

## 医用エンジニアリング研究部

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

脳梗塞急性期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向けた検討を行った。薬物超音波併用による脳梗塞急性期における血栓溶解加速のために、高磁場MRIを用いた脳梗塞モデルにおける急性期血管破綻の画像評価、血栓溶解に向けた経頭蓋的超音波の音場分布の骨透過性評価、及び超音波照射による血栓溶解の2D評価を実施した。

##### 1. ラット急性脳梗塞モデルによる脳血管透過性評価

ラット中大脳動脈閉塞(MCAO)-再開通モデルを作製し、血栓溶解時の血流の再開通に伴う脳組織内梗塞領域、浮腫領域、血液脳関門(BBB)における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。昨年度までに、再開通1時間後に投与された20nmの高分子ミセルMRI造影剤粒子がBBBから劇的に漏出していることを確認し、一方で、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とを報告した。2つの製剤の比較を行った実験から、再開通直後に起こる劇的な変化を追うために高分子ミセルMRI造影剤粒子の特長を活かし、MCAの閉塞を脳血流画像により確認した後に、高分子ミセルMRI造影剤を投与し、BBBの破綻がいつの時点で起こっているかを閉塞時間(1~3時間)の影響とともに検討した。高分子ミセルMRI造影剤の再開通前投与において、閉塞時間(1~3時間)に影響されずBBBの破綻は観測されなかった。同様に浮腫、出血の様子は認められなかった。一方、再開通直後~数分の後に閉塞2ないし3時間の場合に高分子ミセルMRI造影剤の劇的な漏出が、線条体、大脳皮質の広い領域に渡り認められた。閉塞1時間の場合には、再開通後約1時間後に高分子ミセルMRI造影剤の漏出が画像から検出されたが、その領域は閉塞2ないし3時間と比較して、少ない領域を示した。これらの結果は、脳血管閉塞-再開通後に起こるBBBの破綻は閉塞開始からの時間によってBBB破綻に伴う漏出量の程度が決定され、漏出した高分子ミセルMRI造影剤がさらに組織内に分布することが示された。

##### 2. 経頭蓋超音波照射による骨透過率評価

ヒト頭蓋内部への経頭蓋的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し、音響強度が強めあう部位は脳出血の危険性が高く、音響強度が弱まる部位は血栓溶解効率が低くなる。この音響強度の不均一性を改善し、均一化する方法について昨年度まで検討を行った。頭蓋骨密度と骨厚みにより、超音波振動子からの超音波の入射角が垂直よりわずかにずれることにより特定の骨の厚みでは透過率が著しく減少することを明らかにした。昨年度に確立した音響強度の均一化手法により、骨の厚みに依存しない平準化された超音波の透過率が得られた。

##### 3. 超音波血栓溶解効果の2D評価法の開発

昨年度までに、経頭蓋的超音波血栓溶解促進療法の血栓溶解効果評価のためのシステムを樹立した。本年度はヒト血漿及び全血で作製した血栓に対して、tPA、及び超音波の周波数の影響による血栓溶解効果を評価した。超音波照射時の血栓各点の超音波強度と血栓溶解効率とをプロットすると超音波照射中心点の超音波強度(1.0, 1.4, 2.0W/cm<sup>2</sup>)から得られる各音場においての音響強度と血栓溶解増進効率の対応関係が一致することを明らかにした。ヒト全血を用いた血栓に対する中周波数超音波の溶解促進作用はヒト血しょうを用いたときと同様な効果であった。全血血栓溶解効果はバースト波より同強度の連続波超音波が最も強い血栓溶解促進作用を有することを示した。経頭蓋的超音波血栓溶解効果促進法においては、超音波変調により骨透過後の超音波強度の平準化により超音波強度が骨の厚みに対して変動してしまうことを抑え、その変調波超音波の臨床応用可能な想定安全強度に基づく血栓溶解効果が得られることが示された。

#### 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. 薬物ターゲティングに用いる高分子ミセルの抗原性評価

昨年度までに生体親和性の高いポリエチレングリコール(PEG)に対する免疫応答はPEGによる特異性と免疫応答を誘導す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明らかとなった。また、最大抗体産生量が決定されていることにより、抗原としての薬物キャリア量(粒子数)が最も影響を及ぼす原因であることを明らかにした。一方、本年度

は、PEG-コンジュゲートの性質と投与量による抗体産生応答についてより詳細な検討を行った。同じPEG鎖長を有し、コンジュゲートの性質の変化と抗体産生応答の影響を検討した。コンジュゲートの親水性から疎水性への変化に伴い、抗体産生は高くなり、PEGの特異性とコンジュゲートによる抗体産生応答との関係を明らかにした。強く抗体産生を誘導するPEG-コンジュゲートを用いて投与量の変化による抗体産生応答を検討したところ、低い投与量(0.01 $\mu$ g/kg~0.01mg/kg)においては、抗体量は投与量に依存して増加したが、投与量が0.01mg/kg~0.1mg/kgでは抗体産生量が飽和し、さらに投与量が増え1~10mg/kg以上となると、抗体産生の応答は遅れて確認された。抗原量を増やすとIgM抗体産生が長期に渡り持続され、投与された抗原量との関与が示唆された。非常に低い投与量範囲(0.01 $\mu$ g/kg~1 $\mu$ g/kg)においては、2回の抗原曝露によってIgG産生が認められた。これらの結果は、PEGに関する抗体産生はコンジュゲートの性質によって抗体クラスが決定され、IgMを主とする抗体産生がなされているが、クラススイッチ刺激に必要なサイトカイン産生は誘導されていない。認められたIgG産生はクラススイッチに必要なサイトカイン産生の亢進無しに存在しているサイトカイン量のみ依存したIgG産生が認められたと考えられる。

## 2. 薬物キャリアとしての高分子ミセルの精密構造解析と血液内動態への影響

ナノサイズの粒子である高分子ミセルの詳細な構造解析を、放射光施設SPring-8における放射光散乱解析を含めて、多角的な解析法によって明らかにした。構造解析によって薬物キャリアの最外殻PEG密度が最も重要なパラメータであることを明らかにした。即ち、最外殻PEG密度が高い場合には、それが低い場合に比べて、*in vitro*においては腹腔マクロファージによる取込みが低く、*in vivo*においては細網内皮系による取込み、血しょうたんぱく質との相互作用が低く抑えられているために最も長い半減期を与えることが明らかとなった。最外殻PEG密度による血液内挙動への影響について、その相関性を初めて明らかにした。

## 【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、最終年度となる研究を実施した。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

る変調駆動法とともにヒト骨透過性についての検討を行った。変調駆動法による音響強度の均一性が頭蓋骨片によっても得られること、また、血栓溶解効果の2D評価法によって照射される超音波強度に依存せず、音響強度と血栓溶解増強効率との関係が明らかにされた。変調駆動法により経頭蓋的超音波照射による血栓溶解促進効果を脳組織内に平準化された音響強度で与えることが可能になり、音響強度に対する血栓溶解効果が明らかとなったことで、必要な音響強度と少ない副作用が達成される環境が確立されたといえる。また、脳梗塞-再開通モデルにおける血管透過性のMRI評価は、tPA使用時に起こり得る血管透過性亢進部位を高分子ミセルMRI造影剤によって描出することが可能であった。この手法を用いることで、血管透過性亢進と閉塞時間との関係を明らかにすることができた。一方、この脳梗塞-再開通時に認められる血管透過性亢進部位とその後の出血との関係については、今後の検討課題である。

薬物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と生体の免疫応答との関係がPEGの抗原性を鍵として明らかにしている。抗体産生におけるコンジュゲートの必要性、コンジュゲートの性質によって抗体応答が劇的に変わることを明らかにした。薬物ターゲティングの概念から、投与された抗原量と抗体産生の関係を明らかにし、投与量依存的な応答と、過剰量の抗原投与が抗体産生の長期化につながることを明らかにした。T細胞非依存性抗原であるPEGが低い投与量において繰り返し投与を行うとIgG産生を促したことは、クラススイッチに必要なサイトカイン産生の亢進無しにIgG産生へとクラススイッチしたことを意味している。すなわち、常に存在するサイトカインのみでクラススイッチが誘導されたと考えられる。薬物キャリアにおける抗体産生の直接的な問題の解決はなされていない。より詳細に免疫抑制の検討などが必要であると考えられる。

これまで溶液中におけるナノメートルサイズの高分子ミセル構造と生体に投与された後の挙動との関係は明らかでなかった。本年度は、薬物キャリアの最外殻PEG密度が最も重要なパラメータであり、この密度が生体内における挙動を理解するのに役立つことを*in vitro*実験、及び*in vivo*実験によって初めて明らかにした。

## 研究業績

## I. 原著論文

- 1) Yokoyama M. Polymeric micelles as drug carriers: their lights and shadows. *J Drug Target* 2014; 22(7): 576-83.
- 2) Saito O, Furuhashi H. Improving uniformity of intensity distribution of ultrasound passing through a human-skull fragment by random modulation. *International Journal of Clinical Neurosciences and Mental Health* 2014; 1(Suppl.1): S23.
- 3) Nakamura T<sup>1)</sup>, Kawano K<sup>1)</sup>, Shiraishi K, Yokoyama M, Maitani Y<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Hoshi 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.
- 4) Saito O, Wang Z, Mitsumura H, Ogawa T, Iguchi Y, Yokoyama M. Substantial fluctuation of acoustic intensity transmittance through a bone-phantom plate and its equalization by modulation of ultrasound frequency. *Ultrasonics* 2015; 59: 94-101. Epub 2015 Feb 7.
- 5) Shiraishi K, Sanada Y<sup>1)</sup>, Mochizuki S<sup>1)</sup>, Kawano K<sup>2)</sup>, Maitani Y<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>Hoshi Univ), Sakurai K<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Univ of Kitakyushu), Yokoyama M. Determination of polymeric micelles' structural characteristics, and effect of the characteristics on pharmacokinetic behaviors. *J Control Release* 2015; 203: 77-84. Epub 2015 Feb 14.
- 6) Fujioka K, Hanada S<sup>1)</sup>, Inoue Y<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>Toho Univ), Sato K<sup>3)4)</sup> (<sup>4</sup>National Institute for Materials Science), Hirakuri K<sup>3)</sup> (<sup>3</sup>Tokyo Denki Univ), Shiraishi K, Kanaya F<sup>1)</sup>, Ikeda K, Usui R, Yamamoto K<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>National Center for Global Health and Medicine), Kim SU<sup>5)6)</sup> (<sup>5</sup>Chung-Ang Univ, <sup>6</sup>Univ of British Columbia), Manome Y. Effects of silica and titanium oxide particles on a human neural stem cell line: morphology, mitochondrial activity, and gene expression of differentiation markers. *Int J Mol Sci* 2014; 15(7): 11742-59.

## II. 総説

- 1) 大矢裕一<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>関西大), 横山昌幸. ドラッグデリバリーシステム ドラッグデリバリーシステム (DDS) の基礎. *日防衛防衛会誌* 2014; 42(12): 697-700.

## III. 学会発表

- 1) 白石貢一, 川野久美<sup>1)</sup>, 米谷芳枝<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>星薬科大), 青枝大貴<sup>2)</sup>, 石井 健<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>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製剤の免疫原性と回避. 日本分子イメージング学会第9回学会総会・学術集会.

豊中, 5月.

- 2) 白石貢一, 王 作軍, 青木伊知男<sup>1)</sup>, 國領大介<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>放射線医学総合研究所), 横山昌幸. 急性脳梗塞 t-PA 治療における出血リスクの定量的評価. 日本分子イメージング学会第9回学会総会・学術集会. 豊中, 5月.
- 3) 白石貢一, 川野久美<sup>1)</sup>, 米谷芳枝<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>星薬科大), 青枝大貴<sup>2)</sup>, 石井 健<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>医薬基盤研究所), 横山昌幸. PEG に対する抗体産生による PEG ナノ粒子への結合性と影響. 第30回日本 DDS 学会学術集会. 東京, 7月.
- 4) 白石貢一, 王 作軍, 青木伊知男<sup>1)</sup>, 國領大介<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>放射線医学総合研究所), 横山昌幸. 急性脳梗塞再開通後の MRI 造影剤を用いた血管透過性評価. 第30回日本 DDS 学会学術集会. 東京, 7月.
- 5) Yokoyama M, Shiraishi K. New challenges of targeting with macromolecular carriers. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) World Polymer Congress: MACRO 2014. Chiang Mai, July.
- 6) Shiraishi K, Wang Z, Aoki I<sup>1)</sup>, Kokuryo D<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>National Institute of Radiological Sciences), Yokoyama M. PEGylated nanoparticle contrast agents for in vivo imaging, immune response restricts use of the contrast agents. WMIC (World Molecular Imaging Congress) 2014. Seoul, Sept.
- 7) 横山昌幸, 白石貢一. (シンポジウム 2: DDS と MRI トレーサーの現状) 合成高分子をキャリアーとした MRI 造影剤とその応用. 第42回日本磁気共鳴医学会大会. 京都, 9月.
- 8) 王 作軍, 廣瀬秀夫, 齋藤 理, 三村秀毅, 井口保之, 小川武希, 横山昌幸. 正弦波及び変調波超音波血栓溶解促進作用の比較. 第17回日本栓子検出と治療学会. 福岡. 10月.
- 9) 王 作軍, 齋藤 理, 小川武希, 小松鉄平, 三村秀毅, 井口保之, 横山昌幸. 骨ファントムに対して超音波透過率の変動とその変調駆動による平準化. 第17回日本栓子検出と治療学会. 福岡. 10月.
- 10) Yokoyama M. Challenge of targeting technology to acute brain ischemia. PharmaTech 2014. Bangkok, Dec.
- 11) 白石貢一, 王 作軍, 青木伊知男<sup>1)</sup>, 國領大介<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>放射線医学総合研究所), 横山昌幸. 急性脳梗塞の診断・治療に向けた DDS 製剤の開発. 日本薬学会第135年会. 神戸, 3月.
- 12) 王 作軍, 廣瀬秀夫, 齋藤 理, 小川武希, 小松鉄平, 三村秀毅, 井口保之, 横山昌幸. 超音波血栓溶解促進能の新規 in vitro 測定法. 第40回日本脳卒中学会総会. 広島. 3月.
- 13) 横山昌幸, 齋藤 理, 王 作軍, 小川武希, 小松鉄平, 三村秀毅, 井口保之. 超音波頭蓋骨透過率の大き

な変動と変調による平準化. 第40回日本脳卒中学会  
総会. 広島. 3月.

#### IV. 著 書

- 1) 白石貢一. 第2章: マイクロ/ナノカプセルの評価・解析 14節: 薬物キャリアシステムとしての高分子ミセルの構造解析の意義. 田崎裕人企画編集. マイクロ/ナノカプセルの調整, 徐放性制御と応用. 東京: 技術情報協会, 2014. p.201-6.

## 神経科学研究部

教授: 加藤 総夫 神経科学・神経生理学  
准教授: 渡部 文子 神経科学・神経生理学

総合医科学研究センター神経科学研究部神経生理学研究室は, 2013年4月1日に, 総合医科学研究センター神経科学研究部に改組・改称された。

### 教育・研究概要

1. 慢性痛における情動障害と, 炎症性疼痛における痛みの慢性化に関する脳機能に関する研究, 2. 恐怖情動の形成・消去に関わる神経可塑性機構に関する研究, 3. シナプスにおけるグリアーニューロン連関の細胞機構に関する研究, 4. 年齢依存性てんかん症候群の成熟後高次脳機能に及ぼす影響に関する研究, および, 5. 記憶痕跡の形成機構に関する研究を中心に進めるとともに, 学内外の他講座などとの共同研究を進め, 以下の成果を挙げた。

#### I. 慢性痛における情動障害と, 炎症性疼痛における痛みの慢性化に関する脳機能の解明

痛みの苦痛は進化的に早期に獲得された根源的生物機能である。痛みが臨床医学的に重要な問題であるのは, それが患者を苦しめるからにほかならない。痛み, 特に慢性痛の苦痛がどのような脳内機構によって成立しているのか, という問題に神経生理学から答えるべく研究を進めた。

1. 光遺伝学的手法による機能的コネクティクスの一環として, 起始核へのチャンネルロドプシン導入と終止核での光刺激によるシナプス伝達光活性化技術を開発した。同技術を応用し腕傍核-扁桃体中心核間に単シナプス興奮性結合に加えて極めて強い複シナプス性フィードフォワード抑制結合がある事実, および, この単シナプス興奮性シナプス伝達が炎症性疼痛モデルで増強する事実を証明した。これらは, 従来までの電気刺激法では解明不可能であった事実であり, 本神経結合の生理学的意義の再考を迫る重要な所見である。

2. 慢性痛が成立する過程を司る脳内機構を解明するために, 炎症性疼痛モデルを作成し, 下記の解析を行い, 新事実を見出した。

1) カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 欠損マウスにおいて, ホルマリン足底注射による炎症性疼痛が, 腕傍核-扁桃体シナプス伝達の増強を誘発しない事実を明らかにした。炎症性疼痛による