

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791298

研究課題名(和文)小動物SPECT/CTを用いたヨウ素123標識ラクトソーム腫瘍イメージングの開発

研究課題名(英文)A development of Tumor imaging by I-123 Lactosome using small animal SPECT/CT

研究代表者

栗原 研輔(KURIHARA, KENSUKE)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90531997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、癌診断を目的としたナノキャリア「ラクトソーム」の開発を目指し、その基盤となるI-123やIn-111標識ラクトソームを用いた小動物SPECTイメージングに関する研究を行った。各種標識ラクトソームの合成方法確立やICG標識体による蛍光イメージング、そしてbiodistributionによる体内動態調査等を施行したうえでラクトソームの改良を重ねた。最終的にIn-111-DOTA標識S50-A3B型ラクトソームによる良好な小動物SPECTイメージングを得た。しかし肝臓、脾臓への集積抑制やABC現象の完全な回避など、まだ課題も残されている。

研究成果の概要(英文)：We aimed at a development of the nanocarrier called Lactosome who is able to diagnose carcinoma. The study of small animal SPECT imaging was performed by using the Lactosome labeled by I-123 or In-111. We repeated improvement of Lactosome, with establishing of various labeled Lactosome and obtaining fluorescent imaging by ICG labeled Lactosome, and performing the biodistribution. As a result, we finally obtained excellent small animal SPECT imaging by using the Lactosome which is called S50-A3B type and labeled by In-111-DOTA. However, there is left many tasks, such as reduction the accumulation to liver and spleen, the suppression of an ABC phenomenon completely, and so on.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 放射線化学

キーワード：ナノキャリア ミセル SPECT-CT EPR効果 腫瘍イメージング ABC現象 転移モデル

1. 研究開始当初の背景

現在まで様々な薬剤伝達システム (DDS) が開発されているが、その基盤の1つにナノキャリアを用いる分子搬送システムがあり、薬剤を酵素分解などから保護し、尿排泄を回避し、標的部位に効率よく送達して副作用を抑制できる等の特長が知られている。また、蛍光剤や放射性同位元素等のシグナル剤を標識することで、分子イメージングプローブの基盤としても有用であり、さらには治療薬としてリポソーム化ドキシソルピシン (商品名: ドキシル) も上市されている。

申請者らは、これまでに乳酸系両親媒性高分子の自己組織化により形成されるナノ粒子「ラクトソーム」(直径: 20-30nm)を開発し、蛍光剤や放射性フッ素及びヨウ素の標識合成法を確立した。このラクトソームでは、腫瘍組織では正常組織に比して血管透過性が著しく亢進しているために高分子や微粒子が血管より流出しやすく、またリンパ系が発達していないために腫瘍組織に到達した物質が蓄積する性質 (EPR 効果) を利用できる。これにより高い腫瘍集積性を得ながら同時に肝臓や骨髄への集積が少ないことを蛍光イメージングや担癌マウスの PET, SPECT, Biodistribution により明らかにしてきた。

またナノ粒子では体内動態が初回と二回目以降とで異なる ABC 現象を示すことが一般に知られているが、申請者らはこの ABC 現象を減弱させて頻回投与においても腫瘍集積を再現しうる A3B 型構造のラクトソームの開発に成功した。

しかしラクトソームの腫瘍集積には 9-12 時間を要するため短半減期核種でのイメージングには困難があり、<sup>123</sup>I での SPECT イメージングが適していると考えられた。SPECT は PET に比して低被曝で済む長所はあるが空間分解能に劣る欠点が存在する。

しかし近年の SPECT/CT 機の発展もめざましく、平成 22 年に MI Labs 社の小動物用 SPECT 機が京大薬学部、平成 23 年に GMI 社製の小動物用 PET/SPECT/CT 機が京大 RI センターにそれぞれ新規導入されたことにより、より精細な画像を得ることが可能になっていた。

2. 研究の目的

本研究ではこのラクトソームを DDS として臨床応用する橋渡しとして、GLP 基準での非臨床試験 (安全性薬理試験および毒性試験) および第 Ⅰ 相臨床試験を目標としているが、蛍光・SPECT/CT イメージングにおいてさらなるがん組織の描出能向上を目的として担がんモデルマウス (転移モデルを含む) を作成し、蛍光剤や <sup>123</sup>I 標識ラクトソームの至適投与方法や撮像タイミング、撮像条件などの探索研究を行った。

3. 研究の方法

<sup>123</sup>I や <sup>111</sup>In 標識ラクトソーム等の化合物合成は、京大病院放射線診断科・ラクトソームプ

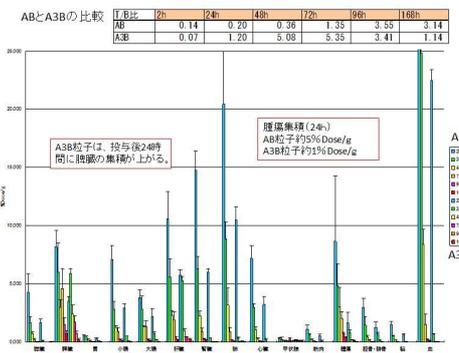
ロジェクトの木村俊作教授、島津製作所基盤技術研究所の技術協力を得た。<sup>123</sup>I、<sup>111</sup>In や小動物用 SPECT を用いた実験は京都大学薬学研究所の佐治英郎教授と京都大学放射性同位元素総合センターの川本卓男教授の協力を得た。前臨床評価は京都大学医学研究科の富樫かおり教授と清水章教授の協力を得た。

4. 研究成果

1) <sup>123</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>125</sup>I 標識ラクトソームの合成  
<sup>131</sup>I 標識 / <sup>123</sup>I 標識 / <sup>125</sup>I 標識ラクトソームについて SIB を用いる合成方法が確立された。

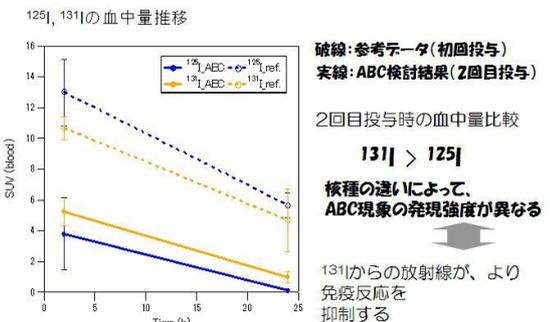
2) <sup>125</sup>I 標識 AB 型ラクトソームと A<sub>3</sub>B 型ラクトソームを用いた biodistribution

<sup>125</sup>I 標識 AB 型ラクトソームと A<sub>3</sub>B 型ラクトソームの皮下がんマウス中での動態を調べた。投与後 2、24、48、72、96、168 時間 (n=4) において解剖を行い、各組織・臓器中の <sup>125</sup>I を計測した。その結果、48 時間から 72 時間の間で ABC 現象が発現している可能性を得た。また血中半減期が AB 型の 16.5 時間に対し 4.3 時間と短縮されたが、腫瘍集積量は AB 型の約 5% Dose/g に対し A<sub>3</sub>B 型は約 1% Dose/g と減少していた。

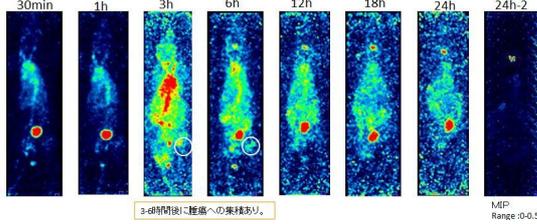


3) <sup>131</sup>I、<sup>125</sup>I 標識 AB 型ラクトソームを用いた biodistribution による ABC 現象確認

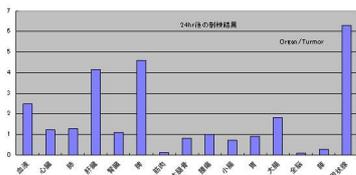
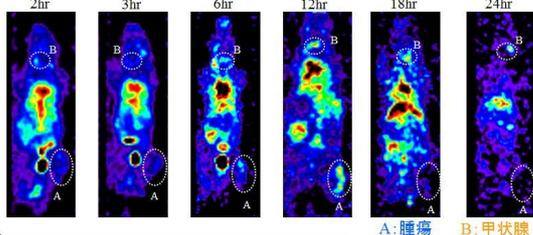
皮下癌マウスを用いた <sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I 標識ラクトソーム投与による ABC 現象の確認試験を行った。<sup>125</sup>I または <sup>131</sup>I 標識ラクトソームを 1 週間の期間をあけて 2 回投与し、2 回目投与後のマウス体内分布を検討した。2 回目投与後 2、24 時間 (各 n=4-5) において解剖を行い、各組織・臓器中の <sup>125</sup>I または <sup>131</sup>I を計測した。その結果いずれも ABC 現象が発現したが <sup>125</sup>I より <sup>131</sup>I の方が発現が弱く、<sup>131</sup>I からの線が免疫反応を抑制する可能性が考えられた。



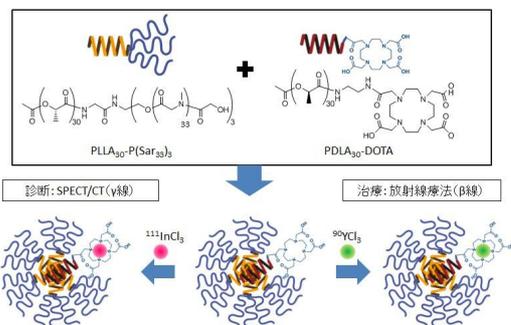
4) AB 型  $^{123}\text{I}$  ラクトソームによる小動物 SPECT  
 Suit2 (ヒト膵癌) を右大腿部に移植した BALB/c nu/nu マウスに対し、 $^{123}\text{I}$  標識 AB 型ラクトソームを 0.592mCi/body 尾静注投与した。結果、3~6 時間後に腫瘍への集積を認め、12 時間以降は良好な描出を得られなかった。24 時間後に麻酔死させてマウス用コリメーターで 12 時間の積算時間をかけて撮像したが、甲状腺への  $^{123}\text{I}$  標識を認めるのみで腫瘍への集積亢進は明らかではなかった。



5)  $\text{A}_3\text{B}$  型  $^{123}\text{I}$  ラクトソームによる小動物 SPECT  
 Suit2 (ヒト膵臓癌) を右大腿部に移植した BALB/c nu/nu マウスに対し、 $^{123}\text{I}$  標識  $\text{A}_3\text{B}$  型ラクトソームを 0.7mCi/body 尾静注投与し、撮像後に biodistribution を施行した。結果、12h 後の測定画像で腫瘍への集積亢進が一番良好に認められたが、今回の SPECT 実験でも甲状腺と思われる集積が出現しており遊離した  $^{123}\text{I}$  の存在が示唆された。

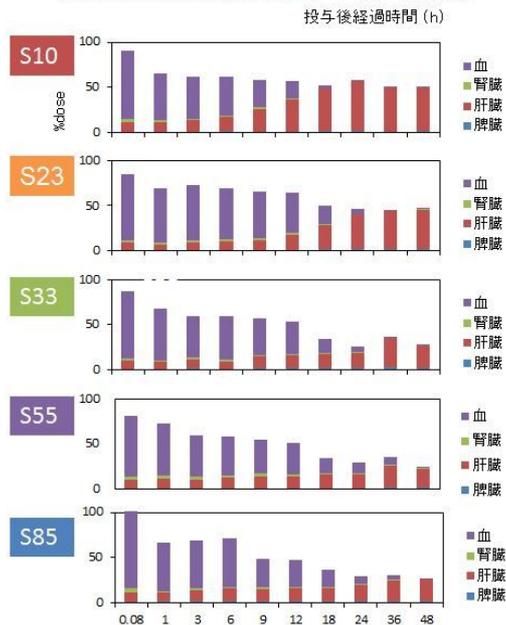


6)  $^{111}\text{In}$ -DOTA 標識ラクトソームの合成  
 ヨウ素化ラクトソームでは遊離した  $\text{I}$  の甲状腺への集積を認めたため、核種を変え  $^{111}\text{In}$  で標識するラクトソームの合成を検討し、 $^{111}\text{In}$ -吸着ラクトソームや  $^{111}\text{In}$ -DOTA 標識ラクトソームの合成方法を確立した。前者は biodistribution で血中安定性不良が示唆されたため、イメージングには  $^{111}\text{In}$ -DOTA 標識の  $\text{A}_3\text{B}$  型ラクトソームを用いることにした。

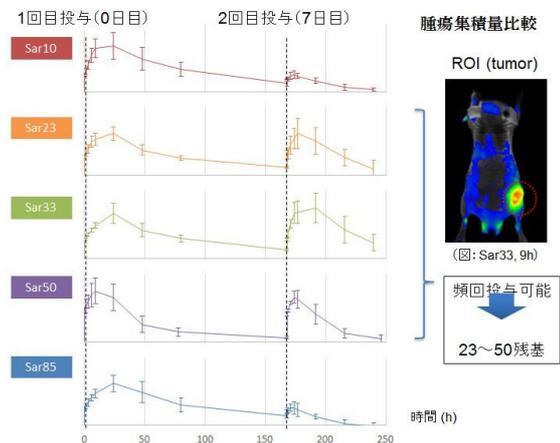


7)  $^{111}\text{In}$ -DOTA 標識ラクトソーム  $\text{A}_3\text{B}$  型ラクトソームを用いた Biodistribution  
 サルコシン鎖長の異なる両親媒性分子  $\text{S}_n\text{-A}_3\text{B}$  ( $n = 10, 23, 33, 50, 85$ ) から調製した 5 種類の ICG 標識ラクトソームを用いて BALB/c nu/nu マウスに静注投与し、5 分、1,3,6,9,12,18,24,36,48 時間後 ( $n=4$ ) において解剖を行い、各組織・臓器中の  $^{111}\text{In}$  を計測した。結果、 $n = 33, 50, 85$  において肝臓への集積亢進が抑制された。

**Biodistribution 投与量に対する割合**



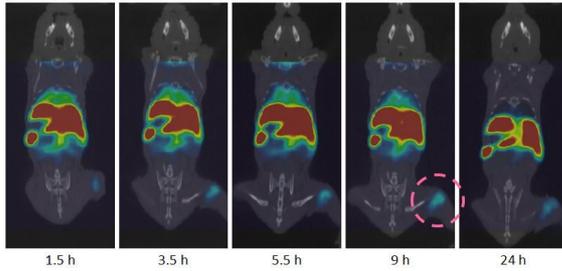
8) ABC 現象の回避方法の探求...サルコシン鎖長の異なる  $\text{A}_3\text{B}$  型ラクトソームを用いた蛍光イメージング  
 サルコシン鎖長の異なる両親媒性分子  $\text{S}_n\text{-A}_3\text{B}$  ( $n = 10, 23, 33, 50, 85$ ) から調製した 5 種類の ICG 標識ラクトソームを用いて 2 回投与した皮下腫瘍マウスを蛍光観察した。その結果、 $n = 23, 33, 50$  において 2 回目投与でも良好な腫瘍集積を得た。7) の結果と合わせて、 $\text{S}_{33}\text{-A}_3\text{B}$  型と  $\text{S}_{50}\text{-A}_3\text{B}$  型の粒子で小動物 SPECT/CT イメージングを行うこととした。



9) <sup>111</sup>In-DOTA 標識 S<sub>33</sub>-A<sub>3</sub>B 型ラクトソームを用いた小動物 SPECT/CT 実験

4T1 (マウス乳癌) を右大腿部に移植した BALB/c nu/nu マウスに対し、<sup>111</sup>In-DOTA 標識 S<sub>33</sub>-A<sub>3</sub>B 型ラクトソームを 0.403mCi/body 尾静注投与した。その結果、1.5 から 24 時間後まで良好な腫瘍集積を得た。

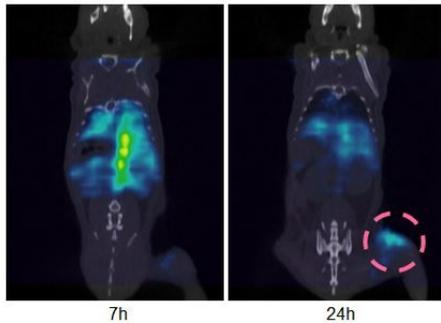
<sup>111</sup>In 標識 S<sub>33</sub>-A<sub>3</sub>B 型ラクトソーム



10) <sup>111</sup>In-DOTA 標識 S<sub>50</sub>-A<sub>3</sub>B 型ラクトソームを用いた小動物 SPECT/CT 実験

4T1 (マウス乳癌) を右大腿部に移植した ICR-nu マウスに対し、<sup>111</sup>In-DOTA 標識 S<sub>50</sub>-A<sub>3</sub>B 型ラクトソームを 0.403mCi/body 尾静注投与した。その結果、24 時間後において良好な腫瘍集積を得た。

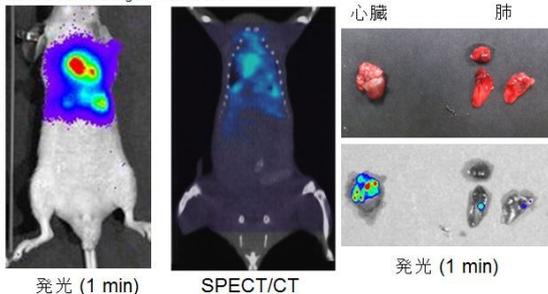
In 標識 S<sub>50</sub>-A<sub>3</sub>B 型ラクトソーム



11) <sup>111</sup>In-DOTA 標識 S<sub>50</sub>-A<sub>3</sub>B 型ラクトソームを用いた転移モデル小動物 SPECT/CT 実験

B16f10 Luc (マウスの悪性黒色腫) を BALB/c nu/nu マウスに心腔内投与することで胸膜播種やリンパ節転移、肺転移を生じることがルシフェラーゼ発光で予め確認した後、小動物 SPECT/CT 実験を行った。<sup>111</sup>In-DOTA 標識 S<sub>50</sub>-A<sub>3</sub>B 型ラクトソームを 0.403mCi/body 尾静注投与した。結果、微小な転移・播種病変に対する良好な腫瘍描出像を得た。

In 標識 S<sub>50</sub>-A<sub>3</sub>B 型ラクトソーム



12) ICG 標識 A<sub>3</sub>B 型ラクトソームを用いた PEIT 処置マウスの蛍光イメージング

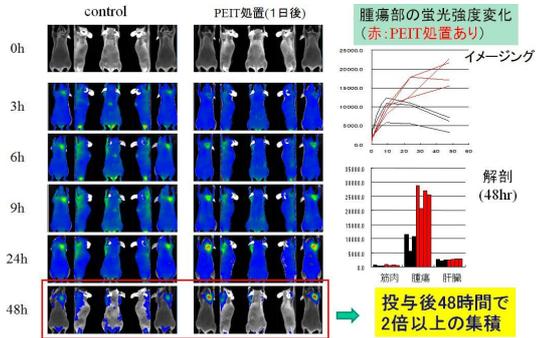
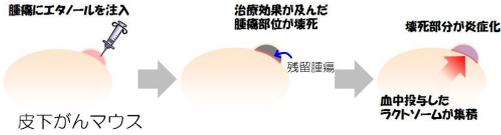
主要局所への集積性を向上させるために 4T1 (マウス乳癌) を右大腿部に移植した BALB/c nu/nu マウスに対し、無水エタノールを局所注入した 1 日後に ICG 標識 A<sub>3</sub>B 型ラクトソームを尾静注投与して蛍光イメージングを行った。結果、非処置群に比して 2 倍の集積亢進を認め、治療応用の可能性と治療状態を診断できる可能性が示唆された。

PEIT (Percutaneous Ethanol Injection Therapy) とは

肝細胞癌にエタノールを注入することにより腫瘍細胞を死滅させる治療法

エタノールの注入量  
 $4/3\pi (r+0.5)^2 mL (r+0.5: 腫瘍の最大径の半分+安全域 cm)$   
 最大径 2cm の腫瘍 (安全域なし) = 0.52ml  
 最大径 4cm の腫瘍 (安全域なし) = 約 4.2ml

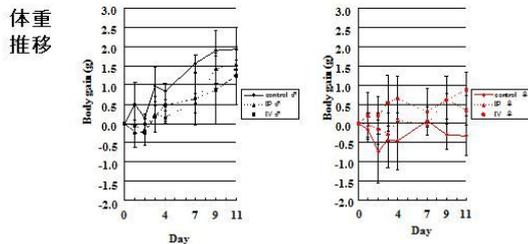
PEIT 併用療法の概要



13) ラクトソーム大量投与による毒性試験

AB 型ラクトソーム 2,000mg/kg (40mg/body) を投与し、急性毒性の有無を確認した。終濃度 90.7 mg/ml、粒子径 38.95 nm (Pdl=0.058) に対し対照群、腹腔内投与、静脈投与の各々 6 群用意し、うち対照群を除く 4 群に 0.5ml/day 投与した。投与後の体重減少は対照群と投与群とで有意差なく、全てのマウスにおいて 11 日目の剖検まで有害事象を認めず、剖検でも器質的異常を指摘できなかった。

マウス: BALB/c 7週齢 (投与時) 雌雄各 3匹 (尾静脈、腹腔投与)  
 投与: ポリマー濃度 90.7 mg/ml (粒子径 38.95 nm)  
 午前 0.2ml、午後 0.3ml (合計 2,000 mg/kg)  
 Control には何も投与せず



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

A.Makino, E.Hara, I.Hara, R.Yamahara, **K.Kurihara**, E.Ozeki, F.Yamamoto, S.Kimura  
Control of in vivo blood clearance time of polymeric micelle by stereochemistry of amphiphilic polydepsipeptides

JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE AUG 2012

161 巻 3 号 ページ:821-825 査読有

DOI:10.1016/j.jconrel.2012.05.006

E.Hara, A.Makino, **K.Kurihara**, E.Ozeki, F.Yamamoto, S.Kimura

Pharmacokinetic change of nanoparticulate formulation "Lactosome" on multiple administrations

INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY NOV

2012 14 巻 3 号 ページ:261-266 査読有

DOI:10.1016/j.intimp.2012.07.011

F.Yamamoto, R.Yamahara, A.Makino, **K.Kurihara**, H.Tsukada, E.Hara, 他 5 名  
Radiosynthesis and initial evaluation of F-18 labeled nanocarrier composed of poly(L-lactic acid)-block-poly(sarcosine) amphiphilic polydepsipeptide

NUCLEAR MEDICINE AND BIOLOGY APR 2013

40 巻 3 号 ページ:387-394 査読有

DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2012.12.008

E.Hara, A.Makino, **K.Kurihara**, M.Sugai, A.Shimizu, I.Hara, E.Ozeki, S.Kimura  
Evasion from accelerated blood clearance of nanocarrier named as "Lactosome" induced by excessive administration of Lactosome

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-GENERAL

SUBJECTS AUG 2013

1830 巻 8 号 ページ:4046-4052 査読有

DOI:10.1016/j.bbagen.2013.03.024

E.Hara, A.Makino, **K.Kurihara**, M.Ueda, I.Hara, T.Kawabe, F.Yamamoto, 他 3 名  
Radionuclide therapy using nanoparticle of I-131-Lactosome in combination with percutaneous ethanol injection therapy

JOURNAL OF NANOPARTICLE RESEARCH

15 巻 12 号 ページ:1-10 査読有

DOI:10.1007/s11051-013-2131-2

〔学会発表〕(国内のみ計 3 件)

### 栗原研輔

両親媒性ナノキャリア「ラクトソーム」開発の現状と問題点～イメージングから治療を目指して～

第 1 回腫瘍分子イメージング夏季集中セミナー  
2012/8/4-5 北海道ニセコ

上田一樹、**栗原研輔**、原功、小関英一、富樫かおり、木村俊作

111In 標識 A3B 型ラクトソームの開発と固形癌の SPECT イメージング

第 53 回日本核医学会学術総会

2013/11/8-10 福岡

上田一樹、**栗原研輔**、原功、佐野紘平、小関英一、富樫かおり、佐治英郎、木村俊作

放射線金属核種を標識したラクトソームによる固形癌のイメージング

第 13 回放射性医薬品・画像診断薬研究会

2013/12/14 京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称: 病変部位の内照射治療用ナノ粒子および治療システム

発明者: 竹内恵理、**栗原研輔**、原功、小関英一、山原亮、牧野顕、木村俊作

権利者: 京都大学、島津製作所

種類: 特許 番号: 2013-533690

出願年月日: 2014 年 3 月 3 日、国内

名称: 病変部位の内照射治療用ナノ粒子および治療システム

発明者: 竹内恵理、**栗原研輔**、原功、小関英一、山原亮、牧野顕、木村俊作

権利者: 京都大学、島津製作所

種類: 特許 番号: 14/344.562

出願年月日: 2014 年 3 月 12 日、外国

名称: 病変部位の内照射治療用ナノ粒子および治療システム

発明者: 竹内恵理、**栗原研輔**、原功、小関英一、山原亮、牧野顕、木村俊作

権利者: 京都大学、島津製作所

種類: 特許 番号: 12832548.7

出願年月日: 2014 年 3 月 14 日、外国

取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

・栗原 研輔 (Kurihara Kensuke)

・京都大学医学部付属病院放射線診断科 ラ

クトソームプロジェクト 助教

・研究者番号: 90631997