

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4180285号  
(P4180285)

(45) 発行日 平成20年11月12日(2008.11.12)

(24) 登録日 平成20年9月5日(2008.9.5)

(51) Int.Cl. F 1  
**A 6 1 N 1/30 (2006.01)** A 6 1 N 1/30

請求項の数 25 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2002-57679 (P2002-57679)	(73) 特許権者	500555789
(22) 出願日	平成14年3月4日(2002.3.4)		ジェネトロニクス、インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願平11-511309の分割		アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 - 1 3 3 4
原出願日	平成10年7月31日(1998.7.31)		カリフォルニア州、サン ディエゴ、ソレ
(65) 公開番号	特開2002-291910 (P2002-291910A)		ント ヴァレー ロード 1 1 1 9 9
(43) 公開日	平成14年10月8日(2002.10.8)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成17年7月29日(2005.7.29)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	08/905,240	(74) 代理人	100118773
(32) 優先日	平成9年8月1日(1997.8.1)		弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100080403
			弁理士 中村 至
		(72) 発明者	ホフマン、ガンター、エイ.
			アメリカ合衆国 9 2 1 0 9 カリフォル
			ニア州、サンディエゴ、リベラ ドライブ
			3 7 5 0

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬剤及び遺伝子の分配に供する電気穿孔法を使用した方法及び装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

異なる数の電極針を有する複数の電極アプリータを受容することが可能な電気穿孔治療装置のための電極針アドレススキームを自動的に設定するためのシステムであって、

a) 複数の電極針および型識別要素を有する電極アプリータであって、該型識別要素が少なくとも電極針の数を表すものと；

b) 電極アダプターが該電気穿孔治療装置に接続されたとき、該型識別要素から電極針の数を決定するため、該電気穿孔治療装置に設けられた回路と；

c) その決定した電極針の数をアドレスするよう該電気穿孔治療装置を設定するための回路と；

を具備してなるシステム。

【請求項 2】

異なる複数の電極アプリータを受容することが可能な電気穿孔治療装置のための電氣的治療パラメータを自動的に設定するためのシステムであって、

a) 針電圧設定値、パルス長またはパルス形状の、該電極アプリータで用いられる電氣的治療パラメータの少なくとも1つを表す型識別要素を有する電極アプリータと；

b) 電極アダプターが該電気穿孔治療装置に接続されたとき、該型識別要素から電氣的治療パラメータを決定するため、該電気穿孔治療装置に設けられた回路と；

c) その決定した電氣的治療パラメータに該電気穿孔治療装置を設定するための回路と；

；

を具備してなるシステム。

【請求項 3】

異なる数の電極針を有する複数の電極アプリケーションを受容することが可能な電気穿孔治療装置において電極針アドレススキームを自動的に設定するための電極アプリケーションであって、

a) 電気穿孔療法のため形成された複数の電極針と；

b) 該電気穿孔治療装置に電氣的に接続されるべく形成され、少なくとも電極針の数を表す型識別要素と；

を具備してなり、

電極アダプターが該電気穿孔治療装置に接続されたとき、該型識別要素が該電気穿孔治療装置に与えられ、決定した電極針の数をアドレスするよう該電気穿孔治療装置を自動的に設定可能にしたことを特徴とする電極アプリケーション。

10

【請求項 4】

異なる複数の電極アプリケーションを受容することが可能な電気穿孔治療装置のための電氣的治療パラメータを自動的に設定するための電極アプリケーションであって、

a) 電気穿孔療法のための複数の電極針と；

b) 該電気穿孔治療装置に電氣的に接続されるべく形成され、針電圧設定値、パルス長またはパルス形状の、該電極アプリケーションで用いられる電氣的治療パラメータの少なくとも 1 つを表す型識別要素と；

を具備してなり、

電極アダプターが該電気穿孔治療装置に接続されたとき、該型識別要素が該電気穿孔治療装置に与えられ、決定した電氣的治療パラメータをアドレスするよう該電気穿孔治療装置を自動的に設定可能にしたことを特徴とする電極アプリケーション。

20

【請求項 5】

a) 電圧パルスの発生源と；

b) 異なる数の電極針を有する複数の電極アプリケーションの 1 つのためのコネクターであって、各電極アプリケーションが少なくとも上記電極針の数を表す型識別要素を含むものと；

c) 電極アダプターが該コネクターに接続されたとき、該型識別要素から電極針の数を決定するための回路と；

d) その決定した電極針の数をアドレスするよう該電気穿孔治療装置を設定し、発生した電圧パルスをアドレスされた電極針へ供給するための回路と；

を具備してなる電気穿孔治療装置。

30

【請求項 6】

電圧パルスの発生を制御するための遠隔治療活性化装置をさらに具備してなる請求の範囲 5 の電気穿孔治療装置。

【請求項 7】

該遠隔治療活性化装置が足踏みスイッチからなる請求の範囲 6 の電気穿孔治療装置。

【請求項 8】

a) 針電圧設定値、パルス長またはパルス形状の少なくとも 1 つからなるプログラム可能な電氣的治療パラメータを有する電圧パルスの発生源と；

b) 電極針を有する複数の電極アプリケーションの 1 つのためのコネクターであって、各電極アプリケーションが選択された電氣的治療パラメータを必要とし、さらに各電極アプリケーションがそこで用いられる特定の電氣的治療パラメータを表す型識別要素を含むものと；

c) 電極アダプターが該コネクターに接続されたとき、該型識別要素から特定の電氣的治療パラメータを決定するための回路と；

d) 電気穿孔治療装置のための電氣的治療パラメータを、上記の決定した特定の電氣的治療パラメータへプログラムするための回路と；

を具備してなる電気穿孔治療装置。

40

【請求項 9】

電圧パルスの発生を制御するための遠隔治療活性化装置をさらに具備してなる請求の範

50

図 8 の電気穿孔治療装置。

【請求項 10】

該遠隔治療活性化装置が足踏みスイッチからなる請求の範囲 9 の電気穿孔治療装置。

【請求項 11】

異なる複数の電極アプリケーションを受容することが可能な電気穿孔治療装置のための針アレイ型パラメータを自動的に設定するための電極アプリケーションであって、

- a) 電気穿孔療法のための複数の電極針と；
- b) 該電気穿孔治療装置に電氣的に接続されるべく形成され、針数、針間隔または針スイッチング・シーケンスの、該針アレイ型パラメータの少なくとも 1 つを表す型識別要素と；

を具備してなり、

電極アダプターが該電気穿孔治療装置に接続されたとき、該型識別要素が該電気穿孔治療装置に与えられ、決定した針アレイ型パラメータに対し該電気穿孔治療装置が自動的に応答可能にされたことを特徴とする電極アプリケーション。

【請求項 12】

異なる複数の電極アプリケーションを受容することが可能な電気穿孔治療装置のためのアプリケーション用の特定のパラメータを提供するための電極アプリケーションであって、

- a) 電気穿孔療法のための複数の電極針と；
- b) 該電気穿孔治療装置に電氣的に接続されるべく形成され、少なくとも 1 つのアプリケーション用の特定のパラメータの識別を与える型識別要素と；

を具備してなり、

電極アダプターが該電気穿孔治療装置に接続されたとき、該型識別要素が該電気穿孔治療装置に与えられ、決定したアプリケーション用の特定のパラメータに対し該電気穿孔治療装置が応答可能にされたことを特徴とする電極アプリケーション。

【請求項 13】

該少なくとも 1 つのアプリケーション用の特定のパラメータが電極アプリケーション内の針の数である請求の範囲 12 の電極アプリケーション。

【請求項 14】

該少なくとも 1 つのアプリケーション用の特定のパラメータが電極アプリケーション内の針の間隔である請求の範囲 12 の電極アプリケーション。

【請求項 15】

該少なくとも 1 つのアプリケーション用の特定のパラメータが電極アプリケーションのための針のスイッチング・シーケンスである請求の範囲 12 の電極アプリケーション。

【請求項 16】

該少なくとも 1 つのアプリケーション用の特定のパラメータが電極アプリケーションの針に印加されるべき電圧設定値である請求の範囲 12 の電極アプリケーション。

【請求項 17】

該少なくとも 1 つのアプリケーション用の特定のパラメータが電極アプリケーションの針に印加されるべきパルス長である請求の範囲 12 の電極アプリケーション。

【請求項 18】

該少なくとも 1 つのアプリケーション用の特定のパラメータが電極アプリケーションの針に印加されるべきパルス形状である請求の範囲 12 の電極アプリケーション。

【請求項 19】

該少なくとも 1 つのアプリケーション用の特定のパラメータが電極アプリケーションの貯蔵寿命である請求の範囲 12 の電極アプリケーション。

【請求項 20】

該少なくとも 1 つのアプリケーション用の特定のパラメータが電極アプリケーションの使用限界である請求の範囲 12 の電極アプリケーション。

【請求項 21】

電極アプリケーションに固有のデータを記憶できる書き込み可能な能動回路を更に含む請求

10

20

30

40

50

の範囲 1 2 の電極アプリケーション。

【請求項 2 2】

該少なくとも 1 つのアプリケーション用の特定のパラメータが電極アプリケーションの貯蔵寿命であり、貯蔵寿命を超えたときのための貯蔵寿命ロックアウト・コードが書き込み可能な能動回路に記憶されている請求の範囲 1 2 の電極アプリケーション。

【請求項 2 3】

該少なくとも 1 つのアプリケーション用の特定のパラメータが電極アプリケーションの使用限界であり、使用限界を超えたときのための使用限界ロックアウト・コードが書き込み可能な能動回路に記憶されている請求の範囲 2 2 の電極アプリケーション。

【請求項 2 4】

該電極アプリケーションのための使用履歴が書き込み可能な能動回路に記憶されている請求の範囲 2 2 の電極アプリケーション。

【請求項 2 5】

捕捉エラー・コードが書き込み可能な能動回路に記憶されている請求の範囲 2 2 の電極アプリケーション。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

発明の背景

本発明は、一般的には、細胞の透過性を増加させるための電気パルスの使用に関し、特に、電気穿孔療法（EPT）、また既知の細胞穿孔療法（CPT）及び電気化学療法（ECT）によって、生体内で、薬剤及び遺伝子の分配のための制御された電界を印加するための方法及び装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

1970年代に、細胞に致命的な損傷を与えることなしに孔を穿設できることが発見された。この発見によって、細胞の細胞質に高分子を注入することが可能となった。遺伝子や、薬理学的化合物等の分子は、電気穿孔法というプロセスを介して、生きている細胞に組み入れることが可能であることが知られている。遺伝子その他の分子は、緩衝媒体内の生きている細胞に混合され、高電界において短パルスが加えられる。この細胞膜は一時的に多孔性となり、遺伝子または分子が細胞の中に入り、これらは細胞のゲノムを改変する。

【0003】

電気穿孔法の適用は、生体内で、一般的に、電極が配置される組織の皮膚に近接する組織または細胞に限定される。従って、別の方法として、体系的な薬物の投与や化学療法によって対処できる、例えば、腫瘍等については、一般的に、電気穿孔のために使用される電極を適用することができない。ある種のガンを化学療法で治療する際には、受け入れがたい程多くの通常細胞を壊死させることなく、ガン細胞を殺すための多量の薬物を使用する必要がある。もし、ガン細胞の内部に直接化学薬物を注入できれば、この目的は達成される。ある種の抗ガン剤、例えば、ブレオマイシンは、通常、効果的にある種のガン細胞の細胞膜を貫通することができない。しかし、電気穿孔法によって、ブレオマイシンを細胞の中に注入することが可能となる。

【0004】

治療は、典型的には、抗ガン剤を直接腫瘍に注入し、一对の電極間の腫瘍に電界を形成することによって行われる。電界強さは、いかなる通常の細胞、すなわちすべての健全な細胞を損傷させることなく、または最小限の損傷に留めるように腫瘍の細胞に電気穿孔が行われるように、適切かつ精密に調整しなければならない。これは、電界が電極間に形成されるように、外部腫瘍に対してその対向する電極の位置とすることによって通常容易に行うことができる。電界が均一の場合には、電極間の距離を計測することができ、式  $E = V / d$  に応じた適当な電圧を電極に加えることができる（ $E$  は電界強度で単位は  $V / cm$ 、 $V$  は電圧で単位はボルト、そして、 $d$  は距離であって単位は  $cm$  である）。大きな、す

10

20

30

40

50

なわち内部の腫瘍を治療する場合には、適当に電極を配置し、これらの間の距離を計測するのは容易ではない。上記本出願の親出願は、生体内で、腫瘍に挿入できる電極を用いた電極システムを開示している。関連する米国特許第5,273,525号において、電極としても機能する注入針として利用できる、電気穿孔のために分子及び高分子を注入する注射器が開示されている。この構成によって、電極を表面下に位置させることが可能となる。

#### 【0005】

細胞穿孔療法を使用した目的物の治療によって、典型的には制ガン剤または細胞毒性剤の適用に関連する有害な影響を回避する手段を提供することができる。そのような治療によって、周囲の健全な細胞または組織への影響を回避しながら、選択的に、好ましくない細胞を損傷させ、または殺傷することができる薬剤を提供することができる。

10

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

予め選択された組織に所定の電界を形成するため、便利かつ効果的に位置決めすることができる改良装置を提供することが第1の目的である。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明の第1の特徴に対応して、患者の身体の一部に電気穿孔を提供するための本発明にかかる電極装置は、支持部材と、組織に挿入するため、前記支持部材に、互いに選択された位置及間隔で搭載された複数の針電極と、所定の強度の電界を形成するため、前記両電極の間の距離に比例した電極への電気信号を提供するための前記距離信号に応答する信号発生器を含む手段とで構成される。

20

本発明は、治療物質を組織に注入するように機能するとともに、前記組織の細胞の部分に電界を形成する電極としても機能する針を含む。

#### 【0008】

本発明の一実施例には、治療電圧パルスを接点及び選択的な配列の変更パターンを決定する、抵抗や能動回路等の「キー」素子を有する針アレイ電極を含む臨床電気穿孔療法のためのシステムが含まれる（このシステムを有する装置はメドパルサ（MedPulser、登録商標）と呼ばれる）。電極配置を種々変更することによって、種々の組織サイトへのアクセス及び処置を行うことが可能となる。

30

本発明のもう一つの実施例では、最小限の侵襲を伴う電気穿孔治療法のため、内視鏡とともに用いられる腹腔鏡用針アプリケーションが提供される。

本発明は、細胞、特に腫瘍細胞の治療のための針アレイ装置を利用した治療法を提供するものである。

#### 【0009】

##### 【発明の実施の形態】

##### 概観

本発明は、電気穿孔法の治療への応用のための装置及び方法を提供するものである。この方法には、化学治療剤または分子の注入及びこれらの腫瘍への電気穿孔法が含まれる。特に、ある種の薬剤または分子が組織に注入され、電圧パルスが組織に配置された「針状」電極に付加される。すなわち、電界が組織の細胞に形成されるのである。後述するこの針状電極組立体は、試験管内または生体内で、腫瘍その他の組織の表面下に、またはその近傍に電極を位置決めすることができる。そのような治療方法は、電気穿孔治療法（EPT）と呼ばれる。また、電気化学的治療法と呼ばれることもある。以下ではEPTに焦点を当てているけれども、本発明は、生体のある種の臓器の遺伝子治療等の他の治療法にも適用することができる。

40

#### 【0010】

EPTの一般的な説明については、本出願の同時係属出願である、1995年9月29日出願の出願番号08/537,265号を参照されたい。この出願は、1995年6月6日出願の出願番号08/467,566号の一部係属出願であって、この出願は、現在は

50

放棄されたが、1993年4月1日出願の出願番号08/042,039号の一部係属出願である。これらのすべては、本明細書に参考文献として記載されている。

#### 【0011】

##### 電極組立体

図1は、本発明の一実施例にかかる針組立体100を示す断面図である。この針組立体100は、中空ステンレス鋼またはナイロン等の医療用プラスチック等で形成された細長い管状支持体すなわちシャフト112を備える。このシャフトが導電体で形成されている場合には、患者と内科医を保護するため、外側部分を電氣的に絶縁する必要がある。シャフト112は、その末端部に複数の電極針114を含み、この電極針114はマルチ導電ワイヤケーブル116の各々の導体と結合する。この電極針114は、鋭利または鈍く形成され、中空または中実に所望の長さ形成される。電極針114の材質は、電氣的に導体でなければならないが、金属で均一に形成する必要はない(例えば、金属被覆プラスチックまたはセラミック針のような合成物または層構造を使用することができる)。治療物質を注入するため、少なくとも1本の中空電極針114を使用することができる。別の実施例では、電極針114は、矩形状、六角形状、または円形配置としている。しかし、他のパターンも適用することができる。

10

#### 【0012】

使用にあたって、マルチ導電ワイヤケーブル116は、高電圧発生装置に接続される。図示した実施例では、末端部近傍の摩擦リング120によって規制される伸縮自在シールド118が、電極針114を保護するとともに、露出させるため、シャフト112の本体に沿って前後に移動することができる。

20

#### 【0013】

図2a乃至図2eは、本発明にかかるいくつかの電極例を図式的に示すものである。図2a及び図2bは、直線的な本体を有する電極であって、異なる間隔で針200が備えられる。例えば、図2aの針は、直径0.5cmのアレイを構成するが、図2bのものは直径1.4cmのアレイを構成する。また、種々の本体寸法を採用することができる。例えば、図2aの電極は、その本体に段付部が形成され、大径の後方部204に対して前方部202は小径に形成されている。図2bの電極は、本体206の径が均一に形成される。図2a及び図2bに示す電極は、特に表面の狭い腫瘍の治療に適する。

30

#### 【0014】

図2c及び図2dは、電極の本体206に対して傾斜した針先端部200を備えるものである。図2cは、針先端部が本体206に対して約45°傾斜したものを示している。図2dは、針先端部が本体206に対して約90°傾斜したものを示している。図2c及び図2dに示す電極は、特に頭部及び頸部の腫瘍の治療に適する。

#### 【0015】

図2eは、本体の小径前方部202に対して傾斜した針先端部200を備える、2重傾斜電極を示す。大径後方部204も傾斜している。図2eの電極は、特に喉頭の腫瘍を治療するのに適するが、身体他の空隙部についても使用することができる。

#### 【0016】

図2fは、特に大きな腫瘍に適する電極を示す。針208の間隔は、例えば、0.65cmである。図2gは、特に、内部腫瘍の治療に適する電極を示す。針の間隔208は、例えば、1.0cmである。

40

#### 【0017】

図2a乃至図2gにおけるいかなる別部材の配置要素(例えば、本体寸法、本体配置、頭部及び本体の角度等)についても好みに応じて組み合わせることができる。特別な寸法に合わせるとともに、針にアクセスするため、針組立体の他の配置を採用することも可能である。

#### 【0018】

##### EPT装置

図3は、本発明の一実施例にかかるEPT治療装置300を示す図である。電極アプリケ

50

ータ 312 が、着脱可能に装置 300 に接続され、電極アプリアータ 312 の選択された電極針 314 に選択的に電圧パルスを加える。装置 300 によって出力される、パルス長さ、電圧レベル、及び電極針のアドレスまたは切り換えパターンのすべてについてプログラム化することができる。

#### 【0019】

表示装置 316 は、治療電圧設定ポイントを表示する。電極アプリアータ 312 にパルスを与えるための足踏みスイッチ 320 を使用可能とするため、遠隔治療能動結合部 318 が備えられる。この足踏みスイッチ 320 によって、内科医が、患者の組織内の電極アプリアータ 312 を位置決めするために両手を自由にしたまま装置 300 を動作させることができる。

10

#### 【0020】

故障検出、電源入り、及び治療動作の完了を示すための指示ライト 322 が便宜のために備えられる。他の指示ライト 324 が、電極アプリアータ 312 が装置 300 に接続されていることを積極的に示すため、及び針アレイの型を示すため（以下の説明を参照されたい）設けられる。装置を「休止」させるとともに、すべての装置の機能をリセットしてデフォルト状態に戻すため、スタンバイ/リセットボタン 326 が備えられる。治療を行うにあたって装置を準備するため、準備ボタン 328 が備えられる。「治療中」であることを際だって指示するための指示ライト 330 が、電極針 314 に電圧パルスが付加されていることを示す。さらに、装置 300 は、ボタン押下、治療の開始または終了、治療中であることを示すための音声指示器を備えることも可能である。

20

#### 【0021】

他の実施例では、装置 300 は、心臓の鼓動を検出するフィードバックセンサに接続される。心臓の近くにパルスを印加すると、通常的心臓のリズムと干渉するおそれがある。パルスを鼓動の間の安全な期間に同期させることによって、そのような干渉の可能性を低減することができる。

#### 【0022】

図 4 は、図 3 の治療装置 300 に使用される回路 400 のブロック図である。交流電源入力モジュール 402 が、電気的に分離された電力を治療装置 300 の全体に供給する。低圧直流電源 404 が、適当な電力を装置 300 の制御回路に提供する。高圧電源 406 が、EPT 治療に必要な（例えば、数千ボルトまでの）適当な高電圧を提供する。高圧電源 406 の出力は、制御組立体 410 の制御のもとで種々の幅及び電圧のパルスを発生させるパルス電源組立体 408 に接続される。パルス電源組立体 408 は、高電圧スイッチアレイ 412 を介して針アレイコネクタ 414 に接続される。遠隔治療動作足踏みコネクタ 416 によって、足踏みスイッチ 320 の取り付けが可能となる。

30

#### 【0023】

高電圧スイッチアレイ 412 によって、EPT に必要な高電圧が針組立体 100 の電極の選択されたサブグループに付加される、EPT 治療用装置の以前の型のものでは、そのような電圧の付加は典型的には、手動の回転式「分配器」スイッチに含まれていたが、または、そのようなスイッチの駆動部に含まれていた。しかし、本発明では、すべてのスイッチは、電子的制御リレーによるものであって、種々のスイッチパターンにわたって、より高速で静かな切換を行うことができ、寿命が長く、より良く、より柔軟な制御を提供することができる。

40

#### 【0024】

図 5 は、図 4 に示す回路の高電圧スイッチアレイ 412 の 1 つの選択スイッチエレメント 500 の図を示す。多くのそのような選択スイッチエレメント 500 が、少なくとも取り付けられている針組立体 100 の最も多い電極の数に見合うように備えられなければならない。各選択スイッチエレメント 500 が、針組立体 100 に供給される高電圧を制御するために備えられ、関係する電極の各極に電圧を提供する能力を有する。

#### 【0025】

特に、逆入力アンプ 502 a に「負」の制御電圧が付加されると、関係する通常開アレイ

50

504aが閉じ、電極コネクタ506を介して結合する1対の電極にパルスを与えるための負の戻り通路が確立される。同様に、第2の逆入力アンプ502bに「正」の制御電圧が付加されると、関係する通常開アレイ504bが閉じ、電極コネクタ506を介して結合する1対の電極にパルスを与えるための正の戻り通路が確立される。

【0026】

#### 針アレイのアドレス

図3の装置300は、可変数の電極針314を有する電極アプリケーション312を収容するように設計される。従って、好適例においては、AからPまでに指定され、9つまでの矩形治療領域及びいくつかの種類の拡大された治療領域を形成する、16種類までの異なる針をアドレスできるように開発がなされた。治療領域は、特別なパルスの間アドレスされる対向する対配置で構成される、少なくとも4本の針で構成される。特別なパルスの間、治療領域の2本の針は正極であって、他の2本は負極となる。

10

【0027】

図6は、9つの矩形治療領域を形成する針のため、中心から時計回りに番号を付けられた好適な4×4マッピングアレイを示す図である。この好適例において、このマッピングアレイは、4本、6本、8本、9本及び16本の針電極の配置を定義する。4針電極は、位置F、G、K及びJ（治療領域1）で構成される。9針電極は、治療領域1～4で定義される位置に位置決めされる。16針電極は、治療領域1から9で定義される位置に位置決めされる。

【0028】

20

図7aは、本発明の一実施例にかかる2×2治療領域のパルスシーケンスを示す。いかなる4つのパルスも、図示されるように、円形の対向する針に各々正または負の電荷が与えられる。時計回り、反時計回りに進めることにより、そのような対の他のパターンもまた可能である。9針電極配置の場合には、好適な円形が16パルスで構成される（4つのパルスの各々に4つの治療領域が存在する）。16針電極配置の場合には、好適な円形は36パルスで構成される（4つのパルスの各々に9つの治療領域が存在する）。

【0029】

6針電極は、図7b乃至図7dに示される円形または六角形配置で構成することができる。または、6針電極は、図6に示すような大規模配列のサブセットとして定義することができる。例えば、図6を参照すると、6針電極は、治療領域1～2（または他の直線的な治療領域対）として定義される位置に配置された針の2×3の矩形配置として定義することができるか、（図6において点線で描かれている）拡大治療領域を定義する針B、G、K、N、I、E（または六角形を形成する位置にある他のすべての組）の六角形配置として定義することができる。同様に、8針電極は、八角形、または図6に描かれた大規模配置のサブセットを構成することができる。例えば、図6を参照すると、8針電極は、治療領域1、2または6（または治療領域の直線上のすべての3点）を定義する位置に配置された針の2×4配置、または拡大された治療領域を定義する針B、C、H、L、O、N、I、E（または八角形を定義する位置の他のすべての組）の八角形配置として定義される。

30

【0030】

40

図6b乃至図6dは、六角形配置及び可能な動作シーケンスの一例を示す。図6bは、第1シーケンスを示し、第1パルスにおいて、針G及びKは正であって、針I及びEは負であって、次のパルスで逆の極性となり、針B及びNは、点線の外隔線で示されるように能動的でない。図6cは、第2シーケンスを示し、第1パルスにおいて、針K及びNは正であって、針E及びBは負であり、次にパルスにおいて逆の極性となり、針G及びIは能動的でない。図6deは、第3シーケンスを示し、第1パルスにおいて、針N及びIは正であって、針B及びGは負であって、次のパルスで逆の極性となり、針K及びEはに能動的でない。シーケンスの1周期において全部で6パルスが印加される。同様の動作シーケンスを八角形配置にも使用することができる。

【0031】

50

物理的配置にかかわらず、本発明の好適例は、EPTを行っている間組織に比較的均一な電界を形成するため、常に、(例えば、図7aに示すように)少なくとも2つの変更可成な電極対を使用する。電界強さは、電気穿孔法による工程を効果的なものとするため、治療薬の注入を可能とするに十分な強度とすることが必要である。

【0032】

#### 電極アプリケーションの自動確認

上記マッピング技法によって、同じ装置300に連結される、異なる電極アプリケーション312を連結することが可能となる。電極針314の数は可変であるため、本発明には、適当な数の電極針314をアドレスするため、自動的に装置300を配置する手段が含まれる。一実施例においては、各電極アプリケーション312には、「キー」抵抗のように、装置300が電極針314の数を決定することができ、適合するアドレススキームを設定するようにする埋め込み式の確認エレメントが含まれる。電極アプリケーション312が装置300に連結されたときに、装置300は型確認エレメントを読む。この型確認エレメントを、電極アプリケーション312のコネクタに組み入れることも可能であり、割り当てられたまたは専用の電気結合を介してアクセスすることができる。

図示例として、次の表には、電極針314の番号と抵抗値が示されている。

針アレイ型ID抵抗 (オーム)	針アドレススキーム
787	6
453	6
232	6
4.32K	9
2.21K	16
1.29K	16

装置300の治療電圧を自動的に設定するため、同様の技術を使用することができる。すなわち、各電極アプリケーション312は、特定の電極アプリケーション312のための治療パルスの適当な電圧レベルを決定するため、「キー」抵抗等の埋め込み式の電圧確認エレメントを含む。電極アプリケーション312が装置300に連結されたときに、装置300は、電圧確認エレメントを読む。

図示例として、次の表には、設定電圧に対する抵抗値が示されている。

針アレイ型ID抵抗 (オーム)	設定電圧
787	560
453	1130
232	1500
4.32K	845
2.21K	845
1.29K	1300

型及び電圧の確認に、同一または異なる確認エレメントを使用することもできる。確認エレメントの性質を変更することもできる。例えば、種々の変数として記憶させたデジタル値またはアナログ値を伴う電子回路を各電極アプリケーション312に組み入れることも可能である。電極アプリケーション312にコード化される情報の例としては、針の数、針の間隔、針アレイの幾何学的配置及び/または針の変換シーケンス等の針アレイ型を示すパラメータ、電圧設定値、パルス長さ及び/またはパルス形状等の電気パルスパラメータ、貯蔵

寿命、使用期限等がある。電極アプリーケータ 3 1 2 がデータを記憶することのできる書き込み可能な能動回路（例えば N V R A M）を使用する場合には、電極アプリーケータ 3 1 2 にコード化される他の情報として、貯蔵寿命による廃棄（すなわち、その貯蔵寿命が終わった場合には電極アプリーケータ 3 1 2 の使用を不可とするコード）、使用回数及び廃棄（すなわち、電極アプリーケータ 3 1 2 が使い捨てとして設計されている場合に、使用回数が許容限度を超えると電極アプリーケータ 3 1 2 の使用を不可とするコードであって、この特徴によって再使用による汚染を回避することができる）、使用履歴（例えば、印加されたパルスの回数、印加した日及び時間等を記憶したログ）、及び例えば、電極アプリーケータ 3 1 2 が製造業者に戻し、そのアプリーケータまたは装置 3 0 0 の故障モードを解析することができるようにする）エラーコードの捕捉等がある。

10

## 【 0 0 3 3 】

廃棄は、アプリーケータの使用開始からの時間及び単一の装置での治療実施回数によって決定される。これは、使い捨てアプリーケータの「キー」エレメント能動回路に、装置への最初の結合に関する時刻スタンプを押印し、その期限を越えて使用しないようにすることで達成される。廃棄を決定する期間は、1 回の手術手順の最大実施時間に基づいて決定されるべきである。

## 【 0 0 3 4 】

さらに、「キー」エレメントの使用法には、製造及び品質管理情報を含めることができる。そのような情報の一例としてロットコードがある。また、それによって、試験していない材料を使用しないこと、例えば、製造検査に合格した後にのみ装置を使用することを義務づけることによって、装置の品質管理を援助することができる。

20

## 【 0 0 3 5 】

腹腔鏡用針アプリーケータ

内部腫瘍の治療に特に有用な本発明の一実施例として、侵襲を最小限に押さえるため、E P T 腹腔鏡用針アレイと内視鏡検査システムを組み合わせたものがある。図 8 は、従来の内視鏡検査システム 8 0 0 を示す図である。光源 8 4 0 からの光が、公知の要領で光ファイバ伝送路 8 4 2 を介して内視鏡 8 4 4 に伝達される。組織は内視鏡 8 4 4 の末端部から放射される光によって照明される。反射光内視鏡 8 4 4 の末端部で集光され、光カプラ 8 5 0 を介して、アイピース 8 4 6 またはビデオカメラ 8 4 8 に伝達される。ビデオカメラ 8 4 8 からの信号がビデオカセットレコーダ 8 5 2 に記録されるか、ビデオモニター 8 5 4

30

## 【 0 0 3 6 】

図 9 a 及び図 9 b は、図 8 の内視鏡 8 4 4 の末端部を改良したものの部分透視側面図であって、本発明にかかる伸縮針アレイ 9 6 0 の詳細を示すものである。可動シース 9 6 2 が内視鏡 9 4 4 及び針アレイ 9 6 0 を覆っている。図 9 a は、延伸位置にあるシース 2 6 2 を示し、この位置で内視鏡 9 4 4 及び針アレイ 9 6 0 を完全に覆っている。図 9 b は、収縮位置にあるシース 9 6 2 を示し、内視鏡 9 4 4 及び針アレイ 9 6 0 を露出させている。（好適例では、可動シース 9 6 2 を使用しているが、シース 9 6 2 と内視鏡 9 4 4 との間での相対運動が可能であれば足り、内視鏡 9 4 4 を可動エレメントとすることも可能である。）

40

好適例では、針アレイ 9 6 0 は、少なくとも 2 本の電極針 9 6 4 を含み、各々は電源（図示しない）に結合され、少なくとも 1 本は中空であって、管 9 6 6 を介して薬剤供給装置（図示しない）に結合される。電極針 9 6 4 の先端は、好適には、内視鏡 9 4 4 の末端部を越えて延設されるように位置し、これによって、電極針 9 6 4 が組織に注入される間、組織サイトを内視鏡 9 4 4 によって観察することができる。

## 【 0 0 3 7 】

各電極針 9 6 4 は、圧縮メカニズム 9 6 8 に連結される。図示の例では、圧縮メカニズム 9 6 8 は、各電極針 9 6 4 のために、内視鏡 9 4 4 及び第 1 延長アーム 9 7 4 に沿って自由に移動することのできる回転可能なスライドベース 9 7 2 に連結される支持アーム 9 7 0 を有する。各第 1 延長アーム 9 7 4 は、回転可能に、内視鏡 9 4 4 に取り付けられた固

50

定ベース 976、及び対応する電極針 964 に連結される。第 2 延長アーム 977 は、( 支持アーム 970 を有しないが ) 第 1 延長アーム 974 と同様に構成され、後述のように、配置されたときに電極針 964 の安定を増すために提供される。

【 0038 】

シース 962 が延伸位置にあると、電極針 964 は互いに近接する位置にある。使用方法によって、この近接の程度は、特定の電圧にとって好ましいものであるが、他の場合には電極針 964 より離間されていることが必要である。

【 0039 】

従って、好適例では、シース 962 が収縮位置に移動すると、圧縮エレメント 978 ( 例えば、ばね ) が各スライドベース 972 を固定ベース 976 から離れる方向に付勢し、各支持アーム 970 が結合された第 1 延長アーム 974 を引っ張って展開させる。この収縮力によって、延長アーム 974、977 が内視鏡 944 から離れて展開位置に向かうように回転し、これによって、図 9 b に示すように電極針 964 間の間隔を増加させる。

【 0040 】

シース 962 が延伸位置に移動すると、シース 962 は電極針 964 とともに押圧し、延長アーム 974、977 を折り畳む。これによって、第 1 延長アーム 974 が、各支持アーム 970 が結合された第 1 延長アーム 974 を引っ張って展開させる。各支持アーム 970 の収縮力によって、各スライドベース 972 が固定ベース 976 に向かって移動して被覆配置となり、図 9 a に示すように、圧縮エレメント 978 を押圧する。

【 0041 】

電極針 964 を分離するため、内視鏡 944 と電極針 964 との間に配置され、最も広い部分が内視鏡 944 の末端部に位置する ( 発泡体、ゴム等の ) 圧縮可能な弾性体で形成されたウェッジ ( または中空の円筒円錐 ) 他の圧縮メカニズム 968 を使用することができる。シース 962 が収縮位置にあるときには、ウェッジの基端部にあるときよりも末端部にあるときの方が弾性体が膨張し、これによって電極針 964 の間隔が増加する。さらに、圧縮メカニズム 968 によって電極針 964 のすべてを可動とする必要はない。例えば、他の電極針 964 が圧縮された位置と延長された位置との間を移動可能であって、内視鏡 944 に対して電極針 964 の一つが固定された位置にあり、展開配置にあるときに内視鏡 944 に対して 2 本の電極針 964 が対象に配置されている場合には、電極針 964 間の十分な間隔を提供することができる。

いずれの場合でも圧縮メカニズム 968 は電極針 964 間を電氣的に絶縁しなければならず、これによって非導電性プラスチックのように、全体または一部を好適に絶縁することができる。

【 0042 】

腹腔鏡の好適例には内視鏡が含まれるが、ある実施例では、内視鏡とは別体の腹腔鏡針アレイを使用することができる。この配置では、内視鏡 944 の支持ロッドを図 15 a、図 15 b に示すもので代用することができる。

【 0043 】

電界パラメータ

発生する電界の性質は、組織の性質、選択された組織の寸法及びその位置によって決定される。電界はできるだけ均一で適正な強さであることが好ましい。電界強さを強くしすぎると、細胞を溶解させることとなり、一方、弱すぎると、効力が低下する。電極は、種々の要領で搭載され、操作されるが、親出願に記載されているものに限定されない。電極は、便利に鉗子上で、または鉗子によって内部位置に操作してもたらされる。

【 0044 】

パルス発生器によってもたらされる電気信号の波形は、指数関数的に減衰するパルス、矩形パルス、単一極性発振パルス列、二極性発振パルス列、またはこれらの波形を組み合わせた形とすることができる。通常電界強さは、約 10 V / cm から約 20 k V / cm とすることができる ( 通常電界強さは電極針間の電圧をこれらの間の距離で割ることにより決定される )。パルス長さは、約 10  $\mu$  秒から 100 m 秒とすることができる。パルス

10

20

30

40

50

の数は所望のもとする事ができるが、典型的には1秒当たり100パルスとすることができる。パルスセットの待ち時間は所望の時間とすることができ、例えば1秒とすることができる。波形、電界強さ及びパルス長さはまた、細胞の型及び電気穿孔を介して細胞に注入される分子の型にも依存する。

#### 【0045】

既知のすべての細胞の電気穿孔に必要な電界強さを含む種々のパラメータが、これらを主題とする調査報告書及び本出願の譲受人である、カリフォルニア州サンディエゴのGENETRONICS INC.によって管理されるデータベースから入手可能である。EPT等の生体内の細胞の電気穿孔に必要な電界は、一般的に、試験管内の細胞に必要な電界の強さと同じである。本発明者の近年の調査によって、好適な強さの範囲は、10V/cmから約1300V/cmである。この範囲の最高の範囲は、約600V/cmであって、科学的な出版物において報告されている他の生体内実験によって証明されている。

10

#### 【0046】

通常電界は、「高」または「低」を指定することができる。好適には、高電界を使用する。通常電界は約700V/cmから1300V/cmであって、より好適には、約1000V/cmから1300V/cmである。低電界を使用する際には、好適には、通常電界は約10V/cmから100V/cmであって、より好適には、約25V/cmから75V/cmである。特定の実施例では、電界が低いときには、パルス長さを長くするのが好適である。例えば、通常電界が約25~75V/cmの場合には、パルス長さを約10msecとするのが好適である。

20

#### 【0047】

本発明にかかる治療方法は、好適には、患者の身体の一部に対して電気穿孔を適用するための電極装置を提供するため、支持部材と、この支持部材に搭載され、選択された部位の組織内に注入され、互いに離間して配置された複数の針電極と、本発明にかかる装置と、所定強さの電界を発生させるため前記電極間の距離に比例する電気信号を電極に印加するための前記距離信号に応答する信号発生装置を含む手段を利用する。

#### 【0048】

代替策として、本発明にかかる治療方法(例えば、低電圧長パルス治療)に、他のシステム、例えば、矩形波パルス電気穿孔システムを利用することができる。例えば、カリフォルニア州サンディエゴのGENETRONICS INC.から入手可能なエレクトロスクウェアポレータ(Electro Square Porator)(T820)を使用することができる。矩形波パルス電気穿孔システムによって、設定電圧まで迅速に上昇し、設定された時間(パルス長さ)そのレベルを維持し、そして迅速に0に低下する、制御された電気パルスを提供する。この型のシステムによって、指数関数的に減衰するシステムに比較して、伝送効率のより良い植物の原形質体及び哺乳動物の細胞ラインの電気穿孔を提供することができる。

30

#### 【0049】

エレクトロスクウェアポレータ(T820)は、商業的に入手しうる最初の3000ボルトまで発生させることのできる矩形波パルス電気穿孔システムである。パルス長さは5 $\mu$ secから99msecである。矩形波電気穿孔パルスは、高い細胞生育力を提供することのできる、より穏やかな効果を細胞に与えることができる。

40

#### 【0050】

T820型エレクトロスクウェアポレータは、高電圧モード(HVM)(100~3000ボルト)及び低電圧モード(LVM)(10~500ボルト)の両方において動作させることができる。LVMにおけるパルス長さは約0.3~99msecであって、HVMにおけるパルス長さは約5~99 $\mu$ secである。T820は、1~99パルスの多パルス発生能力を備える。

#### 【0051】

#### 治療方法

本発明にかかる治療方法には、細胞または組織に高分子を提供するための本発明にかかる装置を使用し、ここでもまた電気穿孔治療法(EPT)と呼ばれる電気治療法が含まれる

50

。前述のように、用語「高分子」または「分子」は、ここでは、薬剤（例えば、化学治療剤）、核酸（例えば、ポリヌクレオチド）、抗体を含むペプチド及びポリペプチドを指す。ポリペプチドという用語には、DNA、cDNA及びRNA配列が含まれる。

#### 【0052】

本発明にかかる方法に使用されることを意図される薬剤は、典型的には、抗腫瘍または細胞毒性の効果を有する化学治療剤である。そのような薬剤または化学治療剤には、プレオマイシン、ネオカルシノスタチン、スラミン、ドキソルビシン、カルボプラチン、タクソール、マイトマイシンC及びシスプラチンが含まれる。その他の化学治療剤は、本発明の属する技術分野における熟練者には公知である（例えば、メルクインデックスを参照されたい）。さらに、「膜機能」剤もまた本発明にかかる方法に含まれる。これらの化学治療剤はまた、上述の薬剤が、または、主に細胞膜を損傷することによって機能する薬剤である。膜機能剤の例としては、N-アルキルメラミド及びパラクロロ水銀ベンゾエートがある。この薬剤の化学組成によって、電気パルスの印加に関連して薬剤の適用を行う最も適当な時間が決定される。例えば、特別な理論によって縛られることを希望するのではないが、低等電ポイントと有する薬剤（例えば、ネオカルシノスタチン、IEP = 3.78）は、電界内でより強く帯電した薬剤の静電的相互作用を回避するため電気穿孔後に適用された場合には、より効果的であるように思われる。さらに、そのような薬剤は、プレオマイシンであって、負の極性の大きいログP（ここで、Pは、オクタノールと水との間の分配係数である）を有し、寸法的に大きく（MW = 1400）、親水性であって、これによって脂質細胞膜に非常に近くなり、腫瘍細胞に非常にゆっくり拡散し、典型的には、電気パルスの前または実質的に同時に適用される。さらに、ある薬剤には、細胞により効果的に導入するため改良を要する場合がある。例えば、タクソール等の薬剤は、細胞により効果的に導入するため、水溶性が高くなるように改良する必要がある。電気穿孔法は、細胞膜に空隙を形成することによって、プレオマイシンその他同等の薬剤を腫瘍細胞に導入するのを助長する。

#### 【0053】

一実施例では、本発明は、主体の組織細胞に分子を導入するため電気穿孔治療法を行うための方法であって、電極アレイを備え、組織を貫通するための1つの針配置を有する少なくとも1本の電極と、組織内に分子を導入するために選択された組織の針電極を挿入し、選択された組織に導電性に関連した電極アレイの第2の電極を位置決めし、組織の電気穿孔のために、電極に電極間の距離に比例した高電流電気信号のパルスを与える。試験管内、または生体内外で組織の電気穿孔を行うことができることを理解しなければならない。電気穿孔はまた、例えば、単一細胞浮遊、または試験管内または細胞培養における生体内外の単一の細胞を利用して行うこともできる。

#### 【0054】

本発明にかかる方法によって、分子の導入によって細胞内の遺伝子の発現を調整することが好ましい。「調整」という用語は、発現しすぎたときに、遺伝子の発現の超過を予見するか、発現が少ないときに、発現を高めることを意味する。細胞の増殖性異常が遺伝子の発現に関係する場合には、翻訳レベルの核酸配列を使用することができる。このアプローチでは、例えば、mRNAをアンチセンス核酸または三重化剤でマスクするか、それにリボザイムを付着させることにより、特定のmRNAの転写または翻訳をブロックするため、アンチセンス核酸、リボザイム、三重化剤を利用する。

#### 【0055】

アンチセンス核酸は、少なくとも特定のmRNA分子（Weintraub、Scientific American、262:40,1990）の一部を補完するDNAまたはRNA分子である。細胞内で、アンチセンス核酸は、対応するmRNAに雑種を作り、二重らせん分子を形成する。細胞は、二重らせん構造のmRNAを翻訳しないため、アンチセンス核酸は、mRNAを干渉する。目的の細胞内に導入するには、より大きな分子よりも、15ヌクレオチドのアンチセンスオリゴマが好適である。試験管内での遺伝子の翻訳を抑制するアンチセンス法の使用は公知である（Marcus-Sakura、Anal Biochem、172:289,1988）。オリゴマが二重らせんDNAの

10

20

30

40

50

回りに巻き付けられ三重らせんを形成するため、転写を停止させるオリゴヌクレオチドの使用は三重戦略として公知である。従って、これらの三重合成物は、選択された遺伝子の特別なサイトを認識するように設計することができる (Maherら、Antisense Res.及びDev. 1(3):227、1991;Helen,C.,抗ガン剤調合6(6):569,1991)。

**【0056】**

リボザイムは、DNA規制エンドヌクレアーゼに類似の要領でDNA特に他の単一らせんRNAを付着する能力を有するRNA分子である。これらのRNAをエンコードしてヌクレオチド配列を改良することによって、RNA分子内の特定のヌクレオチド配列を認識し、それを付着する分子を作ることが可能となる (Cech、J.Amer. Med.Assn.,260:3030,1988)。このアプローチの大きな利点は、それらは配列が具体的であるため、特定の配列を伴うmRNAのみが不活性化されることである。

10

**【0057】**

リボザイムには主に2種の基本形が存在し、その1つはテトラヒメナ型 (Hasselhoff、Nature、334:585、1988)であり、もう1つは「シュモクザメ」型である。テトラヒメナ型リボザイムは、長さにおいて4つのベースの配列を認識し、シュモクザメ型リボザイムは長さにおいて11~18のベース配列を認識する。認識配列が長ければ長い程、配列が目標のmRNA種のみにおいて起こる可能性が高くなる。従って、特別のmRNA種を不活性化するため、シュモクザメ型リボザイムはテトラヒメナ型リボザイムよりも好ましく、18ベース認識配列はより短い認識配列よりも好ましい。

**【0058】**

本発明は、特定の遺伝子またはその不存在によってもたらされる細胞増殖性または免疫不全の治療のための遺伝子治療法をも提供する。そのような治療法は、障害を有する細胞にセンスまたはアンチセンスのポリヌクレオチドを導入することによって治療効果を達成することができる。ポリヌクレオチドの分配は、キメラウイルス等の組替発現ベクトルを使用することによって達成されるか、または、ポリヌクレオチドは、例えば、「裸の」DNAとして分配される。

20

**【0059】**

ここで教示された遺伝子治療のために利用することができる種々のウイルスベクトルには、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクチニア、または好適には、レトロウイルス等のRNAウイルスが含まれる。好適には、レトロウイルスベクトルは、マウスまたは鳥類のレトロウイルスの誘導體である。単一の外部遺伝子を注入することのできるレトロウイルスベクトルの例としては、次に示すものがあるが、これらに限定されるわけではない。すなわち、モロニーマウス白血病ウイルス (MoMuLV)、ハーベーマウス肉腫ウイルス (HaMuSV)、マウス乳腺ガンウイルス (MuMTV)、及びラウス肉種ウイルス (RSV)である。主体が人間の場合には、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)等のベクトルを利用することができる。種々の追加的なレトロウイルスベクトルを多重遺伝子に組み込むことができる。これらのベクトルのすべてが、変換された細胞の確認及び発生を可能とするため選択可能なマーカのために遺伝子を移動または組み入れることができる。

30

**【0060】**

治療用ペプチドまたはポリペプチドもまた、本発明にかかる治療法に含まれる。例えば、免疫調整剤及び他の生体応答調整剤を、細胞による組み入れのために導入することができる。ここで、「生体応答調整剤」という用語は、免疫応答を改良する際に含まれる物質を包圍することを意味する。免疫応答調整剤の例としては、リンフォカイン等の合成物が含まれる。リンフォカインには、腫瘍壊死因子、インターロイキン1、2及び3、リンフォトキシン、マクロファージ活性化因子、遊走素子因子、コロニー刺激因子、アルファインターフェロン、ベータインターフェロン、ガンマインターフェロン、及びそれらの亜型が含まれる。

40

**【0061】**

例えば、ファクタVIIIまたはファクタIX等の抗脈管形成剤を含む代謝酵素及びタンパク質

50

をエンコードするポリヌクレオチドもまた含まれる。本発明にかかる高分子もまた抗体分子を含む。ここで「抗体」という用語は、F a b及びF ( a b ' ) 2等の無傷の分子及びそのフラグメントを意味する。

#### 【 0 0 6 2 】

本発明にかかる方法における薬剤、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの適用は、例えば、腸管外において、注入、急速導入、鼻咽頭吸収、皮膚吸収、口からの吸収によって行われる。腫瘍の場合には、例えば、化学治療剤等を、腫瘍に部分的に、組織的にまたは直接注入する。例えば、薬剤を直接腫瘍に適用するときには、薬剤を「開扇現象」の要領で行うのが有利である。「開扇現象」という用語は、腫瘍の全体にわたって薬剤を大量に分配することを目的として、薬剤を注入しているときに針の方向を変化させることにより薬剤を提供すること、または、ポーラスとしてよりもハンドファンを開くように多方向に注入することによって薬剤を適用することを意味する。本発明の属する技術分野において典型的に使用される容量に比較して、腫瘍全体にわたって薬剤を十分分配させるために薬剤を適用（注入）するときには、薬剤を含む溶液の容量を増加するのが好ましい。例えば、マウスを使用する例では、本発明の属する技術分野における熟練者は、典型的に50 $\mu$ lの薬剤を含む溶液を注入するが、容量を150 $\mu$ lに増加することによって結果は大幅に改善される。人間の臨床治療研究では、腫瘍の適切な灌流を確保するため約20mlが注入された。好適には、注入は基部のまわりに開扇現象によって非常にゆっくりと行うべきである。腫瘍の中心部では、細胞間の圧力が非常に高いが、そこは腫瘍が頻繁に壊死する場所でもある。

#### 【 0 0 6 3 】

好適には、分子は、実質的に電気穿孔治療と同時に適用される。「実質的に同時」とは、時間的に、分子と電気穿孔治療とが適当に短い間隔で適用されることを意味する。分子または治療剤の適用は、例えば、腫瘍の性質、患者の状態、分子の寸法及び科学的性質、分子の半減期等に応じていかなる間隔で行うことができる。

#### 【 0 0 6 4 】

腸管外の適用の準備には、無菌の、水性または非水性溶液、浮遊剤、乳液が含まれる。非水性溶液の例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリブオイル等の植物油、オレイン酸エチル等の注入可能な有機質エステル等がある。不活性希釈液の他に、そのような合成物には、またアジュバント、湿潤液、乳化剤、浮遊剤が含まれる。さらに、パルスを付加する前に局所的に治療剤を維持するため、血管収縮剤を使用することができる。

#### 【 0 0 6 5 】

本発明にかかる方法によっていかなる細胞をも治療することができる。ここで図示した例は、例えば、脾臓、肺、頭、首、皮膚、皮下層ガン等の腫瘍細胞の治療のために本発明にかかる方法を使用する場合について説明したものである。他の細胞の増殖不全は、本発明にかかる電気穿孔法によって容易に治療することができる。「細胞増殖不全」という用語は、形態学的及び遺伝子的の両方において組織のまわりとは異なってしばしば現れる悪性及び良性の細胞集団を意味する。悪性細胞（すなわち、腫瘍またはガン）は、多くの過程を経て発現する。本発明にかかる方法は、特に、例えば、脾臓、頭、首の細胞（例えば、喉頭、鼻咽頭、中咽頭、下咽頭、唇、喉）及び肺、また、心臓、腎臓、筋肉、胸、結腸、前立腺、胸腺、精巣、卵巣等種々の臓器システムの悪性腫瘍その他の障害を治療するのに有用である。さらに、基底細胞ガンまたはメラノーマ等の皮膚の悪性腫瘍についてもまた、本発明にかかる治療法によって取り扱うことができる（例2を参照願う）。主体が人間であることが好適であるが、本発明はまた人間以外の動物またはほ乳類における獣医学的な使用にも有用である。

#### 【 0 0 6 6 】

もう一つの実施例において、本発明は、損傷した、または死滅した細胞を中に含む主体の組織に電気穿孔を行う治療法を適用する方法を提供する。この方法には、電極アレイを提供し、選択された組織に導電性に関連した電極アレイの第2の電極を位置決めし、組織の

10

20

30

40

50

電気穿孔のために、電極に電極間の距離に比例した高電流電気信号のパルスを与えることが含まれる。本方法は、好適には、追加的な細胞毒性のまたは化学治療剤の必要性を防止する低電圧及び長いパルス長さを利用する。例えば、好適には通常の電界は約  $2.5 \text{ V/cm} \sim 7.5 \text{ V/cm}$  の間であり、パルス長さは約  $5 \mu\text{s}$  から  $99 \text{ ms}$  である。

【0067】

次の例は、本発明に関するものであるが、本発明を限定するものではない。これらの例は使用されうるものとして典型的なものであって、本発明の属する技術分野における熟練者にとって公知の手順を代わりに使用することも可能である。

【0068】

【実施例】

以下の実施例は細胞系、動物、ヒトにおける EPT の使用を説明するものである。ここで、実施例 1 は裸マウスの脇腹に皮下的に異種移植したみずばらしく分化したヒトすい臓腫瘍 (Panc-3) における EPT を説明するものである。実施例 2 は基底細胞癌腫および黒色腫の治療のため EPT を用いヒトに対し臨床試験を行った結果を示す。実施例 3 は頭部および首部腫瘍の治療のため EPT を用いヒトに対し臨床試験を行った結果を示す。実施例 4 は低電圧 (電界) および長いパルス長を利用して EPT についての生体外データを提供するものである。EPT についてのパラメータは実施例中に記載されている。すなわち、実施例 1 および頭部および首部臨床試験については公称電界は  $1300 \text{ V/cm}$ 、1 秒間隔で  $99 - 100 \mu\text{s}$  間で 6 パルスであった。臨床試験 (実施例 2) も同様のパラメータを用いたが、電界は  $1130 \text{ V/cm}$  とした (公称電界 ( $\text{V/cm}$ ) は針対間の距離 ( $\text{cm}$ ) だけ分けられた針対間に電圧 ( $\text{V}$ ) が印加される)。これらの実施例は生体外および生体内における好ましくない細胞集合 (例えば腫瘍) を効果的に死滅させるための EPT の使用を説明するものである。

【0069】

実施例 1 - 生体内での腫瘍治療のための EPT

上述のようにファニングを用いながら、プレオマイシン ( $0.15 \text{ mL}$  の食塩水中、 $0.5$  単位) を腫瘍内に注射し、ついで 10 分後、上述のように直径  $1 \text{ cm}$  の円の周りに沿って配列した針アレイ電極を用いて 6 つの矩形波パルスを印加し、単一の治療処置を行った。この針アレイは腫瘍の種々の大きさに適合させるため種々の直径 (例えば、 $0.5 \text{ cm}$ 、 $0.75 \text{ cm}$  および  $1.5 \text{ cm}$ ) のものを使用することができる。また、種々の高さのストッパーをこの針アレイの中央に挿入することにより、針の腫瘍内への穿刺深さを変化させる。組込み機構により電極を切替えてパルス波が腫瘍を最大限にカバーすることができた。この電気的パラメータは、中央電界強度が  $780 \text{ V/cm}$ 、1 秒間に  $6 \times 99 \mu\text{s}$  パルスであった。

【0070】

その結果、殆ど全てのマウスの治療部位において著しい壊死および浮腫が認められた。治療グループ ( $D + E +$ ;  $D =$  薬剤、 $E =$  電界) のマウスの腫瘍容積に実質的な減少 (浮腫のため、最初に若干増大した後) が認められたが、対照グループ ( $D + E -$ ) では腫瘍容積は著しく増大した。腫瘍サンプルの組織学的分析の結果、 $D + E +$  グループにおいては壊死腫瘍細胞ゴーストが見られたのに対し、 $D + E -$  グループにおいては生存細胞と壊死細胞の混合からなっていた。ヒト非微小細胞肺癌 (NSCLC) 腫瘍を裸マウスに異種移植したもので予備研究したものでもプレオマイシンを用い EPT 治療を行ったものは非常に期待できる結果が得られた。

【0071】

腫瘍細胞系 Panc-3、つまりすい臓のみずばらしく分化した腺癌細胞系がアンチ・キサンサー・インステチュート (サンジエゴ) により供給された。EPT 試験のため、ストック・マウスから採取した組織で腫瘍系が維持されているものを解かし、これをそれぞれ約  $1 \text{ mm}$  の大きさの非常に小さい片に切断し、その  $8 - 10$  片を裸マウスの左脇腹に形成された皮下嚢に外科的に異種移植した後、 $6.0$  縫合糸で閉じた。その平均腫瘍サイズが約  $5 \text{ mm}$  に達した後、この触診可能な腫瘍を持ったマウスを無差別に分けた。対照グルー

10

20

30

40

50

プ ( D + E - ; D = 薬剤、 E = 電界 ) として 10 匹のマウス、 E P T 治療のための 10 匹のマウス、すなわちブレオマイシン注射について、 B T X 矩形波 T 8 2 0 ジェネレータからのパルシング ( D + E + ) による治療を行うものに分けた。腫瘍寸法を測定し、下記式により腫瘍容積を計算した。

$$(11/6) \times a \times b \times c$$

ここで、 a , b および c はそれぞれ腫瘍の長さ、幅および厚みである。

【 0 0 7 2 】

0 . 5 単位のブレオマイシン ( シグマ・ケミカル社 ) を 0 . 9 % N a C l 溶液 0 . 1 5 m L 中に溶解させ、対照グループ ( D + E - ) および治療グループ ( D + E + ) の双方にファニングにより各マウスの腫瘍内に注射した。この注射 10 分後、 ( D + E + ) グループのマウスに、針アレイ電極のセットを備えた B T X T 8 2 0 矩形波ジェネレータからのパルスを与えた。電気的パラメータは以下の通りであった。電界強度は 1 3 0 0 V / c m、1 秒間に各 9 9  $\mu$  秒の 6 パルスであった。

マウスは死亡率について毎日モニターし、病気状態の何らかのサインについて記録した。腫瘍の寸法を一定時間ごとに測定し、腫瘍成長退化 / 進行をモニターした。

【 0 0 7 3 】

図 1 0 は、薬剤を用いたもの、用いないもの、 P a n c - 3 腫瘍のためのブレオマイシンを用いパルシングを行ったもの、行わないものなどの種々の対照動物、治療動物についての E P T 結果を示している。腫瘍容積について、治療したマウスと治療しなかったマウスとの間に著しい差異が認められた。治療の約 2 4 日後は検知可能な腫瘍は実質的に認められなかった。この図 1 0 の結果を下記表 1 に 4 3 日までの分について要約されている。腫瘍の実際の退化が図 1 3 a ないし図 1 3 d の連続図に示されており、対応する組織が図 1 4 a ないし図 1 4 c に示されている。

【 0 0 7 4 】

10

20

表 1

## 裸マウスにおけるPanc-3腫瘍の電気化学療法

治療後 (日数)	腫瘍容積 (mm <sup>3</sup> )C1	腫瘍容積 (mm <sup>3</sup> )C2	腫瘍容積 (mm <sup>3</sup> )T1	腫瘍容積 (mm <sup>3</sup> )T2
0	138.746	148.940	123.110	178.370
1	206.979	179.820	210.950	252.720
8	394.786	451.787	104.550	211.110
15	557.349	798.919	113.210	226.966
18	939.582	881.752	161.730	246.910
24	1391.057	1406.980	41.560	47.223
28	1628.631	1474.210	0	0
35	2619.765	2330.310	0	0
38	2908.912	2333.967	0	0
43	3708.571	5381.759	0	0

10

20

細胞系：みすぼらしく分化したヒトすい臓腫瘍 (Panc-3)

マウスモデル：裸マウス

移植：皮下異種移植

対照マウス：C1およびC2

治療マウス：T1およびT2

このPanc-3についての実験を非微小肺癌細胞系(NSCLC)および177(アンチ・キャンサー・インステチュート, サンジエゴ, CA)を用いて繰返した。その結果は図10に示すプレオマイシンを用いたPanc-3についての実験の結果と同様であった。1つの実験において、再発した腫瘍を27日目(図12)に再治療したところ、7日後には腫瘍の痕跡は認められなかった。

30

【0075】

Panc-3およびNSCLCを、薬剤ネオカルシノスタチン(NCS)を用い、上記同様の手法に従って処置した。図11aに示すように、NCSのパルス前投与をプレオマイシンを用いた実験と同様にして行ったが、腫瘍の大きさを減少させる効果は全くなかった。これはNCSの低い等電位点のため、静電的相互作用により薬剤が腫瘍細胞に入り込むことが妨げられたためと思われる。従って、最初にパルシングを行い、ついでパルス後NCS注射を行うことにより実験を繰返した。

40

【0076】

図11bは、7匹の治療マウス(マウスID:1-7)について、最初の腫瘍容積(I)を13日目での最終腫瘍容積(F)と比較したものが示されている。このマウスの幾つか(ID:1, 2, 4および7)については、腫瘍容積の増大が観察されたが、これは浮腫によるものと思えた。しかし、図20dに示すように、5匹のマウスの別のグループを23日目に検査したところ、全てのマウスは腫瘍容積の顕著な減少を示した。

図11aと図11bとの比較からパルス後のNCSの投与はパルス前のNCSの投与よりも効果的であった。

【0077】

この実施例は、裸マウスに皮下的に異種移植したみすぼらしく分化したヒトすい臓腫瘍(

50

Panc - 3) および非微小細胞肺癌 (NSCLC) を、ブレオマイシンまたは NCS および針アレイ電極を用いた本発明の EPT 法により効果的に治療できること示している。なお、他の同様の化学治療剤でも本発明のこの EPT 法を効果的に利用することができる。

【0078】

ブレオマイシンを用いた ECT に対する Panc - 3 の応答が表 2 に示されている。治療したマウスの 68% (17/25) に治療後 28 日後に完全な腫瘍の退化が観察され、20% (5/25) に部分的 (80% 以上) 退化が観察され、また 8% (2/25) には応答が認められず、4% (1/25) が治療後 20 日目に死亡した。治療後 120 日後でも 64% (16/25) が触診可能な腫瘍は観察されなかった。このグループからの代表的な動物 (2/17) についてモニターしたが、その後 243 日間、腫瘍は認められなかった。その後、これら動物は安楽死させた。これらマウスの内の 8% について、治療後 35 日目に腫瘍の再発が認められたが、その速度は非常に遅かった。

10

【0079】

組織学的研究から、EPT を行ったグループについて腫瘍区域における著しい壊死が明らかに確認され、それに対し、対照グループについては壊死は明らかに認められなかった。ブレオマイシンをより多量に腫瘍内に注射し、これをファニングと組み合わせ、腫瘍容積全体に最大限に均一に分散させることは、パルシングの前に薬を注射する従来の方法と比べて非常に効果的であることが見出された。

【0080】

表 2

ブレオマイシンを用いた Panc - 3 の電気化学療法

治療後の日数	28	35	57	84	94	120
治療マウス数 : 25						
完全な退化 (100%)	17	16	16	16	16	16
部分的退化 (80%)	5	3	3	3	3	3 <sup>e</sup>
応答なし	2	2	1 <sup>a</sup>	1	1 <sup>c</sup>	
死亡	1			2 <sup>b</sup>		
腫瘍再発			2		1 <sup>d</sup>	
再治療			2			
組織		1				

20

a, c : 腫瘍増大による負担のためマウスを死亡させる

b : 1 匹は再治療後死亡、また 1 匹は触診可能な腫瘍はなかったが、64 日生存後に死亡

d : 二次的転移腫瘍

e : 繊維状組織

MedPulser (メドパルサー、登録商標) を用いた生体内試験結果

裸マウスの皮下に異種移植し成長させた腫瘍の治療をメドパルサー (登録商標、本発明の装置) を用いて行った予備的実験において良好な結果が得られた。メドパルサーおよびブレオマイシンを用い、EPT により、ヒトすい臓癌異種移植 (Panc - 4) の治療を行ったところ、観察 39 日目までに治療したマウスの約 75% に完全な腫瘍の退化が認められた。同様にして、ヒト前立腺癌異種移植 (PC - 3) の治療を行ったところ、マウスの約 66% に完全な腫瘍の退化が認められた (治療後、60 日目までに癌の再発は認められなかった)。EPT による腫瘍の治療において、4 および 6 針アレイが有効である。

40

【0081】

PC - 3 の生体外実験での MedPulser (メドパルサー、登録商標) の 4 針アレイ および 6 針アレイの比較

PC - 3 (ヒト前立腺癌) に対する生体外での MedPulser (メドパルサー、登録商標) の 4 針アレイ対 6 針アレイの性能比較実験を行った。細胞を RPMI 媒体に懸濁させ、200,000 細胞/mL の割合で均一に接種を行った。ついで、2 x 10<sup>-5</sup> M のブレオマイシンを各ウェル (D + E - および D + E + のみ) に添加した。次に、メドパル

50

サーに接続した6 - 針アレイおよび4 - 針アレイ電極を用いて24ウェルプレートにおいて細胞を電気穿孔した。電気パルスのパラメータは6 - 針アレイについては6 × 99 μ秒、1129 V、4 - 針アレイについては4 × 99 μ秒、848 Vとした。ついで、細胞を96ウェルプレートに移し、37℃で20時間培養した。細胞生存率は、XTTのホルマザンへの代謝変換に基づき、450 nmの波長で分光測光法的に測定されるXTT検査法を用いて判定した。細胞生存率の値は、サンプルのO.D.値、すなわち100%細胞生存の対照(D - E -)および0%細胞生存の対照(D - E -、全ての細胞を溶解させるSDSを用いた)から計算した相対値である。この細胞生存データは次の通りである。

【0082】

表3

治療	平均生存率 (%)	SE
D - E -	100	3.65 (n = 6)
D + E -	27.71	1.05 (n = 6)
D - E + (4N)	101.15	4.32 (n = 12)
D - E + (6N)	97.72	4.33 (n = 12)
D + E + (4N)	4.78	7.53 (n = 12)
D + E + (6N)	-4.12	0.59 (n = 12)

この実験から得られた予備的データから、統計的に見ると、生体外における腫瘍細胞の死滅に対し、4 - 針アレイおよび6 - 針アレイの双方ともほぼ等しく有効であると思われる。

【0083】

実施例2 - 基底細胞癌腫および黒色腫についての臨床試験

ブレオマイシン - EPTの腫瘍に対する有効性を、実施例1で使用したのと同様の腫瘍応答基準を用い8週間の終りまで検査した。

【0084】

投与されたブレオマイシンの濃度は5 U / 1 mLであった。ブレオマイシンの投薬量は下記のようにして投与された。

【0085】

表4

腫瘍の大きさ	ブレオマイシンの投薬量
< 100 mm <sup>3</sup>	0.5 U
100 - 150 mm <sup>3</sup>	0.75 U
150 - 500 mm <sup>3</sup>	1.0 U
500 - 1000 mm <sup>3</sup>	1.5 U
1000 - 2000 mm <sup>3</sup>	2.0 U
2000 - 3000 mm <sup>3</sup>	2.5 U
3000 - 4000 mm <sup>3</sup>	3.0 U
≥ 5000 mm <sup>3</sup>	4.0 U

下記表5は治療に対する応答結果を示す

NE = 効果無し；腫瘍容積の減少は50%未満

PR = 部分的応答；腫瘍容積の減少は50%以上

CR = 完全な応答；身体検査および/または生検による判定の結果、腫瘍の全ての兆候が消滅した。

【0086】

実施例3 - 頭部および首部の癌に対するEPT

下記の患者の全てに対しブレオマイシンの腫瘍内注射と、直径の異なる6個の針アレイとを用いて治療を行った。電圧は1300V/cmの公称電界強度を達成するようにセットした(針アレイの直径に対し1300を掛け、設定されたジェネレータの電圧を与えるようにした)。パルス長は100μ秒であった。

【0087】

#### 研究方法

この研究は単一中央実行可能性臨床研究として設計し、その中で病変内ブレオマイシン投与との組み合わせによるEPT手法の有効性を従来の外科療法、放射線療法、および/または全身的化学療法と比較した。約50個の研究被検体をこの研究に参加させた。全ての研究被検体は身体検査および生検により治療前に検査した。研究被検体の術後評価を4ないし6週間に亘り毎週ごとに行われ、その後、12ヶ月に亘り毎月ごとに行われた。治療後約8ないし12週間、腫瘍部位の生検を行った。CTまたはMRI走査の使用を、HNC被検体の標準医療追跡評価に従って利用した。

【0088】

腫瘍の評価は、腫瘍の径(センチ)の測定、その容積(立方センチ)の見積りが含まれている。ブレオマイシン・スルフェートの腫瘍内投与の前に腫瘍部位を1%リドカイン(キシロカイン)および1:100,000エピネフィリンを用い麻酔にかける。注射されたブレオマイシン・スルフェートの濃度は1cc当たり4単位とし、腫瘍当たりの最大投与量を5単位とする。1被検体当たり1腫瘍を超えて治療する場合、1被検体当たり全体として20単位を超えないようにする。ブレオマイシンの投与量を計算された腫瘍容積1cm<sup>2</sup>当たり1単位とする。ブレオマイシン・スルフェートを注射した後、ほぼ10分経たとき、アプリケーションを腫瘍上に置き、電気的パルスを開始する。電気的パルスの各印加または開始をシーケンスとして参照する。このEPTの使用は被検体が必要とする後の緩和治療に対し禁忌とはならない。

【0089】

この研究において、16週間以内にかかなりの腫瘍退化が認められ、かつ、伝統的療法で見られる主な副作用を生じさせない場合を成功と定義づけた。可能な応答結果としては下記の3つの場合が存在する。

\* 完全な応答(CR): 身体検査および/または生検による判定の結果、腫瘍の全ての兆候の消滅

\* 部分的応答(PR): 50%以上の腫瘍容積の減少

\* 応答なし(NR): 50%未満の腫瘍容積の減少

腫瘍の大きさが増大した場合(25%腫瘍容積)、必要とする場合は、他の療法が被検体の望みに応じて始められる。

【0090】

#### 治療に対する被検体の応答

表6は治療に対する被検体の応答を示している。3個の被検体は完全な応答を示した(被検体No.1、3および4)。4個の被検体は部分的応答を示した(被検体No.2、6、8および9)。2個の被検体は応答を示さなかった(被検体No.5および7)。3個の被検体は病気の進行またはこの研究治療に関係のない合併症が原因で12週に達する前に死亡した(被検体No.2、5および7)。この3個の被検体の内、1個の被検体(No.2)は4週目でPRを達成した。2個の被検体はこの研究へ加わる前にそれらの腫瘍について臨床的治療を全く受けていなかった(被検体No.4および8)。3個の被検体は装置のアプリケーション部分に完全にアクセスさせることができなかつたため、分割的な治療が施された(被検体No.5、7および9)。

表7はブレオマイシン・スルフェートおよび本発明の装置、メドパルサーを用いたEPTを適用して行われた臨床試験の要約を示している。

【0091】

表6

ブレオマイシン・スルフェート/EPTに対する応答

被検体 No./記号	前の治療	治療の 週	応答時間 (週)	応答状態	最後の 臨検
1 / J-S	S	0	2, 8	PR, CR	2 2
2 / G-C	R	0, 4	4	PR	4
3 / L-O	R	0	3	CR	1 6
4 / G-R	なし	0, 4	4, 9	PR, CR	9
5 / R-H	R	0, 4	n a	NR**	4
6 / C-B	R	0, 1 2	2	PR	1 2
7 / C-J	S, R, C	0	n a	NR**	1
8 / L-J	なし	0, 6	4	PR	9
9 / J-T	S, R, C	0, 7	7	PR**	7

(注)

(S) 外科療法、(R) 放射線療法、(C) 化学療法；PR - 部分的応答；CR - 完全な応答；NR - 応答なし；\*\* 分割療法。

【0092】

#### 実施例4 - 低電圧長パルス長(LVLP)EPT

従来の電気化学療法では、高電圧短パルス時間のものを腫瘍の治療のために使用している。しかし、1200 - 1300 V/cm、100 μ秒の電界条件がブレオマイシン、シスプラチン、ペプロマイシン、ミトマイシンc、カルボプラチンなどの抗がん剤を使用する場合、生体外および生体内において非常に効果的であることが見出された。これらの結果は生体外および生体内試験によるものである。このような電氣的条件は臨床試験において患者が十分に耐え得るものであるが、そのような治療は一般に患者の筋肉の痙攣を伴い、患者に不快を生じさせることがある。この不快感はしばしば、個々の患者の苦痛感に関連することが見出された。同一の実験条件下でも患者の応答が著しく異なることがしばしば見受けられた。この問題の幾つかは電気化学療法で低電圧長パルス長を用いることによりかなり減少させることができる。生体内遺伝子転写について報告されている最低電界強度は600 V/cmである(T. Nishira, Cancer Res., 56:1050 - 1055, 1996)。生体内EPT試験において使用された最大電界強度を表8に示す。ここで細胞の50%を殺傷させるのに必要な電界強度は50 V/cm以下である。

【0093】

MCF-7 (ヒト肺癌)、PC-3 (ヒト前立癌) およびC6 (ラット神経膠腫) のような種々の腫瘍細胞系を用いた下記生体外試験によれば、腫瘍細胞の殺傷に関しては、低電圧長パルス時間の使用は高電圧短パルス時間の場合と等しいかまたはそれ以上の効果があることが確認された。これらの結果はMCF-7で示されている。パルス長は4 - 15 m秒の範囲とすることができる。MCF-7の電気穿孔応答は、XTT検査法を用い、高電圧短パルス長(HVSP)および低電圧長パルス長(LVLP)の双方で行った。また、このXTT検査は処置の70時間後におけるXTTのホルマゼンへの代謝変換に基づき、450 nmの波長で分光測光法的に測定したものである(M. W. Roehmら、"テトラゾリウム塩XTTを利用した細胞増殖および生存能のための改良された比色分析法"、J. Immunol. Methods 142:2, 257-265, 1991)。XTTはテトラゾリウム試薬、2,3-ビス(2-メトキシ-4-ニトロ-5-スルホフェニル)-5-[(フェニルアミノ)カルボニル]-2H-テトラゾリウム・ヒドロキシド(XTT)であり、これは生存細胞中で代謝的に還元されて水溶性ホルマゼンとなる。従って、生きている細胞のみがXTTをホルマゼンに変換させる。細胞生存率の値は、サンプルのO.D.値からの式を用いて計算された相対値である、すなわち100%細胞生存の対照(D-E-)および0%細胞生存の対照(D-E-, SDSを用いる)から計算した相対値である。このHVSPを用いた試験はこの開発されたEPTモードのLVLPと直接の比較をし得るように行われた。

【0094】

10

20

30

40

表8

細胞系	細胞の型	HVSP	LVL P
		LD <sub>50</sub> (V/cm)	LD <sub>50</sub> (V/cm)
MCF-7	ヒト肺癌	1800	50

(LD<sub>50</sub>は細胞の50%を殺傷させるのに必要なパルスの致死量である)

25 V / cm程度の低い電圧でも細胞に対しかなりの細胞毒性を生じさせることができた。電界を増大させることにより細胞を完全に死滅させることができた。C6グリオマのよ  
10  
うな細胞系の或るものは、高電圧パルスではそれ程著しい影響を受けなかったが、20  
ないし30 V / cmの低電圧により完全に死滅させることができた。これらの生体外試験結  
果はEPT治療のLVL Pモダリティーの有効性を明らかに画定するものである。

【0095】

生体外でのEPTを用いた薬剤の細胞毒性

MCF-7に対し種々の薬剤を用いた生体外EPT試験結果を高電圧および低電圧の双方  
を用いた場合について以下に説明する。

細胞はATCC(アメリカン・タイプ・テシュ・コレクション、ロックビル, MD, U  
20  
S A)から入手し、その推奨された手法により維持させた。ついで、細胞を適当な媒体中  
に懸濁させ、これに24/96ウエルプレート中にて均一に接種を行った。ブレオマイシ  
ン、シスプラチン、ミトマイシンC、ドクソルビシンおよびタクソールから選択される1  
つの薬剤を細胞懸濁液に直接添加し最終濃度が約 $1 \times 10^{-4}$  (1E-4)ないし $1.3$   
 $\times 10^{-9}$  (1.3E-9)となるようにした。BTX T820エレクトロ・スクエア  
・ポレータから発生する電気的パルスを、上述のBTX針アレイ電極を用いてマイクロ  
プレート中の細胞懸濁液に伝達させた。

【0096】

試験に対応させて、100  $\mu$ 秒または10m秒の6個のパルスを、高電圧または低電圧の  
種々の公称電界を、EPT-196針アレイスイッチを用い6-針アレイの2つの対向す  
る電極対間に印加した。ついで、このマイクロプレートを20時間または70時間、培養  
し、細胞生存率をXTT検査法により測定した。その結果の幾つかを図15(a)、図1  
5(b)、図16(a)、図16(b)および図17に示す。  
30

図17に対応する曲線はメドパルサーを用いて得たものである。

【0097】

LVL Pモードについて述べると、この方法により薬剤無しで細胞に対しパルスを印加し  
た場合でも、細胞の生存率は50%よりかなり小さく、薬剤と組合わせた場合はその生存  
率は更に減少した。薬剤がパルスよりむしろ大きい効果を示し、パルスのみによる最初の  
生存率が約80%となるように選択することが、更に望ましい。LVL Pモードについて  
の典型的細胞死滅曲線を図15(a)に示す。

【0098】

以上、本発明を好ましい具体例を参照して説明したが、その他、本発明の趣旨を逸脱しな  
40  
い範囲において種々の変更が可能であることを理解されたい。従って、本発明は以下に記  
載する請求の範囲により定められるものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明の一実施例を示す組立断面図である。

【図2】図2a乃至2gは、本発明にかかる電極のいくつかの実施例を示す概略図である  
。

【図3】図3は、本発明にかかる治療装置のブロック図である。

【図4】図4は、図3の治療装置のための回路の概略ブロック図である。

【図5】図5は、図4の回路の選択切換素子の概略図である。

【図6】図6は、本発明の一実施例にかかる9つの治療領域を形成する針のための好適な  
50

4 × 4 マップの配置図である。

【図 7】図 7 a は、本発明の一実施例にかかる 2 × 2 治療領域のパルスシーケンスを示す図である。図 7 b 乃至図 7 d は、本発明の一実施例にかかる 6 つの針アレイのパルスシーケンスを示す図である。

【図 8】図 8 は、従来の内視鏡検査システムを示す図である。

【図 9】図 9 a 及び図 9 b は、本発明にかかる伸張 / 収縮針アレイの詳細を示す図である。

【図 10】図 10 は、パンク - 3 異種移植ヌードマウスにプレオマイシンを使用した E P T 後 120 日までの腫瘍体積、( D は薬を、E は電気穿孔を示し)、静脈制御グループ ( D + E - )、D - E -、D - E + )、治療グループ ( D + E + ) を示す。

10

【図 11】図 11 a 及び図 11 b は、ネオカルシノスタチンのパンク - 3 の E P T の効果を示す図であって、薬の注入前後の各々 24 日までを示す。

【図 12】図 12 は、異種移植ヌードマウスの非小細胞肺ガン ( N S C L C ) におけるプレオマイシンを使用した E P T 後 34 日までの腫瘍体積を示す。矢印は、27 日目における 1 匹のマウスの再治療を示す ( D は薬を、E は電気穿孔を示す )。

【図 13】図 13 a 乃至図 13 d は、E P T による腫瘍異種移植 ( a ) 治療に含まれる経過を、傷痕 ( b ) の形成から、乾燥し、最終的にはがれ落ち ( c )、腫瘍の存在しないきれいに治癒した皮膚 ( d ) へと導かれる治療状態を示す。

【図 14】図 14 a 乃至図 14 c は、治療後 35 日経過後の腫瘍サンプルの微細構造を示す。D + E + グループは、D + E - グループ ( a ) の生存できる細胞と壊死細胞の混合と比較して、壊死細胞のゴースト ( b ) を示す。120 日後の腫瘍サイトからのサンプルの微細構造は、腫瘍細胞の完全な消滅を示す ( c )。

20

【図 15】図 15 a 及び図 15 b は、各々、低電圧または高電圧 E P T に曝された M C F - 7 ( 胸ガン ) 細胞の生存を示す。

【図 16】図 16 a 及び図 16 b は、プレオマイシンを使用した低電圧または高電圧 E P T に曝された M C F - 7 ( 胸ガン ) 細胞の生存を示す。

【図 17】図 17 は、異なる濃度のプレオマイシン及びメドパルサーを使用したパルスのない、またはパルスのある M C F - 7 の効果を示す。各々の図において、同一の番号及び同一の符号を付したものは同一の要素を示す。

【図1】

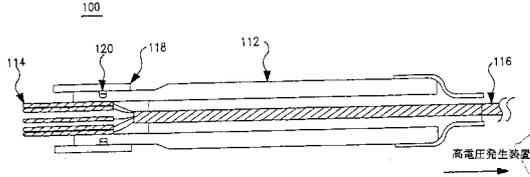


FIG. 1

【図2】

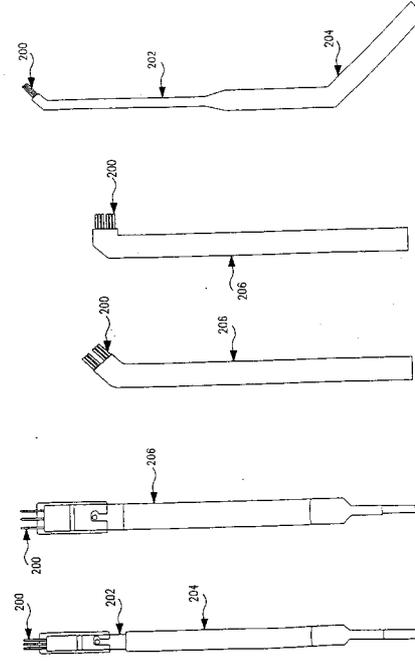


FIG. 2E

FIG. 2D

FIG. 2C

FIG. 2B

FIG. 2A

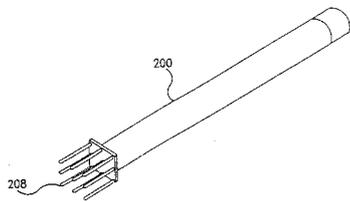


FIG. 2F

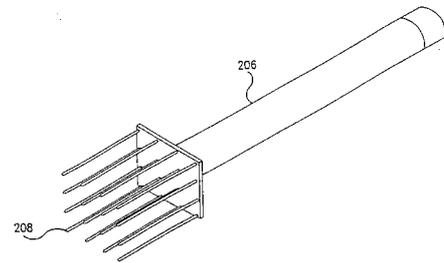


FIG. 2G

【図3】

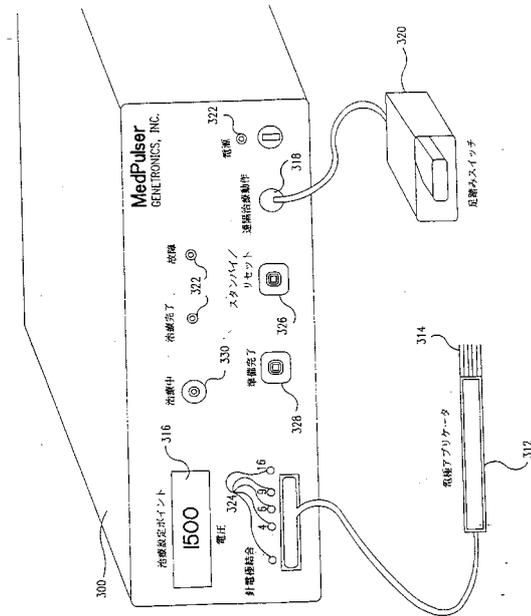


FIG. 3

【 図 4 】

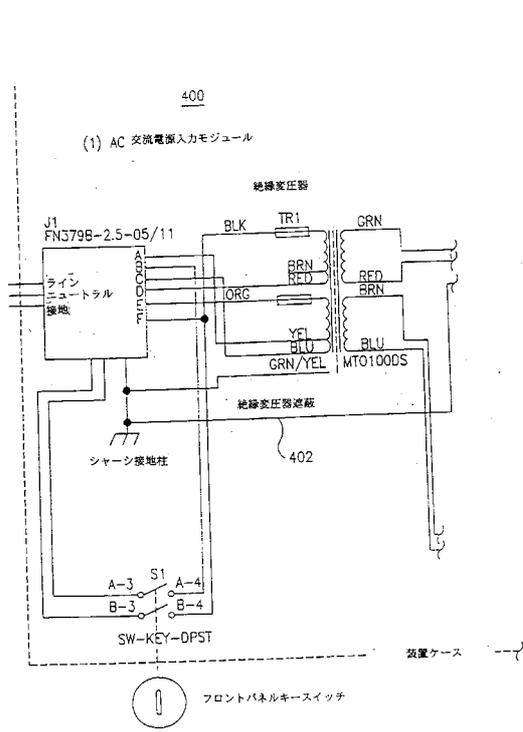


FIG. 4A

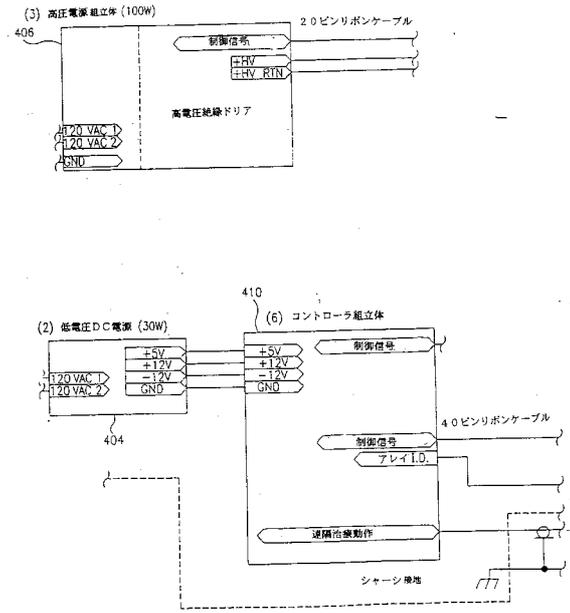


FIG. 4B

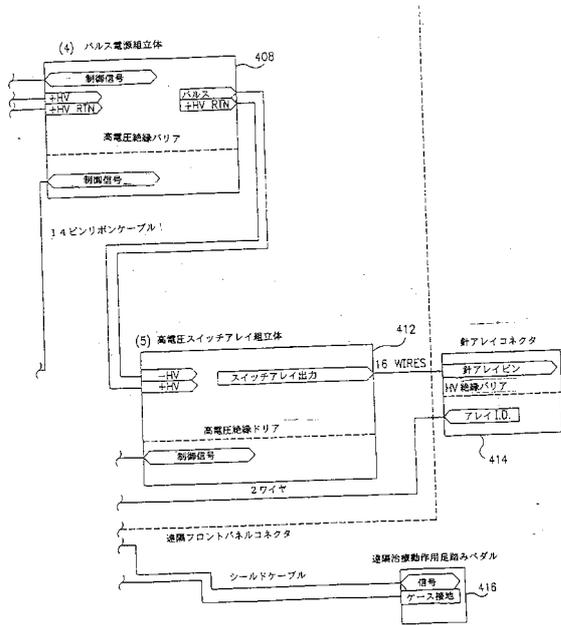


FIG. 4C

【 図 5 】

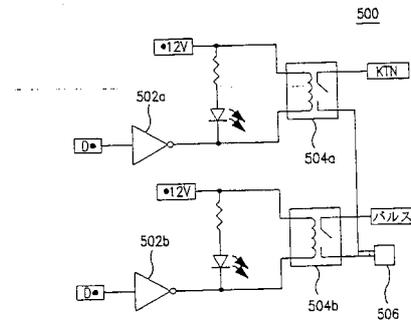


FIG. 5

【 図 6 】

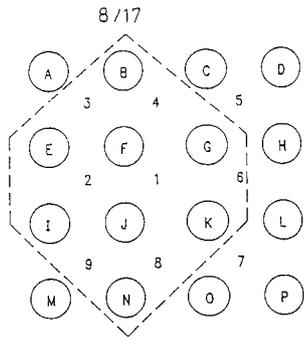


FIG. 6

【 図 7 】

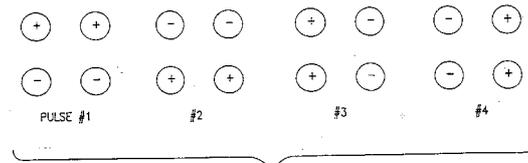


FIG. 7A

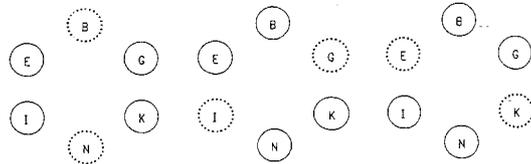


FIG. 7B

FIG. 7C

FIG. 7D

【 図 8 】

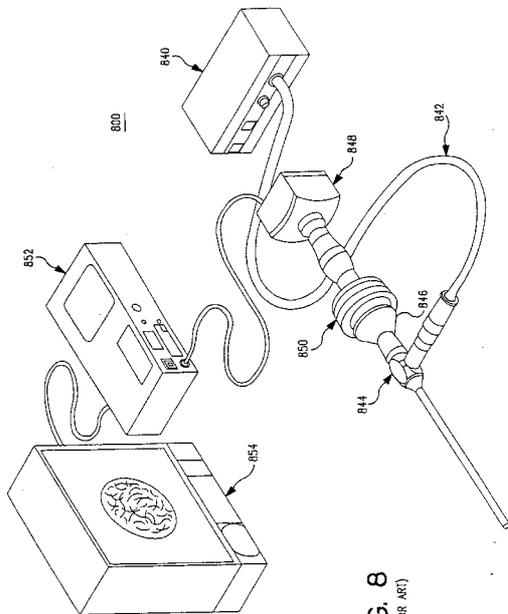


FIG. 8  
(FRICK ACT)

【 図 9 】

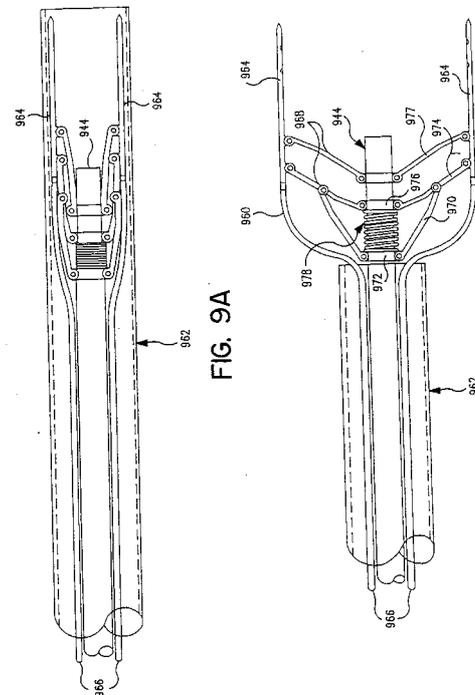


FIG. 9A

FIG. 9B

【 図 1 0 】

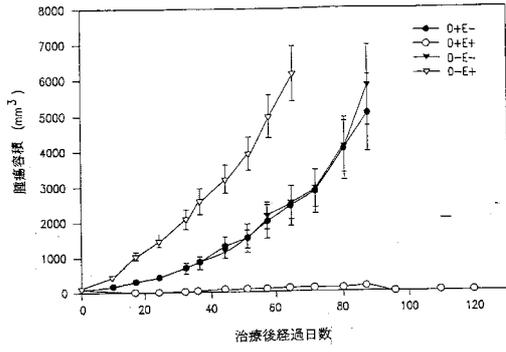


FIG. 10

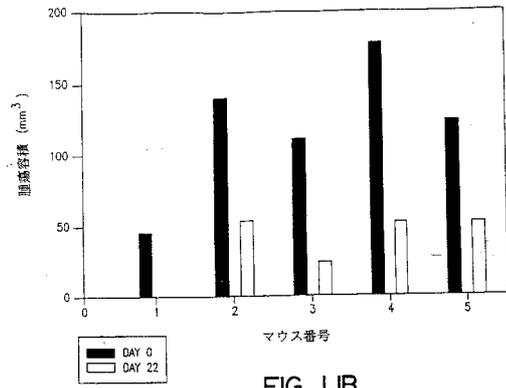


FIG. 11B

【 図 1 1 】

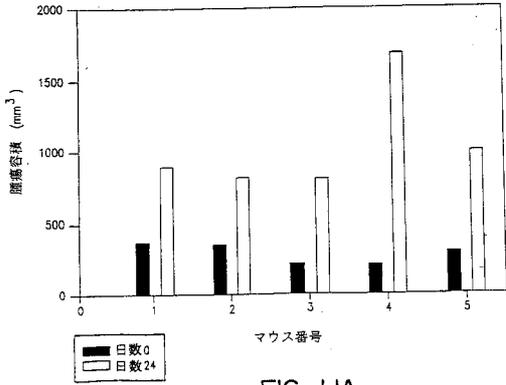


FIG. 11A

【 図 1 2 】

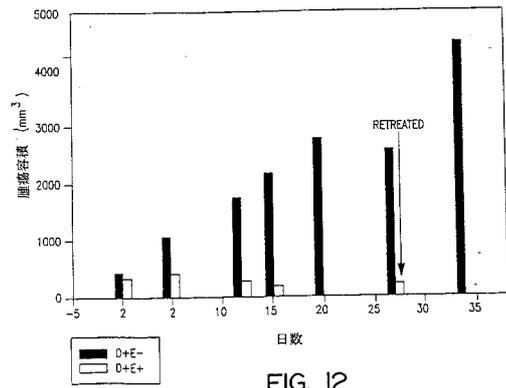


FIG. 12

【 図 1 3 】

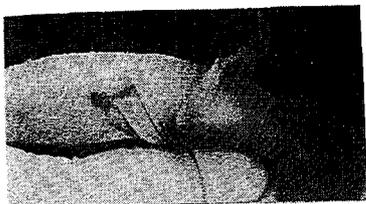


FIG. 13A



FIG. 13B

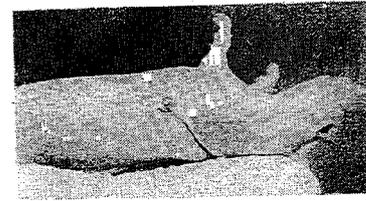


FIG. 13C



FIG. 13D

【 図 1 4 】

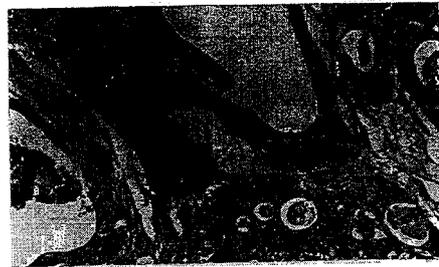


FIG. 14A



FIG. 14B



FIG. 14C

【 図 1 5 】

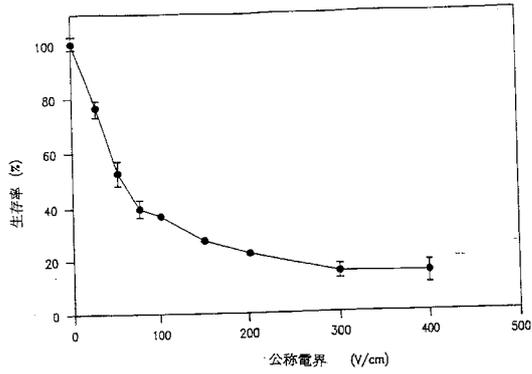


FIG. 15A

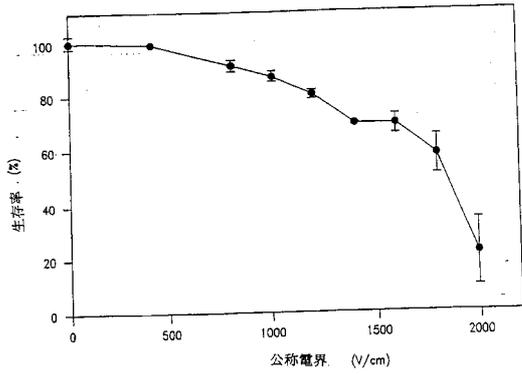


FIG. 15B

【 図 1 6 】

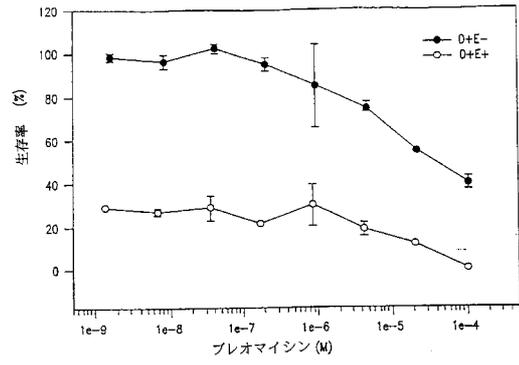


FIG. 16A

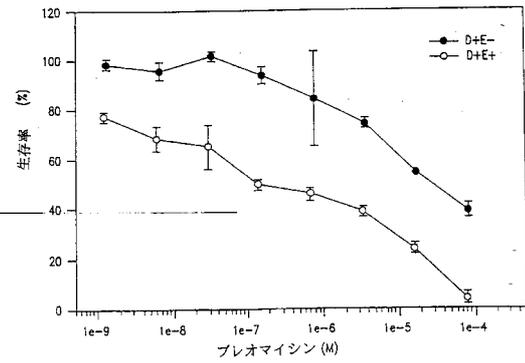


FIG. 16B

【 図 1 7 】

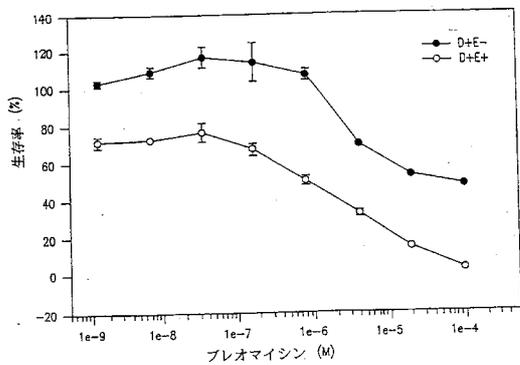


FIG. 17

## フロントページの続き

- (72)発明者 デブ, スケンデュ, ビー.  
アメリカ合衆国 92112 カリフォルニア州, サンディエゴ, フィオレ テラス ビー 215  
番 5205
- (72)発明者 ダイマー, スティーブン, シー.  
アメリカ合衆国 92082 カリフォルニア州, バリー センター, アリサ プレイス 313  
15
- (72)発明者 レヴァター -, ジェフリー, アイ.  
アメリカ合衆国 92067 カリフォルニア州, ランチョ サンタフェ, ランチョ サンタフェ  
ファームズ ロード 14450
- (72)発明者 ナンダ, ガーヴィンダー, エス.  
アメリカ合衆国 92122 カリフォルニア州, サンディエゴ, デコロ ストリート 4178  
, アpartment 72

審査官 大和田 秀明

- (56)参考文献 国際公開第96/039226(WO, A1)  
特開平07-100216(JP, A)  
特開平06-292684(JP, A)  
特開平05-049647(JP, A)  
特表平11-506630(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61N 1/30

专利名称(译)	使用电穿孔方法进行药物和基因分布的方法和装置		
公开(公告)号	<a href="#">JP4180285B2</a>	公开(公告)日	2008-11-12
申请号	JP2002057679	申请日	2002-03-04
[标]申请(专利权)人(译)	基因特伦尼克斯公司		
申请(专利权)人(译)	基因托罗尼克斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	基因托罗尼克斯公司		
[标]发明人	ホフマンガンターエイ デブスケन्दユビー ダイマースティーブンシー レヴァタジェフリーアイ ナンダガーヴィンダーエス		
发明人	ホフマン,ガンター,エイ. デブ,スケन्दユ,ビー. ダイマー,ステイーブン,シー. レヴァタ-,ジェフリー,アイ. ナンダ,ガーヴィンダー,エス.		
IPC分类号	A61N1/30 A61B17/34 A61B18/14 A61N1/00 A61N1/04 A61N1/05 A61N1/32		
CPC分类号	A61N1/0502 A61N1/325 A61N1/327 A61P35/00		
FI分类号	A61N1/30		
F-TERM分类号	4C053/HH03		
代理人(译)	中村 至		
审查员(译)	大和田英明		
优先权	08/905240 1997-08-01 US		
其他公开文献	JP2002291910A JP2002291910A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供用于体内电穿孔疗法的方法和装置。通过使用电穿孔疗法（EPT）在肿瘤中使肿瘤退化，并使用本发明的装置（100）通过电穿孔和化学治疗剂的组合来治疗肿瘤。在一个示例中，提供了利用低电压长度脉冲长度来杀死细胞的EPT方法。在一个实例中，用于临床电穿孔的系统包括针阵列电极（114），其具有确定治疗电压脉冲和/或选择性阵列切换模式的设定点的“关键”元件。许多电极施加器设计允许进入和治疗各种组织部位。在另一方面，提供了一种腹腔镜针头涂敷器，其优选地与内窥镜结合用于微创EPT。

