

201212017B

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23年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 小川 美香子

平成 25 (2013) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 24
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 25

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
総合研究報告書

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ものである。

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した。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）の開発を行った。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が可能になると考える。

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

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）。

A. 研究目的

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]。

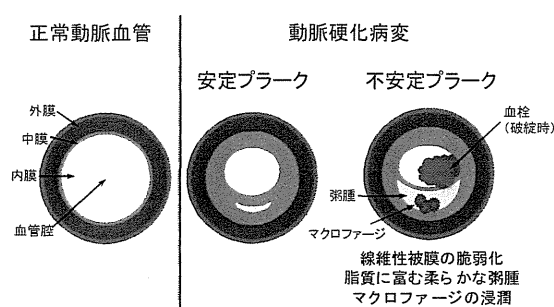


図1 不安定プラークの特徴

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 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 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 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PETの臨床検討が精力的に開始された。一方、

1. $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 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. $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 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。

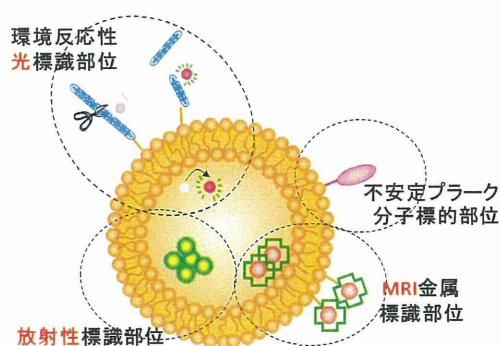


図2 機能性リポソーム

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。

B. 研究方法

1. 標的化リポソームの作成

プラークへの標的性を定量的に評価するためには、放射性標識が有用であることから、脂溶性キレートと水溶性キレートを利用したアクティブローディング法により、 ^{111}In 標識を施すこととした。

また、不安定プラークに浸潤しているマクロファージは、アポトーシス細胞を処理する過程でホスファチジルセリン(PS)を認識し取り込む性質があることが知られているため、リポソーム構成分子としてPSを導入し、標的化を試みた。

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。これを、10 mM NTAが入った30 mM HEPES / 5% mannitol bufferで60度にてゆっくり膨潤させた。得られた溶液をエクストルーダにとおし、100 nmまたは200 nmの粒径のリポソームを作成した(PS100, PS200リポソーム)。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。

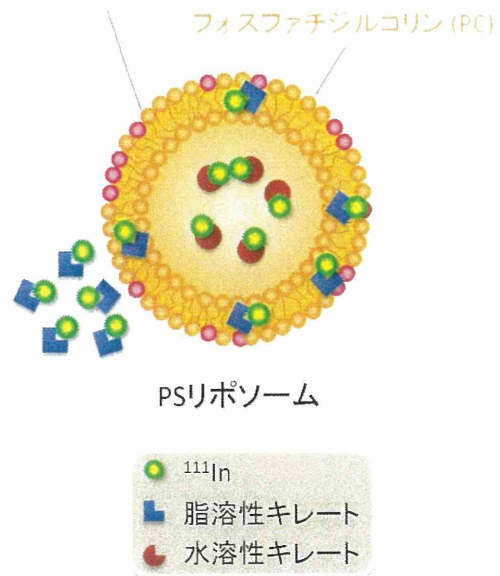
なお、コントロール実験のため、ホスファチジルコリンのみからなるリポソーム(DSPC: chol = 2:1、PC100, PC200 リポソーム)も作成した。

2. 標的化リポソームの放射性標識

作成したNTA内包リポソームに $^{111}\text{InCl}_3$, 51 mM Oxine (in EtOH)、2 M AcONa buffer混合溶液を加え、キレート剤OxineとNTAの交換反応により、リポソームを ^{111}In 標識した。得られた ^{111}In 標識リポソームは超遠心後、生理食塩水で最懸濁することにより回収し、リポソーム画分と上清の放射能を測定することで、放射化学的収率を求めた。

フォスファチジルセリン (PS)

MΦに認識される



PSリポソーム

図3 ^{111}In 標識 PS リポソーム

3. マウス腹腔マクロファージへの取り込み実験

次に、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CO₂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、分担研究者により作成法を確立した¹¹¹In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、¹¹¹In-PC100, ¹¹¹In-PS100, ¹¹¹In-PC200, ¹¹¹In-PS200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、CO₂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。また、比較のため、¹¹¹InClを用いて同様に検討を行った。

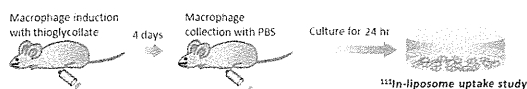


図 4 マウス腹腔マクロファージを用いた取り込み実験

4. インビボ体内動態実験

ddYマウス (6週齢、♂、20g) に¹¹¹In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。

5. 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ノックアウトマウスに7.4 MBqの¹¹¹In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てex vivo ARGを行った。

6. 動脈硬化モデル動物WHHLウサギでのSPECTイメージング

¹¹¹In標識リポソームをWHHLウサギ(12ヶ月齢、♂、4 kg)の耳静脈から74 MBq投与し、投与2, 24, 48時間後に、パラレルホールコリメータを用いて動物用SPECT装置 (FXシステム、Gamma-Medica-Ideas, USA) にて1時間SPECT撮像を行った (64 フレーム、60秒/フレーム)。また、大動脈の位置の同定のため、同装置にて造影CT撮像を行った。CTの造影剤はiohexoleを用いた。

なお、48時間のSPECT撮像後、ウサギを屠殺し大動脈を摘出した。摘出した大動脈は、胸骨の番号を指標

に11個の部位に分け、それぞれドライアイスにて凍結した。各ブロックから連続凍結切片を作成し(5 μm)、オートラジオグラフィ(ARG)、Oil-Red O染色、Azan染色、RAM-11抗体を用いたマクロファージの免疫組織染色を行った。免疫染色は塚田らの方法[8]に従って行い、核の同定のためヘマトキシリンにより共染した。

7. 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¹¹¹In

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、¹¹¹In]PS100-2%PEG2000、¹¹¹In]PS100-5%PEG2000、¹¹¹In]PS100-2%PEG5000、¹¹¹In]PS100-5%PEG5000、¹¹¹In]PS200-2%PEG2000、¹¹¹In]PS200-5%PEG2000、¹¹¹In]PS200-2%PEG5000、¹¹¹In]PS200-5%PEG5000の8種を作成し検討した。

8. 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CO₂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¹¹¹In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、¹¹¹In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、CO₂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。

9. インビボ体内動態実験

ddYマウス（6週齢、♂、20g）に¹¹¹In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。

10. 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ノックアウトマウスに5.6 MBqの¹¹¹In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。

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

11. ICG封入リポソームの作成

次に、簡便なイメージング法である光イメージングによる動脈硬化病変の検出の可能性について検討を行なうため、近赤外蛍光物質であるICGを封入したリポソームの作成を行った。

ICGを注射用水に溶解し、1. と同様に作成した脂質の薄膜を施したフラスコに加えた。これを液体窒素で凍結、超音波処理しながら溶解、を繰り返すことで、凍結融解法によりICGをリポソームに封入した。得られたリポソームは超遠心により回収し、1 mLの生理食塩水に懸濁した。

12. 培養マクロファージでの蛍光観察

ICG-リポソームをマウス腹腔マク

ロファージを培養したディッシュに加え、1時間後に蛍光顕微鏡にて観察した。

1 3. apoEノックアウトマウスでの 蛍光イメージング

ICG-リポソームをapoEノックアウトマウスの尾静脈より投与し、2時間後に血管を摘出した。摘出した血管は、蛍光イメージング装置 (Maestro 2, CRi, USA)にてICGフィルタを用いて撮影し、蛍光画像を得た後に、Oil-Red O染色を施した。

1 4. Gd内包標的化リポソームの 作成

放射性標識リポソーム、蛍光標識リポソームと同様、DSPC: DSPE: 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 (マグネピスト)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分かゆくなり膨潤させた。

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。

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。

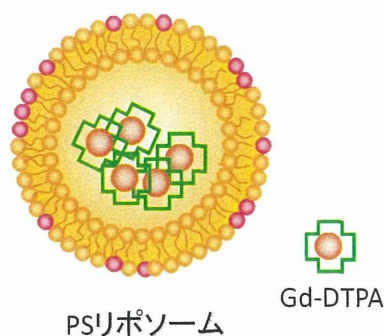


図5 Gd 標識 PS リポソーム

1 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)。

1 6. マクロファージへのインビト

口取り込み実験

^{111}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。

これまで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_2 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。

17. Gd-DTPA封入りポソームによるWHHLウサギでのインビボMRI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アングリ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。投与直後にアングリオグラムを得た後、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。

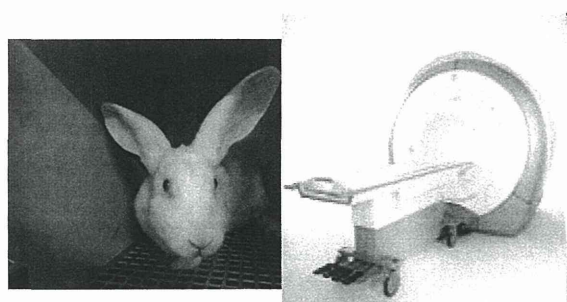


図6 本検討に用いた3T MRI装置とWHHLウサギ

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ます。

(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. 標的化リポソームの作成

100 nm, 200 nm サイズのホスファチジルセリン標識リポソーム (PS100, PS200) および、コントロール実験のためのホスファチジルコリンのみからなるリポソーム (PC100, PC200) を作成することができた。

2. ^{111}In -リポソームの作成

二種類のキレートを用いたアクティブローディング法により、 ^{111}In -PC100, ^{111}In -PS100, ^{111}In -PC200, ^{111}In -PS200すべてにおいて、放射化学的収率95%以上にて目的物を得ることに成功した。

3. 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7に示すとおり、 ^{111}In -PS100で最も高いものとなり、また、PSリポソームではPCリポソームに比較し有意に高い取り込みを示し、PSによるマクロファージへのターゲティングが所期のとおりなされているこ

とが示された。なお、 $^{111}\text{InCl}$ のマクロファージへの取り込みはほとんど認められなかった。

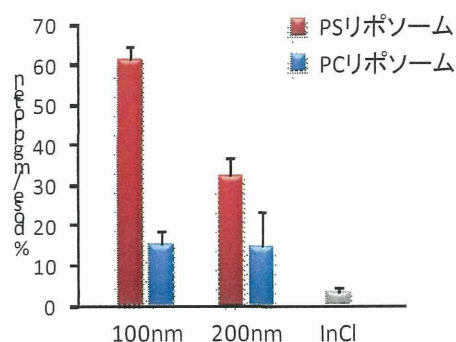
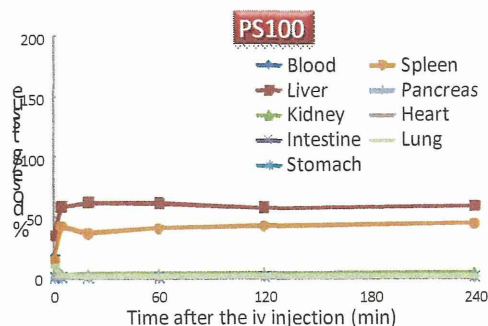


図 7 ^{111}In -リポソームのマウス腹腔マクロファージへの取り込み

4. マウス体内動態

^{111}In -PC100, ^{111}In -PS100, ^{111}In -PC200, ^{111}In -PS200のマウス体内動態を経時的に検討したところ、図8、9に示すとおりとなった。PCリポソームでは、脾臓への高い取り込みが認められた。また、すべてのリポソームについて、肝臓への高い集積が認められたが、 ^{111}In -PC200では最も低かった。血液からのクリアランスは、PCリポソームに比較し、PSリポソームのほうが早い結果となった。



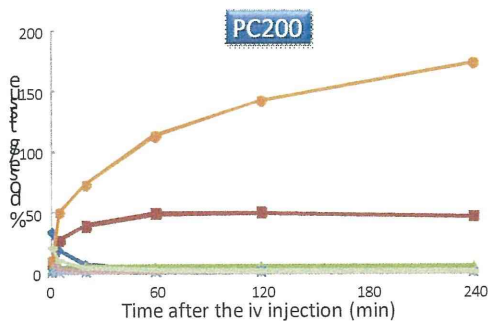
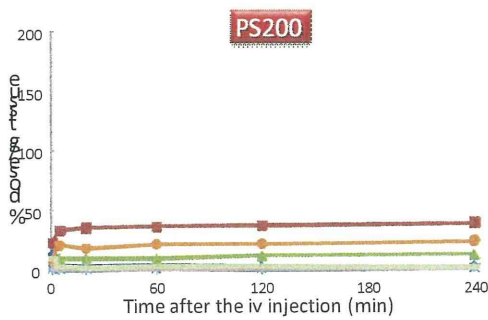
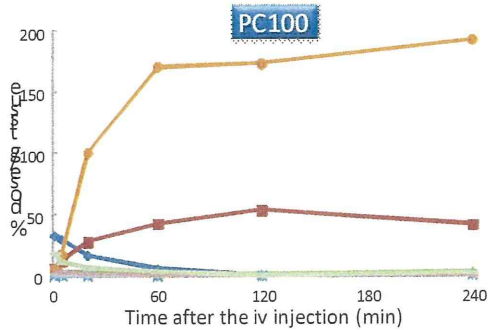


図 8 ^{111}In -リポソームのマウス体内動態

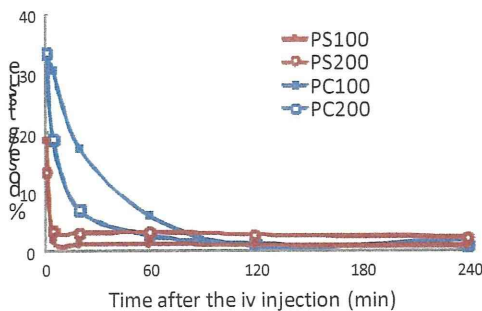


図 9 ^{111}In -リポソームのマウス血中動態

5. 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

apoEノックアウトマウスでのex vivo ARGを行ったところ、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。



図 10 ^{111}In -PS200 による apoE ノックアウトマウスでの ex vivo ARG

6. 動脈硬化モデル動物WHHLウサギでのSPECTイメージング

WHHLウサギによりSPECTイメージングを行ったところ、図11に示すように、大動脈を描出することに成功した。また、図12に示すように、病巣は不安定プラークを形成していることが示された。

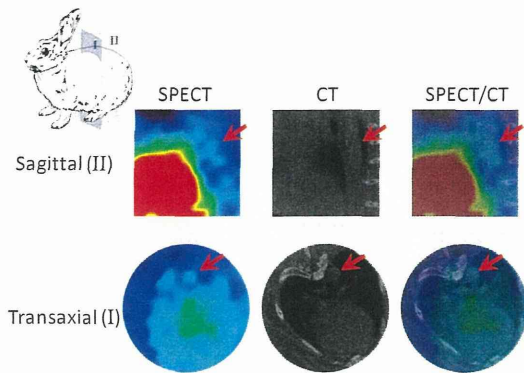


図 11 ^{111}In -PS200 による WHHL ウサギでの投与 48 時間後の SPECT 像。矢印が大動脈。

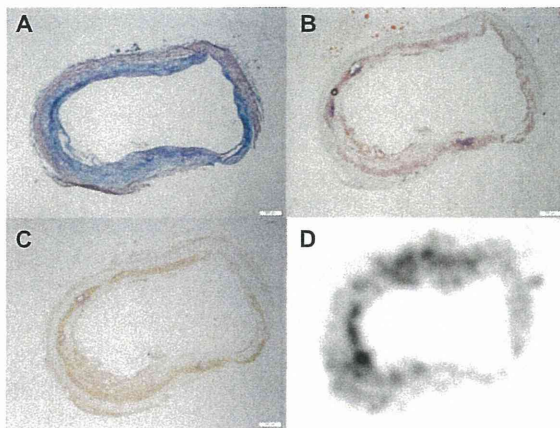


図 12 ^{111}In -PS200 の ARG 画像と、WHHL ウサギの病理像 A: Oil-Red O 染色 (脂肪染色), B: Azan 染色, C: RAM-11 (マクロファージ)免疫組織染色, D: ARG

7. PEG化リポソームの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13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。

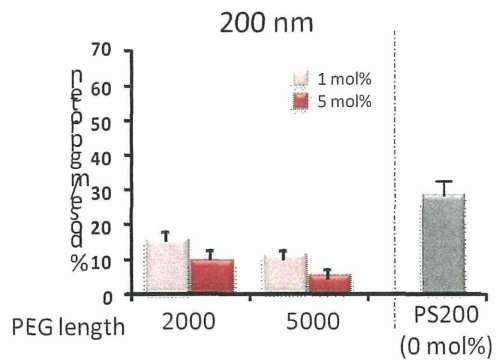
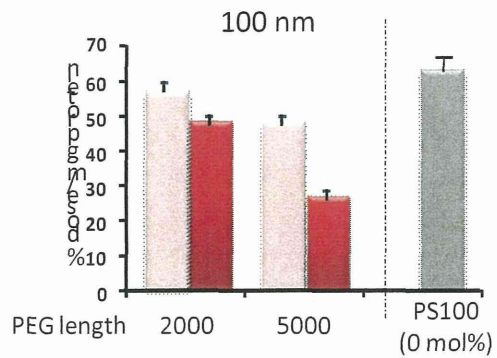


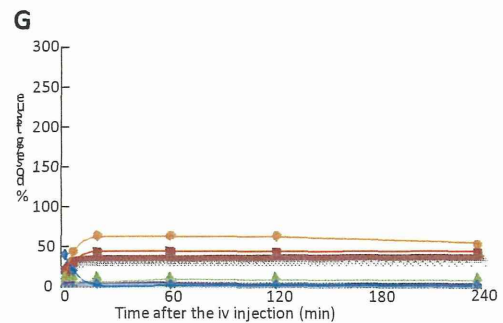
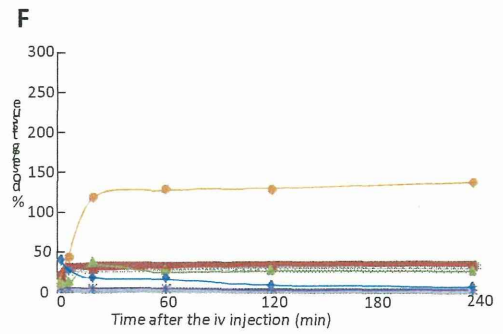
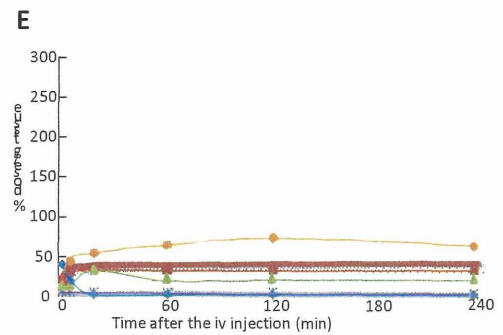
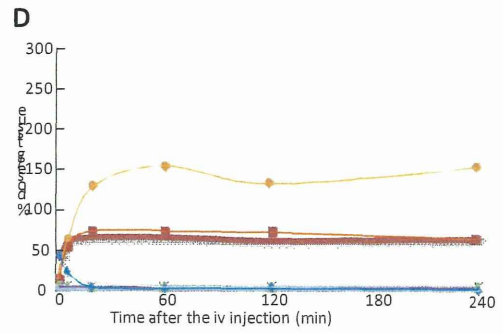
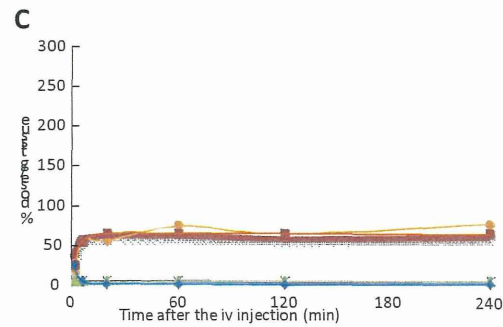
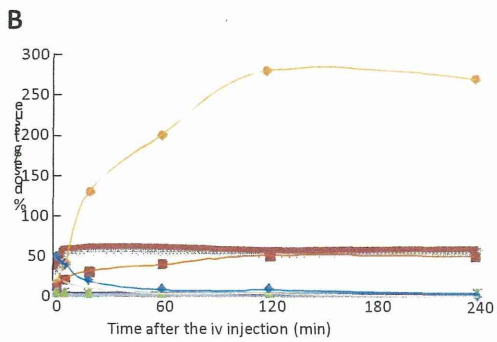
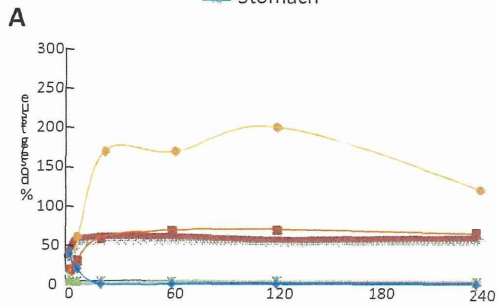
図 13 PEG 化 ^{111}In -リポソームのマウス腹腔マクロファージへの取り込み

8. リポソームPEG化のマウス体内動態への影響

結果を図14,15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化リポソームに比較し、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、インビボでのマクロファージへの集積を期待させるものである。



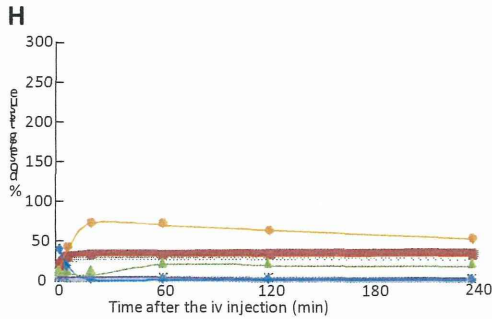


図 14 PEG 化 ^{111}In -リポソームのマウス体内動態
赤太線は、non-PEG 化リポソームの結果を示す。
A: 5%PEG2000PS100,
B: 5%PEG5000PS100,
C: 1%PEG2000PS100,
D: 1%PEG5000PS100,
E: 5%PEG2000PS200,
F: 5%PEG5000PS200,
G: 1%PEG2000PS200,
H: 1%PEG5000PS200

図 15 PEG 化 ^{111}In -リポソームのマウス血中動態
A: PS100, B: PS200

9. PEG化リポソームの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}In]PS200-5%PEG2000で最も高いものとなった。

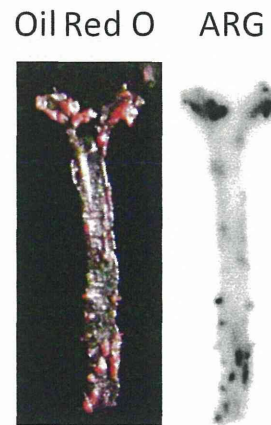
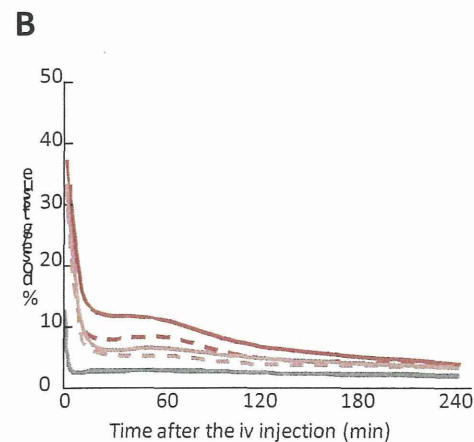
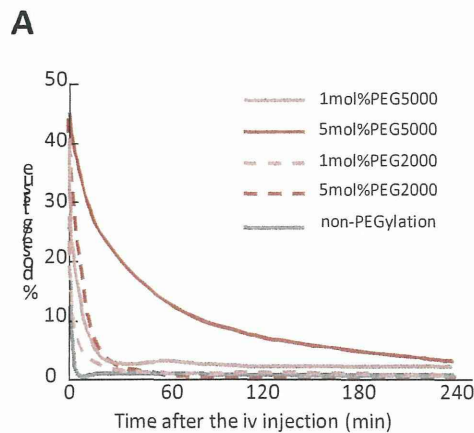
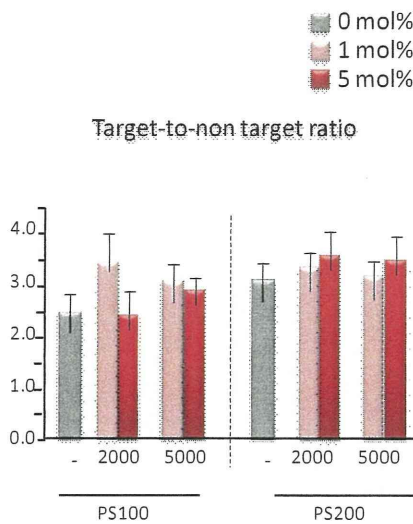


図 16 ApoE $^{-/-}$ マウスにおける ^{111}In]5%PEG2000PS200のen face ARG



Standardized uptake to the plaques

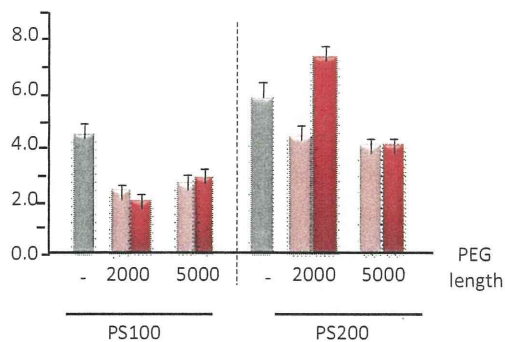


図17 ApoE^{-/-}マウスにおけるARGの解析結果

10. ICG-リポソームの作成

ICGリポソームを作成することに成功した。また、ICGを高濃度にて封入することができたため、濃度消光によりICG蛍光が減弱していることが示された(図18)。蛍光はリポソームを破壊することにより復活し、約4倍の蛍光のアクチベーションが認められた。

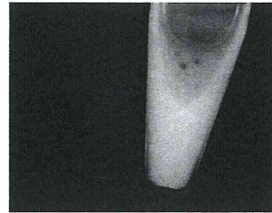


図18 ICG-リポソームの蛍光像
ICGをリポソームに封入することにより蛍光が減弱した(左)。また、リポソームを破壊することにより、蛍光を発するようになった(右)。

11. 培養マウス腹腔マクロファージでの蛍光観察

図19に示すように、マクロファージ内にICG-リポソームが取り込まれている様子が蛍光顕微鏡にて観察された。

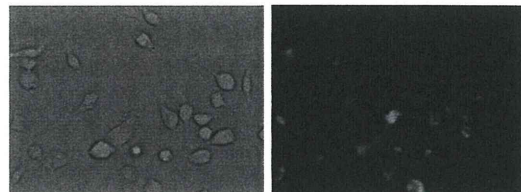


図19 ICG-リポソームのマクロファージにおける蛍光顕微鏡像(右)。左は明視野(DIC)像。

12. apoEノックアウトマウスでの蛍光イメージング

apoEノックアウトマウスを用いて、大動脈での蛍光イメージングを行ったところ、図20に示すように動脈硬化病変に一致した蛍光シグナルを得た。なお、ICGのみを投与した場合は、同条件にて病巣は描出されなかった(図21)

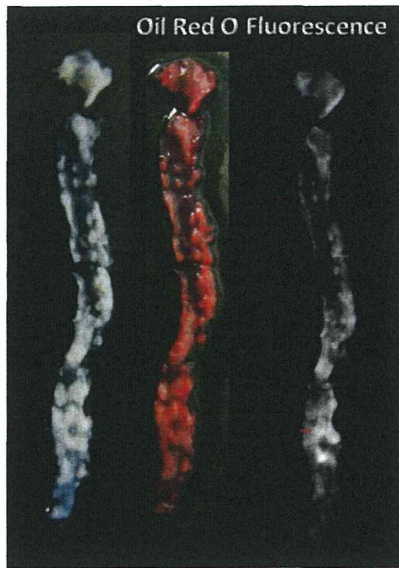


図 20 apoE ノックアウトマウスでの ICG-PS リポソームによる蛍光イメージング

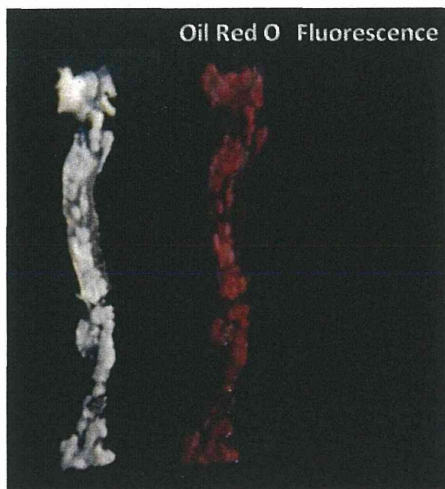


図 21 apoE ノックアウトマウスでの ICG による蛍光イメージング

1 3. 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、臨床にて血管造影剤として用いられているGd-DTPA濃度 (Magnevist) にて、リポソーム膜を形成することを試みた結果、原液を用いた場合にも、リポソームを作成することができた。

内包されなかったGd-DTPA を取り除くため、当初、超遠心のみによる精製を試みた。しかしながら、超遠心のみではGd-DTPAを完全に取り除くことができなかった。これは、超遠心を繰り返すことによっても困難であった。

そこで、まず、ゲル濾過をすることによりGd-DTPAの大部分を取り除くとともに、リポソームの懸濁溶液を生理食塩水に置き換えてから、超遠心をおこなった。この結果、Gd-DTPAを取り除くことができ、Gd-DTPA内包リポソームの精製に成功した。

1 4. Gd-DTPA封入リポソームのMR造影能評価

作成したリポソームの造影能を確認したところ、図22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と予測される。

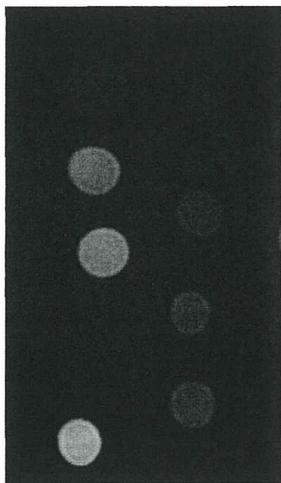


図 22 Gd リポソームをいれたファントムの MRI 画像。左列がリポソーム膜を破壊した後の画像。

15. 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23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シウム濃度は、PS100が 5.07×10^{-2} (mol/l)、PS200が 5.54×10^{-2} (mol/l) だった。マグネシウム液の濃度は原液を4倍に希釈した 1.25×10^{-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、マグネシウム液を加えた群の 5.7% より有意に大きくなった。このことからマグネシウム液を加えた群で有意なシグナルが得られた要因は、マグネシウム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。マグネシウム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 ± 0.348 より有意に大きな値にならず、マグネシウム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、 ^{111}In 標識リポソームにて行った結果と同等である。

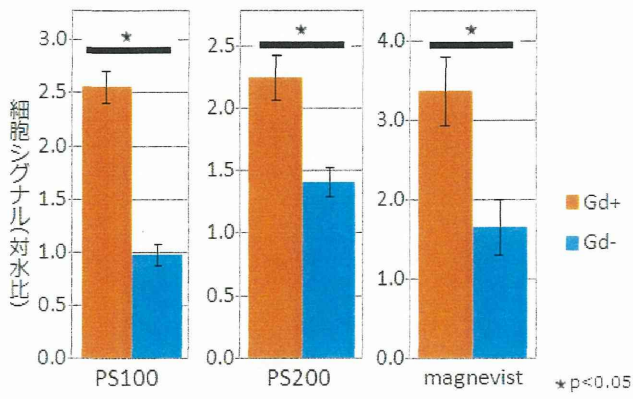
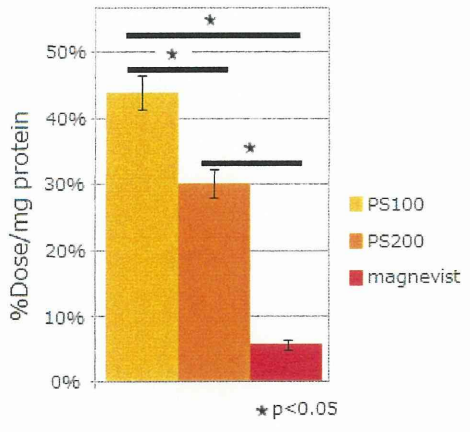


図 23 Gd リポソームのマウス腹腔マクロファージへのとりこみ。



16. Gd-DTPA封入りポソームによる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24, 25に示す。

