

医用エンジニアリング研究室

教授：古幡 博 超音波医学
准教授：横山 昌幸 バイオマテリアル, DDS

教育・研究概要

I. 超音波の医療応用

超音波照射による、脳梗塞血栓溶解、腫瘍縮退の臨床実現に関する研究を行った。特に、先端医療開発特区に採択されている、「急性脳梗塞系統的治療のための分野横断的診断・治療統合化低侵襲システムの開発」の実施に関し、本学の各教室および他大学・施設と共同研究開発を実施した。

1. ラット急性脳梗塞モデルによる安全性評価（神経病理との共同研究）

急性脳梗塞の非開通状態を招来した場合に、血栓溶解剤（rt-PA）と経頭蓋中周波数超音波（500KHz）を照射したときの出血率、浮腫、梗塞領域の増減を評価した。超音波を照射することによる悪影響の増加は、病理組織学的に認められなかった。

2. 超音波 rt-PA 用量減少作用の検討

超音波は、ヒト頭蓋内で多重反射と定在波を発生させる。これを超音波振動子駆動用電気信号で抑制し得ることを、シュリーレン法を用いて明らかにした。

3. 頭蓋内における定在波抑制の検証

超音波は、ヒト頭蓋内で多重反射と定在波を発生させる。これを超音波振動子駆動用電気信号で抑制し得ることを、シュリーレン法を用いて明らかにした。

4. 超音波血栓成長抑制効果の研究

経皮的超音波照射が血管内血栓形成を阻害することを既に明らかにしてきた。その定量的評価実験を *in vitro* で行い、超音波の粒子速度がその主要原因になり得ることを以って、強度依存的であることを示すと共に、その最少閾値は $0.075\text{W}/\text{cm}^2$ であることを示した。

5. 超音波生体内音響作用の研究

既に超音波による一酸化窒素（NO）産生を実時間測定することに成功した。改めて腫瘍内でも NO 産生を惹起する事を示し、腫瘍成長抑制などに関与し得る可能性を示した。

6. 頭蓋超音波 DDS の研究

血液脳関門（BBB）の薬物透過性を高める超音波条件を MRI 評価の下に検討した。特にマイクロバブルを併用した場合には、低音響強度（ $0.3\text{W}/$

cm^2 以下）でも出血性 BBB の破壊を伴わずに数 nm の粒子（Evans blue など）を通過せしめることを確認した。

II. 高分子ミセル薬物キャリアーシステム

抗がん剤などをターゲティングする高分子ミセル型のキャリアーシステムを開発する。

1. 免疫応答評価

高分子ミセルはその外側にポリエチレングリコール（PEG）を有することから、PEG-修飾リポソームで知られている免疫現象である ABC 現象を引き起こす懸念がある。ABC 現象が起こると、ターゲティング性能が顕著に低くなる。ABC 現象で典型的に見られる、2 回目の投与でキャリアーの血中濃度が減少することが、高分子ミセルでは起きないことがわかった。

2. ミセル内核の解析

高分子ミセルキャリアー内に薬物がどのような状態で封入されると、生体内のターゲティングを実現する安定性を示すかについては、全く情報がなかった。SPRING-8 の強力な放射光を用いた散乱解析によってミセル内核を調べると、薬物の安定封入には、内核構成高分子鎖の結晶性と内核表面の PEG 密度が重要であるという新知見が得られた。

3. 内核を光架橋した高分子ミセル作製

高分子ミセルは体内で解離することで長期的な蓄積毒性がないことが特長であるが、その *in vivo* で解離挙動のターゲティングへの影響が未解明である。この解明には、ミセルの大きさ、物性が通常のミセルと同一で解離しないミセルが最も有効な手段である。このために、光照射によってミセル内核が化学的に架橋するシステムを構築した。光架橋部分としてカルコン基を高分子鎖一本当たり平均 2 個導入したミセルで、光架橋に成功した。

III. 画像診断用高分子造影剤の研究

合成高分子を用いて超音波と MRI 造影剤を作製し、その機能解析を行った。

1. 超音波造影剤

液体のパーフルオロカーボンを内部に含む高分子エマルジョンである。この液体は超音波照射によって気体に相変化し、高い超音波造影効果を示す。従来は、がん組織に浸透できるような粒径 200nm 程度のエマルジョンを作製することはできなかった。今回、超音波洗浄機の超音波照射という容易な方法によって、従来法に比べて著しく小さな平均粒径 170~220nm のエマルジョンを、高いパーフルオロ

カーボンの封入率で得ることに成功した。

2. MRI 造影剤

内部にガドリニウムイオンを封入した高分子ミセルを作製した。これが、マウス固形がんターゲットングされて、T1 コントラストを高くがん部位を画像化することに成功した。また、腫瘍血管特異的破断薬 (Cderiv) によって、造影剤の蓄積が有意に増加させ、MRI 画像で高い輝点を得ることに成功した。

一方、同じ高分子ミセル造影剤によって、脳梗塞虚血梗塞部位が造影されることを見いだした。その描出部位は、脳梗塞画像として一般的な脳浮腫領域の一部であった。高分子である rt-PA が脳組織に浸透して出血を起こす危険部位を高分子の造影剤が描出することが期待される。ここで得られたコントラスト高い MRI 画像は、従来の低分子 MRI 造影剤で得られることはなかった。

IV. 研究室配属

1名の研究室配属では、高分子ミセルキャリアーの高分子合成、物性評価を行った。

「点検・評価」

スーパー特区研究として急性脳梗塞治療の研究を実施した。特に大学によってスーパー特区共同実験施設Ⅱを設備されたことによって、血栓溶解に関する超音波と薬剤用量の定量的関係について実験を追求する基盤ができた。さらに経頭蓋的な超音波の影響について新設した大型シュリーレン装置を用いることで、極めて円滑に研究を追求することができた。

ただし、ESR を新規設置したが、人出が不足し、充実した実験を行うことができなかった。スーパー特区としては研究を実施するための人出、またその雇用経費の不足が大きく特区研究の円滑な追求には少なからず障害となった。

同じく超音波の医療応用ではあるが、スーパー特区の脳梗塞ではなく、固形がんへのデリバリー増強という新しいテーマへの足がかりが得られたことは、今後の進展に大きな者であったと考える。

高分子ミセル薬物キャリアーシステムは、横山が研究開発に係わった抗がん剤システムが4種類臨床試験中である。この状況に鑑み、次の世代の開発のための基礎工学的研究に重点をおいている。今回の検討により、高分子ミセルがABC現象という免疫現象を示さない事実は、高分子ミセルがキャリアーシステムとして大変優れていることをしめす。しかし、抗がん剤のデリバリーが中心の現状は、この事実は

それほど重要ではない。抗がん剤の副作用によって、免疫系は損傷されてABC現象は起きないからである。しかし、よりマイルドな薬物をターゲティングする今後の研究開発には、重要な特長となる。(マイルドな薬物として研究している一例は、レチノイドである。) また、ミセル内核物性の解析と光架橋高分子ミセルの作製は、基礎的には重要なアプローチ・方法であるが、そのために必要な技術がかなり高度なものである。よって、その最初の意義有るデータが得られたことは大変有意義であると思える。

画像診断用高分子造影剤については、まず、超音波造影剤で200nm程度の直径のものが得られたのはよかったが、その*in vivo*での安定性(血液循環性)は従来のものとはほぼ同じであった。この超音波造影剤を固形がん診断に有用なものとするためには、エマルジョンの安定性増大というもう一つの課題をクリアする必要がある、その方向にはいまだ意義ある結果を出していないのが現状である。一方、MRI造影剤については固形がん脳梗塞のMRI造影に、大きな基盤が構築できたと信ずる。固形がんに対しては、臨床試験中の抗がん剤システムの化学療法と画像診断を組合せた「Theranostics」のよい例として、開発する基盤が整ったと言える。また、高分子の造影剤が脳梗塞領域で大きな意義があるという今回の発見は、脳梗塞へのターゲティング型画像診断と薬物治療への高分子キャリアーシステムの応用という、全く新規の医療システムの先駆けとなる。

教育面では、数少ないながら3年生1名に研究室配属で、高分子合成とその化学分析、キャリアーとしての性能評価を実際に体験・研究してもらった。医師は認可された医療システムを使う立場からのみ見ることが通常である。それとは逆に、その医療システムを創造・構築する側から眺めて研究を体験することは、希少であり貴重な体験と言える。化学合成や分析の最新の知識と技術を体得しないと、内容が理解できないため、学生にはその体得にかなりの時間を要した。今後は、その知識と技術体得のためのよいプログラムを用意する必要がある。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Hori K (Tohoku Univ), Nishihara M (Kanagawa Acad Sci Tech), Yokoyama M. The combretastatin derivative (Cderiv), a vascular disrupting agent, enables polymeric nanomicelles to accumulate in microtumors. *J Pharm Sci* 2010; 99(6): 2914-25.
- 2) Azuma T (Hitachi Central Research), Ogihara M¹⁾,

- Kubota J¹, Sasaki A¹ (¹Hitachi Medical), Umemura S (Tohoku Univ), Furuhashi H. Dual-frequency ultrasound imaging and therapeutic bilaminar array using frequency selective isolation layer. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2010; 57(5): 1211-24.
- 3) Akiba I¹, Terada N¹, Hashida S¹, Sakurai K¹ (¹Univ of Kitakyushu), Sato T², Shiraishi K, Yokoyama M, Masunaga H² (²Kanagawa Acad Sci Tech), Ogawa H³, Ito K (RIKEN), Yagi N³ (³Jap Synch Radi Res Inst). Encapsulation of a hydrophobic drug into a polymer-micelle core explored with synchrotron SAXS. *Langmuir* 2010; 26(10): 7544-51.
- 4) Shiraishi K, Kawano K¹, Maitani Y¹ (¹Hoshi Univ), Yokoyama M. Polyion complex micelle MRI contrast agents from poly (ethylene glycol)-b-poly (l-lysine) block copolymers having Gd-DOTA; preparations and their control of T(1)-relaxivities and blood circulation characteristics. *J Contr Rel* 2010; 148(2): 160-7.
- 5) Harada Y (Kyushu Univ), Yamamoto T¹, Sakai M¹, Saiki T^{1,2} (¹Kanagawa Acad Sci Tech, ²Keio Univ), Kawano K³, Maitani Y³ (³Hoshi Univ), Yokoyama M. Effects of organic solvents on drug incorporation into polymeric carriers and morphological analyses of drug-incorporated polymeric micelles. *Int J Pharm* 2011; 404(1-2): 271-80.
- 6) Yokosawa M¹, Sonoda Y¹, Sugiyama S¹, Saito R¹, Yamashita Y¹, Nishihara M², Satoh T² (²Kanagawa Acad Sci Tech), Kumabe T¹, Yokoyama M, Tominaga T¹ (¹Tohoku Univ). Convection-enhanced delivery of a synthetic retinoid Am80, loaded into polymeric micelles, prolongs the survival of rats bearing intracranial glioblastoma xenografts. *Tohoku J Exp Med* 2010; 221(4): 257-64.
- ### Ⅲ. 学会発表
- 1) 白石貢一, 川野久美¹, 米谷芳枝¹ (¹星薬科大), 横山昌幸. 高分子ミセルMRI造影剤とABC現象の検証. 日本分子イメージング学会第5回学会総会・学術集会. 大津, 5月.
- 2) 遠藤怜子, 白石貢一, 川畑健一 (日立製作所), 田畑泰彦 (京都大学), 横山昌幸, 古幡 博. 臨床診断用超音波による各種相変化型ナノ液滴の気相化と圧壊の検討. 日本超音波医学会第83回学術集会. 京都, 5月.
- 3) 白石貢一, 馬 会利¹, 川野久美¹, 米谷芳枝¹ (¹星薬科大), 横山昌幸. 高分子ミセルキャリア内核の影響によるABC現象の発現と回避. 第26回日本DDS学会学術集会. 大阪, 6月.
- 4) 白石貢一, 馬 会利¹, 川野久美¹, 米谷芳枝¹ (¹星薬科大), 横山昌幸. 高分子ミセルMRI造影剤の頻回投与によるABC現象への影響と診断への有用性. 第26回日本DDS学会学術集会. 大阪, 6月.
- 5) Yokoyama M, Shiraishi K, Ma H¹, Minowa T¹, Kawano K¹, Hattori Y¹, Maitani Y¹ (¹Hoshi University). Does ABC phenomenon occur for polymeric micelle MRI contrast agents? 37th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. Portland, July.
- 6) Shiraishi K, Kawano K¹, Maitani Y¹ (¹Hoshi Univ), Hori K (Tohoku Univ), Yokoyama M. Combretastatin derivative (Cderiv) as a vascular disrupting agent enhances tumor accumulation of polymeric micelle carrier system. 37th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society. Portland, July.
- 7) Shiraishi K, Kawano K¹, Maitani Y¹ (¹Hoshi Univ), Hori K (Tohoku Univ), Yokoyama M. Effective tumor targeting of polymeric micelle MRI contrast agent by a tumor vascular disrupting agent. 2010 World Molecular Imaging Congress. Kyoto, Sept.
- 8) 白石貢一, 馬 会利¹, 川野久美¹, 米谷芳枝¹ (¹星薬大), 横山昌幸. 高分子ミセル, リポソームの親水・疎水性界面のABC現象への影響. 第59回高分子討論会. 札幌, 9月.
- 9) Yokoyama M. Synthetic polymers for drug targeting carriers. 台湾工業技術研究院セミナー. 新竹, 10月.
- 10) Yokoyama M. Combined diagnosis and chemotherapy of solid tumors using polymeric micelle carriers. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010). Honolulu, Dec.
- 11) Shiraishi K, Ma H¹, Kawano K¹, Maitani Y¹ (¹Hoshi Univ), Yokoyama M. ABC phenomenon of nanocarrier-based MRI contrast agents and their importance for tumor targeting by the EPR effect. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010). Honolulu, Dec.
- 12) 横山昌幸. (B. 医療用高分子の開発) 4. 薬物標的治療に求められる合成高分子. 高分子学会平成22年度東海シンポジウム: 健康・安全な社会のための高分子. 名古屋, 1月.
- 13) 古幡 博, 牧田未央, 福田隆浩, 羽野 寛, 陳旧性 脳梗塞内出血率を経頭蓋超音波脳血栓溶解法は増かさせるか? *Stroke*2010. 盛岡, 4月.
- 14) 王 作軍¹, 銭谷 平, 曹 鉄夫¹, 段 雲友¹ (¹中国人民解放军第四军医大学), 古幡 博. 光学手法

による超音波血栓溶解効率評価. 日本超音波医学会第83回学術集会. 京都, 5月.

- 15) 澤口能一, 王 作軍, 小田雄介, 鈴木 亮, 丸山一雄, 古幡 博. 超音波, バブルリポソーム併用血栓溶解療法の基礎検討. 第13回日本栓子検出と治療学会. 福岡, 11月.
- 16) 王 作軍, 遠藤怜子, 澤口能一, 古幡 博. 小動物用高磁場MRIによる急性脳梗塞発症時における脳浮腫形成の経時的評価の検討. 第13回日本栓子検出と治療学会. 福岡, 11月.
- 17) 清水 純, 牧田未央, 福田隆浩, 東 隆, 金本光一, 古幡 博. 中周波数経頭蓋超音波脳血栓溶解療法の臨床応用に向けてー脳卒中易発症高血圧ラットにおける音響工学的脳神経安全性評価ー. 第29回日本脳神経超音波学会総会. 岡山, 7月.
- 18) 遠藤怜子, 白石貢一, 川畑健一(日立製作所), 田畑泰彦(京都大学), 横山昌幸, 古幡 博. 臨床診断用超音波による各種相変化型ナノ液滴の気相化と圧壊の検討. 日本超音波医学会第83回学術集会. 京都, 5月.
- 19) Shimizu J, Wang Z, Makita M, Fukuda T, Furuhata H. Expression of heat shock protein 70 in rat ischaemic brain after transcranial 489 kHz continuous waveform ultrasonication for thrombolysis. European Stroke Conference 2010. Barcelona, May.
- 20) Shimizu J, Makita M, Fukuda T, Azuma T, Kanemoto K, Furuhata H. Relations of intracranial hemorrhagic rates with aging of stroke-prone spontaneously hypertensive rat after transcranial 489kHz continuous waveform ultrasonication for thrombolysis with alteplase. 15th Meeting of the European Society of Neurosonology and Cerebral Hemodynamics. Madrid, May.

IV. 著 書

- 1) 横山昌幸. 第2章: PET・SPECT分子イメージングと医薬品開発 1. 薬物体内動態評価への分子イメージングの利用 5) 薬物ターゲティング評価への分子イメージングの利用. 佐治英郎(京都大学)編. 遺伝子医学MOOK18号: 創薬研究への分子イメージング応用. 東京: メデイカルドゥ, 2010. p.127-32.
- 2) 古幡 博. 第6編: 超音波画像 第6章: 超音波治療と画像診断 6-2. 超音波経頭蓋血栓溶解技術と画像診断. 石田隆行(広島国際大学), 桂川茂彦(熊本大学), 藤田広志(岐阜大学)監修. 医用画像ハンドブック. 東京: オーム社, 2010. p.1158-68.

V. その他

- 1) 古幡 博. 低侵襲的低周波超音波脳血栓溶解法の効

果増高に関する臨床応用基盤研究. 低侵襲的低周波超音波脳血栓溶解法の効果増高に関する臨床応用基盤研究: 平成21年度総括・分担研究報告書 2010: 3-17.