

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

合成レチノイド封入高分子ミセルの評価解析

分担研究者 川上 茂 京都大学大学院薬学研究所

研究要旨 合成レチノイド封入高分子ミセル製剤による難治性がんの一つである腹膜播種治療法確立を目的に、がん細胞増殖抑制効果および腹腔内投与後の分布評価を行った。

A. 研究目的

がん細胞は正常細胞と異なりアポトーシスが起こりにくく細胞周期の回転が亢進しているため無限に増殖する。合成レチノイドは、これらのがん細胞特有の性質に作用し、アポトーシス誘導や細胞周期停止などの分化誘導によりがん細胞増殖を抑制可能であるため、がん細胞選択的に作用し正常細胞への影響が少なく副作用が起こりにくい事が期待される。しかしながら合成レチノイドは疎水性が高く、現在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事が問題となっている。これらの課題を克服しより広範ながん治療へと応用展開していくためにはレチノイン酸を安定に封入し、がん組織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。我々は、これまでベンゼン環を有する合成レチノイド4HPRがアスパラギン酸残基にベンジル基修飾を導入したポリマーミセル（PEG-P(Asp(Bzl))）に安定に封入され静脈内投与によりEPR効果により固形がんモデルにおいてがん組織へのデリバリーが可能である事を報告した。また、新たな投与経路として、腹腔内投与後PEG-P(Asp(Bzl))による腹水中での合成レチノイドの滞留性の増大が可能であることを報告してきた。今年度は、より強い分化誘導、細胞死誘導能を有するCD437およびATRA耐性克服が報告されているAm80などの新規合成レチノイドのがん細胞選択的な分化誘導メカニズムについて検討に加え、難治性のがんである腹膜播種治療への適用を試みた。

B. 研究方法

ポリマーの合成：poly(ethyleneglycol)-poly(b-benzyl L-aspartate)(PBLA)を出発物質とし、アルカリ化水分解後、アスパラギン酸残基にベンジル基を導入した。合成レチノイドによる分化誘導の評価：がん細胞株（HepG2、Hep3B）および正常ヒト細胞にレチノイン酸を投与し、細胞の形態変化、細胞周期、アポトーシスを評価した。腹膜播種モデルの作製：BALB/c雄性マウス（6週齢）にルシフェラーゼ安定発現がん細胞株（colon26-Luc）をHANKS液に分散させ、 1.0×10^5 個/匹を腹腔内投与して作成した。治療効果の評価：腹膜播種モデルマウスに合成レチノイド/ポリマーミセル誘導体を腹腔内投与後、腹膜および大網を摘出し、ホモジネートの後、組織中のルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性よりがん細胞数を算出した。また、生存期間の延長により治療効果の評価する。（倫理面への配慮）

全ての動物実験は京都大学の規定に基づいて行った。

C. 研究結果

（1）各種合成レチノイドによる分化誘導メカニズムの評価：各種合成レチノイド（ATRA, 4HPR, CD437）によるがん細胞選択的細胞死誘導のメカニズムの検討を目的に分化誘導の評価を行った。各種レチノイン酸含有培地で培養後の細胞の形態を顕微鏡で観察したところ、ATRAおよび4HPRと比較しCD437において顕著なアポトーシス様の形態の変化が認められた（図1）。がん細胞は、正常細胞とは異なり細胞周期が更新しているため無限細胞増殖が誘発されている。

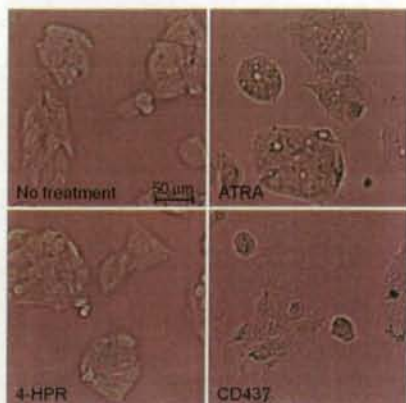


図1 各種レチノイン酸によるヒト由来肝がん細胞HepG2に対するアポトーシス様形態変化の誘導

ATRAは、がん細胞の細胞周期の停止により細胞死を誘導することが知られている。そこで、4HPR、CD437について細胞周期停止の評価をおこなった。各種合成レチノイド含有培地で12~72時間において経時的に細胞周期をFACSにより測定した。ATRAおよび4HPRと比較しCD437においてのみ細胞周期S期の細胞集団の増加が認められ、細胞周期停止が誘発されることが示唆された(図2)。

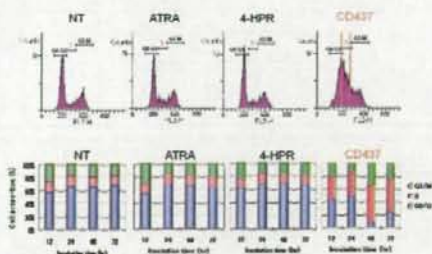


図2 各種レチノイン酸によるHepGに対する細胞周期停止の誘導

(2) 合成レチノイドAm80含有ポリマーミセルによる腹腔内がん細胞増殖抑制効果: まず腹腔内におけるAm80含有ポリマーミセルによるがん細胞の増殖抑制効果の評価を目的にがん細胞を腹腔内へ投与した翌日から5日間にAm80 (0.5 mg/kg)含有ポリマーミセルを腹腔内投与し、経日的に大網におけるがん細胞転移数を測定した。Am80含有ポリマーミセル投

与7日後においてがん細胞の増殖抑制傾向が認められた(図3)。

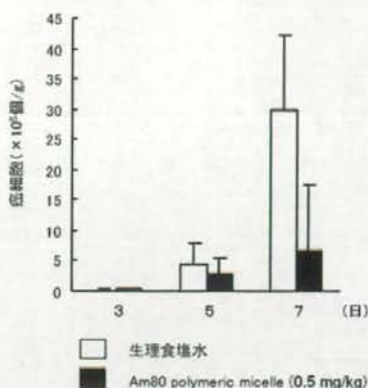


図3 Am80含有ポリマーミセルによるがん細胞増殖予防効果の評価

そこで、がん細胞の腹膜播種治療の評価を目的に、がん細胞の増殖・転移が認められるがん細胞の腹腔内投与3日後よりAm80含有ポリマーミセルの5日間投与を行い、大網および腹膜のがん細胞数を測定したところ、Am80含有ポリマーミセル投与群においてがん細胞数の増殖抑制傾向が認められた(図4)。

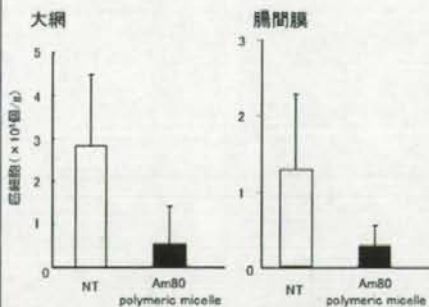


図4 Am80含有ポリマーミセルによる大網および腸間膜におけるがん増殖抑制効果

(3) Am80含有ポリマーミセルによるがん細胞腹膜播種モデルマウスの生存期間延長: 最後にAm80含有ポリマーミセルによる治療効果の評価を目的に(2)の結果において決定した投与スケジュールによりがん細胞の腹膜播種モデルマウスの生存期間延長についてAm80の投与量の検討を行った。投与量0.5 mg/kgでは有意な生存期間延長が認められなかったが

、3 mg/kgおよび5 mg/kg投与群において生理食塩水投与群と比較し生存期間の延長が認められた(図5)。

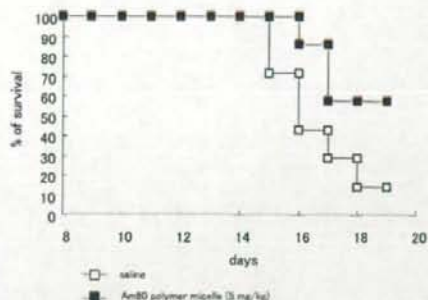


図5 Am80含有ポリマーミセルによる腹膜播種モデルマウスの生存期間延長

D. 考察

合成レチノイド処理によるがん細胞に対する選択的な細胞死誘導のメカニズムには細胞周期停止が関与し、合成レチノイドによるがん分化誘導療法は副作用の少ない治療法になりえると考えられる。またAm80の高分子ミセルへの封入により腹腔内から血中への移行が抑制され、腹腔内への滞留またはリンパ節への移行によりがん細胞の腹膜播種モデルマウスにおいて、がん細胞の増殖抑制ならびに生存期間の延長が認められた。

E. 結論

合成レチノイドによる細胞死誘導にはがん細胞特有の細胞周期亢進を停止させることが関与し、正常細胞への影響は少なくがん細胞選択的であり、合成レチノイドによるがん分化誘導療法は副作用の少ない治療法になりえることが示唆された。Am80封入高分子ミセル製剤により、がん細胞の腹膜播種モデルマウスに対し、がん細胞の増殖抑制ならびに生存期間延長が認められ、腹膜播種治療の可能性が示された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表 【総説】

1. T. Satoh, Y. Higuchi, S. Kawakami, M. Hashida, H. Kagechika, K. Shudo, M. Yokoyama: Encapsulation of the synthetic retinoids Am80 and LE540 into polymeric micelles and the

retinoids' release, Journal of Controlled Release, in press (2009)

2. T. Okuda, S. Kawakami, Y. Higuchi, T. Satoh, Y. Oka, M. Yokoyama, F. Yamashita, M. Hashida, Enhanced in vivo antitumor efficacy of fenretinide encapsulated in polymeric micelles, International Journal of Pharmaceutics, In press, (2009)
3. Y. Kuramoto, S. Kawakami, S. Zhou, K. Fukuda, F. Yamashita, M. Hashida, Mannosylated cationic liposomes/CpG DNA complex for the treatment of hepatic metastasis after intravenous administration in mice, Journal of Pharmaceutical Sciences, 98 (3), 1193-1197 (2009)
4. 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, 25 (2), 428-434 (2008)
5. Y. Kuramoto, S. Kawakami, S. Zou, K. Fukuda, F. Yamashita, M. Hashida, Efficient peritoneal dissemination treatment by immunostimulatory phosphorothioate-type CpG DNA/cationic liposome complex in mice, Journal of Controlled Release 126(3), 274-280 (2008)

2. 学会発表

- 1) 佐藤 琢、樋口 ゆり子、川上 茂、橋田 充、首藤 紘一、影近 弘之、横山 昌幸、合成レチノイド封入高分子ミセルの調製と放出特性評価、日本バイオマテリアルシンポジウム2008、東京、2008年11月17-18日
- 2) 樋口 ゆり子、川上 茂、佐藤 琢、横山 昌幸、橋田 充、合成レチノイドAm80内封高分子ミセルによる新規腹膜播種治療法の確立、日本薬学会第129年会、京都、2009年3月26-28日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

横山 昌幸、佐藤 琢、川上 茂、樋口 ゆり子、橋田 充: 活性成分封入高分子ミセル及び活性成分の溶出制御方法、特願2008-292740

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（医療機器開発推進研究事業）
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

研究要旨 高分子ミセルの生体毒性の有無と腫瘍標的性 (tumor targeting) を病理学組織学的に研究した。今年度は最終年度なので現在までのまとめと今後の研究展開の可能性を検討した。その結果高分子ミセルは急性生体毒性を示さないが急性炎症様症状を惹起して macrophage-phagocyte system (MPS) に取り込まれること、大脳神経核、胎児組織に集積する可能性があること、腫瘍特異的集積を示すことが実証された。高分子ミセルをヒト疾患に適應するには生体毒性と tumor targeting の両面で更なる研究が必要である。

A. 研究目的

抗癌剤を内包した block copolymer micelle (高分子ミセル) の臨床応用への期待が高まっているが高分子ミセルの利点は2つに要約できる。①非水溶性抗癌剤の可溶化と②腫瘍特異的集積である。①に関しては doxorubicin, cisplatin, paclitaxel に関して実験的に検証され臨床治験が行われている。しかし高分子ミセル自体の生体毒性については現在まで検討されてこなかった。②はEPR (enhanced permeability and retention) 効果で説明されているが、実際に高分子ミセル自体が腫瘍に集積するか否かについては組織学的に検討されておらず詳細は不明であった。今年度は前年度に引き続いてラット実験系においてこの2点を検討するとともに、高分子ミセルの生体内分布、胎児組織への移行など今後検討が必要と考えられる課題についても研究した。

B. 研究方法

ビオチン標識高分子ミセルは神奈川県科学技術アカデミー横山昌幸、西原正道によって作成された。その構造は昨年度報告した。動物はドンリュウ系♀ラット (120-160g) を使用した。腫瘍はラット腹水肝癌AH109Aを用いた。免疫組織化学は基本的には avidin-biotin-complex 法を用いた。使用した抗体は抗ラットCD68マウス単クローン抗体 (HyCult)、抗ビ

オチンマウス単クローン抗体 (Roch e) であった。

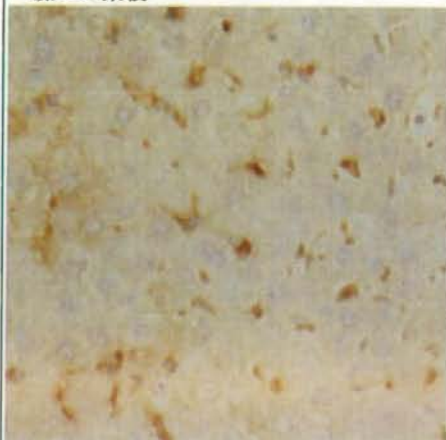
(倫理面への配慮)

すべての動物実験は [Guideline on Animal Experiments in Fukushima Medical University, School of Medicine and the Japanese Government Animal Protection and Management Law] に従って行った。

C. 研究結果

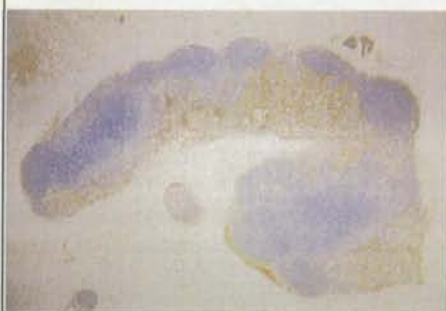
(1) 高分子ミセルのMPSによる取り込み: 追加研究結果。前年度までビオチン標識ミセルを用いた研究は担癌ラットでしか検討しなかったので正常ラットでの研究を追加した。その結果、正常ラットでもMPSは高度に高分子ミセルを取り込むことを明らかにした。また昨年度までリンパ節MPSについては断片的な知見であったので今年度は系統的にリンパ節MPSの高分子ミセル取り込みについて研究した。その結果、リンパ節でも脾臓、肝臓、肺などのMPS同様高分子ミセルを盛んに取り込んでいることが証明された。また、腹部皮下組織に高分子ミセルを注射した場合に注射部位に一致した非可能性肉芽組織が生じることが確認された。MPS以外では体液・体液循環関連細胞 (腹膜、胸膜、脈絡叢)、胎児、黄体細胞、心筋細胞、大脳神経核などに、高分子ミセル陽性反応が見られた。

図1 高分子ミセルの正常ラット肝臓への集積



Kupffer 細胞への高度の取り込みが見られる。高分子ミセル10mg/Rat i. v. 24時間後。

図2 高分子ミセルのリンパ節への集積

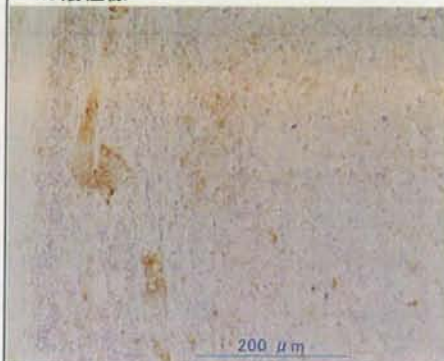


リンパ節辺縁洞に高分子ミセルの集積が認められる。ミセルi. v. 後24時間。

(2) Tumor targeting : ラット腹水肝癌を腹部皮下移植2、3、7、14日後に10mg/1ml生理食塩水(約200mg/kg)を尾静脈注射し、1時間後、24時間後、または1週間後に全身灌流して腫瘍組織を摘出しビオチン標識高分子ミセルの腫瘍内局在を免疫組織学的に検討した。その結果、ビオチン標識高分子ミセルは注射後1時間ですでに腫瘍辺縁部(被

膜)に明らかであった。高分子ミセル注入後24時間後では腫瘍辺縁の巨大類洞様血管内とその周囲の腫瘍血管と腫瘍細胞内に高分子ミセル陽性像を認めた(図3、4)。またビオチン標識高分子ミセル注入1週間後では腫瘍辺縁部のほか中心領域の拡張した腫瘍血管内とその周囲の腫瘍細胞にビオチン標識高分子ミセル陽性像を認めた(図5)。

図3 ビオチン標識高分子の腫瘍辺縁の陽性像



腫瘍辺縁・被膜の変異巨大血管内にビオチン陽性所見が認められる。隣接する腫瘍実質内にも陽性所見があり内部に向かって陽性所見は弱くなる。

図4 高分子ミセルの腫瘍細胞への集積



腫瘍実質内への高分子ミセルの集積。腫瘍細胞内にも明瞭なドット状の陽性反応を認める。移植1週後にビオチン標識高分子ミセル投与、1週後に灌流屠殺。

D. 考察

高分子ミセルは外側に poly(ethylene glycol) を配置して一般的には MPS に取り込まれ難いと考えられるが今回の検討結果からは明らかに全身性の MPS の取り込みが見られた。定量的な把握はできなかったが通常の HE 染色で明らかであるのでかなり高度であると考えられる。取り込みは高分子ミセル投与後 24 時間以内に始まると考えられるが、取り込まれた高分子ミセルがその後どのような運命を辿るかは重要である。投与された高分子ミセルが高度に蓄積されるとすれば phagocyte 機能の低下、免疫機能の低下が惹起されることは容易に考えられるところで早急な研究の展開が求められよう。

今回の研究班に加わるまで私は EPR 効果に関する知識をほとんど持ち合わせておらず、高分子抗癌剤の tumor targeting について深く考察することがなかったからか、研究を担当した当初から EPR 効果の概念がよく理解できず戸惑った。戸惑いの理由の一つは腫瘍血管の捕らえ方にあると理解している。私は腫瘍血管には少なくとも 2 つの面があると考えている。「発達途上にある数の増加を主とする腫瘍血管」と「分化・荒廃・融合を示す腫瘍血管」である。

今回の結果を考えると高分子ミセルは後者の血管でおこる現象に思えるが、結論をうるにはなお詳細で厳密な研究が必要である。

E. 結論

(1) 皮下組織や静脈内に注入された block copolymer 高分子ミセルは肝臓、脾臓、肺、リンパ節、骨髄、皮下の macrophage-phagocyte system (MPS) に高度に取り込まれる。このことは薬剤の非効率性の問題とともに薬剤の MPS への蓄積症への発展の可能性を危惧させる。高分子ミセルの構造改変と慢性毒性試験が必要と考える。

(2) 高分子ミセルは腫瘍辺縁 (被膜)、特に奇異な巨大類洞血管内に

特異的に集積し、ここから腫瘍細胞に拡散するように見える。高分子ミセルの腫瘍特異的集積は分化した腫瘍血管を「場」として生じ、単純な増殖を示す腫瘍血管からの EPR 効果では説明できないように思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

【原著】

1. T. Kawaguchi, T. Honda, M. Nishihara, T. Yamamoto, M. Yokoyama: Histological study on side effects and tumor targeting of a block copolymer micelle on rats. Journal of Controlled Release, 2009 (in press).
2. T. Kawaguchi, S. Imai, S. Haga, J. Morimoto, T. Honda: Demonstration and partial identification of aberrant Muc1 bearing Tn antigen in rat ascites hepatoma AH109A cells with strong lymph node metastasis propensity. In: Cancer Metastasis Research, Editor: A. Watanabe, Nova Science Publisher, pp. 147-163, 2008.

2. 学会発表

- 1) T. Kawaguchi, M. Yokoyama: Immunohistochemical demonstration on tumor targeting of high molecular polymeric micelle in rat ascites hepatoma AH109A. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, pp357, 2008.
- 2) 川口隆憲、西原正通、山本竜広、本多たかし、高分子ミセルの生体有害性の実験的検討。Drug Delivery System 23(3):pp34, 2008.
- 3) 川口隆憲、高分子ミセルの腫瘍標的化の機序。日本病理学会会誌、97 巻1号: pp313, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

ナノ粒子の血管外移行と腫瘍内集積についての微小循環解析

分担研究者 堀 勝義 東北大学加齢医学研究所

研究要旨 腫瘍血管破断薬の前投与で、本来EPR効果が起きにくい微小腫瘍にもナノ粒子が移行集積し易くなった。この解析を通じて、EPR効果促進に働く腫瘍微小環境の条件がより鮮明になった。

A. 研究目的

分担者の研究目的は、ナノ粒子の腫瘍内動態をリアルタイムで捉え、そのin vivoでの振る舞いを明らかにすることにより、ナノ粒子を用いた新しい癌の診断法と治療法の構築に寄与することである。

昨年度までの研究で、我々は、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)でラベルした高分子ミセルをトレーサーとして用い、以下の所見を得た。(a) 高分子ミセルの血管外移行は、正常組織と腫瘍間、および腫瘍組織と壊死間のインターフェイスに存在する血管で亢進しており、特に、後者で著しい。(b) 高分子ミセルは固形腫瘍に集積する。特に、循環機能が低下した腫瘍変性領域に、より高い濃度のミセルが集積する。しかし、(c) それは、循環機能が活発な、径3 mm以下の微小腫瘍の腫瘍血管からは漏出しにくく、そこに蓄積もしない。所見(a)と(b)はEPR効果を成立させる要因であるが、所見(c)は、顕微鏡レベルの微小腫瘍ではEPR効果が起きにくいことを示している。このことは、ナノ粒子化された抗癌薬は、微小転移巣への攻撃力が弱いことを強く示唆している。ナノ粒子化抗癌薬の効力を高めるには、微小腫瘍にもEPR効果を起こす必要がある。

上記(a)と(b)の所見に基づき、我々は、それを実現するには、微小腫瘍の血管を漏れやすくし、同時に腫瘍組織の一部に変性領域を作ることが重要と考えた。その目的達成の手段として、我々は腫瘍血管破断薬AC7700と放射線を用いた。AC7700は腫瘍血流遮断、および腫瘍血管の劣化を引き起こし、腫瘍組織を壊死へと導く。AC7700のこの作用は、移植腫瘍、発癌剤で誘発した原発腫瘍、また、皮下腫瘍のみならず臓器内腫瘍、リンパ節転移巣、径1 mm以下の微小腫瘍にも及ぶことを、我々は以前の研究で明らかにしている。また、放射線も腫瘍血管の透過性を亢進し、同時に癌細胞を変性させることが知られている。

本年度はFITCミセルとFITCアルブミンをトレーサーとして用い、AC7700を前投与し

た場合、放射線照射をした場合に、それらナノ粒子の血管外移行と腫瘍内蓄積がどのように変化するかを解析した。

B. 研究方法

(1) ラット透明窓を用いた腫瘍内ナノ粒子動態の生体観測法

ナノ粒子の腫瘍内動態解析のために、蛍光標識したFITC-高分子ミセル（平均分子量15,259）とFITC-アルブミン（分子量69680）をトレーサーとして用いた。腫瘍には吉田腹水肉腫の変異株LY80を用い、それをラット透明窓内に移植した。蛍光ナノ粒子の腫瘍内移行の経時的解析は、同一部位で長時間の計測が可能な生体観測システムで行なった。静脈内投与した蛍光ナノ粒子の腫瘍内動態を高感度カメラで経時的に撮影し、S-VHSビデオに記録した。そのアナログ画像をデジタル画像に変換し、蛍光強度の変化を定量した。なお、蛍光物質は、静脈内投与直後は血管のみに現れるため、その画像を基に血管と血管外領域を厳密に区別した。

(2) 腫瘍内ナノ粒子動態のAC7700による変化

蛍光ナノ粒子を静脈内投与する1日、3日前にAC7700（10 mg/kg）を静脈内投与した。AC7700を前投与した群と、しない群との間の組織内蛍光強度の経時的変化を比較した。

(3) 腫瘍内ナノ粒子動態の放射線照射による変化

蛍光ナノ粒子を静脈内投与する3日前に透明窓内の腫瘍に10GyのX線を照射し、照射した群と、しない群との間の組織内蛍光強度の経時的変化を比較した。この実験では、アルブミンの消失速度を、腫瘍組織内のFITC強度の半減期で評価した。

(4) 倫理面への配慮

全ての実験は東北大学動物実験委員会に計画書を提出し、審査を受け、承認された。実験は東北大学の動物実験ガイドラインに従って行ない、特に苦痛軽減に配慮した。

C. 研究結果

(1) 微小腫瘍におけるFITCミセルの動態に及ぼすAC7700前投与の効果

図1はAC7700(10 mg/kg) 静脈内投与3日後に、静脈内投与したFITCミセルの腫瘍組織内蛍光強度の変化を、無処置の微小腫瘍のそれと比較した結果である。

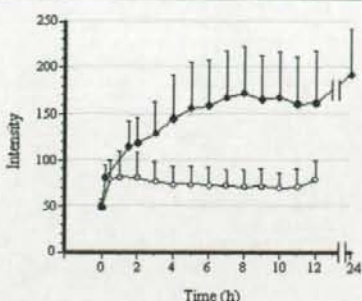


図1 FITCミセルの腫瘍組織内蛍光強度。FITCミセルはTime 0で静脈内投与。(●) FITCミセル投与3日前にAC7700(10 mg/kg)を静脈内投与；(○) AC7700の前投与なし

微小腫瘍では、FITCミセルの血管外移行も腫瘍内集積も低かったが、AC7700処置後に生き残った腫瘍血管では、無処置の腫瘍血管と比べて、血管外移行は著しく亢進していた ($P < 0.0001$)。FITCミセルは、特に循環機能が低下した変性領域に多量に蓄積し、24時間経過後も高い組織内濃度が維持されていた。

(2) 微小腫瘍におけるFITCミセルの動態に及ぼす放射線の効果

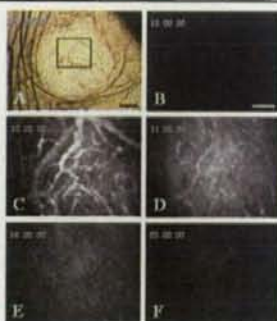


図2 FITCミセルの腫瘍組織内動態への10Gy照射の効果。A, 生体観察像。丸く明るい部分が微小腫瘍。黒枠、蛍光観測領域。Bar, 100 μ m; B, FITCミセル投与直前。Bar, 100 μ m; C, 投与5分後; D, 1時間後; E, 4時間後; F, 10時間後

図2は径約1 mmの微小腫瘍に10Gy照射をし、3日後にFITCミセルを静脈内投与した結果である。投与5分後にはかなりのFITCミセルが血管外に移行した(図2C)。これは、微小腫瘍の腫瘍血管透過性が放射線によって著しく高まったことを示している。照射により腫瘍組織は著しく変性したが、AC7700の場合とは異なり、血管外に移行したFITCミセルは変性組織に留まらず、ウオッシュアウトされた。

(3) 微小腫瘍におけるFITCアルブミンの動態

図3は、径約500 μ mの微小腫瘍内外でのFITCアルブミン動態の典型例である。

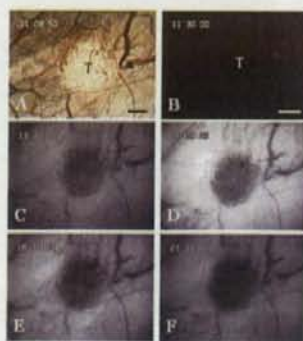


図3 微小腫瘍、および腫瘍と正常組織間インターフェイスにおけるFITCアルブミンの動態。A, 生体観察像。Tは径約500 μ mの微小腫瘍。Bar, 200 μ m; B, FITCアルブミン投与直前。Bar, 200 μ m; C, 投与1時間後; D, 5時間後; E, 7時間後; F, 10時間後。

微小腫瘍内でのアルブミンの血管外移行は、腫瘍と正常組織間のインターフェイスにおける血管外移行と比べて著しく低かった。また、インターフェイスの血管から漏れ出たアルブミンもそこに留まらず、徐々にウオッシュアウトされた。

(4) FITCアルブミンの腫瘍内動態に及ぼすAC7700の効果

図4は、FITCアルブミンを静脈内投与する24時間前にAC7700が静脈内投与された腫瘍におけるFITCアルブミンの動態である。AC7700により、組織の一部に壊死が誘導されている(図4A右上の変色部分)。FITCアルブミンはこの壊死領域に移行蓄積し、投与24時間後もなおそこに留まっていた。

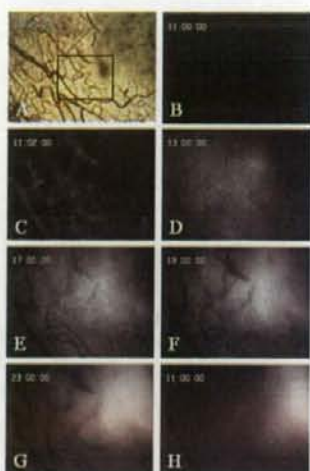


図4 FITCアルブミンの腫瘍内動態へのAC7700前投与の効果, A, 生体観察像, 右上の変色部分が壊死領域. 黒枠, 蛍光観測領域; B, FITCアルブミン投与直前; C, 投与2分後; D, 1時間後; E, 6時間後; F, 8時間後; G, 12時間後; H, 24時間後

(5) FITCアルブミンの腫瘍内動態に及ぼす放射線の効果

図5は、透明窓内の腫瘍に10Gy照射を行い、3日後に静脈内投与されたFITCアルブミンの腫瘍内動態の典型例である。

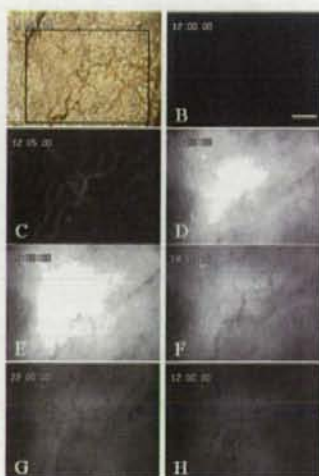


図5 FITCアルブミンの腫瘍内動態への10 Gy照射の効果. A, 生体観察像. 黒枠, 蛍光観測領域; B, FITCアルブミン投与直前. Bar, 100 μ m; C, 5分後; D, 2時間後; E, 3時間後; F, 6時間後; G, 10時間後; H, 24時間後

放射線照射により、腫瘍血管のFITCアルブミンに対する透過性は著しく亢進した。照射3日後は、癌細胞が著しく変性する時期である。しかし、その時期の腫瘍血管の循環機能はむしろ活発になった。血管外移行したFITCアルブミンは変性部位に蓄積せず、腫瘍組織から除々にウオッシュアウトされた。

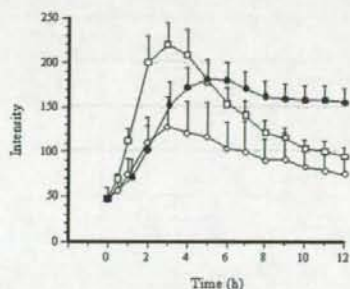


図6 AC7700, 放射線照射によるFITCアルブミンの腫瘍組織内動態の変化. (O) 無処置 (n = 18); (●) FITCアルブミン投与3日前にAC7700 (10 mg/kg)を静脈内投与 (n = 10); (Δ) FITCアルブミン投与3日前に10Gy照射 (n = 10).

図6は、AC7700投与後、および照射後におけるFITCアルブミンの腫瘍組織内蛍光強度の経時的変化を、無処置の微小腫瘍のそれと比較した結果である。

照射を受けた腫瘍では、FITCアルブミンの血管外移行は、無処置の腫瘍と比べて、著しく亢進した ($P < 0.0001$)。しかし、組織からのウオッシュアウトも 10.0 ± 2.1 時間 ($n = 17$) から 5.2 ± 0.4 時間 ($n = 10$) へと有意に速くなり ($P < 0.0001$)、FITCアルブミンは腫瘍組織には停留しなかった。

AC7700処置の場合も、生き残った腫瘍血管からのFITCアルブミンの血管外移行は、無処置の場合の血管外移行と比べ、著しく亢進していた ($P < 0.0001$)。しかし、放射線照射の場合とは異なり、FITCアルブミンのウオッシュアウトは著しく遅くなり、12時間経過後も腫瘍組織内に高い濃度が維持されていた。

D. 考察

昨年度までの研究で、我々は、「高分子ミセルは、固形腫瘍に選択的に集積するが、径3 mm以下の微小腫瘍の腫瘍血管からは漏れにくく、そのようなサイズの腫瘍にはほとんど蓄積しない」ことを見出した。本年度の研究で、高分子ミセル同様、アルブミンの腫瘍血管外移行も微小腫瘍では高くないことが判明した。このことから、これは微小腫瘍の血管に備わった機能特性と考えられる。

しかし、腫瘍血管破断薬AC7700をナノ粒子（高分子ミセル、アルブミン）投与の1日前、あるいは3日前に静脈内投与しておく、微小腫瘍の血管であっても、生き残った腫瘍血管は漏れやすい血管に変わること、そして、AC7700で誘導された変性腫瘍組織にナノ粒子が高濃度で蓄積されることがわかった。これはAC7700の前投与で、微小腫瘍にもEPR効果を起こすことができることを示している。

一方、ナノ粒子投与3日前に10Gy照射を行った場合には、それらナノ粒子に対する腫瘍血管の透過性は著しく亢進したものの、ナノ粒子は腫瘍組織に留まらず、徐々にウオッシュアウトされた。10Gy照射3日後には、腫瘍内の広範囲で変性した癌細胞が観察された。しかし、ナノ粒子がそこに留まらなかったという事実は、ナノ粒子に対する腫瘍血管の透過性亢進と、腫瘍変性領域へのナノ粒子の蓄積とが、必ずしも連動した現象ではないことを示している。我々は、別の研究で、放射線照射3日後に腫瘍血流の増量が最大となり、組織液の流れを含む循環状態の改善が著明になることを示した。放射線照射後に、ナノ粒子が腫瘍内に留まらず、ウオッシュアウトされる理由は、この循環改善が寄与している可能性が高い。

以上の結果は、腫瘍血管の透過性亢進と腫瘍組織の変性は、EPR効果が起きるための必要条件ではあるが、十分条件ではないことを示している。我々は、EPR効果が起きるための必要十分条件は、腫瘍血管の透過性亢進は無論、腫瘍内に変性した組織が存在しており、しかもその変性組織の循環が破綻していることと考察した。

E. 結論

微小腫瘍ではEPR効果は起きにくい、腫瘍血管破断薬AC7700を前投与して、腫瘍循環機能を低下させ、組織の一部に壊死を誘導すれば、微小腫瘍にもEPR効果を起こすことができる。この発見は、ナノ粒子化した抗癌薬や診断薬を微小転移巣に送達し、そこに留めるためのブレイク

スルーである。

この手法を用いれば、微小腫瘍に対するナノ粒子化抗癌薬の攻撃力を高めることができるだろう。また、従来の方法では困難であった微小腫瘍の探知にも威力を発揮するものと思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

【原著】

1. K. Hori, S. Furumoto, K. Kubota: Tumor blood flow interruption after radiotherapy strongly inhibits tumor regrowth, *Cancer Science*, 99 (7), 1485-1491 (2008)

2. 学会発表

- 1) 堀 勝義、腫瘍血流制御のがん治療における意義、第26回腫瘍循環病態研究会、仙台、2008年2月8日
- 2) 堀 勝義、西原正通、横山昌幸、高分子ミセルの腫瘍変性領域への集積、第24回日本DDS学会、東京、2008年6月29-30日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

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(医療機器開発推進研究事業)
分担研究報告書

SN-38内包高分子ポリマーミセルの臨床第I相試験に関する研究
研究分担者: 濱口 哲弥 国立がんセンター中央病院 総合病棟部17B病棟医長

研究要旨 国内で開発されたSN-38内包高分子ポリマーミセルのヒトにおける臨床第I相試験を行い、用量制限毒性、最大耐用量、薬物動態および第II相試験における推奨用量の推定を行った。

A. 研究目的

CPT-11は抗腫瘍活性を有するSN-38に水溶性を向上させる官能基を結合したプロドラッグであり、肝のcarboxylesteraseにより加水分解されて活性代謝物であるSN-38を放出する。その代謝効率は10%未満である。SN-38の殺細胞効果はCPT-11に比し約1000倍優れている。また、carboxylesterase活性は薬理遺伝学的な個人差もあるため、SN-38そのものを生体投与できれば良いが、水難溶のため不可能である。

NK-012はSN-38がポリエチレングリコール(PEG)とポリグルタミン酸の両親媒性のブロックコポリマーのポリグルタミン酸鎖にエステル結合され、その後ミセル可溶化した製剤で平均粒径は20nmである(図1)。SN-38とブロックコポリマーの結合は酵素非依存的に加水分解される。よってSN-38内包高分子ミセルは、患者間の酵素活性の差に影響されることなく安定した薬効を示すことが期待できる。



図1: SN-38内包高分子ミセルの構造

NK012の平均粒径は約20nmであり、リポソーム製剤や他のミセル体抗がん剤と比較するとやや小さめである。我々は37°CのPBS(phosphate buffered saline)内でのNK012からSN38のリリース速度は24時間で57%、48時間で74%である一方、37°Cの5%ブドウ糖液下でのリリースは、24時間で1%、48時間で3%と低値を示しており、こ

のことからもNK012は投与前の環境では安定であり、かつ投与後、生体内では比較的速やかにSN38をリリースする性質が示された。

各種細胞株におけるin vitroでの細胞増殖抑制効果(IC₅₀)はCPT-11の約43~340倍と強い抗腫瘍効果を示し、またヌードマウスの皮下に移植したヒト腫瘍6系(結腸癌3系、胃癌2系、小細胞癌1系)に対する抗腫瘍効果試験においても、NK012は検討した全てのヒト腫瘍系に対してCPT-11に比較し高い有効性を示した。ここでのCPT-11と同等の効果を示すNK012の投与量はSN-38換算量としてCPT-11の1/5~1/10であり、NK012はミセル形成型高分子プロドラッグにする事によってSN-38の薬効を効率よく発現できることが示唆された。

本剤の毒性については、前臨床試験においてリンパ・造血器、消化管、生殖器及び皮膚への殺細胞作用に基づく毒性が認められた。DDS製剤に期待される効果の一つとして、正常組織への分布の減少による有害事象の軽減がある。CPT-11の用量制限毒性の一つである下痢はCPT-11とSN-38の腸管への直接障害が原因の一つと考えられている。NK012とCPT-11投与後の小腸におけるfree SN-38の濃度分布の検討では、両者に差は認められなかった。しかし、NK012はCPT-11自体としての腸管障害がない分、下痢症状を軽減させる可能性が示唆され、恩田らは、ラットのモデルを用いてNK012がCPT-11に比較し強い抗腫瘍効果を発揮すると同時に、下痢症状を軽減させると報告している。

今回、組織学的に悪性腫瘍と診断され、標準治療に無効もしくは適切な治療がない症例を対象に、用量制限毒性(dose limiting toxicity; DLT)・最大耐用量(maximum tolerated dose;

MTD)の決定、薬物動態(pharmacokinetics; PK)解析および第Ⅱ相試験における推奨投与量(recommended dose; RD)の推定を目的に本薬剤の臨床第Ⅰ相試験を行った。

B. 研究方法

対象:組織学的に悪性腫瘍と診断され、標準治療に無効もしくは適切な治療がない症例で、主要臓器機能が十分保持され、PSが0-2、20歳以上74歳未満等の条件にて選択した。投与方法:開始投与量は、前臨床試験においてマウスLD₁₀の1/10が17.3mg/m²、イヌのTDL(Toxic dose low)の1/3が2.13mg/m²であったことから、2mg/m²と設定し、規定に沿って投与量を増量していった。用法・用量は5%ブドウ糖液250mlに溶解し、30分で点滴静注を行い、これを3週間毎に実施した。評価項目:毒性の評価はCTCAE(Ver.3.0)で行い、抗腫瘍効果の判定はRECISTを用いて行った。また血液・尿をサンプルとし、PK解析も実施した。DLTの規準は、1)5日以上継続するGrade4の好中球減少(<500/μL)、2)Grade4の血小板減少(<25,000/μL)、3)Grade3以上の非血液毒性(Grade3までの食欲不振、悪心、嘔吐、過敏症は除く)とした。

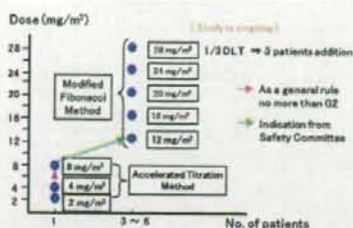
(倫理面への配慮)

臨床第Ⅰ相試験においては新GCP(Good Clinical Practice)に従い施設内倫理審査の承認を得たうえで慎重に行なう。

C. 研究結果

(1)患者背景:症例の内訳は全24例中、大腸癌が最多で12例、次いで膵臓癌4例、小細胞肺癌3例、食道癌3例、非小細胞肺癌1例、肺カルチノイド1例であった。いずれも各癌種の標準治療に不応となったもしくは標準治療がない患者を対象とした。(2)増量経過:増量法は、開始用量を2mg/m²としAccelerated Titration methodにて1例毎に100%増量した。8mg/m²投与群において好中球数が投与前値に比べて約50%減少した為、効果安全性評価委員会に諮り、安全性を考慮し以降はFibonacci変法に変更し増量した。その後、20mg/m²投与群において、Grade4の好中球減少が出現したため、増量幅を4mg/m²とした(図2)。

Dose Escalation



28mg/m²投与群においてDLTであるGrade3の発熱性好中球減少が出現した為、3例追加検討した。その追加3例中1例にGrade4の好中球減少が発現したが、その時点ではDLTの評価が困難であったため、効果安全性評価委員会の答申を受け更に3例再追加し、28mg/m²投与群は計9例での評価となった。また、SN-38のpoor metabolizerであるUGT1A1*28/*28,*6/*6,*6/*28のSNPを持つ症例に対する増量も計画されていたが、該当する症例はいなかった。(3)有害事象:有害事象に関してDLTは、16mg/m²投与群に1例、24mg/m²投与群に1例、28mg/m²投与群に5例の計7例に認められた。16mg/m²投与群では4コース目にGrade3のγGTP増加が認められ、24mg/m²投与群では3コース目に5日以上継続するGrade4の好中球減少が認められた。28mg/m²投与群では、1コース目の9例中2例に5日以上継続するGrade4の好中球減少およびGrade3の発熱性好中球減少がそれぞれ1例ずつ認められ、2コース目以降に5日以上継続するGrade4の好中球減少、好中球減少を伴う感染(Grade3)およびGrade3の心房粗動をそれぞれ1例ずつ認められた。増量規定では、28mg/m²投与群9例中1コース目のDLT発現が2例であったことから、さらなる増量は可能であったが、2コース目以降に発現したDLT等も含め、効果安全性評価委員会でも検討した結果、本試験ではこれ以上の増量は行わないこととし、MTDを28mg/m²と判断し、また、主なDLTがG-CSF等でコントロール可能な好中球減少であったことから推奨投与量を28mg/m²とした。次に副作用発現状況を図に示す(図3.4)。

Dose (mg/m ²)	n	白血球減少				好中球減少				血小板減少			
		Grade				Grade				Grade			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
2-8	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	3	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
18	3	1	2	0	0	2	0	1	0	1	0	0	0
20	3	1	0	2	0	1	0	0	2	0	1	0	0
24	3	0	2	1	0	0	0	2	1	3	0	0	0
28	9	0	1	5	3	0	0	4	5	3	3	0	0
total	24	2	6	9	3	4	0	8	8	8	4	1	0

図3 血液毒性

	2-20mg/m ² (n=12)				24mg/m ² (n=9)				28mg/m ² (n=9)			
	Grade				Grade				Grade			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
悪心	8	2	0	0	3	0	0	0	3	3	1	0
食欲不振	6	3	0	0	3	0	0	0	3	2	2	0
嘔吐	3	1	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0
下痢	3	0	0	0	0	1	0	0	4	4	0	0
腹痛	7	0	0	0	2	1	0	0	4	2	0	0
悪性好中球減少	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
発熱	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
心臓病	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
脳毛	7	1	-	-	1	2	-	-	5	3	-	-
γ-GTP増加	0	1	1	0	1	0	0	0	2	1	0	0

図4 非血液毒性

血液毒性は、20mg/m²投与群で2例Grade4の好中球減少が出現し、28mg/m²投与群では、全例がGrade 3以上の好中球減少を認めていた。血小板減少は28mg/m²投与群でGrade 2が3例であった。非血液毒性については、主な事象は消化管毒性であったが、多くは一過性で、問題となると考えられた下痢については、28mg/m²投与群でGrade3以上はなく、Grade 2が4例であった。(4)薬物動態：図5は28mg/m²投与群におけるPK結果で、ポリマー結合SN-38、非結合SN-38、SN-38Gともに長時間に渡って血中濃度を保っていることが分かる。既報告(11)のCPT-11のPKと比較し、T_{1/2}ではポリマー非結合SN38はSN38の15倍、ポリマー結合SN38はCPT-11の30倍、AUCはそれぞれ2倍、10倍と、T_{1/2}・AUCとも高値を示しており、NK012の血中滞留性の高さが確認された。

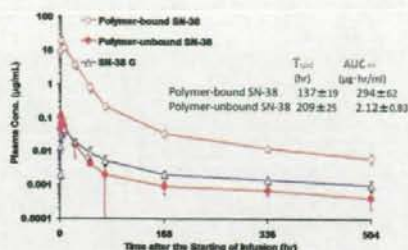


図5 NK012(28 mg/m²)投与後の各PKパラメーター血中濃度(n=9)

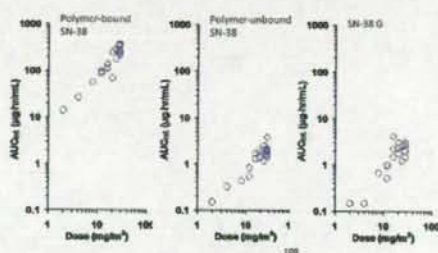


図6 投与量とAUCの関係

図6は投与量とAUCについて関連をみたものであるが、ポリマー結合、非結合SN-38、SN-38G共に用量依存的にAUCが増加していた。(5)有効性評価：抗腫瘍効果は、28mg/m²投与群において食道がんおよび肺カルチノイドの1例に部分奏効(PR)が認められた。大腸癌ではPR例は認められていないが、12例中全例がCPT-11既治療例であるにも関わらず12例中5例に安定(SD)が認められ、4例が6コース以上の投与が可能であった。食道癌のPR症例を図8に提示する。肺両葉の転移が縮小していた。

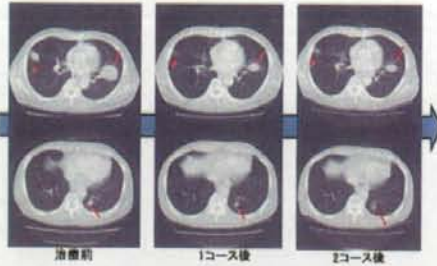


図9 食道癌患者(NK012:28mg/m²投与群) PPR例

D. 考察

SN-38内包高分子ポリマーミセルの臨床第I相試験をおこない、日本人におけるDLT, MTD, RDの決定とPK解析を行った。主な有害事象は骨髄抑制であり、薬物動態の解析では血中安定性についても確認された。また食道がん、気管カールチノイド症例にて有効性も認められた。前臨床試験では、同薬剤の血中動態および腫瘍組織の薬物濃度などの検討がされているが、ヒトでの体内動態、とくに癌組織での薬物動態についての検討はなされていない。そもそもそのような薬物動態を十分解析する方法論が確立していない。本研究班の、横山らは、MRI造影剤を高分子ミセルに内包し体内動態を観察する方法論の開発を行っている。このような観察系が確立することができれば、血液動態のみではなく癌組織を含めた体内動態を解析することができ、このような薬剤の開発に有用な方法になることが期待される。

E. 結論

NK012の国内第I相試験での主なDLTは好中球減少であり、第II相試験における推奨投与量は28mg/m²である。PK解析ではNK012の血中滞留性は良好であり、ポリマー結合型SN-38並びにポリマー非結合型SN-38のAUCは用量依存的に増加している事が認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

【総説】

1) 堀田洋介、濱口哲弥: SN-38内包高分子ミセ

ルNK012 日米独立Phase I 試験. Drug Delivery System 24: 54-61, 2009

【原著】

1) Nakajima T.E, Hamaguchi T, et al. Synergistic antitumor activity of the nobel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. Int J Cancer 122: 2148-2153, 2008

2) Nakajima T.E, Hamaguchi T, et al. Antitumor effect of SN-38-releasing polymeric micelles, NK012, on Spontaneous peritoneal metastases from orthotopic gastric cancer in mice compared with irinotecan. Cancer Res 68: 9318-9322, 2008

2. 学会発表

1) 堀田洋介、濱口哲弥. SN-38内包高分子ミセル(NK012)の臨床第I相試験 -中間報告-. 第24回日本DDS学会. 東京.

2) 中島貴子、濱口哲弥. 胃癌同所異色腹膜播種マウスモデルにおけるSN-38内包ミセルNK012の抗腫瘍効果の検討. 第24回日本DDS学会. 東京.

3) Doi T, Fuse N, Ohtsu A, et al.: Phase I dose escalation study of NK012, polymer micelle of irinotecan metabolite SN-38, in patients with advanced cancer: abstract from 20th EORTC-NCT-AACR symposium on "Molecular targets and Cancer Therapeutics". 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
横山昌幸	高分子ミセル	岡田弘晃	機能性DDSキャリアの製剤設計	シーエムシー出版	東京	2008	42-54
T. Kawaguchi, S. Imai, S. Haga, J. Morimoto, T. Honda	Demonstration and partial identification of aberrant Mucl bearing Tn antigen in rat ascites hepatoma AH109A cells with strong lymph node metastasis propensity	A. Watanabe	Cancer Metastasis Research	Nova Science Publisher	New York	2008	147-163

雑誌

(in pressのものはproofのあるもののみ掲載した)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年	
Narin Chansri, Shigeru Kawakami, et al.	Anti-tumor Effect of All-Trans Retinoic Acid Loaded Polymeric Micelles in Solid Tumor Bearing Mice	Pharmaceutical Research	25	428-434	2008	
Akihiro Hayama, Yoshie Maitani, et al.	Polymeric micelles modified by folate-PEG-lipid for targeted drug delivery to cancer cells in vitro		8	67	3085-3090	2008
Tomoyuki Okuda, Shigeru Kawakami, et al.	Block copolymer design for stable encapsulation of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide into polymeric micelles in mice	J. of Pharmaceutics	357	318-322	2008	

Yoshihiko Murakami, Masayuki Yokoyama et al.	A simple hemostasis model for the quantitative evaluation of hydrogel-based local hemostatic biomaterials on tissue surface	Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	65	186-189	2008
Hiroyuki Koide, Masayuki Yokoyama, et al.	Particle size-dependent triggering of accelerated blood clearance phenomenon	International Journal of Pharmaceutics	362	197-200	2008
Masamichi Nishihara, Masayuki Yokoyama, et al.	Synthesis and Characterization of A Temperature-responsive Amphiphilic Block Copolymer Containing a Liquid Crystalline Unit	Chemistry Letters	37	1214-1215	2008
Kouichi Shiraishi, Masayuki Yokoyama, et al.	Preparation and in vivo imaging of PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agents	Journal of Controlled Release			in press
Takanori Kawaguchi, Masayuki Yokoyama, et al.	Histological study on side effects and tumor targeting of a block copolymer micelle on rats	Journal of Controlled Release			in press
Tomoyuki Okuda, Shigeru Kawakami, et al.	Enhanced in vivo antitumor efficacy of fenretinide encapsulated in polymeric micelles	International Journal of Pharmaceutics			in press
Taku Satoh, Masayuki Yokoyama, et al.	Encapsulation of the synthetic retinoids Am80 and LE540 into polymeric micelles and the retinoids release control,	Journal of Controlled Release			in press
横山昌幸	高分子ミセルターゲティング	炎症と免疫	16	21-26	2008
白石貢一、横山昌幸	ターゲティングを用いたMRI造影剤	Drug Delivery System	23	33-39	2008

横山昌幸	薬物キャリアに用いられる高分子材料	Drug Delivery System	23	610-617	2008
Yukari Kuramoto, Shigeru Kawakami, et al.	Efficient peritoneal dissemination treatment by immunostimulatory phosphorothioate-type CpG DNA/cationic liposome complex in mice	Journal of Controlled Release	126(3)	274-280	2008
Yukari Kuramoto, Shigeru Kawakami, et al.	Mannosylated cationic liposomes/CpG DNA complex for the treatment of hepatic metastasis after intravenous administration in mice	J Pharm Sci	98 (3)	1193-1197	2009
H.L. Ma, Y. Maitani. et al.	Magnetic targeting after femoral artery administration and biocompatibility assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles	Journal of Biomedical Materials Research Part A.	84A(3)	598-606	2008
H.L. Ma, Y. Maitani. et al.	Superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate: Pharmacokinetics, tissue distribution, and applications in detecting liver cancers	International Journal of Pharmaceutics	354(1-2)	217-226	2008
M. Watanabe, Y. Maitani. et al.	In vivo antitumor activity of camptothecin incorporated in liposomes formulated with an artificial lipid and human serum albumin	Journal of Controlled Release	127	231- 238	2008

Y. Maitani, et al.	Artificial Lipids Stabilized Camptothecin Incorporated into Liposomes	Biological & Pharmaceutica l Bulletin	31(5)	990-993	2008
A. Yamada, Y. Maitani. et al.	Design of folate- linked liposomal doxorubicin to its antitumor effect in mice	Clinical Cancer Research	14 (24)	8161-8168	2008
Hori K, Furumoto S, Kubota K	Tumor blood flow interruption after radiotherapy strongly inhibits tumor regrowth	Cancer Science	99(7)	1485-1491	2008
堀田洋介、濱口 哲弥ら	SN-38内包高分子ミセ ルNK012 日米独立 Phase I試験	Drug Delivery System	24	54-61	2009
Nakajima, T.E., Hamaguchi, T., et al.	Synergistic antitumor activity of the novel SN-38- incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil	Int. J. Cancer	122	2148-2153	2008
Nakajima, T.E., Hamaguchi, T., et al.	Antitumor effect of SN-38-releasing polymeric micelles, NK012, on spontaneous peritoneal matastases from orthotropic gastric cancer in mice compared with irinotecan	Cancer Res.	68	9318-9322	2008

3 高分子ミセル

3.1 高分子ミセル薬物キャリアとは¹⁻³⁾

高分子ミセルとはその名の通り、高分子から成るミセル構造のことである。ある分子中に溶媒に溶けやすい部分（ここではAとする）と溶けにくい部分（Bとする）が共存した場合に、Bの部分が含まれて形成する構造がミセルである。低分子両親媒性脂質から成るミセル構造の場合に知られているように、ミセルには大別すると球状ミセルと棒状ミセルがある。高分子ミセルの場合にも、棒状のミセルが薬物キャリアとしての検討が始められたが⁴⁾、本総説は球状ミセルのみを扱う。また、脂質から成る会合体のもう1つの方式は二分子膜の小胞体であるリポソームであり、高分子から成るものとして相当するのはポリマーソームである。ポリマーソームの薬物キャリアとしての検討も始められたばかりと云うところである。

高分子ミセルの場合には、高分子構造中にAとBの構造が含まれていれば形成し得るのであるが、明確な構造を取りやすいのはグラフトコポリマーやブロックコポリマーのように、AとBが高分子鎖になっっている場合である。この高分子の合成については3.3項に述べる。

図1にAB型ブロックコポリマーから成る高分子ミセル型薬物キャリアシステムの例を示す。これは直鎖状の高分子鎖であるA鎖とB鎖が直列につながった形のブロックコポリマーであり、高分子ミセル型薬物キャリアシステムとして最も典型的なものである。生体の体液中で使うので、A鎖は水あるいは緩衝液に溶ける構造のもので、B鎖はこの溶液中で相互作用を及ぼして会合する性質のものである。封入する薬物が疎水性である場合が多いので、典型的な高分子ミセルキ

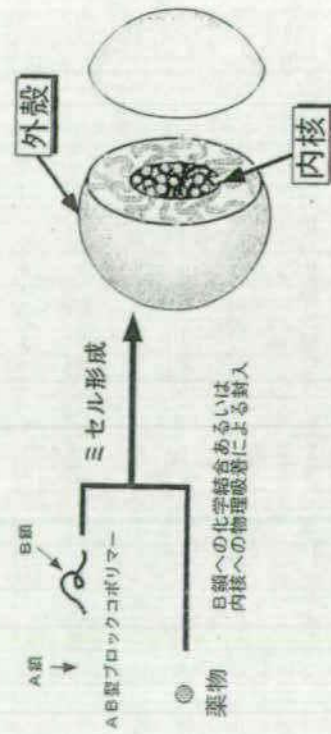


図1 典型的な高分子ミセル薬物キャリアシステムの構造

リアではB鎖は疎水性鎖になる。以下はB鎖が疎水性の場合を説明し、それ以外の相互作用を用いる場合は次項3.2.4で説明する。

このAB型ブロックコポリマーが、数十〜数百個会合してB鎖が疎水性の内核を、A鎖は親水性の外殻を構成した球状のミセル構造を形成する。ミセルに導入する薬物は、B鎖に化学的に結合するか、B鎖が形成するミセル内核に物理的に主に疎水性相互作用で封入される。1つのミセルを形成するポリマー鎖の数は、A鎖とB鎖の化学構造と長さによって規定される。

古典的には、ミセル構造を含む溶液にはミセル構造と、この構造を形成しないで単独で溶媒に溶けているブロックコポリマー（ユニマーと呼ぶ）が共存し、このときのユニマー濃度を臨界ミセル濃度（Critical Micelle Concentration: CMC）と呼ぶ。ユニマー濃度がCMC以上となるとミセル構造を形成し始め、高分子濃度が増加してもミセルの濃度が増加するだけで、ユニマー濃度はほぼCMCに一定に保たれる。このCMCについて、高分子ミセルにおいて重要なことが2つある。

その第一はCMCの小ささである（つまり、低い高分子濃度でミセル構造を形成できる）。高分子ミセルではそのCMCの値が低分子の界面活性剤の場合と比べると小さく、通常1〜10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と小さな値を取ることが知られている⁵⁾。つまり、投与後の血液による希釈後も、血液中のポリマー濃度が十分にCMCよりも大きく、ミセル構造が血液内でターゲットティングに必要な時間保たれることである。ここで少し、計算を試みる。臨界ミセル濃度が3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、投与量3 mg/kg の薬物を、薬物含有量10 wt%の高分子ミセルで投与する場合を想定する。これを血液中に投与すると血液中の高分子濃度は $3 \text{ mg}/\text{kg} \times 10/70 = 0.4 \text{ mg}/\text{mL}$ 位となる（血液量は体重1 kg 当たり70 mL とした）。この値は臨界ミセル濃度よりも100倍以上高い濃度であることから、血液内に投与してからその濃度が1/100未満に減衰するまでの充分に長い時間、（ユニマーではなく）高分子ミセルとしてデリバリーを実現することができる。このようにCMCに基づくミセル構造の安定性をここでは静的安定性と分類する。

これに対し、第二の重要な点は動的な高分子ミセル構造の安定性である。古典的な定義では、ミセルとはユニマーとの間で平衡が成立しているものを指すのであるが、高分子ミセルの場合には内核が固体の性質を持つときに、ミセル構造がユニマーへと解離してゆく速度がゼロあるいは大変小さくなる時がある。前述の静的な安定性とともにもとめたのが図2である。もし、内核が完全な固体の性質を示してユニマーに解離しなくなつたときには、ミセル構造はユニマーとの間の平衡ではなく、解離しない粒子として振る舞うことになる（平衡であつたり平衡でなかつたりと奇妙に思われるかも知れないが、例えばミセル形成過程ではミセル内核が液体状態の高温で行い、その後低温にしてミセル内核を固体にする場合などが考えられる）。一般に、生体内では血液内濃度を下げる排出経路は数多くある。ここでミセルが完全な平衡関係にある場合を想定し

横山昌幸*

* Masayuki Yokoyama 神奈川科学技術アカデミー 横山高分子ナノメダイカルプロジェクト プロジェクトリーダー

1. 静的安定性が高い = ミセル形成の平衡定数Kが大きい
 → 臨界ミセル濃度(ミセル形成が観測し得た時のユニマー濃度)が小さい
2. 動的安定性が高い = ミセル解離の速度定数 k_2 が小さい
 特に、ミセル内核が完全に固体状態になると $k_2 = 0$ となり
 ユニマーと平衡関係にない固体粒子となる



図2 高分子ミセルの静的および動的安定性

てみる。投与したときの高分子の濃度はCMCよりも圧倒的に高くても、ユニマーが腎臓や肝臓から急激に排出された場合に平衡がミセルからユニマーに急速に移行することも考えられる。その場合には、ミセル構造は短時間で失われることとなる。このときに、もしミセル内核が固体性を示して解離の速度がゼロではないにしても、相当に小さなものであれば、長い時間血液内でミセル構造でのテリバリーが可能となるのである。言葉を換えて言うと、ミセルとユニマー間の平衡移動が速く、ポリマー濃度などの条件を変えても瞬時に新たな平衡が成立するものを「古典的」ミセルと呼ぶとすると、高分子ミセルでは「非古典的」なミセルとなることもあり、それがターゲティングに有益に利用し得るということである。

生体内でのターゲティングのためには、動的なミセル構造の安定性は必須のものであると考えられる。その理由は、平衡移動の速い典型的な系であるブルロニックから成る高分子ミセルでは *in vivo*でのターゲティングの例がないことである。これに対し、筆者がターゲティングに用いた高分子ミセルシステムはいずれも内核が固体性を有して、その固体性からNMRスペクトルの情報が内核からは得られないものを用いている。しかし、ターゲティングを最適化するためには、すなわち血中循環性を最適化するために静的および動的な安定性がどの程度の割合で重要かについては明らかにされていない。より広範な薬物、治療目的に対応するためには、血液の中でミセル構造安定性に及ばず、静的および動的な側面の寄与を明らかにするという、基礎的なアプローチが求められると考えられる。

3.2 高分子ミセルキャリアの製剤としての特徴^{1,2)}

高分子ミセル薬物キャリアシステムの製剤学的な長所と短所を表1にまとめた。長所から説明を始めたい。

表1 高分子ミセルの薬物キャリアとしての特徴

長所
1. 10~100 nmの粒径が容易に得られる
2. 機能的な材料設計が容易
3. 低い毒性
4. 様々なタイプの薬物封入が可能
短所
1. 比較的高度な高分子合成が必要
2. 薬物封入法が未発達

3.2.1 10~100 nmの粒径が容易に得られる

高分子の会合体である球状の高分子ミセルでは、その直径は10~100 nmの範囲内である。高分子ミセルとしてはこの範囲の粒径が得られることは当然のことであるが、一般的にこのサイズの範囲の微粒子を得ることは技術的に困難である。この範囲の粒径は、後述する固形がん組織へのターゲティングで有用な大きさである。さらに、高分子から成るために、体液中でキャリアの機能を果たすのに十分な時間ミセル構造を安定に保つことが可能である(前項で記した静的および動的な側面での安定構造)。

この粒径の高分子ミセルが薬物キャリアとして有用なのは以下の2つの理由による。その第一は、この粒径であると腎臓からの排出を逃れ、かつ肝臓・脾臓の細網内皮系に捕捉されにくいために、血中循環性を高く保つことが可能である。その第二は、固形がん組織へのパッシブターゲティング⁴⁾¹⁾の1つの方法であるEPR効果が利用できることである。がん組織では血管内皮の透過性は異常に亢進していると同時に、リンパ系による排出が抑制されているために、ナノサイズのキャリアは本質的に固形がん部位に選択的に蓄積しやすい性質がある。この性質はEPR効果(Enhanced Permeability and Retention effect)と呼ばれ、1986年に前田、松村によって提唱された^{6,7)}。EPR効果は、高分子ミセルに限らずに、リポソームや合成高分子の固形がんへのター

注1) パッシブターゲティングとは、特異抗体の認識を使わずに、拡散や境界透過などの物理現象を通して特定部位への選択的送達を行うことである。