

(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
2016 年 9 月 15 日(15.09.2016)



(10) 国際公開番号

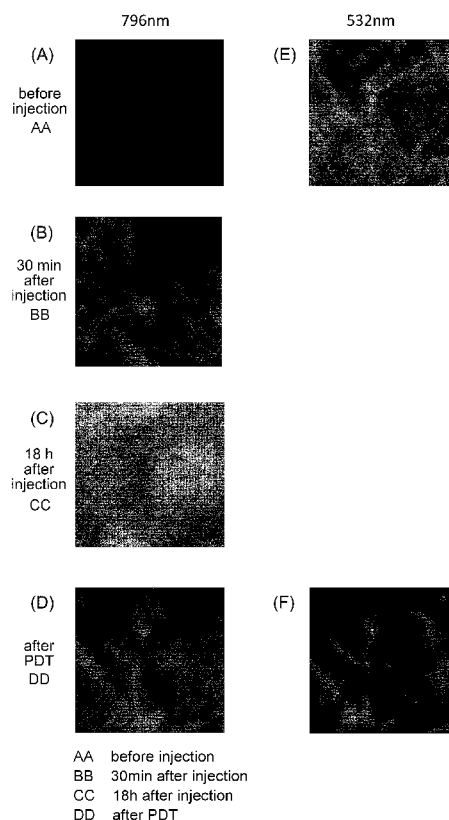
WO 2016/143017 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 49/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/056754
- (22) 国際出願日: 2015 年 3 月 6 日(06.03.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 株式会社島津製作所 (SHIMADZU CORPORATION) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 小関 英一(OZEKI, Eiichi); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 原 功(HARA, Isao); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 新宅 将人, 外(SHINTAKU, Masato et al.); 〒5410054 大阪府大阪市中央区南本町 4 丁目 5-7 東亜ビル いざなぎ国際特許事務所 Osaka (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, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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).

[続葉有]

(54) Title: NANOPARTICLE FOR PHOTOACOUSTIC IMAGING

(54) 発明の名称: 光音響イメージング用ナノ粒子



(57) Abstract: The nanoparticle according to the present invention comprises a molecular aggregate containing an amphiphilic block polymer. The amphiphilic block polymer comprises a hydrophilic block chain having 20 or more sarcosine units and a hydrophobic block chain having 10 or more lactic acid units. The molecular aggregate contains a near-infrared absorbing organic molecule, which has a near-infrared absorbing functional group, at a concentration of 5 $\mu\text{mol/g}$ or greater. It is preferred that the near-infrared absorbing organic molecule is a hydrophobic polymer in which the aforesaid near-infrared absorbing functional group is attached to a polymer chain having 10 or more lactic acid units. The nanoparticle according to the present invention is usable as a contrast agent for photoacoustic imaging.

(57) 要約: 本発明のナノ粒子は、両親媒性ブロックポリマーを含む分子集合体からなる。両親媒性ポリマーは、20個以上のサルコシン単位を有親水性ブロック鎖と10個以上の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖を有する。分子集合体は、近赤外線吸収官能基を含む近赤外線吸収有機分子を含有し、その濃度が5 $\mu\text{mol/g}$ 以上である。近赤外線吸収有機分子は、10個以上の乳酸単位を含むポリマー鎖に前記近赤外線吸収官能基が結合した疎水性ポリマーであることが好ましい。本発明のナノ粒子は、光音響イメージングのコントラスト剤として用いられる。

WO 2016/143017 A1

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：光音響イメージング用ナノ粒子

技術分野

[0001] 本発明は、光音響イメージングに用いられるナノ粒子に関する。

背景技術

[0002] 近年、ナノテクノロジーへの関心が高まっており、ナノサイズ物質特有の性質を活かした新規機能性材料が開発されている。特許文献1には、サルコシン単位を含む親水性ブロック鎖と乳酸単位を含む疎水性ブロック鎖とを有する両親媒性ブロックポリマーが、ポジトロン断層法や蛍光イメージング用のプローブ剤として有用であることが記載されている。

[0003] ポジトロン断層法（PET）、蛍光イメージング（FI）、核磁気共鳴イメージング（MRI）、超音波イメージング（US）等の生体イメージング法は、生体を解剖することなく生体内の状況を把握する方法として、近年注目されている。

[0004] 生体イメージング法の一つである光音響イメージング（PAI）は、光音響効果により生じた音響波（一般には超音波）の発生位置および強度を検出して、測定対象の画像を得る方法である。光音響効果とは、光エネルギーを吸収した分子が熱を放出し、その熱による体積膨張で音響波が発生する現象である。光音響イメージングは、励起手段として空間分解能の高いレーザ光を使用可能であり、組織内での減衰が小さい超音波を検出する手法であるため、空間分解能および深達度の両者に優れる生体イメージング手法として注目されている。光音響イメージングでは、一般に、生体透過性の高い近赤外線（波長700～900nm）のナノパルスレーザが用いられる。

[0005] 光音響イメージングでは、生体内のヘモグロビンやメラニンによる近赤外線吸収に起因して、目的部位が観察しづらい場合がある。そのため、測定対象部位からの音響波を有効に増幅してより詳細な検出や測定を可能とするために、金ナノ粒子や単層カーボンナノチューブ等の近赤外線吸収性を有する

コントラスト剤が用いられている。しかし、無機材料からなるコントラスト剤は毒性があるため、生体への投与が制限される。

[0006] 一方、生体への毒性が小さいコントラスト剤として、インドシアニンググリーン（ICG）等の有機分子が知られている。しかし、ICG等の近赤外線吸収有機分子は、分子サイズが小さいため、測定対象部位への集積性が低い。そこで、ICG等の近赤外線吸収有機分子を、ナノ粒子内に内包させて、光音響イメージングのコントラスト剤として用いることが提案されている。

[0007] 例えば、特許文献2では、リポソームにICGの会合体を内包させた粒子が、光音響イメージングのコントラスト剤として使用可能であることが開示されている。また、特許文献2では、腫瘍等の標的部位に特異的に結合する物質（抗体等）を粒子に固定化することにより、標的部位を特異的に標識できることが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：WO2009/148121号パンフレット

特許文献2：WO2013/125237号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] しかし、上記特許文献2では、近赤外線吸収色素を内包するリポソームが血清中での保持率が高いことが示されているのみであり、生体への適用例は示されていない。また、光音響イメージングの測定例も示されておらず、その有用性が示されているとは言い難い。

[0010] 上記に鑑み、本発明は、生体への毒性が少ない有機分子を用い、かつ生体内への集積性に優れる、光音響イメージング用ナノ粒子の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らが検討の結果、赤外線吸収有機分子を含む両親媒性ポリマーの

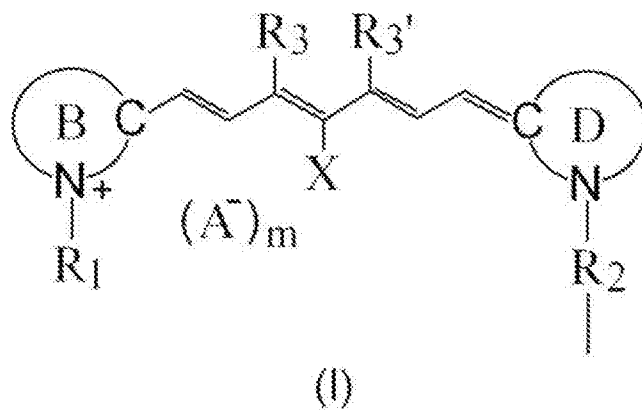
分子集合体のナノ粒子が、上記目的を達成し得ることを見出し本発明に至った。本発明は、光音響イメージングのコントラスト剤として用いられる光音響イメージング用ナノ粒子に関する。

[0012] 本発明のナノ粒子は、20個以上のサルコシン単位を有する親水性ブロック鎖と10個以上の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖を有する両親媒性ブロックポリマーを含む分子集合体からなる。分子集合体は、近赤外線吸収官能基を含む近赤外線吸収有機分子を $5 \mu\text{mol/g}$ 以上の濃度で含む。分子集合体の粒子径は、20～200nmであることが好ましい。

[0013] 好ましい形態において、近赤外線吸収有機分子は、10個以上の乳酸単位を含むポリマー鎖に近赤外線吸収官能基が結合した疎水性ポリマーである。

[0014] 近赤外線吸収官能基は、例えば、下記式(Ⅰ)で表される官能基である。

[0015] [化1]



[0016] 上記式中、 R_1 は、置換されていてもよいアルキル基であり、 R_2 は、置換されていてもよいアルキレン基である。 R_3 および R_3' は、水素原子、または互いに連結して環状構造を形成する基である。 X は水素またはハロゲンである。環Bおよび環Dは、それぞれ同一または異なってもよい含窒素縮合芳香族複素環である。 A^- は陰イオンであり、 m は0または1である。

[0017] 一実施形態において、近赤外線吸収官能基は、インドシアニングリーンに由来する基である。

発明の効果

[0018] 本発明のナノ粒子は、有機分子であり生分解性に優れるため、生体に投与

した場合の毒性が小さい。また、本発明のナノ粒子は、血管病変や癌部位に特異的に集積する特性を有する。そのため、本発明のナノ粒子をコントラスト剤として生体に投与して、近赤外の励起光による光音響イメージングを行うことにより、血管病変や癌部位の位置を可視化して、正確に確定することができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]実施例で用いた光音響イメージング装置の構成図である。

[図2] (A) は実施例のナノ粒子 (ICGラクトソーム) の吸収スペクトルであり、(B) はICGの吸収スペクトルである。

[図3]光音響イメージングの測定結果であり、(A) ~ (D) は796 nmの励起光での光音響信号、(E) および (F) は532 nmの励起光での光音響信号を可視化したものである。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明のナノ粒子は、生体等に投与することにより、光音響イメージングのコントラスト剤として用いられる。ナノ粒子は、両親媒性ブロックポリマーを含む分子集合体からなり、分子集合体中に、近赤外線吸収有機分子を含む。分子集合体中に近赤外線吸収有機分子を含む形態としては、両親媒性ブロックポリマーが、近赤外線吸収ポリマーとともに分子集合体を形成したもの；近赤外線吸収基が結合した両親媒性ブロックポリマーが分子集合体を形成したもの；両親媒性ブロックポリマーの分子集合体内に、近赤外線吸収剤が内包されたもの；および両親媒性ブロックポリマーと疎水性ポリマーとの分子集合体に、近赤外線吸収剤が内包されたものを含む。

[0021] [両親媒性ブロックポリマー]

本発明のナノ粒子では、両親媒性ブロックポリマーの凝集力がドライビングフォースとなって分子集合体を形成する。すなわち、両親媒性ブロックポリマーは、分子集合体の基本要素である。両親媒性ブロックポリマーは、親水性ブロック鎖と疎水性ブロック鎖を有する。

[0022] 親水性ブロック鎖が有する「親水性」とは、疎水性ブロック鎖に対して相

対的に親水性が強いことを意味する。具体的には、当該親水性ブロック鎖が疎水性ブロック鎖とブロックコポリマーを形成することによって、コポリマー分子全体として両親媒性を実現することが可能となる程度の親水性を意味する。同様に、疎水性ブロック鎖が有する「疎水性」とは、親水性ブロック鎖に対して、相対的に疎水性が強いことを意味する。具体的には、当該疎水性ブロック鎖が、親水性ブロック鎖とブロックコポリマーを形成することによって、コポリマー分子全体として両親媒性を実現することが可能となる程度の疎水性を意味する。

[0023] (親水性ブロック鎖)

親水性ブロック鎖は、サルコシン（N-メチルグリシン）に由来する単位（サルコシン単位）を20個以上有する親水性分子鎖である。サルコシンは、水溶性が高い。また、ポリサルコシンはN置換アミドを有することからシーストランス異性化が可能であり、かつ、 α 炭素まわりの立体障害が少ないことから、高い柔軟性を有する。そのため、ポリサルコシン鎖を構成単位として用いることにより、高い親水性と柔軟性とを併せ持つ親水性ブロック鎖が形成される。

[0024] 親水性ブロック鎖のサルコシン単位が20個以上であれば、隣接して存在するブロックポリマーの親水性ブロック同士が凝集しやすく、自己凝集性が高められるため、分子集合体が形成されやすくなる。親水性ブロック鎖中のサルコシン単位の数の上限は特に制限されないが、分子集合体の構造を安定化させる観点からは500個以下が好ましい。サルコシン単位の数が過度に大きいと、分子集合体が安定性を欠く傾向がある。親水性ブロック鎖のサルコシン単位の数は、30～300個がより好ましく、50～200個がさらに好ましい。

[0025] 親水性ブロック鎖は、全てのサルコシン単位が連続していてもよく、上記のポリサルコシンの特性を損なわない限りにおいてサルコシン単位が非連続であってもよい。親水性ブロック鎖がサルコシン以外のモノマー単位を有する場合、サルコシン以外のモノマー単位は特に限定されないが、例えば親水

性アミノ酸あるいはアミノ酸誘導体が挙げられる。アミノ酸は、 α -アミノ酸、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸を含み、好ましくは、 α -アミノ酸である。親水性の α -アミノ酸としては、セリン、スレオニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。また、親水性ブロックは、糖鎖やポリエーテル等を有していてもよい。親水性ブロックは、末端（疎水性ブロックとのリンカー部と反対側の末端）に、水酸基等の親水性基を有することが好ましい。

[0026] 親水性ブロック鎖は、直鎖状でもよく、分枝構造を有していてもよい。親水性ブロック鎖が分枝構造を有する場合、各分枝鎖に2以上のサルコシン単位が含まれることが好ましい。

[0027] （疎水性ブロック鎖）

疎水性ブロック鎖は、10個以上の乳酸単位を有する（本明細書においては、乳酸単位を基本単位とするこの疎水性ブロック鎖を、単にポリ乳酸と記載することがある）。ポリ乳酸は、優れた生体適合性および安定性を有する。そのため、ポリ乳酸を構成ブロックとした両親媒性ポリマーから得られる分子集合体は、生体、特に人体への応用において有用である。また、ポリ乳酸は、優れた生分解性を有することから、代謝が早く、生体内において病変部位以外の組織への集積性が低い。そのため、ポリ乳酸を構成ブロックとした両親媒性物質から得られる分子集合体は、血管病変への特異的な集積性という点で非常に有用である。また、ポリ乳酸は、低沸点溶媒への溶解性が高いため、分子集合体を製造するための溶液に、低沸点の有機溶媒を使用可能である。そのため、分子集合体の製造に用いられる溶剤の残存量を容易に低減可能であり、生体への安全性に優れるとともに、分子集合体の製造効率が高められる。

[0028] 疎水性ブロック鎖が10個以上の乳酸単位を有していれば、疎水コアが形成されやすく、自己凝集性が高められるため、分子集合体が形成されやすくなる。疎水性ブロック鎖中の乳酸単位の数の上限は特に制限されないが、分子集合体の構造を安定化させる観点からは100個以下が好ましい。疎水性

ブロックにおける乳酸単位の数、20～80個がより好ましく、30～50個がさらに好ましい。

[0029] ポリ乳酸の鎖長を調整することは、ポリ乳酸を構成ブロックとした両親媒性物質から得られる分子集合体の形状制御および大きさ制御の一要因として寄与する点においても好ましい。疎水性ブロック鎖は、乳酸単位のすべてが連続していてもよいし、非連続であってもかまわない。

[0030] 疎水性ブロック鎖を構成する乳酸単位は、L-乳酸でもD-乳酸でもよい。また、L-乳酸とD-乳酸が混在していてもよい。疎水性ブロック鎖は、全ての乳酸単位が連続していてもよく、乳酸単位が非連続であってもよい。疎水性ブロック鎖に含まれる乳酸以外のモノマー単位は特に限定されないが、例えば、グリコール酸、ヒドロキシイソ酪酸等のヒドロキシ酸や、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、メチオニン、チロシン、トリプトファン、グルタミン酸メチルエステル、グルタミン酸ベンジルエステル、アスパラギン酸メチルエステル、アスパラギン酸エチルエステル、アスパラギン酸ベンジルエステル等の疎水性アミノ酸あるいはアミノ酸誘導体が挙げられる。

[0031] 疎水性ブロック鎖は、直鎖状でもよく、分枝構造を有していてもよい。疎水性ブロック鎖が分枝していない方が、分子集合体形成時に、コンパクトな疎水コアが形成されやすく、親水性ブロック鎖の稠密度が増大する傾向がある。そのため、粒子径が小さく、構造安定性の高いコア／シェル型分子集合体を形成するためには、疎水性ブロック鎖は直鎖状であることが好ましい。

[0032] (両親媒性ブロックポリマーの構造および合成方法)

両親媒性ポリマーは、親水性ブロック鎖と疎水性ブロック鎖とを結合させたものである。親水性ブロック鎖と疎水性ブロック鎖とは、リンカーを介して結合していてもよい。リンカーとしては、疎水性ブロック鎖の構成単位である乳酸モノマー（乳酸やラクチド）またはポリ乳酸鎖と結合可能な官能基（例えば、水酸基、アミノ基等）と、親水性ブロック鎖の構成単位であるサルコシンモノマー（例えばサルコシンやN-カルボキシサルコシン無水物）ま

たはポリサルコシンと結合可能な官能基（例えばアミノ基）とを有するものが好ましく用いられる。リンカーを適宜に選択することにより、親水性ブロック鎖や疎水性ブロック鎖の分枝構造を制御することができる。

[0033] 両親媒性ブロックポリマーの合成法は、特に限定されず、公知のペプチド合成法、ポリエステル合成法、デブシペプチド合成法等を用いることができる。詳細には、WO 2009/148121号（上記特許文献1）等を参照して、両親媒性ブロックポリマーを合成することができる。

[0034] [近赤外線吸収有機分子]

近赤外線吸収有機分子は、近赤外線（波長700～1300nm）を吸収する官能基を含む。水素結合を有する化合物の置換基は近赤外領域に吸収を有するが、その吸収は比較的小さく、近赤外線は生体組織を透過しやすい。そのため、近赤外線を吸収して熱エネルギーを放出する近赤外線吸収有機分子を含むコントラスト剤を生体に投与して光音響イメージングを行えば、コントラスト剤が集積された部位の情報を正確に得ることが可能となる。すなわち、ナノ粒子中に近赤外線吸収有機分子が含まれることにより、近赤外の励起光を用いた生体の光音響イメージングが可能となる。

[0035] 近赤外線吸収有機分子としては、ポリマーに近赤外線吸収基が結合した態様を有するもの（近赤外線吸収ポリマー）および近赤外線吸収有機分子そのもの（近赤外線吸収剤）が挙げられる。

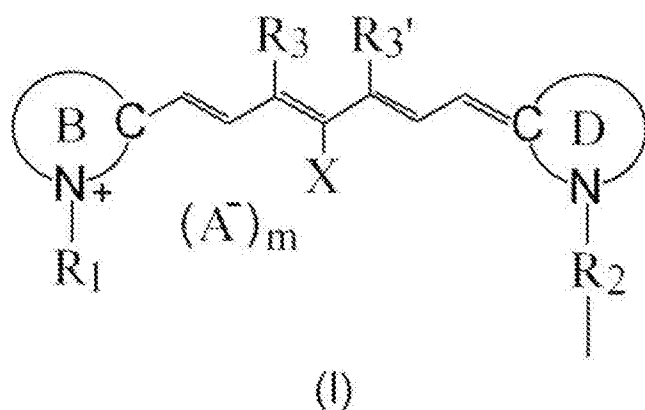
[0036] <近赤外線吸収ポリマー>

近赤外線吸収ポリマーは、ポリマー鎖に近赤外線吸収基が結合したものである。上記の両親媒性ポリマーに近赤外線吸収基が結合したものを近赤外線吸収ポリマーとしてもよく、両親媒性ポリマーとともに自己集合により分子集合体を形成可能なポリマーに近赤外線吸収基が結合したものを、近赤外線吸収ポリマーとして用いてもよい。分子集合体の疎水コアに近赤外線吸収有機分子を複数存在させ、光音響信号の強度を高める観点からは、疎水性ポリマーに近赤外線吸収基が結合したものが好ましく用いられる。

[0037] （近赤外線吸収基）

近赤外線吸収基としては、共役系を介して複数の芳香環が結合していることにより、長大な共役 π 電子系を構成しているものが用いられる。具体的には、シアニン系色素、フタロシアニン系色素、ナフトキノン系色素、ジインモニウム系色素、アゾ系色素等の色素に由来する官能基が挙げられる。中でも、近赤外の吸光係数が高く、光音響信号強度が高められやすいことから、シアニン系が好ましい。シアニン系色素に由来する基の一例は、以下の一般式 (I) で表される。

[0038] [化2]



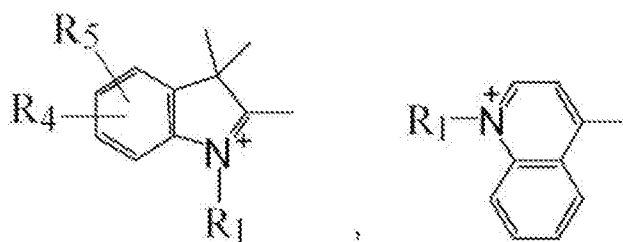
[0039] 上記式 (I) 中、 R_1 は、置換されていてもよいアルキル基であり、 R_2 は、置換されていてもよいアルキレン基である。 R_3 および R_3' は、水素原子、または互いに連結して環状構造を形成する基である。 X は水素またはハロゲンである。環 B および環 D は、それぞれ同一または異なってもよい含窒素縮合芳香族複素環である。 A^- は陰イオンであり、 m は 0 または 1 である。環 B および環 D は、同一でも異なってもよい含窒素縮合芳香族複素環である。

[0040] R_1 (アルキル基) および R_2 (アルキレン基) は、炭素数が 1 ~ 20 であり、好ましくは炭素数が 2 ~ 5 である。 R_1 および R_2 が置換基を有している場合、当該置換基はアニオン性であってもよい。置換基としては、カルボキシ基、カルボキシレート基、金属カルボキシレート基、スルホニル基、スルホネート基、金属スルホネート基、水酸基等が挙げられる。前記金属は、アルカリ金属またはアルカリ土類金属でありうる。

[0041] Xがハロゲンである場合、ハロゲンは、C l、B rおよびIでありうる。
 mが0の場合、R₁およびR₂のいずれか一方がアニオン性基であり、分子全体としてベタイン構造をとる。mが1の場合、A⁻は、C l⁻、B r⁻、I⁻等のハロゲンイオン、C l O₄⁻、B F₄⁻、P F₆⁻、S b F₆⁻、S C N⁻等でありうる。

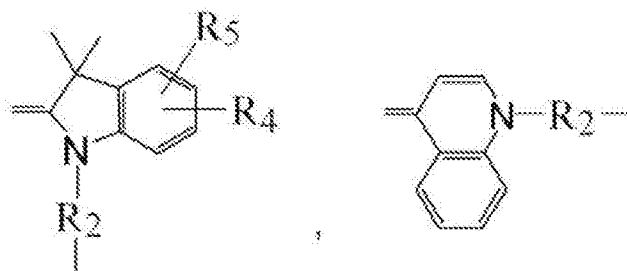
[0042] 環Aおよび環Bは、それぞれ独立に、含窒素二環式や三環式芳香族複素環でありうる。好ましくは、環Bと環Dは同一である。環Bの好ましい態様としては、以下に示す構造が挙げられる。

[0043] [化3]



[0044] 環Dの好ましい態様としては、以下に示す構造が挙げられる。

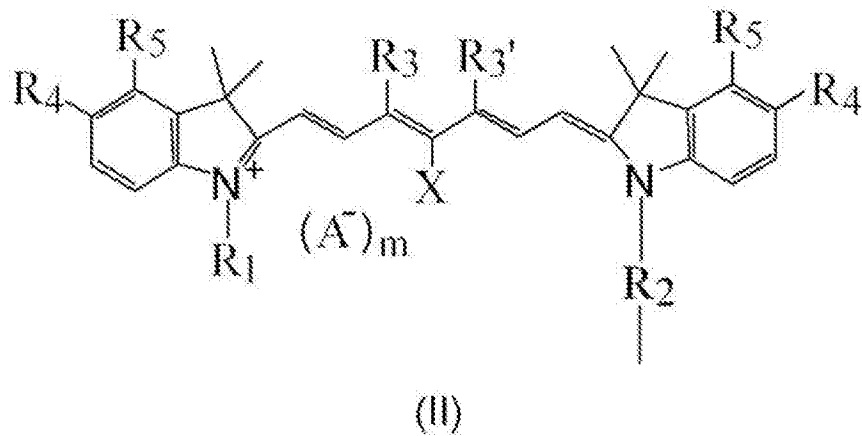
[化4]



[0045] 上記式において、R₄およびR₅は、いずれも水素でありうる。または、R₄およびR₅は、それらが互いに連結してアリール環を形成していてもよい。前記アリール環は、置換されてよいベンゼン環でありうる。

[0046] 好ましい近赤外線吸収基は、下記構造式 (II) で示される、インドシアニン化合物由来の基である。

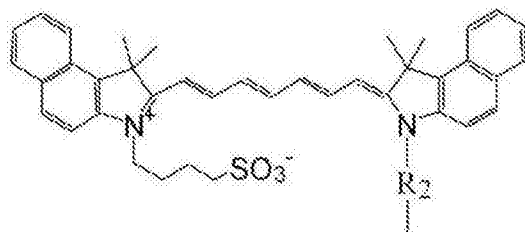
[化5]



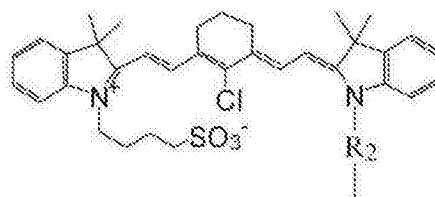
[0047] 好ましい近赤外線吸収基の具体例としては、環Bおよび環Dがいずれも含窒素三環式芳香族複素環であるICG基（下記式III）、IC7-1基（下記式IV）およびIR820基（下記式V）；環Bおよび環Dがいずれも含窒素二環式芳香族複素環であるIR783基（下記式VI）およびIR806基（下記式VII）；ならびに、環Bが含窒素三環式芳香族複素環、環Cが含窒素二環式芳香族複素環であるIC7-2基（下記式VIII）が挙げられる。

[0048]

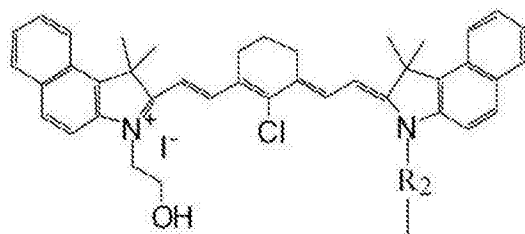
[化6]



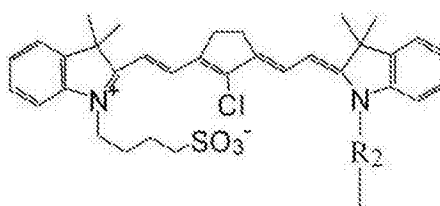
(III)



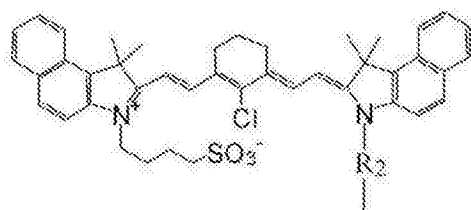
(VI)



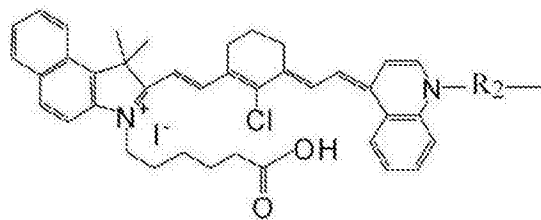
(IV)



(VII)



(V)



(VIII)

[0049] (ポリマー鎖)

近赤外線吸収ポリマーのポリマー鎖部分の構造は特に限定されない。ポリマー鎖は、好ましくは疎水性である。近赤外線吸収ポリマーが疎水性であれば、分子集合体の疎水コアに凝集しやすく、近赤外の励起光による光音響信号強度の高いナノ粒子が得られる。

[0050] 疎水性ポリマー鎖は、好ましくは、複数の乳酸単位を有する。例えば、乳酸単位を主たる構成成分とするもの（すなわちポリ乳酸鎖）でもよく、複数の乳酸単位の疎水性ブロックに加えて親水性ブロックを有するもの（すなわち両親媒性ブロックポリマー鎖）でもよい。近赤外線吸収ポリマーの疎水性ポリマー鎖は、好ましくは5個以上の乳酸単位を有する。疎水性ポリマー鎖の乳酸単位の数は、5～50がより好ましく、15～35がさらに好ましい。

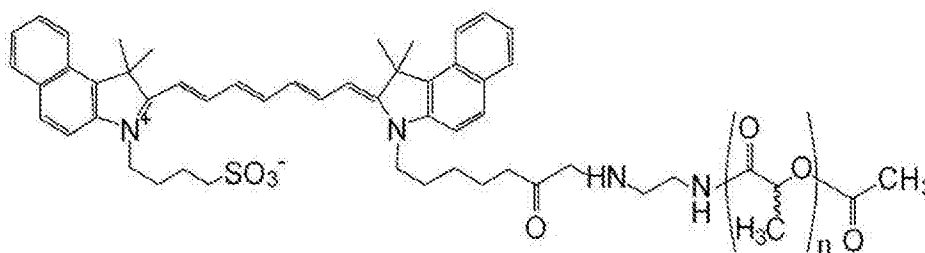
。乳酸単位はすべてが連続していてもよいし、非連続でもよい。

[0051] 分子集合体が、両親媒性ポリマーと近赤外線吸収ポリマーを含む場合、近赤外線吸収ポリマーの疎水性ポリマー鎖の構成単位や鎖長は、基本的に、上記の両親媒性ブロックポリマーにおける疎水性ブロック鎖の分子設計と同様の観点で決定することができる。このようにすれば、近赤外線吸収ポリマーと両親媒性ブロックポリマーの疎水性ブロック鎖との親和性が高いため、疎水コア部分に近赤外線吸収ポリマーを含む分子集合体が得られ易くなる。

[0052] 近赤外線吸収ポリマーのポリマー鎖は、両親媒性ブロックポリマーの長さを超えないことが好ましい。また、近赤外線吸収ポリマーのポリマー鎖は、両親媒性ブロックポリマーにおける疎水性ブロックの2倍の長さを超えないことが好ましい。上記の近赤外線吸収基は、ポリマー鎖の末端構成単位に結合していることが好ましい。

[0053] 疎水性ポリマー鎖に近赤外線吸収基としてインドシアニングリーンに由来するICG基が結合した近赤外線吸収ポリマーの具体例としては、下記式のポリマーが挙げられる。下記式において、 n は整数であり、好ましくは5～50である。

[0054] [化7]

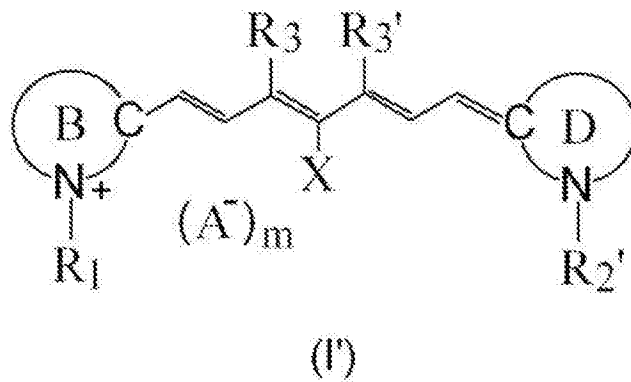


[0055] <近赤外線吸収剤>

近赤外線吸収剤は、上記の両親媒性ブロックポリマーを基本的要素とする分子集合体に内包されることにより、分子集合体の一部を形成し得る。近赤外線吸収剤としては、シアニン系色素、フタロシアニン系色素、ナフトキノ系色素、ジインモニウム系色素、アゾ系色素等が挙げられる。中でも、近赤外の吸光係数が高く、光音響信号強度が高められやすいことから、シアニ

ン系が好ましい。シアニン系色素の一例は、以下の一般式 (I') で表される。

[0056] [化8]

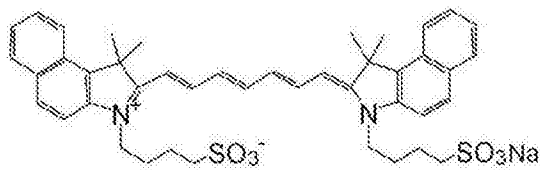


[0057] 上記式 (I') において、 R_2' は、上記式 (I) における R_2 に、水素原子、アルキル基、その他の置換基が付加したものである。上記式 (I') は、 R_2 が R_2' に置き換わったことを除き、上記式 (I) と同様である。

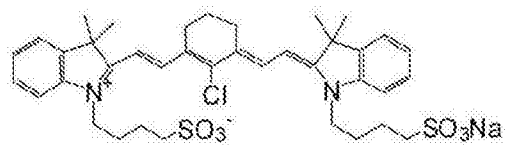
[0058] 上記式 (I') で表される近赤外線吸収剤の具体例としては、環 B および環 D がいずれも含窒素三環式芳香族複素環である I C G (下記式 III')、I C 7 - 1 (下記式 IV') および I R 8 2 0 (下記式 V')；環 B および環 D がいずれも含窒素二環式芳香族複素環である I R 7 8 3 (下記式 VI') および I R 8 0 6 (下記式 VII')；ならびに、環 B が含窒素三環式芳香族複素環、環 C が含窒素二環式芳香族複素環である I C 7 - 2 (下記式 VIII') が挙げられる。

[0059]

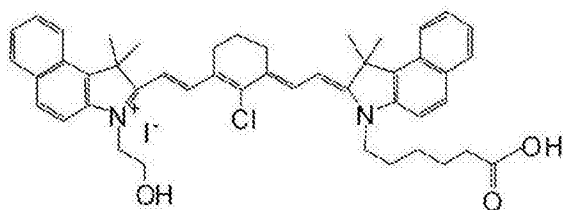
[化9]



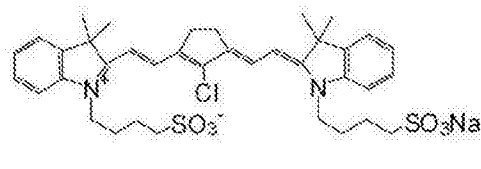
(III') ICG



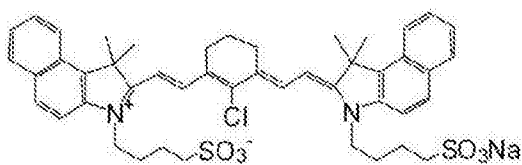
(VI') IR783



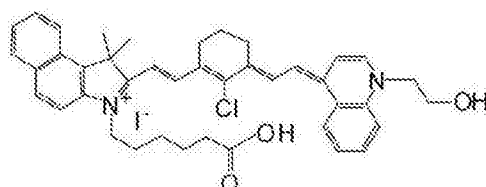
(IV) IC7-1



(VII') IR806



(V') IR820



(VIII') IC7-2

[0060] [ナノ粒子の形成]

本発明のナノ粒子は、上記の近赤外線吸収有機分子を含むように形成された上記両親媒性ポリマーの分子集合体からなる。なお、近赤外線吸収基が結合した両親媒性ブロックポリマーを用いる場合は、両親媒性ブロックポリマーの分子集合体を形成することにより、近赤外線吸収有機分子を含むナノ粒子が得られる。ナノ粒子の作製法は特に限定されず、ナノ粒子の大きさ、特性、担持させる近赤外線吸収有機分子の種類、性質、含有量等に応じて、適宜選択することができる。ナノ粒子が形成されたことは、電子顕微鏡観察により確認できる。

[0061] ナノ粒子の形成方法の具体例としては、両親媒性ポリマーと近赤外線吸収有機分子とを含む溶液を乾固させて得られたフィルムと水系液体とを接触さ

せ、水系液体中にナノ粒子が分散した分散液を得る方法（フィルム法）や、当該溶液を水系液体と接触させて分散液を得る方法（インジェクション法）等が挙げられる。

[0062] フィルム法およびインジェクション法のいずれにおいても、両親媒性ブロックポリマーや近赤外線吸収有機分子等の分子集合体の構成成分および溶媒を含む溶液が用いられる。溶媒は、分子集合体の構成成分を溶解し得るものであれば特に限定されない。フィルム法には、低沸点溶媒が好ましく用いられる。低沸点溶媒とは、1気圧における沸点が100℃以下、好ましくは90℃以下のものをいう。具体的には、クロロホルム、ジエチルエーテル、アセトニトリル、エタノール、トリフルオロエタノール、イソプロパノール、ヘキサフルオロイソプロパノール、アセトン、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、ヘキサン等が挙げられる。インジェクション法では、上記の低沸点溶媒の他、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド等の高沸点溶媒も制限なく用いることができる。

[0063] ナノ粒子の形成に用いられる溶液は、両親媒性ブロックポリマー、近赤外線吸収有機分子、および溶媒以外の成分を含んでいてもよい。例えば、両親媒性ブロックポリマーや近赤外線吸収ポリマー以外のポリマーを、分子集合体の構成成分として含んでいてもよい。親媒性ブロックポリマーや近赤外線吸収ポリマー以外のポリマーとしては、疎水性ポリマーが挙げられる。疎水性ポリマーを加えることにより、分子集合体の疎水コアの形成促進や、疎水コアの体積制御等を行いうる。疎水性ポリマーとしては、上記の近赤外線吸収ポリマーのポリマー鎖（近赤外線吸収基を含まないもの）と同等のものをを用いることができる。なお、近赤外線吸収有機分子の濃度を高め、光音響イメージング用のナノ粒子を得るためには、近赤外線吸収ポリマー以外の疎水性ポリマー（すなわち、近赤外線吸収基を含まない疎水性ポリマー）を使用しないか、あるいは使用量を極力小さくすることが好ましい。具体的には、近赤外線吸収基を含まない疎水性ポリマーの量は、近赤外線吸収ポリマー100モル部に対して、30モル部以下が好ましく、20モル部以下がより好

ましく、10モル部以下がさらに好ましい。

[0064] (フィルム法)

フィルム法は、リポソームの調製に用いられている方法である。上記の両親媒性ブロックポリマーは、疎水性ブロック鎖が乳酸単位を有し、低沸点溶媒への溶解性を有するため、この方法を用いたナノ粒子の調製が可能である。フィルム法は、ガラス容器等の容器中に、上記溶液を用意する工程；溶液から有機溶媒を除去し、容器の内壁にポリマーと近赤外線吸収有機分子とを含むフィルムを得る工程；および、容器中に水系液体を加え、フィルム状物質を、近赤外線吸収有機分子を内包する分子集合体に変換してナノ粒子の分散液を得る工程、を含む。

[0065] 容器内の溶液から溶媒を除去することにより、容器内壁に分子集合体を構成するポリマーと近赤外線吸収有機分子とを含むフィルムが形成される。溶媒の除去の方法は特に限定されず、使用する溶媒の沸点等に応じて、適宜決定できる。例えば、減圧下における溶媒除去を行ってもよいし、自然乾燥による溶媒除去を行ってもよい。

[0066] このフィルムが張り付いた容器中に、水系液体を加え、容器内壁からフィルムが剥がれる過程で分子集合体が形成される。水系液体は、水または水溶液であり、生化学的、薬学的に許容することができるものであればよく、例えば、注射用蒸留水、生理食塩水、緩衝液等が挙げられる。容器内壁からフィルムを剥離させ、ナノ粒子の形成を促進するために、容器内に水系液体が加えられた後、加温処理や超音波処理が行われてもよい。加温処理は、例えば70～100℃、5～60分の条件下で行うことができる。

[0067] なお、容器の内壁にフィルムを形成する代わりに、フィルムやガラス板等の基材上にフィルムを形成し、基材上のフィルムと水系液体とを接触させることにより、ナノ粒子を形成することもできる。基材上のフィルムと水系液体との接触は、例えば、フィルムが形成された基材を水系液体中に浸漬することにより行い得る。

[0068] (インジェクション法)

インジェクション法は、他の多くのナノ粒子の調製に用いられる方法である。この方法においては、上記の溶液を、水系液体に分散させ、精製処理、例えばゲルろ過クロマトグラフィー、フィルタリング、超遠心等の処理を行った後、有機溶媒を除去することによってナノ粒子を調製することができる。インジェクション法において、溶液の溶媒として、生体に有害な有機溶媒を用いた場合は、有機溶媒の除去を厳密に行うことが好ましい。

[0069] (ナノ粒子の凍結乾燥処理)

フィルム法やインジェクション法により得られたナノ粒子の分散液は、そのまま光音響イメージング用のコントラスト剤として、生体に投与することができる。また、得られた分散液を凍結乾燥処理しても良い。凍結乾燥処理の方法としては公知の方法を採用できる。例えば、ナノ粒子の分散液を液体窒素等によって凍結させ、減圧下で昇華させることにより、ナノ粒子の凍結乾燥処理物が得られる。これにより、ナノ粒子を凍結乾燥処理物として保存することが可能になる。必要に応じ、この凍結乾燥物に水系液体を加えて、ナノ粒子の分散液を得ることにより、ナノ粒子を使用に供することができる。

[0070] 凍結乾燥処理前の分散液中には、ナノ粒子の形成に寄与しなかったポリマーや近赤外線吸収有機分子が各々それ自体として残存している場合がある。このような分散液を凍結乾燥処理に供すると、溶媒が濃縮される過程で、ナノ粒子を形成せず残存していたポリマーと近赤外線吸収有機分子とから、さらにナノ粒子を形成することが可能になる。従って、本発明のナノ粒子の調製を効率的に行うことが可能になる。

[0071] (近赤外線吸収有機分子の濃度)

光音響イメージング用ナノ粒子における近赤外線吸収有機分子の濃度は、 $5 \mu\text{mol/g}$ 以上である。近赤外線吸収有機分子の濃度を高くすることにより、ナノ粒子を生体に投与した場合の光音響信号の強度が高められる。近赤外線吸収有機分子の濃度が $5 \mu\text{mol/g}$ 未満の場合、生体へのナノ粒子の投与量を増大させても、生体イメージングを行い得る程度の光音響信号を

得ることが困難である。より精度の高い光音響イメージングを実現可能とするために、ナノ粒子における近赤外線吸収有機分子の濃度は、 $10 \mu\text{mol/g}$ 以上が好ましく、 $15 \mu\text{mol/g}$ 以上がより好ましく、 $20 \mu\text{mol/g}$ 以上がさらに好ましい。ナノ粒子における近赤外線吸収有機分子の濃度の上限は特に制限されず、濃度が高いほど光音響信号強度が高められる傾向がある。ただし、近赤外線吸収有機分子の濃度が高すぎると、分子集合体の構造が不安定となる傾向がある。そのため、ナノ粒子における近赤外線吸収有機分子の濃度は、 $100 \mu\text{mol/g}$ 以下が好ましく、 $70 \mu\text{mol/g}$ 以下がより好ましく、 $50 \mu\text{mol/g}$ 以下がさらに好ましい。

[0072] ICG等の近赤外線吸収基は、蛍光色素でもあり、近赤外線の照射により蛍光を発することから、蛍光コントラスト剤としても用いられている。蛍光イメージングでは、蛍光色素の濃度が高くなると濃度消光によるシグナルの低下が生じる。特に、分子集合体内に近赤外蛍光色素が内包されている場合、1つの分子集合体の疎水コア内に複数の蛍光色素分子が存在すると、蛍光色素分子同士が近接して存在するために濃度消光が生じやすい。例えば、分子集合体のナノ粒子中にICGを内包する場合、その濃度が $5 \mu\text{mol/g}$ 以上になると、ICGからの蛍光がほぼ観測されなくなる。そのため、蛍光イメージング用のナノ粒子では、蛍光色素で標識された疎水性ポリマーに加えて、蛍光色素で標識されていない疎水性ポリマーを用い、疎水コアに取り込まれる蛍光色素の数を制限する必要がある。一方、光音響イメージングでは、1つの分子集合体内に複数の赤外線吸収基を存在させ、蛍光では濃度消光が生じるほどの高濃度とすることにより、生体イメージングを行い得る程度の光音響信号が得られる。

[0073] 両親媒性ポリマーと近赤外線吸収有機分子の使用比率を調整することにより、ナノ粒子中の近赤外線吸収有機分子の濃度を高めることができる。近赤外線吸収有機分子として疎水性ポリマー鎖に近赤外線吸収基が結合した疎水性の近赤外線吸収ポリマーが用いられる場合、近赤外線吸収ポリマーの量は、両親媒性ポリマー100モル部に対して、5～200モル部が好ましく、

10～100モル部がより好ましく、15～70モル部がさらに好ましい。

[0074] (ナノ粒子の大きさ)

本発明の光音響イメージング用ナノ粒子の大きさは、好ましくは20～200nmである。「粒子径」とは、粒子分布で最も出現頻度の高い粒子径、すなわち中心粒子径をいう。粒子径が20nmより小さいものは、分子集合体内に近赤外線吸収有機分子を高濃度に内包することが困難であり、200nmより大きいものは、特に生体内へ注射により投与する場合に、注射剤として好ましくない場合がある。ナノ粒子の大きさは、透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope; TEM) による観察法や、動的光散乱 (Dynamic Light Scattering; DLS) 法により測定できる。

[0075] ナノ粒子の大きさを制御する方法としては、両親媒性ブロックポリマーや疎水性ポリマーの鎖長を調整する方法や、疎水性ポリマーの配合量を調整する方法が挙げられる。疎水性ポリマーの配合量の増大に伴って、分子集合体の疎水コアの体積が増大するため、ナノ粒子が大きくなる傾向がある。

[0076] [ナノ粒子の光音響イメージングへの適用]

本発明の光音響イメージング用ナノ粒子は、サルコシン単位を有する親水性ブロック鎖と乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖を有する両親媒性ブロックポリマーを基本的要素とする分子集合体（いわゆるラクトソーム）である。ラクトソームは、高い血中滞留性を有し、かつ他の分子集合体に比して肝臓への集積量が著しく低いとの特長を有する。

[0077] これまでも、近赤外線吸収剤等の色素を光音響イメージングに使用可能であることが知られているが、インドシアニングリーン等の色素は肝臓への集積性が高く、病変部位に血管等の病変部位に集積させることは困難であった。これに対して、本発明のナノ粒子を用いれば、血中に滞留しているナノ粒子が、腫瘍部位、炎症部位、動脈硬化部位、血管新生部位等の血管病変部位に蓄積しやすいという性質 (EPR (enhanced permeability and retention) 効果) を利用することにより、癌部位等を標的とした光音響イメージングが可能となる。

[0078] (生体へのナノ粒子の投与)

ナノ粒子の投与対象の生体は特に限定されず、ヒトまたは非ヒト動物でありうる。非ヒト動物としては、ヒト以外の哺乳類、より具体的には、霊長類、齧歯類（マウス、ラットなど）、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ等が挙げられる。生体内への投与方法は特に限定されず、全身投与および局所投与のいずれでもよい。すなわち、ナノ粒子の投与は、注射、内服、外用のいずれの方法によっても行うことができる。投与液中におけるナノ粒子の濃度は、 $0.5 \sim 100 \text{ mg/mL}$ 程度であり、好ましくは $0.8 \sim 50 \text{ mg/mL}$ 、より好ましくは $1 \sim 20 \text{ mg/mL}$ である。

[0079] ナノ粒子の投与から検出開始までの時間は、ナノ粒子が有する近赤外線吸収有機分子の種類や投与ターゲットの種類等に応じて、適宜決定することができる。例えば、投与後 $3 \sim 48$ 時間、或いは $1 \sim 24$ 時間とすることができる。上記範囲を下回ると、癌部位等の標的へのナノ粒子の滞留が不十分であったり、シグナルが強すぎるために投与ターゲットと他の部位（バックグラウンド）とを明確に分けることができない場合がある。上記範囲を上回ると、ナノ粒子が投与ターゲットから排泄されてしまう場合がある。

[0080] (光音響イメージング装置)

光音響イメージングは、光エネルギーを吸収した分子が熱を放出し、その熱による体積膨張で音響波が発生する現象（光音響効果）を利用するものである。光音響イメージング装置としては、イメージング部位等に応じて適宜の装置を用いることができる。光音響イメージング装置は、光励起部と音響波検出部とイメージング部とを有する。

[0081] 光励起部は、近赤外線を照射し、生体に投与されたナノ粒子に含まれる近赤外線吸収有機分子を励起させる。光励起部としては、近赤外のコヒーレント光源が好ましく、中でも、OPDレーザが好ましく用いられる。OPDレーザは、光パラメトリック発振 (Optical Parametric Oscillation; OPD) によるコヒーレント光源であり、可視域から赤外域までの広波長域で連続波長可変の光源として実用化されている。

[0082] 音響波検出部は、光励起部からの照射光により励起された分子から放出された熱による体積膨張で発生した音響波（具体的には超音波）を検出する。音響波検出部としては、超音波を検出可能な音響センサを用いることができる。

[0083] イメージング部は、音響波検出部の位置および検出された音響波の波形に基づいて、ナノ粒子が存在する組織の位置や大きさを可視化できるものであればよい。得られた光音響イメージから、生体内におけるナノ粒子の滞留状況を知ることができ、これに基づいて、血管病変の有無や位置等を診断することができる。

実施例

[0084] 以下に本発明のナノ粒子を用いた光音響イメージングの実施例を示すが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0085] [分子集合体の作製]

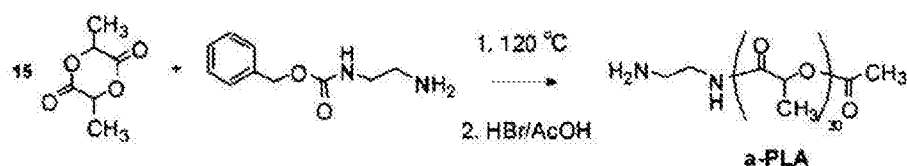
以下のように、近赤外線吸収ポリマー（ICG-PLLA₃₀）と両親媒性ブロックポリマー（PS-*ar*₇₀-PLLA₃₀）とから構成される分子集合体のナノ粒子を作製した。

[0086] <ICG修飾ポリ-L-乳酸（ICG-PLLA₃₀）の合成>

（アミノ化ポリ-L-乳酸の合成）

L-ラクチドとN-カルボベンゾキシー-1, 2-ジアミノエタン塩酸塩とを用い、下記のスキーム1にしたがって、アミノ化ポリ-L-乳酸（α-PLA）を合成した。

[0087] [化10]



[0088] オクタン酸スズ（6.91 mg）をトルエン（1.0 mL）に拡散させた

ものを、重合開始剤であるN-カルボベンゾキシー-1, 2-ジアミノエタン塩酸塩 (310 mg, 1.60 mmol) に加えた。トルエンを減圧留去した後、L-ラクチド (3.45 g, 24 mmol) を加え、Ar 雰囲気下、120℃にて12時間重合反応を行った後、反応容器を室温に空冷した。得られた黄白色固体を約10 mLのクロロホルムに溶解させ、冷メタノール (100 mL) に滴下して、白色沈殿を得た。得られた白色沈殿は遠心分離により回収し、減圧乾燥した。

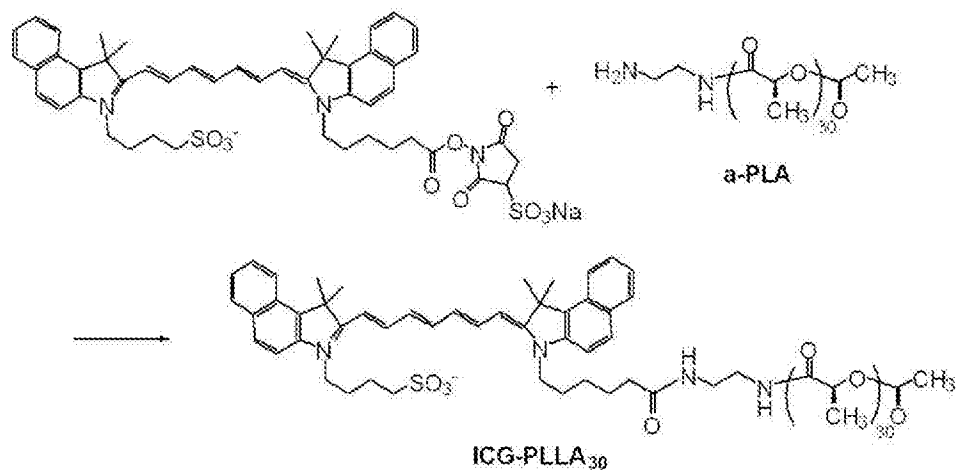
[0089] 得られた白色沈殿 (500 mg) のジクロロメタン (1 mL) 溶液に、25 v/v% 臭化水素/酢酸 (2.0 mL) を加え、遮光、乾燥空気下にて2時間攪拌した。反応終了後、反応溶液を冷メタノール (100 mL) に滴下し、析出した沈殿を遠心分離にて回収した。得られた白色沈殿はクロロホルムに溶解させた後、飽和NaHCO₃水溶液にて洗浄し、無水MgSO₄にて脱水操作を行った。セライト濾過によりMgSO₄を除去した後、真空乾燥して、α-PLAの白色のアモルファス状粉末 (440 mg) を得た。

[0090] (近赤外線吸収基の修飾)

アミノ化ポリL-乳酸 (α-PLA) を1.9 mg含むDMF溶液に、インドシアニングリーン誘導体 (ICG-sulfate) 1 mg (α-PLAに対して1.3当量) を含むDMF溶液を加え、室温で約20時間攪拌した。その後、溶媒を減圧留去し、LH-20カラムにて精製を行い、アミノ基を介してポリL-乳酸にインドシアニングリーン由来の近赤外線吸収官能基が結合したポリマー (ICG-PLLA₃₀) を得た (下記スキーム2)。

[0091]

[化11]

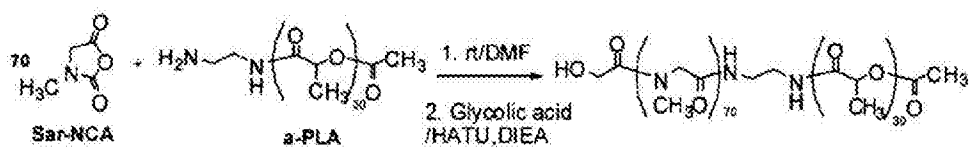


スキーム2

[0092] <両親媒性ブロックポリマー (PSar₇₀-PLLA₃₀) の合成>

アミノ化ポリL-乳酸 (α-PLA) (383 mg, 0.17 mmol) とサルコシン-N-カルボン酸無水物 (Sar-NCA) (3.21 g, 27.9 mmol) に、Ar雰囲気下、ジメチルホルムアミド (DMF) (140 mL) を加え、室温にて12時間攪拌した。反応溶液を0℃に冷却した後、グリコール酸 (72 mg, 0.95 mmol)、O-(ベンゾトリアゾルー1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩 (HATU) (357 mg, 0.94 mmol)、およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) (245 μL, 1.4 mmol) を加え、室温にて18時間反応させた (下記スキーム3)。

[0093] [化12]



[0094] ロータリーエバポレーターによりDMFを減圧溜去した後、LH20カラムにて精製を行い、270 nmにピークが検出されたフラクションを回収・

濃縮した。得られた濃縮溶液を0℃にてジエチルエーテル中に滴下し、再沈澱することにより、ポリ乳酸-ポリサルコシン両親媒性ブロックポリマー（ $\text{PSar}_{70}\text{-PLLA}_{30}$ ）1.7gを得た。

[0095] <ナノ粒子の作製>

ポリ乳酸-ポリサルコシン両親媒性ブロックポリマー（ $\text{PSar}_{70}\text{-PLLA}_{30} \cdot 26\text{H}_2\text{O}$ ， $M_w = 7767$ ）およびICG修飾ポリL-乳酸（ ICG-PLLA_{30} ， $M_w = 2998$ ）それぞれのクロロホルム溶液（0.2mM）を調製し、ICG修飾ポリL-乳酸のモル濃度が20mol%となるように、ガラス容器内で両溶液の混合液を調製した。混合液から溶媒を減圧留去し、ガラス容器の壁面に、混合ポリマーのフィルムを形成させた。ガラス容器内に水を加え、温度82℃で20分間湯せんした後、室温で30分間放置した。0.2mmのフィルターでろ過して浮遊異物を除去した後、凍結乾燥を行い、分子集合体（ICGラクトソーム）のナノ粒子を得た。ナノ粒子中のICG修飾ポリL-乳酸の含有量は、 $27\mu\text{mol/g}$ であった。Malvern社製 Zetasizer Nano Sを用い、動的光散乱（DLS）法により測定したナノ粒子の粒子径は、60nmであった。

[0096] 得られたナノ粒子の水分散液の吸収スペクトルを図2（A）に示す。また、インドシアニングリーン（濃度： $2\mu\text{M}$ ）の吸収スペクトルを図2（B）に示す。ICG単体の吸収スペクトルでは、吸収極大波長が779nmであるのに対して、ICGラクトソームの吸収極大波長は796nmであり、分子集合体の形成により、長波長側にシフトしていることが分かる。また、ICGラクトソームは、ICG単体に比べて吸収ピーク幅が小さくなっており、モル吸光係数が約10%増大していた。

[0097] 光音響信号は、吸光係数に比例する。そのため、本発明のナノ粒子を用いることにより、色素を単独で用いる場合に比べて、信号強度の高い光イメージングが可能であることが分かる。近赤外吸収ピークの極大および形状の変化の理由は明らかではないが、本発明のナノ粒子では、1つの分子集合体内に複数のICG基が近接してリジッドに固定されているために、ICG基同

士の分子間相互作用が生じ、共役 π 電子系が摂動を受けているものと考えられる。

[0098] [光音響イメージング]

図1は、本実施例で用いた光音響イメージング測定システムの構成概要図である。光音響用励起光源1として、30Hzの光パラメトリック発振器（パルス幅6ナノ秒）を用いた。励起光源は、ICGラクトソームの吸収ピークに対応する796nmに調整された。出力光パルスは、ビームスプリッタ5で4本のビームに分割され、それぞれのビームが、レンズ7を介して光ファイバ11に導かれる。各光ファイバからの照射パルス光のエネルギーは20 μ J未満に調整され、組織表面での強度は約13mJ/cm²であった。

[0099] 4本の光ファイバ11の先端は、光音響センサヘッド15に取り付けられている。光音響センサヘッド15のイメージングプローブは、斜めに配置された4本の励起用光ファイバ11、および音響レンズを備える音響波検出用の50MHz超音波センサを有する。このプローブは、深さ分解能が39 μ m、XY面分解能が56 μ mである。

[0100] 光音響センサヘッド15は、可動ステージ13に連結されており、コンピュータ50によりその位置が制御される。本実施例では、150 μ mステップで、4mm四方の領域を走査した。4本の励起用光ファイバ11の光パルスによって誘起された光音響波（超音波）は、電界効果トランジスタアンプ25で増幅される。光電管23は、光音響用励起光源1からのレーザ発振を検出し、これをトリガとして、アンプ25で増幅された音響波が、デジタルオシロスコープ21で検出・記録され平均化される。光音響波の時間波形は、組織内の音速（1540m/秒）に基づいて深さプロファイルに変換され、可視化ソフトウェア（Kitware VolView 3.4）により三次元光音響イメージに再構築される。

[0101] [マウスモデルへのICGラクトソームの投与]

ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞（FaDu）を培養して、雌のマウス（8週齢）の左大腿部に移植し（4 $\times$ 10⁶個/40 μ L）、腫瘍体積が100mm³

程度のものを用いた1.5 wt %のICGラクトソーム生理食塩水分散液を、この皮下腫瘍マウスモデルに、尾静脈注射により投与した（150 mg/kg体重）。投与前、投与30分後、および投与18時間後に行った光音響イメージング像を、図3（A）～（C）に示す。

[0102] [光線力学治療]

投与18時間後に、808 nmのファイバーカップリングCWレーザダイオードを用いて、光線力学治療（PDT）を実施した。腫瘍領域全体をカバーするように、スポットサイズ10 mm、パワー密度600 mW/cm²で10分間（360 J/cm²）レーザ照射を行った。PDT後に測定した光音響イメージング像を、図3（D）に示す。

[0103] [血管の光音響イメージング]

ICGラクトソームの投与前およびPDT後に、血管の光音響イメージング測定を行った。血管の光音響イメージングには、100 Hzの光パラメトリック発振器（パルス幅9ナノ秒）を用い、酸素化ヘモグロビン（HbO₂）と脱酸素化ヘモグロビン（HHb）の等吸収点である532 nmに励起波長を調整した。投与前およびPDT後の光音響イメージング像を、図3（E）、（F）に示す。

[0104] ICGラクトソーム投与前は、532 nmの励起光で血管の構造を示す光音響信号が確認されたが（図3（E））、796 nmの励起光での光音響信号は低かった（図3（A））。投与30分後に、796 nmの励起光での光音響信号の増大が確認された（図3（B））。これは、ICGラクトソームが、血管内を循環したことに起因すると考えられる。投与18時間後には、796 nmの励起光での光音響信号が顕著に増大しており（図3（C））、腫瘍内にICGラクトソームが効率的に蓄積したことを示している。

[0105] 光線力学治療（PDT）実施後は、796 nmの励起光での光音響信号が急速に減少しており（図3（D））、光線力学反応によるICGの光退色が生じたことを示している。また、PDT後は、532 nmの励起光での光音響信号もほとんどが消失し、残りの信号も振幅が約35%減少していた（図

3 (F))。これは、PDTにより、血管のシャットダウンが生じたことを示唆している。

[0106] 以上の結果は、本発明のナノ粒子が病変部位の血管内に特異的に集積し、PDTにより急速に濃度が減少することを、近赤外線を用いた光音響イメージングにより観測できたことを示している。これらの結果から、本発明のナノ粒子は、血管病変の診断に有用であることが分かる。

請求の範囲

[請求項1] 光音響イメージングのコントラスト剤として用いられる光音響イメージング用ナノ粒子であって、

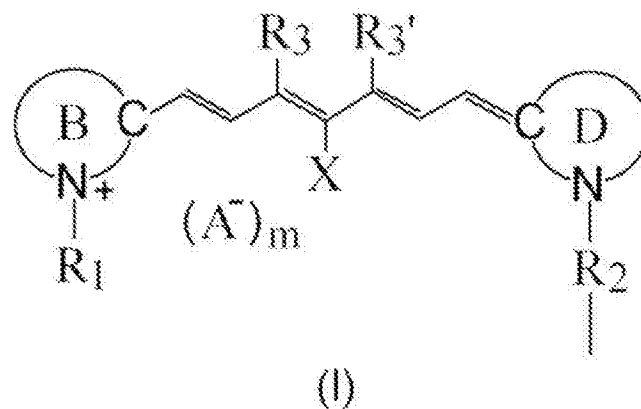
20個以上のサルコシン単位を有する親水性ブロック鎖と10個以上の乳酸単位を有する疎水性ブロック鎖を有する両親媒性ブロックポリマーを含む分子集合体からなり、

前記分子集合体中に、近赤外線吸収官能基を含む近赤外線吸収有機分子を $5 \mu\text{mol/g}$ 以上の濃度で含む、光音響イメージング用ナノ粒子。

[請求項2] 前記近赤外線吸収有機分子は、10個以上の乳酸単位を含むポリマー鎖に前記近赤外線吸収官能基が結合した疎水性ポリマーである、請求項1に記載の光音響イメージング用ナノ粒子。

[請求項3] 前記近赤外線吸収官能基が、下記式(1)で表される官能基である、請求項1または2に記載の光音響イメージング用ナノ粒子：

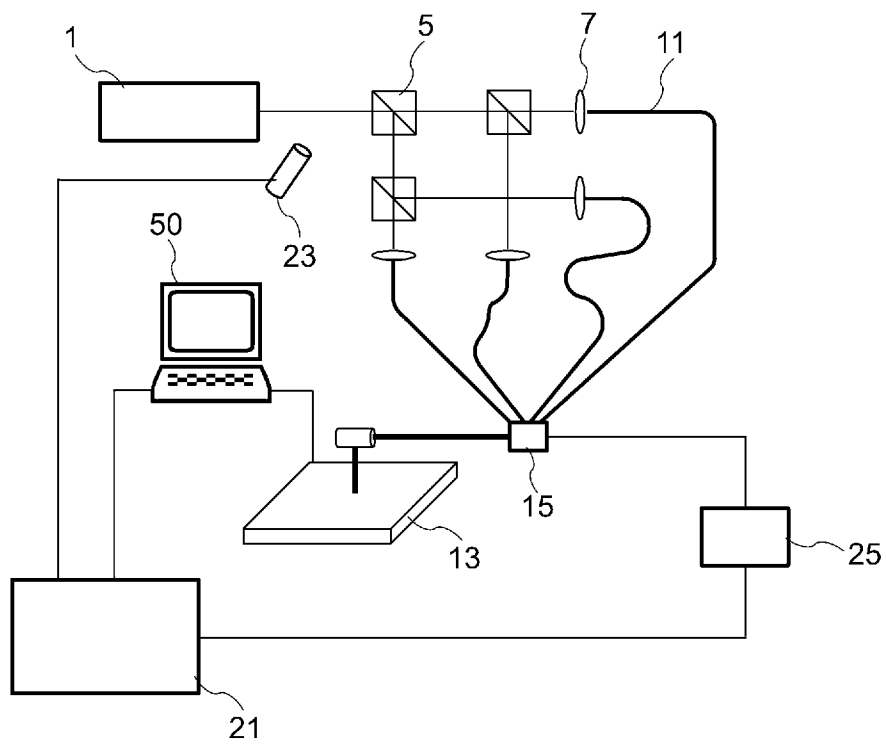
[化1]



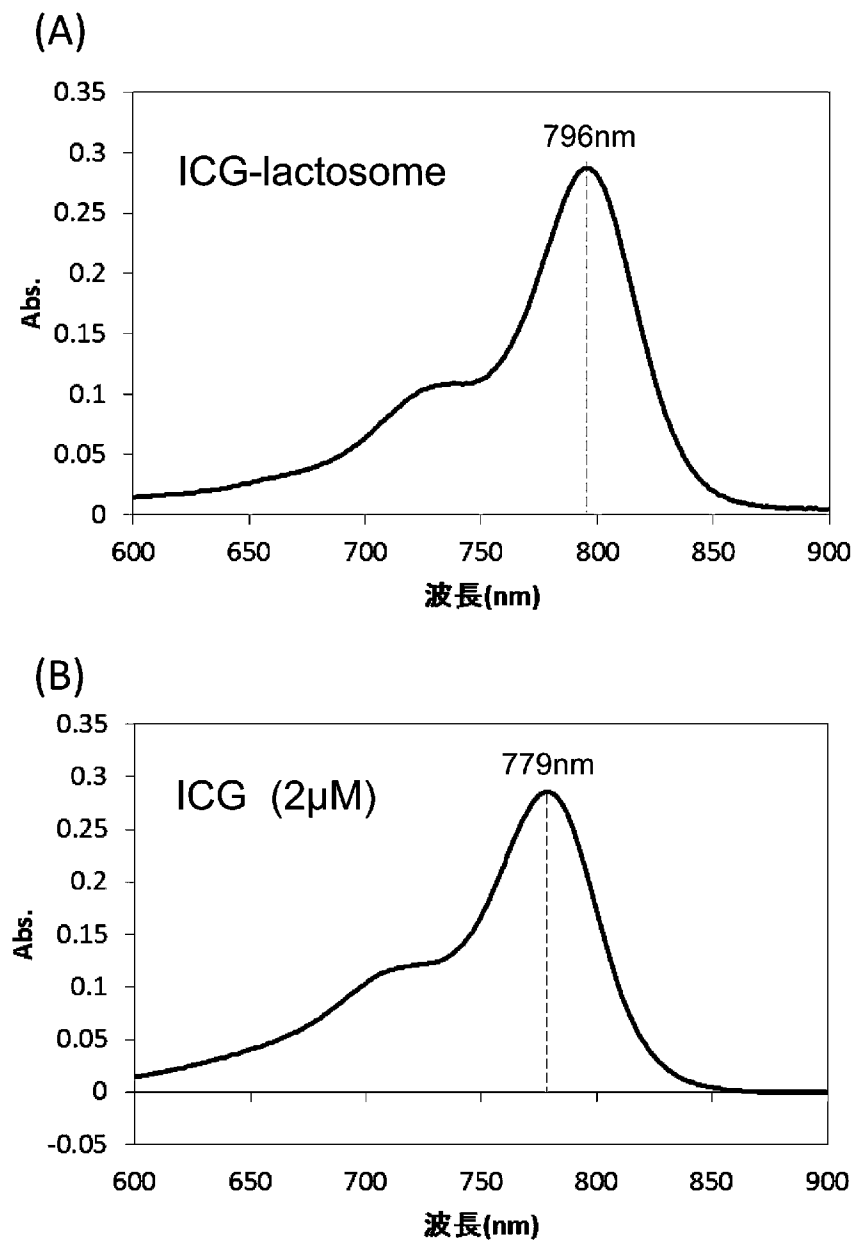
式中、 R_1 は、置換されていてもよいアルキル基であり； R_2 は、置換されていてもよいアルキレン基であり； R_3 および R_3' は、水素原子、または互いに連結して環状構造を形成する基であり； X は水素またはハロゲンであり；環Bおよび環Dは、それぞれ同一または異なってもよい含窒素縮合芳香族複素環であり； A^- は陰イオンであり、 m は0または1である。

- [請求項4] 前記近赤外線吸収官能基が、インドシアニングリーンに由来する基である、請求項1～3のいずれか1項に記載の光音響イメージング用ナノ粒子。
- [請求項5] 前記分子集合体の粒子径が、20～200nmである、請求項1～4のいずれか1項に記載の光音響イメージング用ナノ粒子。
- [請求項6] 血管病変の診断に用いられる、請求項1～5のいずれか1項に記載の光音響イメージング用ナノ粒子。
- [請求項7] 癌部位の検出に用いられる、請求項1～5のいずれか1項に記載の光音響イメージング用ナノ粒子。

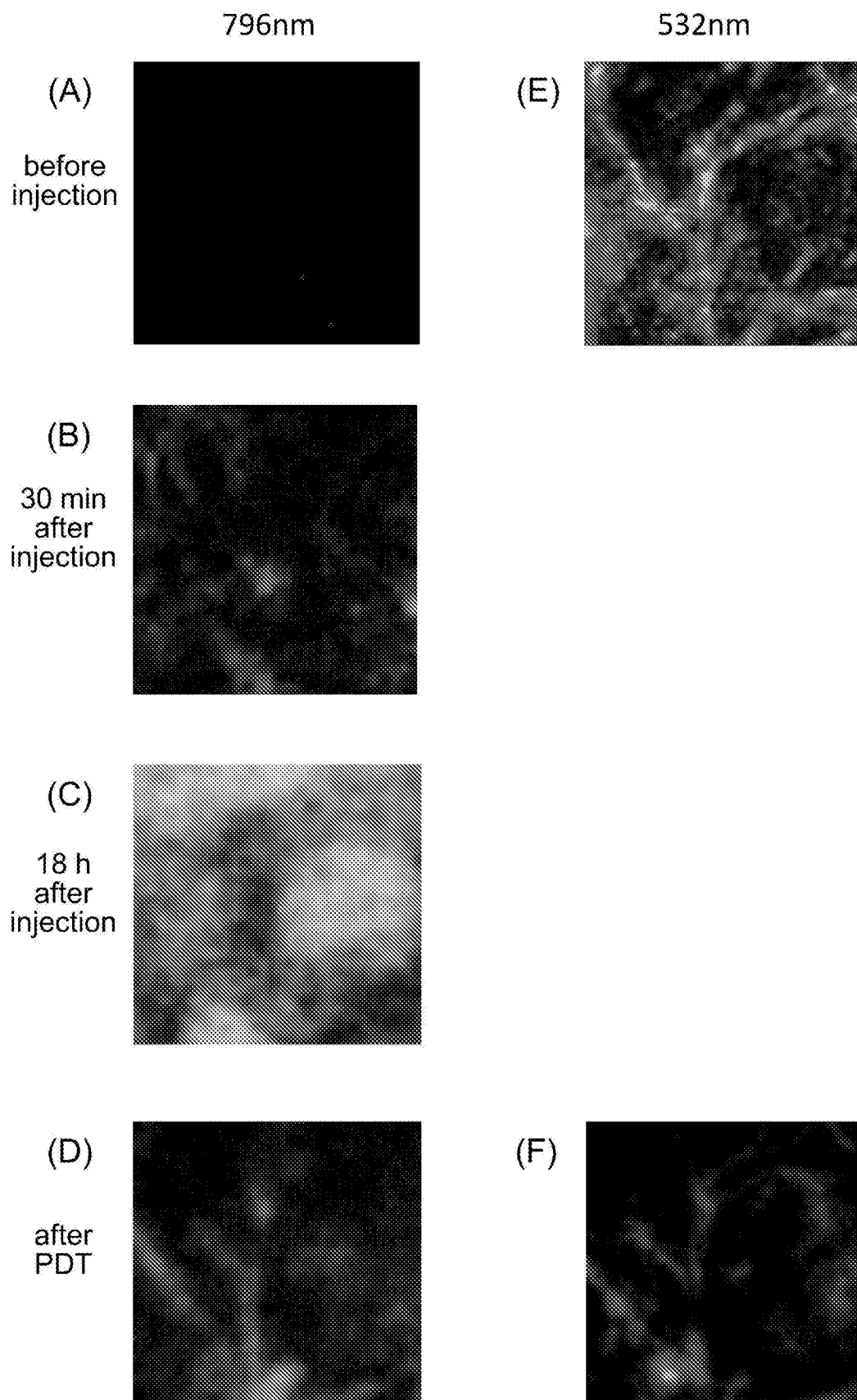
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/056754

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K49/00(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K49/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

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/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/148121 A1 (Shimadzu Corp.), 10 December 2009 (10.12.2009), claims 6, 22, 26 & JP 5531332 B & US 2011/0104056 A1 & EP 2305214 A1	1-7
Y	JP 2014-129318 A (Canon Inc.), 10 July 2014 (10.07.2014), claims 17, 30, 31 & US 2013/0323178 A1 & WO 2013/125237 A1	1-7
Y	JP 2014-227338 A (Canon Inc.), 08 December 2014 (08.12.2014), claims 15, 16; paragraph [0059] & US 2014/0341813 A1	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 May 2015 (25.05.15)

Date of mailing of the international search report
02 June 2015 (02.06.15)

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/056754

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012/128326 A1 (University of Tsukuba), 27 September 2012 (27.09.2012), claims 1 to 13; paragraph [0112] (Family: none)	1-7

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K49/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K49/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2009/148121 A1（株式会社島津製作所）2009.12.10, 請求項6, 22, 26 & JP 5531332 B & US 2011/0104056 A1 & EP 2305214 A1	1 - 7
Y	JP 2014-129318 A（キヤノン株式会社）2014.07.10, 請求項17, 30, 31 & US 2013/0323178 A1 & WO 2013/125237 A1	1 - 7
Y	JP 2014-227338 A（キヤノン株式会社）2014.12.08, 請求項15, 16、【0059】 & US 2014/0341813 A1	1 - 7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 5 . 0 5 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

0 2 . 0 6 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

深草 亜子

4 U

9 5 4 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

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	W0 2012/128326 A1 (国立大学法人筑波大学) 2012. 09. 27, 請求項 1 － 1 3、[0112] (ファミリーなし)	1 － 7