

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4050331号

(P4050331)

(45) 発行日 平成20年2月20日(2008.2.20)

(24) 登録日 平成19年12月7日(2007.12.7)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 N 1/32 (2006.01)

A 6 1 N 1/32

請求項の数 6 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願平11-538483	(73) 特許権者	502299812
(86) (22) 出願日	平成11年1月22日(1999.1.22)		ジェネトロニクス インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2001-517998(P2001-517998A)		アメリカ合衆国、カリフォルニア州 92
(43) 公表日	平成13年10月9日(2001.10.9)		121、サンディエゴ、ソレント ヴァリ
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/001293		ー ロード 11199
(87) 国際公開番号	W01999/037358	(74) 代理人	100064746
(87) 国際公開日	平成11年7月29日(1999.7.29)		弁理士 深見 久郎
審査請求日	平成16年4月15日(2004.4.15)	(74) 代理人	100085132
(31) 優先権主張番号	09/014,291		弁理士 森田 俊雄
(32) 優先日	平成10年1月27日(1998.1.27)	(74) 代理人	100083703
(33) 優先権主張国	米国(US)		弁理士 仲村 義平
(31) 優先権主張番号	09/206,635	(74) 代理人	100096781
(32) 優先日	平成10年12月7日(1998.12.7)		弁理士 堀井 豊
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 接続電極テンプレートを有する電気穿孔装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 間隔をおき、実質的に平行に配置された複数の支持部材を収容するハウジングと、ここで、前記支持部材はそれぞれ、該支持部材を貫通して延び、かつ複数の平行な列状に配置された複数の孔を含み、

一の支持部材における前記孔のうち、少なくともいくつかは、前記ハウジング内に配置された他の支持部材の孔と位置合わせされており、

(b) それぞれの前記支持部材上の複数の導体と、ここで、各導体は、別々に、前記支持部材上の前記複数の孔の少なくとも1つに接続されており、

(c) 複数の針電極と、ここで、前記針電極はそれぞれ、前記支持部材内の1組の位置合わせされた孔に、スライド可能に結合されており、前記針電極の少なくとも1つは、組織内に分子を注入可能なように管状の構造を有しており、かつ、

少なくとも1つの前記支持部材における少なくとも1つの孔に結合された少なくとも1つの導体は、前記複数の針電極の少なくとも1つと電気的に接触しており、

(d) 前記導体を電源に接続するための手段と、を備える、電気穿孔用針電極テンプレート装置。

【請求項2】

前記孔は、矩形の配列または複数の平行な列から選択される構造を有する、請求項1に記載の針電極テンプレート装置。

【請求項3】

一方の極性を有する複数の電極と対向する反対の極性を有する複数の電極、および／または、所定方向におけるすべての平行な行の電極が、同時にパルスを与えられるように、前記導体を電源に選択的に接続するための切換手段を含む、請求項1または2に記載の針電極テンプレート装置。

【請求項4】

前記電極のうち少なくとも1つは、骨に挿入するため穿孔端として構成される、請求項1から3のいずれかに記載の針電極テンプレート装置。

10

【請求項5】

前記支持部材は、プリント回路基板である請求項1に記載の針電極テンプレート装置。

【請求項6】

各基板上の電極への導体の接続は一行上である、請求項5に記載の針電極テンプレート装置。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は一般に電気穿孔の分野に関し、より特定的には、新形成の細胞に薬剤を導入してその細胞に損傷を与えるための、電気穿孔の使用に関する。

発明の背景

20

細胞は、その膜を通じて細胞質内に入る分子の通過に対して、本来的な抵抗力を有する。1970年代に科学者達は最初に「電気穿孔法」を発見した。この方法においては、細胞に、永久的な損傷を与えることなく孔を開けるのに、電界を使用する。この発見により、細胞質内に直接、大きな分子を挿入することが可能となった。電気穿孔法はさらに発展し、分子が細胞内へと通過する孔を細胞に一時的に開けることによって、種々の分子を細胞質内に挿入することができるようになった。

電気穿孔法は、多くの異なる種類の細胞内に物質を注入するのに使用されてきている。このような細胞はたとえば、卵、血小板、ヒトの細胞、赤血球、哺乳類の細胞、植物原形質体、植物花粉、リポソーム、細菌、真菌、酵母、および精子を含む。さらに、電気穿孔法は、本明細書中「注入物質」、「注入分子」および「注入薬剤」と称される、種々の物質を注入するのに使用されてきている。これらの物質は、DNA、遺伝子および種々の化学薬剤を含む。

30

電気穿孔法は、外来の物質を生きた細胞内に導入するのに、インビトロおよびインビボの方法で使用されてきている。インビトロの用途においては、生きた細胞のサンプルがまず注入薬剤と混合され、並列プレート等の電極の間に配置される。その後電極によって電界が細胞／注入薬剤の混合物に付与される。

電気穿孔のインビボの用途においては、電極は、治療されるべき細胞の領域を覆う表皮を挟むカリバス等の、種々の構成で提供される。代わりに、針状の電極が患者内に挿入されて、より深く位置する細胞にアクセスするようにされてもよい。いずれの場合においても、注入薬剤が治療領域内に注入された後、電極によって電界がその領域に付与される。インビボの電気穿孔を行なうシステムの例は、Electro Cell Manipulator ECM600製品、およびElectro Square Porator T820を含む。これらは双方ともGenetronics, Inc.のBTX事業部によって製造され、そこから入手可能である。

40

ある種の癌を化学療法剤で治療する場合、容認することのできないほど多数の正常な細胞を死滅させることなく癌細胞を殺すのに十分な用量の薬を使用することが必要である。化学療法用の薬を癌細胞内に直接挿入することができれば、この目的を達成することが可能となる。最適な抗癌剤のいくつか、たとえばブレオマイシンは通常、ある種の癌細胞の膜を有効に通ることができない。しかしながら、電気穿孔法によれば、ブレオマイシンをそれら細胞内に挿入することが可能となる。

一般に、この治療は、抗癌剤を直接、腫瘍内に注入し、1または複数対の電極の間で腫瘍

50

に電界を印加することによって実行される。薬の分子は腫瘍細胞の間、細胞内または細胞の周りに存在する間質液中に懸濁される。腫瘍細胞を電気穿孔することによって、多くの細胞に隣接する薬の分子がその細胞内に押し込まれるかまたは引き込まれ、その後、癌性腫瘍細胞を死滅させる。「電気化学療法」とは、化学療法剤を腫瘍細胞に直接配達する、電気穿孔法の治療への応用である。

(インビトロおよびインビボの) 公知の電気穿孔法は、治療領域の周りに位置付けられた電極に短い高電圧パルス印加することによって作用する。電極間に生成される電界により、細胞膜は一時的に多孔性となり、そこから、注入薬剤の分子が細胞内へと入る。公知の電気穿孔法の用途においては、この電界は、およそ $100\text{ }\mu\text{s}$ のオーダーの持続期間で、 1000 V/cm のオーダーの単一方形波パルスからなる。このようなパルスはたとえば、Genetronics, Inc. の BTX 事業部によって製造される Electro Square Porator T820 の公知の応用において生成させることが可能である。体内の多くの器官や体内の腫瘍に対する電気穿孔の用途においては、針電極が非常に有用であることが見出された。

電界が、電気穿孔された細胞に実際的な損傷を与える場合がある。たとえば、過度の電界は、細胞壁に永久的な孔を開けることで、細胞に損傷を与えるおそれがある。極端な例では、電界は細胞を完全に破壊しかねない。したがって、選択可能な針電極アレイを使用することができる、改良された電気穿孔法および装置が望まれる。

発明の概要

この発明は、細胞、特に新形成の細胞、に損傷を与えるための、細胞治療用電気穿孔装置を提供する。

本発明の第 1 の局面は、電極テンプレート装置を含む。該電極テンプレート装置は、対向する表面を有する主要支持部材と、支持部材を通じかつ対向する表面を通じて延びる複数の孔と、該複数の孔の少なくとも 1 つに別々に接続される該支持部材上の複数の導体と、各導体とその少なくとも 1 つに接続されるようになっている、該複数の孔を通じて選択的に伸長可能である複数の電極と、該導体を電源に接続するための手段とを含む。この電極テンプレート装置は、治療薬を細胞内に導入するために、細胞に高電圧電界を印加するのに利用される。

本発明の別の局面によれば、該装置は、対向する平行な表面を有する主要支持部材と、矩形の配列 (アレイ) で配置されかつ該支持部材を通じかつ該対向する表面を通じて延びる複数の孔と、該複数の孔の少なくとも 1 つに別々に接続される該支持部材上の複数の導体と、各導体とその少なくとも 1 つに接続されるようになっている、該複数の孔に装着される複数の針電極と、該導体を電源に接続するためのコネクタとを含み、ここで、該針電極の少なくとも 1 つは組織内に薬剤を注入するための管状構造を有する。該組織には該薬剤が接触し、高い振幅の電気信号のパルスが、薬剤とともに細胞を電気穿孔するために細胞に印加される。

【図面の簡単な説明】

図 1 は、本発明の例示の具体例を用いるシステムを示す斜視図である。

図 2 は、使用時の図 1 の具体例を示す立位側面図である。図 2 A は、針電極の先端の 1 具体例を詳細に示す、部分拡大立位側面図である。

図 3 は、図 1 に示したコネクタの第 1 の層またはプリント基板を示す。

図 4 は、該コネクタの第 2 の層を示す、図 3 と同様の図である。

図 5 は、該コネクタの第 3 の層を示す、図 3 と同様の図である。

図 6 は、該コネクタの第 4 の層を示す、図 3 と同様の図である。

図 7 は、該コネクタの第 5 の層を示す、図 3 と同様の図である。

図 8 は、該コネクタの第 6 の層を示す、図 3 と同様の図である。

図 9 は、該コネクタの第 7 の層を示す、図 3 と同様の図である。

図 10 は、針が適所に示される、図 3 から図 9 の層の位置付けを示す斜視図である。

図 11 は、コネクタの行に沿ってとられた部分断面図である。

図 12 は、ユニットの 3 つのラインの導体を横切るようにとられた部分断面図である。

図 13 は、針電極アレイの概略図である。図 13 A は、別の電極接続モードにおける、図

10

20

30

40

50

1の針電極アレイの概略図である。

図13Bは、別の電極接続モードにおける、別の針電極アレイの概略図である。

図14は、図13のレイアウトに対する回路接続を示す、プリント基板の平面図である。

図15は、図13のレイアウトに対する第2の接続群を示す、図14と同様の図である。

図16は、電極アレイの他の具体例の概略図である。

図17は、電極アレイの別の具体例の概略図である。

図18は、電極アレイのさらに別の具体例の概略図である。

図19は、電極アレイのさらに別の具体例の概略図である。

図20は、電極アレイに接続されるパルス発生器および切換回路を含む、システムの概略図である。

10

図21は、電極が引込められた位置にある、ホルダ内に装着された針電極を示す、本発明の別の具体例を示す立位側面図である。

図22は、針電極を延ばした位置で示す、図16と同様の図である。

図23は、図21に示したホルダの詳細を示す拡大図である。

図24は、針電極を引っ込めた位置で示す、カテーテルに適用される、図21と同様の、本発明の具体例を示す立位側面断面図である。

図25は、針電極を延ばした位置で示す、図24と同様の図である。

図26は、図24の電極アレイを具現化する、カテーテルの斜視図である。

図27は、使用時における本発明の別の具体例を示す立位側面断面図である。

図28は、治療後に生き残ったPC-3細胞のパーセンテージを、インビトロで付与されたブレオマイシンの濃度と比較して示すグラフである。結果は、ブレオマイシンのみで治療した細胞を(●)で示し、ブレオマイシンおよび電気穿孔で治療した細胞を(○)で示す。

20

図29は、ヌードマウスにおけるヒト前立腺腫瘍(PC-3)の腫瘍体積を示すグラフである。結果は、治療なしを(●)で、ブレオマイシンのみで治療したものを(○)で、ブレオマイシンおよび電気穿孔で治療したものを(▼)で示す。

図30は、治療後に生き残ったPC-3細胞のパーセンテージを、インビトロで印加された電圧(V)と比較して示すグラフである。

好ましい具体例の説明

本明細書中および請求の範囲で使用される単数の形「a」、「and」および「he」は、文脈から明らかにそうでない場合を除いて、複数をも含むものと解釈されたい。したがって、たとえば「a cell (細胞)」という記載は、少なくとも1つの細胞を含みまた複数の細胞をも含む。同様に、「the needle (針)」という記載は、1または複数の針および、当業者に公知の均等物をも含むと解釈されたい。

30

本明細書中に使用されるすべての技術用語および科学用語は、特に記載がない限り、本発明が属する当該技術分野において当業者に一般に理解されているのと同じ意味で使用される。この明細書中に説明したものと類似または均等の如何なる方法、装置および材料も、本発明の実施または試験に使用することが可能であるが、好ましい方法、装置および材料を以下に説明する。

本明細書中に言及するすべての文献は、ここに説明する発明とともに使用され得る、それら文献内に説明される細胞、治療薬および方法を説明しかつ開示する目的で、ここにその全文が引用により援用される。上述のおよび本文を通じて記載される文献は、本願の出願日に先立って開示されたもののみが提示される。

40

本発明は、電気穿孔を治療に応用するための装置を使用する方法を提供する。該方法は、化学治療薬または分子の注入、および腫瘍への該薬剤または分子の電気穿孔を含む。該薬剤は組織内に注入され、少なくとも1つの電圧パルスが、該組織に配された針電極間に印加される。該針は、電極として機能し、該組織の細胞に電界を生成させる。以下に説明する針電極アセンブリは、電極を皮下腫瘍または他の組織内にもしくはそれに隣接してインビボで位置付けることを可能にする。このような治療は、電気穿孔法(EPT)と称されるが、これは電気化学療法の一つの形である。以下の説明はEPTについてなされるが、

50

本発明は体内のある器官の遺伝子治療等の、他の治療にも応用することが可能である。

治療方法

本発明の治療方法は、インビボまたはインビトロのいずれかで細胞または組織に薬剤を配達するための、本発明の装置を使用する、電気穿孔法（EPT）とも称される電気治療を含む。ここで使用される「薬剤」または「分子」という用語は、薬（たとえば化学治療薬）、核酸（たとえばポリヌクレオチド）、ペプチドおよび抗体を含むポリペプチドを意味する。ポリヌクレオチドという語は、DNA、cDNAおよびRNA配列を含む。

「化学治療薬」とは、抗腫瘍または細胞傷害効果を有する薬剤である。このような薬剤は、通常は生物体内で見ることができない「外因性」薬剤（たとえば化学化合物および薬物等）であり得る。このような薬または薬剤は、ブレオマイシン、ネオカルチノスタチン、スラミン、ドキシソルビシン、タキソール、マイトマイシンCおよびシスプラチンを含む。他の外因性の化学治療薬は、当業者には公知であろう（たとえばThe Merck Indexを参照）。化学治療薬はまた、生物体に本来固有の、「内因性」の薬剤であってもよい。内因性薬剤は、サイトカイン等の生物学的応答調節剤またはホルモン等の、好適な天然由来の薬剤を含む。

治療用ペプチドまたはポリペプチドはまた、本発明の治療方法に含まれ得る。たとえば、免疫調節剤および他の生物学的応答調節剤を投与して、細胞に取込ませることが可能である。「生物学的応答調節剤」という用語は、免疫応答を変更するのに加わる物質を含むものと意味付けられる。免疫応答調節剤の例は、サイトカインのような化合物を含む。「サイトカイン」という語は、ナノモルからピコモル程度の濃度で体液性調節剤として機能し、正常なまたは病気の状態において個々の細胞および組織の機能的活性を調節する、可溶性のタンパク質およびペプチドの多様な群のための総称として使用される。ポリヌクレオチドもまた含まれるが、これは、代謝酵素、およびたとえばファクターVIIIIまたはファクターIX等の、抗脈管形成化合物を含むタンパク質をコードする。

電気化学療法においては、電気穿孔は、化学治療薬を腫瘍細胞内に直接配達するのに使用される。「電気穿孔」とは、薬剤の標的となる組織（または細胞群）の細胞の一部分および／または細胞膜の透過性が高められることを意味し、このような高められた透過性は、細胞を通じて電圧を印加した結果として得られる。電気穿孔法が、細胞膜に孔を開けることによって、腫瘍細胞内にブレオマイシンまたは他の薬等の化学治療薬を入れることを容易にする、と信じられている。この治療は、腫瘍内に直接抗癌剤を投与し、電極対間で腫瘍に電界を印加することによって実行される。理論に縛られることなく、薬の分子は腫瘍細胞の間、該細胞内または該細胞を取囲む間質液内に懸濁される。腫瘍細胞を電気穿孔することによって、それら細胞の多くに隣接する薬の分子が細胞内に押込まれるかまたは引込まれ、その後、癌性腫瘍細胞を殺す。

インビボの任意の細胞を、本発明の方法によって治療することが可能である。本発明の方法は、体内の種々の器官系の細胞増殖傷害を治療するのに有益である。細胞を治療するための本発明の方法は、前立腺、膵臓、喉頭、咽頭、唇、咽喉、肺、腎臓、筋肉、乳房、結腸、子宮、胸腺、精巣、皮膚および卵巣細胞の治療を含むが、これらに限られるものではない。これら細胞は、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヒツジおよびヒトを含む、どの哺乳類の細胞であってもよい。好ましい具体例においては、これら細胞はヒトの細胞とされる。

「新形成」という語は、不適当な細胞増殖の病気を意味する。この傷害は、腫瘍組織の大部分が生体器官の機能を危うくする際に、臨床上最も明らかである。「細胞増殖傷害」という語は、形態学的小および遺伝子型から見て周囲の組織とはしばしば異なって見える、悪性および悪性ではない細胞群を意味する。悪性細胞（すなわち腫瘍または癌）は、多数のステップを含むプロセスの結果として増殖する。正常な組織の増殖を説明する概念は、悪性組織にも当てはまる。なぜなら、正常な組織も悪性の組織も、単一の細胞レベルおよび組織レベルの両方において、同様の増殖特性を共有し得るためである。腫瘍は、細胞レベルの増殖の調整傷害と同様に組織レベルの増殖の調整障害を起こす病気である。腫瘍の増殖特性は、新しい細胞の生成が細胞の死滅を超えるようになるものであり、新形成が、

10

20

30

40

50

自己再生する幹細胞の割合を増加させ、かつそれに対応して、成熟に向かう割合を低下させるのである (McCulloch, E.A.他、"The contribution of blast cell properties to outcome variation in acute myeloblastic leukemia(AML)", Blood 59:601-608, 1982)。一具体例においては、本発明の方法によって治療される細胞は新形成細胞である。したがって、本発明の電気穿孔法は、細胞増殖傷害を治療するのに使用することが可能である。

電気化学療法と称されるプロセスにおいて細胞増殖傷害を電気穿孔で治療する応用をテストする、多くの実験がなされてきている。この治療は、抗癌剤を腫瘍内に直接注入し、電極対間で腫瘍に電界を印加することによって実行される。電界の強度は、腫瘍細胞の電気穿孔が正常なまたは健康な細胞を多数損傷することなく行なうことができるように、合理的に正確に調整されねばならない。これを実行するために、外部腫瘍には、電界が電極間で付与されるように腫瘍の両側に電極を設ける。その後、電極間の距離を測り、公式 $E = V/d$ に従った好適な電圧を電極に印加することができる。本発明の方法において使用される電極装置は、腫瘍細胞の電気穿孔のために腫瘍組織内に所定の電界を生成させることができるよう、腫瘍内にまたはそれに隣接して挿入することのできる電極を有する。一具体例において、この装置によってかけられる電界は、約 50 V/cm から約 1500 V/cm の範囲である。この電界は、約1から約10個の電気パルスとして印加することができる。一具体例において、電界パルスはその持続期間が約 $5\text{ }\mu\text{秒}$ から 50 m秒 であるパルスとして与えられる。この電気パルスは、方形波パルス、指数波パルス、持続期間が限られた単極振動波形、または、持続期間が限られた双極振動波形として印加することが可能である。一具体例においては、電気パルスは方形波パルスで構成される。

電気パルスは、薬剤の注入の前に、それと同時に、またはその後に与えることができる。薬剤の化学的組成によって、電気パルスの投与に対して薬剤を注入するのに最も適した時間が決まる。たとえば、特定の理論にとらわれたいはないが、低い等電点を有する薬（たとえばネオカルチノスタチン、 $\text{IEP} = 3.78$ ）は、電界内の強く荷電された静電的相互作用を防ぐために、電気穿孔の後に注入されるのがより効果的であると信じられている。さらに、プレオマイシン等の薬は、非常に強く負電気を帯びた $\log P$ (P はオクタノールと水との分配係数である) を有し、これらは、そのサイズが非常に大きく ($\text{MW} = 1400$) かつ親水性であるため、脂質膜と密接に結合し、腫瘍細胞内に非常にゆっくりと拡散するので、典型的に電気パルスよりも前にまたは実質的にそれと同時に、注入される。好ましくは、該分子は電気穿孔治療と実質的に同時発生的に注入される。「実質的に同時発生的」という語は、分子と電気穿孔治療とがともに妥当な近い時間で投与されることを意味する。分子または治療薬の投与および電気穿孔は、たとえば、腫瘍の性質、患者の症状、分子のサイズおよび化学的特性、ならびに分子の半減期等の要因に応じて、どのような間隔でも行なうことが可能である。

化学治療薬はしばしば、正常な細胞には有害であるが、電気穿孔は、使用されるこれらの化学物質の量を最小に抑えることが可能である。特に、電気穿孔によって注入薬剤がより多く実際に細胞内に入ることが可能になるため、腫瘍領域内に導入する化学治療薬の量を少なくすることができるのである。

本発明の方法においては、薬剤の「投与」は、当業者に知られたどのような方法でも行なうことが可能である。本発明の方法における薬剤の投与は、たとえば、注射、高速点滴、鼻咽頭吸収、皮膚吸収等によって非経口で、および経口で行なうことができる。腫瘍の場合、たとえば、化学治療薬または他の薬剤は、局所的に、全身に、または腫瘍内に直接注入することで、投与することができる。一具体例においては、薬を腫瘍内に直接投与する際に、その薬は「扇状」に注入される。「扇状」という語は、腫瘍を通じて薬をより広範囲に提供するために、薬を注入する際に針の方向を変えて、または多方向に多数回注入することによって、塊ではなく扇子を広げるように、薬を投与することを意味する。腫瘍を通じて薬が十分に行き渡るよう、腫瘍に対して十分な用量を確実に投与できるように、薬を含む溶液の体積を調節することが望ましい。たとえば、典型的な注入は、治療される組織のサイズ、体積または重量に基づいて行なわれる。ここに説明する薬を使用したある特

10

20

30

40

50

定の非限定的な例（例の項を参照）においては、薬を含む $0.25 \text{ ml} / \text{cm}^3$ の溶液が治療される組織に注入される。このように、薬を含む溶液の体積は、治療される組織のサイズに基づいて調節される。ヒトの組織においては、その体積は同様に、腫瘍の灌流を十分に確保するように調節される。一具体例においては、ヒトに対する注入は、腫瘍の基部のまわり全体に、扇状に、非常にゆっくりと行なわれる。

経口注入のための調製物は、滅菌したまたは水性のまたは非水性の溶液、懸濁液、およびエマルションを含む。非水性の溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブオイル等の植物油、および、オレイン酸エチル等の注入可能な有機エステルを含む。不活性な希釈剤とは別に、このような組成物はまた、佐剤、湿潤剤、乳化剤、および懸濁剤を含み得る。さらに、パルス投与の前に治療薬を局所に留めておくために、

10

電気穿孔装置

図面の図1を参照して、本発明の方法に有用である例示的な具体例を実現する電気穿孔システム10が示される。このシステムは、高電圧パルスを生成させるためのパルス発生器12を含み、好ましくはGenetronics, Inc.「MedPulser」の商標で販売される型の発生器である。パルス発生器は好ましくは、1997年8月1日に出願された、「薬および遺伝子の電気穿孔媒介デリバリーを使用する治療方法（“Method of Treatment Using Electroporation Mediated Delivery of Drugs and Genes”）」と題された、出願連続番号第08/905,240号に開示された種類のものであり、該発生器では、ユーザが規定するパルスを選択することが可能であり、また種々のパラメータをプログラムすることができる。これは、特定の用途に好適なパルス付与方式を予め選択することができるようにするものである。

20

パルス付与ユニットは、パワーセレクトスイッチ14を有する通常のコントロールパネルを有し、また、遠隔作動手段16等の他の制御手段を有してもよい。このパネルはまた、治療設定点のためのデジタル読出装置18等の、オペレータに対して種々の状態およびパラメータを示すさまざまなインジケータ（表示装置）を有する。導体ケーブル20は、パルス発生器を複数の電極のためのコネクタおよびテンプレート22に接続する。該電極コネクタおよびテンプレート22は、選択された電極を選択された導体に接続する働きをし、それら選択された導体が今度は、それら電極をパルス発生器に接続する。該テンプレートはまた、電極の予め定められた1または複数のアレイを確立する一助となる。

30

細胞の最適な電気穿孔または穿孔のためには、組織に対して正確でかつ制御された電圧を印加せねばならない。したがって、選択された電極間に最適な電圧を印加することができるよう、電極間の間隙がわかっていることが重要である。電圧は、細胞に最適な電圧を加えるために、電極間の間隙に従って印加されねばならない。コネクタテンプレート22は、所定の間隙を有する所定のアレイ内に任意の数の電極を選択的に位置付ける手段を提供する。

図示されるシステムは当初、前立腺癌に対する電気穿孔治療を針電極を使用して行なうために設計されたものである。しかし、このシステムを、体からまたは他の表面から届く、任意の数の外部腫瘍および内部腫瘍または体内器官に対して、利用することが可能であることは明らかであろう。たとえば、このシステムは、針電極によってまたは切開手術を含む他の方法によって近づくことのできる、前立腺腫瘍、乳房腫瘍、局所腫瘍、膀胱腫瘍、肝臓腫瘍または体内の他のいかなる器官の治療をも可能にする。本明細書では、たとえば腫瘍内の細胞に薬を挿入することについて主に説明しているが、これが、体内器官内において、あるいは当該器官もしくは組織の細胞内において、遺伝子応答を変更または生成させるため、体内の器官内または選択された任意の組織内の細胞にDNAまたは他の遺伝子物質を挿入するのに使用できることもまた、明らかであろう。

40

本出願人は実験を通じて、好ましくは平行、矩形または正方形のパターンに配列された多数の電極アレイ内の少なくとも数対の電極等、複数電極の対向する組の間でパルスを付与することによって、1対の電極間でパルスを付与した場合よりもよりよい結果が得られることを見出した。たとえば「薬および遺伝子の電気穿孔媒介デリバリー（“Electroporat

50

ion Mediated Delivery of Drugs and Genes”）」と題された出願連続番号第08/467, 566号に開示されるのは、複数対の針が領域を定めかつ治療中にパルスを付与され得る、針のアレイである。同出願はその全文がここに引用により援用されるが、その出願において、針は円形配列で配置されていたが、対向する針電極対の間にパルスを付与することのできる、コネクタおよび切換装置を備えている。

本発明のコネクタテンプレートは、電気穿孔が望まれる組織内において位置付けられる、その間隙が予め定められた、多数の針電極の予め選択されたアレイを正確に構築するためのシステムを、提供するように設計されている。コネクタ(22)は、複数行の孔を有する支持体の形態であり、それら孔を通じて針電極は、選択されたアレイを規定するよう選択的に挿入することが可能であり、また、それら貫通孔を通じて、導体により、ケーブル等の好適なコネクタを介してパルス発生器に接続される。例示の具体例においては、7つの孔が7行提供されており、それら孔と行とは等間隔で配されている。行間の間隙は、特定の用途のために選択することが可能であるが、好ましい例の間隙は、約0.65cm程度である。この配列で、各針電極は、隣接する電極から0.65cmの距離をおいて配置することが可能となる。

電極は、組織の所望の領域および電極への接続をカバーするよう、選択された態様でグリッド内に位置付けられ、それにより、針は腫瘍領域のいたるところにおいて選択的に分配され、腫瘍内の(4本の針または2対で境界を定められた)各四角形に、パルス間で90°回転する交番極性の4つのパルスを印加することができるようにされる。この切換は、治療にかかる全時間が数秒程度となるように、高周波で矩形波ごとに、電子的手段によってなされ得る。このようなアレイを使用すれば、組織の他の領域に不快な電圧または電流レベルをかけることなく、電極間で高電圧を細胞に印加することができる。

図1および図2に示すように、例示のコネクタテンプレートは、正面24および背面(図示せず)を有する、箱状の支持構造である。第1行の貫通孔26、28、30、32、34、36および38は、上面で、導体40、42、44、46、48、50および52によって、支持ハウジングの側縁に接続されており、それらはそこから、適当な手段によって、直接またはプラグおよびソケット構造によって、ケーブル20に接続される。

(番号を付されていない)第2行およびそれ以降の行の貫通孔は、積層体の異なるレベルで導体によって接続され、以下に説明するようなコネクタ構造が作られている。これにより、電極の間隙をより狭めることが可能となる。例示の針群58、60、62、64、66および68は、孔のいくつかに挿入された状態で示されている。それら電極のいくつか60、64および68は中空であって、その外側端に好適なコネクタを有し、薬または遺伝子を注入できるようにされている。これらの針はまた、挿入される側の端部にまたはその近くに、開口端部または1もしくは複数のポート等の、1または複数の好適な出口を有する。たとえば、中空の針電極は、出口ポートを有するものとして示されており、電極60のポートは、参照番号70および72で示される出口ポートを含むものとして示されている。

特に図2を参照して、図示されるコネクタテンプレートは、前立腺癌等の治療に使用される様子が示されている。この例において、コネクタ22は、患者の直腸内に挿入されている超音波プローブ56の細長い支持棒54上に装着されているのがわかる。超音波プローブは、前立腺、および前立腺内の電極の場所を視覚化するのに使用される。テンプレートはその後、図示されるように、複数の針電極58、60および62が水平方向の貫通孔のうち3つを通じて患者の前立腺内へと挿入されるように、位置付けられる。この例において、針電極のうち2つ、58および62が、中実の針電極として示され、中央の電極60が薬、治療薬または他の物質等の分子を注入することができるよう中空であるものとして示されている。第2の針電極群64、66および68は、上述の電極群の下方にあって、コネクタテンプレートの貫通孔を通じて患者の前立腺内に延びている。この例においては、これら針のうち2本64および68が中空であって、患者の前立腺内に治療薬または他の薬剤を注入することができるようになっている。これらは、治療薬の注入が終わった後もその場に残しておいて、前立腺の組織または前立腺内の癌細胞に電気パルスを印加す

10

20

30

40

50

るための電極として機能するようにしてもよい。本発明の一具体例においては、針電極はシャフトの中間部分に沿って部分的に絶縁され、それにより、選択された組織内のおよびテンプレート内の部分のみが導電性となるようにされている。これにより、治療されるべき選択された組織を通じて導電経路を位置付けることができ、また、それを覆う組織を電極パルスから絶縁することができる。

以下の図示および説明から明らかなように、電気穿孔を行なうべき組織の必要な領域をカバーするよう、実質的に任意の必要な配列で、コネクタテンプレートを通じて、十分な数の針電極を位置付けることが可能である。針電極は、電氣的に導電性の任意の適当な材料で構成できる。限定するものではないがこのような材料の例としては、白金、銀、金、ステンレス鋼、および、これらおよび／または他の材料の合金等を含む。治療されるべき組織が健康な組織の下方に位置するような用途においては、電極は好ましくは、その長さの一部に沿って絶縁され、治療対象となる組織を覆っている組織がパルスから絶縁されるようにしてもよい。針電極はまた、どのような好適な形を取ってもよく、特定の用途に応じてどのような好適な長さであってもよい。たとえば、骨等の硬い物質内にまたはそれを通じて挿入することが必要であるような用途においては、針は図2Aに示すように、好適な穿孔端を有して形成されてもよい。図2Aを参照して、針電極69は、骨および他の硬い組織を通じて穿孔するために、スเปード型の穿孔端69aを有して形成されている。この穿孔端は、ツイストドリルとして、または、他のいかなる好適な穿孔構造で形成されてもよい。穿孔端の電極は、ハンドドリルまたは小型の携帯式ドリルモータ等の、好適なパワー手段によって回転させてもよい。

ここで図3から図9を参照して、複数のプリント回路基板が図示されているが、これらは互いに積み重ねられて、組合せられたテンプレートコネクタ22が作られる。図3に示すように、プリント基板24はコネクタテンプレートユニットの面24を形成している。この基板は、各基板がそうであるように、約5cm²の寸法を有する。それぞれの電極のためのコネクタを含む貫通孔に対しては、小さなスペースしか許されないため、貫通孔のいくつか、たとえば貫通孔の各行に対して、別個の回路が別個のプリント基板上に設けられる。したがって、図3から図9に示すように、貫通孔に挿入されるべき針電極の各行に対して、別個のコネクタおよび導体が、別個のプリント基板の表面上に形成される。これらはその後、たとえば図10に示すように、アレイに積み重ねられる。プリント基板内のそれぞれの孔に対する接続は、垂直方向または水平方向のアレイ等、任意の数の配置で作ることができることが理解される。

ここで図4を参照して、プリント基板24のすぐ下に配置されるべきプリント基板74が、大きくされた孔76～88の行を有することがわかる。これらは、図11に示すように、上方の基板上のコネクタの、下端を受取るように設計されている。加えて、このプリント基板は、該アセンブリの針電極のための第2行の接続用孔を形成する。コネクタ90～102の行を有する。これら接続用ソケットは各々、先の具体例と同様に、プリント基板の表面に沿って基板の縁部へと延びる別個の導体に接続されており、その縁部でそれらはケーブルに接続される。各コネクタは、別々に、それ自身の導体を通じてパルス発生器への回路に接続され、そこで該コネクタは、所望の態様で、該発生器に接続され得る。たとえば、各針は同じ極性または逆の極性のいずれかで、隣接する各針と対とされ得る。したがって、針には、対で（すなわち、反対の極性の2本の針に）、複数対で（すなわち対同士で）、または対向する行間で（すなわち、対向する、奇数、偶数または異なる数の電極を有する行同士で）、パルスが与えられ得る。

ここで図11を参照して、コネクタアセンブリの一部分の断面図を示す。ここで、複数の回路基板がフレーム114に装着され、フレーム114がそれら回路基板をわずかな間隔で支持している様子が示される。図示されるように、たとえばソケット26等のソケットは、その下方端で開口部118を有しかつ上方または入口端で開口部120を有するように形成された、ほぼ管状の金属製のさや116からなる。このさやは、ばね接触子122のまわりに形成されかつかしめられており、ばね接触子122は、針とスライド式に接触または係合するように、その中央部で内方向に押さえ付けられるかまたは曲げられている

10

20

30

40

50

。ソケットアセンブリは、上方のプリント基板24内の孔を通じて、その下に位置するプリント基板74内の孔76へと延びるだけの長さを有する。ソケットアセンブリは、それぞれの基板の面上でプリント回路の導体と導電性の接触を形成する。

図12を参照して、プリント基板上の導体の互いにずらされた配列が示されている。図示されるように、導体またはソケットの第2の行は、プリント基板24の下方に配置されたプリント基板74内に形成されている。その下に配されたプリント基板104は、前述のようにその表面に沿って延びる導体を有するソケット124を含む、導電性ソケットの行を有する。導電性ソケットの次の行は、その下に配置されたプリント基板106上にあって、ソケット126を含む。このように、それぞれの電極へのコネクタは、回路基板の配列において異なる層上に配置されている。これにより、それぞれの導体間の間隙が非常に狭い、組合せコネクタテンプレートを形成することができ、したがって、図示されるような高密度のアレイを配備することが可能となる。

本発明の上述の装置は、図2に示すように、前立腺癌の電気穿孔治療用システムとして使用されるものが示されている。このテンプレートは、図示するように、前立腺130内に挿入される複数の針とともに位置付けられる。例示の具体例において、テンプレートは、クランプ136によって、超音波プローブ156の柄または伸長部154上に装着される。この超音波プローブは、患者の直腸内に挿入され、医師が前立腺内の腫瘍を視覚化するのに利用される。医師は超音波プローブを挿入し、その後、針をテンプレートを通じて腫瘍内に挿入する。その後、複数の中空の針を通じて、化学物質が、前立腺の腫瘍内に配達される。その後、たとえば上の応用において記載されたような、または以下に記載するよう

な、好適な切換方式で、電気パルスが針に配達される。たとえば、少なくとも1パルスを、針の対向する2対の間で開始し、その後そのパルスの極性を逆にし、次いで、針接続を90°変更した後に、さらに2つのパルスを第1の極性、そして第2の極性で印加する、という具合である。

上述のテンプレートアレイは、最高で49個の電極を収容することが可能であり、その各々がパルス発生器に別々に接続される。場合によっては、発生器により切換えられるかまたはアドレスされる必要のある電極の数を最小に抑えることが望ましいであろう。これより下に述べる他の具体例においては、電極の配列は、複数の区域が同時に切換可能であってそれにより必要とされる切換の数が減じられるような数の、平行接続とされる。

図13Aを参照して、49本の針電極のアレイが示されるが、この場合、同じ数字の電極はすべて、平行に接続されている。したがって、水平方向の各行内の1つおきの電極が、平行に接続されている。図からわかるように、すべての電極1および2を針3および4に対して、かつその後すべての電極1および3をすべての電極2および4に対して切換え、次いで、極性を逆にすることによって、第1の行と第2の行との間の組織領域全体をカバーするのに4つのパルスのみで済むことになる。パルスは、電極のすべての隣接する行の間で、同様に印加され得る。治療区域は、4つの電極の間の領域であり、それら電極は、対向する対、すなわち、1対が正であるのに対して1対が負である対で、パルスが付与される。好ましいパルス付与方式では、対向する対の間で1つのパルスを付与し、第2のパルスを逆の極性で同じ対に付与する。その後、切換が90°回転して、最初の対に対して90°である電極が対とされ、第1の極性でそして反対の極性でパルスが付与される。このパルス付与方式は、電極のアレイ全体を通じて、各行およびそれに隣接する行に対して、28のパルスを使用して実行される。このように対向する対を使用する方法の有効性は実証されている。

この電極の配列は、図14および図15に示すように、2層の回路基板によって達成することが可能である。この場合、パルス発生器に対して必要な接続はわずか14で済む。図示されたレイアウトにおいては、同じ数字のすべての電極が同じ導体接続に、平行に接続される。このアレイ全体は、2層のプリント回路基板上で構築することが可能である。この、区域を平行に切換える方法は、多数の針を平行に配することでさらに変更することができ、わずか4つのパルスのみで49本の針のテンプレート全体を切換えられるようにすることが可能である。したがって、すべてではないにせよ少なくとも多数の治療区域に対

して、同時にパルスが付与することができるようになる。

図13Bを参照して、25本の針電極を有する他のアレイが示されるが、ここでも、同じ数字のすべての針は回路基板上で平行に接続されている。したがって、水平方向および垂直方向の両方向の行において、1つおきの電極が平行に接続されている。すべての適当な電極1および2は、ともに平行に接続されている針3および4に対してパルスが付与され、第2のパルスは、逆の極性で同じ電極に付与される。第3のパルスでは、電極1が電極3に接続され、ともに接続された電極2および4に対してパルスが付与され、第4のパルスは、この接続に逆の極性で付与される。この接続およびパルス付与方式によれば、どのような数の電極を有するどのように大きいテンプレートも、わずか4つのパルスのみでパルス付与することが可能となる。

この切換方式およびその変形例は、どのようなサイズおよび実質的にどのような形状を有するアレイにも適用することが可能である。図13Aの電極配列および切換方式は、図14および図15に示すような2層の回路基板によって行なうことが可能である。これは、パルス発生器に対してわずか14個の接続を要するのみである。図14および図15に示すように、多層接続テンプレート138は、第1行の針接続ポートのうち4つを平行に接続する導体140を有する。図15に、同じ基板の内部またはその裏側にあり得る第2の層を示すが、これは、第1行の針ソケットの残り3つを平行に接続する導体142を有する。したがって、この配列を使用すれば、各層上の7つの導体が、基板全体上のすべてのソケットをこのようにしてパルス発生器に接続することが可能である。回路基板のソケットには、上に記載したようにばね接触子が設けられ、これにより、針電極はスライド式の接触が可能となり、伸びたり引っ込めたりすることが可能となる。したがって、これは、針電極について、針がホルダから伸びたり、ホルダに引っ込んだりするような設計に、容易に適用することができる。

上述のような回路基板システムによれば、好ましくは多数の平行な行に多数の針を有する、針電極の任意の数の異なるアレイが可能になる。各行内の針は、同じ数であっても異なる数であってもよく、ちょうど対向していてもずれていてもよい。電極のアレイがさまざまであることに加えて、それら電極はまた、物理的なアレイによって必ずしも限定されることなく、いかなる数の種々選択可能なアレイおよび配列でも、パルスが付与することが可能である。最も広義の意味において、ある極性の多数の電極と、反対の極性の多数の電極に対してパルスが付与されることが好ましい。それら多数の電極は少なくとも対であって、偶数または奇数であってもよく、あるいは、同じ数に対し同じまたは異なる数が対向してもよい。図16から図19にはいくつかの具体的な電極のアレイの例を示すが、これら各々は特定の用途において利点を有する。

図16を参照して、針電極が1行おきにずらされた、ほぼ長方形のアレイが示される。この全体を参照番号200で示す。このアレイにおいて、202および204等の水平方向の行は平行であるが、行204内の電極の数の方が少なく、また、それらは行202内の電極に対し横方向にずらされている。垂直方向の行においても、1つおきの行がずらされて形成されていることがわかる。内側のより短い各行における各電極は、隣接する各行内の2つの電極から等しい間隔がとられている。多数の電極を対とすることで、矩形ではない領域をカバーすることができるであろう。

図17を参照して、この電極アレイでは、電極の各行が同じ数の電極を有するが、それらは1方向に1スペース分ずつ横方向にずらされており、その全体が参照番号206で示される。1つおきの行は図示されるように同じ方向ではなく、交互に別方向にずらされてもよい。垂直方向の最初の行と最後の行とを除いて、各行には複数の電極が存在することがわかるであろう。水平方向の行では、208および210等の行はすべて、同じ数の電極を有し、垂直方向においてはすべての行が異なる数の電極を有する。垂直方向に傾斜するすべての行は、1/2のスペースだけずらされた隣接する行と同じ数の電極を有する。対は同じ数の電極を有し、1方向に1スペース分ずつ横方向にずらされている。

図18を参照して、全体が参照番号212で示されるほぼ矩形の電極アレイが示されるが、ここで、電極の最も外側の各行においてはその端の電極が欠けている。214および2

10

20

30

40

50

16等の外側の行は、電極の数が少なく、隣接する内側の行よりも短くなっている。しかし、すべての行は垂直方向および水平方向に位置合わせされており、したがって、電極は隣接する平行な行内で複数の対および複数の対向する電極にパルスを付与することが可能である。

図19を参照して、6つの電極を有する2つの円環状アレイが示される。ここで、ほぼ六角形の電極アレイが形成されており、その全体を参照番号218で示す。このアレイは単一または複数の六角形を有してもよく、針222、224、226、228および230が1つの六角形を形成している。各六角形は治療領域の輪郭を描くかまたはそれを囲み、そのうち、各電極は同じ極性の隣接する各電極と対とされて、極性が切換えられ得る。このアレイにおいて、針は好ましくは同じ極性で対とされて逆の極性の対に対向するようにされる。したがって、(220等の)各電極は同じ極性の隣接する電極222と対とされ、反対の極性で対とされている電極226および228に対してパルス付与される。このシステムは、各電極を任意の極性で隣接する電極と対とし、極性を円のまわりで順に切換えるための、切換手段を含む。このアレイは、選択された領域の組織をより完全に電気穿孔することができるという利点を有する。なぜなら、各対からの2つのパルスがその領域を横切るからである。針の対向する対は、アレイのまわりで順に、交番極性でパルス付与される。

10

電極へのパルスは、図20に概略的に示したシステム等の任意の好適なシステムを使用して任意の好適な態様で付与することができる。パルス発生器232はパルス236を切換回路234を介して電極240、242、244、246、248および250に配達する。電極はどのような選択されたアレイにあってもよい。各パルスの後に、該発生器に結合する制御手段が、信号238を介して切換回路を切換えて、電極の極性および/またはペアリングを切換える。好ましい配列において、この切換回路はいずれかの極性にある各電極を別々に接続することが可能であり、また、各電極を同じまたは反対の極性の隣接する各電極とペアとすることが可能である。

20

図21から図26を参照して、全体が参照番号144で示される、伸縮可能なアセンブリが示される。該アセンブリは、ヘッドまたはノーズ部材148を有する、細長い中央支持部材146を含む。回路基板150は、複数のスライド式の貫通ソケットを有し、針は、支持部材146上でその中に装着され、伸びたり、引っ込んだりする。複数の針152は、中央支持部材146に装着された管状のスリーブ154に装着される。スリーブが支持部材に沿って動くとき、図23に示すように、針は、伸びたり、引っ込んだりする。この装置にはまた、好ましくは、針の伸長の長さを示すため、インジケータまたはゲージ156が備えられる。操作中、ノーズ部材148が組織に対して配置され、それを通じて針が伸長され、スリーブ154が、針電極が所望の深さに延びるまで伸長される。先の具体例と同様に、1または複数の電極は遺伝子または薬を注入するために中空の針であってもよい。ケーブル158は、該装置の針電極をパルス発生器に接続する。

30

伸縮可能な針はまた、カテーテルに有利に適用され得る。図24から26を参照して、カテーテル先端のアセンブリが示され、全体に参照番号160が付されている。この具体例において、細長い可撓性のカテーテル部材162には、スライド式コネクタ166、168、170および172とともに複数の貫通ソケットを有するテンプレート164が、末端で取り付けられている。複数の中空の導体電極174は、カテーテルに沿って移動するように、移動可能なアクチュエータプレート176に装着されている。核酸または薬を注入するための中空の針178は、移動可能な支持プレート176に装着されており、貫通ソケットのうち1つを通じて延び、かつ管腔180を経て、図示されない薬または遺伝子のソースに延びる。図25に示すように、針電極は、カテーテルの端部から伸縮することが可能である。

40

図26および27に示すように、カテーテルは、一方端において針を有しかつ他方端において種々のコネクタおよび操作手段を有する、細長い可撓性の部材である。注入管腔180は、この場合、遺伝子または薬のソースに接続するよう、カテーテルの近端に延びる。複数の電極ワイヤまたは導体182が、電極ワイヤ管腔184におよびそれを通じて延び

50

る。これらは、カテーテルの近端における管腔 184 の端部から延びて、好適なパルス発生器に接続される。ガイドワイヤ 186 は、カテーテルの遠端から延びて、その長さだけ、管腔 188 を介して延びる。管腔 188 は、一方端において移動可能な支持部 176 に接続され、近端においては、カテーテルの端部から針を伸縮させるのに使用するためのディスク 190 を含む。

図 27 は、全体が参照番号 160 で示される哺乳類の体内組織の 1 領域を示す。この中で、腫瘍または器官等の組織の選択された領域 162 が、組織 164 に包含されている。複数の針電極（そのうちの 1 つ 166 のみが詳細に示される）が、選択され、体組織 164 を通って選択された組織 162 に挿入される。電極には、その中央部分 168 に沿って絶縁コーティングが設けられている。先端部分 170 は、組織 162 と導電性の接続がもたらされるように剥き出しのままである。上方部分 172 もまた剥き出しのままとされるが、これは、プリント基板 176 における孔 174 の導電性の小片または接触子と導電性の接続を形成するためである。この構成によれば、組織 164 に悪影響を与えることなく、電気パルスを完全に、選択された組織 162 内に付与することができる。この特徴は、該装置の先に説明したどの具体例にも用いることが可能である。

上に記載したシステムは、好ましくは多数の平行な行内に多数の針を有する、任意の数の異なる針電極のアレイを用いることができる。各行内の針は数が同じであっても異なってもよく、また、ちょうど対向していてもずらされていてもよい。電極の物理的なアレイに加えて、これら電極はまた、物理的なアレイに必ずしも限定されることなく、いかなる数の異なる選択可能なアレイおよび配列にパルスが与えられてもよい。最も広義の意味において、1 つの極性の複数の電極は反対の極性の複数の電極に対してパルス付与されることが好ましい。複数の電極は少なくとも対であって、数が偶数でも奇数でもよく、また、同じ数に同じまたは異なる数が対向してもよい。

以下の具体例は、本発明を説明する目的のものであって限定する目的のものではない。それらは使用され得る典型ではあるが、当業者に公知の他の方法もまた使用することが可能である。

例 1

電気穿孔治療のインビトロでの研究

PC-3 細胞 (ATCC CRL-1435、前立腺癌細胞系) を、37℃で 5% の CO₂ 中、15% のウシ胎児血清 (FCS) および 1% の L-グルタミンで補足した RPMI-1640 中で増殖させた。指数増殖期における細胞をトリプシン処理によって収集し、それらの生存能力をトリパンプルー排除によって測定した。細胞は 2×10^5 細胞/ml を培地に懸濁し、ウェルあたり 4×10^4 個の細胞という最終濃度で 96 ウェルプレートのウェル内に播いた。細胞に、矩形波パルス発生器に接続された適切な針アレイ電極を使用してパルスを与えた。針電極を、96 ウェルマイクロプレートのウェル内に挿入し、以下のパラメータを使用してパルスを与えた：

電圧：0-1000 v

パルス長：99 μ 秒

パルスの数：6

細胞の生存曲線を、異なる電界に対して作成した。結果を図 29 に示す。0.5 cm の針アレイで、パルス長 99 μ s を有する 400~600 ボルトの 6 個のパルスを与えた場合、細胞の 75~80% が治療後 20 時間生存した。したがって、これらのパラメータを電気穿孔治療の研究に選択した。

化学治療薬（ブレオマイシン、シスプラチンおよびマイトマイシン C）は、リン酸塩緩衝生理食塩水 (PBS) 中に溶解しかつ希釈して、 1.3×10^{-9} M から 1×10^{-4} M の範囲の最終濃度で、細胞懸濁液に直接添加した。化学治療薬の存在下、電界を印加した場合としなかった場合との両方の場合における細胞の生存率を、治療後 20 時間の時点で、XTT 細胞増殖アッセイによって測定した (Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., Glasebrook, A.L., "An Improved Colorimetric Assay for Cell Proliferation and Viability Utilizing the Tetrazolium Salt XTT," J. Immunol. Methods, 142:2, 257-26

10

20

30

40

50

5, 1991)。このX T Tアッセイは、テトラゾリウム塩のホルマザンへの代謝変換の分光測定アッセイに基づく（生きた細胞はX T Tをホルマザンに変換し、これは分光測定で測定することができる）。サンプルの生存曲線を図30に示す。結果は、電気穿孔を用いる場合および用いない場合について、各薬剤の IC_{50} （細胞の50%を阻害する薬の濃度）を比較して表わし、これを表1に示す。

表1

インビトロでのPC-3細胞の治療の効果

薬剤	IC_{50} 電気穿孔なし	IC_{50} 電気穿孔あり	細胞傷害 増強率
ブレオマイシン	1×10^{-5}	1×10^{-8}	1000
シスプラチン	5×10^{-5}	1×10^{-5}	5
マイトマイシンC	8×10^{-5}	6×10^{-5}	1.33

PC-3細胞に対する化学治療薬の細胞傷害効果は、薬剤と電気穿孔を組合せることによって大いに強化された。最高の細胞傷害の増強は、ブレオマイシンと電気穿孔を使用することによって達成され、シスプラチンとマイトマイシンCはそれに続いた（インビトロのサンプルの数は6から9の間で変化した。統計はとらなかったが、図に標準誤差を示す）。したがって、電気穿孔は、細胞傷害剤ブレオマイシンおよびシスプラチンに対する細胞の感受性を強化する。

例2

ネズミモデルシステム

インビボにおける化学治療薬の有効性に対する電気穿孔の効果を調べるために、ヌードマウスを利用した。これらの実験において、 5×10^6 個のPC-3細胞を含有する、0.1mlのマトリゲル溶液（4部のRPMI-1640中に希釈された1部のマトリゲルを含有する無血清溶液）を、ヌードマウスの脇腹に注入した。腫瘍はその腫瘍体積が $80 \pm 20 \text{ mm}^3$ になるまで増殖させた。マウスの重量を測り、無作為に6つのグループに分けて、以下のとおりとした：

グループ1：化学治療薬投与せず、電気穿孔なし

グループ2：0.5ユニットのブレオマイシン、電気穿孔なし

グループ3：0.5ユニットのブレオマイシン、4針配列、0.65cm、942V、 $4 \times 100 \mu\text{s}$ のパルス

グループ4：0.5ユニットのブレオマイシン、6針配列、1.00cm、1130V、 $6 \times 100 \mu\text{s}$ のパルス

グループ5：0.5ユニットのブレオマイシン、6針配列、0.50cm、559V、 $6 \times 100 \mu\text{s}$ のパルス

グループ6：0.5ユニットのブレオマイシン、4針配列、0.87cm、1500V、 $4 \times 100 \mu\text{s}$ のパルス

ブレオマイシンを投与した動物においては、その化学治療薬（0.5ユニット）は、0.01mlの生理食塩水に溶解して、「扇状」に腫瘍内に注入した。10±1分後に、Genetronics Medpulser™装置を使用して、6または4針配列の電極の組を使用して腫瘍にパルスを与えた。すべての治療において、単一組のパルスが与えられた。

動物は67日間、その死亡率または病気の兆候を毎日観察した（図29参照、図中D＝薬治療（ブレオマイシン）およびE＝電気穿孔）。腫瘍のサイズを測定し、腫瘍の体積を以下の公式を使用して計算した：

$$\text{体積} = \pi / 6 \times a \times b \times c$$

式中、a、bおよびcは、MOLD-TECHにおける腫瘍の長さ、幅および奥行きを表わす。

観察期間終了後、腫瘍を収集して、その区分を組織分析のために調製した。動物は、進行中の病気を有するもの（先に認められていなかった新しい病変の発現または、既存の病変のサイズよりも25%以上の増加が認められるもの）、完全な応答をしたもの（わかっていた病気が完全に消えたもの）、部分応答したもの（腫瘍サイズが50%以上減少したもの）に分類された。なお、死亡は、同じ檻内のマウス同士の喧嘩によるものと認められた。

表 2

ヌードマウスにおけるPC-3細胞の治療の結果

グループ	動物の数	結果
1	5	4 (80%) 病気進行 1 死亡
2	6	6 (100%) 病気進行
3	7	5 (52%) 完全応答 1 (14%) 部分応答 1 (14%) 死亡
4	7	5 (52%) 完全応答 1 (14%) 部分応答 1 (14%) 死亡
5	6	5 (83%) 完全応答 1 (17%) 部分応答
6	8	5 (63%) 完全応答 1 (12%) 部分応答 2 (25%) 死亡

結果は、化学治療薬と電気穿孔との組合せが腫瘍の治療に有効な方法であることを示した。4針配列も6針配列も、双方とも有効であることがわかった。

例 3

ブレオマイシンの前立腺内注入の技術的な実行可能性の評価

ブレオマイシンを前立腺内に注入することの技術的な実行可能性を評価するために、以下の研究を行なった。直径 ≥ 2 cmのサイズの前立腺を有する雄のビーグル犬に麻酔をし、中線側腹切開を行なって、膀胱および腸を投映して前立腺を視覚可能とした。直接目で見ながら、ブレオマイシンを前立腺の6つの部位（左側および右側の基部、中央、頂部）の各々に注入した。その後4本の電気穿孔針を目で見ながら会陰を介して挿入して、電気穿孔サイクルを付与した。試験化合物または電気穿孔に対する急性の局所的または有害な反応は認められなかった。注入部位には小さな血腫が認められ、これは研究期間を通じて残った。電気穿孔パルスを与える間、筋肉の収縮が認められた。電気穿孔パルスの各シーケンス中、ECGを記録した。最初の2つのシーケンスは、前立腺内に会陰を通じて針を挿入して行なった。さらなる4つのシーケンスは、針を左後足の筋肉内に直接挿入して記録をとった。パルスシーケンスの各々は、ECGの記録上に人為的な刺激反応をもたらした。しかしそれでも、心臓の電氣的なリズムには何ら影響をもたらさないことがECGの記録から明らかであった。QRS複合体のタイミングは、電気穿孔パルス列中、異なることはなく、また、心臓のリズムに臨床的な悪影響は何ら認められなかった。

電気穿孔後1時間して、動物はBeuthanasiaカクテルを使用して安楽死させ、前立腺、会陰およびその周辺の組織のGross病変を、その場で調べた。前立腺、会陰および周辺の組織のGross試験では、前立腺表面の血腫以外には何も発見はなかった。前立腺をその後切除し、組織学的評価のために処理した。前立腺内に認められた組織における顕著な発見は

、出血、水腫および壊死であったが、それらは軽症であり、分布パターンは多病巣性であった。壊死は、前立腺の腺部分内の上皮細胞内で起こっていた。支質には壊死は認められなかった。この研究によって、この治療のプロトコルが前立腺の壊死を誘導するのに利用することが可能であることがわかった。

例 4

前立腺内ブレオマイシンおよび電気穿孔のイヌモデルシステム

前立腺におけるブレオマイシンと電気穿孔との組合せの毒性および副作用を調べるために、イヌのモデルを評価した。直径が ≥ 2 cmのサイズの前立腺を有する雄のビーグル犬を利用した。以下の方法を使用した：

グループ 1 A、D - E +

(D = 薬、E = 電界、+ / - = それぞれ、存在または不在)

全身麻酔下で、側腹切開を行なって前立腺を露出させた。電気穿孔用の針を、会陰を介して前立腺内に、前立腺被膜の基部から頂部へと挿入した。これらは、(ベース長さ 0.5 cm の) 矩形アレイのテンプレートガイドおよび直腸を経る超音波 (TRUS) を使用して挿入した。針の配置および間隙は、透視検査で確認した。生理食塩水 ($0.25 \text{ ml} / \text{cm}^3$) を前立腺内に腹膜を介して注入した。この注入は、TRUS ガイドを使用して、前立腺葉の基部、中央および頂部部分に行なった。電気穿孔に先立って、スクシニルコリンを $1 \text{ mg} / \text{kg}$ 、i. v. で与えた。EP パルスを以下の治療パラメータに従って印加した：

実験 # 1：EPT サイクル (658 V)、4 針アレイ (1 × 治療領域) 使用。電気穿孔後 48 時間で殺す。

実験 # 2：EPT3 サイクル (658 V)、4 針アレイ (1 × 治療領域) 使用。電気穿孔後 48 時間で殺す。

電極の位置は電気穿孔前、電気穿孔中および電気穿孔後に TRUS のイメージで観察した。EKG は、電気穿孔の前、その間、およびその後に観察した。毒性は、電気穿孔後 0 時間、24 時間および 48 時間の時点で、排尿 (排泄、血尿) を調べることで観察した。勃起 (直腸の動悸) は、電気穿孔後 0 時間、24 時間および 48 時間の時点で観察した。血液の化学的プロファイル (腎臓と肝臓の機能を示す) は、電気穿孔後 0 時間、24 時間および 48 時間の時点で観察した。Gross 病理学検査および組織病理学的分析の両方を行なった。特定のには、前立腺、精巣、尿道、肺、直腸、腎臓、膀胱および馬尾を調べた。

グループ 1 B、D - E +

全身麻酔下で、側腹切開を行なって前立腺を露出させた。電気穿孔用の針を、会陰を介して前立腺内に、前立腺被膜の基部から頂点へと挿入した。これらは、(ベース長さ 0.5 cm の) 矩形アレイのテンプレートガイドおよび直腸を経る超音波 (TRUS) を使用して挿入した。針の配置および間隙は、透視検査で確認した。生理食塩水 ($0.25 \text{ ml} / \text{cm}^3$) を腹膜を介して前立腺内に注入した。この注入は、TRUS ガイドを使用して、前立腺葉の基部、中央および頂部部分に行なった。電気穿孔に先立って、スクシニルコリンを $1 \text{ mg} / \text{kg}$ 、i. v. で与えた。EP パルスを以下の治療パラメータに従って印加した：

実験 # 3：EPT3 サイクル (658 V)、4 針アレイ (1 × 治療領域) 使用。電気穿孔後 28 日で殺す。

電極の位置は電気穿孔前、電気穿孔中および電気穿孔後に TRUS のイメージで観察した。EKG は、電気穿孔の前、その間、およびその後に観察した。毒性は、電気穿孔後 0 日、2 日、2 日、7 日、14 日および 28 日の時点で、排尿 (排泄、血尿) を調べることで観察した。勃起 (直腸の動悸) は、電気穿孔後 0 日、2 日、2 日、7 日、14 日および 28 日に観察した。血液の化学的プロファイル (腎臓および肝臓の機能を示す) は、電気穿孔後 0 日、2 日、2 日、7 日、14 日および 28 日の時点で観察した。Gross 病理学検査および組織病理学分析を行なった。特定のには、前立腺、精巣、尿道、肺、結腸、腎臓、膀胱および馬尾を調べた。

グループ I I A：D + E +

全身麻酔下で、側腹切開を行なって前立腺を露出させた。電気穿孔用の針を、会陰を介して前立腺内に、前立腺被膜の基部から頂部へと挿入した。これらは、（ベース長さ0.5 cmの）矩形アレイのテンプレートガイドおよび直腸を経る超音波（TRUS）を使用して挿入した。針の配置および間隙は、透視検査で確認した。ブレオマイシン（4 U/ml）を、腹膜を介して前立腺内に、前立腺体積の0.25 ml/cm³（前立腺体積の1 U/cm³）、TRUSガイドを使用して注入した。電気穿孔に先立って、スクシニルコリンを1 mg/kg、i.v. で与えた。EPパルスを以下の治療パラメータに従って印加した：

実験#4：EPTサイクル（658 V）、4針アレイ（1×治療領域）使用。電気穿孔後48時間で殺す。

実験#5：EPT3サイクル（658 V）、4針アレイ（1×治療領域）使用。電気穿孔後48時間で殺す。

薬の注入および電極の位置は、電気穿孔の前、電気穿孔中およびその後に、TRUSイメージによって観察した。EKGは電気穿孔の前、その間およびその後に観察した。毒性は、電気穿孔後0時間、24時間および48時間の時点で、排尿（排泄、血尿）を調べることで観察した。勃起（直腸の動悸）は、電気穿孔後0時間、24時間および48時間後に観察した。血液の化学的プロフィール（腎臓および肝臓の機能を示す）は、電気穿孔後0時間、24時間および48時間で観察した。Gross病理学検査および組織病理学分析を行なった。特定のには、前立腺、精巣、尿道、肺、結腸、腎臓、膀胱および馬尾を調べた。ブレオマイシンの薬物動態もまた評価した。血液レベルは時間0、注入後、および、電気穿孔後10分、20分、30分、60分および120分の時点で測定した。ブレオマイシンの血液レベルをさらに、電気穿孔後12時間、24時間、36時間および48時間の時点で測定した。

グループIIB、D+E+

全身麻酔下で、側腹切開を行なって前立腺を露出させた。電気穿孔用の針を、会陰を介して前立腺内に、前立腺被膜の基部から頂部へと挿入した。これらは、（ベース長さ0.5 cmの）矩形アレイのテンプレートガイドおよび直腸を経る超音波（TRUS）を使用して挿入した。針の配置および間隙は、透視検査で確認した。ブレオマイシン（4 U/ml）を、腹膜を介して前立腺内に、前立腺体積の0.25 ml/cm³（前立腺体積1 U/cm³）、TRUSガイドを使用して注入した。電気穿孔に先立って、スクシニルコリンを1 mg/kg、i.v. で与えた。EPパルスを以下の治療パラメータに従って印加した：

実験#6：EPT3サイクル（658 V）、4針アレイ（1×治療領域）使用。電気穿孔後28日で殺す。

薬の注入および電極の位置は、電気穿孔の前、電気穿孔中およびその後に、TRUSイメージによって観察した。EKGは電気穿孔の前、その間およびその後に観察した。毒性は、電気穿孔後0日、2日、7日、14日および28日に、排尿（排泄、血尿）を調べることで観察した。勃起（直腸の動悸）は、電気穿孔後0日、2日、7日、14日および28日に観察した。血液の化学的プロフィール（腎臓および肝臓の機能を示す）は、電気穿孔後0日、2日、7日、14日および28日に観察した。Gross病理学検査および組織病理学分析を行なった。特定のには、前立腺、精巣、尿道、肺、結腸、腎臓、膀胱および馬尾を調べた。

ブレオマイシンの薬物動態もまた評価した。血液レベルは時間0、注入後、および、電気穿孔後10分、20分、30分、60分および120分の時点で判定した。ブレオマイシンの血液レベルをさらに、電気穿孔後12時間、24時間、36時間および48時間、ならびに、7日、14日および28日の時点で測定した。

グループIIIA、D+E-

全身麻酔下で、側腹切開を行なって前立腺を露出させた。ブレオマイシン（4 U/ml）を、脇腹を介して前立腺葉の基部、中央および頂部部分へと、0.25 ml/cm³（前立腺体積の1 U/cm³）、TRUSガイドを使用して注入した。電気穿孔に先立って、

10

20

30

40

50

スクシニルコリンを 1 mg/kg 、i. v. で与えた。動物は、ブレオマイシン治療後 48 時間で殺した。

薬の注入は、電気穿孔の前、電気穿孔中およびその後に、TRUS イメージによって観察した。EKG は電気穿孔の前、その間およびその後に観察した。毒性は、電気穿孔後 0 時間、24 時間および 48 時間に、排尿（排泄、血尿）を調べることで観察した。勃起（直腸の動悸）は、電気穿孔後 0 時間、24 時間および 48 時間に観察した。血液の化学的プロファイル（腎臓および肝臓の機能を示す）は、電気穿孔後 0 時間、24 時間および 48 時間に観察した。Gross 病理学検査および組織病理学分析を行なった。特定のには、前立腺、精巣、尿道、肺、結腸、腎臓、膀胱および馬尾を調べた。

ブレオマイシンの薬物動態もまた評価した。血液レベルは時間 0、注入後、および、電気穿孔後 10 分、20 分、30 分、60 分および 120 分の時点で判定した。ブレオマイシンの血液レベルをさらに、電気穿孔後 12 時間、24 時間、36 時間および 48 時間の時点で測定した。

10

グループ I I I B、D + E -

全身麻酔下で、側腹切開を行なって前立腺を露出させた。ブレオマイシン (4 U/ml) を、脇腹を介して前立腺葉の基部、中央および頂部部分へと、 0.25 ml/cm^3 （前立腺体積の 1 U/cm^3 ）、TRUS ガイドを使用して注入した。その後、スクシニルコリンを 1 mg/kg 、i. v. で与えた。動物は、ブレオマイシン治療後 28 日で殺した。

薬の注入は、電気穿孔の前、電気穿孔中およびその後に、TRUS イメージによって観察した。EKG は電気穿孔の前、その間およびその後に観察した。毒性は、電気穿孔後 0 日、2 日、2 日、7 日、14 日および 28 日に、排尿（排泄、血尿）を調べることで観察した。勃起（直腸の動悸）は、電気穿孔後 0 日、2 日、2 日、7 日、14 日および 28 日に観察した。血液の化学的プロファイル（腎臓および肝臓の機能を示す）は、電気穿孔後 0 日、2 日、2 日、7 日、14 日および 28 日に観察した。Gross 病理学検査および組織病理学分析を行なった。特定のには、前立腺、精巣、尿道、肺、結腸、腎臓、膀胱および馬尾を調べた。

20

ブレオマイシンの薬物動態もまた評価した。血液レベルは時間 0、注入後、および、電気穿孔後 10 分、20 分、30 分、60 分および 120 分の時点で判定した。ブレオマイシンの血液レベルをさらに、電気穿孔後 12 時間、24 時間、36 時間および 48 時間、ならびに、7 日、14 日および 28 日の時点で測定した。

30

以上に、現時点において好ましい具体例を参照して本発明を説明したが、本発明の精神から離れることなく種々の変更が行なえることを理解されるべきである。したがって、本発明は、以下の請求の範囲によってのみ限定されるものとする。

【図 1】

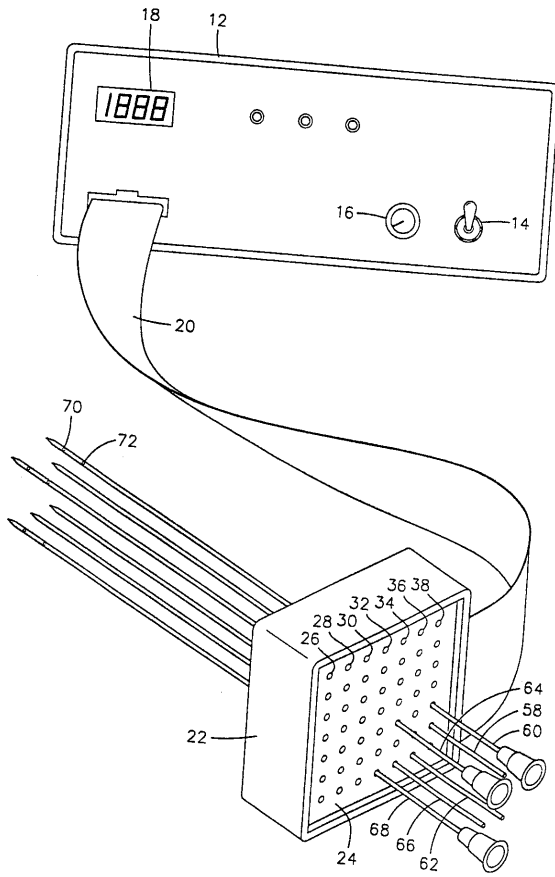


FIG. 1

【図 2 A】

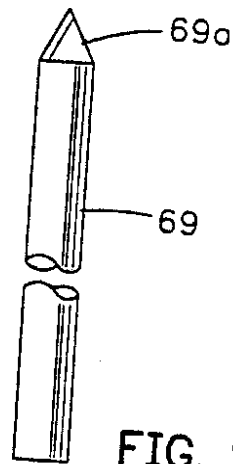


FIG. 2A

【図 2】

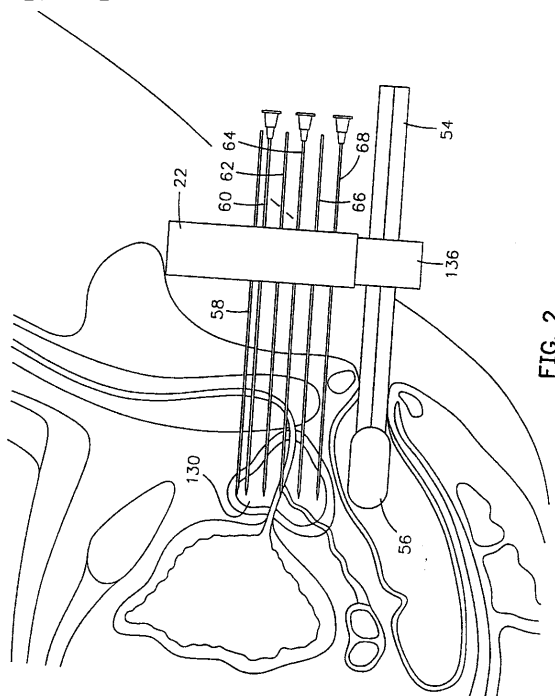


FIG. 2

【図 3】

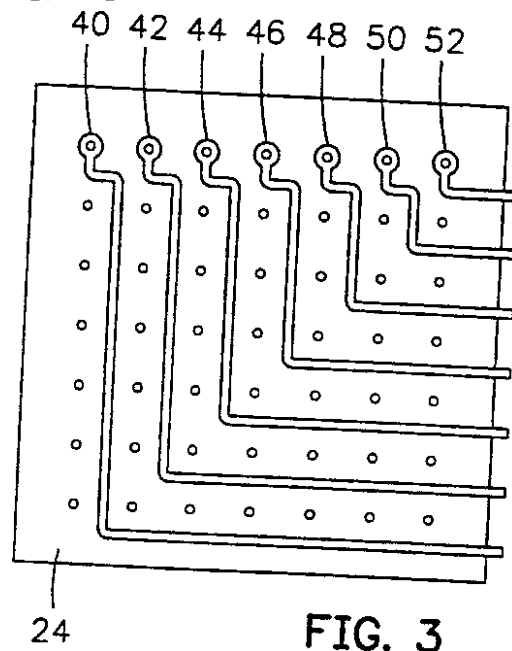
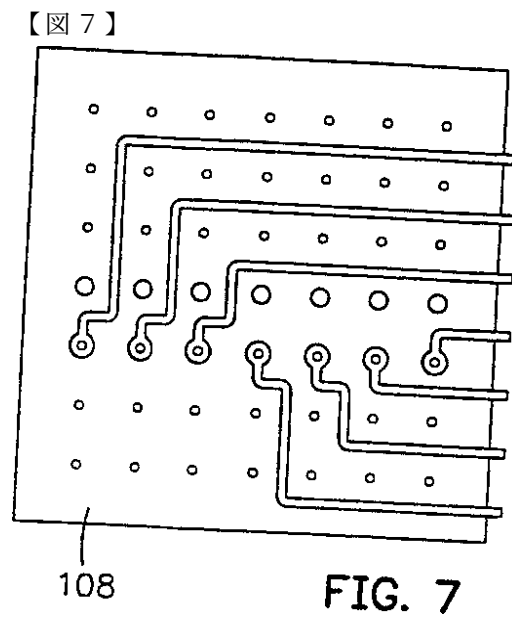
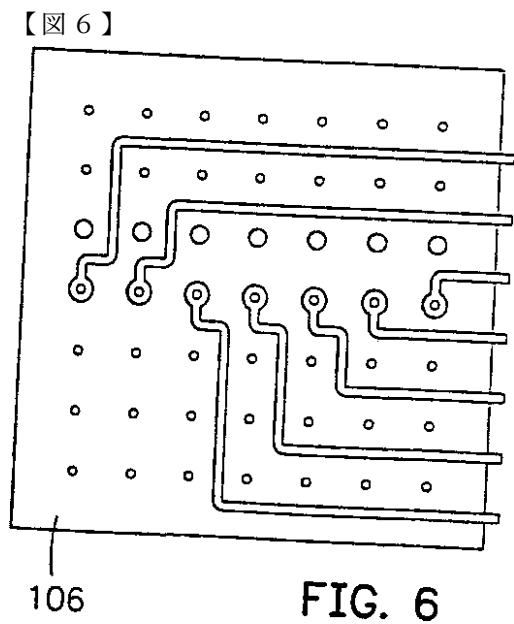
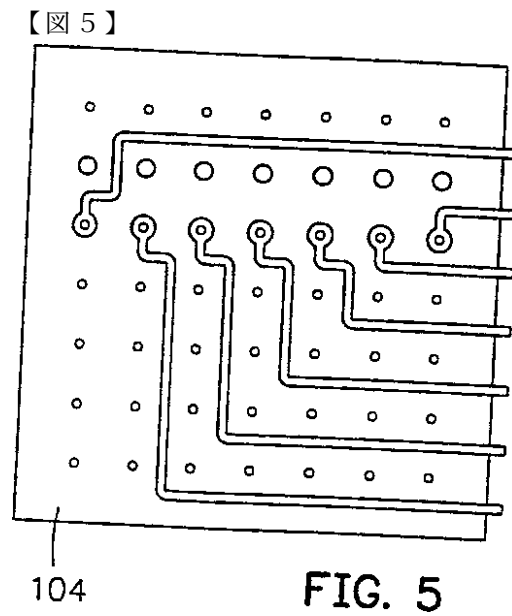
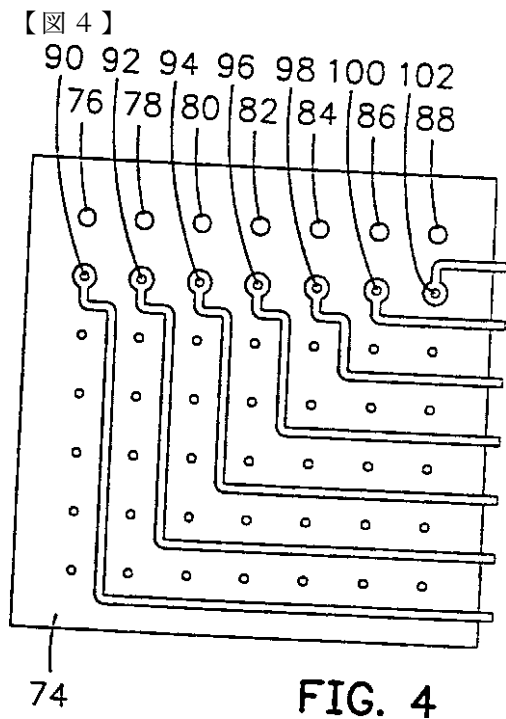


FIG. 3



【図 8】

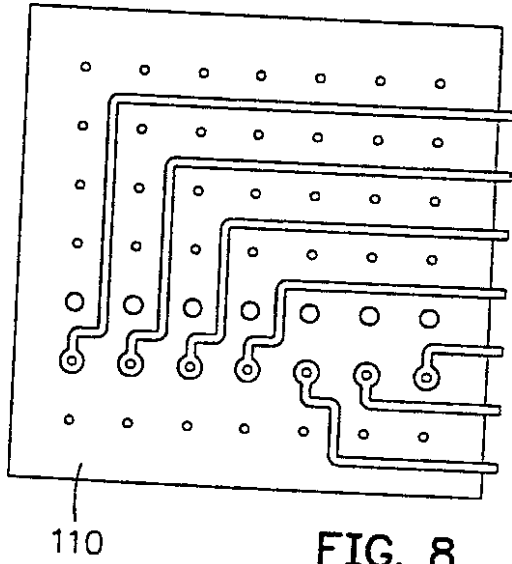


FIG. 8

【図 9】

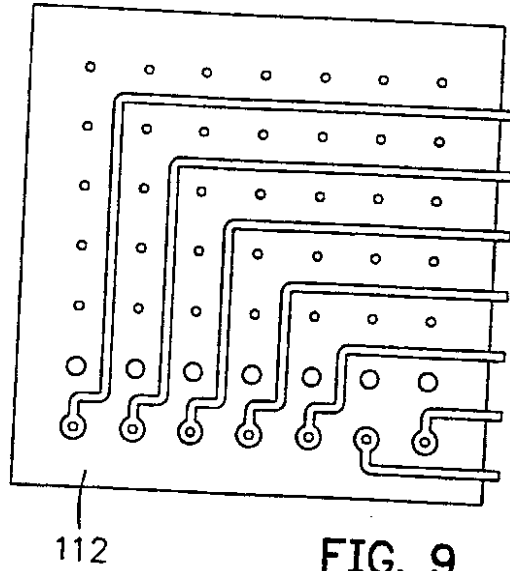


FIG. 9

【図 10】

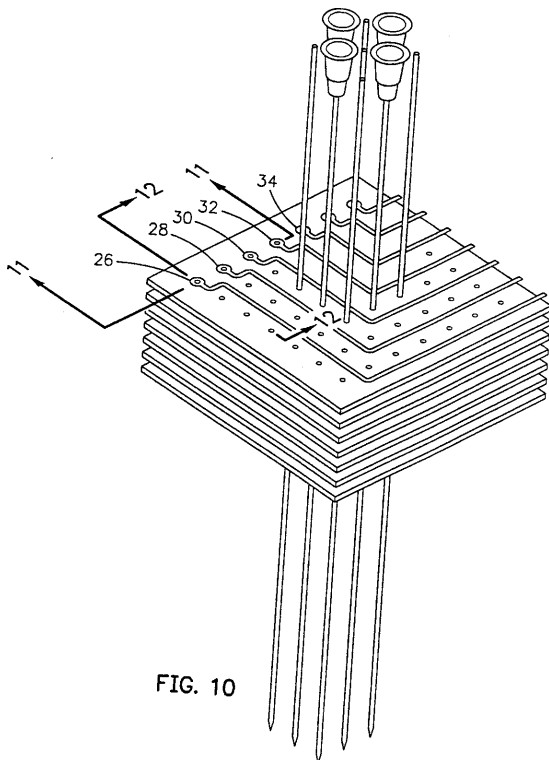


FIG. 10

【図 11】

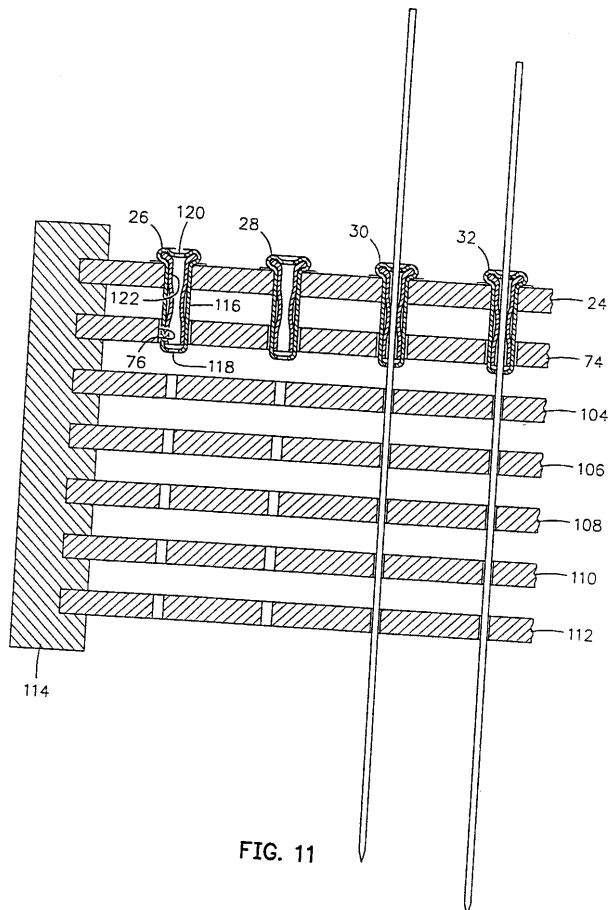
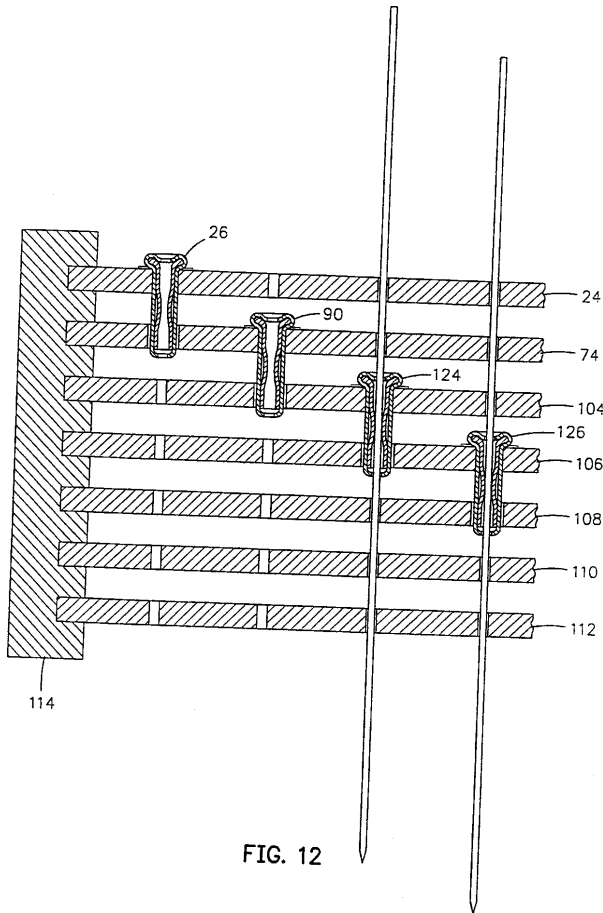


FIG. 11

【図 12】



【図 13】

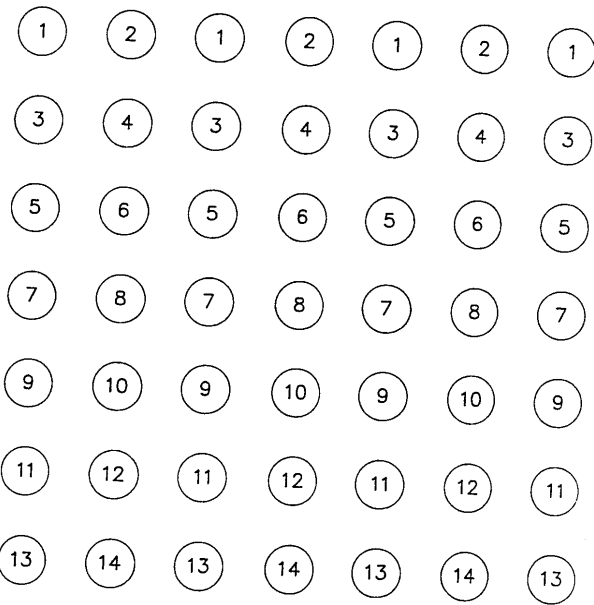


FIG. 13

【図 13 A】

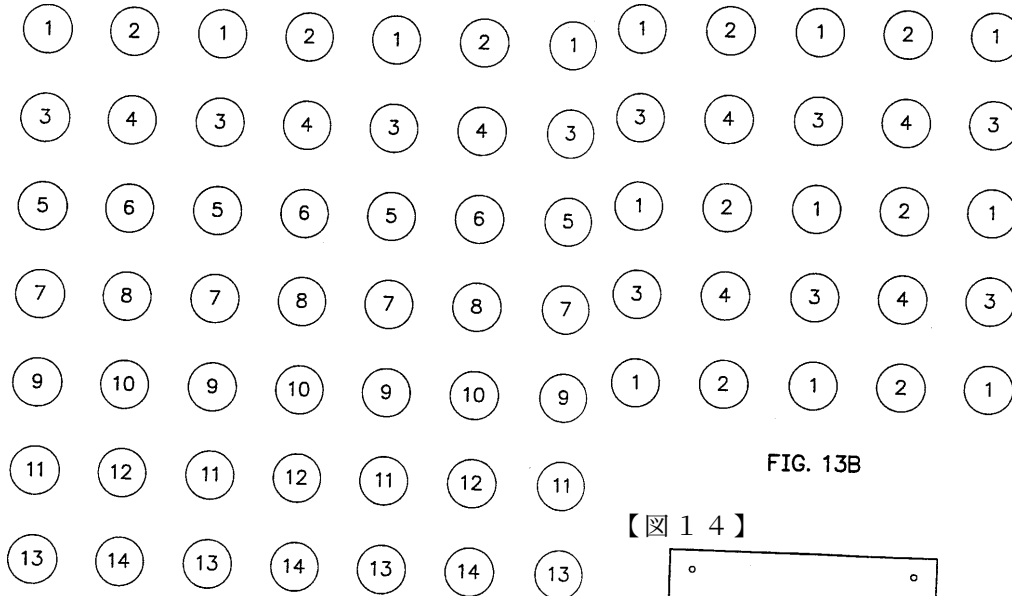


FIG. 13A

【図 13 B】

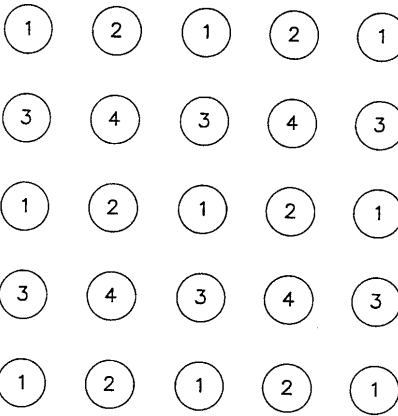


FIG. 13B

【図 14】

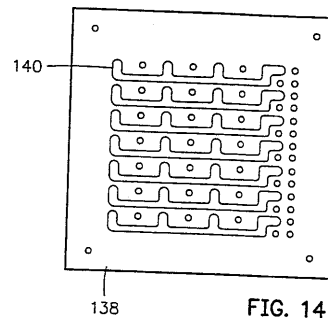


FIG. 14

【図 15】

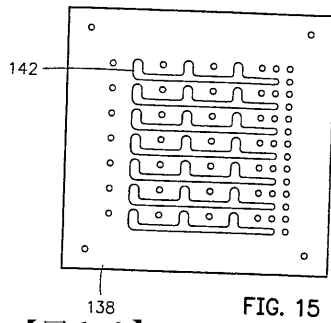


FIG. 15

【図 16】

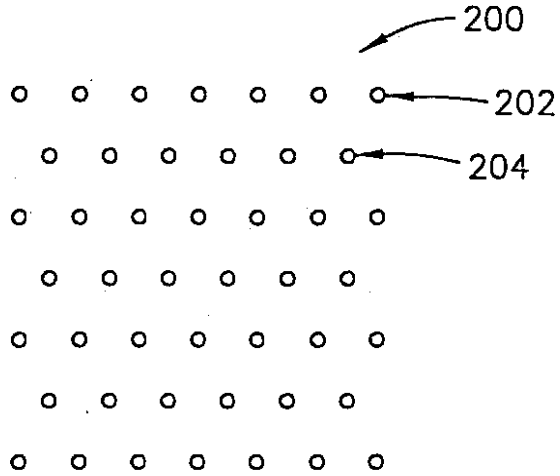


FIG. 16

【図 19】

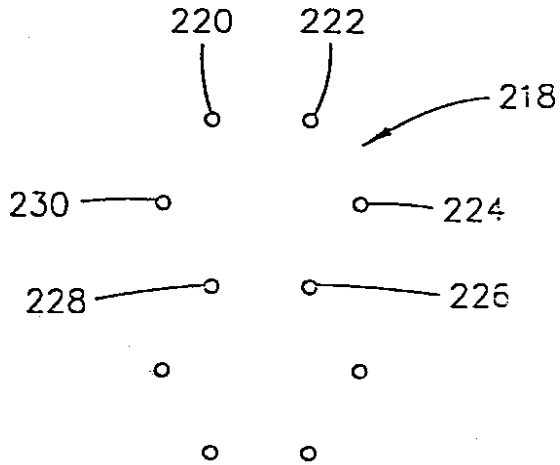


FIG. 19

【図 20】

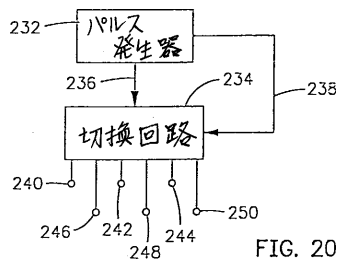


FIG. 20

【図 17】

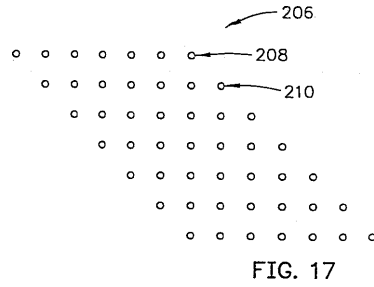


FIG. 17

【図 18】

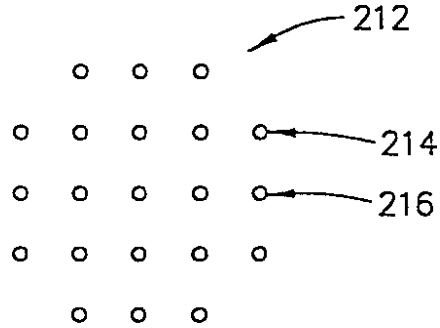


FIG. 18

【図 21】

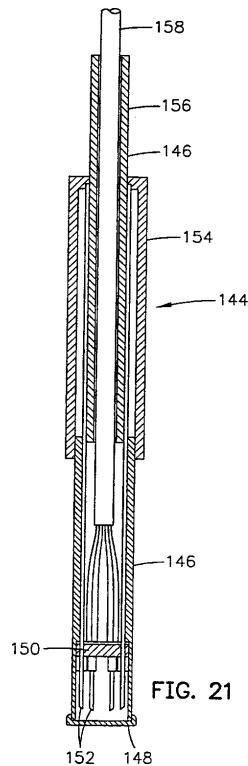


FIG. 21

【図 2 2】

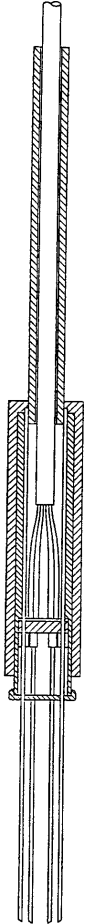


FIG. 22

【図 2 3】

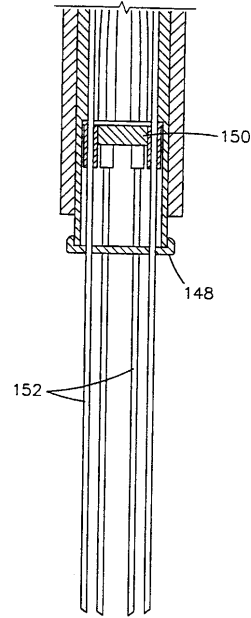


FIG. 23

【図 2 4】

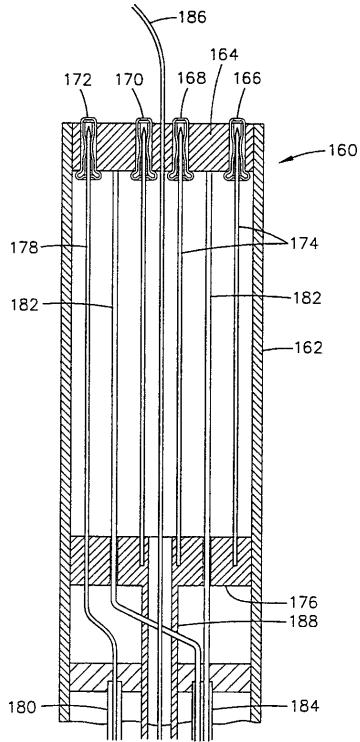


FIG. 24

【図 2 5】

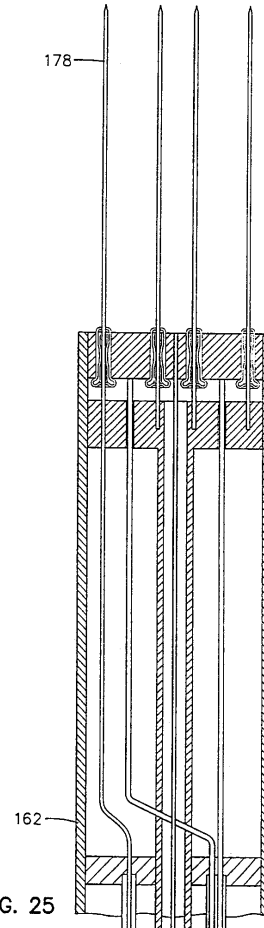


FIG. 25

【図 26】

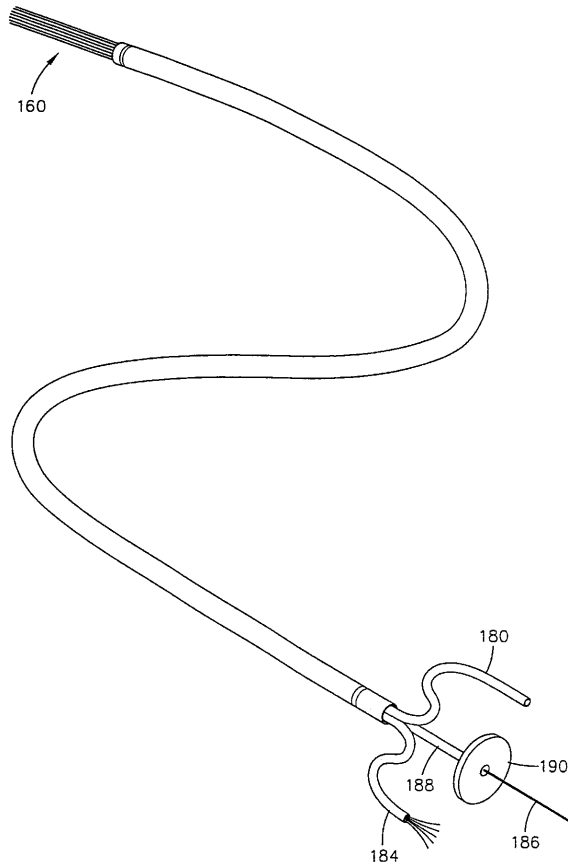


FIG. 26

【図 27】

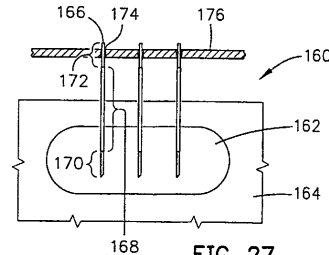


FIG. 27

【図 28】

トレオマイシンを使用する、インビトロでの
PC-3細胞の電気穿孔療法

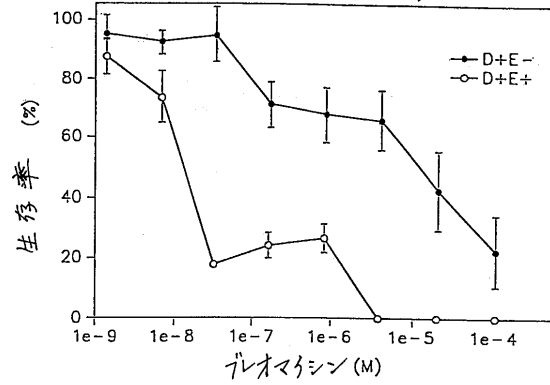


FIG. 28

【図 29】

トレオマイシンを使用する、ヌードマウスにおける
ヒト前立腺腫瘍 (PC-3) の電気穿孔療法

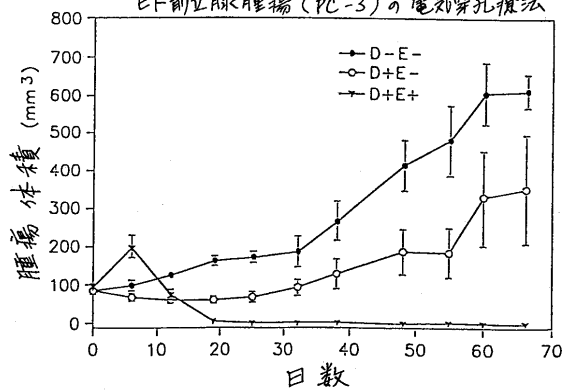


FIG. 29

【図 30】

インビトロでの、パルス電界
に対する PC-3細胞の応答

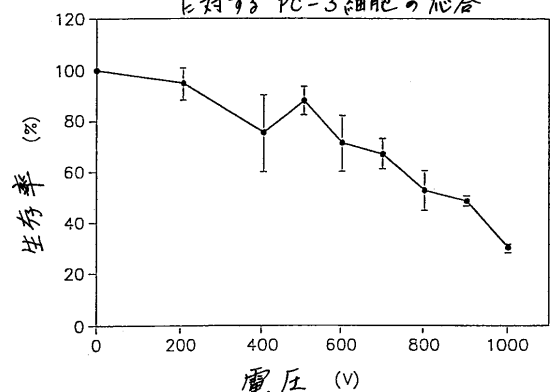


FIG. 30

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 09/234,770

(32)優先日 平成11年1月21日(1999.1.21)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ホフマン, ギュンター・エイ

アメリカ合衆国、92109 カリフォルニア州、サン・ディエゴ、リビエラ・ドライブ、375
0、ナンバー・6

審査官 内藤 真徳

(56)参考文献 特開平07-265417 (JP, A)

特表平07-508427 (JP, A)

国際公開第96/039226 (WO, A1)

国際公開第96/017648 (WO, A1)

米国特許第05318514 (US, A)

特開2002-291910 (JP, A)

国際公開第96/004860 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61N 1/32