

# 座談会

## 臨床家たちが語る DDSの臨床応用

*Clinician's round-table talk  
on the application of DDS*

司会者

国立がんセンター東病院臨床開発センターがん治療開発部 松村保広

発言者

秋田県総合保健センター，秋田大学名誉教授 加藤哲郎

国立がんセンター中央病院消化器内科 濱口哲弥

大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学 南野哲男

京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科 坂本達則

(発言順)

1. 自己紹介
2. それぞれの専門分野を選んだ動機
3. 各領域における問題点と DDS
4. 将来展望
5. おわりに

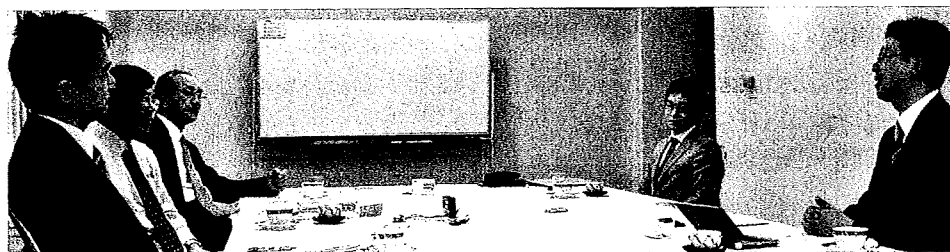
*Yasuhiro Matsumura*

*Tetsuro Kato*

*Tetsuya Hamaguchi*

*Tetsuo Minamino*

*Tatsunori Sakamoto*



この座談会は 2008 年 11 月 6 日(木)，品川プリンスホテルにて収録いたしました。

松村 本日は先生がたお忙しい折に、お運びくださいましてありがとうございます。今回の座談会のテーマは、“臨床家たちが語る DDS の臨床応用”です。臨床家たちが語る、というのが大きなポイントです。積極的なご発言をお願いいたします。

では、自己紹介からはじめていきます。

### 自己紹介



松村 私は熊本大学出身で、昭和56年に熊本大学第一外科へ入りました。その後、同大学の微生物学教室に前田 浩先生(現 崇城大学教授)がおられて、リピオドールにスマンクスという抗がん剤を混ぜて肝臓がん動注するという研究でしたが、そこで私は、その基礎研究および臨床までをやっていました。その後、ニューヨークのマウントサイナイ医科大学の腫瘍内科に留学し、そこでいろいろあって最後まで終わらずに、今度はイギリスのオックスフォード大学の病理に行き、日本に帰ってきました。帰国後、国立がんセンター中央病院の消化器内科に入りました。その後、現在の同センター東病院の臨床開発センターに行ったという経歴です。外科に行ったり、基礎に行ったり、内科に行ったりと、非常に半端なところを送ってしまっていて、いわゆる translational な人間だということになります。

加藤 私は6年前に秋田大学を定年退官し、いまは秋田県総合保健センターにいます。もともとは泌尿器科が専門です。東北大学医学部を昭和37年に卒業、1年間のインター

ンを終えて泌尿器科に入局、医学部紛争の時期を大学院で過ごしました。昭和46年に秋田大学に医学部が新設され、「お前、秋田にしばらく行ってこい」という教授の下命があり、結局そのままずっと秋田大学にいました。

大学院時代に2年ほど病理学教室に行き、赤崎兼義先生と笹野伸昭先生のご指導を受けました。秋田大学に赴任して4年目に文部省在外研究員として、ボストンの Peter Bent Brigham Hospital と Massachusetts General Hospital に半年ずつ計1年間留学しました。前半はひたすら手術場で手術に専念し、後半は膀胱がん細胞株を相手に細胞動態の解析をしました。

そういう関係で、がん化学療法に興味を持つようになり、帰国後も cell cycle を応用した抗がん剤のレジメを開発しようと研究をつけました。しかし、固形がんの cell cycle を *in vivo* でいじくり回すのは大変難しく、ほとんど不可能なことがわかりました。そのような経緯を経て、DDS という当時としては新しい研究領域に足を踏み入れた次第です。



濱口 私は平成4年に三重大学医学部を卒業しました。卒後、がんの臨床をやりたいと思っていたのですが、手先が不器用だったので内科を専攻することにしました。まずは general をやったほうがいいということで、むしろがん以外の病気の患者を最初の3年間は診ていました。卒後4年目にがん化



学療法を中心に勉強するために、がんセンターのレジデントに行きたかったのですが、そのときに相談した教授の意向で、がん化学療法を理解するには基礎のこともしっかり勉強することが必要ということで、三重大学大学院に入り、2年間基礎研究をやっていました。

卒後6年目の平成9年から国立がんセンター中央病院の内科レジデントで行き、そこで松村先生に指導を受けました。3年間、診断部、内科各科をローテーションして、がんの臨床、特に化学療法の基礎を勉強しました。4、5年目は消化器内科のがん専門修練医として消化器がんの化学療法に従事していました。ちょうど私がレジデント3年目のころから DDS 系抗がん剤の臨床第 I 相試験ががんセンターではじまりました。当初は3年のレジデントが終わったら三重県に帰る予定でしたが、臨床試験に関わって非常におもしろかったものですから、そのままがんセンターでの研修を2年延ばしました。チーフレジデントが終了するときに、そのままがんセンター消化器内科のスタッフにさせていただいて、その後は消化器内科の化学療法、それから DDS 製剤の臨床試験、主に臨床第 I 相試験をやっています。

私が学生のころは、まだまだ消化器がんでは化学療法がほとんど効かなくて、特に大腸がんでも生存期間中央値は1年ぐらいでしたが、最近になってアバスタチンやアービタックスなどの新規分子標的治療薬が出てきたおかげで、この10年ぐらいで治療成績は劇的に向上してきました。そういう意味でこのような領域に入ってよかったなと思っています。今後は DDS 製剤の臨床開発をやっていきたいと思っています。

南野 私は昭和39年生まれで、

昭和 63 年に大阪大学医学部を卒業し、医者になって 20 年目になりました。心臓は拍動する臓器であり、ダイナミックな感じがして、学生時代から興味がありました。最初は心臓血管外科にしようか、循環器内科にしようかというところから迷ったのですが、狭心症や心筋梗塞に対して、患者さんに比較的負担の少ない風船療法が始まり出して、この分野をやっていききたいなと思い循環器内科に入りました。

松村 風船療法というのは？

南野 冠動脈の狭窄部位にワイヤーを通して、そこで風船を膨らませ、血管の細い部分を物理的に広げて十分な血流を確保する治療法です。



卒業後 4 年間ほど大学もしくは大阪府立病院で臨床研修を行いました。大阪大学の大学院に入りました。大学院生時代は、心筋虚血耐性効果を生じる虚血プレコンディショニングの成立機序に関する研究を行い、そのトリガーにヌクレオシドの一つであるアデノシンが関与することを明らかにしました。その後、テキサスのベイラー医科大学に 2 年半ほど留学し、心肥大・心不全についての基礎的研究を行いました。その後留学から戻り、阪大病院の病棟主任を 2 年ほど務め、再度患者さんとの接点を多く持ちました。このとき臨床応用可能な新しい治療法の必要性を再認識し、DDS を利用した虚血再灌流障害抑制法の開発を始めました。

松村 その虚血再灌流のところですが、ちょっと DDS に絡んでると。

南野 そうです。

坂本 私が耳鼻科を選んだきっかけですが、学生のときはもちろんい



ろいろ迷いました。手術もしたいし、検査をきちんとして strategic に考えて、治療まで作戦立ててという内科的なアプローチもしてみたいし、研究にもつながることもしたいし、どうしようかなといろいろ迷っていました。ちょうど耳鼻科の後のポスになる人が頻繁に電話をかけてくれて、「おもしろいよ」ということで最終的には決断したんです。

結果的には、広範囲に大きな手術から小さな手術まで、内科的な病気としてはめまいとか難聴とかもそうです。どちらかという薬を使ってなんとかしたいという病気もあるし、研究としては私が一番メインにおいてるのは内耳ですが、内耳の研究もできるし、いろいろなところの手を出せておもしろい選択をいまのところしています。

これまでの経歴は、平成 7 年に医学部を卒業、当時は現在のようなスーパーローテーションはありませんでしたが、さすがに耳鼻科だけしか知らなかったら困ると思い、当時から神戸の中央市民病院でローテーションをやっていましたので、そこで救急と麻酔を回ってから耳鼻科に来ました。その後、伊藤尋一先生が教授になられて、内耳の再生研究をやるということで、乗ってみようかと思い大学院に帰りました。そのときの京都大学の基礎で、ES 細胞の研究をしている笹井芳樹先生(現 理化学研究所)の部屋にちょっとお邪魔して、ES 細胞から内耳の細胞をつくって植えたりとかできないかという研究をしていました。神戸の理化学研究所が発足するときに一緒に誘われましたので、大学院の途中からそちらに行き、大学院後の 2 年

ちょっとの間、リサーチアソシエイトとして内耳の発生の研究をしていました。

大学に帰って来て、いまはいろんな薬なり遺伝子なり内耳再生のネタがいくつかあがってきているので、その臨床的なアウトプットとして DDS が使えないかということで始めているところです。DDS には足を突っ込み始めたところですので、是非今日は勉強させていただきたいと思っています。

それぞれの専門分野を選んだ動機

松村 私が最初の外科を選んだきっかけですが、先ほど言いましたように、熊本の出身で、実をいうと熊本県でも一番南の人吉市です。これは九州のほぼど真ん中であって宮崎県と鹿児島県の境で、西南戦争があったとき西郷さんが一目散に九州山地を鹿児島まで逃げ帰るのですが、その途中、われわれ熊本県民ですが判官びいきの土地柄で西郷さんをかくまってあげたんです。余計な話ですが、同じ熊本でもちょっと違うわけです。そこに人吉総合病院というのがありまして、私が入局した熊本大学第一外科が代々院長を務めていまして、将来は田舎に帰って地域医療をするということを頭に描いて、前の実地のシステムが残っていましたのでその外科に入りました。いまは私の 2 年後輩の木村正美君が院長になっていまして、DDS の臨床試験にも最近参加してくれています。そんなたわいない動機でした。

熊本大学第一外科では、先ほど申しましたスマンクス、リピオドールという動注製剤を開発しまして、スマンクスの開発は前田先生という基礎の先生がなされましたが、リピオドールというリンパ管造影剤を肝臓に入れたら、ちょうど肝臓がんが染

まると、ある外科の先生が見つけたんです。それを混ぜて動注したら、最初の症例に非常に効いたのです。当時はいまの GCP (good clinical practice) 対応のまともな臨床試験がない時代で、そういうのがあって患者さんに使っていました。将来的にはそれはもちろん承認されたのですが、そういうことで創生期に入局して基礎研究と臨床の両方をやりました。

ある日、新婚旅行から帰ってきたら、「おまえ、教授は呼吸器外科で気管支形成術をやると言っている。しかし君はスマンクス、リピオドールをずいぶんやったからどっちか選べ」と先輩に言われて、肝臓がんにやりたかったものですから……。

加藤 今野俊光先生ですね。

松村 そうです。もう亡くなりましたが。

加藤 リピオドールの肝動脈注入を始めた大変有名な先生でした。

松村 それで、DDSの世界に入りました。もちろん外科を辞めるつもりはなかったのですが、どうせなら基礎の前田先生のところでやったらということで、そこに入ってずるずると。それで、いまここにいるという感じです。自分なりに以上のような歴史を持っています。

加藤 私の父は産婦人科の開業医でしたが、身近で見ていて医者ほど割の合わない職業はないと思い、大学入学志願書に最初は法科を記入しました。しかし、クラスの担任から問い質され、思い直して医学部に書き換えました。高邁な理念を持って医者の道に進んだわけではありません。

インターンを修了して専門領域を決めるときも、内科か外科か婦人科かとぎりぎりまで迷った末、泌尿器科にしました。診断学と治療学の双方ができ、手術もやれ、そして当時

としては外科から分科した新しい領域であることが選択の理由でした。新設講座ですので教室の雰囲気は自由で、自分みたいな不勉強な人間でもそこそこに生きていけそうに思えたことも影響したようです。

先ほど言いましたが、秋田大学に戦後初の医学部が設置され、その泌尿器科創設の責任者として診療だけでなく病院運営まですべて仕切ることになったのが一つの転機になりました。設備も研究費もない野戦病院のような環境に放り込まれましたが、大学院出たての若いスタッフとともに、従来の概念にとらわれずによいと思われることは積極的に導入することにしました。その一つが昭和46年、当時まだ未開の分野だった泌尿器がんの化学療法でした。

まず、ステージ4の末期腎がん、胃がん化学療法に準じてマイトマイシンCと5-FUを投与しました。ところが3年ほど経って患者の転機をみると、化学療法をしたグループとしなかったグループの両方ともに1年半以内にほとんどの患者が死亡していました。ショックだったのは、肉体的にも精神的にも、そして経済的にも大きな負担をかけた化学療法が、患者さんになんの利益ももたらさなかったことです。罪悪感に襲われました。このような経験から、細胞動態をもとにした化学療法、そしてDDSの研究へと足を踏み入れた次第です。

松村 加藤先生とは、そんなにしょっちゅうお会いすることはできないのですが、先生に接していて、お年を召してるのにかかわらず、けっこう自由な雰囲気です……。

加藤 年齢のことは余り言わないでください(笑)。

松村 いえいえ。そういった治療ができることと、自由な雰囲気であるということで泌尿器科を選ばれた

と、そのなかで腎がんで化学療法の世界に入られて、ところが当時は副作用とか経済的なものの負担をかけるにもかかわらず、その割にはbenefitがないといった問題をお話ししていただきました。

専門領域に入ろうと思ったきっかけ、その他先生がたで追加しておきたいことがありましたらお願いします。

加藤 肝心の松村先生のお話ですが、消化器外科に入る極めつけはなんだったのですか？

松村 先ほども言いましたが、非常にささいな動機です。自分の天命として田舎から出てきて、同じ熊本でも人吉ってさらに山の中なんです。朝日新聞の旅行の広告を見てみると“九州秘境の旅”って書いてある。そこの宿が人吉になってるくらいです。球磨川下りとかあってすごくのどかなところなんです。人吉総合病院に帰ると、そのためには、人吉総合病院の実地を押さえている昔のピラミッド体制の中での一外科だったものですから、そこに入ったというだけの話です。

## 各領域における問題点と DDS

松村 先ほど加藤先生から問題点の一部を紹介していただきましたが、各先生がたの専門領域において、現在感じておられる問題点、それは医学的にでもいいし、社会的なものでもいいですが、話していただければと思います。

濱口 がんの領域で抗がん剤治療ですが、加藤先生がおっしゃられましたように、私たちの領域では治療は望めないことが多いのですが、最近では survival benefit が、抗がん剤をしない場合に比べれば数ヶ月あるいは1年近く延命効果が得られるというようになってきています。

その分デメリットとして副作用があって、どうしても副作用と付き合っただけ数ヶ月延ばすことになりま。いわゆる生存期間の延長と副作用とをトレードオフしながら抗がん剤の治療をせざるをえません。よって人間苦しいのは嫌ですので、少しでも副作用を軽減し、より効果が高まるような治療、ということでDDSが一番だろうと思、この領域に入ってきました。

現在、抗がん剤治療は内服薬も増えてはきましたが、点滴治療が主ですし、なかには長時間の点滴のために、入院を必要とするケースがあるわけ。そこで患者の残された時間を考えますと、少しでも外来治療でがんとうまく付き合いながらい時間自宅を過ごしていただきたいと考えます。外来治療ができ、しかもなるべく外来に来る頻度も少なく、副作用で悩む期間も短いようなことができれば一番いい。そういう意味ではDDSの特性を活かして治療域を広げて、より短期間の抗がん剤投与で効果を高めて、しかも副作用を減らして利便性を上げることが、DDSによりできればと思、研究に当たっています。

松村 濱口先生のいまのご意見はかなり核心に触れてきたと思。DDSで副作用を減らして治療域を拡張すると、一方で、この10数年来、がんの領域で出てきました分子標的薬が出始めたころは夢の薬、副作用もない、効果はあると。そういったことで、ある意味DDSと対極をなす、いわゆる治療域を拡張するという意味ではそう思、現状については分子標的薬はどうでしょうか。

濱口 実際、分子標的薬を使ってみますと、これまでの抗がん剤より標的分子がより明確になったということがあと思、EGFR(上

皮成長因子受容体)の阻害薬とかVEGF(血管内皮細胞成長因子)の阻害薬などで特有の副作用が出ますので、その副作用管理が必要になってきていると思。分子標的かDDSかというのではなくて、そこをうまく統合して進めていけば、よりいい治療ができるのではないかとあと思、

松村 つまり、分子標的薬であろうとも、むしろそれをさらにDDS化するということも必要であろうということ。実際、臨床の現場で、昔は分子標的薬は副作用が少ないという売りで使っていましたが、がんの専門の医師からすると、抗がん剤治療のマネジメントと分子標的薬治療のマネジメントで、現在どちらが負担がかかるかということ。明確にはわからないと思、それぞれ大変なところがありますよ。

濱口 そうですね。当初、分子標的薬は副作用がそれほどないのではないかとわかれていましたが、薬によっては心毒性が出現し、なかにはかなり程度のひどい症状が出現するものがあります。しかも抗がん剤と併用することで、さらにこのような副作用が強くなってくることで、従来の抗がん剤とはあまり変わらないように思。むしろ副作用の種類が変わってきただけで、ある程度の副作用管理は必要ですので、そういった副作用管理に慣れて、しっかり使っていく必要があります。けっして副作用がなくなったというわけではないと思。

加藤 がんが専門でない先生がたがいらっしゃるので、多少古い話に戻らせていただきたいと思、

真にがん細胞特異性を持つ抗がん剤があるかという、これは、いまもってなにもないといえます。そも

そも抗がん剤の歴史を考えると、最初に世に出たのはnitrogen mustardで、これは第一次世界大戦のときにプロシア軍が使ったイペリット毒ガスの誘導体。要するに、がん化学療法には毒を持って毒を制するという宿命な歴史があ、そのしがらみから、いまも脱却できないと思、

抗がん剤は“毒”であるという前提に立てば、固形がんに対してはつぎのような抗がん剤の体内配送手順が求められます。

まず最初に、抗がん剤が病巣あるいは担がん臓器の血管床に局限して分布されることで、それはarea targetingあるいはfirst order targetingと称される第I段階です。

つぎは、その血管床にある抗がん剤が間質の中に入ってがん細胞のほうに速やかに移動してほしい。これをintrastromalまたはsecond order targetingとい。そして最後に、がん細胞の膜を滞りなく透過してほしい。これがintracellular targetingまたはthird order targetingとなります。抗がん剤の理想的なdeliveryは、このような手順ではないと思。

松村 それは本質だと思。加藤 このようなtargetingの手順を例え話にすると、つぎようになります。残虐非道なテロ首謀者に立ち向かう場合、ピストルかナイフか自動小銃か武器を選ぶのも大事ですが、それよりもまずはその居住国に潜入しなければいけないわけ。つぎは建物の中に、そして部屋の中に無事潜入できたら、初めて身につけた武器を使うことができるわけ。最終的なthird order targetingには分子レベルの工夫が必要でしょうが、少なくとも最初のarea targetingについては臨床家でも挑戦できる余

地があります。そういうことで、松村先生のグループはリピオドールをキャリアにし、私はマイクロカプセルをキャリアにしました。選択的動脈カテーテルでキャリアを腫瘍血管床に集積させ、それから内部の抗がん剤が溶出するという仕組みです。

私はハイブリッドマイクロカプセルというアイデアを持っていました。腫瘍血管床にとどまったマイクロカプセルの中に molecular targeting をするような薬を入れておけば、間質内でがん細胞に取り込まれやすいと考えたわけです。実際はアイデア止まりになってしまいました。

抗がん剤マイクロカプセルを用いた経動脈化学塞栓療法は、内外で2,000例以上の症例に使われ、うち1,000例ほどの集計成績は論文として報告しました。問題は、松村先生たちも苦労したと思いますが、X線透視下の選択的動脈カテーテル法という注入技術が必要なことです。どこでもやれるとは限りません。

そこで考えたのは磁気誘導法です。磁気応答型のマイクロカプセルをつくって、動物実験ではかなりいい線がきました。ただ臨床応用となると、リニアモーターカーの開発に匹敵するような莫大な研究費がいるようで、一大学人の手に余る仕事になるため、20何年間も空白の時間が過ぎ去ってしまいました。

さて、濱口先生にお聞きしたいのですが、molecular targeting の agent がたくさん出てきて興味を集めています。期待通りの効果が上がっているのでしょうか。

濱口 おそらく分子標的薬のイマチニブが有効な慢性骨髄白血病とかGIST (gastrointestinal stromal tumor) のようなものは、比較的単純な構図でがん化していると思うのですが、その他の固形がんに関して

はさまざまな遺伝子が壊れたりしているんで、一つの分子標的薬ですべてを制御するのは難しいと思うのです。よって、それ以外の多くのがんの場合はなかなか難しいと思います。加藤先生が言われましたように、標準治療薬がなかった腎細胞がんが、最近、血管新生阻害薬で治療できるという話になっていますが、そのようながん腫が劇的に増えているわけではないようですし、まだまだこれから検討していかなければならないことはたくさんあると思います。

松村 確かに数年前のアメリカ臨床腫瘍学会で、腎臓がんで近年来、初めて phase III で survival benefit が出たということで、あれはソラフェニブのほうですか。

加藤 そうですね。

松村 実際の臨床現場での位置づけというか、どうなのでしょう。すでに日本でも浸透していると思いますが。

加藤 日本では保険適用になっているのですか？

松村 なっています。

加藤 えらく早いですね。どういうベクトルが働いてそうなったのかわかりませんが、New England Journal of Medicine で survival の延長が報告されましたが、たかだか2、3ヵ月です。

松村 そうです。

加藤 将来に希望を持たせる研究ということは否定しませんが、2ヵ月程度の生存延長が果たしてどのような意義があるのでしょうか。

患者の立場からみると、毎月の薬剤費が30~40万円で年間400~500万円、しかも副作用がけっこう強いです。それに耐えて2ヵ月の余命延長ですね。それが市販薬として認可されていることが理解に苦しむところです。

松村 加藤先生としては、ちょっ

と異様に早いんじゃないだろうか。

加藤 コントロールグループの平均余命が12ヵ月で、それが20ヵ月とか30ヵ月になり、それで保険適用薬になるのなら納得できるのですが。

坂本 私は門外漢ですが、ソラフェニブはどういう薬ですか？

松村 いわゆるチロシキナーゼインヒビターです。マルチプルのです。

坂本 それで、ソラフェニブは study としては2ヵ月だけでも延命効果があるのですか？

松村 ええ。Phase III でそれは証明されています。それまで、実際のところ腎臓がんの治療というのは、先ほど加藤先生がおっしゃいましたが、薬物治療は best supportive care とあまり変わらないという現状がありました。実際、われわれが臨床で腫瘍内科をやっていたときも、腎臓がんという治療法があまり見当たらないという現状のなかで出てきたのです。ただ、あまりにも宣伝が……。

坂本 イレッサのときもそうでした。大騒ぎになりましたが。

松村 そうですね。あれも夢の薬で大騒ぎしたのですが。

坂本 保険適用になってるからみんながわーっと使ったけれど、実は副作用でたくさんの方が亡くなるという状況で、なにか拙速な感じが……。

松村 イレッサの場合は、現状としていま、世界的にはどうですかね。日本で限って使っている感じがします。

濱口 そうですね。EGFR に変異のある患者さんに効くということで、ある程度個別化されつつあるということだと思います。

坂本 カスタマイズして使う分にはいいということですね。

松村 日本ではね、分子標的薬であろうとも、やはり抗がん剤と違う、むしろ臨床的に対応が難しい、出血とか間質性肺炎とかそういった副作用が歴然としてあるので、やはり副作用がない薬とはいえません。延命効果に関しても、ある特殊な遺伝的な腫瘍を除いて一般的ながんにおいては、それほどの延命効果を単一の薬剤でもたらしているわけではないという問題点があったと思います。したがって、将来的にこういったものを DDS 化すべきであろうと思いますが……。

坂本 現状ではどうなのでしょう。Area targeting は、多分 surgical なものとの組み合わせとか、particle のカプセルの組み合わせとかで、ある程度はできていますが、その先の targeting は、実際、臨床ではまだできていないという段階なのですか？

松村 その先とおっしゃると？

坂本 血管から細胞まで到達する secondary targeting とか……。

松村 加藤先生もおっしゃいましたが、ほとんどやっていないと思います。少なくとも分子標的薬を研究している人たちは、まず細胞に入りますから、“Cell” という雑誌に載せようと思って細胞の中に入りますね。DNA を抽出してきてリン酸がどうのこうのって、スライドをつくる時に矢印でもって、いろいろここがこう効いて、こう阻害して、なにがわかってきたかというところ、ますますわからなくなってきたというのが現場の基礎医学者の意見です。

ただ、われわれはもうちょっと単純化して、シャーレの中でがん細胞をやっつけようと思ったら簡単にできます。ところが、先ほど加藤先生もおっしゃいましたが、人間のがんって、将来転移してしまったりどこに巣をつくるかわからない。ではどうやって到達するかは、おそろし

いほど考えられていない。到達したあとも、どうつぎに間質にいったら、その後実際のがん細胞を攻撃するためにはどうしたらいいのかというのは、おそろしいほど研究が少なかったと思います。それは、私の予想ですが、がんの世界ではいまからこういった研究が実学として出てくるのだらうと思います。

さて、がんの領域で話してきましたので、ほかの領域でも DDS がこういうような考え方で研究あるいは開発ができるということ、みなさん非常に知りたがっていると思います。炎症学とか感染症とかでやっておられる先生もいますが、循環器という領域で、南野先生にお話しただきたいと思います。

南野 少し DDS のことから反れるのですが、先ほど話題になった分子標的薬の多くが、心毒性を有することが明らかになっています。私は DDS に関する研究と並んで蛋白質の品質管理障害と心不全の関連を検討しています。分子標的薬が心筋細胞の蛋白質品質管理機構の障害を引き起こし、心毒性出現のメカニズムの一つになっている可能性があります。したがって、今後、循環器内科医とがんの臨床家医がもっと連絡しないといけないと思います。たとえば、定期的に循環器専門医ががんの治療を受けている人の心臓の評価をする、そのようなシステムづくりがものすごく大事なのではないかと思っています。

松村 大事ですよ。実際 phase I のときに心電図をモニターしながらやるのですが、循環器の先生が絶対必要です。

南野 心電図は必要最小限であり、その他の指標も用いて発症を予想できないかということまで積極的に関わっていくことが大事だと思います。厚生労働省のデータ

では、がんで亡くなる方が 1/3、循環器領域で亡くなる方が 1/3、その他が 1/3 ということになっています。松村先生もおっしゃったように、DDS の応用は、がんの領域に限られて、循環器領域に対しては応用はほとんどなされていないと思います。

私たちは、心筋虚血再灌流障害のメカニズム解明など基礎的な検討をしています。そのなかで、ヌクレオシドの一つでありますアデノシンが心保護作用を有することを、大型動物のレベルまでは非常にクリアに示すことができました。実際、アメリカの施設を中心とした大規模臨床試験が急性心筋梗塞の患者さんを対象に行われました。アデノシンの投与にて心筋梗塞サイズは軽減されたのですが、同時に血圧低下の副作用も出現し、広く臨床応用はされていません。実験でいくらよいデータが出ても、実臨床への応用の段階で少し壁があるなということを常々考えていました。

このようなことを考えているときに、松村先生たちが見つけ出された血管透過性のことや EPR 効果のことを知りました。私たちは心筋梗塞の病態はよく勉強していましたから、心筋梗塞の部位もしくはその周辺部位の血管透過性が非常に高まっているという報告を知っていました。そうしますと、ものすごく単純な発想ですが、がんは血管の内皮の発達が未熟でリポソームが入ってくる。一方、心筋梗塞の場合は、物理的に内皮細胞が破綻しているため血管透過性の亢進や EPR 効果が期待でき、リポソームが心筋梗塞に適用になるのではないかと考え研究を開始しました。

図 1 はラットの心臓の輪切り像です。蛍光ラベルしたリポソームを静脈内投与しますと、最下段の TTC

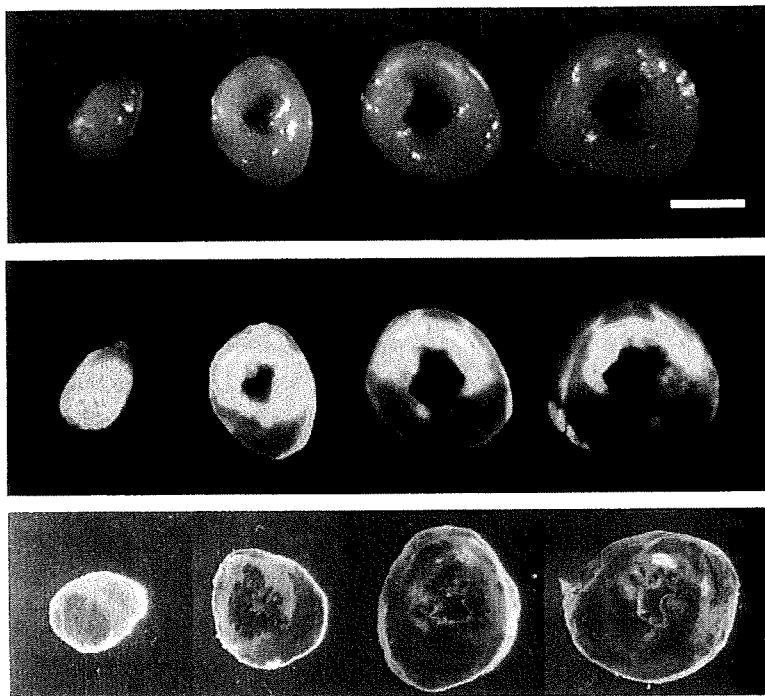


図1 リポソームの心筋梗塞部位への集積 (南野)  
Bar: 1cm

染色陽性である心筋梗塞部位に一致してリポソームが著明に集積することを見いだしました(図1)。ただ、私たちは心筋梗塞の病態評価に精通していますが、薬剤や遺伝子をリポソームに封入する技術やその体内動態の評価については、まったくの素人です。

そこで、異分野の連携を通して研究を進めています。特に静岡県立大学薬学部の奥直人先生、浅井知浩先生や、大阪大学産業科学研究所の黒田俊一先生、ならびに企業とタイアップしながら研究を進めていっている状況です。実際、先ほどの心保護作用を有するアデノシンのリポソーム化を行っていただきました。アデノシンのリポソーム化によりアデノシンの血管弛緩作用による血圧低下という副作用を軽減し、心保護作用の増強を認めました。本当に偶然ですが、その論文が今朝(2008年11月6日)アクセプトされたとメールがきておりました。

加藤 どのジャーナルに載るので  
すか？

南野 “Journal of the American  
College of Cardiology” という循環  
器領域の論文です。

松村 すばらしいですね。おめで  
とうございます。

南野 ありがとうございます。一  
つのきっかけにしたいと思っていま  
す。

加藤 ちなみに南野先生、そのア  
デノシンリポソームは、先生がたが  
世界に先がけて使われたのですか。

南野 はい。

松村 DDSの臨床展開という意  
味では非常に大きな業績だと思いま  
す。ますますこれを発展させていた  
だきたいです。いま、南野先生のお  
話で、私はどちらかというEPR  
効果というよりも、血管透過につい  
てずっとやっていました。釈迦に説  
法ですが、内因系凝固と外因系凝固  
があり、内因系凝固は最終的にキ  
リンという血管透過層をつくり出すの

ですが、その最初のトリガーは  
Hageman factor, 内因系凝固因子  
の12番です。これは、われわれが  
見いだしたのですが、同時に  
Dvorakという人がVPF(血管透過  
性因子)が血管透過に関わって  
ると、これは後々VEGFと同じもの  
であることがわかりましたが、つい  
最近、いわゆる tissue factor, 外  
因系凝固のトリガーがVEGFの産  
生を増強させるという論文が出て  
きました。すなわち、内因系凝固  
であろうが外因系凝固であろう  
が、腫瘍血管透過性亢進に関わ  
ってきます。しかし、いまの南野  
先生のお話ですと、凝固系が起  
こったら血管透過が起こってくる  
というのは、これは必然的なもの  
であろうと思います。

もう一つ、凝固が出てきました  
ので、がんと関係をお話しますと、  
昨日もある講演会でお話したの  
ですが、1800年代の消化器外科  
医にフランスのトゥロソーとい  
う人がいて、この人はがんの末  
期の患者がかなりの頻度で手足  
が腫れる、つまり血栓が起こる  
ということを最初に文章化しま  
した。トゥロソーはそういう臨  
床研究をやっていましたが、あ  
る日、彼のお弟子さんのピータ  
ーという人に「I'm lossed.」い  
ま失望のどん底にいるという手  
紙を書いて、なぜかという自分  
の手足が腫れてきたと、そうい  
った手紙が残っているのだそう  
です。彼は半年後胃がんで死んで  
しまう。これは全部本当のストー  
リーで、つまり、がんと凝固異  
常は前から知られていると。現時  
点において、脳腫瘍とか膵臓がん  
などで有意に深部静脈血栓を起  
こす人が多いことで、がんと凝  
固系・循環器系は、こういったと  
ころでつながっているということ  
を、少し強調したいと思います。

南野 モデルについては、マウス  
はコストや維持の面では大変あり  
がた



いのですが、詳細な解析というやや難があります。たとえば、私たちはマウス、ラット、イヌなどの動物種を扱っていますが、ラット、イヌはどんな感じですか？

松村 想像ですが、マウスとヒトというのはかなり遺伝的に違っています。むしろ大動物にいくほど人間に近いので、その辺のところはいまは余裕がなくて、まったくやっていませんが、南野先生のご意見どおり、ラットやイヌでちょっとやってみるべきかなと。おそらくクロスすると思います。

もう一つ、非常に重要な点だと思いますが、急性期の脳梗塞や心筋梗塞では、梗塞部位を風船療法などで開通させることがなんでもそうですが第一義的で、tissue plasminogen activator とかの薬物がありますが、薬物的なことではこれをやりますよね。いま現在、リポソームアデノシンは、どういった時期にやったら効果があるのでしょうか。

南野 心筋梗塞作製後再灌流直前に投与しています。心筋梗塞の治療として重要なことは、いま松村先生がおっしゃったように二つです。

一つは、詰まった血管を出来るだけ早期に再灌流する。つぎに、再灌流直後は生き残ってる心筋がたくさんいるのです。全部が死んでいるわけではない。もちろん血管閉塞のため壊死に陥ってしまった心筋もありますが、その周りには瀕死の心筋が多く存在します。その部分に対する治療法がないのです。この実験系は臨床応用を念頭においています。心筋梗塞の患者さんが来られてカテーテル検査が開始されるまで30分~1時間ぐらいかかります。その間にリポソーム化アデノシンを先行投与しておく、風船療法にて血流を再開すると同時に心筋梗塞部位にリポソーム化アデノシンが到達し、心保

護効果が期待できます。

加藤 南野先生がおっしゃるように、心筋梗塞のモデルをつくと同時に治療するというのは意味がないわけで、臨床現場では発症から治療までには2~3時間のタイムラグがあるわけです。

松村 理屈が合って薬剤的なGMP(good manufacturing practice), GLP(good laboratory practice)対応が、近い将来、企業とドッキングして、それから肅々とGCP(good clinical practice)対応でやっていけば、効果的な治療薬剤が早く世に出るような気がします。

南野 いま、ある企業にてfeasibility試験の実施予定です。それでうまくいくと、社内での創薬シーズ候補になることが期待できます。企業の協力があれば心強いです。

加藤 早くやっていただきたいですね。このなかでは私が最初にその恩恵を受けるかもしれません。それともう一つ、エリスロポエチンはいろいろな分野でかなり使われています。泌尿器科関係では慢性腎不全の透析患者に日常的に使われており、手術用の自己血採血にもエリスロポエチンを投与しますが、リポソーム化によってcost benefitを図ることが可能ではないでしょうか。

松村 現実問題、エリスロポエチンのDDS製剤として、ポリエチレングリコール付加剤などがすでにありますね。

それでは、循環器領域から今度は坂本先生の耳鼻科領域で是非お話をお願いします。

坂本 私たちのメインのtargetは難聴です。難聴をtargetにすると、抗がん剤でもそうですし、心臓でもそうですが、疾患がfatalですが、こちらのはfatalではない。耳が聞こえなくなると死なないという

ことがあるので、多分どの業界のかたも割と及び腰ってところがあります。

松村 いやいや。私、言っときますけど、左耳完璧にdeafなんです。ですから、学会のときなどすごく聞きにくいときがあります。左耳を聞こえるようにしてもらえたらという個人的な意見があります。

坂本 さまざまな方法でなんとか難聴を治せないかと考えますが、もちろんそれ自体が難しいこともあります。ただ、この5人のメンバーのなかでも難聴のかたがおられて、高齢者は確実に難聴が進んでいくわけで、本当のマーケットはすごく広いはずですが、なかなか脚光を浴びない。脚光を浴びないといっても“感覚器の10年”とか、今年(2008年)、水島裕先生が亡くなりましたが、一生懸命推進しておられて、当科も大分応援していただいたのですが、実際のところアウトプットまでもっていけないというところがあります。

ネタとしてはいろいろあります。たとえば、当科では、いま臨床試験を行っているハイドロジェルにIGF-1(インスリン様成長因子-1)を合わせて内耳にdrug deliveryというか、prolonged releaseで投与する方法をやっていますが、それ以外にいまどれだけの臨床試験が登録ベースでやられているのか調べましたが、日本のUMINとアメリカのClinical Trial.govを見て、interventionで難聴をtargetにしているのは四つしかない。そのうちの一つはterminateになっている。多分完遂できずに終わっているのです。ですから正直全然ないのです。

いままで使われていた薬もステロイドの全身投与ぐらいですので、それ以外にも、たとえば鼓室内投与はするのですが、いいのかわるいのか

よくわからないというぐらいのものしか出てきていませんので、ほとんど手つかずの世界です。それは多分耳鼻科のほうにも責任があると思います。基礎研究が全然足りてない。それから、本当はマーケットが大きいのですが、そのアピールができていないというのは大きいです。また診断技術が進んでない。内耳の難聴といっても target の細胞はいろいろあって、有毛細胞は有名で、そういうところも target なのですが、それだけではなくて一次感覚ニューロンの障害、内耳の恒常性を維持していく血管条という側壁の部分の異常もあるはずで、そういうのを詳細に診断する方法が全然ありません。できればそういうところもだれかがやらないといけないのですが、かなり停滞してる状態です。

そこで、drug delivery ですが、発生学とか遺伝子の導入なども含めて、たとえば growth factor の導入なども含めて、動物実験ベースで効きそうなものはありますのでいろいろ試したいのですが、内耳にもものをもっていく方法がありません。原因はいくつかありますが、まず内耳、蝸牛がすごく硬い骨胞に囲まれていて、あまり blood supply がない。AICA(前下小脳動脈)の枝の細い蝸牛動脈があって、それだけなんです。それから blood brain barrier と同じような blood cochlea barrier というのがあって、どういう実態のものかさっぱりわかっていないのですが、なかなか薬物が通らない。

そういうことがあるので、どうやって全身投与のものが内耳までいくのかさっぱりわかっていないというところ。それから実質があまりない、ほとんど液体の臓器なので、ほかの実質臓器で、たとえば血管から透過してという知識が全然応

用できないという問題にあって、そういうところでもっと研究する population が増えないといけないと思います。それでも内耳障害、突発性難聴など起こったときに、多少の炎症細胞浸潤があることはわかっていますので、それを応用したい。それから骨髄由来の細胞が蝸牛にもしばらくいて、リサイクルされる形になるというのが、当科のデータでもありますので、そういうのを利用して細胞をビークルにしたような drug delivery も可能性はあります。

当科でいまやっているのは、蝸牛の骨胞の中で1ヵ所だけ膜で閉鎖されている部分があって、それは正円窓膜といいます。割と薄い膜です。鼓膜切開、鼓膜を切るだけで、上手にやればそこにアクセスできますので、そこにもものを置いて diffusion で中に入っていくという方法が、いま臨床にもっていきつつある技術のメインです。

実際、それで割といろんなお薬が入ります。先ほどの IGF-1 もそうですし、私がつぎに考えているのはリドカインによる耳鳴り治療です。リドカインは耳鳴りを抑えるといわれていますので、それを蝸牛に入れることはできないか。普通に鼓室にリドカインを注入すると、効くのですが、内耳麻酔でものすごくめまいがするので、実質使えない。私考えるまでもなく drug delivery の方法を使って低濃度で徐放するものをだれかがつくってくれたら、きつとできたはずだと思いますが、少なくともいままではされていません。

松村 ゆっくりというのは、徐放的な薬剤をそこに入れたら……。

坂本 そうです。置けばいい、すごく単純です。あまりたくさんの population がいないところで臨床的なアウトプットを出して、これ使えますというようなデータを出さない

ことにはだれも寄ってきてくれない。それも fatal なものが相手ではないので、死ぬかもしれないような方法はもちろん使えないわけで、極力ハードルを低くすることが、私たちのいまのところのラストだと、GMP 基準も満たせといわれるわけですし、あまり複雑なものをつくっても人に証拠を示せないのです。ですから、私がリドカインで使っているのは PLGA(ポリ乳酸・グリコール酸共重合体)、吸収糸です。PLGA とリドカイン、リドカインは循環器の先生がたはなんぼでも使っている薬ですから、人体に入れてわるいわけはない。

加藤 PLGA とリドカインをどうするのですか？

坂本 Oil-in-Water 法で、particle 化して置くだけで2週間ぐらいは徐放されていますので、それを置いて、言うのが恥ずかしいぐらいシンプルな方法です。

加藤 いわゆるデポ製剤のようですが。

坂本 ポリマーになるときにエンカプセルしてるだけという、それだけです。

松村 あれは完全にエンカプセルされなくたって、emulsion なんていうのは本当のカプセルではないです。それでもある程度、徐放効果はあるみたいです。

坂本 はい。ほかにもきつといろいろ手はあると思いますが、なぜそれをわざわざ選ぶかという、臨床へ向けてのハードルを低くしないといけないところをラストだと思ってるからです。

松村 その治療をやったあと、何回も繰り返してやらないということにはなりますか？

坂本 なると思います。ただ、いま鼓室内に普通に液体のリドカインを注入して、3~4時間、入院が必

要かもしれないぐらいの激しい嘔吐を伴うめまいがつづくのです。それでいて、鼓室内の液体は、1回嚥下するとほとんど排出されてしまいますので、それで治療効果終わりということになるので、それではだれも飛びついてくれないのです。リドカインがきっちり効いていれば、テンポラリーですが、聴力は少し低下するかもしれないといわれています。しかし、いままでの報告で、リドカインを鼓室内に入れたという報告もありますが、それで少なくとも後に残るほどの難聴は起こってきません。

松村 確かに循環器疾患とがん疾患はそのまま死に直結しますが、健康な人が子どものときから死ぬまで何10年と、私みたいに左耳が全然聞こえないとか、耳鳴りに悩まされるとか、むしろ大変な問題です。

坂本 そうなんです。死なないうてことは、死ぬまでずっとということでもあります。

松村 QOLという意味で問題です。私の友達で喘息の研究をやっている人が、「おまえ、がんなんかいままからやったってしょうがないんだ」と、「この世に生まれてから死ぬまで悩まされる喘息なんかは、やっぱり最初に解決しないとだめだな」と、ちょっと極端な話ですけど、そのたぐいだと思います。しかし非常に重要な点であって、まずはとっかかりとして、単純な剤形かもしれませんが、まず耳鳴りでこういうDDS製剤が効いて、そこから突破口でどんどん発展していっただけければと思います。

坂本 はい、できるだけ population を多くしないと、研究が進まないと思っています。

松村 確かに、それは厚生労働省的にもそうです。ある population があって、そこをどう QOL を高め

ることができるかというのはやっぱり必要です。

もう1回ちょっと難聴のほうに、自分の個人的なことに戻りますけど、左耳が生まれつき(?)聞こえないので、聴覚検査をしていただきました。この検査は……。

坂本 おでことか耳の後ろとかに振動子を当てて。

松村 「これはどうにもなりません」と言われたのですが。

坂本 多分内耳の難聴ですね、伝音難聴といって、骨がついてないとか穴があいてるとかでしたら手術で治せるのですが、内耳以降だったら治せない。

松村 DDS学会にはマテリアル工学の人、再生工学の人がいて、骨の再生とかにどんどん傾いている人たちがいっぱいいます。そういった再生医療をそういうところにもってくることが大切だと思いますが……。

坂本 はい、それは、たとえば手術でアプローチできる難聴に関して、骨の技術を応用することができます。実は人工耳小骨というのはアパセラムですでに市販化されています。私も手術で使いますが、どうしても排出されることが、ある確率で起こります。

松村 排出されるというのは、吸収されるということですか？

坂本 どのように動くかといいますが、蝸牛の入り口の振動するところがあるのですが、そこにアパセラムを立てて、立てたものの反対側が鼓膜に当たっている。鼓膜の振動がアパセラムを振動させて蝸牛内を振動させる。コルメラという使い方ですが、そういうものを置きます。単純に考えますと硬いものがいいたろうと。もちろん、人の耳小骨は歯につぐぐらい硬い骨ですので、耳小骨が使えればそれをドリルで削って整形して、間に挟んでするのですが、

無理ならアパセラムを使います。

アパセラムですと、鼓膜に当たっている側が、鼓膜がどうしても柔らかいもので異物反応が引き起こされる場合があるようで、鼓膜のところに穴があいてアパセラムが排出されて聞こえなくなることが、ある確率で起こるので、嫌って使わない先生もずいぶんいます。そういう異物反応を低下させる方法ができればいいのですが。

松村 マテリアルの人たちは、たとえば東京女子医科大学の岡野光夫先生たちは、自分の細胞で口腔内膜や角膜をつくったりとか、あるいは東京大学の片岡一則先生は自分の細胞で骨をつくったりとか、いまやっておられますので、自分の細胞でそういった耳小骨などをつくってそれを埋め込むという、いわゆる再生みたいなことはどうですか？

坂本 耳の手術はたいがい待機できる手術ですので、多少時間がかかってもかまいません。そういう意味では適応はありうると思います。つくらないといけない骨がとても硬い骨で、軟骨で代用する場合もあるので絶対硬くないといけないかという、そうでもないのですが、ある程度の硬さがないといけない、それから安定してないといけないという必要があって、その場で形に合わせて削りたいというものです。

加藤 手術場での微細加工が必要なのですね。

坂本 そうなんです。ドリルでその場で顕微鏡で見ながら細工して、大きさを合わせて入れますので、そういうものに耐えるだけのものができれば、排出の問題は解決されると思います。

松村 聞いてるだけで難しそうですね。Microsurgery ですね、きつと。

坂本 はい、マイクロでやりま

す。

加藤 難聴とか耳鳴りの研究で、動物実験はまず不可能ですね。

坂本 いや、やります。というか、動物でしか示せないこともずいぶんあります。われわれにとってはマウスとラットとモルモットが割と使いやすい大きさですが、モルモットが使いやすいです。

加藤 難聴や耳鳴りの実験モデルはあるのですか？

坂本 あります。たとえば、アミノグリコシド系の抗生剤が耳毒性がかなり強いので、これを使ったりします。また、騒音難聴でモデルをつくったりします。抗がん剤でシスプラチンは耳毒性がけっこう有名ですの……。

松村 2ヵ月すればだいたい末梢神経障害が起こってきます。

坂本 シスプラチンは、ラセン神経節の一次聴覚ニューロンを強く障害し、有毛細胞も障害します。それを、サルに使っています。DDSとは関係ないのですが、細胞移植という方法も……。

加藤 先生、このDDS学会は再生医療も大きな比重を占めています。

坂本 そうですね、ではかまわないですね。一応 spiral ganglion、一次聴覚ニューロンのところの細胞が欠落しているというのに対して、stem cell からニューラルな細胞を induce した細胞を入れるということをやっています。それはげっぱ類ではそれなりにデータがあって、サルでも5例ぐらいはやっています。

松村 神経は再生できるのですか？

坂本 それがどういうモードで再生してるのかが、ちょっと追求しきれていないのです。というのは、もちろん植えた細胞が十分にニューライトを延ばして、パイポーラな神経

なので末梢と中枢と両側にシナプスをつくってれば完璧なのですが、そこがトレースがなかなか難しくできてない。そうではなくて、なにか trophic support みたいなことをしているのかもしれない。

松村 先日のがん学会で、京都大学の山中伸弥先生より iPS 細胞のお話がありました。脊髄損傷の患者さんが、山中先生のその研究の話をつたひびき聞いているそうです。少しわからないのは、たとえば高速道路のインターチェンジががさっと壊れたとします。以前は柏方面から上野に行ったり銀座に行ったりできていた。言いたいのは、脊髄損傷は、がちゃっと壊れるわけでしょ。そこを万能細胞で治すと、そこへ神経も増殖させる。たとえば、すごい熱い物を手で触って、本当は手が反射しないで足が反射するとか、こういうことって起きないのですか。

坂本 Mis-direction ですね、あります。

松村 ですから、すごい発見ですが、脊髄損傷の人が聞くと、「えっ？」と、少し違和感を感じました。

坂本 脊髄損傷では、結局、損傷部位にはなにがあるかといいますと、ニューロンの本体はないわけです。ファイバーが延びている。あとはそこにグリアがあります。ファイバーがあってグリアがあるところに損傷が起こっているときに、細胞をその場に足してやってなにが起こるかという、神経があってもしょうがないわけです。慶應大学の岡野栄之先生はすごく頑張っておられて、それなりの結果が出てる場合もあるみたいですが、それがどのようにして functional な改善をもたらしているのかは、いつまでたっても解決されていない。いったいその細胞がな

にをしたのか。そこにある細胞で、こことこのファイバーをバイパスなんていうことは、いままで知られていないわけで、そんなことがあるのかとみんな思っています。

松村 なるほど。その辺は、そのような単純な疑問に関してはまだわからない。

坂本 はい。答えられていないのです。

加藤 iPS 細胞や ES 細胞を脊髄損傷の部位に移植した場合はどうなるのでしょうか。

坂本 iPS 細胞なり stem cell みたいなものをそこに入れた場合ですか。ある一定の期間はそこに細胞がいます。それがどういう細胞になっているかという、グリアは一つあります。ニューロンになっているかというのは、よくわかりません。

松村 耳鼻科系でも DDS の応用がもし成功したら非常に恩恵を被る人が多いということはわかりました。是非頑張ってくださいと思います。こういうことは、やはり声を荒げて、予算立てしてサポートしないとだめですね。

## 将来展望

松村 個人的にはおもしろい話のがん領域以外の先生がたにお聞きして、すごくためになりました。

それでは、各先生がたに DDS 製剤の実用化への問題点および将来展望を語っていただければと思います。

濱口先生は、実際、DDS 製剤の治験を現場でやっておられて苦労されている点があると思いますが、それを踏まえて、将来 DDS をこういうように発展させたいというのがありましたらお願いします。

濱口 抗がん剤を実用化するために臨床試験に関わってきたのです

が、まずは臨床試験には第Ⅰ～Ⅲ相試験とありますが、第Ⅰ相試験で、副作用をみながらその薬剤の至適投与量を決め、第Ⅱ相試験で、あるがん腫における有効性を評価する。そこで promising ということになる、最終的には第Ⅲ相試験で、標準治療とくらべてなんらかの benefit があるだろうか。一番いいのは生存期間が延びることですが、それ以外にも DDS 製剤で副作用が軽減できるとか利便性があるということを示すことができれば、少なくとも標準治療とくらべて効果が同等以上であることが示されれば、その後の標準治療になりうると考えられています。

そのような臨床試験を最終的には行い、有用性を示さなければならない。ここで一番難しいのは、臨床試験をする場合に、非劣性試験とありますが、効果は同等でなんらかのメリットがあるということを示すとすると、かなりの症例数を集めなければいけない。第Ⅲ相試験であれば、おそらく 500～1,000 例の規模の臨床試験が必要になってきます。また、現在、タキソール内包ミセルの臨床試験などが行われていますが、最近ではアブラキサンのようなアルブミン結合型の製剤やリポソームなど、さまざまな剤形のもので出てきていますので、そういったものと比較するために臨床試験を行おうと思うと、さらに大規模な試験が必要になってきます。そういうところでも効率がよく結果を出していくか、しかもなるべく短時間で世に薬剤を出すことが重要ですので、いかにデザインするかが非常に重要だと思います。

先ほど分子標的薬という話もありましたが、臨床医の多くは分子標的薬の開発にどうしても興味を持っているものですから、DDS 製剤での

臨床試験のことで協力してくれるかたが、なかなか少ない現状です。日本だけでなくグローバルも踏まえて、出来るだけ早くこういった製剤の臨床試験を打ち出していくところが、重要なことだと思っています。

松村 いまアブラキサンの話がありました。これも一種の DDS 製剤です。これは phaseⅢ の段階で survival ではなくて、なんと response rate でやっていました。これは FDA がこういったものに関して早く承認させようとする姿勢だと思いますが、日本でもこういった動きを推すべきだと思いますが……。

濱口 そのとおりだと思います。アブラキサン投与では、タキソール投与の前投薬として必要となるアレルギー予防のための抗ヒスタミン薬やステロイドを使わずにすみます。また、高度な好中球減少症の頻度が減るなど、副作用がタキソールにくらべて軽減することが示され、あくまでもタキソールという効果がわかっているものをアルブミンに結合した薬剤ですから、おそらくレスポンスもある程度は期待できる。そういうことで奏効率を primary endpoint においた試験が成り立ったのだと思います。

よって、そういうところを日本の厚生労働省にもしっかりとアピールをして、いち早く承認可能なデザインで試験ができるようにしていきたいと思っています。

松村 タキソールミセル体も。

濱口 ミセル製剤もです。いま、おそらく日本の場合に、胃がん、大腸がんのようなメジャーながん腫ですと、臨床第Ⅲ相試験でしっかり survival benefit を示せという話がありますが、こういう DDS 製剤に関しては、海外のアブラキサンのような開発の仕方があることをしっか

りアピールしていきたいと思っています。

坂本 Target になっているのは腺がんが主です。耳鼻科領域でいうと、一番多いのは SCC (扁平上皮がん) です。SCC に対する抗がん剤治療という、私が研修医になったころから全然変わってなくて、シスプラチン+5-FU です。なにか新しい動きはないのでしょうか。

濱口 頭頸部がんに関してはある程度可能性がわかっていますので、先ほどのセツキシマブのような抗 EGFR 抗体も臨床応用に入っていますし、アブラキサン、タキソールも、この領域で臨床試験が行われてきている状況です。そういう意味では SCC でも頭頸部領域の治療は進んでいると思っています。

坂本 頭頸部で手術するとえらいことになってしまうのが、縮小手術ができるだけでも大きいですね。

加藤 頭頸部の場合は、局所投与も比較的やりやすい環境です。

坂本 歴史的にも上顎がんに対する動注はすごく長くやられてきたと思います。

松村 現在も動注療法は確かやられています。

坂本 はい。上顎がんに対しては、治療方法の揺れが大きいといえますか、縮小手術というようにして時代と、なんでも extensive にとるとい時代とか、どうしてもいつたりきたりです。いまはどちらかという extensive ですかね。Skull base surgery をやってでもとります。

松村 では南野先生。いわゆる基礎的な研究段階としての製剤ができた。今後おそらく GMP 対応、GLP 対応と上っていかれると思いますが、その辺のところについて、将来展望も含めてお話をお願いします。

南野 心筋梗塞に対する治療は大

分進んできて、亡くなるかたは10%程度です。そのため薬剤による死亡率や心不全の軽減効果を示すためには、非常に大規模な臨床試験が必要となってきます。製薬会社にとっては大きなリスクとなりなかなか手が出ません。公的なバックアップシステムがほしいです。

もう一つの問題点は特許です。既存の薬剤をDDS化することにより効果の増強が得られたとします。それを大学の特許に持っていくと、特許というのは新規性と進歩性がないとだめだと指摘されます。効果が増強されることは進歩性につながりますが、新規性がないということになる。そうすると特許にて保護されないと、いくらよいとわかっているでも参入してくる会社がない。ですからもっとデリバリーのシステム自体、すなわち入れ物に新規性を出すか、中身に新規性を出しなさいと、そういうことになるのです。リポソーム化製剤は安全性が高く、しかも早い段階での応用が期待できるにもかかわらず、特許面を考慮するとなかなか開発が進まないこともあります。

松村 特許性はあると思います。

南野 先生、それでは大学の知的財産部に言っていただけませんかでしょうか(笑)。

坂本 われわれもそうですよ。

南野 個人で維持するか、提供先企業を見つけ出す必要があります。

坂本 PLGA やリドカインもそうですね。

南野 やはり、そうですか……。

坂本 PLGA もリドカインも知られていて、効果も知られている。そこに新規性はないから、そこで特許はとれない。

松村 それを耳鳴りに応用するという。

加藤 使用特許はあるのではないですか？

松村 アメリカはあります。

坂本 それは難しいといわれました。たとえば、その particle をどうやって membrane 上に置くかというテクニカルなところで、あるいは手術技術でという形で特許をとることは可能ですが。

松村 アメリカでしたら確実に可能ですね。日本はまだです。

坂本 ただ、particle 自体でということではできないし、PLGA やリドカインを耳鳴りに使うという治療方法ではとれないです。

松村 そうですか。臨床試験で20億かかるので、それをサポートする企業が……。

南野 ないですよ。

坂本 ですからわれわれが自前でやらざるをえなくなり、そうすると臨床試験を自前で回すのって、非常に大変です。

松村 それは大変ですし、自前の場合はおそらくいろいろいちゃもんもつくでしょうから、phase I までは。

その前に、こういった急性の状況の患者を対象とする phase I というのはどうするのですか。われわれの場合はがんの薬です。dose up study があります。こういったことに関する容量を決める phase I というのはあるのでしょうか？

南野 あると思います。たとえば、心筋梗塞に使用される血栓溶解薬などは治療効果を検討する前に、出血などの合併症に対する評価が行われると思います……。

松村 初期投与量を決めるのは、なにかルールがあるのですか。アデノシンは一般に使っています。リポソームもドキシルとかでも抗がん剤一般に使っていて、人工赤血球でもなんグラムというように使っています。そういう状況のなかで、phase I からそんな効かないような薬を入

れてもしょうがないかなと。ある程度、どのぐらいの量から入れたらいいかというのが難しそうですね。

南野 難しいと思います。最初は健康なかたが対象になると思います。

松村 そうですか。これは健康な人でやってるわけですね。抗がん剤は難しいですね。初期臨床開発の phase I は少なくとも健常人でやる。そして安全域を確かめたあと、recommend を決めて、いざ phase II で患者さんに投与していくと、そういう感じですね。

南野 臨床研究のデザインを専門とする先生がたにコンサルトする必要がありますか？

坂本 私のほうは、走らせているハイドロジェルと IGF-1 は、phase I and II a ということになっていきます。もちろん鼓膜切開は侵襲がありますので、なんらかの患者さんの benefit がないことには投与は倫理的に認められないので、いきなり患者さんに投与して、投与量はステップアップせずに決め打ちです。実際のところは1回投与で、鼓室はけっこう狭いので入るだけ、入れられるだけということで、1容量で決め打ちになっています。

松村 その決め打ちもいいのですが、最初の人はどうやって決めているのですか？

坂本 本当にテクニカルに入るだけってことなんです。

松村 なるほど、容量があるから。

坂本 はい。IGF-1 を選んだ理由というのも、オーファンドラッグで IGF-1 を売っていたから IGF-1 なんです。あとは基礎データとしてネズミで難聴に効くというのももちろんあったのですが、製剤としてある、いわれた希釈でこうやったらこのバイアルでできますというので、

実際に入れられる量でというのを決めたという経緯があります。症例数は phase I, IIa で 25 例、いままで 13 例(?) です。近日中に終わりたいと思います。

松村 がん以外のほうが最初のところは難しいところがありそうですね。

坂本 そうですね、倫理の壁があります。

松村 耳鼻科領域は、死とかではなく機能改善ですからね。

南野 阪大病院では、心移植を必要とするような重症心不全患者さんが多数おられます。将来的には、心不全患者を target にした DDS 治療の開発を考えています。心筋梗塞、心筋症、弁膜症などが基礎疾患となって心不全が生じます。心不全は生活の質を下げるのみならず、予後も非常にわるい疾患です。心不全時に特異的な発現増加する分子を検索中です。ただ、急性心筋梗塞の場合、血管透過性が亢進しているのですが、心不全の場合、透過性に変化がないため、直接投与とかカテーテルを使って心臓の筋肉に打ち込むという、そのようなデリバリーに関する工夫が必要になってきます。

もう一つは、イメージングです。不整脈の一つである心房細動の患者さんでは、心臓の中に血の塊ができやすいことが知られています。血栓の可視化に DDS を用いることができますと、抗凝固療法や治療方針の決定に役立つことが期待できます。

松村 イメージングというのは、血栓がある場所をイメージすることって、臨床的にも意義があることですか？

加藤 それはすごく大事です。症状が出る前に把握できればね。

南野 心房細動患者さんでは、経食道エコーや心臓 CT にて心房内血栓が明らかになることがあります。

坂本 CT で血栓そのものの動態が描出されてるのですね。

南野 大きな血栓ですと明らかになることがあります。

坂本 かなり速い、すごい高速な CT じゃないとだめですよ。

南野 そうなんです、おっしゃるとおりです。64 例 CT を導入して評価しています。

坂本 ダイナミック CT とか。

南野 心臓内血栓の有無が心房細動治療法の選択に大きく影響を及ぼします。循環器内科医は心房内血栓の有無を簡単に判別する方法を切望しています。

松村 その場合、トレーサーとして抗体とか使う場合に、放射性核種、どのようなものが使えますか。超音波の場合は、たんにいわゆる凝固のものをそのまま写すわけですが……。

加藤 超音波を使うとすれば、いまのところマイクロバブル造影剤の利用ですね。

南野 超音波、核医学、CT、MRI などが候補になると思います。

松村 PET CT とかいうのもありますが。

南野 そうですね。

坂本 解像度がわるいです。

南野 はい。ただ理想を言いますと、ベッドサイドでできるような方法が望ましいですね。

#### おわりに

松村 本日は目からうろこみたいな話をたくさん聞かせていただき、DDS 学会の会員の人にもすぐくためになる座談会ができたと思います。

最後に加藤先生からまとめの話をお願いします。

加藤 これまで DDS という、がんが中心だった傾向があります。

確かにがんは、いまま難治疾患の最右翼で、だからこそ DDS が真剣に取り組まなければならない研究テーマです。しかし、過去 30 年間の歩みを見ると、いつも尻をたたかれています。思ったほどの成果が得られず、隘路にさ迷っているような感じがしないでもありません。そのようなとき、今日は循環器科と耳鼻科の先生がたから、DDS と組織再生の技術が効果的に応用できる、あるいはその可能性が高いということを伺い、非常に新鮮な感慨を覚えました。

先生がたが異口同音におっしゃるように、DDS の発展に対しては regulation という障害が立ちふさがっているようです。基礎研究の成果は最終的に臨床に活用されなければなりません、それをどこで踏み切るかが問題になります。安易な臨床応用は禁物で、そのための regulation は不可欠ですが、日本では regulation の運用があまりにも硬直化してるとはいえないでしょうか。“清水の境内”から真っ先に飛び降りるのはいつもアメリカとヨーロッパで、日本は常に 2 番手以降に甘んじてきています。そのため日本で生まれた創意工夫が埋もれてしまう例が多々あります。いつまでたっても外側を回るだけで中に入り込めないというジレンマが、先生がたのお話からも伝わってきました。日本が問いかけてられている大きな課題だと思います。

この閉塞状況から抜け出すには、まず行政や研究機関の管理担当者の柔軟な対応がどうしても必要です。前例があるのか、100% 安全か、全責任をとるのか、あるいは新規性に乏しいのではないかと、等々と事細かな不毛の審査が延々とつづくようでは、せつかくの研究意欲も萎えてしまいますね。

DDSというのは、臨床現場で患者に早く役に立つ医療技術だといえます。それは、“薬はさじ加減”という言葉に遡ります。薬は一人ひとりの患者さんに応じて量や時間や剤型を日々変えてやると、本来の薬効があらわれるということです。この考え方を近代科学技術で体現しようとするのがDDSだといえなくもありません。したがって、医療現場で患者とともに格闘している医師の声の研究開発に的確に反映するようなシステムがないと、DDSの成果は上がらないと思います。その意味でも、若い臨床系の先生がたに大いに頑張ってくださいたいと期待しています。

それからもう一つ、研究のpriorityは大切ですが、なんでもかんでもパテントとか企業製品化という尺度で研究成果を評価しがちな昨今の風潮も問題ではないかと思えます。もう少し精神的にゆとりを持って、研究者が純粋に科学に没頭できる社会環境がほしいものです。これにregulationの柔軟な運用が加われば、何百億円という巨額の開発費を使わなくとも、有用な医療技術が臨床現場に提供されるのではないのでしょうか。

医療現場の要望を患者にフィードバックさせることに、私たち臨床医はいままで少しおとなしすぎたように思います。ここにお集まりくださった先生がたには、是非DDSの必要性を声を大きくして訴えていただきたくお願いします。

松村 本日は、貴重なお話をしていただきましてありがとうございます。これを機会にこういった先生がたの研究がきちんとできるように、きちんとしたコミュニティーをつくって予算立てなどもスクラム組んでやっていくみたいなことを、考えないといけなと思います。

もう一つは、一応司会者として最後にまとめさせていただきますと、ほとんど加藤先生におっしゃっていただき、追加ですが、昔、私が築地で臨床をやっていたときは、ちょうど分子標的薬が夢の薬として出始めのころで、飲んだ席ですが、ある分子標的をやっていた人が「あんたはDDSの宗教家だ」と、私は神様扱いだったのです。「いまからがんをどうして治していくんだ」と、いまからは分子標的薬だと大きな声で言ったのです。ところがどっこい、最初に濱口先生からありましたように、けっして夢の薬ではなかった。

濱口先生がおっしゃったように、ある特殊な白血病とかGISTとかには非常にいい。しかし、どうも普通のがんは、私は常日ごろ言ってるのですが、がんは遺伝子病だけど遺伝子がぐちゃぐちゃになった病気であって、一つの分子標的で治すというのは土台無理があると。最近、DDS製剤も欧米のドキシルとかアブラキサンとか、PEG製剤、インターフェロンとか出てき始めて、どうもDDSも臨床で認可されたからまんざらでもないなど、その人が言い始めたのです。すなわち、私は神様から一般人に降格し始めました。

締めとして言いたいことは、臨床で役に立つこと、これが一番重要かと思えます。DDS製剤もそういうことをきちんと臨床で承認される方向に向いていかないと、元気が出ないし、一般化しないことも歴然としています。今日はがんの話が少し多くなりましたが、耳鼻科領域でも循環器でも非常にプロミッシングでありますので、是非DDS製剤が臨床でいつの日か近い将来使われることになるように、一緒にスクラム組んでいけたらと願います。

ありがとうございました。



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)**BRAIN  
RESEARCH****Research Report****Accumulation of macromolecules in brain parenchyma in acute phase of cerebral infarction/reperfusion**

Takayuki Ishii, Tomohiro Asai, Takeo Urakami, Naoto Oku\*

Department of Medical Biochemistry and Global COE, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 13 January 2010

## Keywords:

Stroke

Reperfusion injury

BBB

t-MCAO

Macromolecule

## ABSTRACT

Ischemia–reperfusion injury is induced by recovery of blood flow after ischemia. This phenomenon is a main cause of ischemic brain injury. The integrity of the blood–brain barrier (BBB) fails after cerebral ischemia and reperfusion. Further elucidation of this phenomenon promotes to develop treatment strategies for ischemia–reperfusion injury. In the present study, we attempted to examine the time-dependent change of ischemia–reperfusion injury in relation to BBB disorders at acute phase in a transient middle cerebral artery occlusion (t-MCAO) model rat as a cerebral infarction and reperfusion model. Brain cell damage after the reperfusion was assessed by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. To clarify a time-dependent change of the integrity of BBB, fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (150 kDa) was injected intravenously into t-MCAO rats, and time-dependent localization of FITC-dextran was monitored in ex vivo. As a result, obvious brain damage was firstly observed at 3 h after reperfusion following 1 h of MCAO. In contrast, the leakage of FITC-dextran from cerebral vessels was observed immediately after the reperfusion. The present data suggest that the integrity of BBB failed prior to the occurrence of serious brain damage induced by ischemia–reperfusion, and that macromolecules such as water-soluble polymers and proteins which cannot pass through the BBB under normal condition would reach brain parenchyma at early stage after reperfusion. These findings would be useful to establish a novel treatment strategy for reperfusion injury after cerebral infarction.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

**1. Introduction**

The BBB strictly limits material exchange in the brain, which makes drug delivery to the brain tissue difficult. However, it is known that the integrity of the BBB fails after cerebral ischemia and reperfusion, resulting in increase in cerebrovascular permeability (Yang and Betz, 1994). Several factors including reactive oxygen species, matrix metalloprotease (MMP)-2, and -9, vascular endothelial growth factor (VEGF) are

considered to be related with increase in permeability by change of cerebral vascular tonus and disruption of basement membrane after reperfusion following cerebral stroke (Rosenberg et al., 1998; Zhang et al., 2002).

In the treatment of cerebral stroke, ischemic penumbra is one of the most important concepts (Lo, 2008). It is defined as ischemic but still viable cerebral tissue. This area recovers if cerebral blood flow is rapidly improved. The aim of treatment for acute phase of cerebral stroke is to recover cerebral blood

\* Corresponding author. Fax: +81 54 264 5705.

E-mail address: [oku@u-shizuoka-ken.ac.jp](mailto:oku@u-shizuoka-ken.ac.jp) (N. Oku).

flow and to revive the function of neuronal cells in the penumbra. However, many deleterious mediators are up-regulated and injure brain tissue by reperfusion after ischemia. For example, reactive oxygen species such as hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and superoxide are produced by reperfusion following brain ischemia (Kontos, 2001). They cause cerebral vasodilatation, resulting in brain tissue injury. In fact,  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxasolepropionic acid (AMPA) is known to mediate superoxide generation, and the inhibition of AMPA receptor improves ischemic outcome (Erdo et al., 2005). Many other pathways are also involved in secondary brain lesion after cerebral infarction (Cunningham et al., 2005; Huang et al., 2006). This cerebral ischemia-reperfusion injury substantially influences prognosis and mortality of patients treated with thrombolytic agents for cerebral infarct therapy. Therefore, improvement of ischemia-reperfusion injury is essential for the treatment of cerebral ischemia and required to protect a cerebral neuronal cell. Although mechanisms of reperfusion injury after cerebral infarction have been widely studied in the world, clinically available drug at present is only Radicut® (edaravone), a free radical scavenger, for cerebral neuroprotection during cerebral ischemia/reperfusion (Yoshida et al., 2006).

In the case of acute disease such as cerebral infarction, therapeutic time window (TTW) is an important concept. It is defined as the promising time to achieve therapeutic efficacy. For example, tissue plasminogen activator (t-PA), a thrombolytic agent, for treatment of cerebral stroke is decided to inject within 3 h because it has prospects of worsening symptoms more than 3 h after ischemia (Marler and Goldstein, 2003).

t-MCAO model rats by a filament method are used to the study of ischemia-reperfusion injury after focal ischemia (Nagasawa and Kogure, 1989). This method can make a stable cerebral occlusion model using a nylon uniformly coated with silicon. In addition, reperfusion is induced easily by pulling the thread out of the artery. Since this model needs no materials such as t-PA to induce reperfusion, the influences of reperfusion can be observed directly without considering superfluous factors.

Macromolecules with biocompatibility and size above 40 kDa possess long-circulating characteristic in bloodstream, and tend to localize at the site where the vascular permeability is increased (Seymour et al., 1995). In fact, vascular permeability is known to increase at inflammatory site, and a dendritic polymer complexed with ibuprofen is reported to localized and retained at the inflammatory site resulting in a high anti-inflammatory effect (Kannan et al., 2004; Svenson, 2009). Moreover, in myocardial ischemia/reperfusion that shows similar pathological event to cerebral ischemia/reperfusion, macromolecular agents accumulated in the infarction zone at early stage by vascular permeability increase (Lukyanov et al., 2004). However it isn't known that time-dependent change in the extent of diffusion of macromolecules into brain tissue by disruption of the BBB after cerebral ischemia/reperfusion in acute phase.

In the present study, we attempted to clarify the time-dependent relationship between ischemia-reperfusion damage and localization of macromolecules by increasing BBB permeability in t-MCAO model rats for the purpose of the determination of effective term for the treatment of reperfusion injury using macromolecular drugs or drugs in macromolecules.

## 2. Results

### 2.1. Brain damage assessment

The time-dependent change of ischemia/reperfusion damage was assessed by TTC staining. A ratio between right and left hemisphere section areas represents brain edema. When this ratio significantly exceeds 1, edema is induced on the side of the occlusion. Fig. 1 shows representative photographs of the brain damage in the t-MCAO rats. Total brain slice areas and damaged ones are calculated by Image J, and their mean values are shown in Table 1. The damage of the brain tissue was firstly observed in the section of the MCA at 3 h after the reperfusion. At 6 h after the reperfusion, the damage was observed more broadly than at 3 h, and the cell death progressed to cerebral cortex. Moreover, the most widespread damage was observed at 24 h after the reperfusion. Similarly, the brain edema was firstly observed at 3 h after the reperfusion. However, significant cerebral damage was not observed until 3 h after the reperfusion.

### 2.2. Leakage of FITC-dextran

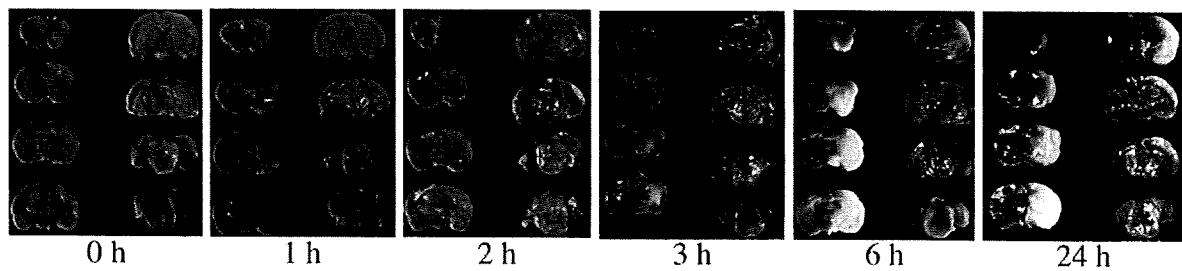
Time course of the change in cerebral blood vessel permeability after reperfusion in the t-MCAO rat were monitored by the leakage of FITC-dextran with *in vivo* imaging system. Fig. 2 shows the leakage of FITC-dextran into brain parenchyma at 1 h after the administration. Table 2 shows average of total photon counts obtained from five rats at each time. Interestingly, the leakage of the FITC-dextran from cerebral vessels was observed immediately after the reperfusion in the t-MCAO rat model. This leakage was observed up to 6 h but not at 24 h after the reperfusion. The FITC-dextran localization in brain tissue became broadly as time advances within 3 h. However, the fluorescence intensity was diminished at 6 h compared with that at 3 h.

In the present study, we did not use the same slices in both TTC staining and FITC imaging due to the technical limitation. However the slices were obtained essentially by the same procedure except the injection of FITC-dextran in the latter experiment. Therefore, both TTC staining and FITC imaging would be comparable.

## 3. Discussion

In the present study, the reperfusion was performed by withdrawing the filament at 1 h after the occlusion using t-MCAO model rats. Although nerve cells suspend electrical activity under ischemic condition, their life is maintained for a few hours because of conservation of ion gradient and cellular membrane pump function (Back, 1998). Therefore, the damage observed in the present study could be mainly derived from reperfusion. Taken together, most of the penumbra area might be protected from death by restoration of blood flow if a treatment for neuroprotection is performed within therapeutic time window.

Cells death of the core infarct area arises predominantly from necrosis, whereas cell death of penumbra area is caused



**Fig. 1** – Photographs of brain sections prepared from the t-MCAO model rats. The damaged regions were visualized by TTC staining after a 1 h-infarct following 0, 1, 2, 3, 6 or 24 h reperfusion. White areas show the damaged regions and red areas show surviving regions.

mainly by apoptosis following cerebral ischemia (Dirnagl et al., 1999; Lopez-Sanchez et al., 2007; Xu et al., 2006). Therefore, an antiapoptotic agent would protect neuronal cells and attenuate reperfusion injury. In fact, pretreated inhibition of caspase-3 results in decrease of cerebral damage in the penumbra area following 2 h infarct (Zhu et al., 2004). Apoptosis is a key factor improving reperfusion injury, and the detail researches contribute to a new treatment strategy for ischemia-reperfusion injury.

The BBB dysfunction results in cerebral edema, hemorrhage formation and neuronal cell death after cerebral infarction. On the other hand, it permits some drugs that cannot penetrate the BBB in normal condition to reach brain parenchyma. Therefore, it would be one of the promising strategies for improving ischemia-reperfusion injury to delivery agents to brain tissue from cerebral blood flow by increasing BBB permeability. Opening of the BBB has been studied by using many tracers in ischemia/reperfusion. After 2 h occlusion and 3 h reperfusion caused great increase in BBB permeability, which was monitored by the uptake of sucrose (Rosenberg et al., 1998). In the present study, we determined the leakage of macromolecule in more acute phase ischemia/reperfusion. The leakage of FITC-dextran into brain tissue was observed just after the reperfusion in the t-MCAO rat model. These data suggest that tight junction of the BBB fails by reperfusion or 1 h infarct and thus macromolecules such as dextran leak out from bloodstream into the brain tissue. Our findings are consistent with previous reports: For example, a

function of myogenic tone, which favors partial vasoconstriction and plays an important role in regulation of cerebrovascular blood flow in response to changes in perfusion pressure, was diminished at early stage after ischemia (Cipolla et al., 1997; Cipolla and Curry, 2002). MMP-2 derived from astrocyte increases at 3 h after reperfusion in the same model rat as the present study (Yang et al., 2007). Therefore, this data suggest that upregulation of MMP-2 is greatly associated with the present result that leakage of FITC-dextran was most broadly at 3 h after reperfusion. Hydroxyl radicals that are one of the most reactivity free radicals greatly increase at immediately after reperfusion in the same model rat as the present study (Kato et al., 2003). Free radicals are related with BBB disruption on how to directly attack cerebral endothelial cells and to mediate MMPs. This report is also associated with the result in the present study. Focusing on the result of 0, 1 and 3 h after reperfusion, fluorescence of FITC-dextran was observed at nearby MCA. In addition, the leakage of FITC-dextran was outspread as time advances. Therefore, BBB disruption progress gradually with time by partial infarct, in this study case is by MCA, after reperfusion.

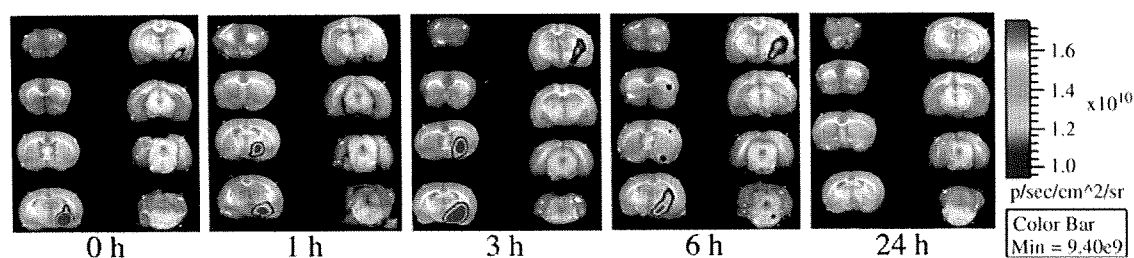
When neuroprotective agents are delivered to brain tissue for the treatment of ischemia-reperfusion injury by enhanced permeability of a failed BBB, a time widow from appearance of BBB disruption to disappearance of it is very important notion. The integrated data demonstrated that the increase of cerebral vascular permeability from BBB dysfunction was occurred at stages before generation of obvious cerebral cell damage in the t-MCAO model rats. This is important information for the treatment and prevention of reperfusion injury. In general, therapeutic agents for acute phase treatment are beneficial as early injection as possible. However, it is also quite important to know until when do these agents are effective after ischemia-reperfusion. For this reason, here we evaluated the permeability change in BBB and brain damage after ischemia-reperfusion to set TTW in acute phase disease. From the present results, we propose that TTW of reperfusion injury is from immediately after reperfusion up to 3 h. At 6 h after the reperfusion, the brain tissue was broadly impaired, and the leakage of FITC-dextran was diminished, hence suggesting that the possibility to save brain cells is lowered. Obvious cerebral cell death was rarely observed up to 3 h after the reperfusion, and the localization of FITC-dextran was observed earlier than outset of the obvious cerebral cell death. Therefore, some treatments before 3 h after reperfusion are

**Table 1** – Time-dependent change of brain injury.

Times after reperfusion	Total volume (cm <sup>3</sup> )	Damage volume (cm <sup>3</sup> )	Right brain/left brain
0 h	1.60±0.02	0	1.00±0.00
1 h	1.61±0.02	0	1.01±0.01
2 h	1.61±0.07	0	1.01±0.01
3 h	1.70±0.03	0.05±0.06	1.04±0.02*
6 h	1.72±0.06	0.27±0.07	1.06±0.01**
24 h	1.81±0.05	0.42±0.03	1.12±0.04**

Values are means±SD; n=5. Right brain/left brain shows the degree of edema. Statistical differences were calculated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison tests as compared with 0 h after reperfusion group. (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

Please cite this article as: Ishii, T., et al., Accumulation of macromolecules in brain parenchyma in acute phase of cerebral infarction/reperfusion, *Brain Res.* (2010), doi:10.1016/j.brainres.2010.01.039



**Fig. 2 – The leakage of FITC-dextran in the t-MCAO model rats. Time-dependent change in the integrity of BBB after the reperfusion was monitored by the leakage of FITC-dextran. The t-MCAO rats were injected with FITC-dextran solution (15 mg/ rat i.v.). FITC-dextran localized in the brain sections was visualized with IVIS. Bar shows the relative level of fluorescence intensity, ranging from low (blue), to medium (green), to high (yellow, red). This is the representative from five independent animal experiments, all of which demonstrated similar profile of responses. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)**

expected to be significantly effective for the improvement in reperfusion injury.

In conclusion, macromolecules leaked out from blood-stream into brain parenchyma before the obvious cerebral cell death appeared in t-MCAO model rats, and this localization was broadly more than the damage area at 3 h after the reperfusion. The present study suggests that an approach within 3 h after reperfusion is important and promising for the treatment or prevention of reperfusion injury to provide great therapeutic response.

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Animal

Male Wistar rats (8 weeks old) weighing 170–210 g were purchased from Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan). The animals were cared according to the Animal Facility Guidelines of the University of Shizuoka. All animal experiments were approved by the Animal and Ethics Review Committee of the University of Shizuoka.

### 4.2. Preparation of t-MCAO model rat

Transient middle cerebral artery occlusion (t-MCAO) was induced by inserting a filament into internal carotid artery

(Nagasawa and Kogure, 1989). Anesthesia was induced with 3% isoflurane and maintained with 1.5% one during cerebral stroke surgery. Rectal temperature was maintained at 37 °C with heating pad. After a median incision of the neck skin, the right carotid artery, external carotid artery, and internal carotid artery (ICA) were isolated with careful conservation of the vagal nerve. A 4-0 monofilament nylon suture coated with silicon was introduced into the right ICA and advanced into the origin of the MCA. A silk ligated the MCA at side of inserting point. After the operation, the neck was closed and anesthesia was discontinued. Success of the surgery was judged by the appearance of hemiparesis. Reperfusion was performed by withdrawing the filament about 10 mm at 1 h after the occlusion under isoflurane anesthesia in this all study.

### 4.3. Brain damage assessment in t-MCAO rat

The ischemia/reperfusion damage in the t-MCAO rat model was assessed by morphometric analysis of the brain sections stained with 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, Wako Pure Chemical Ind. Ltd., Tokyo, Japan). The brain was dissected at 0, 1, 2, 3, 6 or 24 h after reperfusion and sliced into 2 mm thick coronal sections using a rat brain slicer (Muromachi Kikai, Tokyo, Japan). These sections were stained with 2% TTC in PBS for 30 min at 37 °C. Then, they were fixed in 10% formalin neutral buffer solution. All sections were put in grass slides and photographed with a digital camera (OLYMPUS E-300). We measured the unstained area, the stained area and each hemisphere with an image analysis system (NIH Image J). The damage regions were considered as completely white area. Edema was calculated from a ratio between right and left hemisphere sections area.

### 4.4. Leakage of FITC-dextran into brain tissue

Time-dependent change of the integrity of BBB after reperfusion was determined using fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (150 kDa, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) as a macromolecule. FITC-dextran (0.5 mL) dissolved in saline (30 mg/mL) was injected via a tail vein of the t-MCAO rat model at 0, 1, 3, 6 or 24 h after reperfusion, respectively. One

**Table 2 – Total photon counts of brain sections.**

Injection time	Ischemic side ( $\times 10^7$ )	Nonischemic side ( $\times 10^7$ )
0 h	4.18 $\pm$ 0.32*	3.58 $\pm$ 0.16
1 h	5.71 $\pm$ 1.28*	3.64 $\pm$ 0.69
3 h	6.70 $\pm$ 2.47*	3.83 $\pm$ 0.57
6 h	4.21 $\pm$ 1.11	3.37 $\pm$ 0.59
24 h	4.09 $\pm$ 0.67	3.83 $\pm$ 0.38

Values are means $\pm$ SD; n=5. Accumulation of FITC-dextran in the brain was determined as described in the legend of Fig. 2. Total photon counts were obtained from the IVIS images. Total photon counts of ischemic side are significantly higher than those of nonischemic side at 0, 1 and 3 h. (\* $p$ <0.05).

Please cite this article as: Ishii, T., et al., Accumulation of macromolecules in brain parenchyma in acute phase of cerebral infarction/reperfusion, Brain Res. (2010), doi:10.1016/j.brainres.2010.01.039