

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

**特表2002 - 537363**

(P2002 - 537363A)

(43)公表日 平成14年11月5日(2002.11.5)

(51) Int.Cl<sup>7</sup>

識別記号

A 6 1 K 49/00

F I

A 6 1 K 49/00

テ-マコード<sup>8</sup> (参考)

A 4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 49数)

(21)出願番号 特願2000 - 600703(P2000 - 600703)  
(86)(22)出願日 平成12年1月20日(2000.1.20)  
(85)翻訳文提出日 平成13年8月24日(2001.8.24)  
(86)国際出願番号 PCT/US00/01322  
(87)国際公開番号 WO00/50093  
(87)国際公開日 平成12年8月31日(2000.8.31)  
(31)優先権主張番号 09/258,148  
(32)優先日 平成11年2月26日(1999.2.26)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(81)指定国 E P ( A T , B E , C H , C Y ,  
D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I  
T , L U , M C , N L , P T , S E ) , C A , J P

(71)出願人 マリンクロッド・インコーポレイテッド  
M A L L I N C K R O D T I N C .  
アメリカ合衆国、63134 ミズーリ州、セン  
トルイス、マクドネル ブールバード675、  
ビー・オー・ボックス 5840  
(72)発明者 リチャード・ブラッドリー・ドーショー  
アメリカ合衆国63146ミズーリ州セント・ル  
イス、ニーハウス・レイン11977番  
(72)発明者 サミュエル・アチレフ  
アメリカ合衆国63044ミズーリ州セント・ル  
イス、サン・セビーリヤ・コート3424番  
(74)代理人 弁理士 青山 葵 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生理学的機能の測定法

(57)【要約】

一群の体細胞の生理学的機能を測定する方法であって、  
測定可能な電磁波放射を放射することのできる検出可能な  
物質を選択する段階を含む。この物質を一群の体細胞  
に接触する体液中に導入する。この放射を測定し、生理  
学的機能を放射の測定値に基づいて測定する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 腎細胞または肝細胞から成る群から選択される患者体内の一群の細胞の生理学的機能を測定する方法であつて：

a) 電磁波を放射する検出可能な物質を選択する段階、ただし該物質は該患者の身体内の体液から該患者体内にある該細胞群によって選択的に除去されるものであり、そして、該放射は該患者体内にある該体液内で生じるものである；

b) 患者の該体液中に該物質を導入する段階、ただし、この体液は該患者体内の該細胞群に接触するものであり、そして、該放射は該体液内で生じるものである；

c) 該体液が通過する該患者の身体部分からの該放射を測定する段階、ただし、該放射が該測定時点で該体液からまだ除去されていない物質から生じるものである；および

d) 該放射の測定に基づいて該生理学的機能を測定する段階；  
の各段階を包含する方法。

但し、該物質は、第二波長の光で照射されると第一波長で螢光を発する色素を含むものであり、そして該色素は、生理学的に許容されるポリアニオン性キャリヤーにコンジュゲートされているものであり；

そして該測定段階に先立つて、該体液が通過する該身体部分を該第二波長の光で照射して該色素が該第一波長で螢光を発するようにするものであり；

そして測定される該放射が該色素の該第一波長での螢光であり；さらに  
生理学的機能の該測定が該第一波長での螢光の測定に基づくものである。

【請求項2】 該色素が、フェニルキサンテン類、フェノチアジン類、フェノセレナジン類、シアニン類、インドシアニン類およびスクアライン類から成る群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 該生理学的に許容されるポリアニオン性キャリヤーが、ポリアクリル酸、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸、ポリヌクレオチド、ポリアルギニン、ポリセリン、ポリオルニチンおよびポリリジンから成る群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 該物質が、

フルオレッセイン - ポリアスパラギン酸、  
フルオレッセイン - ポリグルタミン酸、  
フルオレッセイン - ポリアクリル酸、  
フルオレッセイン - ポリヌクレオチド、  
フルオレッセイン - ポリニトロフェニルアラニン、  
フルオレッセイン - ポリジニトロフェニルアラニン、  
フルオレッセイン - ポリトリニトロフェニルアラニン、  
フルオレッセイン - ポリスルホニルフェニルアラニン、  
フルオレッセイン - ポリジスルホニルフェニルアラニン、  
フルオレッセイン - ポリトリスルホニルフェニルアラニン、  
フルオレッセイン - ポリサクシネット、  
フルオレッセイン - ポリマロネート、  
フルオレッセイン - ポリグルタレート、  
フルオレッセイン - ポリグリコレート、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリアスパラギン酸、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリグルタミン酸、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリアクリル酸、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリヌクレオチド、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリニトロフェニルアラニン、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリジニトロフェニルアラニン、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリトリニトロフェニルアラニン  
、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリスルホニルフェニルアラニン  
、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリジスルホニルフェニルアラニン、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリトリスルホニルフェニルアラニン、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリサクシネット、

ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン-ポリマロネート、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン-ポリグルタレート、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン-ポリグリコレート、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリアスパラギン酸、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリグルタミン酸、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリアクリル酸、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリヌクレオチド、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリニトロフェニルアラニン、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリジニトロフェニルアラニン、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリトリニトロフェニルアラニン  
、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリスルホニルフェニルアラニン  
、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリジスルホニルフェニルアラニン、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリトリスルホニルフェニルアラニン、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリサクシネート、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリマロネート、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリグルタレート、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリグリコレート、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリアスパラギン酸、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリグルタミン酸、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリアクリル酸、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリヌクレオチド、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリニトロフェニルアラニン、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリジニトロフェニルアラニン、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリトリニトロフェニルアラニン、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリスルホニルフェニルアラニン、

ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリジスルホニルフェニルアラニン、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリトリスルホニルフェニルアラニン、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリサクシネット、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリマロネート、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリグルタレート、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリグリコレート、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリアスパラギン酸、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリグルタミン酸、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリアクリル酸、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリヌクレオチド、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリニトロフェニルアラニン、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリジニトロフェニルアラニン、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリトリニトロフェニルアラニン  
、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリスルホニルフェニルアラニン  
、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリジスルホニルフェニルアラニン、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリトリスルホニルフェニルアラニン、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリサクシネット、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリマロネート、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリグルタレート、および  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリグリコレート  
から成る群から選択される色素である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 b)からd)までの各段階を、生理学的機能が変化するかどうかを測定するために反復する、請求項1に記載された方法。

【請求項6】 該物質を注射する、請求項1に記載された方法。

【請求項7】 該物質を脈管内注射する、請求項1に記載された方法。

【請求項8】 該身体部分が、該患者の皮膚表面近くの血管を含む、請求項1に記載された方法。

【請求項9】 該第二波長が約400～1200ナノメーターである、請求項1に記載された方法。

【請求項10】 該第二波長が約488ナノメーターである、請求項1に記載された方法。

【請求項11】 該身体部分をレーザーで照射する、請求項1に記載された方法。

【請求項12】 該身体部分を赤外線で照射する、請求項1に記載された方法。

【請求項13】 該身体細胞が腎細胞である、請求項1に記載された方法。

【請求項14】 該身体細胞が肝細胞である、請求項1に記載された方法。

【請求項15】 該第一波長が約830ナノメーターである、請求項1に記載された方法。

【請求項16】 該第一波長が約518ナノメーターである、請求項1に記載された方法。

【請求項17】 該生理学的機能が腎機能である、請求項1に記載された方法。

【請求項18】 該生理学的機能が肝機能である、請求項1に記載された方法。

【請求項19】 該放射を該身体部分に関して侵襲的または非侵襲的に測定する、請求項1に記載された方法。

【請求項20】 該放射を内視鏡で測定する、請求項19に記載された方法。

【請求項21】 さらに、該放射を測定するために該身体部分にカテーテルを挿入する段階を含む、請求項19に記載された方法。

【請求項22】 該身体部分が患者の耳である、請求項19に記載された方法。

【請求項23】 該身体部分が患者の指である、請求項19に記載された方

法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****本発明の背景****本発明の技術分野**

本発明は一群の体細胞が示す生理学的機能の測定法の分野に属する。

**【0002】****本発明の技術背景**

肝機能を測定する現行の臨床的診断は臨床検査データの蓄積および腹水および脳障害の臨床的評価であるCTC値を誘導することを含む。D.A. Noe and R.C. Rock (編), *Laboratory Medicine, The Selection and Interpretation of Clinical Laboratory Studies*, Williams and Wilkins, 1994, Baltimore, MD, 第5章器官機能の評価D.A. Noe著、55-60頁；第19章、肝臓および胆管、A.T. Blei著、363- 379頁；第21章、腎臓、D.A. Oken and A.C. Schoolwerth著、401-410頁。

**【0003】**

他の試験にはインドシアニングリーン( ICG )の使用を含むものがある。ICGは肝臓によって独占的に血流から排除されることが知られている。従って、血液ICGクリアランス時間のプロファイルは肝機能に直接的に関連する。J. Caesar, S. Shaldon, L. Chiandussi, L. Guevara and Sheila Sherlock, "The use of indocyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function", *Clin. Sci.*, 21: 43-57 (1961)。

**【0004】**

ICG試験は技術の進展を経た。最初の具体化では全量一時IV注射に続いて、対象から数回採血した。次に血液試料を分光学的に処理してICG濃度を測定した。R. Jalan and P.C. Hayes, "Review article: quantitative tests of liver function", *Aliment Pharmacol., Ther.*, 9: 263-270 (1995); A.W. Hemming, C.H. Scudamore, C.R. Shackleton, M. Pudek, and S.R. Erb, "Indocyanine green clearance as a predictor of successful hepatic resection in cirrhotic patients", *Am. J. Surg.*, 163: 515-518 (1992); P. Ott, S. Keiding an

d L bass, "Plasma elimination of indocyanine green in the intact pig after bolus injection and during constant infusion: comparison of spectrophotometry and high-pressure liquid chromatography for concentration analysis", *Hepatology*, 18: 1504-1515 (1993)。続いて、耳でのデンシトメトリーを採用する非侵襲的な技術が開発された。C.M. Leevy, F. Smith, J. Longueville, G. Paumgartner, and M.M. Howard, "Indocyanine green clearance as a test for hepatic function: Evaluation by dichromatic ear densitometry", *Journal of Medicine*, 24: 10-27 (1993)。この装置の臨床的開発に関する問題点は、最近日本の技術者が主導して耳デンシトメトリー技術に改良した。この新方法はフィンガーピース法と名付けられ、ICG濃度を推定するために、指を通る波長2種の透過光を採用する。M. Kanda, K. Taniguchi, K. Awazu, Y. Ishigami, M. Masuzawa, and H. Abe, "Continuous monitoring of Cardiogreen removal by a diseased liver using an optical sensor", *Proc. SPIE*, 904: 39-46 (1988); M. Nakayama, N. Kanaya, S. Fujita, and A. Namiki, "Effects of ephedrine on indocyanine green clearance during spinal anesthesia: Evaluation by the finger piece method", *Anesth. Analg.*, 77: 947-949 (1993); N. Kanaya, H. Iwasaki, and A. Namiki, "Noninvasive ICG clearance test for estimating hepatic blood flow during halothane and isoflurane anaesthesia", *Can. J. Anaesth.*, 42: 209-212 (1995); N. Kanaya, M. Nakayama, S. Fujita, and A. Namiki, "Comparison of the effects of sevoflurane, isoflurane and halothane on indocyanine green clearance", *Br. J. Anaesth.*, 74: 164-167 (1995); S. Shimizu, W. Kamiike, N. Hatanaka, Y. Yoshida, K. Tagawa, M. Miyata, and H. Matsuda, "New method for measuring ICG  $R_{max}$  with a clearance meter", *World J. Surg.*, 19: 113-118 (1995)。

#### 【0005】

耳デンシトメトリーもフィンガーピース法もICGによる光の吸収（または放射）の測定に関する。

#### 【0006】

また、興味深いのは血漿中のICGの試験管内蛍光測定が示されていることで

ある。B. Hollins, B. Noe, and J.M. Henderson, "Fluorometric determination of indocyanine green in plasma", Clin. Chem., 33: 765-768 (1987)。

### 【0007】

一般的な興味の深い他の文献には次のものがある。R.L. Sheridan, et al., "Burn depth estimation by indocyanine green fluorescence; Initial human trial", Journal of Burn Care & Rehabilitation, 16: 602-604 (1995); M.A. O'Leary, D.A. Boas, B. Chance, and A.G. Yodh, "Reradiation and imaging of diffuse photon density waves using fluorescent inhomogeneities", Journal of Luminescence, 60 and 61: 281-286 (1994); X. Li, B. Beauvoit, R. White, S. Nioka, B. Chance, and A. Yodh, "Tumor localization using fluorescence of indocyanine green (ICG) in rat models", Proc. SPIE, 2389: 789-797 (1995)。

### 【0008】

(発明が解決しようとする技術的課題)

当技術分野ではなお生理学的機能を測定する方法の改善が求められている。

### 【0009】

#### 発明の要約

本発明によれば、一群の体細胞の生理学的機能を測定する方法は、電磁波放射を含む測定可能なメンバーを放射することのできる検出可能な物質を選択する段階を含む。この物質を一群の体細胞に接触する体液中に導入する。この放射を測定し、生理学的機能を放射の測定値に基づいて測定する。この放射は非侵襲的または侵襲的な技術を使用して測定できる。侵襲的技術には、体内の各部分に挿入される内視鏡およびカテーテルを使用することを含む。非侵襲的技術にはたとえば耳クリップおよびフィンガープローブのような表面プローブを含む。

### 【0010】

#### 図面の簡単な説明

図1は一態様による生体内蛍光検出装置の模式的表示である。

図2は腎結紉前(正常)および腎結紉後(結紉)のラットにおける、FITC標識サクシニル化ポリ-D-リジン全量単回注射後の生体内蛍光の時間依存性グ

ラフである。実線は測定データに対する単一指数適合曲線 (single exponential fit) である (励起光 488 nm、放射光を 518 nm で観察)。

図 3 は ICG 全量単回注射後のラット 3 匹に対する、生体内蛍光の時間依存性を示すグラフである。実線は測定データに対する単一指数適合曲線である。

図 4 はラット 1 匹における一連に設定された注射反復後の生体内蛍光の時間依存性を示すグラフである。時間的な経過は次の通りである : ICG ( ICG - 1 )、FITC のみ、食塩水のみ、再び ICG ( ICG - 2 )。

図 5 は肝部分切除前 (正常) および肝部分切除後 (切除) のラット 1 匹における ICG 全量単回注射後の生体内蛍光の時間依存性を示すグラフである。実線は測定データに対する単一指数適合曲線である。

図 6 はフルオレッセイン - ポリアスパラギン酸 (6000) コンジュゲートの血液クリアランスプロファイルを示す。

図 7 はフルオレッセイン - ポリアスパラギン酸 (10000) コンジュゲートの血液クリアランスプロファイルを示す。

図 8 はフルオレッセイン - ポリグルタミン酸 (13000) コンジュゲートの血液クリアランスプロファイルを示す。

図 9 はフルオレッセイン - ポリアルギニン (10000) コンジュゲートの血液クリアランスプロファイルを示す。

図 10 はインドシアニン - モノ (ポリアスパラギン酸 2000) およびインドシアニン - ビス (ポリアスパラギン酸 2000) の血液クリアランスプロファイルを示す。

図 11 はインドシアニン (ポリアスパラギン酸 6000) の血液クリアランスプロファイルを示す。

### 【0011】

#### 本発明の詳細な記載

本発明の一態様に従って、標的物質の血液プールからのクリアランスを測定することによる細胞および/または器官の機能を決定する方法を開示する。この標的物質を本明細書ではトレーサーと記載することもある。細胞および/または器官の機能は、これらの細胞が血流からトレーサーを除去する速度によって決定で

きる。機能はまた目的細胞がトレーサーを蓄積する速度またはそれを活性型またはその他の型に変換する速度を測定することによっても評価できる。

#### 【0012】

この物質は、高性能なクリアランスシステムである一群の細胞または器官を標的とすることができます。この物質は発色団および／または蛍光団を含有していてもよい。

#### 【0013】

発色団および／または蛍光団を含有する物質については、血液プールクリアランスをたとえば耳垂、指、脳または網膜のような非標的部位における組織の吸光または蛍光を測定する光源／光電管装置を使用して測定することができる。目的とする細胞内におけるトレーサーの蓄積は同様な様式で評価できる。このような蓄積の検出は近赤外線の波長において放射する蛍光団を使用することによって促進できる。けだし、身体の組織はこの波長では比較的透明だからである。

#### 【0014】

この物質は、脈管内、腹腔内または皮下の注射または点滴、経口投与、皮膚を通じての経皮吸収または吸入を含む、任意の適切な方法によって患者に導入することができる

#### 【0015】

本発明を生物学的機能の迅速なベッドサイド評価のために使用することができる。例えば、心拍出量、過コレステロール血症の原因、ならびに腎機能および肝機能などのデータを、ベッドサイドでの単回静脈注射後60分以内に得ることができる。一態様に従えば、患者に各々異なる物質（たとえば蛍光団）を含む、異なる化合物を複数（たとえば3種）全量単回注射することができる。

#### 【0016】

心拍出量は、本発明をフィックの原理のような知られている方法と共に利用して測定することができる。

#### 【0017】

糸球体濾過は、たとえばフルオレッセイン-サクシニル化-ポリ-D-リジンまたはフルオレッセイン-イヌリンのような低分子量蛍光物質のクリアランスに

よって決定することができる。

#### 【0018】

過コレステロール血症がLDLクリアランスの低下に起因するかどうかは、蛍光標識LDLのクリアランスを分析することによって測定することができる。肝機能は蛍光標識アシアログリコプロテインまたは、たとえばインドシアニングリーンのような色素のクリアランス速度を測定することによって評価することができる。

#### 【0019】

本発明は、腎臓または肝臓によって、血流からクリアランスされる物質の蛍光検出を含む。従って、生体内蛍光検出による腎機能または肝機能の評価も本発明に含まれる。本発明を血液透析の効果を監視するためにも使用できる。

#### 【0020】

癌細胞または脳細胞も本発明による標的とすることができる。

#### 【0021】

励起波長および放射される光子のためのフィルターを選択することによって、別々の複数トレーサーのクリアランスを同時に測定することができる。マイクロプロセッサーによって濃度／時間曲線をリアルタイムに分析することができる。得られるクリアランス速度を算出し、臨床的効果を即時表示することができる。非標識競合化合物（たとえば、LDL、アシアログリコプロテインなど）が存在する場合には、単一の血液試料をこれらの競合化合物の濃度について分析し、その結果を利用してクリアランス経路を経ての流出（マイクロモル／分）を算出することができる。

#### 【0022】

本発明の有用性を示すために、本発明による非侵襲的蛍光検出系を採用して、脈管系からの色素除去を連続的に監視した。ラットモデルにおける正常な器官の機能と異常な器官の機能との間の識別は、肝臓と腎臓との両方について示された。図1に示しているように、光ファイバー10は光源12から耳14まで光を伝達する。耳14の近くに配置した第二の光ファイバー16は、蛍光を検出系20まで伝達する。この初期の研究では色素2種を採用した。インドシアニングリ-

ンは肝臓によって血流から排他的にクリアランスされ、生体内では780 nmのレーザー光で励起された。この蛍光シグナルは830 nmで検出した。正常肝機能での特徴的クリアランス曲線が得られた。肝臓を一部切除すると、予想通りクリアランス曲線が大きく延長された。FITC標識サクシニル化ポリ-D-リジンを生体内で488 nmのレーザー光で励起した。蛍光シグナルを518 nmで検出した。正常腎機能での特徴的クリアランス曲線が得られた。両腎臓を結紮すると、クリアランス曲線は高く上がって定常化し、クリアランスはあってもごく僅かであることを示した。図2参照。

#### 【0023】

図1に模式的に示した非侵襲的生体内蛍光検出装置は、ICGの蛍光検出には公称785 nmの平行固体レーザー光源 (LaserMax Inc. model # LAS-300-780-5) を採用した。FITCの蛍光検出にはアルゴンイオンレーザー (Coherent Innova model 90) を488 nm線に同調して使用した。いずれのレーザー光源も内径3.2 mmのガラス製光ファイバー束10 (Oriel # 77526) の末端に向かった。このレーザー伝達束の他端は、ラットの耳14から約2 cmの距離に約45°の角度で配置した。蛍光検出光路として使用するための、同様な第二の光ファイバー束16は約30°の角度で耳14から約1 cmの距離に配置した。

#### 【0024】

検出ファイバー束16の出口末端を、焦点距離20 mmのレンズ18の焦点距離に配置した。出力光はこうして束を出てからレンズを通過した後に平行にされた。狭バンド干渉フィルター20 (IF) が光学トレイン (CVI Laser Corporation) の次の要素であって、大体その波長の光が検出器20へと通過することを可能にする。ICGの蛍光実験には830 nmフィルター (10 nm FWHM) を使用した。FITCの蛍光実験には518 nmフィルター (3 nm FWHM) を使用した。

#### 【0025】

検出器20は小さなシリコン製光ダイオード (UDT model PIN-10D) であって、トランスインピーダンス増幅器 (UDT model 101C) に接続された。デジタル電圧計22 (DVM) は出力シグナルを監視する。後続する電圧増幅器24 (Tektron

ix AM-502) は必要ならばシグナルを昇圧する。増幅器の出力はNational Instruments BNC-2080ブリーカウトボードに接続する。これはNational Instruments DAQ-700データ獲得ボード 26 (A/D) に接続する。コンピュータ 29 にある LabVIEW (商標) データ獲得ソフトウェアが粗実験データを収集する。

#### 【0026】

本方法は放射能標識トレーサーを使用した先行技術の方法とは対照的である。本方法は放射能に関する心配がなく、励起波長および放射波長を迅速に変化させるだけで種々のパラメータの測定が同時にできる。

#### 【0027】

種々の色素およびキャリヤーが本明細書に開示する方法には使用できる。使用できる色素にはフェニルキサンテン類 (たとえばフルオレッセイン)、フェノチアジン類、フェノセレナジン類、シアニン類、インドシアニン類およびスクアライン (squaraine) 類が包含される。好適なキャリヤーは生理学的に許容されるポリアニオン性化合物であって、前記色素とコンジュゲートすることができるものである。使用できるキャリヤーにはポリアクリル酸、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸、ポリヌクレオチド、ポリアルギニン、ポリセリン、ポリオルニチンおよびポリリジンを包含する。以下の色素 - キャリヤーコンジュゲートは本発明の部材として使用できるが、「\*」を付したものは好適なコンジュゲートである。左側に RF と付記してあるものは腎機能の試験に使用される; 左側に LF と付記してあるものは肝機能の試験に使用される; および左側に RF / LF と付記してあるものは腎機能と肝機能との試験に使用される。

#### 【0028】

- RF フルオレッセイン - ポリアスパラギン酸\*
- RF フルオレッセイン - ポリグルタミン酸\*
- RF フルオレッセイン - ポリアクリル酸\*
- RF フルオレッセイン - ポリヌクレオチド
- RF フルオレッセイン - ポリニトロフェニルアラニン
- RF フルオレッセイン - ポリジニトロフェニルアラニン
- RF フルオレッセイン - ポリトリニトロフェニルアラニン

- R F フルオレッセイン - ポリスルホニルフェニルアラニン  
 R F フルオレッセイン - ポリジスルホニルフェニルアラニン  
 R F フルオレッセイン - ポリトリスルホニルフェニルアラニン  
 R F フルオレッセイン - ポリサクシネット  
 R F フルオレッセイン - ポリマロネート  
 R F フルオレッセイン - ポリグルタレート  
 R F フルオレッセイン - ポリグリコレート

## 【0029】

- L F ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリアスパラギン酸\*  
 L F ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリグルタミン酸\*  
 L F ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリアクリル酸\*  
 L F ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリヌクレオチド  
 L F ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリニトロフェニルアラニン  
 L F ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリジニトロフェニルアラニン  
 L F ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリトリニトロフェニルアラニン  
 L F ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリスルホニルフェニルアラニン  
 L F ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリジスルホニルフェニルアラニン  
 L F ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリトリスルホニルフェニルアラニン  
 L F ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリサクシネット  
 L F ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリマロネート  
 L F ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリグルタレート  
 L F ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリグリコレート

## 【0030】

R F / L F ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリアスパラギン酸

\*

R F / L F ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリグルタミン酸\*

R F / L F ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリアクリル酸\*

R F / L F ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリヌクレオチド

R F / L F ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリニトロフェニルアラニン

R F / L F ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリジニトロフェニルアラニン

R F / L F ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリトリニトロフェニルアラニン

R F / L F ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリスルホニルフェニルアラニン

R F / L F ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリジスルホニルフェニルアラニン

R F / L F ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリトリスルホニルフェニルアラニン

R F / L F ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリサクシネット

R F / L F ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリマロネート

R F / L F ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリグルタレート

R F / L F ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリグリコレート

### 【0031】

R F ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリアスパラギン酸\*

R F ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリグルタミン酸\*

R F ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリアクリル酸\*

R F ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリヌクレオチド

R F ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリニトロフェニルアラニン

R F ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリジニトロフェニルアラン

- R F ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリトリニトロフェニルアラニン
- R F ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリスルホニルフェニルアラニン
- R F ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリジスルホニルフェニルアラニン
- R F ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリトリスルホニルフェニルアラニン
- R F ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリサクシネット
- R F ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリマロネート
- R F ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリグルタレート
- R F ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリグリコレート

## 【0032】

- R F ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリアスパラギン酸\*
- R F ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリグルタミン酸\*
- R F ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリアクリル酸\*
- R F ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリヌクレオチド
- R F ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリニトロフェニルアラニン
- R F ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリジニトロフェニルアラニン
- R F ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリトリニトロフェニルアラニン
- R F ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリスルホニルフェニルアラニン
- R F ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリジスルホニルフェニルアラニン
- R F ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリトリスルホニルフェニルアラニン

- R F ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリサクシネート  
 R F ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリマロネート  
 R F ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリグルタレート  
 R F ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリグリコレート

## 【0033】

(発明を実施するための最良の形態)

本発明を以下の実施例によってさらに例証するが、これらは限定を意図されたものではない。

## 【0034】

実施例1

生体内での研究では、最初に体重~250gの正常なSprague-Dawleyラットにウレタン(1.35g/kg)を腹腔内注射により投与して麻酔した。

## 【0035】

各動物が所望の麻酔レベルに達した後、胸腔上部に小さな切開(0.5cm)を行って左頸静脈を露出した。左耳の耳垂を顕微鏡スライドグラスに固定し、光ファイバーから放出される入射レーザー光を耳に照射した。次にデータの獲得を開始し、被験物を投与する前に螢光のバックグラウンド値を得た。次に色素(肝クリアランスの評価にはICG;腎クリアランスの評価にはFITC標識ポリ-D-リジン)を頸静脈から投与した。螢光シグナルは直ちに増大してピーク値に達した。シグナルはたぶん血流から色素がクリアランスするとともに時間の関数として減衰した。

## 【0036】

麻酔したラットを背面で固定し、腹部正中線の皮膚を剣状軟骨から尾部までのおよそ中間まで切開した。次に腹部筋肉にも同様な切開を行って肝臓を露出させた。ラットを動かして胸腔の下にボルスタを入れ、肝臓を僅かに前側、横隔膜から遠くなるように動かした。肝中葉および肝左葉を静かに腹腔の外に取り出し、食塩水で湿らせたガーゼパッド上に置いた。両側葉を垂直に起し、3-0結紮を取り出した各葉の周りに付けたが、この処置の時には結紮はしなかった。両葉を

腹腔に入れ直してボルスタを除いた。切開部を創傷クリップで閉じた。

#### 【0037】

以前の研究と同様にして露出した頸静脈から ICG を動物に投与した。以前の記載と同様にして被験物のクリアランスを監視して ICG 肝クリアランスの正常値を決定した。正常クリアランス曲線を得た後に、分離した肝臓葉 2 個の周りの結紮を堅く結んで部分肝切除を行った。この状態に動物を 20 分間置いて平衡させた。次に露出した頸静脈から ICG を投与し、被験物のクリアランスを監視した。試料  $n = 3$  について、正常動物のクリアランス曲線と部分肝切除動物のクリアランス曲線を得た。

#### 【0038】

ICG の全量単回注射の前および後においてラット 3 匹の耳で測定した螢光の時間依存性を図 3 に示す。データを 3 段階として記載できる。段階 1 は全量単回注射前に得られた最初の 30 秒のデータからなる。このデータは一定であって、次回の実験に対するベースライン値を表す。この段階では螢光がないので、このベースライン値はゼロになる筈である。段階 2 は注射後数秒間に起き、色素が耳に到達するにつれてシグナルは急速に最大値まで上昇し、血液プールに平衡する。段階 3 では肝臓が血流から ICG を濾去するにつれて螢光シグナルは時間と共に減衰した。可視的には減衰速度は 3 匹とも同様であった。15 分後にはシグナルは初期値の約 90 % が失われた。

#### 【0039】

測定値が実際に ICG 萤光によることを検証するため次の対照実験を行った。ラットに前記のように 1.41 mM - ICG 500  $\mu$ L を注射した。正常時螢光の時間経過が得られ、図 4 に ICG - 1 として記載する。次に同じラットに 1.41 mM - フルオレッセイン (Sigma, St. Louis, MO) 500  $\mu$ L を注射した。図 4 に示すように、螢光シグナルは検出されなかった。さらなる確認のため、次に同じラットに食塩水溶液 (Baxter, Deerfield, IL) 500  $\mu$ L を注射した。再び、検出可能なシグナルは得られなかった。最後に、ラットに再び 1.41 mM - ICG を 500  $\mu$ L 注射して、第二の「正常」曲線を得た。

#### 【0040】

これらの螢光減衰曲線が肝機能に関連することを検証するために、部分肝切除を含む実験を行った。この部分肝切除の手技は前記に略述した。手術が完了し、肝臓の部分切除において使用するための結紮準備が完了した後、1 mM - ICG 溶液 500 μL をラットに注射した。正常螢光の時間経過曲線が得られ、これを図5に示す。

#### 【0041】

次に結紮を強めて肝臓を部分的に切除した。ラットを10分間平衡させた。次に別の1 mM - ICG 500 μL を投与した。螢光の時間曲線を測定し、これも図5に示す。ICGを血流プールから除去する肝臓の能力は劇的に変化し、部分切除肝臓での螢光減衰速度は正常速度よりもはるかに遅かった。屠殺の後、肝臓を秤量すると肝臓の44%が切除されていたことが確認された。

#### 【0042】

##### 実施例2

ポリ-D-リジン4000 (Sigma P-0296) 500 mg (~125モル当量リジン) を暗色ガラスバイアル内で0.1M-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 mL にマグネティックスターラー棒を用いて溶解した。FITC (イソチオシアニ酸フルオレッセイン、Sigma F-7250) 24.3 mg (62.5マイクロモル) をDMSO (ジメチルスルホキシド) 1.5 mL に溶解した。FITC溶液を徐々にポリ-D-リジン溶液に25で攪拌しつつ添加した。反応を25で30分間進行させ、次に4に移行させ、12時間攪拌した。Sephadex·G-25によりゲルfiltration過し、0.9% (w/v) NaClで溶離してフルオレッセインコンジュゲートを非結合FITCから分離した。

#### 【0043】

前記コンジュゲート~30マイクロモルを含む0.9%NaCl 20 mL をpH電極とマグネティックスターラー棒とを入れた25の暗色ガラス製バイアル中に入れ；0.5M-NaOHを加えてpHを9.5に調整した。攪拌下、この溶液に0.5M-NaOHを加えてpH 9.5~10.0に維持しながら、30分間にわたって無水コハク酸500 mgを徐々に加えた。次にpHを安定値7.5まで落とし、最終容積27 mLとした。反応混合物を3.5 kdカットオフの

透析膜を使用して 0.9% (w/w) NaCl に対して透析し、残存する ~ 4.0 μM - 融光濃度相当のポリマーコンジュゲートを直接点滴に使用した。

#### 【0044】

麻酔したラットを腹部表面に固定し、胸腔の肋骨境界に近い腹腔に両側背腹性切開を行った。腎臓から結合組織を除き、腎周辺の脂肪組織を把持して穩やかに腹腔から取り出した。腎臓血管および尿管周囲の側副血管は遮断しないようにして単一の 3-0 結紮を設置した。結紮はこの手技時点では固定しなかった。

#### 【0045】

サクシニル化したフルオレッセイン標識ポリ-D-リジンを露出した頸静脈から投与した。被験物のクリアランスを前記の通りに監視して、ポリ-D-リジンの正常腎クリアランスを決定した。正常クリアランス曲線が得られた後に全（両側性）腎摘出のために結紮した。この状態で動物を 20 分間安定化させた。被験物を次に露出した頸静脈から投与し、この化合物のクリアランスを監視した。n = 3 試料について正常動物対全腎切除動物のクリアランス曲線が得られた。

#### 【0046】

#### 実施例 3

#### フルオレッセイン - ポリアスパラギン酸 (6000) コンジュゲートの製造

イソチオシアニ酸フルオレッセイン (20 mg) の DMSO (0.5 mL) 溶液をポリアスパラギン酸（分子量：6000、180 mg）の水 (1 mL) 溶液に添加した。赤橙色の均質な溶液を 24 時間常温に保持した。反応混合物をアセトン (20 mL) で処理した。微細な沈殿を遠心分離によって分離した。上清液を廃棄し、沈殿をアセトン (10 mL) 中に再懸濁した。この洗浄工程をさらに 3 回反復して未反応イソチオシアニ酸フルオレッセインを除去した。ペレットを水 (0.5 mL) に溶解し、Sephadex G-25 カラム (Pharmacia PD-10、充填済) 上でクロマトグラフィーを行った。1 mL 画分を集めた。所望の画分 (1 ~ 4) を集め、凍結乾燥して、所望のコンジュゲート 87 mg が橙色固体として得られた。0.21 mg / mL 溶液の吸光度は 0.26 であって、これは 10.2% のコンジュゲートに相当する。励起波長 488 ナノメーターおよび放射波長 520 ナノメーターを使用して実施例 1 の操作を行った。図 6 はフルオ

レッセイン - ポリアスパラギン酸(6000)コンジュゲートの血液クリアランスプロファイルを示す。

#### 【0047】

##### 実施例4

##### フルオレッセイン - ポリアスパラギン酸(10000)コンジュゲートの製造

イソチオシアニ酸フルオレッセイン(20mg)のDMSO(0.5mL)溶液をポリアスパラギン酸(分子量:10000、180mg)の水(1mL)溶液に添加した。赤橙色の均質な溶液を24時間常温に保持した。反応混合物をアセトン(20mL)で処理した。微細な沈殿を遠心分離によって分離した。上清液を廃棄し、沈殿をアセトン(10mL)中に再懸濁した。この洗浄工程をさらに3回反復して未反応イソチオシアニ酸フルオレッセインを除去した。ペレットを水(0.5mL)に溶解し、Sephadex・G-25カラム(Pharmacia PD-10、充填済)上でクロマトグラフィーを行った。所望の画分(1~4)を集め、凍結乾燥して、所望のコンジュゲート100mgを橙色固体として得た。0.19mg/mL溶液の吸光度は0.05であって、これは3.3%のコンジュゲートに相当する。励起波長488ナノメーターおよび放射波長520ナノメーターを使用して実施例1の操作を行った。図7はフルオレッセイン - ポリアスパラギン酸(10000)コンジュゲートの血液クリアランスプロファイルを示す。

#### 【0048】

##### 実施例5

##### フルオレッセイン - ポリグルタミン酸(13000)コンジュゲートの製造

イソチオシアニ酸フルオレッセイン(20mg)のDMSO(0.5mL)溶液をポリグルタミン酸(分子量:13000、150mg)の水(1mL)溶液に添加した。赤橙色の均質な溶液を24時間常温に保持した。反応混合物をアセトン(20mL)で処理した。微細な沈殿を遠心分離によって分離した。上清液を廃棄し、沈殿をアセトン(10mL)中に再懸濁した。この洗浄工程をさらに3回反復して未反応イソチオシアニ酸フルオレッセインを除去した。ペレットを

水 (0.5 mL) に溶解し、Sephadex・G-25カラム (Pharmacia PD-10、充填済) 上でクロマトグラフィーを行った。所望の画分 (1~4) を集めて凍結乾燥して、所望のコンジュゲート 80 mg を橙色固体として得た。0.21 mg / mL 溶液の吸光度は 0.79 であって、これは 60.8% コンジュゲートに相当する。励起波長 488 ナノメーターおよび放射波長 520 ナノメーターを使用して実施例 1 の操作を行った。図 8 はフルオレッセイン - ポリグルタミン酸 (13000) コンジュゲートの血液クリアランスプロファイルを示す。

#### 【0049】

##### 実施例 6

##### フルオレッセイン - ポリアルギニン (10000) コンジュゲートの製造

イソチオシアニン酸フルオレッセイン (20 mg) の DMSO (0.5 mL) 溶液をポリアルギニン (分子量: 10000、150 mg) の水 (1 mL) 溶液に添加した。赤橙色の均質な溶液を 24 時間常温に保持した。反応混合物をアセトン (20 mL) で処理した。微細な沈殿を遠心分離によって分離した。上清液を廃棄し、沈殿をアセトン (10 mL) 中に再懸濁した。この洗浄工程をさらに 3 回反復して未反応イソチオシアニン酸フルオレッセインを除去した。ペレットを水 (0.5 mL) に溶解し、Sephadex・G-25カラム (Pharmacia PD-10、充填済) 上でクロマトグラフィーを行った。所望の画分 (1~4) を集め、凍結乾燥して所望のコンジュゲート 80 mg を橙色固体として得た。0.21 mg / mL 溶液の吸光度は 0.73 であって、これは 60.5% コンジュゲートに相当する。励起波長 488 ナノメーターおよび放射波長 520 ナノメーターを使用して実施例 1 の操作を行った。図 9 はフルオレッセイン - ポリアルギニン (10000) コンジュゲートの血液クリアランスプロファイルを示す。

#### 【0050】

##### 実施例 7

##### インドシアニン - ドデカアスパラギン酸コンジュゲートの製造

(a) ペプチドの合成: ドデカアスパラギン酸モノおよびビスアスパルトイミドは、自動化 Applied・Biostystems 社 432A シナージー合成機を使用する固相 Fmoc ペプチド合成によって製造した。アミノ酸単位 (各 7

5マイクロモル)を順次にN-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)およびヘキサフルオロ磷酸2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム(HBTU)の混合物で活性化した。末端アミノ酸のFmocは20%ピペリジンのジメチルホルムアミド溶液を用いて除去した。

### 【0051】

(b) 色素の合成：近赤外線吸収性ビス(カルボキシヘキシリ)インドシアニン色素(NIRD)は1,1,2-トリメチル[1H]ベンズ[e]インドール(20g、95.6ミリモル)と6-ブロモヘキサン酸(28.1g、144.1ミリモル)とを1,2-ジクロロベンゼン(DCB)中、110°で12時間反応させて製造した。この緑色の溶液を室温まで冷却し、形成した褐色固体沈殿を濾取した。この固体をDCBとジエチルエーテルで洗浄した後、得られた褐色粉末(24g、64%)を室温真空下に乾燥した。この固体の一部(4.0g、9.8ミリモル)、グルタコンアルデヒドジアニルの一塩酸塩(1.4g、5ミリモル)および酢酸ナトリウム三水和物(1.8g、12.9ミリモル)をエタノール中で1時間還流した。溶媒を蒸発後、2N-塩酸水溶液20mLを残渣に加え、混合物を遠心分離し、上清液をデカンテーションした。この操作を上清液が殆ど無色になるまで反復した。この固体残渣に水：アセトニトリル(3:2)混合物を約5mL加え、凍結乾燥して暗緑色フレーク約2gを得た。この化合物の純度は<sup>1</sup>H-NMRとLC-質量スペクトルで確認した。

### 【0052】

(c) 色素-ペプチドコンジュゲート：色素(60mg、75マイクロモル)を0.2M-HBTUのDMSO溶液0.4mLおよび0.4M-ジイソプロピルエチルアミンのDMSO溶液0.4mLからなる活性化剤に加えた。この活性化は約30分間に完了し、樹脂結合ペプチド(25マイクロモル)を色素に加えた。反応は室温で3時間行った。混合物を濾過し、固体の残渣をDMG、アセトニトリルおよびTHFで洗浄した。緑色残渣を乾燥した後、85%トリフルオロ酢酸、5%水、5%チオアニソールおよび5%フェノールの混合物を用いてアスパラギン酸側鎖保護基および樹脂からのペプチド切断を1工程で行った。樹脂を

濾過し、冷t - プチルメチルエーテル (M T B E) を用いて色素 - ペプチドコンジュゲートを沈殿させ、凍結乾燥してH P L Cで精製した。2種の化合物、モノ - およびビス - ドデカアスパルトイミドが得られた。

#### 【0053】

励起波長780ナノメーターおよび放射波長830ナノメーターを使用して、実施例1の操作を行った。図10はインドシアニン - モノ (ポリアスパラギン酸6000) の血液クリアランスプロファイルを示す。

#### 【0054】

##### 実施例8

##### インドシアニン - (NIRD) ポリアスパラギン酸6000コンジュゲートの製造

NIRD (60mg、75マイクロモル) を0.2M - HBTUのDMSO溶液0.4mLおよび0.4M - ジイソプロピルエチルアミンのDMSO溶液0.22mLの混合物で1時間活性化した。この色素にポリアスパラギン酸 (6kDa、100mg) を加えると、3時間後にコンジュゲート反応は終了した。冷M T B E (4×10mL) を加えてペプチドコンジュゲートを沈殿させ、反応溶媒および試薬を洗い去った。得られた緑色ペーストを水に溶解し、凍結乾燥して緑色固体を得た。この化合物はPharmacia・PD-10カラム (Sephadex G-25) を使用してPBSで溶離するゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した。生成物を凍結乾燥し、HPLC、UV - 可視光分光分析、蛍光分析および質量分析によって分析した。励起波長780ナノメーターおよび放射波長830ナノメーターを使用して、実施例1の操作を行った。図11はインドシアニン - (ポリアスパラギン酸6000) の血液クリアランスプロファイルを示す。

#### 【0055】

##### (産業上の利用の可能性)

肝機能または腎機能を監視するための非侵襲的蛍光検出の有用性は確立されている。

#### 【0056】

本発明の各工程は、生理学的機能が変化しつつあるかどうかを決定するために

反復使用することができる。

#### 【0057】

インドシアニングリーンは波長約830nmの螢光を発生する色素であって、肝臓の生理学的機能を測定するために使用された。肝臓の生理学的機能を測定するため、身体の一部分を波長約780nmの光で照射した。肝細胞の生理学または肝機能は本件特許請求項の方法を使用して測定された。

#### 【0058】

フルオレッセイン標識サクシニル化ポリ-D-リジンは波長約518nmの螢光を発生する色素であって、腎臓の生理学的機能を測定するために使用された。腎臓の生理学的機能を測定するため、身体の一部分を波長約488nmの光で照射した。腎機能は本発明の前記方法を使用して測定された。図2参照。

#### 【0059】

これらの色素は静脈注射した。皮膚表面近くの血球を含む身体の部分はレーザー光または赤外線で照射した。

#### 【0060】

ここに特許請求する発明はまた過コレステロール血症を評価するために使用することができる。クリアランス速度の測定は、高い血清コレステロール値がLDL産生速度の上昇またはLDLクリアランス速度の低下のいずれによるかを臨床医が診断することを可能にするであろう。この診断は治療法に影響を与える。

#### 【0061】

ここに特許請求する発明を心拍出量の測定に使用することができる。心機能を測定しながら同時に肝機能および腎機能も測定する性能は肝機能および腎機能に観察された変化が腎臓病または肝臓病に一次的に由来するか、または心臓病から二次的に由来するか、の何れかについて臨床医が予備的結論を導くことを可能にするであろう。

#### 【0062】

ここに記載された態様について多くの修正、変化および細部の変更を行ってもよいが、前記記載におけるおよび添付する図面における全ての事柄は例示的なものとして解釈すべきことが意図されており、限定的意図があると解釈すべきでは

ない。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は一態様による生体内蛍光検出装置の模式的表示である。

【図2】 図2は腎結紉前(正常)および腎結紉後(結紉)のラットにおける、FITC標識サクシニル化ポリ-D-リジン全量単回注射後の生体内蛍光の時間依存性グラフである。実線は測定データに対する単一指数適合曲線(single exponential fit)である(励起光488nm、放射光を518nmで観察)。

【図3】 図3はICG全量単回注射後のラット3匹に対する、生体内蛍光の時間依存性を示すグラフである。実線は測定データに対する単一指数適合曲線である。

【図4】 図4はラット1匹における一連に設定された注射反復後の生体内蛍光の時間依存性を示すグラフである。時間的な経過は次の通りである: ICG(IGC-1)、FITCのみ、食塩水のみ、再びIGC(IGC-2)。

【図5】 図5は肝部分切除前(正常)および肝部分切除後(切除)のラット1匹におけるICG全量単回注射後の生体内蛍光の時間依存性を示すグラフである。実線は測定データに対する単一指数適合曲線である。

【図6】 図6はフルオレッセイン-ポリアスパラギン酸(6000)コンジュゲートの血液クリアランスプロファイルを示す。

【図7】 図7はフルオレッセイン-ポリアスパラギン酸(10000)コンジュゲートの血液クリアランスプロファイルを示す。

【図8】 図8はフルオレッセイン-ポリグルタミン酸(13000)コンジュゲートの血液クリアランスプロファイルを示す。

【図9】 図9はフルオレッセイン-ポリアルギニン(10000)コンジュゲートの血液クリアランスプロファイルを示す。

【図10】 図10はインドシアニン-モノ(ポリアスパラギン酸2000)およびインドシアニン-ビス(ポリアスパラギン酸2000)の血液クリアランスプロファイルを示す。

【図11】 図11はインドシアニン(ポリアスパラギン酸6000)の血液クリアランスプロファイルを示す。

【図1】

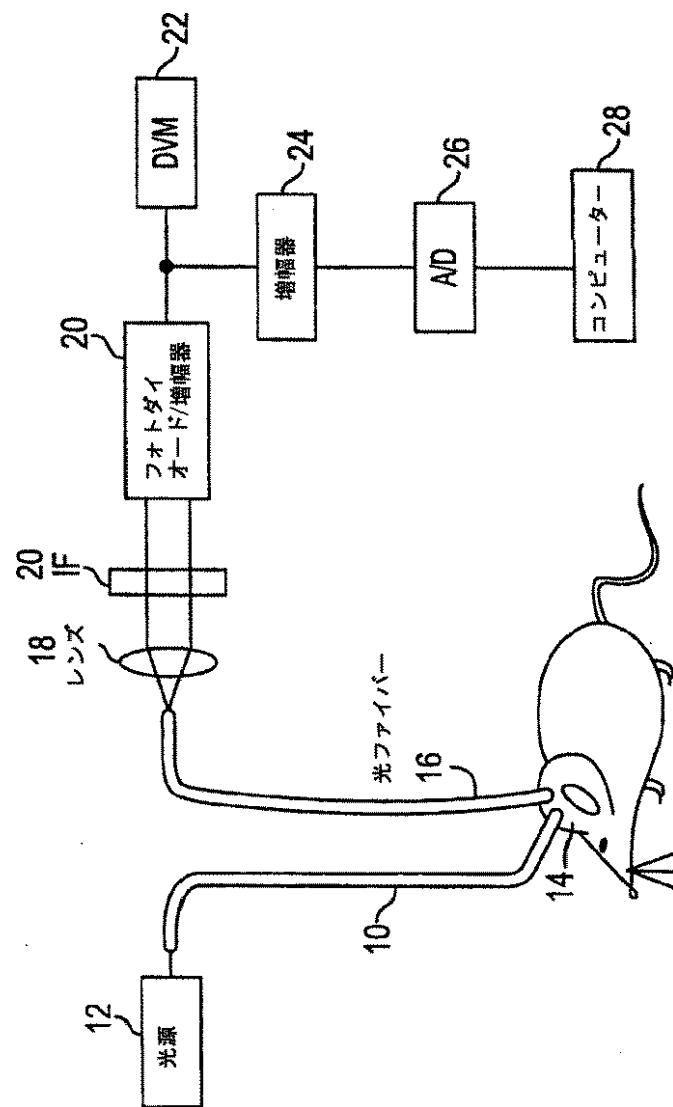


FIG. 1

【図2】

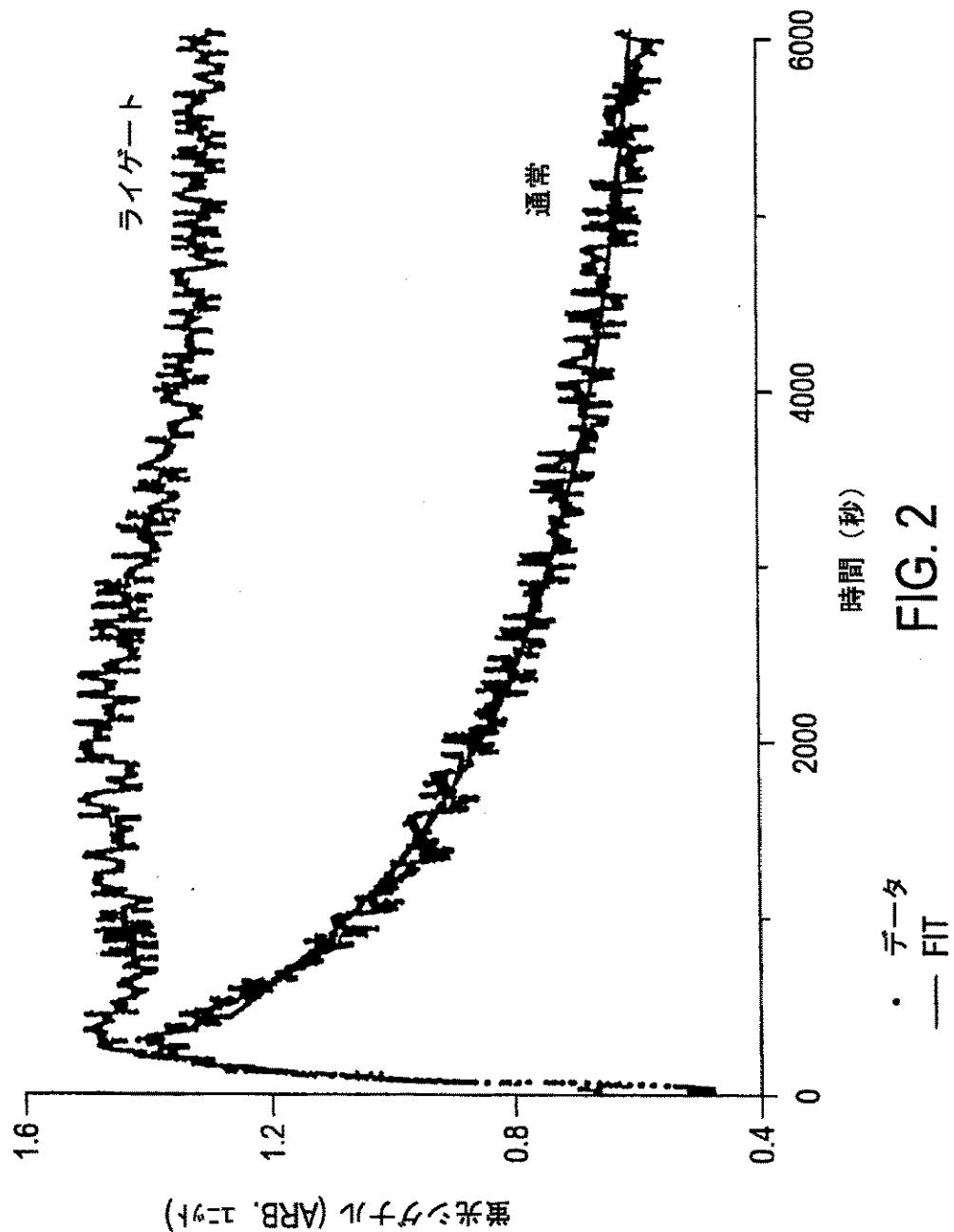


FIG. 2

【図3】

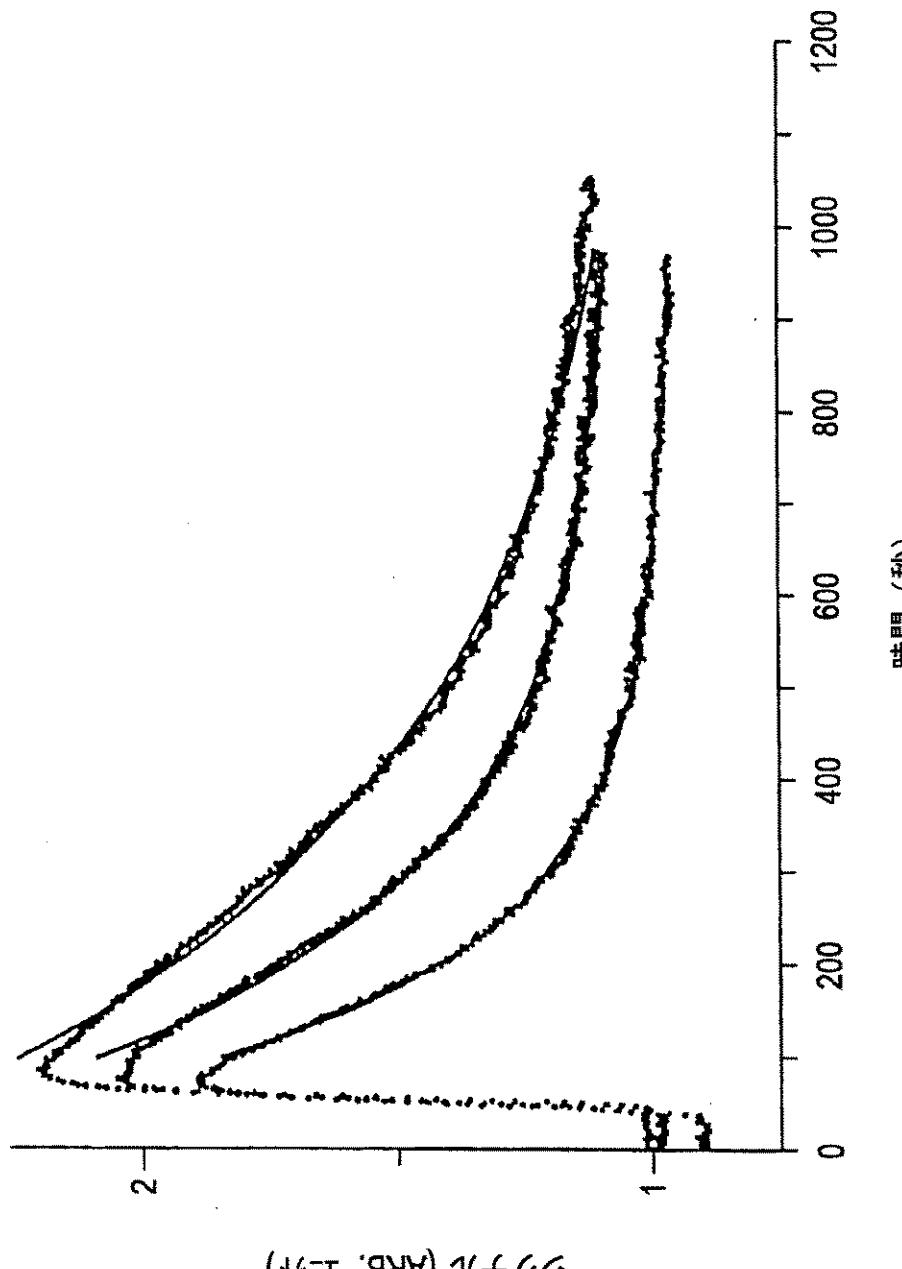


FIG. 3

【図4】

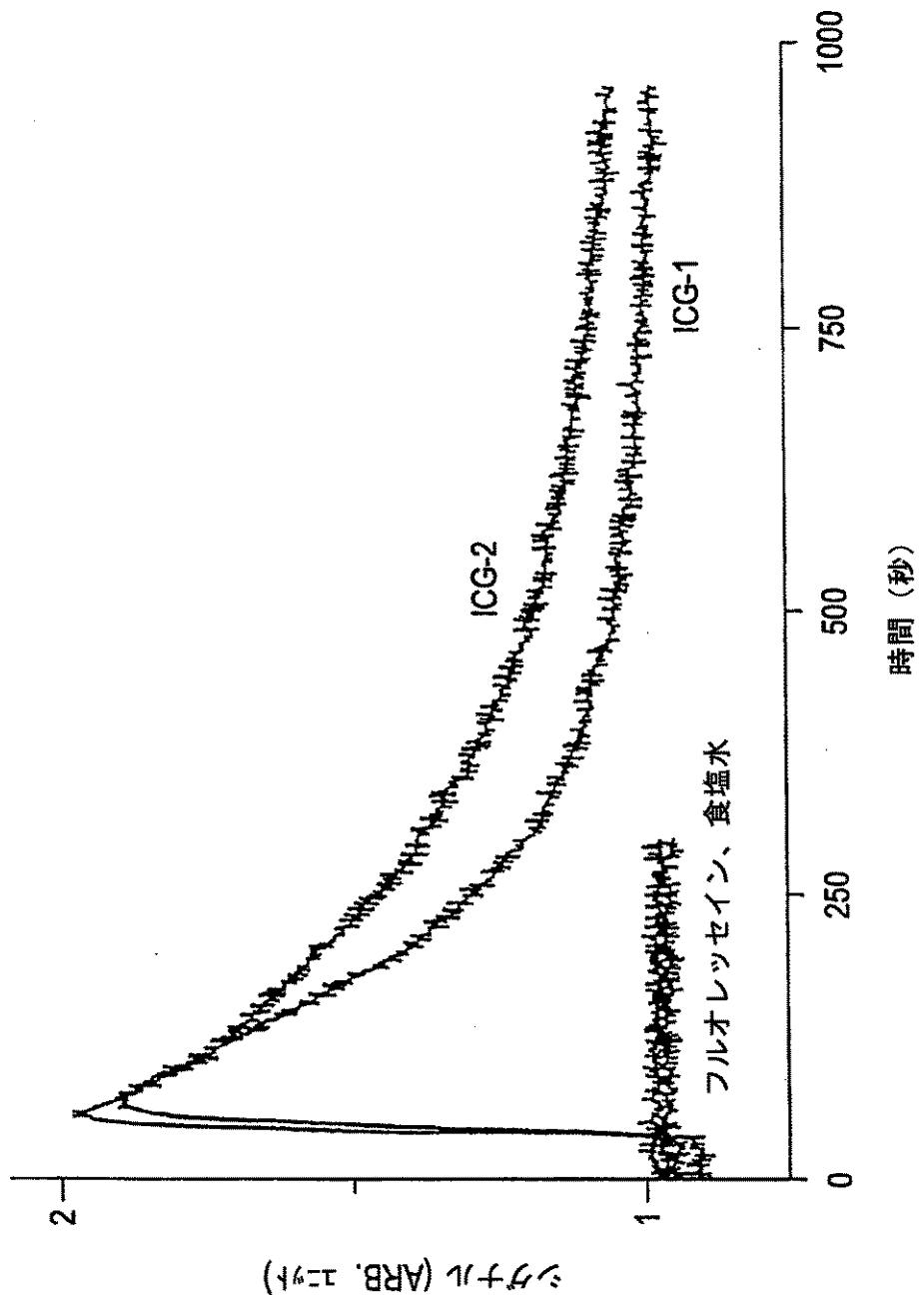


FIG. 4

【図5】

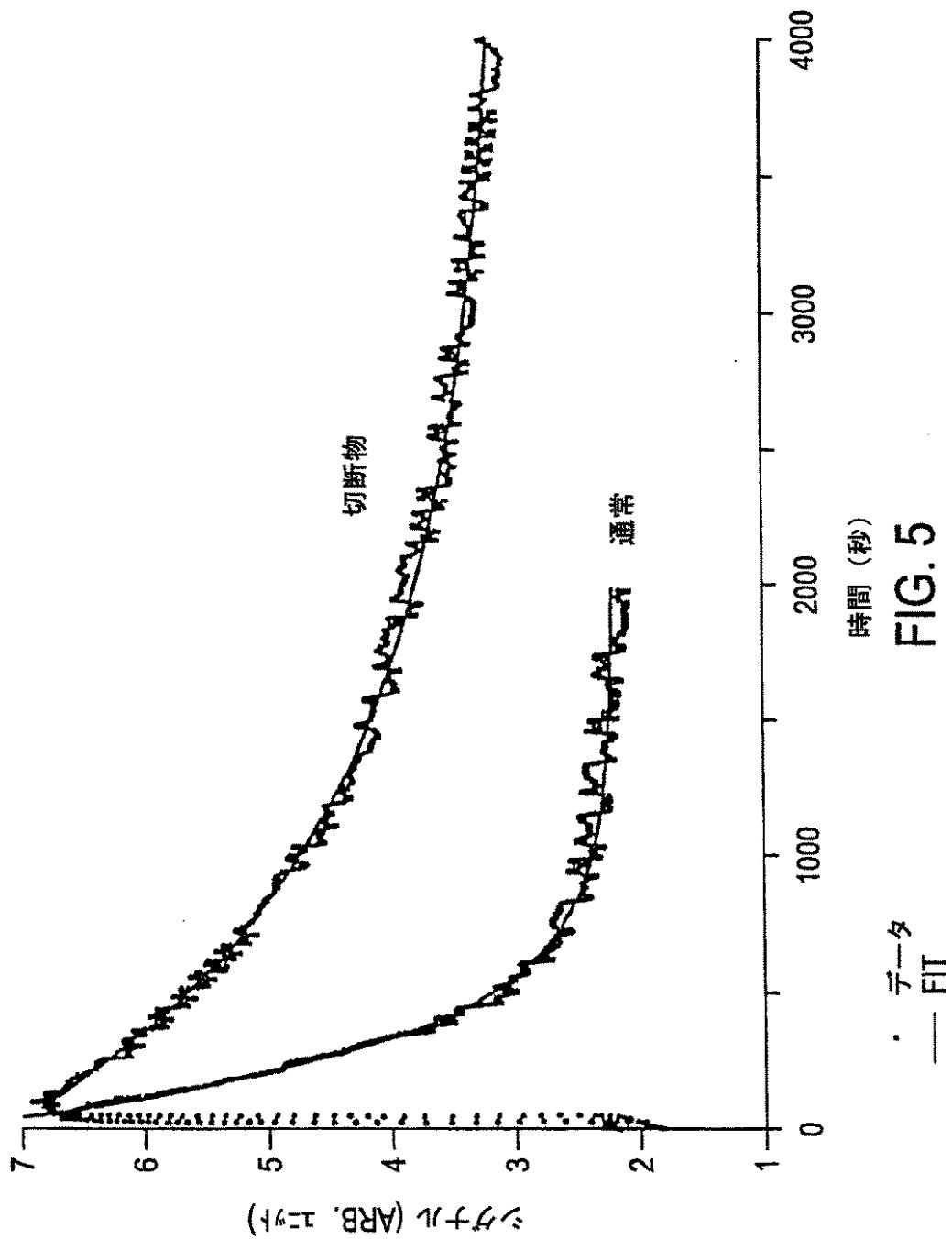
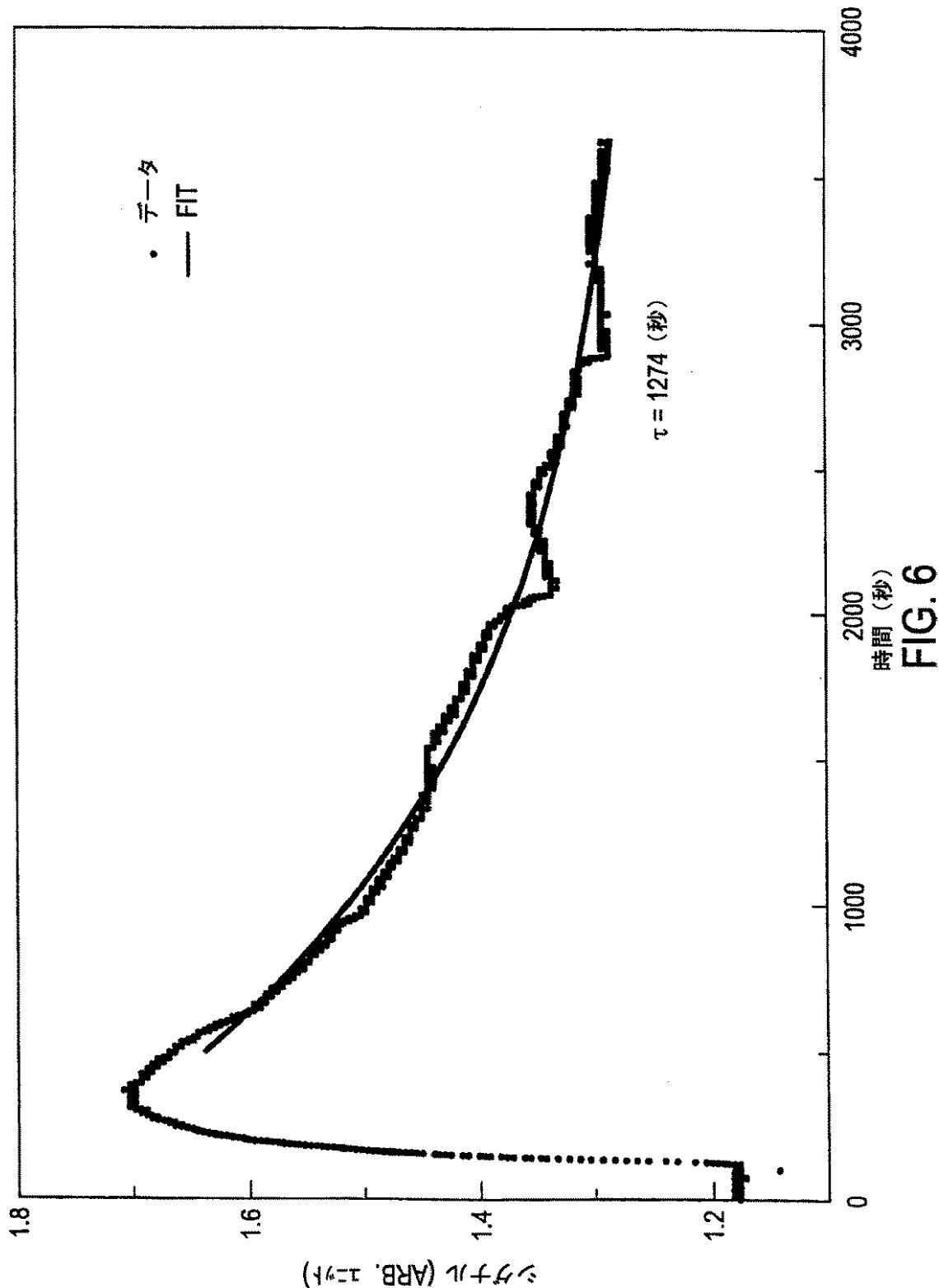
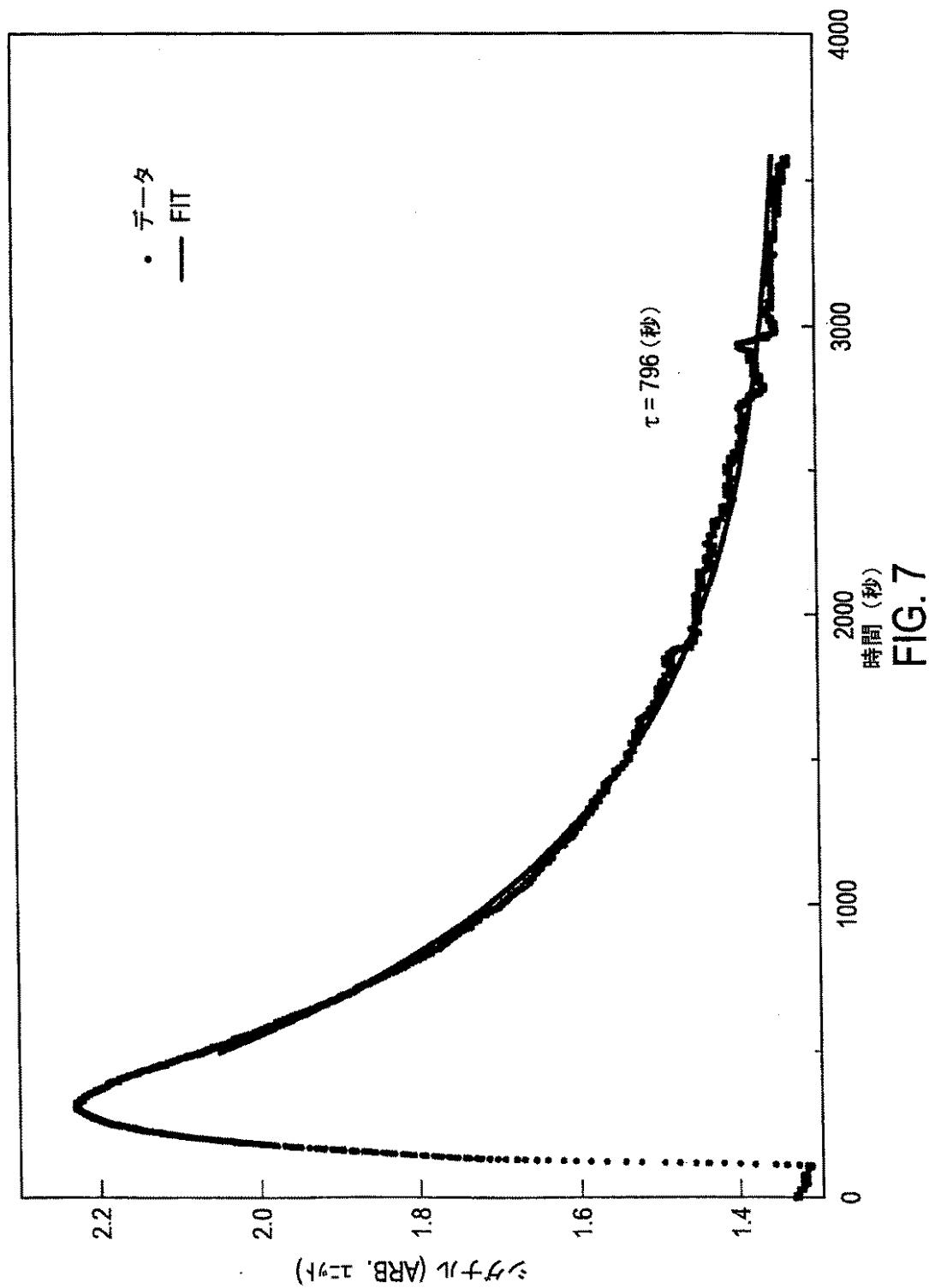


FIG. 5

【図6】



【図7】



【図8】

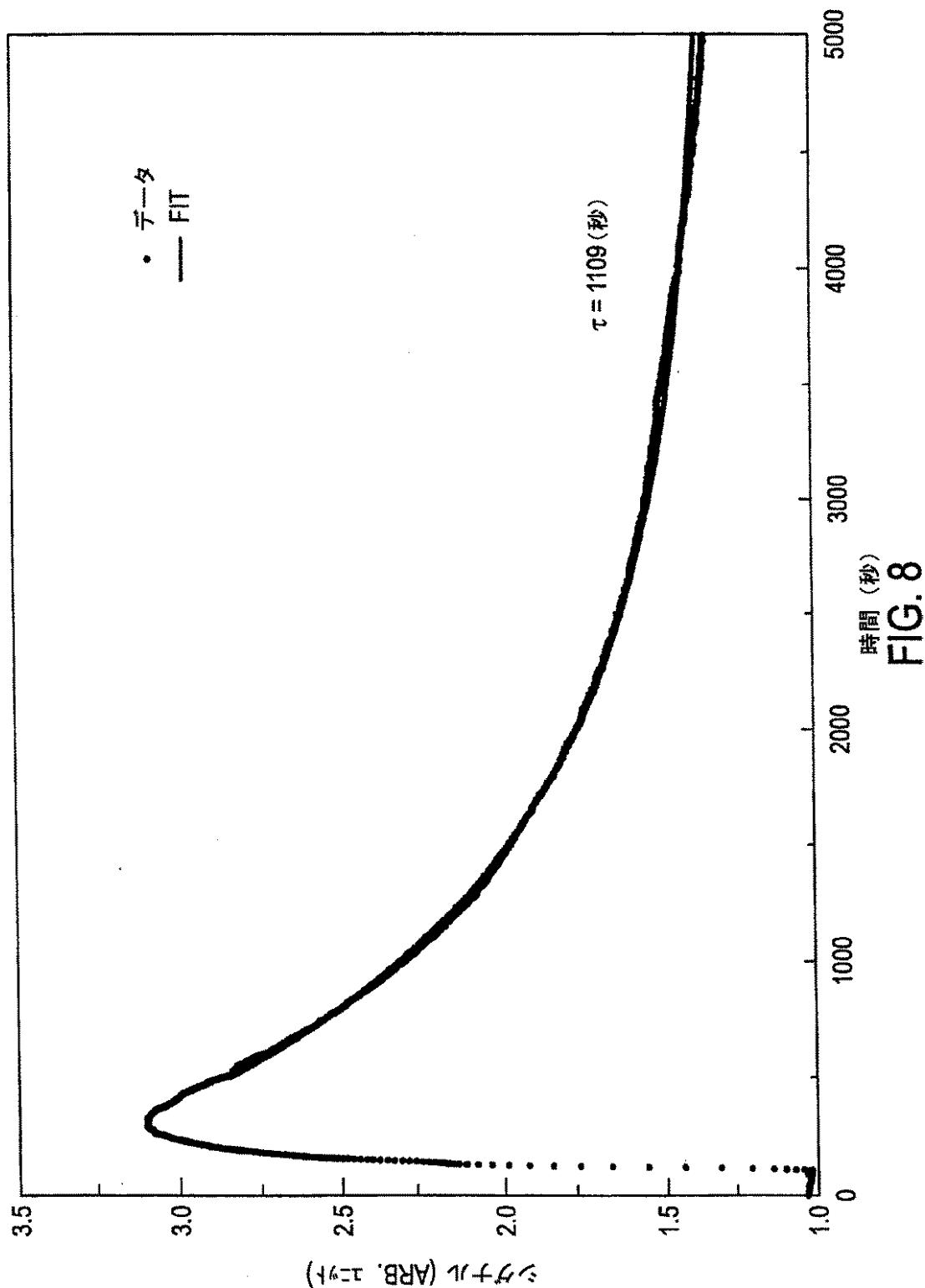


FIG. 8

【図9】

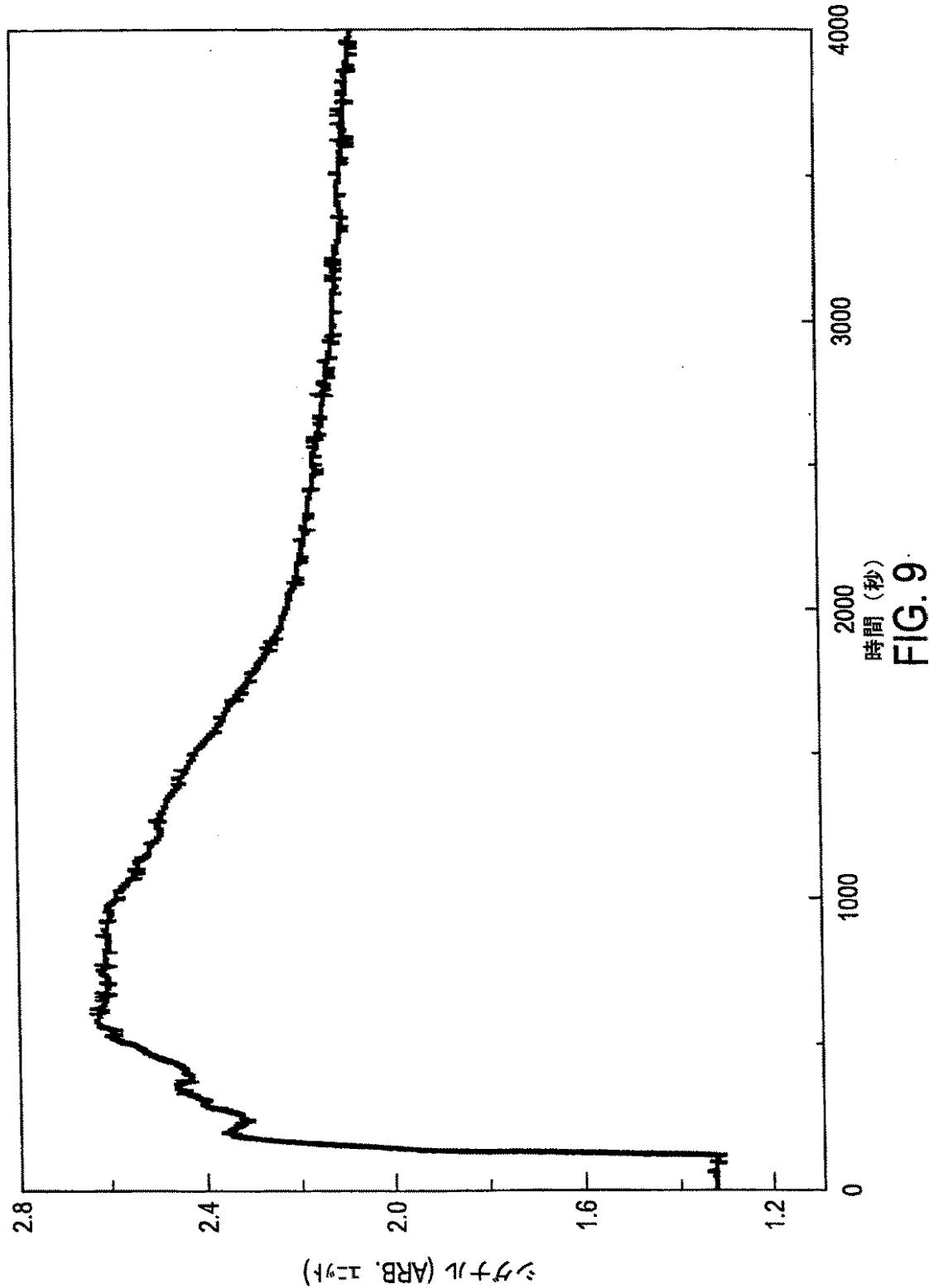
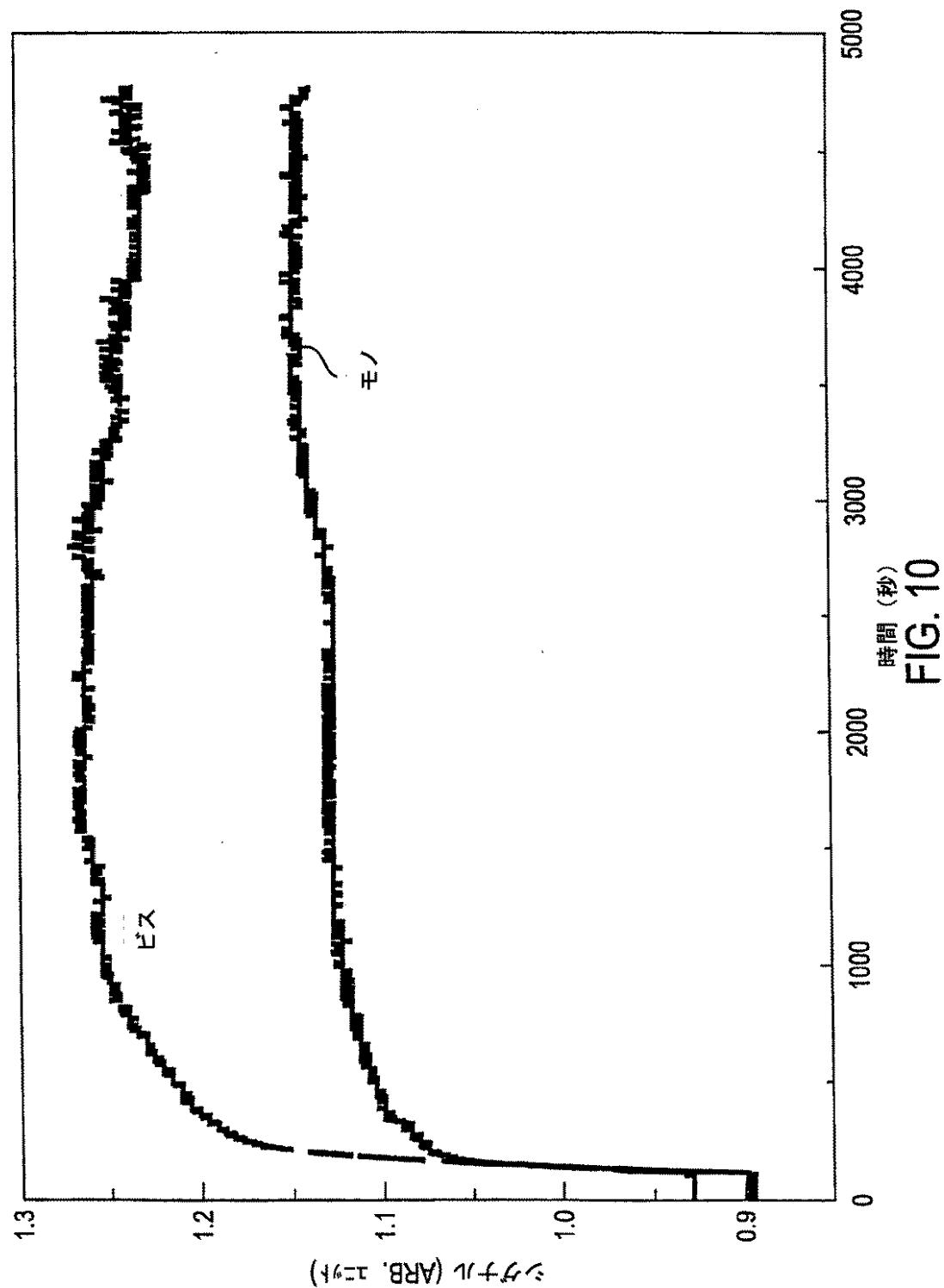
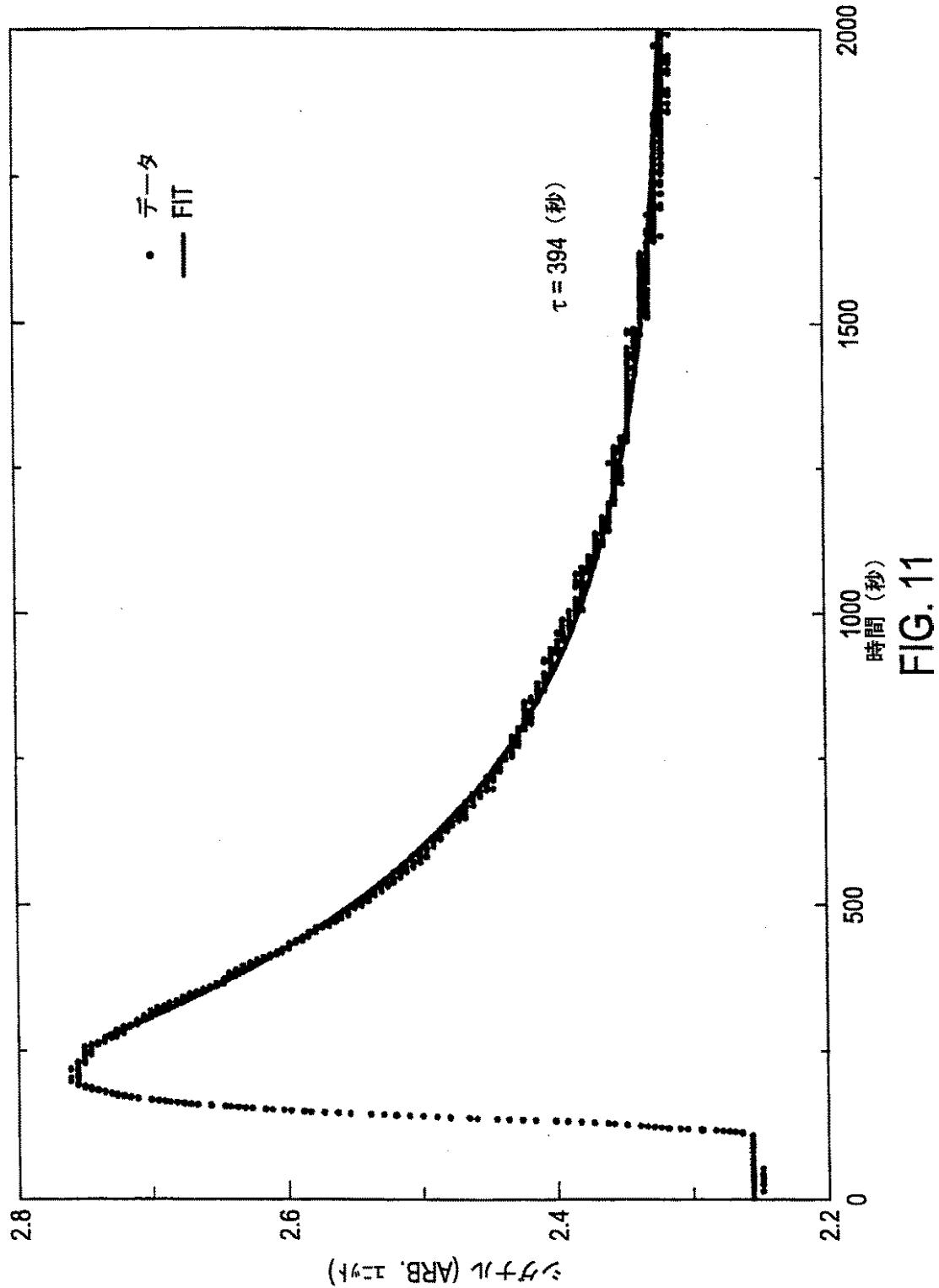


FIG. 9

【図10】



### 【図11】



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年5月4日(2001.5.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 腎細胞または肝細胞から成る群から選択される患者体内の一群の細胞の生理学的機能を測定する方法であって：

a) 電磁波を放射する検出可能な物質を選択する段階、ただし該物質は該患者の身体内の体液から該患者体内にある該細胞群によって選択的に除去されるものであり、そして、該放射は該患者体内にある該体液内で生じるものである；

b) 患者の該体液中に該物質を導入する段階、ただし、この体液は該患者体内の該細胞群に接触するものであり、そして、該放射は該体液内で生じるものである；

c) 該体液が通過する該患者の身体部分からの該放射を測定する段階、ただし、該放射が該測定時点で該体液からまだ除去されていない物質から生じるものである；および

d) 該放射の測定に基づいて該生理学的機能を測定する段階；  
の各段階を包含する方法。

但し、該物質は、第二波長の光で照射されると第一波長で螢光を発する色素であって、そして該色素は：

フルオレッセイン-ポリアスパラギン酸、

フルオレッセイン-ポリグルタミン酸、

フルオレッセイン-ポリアクリル酸、

フルオレッセイン-ポリヌクレオチド、

フルオレッセイン-ポリニトロフェニルアラニン、

フルオレッセイン-ポリジニトロフェニルアラニン、

フルオレッセイン - ポリトリニトロフェニルアラニン、  
フルオレッセイン - ポリスルホニルフェニルアラニン、  
フルオレッセイン - ポリジスルホニルフェニルアラニン、  
フルオレッセイン - ポリトリスルホニルフェニルアラニン、  
フルオレッセイン - ポリサクシネット、  
フルオレッセイン - ポリマロネート、  
フルオレッセイン - ポリグルタレート、  
フルオレッセイン - ポリグリコレート、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリアスパラギン酸、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリグルタミン酸、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリアクリル酸、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリヌクレオチド、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリニトロフェニルアラニン、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリジニトロフェニルアラニン、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリトリニトロフェニルアラニン  
、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリスルホニルフェニルアラニン  
、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリジスルホニルフェニルアラニ  
ン、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリトリスルホニルフェニルアラ  
ニン、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリサクシネット、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリマロネート、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリグルタレート、  
ビス(ヘキサン酸)インドシアニングリーン - ポリグリコレート、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン - ポリアスパラギン酸、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン - ポリグルタミン酸、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン - ポリアクリル酸、

ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリヌクレオチド、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリニトロフェニルアラニン、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリジニトロフェニルアラニン、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリトリニトロフェニルアラニン  
、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリスルホニルフェニルアラニン  
、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリジスルホニルフェニルアラニン、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリトリスルホニルフェニルアラニン、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリサクシネット、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリマロネート、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリグルタレート、  
ビス(プロパン酸)インドシアニングリーン-ポリグリコレート、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリアスパラギン酸、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリグルタミン酸、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリアクリル酸、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリヌクレオチド、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリニトロフェニルアラニン、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリジニトロフェニルアラニン、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリトリニトロフェニルアラニン、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリスルホニルフェニルアラニン、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリジスルホニルフェニルアラニン、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリトリスルホニルフェニルアラニン、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリサクシネット、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリマロネート、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリグルタレート、  
ビス(ベンゾチアゾール)スクアラインポリグリコレート、

ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリアスパラギン酸、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリグルタミン酸、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリアクリル酸、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリヌクレオチド、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリニトロフェニルアラニン、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリジニトロフェニルアラニン、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリトリニトロフェニルアラニン  
、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリスルホニルフェニルアラニン  
、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリジスルホニルフェニルアラニン、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリトリスルホニルフェニルアラニン、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリサクシネット、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリマロネート、  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリグルタレート、および  
ビス(トリヒドロキシフェニル)スクアラインポリグリコレート  
から成る群から選択され；

そして該測定段階に先立って、該体液が通過する該身体部分を該第二波長の光で照射して該色素が該第一波長で螢光を発するようにするものであり；

そして測定される該放射が該色素の該第一波長での螢光であり；さらに  
生理学的機能の該測定が該第一波長での螢光の測定に基づくものである。

【請求項2】 b)からd)までの各段階を、生理学的機能が変化するかどうかを測定するために反復する、請求項1に記載された方法。

【請求項3】 該物質を注射する、請求項1に記載された方法。

【請求項4】 該物質を脈管内注射する、請求項1に記載された方法。

【請求項5】 該身体部分が、該患者の皮膚表面近くの血管を含む、請求項1に記載された方法。

【請求項6】 該第二波長が約400～1200ナノメーターである、請求項1に記載された方法。

【請求項7】 該第二波長が約488ナノメーターである、請求項1に記載された方法。

【請求項8】 該身体部分をレーザーで照射する、請求項1に記載された方法。

【請求項9】 該身体部分を赤外線で照射する、請求項1に記載された方法。  
。

【請求項10】 該身体細胞が腎細胞である、請求項1に記載された方法。

【請求項11】 該身体細胞が肝細胞である、請求項1に記載された方法。

【請求項12】 該第一波長が約830ナノメーターである、請求項1に記載された方法。

【請求項13】 該第一波長が約518ナノメーターである、請求項1に記載された方法。

【請求項14】 該生理学的機能が腎機能である、請求項1に記載された方法。

【請求項15】 該生理学的機能が肝機能である、請求項1に記載された方法。

【請求項16】 該放射を該身体部分に関して侵襲的または非侵襲的に測定する、請求項1に記載された方法。

【請求項17】 該放射を内視鏡で測定する、請求項16に記載された方法。  
。

【請求項18】 さらに、該放射を測定するために該身体部分にカテーテルを挿入する段階を含む、請求項16に記載された方法。

【請求項19】 該身体部分が患者の耳である、請求項16に記載された方法。

【請求項20】 該身体部分が患者の指である、請求項16に記載された方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. and Application No  
PCT/US 00/01322

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K49/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 40106 A (UNIV WASHINGTON ;MALLINCKRODT MEDICAL INC (US)) 17 September 1998 (1998-09-17) claims 1,8,11	1-23
X		1
A	SOULI S ET AL: "IN VIVO PHARMACOKINETIC STUDY OF TWO FLUORESCIN DERIVATIVES BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY" PROCEEDINGS OF THE SPIE, US, SPIE, BELLINGHAM, WA, vol. 2627, 14 September 1995 (1995-09-14), pages 109-117, XP002071643 ----- -/-	1-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
*E* earlier document but published on or after the international filing date		
*L* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.		
*A* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the International search report	
17 April 2000	02/05/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Berte, M	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Appl. No.  
PCT/US 00/01322

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US</p> <p>URATA, KOICHI ET AL: "Clinical evaluation of indocyanine green clearance using the finger-piece method in patients undergoing hepatic surgery" retrieved from STN Database accession no. 118:78470 XP002135872 abstract &amp; YAKURI TO CHIRYO (1992), 20(SUPPL. 10), S2551~S2556 ,</p> <p>DE 44 45 065 A (DIAGNOSTIKFORSCHUNG INST) 13 June 1996 (1996-06-13) claims</p>	1-23
Y		1-23

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. <b>PCT/US 00/01322</b>
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>	
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  <b>Remark: Although claim(s) 1-23 is(are) directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.</b></p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>	
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p>	
<p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

## Information on patent family members

Int'l. Application No.  
PCT/US 00/01322

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9840106	A 17-09-1998	US 5928625	A 27-07-1999	
		AU 6046998	A 29-09-1998	
		EP 0966306	A 29-12-1999	
DE 4445065	A 13-06-1996	AU 709152	B 19-08-1999	
		AU 3740995	A 26-06-1996	
		CA 2205906	A 13-06-1996	
		CN 1174511	A 25-02-1998	
		WO 9617628	A 13-06-1996	
		EP 0796111	A 24-09-1997	
		HU 77378	A 28-04-1998	
		JP 10510250	T 06-10-1998	
		NO 972509	A 02-06-1997	
		NZ 294568	A 30-08-1999	
		ZA 9509707	A 29-05-1996	

フロントページの続き

(72)発明者 ラガバン・ラジャゴパラン  
アメリカ合衆国63043ミズーリ州メリーラ  
ンド・ハイツ、ピンソン・コート13031番  
(72)発明者 ジョゼフ・エドワード・ブガジュ  
アメリカ合衆国63303ミズーリ州セント・  
チャールズ、ケッタリング・ドライブ2916  
番  
F ターム(参考) 4C085 HH11 JJ01 KA27 KB41 KB54  
KB55 KB56 KB57 KB70 KB82  
KB91 LL05 LL11

专利名称(译)	生理功能的测量		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002537363A</a>	公开(公告)日	2002-11-05
申请号	JP2000600703	申请日	2000-01-20
[标]申请(专利权)人(译)	马林克罗特公司		
申请(专利权)人(译)	马连杆有限公司		
[标]发明人	リチャード・ブラッドリー・ドーシャー サミュエル・アチレフ ラガバン・ラジャゴバラン ジョゼフ・エドワード・ブガジュ		
发明人	リチャード・ブラッドリー・ドーシャー サミュエル・アチレフ ラガバン・ラジャゴバラン ジョゼフ・エドワード・ブガジュ		
IPC分类号	G01N21/64 A61B10/00 A61K49/00 G01N33/483		
CPC分类号	A61K49/0034 A61K49/0021 A61K49/0043 A61K49/0054 A61K49/0056		
FI分类号	A61K49/00.A		
F-TERM分类号	4C085/HH11 4C085/JJ01 4C085/KA27 4C085/KB41 4C085/KB54 4C085/KB55 4C085/KB56 4C085/KB57 4C085/KB70 4C085/KB82 4C085/KB91 4C085/LL05 4C085/LL11		
优先权	09/258148 1999-02-26 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

一种用于测量一组体细胞的生理功能的方法，包括选择能够发射可测量的电磁辐射的可检测物质的步骤。将该物质引入与一组体细胞接触的体液中。对该放射线进行测量并且基于放射线测量来测量生理功能。

