

氏名	すぎのした よしき 杉之下 与志樹
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	論医博第1778号
学位授与の日付	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Liver targeting of IFN- $\beta$ with a liver-affinity polysaccharide based on metal coordination in mice (金属配位結合と肝親和性を有する多糖を利用したマウスにおける IFN- $\beta$ の肝へのターゲティング)
論文調査委員	(主査) 教授 乾 賢一 教授 山岡 義生 教授 千葉 勉

### 論文内容の要旨

[緒言] IFN の肝へのターゲティングは、ウイルス性肝炎の治療において治療効果を高めるばかりではなく全身性の副作用を軽減する可能性がある。既に、肝に高い集積性をもつ水溶性高分子プルランと IFN の化学共有結合を介した複合体が作製され、これを用いた IFN の肝へのターゲティングが報告されている。しかし、この化学共有結合を介した IFN-プルラン複合体は、多段階の化学反応が必要であることや、最終的に IFN の大部分が生物活性を失うことなど欠点が多い。そこで、蛋白質の生理活性を良く保持する可能性のある金属配位結合を利用して IFN-プルラン複合体を作製し、マウスを使った動物実験でその複合体の生体内の作用を検討した。

[方法] Recombinant murine IFN- $\beta$  水溶液に Diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) 残基を持つプルラン誘導体(プルラン-DTPA 誘導体)水溶液を亜鉛 ( $Zn^{2+}$ ) 存在下で混合することで金属配位結合による IFN-プルラン複合体を作製した。次に IFN- $\beta$ 、プルラン-DTPA 誘導体中に含まれる DTPA 残基および  $Zn^{2+}$  の様々な混合比で作製した IFN-プルラン複合体を BALB/c マウス (メス, 6 週齢) に静脈内投与し、一定時間後の肝・肺・脾の IFN による 2', 5'-oligoadenylate synthetase (2-5AS) 誘導を Western Blotting 法で評価した。この 2-5AS 誘導の結果から IFN-プルラン誘導体作製時における IFN/DTPA 残基 (プルラン-DTPA 誘導体) /  $Zn^{2+}$  の至適混合比を決定した。更に、この至適混合比で作製した IFN-プルラン複合体による 2-5AS 誘導を、単体の IFN 投与の場合と比較した。

[結果] 亜鉛 ( $Zn^{2+}$ ) 存在下で IFN- $\beta$  水溶液にプルラン-DTPA 誘導体水溶液を混合する場合に IFN-プルラン複合体が生成することは、高速液体クロマトグラフィーにおいて蛍光で検出される IFN- $\beta$  の retention time が短縮する現象から確認された。この IFN-プルラン複合体は、IFN 単体と比べると投与24時間後のマウス肝における 2-5AS 誘導を有意に増強した。その増強効果は、IFN/DTPA 残基 (プルラン-DTPA 誘導体) /  $Zn^{2+}$  の混合比が 1 : 500 : 5 である時に最も強く現れた。この IFN-プルラン複合体 2-5AS 誘導の増強効果は肝特異的で、肺および脾においては認められなかった。また、この肝における 2-5AS 誘導の増強効果は、IFN-プルラン複合体の投与後 2 日間にわたって認められた。

[考察] IFN-プルラン複合体は、IFN 単体と比較すると肝における 2-5AS 誘導を有意にかつ特異的に増強した。既に、化学共有結合を介した IFN-プルラン複合体によって IFN が肝に集積することが証明されていることから、本実験の結果は金属配位結合による IFN-プルラン複合体によって IFN の肝へのターゲティングが実現されたものと考えられる。近年、IFN の血中半減期を延長する IFN-ポリエチレングリコール複合体が用いられているが、この複合体は肝特異的な集積性を有さない。肝に集積性を有する IFN-プルラン複合体は、新しい肝炎治療法として有望と考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

ウイルス性肝炎の治療において、IFN の肝へのターゲティングは治療効果を高めるだけでなく全身性の副作用を軽減する可能性がある。既に肝集積性水溶性高分子プルランと IFN の化学共有結合による IFN-プルラン複合体が報告されているが、この複合体は化学反応が複雑であることや、反応過程で大部分の IFN の生物活性が失われることなどの欠点がある。

そこで申請者らは、蛋白質の生物活性を良く保持する可能性のある金属配位結合を用いた IFN-プルラン複合体を作製し、この複合体の生体内での作用を検討した。

申請者らは、最初に Recombinant murine IFN- $\beta$  水溶液に Diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) 残基を有するプルラン誘導体水溶液を亜鉛存在下で混合するだけで複合体が生成することを、高速液体クロマトグラフィーを用いて確認した。次に、マウスを用いた動物実験で IFN による 2',5'-oligoadenylate synthetase (2-5AS) 誘導を指標として、この複合体の肝・肺・脾における作用を観察した。その結果、IFN 単体と比較して、作製時の IFN/DTPA 残基/亜鉛の混合比が 1 : 500 : 5 である複合体の場合に肝での 2-5AS 誘導が最も強いこと、更に、この 2-5AS 誘導の増強効果は肝特異的であることと投与後 2 日間持続することを明らかにした。

以上の研究は、難治性ウイルス性肝炎の新治療法開発に貢献し、肝臓病治療学の進展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成14年3月4日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。