

医用エンジニアリング研究部

教授：横山 昌幸 DDS, バイオマテリアル
 講師：白石 貢一 DDS, バイオマテリアル,
 イメージング

教育・研究概要

I. 急性期脳梗塞診断及び治療のための高分子キャリア開発

脳梗塞発症急性期（発症後4.5時間以内）において使用される血栓溶解剤（rt-PA）の主作用は血栓溶解であるが、一方で、副作用に症候性の出血がある。すでにrt-PA療法の有効性が示されているが、rt-PA療法によって短期間における出血が高まることも示されている。rt-PA療法時に生じる現象は、rt-PAによる血栓溶解、血栓溶解後の再灌流障害、その後に誘起される血液-脳関門（BBB）の破綻による出血である。rt-PAが再灌流障害時に脳実質に漏出することが出血リスクをさらに高めることが知られている。即ち、発症から血栓溶解治療を行う前までの短時間の間に脳出血リスクの危険性を診断することが強く求められている。医用エンジニアリング研究部は脳梗塞発症後のBBBの病態診断を行うことが、出血リスクの診断に結びつくと考え、BBBの病態とその機能との関係をイメージング手法によって評価する研究を行っている。

前年度まで、ラット中大動脈虚血-再灌流モデルにおける再灌流障害におけるBBBの病態を、大きさ20nmのナノ粒子である高分子ミセルMRI造影剤によってBBBの透過性亢進評価を行ってきた。この手法は、再灌流障害時に起こるBBBの透過性亢進、即ち、通常では透過しない物質の透過性が起きているBBB透過性亢進領域を定量的に高磁場MRIによって明らかにする手法である。本年度は、ラット中大動脈虚血-再灌流モデルにおけるBBBの透過性亢進における分子量の影響、すなわち分子量約67kのrt-PAのBBB透過性を評価するために、異なる分子量の高分子MRI造影剤を作製し、BBBの透過性評価を実施した。

1. 生体適合性高分子を基盤とする高分子MRI造影剤による血液-脳関門透過性評価

1) 生体適合性高分子を基盤とする分子量の異なる高分子MRI造影剤の作製

生体中に存在するたんぱく分子やrt-PAのBBB透過性評価を行うために、分子量の異なる新しい高分子MRI造影剤を作製した。昨年度の問題は、分

子量80kのポリグルタミン酸を基本骨格にしたMRI造影剤を作製したが、マウス血中半減期が短いこと、ラット中大動脈閉塞による虚血-再灌流モデルに投与したMRI造影剤によって明瞭な画像が得られなかったことである。MRI造影剤の評価を行った結果、MRI造影剤作製途中の加水分解過程において分子量が著しく小さくなっていることが明らかとなった。この問題を解決し、設定した分子量のMRI造影剤を作製するために、初段階から分子量の大きなポリグルタミン酸を合成し、加水分解を最小限に留める条件を見出し、分子量3万、及び10万程度のポリグルタミン酸型MRI造影剤の作製に成功した。

2) ラット中大動脈閉塞（MCAO）による虚血-再灌流モデルにおける高分子MRI造影剤の血液-脳関門透過性評価

ラットMCAOモデル作製完了後、3時間閉塞後に糸を抜去させ、血流の再開通を行い、血流再開後のBBB透過性亢進領域について高磁場MRIによる評価を行った。ポリグルタミン酸系MRI造影剤は再開通直後1～5分以内に0.033mmol/kgの投与量で尾静脈より投与した。

(1) 分子量30kのポリグルタミン酸系MRI造影剤

再開通後のT₂強調画像、拡散強調画像から閉塞領域内の浮腫形成から虚血-再灌流モデル作製の成功は確認されたが、分子量30kのポリグルタミン酸系MRI造影剤によって増強されるT₁強調画像はわずかであった。ポリグルタミン酸系MRI造影剤は、再開通直後に投与されているため、初期のポリグルタミン酸系MRI造影剤濃度は十分に高いと考えられる。しかしながら、血流再開通後に脳実質内のT₁強調画像に顕著な画像変化が示されなかったことから、BBBを介した脳実質への集積よりも、血中からの消失が早かったことが示唆された。

(2) 分子量100kのポリグルタミン酸系MRI造影剤

一方、分子量100kのポリグルタミン酸系MRI造影剤は再開通後30分から1時間にポリグルタミン酸系MRI造影剤の脳実質内への集積の結果、T₁強調画像の顕著な画像変化が認められた。再開通3時間後までの時間変化において、T₁強調画像は1～2時間で最も強く、3時間後ではむしろ弱くなる場合があった。2つの異なる分子量の比較を本動物モデルにおいて行ったが、分子量が小さいことによる半減期への影響によって、現在までのところ、分子量によるBBB透過性の違いは得られていない。一方、非常に大きな分子量となる高分子ミセルMRI造影

剤の場合と同様に分子量が100kの場合にもBBBの透過性領域は見出された。

3) 新たなキレート化剤を用いた高分子MRI造影剤の開発

高分MRI造影剤に用いてきた環状キレートDOTAは1つの配位部分を高分子への結合に用いているため、ガドリニウムイオンに対する配位力はわずかに弱まっている。MRI造影剤の製剤開発における問題はキレート基から外れたガドリニウムイオンの生体中への漏れである。より安全なMRI造影剤開発を目指すにあたっては、より高いガドリニウムイオンへの配位力を有するキレート化剤を用いることが求められる。高分子への結合と高いガドリニウムイオンに対する配位力を両立させるため、本年度より新たなキレート化剤を用いてMRI造影剤の作製を行っている。

II. 高分子ミセルキャリアシステムの免疫原性の解明

高分子ミセルは内核と外殻という異なる2層構造を有し、薬物封入することが可能であり、封入した薬物動態を適切に制御することができる薬物キャリアシステムである。高分子ミセル形成をするブロックコポリマーは生体親和性に優れ、無毒であることが望ましい。現在、生体親和性に優れた高分子の代表例であるポリエチレングリコール(PEG)は多くの医薬品・食品等に用いられている。PEGは非常に低い抗原性という性質を持つ。しかしながら、近年、PEGに関する免疫原性が問題となっている。即ち、PEGを有する薬物(PEG化たんぱく質、PEG化粒子)の投与によってPEGに対する抗体産生が誘導される。そのため、それ以降の治療に影響、及び副作用がでることが報告されている。昨年度まで、PEGに対する免疫原性に関して、アジュバントを用いた抗体産生応答を評価してきた。本年度、引き続きPEGに関する免疫原性についての研究を行った。

1. PEG-PBLAを用いた繰り返し投与におけるIgG産生

T細胞非依存的な応答を示すPEG-PBLAの繰り返し投与を行うと、初回投与量に応じてIgG産生が認められることを報告した。一般に、T細胞非依存的抗原がIgMを主とし、IgGクラスを示す場合があることは知られている。しかしながら、1種の抗原としてPEG-PBLAの投与量だけに依存したIgクラスの変化がなぜ誘導されるのかについて検討を行った。初回PEG-PBLA投与後の2回目PEG-PBLA投与を2週間、または6週間後に実施した。

初回投与量が低く、初回投与後に少ない量の抗PEG IgM抗体が産生されている場合には、2週間後、6週間後の2回目のPEG-PBLA投与によって抗PEG IgG抗体産生が認められた。一方、初回投与量が高く、初回投与後に多量の抗PEG IgM抗体が産生されている場合には2週間後のPEG-PBLA投与では抗PEG IgG抗体産生を示さなかった。一方で6週間後にPEG-PBLAを投与した場合には抗PEG IgG抗体産生が認められた。これらの結果が意味することは、T細胞非依存性の抗原はIgM抗体産生が主であるが、IgGクラスへのスイッチをその応答量に応じて行うということを示唆している。ここで得られた知見は物質の抗原性に対する非常に重要な知見と考えられる。

「点検・評価」

1. 急性期脳梗塞診断及び治療のための高分子キャリア開発

脳梗塞発症急性期において、虚血-再灌流障害におけるBBB血管透過性の評価はrt-PA治療時に誘導される出血と深く関わっており、BBB血管透過性の評価は非常に重要な手法と考えられている。本年度、新たに分子基盤としてポリグルタミン酸系MRI造影剤を作製し、BBB透過性との関係をMRIにて評価した。昨年度より問題となっていたポリグルタミン酸系MRI造影剤の問題は解決に至り、それを用いたラットMCAO評価を行った。ポリグルタミン酸系MRI造影剤の分子量とその体外への排出との関係から、目的とする分子量依存的なBBB透過性の結果は得られなかったが、作製法の確立とともに集積後の排出にこれまで得られた知見とは異なる挙動が認められ、今後、明らかにする必要がある。この研究は総合医科学研究センター超音波応用開発研究部との共同で行った研究である。

一方、分子量の異なるMRI造影剤によるBBB透過性評価とともに、より安全なMRI造影剤開発を開始した。MRI造影剤におけるガドリニウムイオンの毒性の問題は、臨床で用いられているMRI造影剤の繰り返し投与によって、明らかな蓄積があることが認められて以来、非常に関心の高い問題である。現在のMRI造影剤の問題は使用されるガドリニウムイオンのキレート化剤からの漏出であり、これにより腎臓、脳内で蓄積が起きている。これらの問題を解決するために、ガドリニウムイオンに対する配位力の強い新たなキレート化剤を用いて、ガドリニウムイオンの漏出のない安全なMRI造影剤開発を開始した。現在まで、順調に進められている。

2. 高分子ミセルキャリアシステムの免疫原性の解明

薬物キャリアシステムで用いられる PEG の免疫原性とその影響について、薬物キャリアと抗 PEG 抗体との関係を世界に先駆けて初めて明らかにし、報告を行った。PEG の免疫原性については、多くの PEG 化たんぱく質製剤が臨床試験中あり、この問題はアカデミア・企業の関心が非常に高い。それゆえ PEG に関する免疫原性を明らかにすることは重要である。さらには、これまで PEG を用いた免疫原性の知見より新たな概念を生む結果が示唆されている。T 細胞非依存的な抗原である PEG 分子は、1 種の抗原にも関わらず、投与条件のみによって IgM クラスを示す場合と IgM/IgG クラスを産生する場合があることを見出した。投与量だけに依存して IgG 抗体クラスが誘導される場合について重要な知見を得た。この結果は、これまで本研究で得られてきた知見によって初めて見出された結果であり、この意味は TI 抗原の根本的性質であると考えられる。PEG を用いる免疫原性についての検討は引き続き行う必要がある。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Shiraiishi K, Kawano K¹⁾, Maitani Y¹⁾ (¹Hoshi Univ), Aoshi T²⁾³⁾, Ishii KJ²⁾³⁾ (²Osaka Univ, ³Natl Inst Biomedical Innovation), Sanada Y⁴⁾, Mochizuki S⁴⁾, Sakurai K⁴⁾ (⁴Kitakyushu Univ), Yokoyama M. Exploring the relationship between anti-PEG IgM behaviors and PEGylated nanoparticles and its significance for accelerated blood clearance. *J Controlled Release* 2016; 234: 59-67.
- 2) Wang Z, Sawaguchi Y¹⁾ (¹Nihonyakka Univ), Hirose H²⁾, Ohara K²⁾, Sakamoto²⁾ (²Kaneka), Mitsumura H, Ogawa T, Iguchi Y, Yokoyama M. An in vitro assay for sonothrombolysis based on the spectrophotometric measurement of clot thickness. *J Ultrasound* 2017; 36(4): 681-98. Epub 2017 Feb 2.
- 3) Wang Z, Komatsu T, Mitsumura H, Nakata N, Ogawa T, Iguchi Y, Yokoyama M. An uncovered risk factor of sonothrombolysis: substantial fluctuation of ultrasound transmittance through the human skull. *Ultrasonics* 2017; 77: 168-175. Epub 2017 Feb 16.
- 4) Shiraiishi K, Wang Z, Kokuryo D²⁾, Aoki I¹⁾ (¹Natl Inst Quantum Radiological Sci Technol), Yokoyama M. A polymeric micelle magnetic resonance imaging (MRI) contrast agent reveals blood-brain barrier (BBB) permeability for macromolecules in cerebral ischemia-reperfusion injury. *J Control Release* 2017; 253: 165-71. Epub 2017 Mar 18.

II. 総説

- 1) 横山昌幸, 王 作軍, 中田典生, 三村秀毅, 井口保之. 先進医療に寄与する超音波技術 経頭蓋超音波透過率の平準化. *超音波 techno* 2016; 28(3): 24-7.

III. 学会発表

- 1) Shiraiishi K, Kawano K¹⁾, Maitani Y¹⁾ (¹Hoshi Univ), Aoshi T²⁾³⁾, Ishii KJ²⁾³⁾ (²Osaka Univ, ³Natl Inst Biomedical Innovation), Sanada Y⁴⁾, Mochizuki S⁴⁾, Sakurai K⁴⁾ (⁴Kitakyushu Univ), Yokoyama M. Immunogenicity of PEG-related nano-probe. 第 11 回日本分子イメージング学会総会・学術集会, 神戸, 5月.
- 2) 白石貢一, 川野久美¹⁾, 米谷芳枝¹⁾ (¹星薬科大), 青枝大貴²⁾³⁾, 石井 健²⁾³⁾ (²大阪大, ³医薬基盤・健康・栄養研究所), 横山昌幸. ナノ粒子をイメージングプローブとして用いる際の高分子ミセル形成の有用性. 第 32 回日本 DDS 学会学術集会, 静岡, 7月.
- 3) 白石貢一, 王 作軍, 横山昌幸. (シンポジウム 5: 病態メカニズムに迫るイメージング技術~DDS への期待~) 血液-脳関門を介した物質移動による脳疾患病態生理評価~イメージングによる診断治療を目指して~. 第 32 回日本 DDS 学会学術集会, 東京, 7月.
- 4) Shiraiishi K, Kawano K¹⁾, Maitani Y¹⁾ (¹Hoshi Univ), Aoshi T²⁾³⁾, Ishii KJ²⁾³⁾ (²Osaka Univ, ³Natl Inst Biomedical Innovation), Sanada Y⁴⁾, Mochizuki S⁴⁾, Sakurai K⁴⁾ (⁴Kitakyushu Univ), Yokoyama M. Fact of PEG-related antibody generation and its relation to accelerated blood clearance. 2016 CRS (Controlled Release Society) Annual Meeting, Seattle, July.
- 5) 白石貢一, 川野久美¹⁾, 米谷芳枝¹⁾ (¹星薬科大), 青枝大貴²⁾³⁾, 石井 健²⁾³⁾ (²大阪大, ³医薬基盤・健康・栄養研究所), 横山昌幸. 高分子キャリアの抗体産生, 及び抗体との結合に関する研究. 遺伝子・デリバリー研究会第 16 回夏季セミナー, 長崎, 9月.
- 6) 白石貢一, 川野久美¹⁾, 米谷芳枝¹⁾ (¹星薬科大), 青枝大貴²⁾³⁾, 石井 健²⁾³⁾ (²大阪大, ³医薬基盤・健康・栄養研究所), 横山昌幸. PEG を有する高分子キャリアと抗体へ結合と抗体産生. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 福岡, 11月.
- 7) Shiraiishi K, Kawano K¹⁾, Maitani Y¹⁾ (¹Hoshi Univ), Aoshi T²⁾³⁾, Ishii KJ²⁾³⁾ (²Osaka Univ, ³Natl Inst Biomedical Innovation), Sanada Y⁴⁾, Mochizuki S⁴⁾, Sakurai K⁴⁾ (⁴Kitakyushu Univ), Yokoyama M. Exploring anti-PEG antibody's (anti-PEG Ab) behaviors in relation to hydrophobicity of PEG-conju-

gates. ICBS2016 (3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo). Tokyo, Nov.

IV. 著 書

- 1) 横山昌幸. Section 7: 微粒子キャリア製剤を利用した薬物ターゲティング 8. 高分子ミセル, Section 10: 次世代型 DDS 技術. 橋田 充¹⁾ 監修, 高倉喜信¹⁾ (¹京都大) 編. 図解で学ぶ DDS: 薬物治療の最適化を目指す先端創薬技術. 第 2 版. 東京: じほう, 2016. p.132-4, 59-72.

超音波応用開発研究部

准教授: 中田 典生 超音波診断学, 医用工学(人工知能分野)

教育・研究概要

I. 超音波による血管閉塞予防法の研究

脳血管塞栓症発症後の超急性期血管再開通治療すなわち組換え組織型プラスミノゲンアクチベーター (rt-PA) 処置直後には血管再開塞がしばしば発症する。rt-PA 治療後 24 時間以内に抗凝固療法が禁止されるため、血管再開塞は致命的な問題である。我々は、インビトロ血餅成長モデルにおける非侵襲超音波の血栓成長制御効果について研究を進めている。この研究では、非侵襲的な超音波照射が血栓の成長を制御できることを示した。安全かつ単純な超音波照射は、超急性期脳梗塞に対する rt-PA 治療後の再開塞を防止するために使用することが可能であると考えられ、さらなる臨床応用に向けて基礎的研究を進めている。

II. 経頭蓋超音波透過率の平準化の研究

急性期脳梗塞に対して経頭蓋超音波血栓溶解促進療法が研究・開発されている。この療法では、超音波頭蓋骨透過率は、有効性と安全性を規定する重要因子である。本研究では、この透過率が大きく変動すること、およびその変動を小さくする超音波変調技術について研究を進めている。

III. ディープラーニング (DL) による乳腺超音波診断支援システム開発の研究

本研究では機械学習の一種である DL を用いて、人工知能 (AI) による B モード乳腺超音波画像に良悪性判定をさせる診断支援システムを開発することを目指している。本研究のため病理診断結果がある乳腺超音波画像 (教師データ) が最低でも 1,000 症例以上必要であり、現在倫理委員会の承認を得て、症例を収集するとともに DL のプログラムをインストールして AI の実験を行う準備を進めている。本研究により乳腺超音波画像診断医の診断効率の向上が期待されている。

IV. 画像診断における AI 活用推進のための教育・啓蒙活動

2017 年 1 月 12 日から 3 月 29 日まで合計 4 回、厚生労働大臣の指示で厚生労働省本省にて保健医療