

抗癌剤を含有したポリビニルアルコール 高分子治療剤の合成と評価

柿木充史、金尾義治、田中哲郎

Construction of Drug Delivery System Using Poly(vinyl alcohol) as Anti-cancer drug carriers

Atsufumi Kakinoki, Yoshiharu Kaneo, and Tetsuro Tanaka

ABSTRACT

The idea of using drug carriers to improve the therapeutic efficacy of pharmacological agents is receiving increasing attention. The consequence of attachment of low molecular weight drugs to macromolecular carriers alters their rate of excretion from the body, changes their toxicity and immunogenicity and limits their uptake by cells via endocytosis, thus providing the opportunity to direct the drugs to the particular cell type where its activity is needed. In addition, these macromolecular conjugates can accumulate in solid tumors due to the enhanced microvasculature of the tumor tissue. This phenomenon has been termed enhanced permeability and retention (EPR-phenomenon) in relation to the tumor targeting. Such delivery systems can be usefully distinguished into the formulations of anti-cancer drugs. In this paper we report on the synthesis of the poly(vinyl alcohol)-doxorubicin conjugates and the synthesis of the poly(vinyl alcohol)-paclitaxel conjugates, and their release experiment, tissue distribution, cellular uptake, and antitumor activity.

緒論

高分子を用いた薬物送達システムは高分子治療剤と総称されている。低分子物質は生体内で自由に拡散し、全身へ一様に分布するのに対し、高分子物質の生体内移行は制限され循環系に長く滞留する。したがって、適当な物理化学的性質を持つ高分子物質を薬物担体（運搬

体)として用いれば、ゲスト分子である薬物の体内動態を制御し、よりポテンシャルの高い薬物送達システムを実現することができる。このようなシステムの開発は、癌の薬物化学療法において強く求められており、副作用の軽減・治療効果の向上が期待されている。それゆえ、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させるかが大きな課題となっている。

一般に、固形腫瘍では腫瘍血管の新生が旺盛であるが、その反面リンパ系が未発達あるいは欠如している。さらに腫瘍組織では血管透過性が著しく亢進しているため、正常細胞では血管外へ漏出しにくい高分子物質が腫瘍血管からは漏出しやすく、また蓄積しやすいことが知られている^(1,2)。この現象はEPR効果(enhanced permeability and retention effect)と呼ばれており、腫瘍集積性をめざした高分子治療剤の拠り所となっている⁽³⁾。1993年にはこの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)がわが国において上市されるに至っている。

ポリビニルアルコール(PVA)はポリ酢酸ビニルのメタノール溶液をアルカリけん化、または酸けん化して得られる合成高分子である。医薬品添加物あるいは食品添加物として使用実績からも明らかのように⁽⁴⁾、体内で極めて安定で毒性もなく安全性が認められている。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である⁽⁵⁾。さらに、当研究室でのこれまでのPVAの体内動態に関する基礎実験において、PVAは特定臓器への集積はなく、長期にわたって血液中を循環しEPR効果による固形癌への集積性が高いことが分かっている^(6,7)。

本研究ではPVAを薬物担体として用い、抗癌剤ドキソルビシンとパクリタキセルの高分子結合体の合成を目指した。ドキソルビシンにはpH感受性を有するcis-アコニット酸をスペーサーとして組み込んだ。パクリタキセルにはエステル結合でこはく酸をスペーサーとして導入した。このようにして合成したPVA-抗癌剤結合体の体内動態特性や抗腫瘍効果を検討した。さらに、疎水性基で修飾した疎水化PVAを合成し、PTXを疎水化PVAで内包したナノ粒子の調製を行い、PVAが薬物担体として有用であるか検討を行った。

第1章 ポリビニルアルコールを利用したpH感受性ドキソルビシン高分子プロドラッグの合成

1-1 序論

ドキソルビシン(DOX)は*Streptomyces peucetius* var.*caesius*の培養濾液中から発見されたアントラサイクリン系の抗腫瘍性抗生物質で、多くの実験移植腫瘍系において、極めて強い抗腫瘍活性が認められている。臨床においても、各国で広範な研究が行われ、造血管腫瘍だけでなく種々の固形癌に対しても幅広い抗腫瘍スペクトラムを有する⁽⁸⁻¹⁰⁾。我が国では、肺癌、消化器癌、乳癌、悪性リンパ腫、膀胱腫瘍、骨肉腫等に優れた効果が認められ適用されている。しかし、アントラサイクリン系抗生物質に特徴的な副作用として、特に心毒性があ

げられ、臨床使用の大きな障壁となっている⁽¹¹⁾。したがって、高分子化することでEPR効果をねらい、治療成績を上げると共にこのような副作用を改善することが期待されている。現在、ヒドロキシプロピルメタクリアミド(HPMA)を担体としたDOXの高分子プロドラッグ(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DOXを内包したのものなど11種類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⁽¹²⁻¹⁴⁾。本研究では、PVAを利用し、DOXと的高分子プロドラッグの合成を行った。

1-2 アコニチルードキシソルビシンの合成と単離

pH感受性を有した高分子プロドラッグは、Shen等によって初めて合成された⁽¹⁵⁾。彼等は、DNRにアコニット酸スパーサーを導入した誘導體合成し、これをアミノエチルポリアクリルアミドビーズ、又はポリリジンに結合させた。その後、同様の手法を用いた、モノクローナル抗体や合成高分子とDNRの数多くの高分子プロドラッグが報告されている^(16, 17)。DNRと同じアントラサイクリン系の抗腫瘍性抗生物質であるDOXもまた、アコニット酸スパーサーを用いてモノクローナル抗体と的高分子プロドラッグが合成されている⁽¹⁸⁾。

以上の知見をもとに、DOXをアコニット酸スパーサーを介してPVAに結合させた高分子プロドラッグの合成を行った。我々は、HPLCによるADOX誘導體の分析から、ADOXには、cis-ADOX(cis型配置)とtrans-ADOX(trans型配置)の2種類が存在することを見出し、カラムによる分取に成功した(Fig. 1, Fig. 2)。各誘導體の収率は、cis-ADOXが36.3%でtrans-ADOXが44.8%であり、この2種類の誘導體が反応の主生成物であることが明らかとなった。Remenyi等はDNRとcis-アコニット酸無水物の反応で2種類のアコニチル-DNR誘導體が生成することを報告している。彼等は、各誘導體を単離精製し、NMR及び質量分析を用い構造決定を行った結果、これらの誘導體は-C=C-をはさんだ α 位のカルボキシル基のシス・トランス異性体であることを報告している⁽¹⁹⁾。

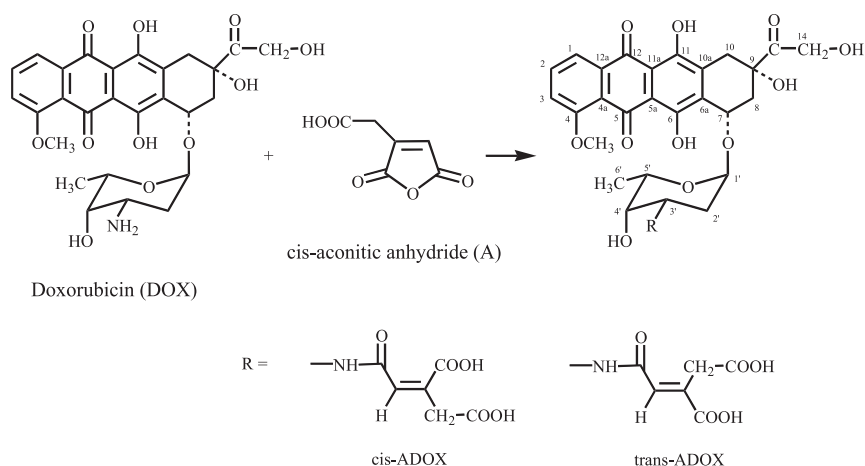


Fig.1. Synthetic pathway of aconityl-doxorubicin (ADOX).

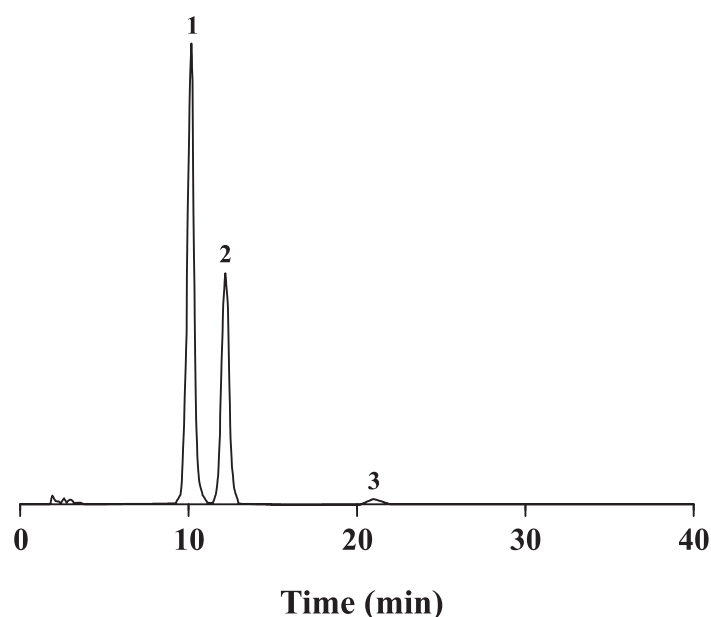


Fig.2. HPLC chromatogram of ADOX. Chromatography was carried out using a HPLC system equipped with a variable-wavelength fluorescent detector. The excitation and emission wavelength were set at 470 nm and 560 nm, respectively. A 4.6 x 150 mm, 5- μ m particle size, C18 reversed-phase column was used at ambient temperature. The mobile phase was $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (3 w/w%): methanol : acetonitrile = 50 : 45 : 5, v/v/v. The injection volume was 20 μ l, and the flow rate was 1.0 ml/min. Peaks: 1, trans-ADOX; 2, cis-ADOX; 3, DOX.

1-3 ポリビニルアルコールドキシソルビシン結合体の合成

ポリビニルアルコールドキシソルビシン結合体 (PVA-ADOX) は、2段階の反応を経て合成した。まず初めに、PVA-エチレンジアミンを合成し、次いで ADOX と PVA-エチレンジアミンを結合させた。

PVA-エチレンジアミンの合成は、PVA の水酸基を CDI で活性化後、大過剰のエチレンジアミンを反応させる。これは大過剰のエチレンジアミンを加えることで、PVA 鎖の架橋や環化を防ぐことができる。得られた PVA-エチレンジアミンのアミノ基を TNBS 法により、結合体のエチレンジアミン含有率を測定すると 4.6 w/w% であり、これは PVA 1 mol にアミノ基が 62 mol 結合していることが明らかとなった。

cis-ADOX、trans-ADOX を用いて、PVA-ADOX 結合体の合成を行った。各 ADOX 誘導体の γ 位のカルボキシル基を EDC で活性化し、さらに NHS を反応させ、活性エステル体を得た。これと PVA-エチレンジアミンを反応させ、PVA-cis-ADOX、PVA-trans-ADOX を得た (**Fig. 3**)。アコニット酸をスパーサーに用いた場合、ADOX と PVA は主にアコニット酸の γ 位のカルボキシル基を介して結合すると考えられている⁽¹⁵⁾。我々は PVA と DOX 組み合わせで初めて高分子プロドラッグを合成することに成功した。

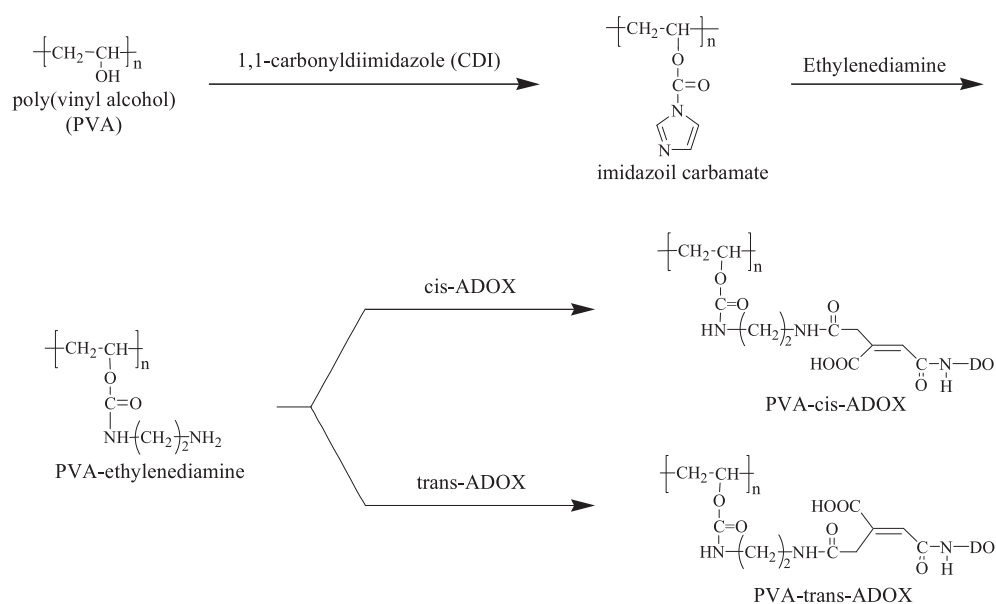


Fig.3. Synthetic pathway of PVA-ADOX conjugates.

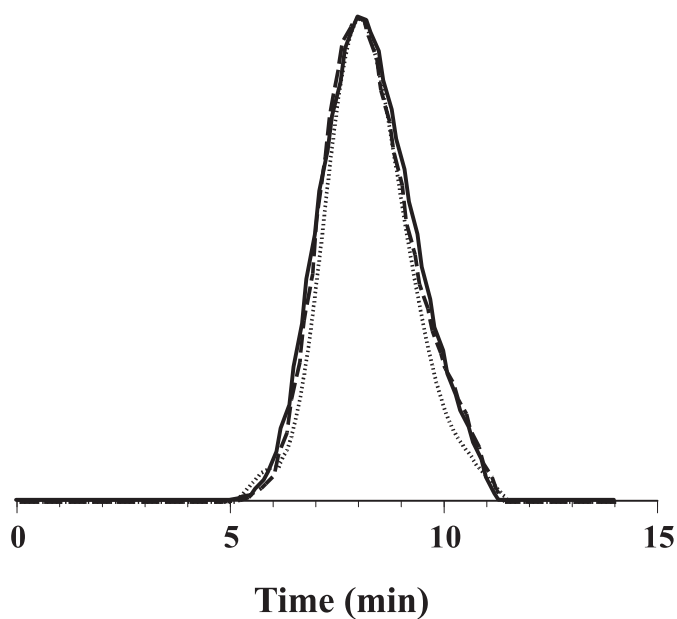


Fig.4. HPSEC chromatograms of PVA (.....), PVA-cis-ADOX (---) and PVA-trans- ADOX (—). HPSEC was carried out on a TSKge1 G4000PWXL column (7.8 x 300 mm) with 0.2 M NaCl in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0. PVA-cis- ADOX and PVA-trans- ADOX were spectrophotometrically detected at 476 nm, whereas PVA was analyzed by a differential refractometer.

結合体の分析は、TSK gel G4000PWXL カラムを接続した高速排除クロマトグラフィーで行った。PVA-cis-ADOX と PVA-trans-ADOX は 3次元クロマトグラム装置 (MCPD-3600) で 476 nm の吸光度を、未修飾の PVA は示差屈折計で検出した (Fig. 4)。PVA-ADOX のピークは、いずれも未修飾の PVA と一致し、ADOX の結合による分子量に影響が無いことが確認された。

高分子プロドラッグの DOX 含量は吸光度法と HPLC 法の 2 種類の方法で算出した。酸性条件下では、DOX のダウノサミン環とアグリコンの間のグリコシド結合は容易に加水分解され、アグリコンを遊離することが知られている⁽²⁰⁾。HPLC 法では、DOX のアグリコンを HPLC で定量するため、結合している DOX を特異的に定量することができる⁽²¹⁾。HPLC 法で求めた DOX 含量は 4.4 w/w% で、これは吸光度法で求めた 4.6 w/w% とほぼ一致した。PVA-ADOX には PVA 1 mol にエチレンジアミンが 62 mol 結合しており、そこに DOX が 6.1 ~ 6.4 mol 結合していることが明らかとなった。

1-4 放出実験

リン酸緩衝液中における、PVA-ADOX からの DOX の放出特性を Fig. 5 に示した。DOX の遊離には pH 感受性があり pH 5、pH 6 のような酸性領域においてより遊離しやすいことが明らかとなった。また、pH 5 における、PVA-cis-ADOX と PVA-trans-ADOX の放出半減期を比較すると、PVA-cis-ADOX は 3 h で PVA-trans-ADOX は 14 h であり、cis 型が trans 型よりも 4.7 倍短いことが明らかとなった。さらに、PVA-cis-ADOX の pH 6 での放出性は、PVA-trans-ADOX よりも約 3 倍高いことが明らかとなった。DOX 放出のメカニズムは、酸性条件下にお

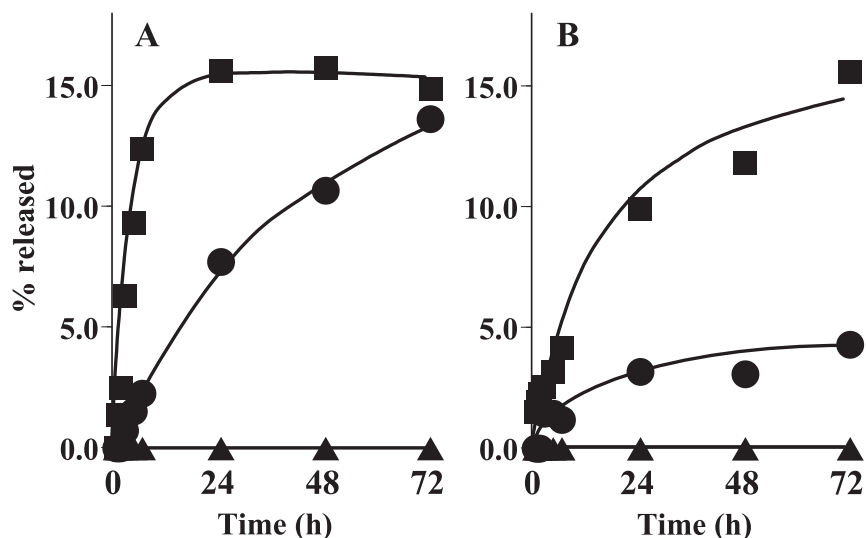


Fig.5. Effect of pH on the release of DOX from PVA-cis- ADOX (A) and PVA-trans-ADOX (B). The release of DOX from the conjugates was determined in 0.1 M citrate buffer solution ($\mu=0.3$) of pH 5 (■), 6 (●), and 7 (▲) at 37 °C .

いて遊離の β 位のカルボキシル基がアミド結合の加水分解を触媒すると考えられており、これは、構造上 PVA-cis-ADOX の方がより有効に働くと考えられた。

1-5 ポリビニルアルコールドキシソルビシン結合体の細胞内取り込み

J774.1 細胞へ PVA-cis-ADOX 及び DOX を添加した時の細胞内の DOX を蛍光顕微鏡で観察した (Fig. 6)。DOX 添加では、細胞全体に DOX に由来する蛍光が観察されたのに対して、PVA-cis-ADOX では、細胞質と核に蛍光が局在していることが明らかとなった。

また、細胞内における DOX 放出性を比較すると、DOX 濃度は PVA-cis-ADOX の方が PVA-trans-ADOX よりも有意に高いことが明らかとなった (Fig. 7)。さらに、細胞内の DOX 濃度は培地中の DOX 濃度よりも高いことから、DOX の放出は細胞内リソソームやエンドソームの酸性領域で起こっていることが示唆された。

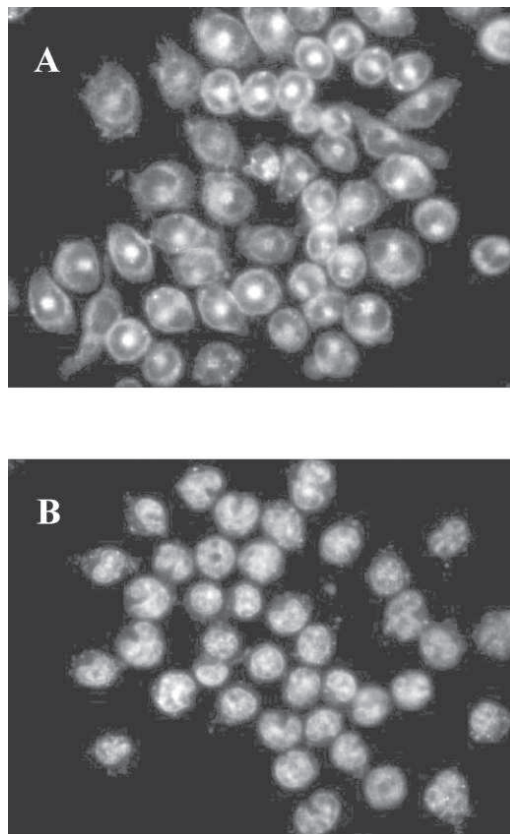


Fig.6. Fluorescence microscopic examination of the cellular distribution of PVA-cis-ADOX (A) and DOX (B) in J774.1. Cells (4×10^5) were incubated with PVA-cis-ADOX (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in DOX equivalent) at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 6 h. After incubation, the cells were washed three times with PBS (pH 7.4) and then examined with a Nikon transmitted light fluorescence microscope of 400 magnifications.

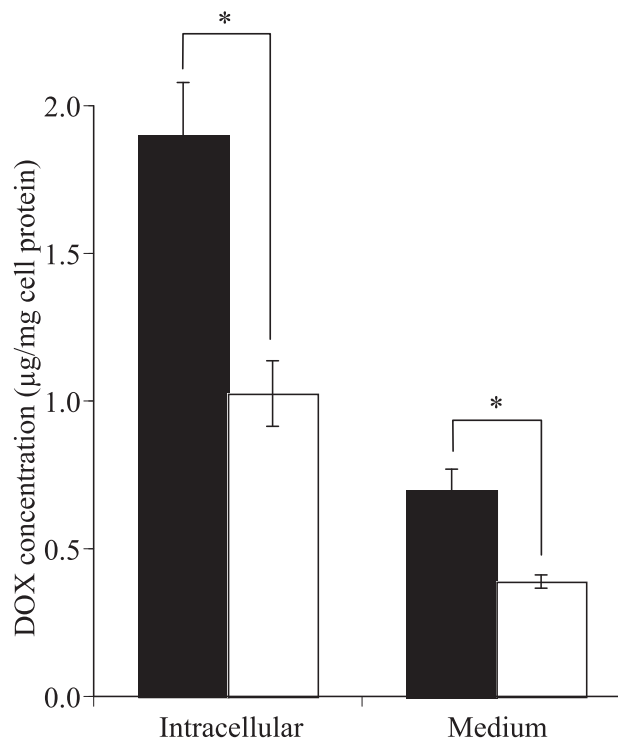


Fig.7. Intracellular release of DOX from PVA-cis-ADOX (close column) and PVA-trans-ADOX (open column) in J774.1. Cells (4×10^5) were incubated with PVA-ADOX conjugates (125 µg/ml in DOX equivalent) at 37 °C for 6 h. After incubation, the cells were washed and homogenized. The amount of DOX was estimated by using a HPLC equipped with a variable-wavelength fluorescent detector. The excitation and emission wavelength were set at 470 nm and 560 nm, respectively. Values are given as means \pm SE (n = 3). The statistical significance was determined based on Student's t-test (* P < 0.05).

1-6 殺細胞効果の測定

J774.1 細胞に対する PVA-cis-ADOX 及び PVA-trans-ADOX の殺細胞効果は、RNA 合成能を評価するために [^3H] ウリジンの取り込みを測定した。PVA-ADOX の殺細胞効果を比較すると、PVA-cis-ADOX の方が PVA-trans-ADOX よりも明らかに高い活性を示した (Fig. 8)。これは、DOX 放出実験と矛盾無く一致する結果となった。各化合物の IC_{50} は、PVA-cis-ADOX が 18 µg/ml (DOX 換算)、DOX が 0.48 µg/ml であった。

PVA と DOX の高分子プロドラッグである PVA-cis-ADOX は、cis- アコニット酸スペーサーを有することで酸性条件下で選択的に DOX を放出することができる。また、PVA-cis-ADOX は、pH 6 の弱酸性条件下でも高い放出性を発揮した。アコニット酸の構造異性によって DOX の放出性が大きく異なることが明らかとなった。さらに、癌の治療には、PVA-cis-ADOX を用いることでより高い効果が見込めるものと期待する。

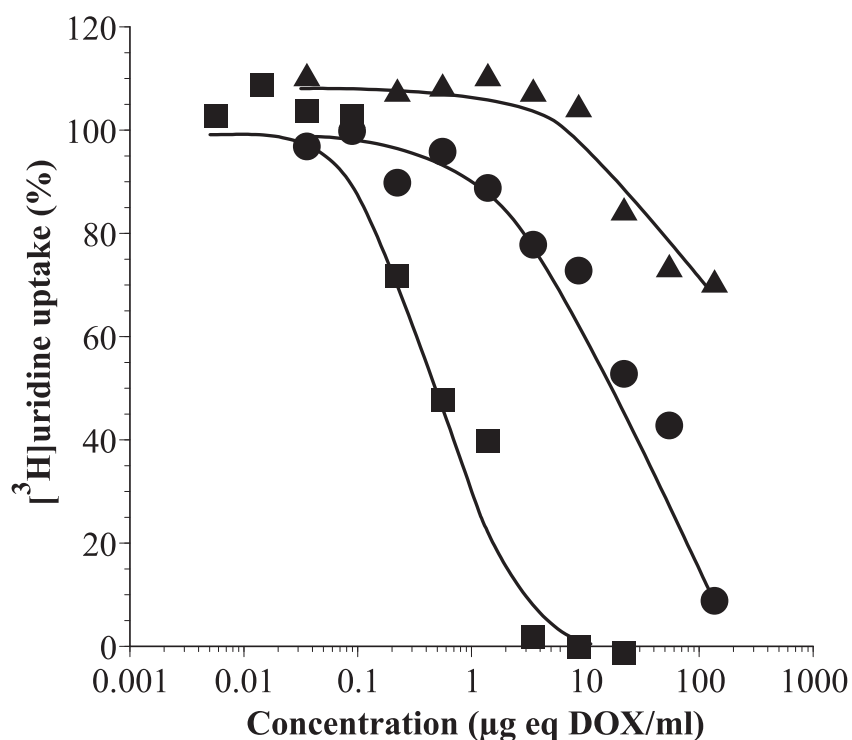


Fig.8. Effects of PVA-cis-ADOX (●), PVA-trans-ADOX (▲) and DOX (■) on the proliferation of J774.1 cells. Cells (5×10^3) were incubated with various drug concentrations for 5 h and then washed with fresh medium and incubated for another 48 h. After incubation, the cells were incubated with [3 H]uridine for 2 h and harvested. Results are shown as percent of the cellular uptake of [3 H]uridine uptake.

第2章 ポリビニルアルコールを利用したパクリタキセル高分子プロドラッグの合成

2-1 序論

Paclitaxel (PTX) はイチイ (*Taxus-brevifolia*) から単離された抗癌剤で⁽²²⁾、卵巣癌や乳癌、非小細胞肺癌の化学療法に用いられる⁽²³⁻²⁷⁾。しかし、PTXは水に極めて難溶性なため⁽²⁸⁾、注射液には可溶化剤としてクレモホール[®]EL (ポリオキシエチレンヒマシ油) が使用されている。ところが、本可溶化剤は重篤な過敏症反応を引き起こすことから^(29,30)、その予防策としてステロイドやH₁ブロッカー、H₂ブロッカーなどの抗アレルギー薬が前投与されている。さらに、可塑剤としてDi-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) を含有している容器や投与器具は、クレモホール[®]ELと接触すると可塑剤が溶出するため使用できないことが明らかとなった⁽³¹⁾。そのため、タキソール注射液を点滴するには、特殊な素材を持った容器や流路 (チューブ) が必要とされている。

以上のような観点から、PTXを高分子化することで水可溶性を獲得し、EPR効果による治

療成績の向上と共に副作用を改善することが期待されている。近年では、Polyethylene glycol (PEG) を用いた 2'-PEG-paclitaxel プロドラッグ^(32, 33) やポリグルタミン酸を担体とした PTX の水溶性高分子プロドラッグやカルボキシメチルデキストランを担体とした PTX の結合体などが報告されている⁽³⁴⁻³⁶⁾。本研究では、PVA を利用して PTX との高分子プロドラッグの合成を行った。

2-2 ポリビニルアルコール-パクリタキセル結合体の合成

Dosio 等は、PTX に無水コハク酸を反応させた誘導体サクシニル-パクリタキセル (SPTX) を合成し、これを更にアルブミンに結合させた高分子プロドラッグの合成法を報告している⁽³⁷⁾。そこで本法に基づいて、SPTX を合成し、さらに PVA - エチレンジアミンと反応させ、PVA-SPTX を合成することができた (Fig. 9)。PTX 含量を吸光度法で算出すると、6.2 w/w % であった。これは PVA 1 mol あたり 5.8 mol の PTX が結合していることが明らかとなった。また、PVA-SPTX の溶解度は、PTX 換算で 2 mg/ml 以上であり、PTX の溶解度 0.3 µg/ml と比較すると大幅に改善することができた。

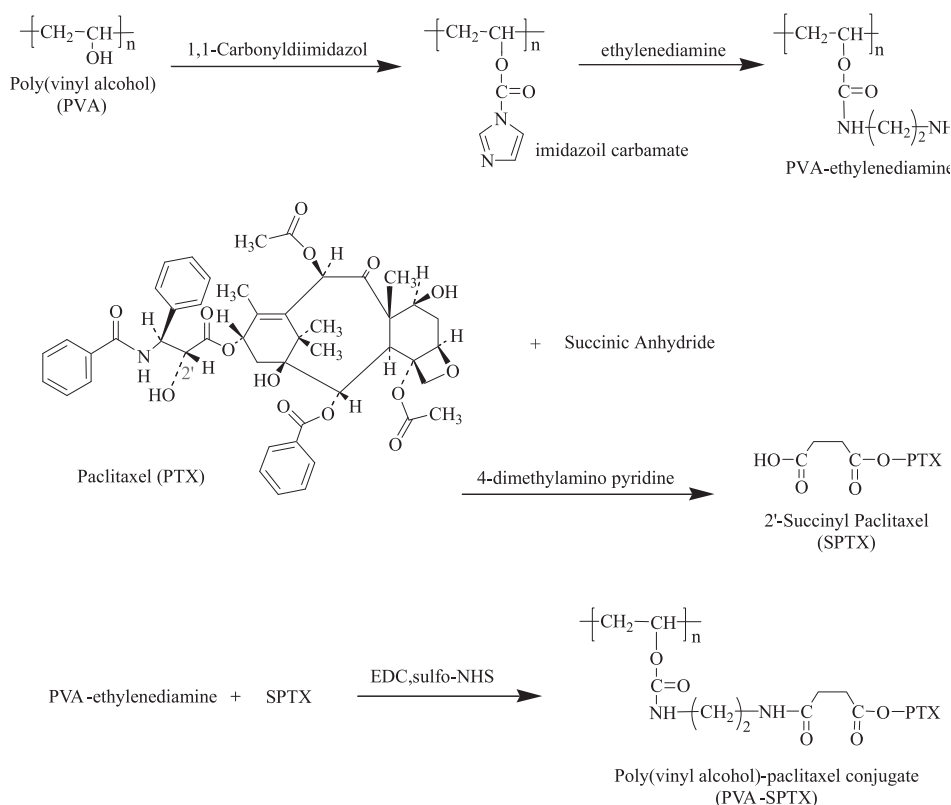


Fig. 9. Synthetic pathway of PVA-SPTX conjugate.

EDC: 1-(3-dimethylaminopropyl)3-ethylcarbodiimide hydrochloride, sulfo-NHS: N-hydroxy-3-sulfo-succinimide.

結合体の分析は、3次元クロマトグラム装置により行った。**Fig.10** に示すように、PVA-SPTX は高分子分画に波長 227 nm 付近の PTX の吸光度が認められ、結合体が合成されていることが確認できた。PVA-SPTX の保持時間は、未修飾の PVA と一致したことから PTX の結合による分子量への影響は無い事が確認できた。

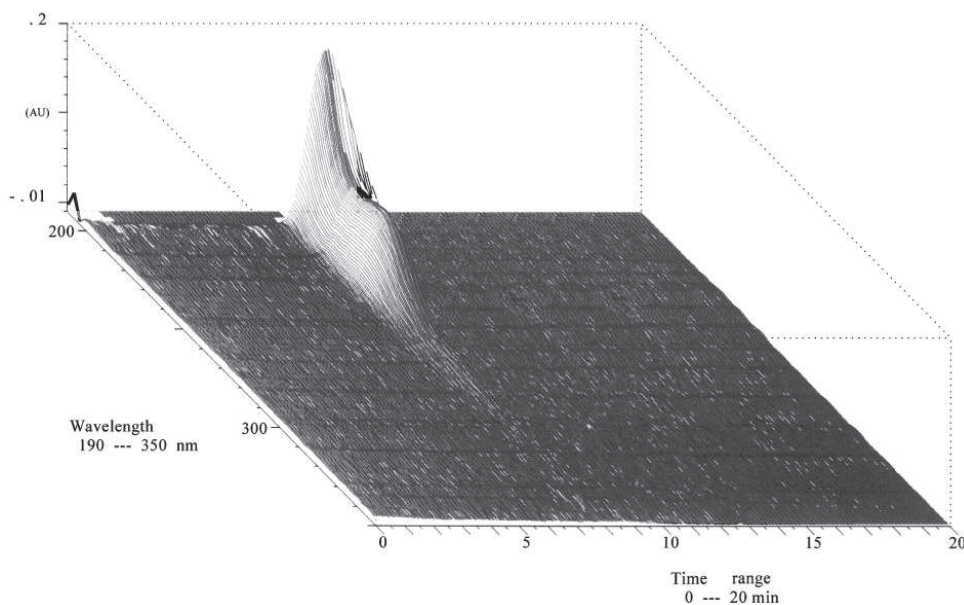


Fig. 10. Three dimensional chromatogram of PVA-SPTX. The retention time of the peak top of PVA-SPTX was 8.4 min in the cross section at 227 nm. High-performance size-exclusion chromatography was carried out using a HPLC system equipped with a photodiode array detector. A 7.8 x 300 mm, TSKgel G4000PWXL column was used at 40 °C . The mobile phase was 20 % acetonitrile in 50 mM LiCl and the flow rate was 1.0 ml/min.

2-3 パクリタキセル安定性と放出特性

1.5 M DENA を含んだクエン酸緩衝液、あるいはリン酸緩衝液中における PVA-SPTX からの PTX の遊離特性を検討した。PTX は DENA に可溶で、1.5 M DENA には PTX を最大 290 $\mu\text{g/ml}$ まで溶解することができる⁽³⁸⁾。DENA を用いることにより化学的シンク条件を作り出し、PVA-SPTX から放出した PTX が析出するのを防いだ。

これまでの検討で PTX は pH 7 の中性では安定で、pH 7 以上では急速に分解することを明らかにしている。PTX が弱アルカリ性条件で分解をうけると主にバッカチン III が生成することが報告されている⁽³⁹⁾。種々の pH における、PVA-SPTX からの PTX の放出特性は、酸性領域では PTX の放出は遅く、中性からアルカリ性領域において、より PTX が放出しやすいことが明らかとなった (**Fig. 11**)。

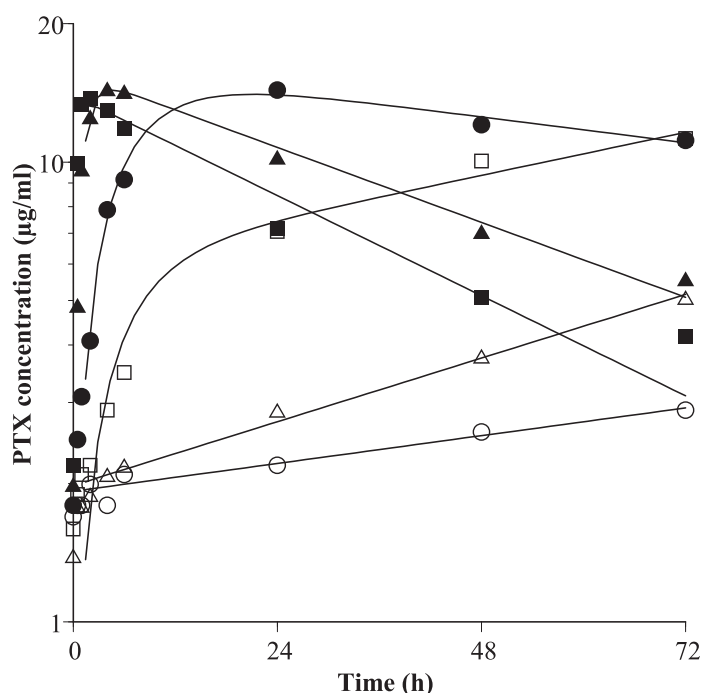


Fig. 11. Regeneration of PTX from PVA-SPTX in 0.05 M citrate buffer solutions ($\mu = 0.15$) of pH 4 (○), 5 (△) or 6 (□) and in 0.05 M phosphate buffer solutions ($\mu = 0.15$) of pH 7 (●), 8 (▲) or 9 (■) containing 1.5 M DENA at 37 °C .

放出性の結果から、放出速度定数 (k_1) および分解速度定数 (k_2) を算出し、pH との関係を図 12 に示す。 k_1 は pH 4~6 ではほぼ一定で、pH 7 以上で増大することが明らかとなった。さらに、その傾きが 1 に近くなる事から特殊塩基触媒によって薬物が放出されることが示唆された。また、 k_1 はいずれの pH においても k_2 よりも高値を示した。

PVA-SPTX から放出する PTX は以下の式で表される。

$$[\text{PTX}] = k_1 [\text{PTX}]^* / (k_2 - k_1) \times (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)) \quad (1)$$

ここで $[\text{PTX}]$ は PTX の濃度、 $[\text{PTX}]^*$ は PVA-SPTX に結合する放出可能な PTX 濃度、 k_1 は放出速度定数、 k_2 は分解速度定数である。

また、 PTX の分解は以下の式で表される。

$$[\text{PTX}] = [\text{PTX}]_0 \exp(-k_2 t) \quad (2)$$

ここで $[\text{PTX}]_0$ は PTX の初濃度である。 PVA-SPTX から放出した PTX 及び、 PTX の分解について、式 (1) 及び式 (2) をもとに非線形最小二乗法プログラム MULTI により解析を行った⁽⁴⁰⁾。 アルゴリズムは Damping Gauss-Newton 法を用いた。

pH 7 での PVA-SPTX からの PTX 放出速度 ($k_1 = 0.187 \text{ h}^{-1}$) は PTX の分解速度 ($k_2 = 0.00345 \text{ h}^{-1}$) に比べて 54 倍速いことが明らかとなった。 また、 放出半減期は 3.7 h、 分解半減期は 201 h であった。

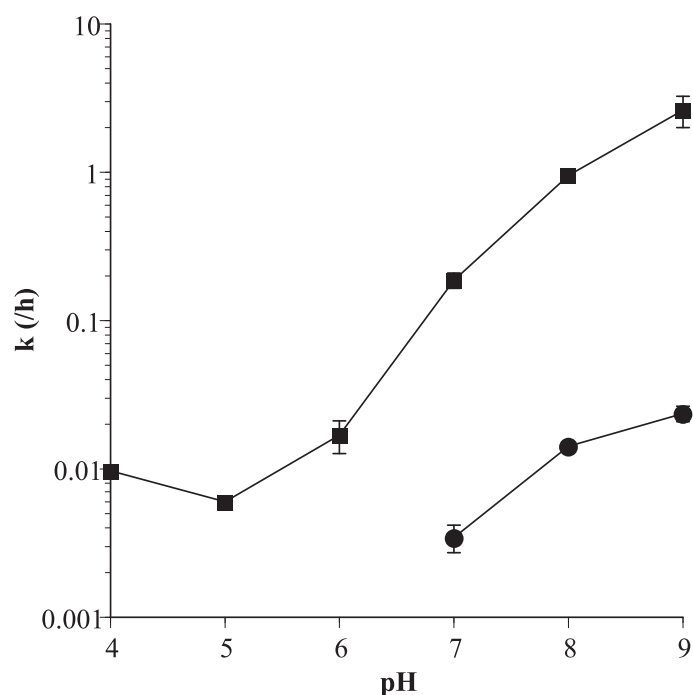


Fig. 12. pH profile of regeneration rate constant of PTX from PVA-SPTX (■) and decomposition rate constant of PTX (●) in 0.05 M citrate buffer solutions ($\mu = 0.15$) or phosphate buffer solutions ($\mu = 0.15$) containing 1.5 M DENA at 37 °C .

さらに、[PTX]* の値から PVA-SPTX の PTX 含量を算出すると、吸光度法で求めた値と一致した。この結果から、PVA-SPTX に結合した PTX は 100% 放出可能であることが明らかとなった。

2-4 体内動態の測定

我々は動物を用いた PVA の体内動態研究についての報告を行った。マウスへの投与では、 ^{125}I -PVA は、数日間に渡って循環血液中を滞留することを明らかにした。PVA はほとんど組織には分布しないが、経時的に肝臓、腎臓、脾臓へ集積することが確認された⁽⁶⁾。

^{125}I -PVA-SPTX を S180 担癌マウスに投与した時の体内動態を Fig. 13 に示す。 ^{125}I -PVA-SPTX は循環血液中を長時間滞留し、経時的に腫瘍組織に集積することが明らかとなった。この結果から、PVA-SPTX は EPR 効果^(3, 41, 42)を発揮し、効果的に腫瘍組織に集積することが示唆された。

2-5 制癌効果の測定

PVA-SPTX の S180 担癌マウスに対する制癌効果を Fig. 14 に示す。投与量は PTX 換算 25 mg/kg/d で、7 d、10 d、14 d、17 d、21 d に投与し、30 d までの腫瘍体積を測定した。PVA-

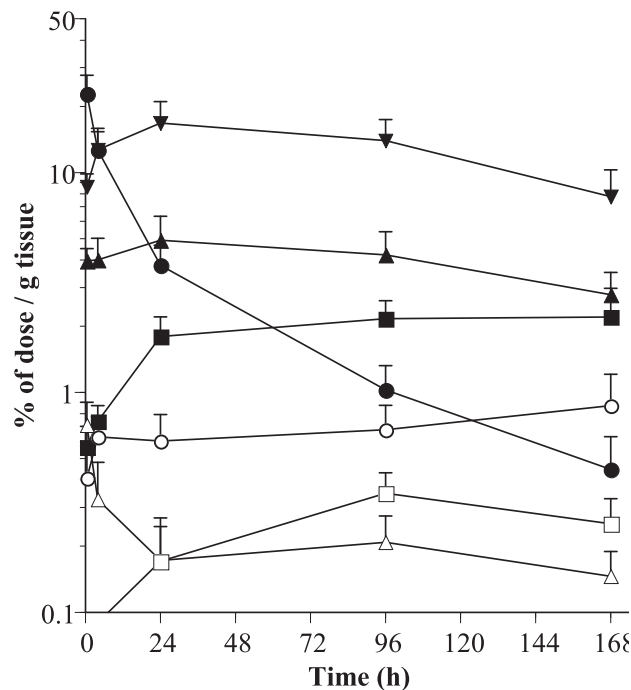


Fig. 13. Time profile of tissue distribution of ^{125}I -PVA-SPTX after intravenous injection (6 mg/kg) to mice. ●, plasma; ▲, liver; ▼, kidney; ■, tumor; ○, spleen; △, lung; □, heart. Each point represents the mean \pm SE of five mice.

SPTX 投与群とコントロール群と比較すると、有意に癌の増殖を抑制した。30 d における平均腫瘍体積はそれぞれ、PVA-SPTX 投与群が $329 \pm 187 \text{ mm}^3$ 、PTX 投与群が $1304 \pm 864 \text{ mm}^3$ 、コントロール群が $4278 \pm 1426 \text{ mm}^3$ であった。

本研究では、PVA と PTX の組み合わせで初めて高分子プロドラッグを合成することができた。PTX を PVA に結合し、高分子プロドラッグとすることで、溶解性が大幅に改善された。さらに、S180 担癌マウスに対する制癌効果の結果から、PVA-SPTX は EPR 効果によって効果的に腫瘍組織に集積し、PTX を徐放する事で制癌効果を発揮することが示唆された。

第 3 章 ポリビニルアルコールを利用したナノ粒子の設計

3-1 序論

抗癌剤をゲスト分子とした高分子治療剤のもうひとつの手法は、高分子ナノ粒子担体を用いる方法である。高分子ナノ粒子担体はその疎水性領域に低分子抗癌剤を内包させたものである。疎水性ポリマーと親水性ポリマーからなる AB 型ブロックコポリマーや、本研究で検討した疎水化ポリマーは、高分子プロドラッグと並んで癌化学療法において最も期待される DDS 的手法のひとつとされている。

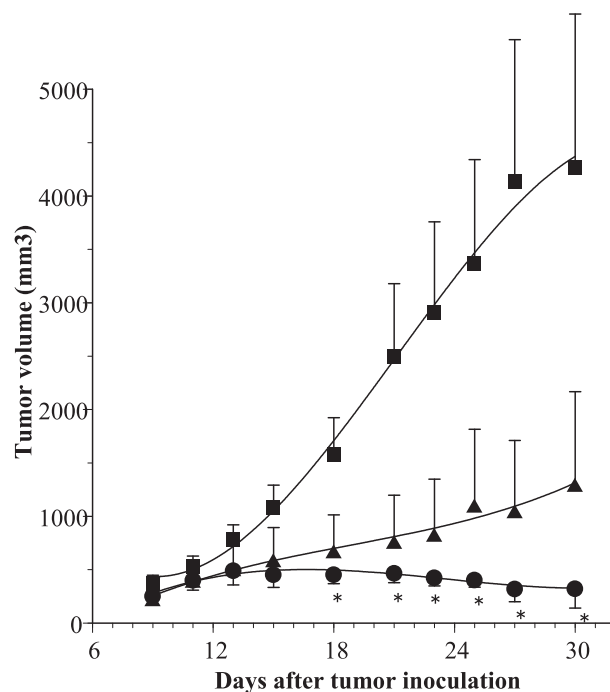


Fig. 14. Antitumor effect of PVA-SPTX and PTX on implanted S180 tumor. Mice were inoculated with S180 cells (1×10^6 cells / mouse) subcutaneously. PVA-SPTX and free PTX were given as intermittent intravenous injections on days 7, 10, 14, 17 and 21 after the tumor inoculation. ●, PVA-SPTX (25 mg/kg in PTX equivalents); ▲, PTX (25 mg/kg); ■, control (5 % glucose). Each point represents the mean \pm SE of six mice (* $P < 0.05$).

近年では、PEG - ポリアスパラギン酸コポリマーで DOX を内包した高分子ミセル^(43, 44) や両親媒性 2-methacryloxyethyl phosphorylcholine polymer を利用した難溶性薬物の可溶化⁽⁴⁵⁾ が報告されている。本研究では、3種類の疎水性基を導入した疎水化 PVA を合成し、PTX を内包したナノ粒子の調製を行った。

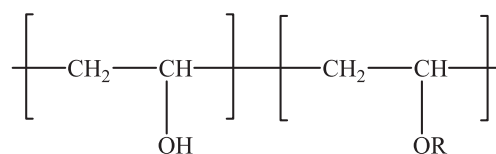
3-2 疎水化ポリビニルアルコールの合成

水溶性高分子である PVA に 3 種類の疎水性基を導入した疎水化 PVA (Stearoyl PVA、Oleoyl PVA、Cholesteroyl PVA) の合成を行った (Fig. 15)。合成による疎水化 PVA の収率はそれぞれ、Stearoyl PVA 78.0%、Oleoyl PVA 85.6%、Cholesteroyl PVA 87.5%であった。

得られた各々の疎水化 PVA を用いてエバポレーション法によって PTX 内包 PVA ナノ粒子を調製し、それぞれ実験に供した。

3-3 PNA の内包化

得られた疎水化 PVA のナノ粒子形成能を評価するために、疎水化 PVA 濃度に対する PNA



R : C(O)CH₂(CH₂)₁₅CH₃ Stearoyl PVA

: C(O)CH₂(CH₂)₆CH=CH(CH₂)₇CH₃ Oleoyl PVA

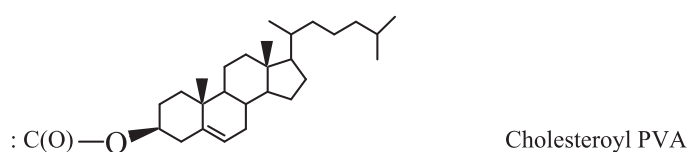


Fig. 15. Structures of hydrophobized poly(vinyl alcohol)

Table 1.
Dynamic light scattering measurements on polymer and drug-polymer aqueous solutions.

	Mean diameter (nm)
PVA	4.3
Stearoyl PVA	20.2
PTX in Stearoyl PVA	83.4
Oleoyl PVA	15.6
PTX in Oleoyl PVA	89.5
Cholesteroyl PVA	13.6
PTX in Cholesteroyl PVA	104.8

の蛍光変化を測定した。PNA は、石鹼などの界面活性剤と混合すると、蛍光極大波長と相対蛍光強度が著しく変化することが知られている。これは、PNA がミセル内部の疎水性領域に移行することで、分子を取り巻く極性環境が変化するためであると考えられている。Akiyoshi 等は、PNA を疎水化多糖に用いることで、ナノ粒子形成能を測定している。これらの知見に基づいて、3種類の疎水化 PVA のナノ粒子形成能を測定した。いずれの疎水化 PVA においても、濃度の上昇に伴って PNA の蛍光極大波長は短波長側にシフトし、同時に相対蛍光強度の増大をみとめた (Fig. 16 ~ 18)。この現象は、PVA のに導入した疎水基の種類に関わらず、20 ~ 40 μg/ml 以上で観察された。この結果から、疎水化 PVA はこの濃度以上で PNA を内包化しているものと考えられた。

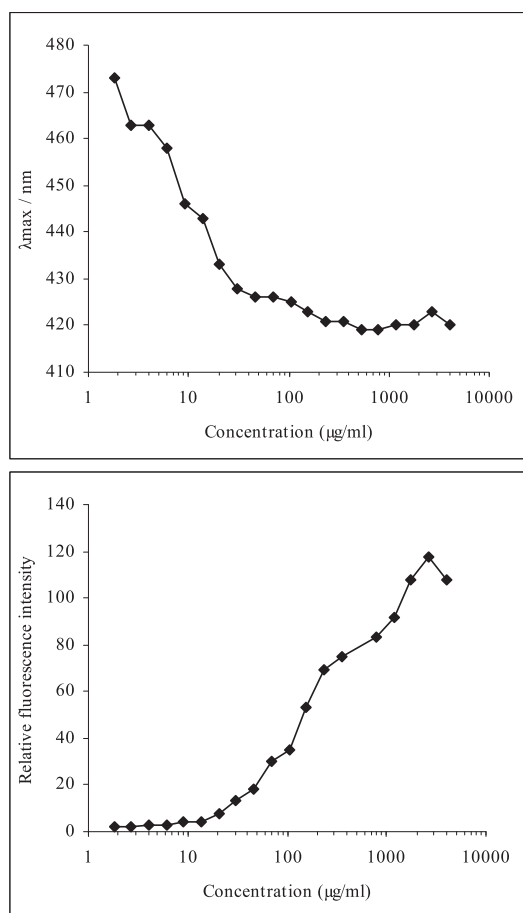


Fig. 16. Emission maximum and relative fluorescence intensity of PNA as a function of the stearyl PVA concentration.

3-4 ナノ粒子の分析

疎水化 PVA 及び PTX 内包 PVA ナノ粒子の粒度分布を動的光散乱法により測定した。Table 1. に示したように、未修飾の PVA の平均粒子径は、4.3 nm であるのに対して、疎水化 PVA の平均粒子径は 13.6 ~ 20.2 nm であり、PVA を疎水化することで粒子径の増大が観察された。PTX 内包 PVA ナノ粒子の平均粒子径は、83.4 ~ 104.8 nm で、疎水化 PVA と比べて粒子径はさらに増大した。

PTX をナノ粒子化した時の溶解度は、PTX 換算で 5 mg/ml 以上であり、PTX の溶解度 0.3 μg/ml と比較すると大幅に改善することができた。PTX 内包 PVA ナノ粒子中の PTX 含有率を、HPLC で測定すると、PTX in stearyl PVA 18.8 w/w%、PTX in oleoyl PVA 19.4 w/w%、PTX in cholesteroyl PVA 19.5 w/w% であり、内包化における PTX の利用率はそれぞれ、94.0 %、97.0 %、97.5 % であった。

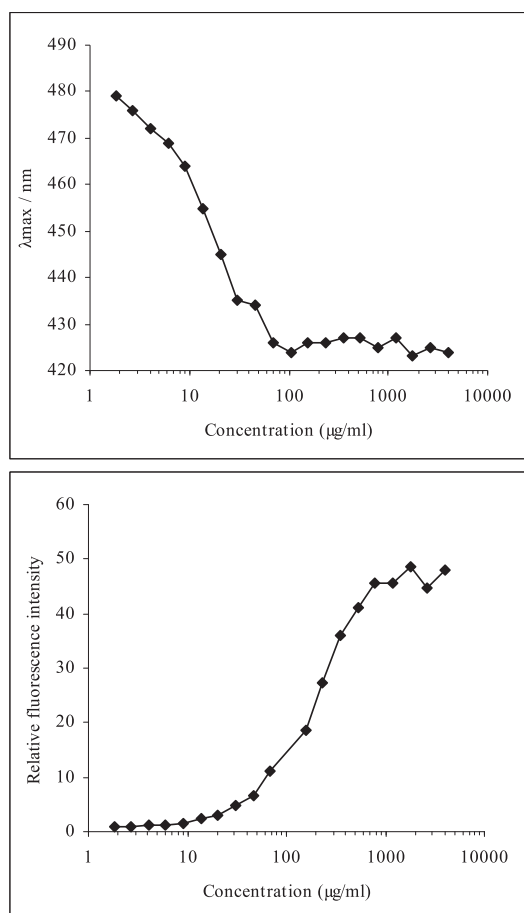


Fig. 17. Emission maximum and relative fluorescence intensity of PNA as a function of the oleoyl PVA concentration.

3-5 パクリタキセル内包 PVA ナノ粒子の体内動態

PTX 内包 PVA ナノ粒子をマウスに投与し、血中滞留性を測定した。PTX in cholesteroyl PVA を投与すると、投与直後の PTX 濃度がフリーの PTX を投与したものよりも高く維持する傾向を示した。一方、PTX in oleoyl PVA 投与では、PTX をほとんど検出されなかった (Fig. 19)。この様に、PVA に導入する疎水基によってナノ粒子の安定性が大きく異なる事が明らかとなった。

本研究で合成した疎水化 PVA は PTX の可溶化に極めて有効であり、高分子ナノ粒子担体として利用できる可能性が示された。今後は、血中安定性が高く、EPR 効果によって腫瘍への PTX 送達を可能とする高分子ナノ粒子担体の合成を目指したいと考える。

総括

癌化学療法においては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させるかが

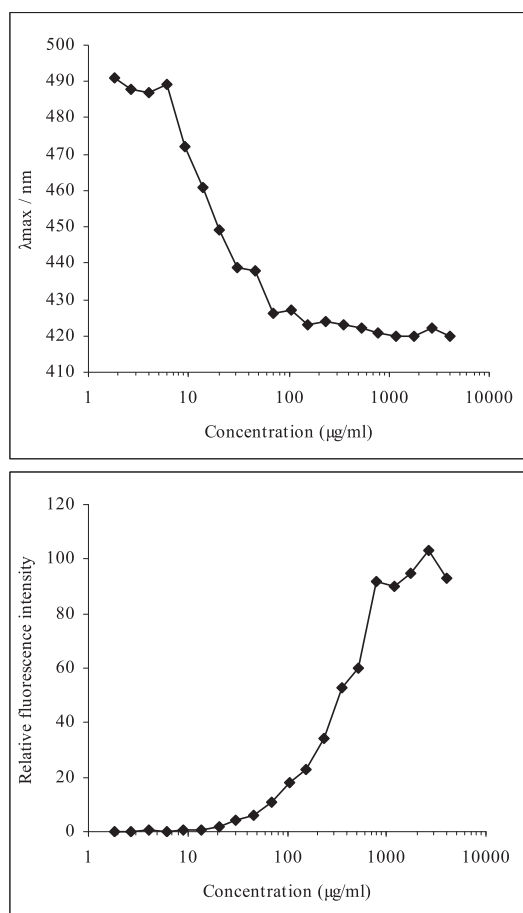


Fig. 18. Emission maximum and relative fluorescence intensity of PNA as a function of the cholesterolyl PVA concentration.

大きな課題となっている。そこで、本研究では、PVA を薬物担体として用いて、高分子治療剤の合成を行った。低分子物質は生体内で自由に拡散し、全身へ一様に分布するのに対し、高分子物質の生体内移行は制限され循環系に長く滞留する。したがって、適当な物理化学的性質を持つ高分子物質を薬物担体として用いれば、ゲスト分子である薬物の体内動態を制御し、よりポテンシャルの高い薬物送達システムを実現することができる。

PVA に DOX を共有結合させた高分子プロドラッグの合成を行った。DOX に pH 感受性スペーサーであるアコニット酸を導入した ADOX 誘導体を合成し、これを介して PVA と結合させた。この高分子プロドラッグは、血液中では安定で、腫瘍組織に移行し癌細胞に貪食をうけてリソソームやエンドソームなどの酸性条件に移行すると、DOX を放出し殺細胞効果を発揮する。従来から、ADOX のスペーサーの構造としては cis 型が生成することが知られていたが、本研究において trans 型も同時に生成することを見出した。酸性条件下における PVA-cis-ADOX 及び PVA-trans-ADOX からの DOX 放出性を比較すると、その速度は cis 型が

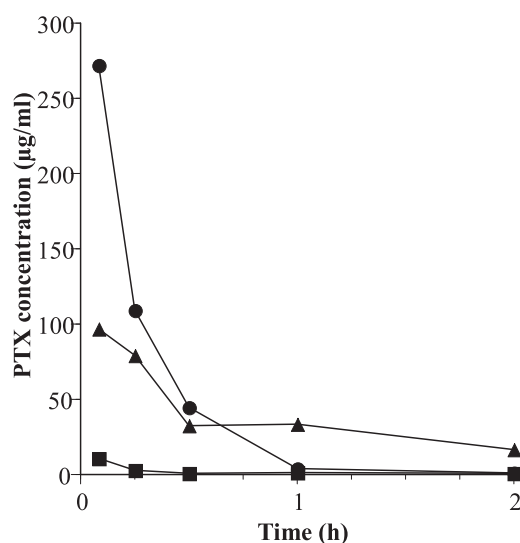


Fig. 19. Time profile of PTX concentration in the plasma after intravenous administration of free PTX (▲), PTX in oleoyl PVA (■) and PTX in cholesteroyl PVA (●). Each drug was administered to ddY mice at a dose of 25 mg/kg in PTX equivalents.

trans 型よりも著しく速いことを見出した。また培養細胞実験においても、PVA-cis-ADOX の方が trans 型より良好な殺細胞効果を示した。このことから、リソソームやエンドソーム内の低 pH 条件下で選択的に DOX を放出させることが、治療上有効であることが示唆された。

PTX は水に極めて難溶性であるため、臨床では溶解剤であるクレモホル EL が必要不可欠となっている。本研究では、PTX を PVA に結合し、高分子プロドラッグとすることで、その溶解性を大幅に改善することができた。また、本プロドラッグは、PTX の 2' 位の水酸基がコハク酸スパーサーを介して PVA とエステル結合したものである。したがって、PVA-SPTX は生理的条件下でスパーサーのエステル結合が加水分解を受けて徐々に PTX を放出した。Sarcoma180 担癌マウスに対して PVA-SPTX の制癌効果を調べたところ、コントロールと比べて有意に癌の増殖を抑制した。この結果から、PVA-SPTX は EPR 効果によって腫瘍組織に集積し、PTX を徐々に放出することで制癌効果を発揮することが示唆された。

抗癌剤をゲスト分子とした高分子治療剤のもうひとつの手法は、高分子ナノ粒子担体を用いる方法である。本研究では、3 種類の疎水性基を導入した疎水化 PVA (疎水化ポリマー) を合成した。いずれの疎水化 PVA も、PTX を効率よく内包化することで、溶解性を大幅に改善することができた。体内動態では PTX を疎水化 PVA ナノ粒子に内包化することで投与直後の血中濃度を高く維持する傾向を示した。本研究で合成した疎水化 PVA は PTX の可溶化に極めて有効であり、高分子ナノ粒子担体として利用できる可能性が示された。

引用文献

- 1) L. W. Seymour. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **9**: 135-87 (1992).
- 2) F. Yuan, M. Dellian, D. Fukumura, M. Leunig, D. A. Berk, V. P. Torchilin, and R. K. Jain. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res* **55**: 3752-6 (1995).
- 3) H. Maeda and Y. Matsumura. Tumorotropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **6**: 193-210 (1989).
- 4) S. K. Mallapragada and S. McCarthy-Schroeder. Poly(vinyl alcohol) as a drug delivery carrier. *Handbook of Pharmaceutical controlled release technology* 31-46 (2000).
- 5) T. Yamaoka, Y. Tabata, and Y. Ikeda. Comparison of body distribution of poly(vinyl alcohol) with other water-soluble polymers after intravenous administration. *J Pharm Pharmacol* **47**: 479-86 (1995).
- 6) Y. Kaneo, S. Hashihama, A. Kakinoki, T. Tanaka, T. Nakano, and Y. Ikeda. Pharmacokinetics and biodisposition of poly(vinyl alcohol) in rats and mice. *Drug Metab Pharmacokinet* **20**: 435-42 (2005).
- 7) A. Kakinoki, Y. Kaneo, Y. Ikeda, T. Tanaka, and K. Fujita. Synthesis of poly(vinyl alcohol)-doxorubicin conjugates containing cis-aconityl acid-cleavable bond and its isomer dependent doxorubicin release. *Biol Pharm Bull* **31**: 103-10 (2008).
- 8) R. C. Young, R. F. Ozols, and C. E. Myers. The anthracycline antineoplastic drugs. *N Engl J Med* **305**: 139-53 (1981).
- 9) T. Dorr and D. Von Hoff. *Cancer Chemotherapy Handbook, 2nd ed.; Appleton and Lange: Norwalk* (1994).
- 10) D. A. Gewirtz. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* **57**: 727-41 (1999).
- 11) C. Myers, E. and B. Chabner, A. In *Cancer Chemotherapy-Principles and Practice*. 356-381 (1990).
- 12) R. Duncan, P. Kopeckova-Rejmanova, J. Strohalm, I. Hume, H. C. Cable, J. Pohl, J. B. Lloyd, and J. Kopecek. Anticancer agents coupled to N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers. I. Evaluation of daunomycin and puromycin conjugates in vitro. *Br J Cancer* **55**: 165-74 (1987).
- 13) R. Duncan, P. Kopeckova, J. Strohalm, I. C. Hume, J. B. Lloyd, and J. Kopecek. Anticancer agents coupled to N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers. II. Evaluation of daunomycin conjugates in vivo against L1210 leukaemia. *Br J Cancer* **57**: 147-56 (1988).
- 14) R. Duncan. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2**: 347-60 (2003).
- 15) W. C. Shen and H. J. Ryser. cis-Aconityl spacer between daunomycin and macromolecular carriers:

- a model of pH-sensitive linkage releasing drug from a lysosomotropic conjugate. *Biochem Biophys Res Commun* **102**: 1048-54 (1981).
- 16) F. Kratz, U. Beyer, and M. T. Schutte. Drug-polymer conjugates containing acid-cleavable bonds. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **16**: 245-88 (1999).
 - 17) E. Diener, U. E. Diner, A. Sinha, S. Xie, and R. Vergidis. Specific immunosuppression by immunotoxins containing daunomycin. *Science* **231**: 148-50 (1986).
 - 18) H. M. Yang and R. A. Reisfeld. Doxorubicin conjugated with a monoclonal antibody directed to a human melanoma-associated proteoglycan suppresses the growth of established tumor xenografts in nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 1189-93 (1988).
 - 19) J. Remenyi, B. Balazs, S. Toth, A. Falus, G. Toth, and F. Hudecz. Isomer-dependent daunomycin release and in vitro antitumor effect of cis-aconityl-daunomycin. *Biochem Biophys Res Commun* **303**: 556-61 (2003).
 - 20) A. Di Marco, M. Gaetani, and B. Scarpinato. Adriamycin (NSC-123,127): a new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemother Rep* **53**: 33-7 (1969).
 - 21) L. W. Seymour, K. Ulbrich, J. Strohalm, J. Kopecek, and R. Duncan. The pharmacokinetics of polymer-bound adriamycin. *Biochem Pharmacol* **39**: 1125-31 (1990).
 - 22) M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. McPhail. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* **93**: 2325-7 (1971).
 - 23) S. G. Arbuck, M. C. Christian, J. S. Fisherman, L. A. Cazenave, G. Sarosy, M. Suffness, J. Adams, R. Canetta, K. E. Cole, and M. A. Friedman. Clinical development of Taxol. *J Natl Cancer Inst Monogr* 11-24 (1993).
 - 24) M. A. Cahan, K. A. Walter, O. M. Colvin, and H. Brem. Cytotoxicity of taxol in vitro against human and rat malignant brain tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* **33**: 441-4 (1994).
 - 25) R. Foa, L. Norton, and A. D. Seidman. Taxol (paclitaxel): a novel anti-microtubule agent with remarkable anti-neoplastic activity. *Int J Clin Lab Res* **24**: 6-14 (1994).
 - 26) H. J. Long. Paclitaxel (Taxol): a novel anticancer chemotherapeutic drug. *Mayo Clin Proc* **69**: 341-5 (1994).
 - 27) P. H. Wiernik and A. I. Einzig. Taxol in malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst Monogr* 185-7 (1993).
 - 28) J. Lee, S. C. Lee, G. Acharya, C. J. Chang, and K. Park. Hydrotropic solubilization of paclitaxel: analysis of chemical structures for hydrotropic property. *Pharm Res* **20**: 1022-30 (2003).
 - 29) M. L. Fjallskog, L. Frii, and J. Bergh. Is Cremophor EL, solvent for paclitaxel, cytotoxic? *Lancet* **342**: 873 (1993).
 - 30) R. Panchagnula. Pharmaceutical aspects of paclitaxel. *Int J Pharm* **172**: 1-15 (1998).

- 31) B. R. Goldspiel. Pharmaceutical issues: preparation, administration, stability, and compatibility with other medications. *Ann Pharmacother* **28**: S23-6 (1994).
- 32) R. B. Greenwald, C. W. Gilbert, A. Pendri, C. D. Conover, J. Xia, and A. Martinez. Drug delivery systems: water soluble taxol 2'-poly(ethylene glycol) ester prodrugs-design and in vivo effectiveness. *J Med Chem* **39**: 424-31 (1996).
- 33) C. Li, D. Yu, T. Inoue, D. J. Yang, L. Milas, N. R. Hunter, E. E. Kim, and S. Wallace. Synthesis and evaluation of water-soluble polyethylene glycol-paclitaxel conjugate as a paclitaxel prodrug. *Anticancer Drugs* **7**: 642-8 (1996).
- 34) C. Li, D. F. Yu, R. A. Newman, F. Cabral, L. C. Stephens, N. Hunter, L. Milas, and S. Wallace. Complete regression of well-established tumors using a novel water-soluble poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate. *Cancer Res* **58**: 2404-9 (1998).
- 35) C. Li, J. E. Price, L. Milas, N. R. Hunter, S. Ke, D. F. Yu, C. Charnsangavej, and S. Wallace. Antitumor activity of poly(L-glutamic acid)-paclitaxel on syngeneic and xenografted tumors. *Clin Cancer Res* **5**: 891-7 (1999).
- 36) S. Sugahara, M. Kajiki, H. Kuriyama, and T. R. Kobayashi. Paclitaxel delivery systems: the use of amino acid linkers in the conjugation of paclitaxel with carboxymethyl dextran to create prodrugs. *Biol Pharm Bull* **25**: 632-41 (2002).
- 37) F. Dosio, P. Brusa, P. Crosasso, S. Arpicco, and L. Cattel. Preparation, characterization and properties in vitro and in vivo of a paclitaxel-albumin conjugate. *Journal of Controlled Release* **47**: 293-304 (1997).
- 38) N. Baek, J. Lee, and K. Park. Aqueous N,N-diethylnicotinamide (DENA) solution as a medium for accelerated release study of paclitaxel. *J Biomater Sci Polym Ed* **15**: 527-42 (2004).
- 39) I. Ringeland S. B. Horwitz. Taxol is converted to 7-epitaxol, a biologically active isomer, in cell culture medium. *J Pharmacol Exp Ther* **242**: 692-8 (1987).
- 40) K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa, and T. Uno. A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J Pharmacobiodyn* **4**: 879-85 (1981).
- 41) H. Maeda. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul* **41**: 189-207 (2001).
- 42) H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* **65**: 271-84 (2000).
- 43) M. Yokoyama, M. Miyauchi, N. Yamada, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, and S. Inoue. Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *Cancer Res* **50**: 1693-700 (1990).
- 44) M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, H. Ekimoto, C. Shibasaki, and K. Kataoka. Toxicity and

antitumor activity against solid tumors of micelle-forming polymeric anticancer drug and its extremely long circulation in blood. *Cancer Res* **51**: 3229-36 (1991).

- 45) T. Konno, J. Watanabe, and K. Ishihara. Enhanced solubility of paclitaxel using water-soluble and biocompatible 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers. *J Biomed Mater Res A* **65**: 209-14 (2003).