

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

研究課題：がん診断・治療両用高分子  
ミセルターゲティングシステム

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横山 昌幸

平成19（2007）年4月

## 目 次

## I. 総括研究報告

がん診断・治療両用高分子ミセルターゲティングシステム-----	1
横山昌幸	

## II. 分担研究報告

1, カンプトテシン封入高分子ミセルへの新規葉酸修飾法の検討-----	14
米谷芳枝	
2, レチノイン酸封入ミセル評価解析-----	18
川上茂	
3, 高分子ミセルの生体有害性と腫瘍標的化の検証-----	21
川口隆憲	
4, 高分子ミセルの腫瘍組織内移行の解析-----	26
堀勝義	
5, 高分子ミセル抗がん剤のトランスレーショナルリサーチ-----	29
濱口哲弥	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	33
--------------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
総括研究報告書

がん診断・治療両用高分子ミセルターゲティングシステム

主任研究者 横山昌幸 （財）神奈川科学技術アカデミー・プロジェクトリーダー

研究要旨 疎水性の抗がん剤を安定・高収率で内包する高分子の設計法を構築し、がんへのターゲティングを達成する。今年度は、高分子ミセルを形成する高分子合成法が確立し、3種の薬物についてミセルに安定に封入し、がんターゲティングあるいは優れた抗がん活性を得た。また、基礎的側面では、キャリアー自体の毒性を解析し、がん浸透挙動のウインドウチャンバー法による直接観察が可能となった。さらに、MRI造影剤システムでは、T1緩和能に及ぼす高分子構造の影響を解析した。

分担研究者

- ・ 米谷芳枝  
星薬科大学 医薬品化学研究所
- ・ 川上茂  
京都大学大学院 薬学研究科
- ・ 川口隆憲  
福島県立医科大学病理学第2講座
- ・ 堀勝義  
東北大学 加齢医学研究所
- ・ 濱口哲弥  
国立がんセンター中央病院

A. 研究目的

高分子ミセルドラッグキャリアーシステムは図1に示すように、合成高分子が数百分子会合しその内核に疎水性薬物を保持し、標的部位に選択性高く運搬することで、飛躍的に薬効を高め、副作用を減少させることができる。特に10～100nmの直径の極めて小さなナノサイズでありながら、多量の疎水性薬物を安定に封入できることで、EPR効果（固形がん組織血管の透過性が亢進している性質）を利用して固形がんターゲットングできることが大きな特長である。

既に、抗がん剤アドリアマイシン、タキソール内包高分子ミセルで、がん組織への選択性高い集積が得られ、ヒトでの

臨床試験が進行中である。

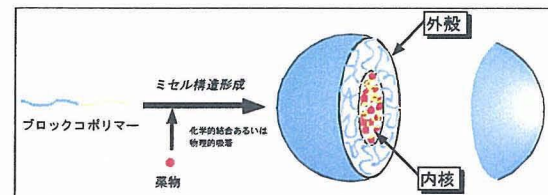


図1 高分子ミセル薬物キャリアーシステム

本研究の目的は、薬物ターゲティングによりがん化学療法の有効性を飛躍的に高めるとともに、微小がんを検出できるMRIシステム開発にある。具体的な目標は、

- (1) 高分子ミセルによる非水溶性抗がん剤の固形がんターゲットングシステム確立
- (2) 分子標的薬と分化誘導剤封入高分子ミセルによる新規化学療法創出
- (3) 微小がんを検出する高分子ミセルMRI造影剤の開発 である。

3年計画の1年目である平成18年度は、各種方法・解析法の確立に重点を置く。すなわち、薬物の封入法、MRI画像解析法、高分子ミセルの病理解析・がん組織内分布解析法、抗がん剤・分化誘導剤の抗がん活性効果解析法である。本年度の具体的成果は以下の通りである。

- (1) 高分子ミセルを形成する高分子

合成法が確立した。

(2) カンプトテシンとレチノイン酸封入ミセルでがんへのターゲティングが実証された。

(3) 葉酸修飾によるアクティブターゲティング型高分子ミセルが作製された

(4) 分化誘導剤4-HPR封入ミセルを作製した。

(5) MR I造影剤で高分子組成とT1緩和能の関係を明らかにした。

(6) 高分子ミセルの大量投与によっても、正常組織に病理的変化が認められないことが確認された。

(7) ウインドウチャンバー法によるがんへのミセル集積挙動の解析法の確立

以上のうち、(3)、(4)、(6)、(7)と(2)の一部の結果は分担研究報告書に得られた結果を記す。本総括研究書では下線の(1)と(5)の内容と、(2)の一部の内容を記す。

## B. 研究方法

### (1) ブロックコポリマーの合成

高分子ミセルを形成するブロックコポリマーとしてポリエチレングリコール-ポリ(β-ベンジル L-アスパルテート)ブロックコポリマーを基とし、それを加水分解してポリエチレングリコール-ポリ(アスパラギン酸)とし、それにエステル形成にて疎水基をアスパラギン酸残基に導入したものである。

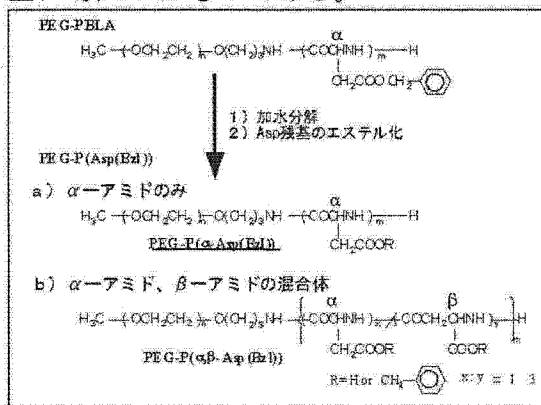


図2 ブロックコポリマーの構造

通常は加水分解をアルカリで行うために、生成したアスパラギン酸残基はその70%程度がβ-アミドとなっている。今回はこれとは別に酸加水分解によってα-アミドが100%保たれたブロックコポリマーを得た。それらに対して主にベンジルエステルをハライド化合物の求核置換反応によって40-80mol%導入したブロックコポリマーを得た。コポリマーの呼び方は、例えばベンジルエステルを70%導入したものをPEG-P(Asp(bzl 70))と表す。アスパラギン酸残基のアミドのタイプを区別するときにはPEG-P(α-Asp(bzl 70))やPEG-P(α, β-Asp(bzl 70))等と表す。今回用いたものはいずれも、PEGの分子量が5,000、アスパラギン酸のユニット数が23-27のものを用いた。

### (2) カンプトテシン封入挙動とポリマー構造との相関解析

カンプトテシン(CPT)とブロックコポリマーをCHCl3に溶かし、溶媒を蒸発させてから、蒸留水を入れて超音波照射をして高分子ミセルを得た。遠心分離、濾過後にCPTの封入量をUV吸収で、ミセル封入安定性を水系のGPCで評価した。

蛍光プローブによるミセル内核の物性評価をピレンとジピレンを用いて行った。規定量の蛍光プローブを高分子ミセルに内包させ、ピレンの場合は励起スペクトルにおけるI339/I334比により内核の疎水性度を、ジピレンの場合にはI480/I398比によって内核流動性の評価を行った。

### (3) レチノイン酸封入高分子ミセルの作製と評価

レチノイン酸のミセル封入は前項カンプトテシンの場合と同様に行った。すなわち、レチノイン酸とブロックコポリマーをCHCl3に溶かし、溶媒を蒸発させて

から、蒸留水を入れて超音波照射をして高分子ミセルを得た。

抗がん活性はCDF1 マウスにマウス大腸癌細胞 CT26 を移植したモデルを用い、移植後3日目から1日おきに5回静脈内投与し、癌体積の変化と生存日数を測定した。

#### (4) MRI 造影剤用高分子の合成と T1 緩和能測定

MRI 造影能を有する Gd (ガドリニウム) イオンを結合したブロックコポリマーを2種類合成した。アスパラギン酸をベースとしたものと、リシンをベースとしたものの2種類である。

アスパラギン酸をベースとしたものはポリエチレングリコール-ポリ(β-ベンジル L-アスパルテート) ブロックコポリマー (PEG-PBLA) をアルカリ加水分解し、ポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸 (PEG-P(Asp)) へと変換させた。アスパラギン酸残基に1級アミノ基をエチレン鎖を介して導入し、続いて活性エステル化された DTPA 誘導体を反応させ、キレート基である DTPA 基を導入した。最後に塩化ガドリニウムを反応させ造影機能を有するポリマーを得た。

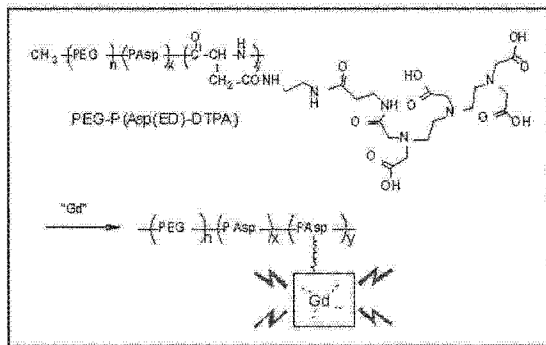


図3 アスパラギン酸系のMRI造影剤用ブロックコポリマー

もう一つのリシンを用いたものは、図

4に示すように、Z保護基をつけたアミノ酸無水物を片末端アミノ基のポリエチレングリコールから重合させた後、Z基を脱保護してポリエチレングリコール-ポリ(L-リシン) ブロックコポリマー (PEG-P(L-Lys)) を得た。これに、キレート基であるDOTAの活性エステルを反応させることによりPEG-P(L-Lys(DOTA))を得た。これに塩化ガドリニウムを反応させ造影機能を有するポリマーを得た。

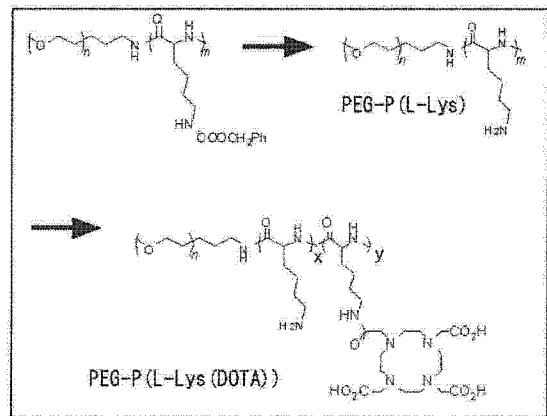


図4 リシン系のMRI造影剤用ブロックコポリマー

ブロックコポリマーの組成は400MHzの<sup>1</sup>H-NMR装置によって求めた。結合したGd量はICP (Induced Coupled Plasma) 測定装置によって定量した。

T1短縮能を表すパラメーターとして以下の式に示すR1を求めた。

$$(1/T_1)_{obs} = (1/T_1)_t + R_1 \cdot [Gd]$$

R1が大きい程、T1緩和能が高いこととなる。測定は400MHz Varian Inova400測定装置で行った。

高分子ミセルを作製するときは、NaCl存在下、(PEG-P(Asp-(Gd-DTPA)))中の負電荷に対し、ポリアリルアミンまたはプロタミンのポリカチオンを混合し、蒸留水に対して透析して高分子ミセルを得た。

### C. 研究結果

#### (1) ブロックコポリマーの合成

従来は、DBUによってアスパラギン酸残基のカルボキシル基を活性化し、ハライド化合物への求核置換反応によって、疎水性基をエステルとしてアスパラギン酸側鎖に導入する反応では、ベンジル基の場合は70%位が最大値として得られるが、ブチル基やノニル基などの単純なアシル鎖の場合には高い置換率のものが得られない欠点があった。この点の改良を試みたところ、1) 反応性の高いヨウ化物を用いること、2) 触媒として用いるDBU試薬の量を厳密に制御し、アスパラギン酸残基を超えないようにする。この2点の工夫を加えることで任意のアシル基でも70%程度の置換率を得ることが可能となった。表1に示すように、ベンジル基の場合には臭化物でDBUを1等量より多くても高いエステル化率を与えるが、run 2、3に示すようなヘプチル基の場合には30%程度と低エステル化率にとどまる。しかし上記の2項目を満たしたrun 4では63%と高いエステル化率を得ることができた。他のペンチルやノニルの場合にも高いエステル化率が得られることがわかった。

表1 アスパラギン酸側鎖へのエステル導入

run	疎水基	ハロゲン種	ハロゲン種の等量 <sup>1)</sup>	DBUの等量 <sup>1)</sup>	エステル化率
1	ベンジル	Br	2.0	2.0	74%
2	ヘプチル	Br	2.0	2.0	29%
3	ヘプチル	I	2.0	2.0	33%
4	ヘプチル	I	1.0	1.0	63%
5	ペンチル	I	1.5	1.0	75%
6	ノニル	I	1.5	1.0	84%

1) アスパラギン酸残基に対して

今回の成果によって、合成できる疎水性高分子鎖構造の範囲が大きく拡大したことになり、今後この研究班において薬物等の封入を最適化することが容易になったことを意味する。

#### (2) カンプトテシン封入挙動とポリマー構造との相関解析 (星薬科大学 米谷分担研究者との共同課題)

図5にCPT封入高分子ミセルのCPT封入安定性の結果を示す。

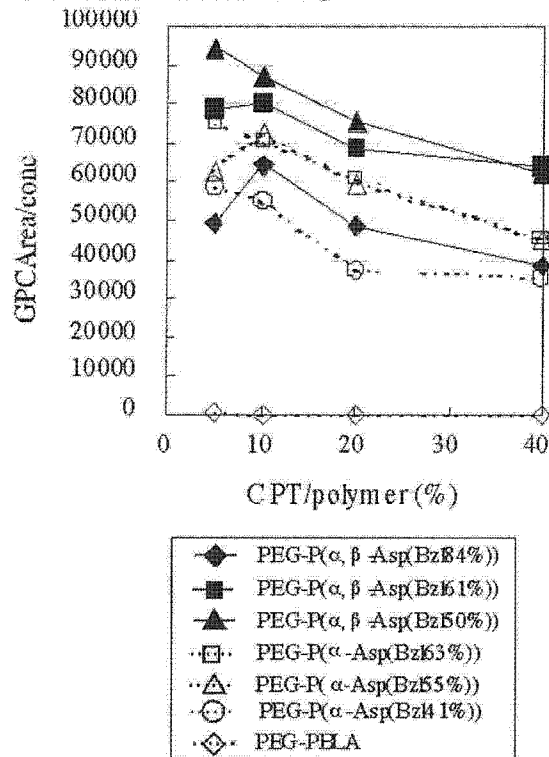


図5 カンプトテシン封入安定性及び疎水性鎖構造の影響

GPCのミセル分画に出る封入CPTの面積をCPT濃度で割った比が大きいほど封入安定性が高いとした。アスパラギン酸残基のアミドがα体みのPEG-P(α-Asp(bzl))とα体とβ体の混合物であるPEG-P(α, β-Asp(bzl))の両系列のブロックコポリマーにおいてベンジル化率60-70%で封入安定性は最大になる。特にα体みのPEG-P(α-Asp(bzl))ではベンジル化率が100%のPEG-PBLAとなると封入安定性が急激に失われる。ベンジル化率は疎水性高分子鎖の疎水性の強さに関連する。ベンジル化率が高いほど疎水性が強くなる。

また、 $\alpha$  体みの PEG-P( $\alpha$ -Asp(bzl)) と  $\alpha$  体と  $\beta$  体の混合物である PEG-P( $\alpha$ ,  $\beta$ -Asp(bzl)) を比較すると、混合物のコポリマーの方が封入安定性が高いことがわかる。混合物の 50% と 61% ベンジル化のものは、 $\alpha$  体の 55% と 63% の両者よりも安定性が高い。ポリマーに対するカンプトテシンの割合を 10% に固定して比較したものが図 6 である。

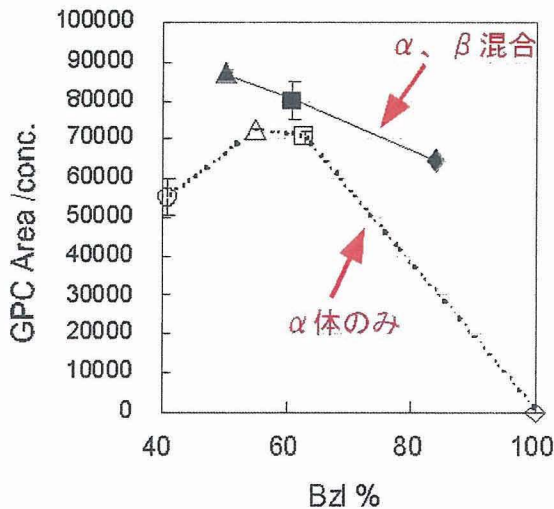


図 6 GPT/ポリマー重量比を10%に固定した場合のGPT封入安定性

実線で結んだ $\alpha$ -アミド+ $\beta$ -アミド混合ブロックコポリマーの場合の方が封入安定性が高いことが明確にわかる。異性体は疎水性などの物性が同一であるので、この現象は興味深く、また薬物封入を最適化するための高分子設計にとって重要な事柄である。また、一般に高分子マトリクスの疎水性は薬物封入安定性を決める重要な因子であるので、この結果で薬物封入安定性が疎水性のみでは決定されなかったことは大変興味深い。

以上の結果から、疎水性以外の要因が安定なCPT封入安定化に寄与していることが明らかになったので、その要因が何であるかを求めるための実験を行った。

表 2 に蛍光プローブのピレンとジピレンによるミセル内核の疎水性の高さと流

動性評価の結果をまとめる。ピレンの I339/I334 比が大きいほど内核の疎水性が高く、ジピレンの I480/I398 比が大きいほ

表 2 ミセル内核物性の比較

ポリマー	ピレンの I339/I334	ジピレンの I480/I398
PEG-P( $\alpha$ , $\beta$ -Asp(Bzl84%))	1.7	0.10
PEG-P( $\alpha$ , $\beta$ -Asp(Bzl61%))	1.6	0.11
PEG-P( $\alpha$ , $\beta$ -Asp(Bzl50%))	1.7	0.10
PEG-PBLA (=PEG-P( $\alpha$ -Asp(Bzl100%))	2.0	0.04
PEG-P( $\alpha$ -Asp(Bzl63%))	1.7	0.41
PEG-P( $\alpha$ -Asp(Bzl55%))	1.6	0.23
PEG-P( $\alpha$ -Asp(Bzl41%))	1.6	0.22

ど内核流動性が高いことを示す。

まず、内核の疎水性度では PEG-P( $\alpha$ -Asp(Bzl100%)) に対応する PEG-PBLA のみ他より高い値を示したが、その他のポリマーはいずれも 1.6-1.7 の同様の値を示した。これは、少量の蛍光プローブが疎水性のベンジル基が会合して集中している局所環境を検出していて、内核全体を検出していないためと考えられる。これに対して、ジピレンを用いた流動性評価では、PEG-PBLA が 0.04 と最も低い値を示し、流動性の低い内核環境を示した。次に低い値は $\alpha$ -アミド+ $\beta$ -アミド混合ブロックコポリマーで 0.10-0.11 が観察された。これに対し、PEG-

PBLA 以外の $\alpha$ 体ポリマーでは 0.22-0.41 という値で流動性の高い内核を有することがわかった。以上からCPTの安定封入性の高かった PEG-P( $\alpha$ ,  $\beta$ -Asp(bzl50%)) や PEG-P( $\alpha$ ,  $\beta$ -Asp(bzl61%)) は疎水性の高さと流動性のバランスが良かったためと考えることができる。また、 $\beta$ -アミドは $\alpha$ -アミドに比べて1原子分だけ主鎖部分が長い。よって、疎水性ベンジル基で疎水性のCPT分子を挟み込むのに立体的に好適出ることが封入安定性に寄与している可能性もある。

蛍光プローブの解析では、CPT封入安定化に寄与している要因を明らかにできなかったが、疎水性の強さのみでは封入安定性が規定されていないことは確認され、疎水性高分子構造の精密な設計がターゲティングを成功させるには重要内事柄であることは再確認された。

### (3) レチノイン酸封入高分子ミセルの作製と評価 (京都大学川上分担研究者との共同課題)

レチノイン酸封入に用いたブロックコポリマーは PEG-P( $\alpha$ ,  $\beta$ -Asp (bz169%)) である。アスパラギン酸ユニット数は 27 である。レチノイン酸はポリマーに対して 10wt.% で仕込み、エバポレーション法で封入したものをを用いた。投与量は 0.60mg ATRA/kg とし、対照としては従来投与方法である HCO-60 に 5% 濃度で分散させたものをを用いた。図 7 に血中濃度を示す。低分子界面活性剤の HCO-60 分散させたもの (○) に比べて、高分子ミセル封入によって高い血中濃度が達成されているのがわかる。

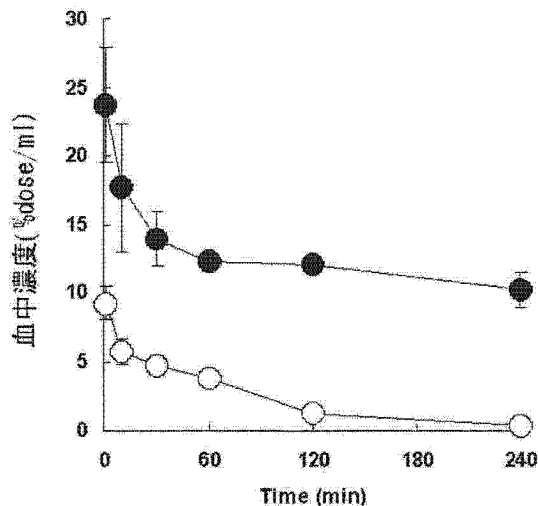


図 7 高分子ミセル封入による血中濃度変化  
● : 高分子ミセル封入, ○ : HCO-60可溶化

図 8 には、48 時間までの血液中濃度

と、CT26 がん、肝臓の濃度を示した。

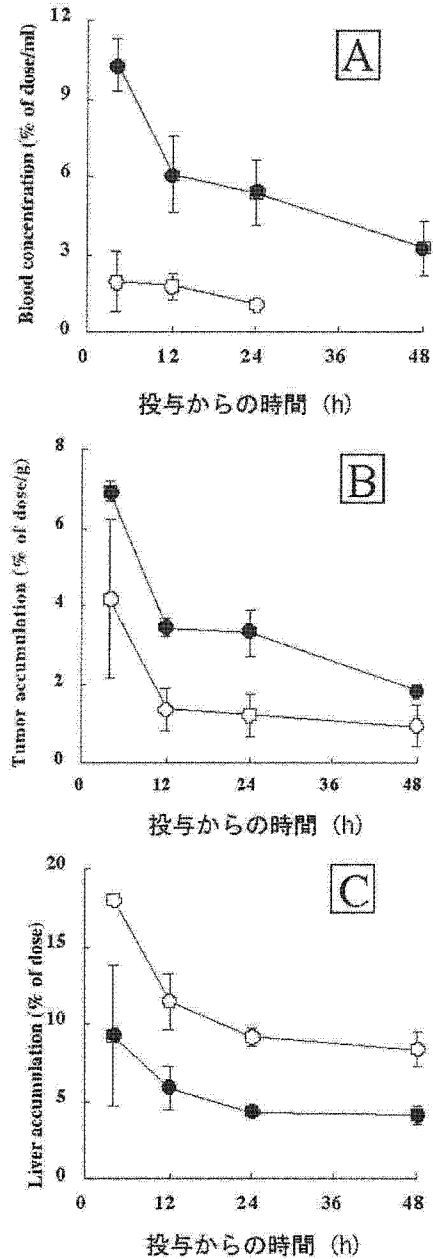


図 8 レチノイン酸封入ミセル体内動態・分布

A: 血液, B: CT26がん, C: 肝臓

● : 高分子ミセル封入, ○ : HCO-60可溶化

HCO-60 分散液に比べて、高分子ミセル封入物は血液濃度が高く、肝臓集積量は少ない。すなわち、固形がんへの EPR 効果によるパッシブターゲティングには好適な挙動を示している。図 8 B に示すよ



うに、CT26への集積もミセル封入によって顕著に高まった。しかし、その時間変化では当予後4時間から癌中濃度は減少しており、典型的なEPR効果とは挙動が異なっている。まだ、封入安定化を高める余地があることを示している。

図9と図10に抗がん活性評価の結果を示す。

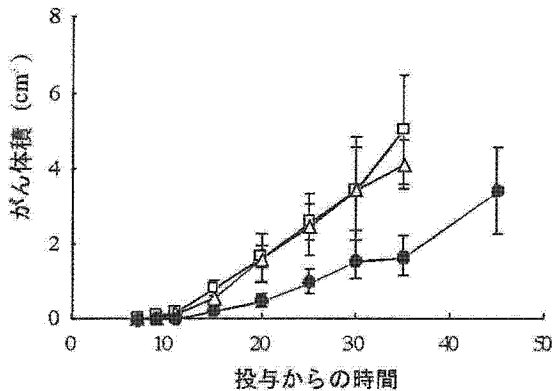


図9 レチノイン酸封入ミセルの抗がん活性：がん成長抑制効果

●：高分子ミセル封入，△：HCO-60可溶化  
□：コントロール

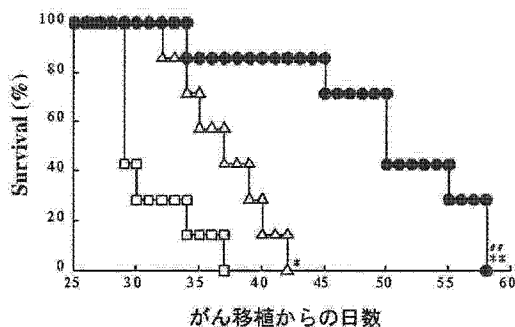


図10 レチノイン酸封入ミセルの抗がん活性：生存期間延長効果

●：高分子ミセル封入，△：HCO-60可溶化  
□：コントロール

いずれの評価軸においても高分子ミセルのみが有意な抗がん活性効果を示している。臨床的には白血病の1種にしか有効性が認められていないレチノイン酸をターゲティングの手法により固形がんへの有効性を与えた意義は大きい。

しかし、抗がん活性実験はがん移植の

3日目から1日おきに5回という比較的頻回投与を行って効果を出している。その点では更なるターゲティング能の改善をすることが望まれる。

#### (4) MRI造影剤用高分子の合成とT1緩和能測定

(A) アスパラギン酸ベースシステム Gd 結合のブロックコポリマーの T1 測定を行った結果、Gd 数が増えるに従い緩和能が向上されることがわかった。図2に、ポリマー鎖の種類と長さによる緩和能の変化を示した。ここで、ポリマー主鎖の PEG 鎖と P(Asp) 鎖の長さの違い以外にポリマー1本鎖当たりの DTPA 結合数と Gd イオン配位数がほぼ同じ構成のポリマーで比較している。括弧内の筋はそれぞれのブロックの繰り返しユニット数を示している。

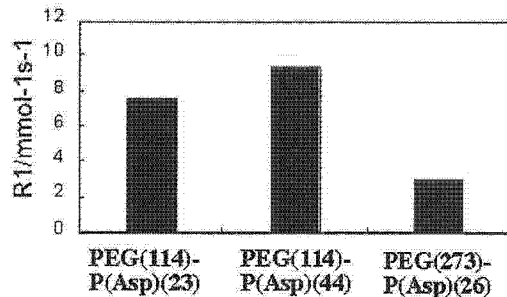


図11 アスパラギン酸ベースのシステムの緩和能 (R1) への鎖長の効果

この図から PEG 鎖の長さに対して P(Asp) 鎖の割合が高くなることによって緩和能が向上することが分かった。ここで高分子の緩和能は高分子の運動性に依存しているため、緩和能は鎖の長さ由来する運動性が直接の影響になると考えられる。長い PEG 鎖 (分子量 12000 が 273 ユニット数となる) の場合は PEG 鎖が水に良く溶解するために、高分子の運動性が高くなり緩和能が低くなったと考えられる。また、P(Asp) 鎖の割合が高くなることで緩和能が向上していることから、

高いキレート基の導入率がポリマーの運動性を落としていることも示唆される。

(同じGd配位数(約7)を少ないAspユニット数で実現しているために、Gdをキレートする基の導入割合が高い)

次に、導入するGdの数とpHが及ぼす緩和能への影響を調べた。PEGの短いPEG(114)-P(Asp)(23)の場合を図12に、PEGの長いPEG(273)-P(Asp)(26)の場合を図13に示す。どちらの場合もポリマー鎖1本当たりのGd結合数が増えると緩和能が増えることがわかった。

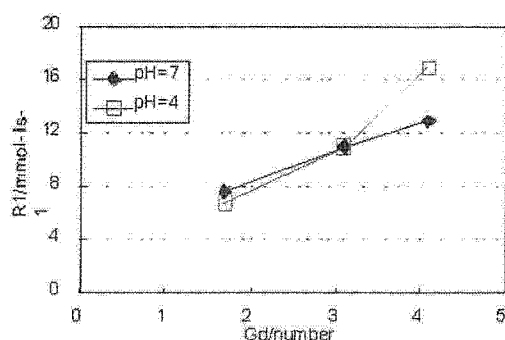


図12 PEG(114)-P(Asp)(23)のpHによる緩和能の変化

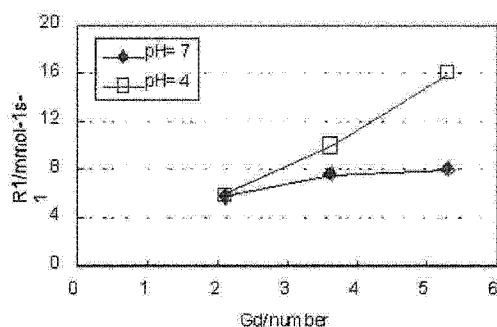


図13 PEG(273)-P(Asp)(26)のpHによる緩和能の変化

この緩和能はGd1個あたりと言えるものであり、この増加は興味深い現象であり、MRI造影剤設計には不可欠な情報である。Gd結合によって高分子鎖の運動性が変わったことによると考えられるが、緩和能に影響する要素は数多くあり、現

時点でその原因の特定はできない。

次にpHの影響を調べると、Gd数が少ない場合にはpHによる差がほとんど現れていないが、Gd数が増加するにつれてpHによる影響が顕著になり、特にPEG鎖が長鎖の図13の場合においてその差は大きくなった。

これらの結果は、pHが低い、つまり酸性側においてP(Asp)鎖に非常に影響を及ぼす。P(Asp)鎖が酸性条件において側鎖カルボキシル基がプロトン化することで高分子鎖の運動性が減少したり、カルボキシル基がPEG鎖と水素結合を形成して高分子鎖の運動性が減少したりで緩和能が増加したことが予想されるが、現在のところ理由は不明である。

これらのブロックコポリマーを塩存在下における安定性をT<sub>1</sub>測定によって検討した(表1)。それぞれ、NaCl濃度を生理食塩水濃度の222mMから<50mMまで変化させたときに緩和能は全く変化をせず、NaCl存在下でGdイオンを錯化したブロックコポリマーが安定であるといえる。しかし、1xPBS存在下では、緩和能がNaCl存在下と比較して低く抑えられていた

表3 塩の緩和能に与える影響

Gd数	R1		
	NaCl<50mM	NaCl=222mM	1xPBS
5.8	13.0	13.0	8.9
4.6	7.7	7.7	5.6
3.3	4.3	4.3	4.4

ポリマー: PEG(114)-PAsp(23)

次に、高分子ミセルの形成と安定性を評価した。PEG-P(Asp-(Gd-DTPA))は負電荷を有する水溶性ポリマーであり、この状態ではミセルを形成しない。そのため、正電荷を有するポリカチオンとポリイオンコンプレックスを形成させることで電

荷を打ち消しあいブロックコポリマーは疎水性を示す。この結果、ブロックコポリマーとポリカチオンはミセルを形成することができる。ポリカチオンとしてポリアリルアミン (PAA) をブロックコポリマーの残カルボン酸基に対して 2 等量分加えミセルを形成させた。ミセル形成前には緩和能が 6.5 であるのに対し、形成後は 0.4 とミセル形成後に緩和能が 15 分の 1 と大変小さくなった。一方、プロタミンとのミセル形成後もおよそ 6 分の 1 に小さくなった。(20 から 3.2) このミセル形成に伴う緩和能の低下は Gd イオンが疎水的環境下におかれ、水との相互作用を顕著に遮断されたためであると考えられる。また、これらのミセル溶液は 24 時間溶液として保持していても、生理食塩水中においても緩和能に変化はほとんどなく安定なミセルを形成していた。

以上のように、ミセル形成により大きな緩和能変化を得たのであるが、ポリマー組成のどの要素が変化を大きくする要因かは今後の検討課題である。

### (B) リシンベースシステム

PEG 鎖の分子量が 5,000 で、リシン重合ユニット数が 23 である、ポリエチレングリコール-ポリ (L-リシン) ブロックコポリマー (PEG-P (L-Lys)) を得た。

表 4 PEG-P (L-Lys (DOTA))<sup>1)</sup> の作製

run	加えたDOTA 活性体等量 <sup>2)</sup>	ポリマー鎖当たりの DOTA導入数
1	6.5	6.5
2	13.0	12.9
3	24.9	24.1

1) PEG分子量: 5,000、Lysユニット数: 23

2) ポリマー鎖 1 本当たり

これに DOTA の活性体をトリエチルアミン

存在かで反応させたところ表 4 に示すように、ほぼ定量的に DOTA を導入できることがわかった。

この PEG-P (L-Lys (DOTA)) に Gd イオンの導入をした結果を表 5 に示す。ここではポリマー鎖 1 本当たりの導入 Gd イオン数を 7-8 にそろえることを目指したものである。

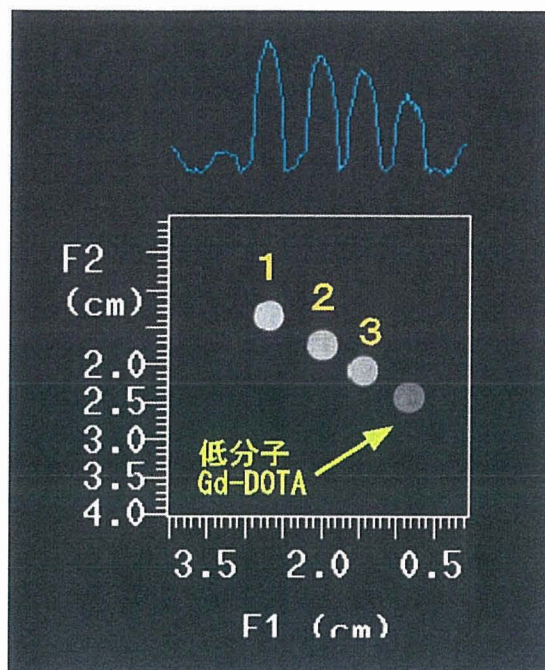
表 5 PEG-P (L-Lys (DOTA)) への Gd イオンの導入

run	DOTA 導入数	添加Gd等量	結合Gd等量
1	6.5	13.0	7.8
2	12.9	6.5	7.9
3	21.6	9.0	7.0

1) ポリマー鎖 1 本当たり

表 5 を見ると、狙った通りの数で制御できることがわかった。この Gd 数の制御によって、DOTA 導入数、そしてその DOTA のどのくらいの割合で Gd イオンを結合させるといった要素が T1 緩和能に及ぼす効果を系統的に解析することが可能となった。

以上示したように、リシンベースシステムでは、上述のアスパラギン酸ベースのシステムに比べて、合成のステップ数が少なく、余計な未反応残基がなく (アスパラギン酸の場合には、1 級アミンを導入した残基が残りやすい)、Gd 配位力のより強い DOTA を用いている、等の特長がある。よって、今後ポリマー構造と T1 緩和能を解析してゆく価値が大きいと考えられる。予備的に、ブロックコポリマーの MR I 画像を取得したのが図 1 4 である。低分子の Gd-DOTA に比べて緩和能が高い画像 (白い画像) が得られるのはもちろんのこと、ポリマー組成によって濃淡の違いが見られた (緩和能が異なる)。



run	DOTA 導入数	結合Gd等量
1	6.5	7.8
2	12.9	7.9
3	21.6	7.0

図 15 PEG-P(L-Lys(DOTA-Gd))のMRI像  
Gd濃度はいずれも0.50mM

#### D. 考察

##### (1) ブロックコポリマーの合成

多種類の疎水性基を高率で導入することが可能になったことは、薬物封入最適なものには大きな進展であった。来年度はアスパラギン酸の他に、グルタミン酸ベースのポリマー合成を行うことが重要と考えられる。

##### (2) カンプトテシン封入挙動とポリマー構造との相関解析

多種類の疎水性基を導入したブロックコポリマーが得られるようになったので、それにカンプトテシンを封入したミセルのマウスでの体内動態・分布の検討が来年度は積極的になされる価値があると考えられる。

#### (3) レチノイン酸封入高分子ミセルの作製と評価

レチノイン酸での更なるターゲティングの最適化とともに、レチノイン酸よりも疎水性で安定なミセル封入に適していると考えられるレチノイド(4-HPRなど)でのターゲティング効率・抗がん活性とを比べて、良い方のシステムを選択してゆく必要があるかと考えられる。

#### (4) MRI造影剤用高分子の合成とT1緩和能測定

平成19年度から稼働予定のMRI装置(星薬科大学に設置)によって、マウスでのMRI画像を得るとともに、T1緩和能やミセル形成安定性などのin vitroデータとの関連解析が次年度の重要研究項目となると考えられる。

#### E. 結論

薬物やMRI造影剤成分を封入した高分子ミセルの作製が滞りなく進展した。また、キャリアーの毒性評価やがん組織浸透性観察の手法が確立した。以上の結果は、3年計画の1年目としては順調な進行であるとともに、次年度以降の研究班内で連携して行う共同研究を強力に推進する基盤が確立したことを意味する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Masato Watanabe, Kumi Kawano, Masayuki Yokoyama, Praneet Opanasopit, Teruo Okano, and Yoshie Maitani, Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of their incorporation and circulation stability,

- International J. of Pharmaceutics, 308, 183-189 (2006)
- 2) Kumi Kawano, Masato Watanabe, Tatsuhiro Yamamoto, Masayuki Yokoyama, Praneet Opanasopit, Teruo Okano, and Yoshie Maitani, Enhanced antitumor effect of camptothecin loaded in long-circulating polymeric micelles, J. Controlled Release, 112, 329-332 (2006)
  - 3) Y. Murakami, M. Yokoyama, T. Okano, H. Nishida, Y. Tomizawa, M. Endo and H. Kurosawa, A novel synthetic tissue-adhesive hydrogel using a crosslinkable polymeric micelle, Journal of Biomedical Materials Research: 80 A, 421-427 (2007)
  - 4) Emiko Nakamura, Kimiko Makino, Teruo Okano, Tatsuhiro Yamamoto, and Masayuki Yokoyama A polymeric micelle MRI contrast agent with changeable relaxivity, J. Controlled Release, 114 (3), 325-333 (2006)
  - 5) Masamichi Nakayama, Teruo Okano, Takanari Miyazaki, Fukashi Kohori, Kiyotaka Sakai, and Masayuki Yokoyama Molecular design of biodegradable polymeric micelles for temperature-responsive drug release, J. Controlled Release, 115, 46-56 (2006)
  - 6) Masayuki Yokoyama, "Polymeric Micelle Drug Carriers for Tumor", Polymeric Drug Delivery I, Particulate Drug Carriers, 2006, American Chemical Society, 27-39 (2006)
  - 7) 横山昌幸, "ドラッグデリバリーシステム (ターゲティング、安定化)", 再生医療の基礎シリーズ 5-生医学と工学の接点-, 再生医療のためのバイオマテリアル, コロナ社 179-203 (2006)
  - 8) 横山昌幸, DDS (ドラッグデリバリーシステム), 材料の科学と工学 (日本材料学会誌), 43(4), 168-172 (2006)
  - 9) Masayuki Yokoyama, Chapter 10: Thermoresponsive polymer assemblies for tumor targeting, in K. Kono ed., Nanoparticles for Pharmaceutical Applications, MML Series, volume 8, Kentus Books, pp. 363-393 (2006)
  - 10) 横山昌幸, DDS に用いられるナノサイズのキャリア, Drug Delivery System, 21(6), 615-622 (2006)
2. 学会発表
    - 1) 横山昌幸, DDS とナノテクノロジー, 第 45 回日本生体医工学会大会, 2006. 5. 16
    - 2) 白石貢一, 中村恵美子, 牧野公子, 岡野光夫, 横山昌幸, 高分子ミセルをキャリアとしたMRI造影剤とT1緩和能の変化, 日本分子イメージング学会, 2006. 5. 23
    - 3) 村上義彦, 横山昌幸, 西田 博, 富澤康子, 遠藤真弘, 黒澤博身, 高分子ミセルが形成する組織接着性ハイドロゲルのマウスを用いた止血特性評価, 第 55 回高分子学会年次大会, 2006. 5. 24)
    - 4) 横山昌幸, 中辻絵理, 山本竜広, 羽山

- 明宏, 川野久美, 米谷芳枝, ドラッグ  
キャリヤー高分子ミセル内核の蛍光分  
析、第 55 回高分子学会年次大会、  
2006. 5. 25)
- 5) 横山昌幸、DDS とナノテクノロジー、  
第 41 回粉体工学会技術討論会、  
2006. 6. 20
- 6) 横山昌幸、薬物ターゲティングにおけ  
る合成高分子材料と生体成分との相互  
作用、第 24 回高分子表面研究会講座、  
2006. 6. 21
- 7) 白石貢一, 中村恵美子, 牧野公子, 岡  
野光夫, 横山昌幸、高分子ミセル型  
MRI 造影剤の T1 緩和能変化、日本 DDS  
学会学術集会、2006. 7. 7
- 8) 村上義彦, 横山昌幸, 西田 博, 冨澤  
康子, 遠藤真弘, 黒澤博身、架橋性高  
分子ミセルを用いた新規組織接着性ハ  
イドロゲルからの薬物除放、第 22 回  
日本 DDS 学会学術集会、2006. 7. 7
- 9) 山本竜広, 横山昌幸, 羽山明宏, 川野  
久美, 米谷芳枝, Opanasopit Praneet,  
岡野光夫、高分子ミセル内核を構成す  
るポリアミノ酸異性化によるカテシン  
封入最適化、第 22 回日本 DDS 学会学  
術集会、2006. 7. 7
- 10) Masayuki Yokoyama, Eri Nakatsuji,  
Tatsuhiro Yamamoto, Masaru Sakai,  
Toshiharu Saiki, Akihiro Hayama,  
Kumi Kawano, and Yoshie Maitani,  
Characterization of Inner Core of  
Polymeric Micelle Drug Carrier by  
Fluorescence Technique, 33<sup>rd</sup> Annual  
Meeting & Exposition of the  
Controlled Release Society,  
2006. 7. 24
- 11) Yoshihiko Murakami, Masayuki  
Yokoyama, Hiroshi Nishida, Yasuko  
Tomizawa, Masahiro Endo, Hiromi  
Kurosawa, Regulation of Sustained  
Drug Release from Tissue-adhesive  
Hydrogel Consisting of Polymeric  
Micelles, 33<sup>rd</sup> Annual Meeting &  
Exposition of the Controlled Release  
Society, 2006. 7. 24
- 12) 山本竜広, 横山昌幸, 羽山明宏, 川野  
久美, 米谷芳枝, PEG-ポリアミノ酸ブロ  
ックコポリマーによるカンプトテシン  
封入安定化～ポリアミノ酸異性体の影  
響～、第 35 回医用高分子シンポジウム、  
2006. 8. 1
- 13) 村上義彦, 横山昌幸, 西田 博, 冨澤  
康子, 遠藤真弘, 黒澤博身、架橋性高  
分子ミセルを組み込んだ組織接着性ハ  
イドロゲルの止血性能評価、第 35 回医  
用高分子シンポジウム、2006. 8. 2
- 14) Koichi Shiraishi, Masayuki  
Yokoyama, Polymeric Micelle as MRI  
Contrast Agent, New Approach for  
Cancer Detection, 5<sup>th</sup> Annual Meeting  
of the Society for Molecular Imaging,  
2006. 9. 1
- 15) 村上義彦, 横山昌幸, 西田 博, 冨澤  
康子, 黒澤博身、高分子ミセルを組み  
込んだ薬物放出性・組織接着性ハイド  
ロゲル、第 9 回日本組織工学会  
2006. 9. 7
- 16) 山本竜広, 横山昌幸, 羽山明宏, 川野  
久美, 米谷芳枝、カンプトテシン封入  
高分子ミセルにおける疎水性内核構造  
の最適化、第 55 回高分子討論会、  
2006. 9. 20
- 17) 白石貢一, 横山昌幸、MRI 造影剤を目  
指した PEG-P (Asp) 誘導体の合成と T1  
緩和、第 55 回高分子討論会、2006. 9. 21
- 18) Masayuki Yokoyama, Tatsuhiro  
Yamamoto, Masamichi Nishihara,  
Koichi Shiraishi, Polymeric  
micelles as targeting carriers to  
solid tumors, International  
Symposium Biomaterials, 2006. 10. 1
- 19) 白石貢一, 横山昌幸、がん選択性を有

する高分子ミセル型MRI造影剤、平成  
18年度 神奈川県産学公交流研究発  
表会、2006.10.19

20) 村上義彦、横山昌幸、西田 博、富澤  
康子、黒澤博身、止血材や薬物放出マ  
トリックスとしての利用を目指した組  
織接着性ハイドロゲル、第44回日本人  
工臓器学会大会、2006.11.1

21) Koichi Shiraishi and Masayuki  
Yokoyama, Longitudinal (T1)  
Relaxivity of Based Block Copolymers  
and Micelle Formation as MRI  
Contrast Agents, The 13<sup>th</sup>  
International Symposium on Recent  
Advances in Drug Delivery Systems,  
2007.2.26

22) 白石貢一、横山昌幸、PEG-PLL を骨格  
としたブロックコポリマーのミセル化  
とT1緩和時間、日本化学会第17春季  
年会、2007.3.25)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

平成19年3月10日に特願  
2007-61134「高分子ミセル型MRI造影  
剤」を特許出願。発明者は白石貢一、横  
山昌幸

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究報告書

カンプトテシン封入高分子ミセルへの新規葉酸修飾法の検討

分担研究者 米谷芳枝 星薬科大学教授

研究要旨 高分子ミセルによる抗癌薬カンプトテシンの腫瘍選択的送達を目的とし、葉酸結合脂質を用いた新規葉酸修飾法を検討し、培養細胞や担癌マウスにおいて評価した。

A. 研究目的

高分子ミセルは、親水性鎖と疎水性鎖からなるブロックコポリマーが会合することで形成される微小な薬物担体である。内核は疎水性鎖からなり、疎水性薬物の封入に適している。一方、外殻は親水性鎖からなり、生体内における異物認識回避を可能とし、固形腫瘍における血管透過性亢進現象を利用した受動的ターゲティングに役立っている。

さらに高分子ミセルを選択的に送達するためには、様々なパイロット分子がミセル表面で機能するよう、高分子の先端に結合されている。腫瘍細胞へのターゲティングにおいては、葉酸を用いる方法がある。これは、各種上皮癌において葉酸受容体が過剰発現しているのに対し、正常組織での発現は極めて限られているため、腫瘍細胞の特異的受容体となりうるためである。

現在、葉酸修飾した高分子ミセルとしては、あらかじめ高分子に葉酸を結合させたものでミセルを作成させる報告がある。この方法では、各高分子ミセルの調製時に、用いる高分子にリガンドを結合させなければならず、また、リガンドの種類と添加量も合成する際に決定する必要がある。そこで、高分子ミセルを形成する高分子の種類にかかわらず、表面修飾するリガンドの種類を任意に決定できるように、リガンド結合脂質を用いる調製法を検討した。本研究では、難溶性の抗癌活性物質カンプトテシン (CPT) を封

入した高分子ミセルを folate-poly(ethylene glycol)-distearoylphosphoethanolamine (folate-PEG-DSPE) で表面修飾し、葉酸結合脂質による高分子ミセルの葉酸修飾の可能性を検討した。

B. 研究方法

<カンプトテシン (CPT) 封入高分子ミセル製剤の調製>

葉酸結合脂質 Folate-PEG<sub>5000</sub>-DSPE は、folate と amino-PEG<sub>5000</sub>-DSPE から合成した。CPT 封入高分子ミセル (plain micelle) は PEG<sub>2000</sub>-poly(aspartic acid) を基本骨格としたブロックコポリマーと難溶性の抗癌活性物質 CPT を用い、溶媒除去法にて調製した。葉酸修飾 CPT 封入高分子ミセル (F-micelle) は、plain micelle の組成に、封入に用いた CPT 量：folate-PEG<sub>5000</sub>-DSPE=10:0.03、0.1、0.2 (mol) となるように folate-PEG-DSPE を加え、溶媒除去法にて調製し、それぞれ、0.03F-micelle、0.1F-micelle、0.2F-micelle とした。

<薬物放出性の評価>

透析膜内に plain micelle、0.03F-micelle、0.2F-micelle を加え、37°C のリン酸緩衝液 (pH 7.4, PBS) 中への CPT 放出量を蛍光で測定することにより評価した。

<葉酸修飾高分子ミセルの細胞内取り込みの評価>

葉酸受容体が過剰発現している KB 細



胞（ヒト咽頭癌上皮細胞株）に、各高分子ミセル製剤を加え 2 時間インキュベートした。細胞表面に結合した高分子ミセル製剤を取り除くため、PBS (pH 7.4) と acidic saline (pH 3.0) で洗浄を行った。高分子ミセルは、蛍光標識物質 DiI で標識し、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡による細胞内への取り込みを測定、観察を行った。

#### <細胞毒性による抗腫瘍効果の評価>

葉酸受容体が過剰発現している KB 細胞と、発現していない HepG2 細胞（ヒト肝臓癌細胞株）に、各高分子ミセル製剤を加え 2 時間インキュベートした後、培地を交換後、48 時間の追加培養を行い、WST-8 assay 法を用い細胞生存率を比較・評価した。

#### <担癌マウスによる抗腫瘍効果の評価>

評価に用いた高分子ミセルは、PEG<sub>5000</sub>-poly(asparatic acid) を基本骨格としたブロックコポリマーを用い、Folate-PEG<sub>10000</sub>-DSPE により 0.2F-micelle を溶媒除去法により調製した。その後、限外濾過により濃縮して用いた。担癌マウスは、雌性 CDF<sub>1</sub> マウスに M109 細胞（マウス肺癌細胞）を皮下移植して作成した。その後、各高分子ミセル製剤を 5mg CPT/kg となるように静脈内投与し、腫瘍サイズを比較することにより抗腫瘍効果を評価した。

### C. 研究結果

調製した各高分子ミセル製剤の平均粒子径は約 230nm、平均 CPT 封入率は約 50% であった。plain micelle、0.03F-micelle、0.2F-micelle からの CPT 放出性は、24 時間でそれぞれ約 40%、60%、40% であり、0.2F-micelle では、plain micelle とほぼ同じ安定性を示した。

フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡による F-micelle の KB 細胞内への取り込み

の評価では、0.2F-micelle、0.1F-micelle、0.03F-micelle、plain micelle の順に取り込みが高くなり、0.2F-micelle では plain micelle の約 14 倍高くなった。これより葉酸修飾率が高いほど、細胞内取り込みが増大することが明らかとなった。また、葉酸修飾高分子ミセルの KB 細胞による取り込みは、2mM の葉酸を加えることで抑制されたことから、葉酸受容体を介したエンドサイトーシスにより取り込まれることが明らかとなった。共焦点レーザー顕微鏡による細胞断面の観察では、F-micelle は細胞表面ではなく、細胞質に局在していることが明らかとなった。

抗腫瘍効果の評価において、葉酸受容体の過剰発現が知られている KB 細胞で 0.2F-micelle は plain micelle よりも約 3 倍、高い抗腫瘍効果を示した。一方、葉酸受容体を発現していない HepG2 細胞では F-micelle と plain micelle の間に有意な差は見られなかった。この結果からも、葉酸修飾高分子ミセルの細胞内への取り込みは葉酸受容体を介していることが確認され、葉酸修飾をした各高分子ミセルは、抗腫瘍効果が增大することが明らかとなった。

担癌マウスにおける抗腫瘍効果の評価には、血中安定性の高い PEG<sub>5000</sub>-poly(asparatic acid) を基本骨格としたブロックコポリマーで調製した高分子ミセル製剤を用いた。この各高分子ミセル製剤の平均粒子径は約 260nm であった。F-micelle 群と plain micelle 群は、生理食塩液投与群と有意な腫瘍成長抑制効果を示した。また、F-micelle 群は plain micelle 群よりも強い抗腫瘍効果を示した。

### D. 考察

本研究では、CPT 封入高分子ミセルへの folate-PEG-DSPE の添加量と、葉酸を結合

する PEG の長さによる癌ターゲティング能の評価から、高分子ミセルの脂質による表面修飾化の可能性を検討した。

高分子ミセルの調製において、葉酸修飾のために folate-PEG-DSPE を添加しても高分子ミセルの粒子径や CPT 封入率に影響が見られなかったことから、脂質添加によって高分子ミセルが受ける影響は少ないことが示唆された。

葉酸修飾した高分子ミセルの KB 細胞への取り込みは、葉酸修飾量が増すにつれて取り込み量が増加し、葉酸受容体に認識され細胞内へ効率よく取り込まれるためには、ある程度の葉酸修飾量が必要であるということが推察された。また、KB 細胞では葉酸修飾による抗腫瘍効果の増強が見られたが、葉酸受容体の発現がない HepG2 細胞では見られなかったことから、高分子ミセル表面に修飾した葉酸が目的の機能を有し、葉酸受容体に認識されていることが明らかとなった。

以上の結果より、高分子ミセルの脂質による葉酸修飾が可能であることが示唆された。また、in vivo においても腫瘍への集積性が向上する傾向が見られ、葉酸修飾 CPT 封入高分子ミセルは、癌ターゲティング用薬物担体として有用であることが示唆された。

## E. 結論

葉酸結合脂質を用いた CPT 封入高分子ミセルの葉酸修飾に成功し、高分子ミセルの能動的ターゲティングを可能とした。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) M. Furuhashi, H. Kawakami, K. Toma, Y.

Hattori, Y. Maitani, Intracellular delivery of proteins in complexes with oligoarginine-modified liposomes and the effect of oligoarginine length, *Bioconjugate Chemistry*, 17: 935-942 (2006)

2) Y. Hiruta, Y. Hattori, K. Kawano, Y. Obata, Y. Maitani, Novel ultra-deformable vesicles entrapped with bleomycin and enhanced to penetrate rat skin, *J. Control. Release*, 113: 146-154 (2006)

3) K. Kawano, M. Watanabe, T. Yamamoto, M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani, Enhanced antitumor effect of camptothecin loaded in long-circulating polymeric micelles, *J. Control. Release*, 112: 329-332 (2006)

4) Y. Hattori, M. Sakaguchi and Y. Maitani Folate-linked lipid-based nanoparticles deliver a NFkB decoy into activated murine macrophage-like RAW264.7 cells, *Biol. Pharm. Bull.*, 29: 1516-1520 (2006)

5) Y. Hattori and Y. Maitani Two-step transcriptional amplification-lipid-based nanoparticles using PSMA or midkine promoter for suicide gene therapy in prostate cancer. *Cancer Science*. 97: 787-798 (2006)

6) S. Igarashi, Y. Hattori, Y. Maitani, Biosurfactant MEL-A enhances cellular association and gene transfection by cationic liposome. *J. Control. Release.*, 112: 362-368 (2006)

7) M. Furuhashi, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, Design, synthesis and gene delivery efficiency of novel oligo-arginine linked PEG-lipids: effect of

oligo-arginine length. *Int. J. Pharm.*, 316(1-2): 109-116 (2006)

発、日本薬学会第 127 年会、2007 年 3 月 28 日-30 日

8) M. Watanabe, K. Kawano, M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani, Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of their incorporation and circulation stability. *Int. J. Pharm.*, 308(1-2):183-189, (2006).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 2. 学会発表

1) カンプトテシン封入高分子ミセルへの新規葉酸修飾方法の検討、羽山明宏、山本竜広、横山昌幸、川野久美、米谷芳枝、第 22 回日本 DDS 学会、2006 年 7 月 7-8 日

2) Kumi Kawano, Masato Watanabe, Tatsuhiro Yamamoto, Masayuki Yokoyama, Praneet Opanasopit, Teruo Okano, Yoshie Maitani, Antitumor Effects of Camptothecin-Loaded Polymeric Micelles, The 33rd Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, 2006.7.22-26

3) 羽山明宏、山本竜広、横山昌幸、川野久美、米谷芳枝、カンプトテシン封入高分子ミセルへの新規葉酸修飾法の検討と in vivo 評価、日本薬学会第 127 年会、2007 年 3 月 28 日-30 日

4) 山田敦史、川野久美、服部喜之、米谷芳枝、ドキソルビシン封入葉酸修飾リポソームの抗腫瘍効果における PEG 脂質の影響、日本薬学会第 127 年会、2007 年 3 月 28 日-30 日

5) 吉澤隆、服部喜之、米谷芳枝、葉酸受容体選択性 siRNA 遺伝子ベクターの開

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究報告書

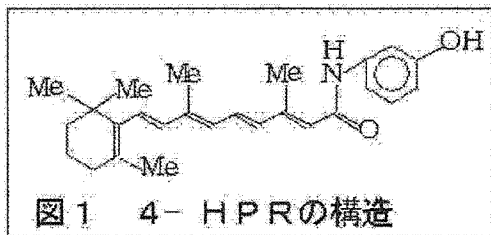
レチノイン酸封入ミセル評価解析

分担研究者 川上 茂 京都大学大学院薬学研究科

研究要旨 4-HPR 封入ポリマーミセル製剤による新規癌治療法への応用展開

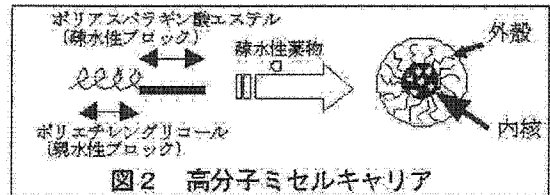
A. 研究目的

N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR) (図1) は核内レセプターへの作用およびその他の分子機構により分化誘導、アポトーシス誘導などの特有の細胞機能制御作用を有する合成レチノイドであり、現在乳癌などを対象として臨床試験が進められている。4-HPR は脂溶性が高く(logP=7)、単独での静脈内投与が困難であるため経口投与での検討が行われているが、消化管膜透過性の悪さからバイオアベイラビリティが低いことが問題となっている。これらの課題を克服しより広範な癌治療へと応用展開していくためには、4-HPR を封入し、癌組織近傍へと送達しうるドラッグデリバリーシステム製剤の開発が必須である。



親水性ブロックと疎水性ブロックから成る共重合体ポリマーは親水環境下で疎水性ブロックを内核とし、外殻を親水性ブロックで覆ったミセル構造を形成することから、脂溶性の高い薬物を安定に封入するのに好適なキャリアである(図2)。一方、血中においても薬物が安定にミセル内に保持されるためには薬物に適した内核環境を作り出すことが重要である。そこで我々は疎水性ブロックに種々の官能基を導入した共重合体ポリマーを合成

し、4-HPR を封入したポリマーミセルの有用性について評価を行った。



B. 研究方法

ポリマーの合成:

poly(ethyleneglycol)-poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) (PBLA) を出発物質とし、アルカリ加水分解後、アスパラギン酸残基に種々の官能基を導入した。導入率はNMR解析を基に算出した。

4-HPR 封入ポリマーミセルの調製: 4-HPR 封入ポリマーミセルは 4-HPR:ポリマー=1:2.5 (重量比) の組成でクロロホルムに溶解後、エバポレーション法により調製した。4-HPR の回収率は吸光度から算出した。

粒子径・Z 電位の測定: Zetasizer Nano ZS を用いてそれぞれ測定した。

4-HPR の体内動態評価: マウスに 4-HPR 5 mg/kg で尾静脈内投与し、所定の時間に下大静脈より血液を採取および各臓器を摘出し、アセトニトリルで抽出後、HPLC を用いて 4-HPR 量を測定した。対照として 4-HPR を HCO-60 に溶解したものをを用いた。

in vivo 抗腫瘍効果: B16BL6 細胞をマウスに皮下移植後、腫瘍径が約 5mm に達した地点で投与を開始し、2 日間隔で計 3 回投与した。投与開始後、2 日間隔で腫瘍径を計測することで腫瘍体積を算出した。