

日本薬剤学会タケル・アヤ・ヒグチ記念賞受賞
高分子運搬体を利用したDDS設計

金尾義治

The APSTJ Takeru & Aya Higuchi Memorial Prizewinner
**Construction of Drug Delivery System Using Macromolecules as
Potential Drug Carriers**

by

Yoshiharu Kaneo

ABSTRACT

The idea of using drug carriers to improve the therapeutic efficacy of pharmacological agents is receiving increasing attention as possible clinical applications. Attachment of drugs to macromolecular carriers alters their rate of excretion from the body and provides the possibility for sustained release over a prolonged period. Moreover, it limits the uptake of drug by cells to the process of endocytosis, thus providing the opportunity to direct the drug to the particular cell type where its activity is required. In this article the consequences of the attachment of pharmaceuticals to macromolecular carriers are demonstrated through our challenges in which polysaccharides, biological macromolecules such as albumin and transferrin, and synthetic polymers are used as carriers.

1. ドラッグ・デリバリー・システムの発展¹⁾

ドラッグ・デリバリー・システム(Drug Delivery System)のことをわが国では薬物送達システム、あるいは薬物配送システムと訳している。一般にその頭文字をとってDDSと呼ばれているが、最近とみに新聞やテレビで目にするようになってきた。

20世紀後半に入って製薬工業は飛躍的な発展を遂げてきた。近代科学のめざましい進歩に支えられて、新規の化合物や、さらには遺伝子工学により作り出される生理活性物質など、次々と新しい医薬品候補が誕生してきた。もはや、化合物の純度は勿論のこと、安全性の確保や製剤技術なども高度にマニュアル化され、純良な医薬品がいつでも安定して手に入るようになってきた。そしてまさに市民権を獲得しようとするのがDDSの概念である。

DDSの目的は薬物送達の最適化、すなわち、いかに効率よく薬物を病巣へ送り届けるかということにある。「必要なときに必要なだけの薬物を病巣に送ること」が最も理想的な化学療法であることは、とうの昔から解っていたことだが、かつてはそのような方法を作り出す技術もゆとりもなかったのである。DDSの基本的な技術は、薬物の放出制御と病巣への標的化に集約される(図1)。初期のDDSでは、まず放出制御に工夫を凝らした製剤が数多く作られた。製剤から薬物を徐々に放出させることにより、その持効化をねらったものである。1日数回にわたる服薬を1回に減らすことで随分患者の負担が軽減され、飲み忘れが減ったといわれる。

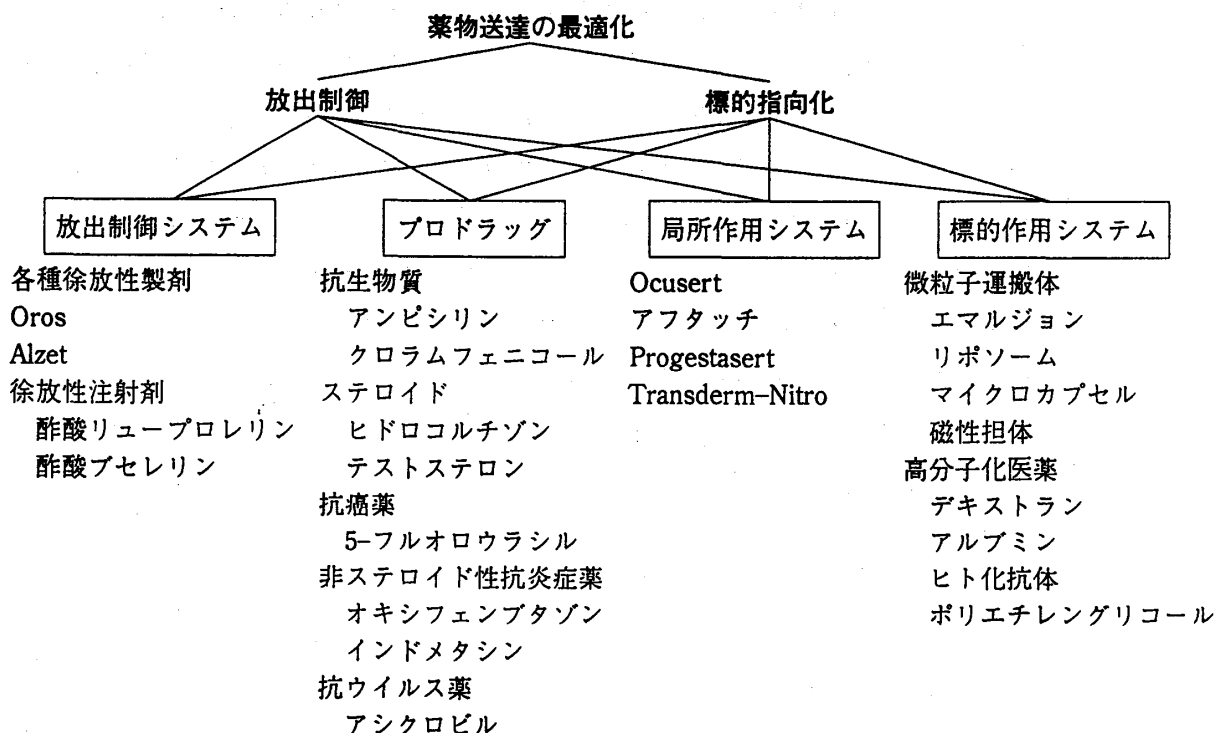


図1 ドラッグ・デリバリー・システム

——医薬品適用のための新しい考え (文献1)

2. 生体空母の設計：医薬品の高分子ハイブリッド化

最近の薬は飲んでもおいそれと効かないものが多くなった。と云っても粗悪なものが出回ってきたわけではない。世の中が進歩して、生化学領域でしか聞くことのできなかつた物質が、実際に医薬品候補として手に入るようになってきたのだ。

生体医薬と呼ばれるこれら一連の生理活性物質は、癌を始めとする様々な疾病にすばらしい効果を発揮するはずである。しかし、それは試験管の中での出来事で、注射してもほんの僅かな効果しか現れないことが多い。もともと、このような生理活性物質は体内では極めて短命なものが多い。こういったものがいつ迄も安定に存在したら、体の中を無数の物質が飛びかうことになり、大混乱に陥ってしまうだろう。

このように遠くまで飛べないハイテク戦闘機（生理活性物質）を空母（高分子）に積んで戦いを挑もうとするのが、著者らの新規DDS開発の戦略である。この作戦では、まず①広く情報を収集して戦闘機（ゲスト分子）を選ぶ。次に②空母（担体高分子）の性能を見比べながらどのタイプにするかを決めるのだが、これは全体の運命を決するだけに重要である。そして戦いは③艦載戦闘機をいつ飛び立たせるか（ゲスト分子と高分子の結合様式）にかかっている。

3. グルタチオンのデキストラン結合体による肝指向化：肝障害予防の試み²⁻⁸⁾

そこで、空母にはデキストランやプルランといった生体適合性の高い中性多糖類高分子を用い、グルタチオンを肝へ運び込ませることを考えた。

グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンの三つのアミノ酸からなるトリペプチドである。肝で生成されたグルタチオンは肝細胞からしみ出して血液に移行、腎で直ぐさま分解される。この代謝サイクルの中で、グルタチオンは体内に入った異物と結合し、尿中へ排泄される。しかし、グルタチオンが大量に消費され、不足すると異物を処理しきれなくなって肝障害などを起こすことになる。現在、肝疾患、重金属などによる中毒症、アレルギー疾患などの治療目的でグルタチオンが使われるが、大量に投与しても腎臓に素早く集まって分解されるため、肝細胞での利用率は極めて低いという難点がある。

著者らはこのグルタチオンを構成するシステインのチオール基とデキストランを結合させ、グルタチオンを10%含む結合体、すなわち高分子ハイブリッドを合成した。マウスの腹腔内に肝障害を起こすアセトアミノフェンを投与。同時に尾静脈に結合体を注射した群は30日で85%生存し肝障害を防げたのに、投与しなかった群は30%しか生存しなかった（図2）。

また、グルタチオンの合成を阻害する薬物をマウスの腹腔内に投与し、グルタチオンの枯渇状態を作ってこの結合体を静脈注射すると、枯渇していたグルタチオンの量は増え、濃度が上昇した。これらの実験結果から、グルタチオン-デキストラン結合体なら肝臓内にグルタチオンを送り込むことが可能で、肝障害の予防に役立つことが明らかとなった。

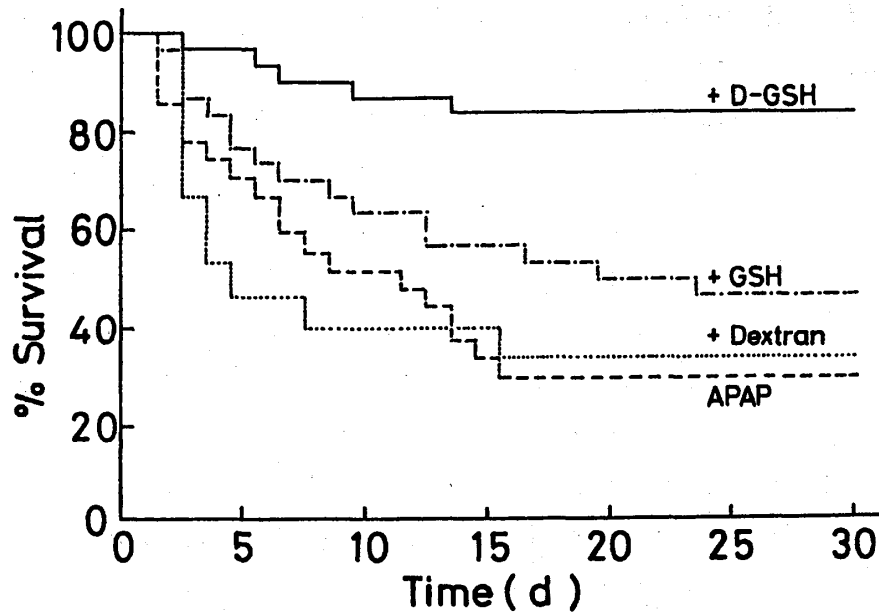


図2 アセトアミノフェン (APAP) 肝障害マウスに対するグルタチオン-デキストラン結合体 (D-GSH) の延命効果

All mice received intraperitoneally a 0.2-ml propylene glycol solution of APAP (5 mmol/kg). Mice were then treated with intravenous injection of a 0.2-ml saline solution of D-GSH (0.39 mmol/kg in GSH equivalent), GSH (0.39 mmol/kg), or dextran (3.4×10^{-5} mol/kg) according to method 1. (文献5)

4. マイトマイシン C のアルブミン結合体による腫瘍集積化⁹⁻¹⁶⁾

DDSの究極の目標は標的化であるといっても過言ではない。特定の臓器、願わくば特定の細胞へのみ薬物が集中してくれれば、癌の化学療法における抗癌剤の効果は飛躍的に増大するだろう。外科的手術の補助手段として、放射線療法と共に抗癌剤による化学療法が行われているが、正常細胞への副作用が余りにも強すぎるため十分な治療を施せないでいる。

薬物と高分子運搬体との結合体は高分子化医薬と呼ばれている。高分子化医薬の開発は特に癌の薬物化学療法において強く求められており、細胞毒性の高い抗癌剤をいかに特定の腫瘍組織へ集積化するかが重要な課題となっている。一般に高分子は、腫瘍組織の特徴である血管系の発達と透過性の亢進、並びにリンパ系の未発達により、受動的に腫瘍へ集積することが知られている。EPR効果 enhanced permeability and retention effect と呼ばれるこの現象は、世界的に広く認められるところとなり、腫瘍集積性を旨とした高分子化医薬の拠り所となっている。

著者らはマイトマイシン C の副作用軽減と腫瘍組織集積性を目的として、生体高分子であるアルブミンとの結合体を合成した。アルブミンは血漿中に多量に含まれる蛋白質であるが、構成アミノ酸であるリジンの ϵ -アミノ基に活性エステル法と呼ぶ手法でマイトマイシン C を化学的に結合させた。アルブミンのような高分子は腫瘍組織に集積しやすいことが知られているからである。

一方、マイトマイシン C は癌細胞の核を分子レベルで攻撃する強力な抗癌剤として知られているが、副作用も強い。しかし、アルブミンとの結合体の状態ではマイトマイシン C の作用はなく、腫瘍組織に集積してから徐々に遊離し癌を攻撃する。このため、効果は癌細胞に集中し、正常細胞への副作用を抑えることができる。

マウスに移植したザルコーマ 180 (S180) 固形癌に対するマイトマイシン C - アルブミン結合体 (G-BSA-MMC、BSA-G-MMC) の抗腫瘍効果を図 3 に示す。生理食塩水を投与した群では 30 日で腫瘍の大きさが 80 倍に増大した。これに対して、結合体を一回静注することにより、腫瘍の増大は顕著に抑制された。

担癌マウスの 40 日生存率は、結合体投与群では飛躍的に増大して 75~100% の成績であったのに、コントロール群では僅か 39% であった。担癌マウスの 40 日生存率はマイトマイシン C 投与群においても増加したが、便の軟化や投与部位の壊死といったマイトマイシン C 特有の副作用が発現した。これに対し結合体では、これらの副作用はまったく認められなかった。

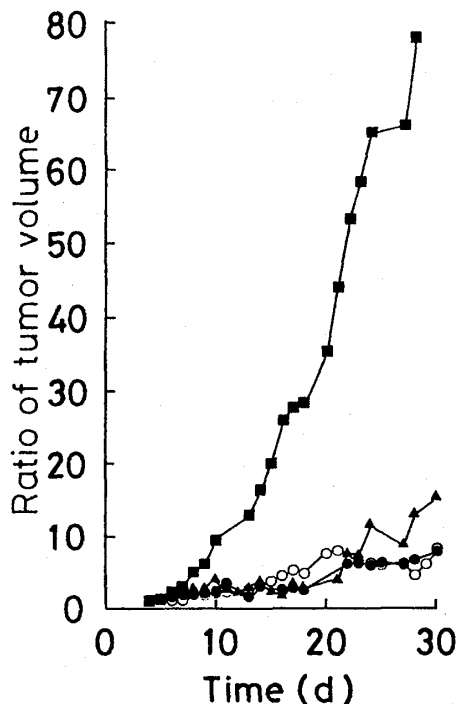


図3 マウスに移植したザルコーマ180固形癌に対するマイトマイシンC-アルブミン結合体 (G-BSA-MMC, BSA-G-MMC) の抗腫瘍効果

Mice were inoculated with S180 cells (1×10^7 cells/mouse) subcutaneously. Four days after the inoculation, a single intravenous dose of the test compound was administered as follows: ●, G-BSA-MMC, (20 mg/kg in MMC equivalents); ○, BSA-G-MMC (20 mg/kg in MMC equivalents); ▲, MMC (5 mg/kg); ■, control (0.9% NaCl, 10 mL/kg). The ratio was calculated by dividing the tumor volume by the reference volume 4 days after the inoculation. Each point represents the mean value of the ratio ($n = 6-27$). (文献11)

5. マイトマイシン C - トランスフェリン結合体による受容体介在性腫瘍細胞

ターゲティング¹⁷⁻¹⁹⁾

次に、抗癌剤の癌細胞への特異性をさらに高める目的で、運搬体高分子としてトランスフェリンを用いることにした。トランスフェリンは鉄イオンの輸送を司る物質で、もともと血液に含まれる糖蛋白質の一種である。鉄イオンと結合した状態で細胞表面の受容体と結合し、細胞の中へ取り込まれる。ここでpHの変化により鉄イオンを離し、結合していた受容体とともに再び細胞表面へと返される(図4)。私たちはこの受容体が癌細胞に異常にたくさん発現することに目をつけて、トランスフェリンとマイトマイシン C の結合体を合成することにしたのである。

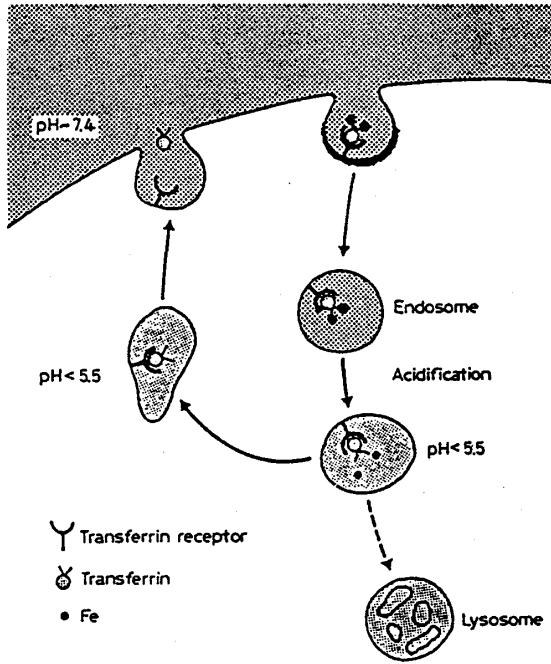


図4 トランスフェリンによる鉄の輸送

結合体の合成では、トランスフェリンの構成アミノ酸であるリジンのε-アミノ基に、活性エステル法でマイトマイシンCを化学的に結合させた(図5)。これを試験管の中で培養したヒト白血病由来の癌細胞(HL60)に作用させると、その増殖を抑制することができた。この効果はマイトマイシンCよりも優れており、受容体に結合しないマイトマイシンC-アルブミン結合体(HSA-G-MMC)ではまったく効果が認められなかった(図6)。

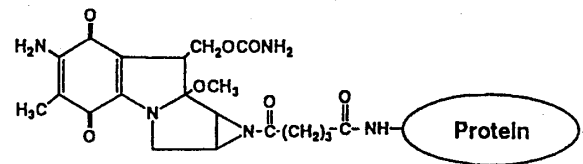


図5 マイトマイシンC-トランスフェリン結合体の構造

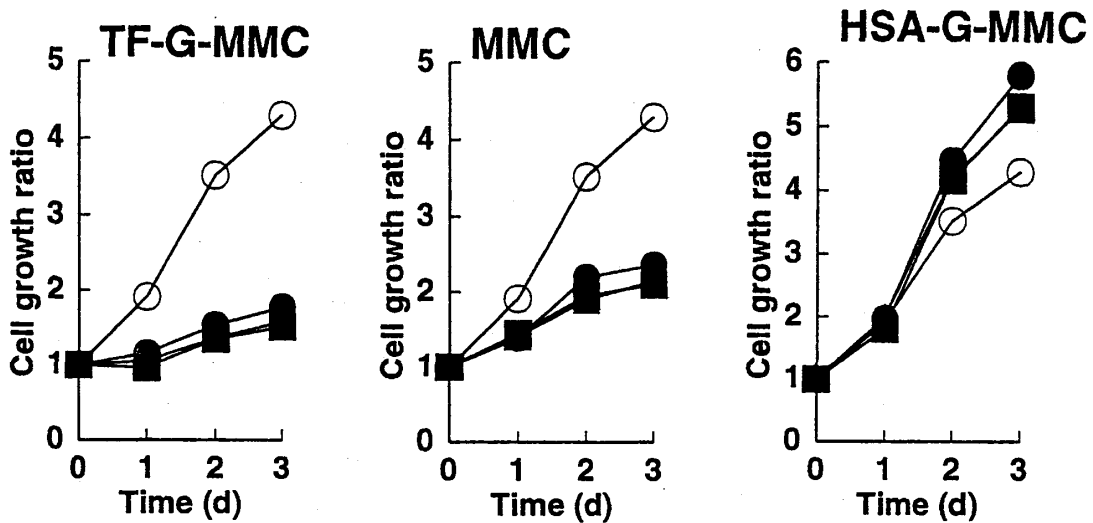


図6 HL 60 癌細胞に対するマイトマイシンC-トランスフェリン結合体 (TF-G-MMC) の殺細胞作用
 ○, Control ; ●, 0.01 MMC $\mu\text{g/ml}$; ▲, 0.1 MMC $\mu\text{g/ml}$; ■, 1.0 MMC $\mu\text{g/ml}$.
 HL 60 cells (1.5×10^5 cells/ml) were incubated with the compound at 0°C for 100 min and washed twice. Then the HL 60 cells were incubated with 10% FBS RPMI 1640 at 37°C under 5% CO_2 -95% air. (文献18)

一方、より強力な効果を求めて抗癌剤を多量にトランスフェリンに結合させると、この運び屋である蛋白質の構造が変わり、受容体に結合しなくなることが明らかとなった。さらに、マイトマイシンCのかわりに同じく抗癌剤のシスプラチンを運ぶ結合体を合成することも可能となった²⁰⁾。

6. 高分子の体内動態とEPR効果

著者らはDDS研究の一環として、薬物運搬体として利用可能な多糖類高分子の体内動態を検討してきた。その体内動態は分子量と投与量に大きく依存する。デキストラン、プルラン、アラビノガラクトン、マンナンなどの中性多糖はいずれも肝に著しく集積するが、構成する糖鎖により肝類洞壁細胞や肝実質細胞などへ特徴的な分布をすることが明らかとなった。²¹⁻²⁵⁾ また、肝への分布には糖鎖受容体認識による取込みが関与し、非線形性(投与量依存性)の原因となっている。このような肝への移行性を回避するために運搬体高分子に負電荷を導入する方法が提唱され広く受け入れられている。この考えをもとに、カルボキシメチルデキストランを運搬体としたドキソルビシン、パクリタキセル、カンプトテシン誘導体の高分子化抗癌剤が合成されている。

以上の知見をもとに、われわれは薬物運搬体として合成高分子ポリビニルアルコール(PVA)を用いることにした。²⁶⁾ PVAは生体適合性も高く、すでに医薬品添加物として長年の使用実績があり、様々な分子量が安定して入手可能である。また、ビニル基ごとに1級のOH基をもつことから、ペンダント形にゲスト分子を結合させるには最適の高分子運搬体の一つと考えられる。ラットやマウスに静注すると、特定臓器への集積性はきわめて低く、長期にわたって血液中を循環しEPR効果によるS180固形癌への集積性が認められた。また、顕微鏡観察によってもFITC蛍光標識PVAは腫瘍組織に著しく集積することが明らかとなった(図7)。

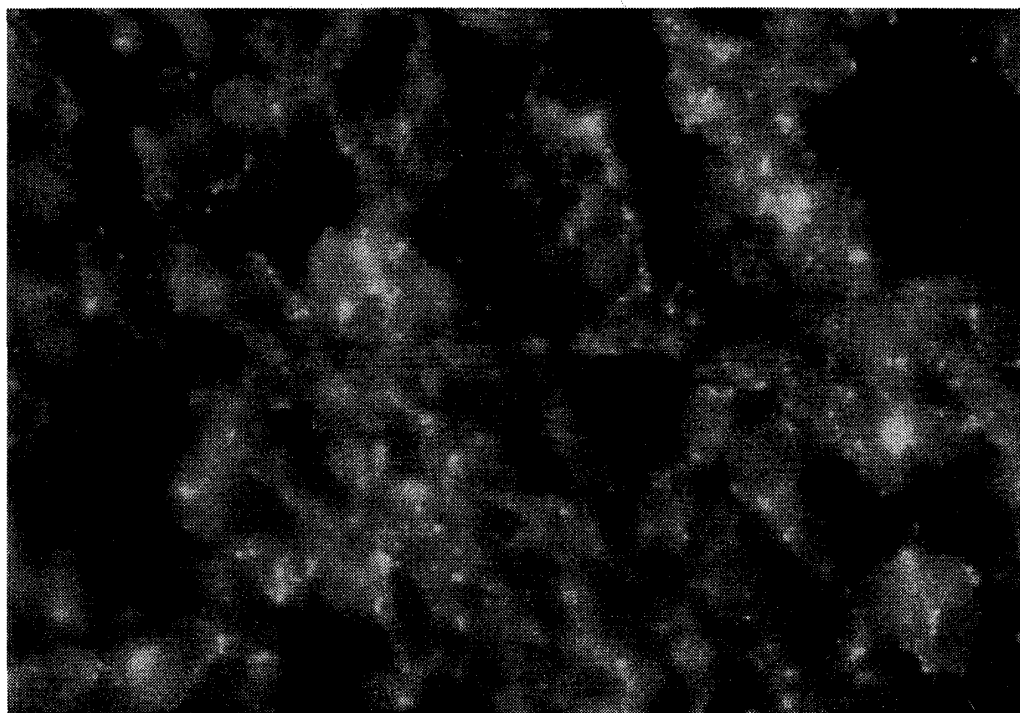


図7 Fluorescence microscopic examination of paraffin section of mouse tumor tissue at 4 days after iv injection of F-PVA (80 K) (120 mg/kg).

そこで、PVAに抗癌剤ダウノルビシンやドキソルビシンを共有結合させた高分子化医薬（高分子化抗癌剤）の合成を行った。まず、抗癌剤分子にpH感受性スペーサーとしてcis-アコニチル基を導入し、これとオクタメチレンジアミン基を導入したPVAとを結合した。図8には代表例としてPVA-ドキソルビシン結合体の三次元高速排除クロマトグラフィーを示す。これらのPVA-抗癌剤結合体からの抗癌剤分子の遊離を調べたところ、中性・アルカリ性領域（pH 7.0とpH 9.0）では認められず、酸性領域（pH 4.0）で遊離することが明らかとなった。

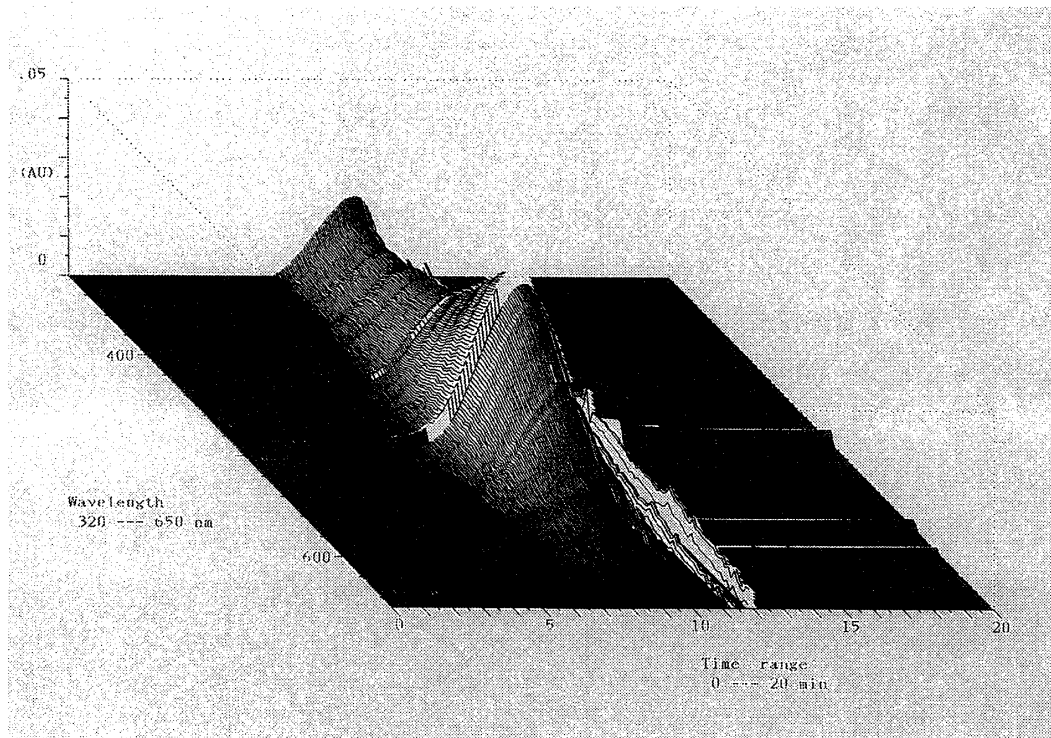


図8 Three dimensional chromatogram of PVA-doxorubicin conjugate.

PVA-ダウノルビシン結合体は、in vitro培養系におけるHL 60細胞の増殖抑制効果を示し、リソソーム内の低pHにおける選択的な薬物放出が示唆された。また、放射性ヨードで標識したPVA-ドキソルビシン結合体をマウスに静注すると、長期にわたって血液中を循環しEPR効果によるS180固形癌への集積性が認められた（図9）。さらに、本結合体はS180担癌マウスにおいて良好な抗癌活性を示した（図10）。

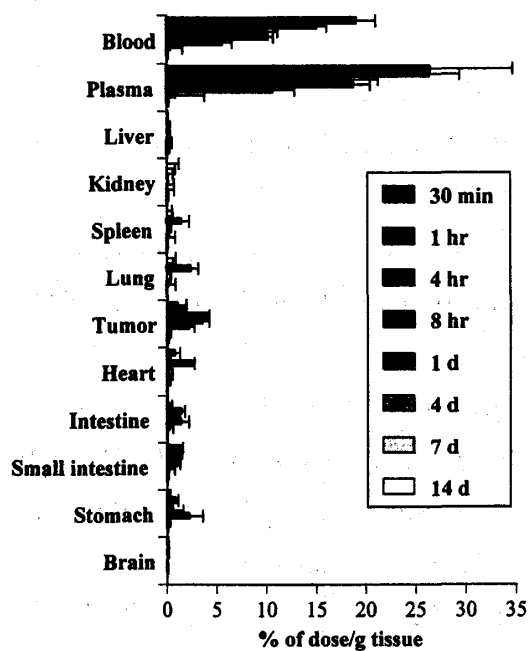


図9 Tissue distribution of ^{125}I -PVA-doxorubicin conjugate after iv injection (6 mg/kg) to S180 bearing mice.

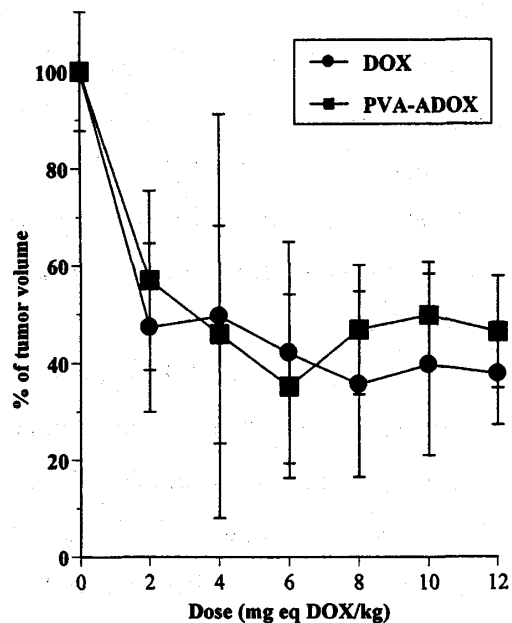


図10 Dose-dependent antitumor effects of PVA-doxorubicin conjugate (PVA-ADOX) on implanted S180 tumor in mice.

7. おわりに

1993年にはEPR効果を利用したネオカルチノスタチン動注製剤ジノスタチンスチマラマー(スマンクス)が上市された。現在、ヒドロキシプロピルメタクリアミド(HPMA)共重合体結合ドキシソルピシン(PK-1)やPEG-アスパラギン酸ブロックコポリマーが形成するポリマーミセルにドキシソルピシンを内包したものなど11種以上の高分子化抗癌剤が臨床応用に向けて研究が進められている。

また、欧米ではドキシソルピシンの処方はそのほとんどがステルス型リポソーム製剤ドキシルに取って代わられた。これに対して、化学的に高分子と薬物を共有結合させた高分子化医薬は、新規化合物として扱われるので製品化へのハードルが高いが、リポソームやナノスフェアなどの微粒子運搬体にはない利点を持ち合わせている。たとえば体内での安定性や組織への浸透性などである。今後は微粒子型DDSのみならず、高分子結合型DDSすなわち高分子化医薬の実用化もさらに加速されるだろう。

参考文献

- 1) 金尾義治著：進歩する薬物治療 D D S 最前線，廣川書店 (2002).
- 2) Y.Kaneo, T.Tanaka, Y.Fujihara, H.Mori and S.Iguchi, Delivery of glutathione, as a dextran conjugate, into the liver, *Int.J.Pharm.*, **44**, 265-267(1988).
- 3) Y.Kaneo, Y.Fujihara, T.Tanaka, Y.Kozawa, H.Mori and S.Iguchi, Effects of glutathione, as the dextran conjugate, on acetaminophen-induced hepatotoxicity, *Chem.Pharm.Bull.*, **37**(1), 218-220(1989).
- 4) Y.Kaneo, Y.Fujihara, T.Tanaka, K.Ogawa, Y.Fujihara and S.Iguchi, Preparation and characterization of a soluble glutathione-dextran conjugate, *Int.J.Pharm.*, **57**, 263-272(1989).
- 5) Y.Kaneo, Y.Fujihara, T.Tanaka, Y.Kozawa, H.Mori and S.Iguchi, Intrahepatic delivery of glutathione by conjugation to dextran, *Pharm.Res.*, **6**(12), 1025-1031(1989).
- 6) 金尾義治, 小川享子, 田中哲郎, 藤原由美恵, グルタチオン-デキストラン結合体の結合様式と高分子プロドラッグとしての性質, *Drug Delivery System*, **9**(5), 345-350(1994).
- 7) Y.Kaneo, K.Ogawa, T.Tanaka, Y.Fujihara and S.Iguchi, A protective effect of glutathione-dextran macromolecular conjugates on acetaminophen-induced hepatotoxicity dependent on molecular size, *Biol.Pharm.Bull.*, **17**(10), 1379-1384(1994).
- 8) Y. Kaneo, T. Uemura, T. Tanaka, S. Kanoh, A. Matsuoka, Pharmacokinetics of glutathione-dextran macromolecular conjugate in mice, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1544-1547 (1995).
- 9) Y.Kaneo, T.Tanaka and S.Iguchi, Preparation and properties of a mitomycin C-albumin conjugate, *Chem.Pharm.Bull.*, **38**(9), 2614-2616(1990).
- 10) Y.Kaneo, T.Tanaka and S.Iguchi, Targeting of mitomycin C to the liver by the use of asialofetuin as a carrier, *Chem.Pharm.Bull.*, **39**(4), 999-1003(1991).
- 11) T.Tanaka, Y.Kaneo and S.Iguchi, Properties of mitomycin C-albumin conjugates in vitro and in vivo, *Bioconjugate Chem.*, **2**(4), 261-269(1991).
- 12) T.Tanaka, Y.Kaneo, S.Shiramoto and S.Iguchi, The disposition of serum proteins as a drug-carriers in mice bearing sarcoma 180, *Biol.Pharm.Bull.*, **16**(12), 1270-1275(1993).
- 13) 田中哲郎, 金尾義治, 白元正一, 宮下正日出, 井口定男, 生体高分子を利用した薬物担体の腫瘍集積性と体内動態, *Drug Delivery System*, **8**(5), 387(1993).
- 14) 田中哲郎, 金尾義治, 総説 生体高分子を薬物担体とした制癌薬の腫瘍指向化, 福山大学薬学部研究年報, **11**, 1-26(1993).
- 15) 田中哲郎, 金尾義治, 宮下正日出, 白元正一, 井口定男, 血清アルブミンを利用した薬物担体の腫瘍集積性—アシル化による体内動態特性の改善—, *Drug Delivery System*, **9**(3), 199-203(1994).
- 16) T.Tanaka, Y.Kaneo, M.Miyashita and S.Shiramoto, Properties of water-insoluble mitomycin C-albumin conjugate as a sustained release drug delivery system in mice inoculated sarcoma

- 180, *Biol.Pharm.Bull.*, **18**(12), 1724-1728(1995).
- 17) T.Tanaka, Y.Kaneo and M.Miyashita, Synthesis of transferrin-mitomycin C conjugate as a receptor-mediated drug targeting system, *Biol.Pharm.Bull.*, **19**(5), 774-777(1996).
- 18) T.Tanaka, Y.Kaneo, and M. Miyashiata, Intracellular disposition and cytotoxicity of transferrin-mitomycin C conjugate in HL60 cells as a receptor-mediated drug targeting system, *Biol.Pharm.Bull.*, **21**(2), 147-152(1998).
- 19) T.Tanaka, Y.Fujishima, and Y.Kaneo, Receptor mediated endocytosis and cytotoxicity of transferrin-mitomycin C conjugate in the HepG2 cell and primary cultured rat hepatocyte, *Biol.Pharm.Bull.*, **24**(3), 268-273(2001).
- 20) 金尾義治, 田中哲郎, 東 和人, 古谷善嗣, トランスフェリン - カルボキシメチルデキストラン結合体を担体としたシスプラチンの癌細胞標的化, *Drug Delivery System*, **12**(5), 353-358(1997).
- 21) 金尾義治, 上村智哉, 田中哲郎, 加納 聰, 薬物担体としての多糖類高分子 - FITC 標識したデキストランとプルランの高速排除クロマトグラフィーによる定量 -, *Drug Delivery System*, **11**(3), 161-168(1996).
- 22) Y. Kaneo, T. Uemura, T. Tanaka, S. Kanoh, Polysaccharides as drug carriers: Biodisposition of fluorescein-labeled dextrans in mice, *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 181-187 (1997).
- 23) 金尾義治, 中野貴透, 田中哲郎, 玉木玲子, 岩瀬宏樹, 山口泰典, 多糖類高分子の肝組織内分布特性, *薬剂学*, **60**(3), 183-195 (2000).
- 24) Y. Kaneo, T. Ueno, T. Tanaka, H. Iwase, Y. Yamaguchi, T. Uemura, Pharmacokinetics and biodisposition of fluorescein-labeled arabinogalactan in rats, *Int. J. Pharm.*, **201**, 59-69 (2000).
- 25) Y. Kaneo, T. Tanaka, T. Nakano, Y. Yamaguchi, Evidence for receptor-mediated hepatic uptake of pullulan in rats, *J. Control. Release*, **70**, 365-373 (2001).
- 26) 金尾義治, 橋濱詩織, 田中哲郎, 中野貴透, 池田有香, 高速排除クロマトグラフィーによる FITC 標識ポリビニルアルコールの体内動態測定, *薬剂学*, **62**, 169-179 (2002).