

医用エンジニアリング研究室

准教授：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

教育・研究概要

I. 超音波の医療応用

急性脳梗塞治療加速のための薬物超音波併用次世代普及型低侵襲システムの開発の実施に関して、本学の内科学神経内科との共同研究開発を実施した。超音波照射による血栓溶解加速のための手法の開発として高磁場 MRI による急性脳梗塞モデルにおける画像診断、経頭蓋的な超音波の音場分布の理論解析、及び超音波振動子の不均一性を均一化する変調駆動法の開発を実施した。

1. ラット急性脳梗塞モデルによる脳血管透過性評価

急性中大脳動脈閉塞 (MCAO) - 再開通モデルを作製し、再開通後の脳内の梗塞領域、浮腫領域、血管透過性の亢進について高磁場 MRI による定量的な評価を行った。再開通後に大きさ 20nm の造影剤粒子を用い、再開通 30 分後からの MRI による画像解析によって 20nm の造影剤粒子が劇的に漏出している明瞭な画像を得た。また、MRI の定量的な測定法により 20nm 粒子の漏出量を定量的に明らかにした。一方、マグネシストを用いた撮像では、明瞭な画像取得には至らなかった。この結果は脳梗塞—再開通モデル作製後に生じる血管透過性の亢進によって、20nm の粒子が即時に漏れ出していることを示唆する。また、その領域が意味することは、最も顕著に血管に負荷がかかり血管構築が破綻している領域を示している。このような画像を臨床的に考えれば、本造影剤により得られた画像は血栓溶解剤の使用に伴い誘導される出血が最も生じやすい部位を示していると考えられる。

2. 変調駆動による頭蓋内音場分布の均一化

ヒト頭蓋内部への超音波照射は超音波振動子の近距離における不均一さ、頭蓋骨の厚みによる反射に伴い、頭蓋内部において音響強度分布に不均一さを誘起する。この場合、音響強度が強まる部位は脳出血の危険性が高くなり、一方、音響強度が弱まる部位に血栓が存在すると溶解効率が低くなることを示唆している。この音響強度の不均一性を 500kHz の波を 50~200kHz の雑音をランダムに導入することで位相反転を誘導する変調駆動法により改善した。変調駆動法の導入により頭蓋骨透過後の超音波強度

分布の不均一性は解消され、経頭蓋超音波照射において頭蓋内音響強度が均一になることが示唆された。また、頭蓋骨密度により透過率が異なり、骨密度が低い場合には超音波の透過率が減少することが理論計算より明らかとなった。

3. 超音波血栓溶解効果の 2D 評価法の開発

超音波照射における血栓溶解促進法は効果的に血栓を溶解させる方法であるが、そのための精密評価システムを樹立することが重要であり、昨年度にその点を検討した。ヒト血漿より作製した血栓に対して、tPA、及び超音波との併用効果による血栓溶解効果を評価した。超音波の音場分布と一致して、tPA による血栓溶解効率が上昇することが明らかとなった。すなわち、超音波強度依存的な血栓溶解促進効果が得られた。一方、超音波周波数に対する血栓溶解促進効果への影響は 400~600kHz の間ではそれほど顕著な差は認められず、また、その間における変調駆動法においても顕著な差は認められなかった。

4. 微小栓子検出向上を目指した頸部超音波栓子検出装置の開発

これまでの側頭部からの超音波診断では頭蓋骨の厚みの違いにより検出が困難であった脳梗塞の原因となる微小栓子を検出するためには新たな装置が必要とされている。そこで、皮膚への貼付型の超音波プローブを開発し、連続検査が可能な検出装置の開発を実施した。

5. 放射線治療を促進する超音波照射 NO 産生と抗腫瘍効果に対する研究

放射線治療は腫瘍内虚血部位では放射線感受性が低く、その放射線治療効果が低減されることが問題となっている。そこで放射線感受性物質である一酸化窒素 (NO) を腫瘍組織への超音波照射により産生させ、放射線治療の飛躍的な治療効果の向上を目指して X 線 - 超音波 NO 産生併用実験を実施した。前年度までに超音波照射に伴い、腫瘍組織内で NO 産生がされることを確認している。グリオーマ 9L 細胞を移植したラット腫瘍組織への超音波照射とそこへの X 線照射による抗腫瘍効果の評価を実施した。

II. 高分子ミセルキャリアシステム

薬物、及び造影剤のためのキャリアシステムを開発。

1. ドラッグキャリアとしての高分子ミセルの抗原性評価

昨年度までにドラッグキャリアに用いる生体親和

性の高いポリエチレングリコール (PEG) に対する免疫応答における抗体産生が、PEG 認識を有する抗体を産生するが、PEG 自身には結合性を示さないことを示してきた。すなわち、従来、考えられてきた PEG に対する抗体は PEG そのもの自身から由来する抗原性ではなく、PEG に結合しているコンジュゲートの性質によって決定されていることが示唆されていた。さらなる検討を行い、産生される抗体数が限定的であることを明らかにした。産生された抗体とキャリアとの結合状態についての検討を行い、産生される抗体数と生体中に投与されるキャリアとの関係を明らかにし、生体における免疫応答の変化を定量的に評価した。すなわち、高分子ミセルを用いた検討の結果、産生される抗体量と投与されるキャリア数との間に大きな差があり、見かけ上、高分子ミセルは抗体の影響を受けていないように見えることが明らかとなった。その一方で、同様のナノサイズのキャリアであるリポソームは抗体量とキャリア数との関係が高分子ミセル程大きくなく、その結果、大きな影響を受けていることが明らかとなった。

2. ドラッグキャリアとしての高分子ミセルの精密構造解析と生体への影響

ナノサイズの粒子である PEG-P (Asp-Bzl) ブロックコポリマーからなる高分子ミセルの内核構造に関する情報を放射光施設 SPring-8 における散乱測定により明らかにした。この測定により 25~56nm の直径を有する高分子ミセルに対して、それぞれの有する内核サイズを明らかにした。この構造解析に基づき、内核のサイズ、内核上に存在する PEG 鎖の表面密度、PEG 鎖の形状を明らかにした。粒子径の大きな高分子ミセルにおいては、PEG 鎖が伸長した状態をとり、非常に濃密なブラシ構造となっていることが示唆された。これらの測定から得られた PEG 鎖の状態と生体内の血しょうたんぱく質や細胞との相互作用の抑制効果が一致することを明らかにした。すなわち、この PEG 鎖の状態によって生体内に投与された高分子ミセルの挙動が決定されていることが示唆された。

〔点検・評価〕

厚生労働省科学研究費の急性脳梗塞治療加速のための薬物超音波併用次世代普及型低侵襲システムの開発に対して、研究を実施した。これまでの超音波照射における血栓溶解加速装置の原理的な問題点を解決するために導入検討を行っている変調駆動法により、均一な音響強度の提供が可能になっている。

また、ヒト頭蓋骨片を用いた超音波透過性の評価により、骨密度、骨厚みの影響による超音波透過性の問題が提議され、この点も、同様の雑音変調駆動法により均一化され、改善されている。超音波血栓溶解効果の 2D 評価法においては、tPA と超音波の併用による血栓溶解促進効果は超音波強度依存性であることが明らかとなった。血栓溶解促進効果の周波数依存性、及び変調駆動法との関係についての検討が必要とされる。超音波照射による血栓溶解促進効果を変調駆動法により、脳内における超音波強度を均一化することで、より副作用の少ない手法の確立を目指していくことになる。また、脳梗塞-再開通モデルにおける、血管透過性の高磁場 MRI により評価によって、tPA 使用時の出血が起こり得る部位を、作製した MRI 造影剤によって描出することが可能になった。脳梗塞-再開通時に出血部位のリスク評価のために、この MRI 造影剤の最適化を検討することが今後求められる。

経済産業省課題解決型医療機器等開発事業における塞栓症の原因となる微小栓子の検出力を向上した頸部超音波栓子検出装置の開発においては、微小栓子検出のための貼付型プローブのプロトタイプの開発が順調に進められている。

科学技術振興機構研究成果最適展開支援プログラムにおける癌根治療法を目的とした放射線-超音波併用療法 (X-US Fusion 療法) の開発においては、超音波照射による腫瘍組織内の NO 産生に基づく X 線の感受性増高効果により抗腫瘍効果が明らかとなり始めている。より超音波と NO 産生に関する基礎的な検討を行うことで、その効果を劇的に向上させる手法の開発が必要とされる。

高分子ミセルキャリアシステムに対する免疫現象について、高分子ミセルキャリアが生体内に投与された際の抗原性となりうる性質が明らかになりつつあり、また、新たな提案として抗体とドラッグキャリアとの結合に関する新たな知見、産生される抗体量の制限について明らかにし、ドラッグキャリアが誘導する免疫現象について明らかにしつつある。

溶液中における高分子ミセル内核の精密測定は、その大きさから測定困難であり、その影響がどのように生体中の挙動に影響するかは明らかではなかった。本手法に基づき、生体中の挙動を決定する高分子ミセル構造上最も重要な要因を明らかにした。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Sanada Y¹⁾, Akiba I¹⁾, Sakurai K¹⁾ (¹⁾Kitakyushu

Univ), Shiraishi K, Yokoyama M, Mylonas E²⁾, Ohta N²⁾, Yagi N²⁾ (²JASRI), Shinohara Y³⁾, Amemiya Y³⁾ (³Univ of Tokyo). Hydrophobic molecules infiltrating into the PEG domain of the core/shell interface of a polymeric micelle: evidence obtained with anomalous small-angle X-ray scattering. *J Am Chem Soc* 2013; 135(7): 2574-82.

- 2) Nakamura T¹⁾, Kawano K¹⁾, Shiraishi K, Yokoyama M, Maitani Y¹⁾ (¹Hoshi Univ). Folate-targeted gadolinium-lipid-based nanoparticles as a bimodal contrast agent for tumor fluorescent and magnetic resonance imaging. *Biol Pharm Bull* 2014; 37(4): 521-7.
- 3) Furuhashi H, Saito O. Comparative study of standing wave reduction methods using random modulation for transcranial ultrasonication. *Ultrasound Med Biol* 2013; 39(8): 1440-50.
- 4) Shiraishi K, Yokoyama M. Polymeric micelles possessing polyethyleneglycol as outer shell and their unique behaviors in accelerated blood clearance phenomenon. *Biol Pharm Bull* 2013; 36(6): 878-82.

II. 総 説

- 1) 白石貢一. ナノテクノロジーを駆使した革新的診断・治療システムの構築に向けて Drug Delivery System (DDS) 型 Magnetic Resonance Imaging (MRI) 造影剤でみる診断と治療システムの構築. *薬誌* 2013; 133(12): 1277-85.

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), 青枝大貴²⁾, 石井 健²⁾ (²医薬基盤研究所), 横山昌幸. 分子プローブ開発におけるナノ粒子の免疫現象. 日本分子イメージング学会第8回学会総会・学術集会. 横浜, 5月.
- 2) 白石貢一, 川野久美¹⁾, 米谷芳枝¹⁾, (¹星薬科大), 横山昌幸. (English Session: BIOPOLYMERS) Mechanistic study on antibody recognition to PEG conjugates. 第62回高分子学会年次大会. 京都, 5月.
- 3) 白石貢一, 川野久美¹⁾, 米谷芳枝¹⁾ (¹星薬科大), 青枝大貴²⁾, 石井 健²⁾ (²医薬基盤研究所), 横山昌幸. (一般演題(口演): ターゲティングII) PEGを認識する抗体の界面認識領域に関する検証. 第29回日本DDS学会学術集会. 京都, 7月.
- 4) Shiraishi K, Kawano K¹⁾, Maitani Y¹⁾ (¹Hoshi Univ), Aoshi T²⁾, Ishii K²⁾ (²NIBIO), Yokoyama M. (Poster Sessions: Micro- and Nanoparticle Design) Importance of an interface between PEG and hydrophobic blocks, mechanistic study of PEG-related IgM response. 40th Annual Meeting & Exposition of the

Controlled Release Society. Hawaii, July.

- 5) Shiraishi K, Kawano K¹⁾, Maitani Y¹⁾ (¹Hoshi Univ), Aoshi T²⁾, Ishii K²⁾ (²NIBIO), Yokoyama M. (Poster Session 3) Immune response of PEGylated nanoparticles potential use as diagnostic agent. *World Molecular Imaging Congress 2013*. Savannah, Sept.
- 6) 白石貢一, 川野久美¹⁾, 米谷芳枝¹⁾ (¹星薬科大), 真田雄介²⁾, 櫻井和朗²⁾ (²北九州市立大), 青枝大貴³⁾, 石井健³⁾ (³医薬基盤研究所), 横山昌幸. (未来型医療を創出する高分子) DDS キャリアによる PEG に関連した IgM 抗体産生と体内動態への影響. 第62回高分子分子討論会. 金沢, 9月.
- 7) 芝 浩史, 古幡 博. (一般口演1: 頸動脈診断と治療) 頸部血管系における HITS 検出の為の貼付型ソフト超音波振動子の開発-送信感度-. 第16回日本栓子検出と治療学会. 名古屋, 10月.
- 8) 王 作軍, 古幡 博. (一般口演4: 測定法など) 超音波溶解促進作用の新しい測定法: 様々な種類の血栓の測定を可能にする改良. 第16回日本栓子検出と治療学会. 名古屋, 10月.
- 9) 齋藤 理, 古幡 博. (一般口演4: 測定法など) 超音波のヒト頭蓋骨片透過における直進性検証. 第16回日本栓子検出と治療学会. 名古屋, 10月.
- 10) 野村卓史, 古幡 博. (一般口演4: 測定法など) 安定した微小栓子検出環境を実現する標準的循環モデルの構築. 第16回日本栓子検出と治療学会. 名古屋, 10月.