

duced by oral immunotherapy with transgenic rice containing major T-cell epitopes of Japanese cedar pollen allergens in cedar pollinosis patients. 第44回 日本免疫学会学術集会, 札幌, 11月.

## 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

### 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）に使用される血栓溶解剤（rt-PA）の問題は使用後に起こる脳出血である。この脳出血は血栓溶解後の再灌流障害を経て誘起される血液-脳関門の破綻が起因となり、rt-PAの使用が脳出血リスクをさらに高める。血栓溶解治療の際に、血液-脳関門の病態を診断し、脳出血リスクの有無を事前に診断することが効果的な脳梗塞急性期における血栓溶解治療へと結びつくと考えられる。前年度まで、高分子ミセルMRI造影剤を用いたラット中大動脈虚血-再灌流モデルにおいて、大きさ20nmのナノ粒子である高分子ミセルMRI造影剤が血液-脳関門の透過性亢進を描出し、脳組織内に分布することを高磁場MRIによって明らかにしてきた。本年度は、ラット中大動脈虚血-再灌流モデルにおける虚血-再灌流後の血液-脳関門の透過性亢進の時間の影響を評価した。また、血液-脳関門の透過性亢進における分子の大きさ、すなわち分子量67kのrt-PAの血液-脳関門透過性について評価するために新たな高分子MRI造影剤を設計し、その作製と血液-脳関門の透過性評価を実施した。

##### 1. 虚血-再灌流後の血液-脳関門（BBB）透過性亢進の時間の影響

###### 1) 虚血-再灌流後のBBB透過性の時間の影響

昨年度まで行っていたナイロン糸を挿入し、血管閉塞を作製するラット中大動脈閉塞（MCAO）モデルにおいて、再開通した後のBBB透過性の時間変化を高分子ミセルMRI造影剤を用いて評価した。血管造影によるMCAOモデル作製完了後に高分子ミセルMRI造影剤（0.033mmol Gd/kg）を投与した後、2時間後にナイロン糸を抜去することで再開通を行った。再開通1時間後、24時間後、及び72時間後にMRI測定を行い、BBBの透過性を高分子ミセルMRI造影剤の漏出によって評価した。再開通1時間後に閉塞された半球内に $T_2$ 強調画像、及び拡散強調画像により浮腫の形成を確認した。一方、 $T_1$ 強調画像は高分子ミセルMRI造影剤の血管外漏出を示した。再開通24時間後の $T_1$ 強調画像は、

再開通1時間後と比較して、同じ領域内に高分子ミセルMRI造影剤のさらなる集積を示さなかった。このことは、同領域のBBB透過性亢進は一過性であり、24時間までにBBB透過性亢進が少なくとも同程度ではないことを示している。一方、再開通24～72時間後の間に $T_1$ 強調画像は高分子ミセルMRI造影剤の漏出によって、新たにBBB透過性亢進領域を示した。また、一部に出血が起こった領域が認められた。これらの結果は、BBB血管透過性が亢進する領域は再開通後の時間によって変化するというを示している。透過性亢進した領域と出血した領域の詳細な関係は今後の課題である。

## 2. 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高分子MRI造影剤の作製

BBB透過性亢進状態は時間によって大きく異なる。昨年度まで用いていた高分子ミセルMRI造影剤は平均粒子径が20nmの粒子であり、生体中に存在するたんぱく分子やrt-PAよりも大きい。BBB透過性亢進をより最適化された条件で詳細に評価するため、大きさの異なる新しい高分子MRI造影剤を設計し、その作製を行った。分子量80k、30kの大きさのポリグルタミン酸を基本骨格に用い、MRI造影剤のガドリニウムイオンを配位するキレート基であるDOTA基を、エチレンジアミン基を介して結合させた。ガドリニウムイオンはDOTA基に配位させ、過剰のガドリニウムイオンはEDTA-2Naを用いて除去し、目的のポリグルタミン酸ベースの高分子MRI造影剤を作製した。

### 2) ポリグルタミン酸を基盤とする高分子MRI造影剤のマウス体内分布測定

作製したポリグルタミン酸を基本骨格とするポリグルタミン酸系MRI造影剤をマウス尾静脈より投与(0.033mmol Gd/kg)した後、各時間に採血し、含まれるガドリニウム濃度から血液中濃度を評価した。その結果、分子量の大きさに依存して血中半減期が変化し、より大きな分子量のポリグルタミン酸系MRI造影剤は血中半減期の延長が認められた。一方、主要臓器への分布解析において、多くは腎臓から検出され、脾・肝臓からはほとんど検出されなかった。このことは、作製したポリグルタミン酸系MRI造影剤が肝臓への細網内皮系に捉えられることがほとんどなかったことを示している。

### 3) MCAO-再開通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

MCAOモデルを作製し、血流再開に伴うBBB透

過性亢進領域、脳組織内梗塞領域、浮腫領域について高磁場MRIによる定量的な評価を行った。昨年度までと同様に、血管造影によるMCAOモデル作製完了後、分子量80kの高分子MRI造影剤を0.033mmol Gd/kgにて投与した。3時間閉塞した後、挿入したナイロン糸を抜去し、再開通を起こし、その後のMRI観測を行った。しかしながら、 $T_1$ 強調画像はMRI造影剤によって増強される顕著な画像変化を示さなかった。一方で再開通後の $T_2$ 強調画像、拡散強調画像から閉塞領域内に浮腫が形成されていた。この結果は、ナイロン糸抜去後に虚血-再灌流モデル作製は成功しているものの、MRIにおける画像強度を向上させるために必要なMRI造影剤濃度に達していなかったことが原因と考えられる。一方、元の分子量の大きさ(分子量=80k)から考えると、速やかに血液中から消失した原因はポリグルタミン酸系MRI造影剤にある可能性が示唆された。この点の解明とMRI評価を行うための、適切な分子量を有する高分子MRI造影剤の作製が今後の課題である。

## II. 薬物、及び造影剤のための高分子ミセルキャリアシステムの開発

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、及び造影剤を封入することが可能、かつ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自身は生体親和性に優れ、無毒であることが望ましい。現在、多くの医薬品・食品に用いられている生体親和性高分子であるポリエチレングリコール(PEG)は親水性、非常に低い抗原性という性質から高分子ミセルキャリアシステムを始めとする薬物キャリアに用いられている。しかしながら、近年、PEGに関する免疫原性がPEG化たんぱく製剤を用いる際に問題となっている。即ち、PEGを有する薬物キャリアの初回投与がPEGに対する抗体産生を誘導し、PEGを異物として認識する。そのため、適切に制御された薬物キャリアの薬物動態が得られなくなり、薬物の治療効果が期待できなくなるばかりか、副作用の影響も懸念される。昨年度まで、PEGに対する免疫原性はPEGの存在によって誘導されるが、PEGの存在が抗体産生応答を担うわけではないということを報告した。即ち、PEGに対する抗体産生応答はPEGに結合するコンジュゲートによって依存し、IgM抗体だけでなくIgG抗体産生をすることを明らかにしてきた。

### 1. 高分子ミセルの抗原性に対するアジュバントによる影響

PEG は PEG 分子による特異性と免疫応答を担うコンジュゲートの性質によって決定されていることを明らかとした。一方、抗体クラスは主として IgM 抗体産生が行われるが、投与条件によって IgM 抗体産生細胞から IgG 抗体産生細胞へのクラススイッチが誘導され、繰り返し投与により PEG 特異的な IgG 抗体 (anti-PEG IgG 抗体) 産生も行われることを明らかにした。そこで、anti-PEG IgG 抗体産生をより高めることを目的にモノフォスフォリビッド A (MPLA) をアジュバントとする anti-PEG IgG 抗体産生への影響を評価した。PEG-PBLA ミセルを初回投与に用い (0.001mg/kg), MPLA 投与量を変化させて anti-PEG IgG 抗体産生を検討したところ、有意な差は示さなかったものの MPLA を使用することによって anti-PEG IgG 抗体産生の増加が認められた。この結果は、PEG-PBLA ブロックコポリマー自身にアジュバント効果がないが、MPLA 投与によって anti-PEG IgM 抗体産生細胞から anti-PEG IgG 抗体産生細胞へのクラススイッチに必要なサイトカイン産生が誘導されたため、anti-PEG IgG 抗体産生量が増加されたと考えられる。一方、初回投与量の IgG 抗体産生への影響についての詳細は明らかでなく、今後の検討課題である。

### 「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

急性期脳梗塞における BBB 血管透過性の評価は rt-PA 使用時に起こる BBB 透過性亢進部位を発端とする出血リスクの有無を診断するために非常に重要な手法となり得る。ここでまで使用してきた高分子ミセル MRI 造影剤は、BBB 血管透過性亢進領域を描出することが可能であった。この再開通直後の BBB 血管透過性亢進領域とその後に起こり得る出血との関連性を見極めることは非常に重要である。本年度、閉塞時間を従来の 3 時間から 2 時間に短縮し、再開通 72 時間後までの様子を MRI にて観測した。MRI における  $T_1$  強調画像は再灌流直後の BBB 血管透過性亢進性が時間に応じて低下することを高分子ミセル MRI 造影剤を用いることで明らかにした。さらに、 $T_1$  強調画像は再開通 24~72 時間後に新たに現れる BBB 透過性亢進領域を高分子ミセル MRI 造影剤によって示した。この BBB 透過性亢進の時間変化と出血との関係を、画像評価を基に、明

らかにしていくことが今後の課題である。また、分子の大きさと BBB 透過性亢進の評価を行うためにポリグルタミン酸系 MRI 造影剤の開発を新たに開始した。現在のところ、MRI 造影剤作製過程における最適条件の検討が必要であるが、BBB 透過性亢進と分子の大きさとの関係は rt-PA による出血リスクとの関係において重要な課題である。

薬物キャリアシステムで用いる PEG の抗原性とその影響について明らかになりつつある。PEG における抗原性と、その影響について、PEG を使用しているアカデミア・企業の関心は非常に高い。PEG における免疫応答について、我々のグループは抗体産生における特異性と応答性領域の働きについて、世界に先駆けて初めて明らかにした。また、T 細胞非依存性抗原とされる PEG 分子を有する PEG-PBLA 投与条件によって、繰り返し投与が anti-PEG IgG 抗体産生をすることを明らかにした。また、アジュバント効果によりクラススイッチ量が高まり IgG 抗体産生が高まることを示した。なぜ、投与量によって IgG 抗体クラスへのスイッチが変わるのかについてはまだ明らかではない。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

### II. 総説

- 1) 白石貢一, ドラッグデリバリーシステム DDS とイメージング, 日防衛防衛会誌 2015; 43(6): 305-9.
- 2) 白石貢一, 横山昌幸, 【虚血性疾患をターゲットにする DDS の新展開】急性期脳梗塞部位へのターゲティングと物質移動病態生理学, Drug Delivery Syst 2015; 30(4): 317-26.

### III. 学会発表

- 1) 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, (ポスターセッション) 高分子 MRI 造影剤を用いた急性期脳虚血の漏出性評価, 日本分子イメージング学会第 10 回学会総会・学術集会, 東京, 5 月.
- 2) 白石貢一, (招待講演) 高分子と生体系とのつながり, 九州地区高分子若手研究会・夏の講演会, 北九州, 6 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・健康・栄養研究所), 横山昌幸, コンジュゲートに依存した PEG の IgM 抗体産生, 第 31 回日本 DDS 学会学術集会, 東京, 7 月.
- 4) 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・健康・栄養研

究所), 横山昌幸. PEG-コンジュゲートの投与量に対する抗体産生への影響. 第31回日本DDS学会学術集会. 東京, 7月.

- 5) Yokoyama M, Shiraishi K, Wang Z, Aoki I (NIRS). (一般演題(口演) / 英語: 動物モデル(腹部)) A polymeric micelle MRI contrast agent detects enhanced BBB permeability in rat transient MCAO model (ラット中大脳脈閉塞-再開通モデルにおける高分子ミセルMRI造影剤を用いたBBB透過性亢進評価). 第43回日本磁気共鳴医学会大会. 東京, 7月.
- 6) 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・健康・栄養研究所), 横山昌幸. (一般演題ポスター: 基盤技術) Anti-PEG 抗体の結合及び anti-PEG 抗体産生に関する研究. 第37回日本バイオマテリアル学会. 京都, 11月.
- 7) Shiraishi K, Wang Z, Yokoyama M. BBB permeability imaging in ischemic stroke reperfusion injury by the use of polymeric micelle MRI contrast agent. European Molecular Imaging Meeting (EMIM 2016). Utrecht, Mar.

## 超音波応用開発研究部

准教授: 中田 典生 超音波診断学

### 教育・研究概要

#### I. 超音波とマイクロバブル相互関係の理論研究

マイクロバブルは超音波造影剤及び増強剤として, ますます重要な役割になると考えている。それらをもっと効率的, 合理的に利用するため, FEM (有限要素法) 及びメッシュフリー法 (Meshfree method) を利用して, 各種の超音波音場中のマイクロバブルの挙動及びその作用のシミュレーション (可視化) の実現を研究している。

#### II. MRI 装置を利用した生体内超音波音場の可視化研究

今の約 1/10 程度の安い MRI 装置はキヤノンと京都大が開発中で, 5 年内で実現する可能性がある。このような安い MRI 装置を利用した人体応用する超音波の伝搬状況のモニターの実現を目指したい。実現すれば, 超音波がもっと有力かつ安全な治療手段となり得ると考えており研究をすすめている。

#### III. ナノバブルを用いた, 分子イメージングの研究

生化学講座, 中央検査部, 東京理科大学との共同研究である。独自に作成したナノバブルを用いて, DDS およびがん治療への応用につき, 引き続き in vivo にて検討した。

#### IV. 機械学習による乳腺超音波診断の研究

対象は病理診断結果がある乳腺超音波画像であり, コンピュータによる機械学習のための教師画像 (答えのある画像) として超音波応用開発研究部に設置したコンピュータに入力される。この研究のために開発された機械学習プログラムに収集した画像データを入力して解析をすることにより, 乳腺超音波画像の良悪性判定のアルゴリズムが作成できるかどうかを試行することが本研究の目的である。

本研究で乳腺超音波画像の良悪性判定のアルゴリズムが作成できれば, この研究の次に実際の乳腺超音波画像を用いてテストを予定 (この前向き研究は, 今回の研究には含まれない) しており, 超音波画像診断医の診断効率の向上が期待される研究である。

### 「点検・評価」

上記, 各研究項目について以下に挙げる研究発表