

2012/2017A

厚生労働科学研究費補助金  
医療機器開発推進研究事業

特異性・汎用性に優れた動脈硬化不安定  
プラーク分子イメージング剤の開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 美香子

平成 25 (2013) 年 5 月

## 目 次

I. 総括研究報告		
特異性・汎用性に優れた動脈硬化不安定プラーク分子イメージング剤の開発		
小川美香子	-----	1
II. 分担研究報告		
1. リポソームへの金属キレートの導入検討	-----	17
梅田泉		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	22

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

特異性・汎用性に優れた動脈硬化不安定プラーク  
分子イメージング剤の開発

研究代表者 小川 美香子  
浜松医科大学メディカルフォトンクス研究センター 准教授

### 研究要旨

本研究では、脳梗塞・心筋梗塞を発症する前に、危険性の高い動脈硬化病変を発見する方法を開発する。

動脈硬化病変に生じるプラークには、安定なものとは不安定なものがある。不安定プラークは、破綻し血管を閉塞させ脳梗塞・心筋梗塞などを引き起こすため、早期に検出し治療を行うことが重要である。そこで本研究では、簡便で特異的なスクリーニングから詳細な病態評価までを可能とする、包括的な不安定プラーク検出法の確立を目指す。このために、分子イメージング剤として、不安定プラークを標的する部位・放射性標識部位・環境反応性光標識部位・MRIのための金属標識部位を導入した、ナノ粒子（機能性リポソーム）を開発する。すなわち、簡便で特異的で低侵襲の光イメージングにてリスク患者を拾い上げ、核医学イメージングにより定量評価・深部探索をし、さらに、発見された病変部を高分解能のMRIにて詳細に評価することにより、効率的、効果的な不安定プラークの検出を行う。平成23年度までに、動脈硬化病変を標的化した放射性標識リポソームを作成することに成功し、不安定プラークへの標的性について定量評価を行った。さらに、不安定プラークでのみ光信号がONとなる環境反応性光標識法について検討を行った。放射性標識を施したりポソームを用い、不安定プラークへの標的性についてインビボにて定量的に評価をするとともに、環境反応性光標識を試みた。

本年度は、以上の結果をもとに、ナノ粒子の体内動態を改善するとともに、MRイメージングのためにGd標識を施し、マルチモダルイメージングによる、臨床応用を目指した包括的診断の可能性について検討を行った。

## 研究分担者

梅田 泉

国立がん研究センター東病院 機能  
診断開発部 室長

### A. 研究目的

心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患による死亡率は27%に上り、悪性新生物（30%）とともにその対策が急務となっている（平成20年厚生労働省統計）。

動脈硬化プラークには、安定なもの動脈硬化病変に生じるプラークは、破綻しにくい安定なもの、破綻しやすい不安定なものに分類される。不安定プラークは、種々のケミカルメディエータ等の刺激に引き続き、破綻、血栓形成、血管内腔の狭窄・閉塞という一連の病態を引き起こし、脳梗塞や心筋梗塞など動脈硬化性疾患発症の原因となる。一方、動脈硬化病変が進行しても安定プラークであればこのような病態を生じない[1]。したがって、動脈硬化性疾患の予防のためには、不安定プラークを早期に検出し適切な治療を行うことが重要となる。

不安定プラークの特徴として、①脂質に富む粥腫の存在②繊維性被膜の脆弱化③マクロファージなどの炎症性細胞の浸潤が挙げられる(図1)。安定プラークでは、繊維性組織による内膜の肥厚が認められるのみである [2]。

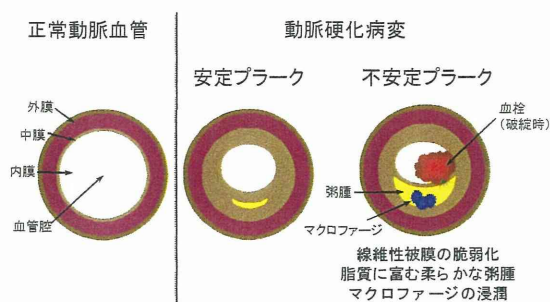


図1 不安定プラークの特徴

現在、一般的に行われているX線CTによる冠動脈造影では、血管の狭窄度を測定することが可能である。しかし、動脈硬化性病変部には血管自体の代償性拡大が起こることが知られている。これは1987年にGlagovらが病理学的に検討し提唱した説であり、動脈硬化の初期には血管内腔が保たれて冠血管自体が外側に向かって代償性に拡大するが、動脈硬化が全血管面積の約40%を超えると内腔の狭小化が始まるという現象である[3]。このため、軽度の動脈硬化は冠動脈造影で評価できない。急性心筋梗塞に至った病変の約70%は狭窄率50%以下の病変であり、梗塞責任病巣の80~90%は狭窄率70%以下であるとの報告もある[4]。したがって、動脈の狭窄度よりもむしろ病変部に存在するプラークの質を診断し不安定か安定かを見極めることが、早期診断、早期治療のために重要と考えられる。最近、超音波診断法やCT、MRIといった形態学的診断法による不安定プラークの検出が試みられているが、その性状に関する鑑別は熟練を有し、また、定量的に不安定性

を評価するには至っていない。

また、これらは動脈硬化病変の石灰化や不安定プラークに蓄積した脂質を画像化しようとするものであるが、不安定プラークの破綻にはこれらの形態的な特徴よりもむしろ、マクロファージによる炎症反応が直接的な原因となっており、マクロファージの浸潤および炎症反応を抑えることが不安定プラークの治療に重要であるといわれている[5, 6]。したがって、不安定プラークの機能的特徴を画像化する方法の開発が望まれている。

近年、生体内分子の動きをin vivoで非侵襲的に画像化する分子イメージング技術が大きな発展を遂げている。分子イメージングによれば、プラークの不安定性に関与する、炎症反応に関わる生体内分子などを直接画像化することができるため、上記の形態学的診断法とは異なり、不安定性にかかわる分子の変化を指標にした、機能診断を可能とし、当該研究領域に重要な知見を与えるものと考えられる。

我々はこれまでに、マクロファージの活発な糖代謝に着目し、PET用糖代謝イメージング剤 $^{18}\text{F}$ FDGを用いて動脈硬化モデル動物にて不安定プラークを描出することに成功した[7]。この成果を基に国内外で $^{18}\text{F}$ FDG-PETの臨床検討が精力的に開始された。一方、

1.  $^{18}\text{F}$ FDGの集積は血糖値に影響されるため、動脈硬化発症要因で

ある糖尿病での評価が困難。

2.  $^{18}\text{F}$ FDGは、糖代謝が活発な組織であれば集積するため、不安定プラークへの特異性に劣る。

3. PETイメージングは設備が高価である・薬の用事調製が必要であるなど、リスク患者の拾い上げのための一次スクリーニングには適しておらず、また、解像度にも限界がある。といった問題点もある。

そこで本研究では、特異性の高い分子イメージング剤の開発、および、簡便なスクリーニングから詳細な病態評価までを可能とする、包括的な不安定プラーク検出法の確立を目指す。

分子イメージング剤として、不安定プラーク標的部位・放射性標識部位（核医学）・環境反応性光標識部位（光）・金属標識部位（MRI）を導入したナノ粒子（機能性リポソーム）を開発する。つまり、簡便・特異的で低侵襲の光イメージングにてリスク患者を拾い上げ、核医学イメージングにより定量評価・深部探索をし、さらに、発見された病変部を高分解能のMRIにて詳細に検討することにより、効率的、効果的な不安定プラークの検出を行う。

特異性・汎用性に優れた新規分子イメージング法の開発、また、これを基礎とする医薬品開発を通じて、動脈硬化性疾患による死亡率を大幅に低減することで、ライフ・イノベーションの推進に大きく寄与すると考えられる。

平成23年度までに、動脈硬化病変を標的化した放射性標識リポソームを作成することに成功し、不安定プラークへの標的性について定量評価を行った。すなわち、不安定プラークに多く浸潤しているマクロファージを標的とし、フォスファチジルセリン(PS)修飾リポソームを放射性標識した分子イメージング剤を開発した。また、本薬剤は、培養マクロファージを用いたインビトロでの検討により、マクロファージへの特異的な取り込まれることを見いだした。次に、apoE KOマウス、WHHLウサギに投与し、動物用SPECTを用いた定量的画像化による評価を行った結果、インビボにおいてもプラークへ取り込まれ、SPECTにて描出することに成功した。しかしながら、PS修飾することにより、血中からのクリアランスがコントロールのフォスファチジルコリンのみからなるリポソーム(PCリポソーム)に比較し早くなり、これにより、インビボでは、病変への集積量が低下した可能性が示唆された。そこで本年度は、本分子イメージング剤の血中動態の改善を目指し、さらなる検討をおこなった。

また、平成23年度に不安定プラークでのみ光信号がONとなる環境反応性光標識法について検討を行った。すなわち、臨床利用可能な近赤外蛍光分子であるICGをリポソームに内包した蛍光分子イメージング剤を作成し、apoEノックアウトマウスの動脈硬化病変に集積することを示した。

そこで、本年度は、以上の結果をもとに、リポソームの体内動態を改善するとともに、マルチモダルイメージングを目指し、MRイメージングのためにGd標識を施しMRIによる病変の描出の可能性について検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 血中動態の改善を目指したPEG化リポソームの作成

polyethylene glycol (PEG)によるナノ粒子の表面修飾は、生体に投与後の肝臓や脾臓への集積を減らし、血中滞留性を向上させることが知られている。しかしながら一方で、マクロファージにも認識されにくくなり、貪食されにくくなる。すなわち、PSによりマクロファージへの認識能を高めた本プローブにおいても、マクロファージへの集積は低下する可能性がある。

そこで、PEGの長さや修飾の程度を変えることにより、動脈硬化病変に浸潤しているマクロファージへのインビボでの集積性について検討を行うこととした。

鎖長の異なる二種類のPEG (PEG 2000およびPEG5000)を用いた。リポソーム膜リン脂質の組成はDPPS/DSPC/Chol/PEG = 1/1/1/5 (mol%) またはDPPS/DSPC/Chol/PEG = 1/1/1/2 (mol%)とした。

リポソーム膜の作成および<sup>111</sup>In標識に関しては、昨年度、共同研究

者の梅田らにより開発された方法を用いた。すなわち、まず、脂質を混合し、クロロホルムに溶解させたのち、これを丸底フラスコにいれ減圧乾固し、フラスコに薄膜を作成した。この薄膜を、10 mM NTAが入った30 mM HEPES / 5% mannitol bufferで膨潤させ、エクストルーダにて100 nmまたは200 nmの粒径とした。得られたリポソーム溶液はゲル濾過 (Sephadex G-50) し、内包されなかったNTAを除いた。これにより、 $[^{111}\text{In}]$ PS100-2%PEG2000、 $[^{111}\text{In}]$ PS100-5%PEG2000、 $[^{111}\text{In}]$ PS100-2%PEG5000、 $[^{111}\text{In}]$ PS100-5%PEG5000、 $[^{111}\text{In}]$ PS200-2%PEG2000、 $[^{111}\text{In}]$ PS200-5%PEG2000、 $[^{111}\text{In}]$ PS200-2%PEG5000、 $[^{111}\text{In}]$ PS200-5%PEG5000の8種を作成し検討した。

## 2. マクロファージへのインビトロ取り込み実験

昨年度と同様、作成したリポソームの不安定プラーク標的化に関する定量評価のため、マウス腹腔マクロファージを用いたインビトロ取り込み実験を行った。マウス(ddY, 8週齢, ♀)腹腔にチオグリコレート培地を2 mL投与した。3日後にice-cold PBS 8 mLにて腹腔マクロファージを回収し30 mmディッシュに播種し、DMEM培地中CO<sub>2</sub>インキュベータ内で24時間培養した。

採取したマウス腹腔マクロファ

ージの培地を交換し、浮遊細胞を除いた後、1時間のプレインキュベーションを行った。この後、作成したPEG化 $^{111}\text{In}$ 標識リポソームを用いて取り込み実験を行った。具体的には、 $^{111}\text{In}$ 標識リポソームを37 kBqずつそれぞれのディッシュに添加し、37°Cにて2時間、CO<sub>2</sub>インキュベータ中にて静置した。2時間後、培地を取り除き、細胞をPBSにて洗浄し、これらを合わせて上清とした。細胞は、0.35 mLのPBSを加えたのち、ディッシュの底から掻き取り回収した。これを2回繰り返すことにより細胞液を得た。ガンマカウンタにて上清と細胞液の放射能を測定し、細胞への各リポソームの取り込み量を求めた。なお、カウント測定後、細胞液のタンパク濃度を測定し、結果はタンパク量あたりの取り込み量で表示した。



## 3. インビボ体内動態実験

ddYマウス (6週齢, ♂, 20g) に $^{111}\text{In}$ 標識リポソーム (37 kBq) を尾静脈から投与した。投与1,5,20, 60, 120, 240分後に屠殺し、各臓器を摘出して重量を計測し、さらにガンマカウンタにて放射能を測定した。

## 4. 動脈硬化モデル動物apoEノックアウトマウスでのex vivoイメージング

高脂肪食を与えたapoEノックア

ウツマウスに5.6 MBqの<sup>111</sup>In標識リポソームを尾静脈から投与後2時間で屠殺し、大動脈を摘出した。摘出した大動脈は縦方向に切開した後、Oil-Red-O染色を施した。この後、イメージングプレートに19時間暴露し、イメージャーにてex vivo ARG画像を得た。

また、得られた画像の動脈硬化病変部位(target)、および、非病変部位(non-target)、血管のないバックグラウンド部位(background)にそれぞれ関心領域を置き、次式にしたがってtarget-to-nontarget ratio (TNR)を算出した。

$$\text{TNR} = \frac{([\text{Target signal}] - [\text{Background signal}])}{([\text{Non-target signal}] - [\text{Background signal}])}$$

## 5. Gd-DTPA封入りリポソームのMR造影能評価

次に、分解能に優れるMRIによる不安定プラークの描出のため、MRI造影能 (T1) を持つGd標識リポソームに関し検討した。

共同研究者の梅田らが作成したGd-DTPA封入りリポソーム (Gd-リポソーム) の造影能に関する評価を行った。

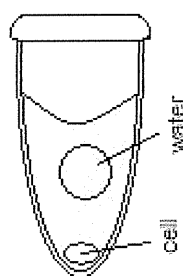
各種濃度のGd-リポソーム、または、Gd-リポソームにリポソーム膜を破壊するためメタノールを加えた溶液のファントムを作成した。これをMRI装置 (GE Healthcare, 3T) にてリストコイルを用いて撮像した (3D/FSPGR, TR: 8, TE: 4, Tl: 400,

1.0 mm / 0.5 sp) 。

## 6. マクロファージへのインビトロ取り込み実験

<sup>111</sup>In標識リポソームと同様、作成したGd-リポソームがマクロファージに取り込まれるか検討するため、マウス腹腔マクロファージを用いたインビトロ取り込み実験を行った。

2と同様の方法により、マウス腹腔よりマクロファージを採取した後、1日間培養した。これに、Gd-PS100, Gd-PS200またはコントロールとしてGd-DTPAを添加し、37°Cにて24時間、CO<sub>2</sub>インキュベータ中にて静置した。各wellをPBSにて洗浄した後トリプシン処理により細胞を0.5mLのエッペンチューブに回収し、遠心、さらにPBSによる洗浄を行うことで細胞の沈殿を得た。実験はn=3にて行い、本チューブを5と同様の方法でMRI撮像し、下図に示す場所に関心領域(ROI)を置き、MRI強度を測定した。



さらに、マクロファージへの取り込み量を推定するため、0.1 mM～0.5 MのGd-DTPA溶液を作成し、同様にMRI撮像を行った。



## 7. Gd-DTPA封入りリポソームによるWHHLウサギでのインビボMRイメージング

マクロファージが多く浸潤する動脈硬化病変を形成している月齢のWHHLウサギ(15ヶ月齢、♀、4 kg)を用いて検討を行った。イソフルランの持続吸入により麻酔後、まず、造影前の画像を得るため膝用コイルにウサギを設置し、MRI撮像を行った(2D, FSE, TR: 247, TE:8.5)。なお、撮像は心電図同期下にて行い、また、Black-Blood法により血液からシグナルをキャンセルし、さらに、脂肪抑制をかけることで脂肪が低信号となるようにした。さらに、造影剤の血中動態を把握するため、MRアンギオグラフィの撮像も試みた。

造影前のT1強調画像を得たのち、ウサギの耳静脈からGd-5%PEG2000PS200リポソームを投与した。投与直後にアンギオグラムを得た後、投与30分、1時間、2時間、24時間後にBlack-blood法により上記と同様の方法にてcoronal画像の撮像を行った。

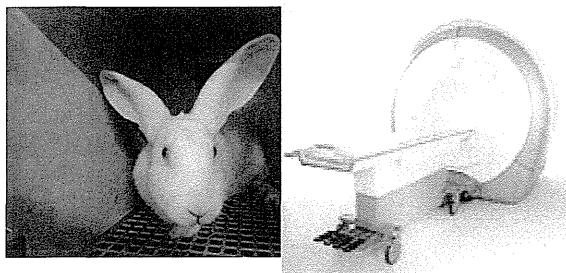


図2 本検討に用いた3T MRI装置とWHHLウサギ

なお、本検討はヒト用の機種である3TのMRI装置を用いて行った。MRI造影剤は、静磁場強度により造影能が異なるため、将来、ヒトへの応用を考える際には臨床機での検討が合目的的であると考ええる。

### (倫理面への配慮)

生命倫理等に関する留意事項として、人における研究内容は含まれていないので該当しない。動物を用いる実験に関しては浜松医科大学動物実験倫理委員会の審査を受け、承認を得て実施した。その他、放射線の取扱他、必要な関連法令を遵守して研究を推進した。

## C. 研究結果

### 1. 培養マウス腹腔マクロファージへの取り込み

培養マクロファージへの取り込みは、図3に示すとおり、PEG化をすることで減少した。ただし、PEG lengthが短く、また、少ない方が取り込まれやすいが、5%PEG5000以外においては、とりこみ量の低下はそれほど大きなものではなかった。

したがって、PEG化PSリポソームを用いた標的化の可能性が示唆された。

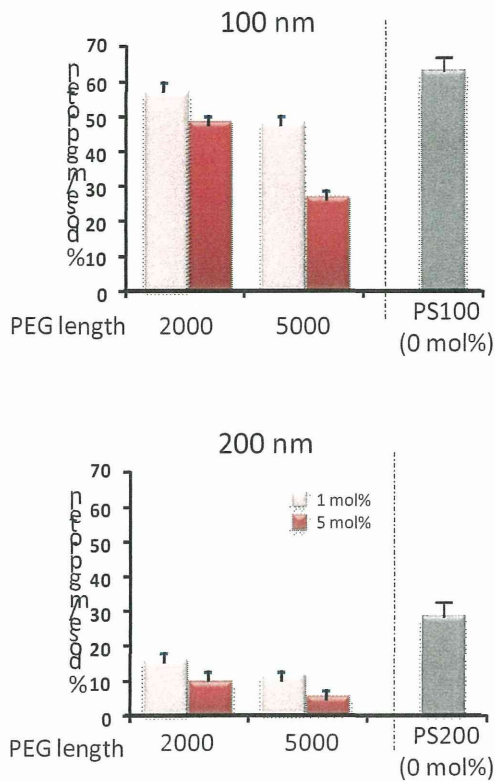
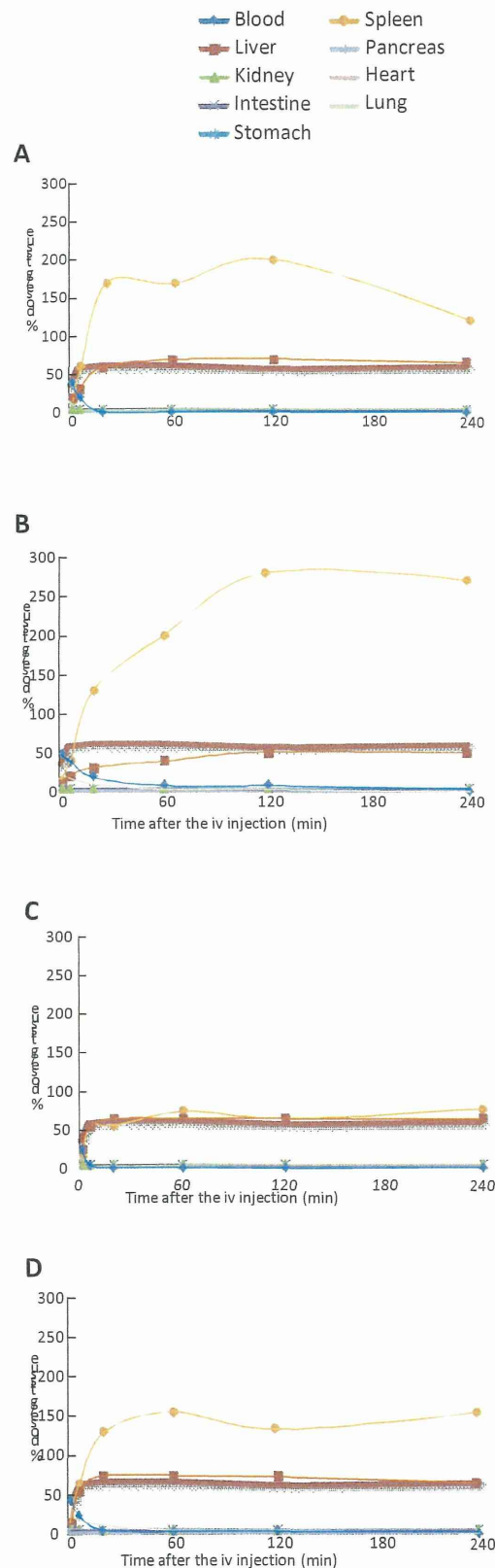


図3 PEG化<sup>111</sup>In-リポソームのマウス腹腔マクロファージへの取り込み

## 2. マウス体内動態

結果を図4,5に示す。100 nm, 200 nmとも、PEG化の程度と量に応じた血中滞留性の向上がみとめられた。一方、non-PEG化リポソームと比較し、肝臓への取り込みはほとんど変化しなかった。

肝臓のクッパー細胞はマクロファージと同様の性質を示すため、肝臓への取り込み低下はマクロファージへの集積低下にも関連するが、本結果は、インビゴでのマクロファージへの集積を期待させるものである。



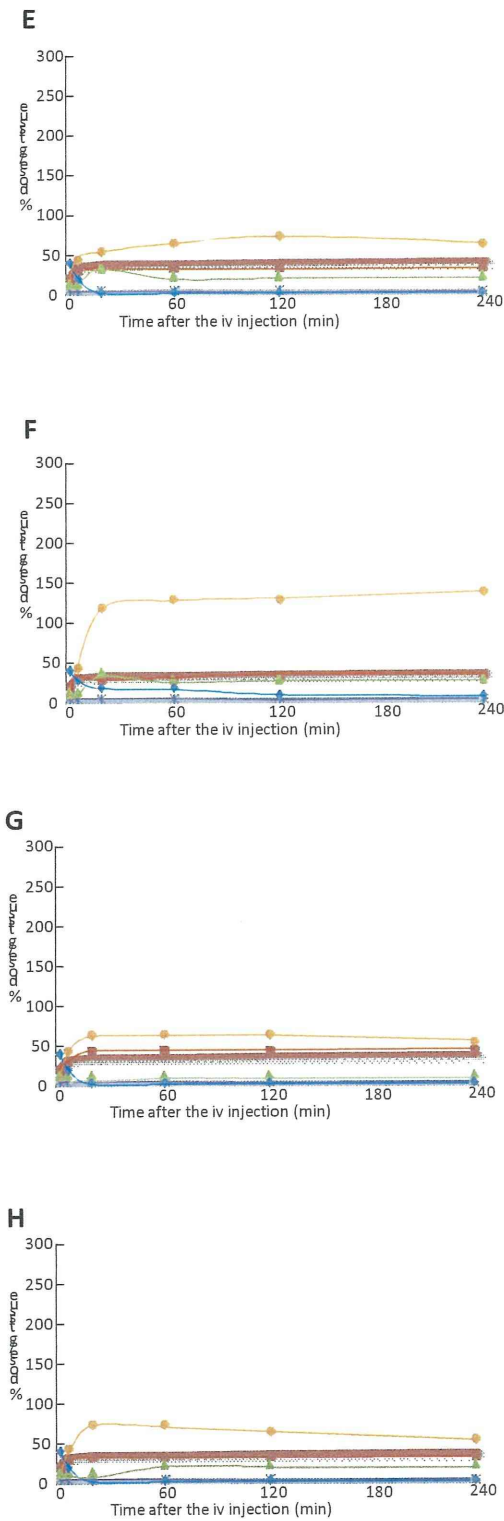


図4 PEG化  $^{111}\text{In}$ -リポソームのマウス体内動態

赤太線は、non-PEG 化リポソームの結果を示す。

- A: 5%PEG2000PS100,
- B: 5%PEG5000PS100,
- C: 1%PEG2000PS100,
- D: 1%PEG5000PS100,
- E: 5%PEG2000PS200,
- F: 5%PEG5000PS200,
- G: 1%PEG2000PS200,
- H: 1%PEG5000PS200

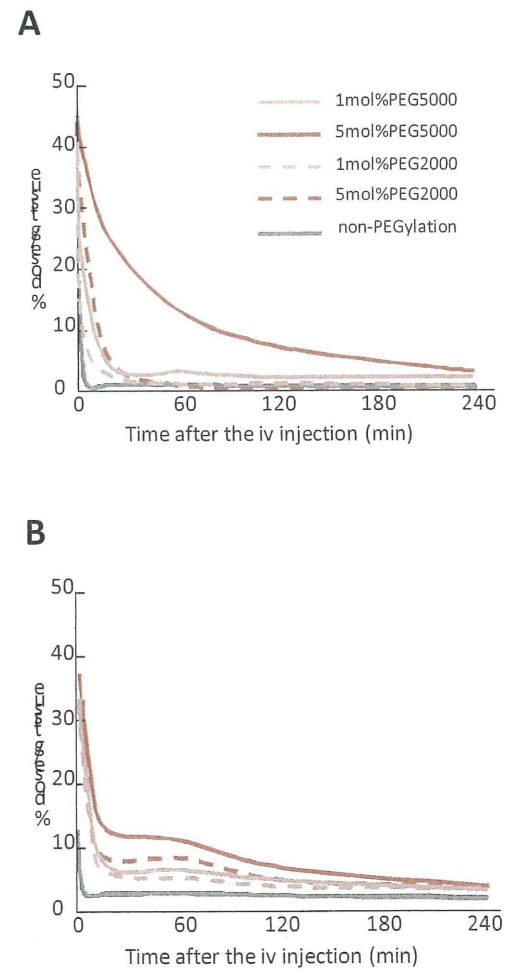


図5 PEG化  $^{111}\text{In}$ -リポソームのマウス血中動態

- A: PS100, B: PS200

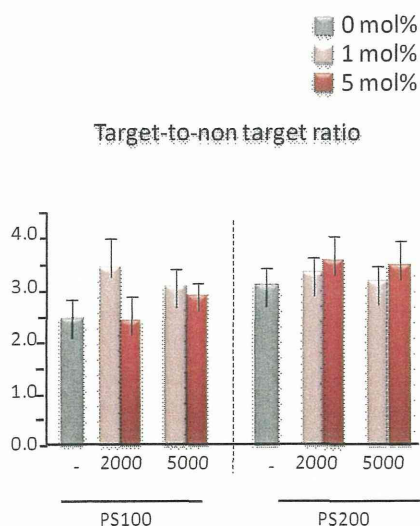
### 3. 動脈硬化モデル動物apoEノックアウトマウスでのex vivoイメージング

non-PEG化リポソームと同様に、Oil-Red O染色により得られた動脈硬化病巣とほぼ一致した画像を得ることができた。

また、TNRに関してはPEG化による大きな変化はなかった。インビボでの病変への取り込みは、 $[^{111}\text{In}]$ PS200-5%PEG2000で最も高いものとなった。



図 6 ApoE -/-マウスにおける $[^{111}\text{In}]$ 5%PEG2000PS200のen face ARG



Standardized uptake to the plaques

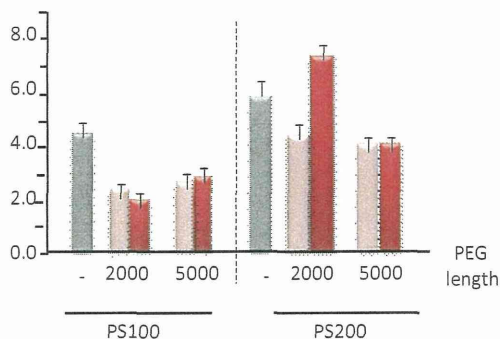


図 7 ApoE -/-マウスにおける ARG の解析結果

### 4. Gd-DTPA封入りリポソームのMR造影能評価

共同研究者らにより作成されたりリポソームの造影能を確認したところ、下図に示すとおり、リポソーム膜に包まれているときは自由水のGdへのアクセスが制限されているためシグナルを持たないが、膜が破壊されるとはじめて造影能をもつ、“アクチベータブルプローブ”であることがわかった。また、Gd濃度に依存したシグナルの増強をみとめた。

アクチベータブルプローブは、マクロファージに取り込まれた後のみシグナルを発するという性質であるため、不安定プラークへの特異性が高いイメージングを達成することができるかと予測される。

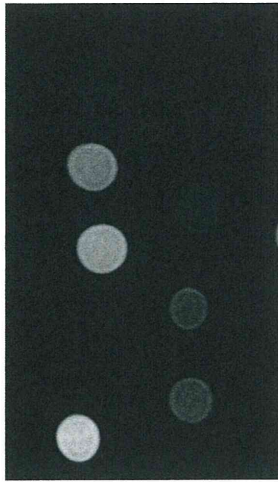


図8 Gd リポソームをいれたファントムのMRI画像。左列がリポソーム膜を破壊した後の画像。

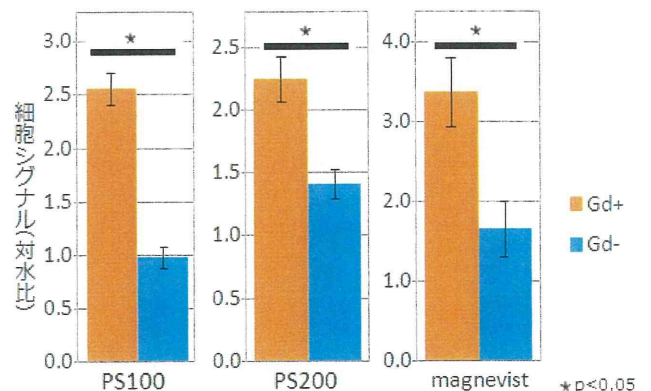
### 5. マクロファージへのインビトロ取り込み

Gd-リポソームのマウス腹腔マクロファージへのとりこみは、図9に示すとおりとなった。

リポソームを加えた群については、PS100(100nm径のリポソーム)を加えた細胞群でPS200を加えた群より有意に大きなシグナルが得られた( $p < 0.05$ )。このことから、PS100リポソームの方がPS200よりもマクロファージに取り込まれやすいと言える。MRIを用いた解析から求められたリポソーム溶液のマグネビスト濃度は、PS100が $5.07 \times 10^{-2}$ (mol/l)、PS200が $5.54 \times 10^{-2}$ (mol/l)だった。マグネビスト液の濃度は原液を4倍に希釈した $1.25 \times 10^{-1}$ (mol/l)であった。各細胞群の%Dose/mg proteinの値を計算すると、リポソーム溶液を加え

た群はPS100が43.9%、PS200が30.1%となり、マグネビスト液を加えた群の5.7%より有意に大きくなった。このことからマグネビスト液を加えた群で有意なシグナルが得られた要因は、マグネビストの取り込まれやすさではなく加えた液の濃度が高かった事であると考えられる。マグネビスト液の濃度がリポソーム液と同じ濃度と仮定すると、近似曲線からシグナル強度は1.39と予測された。これは対照群の $1.66 \pm 0.348$ より有意に大きな値にならず、マグネビスト液を細胞の標識に用いることはできないと言える。

以上の結果から、リポソームはマクロファージの標識に利用可能であり、その径は200nmより100nmの方がマクロファージに取り込まれやすいとわかった。これは、昨年度に $^{111}\text{In}$ 標識リポソームにて行った結果と同等である。



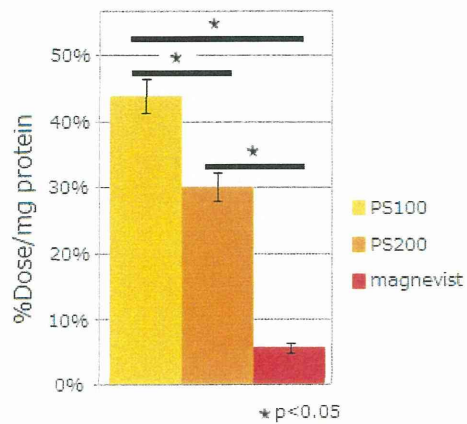
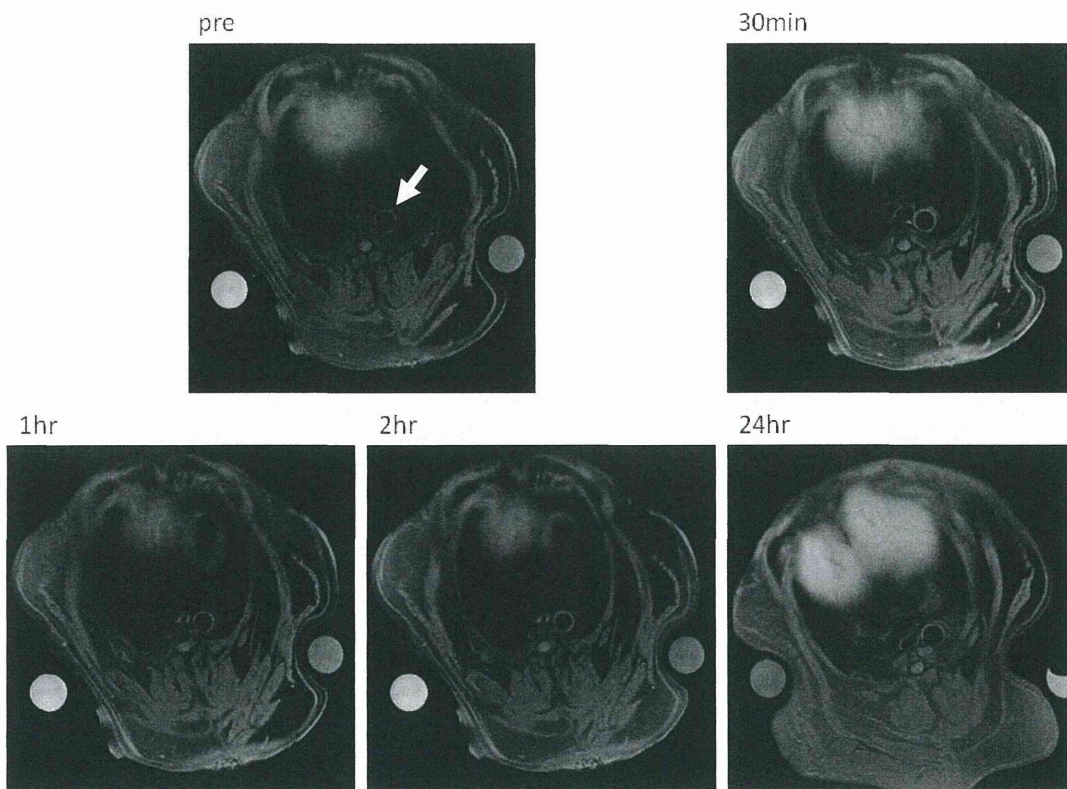


図9 Gd リポソームの Maus 腹腔マクロファージへのとりこみ。

## 6. Gd-DTPA封入リポソームによる WHHLウサギでのインビボMRイメージング

次に、作成したリポソームの不安定プラーク造影能について、動脈硬化モデル動物であるWHHLウサギを用いてインビボにて評価した。

結果を図10, 11に示す。



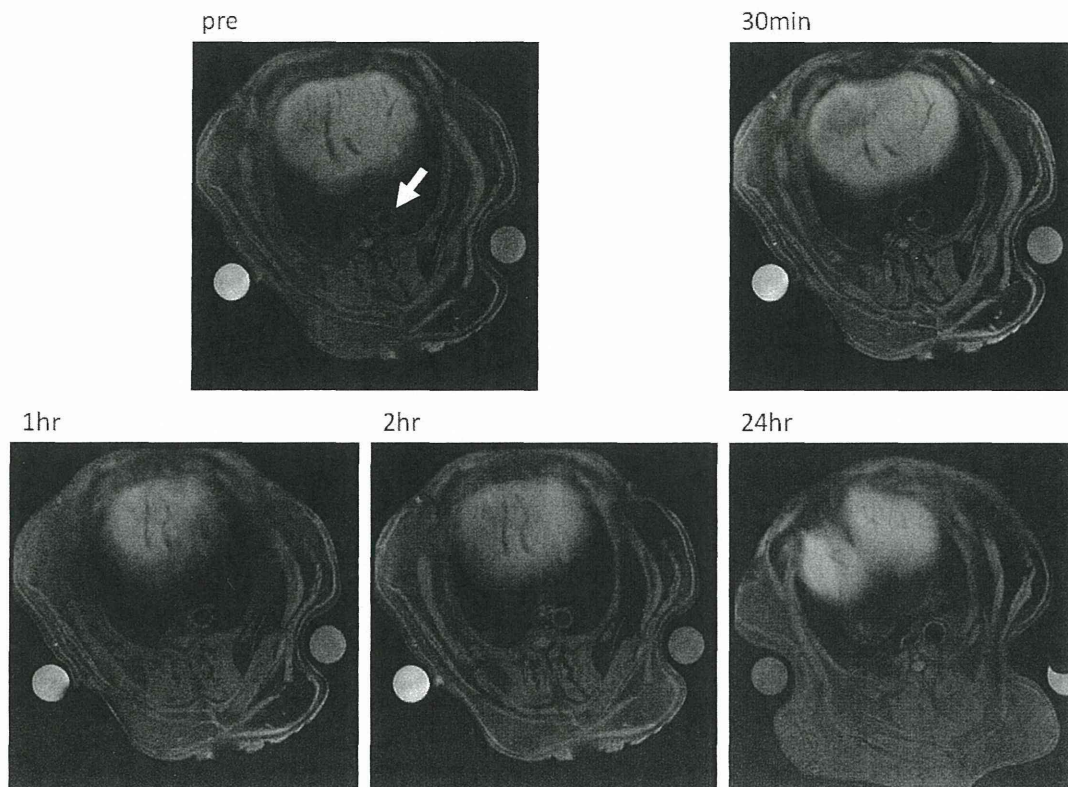


図 10 Gd-5%PEG2000PS200 リポソームによる WHHL ウサギの MRI T1 強調画像 (Black-blood, fat-sat)。それぞれ異なる 2 断面での経時変化画像を示した。どちらの断面においても、動脈壁 (矢印) が造影されているのがわかる。

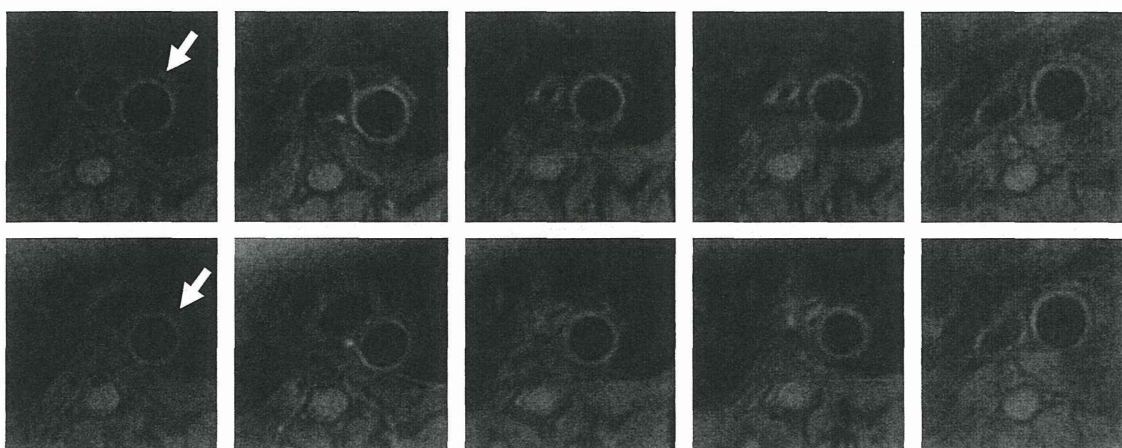


図 11 それぞれの断面中、動脈部位の拡大図。

#### D. 考察

リポソームをPEG化することにより、マクロファージへのターゲティング能を大きく低下させることなく、インビボでの血中動態を改善することができた。これにより、マクロファージへのターゲティングをより効率よく行うことができた。

また、MRI造影剤として、アクチベータブルプローブとして機能するGd標識リポソームを作成し、マクロファージへ取り込まれることを確認した。さらに、インビボにてWHHLウサギを用い、動脈硬化病変を画像化することに成功した。

#### E. 結論

以上により、昨年度の結果をもとに、リポソームに表面修飾を施すことで、より効率よくプラークの不安定性を指標にした定量評価を可能にするイメージングプローブを作成することに成功した。また、MRIにて、特異的な検出を可能にする、イメージングプローブを作成することができたと考える。

さらに、当初予定どおり、MRI用プローブを作成し、動脈硬化病変を捉えることに成功した。さらにこれは、アクチベータブルプローブであることが確認され、高い特異性を持ったイメージングが可能であると示唆された

#### (参考文献)

1. Lendon C., Born G.V., Davies M.J. and Richardson P.D. Plaque fissure: the link between atherosclerosis and thrombosis. *Nouv Rev Fr Hematol* 34, 27-29 (1992).
2. Virmani R., Burke A.P., Farb A. and Kolodgie F.D. Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis* 44, 349-356 (2002).
3. Glagov S., Weisenberg E., Zarins C.K., Stankunavicius R. and Kolettis G.J. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 316, 1371-1375 (1987).
4. Falk E., Shah P.K. and Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 92, 657-671 (1995).
5. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874 (2002).
6. Choudhury R.P., Lee J.M. and Greaves D.R. Mechanisms of disease: macrophage-derived foam cells emerging as the therapeutic targets in atherosclerosis.



rosis. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2, 309-315 (2005).

7. Ogawa M., Ishino S., Mukai T., Asano D., Teramoto N., Watabe H., Kudomi N., Shio mi M., Magata Y., Iida H. and Saji H. (18)F-FDG accumulation in atherosclerotic plaques: immunohistochemical and PET imaging study. J Nucl Med 45, 1245-1250 (2004).

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Mikako Ogawa, Izumi O. Umeda, Mutsumi Kosugi, Ayumi Kawai, Yasuhiro Magata.: Development of <sup>111</sup>In-labeled phosphatidylserine liposomes for detection of atherosclerotic plaques, Journal of Nuclear Medicine 投稿中 (別紙参照)

##### 2. 学会発表

Mikako Ogawa, Izumi O. Umeda, Mutsumi Kosugi, Ayumi Kawai, Yasuhiro Magata.: Development of <sup>111</sup>In-labeled phosphatidylserine liposomes for detection of atherosclerotic plaques., SNM

2012 Annual Meeting, June 9-13, 2012, Miami.

Mikako Ogawa, Izumi O. Umeda, Mutsumi Kosugi, Ayumi Kawai, Yasuhiro Magata.: Development of new molecular imaging probes for in vivo atherosclerotic plaque imaging.、第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2012年7月19～20日、福岡 シンポジウム発表

Mikako Ogawa, Izumi O. Umeda, Mutsumi Kosugi, Ayumi Kawai, Yasuhiro Magata.: Development of <sup>111</sup>In-labeled liposomes for vulnerable atherosclerotic plaque imaging., World Molecular Imaging Congress 2012, September 5-8, 2012, Dublin.

小川美香子、梅田泉、小杉睦、河合亜由美、間賀田泰寛：動脈硬化不安定プラークのイメージングを目的とした、<sup>111</sup>In標識リポソームの開発、第52回日本核医学会学術総会、2012年10月11日～13日、札幌

小川美香子 インビボ分子イメージングで探る生体機能、静岡三大学連携講義「分子イメージングの最前線」、2012年12月10日、静岡

小川美香子 生体イメージング研究が切り開く個別化医療、金沢大学戦略的研究推進プログラム (拠点形成

型) 次世代重点研究プログラム学術  
講演会、2013年1月25日、金沢

Mikako Ogawa, Izumi O. Umeda,  
Mutsumi Kosugi, Ayumi Kawai,  
Yasuhiro Magata.: In vivo  
atherosclerotic plaque imaging by  
radiolabeled liposomes., The 20<sup>th</sup>  
International Symposium on  
Radiopharmaceutical Sciences,  
May 12-17, 2013, Jeju.

Mikako Ogawa, Ryuji Uchino,  
Ayumi Kawai, Yuka Hamaya,  
Yasuhiro Magata.: Development of  
atherosclerosis imaging probe for  
SPECT -- Effect of PEGylation of  
liposomes on macrophage uptake,  
第45回日本動脈硬化学会総会・学術  
集会、2013年7月18～19日、東京、  
発表予定

Mikako Ogawa, Ryuji Uchino,  
Ayumi Kawai, Yuka Hamaya,  
Yasuhiro Magata.: Development of  
atherosclerosis imaging probe for  
SPECT -- Effect of PEGylation of  
liposomes on macrophage uptake,  
World Molecular Imaging  
Congress 2013, September 18-21,  
2013, Savannah. 発表予定

小川美香子、内納隆治、梅田泉、間  
賀田泰寛：動脈硬化不安定プラーク  
イメージングのためのリポソーム製  
剤の開発、第53回日本核医学会学術

総会、2013年11月8日～9日、福岡、  
発表予定

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

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

特異性・汎用性に優れた動脈硬化不安定プラーク分子イメージング剤の開発  
（リポソームへの金属キレートの導入検討）

研究分担者 梅田 泉  
国立がん研究センター東病院 機能診断開発部 室長

### 研究要旨

本研究では、簡便で特異的なスクリーニングから詳細な病態評価までを可能とする、包括的な不安定プラーク検出法の確立を目指す。

このために、ナノ粒子であるリポソームを利用して、不安定プラークを標的とする部位・放射性標識部位・環境反応性光標識部位・MRIのための金属標識部位を導入した、分子イメージング剤を開発する。

昨年度は、不安定プラークに多く認められるマクロファージをターゲットとした標的化リポソームを作成し、定量評価のための<sup>111</sup>In標識法について検討した。本年度は、分解能に優れたMRIにより病変の詳細評価を行うため、リポソームのGd標識法について検討を行った。

#### A. 研究目的

リポソームは、様々な表面修飾を施したり、薬剤を内包したりすることが可能である。したがって、本研究で目指す簡便なスクリーニングから詳細な病態評価までを可能とする、マルチモダル分子イメージング剤のためのプラットフォームとして有用であると考えられる。そこで、昨年度までに、動脈硬化不安定プラークイメージングのための標的化リポソーム作成し、プラークへの標的性を定量評価するための放射性標識法を確

立した。

そこで本年度は、分解能に優れたMRIにより病変の詳細評価を行うため、前年度までに作成した標的化リポソームに、MR造影能（T1造影能）を有するガドリニウム(Gd)による標識を施した。

リポソームは、化粧品材料やDDS薬剤として既に人への応用がされており、臨床応用へ向けての壁が低い。また、本イメージング剤により、新規薬剤の治療効果を経時的にモニタリングすることで、プラーク安定化

作用を指標とした創薬への貢献も期待できる。さらに、このような組織選択性の高いプローブが開発されれば、将来、治療薬を内包したDDSシステムとして利用し、診断と同時に治療を可能とする分子標的薬への展開も期待される。

## B. 研究方法

### 1. Gd内包標的化リポソームの作成

昨年度と同様、DSPC: DSPS: chol = 1:1:1にて脂質を混合し、クロロホルムに溶解させた。これを丸底フラスコにいれ減圧乾固し、フラスコに薄膜を作成した。これに、0.5 M Gd-DTPA (マグネビスト) を加え、70度の温浴とボルテックスを繰り返すことにより、30分かゆっく膨潤させた。

次に、これをフラスコごと液体窒素で凍結させた後、70度にあたためたソニケータで融解するという作業を5回繰り返した。得られた溶液をエクストルーダーにとおし、100 nmまたは200 nmの粒径のリポソームを作成した。

### 2. Gd内包標的化リポソームの精製

1で作成した溶液をゲル濾過 (Sephadex G-50) し精製し、さらに超遠心 (30,000 rpm, 15°C, 30 min) し、内包されなかったGd-DTPAを取り除いた。なお、ゲル濾過をせず、超遠心のみによる精製についても試みた。

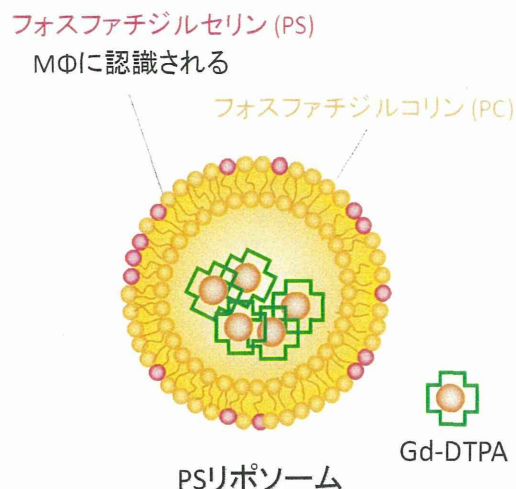


図1 Gd 標識 PS リポソーム

(倫理面への配慮)

生命倫理等に関する留意事項として、人や動物における研究内容は含まれていないので該当しない。放射線の取扱他、必要な関連法令を遵守して研究を推進した。

## C. 研究結果

### 1. Gd内包標的化リポソームの作成

リポソームでは、膜内外で浸透圧に大きな差がある場合、膜を上手く作成できない。そこで、まず、Gd-DTPAを生理食塩水にて1/5 - 1/2希釈し、リポソームが形成されるか検討を行った。この結果、今回用いた膜組成では、問題無くリポソームを作成することができた。

MRイメージングでは、核医学イメージングや光イメージングに比較し感度が劣るため、造影剤の投与量を増やす必要がある。そこで、次に、