

博士論文

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

山口大学大学院 連合獣医学研究科

臨床獣医学専攻

横江 祈

2021年9月

目次

序論	1
第一章 <i>in vivo</i> 実験系におけるリピッドバブルと低強度超音波の併用によるPEG修飾 リポソーム化ドキシソルビシン塩酸塩の抗腫瘍効果の増強効果	
1. 緒言	9
2. 材料および方法	11
2-1. 倫理に関する声明	11
2-2. リピッドバブルの調製	11
2-3. 腫瘍細胞の培養および腫瘍モデルマウスの作製	13
2-4. 超音波装置と出力条件	14
2-5. リピッドバブルの安定性に対する低強度超音波照射の影響	15
2-6. 腫瘍組織における温度測定	16
2-7. PEG修飾リポソーム化ドキシソルビシン塩酸塩の安定性に対するリピッドバブル と低強度超音波併用の影響	17
2-8. 腫瘍組織内におけるPEG修飾リポソーム化ドキシソルビシン塩酸塩蓄積の定量 的評価	18
2-9. 高分子物質の血管外漏出の定性的評価	19
2-10. 腫瘍モデルマウスを用いた腫瘍成長抑制試験	21

2-11. 病理組織学的観察	22
2-12. 統計解析	22
3. 結果	23
3-1. リピッドバブルの安定性に対する低強度超音波照射の影響	23
3-2. 腫瘍組織における温度測定	26
3-3. PEG修飾リポソーム化ドキソルビシン塩酸塩の安定性に対するリピッドバブルと低強度超音波併用の影響	28
3-4. 腫瘍組織内におけるPEG修飾リポソーム化ドキソルビシン塩酸塩蓄積の定量的評価	31
3-5. 高分子物質の血管外漏出の定性的評価	33
3-6. 腫瘍モデルマウスを用いた腫瘍成長抑制試験	36
3-7. 病理組織学的観察	39
4. 考察	41
5. 小括	48

第二章 イヌにおけるリピッドバブルと超音波を用いた腫瘍の診断法および治療法の有用性

1. 緒言	50
2. 材料および方法	51

2-1. 倫理に関する声明	51
2-2. リピッドバブルの調製	52
2-3. 健常ビーグル犬を用いたリピッドバブルの短期的安全性および造影効果の 評価	52
2-3-1. 供試動物	52
2-3-2. 肝臓に対する造影超音波検査および血液検査	52
2-3-3. 画像解析	54
2-4. 肝臓腫瘍性病変を有するイヌを対象としたリピッドバブルを用いた造影超音 波検査の診断的有用性の評価	54
2-4-1. 対象動物	54
2-4-2. 単純超音波検査による肝臓腫瘍性病変の画像評価	55
2-4-3. リピッドバブルおよびソナゾイドを用いた造影超音波検査	55
2-5. 切除困難な体表腫瘍を有するイヌを対象としたPEG修飾リポソーム化ドキソ ルビシン塩酸塩, リピッドバブルおよび低強度超音波併用治療の有用性の予 備的評価.....	57
2-5-1. 対象動物	57
2-5-2. 治療プロトコル	58
2-5-3. 腫瘍組織内の血管系評価のためのリピッドバブルを用いた造影超音波 検査	59

2-5-4. 腫瘍サイズの計測	60
2-6. 統計解析	60
3. 結果	61
3-1. 健常ビーグル犬におけるリピッドバブルを用いた造影超音波検査の短期的安 全性および造影効果	61
3-2. 肝臓腫瘍性病変を有するイヌにおけるリピッドバブルを用いた造影超音波検 査の診断的有用性	67
3-3. 切除困難な体表腫瘍を有するイヌにおけるPEG修飾リポソーム化ドキシソルビ シン塩酸塩, リピッドバブルおよび低強度超音波併用治療の有用性	72
4. 考察	83
5. 小括	91
総括	92
参考文献	93
謝辞	107

序論

セラノスティクス (theranostics) とは、治療 (therapeutics) と診断 (diagnostics) を合成した新しい造語であり、単一の医療機器や薬剤を用いて診断と治療を同時進行的あるいは連続的に実施する医療システムやその概念自体を指す [5, 24]. これまで、診断と治療は異なる技術やアプローチによって、別々のプロセスで進められることが多かった。臨床現場においてこれらを有機的に融合させることにより、新たな価値を生み出そうとする近年の時流が、セラノスティクスの構築を推進する一つの原因力となっている [1]. セラノスティクスが臨床現場に適用されることにより、個人に最適化した医療や効率化した医療が実現することが期待されている [72].

セラノスティクスの実際は、画像診断装置による病変部の器質的・機能的診断、その診断結果に基づく治療およびその治療効果の画像的評価を同時進行的あるいは連続的に実施する診療システムと解釈されることが多く、その背景には近年の画像診断装置やセラノスティクス製剤の進歩および高度化がある。画像診断装置の例として、磁気共鳴画像 (magnetic resonance imaging, MRI) 装置、コンピューター断層撮影 (computed tomography, CT) 装置、陽電子放出断層撮影 (positron emission tomography, PET) 装置あるいは超音波診断装置などが挙げられる。なかでも、超音波診断装置は非侵襲的にリアルタイムイメージングが可能であり、さらにデバイスが比較的小型かつ廉価に導入できるという利点を持つ [32]. 加えて、超音波エネルギーは治療にも利用されていることから、超音波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いる [40]. その実用化の上で鍵となる薬剤は、超音波造影剤として使用されているマイクロバブル (microbubbles, MBs) である. MBsを生体に投与することで、臓器や血管のコントラストを向上させた造影超音波画像が得られる. また、これまでの報告において、超音波とMBsを併用することで患部に薬物を効率的に送達することが可能であることが実験的に示されている [8, 24, 25, 29, 32, 41]. すなわち、MBsを用いた超音波セラノスティクスでは、造影超音波検査 (contrast-enhanced ultrasonography, CEUS) による標的臓器の画像診断と、病変部への効率的な薬物送達による治療を併せて実施することが可能となる (図1A).

一般的に、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ち、一つのMBs粒子の直径は1–10 μm 程度である [63]. 現在、人医療や獣医療で腹部超音波診断に使用される主なMBs製剤はSonoVue[®] (Bracco Imaging) とソナゾイド[®] (第一三共株式会社) であり、これらはCEUSへの利用を目的に開発された. SonoVueは2001年に欧州で承認され、近年では中国やアメリカでも販売されており、海外において主流のMBs製剤である (アメリカでの製品名はLumason[®]). 日本では、1999年に国内初のMBs製剤となるレボビスト[®] (バイエル薬品株式会社) が発売され、2007年にはより造影能の高いソナゾイドが発売された. レボビストは2012年以降製造中止となっているため、2021年現在において国内で使用可能なMBs製剤はソナゾイドのみである. SonoVueはリン脂質の外殻にフッ化硫黄 (SF_6) が内包された構造を、

ソナゾイドは卵黄由来のフォスファチジルセリンからなる外殻にペルフルブタン (C₄F₁₀) が内包された構造を持つ。

MBsに低音圧の超音波を照射すると、MBsは安定的に膨張と収縮を繰り返す振動という現象を生じ、非線形の高周波成分を散乱させる。超音波診断装置は、送信波の周波数とは異なる高周波の散乱信号を受信・抽出して造影画像を生成する [21, 63]。MBsの静脈内投与により病変の血管構造のコントラストを向上させることが可能となり、SonoVueおよびソナゾイドを用いたCEUSでは高い精度で肝臓腫瘍性病変の良悪性鑑別が可能となることが知られている [7, 23, 35, 37, 64]。一方、より高い音圧の超音波照射下では、MBsの振動の程度は繰り返し増大する。負圧に耐えられなくなったMBsは圧壊し、それに伴い微細なジェット流が発生する [21, 28]。MBsの振動や圧壊は生体膜に対して機械的作用をもたらし、膜表面に一過性の小孔形成などが生じる。それにより局所的に生体膜の透過性が亢進し、薬物の生体膜を介した移行が促進されると考えられている (図1A, B) [25, 32, 41]。過去の報告により、MBsの粒子径、外殻の組成およびガスの成分などが薬物送達の効率に関連することが実験的に示されている [39, 48, 65] が、未だ薬物送達に最適なMBsの構造や組成は解明されていない。既に市販されているSonoVueあるいはソナゾイドと超音波を併用した薬物送達の報告に関しては、その多くが*in vitro*や*in vivo*実験系の研究によるものであり [8, 29]、ヒトにおける臨床応用については臨床試験により有用性が検証されている段階である。そのため、治療利用への最適化を目指して様々な組成の新たな

MBsが設計・開発されており，それらを用いた基礎的検討が進められている [32, 41].

帝京大学の丸山らは，診断と治療の両方に活用することを目的として，平均粒子径が約 $2.7\ \mu\text{m}$ のMBsであるリピッドバブル (Lipid bubbles, LBs) を開発した (図2A) [57, 58]. LBsは分子量 $2,000\ \text{Da}$ のポリエチレングリコール (polyethylene glycol, PEG; PEG $2,000$) 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 (C_3F_8) ガスによって構成されている. Omataらの報告では，LBsの静脈内投与によりマウスの腎臓が造影され，造影効果の半減期はSonoVueやソナゾイドよりLBsを投与した群において有意に長かった [39]. Omataらは，PEG $2,000$ による修飾によって，LBsが細網内皮系細胞による捕捉を回避したことが，半減期の差を生じた要因の一つであったと推察した. また，上記報告において，LBsの静脈内投与直後にマウス頭部へ超音波を照射したところ，脳組織への高分子物質の分布が増大したことが示された. これらのことから，LBsは超音波と併用することによりCEUSと薬物送達に利用できる可能性が示唆されており，超音波セラノスティクスへの臨床応用が期待されている.

獣医療において，超音波診断装置はその高い汎用性や動物への負担の少なさから，多くの動物診療施設で取り扱われている. さらに，MBsと超音波の併用による薬物送達を利用することで効率的な薬物治療が実施できることから，超音波セラノスティクスは獣医療と相性の良い診療システムであり，その実用化が動物と診療者の双方にもたらす利点は大きいと考えられる. しかし，これまで獣医療において

MBsと超音波の併用による薬物送達の有用性を検討した報告はなく、ひいては超音波セラノスティクスの実現を試みた研究報告もない。そこで我々は、セラノスティクスへの応用が期待されるLBsを用いて、イヌのがん診療において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を静脈内投与した後、CEUSにより腫瘍の画像的評価を行う。さらに、腫瘍への治療用超音波の照射により同時投与した抗がん剤の効率的な移行を促し、最後にCEUSにより治療効果を判定するという診療システムである。しかし、その獣医臨床応用を目指す上で、次の二点が課題として存在する。課題1：LBsと超音波を腫瘍組織に適用することにより、抗がん剤の薬物送達が可能となるかは未だ検討されていない。課題2：LBsをイヌに適用した報告はなく、イヌにおける安全性、造影効果および臨床的有用性などは明らかになっていない。本研究では、上記二つの課題の解決に向けてマウスやイヌを用いて基礎的および臨床的な検討を行い、イヌのがん診療において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ことを目的とした。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（図2B）に着目し、腫瘍モデルマウスを用いてLBsと超音波の併用が生じる薬物送達によりPLDの抗腫瘍効果が増強されるかを検討した（図2C）。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。

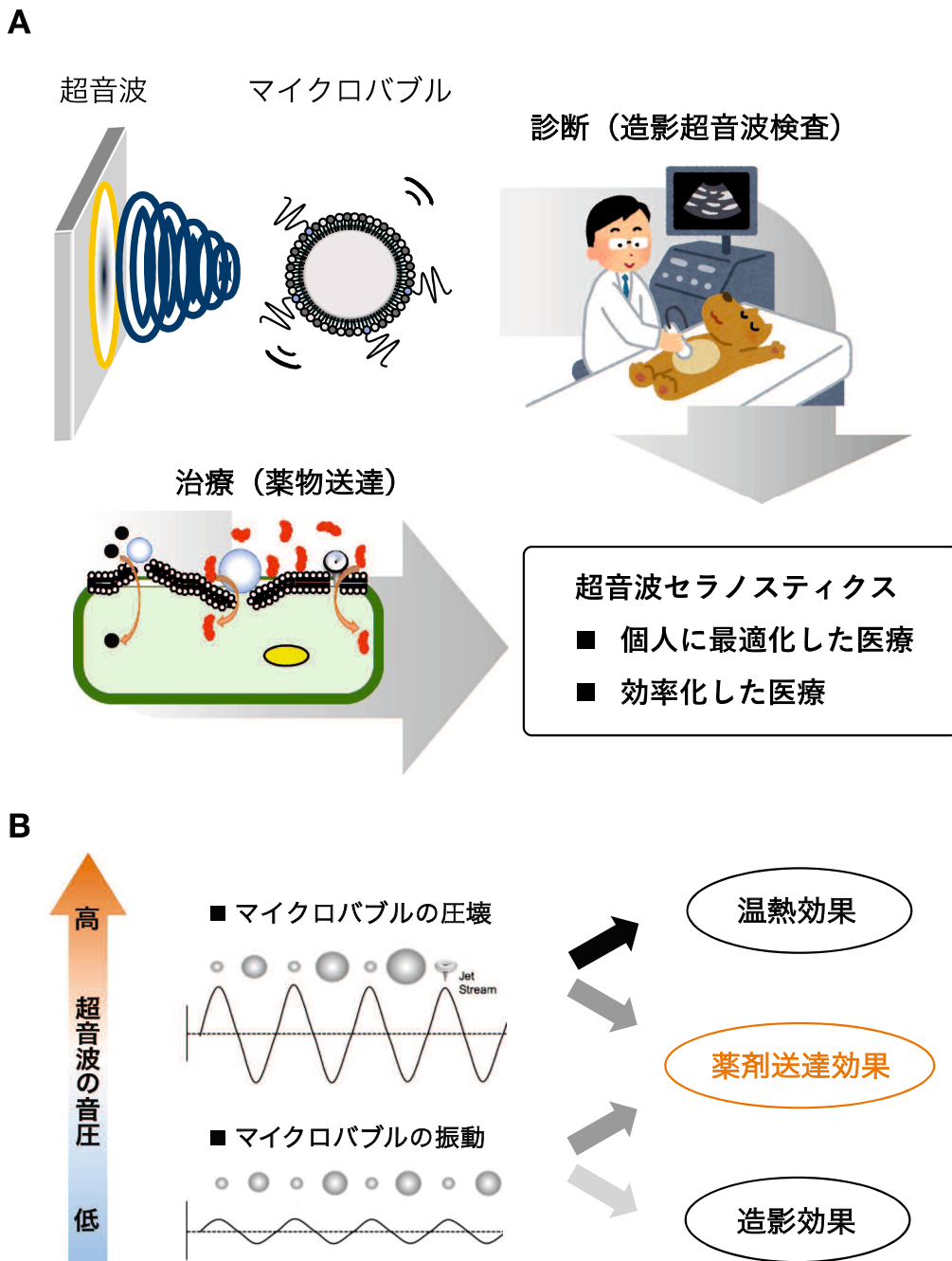
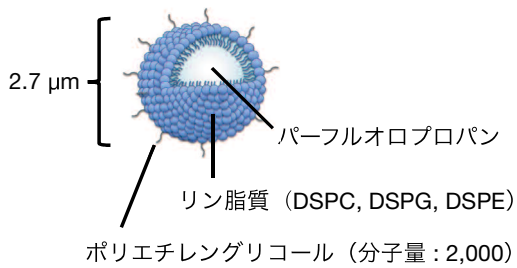


図1. 超音波を用いたセラノスティクスの概要図。(A) 超音波とマイクロバブルを併用することにより、造影超音波検査による診断と、薬物送達による治療を併せて実施することができる。(B) 超音波照射に応じてマイクロバブルの圧壊や振動が生じ、それらを介して生体に対してさまざまな効果を引き起こす。

A

■ リピッドバブル (Lipid bubbles, LBs)

**B**

■ PEG修飾リポソーム化ドキソルビシン塩酸塩 (PEGylated liposomal doxorubicin hydrochloride, PLD)

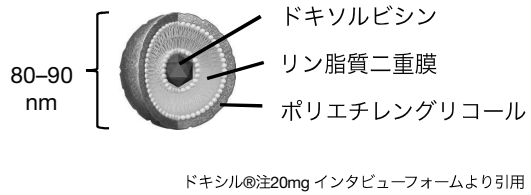
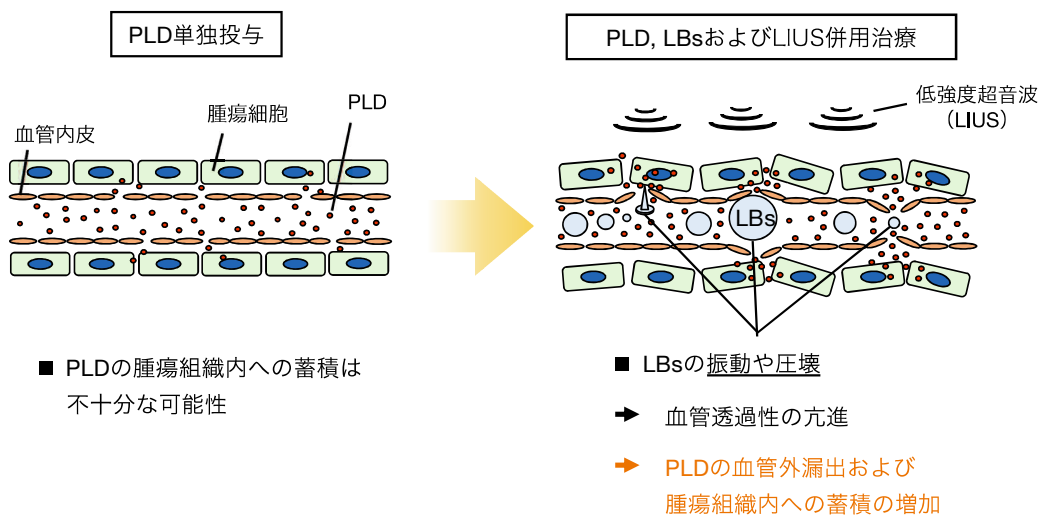
**C**

図2. リピッドバブル (Lipid bubbles, LBs), PEG修飾リポソーム化ドキソルビシン塩酸塩 (PEGylated liposomal doxorubicin hydrochloride, PLD) および低強度超音波 (low-intensity ultrasound, LIUS) を併用した治療についての概要図. (A) LBsの模式図. (B) PLDの模式図. (C) PLD, LBsおよびLIUSを併用した治療の概念図.

第一章

*in vivo*実験系におけるリピッドバブルと低強度超音波の併用による
PEG修飾リポソーム化ドキソルビシン塩酸塩の抗腫瘍効果の増強効果

1. 緒言

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腫瘍患者において、腫瘍の進行を制御する上で重要な役割を果たす [4]。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は、固形腫瘍に対する治療効果が限定的で、かつ重篤な副作用の危険性があるという二つの大きな問題を持つ [34]。これらの問題は、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 [6, 12]。薬物送達の観点から上記の問題点を改善するため、高分子重合体、ミセルあるいはリポソームなどを担体とするナノメディシン（粒子径：5–200 nm）がこれまでに開発されてきた [9]。

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である [2]。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 [16]。PLDはその構造的特徴により血中半減期が長く [14]、血中投与後に腫瘍組織の血管から徐々に漏出することによって、腫瘍組織内に蓄積する特性を持つ [15, 16]。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 [47] ことから、正常組織への分布が異なることが想定されている。一方、近年のメタアナリシスにより、PLDは従来のドキシソルビシン塩酸塩と比較して固形腫瘍の治療効果に優位性がないことが示された [42]。このことから、臨床応

用においてはPLDの腫瘍組織への蓄積が不十分と考えられており，その治療効果を向上させるためにはPLDの腫瘍組織内への蓄積を改善させる必要がある。

最近，MBsと超音波の組み合わせが，組織への薬物送達を改善させるための有望な技術として注目を集めている [17]。超音波を照射することにより，血管内投与したMBsの振動や圧壊が生じ [21, 28]，それらの機械的作用により照射部位の血管透過性が高まることで，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 [32, 41]。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で，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 [27, 30, 49, 50, 56, 62]。それに対し，MBsとLIUSをPLDの投与に組み合わせた報告は限られており [3, 71]，その有用性の実証にはさらなる研究が待ち望まれている。

これまでのLBsを用いた研究では，マウスの正常な脳組織や耳介に対して，LIUSとの併用による薬物送達効果が示唆されているが [39, 57]，LBsとLIUSの併用によるPLDの腫瘍組織への送達について検討した報告はない。我々は，LBsとLIUSの併用が生じる薬物送達効果により，PLDの腫瘍組織への蓄積を増加させ，高い抗腫瘍効果をもたらすという新たな治療法を着想した。本研究では，腫瘍モデルマウスを用いた*in vivo*実験系において，LBsとLIUSの併用によるPLDの腫瘍組織内への蓄積の増加およびPLDの抗腫瘍効果の増強について評価することを目的とした。

2. 材料および方法

2-1. 倫理に関する声明

全ての実験手順および研究計画書は、対象となる動物の尊厳を尊重し、3R (replacement, reductionおよびrefinement) に則って作成された。研究計画書は、鳥取大学動物実験委員会による審査を受け、承認された (承認番号: 18-T-47)。全ての実験は、鳥取大学のガイドラインに準拠して実施された。腫瘍モデルマウスを用いた実験では人道的エンドポイントを次のように設定した; 2日間で10%以上の体重減少, 観察期間中に計20%以上の体重減少または17 mmを超える腫瘍長径のいずれかを認めた時点。

2-2. リピッドバブルの調製

本研究で使用したLBsは、全て帝京大学薬学部薬物送達学教室 鈴木亮教授および小俣大樹講師により調製され、実験での使用のために提供された。

日油株式会社 (東京) より、1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DSPG) およびN- (carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2,000) -1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE-PEG2,000) を購入した。C₃F₈は高千穂化学工業株式会社 (東京) より購入した。

過去の報告 [57] に従って、C₃F₈ガス中でDSPC, DSPGおよびDSPE-PEG2,000の

脂質分散液をホモジナイズ後に凍結乾燥することにより、LBsを調製した。Lipid film hydration法により、DSPC、DSPGおよびDSPE-PEG2,000をモル比30：60：10で含むリポソームを調製した。クロロホルム、メタノール、アンモニウム水溶液およびMilli-Q水（それぞれ65：35：4：4, v/v/v/v）の混合液に、すべての脂質（総脂質量：300 μmol ）を溶解した。ロータリーエバポレーター（Eyela N-1100, 東京理化学株式会社, 東京）を用いて薄い脂質膜を形成し、溶媒を完全に除去するために真空ポンプ（GCD-136X, 株式会社アルバック, 神奈川）で一晩乾燥させた。次に、脂質膜に75 mLの100 mMリン酸緩衝液（pH：7.4）を加え、65°Cで30分間振とうすることにより水和させた。得られたリポソームを、浴槽型ソニケーター（Bransonic 2150j-DTH, Branson Ultrasound Co., Danbury, CT, USA）を用いて10分間超音波処理した。75 mLのリポソームと225 mLの100 mMリン酸緩衝液を含む混合容器にホモジナイザー（ラボ・リユーションMARKII 2.5型, プライミクス株式会社, 兵庫）を挿入した。容器内の空気を C_3F_8 に置換し、混合容器内のリポソームを40°Cで60分間、7,500 rpmでホモジナイズした。これにより得られたバブル分散液を、18%スクロース溶液と1：1（v/v）の比率で混合し、2 mLの混合溶液を5 mLのバイアルに分注した。容器上部の空気を C_3F_8 に置換し、バイアルをゴム製の蓋で閉じ、-30°Cで一晩凍結した。凍結後、蓋を取り外し、バイアルを凍結乾燥機（EyelaFDU-1100およびEyelaDRC-1100, 東京理科学器械株式会社, 東京）内で、-30°Cで1時間、-20°Cで72時間および20°Cで48時間の順に凍結乾燥した。一連の凍結乾燥が完了した後、乾燥機

内をC₃F₈で置換した。バイアルをゴム製の蓋で閉じ、アルミニウムキャップで密閉した。実験に使用する際には、ゴム蓋に挿入したミニスパイク（ビー・ブラウンエースクラブ株式会社，東京）から2 mLの蒸留水（大塚蒸留水，大塚製薬株式会社，東京）を注入し、バイアルを静かに振とうして凍結乾燥したLBsを溶解した。

LBsの粒子数は，Multisizer 3（Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA）を使用して計測した。計測用のサンプルは，10 μLのLBsを約50 mLのISOTON II（Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA）に懸濁し，その懸濁液の50 μLを定量に供した。約 1.6×10^9 個/mLの濃度のLBsを実験に使用した。マウスを用いた全ての実験において，LBsは約 3.2×10^7 個/匹（0.02 mL/匹）の用量で静脈内に投与した。

2-3. 腫瘍細胞の培養および腫瘍モデルマウスの作製

徳島大学生物資源産業学部 宇都義浩教授より，マウス乳腺腫瘍の腫瘍細胞であるEMT6の提供を受けた。EMT6は，10%の非働化ウシ胎児血清（株式会社ニチレイ バイオサイエンス，東京）と抗生物質（5 mg/mL penicillin, 5 mg/mL streptomycin, 10 mg/mL neomycin, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA）を添加したRPMI-1640培地（Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA）を用いて，37°C，5%CO₂の環境下において培養した。セミコンフルエントになった時点において，細胞を継代した。6週齢の雌のBALB/cマウスを日本クレア株式会社（東京）より購入し，ペレット状の食餌と水に自由にアクセスできるコンベンショナル条件下にて飼育した。

1週間の馴致飼育の後， EMT6をリン酸緩衝生理食塩水（PBS, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA）を用いて 1×10^7 個/mlとなるように調整後， マウスの背部皮下に0.1 mL/匹（ 1×10^6 個/匹）の投与量で接種して腫瘍モデルマウスを作製した。

2-4. 超音波装置と出力条件

造影超音波画像の描出には， 超音波診断装置（Arietta60， 日立アロカメディカル株式会社， 東京）と2–12 MHzのブロードバンドリニアプローブを使用した。 超音波診断装置のコントラストハーモニックイメージングモードにおいて， メカニカルインデックスを0.22， バックグラウンドゲインを60 dBに設定した。 LBsの破壊を最小限に抑えるため， 超音波の焦点をエコーウインドウの最深部に設置した。 録画されたスキャン動画は， 超音波診断装置のローカルストレージに保存された。

LIUSの照射には， 理学療法用超音波治療器（UST-770， 伊藤超短波株式会社， 東京）と， 先端に直径15 mmのディスク型トランスデューサーが設置された小型プローブを使用した。 超音波治療器の出力条件は， 次のように設定した；周波数：1 MHz， 出力強度：2 W/cm²， デューティサイクル：50%， パルス繰り返し周波数：100 Hz， 照射時間：60秒。 腫瘍組織に超音波を照射する際は， 十分量のカップリングゲル（ソノジェリーM， キヤノンメディカルサプライ株式会社， 東京）を組織表面に塗布した。

2-5. リピッドバブルの安定性に対する低強度超音波照射の影響

腫瘍組織におけるLBsの造影効果を評価するため、腫瘍モデルマウスの腫瘍組織を対象にLBsを用いたCEUSを行った。加えて、LIUSの照射がLBsの安定性にどのような影響を及ぼすかを評価するため、CEUSの途中でLIUSを照射し、照射後のLBsの造影効果を確認した。本実験はモデルマウスの腫瘍長径が約10 mmに達した時点で実施した。モデルマウスを無作為にLBs群（LBsを用いたCEUSを実施した群）とLBs + LIUS群（LBsを用いたCEUSの途中でLIUSを照射した群）の2群（n = 6匹）に振り分けた。全身麻酔薬として、メデトミジン（ドルベネ注，共立製薬株式会社，東京），ミダゾラム（ドルミカム注射液10 mg，アステラス製薬株式会社，東京）およびブトルファノール（ベトルファール5 mg，Meiji Seikaファルマ株式会社，東京）を生理食塩水に溶解し，最終濃度がそれぞれ0.075 mg/mL，0.4 mg/mLおよび0.5 mg/mLとなる混合液を調製した。この混合液を0.01 mL/g（体重）の用量でマウス腹腔内に投与し，全身麻酔を施した。マウスを37°Cの温水ベッド上に伏臥位にて保定し，超音波診断装置のプローブを腫瘍組織の表面に設置した。29ゲージのインスリン皮下投与用針付シリンジ（テルモ株式会社，東京）を用いてLBsを尾静脈内投与し，同時にCEUSを開始した（この時点をも0秒とした）。LBs群では，中断することなくCEUSを続けた。LBs + LIUS群では，LBsを投与してから30秒後に超音波診断装置のプローブを腫瘍組織表面から外し，画像の描出を中断した。直ちに理学療法用超音波治療器の小型プローブを腫瘍組織の表面に設置し，腫瘍組織にLIUSを60秒間照射した。LIUS照

射終了後、直ちに超音波診断装置のプローブを同じ位置に再設置し、画像の描出を再開した。CEUSは、LBsの投与後900秒間実施した。録画された動画から0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 420, 600および900秒時点のスクリーンショット（1598 × 1204 ピクセル, PNG形式）を撮影し、画像を取得した。全ての画像において、手動で腫瘍組織の辺縁を囲うように関心領域を設置した。関心領域の平均グレースケール強度（mean grayscale intensity, MGI）は、画像解析ソフトウェア（ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>）を用いて、白色信号の強度に応じて0から255の範囲で算出された。LBs投与からの各時間におけるMGIを取得し、時間-MGI曲線を作成した。

2-6. 腫瘍組織における温度測定

LBsの静脈内投与とLIUSの照射による温熱効果の発生を評価するために、腫瘍組織内の温度測定を行った。本実験はモデルマウスの腫瘍長径が約10 mmに達した時点で実施した。モデルマウスは、次に示す4群（n = 5匹）に無作為に分けられた。対照群（無処置）、LBs群（LBs投与のみ）、LIUS群（LIUS照射のみ）およびLBs + LIUS群（LBs投与直後にLIUS照射）。前項（2-5. リピッドバブルの安定性に対する低強度超音波照射の影響）に記載した方法と同様に全身麻酔を施し、37°Cの温水ベッド上に伏臥位に保定した。腫瘍組織内の温度測定には、熱電対温度計（CENTER521, 株式会社佐藤商事, 神奈川）を使用した。温度センサーを腫瘍組織の中心部に挿入

した。LBs群およびLBs + LIUS群では、尾静脈からLBsを投与した。LBs + LIUS群では、LBsの静脈内投与直後に、腫瘍組織にLIUSを60秒間照射した。LIUS群では、LBsを投与せずに腫瘍組織へのLIUS照射のみを実施した。LIUS照射後、腫瘍組織に塗布したカップリングゲルを清潔な乾綿で軽く拭き取った。腫瘍組織の温度は0秒から80秒まで連続的に測定した。

2-7. PEG修飾リポソーム化ドキシソルビシン塩酸塩の安定性に対するリピッドバブルと低強度超音波併用の影響

LBsおよびLIUS照射の併用により、PLDのリポソーム構造が破壊されるかを確認するために、*in vitro*実験系においてPLDの安定性を評価した。48ウェルマイクロプレート（Falcon 353078, Corning Inc., NY, USA）の各ウェルに、PLD（ドキシル，ヤンセンファーマ株式会社，東京）を20 μg /ウェルまたは200 μg /ウェルの用量で添加した。LBsは、 3.2×10^7 個/ウェルで添加し、さらに総液量が1.5 mLとなるようにPBSを各ウェルに添加した。超音波治療器の小型プローブ先端のトランスデューサーを液面に接着させ、LIUSを60秒間照射した。各ウェル中の溶液をサンプルとして、2 mLのチューブに移した。各ウェルを500 μL のPBSで洗浄し、回収した溶液を各チューブに加えた。各チューブの重量を計測した後、各チューブを4°C、約290,000 $\times g$ において1時間超遠心し、サンプルを分離した。超遠心後、各チューブのサンプルから上清を1.6 mLとり、新しい2.0 mLチューブに移した。沈殿物の入ったチューブの重量を測

定し、再懸濁した溶液を新しい2.0 mLチューブに移した。TritonX-100を最終濃度1%となるように各チューブに添加し、PLDからドキシソルビシン塩酸塩を抽出した。上清と沈殿物中のドキシソルビシン塩酸塩重量を定量的に評価するために、蛍光マイクロプレートリーダー（PowerScan HT, DSファーマバイオメディカル株式会社, 大阪）を用いて、それぞれ485 nmの励起波長および590 nmの蛍光波長により各サンプルの蛍光強度を測定した。

2-8. 腫瘍組織内におけるPEG修飾リポソーム化ドキシソルビシン塩酸塩蓄積の定量的評価

LBsとLIUSの併用により、腫瘍組織内へのPLDの蓄積が増加することを定量的に評価するために、腫瘍組織中のドキシソルビシン塩酸塩の重量を算出した。本実験はモデルマウスの腫瘍長径が約10 mmに達した時点で実施した。マウスへのPLDの投与量は10 mg/kgとした。モデルマウスは、次に示す3群（n = 8-9匹）に無作為に分けられた。PLD群（PLDの投与のみ）、PLD + LIUS群（PLD投与直後にLIUS照射）およびPLD + LBs + LIUS群（PLDおよびLBs混合液の投与直後にLIUS照射）。PLD群およびPLD + LIUS群では、尾静脈からPLDを投与した。PLD + LIUS群では、PLDの静脈内投与直後に、腫瘍組織にLIUSを60秒間照射した。PLD + LBs + LIUS群では、PLDおよびLBs混合液を静脈内投与し、直後に腫瘍組織にLIUSを照射した。各処置後、マウスを暗所にて静置した。1時間後、5%イソフルランによる深麻酔下にて、頸椎

脱臼によりマウスの安楽死処置を行い、腫瘍組織を摘出した。摘出した腫瘍組織の湿重量を測定し、 -20°C で保存した。凍結した腫瘍を、直径5 mmのビーズ2個と1 mLの冷却したPBSを入れた耐衝撃性チューブに移し、ビーズ破砕機 ($\mu\text{T-12}$, タイテック株式会社, 埼玉) を用いて3,200 rpmで2分間ホモジナイズした。各チューブを 4°C , $17,000 \times g$ にて20分間遠心分離した。遠心分離後, 100 μL の上清を96ウェルの黒色マイクロプレート (BD Bioscience, Bedford, USA) に移した。蛍光マイクロプレートリーダー (SH-9000Lab, コロナエレクトリック, 茨城) を用いて, それぞれ490 nmの励起波長および590 nmの蛍光波長により上清の蛍光強度を測定した。

2-9. 高分子物質の血管外漏出の定性的評価

高分子物質の血管外漏出を定性的に評価するために、各処置後において腫瘍組織の免疫蛍光染色を実施した。本実験はモデルマウスの腫瘍長径が約10 mmに達した時点で実施した。トレーサーとして、Fluorescein isothiocyanateで標識された分子量70,000 Daのdextran (FITC-dextran, サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社, 東京) を2 mg/匹でマウスの尾静脈内に投与した。FITC-dextran投与直後, 腫瘍組織にLIUSを照射した。または, FITC-dextranおよびLBsの混合液の静脈内投与直後にLIUSを照射した。マウスへの薬剤の投与, LIUSの照射および暗所での静置は前項 (2-8. 腫瘍組織内におけるPEG修飾リポソーム化ドキシソルビシン塩酸塩蓄積の定量的評価) と同様の手順で実施した。マウスを暗所で1時間隔離した後, 5%イソフル

ランによる深麻酔下にて、頸椎脱臼によりマウスの安楽死処置を行い、腫瘍組織を摘出した。腫瘍組織を4%パラホルムアルデヒド中に室温で24時間浸漬した後、20%スクロース溶解PBS中に4°Cで一晩浸漬した。腫瘍組織を凍結組織切片作製用包埋剤（サクラファインテックジャパン株式会社，東京）中に包埋し、ドライアイスで冷却したアセトン内に浸して急速冷凍した。クリオスタット（Leica CM3050 S, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Germany）を用いて、厚さ30 μmの連続凍結切片を作製した。各凍結切片を載せたスライド上に、0.1%Tween-20添加ブロッキングバッファー（abcam ab126587, Abcam, Tokyo, Japan）を十分量滴下し、室温で1時間ブロッキングを行った。ブロッキングバッファーを吸引除去した後、スライド上にラット抗マウスCD31抗体（ab7388, 希釈倍率1 : 500, Abcam, Tokyo, Japan）を添加した0.1%Tween-20添加ブロッキングバッファーを十分量滴下し、4°Cで一晩インキュベートした。PBSを用いてスライドを3回洗浄した後、スライド上にAlexa Fluor 594標識ヤギ抗ラット抗体（ab150160, 希釈倍率1 : 1000, Abcam, Tokyo, Japan）を添加した0.1%Tween-20添加ブロッキングバッファーを十分量滴下し、室温で2時間インキュベートした。各凍結切片をVECTASHIELD Vibrance with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)（Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA）で封入し、オールインワン顕微鏡（BZ-X810, 株式会社キーエンス, 大阪）を用いてデジタル画像を取得した。蛍光顕微鏡画像の取得には、green fluorescent protein用蛍光フィルター（励起波長：470/40 nm, 吸収波長：525/50 nm）、TexasRed用蛍光フィルター（励起波長：560/40

nm, 吸収波長：630/75 nm) およびDAPI用蛍光フィルター (励起波長：360/40 nm, 吸収波長：460/50 nm) を使用した。連続切片をヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin, H&E) で染色し、組織学的に評価した。

2-10. 腫瘍モデルマウスを用いた腫瘍成長抑制試験

PLD, LBsおよびLIUSの併用治療による抗腫瘍効果を評価するために、腫瘍モデルマウスを用いて腫瘍成長抑制試験を実施した。本実験は、モデルマウスの腫瘍長径が約5-7 mmに達した時点で実施した。モデルマウスは次に示す7群 (n = 8-9匹) に無作為に分けられた。対照群 (無処置), LBs群 (LBs投与のみ), LIUS群 (LIUS照射のみ), LBs + LIUS群 (LBs投与直後にLIUS照射), PLD群 (PLD投与のみ), PLD + LIUS群 (PLD投与直後にLIUS照射) およびPLD + LBs + LIUS群 (PLDおよびLBs混合液の投与直後にLIUS照射)。マウスへのPLDの投与量は1 mg/kgとした。マウスの尾静脈内にLBs, PLDまたはPLDおよびLBsの混合液を投与した (対照群およびLIUS群を除く)。LIUS群では薬剤を投与せずに、またLBs + LIUS群, PLD + LIUS群およびPLD + LBs + LIUS群では、薬剤の投与直後に腫瘍組織にLIUSを照射した。本処置を0, 2および4日目に計3回実施した。マウスの観察と体重の測定は、2日に1回の頻度で実施された。腫瘍のサイズをデジタルキャリパーで測定し、「長径 × 短径 × 厚さ × 3.14 ÷ 6」の計算式から腫瘍体積を算出した。治療により腫瘍組織が縮小し、デジタルキャリパーでの測定が不可能な病変になったマウスは、完全奏功

(complete response, CR) と評価された。

2-11. 病理組織学的観察

前項 (2-10. 腫瘍モデルマウスを用いた腫瘍成長抑制試験) と同様の手技で、モデルマウスに対して処置を0, 2および4日目に合計3回実施した。8日目に腫瘍組織を切除し、10%緩衝ホルマリンに浸漬して固定した。各腫瘍組織をパラフィンに包埋し、厚さ4 μm の切片を作製した。本治療による抗腫瘍効果を組織学的に評価するため、切片をH&Eで染色した。さらに、Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 法を用いた*In situ* Apoptosis Detection Kit (タカラバイオ株式会社, 滋賀) により連続切片を処理し、アポトーシス細胞の検出を行った。デジタル画像は、BZ-X810オールインワン顕微鏡により取得した。

2-12. 統計解析

本研究におけるすべての数値データは、平均値 \pm 標準偏差として表記された。各実験において、数値データはStudentの*t*検定、対応のある*t*検定あるいはTukeyの多重比較検定のいずれかによって解析された。すべての統計解析は、コンピューターソフトウェアプログラム (XLSTAT, Addinsoft, Paris, France) 上で行われた。全ての検定で、*p*値が0.05未満の場合を統計的に有意と判断した。

3. 結果

3-1. リピッドバブルの安定性に対する低強度超音波照射の影響

代表的な腫瘍組織の造影超音波画像を図1Aに示す。LBs群において、LBs投与後数秒以内に腫瘍組織に造影効果が認められた。腫瘍組織の造影効果は、時間の経過とともに徐々に減弱した。LBs + LIUS群では、LBs投与後30–90秒の間にLIUSを腫瘍組織へ照射した。LIUS照射終了直後の時点で、腫瘍組織の造影効果は消失した。両群の時間-MGI曲線を図1Bに示す。LBs群において、腫瘍組織のMGIは、LBsの投与後20秒でピークに達し (MGI: 63.5 ± 11.5)、その後徐々に低下した。LBs + LIUS群においても、MGIはLBsの投与後20秒でピークに達した (MGI: 73.7 ± 14.0)。LIUS照射終了直後の時点で、LBs + LIUS群のMGI (14.7 ± 4.8) はLBs群のMGI (55.5 ± 13.4) と比較して有意に低かった ($p < 0.001$)。LBs + LIUS群では、LIUS照射終了以降、MGIは観察期間において低値を維持した。

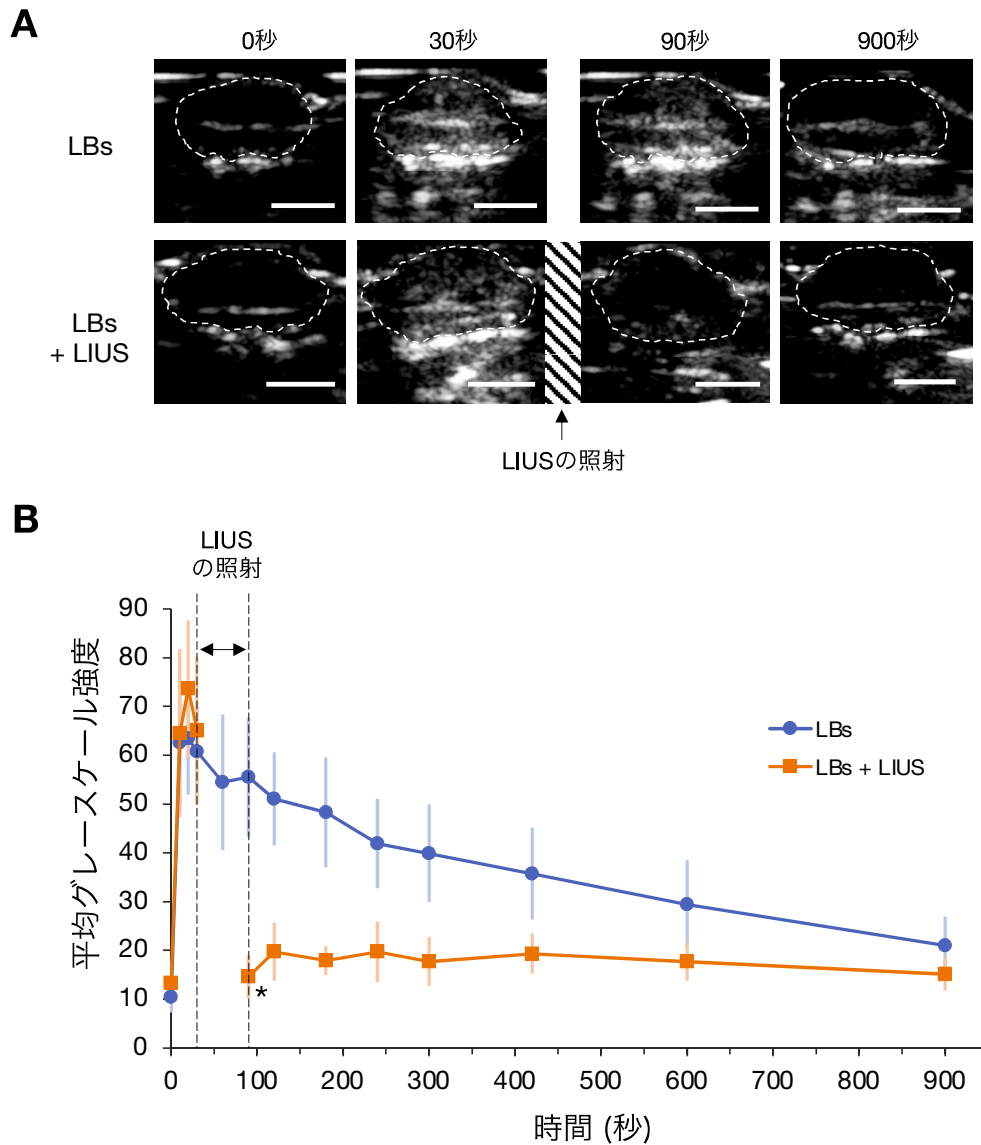


図1. マウスの腫瘍組織における低強度超音波 (low-intensity ultrasound, LIUS) 照射がリピッドバブル (Lipid bubbles, LBs) の安定性に及ぼす影響. (A) LBsをマウス尾静脈内に投与し, 超音波診断装置を用いて腫瘍組織の造影画像を描出している. 画像内の白い破線内の領域は腫瘍組織を示す. LBs + LIUS群では, LBs投与後30-90秒の間, 造影画像の描出を中断し, 腫瘍組織へのLIUS照射を60秒間行っている. スケールバーは5 mmを表す. (B) 造影超音波画像から算出した平均グレースケール強度

(mean-grayscale intensity, MGI) を用いて作成した腫瘍組織における時間-MGI曲線。
MGIは、腫瘍組織の辺縁を囲うように設置した関心領域内における白色信号の強度を平均化したものであり、0-255の範囲で計算される。グラフ上のデータは平均 ± 標準偏差として示されている (n = 6匹)。* LBs投与90秒後において、LBs群とLBs + LIUS群間のMGIに有意差が認められる ($p < 0.001$)。Studentの*t*検定により解析。

3-2. 腫瘍組織における温度測定

各群における腫瘍組織内温度の推移を図2に示す。LIUS群およびLBs + LIUS群では、60秒間のLIUSの照射中に腫瘍組織内温度が経時的に上昇した。60秒時点の腫瘍組織内温度は、0秒時点と比較してLIUS群 ($p = 0.035$) およびLBs + LIUS群 ($p = 0.013$) で有意に高値を示した。LIUS群およびLBs + LIUS群では、LIUSの照射を終了した60秒以降、腫瘍組織内温度は急速に低下した。

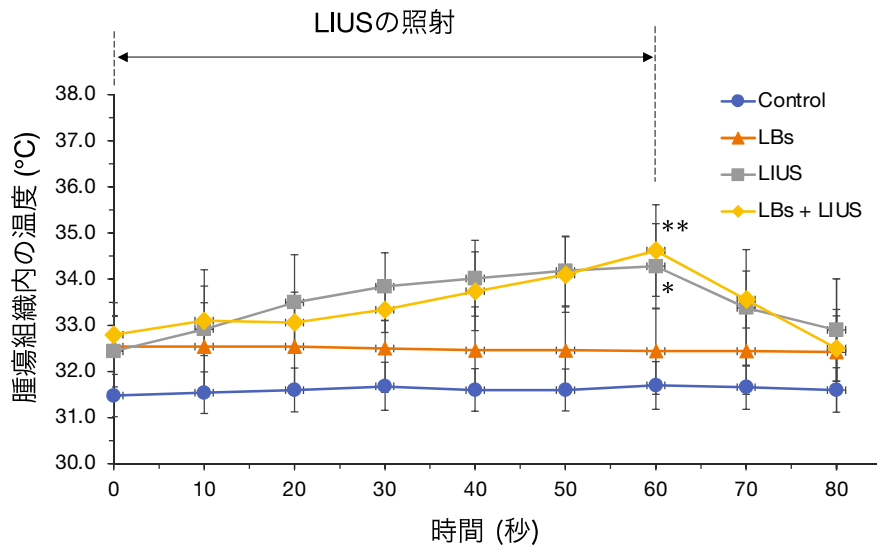


図2. リピッドバブル (Lipid bubbles, LBs) 投与および低強度超音波 (low-intensity ultrasound, LIUS) 照射の併用によるマウス腫瘍組織内の温度変化。グラフ上のデータは平均値 ± 標準偏差として示される (n = 5匹)。60秒時点での腫瘍組織内温度は、0秒時点と比較してLIUS群 (* : $p = 0.035$) およびLBs + LIUS群 (** : $p = 0.013$) で有意に上昇している。対応のある t 検定により解析。

3-3. PEG修飾リポソーム化ドキソルビシン塩酸塩の安定性に対するリピッドバブルと低強度超音波併用の影響

図3は、LBsとLIUS照射による処置後の沈殿物中のドキソルビシン塩酸塩重量と、上清中のドキソルビシン塩酸塩重量の比率を示している。図3Aおよび図3Bでは、PLDを20 μg /ウェルの用量で添加した。図3Cおよび図3Dでは、PLDを10倍量の200 μg /ウェルの用量で添加した。いずれの用量においても、PLD + LBs + LIUS群では、上清中のドキソルビシン塩酸塩重量の比率は他の群よりも有意に大きかった ($p < 0.05$) が、全体に対して4%未満の比率にとどまった。

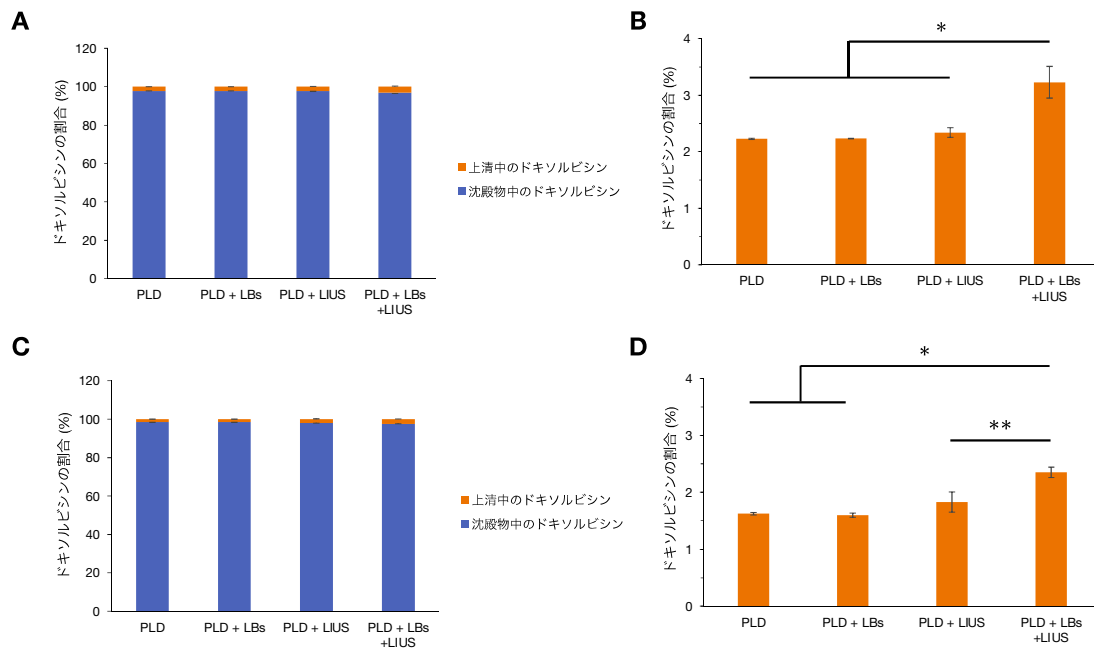


図3. リピッドバブル (Lipid bubbles, LBs) および低強度超音波 (low-intensity ultrasound, LIUS) 照射の併用がPEG修飾リポソーム化ドキソルビシン塩酸塩 (PEGylated liposomal doxorubicin hydrochloride, PLD) の安定性に及ぼす影響. 上清中のドキソルビシン塩酸塩は, LBs存在下でのLIUS照射により破壊されたPLD由来の遊離ドキソルビシン塩酸塩を意味し, 沈殿物中のドキソルビシン塩酸塩は, LIUS照射の後にも破壊されずにリポソーム構造を保っていたPLD由来のドキソルビシン塩酸塩を意味する. (A) PLDを20 µg/ウェルの用量で添加した際のLIUS照射後の上清中と沈殿物中のドキソルビシン塩酸塩重量の比率. (B) PLDを20 µg/ウェルの用量で添加した際の, 上清中のドキソルビシン塩酸塩重量の比率のみを示す. (C) PLDを200 µg/ウェルの用量で添加した際の, LIUS照射後の上清中と沈殿物中のドキソルビシン塩酸塩重量の比率. (D) PLDを200 µg/ウェルの用量で添加した際の, 遊離ドキ

ソルビシン塩酸塩重量の比率のみを示す。(A, C)において、正のエラーバーは上清中の遊離ドキソルビシン塩酸塩重量の標準偏差を表し、負のエラーバーは沈殿物中のドキソルビシン塩酸塩重量の標準偏差を表す。* $p < 0.001$, ** $p = 0.0011$. Tukeyの多重比較検定を用いて解析。

3-4. 腫瘍組織内におけるPEG修飾リポソーム化ドキソルビシン塩酸塩蓄積の定量的評価

各群の腫瘍組織における，湿重量あたりのドキソルビシン塩酸塩重量を図4に示す．PLD + LBs + LIUS群のドキソルビシン塩酸塩重量 ($17.8 \pm 2.9 \mu\text{g/g}$) は，PLD群 ($13.9 \pm 2.1 \mu\text{g/g}$) の1.28倍であった ($p = 0.009$)．

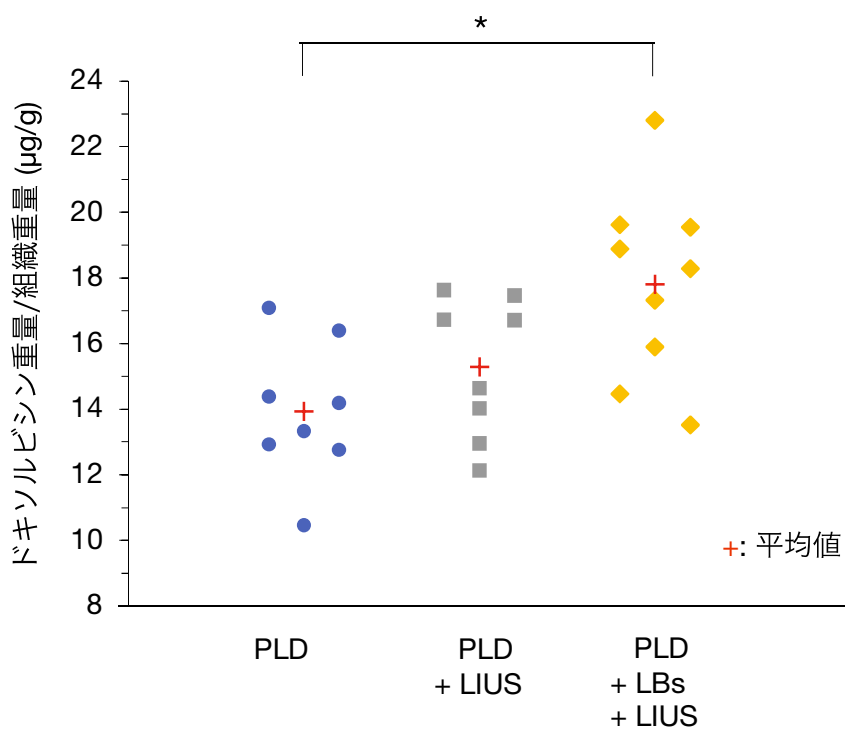


図4. リピッドバブル (Lipid bubbles, LBs) 投与および低強度超音波 (low-intensity ultrasound, LIUS) 照射の併用がPEG修飾リポソーム化ドキソルビシン塩酸塩 (PEGylated liposomal doxorubicin hydrochloride, PLD) の腫瘍組織への蓄積に及ぼす影響. PLDおよびLBsの混合液をマウス尾静脈内に投与後, 腫瘍組織へLIUSを照射する. 1時間後, 腫瘍組織を摘出してホモジナイズし, その上清の蛍光強度を, それぞれ490 nmの励起波長と590 nmの蛍光波長で測定する (n = 8-9匹). * : $p = 0.009$. Tukeyの多重比較検定を用いて解析.

3-5. 高分子物質の血管外漏出の定性的評価

FITC-dextran, FITC-dextran + LIUSおよびFITC-dextran + LBs + LIUSで処置したマウス腫瘍組織の顕微鏡画像を図5に示す。各個体の低倍率画像において、FITC-dextranは主に腫瘍組織周囲の皮下組織内に観察された。FITC-dextranおよびFITC-dextran + LIUSで処置したマウスでは、腫瘍組織内にFITC-dextranの分布はほとんど認められなかった。一方、FITC-dextran + LBs + LIUSで処置したマウスでは、腫瘍組織内にFITC-dextranが明瞭に観察された。高倍率の蛍光顕微鏡画像において、FITC-dextranおよびFITC-dextran + LIUSで処置したマウスでは、腫瘍組織内の血管周囲にFITC-dextranの分布はほとんど認められなかった。反対に、FITC-dextran + LBs + LIUSで処置したマウスでは、腫瘍組織内の血管周囲にFITC-dextranが広範かつ明瞭に分布した。

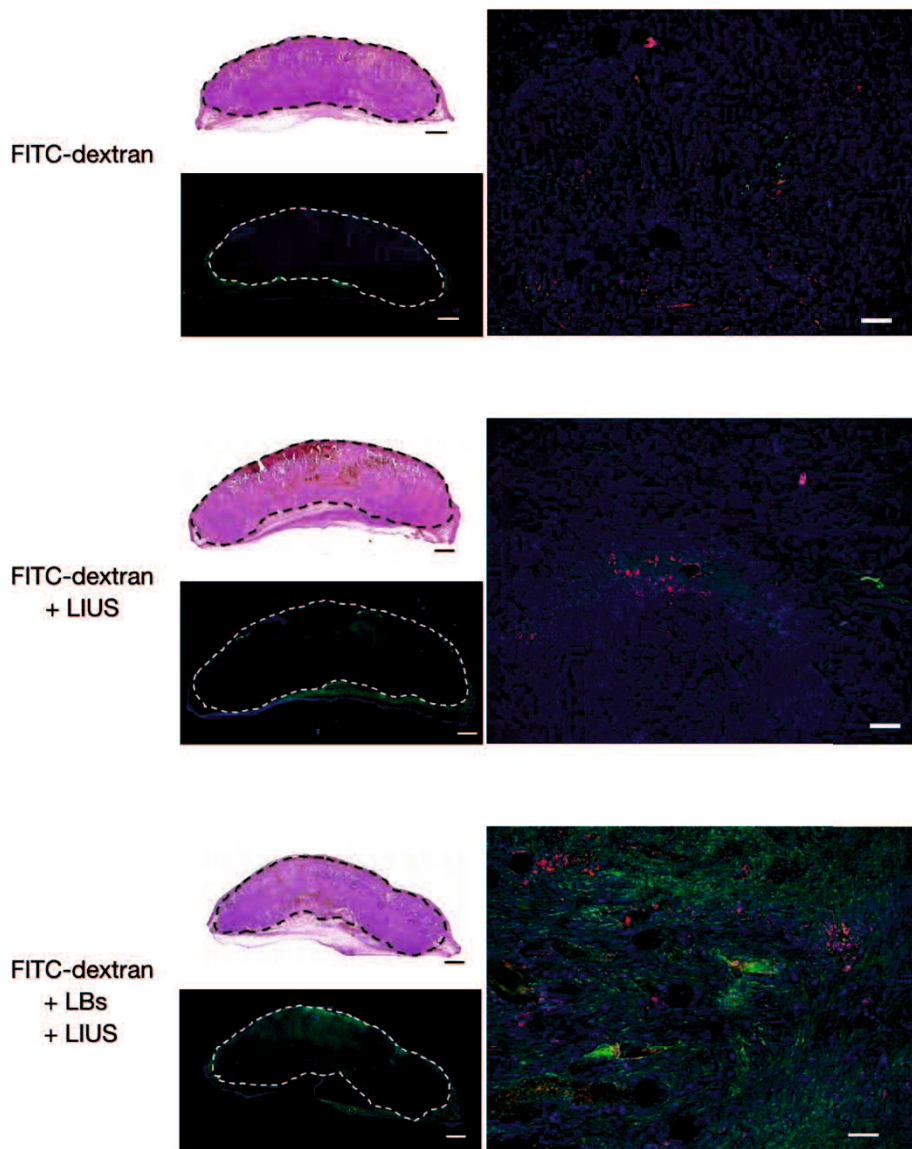


図5. リピッドバブル (Lipid bubbles, LBs) 投与および低強度超音波 (low-intensity ultrasound, LIUS) 照射の併用が腫瘍組織内血管からの高分子物質の漏出に与える影響。図中の各画像に関して、左上はヘマトキシリン・エオジン染色標本の低倍率画像 (腫瘍組織全体)、左下は低倍率蛍光画像 (腫瘍組織全体)、右は高倍率蛍光画像 (腫瘍組織内の血管付近) を示している。腫瘍組織全体が描出された画像は、複数の低倍率画像を連結させて取得しており、破線内の領域は腫瘍組織を示す。蛍光顕

微鏡画像において示される各色は次の通りである；緑：Fluorescein isothiocyanateで標識された分子量70,000 Daのdextran (FITC-dextran), 赤：Alexa Fluor 594で標識した二次抗体が結合したCD31抗原（血管内皮細胞を表す）, 青：4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色された細胞核. FITC-dextranおよびFITC-dextran + LIUSで処置したマウスでは, 低倍率蛍光画像および高倍率蛍光画像において, 腫瘍組織内にFITC-dextranの分布はほとんど認められない. 一方, FITC-dextran + LBs + LIUSで処置したマウスでは, 低倍率蛍光画像において腫瘍組織内にFITC-dextranが明瞭に観察されており, 高倍率蛍光画像では腫瘍組織内の血管周囲にFITC-dextranが広範かつ明瞭に分布している. スケールバーは低倍率画像で1 mmを, 高倍率画像で50 μ mを表す.

3-6. 腫瘍モデルマウスを用いた腫瘍成長抑制試験

各群の腫瘍体積の推移を図6Aに示す。対照群, LBs群, LIUS群およびLBs + LIUS群では, 腫瘍体積は日数の経過とともに増加し, Day 18の時点でそれぞれ 680.6 ± 255.1 , 626.2 ± 136.1 , 699.8 ± 300.8 および $581.5 \pm 371.6 \text{ mm}^3$ に達した。これら4群では, Day 18の時点で少なくとも1匹のマウスで腫瘍の最大径が17 mmを超えたため, 人道的エンドポイントとして観察を終了した。PLD群, PLD + LIUS群およびPLD + LBs + LIUS群では, Day 18の時点で腫瘍体積がそれぞれ 198.9 ± 138.2 , 247.2 ± 98.1 および $87.3 \pm 107.1 \text{ mm}^3$ となり, これら3群の腫瘍成長は対照群に比べて有意に抑制された (それぞれ, $p = 0.003$, $p = 0.007$ および $p < 0.001$)。各群のすべてのマウスにおける観察終了時点での腫瘍体積を図6Bに示す。対照群, LBs群, LIUS群およびPLD + LIUS群ではCRを示したマウスは認められず, LBs + LIUS群およびPLD + LIUS群ではそれぞれ1匹ずつのマウスがCRを示した。一方, PLD + LBs + LIUS群では, 9匹中4匹のマウスでCRが認められた。いずれの群においても, 観察期間中に顕著な体重減少は認められなかった (図6C)。

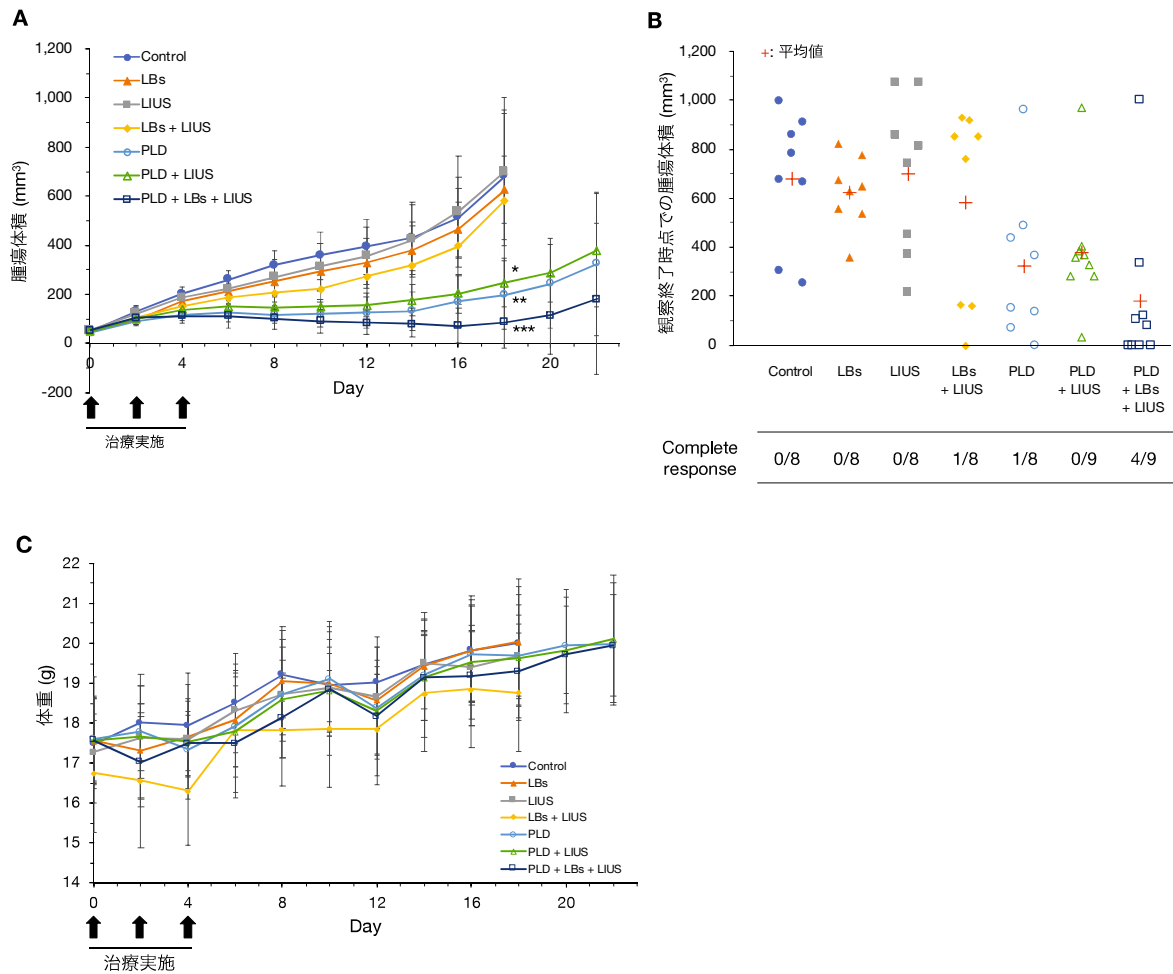


図6. 腫瘍モデルマウスに対するPEG修飾リポソーム化ドキソルビシン塩酸塩 (PEGylated liposomal doxorubicin hydrochloride, PLD) およびリピッドバブル (Lipid bubbles, LBs) の投与および低強度超音波 (low-intensity ultrasound, LIUS) 照射の併用による腫瘍成長抑制効果. 尾静脈内にPLDおよびLBs混合液を投与直後, 腫瘍組織にLIUSを照射する. 治療は0, 2および4日目に計3回実施されている. (A) 観察期間における腫瘍体積の推移. * Day 18のPLD + LIUS群と対照群間における腫瘍体積の有意差 ($p = 0.007$). ** Day 18のPLD群と対照群間における有意差 ($p = 0.003$). *** Day 18のPLD + LBs + LIUS群と対照群間における有意差 ($p < 0.001$). (B) 各群にお

ける全個体の観察終了時点の腫瘍体積および完全奏功 (complete response) を示した
個体数. (C) 観察期間における体重の推移. complete responseを示した個体数を除い
て, 全ての数値データは平均値 \pm 標準偏差として示されている (n = 8-9匹). Tukey
の多重比較検定を用いて解析.

3-7. 病理組織学的観察

対照群, LBs + LIUS群, PLD群およびPLD + LBs + LIUS群の代表的なマウスの病理組織画像を図7に示す. H&E染色において, 対照群およびLBs + LIUS群では, 腫瘍組織に壊死領域はほとんど認められなかった. PLD群では, 腫瘍組織の中心部に壊死領域が認められた. PLD + LBs + LIUS群では, 腫瘍組織の辺縁部を除いた広範囲に壊死領域が認められ, 他の群と比較して壊死領域が最も大きかった. TUNEL染色において, 対照群およびLBs + LIUS群の腫瘍組織では, TUNEL陽性細胞はほとんど認められなかった. PLD群およびPLD + LBs + LIUS群の腫瘍組織では, 壊死領域の周囲に多数のTUNEL陽性細胞が認められた.

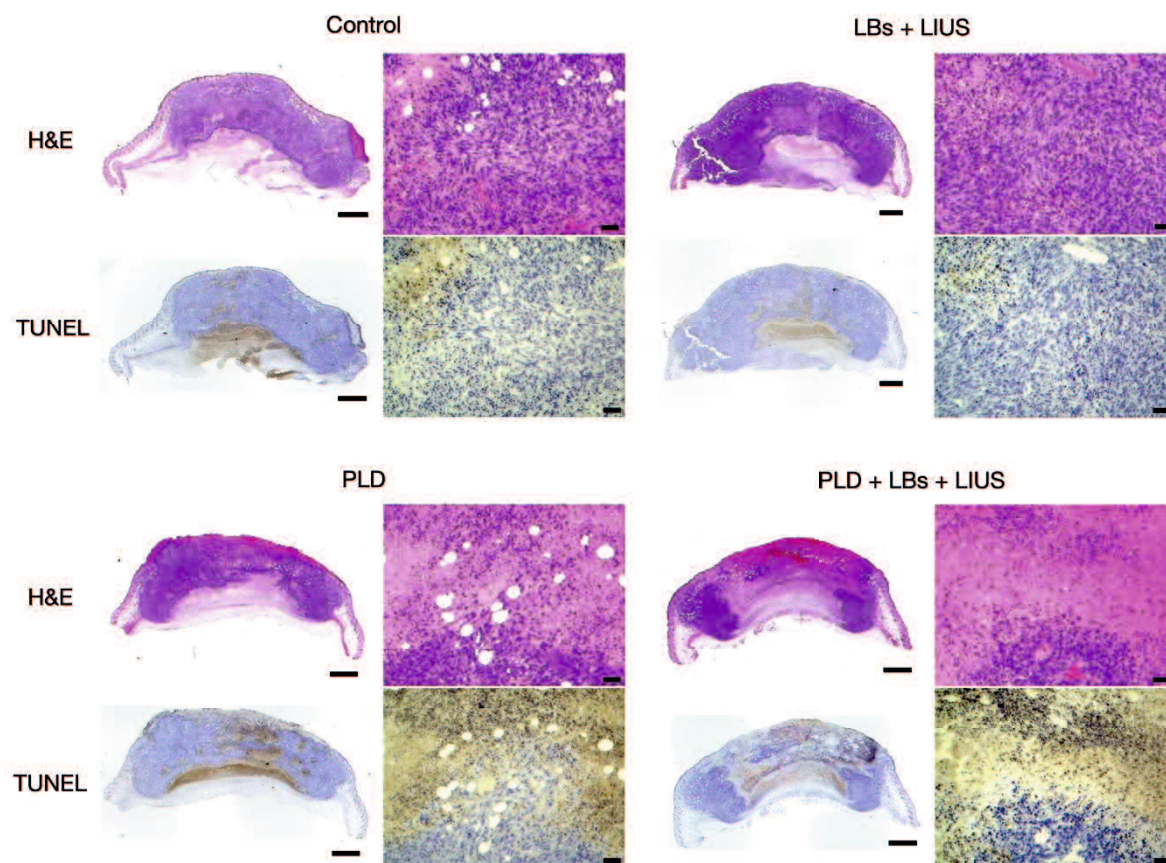


図7. Day 8に摘出した腫瘍組織の顕微鏡画像. PEG修飾リポソーム化ドキソルビシン塩酸塩 (PEGylated liposomal doxorubicin hydrochloride, PLD) およびリピッドバブル (Lipid bubbles, LBs) 投与および低強度超音波 (low-intensity ultrasound, LIUS) 照射の併用治療を, 0, 2および4日目に計3回実施している. 腫瘍組織全体が描出された画像は, 複数の低倍率画像を連結させて取得している. ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin, H&E) でエオジン好性に染色される部位は壊死組織を表す. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 染色で褐色に染まった細胞はアポトーシスを生じていることを表す. スケールバーは低倍率画像で1 mm, 高倍率画像で50 μm を表す.

4. 考察

LBsは、超音波と併用することにより診断や治療に活用することを目的に開発されてきた [57, 58]. これまでマウスにおいて、超音波との併用によりLBsが腎臓組織に対して造影効果を示すことや、脳組織に対して薬物送達効果を有することが確認された [39]. しかし、マウスの腫瘍組織にLBsを適用した研究報告はなく、マウス腫瘍組織におけるLBsの造影効果や薬物送達効果は未だ不明である. そこで本研究では、はじめに腫瘍モデルマウスにおいてCEUSを実施し、マウスの腫瘍組織においてLBsが造影効果を有するかを評価した. 本実験において、LBsの投与により腫瘍組織全体が造影されたことから、LBsは静脈内投与により腫瘍組織の血管系に流入し、造影効果をもたらしたと考えられた. また、本実験ではLIUSの照射がLBsの安定性にどのような影響を及ぼすかを評価するため、LBsの投与後に腫瘍組織にLIUSを照射し、その後の造影効果を評価した. その結果、LIUS照射後には腫瘍組織内におけるLBsの造影効果が消失したことから、LIUSの照射により、腫瘍組織内に流入したLBsが血管内で圧壊を生じたと考えられた.

MBsの圧壊は、近傍の生体組織に対して、機械的作用だけでなく熱的作用を示す. 超音波照射によるMBsの圧壊が生じると、その内部に高温・高圧の微小環境が生成され、結果として組織局所的に温熱効果をもたらす [13, 26]. 特に、腫瘍治療において、腫瘍組織局所的に温熱効果 (> 43°C) を与えることで、腫瘍細胞を死滅させる温熱療法が知られており [66], 超音波による温熱効果を温熱療法に利用する試

みがなされてきた。そこで本実験では、LBsとLIUSの併用によりどれほどの温熱効果が発生するかを評価するために、腫瘍組織内の温度を測定した。LIUS群およびLBs + LIUS群では、腫瘍組織内の温度が約31°Cから約34°Cまで上昇した。この結果から、今回の実験条件では、LBsの静脈内投与とLIUS照射の併用は、温熱療法に利用できるほどの温熱効果を引き起こさなかったことが示唆された。すなわち、本研究において、温熱効果は腫瘍の成長抑制に関与しなかった可能性が考えられた。この結果は、過去のSuzukiらのMBsを用いた研究報告の結果とは一致しなかった [52]。Suzukiらの報告では、LBsとは組成の異なるリン脂質とC₃F₈から構成されるMBs（平均粒子径：500 nm）を腫瘍内に局所投与し、直後にLIUS（出力強度4 W/cm²で2分間）を照射したところ、マウスの腫瘍組織内温度が約44°Cに上昇し、それにより腫瘍成長抑制効果が得られた。Suzukiらの結果と本実験結果における温度上昇の差異は、使用したMBsの組成や粒子径、MBsの投与経路およびLIUSの照射条件が異なっていたことなどに起因したと考えられたが、その要因の完全な解明は困難であった。

MBsの振動や圧壊によって生じる機械的作用は、MBsと超音波を用いた薬物送達において非常に重要な要素である [26]。機械的作用により血管内皮細胞間隙の拡大や細胞膜への可逆的な小孔形成を生じることで、局所的に血管壁や細胞膜の透過性を亢進し、それにより薬物の標的組織への分布を向上させると考えられている [32, 41]。これまで、LBsとLIUSを併用することにより、正常組織への高分子物質の薬物送達が可能となることが示唆されている [39, 57] が、腫瘍組織を対象とした検討はな

されていない。本研究では、LBsとLIUSの併用により、腫瘍組織へのPLDの蓄積が増加することを評価するため、PLDやトレーサーを用いた実験を行った。まず、*in vitro*実験系において、LBsの存在下でLIUSを照射した場合に、PLDのリポソーム構造が破壊されずに保持されるかを評価した。PLDおよびLBs混合液にLIUSを照射した後、破壊されて上清中に遊離したドキシソルビシン塩酸塩の重量と、沈殿物中のリポソーム構造を保持したドキシソルビシン塩酸塩の重量の比率を算出した。その結果、PLD + LBs + LIUS群において、上清中に遊離したドキシソルビシン塩酸塩重量の比率は対照群と比較して約1%有意に増加したが、全体に対して4%以下と非常に小さい比率であった。この結果から、LBs存在下でLIUSを照射しても、PLDのリポソーム構造はそのほとんどが保持されたことが示された。次に、LBsとLIUSの併用により、腫瘍組織へのPLDの蓄積が増加することを、腫瘍モデルマウスを用いた*in vivo*実験系により評価した。PLD+LBs+LIUS群の腫瘍組織において、PLD群よりも湿重量あたりのドキシソルビシン塩酸塩重量が有意に増加（約1.3倍）した。この結果から、LBsの静脈内投与後にLIUSを腫瘍組織に照射することにより、PLDの腫瘍組織内への蓄積が増加したことが示唆された。続いて、LBsとLIUSの併用により、薬剤がどのように腫瘍組織内に分布するかを明らかにするために、トレーサーを用いた定性的評価を行った。比較的高分子である分子量70,000 Daのdextranは、正常な毛細血管では間質に漏出しないが、血管透過性が亢進すると血管外に漏出することが報告されている [11]。そのため、本実験ではFITC-dextran（分子量：70,000 Da）を血管外漏出の

トレーサーとして使用した。蛍光顕微鏡画像において、FITC-dextran + LBs + LIUSで処置したマウスでは、他のマウスよりも腫瘍組織内の血管周囲にFITC-dextranが広範かつ明瞭に分布していた。このことから、LBsの投与後にLIUSを照射することで、腫瘍組織内の血管から間質へのFITC-dextranの漏出が促進されたことが示された。以上の結果から、LBsとLIUSを併用することにより、PLDはリポソーム構造を保持したまま腫瘍組織内の血管系から間質へ多く漏出し、結果としてPLDの腫瘍組織内への蓄積が増加したと考えられた。

UngaらおよびOmataらの報告 [39, 57] では、血中アルブミン（分子量：約66,000 Da）と結合する色素であるエバンスブルーをモデル物質として、LBsとLIUSによる正常組織でのモデル物質の血管外漏出を評価した。これらの報告では、マウスにエバンスブルーとLBsの混合液を静脈内投与した直後に耳介や脳に対してLIUSを照射すると、エバンスブルーが血管外の組織に多く分布することが示された。これらの筆者らは、LIUSの照射を受けたLBsが血管透過性を亢進することにより、比較的高分子であり通常は血管外漏出しないアルブミンが、血管外に漏出したと考察した。また、Shimizuらは最近、毛細血管構造を模したファントムとハイスピードカメラを用いて、LBsと超音波照射の併用による血管内皮細胞への影響を視覚的に評価した [45]。Shimizuらの報告により、超音波照射により生じたLBsの振動や圧壊を介して、血管内皮細胞間隙の拡大や細胞膜の可逆性の損傷が生じた結果、局所的に血管透過性が亢進することが明らかとなった。これらの研究結果は本研究における考察を支

持するものであり、LIUSの照射により生じたLBsの振動や圧壊によって、腫瘍組織における血管透過性が亢進したことが、PLDやFITC-dextranの血管外漏出が増加した要因であったと考えられた。

固形腫瘍において、腫瘍組織の血管系やリンパ系は正常組織のものとは異なり、構造や機能が不完全であることが知られている [9, 54]. 特に、粒子径が20–200 nmのナノメディシンや、分子量が40,000 Daを超える高分子物質は、腫瘍組織の毛細血管壁にある広い間隙を通じて漏れ出し、さらにリンパ系の不完全な排泄機能のために、組織内に保持される傾向がある。この現象は、腫瘍組織を標的としたパッシブドラッグデリバリーの基礎をなす機序として概念化されており、Enhanced permeability and retention (EPR) 効果と呼ばれる [31, 33]. ナノメディシンであるPLDが腫瘍組織内に蓄積する仕組みも、EPR効果に基づいている [2]. しかし、腫瘍組織では、不良な血流状態 [20], 高い間質液圧 [19] および密な間質構造 [69] などの要因によって局所の透過性が動的に変化するため、EPR効果は時間的・空間的に常に一定ではなく不均一である。したがって、腫瘍組織の血管透過性を高めることは、EPR効果を向上させ、ナノメディシンや高分子物質の腫瘍組織内への蓄積を増加させるための有効な戦略であると考えられる。本研究結果から、LBsとLIUSの併用は、局所的に腫瘍組織の血管透過性を高めることにより、EPR効果を向上させる有用な手段となりうると考えられた。

最後に、PLD, LBsおよびLIUSを併用することにより、PLDの抗腫瘍効果が増強

されるかどうかを、腫瘍モデルマウスを用いた腫瘍成長抑制試験により評価した。

本実験では、PLD群、PLD + LIUS群およびPLD + LBs + US群において、対照群に比べて有意な腫瘍成長抑制効果が認められた。PLD群およびPLD + LIUS群ではCRを示したマウスが1匹あるいは0匹であった一方で、PLD + LBs + US群では9匹のうち4匹のマウスがCRとなった。さらに、H&EおよびTUNEL染色では、PLD + LBs + US群の腫瘍組織において、最も広範囲の壊死領域と、多数のアポトーシス細胞が観察された。これらの結果から、腫瘍モデルマウスにおいて、PLD、LBsおよびLIUSを併用することにより、最も高い抗腫瘍効果が発揮されたことが示唆された。最近の報告において、Bushらはヒト乳腺腫瘍細胞の異種移植マウスに対して、PLDの静脈内投与に、ソナゾイドを改良して作製した小型MBsとLIUS照射を併用した [3]。この治療により、PLD単独投与と比較して腫瘍体積や生存期間などの治療反応が有意に改善された。Bushらは、小型MBsとLIUSにより、PLDの腫瘍組織内への移行が増加したことによってPLDの治療効果が増強されたと推察したが、機序を解明するための詳細な検討はされなかった。本研究では、抗腫瘍効果の評価だけでなく、その機序に関する探索を実施した。本研究の一連の結果から、PLDおよびLBsの投与およびLIUS照射の併用による高い抗腫瘍効果は、LBsとLIUSによる温熱効果ではなく、PLDの腫瘍組織内への蓄積の増加が主な要因であったと考えられた。Ogawaraらは、ドキソルビシン塩酸塩抵抗性の腫瘍細胞株を皮下移植した腫瘍モデルマウスにおいて、PLDが腫瘍組織内の血管内皮細胞に対してアポトーシスを引き起こすことによ

り、腫瘍の成長が抑制されたと報告した [38]。したがって、本研究においても、PLDの腫瘍組織内への蓄積の増加は、腫瘍細胞への直接的な障害だけでなく、腫瘍組織内の血管系の損傷をもたらした可能性も考えられた。

本研究にはいくつかの限界が存在する。本研究結果から、LBsとLIUSを併用することにより、PLDの腫瘍組織内への蓄積が増加したことが明らかになった。その機序として、腫瘍組織における血管透過性の亢進が関与したと考えられたが、完全には解明されなかった。LBsとLIUSの併用が、腫瘍組織内の血管系にどのように作用するかを明らかにするためには、追加の*in vitro*実験系において、血管内皮細胞を用いた薬物透過性の評価が必要である。また、本研究におけるPLD、LBsおよびLIUS併用治療の抗腫瘍効果に関して、LBsの濃度、LIUSの出力設定、PLDの投与量および治療回数などの様々な要因が関与したことが推測された。本研究では、実験条件を固定していたため、どの要因が抗腫瘍効果に最も関連しているかを評価することは困難であった。今後、様々な条件において追加実験を行うことにより、本治療に最適な条件を検討することが必要である。さらに、腫瘍成長抑制試験では、PLD、LBsおよびLIUS併用治療により顕著に腫瘍成長が抑制されたが、エンドポイントにおいてPLD単独治療との間に腫瘍体積の有意な差異は認められなかった。PLD、LBsおよびLIUS併用治療の抗腫瘍効果がPLD単独治療より優れていることを実証するためには、PLDの投与量などを最適化した追加の*in vivo*実験を遂行する必要がある。

5. 小括

本研究は、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機序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と考えられた。本実験条件では、LBsとLIUSの併用により腫瘍組織内の温度は約34°Cまでしか上昇しなかったことから、その温熱効果は抗腫瘍効果に関与しなかったと考えられた。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が増加したことが、高い抗腫瘍効果をもたらす要因となったと考えられた。本研究結果は、LBsとLIUSを用いた腫瘍治療をイヌに適用する上での重要な根拠となることが期待される。PLDの腫瘍組織内への蓄積が増加したことの背景には、腫瘍組織内の血管透過性の亢進が機序として存在すると考えられるが、その解明にはさらなる*in vitro*および*in vivo*実験系による検討が必要である。

第二章

イヌにおけるリピッドバブルと超音波を用いた

腫瘍の診断法および治療法の有用性

1. 緒言

超音波セラノスティクスは、超音波装置を用いて病変部の画像的評価、治療効果の付与およびその効果判定を同時進行的あるいは連続的に実施する診療システムを意味する [72]。すなわち、超音波セラノスティクスは、処置時間の短縮と治療効果の最適化を達成できる合理的で効率的な診療システムと言える。超音波セラノスティクスにおいて、超音波造影剤であるMBsを用いることにより、CEUSによる病変部の器質的・機能的診断だけでなく、効率的な薬物送達を併せて実施できる [25]。

Dimceovskiらは、ヒトの膵臓がん患者に対して、既存のMBsであるSonoVueと診断用超音波を用いて抗がん剤の治療効果の増強を試み、腫瘍径の縮小や治療サイクルの増加などの肯定的な結果を得た [10]。この2016年の画期的な報告は、ヒトの腫瘍に対する超音波セラノスティクス実現の先駆けとされ、それを機に超音波セラノスティクスの実用化に向けた研究が進展しつつある。

獣医療においては、腫瘍に罹患した動物は全身状態が不良であることが多く、MBsと超音波の併用により、CEUSと薬物送達による効率的な診療を行えることの恩恵は大きい。そのため、MBsを用いた超音波セラノスティクスは獣医がん診療との親和性が高い診療システムであると考えられる。主流のMBs製剤であるSonoVueとソナゾイドに関して、それらを用いたCEUSがイヌの肝臓腫瘍性病変の良悪性鑑別に有用とする研究結果は、これまでに複数報告されている [23, 35, 37]。一方で、それらと超音波を用いた薬物送達を臨床応用した研究報告はなく、現状として超音波セ

ラノスティクスの獣医療での実現に向けた取り組みは進んでいない。

帝京大学の丸山らにより開発されたLBsは、診断と治療の両方への活用を目的としている [57, 58]。先述の第一章の研究結果から、腫瘍モデルマウスにおいて、LBsが造影効果を有することや、LBsとLIUSの併用によりPLDの腫瘍組織への蓄積が増加することが明らかとなった [68]。これらのことから、LBsはセラノスティクスに適したMBsとして、イヌにおいてCEUSによる診断やPLDを用いた腫瘍治療に臨床応用できる可能性が十分にあると想定される。しかし、これまでイヌにおいてLBsを適用した報告はないことから、イヌにおける基礎的データの取得および臨床的有用性の検討が必要不可欠である。

そこで本研究では、イヌにおけるLBsの基礎的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。さらに、LBsと超音波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。

2. 材料および方法

2-1. 倫理に関する声明

本研究では、対象となる動物の尊厳を尊重し、全ての研究計画書は3R (replacement, reductionおよびrefinement) に則って作成された。健常なビーグル犬を対象とする実験計画書は、鳥取大学動物実験委員会による審査を受け、承認された

(承認番号：15-T-41). 肝臓腫瘍性病変を有するイヌを対象とした臨床試験および切除不可能な体表腫瘍を有するイヌを対象とした臨床試験の臨床研究実施計画書は、鳥取大学農学部動物臨床研究倫理審査委員会による審査を受け、承認された（承認番号：H28-001およびH28-002）.

2-2. リピッドバブルの調製

本章で使用したLBsは、第一章に記載された内容と同様の方法で調製された。約 1.6×10^9 個/mLの濃度のLBsを全ての実験および臨床試験に使用した。

2-3. 健常ビーグル犬を用いたリピッドバブルの短期的安全性および造影効果の評価

2-3-1. 供試動物

本研究は、供試される動物の数を最小限に抑えるため、交互試験としてデザインされた。本研究では、2.9–11.1歳（中央値：4.6歳）、体重11.0–12.6 kg（中央値：12.2 kg）の6頭の健常ビーグル犬を使用した。血液検査および身体検査によって供試動物が健康であることを確認した。全ての健常ビーグル犬において、腹部単純超音波検査により肝臓に異常がないことを確認した。

2-3-2. 肝臓に対する造影超音波検査および血液検査

ビーグル犬のCEUSでは、1–6 MHzのマイクロコンベックスプローブを装着した

超音波診断装置（Arietta60）を使用した。LBsを用いたCEUS（LBs-CEUS）はコントラストハーモニックイメージングモードで行い、メカニカルインデックスを0.18に、バックグラウンドゲインを55 dBに設定した。ビーグル犬を覚醒下で仰臥位に保定し、上腹部の毛刈りを行った。剣状突起のすぐ尾側にプローブを設置し、肝門脈と肝臓組織を同一のエコーウィンドウ内に描出した。橈側皮静脈に設置した22ゲージの留置針からLBsを0.015 mL/kgの用量で静脈内に投与し、続いて3 mLのヘパリン加生理食塩水を注入した。LBsの投与後15分間CEUSを実施し、スキャン動画をArietta60のローカルストレージに保存した。LBsの投与直後および24時間後に、アレルギー症状の発生を肉眼的に観察した。LBsの投与直前および24時間後に採血および血液検査を実施した。動物用多項目自動血球計数装置（pocH-100iV Diff, シスメックス株式会社, 兵庫）を用いて全血球計算を行った。血漿のC反応性蛋白（C-reactive protein, CRP）濃度は、イヌ用CRP測定キット（Laser CRP-2, 株式会社アローズ, 大阪）を用いて測定された。血漿中の尿素窒素（blood urea nitrogen, BUN）、クレアチニン（creatinine, CRE）、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼおよびアルブミンは、動物用臨床化学分析装置（FUJI DRI-CHEM 7000V, 富士フイルム株式会社, 東京）を用いて測定された。7日間の休薬期間の後、造影効果の比較のためにソナゾイド（第一三共株式会社, 東京）を用いたCEUS（Sonazoid-CEUS）を、上記のLBs-CEUSと同様の設定および手技で実施した。ソナゾイドは0.015 mL/kg (0.85×10^9 個/mL) の用量で投与された。

2-3-3. 画像解析

定量的解析のために、各動画からLBsおよびソナゾイド投与後0, 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12および15分のスクリーンショット (1,922 × 1,282 ピクセル, PNG形式) を撮影し、画像を保存した。全ての画像は画像解析ソフトウェア (ImageJ) を用いて解析した。画像解析ソフトウェア上で各画像を表示し、肝門脈および肝臓組織に関心領域を設置した。各関心領域のMGIを0から255の範囲で算出した。LBs投与からの各時間におけるMGIを取得し、時間-MGI曲線を作成した。Sonazoid-CEUSに関する過去の報告に従い [22, 23, 35, 44], LBs-CEUSにおける3つの時相を、次の期間として定義した；動脈相：LBs投与から肝門脈の造影が開始されるまでの期間、門脈相：肝門脈の造影強度がピークとなる前後の期間、クッパー相：肝門脈の造影効果が完全に消失した以降の期間。作成した時間-MGI曲線から、LBs-CEUSにおける各時相のタイミングを決定した。

2-4. 肝臓の腫瘍性病変を有するイヌを対象としたリピッドバブルを用いた造影超音波検査の診断的有用性の評価

2-4-1. 対象動物

本臨床試験では、2016年6月から2019年8月までの期間に鳥取大学農学部附属動物医療センターに来院した21例のイヌを対象とした。腹部単純超音波検査により、肝臓に孤立性または複数の腫瘍性病変が認められたイヌを臨床試験に供した。各病

変は、病理組織学的または細胞学的検査によって確定診断が施された。全症例の詳細な情報は、実験結果の項目3-2および表2に記載されている。

2-4-2. 単純超音波検査による肝臓腫瘍性病変の画像評価

腹部単純超音波検査により、各症例の肝臓腫瘍性病変の特徴を明らかにした。超音波診断装置として、Arietta60またはHI VISION Preirus（株式会社日立メディコ、東京）のうちいずれかを使用した。Arietta60では、1-6 MHzのマイクロコンベックスプローブ、または2-12 MHzのブロードバンドリニアプローブを使用した。HI VISION Preirusでは、4-8 MHzのマイクロコンベックスプローブまたは6-14 MHzのブロードバンドリニアプローブを使用した。取得した超音波画像において、各病変の長径と短径を測定した。病変のサイズが一つのエコーウィンドウ内に収まらない場合は、同時に撮影したCT画像を用いて長径と短径を測定した。各病変部のエコーパターンを、実質性（solid）、嚢胞性（cystic）あるいは混合性（mixed）に分類した。周囲の正常肝臓組織との比較により、各病変部のエコー源性を、高エコー（hyperechoic）、等エコー（isoechoic）あるいは低エコー（hypoechoic）に分類した。

2-4-3. リピッドバブルおよびソナゾイドを用いた造影超音波検査

はじめに、LBs-CEUSとSonazoid-CEUSの造影所見に差異があるかを確認するために、13例のイヌに両検査法を実施した。次に、8例のイヌにLBs-CEUSのみを実施

し、合計21例のイヌにおいてLBs-CEUSを実施した。各CEUSは、Arietta60またはHI VISION Preirusを用いて実施した。Arietta60では1-6 MHzのマイクロコンベックスプローブまたは2-12 MHzのブロードバンドリニアプローブを使用した。HI VISION Preirusでは4-9 MHzのリニアプローブを使用した。各超音波診断装置において、コントラストハーモニックイメージングモードによりCEUSを実施した。メカニカルインデックスは0.18-0.22に設定された。造影剤からの信号と区別するために、組織信号が最小レベルになるようにバックグラウンドゲインを調整した。イヌを仰臥位に保定し、上腹部の毛刈りを行った。連続してCT検査を受ける症例では、CEUSは一般的な全身麻酔下において実施された。橈側皮静脈に設置された22ゲージあるいは24ゲージの留置針から、LBsを0.015 mL/kgの用量で静脈内投与し、続いて3-5 mLのヘパリン加生理食塩水を投与した。プローブを腹部に設置し、正常な肝臓組織と腫瘍性病変を1枚の画像内に収めるようにスキャンした。動脈相、門脈相およびクッパー相の画像を取得するため、薬剤投与後0分から12分まで連続して撮像を行い、動画として記録した。すべてのイヌにおいて、LBsの投与前後に急性アレルギー症状の発生を観察した。LBs-CEUSとSonazoid-CEUSの両方を実施した13例のイヌでは、LBsの投与による肝臓組織の増強が消失したことを確認した後、Sonazoid-CEUSを上記LBs-CEUSと同様の手技で実施した。ソナゾイドは0.015 mL/kgの用量で投与された。各症例におけるCEUSは、3人の獣医師（I. Y., Y. M.およびK. H.）のうちの1人により実施された。

健常ビーグル犬の実験において設定したLBs-CEUSの三時相のタイミングに従って、造影所見を時相ごとに評価した。Sonazoid-CEUSに関しても、LBs-CEUSと同様のタイミングで三時相の造影所見を評価した。各症例の造影所見は、各時相において次のように分類された；動脈相および門脈相：病変全体が均一に造影された場合を均一造影パターンと、病変内が不均一に造影され、単一の造影輝度に分類することが困難な場合を不均一造影パターンとした。均一造影パターンであった場合、周囲の正常肝組織と比較し、病変の造影輝度が高い場合をhyperenhancing、およそ等しい場合をisoenhancing、低い場合をhypoenhancingと評価した。クッパー相：病変部の造影所見をcomplete enhancement defect (CD), irregular enhancement defect (ID) あるいはno enhancement defect (ND) の3つに分類した。病変部全体が、周囲の肝臓組織と境界明瞭に完全な造影欠損を示す場合、CDと評価した。病変全体の輝度が不均一で、内部に不完全な造影欠損が認められる場合、IDと評価した。病変部全体が周囲の肝臓組織と同等に造影されており、造影欠損が認められない場合、NDと評価した。全症例の造影所見は、2人の獣医師 (I. Y.およびY. M.) が協議検討して評価した。

2-5. 切除困難な体表腫瘍を有するイヌを対象としたPEG修飾リポソーム化ドキソル

ビシン塩酸塩, リピッドバブルおよび低強度超音波併用治療の有用性の予備的

評価

2-5-1. 対象動物

本臨床試験には、2016年7月から2017年3月までの期間に鳥取大学農学部附属動物医療センターに来院した3例のイヌを対象とした。イヌの3例は、頭頸部あるいは肛門周囲に自然発生した固形腫瘍を有し、その解剖学的位置や腫瘍の浸潤が原因で外科的な切除が困難であった。試験への組み入れの前に、3例のいずれも重篤な心機能障害、腎機能障害および肝機能障害がないことを確認した。症例に関する詳細な情報は、実験結果の項目3-3および表3に記載されている。

2-5-2. 治療プロトコル

各症例において、橈側皮静脈に22ゲージまたは24ゲージの留置針を設置した。メデトミジン (0.01–0.02 mg/kg)、ミダゾラム (0.2 mg/kg) およびブトルファノール (0.2 mg/kg) の組み合わせ、あるいは単独投与により鎮静処置を施し、腫瘍周囲を毛刈りした。使用直前にLBsおよびPLD (ドキシル, ヤンセンファーマ株式会社, 東京) を調製した。PLDは8.0–16.0 mg/m²の用量で、10–20分かけて持続定量点滴により静脈内投与した。PLDの投与終了後、LBsを5分ごとに0.2–0.4 mL/頭の用量で静脈内投与した。LBsの投与と同時に、先端に直径15 mmもしくは35 mmのディスク型トランスデューサーが設置されたプローブを備えた理学療法用超音波治療器 (UST-770) を用いて、LIUSの照射を行なった。超音波治療器の出力条件は、次のように設定した；周波数：1 MHz, 出力強度：2 W/cm², デューティサイクル：50%あるいは100%, 照射時間：15–40分。治療は7日以上間隔をあけて実施された。PLDとLBs

の投与量，プローブの種類，LIUSの照射時間および治療サイクル数は，各症例の全身状態および腫瘍の大きさを考慮して治療毎に決定された。

一部の症例では，治療に際してCT撮像を実施した。前述した鎮静処置，あるいはプロポフォール（プロポフロ28，ゾエティス・ジャパン株式会社，東京）の静脈内投与による麻酔導入および気管挿管を実施した後，適切に動物を寝台上に保定した。CT画像の撮像は，16列マルチスライスCT装置（ECLOS，株式会社日立メディコ，東京）を用い，以下の設定で実施した；管電圧：100–120 kV，管電流：100–150 mA，撮像回転速度：0.8秒/1回転，スライス厚：2.5 mm。単純CT撮像を実施した後，続けて造影CT撮像を実施した。造影CT撮像では，造影剤としてイオパミドール（オイパロミン300注シリンジ100 mL，富士製薬工業株式会社，富山）を2.0 mL/kg（600 mgI/kg）の用量で使用した。造影剤はオートインジェクター（デュアルショット，株式会社根本杏林堂，東京）を用いて，橈側皮静脈に設置した留置針より15–20秒で静脈内投与した。造影剤投与開始20秒および60秒時点で造影CT撮像を行った。

2-5-3. 腫瘍組織内の血管系評価のためのリピッドバブルを用いた造影超音波検査

各治療時において，治療前後に病変部に対してLBs-CEUSを実施し，治療が腫瘍組織内の血管系に及ぼす影響を評価した。使用した超音波診断装置，プローブおよび設定は，「項2-4-3. リピッドバブルおよびソナゾイドを用いた造影超音波検査」に記載した内容と同様とした。LBsを0.015 mL/kgの用量でイヌに静脈内投与した後，

3–5 mLのヘパリン加生理食塩水を投与した。超音波診断装置のプローブを腫瘍の表面に設置し、コントラストハーモニックイメージングモードによるCEUSを5–10分間実施した。

2-5-4. 腫瘍サイズの計測

最初の治療時点をDay 0とし、来院ごとに腫瘍サイズの計測を行なった。ノギスを用いて腫瘍の長径、短径および厚さを測定し、「長径 × 短径 × 厚さ × 3.14 ÷ 6」の計算式から腫瘍体積を算出した。各症例間の腫瘍体積の変動を比較するため、「Day Xにおける腫瘍体積 ÷ Day 0における腫瘍体積 × 100」の計算式により相対的な腫瘍体積を算出した。

2-6. 統計解析

健常ビーグル犬における実験では、LBsの投与前後の血液検査の数値を、対応のある2標本の*t*検定により解析した。LBs-CEUSとSonazoid-CEUSにおけるMGIの差を、Studentの*t*検定を用いて解析した。肝臓腫瘍性病変を有するイヌを対象とした臨床試験では、造影所見と病変の良悪性との関連を、Fisherの両側正確確率検定を用いて解析した。全ての統計解析は、コンピュータソフトウェアプログラム（XLSTAT）上で行われた。全ての検定で、*p*値が0.05未満の場合を統計的に有意と判断した。

3. 結果

3-1. 健常ビーグル犬におけるリッドバブルを用いた造影超音波検査の短期的安全性

および造影効果

LBs投与前後の健常ビーグル犬に対して実施した血液検査の結果を表1に示す。

LBs投与前および投与24時間後の血液検査の値はすべて基準範囲内であった。血小板 (Platelet, PLT) 数は、投与前 ($37.9 \times 10^4/\mu\text{L}$) と比較して投与後 ($30.7 \times 10^4/\mu\text{L}$) に有意に減少した ($p = 0.020$)。また、BUNは投与前 (15.5 mg/dL) と比較して投与後 (11.5 mg/dL) に有意に減少した ($p < 0.001$)。同様に、CREも投与前 (0.72 mg/dL) と比較して投与後 (0.67 mg/dL) に有意に減少した ($p = 0.034$)。その他の項目については、LBs投与の前後で有意な差は認められなかった。すべての健常ビーグル犬において、LBs投与直後および投与24時間後に、粘膜充血、顔面腫脹、食欲不振、活動低下あるいは虚脱の症状は認められなかった。

表1. 健常ビーグル犬におけるリピッドバブル投与前後の血液検査結果

項目 ¹	リピッドバブル投与前	リピッドバブル投与24時間後	単位
WBC	106.8 ± 20.1	98.3 ± 17.8	10 ² /μL
RBC	705.0 ± 36.7	728.8 ± 70.5	10 ⁴ /μL
HGB	16.0 ± 1.0	16.5 ± 2.0	g/dL
HCT	44.6 ± 2.9	46.1 ± 5.2	%
PLT *	41.0 ± 9.1	30.7 ± 9.2	10 ⁴ /μL
CRP	0.5 ± 0.4	0.6 ± 0.2	mg/dL
BUN *	15.5 ± 1.8	11.5 ± 0.9	mg/dL
CRE *	0.72 ± 0.1	0.67 ± 0.1	mg/dL
ALT	45.7 ± 5.3	49.5 ± 4.6	U/L
ALP	153.3 ± 39.0	152.5 ± 32.3	U/L
ALB	3.3 ± 0.1	3.1 ± 0.3	g/dL

¹ WBC, white blood cell, 白血球；RBC, red blood cell, 赤血球；HGB, hemoglobin, ヘモグロビン；HCT, hematocrit, ヘマトクリット；PLT, platelet, 血小板；CRP, C-reactive protein, C反応性蛋白；BUN, blood urea nitrogen, 血中尿素窒素；CRE, creatinine, クレアチニン；ALT, alanine aminotransferase, アラニンアミノトランスフェラーゼ；ALP, alkaline phosphatase, アルカリホスファターゼ；ALB, albumin, アルブミン. * リピッドバブル投与前と投与24時間後の値に有意差が認められる ($p < 0.05$) . 全ての数値は平均値 ± 標準偏差により示されている ($n = 6$). 対応のある2標本の t 検定により解析.

図1に健常ビーグル犬においてLBs-CEUSおよびSonazoid-CEUSにより得られた代表的な造影画像を示す。LBsの投与後、細い肝動脈がわずかに造影されたが、続く肝臓組織の造影により短時間で視認できなくなった。続いて、10–20秒以内に肝門脈と肝臓組織が造影され始めた。肝門脈はおよそ投与後1分に最も強く造影された（図1B）。その後、肝門脈の造影効果は徐々に減弱し（図1C）、消失した（図1D）。肝臓組織では、15分間の観察期間中、継続して造影効果が認められた（図1D）。Sonazoid-CEUSでは、肝臓組織においてLBs-CEUSよりも強い造影効果が認められた（図1FおよびG）。

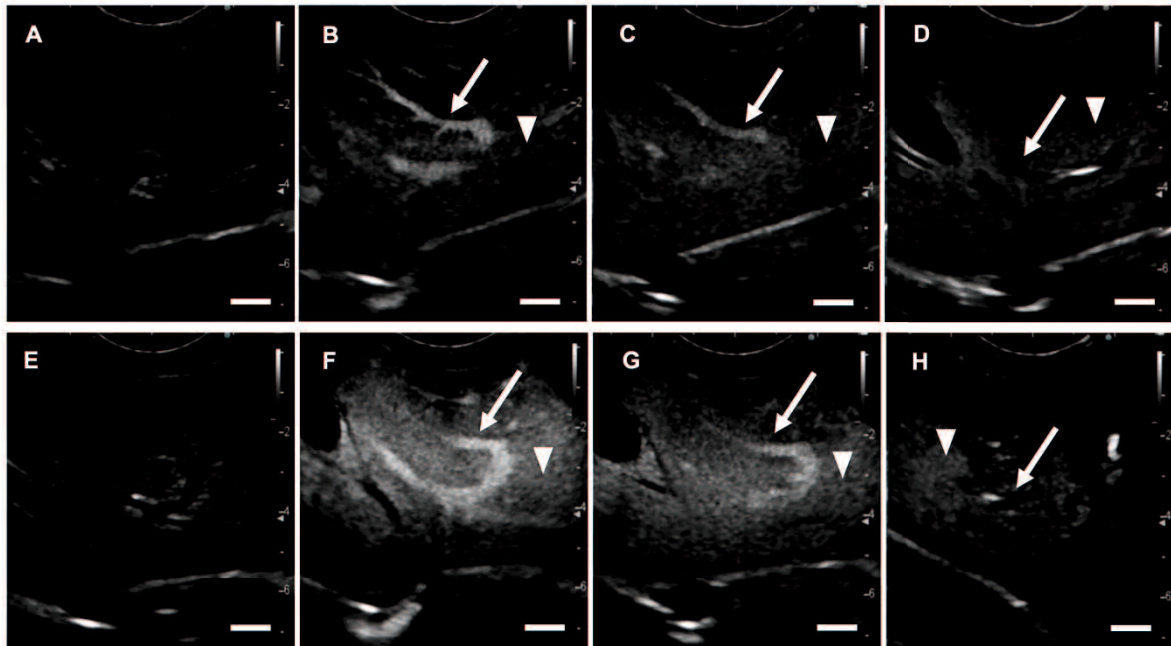


図1. 健常ビーグル犬の肝臓に対する造影超音波検査（contrast-enhanced ultrasonography, CEUS）により得られた代表的な造影画像。剣状突起のすぐ尾側にプローブを設置し、肝門脈と肝臓組織を同一のエコーウインドウ内に描出している。

（A-D）リピッドバブル（Lipid bubbles, LBs）を用いたCEUS。（E-H）ソナゾイドを用いたCEUS。（A, E）両薬剤を投与する直前。（B, F）投与1分後。（C, G）投与3分後。（D, H）投与15分後。（A-D）LBsの投与により、肝門脈（矢印）と肝臓組織（矢頭）に造影効果が認められる。肝門脈の造影効果は時間経過とともに徐々に減弱しているが、肝臓組織では造影効果が15分間維持されている。（E-H）ソナゾイドの投与により、肝門脈（矢印）と肝臓組織（矢頭）に造影効果が認められる。全画像において、スケールバーは1 cmを表す。

図2は、肝門脈と肝臓組織の時間-MGI曲線を示している。肝門脈のMGIは、LBs投与後0.5分でピークに達した後、徐々に低下し、8分以降に基準値に戻った。肝臓組織のMGIは、LBs投与1分後に定常状態に達した。LBs-CEUSとSonazoid-CEUSを比較すると、肝門脈と肝臓組織の時間-MGI曲線は同様の推移を示した。Sonazoid-CEUSでは、肝門脈のMGIはソナゾイド投与後0.5分でピークに達し、その後ベースラインに向かって徐々に低下した。肝臓組織のMGIは、ソナゾイド投与後0.5分でピークに達した後、徐々に低下したものの、15分後でも高い値を維持した。肝臓組織のMGIピーク値は、LBs-CEUSではSonazoid-CEUSよりも有意に低かった（投与1分後において67.2に対し、投与0.5分後において102.5, $p = 0.010$ ）。LBs-CEUSの各時相のタイミングは、動脈相を約0-30秒、門脈相を約30秒-2分、クッパー相を約10分以降と設定した。

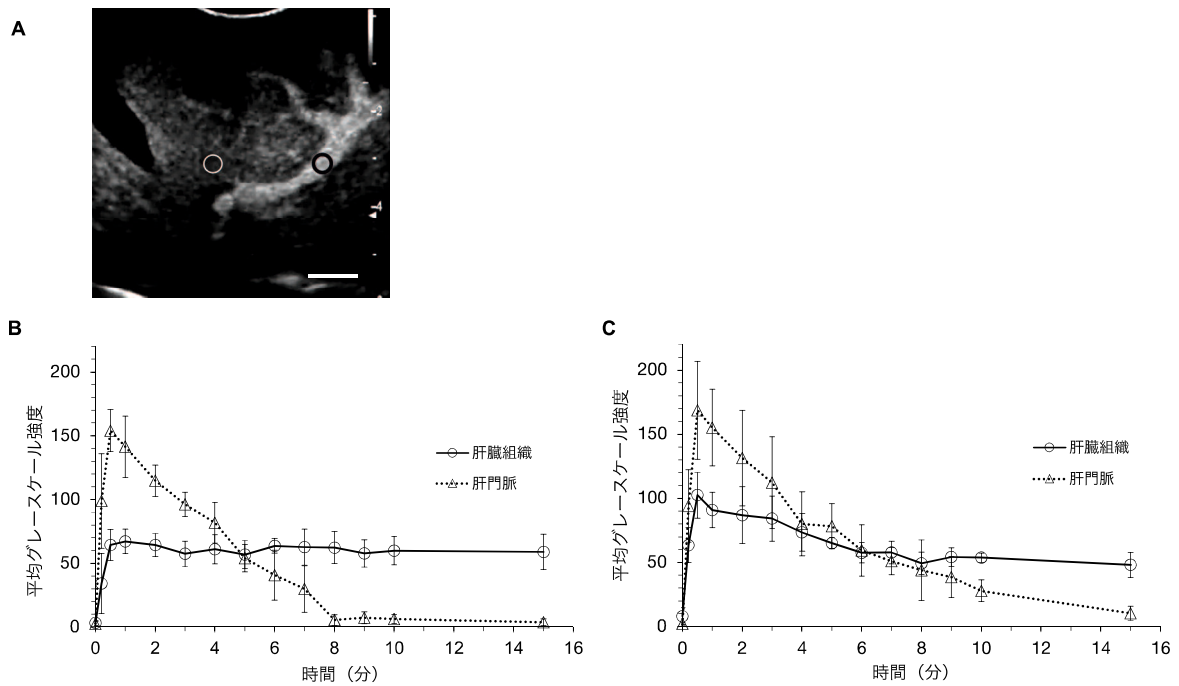


図2. 健常ビーグル犬における造影超音波検査 (contrast-enhanced ultrasonography, CEUS) の画像から得られた肝門脈と肝臓組織の時間-平均グレースケール強度 (mean grayscale intensity, MGI) 曲線. (A) 肝門脈と肝臓組織に設置した関心領域を模式的に示す造影画像. 黒丸は肝門脈, 白丸は肝臓組織の関心領域を示しており, 同程度の深度に設置されている. スケールバーは1 cmを表す. (B) リピッドバブルを用いたCEUSと, (C) ソナゾイドを用いたCEUSから得られた時間-MGI曲線を示す. グラフ上のデータは平均値 \pm 標準偏差として示されている (n = 6).

3-2. 肝臓腫瘍性病変を有するイヌにおけるリピッドバブルを用いた造影超音波検査 の診断的有用性

本臨床試験の対象となった21例のイヌの詳細な結果を表2に示す。21例のイヌの年齢は8.5–14.3歳（中央値：11.7歳）で、体重は1.8–23.2 kg（中央値：8.9 kg）であった。症例の犬種は次に示す通りであった；雑種（n=4）、ミニチュア・ダックスフンド（n=4）、チワワ（n=3）、ミニチュア・シュナウザー（n=2）、ビーグル（n=2）、ウェルシュ・コーギー（n=1）、ボストン・テリア（n=1）、ゴールデン・レトリバー（n=1）、ヨークシャー・テリア（n=1）、フレンチ・ブルドッグ（n=1）およびジャック・ラッセル・テリア（n=1）。肝臓腫瘍性病変を有する21例のイヌのうち、6例が良性病変、15例が悪性腫瘍であった。各病変の診断名を表2に記載する。良性病変は、肝細胞腺腫、胆管腺腫、結節性過形成、肝細胞の変性・壊死、毛細血管拡張症および肝細胞の空胞変性・脂肪変性が1例ずつであり、全て病理組織学的に診断された。悪性腫瘍の15例のうち11例は原発性であり、4例は転移性であった。11例の原発性悪性腫瘍のうち、9例が肝細胞癌であり、胆管癌と上皮性悪性腫瘍が1例ずつであった。4例の転移性悪性腫瘍では、血管肉腫、悪性黒色腫、上皮性悪性腫瘍および非上皮性悪性腫瘍が1例ずつであった。悪性黒色腫は細胞学的に診断され、その他の14例の悪性腫瘍は病理組織学的に診断された。

表2. リピッドバブルおよびソナゾイドを用いた造影超音波検査に関する結果の概要

良性/ 悪性	症例 番号	犬種	年齢 (歳)	性別 ¹	診断名	単純超音波検査		LRS-CEUS		Sonazoid-CEUS ⁶				
						病変サイズ ² (cm)	エコー パターン	エコー 源性 ³	動脈相 ⁴ (0-30秒)	門脈相 ⁴ (30秒-2分)	クッパー相 ⁵ (10分-)	動脈相 ⁴ (0-30秒)	門脈相 ⁴ (30秒-2分)	クッパー相 ⁵ (10分-)
	1	雑種	10	M	肝細胞腺腫	5.97 × 4.20	solid	iso	hyper	iso	ND	hyper	iso	ND
	2	チワワ	12	M	胆管腺腫	3.16 × 2.87	mixed	hypo	hetero	hetero	CD	hetero	hetero	CD
良性	3	雑種	12	SF	糸筒性過形成	2.89 × 2.01	solid	iso	hyper	iso	ND	hyper	iso	ND
	4	ウェルシュ・コーギー	14	SF	肝細胞の変性・壊死	7.06 × 4.36	solid	iso	iso	iso	ND	iso	iso	ND
	5	ボストン・テリア	13	CM	毛細血管拡張症	1.04 × 0.92	solid	hyper	hyper	iso	ND	iso	iso	ND
	6	チワワ	9	SF	肝細胞の空胞変性・脂肪変性	1.55 × 1.54	solid	iso	iso	iso	ND	n/a	n/a	n/a
	7	ヨークシャー・テリア	9	F	肝細胞癌	7.68 × 5.46	solid	hypo	hetero	hetero	ID	hetero	hetero	ID
	8	ミニチュア・ダックスフンド	12	M	肝細胞癌	12.02 × 8.49	solid	hypo	hetero	hetero	ID	hetero	hetero	ID
	9	アレンチ・ブルドッグ	11	F	肝細胞癌	1.56 × 1.12	solid	hypo	iso	iso	CD	iso	hypo	CD
	10	チワワ	11	M	肝細胞癌	2.57 × 2.07	solid	hypo	hypo	hypo	CD	hypo	hypo	CD
悪性 (原発性)	11	雑種	11	SF	肝細胞癌	2.65 × 2.31	solid	iso	hyper	hyper	CD	hyper	hypo	CD
	12	ミニチュア・ダックスフンド	14	CM	肝細胞癌	4.52 × 4.11	solid	iso	iso	hyper	iso	CD	n/a	n/a
	13	ゴールデン・レトリバー	10	CM	肝細胞癌	2.92 × 2.58	solid	hypo	hypo	hyper	iso	CD	n/a	n/a
	14	雑種	14	SF	肝細胞癌	6.82 *	solid	hypo	hypo	hetero	hetero	ID	n/a	n/a
	15	ビーグル	13	F	肝細胞癌	12.26 × 11.64	solid	hypo	hypo	hetero	hetero	ID	n/a	n/a
	16	ミニチュア・シュナウザー	12	CM	胆管癌	6.05 × 3.76	solid	hypo	hypo	hyper	iso	CD	n/a	n/a
	17	ビーグル	8	SF	上皮性悪性腫瘍	6.29 × 5.93	solid	hypo	hypo	hypo	hypo	CD	n/a	n/a
	18	ミニチュア・ダックスフンド	11	M	血管肉腫	2.98 × 1.92	solid	iso	hetero	hetero	CD	hetero	hetero	CD
悪性 (転移性)	19	ミニチュア・シュナウザー	9	SF	悪性黒色腫	1.52 × 0.96	solid	hyper	hypo	hypo	CD	hypo	hypo	CD
	20	ジャック・ラッセル・テリア	13	CM	上皮性悪性腫瘍	9.31 × 5.72	solid	iso	iso	hetero	ID	hetero	hetero	ID
	21	ミニチュア・ダックスフンド	11	CM	非上皮性悪性腫瘍	2.14 × 1.40	solid	hypo	hypo	hypo	CD	n/a	n/a	n/a

¹ M, male, 雄; CM, castrated male, 去勢雄; F, female, 雌; SF, spayed female, 避妊雌. ² 病変サイズ, 長径 × 短径. ³ hyper, hyperechoic ;

iso, isoechoic ; hypo, hypoechoic. ⁴ hyper, hyperenhancing ; iso, isoenhancing; hypo, hypoenhancing ; hetero, heterogeneous enhancement pattern.

⁵ CD, complete enhancement defect ; ID, irregular enhancement defect ; ND, no enhancement defect. ⁶ n/a, not assessed, 未評価. * エコーウェイク
ンドウ内に収まらない大きさであったため、長径は測定できなかった。

対象となった全21例において、LBs-CEUSにおいて動脈相、門脈相およびクッパー相のすべての時相における造影画像が描出された。また、21例のいずれにおいても、LBsの投与に関連した粘膜充血や顔面腫脹の症状は認められなかった。LBs-CEUSとSonazoid-CEUSの各時相における造影所見は、両検査を実施した13例全てで一致した。各症例における造影所見を表2に示す。21例のうち、悪性腫瘍であった15例は、すべてクッパー相においてCDまたはIDを示した。クッパー相におけるCDおよびIDの所見は悪性腫瘍と有意に関連しており、感度、特異度、陽性的中率および陰性的中率はそれぞれ100.0, 83.3, 93.8および100.0%であった ($p = 0.0003$)。一方、良性病変の6例のうち5例では、クッパー相においてNDを示した。胆管腺腫の1例では、CDを示した。クッパー相でのNDの所見は良性病変と有意に関連しており、感度、特異度、陽性的中率および陰性的中率はそれぞれ83.3, 100.0, 100.0および93.8%であった ($p = 0.0003$)。門脈相では、isoenhancingの所見は良性病変と有意に関連しており、感度、特異度、陽性的中率および陰性的中率はそれぞれ83.3, 80.0, 62.5および92.3%であった ($p = 0.014$)。動脈相では、良性病変および悪性腫瘍に関連した有意な所見は認められなかった。図3には良性病変である肝細胞腺腫（症例1）の、また図4には悪性腫瘍である肝細胞癌（症例11）のLBs-CEUSおよびSonazoid-CEUSにおける造影画像を示す。各図の注釈にて画像の詳細を記載する。

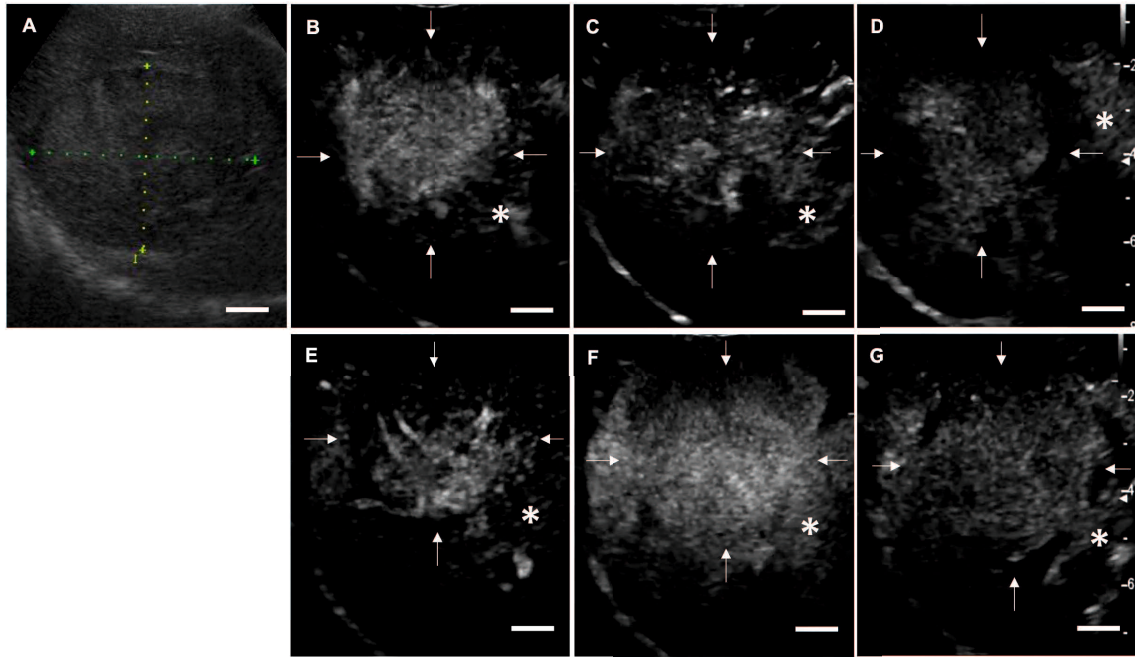


図3. 肝細胞腺腫（症例1）の造影超音波検査（contrast-enhanced ultrasonography, CEUS）における画像。（A）単純超音波検査におけるBモード画像を示す。実質性パターンかつ等エコー性の、長径5.97 cm、短径4.20 cmの病変が観察される。（B-D）リピッドバブル（Lipid bubbles, LBs）を用いたCEUSにおける画像。（B）動脈相における造影超音波画像。病変部は周囲の肝臓組織に比べて造影輝度が高く、hyperenhancingと評価される。（C）門脈相における造影超音波画像。病変部は周囲の肝臓組織と同等の造影輝度であり、isoenhancingと評価される。（D）クッパー相における造影超音波画像。病変部には造影欠損は見られず、no enhancement defectと評価される。（E-G）ソナゾイドを用いたCEUSにおける造影画像。（E）動脈相、（F）門脈相および（G）クッパー相における造影超音波画像。各時相において、LBsを用いたCEUSと同様の所見となっている。全画像において、白矢印は病変部の辺縁を、アスタリスクは正常な肝臓組織を示し、スケールバーは1 cmを表す。

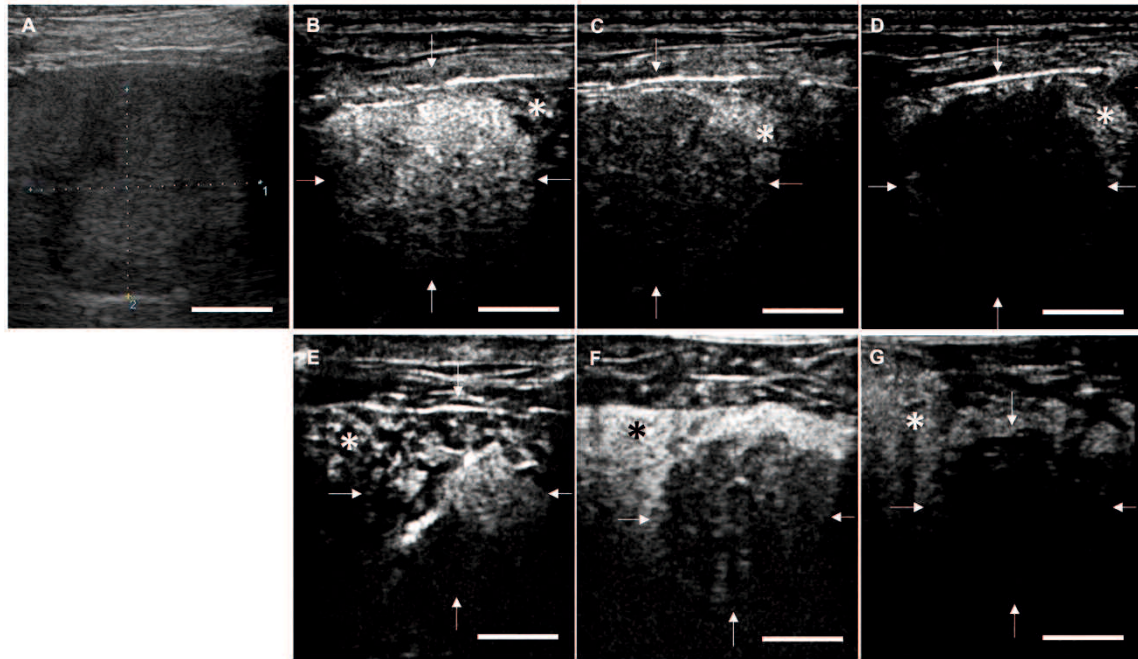


図4. 肝細胞癌（症例11）の造影超音波検査（contrast-enhanced ultrasonography, CEUS）における画像。（A）単純超音波検査におけるBモード画像を示す。実質性パターンかつ等エコー性の、長径2.65 cm、短径2.31 cmの病変が観察される。（B–D）リピッドバブル（Lipid bubbles, LBs）を用いたCEUSにおける画像。（B）動脈相における造影超音波画像。病変部は周囲の肝臓組織に比べて造影輝度が高く、hyperenhancingと評価される。（C）門脈相における造影超音波画像。病変部は周囲の肝臓組織に比べて造影輝度が低く、hypoenhancingと評価される。（D）クッパー相における造影超音波画像。病変部に完全な造影欠損が認められており、complete enhancement defectと評価される。（E–G）ソナゾイドを用いたCEUSにおける画像。（E）動脈相、（F）門脈相および（G）クッパー相における造影超音波画像。各時相において、LBsを用いたCEUSと同様の造影所見となっている。全画像において、白矢印は病変部の辺縁を、アスタリスクは正常な肝臓組織を示し、スケールバーは1 cmを表す。

3-3. 切除困難な体表腫瘍を有するイヌにおけるPEG修飾リポソーム化ドキソルビシン

塩酸塩, リピッドバブルおよび低強度超音波併用治療の有用性

対象となった3例のイヌについての詳細な情報を表3に示す。各症例の腫瘍は、病理組織学的検査あるいはCT検査によって、それぞれ血管周皮腫、耳垢腺癌および甲状腺癌（疑い）と診断された。血管周皮腫の症例1では、握り拳大の腫瘍が肛門周囲に位置しており、広範囲の外肛門括約筋の切除による便失禁を生じる可能性があったため、外科手術の実施が困難であった。耳垢腺癌の症例2では、腫瘍の頭蓋骨への浸潤が著しかったこと、症例3では、肺転移が認められかつ腫瘍が周囲組織に固着していたことから、外科手術が回避された。症例3のみ、観察期間中にトセラニブ（パラディア、ゾエティス・ジャパン株式会社、東京）の投与が行われた。PLD、LBsおよびLIUS併用治療は、症例1、2および3に対して、それぞれ2、6および4回実施された（表4）。併用治療によって腫瘍体積は減少し、症例1、2および3において、最終測定時点ではそれぞれ28.9、28.2および44.3%であった（図5）。症例1および2の生存期間は、それぞれ52日および127日であった（表5および6）。これら2例は、腫瘍と関連のない原因により死亡した。症例3は、Day 83以降の来院および連絡が途絶えたため、それ以降の動物の状況は不明であった（表7）。各症例に実施した治療についての詳細な情報を表4に示す。全症例において、各治療を実施する直前と直後、および治療中に、腫瘍組織に対してLBs-CEUSを実施した。LBs-CEUSでは、治療する前と比較し、治療後に腫瘍組織内に造影効果が減弱した部位が観察された。

表 3. 対象となったイヌの概要

症例番号	犬種	年齢 (歳)	性別 ¹	体重 (kg)	腫瘍の診断名	発生部位	併用療法
1	パピヨン	14	SF	2.5	血管周皮腫	肛門周囲	なし
2	トイ・プードル	7	F	3.8	耳垢腺癌	左耳根部	なし
3	ウェルシュ・コーギー	10	F	10.1	甲状腺癌 (疑い)	頸部	トセラニブ

¹ F, female, 雌; SF, spayed female, 避妊雌.

表 4. 実施した治療に関する情報

症例番号	超音波出力設定				腫瘍体積				生存期間 (日)	アウトカム	
	周波数 (MHz)	出力強度 (W/cm ²)	デュレーテイサイクル (%)	照射時間 (分)	PLD投与量 (mg/m ²)	治療回数 (回)	A: 初回計測時 (cm ³)	B: 最終計測時 (cm ³)			B/A × 100 (%)
1	1	2	50	20-30	16	2	178.0	51.4	28.9	52	死亡 (腫瘍と関連なし)
2	1	2	50あるいは100	30-40	8-16	6	4.4	1.3	28.2	127	死亡 (腫瘍と関連なし)
3	1	2	50	15	15	4	41.0	18.1	44.3	n/a ¹	追跡不能

¹ n/a, not assessed, 未評価. 症例3はDay 83以降の追跡調査ができなかった.

表 5. 症例 1 の臨床経過および治療の詳細

Day	イベント	腫瘍 体積 (cm ³)	PLD 投与量 (mg/m ²)	LBs 投与量 (mL)	超音波出力条件			照射時間 (分)
					周波数 (MHz)	出力強度 (W/cm ²)	デューティ サイクル (%)	
0	組み入れ 第 1 回治療	178.0	16	0.2	1	2	50	30
9	第 2 回治療	175.7	16	0.2	1	2	50	20
23	一般状態の低下 治療延期	85.6	-	-	-	-	-	-
28	一般状態の軽度改善 治療延期	77.8	-	-	-	-	-	-
37	治療延期	38.1	-	-	-	-	-	-
46	治療延期	51.4	-	-	-	-	-	-
52	死亡	n/a ¹	-	-	-	-	-	-

¹ n/a, not assessed, 未評価.

表 6. 症例 2 の臨床経過および治療の詳細

Day	イベント	腫瘍 体積 (cm ³)	PLD 投与量 (mg/m ²)	LBs 投与量 (mL)	超音波出力条件			照射時間 (分)
					周波数 (MHz)	出力強度 (W/cm ²)	デューティ サイクル (%)	
0	組み入れ CT 検査 第 1 回治療	4.4	16	0.2	1	2	50	15
					1	2	100	15
7	第 2 回治療	3.7	16	0.2	1	2	50	40
29	CT 検査 第 3 回治療	3.7	8	0.4	1	2	50	40
43	第 4 回治療	2.7	8	0.4	1	2	50	30
57	第 5 回治療	2.9	12.5	0.2	1	2	50	30
71	第 6 回治療	2.4	14.2	0.4	1	2	50	30
78	病変部の炎症 治療延期	n/a ¹	-	-	-	-	-	-
82	治療延期	1.6	-	-	-	-	-	-
95	治療延期	1.3	-	-	-	-	-	-
113	一般状態の低下 治療延期	n/a ¹	-	-	-	-	-	-
127	死亡	n/a ¹	-	-	-	-	-	-

¹ n/a, not assessed, 未評価.

表 7. 症例 3 の臨床経過および治療の詳細

Day	イベント	腫瘍 体積 (cm ³)	PLD 投与量 (mg/m ²)	LBs 投与量 (mL)	超音波出力条件			
					周波数 (MHz)	出力強度 (W/cm ²)	デューティ サイクル (%)	照射時間 (分)
0	組み入れ CT 検査 第 1 回治療	41.0	15	0.2	1	2	50	15
15	第 2 回治療	28.3	15	0.3	1	2	50	15
36	第 3 回治療	38.2	15	0.3	1	2	50	15
58	CT 検査 第 4 回治療	16.6	15	0.3	1	2	50	15
82	一般状態の低下 治療延期	18.1	-	-	-	-	-	-
83	一般状態の低下 最終観察日	n/a ¹	-	-	-	-	-	-

¹ n/a, not assessed, 未評価.

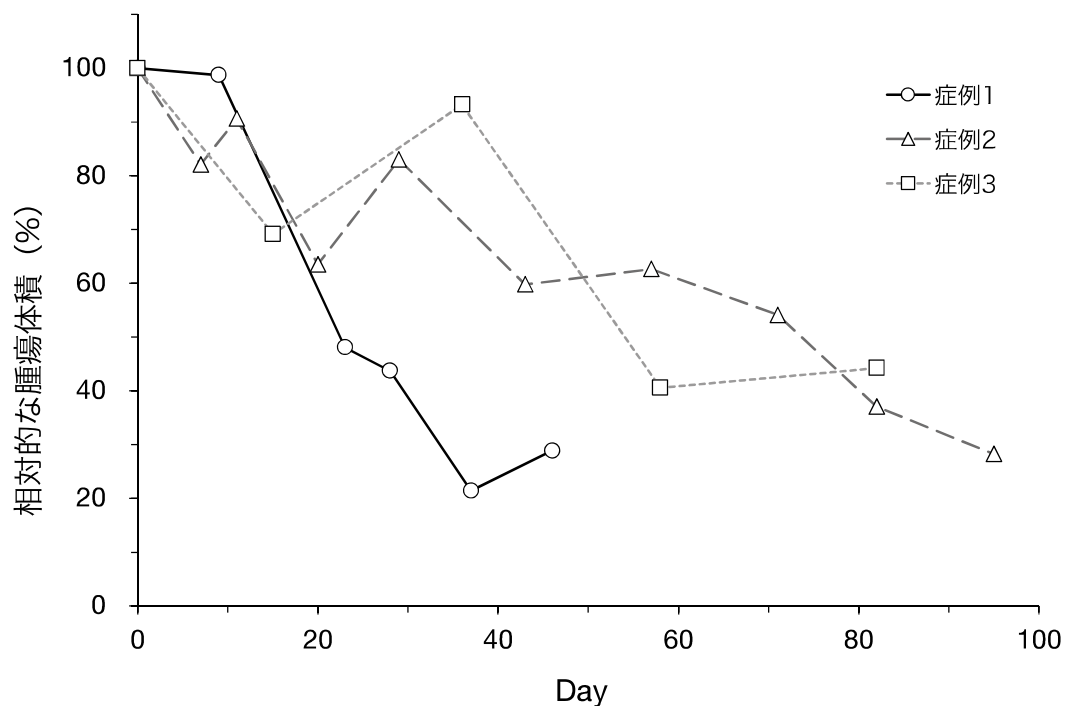


図5. 全3例のイヌにおける相対的な腫瘍体積の推移. 相対的な腫瘍体積は、「Day Xにおける腫瘍体積 ÷ Day 0における腫瘍体積 × 100」の計算式により算出されている. 最終計測時における症例1, 2および3の相対的な腫瘍体積は, それぞれ28.9, 28.2および44.3%となっている.

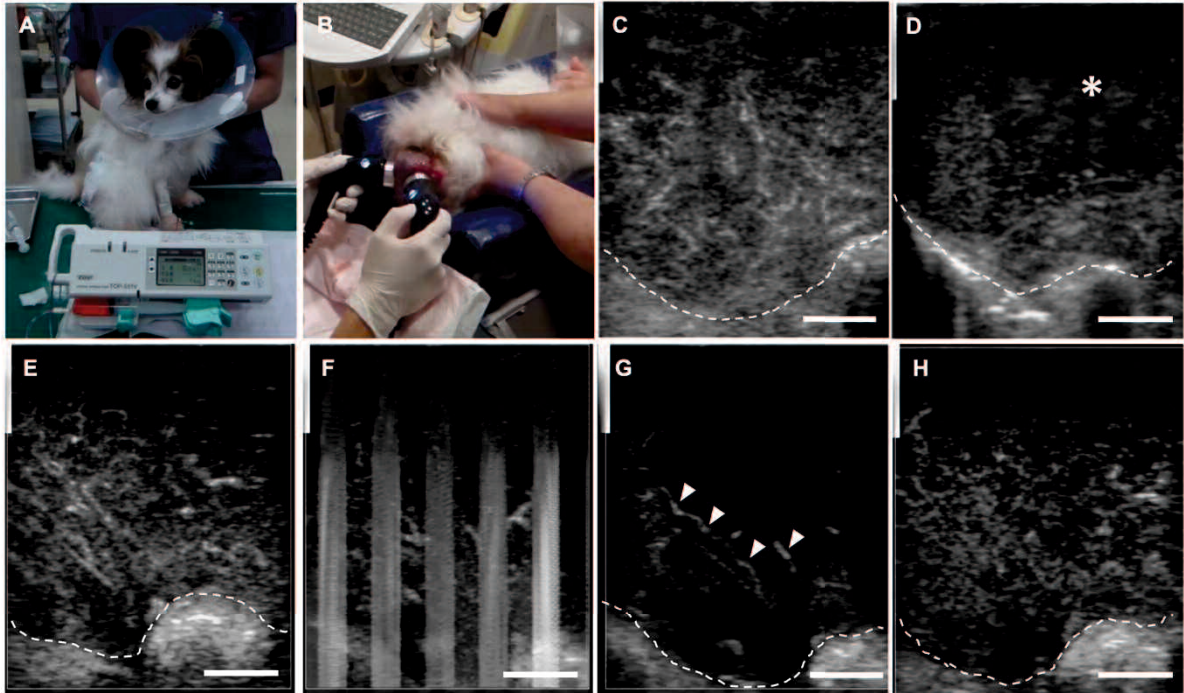


図6. 肛門周囲の血管周皮腫（症例1）に対して実施した，PEG修飾リポソーム化ドキシソルビシン塩酸塩（PEGylated liposomal doxorubicin hydrochloride, PLD），リピッドバブル（Lipid bubbles, LBs）および低強度超音波（low-intensity ultrasound, LIUS）の併用治療に関する画像．（A）症例にPLDを16 mg/m²の用量で20分かけて静脈内投与している．（B）PLDの投与終了後，鎮静下で腫瘍組織に対してLIUSを照射している．LIUS照射中，LBsは5分ごとに静脈内投与されている．（C, D）Day 0の治療前後において，造影超音波検査（contrast-enhanced ultrasonography, CEUS）を実施した際の造影画像．治療の前後にLBsを用いたCEUS（LBs-CEUS）を実施し，造影効果の変化を観察している．白い破線は腫瘍組織の辺縁を表す．（C）治療直前のLBs-CEUSの画像．LBsの投与後80秒時点において，腫瘍組織全体に造影効果が認められる．（D）治療直後のLBs-CEUSの画像．画像右上部分の腫瘍組織に造影効果が減弱した領域が

認められる (アスタリスク). (E-H) Day 0における治療中のLBs-CEUS画像. LBs-CEUSは, LIUSの照射により腫瘍組織内の造影効果にどのような影響が及ぶかをリアルタイムで観察するため, 治療中に実施されている. (E) LIUSの照射前, LBsの投与後40秒時点において, 腫瘍組織全体が造影されている. (F) LIUS照射中, LIUSの照射によって, 白い縦縞模様のアーチファクトが観察されている. (G) LIUSの照射を中断した際の造影画像. LIUSの照射により腫瘍組織の造影効果はほとんど消失し, 照射を中断するとLBsの再灌流により腫瘍組織内の血管系が造影されている (矢頭). (H) LIUSの照射中断後20秒時点での造影画像. LBsが腫瘍組織内全体に再灌流したことにより, 腫瘍組織全体が再び造影されている. スケールバーは1 cmを表す.

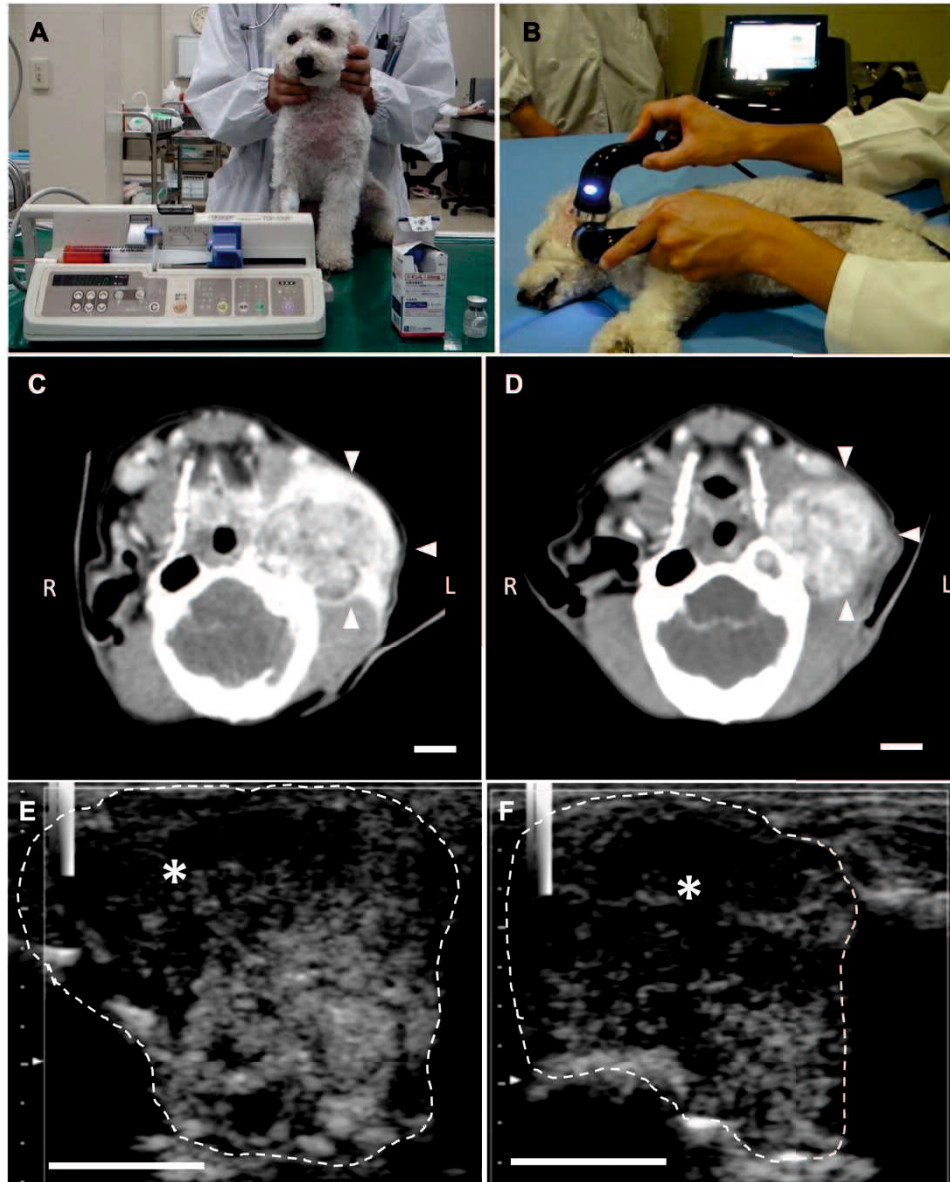


図7. 左耳の耳垢腺癌（症例2）に対して実施した、PEG修飾リポソーム化ドキソルビシン塩酸塩（PEGylated liposomal doxorubicin hydrochloride, PLD）、リピッドバブル（Lipid bubbles, LBs）および低強度超音波（low-intensity ultrasound, LIUS）の併用治療に関する画像。（A）症例にPLDを8–16 mg/m²の用量で20分かけて静脈内投与している。（B）PLDの投与終了後、鎮静下で腫瘍に対してLIUSを照射している。LIUS照射中、LBsは5分ごとに静脈内投与されている。（C, D）症例の造影コンピューター断層撮影画像。（C）Day 0の第1回治療実施前の撮影時点において、腫瘍組織（矢頭）

はヨード系造影剤によって不均質に造影されている。腫瘍組織の浸潤により、左外耳道および鼓室胞の構造が破壊されている。(D) Day 29の第3回治療実施前の撮影時点において、同一に近い断面における腫瘍組織の領域が縮小している。(E, F) Day 29の第3回治療中における、造影超音波検査 (contrast-enhanced ultrasonography, CEUS) の画像。LBsを用いたCEUS (LBs-CEUS) を治療の前後に実施し、腫瘍組織における超音波の造影効果の変化を観察している。白い破線は腫瘍組織の辺縁を表す。(E) 第3回治療直前のLBs-CEUSにおける造影超音波画像。画像上部の腫瘍組織に造影効果が減弱した領域が認められる (アスタリスク)。(F) 画像 (E) とほぼ同一断面における、第3回治療直後の造影超音波画像。画像上部の造影効果が減弱した領域がより拡大して認められる。スケールバーは1 cmを表す。

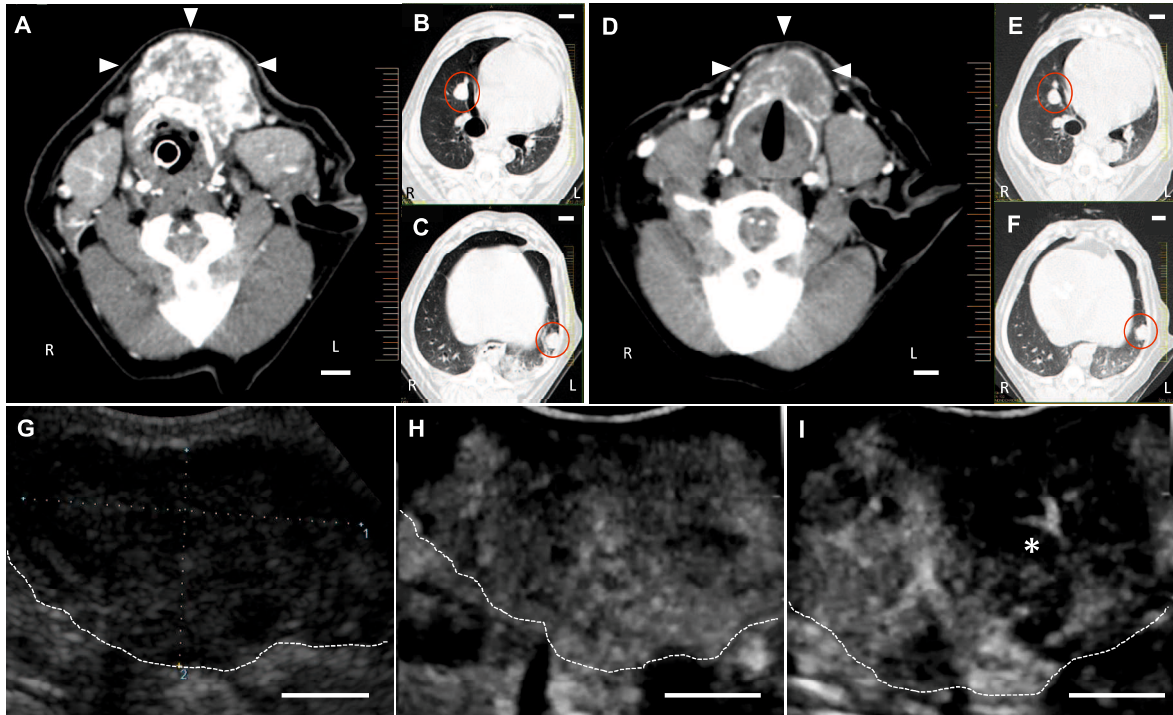


図8. 頸部の甲状腺癌（疑い）（症例3）に対して実施した，治療前後の造影コンピューター断層撮影（computed tomography, CT）およびリピッドバブル（Lipid bubbles, LBs）を用いた造影超音波検査（contrast-enhanced ultrasonography, CEUS）の画像。

（A-C） Day 0における造影CT画像．（A）腫瘍組織（矢頭）は，ヨード系造影剤によって不均質に造影されている．正常な甲状腺は観察されない．（B, C）胸腔内に肺転移を疑う結節（赤丸）が認められる．（D-F） Day 58の第4回治療後における造影CT画像．（D）（A）とほぼ同一断面において，腫瘍組織の領域が縮小している．（E, F）胸腔内の肺転移を疑う結節（赤丸）のサイズの変化は認められない．（G-I） Day 0に実施したLBsを用いたCEUS（LBs-CEUS）における，腫瘍組織の造影超音波画像．LBs-CEUSは各治療の前後に実施され，造影所見の変化を観察している．白い破線は腫瘍組織の辺縁を表す．（G） Day 0の単純超音波検査におけるBモード画像．腫瘍は

低エコー源性を呈する。(H) 第1回治療前におけるLBs-CEUSの造影画像。LBsの投与後30秒時点において、腫瘍組織全体が造影されている。(I) 第1回治療後におけるLBs-CEUSの造影画像。画像中央部の腫瘍組織に造影効果が減弱した領域が認められる(アスタリスク)。スケールバーは1 cmを表す。

4. 考察

LBsは超音波と組み合わせることにより、診断や治療に活用することを目的に開発されてきた。これまで、*in vitro*実験系や*in vivo*実験系において、LBsは超音波と併用することにより造影効果や薬物送達効果を発揮することが示されたが [39, 57, 58]、イヌやヒトに適用された報告はなく、その安全性や造影効果は未だ不明である。そのため本研究では、はじめにLBsの安全性と肝臓における造影効果を評価することを目的として、健常ビーグル犬を用いた基礎的検討を行なった。

健常ビーグル犬を用いた実験では、LBsの短期的安全性を確認するために、LBsを0.015 mL/kgの用量で静脈内に投与し、投与直前と24時間後に血液検査および急性アレルギー症状の観察を実施した。LBs投与前と投与24時間後において、PLT数、BUNおよびCREの値に有意な差が認められたが、それらを含む全ての血液検査の値は基準範囲内であった。また、LBsの投与に関連した粘膜充血、顔面腫脹、食欲不振、活動低下あるいは虚脱といった急性アレルギー症状は認められなかった。以上の結果から、LBsを上記用量で単回投与した場合、健常ビーグル犬において肝障害、腎障害およびアレルギー反応を引き起こす危険性は低いことが考えられた。人医療において、MBs製剤は非常に安全性が高く、心臓、肝臓および腎臓に対する毒性が極めて低いことが知られている [7, 63]。MBs製剤の主要な副作用としてはアナフィラキシー様反応が一般的であるが、その発生率は0.014%と推定され、X線造影剤の副作用の発生率よりも十分に低い [63]。イヌを対象とした過去の研究では、SonoVue

およびソナゾイドの投与によって、急性期のアレルギー症状や臨床病理学的変化は認められず、短期的安全性に優れていたことが報告された [22, 36, 37]. 本実験の結果から、SonoVueやソナゾイドと同様に、LBsはイヌにおいて短期的安全性が高いことが考えられた.

続いて、LBsの静脈内投与後にビーグルの上腹部に対してCEUSを実施し、肝臓における造影効果をSonazoid-CEUSと比較した. Sonazoid-CEUSは、血管相である動脈相、門脈相の後に、肝臓組織が造影されるクッパー相が描出されることが特徴であり [22, 44, 60, 61], これによりイヌの肝臓腫瘍の良悪性鑑別に対して高い診断精度を有する [23, 35]. これは、ソナゾイドが肝静脈洞に存在するクッパー細胞に貪食されるという特性によるものであり [60, 67], 血管相のみが描出される他のMBs製剤を用いたCEUSとは異なる点である. 本実験結果では、Sonazoid-CEUSと同様に、LBs-CEUSにおいて肝門脈だけでなく肝臓組織にも造影効果が認められた. また、両CEUSにおいて、肝門脈および肝臓組織の時間-MGI曲線はほぼ同様の推移を示した. これらの結果から、LBs-CEUSはSonazoid-CEUSと同様に、動脈相、門脈相およびクッパー相を描出したことが示された. LBsはソナゾイドと同様にクッパー細胞に貪食されることにより肝臓組織に対する造影効果を発揮したと考えられたが、その機序については不明であった. 本実験で用いたLBsは、PEG2,000で修飾されたリン脂質から成る外殻を有する. 2017年にSamuelssonらは、*in vitro*および*in vivo*実験系において、PEGで修飾されたりポソームはクッパー細胞による貪食を回避する傾向があ

ることを報告した [43]. 理論上, PEGで修飾されているLBsも同様にクッパー細胞による貪食を回避するべきであるが, 本実験では, 投与したLBsの一部がクッパー細胞に取り込まれた可能性が考えられた. また, Sonazoid-CEUSと比較して, LBs-CEUSにおいて肝門脈のMGIピーク値は有意差がなかった一方で, 肝臓組織のMGIピーク値は有意に低かったことは, LBsがソナゾイドよりも貪食される効率が低いことが原因であった可能性が考えられた. 今後, LBsが肝臓組織に造影効果をもたらす機序の解明には, さらなる研究が必要であると考えられた. また, 本実験結果から, LBs-CEUSにおける各時相の描出タイミングを, 動脈相が約0-30秒, 門脈相が約30秒-2分, クッパー相が約10分以降と定義した. LBs-CEUSにおける各時相の描出タイミングは, イヌの過去の研究報告 [22, 23, 35] におけるSonazoid-CEUSでの三時相の描出タイミングと大きな差異はなかった. 上記結果を基に, 臨床試験での造影プロトコルを決定した.

次に, 肝臓病変の良悪性鑑別におけるLBs-CEUSの有用性を評価するために, 肝臓腫瘍性病変を有するイヌの21例を対象として臨床試験を行った. 全例においてLBsの投与後に肝動脈, 肝門脈および肝臓組織が造影され, LBs-CEUSによって動脈相, 門脈相およびクッパー相を描出することが可能であった. また, LBs-CEUSとSonazoid-CEUSの両方を実施した13例では, 両CEUSの造影所見はすべて一致した. この結果から, LBs-CEUSは臨床例においてSonazoid-CEUSと同等の造影画像を描出したことが示唆された. 全21例において, クッパー相におけるNDの所見は良性病変

と有意に関連し、高い感度、特異度、陽性的中率および陰性的中率を示した。クッパー相におけるCDおよびIDの所見は、悪性腫瘍と有意に関連し、高い感度、特異度、陽性的中率および陰性的中率を示した。これらの結果から、LBs-CEUSでは、クッパー相における造影欠損の所見により、高い精度で肝臓の腫瘍性病変の良悪性鑑別が可能であると考えられた。これは、Sonazoid-CEUSにおいてクッパー相での造影欠損が肝臓腫瘍の良悪性鑑別に最も重要な所見であるとする過去のイヌの報告 [23, 35] やヒトの報告 [18] と一致した。肝臓の良性病変には、クッパー細胞が正常の肝臓組織と同等に存在するが、悪性腫瘍においては、腫瘍組織に置換されることによりクッパー細胞が著しく減少もしくは欠如すると考えられている。そのため、良性病変の場合、内部に存在するクッパー細胞にソナゾイドが貪食されることにより、病変はクッパー相で周囲の肝臓組織と同程度に造影される。一方、悪性腫瘍ではクッパー細胞が欠如しているため病変内でソナゾイドが貪食されず、病変は造影欠損領域として描出される [18, 23, 35, 61]。本臨床試験において、LBs-CEUSはSonazoid-CEUSと同様に、病変内のクッパー細胞の有無をクッパー相として描出したと考えられた。また、本臨床試験において、悪性腫瘍の15例はすべてクッパー相においてCDまたはIDを示した。一方で、良性病変の6例のうち5例はクッパー相でNDを示したが、胆管腺腫の1例のみCDを示した。この結果は、Tamuraらによる最近の研究結果と一致した [53]。Tamuraらの報告では、3例の胆管腺腫に対してSonazoid-CEUSを実施したところ、全例でクッパー相において造影欠損を示した。イヌにおいて、胆管腺腫は低

い立方上皮細胞で裏打ちされた小室からなる嚢胞様の構造をしている [55] ため、胆管腺腫の内部にはクッパー細胞が存在していないと考えられる。このことから、本臨床試験においても、病変内にクッパー細胞が欠如していたことにより、クッパー相において胆管腺腫はCDを呈したと考えられた。

イヌの症例に対するLBsの安全性評価のために、全ての症例において投与直前と直後における急性アレルギー症状を肉眼的に観察した。全21例において、LBsの投与前後において粘膜充血あるいは顔面腫脹の症状は認められず、急性アレルギー症状を引き起こす危険性は低いことが考えられた。本臨床試験における一連の結果から、LBs-CEUSはイヌにおいて安全性に優れ、肝臓腫瘍性病変の良悪性鑑別に有用な検査法であると考えられた。

最後に、切除困難な体表腫瘍を有するイヌの3例に対してPLD, LBsおよびLIUS併用治療を実施し、その有用性を予備的に評価した。PLDは、ドキシソルビシン塩酸塩がPEG2,000に修飾されたリン脂質二重膜に内包された構造を持ち、平均粒子径が約100 nmである [2]。PLDはその粒子径のために腎臓の糸球体での濾過を受けず、またPEG2,000の修飾により細網内皮系細胞から捕捉されにくい。これらの構造的特徴により、PLDはヒトやイヌにおいて投与後に長時間血液中に滞留し、最終的に腫瘍組織に多く蓄積することが知られている [14, 15, 16]。これまで、獣医学領域において、PLDの臨床的な有用性を評価した研究がいくつか報告されている [70]。Vailらは、他に有効な治療手段が得られない種々の悪性腫瘍を有する51例のイヌに対して、

PLDの静脈内投与による治療を行なった [59]. その結果, 51例中5例でCRを, 8例で部分奏功を達成したと報告した. すなわち, 50%以上の腫瘍体積の減少が認められた症例は, 51例中13例 (25.5%) のみであった. Sorenmoらは, 脾臓血管肉腫の14匹のイヌを対象に, 脾臓摘出術後の補助療法としてPLDの腹腔内投与を実施し, その後の臨床転帰を観察した [51]. その結果, 生存期間に有意な延長は認められず, 14例中12例が死後解剖により血管肉腫に関連した死亡であることが確認された. このように, 獣医学領域において, 悪性腫瘍に対するPLD単独投与の治療効果は十分とは言えない. 一方, 本臨床試験では, 腫瘍の種類は過去の報告とは異なっていたが, PLDおよびLBsの投与とLIUS照射を併用することにより3例のイヌすべてで腫瘍体積は50%以下に減少した. 特に, 甲状腺癌が疑われた症例3では, LIUSを照射した頸部の原発腫瘍のみ腫瘍体積が減少し, LIUSを照射しなかった肺の転移病巣に大きさの変化は認められなかった. すなわち, LBs投与下でLIUSを照射することにより, 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た. 以上のことから, PLD, LBsおよびLIUS併用治療は, 切除困難なイヌの体表腫瘤に対して有用な治療法となる可能性が示された.

2016年に, Dimcevskiらは, 既存のMBsであるSonoVueと診断用超音波を用いて, 抗がん剤であるゲムシタビンの治療効果の増強を試みた第I相臨床試験の結果を報告した [10]. この臨床試験では, 外科手術が不適応なヒトの膵臓がん患者10例を対象に, ゲムシタビンを持続点滴で静脈内投与した後, SonoVueを間欠的に投与しなが

ら診断用超音波を病変に照射した。その結果、10例中5例の患者に腫瘍径の縮小や治療サイクル数の増加などの肯定的な成果が得られた。Dimceovskiらは、SonoVueと診断用超音波により腫瘍細胞内へのゲムシタビン取り込みが潜在的に増加したことが、良好な治療結果が得られた要因であったと考察した。我々の第一章の研究結果では、LBsを投与した後にマウスの腫瘍組織へLIUSを照射することで、PLDの腫瘍組織内への蓄積が増加し、それによりPLDの抗腫瘍効果が増強されたことが示唆された [68]。また、Shimizuらの*in vitro*実験により、超音波照射により生じたLBsの振動や圧壊が、血管内皮細胞間隙の拡大や細胞膜の可逆性の損傷を生じ、結果として局所的な血管透過性の亢進が起こることが示された [45]。これらのことから、本臨床試験で認められた治療効果は、以下のような一連の潜在的な機序によって得られたと考えられた。LIUSの照射によりLBsの振動や圧壊が生じ、それにより腫瘍組織内の血管透過性が亢進した。そして、PLDの腫瘍組織内への蓄積が増加し、結果としてPLDの抗腫瘍効果が強く発現した。また、別の機序として、LBsとLIUSによって腫瘍組織内の微小血管が直接損傷を受けたことにより、腫瘍組織に部分的な虚血を引き起こした可能性が考えられた。過去の*in vivo*実験系の報告では、血管内投与したMBsが超音波の照射を受けると、その機械的作用の強度によっては毛細血管に直接損傷が生じることが示唆された [46]。本臨床試験では、治療前後に腫瘍組織へのLBs-CEUSを行った際、治療後にのみ腫瘍組織内部に部分的な造影効果の減弱が生じた。この所見が認められた理由は不明であるが、LBsとLIUSの併用により腫瘍組織

内の血管壁が損傷されたことによって微小血栓が形成され、LBsの腫瘍組織への流入が妨げられたことが原因であった可能性が考えられた。

本研究にはいくつかの限界が存在する。本研究では健常ビーグル犬および腫瘍罹患犬を対象にLBsの安全性について検討した。健常ビーグル犬を用いた実験では、LBsは単一の用量で単回の投与が行われたのみである。また、血液検査の項目は限られており、LBs投与24時間後の一時点のみの検査にとどまっている。また、本実験では遅発性の副作用の評価は実施されなかった。実際の臨床においては、LBsを短時間に繰り返し投与する場面や、より高用量で投与する状況の発生が十分に想定される。したがって、イヌにおけるLBsの安全性をより詳細に評価するために、健常犬に対して、十分な観察期間と検査項目を設けた反復投与試験や高用量投与試験を実施する必要がある。また、肝臓腫瘍性病変に対するCEUSの臨床試験では、LBsの投与直後における有害事象の評価を実施し、急性アレルギー症状を引き起こす危険性が低いことが明らかになった。一方、血液検査や亜急性および遅発性の有害事象の観察は実施されなかった。また、本臨床試験により、肝臓の腫瘍性病変の良悪性鑑別におけるLBs-CEUSの有用性が明らかになったが、本臨床研究では組み入れられた症例数が限定的であったため、病変ごとのCEUS所見を詳細に言及することは適切ではなかった。今後は、LBs-CEUSに関連した血液学的な変化や亜急性および遅発性の副作用を評価するため、および各病変に特徴的なLBs-CEUS所見を明らかにするために、より多くの症例を組み入れた、詳細な有害事象の評価を伴う臨床試験の実

施が必要である。LBsの腫瘍治療への応用に関して、PLD, LBsおよびLIUS併用治療の有用性を評価することを目的に臨床試験を実施した結果、体表に形成された切除困難なイヌの固形腫瘍に対して有用な治療法である可能性が示された。しかし、研究計画としては予備的試験にとどまっており、PLD, LBsおよびLIUS併用治療の詳細な治療効果と安全性を評価するためには、より多くの症例を組み入れた前向き臨床試験へと進めていく必要がある。

5. 小括

本研究において、LBsは初めてイヌに適用され、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、イヌの症例を対象とした臨床試験によって、LBs-CEUSが肝臓腫瘍性病変の良悪性鑑別に有用であることが示唆された。さらに、PLDおよびLBsの投与およびLIUS照射の併用治療が、切除困難な体表腫瘍に対して、有効な治療法となる可能性が示された。以上のことから、本研究は、LBsを用いた超音波セラノスティクスの獣医臨床応用に向けた、重要な基礎的および臨床的検討となった。ただし、本研究で実施された臨床試験では対象となった症例数が少なかったため、より多くの症例を組み入れた前向き臨床試験を実施することにより、その臨床的有用性についてさらに詳細な評価を行う必要がある。

総括

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、機序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。本研究の*in vivo*実験系で得られた知見から、LBsとLIUSの併用によって様々な薬物を腫瘍組織に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。本研究のイヌを用いた一連の実験系では、LBsを用いた超音波セラノスティクスの実現に向けた初めての予備的臨床試験を実施しており、トランスレーショナルリサーチの足掛かりとして重要な証拠となることが期待される。

参考文献

1. Aoki, I. 2016. Nano-theranostics and Nitroxyl Radical-labeled Antitumor Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Yakugaku Zasshi* **136**: 1087–1091.
2. Barenholz, Y. 2012. Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Control. Release* **160**: 117–134.
3. Bush, N., Healey, A., Shah, A., Box, G., Kirkin, V., Eccles, S., Sontum, P. C., Kotopoulis, S., Kvåle, S., Wamel, A. van, Davies, C. de L. and Bamber, J. 2020. Theranostic Attributes of Acoustic Cluster Therapy and Its Use for Enhancing the Effectiveness of Liposomal Doxorubicin Treatment of Human Triple Negative Breast Cancer in Mice. *Front. Pharmacol.* **11**: 75.
4. Chabner, B. A. and Roberts, T. G. 2005. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* **5**: 65–72.
5. Chen, X. S. 2011. Introducing Theranostics Journal – From the Editor-in-Chief. *Theranostics* **1**: 1–2.
6. Chidambaram, M., Manavalan, R. and Kathiresan, K. 2011. Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **14**: 67–77.

7. Claudon, M., Dietrich, C. F., Choi, B. I., Cosgrove, D. O., Kudo, M., Nolsøe, C. P., Piscaglia, F., Wilson, S. R., Barr, R. G., Chammas, M. C., Chaubal, N. G., Chen, M.-H., Clevert, D. A., Correas, J. M., Ding, H., Forsberg, F., Fowlkes, J. B., Gibson, R. N., Goldberg, B. B., Lassau, N., Leen, E. L. S., Mattrey, R. F., Moriyasu, F., Solbiati, L., Weskott, H.-P. and Xu, H.-X. 2013. Guidelines and Good Clinical Practice Recommendations for Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS) in the Liver – Update 2012. *Ultrasound. Med. Biol.* **39**: 187–210.
8. Couture, O., Foley, J., Kassell, N. F., Larrat, B. and Aubry, J.-F. 2014. Review of ultrasound mediated drug delivery for cancer treatment: updates from pre-clinical studies. *Transl. Cancer Res.* **3**: 494–511.
9. Danhier, F. 2016. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J. Control. Release* **244**: 108–121.
10. Dimcevski, G., Kotopoulis, S., Bjånes, T., Hoem, D., Schjøtt, J., Gjertsen, B. T., Biermann, M., Molven, A., Sorbye, H., McCormack, E., Postema, M. and Gilja, O. H. 2016. A human clinical trial using ultrasound and microbubbles to enhance gemcitabine treatment of inoperable pancreatic cancer. *J. Control. Release* **243**: 172–181.

11. Egawa, G., Nakamizo, S., Natsuaki, Y., Doi, H., Miyachi, Y. and Kabashima, K. 2013. Intravital analysis of vascular permeability in mice using two-photon microscopy. *Sci. Rep.* **3**: 1932.
12. Fang, J., Nakamura, H. and Maeda, H. 2011. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**: 136–151.
13. Fujishiro, S., Mitsumori, M., Nishimura, Y., Okuno, Y., Nagata, Y., Hiraoka, M., Sano, T., Marume, T. and Takayama, N. 2009. Increased heating efficiency of hyperthermia using an ultrasound contrast agent: A phantom study. *Int. J. Hyperthermia* **14**: 495–502.
14. Gabizon, A. A., Barenholz, Y. and Bialer, M. 1993. Prolongation of the Circulation Time of Doxorubicin Encapsulated in Liposomes Containing a Polyethylene Glycol-Derivatized Phospholipid: Pharmacokinetic Studies in Rodents and Dogs. *Pharm. Res.* **10**: 703–708.
15. Gabizon, A., Catane, R., Uziely, B., Kaufman, B., Safra, T., Cohen, R., Martin, F., Huang, A. and Barenholz, Y. 1994. Prolonged Circulation Time and Enhanced Accumulation in Malignant Exudates of Doxorubicin Encapsulated in Polyethylene-glycol Coated Liposomes. *Cancer Res.* **54**: 987–992.

16. Gabizon, A., Shmeeda, H. and Barenholz, Y. 2003. Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin. Pharmacokinet.* **42**: 419–436.
17. Golombek, S. K., May, J.-N., Theek, B., Appold, L., Drude, N., Kiessling, F. and Lammers, T. 2018. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **130**: 1–22.
18. Hatanaka, K., Kudo, M., Minami, Y., Ueda, T., Tatsumi, C., Kitai, S., Takahashi, S., Inoue, T., Hagiwara, S., Chung, H., Ueshima, K. and Maekawa, K. 2008. Differential Diagnosis of Hepatic Tumors: Value of Contrast-Enhanced Harmonic Sonography Using the Newly Developed Contrast Agent, Sonazoid. *Intervirolgy* **51**: 61–69.
19. Hofmann, M., McCormack, E., Mujic, M., Roßberg, M., Bernd, A., Bereiter-Hahn, J., Gjertsen, B. T., Wiig, H. and Kippenberger, S. 2009. Increased Plasma Colloid Osmotic Pressure Facilitates the Uptake of Therapeutic Macromolecules in a Xenograft Tumor Model. *Neoplasia* **11**: 812–822.
20. Hori, K., Suzuki, M., Tanda, S., Saito, S., Shinozaki, M. and Zhang, Q. H. 1991. Fluctuations in Tumor Blood Flow under Normotension and the Effect of Angiotensin II-induced Hypertension. *Jpn. J. Cancer Res.* **82**: 1309–1316.

21. Jong, N. D., Frinking, P. J. A., Bouakaz, A., Goorden, M., Schourmans, T., Jingping, X. and Mastik, F. 2000. Optical imaging of contrast agent microbubbles in an ultrasound field with a 100-MHz camera. *Ultrasound Med. Biol.* **26**: 487–492.
22. Kanekoto, H., Ohno, K., Nakashima, K., Takahashi, M., Fujino, Y. and Tsujimoto, H. 2008. Vascular and kupffer imaging of canine liver and spleen using the new contrast agent sonazoid. *J. Vet. Med. Sci.* **70**: 1265–1268.
23. Kanemoto, H., Ohno, K., Nakashima, K., Takahashi, M., Fujino, Y., Nishimura, R. and Tsujimoto, H. 2009. Characterization of canine focal liver lesions with contrast-enhanced ultrasound using a novel contrast agent-Sonazoid. *Vet. Radiol. Ultrasound* **50**: 188–194.
24. Kelkar, S. S. and Reineke, T. M. 2011. Theranostics: Combining imaging and therapy. *Bioconjug. Chem.* **22**: 1879–1903.
25. Kiessling, F., Fokong, S., Koczera, P., Lederle, W. and Lammers, T. 2012. Ultrasound Microbubbles for Molecular Diagnosis, Therapy, and Theranostics. *J. Nucl. Med.* **53**: 345–348.
26. Kondo, T., Umemura, S., Tanabe, K., Ogawa, R., Adachi, I. and Riesz, P. 2000. Novel Therapeutic Applications of Ultrasound. Utilization of Thermal and Cavitation Effects. *Jpn. J. Hyperthermic Oncol.* **16**: 203–216.

27. Kotopoulos, S., Stigen, E., Popa, M., Safont, M. M., Healey, A., Kvåle, S., Sontum, P., Gjertsen, B. T., Gilja, O. H. and McCormack, E. 2017. Sonoporation with Acoustic Cluster Therapy (ACT®) induces transient tumour volume reduction in a subcutaneous xenograft model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Control. Release* **245**: 70–80.
28. Kudo, N., Okada, K. and Yamamoto, K. 2009. Sonoporation by Single-Shot Pulsed Ultrasound with Microbubbles Adjacent to Cells. *Biophys. J.* **96**: 4866–4876.
29. Liu, H.-L., Fan, C.-H., Ting, C.-Y. and Yeh, C.-K. 2014. Combining Microbubbles and Ultrasound for Drug Delivery to Brain Tumors: Current Progress and Overview. *Theranostics* **4**: 432–444.
30. Lu, C.-T., Zhao, Y.-Z., Wu, Y., Tian, X.-Q., Li, W.-F., Huang, P.-T., Li, X.-K., Sun, C.-Z. and Zhang, L. 2010. Experiment on enhancing antitumor effect of intravenous epirubicin hydrochloride by acoustic cavitation in situ combined with phospholipid-based microbubbles. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **68**: 343–348.
31. Maeda, H. 2001. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **41**: 189–207.

32. Martin, K. H. and Dayton, P. A. 2013. Current status and prospects for microbubbles in ultrasound theranostics. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **5**: 329–345.
33. Matsumura, Y. and Maeda, H. 1986. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **46**: 6387–6392.
34. Minchinton, A. I. and Tannock, I. F. 2006. Drug penetration in solid tumours. *Nat. Rev. Cancer* **6**: 583–592.
35. Nakamura, K., Takagi, S., Sasaki, N., Kumara, W. R. B., Murakami, M., Ohta, H., Yamasaki, M. and Takiguchi, M. 2010. Contrast-enhanced ultrasonography for characterization of canine focal liver lesions. *Vet. Radiol. Ultrasound* **51**: 79–85.
36. Nyman, H. T., Kristensen, A. T., Kjelgaard-Hansen, M. and McEvoy, F. J. 2005. Contrast-enhanced ultrasonography in normal canine liver. Evaluation of imaging and safety parameters. *Vet. Radiol. Ultrasound* **46**: 243–250.
37. O'Brien, R. T., Iani, M., Matheson, J., Delaney, F. and Young, K. 2004. Contrast harmonic ultrasound of spontaneous liver nodules in 32 dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound* **45**: 547–553.

38. Ogawara, K., Un, K., Tanaka, K., Higaki, K. and Kimura, T. 2009. In vivo anti-tumor effect of PEG liposomal doxorubicin (DOX) in DOX-resistant tumor-bearing mice: Involvement of cytotoxic effect on vascular endothelial cells. *J. Control. Release* **133**: 4–10.
39. Omata, D., Maruyama, T., Unga, J., Hagiwara, F., Munakata, L., Kageyama, S., Shima, T., Suzuki, Y., Maruyama, K. and Suzuki, R. 2019. Effects of encapsulated gas on stability of lipid-based microbubbles and ultrasound-triggered drug delivery. *J. Control. Release* **311–312**: 65–73.
40. Omata, D., Suzuki, R., Unga, J. and Maruyama, K. 2018. 超音波とマイクロバブルによるセラノステイクス. *Drug Deliv. Syst.* **33**: 190–196.
41. Paefgen, V., Doleschel, D. and Kiessling, F. 2015. Evolution of contrast agents for ultrasound imaging and ultrasound-mediated drug delivery. *Front. Pharmacol.* **6**: 197.
42. Petersen, G. H., Alzghari, S. K., Chee, W., Sankari, S. S. and La-Beck, N. M. 2016. Meta-analysis of clinical and preclinical studies comparing the anticancer efficacy of liposomal versus conventional non-liposomal doxorubicin. *J. Control. Release* **232**: 255–264.

43. Samuelsson, E., Shen, H., Blanco, E., Ferrari, M. and Wolfram, J. 2017. Contribution of Kupffer cells to liposome accumulation in the liver. *Colloids. Surf. B. Biointerfaces*. **158**: 356–362.
44. Sasaki, S., Iijima, H., Moriyasu, F. and waki, H. 2009. Definition of contrast enhancement phases of the liver using a perfluoro-based microbubble agent, perflubutane microbubbles. *Ultrasound Med. Biol.* **35**: 1819–1827.
45. Shimizu, R., Suzuki, R. and Kudo, N. Visualization of Endothelial Cell Damage Caused by Ultrasonically Induced Microbubble Oscillation Inside a Capillary Phantom. Paper presented at the 2020 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS). September 7–11. Las Vegas. NV.
46. Skyba, D. M., Price, R. J., Linka, A. Z., Skalak, T. C. and Kaul, S. 1998. Direct in vivo visualization of intravascular destruction of microbubbles by ultrasound and its local effects on tissue. *Circulation* **98**: 290–293.
47. Solomon, R. and Gabizon, A. A. 2011. Clinical Pharmacology of Liposomal Anthracyclines: Focus on Pegylated Liposomal Doxorubicin. *Clin. Lymphoma Myeloma* **8**: 21–32.

48. Song, K.-H., Fan, A. C., Hinkle, J. J., Newman, J., Borden, M. A. and Harvey, B. K. 2017. Microbubble gas volume: A unifying dose parameter in blood-brain barrier opening by focused ultrasound. *Theranostics* **7**: 144–152.
49. Sonoda, S., Tachibana, K., Uchino, E., Yamashita, T., Sakoda, K., Sonoda, K.-H., Hisatomi, T., Izumi, Y. and Sakamoto, T. 2007. Inhibition of melanoma by ultrasound-microbubble-aided drug delivery suggests membrane permeabilization. *Cancer Biol. Ther.* **6**: 1276–1283.
50. Sorace, A. G., Warram, J. M., Umphrey, H. and Hoyt, K. 2011. Microbubble-mediated ultrasonic techniques for improved chemotherapeutic delivery in cancer. *J. Drug Target.* **20**: 43–54.
51. Sorenmo, K., Samluk, M., Clifford, C., Baez, J., Barrett, J. S., Poppenga, R., Overley, B., Skorupski, K., Oberthaler, K., Winkle, T. V., Seller, G. and Shofer, F. 2007. Clinical and Pharmacokinetic Characteristics of Intracavitary Administration of Pegylated Liposomal Encapsulated Doxorubicin in Dogs with Splenic Hemangiosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* **21**: 1347–1354.
52. Suzuki, R., Oda, Y., Omata, D., Nishiie, N., Koshima, R., Shiono, Y., Sawaguchi, Y., Unga, J., Naoi, T., Negishi, Y., Kawakami, S., Hashida, M. and Maruyama, K. 2016.

- Tumor growth suppression by the combination of nanobubbles and ultrasound. *Cancer Sci.* **107**: 217–223.
53. Tamura, M., Nakamura, K., Osuga, T., Shimbo, G., Sasaki, N., Morishita, K., Ohta, H. and Takiguchi, M. 2019. Findings of contrast-enhanced ultrasonography with Sonazoid for cholangiocellular adenoma in three dogs. *J. Vet. Med. Sci.* **81**: 1104–1108.
54. Taurin, S., Nehoff, H. and Greish, K. 2012. Anticancer nanomedicine and tumor vascular permeability; Where is the missing link? *J. Control. Release* **164**: 265–275.
55. Trigo, F. J., Thompson, H., Breeze, R. G. and Nash, A. S. 1982. The pathology of liver tumours in the dog. *J. Comp. Pathol.* **92**: 21–39.
56. Ueno, Y., Sonoda, S., Suzuki, R., Yokouchi, M., Kawasoe, Y., Tachibana, K., Maruyama, K., Sakamoto, T. and Komiya, S. 2014. Combination of ultrasound and bubble liposome enhance the effect of doxorubicin and inhibit murine osteosarcoma growth. *Cancer Biol. Ther.* **12**: 270–277.
57. Unga, J., Kageyama, S., Suzuki, R., Omata, D. and Maruyama, K. 2019. Scale-up production, characterization and toxicity of a freeze-dried lipid-stabilized microbubble formulation for ultrasound imaging and therapy. *J. Liposome Res.* **30**: 297–304.

58. Unga, J., Omata, D., Kudo, N., Ueno, S., Munakata, L., Shima, T., Suzuki, R. and Maruyama, K. 2019. Development and evaluation of stability and ultrasound response of DSPC-DPSG-based freeze-dried microbubbles. *J. Liposome Res.* **29**: 368–374.
59. Vail, D. M., Kravis, L. D., Cooley, A. J., Chun, R. and MacEwen, E. G. 1997. Preclinical trial of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes in dogs with spontaneously arising malignant tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **39**: 410–416.
60. Watanabe, R., Matsumura, M., Chen, C. J., Kaneda, Y. and Fujimaki, M. 2005. Characterization of tumor imaging with microbubble-based ultrasound contrast agent, sonazoid, in rabbit liver. *Biol. Pharm. Bull.* **28**: 972–977.
61. Watanabe, R., Matsumura, M., Chen, C. J., Kaneda, Y., Ishihara, M. and Fujimaki, M. 2003. Gray-scale liver enhancement with Sonazoid (NC100100), a novel ultrasound contrast agent; detection of hepatic tumors in a rabbit model. *Biol. Pharm. Bull.* **26**: 1272–1277.
62. Watanabe, Y., Aoi, A., Horie, S., Tomita, N., Mori, S., Morikawa, H., Matsumura, Y., Vassaux, G. and Kodama, T. 2008. Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin. *Cancer Sci.* **99**: 2525–2531.

63. Wilson, S. R. and Burns, P. N. 2010. Microbubble-enhanced US in Body Imaging: What Role? *Radiology* **257**: 24–39.
64. Wu, M., Li, L., Wang, J., Zhang, Y., Guo, Q., Li, X. and Zhang, X. 2018. Contrast-enhanced US for characterization of focal liver lesions: a comprehensive meta-analysis. *Eur. Radiol.* **28**: 2077–2088.
65. Wu, S.-Y., Chen, C. C., Tung, Y.-S., Olumolade, O. O. and Konofagou, E. E. 2015. Effects of the microbubble shell physicochemical properties on ultrasound-mediated drug delivery to the brain. *J. Control. Release* **212**: 30–40.
66. Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Felix, R. and Schlag, P. M. 2002. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* **3**: 487–497.
67. Yanagisawa, K., Moriyasu, F., Miyahara, T., Yuki, M. and Iijima, H. 2007. Phagocytosis of ultrasound contrast agent microbubbles by Kupffer cells. *Ultrasound Med. Biol.* **33**: 318–325.
68. Yokoe, I., Omata, D., Unga, J., Suzuki, R., Maruyama, K., Okamoto, Y. and Osaki, T. 2021. Lipid bubbles combined with low-intensity ultrasound enhance the intratumoral

- accumulation and antitumor effect of pegylated liposomal doxorubicin in vivo. *Drug Deliv.* **28**: 530–541.
69. Yuan, F., Leunig, M., Huang, S. K., Papahadjopoulos, D. and Jam, R. K. 1994. Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res.* **54**: 3352–3356.
70. Zabielska-Koczywaś, K. and Lechowski, R. 2017. The use of liposomes and nanoparticles as drug delivery systems to improve cancer treatment in dogs and cats. *Molecules* **22**: 2167.
71. Zhu, F., Jiang, Y., Luo, F. and Li, P. 2015. Effectiveness of localized ultrasound-targeted microbubble destruction with doxorubicin liposomes in H22 mouse hepatocellular carcinoma model. *J. Drug Target.* **23**: 323–334.
72. 丸山一雄 2017. リピッドバブルと超音波によるセラノステイクスシステム. 日本音響学会誌 **73**: 432–439.

謝辞

本研究は，日本学術振興会科研費（JP18K12060）の研究助成を受けて遂行されました。

本研究の遂行および本論文の作成を進めるにあたり，多くの方のご指導とご助力を賜りました。この場を借りて，感謝の意を述べさせていただきます。

主指導教員である鳥取大学獣医外科学教室 大崎智弘准教授には，研究者として未熟な私の意見を常に尊重していただき，時に厳しく，時にあたたかくご指導をいただきました。心より感謝申しあげます。また，懇切丁寧なご指導およびご助言をいただいた副指導教員の鳥取大学獣医内科学教室 原田和記准教授および山口大学獣医外科学教室 谷健二教授に深く御礼申しあげます。

鳥取大学獣医外科学教室 岡本芳晴教授，鳥取大学獣医画像診断学教室 今川智敬教授，村端悠介准教授，鳥取大学獣医臨床検査学教室 竹内崇教授および鳥取大学獣医病理学教室 寸田祐嗣准教授には，実験手技の習得，実験結果の解釈，学術論文の執筆および学位論文の作成に関して，多大なるご指導およびご支援をいただきました。厚く御礼申しあげます。

鳥取大学獣医神経病腫瘍学教室 伊藤典彦准教授，鳥取大学獣医画像診断学教室 柄武志准教授，鳥取大学農学部附属動物医療センター 山下真路特命助教，天羽隆男特命助教には，研究の進捗に関して適切にご指導およびご助言いただきました。心より感謝申しあげます。

徳島大学生物資源産業学部 宇都義浩教授には、マウス乳腺腫瘍細胞である EMT6をご提供いただきました。帝京大学薬物送達学研究室 鈴木亮教授，小俣大樹講師，帝京大学セラノステイクス学講座 丸山一雄特任教授には，リピッドバブルをご調製およびご提供いただきました。鳥取大学獣医解剖学教室 保坂善真教授には，クライオスタットの借用をご快諾いただきました。伊藤超短波株式会社には，治療用超音波機器をご貸与いただきました。これらのご支援無くして，本研究の完遂は成し得ませんでした。厚く御礼を申し上げます。

本研究に関する実験および臨床試験の実施に多大なるご協力をいただきました，鳥取大学獣医外科学教室，獣医神経病腫瘍学教室および獣医画像診断学教室の学生，大学院生およびスタッフの皆様，また，鳥取大学農学部附属動物医療センターのスタッフの皆様に，心より感謝の意を表します。

大学院での研究遂行にあたり，常に私を理解し，支え，励ましてくれた妻の美由紀，娘の紗と蘭，姉の唯そして両親に深く感謝申し上げます。

最後に，臨床試験にご協力いただいた症例犬とそこにご家族に心からの御礼を申し上げます。また，実験に際して尊い命を頂戴した多くの動物たちに，深く感謝の意を表するとともに，その魂が安らかに眠らんことを心よりお祈り申し上げます。