



Title	高分子担体を用いた固定化細胞の機能評価と細胞療法等への応用に関する研究
Author(s)	岡田, 直貴
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3128984">https://doi.org/10.11501/3128984</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

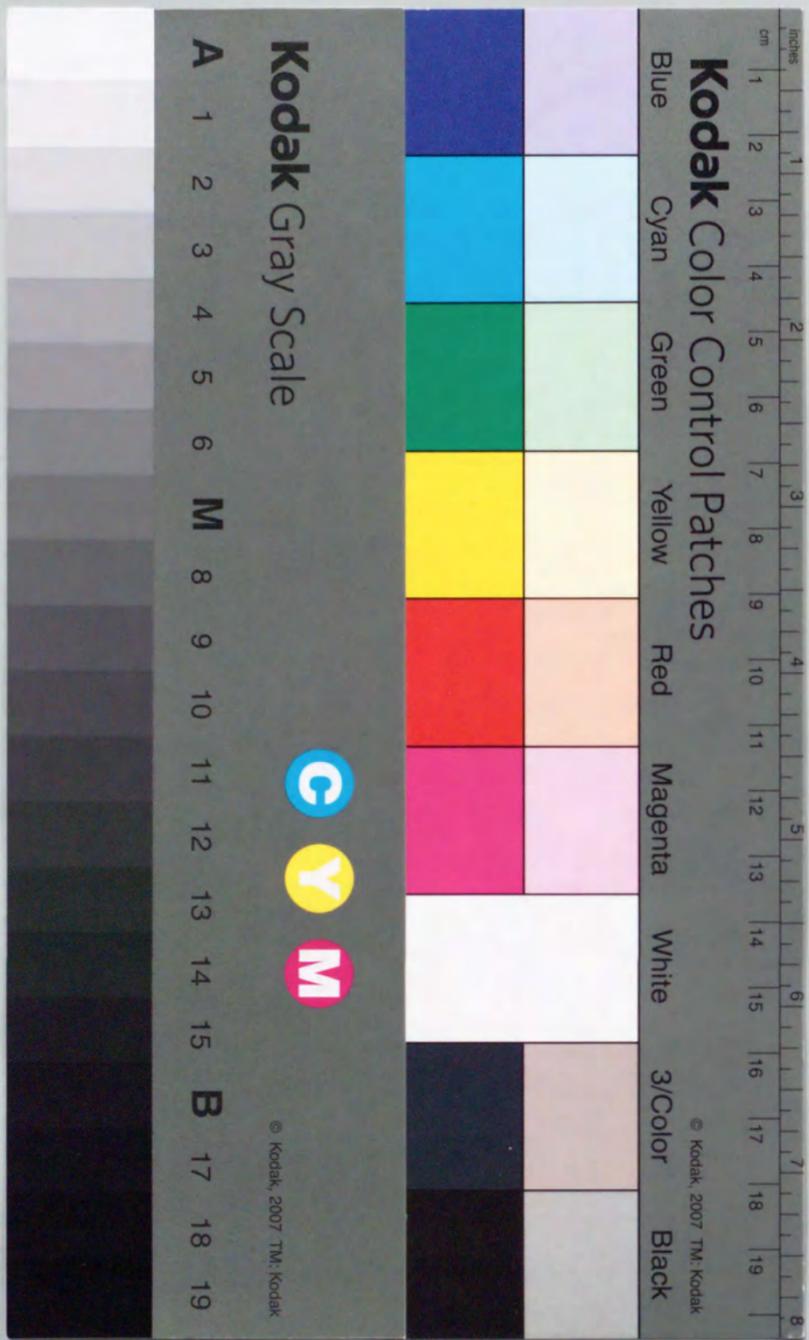
<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

高分子担体を用いた固定化細胞の機能評価と  
細胞療法等への応用に関する研究

1997年

岡田 直貴



①

高分子担体を用いた固定化細胞の機能評価と  
細胞療法等への応用に関する研究

1997年

岡田 直貴

## 目次

緒論	1
本論	4
第一章 細胞の固定化に用いる高分子担体の特性	4
第一節 アガロースマイクロビーズの特性	5
第二節 アルギン酸-ポリ(L)リジン-アルギン酸 (APA) マイクロカプセルの特性	8
第三節 小括	15
第二章 癌細胞封入アガロースマイクロビーズを用いた腫瘍誘導血管新生の新規 <i>in vivo</i> 評価系の開発	18
第一節 アガロースマイクロビーズに封入した A431 細胞の増殖と <i>in vivo</i> 血管新生誘導能	19
第二節 mouse hemoglobin enzyme-linked immunosorbent assay (mHb-ELISA) の確立と <i>in vivo</i> 血管新生の定量	22
第三節 癌細胞封入アガロースマイクロビーズ誘導血管の特性	26
第四節 小括	36
第三章 高分子担体を用いた固定化 SK2 細胞の機能評価と細胞療法への応用	38
第一節 <i>in vitro</i> における固定化 SK2 細胞の機能評価	38
第二節 固定化 SK2 細胞投与によるヒトインターロイキン-6 トランスジェニックマウスの病態改善	43
第三節 <i>in vivo</i> における固定化 SK2 細胞の機能評価	50
第四節 小括	53
第四章 細胞封入 APA マイクロカプセルの免疫原性と免疫隔離性	55
第一節 SK2 細胞封入 APA マイクロカプセルの投与に対するホストの免疫応答	55
第二節 APA マイクロカプセルの免疫隔離性	59
第三節 小括	62
総括	65
結論	68
謝辞	70
参考文献	71

## 緒論

近年の分子生物学の目覚ましい発展に伴い、構造・機能の点で高度に分化した細胞の集合体である生命体が、如何に複雑で巧妙な、そして合理的な機能を有しているかが、分子レベルで次第に明らかとなってきている。特に、生命体がホルモンやサイトカインをはじめとする生理活性物質を、必要なときに、必要な量だけ、必要な部位で如何に機能させているかは驚嘆すべきことであり、この一連の生命現象の中で、細胞は様々な制御・連関のもとに生理活性物質を合成・分泌し、生命体の恒常性の維持を実現させている。細胞に本来的に備わった生理活性物質のセンサー機能・生合成機能・徐放機能等の制御機構は、生理活性物質を薬物に見立てた場合、薬物治療の最適化を目指すDDS (drug delivery system: 薬物送達システム) を具現化したものであり、機能性・合理性という面から眺めると細胞に勝る製剤はないといっても過言ではない。現在行われている薬物療法の多くは、これら細胞間のネットワーク・ホメオスタシスを無視した治療法であるため、どうしても生体に負の作用をも及ぼすことになる。一方、細胞を介して疾病の治療を行う、いわば細胞療法 (cell therapy) ともいべき新しい概念による薬物治療は、生体内においてDDSの概念を日常的に実践している細胞の機能を最大限に利用したものであり、この治療法に適用する剤形は、いわば「細胞性製剤 (cytomedicine)」とも呼ぶべきものと言えよう。さらに遺伝子工学の進歩により、細胞に特定遺伝子を導入する技術の開発が進み、種々の機能を付与した機能性細胞の創製が可能となってきている。この機能性細胞を利用した細胞性製剤が次世代のDDS製剤として実現できれば、例えば、糖尿病患者に適用する細胞性製剤は「血中グルコース濃度の上昇を自らのセンサー機能により認識し、その濃度に応じてインスリンを放出し、一方で、グルコース濃度の低下に従ってインスリンの放出を停止する」といった高度知的製剤として、その機能を生体内で遺憾なく発揮してくれるであろう。このような細胞性製剤の出現によって、薬物療法の世界に革命がもたらされることは間違いない。

細胞性製剤の概念の原型は、輸血や臓器移植等に見られるように、*in vivo*における機能を維持した状態の細胞群を *in vitro*に取り出し、それをそのまま疾病治療の目的で再び生体に戻すという方法で従来より行われてきた。これらを第一世代の細胞性製剤とすれば、第二世代の細胞性製剤とは現在の遺伝子治療で用いられていると言えよう。即ち、現在の *ex vivo* 遺伝子治療は、生体より取り出した自己の細胞内に特定遺伝子を導入することで新たな機能性細胞を作製し、その機能性細胞を生体内へ投与した後、遺伝子発現によって合成・徐放された生理活性物質 (薬物) により、疾病を治療しようとするものである。本研究において最終目標とする第三世代の細胞性製剤とは、さらに知的付加価値を備えたものであり、第二世代のように自己細胞に導入した特定遺伝子の単純な発現を期待するだけでなく、そこに細胞の有するセンサー機能・制御機能を併せ持った機構のもとで生理活性物質を合成・徐放させようとするものである。

しかしながら、医薬品として有用な生理活性物質を合成・分泌する機能性細胞を、生体に直接投与して疾病治療を行おうとした場合、細胞をどのように製剤化するかが問題とな

り、生体内において高い安全性と安定性を保持した剤形に仕上げる必要がある。生命体は生物学的な自己を識別する特別なシステムとして免疫系を高度に進化させ、生体防御の中心的システムとしているため、同種異系 (allogeneic) あるいは異種 (xenogeneic) の機能性細胞を生体に直接投与すると、忽ちホストの免疫系により投与した細胞は拒絶され短時間でその機能を失うことは必至である。また、たとえ細胞性製剤に用いる機能性細胞が同種同系 (isogeneic) である場合においてさえ、何らかの修飾が施されたことによる抗原性発現の可能性は否めない。さらに、ホストと遺伝学および免疫学的に近縁な cell line の細胞を利用した場合には腫瘍原性も大きな問題となる。即ち、細胞性製剤を安定に機能させるためには、まず生体防御機構として欠くことのできない免疫系に影響を与えることなく、生体内で非自己の機能性細胞を長期間生存させるという矛盾した問題を解決しなければならず、その上で安全性をも考慮に入れた粒子設計が要求される。

そこで著者は、半透性の高分子物質を用いて機能性細胞を包括固定化し、物理的バリアーにより機能性細胞を免疫系から隔離することで、生体内で長期間生理活性物質を分泌する細胞性製剤の開発が可能になると考えた (Fig.1)。このストラテジーに応用する高分子担体は、内部に封入した細胞の生存・増殖に不可欠な酸素/二酸化炭素のガス交換や栄養物・老廃物の透過を制限することなく、封入細胞が産生・分泌する生理活性物質を外部へ自由に透過させ、封入細胞の外部への漏出と免疫担当細胞の内部への侵入を共に遮断する機能を有していなければならない。さらに、生体内で長期間安定であり、生体適合性にも優れている等の条件を併せ持つ必要がある。これらの条件がすべて満たされた高分子担体に機能性細胞を封入し生体に投与すれば、高分子担体の内部で細胞が生存し続ける間、Fig.1 に示すような細胞封入担体は生理活性物質の徐放化製剤として長期間有効に機能し得ると考えられる。さらに、細胞性製剤に適用する機能性細胞が生理活性物質の生合成および放出を外部環境のシグナルに応じて制御するセンサー機能を保持していれば、治療有効濃度の範囲で薬物を生体に供与する究極の DDS 製剤を開発することも夢ではない。

以上に示した細胞性製剤の概念を実現するためには、1) 細胞を傷つけることなく、如何に細胞内に生理活性物質の遺伝子等を導入し、細胞に DDS 製剤的機能を付与するか、2) 如何に細胞が有する諸機能を損なわずに高分子担体に包括固定化するか、3) 包括固定化した機能性細胞を如何に生体内で長期間安定に機能させるか、等の問題を解決しなければならない。1) に関しては、近年の遺伝子工学および細胞工学の格段の進歩により、近い将来、細胞への DDS 製剤的機能の付与が容易に行われるようになって考えられる。著者らの研究室においても、遺伝子やタンパク質を細胞内に効率良く安全に導入するベクターとして膜融合リポソームを開発し、種々機能性細胞の創製を行っている<sup>1-3)</sup>。従って本研究では、2)、3) の項目に関して検討し、機能性細胞を生体内で安定に長期間機能させるための細胞性製剤の粒子設計を行うこととした。細胞の固定化に用いる高分子担体にはアガロースマイクロビーズあるいはアルギン酸-ポリ(L)リジン-アルギン酸 (APA) マイクロカプセルを選択し、まずこれら高分子担体の特性に関する検討を行った。次に、癌細胞封入アガロースマイクロビーズを利用した腫瘍誘導血管新生の新規 *in vivo* 評価系の確立を試みると共に、高分子担体に封入した allogeneic あるいは xenogeneic な細胞を投与することで、細胞の

産生・分泌する生理活性物質を生体に作用させることが可能であるかを検討した。さらには、抗体産生細胞を封入したアガロースマイクロビーズあるいは APA マイクロカプセルを細胞療法へ応用し、高分子担体と機能性細胞を用いた細胞性製剤の実現の可能性に関して検討を行った。

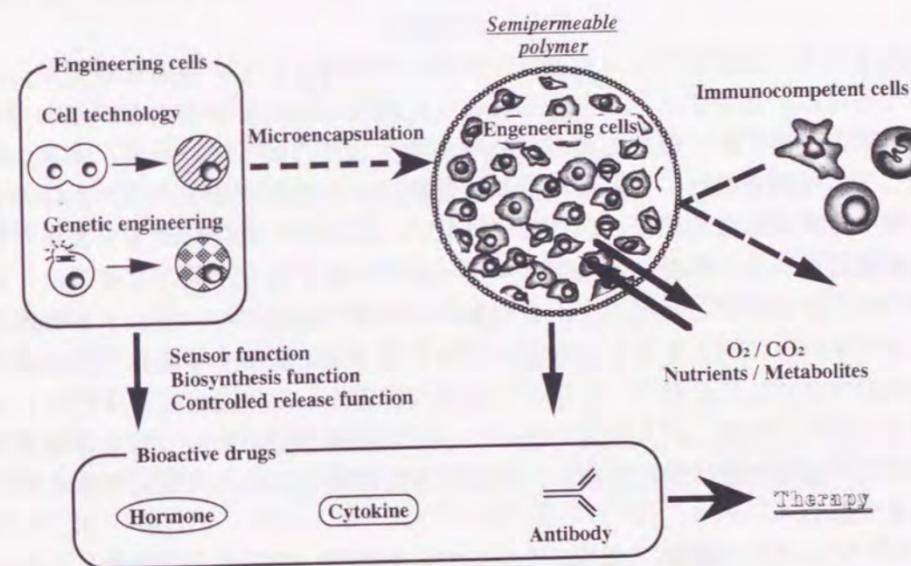


Fig.1 Strategies of medical application using microencapsulated cells "CYTOMEDICINE"

## 本論

### 第一章 細胞の固定化に用いる高分子担体の特性

生命体は、機能的にも形態的にも異なる様々な細胞の有機的な統合体であり、各細胞間の協調的な増殖・分化によりホメオスタシスを維持形成している。このホメオスタシスを統制するために、生体内では数多くの細胞間情報伝達物質により、種々のネットワークが形成されている。これらのネットワークの中心を担っているのは言うまでもなく細胞自身であり、細胞は自身が有する細胞内シグナル伝達機構や細胞内物質挙動制御機構等で構成されているセンサー機能を駆使して、生理活性物質の生合成および放出の量並びにタイミングをコントロールしている。このように DDS を生体内で理想的に且つ具体的に遂行している細胞を、細胞性製剤として開発することはまさに究極の薬物療法を開拓することにならない。

機能性細胞を生体に直接投与し、生理活性物質の供与体としての機能を長期間に渡って維持させるためには、まずホストの免疫系による拒絶反応を回避することが必須である。近年、臓器移植の発展に伴い優れた免疫抑制剤が開発されてきてはいるが、本来、生体の防御機構としての役割を果たしている免疫系を薬物により修飾することは、生体のホメオスタシスの破壊に繋がるため望ましいことではない。従って、免疫抑制剤を使用しない方法で機能性細胞をホストの免疫系から隔離する手段が必要となる。そこで著者は、免疫担当細胞をはじめとする生体防御因子による攻撃から保護するために、投与する機能性細胞を半透性の高分子担体に封入することを選択した。本方法に使用する高分子担体は、封入した細胞に傷害を与えること無く、安全性・生体内安定性・生体適合性に優れているものでなければならない。また、封入細胞の生存に必要な栄養や酸素および封入細胞が放出する生理活性物質や老廃物は自由に透過し、且つ生体防御因子の侵入を阻止するという条件を満たす必要がある。

近年、ハイブリッド人工臓器（あるいはバイオ人工臓器）の分野の目覚ましい進歩に伴い、生体より単離した組織・細胞（膵ランゲルハンス島<sup>4-21</sup>・肝細胞<sup>22-31</sup>・甲状腺細胞<sup>32</sup>・副甲状腺細胞<sup>33-35</sup>・副腎皮質細胞<sup>36</sup>・脳下垂体細胞<sup>37-40</sup>・胸腺細胞<sup>41</sup>・腎臓細胞<sup>42</sup>等）を様々な高分子担体を用いて固定化する方法が開発されている。その中でも、アガロースマイクロビーズとアルギン酸-ポリ(L)リジン-アルギン酸 (APA) マイクロカプセルは最も汎用されている代表的な高分子担体であるが、それらを応用したハイブリッド人工臓器の *in vitro* および *in vivo* における機能あるいは有効性を示した報告と比較して、両高分子担体の強度・物質透過性等の構造的・機能的特性<sup>43-56</sup>あるいは細胞傷害性・生体適合性等の生物学的特性<sup>57-69</sup>に関する詳細な報告は少なく、また研究者によって見解が異なる。そこでまず本章では、アガロースマイクロビーズおよび APA マイクロカプセルの特性に関して詳細な検討を行い、これらが細胞性製剤の粒子設計に応用するための条件を具備しているかについて評価することとした。

### 第一節 アガロースマイクロビーズの特性

アガロースは寒天の主成分を成す多糖で、{D-ガラクトシル-( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)-3,6-アンヒドロ-L-ガラクトシル-( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)}<sub>n</sub>の構造を有する。濃度 1%程度以上の溶液を室温に冷やすとゲルとなり、このゲルは多糖鎖間の水素結合が形成する大きな網目構造を有しているため、高分子物質でも比較的自由に拡散することが可能である。このアガロースゲルを成型したマイクロビーズを Nilsson ら<sup>70-72</sup>が初めて細胞の固定化材料として適用した。

本節では、まずアガロースマイクロビーズの表面および内部構造を走査型電子顕微鏡で観察し、構造的特性を評価した。また、アガロースマイクロビーズの物質透過性に及ぼすアガロース濃度の影響、さらにはアガロースマイクロビーズの生体適合性・生体内安定性に関して検討を行った。

#### 実験材料と方法

##### (1) アガロースマイクロビーズの調製

Nilsson ら<sup>70-72</sup>の方法を若干改変して行った。AGAROSE-LGT<sup>®</sup> (ナカライテスク) を Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) に溶解し 37°C に保温した。このアガロース溶液にあらかじめ 37°C に保温しておいた流動パラフィン (code No. 261-37, ナカライテスク) を加えてエマルジョンとし、氷水中で急冷することによりアガロースの液滴をゲル化させた。Hanks' balanced salt solution (HBSS) でアガロースマイクロビーズを洗浄し、流動パラフィンを完全に除去した。

##### (2) アガロースゲルの物質透過性の評価

円筒の下部に孔径 0.45  $\mu$ m のテフロン膜を張ったインターセル (クラボウ) にアガロース溶液を 150  $\mu$ l 添加し、底面に均一なゲルを形成させた。これを 24 穴培養プレートにセットし、インターセル (ドナー側) に 10 mg/ml に調製したシトクロム C (M.W.=13,000, Sigma), ウシ血清アルブミン (BSA; M.W.=67,000, Sigma) あるいはウシ  $\gamma$ -グロブリン (M.W.>150,000, Sigma) を 50  $\mu$ l 添加した。また、24 穴培養プレート (レセプター側) には PBS を 700  $\mu$ l/well 加え、室温でプレートを 70 rpm で振盪して透過実験を行った。72 時間後に、レセプター側に透過してきた各タンパク濃度を Bio-Rad protein assay kit (dye-binding assay, Bio-Rad) により定量した。

##### (3) アガロースマイクロビーズの生体適合性・生体内安定性の評価

3 ml のアガロースマイクロビーズを 5 週齢の ddY 雌性マウス (清水実験材料) の腹腔内に 18G の注射針を用いて投与した。投与直後および投与 30, 60 あるいは 90 日後にマウスを開腹し、回収できたマイクロビーズ量の測定とマイクロビーズ表面の fibrosis を観察した。

実験結果および考察

アガロースマイクロビーズの走査型電子顕微鏡写真を Fig.2 に示す. 2.5%, 5%, 7.5% の濃度で作製したアガロースマイクロビーズの表面は滑らかであり, 網目構造が確認できた. また, アガロースマイクロビーズは中心部まで均一なゲルにより形成されており, 細胞を封入した場合, 個々の細胞がアガロースゲルに包括されるため, 増殖や移動といった細胞運動がある程度制限されるほか, 接着依存性の増殖を示す細胞の固定化にこの方法が適さないことが示唆された. データには示していないが, どの濃度のアガロースマイクロビーズも非常に高い強度を有しており, 60 分間の超音波処理に対して 100% の抵抗性を示した.

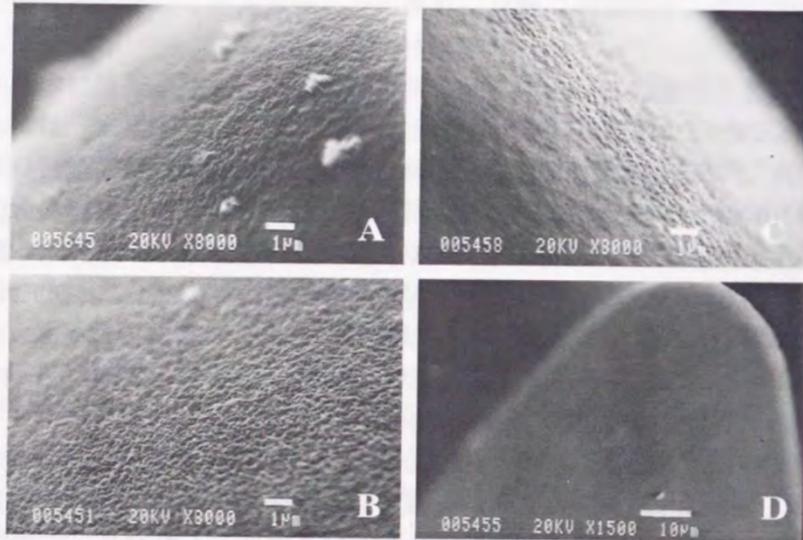


Fig.2 Structural properties of agarose microbeads. The surface finish (A, B, C) and the cross section (D) of the agarose microbeads were assessed by scanning electron microscopy. The concentration (w/v) of agarose hydrogel was (A): 2.5%; (B): 5%; (C, D): 7.5%.

アガロースゲル膜の物質透過性とアガロース濃度との関係を Fig.3 に示す. アガロース濃度の上昇に伴いアガロースゲル膜の物質透過性が制限を受けたことから, アガロースマイクロビーズの物質透過性がアガロース濃度に依存する網目構造の粗密により制御されることが示され, この結果は Iwata ら<sup>43,73)</sup>の報告に一致した. また, 先にも述べた細胞運動の制限が, 高濃度のアガロースで調製した網目構造の密なマイクロビーズにおいて顕著であろうことも推察された.

次に, アガロースマイクロビーズの生体適合性および生体内安定性を *in vivo* で検討した. ddY マウスの腹腔内に投与された 2.5% アガロースマイクロビーズ表面を観察すると,

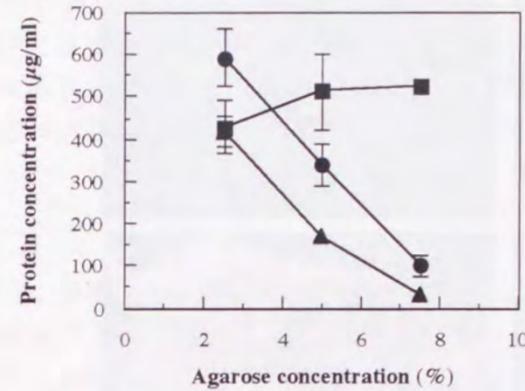


Fig.3 Permeability of agarose hydrogel. Three proteins of different molecular weights: cytochrome-C (M.W.=13,000; ●), BSA (M.W.=67,000; ■) and γ-globulin (M.W.≥150,000; ▲), were tested for their permeabilities to agarose hydrogel. The test was performed in triplicate and each data point represents the mean±SD.

投与後 30 日目では僅かな宿主細胞の接着を認めたに過ぎなかったが, 投与後 60 日目以降では宿主細胞がマイクロビーズ表面を覆い尽くしており顕著な fibrosis を認めた

(Table 1 および Fig.4-A, B, C). また, 腹腔内からのマイクロビーズの回収率は非常に低く (Table 1), 投与したアガロースマイクロビーズの大半がマウス下腹部の脂肪組織内に取り込まれているのが観察された (Fig.4-D). 尚, データには示していないが, アガロースマイクロビーズの生体適合性・生体内安定性はアガロース濃度に影響されなかった. 以上の結果から, アガロースマイクロビーズは生体内で分解を受けることなく安定に存在するが, 組織中への取り込みやビーズ表面での fibrosis が起こることから, ホスト細胞との相互作用が大きいことが判明した. Spargo ら<sup>57)</sup>および Cadic-Amadeuf ら<sup>61)</sup>も腹腔内に投与したアガロースマイクロビーズに起炎性があることを認めており, アガロースに混入する不純物あるいは調製段階でマイクロビーズ内に封じ込められた流動パラフィンがその原因であろうと考えられた.

Table 1 Biostability and biocompatibility of 2.5% agarose microbeads

day <sup>a)</sup>	recovery rate (%)	fibrosis score <sup>b)</sup>
0	83 ± 8	-
30	7 ± 7	±
60	12 ± 3	+
90	3 ± 1	+

a): Days after i.p. injection

b): (-) non-fibrosis, (±) slight fibrosis, (+) severe fibrosis

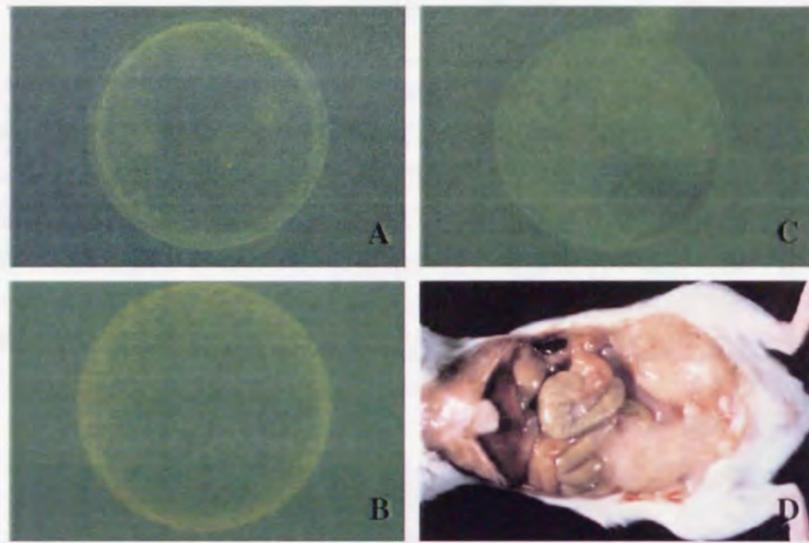


Fig. 4 Micrograph of agarose microbeads retrieved from peritoneal cavity of ddY mice. 2.5% (w/v) agarose microbeads were intraperitoneally injected into ddY mice and retrieved at day 30 (A), 60 (B) and 90 (C, D) post-injection. Photographed with phase contrast microscopy (A, B, C) or stereoscopic microscopy (D).

本節の検討により、アガロースマイクロビーズは長期間に渡る生体適合性に関して改善の余地を残してはいるものの、物質透過性の制御が可能であり、生体内で安定であり、さらに、その優れた強度を生かして様々な投与部位の選択が可能となる高分子担体であることが判明した。

## 第二節 アルギン酸-ポリ(L)リジン-アルギン酸 (APA) マイクロカプセルの特性

アルギン酸はマンヌロン酸とグルロン酸からなるポリアニオンで、グルロン酸がカルシウムイオンなどの二価カチオン、あるいはアルミニウムイオンなどの三価のカチオンとキレート結合することにより容易にゲル化する<sup>52,74</sup>。従って、アルギン酸ナトリウム溶液を塩化カルシウム溶液などのカチオン溶液に滴下するだけで固定化粒子が得られる。しかしながら、アルギン酸マイクロビーズは培地中あるいは生体内に存在する負の荷電をもったリン酸イオン等により、多価カチオンとのキレート結合が解かれるとゲルが容易に崩壊してしまう。この欠点を克服したのが Sun ら<sup>75-77</sup>によって開発されたアルギン酸-ポリ(L)リジン-アルギン酸 (APA) マイクロカプセルである。アルギン酸マイクロビーズをポリカチオンであるポリ(L)リジン (PLL) 溶液に沈めると、静電的相互作用によりアルギン酸ゲル表面に強固なアルギン酸-PLL 膜を形成する。さらに、アルギン酸溶液に浸すことで PLL の過剰な正荷電を中和し、アルギン酸-PLL-アルギン酸の三層膜を形成させる。最後に、物質移動抵抗を低減させ細胞の増殖スペースを拡大する目的で、内部のアルギン酸ゲ

ル部分をクエン酸溶液で溶解し APA マイクロカプセルとする。

本節では、様々な分子量の PLL を用いて APA マイクロカプセルを調製し、強度および粒子径に及ぼす PLL の分子量の影響に関して検討を行った。また、APA マイクロカプセルの表面および APA 膜構造を走査型電子顕微鏡で観察した。さらに、APA 膜の物質透過性および APA マイクロカプセルの生体適合性・生体内安定性を評価した。

## 実験材料と方法

### (1) APA マイクロカプセルの調製

Sun ら<sup>75-77</sup>の方法を若干改変して行った。air jet syringe pump droplet generator を用いて 1.8% (w/v) アルギン酸溶液 (Kelton LVCR<sup>®</sup>, Kelco Division of Merck & Co.) を 1.5% CaCl<sub>2</sub> 溶液中へ滴下した。アルギン酸マイクロビーズを様々な分子量の PLL (Sigma) の 0.1% (w/v) 溶液中で 10 分間穏やかに攪拌し、続いて 0.03% (w/v) アルギン酸溶液中で 4 分間穏やかに攪拌した。得られた APA マイクロビーズを 55 mM クエン酸溶液中で 5 分間穏やかに攪拌し、内部のアルギン酸カルシウムゲルを溶解することで APA マイクロカプセルとした。尚、操作は全て室温で行い、各操作の間では生理食塩水による洗浄を 3 回行った。また、APA 膜をより厚く、強固にする目的で、クエン酸溶液処理前に再度 0.1% PLL 溶液および 0.03% アルギン酸溶液による処理を繰り返した APA マイクロカプセルも併せて調製した。以後、0.1% PLL 溶液および 0.03% アルギン酸溶液による処理を 1 回行ったカプセルを PLL1 回処理 APA マイクロカプセル、2 回行ったカプセルを PLL2 回処理 APA マイクロカプセルと略記する。

### (2) APA マイクロカプセルの強度評価および粒子径測定

20 個の APA マイクロカプセルを生理食塩水に懸濁し、超音波処理 (Bransonic 220) により破壊されたマイクロカプセル数を計測することで強度を評価した。また、APA マイクロカプセルの直径は位相差顕微鏡下で測定した。

### (3) APA 膜の物質透過性の評価

取り扱いを簡便にする目的で、直径約 2 mm のアルギン酸ビーズから、(1)の操作に従ってサイズの大きな APA カプセルを作製した。2 個の APA カプセルを 5 mg/ml に調製したシトクロム C、BSA あるいはウシγグロブリンの各溶液中に浸し、50 回/分で前後に振盪した。24 時間後に APA カプセルを回収・洗浄し、250 μl の生理食塩水中で破壊した。上清中のシトクロム C 濃度は波長 415 nm の吸光度により、また他の 2 種のタンパク濃度は Bio-Rad protein assay kit により定量した。

### (4) APA マイクロカプセルの生体適合性および生体内安定性の評価

2 ml の APA マイクロカプセルを 5 週齢の ddY 雌性マウスの腹腔内に 18G の注射針を用いて投与した。投与直後および投与 30、60 あるいは 90 日後にマウスを開腹し、回収で

きたマイクロカプセル量の測定とマイクロカプセル表面の fibrosis を観察した。

### 実験結果および考察

APA マイクロカプセルの強度と用いた PLL の分子量の関係を Fig.5 に示す。PLL1 回処理 APA マイクロカプセルでは、分子量 9,000 の PLL で作製したカプセルの強度が最も低く、2 分の超音波処理で 20 個すべてのカプセルが破壊された。また、分子量 22,400 の PLL を用いた APA マイクロカプセルの強度が最も高く、用いた PLL の分子量が増大するに従って強度は低下する傾向が観察された。そこで、最も強度の優れた APA マイクロカプセルが得られた分子量 22,400 の PLL を用いて PLL2 回処理 APA マイクロカプセルを調製したところ、同分子量の PLL1 回処理 APA マイクロカプセルを凌ぐ非常に高い強度を有しており、60 分間の超音波処理後も破壊されたカプセルは 20 個中僅か 2~3 個であった。

PLL の分子量と APA マイクロカプセルの粒子径の関係を Fig.6 に示す。どの APA マイクロカプセルもアルギン酸マイクロビーズと比較して粒子径の増大が観察された。また PLL1 回処理 APA マイクロカプセルでは、分子量 56,000 の PLL を用いた場合が最も小さなカプセルとなり、それ以上分子量が増大しても減少しても粒子径の増大が認められた。PLL (M.W.=22,400) 2 回処理 APA マイクロカプセルは、どの PLL1 回処理 APA マイクロカプセルよりも粒子径が小さく 400~450  $\mu\text{m}$  であった。

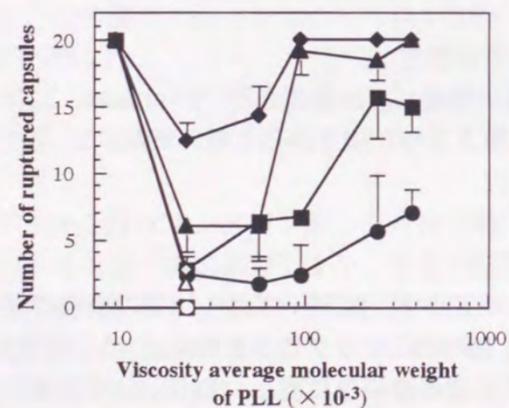


Fig.5 Effect of molecular weight of PLL on the mechanical strength of the APA microcapsules. APA microcapsules were prepared from alginate microbeads with PLL-treatment once (●, ■, ▲, ◆) or twice (○, □, △, ◇). Sonication time was (●, ○): 2 min; (■, □): 10 min; (▲, △): 30 min; (◆, ◇): 60 min. The test was performed in triplicate and each data point represents the mean $\pm$ SD.

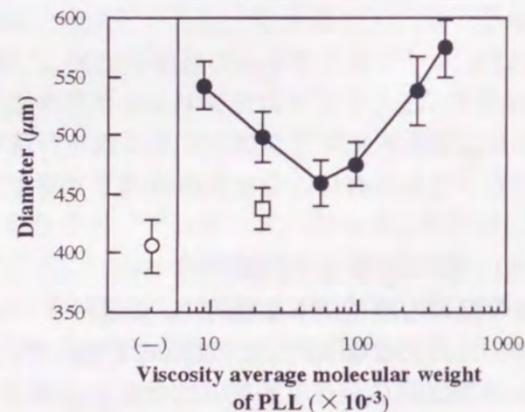


Fig.6 Effect of molecular weight of PLL on the final size of the APA microcapsules. APA microcapsules were prepared from alginate microbeads (○) with PLL-treatment once (●) or twice (□). The capsule size was measured under a phase contrast microscope. Each data point represents the mean $\pm$ SD of 10 samples.

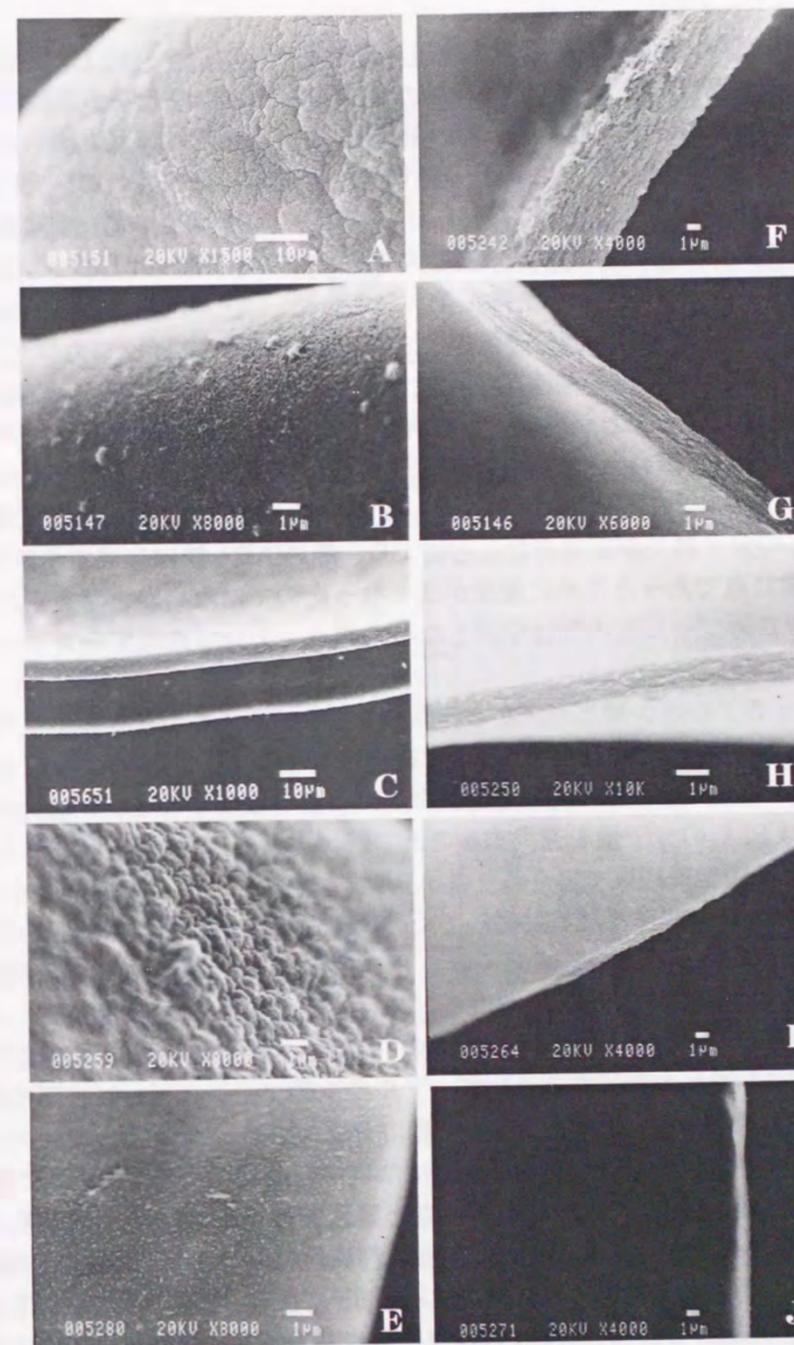


Fig.7 Structural properties of APA microcapsules. APA microcapsules were prepared from alginate microbeads with PLL-treatment once (D-J) or twice (A-C). The surface finish (A, B, D, E) and the membrane thickness (C, F-J) of the APA microcapsules were assessed by scanning electron microscopy. M.W. of PLL was (A-C, G): 22,400; (D, F): 9,000; (H): 56,000; (I): 95,100; (E, J): 243,000.

APA マイクロカプセルの走査型電子顕微鏡写真を Fig.7 に示す。PLL1 回処理 APA マイクロカプセルの表面は分子量 9,000 を用いた場合のみ小さな隆起を多数認められたが、分子量 243,000 の PLL をはじめ、他の分子量の PLL を用いた場合はどれも滑らかであった (Fig.7-D, E)。また、用いた PLL の分子量増大に伴って、形成される APA 膜は薄くなることも明らかとなった (Fig.7-F, G, H, I, J)。PLL (M.W.=22,400) 2 回処理 APA マイクロカプセルの表面も滑らかであり、強拡大するとアルギン酸-PLL コンプレックスが形成する網目構造が観察された (Fig.7-A, B)。さらに、このカプセルの膜厚が約 20  $\mu\text{m}$  であることを認め (Fig.7-C)、同分子量の PLL1 回処理 APA マイクロカプセルの膜厚の約 10 倍であったことから、厚い強固な膜を有した APA マイクロカプセルの調製が PLL2 回処理によって可能であることが視覚的に証明された。APA 膜の厚さは Fig.5 の結果と非常に良く相関しており、厚い APA 膜を有するカプセルの強度が高いという傾向が示された。しかし、分子量 9,000 の PLL で調製した APA マイクロカプセルのみこの傾向に従わず、これは PLL の分子鎖長が短過ぎたことにより、厚い APA 膜は形成するがアルギン酸-PLL 結合が非常に粗であったために強度が低くなったのではないかと考えられた。また、どの APA マイクロカプセルも内部は空洞となっており、十分な細胞増殖スペースの存在が確認された。

次に直径 2 mm のアルギン酸ビーズから作製した APA カプセルを用いて、PLL の分子量と APA 膜の物質透過性の関係について検討を行った (Fig.8)。用いた PLL の分子量が増大するに連れて、APA カプセル内への透過タンパク量は減少することが認められ、APA 膜の物質透過性は PLL の分子量を選択することで制御できることが示された。しかし、この結果と走査型電子顕微鏡観察で得られた各 APA マイクロカプセルの膜厚とを照らし合わせると、APA 膜の厚さが薄くなるに従ってその物質透過性が制限されるという、予想に反した現象が認められた。そこで、高分子量の PLL で作製した薄い APA 膜が物質透過性を大きく制限する理由を、PLL 処理におけるアルギン酸マイクロビーズと PLL の反応様式に求めた。高分子量の PLL はアルギン酸マイクロビーズ内部への拡散が制限され、その結果として薄い APA 膜しか形成できないが、アルギン酸マイクロビーズ表面は高分子量の PLL によって密に架橋されるため、低分子量の PLL を用いた場合と比較して、より微細な網目構造を持つ APA 膜が形成されたのではないかと推察された。この点に関しては、APA 膜の分子密度を評価する等の更なる検討を必要とする。一方、PLL (M.W.=22,400) 2 回処理 APA カプセルは、同分子量の PLL1 回処理 APA カプセルと比較して物質透過性が制限されることが明らかとなった。この結果は、同一の PLL を使用していることから、APA 膜の網目構造よりもむしろ APA 膜の厚さに依存した現象であろうと考えられた。

以上の APA マイクロカプセルの構造的・機能的特性の検討から、APA マイクロカプセルの粒子径は APA 膜の強度と物質透過性のバランスに依存することが示された。APA マイクロカプセル調製に伴う粒子径の増大は、クエン酸溶液処理後に認められる現象であることから、カプセル内部のアルギン酸カルシウムゲルの溶解により生じた浸透圧のためカプセル内部へ水が流入したことにより起ると考えられ、このカプセルの膨張は APA 膜が強固であり、且つ内部のアルギン酸の除去が速やかに為されれば起こりにくいと推察され

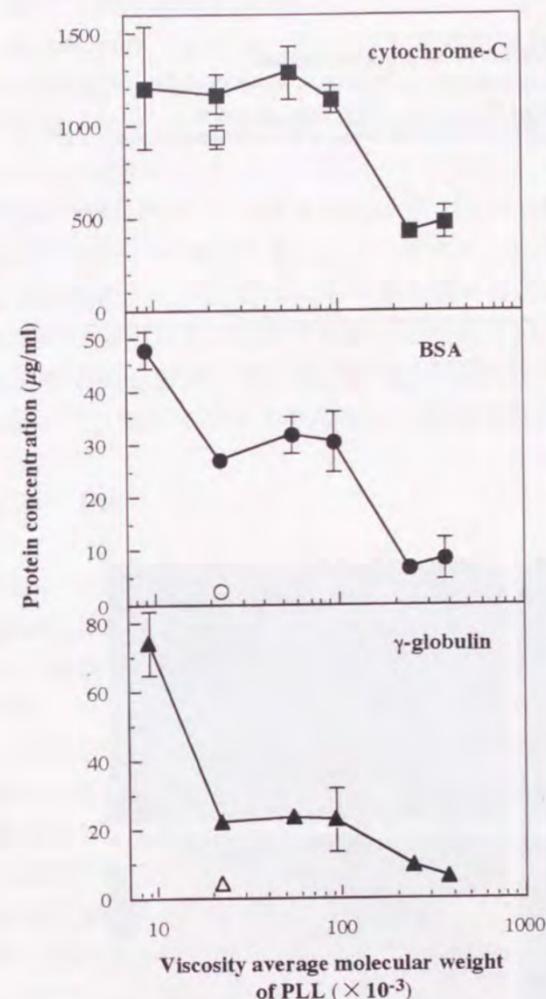


Fig.8 Permeability of APA membranes. Three proteins of different molecular weights: cytochrome-C (M.W.=13,000; ■, □), BSA (M.W.=67,000; ●, ○) and  $\gamma$ -globulin (M.W. $\geq$ 150,000; ▲, △), were tested for their permeabilities to APA membrane. APA capsules were prepared from alginate beads (about 2 mm in diameter) with PLL-treatment once (■, ●, ▲) or twice (□, ○, △). The test was performed in triplicate and each data point represents the mean $\pm$ SD.

た。即ち、分子量の大きな PLL を用いて調製した APA マイクロカプセルでは、強度が低く薄い APA 膜が形成され、その物質透過性も極めて制限されるため粒子径が大きくなる。一方、分子量の小さな PLL を用いると厚く強固な APA 膜の形成が為され、その物質透過性も良好であるために粒子径の小さな APA マイクロカプセルが調製可能である。例外的に、PLL (M.W.=22,400) 2 回処理 APA マイクロカプセルは物質透過性が制限されているにもかかわらず最も小さな粒子径を示したが、これは非常に厚く強固な APA 膜の形成によりカプセルの膨張が阻止されたためであろうと考えられた。

最も強度に優れた PLL (M.W.=22,400) 2 回処理 APA マイクロカプセルの生体適合性および生体内安定性を検討したところ、投与 30, 60 あるいは 90 日後のいずれにおいても投与量の 70%以上の APA マイクロカプセルがマウス腹腔内から intact な状態で回収可能

Table 2 Biostability and biocompatibility of APA microcapsules

day <sup>a)</sup>	recovery rate (%)	fibrosis score <sup>b)</sup>
0	83 ± 10	-
30	75 ± 10	-
60	85 ± 13	-
90	73 ± 3	-

<sup>a)</sup> Days after i.p. injection

<sup>b)</sup> (-) non-fibrosis, (±) slight fibrosis, (+) severe fibrosis

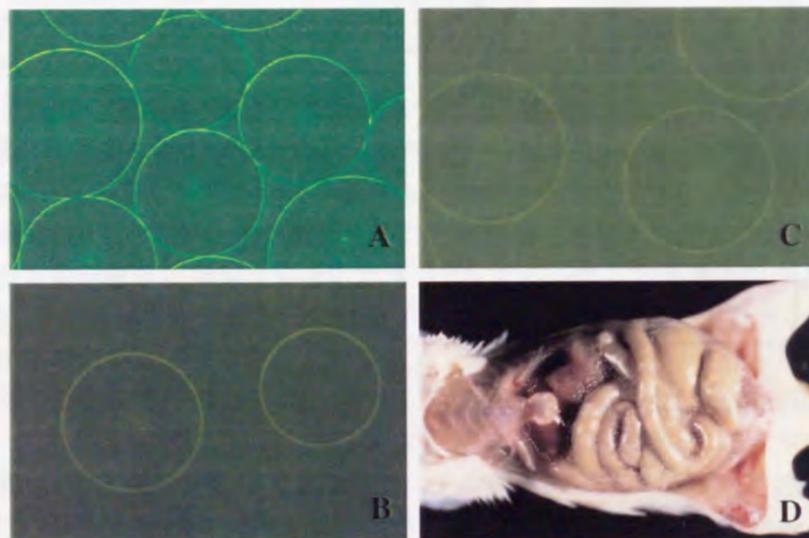


Fig.9 Micrograph of APA microcapsules retrieved from peritoneal cavity of ddY mice. APA microcapsules were intraperitoneally injected into ddY mice and retrieved at day 30 (A), 60 (B) and 90 (C, D) post-injection. Photographed with phase contrast microscopy (A, B, C) or stereoscopic microscopy (D).

であった (Table 2 および Fig.9-D) . この結果は、投与した直後での回収率が 80%程度であることを考慮すると、少なくとも 3ヶ月間はほぼすべての APA マイクロカプセルが腹腔内で安定に存在していたことを示している。また、カプセル表面への宿主細胞の接着および fibrosis は認められず、PLL (M.W.=22,400) 2 回処理 APA マイクロカプセルは極めて優れた生体適合性を有していることが確認された。尚、データには示していないが、マウス腹腔内に投与した APA マイクロカプセルの回収量は強度に密接に関係してお

り、恐らく強度の低い APA マイクロカプセルは投与操作中の外力に耐えきれなかったものと考えられた。しかし、どの PLL で調製された APA マイクロカプセルも、球形を維持したまま回収されたカプセルの表面には fibrosis を認めなかったことから、APA マイクロカプセルはホストに炎症反応・異物反応を誘導しない優れた生体適合性を有した高分子担体であることが示された。

本節の検討において、APA マイクロカプセルは細胞性製剤に応用するための条件をほぼ満足する高分子担体であることが示された。しかしながら、APA マイクロカプセルはその構造上の性質からアガロースマイクロビーズと比較して強度に劣るため、皮下あるいは組織内等の比較的圧力のかかる部位への投与には不適であることも判明した。今後、カプセル強度を高める方法の探索並びに投与方法の工夫によりこの問題点を克服することで、より APA マイクロカプセルを応用した細胞性製剤の適用範囲が広がるものと思われる。

### 第三節 小括

薬物、生理活性物質あるいは酵素等を高分子担体内に封入し、生体内でこれらの徐放化を達成しようとする DDS 製剤の開発は古くから行われてきた<sup>78-80)</sup>。しかしこの徐放化製剤は、担体内へ封入できる薬物量に限界があり、またその放出制御が行われないという欠点を有している。そこで著者は、これらの問題点を解決した新規 DDS 製剤の開発にあたって、生体内で生理活性物質の合成・放出・作用を見事に DDS の概念に従って実践している細胞の機能に着目した。即ち、細胞粒子自身を製剤として生体に適用できれば、そのセンサー機能を生かして薬物の放出を治療有効濃度範囲内で制御し、且つ半永久的に薬物供与体として機能する究極の DDS 製剤が実現されると考えた。しかし、緒論でも述べたとおり生体は高度に進化させた免疫系により非自己と認識する細胞・組織は排除してしまうため、細胞を生体に投与して治療効果を得るには投与する細胞を免疫系から保護するための製剤化が必要である。そこで本研究においては、投与した細胞をホストの免疫系から隔離する手段として高分子担体内に細胞を封入する方法を選択し、細胞性製剤の開発を試みた。

固定化細胞が分泌する生理活性物質を生体に作用させることを想定した場合、まず細胞の固定化に用いる高分子担体の特性を検討し、最適な条件を備えた高分子担体を選択することが必要である。細胞の固定化に用いる担体には、1) 担体自身に細胞傷害性・起炎性がないこと、2) 固定化操作において過激な反応条件 (細胞に傷害を与える温度、毒性を持つ反応補助剤の使用等) が存在しないこと、3) 固定化操作が短時間で終わること、4) 担体が化学的・物理的に安定であり、生体内で容易に分解および破壊されないこと、5) 物質の透過が制御可能であること、等の様々な条件を兼ね備えている必要がある。近年盛んに研究されているバイオリクターあるいはハイブリッド人工臓器の開発に伴って、現在までに細胞を包括固定化する方法として、マイクロビーズ法<sup>70-72,81-88)</sup>・マイクロカプセル法<sup>44-46,75-77,89-105)</sup>・hollow fiber 法<sup>106-113)</sup>・diffusion chamber 法<sup>110,114-118)</sup>等が確立されており、細胞の固定化に用いる材料も天然高分子物質 (アガロース<sup>70-72,87)</sup>・アルギン酸<sup>16,44-46,75-77,81-85,99-101)</sup>・キトサン<sup>46,72,88-90,104,105)</sup>・フィブリン<sup>70,87)</sup>等) および人工高分子物質

(HEMA-MMA<sup>95-97,103</sup>)・PAN/PVC<sup>108-110</sup>)・Eudragit-RL<sup>82,92-95</sup>)・XM-50<sup>106</sup>)・AN69<sup>111,112</sup>)等)と様々である。本研究においては、固定化操作が容易であり細胞に毒性を示さないという観点から、アガロースとアルギン酸を細胞性製剤開発のための高分子担体の成分として選択し、また高分子担体の形状には表面積/体積比が大きいため担体内と外部環境との間の物質交換が為され易いと考えられるマイクロビーズおよびマイクロカプセルを選択した。本章ではまず、調製したアガロースマイクロビーズおよびAPAマイクロカプセルの構造的・機能的・生物学的特性に関して詳細な検討を行った。

細胞性製剤の開発に用いる高分子担体は、封入細胞の生存・増殖に不可欠な酸素や栄養物等を自由に透過し、比較的高分子量の免疫系エフェクター分子である抗体や補体の透過および免疫担当細胞の侵入を阻止することが望ましい。さらに、封入細胞の産生・分泌する生理活性物質を生体へ作用させるためには、当然ながら高分子担体からの生理活性物質の放出が為されなければならない。しかしながら、薬物となる生理活性物質の分子サイズは細胞性製剤を適用する疾病に応じて様々であり、また高分子担体に封入して生体に投与する細胞とそれを投与される宿主との遺伝学的あるいは免疫学的背景の組合せにより要求される免疫隔離性も異なることから<sup>119-121</sup>)、高分子担体の物質透過性は制御可能であることが必要とされる。本章における透過実験の結果から、アガロースマイクロビーズはアガロース濃度を、APAマイクロカプセルはPLLの分子量をそれぞれ選択することにより、適用目的に応じた物質透過性の制御が可能であることが示された。また高分子担体には、至適な物質透過性を保持しつつ、生体内へ投与する操作中および生体内に存在する間の機械的・物理的外力に対して耐え得るだけの強度が必要とされる。データには示していないが、どのアガロース濃度で調製したアガロースマイクロビーズも60分間の超音波処理に対して抵抗性を示し、非常に高い強度を有していた。一方、APAマイクロカプセルの強度はPLLの分子量に依存しており、高分子量のPLLを用いて調製した極めて物質透過性を制限するAPAマイクロカプセルは、生体への投与操作に耐え得るだけの強度を保持していなかった。本研究では、カプセル強度に主眼をおいたAPAマイクロカプセルの改良として、その調製段階でアルギン酸マイクロビーズをコートするPLLおよびアルギン酸による処理を2回ずつ行う方法を提示した。従来のPLL1回処理で調製したAPAマイクロカプセルでは分子量22,400のPLLを用いたカプセルが最も高い強度を示したが、同分子量のPLL処理を2回行うことで60分間の超音波処理を施してもその9割が破壊されない安定なAPAマイクロカプセルの調製に成功した。この結果は、PLL処理回数を増やすことで強固なAPA膜の調製が可能であることを示すと同時に、分子量の異なるPLLを各PLL処理段階において用いることで、優れた強度を維持したままAPAマイクロカプセルの物質透過性のみを変化させ得る可能性を示唆している。

以上にアガロースマイクロビーズおよびAPAマイクロカプセルの構造的・機能的特性を示したが、細胞性製剤が生体内で長期間安定に機能するには高分子担体が生物学的に安定であり、且つ宿主細胞の接着やタンパク質吸着等の修飾を受けない優れた生体適合性を有していることも必要である。アガロースマイクロビーズの生体適合性・生体内安定性はアガロース濃度によって影響されず、アガロースマイクロビーズは生体内で分解を受け

ないものの、投与後1ヶ月目以降では宿主の組織中へ取り込まれたり表面にfibrosisを認めるものが大半であった。この結果は、アガロースマイクロビーズが宿主の細胞や組織と強く相互作用することを示している。一方、APAマイクロカプセルの生体適合性は非常に優れており、宿主に炎症反応および異物反応を惹起した形跡は全く認められなかった。また、高分子量のPLLを用いて調製した強度の低いAPAマイクロカプセルについては投与操作により破壊されるものが認められたが、最も強度に優れた分子量22,400のPLLを用いたPLL2回処理APAマイクロカプセルでは、投与した殆どのカプセルが生体内で破壊されることなく安定に存在していたことが確認された。

本章の検討により、アガロースマイクロビーズは生体適合性に関して、APAマイクロカプセルは強度に関してそれぞれ改善点を残すものの、両高分子担体ともに細胞性製剤開発に応用するために備えるべき条件を比較的満足していることが示された。今後、アガロースマイクロビーズあるいはAPAマイクロカプセルのより詳細な調製条件や他の物質による修飾等<sup>38,122-129</sup>)の検討によって、さらに優れた高分子担体の開発が可能であると思われる。以降の章では、本章の検討結果に基づき、最も研究目的に合致した特性を有するアガロースマイクロビーズあるいはAPAマイクロカプセルを選択し、固定化細胞を用いた新規*in vivo*腫瘍誘導血管新生評価系の確立、さらには細胞性製剤の開発とその有効性に関して検討を行った。

## 第二章 癌細胞封入アガロースマイクロビーズを用いた腫瘍誘導血管新生の新規 *in vivo* 評価系の開発

血管新生は、組織の代謝を維持し生体の機能的恒常性を保持するために不可欠であり、血管内皮細胞の重要な生物学的特性の一つである。血管新生が活発に認められるのは胎児期の血管樹形成時や各臓器の形態的・機能的発育時であり<sup>130-132)</sup>、また成熟個体にあつては、炎症・修復過程<sup>133-135)</sup>、性周期に伴う子宮内膜肥厚<sup>136,137)</sup>、胎盤の形態的・機能的発達時<sup>138)</sup>等である。しかし、これらの生理的状態のみならず、充実性癌の増殖・転移成立過程<sup>139-142)</sup>、糖尿病性網膜症の発生・進展<sup>143)</sup>、慢性関節リウマチの進展<sup>144)</sup>等、病的状態においても血管新生は普遍的に認められる現象である。

歴史的に血管新生過程が注目され始めたのは、移植固形腫瘍内へ周囲組織から新しく形成された血管が侵入し、腫瘍の発育とともに血管が増殖する腫瘍誘導血管新生過程が詳細に観察されるようになってからである<sup>145)</sup>。当然のことながら、癌が生体内で増殖するためには血液供給のための血管新生が必須条件であり、腫瘍の増大が急速過ぎて血管新生が間に合わないと腫瘍の中心部は壊死に陥る。即ち、癌細胞が生体内において生存・増殖を維持するには、自らが血管を誘導する因子を生成・分泌する必要がある。自らが生成・分泌する血管新生促進因子によって癌細胞の血管新生誘導能が決定され、誘導された血管新生によって原発巣での癌細胞増殖が影響を受ける。また、二次増殖巣である転移巣が単なる細胞の集合から可視的な病巣を形成するに至る過程においても血管新生が必須なため、癌細胞の血管新生誘導能は癌転移を左右する重要な因子ともなってくる。即ち、腫瘍血管を人工的に閉塞するあるいは腫瘍血管の誘導・形成を薬物により阻止することによって癌細胞の増殖および転移を抑制することが可能である。このように腫瘍誘導血管新生は悪性腫瘍の増殖および転移を理解するうえで不可欠であるばかりでなく、治療とも結びつく非常に重要な現象である<sup>146-148)</sup>。

以上のような癌病巣における血管新生の重要性は早くから指摘されていたが、簡便で正確なアッセイ法がない等の理由によりその研究は癌の他の分野に比べて著しく遅れている。生体内で認められる血管新生は多数の因子が複雑に絡み合っておこる階層的な現象であり、血管内皮細胞自身の機能でもあるところから、血管新生機序を解析・理解するためには生物学的測定系を用いざるを得ない。そこで、血管新生モデルおよび測定系の開発には多くの努力が払われてきた。近年ようやく、培養血管内皮細胞を用いた *in vitro* 血管新生評価系が開発され、血管新生の各過程（血管基底膜の融解、血管内皮細胞の発芽・遊走・増殖亢進・管腔形成、基底膜の形成）の部分的なアッセイは可能となった<sup>149-151)</sup>。しかし、*in vitro* 実験系だけでは血管新生という複雑な要因を含む現象を総合的に評価するには不十分であり、どうしても *in vivo* 血管新生評価系が必要となる。*in vivo* 血管新生評価法は古くから行われており、代表的なものにニワトリ卵漿尿膜法<sup>152,153)</sup>、ウサギ角膜法<sup>154,155)</sup>がある。これらの方法は、血管新生抑制物質あるいは促進物質のスクリーニング系として現在においてもよく用いられているが、いずれの方法も高度な手技を必要とし、定量性・再現性に乏しいという問題点を抱えている。また、これらの評価系が腫瘍組織における血管新生を再

現しているとは言い難い。これらの理由から、癌治療を目的とした血管新生抑制物質の探索をするために、ヒト癌細胞の誘導した血管新生について検討可能な、簡便且つ定量性に優れた新規 *in vivo* 腫瘍誘導血管新生測定系の開発が急務となっている<sup>156-158)</sup>。

マウスを用いた新規 *in vivo* 腫瘍誘導血管新生評価系の開発にあたってヒト癌細胞を含めた異種癌細胞が誘導する血管新生を再現するには、移植癌細胞をマウスの免疫系による攻撃から回避させつつ、移植癌細胞の産生・分泌する血管新生促進因子を周囲組織に作用させなければならない。そこで本章では、高分子担体による固定化癌細胞および mouse hemoglobin enzyme-linked immunosorbent assay (mHb-ELISA) を用いた新規 *in vivo* 腫瘍誘導血管新生定量系の開発を試み、併せて本系で誘導される新生血管の特性について検討を行った。尚、本系に用いる高分子担体には、皮下投与の操作により破壊されないという条件を満たす必要性からアガロースマイクロビーズを選択した。また、封入細胞の増殖および運動性を考慮し、ゲルの網目構造が比較的粗くなるようにアガロース濃度は2~2.5%に設定した。

### 第一節 アガロースマイクロビーズに封入した A431 細胞の増殖と *in vivo* 血管新生誘導能

アガロースマイクロビーズに封入した A431 細胞をマウスに皮下投与し、ヒト癌細胞が誘導する血管新生をマウス体内で再現することを試みた。A431 細胞はヒト扁平上皮癌であり、強力な血管新生促進因子である線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor ; FGF) および血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial cell growth factor ; VEGF) を産生・分泌することが報告されている<sup>159-161)</sup>。しかし、生存・増殖が接着依存性であるため、細胞を分散した状態でアガロースマイクロビーズに封入したのでは A431 細胞の機能は損なわれることが予想される。そこで、マイクロキャリア上で培養した A431 細胞をアガロースマイクロビーズに封入する方法を選択した。

本節ではアガロースマイクロビーズに封入した A431 細胞 (Aga-A431 細胞) の *in vitro* 培養系における増殖を経日的に測定すると共に、Aga-A431 細胞をマウス背部皮下に投与した際に誘導される血管新生を実体顕微鏡下で観察した。

### 実験材料と方法

#### (1) Aga-A431 細胞の調製

A431 細胞 (理化学研究所細胞開発銀行) と高圧蒸気滅菌した多孔性内部培養型マイクロキャリア (平均粒子径=150  $\mu\text{m}$ , 平均孔径=30  $\mu\text{m}$ , 旭化成) とを 10%ウシ胎仔血清 (fetal calf serum ; FCS) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 日本製薬) に懸濁し、表面無処理培養シャーレに播種した。37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で静置培養し、A431 細胞接着マイクロキャリア (A431-MC) を調製した。A431-MC 懸濁液を 4% (w/v) アガロース溶液に等量加え、第一章・第一節に記載の操作法に従い Aga-A431

細胞を調製した。

### (2) Aga-A431 細胞の増殖の評価

Aga-A431 細胞を 10% FCS 含有 DMEM で培養し、MTT 法<sup>162)</sup>により細胞増殖を評価した。5 mg/ml に調製した MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, 同仁化学研究所) 溶液を培養液の 1/10 量添加し、更に 4 時間培養した。

Aga-A431 細胞を PBS で洗浄し、生成された formazan 結晶を dimethyl sulfoxide

(DMSO, 和光純薬) にて完全に溶解した。この溶液を 96 穴プレートに移し、マイクロプレートリーダーを用いて主波長 595 nm, 副波長 655 nm で吸光度を測定した。同様の方法にてマイクロキャリアあるいは培養プレート上で培養した A431 細胞の増殖も評価した。

### (3) Aga-A431 細胞誘導血管新生の観察

300  $\mu$ l の Aga-A431 細胞を 6 週齢の C57BL/6 雄性マウス (清水実験材料) の背部皮下に 18G の注射針を用いて投与した。投与後 10 日目に投与部位周囲の皮膚と共にペレット状のアガロースマイクロビーズを回収し、誘導形成された新生血管を実体顕微鏡下で写真撮影した。尚、ネガティブコントロールには細胞を封入していないアガロースマイクロビーズ (cell-free Aga) を使用した。

### 実験結果および考察

MTT 処理した培養 3 日目の A431-MC の位相差顕微鏡写真を Fig.10-A に、A431-MC を封入したアガロースマイクロビーズ (Aga-A431 細胞) の位相差顕微鏡写真を Fig.10-B に示す。formazan 結晶を生成した A431 細胞がマイクロキャリアに多数接着しているのが観察され、細胞の剥離を殆ど伴わずに A431-MC は直径約 300  $\mu$ m のアガロースマイクロビーズ内に封入された。

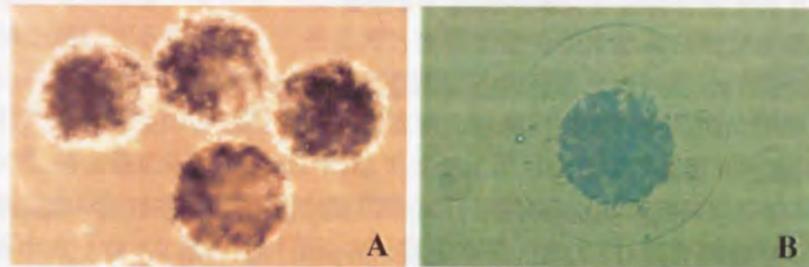


Fig.10 Phase contrast micrographs of A431 cells cultured on microcarriers and entrapped in agarose microbeads. A431 cells cultured on microcarriers (A431-MC) were treated with an MTT reagent on day 3. A431 cells are recognized as black figures upon MTT formazan production (A). A431-MC were microencapsulated by 2% (w/v) agarose hydrogel. The average bead size was about 300  $\mu$ m (B).

Aga-A431 細胞を培養し、経日的に MTT 活性を測定した結果を Fig.11 に示す。Aga-A431 細胞はマイクロキャリアあるいは培養プレート上で培養した A431 細胞と同等の増殖を示し、アガロースマイクロビーズへの封入操作による細胞傷害性は殆ど無いことが明らかとなった。

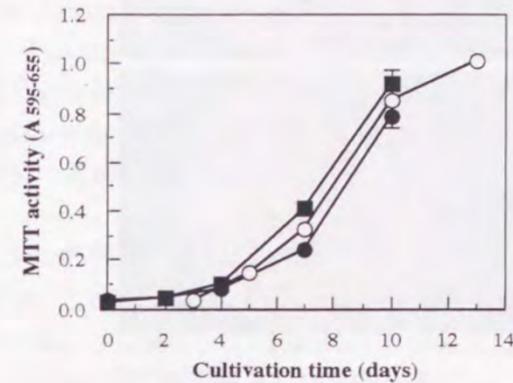


Fig.11 Proliferation of Aga-A431 cells in vitro. A431 cells were cultured on a 24-well culture plate (■) or on microcarriers (●). After culture on the microcarriers for 3 days, A431 cells were microencapsulated by 2% (w/v) agarose hydrogel and cultured on a 24-well culture plate (○). The viability of the cells was evaluated with an MTT assay. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of 3 cultures.

Aga-A431 細胞を C57BL/6 マウスの背部皮下に投与したところ、10 日後には投与部位に多数の新生毛細血管が誘導形成されているのが観察された (Fig.12-A)。また、周囲の組織から遊走浸潤してきた線維芽細胞によって肉芽組織も形成されており、肉芽組織を剥離すると、内部にはアガロースマイクロビーズとそれらの間に張り巡らされた毛細血管を認めた (Fig.12-C, D)。一方、cell-free Aga 投与部位において観察された新生血管量は極めて少なく、アガロースマイクロビーズ自身には血管新生誘導活性が無いことも確認された (Fig.12-B)。この結果は、アガロースマイクロビーズ内の A431 細胞から分泌された血管新生促進因子がアガロースゲル中を拡散してビーズ外へと透過し、周囲の正常組織から新生血管を誘導したことを示唆している。また、肉芽組織はアガロースマイクロビーズを包み込むように形成されており、新生毛細血管を支える足場としての役割を果たしていると推察された。Montesano ら<sup>163)</sup>は、*in vitro*での検討において線維芽細胞が血管新生過程における血管内皮細胞の管腔形成を誘導・促進すると報告しており、また、マウスに固形癌を形成させるとその腫瘍組織の間質には線維芽細胞が多数浸潤していることなどから、今後 *in vivo* 腫瘍誘導血管新生成立過程における線維芽細胞と血管内皮細胞の相互作用について更に検討が為される余地があると思われる。

本節の検討により、アガロースマイクロビーズに封入した癌細胞をマウスに皮下投与することで、本来生着しない異種の癌細胞の誘導する血管新生を免疫学的バリアーを越えて再現できることが明らかとなった。そこで以降において、本系で誘導された血管新生を定量するための測定系の確立を行うと共に、この血管新生がアガロースマイクロビーズ内に封入された癌細胞によって産生された生理活性物質 (血管新生促進因子) に因るものであるかを確認した。

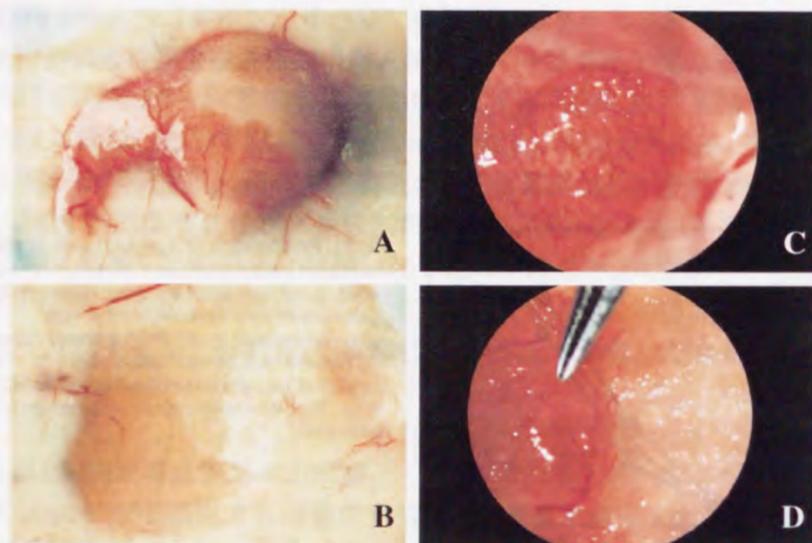


Fig.12 Angiogenesis induced by Aga-A431 cells. Aga-A431 cells or cell-free Aga were subcutaneously injected near the dorsal midline of the C57BL/6 mice. Treated mice were killed, and the agarose gel pellet was exposed on day 10 for observation under a stereoscopic microscope. (A): The injected site of Aga-A431 cells; (B): The injected site of cell-free Aga; (C, D): The inside of the Aga-A431 cells pellet.

## 第二節 mouse hemoglobin enzyme-linked immunosorbent assay (mHb-ELISA) の確立と *in vivo* 血管新生の定量

*in vivo* 血管新生評価系として現在最も普及しているニワトリ卵漿尿膜法およびウサギ角膜法での新生血管定量には、肉眼的に観察される新生血管の密度に応じてスコアを付ける<sup>164)</sup>、画像解析装置を用いて新生血管の総長あるいは総面積を測定する<sup>165,166)</sup>、といった方法が用いられてきた。これらの方法は二次元的に観察される新生血管の測定は可能であるが、腫瘍誘導血管新生系に適用すると定量範囲が腫瘍表面の新生血管に限定され、腫瘍内部にまで侵入している血管の測定は困難である。

最近の研究においては、新生血管内のヘモグロビン量あるいは赤血球量を測定し、相対的に新生血管量を定量する方法が用いられるようになりつつある。ヘモグロビン測定法としては Drabkin 法<sup>167)</sup>の方法が用いられているが感度に乏しい。また、赤血球量の測定法は<sup>51</sup>Cr でラベル化したマウス赤血球を担癌マウスに静注し、一定時間後に腫瘍局所の放射活性を測定する方法が用いられている<sup>168,169)</sup>。この方法は感度に優れているため有用性は高いが、ラジオアイソトープを用いなければならないという欠点がある。

本節では、これら従来の方法の問題点を改善し、且つ正確で再現性の良い新しい *in vivo*

血管新生測定系として、mHb-ELISA により mHb 量を測定し、相対的に新生血管を定量する系の確立を試みた。

## 実験材料と方法

### (1) mHb の調製

Huntsman<sup>170)</sup>の方法に準拠して mHb を調製した。C57BL/6 マウスより血液を採取し、4℃、1,000g で 10 分間遠心分離した後、血漿成分と白血球層を除去した。生理食塩水にて繰り返し洗浄した後、得られた洗浄赤血球 1 容に等容の冷蒸留水および 1/2 容の toluene (和光純薬) を加え、激しく振盪した後、4℃、3,000g で 15 分間遠心分離した。最下層の透明な溶血層を採取し、精製 mHb を得た。

### (2) ウサギ抗 mHb 抗体の調製

mHb (100 μg/ml) を complete Freund's adjuvant (CFA, 和光純薬) と充分混和してエマルジョンとし、10 週齢の日本白色家兎 (清水実験材料) の背部皮下および筋肉内に 0.2 ml/site で数箇所投与した。約 1 週間毎に 3 回、mHb (10~100 μg/ml) と incomplete Freund's adjuvant (IFA, 和光純薬) とのエマルジョンを追加免疫した。最終免疫より 1 週間後に頸動脈より全血液を採取し、得られた抗血清から Protein A-Agarose カラム (Bio-Rad) を用いてウサギ抗 mHb 抗体を精製した。

### (3) biotin 標識ウサギ抗 mHb 抗体の調製

ウサギ抗 mHb 抗体を 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH-CH<sub>3</sub>COONa 緩衝液 (pH5.5) に 5 mg/ml で溶解し、遮光下で 400 mM NaIO<sub>4</sub> 溶液を最終濃度 40 mM となるように 2 分間隔で 5 回に分けて加えた。遮光下で 20 分間反応させた後、PD-10 カラム (Pharmacia) を用いて溶液をゲル濾過し、酸化抗体を分離・採取した。N,N-dimethylformamide (DMF, 和光純薬) に biotin long arm hydrazide (BLAH, Vector Laboratories) を短時間加熱して 20 mg/ml の濃度に溶解し、これを遮光下で酸化抗体溶液 1 ml に対して 50 μl 加えた。3 時間反応させた後、酸化抗体 1 mg に対して約 1 mg の NaBH<sub>4</sub> を加えて反応を止めた。抗体溶液を Tris-HCl 緩衝液 (TBS, pH7.4) 中で透析し、biotin 標識ウサギ抗 mHb 抗体を得た。

### (4) サンプル溶液の調製

Aga-A431 細胞あるいは cell-free Aga を C57BL/6 マウスに皮下投与し、10 日後に投与部位周囲の皮膚と共に回収した。ペレット状になったアガロースマイクロビーズを皮膚から切除し、TBS を 1 ml 入れたチューブに採取した。ポリトロンホモジナイザーを用いてアガロースペレットをホモジネートした後、4℃、30,000g で 10 分間遠心処理し、その上清をサンプル溶液として用いた。

(5) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Laemmli<sup>17)</sup>の方法に準拠して17%ポリアクリルアミド平板ゲルにて行った。mHb 溶液とサンプル溶液のタンパク濃度を Bio-Rad protein assay kit で測定し、それぞれ 5  $\mu$ g/lane, 10  $\mu$ g/lane で電気泳動した。分子量マーカーには Rainbow protein molecular weight markers (Amersham) を用いた。電気泳動分離後、ゲル内のタンパク質は 0.03% Coomassie brilliant blue R-250 溶液で染色した。

(6) western blotting

上記の SDS-PAGE により分離したタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、1.5% gelatine/TBS (pH7.4) でブロッキングした後、一次抗体としてウサギ抗 mHb 抗体、二次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Zymed) を反応させた。4-chloro-1-naphthol (和光純薬) を含む基質溶液を反応させ、抗体の結合部位を発色させた。尚、各操作の間では 0.05% Tween-20/TBS (TTBS) でニトロセルロース膜を 3 回洗浄した。

(7) mHb-ELISA

96 穴マイクロプレートに 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 緩衝液 (pH9.6) で希釈したウサギ抗 mHb 抗体を固相化した。1% BSA/TBS (pH7.4) でブロッキングした後、0.1% BSA/TBS (pH7.4) で希釈した mHb 溶液あるいはサンプル溶液を反応させた。抗原溶液を除き、0.1% BSA/TBS で希釈した biotin 標識ウサギ抗 mHb 抗体を反応させた後、0.1% BSA/TBS で希釈した HRP 標識 avidin D (Vector Laboratories) を反応させた。TMBZ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 同仁化学研究所) を含む基質溶液を加えて発色反応を行い、2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で反応を停止した。マイクロプレートリーダーを用いて主波長 450 nm, 副波長 655 nm で吸光度を測定した。尚、プレートから溶液を除去する際には TTBS でプレートを 3 回洗浄した。

尚、その他の実験方法については、前節までに記載の操作法に従った。

実験結果および考察

mHb-ELISA の確立にあたり、SDS-PAGE および western blotting により検討したウサギ抗 mHb 抗体の結合特異性の結果を Fig.13 に示す。mHb 溶液を泳動したレーンには分子量約 16,000 に一本のバンドを認め、mHb の  $\alpha$  鎖サブユニットおよび  $\beta$  鎖サブユニットの分子量 16,100 に一致した (Fig.13-lane A)。一方、サンプル溶液を泳動したレーンにはマウス血清アルブミンであろうと推測される分子量 67,000 付近のバンドをはじめ数本のバンドを確認した (Fig.13-lane B)。また western blotting により、作製したウサギ抗 mHb 抗体は mHb とのみ特異的に結合することを認めた (Fig.13-lane C, D)。

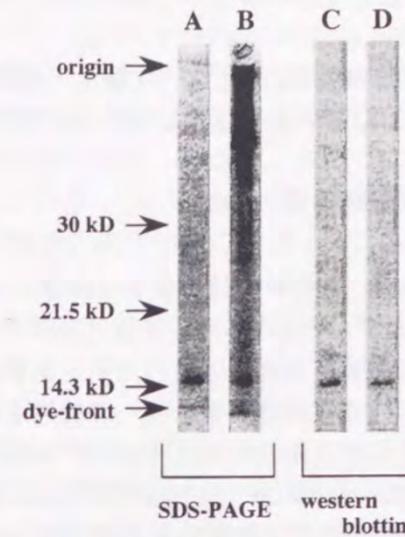


Fig.13 Binding specificity of rabbit anti-mHb IgG. The mHb and sample solution were electrophoresed through a 17% polyacrylamide slab gel containing SDS under nonreducing conditions, and the gel was stained with Coomassie brilliant blue R250. The molecular mass marker standards used were Rainbow protein molecular weight markers (Amersham). Lane A, mHb (5  $\mu$ g/lane); B, sample solution (10  $\mu$ g/lane). Western blotting developed with rabbit anti-mHb IgG and HRP-labeled goat anti-rabbit IgG. Lane C, mHb (5  $\mu$ g/lane); D, sample solution (10  $\mu$ g/lane).

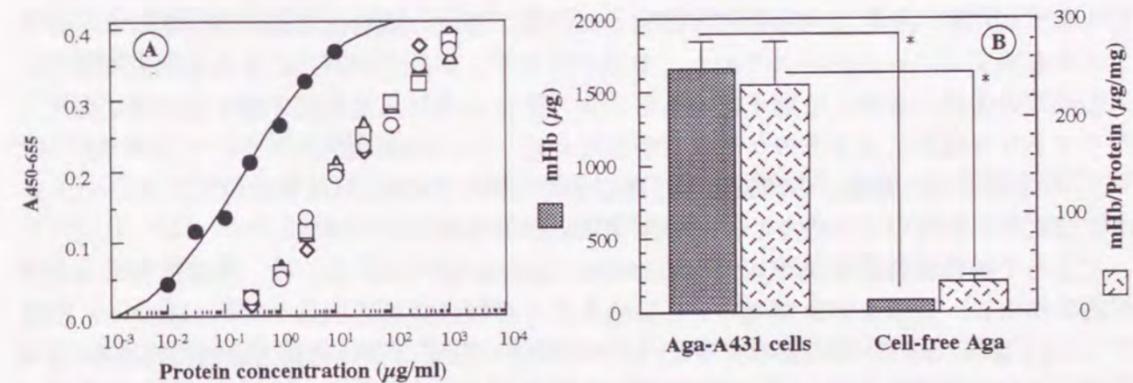


Fig.14 Evaluation of angiogenesis induced by Aga-A431 cells with mHb-ELISA. Aga-A431 cells or cell-free Aga were subcutaneously injected near the dorsal midline of C57BL/6 mice. The mHb and protein levels were determined at day 10 post-injection. A: (●): The standard mHb solution; (○, □, △, ◇): The sample solution prepared from the injected site of Aga-A431 cells. Each data point represents the mean of duplicate values in one assay. B: Each data value represents the mean  $\pm$  SEM of 10 mice. \*P<0.001 significantly different from cell-free Aga.

ウサギ抗 mHb 抗体を用いた mHb-ELISA は、作成した検量線より ng/ml オーダーの mHb が検出可能な優れた測定感度を有していることが判明した。また倍数希釈したサンプル溶液の mHb-ELISA による測定値はこの検量線と良好な平行性を示し、SDS-PAGE および western blotting の結果と同様にウサギ抗 mHb 抗体が mHb と特異的に反応していることが示された (Fig.14-A)。mHb-ELISA により測定した Aga-A431 細胞投与部位の mHb 量は cell-free Aga 投与部位と比較して有意な高値を示した (Fig.14-B)。この結果は前節において肉眼的観察 (Fig.12-A, B) により示された Aga-A431 細胞投与部位と cell-free Aga 投与部位との新生血管量の差異に良く相関しており、mHb-ELISA に

よる mHb 測定値をもって相対的に *in vivo* 血管新生量の評価が可能であることが示された。

本節の検討により mHb-ELISA は従来の視覚的な測定法に比べ定量性・感度・再現性に優れており、*in vivo* 腫瘍誘導血管新生測定系としての有用性が高いことが示された。

### 第三節 癌細胞封入アガロースマイクロビーズ誘導血管の特性

前節までの検討において、ヒト癌細胞の *in vivo* 血管新生誘導能を癌細胞封入アガロースマイクロビーズと mHb-ELISA を用いることで、マウス体内で簡便に評価することが可能であることを示した。しかしながら、本系において誘導形成された新生血管が、封入癌細胞に固形腫瘍を形成させた場合に本来的に形成する腫瘍血管と同一の特性を有しているかについては不明である。腫瘍組織部位の血管は腫瘍細胞の産生・分泌する液性因子や細胞外マトリックスの影響を受け、一般組織の血管とは異なった構造的あるいは機能的特性を示すことが報告されている<sup>172-178</sup>。即ち、正常血管には影響を与えず、腫瘍血管にのみ作用する薬物を本系を用いてスクリーニングするためには、本系で誘導される血管がアガロースゲルに封入された癌細胞の分泌因子に影響を受け、腫瘍血管様の特性を有していることを証明することが不可欠である。本節ではまず、本系で観察される血管新生誘導が封入癌細胞の生成・分泌した因子によるものか、あるいは封入癌細胞の融解壊死後に漏出したサイトゾル成分によるものかを確定するために、S-180 細胞封入アガロースマイクロビーズ (Aga-S-180 細胞) の凍結融解処理により作製した S-180 死細胞封入アガロースマイクロビーズをマウスに投与し、その血管新生誘導能について検討した。

ところで腫瘍壊死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ ) は、腫瘍血管にのみ選択的に作用し、腫瘍を出血壊死に至らしめることが報告されている<sup>179-182</sup>。Meth-A 担癌マウスに TNF- $\alpha$  を静脈内投与すると、1~2 時間後に腫瘍血管の物質透過性は亢進し、3~6 時間後には血管内腔にフィブリン様物質の沈着を認め、24 時間後には血栓が形成され完全に血液循環が遮断されてしまうことが知られている<sup>181-183</sup>。そこで著者は、この TNF- $\alpha$  の作用の特異性をマーカーとして、新規 *in vivo* 腫瘍誘導血管新生評価系において誘導された新生血管の特性を検討することとした。尚、本検討においてアガロースマイクロビーズに封入する癌細胞は TNF- $\alpha$  感受性の高い Meth-A 細胞を選択した。また、TNF- $\alpha$  は生物学的半減期が約 3 分と非常に短く<sup>184</sup>、作用を期待して大量投与すると重篤な副作用を引き起こすことから、ポリエチレングリコール (polyethyleneglycol; PEG) で TNF- $\alpha$  中の 56% のリジン残基を修飾し、血中滞留性を向上させた MPEG-TNF- $\alpha$  を用いた<sup>184-186</sup>。

本章冒頭にも記述したとおり血管新生は癌、糖尿病性網膜症、動脈硬化、慢性関節リウマチ等の疾病においてその発症および症状の進行に深く関与しており、現在までに実験的なレベルではあるがこれら血管新生病 (angiogenic diseases) の治療を目的とした種々の血管新生抑制物質が報告されている。現在までに血管新生阻止活性が確認された物質を大きく分類すると、多硫酸基ポリアニオン物質 (suramin<sup>164,187-189</sup>), pentosan polysulfate; PPS<sup>190-192</sup>), DS-4152<sup>165,193-195</sup>)、抗生物質 (fumagillin<sup>196,197</sup>), AGM-1470 (TNP-470)

<sup>198-202</sup>)、ステロイド (cortisone<sup>203-206</sup>), hydrocortisone; HC<sup>188,205-214</sup>), tetrahydro-S; THS<sup>188,210-214</sup>), medroxyprogesterone acetate; MPA<sup>188,215-219</sup>)、ビタミン類 (レチノイン酸誘導体<sup>220</sup>)、ポリペプチド (interferon- $\gamma$ <sup>221</sup>), YIGSR<sup>222,223</sup>), poly-RGD<sup>224</sup>) となり、血管新生が複雑な一連の過程を経て成り立つ現象であるため各血管新生抑制物質の構造および作用は多彩である。そこで、本節では新規 *in vivo* 血管新生評価系で誘導される血管新生の HC, THS, MPA, suramin あるいは PPS 投与に対する感受性を評価することで、腫瘍誘導血管新生抑制物質のスクリーニング系としての本系の有効性についても検討を行った。

### 実験材料と方法

#### (1) Aga-S-180 細胞の調製

ddY マウスの腹水癌として継代移植した Sarcoma-180 (S-180) 細胞を PBS で  $2.5 \times 10^7$  cells/ml に懸濁した。S-180 細胞懸濁液を 4% (w/v) アガロース溶液に等量加え、第一章・第一節に記載の操作法に従い Aga-S-180 細胞を調製した。また、Aga-S-180 細胞懸濁液の凍結融解処理を 3 回繰り返すことで、S-180 死細胞封入アガロースマイクロビーズを調製した。

#### (2) Aga-Meth-A 細胞の調製

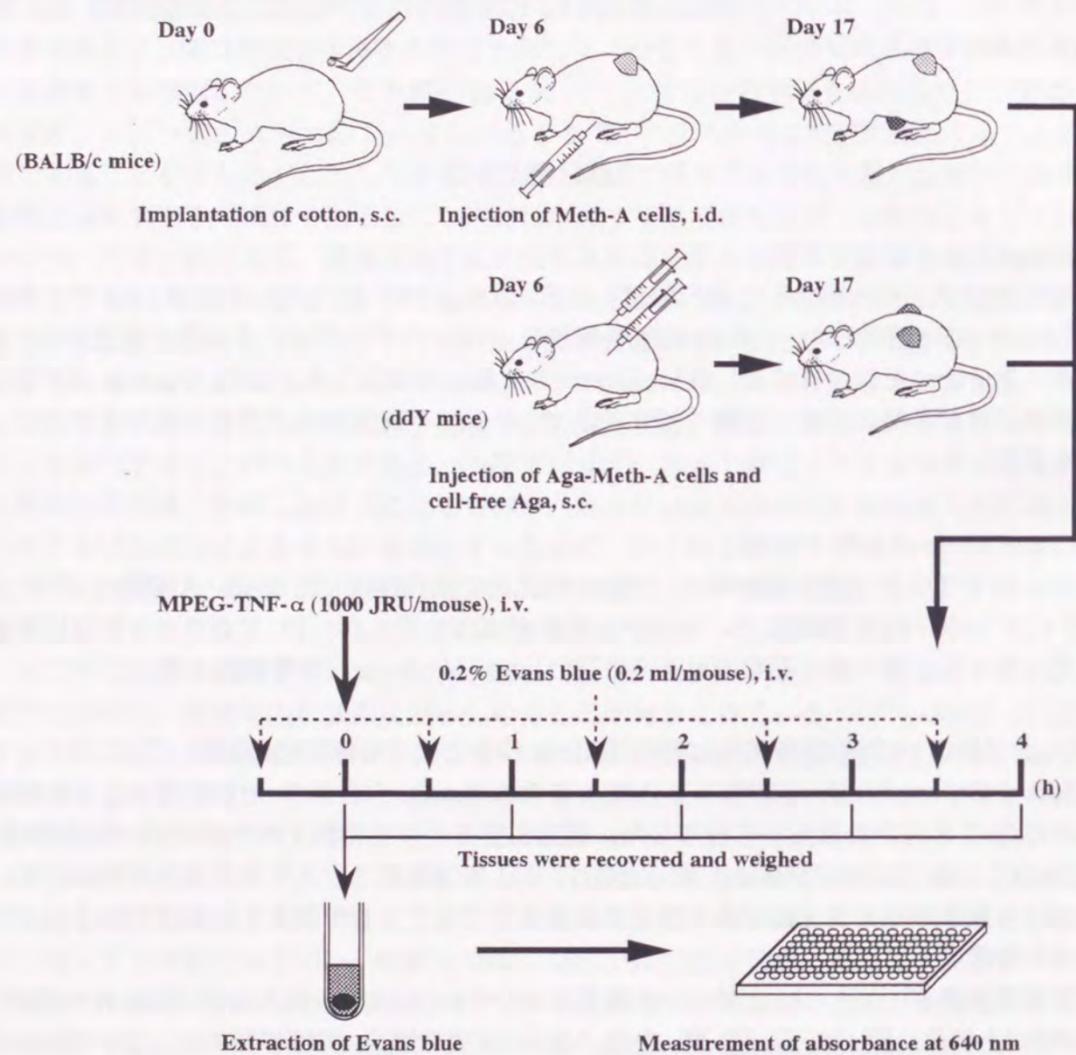
BALB/c マウス (清水実験材料) の腹水癌として継代移植した Meth-A 細胞を PBS で  $2.5 \times 10^7$  cells/ml に懸濁した。Meth-A 細胞懸濁液を 5% (w/v) アガロース溶液に等量加え、第一章・第一節に記載の操作法に従い Aga-Meth-A 細胞を調製した。

#### (3) Aga-Meth-A 細胞誘導新生血管の TNF- $\alpha$ 投与に対する感受性の測定 (Fig.15)

300  $\mu$ l の Aga-Meth-A 細胞あるいは cell-free Aga を 5 週齢の ddY 雌性マウスの背部皮下に 18G の注射針を用いて投与した。腫瘍血管モデルを作製するために Meth-A 細胞 ( $3 \times 10^5$  cells/0.1 ml/mouse) を 5 週齢の BALB/c 雌性マウスの腹部皮内に移植した。Meth-A 細胞移植マウスにはあらかじめ炎症血管のモデルを作製するために、3~4 mg の綿球を背部皮下に移植した。

綿球移植後 17 日目、Aga-Meth-A 細胞、cell-free Aga 投与後あるいは Meth-A 細胞移植後 11 日目に脳、肺、肝、脾、腎、皮膚、Meth-A 固形腫瘍、綿球移植部位、Aga-Meth-A 投与部位、cell-free Aga 投与部位の血管の TNF- $\alpha$  感受性を評価した。各マウスに MPEG-TNF- $\alpha$  (1,000 JRU/mouse、ヒト TNF- $\alpha$  は持田製薬・植村昭夫先生、堀澤義史先生より供与) を尾静脈内投与し、30、90、150、210 分後に 0.2% Evans blue 溶液を尾静脈内投与した。30 分後に腹部大動脈切断により脱血後、各臓器重量を測定し、1~2 ml の DMSO に細切した臓器を 48 時間浸し、血管外へ漏出した Evans blue を抽出した<sup>183</sup>。同様に MPEG-TNF- $\alpha$  未投与群についても Evans blue 投与 30 分後に各臓器重量の測定と臓器からの Evans blue 抽出を行った。抽出液の吸光度を波長 640 nm で測定し、Fig.15

に示す式により血管透過性を評価した。



$$[\text{The vascular permeability ratio}] = \frac{[A_{640} / \text{gram of tissue after the administration of MPEG-TNF-}\alpha]}{[A_{640} / \text{gram of tissue without the administration of MPEG-TNF-}\alpha]}$$

Fig.15 Protocol outlining the analysis of change of vascular permeability after administration of MPEG-TNF- $\alpha$

(4) C6細胞封入アガロースマイクロビーズ (Aga-C6細胞) の調製

ラットグリオーマであるC6細胞を第二章・第一節に記載の操作法に従いマイクロキャリアー上で培養し、C6細胞接着マイクロキャリアー (C6-MC) を調製した。C6-MC懸濁液を4% (w/v) アガロース溶液に等量加え、第一章・第一節に記載の操作法に従いAga-C6細胞を調製した。

(5) 癌細胞封入アガロースマイクロビーズ誘導新生血管の血管新生抑制物質投与に対する感受性の測定 (Fig.16)

300  $\mu$ lの癌細胞封入アガロースマイクロビーズあるいはcell-free Agaを6週齢のC57BL/6雄性マウスの背部皮下に18Gの注射針を用いて投与した。

HC (hydrocortisone 21-phosphate, Sigma) は蒸留水に溶解し、250 mg/kg/day (アガロースマイクロビーズ投与後1~3日目)、100 mg/kg/day (アガロースマイクロビーズ投与後4~6日目)、50 mg/kg/day (アガロースマイクロビーズ投与後7~9日目) あるいは100 mg/kg/day (アガロースマイクロビーズ投与後1~3日目)、50 mg/kg/day (アガロースマイクロビーズ投与後4~6日目)、25 mg/kg/day (アガロースマイクロビーズ投与後7~9日目) あるいは50 mg/kg/day (アガロースマイクロビーズ投与後1~3日目)、25 mg/kg/day (アガロースマイクロビーズ投与後4~6日目)、12.5 mg/kg/day (アガロースマイクロビーズ投与後7~9日目) のスケジュールで経口投与した。

THS (5 $\beta$ -Pregnane-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-20-one, Sigma) は蒸留水に懸濁し、100 mg/kg/day (アガロースマイクロビーズ投与後1~3日目)、50 mg/kg/day (アガロースマイクロビーズ投与後4~6日目)、25 mg/kg/day (アガロースマイクロビーズ投与後7~9日目) のスケジュールで経口投与した。

heparin (heparin sodium, 第一化学) は蒸留水に溶解したものを、アガロースマイクロビーズ投与後1日目から9日間30 mg/kg/dayを経口投与した。

MPA (Sigma) は生理食塩水に懸濁し、アガロースマイクロビーズ投与後1日目から9日間4.8 mg/kg/day、2.4 mg/kg/day あるいは1.2 mg/kg/dayを筋肉内投与した。

suramin (第一製薬・田中紀子先生、岩花倫生先生より供与) は生理食塩水に溶解し、アガロースマイクロビーズ投与後4日目から4日間200 mg/kg/day、100 mg/kg/day あるいは50 mg/kg/dayを腹腔内投与した。

PPS (Sigma) は生理食塩水に溶解し、アガロースマイクロビーズ投与後1日目から9日間25 mg/kg/day あるいは12.5 mg/kg/dayを腹腔内投与した。

各血管新生抑制物質投与による血管新生抑制効果はFig.16に示す式により評価した。

尚、その他の実験方法については、前節までに記載の操作法に従った。

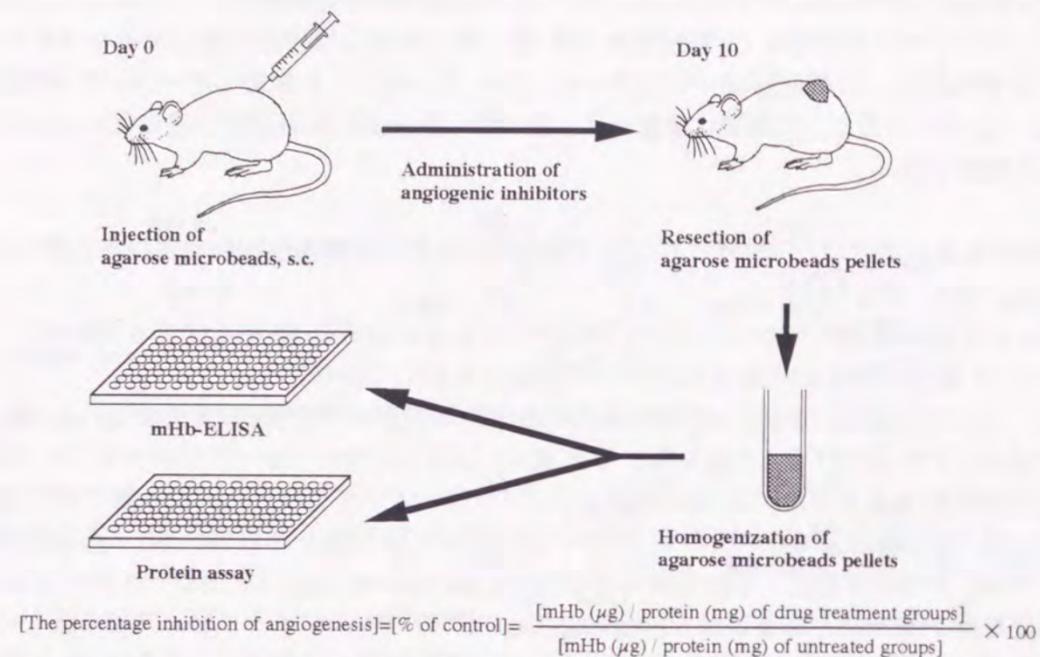


Fig.16 Protocol outlining the analysis of in vivo tumor angiogenesis.

#### 実験結果および考察

腫瘍誘導血管新生の新規 *in vivo* 評価系において誘導・形成される新生血管の性質に関して検討を行った。投与後 10 日目において S-180 死細胞封入アガロースマイクロビーズが誘導した新生血管量は、凍結融解処理をしていない Aga-S-180 細胞投与群と比較して極めて少なく、cell-free Aga 投与部位と同程度であった (Fig.17)。この結果より、癌細胞封入アガロースマイクロビーズによる *in vivo* 血管新生誘導には投与時に封入癌細胞が生存していることが必須であることが確認された。即ち、癌細胞封入アガロースマイクロビーズ投与部位に観察された血管新生は、癌細胞が融解壊死に陥る過程で細胞内より漏出したサイトゾル成分によるものではなく、癌細胞がアガロースマイクロビーズ内で生存している間に分泌した血管新生促進因子によるものであらうと推察された。さらに、データには示していないが、正常細胞であるウシ大動脈由来平滑筋細胞をアガロースマイクロビーズに封入しマウスに皮下投与したところ、新生血管は殆ど誘導されなかったという結果も、本系の血管新生が癌細胞由来の血管新生促進因子により誘導されたものであらうことを支持している。

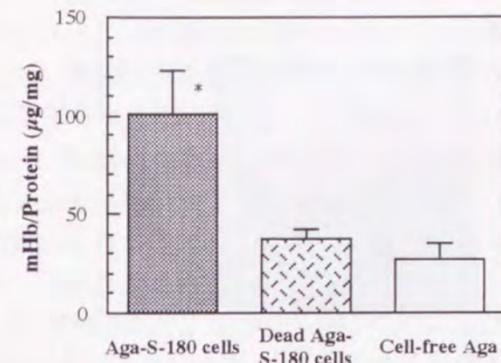
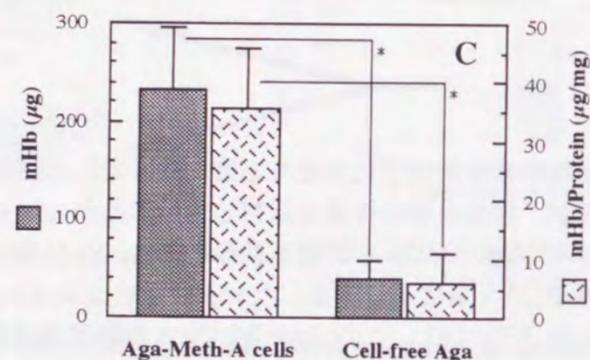
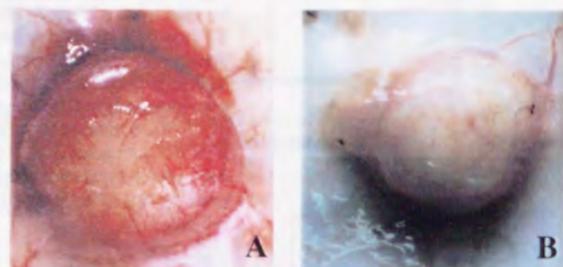
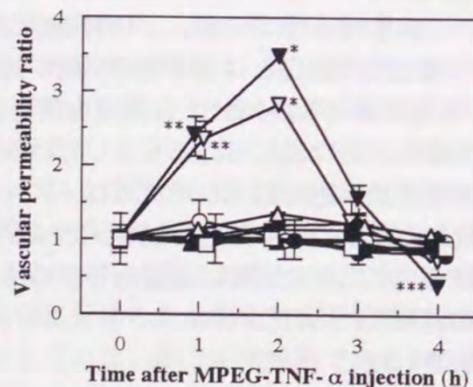


Fig.17 Evaluation of angiogenesis induced by vital or dead Aga-S-180 cells. Dead Aga-S-180 cells were prepared by freezing and thawing of Aga-S-180 cells. Aga-S-180 cells, dead Aga-S-180 cells, or cell-free Aga were subcutaneously injected near the dorsal midline of C57BL/6 mice. The mHb and protein levels were determined at day 10 post-injection. Each data value represents the mean±SEM of 3-4 mice. \* P<0.05 significantly different from cell-free Aga.

そこで次に、封入癌細胞の分泌因子に大きく影響を受けている癌細胞封入アガロースマイクロビーズ誘導血管が、腫瘍血管の性質を保持しているのかに関して検討を行った。ddY マウスの背部皮下に Aga-Meth-A 細胞を投与すると、11 日後には投与部位に顕著な血管新生を認め、mHb-ELISA 系により定量した mHb 量は cell-free Aga 投与部位と比較して有意な高値を示した (Fig.18)。この Aga-Meth-A 細胞誘導血管の TNF-α 感受性を Fig.19 に示す。正常組織および炎症組織 (綿球移植部位) の血管透過性は TNF-α 投与による影響を全く受けなかった。一方、Meth-A 固形腫瘍組織の血管透過性は TNF-α 投与 1 時間後から上昇し、2 時間後に投与前の約 3.5 倍の透過性を示した。その後、血管透過性は次第に減少し、TNF-α 投与 4 時間後には投与前の値を下回った。これは、Meth-A 腫瘍血管の血管内皮細胞が TNF-α によって特異的に傷害を受けたために、投与後 2 時間までは血管の物質透過性が亢進し、その後、血管内腔にフィブリン様物質が沈着することで徐々に血流が阻害されたことを反映した結果であると考えられ、他の研究者らの報告と一致した<sup>181-183)</sup>。この Meth-A 腫瘍血管の透過性変化と同様に、Aga-Meth-A 細胞誘導血管も TNF-α 投与 2 時間後には投与前の約 2.8 倍に血管透過性は亢進し、4 時間後に投与前を下回った。この結果は、TNF-α 投与に対する透過性の変化という血管の生物学的特性の一つを評価したに過ぎないが、Aga-Meth-A 細胞誘導血管が Meth-A 腫瘍血管と非常に近い特性を有しており、明らかに正常血管や炎症血管とは異なることを示している。また、データには示していないが、ウシ大動脈由来平滑筋細胞を封入したアガロースマイクロビーズの投与部位での血管透過性は TNF-α 投与によって全く変化しなかった。即ち、癌細胞封入アガロースマイクロビーズによって誘導された新生血管は腫瘍血管様の特性を保持しており、本系が腫瘍誘導血管新生抑制剤の開発のための *in vivo* スクリーニング系として応用できる可能性を有していることが示唆された。

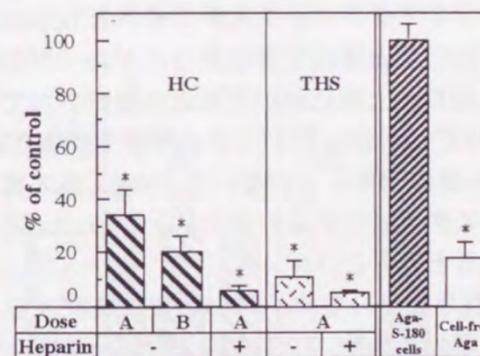


**Fig.18** Angiogenesis induced by Aga-Meth-A cells. Aga-Meth-A cells or cell-free Aga were subcutaneously injected near the dorsal midline of ddY mice. Eleven days later, agarose gel pellets were observed under a stereoscopic microscope (A: Aga-Meth-A cells; B: Cell-free Aga), and the mHb and protein levels were determined (C). Each data value represents the mean±SEM of 6 mice. \* P<0.01 significantly different from cell-free Aga.

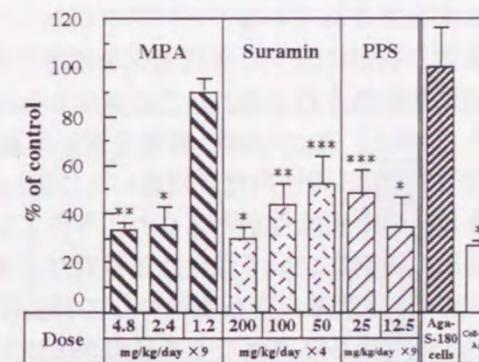


**Fig.19** Effect of systemic pre-treatment with MPEG-TNF- $\alpha$  on the permeability ratio of Evans blue-albumin from blood vessels. Mice were treated with i.v. injection of MPEG-TNF- $\alpha$  (1000 JRU/mouse) and with i.v. injection of 0.2 ml of 0.2% Evans blue suspended in saline at 30 min before the time indicated. The mice were then killed at the time indicated, and the Evans blue in the collected tissues was quantified. Control-basal levels without pre-injection of MPEG-TNF- $\alpha$  are shown for time 0. (□): Brain; (■): Lung; (▲): Liver; (△): Spleen; (◇): Kidney; (◆): Skin; (▼): Meth-A tumor; (●): Cotton; (▽): Aga-Meth-A cells; (○): Cell-free Aga. Each data point represents the mean±SEM of 4-16 mice. Statistical significance compared to the 0-time value: \*, P<0.001; \*\*, P<0.005; \*\*\*, P<0.01.

そこで、現在までに血管新生阻止活性の確認されている物質について癌細胞封入アガロースマイクロビーズ誘導血管新生に対する効果を検討した。Aga-S-180細胞を用いた系においてHC単独投与群は血管新生を用量依存的に抑制し、さらにheparinを併用した群においては90%以上の抑制効果を認めた。THSにおいても単独投与で約90%の血管新生阻害を示し、heparinを併用した場合にはほぼ完全に血管新生を抑制した(Fig.20)。データには示していないがNorrbyら<sup>225)</sup>の報告と同様にheparin単独投与では血管新生促進効果が認められたことから、HCあるいはTHSと併用したheparinがこれらステロイドの血管新生抑制作用を増強したと考えられた。また、等用量のHCとTHSの効果を比較すると、単独投与およびheparin併用投与の両方でTHSの方が強い活性を示した。THSはHCの誘導體であり、グルココルチコイド作用およびミネラルコルチコイド作用を有していないものの血管新生阻害活性を示す代表的なアンジオスタティックステロイドである。この結果はステロイドの血管新生阻害活性がそのグルココルチコイドおよびミネラルコルチコイド活性に相関しないという他の研究者らの知見に一致した<sup>143,164,211,212)</sup>。



**Fig.20** Inhibitory effects of angiostatic steroids with or without heparin on the angiogenesis induced by Aga-S-180 cells. C57BL/6 mice were injected with Aga-S-180 cells at day 0, and were treated with HC or THS for 9 days. A tapering dose of steroids was administered p.o. from day 1, (A): 100 mg/kg/day for 3 days, followed by 50 mg/kg/day for 3 days and 25 mg/kg/day for 3 days with (+) or without (-) administration of 30 mg/kg/day of heparin sodium, p.o.; (B): 250 mg/kg/day for 3 days, followed by 100 mg/kg/day for 3 days and 50 mg/kg/day for 3 days. The mHb and protein levels were determined at day 10 post-injection. Each data value represents the mean±SEM of 3-5 mice. \* P<0.001 significantly different from Aga-S-180 cells (control).



**Fig.21** Inhibitory effects of MPA, suramin and PPS on the angiogenesis induced by Aga-S-180 cells. C57BL/6 mice were injected with Aga-S-180 cells at day 0, and were treated with MPA or PPS for 9 days. Treatment with suramin was given from day 4 to day 7. The mHb and protein levels were determined at day 10 post-injection. Each data value represents the mean±SEM of 4-9 mice. \* P<0.005, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.05 significantly different from Aga-S-180 cells (control).

Aga-S-180 細胞誘導血管新生に対して MPA および suramin は用量依存的な阻害作用を示し、最も多い用量を投与した場合どちらも約 70%の血管新生阻害効果があった。PPS 投与群には用量依存性を認めなかったものの 50~60%の血管新生阻害活性を確認した

(Fig.21)。MPA は血管新生の初期に起こる血管基底膜の分解過程に欠かせないコラゲナーゼおよびプラスミノゲンアクティベーターの活性を阻害し、血管内皮細胞の発芽を抑制することが報告されている<sup>215,219</sup>。また、suramin および PPS は強力な血管新生促進因子である FGF が FGF レセプターに結合するのを阻害することにより、血管内皮細胞の遊走・増殖を抑制する<sup>187,189,192</sup>。本系で誘導された血管新生がこれら作用機構の異なる血管新生抑制物質によって阻害を受けることは、本系が多段階過程を経て成立する腫瘍誘導血管新生を見事に再現していることを強く示唆するものである。

HC および THS の Aga-A431 細胞誘導血管新生に対する阻害効果は単独投与において 30%程度に過ぎなかった (Fig.23)。HC は heparin との併用投与によってもその血管新生阻害活性の増強は認められなかったが、THS は heparin との併用で 80%の阻害作用を示した (Fig.22, 23)。アンジオスタティックステロイドの血管新生阻害に対する heparin の作用増強のメカニズムは明確にはされていないが、heparin が存在するとアンジオスタティックステロイドが血管内皮細胞の DNA 合成や血管基底膜の turn over に影響を与えることが報告されている<sup>211,213,226</sup>。しかし、アンジオスタティックステロイドと heparin の血管新生抑制に対する併用効果を確認できたグループと確認できなかったグループの報告が共に複数為されており、この原因が heparin のロット差に起因するとも報告されている<sup>203</sup>。しかし、Aga-A431 細胞を用いた系において heparin が HC の血管新生阻害作用は増強せず THS の作用だけ増強した原因にロット差は関係していないことから、他の要因が関与している可能性が考えられ、今後アンジオスタティックステロイドと heparin との併用効果の機構については更なる検討が必要であると言えよう。

Aga-C6 細胞誘導血管新生に対して HC は単独投与において約 75%の阻害効果を示し、heparin 併用投与によってその効果が 85%にまで増強された。PPS は約 75%の血管新生阻害効果を示し、suramin には有意差はないものの 45%の阻害活性を確認した (Fig.24)。

これら既に報告されている血管新生抑制物質の本系での効果は、従来の血管新生評価系による結果と一概には比較できないもののほぼ同等の血管新生抑制作用を示した。即ち、本研究で開発した新規 *in vivo* 腫瘍誘導血管新生評価系が血管新生抑制物質のスクリーニング系として応用可能であることが示唆された。

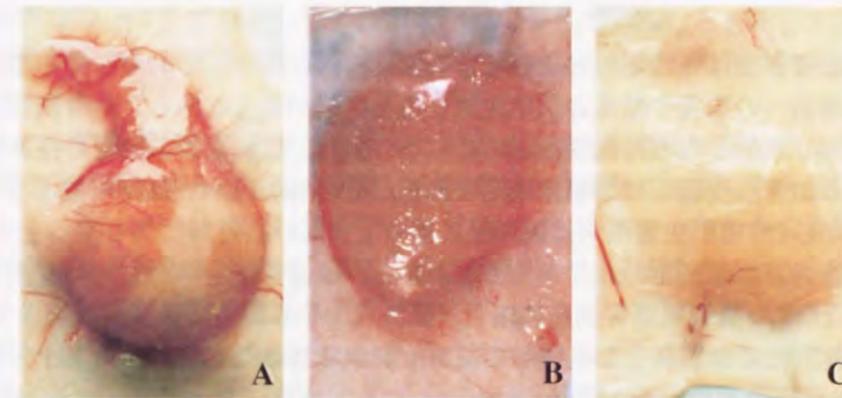


Fig.22 Inhibitory effect of THS with heparin on the angiogenesis induced by Aga-A431 cells. Aga-A431 cells (A) or cell-free Aga (C) were subcutaneously injected near the dorsal midline of C57BL/6 mice. THS was administered orally from day 1 at tapering dose (100 mg/kg/day, 50 mg/kg/day, and 25 mg/kg/day for 3 days each) with administration of 30 mg/kg/day of heparin sodium, p.o., to the mice injected Aga-A431 cells (B). Ten days later, agarose gel pellets were observed under a stereoscopic microscope.

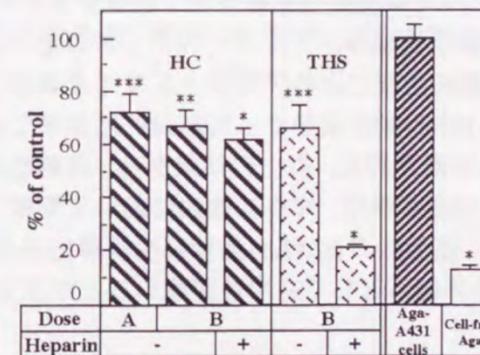


Fig.23 Inhibitory effects of angiostatic steroids with or without heparin on the angiogenesis induced by Aga-A431 cells. C57BL/6 mice were injected with Aga-A431 cells at day 0, and were treated with HC or THS for 9 days. A tapering dose of steroids was administered p.o. from day 1, (A): 50 mg/kg/day for 3 days, followed by 25 mg/kg/day for 3 days and 12.5 mg/kg/day for 3 days; (B): 100 mg/kg/day for 3 days, followed by 50 mg/kg/day for 3 days and 25 mg/kg/day for 3 days from day 1 with (+) or without (-) administration of 30 mg/kg/day of heparin sodium, p.o. The mHb and protein levels were determined at day 10 post-injection. Each data value represents the mean±SEM of 3-5 mice. \* P<0.001, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.05 significantly different from Aga-A431 cells (control).

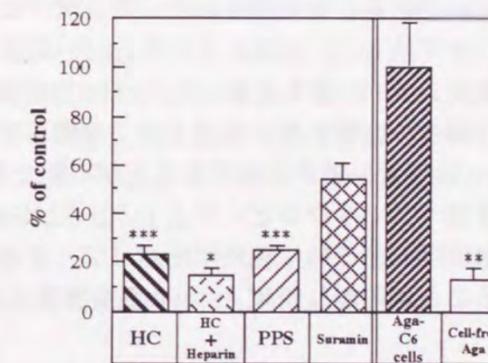


Fig.24 Inhibitory effects of HC, PPS and suramin on the angiogenesis induced by Aga-C6 cells. C57BL/6 mice were injected with Aga-C6 cells at day 0, and were treated with HC or PPS for 9 days from day 1. HC was administered p.o. at a tapering dose (100 mg/kg/day for 3 days, followed by 50 mg/kg/day for 3 days and 25 mg/kg/day for 3 days) with or without administration of 30 mg/kg/day of heparin sodium, p.o. PPS was administered p.o. at 25 mg/kg/day for 9 days. Suramin was administered i.p. at 100 mg/kg/day from day 4 to day 7. The mHb and protein levels determined at day 10 post-injection. Each data value represents the mean±SEM of 5-8 mice. \* P<0.001, \*\* P<0.005, \*\*\* P<0.01 significantly different from Aga-C6 cells (control).

#### 第四節 小括

腫瘍誘導血管新生は癌の増殖および転移過程に密接に関与しており、その成立を阻止することは癌細胞への栄養や酸素の供給を絶つことに繋がることから、血管新生抑制物質は癌治療の有効な薬物となる可能性を秘めている。また、成熟個体の殆どの正常組織および臓器における血管内皮細胞は増殖休止期にあり、その turn over は月単位あるいは年単位であることから、血管新生抑制剤は副作用の極めて少ない抗癌剤になり得ると予想される。そこで、腫瘍誘導血管新生の成立過程の解析あるいは血管新生抑制物質の探索に用いるための優れた *in vivo* 血管新生評価系の確立が望まれ、その開発には多大な努力が払われてきたが、生体内での血管新生が多段階で複雑な現象であることから、未だ十分な条件を備えた *in vivo* 腫瘍誘導血管新生評価系は存在しない。本章においては、血管新生が癌細胞の産生・分泌する血管新生促進因子により誘導されることを利用して、高分子担体を用いた固定化癌細胞の投与により生理活性物質（血管新生促進因子）を生体へデリバリーできることを証明すると共に、腫瘍誘導血管新生の新規 *in vivo* 評価系の確立を試みた。

異種あるいは同種異系の癌細胞を封入したアガロースマイクロビーズをマウスの背部皮下に投与すると、投与後 10 日程度でその投与部位には多数の新生毛細血管が誘導・形成されることを確認した。即ち、癌細胞をアガロースマイクロビーズに封入して投与することにより、マウス体内において本来生着しない癌細胞が誘導する血管新生をも再現することが可能であることが示された。そこで、この *in vivo* 血管新生を感度良く定量するために、ウサギ抗 mHb 抗体を用いた mHb-ELISA の確立を試み、アガロースマイクロビーズ投与部位の mHb 量を定量した。mHb 測定値は肉眼的観察によるアガロースマイクロビーズ投与部位の血管新生の程度と良く相関しており、mHb 測定値をもって相対的に本系での *in vivo* 血管新生量を評価することが可能であると判断された。以上の結果から、癌細胞封入アガロースマイクロビーズと mHb-ELISA を用いた本系は、マウス体内において簡便に、且つ遺伝学的あるいは免疫学的バリアーを越えて、癌細胞の *in vivo* 血管新生誘導能を評価することが可能な新規 *in vivo* 腫瘍誘導血管新生評価系として有用性が高いことが示された。

しかしながら、本系で誘導された血管新生が単なる炎症性であり、形成された毛細血管は腫瘍組織のそれとは異なる特性を有している可能性を否定することはできない。腫瘍組織の血管は腫瘍が産生・分泌する液性因子の影響を受け、その生物学的特性が正常組織の血管とは明らかに異なることが報告されている<sup>172-178)</sup>。そこで、Aga-Meth-A 細胞誘導新生血管の TNF- $\alpha$  に対する感受性を検討したところ、本系で誘導された新生血管はアガロースマイクロビーズに封入された癌細胞の分泌する液性因子の影響を強く受けており、正常組織あるいは炎症組織の血管とは異なる腫瘍血管様の特性を保持していることが判明した。即ち、癌細胞をアガロースマイクロビーズに封入し投与することにより、免疫学的に非自己の癌細胞が産生・分泌する血管新生促進因子を生体に作用させることが可能であることが確認された。また、既に血管新生抑制活性が報告されている物質を本系に適用したところ、直接的に比較することは困難であるが従来の *in vivo* 血管新生評価系におけるこ

れら血管新生抑制物質の効果とほぼ同等の効果が得られた。この結果は、本系が血管新生抑制物質のスクリーニング系としての機能を十分に備えていることを示しており、本系は腫瘍誘導血管新生を阻害することによる癌治療を目指した薬剤の開発に大きく貢献するであろうと思われる。

従来のヒト由来癌細胞を用いた抗血管新生物質あるいは抗腫瘍物質スクリーニング系にはヌードマウスを移植宿主とした系が用いられており、現在においても有用性の高い方法とされている。しかし、ヒト腫瘍/ヌードマウス系ではヌードマウスの飼育をバリエーション方式で行う必要があり、またヌードマウスに非可植性あるいは可植性ではあるが増殖の遅い細胞があるという欠点がある。最近の研究において、アルギン酸マイクロビーズに封入した癌細胞を用いた抗腫瘍物質スクリーニング系が Gorelik ら<sup>227)</sup>によって、また腫瘍誘導血管新生評価系が Plunkett ら<sup>168,169)</sup>によって報告された。両系ともマウス体内において本来生着しない allogeneic あるいは xenogeneic な癌細胞に関しての検討が可能である。これらの系と同様に本系もヌードマウス系にかわるヒト腫瘍細胞誘導血管新生の *in vivo* 評価系として、さらにヒト腫瘍細胞誘導血管新生に対する血管新生抑制物質スクリーニング系として有用性が高いと考える。

本章の検討により、高分子担体に封入した非自己の細胞を生体に投与することで、局所的ではあるが封入細胞の産生する生理活性物質を生体にデリバリーすることが可能であることが示された。そこで以降の章では、「固定化細胞が分泌する生理活性物質を全身性に作用させ疾病治療に応用する」という戦略に基づいた細胞療法という視点から、細胞性薬剤の開発の可能性に関して検討を行った。

### 第三章 高分子担体を用いた固定化 SK2 細胞の機能評価と細胞療法への応用

生命体がホメオスタシスを維持する機構の中で驚嘆すべきことは、細胞が様々な制御のもとで、如何にタイミング良くホルモンやサイトカインをはじめとする生理活性物質を合成し、細胞外に徐放しているかである。細胞に備わった生理活性物質の合成機能・徐放機能・センサー機能等による制御機構はまさしく DDS 製剤の理想型であり、機能面からいえば細胞に勝る製剤はない。

近年の遺伝子工学の進歩に伴って、細胞に特定遺伝子を導入して大量の生理活性物質を合成・分泌させることも可能となり、これは新たな機能性細胞の作製と応用、換言すれば細胞性医薬品の道が拓かれたといっても過言ではない。また、現在の *ex vivo* 遺伝子治療は、生体より取り出した自己の細胞内に特定遺伝子を導入することによって新たな機能性細胞を作製し、その機能性細胞を生体内投与した後、遺伝子発現によって合成・徐放された生理活性物質（薬物）によって疾病を治療しようとするものである<sup>228-239</sup>。この遺伝子治療の考え方をさらに一歩進めて、現状の様に自己細胞に導入した特定遺伝子の単純な発現を期待するだけでなく、そこに細胞の有するセンサー機能・制御機能を併せ持った機構のもとで生理活性物質を合成・徐放させ、且つ免疫学的バリアーを越えさせることが可能となれば、この機能性細胞粒子は DDS に適う理想的な薬物供給製剤となり得る訳である。そこで本章では、現在地球上に存在する最もインテリジェントな粒子である細胞を、如何に製剤化し、如何に疾病治療に応用するかという視点から、「細胞性製剤 (cytomedicine)」ともいべき新規投与剤形の可能性について検討を行った。

緒論でも述べたとおり、機能性細胞を allogeneic あるいは xenogeneic な宿主体内に投与し、その機能を発現維持させることで疾病の予防あるいは治療に応用するには、宿主側の免疫反応により投与細胞が拒絶を受けるといった必然的な問題を回避しなければならない。そこで、高分子担体による細胞固定化法を応用した細胞性製剤の開発を試みた。

#### 第一節 *in vitro* における固定化 SK2 細胞の機能評価

細胞を高分子担体内に封入し生体に投与する場合、担体が破壊されたのでは封入細胞がホストの免疫系により拒絶され機能を失ってしまうばかりか、cell line の細胞を用いた場合にはその腫瘍原性が問題となる。そのため高分子担体の生体内での安定性は細胞を製剤化する上で非常に重要であり、物理的安定性の高いものを使用する必要がある。また、高分子担体に封入された細胞への栄養物あるいは酸素の供給や外部環境の物質濃度に対する細胞の応答性を考慮した場合、マイクロビーズあるいはマイクロカプセルの直径は小さい方が好ましい<sup>240</sup>。そこで、細胞性製剤開発のための最適な APA マイクロカプセルとして、第一章・第二節の検討において最も高い強度および最も小さな粒子径を示した PLL

(M.W.=22,400) 2 回処理 APA マイクロカプセルを選択した。また、前章において封入細胞の産生・分泌する生理活性物質の局所的なデリバリーに成功した、2.5%アガロースマイクロビーズも採用した。

細胞性製剤が疾病治療に長期間有効であるためには、まず、封入機能性細胞が高分子担体内で生存・増殖し、且つ生理活性物質の産生・分泌機能を維持していなければならない。そこで本節では、抗ヒトインターロイキン-6 モノクローナル抗体 (SK2 mAb) を分泌するマウスハイブリドーマである SK2 細胞<sup>241</sup> をアガロースマイクロビーズ (Aga-SK2 細胞) あるいは APA マイクロカプセル (APA-SK2 細胞) に封入し、培養系において経日的に封入 SK2 細胞の増殖と SK2 mAb 分泌機能を評価した。

#### 実験材料と方法

##### (1) Aga-SK2 細胞の調製

BALB/c マウスの腹水癌として継代移植した SK2 細胞 (中外製薬・大杉義征先生、勝目朝夫先生より供与)<sup>241</sup> を PBS で  $2.5 \times 10^7$  cells/ml に懸濁した。SK2 細胞懸濁液を 5% (w/v) アガロース溶液に等量加え、第一章・第一節に記載の操作法に従い Aga-SK2 細胞を調製した。

##### (2) APA-SK2 細胞の調製

SK2 細胞を 1.8% (w/v) アルギン酸溶液で  $5 \times 10^6$  cells/ml あるいは  $1 \times 10^6$  cells/ml に懸濁し、アルギン酸マイクロビーズを作製した。PLL は分子量 22,400 を使用し、0.1% (w/v) PLL 溶液および 0.03% (w/v) アルギン酸溶液による処理は 2 回ずつ行った。その他の操作は、第一章・第二節に記載の操作法に従い APA-SK2 細胞を調製した。

##### (3) Aga-SK2 細胞, APA-SK2 細胞の増殖および SK2 mAb 分泌機能の評価

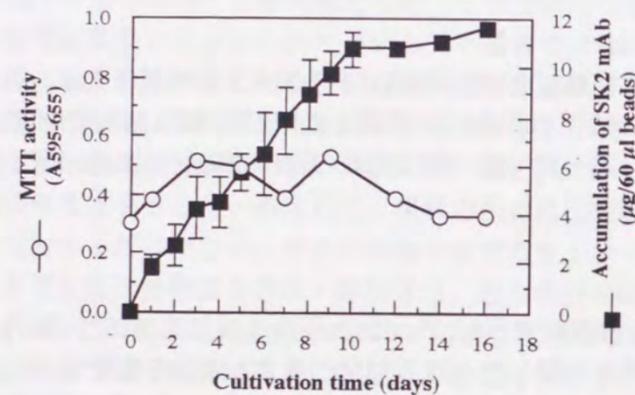
Aga-SK2 細胞あるいは APA-SK2 細胞を 10% FCS 含有 RPMI 1640 で振盪培養 (100 rpm) し、MTT 法により細胞増殖を評価した。MTT 法は第二章・第一節に記載の操作法に従い、Aga-SK2 細胞は DMSO にて、APA-SK2 細胞は 10% SDS/0.005N HCl にてそれぞれ生成された formazan 結晶を完全に溶解した。Aga-SK2 細胞あるいは APA-SK2 細胞の SK2 mAb 分泌機能は、24 時間培養上清中の SK2 mAb 濃度を mouse IgG1-ELISA にて測定し評価した。尚、本章の検討に用いた PLL (M.W.=22,400) 2 回処理 APA マイクロカプセルおよび 2.5%アガロースマイクロビーズが抗体分子を透過することは、第一章の検討により確認している。

尚、その他の実験方法については、前章までに記載の操作法に従った。

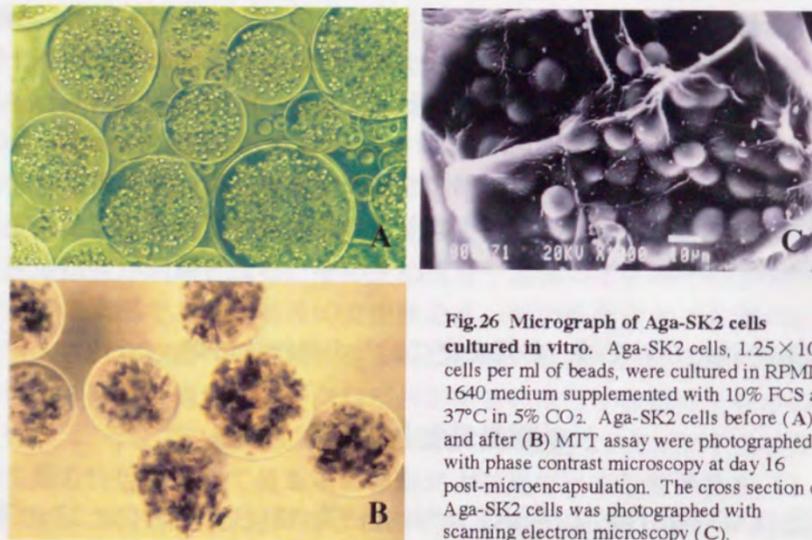
#### 実験結果および考察

Aga-SK2 細胞の MTT 活性および SK2 mAb 分泌量の経日変化を Fig.25 に示す。Aga-SK2 細胞は培養 16 日目においても封入直後と変わらない MTT 活性を維持しており、アガロースマイクロカプセル内の生存 SK2 細胞数に大きな変化のないことが明らかとな

った。培養 16 日目の Aga-SK2 細胞の位相差顕微鏡写真を Fig.26-A に示す。封入された SK2 細胞は小さな細胞塊を幾つか形成しており、MTT 処理を行うと殆どの細胞塊に formazan 結晶の生成が認められた (Fig.26-B)。SK2 細胞を封入したアガロースマイクロビーズの切断面を電子顕微鏡で観察すると、内部の SK2 細胞は良好な細胞形態を保っていた (Fig.26-C)。また、SK2 mAb 分泌機能も培養期間を通して維持されており、Aga-SK2 細胞は SK2 mAb の徐放化担体として機能することが示された (Fig.25)。

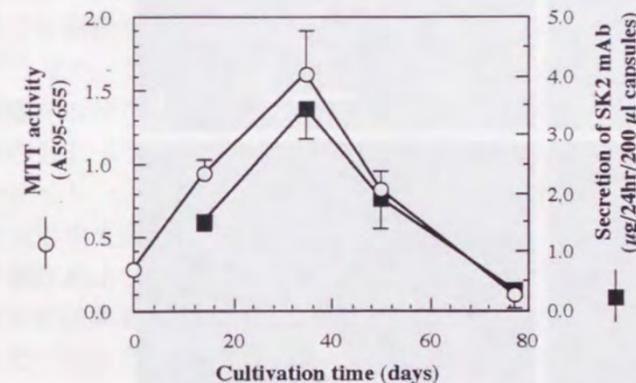


**Fig.25 Profile of proliferation and SK2 mAb-secretion of Aga-SK2 cells under tissue culture condition.** Aga-SK2 cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> on a 12-well culture plate. The culture medium was replaced every two days, and the MTT assay was developed on the indicated day. Accumulation of SK2 mAb was calculated as the concentration of SK2 mAb in conditioned medium which was measured with a mouse IgG1-ELISA system. Each data point represents the mean±SD of 3 cultures.



**Fig.26 Micrograph of Aga-SK2 cells cultured in vitro.** Aga-SK2 cells,  $1.25 \times 10^7$  cells per ml of beads, were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Aga-SK2 cells before (A) and after (B) MTT assay were photographed with phase contrast microscopy at day 16 post-microencapsulation. The cross section of Aga-SK2 cells was photographed with scanning electron microscopy (C).

APA-SK2 細胞の MTT 活性および SK2 mAb 分泌量の経日変化を Fig.27 に示す。APA-SK2 細胞の MTT 活性は培養 30 日目付近まで経日的に上昇し、生細胞数の増加が確認された。その後、徐々に生細胞数は減少したが、この原因はカプセル内の細胞密度の上昇に伴い良好な物質交換が為されなくなったためであろうと考えられた<sup>242)</sup>。培養 APA-SK2 細胞の増殖の様子を Fig.28 に示す。培養日数に伴って封入された SK2 細胞数は増加し、培養 14 日目にはカプセル中央部に細胞塊が観察された (Fig.28-A, B, C)。その後、細胞塊はカプセル内で体積を増し、培養 40 日目にはカプセル内を充満した (Fig.28-D, E)。培養 40 日目の SK2 細胞を封入した APA マイクロカプセルを電子顕微鏡で観察すると、カプセル内部は SK2 細胞で満たされており細胞形態は良好であった (Fig.28-F, G)。APA-SK2 細胞の SK2 mAb 分泌機能は培養期間を通して維持されており、その分泌量は封入 SK2 生細胞数に従った (Fig.27)。これらの結果から、APA-SK2 細胞も SK2 mAb の徐放化担体として *in vivo* において機能するであろうことが示された。



**Fig.27 Profile of proliferation and SK2 mAb-secretion of APA-SK2 cells under tissue culture condition.** APA-SK2 cells,  $1 \times 10^6$  cells per ml of capsules, were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> on a 100 mm culture dish. The culture medium was replaced every two days, and the MTT assay was developed on the indicated day. The amount of SK2 mAb secreted from 200 µl of APA-SK2 cells was calculated as the concentration of SK2 mAb in conditioned medium for 24 h which was measured with a mouse IgG1-ELISA system. Each data point represents the mean±SD of 5-6 cultures.

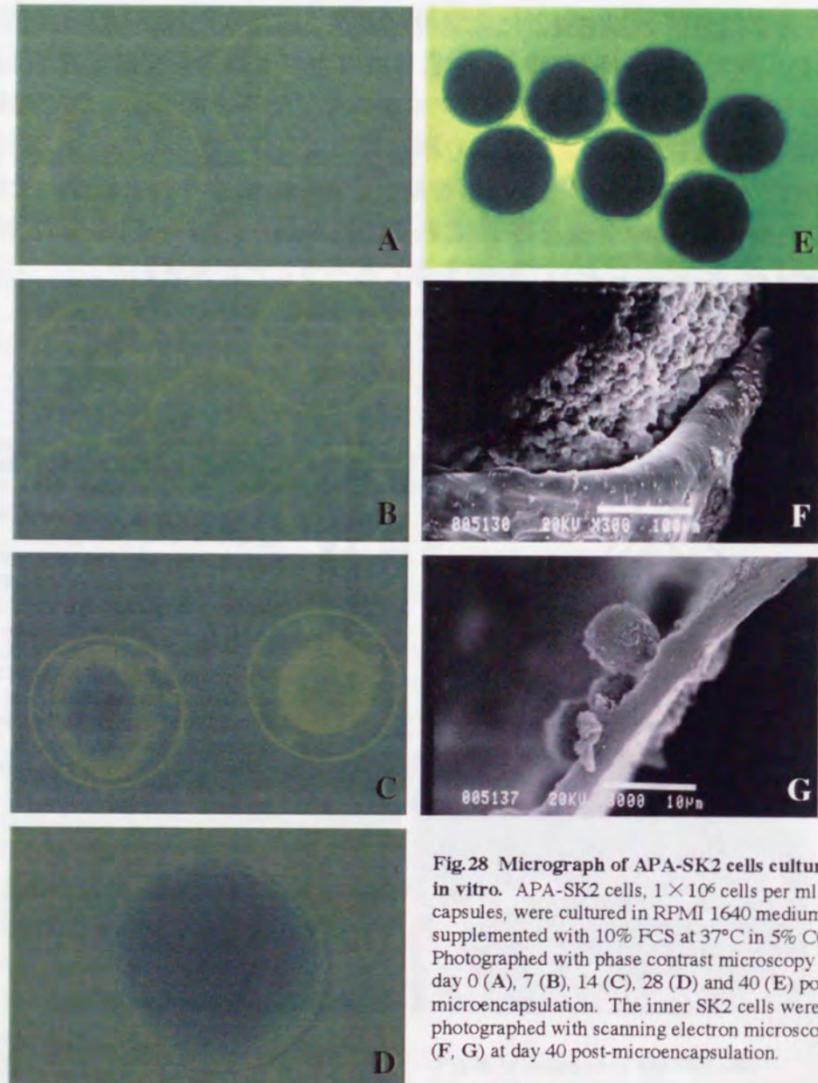


Fig.28 Micrograph of APA-SK2 cells cultured *in vitro*. APA-SK2 cells,  $1 \times 10^6$  cells per ml of capsules, were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ . Photographed with phase contrast microscopy at day 0 (A), 7 (B), 14 (C), 28 (D) and 40 (E) post-microencapsulation. The inner SK2 cells were photographed with scanning electron microscopy (F, G) at day 40 post-microencapsulation.

## 第二節 固定化 SK2 細胞投与によるヒトインターロイキン-6 トランスジェニックマウスの病態改善

前節の結果から, Aga-SK2 細胞あるいは APA-SK2 細胞の投与により, 生体内での SK2 mAb の持続的な徐放が可能であろうことが示唆された. 細胞性製剤のモデルとなるこれらの治療効果を評価する病態動物として, ヒトインターロイキン-6 トランスジェニックマウス (hIL-6 Tgm)<sup>243-245</sup> を選択した. hIL-6 Tgm は C57BL/6 マウス (MHC ハプロタイプは H-2<sup>b</sup>) 由来であり, BALB/c マウス (MHC ハプロタイプは H-2<sup>d</sup>) 由来の SK2 細胞とは allogeneic な関係であるため, 双方に免疫学的な処置を施さずに SK2 細胞を hIL-6 Tgm に投与すると, ホストの免疫系の働きにより投与 SK2 細胞は拒絶反応を受け生着できない. 即ち, Aga-SK2 細胞あるいは APA-SK2 細胞が長期間 hIL-6 Tgm の体内で生存し, SK2 mAb 分泌機能を維持するためには, 免疫的に隔離された環境がこれら細胞性製剤に成立していなければならない.

血清中に約 600 pg/ml の hIL-6 が存在する hIL-6 Tgm は, B 細胞からプラズマ細胞への分化の亢進に基づく IgG1 プラズマサイトーシスあるいはメサンギウム細胞の過増殖に基づく糸球体腎炎を加齢に伴って発症し, 15 週齢程度で死亡することが知られている<sup>243-245</sup>. また, SK2 mAb の頻回投与を長期間に渡って続けることで hIL-6 Tgm のこれらの病態が改善され, 顕著な延命効果が認められることも報告されている<sup>246</sup>. 本節では, 7 週齢の hIL-6 Tgm に Aga-SK2 細胞あるいは APA-SK2 細胞を腹腔内投与し, IgG1 プラズマサイトーシスおよびメサンギウム細胞増殖性腎炎の改善効果を指標に, 細胞性製剤の治療有効性を評価した. IgG1 プラズマサイトーシス抑制の評価は血中 IgG1 濃度・脾臓重量の測定および脾臓病理組織像観察により, メサンギウム細胞増殖性糸球体腎炎抑制の評価は血中尿素窒素 (BUN) 量・尿中タンパク濃度の測定および腎臓病理組織像観察によりそれぞれ行った. また, allogeneic な宿主体内における APA-SK2 細胞の生存・増殖および SK2 mAb 分泌機能維持についても検討を行った.

### 実験材料と方法

#### (1) SK2 mAb の精製

SK2 mAb は SK2 細胞を継代移植した BALB/c マウス腹水の 33%硫酸アンモニウム沈澱分画を, Protein G Sepharose® 4 Fast Flow カラム (Pharmacia) で精製した.

#### (2) hIL-6 Tgm の処置

7 週齢の hIL-6 Tgm (中外製薬・大杉義征先生, 勝目朝夫先生より供与) に Aga-SK2 細胞 ( $3.75 \times 10^7$  cells/3 ml of beads/mouse), APA-SK2 細胞 ( $1.5 \times 10^7$  cells/3 ml of capsules/mouse) あるいは固定化していない SK2 細胞 (free SK2 細胞,  $3.75 \times 10^7$  cells/ml/mouse) を腹腔内投与した. また, 7 週齢から 13 週齢にかけて SK2 mAb (50  $\mu\text{g}$ /mouse) を週 3 回 (計 18 回) 皮下投与した群を作製し, 細胞性製剤投与群の病態改

善効果を比較した。正常マウスには hIL-6 Tgm の littermate を使用した。

(3) 血中 IgG1 濃度, 脾臓重量, BUN 量あるいは尿中タンパク濃度の測定

マウス尾静脈より採血し, 血漿中の IgG1 濃度を mouse IgG1-ELISA にて, BUN 量を尿素窒素 B-テストワコー (和光純薬) にて, それぞれ測定した。また, 代謝採尿ケージを用いて採取した尿中のタンパク濃度を Bio-Rad protein assay kit にて測定した。脾臓重量は 14 週齢のマウスから摘出し測定した。

尚, 本節の実験プロトコールは Fig.29 に示した。また, その他の実験方法については, 前節までに記載の操作法に従った。

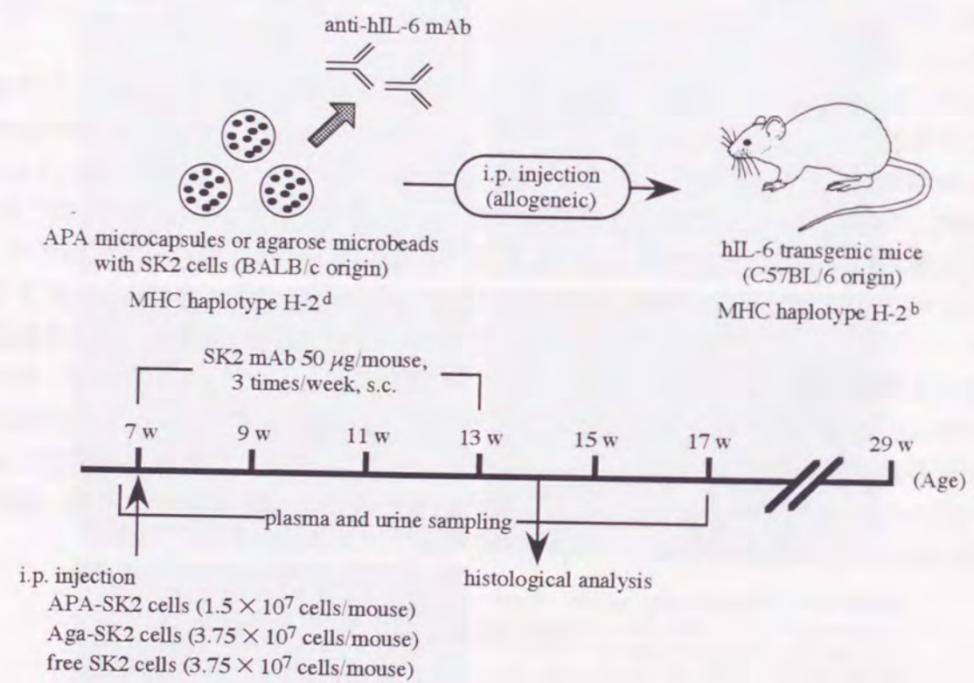


Fig.29 Protocol of cytomedical therapy for IgG1 plasmacytosis and mesangio-proliferative glomerulonephritis in hIL-6 Tgm.

実験結果および考察

hIL-6 Tgm の血中 IgG1 濃度および 14 週齢における脾臓重量を測定した結果を Fig.30 に示す。無処置の hIL-6 Tgm では 10 週齢以降急激な IgG1 レベルの上昇が認められ, 明

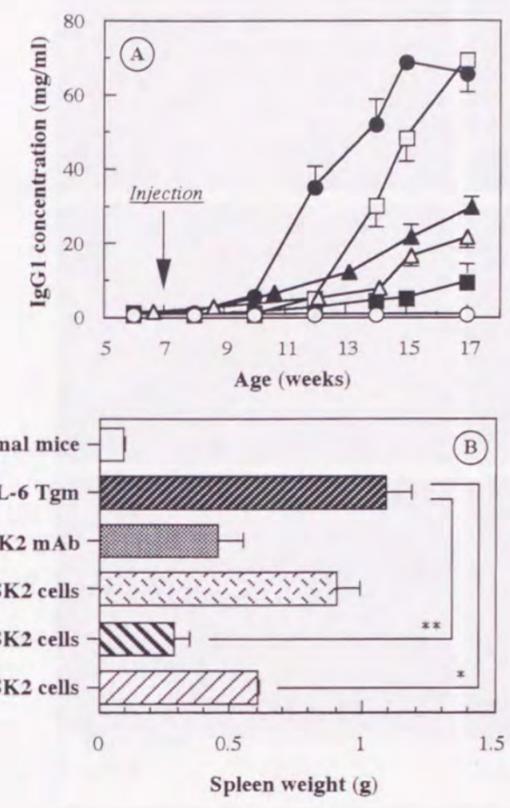


Fig.30 Therapeutic effect of APA-SK2 cells, Aga-SK2 cells, free SK2 cells, and SK2 mAb on IgG1 plasmacytosis in hIL-6 Tgm. Three ml of APA-SK2 cells,  $5 \times 10^6$  cells per ml of capsules, or Aga-SK2 cells,  $1.25 \times 10^7$  cells per ml of beads, were intraperitoneally injected into hIL-6 Tgm at 7 weeks of age. Five hundred  $\mu$ l of free SK2 cells,  $7.5 \times 10^7$  cells per ml, were intraperitoneally injected into hIL-6 Tgm at 7 weeks of age. SK2 mAb was subcutaneously administered to hIL-6 Tgm from 7 weeks to 13 weeks old, at  $50 \mu$ g/mouse, 3 times/week. A: IgG1 concentration in plasma. The mouse IgG1 concentration in plasma was measured by mouse IgG1-ELISA. (○): Normal mice; (●): Untreated hIL-6 Tgm; (△): SK2 mAb-administered hIL-6 Tgm; (□): Free SK2 cell-injected hIL-6 Tgm; (■): APA-SK2 cell-injected hIL-6 Tgm; (▲): Aga-SK2 cell-injected hIL-6 Tgm. Each data point represents the mean  $\pm$  SEM of 4-7 mice. B: Spleen weight of hIL-6 Tgm at 14 weeks of age. Each data value represents the mean  $\pm$  SD of 4-6 mice. \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$  significantly different from untreated hIL-6 Tgm.

らかな IgG1 プラズマサイトーシスの症状を呈した。Aga-SK2 細胞投与群および APA-SK2 細胞投与群では血中 IgG1 濃度の上昇は顕著に抑制され, 特に APA-SK2 細胞投与群の IgG1 プラズマサイトーシス改善効果は, SK2 mAb を 18 回投与した群の効果を上回る結果となった。一方, free SK2 細胞を投与した hIL-6 Tgm の血中 IgG1 濃度の上昇は 2 週間遅らされたに過ぎず, これは投与された SK2 細胞が宿主免疫系により短期間で拒絶されたことを示唆している。脾臓重量測定結果は各群の血中 IgG1 濃度の変化と良く相関していた。無処置群の脾臓は正常マウス (hIL-6 Tgm の littermate) の約 12 倍に肥大しており, Aga-SK2 細胞あるいは APA-SK2 細胞を投与することで有意に抑制された。これら脾臓の病理組織像を観察すると, 無処置群および free SK2 細胞投与群では浸潤してきた多量の形質細胞が認められ, 赤脾髄および白脾髄ともにその構造が破壊されていた (Fig.31-B, D)。一方, SK2 mAb 投与群, APA-SK2 細胞投与群および Aga-SK2 細胞投与群では赤脾髄に軽微な形質細胞の浸潤を認めたが, 白脾髄の構造は正常に保たれていた (Fig.31-C, E, F)。これらの結果から Aga-SK2 細胞あるいは APA-SK2 細胞投与によって hIL-6 Tgm の IgG1 プラズマサイトーシスが顕著に抑制されることが判明した。

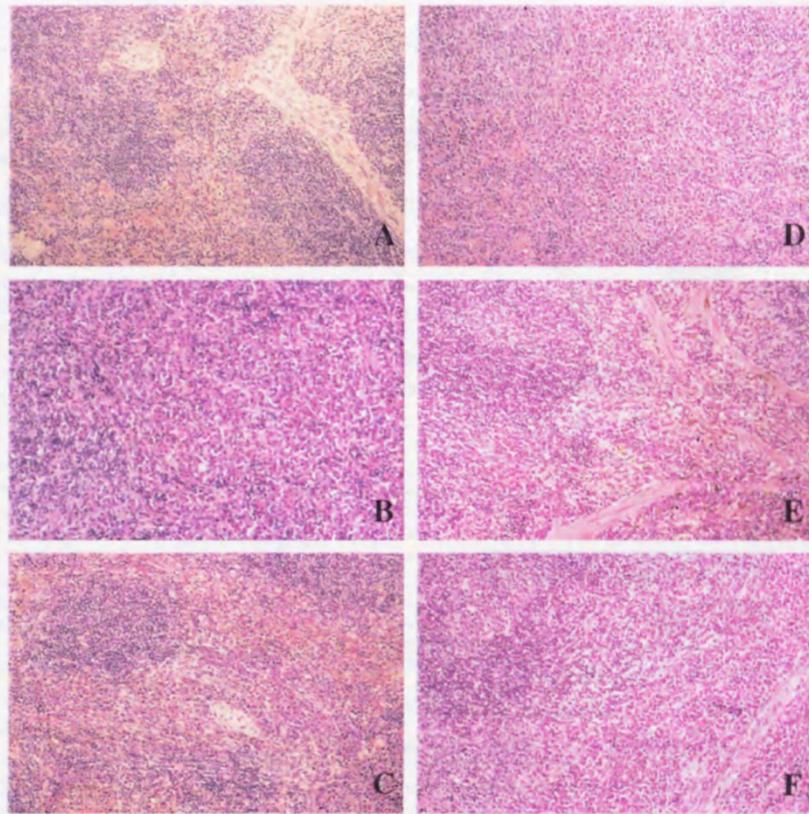


Fig.31 Histological appearance of spleen in hIL-6 Tgm at 14 weeks of age with hematoxylin and eosin staining. A: Normal mice; B: Untreated hIL-6 Tgm; C: SK2 mAb-administered hIL-6 Tgm; D: Free SK2 cell-injected hIL-6 Tgm; E: APA-SK2 cell-injected hIL-6 Tgm; F: Aga-SK2 cell-injected hIL-6 Tgm.

BUN 量および尿中タンパク濃度の経日変化を Fig.32 と Fig.33 にそれぞれ示す。無処置群では 13 週齢以降に BUN 量が、11 週齢以降に尿中タンパク濃度が異常値を示す個体を認め、これらのマウスはメサンギウム細胞増殖性糸球体腎炎を発症していると考えられた。Aga-SK2 細胞あるいは APA-SK2 細胞投与群では測定期間を通して両測定値ともすべての個体で正常値を示した。即ち、Aga-SK2 細胞および APA-SK2 細胞の投与によって hIL-6 Tgm の腎炎発症が抑制されていることが強く示唆された。14 週齢における腎臓の病理組織像を観察すると、無処置群および free SK2 細胞投与群では、メサンギウム細胞の過増殖とメサンギウム基質の過形成のため糸球体が膨満し、糸球体内に毛細血管を認めることができなかった。また、尿細管上皮細胞の細胞外基質により、糸球体周囲の尿細管内腔が塞がれるか若しくは極めて狭くなっているのが観察された (Fig.34-B, D)。一方、SK2 mAb 投与群と同様に APA-SK2 細胞投与群および Aga-SK2 細胞投与群でも尿細管の構造はほぼ正常に保たれており、病理組織像の観察からも細胞性製剤投与によるメサンギウム細胞増殖性糸球体腎炎の発症遅延が確認された (Fig.34-C, E, F)。

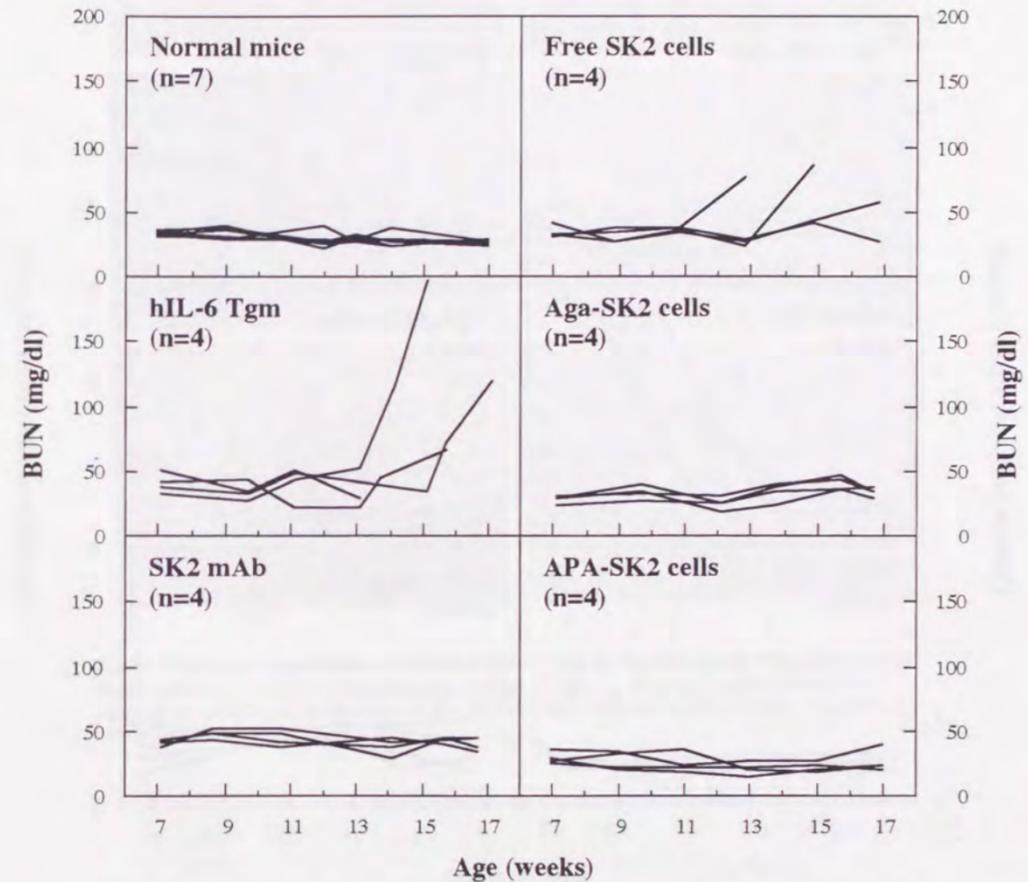


Fig.32 Therapeutic effect of APA-SK2 cells, Aga-SK2 cells, free SK2 cells, and SK2 mAb on the BUN level in hIL-6 Tgm. The treatment of each group was as described in Fig.30. The BUN level was measured by Urea Nitrogen Test-Wako.

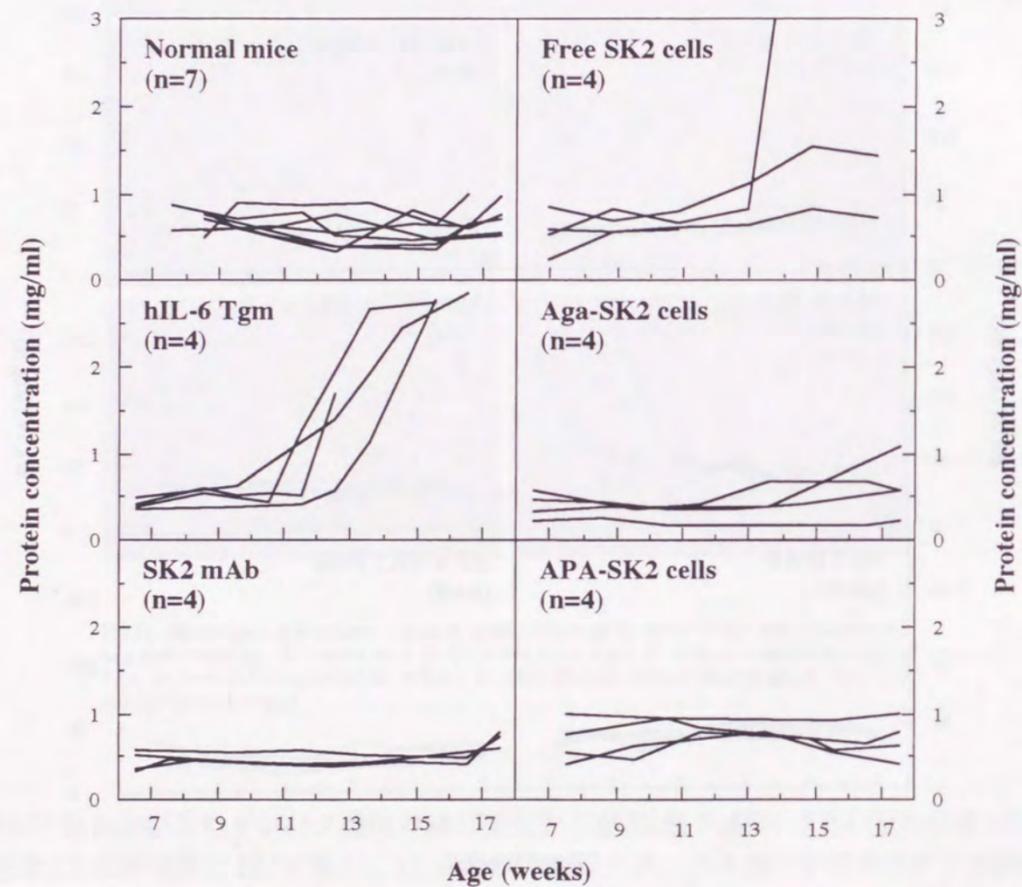


Fig.33 Therapeutic effect of APA-SK2 cells, Aga-SK2 cells, free SK2 cells, and SK2 mAb on proteinuria in hIL-6 Tgm. The treatment of each group was as described in Fig.30. The protein concentration in urine was measured by Bio-Rad protein assay kit.

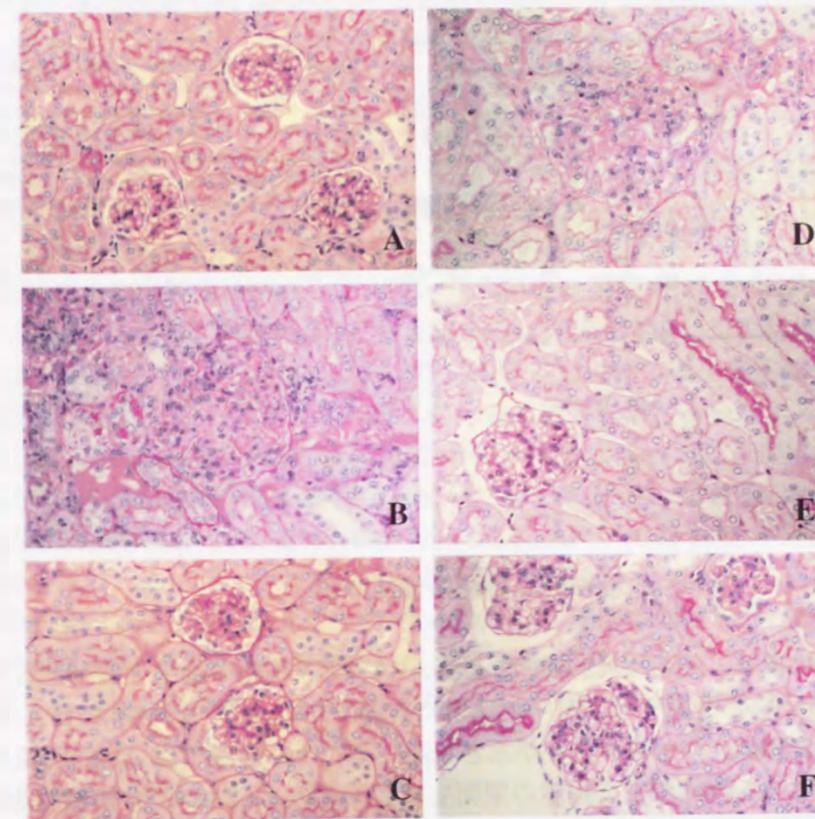


Fig.34 Histological appearance of kidney in hIL-6 Tgm at 14 weeks of age with periodic acid Schiff staining. A: Normal mice; B: Untreated hIL-6 Tgm; C: SK2 mAb-administered hIL-6 Tgm; D: Free SK2 cell-injected hIL-6 Tgm; E: APA-SK2 cell-injected hIL-6 Tgm; F: Aga-SK2 cell-injected hIL-6 Tgm.

IgG1 プラズマサイトーシスおよびメサンギウム細胞増殖性糸球体腎炎の改善に伴い、細胞性製剤を投与した hIL-6 Tgm の生存日数は、無処置群と比較して顕著に延長された (Fig. 35)。特に APA-SK2 細胞投与群においては SK2 mAb 頻回投与群を凌ぐ延命効果が得られた。

以上の結果は、Aga-SK2 細胞あるいは APA-SK2 細胞の投与が hIL-6 Tgm の IgG1 プラズマサイトーシスおよびメサンギウム増殖性腎炎の抑制に非常に有効であり、Aga-SK2 細胞および APA-SK2 細胞が SK2 mAb 徐放化担体、即ち細胞性製剤として生体内で十分に機能し得ることを示している。

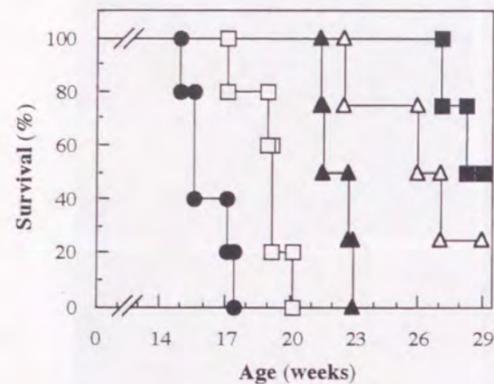


Fig.35 Effect of APA-SK2 cells, Aga-SK2 cells, free SK2 cells, and SK2 mAb on survival time of hIL-6 Tgm. The treatment of each group was as described in Fig.30. (●): Untreated hIL-6 Tgm; (△): SK2 mAb-administered hIL-6 Tgm; (□): Free SK2 cell-injected hIL-6 Tgm; (■): APA-SK2 cell-injected hIL-6 Tgm; (▲): Aga-SK2 cell-injected hIL-6 Tgm.

### 第三節 *in vivo*における固定化SK2細胞の機能評価

前節の結果により、Aga-SK2細胞およびAPA-SK2細胞の細胞性製剤としての投与がSK2 mAbの*in vivo*長期デリバリーに非常に有効であり、その有効性はAPA-SK2細胞の方がAga-SK2細胞よりも高いことが示された。そこで、本節ではAPA-SK2細胞がallogeneicな宿主体内でどの程度の期間生存し、そのSK2 mAb分泌機能を維持しているのかに関して検討を行った。

#### 実験材料と方法

##### (1) APA-SK2細胞の投与および回収

7週齢のC57BL/6雌性マウスにAPA-SK2細胞 ( $3 \times 10^6$  cells/3 ml of capsules/mouse)を腹腔内投与した。経日的にこれらのマウスを開腹し、APA-SK2細胞を無菌的に回収した。APA-SK2細胞のMTT活性を測定すると共に、10% FCS含有RPMI 1640で24時間培養し、培養上清中のSK2 mAb濃度をmouse IgG1-ELISAにて測定した。

##### (2) 血中SK2 mAb濃度の測定

7週齢のC57BL/6雌性マウスにAPA-SK2細胞 ( $3 \times 10^6$  cells/3 ml of capsules/mouse)あるいはfree SK2細胞 ( $3.75 \times 10^7$  cells/ml/mouse)を腹腔内投与した。経日的に尾静脈より採血し、血清中のSK2 mAb濃度をIL-6依存性の増殖を示すMH60.BSF2細胞<sup>247)</sup>を用いたbioassayにて測定した。96穴培養プレートに4 pg/mlのhIL-6および10% FCSを含有するRPMI 1640に懸濁したMH60.BSF2細胞を $5 \times 10^3$  cells/wellで播種し、ここに精製SK2 mAbあるいはサンプル血清を添加した。68時間培

養後、MTT法により測定したMH60.BSF2細胞の増殖阻害を指標にSK2 mAb濃度を算出した。

尚、その他の実験方法については、前節までに記載の操作法に従った。

#### 実験結果および考察

C57BL/6マウスの腹腔内に投与したAPA-SK2細胞のMTT活性とSK2 mAb分泌量の経日変化をFig.36に示す。投与後21日目までAPA-SK2細胞のMTT活性は上昇し、生細胞数の増加が確認された。しかしながら、投与30日目以降では生細胞数の減少が観察され、細胞密度の増大によるカプセル内部への物質拡散の制限あるいは宿主免疫系からの攻撃により封入SK2細胞が死滅することが示唆された。APA-SK2細胞のSK2 mAb分泌機能は投与後46日目においても維持されていたが、SK2 mAb分泌量はカプセル内の生細胞数に依存した推移を示した。*in vivo*から回収したAPA-SK2細胞のMTT活性およびSK2 mAb分泌量はともに*in vitro*で培養した場合(Fig.27)と比較して高値を示した。これは、宿主体内で産生されるサイトカイン類がSK2細胞の増殖および細胞機能に何らかの影響を与えたためであろうと考えられた。尚、データには示していないが回収したAPAマイクロカプセルの表面はintactであり、宿主の炎症反応は認められなかった。

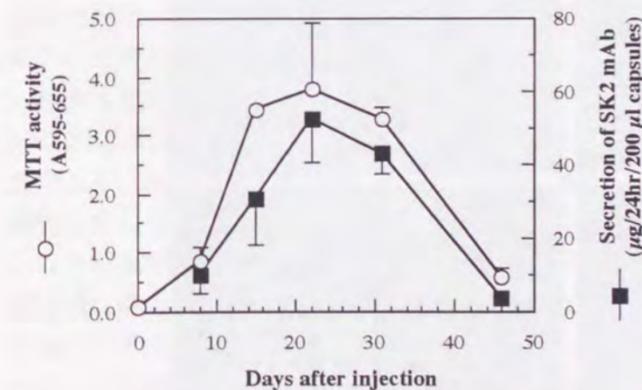
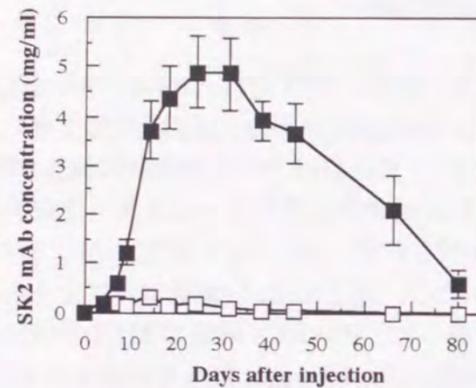


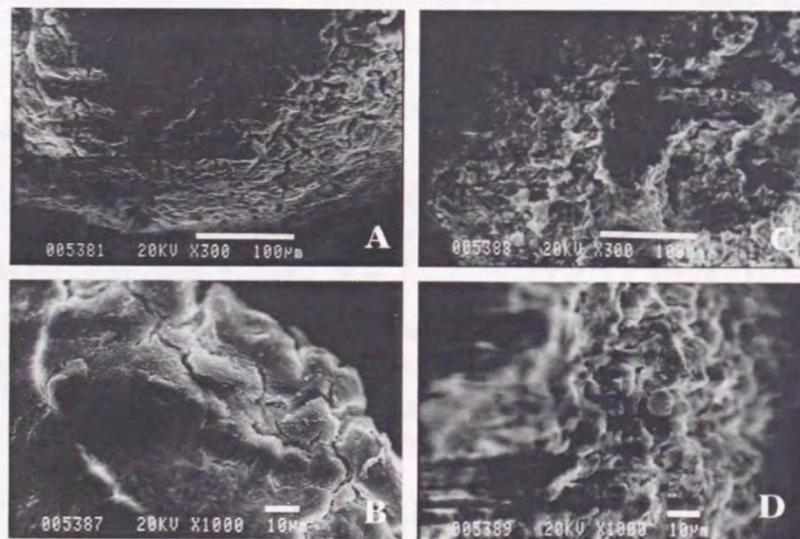
Fig.36 Profile of proliferation and SK2 mAb secretion of APA-SK2 cells injected into allogeneic recipient. Three ml of APA-SK2 cells,  $1 \times 10^6$  cells per ml of capsules, were intraperitoneally injected into normal C57BL/6 mice at 7 weeks of age. APA-SK2 cells were retrieved from these mice, and the MTT assay was developed on the indicated day. The amount of secreted SK2 mAb was calculated based on the concentration in conditioned medium which was measured with a mouse IgG1-ELISA system. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of 3-4 mice.

APA-SK2細胞を投与したC57BL/6マウスの血中SK2 mAb濃度をFig.37に示す。血中SK2 mAb濃度推移はFig.36で示したAPA-SK2細胞の生細胞数変化にほぼ一致しており、投与後10日目から70日目にかけて1 mg/mlのSK2 mAbが検出された。また、APA-SK2細胞によるSK2 mAbの*in vivo*デリバリーの可能な期間が80日程度にも及ぶことが判明した。hIL-6 Tgmの血中hIL-6濃度が約600 pg/mlであることを考慮すると、hIL-6 Tgmの腹腔内に投与したAPA-SK2細胞から放出されたSK2 mAbは、血液循環を

介して全身性にデリバリーされ、投与後 80 日間もの長期に渡って hIL-6 の作用を十分に阻害することができたものと推察された。一方、free SK2 細胞を投与した場合は、血中に SK2 mAb は殆ど検出されず、投与後早期に宿主免疫系により拒絶されたことが示唆された。



**Fig.37** Concentration of serum SK2 mAb in C57BL/6 mice injected with APA-SK2 cells or free SK2 cells. Three ml of APA-SK2 cells,  $1 \times 10^6$  cells per ml of capsules, or 500  $\mu$ l of free SK2 cells,  $7.5 \times 10^7$  cells per ml, were intraperitoneally injected into normal C57BL/6 mice at 7 weeks of age. (■): APA-SK2 cells-injected C57BL/6 mice; (□): Free SK2 cells-injected C57BL/6 mice. The SK2 mAb concentration in serum was measured by MH60.BSF2 cells-proliferation assay system. Each data point represents the mean  $\pm$  SEM of 4 mice.



**Fig.38** Micrograph of APA-SK2 cells at day 100 post-injection. APA-SK2 cells,  $1 \times 10^6$  cells per ml of capsules, were intraperitoneally injected in C57BL/6 mice. On day 100, APA-SK2 cells were retrieved from these mice, and the surface (A, B) or the cross section (C, D) of cluster of SK2 cells was photographed with scanning electron microscopy.

投与後 100 日目に回収した APA-SK2 細胞の電子顕微鏡写真を Fig.38 に示す。カプセル内の SK2 細胞は一つの細胞塊として存在しており、その表面において個々の細胞を識別することは不可能であった (Fig.38-A, B)。断面を観察すると細胞塊の表面付近 (Fig.38-C 左上) に正常な細胞形態を維持した SK2 細胞は認めることができず、内部 (Fig.38-C 右下, D) に細胞様の粒子が僅かに存在していた。また、細胞塊は内部まで非常に密であり、カルシウム塩等の沈着によると推察される石灰化様の現象が認められた。一般的な樹立細胞株は永久増殖能を有し接触阻害を示さないという事実から、封入 SK2 細胞は APA マイクロカプセル内に充満した後も限界まで増殖を続け、増殖のためのスペースが消失すると細胞機能を維持できなくなり死滅したと考えられた。

#### 第四節 小括

従来より、医薬品に安全性や有効性、信頼性に関して最も高い保証を与えるという薬物治療の最適化の観点から、リボソームやマイクロカプセル、ナノスフェア等を用い、徐放性等の機能を付与した DDS 製剤の開発が盛んに行われている。しかしながら、最も精密かつ鋭敏なセンサー機能を駆使して、生体内環境との有機的連関を維持しつつ、生理活性物質の放出制御をしている粒子は生体内の細胞自身である。従って、将来的に最も理想的な DDS 製剤は、著者が本論文において提唱する「細胞性製剤」であると言っても過言ではない。本研究は、細胞がホメオスタシスを維持するために営んでいる生命現象に学び、その生命現象を応用して臨床応用可能な DDS 製剤を開発しようとするものであり、その成果は細胞療法・遺伝子治療・人工臓器などの領域においても応用が可能であり、将来の医学・薬学の分野において多大な貢献を為すものと考えられる。

細胞性製剤を開発するにあたり、実験モデルとして生理活性物質を産生・分泌する細胞には SK2 細胞を、病態モデル動物には hIL-6 Tgm を選択し検討を行った。培養系での評価により、Aga-SK2 細胞および APA-SK2 細胞は SK2 mAb の徐放化担体として十分な機能を有しており、担体内部に封入された SK2 細胞は極めて良好な細胞形態を保持していることが判明した。この結果は、これら細胞性製剤のモデルを生体内に投与することで、長期間に渡る SK2 mAb のデリバリーが可能となることを期待させた。そこで、加齢に伴い IgG1 プラズマサイトーシスおよびメサンギウム細胞増殖性糸球体腎炎を発症し、SK2 mAb の長期頻回投与によってそれらの病態改善が認められる hIL-6 Tgm に、Aga-SK2 細胞あるいは APA-SK2 細胞を単回腹腔内投与し、その治療効果を評価した。

Aga-SK2 細胞あるいは APA-SK2 細胞を投与した hIL-6 Tgm では、無処置群と比較して IgG1 プラズマサイトーシスおよびメサンギウム細胞増殖性糸球体腎炎の明らかな発症抑制が確認された。病態改善効果に伴って顕著な延命効果も観察され、これらの治療効果は Aga-SK2 細胞投与群よりも APA-SK2 細胞投与群でより大きく現れた。高分子担体に封入していない free SK2 細胞を投与した hIL-6 Tgm には殆ど治療効果が無かったこと、また APA-SK2 細胞投与群においては SK2 mAb を長期頻回投与した群を上回る治療効果を示したことから、高分子担体が内部に封入した SK2 細胞をホストの免疫系から保護し、

長期間に渡る SK2 mAb 産生・分泌を達成させたことが強く示唆された。

hIL-6 Tgm に対する細胞性製剤の治療効果が SK2 mAb の長期デリバリーに起因することを確認するために、allogeneic な宿主体内における APA-SK2 細胞の機能に関して詳細な検討を行った。APA-SK2 細胞はマウス腹腔内において良好な増殖を示し、それに伴った SK2 mAb 分泌量の増大を認めたが、投与後 30 日目以降では APA カプセル内の SK2 生細胞数および SK2 mAb 分泌量の減少が確認された。APA-SK2 細胞が死滅する原因として、*in vitro* 培養系と同様に APA マイクロカプセル内の SK2 細胞密度の上昇により、栄養・酸素等の拡散がカプセル中心部にまで及ばなくなったことが推測された。この APA-SK2 細胞の機能低下は、APA-SK2 細胞を投与した C57BL/6 マウスの血中 SK2 mAb 推移の結果からも示された。APA-SK2 細胞投与後 14 日目から 45 日目には、血中に SK2 mAb は 3~5 mg/ml という高濃度で存在していたが、その後徐々に減少し、その経日的な血中濃度推移は腹腔内の APA-SK2 生細胞数と非常に相関していた。この APA-SK2 細胞の細胞性製剤としての機能喪失は、投与後 100 日目にマウス腹腔から回収した APA-SK2 細胞の電子顕微鏡観察により、増殖に必要なカプセル内のスペースが消失したために封入 SK2 細胞が死滅したためであろうと推察された。しかしながら、宿主の免疫系により APA-SK2 細胞の細胞機能が傷害され細胞死に至ったという可能性は否定できない。この点に関しては次章において詳細な検討を行った。

本節における検討により、APA-SK2 細胞は allogeneic な宿主体内にも関わらず、80 日間という長期間に渡り SK2 mAb 徐放化担体として機能していることが明らかとなり、細胞性製剤が生理活性物質の *in vivo* 長期デリバリーを目的とした優れた新規投与剤形であることが示された。今や遺伝子工学的あるいは細胞工学的手法を駆使し、様々な生理活性物質を産生・分泌する細胞を創製することが可能である。また、様々な疾患の原因が分子あるいは遺伝子レベルで解明されてきており、各種疾患の治療に有効な生理活性物質をはじめとする遺伝子産物も特定されつつある。現在、糖尿病<sup>115,129,248-252</sup>、アデノシンデアミナーゼ欠損症<sup>253</sup>、血友病<sup>254</sup>、アルツハイマー病<sup>255-259</sup>、パーキンソン病<sup>255,260-272</sup>、筋委縮性側索硬化症<sup>255,273-275</sup>、小人症<sup>276-279</sup>等の疾患に対して、機能性細胞を用いた細胞療法法の適用が研究されており、本研究で得られた結果と同様に長期に渡る生理活性物質の局所的あるいは全身的デリバリーが動物実験レベルで確認されている。今後、細胞性製剤の臨床応用を見据えた場合、当然ながら細胞性製剤の安全性を高め且つ品質管理を厳格に行うために、用いる高分子担体あるいは細胞に関してより詳細な検討が必要であるが、それと同時に、疾患の成立機序とその治療に有効な生理活性物質の解明が不可欠となってくる。さらに、放出制御機能を有する半永久的な薬物供与体として細胞性製剤を実現させるためには、細胞の増殖制御機構およびセンサー機能に関わっている分子および遺伝子が同定されなければならない。これら様々な分野の研究が進展し統合されたときに、細胞性製剤は究極の DDS 製剤として実現されるであろう。

#### 第四章 細胞封入 APA マイクロカプセルの免疫原性と免疫隔離性

前章の検討により、細胞性製剤が allogeneic な宿主の体内で長期間に及ぶ生理活性物質の徐放化担体として機能することが明らかとなった。また、APA-SK2 細胞は投与後 20~30 日目に生細胞数が最大となり、その後封入 SK2 細胞が死滅していくことも判明した。APA-SK2 細胞の機能低下の原因の一つとして、宿主免疫系による封入 SK2 細胞の破壊という可能性は否定できない。細胞性製剤と宿主との関係が allogeneic あるいは xenogeneic な場合において、細胞性製剤適用による治療の最も大きな障害が宿主免疫系の活性化に伴う拒絶反応である。即ち、細胞性製剤の投与による宿主免疫系の活性化を阻害し、細胞性製剤の治療有効期間を延長させるためには、高分子担体による封入細胞の宿主免疫系からの完全な隔離が望まれる。

免疫系はその機序および mediator から、大きく細胞性免疫と液性免疫の二つに分類される。移植免疫において、allograft の拒絶に対する免疫反応の主役は T リンパ球であり、これは本来は自己細胞がウイルス感染や腫瘍化により異端化したときにそれを排除するシステムである<sup>280</sup>。allogeneic な細胞の主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex ; MHC) 分子は自己細胞の MHC 分子とは微妙な違いがあり、自己細胞の MHC 分子に異常なペプチドが組み込まれたものに類似したものとして T 細胞のレセプターに認識されると考えることができる。即ち、allograft の拒絶は主として細胞性免疫により起こり、その機序は T 細胞によるアロ抗原の認識と特異的な細胞破壊であると理解できる。一方、xenograft の拒絶には補体および抗体が主役を為す液性免疫が大きく関与しており、allograft の拒絶反応とは質的に異なったものである<sup>280-286</sup>。

本章においては、細胞性製剤の開発における次のステップとして、細胞性製剤の適用が宿主免疫系に及ぼす影響を、細胞性製剤と宿主とが allogeneic な組合せの場合について詳細に検討した。また、SK2 細胞に対する免疫の成立したマウスに APA-SK2 細胞を投与することで、APA マイクロカプセルの免疫隔離性を評価した。さらには、将来的に xenogeneic な組合せで細胞性製剤による治療を行うことを想定し、APA-SK2 細胞のウサギ抗血清に対する抵抗性を検討することで、APA マイクロカプセルの異種移植免疫に対する隔離性も評価した。

##### 第一節 SK2 細胞封入 APA マイクロカプセルの投与に対する宿主の免疫応答

APA-SK2 細胞を hIL-6 Tgm の origin である C57BL/6 マウスの腹腔内に投与し、宿主の細胞性免疫および液性免疫の活性化に関して検討を行った。SK2 細胞は BALB/c マウス由来のハイブリドマであり、その MHC ハプロタイプは H-2<sup>d</sup> である。また hIL-6 Tgm および C57BL/6 マウスの MHC ハプロタイプは H-2<sup>b</sup> であり、SK2 細胞とは allogeneic な関係となる。細胞性免疫活性は APA-SK2 細胞を投与したマウス脾細胞の MHC 拘束性細胞傷害活性により、また液性免疫活性は同マウス血清の SK2 細胞溶解活性によりそれぞれ評価した。

## 実験材料と方法

### (1) 細胞性免疫活性の評価

細胞性免疫活性の評価は<sup>51</sup>Cr遊離測定法により行った。7週齢のC57BL/6雌性マウスにAPA-SK2細胞(3×10<sup>6</sup> cells/3 ml of capsules/mouse)あるいはfree SK2細胞(3×10<sup>6</sup> cells/ml/mouse)を腹腔内投与した。投与後9日目あるいは27日目にこれらのマウスから脾細胞を単離し、エフェクター細胞として使用した。SK2細胞(1×10<sup>7</sup> cells/ml/mouse)を1週間毎に4~5回免疫したC57BL/6マウスの最終免疫から8日後に単離した脾細胞をポジティブコントロールとして、intactなC57BL/6マウスの脾細胞をネガティブコントロールとしてそれぞれ使用した。<sup>51</sup>Crラベル化SK2細胞は<sup>51</sup>Crの自然遊離が大きくターゲット細胞として使用することが困難であったため、ターゲット細胞にはSK2細胞と同じMHCハプロタイプ(H-2<sup>d</sup>)を発現しているマウスマストサイトーマのP815細胞を用いた。P815細胞の<sup>51</sup>Crラベル化は、10% FCS含有RPMI 1640培地で継代培養したP815細胞を1×10<sup>7</sup> cells/500 μlに調製し、100 μCiのNa<sup>251</sup>CrO<sub>4</sub>(American Radiolabeled Chemicals)を添加して37℃, 5% CO<sub>2</sub>条件下で1時間インキュベーションすることで行った。10% FCS含有RPMI 1640培地で適当な細胞比に調製した<sup>51</sup>Crラベル化P815細胞と脾細胞とを37℃, 5% CO<sub>2</sub>条件下で4時間インキュベーションし、上清に遊離した<sup>51</sup>Crのカウントをγカウンターで測定した。細胞性免疫活性はマウス脾細胞のターゲット細胞に対する細胞傷害活性(%)で表し、以下に示す式に従って算出した。

$$\text{細胞傷害活性 (\%)} = ([1] - [2]) / ([3] - [2]) \times 100$$

[1]: 細胞傷害性<sup>51</sup>Cr遊離

[2]: 自然<sup>51</sup>Cr遊離

[3]: 最大<sup>51</sup>Cr遊離

尚、最大<sup>51</sup>Cr遊離あるいは自然<sup>51</sup>Cr遊離はそれぞれ0.1% Triton X-100あるいは10% FCS含有RPMI 1640培地で<sup>51</sup>Crラベル化P815細胞を4時間インキュベーションしたときの上清中に遊離した<sup>51</sup>Crのカウントを表している。

### (2) 液性免疫活性の評価

液性免疫活性の評価は抗体-補体依存性細胞溶解測定法により行った。7週齢のC57BL/6雌性マウスにAPA-SK2細胞(3×10<sup>6</sup> cells/3 ml of capsules/mouse)あるいはfree SK2細胞(3×10<sup>6</sup> cells/ml/mouse)を腹腔内投与した。投与後7日目、14日目、21日目あるいは27日目にこれらのマウスから採血し、血清を-80℃で保存した。SK2細胞(1×10<sup>7</sup> cells/ml/mouse)を1週間毎に4~5回免疫したC57BL/6マウスの最終免疫から8日後に回収した血清をポジティブコントロールとして、intactなC57BL/6マウス

の血清をネガティブコントロールとしてそれぞれ使用した。10% FCS含有RPMI 1640培地に懸濁したSK2細胞を96穴培養プレートに1.5×10<sup>5</sup> cells/wellで播種し、マウス血清を最終濃度で10%あるいは1%となるように添加した。37℃, 5% CO<sub>2</sub>条件下で30分間インキュベーションし、補体源としてモルモット血清を最終濃度で10%となるように添加した。さらに30分間インキュベーションした後、MTT法によりSK2細胞のviabilityを測定した。液性免疫活性はマウス血清のターゲット細胞に対する細胞溶解活性(%)で表し、以下に示す式に従って算出した。

$$\text{細胞溶解活性 (\%)} = 100 - \text{ターゲット細胞の生存率 (\%)} = 100 - ([1] / [2] \times 100)$$

[1]: 各サンプル血清添加群のMTT活性

[2]: ネガティブコントロールのMTT活性

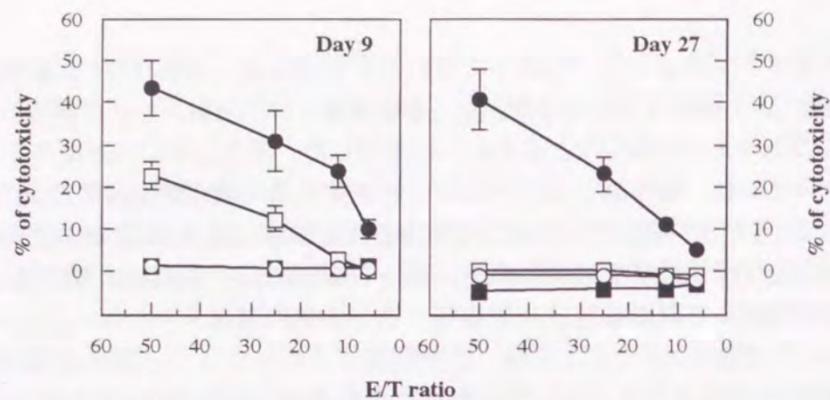
尚、ネガティブコントロールのMTT活性は、SK2細胞を10% FCS含有RPMI 1640培地のみでインキュベーションした場合のMTT活性と同等であり、正常マウス血清およびモルモット補体がSK2細胞を傷害しないことを確認した。

尚、その他の実験方法については、前章までに記載の操作法に従った。

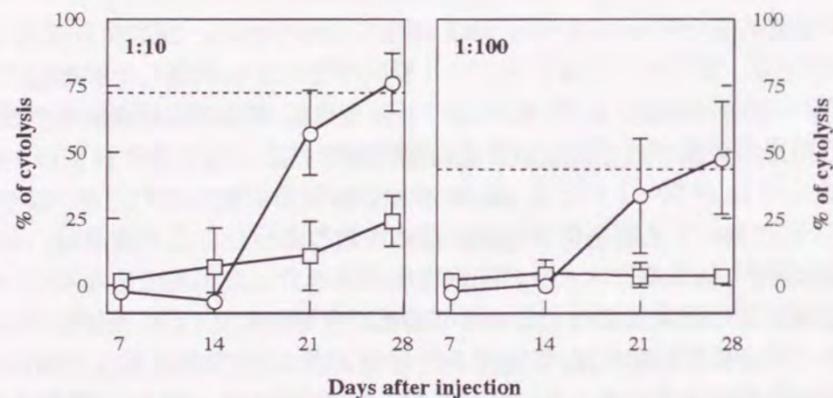
## 実験結果および考察

APA-SK2細胞の投与あるいはfree SK2細胞の投与が宿主細胞性免疫系に及ぼす影響をFig.39に示す。ポジティブコントロール群のマウスから単離した脾細胞には、エフェクター細胞/ターゲット細胞(E/T)比が50:1のとき約40%の細胞傷害活性を認め、SK2細胞に対する細胞性免疫が成立していることが確認された。投与後9日目のfree SK2細胞投与群ではE/T比が50:1のとき23%の細胞傷害活性が検出されたが、投与後27日目にはどのE/T比においても細胞傷害活性は認められなかった。この結果は、投与されたfree SK2細胞が投与後早期にホストの細胞性免疫系を介した拒絶反応を受け、その反応の主体がMHC拘束性の細胞傷害によるものであることを示している。一方、APA-SK2細胞を投与したマウスの脾細胞には、投与後9日目および27日目のどちらにおいても、P815細胞に対する細胞傷害活性は検出されなかった。この結果から、封入SK2細胞とホストの免疫担当細胞との接触をAPAマイクロカプセルが妨げたことにより、ホストにMHC拘束性の細胞性免疫が成立するのを抑制したことが推察された<sup>287,288</sup>。またこの結果は、APAマイクロカプセルの破壊によるSK2細胞の漏出が殆ど無いことも併せて示しており、APA-SK2細胞がホストの腹腔内で安定に存在していることがうかがえた。

APA-SK2細胞投与あるいはfree SK2細胞投与が宿主液性免疫系に及ぼす影響をFig.40に示す。free SK2細胞投与群の10%血清では投与後の日数に伴って僅かずつではあるがSK2細胞溶解活性の上昇が認められ、投与後27日目においては約25%のSK2細胞が傷害された。一方、APA-SK2細胞投与群の投与後21日目以降に回収した血清には顕



**Fig.39** Cytotoxic activity of splenocytes isolated from APA-SK2 cell-injected C57BL/6 mice. Three ml of APA-SK2 cells ( $1 \times 10^6$  cells per ml of capsules; ○) or 1 ml of free SK2 cells ( $3 \times 10^6$  cells/ml; □) were intraperitoneally injected into C57BL/6 mice at 7 weeks of age. On day 9 or 27 after injection, splenocytes were isolated from these mice and incubated with  $^{51}\text{Cr}$ -labeled P815 cells (H-2<sup>d</sup>) which were used as target cells at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$  for 4 h. The splenocytes of intact (■) or SK2 cells-immunized (●) C57BL/6 mice was used as the negative or positive control, respectively. The radioactivity of released  $^{51}\text{Cr}$  was counted by a  $\gamma$ -counter, and the % of cytotoxicity was calculated by the following formula: (% of cytotoxicity) = [(experimental  $^{51}\text{Cr}$ -release) - (spontaneous  $^{51}\text{Cr}$ -release)] / [(maximum  $^{51}\text{Cr}$ -release) - (spontaneous  $^{51}\text{Cr}$ -release)]  $\times 100$ . Maximum  $^{51}\text{Cr}$ -release or spontaneous  $^{51}\text{Cr}$ -release was determined by incubating  $^{51}\text{Cr}$ -labeled P815 cells with 0.1% Triton X-100 or RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS for 4 h and counting the supernatant, respectively. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of 3 or 4 mice.



**Fig.40** Anti-SK2 cell antibody levels in APA-SK2 cell-injected C57BL/6 mice. Three ml of APA-SK2 cells ( $1 \times 10^6$  cells per ml of capsules; ○) or 1 ml of free SK2 cells ( $3 \times 10^6$  cells/ml; □) were intraperitoneally injected into C57BL/6 mice at 7 weeks of age. On days 7, 14, 21 or 27 after injection, sera were collected from these mice and applied to an antibody mediated cytotoxicity assay. The % of cytotoxicity was calculated by the following formula: (% of cytotoxicity) =  $100 - (\% \text{ of viable cell number}) = 100 - [(A_{595-655} \text{ of experimental group}) / (A_{595-655} \text{ of negative control})] \times 100$ . Target SK2 cells of negative control were incubated with serum of intact C57BL/6 mice instead of test serum. The dashed line expresses the cytolytic activity of serum prepared from SK2 cell-immunized C57BL/6 mice. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of 3 mice.

著な SK2 細胞溶解活性が検出され、投与後 28 日目にはポジティブコントロールの血清と同等の細胞傷害活性を認めた。即ち、APA-SK2 細胞を投与された宿主には抗 SK2 細胞抗体の産生が誘導されることが明らかとなり、これは、APA-SK2 細胞から持続的に分泌される様々なタンパク質中に存在する、可溶性のアロ抗原<sup>289)</sup>あるいは腫瘍関連抗原<sup>290)</sup>により宿主の液性免疫系が活性化されたことを示唆している。

本節の検討により、APA-SK2 細胞の投与は allogeneic な宿主の細胞性免疫には影響を与えないが、液性免疫を活性化し、SK2 細胞に対する抗体の産生を促すことが判明した。この結果は、前章の検討で明らかとなった APA-SK2 細胞の細胞性製剤としての機能低下が、宿主の活性化された液性免疫系により封入 SK2 細胞が傷害されたことに起因する可能性を支持している。そこで、活性化された宿主の免疫系に対する APA マイクロカプセルの免疫隔離性を次節において検討した。

## 第二節 APA マイクロカプセルの免疫隔離性

前節の検討により、細胞性製剤と宿主とが allogeneic な組合せでは、投与した細胞性製剤から持続的に分泌されるアロ抗原あるいは腫瘍関連抗原の刺激に起因すると考えられる宿主液性免疫系の活性化が起こることが明らかとなった。アロ抗原あるいは腫瘍関連抗原として認識されるタンパク質を特定することは困難であるが、恐らく大半は APA 膜を透過することが可能な分子サイズであろうと考えられる。即ち、allogeneic な組合せで cell line を用いた細胞性製剤を適用すると、宿主のアロ抗原あるいは腫瘍関連抗原に対する抗体産生を免れることはできない。

そこで本節では、SK2 細胞で免疫した C57BL/6 マウスに APA-SK2 細胞を腹腔内投与し、その増殖を intact な C57BL/6 マウスに投与した場合と比較することで、活性化された allogeneic な宿主の免疫系に対する APA マイクロカプセルの免疫隔離性を評価した。また、拒絶反応の主役が液性免疫であろうと考えられる xenogeneic な細胞性製剤の適用の可能性を、ウサギ抗 SK2 細胞抗血清に対する APA-SK2 細胞の抵抗性を測定することで検討した。

## 実験材料と方法

### (1) allogeneic な抗 SK2 細胞活性に対する APA-SK2 細胞の抵抗性の評価

C57BL/6 マウスに SK2 細胞 ( $1 \times 10^7$  cells/ml/mouse) を 1 週間毎に 4~5 回免疫し、最終免疫から 8 日後に APA-SK2 細胞 ( $3 \times 10^6$  cells/3 ml of capsules/mouse) を腹腔内に投与した。また、対照群として intact な C57BL/6 マウスにも同様の APA-SK2 細胞を投与した。投与後 14 日目および 28 日目に APA-SK2 細胞を回収し、その MTT 活性を測定した。

### (2) ウサギ抗 SK2 細胞抗血清の調製

SK2 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells) を約 1 週間毎に 5 回, 10 週齢の日本白色家兎に静脈内投与した。最終免疫より 9 日後に頸動脈より全血液を採取し, 得られた抗血清を凍結乾燥後  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

### (3) ウサギ抗 SK2 細胞抗血清に対する APA-SK2 細胞の抵抗性の評価

ウサギ抗 SK2 細胞抗血清に対する APA-SK2 細胞の抵抗性の評価は抗体-補体依存性細胞溶解測定法により行った。10% FCS 含有 RPMI 1640 培地に懸濁した APA-SK2 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/ml of capsules) および free SK2 細胞を 24 穴培養プレートに  $1 \times 10^5$  cells/well で播種し, 無処理あるいは非働化处理 ( $56^\circ\text{C}$ , 30 分) したウサギ抗 SK2 細胞抗血清を最終濃度で 10%, 3%あるいは 1%となるように添加した。37 $^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  条件下で 24 時間インキュベーションした後, MTT 法により SK2 細胞の viability を測定した。SK2 細胞の viability (%) は以下に示す式に従って算出した。

$$\text{viability (\%)} = [1] / [2] \times 100$$

[1]: ウサギ抗 SK2 細胞抗血清添加群の MTT 活性

[2]: ネガティブコントロールの MTT 活性

尚, ネガティブコントロールの MTT 活性は, APA-SK2 細胞あるいは free SK2 細胞を 10% FCS 含有 RPMI 1640 培地のみでインキュベーションした場合の MTT 活性を表している。

尚, その他の実験方法については, 前節までに記載の操作法に従った。

### 実験結果および考察

APA-SK2 細胞をモデルに細胞性製剤の免疫隔離性に関して検討を行った。SK2 細胞に対する免疫を獲得した C57BL/6 マウスの腹腔内に投与した APA-SK2 細胞の MTT 活性は, 投与後 14 日目および 28 日目において, intact な C57BL/6 マウスに投与した APA-SK2 細胞の MTT 活性と同等であった (Fig.41)。前節の検討において, SK2 細胞で免疫したマウスには SK2 細胞を傷害するのに十分な細胞性免疫および液性免疫が誘導されていることを確認している。このことから, APA マイクロカプセルは allogeneic なホストの特異的な免疫反応から封入細胞を保護することが明らかとなった。その機構として, 活性化された細胞性免疫系からの保護は, エフェクター細胞と封入細胞との接触を APA マイクロカプセルが物理的なバリアーとして阻止したためであろうと推察された<sup>287,288)</sup>。一方, 活性化された液性免疫系からの APA マイクロカプセルの保護効果は, 以下の機構に起因すると考えられた。まず, APA マイクロカプセルは第一章・第二節および前章の検討により, 抗体分子を透過することが確認されていることから, SK2 細胞免疫マウス体内に存在する抗 SK2 抗体は APA 膜を透過し, 封入 SK2 細胞表面に結合することが

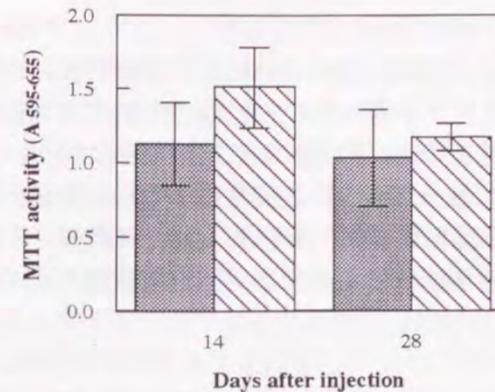


Fig.41 Cell viability of APA-SK2 cells injected into SK2 cell-immunized C57BL/6 mice. Three ml of APA-SK2 cells ( $1 \times 10^6$  cells per ml of capsules) were intraperitoneally injected into intact (dot column) or SK2 cell-immunized (slash column) C57BL/6 mice. On days 14 and 28 after injection, the APA-SK2 cells were retrieved from these mice, and their viability was evaluated by MTT assay. Each data value represents the mean  $\pm$  SEM of 3 mice.

予想される。その後, 封入 SK2 細胞を傷害するためには一連の補体反応の誘導が不可欠である。しかし, 補体系には抗体分子 (IgG; M.W.=150,000) よりも分子量の大きな構成成分 (C1q, C3, C4, C5, C8) が存在し, これらの APA 膜の透過が極めて制限を受けていることが考えられる。さらに, 補体成分が APA 膜を透過している間に不活性化される可能性も考えられる。

ところで, 補体系には種特異性を有した補体制御因子が存在することが知られており, 自己の補体反応による自己組織の傷害を回避するシステムとして働いている<sup>291)</sup>。MCP (membrane cofactor protein; CD46)<sup>292-294)</sup>, DAF (decay-accelerating factor; CD55)<sup>295-298)</sup>, HRF20 (20 kD homologous restriction factor; CD59)<sup>299-301)</sup>の三つの分子は代表的な細胞膜上に存在する補体制御因子であり, これらは自身の存在する細胞膜上での補体カスケード反応を種特異的に阻害する。また, その作用点は各々で異なっており, どの分子も生体内のあらゆる細胞に広範な分布を示す。SK2 細胞も例に漏れずその細胞膜上にはこれらの分子の一つあるいは二つ以上を有していることが予想され, 自身の細胞膜上でのマウス補体反応を抑制すると考えられる。即ち, 前記の APA マイクロカプセルによる補体成分の透過抑制が不完全であったとしても, 僅かに透過してきたマウス補体の反応は SK2 細胞膜上の補体制御因子によって十分に阻害され, SK2 細胞の溶解は阻止される可能性がある。

そこで, マウス補体制御因子が阻止することのできない異種動物の液性免疫系からの攻撃に対する, APA マイクロカプセルの免疫隔離性を評価した (Fig.42)。ウサギ抗 SK2 細胞抗血清は 1%の濃度で free SK2 細胞を 100%傷害した。一方, APA-SK2 細胞は 10%ウサギ抗 SK2 細胞抗血清中で 24 時間培養後も約 50%の viability を維持しており, 完全とはいえないまでも APA マイクロカプセルは異種の液性免疫系から封入細胞を保護した。データには示していないが, 非働化したウサギ抗 SK2 細胞抗血清の添加では SK2 細胞への傷害性が全く認められなかったことから, APA マイクロカプセルが補体成分の透過を一

部制限していることが示唆された。

本節の検討において、APA マイクロカプセルが allogeneic なホストの細胞性免疫から封入細胞を保護することが可能であることが明らかとなった。また、APA 膜は液性免疫のエフェクター分子である特異抗体と補体の透過を完全に抑制することはできないが、細胞性製剤とホストとが allogeneic な関係の場合に限って、液性免疫系による封入細胞の傷害は認められなかった。この機構として、封入細胞の膜表面に存在する補体制御因子の種特異的な働きにより、APA 膜を透過した一部の補体成分による反応が阻害されたことが推察された。

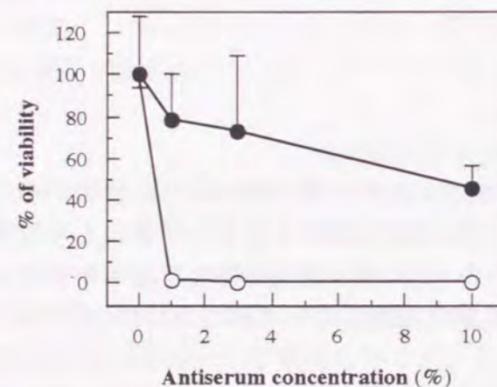


Fig. 42 Resistance of APA-SK2 cells against rabbit anti-SK2 cell antiserum. APA-SK2 cells ( $1 \times 10^6$  cells per ml of capsules; ●) or free SK2 cells (○) were incubated in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and 0, 1, 3, or 10% rabbit anti-SK2 cell antiserum at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. The cell viability was evaluated by MTT assay, and the % of viability was calculated as follows: (% of viability) = [(A 595-655 of experimental group) / (A 595-655 of non-antiserum group)]  $\times$  100. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of 3 cultures.

### 第三節 小括

細胞性製剤投与によるホストの免疫活性の変化、およびホスト免疫系が及ぼす細胞性製剤への影響を、APA-SK2 細胞をモデルとして検討した。C57BL/6 マウスに APA-SK2 細胞を腹腔内投与したところ、allograft の拒絶において中心的な役割を果たす MHC 拘束性の細胞性免疫に活性の上昇は認められなかった。この結果は、APA マイクロカプセルによってホストの免疫担当細胞が標的と成り得る封入細胞と接触することを阻まれ、特異的な免疫活性を獲得することが不可能であったことを強く示唆している。さらにこの結果は、生体内において APA マイクロカプセルからの封入細胞の漏出がないことも示しており、第一章・第二節の検討において、本章の検討に使用した APA マイクロカプセルの強度・生体内安定性が非常に優れたものであることを示した結果と一致する。しかしながら、投与した細胞性製剤からの細胞の漏出が完全に阻止されるという絶対的な保証は得られない。そこで、生体内で高分子担体が分解あるいは破壊され、封入細胞に対する細胞性免疫が成立した場合を想定して、SK2 細胞に対する特異的な細胞性免疫が成立した C57BL/6 マウ

ス腹腔内での APA-SK2 細胞の増殖を検討した。SK2 細胞による免疫処理を施した C57BL/6 マウスの腹腔内における APA-SK2 細胞の増殖は、intact な C57BL/6 マウスの腹腔内での増殖と同等であり、活性化されたホスト細胞性免疫系の攻撃から封入 SK2 細胞が保護されていることが示された。この結果は、特異的に SK2 細胞を傷害するホスト免疫担当細胞と封入 SK2 細胞との接触を、APA 膜が物理的バリアーとして阻害していることを示しており、先に提示した封入 SK2 細胞に対する特異的な細胞性免疫の不成立が APA 膜の細胞接触阻害にあることを支持している。

APA マイクロカプセルが特異的な細胞性免疫の成立を抑制し、且つ細胞傷害性細胞から封入細胞を保護することは明らかとなったが、免疫系のもう一つの構成要素である液性免疫に対する細胞性製剤投与の影響についても検討を行った。APA-SK2 細胞を腹腔内投与された C57BL/6 マウスの血中抗 SK2 抗体レベルを評価したところ、投与 21 日目以降に顕著な上昇が認められ、明らかに液性免疫系による SK2 細胞抗原の認識とそれに伴う活性化が起こっていることが示された。APA-SK2 細胞は SK2 mAb の持続的な分泌を行う一方で、その他の分泌タンパクや断片化された膜タンパク等も生体内へ放出している。これらのタンパク質あるいはペプチドの中に、アロ抗原あるいは腫瘍関連抗原として C57BL/6 マウスの免疫系に認識されるものが存在する可能性は高く、ホスト免疫系に対する持続的な刺激が行われていたとしても何等不思議ではない。しかも、このアロ抗原あるいは腫瘍関連抗原のすべてを特定することは困難であり、恐らく APA 膜を自由に透過できる分子サイズであろうと予想されることから、cell line の細胞を用いた allogeneic な組合せによる細胞性製剤の治療においてアロ抗原あるいは腫瘍関連抗原特異的抗体の産生は免れないものと考えられる。しかしながら、先に示した SK2 細胞で免疫した C57BL/6 マウスには、SK2 細胞に特異的な細胞性免疫の誘導と共に、その血中に抗 SK2 細胞抗体の存在を確認している。即ち、抗 SK2 細胞抗体を有するホストの腹腔内においても APA-SK2 細胞の増殖は影響を受けず、活性化された液性免疫系の攻撃を回避する何らかの機構が存在することが示唆された。また、第三章・第三節で示した APA-SK2 細胞の細胞性製剤としての機能低下が、ホストの免疫系による封入 SK2 細胞の傷害ではなく、APA マイクロカプセル内の増殖スペースが消失したことに伴う細胞死に起因するものであろうことが強く示唆された。

液性免疫系からの封入細胞の隔離は、細胞性製剤とホストとの関係が xenogeneic な場合にさらに厳密に行われる必要がある。異種間で臓器移植を行い血流を再開すると、分単位あるいは秒単位で拒絶される超急性拒絶反応がしばしば認められる。この反応の主役は種特異的自然抗体と補体であり、種特異的自然抗体とは抗原由来の動物種のすべての個体に共通する抗原（種特異抗原）と反応し、生まれながらに存在する抗体を指す<sup>280-285</sup>。即ち、xenogeneic なホストに適用する細胞性製剤は、封入細胞に対する特異的液性免疫からの攻撃を完全に回避しなければならない。APA-SK2 細胞をウサギ抗 SK2 細胞抗血清を含む培地中で培養したところ、APA マイクロカプセルは抗血清による封入 SK2 細胞の傷害を一部抑制した。この結果は、APA 膜が補体成分の透過を完全ではないが制限していることを示唆しており、先に示した SK2 細胞免疫 C57BL/6 マウスの液性免疫系からの

APA-SK2 細胞の保護も、同様に APA 膜の補体透過抑制に起因すると推察された。しかしながら、この機構だけでは APA-SK2 細胞が allogeneic なホストの液性免疫から完全に保護された理由を十分には説明できない。

そこで、SK2 細胞のウサギ抗 SK2 細胞抗血清とマウス抗 SK2 細胞抗血清とに対する抵抗性の違いに着目した。ウサギ抗 SK2 細胞抗血清は僅か 1%濃度で 100%の SK2 細胞傷害活性を示したが、一方、マウス抗 SK2 細胞抗血清はモルモット補体を添加しない限り全く SK2 細胞を傷害しなかった。この細胞傷害活性の差は、SK2 細胞表面に存在する補体制御因子の種特異的な働きに因るものであろうと推測している。即ち、APA-SK2 細胞が allogeneic なホストの特異的な液性免疫から保護される機構には、APA 膜の部分的な補体透過抑制と僅かに透過してきた補体の補体制御因子による不活性化とが深く関与していることが推察された。

本章の検討により、細胞性製剤投与により allogeneic なホストの細胞性免疫は影響を受けないものの、分泌されるアロ抗原あるいは腫瘍関連抗原の刺激によると考えられる液性免疫の活性化と、それに伴う特異抗体の産生が促されることが判明した。また、APA マイクロカプセルが allogeneic なホストの特異的な免疫反応から封入細胞を保護することは可能であるが、xenogeneic なホストの液性免疫系から封入細胞を完全に保護することはできないことも明らかとなった。APA マイクロカプセルの抗体-補体系に対する免疫隔離性については、APA 膜の抗体分子・補体分子の透過性<sup>47,56,302-304</sup>や APA 膜による補体の活性化<sup>303</sup>等の様々な点で未だ統一的な見解が得られていない。また、最近の研究により、アルギン酸マイクロビーズに封入した細胞が活性化マクロファージの産生する NO により傷害されること<sup>305,306</sup>、および APA マイクロカプセルがマクロファージの活性化を促すこと<sup>307</sup>が明らかとなり、新たに封入細胞を NO から保護する方法を探索する必要性が示されつつある。今後、封入細胞の液性免疫系からの完全な隔離を目指した新規高分子担体の開発が望まれ、細胞性製剤の免疫学的な検討が更に進展する必要があると共に、補体・NO 等の生体防御因子を失活させる機能を有したポリマー成分の応用が期待される<sup>122</sup>。

## 総括

### 1) アガロースマイクロビーズおよびアルギン酸-ポリ(L)リジン-アルギン酸 (APA) マイクロカプセルの特性

医薬品として有用な生理活性物質を合成・分泌する機能性細胞を、細胞療法の観点から疾病治療に応用するためには、この細胞を如何に生体内で安定に生存させ機能させるかが重要な課題である。そのためには、生体防御システムとして機能する免疫系から投与した細胞を保護する必要がある。そこで著者は、投与する細胞を半透性の高分子担体内へ封入することにより、生体防御因子からの攻撃を回避し、生体内で長期間安定に機能させることが可能になると考えた。本研究では、細胞を固定化するための高分子担体としてアガロースマイクロビーズと APA マイクロカプセルを選択し、まずそれらの特性に関して検討を行った。

アガロースマイクロビーズは中心部まで均一なゲルによる網目構造が形成されており、外力に対して非常に高い強度を有していた。また、物質透過性はアガロースゲル濃度に依存しており、マウス腹腔内における分解や破壊は認められなかった。しかし投与後 1 ヶ月を越えると、アガロースマイクロビーズがホスト組織内へ取り込まれたり、表面に fibrosis が観察された。一方、APA マイクロカプセルの膜厚は用いたポリ(L)リジン (PLL) の分子量および反応回数に依存しており、膜厚の増大に従って高い強度を示した。また、APA 膜の物質透過性を制御することが可能であり、膜の網目構造が PLL の分子量および反応回数に依存することが示唆された。マウス腹腔内に投与された APA マイクロカプセルは、投与後 3 ヶ月目においても殆どが intact な状態で回収され、生体適合性に優れていた。

以上の検討から、アガロースマイクロビーズは長期間の投与における生体適合性にやや問題を残すものの、非常に高い強度を有しているため腹腔内ばかりでなく皮下や種々組織内等の幅広い投与部位の選択が可能な高分子担体であることが示された。一方、APA マイクロカプセルは強度の点から投与部位は限定されるが、非常に生体適合性に優れた担体であることから、封入細胞の機能を生体内で長期間維持させることのできる高分子担体であることが判明した。今後、更に詳細な両高分子担体の調製条件あるいは他の物質による修飾等の検討を進めることにより、応用目的に最適な特性を有した高分子担体の調製が可能であることが示唆された。

### 2) 腫瘍誘導血管新生の新規 *in vivo* 評価系の開発

高分子担体を用いた固定化細胞の医薬分野への応用として、まず腫瘍誘導血管新生の新規 *in vivo* 評価系の確立を試みた。腫瘍誘導血管新生は悪性腫瘍の増殖および転移に必須の病理的現象であることから、癌治療にも結びつく非常に重要な血管内皮細胞の生物学的特性である。

癌細胞封入アガロースマイクロビーズをマウスに皮下投与したところ、顕著な新生毛細

血管の形成が、動物種あるいは MHC バリアーを越えて観察された。また、この血管新生を *in vivo* 血管新生定量法として確立した mouse hemoglobin enzyme-linked immunosorbent assay (mHb-ELISA) により、精度良く評価できることを確認した。癌細胞封入アガロースマイクロビーズと mHb-ELISA とを用いた新規 *in vivo* 血管新生評価系は、従来の評価系と比較して簡便であり、且つ定量性および再現性に優れていた。腫瘍血管が TNF- $\alpha$  により血管透過性が亢進されるという特異的な現象を指標に、本系で誘導された新生血管の特性を検討したところ、正常組織あるいは炎症組織の血管とは異なる腫瘍血管様の特性を有していた。これは、誘導された新生血管が封入癌細胞の分泌した液性因子の影響を強く受けていることを示しており、本系が癌細胞の *in vivo* 血管新生誘導能の評価ばかりでなく、腫瘍血管の構造・機能解析にも有用であることが示唆された。また、本系で誘導された血管新生は、既に血管新生抑制活性が報告されている物質によって阻害を受けたことから、本系が腫瘍血管新生抑制剤の *in vivo* スクリーニング系としても応用可能であることが明らかとなった。

以上の検討から、腫瘍誘導血管新生の新規 *in vivo* 評価系の確立に成功したと共に、高分子担体を用いた固定化細胞を生体に投与することで、局所的ではあるが生理活性物質の *in vivo* デリバリーが達成されることが明らかとなった。

### 3) 細胞性製剤の開発

生体内で理想的な DDS の概念を遂行している細胞を、生理活性物質の徐放化担体として疾病治療に応用すべく、高分子担体を用いた細胞の製剤化を試みた。細胞性製剤のモデルには高分子担体に封入した抗ヒトインターロイキン-6 抗体 (SK2 mAb) を分泌する SK2 細胞を選択し、またその有効性を評価するための病態動物としてはヒトインターロイキン-6 トランスジェニックマウス (hIL-6 Tgm) を用いた。

SK2 細胞封入アガロースマイクロビーズあるいは APA マイクロカプセルは、培養系において SK2 mAb の分泌機能を維持することが認められた。これらを腹腔内投与した hIL-6 Tgm では、顕著な IgG1 プラズマサイトーシスおよびメサングウム細胞増殖性腎炎の発症遅延とそれに伴う延命が認められた。また、APA マイクロカプセルに封入された SK2 細胞 (APA-SK2 細胞) が hIL-6 Tgm の origin である C57BL/6 マウスの腹腔内で生存・増殖し、SK2 mAb 分泌機能を長期間保持していることも確認された。さらに、APA-SK2 細胞を腹腔内投与した C57BL/6 マウスの血中には、SK2 mAb が投与後 80 日間に渡って検出可能であったことから、hIL-6 Tgm の治療効果が確かに投与された細胞性製剤の機能に起因していることが示された。これらの動物実験モデルの結果は、高分子担体に封入した機能性細胞の投与が生理活性物質の *in vivo* 長期デリバリーに非常に有効であることを示すと共に、細胞の製剤化に最も大きな障害である免疫学的バリアーを打破できたことを示唆している。しかしながら、細胞性製剤の治療有効期間には限界があることも判明した。この原因として、本検討で用いた SK2 細胞のように cell line であり、永久増殖能を有する機能性細胞を高分子担体に封入すると、細胞数の増加に伴い担体内の細胞増

殖スペースが消失し、遂には封入細胞の機能喪失と細胞死を招くと考えられた。この打開策としては、封入細胞の増殖を制御する工夫が必要であり、コンタクトインヒビションを示す細胞・スフェロイド形成により増殖速度を遅くした細胞・最終分化段階の増殖を停止している細胞等の応用が考えられる。

本研究で提示した細胞性製剤のように自然界、とりわけ生命現象に学んで究極の DDS 製剤を設計するという概念は、将に今後の DDS 製剤開発のさきがけとなるものである。細胞性製剤が臨床で実現できれば、これまでの DDS 製剤を遥かに凌ぐ極めてインテリジェントな製剤として、その存在価値は揺るぎないものになると考える。

### 4) 細胞性製剤の免疫原性と免疫隔離性

免疫系は機能面から二つに分類され、一つは生まれながらに存在する非特異的な自然免疫系であり、もう一つは特異性と記憶を伴う獲得免疫系である。また、免疫反応を担うエフェクターの種類によって、細胞性免疫系と液性免疫系とに分類することができる。また移植免疫の分野において、allograft に対しては MHC 拘束性を有する細胞傷害性 T 細胞を中心とした細胞性免疫反応が、一方 xenograft に対しては種特異的な自然抗体と補体を中心とした液性免疫反応が拒絶反応に最も深く関与することが知られている。細胞性製剤が生体内で長期間に渡って治療効果を発揮するためには、この生体防御機構として高度に進化した免疫系から高分子担体が封入細胞を保護することが不可欠である。そこで、APA-SK2 細胞をモデルに、細胞性製剤投与による allogeneic な宿主免疫活性の変化および APA マイクロカプセルの免疫隔離能に関して検討を行った。

APA-SK2 細胞の allogeneic な投与により、ホストの細胞性免疫系は影響を受けなかったが、液性免疫系が活性化され、血中に SK2 細胞に対する抗体が検出された。この特異抗体の産生は、APA-SK2 細胞から可溶性のアロ抗原が持続的に分泌されることに因ると考えられ、allogeneic な組合せの細胞性製剤の適用において逃れることが困難な宿主免疫活性の変化であると思われる。しかしながら、SK2 細胞に対する細胞性免疫および液性免疫を成立させたホストの体内においても、APA-SK2 細胞は拒絶反応から保護されており、その増殖に活性化された宿主免疫系は何等影響を及ぼさなかった。この結果は、APA マイクロカプセルが細胞傷害性の免疫系細胞ばかりでなく、補体をはじめとする免疫系タンパク質の侵入をも抑制したことを示唆している。ところが、APA マイクロカプセルがウサギ抗 SK2 細胞抗血清から封入 SK2 細胞を完全に隔離できないことが判明し、APA-SK2 細胞の allogeneic な宿主液性免疫系による細胞傷害からの回避には、その働きに種特異性を有し、SK2 細胞膜上にも存在するであろう補体制御因子の関与が示唆された。

細胞を封入するための高分子担体の性能は、細胞性製剤の治療効果および治療有効期間を規定する重要な要因であり、また、細胞性製剤の品質・安全性にも直結する。今後、細胞性製剤の臨床での実現を目指す上で、免疫隔離性・生体適合性・生体内安定性等を完全に保証された高分子担体の開発が不可欠である。

## 結論

高分子担体を用いた固定化細胞の機能評価と細胞療法等への応用に関して検討を行い、以下の結論を得た。

1. アガロースマイクロビーズはアガロース濃度を、アルギン酸-ポリ(L)リジン-アルギン酸 (APA) マイクロカプセルはポリ(L)リジンの分子量をそれぞれ変化させることで、物質透過性・強度等の特性が異なる高分子担体の調製が可能であることを明らかとした。また、カプセル強度に主眼をおいた APA マイクロカプセルの改良として、その調製段階でポリ(L)リジンおよびアルギン酸による処理を 2 回ずつ行う方法を提示し、従来よりも強度に優れた APA マイクロカプセルの調製に成功した。今後、より詳細な調製条件の検討あるいは他の物質による修飾方法の探索を行うことで、固定化細胞の産生・分泌する生理活性物質の分子サイズ、あるいは固定化細胞の生体への投与部位等に合わせた最適な高分子担体の選択が可能であることが示唆された。
2. 癌細胞をアガロースマイクロビーズに封入しマウスの皮下に投与することで、同種異系あるいは異種動物由来の癌細胞が誘導する血管新生を再現できることを明らかとした。また、mouse hemoglobin enzyme-linked immunosorbent assay (mHb-ELISA) により測定した mHb 量をもって、アガロースマイクロビーズ投与部位の血管新生を感度良く評価することができることも確認した。本系は従来の *in vivo* 血管新生評価法と比較して簡便であり、且つ免疫学的バリアーを越えて癌細胞の血管新生誘導能を評価可能な新規 *in vivo* 腫瘍誘導血管新生評価系として確立された。
3. 癌細胞封入アガロースマイクロビーズと mHb-ELISA を用いた新規 *in vivo* 腫瘍誘導血管新生評価系において誘導された新生血管が、アガロースマイクロビーズ内の癌細胞により産生・分泌された液性因子の影響を受け、腫瘍血管様の特性を保持していることを確認した。また、作用点の異なる様々な血管新生抑制物質により本系の血管新生誘導が阻害されたことから、本系が腫瘍血管新生抑制物質のスクリーニング系としても非常に有効であることが判明した。
4. 高分子担体に封入した抗ヒトインターロイキン-6 モノクローナル抗体 (SK2 mAb) 産生細胞 (SK2 細胞) を腹腔内に投与することで、ヒトインターロイキン-6 トランスジェニックマウスの IgG1 プラズマサイトーシスおよびメサンギウム細胞増殖性糸球体腎炎の発症抑制と、それに伴う生存日数の延長が達成されることを明らかとした。これは、生理活性物質を産生・分泌する細胞自身を疾病治療に応用可能であることを示しており、細胞性製剤ともいべき新規投与剤形を提示することができた。
5. APA マイクロカプセルに封入した SK2 細胞 (APA-SK2 細胞) は、アロジェニッ

クなマウスの体内で生存・増殖することが可能であり、SK2 mAb の分泌機能を維持していることを明らかとした。また、このマウスの血中には SK2 mAb が投与後 80 日間に渡って検出され、細胞性製剤が生理活性物質の *in vivo* 長期デリバリーに極めて有効であることが判明した。

6. APA-SK2 細胞の投与により、アロジェニックなホストの細胞性免疫系は影響を受けないが、液性免疫系が活性化され SK2 細胞に対する特異抗体の産生が促されることを確認した。また、APA マイクロカプセルに封入した細胞がアロジェニックなホスト免疫系による傷害から保護されることも明らかとした。さらに、APA マイクロカプセルによって異種動物の液性免疫系から封入細胞を隔離することは困難であることも明らかとした。今後、細胞性製剤に関するより詳細な免疫学的検討と、より免疫隔離性に優れた新規高分子担体の開発が必要であることが示唆された。

以上、高分子担体に封入した機能性細胞を生体内に投与することにより、生理活性物質の長期 *in vivo* デリバリーが達成されることを明らかとし、新規 DDS 製剤としての細胞性製剤の概念および方法論を提示した。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師、大阪大学薬学部教授、真弓忠範先生に心より厚く御礼申し上げます。

また、本研究にあたり、終始暖かい御指導と御助言を頂きました大阪大学薬学部講師、中川晋作先生に深謝いたします。

さらに、種々の貴重な御助言を賜りました大阪大学薬学部助手、久保一義先生、堤康央先生、伊藤徳夫先生に感謝いたします。

また、suramin を御供与頂きました第一製薬株式会社、田中紀子先生、岩花倫生先生、ヒトインターロイキントランスジェニックマウス (hIL-6 Tgm) および抗ヒトインターロイキン-6 抗体産生細胞 (SK2 細胞) を御供与頂き、hIL-6 Tgm の病理組織観察に関し御協力と御指導を頂きました中外製薬株式会社、大杉義征先生、勝目朝夫先生、斎藤浩之先生、萬啓悟先生、上田乙也先生、ヒト腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) を御供与頂きました持田製薬株式会社、植村昭夫先生、堀澤義史先生に感謝いたします。さらに、電子顕微鏡観察に関し御協力と御指導を頂きました大阪大学薬学部、木村百合子先生に感謝いたします。

また、本研究を遂行するにあたり御協力を頂きました大阪大学薬学部薬剤学講座の皆様感謝いたします。

最後に、博士前期・後期課程の5年間にわたり経済的援助を賜りました日本育英会に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) Mizuguchi, H., Nakagawa, T., Nakanishi, M., Imazu, S., Nakagawa, S. and Mayumi, T. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218, 402-407.
- 2) Mizuguchi, H., Nakagawa, T., Nakanishi, M., Imazu, S., Nakanishi, T., Kondoh, M., Nakagawa, S. and Mayumi, T. (1996) *Prog. Drug Deliv. Sys.* V, 149-152.
- 3) Nakagawa, T., Mizuguchi, H., Imazu, S., Nakanishi, M., Nakagawa, S. and Mayumi, T. (1996) *Prog. Drug Deliv. Sys.* V, 153-156.
- 4) Iwata, H., Amemiya, H., Matsuda, T., Takano, H. and Akutsu, T. (1988) *J. Bioactiv Compatible Polym.* 3, 356-369.
- 5) Krestow, M., Lum, Z.-P., Tai, I.T. and Sun, A.M. (1991) *Transplantation* 51, 651-655.
- 6) O'Shea, G.M., Goosen, M.F.A. and Sun, A.M. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 804, 133-136.
- 7) O'Shea, G.M. and Sun, A.M. (1986) *Diabetes* 35, 943-946.
- 8) Sun, A.M. and O'Shea, G.M. (1985) *J. Control. Release* 2, 137-141.
- 9) Fan, M.-Y., Lum, Z.-P., Fu, X.-W., Levesque, L., Tai, I.T. and Sun, A. M. (1990) *Diabetes* 39, 519-522.
- 10) Lacy, P.E., Hegre, O.D., Gerasimidi-Vazeou, A., Gentile, F.T. and Dionne, K.E. (1991) *Science* 254, 1782-1784.
- 11) Sun, A.M., Parisius, W., Macmorine, H. Sefton, M. and Stone, R. (1980) *Artif. Organs* 4, 275-278.
- 12) Soon-Shiong, P., Heintz, R.E., Merideth, N., Yao, Q.X., Yao, Z., Zheng, T., Murphy, M., Moloney, M.K., Schmehl, M., Harris, M., Mendez, R., Mendez, R. and Sandford, P.A. (1994) *Lancet* 343, 950-951.
- 13) Iwata, H., Takagi, T., Amemiya, H., Shimizu, H., Yamashita, K., Kobayashi, K. and Akutsu, T. (1992) *J. Biomed. Mater. Res.* 26, 967-977.
- 14) Lum, Z.-P., Krestow, M., Tai, I.T., Vacek, I. and Sun, A.M. (1992) *Transplantation* 53, 1180-1183.
- 15) Chen, C.-F., Chern, H.-T., Leu, F.-J., Chang, T.-M., Shian, L.-R. and Sun, A.M. (1994) *Artif. Organs* 18, 193-197.
- 16) Lum, Z.-P., Tai, I.T., Krestow, M., Norton, J., Vacek, I. and Sun, A.M. (1991) *Diabetes* 40, 1511-1516.
- 17) Inaba, K., Zhou, D., Yang, B., Vacek, I. and Sun, A.M. (1996) *Transplantation* 61, 175-179.
- 18) De Vos, P., Wolters, G.H.J., Fritschy, W.M. and Van Schilfgaarde, R. (1993) *Int. J. Artif. Organs* 16, 205-212.
- 19) Wu, Z., Lu, Z. and Sun, A.M. (1988) *Int. J. Pancreatol.* 3, 91-100.
- 20) Iwata, H., Amemiya, H., Matsuda, T., Takano, H., Hayashi, R. and Akutsu, T. (1989) *Diabetes* 38 Suppl.1, 224-225.
- 21) Wu, Z.G., Shi, Z.Q., Lu, Z.N., Yang, H., Shi, F.Y., Zheng, X.R. and Sun, A.M. (1989) *ASAIO Trans.* 35, 36-738.
- 22) Wong, H. and Chang, T.M.S. (1986) *Int. J. Artif. Organs* 9, 335-336.
- 23) Chang, T.M.S. (1992) *Artif. Organs* 16, 71-74.
- 24) Bruni, S. and Chang, T.M.S. (1991) *Int. J. Artif. Organs* 14, 239-241.
- 25) Dixit, V., Arthur, M. and Gitnick, G. (1993) *Biomater. Artif. Cells Immobil. Biotechnol.* 21, 119-133.
- 26) Bruni, S. and Chang, T.M.S. (1989) *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs* 17, 403-411.
- 27) Wong, H. and Chang, T.M.S. (1988) *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs* 16, 731-739.
- 28) Bruni, S. and Chang, T.M.S. (1995) *Int. J. Artif. Organs* 18, 332-339.
- 29) Dixit, V. and Gitnick, G. (1995) *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 7, 343-357.
- 30) Hirai, S., Kasai, S. and Mito, M. (1993) *Eur. Surg. Res.* 25, 193-202.
- 31) Dixit, V., Darvasi, R., Arthur, M., Brezina, M., Lewin, K. and Gitnick, G. (1990) *Hepatology* 12, 1342-1349.

- 32) Chen, G., Peng, Y., Lou, P. and Liu, J. (1991) *ASAIO Trans.* 37, M439-M440.
- 33) Fu, X.W. and Sun, A.M. (1989) *Transplantation* 47, 432-435.
- 34) Hasse, C., Schrezenmeir, J., Stinner, B., Scharck, C., Wagner, P.K., Neumann, K. and Rothmund, M. (1994) *World J. Surg.* 18, 630-634.
- 35) Darquy, S. and Sun, A.M. (1987) *ASAIO Trans.* 33, 356-358.
- 36) Abobakr, A.M. (1994) *Int. J. Artif. Organs* 17, 171-174.
- 37) Hymer, W.C., Wilbur, D.L., Page, R., Hibbard, E., Kelsey, R.C. and Hatfield, J.M. (1981) *Neuroendocrinology* 32, 339-349.
- 38) Dupuy, B., Cadic, C., Gin, H., Baquey, C., Dufy, B. and Ducassou, D. (1991) *Biomaterials* 12, 493-496.
- 39) Zhong-Ping, C. and Yao-Dong, B. (1994) *Chin. Med. J.* 107, 200-204.
- 40) Hymer, W.C., Harkness, J., Bartke, A., Wilbur, D., Hatfield, J.M., Page, R. and Hibbard, E. (1981) *Neuroendocrinology* 32, 350-354.
- 41) Christenson, L., Aebischer, P. and Galletti, P.M. (1988) *ASAIO Trans.* 34, 681-686.
- 42) Koo, J. and Chang, T.M.S. (1993) *Int. J. Artif. Organs* 16, 557-560.
- 43) Iwata, H., Kobayashi, K., Takagi, T., Oka, T., Yang, H., Amemiya, H., Tsuji, T. and Ito, F. (1994) *J. Biomed. Mater. Res.* 28, 1003-1011.
- 44) Goosen, M.F.A., O'Shea, G.M., Gharapetian, H.M., Chou, S. and Sun, A.M. (1985) *Biotechnol. Bioeng.* 27, 146-150.
- 45) King, G.A., Daugulis, A.J., Faulkner, P. and Goosen, M.F.A. (1987) *Biotechnol. Prog.* 3, 231-240.
- 46) Goosen, M.F.A., King, G.A., McKnight, C.A. and Marcotte, N. (1989) *J. Membr. Sci.* 41, 323-343.
- 47) Halle, J.-P., Bourassa, S., Leblond, F.A., Chevalier, S., Beaudry, M., Chapdelaine, A., Cousineau, S., Saintonge, J. and Yale, J.-F. (1993) *Transplantation* 55, 350-354.
- 48) Ma, X., Vacek, I. and Sun, A.M. (1994) *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22, 43-69.
- 49) Iwata, H., Takagi, T., Kobayashi, K., Yang, H. and Ito, F. (1994) *Transplant. Proc.* 26, 789.
- 50) Hsu, B.R.S., Ho, Y.S., Fu, S.H., Huang, Y.Y., Chiou, S.C. and Huang, H.S. (1995) *Transplant. Proc.* 27, 3227-3231.
- 51) Chen, Z.-P., Bao, Y.-D., Gorczyca, W. and Mohr, G. (1995) *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 23, 597-604.
- 52) Thu, B., Bruheim, P., Espevik, T., Smidsrød, O., Soon-Shiong, P. and Skjåk-Bræk, G. (1996) *Biomaterials* 17, 1031-1040.
- 53) Thu, B., Bruheim, P., Espevik, T., Smidsrød, O., Soon-Shiong, P. and Skjåk-Bræk, G. (1996) *Biomaterials* 17, 1069-1079.
- 54) Shimi, S.M., Newman, E.L., Hopwood, D. and Cuschieri, A. (1991) *J. Microencapsul.* 8, 307-316.
- 55) Iwata, H., Morikawa, N., Fujii, T., Takagi, T., Semejima, T. and Ikada, Y. (1995) *Transplant. Proc.* 27, 3224-3226.
- 56) Vandenbossche, G.M.R., van Oostveldt, P. and Remon, J.P. (1991) *J. Pharm. Pharmacol.* 43, 275-277.
- 57) Spargo, B.J., Rudolph, A.S. and Rollwagen, F.M. (1994) *Biomaterials* 15, 853-858.
- 58) Clayton, H.A., London, N.J.M., Colloby, P.S., Bell, P.R.F. and James, R.F.L. (1990) *Diabetes Res.* 14, 127-132.
- 59) Clayton, H.A., London, N.J.M., Colloby, P.S., Bell, P.R.F. and James, R.F.L. (1991) *J. Microencapsul.* 8, 221-233.
- 60) Wahoff, D.C., Stephanian, E., Gores, P.F., Soon-Shiong, P., Hower, C., Lloveras, J.K. and Sutherland, D.E.R. (1994) *Transplant. Proc.* 26, 804.
- 61) Cadic-Amadeuf, C.M., Vitiello, S., Baquey, C.V. and Dupuy, B.J.P. (1992) *ASAIO J.* 38, M386-M389.
- 62) Klöck, G., Frank, H., Houben, R., Zekorn, T., Horcher, A., Siebers, U., Wöhrle, M., Federlin, K. and

- Zimmermann, U. (1994) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 638-643.
- 63) Zekorn, T.D.C., Horcher, A., Mellert, J., Siebers, U., Altug, T., Emre, A., Hahn, H.-J. and Federlin, K. (1996) *Int. J. Artif. Organs* 19, 251-257.
- 64) Soon-Shiong, P., Feldman, E., Nelson, R., Heintz, R., Yao, Q., Yao, Z., Zheng, T., Merideth, T., Skjåk-Bræk, G., Espevik, T., Smidsrød, O. and Sandford, P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5843-5847.
- 65) Clayton, H.A., London, N.J.M., Colloby, P.S., James, R.F.L. and Bell, P.R.F. (1992) *Transplant. Proc.* 24, 956.
- 66) Soon-Shiong, P., Feldman, E., Nelson, R., Komtebedde, J., Smidsrød, O., Skjåk-Bræk, G., Espevik, T., Heintz, R. and Lee, M. (1992) *Transplantation* 54, 769-774.
- 67) Zimmermann, U., Klöck, G., Federlin, K., Hanning, K., Kowalski, M., Bretzel, R.G., Horcher, A., Entenmann, H., Sieber, U. and Zekorn, T. (1992) *Electrophoresis* 13, 269-274.
- 68) Cole, D.R., Waterfall, M., McIntyre, M. and Baird, J.D. (1992) *Diabetologia* 35, 231-237.
- 69) Shimi, S.M., Hopwood, D., Newman, E.L. and Cuschieri, A. (1991) *Br. J. Cancer* 63, 675-680.
- 70) Nilsson, K., Scheirer, W., Katinger, H.W.D. and Mosbach, K. (1987) *Methods Enzymol.* 135, 399-410.
- 71) Nilsson, K., Scheirer, W., Merten, O.W., Ostberg, L., Liehl, E., Katinger, H.W.D. and Mosbach, K. (1983) *Nature* 302, 629-630.
- 72) Nilsson, K. and Mosbach, K. (1980) *FEBS Lett.* 118, 145-150.
- 73) Iwata, H., Amemiya, H., Matsuda, T., Masuda, M., Takano, H. and Akutsu, T. (1991) *Artif. Organs Today* 1, 229-236.
- 74) Smidsrød, O. and Skjåk-Bræk, G. (1990) *Trends Biotechnol.* 8, 71-78.
- 75) Sun, A.M. (1988) *Methods Enzymol.* 137, 575-580.
- 76) Lim, F. and Sun, A.M. (1980) *Science* 210, 908-910.
- 77) Sun, A.M., O'Shea, G.M. and Goosen, M.F.A. (1984) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 10, 87-99.
- 78) Chang, T.M.S. (1964) *Science* 146, 524-525.
- 79) Chang, T.M.S. and Poznansky, M.J. (1968) *Nature* 218, 243-245.
- 80) Chang, T.M.S., MacIntosh, F.C. and Mason, S.G. (1966) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 44, 115-128.
- 81) Petruzzo, P., Cappai, A., Ruiu, G. and Brotzu, G. (1994) *Transplant. Proc.* 26, 3507-3508.
- 82) Lamberti, F.V. and Sefton, M.V. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 759, 81-91.
- 83) Siebers, U., Zekorn, T., Horcher, A., Klock, G., Houben, R., Frank, H., Bretzel, R.G., Zimmermann, U. and Federlin, K. (1994) *Transplant. Proc.* 26, 787-788.
- 84) Hulst, A.C., Tramper, J., van't Riet, K. and Westerbeek, J.M.M. (1985) *Biotechnol. Bioeng.* 27, 870-876.
- 85) Poncelet, D., Lencki, R., Beaulieu, C., Halle, J.P., Neufeld, R.J. and Fournier, A. (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 39-45.
- 86) Pathak, C.P., Sawhney, A.S. and Hubbell, J.A. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 8311-8312.
- 87) Nilsson, K., Birnbaum, S., Flygare, S., Linse, L., Schroder, U., Jeppsson, U., Larsson, P.-O., Mosbach, K. and Brodelius, P. (1983) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 319-326.
- 88) Zielinski, B.A. and Aebischer, P. (1994) *Biomaterials* 15, 1049-1056.
- 89) Gupta, S., Kim, S.K., Vemuru, R.P., Aragona, E., Yerneni, P.R., Burk, R.D. and Rha, C.K. (1993) *Int. J. Artif. Organs* 16, 155-163.
- 90) Yoshioka, T., Hirano, R., Shioya, T. and Kako, M. (1990) *Biotechnol. Bioeng.* 35, 66-72.
- 91) Lim, F. and Moss, R.D. (1981) *J. Pharm. Sci.* 70, 351-354.
- 92) Sefton, M.V., Dawson, R.M., Broughton, R.L., Blyzniuk, J. and Sugamori, M.E. (1987) *Biotechnol. Bioeng.* 29, 1135-1143.
- 93) Boag, A.H. and Sefton, M.V. (1987) *Biotechnol. Bioeng.* 30, 954-962.
- 94) Broughton, R.L. and Sefton, M.V. (1989) *Biomaterials* 10, 462-465.
- 95) Sefton, M.V., Broughton, R.L., Sugamori, M.E. and Mallabone, C.L. (1987) *J. Control. Release* 6,

- 177-187.
- 96) Crooks, C.A., Douglas, J.A., Broughton, R.L. and Sefton, M.V. (1990) *J. Biomed. Mater. Res.* 24, 1241-1262.
  - 97) Dawson, R.M., Broughton, R.L., Stevenson, W.T.K. and Sefton, M.V. (1987) *Biomaterials* 8, 360-366.
  - 98) Mallabone, C.L., Crooks, C.A. and Sefton, M.V. (1989) *Biomaterials* 10, 380-386.
  - 99) Hsu, B.R.-S., Chen, H.-C., Fu, S.-H., Huang, Y.-Y. and Huang, H.-S. (1994) *J. Formos. Med. Assoc.* 93, 240-245.
  - 100) Halle, J.P., Leblond, F.A., Landry, D., Fournier, A. and Chevalier, S. (1992) *Transplant. Proc.* 24, 2930-2932.
  - 101) Wong, H. and Chang, T.M.S. (1991) *Biomater. Artif. Cells Immobil. Biotechnol.* 19, 687-697.
  - 102) Bañó, M.C., Cohen, S., Visscher, K.B., Allcock, H.R. and Langer, R. (1991) *Bio-Technology* 9, 468-471.
  - 103) Sefton, M.V., Kharlip, L., Horvath, V. and Roberts, T. (1992) *J. Control. Release* 19, 289-298.
  - 104) Matthew, H.W., Salley, S.O., Peterson, W.D. and Klein, M.D. (1993) *Biotechnol. Prog.* 9, 510-519.
  - 105) McKnight, C.A., Ku, A., Goosen, M.F.A., Sun, D. and Penney, C. (1988) *J. Bioactive Compatible Polym.* 3, 334-355.
  - 106) Winn, S.R., Aebischer, P. and Galletti, P.M. (1989) *J. Biomed. Mater. Res.* 23, 31-44.
  - 107) Yang, M.B., Vacanti, J.P. and Ingber, D.E. (1994) *Cell Transplant.* 3, 373-385.
  - 108) Zielinski, B.A. and Aebischer, P. (1994) *Biomaterials* 15, 1049-1056.
  - 109) Kaplan, F.A., Krueger, P.M., Harvey, J. and Goddard, M.B. (1996) *Transplantation* 61, 1215-1221.
  - 110) Lanza, R.P., Kuhlreiber, W.M., Beyer, A. and Chick, W.L. (1994) *Transplant. Proc.* 26, 3346-3347.
  - 111) Kessler, L., Legeay, G., Jesser, C., Damgé, C. and Pinget, M. (1995) *Biomaterials* 16, 185-191.
  - 112) Kessler, L., Aprahamian, M., Keipes, M., Damgé, C., Pinget, M. and Poinsot, D. (1992) *Biomaterials* 13, 44-49.
  - 113) Nyberg, S.L., Platt, J.L., Shirabe, K., Payne, W.D., Hu, W.-S. and Cerra, F.B. (1992) *ASAIO J.* 38, M463-M467.
  - 114) Scharp, D.W., Mason, N.S. and Sparks, R.E. (1984) *World J. Surg.* 8, 221-229.
  - 115) Ohgawara, H., Miyazaki, J., Karibe, S., Katagiri, N., Tashiro, F. and Akaike, T. (1995) *Transplant. Proc.* 27, 3319-3320.
  - 116) Brauker, J., Martinson, L.A., Young, S.K. and Johnson, R.C. (1996) *Transplantation* 61, 1671-1677.
  - 117) Brauker, J., Martinson, L.A., Hill, R.S., Young, S.K., Carr-Brendel, V.E. and Johnson, R.C. (1992) *Transplant. Proc.* 24, 2924.
  - 118) Ar-Rajab, A., Bengmark, S., Ahrén, B. (1991) *Transplantation* 51, 570-574.
  - 119) Weber, C., Tanna, A., Costanzo, M., Ayres-Price, J., Peterson, L. and Wicker, L. (1994) *Transplant. Proc.* 26, 1186-1188.
  - 120) Iwata, H., Takagi, T., Yamashita, K., Kobayashi, K. and Amemiya, H. (1992) *Transplant. Proc.* 24, 934.
  - 121) Weber, C.J., Hagler, M., Konieczny, B., Chryssochoos, J., Rajotte, R., Lakkis, F. and Lowry, R. (1995) *Transplant. Proc.* 27, 3308-3311.
  - 122) Iwata, H., Takagi, T., Kobayashi, K., Oka, T., Tsuji, T. and Ito, F. (1994) *J. Biomed. Mater. Res.* 28, 1201-1207.
  - 123) Tatarikiewicz, K. (1988) *Artif. Organs* 12, 446-448.
  - 124) Sato, T., Chiba, T., Yoshinaga, K., Kitajima, M. and Terashima, M. (1988) *Tohoku J. Exp. Med.* 155, 271-274.
  - 125) Stevenson, W.T.K. and Sefton, M.V. (1987) *Biomaterials* 8, 449-457.
  - 126) Sawhney, A.S., Pathak, C.P. and Hubbell, J.A. (1993) *Biomaterials* 14, 1008-1016.

- 127) Sawhney, A.S. and Hubbell, J.A. (1992) *Biomaterials* 13, 863-870.
- 128) Kung, I.M., Wang, F.F., Chang, Y.C. and Wang, Y.J. (1995) *Biomaterials* 16, 649-655.
- 129) Wang, W.J., Inoue, K., Hayashi, H., Aung, T., Tun, T., Gu, Y.J., Kaji, H., Echigo, Y., Kato, M., Doi, E., Setoyama, H., Kawakami, Y., Imamura, M., Maetani, S., Morikawa, N., Iwata, H., Ikada, Y. and Miyazaki, J. (1996) *Transplant. Proc.* 28, 1094-1096.
- 130) O'Shea, K.S. and Dixit, V.M. (1988) *J. Cell Biol.* 107, 2737-2748.
- 131) Wagner, R.C. (1980) *Adv. Microcirc.* 9, 45-75.
- 132) Auerbach, R., Kubai, L., Knighton, D. and Folkman, J. (1974) *Dev. Biol.* 41, 391-394.
- 133) Knighton, D.R., Silver, I.A. and Hunt, T.K. (1981) *Surgery* 90, 262-270.
- 134) Raugi, G.J., Olerud, J.E. and Gown, A.M. (1987) *J. Invest. Dermatol.* 89, 551-554.
- 135) Kirsner, R.S. and Eaglstein, W.H. (1993) *Dermatol. Clin.* 11, 629-640.
- 136) Rone, J.D. and Goodman, A.L. (1990) *Endocrinology* 127, 2821-2828.
- 137) Gospodarowicz, D. and Thakral, K.K. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 847-851.
- 138) Heldin, C.-H., Usuki, K. and Miyazono, K. (1991) *J. Cell. Biochem.* 47, 208-210.
- 139) Folkman, J. (1985) *Adv. Cancer Res.* 43, 175-203.
- 140) Folkman, J. (1990) *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 4-6.
- 141) Folkman, J. and Cotran, R. (1976) *Int. Rev. Exp. Pathol.* 16, 207-248.
- 142) Weidner, N. (1993) *Semin. Diagn. Pathol.* 10, 302-313.
- 143) Folkman, J. and Ingber, D. E. (1987) *Ann. Surg.* 206, 374-383.
- 144) Goldie, I. (1970) *Acta Orthop. Scand.* 40, 751-764.
- 145) Algire, G.H., Legallais, F.Y. and Park, H.D. (1947) *J. Natl. Cancer Inst.* 8, 53-62.
- 146) Folkman, J. (1972) *Ann. Surg.* 175, 409-416.
- 147) Fotsis, T., Zhang, Y., Pepper, M.S., Adlercreutz, H., Montesano, R., Nawroth, P.P. and Schweigerer, L. (1994) *Nature* 368, 237-239.
- 148) Folkman, J. (1971) *N. Eng. J. Med.* 285, 1182-1186.
- 149) Folkman, J. and Haudenschild, C. (1980) *Nature* 288, 551-556.
- 150) Shing, Y., Folkman, J., Haudenschild, C., Lund, D., Crum, R. and Klagsbrun, M. (1985) *J. Cell. Biochem.* 29, 275-287.
- 151) Ausprunk, D.H. and Folkman, (1977) *J. Microvasc. Res.* 14, 53-65.
- 152) Splawinski, J., Michna, M., Palczak, R., Konturek and Splawinska, B. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 10, 221-226 (1988)
- 153) Vu, M.T., Smith, C.F., Burger, P.C. and Klintworth, G.K. (1985) *Lab. Invest.* 53, 499-508.
- 154) Gimbrone Jr., M.A., Cotran, R.S., Leapman, S.B. and Folkman, J. (1974) *J. Natl. Cancer Inst.* 52, 413-427.
- 155) Poverini, P.J. and Leibovich, S.J. (1984) *Lab. Invest.* 51, 635-642.
- 156) Passaniti, A., Taylor, R.M., Pili, R., Guo, Y., Long, P.V., Haney, J.A., Pauly, R.R., Grant, D.S. and Martin, G.R. (1992) *Lab. Invest.* 67, 519-528.
- 157) Thompson, J.A., Anderson, K.D., DiPietro, J.M., Zwiebel, J.A., Zametta, M., Anderson, W.F. and Maciag, T. (1988) *Science* 241, 1349-1352.
- 158) Andrade, S.P., Fan, T.-P.D. and Lewis, G.P. (1987) *Br. J. Exp. Pathol.* 68, 755-766.
- 159) Myoken, Y., Kayada, Y., Okamoto, T., Kan, M., Sato, G.H. and Sato, J.D. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5819-5823.
- 160) Masuda, Y., Yoshitake, Y. and Nishikawa, K. (1988) *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 24, 893-899.
- 161) Masuda, Y., Yoshitake, Y. and Nishikawa, K. (1987) *Cell Biol. Int. Rep.* 11, 359-365.
- 162) Mosmann, T. (1983) *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- 163) Montesano, R., Pepper, M.S. and Orci, L. (1993) *J. Cell Sci.* 105, 1013-1024.
- 164) Wilks, J.W., Scott, P.S., Vrba, L.K. and Cocuzza, J.M. (1991) *Int. J. Rad. Biol.* 60, 73-77.
- 165) Tanaka, N.G., Sakamoto, N., Inoue, K., Korenaga, H., Kadoya, S., Ogawa, H. and Osada, Y. (1989) *Cancer Res.* 49, 6727-6730.

- 166) Sakamoto, N., Tanaka, N.G., Tohgo, A., Osada, Y. and Ogawa, H. (1987) *J. Natl. Cancer Inst.* 78, 581-585.
- 167) Drabkin, D.L. and Austin, J.H. (1932) *J. Biol. Chem.* 98, 719-733.
- 168) Plunkett, M.L. and Hailey, J.A. (1990) *Lab. Invest.* 62, 510-517.
- 169) Robertson, N.E., Discafani, C.M., Downs, E.C., Hailey, J.A., Sarre, O., Runkle Jr., R.L., Popper, T.L. and Plunkett, M.L. (1991) *Cancer Res.* 51, 1339-1344.
- 170) Huntsman, R.G. (1974) *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 5, 34-36.
- 171) Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- 172) Song, C.W. and Levitt, S.H. (1971) *Cancer Res.* 31, 587-589.
- 173) Dvorak, H.F., Harvey, V.S. and McDonagh, J. (1984) *Cancer Res.* 44, 3348-3354.
- 174) O'Connor, S.W. and Bale, W.F. (1984) *Cancer Res.* 44, 3719-3723.
- 175) Gerlowski, L.E. and Jain, R.K. (1986) *Microvasc. Res.* 31, 288-305.
- 176) Utoguchi, N., Mizuguchi, H., Saeki, K., Ikeda, K., Tsutsumi, Y., Nakagawa, S. and Mayumi, T. (1995) *Cancer Lett.* 89, 7-14.
- 177) Utoguchi, N., Mizuguchi, H., Saeki, K., Ikeda, K., Nakagawa, S. and Mayumi, T. (1996) *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 16, 105-110.
- 178) Utoguchi, N., Mizuguchi, H., Dantakean, A., Makimoto, H., Wakai, Y., Tsutsumi, Y., Nakagawa, S. and Mayumi, T. (1996) *Br. J. Cancer* 73, 24-28.
- 179) Suzuki, S., Ohta, S., Takashio, K., Nitana, H. and Hashimoto, Y. (1990) *Int. J. Cancer* 46, 1095-1100.
- 180) Debs, R.J., Fuchs, H.J., Philip, R., Brunette, E.N., Duzgunes, N., Shellito, J.E., Liggitt, D. and Patton, J.R. (1990) *Cancer Res.* 50, 375-380.
- 181) Shimomura, K., Manda, T., Mukumoto, S., Kobayashi, K., Nakano, K. and Mori, J. (1988) *Int. J. Cancer* 41, 243-247.
- 182) Manda, T., Shimomura, K., Mukumoto, S., Kobayashi, K., Mizota, T., Hirai, O., Matsumoto, S., Oku, T., Nishigaki, F., Mori, J. and Kikuchi, H. (1987) *Cancer Res.* 47, 3707-3711.
- 183) Umeno, H., Watanabe, N., Yamauchi, N., Tsuji, N., Okamoto, T. and Niitsu, Y. (1994) *Jpn. J. Cancer Res.* 85, 325-330.
- 184) Tsutsumi, Y., Kihira, T., Yamamoto, S., Kubo, K., Nakagawa, S., Miyake, M., Horisawa, Y., Kanamori, T., Ikegami, H. and Mayumi, T. (1994) *Jpn. J. Cancer Res.* 85, 9-12.
- 185) Tsutsumi, Y., Kihira, T., Tsunoda, S., Kubo, K., Miyake, M., Kanamori, T., Nakagawa, S. and Mayumi, T. (1994) *Jpn. J. Cancer Res.* 85, 1185-1188.
- 186) Tsutsumi, Y., Kihira, T., Tsunoda, S., Kanamori, T., Nakagawa, S. and Mayumi, T. (1995) *Br. J. Cancer* 71, 963-968.
- 187) Pesenti, E., Sola, F., Mongelli, N., Grandi, M. and Spreafico, F. (1992) *Br. J. Cancer* 66, 367-372.
- 188) Gagliardi, A., Hadd, H. and Collins, D.C. (1992) *Cancer Res.* 52, 5073-5075.
- 189) Takano, S., Gately, S., Neville, M.E., Herblin, W.F., Gross, J.L., Engelhard, H., Perricone, M., Eidsvoog, K. and Brem, S. (1994) *Cancer Res.* 54, 2654-2660.
- 190) Zugmaier, G., Lippman, M.E. and Wellstein, A. (1992) *J. Natl. Cancer Inst.* 84, 1716-1724.
- 191) Pienta, K.J., Murphy, B.C., Isaacs, W.B., Isaacs, J.T. and Coffey, D.S. (1992) *Prostate* 20, 233-241.
- 192) Wellstein, A., Zugmaier, G., Califano III, J.A., Kern, F., Paik, S. and Lippman, M.E. (1991) *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 716-720.
- 193) Inoue, K., Korenaga, H., Tanaka, N.G., Sakamoto, N. and Kadocya, S. (1988) *Carbohydr. Res.* 181, 135-142.
- 194) Nakayama, Y., Iwahana, M., Sakamoto, N., Tanaka, N.G. and Osada, Y. (1993) *J. Cell. Physiol.* 154, 1-6.
- 195) Nakamura, S., Sakurada, S., Salahuddin, S. Z., Osada, Y., Tanaka, N.G., Sakamoto, N., Sekiguchi, M. and Gallo, R.C. (1992) *Science* 255, 1437-1440.
- 196) Ingber, D., Fujita, T., Kishimoto, S., Sudo, K., Kanamaru, T., Brem, H. and Folkman, J. (1990)

- Nature* 348, 555-557.
- 197) Marui, S., Itoh, F., Kozai, Y., Sudo, K. and Kishimoto, S. (1992) *Chem. Pharm. Bull.* 40, 96-101.
- 198) Kusaka, M., Sudo, K., Fujita, T., Marui, S., Itoh, F., Ingber, D. and Folkman, J. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 1070-1076.
- 199) Yanase, T., Tamura, M., Fujita, K., Kodama, S. and Tanaka, K. (1993) *Cancer Res.* 53, 2566-2570.
- 200) Peacock, D.J., Banquerigo, M.L. and Brahn, E. (1992) *J. Exp. Med.* 175, 1135-1138.
- 201) Yamaoka, M., Yamamoto, T., Masaki, T., Ikeyama, S., Sudo, K. and Fujita, T. (1993) *Cancer Res.* 53, 4262-4267.
- 202) Berger, A.E., Dortch, K.A., Staite, N.D., Mitchell, M.A., Evans, B.R. and Holm, M.S. (1993) *Agent. Action.* 39, C86-C88.
- 203) Folkman, J. and Ingber, D. (1992) *Semin. Cancer Biol.* 3, 89-96.
- 204) Sakamoto, N. and Tanaka, N.G. (1988) *Cancer J.* 2, 9-13.
- 205) Maragoudakis, M.E., Sarmonika, M. and Panoutsacopoulou, M. (1989) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251, 679-682.
- 206) Beck, D.W., Olson, J.J. and Linhardt, R.J. (1986) *Exp. Neurol.* 45, 503-512.
- 207) McNatt, L.G., Lane, D. and Clark, A.F. (1992) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42, 687-693.
- 208) Lee, J.K., Choi, B., Sobel, R.A., Chiocca, E.A. and Martuza, R.L. (1990) *J. Neurosurg.* 73, 429-435.
- 209) Folkman, J., Weisz, P.B., Joullie, M.M., Li, W.W. and Ewing, W.R. (1989) *Science* 243, 1490-1493.
- 210) Li, W.W., Casey, R., Gonzalez, E.M. and Folkman, J. (1991) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32, 2898-2905.
- 211) Ingber, D.E., Madri, J.A. and Folkman, J. (1986) *Endocrinology* 119, 1768-1775.
- 212) Crum, R., Szabo, S. and Folkman, J. (1985) *Science* 230, 1375-1378.
- 213) Cariou, R., Harousseau, J.L. and Tobelem, G. (1988) *Cell Biol. Int. Rep.* 12, 1037-1047.
- 214) Thorpe, P.E., Derbyshire, E.J., Andrade, S.P., Press, N., Knowles, P.P., King, S., Watson, G.J., Yang, Y.-C. and Rao-Bette, M. (1993) *Cancer Res.* 53, 3000-3007.
- 215) Oikawa, T., Hiragun, A., Yoshida, Y., Ashino-Fuse, H., Tominaga, T. and Iwaguchi, T. (1988) *Cancer Lett.* 43, 85-92.
- 216) Fujimoto, J., Hosoda, S., Fujita, H. and Okada, H. (1989) *Invasion Metastasis* 9, 269-277.
- 217) Fujimoto, J., Hosoda, S., Fujita, H. and Okada, H. (1989) *Acta Obstet. Gynaecol. Jpn.* 41, 77-82.
- 218) Ashino-Fuse, H., Takano, Y., Oikawa, T., Shimamura, M. and Iwaguchi, T. (1989) *Int. J. Cancer* 44, 859-864.
- 219) Gross, J., Azizkhan, R.G., Biswas, C., Bruns, R.R., Hsieh, D.S.T. and Folkman, J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1176-1180.
- 220) Oikawa, T., Hirota, K., Nakamura, O., Shudo, K., Hiragun, A. and Iwaguchi, T. (1989) *Cancer Lett.* 48, 157-162.
- 221) Maheshwari, R.K., Srikantan, V., Bhartiya, D., Kleinman, H.K. and Grant, D.S. (1991) *J. Cell. Physiol.* 146, 164-169.
- 222) Sakamoto, N., Iwahana, M., Tanaka, N.G. and Osada, Y. (1991) *Cancer Res.* 51, 903-906.
- 223) Grant, D.S., Kleinman, H.K. and Martin, G.R. (1990) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 588, 61-72.
- 224) Saiki, I., Murata, J., Makabe, T., Nishi, N., Tokura, S. and Azuma, I. (1990) *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 668-675.
- 225) Norrby, K. and Sorbo, J. (1992) *Int. J. Exp. Pathol.* 73, 147-155.
- 226) Sakamoto, N. and Tanaka, N.G. (1988) *Cancer J.* 2, 9-13.
- 227) Gorelik, E., Ovejera, A., Shoemaker, R., Jarvis, A., Alley, M., Duff, R., Mayo, J., Herberman, R. and Boyd, M. (1987) *Cancer Res.* 47, 5739-5747.
- 228) Bordignon, C., Notarangelo, L.D., Nobili, N., Ferrari, G., Casorati, G., Panina, P., Mazzolari, E., Maggioni, D., Rossi, C. and Servida, P. (1995) *Science* 270, 470-475.
- 229) Kohn, D.B., Weinberg, K.I., Nolita, J.A., Heiss, L.N., Lenarsky, C., Crooks, G.M., Hanley, M.E., Annett, G., Brooks, J.S., El-Khourey, A., Lawrence, K., Wells, S., Moen, R.C., Bastian, J.,

- Williams-Herman, D.E., Elder, M., Wara, D., Bowen, T., Hershfield, M.S., Mullen, C.A., Blaese, R.M. and Parkman, R. (1995) *Nat. Med.* 1, 1017-1023.
- 230) Selden, R.F., Skoskiewicz, M.J., Howie, K.B., Russell, P.S. and Goodman, H.M. (1987) *Science* 236, 714-718.
- 231) Dhawan, J., Pan, L.C., Pavlath, G.K., Travis, M.A., Lanctot, A.M. and Blau, H.M. (1991) *Science* 254, 1509-1512.
- 232) Palmer, T.D., Thompson, A.R. and Miller, A.D. (1989) *Blood* 73, 438-445.
- 233) Barr, E. and Leiden, J.M. (1991) *Science* 254, 1507-1509.
- 234) Rosenberg, M.B., Friedmann, T., Robertson, R.C., Tuszyński, M., Wolff, J.A., Breakefield, X.O. and Gage, F.H. (1988) *Science* 242, 1575-1578.
- 235) Yao, S. and Kurachi, K. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3357-3361.
- 236) Wolff, J.A., Fisher, L.J., Xu, L., Jinnah, H.A., Langlais, P.J., Iuvone, P.M., O'Malley, K.L., Rosenberg, M.B., Shimohama, S. and Friedmann, T. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9011-9014.
- 237) Piccardo, P., Maysinger, D. and Cuello, A.C. (1992) *Neuroreport* 3, 353-356.
- 238) Moullier, P., Bohl, D., Cardoso, J., Heard, J.M. and Danos, O. (1995) *Nat. Med.* 1, 353-357.
- 239) Naffakh, N., Pinset, C., Montarras, D., Li, Z., Paulin, D., Danos, O. and Heard, J.M. (1996) *Hum. Gene Ther.* 7, 11-21.
- 240) Chicheportiche, D. and Reach, G. (1988) *Diabetologia* 31, 54-57.
- 241) Ohe, Y., Podack, E.R., Olsen, K.J., Miyahara, Y., Miura, K., Saito, H., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Ohira, T., Nishio, K. and Saijo, N. (1993) *Br. J. Cancer* 67, 939-944.
- 242) Yuet, P.K., Harris, T.J. and Goosen, M.F.A. (1995) *Artif. Cells. Blood Substit Immobil. Biotechnol.* 23, 109-133.
- 243) Suematsu, S., Matsuda, T., Aozasa, K., Akira, S., Nakano, N., Ohno, S., Yamamura, J., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7547-7551.
- 244) Suematsu, S., Matsusaka, T., Matsuda, T., Ohno, S., Miyazaki, J., Yamamura, K., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 232-235.
- 245) Tsujinaka, T., Ebisui, C., Fujita, J., Kishibuchi, M., Morimoto, T., Ogawa, A., Katsume, A., Ohsugi, Y., Kominami, E. and Monden, M. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207, 168-174.
- 246) 宮井達也, 鈴木宏志, 勝目朝夫, 森口佳之, 萬啓悟, 龍味哲夫, 福井博泰, 大杉義征, 末松佐知子, 岸本忠三 (1991) 日本免疫学会総会・学術集会記録 21, 116.
- 247) Matsuda, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1988) *Eur. J. Immunol.* 18, 951-956.
- 248) Papas, K.K., Constantinidis, I. and Sambanis, A. (1993) *Cytotechnology* 13, 1-12.
- 249) Tziampazis, E. and Sambanis, A. (1995) *Biotechnol. Prog.* 11, 115-126.
- 250) Hayashi, H., Inoue, K., Aung, T., Tun, T., Wenjing, W., Gu, Y.J., Shinohara, S., Echigo, Y., Kaji, H., Setoyama, H., Kawakami, Y., Imamura, M., Morikawa, N., Iwata, H., Ikada, Y. and Miyazaki, J. (1996) *Transplant. Proc.* 28, 1428-1429.
- 251) Hayashi, H., Inoue, K., Aung, T., Tun, T., Wang, W.J., Gu, Y.J., Shinohara, S., Echigo, Y., Kaji, H., Kato, M., Setoyama, H., Kawakami, Y., Imamura, M., Morikawa, N., Iwata, H., Ikada, Y. and Miyazaki, J. (1996) *Transplant. Proc.* 28, 1097-1098.
- 252) Taniguchi, H., Nakauchi, H., Iwata, H., Amemiya, H. and Fukao, K. (1992) *Transplant. Proc.* 24, 2977-2978.
- 253) Hughes, M., Vassilakos, A., Andrews, D.W., Hortelano, G., Belmont, J.W. and Chang, P.L. (1994) *Hum. Gene Ther.* 5, 1445-1455.
- 254) Liu, H.-W., Ofosu, F.A. and Chang, P.L. (1993) *Hum. Gene Ther.* 4, 291-301.
- 255) Aebischer, P., Winn, S.R. and Galletti, P.M. (1988) *Brain Res.* 448, 364-368.
- 256) Winn, S.R., Hammang, J.P., Emerich, D.F., Lee, A., Palmiter, R.D. and Baetge, E.E. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2324-2328.
- 257) Maysinger, D., Piccardo, P., Filipovic-Grcic, J. and Cuello, A.C. (1993) *Neurochem. Int.* 23, 123-129.
- 258) Maysinger, D., Piccardo, P., Liberini, P., Jalsenjak, I. and Cuello, A.C. (1994) *Neurochem. Int.* 24, 495-503.
- 259) Hoffman, D., Breakefield, X.O., Short, M.P. and Aebischer, P. (1993) *Exp. Neurol.* 122, 100-106.
- 260) Emerich, D.F., Winn, S.R., Christenson, L., Palmatier, M.A., Gentile, F.T. and Sanberg, P.R. (1992) *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16, 437-447.
- 261) Winn, S.R., Tresco, P.A., Zielinski, B., Greene, L.A., Jaeger, C.B. and Aebischer, P. (1991) *Exp. Neurol.* 113, 322-329.
- 262) Aebischer, P., Tresco, P.A., Sagen, J. and Winn, S.R. (1991) *Brain Res.* 560, 43-49.
- 263) Aebischer, P., Wahlberg, L., Tresco, P.A. and Winn, S.R. (1991) *Biomaterials* 12, 50-56.
- 264) Aebischer, P., Tresco, P.A., Winn, S.R., Greene, L.A. and Jaeger, C.B. (1991) *Exp. Neurol.* 111, 269-275.
- 265) Jaeger, C.B., Greene, L.A., Tresco, P.A., Winn, S.R. and Aebischer, P. (1990) *Prog. Brain Res.* 82, 41-46.
- 266) Aebischer, P., Winn, S.R., Tresco, P.A., Jaeger, C.B. and Greene, L.A. (1991) *J. Biomech. Eng.* 113, 178-183.
- 267) Roberts, T., De Boni, U. and Sefton, M.V. (1996) *Biomaterials* 17, 267-275.
- 268) Kordower, J.H., Liu, Y.-T., Winn, S. and Emerich, D.F. (1995) *Cell Transplant.* 4, 155-171.
- 269) Emerich, D.F., Frydel, B.R., Flanagan, T.R., Palmatier, M., Winn, S.R. and Christenson, L. (1993) *Cell Transplant.* 2, 241-249.
- 270) Miyoshi, Y., Date, I., Ohmoto, T. and Iwata, H. (1996) *Exp. Neurol.* 138, 169-175.
- 271) Lindner, M.D., Winn, S.R., Baetge, E.E., Hammang, J.P., Gentile, F.T., Doherty, E., McDermott, P.E., Frydel, B., Ullman, M.D., Schallert, T. and Emerich, D.F. (1995) *Exp. Neurol.* 132, 62-76.
- 272) Aebischer, P., Goddard, M., Signore, A.P. and Timpson, R.L. (1994) *Exp. Neurol.* 126, 151-158.
- 273) Pochon, N.A.-M., Heyd, B., Déglon, N., Joseph, J.-M., Zurn, A.D., Baetge, E.E., Hammang, J.P., Goddard, M., Lysaght, M., Kaplan, F., Kato, A.C., Schlupe, M., Hirt, L., Regli, F., Porchet, F., De Tribolet, N. and Aebischer, P. (1996) *Hum. Gene Ther.* 7, 851-860.
- 274) Aebischer, P., Schlupe, M., Déglon, N., Joseph, J.-M., Hirt, L., Heyd, B., Goddard, M., Hammang, J.P., Zurn, A.D., Kato, A.C., Regli, F. and Baetge, E.E. (1996) *Nat. Med.* 2, 696-699.
- 275) Aebischer, P. and Kato, A.C. (1995) *Eur. Neurol.* 35, 65-68.
- 276) Al-Hendy, A., Hortelano, G., Tannenbaum, G.S. and Chang, P.L. (1995) *Hum. Gene Ther.* 6, 165-175.
- 277) Tai, I.T. and Sun, A.M. (1993) *FASEB J.* 7, 1061-1069.
- 278) Chang, P.L., Shen, N. and Westcott, A.J. (1993) *Hum. Gene Ther.* 4, 433-440.
- 279) Al-Hendy, A., Hortelano, G., Tannenbaum, G.S. and Chang, P.L. (1996) *Hum. Gene Ther.* 7, 61-70.
- 280) Hammer, C., Suckfull, M., and Saumweber, D. (1992) *Transplant. Proc.* 24, 2397-2400.
- 281) Somerville, C.A., and d'Apice, A.J.F. (1993) *Kidney Int.* 44 Suppl. 42, S112-S121.
- 282) Fryer, J.P., Leventhal, J.R. and Matas, A.J. (1995) *Transplant Immunol.* 3, 21-31.
- 283) Manez, R., Kelly, R.H., Marino, I.R., Murase, N., Demetris, A.J. and Starzl, T.E. (1994) *Transplant. Proc.* 26, 1249-1250.
- 284) Calne, R.Y. (1970) *Transplant. Proc.* 2, 550-553.
- 285) Miyagawa, S., Hirose, H., Shirakura, R., Naka, Y., Nakata, S., Kawashima, Y., Seya, T., Matsumoto, M., Uenaka, A. and Kitamura, H. (1988) *Transplantation* 46, 825-830.
- 286) Ishiguro, H., Kobayashi, K., Suzuki, M., Titani, K., Tomonaga, S. and Kurosawa, Y. (1992) *EMBO J.* 11, 829-837.
- 287) Zekorn, T., Endl, U., Horcher, A., Siebers, U., Bretzel, R.G. and Federlin, K., (1995) *Transplant. Proc.* 27, 3362-3363.
- 288) Soon-Shiong, P., Lu, Z.-N., Grewal, I., Lanza, R. and Clark, W. (1990) *Horm Metab. Res. Suppl.* 25, 215-219.

- 289) Horcher, A., Zekorn, T., Siebers, U., Klock, G., Frank, H., Houben, R., Bretzel, R. G., Zimmermann, U., Federlin, K. (1994) *Transplant. Proc.* 26, 784-786.
- 290) Vandenbossche, G.M.R., Bracke, M.E., Cuvelier, C.A., Bortier, H.E., Mareel, M.M. and Remon, J.P. (1993) *J. Pharm. Pharmacol.* 45, 121-125.
- 291) Okada, H., Tanaka, H. and Okada, N. (1983) *Eur. J. Immunol.* 13, 340-344.
- 292) Cole, J.L., Housley Jr., G.A., Dykman, T.R. and MacDermott, R.P. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 859-863.
- 293) Seya, T., Turner, J.R. and Atkinson, J.P. (1986) *Exp. Med.* 163, 837-855.
- 294) Seya, T., Okada, M., Matsumoto, M., Hong, K., Kinoshita, T. and Atkinson, J.P. (1991) *Molec. Immunol.* 28, 1137-1147.
- 295) Hoffmann, E.M. (1969) *Immunochemistry* 6, 391-403.
- 296) Nicholson-Weller, A., Burge, J., Fearon, D.T., Weller, P.F. and Austen, K.F. (1982) *J. Immunol.* 129, 184-189.
- 297) Medof, M.E., Kinoshita, T. and Nussenzweig, V. (1984) *J. Exp. Med.* 160, 1558-1578.
- 298) Fujita, T., Inoue, T., Ogawa, K., Iida, K. and Tamura, N. (1987) *J. Exp. Med.* 166, 1221-1228.
- 299) Okada, N., Harada, R., Fujita, T. and Okada, H. (1989) *Int. Immunol.* 1, 205-208.
- 300) Okada, N., Harada, R., Fujita, T. and Okada, H. (1989) *J. Immunol.* 143, 2262-2266.
- 301) Rollins, S. A., Zhao, J., Ninomiya, H. and Sims, P. J. (1991) *J. Immunol.* 146, 2345-2351.
- 302) Darquy, S. and Reach, G. (1985) *Diabetologia* 28, 776-780.
- 303) Darquy, S., Pueyo, M.E., Capron, F. and Reach, G. (1994) *Artif. Organs* 18, 898-903.
- 304) Tze, W.J. and Tai, J. (1982) *Transplantation* 33, 563-564.
- 305) Wiegand, F., Kroncke, K.-D. and Kolb-Bachofen, V. (1993) *Transplantation* 56, 1206-1212.
- 306) Kröncke, K.-D., Funda, J., Berschick, B., Kolb, H. and Kolb-Bachofen, V. (1991) *Diabetologia* 34, 232-238.
- 307) Pueyo, M.E., Darquy, S., Capron, F. and Reach, G. (1993) *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 5, 197-203.

