

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/025983

発行日 平成29年3月2日 (2017.3.2)

(43) 国際公開日 **平成27年2月26日 (2015.2.26)**

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 K 49/00 (2006.01) A 6 1 K 49/00 C 4 C 0 8 5

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

出願番号	特願2015-532935 (P2015-532935)	(71) 出願人	504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2014/072664	(71) 出願人	301032942 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号
(22) 国際出願日	平成26年8月22日 (2014.8.22)	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号	特願2013-173866 (P2013-173866)	(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(32) 優先日	平成25年8月23日 (2013.8.23)	(74) 代理人	100194423 弁理士 植竹 友紀子
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高分子ナノ粒子複合体、及びそれを含むMRI造影用組成物

(57) 【要約】

本発明は、腫瘍組織に特異的に集積して該組織を選択的に描出することができ、少ない使用量でコントラストが高く、かつ長時間の造影が可能であり、しかも副作用が少なく安全である高分子ナノ粒子複合体、及びこれを用いたMRI造影剤等を提供する。本発明に係る高分子ナノ粒子複合体は、非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントとアニオン性のポリマー鎖セグメントとを含むブロックコポリマーと、M n C a Pとを含んでなることを特徴とする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントとアニオン性のポリマー鎖セグメントとを含むブロックコポリマーと、MnCaPとを含んでなる、高分子ナノ粒子複合体。

【請求項 2】

前記アニオン性のポリマー鎖セグメントが、側鎖にアニオン性基を有するポリペプチドである、請求項 1 記載の複合体。

【請求項 3】

前記非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントが、ポリエチレングリコール、ポリ(2-メチル-2-オキサゾリン)、ポリ(2-エチル-2-オキサゾリン)、ポリ(2-イソプロピル-2-オキサゾリン)、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ヒドロキシエチル及びポリ(メタクリル酸ヒドロキシエチル)からなる群より選ばれる親水性ポリマーに由来するものである、請求項 1 又は 2 記載の複合体。

10

【請求項 4】

前記アニオン性のポリマー鎖セグメントが、ポリ(グルタミン酸)、ポリ(アスパラギン酸)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(メタクリル酸)及びポリ(リンゴ酸)からなる群より選ばれるアニオン性ポリマーに由来するものである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の複合体。

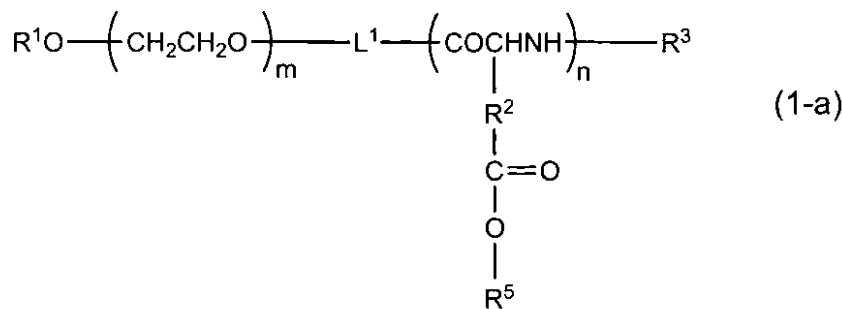
20

【請求項 5】

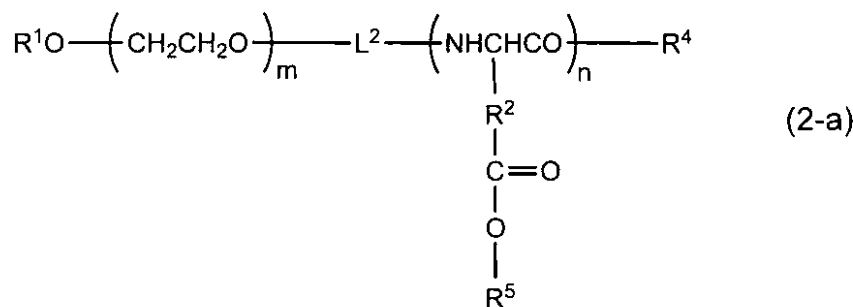
前記ブロックコポリマーの非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントをシェル部分とし、アニオン性のポリマー鎖セグメントをコア部分として形成されたナノ粒子状粒子に、前記MnCaPが内包された形態のものである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 6】

前記ブロックコポリマーが、下記一般式(1-a)又は(2-a)で示されるものである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の複合体。



30



40

〔式(1-a)及び(2-a)中、R¹は水素原子又は未置換若しくは置換された直鎖若しくは分枝のC₁₋₁₂アルキル基を表し、L¹及びL²は連結基を表し、R²はそれぞれ独立してメチレン基又はエチレン基を表し、R³はそれぞれ独立して水素原子、アミノ基の保護基、疎水性基又は重合性基を表し、R⁴はヒドロキシル基又は開始剤残基を表し

50

、 R^5 はそれぞれ独立して水素原子又はアルカリ金属イオンを表し、 m は $5 \sim 20$, 000 の整数であり、 n は $2 \sim 5$, 000 の整数である。]

【請求項 7】

水性媒体中における動的光散乱法により測定した平均分散粒子径が $30 \text{ nm} \sim 150 \text{ nm}$ である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 8】

低 pH 条件下において、高分子ナノ粒子複合体から Mn^{2+} イオンが放出されるものである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の複合体を含むことを特徴とする、MRI 造影用組成物。 10

【請求項 10】

腫瘍の検出用のものである、請求項 9 記載の組成物。

【請求項 11】

腫瘍が原発性腫瘍又は転移性腫瘍である、請求項 10 記載の組成物。

【請求項 12】

腫瘍の悪性度の評価用のものである、請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 13】

被験動物の体内に請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の複合体を投与することを特徴とする、MRI 造影方法。 20

【請求項 14】

腫瘍の検出に用いられる、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

腫瘍が原発性腫瘍又は転移性腫瘍である、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

腫瘍の悪性度の評価に用いられる、請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の複合体を含むことを特徴とする、MRI 造影用キット。

【請求項 18】 30

腫瘍の検出用のものである、請求項 17 記載のキット。

【請求項 19】

腫瘍が原発性腫瘍又は転移性腫瘍である、請求項 18 記載のキット。

【請求項 20】

腫瘍の悪性度の評価用のものである、請求項 17 ~ 19 のいずれか 1 項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、MRI 造影能を有する物質を内包した高分子ナノ粒子複合体、並びに、それを用いた MRI 造影用組成物、MRI 造影方法、及び MRI 造影用キット等に関する。 40

【背景技術】

【0002】

癌の累積罹患率、死亡率が増加の一途をたどる中、あらゆる部位において癌の早期発見は命題といえる。早期発見によって治療時の侵襲も低くなるほか、完治も期待できる。既に進行癌の診断が下された患者に対しては、遠隔転移の有無を的確に診断することは病期（ステージ）の決定、その後の治療方針の決定に非常に重要である。癌の治療には外科治療、放射線療法、化学療法が挙げられるが、外科治療に際しては転移病巣の的確な切除、あるいは焼灼を行うことで癌の根治が期待できる。また放射線療法でも腫瘍の部位を正確に判定し、重点的に照射を行うことで健常部位への照射を防ぎ、副作用を軽減することができる。これらの意味でもあらゆるステージでの癌患者にとって、癌の正確な部位診断、 50

とりわけ悪性度の高い癌の正確な診断を行うことは非常に大きなメリットがある。

悪性腫瘍の画像診断法の代表例としては、X線CT、超音波、核磁気共鳴映像法(MRI)が挙げられる。これらの検査は普及率が高く、各々、利点と欠点を併せ持つ。中でも、MRIは、世界で最も急速に普及している画像診断技術であり、放射線被爆等の問題がなく、軟部組織の質的变化も可視化でき、客観性及び再現性が高いことから、近年その重要度が特に高まっている。しかしながら、MRIは、そのハードウェアのみでは小さな腫瘍が正常組織の複雑な信号に埋もれるため、その同定が困難であり、診断精度向上ためには、腫瘍組織を選択的に描出できるMRI造影剤の開発が大きな課題となっている。

これまで、腫瘍組織とその周囲組織とのコントラストを高めるための様々な造影剤が開発され、実用化されている。代表的な造影剤としては、Gd-DTPA(ガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸)等の金属錯体が挙げられるが(例えば、非特許文献1: Wesbey GE, et al. Physiol Chem Phys Med NMR. 1984; 16(2): 145-155.)、Gd-DTPAは部位特異性に欠け、経静脈投与により、癌などの特定組織への標的性は無く、速やかに各臓器及び筋肉内に拡散するため、腫瘍において確定的な診断を下す事が困難であった。Gd-DTPAはキレート化してその副作用はフリーのGdイオンよりも軽減されるが投与量および濃度(原液は500mM)は大きく、例えば、腎障害患者等において血中滞留性が延長した場合、Gdがイオン化し腎性全身線維症と呼ばれる深刻な症状を引き起こす危険性がある。一方、Mnイオンは、Gd-DTPA等と同様にMRIのコントラストを高める造影剤であるが、Gd-DTPAと同じ濃度を単独に経静脈的に投与すると心毒性など深刻な副作用が生じる。一方、Mnは生体必須元素の一つでもあり、また経口造影剤として臨床で認可されるなど、ごく少量が体内に留まっても毒性は生じない。

ところで、近年、画像診断の分野では、単に癌組織を可視化するだけでなく、悪性度や細胞死などの癌の性質や状態を描出できる、スマート機能型プローブの開発が盛んに行われている(例えば、非特許文献2: Urano et al., Nat Med. 2009 Jan; 15(1): 104-109.)。しかしながら、そのほとんどは蛍光プローブであり、MRI造影剤に関して、実用的な研究はほとんど無い。

【発明の概要】

【0003】

このような状況下において、腫瘍組織に特異的に集積して当該組織を選択的に描出することができ、少ない使用量でコントラストが高く、かつ長時間の造影が可能であり、しかも長時間血液中を循環しても副作用が少なく安全であるMRI造影剤の開発が望まれている。

本発明は、上記状況を考慮してなされたもので、以下に示す、高分子ナノ粒子複合体、MRI造影用組成物、MRI造影方法、及びMRI造影用キット等を提供するものである。

(1) 非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントとアニオン性のポリマー鎖セグメントとを含むブロックコポリマーと、MnCaPとを含んでなる、高分子ナノ粒子複合体。

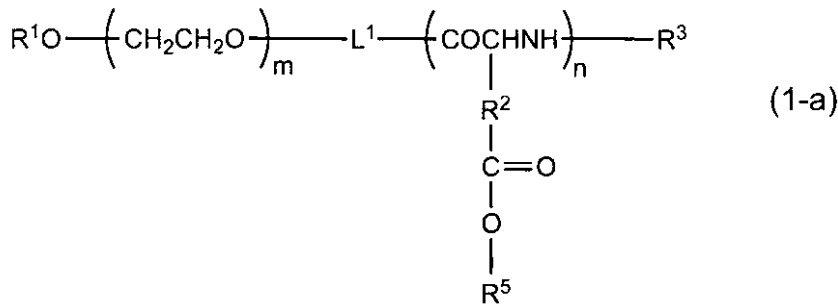
上記(1)の複合体において、アニオン性のポリマー鎖セグメントは、例えば、側鎖にアニオン性基を有するポリペプチドが挙げられ、具体的には、ポリ(グルタミン酸)、ポリ(アスパラギン酸)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(メタクリル酸)及びポリ(リンゴ酸)からなる群より選ばれるアニオン性ポリマーに由来するものが挙げられる。

上記(1)の複合体において、非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントは、例えば、ポリエチレングリコール、ポリ(2-メチル-2-オキサゾリン)、ポリ(2-エチル-2-オキサゾリン)、ポリ(2-イソプロピル-2-オキサゾリン)、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ヒドロキシエチル及びポリ(メタクリル酸ヒドロキシエチル)からなる群より選ばれる親水性ポリマーに由来するものが挙げられる。

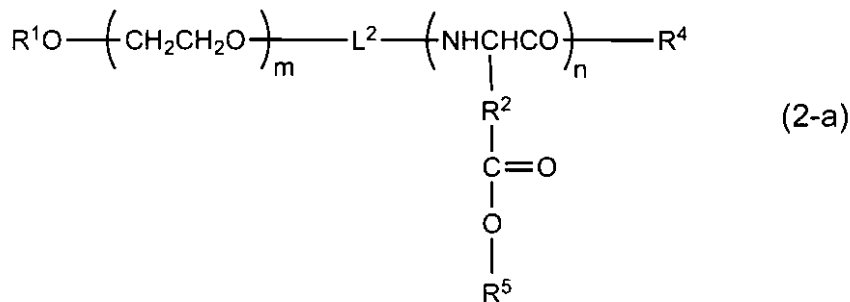
上記(1)の複合体は、例えば、前記ブロックコポリマーの非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントをシェル部分とし、アニオン性のポリマー鎖セグメントをコア部分として形

成されたナノ粒子状粒子に、前記 MnCaP が内包された形態のものが挙げられる。

上記(1)の複合体において、前記ブロックコポリマーは、例えば、下記一般式(1-a)又は(2-a)で示されるものが挙げられる。



10



20

[式(1-a)及び(2-a)中、 R^1 は水素原子又は未置換若しくは置換された直鎖若しくは分枝の C_{1-12} アルキル基を表し、 L^1 及び L^2 は連結基を表し、 R^2 はそれぞれ独立してメチレン基又はエチレン基を表し、 R^3 はそれぞれ独立して水素原子、アミノ基の保護基、疎水性基又は重合性基を表し、 R^4 はヒドロキシル基又は開始剤残基を表し、 R^5 はそれぞれ独立して水素原子又はアルカリ金属イオンを表し、 m は5~20, 000の整数であり、 n は2~5, 000の整数である。]

上記(1)の複合体は、例えば、水性媒体中における動的光散乱法により測定した平均分散粒子径が30nm~150nmであるものが挙げられる。

30

上記(1)の複合体は、例えば、低pH条件下において、高分子ナノ粒子複合体から Mn^{2+} イオンが放出されるものが挙げられる。

(2)上記(1)の複合体を含むことを特徴とする、MRI造影用組成物。

上記(2)の組成物は、例えば、腫瘍の検出用のものが挙げられ、ここで当該腫瘍としては、原発性腫瘍又は転移性腫瘍が挙げられる。

上記(2)の組成物は、例えば、腫瘍の悪性度の評価用のものが挙げられる。

(3)被験動物の体内に上記(1)の複合体を投与することを特徴とする、MRI造影方法。

上記(3)の方法は、例えば、腫瘍の検出に用いられる方法が挙げられ、ここで当該腫瘍としては、原発性腫瘍又は転移性腫瘍が挙げられる。

40

上記(3)の方法は、例えば、腫瘍の悪性度の評価に用いられる方法が挙げられる。

(4)上記(1)の複合体を含むことを特徴とする、MRI造影用キット。

上記(4)のキットは、例えば、腫瘍の検出用のものが挙げられ、ここで当該腫瘍としては、原発性腫瘍又は転移性腫瘍が挙げられる。

上記(4)のキットは、例えば、腫瘍の悪性度の評価用のものが挙げられる。

【図面の簡単な説明】

【0004】

図1は、本発明にかかる高分子ナノ粒子複合体の製造過程の概略を示す図である。

図2は、調製したMnCaPナノ粒子複合体とMnCl₂溶液の造影効果を評価した画

50

像である。MnCaPナノ粒子溶液の信号強度は、同濃度のMnCl₂溶液とほぼ同等、もしくはわずかに高信号を示した。

図3は、マウス由来大腸がん細胞Colon26を皮下移植した腫瘍モデルマウスに対し、MnCaPナノ粒子複合体の投与前後に取得した1T(テスラ)-MR画像である。

図4は、マウス由来大腸がん細胞Colon26を皮下移植した腫瘍モデルマウスに対し、MnCaPナノ粒子複合体の投与前後に取得した1T-MR画像の腫瘍領域の拡大図である。

図5は、マウス由来大腸がん細胞Colon26を皮下移植した腫瘍モデルマウスに対し、MnCaPナノ粒子複合体の投与後のMR画像(左図)と、同一位置から取得したPimonidazoleを用いて取得した免疫組織染色像(右図)である。MR画像において特異的に白い領域と、組織染色像において茶色になった領域の範囲が一致した(白矢印)。

図6は、マウス由来大腸がん細胞Colon26を皮下移植した腫瘍モデルマウスに対し、MnCaPナノ粒子複合体の投与後に取得したMR画像(左図)と、乳酸の化学シフト領域の信号強度を画像化した化学シフト画像を重畳した画像(右図)である。乳酸が多い領域(右図、白色)がMR画像において白くなった領域と一致した(白矢印)。

図7は、肝転移モデルマウスに対し、MnCaPナノ粒子複合体の投与前および投与1、2時間後のMR画像と、摘出した肝臓写真である。MnCaPナノ粒子複合体の投与後、転移した腫瘍が白く強調された(白矢印)。また摘出した肝臓内の腫瘍と一致した(白実線矢印)。加えて、投与1時間後には肝臓内の微小血管も描出された。

図8は、作製したリンパ節転移モデルマウス(腫瘍モデルマウス)の図である。(a)リンパ節に転移した腫瘍からのルシフェラーゼ発光をフォトンイメージャーで観察した写真、(b)リンパ節に転移した腫瘍を解剖学的に観察した写真。

図9は、MnCaPミセル複合体の投与前、並びに投与後45分後及び60分後の正常リンパ節(Normal;黄色矢印)及びリンパ節転移部(Metastasis;赤色矢印)を含む1T-MR画像である。

【発明を実施するための形態】

【0005】

以下、本発明を詳細に説明する。本発明の範囲はこれらの説明に拘束されることはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施し得る。

なお、本明細書は、本願優先権主張の基礎となる特願2013-173866号明細書(2013年8月23日出願)の全体を包含する。また、本明細書において引用された全ての刊行物、例えば先行技術文献、及び公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込まれる。

1. 高分子ナノ粒子複合体

本発明の高分子ナノ粒子複合体は、高い血中滞留性と腫瘍組織選択性(EPR効果によるもの)を有する高分子ナノ粒子を利用したドラッグデリバリーシステムに着目して見出されたものである。本発明は、当該高分子ナノ粒子にMRI造影能を発揮し得る特定の化合物(MnCaP)を内包させた高分子ナノ粒子複合体を提供するものである。

本発明の高分子ナノ粒子複合体は、(1)非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントとアニオン性のポリマー鎖セグメントを含むブロックコポリマーと、(2)MRI造影能を発揮し得る特定の化合物としてのMnCaPとを含んでなるものである。ここで、当該複合体の具体的な形態としては、上記ブロックコポリマーの非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントをシェル部分とし、アニオン性のポリマー鎖セグメントをコア部分として形成されたナノ粒子状粒子に、上記MnCaPが内包された形態のものであることが好ましい。

なお、本発明においては、便宜上、上記各ポリマー鎖セグメントには、いわゆるオリゴマー鎖の範疇に入るセグメントも包含されるものとする。

(1) ブロックコポリマー

前記ブロックコポリマー中、非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントとしては、限定はされないが、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリ(2-メチル-2-オキ

10

20

30

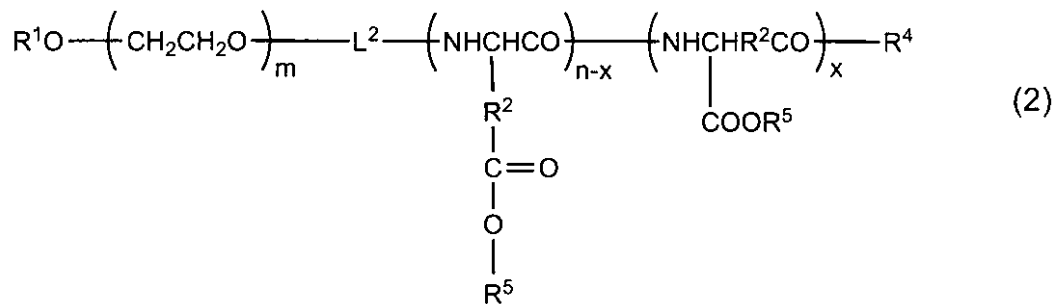
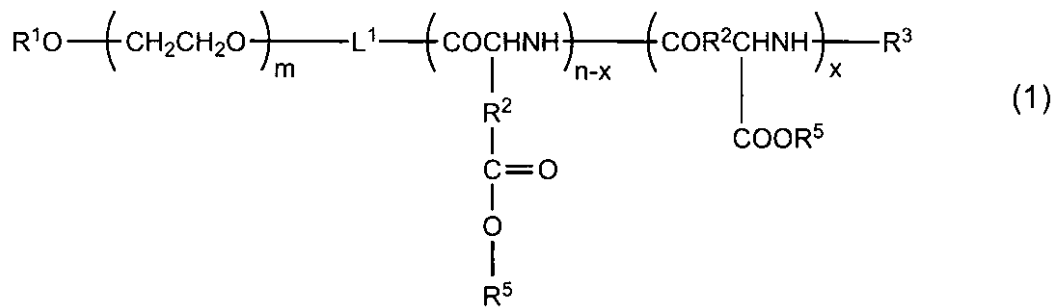
40

50

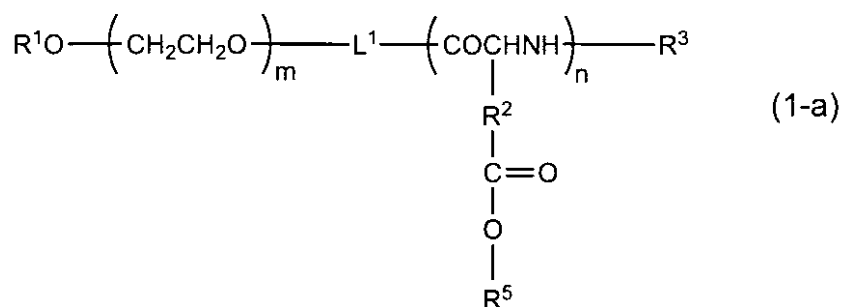
サゾリン)、ポリ(2-エチル-2-オキサゾリン)、ポリ(2-イソプロピル-2-オキサゾリン)、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ヒドロキシエチル及びポリ(メタクリル酸ヒドロキシエチル)からなる群より選ばれる水溶性ポリマーに由来するものが好ましく挙げられ、中でも、PEGに由来するものがより好ましい。当該非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントは、親水性であることから優れた生体適合性を、高分子ナノ粒子複合体に付与することができる。

前記ブロックコポリマー中、アニオン性のポリマー鎖セグメントとしては、限定はされないが、例えば、側鎖にアニオン性基を有するポリペプチドが好ましく挙げられる。具体的には、例えば、ポリ(グルタミン酸)、ポリ(アスパラギン酸)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(メタクリル酸)及びポリ(リンゴ酸)からなる群より選ばれるアニオン性ポリマーに由来するものが好ましく挙げられ、中でも、ポリ(グルタミン酸)に由来するものがより好ましい。

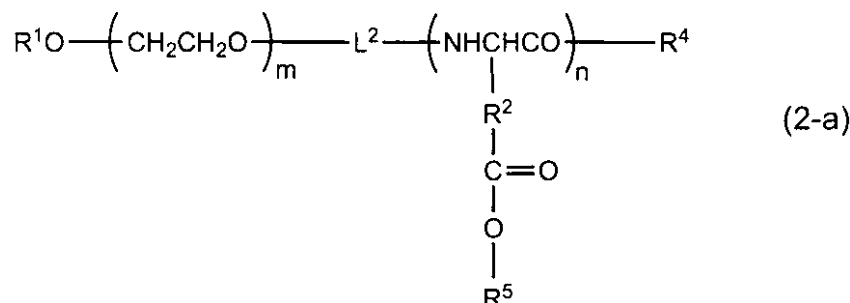
本発明に用いるブロックコポリマーとしては、具体的には、下記一般式(1)又は(2)で示されるものが例示できる。



また、本発明に用いるブロックコポリマーの、他の好ましい具体例としては、下記一般式(1-a)又は(2-a)で示されるものも例示できる。



10



20

上記式(1)、(2)、(1-a)及び(2-a)中、 R^1 は水素原子又は未置換若しくは置換された直鎖若しくは分枝の C_{1-12} アルキル基を表し、 L^1 及び L^2 は連結基を表し、 R^2 はそれぞれ独立してメチレン基又はエチレン基を表し、 R^3 はそれぞれ独立して水素原子、アミノ基の保護基、疎水性基又は重合性基を表し、 R^4 はヒドロキシル基又は開始剤残基を表し、 R^5 はそれぞれ独立して水素原子又はアルカリ金属イオンを表す。また、 m は5~20,000(好ましくは10~5,000、より好ましくは40~500)の整数であり、 n は2~5,000(好ましくは5~1,000、より好ましくは10~200)の整数である。

また、上記式(1)、(2)、(1-a)及び(2-a)中の、 m 個の繰り返し単位の部分が、非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントに相当する。また、上記式(1)及び(2)中の、 $(n-x)$ 個と x 個の繰り返し単位の部分、及び上記式(1-a)及び(2-a)中の、 n 個の繰り返し単位の部分が、アニオン性のポリマー鎖セグメントに相当する。

30

R^1 については、前述した未置換若しくは置換された直鎖若しくは分枝の C_{1-12} アルキル基としては、限定はされないが、例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、*iso*-プロピル、 n -ブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、 n -ペンチル、 n -ヘキシル、デシル、ウンデシル等が挙げられ、置換された場合の置換基としては、例えば、アセタール化ホルミル基、シアノ基、ホルミル基、カルボキシ基、アミノ基、 C_{1-6} アルコキシカルボニル基、 C_{2-7} アシルアミド基、同一もしくは異なるトリ- C_{1-6} アルキルシロキシ基、シロキシ基またはシリルアミノ基が挙げられる。置換基がアセタール化ホルミル基であるときは、酸性の温和な条件下で加水分解して他の置換基であるホルミル基(-CHO:またはアルデヒド基)に転化できる。このようなホルミル基、または上記カルボキシ基もしくはアミノ基は、例えば、前記ブロックコポリマーを生成した後に、対応する保護された形態の基または部分から脱保護もしくは転換して生じさせることができ、次いで必要に応じ、適当な抗体もしくはその特異結合性を有する断片(F(ab')₂、F(ab)、または葉酸など)を共有結合し、そして該ブロックコポリマー(ひいては、本発明の高分子ナノ粒子複合体)に標的指向性を付与するために利用することもできる。このような官能基を片末端に有する非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントは、例えば、WO96/32434、WO96/33233、WO97/06202に記載のブロック共重合体のPEGセグメント部の製造法に準じて形成することができる。このよう

40

50

に形成される非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントと、アニオン性のポリマー鎖セグメントとは、前述した各ブロック共重合体の製造方法に応じて、どのような連結様式をとっていてもよく、どのような連結基で結合されていてもよい。当該製造方法は、特に限定はされないが、末端にアミノ基を有する非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントを用いて、そのアミノ末端から、例えば、 β -ベンジル-L-アスパルテート及び/又は β -ベンジル-L-グルタメートのN-カルボン酸無水物(NCA)を重合させてブロック共重合体を合成し、その後、側鎖ベンジル基を他のエステル基に変換するか、または部分もしくは完全加水分解することにより目的のブロック共重合体を得る方法が挙げられる。この場合、得られた共重合体の構造は、一般式(1)又は(1-a)のブロックコポリマーを構成する共重合体の構造となり、連結基 L^1 は、用いた非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントの末端構造に由来する構造となり、好ましくは $-(CH_2)_p-NH-$ である(ここで、 p は1~5の整数であることが好ましい)。また、アニオン性のポリマー鎖セグメント、又は該ポリマー鎖の誘導体を合成してから、予め用意した非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントと結合させる方法でも、共重合体は製造可能である。この場合、結果的に上記の方法で製造したものと同一の構造となることもあるが、一般式(2)又は(2-a)のブロックコポリマーの構造となることもあり、連結基 L^2 は、限定はされないが、好ましくは $-(CH_2)_q-CO-$ である(ここで、 q は1~5の整数であることが好ましい)。

R^3 については、前述したアミノ基の保護基としては、例えば、ベンジルオキシカルボニル基、*t*-ブチルオキシカルボニル基、アセチル基及びトリフルオロアセチル基等が挙げられる。また、疎水性基としては、例えば、ベンジルカルボニル基及びベンズヒドリルカルボニル基等が挙げられる。さらに、重合性基としては、例えば、アクリロイル及びメタクリロイル基等が挙げられる。

R^4 については、前述した開始剤残基としては、例えば、NCA重合の開始剤となり得る脂肪族または芳香族の1級アミン化合物残基($-NH-$ アルキル)等が挙げられる。

R^5 について、前述したアルカリ金属のイオンとしては、例えば、ナトリウム(Na)イオン、リチウム(Li)イオン及びカリウム(K)イオン等が挙げられる。

(2)MRI造影能を発揮し得る特定の化合物としてのMnCaP

本発明の高分子ナノ粒子複合体に含まれるMnCaPは、特に、低pH環境下において分解(溶解)し、マンガンイオン(Mn^{2+})を生じるものである。これにより、 Mn^{2+} イオンが高分子ナノ粒子複合体から放出されることになる。前述のとおり、 Mn^{2+} イオンは、周囲のタンパク質と結合した場合、その相互作用によって、緩和能がおよそ10倍以上に増大する特性を有する。そのため、本発明の高分子ナノ粒子複合体をMRI造影剤として用いた場合、腫瘍組織内の低pH環境で選択的に Mn^{2+} イオンを放出し、腫瘍組織のタンパク質等と結合して造影剤の位置が不動化され、同時にMRI信号強度の増大効果をもたらすことができる(特に断りが無い場合、MRI信号とは、T1強調画像法における信号強度をいう)。また、MnCaPは崩壊しない状態で、正常の肝組織に一定量集積することが可能で、その場合、横緩和時間の短縮効果によりMRI信号強度の低下をもたらす。同時に肝腫瘍では、その低いpHに反応して崩壊し、 Mn^{2+} イオンを放出することでMRI信号強度の上昇をもたらす、より高い検出力を発揮する。

MnCaPは、下記式に示す反応(概要)により生成され得るものである。



ここで、MnCaPのマウスに対する最大耐用量(MTD: maximum tolerant dose)は、およそ1.5mmol/kgである。これに対し、 $MnCl_2$ の最大耐用量(MTD)はおよそ0.22mmol/kgであり、MnCaPの約1/7である。したがって、最大耐用量(MTD)の点でも、MnCaPを用いる本発明の高分子ナノ粒子複合体は、MRI造影における実用性に極めて優れたものである。

(3)高分子ナノ粒子複合体

本発明の高分子ナノ粒子複合体の製造方法としては、限定はされないが、前述したプロ

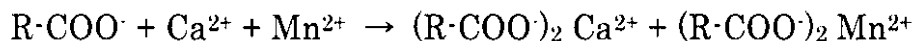
ックコポリマーと、MnCaPの原料化合物とを、水性媒体中にて混合し、反応させる方法が好ましい。MnCaPの原料化合物としては、 HPO_4^{2-} を含有する(を生じる)化合物、 Ca^{2+} を含有する(を生じる)化合物、 Mn^{2+} を含有する(を生じる)化合物を、それぞれ用いることが好ましい。

また、反応条件としては、目的の高分子ナノ粒子複合体が得られる限り、いかなる条件を設定してもよいが、例えば、上記混合後、50～180 で5～120分加熱する(熱水合成する)ことが好ましく、より好ましくは80～150 で10～240分加熱することであり、特に好ましくは120 程度で20分程度加熱することである。当該熱水加熱により、MnCaPが合成される。なお、当該高分子ナノ粒子複合体の製造方法の概略は、例えば、図1に示すとおりである。

反応溶媒となる水性媒体としては、水(特に、脱イオン水)が好ましく、更に、各種無機もしくは有機緩衝剤、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、エタノール等の水混和有機溶媒を、本発明の高分子ナノ粒子複合体の形成反応に悪影響を及ぼさない範囲で含んでいてもよい。

製造された高分子ナノ粒子複合体の単離及び精製は、常法により、水性媒体中から回収することができる。典型的な方法としては、限外濾過法、ダイアフィルトレーション、透析方法が挙げられる。

本発明の高分子ナノ粒子複合体の形態としては、前述のとおり、例えば、前述したブロックコポリマーの非荷電性親水性のポリマー鎖セグメントをシェル部分とし、アニオン性のポリマー鎖セグメントをコア部分として形成されたナノ粒子状粒子に、MnCaPが内包された形態のものが好ましく挙げられる。通常、水性媒体(水性溶媒)中においては、本発明の高分子ナノ粒子複合体は、凝集して、可溶化した高分子ナノ粒子状の形態を形成し得る。MnCaPは、その生成過程において、ブロックコポリマーのアニオン性のポリマー鎖セグメントと、下記式(概略)のようにイオン結合をし得る。



よって、最終的に、MnCaPは、コア部分を構成するアニオン性のポリマー鎖セグメントとともに、ナノ粒子粒子の内部に内包された状態となる。

このような、本発明の高分子ナノ粒子複合体は、水性媒体中における平均分散粒子径(動的光散乱法により測定)が、例えば、30nm～150nmであることが好ましく、より好ましくは30nm～100nmであり、さらに好ましくは30nm～80nmである。当該粒子径であることにより、EPR効果が発揮され、腫瘍組織選択的に集積することができる。

本発明の高分子ナノ粒子複合体におけるMnCaPの含有割合は、当該複合体に対するMnイオンの含有割合でみたときに、例えば、1～15重量%であってもよいし、また0.01～5重量%や、0.3～4.0重量%であってもよく、限定はされないが、MRIの地場強度や撮像条件に応じて、適宜最適な含有割合に調製することもできる。

2. MRI造影用組成物、MRI造影方法

本発明においては、上述した本発明の高分子ナノ粒子複合体を含むことを特徴とする、MRI造影用組成物が提供される。本発明の組成物は、MRI造影による癌(悪性腫瘍)の検出及び/又診断手段として使用することができる。なお、場合によっては、抗腫瘍活性を有する公知の各種化合物又は組成物を高分子ナノ粒子複合体に併せて内包することにより、MRI造影用かつ抗腫瘍用医薬組成物として用いることもできる。

本発明のMRI造影用組成物を用いる場合、検出等の対象となる腫瘍の種類は、限定はされず、公知の各種癌種を挙げることができる。

前述のとおり、本発明のMRI造影用組成物は、治療抵抗性の癌細胞が存在する、腫瘍組織の中心部にある低酸素領域(Hypoxia)を明確にイメージングすることができるものであり、そのため腫瘍の悪性度を評価するために用いることもできる。

また、本発明のMRI造影用組成物は、従来では腫瘍特異的には検出困難であった微小癌(例えば約1mm程度の癌)をMRIで検出することができるものであるため、各種癌

10

20

30

40

50

の原発性腫瘍や転移性腫瘍、特に初期の原発性腫瘍や転移性腫瘍の検出及び診断も可能とするものである。

本発明のMRI造影用組成物において、前述した高分子ナノ粒子複合体の含有割合は、限定はされず、MRI造影効果を勘案して適宜設定することができる。

本発明のMRI造影用組成物は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、ネコ等の各種動物に適用することができ、特に限定はされない。被験動物への投与方法は、通常、点滴静注などの非経口用法が採用され、投与量、投与回数及び投与期間などの各条件は、被験動物の種類及び状態等に応じて、適宜設定することができる。例えば、ヒトに静脈内投与をする場合の用量は、必要に応じて実験動物又はボランティアによる小実験を行い、それらの結果を考慮して、さらには患者の状態を考慮して専門医が決定するのが好ましいが、一般的には、1日1回、 $1.0 \sim 10,000 \text{ mg/m}^2$ とすることができる。

本発明のMRI造影用組成物は、MRI造影用という用途を勘案し、薬剤製造上一般に用いられる賦形材、充填材、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、潤滑剤、界面活性剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤及び等張化剤等を適宜選択して使用することができる。

本発明においては、被験動物の体内に本発明の高分子ナノ粒子複合体、又は本発明のMRI造影用組成物を投与することを特徴とする、MRI造影方法（特に、腫瘍検出用のMRI造影方法や、原発性腫瘍や転移性腫瘍の検出用のMRI造影方法）を提供することもでき、また、当該方法を利用した腫瘍の悪性度の評価方法を提供することもできる。これらの方法においては、従来MRI造影に関する知見及び技術水準に基づいて、適宜他の工程を含むことができる。例えば、前記投与後又は前記投与と同時に被験動物についてMRI検査を行う工程、当該検査で得られた結果（画像）に基づき腫瘍の有無を検出する工程等が挙げられる。

3. MRI造影用キット

本発明のMRI造影用キットは、前述した本発明の高分子ナノ粒子複合体を含むことを特徴とする。当該キットは、前述したMRI造影方法や当該方法を利用した腫瘍の悪性度の評価方法に好ましく用いることができる。

当該キットにおいて、本発明の高分子ナノ粒子複合体の保存状態は、限定はされず、その安定性（保存性）及び使用容易性等を考慮して、溶液状又は粉末状等の状態を選択できる。

本発明のMRI造影用キットは、前記高分子ナノ粒子複合体以外に他の構成要素を含んでいてもよい。他の構成要素としては、限定はされないが、例えば、各種バッファー、防腐剤、分散剤、安定化剤、及び使用説明書（使用マニュアル）等を挙げることができる。

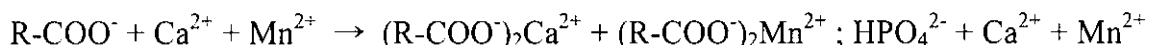
以下に、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】

【0006】

< MnCaPナノ粒子複合体（高分子ナノ粒子複合体）の製造 >

MnCaPナノ粒子複合体は、下式に基づく化学反応を利用し、さらに図1（概略図）に示すような複合体形成と熱水処理の2段階の過程を得て製造した。

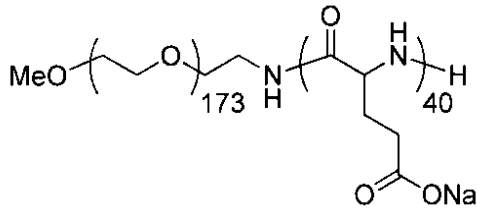


→ MnCaP

はじめに、 250 mM の Ca^{2+} と 20 mM の Mn^{2+} をTris-HClバッファー（ $\text{pH} 7.6$ ）に溶かした溶液Aを調製した。次に、 5 mM のポリエチレングリコール-ポリ（グルタミン酸）ブロックコポリマー（PEG-b-P(Glu)）を 6 mM の HPO_4^{2-} を含む 50 mM HEPESバッファーSaline（ $\text{pH} 7.1$ ）に溶かした溶液Bを調製した。体積にして同量の溶液Aと溶液Bをボルテックスミキサーを用いて5秒間攪拌、混合して、MnCaPナノ粒子複合体を調製した。得られたMnCaPナノ粒

子複合体の溶液を 120 に設定したオートクレーブを用いて 20 分間の水熱処理を施した。得られた MnCaP ナノ粒子複合体を 25 mM HEPES バッファースaline (pH 7.4) に対して透析した後、HEPES バッファーを用いた限外濾過により精製した。

なお、上記 PEG-b-P(Glu) の構造は、以下の通りである。



10

【実施例 2】

【0007】

<方法>

1. MnCaP ナノ粒子複合体の緩和能の計測と既存の MnCl₂ との溶液中での比較

製造した MnCaP ナノ粒子複合体が有する緩和能の計測、および既存の MnCl₂ 単体との造影効果を比較するため、前臨床用永久磁石型 1 T (テスラ) MR 装置 (IconTM, Bruker-Biospin, Germany) を使用し、緩和能の計測ならびに T₁ 強調画像を取得し比較した。計測には、濃度が 0.1 ~ 0.5 mM の MnCaP ナノ粒子複合体および同濃度の MnCl₂ を使用し、PCR 用のサンプルチューブに入れて計測した。希釈には、蒸留水を使用した。

20

緩和能の計測には、プロトン用ボリュームコイル (内径 35 mm) を使用した。撮像法は反転パルスを導入した高速スピネコー法 (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement, RARE) を使用した。撮像に使用したパラメータは以下の通りである。

エコータイム (Echo Time, TE) = 10 ms ;

繰り返し時間 (Repetition Time, TR) = 16,000 ms ;

反転時間 (Inversion Time, TI) = 49.59, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1600, 2400, 3200, 6400 ms ;

30

RARE Factor = 8 ;

撮像視野 (Field Of View, FOV) = 48.0 x 48.0 mm² ;

スライス厚 = 2.0 mm ;

画素数 = 256 x 256 ;

撮像方向 = 水平断 (Horizontal) ;

加算回数 = 1 ;

1 つの TI あたりの撮像時間 = 8 分 32 秒 (T₁ 強調画像は、スピネコー法を使用し、以下の撮像パラメータを使用して取得した : TE = 10.0 ms ; TR = 400 ms) ;

FOV = 48.0 x 48.0 mm² ;

40

スライス厚 = 2.0 mm ;

画素数 = 256 x 256 ;

撮像方向 = 水平断 ;

加算回数 = 8 ;

撮像時間 = 13 分 39 秒

2. 皮下腫瘍モデルマウスを用いた腫瘍集積性の検討

製造した MnCaP ナノ粒子複合体の腫瘍集積性を検証するため、皮下に腫瘍細胞を移植したモデルマウスに MnCaP ナノ粒子複合体を投与し、腫瘍における MRI 画像の変化を可視化した。MRI は前述の前臨床用永久磁石型 1 T - MR 装置、ならびにプロトン用ボリュームコイルを使用した。腫瘍モデルマウスは、メスの BALB/c ノードマウス

50

(日本 S L C) の臀部皮下にマウス由来大腸がん細胞 C o l o n 2 6 を 1.0×10^6 c e l l / 5 0 μ l を移植して作成した。実験には、移植後 7 ~ 9 日目に、腫瘍サイズが 5 ~ 1 0 m m 程度になったモデルマウスを使用した。

M R 撮像は、スピンエコー法を用い、使用したパラメータは、以下のとおりである。

T E = 1 1 . 5 m s ;

T R = 4 0 0 m s ;

F O V = 4 4 . 0 x 4 4 . 0 m m ² ;

スライス厚 = 1 . 0 m m ;

画素数 = 2 5 6 x 2 5 6 ;

撮像方向 = 横断面 (T r a n s a x i a l) ;

加算回数 = 4 ;

撮像時間 = 6 分 4 9 秒

撮像は、M n C a P ナノ粒子複合体投与前および投与後 4 時間後まで連続的に実施した M n C a P ナノ粒子複合体は、0 . 2 2 m m o l / k g M n 濃度になるように調整し、マウス尾静脈より投与した。撮像時には、撮像中にマウスが動かないようにイソフルラン吸引麻酔 (1 . 0 ~ 2 . 0 %) を使用した。また、マウス直腸に熱電対温度計を挿入し、自作の温水還流システムを用いて、体温が 3 6 ~ 3 7 に保った。

3 . 低酸素領域の検出する免疫組織染色像と M R 画像の比較

製造した M n C a P ナノ粒子複合体が、p H の低下に反応することを評価するため、腫瘍内において p H が低い低酸素領域を検出する免疫組織染色像と、M n C a P ナノ粒子複合体の投与に取得した M R 画像を比較した。低酸素領域を検出するためのマーカーとして、2 - ニトロイミダゾール (2 - n i t r o m i d a z o l e) 系の化合物であるピモニダゾール (P i m o n i d a z o l e) を含む H y p o x y p r o b e ^{T M} - 1 (H P I) を使用した。H y p o x y p r o b e ^{T M} - 1 は、腫瘍モデルマウスに対し、6 0 m g / k g の濃度で、M n C a P ナノ粒子複合体の投与前にマウス尾静脈より投与した。M n C a P ナノ粒子複合体を投与した際の M R 画像は、上記 2 と同様の実験プロトコル・パラメータを用いて取得した。M n C a P ナノ粒子複合体投与 4 時間後まで連続的に M R 画像を取得した後、モデルマウス皮下に移植した腫瘍を切除し、4 % パラフォルムアルデヒド・りん酸緩衝液を用いて組織固定した。パラフィン包埋を行い、抗 P i m o n i d a z o l e 抗体を用いた免疫組織染色を実施し、倒立実体顕微鏡を用いて取得した画像と M R 画像とを比較した。

4 . 化学シフト画像化法による乳酸高代謝領域画像と、M R 画像の比較

腫瘍内の低酸素化が進んだ領域は、嫌気性代謝により、組織の乳酸 (L a c t a t e) が増加する。乳酸は低い p H を持つため、高い乳酸量を示す組織は、低い血液循環に伴う低酸素および低 p H を示唆するマーカーとなる。そこで、M R スペクトロスコピー (M R S p e c t r o c o p y , M R S) を利用し、乳酸の持つ化学シフト領域の信号強度を画像化した化学シフト画像化法 (C h e m i c a l S h i f t I m a g i n g , C S I) を用いて取得した乳酸の代謝画像と、M n C a P ナノ粒子複合体を投与して取得した M R 画像の信号強度の上昇領域が一致するかを調べた。

C S I 画像は、前臨床用超電導磁石型 7 . 0 T - M R 装置 (B i o s p e c , B r u k e r - B i o s p i n) と、冷却コイル (C r y o P r o b e ^{T M} , B r u k e r - B i o s p i n) を用いて取得した。C S I 画像の撮像には、M R S で使用される P R E S S (P o i n t - R E S o l v e d S p e c t r o s c o p y) 法を用いて、V A P O R (v a r i a b l e p u l s e p o w e r a n d o p t i m i z e d r e l a x a t i o n d e l a y s) 法を使用してプロトンから生じる信号を抑制した。撮像パラメータは以下の通りである。

T E = 2 0 m s ;

T R = 3 , 0 0 0 m s ;

F O V = 1 4 . 1 x 1 4 . 1 m m ² ;

スライス厚 = 1 . 5 m m ;

10

20

30

40

50

取得データ数：10 x 10；

再構成画像の画素数：16 x 16；

撮像時間：12分48秒（CSI画像取得後、腫瘍モデルマウスを1T-MR装置に移動し、MnCaPナノ粒子複合体の投与前後において、MR画像を取得した。撮像パラメータは上記2項の場合と同様であった。）

5. 肝転移モデルマウスにおける微小腫瘍の検出

転移・微小腫瘍に対するMnCaPナノ粒子複合体の腫瘍検出能を検討するため、肝転移モデルマウスを使用し、肝転移腫瘍の検出を評価した。肝転移モデルは、メスのBALB/cヌードマウス（日本SLC）の脾臓にマウス由来大腸がん細胞Colon26を $1.0 \times 10^6 \text{ cell} / 50 \mu\text{l}$ を移植して作成した。実験には、移植後7~9日目に実施した。MnCaPナノ粒子複合体の投与量は、 $0.22 \text{ mmol} / \text{kg}$ Mn濃度であり、マウス尾静脈より投与した。MR撮像は、上記2項と同様の方法で実施した。撮像に使用したパラメータは、以下のとおりである。

TE = 11.5 ms；

TR = 400 ms；

FOV = 85.0 x 85.0 mm²；

スライス厚 = 1.0 mm；

画素数 = 256 x 256；

撮像方向 = 水平面（Horizontal）；

加算回数 = 4；

撮像時間 = 6分49秒。

< 結果・考察 >

1. MnCaPナノ粒子複合体の緩和能の計測と既存のMnCl₂との溶液中での比較

MnCaPナノ粒子複合体とMnCl₂溶液のT₁強調画像を図1に示す。MnCaPナノ粒子複合体の信号強度は、同じMn²⁺濃度のMnCl₂溶液の信号強度とほぼ同等、またはわずかな高信号（約10~27%）を示した。計測した縦緩和能r₁は、MnCaPナノ粒子複合体が $6.5 \sim 11.10 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、MnCl₂溶液が $7.30 \sim 7.58 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であり、製造したMnCaPナノ粒子複合体は、MnCl₂溶液と同等、もしくはわずかに高い造影効果を有することが確認できた。この結果より、MnCaPナノ粒子複合体が崩壊する前の状態においても、MnCl₂溶液と同程度の信号強度をもつため、その集積した部位においてMnCaPナノ粒子複合体の動態に応じた中程度のMR信号強度の上昇が期待できる。

2. 皮下腫瘍モデルマウスを用いた腫瘍集積性の検証

MnCaPナノ粒子複合体の投与前および投与後4時間までの、腫瘍領域を含むマウス体幹部、ならびに腫瘍領域を拡大した1T-MR画像を図2、3に示す。腫瘍領域における投与前の信号強度は、周囲の筋肉領域と同等であったのに対し、投与後、腫瘍内のMR信号強度は、腫瘍内がほぼ均一に中程度に上昇した（投与前の信号比で約45%上昇）。これは、投与したMnCaPナノ粒子複合体が腫瘍へ集積すると共に、毛細血管に存在するMnCaPナノ粒子複合体からの信号も寄与したためと考えられた。投与して2時間以降、腫瘍の一部領域において、極めて大きく信号が上昇した領域が観察された（投与前の信号比で約120%上昇）。これは、正常組織よりもpHが低い領域において、MnCaPナノ粒子複合体が溶解することでMn²⁺が放出され、周囲のタンパク質等との相互作用により、造影効果が大きく増大したためと考えられた。Mn²⁺は、タンパク質と結合することにより分子運動が制限され、緩和能が大きく向上することが報告されている（文献：Koylu MZ, Asubay S, Yilmaz A. Determination of Proton Relaxivities of Mn(II), Cu(II) and Cr(III) added to Solutions of Serum Proteins. Molecules, 2009; 14(4): 1537-1545.）。

3. 低酸素領域の検出する免疫組織染色像とMR画像の比較

MnCaPナノ粒子複合体の投与後に取得したMR画像、ならびに低酸素領域を検出するためにPimonidazoleを用いて取得した免疫組織染色像を図4に示す。MR画像において、周囲よりも信号強度が上昇している領域と、ピモニダゾール免疫組織染色像において陽性（茶色）となった低酸素・低pH領域がよく一致した。このことから、低酸素領域においてpHが低下し、使用したMnCaPナノ粒子複合体が溶解し、 Mn^{2+} による造影効果が増大したと考えられた。

4．化学シフト画像化法による乳酸高代謝領域画像と、MR画像の比較

MnCaPナノ粒子複合体投与前に化学シフト画像化法により取得した乳酸の代謝領域画像と、MnCaPナノ粒子複合体投与後に取得した1T-MR画像を図5に示す。化学シフト画像化法により取得した高い乳酸の分布を示す領域と、MnCaPナノ粒子複合体投与後に取得した腫瘍内のMR画像において信号強度が特異的に上昇した領域がよく一致した。このことから、嫌気性代謝により乳酸が多く生成される低酸素領域において、集積したMnCaPナノ粒子複合体が溶解することにより、 Mn^{2+} による造影効果が増大したことが示唆された。

5．肝転移モデルマウスにおける微小腫瘍の検出

肝転移モデルマウスに対し、MnCaPナノ粒子複合体を投与前後に取得した1T-MR画像ならびに、実験終了後に摘出した肝臓実質臓器を図6に示す。MnCaPナノ粒子複合体投与後の1T-MR画像において、正常な肝臓領域の信号が低下するとともに、腫瘍領域の信号が増加した。信号が増加した領域は、摘出臓器において、腫瘍がある領域と一致した。

正常な肝臓領域の信号変化は、MnCaPナノ粒子複合体が高集積することで、横緩和時間の短縮効果が大きくなり、 Mn^{2+} が有する陽性造影効果が低下したと考えられる。一方、腫瘍領域に関しては、MnCaPナノ粒子複合体が集積するとともに、pHの変化に反応して、MnCaPナノ粒子複合体が溶解し、 Mn^{2+} による増大効果が生じたと考えられる。現在、臨床において使用されているGd-EOB-DTPAは、正常肝臓領域が白く造影され、腫瘍領域はほとんど変化しないことを利用して、腫瘍を検出する。一方、MnCaPナノ粒子複合体は、腫瘍領域が白く造影され、周囲の正常組織の信号が低下することにより、より大きいコントラストが生じたMR画像が得られた。これらのことから、MnCaPナノ粒子複合体は、微小な肝転移腫瘍の検出に有用であると考えられた。さらに、MnCaPナノ粒子複合体は、長い血中半減期を有するため、血管造影効果を併せ持つ。この特徴は、腫瘍のみならず、腫瘍への栄養血管を造影し、腫瘍の特性や治療効果などを評価することに利用可能であると考えられた。

【実施例3】

【0008】

<方法>

製造したMnCaPミセル複合体のリンパ節イメージングを検討するため、作製したリンパ節転移モデルマウス（腫瘍モデルマウス）（図8参照）に投与し、その信号変化を比較した。MRIは前臨床用永久磁石型1T-MR装置、及びプロトン用ボリュームコイルを使用した。

腫瘍モデルマウスは、メスのBALB/cマウスの左前脚裏にルシフェラーゼ遺伝子を導入したマウス乳癌細胞4T1-Luc細胞 $2.0 \times 10^6 / 10 \mu l$ を移植して作製した。実験は移植後16日後に実施した。

MR撮像は、スピンエコー法を用い、使用したパラメータは、以下の通りである。

TE = 10.6 ms ;

TR = 400 ms ;

FOV = 40.0 x 40.0 mm² ;

スライス厚 = 1.0 mm (スライスギャップなし)

画素数 = 256 x 256 ;

撮像方向 = 横断面 (Transaxial) ;

加算回数 = 4 ;

撮像時間 = 6分49秒

MR撮像は、MnCaPミセル複合体投与前から投与後2時間後まで、連続的に実施した。MnCaPミセル複合体は、 0.22 mmol/kg Mn濃度になるように調整し、マウス尾静脈より投与した。撮像時には、撮像中にマウスが動かないように、イソフルラン吸引麻酔(1.0~2.0%)を使用した。また、マウス直腸に熱電対温度計を挿入し、自作の温水還流システムを用いて、マウスの体温を $36\sim 37$ に保った。

<結果>

MnCaPミセル複合体の投与前、並びに投与後45分後及び60分後のリンパ節転移部を含む1T-MR画像を、図9に示す。腫瘍領域における投与前の信号が周囲の筋肉組織と同等であったのに対し、投与後のリンパ節転移部(Metastasis; 赤色矢印)のMR信号強度が上昇(白く変化)したことが分かった。これは、投与したMnCaPミセル複合体がリンパ節転移部へ集積し、放出されたマンガン造影剤ががん組織と結合し、信号増強を生じたためと考えられた。一方、正常リンパ節(Normal; 黄色矢印)においても、投与後にリンパ節のごく一部に限局した信号が観察されたが、受動的な流入による極めて限局した範囲(おそらく辺縁洞及び髄質リンパ洞)に留まった。

【産業上の利用可能性】

【0009】

本発明によれば、腫瘍組織に特異的に集積して該組織を選択的に描出することができ、少ない使用量でコントラストが高く、かつ長時間のMRI造影が可能であり、しかも副作用が少なく安全であるMRI造影用組成物(MRI造影剤)と、それに用いる高分子ナノ粒子複合体等を提供することができる。

本発明のMRI造影用組成物(ひいては高分子ナノ粒子複合体)は、pHに応答して溶解する特性を有しており、低pH環境下においてマンガンイオン(Mn^{2+})を放出し得るものである。ここで、放出された Mn^{2+} イオンは、周囲のタンパク質との相互作用によって、緩和能がおよそ10倍以上に増大する特性を有する。そのため、本発明のMRI造影用組成物は、腫瘍組織内の低pH環境で選択的に Mn^{2+} イオンを放出し、MRI信号強度の増大効果をもたらすことができるものである。

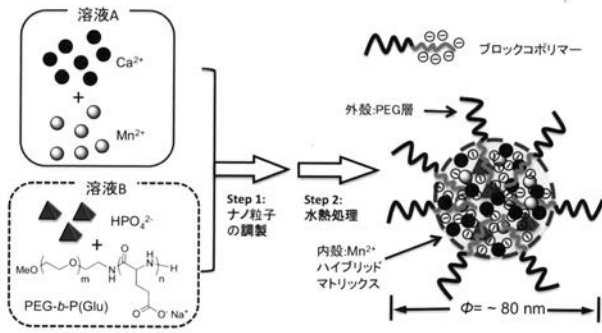
具体的には、例えば、本発明のMRI造影用組成物は、投与後2時間程までに腫瘍組織全体のコントラストを上昇させ(MRI信号強度を増大させ)、その後、特に腫瘍組織の中心部分のコントラストを著しく上昇させることができる。この中心部分は、アシドーシスによってpHが特に低下している低酸素領域(Hypoxia)であり(免疫染色によっても確認されている)、治療抵抗性の癌細胞が存在する悪性度の高い領域であることが知られている。よって、本発明のMRI造影用組成物は、少量の造影剤投与で、治療抵抗性の癌細胞が内部に存在する場合は、Hypoxiaを高いコントラストで明確にイメージングできる世界発のプローブとなるものであり、このことは、腫瘍の悪性度を評価し得ることも意味する。

また、本発明のMRI造影用組成物は、従来では検出困難であった微小癌(例えば約1mm程度の癌)をMRI検出することができるものであるため、初期の原発性腫瘍や転移性腫瘍の早期発見も可能とするものである。とりわけ、肝癌においては、正常の肝組織では横緩和時間の短縮による信号低下、肝癌の領域ではMn放出による信号上昇をもたらし、さらに大きなコントラストを形成可能な特性を有する。

このように、本発明のMRI造影用組成物(ひいては高分子ナノ粒子複合体)は、従来にはない高い癌に対する診断精度を有するMRI造影法を可能とする点で、極めて有用なものである。

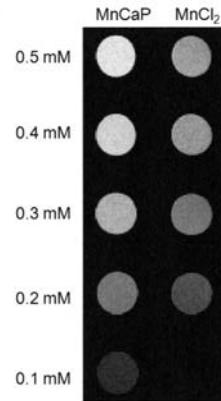
【 図 1 】

図 1



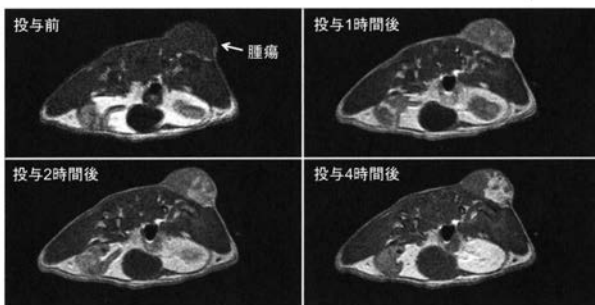
【 図 2 】

図 2



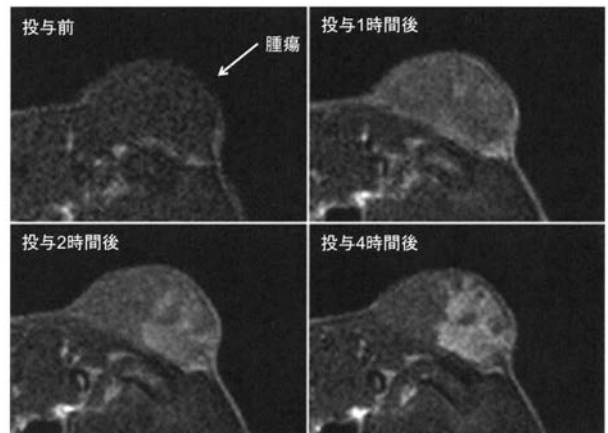
【 図 3 】

図 3



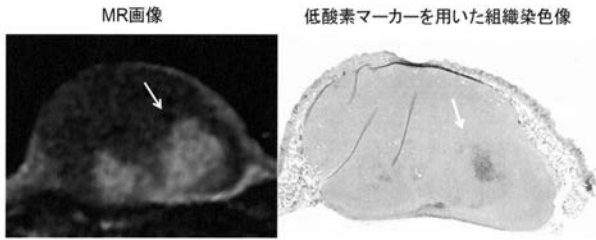
【 図 4 】

図 4



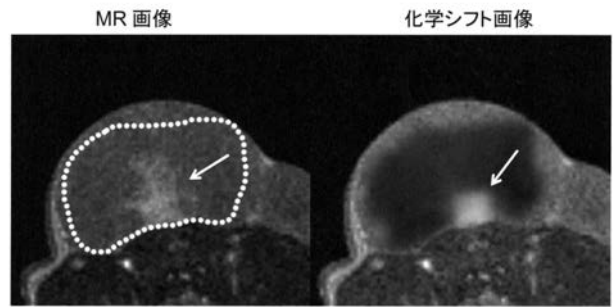
【 図 5 】

図 5



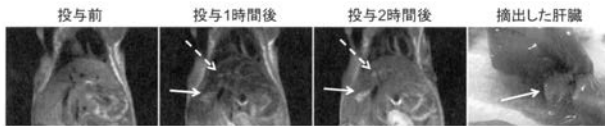
【 図 6 】

図 6



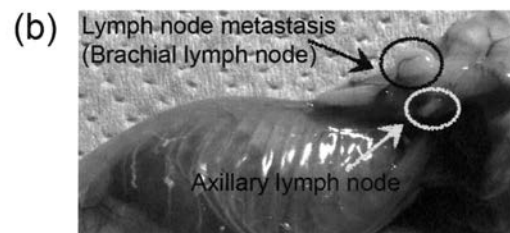
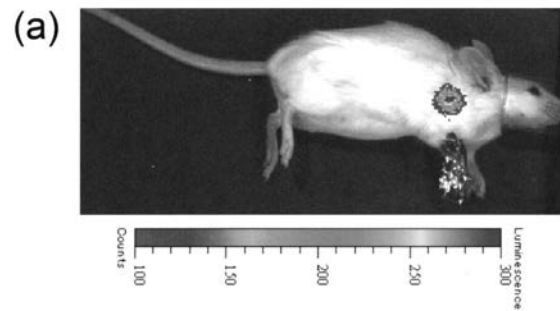
【 図 7 】

図 7



【 図 8 】

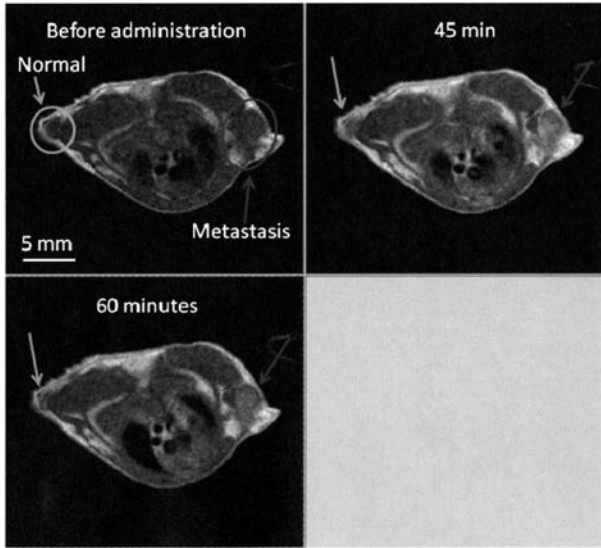
図 8



【 図 9 】

図 9

T₁-weighted images with lymph node metastasis (1T)



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/072664
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K49/00 (2006.01) i 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) A61K49/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-531296 A (ATgen Co., Ltd.), 03 September 2009 (03.09.2009), claims; paragraph [0001]; preparation examples 1 to 3; example 4 & WO 2007/097593 A1 & US 2009/0324494 A1 & EP 01988928 A1 & KR 10-2007-0088388 A & KR 10-2007-0088390 A & KR 10-2009-0088391 A & KR 10-2007-0088392 A & KR 10-2009-0088393 A	1-12, 17-20
A	JP 2010-516760 A (Seoul National University Industry Foundation), 20 May 2010 (20.05.2010), claims; paragraph [0001]; examples & WO 2008/093999 A1 & US 2012/0114564 A1 & EP 02117606 A1 & KR 10-2008-0071463 A & KR 10-2008-0071472 A & KR 10-2009-0119867 A & AU 2008211871 A	1-12, 17-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family 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 application or patent 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 November, 2014 (04.11.14)		Date of mailing of the international search report 11 November, 2014 (11.11.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/072664

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-143805 A (Japan Science and Technology Agency), 26 June 2008 (26.06.2008), claims; paragraphs [0006] to [0008]; examples 1 to 4 & WO 2008/068939 A1 & US 2010/0278737 A1 & CA 2707233 A	1-12, 17-20
A	JP 2012-197323 A (The University of Tokyo), 18 October 2012 (18.10.2012), claims; paragraphs [0037], [0038], [0040]; examples 1, 8 & WO 2011/010674 A1	1-12, 17-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/072664

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 13-16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions of claims 13-16 pertain to diagnostic methods practiced on the human body and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. 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:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. 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.:
4. 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.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 2 6 6 4									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K49/00(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K49/00											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2014年										
日本国実用新案登録公報	1996-2014年										
日本国登録実用新案公報	1994-2014年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
A	JP 2009-531296 A (エイティージェン カンパニー リミテッド) 2009.09.03, 特許請求の範囲、段落【0001】、製造例1-3、実施例4 & WO 2007/097593 A1 & US 2009/0324494 A1 & EP 01988928 A1 & KR 10-2007-0088388 A & KR 10-2007-0088390 A & KR 10-2009-0088391 A & KR 10-2007-0088392 A & KR 10-2009-0088393 A	1-12, 17-20									
C欄の続きにも文献が列挙されている。		パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 04.11.2014		国際調査報告の発送日 11.11.2014									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 中尾 忍	4U 3955								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3439								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 2 6 6 4
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2010-516760 A (ソウル ナショナル ユニバーシティー インダストリー ファウンデーション) 2010.05.20, 特許請求の範囲、段落【0001】、実施例 & WO 2008/093999 A1 & US 2012/0114564 A1 & EP 02117606 A1 & KR 10-2008-0071463 A & KR 10-2008-0071472 A & KR 10-2009-0119867 A & AU 2008211871 A	1-12, 17-20
A	JP 2008-143805 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2008.06.26, 特許請求の範囲、段落【0006】 - 【0008】、例1-例4 & WO 2008/068939 A1 & US 2010/0278737 A1 & CA 2707233 A	1-12, 17-20
A	JP 2012-197323 A (国立大学法人 東京大学) 2012.10.18, 特許請求の範囲、段落【0037】、【0038】、【0040】、実施例1, 8 & WO 2011/010674 A1	1-12, 17-20

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 2 6 6 4

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 13-16 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求項13-16に係る発明は、人体の診断方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則第39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG

(72) 発明者 片岡 一則

東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内

(72) 発明者 西山 伸宏

東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内

(72) 発明者 カブラル オラシオ

東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内

(72) 発明者 米 鵬

東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内

(72) 発明者 岸村 顕広

東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内

(72) 発明者 三浦 裕

東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内

(72) 発明者 青木 伊知男

千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目 9 番 1 号 国立研究開発法人放射線医学総合研究所内

(72) 発明者 國領 大介

千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目 9 番 1 号 国立研究開発法人放射線医学総合研究所内

(72) 発明者 佐賀 恒夫

千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目 9 番 1 号 国立研究開発法人放射線医学総合研究所内

F ターム(参考) 4C085 HH07 JJ02 KA28 KB07 KB72 KB74 KB75 KB76 LL18

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。