

学 位 論 文 要 旨

氏名 横江 祈

題 目：リピッドバブルを用いたセラノスティクスの
獣医療での実現に向けた基礎的および臨床的検討

論文要旨：

セラノスティクスは、画像診断装置を用いて、病変部の診断、それに基づく治療およびその効果判定までを同時進行的あるいは連続的に行う診療システムと解釈される。特に、安全性の高い超音波エネルギーを用いたセラノスティクス（超音波セラノスティクス）の実用化が有望視されており、超音波造影剤であるマイクロバブル（microbubbles, MBs）との併用に注目が集まっている。MBsは脂質などから形成される外殻にガスが内包された構造を持つ（粒子直径：1–10 μm ）。超音波照射により、MBsは振動や圧壊を生じる。造影超音波検査（contrast-enhanced ultrasonography, CEUS）では、MBsの振動に伴い発生する高周波成分を画像化する。さらに、MBsの振動や圧壊が生体膜にもたらす機械的作用により、照射部位に薬物送達効果が得られることが実験的に示されている。すなわち、MBsを用いた超音波セラノスティクスの適用によって、CEUSによる診断と薬物送達による治療を併せた効率的な医療が可能となる。

既存のMBs製剤は、CEUSでの使用を目的に開発された。それらと超音波を用いた薬物送達は未だ研究段階であり、臨床での実用化には至っていない。そのため、薬物送達への利用を目指して様々なMBsが設計・開発されている。帝京大学の丸山らにより開発されたリピッドバブル（Lipid bubbles, LBs）は、分子量2,000のポリエチレングリコール（polyethylene glycol, PEG）で修飾された単層のリン脂質から成る外殻内に、パーフルオロプロパンガスを内包するMBsである（平均粒子径：約2.7 μm ）。マウスを用いた研究により、LBsと超音波による造影効果や、正常組織への薬物送達効果が実証されており、超音波セラノスティクスへの応用が期待されている。我々は、安全で効率に優れる超音波セラノスティクスと獣医療の親和性に着目し、イヌのがん診療において、LBsを用いた超音波セラノスティクスを実現することを構想した。具体的には、LBsを用いたCEUS（LBs-CEUS）により腫瘍組織の画像診断を行い、続けて治療用超音波の照射により抗がん剤の薬物送達を促し、最後にCEUSにより治療効果を判定するという一連の診療システムである。しかし、現在のところ、LBsと超音波を用いた抗がん剤の薬物送達およびLBsのイヌにおける特性に関する研究報告はない。本研究では、イヌのがん診療での超音波セラノスティクスの実用化に向けた基盤を形成することを目的として、マウスやイヌを用いた基礎的および臨床的な検討を行った。

第一章では、腫瘍組織内に蓄積する特性を持つ抗がん剤である、PEG修飾リポソーム化ドキソルビシン塩酸塩（PEGylated liposomal doxorubicin hydrochloride, PLD）に着目した。PLDはPEG修飾されたリン脂質二重膜にドキソルビシン塩酸塩が内包される構造をとり、粒子直径は

80–90 nmである。その構造的特徴から、PLDは長く血中に滞留し、結果として腫瘍組織内に蓄積する。しかし、従来のドキソルビシン塩酸塩と比較してPLDの治療効果に優位性がないことが近年報告され、腫瘍組織への蓄積性を改善させる必要性が指摘されている。そこで我々は、LBsと低強度超音波 (low-intensity ultrasound, LIUS) の併用により、PLDの腫瘍組織内への蓄積を増加させるという手法を着想した。本章では、上記手法の抗腫瘍効果とその機序の解明を目的として、腫瘍モデルマウスを用いた検討を行った。PLDおよびLBsの混合液をマウス尾静脈内投与直後に腫瘍組織にLIUSを照射した群 (PLD + LBs + LIUS群) では、PLD単独投与群と比較して腫瘍組織内のドキソルビシン塩酸塩重量が約1.3倍に増加した。治療試験では、PLD + LBs + LIUS群において、対照群と比較して有意に腫瘍成長が抑制され、9匹中4匹で完全奏功が認められた。また、病理組織学的検査で腫瘍組織に広範な壊死領域と多数のアポトーシス細胞が観察された。以上のことから、LBsとLIUSの併用により、PLDの腫瘍組織内への蓄積が増加し、抗腫瘍効果が増強されたと考えられた。

第二章では、健常ビーグル犬を用いてLBsの短期的安全性および造影効果を評価し、さらに腫瘍罹患犬を対象としてLBsを用いた超音波セラノスティクスの臨床的有用性を評価した。はじめに、健常ビーグル犬6頭の肝臓に対してLBs-CEUSを実施したところ、肝門脈と肝臓組織が造影された。また、LBs投与24時間後において血液検査上の異常およびアレルギー症状の発生は認められなかった。以上のことから、LBsはイヌにおいて肝臓に造影効果を有し、短期的安全性が高いことが示された。次に、肝臓腫瘍性病変を有するイヌ21例を対象にLBs-CEUSを実施したところ、クッパー相における造影欠損所見は悪性腫瘍と有意に関連しており、高い感度、特異度、陽性的中率および陰性的中率を示した。この結果から、LBs-CEUSは肝臓腫瘍性病変の良悪性鑑別に有用であると考えられた。最後に、外科的に切除困難な肛門周囲および頭頸部の固形腫瘍を有するイヌ3例に対して、PLD, LBsおよびLIUS併用治療を実施したところ、全例において腫瘍体積が50%以上減少した。肺転移を有した症例では、LIUSが照射された原発巣のみサイズが縮小し、照射されなかった肺転移病巣に変化はなかった。これらのことから、LIUSの照射部位特異的にPLDの抗腫瘍効果が増強されたと考えられ、PLD, LBsおよびLIUS併用治療は、切除困難なイヌの体表腫瘍に対して有用な治療法となる可能性が示された。

本研究において、マウスを用いた検討では、LBsとLIUSの併用によるPLDの薬物送達効果とその高い抗腫瘍効果が明らかとなった。また、イヌを用いた検討では、LBsの短期的安全性、造影効果および腫瘍の診断と治療における有用性が示された。以上より、本研究は、イヌのがん診療においてLBsを用いた超音波セラノスティクスを実用化するための、基盤を形成する役割を果たした。今後、より詳細な機序の解明や臨床的有用性の実証を行うことにより、さらに実用化に近づくことが期待される。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	横江 祈
審 査 委 員	主 査：鳥取大学 准教授 大崎 智弘
	副 査：鳥取大学 教授 今川 智敬
	副 査：鳥取大学 教授 竹内 崇
	副 査：山口大学 教授 谷 健二
	副 査：鳥取大学 准教授 原田 和記
題 目	リピッドバブルを用いたセラノスティクスの実現に向けた基礎的および臨床的検討
<p>審査結果の要旨：</p> <p>抗がん剤を用いた化学療法は、切除困難またはすでに転移が認められる固形がん患者において、腫瘍の進行を管理する上で重要な役割を果たす。しかし、低分子量（一般に 1,000 Da 以下）の抗がん剤を使用する従来の化学療法には、固形腫瘍に対する治療効果が限定的であることおよび重篤な副作用の危険性があることの二つの大きな問題点がある。これらの問題点は、従来の抗がん剤は腫瘍組織選択性が低く、正常組織にも分布することに起因する。薬物送達の観点から、これらの従来の抗がん剤の欠点を改善するために、これまで高分子重合体、ミセルおよびリポソームなどのナノメディシン（粒子径：5–200 nm）が多く開発されてきた。</p> <p>PEG 修飾リポソーム化ドキシソルビシン塩酸塩（PEGylated liposomal doxorubicin hydrochloride: PLD）は、1995 年に世界ではじめて承認されたナノメディシンの一つである。PLD は、PEG で修飾されたリン脂質二重膜からなる外殻に、ドキシソルビシン塩酸塩を内包する構造をとり、その平均粒子径は 80–90 nm である。PLD はその構造的特徴により血中半減期が長く、血中投与後に腫瘍組織に蓄積する特性を持つ。従来のドキシソルビシン塩酸塩と比較して、PLD では骨髄抑制や心臓毒性などの重篤な副作用の危険性が軽減されていることが知られている。しかしながら、近年のメタアナリシスによって、PLD は従来のドキシソルビシン塩酸塩と比較して固形がんの治療効果に優位性がないことが明らかになっており、臨床応用においては PLD の腫瘍組織への蓄積が不十分である可能性が考えられている。</p> <p>最近、マイクロバブル（MBs）と超音波の組み合わせが、薬物送達を改善するための有望な技術として注目を集めている。MBs とは、タンパク質、脂質またはポリマーなどにより形成される直径 1–10 μm 程度の外殻に、空気、フッ化硫黄あるいはフッ化炭素などのガスを内包した構造を持つ。低音圧の超音波照射下で生じる MBs の安定した振動は、オシレーションと呼</p>	

ばれる。一方、音圧の増大に伴い生じる MBs の圧壊は、慣性キャビテーションと呼ばれる。これらの現象により、MBs に隣接する血管壁の透過性が高まり、同時に投与された薬物の血管外漏出が増加すると考えられている。これまで、多くの *in vivo* 研究において、従来の抗がん剤に MBs と低強度超音波 (low-intensity ultrasound : LIUS) を組み合わせることにより、高い抗腫瘍効果を得られることが報告されており、MBs と LIUS を用いた抗がん剤の薬物送達の有用性が示唆されている。

近年、帝京大学の丸山らは、治療と診断の両方に活用することを目的として、平均粒子径が約 2.7 μm の MBs の一種であるリピッドバブル (Lipid bubbles : LBs) を新規に開発した。LBs は分子量 2,000 Da のポリエチレングリコール (polyethylene glycol, PEG : PEG2,000) で修飾された単層のリン脂質から成る外殻と、それに内包されるパーフルオロプロパンガスによって構成されている。小俣らの報告により、LBs と超音波を組み合わせることによりマウスの臓器への造影効果を有することや、脳組織への薬物送達が可能となることが示されている。

そこで本研究では、腫瘍モデルマウスにおいて、PLD、LBs および LIUS を用いた併用治療のメカニズムとその抗腫瘍効果を明らかにすることを目的とした。本研究の結果から、PLD および LBs 混合液をマウス尾静脈内投与した直後に、腫瘍組織に LIUS を照射することで PLD の腫瘍組織内への蓄積が増加することが示唆された。さらに、PLD、LBs および LIUS の併用治療は腫瘍の成長を強く抑制したことから、LBs と LIUS を併用することにより、PLD の抗腫瘍効果が増強された。以上のことから、LBs と LIUS を併用することで、PLD の腫瘍組織内への蓄積を向上させ、高い抗腫瘍効果を引き出したと考えられた。

次に、犬における LBs の基礎的なデータの取得を目的とし、健常ビーグル犬を用いて LBs の短期的安全性と肝臓の CEUS における造影効果を評価した。また、LBs と US を用いた腫瘍の診断法と治療法の臨床的有用性を検討することを目的として、腫瘍罹患犬を対象とした予備的な臨床試験を実施した。LBs は初めて犬に適用され、健常ビーグル犬における LBs の短期的安全性および肝臓の CEUS における造影効果が明らかとなった。また、肝臓の腫瘍性病変を有する犬において、LBs-CEUS がその良悪性鑑別に有用であると考えられた。さらに、PLD および LBs の投与および LIUS 照射の併用治療が、体表に発生した切除困難な犬の固形腫瘍に対して、有効な治療法となる可能性が考えられた。

結論として、本研究は、犬のがん診療において LBs を用いた超音波の診断および治療を実用化するための、基盤を形成する役割を果たした。今後、メカニズムの解明やより詳細な臨床的有用性の実証を行うことにより、さらに実用化に近づくことが想定される。また、本研究の *in vivo* 実験系で得られた知見から、LBs と LIUS を併用することにより、腫瘍組織に対して様々な薬剤を送達できる可能性があると考えられた。PLD の他、DNA や抗体医薬などの高分子物質を腫瘍組織へ効率的に送達することへの応用が期待される。以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文として提出され、学位論文として十分な価値を有すると認める。