

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
准教授：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. 生体適合性高分子を基盤とする高分子 MRI 造影剤と安定性評価

医用エンジニアリング研究部は、従来の MRI 造影剤の概念とは異なる使用用途が可能な MRI 造影剤開発を行っている。本研究部で開発された MRI 造影剤は分子の大きさに依存した特異的な MR 造影が可能になることを動物実験モデルにおいて成功しており、さらなる開発を目指している。

現在、臨床現場において用いられている MRI 造影剤は低分子のガドリニウムイオン (Gd^{3+})-キレート錯体 (Gd -キレート錯体) であり、これらは血液中への拡散に伴う非特異的な造影効果を示す。低分子 Gd -キレート錯体は、投与直後に速やかに血液中に拡散されることでイメージングが可能になり、短い血中半減期のため速やかに排出される。一方で、低分子 Gd -キレート錯体は、多量の造影剤投与、診断毎の繰り返し投与によって生体内中への蓄積が起これ、その蓄積に伴う障害が問題となっている。MRI 造影剤の主排出経路は腎排出であり、特に、腎機能低下がみられる患者に対しては、重篤な腎性全身性線維症 (NSF) が引き起こされることが報告されている。さらに、近年、小脳歯状核、淡蒼球等に MRI 造影剤の残存による高信号領域が認められている。現在、2つの例において、その影響は不確かであるが、MRI 造影剤の生体に対する長期的な残存はキレートからの Gd^{3+} の漏出の可能性を高める。 Gd^{3+} はリン酸イオンと強く相互作用し、不溶性の塩を形成するため、生体内に蓄積する。これらのことから、MRI 造影剤の設計は Gd^{3+} を漏出ししない非常に安定なキレートが望まれる。

一方、組織、疾患特異的な MRI 造影剤は、病態特異的な MR 造影が可能になり、診断における有効性は大きく高まるばかりだけでなく、脳の機能的画像を描出することが可能になると考えられる。今後の発展に重要な点は作製した MRI 造影剤の機能を保ちながら、安全性を担保することである。本研究部で開発した MRI 造影剤は造影効果が十分に発揮され、安定であることを明らかにしてきたが、上記に挙げた課題を克服するため、より安定性が高く、

安全面と機能面を担保する MRI 造影剤の開発を進めている。

1. MRI 造影剤の安定性評価

第一に、 Gd 錯体から遊離される Gd イオンの検出をするために、HPLC システムを用いた評価方法を確立した。その上で、各種条件の下、 Gd 錯体から遊離される Gd イオンの検出を行い、MRI 造影剤の安定性を評価した。低分子 MRI 造影剤として、既に、腎蓄積が認められている Gd -DTPA、 Gd -DTPA-BMA、安定な低分子 MRI 造影剤として知られている Gd -DOTA、高分子系 MRI 造影剤として 7 配位、8 配位のキレートを用いたポリグルタミン酸を基盤とする MRI 造影剤 ($P(Glu-ED-DOTA-Gd)$ 、 $P(Glu-ED-DOTAGA-Gd)$)、及び PEG 化ブロックコポリマーからなる高分子ミセル MRI 造影剤 ($PEG-P(Lys-DOTA-Gd)$) を用いて比較検討を行った。第一に、50% 血清中において、ポリグルタミン酸を基盤とする MRI 造影剤は Gd^{3+} の遊離が 21 日後までほとんど確認されなかった。一方で、低分子の Gd -DTPA、 Gd -DTPA-BMA は遊離の Gd^{3+} が認められた。血清中にリン酸イオンを添加すると顕著に安定性に影響を及ぼした。即ち、50% 血清中 10mM と 50mM のリン酸イオンの存在下においては 50mM リン酸イオン存在下で顕著に Gd^{3+} の遊離が加速された。50% 血清中に 50mM のリン酸イオン存在下において、 Gd イオンの遊離を比較すると、低分子 Gd -DTPA-BMA の安定性が著しく不安定となり、次いで Gd -DTPA の 2 つの MRI 造影剤が極めて早い段階から遊離の Gd^{3+} が認められた。高分子 MRI 造影剤 $P(Glu-ED-DOTA-Gd)$ 、新たに作製した $P(Glu-ED-DOTAGA-Gd)$ は安定な低分子 MRI 造影剤として知られる Gd -DOTA と同様の安定性を示した。一方、この検討の中で 7 配位型でありながら、高分子ミセル MRI 造影剤は最も高い安定性を示すことが明らかとなった。高分子 MRI 造影剤は低分子に比べて分子量が大きく、生体内に存在する時間が延長される。このことは、低分子 MRI 造影剤と比較して、 Gd^{3+} とリン酸イオンや他の生体内基質との接触の可能性が高まることが予想される。MRI 造影剤の造影効果と安全性の担保を両立するために、高分子ミセル MRI 造影剤においてもさらなる安定性を目指した分子設計を導入し、安全性が高く、かつ造影効果の高い MRI 造影剤の作製に着手している。

II. 合成高分子の免疫原性解明と新展開

高分子ミセルは高分子の会合体であり、大きさが

10～100nm であるため、会合体による薬物動態の制御と解離による排出に優れ、薬物キャリアの一つとして広く研究されている。高分子ミセル内部に薬物封入が可能であることから、高分子ミセル内部に封入された薬物は、高分子ミセルに運搬され、薬物動態が適切に制御される。高分子ミセルの薬物キャリアとしての動態は、高分子の生体親和性の性質に影響される。一般に、この生体親和性を担う高分子としてポリエチレングリコール（PEG）が用いられる。PEG は生体親和性に優れ、無毒であることが知られており、多くの医薬品・食品・化粧品等に用いられ、現在、10 種以上の PEG 化たんぱく質製剤が認可されている。しかしながら、薬物、または薬物キャリアに PEG を用いた際に起こる免疫応答が問題として挙げられている。一つはアナフィラキシー様応答であり、もう一つには免疫原性の問題である。本研究部は後者の課題に着目して研究を進めている。PEG 化による PEG に対する免疫原性の問題は、一部の PEG 化たんぱく質製剤において特に顕著に表れ、抗 PEG 抗体の存在と治療効果に強い相関があることが報告されている。薬物キャリアに PEG を用いた場合、強い細胞毒性を有する抗がん剤を薬物キャリアに封入した場合を除き、抗 PEG 抗体が観察される。PEG 化は、簡便かつ、効果的であるため、汎用性の高い手法であるため、この問題について解決されることが望まれている。

本研究部は PEG の免疫原性の本質は PEG だけにあるのではないことを既に報告している。即ち、PEG の免疫原性とは PEG 化された分子全体の PEG を介した免疫原性であり、この点を理解することで、PEG の免疫原性を低減させる手法に取り組んでいる。既に、PEG 化高分子においては、T 細胞非依存的な免疫応答が抑制されることを報告した。本年度は、T 細胞依存的な免疫応答の抑制を目指し、PEG 化たんぱく質の合成・評価を行った。加えて、生体の応答を利用した免疫寛容（トレランス）の誘導が起こっていることを示唆する結果が、昨年度、得られており、引き続き詳細な検討を行った。

1. 免疫アジュバントによる PEG に対する免疫応答のトレランス誘導

Toll 様受容体に対する作用を示す免疫賦活剤（アジュバント）を PEG 化高分子ミセルに封入することで、PEG に対する免疫応答を抑制するトレランスが誘導されていることを報告した。本年度、より詳細な検討を行った。まず、抗原性が高い PEG 分子にアジュバントを封入すると、初回投与時には、PEG に対する抗体産生が確認される。産生された

抗体の半減期は長いいため、初期には血中に存在するが、繰り返し投与に対して抗体産生を増加させない。この効果は、初回のアジュバント投与量依存的にトレランスが誘導されることが確認された。即ち、投与量依存的に抗体産生の非応答が認められた。一方、非常に抗原性の弱い PEG 化分子にアジュバントを封入し、別途、抗原性が高い PEG 分子を同時に投与しても、PEG に対するトレランスは誘導されなかった。これらのことから、抗原性が十分に高く、抗体産生を誘導することが可能な PEG 化分子において、積極的にアジュバントが働くことが重要であることが示唆された。

2. インターフェアリング効果を有する PEG 化分子の作製

昨年度に PEG 化たんぱく質の作製の最適経路を見出し、各種 PEG 化たんぱく質の作製を行った。PEG 特異的抗体と PEG 分子間の相互作用をインターフェアする目的で各種 PEG 高分子を作製した。たんぱく質として、uricase, asparaginase, 及び mouse albumin を用いて PEG 化を行った。各種たんぱく質のアミノ基、チオール基は 2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム（TNBS 法）、Ellman 試薬（Ellman 法）を用い、それぞれ定量した。TNBS 法においてはグリシンを、Ellman 法においてはシステインを標準物質として用いた。また、たんぱく質への PEG 化は、¹H NMR, Gel permeation chromatography（GPC）を用いて紫外可視吸光波長（280nm）にて定量した。

「点検・評価」

2019 年度は柏・臨床医学研究所内へと異動してから 3 年目となった。研究遂行がスムーズに行えるようになった。一方で、教員 1 名が研究費関連で約半年間、海外赴任のため研究部に不在となり、外部発表（学会発表、及び発表論文）が減った。この点は、次年度に改善されると考えられる。本研究部の研究成果を論文として外部発表できるように、次年度以降は研究とともに成果発表にも力をいれていく必要がある。教育面においては、学部 3 年生の研究室配属に対して、研究における安全性の概念を含めて工学的な研究を体験して頂き、医学とは異なる視点を感じて頂けるように研究部として受け入れ態勢を整えており、今年度は学生 1 名を受け入れた。次年度以降も継続して、学生を受け入れ体制を整えていきたい。

1. 生体適合性高分子を基盤とする高分子 MRI 造影剤と安定性評価

MRI 診断領域において、高分子を基盤とする新たな MRI 造影剤は有効な手段となりうるため、新たな MRI 造影剤の可能性を検討すべく、基礎的な検討も行っていく必要がある。第一に、生体中の半減期が長いことによる安全面の担保である。十分な MRI 造影剤の安定性の確保は安全性の確保につながるが、MRI 造影剤の不安定性原因の理解を深めること、それにより MRI 造影剤の安定性評価が確立される。現在、十分に高い安定性を有する高分子系 MRI 造影剤が得られているが、高分子系 MRI 造影剤有用性を明らかにするばかりでなく、積極的にその安全性を明らかにしていく。

2. 高分子ミセルキャリアシステムを用いた免疫原性の解明

本研究部は生体適合性 PEG に対する免疫原性の本質について世界に先駆けて明らかにしてきた。たんぱく質製剤の PEG 化は簡便、かつ有効な手法であるため、PEG 化たんぱく質製剤の研究開発、及び臨床試験が進められている。そのため、PEG に対する免疫原性への関心はアカデミア、及び企業において高まっている重要な課題であり、PEG に対する免疫原性の本質を明らかにし、これを克服する手段を見出すことがアカデミアに求められている。昨年度より国際共同研究を進める科学研究費を進め、従来の免疫学だけでは到達しえない概念を用いた研究テーマを開始した。本テーマは本研究部の基本的概念を国際的に活発なオランダ、及びドイツのグループと組み、国内だけでは達成できない研究を推進する。2019 年はオランダのグループとの共同研究を進めた。研究は順調に進められ、今後、特許を含めて展開をしていく予定である。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Yokoyama M, Shiraishi K. Stability evaluation of Gd chelates for macromolecular MRI contrast agents. MAGMA 2020 ; 33(4) : 527-36. Epub 2019 Dec 10.

III. 学会発表

- 1) 横山昌幸, 白石貢一. (口頭) 高分子 MRI 造影剤の Gd キレート安定性評価. 第 35 回日本 DDS 学会学術集会. 横浜, 7 月.
- 2) 白石貢一, 横山昌幸. (ポスター) PEG 特異的相互作用に関する考察. 第 35 回日本 DDS 学会学術集会. 横浜, 7 月.
- 3) 白石貢一, 横山昌幸. (口頭) 逡巡する PEG. 第 68 回高分子討論会. 福井, 9 月.

超音波応用開発研究部

准教授：中田 典生 画像診断, 超音波診断, 人工知能

教育・研究概要

I. 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等がある乳腺超音波画像 (教師学習用データ) が最低でも 1,000 症例以上必要であり、現在、大学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 の開発を進めている。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。

II. AI 開発のためのコンピュータのハードウェアおよびソフトウェアの環境整備

AMED 平成 31 年度「臨床研究等 ICT 基盤構築・人工知能実装研究事業」の採択課題、超音波デジタル画像のナショナルデータベース構築と人工知能支援型超音波診断システム開発に関する研究 (研究代表者：日本超音波医学会理事長 工藤正俊) において超音波画像処理とプロトタイプ診断支援の開発を研究分担者として行う。今年度は、他領域の画像群を用いた AI 転移学習効果の研究として、各種画像データセットによる転移学習の効果判定、AI 開発のためのコンピュータのハードウェアおよびソフトウェアの環境整備を行った。

III. 画像診断における AI 活用推進のための教育・啓蒙活動

日本超音波医学会や日本放射線医学会において、学会員 (超音波専門医や放射線科医) に近未来の画像診断支援への AI 活用の将来性やその原理について解説する教育・啓蒙活動を行った。また日本腎臓学会誌や医用画像情報学会雑誌にその内容を執筆・掲載した。

IV. 超音波とマイクロバブルの併用による、急性期重要血管閉塞の快速再開通法に関する in vitro 研究

急性期脳梗塞の治療において、閉塞血管の早期再