

Title	機能性修飾高分子の動態特性を利用したバイオコンジュゲート化DDSの最適化に関する研究
Author(s)	鎌田, 春彦
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3169331">https://doi.org/10.11501/3169331</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

機能性修飾高分子の動態特性を利用した  
バイオコンジュゲート化DDSの最適化に関する研究

2000年

鎌田 春彦



## 目次

緒論	1
本論	
第一章 ポリビニルピロリドン (PVP) を用いたTNF- $\alpha$ のバイオコンジュゲーション	4
第一節 PVP-TNF- $\alpha$ の作製とin vitroバイオコンジュゲート特性の評価	6
第二節 PVP-TNF- $\alpha$ の静脈内投与による固形腫瘍に対する抗腫瘍効果	10
第三節 PVP-TNF- $\alpha$ の抗腫瘍効果メカニズムに関する研究	13
第四節 小括	18
第二章 徐放性を有する修飾高分子の開発	21
第一節 徐放性を有する修飾高分子のin vitroにおける性質とその機能評価	22
第二節 徐放性を有する修飾高分子の体内動態に関する検討	26
第三節 徐放性を有する水溶性高分子を用いたin vivo抗腫瘍効果に関する検討	29
第四節 小括	32
第三章 腎臓へのターゲティングキャリアーの開発とその特性	35
第一節 環無水物導入PVPの作製とその徐放化能に関する研究	36
第二節 環無水物導入PVPの生体内動態特性	38
第三節 環無水物導入PVPの腎臓ターゲティングキャリアーの有用性に関する研究	40
第四節 小括	45
総括	49
結論	51
謝辞	52
参考文献	53

## 緒論

20世紀初頭の化学合成技術の革新的発展に伴って、疾病治療に有効な天然物（生薬）の薬効成分のみを工業レベルで安定かつ安価に創出できるようになり、薬物治療が社会的に広く浸透し始めた。その後、より有効かつ安全性に優れた薬物治療を追及していくとする観点から、生薬抽出物やその化学合成物を単なる「薬物（有効成分）」としてではなく、「薬剤（医薬品）」として利用しようとする「製剤技術」の開発が注目されるようになり、錠剤や注射剤など、個々の疾病に応じて、薬物の有効性や汎用性を出来る限り高めようとする様々な剤形が考案されてきた。これら過去における「製剤技術」は主として、吸収性や安定性、組織分布（体内挙動）などの点で、薬物の薬効発現強度（生物学的利用能；バイオアベイラビリティ）を投与剤形の工夫により、改善しようとするものであった。さらに近年ではプロドラッグ化など、いわゆる現在のDrug Delivery System（DDS；薬物送達法）研究にみられる、薬物そのものの動態特性や作用メカニズムおよび、その薬理効果をも改善していくとする「製剤技術」が次々と開発されてきており、この「製剤技術」は今日の薬物治療の発展に多大な貢献を果たしていると言えよう。

一方で昨今の分子生物学・遺伝子工学の進展に伴い、物理化学的安定性や拡散性、膜透過・吸収性に比較的優れている上述の低分子薬物のみならず、新たにタンパク質・遺伝子といった生体高分子を初めとする、種々ヒト由来内因性生理活性物質を有効な医薬品として適用しようとする試みが注目されるようになってきた<sup>1,2)</sup>。特に近年、遺伝子欠損やサイトカインの過不足が様々な難治性疾患の原因となっていることなど<sup>3,4)</sup>、各種疾病が分子レベルで解明されつつあることも相まって、これら生理活性物質を標的とした分子治療戦略の早期開発が期待されている。この治療戦略は、疾病の原因となっている遺伝子や生理活性物質の異常発現を、質的・量的に是正することで、恒常性（ホメオスタシス）を回復・維持させようとする点で、言わば病態側（生体側）から親た薬物治療とも捉えられ、既存の治療法とは異なった新たな次世代戦略として大きな期待が寄せられている。しかしながら、これまでに同定された数多くの生理活性物質が、次々と新しい「薬物」として研究・開発されてきたにもかかわらず、実際に「薬剤（医薬品）」として臨床応用されているものは極めて少ないのが現状である<sup>1)</sup>。これは、1) サイトカインなどの生体高分子は一般に、物理化学的にも生物学的にも不安定であるため<sup>5,6)</sup>、十分な薬理効果を得るためには大量頻回投与を余儀なくされてしまうこと、2) サイトカインは通常、一種類のサイトカインが様々な生理作用を有するうえ、その標的組織・細胞が多岐に渡っているため、生体に適用した際には、目的とする作用のみならず、予期せぬ作用をも同時に招いてしまう<sup>7,8)</sup>ことなどに因る。従ってサイトカインなどを疾病治療に応用していくためには、まずその体内安定性を改善し、多様なin vivo作用の中から治療に必須な目的作用のみを選択的に引き出し得る、新たな「製剤技術」が必要となってくる。

生体高分子などの内因性生理活性物質を21世紀を担う「薬剤（医薬品）」として開拓していこうと考えた場合、従来までの低分子薬物を用いた疾病治療の最適化を目指した、薬物の生体内挙動を時間的かつ空間的に制御しようとするDDSを駆使することは勿論のこと、そのうえで少なくとも、上述の1)、2)の問題点を克服し得る「製剤技術」の創出が必須となってくる。内因性生理活性物質は一般に、標的とする組織や細胞に至適な作用時間-濃度パターンのもと作用することで、理想とする目的の生理作用を発現している。すなわち生体は、自らの恒常性を維持するために、生理活性物質を時間的-空間的に放出制御・標的指向しており、これはまさに我々が理想とするDDSを具現しているものと考えられる。従って、サイトカインなどの内因性生理活性タンパク質を用いた薬物治療の最適化を目指すためには、まず体内における安定性を保持した上で、有効な薬物濃度を長時間維持し、同時に標的組織へ選択的に薬物を送達する基盤技術の開発が必要となってくると言えよう。本基盤技術は当然のことながら、サイトカインなどの生理活性タンパク質に限らず、これまで鋭い活性を持つにも関わらずその副作用のために薬物治療への応用が断念されてきたあらゆる薬物に対しても、薬物治療応用への道を再び拓くものと考えられるため、「創薬技術」とも言うべき新たなアプローチとなり得るものと考えられる。

以上の観点から我々はこれまで、期待されながらも臨床応用が前途多難であると考えられていた腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ )<sup>9,10)</sup> やインターロイキン-6 (IL-6)<sup>11)</sup> のポリエチレングリコール (PEG) によるバイオコンジュゲーションを試みてきた。その結果、TNF- $\alpha$  やIL-6の目的とする治療作用発現メカニズムを考慮した上で、さらに最適のバイオコンジュゲート条件を詳細に検討することで、サイトカインの体内安定性を飛躍的に向上させ得ること<sup>12,13)</sup>、さらに目的治療作用と副作用を選択分離し、目的治療作用のみを効率よく数百倍にも高め得ることを見出している<sup>14,15)</sup>。先述の基盤的創薬技術ともいべきバイオコンジュゲーションによるサイトカインへの作用の選択性付与は、体内安定性の向上に伴う投与量の大幅な削減や、副作用発現組織移行性の低下などに起因することが判明している<sup>16)</sup>。

一方で我々の上記サイトカインのバイオコンジュゲーションに関する一連の研究から、バイオコンジュゲーションに用いる修飾高分子の物理化学的性質によってバイオコンジュゲート薬物の体内動態が決定付けられるため、任意の体内挙動を示す修飾高分子を適用することで、バイオコンジュゲーションにより薬物の体内動態を自由に制御し得ることを報告している<sup>17,18)</sup>。このことは、薬物の作用メカニズムに応じて修飾高分子を分子設計していくことで、1) 薬物の体内安定性の飛躍的向上、2) 薬物への作用の選択性付与（作用の点でのTargeting能の付与）のみならず、薬物の薬効発現を時間的-空間的に制御し得ることを意味している。すなわち基盤的創薬技術としてのバイオコンジュゲーションを適用しつつ、さらに高い信頼性が保証された次世代薬物を創出していくためには、精巧緻密に生体内挙動を制御し得るインテリジェントな機能を持った修飾高分子を開発して

いかねばならない。

しかしながら、これまで安全性や抗原性などの面からバイオコンジュゲーションには主としてPEGが汎用されているに過ぎない<sup>19-22)</sup>。我々の研究からも、PEGは十分とは言えないまでも、血中滞留性の向上のみを目的としたバイオコンジュゲーションには適した高分子のひとつであることが明らかとなっている。しかしPEGは、その構造上、体内動態を制御するための種々の機能性官能基の導入は困難であり、新たな付加価値をさらに追加することが出来ない。以上の観点から、薬物治療の最適化を目指し、機能導入可能な新規修飾高分子の開発を最終目的に、我々はまずその基本骨格となる幹高分子を検索するため、PEGを含めた様々な水溶性高分子のin vivo体内動態、in vitroにおける血管内皮細胞との相互作用強度を検討してきた。その結果、ポリビニルピロリドン (PVP) が、他の水溶性修飾高分子と比較して血中滞留性に優れており、さらに血中からの組織移行性が極めて低いことを見出した。局方収載品であるPVPは、これまでにも代用血漿として用いられてきたという経緯から、非常に生体適合性・安全性に優れていることが判明している<sup>23)</sup>。またPVPはラジカル共重合法により、機能導入に不可欠な種々の官能基を容易に導入することが可能であることから、ターゲティングなどインテリジェントな機能を新たに追加導入出来得る幹高分子として非常に有用性が高いと考えられる (Fig.1)。

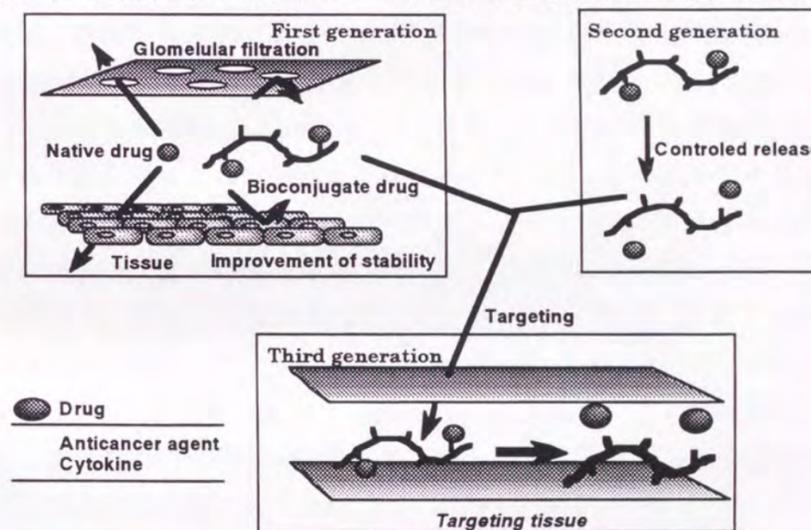


Fig.1 Advantages and future strategies of bioconjugate drugs on molecular design

本研究においては、まずバイオコンジュゲーションの疾病治療への応用を念頭におき、モデルサイトカインとしてTNF- $\alpha$ を用い、TNF- $\alpha$ を水溶性高分子でバイオコンジュゲーションすることで生体内不安定性が克服され、臨床応用への道が拓かれ得ることを認めた。さらに、修飾高分子として有用であることが示されたPVPを幹高分子として、薬物徐放を可能とする用いた新規修飾高分子を開発するとともに、腎臓へのターゲティングデバイスの開発にも成功したのでここに学位論文としてまとめた次第である。

## 本論

### 第一章 ポリビニルピロリドン (PVP) を用いたTNF- $\alpha$ のバイオコンジュゲーション

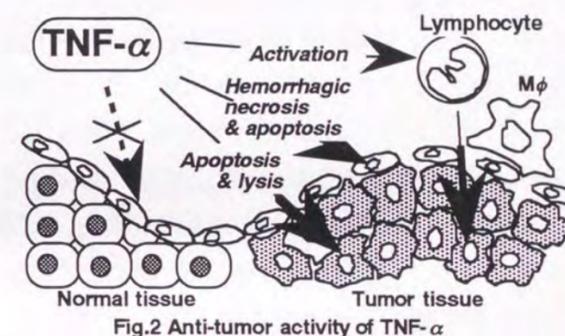
癌は現在、国内における死亡原因の第一位にあげられ、癌に対する有効な治療法の開発が医療分野における緊急課題といわれて久しい。現在、外科的手術が癌治療の主流となっているが、多発性癌や転移癌などに対しては殆ど手の施しようのないのが現状であり、このような難治性の癌に対しても有効な治療法が待ち望まれている。本視点から、放射線療法など様々な方法が考案されてきたが<sup>24)</sup>、中でも抗癌抗生物質を用いたいわゆる癌化学療法は、全身的に薬物を投与することで、手術が不可能な原発性の固形癌のみならず、これまでに治療の出来なかった数多くの難治性癌に対して有効な手段と目されている。しかしながらこれまで数多くの抗癌活性を有する薬物が新しい医薬品の候補としてあげられてきたにも関わらず、いずれも重篤な副作用のため、その治療効果や患者のQOLの点から見て有効な治療法とは言えなかった。従って既存の抗癌作用以外の新規作用点を有する薬物の開発に期待が寄せられている。

一方で近年のライフサイエンスの発展に伴い、免疫系や内分泌系、造血系などの生体内情報伝達の一翼を担っているサイトカインなどの生理活性タンパク質が相次いで同定され、pg~ng/mLという低濃度で鋭い目的の生理作用をin vivoで発現する、これら生体高分子の機能や役割の全貌が次第に解明されつつある。中でもサイトカインは有機的連関のもと、サイトカインネットワークと呼ばれる複雑かつ巧妙な作用発現機構を駆使しつつ、生体の恒常性を絶妙に維持していることから、その医薬品としての臨床的有用性が高く評価されている。特に昨今のバイオテクノロジー技術の目覚ましい発展により、サイトカインを始めとする種々生理活性タンパク質の大量生産が可能となってきたことも相俟って、今後ますますサイトカインを医薬品として適用しようとする試みは注目されていくものと考えられる。しかしながら、サイトカインなどの生理活性タンパク質は、一般に体内安定性に乏しいうえ、一種類のサイトカインが様々な組織の細胞に対し、多種多様な生理作用を発揮することが知られている。その為、サイトカインなどの生理活性タンパク質を生体に適用した際には、予期せぬ重篤な副作用を発現してしまっているのが現状である。従って、サイトカインの臨床応用を実現するためには、上記の両問題点を克服し得る新規DDSの開発が、今後の最重要課題であると言える。

さて、TNF- $\alpha$ は、腫瘍部位に血液凝固を伴った出血性壊死を誘導する因子として同定され<sup>25)</sup>、動物実験レベルでは多くの癌種に対して著効を示す「夢の抗癌剤」として脚光を浴びた<sup>26-28)</sup>。しかしながらヒトにおける全身投与では、有効性が一部の症例において認められたものの<sup>29-31)</sup>、全体としての奏効率は5%前後と期待を裏切る結果に終わってしまっている<sup>32-36)</sup>。これは、TNF- $\alpha$ の半減期が数分から数十分と極めて短いために<sup>37)</sup>、十

分な薬理作用を得るための大量頻回投与もしくは大量持続投与が余儀なくされてしまうことや、様々な組織の細胞上に発現している2つのレセプター (TNFR-I, TNFR-II) を介して<sup>38,39)</sup>、目的とする抗腫瘍作用以外にも、多様なin vivo生理作用が同時に発現してしまうことが原因となっている。しかしながら一方で、TNF- $\alpha$ の局所療法では高い奏効率が得られており<sup>40,41)</sup>、TNF- $\alpha$ を用いた癌治療の可能性が未だ強く支持され続けているのも実状であることから、TNF- $\alpha$ を全身投与可能な薬物として臨床応用しうる「創薬技術」の台頭が待望されている。

このTNF- $\alpha$ の抗腫瘍効果は、直接的な腫瘍細胞傷害だけでなく<sup>42-45)</sup>、血中の抗腫瘍エフェクター免疫細胞の賦活化<sup>46)</sup>や腫瘍血管の特異的傷害 (腫瘍出血壊死)<sup>47,48)</sup>により発揮されることが知られている<sup>49,50)</sup> (Fig.2)。また、腫瘍血管の出血壊死作用のプロセスの中で、腫瘍血管の血管透過性が亢進し<sup>51,52)</sup>、血中から腫瘍組織への高分子物質の移行性が促進されるなど<sup>53)</sup>、高分子の癌組織におけるEPR効果<sup>54-56)</sup> (enhanced permeability and retention effects) が亢進することが知られていることから、結局のところ、血中滞留性を向上させれば、TNF- $\alpha$ の作用機序全ての点において作用の増強が達成し得るものと期待される。また一方で、血中から肝臓などの正常組織へのTNF- $\alpha$ の移行が、目的作用以外の作用発現 (副作用発現) に直結するため<sup>57,58)</sup>、副作用の効率的軽減の観点からも、その血中安定性の向上は、TNF- $\alpha$ を臨床応用するための有効な手段となり得るものと考えられる。



以上の観点から我々は、TNF- $\alpha$ の血中滞留性の向上を目的に、PEGバイオコンジュゲーション (PEGylation) を試みたところ、最適のバイオコンジュゲート条件を詳細に検討することで、その体内安定性を飛躍的に向上し (プロテアーゼ抵抗性付与 [立体配位効果])、腎糸球体濾過速度やその他の正常組織への移行性を大幅に低下させ得ること (高分子化効果)、その結果血中滞留性が著しく向上し、副作用を軽減しつつ、目的治療作用のみを100倍にも選択的に高め得ることを見出している。しかし今後、TNF- $\alpha$ の持つ抗腫瘍効果を更に厳密かつ選択的に引き出していくためには、より血中滞留性の向上に適した修飾高分子を検索していかねばならない。さらに、多くの生理活性タンパク質に対して有効な、新規創薬技術としてのバイオコンジュゲーションを確立し、より優れた薬効と安全性を有する次世代医薬品を分子設計していく必要がある。そのためには、疾病や

治療目的に応じて、血中滞留性の向上のみならず、バイオコンジュゲート体の生体内挙動をより緻密に制御し得る、ターゲティング能や疾病環境をセンサーしつつ、薬物の徐放化を可能とするインテリジェントな修飾高分子の開発も必須となってこよう。しかしながら、前述のように、これまで用いてきたPEGは、構造上、新たな機能性官能基を導入することが困難である。この点、ターゲティング能などの付加機能を導入できる修飾高分子として、我々がその有用性を見出したPVPは、検討した非電荷水溶性高分子の中で、最も血中滞留性に優れており、かつ代用血漿として用いられてきた経緯から、安全性にも優れている。本章ではこのPVPを修飾高分子として適用し、TNF- $\alpha$ バイオコンジュゲーションを行い、血中滞留性の向上を目的としたバイオコンジュゲーションにおけるPVPの修飾高分子としての有用性と、今後種々機能を導入していくうえでの幹修飾高分子としての可能性を考察した。

#### 第一節 PVP-TNF- $\alpha$ の作製とin vitroバイオコンジュゲート特性の評価

我々の研究室ではこれまでPEGを用いたTNF- $\alpha$ のバイオコンジュゲーションを行ってきた。本研究ではTNF- $\alpha$ の抗腫瘍メカニズムから、これまでの研究で最も血中滞留性に優れ、かつ組織移行性に乏しかったPVPを合成し、これを修飾高分子として用いたPVP-TNF- $\alpha$ を作製した。

#### 実験材料と方法

##### 試薬および器具

PVPの合成にあたり、以下の試薬を用いた。ラジカル重合の開始剤として、4, 4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸) (4,4'-azobis-4-cyanovaleric acid; ACVA、和光純薬工業)およびモノマーとしてビニルピロリドン (N-vinyl-2-pyrrolidone; VP、和光純薬工業)を用いた。また、重合反応における分子量制御を行うために $\beta$ -メルカプトプロピオン酸 ( $\beta$ -mercaptpropionic acid;  $\beta$ -MP、和光純薬工業)を用いた。溶媒として使用したジメチルホルムアミド (dimethylformamide; DMF) はキシダ化学より購入した。ポリマーの分取にはSephadex-G75 (Pharmacia)、分取したPVPの分子量決定にはTSKgel-G4000PwxL (株式会社トーソー)、またPVP-TNF- $\alpha$ の分取に関しては、TSKgel-G3000SwxL (株式会社トーソー)を用いた。透析にはSpectra/Por3、MWCO3,500 (The Spectrum Companies)を用いた。PVPの活性化には、N-ヒドロキシコハク酸イミド (N-hydroxysuccinimide; NHS、和光純薬工業)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (dicyclohexylcarbodiimide; DCC、和光純薬工業)を用いた。PEGスタンダードはTSKstandard polyethylene oxide (株式会社トーソー)を用いた。natural human TNF- $\alpha$ は林原生物科学研究所より供与された。

#### PVPの作製方法 (Scheme 1)

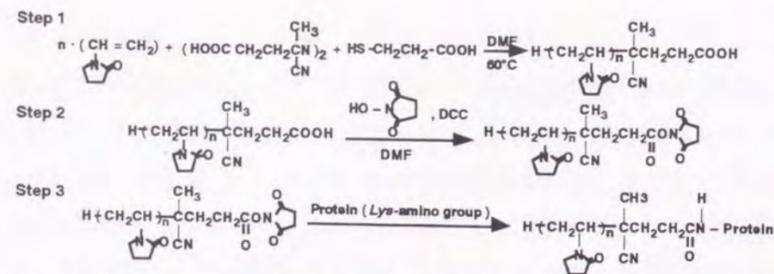
ポリビニルピロリドン (polyvinylpyrrolidone; PVP) はラジカル重合法により作製した。モノマーとしてVP (270mmol)、ラジカル重合の開始剤としてACVA (1.2mmol)、連鎖移動剤として、 $\beta$ -MP (2.7mmol) を使用し、あらかじめモレキュラーシーブスにより脱水させておいたDMF中に溶解させた。DMF溶液をそれぞれ重合管中に注ぎ込み、凍結融解による脱気を3回行った後、減圧下で封管した。その後、ラジカル反応を進行させるために、60°C恒温槽中で6時間加温し、PVPをラジカル重合した。反応後、大過剰量のジエチルエーテル中に反応溶液を注ぎ込むことでPVPを析出させ、ガラスフィルターを用い吸引濾過により抽出した。未反応のモノマー、開始剤、および連鎖移動剤を完全に除去するため、排除限界分子量3,500の透析膜で透析した後、凍結乾燥した。ゲル濾過クロマトグラフィーにより分子量約6,000のものを分取・精製した後、水中で脱塩・透析を行い、凍結乾燥した。PVPの平均分子量として、ゲル濾過HPLCによりスタンダードとしてPEGを用い分子量校正曲線から算出した相対値として、数平均分子量 (Mn) を算出した。

#### PVPのアミノ基反応性官能基の導入方法 (PVPの活性化方法) (Scheme 1)

分取したPVP200mgをガラス瓶中で1.0mLのDMFに溶解し、平均分子量換算で10倍モル量のNHSおよびDCCを加えた。反応溶液をエッペンチューブ中で激しく攪拌しながら反応を行い、NHS、DCCを1時間毎に2回同様に添加した後、22時間室温で反応させ、カルボキシル基の活性化を行った。反応後、沈殿した副生成物ジシクロヘキシルウレアを遠心分離により沈殿させ、上清のDMFを大過剰量のジエチルエーテル中にそそぎ込むことにより活性化PVPを抽出、吸引乾燥した。抽出したポリマーにジクロロメタン5mLを加えて再溶解し、ジエチルエーテルに滴下して再抽出することで、活性化PVPを精製した。

#### PVP-TNF- $\alpha$ の作製 (Scheme 1)

PVP-TNF- $\alpha$ の作製は前記活性化PVPを用い、0.651mg/mLのnatural human TNF- $\alpha$ を含むPBS溶液 (リン酸緩衝生理食塩水、pH7.4) 500 $\mu$ Lに、10倍モル量の活性化PVPを加え、室温で30分間TNF- $\alpha$ のリジン $\epsilon$ -アミノ基と反応させた。反応停止は、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸を添加することで反応を競合停止させた。反応溶液は未反応のPVP、native TNF- $\alpha$ を除去するためにゲル濾過HPLCを用い、種々の時間で分取することにより分子サイズの異なるPVP-TNF- $\alpha$ を得た。また、PVP-TNF- $\alpha$ の平均分子量として、ゲル濾過HPLCによりスタンダードとしてタンパク質分子量マーカーを用い分子量校正曲線から算出した相対値として、数平均分子量 (Mn) を算出した。



**Scheme 1 Preparation of polyvinylpyrrolidone for molecular design of bioconjugated protein.**  
 Step 1: Synthesis of polyvinylpyrrolidone  
 Step 2: Activation of carboxyl group with N-hydroxy succinimide and dicyclohexyl carbodiimide  
 Step 3: Bioconjugation with protein and synthetic polyvinylpyrrolidone

### PVP-TNF- $\alpha$ の比活性測定

PVP-TNF- $\alpha$  の残存活性は、LM細胞増殖阻害実験により行った<sup>59)</sup>。LM細胞は、100mmシャーレ中で、1%牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum; FBS) 含有イーグル培地 (MEM、日水製薬) で継代培養し、サブコンフルエント状態の細胞を1mM EDTA含有、0.05%トリプシンでシャーレから剥離した。1,000rpm、5minの遠心、PBS (-)により洗浄した後、 $1 \times 10^5$  cells/mLに調製した。1%FBS MEMを用い種々の濃度に溶解したPVP-TNF- $\alpha$ をあらかじめ96穴プレートに添加し、細胞懸濁液100 $\mu$ Lをさらに播種した。37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下で培養後、メチレンブルー染色法で生細胞数の割合を測定し、国内標準TNF- $\alpha$ をもとに比活性を評価した。バイオコンジュゲーションによる残存活性は、使用したTNF- $\alpha$ の比活性と比較することにより算出した。

### 結果および考察

バイオコンジュゲーションにより、TNF- $\alpha$ の多彩なin vivo作用の中から、目的治療効果 (抗腫瘍作用) と副作用の原因となるその他の作用を分離し、目的とする治療効果のみを効率よく引き出していくためには、前述したようにPEG化TNF- $\alpha$ と比較して、さらなる血中滞留性の向上が必要となる。そこで、これまでの検討により同一分子量のPEGよりも血中滞留性が格段に優れたPVPを修飾高分子としてTNF- $\alpha$ バイオコンジュゲーションに適用した。これまで用いられてきたPEG (methoxy-ssPEG) は、主鎖の片末端をメトキシ化され、もう片末端をアミノ基と反応性の高いサクシニミジルサクシネートで活性化されたものであった。従って、これと同様のバイオコンジュゲート条件にするために、片末端のみにカルボキシル基を導入することで、PEGと同様のアミノ基反応官能基を付与するPVPをラジカル重合により合成した。通常ラジカル重合は、分子量分布が非常に広範囲に渡るため連鎖移動剤を用い、これまでの検討により最もin vivoの抗腫瘍効果が高くなる分子量5,000のPEGに最も近い、分子量6,000のPVPを効率よく合成しうる条件で行った。用いたPVPはこれまでのPEGと同様シャープな分子量分布を持

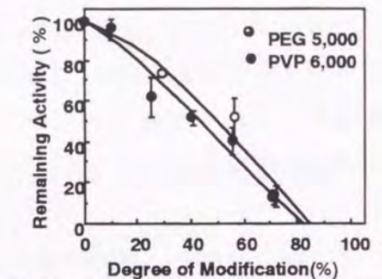
たせるため、さらにゲル濾過により分取・精製した後、実験に供した。TNF- $\alpha$ の高分子バイオコンジュゲーションは、主鎖片末端をNHSおよびDCCで活性化したPVPとTNF- $\alpha$ のリジン- $\epsilon$ -アミノ基間にアミド結合を形成させることによって行った。

PVPバイオコンジュゲートTNF- $\alpha$ は、ゲル濾過HPLCにより種々の分子量に分画し、分子量の大きなものから順にFr.1から5まで分取した (Table 1)。PVP-TNF- $\alpha$ のレセプターに対する残存結合活性は、修飾率の増加に伴って減少し、その活性低下の傾向は、今まで行ってきたPEGによるバイオコンジュゲーションとほぼ同じ傾向にあった (Fig.3)。

**Table 1 Preparation of bioconjugated TNF- $\alpha$  with PVP**

	Number-Average <sup>a)</sup> Molecular Weight	Specific Activity <sup>b)</sup> ( $\times 10^5$ JRU / mgTNF)	Remaining Activity (%)	Yield (%)
PVP-TNF- $\alpha$ Fr.1	134,000	2.40 $\pm$ 0.59	13.5	7.7
PVP-TNF- $\alpha$ Fr.2	117,000	7.35 $\pm$ 1.12	41.3	13.5
PVP-TNF- $\alpha$ Fr.3	101,000	9.35 $\pm$ 0.07	52.5	16.3
PVP-TNF- $\alpha$ Fr.4	84,000	11.1 $\pm$ 0.2	62.5	13.2
PVP-TNF- $\alpha$ Fr.5	74,000	15.3 $\pm$ 0.1	86.2	7.9
Native TNF- $\alpha$	58,000	17.8 $\pm$ 0.5	100.0	41.4
MPEG-TNF- $\alpha$	108,000	11.4 $\pm$ 2.1	52.3	—

a); Determined by GFC (protein standard).  
 b); Assessed by growth inhibition of LM tumor cell assay.



**Fig.3 In vitro relationship between degree of modification and remaining activity compared with PEG and PVP on bioconjugated TNF- $\alpha$ .**

従って、平均分子サイズがほぼ同一であり、非電荷水溶性のPVPがレセプターへの結合に及ぼす効果は、PEGとほぼ同一であると推察される。in vitroにおけるPVP-TNF- $\alpha$ の活性低下の原因としては、修飾高分子による立体障害の形成や、TNF- $\alpha$ の活性発現に重要なリジン残基の修飾、などが考えられる。すなわち、TNF- $\alpha$ の活性発現に重要な部位として、Lys11やLys90が考えられるが<sup>60-63)</sup>、これらのリジン残基にPVPが結合することで、その活性を大幅に失ってしまった可能性がある。また、これまでのPEG化TNF- $\alpha$ の検討から、用いた修飾高分子の分子量の増大に比例して、活性低下の傾向が顕著に現れたことから、活性発現に重要なアミノ基に直接結合することによって活性低下が起こる以外にも、活性発現部位近傍に修飾高分子が結合することで、修飾高分子の立体障害により活性が低下してしまった可能性が考えられる。今後、これらの活性低下の原因に関して、水溶液中での水溶性高分子の立体構造や動的な挙動特性、また修飾高分子とタンパク質との結合部位などを、光散乱法やキャピラリー電気泳動法などの手法を用い、詳細に検討する必要がある。また、同様の活性低下の傾向がIL-6を用いたバイオコンジュゲーションにおいても認められていることから、サイトカインのような活性発現にレセプターとの結合を要する生理活性タンパク質のバイオコンジュゲーションにおいては、用いる修飾高分子の分子量やタンパク質への結合量などを十分に考慮に入れる必要がある。

## 第二節 PVP-TNF- $\alpha$ の静脈内投与による固形腫瘍に対する抗腫瘍効果

前節で作製されたPVP-TNF- $\alpha$ のin vivoにおける抗腫瘍効果を検討するために、種々の分子サイズを有するPVP-TNF- $\alpha$ を担癌マウスに投与することで、どの分子サイズのものが最も抗腫瘍効果が高いのか、スクリーニングを行った。その上で、これまでのPEG化TNF- $\alpha$ の検討から、最も抗腫瘍効果に優れていた、MPEG-TNF- $\alpha$ （修飾高分子：PEG5,000）との比較をMeth-A担癌マウスに対する頻回投与により評価した。

### 実験方法

#### 実験動物および細胞

ddYマウスおよびBALB/cは日本SLC（静岡）より購入した。Meth-A fibrosarcomaはBALB/cマウスの腹腔内で継代維持した。Sarcoma-180 (S-180)はddYマウスの腹腔内で継代維持した。

#### バイオコンジュゲートTNF- $\alpha$ のin vivo抗腫瘍効果の評価

バイオコンジュゲートTNF- $\alpha$ のin vivo抗腫瘍効果はddYマウス、およびBALB/cマウスにそれぞれS-180およびMeth-A fibrosarcomaを移植しその抗腫瘍効果を検討することにより評価した。ddYマウスおよびBALB/cマウスへの皮内固形癌の作製は、以下の通り行った。ddYマウス腹腔で継代維持されていたS-180およびBALB/cマウス腹腔内で継代維持されていたMeth-Aを採取し、遠心後血球細胞を溶解させた後、PBS(-)で洗浄した。トリパンプルー法により生細胞数を計測した後、細胞をPBS(-)で懸濁し $2.5 \times 10^6$  cells/mLに調製した。マウス腹部を除毛した後、先の細胞懸濁液200  $\mu$ L ( $5 \times 10^5$  cells)を腹部皮内に移植した。PVP-TNF- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ を種々の濃度に生理食塩水で希釈し、コントロールとして生理食塩水、10mg/mLのPVP（生理食塩水）を用いた。またこれまでのPEG化TNF- $\alpha$ の中で最も活性の高かったMPEG-TNF- $\alpha$ を1,000JRU投与してPEG化TNF- $\alpha$ とPVP-TNF- $\alpha$ との比較に用いた。PVP-TNF- $\alpha$ の各フラクションを、腫瘍細胞移植7日後、直径約7mmの固形癌に達したS-180担癌マウスに対して単回尾静脈内投与し、投与24時間後の出血壊死係数を測定することで最もin vivo抗腫瘍効果の高いフラクションをスクリーニングした。なお出血壊死作用は以下のようにA.Carswellら<sup>25)</sup>の方法により0から3の4段階で表示した。

- 0：全く腫瘍表面に出血壊死を認めないもの
- 1：わずかに出血壊死を認めるもの
- 2：腫瘍表面積の25から50%に出血壊死を認めるもの
- 3：腫瘍表面積の50%以上に出血壊死を認めるもの

腫瘍増殖の抑制に関する詳細な検討は、Meth-A担癌マウスに移植後7、10、14、17日目

に希釈したサンプルを200  $\mu$ L尾静脈内投与することにより行った。腫瘍体積は以下に示すようにK.Haranakaらの方法により算出した<sup>64)</sup>。

$$(\text{腫瘍体積}) = 1/2 (a \times b^2) - 1/2 (an \times bn^2)$$

a：腫瘍の長径      an：TNF- $\alpha$ の作用による出血壊死部長径

b：腫瘍の短径      bn：TNF- $\alpha$ の作用による出血壊死部短径

加えて体重変化、延命率を計測し、TNF- $\alpha$ およびそのバイオコンジュゲート体投与による副作用の指標とした。また生存日数が150日を越えたものは完全治癒と見なした。相対腫瘍増殖度の算出方法を以下に示す。

(相対腫瘍増殖度)

$$= (\text{腫瘍体積}) / \{ \text{腫瘍移植7日目 (投与開始日) の腫瘍体積} \}$$

延命率は以下の式により求めた。

(延命率)

$$= (\text{投与群の平均生存日数}) / (\text{コントロール群の平均生存日数}) \times 100$$

### 結果および考察

PVP-TNF- $\alpha$ のそれぞれの分子サイズ分画におけるin vivo抗腫瘍効果を、S-180担癌マウスに単回尾静脈内投与することで評価した (Fig.4)。

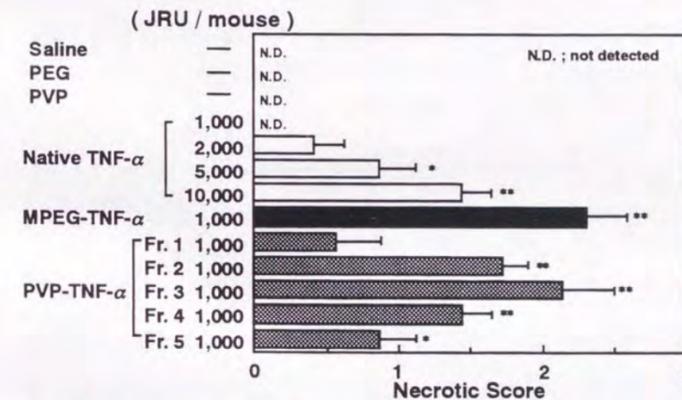


Fig.4 Tumor necrotic effects of native TNF- $\alpha$  or bioconjugated TNF- $\alpha$  on Sarcoma-180 solid tumors. Mice were used in groups of five. Each value is the mean  $\pm$  S.E.M. The maximum response (score 3), the major part of the tumor mass destroyed, indicates that 50% or more of tumor mass is necrotic; the moderate response (score 2), 25-50% necrotic; the minimum response (score 1), less than 25% necrotic; and no response (score 0), no visible necrosis. Statistical significance compared with saline control. \*P<0.01. \*\*P<0.001. N.D.; not detected.

MPEG-TNF- $\alpha$ は、我々がこれまでPEGで行ってきたバイオコンジュゲート体の中で、in vivoでの活性が最も高かったもので、PVP-TNF- $\alpha$ との比較に用いた。native TNF- $\alpha$  10,000単位投与群は、投与後24時間以内に投与したマウスの約半数が死亡することから、native体10,000単位を投与の最大量とし、PVP-TNF- $\alpha$ との活性比較に用いた。in vivoにおける抗腫瘍効果をそれぞれのフラクションと比較検討したところ、PVP-TNF- $\alpha$ の中では平均分子サイズが101,000のFr.3の出血壊死作用が最も大きく、1,000単位の投与において、native体10,000単位の投与を上回る出血壊死が観察され、MPEG-TNF- $\alpha$ とほぼ同程度の作用増強効果を有していた。Fr.3よりも分子サイズが増

大しても、また減小してもin vivoにおける作用が低下したことから、PVP-TNF- $\alpha$ のin vivo作用強度には至適条件が存在することが判明した。その原因として、in vivoにおける抗腫瘍効果は分子サイズおよびin vitroにおける活性の相互的なバランスが重要であることが挙げられる。そこで次に、抗腫瘍効果が最も高かったPVP-TNF- $\alpha$  Fr.3について頻回投与を行うことで、その有用性を評価した。

PVP-TNF- $\alpha$  Fr.3の抗腫瘍効果をより詳細に検討するために、Meth-A担癌マウスを用い、週2回計4回の頻回投与によるin vivo抗腫瘍効果を、その延命効果を指標に検討した (Table 2)。

Table 2 Anti-tumor effect of PVP-TNF- $\alpha$  on survival days after Meth-A tumor inoculation

run	Single i.v. Injection Dose (JRU / mouse)	Survival Time <sup>a)</sup> (Days)	Complete Regression <sup>b)</sup>
Saline	0	31 $\pm$ 1 (27, 28, 29, 29, 31, 32, 33, 33, 37)	0 / 9
PEG	0	31 $\pm$ 1 (28, 28, 28, 32, 33, 34, 35)	0 / 7
PVP	0	32 $\pm$ 1 (28, 29, 29, 31, 31, 31, 32, 35, 36, 38)	0 / 10
Native TNF- $\alpha$	10,000	67 $\pm$ 25 (7, 7, 7, 16, 50, >150, >150, >150)	3 / 8
	5,000	46 $\pm$ 1 (43, 43, 44, 48, 48, 48, 50)	0 / 7
	2,000	43 $\pm$ 1 (40, 40, 42, 43, 43, 44, 48)	0 / 7
MPEG-TNF- $\alpha$	500	>150 * (>150, >150, >150, >150, >150, >150, >150, >150, >150, >150)	10 / 10
	200	>150 * (>150, >150, >150, >150, >150, >150, >150, >150, >150, >150)	10 / 10
	100	94 $\pm$ 20 (46, 48, 52, 59, >150, >150, >150)	3 / 7
PVP-TNF- $\alpha$ Fr.3	500	>150 * (>150, >150, >150, >150, >150, >150, >150, >150, >150, >150)	10 / 10
	200	>150 * (>150, >150, >150, >150, >150, >150, >150, >150, >150, >150)	10 / 10
	100	118 $\pm$ 13 (58, 60, 74, 91, >150, >150, >150, >150, >150, >150)	6 / 10
	50	112 $\pm$ 13 (40, 74, 77, 89, 91, >150, >150, >150, >150, >150)	5 / 10

a) Days after tumor inoculation (Mean  $\pm$  SE).

b) Complete regression was defined when tumor did not regrow for more than 150 days.

Statistical significance compared with native TNF- $\alpha$  10,000 JRU: \*P < 0.01.

4例が副作用のため投与期間中に突然死するnative体10,000単位の投与においても、わずか8例中3例の完全治癒を認めるに過ぎなかった。一方、PVP-TNF- $\alpha$  Fr.3は、わずか200単位の投与で、10例中10例の完全治癒が得られた。さらに、MPEG-TNF- $\alpha$ では100単位の投与で7例中3例の完全治癒しか得られなかったが、PVP-TNF- $\alpha$  Fr.3は50単位の投与によっても10例中5例もが完全治癒しており、native TNF- $\alpha$ と比較しても約200倍もの有効性を示した。

またその副作用に関して、体重減少を指標に評価した。native TNF- $\alpha$ 投与では投与期間中の著しい体重減少が観察され、顕著な副作用が発現した。それと比較して、PVP-TNF- $\alpha$  Fr.3における体重減少などの副作用は全く観察されなかった。以上の結果より、PVP-TNF- $\alpha$  Fr.3はこれまで行われてきたPEGを用いたバイオコンジュゲーションと比較して、約2倍の抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

### 第三節 PVP-TNF- $\alpha$ の抗腫瘍効果メカニズムに関する研究

PVPを用いたバイオコンジュゲートTNF- $\alpha$ の抗腫瘍効果がストラテジー通り、血中滞留性の向上に起因するのかを検討するために、その体内動態を検討した。また、そのメカニズムに関して、腫瘍血管への作用が示唆されたため、in vitroで腫瘍細胞培養上清により腫瘍血管内皮細胞を再構築し、これに対するTNF- $\alpha$ の作用強度を正常血管内皮細胞と比較することで、in vivoでのTNF- $\alpha$ の腫瘍血管に対する感受性の違いに関して検討した。

#### 実験材料と方法

##### 実験材料と器具

PVP-TNF- $\alpha$ の<sup>125</sup>Iラベル化に用いた、Na<sup>125</sup>IはNEN Life Science Product Inc. より購入した。また、ラベル化に必要な試薬であるエンザイモビーズ (Enzymobead) はBioRad Laboratoriesより購入した。放射活性の測定は、自動ガンマカウンター (COBRAII, Packard Instrument Company) により測定した。ラベル化TNF- $\alpha$ の吸着を防止する目的で、ポリビニルアルコール (polyvinyl alcohol; PVA, 和光純薬工業) および牛血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA, Armour Pharmaceutical Company) を用いた。細胞傷害性の評価を行うにあたり、(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT; 同人化学工業) を5mg/mLの濃度でPBSに溶解させたものMTT溶液として使用した。

##### 動物

動態実験に際し、5週齢、雌性BALB/c (日本SLC) を使用し、Meth-A担癌マウスを作製した。作製法については前節に準じて行った。

##### 細胞および培養液

牛大静脈血管内皮細胞 (BVEC, 当講座・宇都口らが単離)、牛血管平滑筋細胞 (SMC, 当講座・角田らが単離)、Meth-A細胞、Colon26細胞は、10%FBS含有ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, 日水製薬) により継代培養した。またBVECの継代数は12~15継代のものを使用した。

##### バイオコンジュゲートTNF- $\alpha$ の生体内挙動の検討

バイオコンジュゲートTNF- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ の<sup>125</sup>Iラベル化はラクトパーオキシダーゼ法を用いた。タンパク量17.1 $\mu$ g/mLになるようにTNF- $\alpha$ 、バイオコンジュゲートTNF- $\alpha$ を生理食塩水で希釈した後、この溶液25 $\mu$ L (TNF- $\alpha$ タンパク量427.5ng) 中に

pH7.2の0.1Mリン酸緩衝液50 $\mu$ Lと1 mCiのNa<sup>125</sup>I、エンザイモビーズ50 $\mu$ Lを混合した。ラベル化は、2%グルコース水溶液を添加することにより開始させ、室温で30分間反応させた。100 $\times$ g、10分の遠心操作を行いエンザイモビーズのみを沈殿させ、上澄みの反応溶液150 $\mu$ Lを回収した。回収溶液は直ちに2%PVA含有生理食塩水50 $\mu$ L中に入れ、チューブへの吸着を防いだ。溶出液を0.5%PVA生理食塩水としてあらかじめ1%BSA生理食塩水でブロッキングされた脱塩カラムにより未反応の<sup>125</sup>Iを除去した。なおこのラベル化により、TNF- $\alpha$ の活性は前述のLM細胞増殖阻害実験の検討からはほぼ100%残存していることを確認している。こうして得られた<sup>125</sup>Iラベル化PVP-TNF- $\alpha$ を用い、体内動態をMeth-A担癌マウスによって検討した。サンプルを6 $\times$ 10<sup>6</sup>cpm/mLの濃度に生理食塩水で調製し、200 $\mu$ L (1.20 $\times$ 10<sup>6</sup>cpm) のラベル化体を尾静脈内投与し、以後経時的に所定の時間で尾部から採血した。PVP-TNF- $\alpha$ の臓器分布の評価は、3時間後マウスを麻酔下脱血死させ、種々の組織を摘出することで行った。血液中、組織中のラベル化体の存在量は、 $\gamma$ -カウンターにより計測した。なお一群あたり4匹のマウスを用い、PVP-TNF- $\alpha$ の尾静脈単回投与後の生体内動態を定量的に評価するため、生理学的薬物速度論に基づいたモデルを用いて、非線形最小二乗プログラムMULTIにより解析を行った。

#### 培養上清 (Conditioned Medium ; CM) の調整

150mmシャーレ (Nunc) にSMC、Colon26を1.35 $\times$ 10<sup>6</sup>cells播種し、翌日ASF培地 (味の素) を27mL加え培地交換を行った。48時間後に培養上清を回収して0.2 $\mu$ mのフィルターを通したものを腫瘍細胞由来CMとした。Meth-A細胞は浮遊培養であるため、同量の細胞数をASF培地中に播種した後、48時間後に培養上清を回収し同様に調整した。回収したCMは、1.5mLEッペンチューブ中に分注し、-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

#### 腫瘍血管内皮細胞の再構築およびTNF- $\alpha$ 感受性の測定

腫瘍血管内皮細胞 (腫瘍EC) の再構築は、BVECに各種CMを作用させることにより行った。96穴マルチプレート (Nunc) にBVECが10,000~156cells/wellとなるように1/2倍ずつ段階希釈を行い細胞を播種した。翌日、BVECが接着したことを確認後、1/2希釈した培養液で血清濃度がfinal 10%になるようにCMと培地交換し (Day1)、3日目に同様の培地交換を行い、5日目まで培養した。こうして4日間CMを作用させたBVECをin vitroで再構築した腫瘍ECとした。その後、それぞれ20%FBSで段階希釈済みのTNF- $\alpha$ 溶液を50 $\mu$ L添加し、ここにCMを同量添加し、48時間培養した。培養後、生細胞数を以下の方法にて測定した。5mg/mLの濃度でPBS(-)中に溶解したMTT溶液を96穴プレート中に10 $\mu$ L/well添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下で4時間培養した。培養後20%SDS/0.04N HClを100 $\mu$ L/well加え、暗所でover night放置した。溶出してきたMTTホルマザン

をマイクロプレートリーダーを用いてOD595/656nmにおける吸収を測定した。

#### 実験結果および考察

TNF- $\alpha$ の作用機序としては、大きく3つの効果が考えられる。一つには、腫瘍細胞自身に対する壊死作用、一つには腫瘍血管内皮細胞に対する細胞傷害性、そしてもう一つは免疫細胞の賦活化である。TNF- $\alpha$ はin vivoでこれら3つの作用が協奏する形で作用していると考えられるため、これらすべての抗腫瘍効果に関与する要因をより強調した形でTNF- $\alpha$ をバイオコンジュゲートすることで、より高い抗腫瘍効果が得られるものと考えられる。そこでPVP-TNF- $\alpha$ のin vivoにおける抗腫瘍効果の向上メカニズムを検討するために、<sup>125</sup>Iでラベル化したPVP-TNF- $\alpha$ を静脈内投与し、その血中動態を比較検討した (Fig.5)。

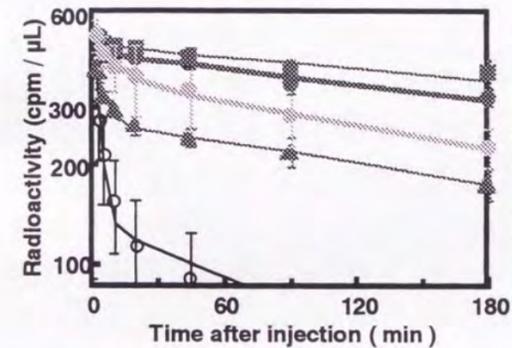


Fig.5 Plasma clearance of bioconjugated TNF- $\alpha$  after i.v. injection in BALB/c mice. Mice were intravenously injected with <sup>125</sup>I-labeled polymers. After administration, blood was collected from tail vein at indicated times and radioactivities were measured by a  $\gamma$ -counter. Mice were used in groups of four. Each value is the mean  $\pm$  S.D. Native TNF- $\alpha$ ; O, PVP-TNF- $\alpha$  Fr.2;  $\blacksquare$ , Fr.3;  $\bullet$ , Fr.4;  $\blacktriangle$  MPEG-TNF- $\alpha$ ;

native TNF- $\alpha$ は、他の研究者らの報告とほぼ一致し、静脈内投与後速やかに血中から消失した (投与半減期4.6分)。一方、PVP-TNF- $\alpha$ はその分子サイズの増大に伴い、血中滞留性が向上し (投与半減期46.9~604.2分)、in vivoでの活性が最も高かったPVP-TNF- $\alpha$  Fr.3では、nativeと比較して投与半減期が約80倍に、分子量がほぼ同じ10万であるMPEG-TNF- $\alpha$ と比べても、投与半減期は約3倍に増大した (Table 3)。

Table 3 Pharmacokinetic parameters of bioconjugated TNF- $\alpha$

	t1/2 (min)	AUC (0-3hr) (cpm·hr/ $\mu$ L)	CLtotal ( $\mu$ L/min)	ke ( $\times 10^{-3}$ /min)
Native TNF- $\alpha$	4.6 $\pm$ 2.2	224 $\pm$ 44	47.2 $\pm$ 9.6	24.1 $\pm$ 8.8
PVP-TNF- $\alpha$ Fr.2	604.2 $\pm$ 364.4	1264 $\pm$ 77	3.0 $\pm$ 1.6	1.5 $\pm$ 0.8
PVP-TNF- $\alpha$ Fr.3	360.1 $\pm$ 45.7	1149 $\pm$ 54	4.3 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.2
PVP-TNF- $\alpha$ Fr.4	46.9 $\pm$ 41.9	679 $\pm$ 44	8.9 $\pm$ 2.2	4.3 $\pm$ 0.6
MPEG-TNF- $\alpha$	122.6 $\pm$ 85.0	1080 $\pm$ 85	3.9 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.2

The pharmacokinetic parameters of native and each bioconjugated TNF- $\alpha$  were evaluated by curve fitting by means of non-linear least squares program (MULTI). Each value is the mean  $\pm$  S.D.

native TNF- $\alpha$ は2相性の消失パターンを示したが、PVP-TNF- $\alpha$ では一相性の消失パターンを示したことから、PVP-TNF- $\alpha$ では血管から組織への移行が抑制されているものと解析された。また、今回データには示していないが、投与3時間後の各組織

への移行性を評価した結果、肝臓・脾臓をはじめとする各組織への移行性がPVP化によって抑制されていることが明らかとなった。この血中滞留性の向上は、修飾高分子として用いたPVPがPEGよりも高い血中滞留性を示すことから、用いた修飾高分子の体内挙動に依存しており、バイオコンジュゲート体の体内挙動が用いた修飾高分子の特性に起因することが判明した。一般に高分子物質は、腫瘍部位へ選択的に捕捉され、長期間にわたりその局所にとどまることが知られている。このことは癌組織のEPR効果として知られており、固形腫瘍の治療に有用であると考えられる。EPR効果の原因として、1) 多くの固形腫瘍血管は、構造上の欠陥があり、血管透過性が亢進しているため、高分子物質でさえも腫瘍組織内へ漏出しやすいこと<sup>65-67)</sup>、2) さらに、腫瘍局所では、ブラジキニン、一酸化窒素など血管透過性亢進因子が多量に産生されていること、3) 腫瘍部位での血管密度が正常組織よりも高いことから血管から腫瘍組織への薬物漏出亢進に寄与していること、4) さらに固形腫瘍組織では高分子物質などの回収路であるリンパ系からの回収が正常組織のように進行しないことなどの理由が考えられており、長時間これら高分子物質が腫瘍部位に滞留すると考えられている。今回作製したPVP-TNF- $\alpha$ は、バイオコンジュゲート効果によりnative体と比較して分子サイズが増大し、かつ血中滞留性が向上したことから、腫瘍組織中に長期に渡って滞留し、作用し続けた可能性が考えられた。

さて、以上のように、EPR効果とPVP-TNF- $\alpha$ の高い血中滞留性がTNF- $\alpha$ の抗腫瘍効果を効率的に引き出したものと考えられた。そこで次に、抗腫瘍効果増大の要因として考えられた、血中滞留性の向上に伴うPVP-TNF- $\alpha$ の腫瘍血管に対する作用の増強が示唆されたことから、TNF- $\alpha$ の腫瘍血管に対する感受性に関して基礎的知見の集積を図った。これまでmandaraの報告<sup>68)</sup>により、血管に対するTNF- $\alpha$ の感受性は、腫瘍血管において向上していることがin vivo実験から示唆されている。また血管内皮細胞 (endothelial cell; EC) に各組織細胞や腫瘍細胞の培養上清 (CM)、細胞外マトリックス (extracellular matrices; ECM) を作用させることで、ECが各組織特有の諸性質を示すようになることを見出している<sup>69)</sup>。また、ECに腫瘍細胞CMを作用させることで、コンフルエント時の細胞形態に変化が認められ、また血管内皮細胞層の物質透過性も腫瘍細胞の液性因子の影響を受けたEC層の透過性が有為に亢進していたことも見出している<sup>70)</sup>。従って、TNF- $\alpha$ のin vivo抗腫瘍効果の違いが、in vivoにおけるTNF- $\alpha$ のEC感受性の違いに起因している可能性が示唆されたことから、腫瘍細胞由来の液性因子がECに作用し、TNF- $\alpha$ 感受性を制御しているのではないかと考え、以下腫瘍細胞CMを用いECをin vitroで培養することで、TNF- $\alpha$ に対するEC感受性がどのように変化するかを検討した。

in vivoにおけるTNF- $\alpha$ に対する高感受性モデル腫瘍としてMeth-A fibrosarcomaを、また低感受性モデル腫瘍としてColon26 adenocarcinomaを選択した。まずCMで培養することによる細胞傷害性および細胞増殖活性を評価したところ、腫

瘍細胞のCMを作用させることによる、細胞傷害ならびに細胞増殖への影響は確認されなかった。そこで次に、各腫瘍培養上清を用い培養したECのTNF- $\alpha$ 感受性を評価したところ、顕微鏡観察下では細胞死が観察され (Fig.6) ; またMTT法による細胞傷害性の検討においても、細胞数の減少が確認された (Fig.7) 。コントロール培地で培養を行った群や正常細胞の平滑筋細胞 (SMC) のCMを作用させた群では、高濃度のTNF- $\alpha$ を作用させることで、若干の細胞数の減少がみられるものの、Meth-A細胞のCMを作用させた群と比較して、TNF- $\alpha$ による細胞死は顕著ではなかった。また、in vivoにおいてTNF- $\alpha$ に低感受性であるとされる、Colon26細胞のCMで培養を行った群は、低濃度のTNF- $\alpha$ を作用させた時にはコントロール群と大差はなかったが、高濃度のTNF- $\alpha$ ではコントロールと比較して顕著な細胞死が確認された。また、データには示さないが今回使用した腫瘍細胞は、in vitroではTNF- $\alpha$ に感受性を示さないことから、in vivoにおけるTNF- $\alpha$ 感受性が腫瘍ECに支配されていることが強く示唆された。

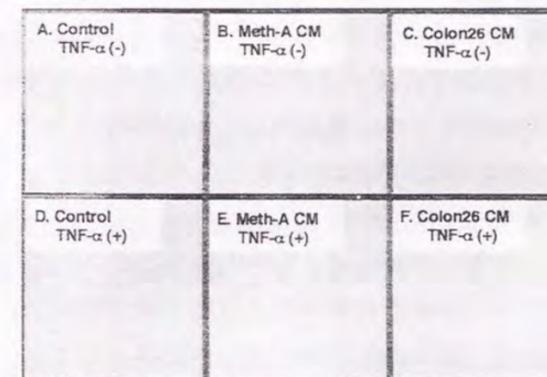


Fig.6 Induction of apoptosis in endothelial cells by TNF- $\alpha$ . Cells were cultured with TNF- $\alpha$  for 48 hr and the morphology of cells was observed by phase-contrast microscopy. Characteristic morphological features of apoptosis were observed in TNF- $\alpha$  treated-EC cultured with Meth-A CM (E) and Colon26 CM (F). No morphological changes were observed in non-treated-EC cultured with control medium (A), Meth-A CM (B), Colon26 CM (C) and TNF- $\alpha$  treated EC cultured with Control medium (D).

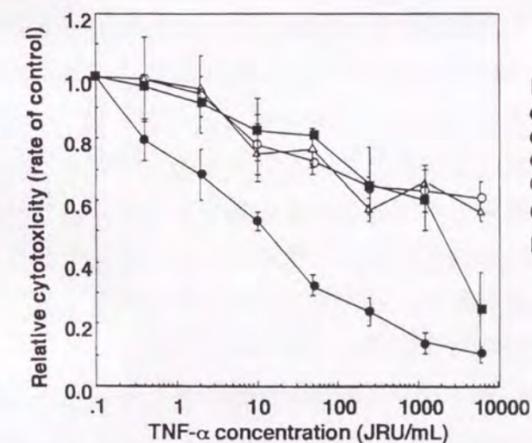


Fig.7 Growth inhibitory effects of TNF- $\alpha$  to endothelial cells treated with various conditioned medium (CM). Bovine vein endothelial cells were exposed to decreasing concentrations of TNF- $\alpha$ . Control; (○), Smooth muscle cell CM (Δ), Meth-A CM; (●), Colon26 CM; (■).

これまで、TNF- $\alpha$ が腫瘍血管のみを特異的に崩壊させる作用は知られていたものの、その機構については未だ明確にされておらず、TNF- $\alpha$ が腫瘍細胞に作用して毒性物質を介して血管を傷害するとの説がある一方、TNF- $\alpha$ が腫瘍組織ECを直接傷害すると

いう説もある。これに関して、本研究は後者が有力な説であるという可能性を強く示唆するものである。

#### 第四節 小括

生体内安定性の改善および副作用の軽減は、これまで切れ味鋭い生理作用を有しながらもその副作用のために臨床応用を断念せざるを得なかった多くの生理活性物質や癌化学療法に用いられている抗癌抗生物質など低分子薬物の臨床的な有用性を向上するために必須の課題である。従って生体内安定性の向上や作用の選択性付与を目指すDDSの開発は、これまで臨床応用を断念せざるを得なかった多くの薬物を、再び利用可能とし得ることからも、次世代の医薬品候補を生み出す創薬技術として注目を集めている。

我々は新規創薬技術として、バイオコンジュゲーションに着目し、種々サイトカインをモデル薬物として用いた一連の研究の中で、活性発現のために複雑な立体構造を有するレセプターとの結合を要するサイトカインのバイオコンジュゲーションにおいても、分子サイズ-in vitroにおける比活性の相関を考慮し、さらに血中滞留性-標的組織移行性など薬物の体内動態を緻密に制御することで、最適なバイオコンジュゲート条件を見出した。その結果、体内安定性を飛躍的に増大させ、かつ治療作用と副作用の選択分離を実現することで、バイオコンジュゲーションによるサイトカイン療法の有用性を示してきた。しかしながら今後、従来までのバイオコンジュゲート薬物の有用性を更に向上させるためには、薬物の特性やバイオコンジュゲーションの目的に応じた修飾高分子を開発していく必要がある。

そこで本章では、TNF- $\alpha$ をモデル薬物として用い、PVPのバイオコンジュゲート化DDSへの応用に向けた有用性を評価した。現在、副作用の軽減を目的として、TNF- $\alpha$ の単独投与以外にも、他のサイトカインや薬物との相乗効果を期待した併用療法や多剤併用療法が行われているが、目覚ましい治療効果が得られた例は殆どないのが現状であり、サイトカインの臨床応用は殆ど進展していない。これは先述したように、TNF- $\alpha$ の生体内不安定性や、in vivo作用の多様性により、重篤な副作用を招いてしまったことが原因と考えられる。そのため現在TNF- $\alpha$ の主作用と副作用の選択分離を目的に、遺伝子工学的手法を用いてTNF- $\alpha$ 変異体の作成が試みられているが<sup>71)</sup>、結局のところこれらのアプローチは全て体内安定性の改善には着目していないため、これまでのところ期待通りの結果は得られていないのが現状である。

正常組織への分布や目的としない細胞に対する作用が原因となって発現する副作用を回避することを目的に、標的組織や細胞へのターゲティングが考案されている。例えば、腫瘍細胞に発現している抗原を標的とした、抗原抗体反応<sup>72-74)</sup>やin vivo peptide libraryを利用したターゲティング療法<sup>75-77)</sup>が、数多く報告されてきている<sup>78-81)</sup>。しかしながら、腫瘍細胞特異的に発現している抗原は、今のところ存在せず、また腫瘍組織への抗

体の集積性は、肝臓や脾臓の細網内皮系 (reticuloendothelial system ; RES) への取り込みと比較して、非常に微々たるものであることから<sup>82)</sup>、その治療への応用は制限されているのが現状である。しかしながら、native薬物と比較した場合、その集積性が上昇している報告もなされており、抗原抗体反応を用いた治療法が全く意味のないものではない。すなわち、RESへの取り込みを回避しつつ腫瘍への集積性を上昇させることが出来れば、その有用性は計り知れないものになる。

一方で腫瘍組織は血管透過性が高く、さらに高分子の排泄機構であるリンパ系が発達していないことから、高分子物質は腫瘍の血管壁を通過しやすく、さらに透過した後、腫瘍組織に滞留しやすいという性質を持つ。このEPR効果として知られる腫瘍の物理化学的性質を示す重要な知見をもとに、数多くの高分子化抗癌薬物が開発されている。バイオコンジュゲーションにより分子量を増大させたTNF- $\alpha$ は、非常に高い抗腫瘍効果を示した。これは、以上のEPR効果を利用した結果と考察されるが、これとてまだ十分なものとは言えない。これまでにPEGなどの水溶性高分子を用いたバイオコンジュゲーションにより、RESへの取り込みを回避させ、体内安定性を高めることで、このEPR効果をより強めた高分子化薬物が開発されてきた。我々が見出したPVPは、PEG以上にRESへの取り込みや組織への分布が抑制されるため、抗腫瘍効果が増大したものと考えられる。さらに、PVPはさらなる機能を導入できることから、上述した特異的認識機構を、修飾高分子自身に導入し、さらなるターゲティング能を付与することも可能であると考えられる。今後、このようなインテリジェントな機能を有した高分子を開発していくことで、さらなる新規抗腫瘍薬物の開発が期待される。

またこのTNF- $\alpha$ の抗腫瘍効果は直接的な腫瘍細胞傷害のみならず、腫瘍血管の特異的崩壊や、免疫系の活性化などにより発揮されることが知られている。また、TNF- $\alpha$ は腫瘍血管壊死作用のプロセスのなかで腫瘍血管の物質透過性を選択的に向上させることも我々は見出している。一方で肝臓などの正常組織へ移行してしまったTNF- $\alpha$ が副作用の主因となることから、TNF- $\alpha$ の血中滞留性を向上させ、正常組織への移行性を低下させることで、効率よく治療効果のみを増大できるものと考えられた。抗腫瘍効果のメカニズムとして、本章の結果により、腫瘍組織を直接ターゲットとしたもの以外にも、腫瘍血管を傷害することにより抗腫瘍効果が増強されている可能性が示唆される。近年、腫瘍血管を標的とした癌治療に注目が集まっている<sup>83-86)</sup>。腫瘍が増殖する際には、血管新生が必須であるため、血管新生を伴わない腫瘍の増殖はあり得ない。従って、血管新生を抑えられれば、それだけで腫瘍の増殖は抑制され、いわゆるdormantとよばれる状態で、存在することになる。また、血管新生を阻害するだけで、腫瘍の退縮が認められた例もあり<sup>87)</sup>、腫瘍増殖抑制を目的とした、血管新生阻害薬の開発は、非常に注目を集めている。今回作製したPVP-TNF- $\alpha$ は血中滞留性が高まり、その結果、腫瘍血管に長期に渡り作用し続けたことが原因となって、抗腫瘍効果が増強されたとも考えられることから、TNF-

$\alpha$ を腫瘍血管を標的とした抗腫瘍血管薬物としての応用も期待される。

さて一般に作用機構の異なる抗癌剤の組み合わせは、相乗効果を期待できることが知られている。例えば、TNF- $\alpha$ の場合、1979年Ostroveらにより、アクチノマイシンDを併用するとTNF- $\alpha$ の細胞傷害活性が10倍から数100倍まで著しく上昇することが見出されている<sup>88,103</sup>。その後の検討により、ほとんどすべての抗癌抗生物質がTNF- $\alpha$ の抗腫瘍効果を高めることが明らかにされている<sup>89-92</sup>。本章では、抗癌抗生物質のバイオコンジュゲーションとサイトカインなどの生理活性タンパク質のバイオコンジュゲーションを別々に論じてきたが、動態制御しうる修飾高分子さえ設計できれば、例えばこれまでに述べたTNF- $\alpha$ といったサイトカインと、これらの相乗効果を期待できる抗癌抗生物質を同一分子内に内包する高分子バイオコンジュゲート医薬品の開発もまた可能になってくものと考えられる。すなわち以上のようなアプローチを試みるためにも、バイオコンジュゲーションに用いる修飾高分子に様々な機能を導入していくことが必要となるのである。また、ジビニルエーテルと無水マレイン酸の共重合体である、DIVEMAはそれ自体に抗癌活性を持つというユニークな性質を持った高分子で<sup>93-96</sup>、高分子バイオコンジュゲーションの修飾高分子として大いに期待されている<sup>97-100</sup>。このような修飾高分子自体が薬理活性を併せ持つような修飾高分子の開発も、癌治療を念頭に置いた高分子バイオコンジュゲーションにおいては有用な手段であると考えられる<sup>101,102</sup>。

PVPが、PEG以上に血中滞留性の向上を目的としたバイオコンジュゲーションに適していることをTNF- $\alpha$ を一例として示してきたが、PVPはラジカル共重合により種々の機能を導入できることから、PEGよりもはるかに優れた修飾高分子になりうると期待できる。今後、薬物自身の生体内挙動をより緻密に制御しうる修飾高分子を開発し、最適なバイオコンジュゲート化DDSを確立していくことを目的に、PVPに機能導入を行っていく必要がある。次章では、このPVPに薬物をnativeな形で放出制御させる機能を導入し、その薬物放出特性に関する検討を行った。

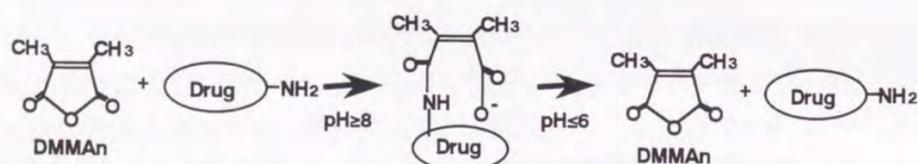
## 第二章 徐放性を有する修飾高分子の開発

薬物を標的部位に適切な濃度-時間パターンで作用させることで薬物治療の最適化を図ろうとする観点から、放出制御膜や高分子マトリックスを利用したコントロールドリリース型DDS製剤（徐放製剤）が開発され、臨床的に応用されてきている<sup>104-110</sup>。しかしながら、サイトカインなどの生理活性タンパク質や多くの抗癌抗生物質への適用においては、未だ十分な臨床成果が得られていないのが現状である<sup>111</sup>。これは、以上のアプローチの多くが体内不安定かつ多様なin vivo生理作用を有するnativeな生理活性物質を、何ら工夫を施すことなく、そのまま単に大量徐放しようとしたものに過ぎなかったことに起因する。すなわち、有効な薬物治療を行うためには、薬物を標的組織中で有効濃度範囲に制御しつつ、徐放することが必要不可欠であると考えられる。また、疾病組織へ選択的に薬物を送達するための標的指向性（ターゲティング）のみを単純に付与しようとするアプローチに関しても、その集積性や作用メカニズムの観点から、十分な効果を発揮し得ていないのが現状である<sup>112</sup>。すなわち、これら生理活性物質に単なる徐放性や標的指向性のみを別々に付与しただけでは、標的組織局所で理想的な時間-濃度パターンで作用することが出来ず、多くの副作用を引き起こしてしまうことになる。本来、サイトカインなどの生理活性タンパク質は、糖鎖修飾により然るべき生体内安定性と生体内挙動特性を付与されうえて、作用局所において最適な濃度-時間パターン（徐放化）に維持されており、高度に制御された有機的連関のもと、ホメオスタシスを維持・形成しつつ生理作用を発現している。言うなれば、生体内で産生される生理活性物質は、それを人為的に投与した「薬物分子」と見立てた場合、薬物治療の最適化を目指したDDSを具現しているといえる。

前章において、薬物をバイオコンジュゲーションすることで、体内安定性が飛躍的に向上することを示してきた。しかしながら同時に、バイオコンジュゲーションによりその修飾高分子の形成する立体障害のために、サイトカインの比活性が大幅に低下してしまうため、潜在的に有する薬物の有用性を十分に活用し得ていないのもまた事実である。バイオコンジュゲート薬物は、イムノコンジュゲートのS-S結合などの例外を除き、多くの場合、比較的安定な共有結合を介して構築されている。そのため、薬物に結合した修飾高分子が立体配位的に標的細胞との結合性を低下させてしまったり、活性発現に重要な官能基の修飾などにより、薬物の持つ比活性を低下させてしまっていることが往々にして観察される<sup>113</sup>。従ってバイオコンジュゲート薬物は、殆どの場合、修飾高分子が結合したまま、標的細胞に効率的に作用しなければならないという、使命を背負っている。また、修飾高分子と薬物間の結合にリンカーを介した場合、遊離した薬物がnative薬物としての形を有していないことが殆どであり、結局活性を低下させてしまう原因となっている。従って、バイオコンジュゲーションのさらなる有用性を引き出すためには、薬物の生体内安定性と作用の選択性を保持しつつ、標的組織中に効率よく送達し、100%の活性を有し

たnativeな薬物を徐放し得る修飾高分子の開発が必須となってくる。

1967年Butlerらは、環無水物であるジメチル無水マレイン酸 (dimethylmaleic anhydride; DMMAAn)、シトラコン酸無水物 (citraconic anhydride; CAn)、無水マレイン酸 (maleic anhydride; MAn) がアミノ基の可逆的な保護試薬になりうることを提示している<sup>114,115)</sup>。これらの環無水物は塩基性側でアミノ基と結合し、酸性側でアミノ基を解離するというpH応答性を有している (Scheme 2)。一方で、上記の化合物はいずれも、その構造中に二重結合を有していることから、ラジカル共重合法により容易に修飾高分子へ導入できる。従って、環無水物を導入したPVP誘導体を作製できれば、アミノ基を有する薬物を結合させ、その後薬物をそのpHによって薬物放出を制御し得る修飾高分子を作製し得るものと考えられる。



Scheme 2 Characteristics of 2,3-Dimethylmaleic Anhydride (DMMAAn). 2,3-dimethylmaleylamino bond was shown to be formed at more than pH8 and cleaved at lower than pH6.

以上の観点から、バイオコンジュゲーションに用いる修飾高分子には、体内安定性を十分に保ちつつ、標的指向性・徐放性などの機能を導入していく必要がある。これまで検討してきたPVPは、ラジカル共重合法により機能導入に不可欠な種々官能基を導入することが可能であることから、薬物のバイオコンジュゲーションの最適化をめざす上で、非常に有用であると考えられる。そこで、生体内安定性を付与されたバイオコンジュゲート薬物のさらなる有用性確保のため、ターゲティング能と徐放化能を修飾高分子に導入し、バイオコンジュゲート薬物にこれら高次機能を付与しようと考えた。本章においてはPVPを幹修飾高分子として適用し、修飾高分子への徐放化能の導入、次章では徐放化能を有する修飾高分子へのターゲティング能の導入を試み、その有用性を評価した。

#### 第一節 徐放性を有する修飾高分子のin vitroにおける性質とその機能評価

アミノ基保護試薬として、タンパク質修飾に用いられるMAnやCAn、DMMAAnなどの環無水物は、その構造から見て分かるとおり、二重結合を分子内に内包している。また、これらの環無水物は、アミノ基を介して結合し、pHの変化によってアミノ基を可逆的に遊離するという性質を有している。従って、これら環無水物を導入したラジカル共重合体を作製できれば、可逆的にアミノ基を結合・遊離するインテリジェントな修飾高分子が作製可能であると考えられるが、環無水物導入PVPを用いた薬物治療を考える際に、

その基本的性質を検討しておく必要がある。上記の観点から、本節ではまず環無水物の各pHにおけるアミノ基放出性を評価した。さらにこれら環無水物をモノマーとして用い、pHに依存して可逆的に薬物の放出が期待できる環無水物導入PVPを作成し、その基本的特性を評価した。

#### 実験材料および方法

##### 試薬

環無水物のアミノ基放出性の検討には、ジメチル無水マレイン酸 (2,3-dimethylmaleic anhydride; DMMAAn, Acros)、シトラコン酸無水物 (citraconic anhydride; CAn, 和光純薬工業)、無水マレイン酸 (maleic anhydride; MAn, 和光純薬工業) を用い、ジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide; DMSO infinity pure, 和光純薬工業) に溶解させることで行った。またアミノ基を有するモデル試薬としてε-アミノカブロン酸 (ε-amino-n-caproic acid, SIGMA) を用いた。遊離アミノ基の定量には試薬にフルオレスカミン (Fluram®, Fluka) を用い、フルオレスカミン法にて評価した。ラジカル共重合試薬は第一章、第一節に示したものを使用した。水溶性の蛍光試薬である、N-(5-aminopentyl)-4-amino-3,6-disulfo-1,8-naphthalimide, dipotassium salt (Lucifer Yellow Cadaverine; LYC, フナコシ) を薬物放出の指標として検討した。遊離のLYC除去には脱塩カラムの10-PG (BioRad) を使用した。また、血清中での薬物放出の評価には、C3Hマウス (日本SLC) より回収し凍結保存した血清を用いた。

##### 環無水物のアミノ基放出性の検討

ε-アミノカブロン酸を0.1mg/mLの濃度となるようにホウ酸緩衝水溶液 (borate buffer, pH8.5) に溶解させ、ε-アミノカブロン酸のモル量に対し3倍量の環無水物を $1.83 \times 10^{-3}$ mmol/10μLの濃度でDMSOに溶解した。DMSO溶液をホウ酸緩衝水溶液中に滴下し、ε-アミノカブロン酸と環無水物を反応させた後、環無水物がアミノ基と離れないことを以下のフルオレスカミン法により確認した。反応液10μLをpH8.5のホウ酸緩衝液490μLと混合した後、フルオレスカミンを1, 4-ジオキササンに溶解した溶液を500μL添加した。激しく攪拌した後、蛍光強度 (励起波長Ex; 390nm、蛍光波長Em; 475nm) を測定した。このε-アミノカブロン酸-環無水物反応溶液を所定のpHに調製した後、経時的にサンプリングを行い、それぞれのサンプルの遊離アミノ基量を、同様にフルオレスカミン法を用いて測定し、遊離薬物の指標として評価した。

##### 環無水物導入PVPの作製

モノマーとしてビニルピロリドン13.0g (117mmol) とモル比にして5%の環無水物を混

合し、27mLのDMF中に溶解させた。ラジカル重合の開始剤として、ACVA224mg (0.8mmol) を使用し、DMF溶液中に溶解させた。同様に溶液を3本の重合管中に分注し、凍結融解による脱気を行った後、減圧下で封管した。その後、60°C恒温槽中で6時間加温し、ラジカル反応を起こさせた。大過剰量のジエチルエーテル中に反応溶液を注ぎ込み、精製した環無水物導入PVPを析出させ、ガラスフィルターを用いて吸引濾過抽出した。その後ポリマーを再びDMF中に溶解し、同様の抽出操作を二回繰り返して、未反応のモノマーおよび開始剤などを完全に除去した。

#### 環無水物導入PVPとLYCとの結合

水溶性の蛍光試薬である、LYC (1.27mg/300 $\mu$ L in pH8.5ホウ酸緩衝水溶液) を6mgの環無水物PVPに直接注ぎ込み、溶解後室温で30分間反応させた。LYC添加量の設定は、環無水物の導入率が5%であると仮定したとき、DMMAAnが試薬とが1:1で反応するものとして算出した。反応後、あらかじめpH8.5のホウ酸緩衝水溶液で置換しておいた脱塩カラムを用いて未反応のLYCを除去した。さらにこの環無水物導入PVP-LYC結合体の含まれるフラクションを同様の方法でリクロマトし、サンプルとして用いた。

#### 環無水物導入PVPの薬物放出性の確認

作製した環無水物導入PVP-LYC結合体溶液を所定のpHに調製した後、37°Cの恒温槽中でincubateし、経時的にサンプリングした。結合LYCと遊離LYCを10-PGにより分離し、励起波長424nm、蛍光波長530nmで蛍光強度を測定することで、結合体と遊離LYCの割合を算出した。血清中での薬物放出性の評価は、マウス血清を1:1で混合させたものを用い、同様の方法で測定した。3時間後のサンプルを測定した後、NaN<sub>3</sub>を添加して血清添加群の腐敗を防いだ。

#### 実験結果および考察

1967年Butlerらは、環無水物であるDMMAAn、CAn、MAAnがアミノ基の可逆的な保護試薬になりうることを提示している<sup>114,115)</sup>。そこで、上記の3種類の環無水物のpH応答性を検討するために、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸をモデル薬物として環無水物と結合させ、可逆的な薬物の結合・遊離をフルオレスカミン法により評価した (Fig.8)。他の環無水物化合物であるCAn、MAAnの薬物放出性は、メチル基の数が減少するに従い徐々に低下した。特にMAAnではpH5.0条件でほとんど放出されないことが観察された。Butlerらの報告においても、中性pH領域でのアミノ基の遊離はほとんど起こらないことが示されており、その結果を支持するものであった。また中性pH領域でDMMAAnは結合した $\epsilon$ -アミノカプロン酸の約半数を2時間で放出し、結合したアミノ基を可逆的に徐放することが明らかとなった。通常、生理活性タンパク質はpHによってその構造が不可逆的に変化し、

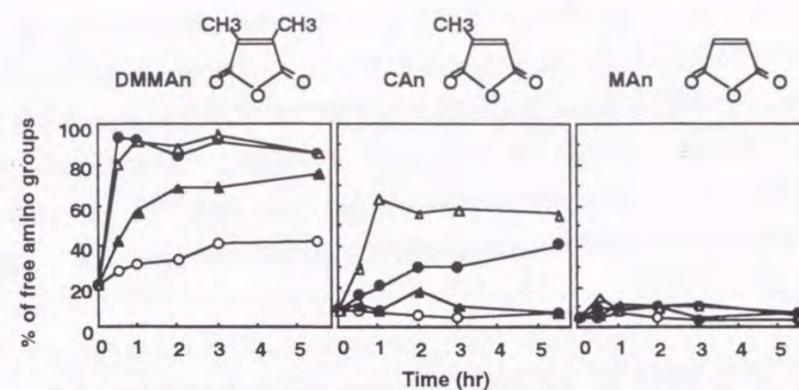


Fig.8 Effect of pH conditions on the release of  $\epsilon$ -aminocaproic acid from 2,3-dimethylmaleic anhydride (DMMAAn), citraconic anhydride (CAn) and maleic anhydride (MAAn). DMMAAn, CAn and MAAn were reacted with  $\epsilon$ -amino-n-caproic acid. Remaining free amino groups of  $\epsilon$ -amino-n-caproic acid at indicated time were quantified by Fluorescamine-method. ( $\Delta$ ): pH5.0 solution, ( $\bullet$ ): pH6.0 solution, ( $\blacktriangle$ ): pH7.0 solution, ( $\circ$ ): pH8.5 solution.

活性を失うことになる。DMMAAnは、他の環無水物 (MAAn、CAn) と比較して、中性pH付近でアミノ基と可逆的に結合・解離することから、タンパク質を用いたバイオコンジュゲーションのアミノ基保護試薬としての有用性が非常に高いことが示唆される<sup>116)</sup>。以上の結果より、これらの環無水物を高分子に導入することで、薬物を目的とするpH領域中で徐放させることが可能となると考えられた。

そこで、pH応答性および徐放性をPVPに導入するため、開始剤にACVAを用いビニルピロリドンと環無水物を、5%の混合比でラジカル共重合した (Fig.9)。今回コモノマーとして用いた環無水物の中で、中性pH領域における薬物放出速度が最も速い環無水物としてDMMAAnを、また最も遅い環無水物としてMAAnを用い、その薬物放出能を検討した。コモノマーとして導入した環無水物の構造変化に伴う薬物放出特性の変化を評価することを目的に、アミノ基を有する蛍光試薬であるLYCをモデル薬物として用い、環無水物導入PVPの薬物放出性を評価した。

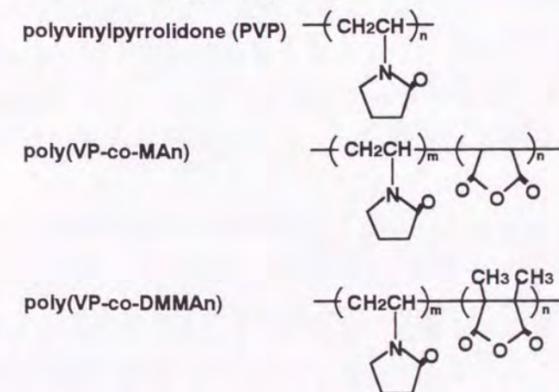


Fig.9 Chemical structures of PVP and PVP derivatives. VP; N-vinyl-2-pyrrolidone, DMMAAn; 2,3-dimethylmaleic anhydride, MAn; Maleic anhydride

その結果DMMAAn導入PVPは、弱塩基条件下であるpH8.5でのLYC放出は殆ど観察され

なかったのに対して、弱酸性条件下であるpH6では、24時間後には約20%のLYCを放出した。また、MAn導入PVPではpH6の条件下でも、5%前後の薬物放出しか観察されなかったことから、中性pH付近における環無水物間のpH応答性は、モノマーの徐放性に依存していることが明らかとなった (Fig.10)。さらに、DMMAAn導入PVPは中性のpH7.2の条件下で、4日間で薬物の約20%を放出したのに対して、MAn導入PVPは約10%のLYCしか放出せず、薬物の薬物放出速度が緩やかな高分子であることが明らかとなった (Table 4, 5)。

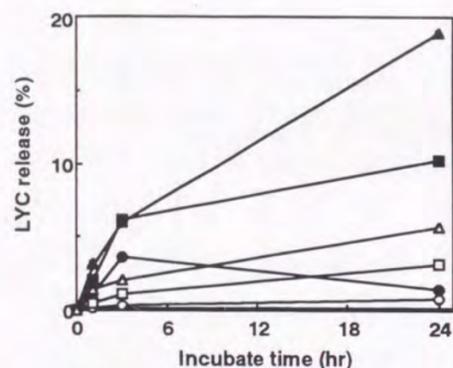


Fig.10 Release pattern of LYC from poly (VP-co-DMMAAn) and poly (VP-co-MAn). Closed symbol; poly (VP-co-DMMAAn), open symbol; poly (VP-co-MAn), (●)(○); pH8.5, (■)(□); pH7.0, (▲)(△); pH6.0

in vivoにおける適用を見据え、薬物放出が血清存在下変化するのかどうかを検討した (Table 4, 5)。DMMAAn導入PVPは血清非存在下では約20%のLYCを放出し、血清存在下でも約17%のLYCを放出した。また同様にMAn導入PVPでも、薬物放出における血清の影響は殆どなく、in vivoにおいても分解酵素などの影響により薬物放出速度は変化しないことが示唆された。以上の結果からこれら環無水構造を有するPVPは経時的に薬物を放出する徐放ポリマーであることが判明し、また導入する官能基によってもその放出性は変化することから、PVPに導入する環無水物の種類を変えることで、薬物の使用目的や作用メカニズムなどを考慮した薬物放出制御が行えることが示唆された。

## 第二節 徐放性を有する修飾高分子の体内動態に関する検討

バイオコンジュゲート薬物を分子設計する場合、修飾高分子の持つ体内挙動特性がバイオコンジュゲーションに用いる薬物の体内挙動に反映されるため、薬物自身の有する作用メカニズムに応じた修飾高分子の分子設計がまず必要になる。そこで、修飾高分子の体内挙動をより詳細に検討する必要があることから、その体内動態を検討した。

Table 4 Release rate of LYC from poly (VP-co-DMMAAn) under physiological conditions.

	Day1	Day2	Day3	Day4
pH 8.0 Conjugate	97.6	96.4	94.1	90.5
Free	2.0	3.2	5.4	8.9
pH 7.2 Conjugate	91.3	87.1	82.8	79.8
Free	8.3	12.1	16.4	19.7
Serum Conjugate	92.1	88.4	85.7	82.5
Free	7	10.7	13.5	16.7

Table 5 Release rate of LYC from poly (VP-co-MAn) under physiological conditions.

	Day1	Day2	Day3	Day4
pH 8.0 Conjugate	97.3	95.2	93.7	93.5
Free	2.0	3.9	4.7	5.3
pH 7.2 Conjugate	94.7	91.2	89.3	88.1
Free	4.4	7.9	9.3	10.5
Serum Conjugate	93.1	90.2	88.9	90.4
Free	3.8	5.8	5.9	6.8

## 実験材料と方法

### 試薬および器具

ポリマーの活性化試薬は第一章、第一節に示した試薬を用いた。脱塩カラムには10-PG (Biorad) を用いた。ポリマーのラベル化は、活性化ポリマーに塩酸チラミン (和光純薬工業) を導入し、クロラミンT法を用いて行った。ラベル化に用いたNa<sup>125</sup>I (17.4Ci/mg、105.58mCi/mL) は、NEN Reserch Productsより購入した。またクロラミンT法を用いたラベル化には、p-トルエンスルホンクロロアミドナトリウム三水和物 (sodium p-toluene-sulfonchloramide trihydrate; クロラミンT、和光純薬工業) およびピロ亜硫酸ナトリウム (sodium pyrosulfite、和光純薬工業) を用いた。ポリビニルアルコール (polyvinyl alcohol; PVA、和光純薬工業) はポリマーのカラムへの吸着を防ぐ目的で添加した。麻酔にはベントバルビタール (Nembutal Injection、ダイナボット) を使用した。

### 環無水物導入PVPのアミノ基反応性官能基の導入

環無水物導入PVPの活性化は以下の通り行った。PVPおよびPVP誘導体をDMFに溶解し、PVPおよび環無水物導入PVP (それぞれ5mg) に15倍モル量のNHS (1.43mg) とDCC (2.58mg) をそれぞれ加え、第一章、第一節に記載した方法に準じて行った。

### 環無水物導入PVPのラベル化

活性化環無水物導入PVPに対して2倍モル量の塩酸チラミンをpH7.2のリン酸溶液の中に混和し、室温で24時間反応させた後、脱塩カラムにより未反応の塩酸チラミンを除去した。チラミン-環無水物導入PVP結合体を凍結乾燥した後、クロラミンT法により<sup>125</sup>Iラベル化を行った。チラミン-環無水物導入PVP結合体を1mg/200μLになるように、pH7.5の0.4Mリン酸緩衝溶液中に溶解し、Na<sup>125</sup>Iを0.7μL加えた。38mMクロラミンTを10μL添加し、激しく攪拌することにより反応を開始し、同様の操作を30秒毎に9回繰り返した。25mMピロ亜硫酸ナトリウムを50μL添加することによりラベル化反応を停止し、未反応の<sup>125</sup>Iを除去するために、あらかじめ0.04%PVAを含むpH8.5ホウ酸緩衝水溶液で平衡化した脱塩カラムにより精製を行った。

### 環無水物導入PVPの体内動態の検討

環無水物導入PVPの生体内動態の検討は、ddYマウス (日本SLC) を用いて検討した。<sup>125</sup>Iラベル化環無水物導入PVPを1×10<sup>6</sup>cpm/200μLになるように生理食塩水で調製し、単回尾静脈内投与を行った。血中濃度推移の検討は、所定の時間にマウス尾部より血液を採取し、γカウンターでその放射活性を測定することにより行った。環無水物導入PVPの組織分布は、同様に<sup>125</sup>Iラベル化高分子を単回尾静脈内に投与した後、3時間後にベント

バルビタール麻酔下マウスを脱血死させ、各組織を採取し、その放射活性を測定することにより評価した。

### 実験結果および考察

環無水物導入PVPの体内動態を検討したところ、DMMAAn導入PVPは幹高分子（ホモポリマー）であるPVPとほぼ同等の滞留性を示した（Fig.11）。一方、MAN導入PVPはPVPホモポリマーよりも滞留性に乏しいことが判明した。またそれぞれのポリマーの組織分布を検討したところ、PVPホモポリマーは血中に局在し、ほとんどの組織にも分布しなかった（Fig.12）。またDMMAAn導入PVPにおいては、腎臓への移行が若干観察されたものの、PVPと同様ほぼ血液中に存在し、他の組織には移行しなかった。それに対してMAN導入PVPでは、肝臓・腎臓への集積性が高まっていた。

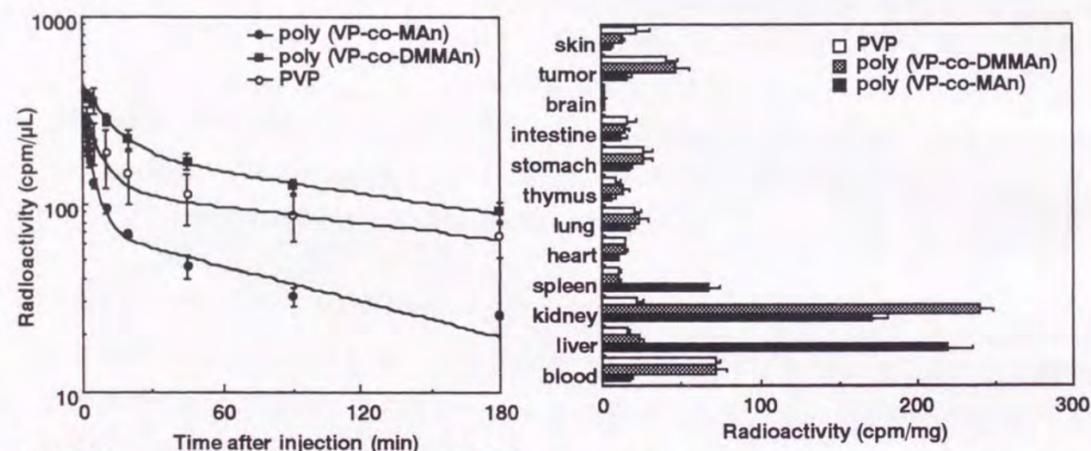


Fig.11 Plasma clearance of poly (VP-co-DMMAAn) and poly (VP-co-MAN) after i.v. injection in mice. Mice were intravenously injected with  $^{125}\text{I}$ -labeled polymers. After administration, blood was collected from tail vein at indicated time and radioactivities were measured by a  $\gamma$ -counter. Mice were used in groups of five. Each value is the mean  $\pm$  S.D. (○); PVP, (■); poly (VP-co-DMMAAn), (●) poly (VP-co-MAN)

一般に、血管内皮細胞上は、負電荷を有するシアル酸が多数存在することから、アニオン性高分子はノニオン性、カチオン性の高分子と比較して、細胞やタンパク質との相互作用が低いと考えられており<sup>117)</sup>、組織との親和性および取り込みなどが抑制され、血中滞留性が高いと考えられている<sup>118,119)</sup>。しかしながら、強アニオン性高分子は肝臓のクッパー細胞などが有するスカベンジャーレセプターなどに捕捉され、血中から消失することが知られている<sup>120-126)</sup>。今回作製した環無水物導入PVPは、水溶液中で無水環部分が加水分解されるため、多数のカルボキシル基を有するアニオン性高分子としての性質を有している。DMMAAn導入PVPとMAN導入PVPは導入した環無水物の割合が同一であることが

ら、カルボキシル基の導入率は同じであると考えられる。しかし、MAN導入PVPが肝臓などの組織に分布するのに対し、DMMAAn導入PVPは殆ど組織に分布しなかった。この原因に関しては、今後、分子あたりのトータルの電荷をゼータ電位などを指標に測定することで、より詳細に解析していく必要がある。また、今回の結果から単にアニオンの性質を修飾高分子に導入しても、必ずしも血中滞留性の向上が望めないことが明らかとなった。また、この体内挙動変化の原因は、官能基による特性だけでなく、メチル基の導入による脂溶性の増大や、それぞれのカルボキシル基の有するイオン化傾向ならびに水溶液中での分子構造や、その物理化学的諸性質を詳細に検討することで、明らかになることと期待される。

### 第三節 徐放性を有する水溶性高分子を用いたin vivo抗腫瘍効果に関する検討

前節の結果から、DMMAAn導入PVPの特性として徐放性を有することが明らかとなった。さらにDMMAAn導入PVPはpHの低下に伴い、薬物の放出速度が上昇することが明らかとなっている。またこのDMMAAnは、理論的に結合していたリジンアミノ基を可逆的に解離するため、結合したアミノ基を、元あった構造のまま放出する性質を有している。従って、DMMAAnを導入したPVPは、アミノ基を有するタンパク質や低分子薬物を、活性を損なうことなく放出することができる。一般に炎症部位や腫瘍組織中のpHは生体内のpHと比較して、酸性に傾いていることが知られている<sup>127)</sup>。また、高分子物質は前述したEPR効果により、長く腫瘍組織に留まる性質を有していることから、DMMAAn導入PVPと抗癌物質との結合体は、他の正常組織と比較して腫瘍部位に集積しやすく、さらにnativeな薬物を放出しやすいと考えられたことから、副作用を軽減できる可能性がある。

近年、悪性腫瘍に対して種々の抗癌剤を用いた治療が行われるようになり、その抗腫瘍効果が明らかになってきつつある。中でも、造血器腫瘍・固形腫瘍を問わず、幅広いスペクトラムを有するアドリアマイシン（ADR）は、乳ガン・肝ガン・リンパ系腫瘍などの腫瘍にも幅広く用いられ、高い有効性が示されている。本剤の作用機序としてDNA二本鎖にインターカレートしDNAの正常な解離を妨げるほか、トポイソメラーゼ阻害やアントラサイクリン環に由来する活性酸素の生成など、様々な抗癌機構が関与している。しかしながら、ADRは強い慢性の心毒性を示し、この問題点を克服するために種々の薬物キャリアーを用いた化学療法が考案され、臨床応用されてきている。DMMAAn導入PVPはADRと結合し高分子化することでその毒性をマスクし、さらに腫瘍の持つEPR効果により腫瘍部位に集積し、腫瘍局所で薬物の活性発現を制御する薬物キャリアーとして期待できる。本節では、マウス固形腫瘍の退縮を目指してDMMAAn導入PVPとADRとの結合体を頻回投与することで、その抗腫瘍効果を検討した。

## 実験材料と方法

### 試薬および器具

メチルピロリドン (N-methyl-2-pyrrolidone; NMP, 和光純薬工業)、アドリアマイシン (ドキソルビシン塩酸塩; ADR, 和光純薬工業)、トリエチルアミン (triethylamine, 和光純薬工業) を試薬として用いた。未反応のADRを除去するために、分子量分画約30,000のPM-30 (アミコン) の限外濾過フィルターを用い、限外濾過した。DMMAAn導入PVP-ADR結合体の血液学的な副作用評価は、自動血球測定装置 (PLATELET COUNTER PL-110, 東亜医用電子株式会社) により白血球、赤血球、血小板、ヘマトクリット値およびヘモグロビン量を測定することにより評価した。また、肝臓への副作用の指標としてGOTを選択し、トランスアミナーゼCII-テストワコー (和光純薬工業) を用いて検討した。

### 動物および細胞

抗腫瘍効果の検討には、ddYマウス (日本SLC) にSarcoma-180 (S-180) (東北大学加齢医学研究所より供与) を移植することで行った。

### DMMAAn導入PVPとアドリアマイシンの結合方法

DMMAAn導入PVPをNMP中に80mg/4mLの濃度に溶解し、そこに20mg/4mL (NMP) の濃度で溶解させたADRを添加した。触媒としてトリエチルアミンを30 $\mu$ Lを添加し、室温で暗所、over nightで攪拌した。反応を終えたサンプルに精製水50mLを加え、pH8.0になるように0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>で調整した。未反応のDMMAAn導入PVPの無水環部分を加水分解後限外濾過し、未反応のADRを除去した。その後精製水を加えて、バッファー置換したのち、上清を回収してポアサイズ0.45 $\mu$ mのフィルターを通し、1.5mLエッペンチューブ中に分注し凍結乾燥後、冷凍保存した。

### DMMAAn導入PVPのin vivo抗腫瘍効果に関する検討

in vivo抗腫瘍効果の検討に関してはS-180担癌ddYマウスを使用した。担癌マウスの作成方法は前章、第一節に準じて行った。コントロールとして非腫瘍移植マウス、およびPBS投与群、DMMAAn導入PVP3mg投与群の3つの群を作成した。投与サンプルは、サンプルの吸光度 (OD) を指標に、native ADR量に換算して投与した。コンジュゲート体の抗腫瘍効果の検討は、腫瘍移植後7~8日目の腫瘍が7mm前後の大きさになったものに対して2日に1回ずつ計3回の頻回投与により行った。腫瘍体積および体重変化の測定に関しては、前章、第一節に準じて行った。また副作用の指標として血液成分および肝障害に関して検討を行った。

## 実験結果および考察

本節では、高分子物質の透過性が高く、また他の組織と比較してpHが低い腫瘍組織を標的とする、新規抗癌高分子薬物の作製を行った。すなわち、低分子の抗癌剤であるアドリアマイシン (ADR) をモデル薬物として用い、薬物の体内安定性の向上、および毒性軽減による投与量の増大を目的に、DMMAAn導入PVPとの結合体を作成し、その抗腫瘍効果および副作用について検討した。

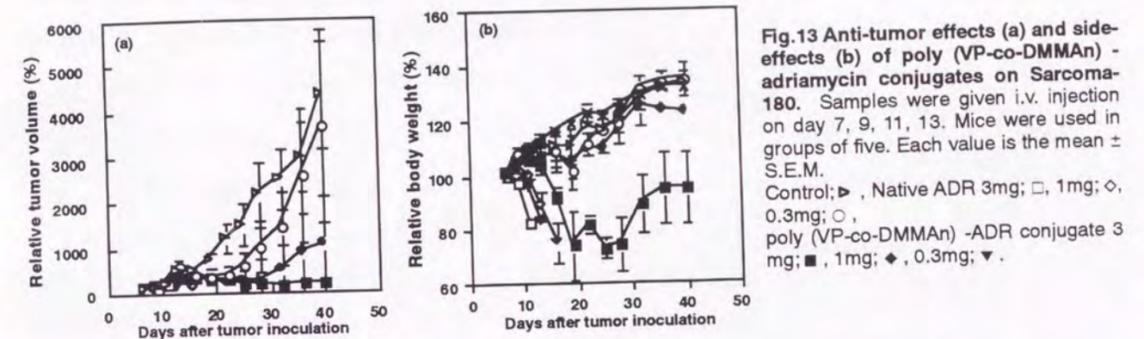


Fig.13 Anti-tumor effects (a) and side-effects (b) of poly (VP-co-DMMAAn) - adriamycin conjugates on Sarcoma-180. Samples were given i.v. injection on day 7, 9, 11, 13. Mice were used in groups of five. Each value is the mean  $\pm$  S.E.M. Control;  $\blacktriangle$ , Native ADR 3mg;  $\square$ , 1mg;  $\circ$ , 0.3mg;  $\diamond$ , poly (VP-co-DMMAAn) -ADR conjugate 3mg;  $\blacksquare$ , 1mg;  $\blacklozenge$ , 0.3mg;  $\blacktriangledown$ .

その結果、高濃度のnative体投与群では、ほとんどが副作用のために突然死し、投与開始後10日目まででnative体1mg/mL以上を投与した群では全例が死亡した。また、修飾高分子とnative体を単に混合して投与した群でも、同様の副作用による突然死が観察された。しかしながら、それ以下の濃度の0.33mg/mLの投与群では殆ど抗腫瘍効果がなく、投与直後は若干の抗腫瘍効果が認められたものの、40日後にはコントロールとほぼ同じレベルにまで腫瘍が増殖した。臨床では、このように治療効果が乏しく、副作用の著しい抗癌抗生物質が使用されているのが現状である。これに対し、バイオコンジュゲート体3mg/mLの投与群においては副作用による死亡例が観察されず、40日目まで完全に腫瘍増殖を抑制した。また、バイオコンジュゲート体1mg/mLの投与群でも少なくとも28日後までは腫瘍の増殖を抑制した。バイオコンジュゲート体3mg/mLの投与群では、顕著な体重減少が観察されたものの、1mg/mLの投与群では体重増加の抑制傾向が観察されるに過ぎず、コントロール群と比較してもほとんど差は認められなかった。また、血小板減少に関してはバイオコンジュゲート体の3mg/mLの投与群で顕著な血小板減少が観察されたが、他のバイオコンジュゲート体投与群では観察されなかった (Fig.14)。また、バイオコンジュゲート体1mg/mLおよびnative体0.33mg/mLの投与群では投与一週間後に、リバウンドとみられる若干の血小板の増加を示しているが、臨床を考えた場合、それほど大きな問題とはならないと考えられる。また、データには示していないが、投与24時間後に測定したGOTの値はどの群でも、顕著な上昇は観察されず、肝障害などの正常組織に対する副作用は今回の実験では観察されなかった。以上のこ

とから、今後投与スケジュールを最適化する必要があるものの、DMMAAn導入PVP-ADR結合体の癌治療に対する有用性が示された。

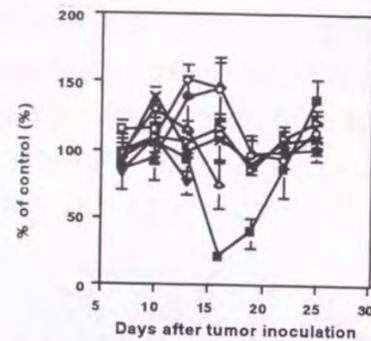


Fig.14 Effect of poly (VP-co-DMMAAn)-ADR conjugates on platelet. Blood was taken from the tail vein and the counts of platelets were measured by platelet counter. Each point represents the mean of four mice.  
intact; x, control; ▷, Native ADR 3mg; ◻, 1mg; ◇, 0.3mg; ○, poly (VP-co-DMMAAn)-ADR conjugates 3 mg; ■, 1mg; ◆, 0.3mg; ▼.

修飾高分子自身の体内挙動は第二節で示したが、DMMAAn導入PVPはこれまで用いてきたPVPとほぼ同程度の高い滞留性を示すこと、また、特異的な組織への取り込みはほとんど観察されないことから、native体と比較しても十分にその副作用を抑制することができると考えられる。結合した薬物に関する体内動態については、今後検討していかねばならないが、用いた修飾高分子の性質から、血中での滞留性は高いと考えられる。

代表的な腫瘍の物理化学的・生物学的特性として、前述したように、高分子の血管透過性・蓄積性に富んでいることが知られている (EPR効果)。このことにより、高分子化した薬物は、腫瘍組織中に滞留しやすくなっていると考えられる。また、上述したように、腫瘍内は生体内のpHと比較して低い傾向にあるので、腫瘍内におけるDMMAAn導入PVPの薬物放出速度が高いということも考えられる。今回用いたADRは、修飾高分子と結合した状態では作用できず、intactな状態で徐放されてはじめてその抗腫瘍効果を発揮する。従って、今回これらの抗腫瘍効果が観察されたのは、薬物がキャリアーとしてのDMMAAn導入PVPから放出されることが原因であることが考えられる。native体高濃度投与群では突然死など著しい副作用が観察されるが、今回のDMMAAn導入PVP-ADR結合体では、そのような顕著な毒性は軽減されていた。以上の結果からDMMAAn導入PVPは、ADRの毒性を軽減し、さらに腫瘍組織で薬物が放出されるという、理想的な薬物治療キャリアーであることが明らかとなった。またこのDMMAAn導入PVPは、様々な徐放性薬物の開発にも有用であると考えられる。これまでバイオコンジュゲーションを行ってきたIL-6やLeukemia Inhibitory Factor (LIF)、Thrombopoietin (TPO)などの血小板増加作用のあるサイトカイン類に関しては生体内で徐放されることが重要な薬理効果増強の原因となるので、このようなサイトカインのバイオコンジュゲーションにも有用である。

#### 第四節 小括

治療すべき標的組織中に至適量の薬物を必要な時間だけ滞留させることで、理想とする薬物治療が実現されることから、有効薬物濃度を長時間維持するシステムの開発は、薬物治療の最適化を目指す上で必要不可欠であると考えられる。以上の観点からこれまでも、マイクロスフェアやリポソームなど、様々な徐放化製剤が考案され、その有効性が認められているものの、このような粒子の中に薬物を封入するアプローチには様々な問題があった。すなわち、分子サイズの大きな粒子様の薬物は、静脈内投与の場合、細網内皮系 (RES) に取り込まれるため、結局肝臓や脾臓といった臓器に分布し、体内動態を制御するのが極めて困難である。従って、臓器への移行性を制御しつつ、さらに任意に薬物を徐放する薬物キャリアーの開発に期待が寄せられていた。

一方で、これまで我々は、薬物の作用メカニズムを考慮した最適条件下でバイオコンジュゲーションを行うことにより、薬物の体内安定性を向上できること、さらにはバイオコンジュゲーションに用いる修飾高分子の種類や性質により、薬物の体内挙動を自由に制御し得ることを見出した。すなわち我々はこれまでに提示してきた、第一世代ともいうべきバイオコンジュゲーションにより、薬物の安定化と作用選択性を付与し得ることを報告してきた。しかしながら、高分子バイオコンジュゲーションは、体内安定性を向上させるという利点を有してはいたが、その一方で薬物の活性発現に重要な官能基およびその近傍官能基に修飾高分子が結合することにより生じる立体障害のため、比活性低下をまねくという致命的問題を抱えている。従って、今後バイオコンジュゲート化DDSを最適化していくためには、このバイオコンジュゲーションにおいて必ず生じる比活性低下という問題点を解決し得る新規修飾高分子を開発する必要がある。

そこで本章では、pHに応答し薬物をnativeな形で放出することが可能な修飾高分子の開発を行った。幹修飾高分子として選択したPVPは、ラジカル重合により機能導入に不可欠な種々官能基を導入でき、さらに静脈内投与後、血中以外の他の組織へ分布しないことから、動態制御を目的とした機能性修飾高分子の開発に最適なポリマーであると考えられる。無水環構造を有するMANなどの環無水物は、pH依存的にアミノ基と結合、解離するアミノ基保護試薬として提示され、これまでにこの環無水物を用い、アミノ基を他の官能基へ誘導する際の試薬などとして応用されてきた。そこで我々はこの環無水物の特性を幹修飾高分子であるPVPに導入することで新規機能性修飾高分子の作製を試みた。その結果、環無水物導入PVPはpHの変化に依存して薬物を放出し、さらに生体の生理的条件である中性pH付近で薬物を徐放した。また、その薬物放出速度は、導入する環無水物の特性によって制御することが可能であった。またその体内動態を検討したところ、DMMAAnを導入したPVPはこれまで最も血中滞留性の高かった幹高分子であるPVPとほぼ同等の血中滞留性を有し、血中濃度を恒常的に維持し続ける徐放デバイスとして有用であることも明らかとなった。従ってこのDMMAAn導入PVPと抗癌剤との結合体は、第一章で解説した癌組織のEPR効果を利用した固形腫瘍の治療にも有用であると考えられ

た。また、腫瘍組織では通常他の正常組織よりもpHが低下していることが知られていることから、DMMAn導入PVPはEPR効果により腫瘍部位へ集積するだけでなく、腫瘍部位でより多くnative薬物を徐放し得る可能性が期待できる。そこで第三節では、DMMAn導入PVPの薬物キャリアーとしての有用性を評価するために抗癌抗生物質であるアドリアマイシンとの結合体を作製し、その抗腫瘍効果ならびに副作用に関して検討を行った。その結果、S-180担癌マウスにおいて、DMMAn導入PVPとアドリアマイシンとの結合体はnative体と比較し、抗腫瘍効果に優れ、かつ副作用も軽減されたことから、癌を標的とした薬物治療に有効な薬物キャリアーであることが示された。今回示した環無水物導入PVPはpHに応答し、かつ中性付近で薬物を徐放する薬物キャリアーとして紹介したが、今後これらの機能以外に、さらに標的組織へ選択的に薬物を送達する機能を導入することで、より多くの薬物を対象とした薬物キャリアーとして利用できる可能性が示唆された。すなわち、標的組織中へ選択的に移行し、薬物を徐放することで高い薬効を発現し、その他の組織には移行しないと、薬効発現を制御する技術として応用することも可能である。次章では、この徐放性を有した環無水物導入PVPの体内動態を制御することで、特定の組織にのみ選択的に集積し、そこで薬物を徐放させる新規修飾高分子を作製したので報告する。

### 第三章 腎臓へのターゲティングキャリアーの開発とその特性

薬物治療の最適化の観点から、理想的な水溶性高分子バイオコンジュゲーションを実現させるために、これまで高度な体内安定性を付与する第一世代ともいべきバイオコンジュゲーションを更にインテリジェント化することで、第二世代、第三世代へと発展させていく必要がある。すなわち、第一章で述べた第一世代のバイオコンジュゲーションにより薬物の安定性を向上させた上で、第二章では修飾高分子から100%活性を保持した薬物を任意の放出パターンによって徐放化させるような第二世代のバイオコンジュゲーションの開発を行った。しかしながら今後、さらに一歩進んで修飾高分子の諸性質により標的組織に薬物をターゲティングすることで、薬物への安定性付与と時間的かつ空間的薬物動態制御を同時に充たしていく第三世代のバイオコンジュゲート化DDSとも言うべき、新たな戦略を構築していく必要がある。前章までの検討で、環無水物導入PVPはpHに応答して薬物を放出し、さらに中性pH条件下で薬物を徐放する薬物キャリアーとして利用できる事が明らかとなった。従って、この環無水物導入PVPに、特定の組織のみに選択的に薬物を送達しうる機能を導入することによって、上記の第三世代のバイオコンジュゲート化DDSが達成できると考えられる。

さて腎臓は、体内の不要な排泄物を除去し、水分ならびに電解質の排泄を調節して体液量や組成を一定に保つとともに、必要な栄養物を再吸収するという、生体の恒常性を維持する調節臓器である。また腎臓は、血液を糸球体でろ過し尿を産生する過程で体内に不要ないし有害な物質を除いているだけでなく、生体内の水分と電解質の平衡が保たれるように、副腎皮質ホルモンや脳下垂体後葉ホルモンなどによって精密に制御されている上、自らも生理活性物質を産生する。そのためひとたび、腎臓の機能が低下し、これらの恒常性維持機能が失われると、我々の正常な生命維持活動はすぐさま失われてしまうことから、腎疾患は生体の恒常性を崩壊させる直接的・間接的要因ともなりうる。近年生活習慣病の一つである糖尿病による腎機能低下<sup>128)</sup>、および自己免疫疾患による慢性腎炎<sup>129)</sup>など、腎臓における様々な疾病が浮き彫りとなり、それらを治療する方法論が注目を集めている。現在腎炎の治療においては、主に抗炎症性ステロイドの頻回投与やパルス療法が行われているが、薬物の長期間頻回投与によって生じる副作用の軽減や患者のQOLの改善という点から、腎臓に高率に集積した後、長期間滞留する薬物の開発に期待が寄せられている。

以上の点から、腎疾患治療を目的に様々な薬物キャリアーが開発されてきたが<sup>130-133)</sup>、これまでの腎臓へのキャリアーの開発は十分でなく、まだまだ発展途上であると言わざるを得ない。例えば、薬物に正電荷を持たせ、腎臓へターゲットさせようとする試みもなされているが、それらは生体内の細胞表面が有するアニオン性の性質を利用したに過ぎないため腎臓以外の組織にも分布してしまう結果となっている。更に、カチオン性の電荷

を有するタンパクの一つであるリゾチームと薬物とを結合させたバイオコンジュゲート薬物も開発されたが<sup>134-136)</sup>、薬物がnativeな形でリリースされないために、薬理活性自体を失ってしまうことが明らかとなっている。従って、これらの問題点を克服するためには、まず、腎臓へ高率にターゲットし、さらに、nativeな形で薬物を放出しうる薬物キャリアの開発が重要な課題となってくる。

以上の問題点を踏まえ我々は、薬物の有効性、安全性、作用の選択分離性に優れた第三世代のバイオコンジュゲート化DDSの確立を目的に、局方収載品でもあり安全性の高いPVPを幹修飾高分子として様々な機能を導入することで、標的指向性と徐放性を同時に有するバイオコンジュゲート化DDSの開発を試みた。これまで我々が行ってきた、アニオン性導入PVPの生体内動態特性評価の知見より、カルボキシル基を至適量だけ導入されたPVPが、優れた腎指向性を有することが判明している。前章で示した環無水物導入PVPは、開環状態においてカルボキシル基を有することから、最適量の環無水物をPVPに導入することによって、腎指向性を有すると同時に、生理的pH付近で薬物を徐放化し得る新規機能性修飾高分子の開発が可能になるものと期待された。すなわち、薬物の生体内挙動を空間的だけでなく時間的にも制御した、まさに第三世代のバイオコンジュゲート化DDSを可能にする修飾高分子が誕生するものと考えられる。

本章では、次世代ターゲティング療法の確立を目的に、側鎖に多数のカルボキシル基を有し、かつ薬物の生体内挙動を時間的に制御し得る徐放化デバイスでもある環無水物導入PVP誘導体を作製した。

#### 第一節 環無水物導入PVPの作製とその徐放性に関する検討

現在までのところ薬物の体内挙動を空間的にも時間的にも制御することに成功した薬物キャリアは皆無と言える。前章において我々は、薬物の体内挙動を時間的に制御することを目的に、環無水物をPVPへ導入し、徐放性を有する修飾高分子を作製した。一方アニオン性導入PVPは、これまでの詳細な生体内動態特性の解析により、至適量のカルボキシル基を導入することで高い腎集積性を示すことが明らかとなっている。環無水物の性質として水溶液中で加水分解を受け開環し、カルボキシル基が生じることを考えると、至適量の環無水物をPVPへ導入することで、徐放性を有し、かつ腎ターゲティング能を有する新規機能性修飾高分子が作製できると期待された。すなわち、腎臓に到達後、その部位で薬物を放出するといった、薬物を空間的-時間的に制御し得るまさに理想的な次世代のインテリジェントデバイスが創製できるものと思われる。

そこで本節ではまず、ラジカル共重合法により環無水物導入PVPの作製を行い、環無水物導入PVPの各pHにおける徐放性を評価するとともに、より生理的pHに近い条件、すなわち中性pHにおける徐放性を検討した。環無水物導入PVPの腎集積を期待し

て、環無水物の仕込み比をこれまでに最も高い腎集積性を示したアクリル酸導入PVPの導入率と同じ20%で行い、まず環無水物導入PVPの時間的薬物挙動制御能、即ち薬物徐放性について検討を行った。

#### 実験材料および方法

##### 実験材料および器具

試薬は第二章、第一節に示したものを使用した。

##### 環無水物導入PVPの作製

環無水物導入PVPの作製は、前章、第一節に準じて行った。ただし、モノマーとしての環無水物の導入率を20%とし、ポリマーの重合速度の違いから、ラジカル反応時間は72時間とした。なお、環無水物導入PVPの環無水物の導入率に関しては、<sup>3</sup>H-NMRで仕込み比と同様の導入率になっていることを確認している。

##### 環無水物導入PVPとLYCとの結合

第二章、第一節に準じて行った。

##### 環無水物導入PVPとLYCの結合体における薬物放出性の確認

第二章、第一節に準じて行った。

#### 実験結果および考察

環無水物は前章で示したとおり、pH応答性を有しており、また塩基性側でアミノ基と結合し、酸性側でアミノ基を遊離するアミノ基保護試薬として知られている。また、これら環無水物を導入したPVPの徐放性が生理的条件下観察されたことから、この徐放機能が環無水物の導入率によってどのように変化するか検討した (Fig.15)。モデル薬物として前章、第一節で用いたLYCを用いて環無水物導入PVPのpH応答性について評価したところ、20%環無水物導入PVPとLYCとの結合体は、前節と同様pHの低下に従ってLYCをより多く放出し、薬物の放出速度が増大することが確認された。また環無水物の導入率が増加することでも薬物の放出速度が増大することが明らかとなった。

また、生理的条件、すなわち中性pH付近における環無水物導入PVPの徐放性を検討するために、pH7.2の緩衝液中と血清中で経日的にLYCの放出を測定することで評価した (Table 4)。20%環無水物導入PVPは、pH7.2の緩衝液中においても血清中においても、ほぼ同様の徐放パターンを示したことから、生体内においても薬物を有効に徐放化し得ることが示唆された。さらに、5%、20%環無水物導入PVPのLYCの徐放速度を比較すると、5%DMMAAn導入PVPは17%程度のLYC放出しか認められないのに対し、20%

DMMAAn導入PVPは4日間で約30%ものLYCを放出していることが明らかとなった。また、MAN導入PVPについても経日的な徐放性の検討を行い、20%導入率、37°C、pH7.2の条件において4日間で14%の放出性が確認された。

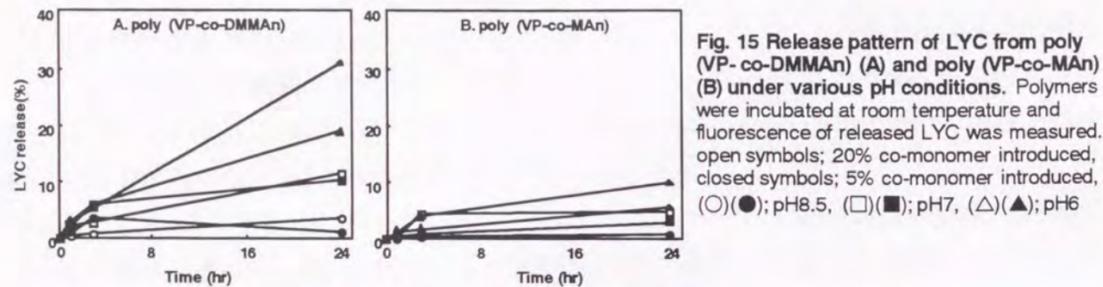


Fig. 15 Release pattern of LYC from poly (VP-co-DMMAAn) (A) and poly (VP-co-MAN) (B) under various pH conditions. Polymers were incubated at room temperature and fluorescence of released LYC was measured, open symbols; 20% co-monomer introduced, closed symbols; 5% co-monomer introduced, (○)(●); pH8.5, (□)(■); pH7, (△)(▲); pH6

Table 4 Release rate of LYC from poly (VP-co-DMMAAn) and poly (VP-co-MAN)

		Day1			Day2			Day4		
		pH8	pH7	Serum	pH8	pH7	Serum	pH8	pH7	Serum
poly (VP-co-DMMAAn)	5%	2.0	8.3	7.0	3.2	12.1	10.7	8.9	19.7	16.7
	20%	3.7	16.9	13.1	5.2	24.0	22.9	9.7	32.3	29.5
poly (VP-co-MAN)	5%	2.0	4.4	3.8	3.9	7.9	5.8	5.3	10.5	6.8
	20%	0.9	1.6	-	1.6	7.0	-	3.5	14.0	-

以上の結果より、PVPへの環無水物の導入率を制御することにより徐放化パターンを任意に制御でき、薬物の作用メカニズムに応じて、薬物挙動の時間的制御を行い得る修飾高分子であることが明らかとなった。今後導入率に応じた環無水物導入PVPの水溶液中での立体構造や各原子における電子密度などを詳細に検討することで、徐放化のメカニズム、徐放速度のより緻密な制御が可能になるものと考えられる。また、前章で述べたように環無水物の徐放化特性はその二重結合に結合しているメチル基が重要であることから、環無水物のメチル基をエチル基やプロピル基などに变化させることで、様々な徐放化パターンを有する修飾高分子が新たに創製できるものと考えられる。

## 第二節 環無水物導入PVPの生体内動態特性

これまでの研究から、至適量のカルボキシル基を導入したアクリル酸導入PVPは高い腎集積性を示すことが明らかとなっている。徐放性を有する環無水物導入PVPも、導入された無水環部分が水溶液中で加水分解され、カルボキシル基を生じることから、アクリル酸導入PVPと同様、選択的に腎臓へ移行し得る可能性が考えられる。そこで、本節では、環無水物導入PVPの薬物の空間的制御能、すなわち腎指向性について検討を行った。

## 実験材料および方法

環無水物導入PVPの活性化、ラベル化方法および体内動態の検討

第二章、第二節に記載した方法に準じて行った。なお、環無水物導入PVPは、平均分子サイズ 6,000、分子量分布 (Mw/Mn) 1.14~1.16のものを実験に供した。

## 実験結果および考察

環無水物導入PVPは、導入された環無水物の種類に関わらず、導入率の増加に従い血中滞留性の低下が観察された (Fig.16)。従って、環無水物導入PVPの血中濃度推移は、一般的に言われているアニオン性高分子の動態特性とは全く異なり、これまでの我々の知見であるアニオン性導入PVPの生体内動態特性と同様の挙動特性を示した。さらに、導入率が同じDMMAAn導入PVPとMAN導入PVPとの血中滞留性を比較すると、DMMAAn導入PVPの方が僅かではあるが血中滞留性が高かった。

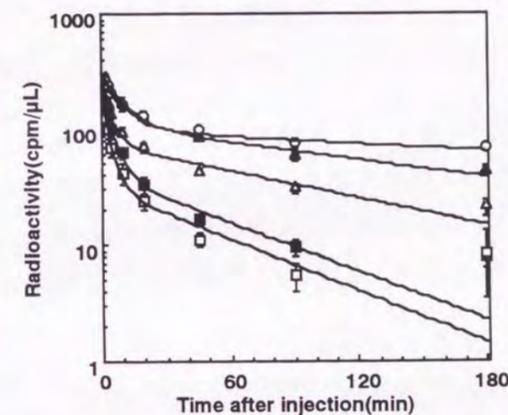


Fig.16 Plasma clearance of poly (VP-co-DMMAAn) and poly (VP-co-MAN) after intravenous injection in mice. Mice were intravenously injected with <sup>125</sup>I-labeled polymers. After administration, blood was collected from tail vein at indicated times and radioactivities were counted by a  $\gamma$ -counter. Mice were used in groups of five. Each value is the mean  $\pm$  S.D. (○); PVP, closed symbol; poly (VP-co-DMMAAn), open symbol; poly (VP-co-MAN), square (■, □); 20% co-monomer introduced, triangle (▲, △); 5% co-monomer introduced.

疎水性残基であるスチレンと無水マレイン酸との交互共重合体であるスチレン-無水マレイン酸共重合体 (SMA) は、血中のアルブミンと結合することで、高い血中滞留性を有することが知られている。またこれまでの我々の知見において、疎水性のアルキル基をPVPに導入することでその血中滞留性が向上する事からも、この血中滞留性の向上は環無水物の高分子の疎水性が上昇したためとも推察できる。すなわち、DMMAAnの有するメチル基が疎水残基として働き、アルブミンなどの血中タンパク質と結合することで、DMMAAn導入PVPの血中滞留性が高まったとも考察される。また、SMAは静脈内投与後、肝臓に集積することが知られている。今回検討したこの環無水物導入PVPは肝臓などの組織にはほとんど分布しないことから、その取り込み機構の相違に関して詳細な検討が望まれる。

また、カルボキシル基を多数有している20%環無水物導入PVPは、これまでの我々の知見であるアクリル酸導入PVPの生体内動態特性を裏付けるように、他の組織には殆ど移行せず、高い腎集積性を示した (Fig.17)。さらに20%DMMAAn導入PVPの腎

移行量は投与量の約40%に達することが明らかとなった。以上の結果より、20%の導入率で作製した環無水物導入PVPは、優れた腎集積性を持ち、さらに腎臓以外の組織への低い移行性を有することから、腎臓をターゲットとした薬物治療キャリアーとして、有用であることが明らかとなった。

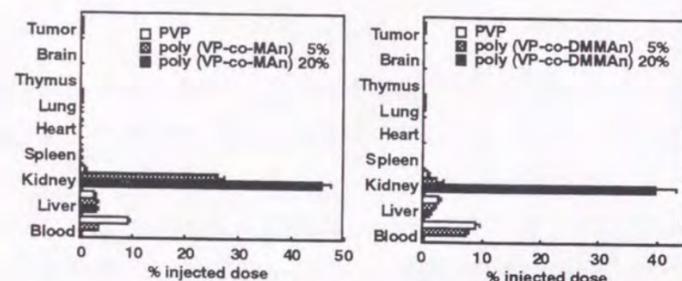


Fig.17 Tissue distribution of poly (VP-co-DMMAAn) and poly (VP-co-MAn) at 3 hr after i.v. injection in mice. At 3 hr after i.v. injection, mice were sacrificed and each organ was collected. The radioactivities were counted by a  $\gamma$ -counter. Mice were used in groups of five. Each value is the mean  $\pm$  S.D.

### 第三節 環無水物導入PVPの腎ターゲットキャリアーとしての有用性に関する研究

前節までの結果より、環無水物導入PVPは優れた腎集積性、薬物の放出性を有することから、腎臓を標的とした薬物治療の最適化を目指す上で、非常に有用な薬物キャリアーであると考えられた。その薬物キャリアーとしての有用性をより詳細に検討することを目的に、まず環無水物導入PVPの細胞傷害性を評価し、さらに腎臓における薬物キャリアーの分布特性および集積メカニズムについても検討した。

#### 実験材料および方法

##### 試薬

細胞傷害性を有する高分子として4級アミン構造を有するhexadimethrine bromide (polybrene; アルドリッチ) を使用した。蛍光ラベル化試薬として、5-(aminoacetamido) fluorescein (AFF; モレキュラープローブ) を用いた。

##### 細胞と動物

サル腎上皮細胞株LLC-MK2は10%FBS含有MEM (日水) 中で継代培養した。また正常ヒト腎近位尿細管上皮細胞 (renal proximal tubular epithelial cell; RPTEC) は三光純薬より購入し、ブレッドキットREGM (三光純薬) 中で培養した。またRPTECは4~6継代のものを実験に使用した。実験動物としてBALB/cマウス (雄、五週齢、日本チャールズリバー) を用いた。

#### 凍結切片の作製

腎臓における部位局在性を検討するため、環無水物導入PVPを蛍光試薬AFFによりラベル化した。DMMAAn導入PVP 1分子に対して蛍光試薬AFF 1分子を導入できるように、ポリマーを第二章、第一節に準じて蛍光ラベルした。AAFラベル化環無水物導入PVPをBALB/cマウスに尾静脈内投与し、3時間後の腎凍結組織切片を作製した。蛍光ラベル化環無水物導入PVPをBALB/cマウスに尾静脈内投与し、3時間後にペントバルビタール麻酔下、腹部大動脈切断により、脱血死させた。その後、腎臓を回収し、適当な大きさに切断した後、包埋剤に浸漬し液体窒素を用いて急速凍結を行った。凍結組織片をクリオスタットにより薄切し (10 $\mu$ m)、ポリ-L-リジンでコートされたスライドガラスに貼付した。凍結切片をメタノール:アセトン (1:1) 溶液中で固定化した後、マイヤーのヘマトキシリン液で核染色を行った。組織切片上に封入剤をのせ、カバーガラスをかけた後、蛍光顕微鏡下で観察を行った。

#### 環無水物導入PVPの細胞傷害性の評価

環無水物導入PVPの細胞傷害性は、MTT法により評価した。LLC-MK2およびRPTECを96穴プレートにそれぞれ $1.2 \times 10^4$  cells/well播種し、12時間CO<sub>2</sub>インキュベーター中で培養することで、プレートに接着させた。その後、培養液を取り除き、各種ポリマーを所定の濃度にPBS(-)に溶解したものを、培養液と1:1の割合で混合、添加した後、24時間培養した。

#### 経時的な腎臓への取り込みに関する検討

DMMAAn導入PVPの経時的な腎臓への取り込みは、DMMAAn導入PVPを<sup>125</sup>Iでラベル化し、BALB/cマウスに投与後、所定の時間に各臓器を摘出し、その放射活性を $\gamma$ カウンターにより測定することで評価した。<sup>125</sup>Iラベル化、およびその操作に関しては同章、第二節に準じて行った。

#### 細胞への取り込み実験

蛍光物質でラベル化したDMMAAn導入PVPを5mg/mLの濃度に培養メディウム (REGM) を用いて溶解し、培養用カバーガラス上に培養したRPTECに添加した。CO<sub>2</sub>インキュベーター内で3時間培養した後、PBSを用いてwash outし、取り込まれなかったポリマーを除去した。その後、スライドガラスの上に培養用カバーガラスをかけた後、共焦点レーザー顕微鏡を用い、細胞への取り込みを観察した。

#### 実験結果および考察

前節の結果より、その高い腎集積性が明らかとなった環無水物導入PVPを腎臓を

標的としたターゲティングデバイスとして応用しようとする場合、これらのデバイスが腎臓という組織レベルではなく、腎臓におけるそれぞれの機能を担う器官・細胞レベルで、その集積部位を特定する必要がある。そこでまずこれら環無水物導入PVPの薬物治療への応用を目的に、腎臓組織中の集積部位を詳細に検討した (Fig.18)。

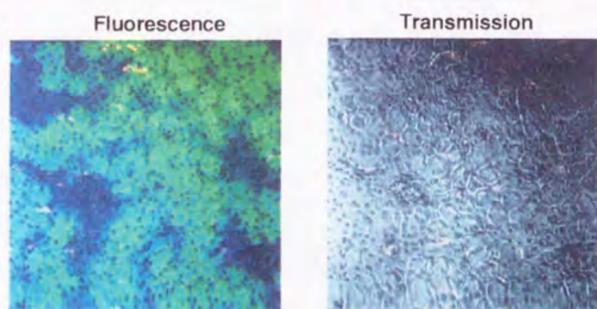


Fig.18 Histologic pictures of a kidney section from a mouse treated with poly(VP-co-DMMAn)-AAF conjugate. Frozen kidney was sectioned by cryostat. Fluorescence image (A) and transmission image (B) were taken by confocal laser scanning microscopy.

20%環無水物導入PVPの腎集積部位を特定するために、蛍光物質でラベル化した無水物導入PVPを作製し、BALB/cマウスに投与3時間後の腎臓凍結組織切片を作製した。単独の蛍光試薬やPVPホモポリマー、蛍光試薬とDMMAn導入PVPの単なる混合投与群では腎臓のどの部分にも集積していなかった。一方、DMMAn導入PVPは、投与後3時間で糸球体や遠位尿細管、および腎髄質にはほとんど集積することなく、大部分が腎臓皮質の近位尿細管上皮細胞の細胞質に集積し、かつその細胞内に取り込まれているものと予想された (近位尿細管上皮細胞は、形態学的に遠位尿細管上皮細胞と比べると、尿細管腔を形成している細胞の密度が低く、細胞のかさが高いなどの特徴を持つ)。また、同様の結果がMAn導入PVPにおいても観察され、同様の構造を持つ環無水物導入PVPは特異的に尿細管上皮細胞に集積することが明らかとなった。

これら環無水物導入PVPが腎臓の尿細管を標的としたターゲティングキャリアーとして非常に有効であることが判明したため、in vitroにおいて細胞毒性に関する検討を行い、薬物キャリアーとしての有用性を評価した (Fig.19)。環無水物導入PVPは、腎臓の尿細管に高率で集積することから、サル腎上皮細胞であるLLC-MK2を選択し、その細胞傷害性を評価した。4級アミンの高分子polybreneは、細胞との強い相互作用が知られており、高い細胞傷害性を示した。それに対して、20%DMMAn導入PVPは、10mg/mLという濃度の条件においても安全性の高いPVPと同様、全く細胞傷害性を示さなかった。しかしながら、MAn導入PVPでは、高濃度になるにつれ細胞傷害性が顕著となり、10mg/mLの濃度条件下、そのviabilityは60%に低下した。本結果より、MAn導入PVPは腎臓へ集積後の細胞傷害性が危惧された。従って、腎臓を標的とした薬物キャリアーにはDMMAn導入PVPが最も優れていることが示唆された。また、今回データには示さなかったが、in vitroにおいて長期の細胞傷害性を検討したところ、

10mg/mLの濃度で4日間DMMAn導入PVPを作用し続けても、その細胞増殖は全く阻害されることなく、細胞傷害性は観察されなかった。さらにこのDMMAn導入PVPのヒトへの応用を見据え、ヒト近位尿細管上皮細胞であるRPTECを用い、同様の検討を行ったところ、このDMMAn導入PVPはコントロールとして用いたPVPと同様に、殆ど細胞傷害性を示さないことが明らかとなった。

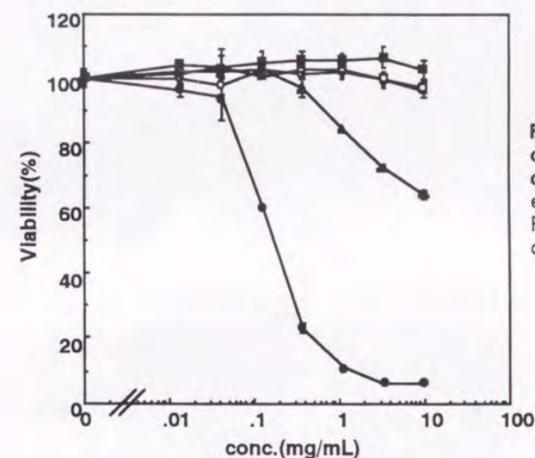


Fig.19 Cytotoxicity of various polymers on LLC-MK2 treated with various concentrations. LLC-MK2 cells were exposed to decreasing concentrations of PEG(○), PVP(□), polybrene(●), poly(VP-co-DMMAn) (■) and poly(VP-co-MAn) (▲).

これまでの検討より、DMMAn導入PVPは腎臓の尿細管に特異的に集積し、また細胞傷害性も全く観察されなかったことから、非常に安全性の高い腎臓ターゲティングキャリアーとして有用であることが明らかとなっている。しかしながら、この腎臓への集積が一過性のものであり、その後速やかに排泄されたのではその有効性は低い。そこで腎臓への集積性を経時的に観察することで、その腎滞留性を検討した。BALB/cマウスを所定の時間に脱血死させ、臓器を回収し、その集積性を評価したところ、20%DMMAn導入PVPは、BALB/cマウスに投与1時間後から非常に高い集積性を示し、投与量の約70~80%も腎臓へ選択的に移行していることが明らかとなった (Fig.20)。腎移行量における経時変化を検討したところ、マウスに投与5分後という非常に早い時間においても投与量の約30%の薬物が集積し、1~24時間後においては投与量の約70~80%、96時間後では投与量の約45%が集積しているという結果を得た (Fig.21)。また今回データには示さないが、96時間後の腎臓組織をホモジネートし、20%SDSによりタンパク質を可溶化した後、腎臓中に含まれる放射活性をゲル濾過を用いて調べたところ、99%以上が高分子の状態で存在していたことから、96時間後においても薬物は安定に修飾高分子と結合しつつ徐放化されているものと考えられた。また、腎臓中のDMMAn導入PVPの分解性を調べる目的で、SDS可溶化した腎臓組織ホモジネート溶液をゲル濾過HPLCに添加したところ、投与前のサンプルと同様の分子量分布を示したことから、DMMAn導入PVPは腎臓中で分解されず、安定に存在していることが示唆された。さらに、腎臓より排泄さ

れた尿中にDMMA<sub>n</sub>導入PVPが観察されることから、DMMA<sub>n</sub>導入PVPは、腎臓中に蓄積され続けるわけではなく、徐々に排泄されているものと考えられた。

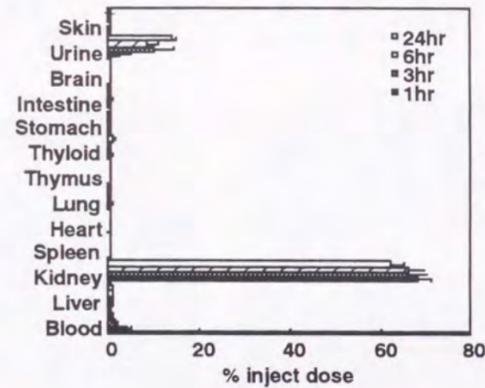


Fig.20 Tissue distribution of poly (VP-co-DMMA<sub>n</sub>) at 3 hr after i.v. injection in mice. At 3 hr after i.v. injection, mice were sacrificed and each organs were collected. The radioactivities were counted by a  $\gamma$ -counter. Mice were used in groups of five. Each value is the mean  $\pm$  S.D.

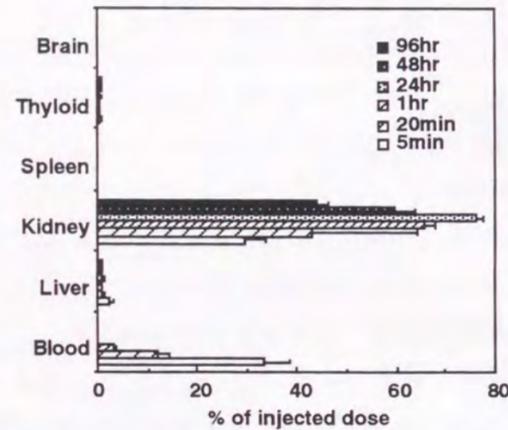


Fig.21 Retention of poly (VP-co-DMMA<sub>n</sub>) to various tissues after i.v. injection in mice. At indicated time after i.v. injection, mice were sacrificed and each organs were collected. The radioactivities were counted by a  $\gamma$ -counter. Mice were used in groups of five. Each value is the mean  $\pm$  S.D.

*in vivo*で近位尿細管上皮細胞の細胞質へ取り込まれることが示唆されたことから、次にヒト近位尿細管上皮細胞を使用して、*in vitro*でのDMMA<sub>n</sub>導入PVPの細胞質内取り込みを検討した。共焦点レーザー顕微鏡により、Z軸断面を観察した結果、確かにヒト近位尿細管上皮細胞の細胞内に取り込まれていることが判明した (Fig.22)。一方単独の蛍光試薬やPVPホモポリマー、蛍光試薬とDMMA<sub>n</sub>導入PVPの単なる混合添加群では、細胞への取り込みは全くみられなかった。また、4°Cの条件下で同様の取り込み実験を行ったところ、細胞への取り込みは観察されなかったことから (Fig.23)、能動的な取り込み機構により細胞内に取り込まれている可能性が示唆された。腎臓における高分子物質の取り込み機構として、 $\beta$ 2-ミクログロブリンなどのタンパク質を認識するレセプター依存性エンドサイトーシスが知られているが<sup>137,138)</sup>、それらと同様のアニオン性高分子を認識するレセプター分子を介した取り込み経路が存在する可能性が示唆された。また現在生体におけるアニオン性高分子の取り込み機構として、前章で述べたように肝臓などにおけるスカベンジャーレセプターを介したエンドサイトーシスが知られているが、この

DMMA<sub>n</sub>導入PVPは全く肝に移行しないことから、従来のアニオン性高分子の取り込み機構とは異なる新しい取り込み機構が存在している可能性が示唆された。

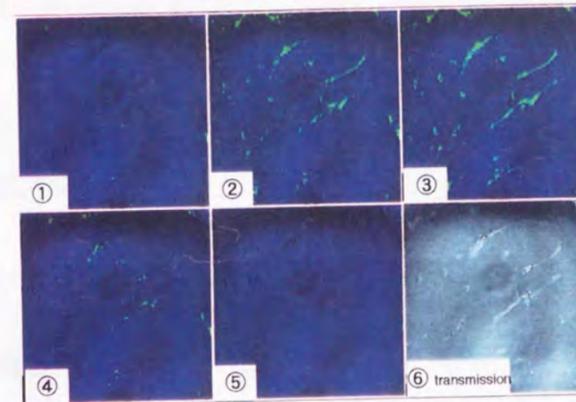


Fig.22 Polymer uptake of AAF-labeled poly (VP-co-DMMA<sub>n</sub>) on renal proximal tubular epithelial cell. Sections 1 to 5 are the images of fluorescence captured by confocal laser microscopy. Section 6 is the image of transmission.

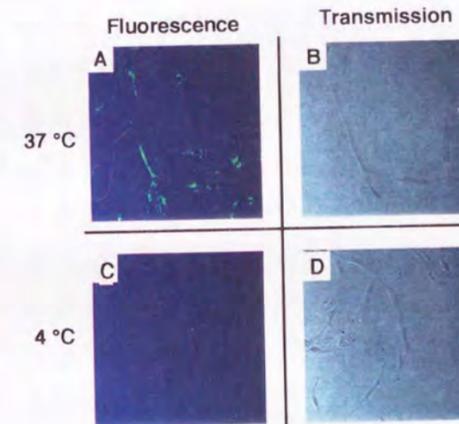


Fig.23 Polymer uptake on RPTEC incubated at 37°C and 4°C. Poly (VP-co-DMMA<sub>n</sub>) was labeled with AAF and incubated on RPTEC for 1.5hr. Fluorescence image (A and C) and transmission image (B and D) were captured by confocal laser microscopy.

#### 第五節 小括

バイオコンジュゲート薬物は、用いる修飾高分子に依存した体内挙動を示すことが明らかとなっている。従って、修飾高分子の持つ挙動特性を綿密に制御することで、薬物を選択的に標的組織へ送達することが可能であると考えられる。これまでの検討から、修飾高分子に導入する官能基の諸性質によって、任意に体内挙動を制御できる可能性が示唆されている。例えば、アルブミンとの結合により、血中滞留性が向上するスチレン-マレイン酸共重合体 (SMA) を修飾高分子として用いたバイオコンジュゲート体は、SMAの性質を反映し、高い血中滞留性が示されている。また我々独自の検討でも、アニオン性官能基であるカルボキシル基を導入したPVPは、高い腎集積性を示し、さらに長鎖脂肪酸で脂溶性の側鎖をもつラウリン酸導入PVPは、脾臓へ高率に集積することが明らかとなっている。すなわち、バイオコンジュゲーションに用いる修飾高分子を任意に選択する

ことで、バイオコンジュゲート薬物を標的組織へ思いのままに送達することが可能であると考えられる。以上の観点から、前章で示した薬物の体内挙動を時間的に制御する第二世代のバイオコンジュゲーションを更に発展させ、標的部位に選択的に薬物を送達することで、薬物の空間的制御と時間的制御を同時に可能にする、まさに理想的な第三世代のバイオコンジュゲート化DDSの確立を試みた。

前章の結果から、環無水物は生理的pH付近で結合した薬物の徐放性を有していた。この環無水物をPVPへ導入することで薬物の生体内動態を時間的に制御し得る徐放性をPVPに付与できた。さらに、これまでの我々の検討において至適量のカルボキシル基を有するアクリル酸導入PVPが高い腎移行性を示すこと、また環無水物が加水分解反応により開環することで、同様にカルボキシル基が生じることを考え併せると、至適量の環無水物をPVPへ導入することによって腎ターゲティング能をも付与できるものと考えられた。上記の観点から、最適の導入率で環無水物をラジカル共重合法によりPVPへ導入した結果、予想通り高い腎集積性を示す修飾高分子の作製に成功した。体内動態の検討において、これまでの研究により明らかとなったカルボキシル基導入PVPの体内動態と同様、多数のカルボキシル基を有する環無水物導入PVPは、腎臓の近位尿細管上皮細胞特異的に集積した。中でもDMMAAn導入PVPは、腎臓の近位尿細管にin vitroで作用させてもPVPと同様に全く細胞傷害性を示さなかったことから有用なデバイスとして期待される。DMMAAn導入PVPは、投与後5分ですでに投与量の約30%が集積し、1~24時間で投与量の約80%が、投与後96時間で約45%が滞留している事が明らかになった。従ってDMMAAn導入PVPは、投与後速やかに腎臓の近位尿細管上皮細胞へ移行し、少なくとも4日間以上は薬物を徐放化し得るものと期待できる。また、in vivoにおける毒性試験においても、20%DMMAAn導入PVPは1g/kgという投与量においてもBUNの上昇は認められず、さらに病理組織切片レベルでも、2.5g/kgの投与によって、脂肪滴や硝子変性などの病変は全く観察されなかったことから、少なくとも急性毒性は認められないことが示唆された。

腎臓へのターゲティングデバイスとして、前述したリゾチーム以外にもストレプトアビジンを用いた検討がなされてきた<sup>139)</sup>。腎臓には生体内ヒオチンが比較的多く分布しており、これらの分子を介した結合による腎ターゲティングの方法論が考えられてきた。しかしながら、これらの分子を標的とした場合でも、投与2時間後で約5%あまりが腎臓に集積し、最も高い集積が認められる投与24時間後にして、たかだか投与量の約20%が腎臓に集積するのみであり、また投与86時間後には投与量の5%前後しか滞留していない結果となっている。また他の腎ターゲティングを行った場合に関しても、投与量の数%が腎臓に集積するのみであり<sup>140)</sup>、今回合成したDMMAAn導入PVPは非常に高い腎集積性と腎滞留性を有することからも、これまでのあらゆるターゲティングキャリアーよりも有用性が高いことが示された。

このほかにも、腎臓に局在する分泌や排泄などに関わる様々なトランスポーターをターゲットとした薬物の分子設計に関する研究が行われてきた。しかしながら、実際にはそれらのトランスポーターを介した薬物の取り込み機構を利用した薬物開発は、大きく進展していない。その原因として、まず腎臓のトランスポーターの基質特異性があげられる。腎臓の近位尿細管に存在するアミノ酸トランスポーターやグルコーストランスポーターは、基質選択性が高く、その分子構造が一部でも異なると、それらのトランスポーターを介して基質となる物質を取り込まなくなる。また、有機アニオントランスポーターやカチオントランスポーターなど、比較的基質選択性の低いトランスポーターも存在するが、高分子量の分子をトランスポートするわけではなく、通常分子量約1,000以上の物は取り込まないとされている。今回示したDMMAAn導入PVPは、平均分子量が6,000の比較的大きな分子であるにもかかわらず、in vitroの検討により4℃の培養条件下で尿細管上皮細胞に取り込まれなかったことから、何らかの能動的な取り込み機構が存在するものと示唆された。さらにアニオン性修飾高分子を投与することで、取り込みが拮抗的に阻害されることから、これらアニオン性高分子の取り込み機構は同一であることが示唆された。これまで高分子の取り込み機構はエンドサイトーシスやピノサイトーシスが考えられるが、通常これらを介した腎臓への取り込みは、投与量の10%以下であることが報告されていることから、今回の結果は、新しい取り込み機構の存在を示唆するものである。また合成高分子である環無水物導入PVPが、抗体などのようなアクティブ・ターゲティングデバイスのごとく、選択的に尿細管上皮細胞に移行し、あたかも膜透過性に優れた低分子薬物のように細胞質内に導入されるということを示していることから、今後このアニオン性導入修飾高分子のさらなる取り込み機構の解明に期待したい。

一般にアニオン性高分子は、腎系球体上皮細胞スリット膜のアニオンバリアや血管内皮細胞との電氣的反発により、殆ど腎系球体濾過を受けず、血中滞留性に優れていると考えられてきた。しかしながら、本章で示したように、アニオン性高分子でも血中滞留性の上昇が認められなかったことから、分子の荷電状態のみでその体内動態は規定されないことが明らかとなった。さらに、環無水物導入PVPの体内挙動は、アニオン性高分子の体内消去機構であるスカベンジャーレセプターを介した肝取り込みを示さず、従来までの固定観念を覆す興味深い知見である。

今回作製したDMMAAn導入PVPは腎臓へ高率で集積することが明らかとなった。通常腎排泄性の薬物は、系球体濾過や再吸収経路に乗り、尿中へ排泄されるが、それらは一過性の集積を示すものの、速やかに排泄される。しかしながら、今回作製したDMMAAn導入PVPは、腎臓へ集積後、長時間にわたり滞留し、かつそこで薬物を徐放し得る機能を有している。今後、その腎臓への取り込み機構や滞留機構に関してより詳細な検討を重ねる必要があるが、少なくともDMMAAn導入PVPは、薬物キャリアーとして具備する条件の一つである標的組織への高い移行性、ならびに組織中での滞留性などの機能

を有しており、非常に有効な腎ターゲティングキャリアーとなりうることが示唆された。

以上の知見から、20%DMMA<sub>n</sub>導入PVPは、高い腎移行性・集積性を示し、さらに薬物を徐放化し得る修飾高分子であることが明らかとなった。これまで理想的なDDSを達成するために、薬物を標的組織のみに移行させ得るといった空間的な制御だけでなく、薬物の放出といった時間的な制御も同時に充たす創薬技術の開発が望まれていた。しかしながら、現実には上記の2つの条件を同時に充たす創薬技術はこれまでほとんどなく、成し遂げられてきたのは、どちらか一方の制御を目的としたものがほとんどであった。我々が生み出したこのDMMA<sub>n</sub>導入PVPは、これまで理想的なDDSを達成するために必要であった2つの条件を同時に充たしていることから、今後更なる基礎的な検討を行うことにより、第三世代のDDSを達成するための修飾高分子になりうると期待される。

## 総括

生体は、多彩な細胞群から構成され、それらがクロストークすることにより生体の恒常性を維持しつつ、生命活動を営んでいる。すなわち、複雑な有機的連関の下、体内で様々な生理活性物質が、周りの環境に応じて産生され、その生理作用を発揮している。しかしながら、外的・内的要因によってそれらの連関が崩壊し、恒常性維持システムが破綻することで、疾病の原因となる因子がたとえ局所にしか存在していなくとも、全身的にその影響がおよび、多面的な疾患症状を同時に呈することになる。その原因を追及し、治療に効果的な薬物を投与することで、その恒常性をもとあった健康な状態に戻すこと、それがすなわち薬物治療の概念である。

これまでの薬物治療は、天然物由来の生理活性物質を利用した治療が中心に行われ、疾病の原因を追及してきたと言うよりむしろ、トライアンドエラーの道であったといえる。すなわち、疾病の原因が単純であり、それに対する薬物を投与するのみで、問題となる体内恒常性の破綻が解決する場合、これまで行われてきた薬物治療はある程度有効であったといえる。しかしながら、これからの疾病治療を考えた場合、これまで行われてきた単なるトライアンドエラーだけの薬物治療のみで、今後治療すべき難治性疾患を克服し得ないことは明白である。従って、疾患の原因をより深く追求し、それに対して有効な薬物を探索・創製していくことで、これまで薬物治療が不可能であった、多くの難治性疾患を治療できるものと期待される。

一方で、近年の生命科学の目覚ましい発展と相まって、様々な難治性疾患の原因が、遺伝子の欠損や内因性生理活性物質の過不足が原因であることが明らかとなってきた現代において、疾患の原因となる生理活性物質の発現を是正し、生体内の恒常性を回復することを目的とした薬物治療戦略に期待が寄せられている。通常、生体内で発現している生理活性物質は、作用発現を期待する標的組織局所で、最適な濃度-時間パターンを維持しながらその生理作用を発現している。すなわち、それらの生理活性物質を薬物として見立てた場合、これらの薬物は、糖鎖などの修飾により十分な生体内安定性を付与された上で、選択的に標的とする臓器や細胞に、必要量だけが作用している。そうすることで、目的とする生理作用のみが選択的に発現することになり、生体はその恒常性を崩壊させることなく、薬物治療の最適化を目指した生理活性タンパク質のDDSを具現しているといえる。このような生体の巧妙な仕組みこそ我々が目指すべきDDSそのものであり、生命現象の天然様式に学んだ創薬基盤技術の根本を生体に見て取れる。従って今後、内因性生理活性物質を薬物治療に応用していくためには、生体内で起こる作用発現機構を十分に考慮したDDSの開発が重要な課題といえる。

この点、本博士論文で示したバイオコンジュゲート化DDSは、PVPという生体安全性の高い高分子を用いることにより、薬物の生体内安定性の維持、および標的組織への

選択的移行性（ターゲティング）、さらに移行した薬物の放出制御といった、第一・第二・第三世代の機能全てにわたり、一挙になし得ることが判明した。以上のシステムは生体における生理活性物質の挙動を模倣した薬物治療システムとも考えられるが、生体におけるサイトカインなどの液性因子に反応して放出する、いわゆるセンサー機能などを完全に模倣したものではなく、今後さらなる機能を付与した新規修飾高分子を模索する必要がある。

現代の医療を支え続けてきた薬物治療が、今後ますます推進されていくことは言うまでもない。今後、難治性の疾患の原因が次々と明らかになり、これらの治療を目的として、新規作用点を有する新しい薬物が探索され、それらを用いた薬物治療がなされていくだろう。これからの薬物治療を見据え、この創薬基盤技術とも言うべきバイオコンジュゲーションを、あらゆる疾患に適応できる形に最適化していくことで、これまで不治とされていた数多くの疾患に応用されていくことを期待する。

## 結論

バイオコンジュゲーションの有用性を更に向上させうる、新規バイオコンジュゲート化DDSの開発に関する検討を行い、以下の結論を得た。

1. 血中滞留性の最も高かったPVPを用い、TNF- $\alpha$ をバイオコンジュゲーションすることで、in vivoにおける抗腫瘍効果をnative体と比較して約200倍にも増強することに成功した。この抗腫瘍効果増強の原因として、PVP-TNF- $\alpha$ の高い血中滞留性が考えられた。
2. PVPへ環無水物を導入することで、nativeな薬物を徐放させる新規修飾高分子を作製した。また導入する環無水物の構造や導入率を変化させることで、薬物の徐放速度を任意にコントロールすることに成功した。
3. 環無水物であるDMMA<sub>n</sub>を至適量PVPへ導入することで、腎臓へ選択的に集積するターゲティングデバイスを開発した。このDMMA<sub>n</sub>導入PVPは投与量の70~80%が腎臓へ集積し、また細胞傷害性も観察されなかったことから、腎臓への薬物ターゲティングキャリアーとして非常に有用であることが判明した。

以上、PVPやその誘導体を用いることで、薬物の体内安定性を保持しつつ、さらに標的組織中で薬物を徐放化させるという、これまで述べてきた第一世代から第三世代への全く新しいバイオコンジュゲート化DDSを同時に実現しうることが明らかとなった。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜るのみならず、公私にわたり暖かいご配慮を賜りました恩師、大阪大学大学院薬学研究科教授、真弓忠範先生に衷心より謝意を表します。

また、本研究にあたり、種々御指導を頂きました大阪大学大学院薬学研究科助教授、中川晋作先生に深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、終始あたたかい御助言と御指導・御鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科助手、堤 康央先生に心から御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、貴重な御助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科助教授、久保一義先生に感謝いたします。

高分子の物性に関して種々御指導を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授、小林祐次先生に厚く御礼申し上げます。また高分子合成に関し、種々御便宜、御指導を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授、北 泰行先生、同助手赤井周司先生に深謝いたします。高分子の挙動特性に関し、種々御指導を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授、小林資正先生、同助手青木俊二先生に深く感謝いたします。修飾高分子の分子特性に関して、御便宜、御指導を頂きました通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所室長、平野隆先生、同研究員、角田慎一先生に厚く御礼申し上げます。また、体内動態の検討に関して、種々御便宜を頂いた神戸学院大学薬学部教授、三宅正治先生に感謝いたします。

貴重なるTNF- $\alpha$ を快く御供与いただきました林原生物科学研究所および持田製薬株式会社に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、共に協力しあい、研究の難しさと成功の喜びを分かち合った、紀平哲也修士、金田喜久博士、牟宇博士、小泉桂一博士、山本陽子修士、小平浩史修士、石川智世至修士、難波岳修士、佐藤恵子学士、松田貴久学士をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野の皆様、心から感謝いたします。

最後に在学中の経済的援助を賜りました、日本育英会ならびに日本学術振興会に感謝いたします。

## 引用文献

1. Russell CS and Clarke LA, *Clin. Genet.* (1999) **55**: 389-394
2. Knoell DL, and Yiu IM, *Am. J. Health-Sys. Pharmacol.* (1998) **55**: 899-904
3. Balkwill FR, *Eur. Cytokine Netw.* (1994) **5**: 379-385
4. Johnson RJ, *Kidney Int.* (1997) **52(Suppl.6)** : S2-S6
5. Motzer RI, Rakhit A, Schwartz LH, Olencki T, Malone TM, Sandstrom K, Nadeay R, Parmar H, and Bukowski R, *Clin. Cancer Res.* (1998) **4**:1183-1191
6. Castell JV, Geiger T, Gross V, Andus T, Walter E, Hirano T, Kishimoto T and Heinrich PC, *Eur. J. Biochem.* (1988) **177**:357-361
7. Banks RE, Patel PM and Selby PJ, *Brit. J. Cancer* (1995) **71**: 655-659
8. Hirano T, Akira S, Taga T and Kishimoto T, *Immunol Today* (1990) **11**: 443-449
9. Tsutsumi Y, Kihira T, Tsunoda S, Kubo K, Miyake M, Kanamori T, Nakagawa S, Mayumi T, *Jpn. J. Cancer Res.* (1994) **85**: 1185-1188
10. Tsutsumi Y, Tsunoda S, Kamada H, Kihira T, Nakagawa S, Kaneda Y, Kanamori T, Mayumi T, *Br. J. Cancer.* (1996) **74**: 1090-1095
11. Tsutsumi Y, Tsunoda S, Kamada H, Kihira T, Kaneda Y, Ohsugi Y, Mayumi T, *Thromb. Haemost.* (1997) **77**: 168-173
12. Tsutsumi Y, Kihira T, Yamamoto S, Kubo K, Nakagawa S, Miyake M, Horisawa Y, Kanamori T, Ikegami H, Mayumi T, *Jpn. J. Cancer Res.* (1994) **85**: 9-12
13. Tsutsumi Y, Kihira T, Tsunoda S, Kamada H, Nakagawa S, Kaneda Y, Kanamori T, Mayumi T, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1996) **278**: 1006-1011
14. Tsutsumi Y, Kihira T, Tsunoda S, Kanamori T, Nakagawa S, Mayumi T, *Br. J. Cancer.* (1995) **71**: 963-968
15. Tsutsumi Y, Tsunoda S, Kaneda Y, Kamada H, Kihira T, Nakagawa S, Yamamoto Y, Horisawa Y, Mayumi T, *Jpn. J. Cancer Res.* (1996) **87**: 1078-1085
16. Burnham NL, *Am. J. Hosp. Pharm.* (1994) **51**: 210-218
17. Mu Y, Kamada H, Kodaira H, Sato K, Tsutsumi Y, Maeda M, Kawasaki K, Nomizu M, Yamada Y, and Mayumi T, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1999) **264**: 763-767
18. Mu Y, Kamada H, Kaneda Y, Yamamoto Y, Kodaira H, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Maeda M, Kawasaki K, Nomizu M, Yamada Y, and Mayumi T, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1999) **255**: 75-79

19. Fuertges F and Abuchowski A, *J. Control. Release* (1990) **11**: 139-148
20. Nucci ML, Shorr R and Abuchowski A, *Adv. Drug Delivery Rev.* (1991) **6**:133-151
21. Francis GE, Fisher D, Delgado C, Malik F, Gardiner A, Neale D, *Int. J. Hematol.* (1998) **68**: 1-18
22. Delgado C, Francis GE, and Fisher D, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* (1992) **9**: 249-304
23. Wessel W, Schoog M and Winkler E, *Arzneim. Forsh. (Drug Res.)* (1971) **10**: 1468-1482
24. Gillette EL *Cancer Res.* (1984) **44(Suppl10)**: 4836S-4841S
25. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, and Williamson B, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1975) **72**: 3666-3670
26. Helson L, Helson C, and Green S, *Exp. Cell. Biol.* (1979) **47**: 53-60
27. Havell EA, Fiers W, and North RJ, *J. Exp. Med.* (1998) **167**: 1067-1085
28. Old LJ, *Clin. Bull.* (1976) **6**: 118-120
29. Spriggs DR, Sherman ML, Michie H, Arthur KA, Imamura K, Wilmore D, Frei III E, Kufe DW, *J. Natl. Cancer Inst.* (1988) **80**: 1039-1044
30. Blick M, Sheriwin SA, Rosenblum M and Gutterman J, *Cancer Res.* (1987) **47**: 2986-2989
31. Smith II JW, Urba WJ, Clark JW, Longo DL, Farrell M, Creekmore SP, Conlon KC, Jaffe H, and Site RG, *J. Immunother.* (1991) **10**: 355-362
32. Furman WL, Strother D, McClain K, Bell B, Leventhal B, and Pratt CB, *J. Clin. Oncol.* (1993) **11**: 2205-2210
33. Kimura K, Taguchi T, Urushizaki I, Ohno R, Abe O, Furue H, Hattori T, Ichihashi H, Inoguchi K, Majima H, Niitani H, Ota K, Saito T, Suga S, and A-TNF Cooperative Study Group, *Cancer Chemother. Pharmacol.* (1987) **20**: 223-229
34. Sherman ML, Spriggs DR, Arthur KA, Imamura K, Frei III E, and Kufe DW, *J. Clin. Oncol.* (1988) **6**: 344-350
35. Moritz T, Niederle N, Baumann J, May D, Kurschel E, Osieka R, Kempeni J, Schlick E, and Schmidt CG, *Cancer Immunol. Immunother.* (1989) **29**: 144-150
36. Rosenberg SA, *JAMA* (1992) **4**: 2416-2419
37. Creaven PJ, Plager JE, Dupere S, Huben RP, Takita H, Mittelman A and Proefrock A, *Cancer Chemother. Pharmacol.* (1987) **20**: 137-144
38. Schmid EF, Binder K, Grell M, Scheurich P, and Pfizenmaier K, *Blood* (1995) **86**:

- 1836-1841
39. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, Mann DL, *Circulation* (1995) **92**: 1487-1493
40. Pfreundschuh MG, Steinmetz HT, Tuschen R, Schenk V, Diehl V and Schaadt M, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* (1989) **25**: 379-388
41. van der Schelling GP, Ijzermans JNM, Kok TC, Scheringa M, Marquet RM, Splinter TAR and Jeekel J, *Eur. J. Cancer* (1992) **28A**: 1073-1078
42. Ruggiero V, Latham K, and Baglioni C, *J. Immunol* (1987) **138**: 2700-2717
43. Wright SC, Kumar P, Tam AW, Shen N, Varma M, and Larrick JW, *J. Cell. Biol.* (1994) **48**: 344-355
44. Nobuhara M, Kanamori T, Ashida Y, Ogino H, Hirosawa Y, Nakayama K, Asami T, Iketani M, Noda K, Andho S, and Kurimoto M, *Jpn. J. Cancer Res.* (1987) **78**: 193-201
45. Ostrove JM and Gifford GE, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1979) **160**: 354-358
46. Asami T, Imai M, Tanaka Y, Hosaka Y, Kato K, Nakamura N, Horisawa Y, Ashida Y, Kanamori T, Nobuhara M and Kurimoto M, *Jpn. J. Cancer Res.* (1989) **80**: 1161-1164
47. Shimomura K, Manda T, Mukumoto S, Kobayashi K, Kazuo N and Mori J, *Int. J. Cancer* (1988) **41**: 243-247
48. Watanabe N, Niitsu Y, Umeno H, Kuriyama H, Neda H, Yamauchi N, Maeda M, and Urushizaki I, *Cancer Res.* (1988) **48**: 2179-2183
49. Rink L and Kirchner H, *Int. Arch. Allergy Immunol.* (1996) **111**: 199-209
50. Havell EA, Fiers W, and North RJ, *J. Exp. Med.* (1988) **167**: 1067-1085
51. Umeno H, Watanabe N, Yamauchi N, Tsuji N, Okamoto T and Niitsu Y, *Jpn. J. Cancer Res.* (1994) **85**: 325-330
52. Wheatney EM, McKeown-Longo PJ, Vincent PA, Saba TM, *Am. J. Physiol.* (1993) **9**: L148-L157
53. Suzuki S, Ohta S, Takashio K, Nitani H, Hashimoto Y, *Int. J. Cancer* (1990) **46**: 1095-1100
54. Matsumura Y and Maeda H, *Cancer Res.* (1986) **46**: 6387-6392
55. Maeda H, *Adv. Drug Delivery Rev.* (1991) **6**: 181-202
56. Matsumura Y, Oda T and Maeda H, *癌と化学療法* (1987) **14**: 821-829
57. Leist M, Gantner F, Jilg S, and Wendel A, *J. Immunol.* (1995) **154**: 1307-1316

58. Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Germann PG, Tiegs G, and Wendel A, *J. Immunol.* (1994) **153**: 1778-1788
59. Yamazaki S, Onishi E, Enami K, Natori K, Kohase M, Sakamoto H, Tanouchi M and Hayashi H, *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* (1986) **39**: 105-118
60. Jones EY, Stuart DI & Walker NPC, *Nature* (1989) **338**: 225-228
61. Van Ostade X, Tavernier J, Prange T and Fiers W, *EMBO J.* (1991) **10**: 827-836
62. Yamagishi J, Kawashima H, Matsuo N, Ohue M, Yamayoshi M, Fukui T, Kotani H, Furuta R, Nakano K and Yamada M, *Protein Engineer.* (1990) **3**: 713-719
63. Soma G, Kitahara N, Tsuji Y, Kato M, Oshima H, Gatanaga T, Inagawa H, Noguchi K, Tanabe Y, and Mizuno D, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1987) **148**: 629-635
64. Haranaka K, Satomi N and Sakurai A, *Int. J. Cancer* (1984) **345**: 263-267
65. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, and Jain RK, *Cancer Res.* (1995) **55**: 3752-3756
66. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, and Jain RK, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) **95**: 4607-4612
67. Jain RK, *Adv. Drug Delivery Res.* (1997) **26**: 71-90
68. Manda T, Shimomura K, Mukumoto S, Kobayashi K, Mizota T, Hirai O, Matsumoto S, Oku T, Nishigaki F, Mori J. et al., *Cancer Res.* (1987) **47**: 3703-11
69. Utoguchi N, Mizuguchi H, Saeki K, Ikeda K, Nakagawa S, Mayumi T, *Int. J. Microcirc.* (1996) **16**: 105-110
70. Utoguchi N, Mizuguchi H, Saeki K, Ikeda K, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Mayumi T, *Cancer Lett.* (1995) **89**: 7-14
71. Van Ostade X, Vandenaabeele P, Everaerd B, Loestscher H, Gentz R, Brockhaus M, Lesslauer W, Tavernier J, Brouckaert P & Fiers W, *Nature* (1993) **361**: 266-269
72. Saga T, Neumann RD, Heya T, Sato J, Kinuya S, Paik CH, and Weinstein JN, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) **92**: 8999-9003
73. Martiny-Baron G and Marme D, *Curr. Opin. Biotech.* (1995) **6**: 675-680
74. Borgstrom P, Hillan KJ, Sriramarao P, and Ferrara N, *Cancer Res.* (1996) **56**: 4032-4039
75. Pasqualini R, Rouslahti E, *Nature* (1996) **380**: 364-366
76. Koivunen E, Arap W, Valtanen H, Rainisalo A, Medina P, Heikkila P, Kantor C, Gahmberg CG, Salo T, Konttinen YT, Sorsa T, Ruoslahti E, and Pasqualini R, *Nat.*

- Biotech.* (1999) **17**: 768-774
77. Folkman J, *Nat. Biotech* (1999) **17**: 749
78. Moro M, Pelagi M, Fulci G, Paganelli G, Dellabona P, Casorati G, Siccardi AG, and Corti A, *Cancer Res.* (1997) **57**: 1922-1928
79. Low KB, Ittensohn M, Le T, Platt J, Sodi S, Amoss M, Ash O, Carmichael E, Chakraborty A, Fischer J, Lin SL, Luo X, Miller SI, Zheng L, King I, Pawelek JM, and Bermudes D, *Nat. Biotech.* (1999) **17**: 37-40
80. Pawelek JM, Low KB, and Bermudes D, *Cancer Res.* (1997) **57**: 4537-4544
81. Brown MS, Basu SK, Falck JR, Ho YK, and Goldstein JL, *J. Supramol. Struct.* (1980) **13**: 67-81
82. Epenetos AA, Snook D, Durbin H, Johnson PM, and Taylor-Papadimitriou J, *Cancer Res.* (1986) **46**: 3183-3191
83. Chen C, Parabgi S, Tolentino MJ, and Folkman J, *Cancer Res.* (1995) **55**: 4230-4233
84. Folkman J, *Adv. Cancer Res.* (1985) **43**: 175-202
85. Brem H and Folkman J, *J. Pediat. Surg.* (1993) **28**: 445-451
86. Shibuya M, *Adv. Cancer Res.* (1995) **67**: 281-316
87. Zetter BR, *Annl. Rev. Med.* (1998) **49**: 107-424
88. Ostrove JM, Gifford GE, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1979) **160**: 354-
89. Lienard D, Ewalenko P, Delmotte JJ, Renard N, and Lejeune FJ, *J. Clin. Oncol.* (1992) **10**: 52-60
90. Yilmaz A, Bieler G, Spertini O, Lejeune FJ, and Ruegg C, *Int. J. Cancer* (1998) **77**: 592-599
91. Cheresch DA, *Nat. Med.* (1998) **4**: 395-396
92. Ruegg C, Yilmaz A, Bieler G, Bamat J, Chaubert P, and Lejeune FJ, *Nat. Med.* (1998) **4**: 408-414
93. Breslow DS, Edwards EI, Newburg NR, *Nature* (1973) **246**: 160-162
94. Santoni A, Puccetti P, Riccardi C, Herberman RB, and Bonmasser E, *Int. J. Cancer* (1979) **24**: 656-661
95. Harmel, Jr. RP, and Zbar B, *J. Natl. Cancer. Inst.* (1975) **54**: 989-992
96. Rinehart JJ, Young DC, and Neidhart JA, *Cancer Res.* (1983) **43**: 2358-2362
97. Hirano T, Todoroki T, Kato S, Yamamoto H, Caliceti P, Veronese F, Maeda H and Ohashi S, *J. Controlled Release* (1994) **28**: 203-209

98. Oda T, Akaie T, Hamamoto T, Suzuki F, Hirano T, Maeda H, *Science* (1989) **244**: 974-976
99. Hirano T, Ohashi S, Morimoto S, Tsuda K, Kobayashi T, Tsukagoshi S, *Macromol. Chem.* (1986) **187**: 2815-2824
100. Yamamoto H, Miki T, Oda T, Hirano T, Sera Y, Akagi M, and Maeda H, *Eur. J. Cancer* (1990) **26**: 253-260
101. Kaneda Y, Yamamoto Y, Tsunoda S, Kamada H, Tsutsumi Y, Hirano T, Mayumi T, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1997) **239**: 160-165
102. Kaneda Y, Yamamoto Y, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Hirano T, Mayumi T, *Cancer Res.* (1998) **58**: 290-295
103. Ruggiero V, Latham K, and Baglioni C, *J. Immunol.* (1987) **138**: 2700-2717
104. Seymour LW, Ulbrich K, Steyger PS, Brereton M, Subr V, Strohalm J & Duncan R, *Br. J. Cancer* (1994) **70**: 636-641
105. Seymour LW, Ulbrich K, Wedge SR, Hume IC, Strohalm J & Duncan R, *Br. J. Cancer* (1991) **63**: 859-866
106. Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Ekimoto H, Shibazaki C, and Kataoka K, *Cancer Res.* (1991) **51**: 3229-3236
107. Seymour LW, Ulbrich K, Strohalm J, Kopecek J and Duncan R, *Biochem. Pharmacol.* (1990) **39**: 1125-1131
108. Vandorpe J, Schacht E, Dunn S, Hawley A, Stolnik S, Davis SS, Garnett MC, Davies MC and Illum L, *Biomaterials* (1997) **18**: 1147-1152
109. Duncan R, Seymour LC, Scarlett L, Lloyd JB, Rejmannova P and Kopecek J, *Biomed. Biochem. Acta* (1986) **880**: 62-71
110. Yokoyama M, Sugiyama T, Okano T, Sakurai Y, Naito M, and Kataoka K, *Pharm. Res.* (1993) **10**: 895-899
111. Coukell AJ and Spencer CM, *Drugs* (1997) **53**:520-538
112. Yokoyama M, Okano T, *Adv. Drug Delivery Rev.* (1996) **21**: 77-80
113. Kaliman P, Ermăcora MR, Nowicki C, Todel CW and Santome JA, *Int. J. Peptide Protein Res.* (1991) **38**: 38-46
114. Butler PJG, Harris JI, Hartley BS and Leberman R, *Biochem. J.* (1967) **103**: 78P-79P
115. Butler PJG, Harris JI, Hartley BS and Leberman R, *Biochem. J.* (1969) **112**: 379-389
116. Tsunoda S, Ishikawa T, Yamamoto Y, Kamada H, Koizumi K, Matsui J, Tsutsumi Y, Hirano T, Mayumi T, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1999) **290**: 368-372
117. Simionescu N, *Physiol. Rev.* (1983) **63**: 1536-1579
118. Takakura Y, Takagi A, Hashida M, and Sezaki H, *Pharm. Res.* (1987) **4**: 293-300
119. Jansen RW, Molema G, Ching TL, Oosting R, Harms G, Moolenaar F, Hardonk MJ, and Meijer DF, *J. Biol. Chem.* (1991) **266**: 3343-3348
120. Shnyra A and Lindberg AA, *Infect. Immun.* (1995) **63**: 865-873
121. Brown MS, Basu SK, Falck JR, Ho YK, and Goldstein JL, *J. Supramol. Struct.* (1980) **13**: 67-81
122. Dresel HA, Frierich E, Via DP, Sinn H, Ziegler R and Schettler G, *EMBO J.* (1987) **6**: 319-326
123. Basu SK, Goldstein JL, Anderson RGW, and Brown MS, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1976) **73**: 3178-3182
124. Sparrow CP, Parthasarathy S, and Steinberg D, *J. Biol. Chem.* (1989) **264**: 2599-2604
125. Arai H, Kita T, Yokobe M, Narumiya S, and Kawai C, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1989) **159**: 1375-1382
126. Hampton RY, Golenbock DT, Penman M, Krieger M & Raetz CRH, *Nature* (1991) **352**: 342-344
127. Wike-Hooley JL, Haveman J and Reinhold HS, *Radiother. Oncol.* (1984) **2**: 343-366
128. Ziyadeh FN and Goldfarb S, *Kidney Int.* (1991) **39**: 464-475
129. Makker SP, *Am. J. Med.* (1980) **69**: 949-952
130. Suzuki K, Susaki H, Okuno S and Sugiyama Y, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1999) **288**: 57-64
131. Suzuki K, Ando T, Susaki H, Mimori K, Nakabayashi S, and Sugiyama Y, *Pharm. Res.* (1999) **16**: 1026-1034
132. Suzuki K, Sasaki H, Okuno S, Yamada H, Watanabe HK and Sugiyama Y, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1999) **288**: 888-897
133. Susaki H, Suzuki K, Ikeda M, Yamada H, and Watanabe HK, *Chem. Pharm. Bull.* (1994) **42**: 2090-2096
134. Franssen EJJ, Koiter J, Kuipers CAM, Bruins AP, Moolenaar F, de Zeeuw D, Krizinga WH, Kellogg RH, and Meijer DKF, *J. Med. Chem.* (1992) **35**: 1246-1259

135. Franssen EJJ, Moolenaar F, de Zeeuw D, and Meijer DKF, *Pharm. Res.* (1993) **10**: 963-969
136. Franssen EJJ, van Amsterdam RGM, Visser J, Moolenaar F, de Zeeuw D, and Meijer DKF, *Pharm. Res.* (1991) **8**: 1223-1231
137. Okamoto CT, *Adv. Drug Delivery. Rev.* (1998) **29**: 215-228
138. Monsigny M, Roche AC, Midoux P, Mayer R, *Adv. Drug. Delivery Rev.* (1994) **14**: 1-24
139. Schechter B, Arnon R, Colas C, Burakova T, and Wilchek M, *Kidney Int.* (1995) **47**: 1327-1335
140. Schiller A, Reb G, and Taugner R, *Arzneim. Forsch.* (1978) **28**: 2064-2070

