

表5から透析法の方がエバポレーション法よりも多種類のポリマーで良好な封入率が得られていることがわかる。しかし、50%以上の封入率が得られた、系については、封入方法による粒子径への影響は認められなかった。Am80封入ミセルを5-24PEG-P(Asp(Bzl))2種のポリマーで調製した場合、室温静置数日以内に白色の沈降物が観察された。Am80封入ミセル溶液を長期保管する場合は凍結することが望ましい。なお、この沈降現象はAm80仕込量が10%を超えたとき、ならびにベンジル修飾率が高い場合に生じやすい傾向が確認された。

透析法によるAm80のミセルからの放出試験の結果を図15に示した。ミセル化に使用したポリマーは5-24PEG-P(Asp(Bzl)76%)、ミセル溶液中のポリマーとAm80の濃度はそれぞれ1.0および0.83 mg/mLである。透析1週間後の放出率は約30%であり、Am80は水中では緩やかに放出される。

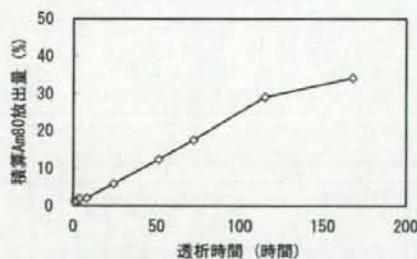


図15 透析法によるAm80水中での放出性評価

この試験中にミセル溶液の凝集は観察されていない。一方、京都大学における*in vivo*試験では、上記と同様の組成からなるミセルではAm80の血中滞留性の向上を確認できなかった。*In vitro*と*in vivo*における放出条件の差異を埋める評価系が求められる。

GPC法によるAm80封入ミセルの測定結果を図16に示した。挿入図はAm80未封入のミセルの測定結果である。ここではポリマー1および2のミセルについて評価を行っている。

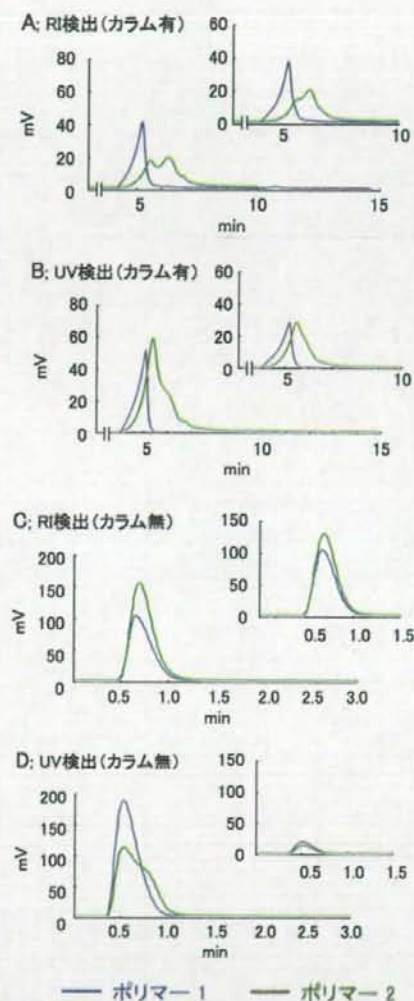


図16 ポリマー1および2のAm80封入ミセルのGPCクロマトグラム。A-B;カラム装着、C-D;カラム未装着。挿入図は薬剤未封入のミセル未封入のミセル

カラム装着系で5分前後に現れるRIピークがミセル成分である(図16-A)。

UV検出ピークが同時間帯で認められるとAm80がミセルに封入された状態にあるといえるが、Am80未封入のミセルでもUV吸収が無視できない強度で観察された(図16-B挿入図)。この吸収はミセルによるものであり、バックグラウンド吸収と見なされるべきものである。Am80未封入ミセルのクロマトグラム(図16-A, B挿入図)のUVとRIのピーク面積比(UV/RI)を取ると、これが単位ミセル濃度あたりのバックグラウンド吸収として扱うことができる(表6)。Am80封入ミセルのクロマトグラム(図16-A, B)のUV/RIはポリマー1と2のいずれについても未封入ミセルよりも高い数値を示しており、Am80がミセルに封入されていることが示された。

表6 Am80封入ミセルのGPC分析結果。

ポリマー	カラム	Am80	UV面積*	RI面積*	UV/RI
1	+	+	1.6	1.3	1.2
2	+	+	3.5	1.6	2.2
1	+	-	1.0	1.3	0.8
2	+	-	1.6	1.3	1.2
1	-	+	6.6	1.7	3.8
2	-	+	5.3	2.6	2.1
1	-	-	5.4	1.6	0.3
2	-	-	3.5	2.0	0.2

* 単位は $\text{mV}\cdot\text{sec}$ (10^3)。

表7 カラム内でのミセルおよび薬剤の損失率。

ポリマー	薬剤	UV面積 減少率 (%)	RI面積 減少率 (%)
1	Am80	75	24
2	Am80	34	38
1	LE540	91	38
2	LE540	63	29

一方、カラムを装着していない系の測定結果(図19-C, D)と比較することでカラム内吸着によるミセルの損失量を評価できる(表7)。興味深いことにポリマー1のAm80封入ミセルは、RIピーク面積の減少率、すなわち

Am80の損失は75%に上った。詳細な機構は不明であるが、カラム内でAm80がミセルから放出されていると推察される。ポリマー2についてはRIとUVのピーク面積減少率はそれぞれ62および66%であり、ポリマー1よりも良好なAm80の保持性能を示した。

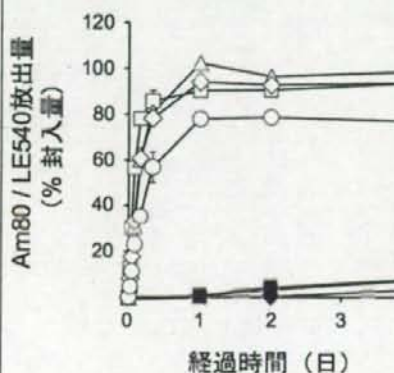
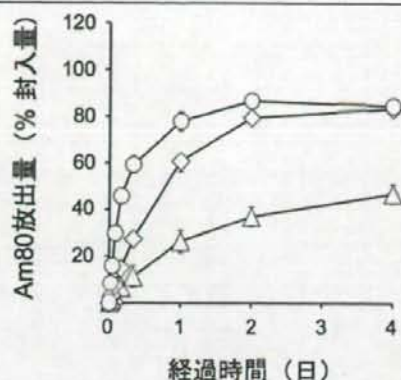


図17 Am80およびLE540のin vitro 薬物放出

この薬剤とミセルの損失率が一致しない現象はLE540封入ミセルについても示された。また、LE540の保持に対してもポリマー2がポリマー1よりも優れていた(表7)。以上の結果は、GPC解析を詳細に行うことでポリマー種による薬剤保持性能の評価が可能であることを示唆している。

次に、PBS中有でのAm80及びLE540の薬物放出速度を求めた。

透析チューブ (1-kDa cut-off) 中の Am80 封入高分子ミセル溶液から外部透析液 (PBS, pH 7.4) への Am80 の放出挙動を示す。Am80 を白抜きプロット、同じく合成レチノイドで Am80 よりも疎水性の強い LE540 を黒いプロットで示す。Bz1)80 や Bz1)53 などの数字は疎水性のベンジルエステル化率を示す。PEG-PBLA は 100% のエステル化率に相当する。どの場合も放出速度に大差はなく、8 時間で 60 ~ 80% の内包薬物が放出するという、速やかな放出である。LE540 の場合には徐放が達成されているので、Am80 の速い放出は Am80 が安定にミセル内核に内包されていないことを示す。このような場合に従来は、疎水性の高分子鎖の化学構造を薬物の封入安定化に最適化してきた。しかし、ここで用いているブロックコポリマーはカンプトテシンなどの薬物を安定に封入して、in vivo でのターゲティングに実績のあるブロックコポリマーである。高分子構造を変えることなく、封入安定化が実現することが好ましい。LE540 との放出速度の比較から、安定なミセル内封入には Am80 は疎水性が低いと考えられる。そこで、カルボン酸を有する Am80 と疎水性の塩基をイオンペア形成させて、そのイオンペアの状態でのミセル内核への封入を試みた。PEG-PBLA 5-24 を用いた場合の結果を図 18 に示す。アルキル鎖長の異なる *N,N*-ジメチルアルキルアミンを添加剤として加えた結果、アルキル鎖長の増大にともない Am80 の放出速度が顕著に低減した。この事実は、形成したイオンペアは Am80 よりも疎水性が強いために、ミセル内核に安定に舟生されて、放出速度が顕著に減少したことを示唆する。



N,N-ジメチルアルキルアミン

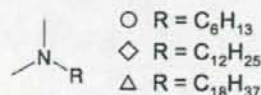
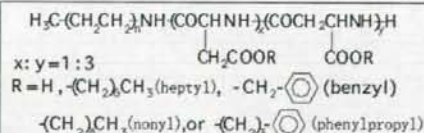


図18 疎水性アミンの共封入によるAm80放出の徐放化

4- HPR封入ミセルの評価

{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A-1)。



図A-1 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 $\pi-\pi$ 結合を介した封入の有用性が伺えた(図A-2)。

調製した4-HPR封入ポリマー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。

	4-HPR recovery (%)	particle size (nm)	Z-potential (mV)
heptyl (65%)	35.9 ± 2.6	223 ± 1.4	-1.3 ± 0.4
benzyl (77%)	48.9 ± 1.4	175 ± 7.9	-1.4 ± 1.2
nonyl (84%)	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A-2 4-HPR封入ポリマーミセルの収率及び物理的性質

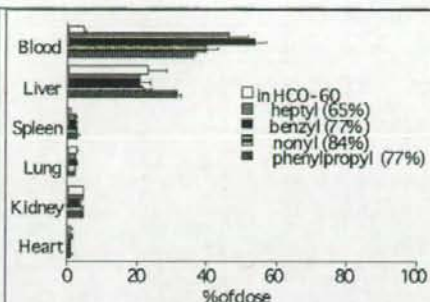
4-HPR封入ポリマーミセルの体内動態

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A-3)。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。

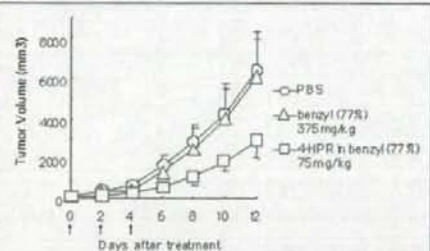
担癌マウスでの4-HPR封入ポリマーミセルの抗がん活性

前述の結果から、ベンジル基導入率77%



図A-3 4-HPR封入ポリマーミセルの体内分布

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A-4)。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。

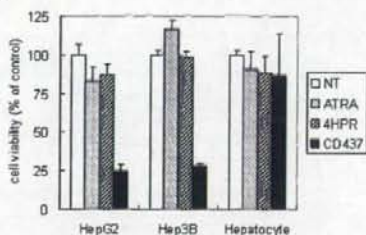


図A-4 4-HPRポリマーミセルによる癌治療効果

レチノイドによる正常細胞への影響

まず各種レチノイド(ATRA、4HPR、CD437)によるレチノイドの正常細胞への影響の評価を目的に、レチノイドの主な代謝組織であるヒト正常肝細胞に対する細胞死誘導の影響をヒト由来肝癌細胞株と比較して評価した。各薬物を0.01~100 μ Mの各濃度で72時間処理を行ったところ、CD437のみ1 μ Mで有意な増殖抑制効果が認められたが、ATRAおよび4-HPRは10 μ Mでも

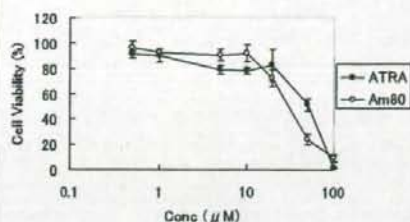
ほとんど増殖抑制効果が認められなかった。次に、薬物濃度を1 μ Mに固定して24~72時間において経時的に細胞増殖抑制効果を評価したところ、ATRAや4-HPRでは72時間でもほとんど増殖抑制効果を示さないのに対し、CD437では24時間で細胞生存率が25%であった。さらに、正常細胞への影響を評価するためにATRA、4-HPR、およびCD437を1 μ Mで72時間処理したところ、いずれの薬物についてもCD437はATRAや4-HPRと同様にほとんど細胞死は認められなかった(図A-5)。従って、CD437は、正常細胞への細胞死をほとんど誘導することなく、ATRAおよび4-HPRに比べて有意に肝癌に対する細胞死を誘導することが明らかとなった。



図A-5 各種レチノイドによるヒト正常肝細胞(Hepatocyte)およびヒト由来がん細胞株(HepG2およびHep3B)に対する細胞死誘導効果

合成レチノイドAm80によるがん増殖抑制効果

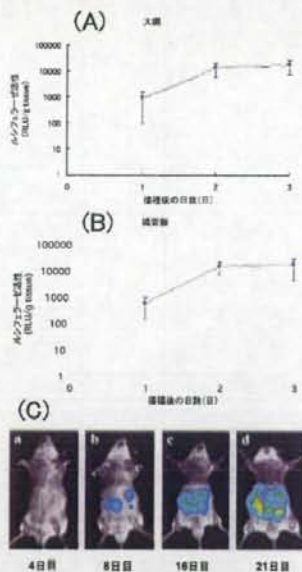
ATRA耐性を克服した新規合成レチノイドAm80の腹膜播種治療への応用を目的にマウス由来結腸がん細胞株colon26細胞、CT26細胞株に対する増殖抑制効果をMTT assay法により評価した。100 mM、48時間処理により細胞生存率はほぼ0%であり、colon26細胞株に対してATRAと同程度に高い細胞増殖抑制効果を示した(図A-6)。



図A-6 Am80およびATRAによるcolon26に対する細胞死誘導効果

腹膜播種モデルの作製

in vivoでのがん細胞増殖の定量的およびイメージングによる視覚的評価可能

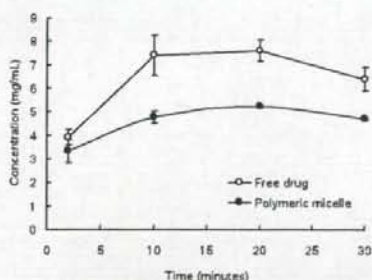


図A-7 腹膜播種モデルにおける大網(A)および腸間膜(B)のがん細胞増殖の定量的評価およびイメージングによる評価(C)

な腹膜播種モデルの確立を目的に、ルシフェラーゼ安定発現細胞株を作製し、マウスの腹腔内に投与した。腹膜投与一定日数後、腹膜播種におけるがんの転移組織である大網および腸間膜を採取しホモジナイズ後の

ルシフェラーゼ活性を測定したところ、従来の肉眼による結節数による評価の約6倍の感度で評価可能であった。また、一定日数後の腹膜播種モデルマウスを高感度イメージングによる評価が可能であった(図A-7)。

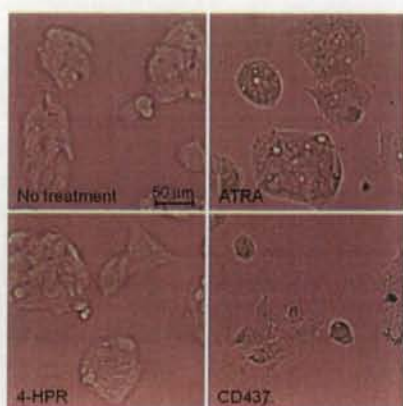
レチノイド封入高分子ミセルの投与後の腹腔内滞留性の評価: 腹腔内投与後の血中への移行は分子量により決定され、分子量の小さい分子は速やかに血中へ移行するが、分子量の大きな分子は血中への移行が抑制されリンパ節への移行することが知られている。そこでAm80単体を5%DMSO-生理食塩水に分散させた場合と高分子ミセルに封入した場合の腹腔内投与後の血中濃度を測定したところ、Am80単体の場合と比較し高分子ミセルに封入した場合は有意な血中への移行抑制が認められた(図A-8)。



図A-8 Am80内封高分子ミセルおよびAm80単体を腹腔内投与後の血漿中のAm80濃度

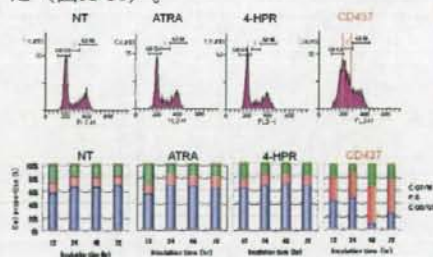
各種合成レチノイドによる分化誘導メカニズムの評価

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A-9)。



図A-9 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

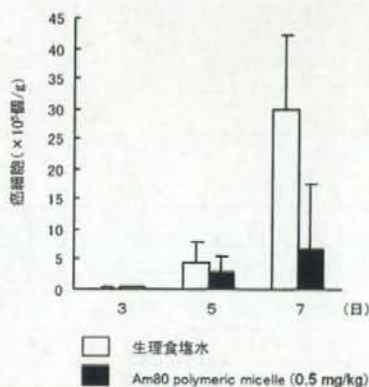
がん細胞は、正常細胞とは異なり細胞周期が更新しているため無限細胞増殖が誘発されている。ATRAは、がん細胞の細胞周期の停止により細胞死を誘導することが知られている。そこで、4HPR, CD437について細胞周期停止の評価をおこなった。各種合成レチノイド含有培地で12~72時間において経時的に細胞周期をFACSにより測定した。ATRAおよび4HPRと比較しCD437においてのみ細胞周期S期の細胞集団の増加が認められ、細胞周期停止が誘発されていることが示唆された(図A-10)。



図A-10 各種レチノイン酸によるHepG2に対する細胞周期停止の誘導

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A-11)。



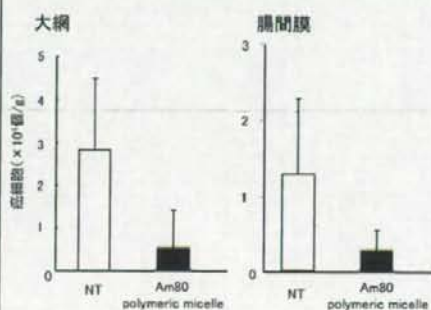
図A-11 Am80含有ポリマーミセルによるがん細胞増殖予防効果の評価

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A-12)。

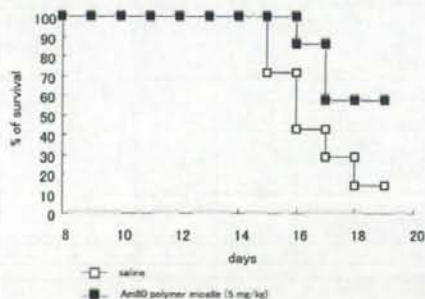
Am80含有ポリマーミセルによるがん細胞腹膜播種モデルマウスの生存期間延長

最後にAm80含有ポリマーミセルによる治療効果の評価を上記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A-12)。



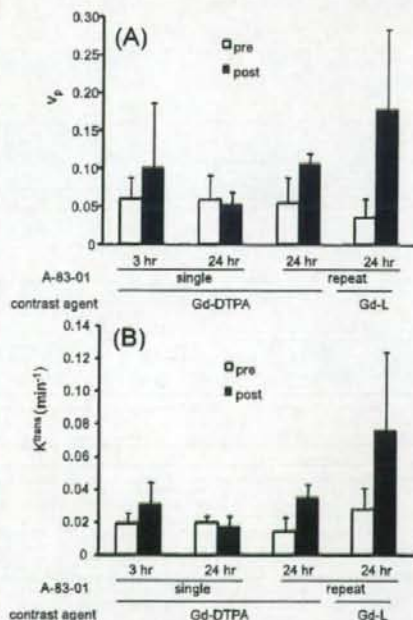
図A-12 Am80含有ポリマーミセルによる大網および腸間膜におけるがん増殖抑制効果



図A-13 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

(4) MRI 造影剤用高分子の合成と T1 緩和能測定

DCE-MRIによる血管透過性評価: DCE-MRIを用いて、A-83-01で処置したマウス腫瘍の血管透過性および造影剤移行性を評価した。Gd-DTPAを造影剤として用いた場合には、A-83-01単回投与3時間後において、 v_p および K^{trans} がいずれも増加し、腫瘍中を流れる血漿容積の増加と血管透過性の亢進が見られた(図B-1)。また、24時間後では投与前の v_p 、 K^{trans} の値に近くなり、A-83-01単回投与では作用時間が短く、作用に個体差が大きいことが分かった。



図B-1 DCE-MRIから算出された腫瘍中血漿容積 (v_p , A)

そこで、A-83-01を繰り返し投与すると、初回投与から24時間後のすべてのマウスで v_p および K^{trans} の増加が見られ、造影剤にGd-Lを用いると増加が顕著であった。

また、腫瘍内Gd濃度曲線において造影剤を投与60秒後までのAUCを算出すると(図B-2)、A-83-01の繰り返し投与により、Gd-DTPAで1.8倍、Gd-Lで3.8倍増加し、造影剤の腫瘍移行性の増加が確認された。よって、A-83-01の繰り返し投与は腫瘍血管透過性を高め、特に微粒子の移行性が亢進することをDCE-MRI法で非侵襲的に確認することができた。

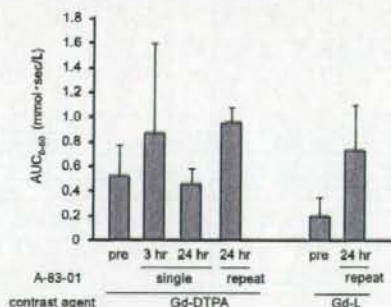
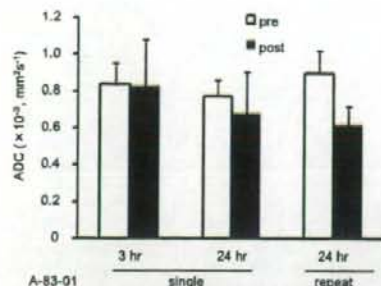


図2 造影剤投与60秒後までの腫瘍内Gd濃度-時間曲線下面積(AUC)

拡散強調画像から求めた見かけの拡散定数

見かけの拡散定数(ADC)は水分子の動きやすさに依存して増減し、細胞外液のADCは細胞内液に比べて10倍以上高い。よってADCの変化は、腫瘍内の細胞外液、細胞内液の体積変化の指標として考えられる。

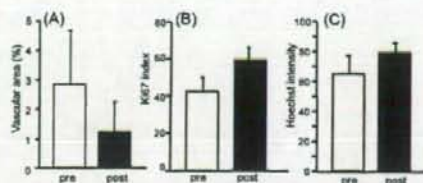


図B-3 拡散強調画像から求めた見かけの拡散定数 (ADC)

図B-3に示すように、拡散強調MR画像から求めた腫瘍のADCは、A-83-01の単回投与3時間後や24時間後では変化が見られなかったが、繰り返し投与24時間後では減少した。腫瘍組織切片の観察から、腫瘍細胞の形態変化やネクローシスは見られなかったことから、細胞内液の体積変化は考え難く、A-83-01処置によるADC低下は細胞外液の減少の結果と考えられた。

腫瘍組織観察

腫瘍組織切片の顕微鏡観察から、未処置群ではいびつな形態の腫瘍血管が観察されたのに対し、A-83-01繰り返し処置により円形や楕円形の正常に近い形態への変化が見られ、血管を覆うペリサイトの新生が観察された。腫瘍血管面積を比較すると、A-83-01処置により減少が見られた (図B-4 A)。さらに、血管周囲ではKi67で染色された増殖期細胞が増加しており (図B-4 B)、また、Hoechstで染色された血流のある血管も増加していた (図B-4 C)。以上のことから、A-83-01は腫瘍血管形態を正常に近づけ、血流を回復させることが示唆された。



図B-4 A-83-01繰り返し投与による腫瘍内血管面積 (A)、腫瘍血管周囲の増殖細胞数 (B)、Hoechst蛍光強度 (C) の変化

高分子ミセル造影剤

(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19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はポリマー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。

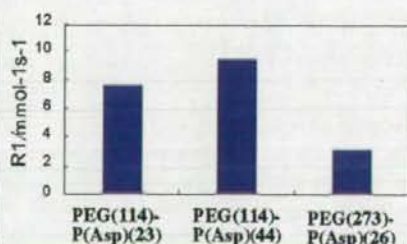


図19 アスパラギン酸ベースのシステムの緩和能 (R1) への鎖長の効果

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、緩和能は鎖の長さによって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)

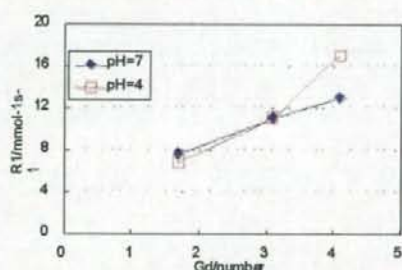


図 20 PEG(114)-P(Asp)(23)のpHによる緩和能の変化

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20に、PEGの長いPEG(273)-P(Asp)(26)の場合を図21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。この緩和能はGd1個あたりとも言えるものであり、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。

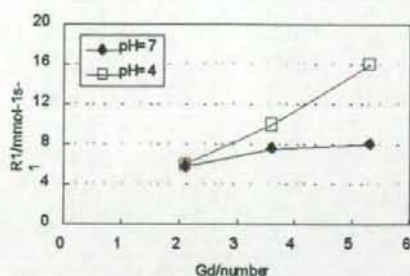


図 21 PEG(273)-P(Asp)(26)のpHによる緩和能の変化

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21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T₁測定によって検討した(表8)。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8 塩の緩和能に与える影響

Gd数	RI	RI	RI
	NaCl<50m M	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。

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

表9 PEG-P(L-Lys(DOTA))¹⁾の作製

run	加えたDOTA 活性体等量 ²⁾	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

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 1 0 PEG-P(L-Lys(DOTA))へのGdイオンの導入

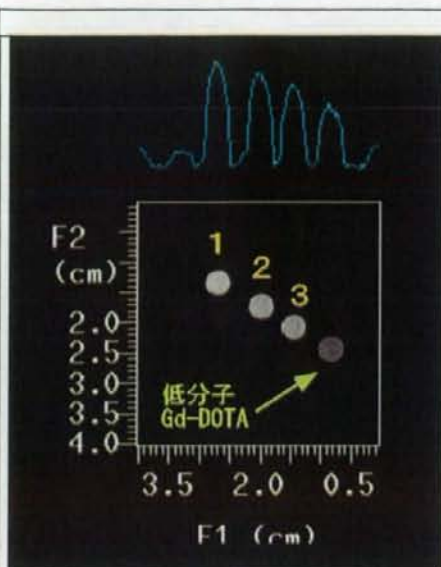
run	DOTA 導入数	添加Gd等量	結合Gd等量
1	6.5	13.0	7.8
2	12.9	6.5	7.9
3	21.6	9.0	7.0

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MRI画像を取得したのが図14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）。

次に、in vivoでのマウスMRI画像取得のための、ミセル剤の作製に進んだ。リシンユニット数が72、そのうちDOTAを12残基結合して、そのすべてにGdイオンを結合したブロックコポリマーを用いた。このブロックコポリマーと表11に示す、種々のポリアニオン（部分的にベンジルエステル化したポリアスパラギン酸、PEG-P(Asp-Bzl)）と透析法によって高分子ミセルを作製した。アスパラギン酸鎖のユニット数が22及び44のどちらの場合を用いても表11に示したように、



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 2 2 PEG-P(L-Lys(DOTA-Gd))のMRI像
Gd濃度はいずれも0.50mM

疎水性基であるベンジル基の導入率が低い場合と、逆に高導入率の場合に高分子ミセルの緩和能が下がる傾向が得られた。ベンジル基の導入率が高くポリアニオンの疎水性が高い場合はポリアニオンの疎水性が高分子ミセルの形成に大きく寄与していると考えられる。MRI造影剤となるGdイオンがポリアニオンの疎水性相互作用によって形成される高分子ミセル内殻に同時に内包され、その内殻にあるGdイオンが周囲の水との相互作用を妨げられたためと考えられる。一方で、低いベンジル化率のポリアニオンを用いたときに緩和能が下がったことは、高分子ミセルを形成する際の対イオン同士の強いイオン相互作用の影響が大きい。

表 1 1 高分子ミセルの作製と緩和能

Run	アスパラギン酸 /ユニット数	ベンジル化率 /%	緩和能 /mM ⁻¹ s ⁻¹
1	22	26	4.8
2	22	41	5.4
3	22	79	4.6
4	44	28	5.1
5	44	45	5.4
6	44	83	4.8

ブロックコポリマーの緩和能 $R_1=5.5\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$

このイオン相互作用によって2つの高分子鎖がイオン結合で凝集し、かつ疎水性基であるベンジル基があることにより高分子ミセル内殻が形成しやすくなったためと考えられる。

これら2つの事柄から、緩和能の減少にはイオン相互作用と疎水性相互作用がともに必要であることが分かり、この指針に基づくことによりさらなる緩和能の減少が見込まれる。

アニオン性ブロックコポリマー(表 6 r un3)は、ポリアリルアミン(分子量15,000)を対となるポリカチオンとして用いて高分子ミセルを形成した。作製した高分子ミセルの緩和能は図 2 3 に示すように、ブロックコポリマーの緩和能が6.2であったのに対して、その

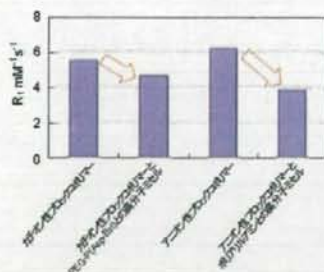


図 2 3 高分子ミセル形成前後の緩和能の変化

高分子ミセルの形成に伴い3.8まで減少した。このことは、ポリアリルアミンのようなカチオン密度が高く

イオン相互作用によって疎水的環境をつくることのできる高分子を用いたため、前述した場合と同様にGdイオンが疎水的環境に置かれ、水との相互作用をとれなくなったためと考えられる。この調整した高分子ミセル溶液のMRIファントム画像は、図 2 4 に示すように、Gdイオン濃度0.25mMにおいて、ブロックコポリマーが強い(白い)画像強度を示すのに対して、高分子ミセルにすることでGd-DTPAと同程度の弱い(灰色~黒)画像強度になっていることが確認された。

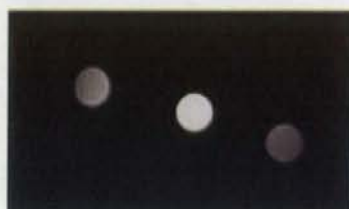


図 2 4 MRI ファントム画像 (左)Gd-DTPA, (中央) ブロックコポリマー, (右)高分子ミセル (ブロックコポリマー+ポリアリルアミン). Gdイオン濃度=0.25mM.

スケジュールの最適化によって、ターゲット効果及び抗がん活性の増強が期待される。また、MRI実験とオーバーラップさせることによって、現象の解析の精度を高めることが可能になると予想される。

これらのイオン相互作用を用いた高分子ミセルの形成とその緩和能減少の結果は、本研究の目的である微小ながん組織を検出するMRI造影剤となることを*in vitro*において示すものである。すなわち、血液循環中の高分子ミセル形成時には緩和能が低く、MRIにおける造影効果が抑えられ、固形がん組織にMRI造影剤が集積した後にブロックコポリマーへと解離することによって固形がんにおいて造影効果を発揮する新しい形のMRI造影剤となる。

以上のようにカチオン性、アニオン性ブロックコポリマーともに *in vitro* において緩和能変化を得た。その変化は疎水性の効果とイオン相互作用を制御することによって緩和能の変化を大きくすることができると予想され、今後さらなる緩和能変化が見込まれる。

高分子ミセル型MRI造影剤の *in vivo* 評価

作製した高分子ミセル型MRI造影剤の *in vivo* における挙動を検討した。カチオン性ブロックコポリマーとポリアニオンとしてデキストラン硫酸を用いた高分子ミセルをマウス尾静脈より 0.05mmol Gd/kg 投与し、その血中濃度変化を追った。その結果、低分子化合物であるGd-DTPAよりも血中滞留性の延長が認められた。また、このカチオン性ポリマー単独においてマウスへの急性毒性が観察されたが、高分子ミセル化することで、急性毒性は観察されず、毒性が軽減されることも確認された(図25)。

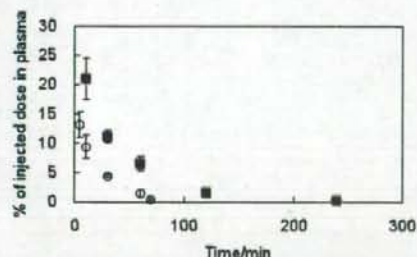


図25 MRI造影剤の血中濃度変化 (■)高分子ミセル(カチオン性ブロックコポリマー+デキストラン硫酸)、(○)Gd-DTPA

一方、アニオン性ブロックコポリマーがポリマー単独で高分子ミセルを形成することを本研究では見だし、その血中滞留性は24時間後において20%以上残存する高い血中安定性を示した(図26)。

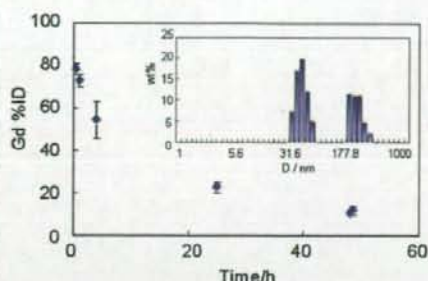


図26 アニオン型高分子ミセルMRI造影剤の血中濃度変化と粒子サイズ

この挙動はポリリシン側鎖のアミノ基を完全にDOTA基で置換したポリマーから作製される高分子ミセルにより起こり、PEG-P(Lys)の効率的な合成スキームによって得られた結果であるといえる。

アニオン性ブロックコポリマーから得られた血中滞留性のよい高分子ミセル型MRI造影剤を用いて固形がん(C26)への集積性をみると、24時間後において~8%IDの高分子ミセルの集積が確認され、それと同時に腫瘍部位で取得されたMRIも24時間後に画像強度が最大になることを確認した(図27)



図27 アニオン型高分子ミセルMRI造影剤投与24時間後の腫瘍の画像強度の変化

高分子ミセルをキャリアとしてMRI造影剤を運ぶこの高分子ミセル型MRI造影剤の場合は、治療薬(抗がん剤)の挙動を種々の分析装置で観察する(抗がん剤+高分子ミセル)のシステムとは異なり、キャリアとして的高分子ミセルの挙動を観察していることになる。

よって、本研究で得られる高分子ミセル型MRI造影剤の挙動をMRIで観察することは（抗がん剤＋高分子ミセル）の挙動を生じた状態で観察できることになる。このことは、治療薬（抗がん剤）を高分子ミセルによってデリバリーする本研究において、抗がん剤到達量の予測や、高分子ミセルの位置情報など極めて重要な情報を与えることになる。

次に、血中半減期が長くがんへのターゲティング能が高い造影剤組成を検討した。この検討の中で、ブロックコポリマーPEG-P(Lys-DOTA)では、リシン残基全てにDOTA基を導入されると、高分子ミセルを形成することを発見した。このPEG-P(Lys-DOTA)に対して、ガドリニウムイオンを部分的に配位させると、その構造を維持したまま高分子ミセルMRI造影剤となることが分かった。この高分子ミセルMRI造影剤は結合したDOTA基同士のイオニックな相互作用によって内殻を形成し、非常に安定な高分子ミセルを形成していることが確認された。その粒径分布を図28に示す。

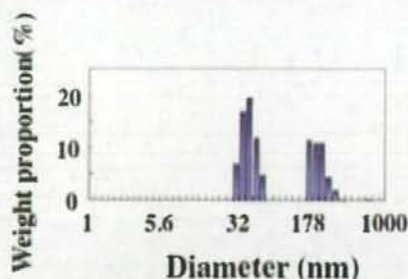


図28 高分子ミセルMRI造影剤の粒径分布

200nm付近の2次凝集と考えられる粒子の混入はあるものの、約40nmの直径のミセル形成が確認された。次に、この高分子ミセルMRI造影剤の血中動態評価を行った。

0.05mmolGd/kgの投与量でマウス尾静脈より投与した結果を図29に示す。

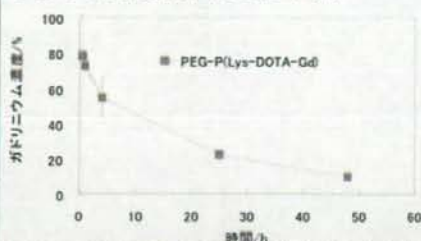


図29 高分子ミセルMRI造影剤の血中濃度

この高分子ミセルは、大変安定な血中循環性を示し、静脈投与24時間後でも約20%の投与量が血中に見いだされた。また、その体内分布も図30に示すように、固形がんと正常組織の高い選択性を示し、かつ高い腫瘍集積性を示した。肝臓・脾臓の細網内皮系ではC26マウスがんよりも若干高い値を示したが、これは高分子ミセル抗がん剤のターゲティングでも観察されたことである。肺、心臓、筋肉などの正常臓器・組織に対しては十分な選択性を有していることがわかった。

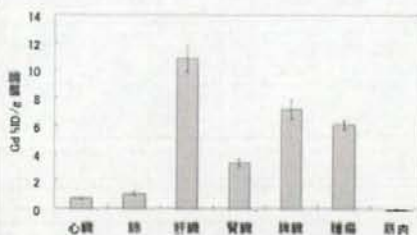


図30 高分子ミセルMRI造影剤の体内分布（投与24時間後）

また、腎臓は正常上記としては比較的高い分布量であったが、この事実はこの造影剤が腎臓から排出されていることを示唆する。そこで、尿中排泄を調べたのが図31である。腎臓から尿としてこの造影剤が排出されていることが観察された。

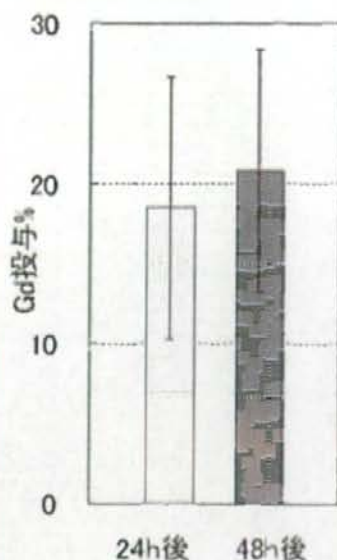


図3 1 高分子ミセル造影剤の尿への排出

また、ここで検出したGdイオンは高分子ミセル分画か高分子分画に有ることがゲルパーミエーションクロマトで確認された。血液中で徐々にミセル構造からブロックコポリマー鎖に解離して腎臓から尿に排出されることが判明した。この事実は、この造影剤の長期的毒性を考える上で重要な事柄である。

この高分子ミセルMRI造影剤を0.05mmolGd/kgの投与量でマウス尾静脈より投与し、固形がんのMRIを測定し、画像強度の時間変化を追った。図3 2に示す。腫瘍サイズは約100mm³程度の大きさで実験を行った。図3 2 Bに示すように、投与前の腫瘍の画像強度に比べて24時間後の画像強度は高分子ミセルMRI造影剤の集積によって明瞭な腫瘍画像を与えた。24時間後においては、血中に十分な量のMRI造影剤が残っているため心臓に流れる血液の画像強度が高い。

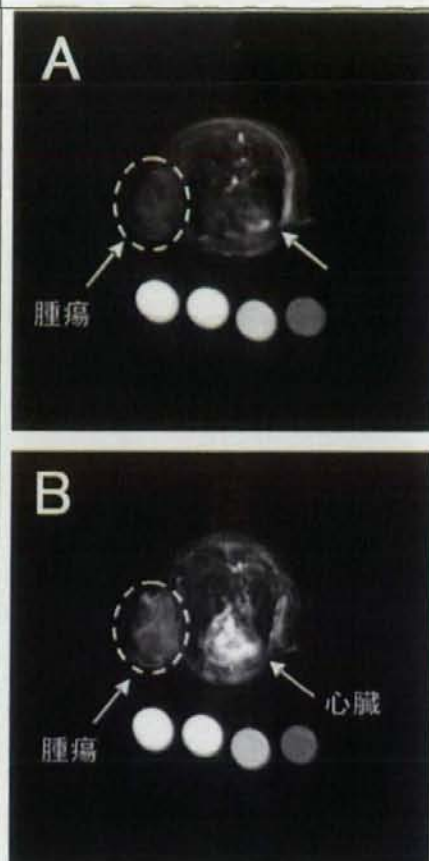


図3 2 高分子ミセルMRI造影剤投与前と投与24時間後のMRIアキシャルMIP画像(A)投与前、(B)投与24時間後(白枠が腫瘍)
MRI撮像条件: 磁場9.4T、T1-強調グラジエントエコー法、TR/TE = 8.0/4.5, flip angle = 30°, FOV = 45 × 45 mm, 192 × 192マトリックスサイズ、2mmスライスx3のMaximum Intensity Projection(MIP)画像

しかしながら、MRI造影剤が十分にEPR効果によって集積されれば、固形がんのMRIによる観測は十分可能である。腫瘍の画像強度の時間変化を解析すると、図3 3 Aに示すように、投与後24時間後にピークに達する典型的なEPR効果によるがん集積挙動を示している。

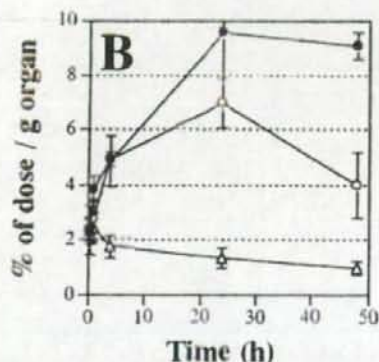
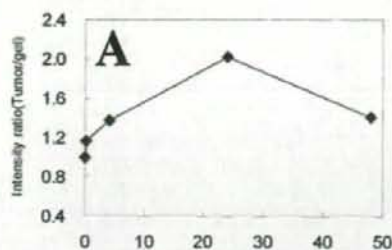


図33 C26マウスがんへの集積挙動
(A)MRI造影剤投与後の腫瘍におけるT1強調画像強度の時間変化
(B)アドリアマイシン封入高分子ミセルの固形がんへの集積

この挙動は図33Bに示す、以前に解析したアドリアマイシン封入高分子ミセルの時間毎のアドリアマイシン量の変化とほぼ一致する。この一致は抗がん剤内包高分子ミセル治療剤のがんターゲティング挙動を造影剤によって測定して、その治療効果の予測を可能とする。通常、抗がん剤封入高分子ミセルが固形がんにとりだけ薬物を送達したかについて生体で観察することは極めて難しい。固形がんの縮小の様子を観察する方法はあっても、どれだけの量がどこに届いているかを判断することは腫瘍を摘出しない限りは分からないからである。また、量については分析可能であっても、場所を特定することについては難しい。

この高分子ミセルMRI造影剤は造影剤投与後の高分子ミセルの様子をMRIで観測することができるため、どこにどれだけの抗がん剤が送達されるかを、MRIを測定し、解析することによって予想できる技術となる。次に、腫瘍血管破断薬AC7700が及ぼすがん集積挙動への影響を解析した。集積量(Gdイオン量で測定)を図34Aに、MRI画像を図34Bに示す。

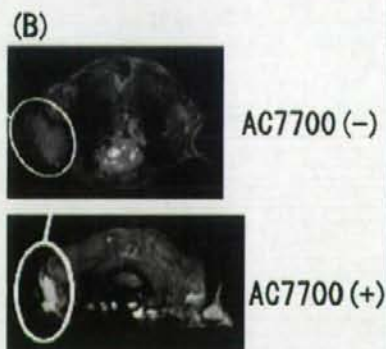
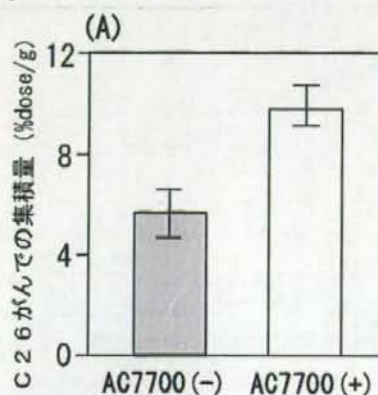


図34 AC7700投与の効果
(A)造影剤集積量の増加
(B)MRI画像での高輝点の出現
(造影剤投与24時間後)

AC7700を投与してから3日後に造影剤を投与すると、C26がんへの集積量が有意に高まり、そのためにMRI画像においても、顕著に明瞭ながん画像が得られた。

EPR効果は必ずしも固形がん全体の組織への透過性を意味するものではないが、図34BのAC7700(-)ではがん全体に造影剤の分布が観察される。この大きさ(約100mm³)ではがん組織全体がEPR効果を示していると言える。これとは対照的に、図34BのAC7700(+)では癌周辺の一部のみに非常に高い輝度を示している。画像診断のためにはこのような明瞭な輝点として現れることは、集積量の増加以上の意義がある。AC7700は癌周辺の成癌組織に一過的な変性領域を誘導し、そこに高分子ミセルが集積すると、分担研究の堀の研究が示している。今回のMRIの結果はこの堀の研究と一致する。

次に、これまで扱ってきた約100mm³の癌サイズより小さな微小がんモデルを用いて検討した。同じく、C26マウスがんであるが、50mm³以下で造影を行った。(直径3mm程度)結果を図35に示す。投与24時間後のMRIでは、高分子ミセルMRI造影剤の集積による腫瘍の一部に特に画像強度の増加を認めることができた。

集積量は $8.3 \pm 0.6\%$ ID/腫瘍と高い値であった。この結果より、この高分子ミセルMRI造影剤は直径1cm以下の微小がんの検出に対しても非常に有用な造影剤として期待される。



図35 微小がんでの高分子ミセル造影剤の集積(投与24時間後、MRI撮像条件:磁場9.4T、T1-強調グラジエントエコー法、TR/TE=8.0/4.5、flip angle=30°、FOV=45×45mm、192×192マトリックスサイズ、2mmスライスx3のMaximum Intensity Projection(MIP)画像)

(5) 葉酸結合高分子ミセル

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PEG₅₀₀₀-poly(aspartic 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。

(6) 腫瘍血管破断薬AC7700と高分子ミセルの併用効果

高分子ミセルと腫瘍血管破断薬AC7700との併用効果の解析は、19年度に新たに加わった実験項目である。追加された理由は、後述の分担研究報告の項に述べられているように、ウインドウチャンパー法によるがんへのミセル集積挙動の解析でがんの周辺の変性領域に特に高い濃度で高分子ミセルが集積していることが観察されたことである。高分子ミセルのがんへの集積機構であるEPR効果では、がんが大きくなるに従って、がんの中心部分よりもがん周辺部位に濃度高く集積するようになることは知られていた。これに対して、変性領域は正常部位の一部であり、変性部位に特に高い濃度が集積することは新たな発見である。(もちろん、正常部位に比べてがん部位で高い濃度が集積することは今回のウインドウチャンパー法の実験によっても確かめられている。)一方、腫瘍血管破断薬AC7700は腫瘍選択的に血流を遮断することで抗がん活性を示す薬物であるが、抵投与量で用いた場合、可逆的に(時間経過により正常に戻るという意味)がんに接した正常部位に変性領域を生ずる。以上の二つの事柄を結びつけると、「AC7700によって変性部位を形成させて、そこに高分子ミセルを選択的に送達させる」という新しいターゲティング手法が考えられる。

この新しい手法による、送達量の増加及び抗がん活性の増大が得られるかについての、in vivo検討を行った。

AC7700毒性評価

Ac7700を80 mg/kg投与したマウスは3匹中3匹、48時間以内に死亡した。投与の翌日の体重は、80 mg/kgと40 mg/kgの場合が最も減少が激しいが、80 mg/kgが死亡するのに比べ、40 mg/kgでは生存している。その他の投与群（5 mg/kg、10mg/kg、20mg/kg）では図36に示すように、顕著な体重減少は認められなかった。体重の最低値は投与後約24時間後で、体重は2、3日で回復し始める。

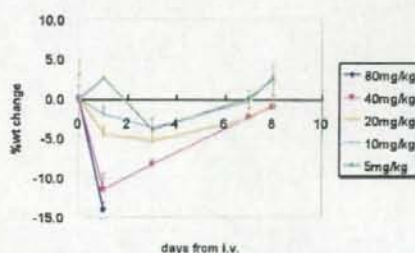


図36 AC7700投与に伴う体重変化
(投与日の体重に対して%で示した)

以上の結果から、ADRミセルとAC7700の併用実験においては、AC7700の投与量を40 mg/kg以下にする必要があることが判明した。さらに、併用実験ではAC7700単独投与で観察された結果より体重減少などの副作用がより厳しくなる可能性を考え、20 mg/kgを投与することにした。

ADR封入ミセル単独抗がん活性

図37に示すように、ADR封入ミセル投与による体重減少は20 mg/kgの群で、ADRミセル投与5日後あたりで最も顕著（投与日の体重に対して約18%の減少）であったが、数日後には回復した。その他の群では目立った体重減少は認められなかった。

腫瘍体積の変化を図38に示す。腫瘍量の減少は20 mg/kgの群が他の群よりも顕著であったが、ADRミセルを投与した全ての群で、コントロール群よりも腫瘍のサイズが小さかった。

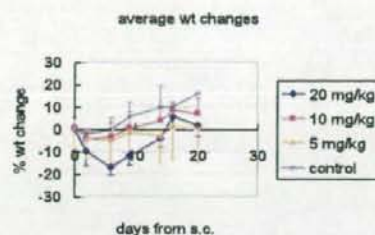


図37 AC7700投与に伴う体重変化
(投与日の体重に対して%で示した)

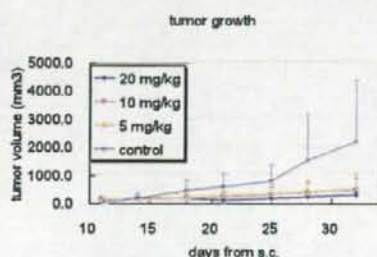


図38 ADRミセル単独での抗がん活性

コントロール群では皮下移植後26日目には1匹死亡したが、ADRミセル投与群では死亡はなかった。

これらの結果より、AC7700/ADRミセル併用実験では、体重減少が少なく、かつ抗がん活性がある程度期待できる10 mg/kgを投与することにした。20 mg/kgでは体重が薬剤投与時と比べ20%近く減少する上、ADRミセル単独での抗がん活性が強いため、AC7700/ADRミセル併用時との比較が難しくなると判断した。

AC7700/ADRミセル併用

以上の検討の結果から、投与量をAC7700を20mg/kg、ADR高分子ミセルを10mg/kg（それぞれ1回投与）に設定した。また、併用による効果を高めるためにはAC7700を投与してから高分子ミセルを投与するまでの間隔は重要な因子であるが、今回は1日のみを検討した。