

同時にマウスの体重を計測することで毒性についても評価した。

C. 研究結果

(1) 4-HPR 封入ポリマーミセルの調製およびその物理化学的性質

ヘプチル、ベンジル、ノニル、フェニルプロピルの4種類の官能基を導入したポリマーを合成し、評価を行った(図3)。

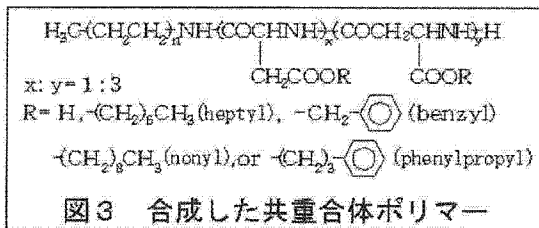


図3 合成した共重合体ポリマー

4-HPRの回収率について、直鎖型のヘプチル基およびノニル基を導入したポリマーミセルでそれぞれ36%、26%であったのと比較し、ベンゼン環を有するベンジル基およびフェニルプロピル基を導入したものでそれぞれ49%、56%と高く、4-HPRおよびポリマーミセル構造間のπ-π結合を介した封入の有用性が伺えた(図4)。調製した4-HPR封入ポリマー

	4-HPR recovery (%)	particle size (nm)	Z-potential (mV)
heptyl (65%)	35.9 ± 2.6	223 ± 1.4	-13 ± 0.4
benzyl (77%)	48.9 ± 1.4	175 ± 7.9	-14 ± 1.2
nonyl (64%)	26.3 ± 1.0	214 ± 13.4	-2.9 ± 1.2
phenylpropyl (77%)	56.2 ± 2.1	190 ± 2.8	-1.1 ± 0.8

図4 4-HPR封入ポリマーミセルの回収率及び物理的性質

ミセルはそれぞれ粒子径が170~220 nm、Z電位が-3~-1 mVであった。また4-HPR封入ポリマーミセルの粒子径は室温保存においても1ヶ月以上変化が認められなかったことから、4-HPR封入ポリマーミセルの高い安定性が示された。さらにHCO-60では4-HPRを約0.5 mg/mL

までしか可溶化できないのに対し、ポリマーミセルでは5 mg/mLの濃度で可溶化でき、4-HPRの高投与量設計が可能であった。

(2) 4-HPR 封入ポリマーミセルの体内動態

調製した4-HPR封入ポリマーミセルの静脈内投与1時間後の体内動態を評価した結果、各々4-HPR封入ポリマーミセルについてHCO-60に溶解したものと比較し、8~12倍の血中4-HPR濃度の上昇が認められた(図5)。これらの結果より脂溶性官能基導

入がもたらす疎水的相互作用により4-HPRが血中において安定に保持され、さらに外殻を構成するPEGにより細網内皮系の貪食を回避することで高い血中滞留性を獲得していることが示唆された。中でもベンジル基を導入したもので最も高い血中4-HPR濃度を示した。そこでベンジル基の導入率を変化させ同様に体内動態を評価したところ、ベンジル基導入率が77%以上のもので4-HPRの血中滞留性向上作用がみられるのに対し、69%以下ではみられなかった。

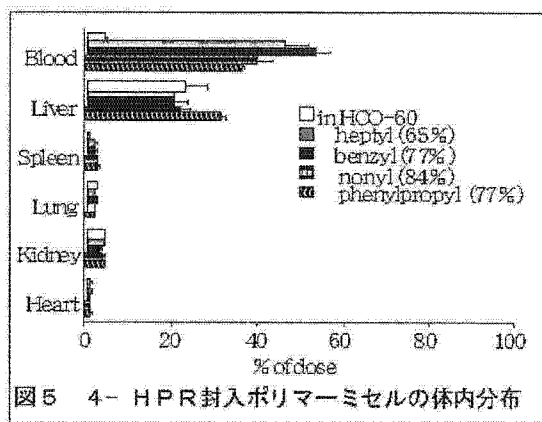


図5 4-HPR封入ポリマーミセルの体内分布

(3) 担癌マウスでの4-HPR封入ポリマーミセルの抗がん活性

前述の結果から、ベンジル基導入率77%

のポリマーミセルは血中滞留性向上作用に付随した Enhanced Permeability and Retention (EPR)効果に基づく癌治療効果が期待される。そこで B16BL6 担癌マウスを用いて抗腫瘍効果を評価した、ベンジル基導入率 77% の 4-HPR 処理群では、PBS およびポリマーミセル単独処理群と比較し、腫瘍体積増加が有意に抑制できた (図 6)。またこの際体重減少は見られなかったことから深刻な毒性は無いことが示された。

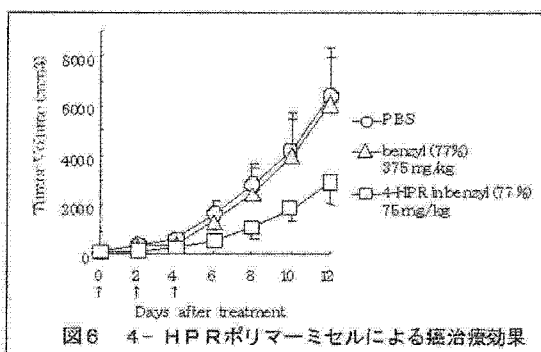


図6 4-HPRポリマーミセルによる癌治療効果

D. 考察

脂溶性薬物の血中滞留性向上を目的としたポリマーミセルを開発する上で、内核の疎水環境構築が重要であり、特にベンゼン環を有する薬物については薬物およびポリマー間の $\pi-\pi$ 結合を介した封入が有用であると考えられる。

E. 結論

4-HPR の血中滞留性を大きく向上する新規ポリマーミセル製剤の開発に成功し、癌治療への応用可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. Kawakami, S. Suzuki, F. Yamashita, M. Hashida: Induction of apoptosis in A549 human lung cancer cells by all-trans

retinoic acid incorporated in DOTAP/cholesterol liposomes, *Journal of Controlled Release*, 110 (3), 514-521 (2006).

- 2) N. Chansri, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida: Inhibition of liver metastasis by all-trans retinoic acid incorporated in O/W emulsions in mice, *International Journal of Pharmaceutics*, 321 (1-2), 42-49 (2006).
- 3) W. Yeeprae, S. Kawakami, S. Suzuki, F. Yamashita, M. Hashida: Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of cationic liposomes, *Pharmazie*, 61 (2) 102-105 (2006).
- 4) S. Suzuki, S. Kawakami, N. Chansri, F. Yamashita, M. Hashida: Inhibition of pulmonary metastasis in mice by all-trans retinoic acid incorporated in cationic liposomes, *Journal of Controlled Release*, 116 (1), 58-63 (2006).
- 5) N. Chansri, S. Kawakami, M. Yokoyama, T. Yamamoto, P. Charoensit, M. Hashida: Antitumor effect of all-trans retinoic acid loaded polymeric micelles in solid tumor bearing mice, *Pharmaceutical Research*, in press

2. 学会発表

- 1) 川上 茂, Narin Chansri, 横山昌幸, 山本竜広, 山下富義, 橋田 充, 全トランス型レチノイン酸封入高分子ミセルによる癌ターゲティング, *日本薬学会第127年会*, 富山, 2007年3月28-30日
- 2) T. Okuda, S. Kawakami, T. Yamamoto, M. Yokoyama, M. Hashida, Development of novel polymeric micelle formulations for targeted delivery of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide, *Pharmaceutical Sciences World Congress*, Amsterdam, The Netherlands, 2007年4月22-25日

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

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

高分子ミセルの生体有害性と腫瘍標的化の検証

分担研究者 川口隆憲 福島県立医科大学病理学第二講座

研究要旨 高分子ミセルキャリアーの有害性の有無の詳細な検討を行った。静脈投与によりラットの体重変化を観察したところには有意な変化はなかった。一方、脾臓と肝臓に泡沫細胞の集積がみられた。

A. 研究目的

高分子ミセルは非水溶性抗がん剤の腫瘍特異的運搬体 (carrier) として注目され、実用化への期待が高まっている。しかし、高分子ミセルの生体に対する有害性の有無についてはほとんど検討されていない。既に、ミセル相互の接着による巨大分子化、免疫細胞の刺激の可能性が指摘されているので、高分子ミセルの生体内投与に伴い生じうる病態を明確に把握する必要がある。また近年高分子ミセルの腫瘍特異的集積についても必ずしも明快なものではないという指摘がある。著者は厚生労働省がん研究班員として長年にわたり抗がん剤内包ミセルの副作用の軽減効果や抗腫瘍効果の観点から研究してきたが、今回本研究班がスタートすることとなったので、生体有害性と腫瘍標的化の観点から高分子ミセルを検証することにした。

B. 研究方法

ブロックコポリマー高分子ミセルの生体毒性ならびに蓄積性についての実験的研究

高分子ミセルは神奈川科学芸術アカデミー横山研より供給された (表3参照)。高分子ミセルは使用までは -20°C または -80°C に保存された。投与量を変えて2つの実験を行った。

実験1.

ドンリュウ系ラットのメス (140-160g) を用いた。ミセル群 (6匹) には 20mg/kg/rat、0.5ml を隔日毎に5回 (D-0, D-2, D4, D-6, D-8) 尾静脈内に注入した。対照群 (6匹) には生理食塩水 (大塚製薬) を 0.5ml 尾静脈内に注射した。投与開始後 30日まで経過観察し、隔日に体重を測定した。投与開始後 30日目にエーテル麻酔下に動物を屠殺、大脳、心臓、肺、肝臓、脾臓の重量を測定、また主要な組織を病理組織学的に検討した。

実験2.

ドンリュウ系ラットメス (100-120g) を用いた。ミセル群 (6匹) には 200mg/kg/rat を 1ml 連日5回、対照群 (6匹) には生理食塩水 1ml を連日5回尾静脈内に注入した。投与後経過観察して体重を測定、7日後にエーテル麻酔下に動物を屠殺、主要臓器の重量を測定するとともに病理組織学的に検討した。

C. 研究結果

実験 1

ラット体重の変動を図 1 に掲げたが、ミセル群と対照群の間に有意な差はなかった。また、大脳、心臓、肺、肝臓、脾臓の重量にもミセル群、対照群の間に差はなかった (表 1)。主要な組織を病理組織学的に検討したが、特記すべき病的所見はなかった (付図略)。

図 1

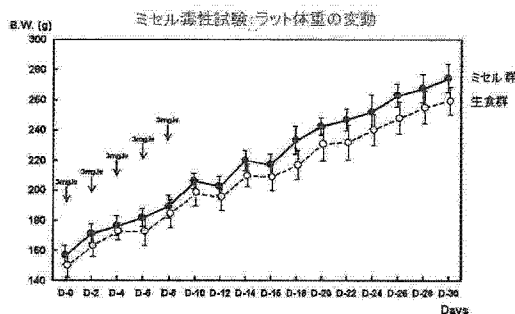


表 1

臓器重量: 高分子ミセル急性毒性実験 1

	ミセル群			生食群		
	平均 (g)	SD	動物数 (n)	平均 (g)	SD	動物数 (n)
脳	1.36	0.06	6	1.35	0.09	6
心臓	0.95	0.09	6	0.89	0.09	6
肺	1.33	0.11	6	1.27	0.19	6
肝臓	18.18	1.47	6	16.8	2.09	6
脾臓	0.7	0.09	6	0.64	0.1	6
腎臓	2.47	0.2	6	2.39	0.16	6

p < 0.05

実験 2

ミセル群と生食群との間に体重変動や主要臓器重量に差はなかった (図 2、

表 2)。しかし、病理組織学的に検討したところ、ミセル群と対照群とでは、脾臓と肝臓に大きな差が認められた。すなわち、ミセル群の赤脾髄には著しい抗ラット CD68 陽性の泡沫細胞の集積がみられた。これらの泡沫細胞の胞体はベルリン青鉄染色では生食群に比較して淡い傾向があった (図 3)。またミセル群では肝臓の Kupffer 細胞の著しい腫大が観察された。

図 2

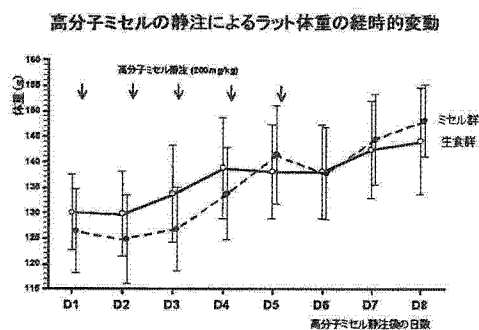


表 2

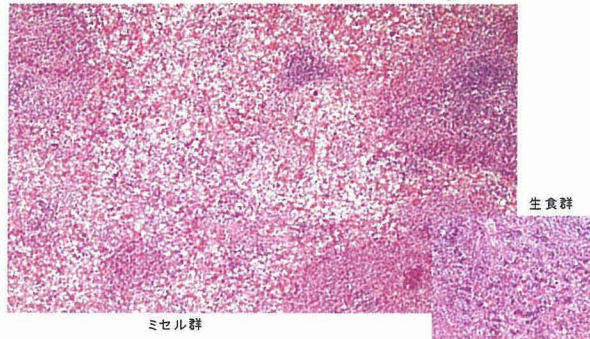
高分子ミセル急性毒性実験 2:
臓器重量

	ミセル群			生食群		
	平均 (g)	SD	動物数 (n)	平均 (g)	SD	動物数 (n)
脳	1.65	0.1	6	1.57	0.1	6
心臓	0.58	0.06	6	0.67	0.07	6
肺	1.21	0.08	6	1.44	0.12	6
肝臓	10.6	1.08	6	10.55	0.67	6
脾臓	0.97	0.06	6	0.46	0.07	6
腎臓	1.61	0.16	6	1.73	0.16	6

いずれの臓器でもミセル群と生食群の間に有意差はなかった (p < 0.05)。

図 3

脾臓における泡沫細胞集積 1



付図 3 説明

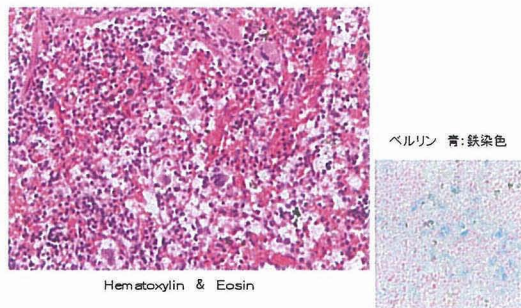
低倍率でミセル群の赤脾髄は HE 染色で染色されず抜けて見える（図中心部）。同じ領域の生食群。

付図 4 説明

高倍率では抜けてみえる部分は大単核球の集まりであることがわかる。これらの細胞はベルリン青染色陽性、抗ラット CD68 抗体陽性であった。

図 4

脾臓における泡沫細胞の集積 2



1. ブロックコポリマー高分子ミセルの腫瘍細胞標的化・ビオチン標識
高分子ミセルを用いた免疫組織学的研究

表 3 に

提供されたビオチン化ミセルの仕様を掲げた。

表 3

ビオチン化ミセルの作成

	2mol%ビオチン化ミセル	10mol%ビオチン化ミセル
Lot No.	bt2-051117	bt10-051117
ビオチン化ポリマー率	2mol%	10mol%
濃度 (ポリマー)	11.0mg/ml	14.0mg/ml
(溶液)	0.9wt%NaCl 溶液	0.9wt%NaCl 溶液
試料全容積	2.0ml (チューブ 2 本 x 1ml)	1.6ml (チューブ 2 本 x 0.8ml)
試料全量 (ポリマー)	22mg	22.4mg

ポリマー骨格:	biotin-PEG ₂ -PBLA ₂₅	PEG ₂ -PBLA ₂₅
ビオチン化率	56%	-
ベンジル化率	79%	72%
分子量	10044	9279

PEG₂: Poly(ethylene glycol) 分子量 5000
PBLA_{25 or 21}: Poly (benzyl L-aspartate) アスパラギン酸ユニット数 25, もしくは 24

徳島大学 医学部 徳島県立中央病院
徳島県立中央病院 徳島県立中央病院 徳島県立中央病院

まずビオチン化ミセルを① avidin-biotin complex 法で免疫組織学的に検出できるか否か、②発色法の選択 peroxidase 発色、alkaline phosphatase 法、③メタノール、キシレン処理が可能か、の 3 点を検討した。

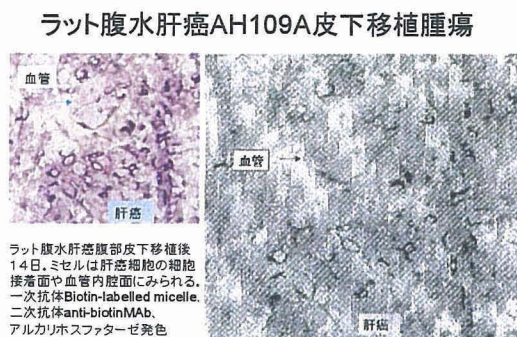
実験 3. ビオチン化ミセルの検出

PVDF 膜にブロットしたビオチン化ミセルは 2mol、10mol とともに濃度に依存した反応強度を示した。Alkaline phosphatase 発色でよく検出された。ただし、メタノール、キシロール系を経る条件では検出できなかった。また、皮下にビオチン化ミセルを注射し 24 時間後に組織をホルマリンやパラホルムアルデヒド、亜鉛固定を施し免疫組織学的に検出を試みたが、明瞭な陽性像は得られなかった (写真略)。

実験 4. 凍結癌組織へのビオチン化ミセルの結合性

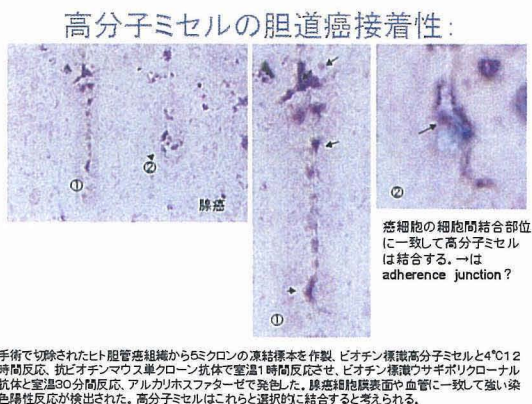
2つの実験を行った。一つはラット腹水肝癌 AH109A 細胞を皮下に移植し2週間後に腫瘍を摘出、凍結標本を作製し、ビオチン化ミセルの結合性を検討した。その結果、ミセルは肝癌細胞に一致して高率に、強く結合すると思われる結果が得られた。またところどころで、血管壁にも結合するように思われた(図5)。

図5



類似の結果は、ヒト胆管癌でも得られた(図6)

図6



D. 考察

- 今回検討した高分子ミセルは通常の濃度では頻回の投与でも体重、臓器重量、病理組織検査でも異常を検出できなかったが、通常10倍量を短時間に投与した場合、脾臓や肝臓の単球、マクロファージの泡沫化をきたした。高分子ミセルは高濃度で単球・マクロファージを活性化する可能性が示唆される。高濃度ミセルを投与した場合最終的にいかなる病理像が形成されるのか今後研究したい。
- ビオチン化ミセルの研究では現在まで生体内ミセルの免疫組織学的、免疫電子顕微鏡的検出に成功していない。ビオチン化率の向上、ミセルの有機溶媒耐性化がネックとなっている。しかしミセルが肝癌細胞や胆管癌細胞に特異的に接着する可能性を示唆する予想外の結果が得られた。しかし今回の研究方法は極度に感度を高めたもので、結果の解釈にはなお慎重を要する。今後の更なる検討が必要である。

E. 結論

高分子ミセルキャリアの有害性に関するはじめての病理解析を行った。今回得られて知見は、今後の詳細な検討の礎となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawaguchi, T., Takazawa, H., Imai, S., Morimoto, J., Watanabe, T., Kanno, M., Igarashi, S. Expression of Vicia villosa agglutinin (VVA)-binding glycoprotein in primary breast cancer cells in relation to lymphatic metastasis: Is atypical MUC1 bearing Tn antigen a receptor of VVA? Breast Cancer Res Treat 98: 31-43, 2006.
2. Suzuki, S., Kawaguchi, T., Hasegawa, T., Yonechi, A., Ohsugi, J., Higuchi, M., Ogishi, A., Gotoh, M. Prognostic impact of p53 protein overexpression in patients with Node-negative lung adenocarcinoma. Cancer Lett 237: 242-247, 2006
3. Negishi, T., Koizumi, F., Uchino, H., Kuroda, J., Kawaguchi, T., Naito, S., Matsumura, Y. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, is a more potent radiosensitising agent compared to free paclitaxel. Br J Cancer 95:601-606, 2006

2. 学会発表

なし

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

高分子ミセルの腫瘍組織内移行の解析

分担研究者 堀 勝義 東北大学加齢医学研究所助教授

研究要旨 新しく開発された高分子ミセルが、循環に影響を与えることなく選択的に腫瘍組織に移行することを、生体計測で明らかにした。

A. 研究目的

腫瘍血管は正常血管と比べ、周皮細胞や平滑筋細胞との関係が弱く、内皮細胞間のギャップも大きい。そこで高分子化した薬剤は、篩の目の細かい正常血管よりも、目の粗い腫瘍血管から選択的に漏れる。また、血管から組織に出た高分子は、通常、リンパ管システムによって回収されるが、腫瘍組織ではこのシステムの発達が未熟であるため、ひとたび腫瘍組織に漏れ出た高分子は、そこに長くとどまると考えられている。これが EPR (Enhanced permeability and retention) 効果であり、抗癌剤を高分子化して治療効果を高めようとする研究の基本原理の一つとなっている。

本研究班のプロジェクトリーダーである横山らが新たに開発した高分子ミセルは、この EPR 効果を利用して、水に溶けにくい抗癌剤や診断薬を選択的かつ多量に腫瘍組織に送り込めるように設計した薬物キャリアーである。しかし、この高分子ミセルが生体内で、実際にどのような挙動を示すかはまだわかっておらず、それを把握することは、診断と治療を計画する上できわめて重要である。

分担者の研究目的は、①この高分子ミセルの循環への影響を調べること、②ミセルの正常組織、腫瘍組織への移行性を計測する手法を開発すること、そして、③ミセルの生体での動態を解析し、これを用いた診断・治療を合理的に進めるための基盤を構築すること、である。

B. 研究方法

(1) 高分子ミセルの腫瘍血流と全身血圧に及ぼす影響

高分子ミセルが微小循環動態にどのような影響を与えるかを調べるためのポリマーミセルとして、poly(ethylene glycol) と poly(β -benzyl L-aspartate) で構成される PEG₁₂-PBLA₁₄ (平均分子量 14,870、PEG の平均分子量が 12,000 で β -benzyl L-aspartate の平均重合ユニット数が 14 のもの) と、これにアドリアマイシンを封入したミセル PEG12-P(Asp(ADR))22 を用いた。これは PEG の平均分子量が 12,000 でアスパラギン酸平均重合ユニット数が 22 で、そのアスパラギン酸の 59% にアドリアマイシンの結合している。このブロックコポリマーから成る高分子ミセルにアドリアマイシンを物理的に封入したものである。

測定に用いる固形腫瘍は、吉田腹水肉腫 LY80 細胞を Donryu ラットの背部に移植して作成した。腫瘍血流量は水素クリアランス法で測定し、全身血圧の測定は大腿動脈にカテーテルを挿入することにより行った。

(2) FITC ミセルの腫瘍組織内濃度の経時的变化

高分子ミセルが生体でどのような動きをするのかを解析するトレーサーには、上記の PEG₁₂-PBLA₁₄ の PBLA 側の末端に FITC を化学結合させた PEG₁₂-PBLA₁₄-FITC (FITC ミセル) を用いた。

FITC ミセルの腫瘍内移行を正確に把握するために、分担者は、同一部位で長時間の計測が可能な新しい生体観測システムを開発した。これは、ラット透明窓内で生育する腫瘍と腫瘍血管を直接観察すると同時に、静脈内投与された FITC ミセルの動きを落射蛍光で捉え、それを定量する方法である。本実験での観測時間は、通常 12-15 時間であり、FITC ミセルの動態を、経時的に S-VHS に記録した。アナログからデジタル変換して得た画像の輝度の推移をコンピュータ解析した。

C. 研究結果

(1) 高分子ミセルの腫瘍血流と全身血圧に及ぼす影響

静脈内投与した 40 mg/kg PEG₁₂-PBLA₁₄、および 10 mg/kg のアドリアマイシンを封入した PEG₁₂-P(Asp(ADR))₂₂ が腫瘍血流と全身血圧に及ぼす影響を、経時的に 6 時間計測した結果を、それぞれ図 1 と図 2 に示す。

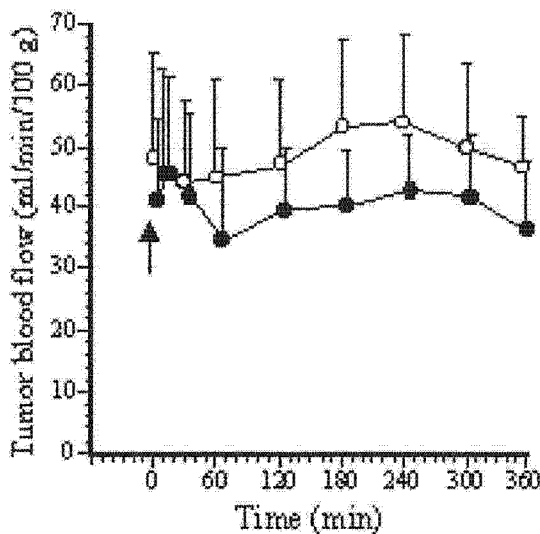


図 1. 高分子ミセルの腫瘍血流に及ぼす影響
○, PEG₁₂-PBLA₁₄ (n = 15); ●, アドリアマイシン封入ミセル PEG₁₂-P(Asp)₂₂ (n = 8) 平均値 ± SD 矢印, ミセル静脈内投与

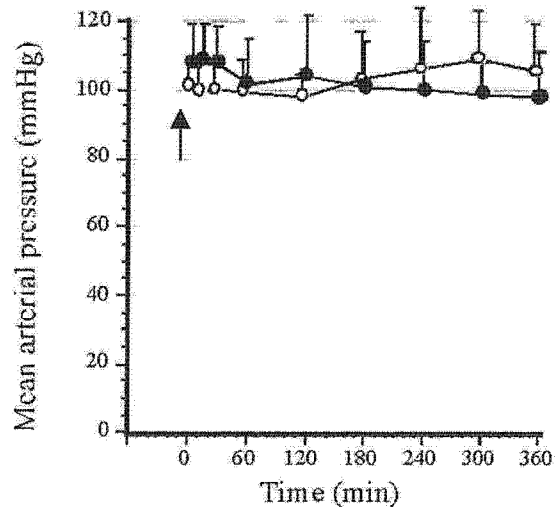


図 2. 高分子ミセルの全身血圧に及ぼす影響
○, PEG₁₂-PBLA₁₄ (n = 15); ●, アドリアマイシン封入ミセル PEG₁₂-P(Asp)₂₂ (n = 8) 平均値 ± SD 矢印, ミセル静脈内投与

両ミセル共に、腫瘍血流、全身血圧に有意の変化を及ぼさなかった。

(2) FITC ミセルの腫瘍組織内濃度の経時的变化

FITC ミセルを静脈内投与した後、正常皮下組織と腫瘍組織における組織内濃度を、同一部位で 12 時間、経時的に計測した結果を図 3 に示す。正常皮下組織では、静脈内投与された FITC ミセルは、細動脈、毛細血管、集合細静脈、細静脈と通過していくが、毛細血管からの漏れは、12 時間の経過観察中ごくわずかであった。一方、腫瘍組織では、投与直後から、腫瘍血管から漏れ始め、約 1 時間でピークに達した。分子量 4,000 の FITC デキストランを静脈内投与した場合には、腫瘍組織に分布した蛍光色素は約 2 時間で完全に抜けるのに対し、FITC ミセルは、12 時間経過後も、腫瘍組織からほとんど抜けなかった。なお、画像解析により、FITC ミセルの血中半減期は 9~10 時間と算出された。

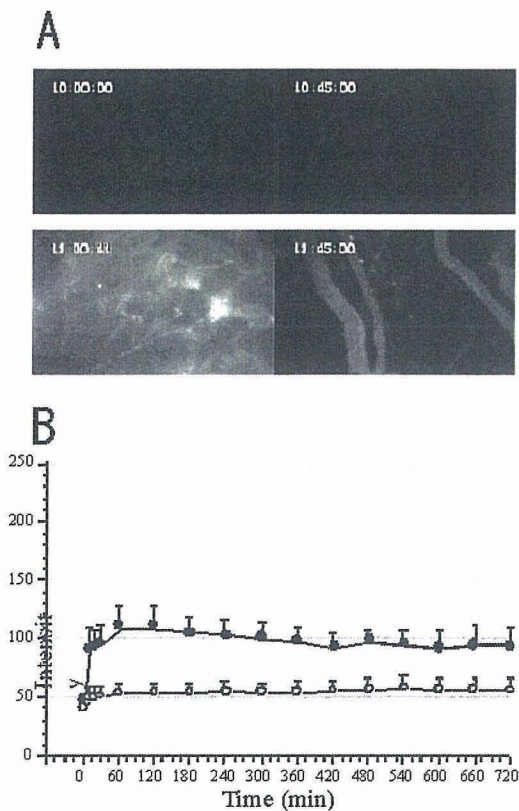


図3. FITC ミセルの組織移行性

A, FITC ミセル移行性の典型例

左上, FITC ミセル投与前の腫瘍組織; 左下, FITC ミセル投与1時間後の腫瘍組織; 右上, FITC ミセル投与前の正常組織; 右下, FITC ミセル投与1時間後の正常組織

B, 輝度の定量

○, 正常皮下組織; ●, 腫瘍組織 平均値 ± SD
腫瘍、正常共にそれぞれ4頭のラットを用い、腫瘍では22の関心領域(100ピクセル/関心領域)、正常では20の関心領域を計測した。

D. 考察

新しく開発された高分子ミセルは、血中半減期は約10時間と長く、その間、正常組織にはほとんど移行しないため、抗癌剤や診断薬を腫瘍選択的に到達させることが可能である。また、全身血圧に影響を与えず、微小循環を擾乱することも

ないため、薬剤のキャリアーとしての安全性も高いと思われる。しかし、癌の診断効率を高めるため、また、全身に撒布された微小転移巣に対する治療効果を上げるためには、移行量をさらに増やすことが不可欠である。次年度は微小増殖巣へのミセル移行量を高める方策の開発を中心に研究を進めたい。

E. 結論

新しく開発された高分子ミセルは、腫瘍組織移行性に選択性があり、全身循環、微小循環への副作用もほとんどない優れた薬物キャリアーである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 堀 勝義、古本祥三、放射線照射後腫瘍血流遮断による癌再発抑制の実験研究、第65回日本癌学会学術総会。2006.9.

2) 堀 勝義、放射線照射後腫瘍血流遮断による癌再発抑制とその微小循環機序。第24回腫瘍循環病態研究会。2007.1.26

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

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

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

分担研究者 濱口哲弥 国立がんセンター中央病院

研究要旨 製剤研究から迅速に臨床試験の開始につなげるために、100nm以上の凝集がない高分子ミセルの作製法の検討を行った。また、本研究班での動物での高分子キャリアーの副作用に関する結果と臨床試験との相関解析を行った。

A. 研究目的

分担研究者の濱口は本研究班において高分子ミセルの研究に従事する一方、高分子ミセル抗がん剤の臨床試験を遂行している。基礎研究の結果を速やかにかつ有意義な臨床試験につなげるには、質の高いトランスレーショナルリサーチが必須であると考えている。本研究では次の2点について検討を行った。

(1) カンプトテシン封入高分子ミセルの微小粒径化

(2) 高分子ミセルキャリアーの副作用についての動物実験と臨床試験の比較

(1)の微小粒径化とは、高分子ミセル製剤作製の際に起こる場合のある2次凝集の形成を抑制することである。高分子ミセル製剤の場合、ミセル形成と同時にまた、高分子ミセルに薬物を封入する際に直径が数十nmの高分子ミセルの他に、直径が200nm以上の2次凝集の形成が起こる場合がある。本来の高分子ミセルとこの2次凝集が体内動態においてほぼ同一であるのか、顕著に異なるのかについては現在不明である。よって、基礎研究段階においても2次凝集を抑制する方法を得ることは重要であるとともに、製剤過程での必要な技術開発である。(臨床製剤では、2次凝集のない作製法を得るか、2次凝集が少量生成してもろ過などで除いて最終的に2次凝集がないものを得る必要がある)臨床試験への開発を迅

速に進めるためには2次凝集のない製剤作製法を得ることが重要となる。2次凝集が除かれることは、これまでに、抗がん活性物質カンプトテシン封入高分子ミセルでは、かなり2次凝集が含まれていた。今回、この2次凝集を抑制して高分子ミセル封入を行う方法について神奈川県科学技術アカデミーと共同で検討した。

(2)は高分子キャリアー自体の毒性に関する研究である。これまでの高分子ミセル抗がん剤の基礎研究・開発を通して、高分子キャリアー自体の毒性は全く観察されていない。これは無毒であることを意味するのではなく、内包した抗がん剤が発現する副作用に隠れてしまう低いレベルであるということである。いくら低いレベルといっても、高分子ミセルキャリアーの主たる副作用・有害事象がどこに、どのような時間経過で発現するものかを知ることは臨床試験の計画、実行のためにも重要な事柄である。本研究班の今年度の活動の中で、福島県立医大の川口憲隆博士が高分子ミセルの詳細な病理学的解析をラットにて行った。結果はほとんど病的な変化は見いだされなかったが、脾臓と肝臓において泡沫細胞の集積が唯一起こった変化であった。

一方、臨床試験はアドリアマイシンとタキソール内包高分子ミセルについて行われていて、内包抗がん剤が単独で示す副作用と明確にタイプが異なり、高分子ミセルに特有らしい副作用が見られたこ

とはなかった。しかし、現時点で高分子ミセルキャリア自体の動物での副作用の結果の視点から、臨床試験の結果を精査して、これまで報告された副作用の中でキャリア自体に基づくものが含まれているかを検討することは有意義であると思われる。よって、脾臓と肝臓での泡沫細胞の集積が各種血清データ等に影響する可能性をここで検討する。

B. 研究方法

(1) カンプトテシン封入高分子ミセルの微小粒径化

用いたブロックコポリマーはこれまでの検討の中で最も安定にカンプトテシンを封入できる PEG-P(α , β -Asp(bzl 74%)を用いた。薬物の封入は、エバポレーション法で行った。カンプトテシン(CPT)とブロックコポリマーを有機溶媒に溶かし、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。CPTの封入量はDMSO/H₂O=9:1中での吸光度測定により、粒径測定は動的光散乱測定によりそれぞれ行った。

(2) 高分子ミセルキャリアの副作用についての動物実験と臨床試験の比較

すでに臨床第I相試験が終了したタキソール内包ミセルの前臨床試験および臨床試験での有害事象を再度レビューし、とくに肝胆道系の有害事象につき動物実験と臨床試験の結果との比較をおこなった。

C. 研究結果

(1) カンプトテシン封入高分子ミセルの微小粒径化 (神奈川科学技術アカデミーと共同での検討)

従来、エバポレーション法によるCPTの高分子ミセルへの封入がクロロフォルムに限られていたのは蒸発しやすい溶媒でCPTを良く溶かす有機溶媒が見つかってなかったからである。そこで各種

溶媒を詳細に検討した。CPT封入に用いるためには、沸点が80℃位以下で蒸発しやすく、CPTを良く溶解させる(表

表1 各種溶媒のカンプトテシン溶解性と沸点

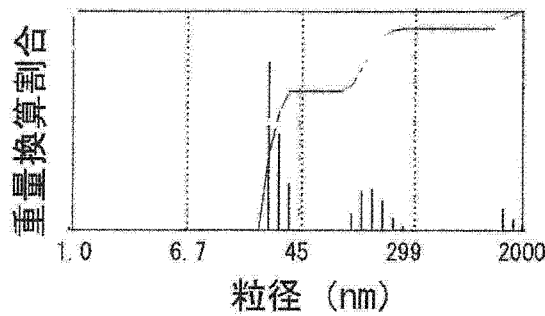
溶媒	CPT溶解性	沸点(°C)
クロロホルム	○	61
ジクロロメタン	△	40
ジメチルスルホキシド	○+	189
ジメチルホルムアミド	○+	153
ジメチルアセトアミド	○+	166
メタノール	x	65
エタノール	x	79
イソプロパノール	x	83
酢酸エチル	x	77
ヘキサン	x	69
アセトン	x	57
ジオキサン	△	101
テトラヒドロフラン	△	66
アセトニドル	x	82
2,2,2 トリフルオロエタノール	○+	74
1,1,1,3,3,3 ヘキサフルオロイソプロパノール	○+	59

では○あるいは○+) が必要である。この結果、クロロフォルムの他に赤線で囲んだフッ素を含む2つの溶媒が条件を満たすことがわかった。

この2つのフッ素系溶媒のうち、2,2,2トリフルオロエタノールを用いてCPTの封入をPEG-P(α , β -Asp(bzl 74%)に対して行った。CPT/ポリマー重量比10%で封入を行い、ミセルの粒径分布を従来のクロロフォルムと比べたのが図2である。クロロフォルムの場合に比べて、図の一番左側のミセルのピークの割合が顕著に大きくなっている。重量平均の粒径は、クロロフォルムの場合が186nmであるのに対し、トリフルオロエタノールでは67nmと小さくなっている。

もう一つのフッ素系溶媒ヘキサフルオロイソプロパノールを用い、CPT/ポリマー比を5%から20%まで3種類で行った封入操作の結果を表2にまとめる。どのCPT/ポリマー比でも、従来法であるクロロフォルムを用いた場合に比べて、2種のフッ素系溶媒は小さな平均粒径を与えていた。

(a) クロロフォルム溶媒の場合



(b) トリフルオロエタノールの場合

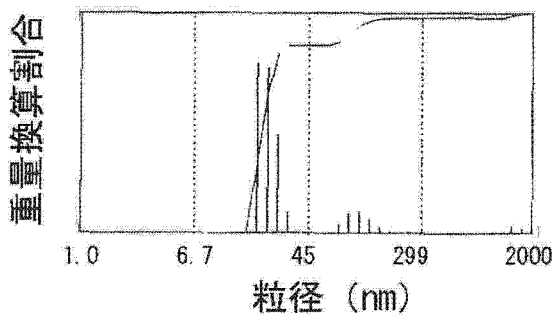


図2 CPT封入ミセルの粒径分布 (CPT/ポリマー=10wt%の時)

重量平均粒径78nmの高分子ミセルが得られた。

表2 カンプトテシン封入ミセルの粒径に及ぼす溶媒の効果

溶媒	GPT/ポリマー重量比	重量平均粒径 (nm)
クロロフォルム	5%	66
	10%	186
	20%	200
トリフルオロエタノール	5%	77
	10%	67
	20%	92
ヘキサフルオロイソプロパノール	5%	52
	10%	97
	20%	75

(2) 高分子ミセルキャリアーの副作用についての動物実験と臨床試験の比較

タキソール内包ミセルの前臨床試験において、ラットの単回・反復および間歇

投与実験で、肝酵素 GOT, GPT の上昇および T. Bil の増加、肝細胞の変性・壊死、胆管上皮細胞の変性・壊死、イヌでは反復投与試験でさらに胆嚢上皮細胞の変性・壊死がみられた。高分子ミセルの投与により、肝・脾細胞の泡沫細胞の集積がみられたことから、投与された高分子ミセルの一部は肝・脾臓の網内系にトラップされマクロファージに貪食されるため、肝細胞がある程度高濃度のタキソールが肝細胞に暴露されて肝細胞障害が起こるとともに胆汁排泄される際に胆管・胆嚢上皮へも影響を及ぼしていると考えられる。一方、臨床第 I 相試験では、19 例という少数例の検討であるが、GOT, GPT の上昇などの肝障害はみられなかった。今後、臨床第 II 相試験などでも肝障害の発症には注意深く観察する必要があると思われる。

D. 考察

溶媒としては特殊なフッ素系溶媒を用いることで、CPT封入高分子ミセルの2次凝集形成の割合を減少させ、粒径を顕著に小さなものとすることができた。従来CPT封入高分子ミセルで体内動態や抗がん活性を調べたのは2次凝集が大部分を占める剤形であった。今回得られた2次凝集の少ない高分子ミセルによる体内動態解析が次年度の検討課題の一つになる。また、溶媒の性質とミセル粒径との関係をさらに詳細に解析することによって2次凝集の少ない高分子ミセルを得る方法論を確立することが今後の課題であり、重要な製剤技術となり得る。

また2次凝集の少ない高分子ミセルであれば網内系へのトラップが回避されることにより肝・脾臓での泡沫化細胞の集積が抑制されることが期待され、ひいては肝細胞の変性・壊死、胆管・胆嚢上皮細胞の変性・壊死が軽減されることによ

り、薬剤の安全性が向上するものと期待される。

E. 結論

特殊な溶媒を用いることで、高分子ミセル製剤の2次凝集を少なくすることに初めて成功した。有害事象についての動物実験と臨床試験の比較検討を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fumiaki Koizumi, Masayuki Kitagawa, Takahito Negishi, Takeshi Onda, Shin-ichi Matsumoto, Ttsuya Hamaguchi, and Yasuhiro Matsumutra, Novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors, Cancer Research, 66, 10048–10056 (2006)

2. 学会発表

1) K. Kato, T. Hamaguchi, H. Yasui, T. Okusaka, H. Ueno, M. Ikeda, K. Shirao, Y. Shimada, H. Nakahama, K. Muro, and Y. Matsumura Phase I study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, in patients with advanced cancer. The 42nd Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, 2006,

4) 濱口哲弥. ポリマーミセル抗がん剤の前臨床及び臨床試験. 第65回日本癌学会: 2006年9月28-30日

カンプトテシン

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者名	論文タイトル名	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	ページ	出版年
Masayuki Yokoyama	Chapter 10: Thermoresponsive polymer assemblies for tumor targeting	K. Kono ed.	Nanoparticles for Pharmaceutical Applications, MML Series, volume 8	Kentus Books	363 -393	2006
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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Emiko Nakamura, Kimiko Makino, Teruo Okano, Tatsuhiko Yamamoto, and Masayuki Yokoyama	A polymeric micelle MRI contrast agent with changeable relaxivity	J. Controlled Release	114 (3),	325 -333	2006
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
Masayuki Yokoyama	Polymeric Micelle Drug Carriers for Tumor, Polymeric Drug Delivery I, Particulate Drug Carriers	American Chemical Society	2006	27 -39	2006
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
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
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
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Y. Hattori and Y. Maitani	Two-step transcriptional amplification-lipid-based nanoparticles using PSMA or midkine promoter for suicide gene therapy in prostate cancer	<i>Cancer Science.</i>	97	787 -798	2006
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
M. Furuhata, 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
S. Kawakami, S. Suzuki, F. Yamashita, M. Hashida	Induction of apoptosis in A549 human lung cancer cells by all-trans retinoic acid incorporated in DOTAP/cholesterol liposomes	Journal of Controlled Release	110 (3)	514 -521	2006
N. Chansri, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida	Inhibition of liver metastasis by all-trans retinoic acid incorporated in O/W emulsions in mice,	International Journal of Pharmaceutics	321 (1-2)	42-49	2006
W. Yeeprae, S. Kawakami, S. Suzuki, F. Yamashita, M. Hashida	Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of cationic liposomes	Pharmazie.	61 (2)	102 -105	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
S. Suzuki, S. Kawakami, N. Chansri, F. Yamashita, M. Hashida	Inhibition of pulmonary metastasis in mice by all-trans retinoic acid incorporated in cationic liposomes	Journal of Controlled Release	116 (1)	58-63	2006
N. Chansri, S. Kawakami, M. Yokoyama, T. Yamamoto, P. Charoensit, M. Hashida	Antitumor effect of all-trans retinoic acid loaded polymeric micelles in solid tumor bearing mice	Pharmaceutical Research, in press			
Kawaguchi, T., Takazawa, H., Imai, S., Morimoto, J., Watanabe, T., Kanno, M., Igarashi, S.	Expression of Vicia villosa agglutinin (VVA)-binding glycoprotein in primary breast cancer cells in relation to lymphatic metastasis: Is atypical MUC1 bearing Tn antigen a receptor of VVA?	Breast Cancer Res Treat	98	31-43	2006
Suzuki, S., Kawaguchi, T., Hasegawa, T., Yonechi, A., Ohsugi, J., Higuchi, M., Ogishi, A., Gotoh, M.	Prognostic impact of p53 protein overexpression in patients with Node-negative lung adenocarcinoma	Cancer Lett	237	242 -247	2006
Negishi, T., Koizumi, F., Uchino, H., Kuroda, J., Kawaguchi, T., Naito, S., Matsumura, Y.	NK105, a paclitaxel -incorporating micellar nanoparticle, is a more potent radiosensitising agent compared to free paclitaxel.	Br J Cancer	95	601 -606	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fumiaki Koizumi, Masayuki Kitagawa, Takahito Negishi, Takeshi Onda, Shin-ichi Matsumoto, Ttsuya Hamaguchi, and Yasuhiro Matsumutra,	Novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial rowth factor-secreting bulky tumors	Cancer Research	66	10048- 10056	2006