

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3634869号
(P3634869)

(45) 発行日 平成17年3月30日(2005.3.30)

(24) 登録日 平成17年1月7日(2005.1.7)

(51) Int. Cl.⁷

A 6 1 K 49/00

F I

A 6 1 K 49/00

Z

請求項の数 7 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願平10-507737	(73) 特許権者	396019387
(86) (22) 出願日	平成9年8月4日(1997.8.4)		アメルシャム ヘルス アクスイエ セル
(65) 公表番号	特表2000-517296(P2000-517296A)		スカプ
(43) 公表日	平成12年12月26日(2000.12.26)		ノルウェー国、エンーO4O1 オスロ、
(86) 国際出願番号	PCT/GB1997/002119		ニイダレン、ポストボックス 4220 ニ
(87) 国際公開番号	W01998/005364		イコペイエ 2
(87) 国際公開日	平成10年2月12日(1998.2.12)	(74) 代理人	100091731
審査請求日	平成13年5月2日(2001.5.2)		弁理士 高木 千嘉
(31) 優先権主張番号	9616301.9	(74) 代理人	100080355
(32) 優先日	平成8年8月2日(1996.8.2)		弁理士 西村 公佑
(33) 優先権主張国	英国(GB)		
(31) 優先権主張番号	9705918.2		
(32) 優先日	平成9年3月21日(1997.3.21)		
(33) 優先権主張国	英国(GB)		
早期審査対象出願		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】造影剤における又はこれに関する改良

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

オプソニン化性リン脂質物質により安定された生物学的適合性気体の微小泡を含有する、人または人以外の動物対象の肝臓の超音波造影における造影剤であって、そのリン脂質物質の少なくとも50%は、少なくとも一つのホスファチジルセリンを含む負に荷電したリン脂質からなり、それによってその微小泡の少なくとも一部分は対象の肝臓による拘束及び／又は肝臓内での取り込みが可能であり、そしてそれらの拘束された及び／又は取り込まれた微小泡が対象への該造影剤の投与後2～8時間、肝臓内にエコー形成性を発揮することができることを特徴とする、上記造影剤。

【請求項 2】

生物学的適合性気体が、六フッ化硫黄、十フッ化二硫黄、フッ素化ケトン、フッ素化エーテル又は過フッ化炭化水素を含む請求項 1 記載の造影剤。

【請求項 3】

過フッ化炭化水素がペルフルオロブタンから成る請求項 2 記載の造影剤。

【請求項 4】

オプソニン化性リン脂質物質がフッ素化されており、そして生物学的適合性気体が空気、窒素、二酸化炭素、酸素、水素、酸化窒素、不活性ガス、場合によりハロゲン化された低分子量炭化水素、ハロゲン化硫黄及び前記のいずれかの混合物から選択される請求項 1 記載の造影剤。

【請求項 5】

10

20

肝臓中の血流を刺激することができる物質及び／又は貪食作用を刺激することにより肝臓取り込みを増加させることができる物質との共投与用に処方される請求項1～4のいずれか一項に記載の造影剤。

【請求項6】

オプソニン化性リン脂質物質により安定された生物学的適合性気体の微小泡を含有し、そのリン脂質物質の少なくとも50%は、少なくとも一つのホスファチジルセリンを含む負に荷電したリン脂質からなる、人または人以外の動物対象の肝臓の超音波造影における造影剤であって、その造影剤は、対象へのその投与後5～10分以内に肝臓内にエコー形成性を発揮することができるように肝臓内で急速な拘束及び／又は取り込みを行うことができ、かつ対象へのその投与後2～8時間、肝臓内にエコー形成性をさらに発揮することができる、上記造影剤。

10

【請求項7】

人または人以外の動物対象の肝臓の超音波造影用造影剤の製造における、オプソニン化性リン脂質物質により安定された生物学的適合性気体の微小泡の使用であり、そこでそのリン脂質物質の少なくとも50%は、少なくとも一つのホスファチジルセリンを含む負に荷電したリン脂質からなり、それによってその微小泡の少なくとも一部分は対象の肝臓による拘束及び／又は肝臓内での取り込みが可能であり、そして対象への該造影剤の投与後2～8時間、肝臓内にエコー形成性を発揮することができることを特徴とする、上記使用。

【発明の詳細な説明】

本発明は超音波造影、より詳しくは肝臓の超音波造影方法及び肝臓におけるその長い滞留時間のために、かかる方法に有用である造影剤に関する。

20

肝臓癌のような癌及び肝臓への癌の拡大転移は工業化された世界における主要な死亡原因でありそして腫瘍検出の改良された方法が常に求められている。肝臓の調査は例えばX線造影、例えばリポソームに封入されたヨウ素化X線造影剤の注射による投与に引き続いて実行することができる。すなわち、W0-A-8809165に記述されているように、そのようなリポソームは網内皮細胞系との相互作用により肝臓及び脾臓に固定されてこれらの臓器のX線検査が可能になる。一般に腫瘍組織は健康な組織と異なる脈管質及び／又はより少ない吸収部位を有しており、それによりコントラストが改変された領域として検出することができる。

W0-A-8809165に記述されているように、肝臓のX線検査は一般にヨウ素化X線造影剤が組織g当たりヨウ素2～2.5mgの濃度で、すなわち約1.5kgの成人肝臓の場合全量で約3.5gがそこに存在することが必要である。肝臓によるリポソームの取り込みは概して40%であり、従ってこの水準をもたらすには約9gのヨウ素を含む造影剤を注射することを要するとされている。これには9gまでの脂質の同伴する注入を伴っており、望ましくない副作用を生ずる恐れがある。

30

肝臓の超音波検査は、X線及びコンピューター使用断層撮影(CT)走査装置に比べて超音波走査装置の実質的に少ない費用、イオン化放射線(患者及び医療従事者双方に安全上の問題を増す恐れがある)を使用しないこと、そして必要とする造影剤の用量の少ないことにより大きな関心を集める可能性がある。この最後の点に関連して、気体及び／又は揮発性液体の微小泡からなる造影剤は微小泡の低い密度及び圧縮性の容易なことから特に有効な超音波の後方散乱剤であることがよく知られている。そのような微小泡分散体は、適当に安定化されれば、しばしば都合のよい少ない用量で血管系及び組織微小脈管構造の高度に有効な超音波可視化が可能になるであろう。しかしながら、そのような造影剤は一般的には、例えば肝臓、脾臓又はリンパ節において網内皮細胞系による取り込みにより脈管構造から除かれ、その限りではこれらの臓器の既存の造影方法はその適用が限定される。

40

US-A-5425366は種々の型の微粒子超音波造影剤、例えば気体含有ポリマーマイクロカプセルが肝臓に取り込まれるが、それらは慣用的なBモード法を使用しては有効な造影ができないと述べている。これについては、放射された超音波信号が均一な陰影付けを生ずる造影剤による累加的な反射の結果肝臓組織の中へのわずかな侵入深度しか得られないことによると推定されている。しかしながら、放射された超音波信号の微粒子の構造物質と

50

の相互作用による、例えば信号の吸収及び熱への変換となる減衰の結果であるとも考えられる。

肝臓のような臓器中に保持されるそのような微粒子造影剤は本質的に静止しているが、それでもなおそれらは色ドップラー法により可視化され得ることがUS-A-5425366に示唆されている。色ドップラー調査に付随する高い放射エネルギー水準が微粒子の爆発を引き起こし、それにより「音響的に刺激された音響的放射」と記載されたドップラー感受性信号を発生すると説明されているが、検出器が微粒子の消失を高速運動と解釈しそして適当な表示を発生するのが事実であるように思われる。放射された超音波信号による微粒子の漸進的破壊は、調査が進むにつれて信号が組織の中により深く侵入するのを助長することともまた注目される。

10

この方法の欠点は、上記特許に記述されているようなポリマー封入造影剤により示されるはなはだしい減衰である。これは封入物質の比較的な剛性により起こりそして肝臓全体の均一な信号水準の発生を妨げる。従って、走査時間は必然的に長くなりそして得られる情報は解釈の困難なことがあり得る。従って、この方法は超音波断層撮影に適当でない。本質的に静止している粒子からの異常な結果を有効に検出するために色ドップラー装置を使用することから不可避免的に生ずる情報及び映像品質の損失も不都合なことである。従って、そのような装置の色表示は信号強度よりむしろマップ速度を意図しており、そのため強度に関する情報は、例えばゆっくり動く組織から生ずる信号を排除する高域濾波器の使用により簡単に失われるか又はひずませられる。

さらに、US-A-5425366に記述されたポリマーマイクロカプセルのような微粒子超音波造影剤の上述のはなはだしい減衰のため、必然的に後方散乱：減衰比は比較的低い。このことは、不可避免的に肝臓の造影に関連して検査することが望ましい体の他の部分、例えば脈管構造の超音波造影の効率を制限する。

20

従って種々の造影方法、例えば慣用的なBモード及び高調波造影(harmonic imaging)を含む方法により肝臓の効率的な可視化が可能な造影剤を使用する超音波造影方法が求められている。

本発明は、オプソニン化性(opsonizable)両親媒性物質により安定させた気体の微小泡からなる造影剤が、肝臓及び脾臓において長いコントラスト発生滞留時間を示すという発見に基づく。そのような両親媒性物質で安定させた微小泡は肝臓及び脾臓のマクロファージにより食菌されると予想されそして実際に両親媒性物質は本明細書でさらに詳しく説明するように、肝臓において、例えば網内皮細胞系のクッパー細胞による速やかな取り込みを容易にするように選ぶことができるが、それらのコントラスト発生効果が例えば数時間にわたって継続することは、そのような食作用の後に速やかな造影剤の破壊及びエコー形成性の喪失が予想されただけに極めて驚くべきことである。

30

かくして本発明の一つの態様によれば、人又は人以外の動物対象にオプソニン化性両親媒性物質により安定させた生物学的適合性気体の微小泡からなる造影剤のコントラストを増強する量を投与し、前記微小泡の少なくとも一部分を対象の肝臓に取り込まれるようにしそして肝臓の少なくとも一部分の超音波映像を発生させることからなる超音波造影方法が提供される。

本発明はさらに、肝臓の超音波造影に使用するための上で定義した造影剤、並びに人及び人以外の動物対象における肝臓の超音波造影に使用するための造影剤の製造におけるオプソニン化性両親媒性物質により安定させた生物学的適合性気体の微小泡の使用を包含する。

40

所望によりフッ素化されていてもよいオプソニン化性両親媒性物質は、例えばオプソニン化性両親媒性脂質、オプソニン化性両親媒性タンパク質及びオプソニン化性両親媒性の天然及び合成ポリマーから選ぶことができる。

オプソニン化性両親媒性脂質物質は、例えば、1つ又は1つより多くの膜形成性脂質を含み、この用語は本明細書においては水性媒質中で液体の結晶又はゲル状態の二層を形成することができる両親媒性脂質を表すために使用される。そのような両親媒性脂質はまた、例えばラングミュアブロッジェット膜におけるように気-水界面で単層又は単一の二層を

50

形成する。かくしてこの用語は、水性媒質中で極めて低濃度においてさえ液体の結晶又はゲル状態の二層を形成するような低い水溶解度並びに水溶液中で表面張力が実質的に例えばほとんど0まで減少する傾向を特徴とする生物学的膜に見いだされるような脂質を含む。そのような脂質は、本発明により使用する造影剤の気体微小泡の回りにその封入性の単層、二層又は多重層を形成する。

そのような膜形成性脂質の例は、リポペプチド、新油性に誘導体化された炭水化物、例えば1つ又は1つより多くの脂肪アシル基を担持するもの、脂肪酸のモノ及びジグリセリドエステル、スフィンゴリピド、グリコリピド及び、より好ましくはリン脂質、例えばホスファチジン酸、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、カルジオリピン及びそれらの対応するリソ（すなわちモノアシル、好ましくは1-アシル化）類似体を含む。

10

本発明に使用する造影剤のオプソニン化性両親媒性物質は、場合により膜の性質、例えば安定性、分散性、凝集傾向、生物学的活性、柔軟性又は極性を変える添加物と一緒に1つ又は1つより多くの膜形成性脂質を含んでよい。代表的な添加物は非膜形成性脂質、例えばコレステロールのようなステロールを含む。

いずれかの膜形成性脂質物質の少なくとも一部分、例えば少なくとも5%、例えば少なくとも20%、好ましくは少なくとも50%は製造及び／又は使用条件下で個々に正味の全体の負電荷を担持する分子からなるのが有利である。かくして荷電した脂質膜の間の電子的反発は、気体微小泡の回りに安定な及び安定させる脂質単層の形成を促進し、そのような薄膜の柔軟性及び変形性は、気体が1つ又は1つより多くの脂質二層により封入されている系に関連する造影剤のエコー形成性を著しく向上させられると思われる。その上、そのような単層系は二層系に比較して実質的に減衰の減少を示し、そのため放射された超音波信号のより深く侵入が可能になり、その結果肝臓のより深部での造影を容易にする。

20

負に荷電した膜形成性脂質物質の存在は又、クッパー細胞による造影剤の認識を容易にし、それにより例えばそのような脂質からなる造影剤を静脈注射した後のラットの肝臓の電子顕微鏡検査により確認されるように、肝臓の取り込みを増加させる。

負に荷電した膜形成性脂質物質の例は、負に荷電したリン脂質例えば天然に存在する（例えば大豆又は卵黄由来）、半合成の（例えば一部分又は完全に水素化された）及び合成のホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸及びカルジオリピンを包含し、そのようなリン脂質の脂肪アシル基は典型的にはそれぞれ、例えばパルミトイル及びステアロイル基におけるように約14~22個の炭素原子を含む。

30

ホスファチジルセリンからなる造影剤の使用は、クッパー細胞及び脾臓マクロファージが老化した赤血球及び血小板をそれらの表面上の高濃度のホスファチジルセリンの存在により認識することから特に好ましい。従ってそれらは、肝臓及び脾臓においてそのようなホスファチジルセリン含有造影剤を同じように認識しそして貪食するであろう。

膜形成性脂質又は他のオプソニン化性両親媒性物質は、少なくとも肝臓への血流による造影剤の輸送の間に造影剤が気体含有物へ実質的に非透過性であるように有利に選択することができる。これは、例えば脂質などの膜に対して比較的低い拡散速度を示す気体を使用することにより達成される。そのような気体の例は、ハロゲン化硫黄例えば六フッ化硫黄又は十フッ化二硫黄；フッ化炭化水素例えば過フッ化炭化水素；フッ素化（例えば過フッ素化）ケトン例えばペルフルオロアセトン；及びフッ素化（例えば過フッ素化）エーテル例えばペルフルオロジエチルエーテルを包含する。例えば7個までの炭素原子を含んでよい代表的な過フッ化炭化水素は、ペルフルオロアルカン例えばペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン（例えばペルフルオロ-n-ブタン、場合により他の異性体例えばペルフルオロイソブタンとの混合物）、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン及びペルフルオロヘプタン；ペルフルオロアルケン例えばペルフルオロプロペン、ペルフルオロブテン（例えばペルフルオロブト-2-エン）及びペルフルオロブタジエン；ペルフルオロアルキン例えばペルフルオロブト-2-イ

40

50

ン；ペルフルオロシクロアルカン例えばペルフルオロシクロブタン、ペルフルオロメチルシクロブタン、ペルフルオロジメチルシクロブタン、ペルフルオロトリメチルシクロブタン、ペルフルオロシクロペンタン、ペルフルオロメチルシクロペンタン、ペルフルオロジメチルシクロペンタン、ペルフルオロシクロヘキサン、ペルフルオロメチルシクロヘキサン及びペルフルオロシクロヘプタン；及びさらに別の膜透過性気体例えば空気、窒素、二酸化炭素、酸素などとの混合物を含む前記のいずれかの混合物、例えばそのようなさらに別の膜透過性気体の90%までを含む混合物を包含する。

1つ又は1つより多くのホスファチジルセリンで封入されたペルフルオロアルカン、例えばペルフルオロブタンの微小泡からなる造影剤の使用は本発明のこの実施態様の特に好ましい具体例である。

別法として空気、窒素、二酸化炭素、酸素などのような気体に対して比較的低い透過性を示す膜形成性脂質又はその他のオプソニン化性両親媒性物質を選ぶことができる。すなわち、例えばフッ素化された膜形成性脂質物質、例えば脂肪アシル基がフッ素化された、好ましくは過フッ素化されたそれを、本発明に有用な造影剤において広範囲の生物学的適合性気体（この用語は37℃の正常な人の体温で実質的に又は完全に気体／蒸気状態である混合物を含めた物質を含む）を封入するために使用することができる。そのような気体の例は空気、窒素、酸素、二酸化炭素、水素、酸化窒素、不活性ガス（例えばヘリウム、アルゴン、キセノン又はクリプトン）、場合によりハロゲン化されたシラン（例えばテトラメチルシラン）、場合によりハロゲン化された低分子炭化水素（例えば7個までの炭素原子を含む、例えばアルカン例えばメタン、エタン、プロパン、ブタン又はペンタン；シクロアルカン例えばシクロブタン又はシクロペンタン；アルケン例えばプロペン又はブテン；アルキン例えばアセチレン；エーテル；ケトン；エステル及び前記のいずれかのハロゲン化化合物で上に挙げたような過フッ化炭化水素を含む）、ハロゲン化硫黄（例えば六フッ化硫黄又は十フッ化二硫黄）及び前記のいずれかの混合物を含む。

脂質などの膜は肝臓により造影剤が拘束されるか及び／又は取り込まれた後、例えば表面における拘束により（例えば受容体との特異的相互作用により）又は既知の内在化過程により細胞に取り込まれた後、必ずしも非透過性のままであるか及び／又は気体微小泡に安定させる必要がないことは理解されるであろう。すなわち、そのような拘束／取り込みの後におけるエコー形成性は、元の膜形成性脂質又は他のオプソニン化性物質により安定させた気体微小泡、両親媒性物質の少なくとも一部分が内因生リン脂質により置き換えられた微小泡、造影剤から放出された遊離の気体微小泡（溶解しない場合、または肝臓により廃棄された）、又は前記のいずれかの組合せから得られるであろう。さらに気体微小泡の安定化は、気体が正常な血流ガス例えば酸素、二酸化炭素及び窒素より低い水溶解度を有する場合向上することが理解されるであろう。

本発明により使用する造影剤の微小泡は0.1~10 µm、例えば1~7 µmの平均の大きさを有するのが好都合であり、それにより、静脈内投与後肺組織を自由に通過しそして最後に肝臓及び脾臓のような臓器により取り込まれることが可能になる。そのような微小泡は、それでもなお実質的なエコー形成性（サイズ依存性特性）を発揮するに十分な大きさである。肝臓造影を向上させるこの大きさの微小泡の使用は、肝臓への毛管窓の通過を確実にするため約30~100nmの大きさが望ましいとするW0-A-9109629のような先行技術の提案と対比される。この大きさの範囲の気体微小泡は、上述の好ましい大きさの範囲より著しく低いエコー形成性を示すであろう。

所望により、肝臓における血流を刺激することができる物質、例えばグルカゴン、及び／又は食欲作用を刺激することにより肝臓取り込みを増加させることができる物質、例えば抗体、抗体断片又はフィブロネクチンを造影剤投与の前、その間又は後に投与してよい。本発明に有用な好ましいリン脂質含有造影剤は、例えば、注射されるリン脂質の量が0.1~10 µg/kg体重、例えば1~5 µg/kgであるような用量を投与することができる。そのような低い濃度のリン脂質の使用は、有毒な副作用の恐れを最小にする点で実質的な利点がある。

本発明に有用な好ましい造影剤は肝臓において、例えばクッパー細胞により迅速に取り込

10

20

30

40

50

まれることから、患者の肝臓造影は造影剤の投与後5～10分が経過したら直ちに実行してよいが、造影剤を最大限に取り込ませるため調査を若干、例えば投与後約30分まで遅らせるのが好ましい。肝臓におけるエコー形成性造影剤の長い滞留時間のため、投与後数時間（例えば2～8時間）有効な造影を実行することができる。

肝臓の超音波造影は、例えば約0.1～15MHz、例えば1～10MHzの造影振動数を使用して実行することができる。

本発明により使用することができる代表的な造影方法は、Mモード造影、Bモード造影、連続波ドップラー造影、パルス波ドップラー法例えば色又はパワードップラー造影、高調波造影、及び前記のいずれかの組合せを包含する。本発明に使用する両親媒性物質安定化微小泡造影剤の柔軟性は、例えば、US-A-5410516に記述されたような非線形効果に基づく高調波造影方法、例えば高次調波（例えば造影振動数の2、3、4...倍における）
10、低調波（例えば造影振動数の1/2、1/3、2/3、3/4...倍における）及び超高調波（例えば造影振動数の3/2、5/4...倍における）に特に適するものにしており、第二の高調波造影の使用が特に有利であろう。

高調波造影は典型的には高調波超音波エネルギーへの有効な変換をもたらすため、微小泡造影剤を高い強度の超音波放射に当てることが必要である。肝臓のような大きな組織部分においては、超音波強度の空間分布は入射超音波ビームを横断する不均一性の結果として極めて不均一であること、そして組織による音響的減衰のため、造影される組織の遠位部分から十分な戻り信号強度を得るためには極めて高い入射強度を使用することが必要となり得る。これにより、変換器に近接する組織部分において対比効果の速やかな消失を引き
20起こすことがあり、この場合、高い強度の超音波放射が周囲組織液への微小泡の溶解を促進し、そして放射の開始から僅か1秒以内に対比効果が消失する結果となる。これは組織部分の十分な概観を確保する点でそのような方法の有用性を不可避免的に制限する。

しかしながら、本発明に使用する造影剤の柔軟性は、低い入射超音波強度の場合でさえそれらが高調波エネルギー変換における高い効力を発揮する原因となり、変換器に近接する肝臓の部分において微小泡の破壊現象を引き起こさない低い超音波強度で肝臓の深部に位置する部分の高調波造影に関して本造影剤を役立つものにする。より一般的には、本造影剤の柔軟性は造影剤を破壊しない低い超音波強度水準での種々の造影方法に本造影剤を使用することを可能にし、それにより肝臓の中の関心のある部分の、例えば確認目的のための又は種々の造影方法を使用しての多重走査を容易にする。
30

しかしながら、所望により高い超音波強度水準を使用することができ、そしてコントラストは微小泡破壊を検出する方法により検出される。そのような方法の例は、位相感受性方法例えば色ドップラー（例えばUS-A-5425366に記述されている）又はパワードップラー、及び位相無感受性方法、例えばUS-A-5456257に記述された方法を含む。US-A-5425366により造影剤として使用する典型的にはポリマーで封入した微小泡と異なり、本造影剤は入射超音波エネルギーに対して極度に感受性であるように計画することが容易であり、例えば安定化用の両親媒性物質を単層の形体でを使用することによる。それにより微小泡破壊は驚くべき低い水準の使用超音波エネルギーで引き起こされ、極めて低い入射超音波エネルギー水準で肝臓又はその部分の効率のよい擬ドップラー造影が可能になる。

それにより使用される検出方法は非ドップラー相関に基づく方法、例えば色速度造影及び
40時間又は振動数領域で処理された連続超音波パルスの間の低い相関に基づくその他の方法を包含し、例えば場合により他の信号と混合したRF信号、振幅復調RF信号、又は他の方法を使用して処理したRF信号を使用する。真の又は見かけの微小泡破壊の検出は非線形方法、例えば放射超音波パルス、例えば高次調波、低調波または超高調波の基本振動の帯域幅の外にある信号又は、例えば放射パルス及びそのような調波から得られる振動数の和又は差を解析して実行することもできる。

驚くべきことに、正常には微小泡破壊を伴うと考えられる造影方法は本発明の造影剤を使用して反復して実行し得ることを見いだした。すなわちそのような方法は、微小泡を破壊するよりむしろ現在使用する造影剤の音響特性を可逆的に変化させ、それにより反復する走査を実行することを可能にすると思われる。
50

なお驚くべきことに、長い肝臓における滞留時間の後においてさえ本発明に有用な造影剤は血液及び組織の運動から生ずるそれより著しく幅広いスペクトルを有するドップラー信号を生ずることを見いだした。これにより、通常ドップラー造影に使用されるより高い濾波器設定を使用することによる妨害性の運動する人工産物と無関係に検出が可能である。より高い利得設定を同様に使用することができ、それにより全走査にわたる均質なコントラストの検出をもって影像を作ることが可能になる。

本発明に有用な造影剤は任意の適当な方法により製造することができ、有利には次の段階

i) オブソニン化性両親媒性物質、例えば膜形成性脂質を含む水性媒質中で気体微小泡の分散系を作る段階、

ii) このようにして得られた両親媒性物質で安定させた気体分散系を凍結乾燥して乾燥製造物を得る段階、そして

iii) 前記乾燥製造物を注射可能な担体液中で再構成する段階からなる方法による。

段階(i)は、例えば、両親媒性物質を含む水性媒質をいずれかの適当な乳濁液製造方法、例えば超音波処理、振盪、高圧均質化、高速攪拌又は高剪断混合に、例えばロータステータホモジナイザーを使用して選択した気体の存在下でかけることにより実行することができる。水性媒質は、希望により粘度増強剤としてそして両親媒性物質の溶解性助剤として作用する添加物、例えばアルコール又はポリオール、例えばグリセロール及び／又はプロピレングリコールを含ませることができる。

乳化段階で使用する気体は最終製造物で望まれるものである必要はない。従ってこの気体含有物の大部分は、その後の凍結乾燥段階で除きそして残留気体は乾燥製造物の排気により除き、次いでこれに希望の最終製造物気体を大気圧又は超過圧力下で加えることができる。従って、乳化気体は最終製造物に対する考慮を払うことなく純粋に乳化工程パラメータを最適にするように選ぶことができる。フッ化硫黄、例えば六フッ化硫黄又はフッ素化低分子炭化水素気体、例えば好ましくは4又は5個の炭素原子を含むペルフルオロアルカン又はペルフルオロシクロアルカンの存在下における乳化は、最後に一定したそして分布範囲の狭い微小泡の大きさの最終製造物を取得する点で特に有利である。

乳化は大体周囲温度、例えば約25±10℃で都合よく実行される。水和とそれにより両親媒性物質の分散そして次にそれを乳化に先立って周囲温度に平衡させることを容易にするため、最初に水性培地を加熱することが必要である。

段階(i)で作られた分散系は、添加物例えば粘度増強剤及び溶解性助剤、並びに望ましくない物質例えば気体を含まないコロイド粒子そして過小の及び／又は過大の微小泡を分離しそして除くため、凍結乾燥段階(ii)にかける前1回又は1回より多くの洗浄操作にかけるのが有利である。そのような洗浄はそれ自体既知の方法で実行することができ、微小泡は浮遊又は遠心分離のような方法を使用して分離される。このように大きさを分画した微小泡分散系は微小泡の少なくとも90%が2 µmの範囲内の大きさであるように、例えば2～5 µmの範囲内の体積平均直径を有するように作ることができる。

段階(ii)は1つ又は1つより多くの低温保護剤(cryoprotective agent)及び／又は液性保護剤(lyoprotective agent)及び／又は増量剤の存在下で実行するのが有利であり、そのような薬剤(1つ又は複数)は洗浄段階の後、凍結乾燥の前に添加するのが有利である。低温保護及び／又は液性保護作用を有する薬剤の実体についての表がActa Pharm. Technol., 34巻(3号), 129-139ページ(1988年)に記載されており、その内容は参照により本明細書に組み入れる。そのような薬剤の例は、アルコール(例えばt-ブタノールのような脂肪族アルコール)、ポリオール例えばグリセロール、アミノ酸例えばグリシン、炭水化物(例えばスクロース、マンニトール、トレハロース、グルコース、ラクトース及びシクロデキストリンのような糖、又はデキストランのような多糖)及びポリグリコール例えばポリエチレングリコールを含み、生理学的に十分許容される糖例えばスクロースの使用(例えば製造物に等張性又はいくらか高張性を与えるような量で)が好ましい。

気体分散系の凍結乾燥は、例えば、最初にそれを凍結しそしてその後凍結した気体分散系

10

20

30

40

50

を、例えばそれ自体一般に既知の方法で凍結乾燥することにより実行することができる。そのような凍結した気体分散系は凍結したまま貯蔵しそして希望するとき、例えば簡単な加温により及び／又は担体液の添加により解凍して本発明の造影剤として有用な微小泡分散系を再生することができる。

乾燥製造物は正常には投与前上述の段階 (iii) により再構成されるので、気体分散系は注射可能な形体に再構成するため、凍結乾燥した乾燥製造物の適当な量、例えば単一投与単位をそれぞれ含むバイアル瓶を与えるように凍結乾燥の前に密封可能なバイアル瓶に充填するのが好都合である。気体分散系をまとめてではなくむしろ個々のバイアル瓶で凍結乾燥することにより、微妙なハチノ巣状構造の凍結乾燥製造物を取り扱うことそしてこれらの構造の少なくとも一部分が変質する危険が回避される。凍結乾燥しそしていずれかの
10 随意のさらなる気体の排気及び究極に処方された造影剤中に微小泡として存在することが望まれる気体を上部空間に導入した後、バイアル瓶は適当な密閉具で密封することができる。

一般に凍結気体分散系又は段階 (ii) からの乾燥製造物は、例えばなんらかの必要な及び／又は所望の気体内容物の供給又は交換の後、適当な注射可能な担体液例えば注射用の無菌のパイロジェンを含まない水又は塩水の添加により再構成することができる。乾燥製造物がバイアル瓶の中にある場合、それを通して担体液を注射器を使用して注入することができる隔壁で密封するのが便利である。再構成後製造物を混合するか又は穏やかに振盪するのが好都合である。穏やかに手で振盪するだけで一定した微小泡の大きさの製造物が再
20 現性よく得られる。

本発明に有用な造影剤を製造するもう一つの方法は、粉末のオプソニン化性両親媒性物質を気体と接触させ、粉末の両親媒性物質を水性担体液と混合して気体の充満した微小泡の懸濁液を形成させ、微小泡から層を形成させ、この層を分離しそして分離した微小泡を洗浄することからなる (例えばUS-A-5445813に記述されているように)。使用することができさらに別の方法は、オプソニン化性両親媒性物質を含む水溶液を気体の存在下で振盪することを含む (例えばWO-A-9428780に記述されているように)。

次の非限定的な実施例は本発明を例証するものである。

【図面の簡単な説明】

添付の図面において：

図1Aは実施例7に記述のようにして得られた塩水処理対照ラットの肝臓からの試料の電子
30 顕微鏡写真であり、

図1Bは図1Aのしるしをつけた部分の拡大図であり、

図1Cは実施例7に記述のようにして得られた造影剤処理ラットの肝臓からの試料の電子顕
微鏡写真であり、そして

図1Dは図1Cのしるしをつけた部分の拡大図である。

A-造影剤の製造

実施例 1

a) ペルフルオロブタン微小泡分散体の振盪による製造

25.3mgの水素化された卵ホスファチジルセリンをプロピレングリコール及びグリセロール (3:10 w/w) の混合物の5.4% (w/w) を含む12.5mlの水に添加する。リン脂質物質を70℃
40 に約30分間加熱し、次いで室温に冷却することにより水和する。11mlの分散体を1mlづつ11個の2mlバイアル瓶に分注し、そしてバイアル瓶の上部空間をペルフルオロ-n-ブタンガスで満たす。バイアル瓶にしっかり栓を施しそしてEspe CapMix^(R) (歯科用材料用ミキサー) を使用して45秒間振盪する。得られる微小泡分散体を4つの大きなバイアル瓶に合体しそして2000rpmで5分間遠心分離すると微小泡の浮遊層の下に濁った下部浮遊層が得られる。下部浮遊層を注射器で除きそして等量の中性pHの水で置き換える。洗浄操作を繰り返すが、この場合は下部浮遊層を10% (w/w) スクロースで置き換える。得られる分散体の2mlづつを凍結乾燥用に特別に設計した10mlの平底バイアル瓶に分注し、そしてバイアル瓶を-47℃に冷却しそして約48時間凍結乾燥して白色綿毛状固体物質を得る。バイアル瓶を真空室に移し、そして空気を真空ポンプで除きそしてペルフルオロ-n-ブタンガ
50

スで置き換える。使用前、水を添加しそしてバイアル瓶を手で穏やかに数秒間振盪すると超音波造影剤に適当な微小泡分散体を得られる。

b) ペルフルオロブタン微小泡分散体のロータステータ混合による製造

500.4mgの水素化された卵ホスファチジルセリンをプロピレングリコール及びグリセロール (3:10 w/w) の混合物の5.4% (w/w) を含む100mlの水に添加する。混合物を振盪しそして80℃で5分間加熱し、室温に冷却させ、再び振盪しそして使用前一晩静置する。

得られる溶液の50mlを円錐状頸部を有する丸底フラスコに移す。フラスコに25℃に保つ水浴に接続した温度調節用入り口及び出口を有するガラスジャケットを取り付ける。ロータステータ混合用シャフトを溶液に挿入しそしてガス洩れを無くするため頸部壁及び混合用シャフトの間の空隙をガス含量の調節及び圧力制御のためのガス入り口／出口接続を取り付けた特別に設計した金属プラグで密封する。ガス出口は真空ポンプに接続しそして溶液を1分間脱気する。次いでペルフルオローn-ブタンガスの気体をガス入り口を通じて充填する。

ロータステータ混合用シャフトを開口部が液の表面より僅かに上にあるように保ちながら、溶液を23000rpmで10分間均質化する。白色のクリーム状分散体を得られ、これを密封可能な容器に移しそしてペルフルオローn-ブタンでフラッシングする。分散体を次に分液用漏斗に移しそして12000rpmで30分間遠心分離して上部の泡のクリーム状層及び濁った下部浮遊層を得る。下部浮遊層を除き、水で置き換える。次いで遠心分離を2回繰り返すが今回は12000rpmで15分間とする。最後の遠心分離後、上澄液を10% (w/w) スクロースで置き換える。得られる分散体の2mlづつを凍結乾燥用に特別に設計した10mlの平底バイアル瓶に分注し、そしてバイアル瓶を-47℃に冷却しそして約48時間凍結乾燥して白色綿毛状固体物質を得る。バイアル瓶を真空室に移し、そして空気を真空ポンプで除きそしてペルフルオローn-ブタンガスで置き換える。使用前、水を添加しそしてバイアル瓶を手で穏やかに数秒間振盪すると超音波造影剤に適当な微小泡分散体を得られる。

c) ペルフルオロブタン微小泡分散体の超音波処理による製造

500.4mgの水素化された卵ホスファチジルセリンをプロピレングリコール及びグリセロール (3:10 w/w) の混合物の5.4% (w/w) を含む100mlの水に添加する。混合物を振盪しそして80℃で5分間加熱し、室温に冷却し、再び振盪しそして使用前一晩静置する。

この溶液を4mlの超音波処理装置のフルスルーセルを通してポンプ送入しそして20kHzで90 μ mの振幅の超音波にさらす。超音波処理装置のホーンの直径は1.3cm、セルの内径は2.1cmそしてホーンとセルの底との距離は1cmである。脂質溶液をペルフルオローn-ブタンと1:2v/vの比率で混合した後超音波処理装置のセルに入れる (脂質溶液20ml/分そしてペルフルオローn-ブタンガス40ml/分)。温度を33℃に保つ。白色のクリーム状分散体を得られ、これを容器に満たしそしてペルフルオローn-ブタンでフラッシングする。

特徴の記述

微小泡のサイズ分布及び体積濃度を1～30 μ mの測定範囲の50 μ mの開口部を取り付けたコールターカウンターマークII装置を使用して測定する。20 μ lの試料を室温で空気中で飽和させた200mlの塩水で希釈し、そして測定の前3分間平衡させる。

超音波特徴調査は「アルブネックスミクロスフェアの超音波散乱特性 (Ultrasound scattering properties of Albunex microspheres)」, Ultrasonics 31巻 (3号)、175-181 ページ (1993年) に記述されたde Jong, N. 及び Hoff, L. の論文を僅かに修正した実験構成に基づいて実行する。この装置使用により造影剤の希釈懸濁液の2～8MHzの振動数範囲における超音波減衰効力を測定する。減衰測定の間試料を120mmHgの超過圧力に90秒間さらして圧力安定性試験を実施する。典型的には2～3 μ lの試料を55mlのIsoton IIで希釈しそして希釈した試料懸濁液を分析の前3分間攪拌する。一次応答パラメータとして3.5MHzにおける減衰を超過圧力の解除後の3.5MHzにおける回復減衰と一緒に使用する。

表 1. 1

実施例 1 (a)~(c)により製造した微小泡分散体の生体外特徴 (数及び体積加重濃度並びに体積平均直径。音響特性は上述のように測定した)

製造方法 (実施例番号)	数 濃 度 ($10^6/\text{ml}$)	体積濃度 (%)	体積平均 直 径 (μm)	3.5 MHz における 減 衰 (dB/cm)	超過圧力 解除後の 残 存 率 (%)	最大減衰 における 振 動 数 (MHz)
1(a)	1519	1.45	3.91	30.46	100	4.1
1(b)	10518	6.51	3.16	150.4	96	4.3
1(c)	23389	9.57	3.83	117	100	3.5

10

実施例 2

ロータステータ混合、凍結乾燥及び気体交換による種々の微小泡分散体の製造

実施例 1 (b)により製造した5つの試料の気体内容物をそれぞれ空気、ペルフルオロブタン、六フッ化硫黄、トリフルオロメチル硫黄ペンタフルオリド及びテトラメチルシランに次の手順により置き換える。

20

実施例 1 (b)からの凍結乾燥製造物を含む2つの試料を気体入り口及び気体出口を有するデシケーターに置く。このデシケーターを試料の制御された排気及び選択した気体の導入ができる

Büchi 168

真空/蒸留器制御装置に接続する。試料を約10mbarで5分間排気し、その後選択した気体を導入して圧力を大気圧まで増加させ、次いでバイアル瓶に注意深く蓋をする。この手順を選択した気体のそれぞれにつき試料の一对を使用して繰り返す。

2mlの蒸留水を各バイアル瓶に添加しそしてバイアル瓶を使用前穏やかに手で振盪する。

得られる微小泡分散体につき実施例 1 に記述したようにサイズ分布測定に関連した特徴調査を行う。その結果を表2.1に要約して示す。

30

表 2. 1

実施例 2により製造したホスファチジルセリン安定化微小泡分散体の生体外特徴 (数及び体積加重濃度並びに体積平均直径)

気 体	数 濃 度 ($10^6/\text{ml}$)	数平均直径 (μm)	体積濃度 (%)	体積平均直径 (μm)
ペルフルオロブタン	9756	1.8	4.9	5.8
トリフルオロメチル 硫黄ペンタフルオリド	10243	1.9	5.9	3.5
六フッ化硫黄	9927	1.9	5.7	3.2
テトラメチルシラン	9947	1.9	6.1	3.7
空 気	9909	1.9	6.4	4.0

40

上の結果に見られるように、気体交換によりサイズ分布に著しい変化はなく、前以て形成された微小泡の大きさは凍結乾燥及び再構成の両者の間に実質的に保持されることを示している。

50

B—超音波肝臓造影方法

実施例 3

ウサギの肝臓造影

実施例 1 により製造した造影剤を鎮静剤としてキシラジン塩酸塩及びケタミン塩酸塩の混合物の0.65mg/kgを筋肉内に投与したウサギにリン脂質 5 μ g/kgの用量で静脈内注射した。超音波変換器を肝臓部分の上の毛を剃った皮膚の上に置いた。Bモード造影（5～7MHz）、色ドップラー造影、第二高調波造影、パワードップラー造影、高調波及び色ドップラー造影の組合せ並びに高調波及びパワードップラー造影の組合せは肝臓に移植したVX2腫瘍の存在を示しそして動脈内投与したエチオドールを造影剤として使用するX線ラジオグラフィにより得られた結果と相関していた。

10

実施例 4

ウッドチャックの肝臓造影

実施例 3 の手順を使用してウッドチャックの自然発生した肝臓腫瘍の存在を検出した。その結果は肝臓の組織学的検査と相関していた。

実施例 5

イヌの肝臓造影

実施例 1（a）のように製造した1%微小泡分散体の66 μ lを20kgの雑種のイヌに静脈内注射した。肝臓の第二調波造影を注射の前及び10分後に第二調波造影を装備したATL HDI-3000スキャナーを2.5MHzの放射振動数でそしてP5-3整相列セクター走査変換器を使用して作った。スキャナーの電気出力は0.3の機械的指数（MI）の低い水準に設定した。変換器を中線に近接した肋骨下の位置に置いた。注射後に得られた影像における肝臓の対比誘導増強は安定でありそして連続超音波走査にもかかわらず安定でありそして時間とともに低下しないことが明らかであった。注射前に得られた基線影像と比較して、10cmを超える深度に及ぶ全肝臓の明らかな対比増強が認められた。

20

実施例 6

ヒト肝臓の腫瘍の造影

実施例 1（a）のように製造した1%微小泡分散体の10 μ lを女性の人患者に静脈内注射した。ATL HDI-3000スキャナーを使用して実行した肝臓の基本Bモード造影は明らかに転移病変の回りの脈管の管増強を示していた。注射後15分には、基線走査においては周囲組織と等エコー性であり、そのため当初は見るのが困難であった病変が周囲の正常な肝臓組織がよりエコー形成性になるにつれて向上した可視性を示した。この効果は注射後30分においてはより一層明らかになり、肝臓における造影剤の長い滞留時間の後まで持続するそして改良された対比効果を示した。

30

実施例 7

ラット肝臓における生体内取り込み後の造影剤の細胞内分布

3匹の麻酔をかけられていないラットにそれぞれ実施例 1（a）のように製造した1%微小泡分散体を尾静脈内に1回の静脈内注射を行った（体重kg当り50 μ lの微小泡、人における典型的な造影用量の数百倍に相当する）。対照ラットには同様に塩水を注射した。注射に続いてラットに麻酔をかけた。注射後10分に腹及び胸壁を切開し、そして肝臓を緩衝剤（100mMのHEPES, pH7.4）でそれが青白くなるまで、そして次にグルタルアルデヒド（2%v/v）を含む同じ緩衝剤でそれが硬くなるまで灌流した。次いで肝臓を摘出しそして薄い薄片に切った。組織試料をエポキシ樹脂で処理し、そして光学顕微鏡による検査のためやや薄い（約1 μ m）切片に切った。適当な部分を光学顕微鏡検査により選択しそしてそれから小部分の超薄切片を切り出しそして電子顕微鏡検査のため四酸化オスミウムで染色した。

40

塩水処理ラットからの試料に関連する対照電子顕微鏡写真（図1A及び図1Bのその拡大図参照）は、クッパー細胞、内皮細胞又は実質細胞に空胞化のないことを示した。造影剤処理ラットからの試料に関連する電子顕微鏡写真（図1C及び図1Dのその拡大図参照）は、いくつかのクッパー細胞が内面化した微小粒子又は微小泡（“P”）を有することを示した。そのような微小粒子又は微小泡は内皮細胞又は実質細胞では明らかにされなかった。その上

50

、リン脂質物質と信じられる濃く染色された物質（“PL”）がいくつかの微小粒子又は微小泡の縁に認められた。

【図 1 A】

FIG. 1A



【図 1 B】

FIG. 1B.



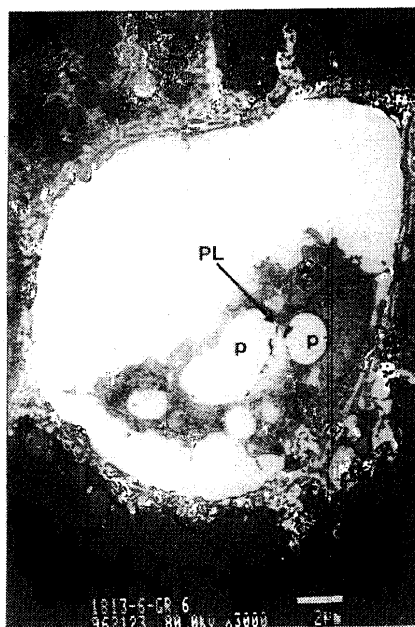
【図 1 C】

FIG. 1C.



【図 1 D】

FIG. 1D.



フロントページの続き

- (72)発明者 ジョンソン, デイヴィッド
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19087-8630. ウェイン. ピー・オー・ボックス66
30. デヴォンパークドライブ466. ニュコメド・インコーポレイテッド
- (72)発明者 エーステンセン, ヨニー
ノールウェー国エン-0401 オスロ. ピー・オー・ボックス4220トルシヨヴ. ニュコヴェ
イエ2. ニュコメド・イメージング・アクシエセルカペト
- (72)発明者 エリクセン, モーテン
ノールウェー国エン-0401 オスロ. ピー・オー・ボックス4220トルシヨヴ. ニュコヴェ
イエ2. ニュコメド・イメージング・アクシエセルカペト
- (72)発明者 トーネス, アウデュン
ノールウェー国エン-0401 オスロ. ピー・オー・ボックス4220トルシヨヴ. ニュコヴェ
イエ2. ニュコメド・イメージング・アクシエセルカペト
- (72)発明者 フリグスタード, シーグミュン
ノールウェー国エン-0401 オスロ. ピー・オー・ボックス4220トルシヨヴ. ニュコヴェ
イエ2. ニュコメド・イメージング・アクシエセルカペト
- (72)発明者 デュグスタード, ハーラル
ノールウェー国エン-0401 オスロ. ピー・オー・ボックス4220トルシヨヴ. ニュコヴェ
イエ2. ニュコメド・イメージング・アクシエセルカペト
- (72)発明者 クラーヴェネス, ヨー
ノールウェー国エン-0401 オスロ. ピー・オー・ボックス4220トルシヨヴ. ニュコヴェ
イエ2. ニュコメド・イメージング・アクシエセルカペト
- (72)発明者 ロングヴェド, ポール
ノールウェー国エン-0401 オスロ. ピー・オー・ボックス4220トルシヨヴ. ニュコヴェ
イエ2. ニュコメド・イメージング・アクシエセルカペト
- (72)発明者 スクートヴェイト, ロウアール
ノールウェー国エン-0401 オスロ. ピー・オー・ボックス4220トルシヨヴ. ニュコヴェ
イエ2. ニュコメド・イメージング・アクシエセルカペト
- (72)発明者 ブレンデル, ヨールン
ノールウェー国エン-0401 オスロ. ピー・オー・ボックス4220トルシヨヴ. ニュコヴェ
イエ2. ニュコメド・イメージング・アクシエセルカペト

審査官 小堀 麻子

- (56)参考文献 国際公開第94/028780 (WO, A1)
国際公開第96/008234 (WO, A1)
特表平07-507780 (JP, A)
特表平07-507778 (JP, A)
特表平11-501305 (JP, A)
特表平11-506782 (JP, A)
Journal of liposome Research, 1996年, Vol.6, No.1, pp19-32

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
A61K 49/00
CAPLUS(STN)
MEDLINE(STN)
EMBASE(STN)