

**厚生労働科学研究研究費補助金**

**感覚器障害研究事業**

**レーザー細隙灯とリポソームによる加齢黄斑変性症への  
光化学療法に関する研究**

**平成14年度 総括研究報告書**

**主任研究者 西脇 弘一**

**平成15（2003）年 4月**

## 目次

### I. 研究報告

レーザー細隙灯とリポソームによる加齢黄斑変性症への光化学療法に関する研究  
西脇弘一・・・1

(資料)

- 温度感受性リポソーム・・・6
- 網脈絡膜診断・治療機器「SL-PDT」の開発・・・12

II. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・18

III. 研究成果の刊行物・別刷・・・19

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

研究報告書

レーザー細隙灯とリポソームによる加齢黄斑変性症への光化学療法に関する研究

主任研究者：京都大学医学研究科助手

西脇弘一

研究要旨：3種類のレーザーを組み込んだ細隙灯顕微鏡を開発しそれを用いて脈絡膜循環の評価や経瞳孔的温熱療法における実際の生体温度のモニタリングを行った。このシステムを使った新生血管の光化学療法に向けての研究が現在進行している。

A. 研究目的

加齢黄斑変性症は年々増加する極めて失明率の高い疾患である。現在有効とされている治療法はレーザーによる光凝固療法であるが、蛍光眼底撮影法で境界鮮明に描出される脈絡膜新生血管に対しては有効であるが、境界の不明な新生血管には無治療と同じ効果しかないことが示されている。しかも患者の80%は中心窩の新生血管を持つため光凝固治療の適応にならず無治療の状態である。最近、各種の表層癌の臨床治療に用いられ注目されている光化学療法が、眼科領域でも脈絡膜新生血管に応用され米国にて臨床試験がおこなわれている。利点として光凝固治療に比べて組織破壊が少ないことがあげられ、網膜中心窩に新生血管のある患者の治療に試験的に使われているが、今までの発表結果では治療後6週以内に50%以上が再発が認められ、平均3.4回の治療を受けなくてはならない。この光化学療法を成功させるためには、限局的に高濃度に効率良く脈絡膜新生血管だけに薬物をデリバリーするシステムを開

発することが必要である。申請者が米国ジョーンズホプキンス大学 Zeimer 教授と協同で開発してきた温度感受性リポソームを用いた薬物送達システムは、41度で相転移を起こし内包した薬物を放出するリポソームを静注し、低出力レーザーで標的とする網脈絡膜を局所的に暖めることで、高濃度の薬物を局所的に薬物送達できる画期的なシステムである。そこで、光感受性物質を温度感受性リポソームに内包し、今までのシステムに光化学療法装置を組み込むことで、脈絡膜新生血管に選択的に薬物を送達し光化学療法の効果を増強し、かつ周囲の組織の障害を軽減することができる。本研究により、光凝固などの治療の適応にならず経過観察せざるを得なかった多くの加齢黄斑変性症の患者を救うことができ、我が国で増加する加齢黄斑変性症の患者の Quality of Life を高めることで社会的貢献度は高い。

B. 研究方法

現有する細隙灯顕微鏡にアルゴンレーザ

ーを組み込んで、まずアルゴンレーザー細隙灯顕微鏡を作成する。ラット、ウサギおよびカニクイザルに上記で作成した細隙灯顕微鏡を用いて蛍光眼底撮影を行い、レーザーの網膜での安全性を確かめる。その後照準温熱用のレーザー、リポソームから放出された光感受性物質を励起させラジカルを産生させるための治療用ダイオードレーザーの2つのレーザーを、光ファイバーで細隙灯顕微鏡に導入する。3種類の用途のレーザーの発振のタイミングをあわせるために、レーザー発振装置と細隙灯顕微鏡の間にリレーおよびコンピューターを挿入し、レーザー発射の時期、時間、出力をコンピューター制御できるシステムを作成する。また、細隙灯顕微鏡にCCDカメラおよび画像エンハンサーを接続して、得られた画像をデジタル化してDVDにて録画し、デジタル画像をコンピューターで解析できるシステムを作る。41度で相転移するリン脂質であるDPPCを主材料にして、第3世代光感受性色素であるフタロサイアニンなどを内包した温度感受性リポソームを作成する。作成したリポソームの粒径が400nmを越えないように、エクストルーダーでリポソームの粒径を揃えた後、ゲルろ過法を用いて内包されなかった蛍光色素を除去する。作成したリポソームが予想した41度で相転移を起こし、且つ体温（37度）で内包された薬物の漏出がないかどうかを生体中でヒト血清を用いてインキュベーションし、その後漏出した蛍光色素と内包されたままの蛍光色素の比を蛍光測定器で測定し、リポソームの温度感受性を調べる。またリン脂質と

してDPPC, DPPG, DSPCを様々な割合で混合することにより、様々な温度で相転移するリポソームを作成する。作成したリポソームが体内循環内で安定して存在し、かつ全身に大きな副作用がないか調べるために、ラットに静注しその後静脈血を採取し、薬物濃度の測定および一般血液検査を行う。ラットにおいてレーザーの強凝固を眼底に行い、脈絡膜新生血管のモデルを作成する。上記で作成したカルボキシフルオレセインを内包した温度感受性リポソームおよび細隙灯顕微鏡カメラシステムで、ラット新生血管が明確に描出され、コンピューターによる制御が行われるか評価する。新生血管では周囲の正常脈絡膜毛細血管に比べて血流が遅いことを調べるために、リポソームに内包した蛍光色素を新生血管周囲で放出させ、その後の蛍光色素の流れを経時的に撮影し画像解析する。そして蛍光色素が新生血管にのみ存在し、その周囲の正常脈絡膜毛細血管にはみられなくなった時期を調べ光化学療法タイミングを計測する。ラット新生血管モデルを用いて、光感受性物質およびカルボキシフルオレセインを内包したリポソームを静注した後、温熱用レーザーによる薬物のリポソームの放出、薬物が新生血管にのみ存在し周囲の正常循環から消えた時期に、ダイオードレーザーによる照射による光化学療法を行い、新生血管のみを閉塞し周囲の組織を障害せずに治療できるかどうか評価する。評価法は蛍光ビデオ眼底造影を治療前と治療後で比べ、組織学的に治療効果を評価する。最終的にはヒトに近いカニクイザルの脈絡膜新生血

管モデルを作成し、本法での治療効果および全身への影響を評価する。

(倫理面への配慮)

動物に対する取り扱いに関しては学内および学外の動物研究所の規定に従った。また眼科領域では標準となっているARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology)の定めるガイドラインに準拠した。

### C. 研究結果

眼底観察用に用いるアルゴンレーザー、眼底を41度程度に暖めリポソームに内包した蛍光物質および光感受性物質を放出させるための温熱照準用のレーザー、リポソームから放出された光感受性物質を励起させラジカルを産生させるための治療用ダイオードレーザーの3波長レーザーを組み込んだ改良型細隙灯顕微鏡をトプコン社と協同開発した。以前用いていた眼底カメラは光路上の制約が多く、途中での光量の損失が大きいという欠点が判明した。一方細隙灯顕微鏡は臨床上でもレーザーを人眼に照射するときを使い、レーザーを組み込みやすいという利点がある。従来の細隙灯顕微鏡を改良し、眼底観察用、ターゲティング用、温熱用の3種類の用途にわけたレーザーのタイミングをあわせるために、レーザー発振装置と細隙灯顕微鏡の間にリレーおよびコンピューターを挿入し、レーザーの発射の時期、時間、出力をコンピューター制御できるシステムを作成した。まずラット、ウサギおよびカニクイザルに上記で作成した改良型細隙灯顕微鏡を用いて、通常のフルオレセインによるビデオ蛍光

眼底撮影を行い、連続して撮影できることを確認した。その後画像を画質を劣化させずにコンピューターに取り込ませるための高感度、高画質CCDカメラの選定を行った。コンピューターに取り込んだ後で画像解析、保存を行うことができるシステムを完成させた。リポソームに関しては、41度で相転移するリン脂質であるDPPCを主材料にして、蛍光色素であるカルボキシフルオレセインを内包した温度感受性リポソームをfreeze & thaw法で作成することができた。作成したリポソームの粒径が400nmを越えないようにリポソームの粒径を揃えた後、ゲルろ過法を用いて内包されなかった蛍光色素を除去している。フルオレセインではfreeze & thaw法で作成することが最も簡便で効率の高い方法であるのに対して、光感受性物質(フタロサイアニン)では従来からのevaporation法で行った方が良い結果が得られた。また内包させる物質の純度が、温度感受性リポソームの相転移温度に関係し、純度が高いほど相転移曲線が本来のリン脂質のものに近いことが分かった。またリン脂質としてDPPC, DPPG, DSPCを様々な割合で混合することにより、様々な温度で相転移するリポソームを作成することに成功した。カルボキシフルオレセインを内包したリポソームに関してまずin vitroにおいてその温度感受性を確認した後、ラットとサルにおいて生体実験を行った。まずいずれの動物種においても正常眼を用い、温熱用レーザー照射によりリポソームが局所ではじけるかを観察した。網膜にダメージを与えない低レベルのエネルギーの

レーザー照射により、リポソームを脈絡膜においてはじけさせることができ、内包されフルオレセインの流れを追うことができた。ラット、サルにおいてレーザーの強凝固を眼底に行い、脈絡膜新生血管のモデルを作成し、これを従来の蛍光眼底造影により証明した。

#### D. 考察

カルボキシフルオレセインを内包した温度感受性リポソームをラット、ウサギおよびカニクイザルに投与後、上記の改良型細隙灯顕微鏡を用いて脈絡膜血管造影を実施した。この結果脈絡膜循環を生体下で評価することが可能となり、その循環が領域別支配をうけていることが証明された。このことは、現在依然として不明な点の多い脈絡膜循環に新たな視点を与えるものであり、さらに脈絡膜障害モデルなどの作成によりいっそうの研究進歩が期待される。また様々な相転移温度を持つリポソームを作成することに成功し、脈絡膜新生血管の経瞳孔的温熱療法における実際の生体温度のモニタリング法を開発した。今後の展望として、光感受性物質をリポソーム内に封入する実験に着手し、それを生体下でドラッグデリバリーシステムとして確立する必要がある。効率よく光感受性物質を新生血管に集積させ光化学療法を行うことにより、加齢黄斑変性症の治療を飛躍的に進歩させる可能性があると考えられる。

#### E. 結論

改良型細隙灯顕微鏡の長所として、励起光としてレーザーを使用することにより、

光量が強くなり、微弱な蛍光でも感知できるため、初期の病変でも早期発見が可能となった。蛍光眼底造影の画像を画質を劣化させることなくコンピューターに取り込み、画像解析を行うことができるシステムも完成した。これにより蛍光の強度測定、画像解析、画像の保存編集なども容易に行える様になった。リポソームは様々な作成方法を試行した結果、現段階での作成法で作られたもので新生血管治療に使用可能であると考えている。使用するリン脂質として DPPC, DPPG, DSPC を様々な割合で混合することにより、様々な温度で相転移するリポソームを作成することに成功したが、これをさらに臨床応用すれば生体温度のモニタリングに使用できる可能性がある。またリポソームを用いた脈絡膜血管造影により従来の方法では描出の難しかった脈絡膜血管を選択的に造影することができ、今後の脈絡膜循環の研究の発展に寄与することと考えられる。

#### F. 特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

1. Yoshiaki Ieki, MD; Hirokazu Nishiwaki, MD; Shinji Miura, MD et al: Experimental Macular Edema Induced by Macular Venule Occlusion in Monkey. Current Eye Research 平成 14 年発行第 25 巻第 2 号 123 頁～131 頁

2. Yoshiaki Ieki, MD; Hirokazu Nishiwaki, MD; Shinji Miura, MD; Yuya Hirata, MD

et al: Quantitative evaluation for blood-retinal barrier breakdown in experimental retinal vein occlusion produced by photodynamic thrombosis using a new photosensitizer. 平成 15 年発行 Current Eye Research 掲載予定

3. Shinji Miura, MD; Hirokazu Nishiwaki, MD; Yoshiaki Ieki, MD; Yuya Hirata, MD et al: Noninvasive Monitoring Technique of Chorioretinal Temperature during Transpupillary Thermotherapy with Thermosensitive Liposome. 平成 15 年発行 Investigative Ophthalmology & Visual Science 掲載予定

4. Yuya Hirata, MD; Hirokazu Nishiwaki, MD; Shinji Miura, MD; Yoshiaki Ieki, MD et al: *In vivo* analysis of choroidal circulation by continuous laser-targeted angiography in rat. 平成 15 年発行 Investigative Ophthalmology & Visual Science 掲載予定

## 2) 学会発表

1. 平田裕也, 西脇弘一, 家木良彰, 三浦真二, 桐生純一, 本田孔士: 温度感受性リポソームを用いた持続的局所レーザー照射による *in vivo* 脈絡膜循環の評価. 第 27 回日本微小循環学会総会. 2002/2/21-22.

2. 家木良彰, 西脇弘一, 平田裕也, 三浦真二, 桐生純一, 本田孔士: 親水性光感受性物質 PAD-S31 を用いた光化学療法によるラット網膜血管閉塞モデル. 第 27 回日本微小循環学会総会.

2002/2/21-22.

3. 三浦真二, 西脇弘一, 家木良彰, 平田裕也, 桐生純一, 本田孔士: 温度感受性リポソームを用いた脈絡膜温度モニタリングを併用した経瞳孔温熱療法の可能性. 第 27 回日本微小循環学会総会. 2002/2/21-22.

4. 平田裕也, 西脇弘一, 家木良彰, 三浦真二, 桐生純一, 本田孔士: 温度感受性リポソームを用いた持続的局所レーザー照射による *in vivo* 脈絡膜循環の評価. 第 106 回日本眼科学会総会. 2002/5/23-26.

5. 家木良彰, 西脇弘一, 平田裕也, 三浦真二, 桐生純一, 本田孔士: 光感受性物質による実験的網膜静脈閉塞症の定量的評価; 高血圧と網膜色素上皮障害の影響. 第 106 回日本眼科学会総会. 2002/5/23-26.

6. 三浦真二, 西脇弘一, 家木良彰, 平田裕也, 桐生純一, 本田孔士: 温度感受性リポソームを用いた、経瞳孔温熱療法施行中の脈絡膜温度モニタリングの可能性. 第 106 回日本眼科学会総会. 2002/5/23-26.

H. 特記事項なし

## 温度感受性リポソーム～精製法と特徴

### 序論

リポソームとは、脂質二重層から構成される閉鎖小胞である。元来、リポソームは生体膜の流動性等の物性を研究するためのモデルとして用いられたが、小胞内に種々の水溶性物質を封入でき、膜内にも高分子や抗体等を導入することも可能であることが報告されて以来、薬物担体、すなわち drug delivery system の一つとして注目を浴びるようになった。

リポソームは、その脂質二重層の数に基づいて分類した場合、多重膜リポソーム (multilamellar vesicle; MLV) と一枚膜リポソーム (unilamellar vesicle) に分けられる。また調製方法によって、数枚膜リポソーム (oligolamellar vesicle) や安定な多分岐膜リポソーム (stable plurilamellar vesicle; SPLV) が形成される場合もある。リポソームといえばどちらかという MLV を指し、一枚膜リポソームは phospholipid vesicle と呼ばれることが多い。後者はさらに大きさによって、小さな一枚膜リポソーム (small unilamellar vesicle; SLV)、大きな一枚膜リポソーム (large unilamellar vesicle; LUV)、および巨大リポソーム (giant unilamellar vesicle; GUV) に分けられる。SUV は直径数 10nm 以下、LUV は 100~1000nm、GUV は 1000nm 以上のリポソームを指す。そのほか、特定のリポソームに対しいろいろな呼び方がある。たとえば、調整方法に重点を置き、逆相蒸発法によって調製したリポソームを reverse-phase evaporation vesicle (REV)、extruder を用いて調製したリポソームを vesicles prepared with evaporation technique (VET) と呼ぶ。

### 温度感受性

リポソームの膜構成分子の集合状態は温度によって大きく影響され、温度を上げていくとある温度で脂肪酸部分が融けて極性部 (親水基) 間に水が入り込みやすくなる。この温度は相転移温度 ( $T_c$ )、クラフト点と呼ばれる。脂質分子集合体中に水が入り込むと極性基間の相互作用が弱まり、リポソーム膜の安定性が低下し、結果的に内包物が漏出することになる。これが温度感受性リポソームの原理である。内包物質を放出する温度 ( $T_c$ ) は、リポソーム膜を形成するリン脂質の種類のほか、コレステロールの有無、内包物質の親油性などに影響される。図 1 に各リン脂質の  $T_c$  を示した。



図 1 : 代表的なリン脂質の荷電と Tc

表 7.3 代表的なリン脂質の荷電とラメラ相状態での Tc<sup>a)</sup>

リン脂質	略称	荷電 <sup>b)</sup>	Tc (°C) <sup>c)</sup>
Egg phosphatidylcholine	egg PC	0	-15 ~ -7
Dilauryloylphosphatidylcholine (C12:0)	DLPC	0	-1.8
Dimyristoylphosphatidylcholine (C14:0)	DMPC	0	23
Dipalmitoylphosphatidylcholine (C16:0)	DPPC	0	41
Distearoylphosphatidylcholine (C18:0)	DSPC	0	55
1-Myristoyl-2-palmitoylphosphatidylcholine (C14:0, 16:0)	MPPC	0	27
1-Palmitoyl-2-myristoyl phosphatidylcholine (C16:0, 14:0)	PMPC	0	35
1-Palmitoyl-2-stearoyl phosphatidylcholine (16:0, 18:0)	PSPC	0	44 <sup>d)</sup>
1-Stearoyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine (C18:0, 16:0)	SPPC	0	47 <sup>e)</sup>
Diolcylphosphatidylcholine (C18:1)	DOPC	0	-22
Dilauryloylphosphatidylglycerol	DLPG	-1	4
Dimyristoylphosphatidylglycerol	DMPG	-1	23
Dipalmitoylphosphatidylglycerol	DPPG	-1	41
Distearoylphosphatidylglycerol	DSPG	-1	55
Diolcylphosphatidylglycerol	DOPG	-1	-18
Dimyristoyl phosphatidic acid	DMPA	-1 <sup>f)</sup>	51
Dimyristoyl phosphatidic acid	DMPA	-2 <sup>g)</sup>	45
Dipalmitoyl phosphatidic acid	DPFA	-1 <sup>h)</sup>	67
Dipalmitoyl phosphatidic acid	DPFA	-2 <sup>g)</sup>	58
Dimyristoyl phosphatidylethanolamine	DMPE	- <sup>i)</sup>	50
Dipalmitoyl phosphatidylethanolamine	DPPE	-	60
Dimyristoyl phosphatidylserine	DMPS	-	38
Dipalmitoyl phosphatidylserine	DPSP	-	51
Brain phosphatidylserine	brain PS	-	6 ~ 8
Brain sphingomyelin	brain SM	0	32
Dipalmitoyl sphingomyelin	DPSM	0	41
Distearoyl sphingomyelin	DSSM	0	57

a) pH 7.0 における荷電, b) 示差走査熱量測定 (DSC) により求めた, c) pH 6.0, d) pH 9.0, e) pH 6.5, f) pH 9.1, g) PE は pH 7.0 で部分的に titration される。

(参考文献8), p.471 の Table 1 を転載)

2種類以上のリン脂質を混合してリポソームを作成した場合、Tc は各リン脂質の重量モル濃度比によって決定される。我々は、大きな一枚膜リポソーム(LUV)内に蛍光物質 carboxyfluorescein(CF)を内包し 40°C、46°C、52°Cに Tc を持つ三種類の温度感受性リポソームを作成し、研究に用いた。CF は励起波長 490nm、蛍光波長 520nm の蛍光物質で、眼科臨床で日常的に使用されるフルオレセインナトリウムとほぼ同じ蛍光特性をもち、しかもリポソーム内に封入されやすい。高濃度でリポソーム内に封入された CF は蛍光を発しない自己消光(self-quenching)の状態となる。ところが一旦リポソームが Tc まで加温されるとリポソーム外に漏出し、希釈されて蛍光を発する。さらに血流内では速やかに色素は希釈されながら洗い流されるため、加温が終了すると蛍光は消失する。このことを利用した脈絡膜の局所的造影法を Zeimer

らは「Laser targeted dye delivery」と報告した。

## リポソーム作成法

### (1) CFの精製

5- 6- Carboxyfluorescein mixed isomer (Molecular probe 社)を 5N-NaOH に溶解後、pH7.4、浸透圧 290osm となるよう 1N-HCl にて調製する。その後、Ralston らの手法に従い室温で Sephadex LH-20 (Sigma 社)にてゲル濾過を行った後、ポアサイズ 0.2 $\mu$ m のフィルターにて濾過を行う。

### (2) リン脂質薄膜の調製

リン脂質として、Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG), Distearoylglycerophosphocholine (DSPC) (いずれも Genzyme 社)を使用した。40 $^{\circ}$ C に Tc を持つリポソーム(40 $^{\circ}$ C リポソーム)、以下同様に 46 $^{\circ}$ C リポソーム、52 $^{\circ}$ C リポソームのリン脂質混合比を図 2 に示す。いずれも、リン脂質 500mg をクロロホルム 30ml、メタノール 20ml、蒸留水 100 $\mu$ l に溶解し、ナス型フラスコに入れロータリーエバポレーターで溶媒を減圧除去して、リン脂質の薄膜を調製する。

図 2 各リポソームの脂質組成

リン脂質	DPPC	DPPG	DSPC
40 $^{\circ}$ C リポソーム	400	100	0
46 $^{\circ}$ C リポソーム	200	100	200
52 $^{\circ}$ C リポソーム	0	100	400

単位 mg

### (3-1) Mayer らの方法によるリポソーム作成法

作成したリン脂質薄膜に CF10ml を添加し、ロータリーエバポレーターを Tc 以上に加温しながら回転させ、リポソーム懸濁液を得る。10cc のエタノールを懸濁液に添加し、55 $^{\circ}$ C に加温しながらエバポレーターを回転させてエタノールを除去。5cc の蒸留水 (60 $^{\circ}$ C) をフラスコの壁に沿わせながら添加し、1 時間 hydration を行う。蒸留水を加えて 14cc に液量を調整した後、サイジング (後述) を行う。

### (3-2) 凍結融解法によるリポソーム作成

作成したリン脂質薄膜に CF10ml を添加し、Tc 以上に加温しながら激しく攪拌したのち、浴槽型ソニケーターで超音波処理しリポソーム懸濁液を得る。液体窒素にリポソーム懸濁液の入ったチューブを浸し、十分凍らせた後に室温に放置する。この凍結-融解の手順を五回繰り返す。

### (4) リポソームのサイジングと非封入物質の除去

エクストルーダーにポリカルボネート膜 (ポアサイズ 0.4 $\mu$ m) を装着し、窒素加圧にて押し出す。その後ポアサイズ 0.2 $\mu$ m のポリカルボネート膜に交換し、窒素加圧による押し出しを五回繰り返す。こうして得られたリポソーム懸濁液を Sephadex G-50 カラム(Pharmacia 社)に通してゲル濾過クロマトグラフィを行い、非封入の CF を除去する。

### 封入率と放出率

各リポソームの Tc を調べるため、以下の実験を行った。

リポソーム懸濁液 30 $\mu$ l を 50% Human Serum 3ml と混合したものをサンプルとした。このサンプルに室温で界面活性剤 Triton X-100 0.1ml (Sigma 社)を添加してリポソーム膜を破壊したものをコントロールとして、Spectrofluorephotometer で励起光 488nm、蛍光 514nm の蛍光強度(A)を測定した。また、各リポソームのサンプルを様々な温度(t)で五分間インキュベートした後、蛍光強度を測定(Bt)、この蛍光強度のコントロールに対する比率をパーセント表示したものを放出率とした。

$$\text{放出率(\%)} = Bt \div A \times 100$$

各リポソームの各温度における放出率を図3に示した。これは Temperature profile と呼ばれるグラフである。グラフに示したように、各リポソームは Tc 理論値付近で内包 CF を放出し、高い温度感受性を示した。

また、リポソームの保持効率を以下の計算式で算出した。

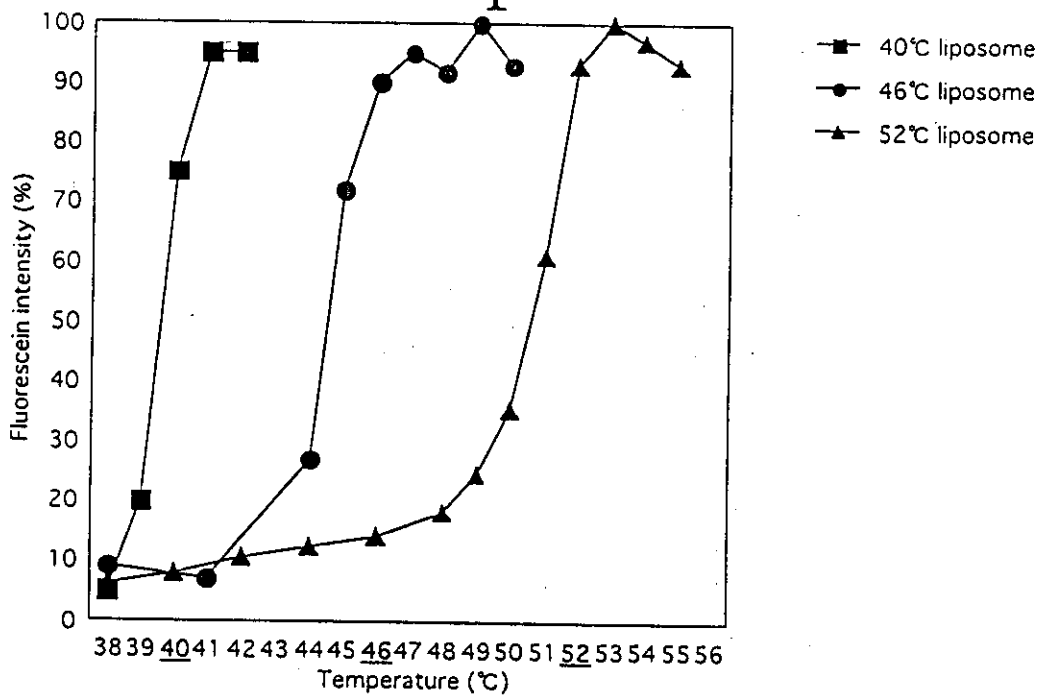
Triton-X で処理を行わないサンプルの蛍光強度を A、処理後の蛍光強度を B として

$$\text{保持効率(\%)} = (4B - A) \div 4B \times 100$$

この結果、凍結融解法で作成したリポソームは 40 $^{\circ}$ Cリポソーム、46 $^{\circ}$ Cリポソーム、52 $^{\circ}$ Cリポソームのいずれも 98%以上の保持効率であった。これに対し、Mayer らの方法で精製したリポソームは 70~80%程度の保持効率にとどまったため、以降の実

験ではすべて凍結融解法を用いてリポソームを作成した。

図 3 Temperature profiles of CF-liposome



## 結論

我々が用いた凍結融解法は代表的なリポソーム精製法の一つである。リポソームを構成するリン脂質は両親媒性分子であり、水溶液に懸濁するとその親水性基が水和する。一方、疎水性基は水の環境から押し出され、疎水性基同士で集合する。そのため二分子膜構造の脂質二重層が形成されることになる。こうして形成されたリポソーム懸濁液を凍結すると、水和していた水分子が氷を形成するために親水性基の脱水和が起こる。次の融解の過程で水分子は再び親水性基に結合するが、この過程で二分子膜の再配列が起こると考えられる。二分子膜が再配列するとき、リポソームの融合や内包物の流出などが観察されると報告されている。こうして SUV から LUV を形成させる、というのが凍結融解法の原理である。凍結融解を繰り返すことにより溶質が濃縮され、高い保持効率を持つリポソームを調製できることがこの製法の特徴である。また、有機溶媒を用いない方法であるので、酵素など有機溶媒により失活のおそれのあるものも封入しえる手法である。このようにして精製した CF 内包温度感受性リポソームを、次章にて紹介するスリットランプ型網脈絡膜血流診断・治療機器「SL-PDT」と併用して、我々は研究を進めた。

## スリットランプ型網脈絡膜血流診断・治療機器「SL-PDT」の開発

網膜、脈絡膜血流の可視化は眼内の循環動態や糖尿病網膜症、網膜血管閉塞症などの循環障害を知る上でも、また脈絡膜新生血管など通常の眼底検査ではその進展や走行を診断し難い疾患の検査としても重要である。眼科領域では古くからフルオレセイン蛍光眼底造影が用いられてきた。これは眼底カメラの光源側に励起フィルターを、撮影側に濾過フィルターを装着することにより、血液を媒体としたフルオレセインナトリウムから発した蛍光を選択的に撮影するものである。静注されたフルオレセインナトリウムは眼内の血管支配に従って、まず脈絡膜へ流入し短時間（1～2 秒）の choroidal flash を描出した後、網膜血管へと流入して明瞭な造影像を描出する。従って、フルオレセイン蛍光眼底造影は網膜血管の描出には適するが、脈絡膜造影には不適と言える。この欠点を克服するために脈絡膜流入時の画像を高速度カメラで撮影するなどの手法も試みられたが、普及には至らなかった。

インドシアニングリーン色素を静注し、励起光、蛍光ともに赤外光を用いて行うインドシアニンググリーン蛍光造影法は 1973 年に Flower らが脈絡膜循環をよく現す方法として初めて報告した。さらに、ダイオードレーザーで眼底を走査して画像を得る走査型レーザー眼底鏡(SLO)が開発され解像度も向上し広く臨床の場で用いられるようになった。しかしながら、インドシアニンググリーン蛍光造影法も脈絡膜造影後に網膜が造影され脈絡膜血管が不鮮明となってしまう、脈絡膜大血管の造影には有用だが毛細血管の走行は判別しがたいなどの欠点を抱える。

このように脈絡膜血管のみを選択的に造影する新たな手法が求められていた。Zeimer らは眼底カメラの照明系にアルゴンレーザーを用い、CF 内包リポソームを静注後にカメラに組み込んだ波長 1054nm の Nd-YAG レーザーを眼底に照射してリポソームを加温し、照射直後の蛍光を捉えた。これにより局所の脈絡膜血流や脈絡膜新生血管を繰り返し撮影することに成功し、これを Laser targeted dye delivery と報告した。我々は、Zeimer らのシステムを応用し、網膜・脈絡膜血流の診断・治療用機器として、眼科診療に用いられる診察用スリットランプを改造し、3種類の波長のレーザー（コヒレント社）を組み込んだレーザースリットランプ「SL-PDT」（図 1）をトプコン（株）と共同開発した。以下にその構造と利用法について述べる。

## スリットランプ

トプコン社スリットランプ「SL-10L」を改造した。

1/2 型赤外 CCD カメラ(TAKEX 社製)を装着。

C マウント 1/2 型用 TV リレーレンズを用い、ICG バリアフィルターユニットを装着した。これはレーザー保護ユニットを改造したものである。

画角は 6、10、16、25、40 倍の 5 変倍である。

## 組み込まれたレーザー (図 2)

- 3) 488nm アルゴンレーザー (観察光)・・・スリットの観察光と蛍光物質の励起光を兼ねる。温度感受性リポソームから漏出した蛍光色素 CF を励起することができる。
- 4) 685nm 半導体レーザー (治療光)・・・680nm 付近に励起波長を持つ光感受性物質を励起させる。光感受性物質の種類に応じてレーザーを交換すれば様々な光感受性物質に対応可能である。
- 5) 810nm 半導体レーザー (温熱光)・・・温度感受性リポソームを加熱し、リポソームから封入物質を漏出させる。エイミングビームを兼ねる。脈絡膜に対する経瞳孔温熱療法用レーザーとしても利用可能である。エイミングビームの強さも調節可能である。

## 仕様

490nm アルゴンレーザーはスリットランプの観察光 (通常のスリットでは、ハロゲン白色光が用いられる) としてスリット状に眼底に投射される。まずモデルアイを用いて角膜表面でのアルゴン出力が生体に害のない出力であることと、モデルアイ内のチューブ (血管を模した) に蛍光色素 CF を流し、蛍光色素が励起され、また蛍光を CCD カメラで捉えうることを確認した。被験動物の眼球の大きさに合わせて、非接触型前置レンズ、あるいは接触型レンズを使用して、眼底に照射する (図 3-1)。

810nm と 685nm のレーザーはスリット台内部の積分球を經由してスリット台の対物レンズよりスポット状に眼底に照射される (図 3-2)。これら二つの波長のレーザーは同心円状に配置されており、スポット径の比は  $685\text{nm} : 810\text{nm} = 2 : 1$  となっている。スリット台付属のマニピュレーターを動かせば眼底上でのスポットの位置を

任意の場所へ移動することができる。

眼底より得られた画像は Band-path フィルターを通して不要な波長をカットされ、スリットランプ上部に接続された CCD カメラを通じてビデオエンハンサーにて増幅され、テレビモニター上に映写される。この画像は S-VHS や DV に録画、保存される。験者はテレビモニターを見ながら観察光やレーザースポットを操作する。

#### 観察に使用したレンズ

ラット Volk 社 78D 非接触型レンズ、同社 60D 非接触型レンズ

カニクイザル Volk 社接触型レンズ「Super Macula」

#### レーザー出力

##### (1) 490nm アルゴンレーザー

今回我々が研究に用いた CF 内包温度感受性リポソームの蛍光像の観察にはラット、カニクイザルともに 400mW の設定を観察光、励起光に用いた。だが実際には角膜表面付近でのレーザー出力を測定器にて計測したところ約  $2.9\text{mW}/\text{cm}^2$  であった。これは SL-PDT の構造上、光路内で大幅にパワーが減衰するためであると考えられた。National Standard for Safe Use of Lasers によれば、網膜上でのレーザー出力の安全閾値は散瞳下で  $240\text{mW}/\text{cm}^2$  とされており、SL-PDT の観察光は網膜光傷害を与えない出力であると考えられた。

##### (2) 685nm、810nm 半導体レーザー

SL-PDT にはコントローラーが付属しており、685nm、810nm 半導体レーザーの照射時間、照射のタイミング、照射出力を設定できるようになっている。685nm は 0mW ~50mW、810nm は 0mW~75mW の間で出力を調節できる。角膜表面での各波長のレーザー出力を計測したところ、ほぼコントローラーの表示値の出力が照射されていた。

#### 使用法

##### (1) 局所的脈絡膜造影（後述）を併用した光力学療法

810nm（温熱光）を照射後、0.1~0.5 秒後に 685nm（治療光）を照射するようセットする。CF と光感受性物質を両方内包した温度感受性リポソームを静注後、眼



底に 810nm を照射、リポソームに内包された CF と光感受性物質を放出させる。放出された CF は脈絡膜内の病変部を描出する。病変部に光感受性物質が行き渡ったタイミングで 685nm を照射し、光感受性物質を励起、治療を行う。

#### (2) 光線力学療法と経瞳孔温熱療法の併施

685nm (治療光) を照射後、810nm (温熱光) を照射するようセットする。光感受性物質を静注後、685nm を照射して病変部に光線力学療法を施行し、終了後に 810nm を照射、経瞳孔温熱療法を施行する。後述する脈絡膜温度モニタリングを併用することも可能である。

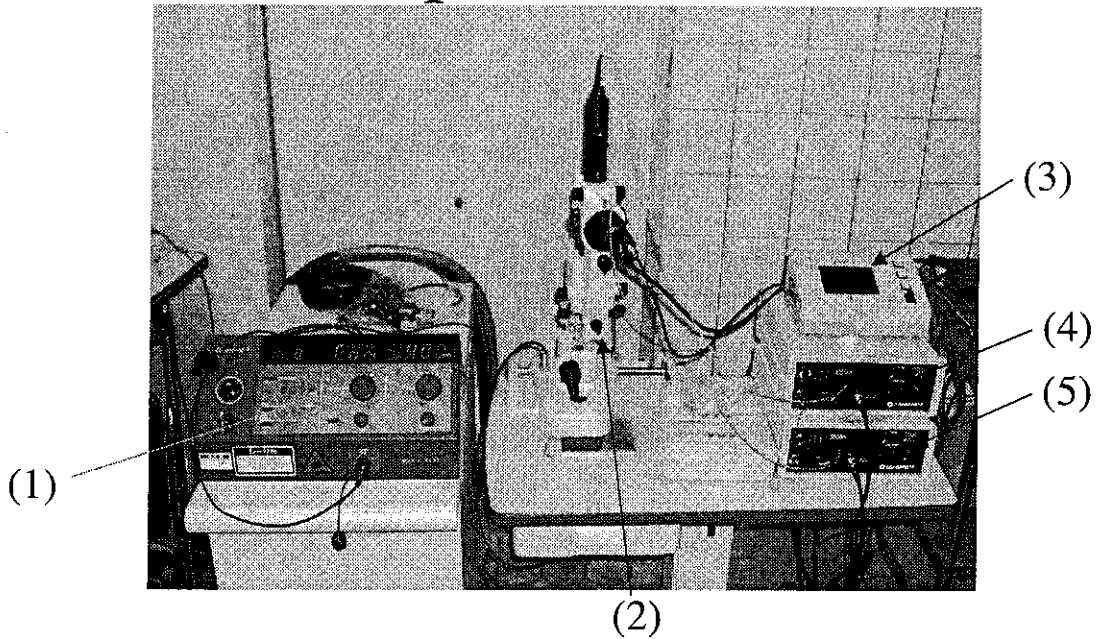
#### (3) 温度感受性リポソームを用いた、非侵襲的手法を用いた *in vivo* 脈絡膜血流のマッピング

CF 内包温度感受性リポソームを静注後、網膜に凝固斑が出ない程度の出力で眼底に 810nm を照射する。脈絡膜毛細血管内に漏出した蛍光色素を観察しながら照射部位を移動させると、脈絡膜血管の支配領域を観察できる。

#### (4) 光感受性物質を用いた網膜血管閉塞モデル

光感受性物質と蛍光色素フルオレセインナトリウムを静注後、網膜血管に 685nm を照射し、血管内の光感受性物質を励起する。フルオレセインによる蛍光によって、血流の変化や途絶をリアルタイムに観察しながら血管閉塞を起こすことができる。

# 図1 Topcon社 SL-PDT



(1)490nmアルゴンレーザー(2)スリットランプ(3)コントローラー(4)810nm半導体レーザー(5)685nm半導体レーザー

## 図2 SL-PDTの構造

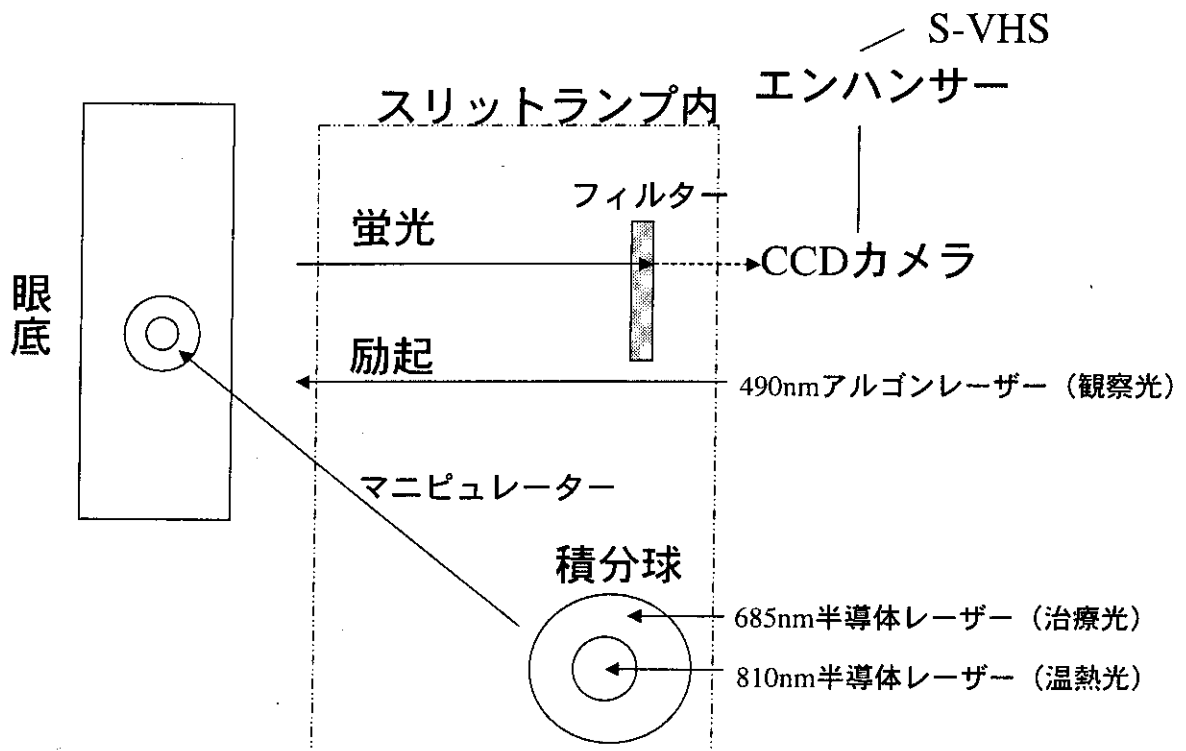
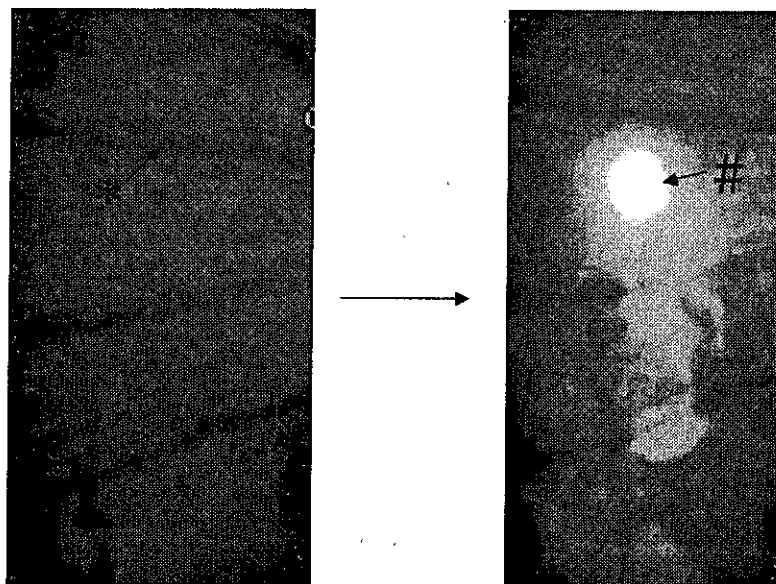


図3 SL-PDTによる蛍光画像



3-1 490nmアルゴンレーザー  
(観察光)をラット眼底に照射  
して眼底を観察。網膜血管(\*),  
神経線維層の走行が観察される。

3-2 CF内包温度感受性リポソームを照射後、温熱光(＃)を照射。脈絡膜毛細血管板を流れる  
蛍光色素を捉えることができる。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshiaki Ieki, MD; Hirokazu Nishiwaki, MD; Shinji Miura, MD et al	Experimental Macular Edema Induced by Macular Venule Occlusion in Monkey	Current Eye Research	第 25 巻第 2 号	123 頁 ~ 131 頁	平成 14 年
Yoshiaki Ieki, MD; Hirokazu Nishiwaki, MD; Shinji Miura, MD; Yuya Hirata, MD et al	Quantitative evaluation for blood-retinal barrier breakdown in experimental retinal vein occlusion produced by photodynamic thrombosis using a new photosensitizer	Current Eye Research	掲載予定		平成 15 年
Shinji Miura, MD; Hirokazu Nishiwaki, MD; Yoshiaki Ieki, MD; Yuya Hirata, MD et al	Noninvasive Monitoring Technique of Chorioretinal Temperature during Transpupillary Thermotherapy with Thermosensitive Liposome	Investigative Ophthalmology & Visual Science	掲載予定		平成 15 年
Yuya Hirata, MD; Hirokazu Nishiwaki, MD; Shinji Miura, MD; Yoshiaki Ieki, MD et al	<i>In vivo</i> analysis of choroidal circulation by continuous laser-targeted angiography in rat	Investigative Ophthalmology & Visual Science	掲載予定		平成 15 年