辺縁部においてのみ相変化を示す高輝度のエコーを観察した。



図 2)-1-4-2 相変化直後の VX2 移植腎臓の経皮的コントラストエコー像

図 2)-1-4-3 は、上記図 2)-1-4-2 とほぼ同時に撮像したエコー像であるが、高調波成分のみを画像上に示している。図 2)-1-4-1 および図 2)-1-4-2 と見比べてみると、より明瞭に VX2 腫瘍部分においてのみ相変化が観察されている。約 1 センチの腫瘍の全体に相変化が見られるわけではなく、腫瘍の辺縁部位に特に相変化がさかんに観察されるのに対して、腫瘍中心部には相変化は見られなかった。



図 2)-1-4-3 相変化直後の VX2 移植腎臓の経皮的差分エコー像

腫瘍部位での高輝度エコーは、相変化開始後しばらくは連続して見られた。図 2)-1-4-4 は、相変化開始 10 秒後のコントラストエコー像である。腫瘍辺縁部では、引き続き高輝度エコーが観察されているのがわかるが、輝度は減弱していると考えられた。図 2)-1-4-5 には、上記の腎臓 VX2 腫瘍の断面写真を示した。



図 2)-1-4-4 相変化開始約 10 秒後の VX2 移植腎臓の経皮的コントラストエコー像



図 2)-1-4-5 VX2 移植腎臓の断面写真

以上の結果から、中型動物であるウサギの実質臓器内腫瘍において相変化超音波の焦点部

位において選択的な相変化が可能であることがわかった。

相変化造影治療のタイミング最適化のために相変化造影剤の体内動態の検討（ウサギ）

中大型動物における相変化造影剤を用いた治療を行う上で極めて重要な血中造影剤動態のデータとしてウサギの結果を以下に示す。

図 2)-1-4-6 にウサギに相変化造影剤を耳介静脈より投与し股動脈より経時間的に採血して造影剤中の C5 成分の濃度を定量した結果の一例を示す。投与量は、C5 成分として、Dose=20mg/kg であった。血液中の C5 成分の推移は、2 相性を示し、急速な分布相と緩やかな消失相を呈した。

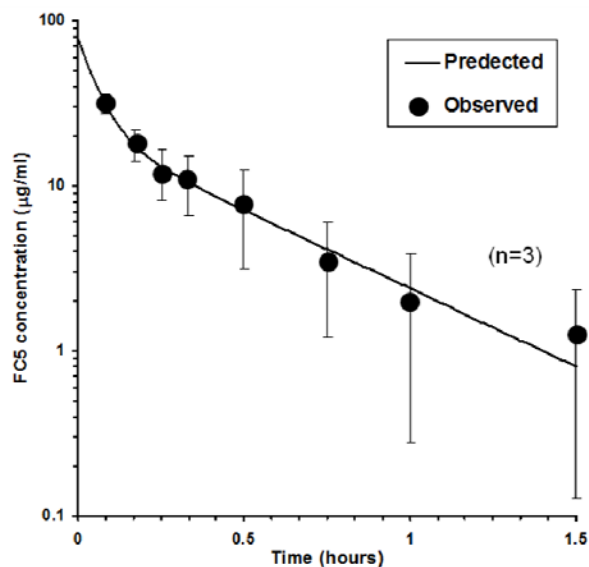


図 2)-1-4-6 ウサギにおける相変化造影剤の血液中濃度推移（静脈投与後）

横軸は投与後時間を示し、縦軸は血液中の相変化造影剤中 C5 成分の濃度。

Parameter	Unit	Mean ± SD
A	µg/ml	82.09 ± 44.77
α	h ⁻¹	20.69 ± 9.92
$t_{0.5(\alpha)}$	h	0.04 ± 0.02
B	µg/ml	20.92 ± 6.14
β	h ⁻¹	2.43 ± 0.79
$t_{0.5(\beta)}$	h	0.28 ± 0.09
K12	h ⁻¹	9.32 ± 6.90
K21	h ⁻¹	6.10 ± 0.92
Kel	h ⁻¹	7.70 ± 2.89
Cl	L/Kg/h	0.54 ± 0.26
MRT	h	0.33 ± 0.13
Vss	L/kg	0.16 ± 0.01
AUC'	µg/ml.h	13.64 ± 4.98
AUMC'	(µg/ml)h ²	4.94 ± 3.43

表 2)-1-4-1 ウサギにおける相変化造影剤の血中動態パラメータ

上記の表①-4-1の中で、特に重要なパラメータは

- ・分布相半減期(α 相) ; 0.04 時間 (2.4 分)
- ・消失相半減期(β 相) ; 0.28 時間 (約 18 分)
- ・定常状態分布容(Vdss) ; 0.16 L/kg

であり、グラフおよび表より、投与後 30 分以内に血中濃度が約 10 分の 1 にまで下がり、以後速やかに消失する。また、分布容積は 0.16L/kg で投与した薬剤の初回の肺通過消失効果は大きくはなく、ほぼ薬剤が血液中に分布したと考えていいと思われる。すなわち、薬剤の利用性は以前より向上していると考えられる。このことは、肺通過の際に急激に気化することによる肺障害の危険性回避には重要な特性と思われる。

まとめ

相変化造影剤を用いた相変化撮像を小動物だけでなく、ウサギを使った中型動物の腫瘍モデルにおいて実現している。選択的な治療効果を発揮させ、同時に標準部位以外での副作用を回避するための相変化造影剤体内挙動の把握と治療超音波の照射条件を詰め、「②-3 治療用超音波及び照射システムの中・大動物による治療効果検証」において述べたようにマウス・ラットではなく人に近い超音波画像が取得できるウサギの内部臓器（腎臓）において、治療用超音波を使った限局的な治療効果の発現につなげることができた。相変化用超音波および照射システムの小動物による安全性検証

目的

相変化ナノ液滴は数百 nm の液滴であり、臨床用超音波診断装置では検出できないが、相変化用超音波照射によりミクロンサイズの気泡に相変化させることで、超音波造影の増感作用を期待するものである。ナノ液滴の大きさは腫瘍血管における Eenhancement Permiation and Retention 効果による腫瘍集積を期待しており、ナノ液滴のサイズを利用した腫瘍ターゲッティングと外部からの超音波照射によるターゲッティングにより、標的患部でのみ相変化が生じることを期待した。標的部における相変化現象の確認は重要であるが、実用化においては、ナノ液滴の代謝、標的外における安全性も担保されなければならない。本研究では、標的部外での正常組織における安全性を病理組織学的に検証することを目的とした。

本システムは、次世代の超音波造影剤を使用した診断手法であることから、国内外の臨床現場で広く使用されている超音波診断装置の安全基準をそのまま適用することはできない。本研究では、1) 相変化ナノ液滴と 2) 相変化用超音波条件を用いて、3) 相変化ナノ液滴併用超音波による組織傷害の病理組織学的重症度の新分類法を提案した。4) 臨床診断用超音波条件による各種相変化ナノ液滴の相変化現象と圧壊の確認をし、5) 各種相変化ナノ液滴の副作用を調べた。提案した組織傷害重症度の新分類法を基に、6) 相変化による正常組織傷害の病理組織学的評価を行った。

安全性試験

1) 相変化ナノ液滴

本プロジェクトで開発中の相変化ナノ液滴には第一世代キャリア（日立製）と第二世代キャリ

ア（K A S T製、京大製、帝京大製）の4つの種類がある。本安全性試験では、これら4つのキャリアの安全性を検証した。

表 2)-1-5-1 相変化ナノ液滴の種類

	特徴
日立製	PFC 封入リン脂質を使ったエマルジョン
K A S T製	PFC 封入アスパラギン酸ポリマーを使ったエマルジョン
京大製	PFC 封入ゼラチン誘導体を使ったエマルジョン
帝京大製	液滴ミセル封入バブルリポソーム

表 2)-1-5-2 相変化ナノ液滴の組成

	封入 PFC の体積比率
A	PFC5:PFC6=50:50
B	PFC5:PFC6=85:15

2) 相変化用超音波条件

相変化ナノ液滴にある条件の超音波を照射すると液滴は気相化してマイクロバブルが生成される。小動物に対する超音波条件の最適化は、マウス皮下腫瘍 colon26 モデルを使って、日立中研により最適化された。

表 2)-1-5-3 相変化用超音波条件

周波数	3MHz
波形	single burst
波数	100 cycles
音響強度	2.0 kW/cm ² ~ 2.5 kW/cm ²

3) 相変化ナノ液滴併用超音波による組織傷害の病理組織学的重症度の新分類法

【実験目的】

相変化ナノ液滴と超音波を併用した際の組織傷害を評価するために、新しく評価基準を作成する。

【実験方法】

実験対象：Fisher 344 ラット(176.5g) 1例

麻酔方法：イソフルレン (1.0~3.0%)、マスク吸入麻酔、空気 250~330ml/min

測定項目：直腸温

投与方法：26 G針により尾静脈から日立製相変化型ナノ液滴を投与 (B)

実験手順：相変化型ナノ液滴を投与後、5分以内に相変化用超音波 (参照；2) 相変化用超音波) を

照射した。実験終了後直ちに相変化域を摘出、10%ホルマリンにて組織を固定した。

相変化の確認方法：vevo770（visualsonic 社）で超音波画像上の輝度上昇を確認した

組織傷害の評価方法：固定後の組織をパラフィン包埋後、4 μ m で薄切、各種染色（HE 染色、Masson 染色、PAS 染色、および免疫染色として HSP27、HSP40、HSP70）を行い、病理組織学的に評価した。

【実験結果】

HE 染色、Masson 染色、PAS 染色の結果から、肝組織傷害は可逆的な軽度変性（grade I）から不可逆的な重度変性（grade IV）までみられた。この組織傷害重症度を分類表 4 に纏めた。

熱などのストレスにより生じる HSP ファミリー（HSP27、HSP40、HSP70）は発現が組織傷害の grade に伴って増加した（表 2）-1-5-5 参照）。

【考察】

相変化型ナノ液滴と超音波による組織傷害重症度を病理組織学的に分類した。これは、ナノ液滴併用超音波の病理組織学的新安全評価基準である。さらに、免疫組織化学の発現も傷害の重症度と対応することが見出された。今後、本システムの実用化においては、ここで作成した安全基準と免疫化学の発現を考慮して、ナノ液滴条件と超音波条件の安全範囲を調べる必要があると考えられた。

小動物に対して最適化された相変化用超音波条件を用いたが、凝固壊死を伴う不可逆的变化が生じた。この時使用した日立製ナノ液滴（組成 B）は沸点が 29 度の PFC5 が多く含まれており、相変化が生じ易かったものと考えられる。相変化は腫瘍部の診断を目的としており、加熱凝固作用を期待しないが、ナノ液滴の状態と加えられる超音波エネルギーの trade-off で重篤な組織傷害を招来することが示唆された。

【結論】

相変化ナノ液滴と超音波の併用による組織傷害の病理組織学的重症度の新分類法を提案した。

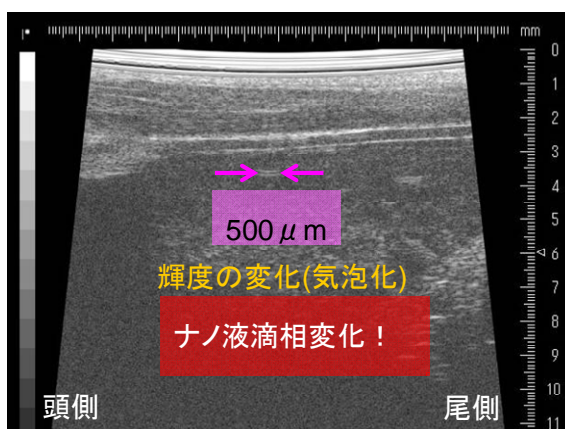


図 2)-1-5-1 ラット肝臓における相変化後の超音波画像

ナノ液滴（0.4mL）尾静脈注射 3 分後に相変化用超音波照射後の超音波画像。Vevo770 40MHz プロブで撮像。（相変化用超音波条件：3MHz, 2kW/cm² (SPTP), PRF50Hz, 100 波, PD 0.03ms）

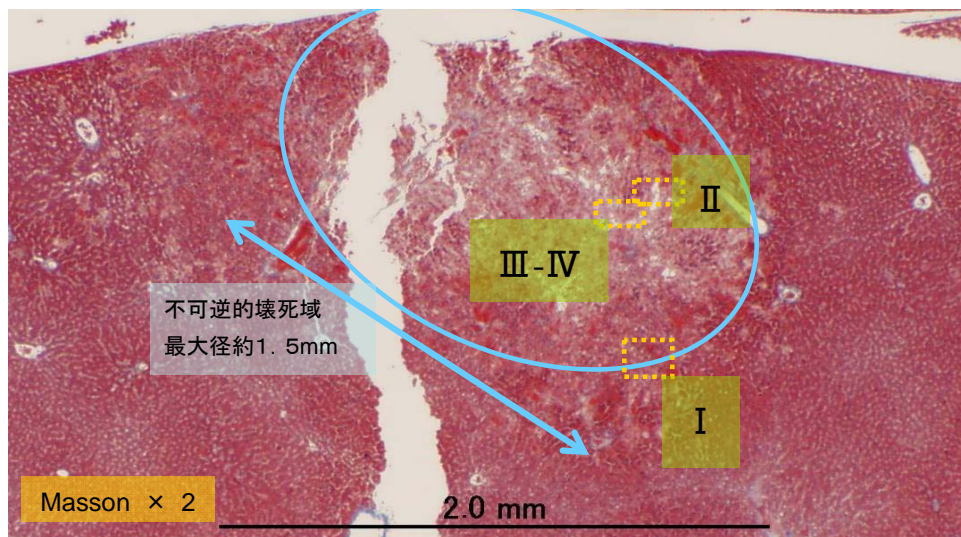


図 2)-1-5-2 HE 染色後の相変化部組織像（低倍率）

相変化域において、相変化用超音波ビームのフォーカルエリア径 1mm の約 1.5 倍の範囲に不可逆的壊死域（最大径 1.5mm）が認められ（Ⅲ、Ⅳ）、出血を伴っていた。壊死域の周辺部には、細胞変性（Ⅰ、Ⅱ）が認められた。また、障害部の周囲で核分裂像を散見した。

4) 臨床診断用超音波条件による各種相変化ナノ液滴の相変化現象と圧壊の確認

【実験目的】

臨床診断用超音波条件下で、日立製、KAST 製、京大製の 3 種の相変化ナノ液滴（条件 B）が、相変化および圧壊することを確認する。

【実験方法】

実験対象：相変化ナノ液滴（日立製、K A S T 製、京大製）（PFC5 濃度換算 0.3mg/mL）

各 3 例

ソナゾイド（臨床血中濃度） 3 例

超音波条件：aplio XG（東芝製、東京） Flash Echo

周波数 7MHz, MI 0.86, Flash 数 15 回, PRF 2Hz) , PD 5min

超音波照射方法：容量約 1mL のアクリルアミドゲル容器に、各種ナノ液滴、或いは、ソナゾイドを満 たし、臨床診断用超音波を照射した。

相変化及び圧壊の評価方法：診断用超音波画像上の輝度変化を確認した。また、超音波照射後の溶液を採取し、光顕と動的光散乱法（DLS）により残存バブルと残存ナノ液滴の有無を検討した。

【実験結果】

全てのナノ液滴において、超音波照射開始後に超音波画像上で高輝度のバブルが認められた。また、超音波照射終了後には、超音波画像上でバブル（高輝度）をほとんど認めなかった。ソナゾイドに関しては、5 分後に超音波画像上でバブルの存在を認めなかった。但し、DLS および光顕では超音波照射後のナノ液滴の溶液において数百ナノサイズからマイクロサイズの粒子の存在が認められた。

【考察】

ナノ液滴が液相であった場合、超音波画像上で確認できない。本実験では、FE 1回目に高輝度のバブルを確認した。ことから、ナノ液滴は第1回目のFEで気相化したものと考えられる。続けて15回FEを照射すると平均輝度（画像サイズ100×100 pixels）は徐々に低下した。このことから、生成したマイクロバブルがFE照射回数に従って圧壊したものと考えられた。

本実験で使用したナノ液滴（39℃）の粒子径は200nm-500nmであり、気相化した際のバブルの平均粒径数 μm になると推定できる。従って、超音波5分間照射後の顕微鏡写真において確認できた数 μm の粒子は、FEによって生成したバブルが圧壊せずに残存したものと考えられる。また、動的光散乱法の結果から、溶液中の残存ナノ液滴の平均粒径は約500nm-1 μm であり、超音波を照射しない時の平均粒径よりも粒径は大きく、超音波照射による液滴の凝集が示唆された。

【結論】

臨床診断用超音波条件下で、相変化ナノ液滴（日立製、KAST製、京大製）は相変化および圧壊することを確認した。

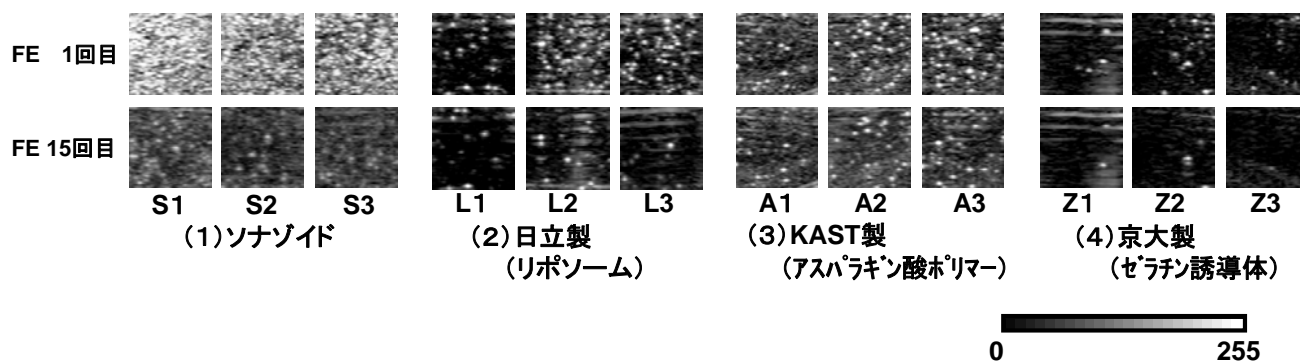


図 2)-1-5-3 Flash Echo 照射 1 回目と 15 回目の臨床診断用超音波画像

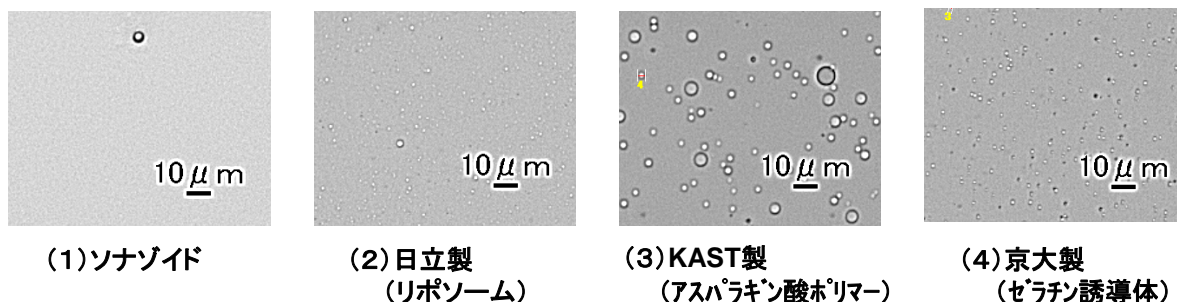


図 2)-1-5-4 圧壊後の顕微鏡写真（20 倍）

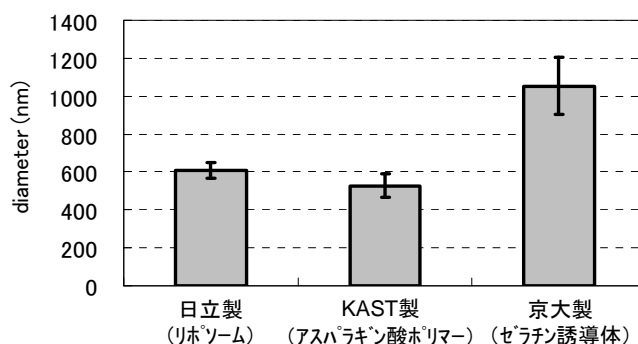


図 2)-1-5-5 動的光散乱法による圧壊後の粒径計測結果

5) 各種相変化ナノ液滴の副作用

【実験目的】

日立製、KAST 製、京大製の3種の相変化型ナノ液滴を単回投与した際の副作用を検討する。

【実験方法】

実験対象：ウサギ日本白色種オス 36羽

麻酔方法：ミダゾラム 0.4mg/kg+メデトミジン 0.08mg/kg 筋肉内投与, 酸素吸入 (マスク)

測定項目：非観血的血圧 (後脚)、直腸温、血液酸素飽和度および脈拍 (前脚)

投与方法：22G針により耳介辺縁静脈から各薬剤 (日立製、KAST 製、京大製、ペルフルブタン)

単回投与 (薬剤濃度：25mg/kg)。比較対象として生理食塩水 (2.2mL/kg) 投与。

血液生化学検査：投与前、投与1日後、4日後及び7日後に血液を採取し、肝・胆・膵機能、腎機能 および血中脂質に関して血液生化学的評価を経時的に行った (表2)-1-5-4)。

病理組織学的評価：液滴投与7日後に屠殺後、心・肺・肝・腎・脾を摘出し、10%ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、4μmで薄切、HE染色、Masson染色、PAS染色を行った。

表2)-1-5-4 血液生化学検査項目の詳細

評価項目	詳細
肝・胆・膵機能	総タンパク, アルブミン, コリンエステラーゼ, LDH, GOT(AST), GPT(ALT), γ -GTP, ALP, 総ビリルビン
腎機能	尿素窒素, クレアチニン
血中脂質	総コレステロール, 中性脂肪, リン脂質, 遊離脂肪酸, 遊離コレステロール, エステル型コレステロール

【結果】

各ナノ液滴を投与して1時間以内に、SpO₂の一過性低下を数例認めた。KAST製1例で投与後約20分に水平性眼振を認めたが、自然に消失した。7日後の摘出脳組織に異常を認めなかった。また、日立製1例 (投与2日後) と京大製1例 (投与後6時間以内) が死亡し、その直後の剖検において肉眼的に肺うっ血、肺水腫を認めた (表2)-1-5-4、図2)-1-5-6)。死亡例以外の例で、心・肺・肝・腎・脾に病理組織学的に組織傷害を認めなかった。血液生化学的検査に関しては、日立製、KAST製、ペルフルブタンはshamと差がなかったが、京大製は投与1日後に中性脂肪が有意に高値を示した (図2)-1-5-7)。

【考察】

相変化型ナノ液滴投与による生体に対する副作用として、1) 致命的副作用；呼吸循環障害、2) 一時的副作用；水平性眼振、血清中性脂肪増加があった。

死亡例2例に関しては、肺の病理組織所見において、日立製液滴では投与2日後にびまん性肺胞障害、京大製液滴では投与後約6時間で二次的肺水腫が認められた。

呼吸障害に関しては、投与直後にSpO₂の低下を数例で認めた。死亡例における急性変化を元に考察すると、SpO₂低下の原因として肺胞毛細血管においてナノ液滴による一過性閉塞・再開通を来とし、ガス交換の一過性障害が惹起されたものと推測された。

この一過性の微小循環障害は、水平性眼振の出現にも関与したものと考えられる。即ち、摘出した脳組織の脳幹部、小脳に出血・虚血等の変化は病理学的に認められず、椎骨脳底動脈系の穿通枝などの細い血管にナノ液滴による一過性の閉塞・開通が起こったものと推測された。

京大製のナノ液滴による中性脂肪の増加は、原材料の代謝産物からの生合成に伴う副作用と考えられる。今回は単独投与のみ行ったが、動物実験においては反復投与による影響を今後比較・検討する必要があると考える。

以上より、がん治療への相変化型ナノ液滴の臨床応用に向けての問題点として、以下の事項が挙げられる。1) 組織への微小循環障害即ち呼吸・循環器・神経への影響は、高齢者で心肺機能の低下や無症候性脳梗塞が存在する症例では重篤となりうる。2) 原材料による中性脂肪の上昇は、心筋梗塞・脳梗塞のなど閉塞性血管障害の既往のある症例において再発の危険因子となる可能性がある。

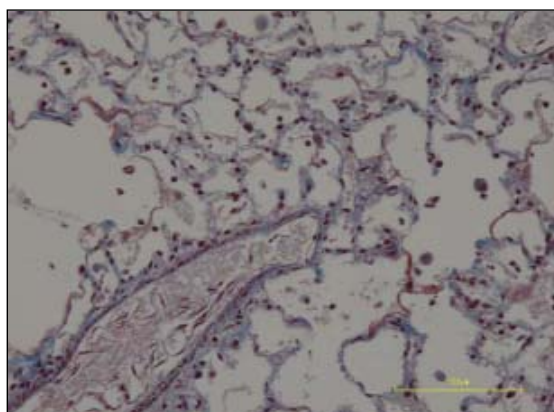
【結論】

相変化ナノ液滴の副作用として、呼吸循環障害（致命的副作用）と水平性眼振、血清中性脂肪増加（一時的副作用）があることが明らかとなった。

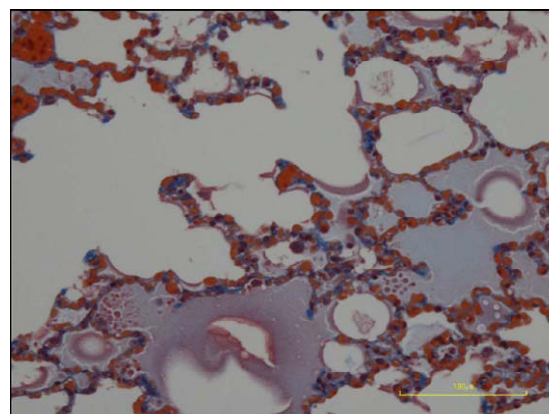
表 2)-1-5-5 相変化型ナノ液滴の副作用

相変化型 ナノ液滴	Sham (生理食塩水)	日立製	KAST製	京大製	ソナゾイド (臨床投与量)
例数	7	8	6	6	7
死亡	0	1	0	1	0
SpO2 10%以上 低下例	0	5	5	1	0 (測定エラー1例有)
水平性眼振	0	0		0	0

対象:ウサギ(36例) 麻酔:ミダゾラム0.4mg/kg, メドミジン0.08mg/kg 筋肉内投与
投与方法:静脈内単回投与 投与量:25mg/kg



1) 日立製投与3日後 死亡例
軽度のびまん性肺胞傷害(フィブリン析出、硝子膜形成、マクロファージの遊走など)が認められ、ショック状態であったことが示唆された



2) 京大製投与後6時間以内 死亡例
急性心不全によると推定される2次的な肺水腫、鬱血が認められた

対象:ウサギ(36例中2例) 麻酔:ミダゾラム0.4mg/kg, メドミジン0.08mg/kg 筋肉内投与
投与方法:静脈内単回投与 投与量:25mg/kg(※帝京大は0.16mg/kg,11mg/kg)

図 2)-1-5-6 死亡例の肺の組織像

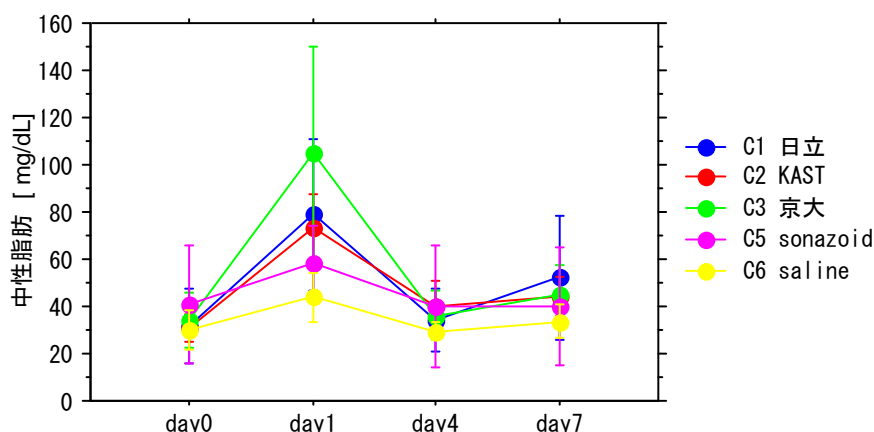


図 2)-1-5-7 相変化型ナノ液滴投与後の中性脂肪の変化

6) 相変化による正常組織傷害の病理組織学的評価

【実験目的】

相変化ナノ液滴とマウス腫瘍モデルに最適化された相変化用超音波を併用した際の正常組織傷害を病理組織学的に評価することを目的として、正常肝組織傷害の A) 強度依存性、B) 超音波照射回数依存性、C) 液滴投与依存性を検証した。

【実験方法】

実験対象：Fisher 344 ラット (250~300 g) 6頭

麻酔方法：イソフルレン (導入 3.0-4.0%, 維持 1.0-2.0%)、マスク吸入麻酔、
酸素 680~750ml/min

測定項目：直腸温、血液酸素飽和度 (SpO2) (前脚)

動物モデル作成方法：Umemura らが用いたマウス開腹下肝臓牽引モデルをラットにおいて作成した^{1,2)}。大腿静脈より 24 G 留置針を挿入後、腹部を正中切開し、肝左葉を 6-0 プロリーン糸で体外に牽引し、専用のフレームに固定した。

超音波条件：

表 2)-1-5-6 超音波条件

群名	超音波条件			
	周波数	波形	波数	強度
L 群	3.381	Single burst	100	2.0kW/cm ² - 2.5kW/cm ²
H 群	3.381	Single burst	100	200kW/cm ² - 250kW/cm ²
H530 群	3.381	PRF53Hz, Duty0.16%, PD10s	100	200kW/cm ² - 250kW/cm ²

実験手順：大腿静脈から日立製相変化型ナノ液滴 (組成 A) を単回投与した後、0.9%の生理食塩水槽中で相変化用超音波を体外に牽引した肝臓に照射した。実験中はラットの直腸温が 36 度~37 度を保つように水温を調整した。超音波の照射時刻は以下の通りである。

L 群 3 例) 液滴投与前、投与後 3 分、40 分

H 群 3 例) 液滴投与前、投与後 3 分、10 分、20 分、30 分、40 分、50 分、60 分

H530 群)

液滴投与 3 例：液滴投与前、投与後 3 分、40 分

液滴非投与 2 例：(液滴投与前、投与後 3 分、10 分、20 分、30 分、40 分、50 分、60 分
を想定)

一回目照射後 0 分、10 分、17 分、27 分、37 分、47 分、57 分、67 分

病理組織学的評価：実験終了後、直ちに安楽死せしめ、肝を摘出した。10%ホルマリン固定後、超音波照射部を切り出し、パラフィン包埋後、600 μ m 毎に厚さ 4 μ m に薄切し、HE 染色を行った。組織傷害重症度分類表の grade II ~ grade IV に相当する組織傷害を (組織傷害) 陽性とした。

【結果】

L 群 3 例において、相変化 (超音波画像上の輝度上昇) を認めず、超音波照射による組織傷害所見は肉眼的・病理組織学的いずれも陰性であった。

H 群 3 例において、相変化現象 (超音波画像上の輝度上昇) は認められなかった。3 例中 1 例で、液滴投与後 10 分に超音波照射による皮下出血を肉眼的に確認し、病理組織学的組織傷害所見は陽性 (最大傷害断面積 0.50mm²) であった。

H 530 群の液滴投与 3 例全例において、液滴投与後 3 分と 40 分に、超音波照射による液滴の相変化を認めた。同時に、肉眼的に被膜下出血、或いは、臓器外への出血を確認した。同部位の病理組織学的組織傷害所見は陽性であった。傷害の最大断面積は 3 分：2.08-2.79mm²、40 分：2.49-3.97mm² であった。また、液滴非投与 2 例において、相変化および肉眼的傷害、いずれの陽性所見を認めなかったが、液滴投与後 10 分に超音波を照射した部位において、病理組織学的に組織傷害陽性所見 (最大傷害断面積 0.33mm²) を認めた。

【考察】

A) 正常肝組織傷害の強度依存性

L 群で用いた超音波条件は、マウス腫瘍モデルに最適化した相変化用超音波条件であった。L 群では、液滴は相変化せず、病理組織学的傷害は陰性であった。このことから、同超音波条件はラット正常肝臓に対して病理組織学的に安全であることが示唆された。

H 群は L 群で用いた超音波強度の 100 倍であったが、液滴投与後 10 分に 3 例中 1 例において最大傷害断面積直径約 0.8mm の組織傷害を招来した。超音波ビーム焦点 (6dB 強度) の短軸方向断面の直径は約 1mm であり、傷害領域と超音波焦点領域が球体であると仮定すると、超音波ビーム焦点領域の体積に対して約 50%の組織傷害領域が 3 例中 1 例に生じたと考えられる。傷害の重症度は grade II ~ IV であった。

以上より、マウス腫瘍モデルに最適化した相変化用超音波条件は超音波ビーム焦点領域内外において、病理組織学的に安全であることが示唆された。強度が 100 倍の場合、超音波ビーム焦点領域外に組織傷害を認めず、標的患部外正常組織においては病理組織学的に安全であると考えられた。

B) 正常肝組織傷害の超音波照射回数依存性

H530 群の結果から、ラット正常肝臓に H 群の超音波を連続して 530 回照射すると、液滴投与後 3 分と 40 分に液滴の相変化を確認できた。この相変化現象は出血を伴い、病理組織学的に傷害所見陽性領域の直径は 3 分：最大約 1.8mm、40 分：最大約 2.0mm であり、ビーム焦点領域に対して 3 分：約 6 倍、40 分：約 8 倍の組織傷害領域が生じたと考えられる。

マウス腫瘍モデルに最適化した相変化用超音波の強度 100 倍条件下では、ラット正常組織における組織傷害は、超音波ビーム焦点領域の約 50%であったが、これを 530 回繰り返し照射すると超音波ビーム焦点領域の 5 倍～8 倍に傷害領域は広がり、傷害の程度は重傷化することが示唆された。

C) 正常肝組織傷害の液滴投与依存性

H530 群で液滴非投与 2 例中 1 例において、液滴投与後 10 分を想定した時刻において、直径約 0.7mm の組織傷害が生じた。組織傷害領域の大きさは超音波ビーム焦点領域の約 30%であった。

マウス腫瘍モデルに最適化した相変化用超音波強度 100 倍条件下で生じた組織傷害領域と同等程度であったことから、H530 群で液滴投与 3 例の組織傷害領域がビーム焦点領域の 5～8 倍であったのは、超音波固有の影響よりも液滴投与による影響であったことが示唆された。

D) 相変化による出血の原因

本実験では、ラット正常肝モデルは梅村等の論文^{1,2)}を基に作成した。このモデルでナノ液滴と超音波を併用すると、肝臓組織よりも周囲の生理食塩水の熱容量が大きいことから、加熱凝固作用が抑えられ、出血が生じ易いことが示唆されている。但し、生理食塩水が無い場合に加熱凝固作用が増高することに関する結果は示されていない。本試験においても、同様の理由から肝挫傷に伴い臓器外への出血を生じた可能性が推測される。

熱的作用を利用した治療法の 1 つに RFA 治療がある。国内においては、肝臓治療が保険適用となっている。RFA 治療では、急激な温度上昇による肝腫瘍内の圧力上昇が問題であり、術中の肝臓破裂の症例報告もあった³⁾。現在は、圧力上昇を防ぐための研究も進んでおり、多段階的に RFA 強度を上げる工夫が取られている⁴⁾。本システムよりも周波数が低く (480kHz 程度の電磁波)、侵襲的治療 (電極を穿刺する) 法であることなどの違いはあるが、実用化に向けては、本システムの熱的作用と圧力上昇の関係も検討する必要があるものと考ええる。

以上より、本治療法においては相変化ナノ液滴と超音波を併用した際の臓器の挫傷や被膜下出血などの出血性合併症の制御が臨床使用に向けての大きな課題である。今回肝臓を標的臓器として選択した理由は、肝細胞がんや転移性肝がんが今後の治療対象となり得ると同時に、ナノ液滴集積の起こりやすい充血性の実質臓器であるという理由である。肝細胞がんや腎細胞がんは血流豊富な腫瘍であるため、ナノ液滴の集積は期待できるが、一方で今回の肝臓と生理食塩水のような解剖学的に臓器と液体が近接する部位に発生した腫瘍 (脈管の集中する肝門部、肝下面胆嚢近傍、腎盂・腎杯部) に適応した場合、動物実験と同様に腫瘍内出血、臓器自体の破壊や腹腔内出血を惹起する可能性がある。従って標的臓器や治療対象とする腫瘍の血管構造のみならず解剖学的構造を念頭において基礎的データを積み上げ、本治療方法の臨床応用への最適化を検討すべきものと考ええる。一方、臓器と液体が近接していない部位に発生した腫瘍に適応した場合においては、加熱凝固作用により組織が傷害され、出血が生じない代わりに、熱的組織傷害が重傷化する場合も考えられる。出血の有無や加熱による組織傷害領域の拡大は、標的患部と液体の相互の位置関係に依存するため、臨床応用に際しては、適切な腫瘍を選択し、適切なモデルにおいて安全性を評価する必要があるものと考ええる。

本実験で使用した超音波条件のラット正常肝臓における有効性は未検討であった。本実験において、最適化された超音波条件とは、動物種の異なるマウス colon26 皮下腫瘍で相変化を生じる超音波条件であった。また、本実験は例数が少なく、統計的処理はできなかった。超音波条件はポジテ

イブコントロールとの比較に留まり、超音波条件と組織傷害との関係を十分に検討したとは言えなかった。以上、課題は多々残す形ではあるが、マウス皮下腫瘍において有効性を担保する液滴投与条件と超音波条件は、ラット正常肝臓に対して無害であったことを示すことができた。

【結論】

マウス腫瘍モデルに最適化された相変化用超音波は、ラット正常肝臓に対して、病理組織学的に安全であることが示唆された。

臨床応用に向けた考察

相変化ナノ液滴と超音波を併用した際の安全基準はこれまでになかった。本研究では、まず、ラット正常肝臓を対象として、相変化ナノ液滴併用超音波による組織傷害の病理組織学的重症度の新分類法を提案した。重症度の grade I は可逆的変性であり、病理組織学的に安全であると考え、その後の安全評価の基準とした。

相変化ナノ液滴は、臨床診断用超音波条件下で相変化と圧壊が可能であることが確認され、現行の臨床診断用超音波診断装置による診断と治療の可能性が示唆された。

一方、相変化ナノ液滴の副作用は呼吸循環障害などであることが明らかとなり、実用化にむけての課題を提起した。

また、マウス腫瘍モデルに最適化された相変化用超音波よりも高強度の超音波を連続して照射すると、肝挫傷に伴う臓器外への出血を生じる可能性が示唆された。

以上より、今後も本治療システムの臨床応用に向けて安全な超音波条件の範囲を更に検討する必要があるものと考えられる。

結論

組織傷害の病理組織学的安全基準を提案し、相変化ナノ液滴と相変化用超音波の安全評価因子を提示した。小動物腫瘍モデルに最適化した相変化用超音波は超音波ビーム焦点外において、病理組織学的に安全であることが示唆された。本治療システムの臨床現場での実用化に向けて、今後も継続して安全な超音波条件の範囲を検討すべきである。

治療用超音波照射シーケンス

背景

本開発では、ナノ液滴の相変化により生じるマイクロバブルをマーカとして治療対象をあらかじめ超音波画像上で確認し、かつマイクロバブルを治療増感剤として用いる低侵襲治療を行うための超音波照射シーケンスおよび治療装置の開発を行う。本開発における超音波治療は、加熱作用とキャビテーションによる作用の双方について検討を行う。

1) 加熱凝固作用

本開発では、ナノ液滴の相変化により局所的に生じたマイクロバブルによる超音波吸収係数の高い領域を選択的に加熱するための超音波照射シーケンスの開発を行う。かかる開発においては、

深さ方向の分解能を失わず、以下に温度上昇領域を広げることができるかが治療のスループットに深く関係する。このような超音波照射方法として、提案者らは位相の180度異なる超音波ビームを同一の焦点をターゲットとして照射するスプリットフォーカス方式を提案し、動物実験によりその効果を実証してきている。本開発では、ナノ液滴の相変化により生成生製するマイクロバブルが存在する条件下でスプリットフォーカスの効果を最適化できる照射条件について検討を行う。

2) キャビテーションによる作用

本開発においては、治療用超音波を照射中あるいは照射直後の患部におけるキャビテーション生成生製状況あるいは温度上昇さらには患部のダメージに関するモニタリングを超音波で行うための新たな計測方式に関する基礎検討を行う。特にこれまで通常の超音波診断画像で用いられることの少なかった超音波の位相情報などの温度や組織変性に起因する信号をも考慮した新たな計測手法に関して治療時のモニタリングに必要な要件の検討を行う。また、本開発におけるナノ液滴が相変化によってマイクロバブルとなった状態は、この三つの過程の成長が終わった段階に相当する。このため、あとは圧壊するだけでキャビテーションの作用を得ることが可能であり、生体においては数 kW/cm² の超高強度の超音波が必要となる場合もあるキャビテーションを低い超音波強度で安定して生じることが可能である。本研究開発では、ナノ液滴の相変化によるマイクロバブルによりキャビテーションを生成生製して治療効果を得るための超音波照射シーケンスの開発を行う。第二高調波重畳法をナノ液滴と組み合わせて治療効果の向上が可能かどうかの基礎検討を行い、加熱凝固治療との相乗的な治療効果を目指す。

方式の提案および検討

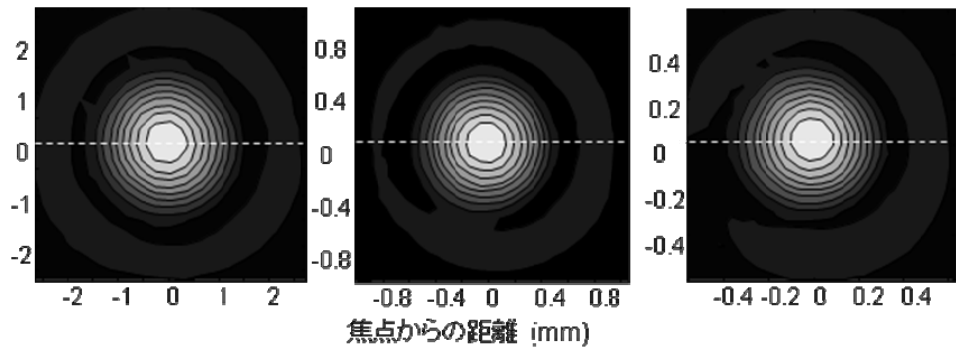
1. 相変化のさせ方と生じるマイクロバブルの挙動との関係

相変化ナノ液滴より生成したマイクロバブルを用いた治療用シーケンスを確立するにあたり、まず、相変化の条件を変化させた際のマイクロバブルの挙動に関する知見を得るための検討を行った。

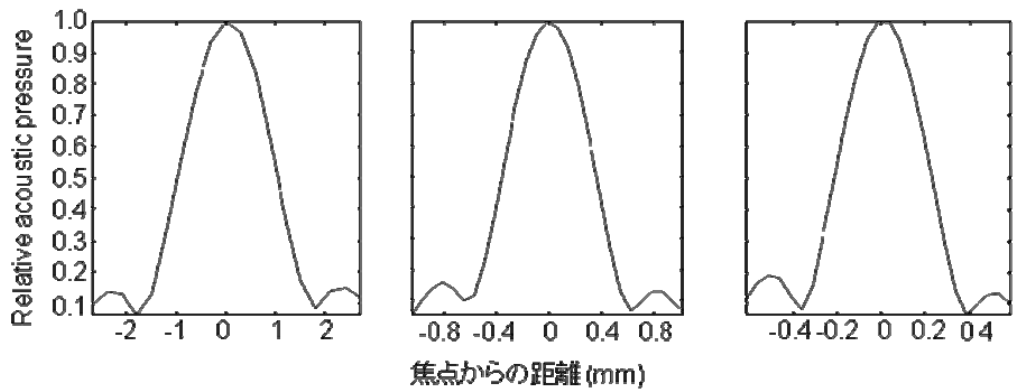
【実験方法・結果・考察】

図2)-2-1-1に、今回用いた超音波トランスデューサの音場形状を測定した結果を示す。今回ひとつのトランスデューサを用いて3つの周波数に関する実験を行ったが、それぞれの周波数において対称性の極めて高い音場が形成されていることがわかる。特に5倍高調波である5.5 MHzに関しては、通常用いられるものではないため、音場の形状について詳細な検討が必要であるが、今回の検討により極めて対称性が高い理想的な音場を形成していることがわかり、実験を行うのに適していることが示唆された。また、生成される超音波強度（音圧）に関する測定も別途行い、100V15Aのブレーカで使用可能なE&I 2100Lを用いて最大10MPaの音圧を発生することが可能であった。図2)-2-1-2は、本実験系での典型的な相変化生成時の超音波診断装置上の変化を示したものである。周波数が高くなるに従って、焦域が小さくなるため、相変化の生じるサイズもそれに合わせてちいさくなっているのがわかる。なお、いずれの周波数においても、焦点の位置よりも手前の位置にのみ相変化が生じていることがわかる。これは、焦点で一番相変化が生じること

により音響的な壁ができ、それ以降の領域への超音波の伝搬が著しく阻害されるためであると考えられる。このような結果は、この相変化による気泡を用いて治療を行う場合には重要であり、治療を行う場所の一番奥側を焦点に持つて行くことが必要となる。図 2)-2-1-3 は、図 2)-2-1-2 に示される超音波画像上の変化を経時的に示したものである。相変化用パルス照射直後に急速に気泡が生成し、その後、指数関数的に減少していく様子が見て取れる。なお、1.1MHz に比べ、それよりも高い周波数を用いた場合には、1 秒経過した後の相対的な輝度値が高いことがわかる。これは、高い周波数では短時間で消失する気泡と長時間存在する気泡の二種類の気泡が存在することを示唆している。このような違いが治療効果に及ぼす変化については今後詳細な検討が必要となるが、基本的には高い周波数での治療では熱的效果が、低い周波数ではキャビテーションと熱的效果の双方が関与する者と考えられる。図 2)-2-1-4 は、超音波の強度（音圧）と超音波の照射時間を変化させたときの相変化の生じる程度を、図 2)-2-1-3 の最大輝度を指標として示したものである。図 2)-2-1-3 から、1.1MHz とそれ以上の周波数とで明確な違いがあることがわかる。すなわち、低い周波数では、一定の超音波強度が加えられれば、照射時間に関係なく相変化が生じるのに対し、高い周波数では、強度と時間とが一定の閾値を超えたときのみ相変化が生成するという傾向があることがわかった。照射時間を 1000 サイクルで固定した際には、周波数が低いほど強度閾値が低いことがわかった。このような結果から、高い周波数においては、熱的な機序により相変化が生じていることが示唆された。これを詳細に検討するため、同じ時間の超音波照射を行いながら、それを短いパルス列にした際に相変化の生成に変化が生じるかどうかを調べた結果を図 2)-2-1-5 に示す。3.3 と 5.5 MHz とで全く異なる結果が得られた。すなわち、5.5 MHz ではパルスが長い、つまり休憩時間が長くなると、相変化が生じなくなる傾向が見られ、3.3 MHz では休憩時間があってもなくても相変化の生成に影響は無かった。以上の結果より、5.5 MHz では熱的な効果により相変化が生じており、1.1 MHz では非熱的な効果おそらくキャビテーション的な効果により相変化が生じていることが予想された。なお、3.3 MHz については、どちらともいえない傾向であった。続いて、これまでの超音波診断装置でのモニタリングで実際にどのような音響的な現象が捉まられているのかを調べるため、収束型のハイドロフォンにより相変化時の音響信号を取得し、結果を解析するとこととした。図 2)-2-1-6～8 に今回用いた各周波数に関する典型的な取得波形、およびそれを周波数解析したもの（スペクトログラム）、さらに相変化が生じたと思われる部位の拡大波形をそれぞれ示す。それぞれの周波数において、相変化時に、低周波（2MHz 以下のインパルス的な波形が生成していることがわかる。



a) 焦点面での音場プロファイル(2D)



b) 焦点面での音場プロファイル(クロスセクション)

1.1 MHz

3.3 MHz

5.5 MHz

図 2)-2-1-1 使用した超音波のビーム形状

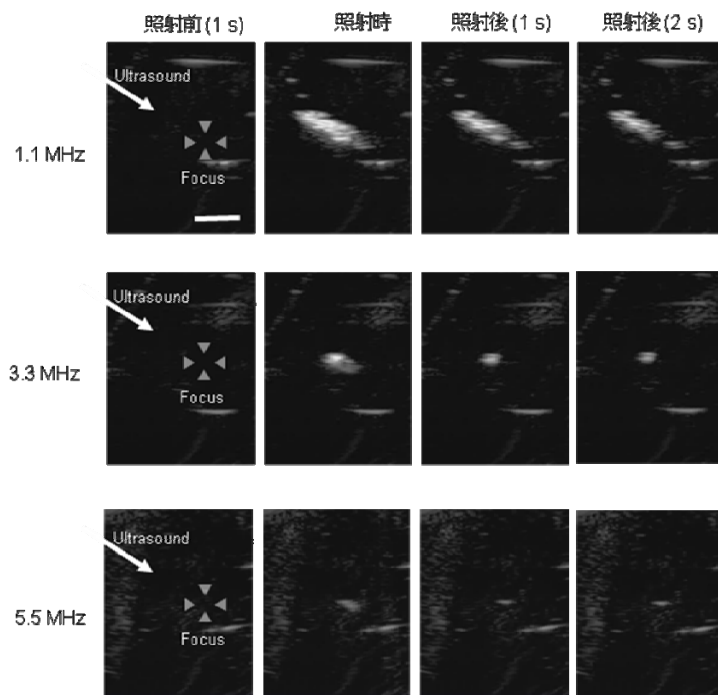


図 2)-2-1-2 相変化時の超音波画像上の変化

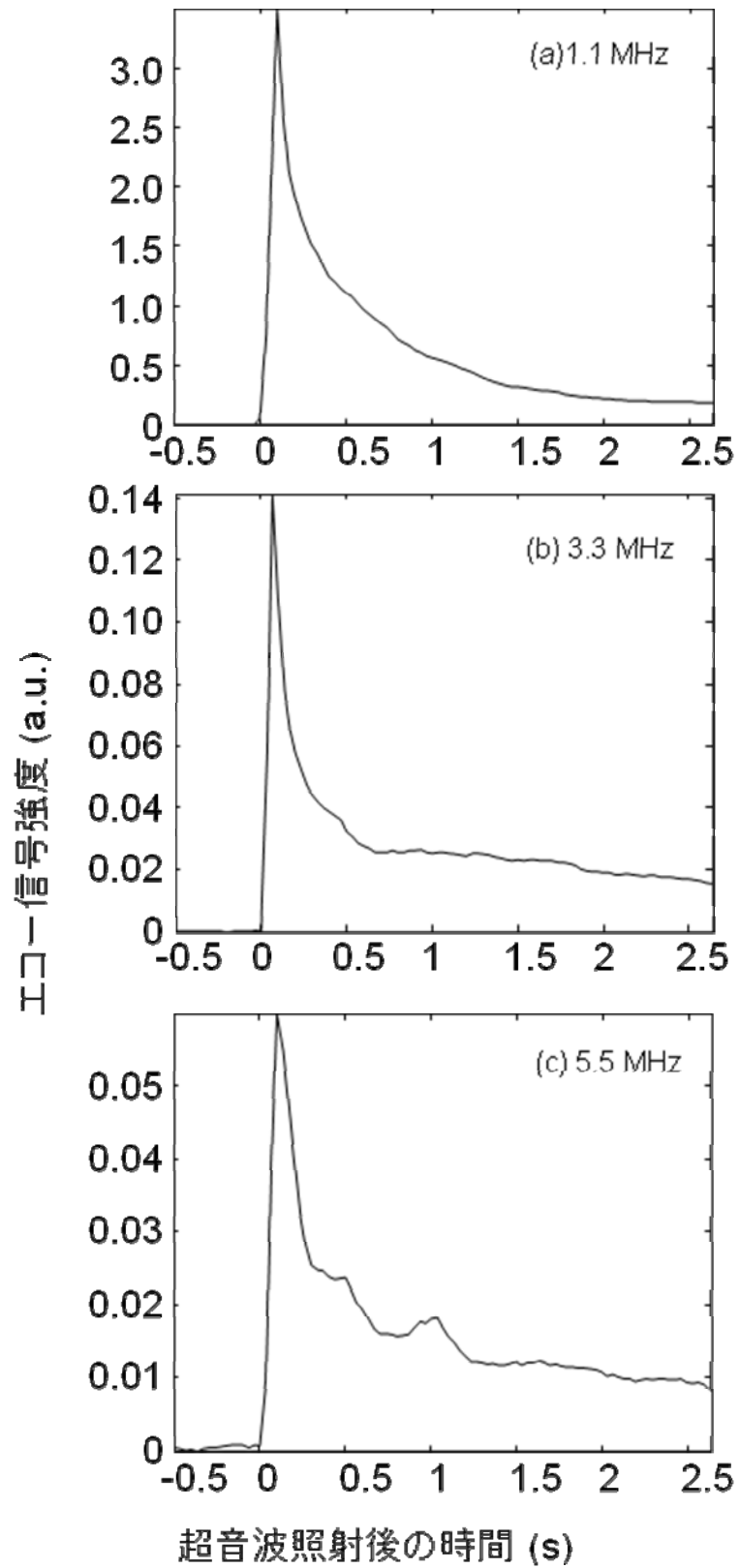


図 2)-2-1-3 相変化時の画像輝度値の時間変化

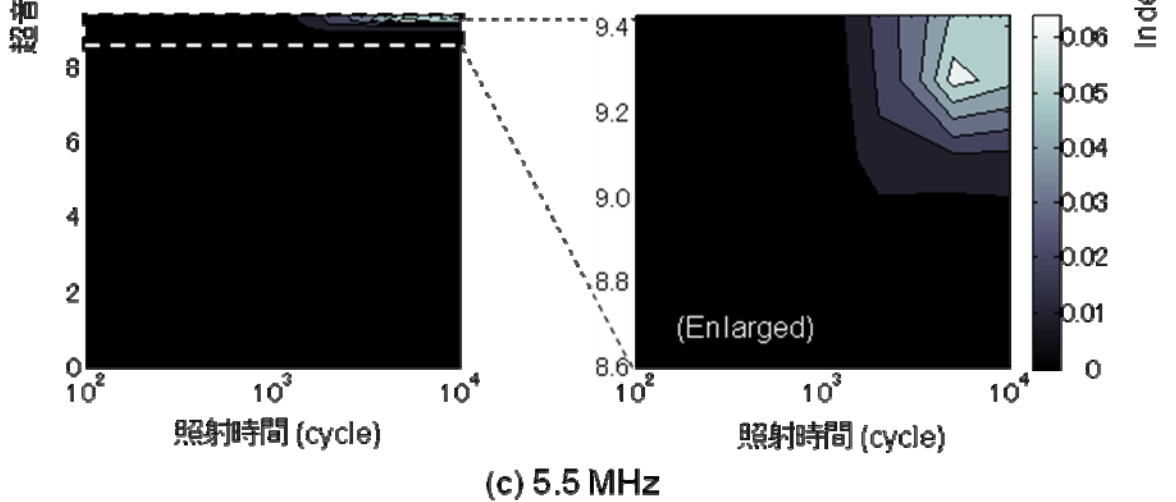
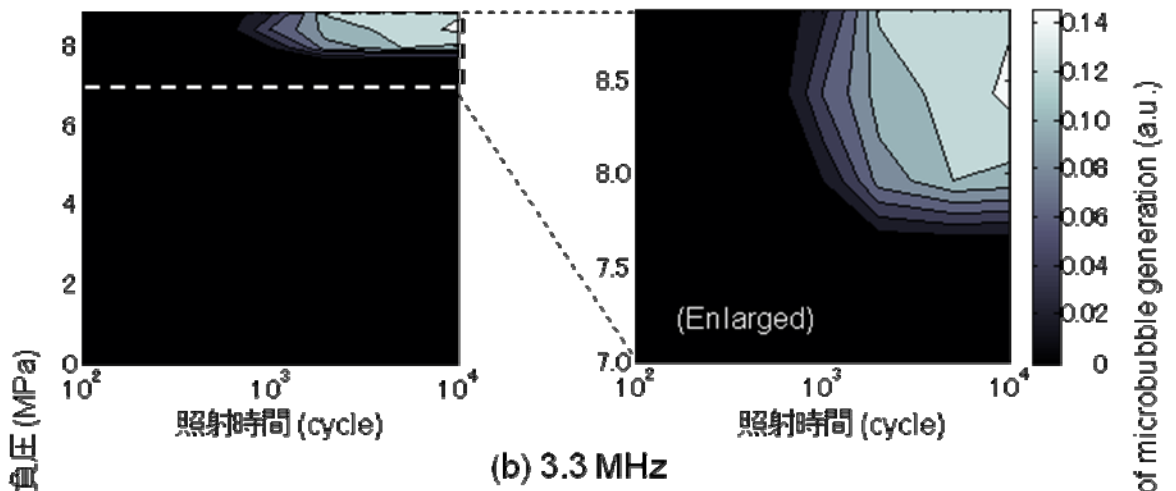
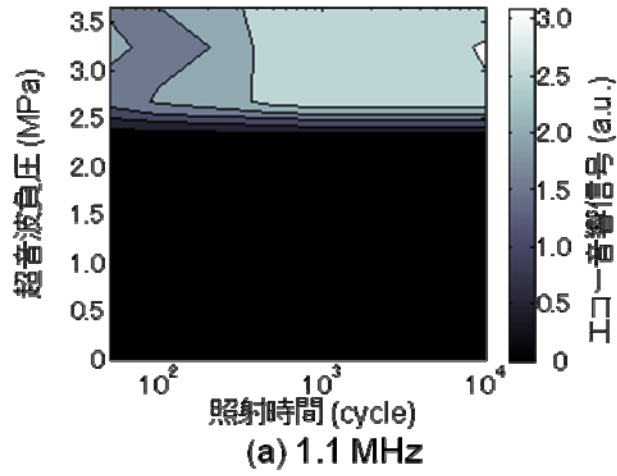


図 2)-2-1-4 エコー音響信号の超音波強度およびパルス長依存性

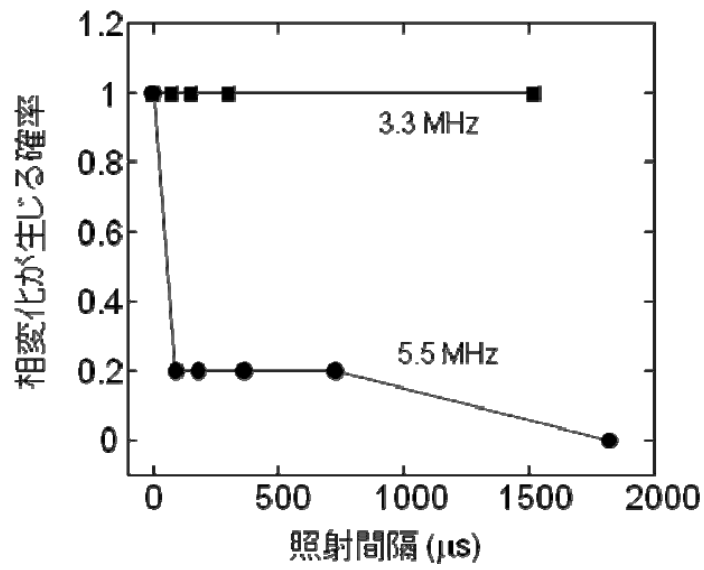


図 2)-2-1-5 間欠照射の効果

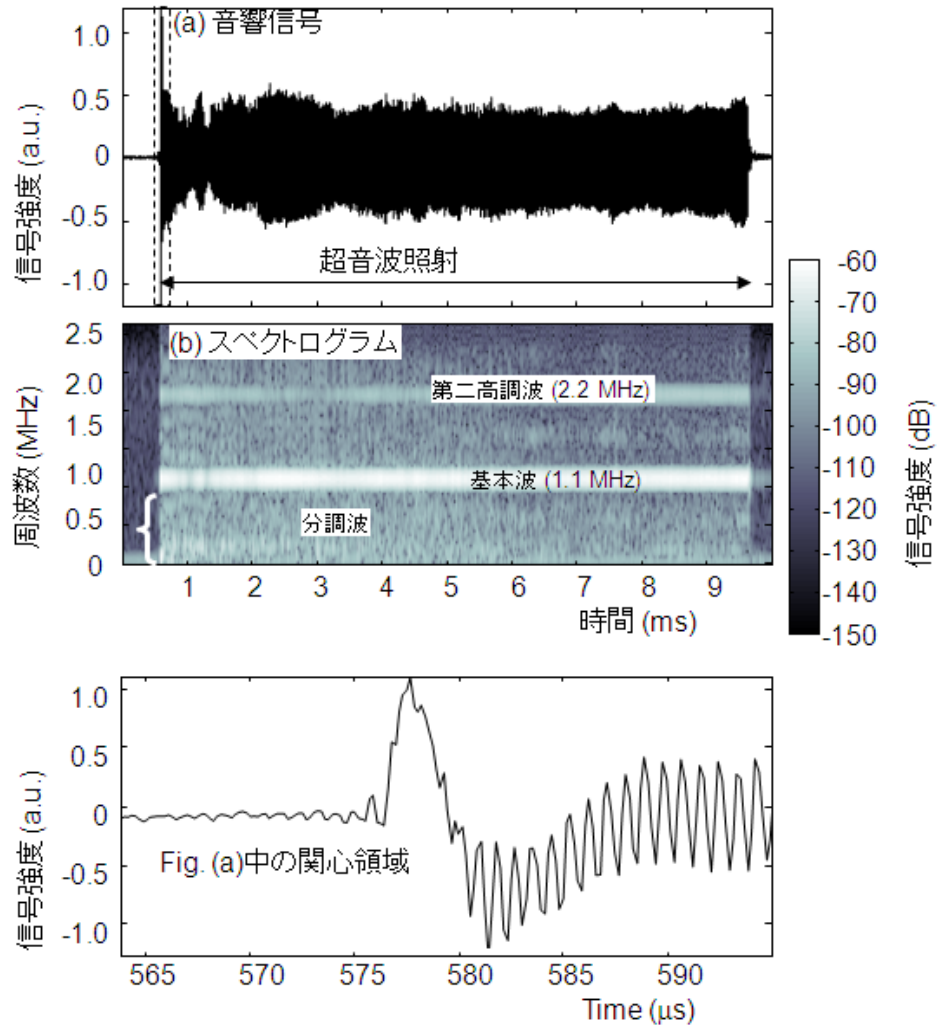


図 2)-2-1-6 相変化時の音響信号 (1.1 MHz)

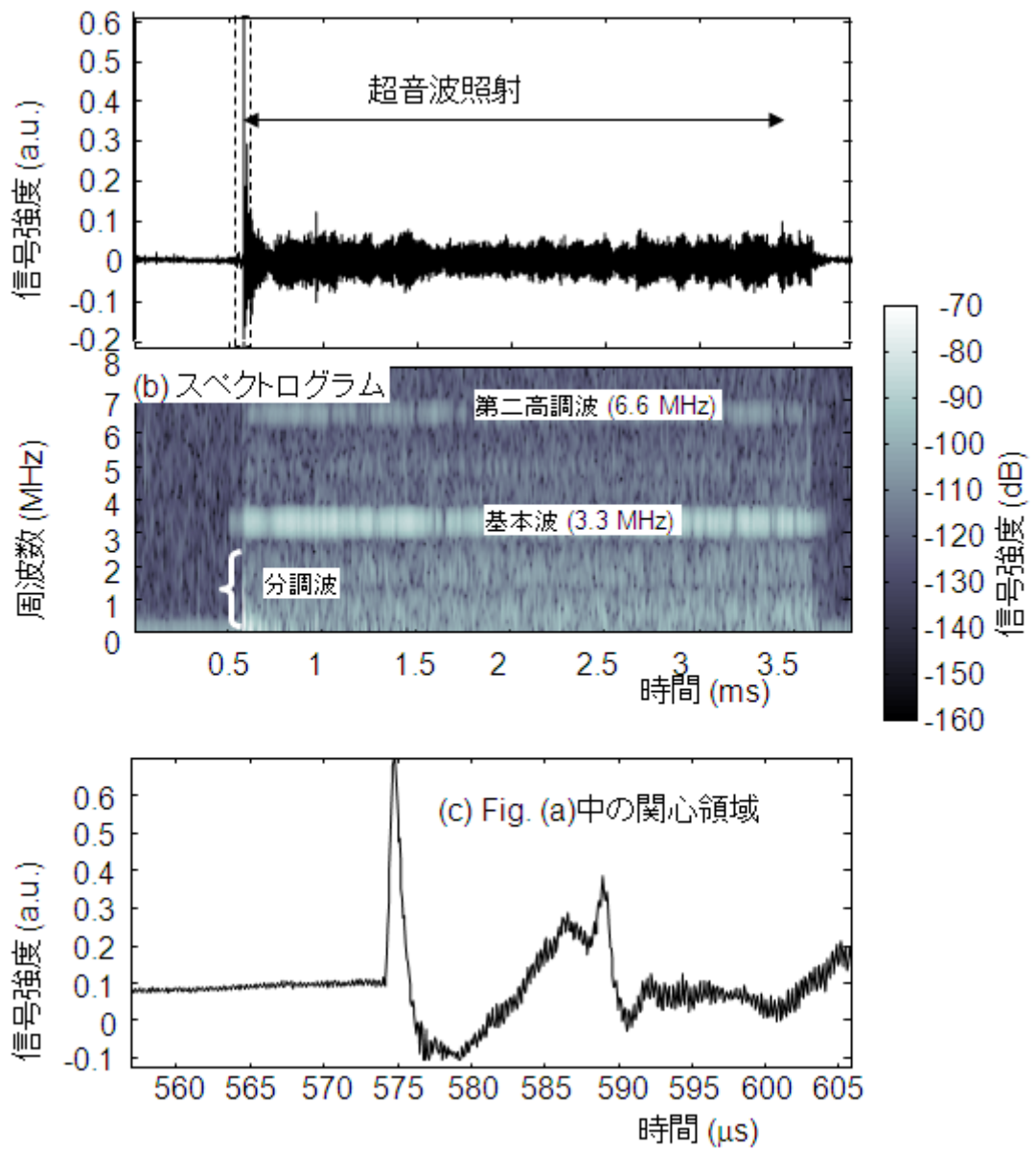


図 2)-2-1-7 相変化時の音響信号(3.3 MHz)

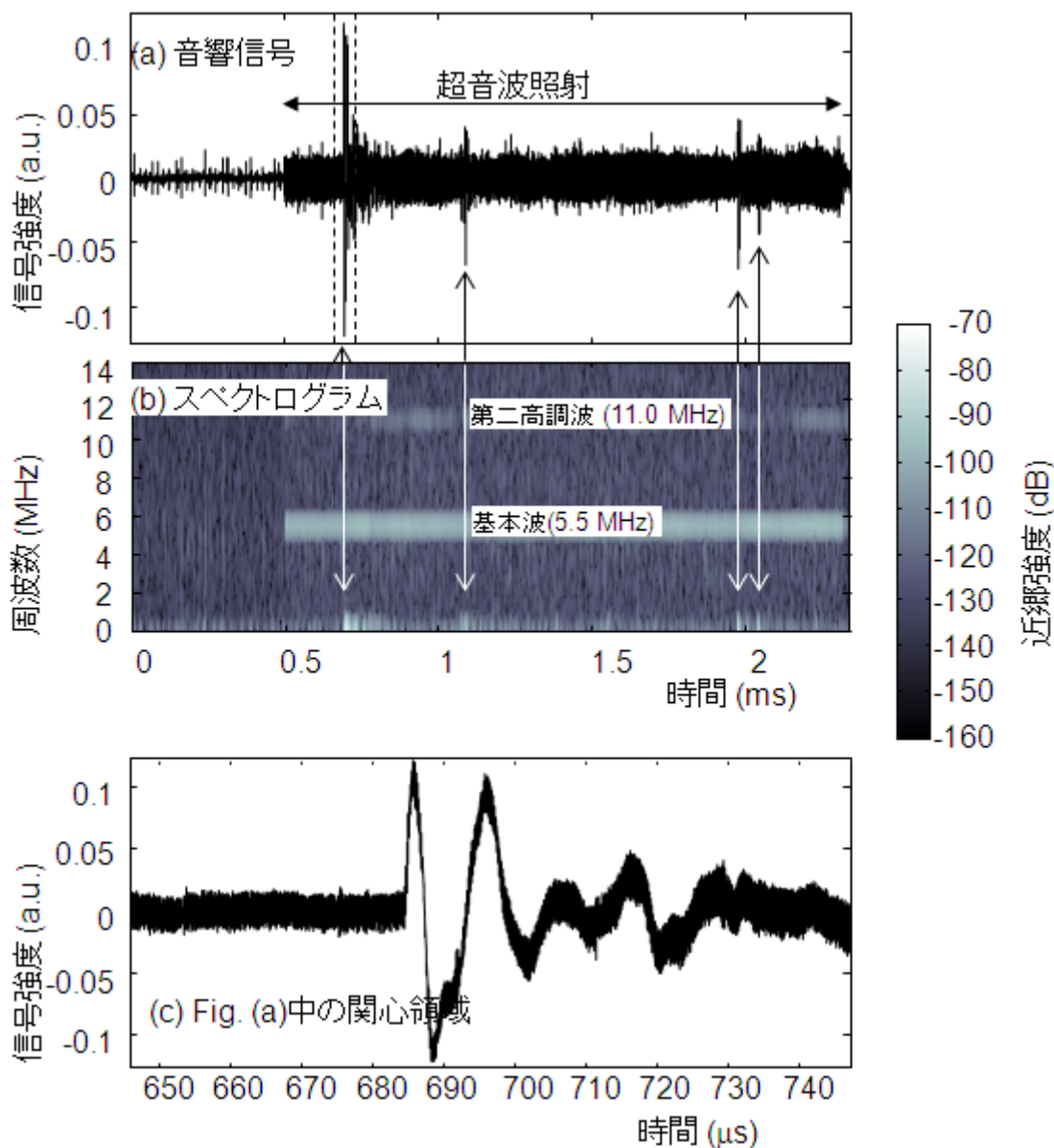


図 2)-2-1-8 相変化時の音響信号(5.5 MHz)

ただし、周波数により異なる点もあり、5.5MHzにおいては、このインパルスの波形が超音波照射直後ではなく、照射開始から約 0.2ms 後に見られている。この 5.5MHz における現象が図 2)-2-1-5 で見られた、休憩時間を長くすると相変化が生じなくなるという結果の原因であると考えられる。

2. 超音波モニタリングを可能とする相変化-治療統合シーケンス

上記検討で得られた相変化ナノ液滴から生成したマイクロバブルの特性を踏まえた上で、そのマイクロバブルを増感剤として用いる治療用シーケンスの開発を行った。

【実験方法・結果・考察】