

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461872

研究課題名(和文) ミクロ粒子の経動脈的注入における粒子と溶出薬剤の動態とその制御に関する実験的研究

研究課題名(英文) Experimental study on control of the drug distribution in transarterial infusion

研究代表者

香田 渉 (Koda, Wataru)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30401920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：IVR技術を利用した特異的、効率的、非侵襲的delivery systemを開発するため、血管作動性物質による血管透過性の制御機能について検討した。超音響イメージングにてインドシアニングリーン(ICG)の動態を確認することが可能であり、ICGが細胞内に取り込まれていることも確認できた。また、血管透過性が亢進した状態ではエバンスブルーの組織内蓄積が増強し、血管透過性が低下した状態ではICGによる超音響イメージングシグナルが低下した。

研究成果の概要(英文)：To develop specific, effective and non-invasive delivery system using IVR technology, we investigated the relationship of vasoactive substances to vascular permeability. By photoacoustic imaging, it was possible to confirm the kinetics of indocyanine green (ICG) and ICG uptake into the cells. In addition, the tissue accumulation of Evans blue was enhanced in the state of increased vascular permeability, and the signal of a photoacoustic imaging by ICG was reduced in the state of decreased vascular permeability.

研究分野：放射線科学

キーワード：インターベンショナルラジオロジー(IVR) 癌 血管透過性

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療の進歩により細胞移植の臨床応用が目前に迫り、遺伝性疾患や癌に対する遺伝子治療や固形腫瘍に対する免疫療法も臨床応用が進められている。これらの治療に共通な課題として、機能する細胞（幹細胞あるいは免疫細胞）や遺伝子を標的組織に特異的、効率的、そして非侵襲的に導入するシステムを確立する必要がある。これは化学療法をはじめとする薬物療法においても重要であり、体内の薬物分布を量的・空間的・時間的に制御する Drug Delivery System; DDS の開発が急がれている。

ナノテクノロジーを用いた nano DDS は、今のところ臨床的有効性が証明されたものは少なく、Device-based DDS は脳腫瘍において臨床的有効性が確認されているが、侵襲的な手法が必要となる。一方、microparticle-based DDS (1-1000  $\mu\text{m}$  径) は生体適合物質のうち比較的製造が単純で、大量の薬物を溶出によってコントロールしながら delivery できる。microparticle として欧米では様々な beads が臨床応用されており、塞栓物質としての利用のほか、carrier として機能する drug eluting beads; DEB も実用化されている。しかし、本邦では未承認であり、基礎的ならびに臨床的研究およびその実用において、欧米に大きく後れをとっている。現在、beads に関する臨床的有効性を示す論文が複数発表されている一方、その性状については不明な点も多く、投与された beads の腫瘍内での正確な分布や生体内で溶出した薬物の局所濃度や経時的な分布変動は明らかではない。薬物の付加、溶出、あるいは物理化学的性質についてもわかっていない事は多い。beads は有力な塞栓物質かつ carrier となる可能性が高く、その性状を明らかにし、分布（粒子および付加物質）をコントロールする研究を進めることは本邦において急務である。

DDS に寄与する薬物投与経路として、IVR による選択的な経動脈的投与は非常に有用である。これは長年の癌治療の臨床において実証済みと言える。この IVR 技術と beads を組み合わせることによりその局在をコントロールすることができれば、低侵襲かつ有効な delivery system の構築が期待される。しかし、beads は生体内において画像化することができなかつたため、投与中の分布や生体内での動態を経時的に追跡することができず、beads 研究の一つの障壁となっていた。これまでに我々の教室では、肝腫瘍を中心に腫瘍血管の解剖ならびに血行動態について、病理組織学的検討および画像解析により明らかにしてきた (Radiology. 1998;206:161-166、CardiovascIntervent Radiol. 2001;24:383-387、J Comput Assist Tomogr. 2002;26(6):975-80、Radiology. 2009;252(2):605-14、Abdom Imaging. 2011;36(3):264-72)。また、生体顕微鏡を用いた肝臓や腸管・腸間膜における血流や塞栓物質

の動態についての研究も行っており、肝腫瘍における微小血行動態の変化も明らかにしてきた (Radiology. 2007;243(2):386-95)。肝細胞癌に対する樹状細胞免疫療法では、腫瘍への樹状細胞の集積効率を向上させるために、樹状細胞の腫瘍栄養血管からの経動脈的投与とゼラチンスポンジ細片による動脈塞栓を併用して細胞移入する臨床試験も行い (金沢大学倫理委員会第 187 号承認)、その基礎的根拠を確認するため、樹状細胞を SPIO により磁氣的に標識する方法を確立し、塞栓物質とともに血管内投与した標識樹状細胞の生体内分布ならびに動態を経時的に MRI で追跡する動物実験も行ってきた (科学研究補助金研究 課題番号 27890885)。さらに血管作動性物質の肝疾患や病態形成への関与 (Lab Invest. 2000;80(7):1007-17) や血管新生および血管障壁機能についての基礎的研究 (Nat Med. 2012;18(10):1560-9) も行い、血管作動性物質の役割や微小循環が治療の標的となり得ることについても明らかにしてきた。

以上の研究動向と我々の研究成果を踏まえて、細胞や薬剤を標的組織に特異的、効率的、かつ非侵襲的に delivery するシステムを開発するため、まず、肝腫瘍に対する microparticle (beads) の経動脈的投与における粒子および薬剤の生体内分布ならびに動態を明らかにし、粒子の性状や血管作動性物質の作用によりその腫瘍内分布をコントロールする研究を行うことを着想した。

しかし、実際に研究を開始したところ、薬剤の carrier としての利用を予定していた beads の薬事認可の動きが進み国内での beads の入手等が困難になるなど、いくつかの要因が重なり beads を用いた実験をスムーズに開始することができなかつた。このため、血管作動性物質を経動脈的投与した際の血管の形態ならびに機能の評価を先行して行うことにしたが、血管内皮バリアー機能としての病理学的形態、分子生物学的機能、血管透過性を検討し、さらに血管作動性物質によるこれらの制御機能を解明することができれば、目的とする microparticle や溶出薬剤等の腫瘍内分布のコントロールの実現に向けて、さらに大きな知見を得ることができると考えた。また、当施設に小動物用超音波高解像度イメージングシステムが導入され設備環境が整ったことから、血管透過性をはじめとする微小環境の評価において、次世代画像診断機器として認識されつつある光音響イメージングを利用した手法を確立し、今後の研究に利用することを想到した。

光イメージングは、これまで核医学検査と同等に高い濃度分解能を有する一方で時間分解能と空間分解能は劣るとされ、この点で細胞追跡イメージングには MRI がより有利と考えられてきた。しかし、光イメージングの中でも光音響イメージングは時間分解能と空間分解能が高い機器として注目されている。エバンスブルーやインドシアニングリ

ーンは即座にアルブミンと結合することから血管透過性を評価する薬剤として使用されるが、インドシアニングリーンは超音響イメージングにて描出可能とされ、また細胞内に取り込まれ易い物質としても注目されている。

## 2. 研究の目的

将来の臨床応用が期待される再生医療、免疫療法、遺伝子治療、そして化学療法に応用可能な「IVR技術を利用した特異的、効率的、そして非侵襲的 delivery system」を開発することが最終的な目標である。

そのための基礎的研究として、本研究課題では、臨床的実績のある経動脈的投与と有用な carrier として期待されている microparticle を利用し、①肝腫瘍に対する microparticle の経動脈的投与における粒子および溶出薬剤の分布ならびに動態を生体での画像的追跡および組織学的検討により明らかにすること、②粒子性状の変化や血管作動性物質の作用により microparticle や溶出薬剤の腫瘍内分布をコントロールし腫瘍への選択的集積効率を向上させることを当初の目的とした。

しかし、上記の理由により、まず、③血管内皮バリアー機能としての病理学的形態、分子生物学的機能、血管透過性を評価し、血管作動性物質によるこれらの制御機能を解明することにより、microparticle や溶出薬剤等の腫瘍内分布のコントロールの実現を目指す。そのため、血管透過性の程度と導入された細胞や物質を同時に評価するシステムとして、超音響イメージングによる評価方法を確立する。

## 3. 研究の方法

(1) エバンスブルーを用いた血管透過性亢進状態の評価

ウサギ（非腫瘍植え込みモデル  $n > 4$ 、VX2 肝植え込みモデル  $n > 4$ ）に対して、大腿動脈よりカテーテルを導入し、総肝動脈にマイクロカテーテルを留置して 2% エバンスブルーを動注した。その際、腫瘍植え込みモデルにおいてニトロールを同時に動注する群 ( $n > 2$ )、しない群 ( $n > 2$ ) を施行した。

(2) インドシアニンググリーン濃度に応じた超音響イメージングのシグナルの評価

5mg/ml、2.5mg/ml、1.0mg/ml の異なる濃度のインドシアニンググリーンを浸した綿棒を超音響イメージングで撮像し、濃度に応じたシグナルの変化を観察する。

(3) 超音響イメージングによるインドシアニンググリーの動態評価 1

まず、腫瘍皮下移植モデルマウスを作成した。C57BL/6J マウスに対して、移植腫瘍として Lewis lung carcinoma (LLC) を  $1.0 \times 10^7$  cells/mL を皮下注し、10 日間飼育した。

光イメージングによる評価として小動物超音波高解像度イメージングシステム (Vevo LAZR Imaging system: FUJIFILM Visual Sonics 社) を用いた。イソフルラン吸入下 (2%/L/min) にて鎮静し、自動注入器 (マイクロシリンジポンプ ヒュージョンタッチ 200) を用いて尾静脈よりインドシアニンググリーン 1mg を  $200 \mu\text{l}/10$  秒で尾静注し、皮下腫瘍におけるその動態を呼吸同期下にて観察・定量化した ( $n > 4$ )。さらに、0.5mg ( $n > 4$ )、0.2mg ( $n > 4$ ) を尾静注し、シグナルの変化を観察及び定量化し、最高値や経時的変化を比較した。

(4) 超音響イメージングによるインドシアニンググリーの動態評価 2

前項のごとく飼育した皮下腫瘍モデルマウスに対して抗 VEGF 薬である VEGF-trap を 5mg/kg 腹腔内注射し、直後に皮下腫瘍におけるシグナルの変化を同様に観察・定量化した ( $n > 3$ )。

(5) 細胞内へのインドシアニンググリーン導入

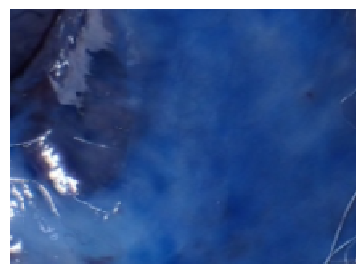
ICG 1mg を心腔内に投与 1 分後に、4% パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を施行し、凍結切片を作成した。1 次抗体 (CD31)、2 次抗体 (Alexa488) 反応、DAPI 染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。ただし、インドシアニンググリーンは可視光ではなく、近赤外光により励起し共焦点顕微鏡で観察した画像をシステム上で merge した。皮下腫瘍を含め、肝、腎などの臓器で、細胞内にインドシアニンググリーンが取り込まれるかを評価した。

## 4. 研究成果

(1) エバンスブルーを用いた血管透過性亢進状態の評価

初期評価として、総肝動脈を選択したカテーテルよりエバンスブルーを動注した。この際、ニトロールを用いた検討を施行したが、エバンスブルーは早期に胆管に排泄されるため、組織内に残存したエバンスブルーの比較や定量評価は困難であった (図 1)。

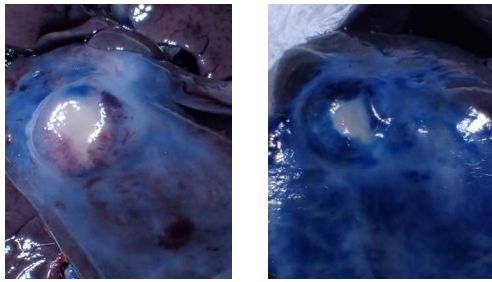
図 1. ニトロール併用によりエバンスブルーが蓄積した肝臓



ニトロ製剤は血管透過性を亢進させると考えられているが、ニトロ製剤投与にて腫瘍や腫瘍周囲のエバンスブルー蓄積が増加していた (図 2)。エバンスブルーの蓄積程度が血管透過性を主とした動態を示唆する可能

性が考えられる。

図2. ニトロール併用によるエバンスブルー蓄積の違い

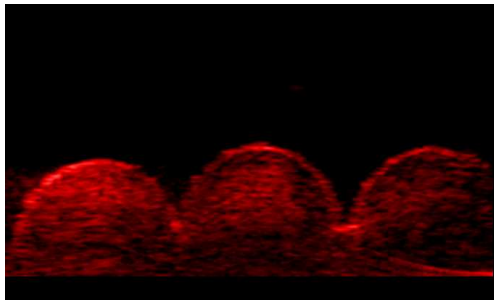


ニトロール (-)                      ニトロール (+)

(2) インドシアニングリーン濃度に応じた光音響イメージングのシグナルの評価

インドシアニンググリーンを浸した綿棒を光音響イメージングで撮像したところ、インドシアニンググリーンの濃度に応じてシグナルが変化していることが視覚的に判った (図3)。

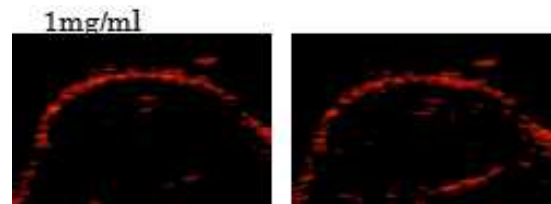
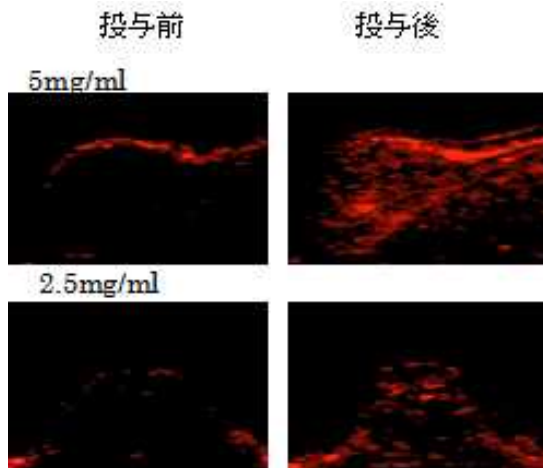
図3. 5mg/ml、2.5mg/ml、1.0mg/ml のインドシアニンググリーンを浸した綿棒の光音響イメージング



(3) 光音響イメージングによるインドシアニンググリーンの動態評価 1

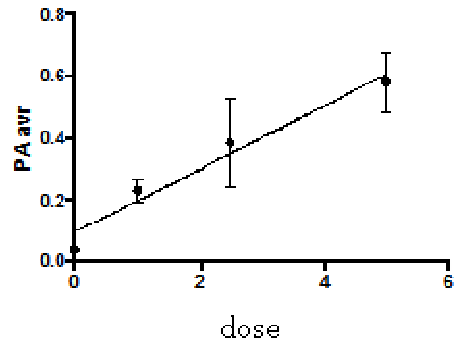
インドシアニンググリーン投与前後で腫瘍内のシグナル増強がみられた。また、それは濃度依存的であり、インドシアニンググリーンの濃度が増加するにつれ、シグナルは増強した (図4)。

図4. 腫瘍皮下移植モデルマウスにおけるインドシアニンググリーン投与前後の光音響イメージング



定量化した評価でも濃度依存性にシグナルが増強していることが判った (図5)。

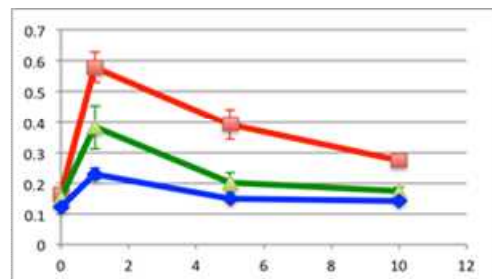
図5. 腫瘍皮下移植モデルマウスにおける光音響イメージングの定量的評価



$R^2=0.8231$

また、peak を迎えた後 10 分かけてシグナルは減弱していた。これらのシグナルもやはり濃度依存的に減弱していた (図6)。

図6. 光音響イメージングにおける移植皮下腫瘍のシグナルの time intensity curve

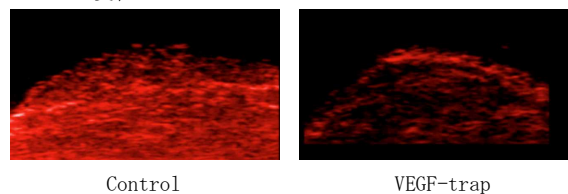


5mg/2.5mg/1.0mg

(4) 光音響イメージングによるインドシアニンググリーンの動態評価 2

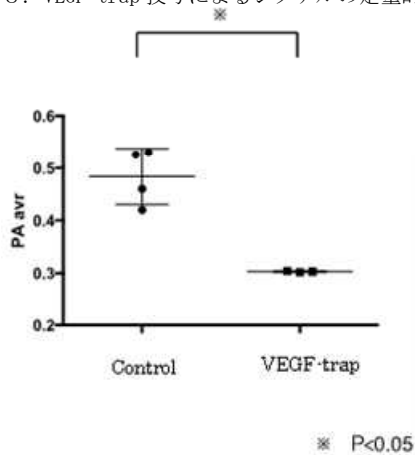
抗 VEGF 薬 VEGF-trap 投与下では、皮下腫瘍モデルマウスの光音響イメージングのシグナル減弱に変化がみられた (図7)。

図7. VEGF-trap 投与による光音響イメージングのシグナル変化



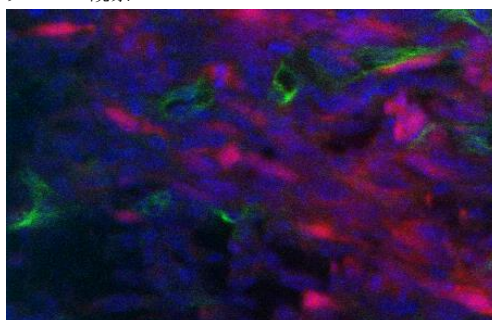
定量的評価でも VEGF-trap 投与により有意差を持ってシグナルは減弱していた (図8)。

図8. VEGF-trap 投与によるシグナルの定量的評価



(5)細胞内へのインドシアニングリーン導入  
 蛍光顕微鏡により、紡錘形を呈した腫瘍細胞内にインドシアニンググリーンを認めた(図9;赤はインドシアニンググリーン、緑は血管内皮、青は核)

図9. 蛍光顕微鏡による腫瘍組織内インドシアニンググリーンの観察



#### 研究成果まとめ

光音響イメージングにてインドシアニンググリーンの動態を確認することができた。さらに、細胞内にインドシアニンググリーンが取り込まれていることも確認することができた。また、血管透過性が亢進した状態ではエバンスブルーの蓄積が増強し、血管透過性が低下していると思われる状態ではインドシアニンググリーンによるシグナルが低下すると考えられた。

#### <参考文献>

- ①Onda, et al. Preferential Tumor Cellular Uptake and Retention of Indocyanine Green for In Vivo Tumor Imaging. *Int J Cancer*. 2016 Mar 23.
- ②C. Kim, et al. Sentinel lymph nodes and lymphatic vessels: noninvasive dual-modality in vivo mapping by using indocyanine green in rats - volumetric spectroscopic photoacoustic imaging and planar fluorescence imaging. *Radiology*, 2010, 255 (2) , 442.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ①Kenichiro Okumura, Kotaro Yoshida, Dai Inoue, Tetsuya Minami, Wataru Koda, Satoshi Kobayashi, Toshihumi Gabata, Sho Aki, Kazuaki Yoshioka, Yoh Takuwa  
 Initial evaluation of Photoacoustic Imaging in an vivo animal model  
 第75回日本医学放射線学会総会 2016年4月14日~17日 横浜
- ②Kotaro Yoshida, Kenichiro Okumura, Dai Inoue, Tetsuya Minami, Wataru Koda, Satoshi Kobayashi, Toshihumi Gabata, Sho Aki, Kazuaki Yoshioka, Yoh Takuwa  
 Usefulness of indocyanine green contrast agent for photoacoustic imaging in an in vivo model  
 第75回日本医学放射線学会総会 2016年4月14日~17日 横浜
- ③奥村健一郎、吉田耕太郎、井上 大、南 哲弥、香田 渉、小林 聡、蒲田敏文、安藝翔、吉岡和晃、多久和陽  
 インドシアニンググリーンを用いた光音響イメージングの生体への応用  
 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1日~4日 神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

香田 渉 (KODA, Wataru)  
 金沢大学・医学系・准教授  
 研究者番号：30401920

##### (2) 研究分担者

松井 修 (MATSUI, Osamu)  
 金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任教授  
 研究者番号：10019961

南 哲弥 (MINAMI, Tetsuya)  
 金沢大学・附属病院・准教授  
 研究者番号：60436813

吉田 耕太郎 (YOSHIDA, Kotaro)  
 金沢大学・医学系・助教  
 研究者番号：30645130

##### (3) 連携研究者

なし