

がんの光超音波イメージングを目的とした  
イメージングプローブの開発に関する研究

2016

金崎 健吾



# 目次

緒言	1
第1章 光超音波イメージングプローブの光吸収体としての 酸化鉄粒子とインドシアニンググリーンの比較検討	4
1.1 実験方法	6
1.2 結果および考察	8
1.3 小括	10
第2章 インドシアニンググリーンを光吸収体とする 光超音波イメージングプローブの開発	11
第1節 ヒト血清アルブミンを母体とした光超音波イメージングプローブの開発	12
2.1.1 実験方法	13
2.1.2 結果および考察	16
2.1.3 小括	24
第2節 ポリエチレングリコールを母体とした 光超音波イメージングプローブの開発	25
2.2.1 実験方法	26
2.2.2 結果および考察	30
2.2.3 小括	38

第3節 ポリオキサゾリンを母体とした光超音波イメージングプローブの開発…… 39

2.3.1 プローブ設計 …………… 40

2.3.2 実験方法 …………… 41

2.3.3 結果および考察 …………… 45

2.3.4 小括 …………… 57

結語 …………… 58

引用文献 …………… 60

謝辞 …………… 67

## 緒言

悪性腫瘍を含むがんは日本人の死因第一位であり、その数は増加傾向にあることから<sup>[1]</sup>、高い治療効果に直結しうる非侵襲的画像診断法の開発が強く求められている。近年、生体組織透過性の高い近赤外光を利用した光イメージング法による腫瘍診断が注目されている<sup>[2]</sup>。光イメージング法は、蛍光イメージング (Fluorescence imaging, FI) 法と光超音波イメージング法 (Photoacoustic imaging, PAI) に大別される。FI は、励起光を吸収した蛍光体から発生する蛍光を検出するイメージング法であり、簡便で汎用性が高い一方で、光の吸収・散乱によって体深部の観察が困難な場合がある<sup>[3]</sup>。一方、PAI は、パルス照射光を吸収した光吸収体が熱膨張することで発生する超音波 (光超音波 (Photoacoustic, PA)) を検出するイメージング法であり<sup>[4,5]</sup>、光を照射し、超音波を検出するため、FI に比べて体深部を高解像度で観察しうる。PAI は内在性の光吸収体 (ヘモグロビン等) を利用することも可能であるが、がんを診断するためには、がんへ集積し PA 信号を発するイメージングプローブ (PAI プローブ) の開発が必要であり<sup>[6]</sup>、その開発研究が進められているが、これまでに有効なプローブは得られていない。そこで本研究では、がんの PAI に有効なイメージングプローブの開発を計画した。

まず初めに、近赤外光の吸収能および、臨床実績を有する酸化鉄粒子 (IONP)<sup>[7,8]</sup> およびインドシアニングリーン (ICG)<sup>[9,10]</sup> に PAI プローブ用光吸収体としての可能性があると考え、IONP および ICG 単独、さらに IONP または ICG を結合した抗腫瘍抗体について、光超音波発信能を調べ、両者の PAI プローブ用光吸収体としての有効性を評価した。

近赤外レーザーおよび超音波探触子を組み合わせることで作製した *In vitro* PA 信号測定装置を用いて、1 mm 厚キュベット内に封入したサンプルの PA 信号強度を測定した。その結果、抗体への結合の有無に依らず、IONP に比べて ICG の方が高い近赤外光吸収能に起因する 800 倍以上強い光超音波信号を示し、ICG が PAI プローブの光吸収体としてより優れていることを見出した。

上記の検討結果から、ICG を光吸収体として選択し、次に ICG を効率的に送達する PAI プローブの開発を計画した。

ヒト血清アルブミン (HSA) は enhanced permeability and retention (EPR) 効果でがんへ集積することが知られており、そのために HSA は薬物をがんへ送達させるためのキャリアとして有効であることが報告されている<sup>[11]</sup>。そこで HSA を PAI プローブの母体として選択し、HSA に対する ICG の結合数が光超音波信号強度とマウス大腸癌細胞 Colon26 担癌マウスでの腫瘍への集積性に与える影響を検討するために、ICG を 0.5、2.9、8.2 個結合させた HSA (HSA-ICG) を設計・合成した。ICG 数が増加すると光超音波信号強度は増加する一方で、腫瘍への集積量は低下することを認めた。さらに作製した HSA-ICG に *p*-SCN-Bn-DTPA を介して <sup>111</sup>In を導入し、マウス大腸癌細胞 Colon26 担癌マウスに投与し腫瘍集積性を調べた結果、ICG 数が増加すると肝臓への集積が増加し、腫瘍集積が低下することを認めた。次に、検討した HSA-ICG 群の中で、光超音波信号と腫瘍集積量との観点から、最も有効と評価された HSA-ICG (ICG 結合数 2.9 個) を用いて *in vivo* PAI を実施した。

その結果、HSA-ICG の投与により腫瘍部選択的かつ投与量依存的な PA 信号の増加を認めた。以上の結果より、HSA-ICG は、EPR 効果によって腫瘍へ集積しがんの PAI を可能にすることが示された。

プローブの腫瘍集積に EPR 効果を利用することの有効性が示されたことから、本効果を利用したより有効ながんの PAI プローブの開発を計画した。すなわち、HSA と同じ水溶性高分子でありながら、化学合成が可能で、生体適合性が高い<sup>[12, 13]</sup>という特長を有するポリエチレングリコール (PEG) について、その ICG キャリアとして可能性を検討した。そこで、はじめに PEG の分子量と EPR 効果による腫瘍集積性との相関を検討するために、分子量 5-40 kDa の PEG に ICG を 1 分子結合させた PEG (PEG-ICG) を合成し、Colon26 担癌マウスでの腫瘍集積および血中滞留性を調べた。その結果、分子量の増大に伴う、腫瘍集積性の増加および血中滞留時間の延長を認めた。*p*-SCN-Bn-DTPA を介して <sup>111</sup>In を導入した PEG を用いた体内動態評価結果から、プローブは主に尿排泄されており、その排泄量は、PEG の分子量および、アルブミンなどの血中蛋白質との相互作用に依存することが示唆された。さらに、腫瘍集積および腫瘍/血液比が共に良好であった分子量 20 kDa の PEG-ICG を用いた PAI では、腫瘍部選択的かつ投与量依存的な信号の増加を認めた。以上の結果より、水溶性合成高分子を母体とした PEG-ICG はがんの PAI プローブとして有効であることが示された。

さらに、PEG-ICG より高感度ながんの PAI を可能とするために、PAI プローブの ICG 結合数と腫瘍/血液比を上げることが計画した。そこで、水溶性合成高分子ポリオキサゾリン (POZ) が PEG に比べてより多くの ICG を結合でき、かつ血液から早期に消失する可能性がある<sup>[14]</sup>ことに着目し、PAI のための ICG キャリアとしての POZ の有効性を検討した。すなわち、POZ と ICG との結合体 (POZ-ICG) について、POZ の分子量、POZ の側鎖の加水分解割合、および、POZ に対する ICG の結合数が Colon26 担癌マウスでの腫瘍への集積性に与える影響を検討した。はじめに、分子量 8-200 kDa の POZ-ICG について Colon26 担癌マウスでの腫瘍集積および血中滞留性を調べた結果、分子量の増大に伴う腫瘍集積性の増加および血中滞留時間の延長を認めた一方で、同程度の分子量の PEG-ICG よりも早く血液から消失した。次に、POZ の側鎖を種々の割合で加水分解した POZ-ICG では、加水分解割合の増加に伴い腫瘍集積は低下した。また、POZ に様々な割合で ICG を結合させた場合、一定数以上の ICG が結合すると肝臓集積が増加し腫瘍集積は低下した。その結果、分子量 50 kDa かつ加水分解割合 5% の POZ-ICG (ICG/POZ=7.8) が、良好な腫瘍集積量および PEG-ICG よりも高い腫瘍/血液比を示した。この POZ-ICG を用いた PAI では、腫瘍部選択的な信号の増加を認め、またその信号の増加は投与量ならびに腫瘍集積量依存的であった。以上の結果より、POZ-ICG は、PEG-ICG および HSA-ICG に比べて多くの ICG を結合でき、がんの高感度な PAI プローブとして有効である可能性が示された。

以上、本研究は、がんの高感度な PAI のためのイメージングプローブの開発に基礎的な成果を収めたものである。これらの知見は、今後のがんの基礎的研究および臨床画像診断診断への PAI の利用において有益な情報を提供するものと考えられる。

これらの結果について、以下に詳述する。

## 第1章 光超音波イメージングプローブの光吸収体としての 酸化鉄粒子とインドシアニンググリーンの比較検討

がんの転移・再発を防ぎ根治させるためには、早期発見、早期治療が重要となる。特に臨床症状が発現するより前に腫瘍を検出し、早期から適切な治療を施すことは患者の Quality of life (QOL) の向上にとって大きな意味を持つ。画像診断技術は、生検法に比較して非侵襲的であり、腫瘍診断の方法として臨床で不可欠な手法となっている。

その中で、近年、光学・センシング技術の発展に伴い、近赤外波長領域の光を利用した光イメージング法が注目されている<sup>[2]</sup>。近赤外波長領域は、生体内に多く含まれる水、ヘモグロビン、メラニンの光吸収が少なく、他の波長領域と比較して生体内で吸収による光エネルギーの低下が少ない<sup>[15]</sup>が、イメージングの範囲は体表近くの体浅部に限られる。

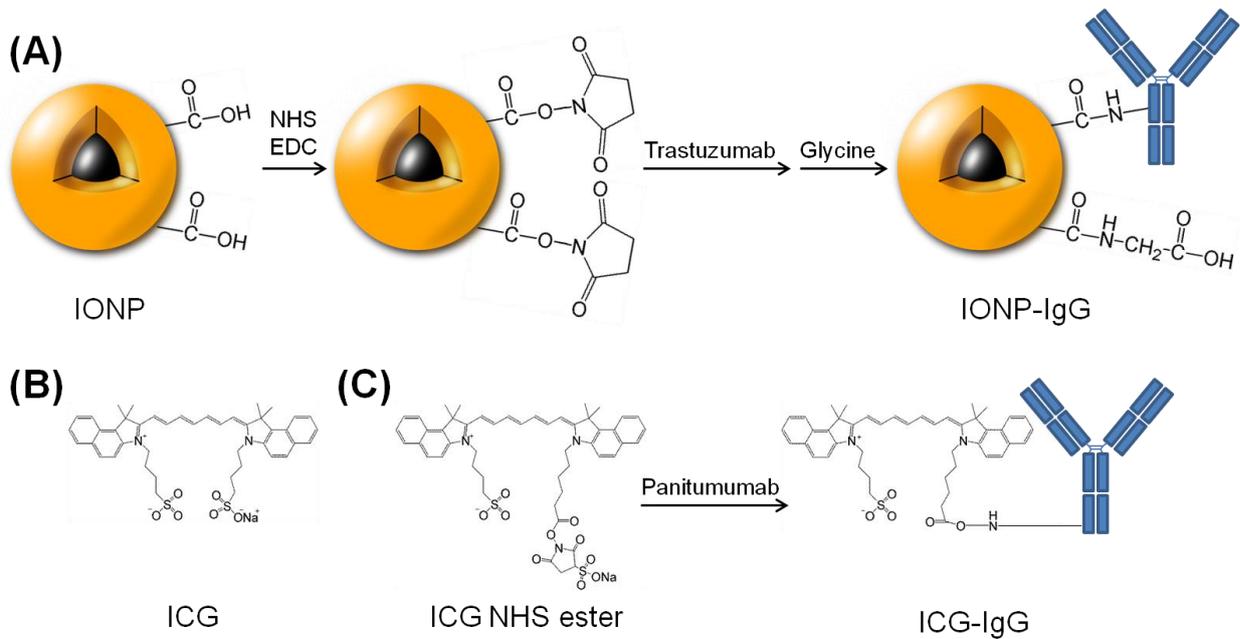
一方、光イメージング法の一つである光超音波 (PA) イメージング法 (PAI) は、外部より照射されたパルス光を吸収した光吸収体が熱膨張することで発生する超音波を検出するイメージング法<sup>[4, 5]</sup>、励起光の入力および蛍光の検出の両方を光で行う FI 法に比較して、PAI は超音波で検出を行うため、体深部を高解像度で観察することが可能であることから近年注目されている。しかし、この PAI によってがんを診断するためには、がんへ集積し PA 信号を発するイメージングプローブの開発が必要である。

このイメージングプローブの開発にあたって、光吸収体の選択は重要な因子である。無機材料の粒子型の光吸収体としては、これまでに、カーボンナノチューブや金ナノ粒子などの研究が報告されている<sup>[16-19]</sup>。しかし、カーボンナノチューブや金ナノ粒子は、未だにその安全性や生体適合性に課題が残されており<sup>[20, 21]</sup>、アメリカ Food and Drug Administration (FDA) での承認は得られていない。一方で、同じ粒子形であっても酸化鉄ナノ粒子 (Iron oxide nanoparticle ; IONP) は、リゾビスト®に代表されるように臨床検査薬としての実績があり、毒性が低く<sup>[7]</sup>、生分解性があることが報告されている<sup>[22, 23]</sup>。さらに、IONP は近赤外光の吸収能を有することが報告されており<sup>[8]</sup>、これまでにマグヘマイト ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) からなる IONP を用いた *in vitro* での癌細胞の PAI が報告されている<sup>[24]</sup>。

一方で、光吸収体としては蛍光色素も広く知られている。代表的なものとして、近赤外蛍光色素であるインドシアニンググリーン (ICG) があり、これは、網脈絡血管造影剤や肝機能検査薬としての実績があり<sup>[9, 10]</sup>、その安全性が高いことが報告されている。さらに ICG は PA イメージングが可能であることが報告されている<sup>[25]</sup>。

しかし、IONP および ICG について、それぞれの PA 信号強度を直接比較した報告はない。そこで本章では、イメージングプローブの光吸収体選択のために、IONP および ICG、さらに IONP または ICG を結合した抗腫瘍抗体について、水溶液中での光超音波信号を比較評価した。なお、抗腫瘍抗体としては、モデルとして代表的な 2 種類の FDA で認可されたヒト型化モノクローナル抗体を使用した。一つは、がんの悪性度と相関があり、乳癌、卵巣癌、胃癌などの多くの癌で高発現している上皮増殖因子受容体 2 (HER2) <sup>[26-28]</sup> に結合する抗体 Trastuzumab (Herceptin®) <sup>[29]</sup> を選択した。もう一つは、細胞増殖、浸潤、転移や血管

新生に参与しがんの悪性度と関係する<sup>[30, 31]</sup>上皮増殖因子受容体 (EGFR) に結合する抗体 Panitumumab を選択した。抗腫瘍抗体との結合に際しては、それぞれ次の通りに実施した。IONP は、表面のカルボキシ基を活性エステル化し、抗体のアミノ基と共有結合させた (Figure 1-1-1A)。同様に ICG は、一方のスルホン酸基をカルボキシ基へ置換した誘導体を、抗体のアミノ基と共有結合させた (Figure 1-1-1B, C)。



**Figure 1-1-1.** Probe design. (A) Scheme of IONP conjugation with IgG. (B) ICG. (C) Scheme of ICG conjugation with IgG.

## 1.1 実験方法

### 試薬・機器

実験には、Sigma Aldrich 社、株式会社同仁化学研究所、ナカライテスク株式会社、Thermo Fisher Scientific 社から購入した特級試薬を用いた。酸化鉄粒子は、コアフロント株式会社から購入した。Trastuzumab および Panitumumab は、それぞれ中外製薬株式会社および武田薬品工業株式会社から購入した。短鎖エチレングリコールリンカーを介してスクシンイミジルエステル基を有する ICG である ICG-EG4-Sulfo-OSu は株式会社同仁化学研究所から購入した。サイズ排除クロマトグラフィー装置には、GE Healthcare Japan 社製 AKTA Explorer を用いて、分離カラムとして GE Healthcare Japan 社製 Superdex200 10/300GL を使用した。粒子サイズおよびゼータ電位の測定には、大塚電子株式会社製 DLS-8000 series および、Marvern 社製 Zetasizer Nano ZS をそれぞれ使用した。吸光度の測定には、株式会社島津製作所製 UV-1800 UV-Vis NIR システムを使用した。水溶液中の PA 信号測定には、Lotis TII 社製チタンサファイアレーザー（パルス頻度 10 Hz、パルス幅 20 ns）、Panametric NDT 社製超音波探触子（Model V303、1 MHz 中心帯域）、オリンパス社製超音波信号増幅器（Model 5682）、および Tektronix 社製オシロスコープ（DPO3034）を使用した。

### 抗体結合 IONP の合成

Trastuzumab を結合させた IONP の合成方法は以下の通りである。0.1 M の 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) 緩衝液 (pH 6.3) に溶解させた Sigma-Aldrich 社製 N-Hydroxysuccinimide (6 mg/mL、0.4 mL) および Sigma-Aldrich 社製 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (5 mg/mL、0.4 mL) を、表面にカルボキシ基を有する粒径 20 nm のコアフロント社製 nanomag®-D-spio (5 mg/mL、4 mL) と混合し、室温で 1 時間反応させた。反応溶液は、0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 8.0) を移動相とした GE Healthcare 社製 PD-10 ゲルろ過カラムによって精製した。精製後の粒子 (5 mg/mL、4 mL) と、Trastuzumab (16 mg/mL、1 mL) とを 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 8.0) 中で混合し、室温で 3 時間反応させた。反応後、グリシン水溶液 (1 M、3  $\mu$ L) を添加し粒子表面の未反応のスクシニミジル基を失活させた。最後に、移動相として流速 0.5 mL/min の PBS (pH 7.4) を用いた GE Healthcare 社製 Superdex 200 10/300 GL によるサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。得られた Trastuzumab 結合 IONP を IONP-IgG と呼ぶ。

粒子に結合した抗 HER2 分子の数は、反応時に加えた抗 HER2 分子の量から未結合分を差し引くことで算出した。具体的には、精製時に得られた未結合抗 HER2 分子と、既知量の抗 HER2 分子をラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離し、coomassie brilliant blue (CBB) 染色した。染色されたバンドの強度から未結合抗 HER2 分子の量を定量し結合量を算出した。一方、IONP の定量は酸化鉄由来の吸収である 710 nm の吸光度から算出した。

### 抗体結合 ICG の合成

ICG と抗体とを純度高く共有結合できる ICG-EG4-sulfo-OSu を用いて既報の方法に従い合成した<sup>[32]</sup>。具体的には、Panitumumab (0.5 mg, 3.4 nmol) および ICG-EG4-Sulfo-OSu (32.3  $\mu$ g, 27.4 nmol) を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH8.6) 中で混合した。室温で 1 時間反応させた後、PD-10 サイズ排除カラムによって精製した。得られた Panitumumab 結合 ICG を ICG-IgG と呼ぶ。ICG および抗体の濃度は、それぞれ極大吸収吸光度から算出し、ICG 1 分子に結合した抗体の数を求めた。

### 水溶液中での PA 信号測定

PA 信号測定装置は、IONP および IONP-IgG の測定には、710 nm、ICG および ICG-IgG の測定には、797 nm および 810 nm のレーザーを使用した。1 mm セル厚のポリスチレン製キュベットに被測定溶液を封入し、水を満たした水槽にキュベットおよび超音波探触子を入水させ、水槽外よりレーザーを照射し PA 信号を検出した。得られた PA 信号は、測定サンプルの重量濃度と照射レーザーの強度で規格化した。

### 統計解析

データは平均値 $\pm$ 標準偏差で表わした。有意差検定は Student's *t*-test により行い、 $p < 0.05$  を有意とした。

## 1.2 結果および考察

### PAI プローブの合成

20 nm の IONP1 分子に結合した抗体の数は、 $4.6 \pm 2.3$  個であり、粒子サイズは  $39.4 \pm 9.3$  nm に増加した。一方で、抗体 1 分子に結合した ICG の数は、 $2.6 \pm 0.2$  個であった。

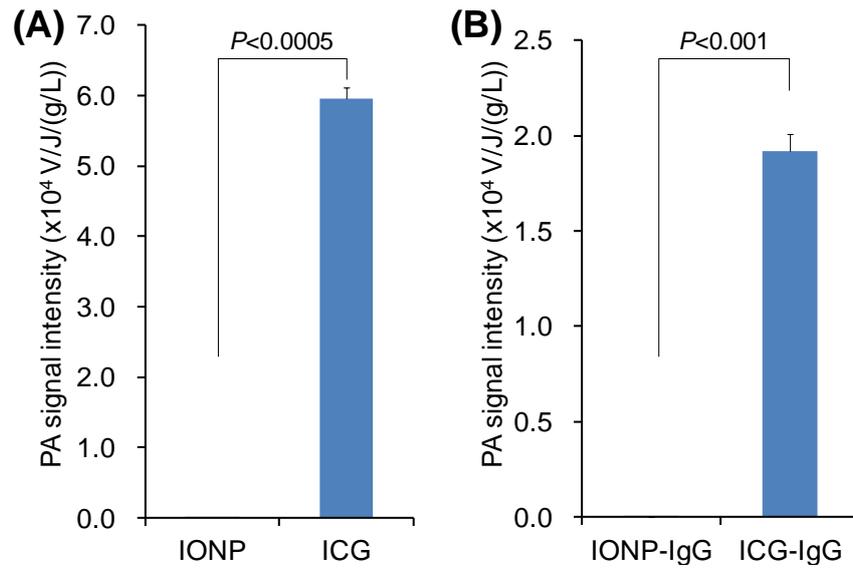
### 水溶液中での PA 信号測定

IONP および ICG を用いて水溶液中での PA 信号を測定した結果を Figure 1-1-2A に示した。得られた PA 信号を照射したレーザー強度および測定対象の PAI プローブの単位重量で規格化した結果、IONP に比較して ICG の方が有意に PA 信号が高く、その差は約 3800 倍であった。同様に、IONP-IgG および ICG-IgG を用いて水溶液中での PA 信号を測定した結果を Figure 1-1-2B に示した。IONP-IgG に比較して ICG の方が有意に PA 信号が高く、その差は単位重量あたり約 800 倍であった。

生体内に投与された PAI プローブからの信号を高感度に検出するためには、高い PA 信号が得られることが望ましい。Figure 1-1-2 で示したように IgG の結合の有無に寄らず、いずれも ICG の方が有意に高い PA 信号が得られた。この理由は次のように考察できる。IONP や金ナノロッド、カーボンナノチューブといった無機材料の粒子型の PAI プローブに比較して、ICG はモル吸光係数が小さい (ICG :  $\sim 2 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 、金ナノロッド :  $6 \times 10^6 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 、カーボンナノチューブ :  $10^9 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ )。しかしながら、粒子型の PAI プローブは分子サイズが大きいためモル吸光係数を重量で除すると、ICG が最も高い吸光係数となる (ICG :  $260 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ Da}^{-1}$ 、金ナノロッド :  $35 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ Da}^{-1}$ 、カーボンナノチューブ :  $0.029 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ Da}^{-1}$ )<sup>[33]</sup>。つまり重量を揃えた場合、粒子型の PAI プローブよりも ICG の方が吸光係数が高くなり、高い PA 信号が得られることとなる。

Figure 1-1-2 において ICG と ICG-IgG の PA 信号に約 3 倍の差がある最も大きな理由は、測定波長の違いにあると推察される。今回の実験では、ICG は 797 nm、ICG-IgG は 810 nm のレーザーによって PA 信号を測定した。ICG は 790 nm 付近に吸収極大を有しているため、810 nm よりも 797 nm のレーザーの方が吸収されるエネルギーが多くなる。そのため ICG-IgG よりも ICG の方が高い PA 信号が得られたと考えられる。

以上より ICG が PAI プローブの光吸収体として有効である可能性が示された。



**Figure 1-1-2.** Comparative analysis of PA signals. (A) IONP and ICG, and (B) IONP-IgG and ICG-IgG.

### 1.3 小括

本章において、IONP または ICG を用いた PAI プローブを設計・合成し、PAI プローブとして 2 種類の異なる光吸収体の PA 信号強度を比較検討し、以下に述べる結果を得た。

- (1) IONP および ICG にそれぞれ抗体を結合した IONP-IgG および ICG-IgG を合成した。
- (2) 波長可変レーザーおよび超音波探触子を組み合わせることで、IONP および ICG 両者の PA 信号を測定し比較できる装置を作製した。
- (3) IONP に比較して、ICG は単位重量あたり 3800 倍 PA 信号が強かった。
- (4) IONP-IgG に比較して、ICG-IgG は単位重量あたり 800 倍 PA 信号が強かった。

以上の結果より、抗体結合の有無に寄らず ICG の方が強い PA 信号が得られることが示され、PAI プローブの光吸収体として好適な性質を有することが明らかとなった。

## 第2章

### インドシアニンググリーンを光吸収体とする光超音波イメージングプローブの開発

がんの PAI のためのイメージングプローブの光吸収体として、ICG は近赤外領域での高い光吸収能と強い光超音波信号を発することを第 1 章にて見出した。PAI によってがんを画像化するためには、この ICG を効率良くがんへ送達させる必要がある。しかしながら健康人での ICG 単体の体内動態として、血中半減時間が短いこと ( $T_{1/2}=4$  分)<sup>[33]</sup>、胆管系から排泄されることが知られている<sup>[34]</sup>。そのため、ICG を効率良くがんへ送達させるドラッグデリバリーシステム (DDS) キャリアを作製することが重要となる。

イメージングプローブをがんへ多く送達させる方法の一つとして、Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果による DDS を挙げることが出来る。EPR 効果は次のようなメカニズムが提唱されている。すなわち、腫瘍近傍では新生血管形成が不完全であり、血管壁が疎な状態であることに加えて、リンパ組織も欠如あるいは未発達であるため組織中の異物を排除できないことが報告されている。このような腫瘍血管では、低分子量の物質は、血管から漏出しても再度血管へ戻るため集積しないが、高分子量の物質は血管から漏出すると、拡散速度が小さいため血管へ戻ることなく集積する<sup>[35, 36]</sup>。ところで、癌細胞に特異的に高発現する細胞表面受容体のような腫瘍マーカーを標的とした DDS では、腫瘍マーカーの発現量が多くなければ、PAI 装置検出感度を下回る可能性がある。一方で EPR 効果による DDS では、投与量の調整によって、より多くのイメージングプローブを送達可能であると考えて、本研究では、PAI によるがんイメージングに必要な ICG を EPR 効果によって送達するキャリアについて探索研究を行った。

## 第1節

### ヒト血清アルブミンを母体とした光超音波イメージングプローブの開発

ヒト血清アルブミン (HSA) は、パクリタキセルと HSA とが粒子状態で結合したアブラキサン®に代表されるように DDS キャリアとして注目されている血中蛋白質である<sup>[11, 37]</sup>。HSA は、低分子化合物の薬剤と複合体を形成し、EPR 効果によって腫瘍集積することが報告されている<sup>[35, 36]</sup>。また、HSA は一日あたり最大約 2 g/kg まで投与可能な医薬品として FDA で認可されており、急性毒性や長期毒性は低いことから<sup>[38-40]</sup>、EPR 効果を利用した PAI のためのイメージングプローブの腫瘍集積における有効性評価のキャリアとして好適であると考えた。

以上より本節では、EPR 効果によるがんへのイメージングプローブの集積を期待して、HSA と ICG との結合体 (HSA-ICG) を作製した。HSA-ICG は、ICG のスルホン酸基をカルボキシ基へ置換した後に、活性エステル基に置換した ICG 誘導體と、HSA とを共有結合させることにより得た。HSA への ICG の結合数については、過剰量の HSA の投与は血圧の低下や免疫応答を引き起こす恐れがある<sup>[41]</sup>ことから、HSA 1 分子に多くの ICG を結合させる方が好ましい。PAI においても ICG 濃度が高い方が強い PA 信号が期待できる一方で、過剰量の ICG の結合は HSA の体内動態に影響を及ぼす恐れがある。そのため、HSA と共有結合させる ICG の数を変えて、がんの PAI のためのイメージングプローブとして最適な HSA-ICG の ICG 結合数を評価した。

また、HSA-ICG の各臓器における集積量を定量的に評価するために、本化合物を放射標識した。具体的には、放射標識に用いる核種として、Indium-111 (<sup>111</sup>In、半減時間 2.8 日) を選択し、キレート試薬 diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) を介して HSA に標識し、得られた <sup>111</sup>In-DTPA-HSA-ICG の担癌マウスでの体内動態を評価した。さらに、がんの PAI のためのイメージングプローブとしての有効性を *in vivo* および *ex vivo* イメージングによって評価した。

## 2.1.1 実験方法

### 試薬・機器

実験には、Sigma Aldrich 社、株式会社同仁化学研究所、ナカライテスク株式会社、Thermo Fisher Scientific 社から購入した特級試薬を用いた。スクシンイミジルエステル基を有する ICG である ICG-Sulfo-OSu は株式会社同仁化学研究所から購入した。粒子サイズの測定には、Marvern 社製 Zetasizer Nano ZS を使用した。吸光度の測定には、島津株式会社製 UV-Vis-NIR system UV-1800 を用いた。蛍光撮像には、Perkin Elmer 製 IVIS Imaging System 200 を用い、励起波長 745 nm、蛍光波長 840 nm、撮像時間 1 秒にて実施した。 $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$  は日本メジフィジックス株式会社より提供を受けた。放射能の測定には、PerkinElmer 製キオトウェルガンマカウンター Wallac 1470WIZARD を用いた。水溶液中の PA 信号測定には、第一章と同様の方法を用いて行った。*In vivo* PAI には、Endra 社製 Nexus128 装置を用いて、100 pulse/angle、120angle/測定、レーザー波長：797 nm、周波数：20 Hz の条件で測定を行い、画像を得た。得られた画像の解析には Osirix Software を使用した。PA 画像中の PA 信号強度はボリュームレンダリングポイントの値を照射したレーザー強度で規格化することにより算出した。

### HSA-ICG の調製

Sigma Aldrich 製 HSA (10 mg/1 mL 炭酸緩衝液 (pH 8.5)) に対して、それぞれ HSA:ICG (mol:mol) の割合が 1:1、1:7、および 1:21 となるように ICG-Sulfo-OSu (DMSO 中 10.8 mM に調製) を加えた。室温で 3 時間反応させた後、PBS を用いて Millipore 社製 Amicon ultra (分子量分画サイズ：30 kDa) によって精製した。精製後の HSA-ICG の分子量は、Life Technologies 製 Novex® Tris-Glycine 4-20% gel を用いた SDS-PAGE により分離後、Coomassie Brilliant Blue (CBB) により染色することにより確認した。精製後の HSA-ICG の共有結合した ICG の割合は、次のように算出した。まず、HSA-ICG の ICG 濃度は、5% の SDS 存在下での吸光度より算出した。次に、HSA-ICG (10 pmol ICG) と ICG-sulfo-OSu (0-40 pmol) を SDS-PAGE により分離後、蛍光画像を撮像した。蛍光画像中の既知濃度の ICG-sulfo-OSu の蛍光強度を基にして、HSA-ICG に含まれていた非共有結合の ICG の蛍光強度から濃度を算出し、共有結合した ICG の割合を算出した。一方、HSA-ICG の蛋白質濃度は Thermo Fisher Scientific 製の BCA Assay kit により算出した。共有結合した ICG 濃度と、蛋白質濃度から HSA-ICG の共有結合した ICG の割合を算出した。精製後の HSA-ICG の血漿中安定性は、HSA-ICG とマウス血漿を体積比 1:9 となるように混合し、37°C で 24 時間インキュベートした後、SDS-PAGE によって確認した。

### 水溶液中での PA 信号測定

HSA-ICG の ICG 濃度を 0-55  $\mu\text{M}$  まで種々に希釈調製し、第 1 章記載の測定方法に従い PA 信号を測定した。得られた PA 信号は、照射したレーザー強度で規格化し、さらに ICG 濃度、HSA 濃度、または 797 nm における吸光度で規格化した。

## 細胞培養

マウス大腸癌細胞 Colon26 は、理研バイオリソースセンターから購入し、培養には Life Technologies 社製 10% Fetal Bovine Serum (FBS) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いた。培地には、ペニシリン (100 U/mL) ストレプトマイシン (100 µg/mL) を混合し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下にて培養した。

## 担癌モデル動物の作製

BALB/c-nu/nu マウス (雌性、5 週齢) は日本エスエルシー株式会社より購入した。動物は 12 時間毎の昼夜サイクル条件下で飼育し、飼料、水は自由に与えた。Colon26 細胞は PBS に懸濁し (1 × 10<sup>6</sup> cells/50 µL)、BALB/c-nu/nu マウスに皮下投与し、7 日後に実験に使用した。動物実験は京都大学動物実験委員会の承認を受けて行った。

## In vivo 蛍光イメージングおよび腫瘍・血液中プローブ量測定

HSA-ICG および ICG を、ICG 濃度で 13 nmol/100 µL PBS および 104 nmol/100 µL PBS となるように調製し、Colon26 担癌マウスへ尾静脈より投与した。投与 1、6、24 時間後に IVIS Imaging System 200 を用いてマウス全身蛍光を撮像した。撮像後、腫瘍を摘出し 1% Triton-X 水溶液を加えて十分に破碎した。腫瘍破碎液は 4°C、16,000 g、5 分の条件で遠心分離し上清を回収した。HSA-ICG 未投与の腫瘍破碎液で 0.0625-4 µM となるように希釈した HSA-ICG、および回収した上清の各々 2 µL に DMSO 18 µL を加えて蛍光強度を測定した。得られた蛍光強度から腫瘍中に含まれる HSA-ICG の量を算出した。蛍光強度の腫瘍/筋肉比は画像上の対象部位に関心領域を設定し算出した蛍光強度より算出した。

## 体内放射能分布評価

HSA-ICG の放射標識は次の手順で実施した。0.1 M リン酸緩衝液 (pH8.6) に溶解させた Macrocyclics 製 2-(4-Isothiocyanatobenzyl)-DTPA (*p*-SCN-Bn-DTPA) を HSA-ICG に対して、HSA:DTPA=1:0.7-2.0 となるように混合した後、37°C で 6 時間遮光下で反応させた。0.1 M リン酸緩衝液 (pH8.6) を用いて Amicon ultra (分子量分画サイズ: 30 kDa) によって精製した後、HSA あたり 0.5 分子の DTPA が結合した HSA-ICG (DTPA-HSA-ICG) を得た。得られた DTPA-HSA-ICG と、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH6.0) に溶解させた <sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> とを混合し、室温で 15 分反応させることで放射標識された HSA-ICG を得た。放射化学的純度は、GE Healthcare 製 PD-10 カラムおよび Amicon ultra (分子量分画サイズ: 30 kDa) によって分離操作することにより決定した。

<sup>111</sup>In 標識した HSA-ICG (37 kBq、13 nmol ICG/150 µl PBS) または、HSA (37 kBq、26 nmol HSA/150 µl PBS) を Colon26 担癌マウスへ尾静脈より投与した (各時間 n=3~4)。投与 1、6、24 時間後にマウスを安楽死させ、主要な臓器および腫瘍の重さおよび放射能を測定した。データは投与量および組織重量に対する割合 (%ID/g) として算出しまとめた。

### In vivo 光超音波イメージング

HSA-ICG2.9をICG量で13、26、52、および104 nmolとなるよう調製し、Colon26 担癌マウスへ尾静脈より投与した (n=3~4)。投与前および投与 24 時間後に上述の条件で PAI を実施した。さらに、HSA-ICG0.5、HSA-ICG2.9、および HSA-ICG8.2 をそれぞれ HSA 量で 9 nmol となるよう調製し、Colon26 担癌マウスへ尾静脈より投与し、上述と同じように PAI を実施した。

### 光超音波イメージングと蛍光イメージングの比較

フレゼニウスカービジャパン株式会社製 Intralipid fluid solution 20%を用いて、既報の通りイントラリピッドゲルを調製した<sup>[42]</sup>。具体的には、終濃度 0.5%となるように TAgarose を純水に加えて 90°C で加熱し溶解させた。温度が 60°C まで低下した後、終濃度 1%となるようにイントラリピッドを加えて室温まで放熱させ凝固させた。作製したイントラリピッドゲルで覆った状態で、HSA-ICG を投与した Colon26 担癌マウスから摘出した腫瘍の PAI および FI を実施した。実際の腫瘍サイズは定規で測定し、見かけの腫瘍サイズは半値幅から算出した。

### 統計解析

データは平均値±標準偏差で表わした。有意差検定は Student's *t*-test により行い、 $p < 0.05$  を有意とした。

## 2.1.2 結果および考察

### HSA-ICG の調製

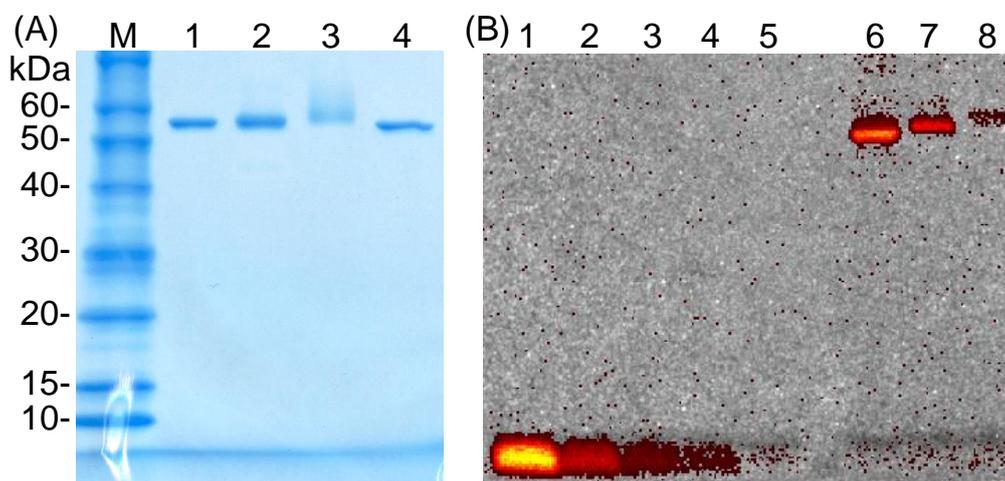
HSA に対する ICG-Sulfo-OSu の添加割合が増加するに従って、HSA に共有結合した ICG の数も増加した (Table 2-1-1)。作製した HSA-ICG を以降では、ICG 結合数 (D/P) に応じて、HSA-ICG0.5、HSA-ICG2.9、および HSA-ICG8.2 と呼ぶ。HSA-ICG の大きさは、ICG 結合数の増加に伴って増加した (HSA:  $6.0 \pm 1.2$  nm、HSA-ICG0.5:  $7.7 \pm 0.7$  nm、HSA-ICG2.9:  $8.7 \pm 1.7$  nm、HSA-ICG 8.2:  $10.4 \pm 1.3$  nm)。SDS-PAGE による分析の結果、HSA-ICG は ICG の結合に伴うわずかな分子量の増加を示したが、HSA 同士の凝集は生じなかった (Figure 2-1-1A)。一方、SDS-PAGE の蛍光観察の結果、いずれの HSA-ICG も 90% 程度の高い純度であった (Figure 2-1-1B)。マウス血清中での安定性を *in vitro* で評価した結果、いずれも 90% 程度は未変化体のまま存在しており安定であることが示唆された。

**Table 2-1-1.** Properties of HSA-ICG.

	Mixed rate of ICG-Sulfo-OSu to HSA	D/P <sup>§</sup>	Purity <sup>¶</sup> (%)
HSA-ICG0.5	1	0.5	89
HSA-ICG2.9	7	2.9	93
HSA-ICG8.2	21	8.2	89

<sup>§</sup>D/P = (ICG concentration covalently bound to HSA) / (HSA concentration).

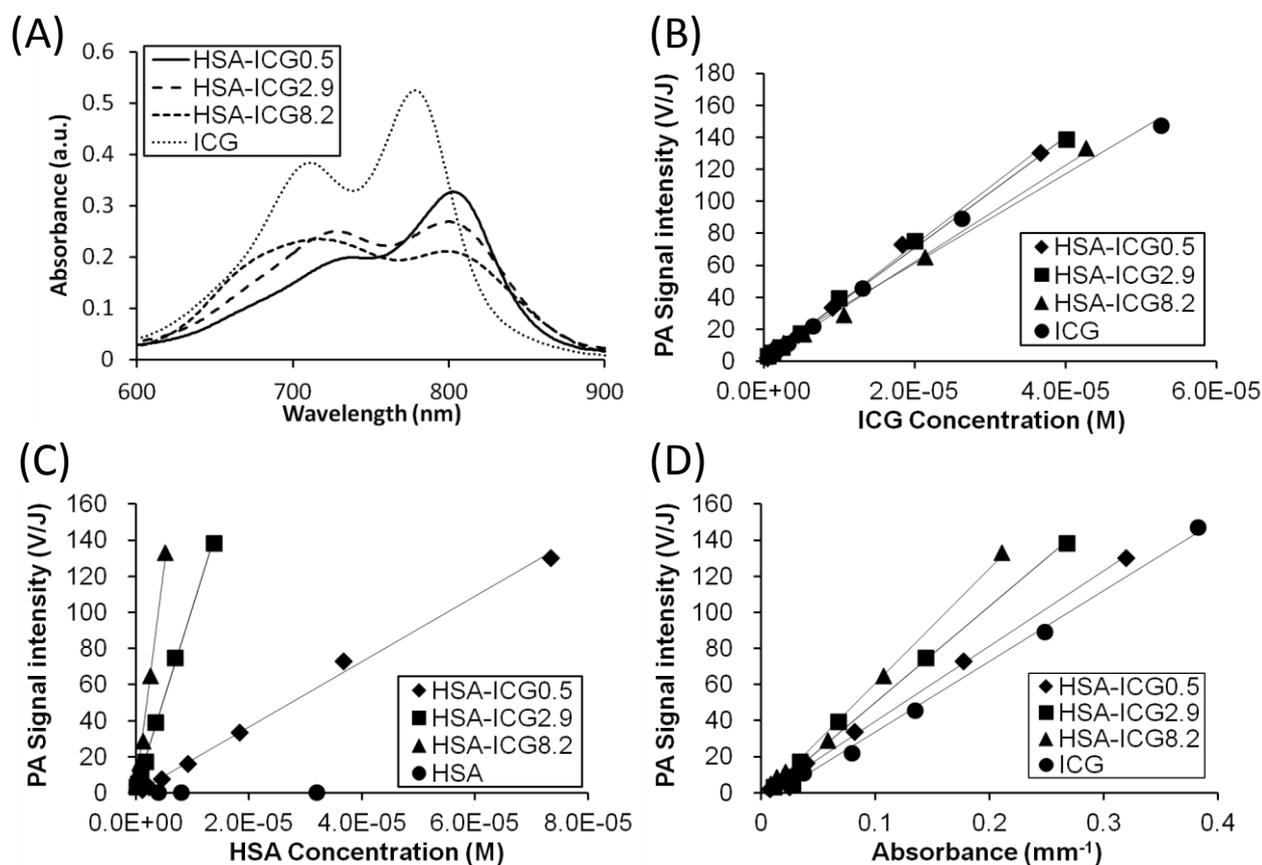
<sup>¶</sup>Purity = (Number of ICG covalently bound to HSA) / (Total ICG)



**Figure 2-1-1.** Electrophoretic analysis of HSA-ICG. (A) The gel stained by CBB to detect HSA. Lane M, molecular-weight marker; 1, HSA-ICG0.5; 2, HSA-ICG2.9; 3, HSA-ICG8.2; 4, HSA. (B) Fluorescence images of ICG-Sulfo-OSu and HSA-ICG after electrophoresis. 1, ICG-Sulfo-OSu 40 pmol; 2, ICG-Sulfo-OSu 20 pmol; 3, ICG-Sulfo-OSu 10 pmol; 4, ICG-Sulfo-OSu 5 pmol; 5, ICG-Sulfo-OSu 2.5 pmol; 6, HSA-ICG0.5; 7, HSA-ICG2.9; 8, HSA-ICG8.2.

## HSA-ICG の *in vitro* PA 信号評価

ICG および HSA-ICG の PA 信号発信能について評価した結果を Figure 2-1-2 にまとめた。ICG は HSA に結合した際に、30~40 nm 程度赤方偏移した近赤外吸収を示した (Figure 2-1-2A)。いずれの HSA-ICG も、ICG の H 会合体形成に伴う青方偏移由来の吸収スペクトルを示し、この傾向は ICG 結合数が多い方が顕著であった。HSA-ICG の PA 信号は、ICG 単独の場合と同じように ICG 濃度に応じて直線的に増加した (Figure 2-1-2B)。HSA あたりの PA 信号は、ICG 結合数に従って、HSA-ICG8.2 > HSA-ICG2.9 > HSA-ICG0.5 > HSA の順に大きくなった (Figure 2-1-2C)。相対 PA 信号強度は、HSA-ICG0.5 を 1 とすると、HSA-ICG2.9 は 5.6、HSA-ICG8.2 は 13.7 となった。さらに、797 nm における ICG および HSA-ICG の吸光度に対する PA 信号強度を求めた結果、HSA-ICG8.2 は吸光度が低くとも強い PA 信号が得られた。このことから、PA 信号強度は、色素の吸収量によってのみ決まるのではなく、HSA に結合した ICG 濃度も寄与していることが示された。

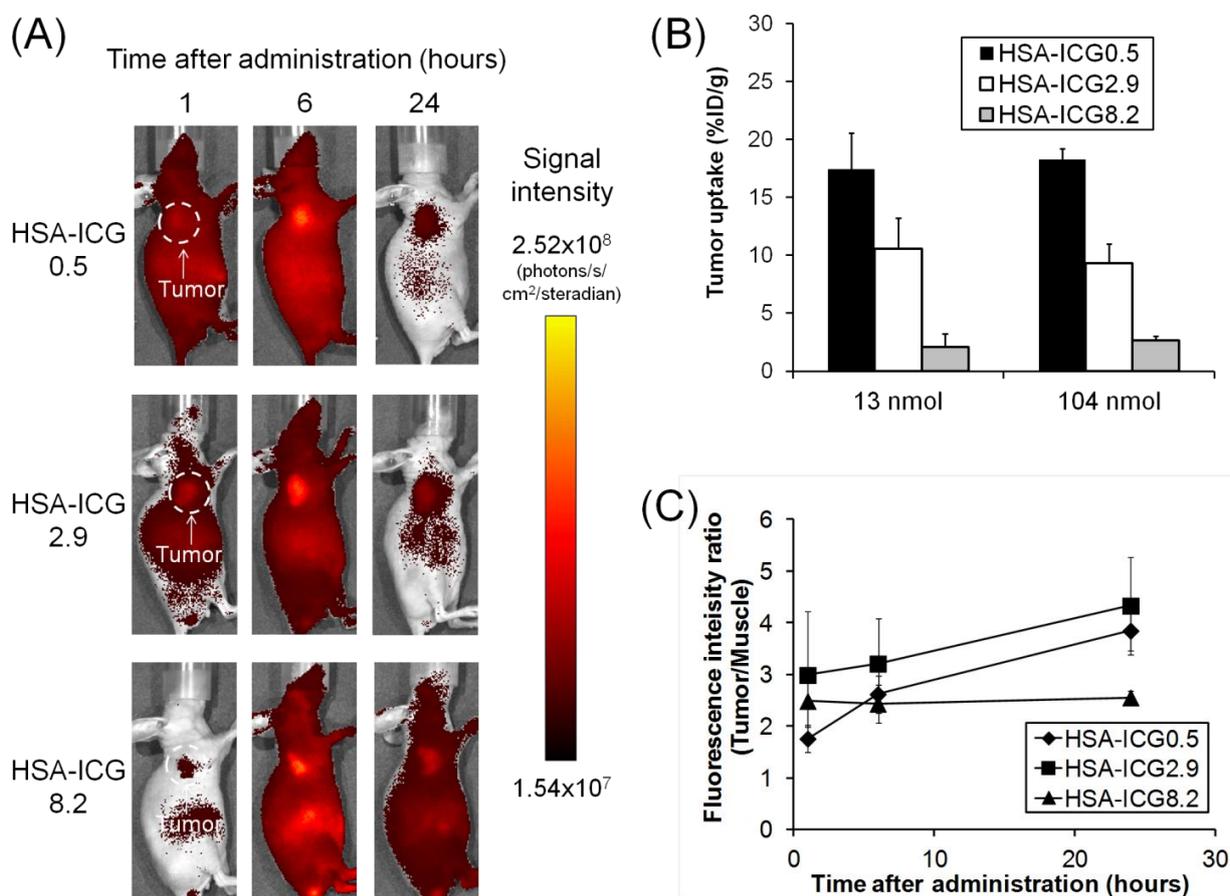


**Figure 2-1-2.** Absorption spectra and PA signals of HSA-ICG. (A) NIR absorption spectra of ICG and HSA-ICG. The ICG concentration of each sample was approximately 4  $\mu\text{M}$ . (B), (C), (D) PA signal plotted against ICG concentration, HSA concentration, and absorbance value, respectively.

### 蛍光測定による HSA-ICG の腫瘍集積評価

腫瘍集積性を評価するため、HSA-ICG を Colon26 担癌マウスへ投与し、1、6、24 時間後に全身蛍光像を撮像した (Figure 2-1-3A)。いずれの HSA-ICG でも投与 6、24 時間後に腫瘍が描出され、腫瘍部分の蛍光強度は同程度であった (HSA-ICG0.5 :  $1.0 \times 10^8$ 、HSA-ICG2.9 :  $1.2 \times 10^8$ 、HSA-ICG8.2 :  $1.5 \times 10^8$  photons/s/cm<sup>2</sup>/steradian)。

一方で、摘出した腫瘍破砕液の蛍光強度から算出した投与 24 時間後の腫瘍集積量は、HSA への ICG 結合数の増加に伴い減少した (Figure 2-1-3B、HSA-ICG0.5 : 17.4、HSA-ICG2.9 : 10.6、HSA-ICG8.2 : 2.1% ID/g)。比較対照として、HSA に共有結合していない ICG の腫瘍集積は、投与 1、3、24 時間後にそれぞれ、 $0.12 \pm 0.02$ 、 $0.06 \pm 0.01$ 、 $0.02 \pm 0.004$ % ID/g であった。また、HSA-ICG の投与量を増加した場合でも、投与 24 時間後の腫瘍集積量は変化しなかった (Figure 2-1-3B)。in vivo 画像中の蛍光強度の腫瘍/筋肉比は、HSA-ICG0.5 および HSA-ICG2.9 の場合は経時的に徐々に増加したのに対し、HSA-ICG8.2 は 24 時間後までほぼ一定であった (Figure 2-1-3C)。



**Figure 2-1-3.** In vivo fluorescence imaging of tumor-bearing mice injected with HSA-ICG. (A) The whole-body near-infrared fluorescence images of mice were acquired at 1, 6, and 24 hours after intravenous injection of probes. (B) Tumor accumulation of HSA-ICGs (13 and 104 nmol ICG) at 24 hours. (C) Time course of fluorescence intensity ratios (Tumor/Muscle) calculated based on whole-body near-infrared fluorescence images of mice.

## 放射標識 HSA-ICG の体内分布評価

Colon26 担癌マウスにおける、<sup>111</sup>In で標識した HSA-ICG (ICG/HSA=0、0.5、2.9、8.2 の 4 種類) の 1、6、24 時間後の体内分布を評価した (Table 2-1-2)。投与 24 時間後の腫瘍集積量はそれぞれ、16.8 (<sup>111</sup>In-DTPA-HSA)、15.9 (<sup>111</sup>In-DTPA-HSA-ICG0.5)、9.5 (<sup>111</sup>In-DTPA-HSA-ICG2.9)、2.9 (<sup>111</sup>In-DTPA-HSA-ICG8.2) % ID/g となり、蛍光測定による HSA-ICG の腫瘍集積評価の結果と一致した (Figure 2-1-3)。HSA に結合した ICG の数が増加するに従い、肝臓への集積が増加し、血液および腎臓への集積は低下した。これは分子サイズおよび電荷の影響であると考えられる。腫瘍/血液比および腫瘍/筋肉比はいずれも経時的に増加した。その中でも <sup>111</sup>In-DTPA-HSA-ICG8.2 は、素早い血中クリアランスに起因する最も高い腫瘍/血液比を示した。しかしながら、腫瘍集積量が低いこと、および、腫瘍/正常組織比 (肝臓、腎臓、筋肉等) が最も低いことから PAI の腫瘍造影には不相当であると考えられた。一方、<sup>111</sup>In-DTPA-HSA-ICG0.5 と <sup>111</sup>In-DTPA-HSA-ICG2.9 の腫瘍/血液比には有意差はみられなかった。<sup>111</sup>In で標識した HSA-ICG のうち、HSA-ICG0.5 が最も高い腫瘍集積を示した (15.9%ID/g、Table 2-1-2) が、HSA に結合している ICG 数が他と比較して少ないため、PAI のためにより多くの HSA 量を投与する必要がある。実際に、HSA あたりの相対 PA 信号強度 (Figure 2-1-2C) と腫瘍集積量の積は、それぞれ 15.9 (HSA-ICG0.5)、53.0 (HSA-ICG2.9)、39.3 (HSA-ICG8.2) となった。従って、HSA 量を揃えて投与した場合、HSA-ICG2.9 は投与 24 時間後に腫瘍から最も強い PA 信号が得られる計算となるため、以降ではこれについて詳細な *in vivo* PAI を行った。

**Table 2-1-2.** Biodistribution results for <sup>111</sup>In-DTPA-HSA-ICG or <sup>111</sup>In-DTPA-HSA in colon26 tumor bearing mouse. Results are expressed as means (% ID/g) ± SD (n = 3-4).

Organ	HSA-ICG0.5		
	1 hours	6 hours	24 hours
<b>Blood</b>	31.37 ± 4.7	19.58 ± 1.41	8.51 ± 1.67
<b>Heart</b>	4.91 ± 1.54	4.41 ± 0.68	3.65 ± 0.65
<b>Lungs</b>	7.12 ± 1.19	6.05 ± 0.82	3.77 ± 0.57
<b>Liver</b>	8.38 ± 1.23	10.29 ± 0.66	8.86 ± 0.61
<b>Kidneys</b>	17.26 ± 1.12	18.78 ± 2.22	13.90 ± 1.06
<b>Stomach</b>	1.24 ± 0.22	1.55 ± 0.27	1.40 ± 0.04
<b>Intestine</b>	2.08 ± 0.24	2.66 ± 0.48	1.96 ± 0.12
<b>Pancreas</b>	1.54 ± 0.29	1.75 ± 0.34	2.07 ± 0.35
<b>Spleen</b>	5.42 ± 0.72	6.16 ± 0.41	8.57 ± 1.34
<b>Muscle</b>	1.00 ± 0.09	1.39 ± 0.21	1.53 ± 0.2
<b>Tumor</b>	3.84 ± 0.53	10.59 ± 0.91	15.88 ± 2.84
<b>Tumor/Blood ratio</b>	0.12 ± 0.00	0.54 ± 0.08	1.88 ± 0.15
<b>Tumor/Muscle ratio</b>	3.87 ± 0.59	7.67 ± 0.65	10.35 ± 1.17

<b>Organ</b>	<b>HSA-ICG2.9</b>		
	<b>1 hours</b>	<b>6 hours</b>	<b>24 hours</b>
<b>Blood</b>	29.22 ± 3.38	15.81 ± 2.58	4.45 ± 0.78
<b>Heart</b>	5.52 ± 0.97	4.47 ± 0.65	3.40 ± 0.35
<b>Lungs</b>	7.20 ± 1.55	4.94 ± 0.4	2.99 ± 0.4
<b>Liver</b>	14.84 ± 1.79	24.84 ± 1.09	22.65 ± 5.21
<b>Kidneys</b>	9.16 ± 0.77	6.73 ± 0.3	4.76 ± 0.43
<b>Stomach</b>	1.29 ± 0.19	1.48 ± 0.31	0.85 ± 0.53
<b>Intestine</b>	1.86 ± 0.24	2.59 ± 0.25	2.14 ± 0.9
<b>Pancreas</b>	1.37 ± 0.19	1.33 ± 0.08	1.32 ± 0.09
<b>Spleen</b>	6.78 ± 0.62	8.63 ± 0.78	9.46 ± 0.97
<b>Muscle</b>	0.88 ± 0.2	0.96 ± 0.27	0.91 ± 0.09
<b>Tumor</b>	4.20 ± 0.14	8.15 ± 0.47	9.52 ± 1.58
<b>Tumor/Blood ratio</b>	0.14 ± 0.01	0.53 ± 0.09	2.15 ± 0.17
<b>Tumor/Muscle ratio</b>	4.95 ± 1.09	8.93 ± 2.07	10.63 ± 2.45

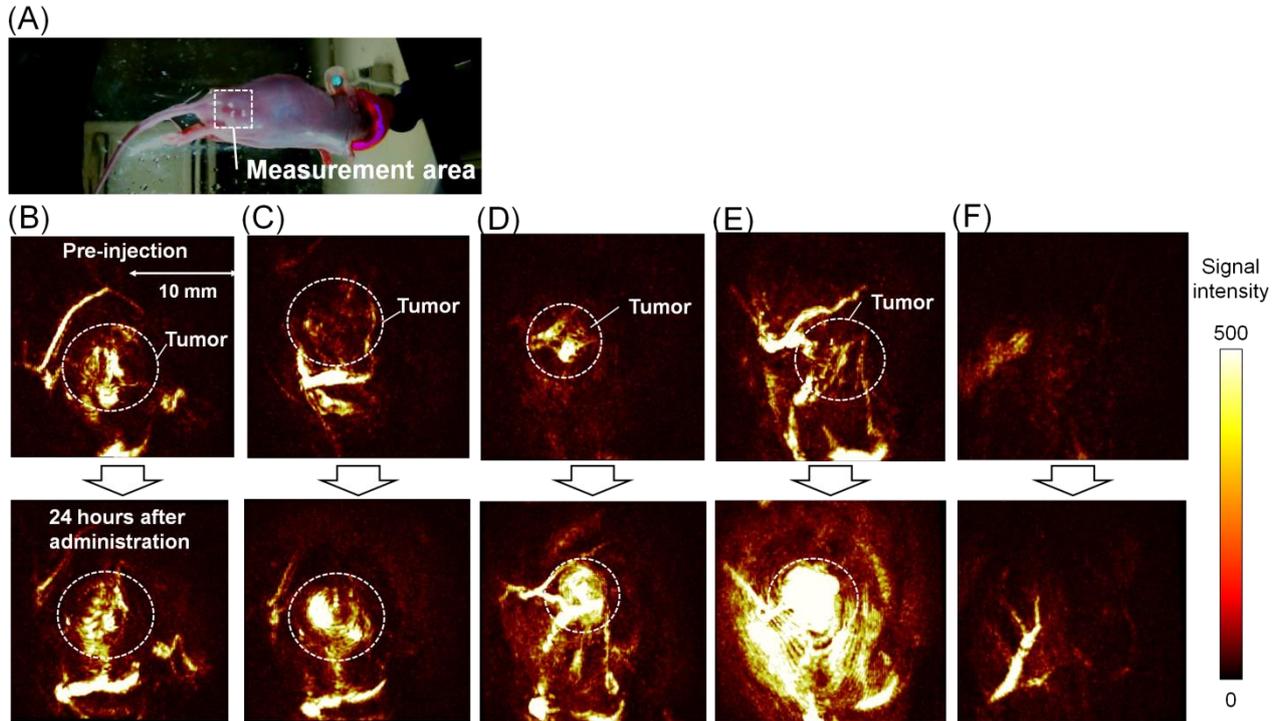
<b>Organ</b>	<b>HSA-ICG8.2</b>		
	<b>1 hours</b>	<b>6 hours</b>	<b>24 hours</b>
<b>Blood</b>	7.62 ± 1.46	2.10 ± 0.04	0.39 ± 0.05
<b>Heart</b>	3.07 ± 0.65	2.09 ± 0.16	1.44 ± 0.1
<b>Lungs</b>	3.25 ± 0.58	1.68 ± 0.06	1.07 ± 0.14
<b>Liver</b>	52.33 ± 8.48	63.57 ± 1.39	49.86 ± 3.83
<b>Kidneys</b>	5.50 ± 1.34	3.72 ± 0.03	3.48 ± 0.34
<b>Stomach</b>	0.79 ± 0.33	0.56 ± 0.14	0.48 ± 0.12
<b>Intestine</b>	1.24 ± 0.37	1.43 ± 0.16	1.07 ± 0.12
<b>Pancreas</b>	0.47 ± 0.05	0.43 ± 0.01	0.49 ± 0.11
<b>Spleen</b>	15.42 ± 3.24	15.03 ± 0.89	12.56 ± 1.31
<b>Muscle</b>	0.51 ± 0.02	0.54 ± 0.28	0.55 ± 0.29
<b>Tumor</b>	2.37 ± 0.63	3.47 ± 0.64	2.87 ± 0.62
<b>Tumor/Blood ratio</b>	0.31 ± 0.04	1.65 ± 0.28	7.41 ± 2.21
<b>Tumor/Muscle ratio</b>	4.65 ± 1.04	8.32 ± 5.55	6.48 ± 3.25

Organ	HSA		
	1 hours	6 hours	24 hours
<b>Blood</b>	32.63 ± 3.89	18.99 ± 2.26	8.40 ± 0.11
<b>Heart</b>	4.81 ± 0.33	4.15 ± 0.67	3.44 ± 0.28
<b>Lungs</b>	7.39 ± 0.24	6.27 ± 1.32	4.13 ± 0.07
<b>Liver</b>	10.74 ± 0.71	11.64 ± 1.89	10.42 ± 0.95
<b>Kidneys</b>	27.24 ± 3.09	27.00 ± 3.62	21.82 ± 0.67
<b>Stomach</b>	1.24 ± 0.59	1.65 ± 0.62	1.02 ± 0.25
<b>Intestine</b>	1.95 ± 0.25	2.71 ± 0.49	1.85 ± 0.11
<b>Pancreas</b>	1.44 ± 0.17	1.67 ± 0.27	1.83 ± 0.14
<b>Spleen</b>	5.35 ± 0.42	6.76 ± 0.97	8.04 ± 0.23
<b>Muscle</b>	0.91 ± 0.15	1.24 ± 0.11	1.17 ± 0.04
<b>Tumor</b>	4.47 ± 1.19	9.44 ± 1.86	16.79 ± 1.42
<b>Tumor/Blood ratio</b>	0.14 ± 0.02	0.50 ± 0.11	2.00 ± 0.18
<b>Tumor/Muscle ratio</b>	5.00 ± 1.48	7.62 ± 1.4	14.43 ± 1.67

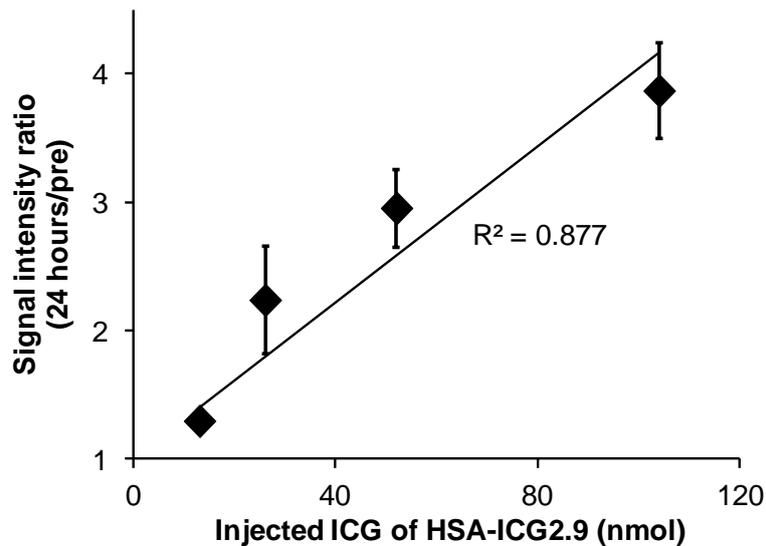
### In vivo 光超音波イメージング

Colon26 担癌マウスを用いて Figure 2-1-4 (A) に示すように PAI を実施した。HSA-ICG2.9 投与 24 時間後のマウスの腫瘍は投与量 26 nmol 以上において明瞭に描出された (Figure 2-1-4 (C) (D) (E)) 一方で、非腫瘍部ではわずかな PA 信号の増加が確認されたのみであった (Figure 2-1-4 (F))。In vivo PA 画像から求めた腫瘍/筋肉比は、投与量の少ない方から順に 6.0±2.4、10.2±2.8、7.4±2.2、8.9±0.7 となり、放射標識した HSA-ICG2.9 の体内分布評価 (Table 2-1-2) とよく一致した。腫瘍部分の PA 信号強度は、ICG の投与量の増加に従って増加した (Figure 2-1-5)。増加量はそれぞれ、30±8 (13 nmol)、124±42 (26 nmol)、196±30 (52 nmol)、287±37 (104 nmol) %であった。さらに、HSA 量を基準に投与量を揃えた場合 (HSA として 9 nmol 投与)、腫瘍部分の PA 信号強度の増加は、それぞれ 41±28 (HSA-ICG0.5)、124±42 (HSA-ICG2.9)、60±5 (HSA-ICG8.2) %であった。このことから、HSA-ICG2.9 が最も感度良く腫瘍を描出できることが確認できた。さらに in vivo PA 画像から算出した投与 24 時間後の腫瘍/筋肉比は、14.4±5.4 (HSA-ICG0.5)、10.2±2.8 (HSA-ICG2.9)、14.2±1.9 (HSA-ICG8.2) となりいずれの場合でも有意差は見られなかった。

これまでに他の研究グループが報告した PAI プローブとしては、金属ナノ粒子やカーボンナノチューブなどがある<sup>[43]</sup>。例えば RGD ペプチド結合単層カーボンナノチューブを用いた研究では、腫瘍へ 14%ID/g 集積し PA 信号増加 (100%増加) することが報告されている<sup>[16, 44]</sup>。さらに、標的化分子を結合した金ナノケージも腫瘍部で 40%の PA 信号増加する報告がある<sup>[45]</sup>。一方で、我々の HSA-ICG2.9 は、腫瘍集積量 9.5%ID/g、PA 信号増加最大 380%を達成し、既報の PAI プローブと同等またはそれ以上の性能を示した。さらに、金属ナノ粒子やカーボンナノチューブには安全性や生体適合性に課題が残されている<sup>[20, 21]</sup>が、ICG および HSA は共に生体内投与が認められており安全性が高いメリットも有する。



**Figure 2-1-4.** *In vivo* PA tumor imaging with HSA-ICG2.9 in colon26 tumor-bearing mice. (A) Mouse placement in bowl. The square drawn by the dashed line was the measurement region. (B)-(F) PA images constructed with a volumetric rendering were acquired before (top) and 24 hours after (bottom) tail-vein injection of 100  $\mu$ L of HSA-ICG. ICG amount of injected HSA-ICG was 13 nmol (B), 26 nmol (C), 52 nmol (D), and 104 nmol (E). The circles drawn by the dashed line were the tumor regions. Panels (F) are non-tumor regions (leg).

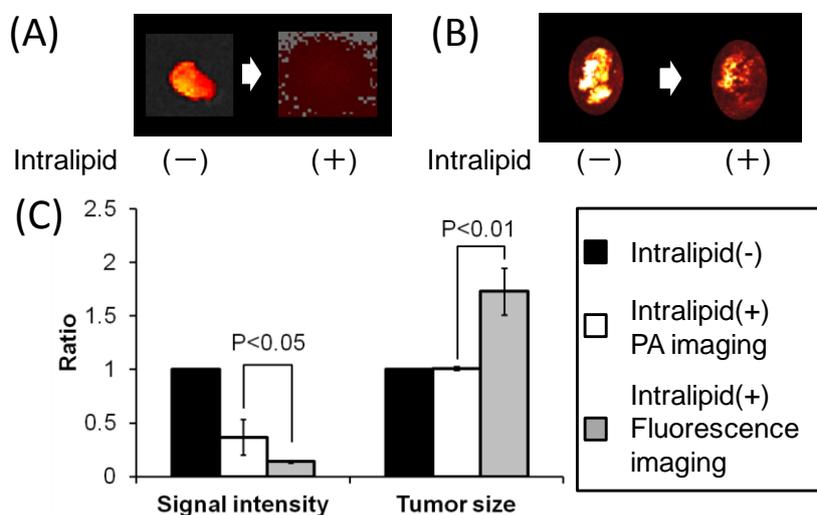


**Figure 2-1-5.** The PA signal intensity ratios (24 h post-injection/pre-injection) are plotted relative to the injected dose of HSA-ICG2.9. Error bars represent the standard error of measurement for the population of mice.

## 光超音波イメージングと蛍光イメージングの比較

次に、生体内部にある HSA-ICG が集積した腫瘍を想定して、PAI と FI を比較した。生体の拡散媒体として、1 cm の 1% イントラリピッドゲルを使用した。イントラリピッドゲル無しの場合、摘出した腫瘍の実寸サイズ ( $0.77 \pm 0.14$  cm) は、どちらのモダリティによる測定でもほぼ同じサイズであった ( $0.78 \pm 0.15$  mm (PAI)、 $0.77 \pm 0.13$  mm (FI))。FI において、イントラリピッドゲルを使用した場合、摘出した腫瘍からの信号強度は 86% 減少し、みかけの腫瘍サイズは 1.7 倍増加した (Figure. 2-1-6 (A)、(C))。一方で、PAI において、信号強度は 63% 減少したものの、みかけの腫瘍サイズはほとんど変わらなかった (Figure. 2-1-6 (B)、(C))。PAI と FI を比較すると、PAI の方が有意に高い信号強度 ( $P < 0.05$ )、および、腫瘍サイズ ( $P < 0.01$ ) が維持されていた (Figure. 2-1-6 (C))。以上より、超音波を検出する特徴を有する PAI は、FI に比較して高い解像度で腫瘍を検出できる可能性が示された。

FI は、簡便で高感度な非侵襲的イメージング方法である。しかしながら、ICG の蛍光は、蛋白質に結合した場合、hetero-fluorescence resonance energy transfer (FRET) によって消光されることが知られている<sup>[25, 46, 47]</sup>。さらに、ICG の蛍光強度は周囲の環境 (濃度や表面からの距離) によっても変化する可能性があり、例えば本研究においても HSA への ICG の結合数が増加するに従って蛍光強度は低下した (Figure 2-1-1 (B))。一方で、PAI は Figure 2-1-4 および Figure 2-1-5 に示されるように FI よりも定量性に優れていることが分かった。



**Figure 2-1-6.** Fluorescent and PA imaging of the excised tumor injected with HSA-ICG2.9. Fluorescence images (A) and PA images (B) of the tumor (left; without intralipid, right; with intralipid). (C) The change ratios of signal intensity and tumor size in the PA imaging (white) and fluorescence imaging (gray) with/without intralipid.

### 2.1.3 小括

本節では、HSA-ICG を作製し、担癌マウスを用いた蛍光測定による腫瘍集積評価および、放射標識した HSA-ICG を用いた体内動態評価を行った。さらに、がんの PAI のためのイメージングプローブとしての有効性を *in vivo* および *ex vivo* イメージングによって評価し、以下に述べる結果を得た。

- (1) 3 種類の ICG 結合数の異なる HSA-ICG (HSA-ICG0.5、HSA-ICG2.9、HSA-ICG8.2) ならびに、それぞれの HSA-ICG を <sup>111</sup>In 標識したイメージングプローブを設計・合成した。
- (2) HSA1 分子あたりへの ICG 結合数が増加するに従い、溶液中の PA 信号が増加した。
- (3) ICG 結合数が増加するに従い、投与 24 時間後の血中濃度および腫瘍集積量は減少した。
- (4) 最も好適な性質を有する HSA-ICG2.9 を投与した *in vivo* PAI では腫瘍を明瞭に描出し、腫瘍部からは投与量依存的に PA 信号が増加した。
- (5) *ex vivo* イメージングでは、FI に比較して PAI が、高い解像度で感度良く腫瘍を検出できる可能性を示した。

以上の結果より、HSA-ICG は EPR 効果によって腫瘍へ集積しがんの PAI を可能にすることが示された。

## 第2節

### ポリエチレングリコールを母体とした光超音波イメージングプローブの開発

前節で EPR 効果を利用することの有効性が示されたことから、さらに有効ながん PAI プローブの開発を計画した。すなわち、HSA と同じ水溶性高分子でありながら、化学合成が可能で、生体適合性が高いという特長を有するポリエチレングリコール (PEG) について、その ICG キャリアとして可能性を検討した。

PEG によってナノサイズ粒子の表面を覆い粒子の親水性を向上させることで、リポソームやナノミセルなどのナノサイズ粒子の体内動態を改善し、生体内での安定性を付与できることが知られている<sup>[48, 49]</sup>。さらに粒子以外にも生理活性蛋白質と PEG とを共有結合させることで体内動態を最適化した臨床医薬品も上市されている<sup>[12, 13]</sup>。このように PEG が広く用いられるのは、次に挙げる特長を有するためであると考えられる。すなわち、①水への高い溶解性、②低い毒性と高い生体適合性<sup>[13]</sup>、③ポリマー末端に様々な官能基導入可能である修飾簡便性、④広範囲の分子量を利用できる利便性<sup>[50]</sup>である。このような性質を持つ PEG であるが、それ自身を DDS キャリアとして利用したがんイメージングの有効性、および、EPR 効果を利用したイメージングにおける最適な構造についてはまだ報告されていない。

そのため本節では、PEG と ICG との結合体 (PEG-ICG) を作製し、担癌マウスを用いて蛍光測定による腫瘍集積を調べて ICG キャリアとしての有効性を評価した。すなわち、EPR 効果による腫瘍集積における最適な分子量を調べるために、分子量 5、10、20、および 40 kDa の PEG (以降、分子量に応じて PEG5、PEG10、PEG20、および、PEG40 と呼ぶ) を選択し、ICG はスルホン酸基をカルボキシ基へ置換した後に活性エステル基に置換した ICG 誘導体を用いて、各分子量の PEG と共有結合させた (作製した PEG-ICG を分子量に応じて PEG5-ICG、PEG10-ICG、PEG20-ICG、PEG40-ICG と呼ぶ)。また、作製した PEG-ICG (20 kDa) の詳細な体内動態評価においては、前節と同様に DTPA をキレート試薬として結合させ <sup>111</sup>In により放射標識した (<sup>111</sup>In-DTPA-PEG-ICG)。さらに、これらの PEG-ICG について、がんの PAI のためのイメージングプローブとしての有効性を *in vivo* イメージングによって評価した。

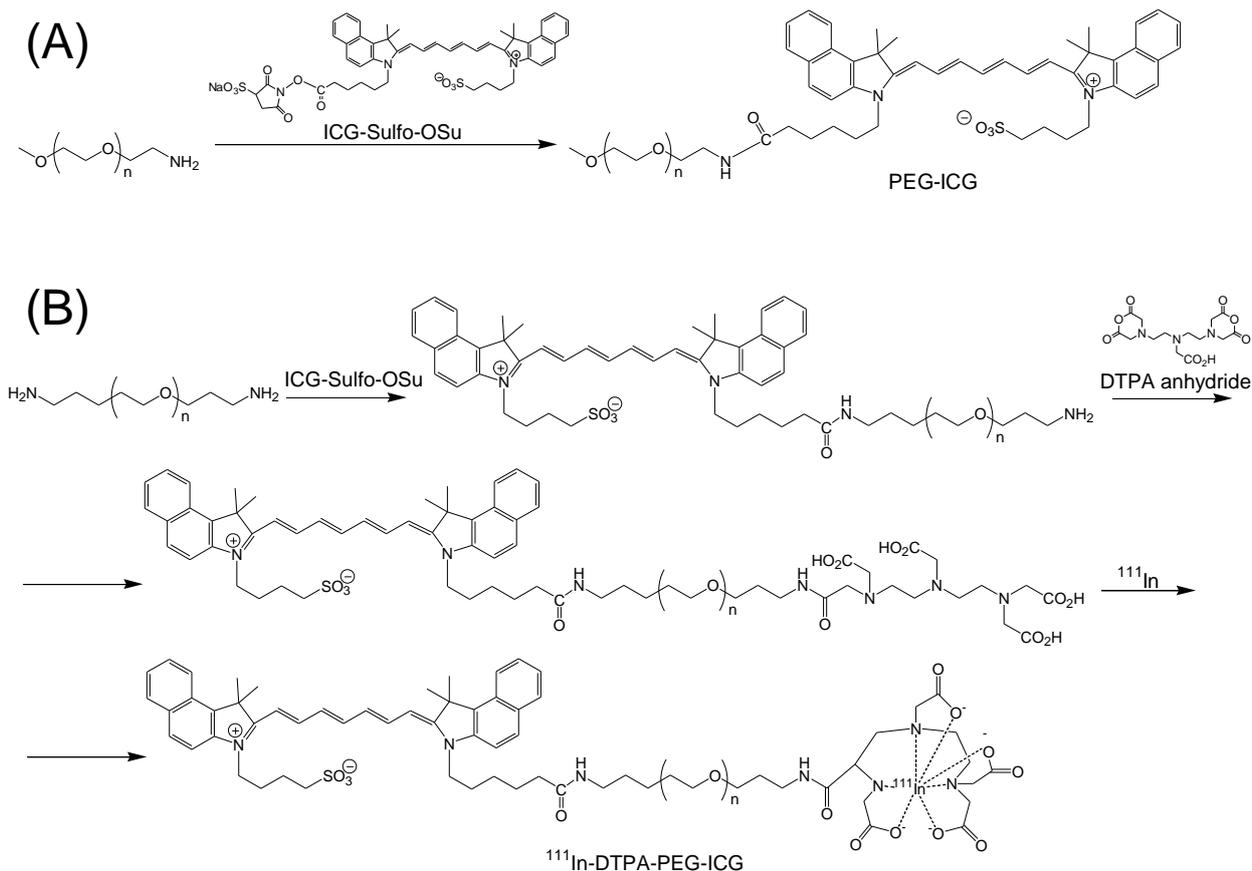
## 2.2.1 実験方法

### 試薬・機器

実験には、Macrocyclics 社、株式会社同仁化学研究所、ナカライテスク株式会社、和光純薬工業株式会社から購入した特級試薬を用いた。 $\alpha$ -aminoethyl- $\omega$ -methoxy poly(oxyethylene) (monoamino PEG, SUNBRIGHT ME-EA series, molecular weight: 5, 10, 20, and 40 kDa)、および、 $\alpha$ -aminopropyl- $\omega$ -aminopropyl poly(oxyethylene) (diamino PEG, SUNBRIGHT DE-PA series, molecular weight: 20 kDa)は、日油株式会社から購入した。ICG-Sulfo-OSu は株式会社同仁化学研究所から購入した。粒子サイズの測定には、Marvern 社製 Zetasizer Nano ZS を使用した。吸光度の測定には、株式会社島津製作所製 UV-1800 UV-Vis NIR システムおよび Tecan Japan 社製 Infinite® 200 PRO plate reader を使用した。イオン交換クロマトグラフィーには、GE healthcare 社製 AKTA purifier 10 システムを使用した。SDS-PAGE 後のゲルのオートラジオグラフィー撮像は、富士フイルム株式会社製 BAS-5000 を使用した。水溶液中の PA 信号測定は、第一章に記載した通りの方法で行った。*In vivo* PAI 測定は、第 2 章第一節に記載した通りの方法で行った。

### PEG-ICG の調製

PEG-ICG は Figure 2-2-1.A に記載の反応スキームに従って合成した。具体的には、各 monoamino PEG (0.54  $\mu$ mol/ 1 mL chloroform) と ICG-sulfo-OSu (1.08  $\mu$ mol/ 100  $\mu$ L dimethyl sulfoxide (DMSO)) とを混合し、遮光下で室温にて反応させた。24 時間後に溶媒を留去した後、反応物を 2 mL のメタノールに溶解させ、Spectrum Laboratories 社製再生セルロース透析膜 Spectra/Por® 7 (MWCO: 3.5 kDa) に封入し、メタノールを透析外液として用いて未反応の ICG を除去するため透析精製した。PEG は既報の方法に従い定量した<sup>[51, 52]</sup>。具体的には、96 穴プレートに既知濃度の PEG 水溶液 (1–20  $\mu$ g/mL, 200  $\mu$ L) および定量対象の PEG-ICG 溶液 (200  $\mu$ L)、および、5%塩化バリウム-1M 塩酸水溶液 (100  $\mu$ L)、および、1.66% ヨウ化カリウム-1.27% ヨウ素水溶液 (5  $\mu$ L) を加えて 5 分静置した後、535 nm の吸光度を測定した。既知濃度の PEG 水溶液の吸光度を基にキャリブレーション曲線を作成し、定量対象の PEG 溶液の濃度を計算した。PEG と結合した ICG の数は、終濃度 5% SDS 水溶液となるように PEG-ICG 水溶液を希釈し、795 nm の吸光度を測定することで計算した。作製した PEG-ICG の純度は SDS-PAGE により未結合の ICG と PEG-ICG を分離した後、IVIS imaging System 200 を用いて蛍光強度を測定した。既知濃度の ICG を用いたキャリブレーション曲線に基づく蛍光強度から PEG-ICG の純度を算出した。続いて、電気泳動後のゲルを 100 mL の純水に入れ、5%塩化バリウム-1M 塩酸水溶液 (50 mL)、および、1.66% ヨウ化カリウム-1.27% ヨウ素水溶液 (2.5 mL) を加えて 5-10 分静置することで PEG を染色した。



### 細胞培養および担癌モデル動物の作製

第2章第1節記載の方法に従い、細胞培養および担癌モデル動物を作製した。

### *In vivo* 蛍光イメージングおよび腫瘍・血液中プローブ量測定

PEG-ICG および ICG を、ICG 濃度で 13 nmol/100  $\mu\text{L}$  PBS となるように調製し、Colon26 担癌マウスへ尾静脈より投与した。投与 3、6、24、48、72、168 時間後に IVIS Imaging System 200 を用いてマウス全身蛍光を撮像した。撮像後、腫瘍を摘出し第2章第一節記載の方法と同様に腫瘍中に含まれる PEG-ICG および ICG の量を算出した。前述の *in vivo* FI と平行して、血中に含まれる PEG-ICG および ICG の量を算出するために、投与 5、15、30 分、1、3、6、24、48、72、168 時間後に採血 (2  $\mu\text{L}$ ) し、1% triton-X 水溶液 (9  $\mu\text{L}$ ) および DMSO (9  $\mu\text{L}$ ) と混合し蛍光強度を測定した。既知濃度の PEG-ICG および ICG の 1% triton-X 水溶液 (9  $\mu\text{L}$ ) および未処置マウス血液 (2  $\mu\text{L}$ ) および DMSO (9  $\mu\text{L}$ ) の混合溶液の蛍光強度から、キャリブレーション曲線を作成し、血中に含まれる PEG-ICG および ICG の量を算出した。

## <sup>111</sup>In 標識 PEG-ICG の調製

<sup>111</sup>In 標識 PEG-ICG は Figure 2-2-1.B に記載の反応スキームに従って合成した。具体的には、分子量 20 kDa の diamino PEG (1.08 μmol in 1 mL chloroform) と ICG-Sulfo-OSu (1.08 μmol/100 μL DMSO) とを混合し、遮光下で室温にて反応させた。24 時間後に溶媒を留去した後、反応物を 2 mL のメタノールに溶解させ、Spectrum Laboratories 社製再生セルロース透析膜 Spectra/Por® 7 (MWCO: 3.5 kDa) に封入し、メタノールを透析外液として用いて未反応の ICG を除去するため透析精製した。溶媒留去した後、MES 緩衝液 (20 mM、pH4.0) を添加して ICG 結合 diamino PEG を溶解させ、GE healthcare 社製 Resource® S 1 ml カラムを用いた陽イオン交換クロマトグラフィーにより未反応の PEG を除去精製した。溶出溶媒としては、MES 緩衝液 (20 mM、pH4.0) 流速 4 mL/min を用いて、塩化ナトリウムによる濃度勾配 (0-16 分:0-1 M) によって ICG 結合 diamino PEG を溶出させた。Amicon Ultra centrifugal unit (MWCO: 10 kDa) を用いて溶媒をホウ酸緩衝液 (50 mM、pH 8.5) に置換した後、DTPA:PEG=10:1 となるように、DTPA anhydride と ICG 結合 diamino PEG を混合し遮光下 37°C で 24 時間反応させた。Amicon Ultra centrifugal unit (MWCO: 10 kDa) を用いた限外濾過によって、反応溶液から未結合の DTPA を除去精製した。溶媒を Tris-HCl 緩衝液 (20 mM、pH9.0) に置換した後、GE healthcare 社製 Resource® Q 1 ml カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより、DTPA が結合していない ICG 結合 diamino PEG を除去精製した。溶出溶媒としては、Tris-HCl 緩衝液 (20 mM、pH9.0) 流速 4 mL/min を用いて、塩化ナトリウムによる濃度勾配 (0-16 分:0-1 M) によって DTPA と ICG が結合した PEG (DTPA-PEG-ICG) を溶出させた。DTPA-PEG-ICG の溶出は、前述の PEG 定量法および 795 nm の吸光度測定法により確認した。

得られた DTPA-PEG-ICG と、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH6.0) に溶解させた <sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> とを混合し、室温で 30 分反応させることで放射標識された DTPA-PEG-ICG (<sup>111</sup>In-DTPA-PEG-ICG) を得た。放射化学的純度は、SDS-PAGE により未結合の <sup>111</sup>In と <sup>111</sup>In-DTPA-PEG-ICG を分離した後、BAS-5000 を用いてオートラジオグラフィー撮像し Multi Gauge V3.0 ソフトウェアにより定量した。

## 体内放射能分布評価

<sup>111</sup>In-DTPA-PEG-ICG (37 kBq、13 nmol ICG/150 μl PBS) を Colon26 担癌マウスへ尾静脈より投与した (各時間 n=3~4)。投与 1、3、6、24、48、72 時間後にマウスを安楽死させ、主要な臓器および腫瘍の重さおよび放射能を測定した。糞および尿は投与 24 時間後までの総量を回収し放射能を測定した。各臓器の放射能は、投与量および組織重量に対する割合 (%ID/g) として、糞および尿の放射能は投与量に対する割合 (%ID) として算出しまとめた。

## 水溶液中での PA 信号測定

各 PEG-ICG および ICG の ICG 濃度を 30 μM に調製し、第 1 章記載の測定方法に従い PA 信号を測定した。

### In vivo 光超音波イメージング

PEG20-ICG を ICG 量で 13、26、52、および 104 nmol となるよう調製し、Colon26 担癌マウスへ尾静脈より投与した (n=3)。投与前および投与 24 時間後に上述の条件で PAI を実施し、第 1 節に記載の方法により解析した。

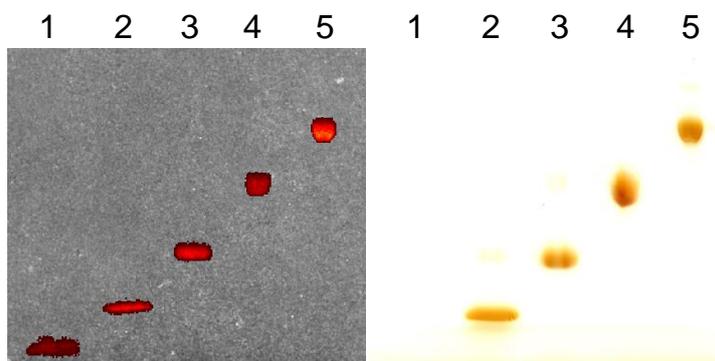
### 統計解析

データは平均値±標準偏差で表わした。有意差検定は Student's *t*-test により行い、 $p < 0.05$  を有意とした。

## 2.2.2 結果および考察

### PEG-ICG の調製

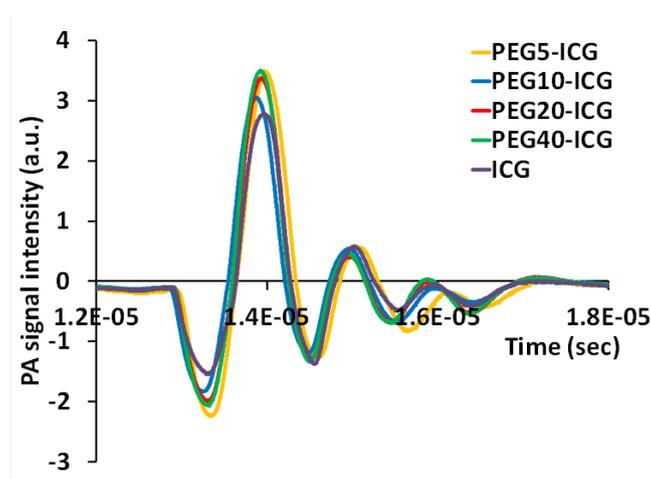
monoamino PEG の流体力学的半径は、PEG5:  $4.4 \pm 0.03$ 、PEG10:  $6.3 \pm 0.05$ 、PEG20:  $9.3 \pm 0.04$ 、PEG40:  $13.6 \pm 0.2$  nm であった。各 PEG-ICG の PEG1 分子あたりの ICG 結合数は約 1 であった (PEG5-ICG:  $1.03 \pm 0.01$ 、PEG10-ICG:  $0.93 \pm 0.02$ 、PEG20-ICG:  $0.99 \pm 0.02$ 、PEG40-ICG:  $1.03 \pm 0.01$ )。さらに各 PEG-ICG に共有結合した ICG の割合を SDS-PAGE により求めた結果、PEG5-ICG:  $98.3 \pm 0.2\%$ 、PEG10-ICG:  $99.0 \pm 0.4\%$ 、PEG20-ICG:  $99.4 \pm 0.1\%$ 、PEG40-ICG:  $99.4 \pm 0.1\%$  となり、いずれも高純度であることを確認した (Figure 2-2-2.)。



**Figure 2-2-2.** Electrophoretic analysis of PEG-ICG. Fluorescent images of PEG-ICG after electrophoresis (left panel) and after iodine staining to detect PEG (right panel). Lane content: 1, ICG-sulfo-OSu; 2, PEG5-ICG; 3, PEG10-ICG; 4, PEG20-ICG; 5, PEG40-ICG.

### 水溶液中での PA 信号測定

各 PEG-ICG の PA 信号発信能を *in vitro* にて比較した (Figure 2-2-3)。ICG 濃度を揃えて測定し、比較した結果、いずれの PEG-ICG も ICG と同程度の PA 信号強度を示した。



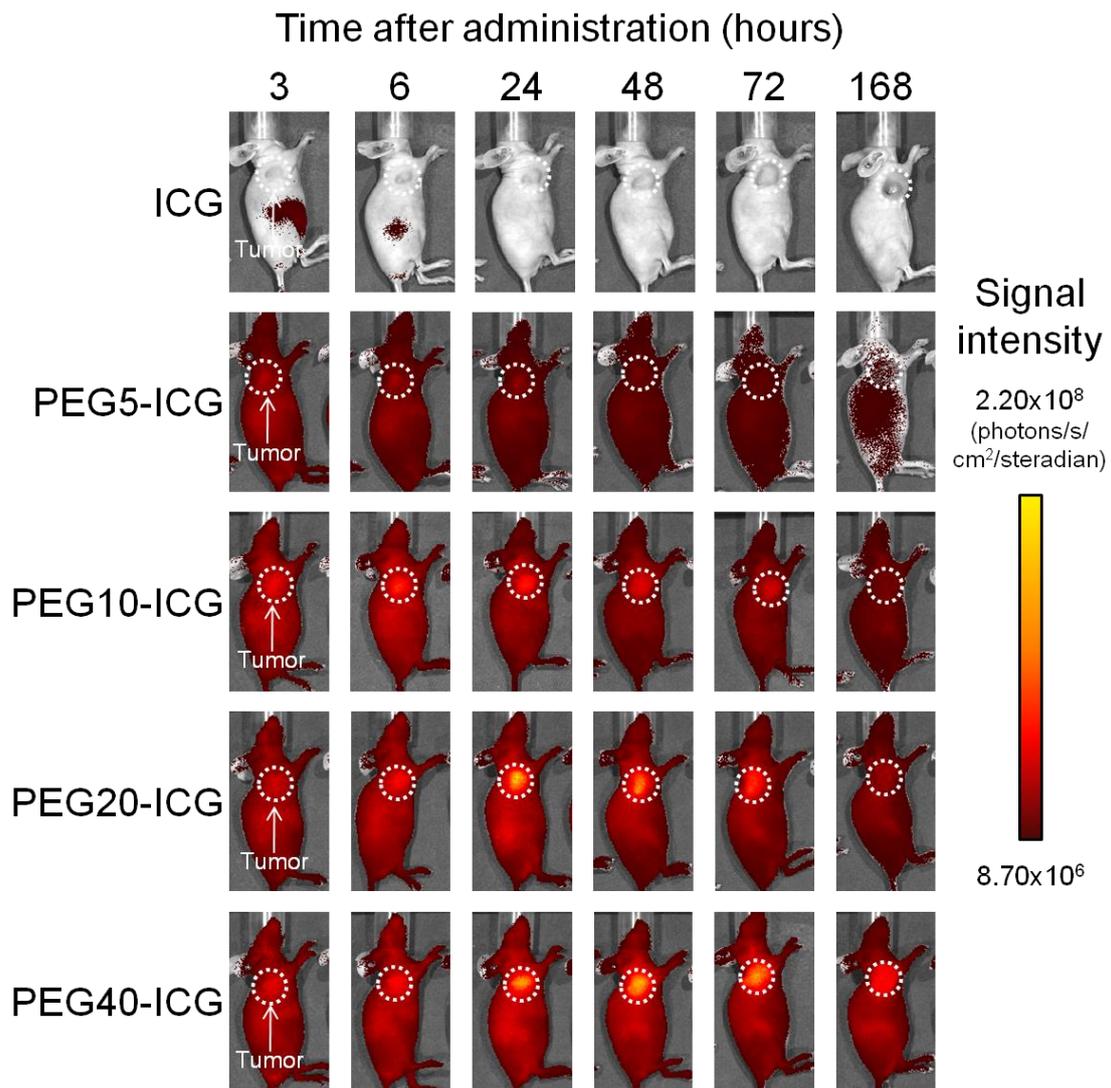
**Figure 2-2-3.** PA signal intensity of PEG-ICG and ICG. Yellow: PEG5-ICG, blue: PEG10-ICG, red: PEG20-ICG, green: PEG40-ICG, purple: ICG.

### In vivo 蛍光イメージングおよび腫瘍蛍光測定

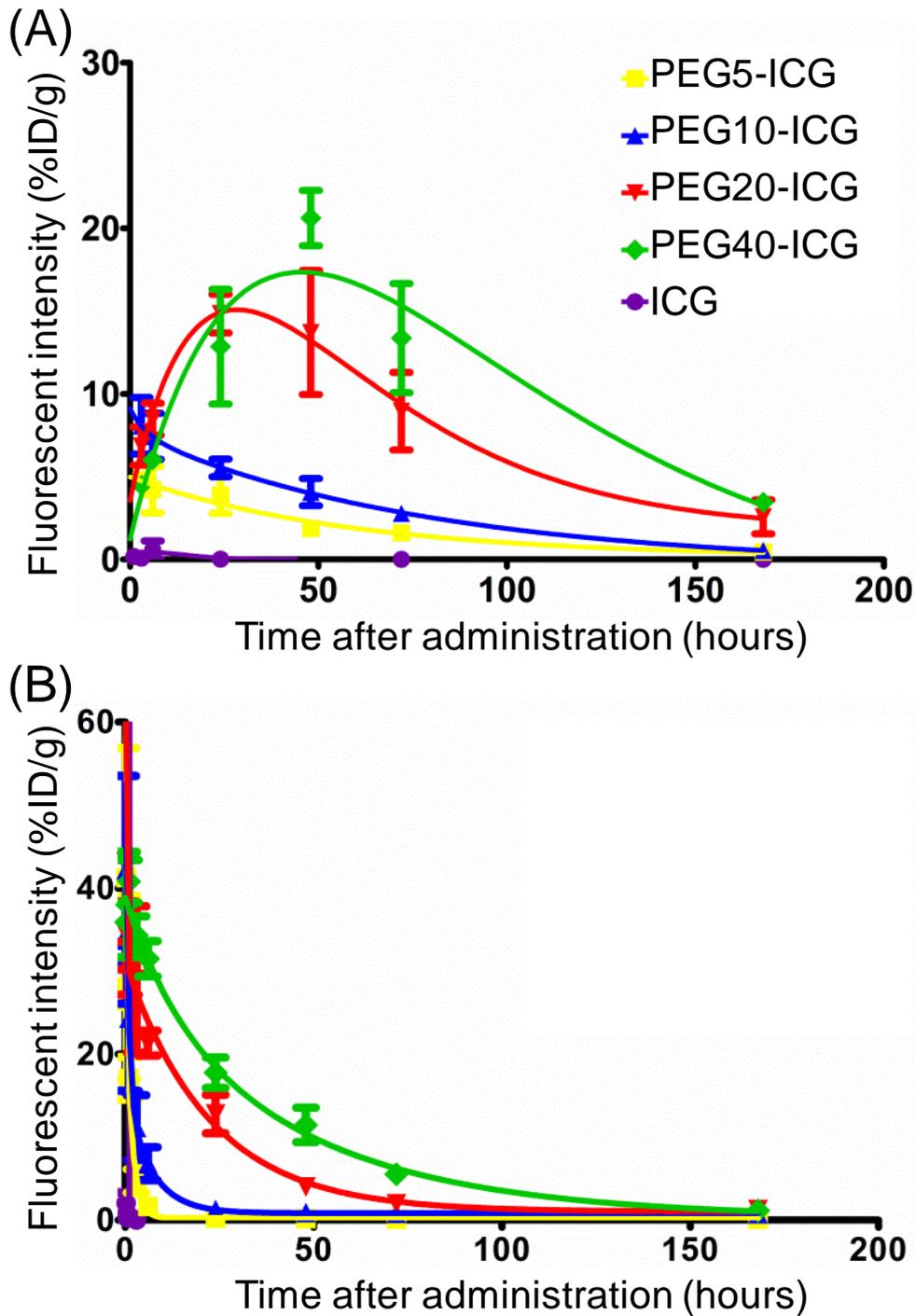
PEG-ICG および ICG を投与したマウスの全身蛍光画像を経時的に撮像し、Figure 2-2-4 にまとめた。PEG10-ICG、PEG20-ICG、および、PEG40-ICG は投与 24 時間後以降において、周囲に比較して腫瘍部（右肩）の蛍光強度の上昇が確認された。また、腫瘍部の蛍光強度は PEG 分子量の増加に伴い強くなり、かつ、投与後長時間経過した後も強い蛍光が維持されていた。続いて、PEG-ICG および ICG の腫瘍集積量および血中濃度を ICG の蛍光強度を基に算出した（Figure 2-2-5）。その結果、PEG20-ICG および PEG40-ICG は、PEG5-ICG、PEG10-ICG、および ICG に比較して高い腫瘍集積性（Figure 2-2-5A）および長い血中半減時間（Figure 2-2-5B）を示した。すなわち、血中半減時間はそれぞれ、ICG : 0.098 時間、PEG5-ICG : 0.57 時間、PEG10-ICG : 1.24 時間、PEG20-ICG : 9.5 時間、PEG40-ICG : 22.5 時間となった。また、PEG20-ICG は、投与 24 時間後に  $14.9 \pm 1.2$  %ID/g、PEG40-ICG は、投与 48 時間後に、 $20.6 \pm 1.7$  %ID/g と最も高い腫瘍集積量を示した。

PEG の分子量増加に伴う腫瘍集積量の増加は次の要因が寄与していることが考えられる。つまり、血中半減時間が延長することによって EPR 効果によって血中から腫瘍へ移行するプローブの量が増加することである。この PEG の分子量と血中半減時間の関係は、ヨウ素-125 ( $^{125}\text{I}$ ) 標識 PEG で報告されている結果と概ね一致した<sup>[53]</sup>。PEG-ICG の血中半減時間は PEG5-ICG および PEG10-ICG に比較して大幅に延長した。これは、PEG の水和半径が原因であると考えられる。一般的に PEG は、同じ分子量の蛋白質よりも大きな水和半径であることが知られている<sup>[54]</sup>。Fee と Van Alstine によって報告されている計算式<sup>[55]</sup>に基づき PEG の水和半径を計算すると、それぞれ、PEG5 : 4.5 nm、PEG10 : 6.6 nm、PEG20 : 9.7 nm、PEG40 : 14.3 nm となる。この値は実際に DLS で測定した値と良く一致した。一般的に 6~8 nm のサイズの蛋白質やナノ粒子は、腎臓の糸球体ろ過によって素早く尿クリアランスされることが知られている<sup>[56, 57]</sup>。PEG5 および PEG10 は、この孔サイズより小さいため血中から比較的早くクリアランスされ腫瘍へあまり集積しなかったと考えられる（Figure 2-2-6）。一方で、PEG20 および PEG40 はろ過の孔サイズより大きい、経時的に血中からクリアランスされた。このことは、球状の分子と異なり直鎖状の水溶性のポリマーは snake-like な動き<sup>[58]</sup>によって孔を徐々に透過した結果であると考えられる。

PEG5-ICG および PEG10-ICG の腫瘍集積量は、PAI の感度を下回る一方、PEG20-ICG および PEG40-ICG は十分な腫瘍集積量を示した。腫瘍/血液比は、PEG20-ICG :  $1.2 \pm 0.1$ 、PEG40-ICG :  $0.7 \pm 0.1$  となり、PEG20-ICG の方が高いコントラストが得られると考えて、分子量 20 kDa の PEG を放射標識した  $^{111}\text{In}$ -DTPA-PEG-ICG を用いた体内放射能分布評価を行った。



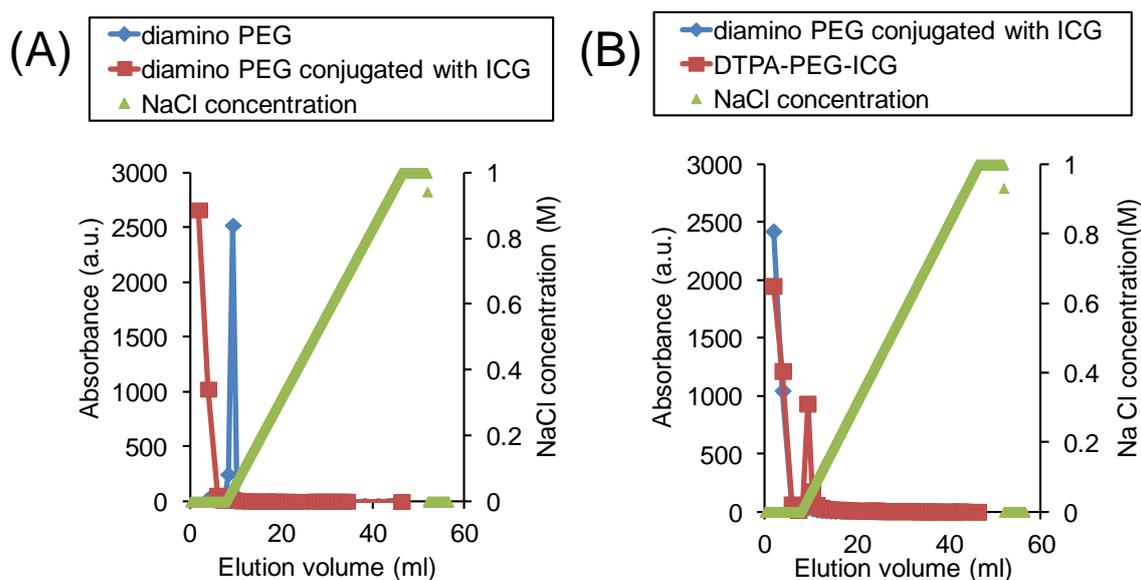
**Figure 2-2-4.** *In vivo* Fluorescence images of colon26 tumor-bearing mice at 3, 6, 24, 48, 72, and 168 hours after administration with ICG or PEG-ICG. White dash lines indicate tumors.



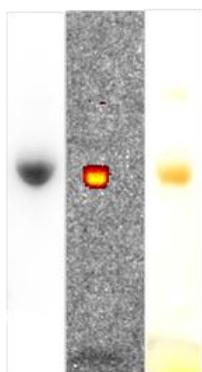
**Figure 2-2-5.** Measurement of the *in vivo* fluorescence of colon26 tumor-bearing mice injected with PEG-ICG and ICG alone. The graph presents the time course for the accumulation of PEG-ICG or ICG (%ID/g) in the tumor (A) and blood (B). Yellow: PEG5-ICG, blue: PEG10-ICG, red: PEG20-ICG, green: PEG40-ICG, purple: ICG.

## $^{111}\text{In}$ 標識 PEG-ICG の調製

DTPA-PEG-ICG 調製時のイオン交換クロマトグラムを Figure 2-2-6 に示した。陽イオン交換クロマトグラフィーでは、ICG 結合 diamino PEG はカラムに結合することなく溶出された一方で、diamino PEG はカラムに捕捉された (Figure 2-2-6A)。次に実施した陰イオン交換クロマトグラフィーでは、DTPA-PEG-ICG はカラムに捕捉された一方で、ICG 結合 diamino PEG はカラムに結合することなく溶出された (Figure 2-2-6B)。DTPA-PEG-ICG を含む溶出画分 (溶出体積 10 mL 付近、(Figure 2-2-6B)) を回収し  $^{111}\text{In}$  放射標識を行った結果、 $95.2 \pm 1.5\%$  の放射化学的純度で  $^{111}\text{In}$ -DTPA-PEG-ICG を得た (Figure 2-2-7)。



**Figure 2-2-6.** Ion exchange chromatography with DTPA-PEG-ICG. (A) Cation exchange chromatography with diamino PEG (blue) and diamino PEG conjugated with ICG (red). (B) Anion exchange chromatography with diamino PEG conjugated with ICG (blue) and DTPA-PEG-ICG (red).



**Figure 2-2-7.** Electrophoretic analysis of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-PEG-ICG. Autoradiographic images (left panel) and fluorescence images (center panel) and iodine staining to detect PEG (right panel) of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-PEG-ICG after electrophoresis.

### 体内放射能分布評価

$^{111}\text{In}$ -DTPA-PEG-ICG 投与 1、3、6、24、48、72 時間後における colon26 担癌マウスの体内分布を Table 2-2-1 にまとめた。 $^{111}\text{In}$ -DTPA-PEG-ICG の腫瘍集積量は、投与 24 時間後に最大となり ( $11.1 \pm 0.5 \% \text{ID/g}$ )、蛍光測定で求めた PEG20-ICG の腫瘍集積量と概ね一致した ( $14.9 \pm 1.2 \% \text{ID/g}$ 、Figure 2-2-6)。投与 24 時間後の  $^{111}\text{In}$ -DTPA-PEG-ICG の血中濃度も、蛍光測定で求めた PEG20-ICG と概ね一致した ( $^{111}\text{In}$ -DTPA-PEG-ICG :  $9.0 \pm 0.5 \% \text{ID/g}$ 、PEG20-ICG :  $12.8 \pm 2.3 \% \text{ID/g}$ )。正常組織としては、肝臓や腎臓にわずかに集積が見られたがマウスの体重、行動などに大きな変化は見られなかった。また、排泄物の放射能を調べた結果、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-PEG-ICG は主に尿中に排泄された ( $24.6 \% \text{ID}$ ) ことを確認した。この結果は、PEG のサイズと腎臓にてろ過を受ける糸球体の孔サイズとの関係を支持していると考えられる。

**Table 2-2-1**

*In vivo* biodistribution of <sup>111</sup>In-DTPA-PEG-ICG in colon26 tumor-bearing mice.<sup>§</sup>

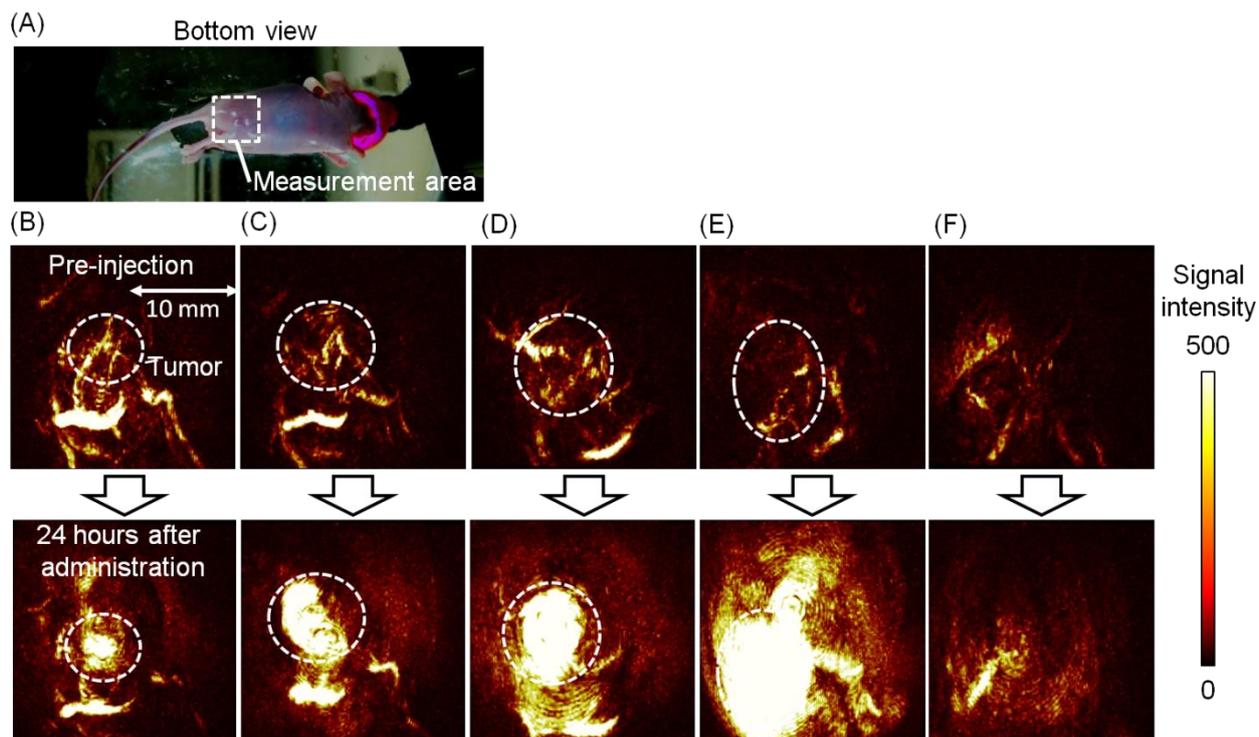
Organs (%ID/g) and excreta (%ID)	<sup>111</sup> In-DTPA-PEG-ICG						
	1 hours	3 hours	6 hours	24 hours	48 hours	72 hours	
Blood	35.6 ± 4.7	28.2 ± 2.0	21.9 ± 2.5	9.0 ± 0.5	5.4 ± 0.4	1.6 ± 0.4	
Heart	4.9 ± 0.6	4.3 ± 1.1	3.4 ± 0.3	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.2	1.7 ± 0.2	
Lungs	7.7 ± 1.6	7.6 ± 1.5	5.0 ± 0.5	3.1 ± 0.3	2.7 ± 0.3	1.8 ± 0.2	
Liver	8.3 ± 0.9	8.7 ± 0.1	8.2 ± 0.7	8.7 ± 0.4	8.1 ± 0.7	8.5 ± 0.4	
Kidneys	10.3 ± 0.4	9.0 ± 0.8	8.2 ± 0.3	7.1 ± 0.6	5.8 ± 0.5	4.1 ± 0.5	
Stomach	1.3 ± 0.2	1.9 ± 0.1	0.9 ± 0.3	1.1 ± 0.6	1.8 ± 0.4	0.9 ± 0.2	
Intestine	2.4 ± 0.2	2.2 ± 0.3	1.6 ± 0.2	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1	
Pancreas	3.9 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.3 ± 0.3	2.3 ± 0.3	2.0 ± 0.2	
Spleen	4.4 ± 0.1	4.9 ± 0.9	3.8 ± 0.4	4.6 ± 0.6	5.2 ± 0.5	4.5 ± 0.4	
Muscle	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.0	1.4 ± 0.4	
Skin	2.1 ± 0.3	2.3 ± 0.3	2.9 ± 0.5	4.1 ± 0.5	5.4 ± 0.7	5.1 ± 0.2	
Tumor	2.9 ± 0.2	5.5 ± 1.5	5.1 ± 0.1	11.1 ± 0.5	10.2 ± 3.0	7.2 ± 0.6	
<b>Tumor/blood ratio</b>	<b>0.1 ± 0.0</b>	<b>0.2 ± 0.0</b>	<b>0.2 ± 0.0</b>	<b>1.2 ± 0.1</b>	<b>1.9 ± 0.7</b>	<b>4.7 ± 0.6</b>	
Feces				3.5 ± 2.2			
Urine				24.6 ± 3.2			

<sup>§</sup> Results are expressed as mean ± SD %ID/g (n=3–4).

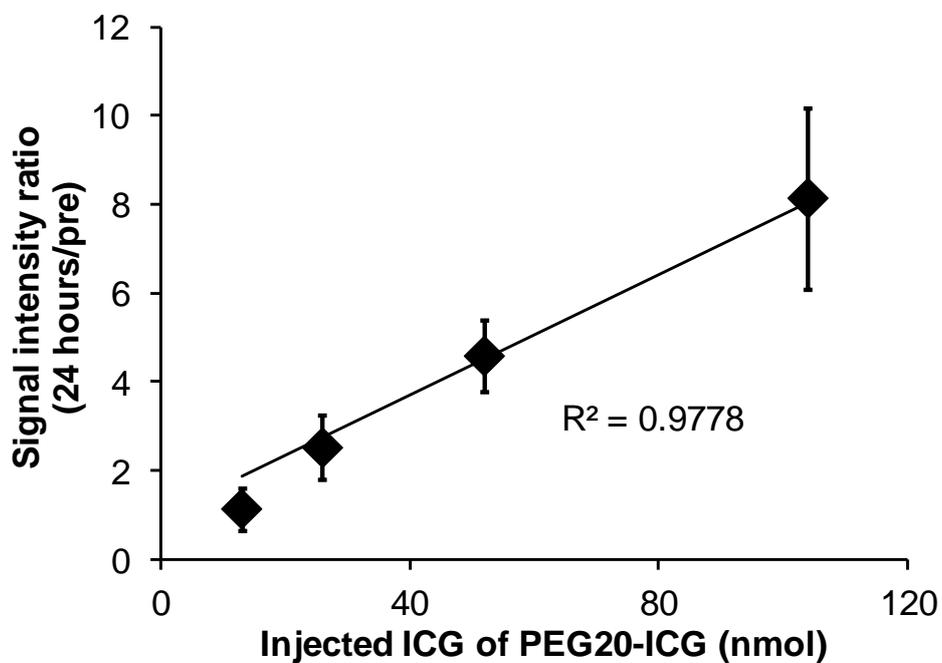
### *In vivo* 光超音波イメージング

Colon26 担癌マウスを麻酔で眠らせ、Figure 2-2-8A に示すように測定装置に固定した。プローブ投与前の時点で、腫瘍部および非腫瘍部（背中）から血液中のヘモグロビンから生じたと思われる弱い PA 信号を観察した（Figure 2-2-8B-F）。PEG20-ICG 投与 24 時間後においては、いずれの投与量においても腫瘍を明瞭に描出した（Figure 2-2-8B-E）。一方で、PEG20-ICG（26 nmol）投与 24 時間後の非腫瘍部での PA 信号の増加は、投与前に比較して 30% しか増加しなかった（Figure 2-2-8F）。腫瘍部からの PA 信号は、PEG20-ICG の投与量の増加に応じて比例的に増加した（Figure 2-2-9）。PA 信号増加量はそれぞれ、14 ± 48%（13 nmol）、152 ± 72%（26 nmol）、359 ± 81%（52 nmol）、715 ± 205%（104 nmol）であった。このことは PAI の定量性の高さを支持するものと考えられる。

以上の検討において、PEG20-ICG は FI および PAI の両方で腫瘍部を明瞭に描出することができた。また、PEG20-ICG による腫瘍部の PA 信号の増加量は、既報の金ナノ粒子やカーボンナノチューブ等を用いた PAI プローブの腫瘍部の PA 信号の増加量（いずれも約 3 倍）と比較して同等以上であった<sup>[17-19, 59]</sup>。さらに、PEG および ICG はその生体適合性から、いずれも FDA で医薬品（添加物含む）として承認されている<sup>[9, 10, 12, 13]</sup>。本節の実験における最も多い投与量（104 nmol）においても投与されたマウスに何の影響もみられなかった。また、<sup>111</sup>In-DTPA-PEG-ICG による体内放射能分布評価においても、正常組織への目立った集積はなかった（Table 2-2-1）。



**Figure 2-2-8.** *In vivo* PA imaging within colon26 tumor-bearing mice injected with PEG20-ICG. (A) Setting of the mouse in the instrument. The square indicates the measurement region. (B-F) PA images before and 24 hours after injection of PEG20-ICG. The injected dose of ICG for PEG20-ICG was (B) 13 nmol, (C) 26 nmol, (D) 52 nmol, and (E) 104 nmol. The dashed line circles indicate the tumor regions. (F) PA images of non-tumor regions of the back.



**Figure 2-2-9.** The PA signal intensity ratios (24 hours post-injection/pre-injection) plotted relative to the ICG content of injected PEG20-ICG. Data are presented as the mean  $\pm$  SD.

### 2.2.3 小括

本節では、PEG-ICG を作製し、担癌マウスを用いた蛍光測定による腫瘍集積評価および、放射標識した PEG-ICG を用いた体内動態評価を行った。さらに、PAI のためのイメージングプローブとしての有効性を *in vivo* イメージングによって評価し、以下に述べる結果を得た。

- (1) 4 種類の分子量の異なる PEG-ICG (PEG5-ICG、PEG10-ICG、PEG20-ICG、PEG40-ICG) ならびに、分子量 20 kDa の PEG-ICG を  $^{111}\text{In}$  標識したイメージングプローブを設計・合成した。
- (2) PA 信号強度はいずれのプローブも ICG と同程度だった。
- (3) 分子量が増加するに従い、腫瘍集積量が増加し、血中滞留時間が延長した。投与 24 時間後における腫瘍集積量および腫瘍/血液比の高さから PEG20-ICG が最も PAI に好適な性質を有することが示唆された。
- (4)  $^{111}\text{In}$ -DTPA-PEG-ICG を用いた体内動態評価では、PEG-ICG と同様の血中濃度および腫瘍集積量経時変化を示した一方で、正常組織に目立った集積はみられなかった。
- (5) PEG20-ICG を投与した *in vivo* PAI では腫瘍を明瞭に描出し、腫瘍部では投与量依存的に PA 信号が増加した。

以上の結果より、水溶性合成高分子を母体とした PEG-ICG は EPR 効果で腫瘍へ集積し、がんの PAI のためのイメージングプローブとして有効であることが示された。

### 第3節

#### ポリオキサゾリンを母体とした光超音波イメージングプローブの開発

前節では、水溶性高分子である PEG が EPR 効果によって腫瘍集積し、腫瘍の PAI のためのイメージングプローブとして有効であることを示した。この PEG-ICG より高感度ながんの PAI には、PAI プローブの ICG 結合数と腫瘍/血液比を上げることが望まれる。PEG には、直鎖状の末端官能基を介して ICG を 1 分子しか結合できないことや、腫瘍/血液比が高くないため血液に含まれる PAI プローブからの信号がノイズとなりうると言った課題が残っている。そこで本節では、PEG の問題点の改善を求めて、PEG に代わる水溶性合成高分子のポリオキサゾリン (POZ) に着目した。

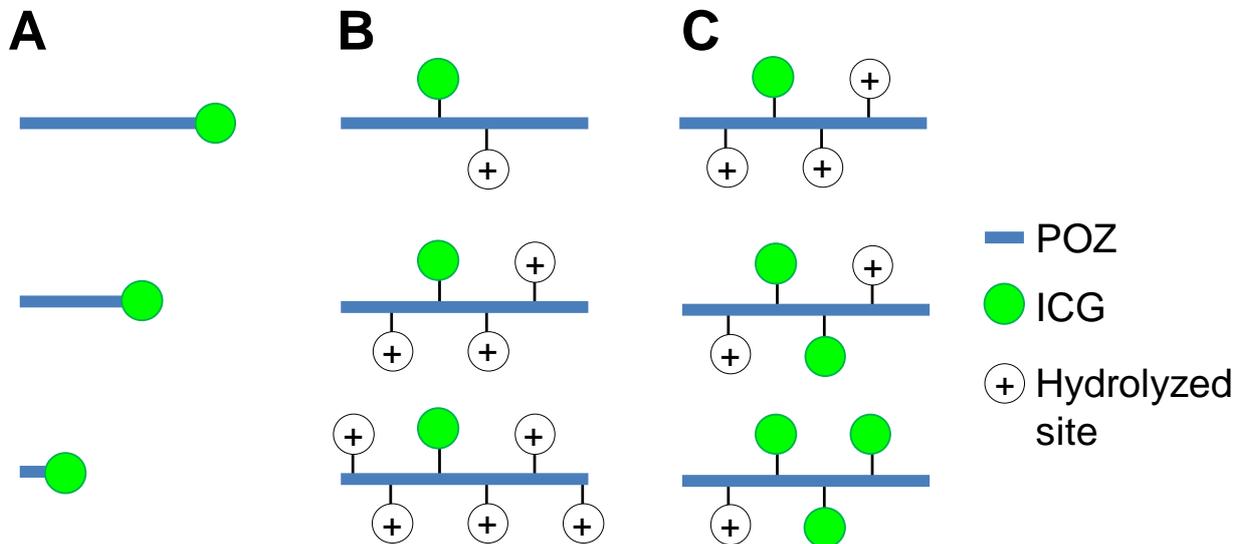
POZ は N-acyl ethyleneimine の繰り返し構造を有する水溶性高分子であり、*in vitro* および *in vivo* において PEG と同程度毒性が低いことが報告されている<sup>[60, 61]</sup>。さらに、POZ は血液中から素早くクリアランスされることが確認されており<sup>[14]</sup>、ナノ粒子<sup>[62, 63]</sup>や蛋白質<sup>[64, 65]</sup>を含む薬物輸送キャリアの修飾剤としても利用されている。このような性質を持つ POZ であるが、それ自身の腫瘍イメージングにおける DDS キャリアとしての有効性、および、EPR 効果を示すための最適な構造についてはまだ報告されていない。一方で、これまでに多くの水溶性高分子は自身の分子量や電荷によって体内動態や腫瘍集積が変わることが報告されている<sup>[66]</sup>。

以上より本節では、POZ と ICG との結合体 (POZ-ICG) を作製し、担癌マウスを用いた蛍光測定による腫瘍集積評価を基に、ICG キャリアとしての POZ-ICG の最適な構造を探索し、腫瘍の PAI のためのイメージングプローブとしての有効性を評価した。

### 2.3.1 プローブ設計

POZ はリビングカチオン開環重合によって任意の分子量を合成することができる<sup>[67, 68]</sup>。前節（第2章第2節）において、PEGの分子量の増加がEPR効果による腫瘍集積の増加につながることを示されたことから、POZにおいてもEPR効果に最適な分子量を調べる必要がある。また、POZは側鎖のアシル基を加水分解することで2級アミノ基を導入することが報告されている<sup>[69, 70]</sup>。そのため加水分解により導入された2級アミノ基を介してPEGよりも多くのICGを結合させることが可能となる。一方で、正に帯電した粒子は、生体内において血中滞留時間が短くなることが報告されており<sup>[71, 72]</sup>、2級アミノ基を過剰に導入することはプローブの体内動態に好ましくない影響を与える恐れがある。

以上を背景として、本節では、がんのPAIのためのイメージングプローブとして最適なPOZ-ICGの構造を探索するために、Figure 2-3-1に示す3段階のプローブ設計・合成を行い評価した。初めに、EPR効果による腫瘍集積のために最適なPOZの分子量を調べることを目的として、分子量8~200 kDaの7種類のPOZ-ICGを設計した（Figure 2-3-1A）。次に、POZの加水分解された部位の割合が、腫瘍集積に与える影響について評価するために、加水分解割合を2.5、5、10、15、20%とした5種類のPOZ-ICGを設計した（Figure 2-3-1B）。最後にPOZ1分子に結合しているICGの数が、腫瘍集積に与える影響について評価するために、ICG結合数を様々に変えた多点ICG結合POZを設計した（Figure 2-3-1C）。



**Figure 2-3-1.** Drug design of POZ-ICG derivatives for sensitive PA tumor imaging in this study. We evaluated the influence of (A) molecular weight of POZ-ICG, (B) hydrolysis ratio in POZ-ICG, and (C) number of ICG molecules conjugated with POZ on probe accumulation in the tumor.

## 2.3.2 実験方法

### 試薬・機器

実験には、東京化成工業株式会社、株式会社同仁化学研究所、ナカライテスク株式会社、和光純薬工業株式会社、シグマアルドリッチジャパン社から購入した特級試薬を用いた。1*H*-Benz[e]indolium,2-[7-[3-(5-carboxypentyl)-1,3-dihydro-1,1-dimethyl-2*H*-benz[e]indol-2-yliden e]-1,3,5-heptatrien-1-yl]-1,1-dimethyl-3-(4-sulfobutyl), inner salt (ICCA) は、既報のカップリング方法により合成した<sup>[73]</sup>。重合反応時のマイクロウェーブ照射には、CEM 社製 Discover system を使用した。核磁気共鳴スペクトル (<sup>1</sup>H NMR) の測定には、重クロロホルムを溶媒、テトラメチルシランを内部標準として用い、機器としては JEOL 社製 JNM-LM400 を使用した。ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) は、株式会社島津製作所製ポンプ LC-20AD、および、同社製示差屈折率検出器 RID-10、および、昭和電工株式会社製 GPC カラム KD 804 を組み合わせて使用した。GPC の移動相として *N,N*-dimethylformamide (DMF) を用い、流速 0.5 mL/min とした。重量平均分子量は、Agilent Technologies 社製標準 PEG を用いた検量線から算出した。吸光度の測定は、第 2 章第 2 節に記載した通りの方法で行った。電気伝導度の測定には、株式会社堀場製作所製 LAQUAtwin COND を使用した。p*K*<sub>a</sub> 算出における pH の測定には、株式会社堀場製作所製 9618S-10D pH meter を使用した。蛍光強度の測定には、株式会社島津製作所製分光蛍光光度計 RF-6000 を使用した。*In vivo* PAI は、第 2 章第一節に記載した通りの方法で行った。

### 細胞培養および担癌モデル動物の作製

第 2 章第一節記載の方法に従い、細胞培養および担癌モデル動物を作製した。

### POZ-ICG の合成

各種 POZ-ICG は Figure 2-3-2 に記載の手順で行った。まず、分子量 7.7-31 kDa の POZ は既報のマイクロウェーブ照射法によって合成した<sup>[68, 69]</sup> (Figure 2-3-2A)。具体的には、methyl *p*-toluenesulfonate (5 mg, 1 eq.) および 2-ethyl-2-oxazoline (1.1 g, 400 eq.) を超脱水 acetonitrile (0.5-3 mL) に溶解させ、反応管に封入した後、140 °C、14 分間の条件で攪拌しながらマイクロウェーブを照射した。引き続き、反応溶液に ethylenediamine (16 mg, 10 eq.) を添加し 140 °C、7 分間の条件で攪拌しながらマイクロウェーブを照射した。溶媒留去した後、反応物を 2 mL のメタノールに溶解させ、Spectrum Laboratories 社製再生セルロース透析膜 Spectra/Por® 7 (MWCO: 3.5 kDa) に封入し、メタノールを透析外液として用いて透析精製した。得られたポリマーは <sup>1</sup>H NMR および GPC によって分析した。

<sup>1</sup>H NMR:  $\delta$  [ppm] = 3.3-3.6 (br, 4nH, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N)、2.2-2.5 (br, 2nH, C=OCH<sub>2</sub>)、1.0-1.2 (br, 3nH, CH<sub>3</sub>)

分子量 7.7-31 kDa の POZ (50-200 mg, 1 eq.)、および ICCA (10 mg, 2 eq.)、および 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (WSC) (2.5 mg, 2 eq.)、および 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) (1.6 mg, 2 eq.) をクロロホルム (2 mL) に溶解させ、

遮光下で室温 24 時間攪拌し反応させた。反応後の溶媒を留去し、反応物を 2 mL のメタノールに溶解させ、上述の再生セルロース透析膜に封入し、メタノールを透析外液として用いて未反応の ICCA を除去するために透析精製した。得られた POZ-ICG の ICG 濃度は、終濃度 5% の SDS 水溶液中における 795 nm の吸光度から算出し、純度は PD-10 カラムによる分析から算出した。

続いて、シグマアルドリッチ社製 poly(2-ethyl-2-oxazoline) (分子量：25、50、200 kDa) を既報の方法で加水分解し<sup>[70]</sup>、2 級アミノ基を導入した (Figure 2-3-2B)。具体的には、純水に溶解させた poly(2-ethyl-2-oxazoline) (250 mg、25 mg/mL) に 2 M 塩酸 (0.1-0.8 mL) を添加し、オイルバスで 24 時間還流させた。水酸化ナトリウムによって中和し、凍結乾燥させ水を除去した。反応物をクロロホルムに溶解させセライトろ過により部分的に加水分解された POZ を得た。得られた POZ の加水分解割合は <sup>1</sup>H NMR および電気伝導度測定により算出した。

<sup>1</sup>H NMR:  $\delta$  [ppm] = 3.3-3.6 (br, 4nH,  $\text{CH}_2\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$ )、2.6-2.9 (br, 4nH,  $\text{CH}_2\text{NHCH}_2$ )、2.2-2.5 (br, 2nH,  $\text{C}=\text{OCH}_2$ )、1.0-1.2 (br, 3nH,  $\text{CH}_3$ )

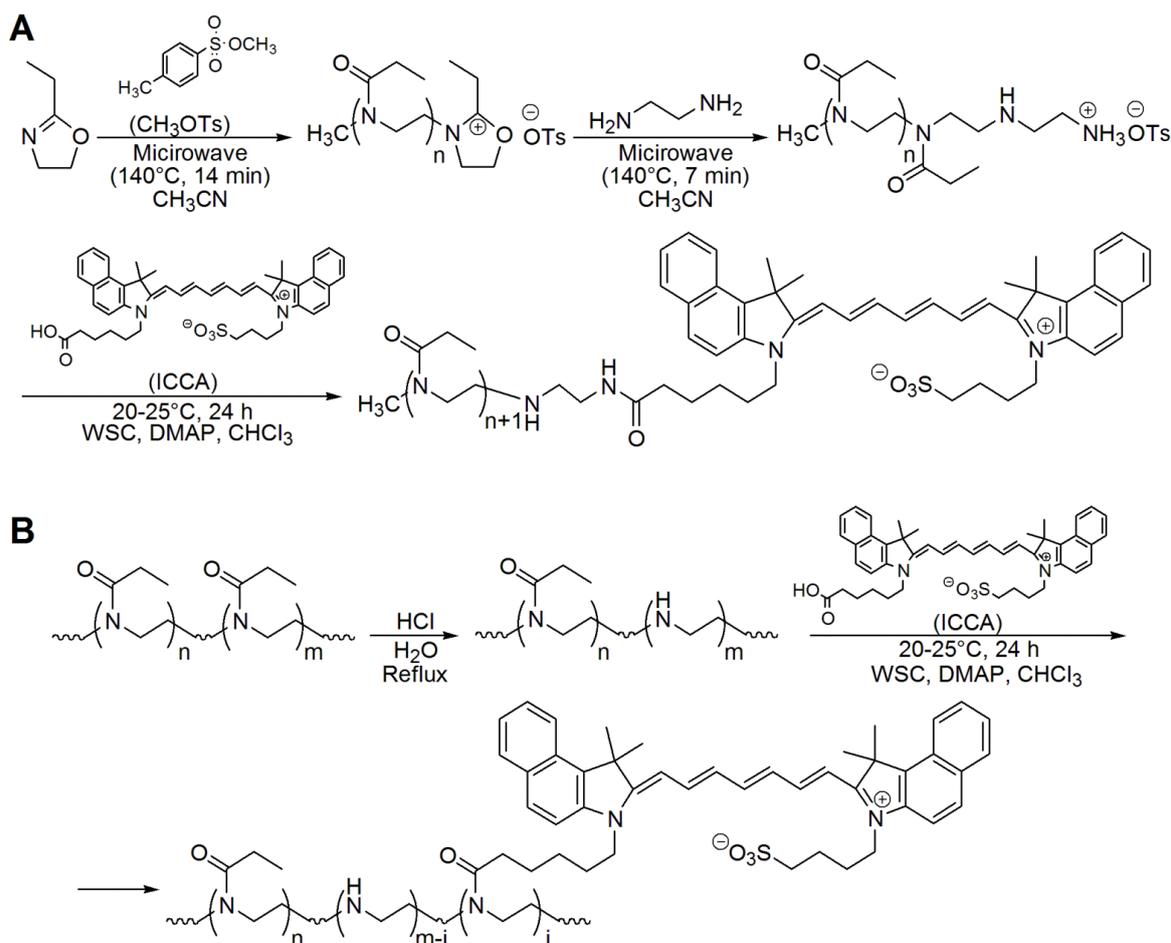
加水分解された POZ の電気伝導度は、0.01 M 塩酸水溶液中の POZ (60  $\mu\text{M}$ ) を調製し測定した。また、加水分解された POZ の pKa は既報の中和滴定法を用いて算出した<sup>[74]</sup>。具体的には、POZ を純水に溶解させ (0.6  $\mu\text{mol}$  (アミノ基換算濃度) in 1 mL  $\text{H}_2\text{O}$ )、水酸化ナトリウム水溶液 (0.01 M、60  $\mu\text{L}$ ) を添加し全てのアミノ基を脱プロトン化した。続いて、0.001 M 塩酸を用いた中和滴定による pH 変化を測定し、滴定曲線から pKa を算出した。

加水分解された POZ (25、50、200 kDa (10 mg、1 eq.)) は、ICCA (1-300 eq.)、および、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (WSC、1-300 eq.)、および、4-Dimethylaminopyridine (DMAP、1-150 eq.) を混合し 2 mL のクロロホルム中で室温で 24 時間遮光下にて攪拌しながら反応させた。反応溶液は、上述の POZ-ICG と同じように精製し、得られた加水分解 POZ-ICG の ICG 濃度は、終濃度 5% の SDS 水溶液中における 795 nm の吸光度から算出し、純度は PD-10 カラムによる分析から算出した。

POZ-ICG と血清アルブミンとの結合親和性は、既報の方法に従って行った<sup>[75]</sup>。具体的には、POZ-ICG (0-100  $\mu\text{M}$ ) と、牛胎児血清アルブミン (BSA、4  $\mu\text{M}$ ) とを混合し、室温で 30 分平衡化させた。続いて、BSA 中に含まれるトリプトファン残基の蛍光強度 (ex/em = 279/342 nm) を測定し、静的消光相互作用に基づく Hill の式 (下式 (1)) から結合親和性を算出した。

$$\log \left[ \frac{(F_0 - F)}{F} \right] = \log K_b + n \log [\text{ICG}] \quad (1)$$

ここで、 $K_b$  は結合定数、 $n$  は結合部位の数、 $F$  および  $F_0$  はそれぞれ POZ-ICG 共存下および非共存下における BSA 中のトリプトファン残基の蛍光強度を表わす。



**Figure 2-3-2.** The synthesis scheme of POZ-ICG. (A) ICG was introduced into the terminal end of POZ derivatives synthesized via microwave irradiation. (B) Multiple ICG molecules were introduced into POZ derivatives whose acyl groups were partially hydrolyzed using hydrochloric acid.

#### 蛍光測定による *In vivo* 体内動態評価および腫瘍・血液中プローブ量測定

POZ-ICG の腫瘍集積および血中濃度測定は、第 2 章第 2 節記載の方法に従った。具体的には、POZ-ICG (13 nmol / 100  $\mu$ L PBS) を Colon26 担癌マウスへ投与し、1、24 時間後にマウス全身蛍光像を撮像した。投与 24 時間後に腫瘍を摘出し、腫瘍中に含まれる POZ-ICG を定量した。また、POZ-ICG 投与 5、15、30 分、1、3、6、24 時間後にマウス血液を採取し、血液に含まれる POZ-ICG を定量し、血中半減時間を算出した。さらに、投与 24 時間後に肝臓および腎臓を摘出し、IVIS Imaging System 200 (ex: 745 nm, em: 840 nm, exposure time: 1 sec) を用いて蛍光撮像し各臓器の蛍光強度を測定した。

#### 水溶液中での蛍光測定および PA 信号測定

終濃度 15  $\mu$ M (ICG 換算) となるように 50 mg/mL BSA 溶液と混和した後、Infinite® 200 PRO plate reader により蛍光強度を測定した (ex: 785 nm, em: 815 nm)。同様に調製した POZ-ICG 溶液について、第 1 章記載の測定方法に従い PA 信号を測定した。

### In vivo 光超音波イメージング

POZ-ICG を ICG 量で 13、26、52、78、および 104 nmol となるよう調製し、Colon26 担癌マウスへ尾静脈より投与した (n=4)。投与前および投与 24 時間後に上述の条件で PAI を実施し、PA 信号強度は第 1 節に記載の方法により解析した。

### 統計解析

データは平均値±標準偏差で表わした。有意差検定は Student's *t*-test により行い、 $p < 0.05$  を有意とした。

### 2.3.3 結果および考察

#### EPR 効果による腫瘍集積のための最適な POZ の分子量の検討

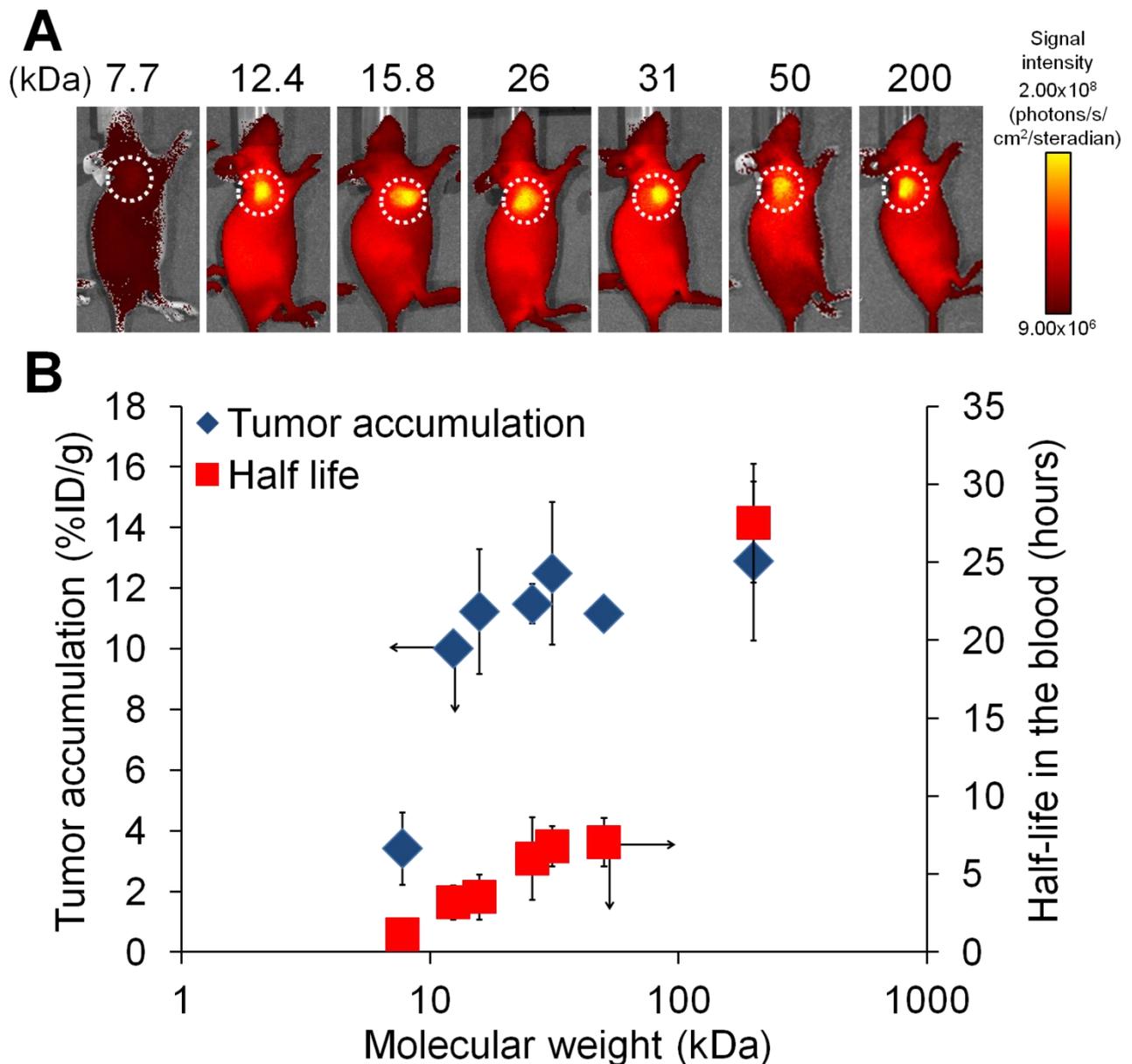
分子量の検討において合成した POZ-ICG の分子量および POZ に結合した ICG の数を Table 2-3-1 にまとめた。いずれの POZ-ICG もサイズ排除クロマトグラフィーによる分析の結果、95%以上の純度で得られたことを確認した。

**Table 2-3-1.** Physicochemical properties of POZ-ICG derivatives having different molecular weights.

Sample	Molecular weight <sup>§</sup> (kDa)	Number of ICG conjugated to POZ
P1-ICG1.1	7.7	1.1
P2-ICG1.1	12.4	1.1
P3-ICG0.9	15.8	0.9
P4-ICG0.7	26	0.7
P5-ICG0.8	31	0.8
P6-ICG1.0	50	1.0
P7-ICG1.1	200	1.1

<sup>§</sup>Molecular weight was determined by gel permeation chromatography (GPC) and expressed as weight-average molecular weight.

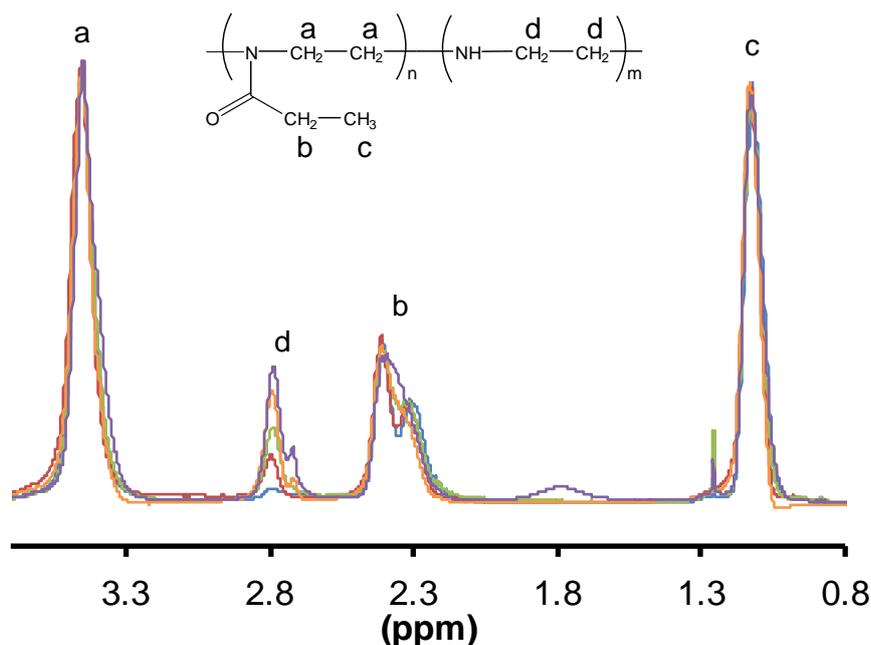
合成した POZ-ICG の Colon26 担癌マウスにおける腫瘍集積量および血中クリアランスの結果を Figure 2-3-3 に示した。POZ の分子量が増加するに伴い腫瘍集積量が増加し、分子量 15.8 kDa 以上で 11-13%ID/g という高い値を示した。このことから、EPR 効果による腫瘍集積にはこの範囲の分子量が適していることが示唆された。一方で、血中半減時間も POZ の分子量の増加に伴い増加した。結果として、投与 24 時間後の腫瘍/血液比は、分子量 50 kDa 以下で 3 以上となり、第 2 章第 2 節で検討した PEG-ICG よりも有意に高い値を示した（投与 24 時間後の腫瘍/血液比 PEG20-ICG : 1.2、PEG40-ICG : 0.7）。以上の結果から、POZ-ICG のイメージングプローブとしての可能性が示唆されたため、以降の検討では、分子量 25 および 50 kDa の POZ を選択し、加水分解割合と POZ 1 分子あたりの ICG 結合数について検討した。



**Figure 2-3-3.** *In vivo* fluorescent measurement of POZ-ICG derivatives with different molecular weights. (A) *In vivo* fluorescence images of tumor-bearing mice administered with POZ-ICG (left to right; P1-ICG1.1, P2-ICG1.1, P3-ICG0.9, P4-ICG0.7, P5-ICG0.8, P6-ICG1.0, and P7-ICG1.1). Dotted circles indicated the tumor regions. (B) Tumor accumulation (%ID/g) (blue) and half-life in the blood (hours) (red) of POZ-ICG.

#### 多点 ICG 結合加水分解 POZ の評価

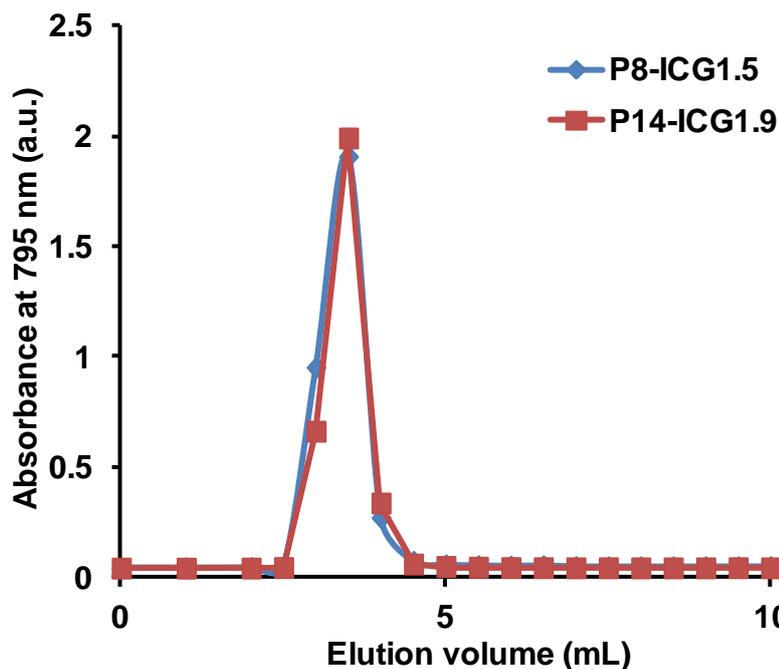
多点 ICG 結合のために、POZ を部分的に加水分解した結果、加水分解割合（2級アミノ基導入割合）が、2.5、5、10、15、20%の POZ が得られた（Figure 2-3-4）。



**Figure 2-3-4.** NMR spectrum of hydrolyzed POZ. Hydrolysis percentage of POZ was 2.5, 5, 10, 15, and 20% for blue, red, green, orange, and purple lines, respectively.

得られた加水分解 POZ の pKa 値および電気伝導度を Table 2-3-2 にまとめた。いずれの POZ の pKa 値も約 10 となった。一方、電気伝導度は、加水分解割合の増加に伴い低下した。これはイオン化に伴い H<sup>+</sup>を消費したことが一因であると考えられる。これらの結果から、加水分解 POZ は、中性条件下である生体内において、正に帯電し、その電荷は加水分解割合の増加に伴い増加することが示唆された。

続いて、ICG を多点結合させる前に、POZ の加水分解割合が *in vivo* での POZ-ICG の動態に与える影響について評価した。加水分解した POZ に ICG を導入した POZ-ICG は高純度で得られた (Figure 2-3-5)。合成した POZ-ICG を Colon26 担癌マウスに投与し、腫瘍集積量を評価した結果を Figure 2-3-6 にまとめた。POZ の分子量によらず、加水分解割合が増加するに従って腫瘍集積量は減少した (Figure 2-3-6C)。さらに、加水分解割合の増加に伴い血中半減時間は減少した (Table 2-3-2)。これは、生体内で正に帯電した POZ-ICG が血液から素早くクリアランスされたことが原因であると考えられる。実際に、加水分解割合 20% の P12-ICG1.9 および P17-ICG1.9 は、加水分解割合 2.5% の P8-ICG1.5 および P13-ICG1.7 に比較して、担癌マウスに投与後 1 時間の段階で大部分が肝臓に取り込まれたことを確認した (Figure 2-3-7)。この結果は、正に帯電したナノ粒子が短い血中半減時間を示す報告とも一致した<sup>[71, 72]</sup>。

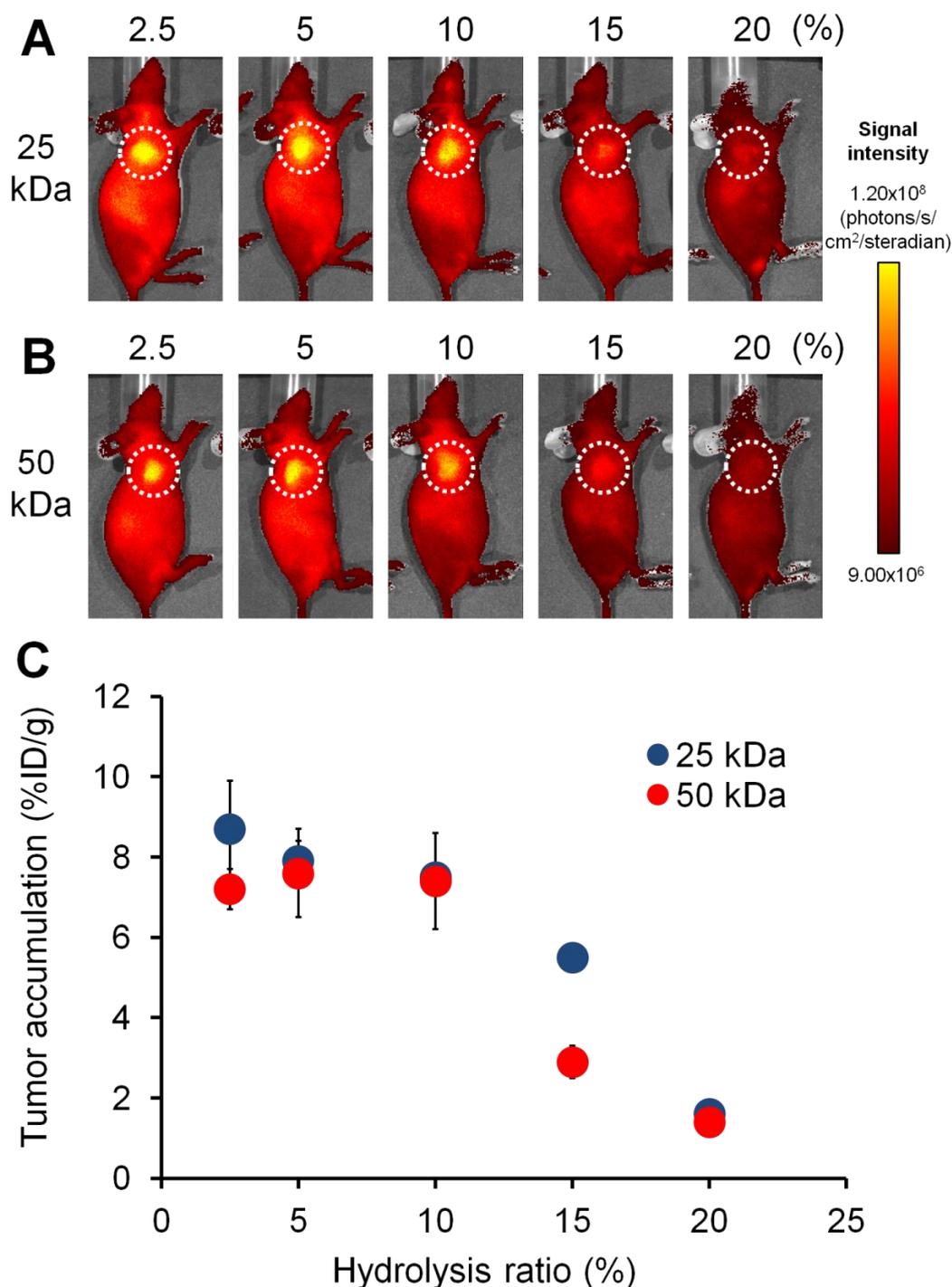


**Figure 2-3-5.** Size exclusion chromatography of POZ-ICG with PD-10 column. POZ-ICG was detected by absorbance at 795 nm. Representative charts of P8-ICG1.5 and P14-ICG1.9 were shown. The absorbance of ICG was detected only in high molecular weight fraction (3-4 mL).

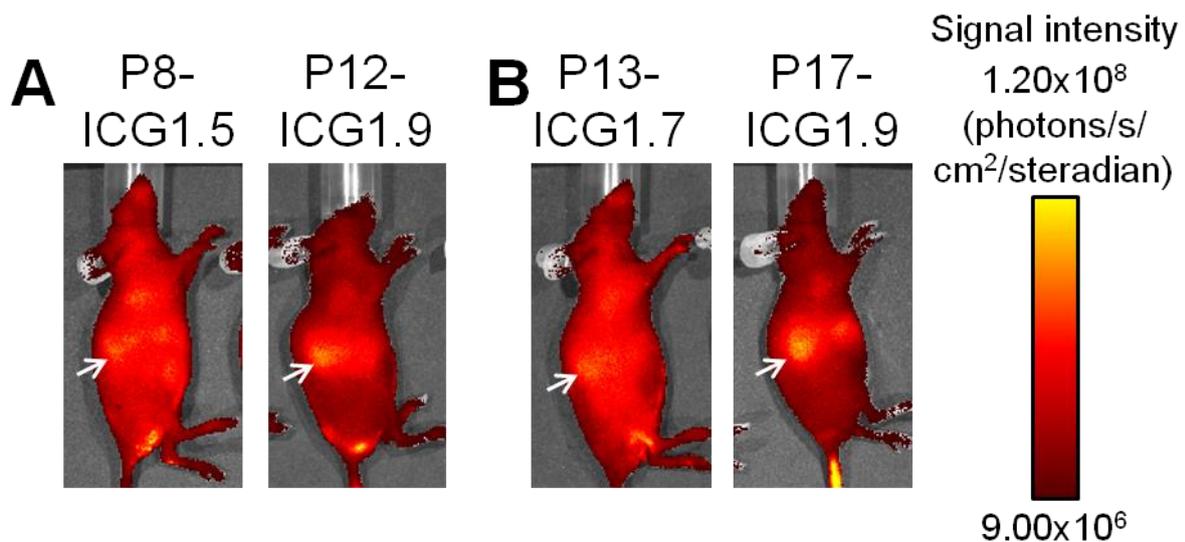
**Table 2-3-2.** Physicochemical properties and half-life in the blood of hydrolyzed POZ-ICG with different hydrolysis ratios.

Sample	Molecular weight <sup>§</sup> (kDa)	Hydrolysis ratio (%)	pKa <sup>¶</sup>	Electric conductivity <sup>¶</sup> (mS/cm)	Number of ICG molecules conjugated to POZ	Half-life in the blood <sup>†</sup> (h)
P8-ICG1.5	25	2.5	10.1	3.9	1.5	4.9 ± 1.2
P9-ICG0.6	25	5	10.2	3.8	0.6	4.6 ± 0.6
P10-ICG0.6	25	10	10.2	3.4	0.6	3.8 ± 0.5
P11-ICG0.7	25	15	10.3	3.1	0.7	2.1 ± 0.4
P12-ICG1.9	25	20	10.2	2.9	1.9	1.1 ± 0.0
P13-ICG1.7	50	2.5	10.3	3.7	1.7	4.8 ± 1.2
P14-ICG0.5	50	5	10.2	3.4	0.5	4.5 ± 0.1
P15-ICG1.0	50	10	10.4	2.7	1.0	3.4 ± 0.4
P16-ICG1.1	50	15	10.3	2.4	1.1	2.0 ± 0.4
P17-ICG1.9	50	20	10.4	1.7	1.9	1.1 ± 0.2

<sup>§</sup>Molecular weight was determined by gel permeation chromatography (GPC) and expressed as weight-average molecular weight. <sup>¶</sup>pKa and electric conductivity were determined before ICG conjugation. <sup>†</sup>Half-life of POZ-ICG in the blood was calculated based on probe concentration in blood collected from tumor-bearing mice.



**Figure 2-3-6.** Influence of POZ hydrolysis ratios on *in vivo* biodistribution. (A) *In vivo* fluorescence imaging of tumor-bearing mice administered with POZ-ICG (25 kDa) (left to right; P8-ICG1.5, P9-ICG0.6, P10-ICG0.6, P11-ICG0.7, and P12-ICG1.9, as shown in Table 2-3-2). (B) *In vivo* fluorescence imaging of tumor-bearing mice administered with POZ-ICG (50 kDa) (left to right; P13-ICG1.7, P14-ICG0.5, P15-ICG1.0, P16-ICG1.1 and P17-ICG1.9, as shown in Table 2-3-2). Dotted circles indicated tumor regions. (C) Tumor accumulation of POZ-ICG (%ID/g) (Blue; 25 kDa, Red; 50 kDa).



**Figure 2-3-7.** *In vivo* fluorescent images of tumor-bearing mice at 1 hours after administration with POZ-ICG (A; 25 kDa, B; 50 kDa). (A) Left: P8-ICG1.5, right: P12-ICG1.9. (B) Left: P13-ICG1.7, right: P17-ICG1.9 as shown in Table 2-3-2.

Figure 2-3-6 に示したように、加水分解割合 2.5-10% の範囲において比較的高い腫瘍集積量が示されたため、この範囲の加水分解割合を有する分子量 25 および 50 kDa の POZ に対して ICG の結合数を変えて POZ-ICG を合成した (Table 2-3-3)。

作製した POZ-ICG を Colon26 担癌マウスに投与し体内動態を評価した。加水分解割合 2.5% の場合、どちらの分子量においても POZ あたりの ICG 結合数が増えると腫瘍集積量はわずかに増加した (Figure 2-3-8A 青丸 (25 kDa、2.5%加水分解) および赤丸 (50 kDa、2.5%加水分解))。しかしながら、加水分解割合の低さから反応基の数が少ないため、ICG の数を多く導入することが出来なかった。分子量 50 kDa の加水分解割合 5% の場合、ICG 結合数が 7.8 個まで増加しても腫瘍集積量は高いことが分かった (Figure 2-3-8A 赤四角)。しかし過剰量の ICG が導入される (ICG 結合数 10.3) と、腫瘍への移行量は低下した。残りの POZ-ICG は、ICG 結合数の増加に伴って腫瘍集積量が減少した (Figure 2-3-8A 青四角 (25 kDa、5%加水分解)、青三角 (25 kDa、10%加水分解)、および、赤三角 (50 kDa、10%加水分解))。 *In vivo* マウス全身蛍光画像の結果から、過剰量の ICG の導入は、早期から POZ-ICG を肝臓取り込みへ誘導している可能性が示された (Figure 2-3-8B)。

以前の報告<sup>[76, 77]</sup>から、血清アルブミンと色素との相互作用は薬物動態を変化させることが知られている。そこで、POZ-ICG の体内動態変化の原因を確認するために、代表的な POZ-ICG (50 kDa、5%加水分解) と血清アルブミンとの結合親和性を測定した。その結果、POZ に結合した ICG の数が 1.9、4.7、7.8、10.3 と増加するに従い、血清アルブミンに対する結合親和性 ( $K_b$ ) は、 $3.0 \pm 0.1$ 、 $3.5 \pm 0.2$ 、 $8.7 \pm 1.1$ 、および、 $13.0 \pm 0.4 \text{ M}^{-1}$  と増加した。このことから、高い  $K_b$  を持つ POZ-ICG は、ICG それ自身の性質によって肝臓へ集積することに加えて、POZ-ICG と血清アルブミンとの結合体となって肝臓に輸送され蓄積するこ

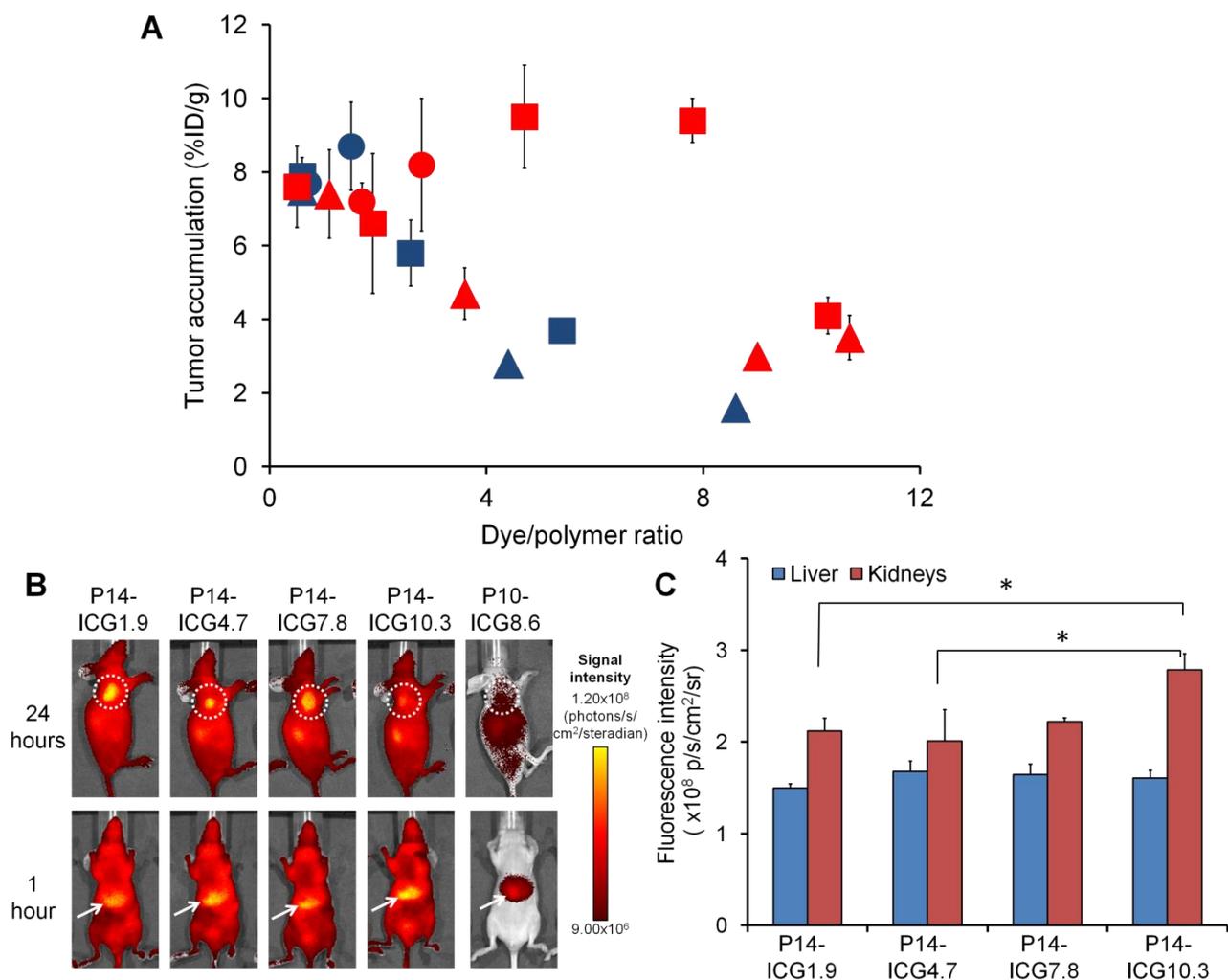
とが示唆された。一方で、分子量 50 kDa、5%加水分解の場合は、ICG 結合数が 1.9 から 7.8 へ増加するに伴い腫瘍集積量が増加した。これは、ICG 結合数が増加したことに伴う 2 級アミノ基の数の減少が一因であると考えられる。また、これまでの検討から、加水分解割合や ICG 結合数は、POZ の分子量が小さい場合 (25 kDa) において顕著に腫瘍集積量に影響を与えることが示された。

次に、最も好ましい腫瘍集積性を示した 50 kDa、5%加水分解の POZ-ICG の正常組織への分布を調べた。ICG 結合数を 1.9、4.7、7.8、10.3 と変えた POZ-ICG を投与したマウスから投与 24 時間後に肝臓および腎臓を摘出し、臓器の蛍光強度を測定した。肝臓においてはいずれの POZ-ICG もほとんど同程度の蛍光強度を示した一方で、最も ICG 結合数の多い P14-ICG10.3 は、腎臓において他と比較し有意に高い蛍光強度を示した (Figure 2-3-8C)。投与 24 時間後の POZ-ICG のプローブ濃度は、ICG 結合数の増加に伴い減少する傾向にあったため、ICG 多点結合 POZ-ICG はいずれも 2 以上の腫瘍/血液比を示した (Table 2-3-3)。

**Table 2-3-3.** Physicochemical properties and *in vivo* biodistribution data of POZ conjugated with multiple ICG molecules.

Sample	Molecular weight <sup>§</sup> (kDa)	Hydrolysis ratio (%)	Number of ICG conjugated to POZ	Tumor accumulation (%ID/g)	Probe concentration in the blood (%ID/g)	Tumor-to-blood ratio
P8-ICG0.7	25	2.5	0.7	7.7±0.2	2.1±0.5	3.9±0.9
P8-ICG1.5	25	2.5	1.5	8.7±1.2	0.9±0.1	9.2±2.0
P9-ICG0.6	25	5	0.6	7.9±0.5	1.4±0.2	5.5±0.3
P9-ICG2.6	25	5	2.6	5.8±0.9	0.4±0.1	15.4±2.4
P9-ICG5.4	25	5	5.4	3.7±0.2	0.3±0.0	11.3±0.8
P10-ICG0.6	25	10	0.6	7.5±0.3	0.5±0.1	14.1±2.1
P10-ICG4.4	25	10	4.4	2.8±0.2	0.1±0.0	22.7±3.9
P10-ICG8.6	25	10	8.6	1.6±0.1	0.2±0.0	11.0±3.1
P13-ICG1.7	50	2.5	1.7	7.2±0.5	3.6±0.3	2.8±0.3
P13-ICG2.8	50	2.5	2.8	8.2±1.8	2.9±0.5	2.9±0.7
P14-ICG0.5	50	5	0.5	7.6±1.1	2.6±0.2	2.9±0.5
P14-ICG1.9	50	5	1.9	6.6±1.9	1.8±0.3	3.6±0.5
P14-ICG4.7	50	5	4.7	9.5±1.4	2.0±0.3	4.8±1.2
P14-ICG7.8	50	5	7.8	9.4±0.6	1.5±0.1	6.3±1.0
P14-ICG10.3	50	5	10.3	4.1±0.5	0.6±0.1	7.6±0.9
P15-ICG1.0	50	10	1.0	7.4±1.2	1.6±0.1	4.7±0.6
P15-ICG3.6	50	10	3.6	4.7±0.7	0.5±0.1	8.7±0.4
P15-ICG9.0	50	10	9.0	3.0±0.3	0.1±0.1	23.4±2.2
P15-ICG10.7	50	10	10.7	3.5±0.6	0.2±0.1	23.5±7.8

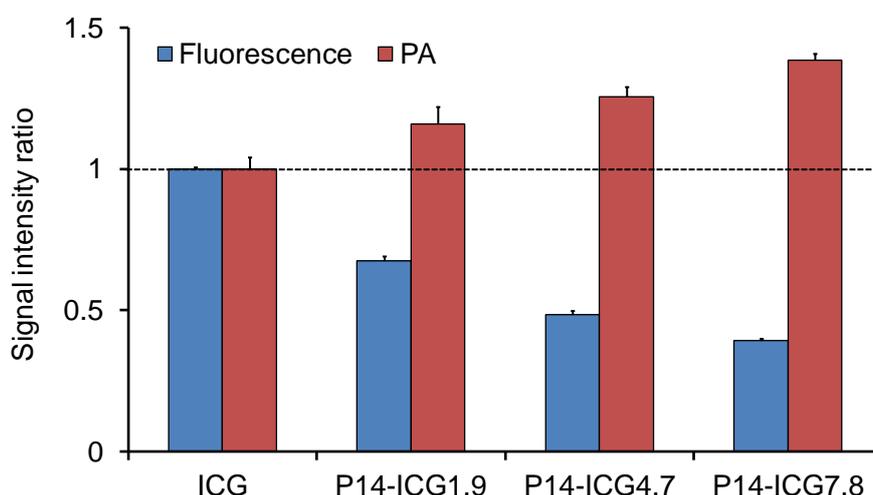
<sup>§</sup>Molecular weight was determined by gel permeation chromatography (GPC) and expressed as weight-average molecular weight.



**Figure 2-3-8.** Influence of numbers of ICG molecules on *in vivo* biodistribution. (A) Tumor accumulation of POZ-ICG with molecular weight of 25 kDa (blue) and 50 kDa (red). Circles, squares, and triangles indicate hydrolysis ratios of 2.5, 5, and 10%, respectively. (B) *In vivo* fluorescence images of tumor bearing mice at 24 hours (upper) and 1 hour (lower) after administration of POZ-ICG. Left to right; P14-ICG1.9, P14-ICG4.7, P14-ICG7.8, P14-ICG10.3, and P10-ICG8.6. Dotted circles and white arrows indicate the tumor and liver regions, respectively. (C) Fluorescence intensity of liver and kidneys isolated from the mice at 24 hours after administration of POZ-ICG (\*P<0.05).

## 水溶液中での蛍光測定および PA 信号測定

*In vivo* 体内動態評価にて、高い腫瘍集積性を維持することが示された分子量 50 kDa、加水分解割合 5% の 3 種類の POZ (P14-ICG1.9、P14-ICG4.7、P14-ICG7.8) を用いて詳細な物性を評価した。まず、それぞれのプローブの蛍光強度は、同濃度の ICG よりも低く、POZ あたりに結合した ICG の数が増加するに従い減少した (Figure 2-3-9 青)。これは、既報の論文<sup>[78]</sup>にあるように、高密度で結合した ICG の分子間相互作用によって部分的に蛍光が消光しているためであると考えられる。一方で、PA 信号強度は、ICG に比較して大きく、POZ あたりに結合した ICG の数が増加するに従い増加した (Figure 2-3-9 赤)。PA 信号強度は、P14-ICG7.8 で最大となり ICG に比較して 39% 増加した。このひとつの要因として、ICG の蛍光の消光した分のエネルギーが PA 信号の発生に使用されたことが考えられる。更なる要因として、ICG が POZ に高密度に結合すると熱エネルギーが局所的に増加し熱エネルギーから音響信号への変換効率が高まる可能性が考えられる<sup>[79, 80]</sup>。

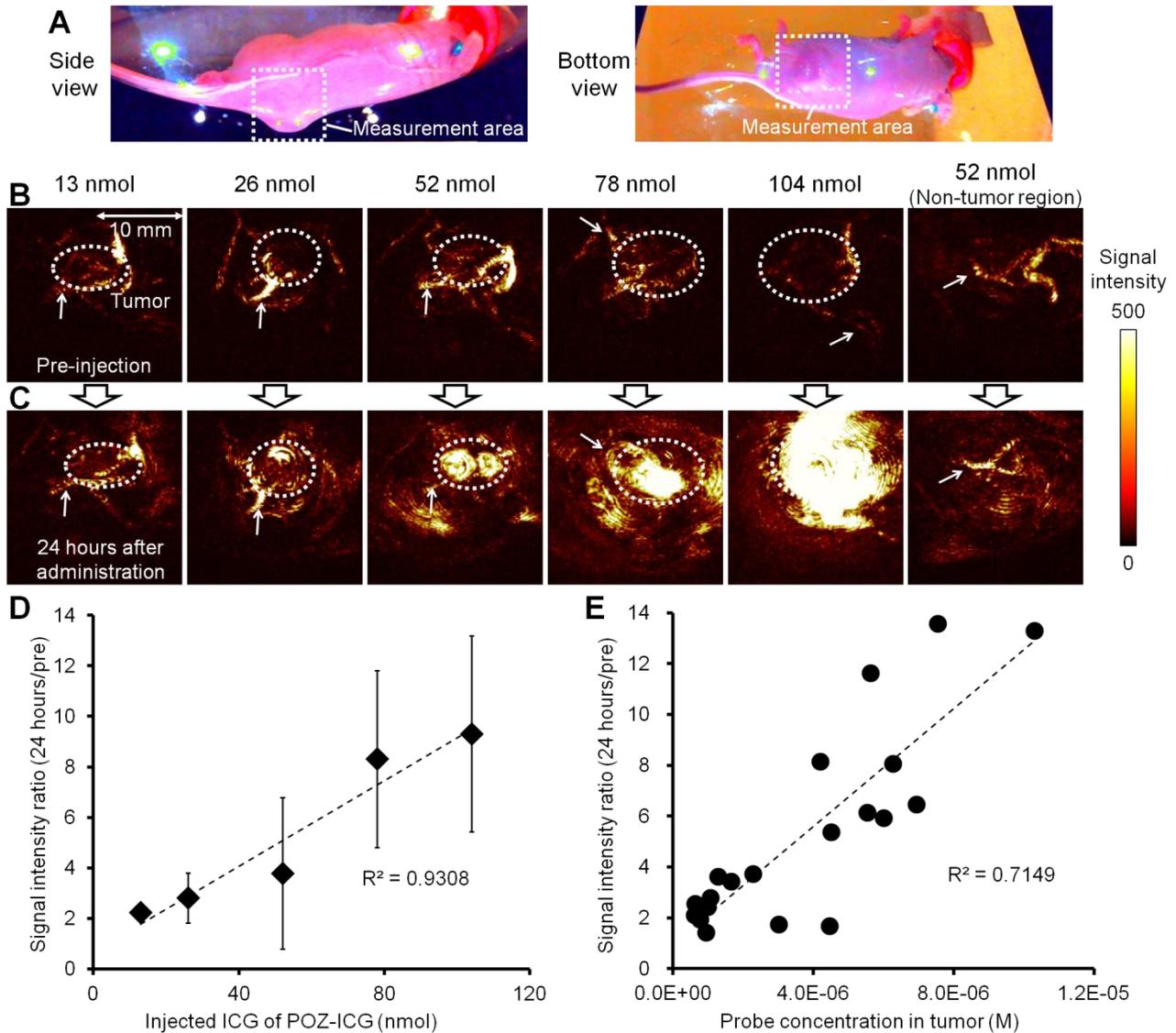


**Figure 2-3-9.** Signal intensity ratio of POZ-ICG (P14-ICG1.9, P14-ICG4.7, and P14-ICG7.8) and ICG. Blue: fluorescence intensity ratio, red: PA signal intensity ratio. Data were normalized by the signal intensity of ICG.

## *In vivo* 光超音波イメージング

ここまでの結果から、ICG 多点結合 POZ-ICG のなかで最も腫瘍集積量と腫瘍/血液比が高く (Table 2-3-3)、かつ、高い PA 信号強度 (Figure 2-3-9) を示した P14-ICG7.8 を *in vivo* PAI に用いイメージングプローブとしての性能を評価した。プローブ投与前では、血管のみが描出された (Figure 2-3-10A)。P14-ICG7.8 (13 nmol 以上) 投与 24 時間後では、血管からの PA 信号強度はほとんど変化しなかった一方で、腫瘍領域を明瞭に描出した (Figure 2-3-10B)。ICG 換算で 52 nmol の P14-ICG7.8 を投与した場合において、非腫瘍部に比較して腫瘍部は有意に PA 信号強度が高かった ( $4.7 \pm 2.5 \times 10^5$  vs  $1.2 \pm 0.6 \times 10^5$  (a.u.))。P14-ICG7.8 投与に伴う腫瘍領域での PA 信号強度の増加は、実施範囲において投与量と比例関係が見

られた（投与前に対する PA 信号増加割合は、それぞれ、13 nmol :  $124 \pm 28\%$ 、26 nmol :  $181 \pm 99\%$ 、52 nmol :  $279 \pm 300\%$ 、78 nmol :  $731 \pm 351\%$ 、104 nmol :  $830 \pm 387\%$ ）(Figure 2-3-10C)。さらに、PA 信号強度の増加割合は、腫瘍中に含まれる ICG 濃度とも比例関係が見られた (Figure 2-3-10D)。



**Figure 2-3-10.** *In vivo* PA imaging of tumor-bearing mice administered with P14-ICG7.8. Photographs of tumor-bearing mice placed in the PA imaging device (A). The square region indicates the measurement area. (B, C) PA images (view from the bottom) before (B) and at 24 h after (C) probe administration (Left to right: tumor regions injected with 13, 26, 52, 78, and 104 nmol ICG and non-tumor regions (thighs) injected with 52 nmol ICG). Dotted circles and arrows indicated the tumor regions and blood vessels, respectively. Scale bar units: arbitrary unit. (D) Plot of PA signal intensity ratio (24 hours/pre) vs. injected dose of P14-ICG7.8. (E) Plot of PA signal intensity ratio (24 hours/pre) vs. P14-ICG7.8 concentration in isolated tumors.

ここまで得られた P14-ICG7.8 の結果を、第 2 章第 1 節に記載の HSA-ICG および第 2 章第 2 節に記載の PEG-ICG と比較した。HSA-ICG は ICG 結合数が多くなると、腫瘍集積量が減少した (2.1%ID/g (投与 24 時間後)) 一方で、P14-ICG7.8 は ICG 結合数 7.8 個においても、腫瘍集積量が高く維持されていた (9.4%ID/g (投与 24 時間後))。次に PEG20-ICG と比較した場合、P14-ICG7.8 の腫瘍集積量はわずかに少なかった (P14-ICG7.8 :  $9.4 \pm 0.6\%$  ID/g、PEG20-ICG :  $14.9 \pm 1.2\%$  ID/g)。しかしながら、同じ量の ICG を投与した場合、*in vivo* PAI で得られた PA 信号強度比 (プローブ投与前に対する投与 24 時間後の割合) は、ほぼ同程度であった (P14-ICG7.8 :  $8.3 \pm 3.9$ 、PEG20-ICG :  $7.2 \pm 2.1$ )。これは Figure 2-3-9 に示したように POZ-ICG に結合した ICG1 分子あたりの PA 信号の増加が要因であると考えられる。また、ICG がポリマー 1 分子に対し 1 個結合している PEG20-ICG に比較して、P14-ICG7.8 は ICG が複数結合しているため、結果として 1/10 程度のポリマー量で *in vivo* イメージングが可能になる。このことは、安全性とコストの両方の観点から好ましい。本節で実施したプローブ投与量の範囲内においてマウスには目立った副作用は見られなかったことから、POZ-ICG は毒性が低く前臨床試験に資する性質を有していることが確認できた。さらに、P14-ICG7.8 の腫瘍/血液比は PEG20-ICG に比較して有意に高かった (P14-ICG7.8 :  $6.3 \pm 1.0$ 、PEG20-ICG :  $1.2 \pm 0.1$ )。このため、P14-ICG7.8 を投与された担癌マウスの血管からの PA 信号強度はほとんど変化せず、腫瘍領域をコントラスト良く描出することができた (Figure 2-3-10AB)。

### 2.3.4 小括

本節では、POZ-ICG を作製し、担癌マウスを用いた蛍光測定による腫瘍集積評価および、血中濃度評価により、POZ 分子量、POZ 加水分解割合、ICG 結合数の 3 項目を基に最適な分子構造を探索した。その結果得られたプローブについて、*in vivo* PAI によって有効性を評価し、以下に述べる結果を得た。

- (1) 7 種類の分子量の異なる POZ-ICG、ならびに、5 種類の加水分解割合の異なる POZ-ICG、ならびに、19 種類の ICG 結合数の異なる POZ-ICG を設計・合成した。
- (2) 分子量が増加するに従い、腫瘍集積量および血中半減時間が増加した。投与 24 時間後における腫瘍/血液比の値から、分子量 25 kDa、50 kDa の 2 種類が PAI に好適な性質を有することが示唆された。
- (3) 加水分解割合が増加するに従い、腫瘍集積量および血中半減時間が減少した。生体内にて正に帯電することが一因であると示唆された。
- (4) 加水分解割合 2.5% では多くの ICG を結合できなかった。一方、加水分解割合 10% では、多くの ICG を結合させると腫瘍集積量が低下した。分子量 50 kDa の加水分解割合 5% において ICG 結合数を増加させた場合においても腫瘍集積量が高く維持され、かつ、高い腫瘍/血液比を示した。
- (5) *in vitro* 蛍光測定および PA 信号測定では、POZ に結合した ICG の数が増加するに伴い蛍光信号強度が低下し、PA 信号強度は増加した。
- (6) P14-ICG7.8 を投与した *in vivo* PAI では血管からの信号強度は変化しない一方で、腫瘍を明瞭に描出し、腫瘍部からは投与量および集積量依存的に PA 信号が増加した。

以上の結果より、POZ-ICG は HSA-ICG および PEG-ICG に比べて多くの ICG を結合でき、かつ、高い腫瘍/血液比を示すことが分かり、がんの高感度な PAI プローブとして有効である可能性が示された。

## 結語

本研究では、がんの高感度な光超音波イメージングを目的として、光超音波信号を発する光吸収体の比較検討、および、多くの光吸収体を高効率にがんへ送達させるイメージングプローブの設計およびその評価を行い、以下の知見を得た。

1. 2種類の光吸収体、IONPおよびICG、さらにそれぞれに抗体を結合したIONP-IgGおよびICG-IgGを合成した。波長可変レーザーおよび超音波探触子からなるPA信号測定装置を作製し、抗体結合の有無に寄らずICGの方が強いPA信号が得られることを示した。以上の結果より、ICGがPAIプローブの光吸収体として好適な性質を有することを明らかにした。

2. EPR効果によってICGをがんへ送達するキャリアとしてHSAを選択し、3種類のICG結合数の異なるHSA-ICG、ならびに、それぞれのHSA-ICGを<sup>111</sup>In標識したイメージングプローブを作製した。*In vitro*におけるPA信号強度は、HSAへのICG結合数が増加するに従い増加することを示した。また、*in vivo*において、HSAへのICG結合数が増加するに従い、投与24時間後の血中濃度および腫瘍集積量は減少することを示した。最もPAIに好適な性質を有するHSA-ICG2.9を投与した*in vivo* PAIでは腫瘍を明瞭に描出し、腫瘍部からは投与量依存的にPA信号が増加することを示した。以上の結果より、EPR効果を利用したHSA-ICGはがんのPAIを可能にすることを明らかにした。

3. HSA-ICGよりさらに有効なPAIプローブ開発を目指し、水溶性高分子であるPEGを選択し、4種類の分子量の異なるPEG-ICG、ならびに、分子量20 kDaのPEG-ICGを<sup>111</sup>In標識したイメージングプローブを設計・合成した。*In vitro*におけるPA信号強度は、いずれのPEG-ICGもICGと同程度であることを示した。また、*in vivo*において、PEG-ICGの分子量が増加するに従い、腫瘍集積量が増加し血中滞留時間が延長すること、正常組織に目立った集積はみられないことを示した。最もPAIに好適な性質を有するPEG20-ICGを投与した*in vivo* PAIでは腫瘍を明瞭に描出し、腫瘍部では投与量依存的にPA信号が増加することを示した。以上の結果より、水溶性合成高分子を母体としたPEG-ICGはEPR効果で腫瘍へ集積し、がんのPAIのためのイメージングプローブとして有効であることを明らかにした。

4. PEG-ICGより高感度なPAIプローブ開発を目指し、より多くのICGを結合でき、かつ血液から早期に消失する可能性のある水溶性高分子POZを選択した。POZ分子量、POZ加水分解割合、ICG結合数の3項目を基に最適な分子構造を探索するため、7種類の分子量の異なるPOZ-ICG、ならびに、5種類の加水分解割合の異なるPOZ-ICG、ならびに、19種類のICG結合数の異なるPOZ-ICGを設計・合成した。*in vivo*において、分子量が増加するに従い、腫瘍集積量および血中半減時間が増加すること、加水分解割合が増加す

るに従い、腫瘍集積量および血中半減時間が減少すること、一定数以上の ICG が結合すると腫瘍集積は低下することを示した。また、*in vitro* 測定では、POZ に結合した ICG の数が増加するに伴い蛍光信号強度が低下し、PA 信号強度は増加することを示した。PEG-ICG よりも高い腫瘍/血液比を示し、腫瘍集積量も高い P14-ICG7.8 を投与した *in vivo* PAI では血管からの信号強度は変化しない一方で、腫瘍を明瞭に描出し、腫瘍部からは投与量および集積量依存的に PA 信号が増加した。以上の結果より、POZ-ICG は HSA-ICG および PEG-ICG に比べて多くの ICG を結合でき、かつ、高い腫瘍/血液比を示すことが分かり、がんの高感度な PAI プローブとして有効である可能性を明らかにした。

以上、本研究は、がんの高感度な PAI のためのイメージングプローブの開発に基礎的な成果を収めたものである。これらの知見は、今後のがんの基礎的研究および臨床画像診断診断への PAI の利用において有益な情報を提供するものと考えられる。

## 引用文献

1. 構成労働省 平成 27 年 (2015) 人口動態統計の年間推計  
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/suikai15/> (2016 年 10 月)
2. Weissleder, R.; Pittet, M. J. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* **452**, 580–589 (2008).
3. Ntziachristos, V. Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology. *Nat Methods*, **7**(8), 603–614 (2010).
4. Razansky, D.; Deliolanis, N. C.; Vinegoni, C.; Ntziachristos, V. Deep tissue optical and optoacoustic molecular imaging technologies for pre-clinical research and drug discovery. *Curr Pharm Biotechnol*, **13**(4), 504-522 (2012).
5. Laufer, J.; Johnson, P.; Zhang, E.; Treeby, B.; Cox, B.; Pedley, B.; Beard, P. *In vivo* preclinical photoacoustic imaging of tumor vasculature development and therapy. *J Biomed Opt*, **17**(5), 056016 (2012).
6. Luke, G. P.; Yeager, D.; Emelianov, S. Y. Biomedical applications of photoacoustic imaging with exogenous contrast agents. *Ann Biomed Eng*, **40**(2), 422–437 (2012).
7. Cho, W. S.; Cho, M.; Kim, S. R.; Choi, M.; Lee, J. Y.; Han, B. S.; Park, S. N.; Yu, M. K.; Jon, S.; Jeong, J. Pulmonary toxicity and kinetic study of Cy5.5-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles by optical imaging. *Toxicol Appl Pharmacol*, **239**(1), 106-115 (2009).
8. Tang, J.; Myers, M.; Bosnick, K. A.; Brus, L. E. Magnetite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanocrystals: Spectroscopic Observation of Aqueous Oxidation Kinetics. *J Phys Chem B*, **107**(30), 7501-7506 (2003).
9. Dzurinko, V. L.; Gurwood, A. S.; Price, J. R. Intravenous and indocyanine green angiography. *Optometry*, **75**(12), 743–755 (2004).
10. Sakka, S. G. Assessing liver function. *Curr Opin Crit Care*, **13**(2), 207–214 (2007).
11. Ishima, Y.; Chen, D.; Fang, J.; Maeda, H.; Minomo, A.; Kragh-Hansen, U.; Kai, T.; Maruyama, T.; Otagiri, M. *S*-Nitrosated human serum albumin dimer is not only a novel anti-tumor drug but also a potentiator for anti-tumor drugs with augmented EPR effects. *Bioconjug Chem*, **23**(2), 264–271 (2012).
12. Pasut, G.; Veronese, F. M.; State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research. *J Control Release*, **161**(2), 461–472 (2012).
13. Fruijtier-Pöllöth, C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicology*, **214**(1-2) 1–38 (2005).

14. Gaertner, F. C.; Luxenhofer, R.; Blechert, B.; Jordan, R.; Essler, M. Synthesis, biodistribution and excretion of radiolabeled poly(2-alkyl-2-oxazoline)s. *J Controlled Release*, **119**(3), 291–300 (2007).
15. Frangioni, J. V. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol*, **7**(5), 626–634 (2003).
16. Liu, Z.; Cai, W.; He, L.; Nakayama, N.; Chen, K.; Sun, X.; Chen, X.; Dai, H. *In vivo* biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nat Nanotechnol*, **2**(1), 47–52 (2007).
17. Li, P. C.; Wang, C. R.; Shieh, D. B.; Wei, C. W.; Liao, C. K.; Poe, C.; Jhan, S.; Ding, A. A.; Wu, Y. N. *In vivo* photoacoustic molecular imaging with simultaneous multiple selective targeting using antibody-conjugated gold nanorods. *Opt Express*, **16**(23), 18605–18615 (2008).
18. de la Zerda, A.; Liu, Z.; Bodapati, S.; Teed, R.; Vaithilingam, S.; Khuri-Yakub, B. T.; Chen, X.; Dai, H.; Gambhir S. S. Ultrahigh sensitivity carbon nanotube agents for photoacoustic molecular imaging in living mice. *Nano Lett*, **10**(6), 2168–2172 (2010).
19. Cheng, K.; Kothapalli, S. R.; Liu, H.; Koh, A. L.; Jokerst, J. V.; Jiang, H.; Yang, M.; Li, J.; Levi, J.; Wu, J. C.; Gambhir, S. S.; Cheng, Z. Construction and validation of nano gold tripods for molecular imaging of living subjects. *J Am Chem Soc*, **136**(9), 3560–3571 (2014).
20. Yang, S. T.; Wang, X.; Jia, G.; Gu, Y.; Wang, T.; Nie, H.; Ge, C.; Wang, H.; Liu, Y. Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice. *Toxicol Lett*, **181**(3), 182–189 (2008).
21. Nie, L.; Wang, S.; Wang, X.; Rong, P.; Ma, Y.; Liu, G.; Huang, P.; Lu G.; Chen X. *In vivo* volumetric photoacoustic molecular angiography and therapeutic monitoring with targeted plasmonic nanostars, *Small*, **10**(8), 1585-1593 (2014).
22. Levy, M.; Luciani, N.; Alloyeau, D.; Elgrabli, D.; Deveaux, V.; Pechoux, C.; Chat, S.; Wang, G.; Vats, N.; Gendron, F.; Factor, C.; Lotersztajn, S.; Luciani, A.; Wilhelm, C.; Gazeau, F. Long term *in vivo* biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, **32**(16), 3988-3999 (2011).
23. Lartigue, L.; Alloyeau, D.; Kolosnjaj-Tabi, J.; Javed, Y.; Guardia, P.; Riedinger, A.; Péchoux, C.; Pellegrino, T.; Wilhelm, C.; Gazeau, F. Biodegradation of iron oxide nanocubes: high-resolution *in situ* monitoring. *ACS Nano*, **7**(5), 3939-3952 (2013).
24. Grootendorst, D. J.; Jose, J.; Fratila, R. M.; Visscher, M.; Velders, A. H.; Ten Haken, B.; Van Leeuwen, T. G.; Steenbergen, W.; Manohar, S.; Ruers, T. J. Evaluation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Endorem®) as a

- photoacoustic contrast agent for intra-operative nodal staging. *Contrast Media Mol Imaging*, **8**(1), 83-91 (2013).
25. Sano, K.; Nakajima, T.; Miyazaki, K.; Ohuchi, Y.; Ikegami, T.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Short PEG-linkers improve the performance of targeted, activatable monoclonal antibody-indocyanine green optical imaging probes. *Bioconjugate Chem*, **24**(5), 811-816 (2013).
  26. Slamon, D. J.; Clark, G. M.; Wong, S. G.; Levin, W. J.; Ullrich, A.; McGuire, W. L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, **235**(4785), 177-182 (1987).
  27. Park, D. I.; Yun, J. W.; Park, J. H.; Oh, S. J.; Kim, H. J.; Cho, Y. K.; Sohn, C. I.; Jeon, W. K.; Kim, B. I.; Yoo, C. H.; Son, B. H.; Cho, E. Y.; Chae, S. W.; Kim, E. J.; Sohn, J. H.; Ryu, S. H.; Sepulveda, A. R. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Dig Dis Sci*, **51**(8), 1371-1379 (2006).
  28. Berchuck, A.; Kamel, A.; Whitaker, R.; Kerns, B.; Olt, G.; Kinney, R.; Soper, J. T.; Dodge, R.; Clarke-Pearson, D. L.; Marks, P.; McKenzie, S.; Yin, S.; Bast, R. C. Jr. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, **50**(13), 4087-4091 (1990).
  29. FDA approval letter, Reference No.98-0369.
  30. Gullick, W. J.; Marsden, J. J.; Whittle, N.; Ward, B.; Bobrow, L.; Waterfield, M. D. Expression of epidermal growth factor receptors on human cervical, ovarian, and vulval carcinomas. *Cancer Res*, **46**(1), 285-292 (1986).
  31. Salomon, D. S.; Brandt, R.; Ciardiello, F.; Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, **19**(3), 183-232 (1995).
  32. de la Zerda, A.; Kim, J. W.; Galanzha, E. I.; Gambhir, S. S.; Zharov, V. P. Advanced contrast nanoagents for photoacoustic molecular imaging, cytometry, blood test and photothermal theranostics. *Contrast Media Mol. Imaging*, **6**(5), 346–369 (2011).
  33. Cherrick, G. R.; Stein, S. W.; Leevy, C. M.; Davidson, C. S. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J Clin Invest*, **39**(4), 592–600 (1960).
  34. Dawson, C. A.; Linehan, J. H.; Rickaby, D. A.; Roerig, D. L. Influence of plasma protein on the inhibitory effects of indocyanine green and bromocresol green on pulmonary prostaglandin E1 extraction,” *Br J Pharmacol*, **81**(3), 449–455 (1984).
  35. Maeda, H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs *via* the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjug Chem*, **21**(5), 797–802

- (2010).
36. Maeda, H.; Matsumura, Y. EPR effect based drug design and clinical outlook for enhanced cancer chemotherapy. *Adv Drug Delivery Rev*, **63**(3), 129–130 (2011).
  37. Elsadek, B.; Kratz, F. Impact of albumin on drug delivery—new applications on the horizon. *J Control Release*, **157**(1), 4–28 (2012).
  38. Tullis, J. L. Albumin. 2. Guidelines for clinical use, *JAMA*, **237**(5), 460–463 (1977).
  39. Vermeulen, L. C. Jr; Ratko, T. A.; Erstad, B. L.; Brecher, M. E.; Matuszewski, K. A. A paradigm for consensus. The University Hospital Consortium guidelines for the use of albumin, nonprotein colloid, and crystalloid solutions. *Arch Int Med*, **155**(4), 373–379 (1995).
  40. Mendez, C. M.; McClain, C. J.; Marsano, L. S. Albumin therapy in clinical practice. *Nutr Clin Pract*, **20**(3), 314–320 (2005).
  41. Evans, T. W. Review article: albumin as a drug—biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther*, **16**(Suppl 5), 6–11 (2002).
  42. Cook, J. R.; Bouchard, R. R.; Emelianov, S. Y. Tissue-mimicking phantoms for photoacoustic and ultrasonic imaging. *Biomed Opt Express*, **2**(11), 3193–3206 (2011).
  43. Mehrmohammadi, M.; Yoon, S. J.; Yeager, D.; Emelianov, S. Y. Photoacoustic Imaging for Cancer Detection and Staging. *Curr Mol Imag*, **2**(1), 89–105 (2013).
  44. de la Zerda, A.; Bodapati, S.; Teed, R.; May, S. Y.; Tabakman, S. M.; Liu, Z.; Khuri-Yakub, B. T.; Chen, X.; Dai, H.; Gambhir, S. S. Family of enhanced photoacoustic imaging agents for high-sensitivity and multiplexing studies in living mice. *ACS Nano*, **6**(6), 4694–4701 (2012).
  45. Kim, C.; Cho, E. C.; Chen, J.; Song, K. H.; Au, L.; Favazza, C.; Zhang, Q.; Copley, C. M.; Gao, F.; Xia, Y.; Wang, L. V. *In vivo* molecular photoacoustic tomography of melanomas targeted by bioconjugated gold nanocages. *ACS Nano*, **4**(8), 4559–4564 (2010).
  46. Sano, K.; Mitsunaga, M.; Nakajima, T.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *In vivo* breast cancer characterization imaging using two monoclonal antibodies activatably labeled with near infrared fluorophores. *Breast Cancer Res*, **14**(2), R61 (2012).
  47. Sano, K.; Nakajima, T.; Ali, T.; Bartlett, D. W.; Wu, A. M.; Kim, I.; Paik, C. H.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Activatable fluorescent cys-diabody conjugated with indocyanine green derivative: consideration of fluorescent catabolite

- kinetics on molecular imaging. *J Biomed Opt*, **18**(10), 101304 (2013).
48. McDonnell, T.; Ioannou, Y.; Rahman, A. PEGylated drugs in rheumatology - why develop them and do they work? *Rheumatology (Oxford)*, **53**(3), 391–396 (2014).
  49. Prantner, A. M.; Scholler, N. Biological barriers and current strategies for modifying nanoparticle bioavailability. *J Nanosci Nanotechnol*, **14**(1), 115–125 (2014).
  50. Davis, F. F. The origin of pegnology. *Adv Drug Deliv Rev*, **54**(4), 457–458 (2002).
  51. Sims, G. E.; Snape, T. J. A method for the estimation of polyethylene glycol in plasma protein fractions. *Anal Biochem*, **107**(1), 60–63 (1980).
  52. Zambaux, M. F.; Bonneaux, F.; Gref, R.; Dellacherie, E.; Vigneron, C. Protein C-loaded monomethoxypoly (ethylene oxide)-poly(lactic acid) nanoparticles. *Int J Pharm*, **212**(1), 1–9 (2001).
  53. Yamaoka, T.; Tabata, Y.; Ikada, Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J Pharm Sci*, **83**(4), 601–606 (1994).
  54. Harris, J. M.; Chess, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov*, **2**(3), 214–221 (2003).
  55. Fee, C. J.; Van Alstine, J. M. Prediction of the viscosity radius and the size exclusion chromatography behavior of PEGylated proteins. *Bioconjugate chem*, **15**(6), 1304–1313 (2004).
  56. Liu, J.; Yu, M.; Zhou, C.; Zheng, J. Renal clearable inorganic nanoparticles: a new frontier of bionanotechnology. *Material Today*, **16**(12), 477–486 (2013).
  57. Choi, H. S.; Liu, W.; Misra, P.; Tanaka, E.; Zimmer, J. P.; Itty Ipe, B.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V. Renal clearance of quantum dots. *Nature Biotechnol*, **25**, 1165–1170 (2007).
  58. Veronese, F. M.; Pasut, G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today*, **10**(21), 1451–1458 (2005).
  59. Sano, K.; Ohashi, M.; Kanazaki, K.; Ding, N.; Deguchi, J.; Kanada, Y.; Ono, M.; Saji, H. *In vivo* photoacoustic imaging of cancer using indocyanine green-labeled monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **464**(3), 820–825 (2015).
  60. Viegas, T. X.; Bentley, M. D.; Harris, J. M.; Fang, Z.; Yoon, K.; Dizman, B.; Weimer, R.; Mero, A.; Pasut, G.; Veronese, F. M. Polyoxazoline: chemistry, properties, and applications in drug delivery. *Bioconjug Chem*, **22**(5), 976–986 (2011).
  61. Luxenhofer, R.; Han, Y.; Schulz, A.; Tong, J.; He, Z.; Kabanov, A. V.; Jordan, R.

- Poly(2-oxazoline)s as polymer therapeutics. *Macromol Rapid Commun*, **33**(19), 1613–1631 (2012).
62. Obeid, R.; Scholz, C. Synthesis and self-assembly of well-defined poly(amino acid) end-capped poly(ethylene glycol) and poly(2-methyl-2-oxazoline). *Biomacromolecules*, **12**(10), 3797–3804 (2011).
  63. Gaspar, V. M.; Gonçalves, C.; de Melo-Diogo, D.; Costa, E. C.; Queiroz, J. A.; Pichon, C.; Sousa, F.; Correia, I. J. Poly(2-ethyl-2-oxazoline)-PLA-g-PEI amphiphilic triblock micelles for co-delivery of minicircle DNA and chemotherapeutics. *J Controlled Release*, **189**, 90–104 (2014).
  64. Mero, A.; Pasut, G.; Dalla Via, L.; Fijten, M. W.; Schubert, U. S.; Hoogenboom, R.; Veronese, F. M. Synthesis and characterization of poly(2-ethyl 2-oxazoline)-conjugates with proteins and drugs: suitable alternatives to PEG-conjugates? *J Controlled Release*, **125**(2), 87–95 (2008).
  65. Tong, J.; Yi, X.; Luxenhofer, R.; Banks, W. A.; Jordan, R.; Zimmerman, M. C.; Kabanov, A. V. Conjugates of superoxide dismutase 1 with amphiphilic poly(2-oxazoline) block copolymers for enhanced brain delivery: synthesis, characterization and evaluation *in vitro* and *in vivo*. *Mol Pharmaceutics*, **10**(1), 360–377 (2013).
  66. Takakura, Y.; Hashida, M. Macromolecular Carrier Systems for Targeted Drug Delivery: Pharmacokinetic Considerations on Biodistribution. *Pharm Res*, **13**(6), 820–831 (1996).
  67. Hoogenboom, R.; Wiesbrock, F.; Leenen, M. A.; Meier, M. A.; Schubert, U. S. Accelerating the living polymerization of 2-nonyl-2-oxazoline by implementing a microwave synthesizer into a high-throughput experimentation workflow. *J Comb Chem*, **7**(1), 10–13 (2005).
  68. Huang, H.; Hoogenboom, R.; Leenen, M. A.; Guillet, P.; Jonas, A. M.; Schubert, U. S.; Gohy, J. F. Solvent-induced morphological transition in core-cross-linked block copolymer micelles. *J Am Chem Soc*, **128**(11), 3784–3788 (2006).
  69. Brissault, B.; Kichler, A.; Guis, C.; Leborgne, C.; Danos, O.; Cheradame, H. Synthesis of linear polyethylenimine derivatives for DNA transfection. *Bioconjugate Chem*, **14**(3), 581–587 (2003).
  70. Chujo, Y.; Sada, K.; Saegusa, T. Reversible gelation of polyoxazoline by means of Diels-Alder reaction. *Macromolecules*, **23**(10), 2636–2641 (1990).
  71. Xiao, K.; Li, Y.; Luo, J.; Lee, J. S.; Xiao, W.; Gonik, A. M.; Agarwal, R. G.; Lam, K. S. The effect of surface charge on *in vivo* biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials*, **32**(13), 3435–3446 (2011).
  72. Dellian, M.; Yuan, F.; Trubetskoy, V. S.; Torchilin, V. P.; Jain, R. K. Vascular permeability in a human tumour xenograft: molecular charge dependence. *Br*

- J Cancer*, **82**(9), 1513–1518 (2000).
73. Bai, M.; Achilefu, S. Synthesis and spectroscopy of near infrared fluorescent dyes for investigating dichromic fluorescence. *Bioorg Med Chem Lett*, **21**(1), 280–284 (2011).
74. Jo, J.; Nagane, K.; Yamamoto, M.; Tabata, Y. Effect of amine type on the expression of plasmid DNA by cationized dextran. *J Biomater Sci Polym Ed*, **21**(2), 225–236 (2010).
75. Berezin, M. Y.; Guo, K.; Akers, W.; Livingston, J.; Solomon, M.; Lee, H.; Liang, K.; Agee, A.; Achilefu, S. Rational approach to select small peptide molecular probes labeled with fluorescent cyanine dyes for *in vivo* optical imaging. *Biochemistry*, **50**(13), 2691–2700 (2011).
76. Temma, T.; Onoe, S.; Kanazaki, K.; Ono, M.; Saji, H. Preclinical evaluation of a novel cyanine dye for tumor imaging with *in vivo* photoacoustic imaging. *J Biomed Opt*, **19**(9), 090501 (2014).
77. Onoe, S.; Temma, T.; Kanazaki, K.; Ono, M.; Saji, H. Development of photostabilized asymmetrical cyanine dyes for *in vivo* photoacoustic imaging of tumors. *J Biomed Opt*, **20**(9), 096006 (2015).
78. Mordon, S.; Devoisselle, J. M.; Soulie-Begu, S.; Desmettre, T. Indocyanine green: physicochemical factors affecting its fluorescence *in vivo*. *Microvasc Res*, **55**(2), 146–152 (1998).
79. Dragulescu-Andrasi, A.; Kothapalli, S. R.; Tikhomirov, G. A.; Rao, J.; Gambhir, S. S. Activatable oligomerizable imaging agents for photoacoustic imaging of furin-like activity in living subjects. *J Am Chem Soc*, **135**(30), 11015–11022 (2013).
80. Qin, H.; Zhou, T.; Yang, S.; Xing, D. Fluorescence quenching nanoprobe dedicated to *in vivo* photoacoustic imaging and high-efficient tumor therapy in deep-seated tissue. *Small*, **11**(22), 2675–2686 (2015).

## 謝辞

本研究の終わりに鑑み、終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 佐治 英郎 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

同時に、本研究の遂行および本論文の作成にあたり、懇切なる御指導と御教示を戴きました神戸薬科大学薬品物理化学研究室 佐野 紘平 講師に深く感謝申し上げます。

本研究全般にわたり有益な御助言、御指導を戴きました、京都大学大学院薬学研究科 小野 正博 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり有益な御助言と御指導、御協力を戴きました福井大学高エネルギー医学研究センター 牧野 顕 准教授、国立循環器病研究センター 天満 敬 室長、昭和薬科大学薬品物理化学研究室 尾江 悟 助教、京都大学医学部附属病院 志水 陽一 助教、京都大学大学院薬学研究科 渡邊 裕之 助教、京都薬科大学代謝分析学分野 木村 寛之 准教授、キヤノン株式会社 本間 務 氏、小林 秀一 氏に厚く御礼申し上げます。

さらに、ともに実験を進め、御協力を戴きました京都大学大学院薬学研究科 近藤 直哉 博士、松村 憲志 博士、吉村 優志 修士、松岡 大航 学士、丁寧 修士、大橋 愛美 学士、出口 諄 学士、金田 侑子 氏をはじめ、病態機能分析学分野の方々にそれぞれ謹んで御礼申し上げます。

最後に、著者が研究に専念できるように陰ながら支えて下さいました家族、友人に感謝致します。