

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年3月7日(07.03.2019)



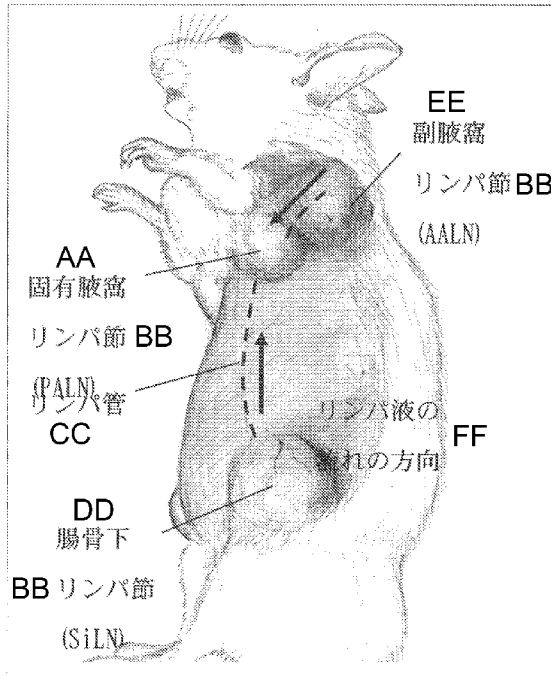
(10) 国際公開番号
WO 2019/045005 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 47/26 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01) *A61K 33/24* (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01) *A61K 35/12* (2015.01)
A61K 31/505 (2006.01) *A61K 45/00* (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01) *A61P 35/04* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/032220
- (22) 国際出願日: 2018年8月30日(30.08.2018)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願 2017-167951 2017年8月31日(31.08.2017) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東北大学 (TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1-1 Miyagi (JP).
- (72) 発明者: 小玉 哲也 (KODAMA, Tetsuya); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1-1 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 森 士朗 (MORI, Shiro); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1-1 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

(54) Title: APPROPRIATE OSMOTIC PRESSURE RANGE OF SOLUTION CONTAINING DRUG EFFECTIVE IN LYMPHATIC DRUG DELIVERY SYSTEM

(54) 発明の名称: リンパ行性薬剤送達法に有効な薬剤を含む溶液の適正な浸透圧域

[図1]



- AA Proper axillary
- BB Lymph node
- CC Lymph duct
- DD Subiliac
- EE Accessory axillary
- FF Direction of lymph flow

(57) Abstract: Provided is an optimum formulation for intralymphatic administration containing a drug such as a pharmaceutical, cell, or nucleic acid to be used in a lymphatic drug delivery system. A drug-containing liquid formulation for delivering the drug to a target lymph node by a lymphatic drug delivery system, wherein the formulation for intralymphatic administration has an osmotic pressure of the liquid of 700-2700 kPa.

WO 2019/045005 A1

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(57) 要約 : リンパ行性薬剤送達法において用いられる、医薬、細胞、核酸等の薬剤を含有する最適なリンパ節内投与製剤を提供する。 リンパ行性薬剤送達法によって薬剤を標的リンパ節に送達するための薬剤含有液体製剤であって、液体の浸透圧が700~2700kPaであるリンパ節内投与製剤。

明 細 書

発明の名称：

リンパ行性薬剤送達法に有効な薬剤を含む溶液の適正な浸透圧域

技術分野

[0001] 本発明はリンパ行性薬剤送達法に有効な薬剤を含む溶液の浸透圧に関する。

背景技術

[0002] がんは日本人の二人に一人が罹患する病気であり、がん患者の死因9割が転移に起因する。乳がんや頭頸部がんをはじめとするがんの多くは、リンパ管を介して所属リンパ節に転移を来す。

[0003] 現在の転移リンパ節に対する化学療法として、血管を介した静脈内投与が一般的である。静脈に投与された薬剤は末梢組織で毛細血管より間質へ漏出し、ふたたび血管及びリンパ管に再吸収される。

[0004] リンパ系は粒径の大きな物質及び高分子物質を優先的に取り込むという特徴をもつ。粒子の大きさが10-100nmの場合にはリンパ系へ再吸収されやすく、10nm以下の粒子は主に血管に再吸収される。また、リンパ系への再吸収の効率は分子量と正の相関を示し、特に分子量が16,000を超える物質は主にリンパ系に取り込まれる。したがって、一般的に低分子である抗がん剤は、リンパ系へのアクセスは困難であり、標的リンパ節への薬剤送達効率は低いと考えられる。

[0005] 現在のドラッグデリバリーシステム(DDS)における重要な原理はEPR効果(Enhanced Permeability Retention effect)である。がん組織が構築する未成熟な腫瘍血管は正常な血管内皮とは異なり、血管内皮細胞間に200nm程度の広い隙間が開口している。

そのため50-100nm程に粒径が制御された微粒子製剤や高分子製剤は受動的にがん組織に集積される。現在、このEPR効果を利用してリポソームやミセル化した薬剤が開発されており、固形腫瘍についてはその治療効

果が数多く報告されている。

[0006] しかしながら、リンパ節転移の治療に関する研究報告は、固形腫瘍の治療に関する研究に比べ、相対的に少なく、この理由として、リンパ節転移研究に有益な疾患モデルが開発されていないことがあった。斯かる状況の下、本発明者らは、ヒトのリンパ節の大きさと同等のリンパ節を有するMXH10/Mo-1pr/1prリンパ節腫脹マウスを樹立することに成功し(図1、非特許文献1)、このマウスを用いて、EPR効果に基づく薬剤送達法では早期の転移リンパ節に対して治療効果が期待されないことを報告した(非特許文献2)。これは、リンパ節に侵入し生着した腫瘍細胞が増殖するために必要な酸素や栄養を供給するための血管が、正常なリンパ節において十分に存在するため、リンパ節転移早期における腫瘍形成で血管新生が発生しにくいためだと考えられる。

[0007] 本発明者らは、従来の血行性全身投与あるいは経口投与に依存しない、転移リンパ節に対する新たな治療法として、リンパ行性薬剤送達法を提案してきた(非特許文献3、非特許文献4)。この概念は、原発巣周囲の所属リンパ節に局注し、所属リンパ節とその下流のリンパ節転移を治療あるいは予防する方法、あるいは転移リンパ節の上流に位置するリンパ節に薬剤を投与し、リンパ管経由で薬剤を下流の転移リンパ節に送達させる方法である。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1: Shao L, Mori S, Yagishita Y, Okuno T, Hatakeyama Y, Sato T, Kodama T. Lymphatic mapping of mice with systemic lymphoproliferative disorder: usefulness as an inter-lymph node metastasis model of cancer. *J Immunol Methods* 2013; 389:69-78.

非特許文献2: Mikada M, Sukhbaatar A, Miura Y, Horie S, Sakamoto M, Mori S, Kodama T. Evaluation of the enhanced permeability and retention effect in the early stages of lymph node metastasis. *Cancer Sci* 2017

非特許文献3 : Kodama T, Hatakeyama Y, Kato S, Mori S. Visualization of fluid drainage pathways in lymphatic vessels and lymph nodes using a mouse model to test a lymphatic drug delivery system. Biomedical optics express 2015; 6:124-34.

非特許文献4 : Kodama T, Matsuki D, Tada A, Takeda K, Mori S. New concept for the prevention and treatment of metastatic lymph nodes using chemotherapy administered via the lymphatic network. Scientific reports 2016; 6:32506

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、リンパ行性薬剤送達法において用いられる、医薬化合物、細胞、核酸等の薬剤を含有する最適なリンパ節内投与製剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、リンパ行性薬剤送達法において用いられる、リンパ節内投与製剤について種々検討した結果、特定の浸透圧域を有する液体製剤が、標的リンパ節における薬剤貯留性が高く、また、下流リンパ節への送達性が高く、良好な薬剤効果を有することを見出した。

すなわち、本発明は、以下の1)～11)に係るものである。

1) リンパ行性薬剤送達法によって薬剤を標的リンパ節に送達するための薬剤含有液体製剤であって、液体の浸透圧が700～2700kPaである、リンパ節内投与製剤。

2) 液体の浸透圧が900kPa以上である、1)のリンパ節内投与製剤。

3) 液体の浸透圧が、2400kPa以下である、1)のリンパ節内投与製剤。

4) 液体の浸透圧が950～2000kPaである、1)のリンパ節内投与製剤。

5) 液体の粘度が0.5～20 mPa・sである、1)～4)のいずれかのリンパ節内投与製剤。

6) 液体の粘度が1.0～15 mPa・sである、1)～4)のいずれかのリンパ節内投与製剤。

7) 非イオン性界面活性剤を含有する、1)～6)のいずれかのリンパ節内投与製剤。

8) 非イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルである、7)のリンパ節内投与製剤。

9) ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルがオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンである8)のリンパ節内投与製剤。

10) 薬剤が、医薬活性物質、核酸分子収容体又は培養細胞である1)～9)のいずれかのリンパ節内投与製剤。

11) 薬剤が、抗がん剤である1)～9)のいずれかのリンパ節内投与製剤。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、リンパ行性薬剤送達法において、目的薬剤の効果を標的リンパ節において効果的に発揮させるためのリンパ節内投与製剤が提供される。すなわち、リンパ行性薬剤送達法において、低分子化合物、ポリペプチド、抗体、核酸等の医薬活性物質や免疫療法、遺伝子治療又は再生医療において使用される各種培養細胞等の薬剤の、リンパ節からネットワーク下流に位置するリンパ節への送達率及び貯留時間を調節でき、投与された薬剤のリンパ節及び下流リンパ節における治療又は予防的治療効果の最適化を図ることができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]マウス実験におけるリンパネットワーク図。腋窩部には固有腋窩リンパ節 (proper axillary lymph node : P A L N) と副腋窩リンパ節 (accessory axillary lymph node : A A L N) が存在する。副腋窩リンパ節及び腸骨下リンパ節 (subiliac lymph node : S i L N) は、固有腋窩リンパ節に対して

、リンパネットワークの上流に位置する。すなわち副腋窩リンパ節→固有腋窩リンパ節、腸骨下リンパ節→固有腋窩リンパ節のリンパ流れが存在する。

[図2]ポリソルベート80体積パーセントと粘度の関係。

[図3]リンパ行性薬剤送達法による腸骨下リンパ節から固有腋窩リンパ節への溶液の動態。

[図4]腸骨下リンパ節および固有腋窩リンパ節に貯留性する各溶液の貯留特性。

[図5]各溶液に対する体重変化。

[図6]注射日からDay 6目での腸骨下リンパ節及び固有腋窩リンパ節の病理像。

[図7]A : Day 0[†]における腸骨下リンパ節 (S i L N) から内側腋窩リンパ節 (P A L N) に流れ出る溶液の動態。B : Day 6[†]における抗腫瘍効果 (i n v i v o イメージング画像)。

[図8]Day 6[†]における各浸透圧に対する抗腫瘍効果。

[図9]Day 6[†]における各粘度に対する抗腫瘍効果。

[図10]各溶液に対する治療開始後Day 3[†]及びDay 6[†]でのマウス画像。

[図11]実験日における高周波超音波で得られた固有腋窩リンパ節のBモード画像。

[図12]Day 6[†]での腸骨下リンパ節及び固有腋窩リンパ節の病理像。

[図13]各溶液に対するマウスの体重変化。

[図14]グルコース体積パーセントと粘度との関係。

[図15]エピルピシン実験の概念図。

[図16]腫瘍細胞接種後16日目における病理像。

[図17]ニムスチン実験の概念図。

[図18]腫瘍細胞接種後16日目における病理像。

[図19]メトトレキサート実験の概念図。

[図20]腫瘍細胞接種後16日目における病理像。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明において、「リンパ行性薬剤送達法」とは、転移リンパ節の上流に位置するリンパ節に薬剤を投与し、リンパ管経由で当該薬剤を下流のリンパ節に送達させる方法である。

本発明において、「リンパ節内投与製剤」とは、リンパ行性薬剤送達法によって目的薬剤を標的リンパ節に送達するための、リンパ節内に投与される液体製剤である。

[0014] 本発明において、「薬剤」とは、疾病の治療又は予防的治療を目的として人を含む動物の体内に投与される各種物質を意味し、医薬活性物質（例えば、低分子化合物、特に低分子有機化合物；タンパク質又はポリペプチド（細胞増殖因子、細胞増殖抑制因子、神経栄養因子、酵素、ホルモン、サイトカイン等）；多糖類；脂質；抗体；核酸（DNA分子、RNA分子、アプタマー等）；ウイルス等）の他、遺伝子治療のための核酸分子を収容する構造体（ウイルス、ウイルス様粒子、ミニサークル、プラスミド又はベクター（ネイキッドDNA）、リポソーム及び／又はナノ粒子）、免疫療法、遺伝子治療又は再生医療において使用される各種培養細胞（例えば、多能性幹細胞（ES細胞、iPS細胞等）、組織幹細胞、間葉系幹細胞等）等が包含される。

なお、本明細書において、「治療」とは、疾病を有する対象の治療（即時治療）のことを指し、その状態、又はその状態によって生じる1つ若しくは複数の症状を、改善、軽減又は消失させることを意味する。「予防的治療」とは、疾病になるリスクはあるが、現時点ではその状態や症状を有しない対象の治療を意味する。

[0015] 上記医薬活性物質の種類は、特に限定されず、中枢神経用薬、末梢神経系用薬、感覚器官用薬、循環器官用薬、呼吸器官用薬、消化器官用薬、泌尿生殖器官用薬、ホルモン剤、腫瘍用薬、放射性医薬品等の何れでも良いが、腫瘍用薬（抗がん剤）が好適である。

[0016] また、上記医薬活性物質の製剤形態は、組成物の形態でもよく、高分子ポリマーミセル医薬品等のミセル製剤、リポゾーム製剤であってもよい。

[0017] 以下に、好適な薬剤の一例を示す。

(1) 分子標的薬（イブリツモマブチウキセタン、イマチニブ、エベロリムス、エルロチニブ、ゲフィチニブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、スニチニブ、セツキシマブ、ソラフェニブ、ダサチニブ、タミバロテン、トラスツズマブ、トレチノイン、パニツムマブ、ベバシズマブ、ボルテゾミブ、ラパチニブ、リツキシマブ）から選ばれる1種以上。

(2) アルキル化剤（イホスファミド、シクロホスファミド、ダカルバジン、テモゾロミド、ニムスチン、ブスルファン、メルファラン、ラニムスチン）から選ばれる1種以上。

(3) 代謝拮抗剤（エノシタビン、カペシタビン、カルモフル、クラドリピン、ゲムシタビン、シタラビン、シタラビンオクホスファート、テガフル、テガフル・ウラシル、テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム、ドキシフルリジン、ネララビン、ヒドロキシカルバミド、フルオロウラシル、フルダラビン、ペメトレキセド、ペントスタチン、メルカプトプリン、メトトレキサート）から選ばれる1種以上。

(4) 植物アルカロイド（イリノテカン、エトポシド、エリブリン、ソブゾキサソ、ドセタキセル、ノギテカン、パクリタキセル、パクリタキセル注射剤、ビノレルピン、ピンクリスチン、ビンデシン、ビンブラスチン）から選ばれる1種以上。

(5) 抗がん性抗生物質（アクチノマイシンD、アクラルピシン、アムルピシン、イダルピシン、エピルピシン、ジノスタチンスチマラマー、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、ピラルピシン、ブレオマイシン、ペプロマイシン、マイトマイシンC、ミトキサントロン）から選ばれる1種以上。

(6) プラチナ製剤（オキサリプラチン、カルボプラチン、シスプラチン、ネダプラチン）から選ばれる1種以上。

(7) ホルモン剤（アナストロゾール、エキセメスタン、エストラムスチン、エチニルエストラジオール、クロルマジノン、ゴセレリン、タモキシフェン、デキサメタゾン、トレミフェン、ピカルタミド、フルタミド、プレドニ

ゾン、ホスフェストロール、ミトタン、メチルテストステロン、メドロキシプロゲステロン、メピチオスタン、リュープロレリン、レトロゾール) から選ばれる1種以上。

(8) インターフェロン・ α 、インターフェロン・ β 、インターフェロン・ γ 、インターロイキン2、ウベニメクス、乾燥BCG、レンチナン) から選ばれる1種以上。

(9) 上記(1)～(8)のミセル製剤。

(10) 上記(1)～(8)のリポゾーム製剤。

(11) 免疫療法、遺伝子治療、再生医療などにおいて使用される各種細胞懸濁液。

[0018] 本発明のリンパ節内投与製剤は、リンパ節内に注射可能な剤型、すなわち注射用組成物であるのが好ましい。注射用組成物の形態は、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤、ゲル、或いは用事調製のための固体組成物の何れでも良い。

[0019] 本発明のリンパ節内投与製剤は、例えば注射用蒸留水、生理食塩水、リンゲル液、リン酸塩緩衝液(PBS)等の水性の希釈剤、又は例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油；エタノールなどのアルコール類、ポリソルベート20、60、80等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等の非水性の希釈剤を用いて、上記薬剤の溶液、懸濁液、乳濁液が調製されるが、その場合において、当該液体の浸透圧が700kPa～2700kPaであるように調製される。

[0020] リンパ節内投与製剤の浸透圧は、700～2700kPaの範囲で調整されるが、下流に位置するリンパ節への薬剤の送達率及び貯留性並びに組織障害性の点から、好ましくは700kPa以上、より好ましくは800kPa以上、より好ましくは900kPa以上、より好ましくは950kPa以上であり、より好ましくは1000kPa以上であり、且つ2700kPa以下、好ましくは2400kPa以下、より好ましくは2000kPa以下である。例えば、700～2700kPa、好ましくは900～2700kPa

a、より好ましくは900~2400kPa、より好ましくは950~2400kPa、より好ましくは950~2000kPaである。

[0021] 本発明において、浸透圧 Π は、 $\Pi = CRT$ で定められたファントホッフの式より算出される。なお、式中、Cはモル濃度(mol/L)、Rは気体定数($R = 8.31 \times 10^3 \text{ Pa} \cdot \text{L} / \text{K} \cdot \text{mol}$)、Tは絶対温度(K)をそれぞれ示す。

例えば、後述の表1に示す溶液の浸透圧 Π (Pa)は、(ポリソルベート80のモル濃度+エタノールのモル濃度) $\times 8.31 \times 10^3 \times (273 + \text{摂氏温度})$ で求められる。

[0022] 併せて、本発明のリンパ節内投与製剤は、薬剤効果及び製剤上の取り扱いの点から、その粘度が、25mPa·s以下であるのが好ましく、より好ましくは20mPa·s以下、より好ましくは15mPa·s以下、より好ましくは13mPa·s以下であり、且つ好ましくは0.5mPa·s以上、より好ましくは1mPa·s以上である。

例えば、0.5~25mPa·s、好ましくは1.0~15mPa·s、より好ましくは1.0~13mPa·sである。

粘度は後述の実施例で示すように、20℃において振動粘度計(例えば、音叉振動式粘度計<SV-1A、エー・アンド・デイ株式会社製>)を使用して測定することが可能である。

[0023] 浸透圧の調整は、グルコース、マンニトール、ソルビトール、ショ糖、トレハロース、ラフィノース、マルトース等の糖類や、塩化ナトリウム、塩化カリウム等の塩類、糖アルコール若しくは多価アルコール又はそのエーテル、非イオン性界面活性剤等を用いて行うことができる。また、粘度の調整は、一般に注射製剤において、増粘剤として用いられる各種の親水性ポリマーを用いて行うことができる。具体的には、例えば、セルロース、アミロース、ペクチン、ゼラチン、デキストリン、アルギン酸塩等の直鎖状の多糖類；セルロース誘導体(メチルセルロース(MC)、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)及びヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)等の

ヒドロキシアルキルセルロース、カルボキシアルキルセルロース、並びにカルボキシメチルセルロース（CMC）を含むこれらの塩等）；グリコサミノグリカン（ヒアルロン酸及びその塩等の非硫酸化グリコサミノグリカン、脱硫酸化ヘパリン、脱硫酸化コンドロイチン硫酸、及び脱硫酸化デルマタン硫酸等）；ガラクトマンナン（グアーガム、フェヌグreekガム、タラガム、ローカストビーンガム、及びイナゴマメガム等）；カルボマー；ポリアクリル酸；ポリカルボフィル；ポリビニルピロリドン；ポリアクリルアミド；ポリビニルアルコール；ポリ酢酸ビニルの誘導体及び混合物が挙げられる。

[0024] このうち、浸透圧及び粘度を共に調整可能な非イオン性賦形剤を用いるのが好ましく、例えば、グルコース、マンニトール、ソルビトール、ショ糖、トレハロース、ラフィノース、マルトース等の糖類、非イオン性界面活性剤が好ましく、非イオン性界面活性剤がより好ましい。非イオン性界面活性剤としては、高級アルコールエチレンオキシド付加物、アルキルフェノールエチレンオキシド付加物、脂肪酸エチレンオキシド付加物、多価アルコール脂肪酸エステルエチレンオキシド付加物、高級アルキルアミンエチレンオキシド付加物、脂肪酸アミドエチレンオキシド付加物、油脂のエチレンオキシド付加物、グリセリン脂肪酸エステル、ペンタエリスリトールの脂肪酸エステル、多価アルコールのアルキルエーテル、アルカノールアミン類の脂肪酸アミドなどが挙げられるが、中でも、例えば、ソルビトール及びソルビタンの脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンヒマシ油（polyethoxylated castor oil）、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（polyethoxylated hydrogenated castor oil）、ポリオキシエチレンポリプロピレングリコール共重合体、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステルなどが好ましく用いられる。

[0025] ソルビタン脂肪酸エステルとしては、特に、モノステアリン酸ソルビタン、セスキオレイン酸ソルビタン、トリオレイン酸ソルビタンなどが好適である。ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルとしては、特に、モノラ

ウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン（ポリソルベート20、Tween 20）、モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン（ポリソルベート60、Tween 60）、トリステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン（ポリソルベート65、Tween 65）、オレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン（ポリソルベート80、Tween 80）などが好適である。ポリエチレングリコール脂肪酸エステルとしては、特に、モノラウリン酸ポリエチレングリコール（10E, 0.）などが好適である。シヨ糖脂肪酸エステルとしては、特に、シヨ糖パルミチン酸エステル類）、シヨ糖ステアリン酸エステル類などが好適である。ポリオキシエチレンヒマシ油（polyethoxylated castor oil）としては、特に、ポリオキシエチレングリセロールトリリシノレート35などが好適である。ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（polyethoxylated hydrogenated castor oil）としては、特に、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油50、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60などが好適である。ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール共重合体としては、特に、ポリオキシエチレン(160)ポリオキシプロピレン(30)グリコールなどが好適である。グリセリン脂肪酸エステルとしては、モノステアリン酸グリセリルなどが好適である。ポリグリセリン脂肪酸エステルとしては、特に、テトラグリセリンモノステアリン酸、デカグリセリンモノラウリン酸などが好適である。

[0026] 非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルがより好ましく、ポリソルベート20、ポリソルベート60、ポリソルベート65又はポリソルベート80が好ましく、ポリソルベート80（オレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン）がより好ましい。

浸透圧の調製に、非イオン性賦形剤を用いた場合の、製剤中の非イオン性界面活性剤の体積パーセントは、例えば0～25%（v/v）であるのが好ましく、より好ましくは8～25%（v/v）であり、より好ましくは10～23%（v/v）であり、さらに好ましくは15～20%（v/v）である。

- [0027] 本発明のリンパ節内投与製剤は、上記の薬剤と浸透圧調製剤に、本発明の効果を阻害しない範囲で、適宜、界面活性剤、保存剤（安定化剤）、無痛化剤、局所麻酔剤及びpH調整剤、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解補助剤のような補助剤（賦形剤）を配合し、公知の注射剤と同様に常法に従い調製することができる。
- [0028] 保存剤としては例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン等のアルキルパラベン等が挙げられ、無痛化剤としては例えば、ベンジルアルコール等が挙げられ、局所麻酔剤としては例えば、塩酸キシロカイン、クロロブタノール等が挙げられ、pH調整剤としては例えば、塩酸、酢酸、水酸化ナトリウムあるいは各種緩衝剤等が挙げられる。
- [0029] また、界面活性剤、分散剤、乳化剤としては、上述した非イオン性界面活性剤やポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム等が挙げられる。
- [0030] また、可溶化剤としては、例えばサリチル酸ナトリウム、ポロキサマー、酢酸ナトリウム等が挙げられ、防腐剤としては、例えばメチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール、クロロブタノール、安息香酸ナトリウム、フェノール等が挙げられ、安定剤としては、例えばヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン等のアルブミンが挙げられる。
- [0031] 斯くして調製された本発明のリンパ節内投与製剤は、患者のリンパ節内に局所投与される。ここで、投与対象となるリンパ節は、治療又は予防的治療を目的とするリンパ節（標的リンパ節）自体であってもよく、又は当該リンパ節が属するリンパ管ネットワーク上流に位置するリンパ節であってもよい。具体的には、例えば、腫瘍細胞が原発巣から移動して最初に転移を発症するセンチネルリンパ節や、センチネルリンパ節の下流に位置するリンパ節（二次リンパ節）、原発巣周囲の所属リンパ節の上流に位置するリンパ節、所属リンパ節が属するリンパ管ネットワークの上流に位置するリンパ節等が挙げられる。ここで、標的リンパ節は、がんを有しているか否かは問われない。例えば、リンパ節郭清する前に、郭清域内のリンパ節（上流側リンパ節）にリ

リンパ節内投与製剤を投与し、リンパ管ネットワークを介して郭清域外のリンパ節（下流側リンパ節）に抗がん剤を送達させて、郭清を実施することにより、下流側リンパ節の予防的治療が可能である。

[0032] 本発明のリンパ節内投与製剤のリンパ節への投与は、リンパ節内に本発明のリンパ節内投与製剤が注入できればその手法は限定されず、患者の皮膚を切開して露わになったリンパ節に注入投与してもよいし、患者の皮膚の上からリンパ節の位置として見当をつけた部位に注射投与してもよい。

実施例

[0033] 以下、本発明を実施例に基づきさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0034] 参考例1 インドシアニングリーン（ICG）を含む溶液の粘性の測定

1. 材料・方法

1) 溶液の準備

ポリソルベート80（polysorbate 80、日油株式会社）、蒸留水、インドシアニングリーン溶液（Indocyanine Green：ICG、第一三共株式会社）を混合し、粘度の異なる組成の溶液を調製した（表1）。

表1の溶液の粘度は音叉振動式粘度計（SV-1A：粘度測定域：0.3～10、000 mPa・s、SV-1H：粘度測定域：0.3～1000 mPa・s、エー・アンド・デイ株式会社）で、室温下（20℃）で測定した。

表1中、血液の浸透圧に対する比とは、 $1 \text{ mOsm/Kg} = 2269.68 \text{ Pa}$ の関係から各溶液の浸透圧 [kPa] を mOsm/Kg に単位換算し、これを血液の浸透圧 290 mOsm/Kg で除した値である。

[0035] 2. 結果

1) ポリソルベート80体積パーセントと粘度との関係

図2にポリソルベート80体積パーセントと粘度との関係を示す。ポリソルベート80含有率が高くなるほど、粘度が指数関数的に増加する傾向にあ

った。

ポリソルベート80体積パーセント（ x ）、粘度（ y ）とすると、以下の関係式（式1）を得た。

[0036] [数1]

$$y = 0.5088e^{0.1873x}$$

[0037] 表1中における浸透圧は、以下の浸透圧は以下のファンツホッフの式（式2）より求めた。

[0038] [数2]

$$\Pi = CRT$$

Π : 浸透圧[Pa]

$$C = \frac{n}{V}$$

C : モル濃度[mol/L]

n : 溶液の全モル数[mol]

V : 溶液の体積[L]

R : 気体定数(8.31×10^3)[Pa · L/(K · mol)]

T : 絶対温度[K]

[0039] [表1]

	SolutionA	SolutionB	SolutionC	SolutionD
ポリソルベート80 (μ L)	0	167	333	500
蒸留水 (μ L)	600	400	200	0
ICG 希釈標準液 (μ L)	400	400	400	400
100% エタノール (μ L)	0	33	67	100
全容量 (μ L)	1000	1000	1000	1000
ポリソルベート80の体積パーセント[v/v]	0.00	16.67	33.33	50.00
粘度(mPa·s)	1.01	6.01	427	8020
浸透圧 Π [kPa]	0	1740	3481	5221
血液の浸透圧に対する比	0.0	2.6	5.3	7.9

[0040] 実施例1 溶液の浸透圧を変えた場合のリンパ行性薬剤送達による薬剤動態

1. 材料・方法

1) 溶液の調整

表1で示した4つの溶液（Solution A, B, C, D）を準備した。各溶液の浸透圧及び粘度は、以下のとおりである。

Solution A : 浸透圧 = 0 kPa、粘度 = 1.01 mPa · s)

Solution B : 浸透圧 = 1740 kPa、粘度 = 6.01 mPa · s)

Solution C : 浸透圧 = 3481 kPa、粘度 = 427 mPa · s)

Solution D : 浸透圧 = 5221 kPa、粘度 = 8020 mPa · s)

[0041] 2) 溶液の浸透圧の変化にともなうリンパ行性薬剤送達法で送達される溶液の可視化

溶液を腸骨下リンパ節(SiLN)に投与速度 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で $200 \mu\text{L}$ 注射し、リンパ管経由で固有腋窩リンパ節(PALN)への送達性と貯留性を生物発光イメージングシステム(IVIS, PerkinElmer社製)の蛍光モードで観察した(Excitation filter: 745 nm, Emission filter: ICG)。

観察日は、インドシアニンググリーン溶液を腸骨下リンパ節に注射する直前、直後、6時間後、1日後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後、7日後、14日後、21日後、28日後、35日後、42日後、49日後とした。

[0042] 3) 腸骨下リンパ節および固有腋窩リンパ節に貯留する溶液の貯留特性

前述の2)の測定日に得られた腸骨下リンパ節および固有腋窩リンパ節の蛍光値と測定時間との関係をプロットした。

[0043] 4) リンパ行性薬剤送達法によるインドシアニンググリーン溶液注入にともなう体重変化

体重測定日は、インドシアニンググリーン溶液を腸骨下リンパ節に注射する直前、1日後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後、7日後、14日後、21日後、28日後、35日後とした。各回の体重測定値は平均値±標準誤差(mean±SE)として表記した。

[0044] 2. 実験結果

1) リンパ行性薬剤送達法による腸骨下リンパ節から固有腋窩リンパ節への溶液の動態

図3にリンパ行性薬剤送達法による腸骨下リンパ節から固有腋窩リンパ節への溶液の動態を示す。

投与直後において、すべての溶液において、腸骨下リンパ節から固有腋窩リンパ節への流れが確認された(0hr)。

注射後1日目で、固有腋窩リンパ節への貯留効果はSolution B、C、Dで確認されたが(○で囲まれた箇所)、Solution Aでは確認されなかった。

注射後7日目で、腸骨下リンパ節にSolution B、C、Dの貯留が確認されたが(○で囲まれた箇所)、Solution Aは確認されなかった。

注射後14日目で、腸骨下リンパ節にSolution C、Dの貯留が確認されたが(○で囲まれた箇所)、Solution A及びBでは確認されなかった。

注射後21日目で、腸骨下リンパ節にSolution Dの貯留が確認されたが(○で囲まれた箇所)、Solution A、B、Cは確認されなかった。

Solution Dでは、Solution Dを、注射容器に入れ、注射針から押し出すには相当の力が必要であり、実用に適した溶液ではなかった。

Solution C及びDでは腸骨下リンパ節に浮腫が確認された(矢印部分)。

[0045] 2) 腸骨下リンパ節および固有腋窩リンパ節に貯留する溶液の貯留特性

図4に図3で得られた腸骨下リンパ節および固有腋窩リンパ節に貯留する各溶液の貯留特性を示す。投与直後では、固有腋窩リンパ節ではsolution Bの貯留性が高く、腸骨下リンパ節ではsolution Dの貯留性が高くなることが確認された。

[0046] 3) 各溶液に対する体重変化

図5に各溶液に対するマウスの体重変化を示す。エラーバーは平均±標準誤差として表記されている。Solution A、B、C、Dを腸骨下リンパ節に注射しても、副作用としての顕著な体重減少は確認されなかった。

[0047] 4) 浸透圧及び粘度の適正域

以上から、浸透圧、粘度の適正な範囲は、浸透圧上限値は3481 kPa以下、粘度上限値は427 mPa·s以下であると判断できる。

[0048] 実施例2 浸透圧の変化に対する病理解析

1. 材料・方法

1) 溶液の調整

表2に示された溶液、Π758、Π408、Π515、Π556、Π2610、Π2773を使用した。Π758の粘度に関しては、生理食塩水の粘度が水と同等と判断し参考文献（理科年表、国立天文台編、1997、丸善株式会社）から得た。溶液Π758、Π408、Π515、Π556、Π2610、Π2773の粘度に関しては、音叉振動式粘度計（SV-1A：粘度測定域：0.3~10、000 mPa·s、SV-1H：粘度測定域：0.3~1000 mPa·s、エー・アンド・デイ株式会社）で、室温下（20℃）で測定した。

浸透圧は前記と同様に前記（式2）より求めた。

表2中、血液の浸透圧に対する比とは、 $1 \text{ mOsm/Kg} = 2269.68 \text{ Pa}$ の関係から、各溶液の浸透圧 [kPa] を mOsm/Kg に単位換算し、これを血液の浸透圧 290 mOsm/Kg で除した値である。

[0049]

[表2]

溶液	Π758	Π408	Π515	Π556	Π2610	Π2773
ポリソルベート80 (μL)	0	10	20	24	220	239
100% エタノール (μL)	0	2	4	4.8	44	48
蒸留水 (μL)	0	588	576	571.2	336	314
生理食塩水 (μL)	1000	400	400	400	400	400
Total (μL)	1000	1000	1000	1000	1000	1001
ポリソルベート80 [%]	0.0	1.0	2.0	2.4	22.0	23.9
粘度 (mPa・s)	1.04	1.0	0.93	1.05	13.9	18.9
浸透圧 [kPa]	758	408	515	556	2610	2773
血液の浸透圧に対する比	1.2	0.6	0.8	0.8	4.0	4.2

[0050] 2) マウス

マウスとしては図1に示すMXH10/Mo-Ipr/Iprマウス(14-18週齢)(前記非特許文献1)を使用した。

[0051] 3) 溶液の注射

溶液を腸骨下リンパ節(SiLN)に投与速度10μL/minで200μL注射し、リンパ管経由で固有腋窩リンパ節(PALN)に送達させた。注射日をday0とした。

[0052] 4) 病理解析

注射日から6日目(Day6)に腸骨下リンパ節と固有腋窩リンパ節を摘出し取り出し、10%ホルマリン溶液に浸漬して4日間放置したのちパラフィンで包埋し、ブロックを作製した。パラフィンブロックはマイクローム(REM-700, Yamato Kohki, Saitama, Japan)を使用し厚さ3μmに薄切し、スライドガラス(Superfrost, Matsunami, Osaka, Japan)に貼付した。その後、パラフィン伸展器(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)上に一晩置き、十分伸展させた。作製した切片は、HE全自動染色システム(Ventana Symphony, Ve

ntana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA) を用いてヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色をおこなった。

観察には光学顕微鏡 (B X 5 1, オリンパス社製) を用いて明視野観察法で観察した。

[0053] 2. 結果

1) 病理解析

図6に注射日から6日目 (D a y 6) での腸骨下リンパ節及び固有腋窩リンパ節の病理像を示す。溶液はΠ756、Π408、Π515、Π556、Π2610およびΠ2773である。倍率は2倍および10倍である。2倍画像上で□で囲んだ部位を拡大したものが10倍像である。画像においてTは腫瘍領域、Nは壊死領域を示す。

(A) Π758

S i L N

リンパ節に特記すべき病的変化は認められなかった。

P A L N

リンパ節に特記すべき病的変化は認められなかった。

(B) Π408

S i L N

リンパ節髓洞に軽度の拡張がみられ、リンパ節髓質に軽度の浮腫を認めるが、リンパ節に明らかな器質的变化が認められなかった。

P A L N

リンパ節全体のリンパ節髓洞に拡張がみられ、リンパ節外に浮腫を認められた。しかし、壊死巣や線維化は観られず可逆的变化と思われる。

(C) Π515

S i L N

リンパ節髓洞に軽度の拡張がみられ、リンパ節髓質に軽度の浮腫を認められたが、リンパ節に明らかな器質的变化が認められなかった。

P A L N

リンパ節髄洞に軽度の拡張がみられ、リンパ節髄質に軽度の浮腫を認められたが、リンパ節に明らかな器質的变化が認められなかった。

(D) Π 5 5 6

S i L N

リンパ節髄洞に軽度の拡張がみられ、リンパ節髄質に浮腫を認めるが、リンパ節に明らかな器質的变化が認められない。

P A L N

リンパ節全体のリンパ節髄洞に拡張がみられ、リンパ節外に浮腫を認められた。しかし、壊死巣や線維化は観られず可逆的变化と思われる。

(E) Π 2 6 1 0

S i L N

リンパ節髄洞に軽度の拡張がみられた。

P A L N

リンパ節全体のリンパ節髄洞に拡張がみられ、リンパ節外に浮腫を認められた。しかし、壊死巣や線維化は観られず可逆的变化と思われる。

(F) Π 2 7 7 3

S i L N

リンパ節の大部分に及ぶ広範な壊死を認め、輸出リンパ管基部も壊死に陥っていたことから、輸出リンパ管を介した薬剤送達は困難な所見を呈している。

P A L N

リンパ節髄洞に軽度の拡張がみられ、リンパ節髄質に軽度の浮腫を認められたが、リンパ節に明らかな器質的变化が認められなかった。

[0054] 以上の結果から、浸透圧 2 7 7 3 k P a、粘度 1 8. 9 m P · s の溶液は、下流リンパ節への薬剤送達を達成できず、リンパ行性薬剤送達の製剤としては適さないと考えられる。

[0055] 実施例 3 シスプラチンを含む溶液を用いた浸透圧域の検討

1. 材料・方法

1) 溶液の調製

表3にシスプラチンを含む溶液の組成を示す。

溶液はsolution I、solution I'、solution II、solution II'、solution III、solution III'、solution IV、solution IV'、solution Vである。シスプラチンのworking solutionはsalineで準備する。マウスにはマウス体重あたり、5mg/kgを投与するように調整した。

[0056] 表3に示された粘度は前記(式1)から算出した。

表3に示された浸透圧は前記(式2)より求めた。

表3中、血液の浸透圧に対する比とは、 $1\text{ mOsm/Kg} = 2269.68\text{ Pa}$ の関係から、各溶液の浸透圧[kPa]を mOsm/Kg に単位換算し、これを血液の浸透圧 290 mOsm/Kg で除した値である。

[0057] [表3]

	Solution I	Solution I'	Solution II	Solution II'	Solution III	Solution III'	Solution IV	Solution IV'	Solution V
ポリソルベート80 (μL)	0	42	83	125	167	208	250	292	333
100% エタノール(μL)	0	8	17	25	33	42	50	58	67
蒸留水(μL)	600	550	500	450	400	350	300	250	200
500 μg/mL ICG (μL)	200	200	200	200	200	200	200	200	200
5 mg/kg CDDP 溶液 (μL)	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Total (μL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
ポリソルベート80の体積パーセント [v/v]	0.0	4.2	8.3	12.5	16.7	20.8	25.0	29.2	33.3
粘度 (mPa·s)	0.5	1.1	2.4	5.3	11.5	25.2	55.0	120.0	261.8
浸透圧 Π (kPa)	152	588	1024	1459	1897	2331	2768	3200	3641
血液の浸透圧に対する倍率	0.2	0.9	1.6	2.2	2.9	3.5	4.2	4.9	5.5

[0058] 2) 腫瘍細胞

ルシフェラーゼ遺伝子を発現するKM-Luc/GFP悪性線維性組織球腫瘍細胞を使用した (Li L, Mori S, Sakamoto M, Takahashi S, Kodama T. Mouse model of lymph node metastasis via afferent lymphatic vessels f

or development of imaging modalities. PLoS One 2013; 8:e55797)。細胞の培養には、培地として10%ウシ胎児血清 (FBS; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)、1%L-グルタミン-ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich)、及び0.5%G418 (Sigma-Aldrich)を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich)を用いた。培養条件は、37℃、5%CO₂とした。

[0059] 3) 細胞接種

固有腋窩リンパ節に細胞溶液 (4×10^5 cells/mL) を40 μ L接種した。この日をday-3^Tとした。

[0060] 4) 薬剤投与

細胞接種後3日目に、腸骨下リンパ節にシスプラチン溶液を速度10 μ L/minで200 μ L投与し固有腋窩リンパ節に送達させた。

[0061] 5) 生物発光イメージングシステムを用いた腫瘍の成長の確認

固有腋窩リンパ節内の腫瘍成長を評価するために、生物発光イメージングシステム (IVIS, PerkinElmer社製) を使用した。麻酔下において、15 mg/mLに濃度調整したルシフェリンをマウスの体重に合わせて10 μ L/gをマウスの腹腔内に注射した。ルシフェリン投与10分後に、IVISを用いて生物発光強度を測定した。測定データは、専用の解析ソフトを使用して固有腋窩リンパ節における単位時間当たりの発光量を算出した。治療開始日 (day 0^T)、治療開始後3日目 (day 3^T)、治療開始後6日目 (day 6^T) に1回、生物発光強度の測定を行った。

[0062] 6) 固有腋窩リンパ節の超音波診断

小動物用高周波超音波診断装置 (中心周波数25 MHz、空間分解能70 μ m、方位分解能140 mm、VEVO770, VisualSonics社) 下で、固有腋窩リンパ節のBモード像を得る。腫瘍接種日 (day-3^T)、治療開始日 (day 0^T)、治療開始後3日目 (day 3^T)、治療開始

後6日目 (day 6^T) に、計測した。

[0063] 7) リンパ節体積測定

腫瘍接種日 (day - 3^T)、治療開始日 (day 0^T)、治療開始後3日目 (day 3^T)、治療開始後6日目 (day 6^T) に、マウスの体重を測定した。

8) 病理解析

治療開始後6日目 (day 6^T) に腸骨下リンパ節及び固有腋窩リンパ節を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン染色により、病理像を解析した。

[0064] 2. 実験結果

1) 溶液の動態

図7Aにsolution I、solution I'、solution II、solution II'、solution III、solution III'、solution IV、solution Vのday 0^Tにおける腸骨下リンパ節 (SiLN) から内側腋窩リンパ節 (PALN) に流れ出る溶液の動態のin vivoイメージング画像を示す。

図7Bにday 6^Tにおける抗腫瘍効果として、in vivoイメージング画像を示す。血液の浸透圧に対する比とは、 $1\text{mOsm/Kg} = 2269.68\text{Pa}$ の関係から、各溶液の浸透圧 [kPa] をmOsm/Kgに単位換算し、これを血液の浸透圧 290mOsm/kg で除した値である。

[0065] 2) 浸透圧対する抗腫瘍効果

図8にday 6^Tにおける各浸透圧に対する抗腫瘍効果を示す。縦軸は無次元化されたルシフェラーゼ活性値を示す。luciferase activity (day 6^T) / luciferase activity (day 0^T) という無次元量を導入した。結果、luciferase activity を指標とした抗腫瘍効果の評価では、浸透圧 $\Pi = 3200\text{kPa}$ まで固有腋窩リンパ節に対する抗腫瘍効果が確認された。

[0066] 3) 粘度に対する抗腫瘍効果

図9にday 6^Tにおける各粘度に対する抗腫瘍効果を示す。

結果、Luciferase activityを指標とした抗腫瘍効果の評価では、粘度 $\mu = 120 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ までは、固有腋窩リンパ節に対する抗腫瘍効果が確認できた。

[0067] 4) マクロ視野における浸透圧および粘度に対する浮腫の評価

図10に、各溶液に対する治療開始後Day 3^T及びDay 6^Tでのマウス画像を示す。Day 3^Tにおいて、溶液IV（浸透圧 $\Pi = 2768 \text{ kPa}$ 、粘度 $\mu = 55 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ ）及びV（浸透圧 $\Pi = 3641 \text{ kPa}$ 、粘度 $\mu = 261.5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ ）で浮腫が確認された。

[0068] 5) 高周波超音波イメージング法による浮腫の評価

図11に、実験日における高周波超音波で得られた固有腋窩リンパ節のBモード画像を示す。Day 6^Tにおいて、溶液IV（浸透圧 $\Pi = 2768 \text{ kPa}$ 、粘度 $\mu = 55.0 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ ）及びV（浸透圧 $\Pi = 3641 \text{ kPa}$ 、粘度 $\mu = 261.8 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ ）で浮腫が確認された。

[0069] 6) 病理解析

図12にsolution I、solution I'、solution II、solution II'、solution III、solution III'、solution IV、solution IV'、およびSolution Vにおけるday 6^Tでの腸骨下リンパ節および固有腋窩リンパ節の病理像を示す。倍率は2倍および10倍である。2倍画像上で□で囲んだ部位を拡大したものが10倍像である。画像においてTは腫瘍領域、Nは壊死領域、Eは浮腫領域を示す。

(A) solution I

SiLN

既存のリンパ節の大部分が壊死に陥り、壊死の範囲は周囲組織にも及んでいる。抗がん剤の周囲組織への拡散が示唆される。輸出リンパ管からのPALNへの薬剤送達が始り期待できない所見である。

PALN

リンパ節辺縁洞の場所により、腫瘍組織が壊死に陥った領域も認められる

が、殆ど腫瘍増殖が抑制されていない領域も認められる。リンパ節実質の構造は保たれている。リンパ節辺縁洞の一部に抗がん剤が流入したものの、全域には到達しなかったものと思われる。

(B) solution 1'

SiLN

リンパ節中央に抗がん剤の注入によると思われる広範な壊死巣の形成が認められ、リンパ節辺縁洞にも及んでいる。輸出リンパ管からのPALNへの薬剤送達に殆ど期待できない所見である。

PALN

リンパ節辺縁洞を起点として増殖したと思われる腫瘍の浸潤・増殖が認められる。薬剤送達に殆ど為されなかったと思われる。

(C) solution 11

SiLN

リンパ節中央に抗がん剤の注入によると思われる壊死巣の形成が認められたが、リンパ節辺縁洞の組織は保存されており、輸出リンパ管からのPALNへの薬剤送達に期待できる所見である。

PALN

リンパ節辺縁洞相当部に腫瘍細胞の増殖がみられたが、腫瘍組織の広範な壊死を伴っていた。SiLNからのリンパ行性の薬剤送達に期待できる所見である。

(D) solution 11'

SiLN

リンパ節門部相当部に浮腫と限局した壊死を認められたものの、リンパ節の構造は保存されており、輸出リンパ管からのPALNへの薬剤送達に期待できる所見である。

PALN

リンパ節辺縁洞およびリンパ節実質相当部に腫瘍細胞の増殖がみられたが、腫瘍組織の広範な壊死もみられた。SiLNからのリンパ行性の薬剤送達

の効果と考えられる。

(E) solution III

SiLN

リンパ節の一部に限局した壊死病巣を認められたもののリンパ節の構造は保存されており、輸出リンパ管からのPALNへの薬剤送達が可能である所見である。

PALN

リンパ節辺縁洞およびリンパ節実質相当部に腫瘍細胞が増殖し、壊死したことを示す広範な壊死病巣を認められた。腫瘍細胞の残存はみられなかった。SiLNからのリンパ行性の薬剤送達による著明な抗腫瘍効果と考えられる。

(F) solution III'

SiLN

リンパ節に壊死組織がみられ、辺縁洞も一部壊死に陥っていた。

PALN

リンパ節辺縁洞およびリンパ節実質に腫瘍細胞の増殖が認められ、一部腫瘍組織が壊死に陥っていた。限局的ではあるが、SiLNからのリンパ行性の薬剤送達による抗腫瘍効果が認められた。リンパ行性薬剤送達を期待できる結果であるため、投与するシスプラチン濃度を高めることなどで、所望の抗腫瘍効果が得られると考えられる。

(G) solution IV

SiLN

既存のリンパ節に広範な壊死像を認め、周囲組織には著明な浮腫を認める。輸出リンパ管からのPALNへの薬剤送達が可能でない所見である。

PALN

リンパ節辺縁洞を起点として増殖したと思われる壊死を伴った腫瘍がみられる。十分な抗がん剤の薬剤送達が行われなかったものと思われる。

(H) solution IV'

S i L N

リンパ節門部相当部に壊死組織がみられ、また、周囲組織に浮腫を伴っており、輸出リンパ管からのPALNへの十分な薬剤送達期待できない所見である。

P A L N

リンパ節の広範な領域が腫瘍に置換されており、抗がん剤の薬剤送達が殆ど為されなかったものと思われる。

(I) s o l u t i o n V

S i L N

リンパ節門部の領域が広範な壊死に陥っており、また、周囲組織には著明な浮腫を伴っており、輸出リンパ管からのPALNへの薬剤送達が殆ど期待できない所見である。

P A L N

既存のリンパ節全ての領域が腫瘍に置換された状態である。抗がん剤は殆ど送達されなかったと思われる。

以上から、CDDPを含む溶液を使用した場合のリンパ行性薬剤送達法に、より有効な溶液はsolution II~solution III'であった。当該病理像の結果から、リンパ行性薬剤送達の製剤として、浸透圧588kPa以下、又は、2768kPa以上は適さないと考えられる。

[0070] 7) 病理解析

図13に各溶液に対するマウスの体重変化を示す。すべての溶液(solution I、II、III、IV、V)において、明確な体重減少は確認されなかった。

[0071] 参考例2 グルコースを含む溶液の粘性の測定

1. 材料・方法

1) 溶液の準備

グルコース (Otsuka, 50% glucose) を希釈し、粘度の異なる溶液 (0.1 ~ 50 v/v% グルコース水溶液) を調製した (表4)。溶液の粘度は音叉振動

式粘度計（SV-1A：粘度測定域：0.3～10、000 mPa・s、SV-1H：粘度測定域：0.3～1000 mPa・s、エー・アンド・デイ株式会社）で、室温下（20℃）で測定した。

[0072] 1. 結果

図14はグルコース体積パーセントと粘度との関係である。グルコースの体積パーセントの増加とともに、粘度は指数関数的に増加する。

グルコース体積パーセント（x）、粘度（y）とすると、以下の関係式（式3）を得た。

[0073] [数3]

$$y = 0.898e^{0.0386x}$$

表4中における浸透圧は、ファントホッフの式前記（式2）より求めた。

血液の浸透圧に対する比とは、 $1 \text{ mOsm/Kg} = 2269.68 \text{ Pa}$ の関係から各溶液の浸透圧 [kPa] を mOsm/Kg に単位換算し、これを血液の浸透圧 290 mOsm/Kg で除した値である。

[0074] [表4]

50%グルコース(mL)	10	100	1000	2500	5000
グルコース%(v/v)	0.1	1	10	25	50
粘度 [mPa・s]	0.88	1.01	1.28	2.23	6.40
温度	22	22	22	22	22
浸透圧[kPa]	21	209	2093	5232	10465
血液の浸透圧に対する比	0.0	0.3	3.2	79	15.0

[0075] 実施例4 エピルピシンを含む溶液を用いた粘度域及び浸透圧域の検討

1. 材料・方法

1) 溶液の調製

表5にエピルピシンを含む溶液の組成を示す。

溶液は solution C、solution C'、solution D、solution Fである。

表5における粘度は前記（式3）から求めた。各溶液の粘度はほぼ1 mP

a × sであった。

表5中における浸透圧は、ファントホッフの式前記（式2）より求めた。

血液の浸透圧に対する比とは、 $1\text{ mOsm/Kg} = 2269.68\text{ Pa}$ の関係から各溶液の浸透圧 [kPa] を mOsm/Kg に単位換算し、これを血液の浸透圧 290 mOsm/Kg で除した値である。

[0076] [表5]

drug solution	SolutionC'	SolutionC	SolutionD	SolutionF
グルコース 50% (μL)	95.0	95.0	130.0	170.0
生理食塩水 (μL)	0.0	0.0	0.0	0.0
エピルピシン (μL) diluted with PBS	0	100	100	100
PBS	505	405	370	330
250 $\mu\text{g/mL}$ ICG (μL), diluted with PBS	400	400	400	400
Total (μL)	1000	1000	1000	1000

グルコース体積パーセント (v/v)	4.8	4.8	6.5	8.5
粘度 ($\text{mPa} \cdot \text{s}$)	1.08	1.08	1.15	1.25
温度	22	22	22	22
浸透圧 [kPa]	1600	1600	1943	2335
血液の浸透圧に対する比	2.4	2.4	3.0	3.5

[0077] 2) 腫瘍細胞

ルシフェラーゼ遺伝子を発現するFM3A-Lucマウス乳がん細胞を使用した (Shao L, Mori S, Yagishita Y, Okuno T, Hatakeyama Y, Sato T, Kodama T. Lymphatic mapping of mice with systemic lymphoproliferative disorder: Usefulness as an inter-lymph node metastasis model of cancer.

J Immunol Methods. 2013 Mar 29;389(1-2):69-78.)。細胞の培養には、培地として10%ウシ胎児血清 (FBS; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)、1%L-グルタミン-ペニシリン-

ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich)、及び0.5%G418 (Sigma-Aldrich)を含むRPMI-1640 medium (Biological Industries, Haemek, Israel)を用いた。培養条件は、37℃、5%CO₂とした。

[0078] 3) 細胞接種

腸骨下リンパ節 (SiLN) に細胞溶液 (3.3×10^5 cells/mL) を60 µL接種した。この日をday 0とした。実験の概要図を図15に示す。

[0079] 4) 溶液投与

細胞接種後7日目 (D7) に、腸骨下リンパ節にエピルビシン溶液をボーラス投与で200 µL投与し固有腋窩リンパ節 (PALN) に送達させた。薬剤濃度はマウスを34 gと仮定して、3 mg/kg/mouseとした。

[0080] 5) 病理解析

腫瘍移植後16日目 (D16) に腸骨下リンパ節及び固有腋窩リンパ節を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン染色により、病理像を解析した。

[0081] 2. 実験結果

1) ボーラス投与の場合

図16は腫瘍移植後16日目における病理像である。

(C) Solution C

SiLN (C-1, C-2)

リンパ節に腫瘍の浸潤・増殖は確認できない。投与薬剤による増殖抑制効果と考えられる。

PALN (C-3, C-4)

リンパ節内に腫瘍細胞は確認できない。投与薬剤による転移抑制効果と考えられる。

(D) Solution D

SiLN (D-1, D-2)

リンパ節辺縁洞を起点に浸潤・増殖したと思われる腫瘍細胞がわずかにみ

られるが、腫瘍組織の大部分は壊死組織に陥り、線維性組織に置換されている。投与薬剤による増殖抑制効果と考えられる。

PALN (D-3, D-4)

リンパ節内に腫瘍細胞は確認できない。投与薬剤による転移抑制効果と考えられる。

(F) Solution F

SILN (F-1, F-2)

リンパ節内に腫瘍細胞は確認できない。投与薬剤による増殖抑制効果と考えられる。

PALN (F-3, F-4)

リンパ節内に腫瘍細胞は確認できない。投与薬剤による転移抑制効果と考えられる。

(C') Solution C', Control

SILN (C'-1, C'-2)

リンパ節辺縁洞を起点に浸潤・増殖したと思われる腫瘍細胞が、著明な増殖傾向を示し、リンパ節周囲に腫瘍塊を形成している。

PALN (C'-3, C'-4)

リンパ節辺縁洞に腫瘍細胞の浸潤、増殖が認められ、転移病巣を形成している。

以上から、エピルピシンを含む溶液を使用した場合のリンパ行性薬剤送達法においても、浸透圧1600kPa~2335kPaの範囲で、本発明の効果が発揮され、良好な薬剤効果が得られることが示された。

[0082] 実施例5 ニムスチンを含む溶液を用いた浸透圧域の検討

1. 材料・方法

1) 溶液の調製

表6にニムスチンを含む溶液の組成を示す。

溶液はsolution C、およびsolution Dである。

表6中の粘度は前記(式3)から求めた。

粘度はほぼ $1 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ であった。

表6中における浸透圧は、ファントホッフの式前記（式2）より求めた。

血液の浸透圧に対する比とは、 $1 \text{ mOsm/Kg} = 2269.68 \text{ Pa}$ の関係から各溶液の浸透圧 [kPa] を mOsm/Kg に単位換算し、これを血液の浸透圧 290 mOsm/Kg で除した値である。

[0083] [表6]

drug solution	Solution C	Solution D
グルコース 50% (μL)	95.0	130.0
生理食塩水 (μL)	0.0	0.0
ニムスチン (μL) diluted with PBS	100	100
PBS	405	370
250 $\mu\text{g/mL}$ ICG (μL), diluted with PBS	400	400
Total (μL)	1000	1000

グルコース体積パーセント (v/v)	4.8	6.5
粘度 ($\text{mPa} \cdot \text{s}$)	1.08	1.15
浸透圧 [kPa]	1600	1943
血液の浸透圧に対する比	2.4	3.0

[0084] 2) 腫瘍細胞

ルシフェラーゼ遺伝子を発現するFM3A-Lucマウス乳がん細胞を使用した (Shao L, Mori S, Yagishita Y, Okuno T, Hatakeyama Y, Sato T, Kodama T. Lymphatic mapping of mice with systemic lymphoproliferative disorder: Usefulness as an inter-lymph node metastasis model of cancer.

J Immunol Methods. 2013 Mar 29;389(1-2):69-78.)。細胞の培養には、培地として10%ウシ胎児血清 (FBS; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)、1%L-グルタミン-ペニシリン

ーストレプトマイシン (Sigma-Aldrich)、及び0.5%G418 (Sigma-Aldrich)を含むRPMI-1640 medium (Biological Industries, Haemek, Israel)を用いた。培養条件は、37°C、5%CO₂とした。

[0085] 3) 細胞接種

腸骨下リンパ節に細胞溶液 ($3.3 \times 10^5 \text{ cells/mL}$) を60 μL 接種した。この日をday 0とした。図17はニムスチンの実験の概念図である。

[0086] 4) 溶液投与

細胞接種後7日目(D7)に、腸骨下リンパ節にニムスチン溶液をボラス投与で200 μL 投与し固有腋窩リンパ節に送達させた。薬剤濃度はマウスを34gと仮定して、5mg/kg/mouseとした。

[0087] 5) 病理解析

腫瘍移植後16日目(D16)に腸骨下リンパ節及び固有腋窩リンパ節を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン染色により、病理像を解析した。

[0088] 2. 実験結果

図18は腫瘍細胞接種後16日目における病理像(ボラス投与)の病理像である。

(C) Solution C

SiLN (I, J)

リンパ節内に腫瘍細胞は確認できない。投与薬剤による増殖抑制効果と考えられる。

PALN (K, L)

リンパ節内に腫瘍細胞は確認できない。投与薬剤による転移抑制効果と考えられる。

(D) Solution D

SiLN (M, N)

リンパ節内に腫瘍細胞は確認できない。投与薬剤による増殖抑制効果と考

えられる。

PALN (O, P)

リンパ節内に腫瘍細胞は確認できない。投与薬剤による転移抑制効果と考えられる。

以上から、ニムスチンを含む溶液を使用した場合のリンパ行性薬剤送達法においても、浸透圧 $1600 \text{ kPa} \sim 1943 \text{ kPa}$ の範囲で、本発明の効果が発揮され、良好な薬剤効果が得られることが示された。

[0089] 実施例6 メトトレキサートを含む溶液を用いた浸透圧域の検討

1. 材料・方法

1) 溶液の調製

表7にメトトレキサートを含む溶液の組成を示す。

溶液は solution B、solution C、および solution D である。

表7中の粘度は前記(式3)から求めた。

粘度はほぼ $1 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ であった。

表7中における浸透圧は、ファンツホッフの式前記(式2)より求めた。

血液の浸透圧に対する比とは、 $1 \text{ mOsm/Kg} = 2269.68 \text{ Pa}$ の関係から各溶液の浸透圧 $[\text{kPa}]$ を mOsm/Kg に単位換算し、これを血液の浸透圧 290 mOsm/Kg で除した値である。

[0090]

[表7]

drug solution	Solution B	Solution C	Solution D
グルコース 50% (μL)	55.0	95.0	130.0
生理食塩水 (μL)	0.0	0.0	0.0
メトトレキサート (μL) diluted with PBS	100	100	100
PBS	445	405	370
250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ICG (μL), diluted with PBS	400	400	400
Total (μL)	1000	1000	1000

グルコース体積パーセント (v/v)	2.8	4.8	6.5
粘度 ($\text{mPa} \cdot \text{s}$)	1.00	1.08	1.15
浸透圧 [kPa]	1208	1600	1943
血液の浸透圧に対する比	1.8	2.4	3.0

[0091] 2) 腫瘍細胞

ルシフェラーゼ遺伝子を発現するFM3A-Lucマウス乳がん細胞を使用した (Shao L, Mori S, Yagishita Y, Okuno T, Hatakeyama Y, Sato T, Kodama T. Lymphatic mapping of mice with systemic lymphoproliferative disorder: Usefulness as an inter-lymph node metastasis model of cancer.

J Immunol Methods. 2013 Mar 29;389(1-2):69-78.)。細胞の培養には、培地として10%ウシ胎児血清 (FBS; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)、1%L-グルタミン-ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich)、及び0.5%G418 (Sigma-Aldrich) を含むRPMI-1640 medium (Biological Industries, Haemek, Israel)を用いた。培養条件は、37°C、5%CO₂とした。

[0092] 3) 細胞接種

腸骨下リンパ節に細胞溶液 ($3.3 \times 10^5 \text{ cells}/\text{mL}$) を60 μL 接種した。この日をday 0とした。図19はメトトレキサート実験の概念

図である。

[0093] 4) 溶液投与

細胞接種後7日目(D7)に、腸骨下リンパ節にメトトレキサート溶液をボーラス投与で200 μ L投与し固有腋窩リンパ節に送達させた。薬剤濃度はマウスを34gと仮定して、5mg/kg/mouseとした。

[0094] 5) 病理解析

腫瘍移植後16日目(D16)に腸骨下リンパ節及び固有腋窩リンパ節を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン染色により、病理像を解析した。

[0095] 2. 実験結果

抗腫瘍効果の病理像を図20に示す。

(B) Solution B

SiLN (E, F)

リンパ節に明らかな腫瘍細胞の増殖は確認できない。投与薬剤による増殖抑制効果と考えられる。

PALN (G, H)

リンパ節に明らかな腫瘍細胞の増殖は確認できない。投与薬剤による転移抑制効果と考えられる。

(C) Solution C

SiLN (I, J)

リンパ節に明らかな腫瘍細胞の増殖は確認できない。投与薬剤による増殖抑制効果と考えられる。

PALN (K, L)

リンパ節に明らかな腫瘍細胞の増殖は確認できない。投与薬剤による転移抑制効果と考えられる。

(D) Solution D

SiLN (M, N)

リンパ節に明らかな腫瘍細胞の増殖は確認できない。投与薬剤による増殖抑制効果と考えられる。

PALN (O, P)

リンパ節に明らかな腫瘍細胞の増殖は確認できない。投与薬剤による転移抑制効果と考えられる。

- [0096] 以上から、メトトレキサートを含む溶液を使用した場合のリンパ行性薬剤送達法においても、浸透圧1208~1943 kPaの範囲で、本発明の効果が発揮され、良好な薬剤効果が得られることが示された。

産業上の利用可能性

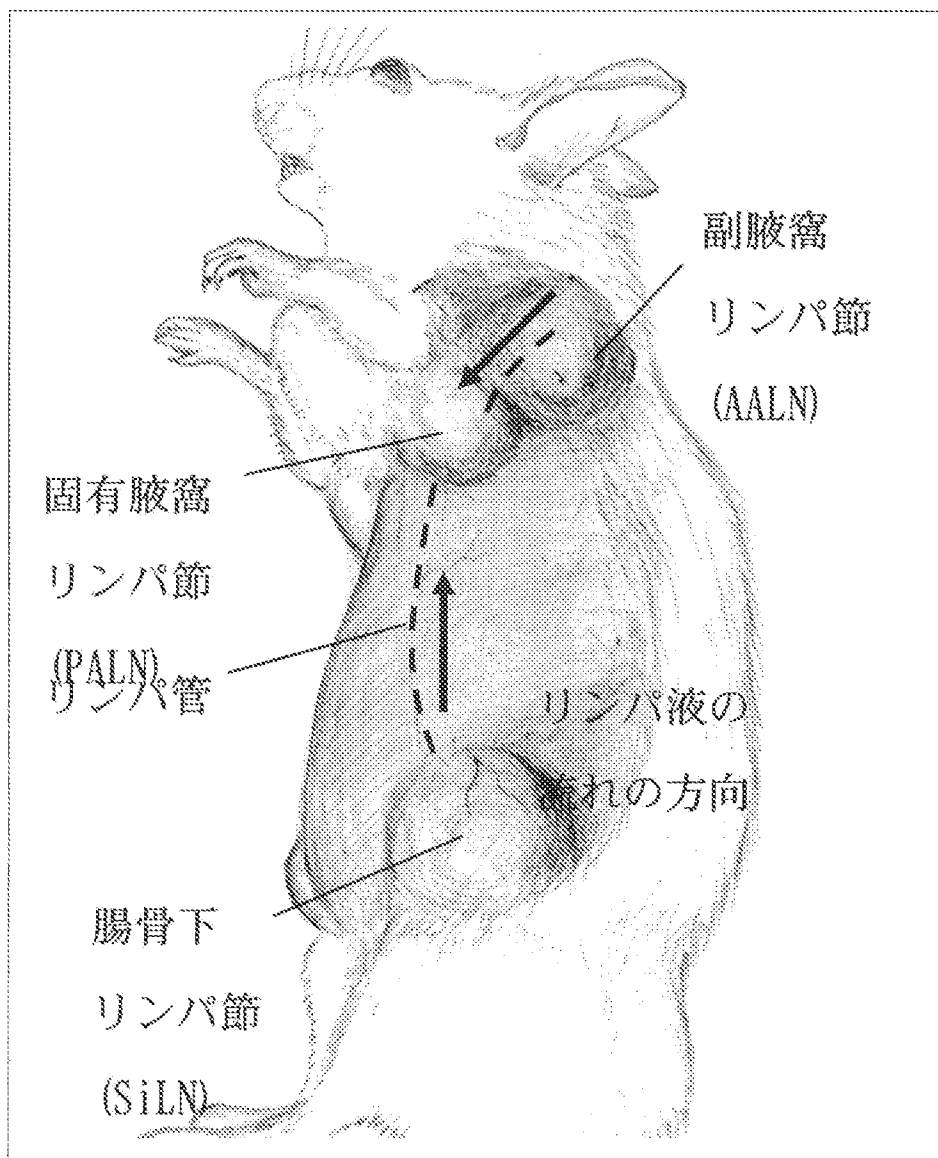
- [0097] 本発明のリンパ節内投与製剤によれば、リンパ節に薬剤を投与して、投与したリンパ節より下流のリンパ節に効率よく薬剤を流し込むことができる。例えば、薬剤が抗がん剤である場合、標的のリンパ節で抗がん作用を発揮するだけでなく、微小ながんが転移している可能性がある他のリンパ節にも抗がん剤を効率よく流し込むことができ、微小ながんを殺すことで、再発を防止することができる。

また、例えば、手術で郭清できない領域のリンパ節にがんがある場合、外科的手術での治癒は不可能であるが、本発明のリンパ節内投与製剤を用いることで、上流のリンパ節から抗がん剤を流して郭清できない領域のリンパ節の治療を行うことが可能である。さらに、本発明のリンパ節内投与製剤においては、使用する薬剤の量は、従来の全身投与に用いる量よりも少ないため、副作用も少なく、安全性が高い。

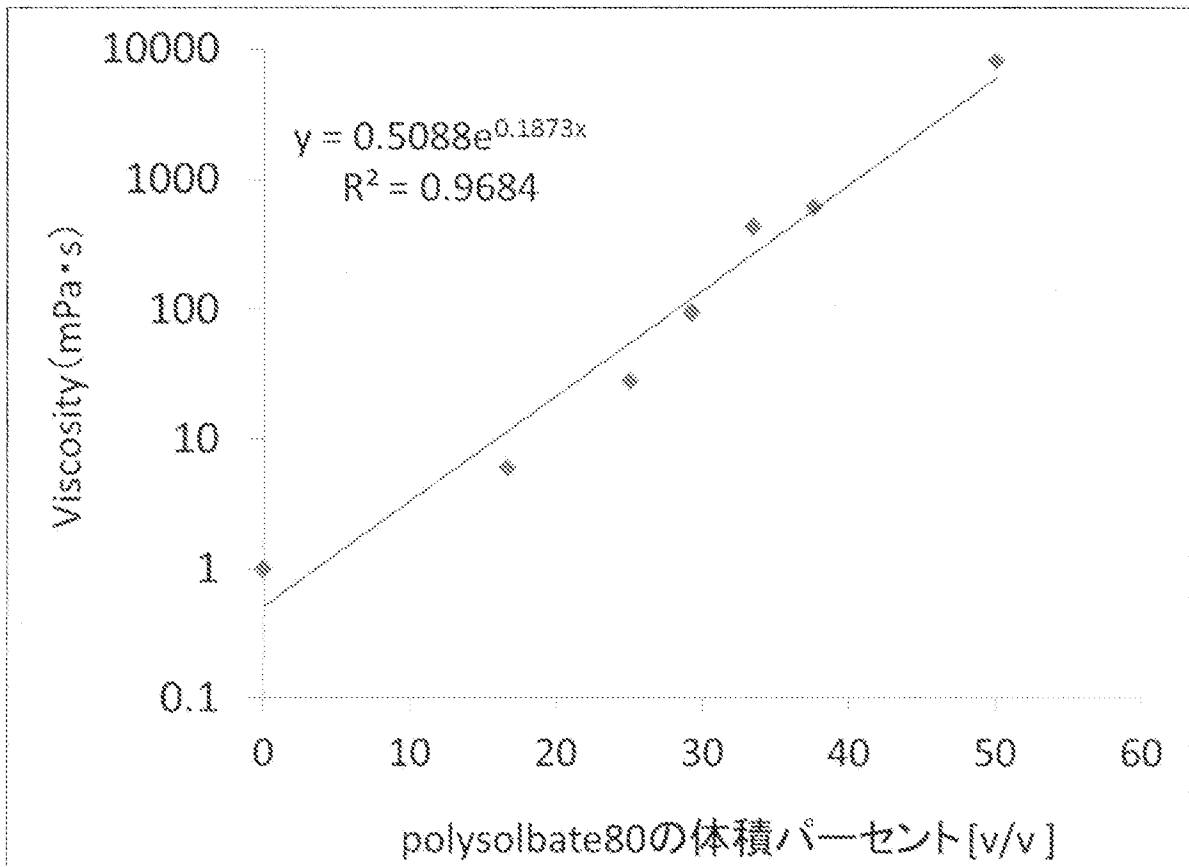
請求の範囲

- [請求項1] リンパ行性薬剤送達法によって薬剤を標的リンパ節に送達するための薬剤含有液体製剤であって、液体の浸透圧が700～2700kPaである、リンパ節内投与製剤。
- [請求項2] 液体の浸透圧が、900kPa以上である、請求項1記載のリンパ節内投与製剤。
- [請求項3] 液体の浸透圧が、2400kPa以下である、請求項1記載のリンパ節内投与製剤。
- [請求項4] 液体の浸透圧が、950～2000kPaである、請求項1記載のリンパ節内投与製剤。
- [請求項5] 液体の粘度が0.5～20mPa・sである、請求項1～4のいずれか1項記載のリンパ節内投与製剤。
- [請求項6] 液体の粘度が1.0～15mPa・sである、請求項1～4のいずれか1項記載のリンパ節内投与製剤。
- [請求項7] 非イオン性界面活性剤を含有する、請求項1～6のいずれか1項記載のリンパ節内投与製剤。
- [請求項8] 非イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルである、請求項7記載のリンパ節内投与製剤。
- [請求項9] ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルがオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンである請求項8記載のリンパ節内投与製剤。
- [請求項10] 薬剤が、医薬活性物質、核酸分子収容体又は培養細胞である請求項1～9のいずれか1項記載のリンパ節内投与製剤。
- [請求項11] 薬剤が、抗がん剤である請求項1～9のいずれか1項記載のリンパ節内投与製剤。

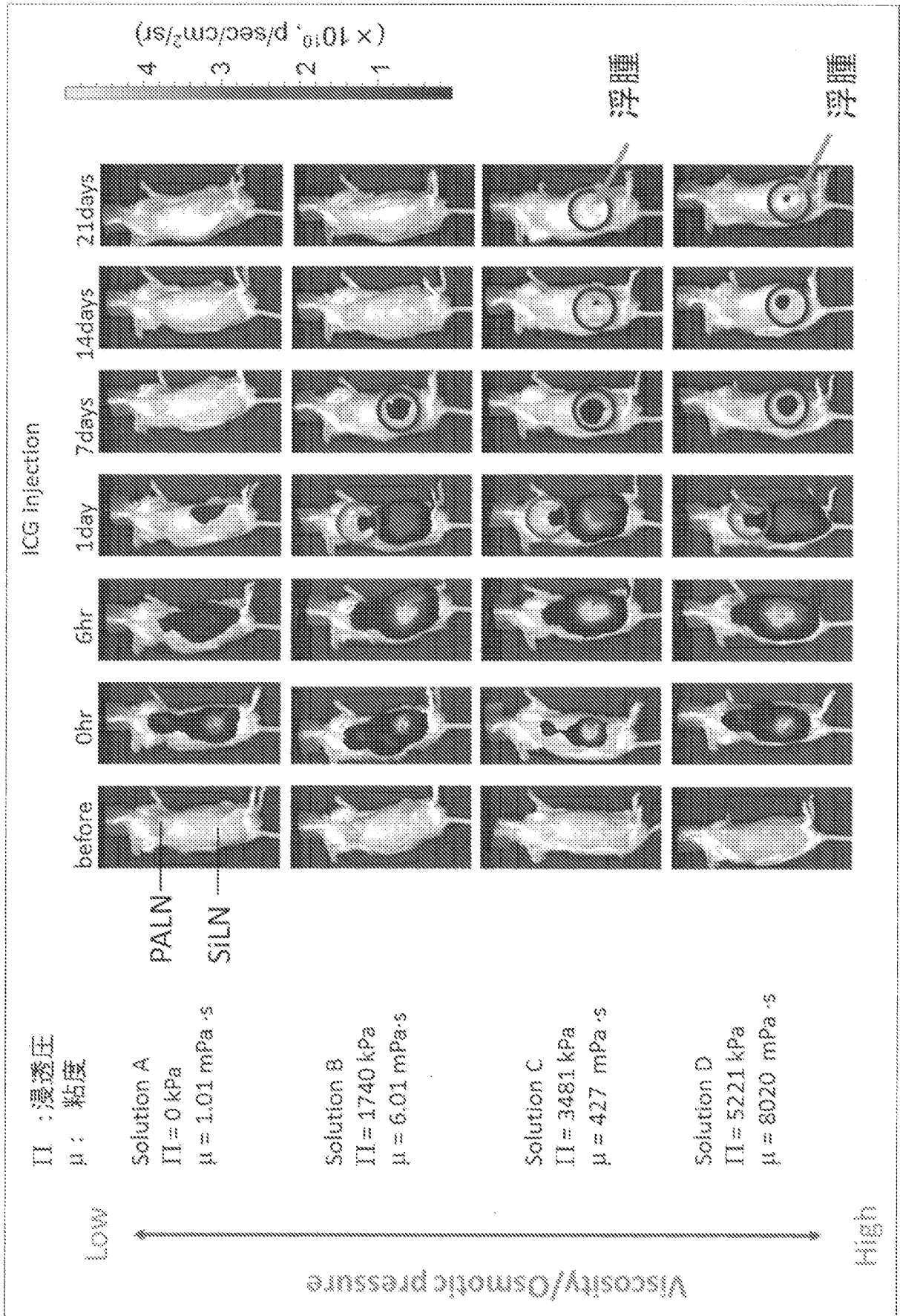
[図1]



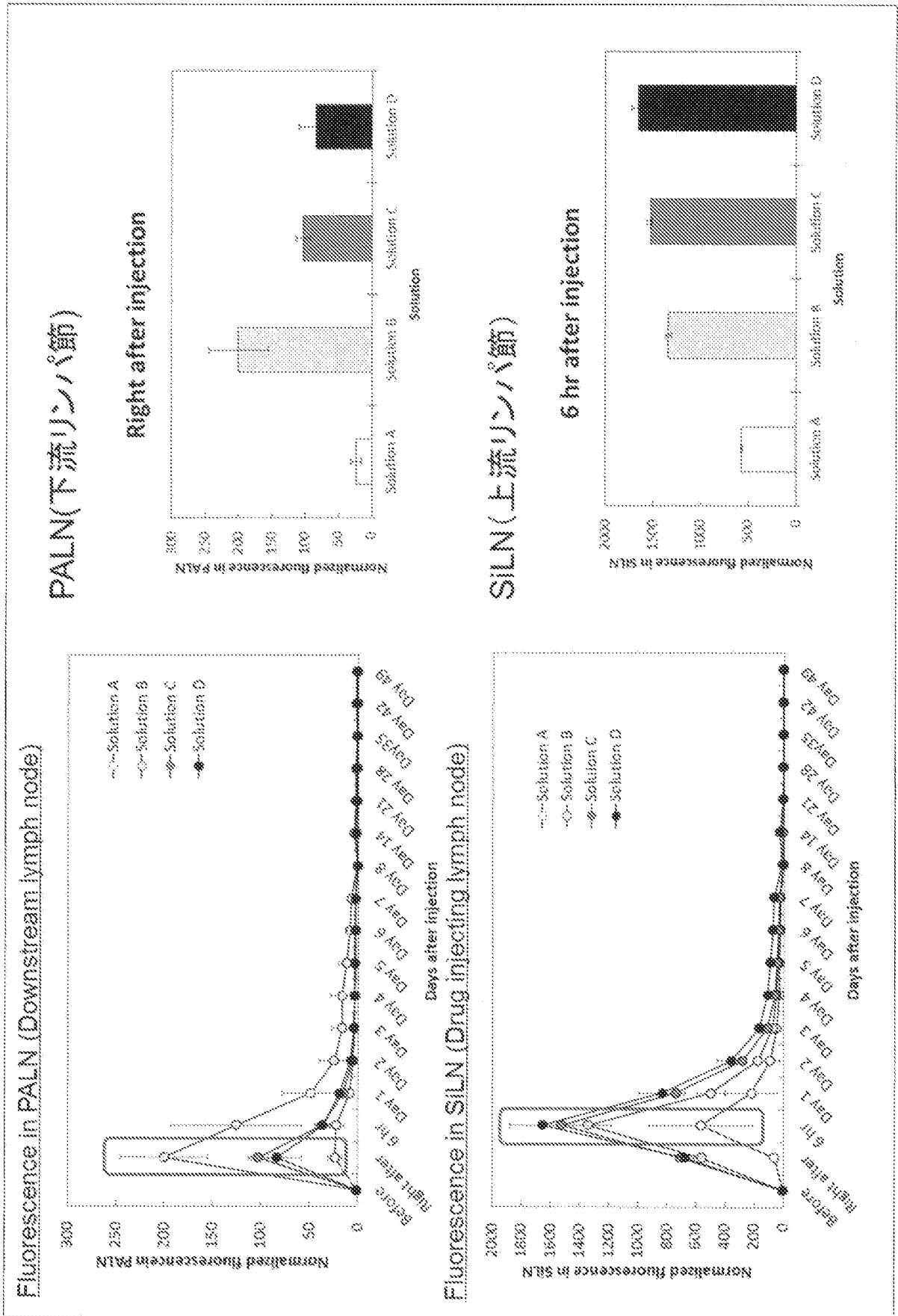
[図2]



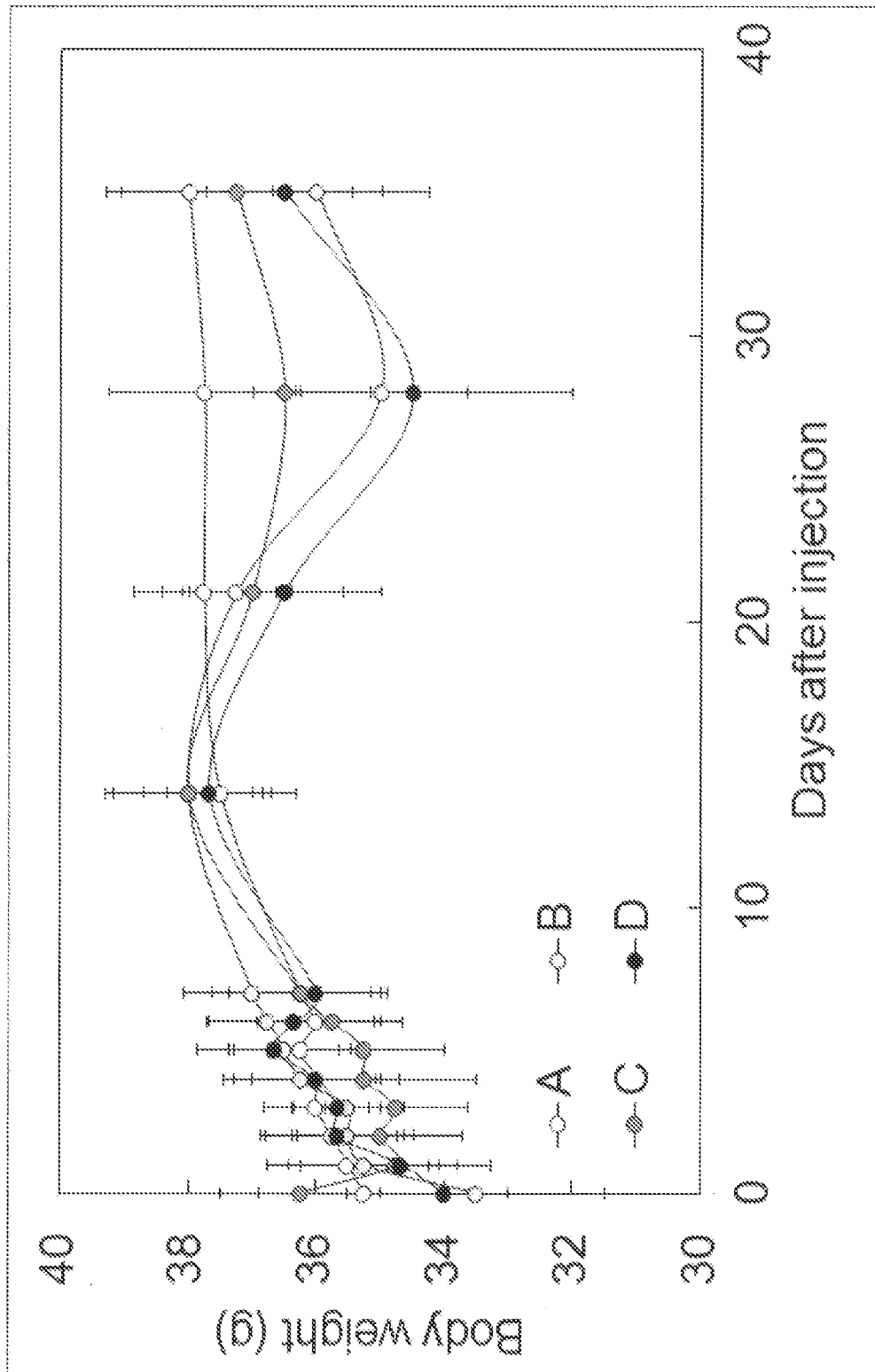
[図3]



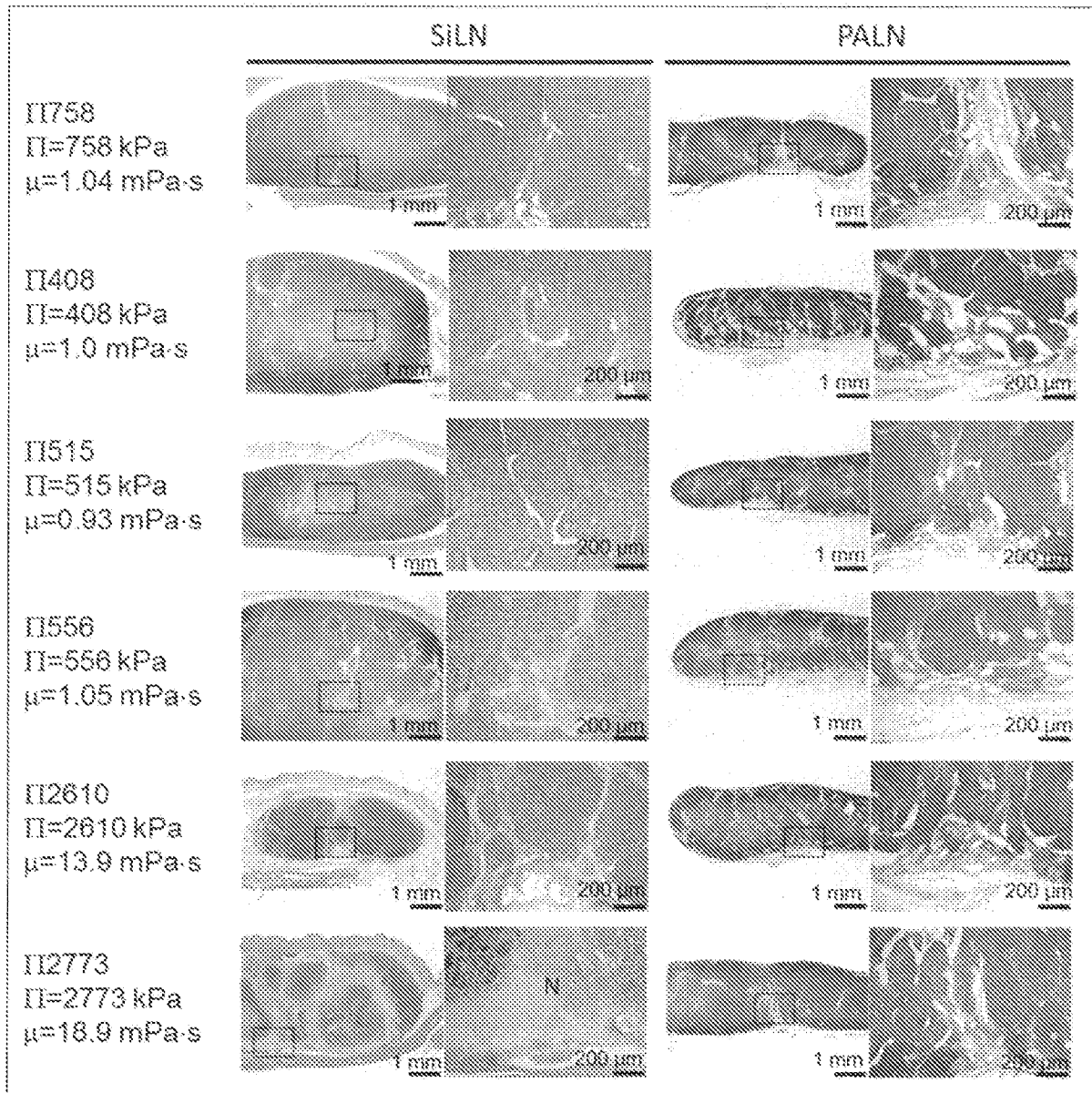
[図4]



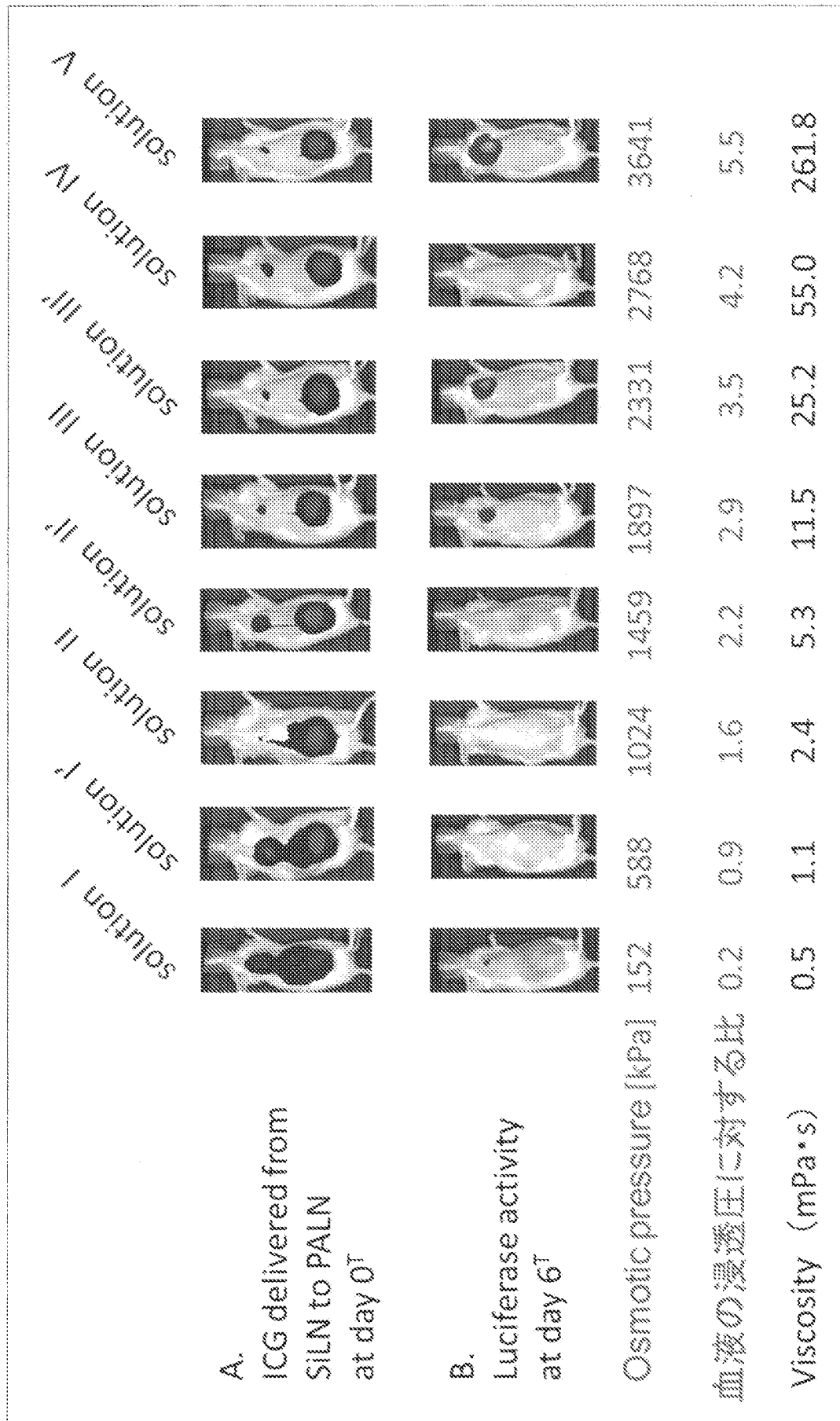
[図5]



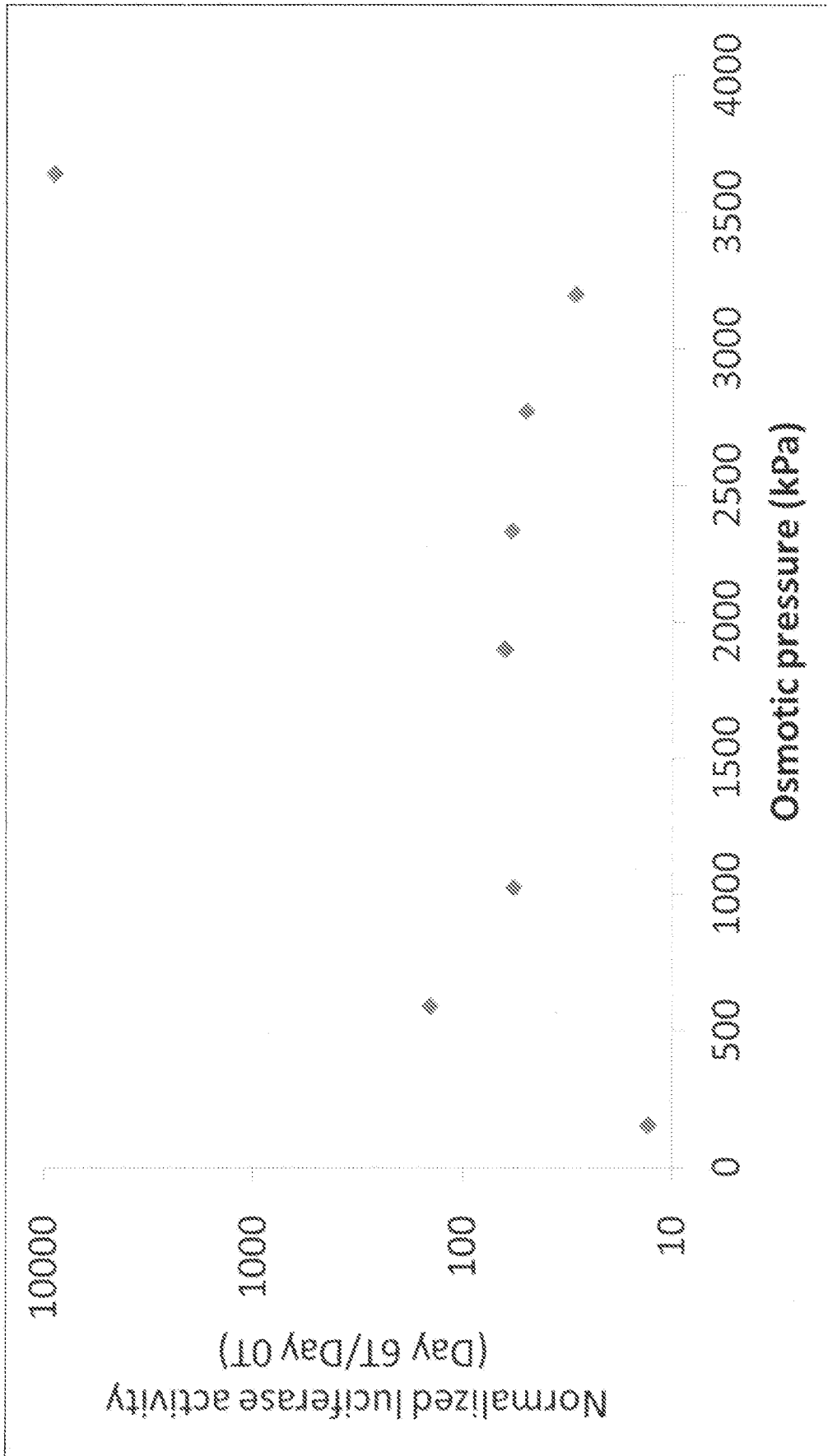
[図6]



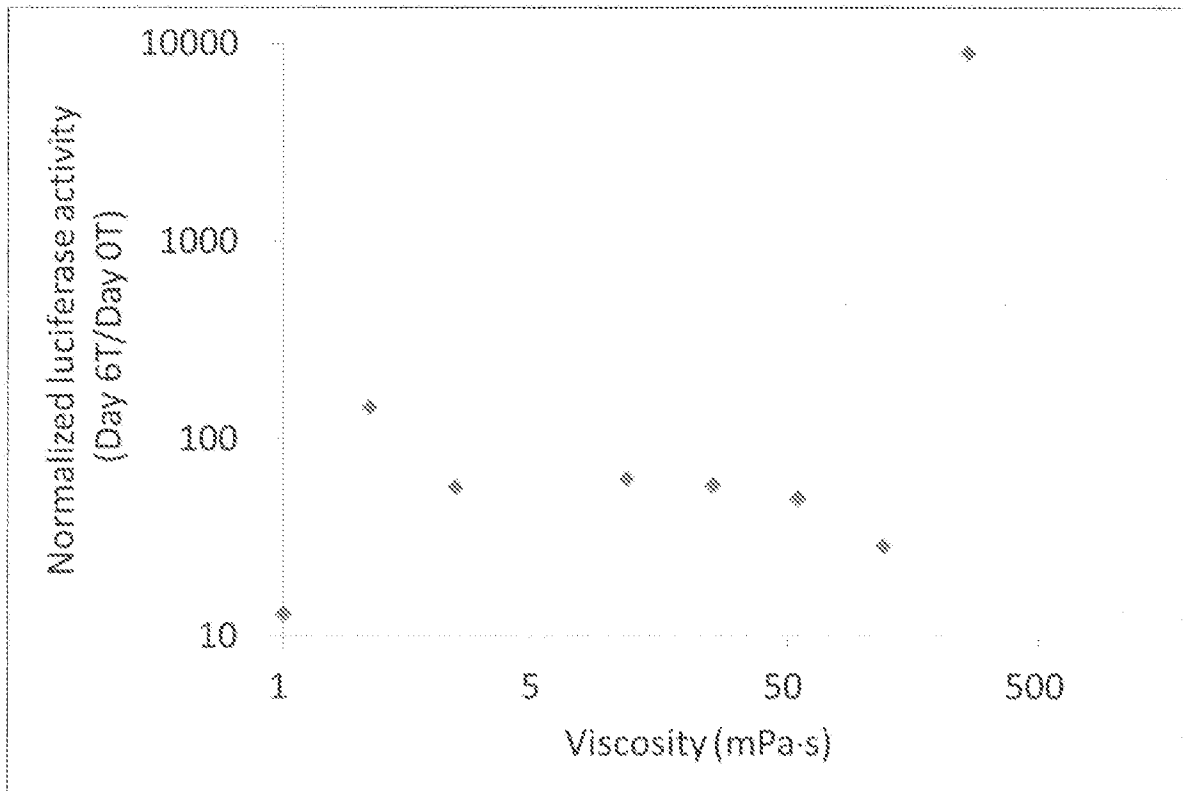
[図7]



[8]



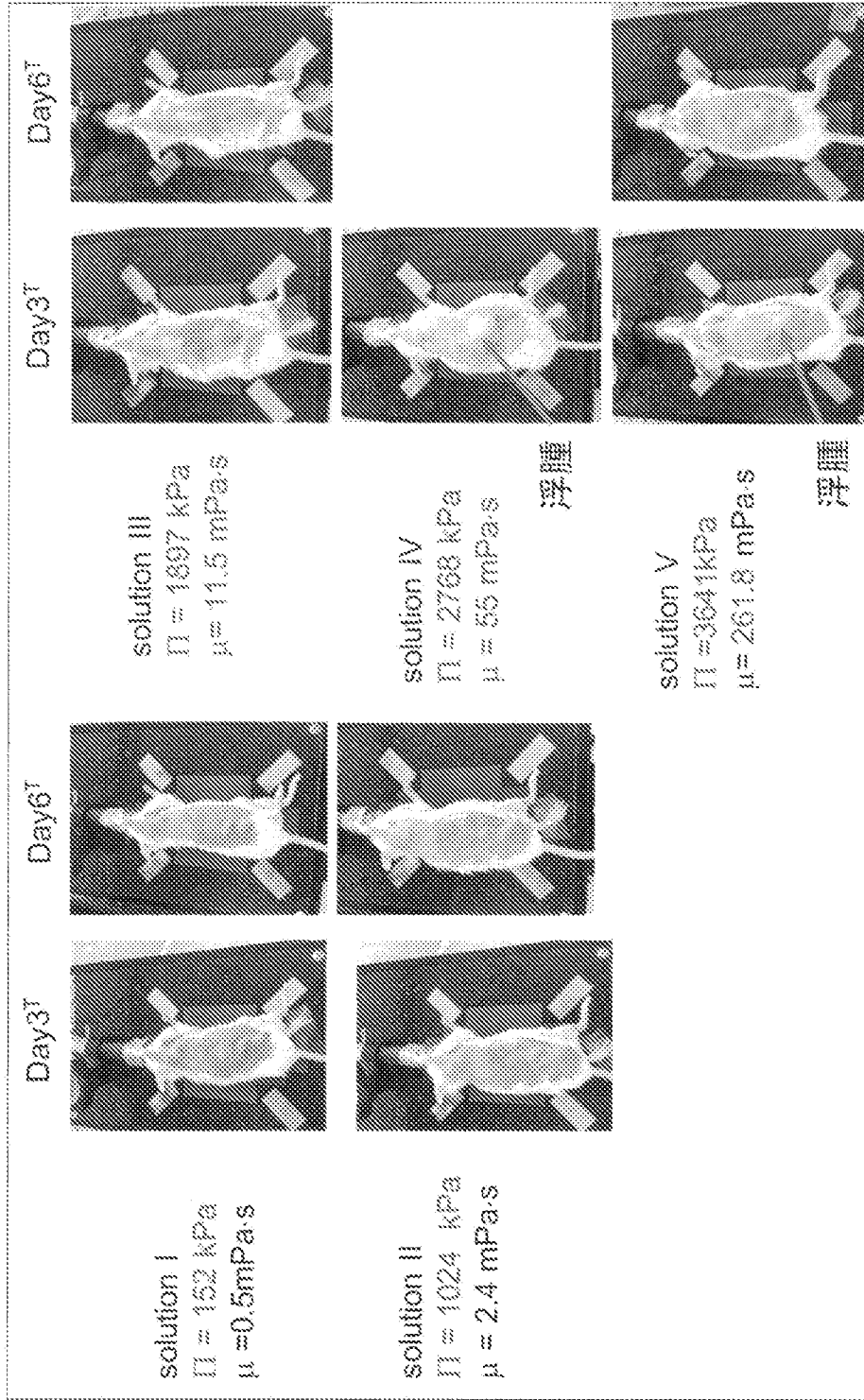
[図9]



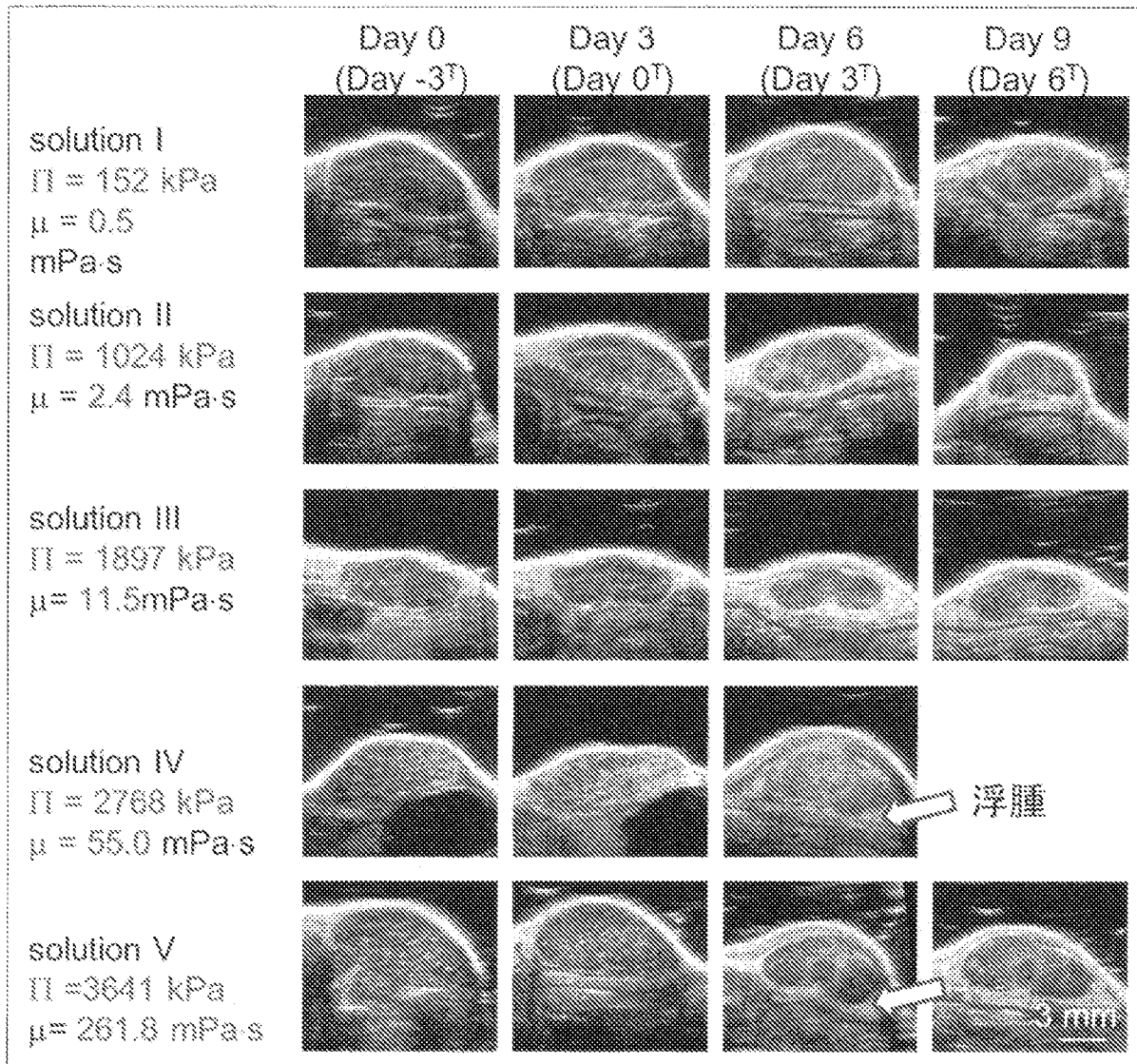
[図10]

TOHROGUPCI (西画 最終版) / ページ 10

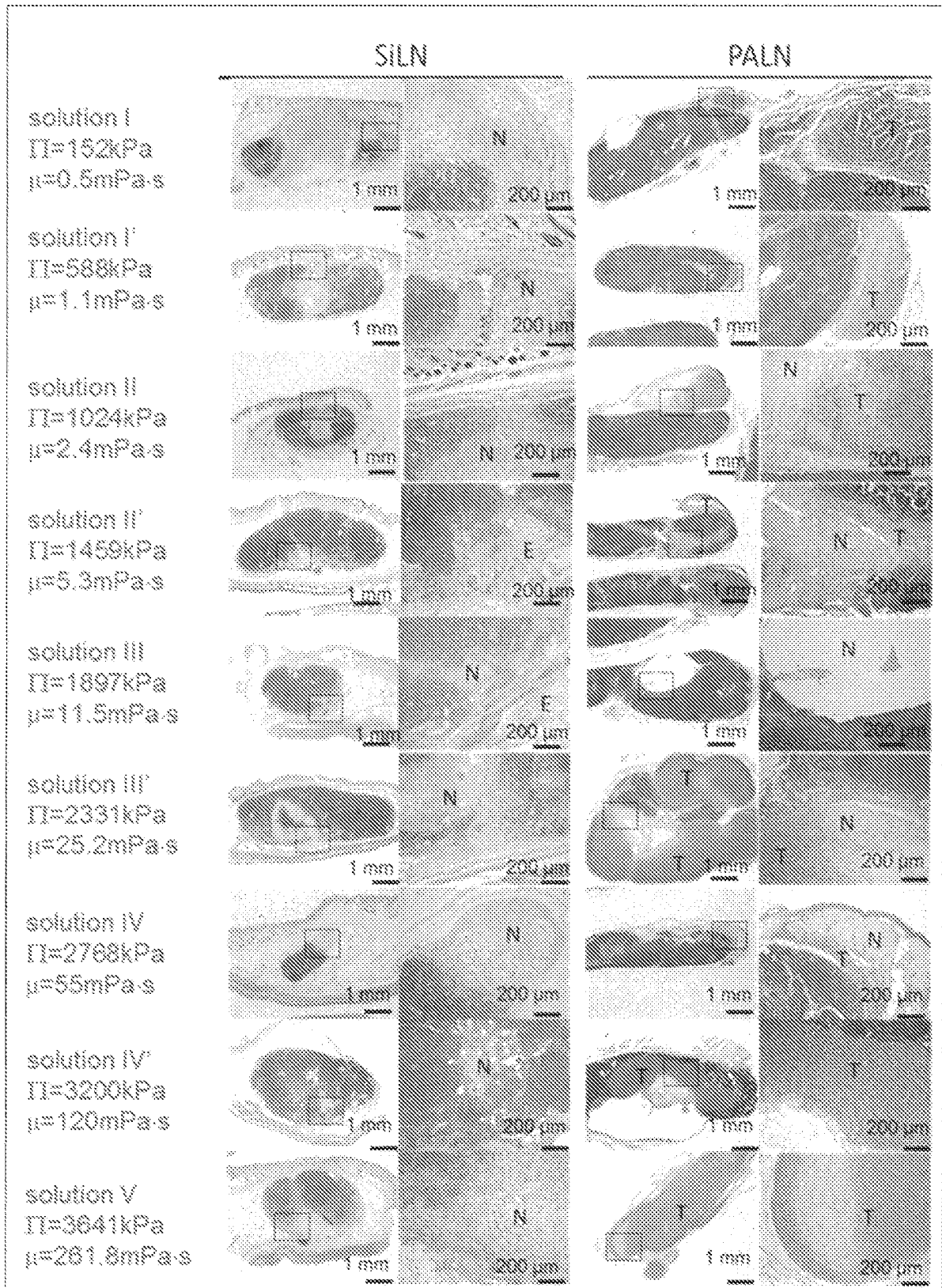
[図10]



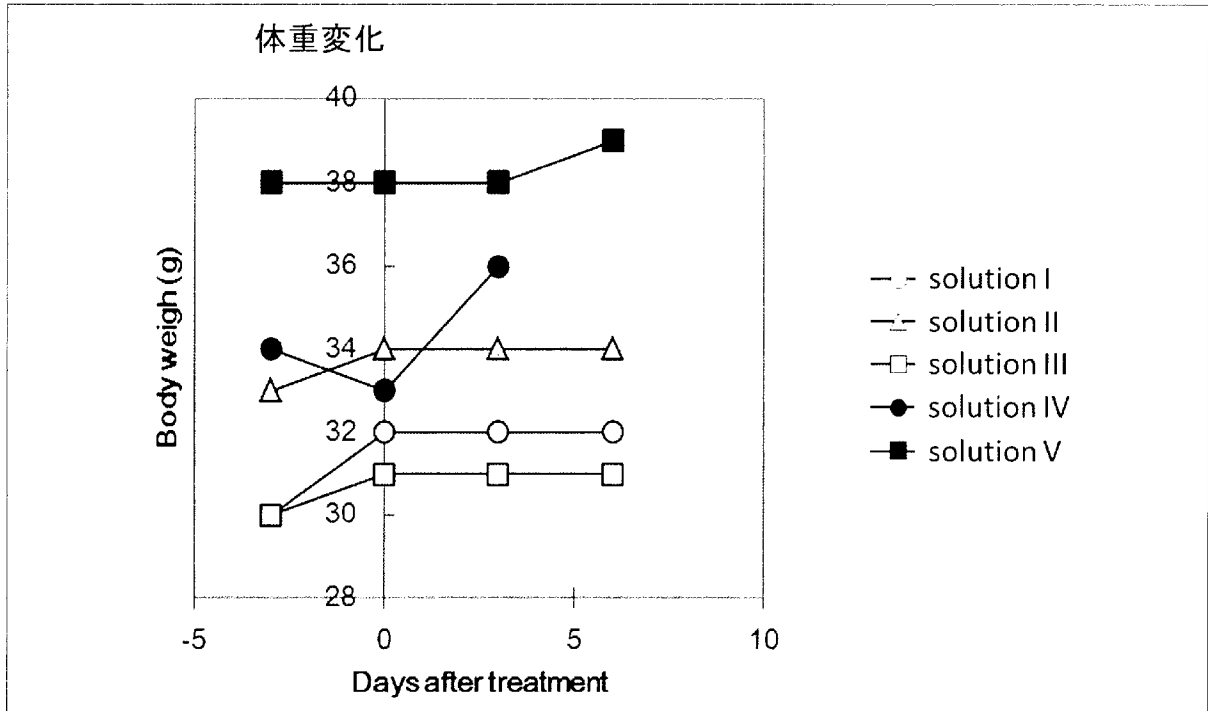
[図11]



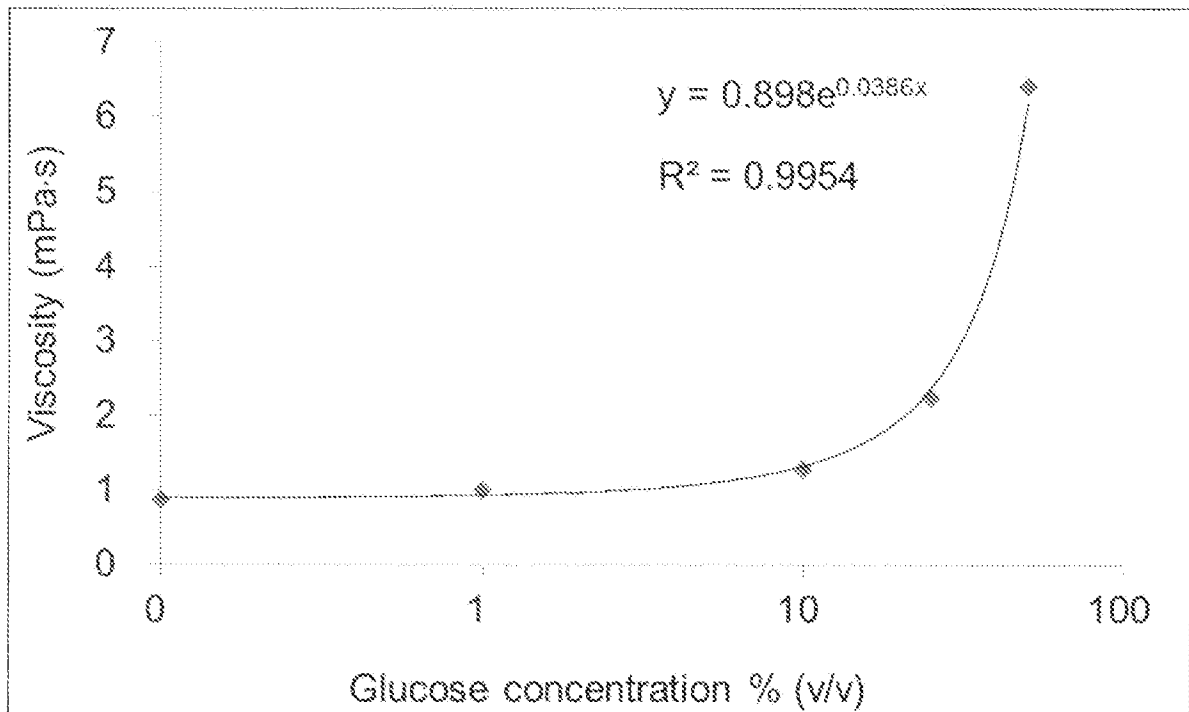
[12]



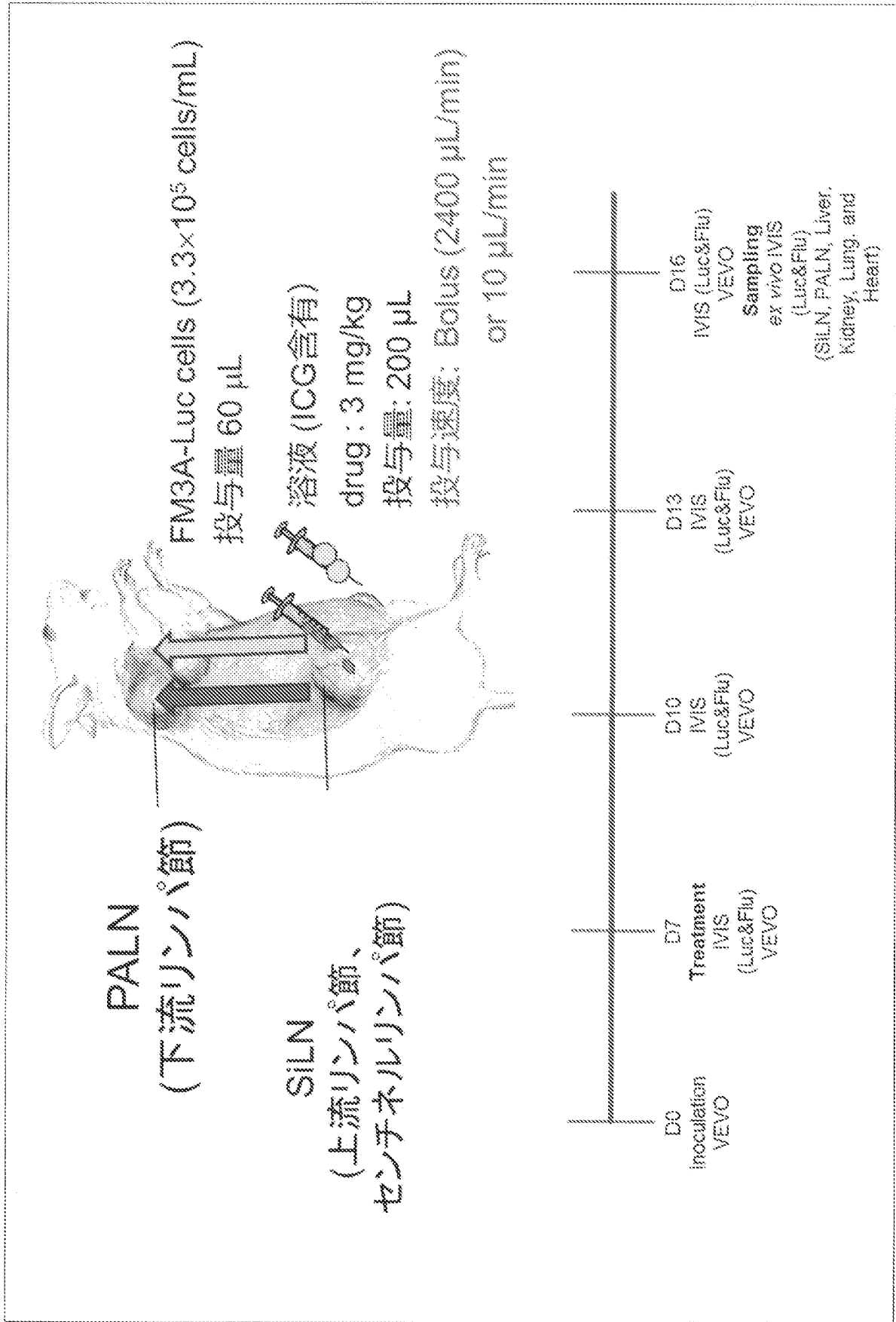
[図13]



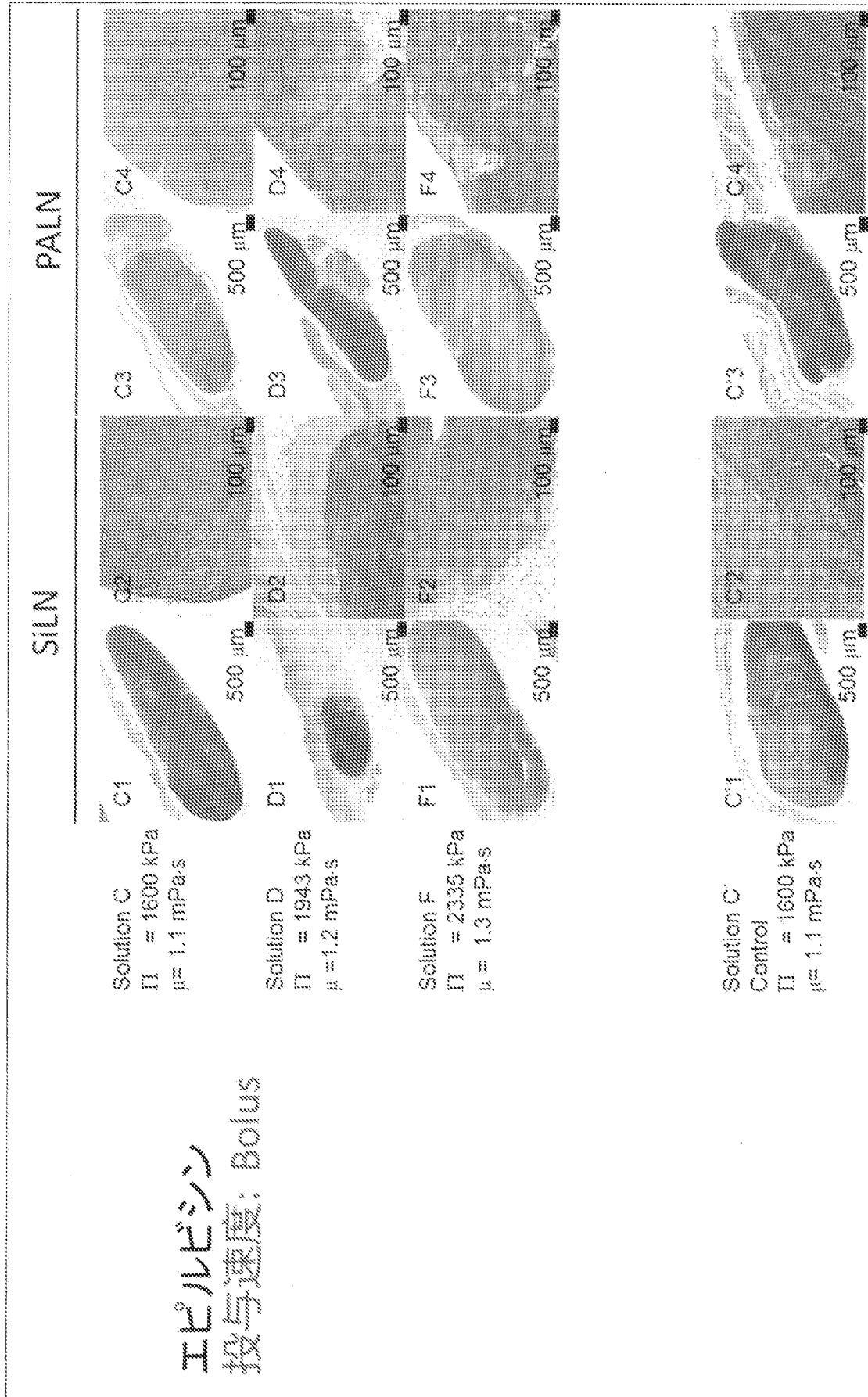
[図14]



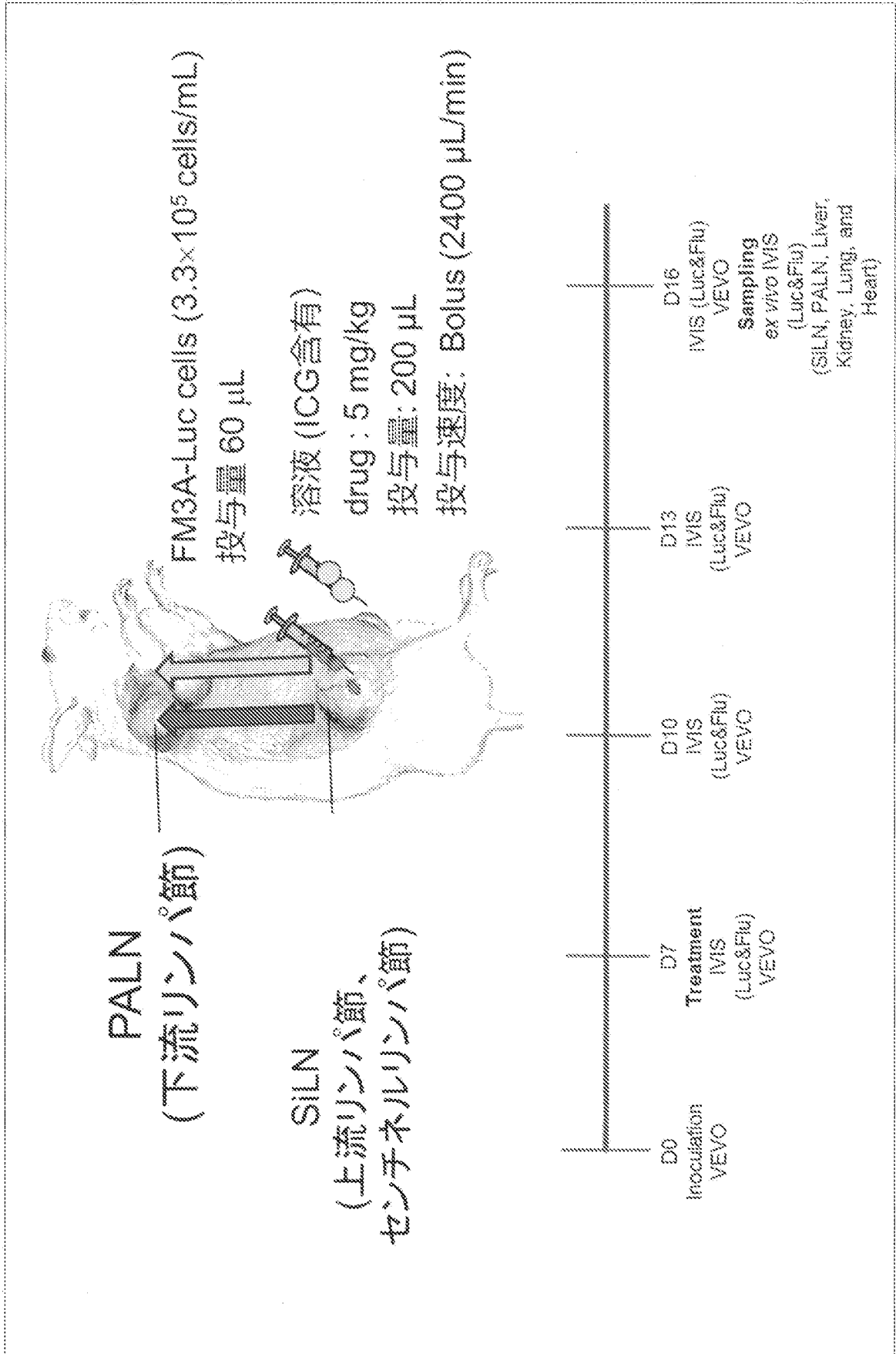
[図15]



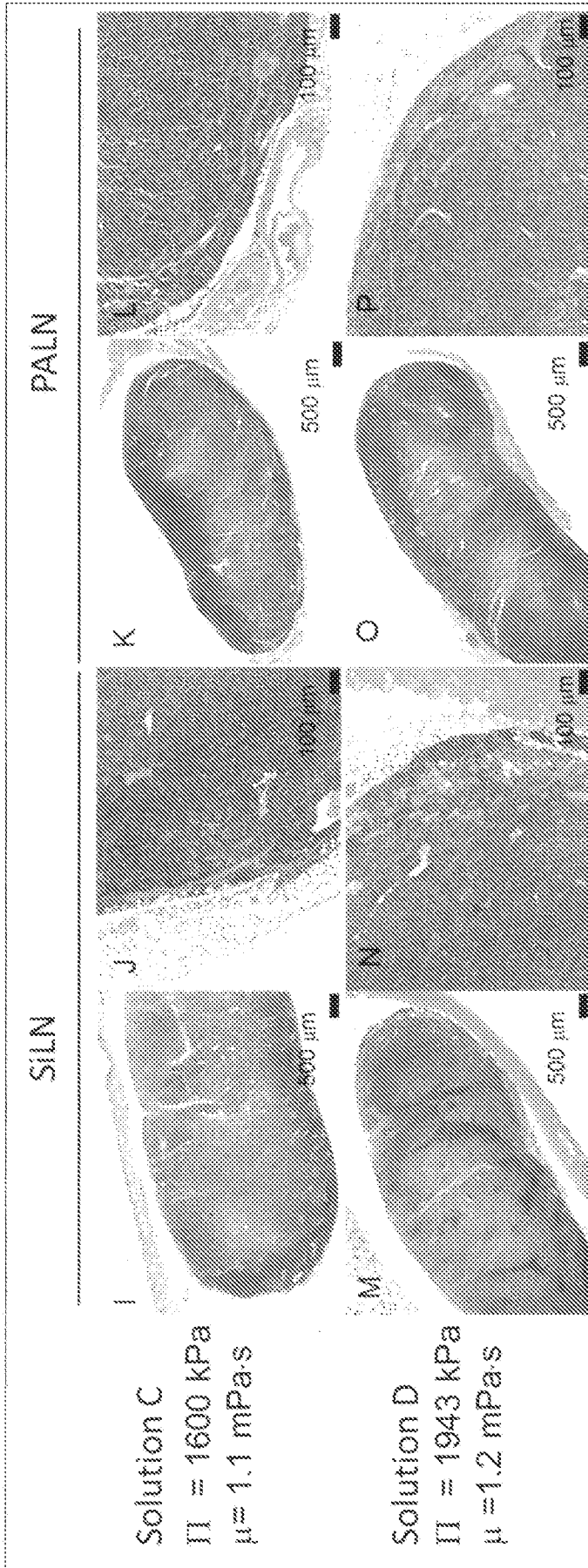
[16]



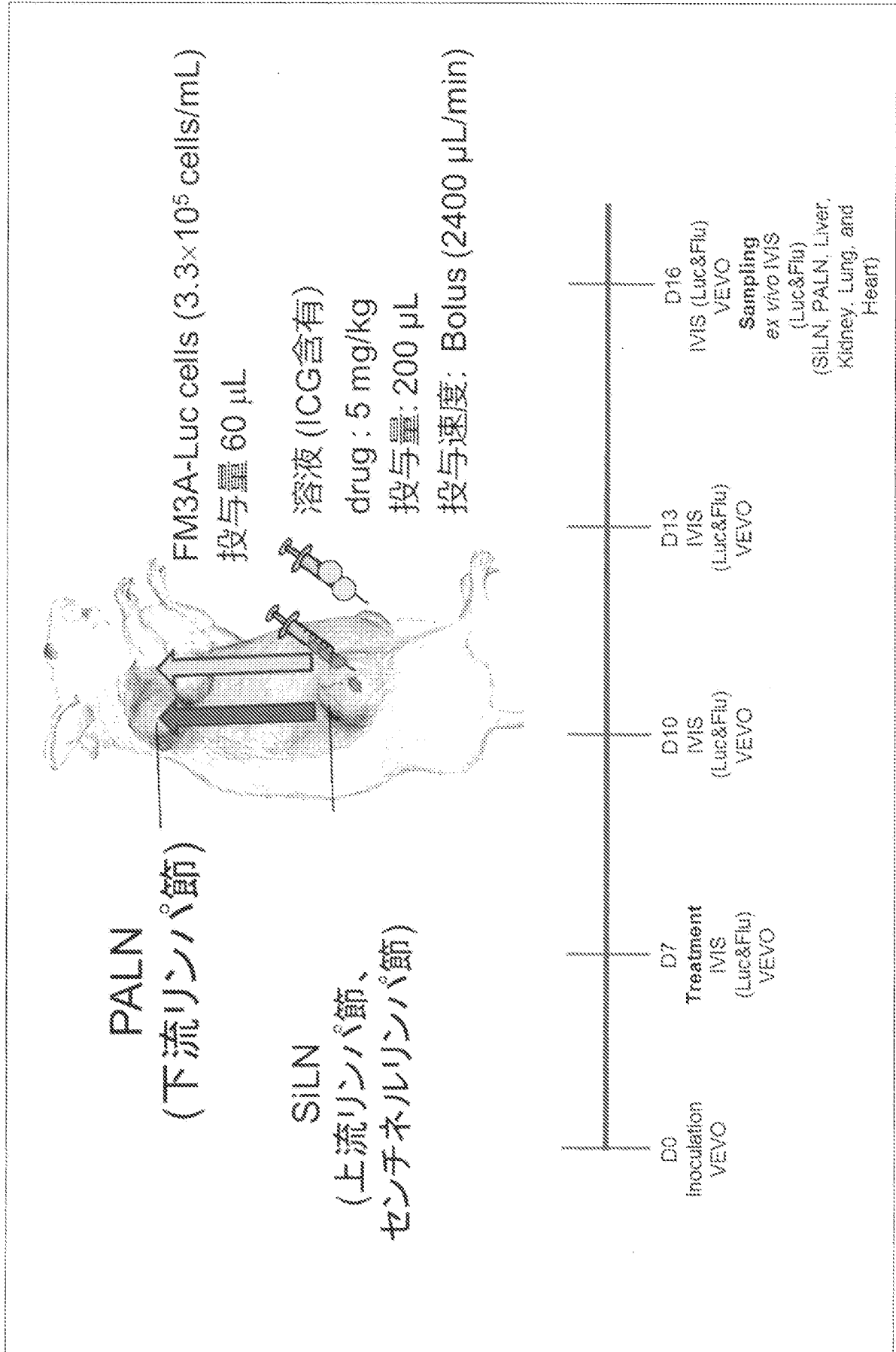
[図17]



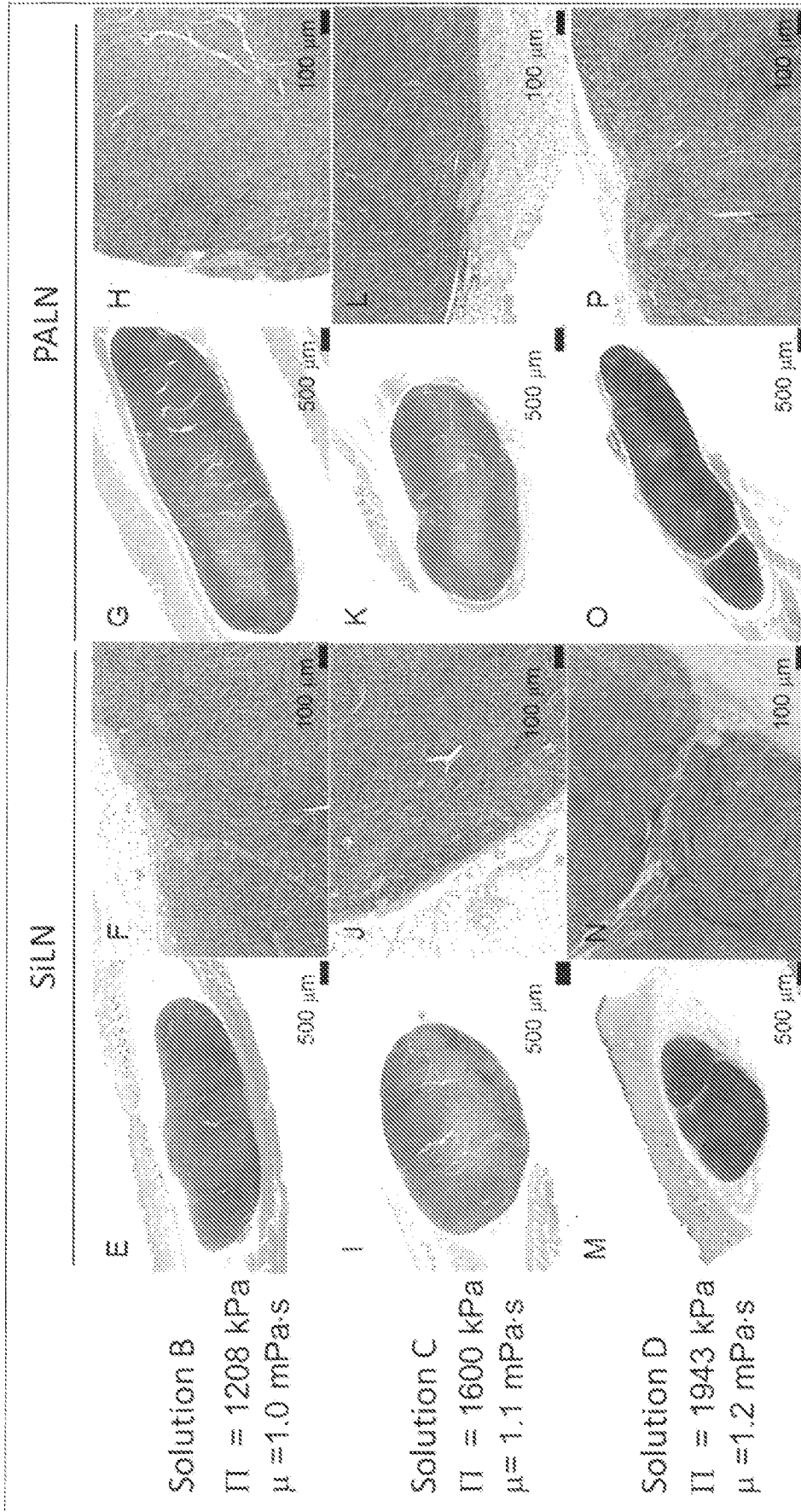
[18]



[図19]



[20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/032220

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A61K47/26(2006.01) i, A61K9/08(2006.01) i, A61K31/282(2006.01) i,
A61K31/505(2006.01) i, A61K31/519(2006.01) i, A61K31/704(2006.01) i,
A61K31/7088(2006.01) i, A61K33/24(2006.01) i, A61K35/12(2015.01) i,
A61K45/00(2006.01) i, A61P35/00(2006.01) i, A61P35/04(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)

Int.Cl. A61K47/26, A61K9/08, A61K31/282, A61K31/505, A61K31/519, A61K31/704,
A61K31/7088, A61K33/24, A61K35/12, A61K45/00, A61P35/00, A61P35/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	藤井穂乃香 ほか, リンパネットワークを利用した転移リンパ節治療法の開発, In: 第29回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 18 January 2017, in particular, column "2B42", (FUJII, Honoka et al., "Development of a treatment for metastatic lymph nodes via lymphatic network", Proceedings of the 29th lecture conference of Bioengineering)	1, 3, 5, 6, 10, 11
A		2, 4, 7-9
A	JP 2015-192670 A (TOHOKU UNIVERSITY) 05 November 2015 (Family: none)	1-11
A	MIURA, Yoshinobu et al., "Early diagnosis of lymph node metastasis: Importance of intranodal pressures", Cancer Science, 2016, vol. 107, no. 3, pp. 224-232, ISSN: 1349-7006	1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
21 November 2018 (21.11.2018)

Date of mailing of the international search report
04 December 2018 (04.12.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K47/26(2006.01)i, A61K9/08(2006.01)i, A61K31/282(2006.01)i, A61K31/505(2006.01)i, A61K31/519(2006.01)i, A61K31/704(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K33/24(2006.01)i, A61K35/12(2015.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/04(2006.01)i</p>															
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K47/26, A61K9/08, A61K31/282, A61K31/505, A61K31/519, A61K31/704, A61K31/7088, A61K33/24, A61K35/12, A61K45/00, A61P35/00, A61P35/04</p>															
<p>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</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">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>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018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	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2018年														
日本国実用新案登録公報	1996-2018年														
日本国登録実用新案公報	1994-2018年														
<p>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)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>															
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:70%;">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</th> <th style="width:20%;">関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>藤井穂乃香 ほか, リンパネットワークを利用した転移リンパ節治療法の開発, In:第29回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 2017.01.18,</td> <td>1, 3, 5, 6, 10, 11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>特に2B42欄</td> <td>2, 4, 7-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2015-192670 A (国立大学法人東北大学) 2015.11.05, (ファミリーなし)</td> <td>1-11</td> </tr> </tbody> </table>				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	X	藤井穂乃香 ほか, リンパネットワークを利用した転移リンパ節治療法の開発, In:第29回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 2017.01.18,	1, 3, 5, 6, 10, 11	A	特に2B42欄	2, 4, 7-9	A	JP 2015-192670 A (国立大学法人東北大学) 2015.11.05, (ファミリーなし)	1-11
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													
X	藤井穂乃香 ほか, リンパネットワークを利用した転移リンパ節治療法の開発, In:第29回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 2017.01.18,	1, 3, 5, 6, 10, 11													
A	特に2B42欄	2, 4, 7-9													
A	JP 2015-192670 A (国立大学法人東北大学) 2015.11.05, (ファミリーなし)	1-11													
<p>☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。</p>		<p>☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>													
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>													
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align: center;">21.11.2018</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align: center;">04.12.2018</p>													
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align: center;">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</p>		<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2">特許庁審査官 (権限のある職員)</td> <td style="width:10%; text-align: center;">4U</td> <td style="width:10%; text-align: center;">6112</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">参鍋 祐子</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td colspan="2">電話番号 03-3581-1101</td> <td colspan="2">内線 3439</td> </tr> </table>		特許庁審査官 (権限のある職員)		4U	6112	参鍋 祐子				電話番号 03-3581-1101		内線 3439	
特許庁審査官 (権限のある職員)		4U	6112												
参鍋 祐子															
電話番号 03-3581-1101		内線 3439													

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	MIURA, Yoshinobu et al., Early diagnosis of lymph node metastasis: Importance of intranodal pressures, Cancer Science, 2016, Vol.107, No. 3, pp.224-232, ISSN:1349-7006	1-11