

博士論文

Accelerated Blood Clearance (ABC) 現象を回避可能な
新規マイクロバブル製剤の開発

Development of the novel microbubbles for avoiding
the Accelerated Blood Clearance (ABC) phenomenon

2020 年

島 忠光

略語一覧

ABC	: Accelerated Blood Clearance
C ₃ F ₈	: Perfluoropropane
C ₄ F ₁₀	: Perfluorobutane
DMPC	: 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DMPG	: 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
DPPA	: 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidic acid
DPPC	: 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DSPC	: 1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DSPE-PEG(2k)-OMe	: 1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine- <i>N</i> - [methoxy(polyethylene glycol) -2000]
DSPG	: 1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
DiR	: 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
HEPES	: <i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine- <i>N</i> -2-ethane sulfonic acid
IVIS	: In Vivo Imaging System
MB	: Microbubble
MPEG5000-DPPE	: 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine- <i>N</i> - [methoxy(polyethylene glycol) -5000]
PBS	: Phosphate buffered saline
PEG	: Polyethylene glycol
PG(PEG)-MB	: DSPC : DSPG : DSPE-PEG(2k)-OMe = 1 : 2 : 0.33 で構成された MB
ROI	: Region of Interest
S/N 比	: Signal/Noise 比
SF ₆	: sulfur hexafluoride
TMB	: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
EggPC	: L- α -phosphatidylcholine (Egg, Chicken)
nonPEG-MB	: DSPC : DSPG = 1 : 2 で構成された PEG 未修飾 MB

目次

緒論.....	1
本論.....	6
第一章　PG(PEG)-MB の特性評価と ABC 現象誘導の検討.....	6
第一節　PG(PEG)-MB の繰り返し投与による ABC 現象の誘導.....	8
第二節　ABC 現象誘導における抗 PEG IgM 抗体の関与.....	14
第三節　抗 PEG 抗体による ABC 現象の交差性に対する検討.....	19
第四節　小括.....	21
第二章　PEG 未修飾マイクロバブルの開発.....	22
第一節　PEG 未修飾マイクロバブルの外殻組成の検討.....	23
第二節　PEG 未修飾マイクロバブルによる抗 PEG IgM 抗体誘導.....	27
第三節　PEG 未修飾マイクロバブルの超音波造影.....	29
第四節　ABC 現象誘導下におけるマイクロバブルの組織分布.....	31
第五節　小括.....	34
総括.....	36
実験材料一覧.....	38
謝辞.....	40
参考文献.....	42

緒論

人間が聞くことのできる音の周波数は 20～20,000 Hz といわれており、一般に 20,000 Hz 以上の周波数の音を超音波という。超音波は音であるため固体、液体、気体を媒質に伝わっていくが、液体から気体など音響特性が異なる境界で一部が反射し、反射エコーを得ることができる。超音波のこのような性質は、医療においても利用されている。そのひとつとして、超音波を出す探触子（プローブ）をヒトの身体に押し当てて体内の臓器や組織の形状、動きなどを画像化して観察できる超音波検査が臨床で使用されている。超音波検査は、画像のリアルタイム観察や迅速かつ低侵襲な検査の施行という利点を有しており、様々な疾患の診断や病期の評価に用いられている。実際に体内の胎児の観察、各臓器の造影による腫瘍や結石の診断、心臓の造影による弁膜症の評価や頸動脈の造影による動脈硬化の評価などに使用されている。各疾患の検査では、目的の造影箇所に適した造影モードが用いられ、その造影モードには A モード、B モード、カラードップラーモード、パワードップラーモード、ハーモニックモードなど様々な種類がある（表 1）。A モードでは、造影超音波として入力した波長

表 1 超音波造影における造影モードと特徴

造影モード	特徴	主な使用タイミング
A モード	反射エコーの強さと距離を表示	主に眼科領域で使用
B モード	反射エコーの強さを輝度にして表示 一般的に認識される超音波画像	各臓器や胎児に使用
M モード	B モードで得られる輝度の情報を時系列で表示	心臓の弁など動きのある臓器に使用
カラードップラーモード	ドップラー効果を利用し、プローブに向かってくる信号を赤、離れていく信号を青の色で表示し、色の濃さで速さを表現	循環器系の血流の速い場所に使用
パワードップラーモード	ドップラー効果を利用し、得られた信号の強さを色で表示	腹部などの血流の遅い場所に使用
ハーモニックモード (コントラスト)	反射エコーのうち高調波成分のみを表示することで造影剤の信号を強調できる	造影剤使用時に使用

と同じ波長の反射波を検出し、反射波の生じた深さ情報を得ている。この A モードの情報をもとに 2D 画像化したものが B モードであり、我々がよく目にする一般的な超音波診断画像である。カラードップラーモードは、血球を反射源としたドップラー

効果を利用し、血流の速い部位の血流造影法として汎用されている。一方、血流が遅い場合、造影の感度が低下し、カラードップラーモードが利用できないため、パワードップラーモードが利用される。しかし、このパワードップラーモードは低速血流の造影感度を上げるため motion artifact の影響を受け易い。このようなドップラーモードによる血流造影の欠点を補うため、超音波造影剤であるマイクロバブル (MB) を利用したハーモニック (コントラスト) モードによる造影が開発及び利用されている¹。

MB に造影超音波が照射されると、超音波の疎密波により MB に内包される造影ガスが振動し、非線形の反射波が生じる (図 1)。この非線形の反射波は、造影超音波として入力した周波数の整数倍の周波数を含むことが知られている²。そのため、入力

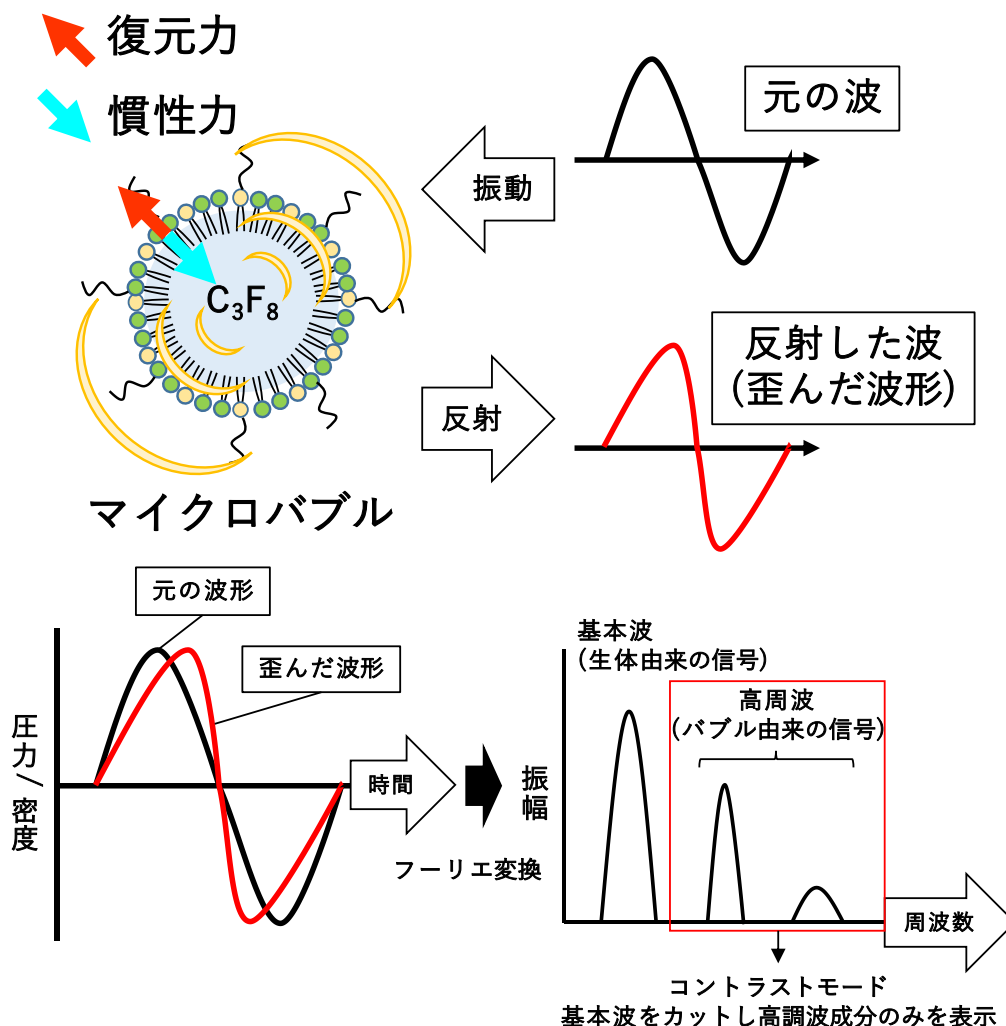


図 1 超音波によるマイクロバブルの振る舞い

気泡は収縮しにくく膨張しやすい。気泡内部の気体による復元力と外側の液体による慣性力によってマイクロバブルは共振する。超音波の振動によって気泡が壊されると強い高調波が発生する。

した周波数の 2 倍や 3 倍の高調波成分のみを検出することで、MB が存在する場所のみからのシグナルを得ることができる。このように MB からの高調波成分のみを検出するのがハーモニックモードであり、入力波と同じ周波数の反射波を検出しないため、B モードで得られるような組織由来のシグナルを排除することができる。このことから、高い S/N 比で MB からシグナルを検出できるため、MB を利用したハーモニックモードでの超音波造影が、他のモードでは観察が難しい微小血流の検出など詳細な血行動態の評価法として利用されている¹。近年では、超音波造影に関して新しい造影法として、MB を超音波のフラッシュで一度崩壊させることで消失させ、血液の再環流を観察する Flash Replenishment Imaging 法を応用した Micro Flow Imaging による血管の描出が行われている。このように、MB を利用した新たな超音波診断技術の開発は、日進月歩で発展しており超音波診断の幅がさらに広がるものと期待されている³。実臨床において Kurt らは、超音波造影剤である Definity を使用した超音波検査の施行により、患者管理において処方薬剤の変更や、他の追加検査の省略ができ医療コストの節約にもなると報告している⁴。この報告からも、造影剤を利用した超音波検査は診断・治療・医療経済の多面から非常に有用な検査といえる。そのため現在では、超音波造影剤を利用した超音波造影検査が、特に海外の臨床で多用されている (表 2)。

表 2 上市されている MB 製剤一覧

商品名	開発元	外殻成分	気泡成分	平均径
Levovist	Schering(独)	Palmitic acid	空気	2~4 μm
Optison	Amersham(米)	Albumin	C ₃ F ₈	3.0~4.5 μm
Definity	Bristol-Myers(米)	DPPC	C ₃ F ₈	1.1~3.3 μm
		DPPA		
		MPEG5000-DPPE		
SonoVue	Bracco(伊)	DSPC	SF ₆	2.5 μm
		DPPG		
		Palmitic acid		
		Macrogol 4000		
Sonazoid	GE Healthcare(米)	Hydrogenated eggPS	C ₄ F ₁₀	3 μm

超音波診断の最大の利点に、リアルタイム性が挙げられる。しかし、臨床で用いられている多くの MB 製剤の血中半減期が数分程度と短く、現在の MB を用いた造影超音波診断において微小血流をリアルタイムに観察しながら解析することが困難であ

る⁵。したがって、超音波診断の利点を最大限引き出すために MB の安定化や血中滞留性の向上が必要不可欠である。これまでに開発されてきた多くの MB は、核に超音波造影ガスの気泡を持ち、その気泡を安定化するために外殻成分としてリン脂質またはアルブミン等が気泡の周囲を被った構造をしている⁶。つまり、MB は水中において液体と気体によるエマルジョンのような状態で存在している。そのため、気泡の安定性は外殻成分の影響を大きく受けることが知られている⁷。このような観点から、多くのグループが MB の外殻成分に着目し、安定性に優れた MB 開発を行っている。そのなかで、血中滞留性向上を目的に Polyethylene glycol (PEG) 修飾脂質やマクロゴール 4000 (PEG4000) を利用した MB が開発され、Definity や SonoVue (Lumason) として臨床応用されている。我々の研究グループでは、PEG 修飾脂質を用いた MB にジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG) を添加すると、MB の安定性や血中滞留性向上がさらに向上することを見出した。そして、DSPG 添加量を最適化した MB (PG(PEG)-MB) の開発に成功した⁷。この PG(PEG)-MB は、これまでの MB より血中滞留時間が長く、微小血流のリアルタイム観察などの超音波造影剤としての利用が見込まれる。さらに、PG(PEG)-MB と治療用超音波照射の併用により、遺伝子や薬物デリバリーも可能であることが明らかとなっている。そのため、診断と治療を同一の薬剤で行う、もしくは同時に行う手法である「セラノスティクス (Theranostics = Therapeutics + Diagnostics)」への応用も期待される。

近年、医薬品の投与により生じるインフュージョンリアクションが問題視されている。この原因の多くは、医薬品や医薬品添加物に対する免疫反応によるものである。この免疫反応を惹起する医薬品添加物として前述した PEG が挙げられる。PEG はペガシス⁸やペグイントロン⁹などの PEG 化たんぱく質製剤やドキシル¹⁰などのドキシソルビシン封入 PEG 修飾リポソーム製剤として医薬品応用されている。これらの製剤は、PEG 化により生体の細網内皮系に捕捉されにくくなっており、血中滞留性向上を期待した製剤として利用されている¹¹⁻¹³。しかし、一部の医薬品ではこの PEG に対する抗体誘導が報告されており¹⁴⁻¹⁷、抗 PEG 抗体が補体系を活性化し、PEG 修飾製剤に対するインフュージョンリアクションを発生させることも報告されている¹⁸⁻²⁰。特に血中滞留性の短縮に関しては、2000 年に PEG を修飾したリポソームで初回投与に比べ繰り返し投与におけるクリアランスが著しく上昇する Accelerated Blood Clearance (ABC) 現象として報告されている²¹。

このような ABC 現象は、リポソームに限らず、ミセルなどの粒子状製剤や PEG 修飾 β グルクロニダーゼなどの PEG を使用した製剤にも確認されている^{22,23}。さら

に 2018 年には、PEG 修飾 MB による ABC 現象の誘導が、はじめて報告された²⁴。

この PEG 修飾 MB に対する ABC 現象では、MB による血管の超音波造影において、造影輝度が速やかに消失することが確認されている。このような MB に対する ABC 現象の誘導は、MB の超音波造影効果に影響するため、血流動態の誤認による間違っ た診断結果につながる可能性がある。また、PEG を使用した MB は、前述した抗 PEG 抗体によるアレルギー反応を誘導する可能性もある。

前述したように我々は、安定性・血中滞留性に優れた PG(PEG)-MB の開発に成功している⁷。しかし、この PG(PEG)-MB において、外殻成分に PEG が含まれていることから ABC 現象の誘導やアレルギー反応の誘発などが懸念された。そこで本研究では、この PG(PEG)-MB の ABC 現象誘導について検討した。その結果、PG(PEG)-MB においても、ABC 現象が誘導されることが明らかとなった。このことより、PG(PEG)-MB が、超音波造影における誤診や PEG に対するアレルギー反応を誘導する可能性がある。この問題を解決するためには、ABC 現象を回避可能な MB 製剤の開発が必要不可欠であると考えた。そこで本研究では、ABC 現象を回避可能な新規 MB 製剤の開発を試みた。

本論

第一章 PG(PEG)-MB の特性評価と ABC 現象誘導の検討

PEG は一般的に人体に無害であり安全性の高い物質だと考えられ様々な薬剤に添加物として使用されている。一方、PEG に関して、日用品や食品に含まれる PEG の曝露や PEG 修飾薬剤の使用により、抗 PEG IgM 抗体が産生されることが知られている^{20,25-27}。そのため「PEG が人体にとって完全に無害と言い切れない」とする報告が多数ある^{14,17-20,28}。その中には、抗 PEG IgM 抗体の誘導により、血中の PEG 修飾リポソームのクリアランスが上昇するという ABC 現象の報告がある²³。この ABC 現象の初期段階では、PEG 修飾リポソームの投与により、PEG に対する抗 PEG IgM 抗体が産生誘導される²⁹。そして、この抗 PEG IgM 抗体は、再投与した PEG 修飾リポソームをオプソニン化し、肝臓マクロファージへのリポソームの取り込みを促進する^{29,30}。また、脾臓では B 細胞により再投与した PEG 修飾リポソームが認識され³¹、PEG 修飾リポソームの血中クリアランスが加速される(図 2)。このような ABC 現象は、リポソームに限らず、PEG を使用した様々な製剤に確認され^{22,23}、PEG を修飾した MB においても報告されている²⁴。この MB に関する報告では、PEG 修飾 MB を

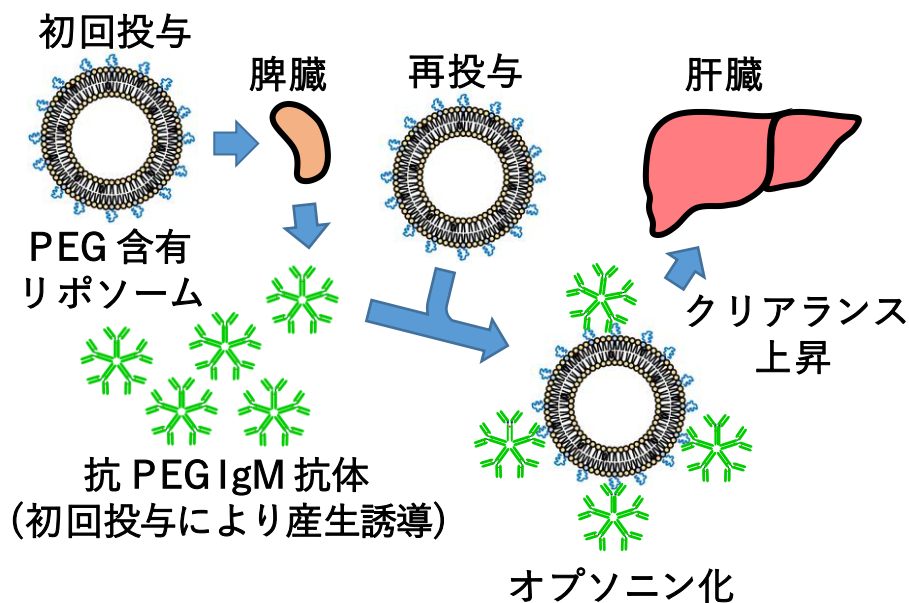


図 2 ABC 現象の概要

PEG 修飾 リポソームが脾臓で免疫され、抗 PEG 抗体が産生される。そして、産生された抗体により再投与した薬剤がオプソニン化され、肝臓への取り込みが促進する。

28 日間にわたりラットに繰り返し投与することで 2 日目以降の投与において ABC 現象が誘導され、造影輝度の消失が速くなることが示されている。また、PEG 修飾 MB を投与したラットにおいて、抗 PEG 抗体産生誘導が確認されている。さらに、この ABC 現象は、市販されている PEG 修飾 MB 製剤である Definity でも確認されている²⁴。したがって、MB に修飾された PEG が ABC 現象の発現に関わっていると考えられた。

これまでに開発してきた PG(PEG)-MB は、超音波診断・治療（超音波セラノスティクス）への応用を目的に安定性が高くなるように最適化されており、外殻脂質組成が DSPC : DSPG : DSPE-PEG(2k)-OMe = 1 : 2 : 0.33 (mol 比) となっている⁷。しかし、PEG 修飾 MB の ABC 現象誘導の報告から考えると、この PG(PEG)-MB も PEG を外殻に有する MB であるため、繰り返し投与により ABC 現象を誘導する可能性がある。そこで本章では、PG(PEG)-MB の繰り返し投与による ABC 現象の誘導について検討した。

第一節 PG(PEG)-MB の繰り返し投与による ABC 現象の誘導

PEG は MB 投与後の細網内皮系からの捕捉回避を目的にすると共に、両親媒性分子のもつ界面活性作用で気泡エマルジョンである MB を安定化する作用も知られている³²⁻³⁴。そのため、PG(PEG)-MB にも外殻成分として総脂質組成の 10% に DSPE-PEG が利用されており、MB 表面に PEG 鎖が存在している。したがって、PG(PEG)-MB の繰り返し投与により ABC 現象が誘導される可能性がある。そこで本節では、PG(PEG)-MB のマウスへの投与による ABC 現象誘導の有無を検討した。

【実験材料と実験方法】

PG(PEG)-MB の調製方法

DSPC : DSPG : DSPE-PEG(2k)-OMe = 1 : 2 : 0.33 (mol 比) を有機溶媒混合液 (クロロホルム : メタノール : 10% アンモニア水 : MilliQ = 65 : 35 : 4 : 4) に溶解させ、ロータリーエバポレーター

にて有機溶媒を減圧除去し脂質薄膜を作製した。その後、脂質薄膜をデシケータにて終夜減圧し有機溶媒を完全に除去した。この脂質薄膜に 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を添加し水和した。水和後、恒温振盪 (65°C、30 分間、160 rpm) しリポソームとした。調製した 1 mM リポソーム 20 mL を 50 mL 用ファルコンチューブへ添加し、C₃F₈ 存在下でホモジナイザーを用いて高速攪拌 (15,000 rpm、

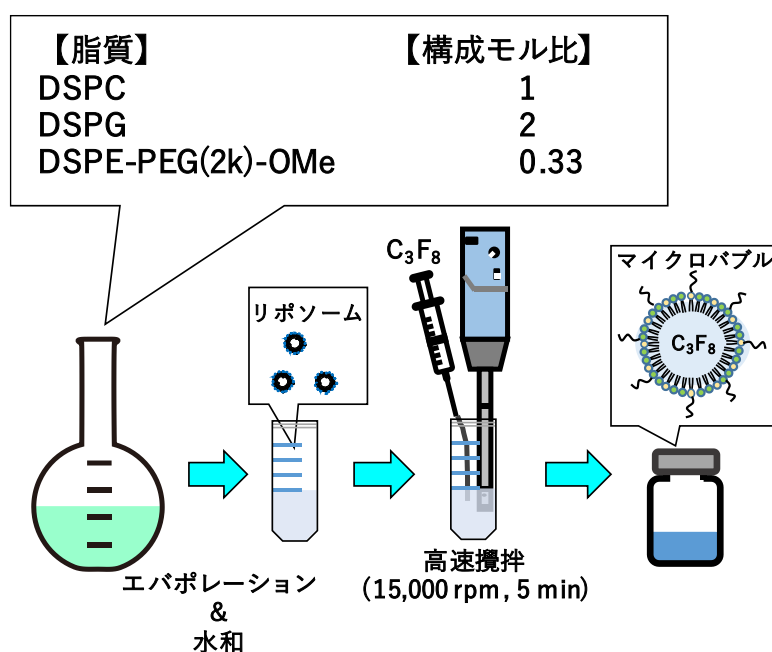


図 3 PG(PEG)-MB の調製方法

脂質を有機溶媒に溶解し、有機溶媒を減圧除去することで均一な脂質膜を作製した。脂質膜を水和してリポソームにすることで均一な脂質懸濁液を作製した。作製した脂質懸濁液に C₃F₈ を吹き付けながら泡立てるように高速攪拌することで C₃F₈ を内包したマイクロバブルを調製した。

5 min) することで PG(PEG)-MB を調製した (図 3)。調製した PG(PEG)-MB と凍結乾燥時の保護剤となる 18% スクロース溶液を各 1 mL ずつ 1:1 の割合で 5 mL 用バイアルへ添加し、凍結乾燥 (-35°C ; 1 時間、-15°C ; 8 時間、+20°C ; 8 時間) を行った。作製した凍結乾燥品 (図 4) を MilliQ 2 mL で用時溶解し、PBS で希釈して実験に使用した。

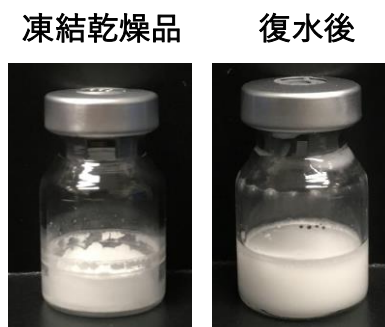


図 4 PG(PEG)-MB の外観

コールターカウンター法による MB のサイズと個数濃度の測定方法

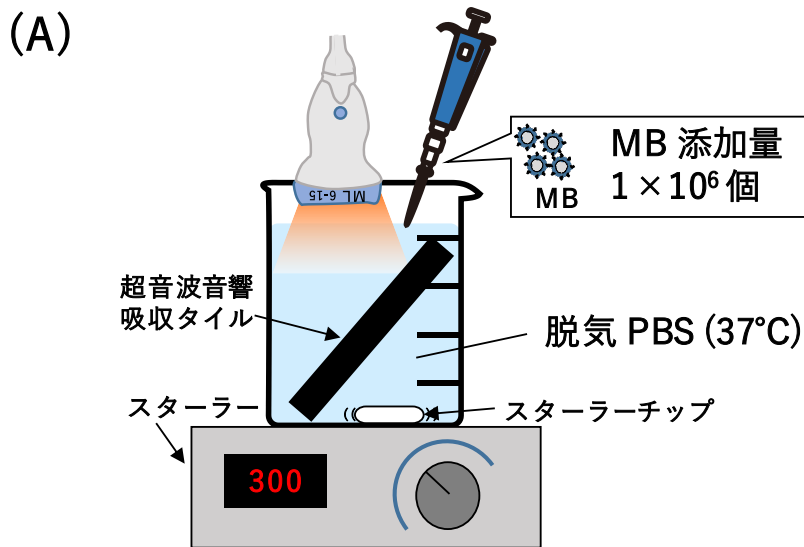
ガラスビーカー内の ISOTON 50 mL に調製した PG(PEG)-MB (10 μ L) を添加し、コールターカウンター法で精密粒度分布測定装置 (Multisizer3) を用いて平均粒子径と個数濃度を測定した。

in vitro における PG(PEG)-MB の安定性評価方法

造影時のノイズを抑えるため超音波音響吸収タイルを設置したビーカーに 500 mL の脱気 PBS (37°C、攪拌下) を注ぎ、PG(PEG)-MB (1×10^6 個/50 μ L) を添加して超音波造影装置 (LOGIQ E9) のコントラストモードを用いて超音波造影 (照射条件: Dynamic range (DR)=72 dB, 相対超音波出力 (AO)=70%, Mechanical index (MI 値)=0.2, Gain=1 dB) した (図 5)。撮影した造影像は画像処理ソフトウェア (ImageJ) を用いて輝度解析し、相対輝度を算出した。相対輝度は最高輝度から以下の式を用いて算出した。

$$\text{相対輝度} = \text{測定輝度} / \text{最高輝度} \times 100 (\%)$$

さらに、相対輝度が 50% となった時間を造影輝度の半減期 (造影半減期) として算出した。また、各測定の 1 秒毎の相対輝度の平均をとり、散布図とすることで相対輝度の消失曲線を描出した。



(B) 超音波造影画像

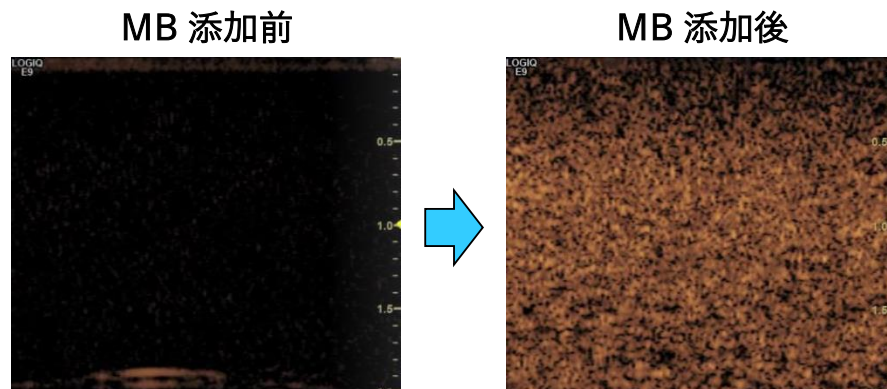


図 5 *in vitro* における PG(PEG)-MB の安定性評価方法

PBS 中に PG(PEG)-MB を添加して、攪拌下で超音波造影を行った。

(A) 実験の模式図

(B) コントラストモードによる PG(PEG)-MB の超音波造影画像

in vivo における PG(PEG)-MB の血中滞留性評価方法

ddY マウス (雌性、6 週齢) の後背部を除毛し、イソフルラン麻酔下において PG(PEG)-MB (0.25×10^7 個/マウス) を静脈内投与した。PG(PEG)-MB 投与後、超音波造影装置 (LOGIQ E9) のコントラストモード (照射条件: DR=72 dB, AO=70%, MI 値 = 0.2, Gain=1 dB) を用いて、腎臓における超音波造影輝度の変化を指標に各 MB の血中滞留性を評価した。超音波撮像画像は ImageJ を用いて輝度解析し、造影半減期を算出した。さらに、PG(PEG)-MB 初回投与から 7 日後に PG(PEG)-MB (0.25×10^7 個/マウス) を再投与し、同様の方法で血中滞留性を評価し、造影半減期を比較した。

【結果と考察】

はじめに本研究で調製した PG(PEG)-MB の特性を評価した。その結果、PG(PEG)-MB の平均粒子径は $2.16 \pm 0.06 \mu\text{m}$ で、調製時の平均個数濃度は $1.3 \pm 0.3 (\times 10^9 \text{ 個/mL})$ であった。既存の超音波造影剤である Sonazoid の平均粒子径はインタビューフォーム³⁵より $2\sim 3 \mu\text{m}$ とされているため、本検討における PG(PEG)-MB の粒子径は Sonazoid とほぼ同様と示された。また、PG(PEG)-MB を *in vitro* で超音波造影した結果、PG(PEG)-MB の造影輝度が時間の経過とともに低下した。PG(PEG)-MB の造影半減期を算出したところ、造影半減期の平均値は 124.3 ± 25.4 秒であった (図 6)。

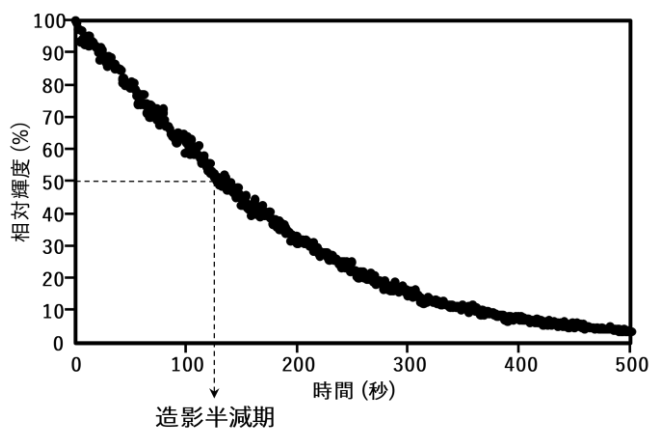


図 6 *in vitro* における PG(PEG)-MB の超音波造影輝度消失曲線

PEG(PEG)-MB の *in vitro* の超音波造影による造影輝度消失曲線
各サンプルの相対輝度の平均値を散布図として相対輝度の消失曲線を描いた。(n=3)

次に、この PG(PEG)-MB の ABC 現象を検討するため、PG(PEG)-MB をマウスに投与し、その 7 日後に PG(PEG)-MB を再投与した時のマウス腎臓における超音波造影輝度の推移を検討した (図 7)。腎臓は血流が多く、表皮に近いので超音波造影での観察に適しており²⁴、本研究の観察臓器として選択した。PG(PEG)-MB の造影半減期を算出した結果、初回投与に比べ、2 回目に投与したマウスにおいて超音波造影輝度の消失が早く、造影半減期が有意に短縮した (図 8)。このことから、PG(PEG)-MB が ABC 現象を誘導することが明らかとなった。このように、繰り返し投与で MB の造影半減期が変化することは、臨床で同一患者への再検査を行う場合に障害となる可能性が懸念された。そのため、ABC 現象を回避可能な MB の開発が必要と考えられた。また、過去の報告によると、PEG 修飾リポソームや PEG 修飾 MB の繰り返し投与において、抗 PEG IgM 抗体の誘導が ABC 現象の原因であることが示されている^{24,28}。本検討により、PG(PEG)-MB による ABC 現象の誘導が確認できたため、PG(PEG)-MB

においても抗 PEG IgM 抗体の誘導が ABC 現象の原因である可能性が考えられた。

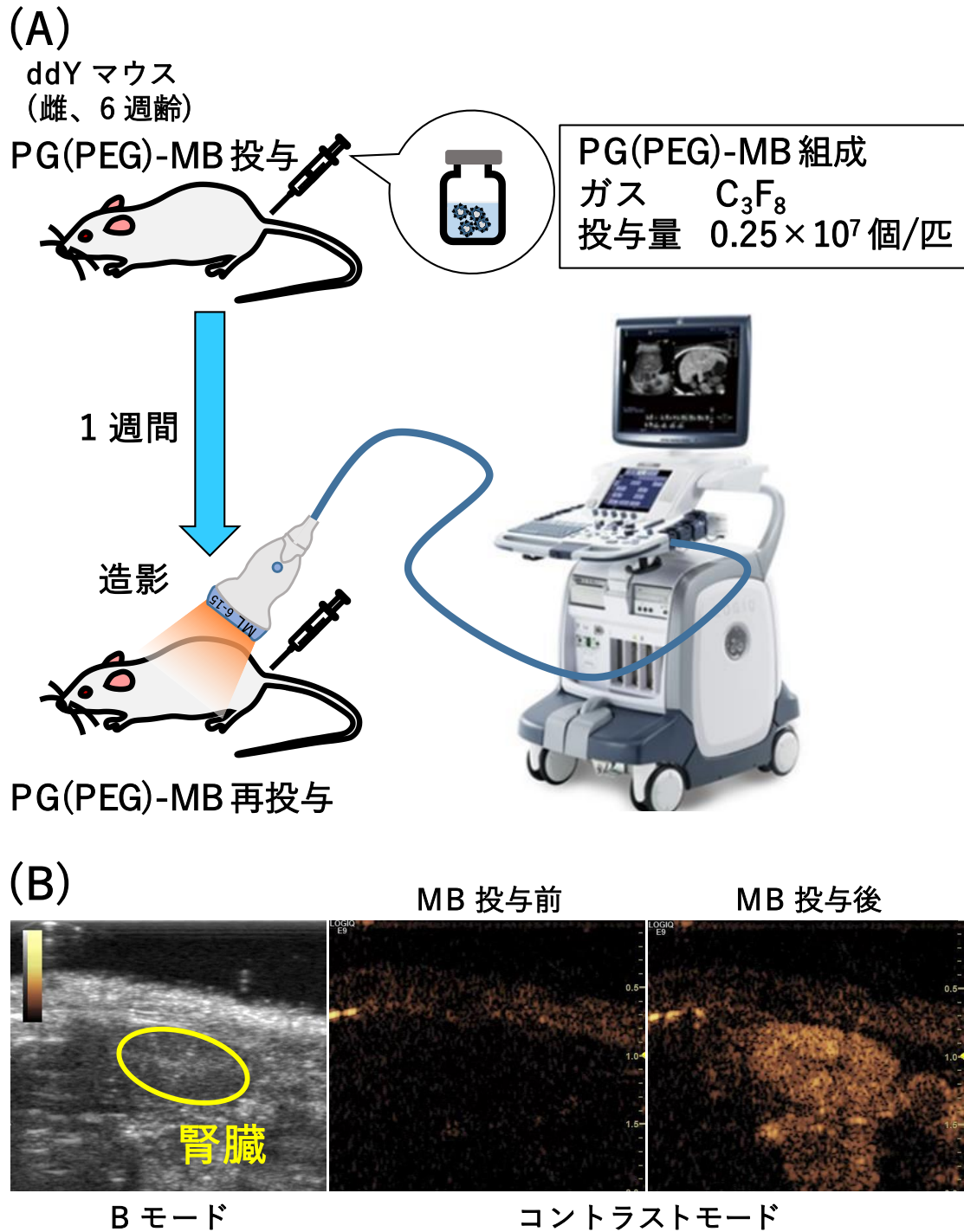


図 7 PG(PEG)-MB の繰り返し投与による造影評価

PG(PEG)-MB をマウスへ投与し、7 日後に再投与して超音波造影した。

(A) 実験の模式図 (B) 超音波造影により撮像したマウスの腎臓を B モードとコントラストモードで造影した。(黄色の円：腎臓)

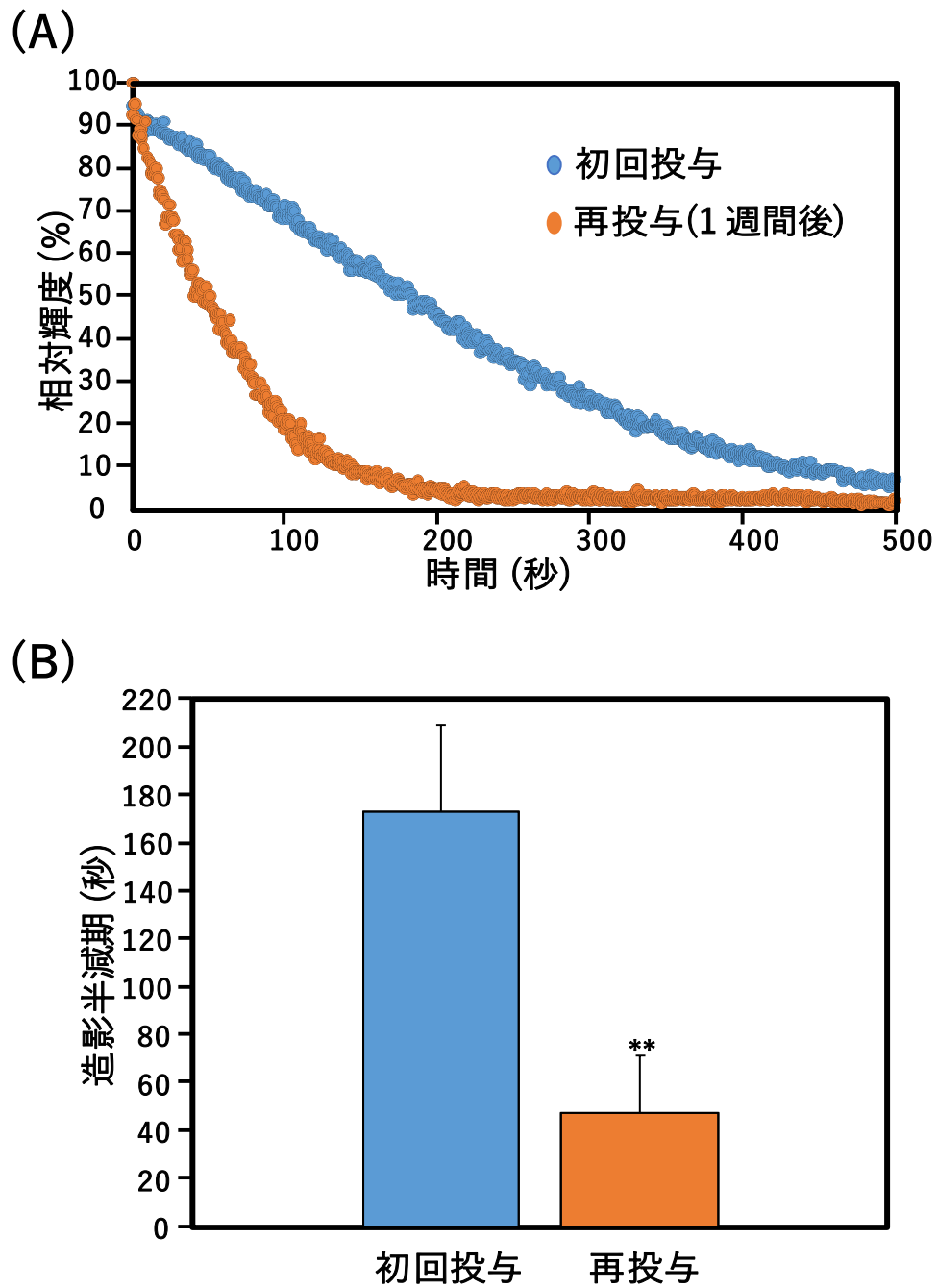


図 8 PG(PEG)-MB の繰り返し投与における超音波造影

PEG(PEG)-MB を初回投与から 7 日後に再投与し、コントラストモードで撮像した超音波造影データ。

(A) 造影輝度消失曲線 (相対輝度の平均値から作成、n=3)

(B) 造影半減期 (平均値 ± 標準偏差、n=3、** $P < 0.01$, student's t -test, vs 初回投与)

第二節 ABC 現象誘導における抗 PEG IgM 抗体の関与

本節では、PG(PEG)-MB 投与における抗 PEG 抗体の産生誘導について検討した。なお、この抗 PEG 抗体について、ヒトでは IgM と IgG の両方が検出されることが示されている^{25,26}。しかし、ラットなどの齧歯類の研究において、誘導される抗 PEG 抗体は IgG へのクラススイッチは起こらず、IgM 抗体が有意に上昇することが報告されている^{36,37}。そこで本検討では、PG(PEG)-MB 投与後のマウス血中抗 PEG IgM 抗体価を評価した。

【実験材料と実験方法】

PEG 修飾リポソームの調製方法

EggPC : Cholesterol : DSPE-PEG(2k)-OMe = 1.85 : 1 : 0.15 (mol 比) をクロロホルムに溶解させ、ロータリーエバポレーターにて有機溶媒を減圧除去し、脂質薄膜を作製した。その後、脂質薄膜をデシケータにて終夜減圧し、有機溶媒を完全に除去した。この脂質薄膜に 25 mM HEPES 緩衝液 (0.14 M NaCl, pH 7.4) を 20 mL 添加して水和した。水和後、恒温振盪 (65°C、30 分間、160 rpm) し、バス型ソニケーターで 10 分間のソニケーションを行った。その後、エクストルーダー (膜孔径 : 400 nm×3 回, 200 nm×15 回, 100 nm×10 回, 80 nm×3 回) により粒子径を調製し、450 nm フィルターでろ過し、PEG 修飾リポソーム懸濁液とした。作製した PEG 修飾リポソームは動的光散乱法により粒子径分析装置 (Zetasizer Nano-ZS) を用いて平均粒子径を測定した。

PEG 修飾リポソームによる抗 PEG IgM 抗体誘導方法

ddY マウス (雌性、6 週齢) に PEG 修飾リポソーム (EggPC : 0.1 μmol/kg) を静脈内投与し、投与後 0, 3, 5, 7, 10, 14 日目にヘパリン処理キャピラリーで採血を行った。回収した血液を遠心分離 (3400 rpm、30 分) することで血漿を回収し、固相を DSPE-PEG(2k)-OMe とし、一次抗体として希釈したマウスの血漿、二次抗体を GOAT anti MOUSE IgM HRP conjugate (0.1 μg/mL)、発色基質に TMB を用いた ELISA 法により、抗 PEG IgM 抗体の抗体価を評価した。なお、抗体価は吸光度 (450 nm) が 0.1 以上となる最大希釈倍率の 2 を底とする常用対数と定義した。

PG(PEG)-MB による抗 PEG IgM 抗体誘導方法

ddY マウス (雌性、6 週齢) に PG(PEG)-MB (0.25×10⁷ 個/マウス) を静脈内投与し、

PG(PEG)-MB 投与後 0, 3, 5, 7, 10, 14 日目に採血を行った(図 9)。回収した血液を遠

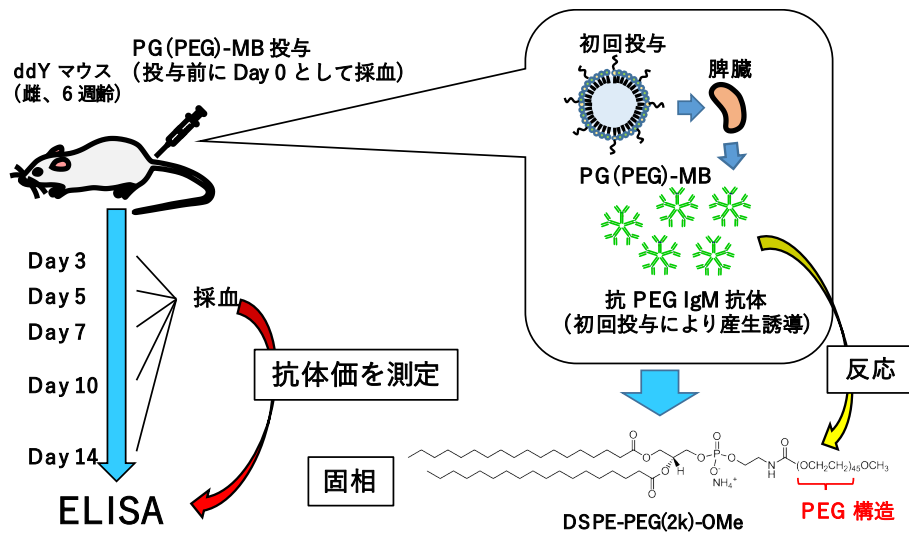


図 9 PG(PEG)-MB による抗 PEG IgM 抗体誘導方法

心分離 (3400 rpm、30 分) することで血漿部分を回収し、PEG 修飾リポソームによる抗 PEG IgM 抗体誘導の実験と同様の ELISA 法により、抗 PEG IgM 抗体の抗体価を評価した。

遊離 PEG 前投与による PG(PEG)-MB の超音波造影への影響検討方法

ddY マウス (雌性、6 週齢) に PG(PEG)-MB (0.25×10^7 個/マウス) を投与し、投与後 7 日後に遊離 PEG-20k (120 mg/マウス) をマウスの静脈内へ投与した。遊離 PEG 投与後 3 時間後に PG(PEG)-MB (0.25×10^7 個/マウス) の再投与を行った(図 10)。

PG(PEG)-MB 投与後に超音波造影装置 (LOGIQ E9) (照射条件: DR = 72 dB, AO = 70%, MI 値 = 0.2, Gain = 1 dB) を用いて腎臓における超音波造影輝度の変化を指標に、ABC 現象誘導下での PG(PEG)-MB の造影半減期への遊離 PEG 投与の影響を評価した。

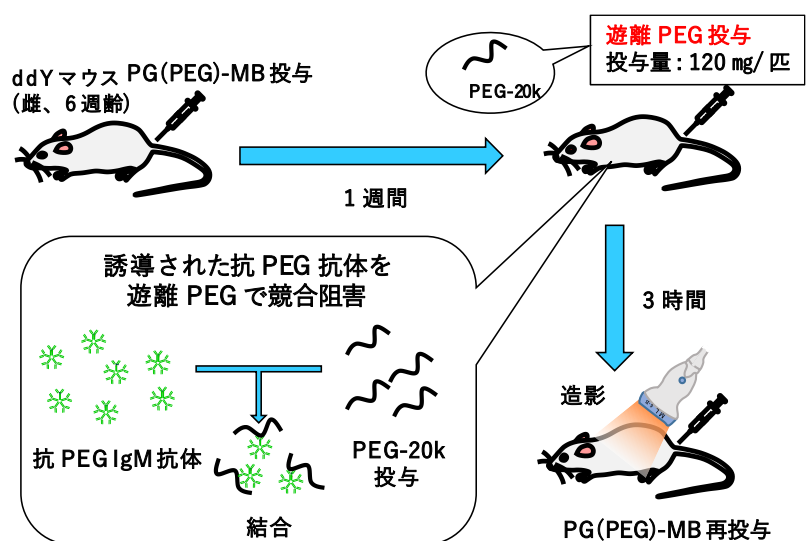


図 10 遊離 PEG 前投与による PG(PEG)-MB の超音波造影への影響検討方法

【結果・考察】

本検討では、先行論文³⁶に報告のある PEG 修飾リポソーム投与による抗 PEG IgM 抗体の誘導を、PG(PEG)-MB 投与による抗 PEG IgM 抗体誘導に関する検討のポジティブコントロールにすることを考えた。そのため、はじめに上述の実験におけるポジティブコントロールとしての PEG 修飾リポソームの妥当性を検討することとした。本検討の方法で作製した PEG 修飾リポソームの平均粒子径は 73.77 ± 3.71 nm ($n=3$) となった。マウスに PEG 修飾リポソームを投与し、経日的に血液をサンプリングし、血漿中の抗 PEG IgM 抗体価を検討した。その結果、PEG 修飾リポソームの投与 3 日後から抗 PEG IgM 抗体価の有意な上昇が認められ、抗体価の高値は投与後 14 日間に渡り継続していた。先行論文においても PEG 修飾リポソーム投与後 3 日目から抗 PEG IgM 抗体の上昇が認められており³⁶、経時的な抗体価の推移が本検討結果と類似していた。そのため、本検討で使用した PEG 修飾リポソームが、PG(PEG)-MB を評価するためのポジティブコントロールとして妥当であると考えられた。次に、PG(PEG)-MB を投与したマウスでの抗 PEG IgM 抗体の誘導について検討した。その結果、PG(PEG)-MB 投与後 3 日目以降で血漿中の抗 PEG IgM 抗体価の有意な上昇がみられ、投与後 14 日間に渡り高値が継続した (図 11)。この抗 PEG IgM 抗体価の上

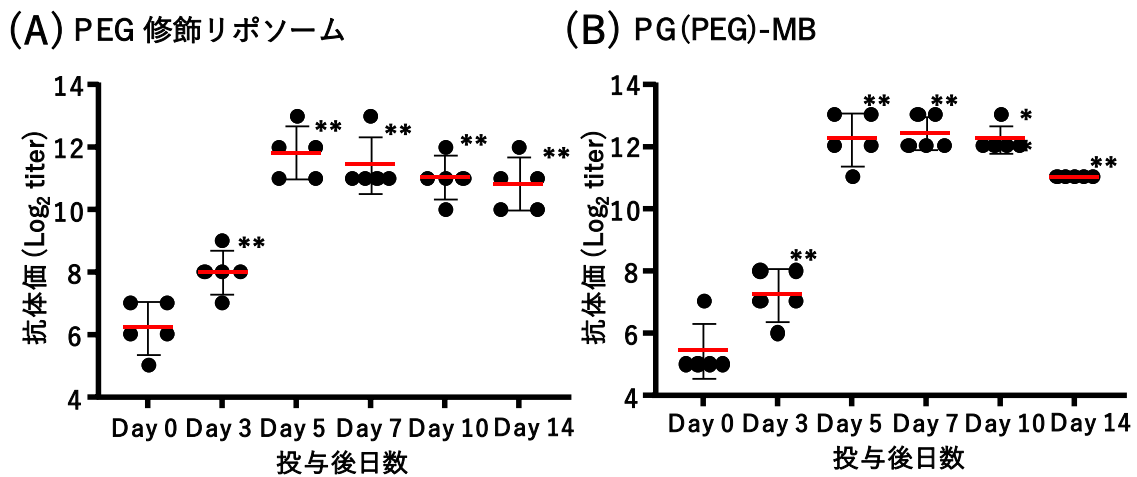


図 11 マウスの血漿における抗 PEG IgM 抗体価の測定

PEG 粒子を投与したマウスでの血中抗 PEG IgM 抗体価を測定した。

(A) PEG 修飾リポソーム投与後の抗 PEG IgM 抗体価

(平均値 ± 標準偏差、 $n=5$ 、** $P < 0.01$, Dunnett's test, vs Day 3, 5, 7, 10, 14)

(B) PG(PEG)-MB 投与後の抗 PEG IgM 抗体価

(平均値 ± 標準偏差、 $n=5$ 、** $P < 0.01$, Dunnett's test, vs Day 3, 5, 7, 10, 14)

● : 測定値、— : 平均値

昇は PEG 修飾 MB 投与後 7 日目にピークを迎えており、MB の ABC 現象を報告した先行論文²⁴と類似していた。これらの結果から、PG(PEG)-MB の投与においても PEG 修飾リポソーム投与と同様に抗 PEG IgM 抗体産生が誘導されることが明らかとなった。このように PG(PEG)-MB 投与でも抗 PEG IgM 抗体の産生が確認されたことから、PG(PEG)-MB の ABC 現象の原因が抗 PEG IgM 抗体の誘導であると考えられた。そこで、PG(PEG)-MB 投与における抗 PEG IgM 抗体の ABC 現象への関与を明確にするため、遊離 PEG を用いた競合阻害実験を行った。この検討において、遊離 PEG の投与量として Fix らのラットでの報告²⁴をもとに、マウス投与量への換算を考えた。この報告では、高濃度の抗 PEG 抗体による ABC 現象を解消できる遊離 PEG 投与量を 6,000-15,000 mg/kg と算出している。そこで本検討では、この投与量を参考にマウスへの投与量に換算し、遊離 PEG を 120 mg/マウスとして投与することとした。PG(PEG)-MB を投与し抗 PEG IgM 抗体を誘導したマウスに、遊離 PEG を投与した後に PG(PEG)-MB を再投与した結果、PG(PEG)-MB の造影半減期は、初回投与と同等まで回復した (図 12)。これより、遊離 PEG の投与で ABC 現象が解消されることが示された。これは、遊離 PEG の投与により本来 PG(PEG)-MB に結合するはずであった抗 PEG IgM 抗体が競合阻害され、PG(PEG)-MB のオプソニン化が回避されたためであると推察された。このような PG(PEG)-MB のオプソニン化回避に伴い、肝臓及び脾臓への取り込みが抑制され、造影半減期が初回投与と同等になったと考えられた。以上の結果から、PG(PEG)-MB 再投与でみられた ABC 現象の原因が抗 PEG IgM 抗体であることが示唆された。

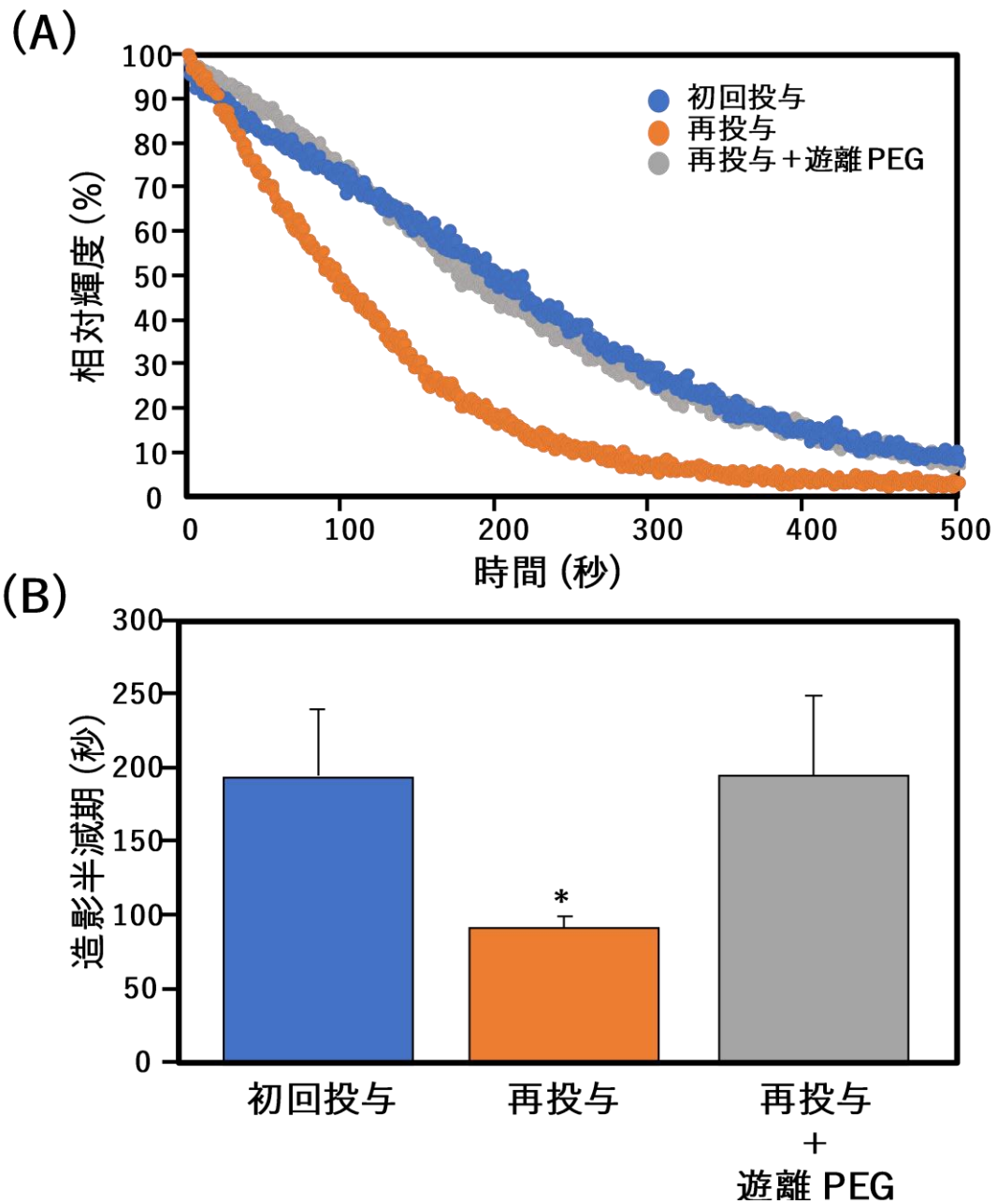


図 12 遊離 PEG 前投与による PG(PEG)-MB の超音波造影への影響検討
 抗 PEG 抗体の PG(PEG)-MB への結合を競合阻害する目的で遊離 PEG を投与し、PG(PEG)-MB 投与後にコントラストモードで超音波造影を行った。
 (A) 造影輝度消失曲線 (相対輝度の平均値から作成、n=3)
 (B) 造影半減期 (平均値 ± 標準偏差、n=3、* $P < 0.05$, Dunnett's test, vs 再投与, 再投与+遊離 PEG)

第三節 抗 PEG 抗体による ABC 現象の交差性に対する検討

前節により、PG(PEG)-MB の ABC 現象の原因が抗 PEG IgM 抗体であることが明らかとなった。このことから、抗 PEG IgM 抗体が誘導されるような PEG を利用した製剤の使用経験がある患者では、PEG 化製剤の種類が変わっても抗 PEG 抗体の交差反応により PG(PEG)-MB の ABC 現象が誘導される可能性が考えられた。そこで本節では、異なる PEG 化製剤間の ABC 現象の交差反応について PG(PEG)-MB の造影半減期への影響を指標に評価した。

【実験材料と実験方法】

PEG 修飾リポソームの調製方法

PEG 修飾リポソームは第一章第二節と同様の方法で調製した。

PEG 修飾リポソーム投与後における PG(PEG)-MB の血中滞留性評価方法

ddY マウス (雌性、6 週齢) に PEG 修飾リポソーム (EggPC : 0.1 $\mu\text{mol/kg}$) を静脈内投与した。さらに、7 日後に後背部を除毛し、イソフルラン麻酔下において PG(PEG)-MB (0.25×10^7 個/マウス) を静脈内投与した。PG(PEG)-MB 投与後、超音波造影装置 (LOGIQ E9) を用いて第一章第一節「*in vivo* における PG(PEG)-MB の血中滞留性評価方法」と同様に造影し、造影半減期を算出した。

【結果・考察】

PEG 修飾リポソームを事前に投与し、抗 PEG IgM 抗体が誘導されたマウスに PG(PEG)-MB を投与したときの超音波造影への影響を検討した。その結果、無処置のマウスへの PG(PEG)-MB 投与に比べ、PEG 修飾リポソーム投与後の PG(PEG)-MB 投与において、超音波造影半減期の有意な短縮が認められた (図 13)。このことから、PEG 修飾リポソームの投与で産生誘導された抗 PEG IgM 抗体が、PG(PEG)-MB の ABC 現象にも関与することが明らかとなった。このように、産生誘導された抗 PEG IgM 抗体は、PEG 化製剤の種類を超えた交差性を有していることが示された。抗 PEG 抗体の薬剤間での交差性は、抗 PEG 抗体について調査した先行論文²⁶や Pegloticase³⁸でも懸念されている。このように、本検討でみられた抗 PEG IgM 抗体の交差性は臨床現場において問題点とされる可能性があり、抗 PEG IgM 抗体の影響から逃れる対策を講じる必要があると考えられた。

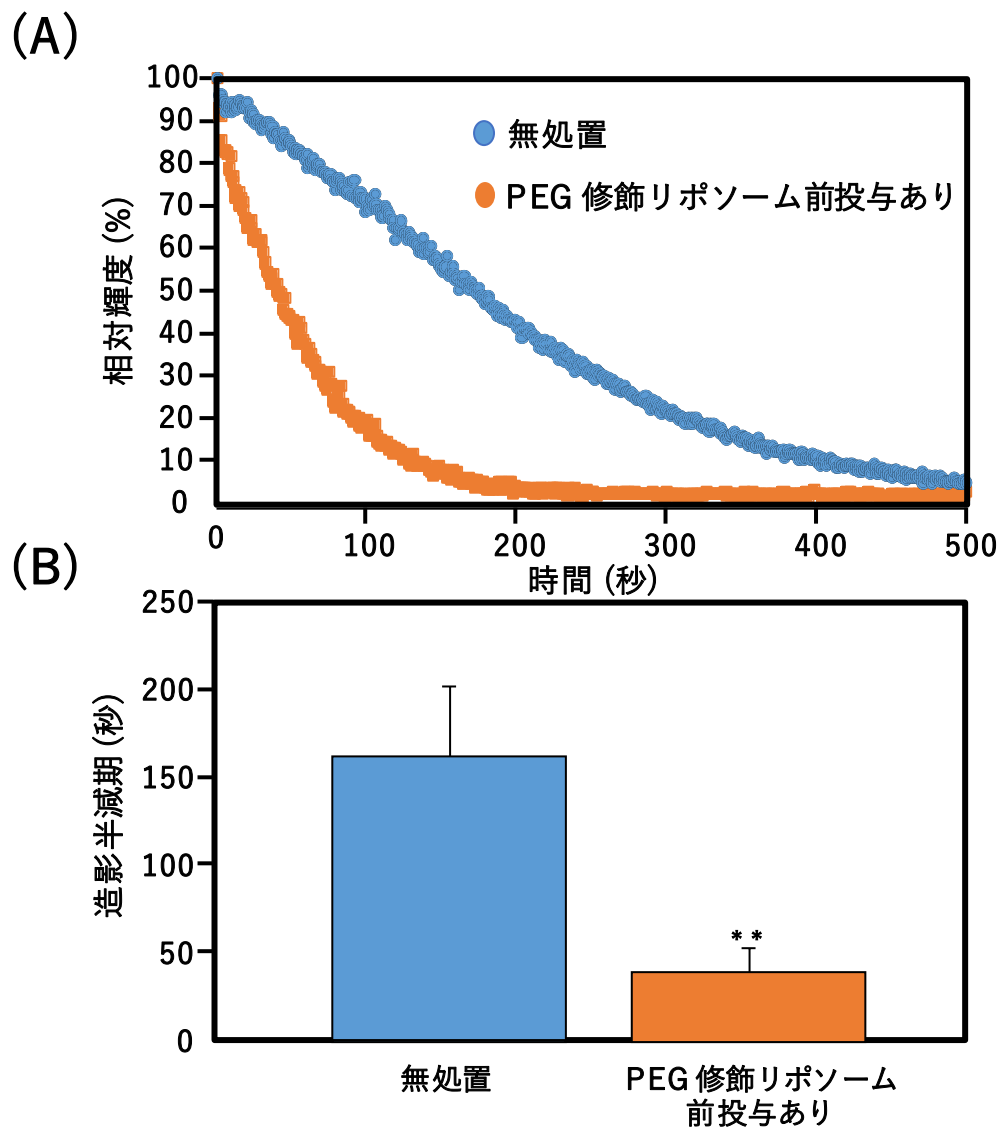


図 13 PEG 修飾リポソーム投与後における PG(PEG)-MB の血中滞留性評価
 ABC 現象の交差性を検討するため、PEG 修飾リポソーム前投与後の PG(PEG)-MB の超音波造影を行った。
 (A) 造影輝度消失曲線 (相対輝度の平均値から作成、n=3)
 (B) 造影半減期 (平均値 ± 標準偏差、n=3、** $P < 0.01$, student's t -test, vs 無処置)

第四節 小括

本章では、PG(PEG)-MB による ABC 現象の誘導と抗 PEG IgM 抗体の産生誘導、および ABC 現象に対する抗 PEG IgM 抗体の関与と ABC 現象の交差性について検討した。

第一節では、PG(PEG)-MB のマウスへの繰り返し投与により、PG(PEG)-MB の超音波造影半減期が短縮し、PG(PEG)-MB による ABC 現象の誘導が確認された。そこで第二節において、PG(PEG)-MB 投与による抗 PEG IgM 抗体の産生誘導を検討した。その結果、PG(PEG)-MB の投与による抗 PEG IgM 抗体産生の誘導が明らかとなった。また、遊離 PEG の事前投与による抗 PEG IgM 抗体の競合阻害により、PG(PEG)-MB に対する ABC 現象が解消することが明らかとなった。このことから、PG(PEG)-MB の ABC 現象の原因として抗 PEG IgM 抗体が重要であることが示された。このように、PG(PEG)-MB の投与で ABC 現象を誘導するほどの抗 PEG IgM 抗体が産生されていることが判明した。そのため、第三節では抗 PEG IgM 抗体による ABC 現象の交差性について検討した。PEG 修飾リポソームで抗 PEG IgM 抗体産生を誘導したマウスに PG(PEG)-MB を投与したところ、PG(PEG)-MB の造影半減期が著しく短縮された。このことから、抗 PEG IgM 抗体による ABC 現象の交差性が確認された。

臨床現場において、患者の病歴や薬歴を確認することは必要であるが、自己申告に頼る点が多く、完全に把握することは困難である。これに加え一般的な生活において、PEG の曝露による抗 PEG 抗体の保持を把握することは、抗 PEG 抗体保持の事前検査を行う以外不可能に近い。また、抗 PEG 抗体の保持によるアレルギー反応の惹起の可能性を予測することは困難を極める。そのため、抗 PEG 抗体を誘導しない診断・治療薬の開発が、ABC 現象やアレルギー反応回避の両面において必要であると考えられた。そこで次章では、抗 PEG 抗体を誘導しない超音波造影用 MB の開発に着手した。

第二章 PEG 未修飾マイクロバブルの開発

第一章では、PG(PEG)-MB が ABC 現象を誘導することが明らかとなった。また、抗 PEG IgM 抗体が交差反応を示すことが確認され、抗 PEG IgM 抗体の所持・未所持が PG(PEG)-MB を使用する場合の個体差の原因になると考えられた。先行論文により、健常人においても抗 PEG 抗体の所持率が高いことが報告されている^{25,26}。そのため、PEG 化製剤で ABC 現象の回避を目指すことは困難であると考えられた。また、診断に利用される MB では、高い安全性が求められる。現在、MB を安全性の高い造影剤として利用している報告が多く³⁹⁻⁴¹、CT で用いられる造影剤と比べて副作用が少ないことも報告されている⁴²。しかし、抗 PEG 抗体に起因するインフュージョンリアクションなどが問題となれば、MB における高い安全性という特長が失われる。そのため、ABC 現象の回避と安全性の担保から、PEG を使用せずに血中滞留性の良好な MB を開発することが望まれる。このようなことから、ABC 現象回避の条件として「繰り返し投与で造影半減期が短縮しないこと」、「抗 PEG 抗体の所持・未所持により造影半減期が変わらないこと」の 2 点が、新規 MB の達成項目として重要である。そこで、本章では PEG を使用しない血中滞留性の良好な新規 MB の開発を試みた。

第一節 PEG 未修飾マイクロバブルの外殻組成の検討

多くの MB の外殻には、脂質アンカーに親水性の PEG を修飾した PEG 修飾脂質が利用されている。この PEG 修飾脂質のような両親媒性分子は、その界面活性作用により気泡の安定化作用を有している。したがって、PEG を使用しない MB の開発では、MB の安定性を確保できる外殻脂質組成を検討する必要がある。これまでに我々の研究グループでは、様々な MB を調製した経験から PG(PEG)-MB の構成成分である DSPC と DSPG の割合を変えることにより MB の安定性が変化することを見出してきた⁷。そこで本節では、PEG を使用せず、DSPC と DSPG のみを基本成分とした MB の調製に最適な外殻組成割合について検討した。

【実験材料と実験方法】

nonPEG-MB の調製方法

各脂質懸濁液 (DSPC : DSPG = 1 : 2, 1 : 1, 2 : 1 (mol 比)) を有機溶媒混合液 (クロロホルム : メタノール : 10% アンモニア水 : MilliQ = 65 : 35 : 4 : 4) に溶解させ、ロータリーエバポレーターにて有機溶媒を減圧除去し脂質薄膜を作製した。その後、脂質薄膜をデシケータにて終夜減圧し有機溶媒を完全に除去した。この脂質薄膜に 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を添加し、水和した。水和後、恒温振盪 (65°C、30 分間、160 rpm) し、リポソームとした。調製したリポソーム (脂質濃度 1 mM) 20 mL を 50 mL チューブへ添加し、C₃F₈ 存在下にてホモジナイザーを用いて高速攪拌 (15,000 rpm、5 min) することで nonPEG-MB を調製した。調製した nonPEG-MB と凍結乾燥時の保護剤として 18% スクロース溶液を各 1 mL ずつ 1 : 1 の割合で 5 mL 用バイアルへ添加し、凍結乾燥 (-35°C ; 1 時間、-15°C ; 8 時間、+20°C ; 8 時間) を行った。作製した凍結乾燥品を MilliQ 2 mL で用時溶解し、PBS で希釈して実験に使用した。

コールターカウンター法によるマイクロバブルのサイズと個数濃度の測定方法

第一章第一節と同様の方法でコールターカウンター法により各組成の nonPEG-MB の平均粒子径と個数濃度を測定した。

in vitro における nonPEG-MB の安定性評価方法

造影時のノイズを抑えるため超音波音響吸収タイルを設置したビーカーに 500 mL の脱気 PBS (37°C、攪拌下) を注ぎ各組成の nonPEG-MB (1×10⁶ 個/50 μL) を添加し、

超音波造影（照射条件：DR=72 dB, AO=70%, MI 値=0.2, Gain=1 dB）した。撮影した造影像は ImageJ を用いて輝度解析し、相対輝度を算出した。相対輝度は第一章第一節「*in vitro* における PG(PEG)-MB の安定性評価方法」と同様の計算式で算出した。

in vivo における nonPEG-MB の血中滞留性評価方法

ddY マウス（雌性、6 週齢）の後背部を除毛し、イソフルラン麻酔下において各組成の nonPEG-MB (0.25×10^7 個/マウス) を静脈内投与した。各 nonPEG-MB 投与後、超音波造影装置 (LOGIQ E9) を用いて第一章第一節「*in vivo* における PG(PEG)-MB の血中滞留性評価方法」と同様に造影し、造影半減期を算出した。

【結果と考察】

DSPC : DSPG = 1 : 2, 1 : 1 または 2 : 1 (mol 比) の外殻脂質組成からなる MB を調製したところ、外観は全て白濁した乳濁液となり、いずれの組成でも MB が形成されていた (図 14)。また、各 MB の粒子径を測定した結果、どの組成の粒子も平均粒

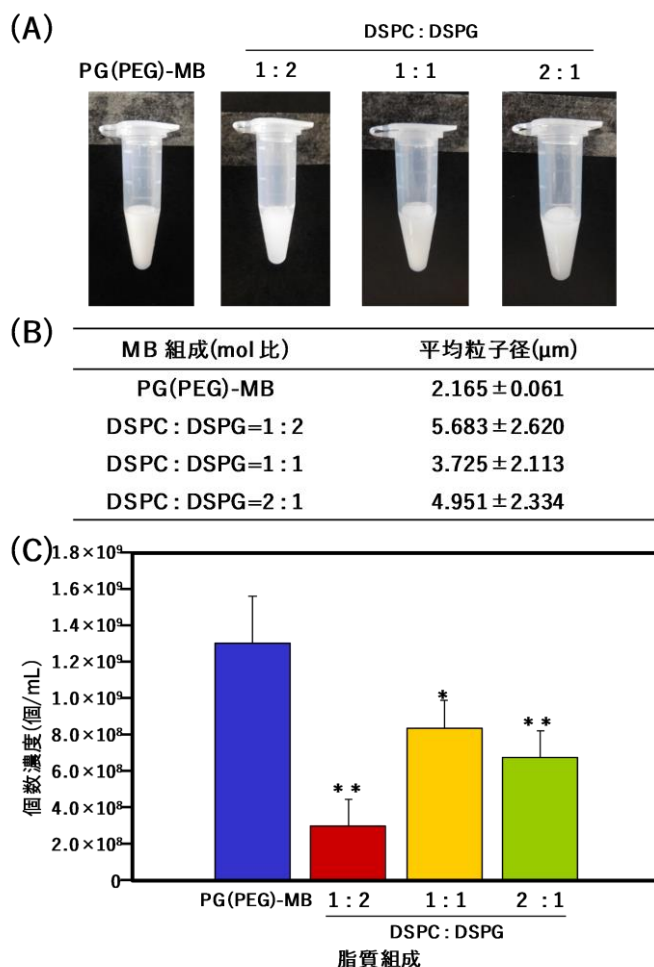


図 14 PEG 未修飾 MB の特性評価

PEG を使用せずに作製した MB における、DSPC と DSPG の割合による物性の違いを評価した。

(A) 各 MB の外観

(B) 各 MB の平均粒子径 (平均値 ± 標準偏差、n=3)

(C) 各 MB の個数濃度 (平均値 ± 標準偏差、n=3)

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, Dunnett's test, vs 1 : 2, 1 : 1, 2 : 1

子径 6 μm 以下となった。個数濃度は PG(PEG)-MB で一番高くなった。このように PEG 修飾脂質を使用した MB において個数濃度が高くなるのは、PEG 修飾脂質の界面活性作用により調製される MB の個数が多くなるためであると考えられた。いずれにしても、MB の生体内への投与は個数を合わせて投与するため、調製時の個数濃度は大きな問題にはならないと考えられた。

in vitro の超音波造影では、PG(PEG)-MB と比べ DSPC : DSPG = 1 : 1 や 2 : 1 の外殻脂質組成において、造影半減期が有意に短くなった (図 15)。DSPC : DSPG = 1 :

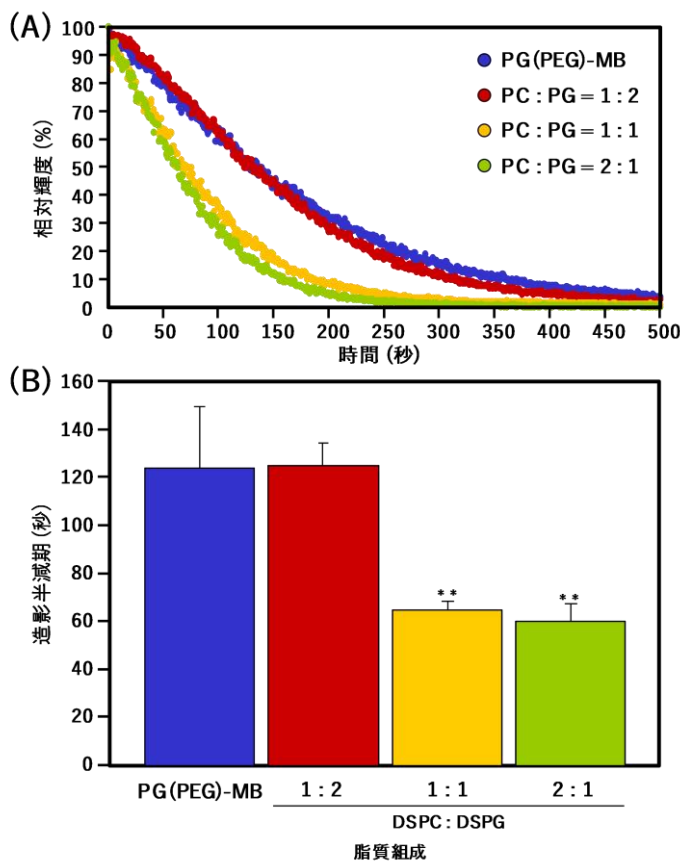


図 15 *in vitro* における nonPEG-MB の安定性評価

各 MB の *in vitro* における超音波造影を行った。

(A) 造影輝度消失曲線 (相対輝度の平均値から作成、 $n=3$)

(B) 造影半減期 (平均値 \pm 標準偏差、 $n=3$)

** $P < 0.01$, Dunnett's test, vs 1 : 2, 1 : 1, 2 : 1

2 の外殻脂質組成では、PG(PEG)-MB と有意な差が無い造影半減期が得られた。このことから、PEG を使用しない MB の外殻脂質組成として DSPC : DSPG = 1 : 2 が安定性の観点から最適であることが明らかとなった。リポソームの研究分野における示差熱分析では、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) で構成された脂質膜にジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG) を添加することにより相転移温度が上昇することが明らかになっている⁴³。この PG 添加による脂質二分子膜の相転移温度上昇は、膜の安定化を意味している。一般に、DSPC の親水基部分 (PC) はかさ高いことが知られている。そのため、PC だけで構成した脂質膜は立体的混雑により膜が不安定になりやすい。そこに PC と比較し親水基部分が小さい PG を添加す

ることで、膜表面の立体的混雑が解消され、リン脂質の密度が高まることで膜が安定化すると考えられた。今回はリポソーム膜のような脂質二分子膜ではないが MB 外殻の脂質単分子膜である PC と PG の立体混雑が DSPC : DSPG = 1 : 2 で最も解消され MB の安定化につながったものと考えられた。

次に、*in vivo* での各組成の nonPEG-MB の造影半減期を検討したところ、外殻脂質組成が DSPC : DSPG = 1 : 2 において血中滞留性が長くなることが明らかとなった (図 16)。MB の血中滞留性に粒子のサイズが影響するといった報告⁴⁴もあるが、今回 PEG を除去した外殻脂質組成間において粒子径に大きな違いはみられなかった。そのため、この血中滞留性の向上は、粒子のサイズではなく膜の安定化による MB 自体の安定性向上が主な要因であると考えられた。

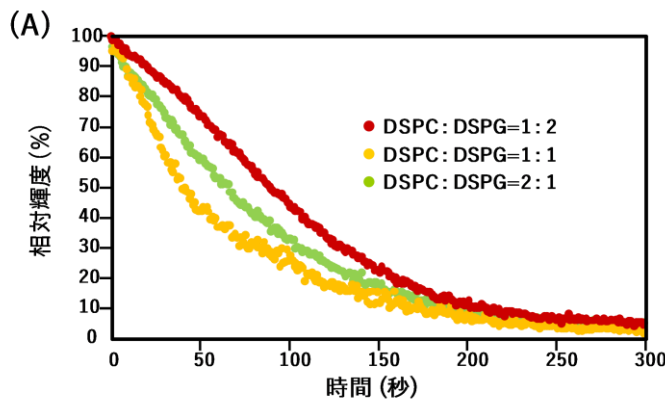


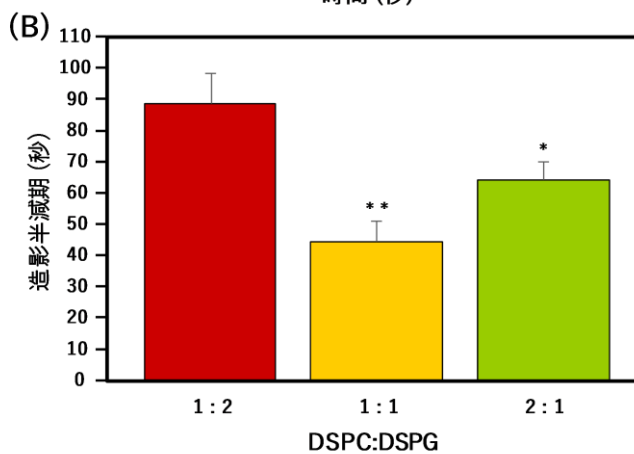
図 16 *in vivo* における nonPEG-MB の血中滞留性評価

各 MB の *in vivo* における超音波造影を行った。

(A) 造影輝度消失曲線 (相対輝度の平均値から作成、n=3)

(B) 造影半減期 (平均値 ± 標準偏差、n=3)

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, Dunnett's test, vs 1 : 1, 2 : 1



第二節 PEG 未修飾マイクロバブルによる抗 PEG IgM 抗体誘導

前節において、PEG 修飾脂質を除いた場合、外殻脂質組成として DSPC : DSPG = 1 : 2 が安定で血中滞留性の良好な MB の構築に重要であることが示された。そのため、この組成の MB を nonPEG-MB として研究を進めていくこととした。PG(PEG)-MB の ABC 現象の原因が抗 PEG IgM 抗体の誘導であったことから、本節では nonPEG-MB 投与後の抗 PEG IgM 抗体の誘導について検討した。

【実験材料と実験方法】

nonPEG-MB の静脈内投与後の血中抗 PEG IgM 抗体価の測定方法

ddY マウス (雌性、6 週齢) に nonPEG-MB (0.25×10^7 個/マウス) を静脈内投与し、nonPEG-MB 投与後 0, 3, 5, 7, 10, 14 日目に採血を行った。回収した血液を遠心分離 (3400 rpm、30 分) することで血漿部分を回収し、第一章第二節の「PEG 修飾リポソームによる抗 PEG IgM 抗体誘導方法」と同様に ELISA 法により、血中抗 PEG IgM 抗体の抗体価を評価した。

【結果と考察】

nonPEG-MB を投与後、経日的に採血し、抗 PEG IgM 抗体価を ELISA にて評価した。その結果、nonPEG-MB 投与群の抗 PEG IgM 抗体価は、ポジティブコントロールの PG(PEG)-MB 投与群よりも有意に低い値となった ($P < 0.01$, Dunnett's test, vs Day0, 3, 5, 7, 10, 14)。しかし、nonPEG-MB 投与群において無処置群より若干の抗体価上昇が認められた (図 17)。nonPEG-MB には PEG が含まれないことから、この抗体価の上昇はプレートに固相化した DSPE-PEG(2k)-OMe に対する非特異的な抗体の誘導によるものと推察された。いずれにしても、ポジティブコントロールである PG(PEG)-MB 投与ほどの抗体価の上昇は認められず、nonPEG-MB 投与後の血清はどの時点でもポジティブコントロールと比べ有意に低かった。そのため、nonPEG-MB による抗 PEG IgM 抗体誘導は弱く、PG(PEG)-MB と比べて抗原性が低下していることが示唆された。

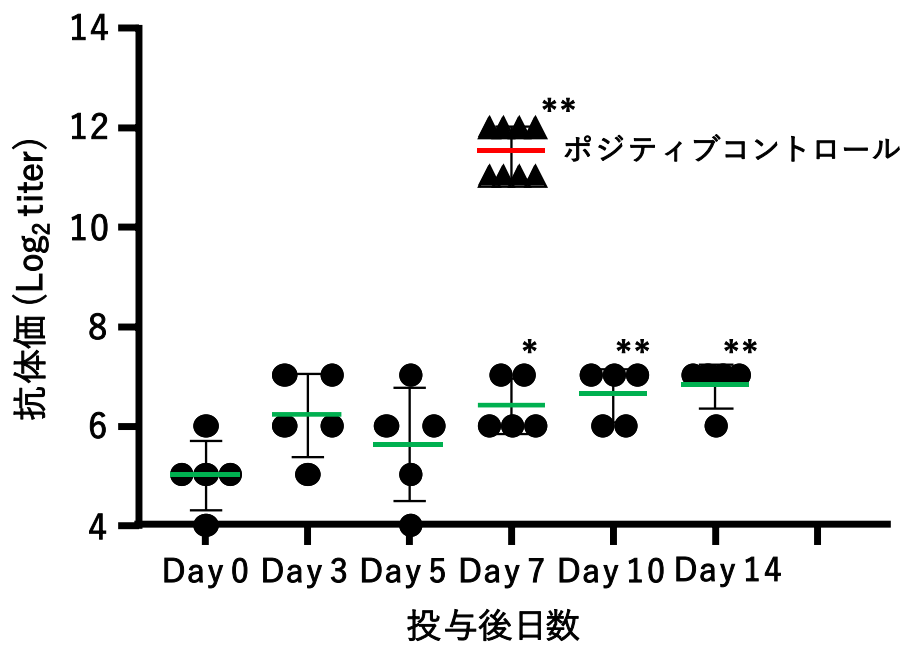


図 17 nonPEG-MB の静脈内投与後の血中抗 PEG IgM 抗体価の測定
 nonPEG-MB 投与後の抗 PEG 抗体価を測定した。(平均値 ± 標準偏差、
 n=5)
 ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, Dunnett's test, vs Day 3, 5, 7, 10, 14, ポジティブコ
 ントロール) ● : 測定値、— および — : 平均値

第三節 PEG 未修飾マイクロバブルの超音波造影

本章のはじめで述べたように、ABC 現象を回避する MB の開発において「繰り返し投与で造影半減期が短縮しないこと」、「抗 PEG 抗体の所持・未所持により造影半減期が変わらないこと」の 2 点が重要である。そこで本節では、nonPEG-MB のマウスへの繰り返し投与による ABC 現象誘導の有無を評価した。また、PG(PEG)-MB の前投与により抗 PEG IgM 抗体を誘導したマウスを作成し、この ABC 現象が誘導される条件下での nonPEG-MB の超音波半減期の影響を検討した。

【実験材料と実験方法】

nonPEG-MB の繰り返し投与における超音波造影評価方法

ddY マウス（雌性、6 週齢）の後背部を除毛し、イソフルラン麻酔下において nonPEG-MB (0.25×10^7 個/マウス) を静脈内投与した。nonPEG-MB 投与後、超音波造影装置 (LOGIQ E9) を用いて第一章第一節の「*in vivo* における PG(PEG)-MB の血中滞留性評価方法」と同様に造影し、造影半減期を算出した。また、7 日後に nonPEG-MB (0.25×10^7 個/マウス) を再投与し、同様の方法で血中滞留性を評価した。

抗 PEG 抗体存在下における nonPEG-MB の超音波造影評価方法

ddY マウス（雌性、6 週齢）の後背部を除毛し、イソフルラン麻酔下において PG(PEG)-MB (0.25×10^7 個/マウス) を静脈内投与した。7 日後に nonPEG-MB を投与し、超音波造影装置 (LOGIQ E9) を用いて第一章第一節の「*in vivo* における PG(PEG)-MB の血中滞留性評価方法」と同様に造影し、造影半減期を算出した。

【結果と考察】

nonPEG-MB の ABC 現象誘導について検討したところ、nonPEG-MB は繰り返し投与しても造影半減期に有意な差がなかった (図 18)。このことから nonPEG-MB は ABC 現象を誘導しないことが示唆された。また、PG(PEG)-MB 投与後に nonPEG-MB を投与した結果、抗 PEG IgM 抗体が誘導されていると考えられるマウスにおいても造影半減期に有意な差がなかった (図 19)。したがって、nonPEG-MB は既存の抗 PEG IgM 抗体に影響されない MB であることが明らかとなった。これらのことから、nonPEG-MB は「繰り返し投与で造影半減期が短縮しないこと」、「抗 PEG 抗体の所持・未所持により造影半減期が変わらないこと」という 2 点の要件を満たす ABC 現

象を回避可能な新規 MB であることが示された。

本研究において初回投与時の造影半減期は、nonPEG-MB に比べ PG(PEG)-MB で長い傾向にあった。しかし、第一章第一節の実験で示されたように PG(PEG)-MB は繰り返し投与で造影半減期が短縮し、繰り返し投与においては nonPEG-MB の造影半減期を下回る場合もあった。一方で、nonPEG-MB は繰り返し投与や抗 PEG IgM 抗体存在下でも造影半減期が大きく変化せず、繰り返し投与でも同等の効果を維持できることが期待される。このように、本検討の目的である「繰り返し投与で造影半減期が短縮しないこと」、「抗 PEG 抗体の所持・未所持により造影半減期が変わらないこと」の 2 点の項目が達成できたと考えられた。

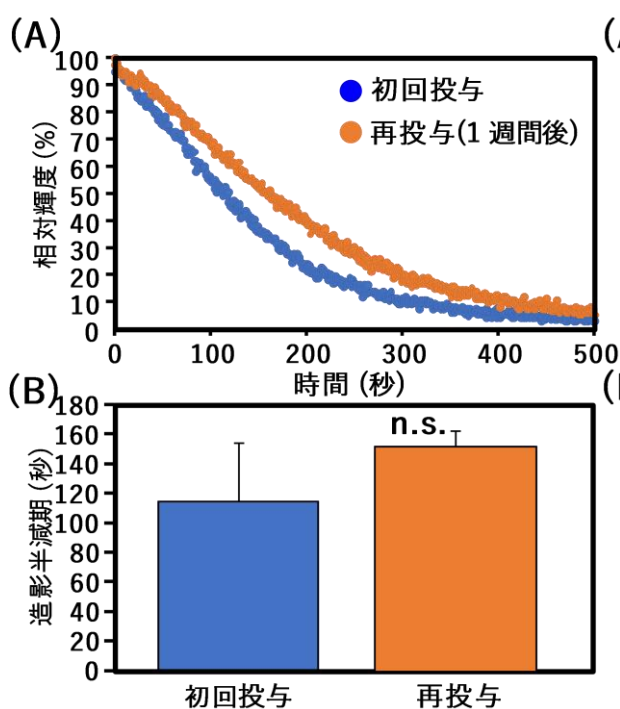


図 18 nonPEG-MB の繰り返し投与における超音波造影評価

nonPEG-MB を繰り返し投与し、超音波造影を行った。

(A) 造影輝度消失曲線(相対輝度の平均値から作成、n=3)

(B) 造影半減期(平均値 ± 標準偏差、n=3)

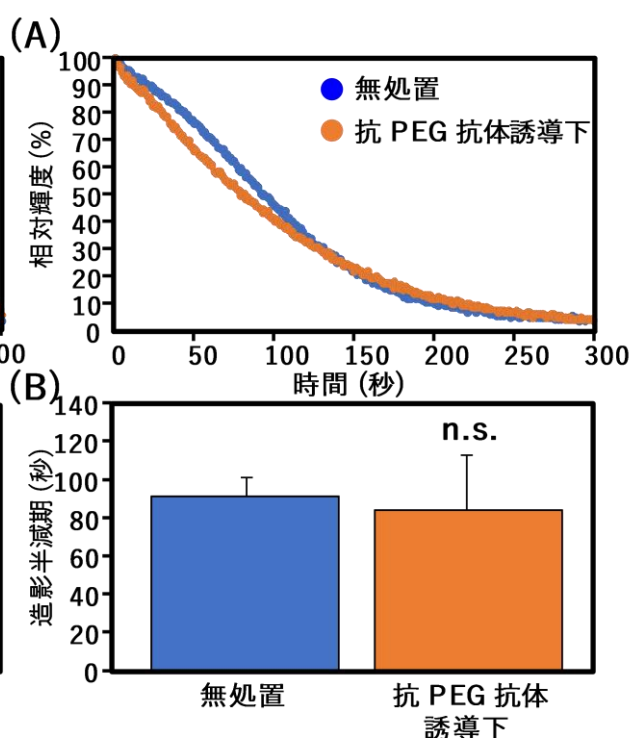


図 19 抗 PEG IgM 抗体存在下における nonPEG-MB の超音波造影評価

抗 PEG IgM 抗体誘導下で nonPEG-MB の超音波造影を行った。

(A) 造影輝度消失曲線(相対輝度の平均値から作成、n=3)

(B) 造影半減期(平均値 ± 標準偏差、n=6)

第四節 ABC 現象誘導下におけるマイクロバブルの組織分布

前節の結果から nonPEG-MB が ABC 現象を回避可能な新規 MB 製剤として利用可能になると考えられた。Fix らの報告では MB の ABC 現象の一因として、造影輝度による定性的な観察から MB の肝臓への取り込みが向上している可能性を考察している²⁴。これは、これまでに報告されている PEG 修飾リポソームの ABC 現象の報告と概ね同様となる⁴⁵。そのため、前節で示された nonPEG-MB の ABC 現象回避のメカニズムが、肝臓への取り込みの回避によるものと推察された。しかし、このような ABC 現象を回避できる MB はこれまでに報告されておらず、ABC 現象回避の機序は明らかとなっていない。そこで本節では、MB の ABC 現象回避の機序解明を目的に、マウスへ投与後の MB の組織分布を検討した。

【実験材料と実験方法】

DiR 修飾 PG(PEG)-MB の調製方法

DSPC : DSPG : DSPE-PEG(2k)-OMe = 1 : 2 : 0.33 (mol 比)と DiR (脂質モル濃度に対し 1%) を有機溶媒混合液 (クロロホルム : メタノール : 10% アンモニア水 : MilliQ = 65 : 35 : 4 : 4) に溶解させ、ロータリーエバポレーターにて有機溶媒を減圧除去し脂質薄膜を作製した。その後、第一章第一節の「PG(PEG)-MB の調製方法」と同様に調製し、実験に使用した。

DiR 修飾 nonPEG-MB の調製方法

DSPC : DSPG = 1 : 2 (mol 比)と DiR (脂質モル濃度に対し 1%) を有機溶媒混合液 (クロロホルム : メタノール : 10% アンモニア水 : MilliQ = 65 : 35 : 4 : 4) に溶解させ、ロータリーエバポレーターにて有機溶媒を減圧除去し脂質薄膜を作製した。その後、第二章第一節の「nonPEG-MB の調製方法」と同様に調製し、実験に使用した。

IVIS による各 MB の組織分布評価方法

無蛍光飼料で飼育した ddY マウス (雌性、6 週齢) に PG(PEG)-MB (0.25×10^7 個/マウス) を静脈内投与し、抗 PEG 抗体を誘導した。7 日後に DiR 修飾 PG(PEG)-MB もしくは DiR 修飾 nonPEG-MB を DiR の蛍光量として各 1×10^9 [photons/sec] / [$\mu\text{W}/\text{cm}^2$] / マウスを麻酔下で静脈内投与し、投与 3 分後に脱血して各臓器を摘出した。摘出した臓器を *in vivo* imaging system (IVIS) で撮影し、各臓器を囲う ROI をか

け各臓器における Total Radiant Efficiency [photons/sec] / [$\mu\text{W}/\text{cm}^2$] / mg tissue を指標に、各組織への MB の分布を評価した。

【結果と考察】

リポソームにおける ABC 現象では、初回投与と再投与で薬剤の体内動態が劇的に変化する⁴⁵。そのため、MB の組織分布の解析が MB の ABC 現象の機序解明に重要である。そこで、ABC 現象を誘導したマウスにおける MB の組織分布を検討した。本検討では、蛍光物質の DiR で標識した PG(PEG)-MB (DiR 修飾 PG(PEG)-MB) もしくは DiR で標識した nonPEG-MB (DiR 修飾 nonPEG-MB) をマウスに投与し、3 分後に臓器を摘出し、MB の組織分布を IVIS により解析した。その結果、いずれの MB でも撮影画像から肝臓に強く蛍光がみられ (図 20)、蛍光量は肝臓・脾臓・肺に多く分布することが明らかとなった。このように MB がこれらの臓器に多く分布する結果は、Willmann らや Taetis らが PET を用いて MB 由来の脂質のラットやマウスにおける体内分布を観察した報告と類似していた^{46,47}。したがって、PG(PEG)-MB や nonPEG-MB も、これらの報告にある MB と同様の組織分布を示したものと考えられた。

さらに、ABC 現象誘導時における MB の組織分布の結果から、肝臓における蛍光強度は、DiR 修飾 nonPEG-MB において ABC 現象誘導群と非誘導群で同程度であった。一方、DiR 修飾 PG(PEG)-MB では、ABC 誘導群の肝臓における蛍光強度が、非誘導群の約 1.7 倍高くなることが明らかとなった。なお、脾臓における MB の分布は ABC 現象の有無で有意差は無かった。このことより、MB の ABC 現象における超音波造影輝度の急激な低下は、MB の肝臓への速やか取り込みが 1 つの要因であると考えられた。一方、PEG 修飾リポソームで報告されている ABC 現象では、PEG 修飾リポソームの肝臓および脾臓への取り込みがクリアランス促進に寄与していることが報告されている⁴⁵。本検討において ABC 現象時の脾臓への MB の取り込みは有意差は無かったが、増加している傾向もみられた。そのため、さらなる詳細なデータについてはサンプル数を増やして検討を行う必要があると考えられた。また、PG(PEG)-MB と PEG 修飾リポソームの ABC 現象誘導下における組織分布の違いは、粒子の大きさ等の MB とリポソームの元々の物性が大きく異なることに起因する可能性が考えられた。

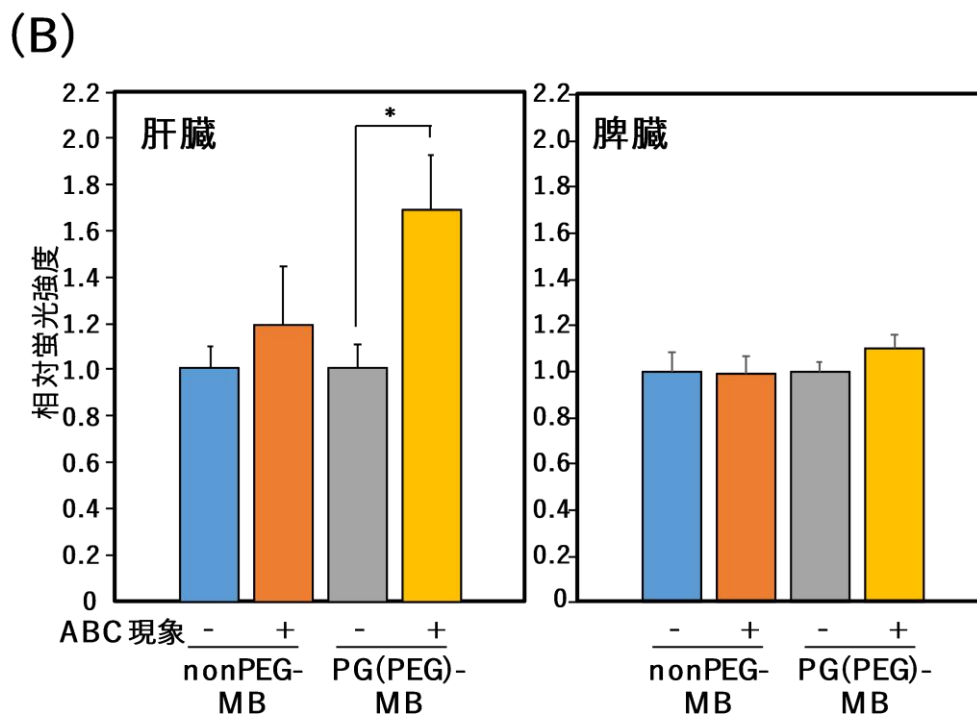
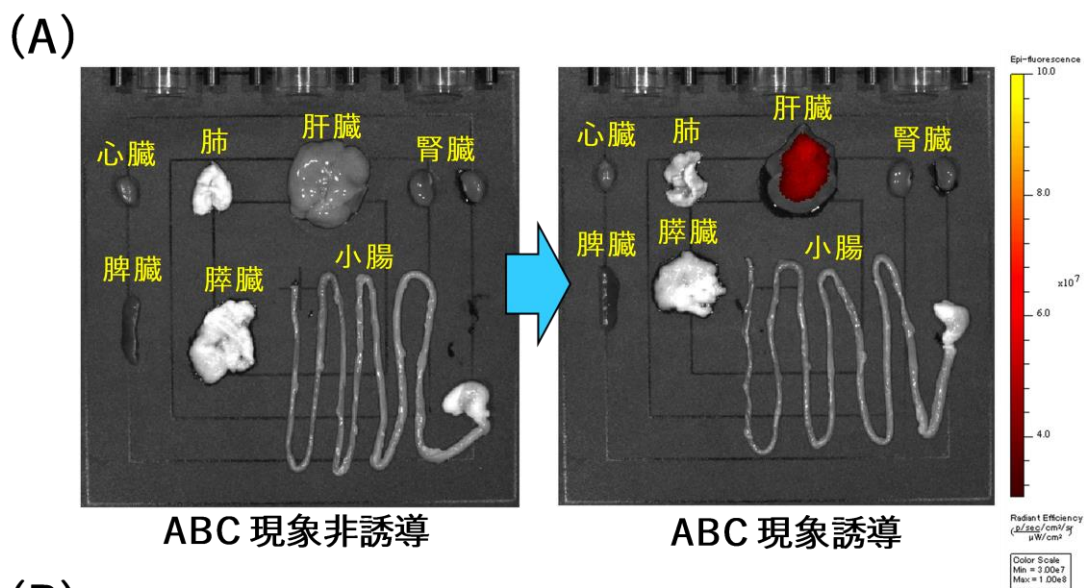


図 20 ABC 現象誘導下における MB の組織分布

PG(PEG)-MB の前投与により ABC 現象を誘導したマウスにおける、DiR 修飾 PG(PEG)-MB もしくは DiR 修飾 nonPEG-MB の組織分布評価を行った。DiR 修飾 PG(PEG)-MB 投与 3 分後に臓器を摘出して撮影した。

(A) IVIS による蛍光観察

(B) 肝臓または脾臓の相対蛍光強度(平均値 \pm 標準偏差、 $n=3$, $*P < 0.01$, student's t -test)

第五節 小括

本章では、ABC 現象を回避可能な新規 MB の開発を行った。PG(PEG)-MB で誘導される ABC 現象は抗 PEG IgM 抗体が重要な原因と考えられたため、PEG を使用しない MB の ABC 現象回避について検討した。この PEG を使用しない MB の開発において、MB の安定性に寄与している PEG 修飾脂質を外殻から除外するため、より安定な外殻脂質組成を検討する必要があるがあった。そこで、MB を構成する DSPC および DSPG の割合について MB の安定性の観点から評価した。その結果、DSPC : DSPG = 1 : 2 (mol 比) の MB で安定性が高いことが明らかとなった。そこで、この組成の MB (nonPEG-MB) の繰り返し投与による超音波造影への影響を検討した。その結果、nonPEG-MB を再投与しても造影半減期が変化しないことが示された。さらに、この nonPEG-MB を投与した際の抗 PEG IgM 抗体誘導について検討したところ、nonPEG-MB 投与による抗 PEG IgM 抗体価は低いことが明らかとなった。このように、nonPEG-MB は、ABC 現象の原因となる抗 PEG IgM 抗体をほとんど誘導しない MB であることが示された。

ヒトでは一定の割合で抗 PEG 抗体の所持が認められることから、nonPEG-MB が抗 PEG IgM 抗体の存在下でも影響を受けない MB であることを検証する必要があるがあった。そこで、PG(PEG)-MB 投与により抗 PEG IgM 抗体を誘導したマウスに nonPEG-MB を投与し、超音波造影半減期への影響を評価した。その結果、nonPEG-MB は抗 PEG IgM 抗体が存在する環境下でも造影半減期が変化せず、抗 PEG IgM 抗体の影響を受けない MB であることが明らかとなった。このことから nonPEG-MB は「繰り返し投与で造影半減期が短縮しないこと」、「抗 PEG 抗体の所持・未所持により造影半減期が変わらないこと」という「ABC 現象を回避可能な新規 MB 製剤」としての要件を満たしていることが明らかとなった。

PEG 修飾リポソームの ABC 現象では、PEG 修飾リポソームが肝臓や脾臓に速やかに取り込まれ、血中から急激に消失することが報告されている⁴⁵。しかし、MB の ABC 現象において MB のクリアランスに関わる組織への MB の分布についての報告はない。そこで、MB の ABC 現象の誘導メカニズムの解析を目的に、ABC 現象誘導の有無における nonPEG-MB と PG(PEG)-MB の組織分布を比較した。その結果、nonPEG-MB は ABC 現象の有無で肝臓への分布に変化が認められなかった。一方、PG(PEG)-MB において ABC 誘導群では、非誘導群と比較し肝臓への分布が増加した。なお、脾臓への分布では nonPEG-MB および PG(PEG)-MB において ABC 現象の有

無での変化は認められなかった。このことから、MB の ABC 現象では、肝臓への分布の増加が造影輝度の急激な低下に関係していると推察された。

以上、本章では ABC 現象を誘導しない PEG 未修飾 MB の開発に成功した。また、本検討で開発した新たな MB が ABC 現象を誘導する様な抗 PEG IgM 抗体存在下でも、その超音波造影半減期に変化が認められないことが明らかとなった。さらに、MB の ABC 現象の原因が、肝臓への MB の速やかな取り込みであることを見出した。現在、薬物デリバリー用のナノ粒子状製剤開発に対して、ABC 現象を誘導しない表面修飾用分子やポリマーなど開発が進められている⁴⁸⁻⁵⁰。このような、分子やポリマーは今後の MB 開発に応用可能であると予想される。その際、本検討で確立した MB の評価系が役に立つものと期待される。

総括

造影剤を利用した超音波造影検査は、安全性、リアルタイム性、汎用性や診断コストの観点から有用とされている。特に、保険医療制度の違いでコストの問題意識の高い海外において汎用されている。一方、近年になり、PEG 修飾 MB に対する抗 PEG 抗体を原因とする ABC 現象が報告された²⁴。この ABC 現象は、我々の開発した PG(PEG)-MB に対しても例外なく誘導されることが、本研究において明らかとなった。また、PEG により誘導される抗 PEG 抗体は、他剤への影響や PEG 薬剤のアレルギーに関連すると報告されはじめている。Armstrong らの報告によれば、PEG 修飾アスパラギナーゼによる白血病治療において抗 PEG 抗体陽性の患者では血中の薬物活性が低くなることが示され、治療への悪影響を懸念されている¹⁴。同様に Hershfield らや Lipsky らも痛風治療薬である Pegloticase について、抗 PEG 抗体による薬効の損失とインフュージョンリアクションの増加を報告しており^{16,17}、抗 PEG 抗体誘導への対策の必要性が示された。また、本検討においても抗 PEG 抗体を誘導する PEG 修飾リポソームの前投与により PG(PEG)-MB の造影半減期が短縮することが明らかとなった。本検討における条件下での造影時間は数十秒から数百秒であり、検討条件の違いによる造影時間も数十秒程度の変化であった。しかし、この MB における ABC 現象は、超音波検査の診断結果を変えてしまう可能性がある。本研究で着目した抗 PEG 抗体は PubMed における検索ワードでのヒット数も増加傾向にあり、近年注目を集めている。しかし、2018 年に McSweeney らにより報告された医師への調査によるとこの抗 PEG 抗体について PEG 薬剤の有効性の低下やアレルギーなどの反応が起きることを知っているのは医師のうち 22% だけであり、McSweeney らはこれらの抗 PEG 抗体による有害事象を認識することが重要であると訴えている⁵¹。今後、この抗 PEG 抗体の認知が広まることで、今まで見えていなかった PEG 修飾薬剤に対する問題点が浮かび上がる可能性は高い。そのため、臨床で問題となる前に製剤化の時点で、ABC 現象やアレルギーなどの反応を回避可能な薬剤を開発することが重要であると考えられた。

本研究では、ABC 現象を回避可能な MB 製剤として、PEG の影響を完全に排除した MB の開発を目指した。そのため、本検討では PEG を使用しない新規 MB の開発を行った。そして、この PEG 未修飾 MB として、DSPC: DSPG = 1:2 の外殻脂質組成を有する MB (nonPEG-MB) が有望であることを見出した。実際に、この nonPEG-MB を繰り返し投与しても超音波造影における造影半減期は短縮せず、抗 PEG IgM

抗体が誘導された個体においても造影半減期が変化しないことが明らかとなった。このように、本研究を通して ABC 現象の影響を受けない血中滞留性に優れた新規 MB の開発に成功した。本研究で開発した nonPEG-MB は、「ABC 現象が回避できること」、「既存の抗 PEG 抗体に影響を受けないことから薬効が変化しないこと」を最大の特徴とする超音波造影剤である。そのため、臨床現場で抗 PEG 抗体保有の有無を気にすることなく使用できる診断薬として、患者間での診断誤差を最小限に抑えられることが期待できる。

これまでの検討において MB の ABC 現象に関するメカニズム解析は、ほとんど進められていない。そこで本研究において、このメカニズム解析に着手した。ABC 現象誘導時の MB の体内分布評価は、MB のクリアランス経路を解析する上で大変重要である。そのため、PG(PEG)-MB と nonPEG-MB の組織分布の違いを検討した。その結果、PG(PEG)-MB では ABC 誘導時に肝臓への MB の分布が増加するのに対し、nonPEG-MB では血中抗 PEG IgM 抗体の有無に関わらず、nonPEG-MB の肝臓への分布に変化が認められなかった。したがって、この肝臓への分布の違いが、PG(PEG)-MB による ABC 現象の機序の一因であると考えられた。本検討で得られた結果は、今後の MB の ABC 現象の機序解明に向けた研究のための基礎データになるものと考えている。

以上、本研究により、DSPC : DSPG = 1 : 2 の組成で作製した MB が ABC 現象を回避可能な新規 MB となることを明らかとした。また、この新規 MB は PEG を含有していないことから、他の PEG 医薬品と比べて PEG に関連する副作用の可能性が低下するものと推測された。つまり、PEG に対するアレルギー反応へのリスク低減が期待できる。このように、本研究で開発した ABC 現象を回避可能な MB は、患者の抗 PEG 抗体所持の有無に関わらず同様に評価が可能であり、かつ安全に検査が施行可能という利便性が見込める。そのため、超音波診断・治療を同時に行う超音波セラノスティクスにおいて適した薬剤となると予想される。今後、本研究で開発された MB のさらなる最適化が進めば、このような超音波セラノスティクス構築において、本研究で培われた MB の調製・評価技術などが応用可能となると考えられる。そして、本研究で開発した nonPEG-MB は脂質組成の調節が容易である。そのため、抗体の修飾などによるターゲティング付与など目的に合わせて様々な特性を自在に付与することができると考えられる。将来的に、本研究が様々な機能を付与した MB 開発の基盤となり、様々な疾患に対する超音波セラノスティクス構築に応用されていくことを期待している。

実験材料一覧

試薬類

Cholesterol	: 富士フイルム和光純薬株式会社
DSPC	: 日油株式会社
DSPE-PEG(2k)-OMe	: 日油株式会社
DSPG	: 日油株式会社
DiR	: Thermo Fisher Scientific
HEPES	: 株式会社同仁化学研究所
PBS	: 日水製薬株式会社
milliQ	: Merck Millipore
イソフルラン	: 富士フイルム和光純薬株式会社
エタノール (99.5)	: 富士フイルム和光純薬株式会社
クロロホルム	: 和光純薬工業
メタノール	: 和光純薬工業
アンモニア水	: 和光純薬工業

抗体

GOAT anti MOUSE IgM HRP conjugate : アブカム株式会社

実験動物関連

ddY	: 日本エスエルシー株式会社
無蛍光飼料 (iVid#2)	: オリエンタル酵母工業株式会社

消耗品類

超音波造影用ゲル	: 東芝医療用品
除毛剤	: Kracie
ヘパリン処理済みヘマトクリット管	: Drummond Scientific
注射針	: テルモ株式会社
注射筒	: テルモ株式会社

機器類

ロータリーエバポレーター (NVC-2100)	: 東京理化器械株式会社
恒温振盪水槽 (NTS-4000)	: 東京理化器械株式会社
精密粒度分布測定装置 (Multisizer3)	: BECLMAN COULTER
ISORON	: BECLMAN COULTER
アパチャー アパチャー径 50 μm	: BECLMAN COULTER
超音波造影装置 (LOGIQ E9)	: GE ヘルスケア・ジャパン
持型体外式超音波診断用プローブ (ML6-15-D プローブ)	: GE ヘルスケア・ジャパン
超音波音響吸収タイル	: イーステック
画像処理ソフトウェア (ImageJ)	: 開発元; アメリカ国立衛生研究所
ホモジナイザー (T25 digital ULTRA-TURRAX): IKA	
凍結乾燥機 (FDU- 1100)	: 東京理化器械
<i>in vivo</i> 蛍光イメージング装置 (IVIS)	: 住商ファーマインターナショナル
Zetasizer Nano-ZS	: Malvern Panalytical
卓上遠心機 (himac CT 15RE)	: 日立工機株式会社

謝辞

終わりに臨み、本研究の推進ならびに本論文の作成に関して、終始ご懇篤なるご指導・ご鞭撻を賜りました帝京大学薬学部薬物送達学研究室 鈴木 亮教授に厚く御礼申し上げます、感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、本研究の推進ならびに本論文の作成に関して、終始有益な御指導・御鞭撻を賜りました帝京大学薬学部セラノスティクス学講座 丸山 一雄特任教授に衷心より謝意を表します。

また、本研究の推進ならびに本論文の作成に関して、終始ご懇切なるご助言とご指導を賜りました帝京大学薬学部薬物送達学研究室 小俣 大樹助教に謹んで深く感謝の意を表します。

学位論文作成において、帝京大学薬学部 奥 直人教授、細山田 真教授、横山 和明教授および黄倉 崇教授には本論文の細部にわたりご指導・ご鞭撻を賜りました。ここに感謝の意を表します。

マイクロバブルの特性評価に関するご助言を賜りました北海道大学大学院情報科学研究院 工藤 信樹先生に深く感謝の意を表します。

大学院進学にご助言をいただくとともに、常に気にかけてくださった昭和薬科大学薬剤学研究室 宇都口 直樹教授、野村 鉄也助教に心より感謝の意を表します。

本研究における動物実験の推進にあたり、多大なる御協力、御助言を賜りました帝京大学中央実験動物施設 坂本 吉正先生、同 高瀬 有加里先生に厚く御礼申し上げます。

本実験ならびに研究室での研究活動に際し、多くの有益なご助言、ご協力をいただきました小田雄介博士、Johan Unga 博士、小田 早苗氏、宗像 理紗博士、影山 彩織学士、萩原 芙美子学士、鈴木 悠乃学士、関 英一郎学士、丸山 保学士、山田 拓実氏ならびに帝京大学薬学部薬物送達学研究室の皆さまに感謝すると共にこれからのご活

躍を心よりお祈り申し上げます。

社会人大学院生として大学院と職場業務の両立にご理解くださり、ご協力いただきました帝京大学医学部附属病院薬剤部 安野 伸浩部長ならびに薬剤部の皆さまに心から御礼申し上げます。

最後に、学位取得にあたり、見守り、励まし支えてくれた家族に深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1 Burns, P. N. *et al.* in *1994 Proceedings of IEEE Ultrasonics Symposium*. 1547-1550 vol.1543.
- 2 甲子乃人. コンパクト超音波 α シリーズ 超音波の基礎と装置. 166-169 (2014).
- 3 祖父尼, 淳. *et al.* Sonazoid®を用いた造影超音波診断の有用性. *痔臓* **26**, 11-22, doi:10.2958/suizo.26.11 (2011).
- 4 Kurt, M. *et al.* Impact of contrast echocardiography on evaluation of ventricular function and clinical management in a large prospective cohort. *Journal of the American College of Cardiology* **53**, 802-810, doi:10.1016/j.jacc.2009.01.005 (2009).
- 5 Landmark, K. E. *et al.* Pharmacokinetics of perfluorobutane following intravenous bolus injection and continuous infusion of sonazoid in healthy volunteers and in patients with reduced pulmonary diffusing capacity. *Ultrasound in medicine & biology* **34**, 494-501, doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2007.09.019 (2008).
- 6 Podell, S. *et al.* Physical and biochemical stability of Optison, an injectable ultrasound contrast agent. *Biotechnology and applied biochemistry* **30**, 213-223 (1999).
- 7 Unga, J. *et al.* Development and evaluation of stability and ultrasound response of DSPC-DPSG-based freeze-dried microbubbles. *J Liposome Res* **29**, 368-374, doi:10.1080/08982104.2018.1556294 (2019).
- 8 医薬品インタビューフォーム 「ペガシス®皮下注 90 μ g/180 μ g」.
- 9 医薬品インタビューフォーム 「ペグイントロン®皮下注用 50 μ g/0.5mL 用」.
- 10 医薬品インタビューフォーム 「ドキシル®注 20 mg」.
- 11 Klibanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P. & Huang, L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS letters* **268**, 235-237, doi:10.1016/0014-5793(90)81016-h (1990).
- 12 Maruyama, K., Mori, A., Bhadra, S., Subbiah, M. T. & Huang, L. Proteins and peptides bound to long-circulating liposomes. *Biochimica et biophysica acta* **1070**, 246-252, doi:10.1016/0005-2736(91)90171-4 (1991).
- 13 Milla, P., Dosio, F. & Cattel, L. PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. *Current drug metabolism* **13**,

- 105-119, doi:10.2174/138920012798356934 (2012).
- 14 Armstrong, J. K. *et al.* Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* **110**, 103-111, doi:10.1002/cncr.22739 (2007).
- 15 Avramis, V. I. & Panosyan, E. H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. *Clinical pharmacokinetics* **44**, 367-393, doi:10.2165/00003088-200544040-00003 (2005).
- 16 Hershfield, M. S. *et al.* Induced and pre-existing anti-polyethylene glycol antibody in a trial of every 3-week dosing of pegloticase for refractory gout, including in organ transplant recipients. *Arthritis research & therapy* **16**, R63, doi:10.1186/ar4500 (2014).
- 17 Lipsky, P. E. *et al.* Pegloticase immunogenicity: the relationship between efficacy and antibody development in patients treated for refractory chronic gout. *Arthritis research & therapy* **16**, R60, doi:10.1186/ar4497 (2014).
- 18 Mohamed, M. *et al.* PEGylated liposomes: immunological responses. *Science and technology of advanced materials* **20**, 710-724, doi:10.1080/14686996.2019.1627174 (2019).
- 19 Kozma, G. T. *et al.* Pseudo-anaphylaxis to Polyethylene Glycol (PEG)-Coated Liposomes: Roles of Anti-PEG IgM and Complement Activation in a Porcine Model of Human Infusion Reactions. *ACS nano* **13**, 9315-9324, doi:10.1021/acsnano.9b03942 (2019).
- 20 Wenande, E. & Garvey, L. H. Immediate-type hypersensitivity to polyethylene glycols: a review. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **46**, 907-922, doi:10.1111/cea.12760 (2016).
- 21 Dams, E. T. *et al.* Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **292**, 1071-1079 (2000).
- 22 Koide, H. *et al.* Size-dependent induction of accelerated blood clearance phenomenon by repeated injections of polymeric micelles. *International journal of pharmaceutics* **432**, 75-79, doi:10.1016/j.ijpharm.2012.04.049 (2012).
- 23 Cheng, T. L., Wu, P. Y., Wu, M. F., Chern, J. W. & Roffler, S. R. Accelerated

- clearance of polyethylene glycol-modified proteins by anti-polyethylene glycol IgM. *Bioconjugate chemistry* **10**, 520-528, doi:10.1021/bc980143z (1999).
- 24 Fix, S. M. *et al.* Accelerated Clearance of Ultrasound Contrast Agents Containing Polyethylene Glycol is Associated with the Generation of Anti-Polyethylene Glycol Antibodies. *Ultrasound in medicine & biology* **44**, 1266-1280, doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2018.02.006 (2018).
- 25 Yang, Q. *et al.* Analysis of Pre-existing IgG and IgM Antibodies against Polyethylene Glycol (PEG) in the General Population. *Analytical chemistry* **88**, 11804-11812, doi:10.1021/acs.analchem.6b03437 (2016).
- 26 Chen, B. M. *et al.* Measurement of Pre-Existing IgG and IgM Antibodies against Polyethylene Glycol in Healthy Individuals. *Analytical chemistry* **88**, 10661-10666, doi:10.1021/acs.analchem.6b03109 (2016).
- 27 Garay, R. P., El-Gewely, R., Armstrong, J. K., Garratty, G. & Richette, P. Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. *Expert opinion on drug delivery* **9**, 1319-1323, doi:10.1517/17425247.2012.720969 (2012).
- 28 Hsieh, Y. C. *et al.* Pre-existing anti-polyethylene glycol antibody reduces the therapeutic efficacy and pharmacokinetics of PEGylated liposomes. *Theranostics* **8**, 3164-3175, doi:10.7150/thno.22164 (2018).
- 29 Ishida, T. *et al.* Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **112**, 15-25, doi:10.1016/j.jconrel.2006.01.005 (2006).
- 30 Laverman, P. *et al.* Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **298**, 607-612 (2001).
- 31 Shimizu, T. *et al.* Anti-PEG IgM and complement system are required for the association of second doses of PEGylated liposomes with splenic marginal zone B cells. *Immunobiology* **220**, 1151-1160, doi:10.1016/j.imbio.2015.06.005 (2015).
- 32 Lozano, M. M. & Longo, M. L. Microbubbles coated with disaturated lipids and DSPE-PEG2000: phase behavior, collapse transitions, and permeability. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **25**, 3705-3712,

- doi:10.1021/la803774q (2009).
- 33 Abou-Saleh, R. H., Swain, M., Evans, S. D. & Thomson, N. H. Poly(ethylene glycol) lipid-shelled microbubbles: abundance, stability, and mechanical properties. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **30**, 5557-5563, doi:10.1021/la404804u (2014).
- 34 Wrenn, S. P., Mleczko, M. & Schmitz, G. Phospholipid-stabilized microbubbles: Influence of shell chemistry on cavitation threshold and binding to giant unilamellar vesicles. *Applied Acoustics* **70**, 1313-1322, doi:10.1016/j.apacoust.2008.09.017 (2009).
- 35 医薬品インタビューフォーム「ソナゾイド® 注射用 16 μ L」.
- 36 Ichihara, M. *et al.* Anti-PEG IgM Response against PEGylated Liposomes in Mice and Rats. *Pharmaceutics* **3**, 1-11, doi:10.3390/pharmaceutics3010001 (2010).
- 37 Ishida, T., Wang, X., Shimizu, T., Nawata, K. & Kiwada, H. PEGylated liposomes elicit an anti-PEG IgM response in a T cell-independent manner. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **122**, 349-355, doi:10.1016/j.jconrel.2007.05.015 (2007).
- 38 FDA. *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION (KRYSTEXXA)* 米国添付文書.
- 39 Kumar, S. *et al.* Safety profile of ultrasound enhancing agents in echocardiography. *Echocardiography* **36**, 1041-1044, doi:10.1111/echo.14344 (2019).
- 40 Boolani, H. & Main, M. L. Update on Contrast Echocardiography: Safety and Utility. *Current Cardiovascular Imaging Reports* **5**, 410-419, doi:10.1007/s12410-012-9162-4 (2012).
- 41 Parker, J. M. *et al.* Safety of ultrasound contrast agents in patients with known or suspected cardiac shunts. *The American journal of cardiology* **112**, 1039-1045, doi:10.1016/j.amjcard.2013.05.042 (2013).
- 42 Schlieff, R., Alhassan, A., Wiggins, J., Schumann, W. & Niendorf, H.-P. Safety of the Galactose-Based Ultrasound Contrast Agent Levovist. *Academic Radiology* **9**, S240-S242, doi:10.1016/s1076-6332(03)80446-4 (2002).
- 43 Lewis, R. N., Zhang, Y. P. & McElhaney, R. N. Calorimetric and spectroscopic studies of the phase behavior and organization of lipid bilayer model membranes composed of binary mixtures of dimyristoylphosphatidylcholine and

- dimyristoylphosphatidylglycerol. *Biochimica et biophysica acta* **1668**, 203-214, doi:10.1016/j.bbamem.2004.12.007 (2005).
- 44 Sirsi, S., Feshitan, J., Kwan, J., Homma, S. & Borden, M. Effect of microbubble size on fundamental mode high frequency ultrasound imaging in mice. *Ultrasound in medicine & biology* **36**, 935-948, doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2010.03.015 (2010).
- 45 Ishida, T. & Kiwada, H. Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes. *International journal of pharmaceutics* **354**, 56-62, doi:10.1016/j.ijpharm.2007.11.005 (2008).
- 46 Tartis, M. S. *et al.* Dynamic microPET imaging of ultrasound contrast agents and lipid delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **131**, 160-166, doi:10.1016/j.jconrel.2008.07.030 (2008).
- 47 Willmann, J. K. *et al.* Targeted microbubbles for imaging tumor angiogenesis: assessment of whole-body biodistribution with dynamic micro-PET in mice. *Radiology* **249**, 212-219, doi:10.1148/radiol.2491072050 (2008).
- 48 Abu Lila, A. S., Nawata, K., Shimizu, T., Ishida, T. & Kiwada, H. Use of polyglycerol (PG), instead of polyethylene glycol (PEG), prevents induction of the accelerated blood clearance phenomenon against long-circulating liposomes upon repeated administration. *International journal of pharmaceutics* **456**, 235-242, doi:10.1016/j.ijpharm.2013.07.059 (2013).
- 49 Romberg, B. *et al.* Pharmacokinetics of poly(hydroxyethyl-l-asparagine)-coated liposomes is superior over that of PEG-coated liposomes at low lipid dose and upon repeated administration. *Biochimica et biophysica acta* **1768**, 737-743, doi:10.1016/j.bbamem.2006.12.005 (2007).
- 50 Ishihara, T. *et al.* Evasion of the accelerated blood clearance phenomenon by coating of nanoparticles with various hydrophilic polymers. *Biomacromolecules* **11**, 2700-2706, doi:10.1021/bm100754e (2010).
- 51 McSweeney, M. D., Versfeld, Z. C., Carpenter, D. M. & Lai, S. K. Physician Awareness of Immune Responses to Polyethylene Glycol-Drug Conjugates. *Clinical and translational science* **11**, 162-165, doi:10.1111/cts.12537 (2018).