

HER2	Epidermal growth factor receptor 2
IHC	Immunohistochemistry
FISH	Fluorescence in situ hybridization
MUGA	Multigated acquisition
PgR	Progesterone receptor
RECIST	Response evaluation criteria in solid tumors

Introduction

Despite improvements in survivability of nonmetastatic breast cancer patients over the past 25 years, particularly for both estrogen receptor (ER)-positive and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive disease, metastatic breast cancer remains an incurable disease [1, 2]. When the disease recurred, the decision to choose a certain therapy is usually based on tumor biology, symptoms, metastatic pattern, time to disease recurrence, and patient desire [3].

For metastatic breast cancer the initial treatment with anthracycline-based chemotherapy and/or taxane-based therapy is considered as standard [4, 5], whereas the outcome is still poor at present. Therefore, the new avenue for breakthrough in treatments is required to provide. One of the possible approaches is to use molecular targeting therapy. Breast cancers that make high levels of the transmembrane protein kinase HER2 (i.e., those that overexpress HER2) have a poorer prognosis as compared to those that either do not make this protein or make lower levels [6]. It is important that overexpression of HER2 also identifies those women who may benefit from the targeted drug trastuzumab, and those who do better with chemotherapy regimens that contain a drug of the anthracycline class [6]. The humanized monoclonal antibody trastuzumab, which targets the human HER2, is an effective treatment for patients with HER2 overexpression, which comprises approximately 15–25% of all breast cancers [7, 8]. Meanwhile, capecitabine (N⁴-pentyloxycarbonyl-5'-deoxy-5-fluorocytidine), an orally administered prodrug of fluorouracil (FU), is also a highly active and well-tolerated treatment option for metastatic breast cancer. Capecitabine is the therapy specifically approved for anthracycline- and taxane-exposed patients, a setting that is becoming increasingly important as more patients have recurrent metastatic disease after receiving adjuvant anthracycline and taxane therapy [9–12]. The combination of capecitabine and trastuzumab might achieve improved efficacy in patients with HER2-positive metastatic breast cancer without compromising tolerability [13–15].

Recently, Schaller et al. [13] reported that the combination of capecitabine and trastuzumab is highly active in patients with HER2-overexpressing anthracycline- and/or taxane-pretreated breast cancer. However, to date, no studies

have investigated the activity of capecitabine and trastuzumab in patients with HER2-overexpressing breast cancer resistant to both anthracyclines and taxanes. In the present study, we evaluate the activity and safety of this two-agent combination therapy in patient, resistant to both anthracyclines and taxanes.

Patients and methods

Eligibility criteria

To be eligible for the study, patients had to meet the following criteria: age greater than 20 years and less than 75 years; histologically proven breast cancer with HER2 overexpressing progressive metastatic disease; resistance to both anthracyclines and taxanes for metastatic and advanced disease as described in below, resistance definition section; at least one measurable tumor site (target lesion) with index lesions on physical examination, X-ray, ultrasound, or computed tomography scan; Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status of 0–2; estimated life expectancy ≥ 3 months; reasonable bone marrow function (neutrophil count $\geq 1,500/\mu\text{L}$, platelet count $\geq 100,000/\mu\text{L}$, and hemoglobin levels $\geq 9 \text{ g/dL}$); adequate hepatic and renal function, including AST and ALT twice (in cases of liver metastasis, three times) the upper limit of normal, bilirubin 1.5 g/dL, alkaline phosphatase 2.5 times the upper limit of normal, serum creatine 1.2 mg/dL, and basal creatine clearance 50 mL/min; no evidence of cardiac dysfunction (LV ejection fraction $> 50\%$). This capecitabine and trastuzumab combination regimen was eligible for patients in third line of therapy, resistant to both anthracyclines and taxanes. Hormonal therapy, in the neoadjuvant or adjuvant setting or for advanced disease, was permitted, but concomitant hormone therapy was not allowed. Moreover, prior trastuzumab was allowed. Brain or leptomeningeal involvement was not allowed. Written informed consent was obtained before registration. The HER2 status was assessed at study entry by immunohistochemistry (IHC) and/or fluorescence in situ hybridization (FISH). Patients with HER2-receptor overexpression at the 3+ level (Hercep Test; DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) were immediately eligible for inclusion. A HER2 expression at the 2+ level required confirmation by the proof of a HER2 gene amplification by FISH. HER2 testing was performed on a sample of the primary tumor or a biopsy of a metastatic site. HER2 status was examined by the pathologists of each institution participated in this study. The FISH ratio was assessed as the number of genes proportional to the number of centromeres. The HER2 was considered amplified when the FISH signal ratio of HER2 was 2 and more. Exclusion criteria included pretreatment

with capecitabine (Xeloda; Hoffman La, Roche AG); hypersensitivity to trastuzumab (Herceptin; Hoffman-La Roche AG, Basel, Switzerland), fluoropyrimidines, capecitabine, or any other substance of the drug preparation; known lack of dihydropyrimidine dehydrogenase; local resection or irradiation of the marker lesion after study entry; additional systemic antitumor therapy study; pregnancy or breastfeeding.

All data were managed and analyzed in a central data coordinating division located at the Foundation for Biological Research and Innovation, Translational Research Informatics Center, Kobe, Japan.

Definition of both anthracycline and taxane resistance

We used Ando's definition [16] for reference to determine the primary resistance and secondary resistance to chemotherapeutic agents. All patients must not have received only anthracyclines, but also taxanes for metastatic disease. Primary resistance to anthracycline or taxane was defined as progressive disease during or within 6 months after completion of anthracycline or taxane, respectively. Patients without any documented tumor response to first-line chemotherapy that included anthracyclines or taxanes for metastatic disease also were classified as having primary resistance. Patients whose disease progressed more than 6 months after completion of anthracycline or taxane were treated as a first-line regimen for metastatic disease. Secondary resistance was defined as disease progression among 6–12 months after a documented clinical response to first-line chemotherapy with anthracyclines or taxanes for metastatic disease. Secondary resistance was further divided into three categories as follows: (a) absolute resistance: disease progression during treatment with regimens that contained anthracycline or taxane after a period after completion of the chemotherapy; (b) relative resistance: disease progression within 6 months after complete of the chemotherapy; and (c) sensitive regrowth: disease progression more than 12 months after completion of the chemotherapy.

Therapy

Trastuzumab was administered at an initial dose of 4 mg/kg body weight and was administered subsequently at weekly doses of 2 mg/kg body weight during 90 min. Capecitabine was administered during 21 days with a subsequent pause of 7 days. The daily dose was 1,657 mg/m² administered in equal parts in the morning and in the evening. This cycle was repeated every 28 days for six cycles. Trastuzumab was discontinued while capecitabine was held. When capecitabine was withdrawn, a new treatment cycle was considered. Trastuzumab and capecitabine were administered until disease progression or unacceptable toxicity.

If capecitabine-associated toxicity occurred, dosage reduction and delayed were permitted.

1. If a grade 2 toxicity occurred, the therapy was interrupted immediately until the symptoms disappeared completely. At that time, the medication was continued at a 75% level until six cycles. The level was never increased. If a grade 2 or 3 toxicity occurred again, this process was allowed once more until six cycles, at which point the medication was continued at a 50% level. The level was never increased. If a grade 4 toxicity occurred again, the therapy was interrupted immediately. The treatment was discontinued when the patient developed signs of toxicity for a third time.
2. At the beginning of the treatment, if a grade 3 toxicity occurred, the therapy was stopped immediately until the symptoms disappeared completely. At that time, the medication was continued at a 50% level until six cycles. The level was never increased. If a grade ≥ 2 toxicity occurred again, the treatment was discontinued.
3. At the beginning of the treatment, if a grade 4 toxicity occurred, the therapy was stopped immediately.

A dose modification of trastuzumab was not allowed. Mild antiemetic drugs, such as metoclopramide and dexamethasone, and mild antidiarrheal drugs, such as loperamide hydrochloride were administered, if necessary. Trastuzumab was discontinued if patients developed congestive heart failure or the LVEF fell below 45%. The decision to discontinue trastuzumab at that point was discussed with the patient after the risks and potential benefits of trastuzumab therapy were assessed. Granulocyte colony-stimulating factor, to prevent febrile neutropenia was allowed, if grade ≥ 3 leukopenia occurred, and blood or platelet transfusion was allowed, if grade ≥ 3 anemia or thrombocytopenia occurred.

Assessment

The pretreatment evaluation included medical history and physical examination, complete blood cell count, serum chemistries, liver function tests, ECG, echocardiography, tumor marker evaluation (CA15-3, CEA), hormone receptor status (ER, PgR, HER2), and staging studies appropriate to define the extent of metastatic disease, which included chest X-ray, abdominal ultrasound, brain, thoracic and/or abdominal computed tomography scan, and bone scan. Antitumor activity was evaluated every two cycles on all measurable lesions, and all patients were scheduled for at least a 2-week treatment to be eligible for assessment of tumor response. In patients with tumor response or stable disease, the treatment was planned to be continued for up to six cycles; thereafter, maintenance or no therapy was based

on the clinician's choice. After the completion of the treatment plan, the patients were monitored every two cycles. Clinical monitoring, complete blood cell count, serum chemistries, and liver function tests were performed every 2 weeks until six cycles, and thereafter every 12 weeks. Repeated multigated acquisition (MUGAs) or echocardiograms were performed after completion of cycle 2, 4, and 6, and thereafter every 12 weeks, if the medication is continued. Patients were evaluated for toxicity, graded according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria version 2.0 [17].

Tumor response was evaluated according to the response evaluation criteria in solid tumors (RECIST) [18]. Progression-free survival was defined from the first day of treatment to the identification date of recurrence of cancer or death from any cause. Overall survival was dated from the first day of treatment until death or was censored on the date of the last follow-up appointment.

Statistical analysis

The primary endpoint of the study was the assessment of the overall survival. Secondary endpoints were the determination of the progression-free survival and response rate. In this trial, the targeted patients resistant to both anthracycline and taxane had highly dismal disease, whose 1 year survival was estimated <33% [16], thereby overall survival was chosen for the primary endpoint. The recent paper [19] reported that overall survival should be viewed as the endpoint of choice to assess the efficacy of new treatments in advanced breast cancer. The regimen would have been considered promising if the true 1-year survival were 50% or higher in conjunction with acceptable toxicity, and would be considered of no further interest if the true 1-year survival were 33% or lower. With 63 patients, the power of a two-sided 0.05-level test is 80%. However, the power was reduced to 62% because only 40 patients were enrolled in the study. Survival curves were estimated using the Kaplan–Meier method. To test the differences of the survival curves among subgroup of patients, the log-rank test was used. All statistical analyses were performed using the SAS version 9.1 (SAS Institute, Inc, Cary, NC, USA). All tests were two-sided, and a $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Patients characteristics

From June 2003 to May 2006, 40 patients with metastatic and HER2-overexpressing breast cancer, which was defined as the primary resistance or secondary resistance to

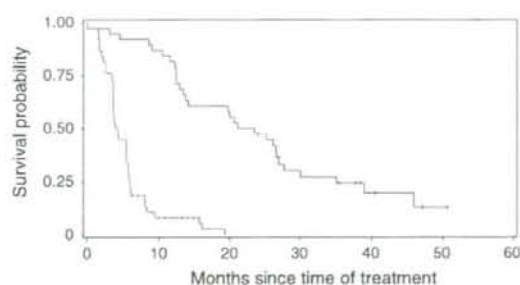
both anthracycline and taxane, were entered onto the study. One patient was declared ineligible after registration: one patient was treated off-protocol immediately after enrollment. Thirty-eight patients were reviewed extramurally and analyzed. The demographic data, numbers of metastatic tumor, and prior therapies are listed in Table 1. The median age was 53 years (range 30–69 years), and Eastern Cooperative Oncology Group performance status was good (0 or 1 in 95% of cases). Regarding prior treatments, 18 patients were given anthracycline as neoadjuvant or adjuvant chemotherapy and 19 patients for metastatic disease. In addition, 9 patients were given taxane as neoadjuvant or adjuvant chemotherapy and 28 patients for metastatic disease. Resistance to previous chemotherapies (anthracycline/taxane) was 7 patients (18%) with primary resistance/primary resistance, 11 with (29%) with primary/secondary, 6 (16%) with secondary/primary, 11 (29%) with secondary/secondary, and 3 (8%) with unknown, respectively. Predominate sites of metastasis were found in 37 cases (97%). 27 patients (71%) had one metastatic site, and 10 patients (26%) had multiple metastases involving two or more organ systems; 17 lung (45%), 10 liver (26%), 5 bone (13%), 2 skin (5%), and 4 other sites (10.5%), respectively. 34 (90%) of the patients had invasive ductal carcinomas, 3 patients (8%) had cancers of other types, but the histopathological type of one patient (3%) was unknown. Seventy nine percent of patients had a past history of prior therapy of trastuzumab.

Treatment activity

A median of 4.5 cycles (range 1–9 cycles) of treatment were delivered. The median dose of capecitabine was 227,400 mg/body (range 2,400–453,600 mg/body) and the median dose of trastuzumab was 1.28 mg/m²/week (range 0.31–1.51 mg/m²/week). Median follow-up time was 22.4 months (range 0.4–50.6 months). Median overall survival and progression-free survival of the entire group were 22.3 and 4.1 months, respectively (Fig. 1). Survival at 1 and 2 year was 81.6% (95% CI, 65.2–90.8%) and 47.4% (95% CI, 31.0–62.1%), respectively. The best responses recorded for each patient are listed in Table 2. A response rate (CR or PR) was recorded in 7 of 38 women (18.4%; 95% CI, 7.7–34%); 2 patients (5%) achieved a CR, and 5 patients (13%) achieved a PR. SD was observed in 20 patients (53%), and PD was observed in 8 (21%). Clinical benefit rate (CBR: CR or PR or SD \geq 24 weeks) was 21.1% (95% CI (confidence interval), 9.6–37.3%). All patients were treated previously with both anthracyclines and taxanes. According to the previous treatment, a tumor response was obtained in 18 (47%) of 38 cases previously submitted to anthracycline-containing regimens and in 22 (58%) of 38 cases submitted to taxane-containing regimens.

Table 1 Patient Characteristics

	No. of patients	%
No.	38	
Age, years		
Median	53	
Range	30–69	
Performance status ^a		
0	31	81.6
1	5	13.2
2	2	5.3
Menopausal status		
Premenopause	12	31.6
Postmenopause	26	68.4
Receptor status		
Estrogen receptor		
Positive	7	18.4
Negative	31	81.6
Progesterone receptor		
Positive	6	15.8
Negative	31	81.6
Unknown	1	2.6
Resistance to previous chemotherapies (Anthracycline/Taxane)		
Primary resistance/Primary resistance	7	18.4
Primary resistance/Secondary resistance	11	29.0
Secondary resistance/Primary resistance	6	15.8
Secondary resistance/Secondary resistance	11	29.0
Unknown	3	7.9
Prior trastuzumab		
Yes	30	78.9
No	8	21.2
Histology		
Invasive ductal carcinomas	34	89.5
Other	3	7.9
Unknown	1	2.6
Number of metastasis		
1	27	71.1
≥2	10	26.3
Unknown	1	2.6
Primary metastatic sites		
Lung	17	44.7
Liver	10	26.3
Bone	5	13.2
Skin	2	5.3
Peritoneum	1	2.6
Mediastinum	1	2.6
Pleura	1	2.6
Unknown	1	2.6

^a Eastern Cooperative Oncology Group**Fig. 1** Overall survival curve (solid line) and progression-free survival curve (dotted line) of patients with HER2 overexpressing metastatic breast cancers with capecitabine and trastuzumab combination chemotherapy resistant to both anthracyclines and taxanes**Table 2** Response to therapy ($n = 38$)

Response	No. of Patients	%
Complete response	2	5.3
Partial response	5	13.2
Stable disease	20	52.6
Progressive disease	8	21.1
Not evaluated	3	7.9
Response rate	18.4% (95% CI, 7.7–34.3%)	
Clinical benefit rate (CBR = CR + PR + SD \geq 24 weeks)	21.1% (95% CI, 9.6–37.3%)	

CI confidence interval, CR complete response, PR partial response, SD stable disease for 6 weeks, PD progressive disease

13 (34%) or 10 (26%) of 38 patients had progressive disease during the treatment with anthracyclines or taxanes, respectively. There was no difference in overall survival in patients with and without history of trastuzumab ($P = 0.80$).

Anthracycline or taxane resistance and response to capecitabine and trastuzumab combination chemotherapy

The response rates of patients with primary and secondary resistance of anthracycline and taxane are shown in Table 3. There was no difference in response rate between primary and secondary resistance in anthracycline and taxane pretreated patients, respectively ($P = 0.73$).

Toxicity

Associated side effects are reported in Table 4; on the whole, they were mild. There were no treatment-related deaths. Regarding the hematological toxicities, neutropenia occurred in 19 patients but was grade 3 only in 2 patients (5%). Thrombocytopenia was rather uncommon, occurring

Table 3 Response rates classified by anthracycline or taxane resistance category

Anthracycline/ Taxane	Primary resistance/ Primary resistance	Primary resistance/ Secondary resistance	Secondary resistance/ Primary resistance	Secondary resistance/ Secondary resistance
No. of patients	7	11	6	11
Response rate (%)	1/7 (14.3)	2/11(18.2)	2/6 (33.3)	1/11(9.1)
95% CI	0.4–57.9	2.3–51.8	4.3–77.7	0.2–41.3

C Confidence interval. There was no difference in response rate among each group ($P = 0.73$)

(grade 1) in only two case (5%). Seven patients developed grade 2 anemia (18%). Grade ≥ 4 hematologic toxicity was not observed. No patient developed a documented infection, and none required hospitalization owing to toxicity. Moreover, grade 1/2 liver dysfunction (elevated AST, ALT, ALP, γ -GTP, and T-bil) was common (45, 34, 50, 34, and 42%), and grade 1/2 hypercalcemia and hypoalbuminemia was also common (45 and 32%). Regarding the nonhematological toxicities, the most common adverse events were hand-foot syndrome (grade 1/2/3 in 24; 63%), fatigue (grade 1/2 in 12; 32%), and diarrhea (grade 1/2/3 in 9; 24%). Mucositis occurred in 11 patients (grade 1 in 10; 29%). Serious adverse effects occurred in three patients (7.9%, 95% CI, 1.7–21.4%); 2 died of breast cancer and one died of accidental asphyxia. Twenty-three patients discontinued therapy because of disease progression in 13, physician's discretion in 4, adverse effects in 4 (grade 3 neutropenia at cycle 2, grade 2 general fatigue at cycle 2, and grade 3 hand-foot syndrome at cycle 2 and 5), and death in 2.

Discussion

We have detected three reports concerning the activity of capecitabine and trastuzumab in anthracyclines or taxanes-pretreated patients with HER2-overexpressing breast cancer [13–15]. However, there is no prospective study describing the activity of capecitabine and trastuzumab in patients with HER2-overexpressing breast cancer resistant to both anthracyclines and taxanes. This is the first report that the combination of capecitabine and trastuzumab is active in patients with HER2-overexpressing breast cancer resistant to both anthracycline and taxane. Moreover, we could observed that among the patients with the primary and secondary resistant to anthracycline and taxane, there was no difference in response rate.

In recent studies of various chemotherapeutic agents for breast cancer patients after failure of both anthracycline and taxanes, the median overall survival was 12.8 months with capecitabine alone [8], 7.8 months with gemcitabine alone [20], 7.4 months with gemcitabine and cisplatin [21], and 10.3 months with gemcitabine and pemetrexed [22]. In the

present study, we suggested that the median overall survival was prolonged to 22.3 months with the combination of capecitabine and trastuzumab for patients resistant to both anthracyclines and taxanes. Therefore, we speculate that trastuzumab with capecitabine can increase the overall survival in patients with these HER2 overexpressing metastatic breast cancers. For such category of patients, one phase II study of trastuzumab plus gemcitabine in both anthracycline and taxane-pretreated patients with metastatic breast cancer, the median overall survival was reported to be 14.7 months [23]. Further, Fig. 1 shows that 79% of the patients enrolled in the present study had a past history of trastuzumab administration. Very recently, Minckwitz et al. [24] reported a higher efficacy for continuing trastuzumab beyond trastuzumab progression when second-line chemotherapy with capecitabine was initiated.

Until recently relative few clinical data were available concerning the combination of trastuzumab with capecitabine. Osako et al. [14] retrospectively evaluated the efficacy and safety of combination therapy of trastuzumab plus capecitabine in heavily pretreated patients with HER2-positive metastatic breast cancer. They investigated objective response rate, clinical benefit rate, and time-to-treatment failure according to RECIST. A total of 49 patients were assessed and median follow-up time of patients was 16.2 months (1.4–43.5 months). Objective response rate was 16% (95% CI: 7–30%) and clinical benefit rate was 47% (95% CI: 32–62%). Median time-to-treatment failure was 5.4 months. Osako's report suggests the combination therapy of trastuzumab plus capecitabine was active and tolerable for heavily pretreated patients with HER2-positive metastatic breast cancer. The combination therapy with capecitabine and trastuzumab has been used by the other investigators as a first-line [25] or second-line [13] treatment for metastasis from breast cancer. Patients receiving trastuzumab and capecitabine as first-line therapy had a longer time to disease progression than did patients receiving this treatment as second- or third-line therapy (median time to disease progression, 9.3 vs. 6.7 months, $P < 0.05$), but did not have longer overall survival (median overall survival, 26.0 vs. 28.0 months).

As to the toxicities of the combination therapy with capecitabine and trastuzumab, Schaller et al. [13] reported

Table 4 Toxicity results

Toxicity grade ^a	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
	No. of patients (%)	No. of patients (%)	No. of patients (%)	No. of patients (%)
Hematological toxicity				
Anemia	1 (2.6)	7 (18.4)	0	0
Leucocytopenia	1 (2.6)	6 (15.8)	0	0
Neutropenia	11 (28.9)	6 (15.8)	2 (5.3)	0
Thrombocytopenia	2 (5.3)	0	0	0
Elevated ALP	17 (44.7)	2 (5.3)	0	0
Elevated AST	14 (36.8)	3 (7.9)	0	0
Elevated ALT	12 (31.6)	1 (2.6)	0	0
Elevated γ -GTP	8 (21.1)	3 (7.9)	2 (5.3)	0
Elevated T-Bil	11 (28.9)	5 (13.2)	0	0
Elevated creatinine	1 (2.6)	0	0	0
Hypercalcemia	16 (42.1)	1 (2.6)	0	0
Hypoalbuminemia	12 (31.6)	0	0	0
Nonhematological toxicity				
Hand-foot syndrome	16 (42.1)	5 (13.2)	3 (7.9)	0
Mucositis	11 (28.9)	0	0	0
Nausea	8 (21.1)	0	0	0
Vomiting	4 (10.5)	0	0	0
Diarrhea	7 (18.4)	1 (2.6)	1 (2.6)	0
Constipation	0	0	1 (2.6)	0
Abdominal pain	1 (2.6)	0	0	0
Edema	3 (7.9)	0	0	0
Rash	1 (2.6)	0	0	0
Hyperpigmentation	5 (13.2)	0	0	0
Pruritus	1 (2.6)	0	0	0
Injection site reaction	1 (2.6)	0	0	0
Nail changes	1 (2.6)	1 (2.6)	0	0
Ulceration	1 (2.6)	0	0	0
Cervical pain	1 (2.6)	0	0	0
Chest pain	2 (5.3)	0	0	0
Cough	2 (5.3)	1 (2.6)	0	0
Sputum	0	1 (2.6)	0	0
Dyspnea	0	1 (2.6)	0	0
Fever	3 (7.9)	1 (2.6)	0	0
Fatigue	10 (26.3)	2 (5.3)	0	0
Appetite loss	2 (5.3)	1 (2.6)	0	0
Weight loss	0	1 (2.6)	0	0
Headache	5 (13.2)	0	0	0
Dizziness	1 (2.6)	0	0	0
Voice changes	1 (2.6)	0	0	0
Impaired motor function	4 (10.5)	0	0	0
Photophobia	0	1 (2.6)	0	0
Cataract	0	1 (2.6)	0	0
Back pain	1 (2.6)	0	0	0
Urinary retention	1 (2.6)	0	0	0
Pain on urination	1 (2.6)	0	0	0

^a According to National Cancer institute common Toxicity Criteria

that the safety profile of this combination was favorable for breast cancer patients with HER2-overexpressing anthracycline- and/or taxane-pretreated breast cancer. The most common adverse events were pain, hand-foot syndrome, and gastrointestinal toxicities. In the present study, we confirmed that this combination therapy was safe and well tolerated regimen. Moreover, the present study suggested that grade 1/2 liver dysfunction (elevated AST, ALT, ALP, γ -GTP, and T-bil) was common in the combination therapy of capecitabine and trastuzumab. As to the hematological toxicities, grade 1/2 anemia occurred in 21% patients in the present trial versus 68% in Schaller's trial, but grade 3/4 anemia in 5% versus 8% patients. Moreover, regarding the nonhematological toxicities, grade 1/2 hand-foot syndrome, one of the most common adverse events, occurred in 55% patients in this present trial versus 68% in Schaller's trial, but grade 3/4 in 8 versus 16% patients. Because it was reported that no clinically relevant differences in the pharmacokinetics of capecitabine and its key metabolites 5'-DFUR, 5'-DFCR, and 5-FU were found between Japanese and Caucasian patients [26], the lower incidence of toxicity observed in our study may be due to the difference of total doses of capecitabine between the present trial and Schaller's trial: the total dose of the present trial [about $156,586 \text{ mg/m}^2$: $1,657 \text{ mg/m}^2 \times 21 \text{ days} \times 4.5$ (median treatment cycles)] versus that of Schaller's trial (about $280,000 \text{ mg/m}^2$: $2,500 \text{ mg/m}^2 \times 14 \text{ days} \times 8$ (median treatment cycles)). The reason why we selected a dose $1,657 \text{ mg/m}^2/\text{day}$ during 21 days with a subsequent pause of 7 days as given capecitabine was rigorously based on the previous result in Japan [27]. There were no differences in response rate (20 vs. 20%) and median time to disease progression (2.8 vs. 3.0 months) between the different drug administrations from Japan and US [8, 27]. Consistent with this, further investigations are needed to assess the safety in additional clinical trials.

In conclusion, the combination of capecitabine and trastuzumab is active and well-tolerated in patients with HER2-overexpressing breast cancer well defined resistance to both anthracyclines and taxanes. Although at present, the other chemotherapeutic agents such as vinorelbine and oxaliplatin are under way for such category group disease [28], our results suggest that this combination therapy may be established as a third line chemotherapy for these breast cancer patients, by using the overall survival as primary endpoint and the progression-free survival and response rate as secondary endpoints, because the targeted patients in the present study had highly dismal disease.

Acknowledgments We thank Keiko Miyakoda and Tomomi Sakabayashi (Translational Research Informatics Center, Kobe, Japan) for their statistical review and advice.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

Appendix

The following individuals and institutions participated in this study: N. Ohuchi, MD, T. Ishida, MD, M. Takeda, MD, Tohoku University Hospital, Sendai, Japan; Y. Takatsuka, MD, T. Aihara, MD, Kansai Rosai Hospital, Amagasaki, Japan; N. Masuda, MD, Osaka National Hospital, Osaka, Japan; S. Noguchi, MD, T. Taguchi, MD, Osaka University Hospital, Suita, Japan; R. Nishimura, MD, Kumamoto City Hospital, Kumamoto, Japan; G. Amano, MD, Sakata City Hospital, Sakata, Japan; M. Tamura, MD, M. Takehara, MD, Hokkaido Cancer Center, Sapporo, Japan; T. Ohmura, MD, Sapporo Medical University Hospital, Sapporo, Japan; Y. Narita, MD, Teine Keijinkai Hospital, Sapporo, Japan; M. Kashiwaba, MD, Iwate Medical University Hospital, Morioka, Japan; Y. Kiyosawa, MD, Nakadori General Hospital, Akita, Japan; T. Hashizume, MD, Akita City Hospital, Akita, Japan; S. Kimura, MD, M. Kamiga MD, Yamagata University Hospital, Yamagata, Japan; A. Kikuchi, MD, S. Kudo MD, Yamagata Prefectural Central Hospital, Yamagata, Japan; H. Hirakawa, MD, A. Tazawa MD, Tohoku Kosai Hospital, Sendai, Japan; K. Namiki, MD, R. Yoshida, MD, Osaki Citizen Hospital, Osaki, Japan; T. Nomizu MD, Hoshi General Hospital, Koriyama, Japan; E. Fukuma, MD, Kameda General Hospital, Kamogawa, Japan; N. Yamamoto, MD, Chiba Cancer Center, Chiba, Japan; M. Toi, MD, S. Saji MD, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital, Tokyo, Japan; H. Tahara, MD, Y. Takeda, MD, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan; S. Nakamura, MD, St. Luke's International Hospital, Tokyo, Japan; M. Kusama, MD, Tokyo Medical University Hospital, Tokyo, Japan; T. Asaga, MD, M. Inaba, MD, Kanagawa Cancer Center, Yokohama, Japan; M. Fukuda, MD, H. Ogata, MD, St. Marianna University Hospital, Kawasaki, Japan; K. Iwase, MD, Fujita Health University Hospital, Toyoake, Japan; H. Yoshino, MD, Ishikawa Prefectural Central Hospital, Kanazawa, Japan; E. Shiba, MD, Osaka Kosei Nenkin Hospital, Osaka, Japan; J. Matsuoka, MD, Okayama University Hospital, Okayama, Japan; S. Murakami, MD, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Hiroshima, Japan; S. Mitsuyama, MD, Kitakyushu Municipal Medical Center, Kitakyushu, Japan.

References

1. Ueno M, Kiba T, Nishimura T et al (2007) Changes in survival during the past two decades for breast cancer at the Kyoto University Hospital. *Eur J Surg Oncol* 33:696–699

2. Petrelli F, Cabiddu M, Cazzaniga ME et al (2008) Targeted therapies for the treatment of breast cancer in the post-trastuzumab era. *Oncologist* 13:373–381
3. Beslija S, Bonnetterre J, Burstein H et al (2007) Second consensus on medical treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 18:215–225
4. Ueno NT, Buzdar AU, Singletary SE (1997) Combined-modality treatment of inflammatory breast carcinoma: twenty years of experience at M. D. Anderson Cancer Center. *Cancer Chemother Pharmacol* 40:321–329
5. Berg CD, Swain SM (1994) Results of concomitantly administered chemoradiation for locally advanced noninflammatory breast cancer. *Semin Radiat Oncol* 4:226–235
6. <http://www.uptodate.com/patients/content/topic.do?topic-Key=cancer/2904>
7. Hynes NE, Stern DF (1994) The biology of *erbB-2/neu/HER-2* and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198:165–184
8. Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP (1998) ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 34:791–808
9. Blum JL, Jones SE, Buzdar AU et al (1999) Multicenter phase II study of capecitabine in paclitaxel-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 17:485–493
10. Blum JL, Dieras V, Lo Russo PM et al (2001) Multicenter, phase II study of capecitabine in taxane-pretreated metastatic breast carcinoma patients. *Cancer* 92:1759–1768
11. Reichardt P, Von Minckwitz G, Thuss-Patience PC et al (2003) Multicenter phase II study of oral capecitabine (Xeloda[®]) in patients with metastatic breast cancer relapsing after treatment with a taxane-containing therapy. *Ann Oncol* 14:1227–1233
12. Fumoleau P, Lartigand R, Clippé C et al (2004) Multicenter, phase II study evaluating capecitabine monotherapy in patients with anthracycline- and taxane-pretreated metastatic breast cancer. *Eur J Cancer* 40:536–542
13. Schaller G, Fuchs I, Gonsch T et al (2007) Phase II study of capecitabine plus trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2 overexpressing metastatic breast cancer pretreated with anthracyclines or taxanes. *J Clin Oncol* 25:3246–3250
14. Osako T, Ito Y, Takahashi S et al (2008) Efficacy and safety of trastuzumab plus capecitabine in heavily pretreated patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 62:159–164
15. Bartsch R, Wenzel C, Altörjai G et al (2007) Capecitabine and trastuzumab in heavily pretreated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 25:3853–3858
16. Ando M, Watanabe T, Nagata K et al (2001) Efficacy of docetaxel 60 mg/m² in patients with metastatic breast cancer according to the status of anthracycline resistance. *J Clin Oncol* 19:336–342
17. http://ctep.cancer.gov/forms/CTCv20_4-30-992.pdf
18. Therasse P, Arbuick SG, Eisenhauer EA et al (2000) New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 92:205–216
19. Burzykowski T, Buyse M, Piccart-Gebhart MJ et al (2008) Evaluation of tumor response, disease control, progression-free survival, and time to progression as potential surrogate end points in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 26:1987–1992
20. Smorenburg CH, Bontenbal M, Seynaeve C et al (2001) Phase II study of weekly gemcitabine in patients with metastatic breast cancer relapsing or failing both an anthracycline and a taxane. *Breast Cancer Res Treat* 66:83–87
21. Tas F, Guney N, Derin D et al (2008) Biweekly administration of gemcitabine and cisplatin chemotherapy in patients with anthracycline and taxane-pretreated metastatic breast cancer. *Invest New Drugs* 26:363–368
22. Ma CX, Steen P, Rowland KM et al (2006) A phase II trial of a combination of pemetrexed and gemcitabine in patients with metastatic breast cancer: an NCCTG study. *Ann Oncol* 17:226–231
23. O'Shaughnessy JA, Vukelja S, Marsland T et al (2004) Phase II study of trastuzumab plus gemcitabine in chemotherapy-pretreated patients with metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 5:142–147
24. Minckwitz G, Zielinski C, Maarteense E et al (2008) Capecitabine vs. capecitabine + trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing during trastuzumab treatment: The TBP phase III study (GBG 26/BIG 3-05). *J Clin Oncol* 26:1025a
25. Xu L, Song S, Zhu J et al (2004) Results of a phase II trial of Herceptin plus Xeloda in patients with previously untreated HER2-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 88(suppl 1):S128
26. Reigner B, Watanabe T, Schüller J et al (2003) Pharmacokinetics of capecitabine (Xeloda) in Japanese and Caucasian patients with breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 52:193–201
27. Watanabe T, Katsumata N, Sasaki Y et al (1991) A multicenter phase II Trial of Xeloda[™] (Capecitabine) in patients with docetaxel-refractory advanced/metastatic breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 20:1991a
28. <http://www.clinicaltrials.gov>

1-6 機能性ナノ粒子による生体イメージング —がん診療への応用—

武田元博 東北大学大学院医学系研究科
小林芳男 茨城大学工学部生体分子機能工学科
小林正樹 東北工業大学知能エレクトロニクス学科
桜井 遊 東北大学大学院医学系研究科
甘利正和 東北大学大学院医学系研究科
石田孝宣 東北大学大学院医学系研究科
鈴木昭彦 東北大学大学院医学系研究科
大内憲明 東北大学大学院医学系研究科

1 はじめに

ナノテクノロジーにおける物質創製は、分子レベルで物質を合成するボトムアップ法と、従来存在する物質の分解・分割で小さな物質を新たに創り出すトップダウン法の、2つの異なる物質制御技術からなる。さらに近年in-silico designと呼ばれる、シミュレーションによって有用・安定な化学構造を予測し合成する手法や、合成した物質の物性から構造を予測する手法が出現するなど、多くの工学分野がナノテクノロジーに関与している。

これらナノレベルの物質制御技術は、現在急速な勢いで発展し、そこから生み出されたさまざまな物質は、われわれの生活を大きく変える可能性を秘めている。たとえば、ナノサイズへ微小化された電子回路の部品や、これらを組み合わせでできたデバイスによるマイクロまたはナノサイズの装置や、新たな機能を付与して創製された分子・クラスターなどの物質が挙げられ、これらの技術は従来の“もの作り”をベースとして、シミュレーションやナノメートルオーダーの計測技術などの新しい技術を巻き込みながらさらに発展していこうとしている。

このように、ナノテクノロジーは従来にはない機能を持った物質を生み出しつつあり、それらは医療においても利用可能と考えられることから、現在、その応用が試み始められている。さまざまな疾患の中で、がんは1985年以降、日本人の死因の第1位を占めており、働き盛りの年代のがん死は人口の急速な高齢化が進むわが国において、もっとも緊急に改善しなければならない課題の

1つである。われわれは、特になん診療において、診断から治療にいたるまでのさまざまな段階で機能性ナノ粒子を医療応用することを目指して研究を行っている。

本稿では、特になん診療において求められるナノテクノロジーへの期待を中心に、(1) 機能性ナノ粒子とは何か、(2) 医療における画像診断の重要性、(3) われわれが取り組んでいる新しい機能性ナノ粒子と医療における画像診断応用、(4) 機能性ナノ粒子を用いたイメージングの今後の展開について、順に概説する。なお、われわれが開発したX線造影用のヨウ化銀ビーズについては作成法についても解説する。

2 機能性ナノ粒子とは何か

ナノ粒子は、数百ナノメートル以下の大きさを持つ粒子と定義され、量子ドット、金コロイド、ヨウ化銀ビーズなどの無機物から、 dendrimer^[1]、リポソーム^[2]、高分子ミセル^[3]などの有機物まで、きわめて多彩な材料が該当する。人工的に作られたナノ粒子は、それぞれさまざまな目的で作られており、たとえば量子ドットはそれ自体優秀な蛍光特性を持ち、有機系蛍光色素の20~30倍もの蛍光強度、高い耐光性、励起波長の多様性などを示す。ヨウ化銀ビーズは、X線造影効果を持つ材料として作製されている。

また dendrimer やリポソーム、高分子ミセルなどは薬剤を内包する空間を持つことから Drug Delivery System (DDS) に利用される。DDSとは、薬剤を目的とする標的臓器・部位へ輸送するシステムのことであり、たとえば dendrimer は樹枝状に伸びたポリマーの多数の枝の間に物質を挟み込み、またリポソームや高分子ミセルなどは、中空であるため、内部に薬剤を内包することによって DDS に利用される。薬剤を内包することによって健常部位に対する副作用を軽減し、病巣での薬剤放出を狙うのである。

このように、機能を有するナノ粒子を生体に投与する場合、病変部に特異的に集積してそれぞれの機能を発揮することはもちろん重要であるが、病変部外に存在するナノ粒子の振る舞いも重要である。つまり、体内動態はナノ粒子の安全性に直結する。理想的には体内に蓄積することなく、排泄または分解される必要があり、ナノ粒子は排泄経路も考慮して作製されるべきなのである。

ナノ粒子の大きさはさまざまであるが、医療応用する際にサイズが大きな意義を持つ場合がある。それは悪性腫瘍のDDSとして応用する場合である。

悪性腫瘍の早い成長には血流が欠かせないが、多くの悪性腫瘍は血管成長因子を直接分泌して自らの腫瘍の成長に必要な血管を新生し、腫瘍周囲の血管網を構築する。これを腫瘍血管というが、腫瘍血管は急速に成長する腫瘍に対して血流を賄うため急速に構築される。そのため通常の血管内皮と構造が異なり血管孔が大きいことが指摘されている^[4]。その結果、通常では通過し得ない数十から百ナノメートルの物質を透過させることが知られている。この性質を利用して、100nm程度またはそれ以下のナノ粒子を作製して、腫瘍間質に選択的に取り込ませることで腫瘍への効率的なDDSを得ることができる。また腫瘍選択的な薬剤の到達によって、健常組織のダメージを軽減できると期待される。

3 医療における画像診断の重要性

医療の基本は病気予防、診断、および治療である。治療を行う前に診断をつけなければならない。診断においては、①正しい病名；何の病気であるか、②正しい病期；どの程度の重さの病気なのか（例、がんの進行度＝病期）、③正確な原因；何が原因なのか（明らかでないことも多いが）をまず明らかにしようとする。これらは病気を正しく治療するために必須の事項である。

暫定的な診断が決定した後、治療が開始される。もちろん、診療初期には症状に対する治療を行い、経過を見ながら診断をつけていくことも珍しくない。この場合も医師は絶えず正しい診断は何かを考えながら、治療に対する効果を確かめつつ追加の検査を行い、正しい診断に向かうこととなる。がん診療における病名診断には組織診断がきわめて重要である。病名診断に続き、その拡がり、すなわち病期診断が行われる。その際、非常に重要な役割を担っているのが画像診断である。

X線CTやMRI、PETなどの新しい画像診断は、従来の単純X線写真に頼った診断法を一変させた。すなわち、従来得ることのできなかつた三次元的情報が得られるようになったのである。画像診断は特に固形がんで重要であり、がんの代謝機能を検出するPETの出現で質的診断を可能とする画像診断はさらに

その重要性を増している。画像診断は特にがんなどにおいて診断から外科治療・放射線治療などの局所療法を行う際、その範囲を決定するための重要な手段である。

4 われわれが取り組んでいる新しい機能性ナノ粒子と医療における画像診断応用

以下、それぞれの機能性ナノ粒子について解説する。

4-1 蛍光マーカー

蛍光薬は眼底撮影などの血管造影、リンパ管造影などに用いられてきた。近年、量子ドットが開発され、その優れた蛍光特性からさらに多くの応用法が考えられてきた。

外科領域では、がん手術の際のセンチネルリンパ節生検に蛍光ナノ粒子を用いる手法が注目されている。その理由は、センチネルリンパ節生検に用いる造影剤には適切な粒子サイズが必要とされ、蛍光ナノ粒子はその最適なサイズをとり得るからである。ある一定の大きさに調整可能な蛍光ナノ粒子としては、①量子ドット、②シリコンナノ粒子、③蛍光色素含有ポリスチレンビーズなどが挙げられる。

まず、①量子ドットは半導体の結晶であり、蛍光波長は材料、粒径によって決定される。最もポピュラーに利用される量子ドットは、カドミウムセレンであるが、同じ材料でありながら粒径を1~3nmと変えることで、青から赤に蛍光波長を変えることができる。そのほかの特徴として、材料が光学的に安定なため、蛍光がきわめて退色しにくく、蛍光寿命が従来の有機系蛍光色素に比べて長いという点が挙げられる。市販のものは蛍光特性改善のためにZnS、ポリマーなどでコーティングされ、粒径が17nm程度となっている。欠点として、高価なこと、および材料にカドミウムを用いているため、安全性についての懸念が挙げられる。

②シリコンナノ粒子も粒径を変えることにより、波長可変である。物質として安定であり有害な元素を含まないことが最大の利点である。また材料が高価、豊富であるため、安全性、経済性の面で注目されている。

③蛍光色素内包ポリスチレンビーズは、ポリスチレンビーズ樹脂中に蛍光色

素を含有したもので、直径20, 40, 100, 200, 500, 1000nmのサイズの均一なビーズがそれぞれ市販されている。蛍光波長は、可視域から近赤外まで複数の波長が選択できる。欠点は、量子ドットと比較すると蛍光寿命が短く、退色が早い。また高価なことが挙げられる。

前述したように、ナノサイズ蛍光ビーズの最も重要な医療応用の1つとして、がん手術におけるセンチネルリンパ節生検が挙げられる。センチネル(sentinel)とは英語の軍隊用語で、歩哨、見張りを示す。現在、センチネルリンパ節生検に基づく手術が、外科領域におけるティラーメイド医療として脚光を浴びている。がん病巣から最初にリンパ流を受けるリンパ節、すなわちセンチネルリンパ節を探し当て、そのリンパ節の転移状況を調べることにより転移そのものの有無を診断し、その結果から他のリンパ節の転移の可能性を判断する方法である。センチネルリンパ節に転移がない場合は、その他のリンパ節に転移がないと判断でき、リンパ節郭清(予防的な除去)範囲を縮小、省略できる。その際、がんの手術に先立って、センチネルリンパ節を検出することが必要となってくるが、現在は主に ^{99m}Tc 標識コロイドに代表されるラジオアイソトープ(RI)法と、イソソルフアンブルー、インドシアニンググリーンなどによる色素法が用いられている。

この2つの方法を、単独あるいは併せて用いることで、精度高くセンチネルリンパ節を同定することができるが、それぞれに長短所がある。RIの長所としては、皮切前に体外から同定可能であり、最小限の皮切で生検可能、深部のリンパ節に対しても有用、定量的・客観的評価が可能といったことが挙げられる。短所としては、検査費用が高価であり、また、放射線の取り扱いに対する法的な規制から、限られた施設でしか行えないのが難点である。一方、色素法は安価で、手技が簡便である反面、熟練を要し、また体外診断できないので客観的評価が難しい。センチネルリンパ節が存在する可能性のもっとも高い場所を推測して皮切を加えるため、最適なアプローチが時として困難である。

そこで、われわれはそれらと併用あるいは代替となる新たな診断法として、蛍光ビーズをトレーサーとして使用する方法に着目した。蛍光計測法はRIと異なって、煩雑な取り扱いなしに体外診断、客観的評価が可能であり、また、手術中リアルタイムに蛍光観察することにより視認できる。

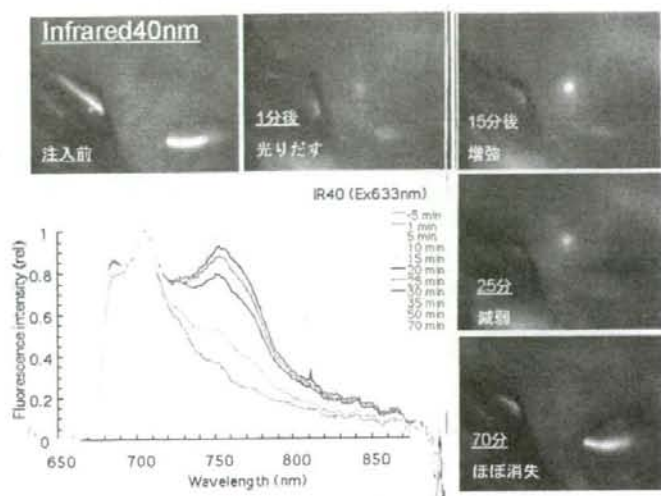


図1-6-1 Infrared 40nmビーズを注射後の右鼠径リンパ節の蛍光画像と分光スペクトル

生体内に投与されたナノ粒子の挙動を規定する要因としては、化学的要因（化学的組成、表面電荷、pH、浸透圧など）、物理的要因（粒径、粒径分布、粒子の形、濃度分布、粒子の安定性など）などがあるが、そのなかでも粒径は最も大きな要因である。すなわち、径がごく小さなものは、間質腔から内皮細胞間隙を通過して毛細リンパ管内に入り込むが、ある程度大きくなるとマクロファージの貪食作用で取り込まれた後にリンパ節に運ばれる。

われわれはラットをモデルとして、蛍光ポリスチレンビーズを用いたセンチネルリンパ節検出法における最適な粒径および蛍光波長について検討を行った。その結果、数分から30分程度の造影効果を得るには粒径40nmが最も集積性に優れ、蛍光波長は近赤域が最もS/N比の優れた波長であることが示された（図1-6-1）¹⁵⁾。さらに蛍光計測法は、従来法の1つである色素法よりもセンチネルリンパ節検出率において優れていることが示されている。

蛍光法の欠点は、蛍光そのものが肉眼ではわかりにくいいため、蛍光計測装置が必要であることと、現在の計測方法では深部方向の計測限界が1cm程度であることである。検出限界が1cm程度では、乳がんにおける腋窩のセンチネルリンパ節検出は困難で、体表リンパ管の描出のみ可能である。したがって量子ドットの特性を生かす、新しい原理に基づく蛍光検出法が必要である。タイム

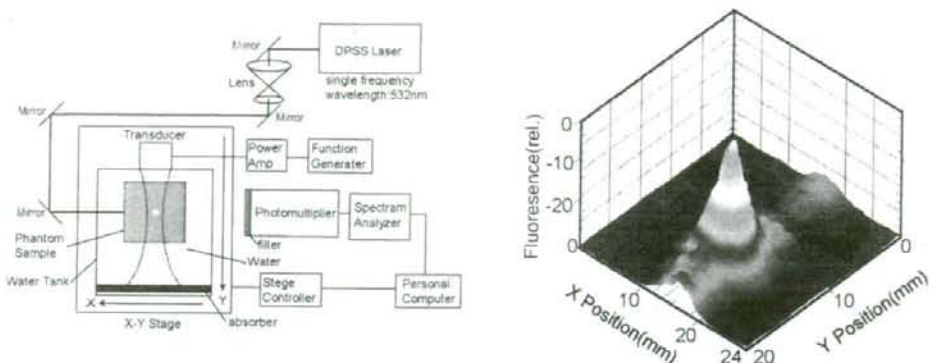


図1-6-2 超音波タグ蛍光断層イメージングシステムのブロック図(左)およびIntralipid-アガロースゲル内に蛍光物質を包埋した生体模擬試料内部の蛍光分布画像(右)

ゲート方式や、超音波変調法などが深部の蛍光色素検出法として考えられるが、小林らは超音波変調に基づく音響学的効果を利用した新規手法で、3cm程度の深部の蛍光色素検出を可能とした(図1-6-2)^[6]。早期の実用化が望まれる。

またわれわれは基礎医学領域で、輝度の高い量子ドットを結合した薬物や生体分子を観察する、1分子イメージング法を確立した。薬物や生体分子の生体内動態観察が高い時間空間分解能で実現できたため、DDSの効率化を進める上で有用な新しい手法として注目されている^[7]。

4-2 X線造影剤

われわれは、数十ナノメートルの粒径を持つ新規のX線造影剤として、ヨウ化銀を核とし、シリカの被殻を持つナノ粒子を作製した。ナノサイズシリカコーティングヨウ化銀ナノ粒子生成と、そのシリカコーティングからなる。以下、小林が開発した作製手順について概説する^[8]。

①ヨウ化銀ナノ粒子作製

われわれは液相法を利用して、ヨウ化銀粒子を作製している。ヨウ素源としてヨウ化カリウム(KI)、銀源として、過塩素酸銀(AgClO_4)を用いる。それぞれの水溶液を作製し、ヨウ化カリウム水溶液を攪拌しながら過塩素酸銀を添加して、ヨウ化銀コロイド液を作製した。この方法により、約20nmの平均粒径を持つヨウ化銀ナノ粒子を作製することができた。

②ヨウ化銀ナノ粒子のシリカコーティング

ヨウ化銀ナノ粒子のシリカコーティングは、液層を利用したゾル-ゲル法を用いて行った。上記①で作製したヨウ化銀コロイド液にシランカップリング剤である3-mercaptopropyltrimetoxysiane (MPS)を加え、15分後にエタノール、オルトケイ酸テトラエチル (Tetraethyl orthosilicate, TEOS), 塩基性触媒であるジメチルアミン (dimethyl amine, DMA)を順に添加する。MPS, TEOS, DMAそれぞれの濃度を変え、最適な濃度条件を選定した。

TEOS濃度を変えることで、シリカ殻の厚さを調整できることがわかった。実験の結果、TEOS濃度は $0.002 \sim 0.004 \text{ mol/l}$ が最適で、それ以上になるとシリカ粒子が増えることが明らかになった。また、触媒として用いるDMAはシリカ殻の生成に関わり、濃度として $0.01 \sim 0.1 \text{ mol/l}$ において有効にシリカ殻が生成されることがわかっている。以上の条件で、平均粒子径約60nmのシリカコーティングヨウ化銀ビーズを作製することに成功した (図1-6-3)。

シリカコーティングヨウ化銀ビーズを、X線CTの造影剤として用いた場合の造影CT像を図1-6-4に示す。これはラットにシリカコーティングヨウ化銀ビーズ懸濁液を静脈注射し、注射前、60分後に撮影した肝、脾のCT像である。従来の造影剤は造影効果が数分で終了し、長時間の造影効果が得られない。シリカコーティングヨウ化銀ビーズは、ある程度粒径が大きいいため、血流の緩やかな血管洞の存在する肝臓や脾臓において長時間造影効果が得られるものと考えられる。このため一回の造影剤投与で、一定時間後の繰り返し撮影

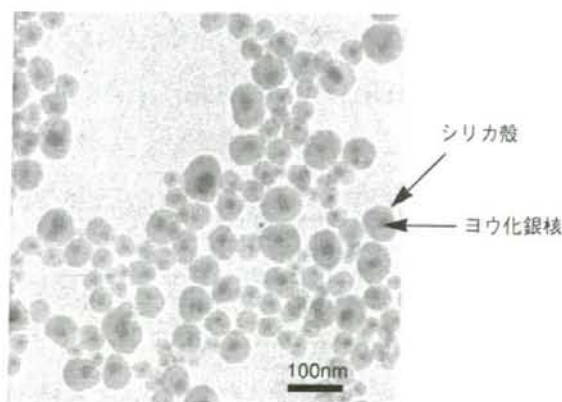


図1-6-3 シリカコーティングヨウ化銀ビーズの透過電顕像

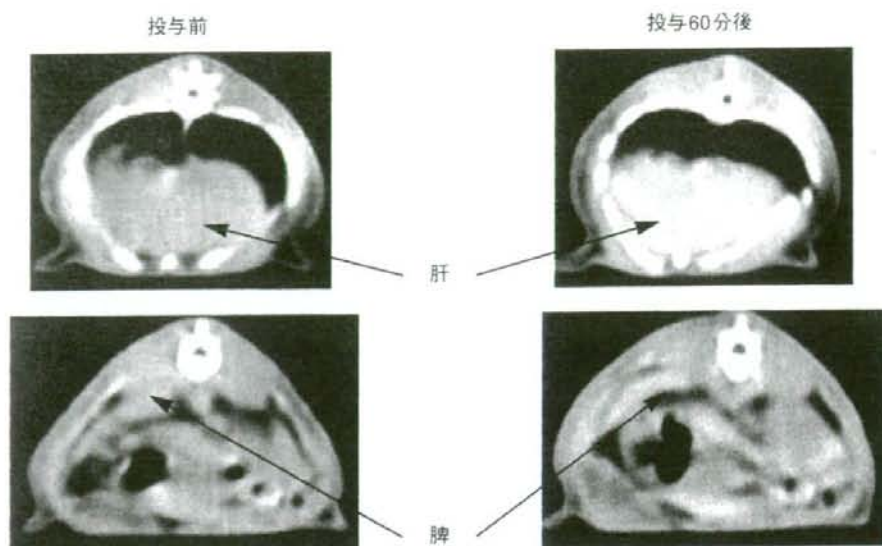


図1-6-4 シリカコーティングヨウ化銀ビーズ静脈注射後の肝および脾の造影効果

が可能である。すなわち、がんの外科手術において、術前に一度造影するだけで、切除前の三次元マーキングと切除後の病巣確認がCT撮影で可能となる。

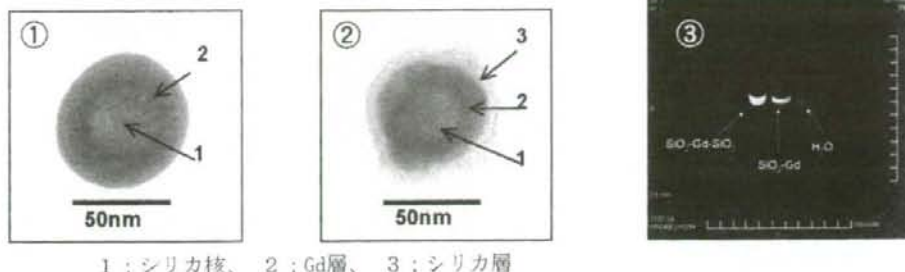
ナノサイズヨウ化銀ビーズはセンチネルリンパ節生検にも応用可能であり、予備的検討でも長時間の造影効果が示された。しかし現段階では造影効果が弱く、濃度、粒径などさらに検討が必要である。

4-3 MRI造影剤

ガドリニウムのような常磁性元素を用いたナノ粒子が作製されている。われわれはナノサイズヨウ化銀ビーズと同様MRI造影剤として、ガドリニウムを用いたナノ粒子を作製した。ガドリニウムは水溶液中でコロイド形成し難いため、まずシリカ核をStöber法で作製し、これにガドリニウムが沈着するようにして作製した。作製したガドリニウムナノ粒子は、MRIにて水に比較して高信号が得られた(図1-6-5)。

5 機能性ナノ粒子を用いたイメージングの今後の展開

近年、悪性腫瘍血管の構築上の特性による、ナノ粒子の選択的腫瘍造影効果が指摘されているが、ナノ粒子のサイズ選択による腫瘍への選択的蓄積は、



1 ; シリカ核、 2 ; Gd層、 3 ; シリカ層

- ① $\text{SiO}_2\text{-Gd}$ 粒子の走査透過電子顕微鏡像
- ② $\text{SiO}_2\text{-Gd-SiO}_2$ 粒子の走査透過電子顕微鏡像
- ③ ナノサイズガドリニウム粒子懸濁液のT1強調MRI画像

図 1-6-5 ナノサイズガドリニウム粒子懸濁液のT1強調MRI画像

今後のDDSのあり方に大きく影響すると予測される。現在、抗がん剤結合ナノ粒子の作製が試みられているが、抗体を利用した超選択的DDSはイメージングのみならず、治療においても大きな力を発揮するものと考えられる。現時点で、高分子PEGミセルを初めとした、いくつかのナノ粒子についての臨床試験が進行中である。その結果は1~2年先になると考えられるが、良好な抗腫瘍効果と副作用低減が見込まれることから、新しい抗がん剤DDSとして期待される。

われわれの研究により、数十ナノメートル程度の粒径のマーキング機能を持つナノ粒子は、一定時間臓器に滞留し造影効果を持続することが示唆されている。病巣を長時間描出し続ける新規造影剤の特性は、外科治療や放射線治療において治療標的を可視化し加療する上で大きな利点であり、この性質を利用した新たな治療法の確立が大いに期待される。

また、量子ドットはきわめて明るい優れた蛍光材料であるが、医療应用のためには、現在の蛍光計測の計測限界を超える深部の計測技術の開発が必要である。われわれの超音波変調に基づく、音響学的効果を利用した方法で3cm程度の深部の蛍光色素検出が可能となった。優れた機能を持つナノ粒子であっても、同時に計測法が進歩しなければ活用が難しい場合もあるといえる。

ナノ粒子には従来にない新規物質が多く、その医療应用にはそれぞれに安全

性の確立が必須である。安全性評価については、急性毒性のみでなく、成長・生殖毒性なども考慮するべきである。ナノ粒子の医療応用を実現させるためには、開発を進めるのみではなく、安全性に関する一定の基準に基づいたガイドラインの早期確立を実現させ、その基準を満たすナノ粒子の創製を目指していかなければならない。

[執筆者プロフィール]

ただ もとひろ

1987年東北大学医学部卒業、2001年東北大学病院助手、05年より東北大学大学院工学研究科准教授。バイオロボティクス専攻、大学院医学系研究科 腫瘍外科学分野。研究・専門テーマは乳腺外科、ナノテクノロジーの医療応用

[参考文献]

1. Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. A. New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* (Tokyo), 17 (1985) 117-132.
2. Iga K, Ohkouchi K, Ogawa Y, Toguchi H, Membrane modification by negatively charged stearyl-polyoxyethylene derivatives for thermosensitive liposomes: reduced liposomal aggregation and avoidance of reticuloendothelial system uptake. *Drug Target.*, 2 (3) (1994) 259-67
3. Nishiyama N, Okazaki S, Cabral H, Miyamoto M, Kato Y, Sugiyama Y, Nishio K, Matsumura Y, Kataoka K., Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Res.* 15;63 (24) (2003) 8977-83
4. Maeda H, Matsumura Y, Tumorotropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* 6 (1989) 193-210
5. Nakajima M, Takeda M, Kobayashi M, Suzuki S, Ohuchi N, (total 5, 2nd) Nano-sized fluorescent particle as a new tracer for sentinel node detection: An experimental model for decision of appropriate size and wavelength. *Cancer Sci.*, 96 (2005) 353-356
6. Kobayashi M, Mizumoto T, Shibuya Y, Takeda M and Enomoto M, Fluorescence tomography in turbid media based on acousto-optic modulation imaging. *Applied Physics Letter*, 89 (2006) 1811022
7. Tada H, Higuchi H, Watanabe TM, Ohuchi N: In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice. *Cancer Research* 67 (2007) 1138-1144
8. Kobayashi Y, Misawa K, Takeda M, Kobayashi M, Satake M, Kawazoe Y, Ohuchi N, Kasuya A, Konno M. Silica-coating of AgI semiconductor nanoparticles. *Colloids and Surfaces A*, 251 (2004) 197-201

1-5 単一量子ドットのバイオ・医療ナノイメージング

樋口秀男 東北大学先進医工学研究機構
大内憲明 東北大学医学研究科第2外科

現代の医学は、われわれの身体の生理現象や疾患を分子レベルで解明する方向に進んでいる。なかでも細胞や分子イメージング分野は急速に発展をしている。これらのイメージングを可能にする装置として、光を利用した内視鏡・顕微鏡・光トポグラフィー、音の反射を利用した超音波、X線の吸収を利用したX線CT、水の回転緩和時間を核磁気共鳴法で測定するMRI、陽電子の位置を同定するPETが知られている。

現在人体に利用されているこれらの装置の空間分解能は、光で0.1~1mm、超音波やX-CTやMRIで1~10mm、PETで10mm程度である^[1, 2]。動物実験レベルでは、分解能は人より10~100倍程度よいのであるが、細胞レベル(10 μ m)でイメージングできる装置は光しかない。さらに細胞レベルを超えて真の分子レベルに向かうためには、光を利用することが最善である。近年の材料開発と顕微鏡技術の進歩により、強い蛍光を発する単一のナノ粒子である量子ドットをイメージングし、粒子の中心の位置を決める場合の位置精度は数nmにも達しており、まさに分子レベルのイメージングが可能である^[3-5]。この節では、最近の量子ドットを用いた単一分子レベル、かつnm精度のイメージングの原理や実験を説明する。

1 蛍光物質の生物科学への応用

ナノ粒子のなかでも、蛍光性量子ドットが現在これほど脚光を浴びているのは、生物学の蛍光観察の歴史と強い関係がある。天然石や生物には蛍光を発する物質、たとえば蛍(光)石や染料が多数存在する。1850年頃には、色素(染料)が人工的に合成された。20世紀前半までに化学分野で、蛍光分子の特性や量子化学的な解析がなされた。それ以後、高感度の蛍光分光器や蛍光顕微鏡が進歩し、生物への応用が発展した。近年では、細胞生物学や医療診断