

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3816809号  
(P3816809)

(45) 発行日 平成18年8月30日(2006.8.30)

(24) 登録日 平成18年6月16日(2006.6.16)

(51) Int. Cl. F I  
**A 6 1 K 41/00 (2006.01)** A 6 1 K 41/00  
**A 6 1 K 31/352 (2006.01)** A 6 1 K 31/352  
**A 6 1 K 31/409 (2006.01)** A 6 1 K 31/409  
**A 6 1 K 31/555 (2006.01)** A 6 1 K 31/555  
**A 6 1 K 45/00 (2006.01)** A 6 1 K 45/00

請求項の数 4 (全 13 頁) 最終頁に続く

<p>(21) 出願番号 特願2002-22254 (P2002-22254)</p> <p>(22) 出願日 平成14年1月30日(2002.1.30)</p> <p>(65) 公開番号 特開2003-226654 (P2003-226654A)</p> <p>(43) 公開日 平成15年8月12日(2003.8.12)</p> <p>審査請求日 平成14年1月30日(2002.1.30)</p> <p>(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願(平成13年度新エネルギー・産業技術総合開発機構(再)委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)</p>	<p>(73) 特許権者 000005108 株式会社日立製作所 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号</p> <p>(74) 代理人 100091096 弁理士 平木 祐輔</p> <p>(72) 発明者 川畑 健一 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社 日立製作所 中央研究所内</p> <p>(72) 発明者 梅村 晋一郎 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社 日立製作所 中央研究所内</p> <p>(72) 発明者 佐々木 一昭 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社 日立製作所 中央研究所内</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(54) 【発明の名称】 薬剤、薬剤キャリア、薬剤の製造方法及び腫瘍の治療方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

内部の空間に気体を封入したタンパク質からなる外殻を有し、  
 前記外殻に超音波照射により生じた音響キャビテーションにより活性酸素を発生する物質として、親油性を有し光増感能を有する抗がん剤、キサンテン系色素増感剤、ポルフィリン系色素増感剤のいずれかを保持し、

前記外殻は外径が0.1 μm以上5 μm以下の球殻状の形状を有することを特徴とする薬剤。

【請求項2】

請求項1記載の薬剤において、前記タンパク質は界面活性作用を有することを特徴とする薬剤。 10

【請求項3】

請求項1記載の薬剤において、前記タンパク質は、アルブミン、LDL、ヘモグロビン、サポニン又はプロテインZであることを特徴とする薬剤。

【請求項4】

超音波照射と併用して用いられる薬剤の製造方法において、  
 界面活性作用を有するタンパク質と、超音波照射により生じた音響キャビテーションにより活性酸素を発生する物質として、親油性を有し光増感能を有する抗がん剤、キサンテン系色素増感剤、ポルフィリン系色素増感剤のいずれかとを含む溶液に対して超音波を照射し泡を生成する工程と、

前記生成した泡の中から外径が $0.1\ \mu\text{m}$ 以上 $5\ \mu\text{m}$ 以下の泡を選別する工程とを含むことを特徴とする超音波照射と併用して用いられる薬剤の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、超音波照射によって音響キャビテーションを生成し、その作用により治療・診断を行うための薬剤、薬剤キャリア、及びその薬剤を用いた治療方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

体外から収束超音波を照射することによる悪性腫瘍の治療は、手術に較べ低侵襲的であり、被施術者の術中における体力消耗や施術後のQuality of Lifeに関して原理的に優れていることから、今後その社会的価値を高めていくものと考えられる。収束超音波を用いる治療法は、生体組織による超音波エネルギーの吸収を通して患部の温度を上昇させる熱的なものと、化学物質と超音波との相互作用を用いる化学的なものとに分類することができる。後者のうち、超音波照射により活性酸素を発生する物質を用いる治療法が梅村らにより提案され(S. Umemura, et al.: Jpn J. Cancer Res. vol. 84 pp.582-586 (1993))、音響化学療法と名づけられている。

【0003】

音響化学治療は、治療効果を得る上で音響キャビテーションが重要な役割を担っていると考えられている。この目的のために、音響キャビテーションの生成・圧壊を効率的に行なう方法として、従来、専ら物理的な手段を用いるものが提案されてきた。特開平2-126848号公報には、 $1\sim 100\text{ms}$ の間隔で音場を切り変えて超音波を照射する技術が記載されている。この技術は、音響キャビテーションの生成に要する超音波照射時間が $1\sim 100\text{ms}$ であることに着目し、波面の異なる音場をこの時間間隔で切り替えながら超音波を照射するもので、一方の音場により生成した音響キャビテーションを、もう一方の音場により圧壊するというサイクルを繰り返し行なう。これにより、音場の切り替えを行わない場合に較べて、音響化学作用の効率を同じ超音波パワーにおいて一桁ほど改善することができる。また、米国特許第5523058号には、通常、反射物が存在する場合のみに得られる、音響キャビテーション生成に有利な波形を持つ超音波を、反射物がない状況においても得ることのできる技術が記載されている。この技術は、音響キャビテーション生成に有利な波形を、一つの周波数成分にその倍周波を重畳することにより得るものである。超音波照射を生体に行う際には、反射物の効果は必ずしも期待できないことから、この技術は、超音波照射による治療においてその効果の増進及び安全性の向上への寄与が期待される。

【0004】

また、特公平6-29196号公報には、超音波の抗腫瘍効果を化学的に高める方法として、超音波の化学作用により活性酸素を生成する物質を用いる方法が記載されている。この技術で用いられるポルフィリン等の物質は、超音波により生じた音響キャビテーションにより二次的に活性酸素を生じる機能を有しているが、キャビテーション閾値の低下を引き起こすことはできなかった。これに対し、W098/01131には、両親媒性のキサンテン系色素増感剤によりキャビテーション閾値の低下を生じ、かつ超音波により生じた音響キャビテーションにより二次的に活性酸素を生じる手法が記載されている。

【0005】

また、超音波診断の分野においては空気あるいは難溶性の気泡をタンパク質、界面活性剤などのシェルで被覆したマイクロバブル系造影剤が広く使われているが、A.A. AtchleyらがUltronics, vol.26, pp.280-285(1988)に報告しているように、これらの造影剤には音響キャビテーションの閾値を低下させる効果がある。この性質を用い、E.C. UngerらはAm. J. Cardiol., vol.29 (Supp. 2), S149に、造影剤表面に血栓選択性のあるペプチドを結合させた超音波と組み合わせて用いる血栓治療薬を提案している。しかしながら、マイクロバブル自身はキャビテーションを生じやすくする性質は有しているものの、超音波

照射により活性酸素などを生成するといった生理活性を有せず、上記血栓治療薬への応用においても、血栓溶解剤と併用する必要がある。また、造影剤として有効な数 $\mu\text{m}$ の直径の気泡は血管から組織への移行性が極めて低いことから、従来のマイクロバブル系造影剤をそのまま用いる場合には、血管内以外の部位への治療応用は困難である。

#### 【0006】

##### 【本発明が解決しようとする課題】

上に述べたように、音響キャビテーションによる生体作用を効率的に生成するための技術はいくつか提案されている。ところで、音響化学療法に用いる治療薬には、(1)腫瘍に集積し、(2)音響キャビテーションの閾値を低下させ、かつ、(3)超音波により生じた音響キャビテーションにより活性酸素を生じる、という三つの機能が要求される。この要求を部分的に満たすものとしてW098/01131に示された方法、すなわち両親媒性のキサンテン系色素増感剤によりキャビテーション閾値の低下を生じさせ、かつ超音波により生じたキャビテーションにより二次的に活性酸素を生じさせる方法がある。しかしながら、この方法は、ひとつの物質に三つの機能を持たせることから、特に音響キャビテーションにより二次的に活性酸素を生じるという機能においてポルフィリン系増感剤に比べて劣ってしまうことが課題であった。

10

#### 【0007】

また、超音波診断用の造影剤として用いられる、空気あるいは水に難溶性のガスをタンパク質あるいは界面活性剤などのシェル（外殻）により安定化した安定化気泡は、血管内においてキャビテーションを生成する音響強度を低下させる効果を有することから、薬剤と組み合わせることにより血管内治療への適用が期待されている。しかしながら、従来、安定化気泡と組み合わせられてきた薬剤は、血栓溶解剤あるいはDNAなどであり、特にキャビテーションと相互作用するものではなく、キャビテーションは薬剤の患部への浸透を助長するなど間接的な係わり合いをもつのみであった。

20

#### 【0008】

本発明は、このような従来技術の問題点に鑑み、(1)腫瘍に集積し、(2)音響キャビテーションの閾値を低下させ、(3)超音波により生じた音響キャビテーションにより二次的に活性酸素を生じる、という三つの機能を同時に有する音響化学療法に好適な薬剤を提供することを目的とする。また、本発明は、その薬剤を用いた腫瘍の治療方法を提供することをも目的とする。

30

#### 【0009】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、音響キャビテーションの閾値を低下させ、超音波により生じた音響キャビテーションにより二次的に活性酸素を生じるという効果を得るには、キャビテーションを生成する音響強度を低下させる効果を有する安定化気泡とキャビテーションにより活性酸素を生成する効果を有する成分とを含むよう構成された薬剤を用いることが好ましいとの考えに立ち、鋭意研究を重ねた。その結果、空気あるいは難溶性ガスをタンパク質あるいは界面活性剤などのシェル（外殻）で安定化させた安定化気泡及び該シェル相に配置した親油性を有しかつ超音波により生じた音響キャビテーションにより二次的に活性酸素を生じる機能を有する生理活性物質を含むよう構成された薬剤により目的を達成できることに想到した。

40

#### 【0010】

一般に、気泡などの微粒子を血管から体内に導入すると、微粒子の大きさにより、体内で存在する部位が異なる。例えば橋田充・高倉喜信著「生体内薬物送達学」101-105頁（産業図書、1996年）に記載されているように、超音波診断用の造影剤として用いられる直径1~10 $\mu\text{m}$ の気泡は主に血管及び肝臓中に存在する。また、サブ $\mu\text{m}$ サイズの微粒子は腫瘍に蓄積する。

#### 【0011】

図1は一般的な音響キャビテーションの過程を示したものであり、核生成、成長、共振、圧壊という過程を経る。直径1~10 $\mu\text{m}$ の安定化気泡は一般に超音波診断用に用いられ

50

る周波数である1～10 MHzに共振する大きさであり、この大きさの気泡を用いると、キャビテーションの効果が図に示す核生成、成長、圧壊の過程を経ずにいきなり圧壊のみで得られる。これにより、少ない超音波エネルギーでキャビテーションを生じることができ、このような原理により、Ultrasonics, vol.26, pp.280-285(1988)に記載されているように、安定化気泡はキャビテーション閾値を低下させる効果を持つ。安定化気泡のシェルの素材であるタンパク質あるいは界面活性剤は、一般に親油性の物質と容易に相互作用し、複合体を形成することが知られている。キャビテーションにより活性酸素を生じる機能を有する生理活性物質は一般に親油性であり、シェルの素材とキャビテーションにより活性酸素を生じる機能を有する親油性の生理活性物質との複合体は、安定化気泡がキャビテーションを低い音響強度で生じるよう働き、かつキャビテーションが生成した際には、音響キャビテーションにより活性酸素を生じる機能を有する生理活性物質により活性酸素が生成する。このことより、安定化気泡として直径1～10 μmの気泡を用いると、血管を対象とする場合には、血栓溶解などの効果、あるいは腫瘍組織への栄養血管を破壊し、腫瘍への栄養補給を絶つ効果を、血栓溶解剤あるいは腫瘍組織塞栓剤などに頼ることなく得ることができる。

10

**【0012】**

安定化気泡の直径が1 μmを下回る場合、キャビテーションは、上記成長、共振、圧壊の過程を経ることになり、直径1 μm以上の場合のように、いきなり圧壊を生じてキャビテーションを生成する効果は得られない。しかしながら、図1に示される核として安定化気泡を用いることにより、成長、共振、圧壊の過程を経てキャビテーションの効果を得ることが可能であり、核生成の過程を経ないことから、キャビテーションに必要な超音波強度は低下する。また、サブμmサイズの安定化気泡は腫瘍へ蓄積するため、腫瘍に集積し、かつキャビテーション閾値を低下させることのできる音響化学療法用治療薬を得ることが可能である。

20

**【0013】**

なお、米国特許第5,523,058号に記載されている基本波に第二高調波を重畳する超音波照射方法は、気泡成長の過程を促進することから、サブμmサイズの安定化気泡との組み合わせに適している。また、Deleckiらの報告(Ultrasound in Med. & Biol., vol.23, pp.1405-1412 (1997))によれば、生体中で数分間しか安定に存在しないことがわかっているマイクロバブル系超音波造影剤Albunex(登録商標)は、投与後数時間経過しても体内のキャビテーション閾値を低下させる。Albunex(登録商標)を構成するシェルは変性アルブミンであり、気泡崩壊後は界面活性剤のように小さい気泡を形成するよりもシェルが残骸となって存在する方が確率が高い。このシェルの残骸はタンパク質の集合体であり、サブμmの大きさのタンパク質の集合体を形成することによりキャビテーション閾値を低下させ、かつ腫瘍に集積させることが可能である。

30

**【0014】**

以上のような考察をもとに、生体に投与可能なタンパク質及び界面活性剤に関し検討した結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、超音波照射と併用して用いる本発明による薬剤は、内部空間に気体を封入した外殻を有し、前記外殻に超音波照射により活性酸素を発生する物質を保持したことを特徴とする。この薬剤は超音波照射と併用される。

40

**【0015】**

外殻の内部空間に封入する気体は、空気あるいは難溶性ガスとすることができる。超音波照射により活性酸素を発生する物質は外殻の表面に保持されていてもよいし、外殻の内部に保持されていてもよい。

外殻は外径が0.1 μm以上5 μm以下の球殻状の形状を有するものとする。薬剤として外径0.1 μm以上1 μm以下の安定化気泡を用いることにより、薬剤を腫瘍に蓄積させることができる。

**【0016】**

外殻を構成する材料はタンパク質、特に界面活性作用を有するタンパク質が好ましい。界

50

面活性作用を有するタンパク質としては、生体に対する毒性が低ければ特に制限はないが、血液中に多く存在するアルブミン、LDL、ヘモグロビンが特に望ましい。また、用途によってはサポニン、プロテインZなどの血液中には存在しないが発泡性の高いタンパク質も外殻を形成しやすい性質をもつことから外殻の材料として供され得る。

また、外殻を構成する材料は界面活性剤とすることもできる。界面活性剤としては特に制限はないが、生体毒性の低いものが適することから、リン脂質を用いることが望ましい。

#### 【0017】

外殻に保持され、超音波照射により活性酸素を発生する物質は、光増感能を有する抗がん剤、光増感能を有する色素である色素増感剤（キサンテン系色素増感剤、ポルフィリン系色素増感剤など）のいずれかとすることができる。本発明による薬剤キャリアは、薬剤成分を保持し超音波照射と併用して用いられるキャリアにおいて、気相の状態が存在する気体を内部に封入した平均外径が0.1 μm以上5 μm以下の外殻を備えることを特徴とする。薬剤キャリアとして外径0.1 μm以上1 μm以下のものを用いると、薬剤を腫瘍に蓄積させることができる。

10

#### 【0018】

本発明による超音波照射と併用して用いられる薬剤の製造方法は、界面活性作用を有するタンパク質と超音波照射により活性酸素を発生する物質とを含む溶液に対して超音波を照射し泡を生成する工程と、生成した泡の中から所望の寸法範囲の泡を選別する工程とを含むことを特徴とする。

#### 【0019】

選別工程では、フィルタや遠心分離機を用いて所望の外径範囲の泡を選別する。こうして選別された泡は、タンパク質の膜（外殻）で包まれ、膜の内部には気体が封入され、かつ、外殻をなすタンパク質の膜に超音波照射により活性酸素を発生する物質が保持されている。

20

#### 【0020】

本発明による腫瘍の治療方法は、平均外径が0.1 μm以上5 μm以下であって内部に気体を封入した外殻を備え、前記外殻に超音波照射により活性酸素を発生する物質を保持した薬剤を投与するステップと、患部に対して基本波と該基本波の第二高調波とを重畳して照射するステップとを含むことを特徴とする。基本波の周波数は0.1 ~ 1.5 MHzの範囲が好ましい。薬剤として外径0.1 μm以上1 μm以下の安定化気泡を用いると、薬剤を腫瘍に蓄積させることができる。

30

#### 【0021】

##### 【発明の実施の形態】

以下、図面を参照して本発明の実施の形態を説明する。ただし、本発明の適用は、以下に述べる具体例に限られるものではない。

#### 【0022】

##### 〔実施例1〕

タンパク質をシェルとする安定化気泡をキャリアとし、ヘマトポルフィリン2量体をシェルに配置した、本発明の薬剤の調製例について説明する。

ヒト血清アルブミン5 w/v%の水溶液100 mlにヘマトポルフィリン2量体0.1 gを添加し、攪拌した。透析によりアルブミンに吸着しないヘマトポルフィリン2量体を除去した後、超音波破碎機(20 kHz)により超音波を5分間照射し、気泡を発生させた。この際、雰囲気調整することによりキャリア内のガスを空気あるいは難溶性ガスに規定した。難溶性ガスあるいはガスの原料である液体としては、パーフルオロカーボンである $C_nF_{2n+2}$  (n = 1 ~ 9) あるいは $SF_6$ を用いた。超音波照射後、2 μmのフィルタによりサイズの大きい気泡を除去し、目的とするサブμmの直径を持つ安定化気泡を得た(最大分布粒径: 0.7 μm)。

40

#### 【0023】

一般に、超音波の周波数が低い(20 ~ 数千100 kHz)場合には、キャビテーションの作用は機械的なものがメインであり、逆に周波数が高い(1 MHz近辺)場合には、化学

50

的な作用がメインとなる。後者においては、化学的な作用により活性酸素が生成し、これにより酸化・還元が生じる。本実施例において気泡生成用に低周波の超音波を用いているのは、化学的な作用によりヘマトポルフィリン2量体の変成などが生じないようにするためである。逆に治療を行う際には、この活性酸素が重要であるので、20kHz程度の低い超音波周波数は適切ではない。また、通常、液体中の直径数 $\mu\text{m}$ あるいはそれ以下の大きさの気泡は、表面積/体積の比が小さいため、表面張力により複数の気泡で存在するよりも合体して大きな気泡を形成した方が有利である。この表面張力を低下させることにより、微小な気泡が安定に存在できるようになる。今回用いたアルブミンは界面活性剤としての機能を有しており、表面張力を低下させる能力を有する。この作用により、アルブミンをシェルとして有する構造の気泡は安定化される。

10

#### 【0024】

図2は、この安定化気泡の構造の概念図を示す。シェル51で気泡を安定化したものがキャリアであり、薬剤はこのキャリアのシェル51に超音波照射により活性酸素を発生する物質(本実施例の場合にはヘマトポルフィリン2量体)52が配置された構造となっている。シェル51の厚さは構成物質によって異なるが、1~50nm程度であり、サブミクロンあるいはミクロンの直径の気泡に対して極めて薄い。

#### 【0025】

気泡サイズ及び個数の確認には、気泡が微小孔を通る際の電気抵抗値の変化を指標として溶液中の気泡の大きさと個数の分布を測定するコールターカウンタを用いた。得られた薬剤溶液を4において保存し、一ヶ月後にコールターカウンタにより粒径を調べ、ほぼ変化していないことを確認した。作成直後および一ヶ月後の粒径分布を図3に示す。タンパク質として、ヒト血清アルブミン以外に、ヒト血清グロブリン、ヒトヘモグロビン、サボニン、プロテインZを用い、同様の結果を得た。

20

以下に、こうして得られた薬剤の特性に関して行った試験の結果を示す。

#### 【0026】

##### 試験例1

図4に概略を示す実験装置を用い、超音波と組み合わせて用いる本発明の薬剤がキャビテーション閾値を低下させる効果を測定した。キャビテーション生成の指標には、キャビテーションに特与とされ、かつ気泡の振動に直接関与する、照射した超音波の半分の周波数成分(分調波)の強度を用いた。

30

#### 【0027】

超音波と組み合わせて用いる本発明の薬剤を50mg/mlの濃度で含むリン酸緩衝液(pH=7.4)を試料溶液17として、試料溶液17を封入した30x25mmの大きさのポリエチレンバッグ16を、ピンチコック18a及び18bにより固定具19に固定し、脱気水14を満した水槽15に入れる。波形発生装置27により、周波数1MHzのサイン波と周波数2MHzのサイン波とを合成し増幅器26により増幅して、固定具23に保持される平面型超音波トランスデューサ22に入力した。超音波トランスデューサ22から周波数1MHzと2MHzとを重畳した超音波を同時に1分から2分間照射し、超音波の照射の間、試料溶液17からの音響信号を保持具21に保持される水中マイクロフォン20により測定した。水中マイクロフォン20で測定した音響信号をスペクトルアナライザ24に入力し、1MHzの分調波である500kHzの信号成分を1秒毎に取り出し、信号処理装置25により分調波成分の2乗の時間平均を求めた。分調波成分の自乗の時間平均を分調波強度と定義し、音響キャビテーション生成の大きさの指標とした。対照実験は、超音波と組み合わせて用いる本発明の治療薬を含むリン酸緩衝液(pH=7.4)をリン酸緩衝液(pH=7.4)に置き換えて行なった。

40

#### 【0028】

試験結果の一例を図5に示す。超音波と組み合わせて用いる治療薬としては、実施例1に示したアルブミンからなるタンパク質キャリアとヘマトポルフィリン2量体とを含むものを用いた。タンパク質キャリアのみの結果も併せて示した。超音波と組み合わせて用いる治療薬及びタンパク質キャリアでは約2W/cm<sup>2</sup>以上で音響キャビテーションが生じ、

50

音響強度の増加に伴い、分調波強度も増加している。これに対し、対照実験においては  $10\text{ W} / \text{cm}^2$  でも音響キャビテーションが生じていない。また、ヘマトポルフィリン 2 量体単独では  $8\text{ W} / \text{cm}^2$  以上でのみ音響キャビテーションが生じている。このことから、本発明の治療薬が音響キャビテーション閾値を対照に比べ  $1 / 5$  以下、またヘマトポルフィリン 2 量体単独に比べ約  $1 / 4$  に低下させていることがわかる。この閾値低下効果はタンパク質キャリアによりもたらされることから、ヘマトポルフィリン 2 量体以外の生理活性物質、例えばキサントゲン系色素増感剤を用いても同様の効果が得られることは自明である。また、タンパク質キャリアとして、ヒト血清アルブミン以外に、ヒト血清グロブリン、ヒトヘモグロビン、サポニン、プロテイン Z を用いても、同様の結果が得られた。

【0029】

10

#### 試験例 2

第二高調波重畳法による超音波照射を用いたマウス腫瘍の治療実験を行った。抗腫瘍効果の測定（腫瘍増殖阻止試験）は、図 6 に示す実験系を用い、次のように行なった。7 週齢の雄性 BALB/c マウス（1 群 3 匹）の腹部皮下に Colon26 細胞を移植し、その後、腫瘍直径が約  $1\text{ cm}$  になった段階で、超音波と組み合わせて用いる本発明の治療薬を投与量  $50\text{ mg} / \text{kg}$  体重となるよう静脈注射した。固定具 19 に固定された麻酔されたマウス 28 を脱気水 14 を満した水槽 15 に入れ、皮下に移植した直径約  $1\text{ cm}$  の腫瘍が収束超音波トランスデューサ 29 の焦点の位置に来るよう固定具 19 を移動させる。超音波と組み合わせて用いる本発明の治療薬を静脈注射により投与した後、薬剤投与 12 時間後に、 $0.5\text{ MHz}$  及び  $1\text{ MHz}$  の超音波を重畳して同時にそれぞれ  $10\text{ W} / \text{cm}^2$  の音響強度で 5 分間照射し、超音波の照射後 14 日後に腫瘍 28 の重量を測定し、次式により腫瘍増殖阻止率を算出した。

20

【0030】

【数 1】

$$\text{腫瘍増殖阻止率(\%)} = \frac{\text{対照実験群の平均腫瘍重量} - \text{試験群の平均腫瘍重量}}{\text{対照実験群の平均腫瘍重量}} \times 100$$

対照実験群は、マウスに Colon26 細胞を移植した後に超音波と組み合わせて用いる本発明の治療薬の投与を行なって超音波を照射しない群、及びマウスに Colon26 細胞を移植した後に本発明の超音波と組み合わせて用いる治療薬の投与を行わずに超音波照射を行なう群からなる。

30

【0031】

本実施例の治療薬を用いた結果の一例を図 7 に示す。超音波照射を行なった場合の腫瘍増殖阻止率（抑制率）は、対照実験では  $10.2\%$  であるのに対して、治療薬としてアルブミンとヘマトポルフィリン 2 量体との組み合わせを用いた場合には  $70.5\%$  であり、約 7 倍の抗腫瘍効果が得られている。

【0032】

〔実施例 2〕

次に、ヘモグロビンをキャリアとし、ローズベンガルをキャリアのシェルに保持させた薬剤の調製例について説明する。

40

ヘモグロビン  $5\text{ w} / \text{v}\%$  の水溶液  $100\text{ ml}$  にローズベンガル  $0.1\text{ g}$  を添加し、攪拌した。透析によりアルブミンに吸着しないローズベンガルを除去した後、超音波破砕機（ $20\text{ kHz}$ ）により超音波を 3 分間照射して気泡を発生させた。超音波照射後、30 分間攪拌を行い、 $2\text{ }\mu\text{m}$  のフィルタによりサイズの大きい残さを除去し、目的とするサブ  $\mu\text{m}$  の大きさを持つ薬剤を得た。気泡サイズ及び濃度の確認には、コールターカウンタを用いた。結果の一例を図 8 に示す。

【0033】

本実施例の治療薬に関し、実施例 1 の試験例 2 と同様の実験系を用いてマウス腫瘍への治療効果を調べた結果を図 9 に示す。超音波照射を行なった場合の腫瘍増殖阻止率（抑制率）は、対照実験では  $10.2\%$  であるのに対して、治療薬としてヘモグロビンとローズベ

50

ンガルとの組み合わせを用いた場合には60.2%であり、約6倍の抗腫瘍効果が得られている。タンパク質として、ヒトヘモグロビン以外に、ヒト血清アルブミン、ヒト血清グロブリン、サポニン、プロテインZを用いても同様の結果が得られた。

【0034】

〔実施例3〕

次に、タンパク質をキャリアとし、ローズベンガルをキャリアと混合させた薬剤の調製例について説明する。

ヒト血清アルブミン5w/v%の水溶液100mlに超音波破砕機(20kHz)により超音波を5分間照射し、気泡を発生させた。この際、雰囲気調整することによりキャリア内のガスを空気あるいは難溶性ガスに規定した。難溶性ガスあるいはガスの原料である液体としては、パーフルオロカーボンである $C_nF_{2n+2}$ ( $n=1\sim 9$ )あるいは $SF_6$ を用いた。超音波照射後、2 $\mu$ mのフィルタによりサイズの大きい気泡を除去し、安定化気泡キャリアを得た。この後、本キャリア分散液10mlと磷酸緩衝液100mlにローズベンガル0.1gを溶解した溶液5mlを足し合わせ、ゆるやかに攪拌することにより目的とするタンパク質をキャリアとし、ローズベンガルをキャリアと混合させた薬剤を得た。

10

【0035】

〔実施例4〕

タンパク質をシェルとする安定化気泡をキャリアとし、ヘマトポルフィリン2量体をシェルに配置した超音波と組み合わせて用いる治療薬と第二高調波重畳法による超音波照射を用いた腫瘍治療の例について説明する。

20

【0036】

図10に、超音波と組み合わせて用いる本発明の治療薬により治療を行う治療装置の構成例を示す。本治療装置は、基本となる周波数の超音波(基本波)とその倍の周波数の超音波(第二高調波)とを焦点で重なるよう照射する第二高調波重畳法により超音波が照射できるようになっている。この第二高調波重畳法はキャビテーションを生成するのに適している。装置は、治療超音波コントローラ9により制御された信号発生部5,7により正弦波信号を発生させ、増幅部6,8により増幅して基本波用トランスデューサ2及び第二高調波用トランスデューサ3に交流電圧を印加することで超音波の照射を行うよう構成されている。超音波の照射は脱気水14を介して行われる。また、照準部コントローラ11により制御された照準用超音波診断プローブ4により得られた超音波断層像を元に画像処理部10にて治療用ガイダンスと共に表示する。システムコントローラ12を操作卓13により制御し、治療超音波コントローラ9に印加電圧、焦点位置などの情報を与える。

30

【0037】

治療の手順は、腫瘍1に基本波用トランスデューサ2及び第二高調波用トランスデューサ3が焦点を結ぶように、照準用超音波診断プローブ4を用いた画像診断により位置を調整する。システムコントローラ12により、治療位置を確認しつつ治療用超音波コントローラ9を制御して治療用超音波を照射する。キャビテーション閾値は周波数が高いほど高く、3MHz以下が実用的であることから、基本波としては、0.1~1.5MHzを用い、第二高調波としては0.2~3MHzを用いることが望ましい。また超音波強度は、部位により5~100W/cm<sup>2</sup>の範囲で変化させて用いる。

40

【0038】

本治療においては、治療効果は超音波照射によりキャビテーションを生成し、さらにキャビテーションによりヘマトポルフィリン2量体から生成する活性酸素により腫瘍細胞の細胞膜などの構成成分を酸化的に破壊することにより主に得られる。また、これに加えて、超音波エネルギーが生体に吸収されることによる加温作用も関与するものと期待される。本治療においては、キャビテーションをより低いエネルギーで生成する目的で治療部位において基本波に第二高調波を重畳する手法を用いている。

【0039】

図11に、試験例1に示す実験系を用いて基本波に第二高調波を重畳する手法がキャビテ

50

ーション生成に及ぼす効果の一例を示す。図 1 1 に示されているように、基本波 ( 0 . 5 M H z ) あるいは第二高調波 ( 1 . 0 M H z ) 単独ではほとんど分調波が生成せずキャビテーションが生じていないのに対し、重畳を行うとキャビテーションが生成し、特に重畳を 1 : 1 で行うときに最も強くキャビテーションの生成が認められる。

【 0 0 4 0 】

【 発明の効果 】

以上説明したように、超音波と組み合わせて用いる本発明の薬剤により、生体内にてキャビテーションを生成する効果及びキャビテーションにより活性酸素を生成する効果が得られ、このことにより高い効率で血管内あるいは腫瘍の治療・診断を行なうことができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 音響キャビテーションの過程を示す図。

【 図 2 】 本発明の薬剤の概念的な構造を示す図。

【 図 3 】 本発明の薬剤の粒径分布を示す図。

【 図 4 】 本発明の薬剤による音響キャビテーション閾値低下の効果を測定する実験系を示す図。

【 図 5 】 本発明の薬剤による音響キャビテーション閾値低下の効果を示す図。

【 図 6 】 本発明の薬剤と超音波照射による腫瘍増殖の抑制効果を測定する実験系を示す図。

【 図 7 】 本発明の薬剤と超音波照射による腫瘍増殖の抑制効果を示す図。

【 図 8 】 本発明の薬剤の粒径分布を示す図。

【 図 9 】 本発明の薬剤と超音波照射による腫瘍増殖の抑制効果を示す図。

【 図 1 0 】 本発明の治療薬と組み合わせて用いる治療装置の構成を示す図。

【 図 1 1 】 基本波と第 2 高調波とを組み合わせると照射した場合のキャビテーション生成を示す図。

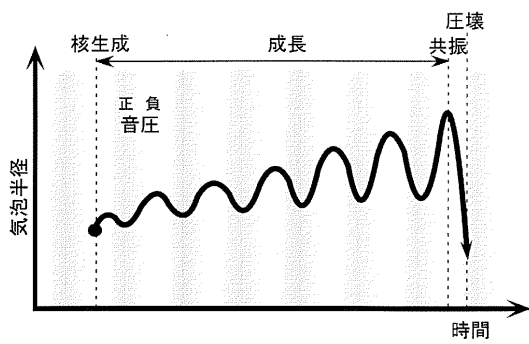
【 符号の説明 】

- |     |                    |    |
|-----|--------------------|----|
| 1   | 腫瘍                 |    |
| 2   | 基本波照射用トランスデューサ     |    |
| 3   | 第 2 高調波照射用トランスデューサ |    |
| 4   | 照準用超音波プローブ         |    |
| 5   | 基本波信号発生部           | 30 |
| 6   | 基本波信号増幅部           |    |
| 7   | 第 2 高調波信号発生部       |    |
| 8   | 第 2 高調波信号増幅部       |    |
| 9   | 治療用超音波コントローラ       |    |
| 1 0 | 画像処理部              |    |
| 1 1 | 照準部コントローラ          |    |
| 1 2 | システムコントローラ         |    |
| 1 3 | 操作卓                |    |
| 1 4 | 脱気水                |    |
| 1 5 | 水槽                 | 40 |
| 1 6 | ポリエチレンバッグ          |    |
| 1 7 | 試料溶液               |    |
| 1 8 | ピンチコック             |    |
| 1 9 | 試料溶液固定具            |    |
| 2 0 | 水中マイクロフォン          |    |
| 2 1 | 保持具                |    |
| 2 2 | 超音波トランスデューサ        |    |
| 2 3 | トランスデューサ固定具        |    |
| 2 4 | スペクトルアナライザ         |    |
| 2 5 | 信号処理装置             | 50 |

- 2 6 増幅器
- 2 7 波形発生装置
- 2 8 マウス
- 2 9 収束超音波トランスデューサ
- 5 1 シェル
- 5 2 超音波照射により活性酸素を発生する物質

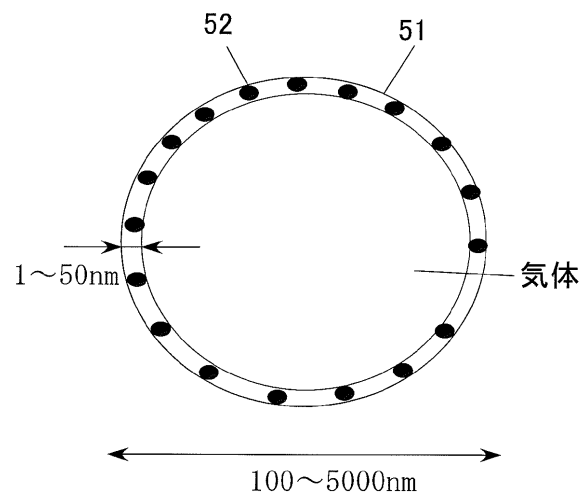
【 図 1 】

図1



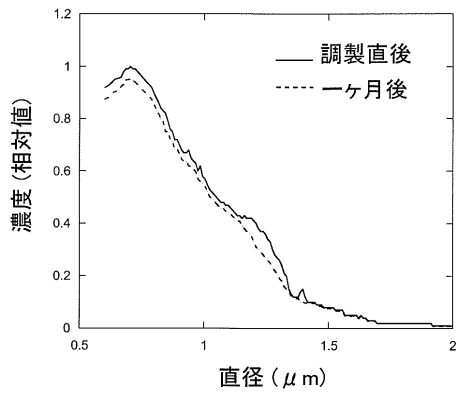
【 図 2 】

図 2



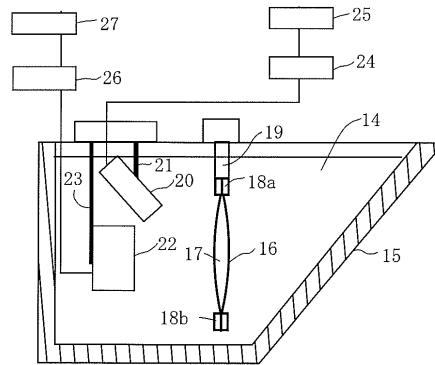
【 図 3 】

図3



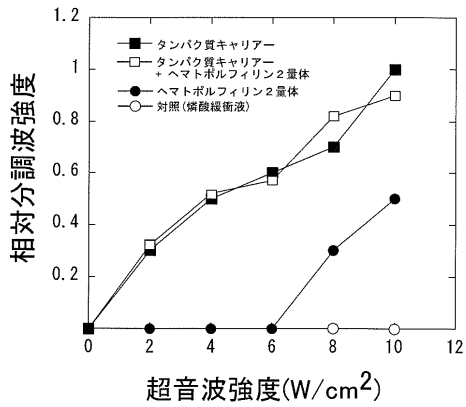
【 図 4 】

図4



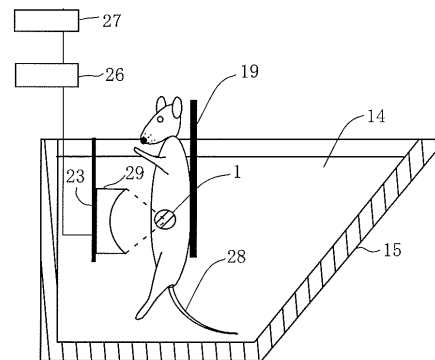
【 図 5 】

図5



【 図 6 】

図6



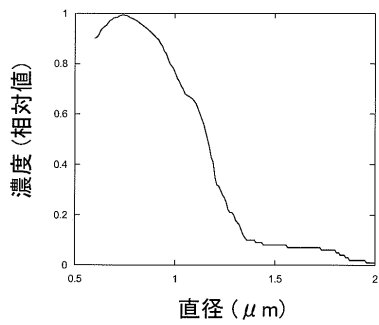
【 図 7 】

図7

治療薬		腫瘍増殖抑制率(%)	
キャリアー	生理活性物質	超音波照射なし	超音波照射あり
アルブミン	ヘマトポルフィリン2量体	2.5	70.5
対照		0	10.2

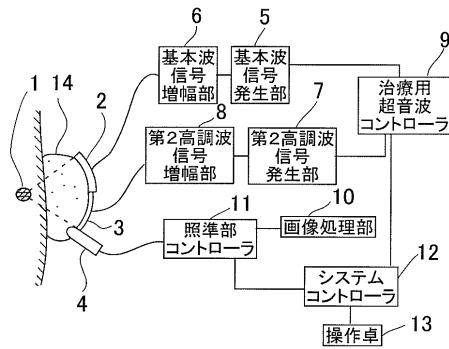
【 図 8 】

図 8



【 図 1 0 】

図10



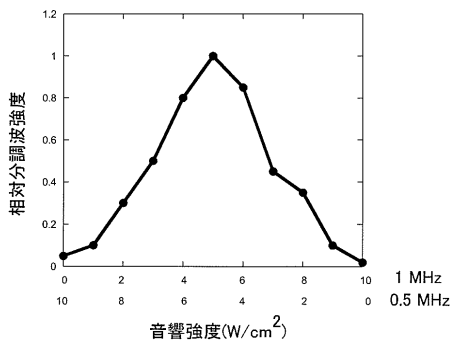
【 図 9 】

図9

治療薬		腫瘍増殖抑制率(%)	
キャリアー	生理活性物質	超音波照射なし	超音波照射あり
ヘモグロビン	ローズベンガル	0.5	60.2
対照		0	10.2

【 図 1 1 】

図11



---

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I
<b>A 6 1 K 47/42</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 47/42
<b>A 6 1 P 35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00
A 6 1 B 8/00	(2006.01)	A 6 1 B 8/00

審査官 清野 千秋

(56) 参考文献 特開平 0 5 - 0 7 8 2 6 0 ( J P , A )  
特開平 1 1 - 3 2 2 6 3 3 ( J P , A )  
特開平 0 4 - 0 5 4 1 3 2 ( J P , A )  
特開平 0 1 - 1 4 6 8 2 9 ( J P , A )

(58) 調査した分野 ( Int.Cl. , D B 名 )  
A61K 41/00

专利名称(译)	医学，药物载体，制造药物的方法和肿瘤的治疗方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP3816809B2</a>	公开(公告)日	2006-08-30
申请号	JP2002022254	申请日	2002-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社日立制作所		
申请(专利权)人(译)	株式会社日立制作所		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社日立制作所		
[标]发明人	川畑健一 梅村晋一郎 佐々木一昭		
发明人	川畑 健一 梅村 晋一郎 佐々木 一昭		
IPC分类号	A61K41/00 A61K31/352 A61K31/409 A61K31/555 A61K45/00 A61K47/42 A61P35/00 A61B8/00		
CPC分类号	A61K41/0033 A61P35/00		
FI分类号	A61K41/00 A61K31/352 A61K31/409 A61K31/555 A61K45/00 A61K47/42 A61P35/00 A61B8/00		
F-TERM分类号	4C076/AA58 4C076/BB32 4C076/CC27 4C076/DD35 4C076/EE41 4C076/FF54 4C076/FF68 4C084/AA11 4C084/AA17 4C084/MA05 4C084/MA37 4C084/NA20 4C084/ZB26 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BA08 4C086/CB04 4C086/HA28 4C086/MA37 4C086/NA20 4C086/ZB26 4C301/EE20 4C301/LL20 4C601/DE07 4C601/DE08 4C601/DE12 4C601/EE30 4C601/LL40		
其他公开文献	JP2003226654A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够通过超声波产生声空化来降低空化阈值和二次活性氧的试剂。解决方案：该药物与超声波照射结合使用，该超声波照射具有在内部空间中充满气体的外壳，并且通过超声波照射在外壳上保持产生活性氧的物质。

