

200812004A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

: ナノメディシン研究

研究課題: がん診断・治療両用高分子

ミセルターゲティングシステム

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横山 昌幸

平成21(2009)年4月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

：ナノメディシン研究

研究課題：がん診断・治療両用高分子
ミセルターゲティングシステム

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横山 昌幸

平成21（2009）年4月

目次

I. 総括研究報告

- がん診断・治療両用高分子ミセルターゲティングシステム----- 1
横山昌幸

II. 分担研究報告

- 1, リポソーム化造影剤を用いた DCE-MRI による微粒子の血管透過性評価--- 1 4
米谷芳枝
- 2, 合成レチノイド封入高分子ミセルの評価解析----- 1 8
川上茂
- 3, 高分子ミセルの生体有害性と腫瘍標的化の検証----- 2 1
川口隆憲
- 4, ナノ粒子の血管外移行と腫瘍内集積についての微小循環解析----- 2 4
堀勝義
- 5, SN-38 内包高分子ミセルポリマーミセルの臨床第 I 相試験に関する研究-- 2 8
濱口哲弥

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 3 2

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
総括研究報告書

がん診断・治療両用高分子ミセルターゲティングシステム

主任研究者 横山昌幸（財）神奈川科学技術アカデミー・プロジェクトリーダー

研究要旨 疎水性の抗がん剤を安定・高収率で内包する高分子の設計法を構築し、がんへのターゲティングを達成する。最終年度は、腫瘍血管作用薬を用いてより効果的な抗がん剤ターゲティング法の検討を行った。また、合成レチノイド封入高分子ミセルのあたらし安定ミセル内封入法と *in vivo* 活性解析を進めた。MRI 造影剤システムでは、優れた腫瘍選択的造影剤としての特性が確認された。

分担研究者

- ・ 米谷芳枝
星薬科大学 医薬品化学研究所
- ・ 川上茂
京都大学大学院 薬学研究科
- ・ 川口隆憲
福島県立医科大学病理学第2講座
- ・ 堀勝義
東北大学 加齢医学研究所
- ・ 濱口哲弥
国立がんセンター中央病院

A. 研究目的

高分子ミセルドラッグキャリアシステムは図1に示すように、合成高分子が数百分子会合しその内核に疎水性薬物を保持し、標的部位に選択性高く運搬することで、飛躍的に薬効を高め、副作用を減少させることができる。特に10~100nmの直径の極めて小さなナノサイズでありながら、多量の疎水性薬物を安定に封入することで、EPR効果（固形がん組織血管の透過性が充進している性質）を利用して固形がんへターゲティングできることが大きな特長である。

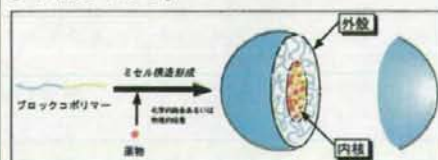


図1 高分子ミセル薬物キャリアシステム

既に、抗がん剤アドリアマイシン、タキソール内包高分子ミセルで、がん組織への

選択性高い集積が得られ、ヒトでの臨床試験が進行中である。本研究の目的は、薬物ターゲティングによりがん化学療法の有効性を飛躍的に高めるとともに、微小がんを検出できるMRIシステム開発にある。具体的な目標は、

- (1) 高分子ミセルによる非水溶性抗がん剤の固形がんターゲティングシステム確立
- (2) 分子標的薬と分化誘導剤封入高分子ミセルによる新規化学療法創出
- (3) 微小がんを検出する高分子ミセルMRI造影剤の開発である。

特に、診断（MRI）と治療（化学療法）を同一のキャリアシステムで行うことが可能となるために、さらに、高分子ミセル造影剤MRI画像から、高分子ミセル化学療法の有効性が予測され得る。これは患者個々へのオーダーメイド治療の実現につながる。（高分子ミセルMRI造影剤で明確に固形がん画像が得られた患者は、高分子ミセル抗がん剤での治療効果が高いと予想され得る。）

3年計画の最終年度である平成20年度は、以下の点に重点を行って研究を推進した。

- ・ ウィンドウチャンパー法を用いたがん組織での高分子ミセル集積挙動に及ぼす放射線照射や腫瘍血管破断薬の影響解析
- ・ 腫瘍血管破断薬AC7700と高分子ミセルの組み合わせによる、新規薬物及びMRI造影剤ターゲティング戦略の構築

・レチノイド封入高分子ミセルによる in vivo 抗がん活性評価
 ・高分子ミセルMR I 造影剤の Maus 固形がん造影挙動の解析

本年度に得られた具体的成果は以下の通りである。

- (1) 高分子ミセル内核に封入した薬物カンプトテシンの結晶状態と、封入機構を解析した。
- (2) DCE-MRI法によるナノサイズキャリアの腫瘍血管透過挙動を解析した。
- (3) 合成レチノイドAm80封入高分子ミセルによる Maus 腹膜播種モデルでの抗がん活性を得た。
- (4) ウィンドウチャンバー法による3mm以下の微小がんへのミセル集積挙動を解析した。そして放射線照射あるいは腫瘍血管破断薬AC7700投与によって、この微小がんへの集積が高まることを見いだした。
- (5) 現在進行中の高分子ミセル抗がん剤の臨床結果と動物でのデータの比較を行い、高分子ミセルのがんターゲティング研究の方向性を規定した。
- (7) 分化誘導剤レチノイドであるAm80の高分子ミセルからの放出を徐放化する新手法を確立した。
- (8) 高分子ミセル造影剤が Maus 固形がんを選択的に送達されることを観察した。また、3mm程度の微小がんにもターゲティングされること、AC7700の前投与によって送達量が高まることを見いだした。

以上のうち、(2)、(3)、(4)、と(5)は分担研究報告書にその結果を記す。本総括研究書では下線の(1)、(7)、(8)の内容を記す。

B. 研究方法

(1) カンプトテシン封入高分子ミセルの解析

高分子ミセルを形成するブロックコポリマーとして用いたものは、前年度と同じポリエチレングリコール-ポリ(β-ベンジル L-アスパルテート) (PEG-PBLA) ブロックコポリマーを基とし、それを加水分解してポリエチレングリコール-ポリ(アスパラギン酸)とし、それにエステル形成にて疎水基をアスパラギン酸残基に導入したものである。その合成経路を図2に示す。

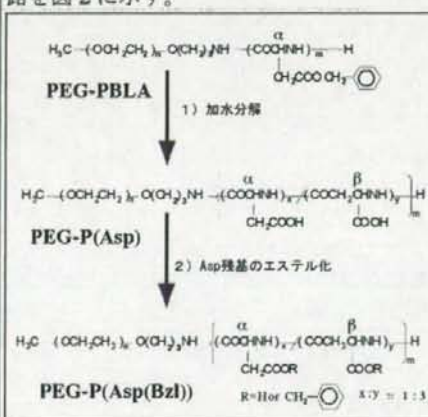


図2 ブロックコポリマーの構造

PEG-PBLAを加水分解したものがポリエチレングリコール-ポリ(アスパラギン酸) (PEG-P(Asp)) ブロックコポリマーであり、アルカリ加水分解のために、生成したアスパラギン酸残基はその70%程度がβ-アミドとなっている。それらに対してハライド化合物の求核置換反応によって74%ベンジルエステルを導入したPEG-P(Asp(Bzl))を得た。今回用いたものはいずれも、PEGの分子量が5,000、アスパラギン酸のユニット数が27のものを用いた。

このブロックコポリマー5mgに有機溶媒(2,2,2-trifluoroethanol (TFE)、もしくはCHCl₃)に溶解した、カンプトテシン溶液(1mg/mL)を加え攪拌し、溶媒を窒素気流下で蒸発させることによりフィルムを作製した。このフィルムに蒸留水4.0mLを加えて超音波照射を行い、遠心分離により沈殿物を取り除いた。

上清をフィルターで精製し、血中濃度測定の場合は0.9 wt%になるようNaClを加えた。ミセルの粒径はdynamic light scattering (DLS)で、水溶液中で行った。AFMによる観察には、ミセル溶液をmica基板上に滴下し、数分間接触させた後に水で洗浄し、窒素気流で乾燥させたフィルムを用いた。

(2) Am80封入高分子ミセルからの薬物放出を徐放化する新手法

Am80はATRAと同様に急性全骨髄球性白血病 (APL) の治療に有効であり、再発および難治性APL治療薬として認可されている。ヒト骨髄性白血病細胞HL-60に対する分化誘導能はATRAよりも強く、ATRAより化学的に安定であり、さらにATRA耐性の機構の一つと考えられる細胞内ATRA結合タンパク質との相互作用が小さいなどの性質をもつ。また、腫瘍形成や血管新生を促進するIL-6の発現を抑制することから、固形腫瘍に対する抗腫瘍効果が期待される。

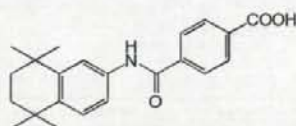


図3 Am80の構造式

このAm80を封入するために用いたブロックコポリマーは前項と同じ系統のPEG-PBLAおよびPEG-P(Asp(Bzl))である。今回用いたものはいずれも、PEGの分子量が5,000、アスパラギン酸のユニット数が24のものを用いた。PEG-P(Asp(Bzl))のベンジルエステル化率は、33、53、および80%を用いた。Am80の高分子ミセルへの封入は前項と同じく、エバポレーション法によって行った。ただし、用いた有機溶媒はテトラヒドロフラン(THF)である。

Am80のミセルからの徐放を達成するために、疎水性のアミンとAm80をイオンコンプレックスとしてミセルに封入

する場合は、Am80と疎水性のアミン、ブロックコポリマーを共にTHFに溶かしてから上記と同様にエバポレーション法によって封入した。n vitroでの薬物放出速度の測定は、薬物を封入した高分子ミセル溶液を透析チューブ (1-kDa cut-off) 中にいれて、外部透析液 (PBS, pH 7.4) に放出されたAm80量を逆相HPLCによって測定した。

(3) 高分子ミセルMRI造影剤

MRI造影剤用高分子の合成

MRI造影剤(Gd-DOTA)を有するブロックコポリマーを合成した。その構造はポリエチレングリコール-ポリリシン(PEG-P(Lys))からなるブロックコポリマーであり、すべてのリシン側鎖にGdイオンのキレート化剤であるDOTA基を結合した。このDOTA基の一部にのみ、Gd³⁺イオンを配位させる。Gd³⁺イオンを配位していない空のDOTA残基は、3級アミンとカルボキシル基の両性イオン構造であるので、これが高分子鎖間でイオン相互作用することによって、高分子ミセルが形成する。このブロックコポリマー-PEG-P(Lys-DOTA)の化学構造を図4に示す。

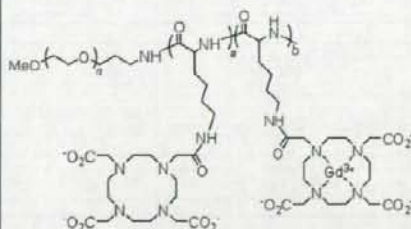


図4 MRI造影剤高分子ミセルを形成する高分子の構造

高分子の組成は¹H-NMRで求め、Gd³⁺イオン量はICPで測定した。GdCl₃によってGd³⁺イオンを配位させた後、希塩酸処理、精製水に対する透析によって、DOTA残基に結合していないGd³⁺イオンを除去した。

ミセル粒径は動的光散乱 (DLS) によって測定した。

T1緩和能測定

MRIの画像強調能 (T_1 短縮能= R_1) を表すパラメーターとして以下の式に示される R_1 を9.4T (Varian Inova400) の磁場のもと求めた。

$$(1/T_1)_{obs} = (1/T_1)_0 + R_1 \cdot [Gd]$$

R_1 が大きい程、 T_1 強調能力が高いこととなる。本研究ではブロックコポリマーの際にこの緩和能が高く、高分子ミセルの形成によって低くなることによってがん選択的に造影効果を有するMRI造影剤となる。

体内動態・分布の測定

0.05 mmol Gd/kgの投与量でマウス尾静脈より投与し、一定時間後に血液、主要臓器、腫瘍を採取し、熱した濃硝酸による可溶化処理の後、含まれるGd³⁺イオン量はICPで測定することにより血中動態・体内分布、腫瘍集積性の評価を行った。

MRI画像取得

MRIの画像評価はマウスへMRI造影剤を0.05mmol Gd/kg静脈内投与し、その後、時間ごとのMRIを取得して評価を行った。MRIの測定は9.4Tの磁場のもと、グラディエントエコー法を用いてT1強調画像を取得した。

C. 研究結果

(1) カンプトテシン封入高分子ミセルの解析

溶媒を2種類 (CHCl₃とTFE)、CPT/ブロックコポリマーの重量比を様々に変えた場合の、封入率のCPTミセル溶液中のCPT濃度を図5に示す。例えば、TFE溶液から作製した高分子ミセル溶液に含まれるCPTの濃度は、10% CPTミセルでは約40 μ g/mL、100% CPTミセルでは約190 μ g/mLであった。仕込み比に対して、最終的に回収されるCPTの量はそれぞれのミセル溶液で34%、15%であり、CPT仕込み比が高い場合、得られるCPTの量は多くなるものの回収効率は低くなることが分かった。図5からTFE使用の場合とCHCl₃使用の場合で、CPT/polymer仕込み比に対するミセル溶液中のCPTの濃度の変化が異なることが分かる。

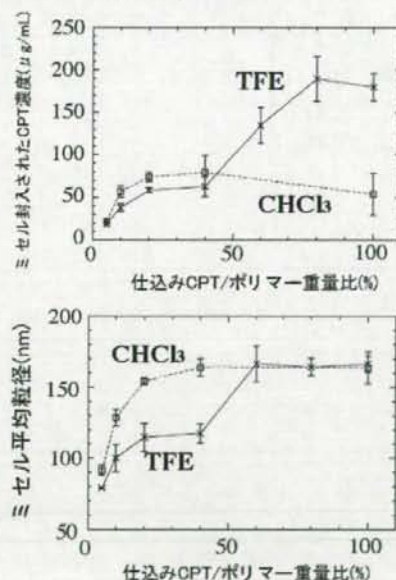


図5 CPTミセル溶液中のCPTの濃度とミセルの粒径

このことから、TFE溶液から作製したミセルとCHCl₃で作製したミセルでは、粒子の成長過程が違うと考えられる。

CPTを含まない、「空ミセル」の状態ではキュムラント粒径は50 nm程度であり、CPTを加えることにより粒径が大きくなることが分かる。この粒径増加挙動は、TFEとCHCl₃の場合で異なり、両溶媒間で粒子の成長過程が異なることが示唆された。

図6に10% CPTミセルと100% CPTミセルから作製したフィルム（いずれもTFE使用）のAFM観察の結果を示す。

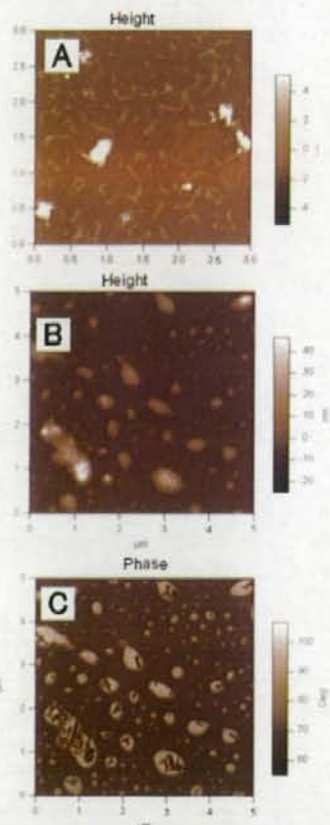


図6 : CPTミセルのAFM画像。(A) 10% CPT/polymerの $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$ height画像、(B) 100% CPT/polymerの $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ height画像、(C) 100% CPT/polymerの $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ phase画像。いずれも TFE 使用。

図6Aは10% CPTミセルのheight画像である。この画像ではポリマーと思われる糸状の構造が目立つ。この構造は高分子ミセルを形成していない、フリーの高分子鎖、及び高分子ミセルの集合体だと思われる。

周辺の領域に対し、このような構造物は数nmから数十nmの高さである。また、ところどころに $1\mu\text{m}$ 四方程度の、コントラストが明るい部分がある。これらはおそらく高分子ミセルの大きな凝集体と思われる。図4Bは100% CPTミセルのheight画像である。10% CPTミセルと比べ、 $1\mu\text{m}$ 程度の大きなかたまりが目立つ。一方で、10% CPT/polymerサンプルに多く含まれる糸状の構造は、図6Bでは観察されなかった。そのほかに、ミセルの凝集であろう数十nmから数百nmの円形のislandも観察された。数百nm程度の小さなislandは、周辺との高さの差が数nmであるが、 $1\mu\text{m}$ 程度の大きなかたまりは周囲と比べ30 nm程高い。図6Cは6Bのphase画像である。この画像では、height画像で見られた大きなかたまりの上に、短冊状の、コントラストが暗い部分が存在する。この結晶のような構造はCPTが結晶化したものと考えられる。同様の構造はSEMでも確認された。また同じサンプル内の別の箇所では、CPTの結晶がポリマーで覆われたような、数十nm \times $1\mu\text{m}$ の長方形の構造が観察された。これらの結晶構造は10% CPTミセルでは観察されなかったことから、100% CPT/polymerサンプルでは過剰なCPTが溶液中で結晶化し、ミセル水溶液に混在していると考えられる。

AFM、SEM測定で得られた画像から、CPTの結晶がミセルサンプルに混入していると考えられたため、CPTの各種溶媒への溶解度を調査することにした。CPTの溶解性は、濁度によって評価した。CHCl₃、TFE、DMSOを溶媒とした結果が図5である。このグラフからCPTは5 mg/mL以下ではDMSOに比較的によく溶けることが分かる。これに比べるとCHCl₃への溶解性は低く、CPTは1 mg/mL以下ではCHCl₃によく溶けるが、それ以上高濃度にするると溶解性が極端に下がる。同様の現象はTHF、1,4-dioxaneでも認められた。溶解性を重視すると、CPTのDMSO溶液を使用するのが好ましいが、先に述べたように、evaporation法でCPTミセルを作製す

する際に溶媒を蒸発させる必要があるため、DMSOのような沸点の高い(189 °C)溶媒は扱いにくい。その点TFEの沸点は74 °Cで、我々の作業に適している。CPTの溶解性も実験に必要な約1~5 mg/mLの範囲で比較的良い。そのほか一般的に使用される溶媒への溶解性も調査したが、CPTの溶解性と溶媒の沸点を検討したところ最も優れている溶媒はTFEであった。

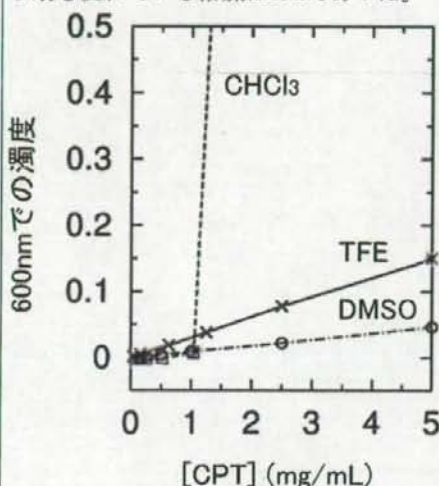


図7 CPT溶液の濁度測定 (600 nmで測定)

CPT内包高分子ミセルを作製する際には、高分子とCPTの混合フィルムを作製する。そのためCPTが高分子に分配されれば、CPTの結晶化は起こりにくいだろう。しかしCHCl₃溶液などでは、ある一定の濃度以上では溶液中で既に結晶化が起きており、ポリマーと混合する時点ではポリマーとCPTの相互作用で薬がミセル内に保持されるのではなく、CPTの結晶をポリマーが覆う状態であることが推察される。ポリマーコートされたCPTの結晶は、安定に水溶液中に存在する可能性があるが、過剰なCPTのほとんどは、遠心分離とフィルター除去する際に取り除かれる。

今回の報告では、CPTミセルの作製にはCPTの結晶化が問題になることを示した。溶液に溶けない過剰なCPTが存在する条件下で作製したミセルには、CPTの大きな結晶を高分子が覆った粒子が、ミセル溶液中に混在すると思われる。前年度の検討により、CPTの溶解性が高い条件(TFEを溶媒として用いた)で作製したミセルは比較的粒径も小さく、薬剤の血中滞留性も上がることが分かっている。以上のように、薬物封入過程で用いる溶媒への薬物の溶解性が高分子ミセル製剤の粒径と薬物封入安定性に大きな影響を与えていることが判明した。

(2) Am80封入高分子ミセルからの薬物放出を徐放化する新手法

Am80はATRAと同様に急性全骨髄球性白血病(AML)の治療に有効であり、再発および難治性AML治療薬として認可されている。ヒト骨髄性白血病細胞HL-60に対する分化誘導能はATRAよりも強く、ATRAより化学的に安定であり、さらにATRA耐性の機構の一つと考えられる細胞内ATRA結合タンパク質との相互作用が小さいなどの性質をもつ。また、腫瘍形成や血管新生を促進するIL-6の発現を抑制することから、固形腫瘍に対する抗腫瘍効果が期待される。

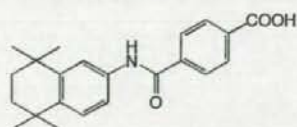


図8 Am80の構造式

このAm80を封入するために用いたブロックコポリマーは前項と同じ系統のPEG-PBLAおよびPEG-P(Asp(Bz1))である。今回用いたものはいずれも、PEGの分子量が5,000、アスパラギン酸のユニット数が24のものを用いた。PEG-P(Asp(Bz1))のベンジルエステル化率は、33、53、および80%を用いた。

Am80の高分子ミセルへの封入は前項と同じく、エバポレーション法によって行った。ただし、用いた有機溶媒はテトラヒドロフラン(THF)である。ベンジル修飾率33、53、および80%のPEG-P(Asp(Bzl)_x) 5-24、ならびにPEG-PBLA 5-24を用いてAm80の封入を検討した結果、いずれの高分子でも高い封入率が得られた(≥75%)。

Am80の高分子ミセルからの放出挙動をin vitroで評価した結果、Am80はPBS中で速やかに高分子ミセルから放出されることが明らかとなった。図9に透析チューブ(1-kDa cut-off)中のAm80封入高分子ミセル溶液から外部透析液(PBS, pH 7.4)へのAm80の放出挙動を示す。Am80を白抜きプロット、同じく合成レチノイドAm80よりも疎水性の強いLE540を黒いプロットで示す。

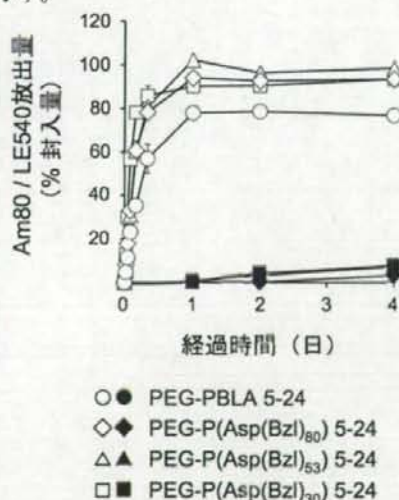
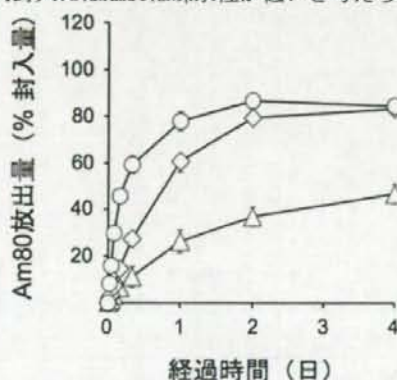


図9 Am80およびLE540のin vitro薬物放出

Bzl)80やBzl)53などの数字は疎水性のベンジルエステル化率を示す。PEG-PBLAは100%のエステル化率に相当する。どの場合も放出速度に大差はなく、8時間で60~80%の内包薬物が放出するという、速やかな放出である。

LE540の場合には徐放が達成されているの

で、Am80の速い放出はAm80が安定にミセル内核に内包されていないことを示す。このような場合に従来は、疎水性の高分子鎖の化学構造を薬物の封入安定化に最適化してきた。しかし、ここで用いているブロックコポリマーはカンプトテシンなどの薬物を安定に封入して、in vivoでのターゲティングに実績のあるブロックコポリマーである。高分子構造を変えることなく、封入安定化が実現することが好ましい。LE540との放出速度の比較から、安定なミセル内封入にはAm80は疎水性が低いと考えられ



N,N-ジメチルアルキルアミン

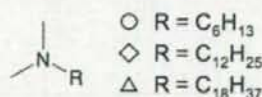


図10 疎水性アミンの共封入によるAm80放出の徐放化

る。そこで、カルボン酸を有するAm80と疎水性の塩基をイオンペア形成させて、そのイオンペアの状態ではミセル内核への封入を試みた。

PEG-PBLA 5-24を用いた場合の結果を図10に示す。アルキル鎖長の異なるN,N-ジメチルアルキルアミンを添加剤として加えた結果、アルキル鎖長の増大にともないAm80の放出速度が顕著に低減した。この事実は、形成したイオンペアはAm80よりも疎水性が強いために、ミセル内核に安定に舟生されて、放出速度が顕著に減少したことを示唆する。

(3) 高分子ミセルMRI造影剤

ブロックコポリマーPEG-P(Lys-DOTA)では、リシン残基全てにDOTA基を導入されると、高分子ミセルを形成することが分かった。このPEG-P(Lys-DOTA)に対して、ガドリニウムイオンを部分的に配位させると、その構造を維持したまま高分子ミセルMRI造影剤となることが分かった。この高分子ミセルMRI造影剤は結合したDOTA基同士のイオニックな相互作用によって内殻を形成し、非常に安定な高分子ミセルを形成していることが確認された。その粒径分布を図11に示す。

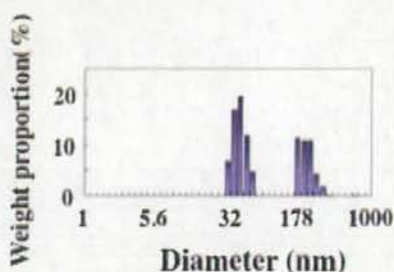


図11 高分子ミセルMRI造影剤の粒径分布

200nm付近の2次凝集と考えられる粒子の混入はあるものの、約40nmの直径のミセル形成が確認された。

次に、この高分子ミセルMRI造影剤の血中動態評価を行った。0.05mmolGd/kgの投与量でマウス尾静脈より投与した結果を図12に示す。

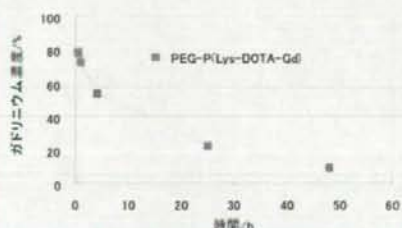


図12 高分子ミセルMRI造影剤の血中濃度

この高分子ミセルは、大変安定な血中循環性を示し、静脈投与24時間後でも約20%の投与量が血中に見いだされた

また、その体内分布も図13に示すように、固形がんと正常組織の高い選択性を示し、かつ高い腫瘍集積性を示した。肝臓・脾臓の細網内皮系ではC26マウスがんよりも若干高い値を示したが、これ

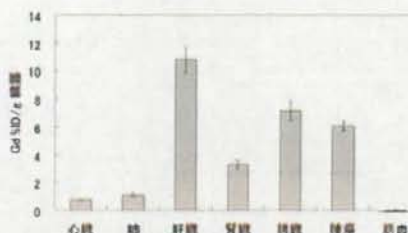


図13 高分子ミセルMRI造影剤の体内分布 (投与24時間後)

は高分子ミセル抗がん剤のターゲティングでも観察されたことである。肺、心臓、筋肉などの正常臓器・組織に対しては十分な選択性を有していることがわかった。

また、腎臓は正常上記としては比較的高い分布量であったが、この事実はこの造影剤が腎臓から排出されていることを示唆する。そこで、尿中排泄を調べたのが図14である。

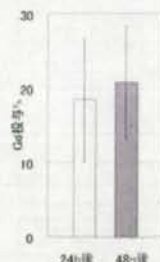


図14 高分子ミセル造影剤の尿への排出

腎臓から尿としてこの造影剤が排出されていることが観察された。また、ここで検出したGdイオンは高分子ミセル分画か高分子分画に有ることがゲルパーミエーションクロマトで確認された。血液中で徐々にミセル構造からブロックコポリマー鎖に解離して腎臓から尿に排出されることが判明した。この事実は、この造影剤の長期的毒性を考える上で重要な事柄である。

この高分子ミセルMRI造影剤を0.05mmolGd/kgの投与量でマウス尾静脈より投与し、固形がんのMRIを測定し、画像強度の時間変化を追った。図15に示す。腫瘍サイズは約100mm³程度の大きさで実験を行った。

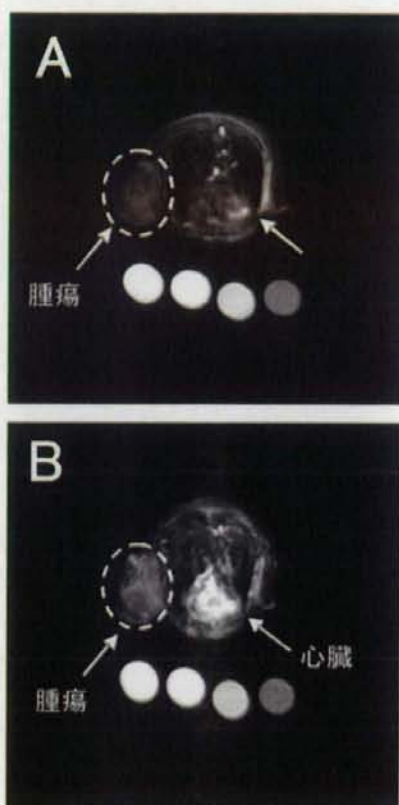


図15 高分子ミセルMRI造影剤投与前と投与24時間後のMRIアキシアルMIP画像(A)投与前、(B)投与24時間後(白枠が腫瘍)
MRI撮像条件: 磁場9.4T、T1-強調グラジエントエコー法、TR/TE = 8.0/4.5, flip angle = 30°, FOV = 45 × 45 mm, 192 × 192マトリックスサイズ、2mmスライス×3のMaximum Intensity Projection(MIP)画像

図15Bに示すように、投与前の腫瘍の画像強度に比べて24時間後の画像強度は高分子ミセルMRI造影剤の集積によって明瞭な腫瘍画像を与えた。

24時間後においては、血中に十分な量のMRI造影剤が残っているため心臓に流れる血液の画像強度が高い。しかしながら、MRI造影剤が十分にEPR効果によって集積されれば、固形がんのMRIによる観測は十分可能である。腫瘍の画像強度の時間変化を解析すると、図16Aに示すように、投与後24時間後にピークに達する典型的なEPR効果によるがん集積挙動を示している。この挙動は図16Bに示す、以前に解析したアドリアマイシン封入高分子ミセルの時間毎のアドリアマイシン量の変化とほぼ一致する。この一致は抗がん剤内包高分子ミセル治療剤のがんターゲティング挙動を造影剤によって測定して、その治療効果の予測を可能とする。

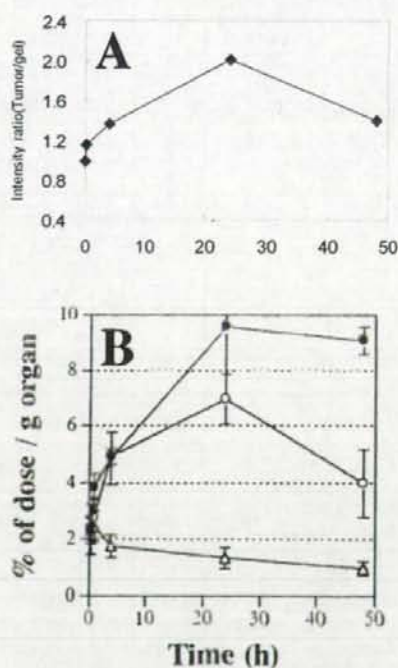


図16 C26 マウスがんへの集積挙動
(A) MRI造影剤投与後の腫瘍におけるT1強調画像強度の時間変化
(B) アドリアマイシン封入高分子ミセルの固形がんへの集積

通常、抗がん剤封入高分子ミセルが固形がんにとどれだけ薬物を送達したかについて生体で観察することは極めて難しい。固形がんの縮小する様子を観察する方法はあっても、どれだけの量がどこに届いているかを判断することは腫瘍を摘出しな限りは分からないからである。また、量については分析可能であっても、場所を特定することについては難しい。この高分子ミセルMRI造影剤は造影剤投与後の高分子ミセルの様子をMRIで観測することができるため、どこにどれだけの抗がん剤が送達され得るかを、MRIを測定し、解析することによって予想できる技術となる。

次に、腫瘍血管破断薬AC7700が及ぼすがん集積挙動への影響を解析した。集積量(Gdイオン量で測定)を図17Aに、MRI画像を図17Bに示す。

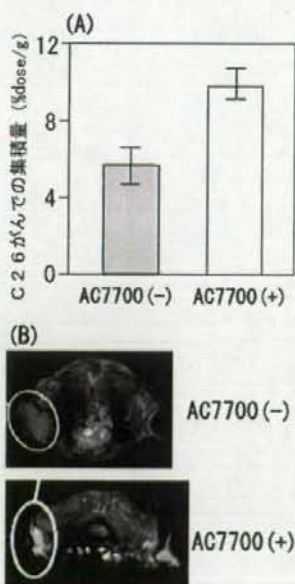


図17 AC7700投与の効果
(A) 造影剤集積量の増加
(B) MRI画像での高輝点の出現
(造影剤投与24時間後)

AC7700を投与してから3日後に造影剤を投与すると、C26がんへの集積量が有意に高まり、そのためにMRI画像に

おいても、顕著に明瞭ながん画像が得られた。EPR効果は必ずしも固形がん全体の組織への透過性を意味するものではないが、図17BのAC7700(-)ではがん全体に造影剤の分布が観察される。この大きさ(約100mm³)ではがん組織全体がEPR効果を示していると言える。これとは対照的に、図17BのAC7700(+)では癌周囲の一部のみに非常に高い輝度を示している。画像診断のためにはこのような明瞭な輝点として現れることは、集積量の増加以上の意義がある。AC7700は癌周囲の成癌組織に一過的な変性領域を誘導し、そこに高分子ミセルが集積すると、分担研究の堀の研究が示している。今回のMRIの結果はこの堀の研究と一致する。

次に、これまで扱ってきた約100mm³の癌サイズより小さな微小がんモデルを用いて検討した。同じく、C26マウスがんであるが、50mm³以下で造影を行った。(直径3mm程度)



図18 微小がんでの高分子ミセル造影剤の集積
(投与24時間後、MRI撮像条件: 磁場9.4T、T1-強調グラジエントエコー法、TR/TE=8.0/4.5, flip angle=30°, FOV=45×45mm, 192×192マトリックスサイズ、2mmスライスx3のMaximum Intensity Projection(MIP)画像)

結果を図18に示す。投与24時間後のMRIでは、高分子ミセルMRI造影剤の集積による腫瘍の一部に特に画像強度の増加を認めることができた。集積量は $8.3 \pm 0.6\% \text{ID}/\text{腫瘍}$ と高い値であった。この結果より、この高分子ミセルMRI造影剤は直径1cm以下の微小がんの検出に対しても非常に有用な造影剤として期待される。

D. 考察

(1) カンプトテシン封入高分子ミセルの作製

従来、高分子ミセルキャリアーへの薬物封入過程はtry&errorによって見いだしたものであり、科学的なアプローチがほとんどなされていなかった。今回、ポリマーと薬物が同じでも封入過程が異なることでターゲティング性能が異なる系を見だし、用いる溶媒の溶解性（封入のための溶液には完全に溶解しているが）が、薬物の結晶化を通じてターゲティング性能に影響を及ぼすことが判明した。この結果は、新たな薬物を高分子ミセルによってターゲティングする場合、または実験室で得られた優れた製剤を工業化する場合に必須の事柄に初めて光を当てたと言える。

(2) Am80封入高分子ミセルからの薬物放出を徐放化する新手法

従来、高分子ミセルの薬物放出速度を変えるためには新たな高分子を合成する方法がとられてきた。合成には手間と時間が掛かることが多く、迅速なる研究開発のためには、このことが高分子ミセル製剤の弱点でもあった。今回、疎水性のイオンペアを形成させることによって薬物の徐放化を得ることに初めて成功した。これは高分子合成に比べると極めて簡便な手法であり、意義深い。さらに、多様な活性を有し、化学的に安定な合成レチノイド（ATRAはpHや光に対して非常に不安定で製剤化での問題点になる）は、抗がん活性も含めて多様な活性の期待がかかる。

(3) 高分子ミセルMRI造影剤

高分子ミセル型MRI造影剤は、EPR効果を利用してがんターゲティングが極めて効果的に達成し、マウスがんの画像コントラストを顕著に高めることを実証した。また、高分子ミセル抗がん剤と同一の体内分布・動態を示すことから、高分子ミセルによる化学療法の効果を予測し得るシステムとして高分子ミセルMRI造影剤が活用されることが明らかとなった。また、AC7700による高分子ミセルターゲティングの増強効果を、MRIで検証できることがわかった。このことは、ウインドウチャンパー法、病理的解析などの基礎医学の手法と合わせることで、腫瘍血管の透過性という基礎医学での貢献をし得ることを意味する。

E. 結論

高分子ミセル製剤技術の基盤が大きく拡大したとともに、高分子ミセルをMRI造影剤としての有用性を証明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Narin Chansri, Shigeru Kawakami, Masayuki Yokoyama, Tatsuhiro Yamamoto, Pensri Charoensit, and Mitsuru Hashida, Anti-tumor Effect of All-Trans Retinoic Acid Loaded Polymeric Micelles in Solid Tumor Bearing Mice, *Pharmaceutical Research*, **25**, 428-434 (2008)
- 2) Akihiro Hayama, Tatsuhiro Yamamoto, Masayuki Yokoyama, Kumi Kawano, Yoshiyuki Hattori, Yoshie Maitani, Polymeric micelles modified by folate-PEG-lipid for targeted drug delivery to cancer cells in vitro, *J. Nanoscience and Nanotechnology*, **8**, 3085-3090 (2008)
- 3) Tomoyuki Okuda, Shigeru Kawakami, Masayuki Yokoyama, Tatsuhiro Yamamoto, Fumiyoshi Yamashita, and Mitsuru Hashida, Block copolymer design for stable encapsulation of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide into polymeric micelles in mice, *International J. of Pharmaceutics (Note)*, **357**, 318-322 (2008)
- 4) Yoshihiko Murakami, Masayuki Yokoyama, Hiroshi Nishida, Yasuko, Tomizawa and Hiromi Kurosawa, A simple hemostasis model for the quantitative evaluation of hydrogel-based local hemostatic biomaterials on tissue surface, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **65**, 186-189 (2008)
- 5) Hiroyuki Koide, Tomohiro Asai, Kentaro Hatanaka, Takeo Urakami, Takayuki Ishii, Eriya Kenjo, Masamichi Nishihara, Masayuki Yokoyama, Tatsuhiro Ishida, Hiroshi Kiwada, and Naoto Oku,

- Particle size-dependent triggering of accelerated blood clearance phenomenon, *International Journal of Pharmaceutics*, **362**, 197-200 (2008)
- 6) Masamichi Nishihara, Yoshihiko Murakami, Takashi Shinoda, Jun Yamamoto, Masayuki Yokoyama, Synthesis and Characterization of A Temperature-responsive Amphiphilic Block Copolymer Containing a Liquid Crystalline Unit, *Chemistry Letters*, **37** (12) 1214-1215 (2008)
- 7) T. Inoue, Y. Yamashita, M. Nishihara, S. Sugiyama, Y. Sonoda, T. K. Umabe, M. Yokoyama, T. Tominaga, Therapeutic efficacy of a polymeric micellar doxorubicin infused by convection-enhanced delivery against intracranial 9L brain tumor models, *Neuro-Oncology*, **in press**.
- 8) Tomoyuki Okuda, Shigeru Kawakami, Yuriko Higuchi, Taku Satoh, Yoshimi Oka, Masayuki Yokoyama, and Mitsuru Hashida, Enhanced antitumor activity of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide by polymeric micelles following intravenous injection in tumor-bearing mice, *Cancer Science*, **in press**.
- 9) Kouichi Shiraishi, Kumi Kawano, Takuya Minowa, Yoshie Maitani, and Masayuki Yokoyama, Preparation and in vivo imaging of PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agents, *Journal of Controlled Release*, **in press**
- 10) Tomoyuki Okuda, Shigeru Kawakami, Yuriko Higuchi, Taku Satoh, Yoshimi Oka, Masayuki Yokoyama, Fumiyoshi Yamashita, and Mitsuru Hashida, Enhanced in vivo antitumor efficacy of fenretinide encapsulated in polymeric micelles, *International Journal of Pharmaceutics*, **in press**
- 11) Yoshihiko Murakami, Masayuki Yokoyama, Hiroshi Nishida, Yasuko, Tomizawa and Hiromi Kurosawa, In Vivo and In Vitro Evaluation of Gelation and Hemostatic Properties of a Novel Tissue-Adhesive Hydrogel Containing a Crosslinkable Polymeric Micelle, *Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials*, **in press**
- 12) Takanori Kawaguchi, Takashi Honda, Masamichi Nishihara, Tatsuhiro Yamamoto, and Masayuki Yokoyama, Histological study on side effects and tumor targeting of a block copolymer micelle on rats, *Journal of Controlled Release*, **in press**
- 13) Taku Satoh, Yuriko Higuchi, Shigeru Kawakami, Mitsuru Hashida, Hiroyuki Kagechika, Koichi Shudo, Masayuki Yokoyama, Encapsulation of the synthetic retinoids Am80 and LE540 into polymeric micelles and the retinoids' release control, *Journal of Controlled Release*, **in press**

<総説・解説>

- 1) 横山昌幸
高分子ミセルターゲティング、炎症と免疫、**16** (1) 21-26 (2008)
- 2) 白石貢一、横山昌幸、ターゲティングを用いたMRI造影剤、特集 分子イメージングとDDS、*Drug Delivery System* **23**(1) 33-39 (2008)
- 3) 横山昌幸、白石貢一
分子イメージングのためのナノ材料、秋吉一成、岸田晶夫監修、「次世代医療のための高分子材料工学」シーエムシー出版、276-286 (2008)
- 4) 横山昌幸
高分子ミセル、岡田弘晃監修、「機能性DDSキャリアの製剤設計」シーエムシー出版、42-54 (2008)
- 5) 横山昌幸
薬物キャリアに用いられる高分子材料、特集 DDSに利用される高分子化学、*Drug Delivery System* **23** (6) 610-617 (2008)

2. 学会発表

- 1) 白石貢一、川野久美、箕輪卓也、米谷芳枝、横山昌幸、第3回日本分子イメージング学会総会、2008. 5. 22、腫瘍イメージングを旨とした高分子ミセル型MRI造影剤の開発
- 2) 西原正通、村上義彦、篠田貴志、山本潤、横山昌幸、第24回日本DDS学会学術集会、2008. 6. 30、刺激応答性高分子ミセルのための多機能型両親媒性ブロックコポリマーの合成と評価
- 3) 白石貢一、川野久美、箕輪卓也、米谷芳枝、横山昌幸、第24回日本DDS学会学術集会、2008. 6. 30、高分子ミセル型MRI造影剤の腫瘍への集積挙動
- 4) 原田佳子、山本竜広、横山昌幸、川野久美、米谷芳枝、第24回日本DDS学会学術集会、2008. 6. 30、カンプトテンシン内包高分子ミセル作製における溶媒の影響
- 5) 箕輪卓也、川野久美、白石貢一、横山昌幸、米谷芳枝、第24回日本DDS学会学術集会、2008. 6. 30、Gd封入リポソーム製剤のMRIによる腫瘍集積性の評価
- 6) Masamichi Nishihara, Tomoo Inoue, Yoji Yamashita, Shinichiro Sugiyama, Yukihiko Sonoda, Toshihiro Kumabe, Teiji Tominaga, Masayuki Yokoyama, 2008. 7. 14, The 35th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Evaluation of therapeutic efficacy and Adriamycin distribution encapsulated in polymeric micelles by convection-enhanced delivery
- 7) 白石貢一、川野久美、箕輪卓也、米谷芳枝、横山昌幸、2008. 7. 14, The 35th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Polymeric Micelles for MRI Contrast Agent, Tumor Targeting and Imaging by Magnetic Resonance Imaging
- 8) 白石貢一、川野久美、箕輪卓也、米谷芳枝、横山昌幸、2008. 9. 12, 2008 World Molecular Imaging Congress, *In vivo* tumor targeting and imaging of PEG-based polymeric micelle MRI contrast agent
- 9) 横山昌幸、西原正通、白石貢一、原田佳子、佐藤 琢、第57回高分子討論会、2008. 9. 24、薬物と造影剤のターゲティングのための高分子ミセルキャリアー
- 10) 白石貢一、川野久美、箕輪卓也、米谷芳枝、横山昌幸、第57回高分子討論会、2008. 9. 24、高分子ミセルを用いたMRI造影剤の作製と腫瘍のイメージング
- 11) 西原正通、村上義彦、篠田貴志、山本潤、横山昌幸、第57回高分子討論会、2008. 9. 24、温度及び光応答性を有した高分子ミセルの作製と評価
- 12) Takanori Kawaguchi, Masamichi Nishihara, Masayuki Yokoyama, Takashi Honda, 2008. 10. 29, 第67回日本癌学会学術総会、Immunohistochemical demonstration on tumor targeting of high molecular polymeric micelle In rat ascites hepatoma AH109
- 13) 原田佳子、山本竜広、川野久美、米谷芳枝、横山昌幸、日本バイオマテリアル学会学術集会、2008. 11. 18、高分子ミセルへの薬物封入に及ぼす溶媒の影響
- 14) 佐藤 琢、樋口ゆり子、川上茂、橋田充、首藤紘一、影近弘之、横山昌幸、日本バイオマテリアル学会学術集会、2008. 11. 18、合成レチノイド封入高分子ミセルの調整放出特性
- 15) 佐藤 琢、樋口ゆり子、川上茂、橋田充、影近弘之、横山昌幸、2008. 11. 22、第19回日本レチノイド研究会学術集会、合成レチノイドAm80およびLE540の高分子ミセルへの封入と放出制御の評価

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

リポソーム化造影剤を用いたDCE-MRIによる微粒子の血管透過性評価

分担研究者 米谷芳枝 星薬科大学

研究要旨 微粒子化した造影剤を用いたDCE-MRI法によって、微粒子製剤の腫瘍集積性に影響を与えるTGF- β 阻害剤の血管透過性に対する作用を評価した。

A. 研究目的

腫瘍の成長には血管新生が不可欠であり、種々の血管新生因子の亢進により腫瘍血管が形成される。そのため腫瘍の新生血管は、正常血管に比べ透過性が亢進しており、リポソームや高分子ミセルなどの微粒子は腫瘍に集積しやすく、この性質を応用して薬物送達が行われている。しかし、その腫瘍集積性はミクロな血行状態に依存しており、十分量の微粒子を送達できないこともある。

近年、抗がん剤封入微粒子の腫瘍送達において、Transforming growth factor- β (TGF- β) のシグナル阻害剤を併用することにより、微粒子の腫瘍集積量の増加や治療効果の増強が報告されている。これは、TGF- β 阻害剤により腫瘍血管の透過性がさらに亢進するためと考えられている。

そこで本研究では、微粒子送達に重要となる血管透過性について、ダイナミック造影MRI (dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging; DCE-MRI) を用いて評価した。DCE-MRI は、*in vivo* における非侵襲的な血管新生阻害剤の評価法として知られており、連続的にMR画像を取得しながら造影剤を投与し、造影剤による腫瘍の画像強度変化から、腫瘍における血管透過性や血漿容積を算出して、血管の機能を評価することができる。そこで、DCE-MRIに用いられるMRI造影剤(Gd-DTPA)をリポソーム化(Gd-L)し、TGF- β 阻害剤 A-83-01で処置した腫瘍の微粒子に対する血管透過性を評価し、微粒子の腫瘍移行性について検討した。また、腫瘍中の水分子の拡散速度を評価できる拡散強調画像や腫瘍組織切片の観察結果と比較検討した。

B. 研究方法

動物：マウス結腸癌由来であるcolon26細胞 (1.0×10^6 cells) を5週齢の雌性CDF1マウスの側腹部皮下に移植した。腫瘍サイズ約100mm³でA-83-01を1回当たり1mg/kgの投与量で腹腔内投与した。繰り返し投与では、初回投与21時間後に追加投与を行った。

Gd封入リポソーム：Gd封入リポソーム(Gd-L)の組成は、卵黄レシチン、コレステロール、PEG₂₀₀₀-DSPEを10:4:0.7 (モル比) からなり、Gd-DTPA (Magnevist®) を内封して調製し、粒子径を約120 nmにした。

DCE-MRI：イソフルラン麻酔下のマウスを、9.4T 垂直型MRIに挿入した。腫瘍と左心室を含むスライス1枚/1秒で連続撮像しながら造影剤を投与し、360枚の画像を得た。腫瘍と左心室の画像強度をGd濃度(Ct(t)、Cp(t))に変換し、以下の式から腫瘍内血漿容積(v_p)と容積輸送定数(K^{trans})を求めた。

$$Ct(t) = K^{trans} \int_0^t Cp(\tau) d\tau + v_p Cp(t)$$

拡散強調画像：マウス腫瘍において異なる4つの運動傾斜磁場(b値; 0, 200, 400, 800)を負荷してMR画像を取得し、見かけの拡散定数(ADC)を求めた。

腫瘍組織観察：繰り返しA-83-01処置後及び未処置の腫瘍の切片を作成し、hematoxylin eosin 染色、抗smooth muscle actin 抗体によるペリサイト染色、抗Ki67抗体による増殖期細胞の染色を行った。また、Hoechst 33342を静脈内投与後に腫瘍切片を作成し、腫瘍中の血流状態を評価した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は星薬科大学の規定に基づき行った。

C. 研究結果

(1) DCE-MRIによる血管透過性評価：DCE-MRIを用いて、A-83-01で処置したマウス腫瘍の血管透過性および造影剤移行性を評価した。Gd-DTPAを造影剤として用いた場合には、A-83-01単回投与3時間後において、 v_p および K^{trans} がいずれも増加し、腫瘍中を流れる血漿容積の増加と血管透過性の亢進が見られた(図1)。また、24時間後では投与前の v_p 、 K^{trans} の値に近くなり、A-83-01単回投与では作用時間が短く、作用に個体差が大きいことが分かった。そこで、A-83-01を繰り返し投与すると、初回投与から24時間後のすべてのマウスで v_p および K^{trans} の増加が見られ、造影剤にGd-Lを用いると増加が顕著であった。

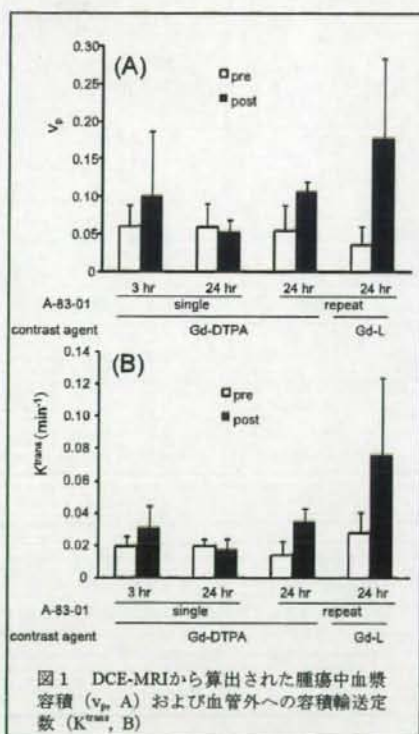


図1 DCE-MRIから算出された腫瘍中血漿容積 (v_p , A) および血管外への容積輸送定数 (K^{trans} , B)

また、腫瘍内Gd濃度曲線において造影剤を投与60秒後までのAUCを算出すると(図2)、A-83-01の繰り返し投与により、Gd-DTPAで1.8倍、Gd-Lで3.8倍増加し、造影剤の腫瘍移行性の増加が確認された。よって、A-83-01の繰り返し投与は腫瘍血管透過性を高め、特に

微粒子の移行性が亢進することをDCE-MRI法で非侵襲的に確認することができた。

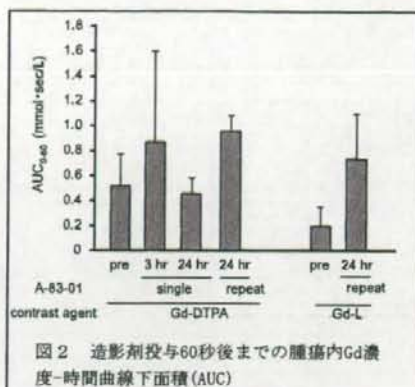


図2 造影剤投与60秒後までの腫瘍内Gd濃度-時間曲線下面積(AUC)

(2) 拡散強調画像から求めた見かけの拡散定数：見かけの拡散定数(ADC)は水分子の動きやすさに依存して増減し、細胞外液のADCは細胞内液に比べて10倍以上高い。よってADCの変化は、腫瘍内の細胞外液、細胞内液の体積変化の指標として考えられる。拡散強調MR画像から求めた腫瘍のADCは、A-83-01の単回投与3時間後や24時間後では変化が見られなかったが、繰り返し投与24時間後では減少した。腫瘍組織切片の観察から、腫瘍細胞の形態変化やネクロシスは見られなかったことから、細胞内液の体積変化は考え難く、A-83-01処置によるADC低下は細胞外液の減少の結果と考えられた。

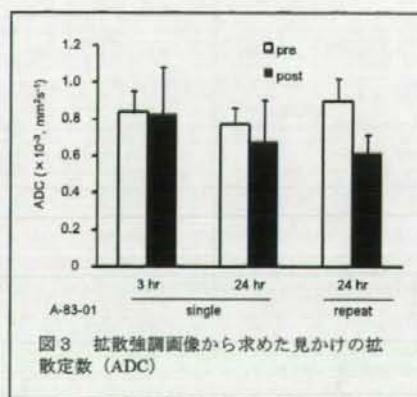
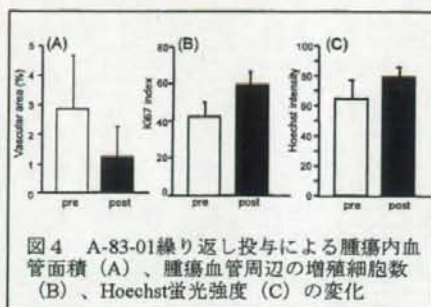


図3 拡散強調画像から求めた見かけの拡散定数(ADC)

(3) 腫瘍組織観察：腫瘍組織切片の顕微鏡観察から、未処置群ではいびつな形態の腫瘍血管が観察されたのに対し、A-83-01繰り返し処置により円形や楕円形の正常に近い形態への変化が見られ、血管を覆うペリサイトの新生成が観察された。腫瘍血管面積を比較すると、A-83-01処置により減少が見られた(図4A)。さらに、血管周囲ではKi67で染色された増殖期細胞が増加しており(図4B)、また、Hoechstで染色された血流のある血管も増加していた(図4C)。以上のことから、A-83-01は腫瘍血管形態を正常に近づけ、血流を回復させることが示唆された。



D. 考察

DCE-MRIを用いて、TGF- β 阻害剤A-83-01による腫瘍血管透過性の変化を評価した。A-83-01の繰り返し処置によって、腫瘍内血液量の増加と血管透過性の亢進が見られ、特にGd-Lの移行性を増加した。また、腫瘍血管の形態が正常血管に近づき、ペリサイトの新生成が見られたことや、血管周辺で増殖期にある細胞数が増加したことから、血流の回復が示唆された。A-83-01処置によるADCの低下は、血流の回復によって腫瘍中の細胞外液が回収されたためと考えられ、その結果腫瘍間質圧が低下したことが微粒子の腫瘍移行性を高めた理由と推察される。

以上のことから、A-83-01は血液送達能力の低い腫瘍新生血管を正常な血管の形態に近づけ、血流を回復させたことにより造影剤の移行性を増加することが示唆された。特にGd-Lの腫瘍移行性は著しく増大し、A-83-01処置は微粒子の腫瘍集積性を改善できると考えられる。

E. 結論

リポソーム化造影剤を用いたDCE-MRIは、微粒子送達に影響を与える腫瘍の微小血管環境の評価に有用な手段であると考えられた。TGF- β 阻害剤A-83-01は、腫瘍血流の回復により微粒子製剤の腫瘍送達性を改善することが示唆された。DCE-MRIから求められる v_p 、 K^{trans} と、拡散強調画像から求められるADCの値は、腫瘍の血管状態を示すバイオマーカーとなりうるということが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. A. Hayama, T. Yamamoto, M. Yokoyama, K. Kawano, Y. Hattori, Y. Maitani. Polymeric micelles modified by folate-PEG-lipid for targeted drug delivery to cancer cells in vitro. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 8:3085-3090 (2008).
2. H.L. Ma, X.R. Qi, W.X. Ding, Y. Maitani, T. Nagai. Magnetic targeting after femoral artery administration and biocompatibility assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 84A(3):598-606 (2008).
3. H.L. Ma, Y.F. Xu, X.R. Qi, Y. Maitani, T. Nagai. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate: Pharmacokinetics, tissue distribution, and applications in detecting liver cancers. *Int. J. Pharm.* 354(1-2):217-226 (2008).
4. M. Watanabe, K. Kawano, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, In vivo antitumor activity of camptothecin incorporated in liposomes formulated with an artificial lipid and human serum albumin. *J. Control. Release*, 127: 231-238 (2008).
5. Y. Maitani, S. Katayama, K. Kawano, A. Hayama, K. Toma, Artificial lipids stabilized camptothecin incorporated into liposomes. *Biol. Pharm. Bull.*, 31(5): 990-993, (2008).
6. A. Yamada, Y. Taniguchi, K. Kawano, T. Honda, Y. Hattori, Y. Maitani, Design of folate-linked liposomal doxorubicin to its antitumor effect in mice. *Clinical Cancer Res.* 14(24): 8161-8168(2008).

2. 学会発表

- 1) 箕輪 卓也、川野 久美、白石 貢一、横山 昌幸、米谷 芳枝、Gd封入リボソーム製剤のMRIによる腫瘍集積性の評価、フィジカル・ファーマフォーラム 2008、東京、2008年3月24-25日
- 2) 箕輪 卓也、川野 久美、白石 貢一、横山 昌幸、米谷 芳枝、Gd封入リボソームのDCE-MRIによる腫瘍血管透過性の評価、第3回日本分子イメージング学会学術大会、埼玉、2008年5月22-23日
- 3) 箕輪 卓也、川野 久美、白石 貢一、横山 昌幸、米谷 芳枝、Gd封入リボソーム製剤のMRIによる腫瘍集積性の評価、第24回日本DDS学会、東京、2008年6月29-30日
- 4) 箕輪 卓也、川野 久美、栗林 秀人、白石 貢一、服部 喜之、横山 昌幸、米谷 芳枝、Gd封入リボソーム造影剤を用いたDCE-MRIによるTGF- β 阻害剤の評価、日本薬学会第129年会、京都、2009年3月26-28日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし