

物理化学的特性の修飾に基づくタンパク質医薬品
の体内動態制御に関する研究

藤 田 卓 也

目次

総論の部	1
緒言	1
第 I 章 多糖類の物理化学的性質と体内動態の関連	2
I—1 Dextran 誘導体の合成と物理化学的特性	2
1— a Dextran 誘導体およびその放射標識体の合成	3
1— b Dextran 誘導体の物理化学的特性	3
I—2 全身投与時の dextran 誘導体の体内動態特性	4
2— a 血中濃度および体内分布	4
2— b 臓器分布	6
2— c 薬動学的解析	6
I—3 考察	10
第 II 章 物理化学的性質に基づくタンパク質の体内動態特性の整理	14
II—1 モデルタンパク質の選択とその物理化学的性質	15
1— a 放射標識体の合成	15
1— b 各種モデルタンパク質の物理化学的性質	15
II—2 タンパク質の体内動態に及ぼす分子量の影響	15
2— a 血中動態および体内分布	15
2— b 薬動学的解析	17
II—3 体内動態に及ぼす電荷導入の影響	19
3— a 電荷導入タンパク質の合成	19
3— b 体内動態に及ぼす正電荷導入の影響	21
3— c 体内動態に及ぼす負電荷導入の影響	22
3— d 薬動学的解析	22
3— e [^{111}In]sucBSA および [^{111}In]cBSA の肝構成細胞への分布	24
3— f [^{111}In]sucBSA の肝取り込みにおける BSA および dextran 誘導体との同時投与の影響	24
II—4 化学修飾の組み合わせによるタンパク質の体内動態制御	26
4— a 複合化学修飾アルブミン誘導体の合成とその物理化学的性質	27
4— b 血中動態と肝移行特性	28
4— c 薬動学的解析	29

II-5	考 察	30
第 III 章 高分子修飾大豆トリプシンインヒビターの合成と体内動態および薬理効果の改善		
III-1	STI-dextran conjugates の合成とその物理化学的性質	34
1-a	合成法の検討	35
1-b	STI-D の物理化学的性質	35
III-2	STI-D の体内動態特性の検討	41
2-a	Trypsin 阻害活性を指標とした血中動態および尿中排泄	42
2-b	放射活性を指標とした体内動態	42
2-c	薬動学的解析	43
III-3	STI-D の薬理効果の検討	44
3-a	Trypsin ショックモデルの作成	45
3-b	Trypsin ショックの治療効果の検討	45
3-c	急性膵炎モデルの作成	47
3-d	急性膵炎の治療効果の検討	47
III-4	考 察	48
第 IV 章 高分子修飾によるウリカーゼの体内動態制御と免疫学的特性の改善		
IV-1	UC-dextran conjugates の合成とその物理化学的・免疫学的特性	51
1-a	UC-D の合成	51
1-b	UC-D の免疫学的特性に関する検討	52
1-c	UC-D の安定性に関する検討	53
IV-2	ラット静脈内投与後の血中動態の検討	54
2-a	血中動態	54
2-b	薬動学的解析	55
IV-3	電荷の異なる dextran 誘導体—UC 結合体の体内動態に関する検討	56
3-a	Dextran 誘導体—UC 結合体の合成とその物理化学的性質	57
3-b	全身投与時の体内動態	57
3-c	薬動学的解析	60
IV-4	考 察	61

結 論	63
謝 辞	65
実験の部	
第 I 章 実験の部	66
第 II 章 実験の部	68
第 III 章 実験の部	71
第 IV 章 実験の部	74
引用文献	76

総論の部

緒言

近年の遺伝子工学の発展により、多種多様な生理活性ペプチド、タンパク質が発見され、すでに医薬品として臨床使用されているものも多い(1-7)。こうした生理活性タンパク質に代表される高分子薬物の体内動態は、いずれも高分子自身の物理化学的特性と生体側の解剖学的・生理学的要因のバランスにより規定されると考えられる(8,9)。しかしながら、現状では高分子薬物の全身投与後の体内分布動態に関する情報の蓄積も十分とは言い難く、製剤設計に適用される体系化された指針も得られていない。

著者は、物理化学的性質の異なる各種 dextran 誘導体やタンパク質誘導体をモデル高分子薬物として用い、高分子薬物の分子量や電荷等の物理化学的特性と体内動態の一般的な関係を薬動学の立場より整理した。さらに、得られた結果に基づいて、soybean trypsin inhibitor や uricase 等のモデルタンパク質医薬品を対象に dextran 誘導体を用いて化学修飾を施すことにより、これらモデルタンパク質の体内動態を精密に制御できることを示し、高分子修飾を利用したタンパク質医薬品の体内動態制御法のための合理的設計指針を構築した。

以下、これらの結果について四章にわたり論述する。

第 I 章 多糖類の物理化学的特性と体内動態の関連

近年の生命工学および合成化学の進歩に伴い、微量で強い治療効果を有するが、副作用も強くまた安定性等にも問題を抱える薬物が数多く登場してきた。こうした薬物としてペプチドホルモンやサイトカイン、オートコイドに代表される生体医薬、細胞毒作用を作用機序とし投与方法が難しい抗癌剤などが挙げられる。そこで、こうした薬物の適用に対し、多くの製剤素材に関する情報と技術を盛り込んだ新しい薬物投与形態、すなわち drug delivery system (DDS) の開発が活発に進められている (10, 11)。こうした DDS 開発の中でも、とりわけターゲティング (標的指向化) は薬物治療に関わる最も基本的かつ重要な概念として注目を集めている。薬物ターゲティングは、標的となる部位に何らかの親和性のある物質をキャリアー (運搬体) として用い、そのキャリアーの動きに薬物を乗せることにより達成される。薬物キャリアーとしては、微粒子性のもの (12-15)、分子性のもの (8, 16-22)、赤血球などの生物由来の素材 (23, 24) と大きく 3 つに分類されるが、その中でも高分子物質をキャリアーに利用するアプローチは、高分子のもつ様々な性状、機能を利用できることから注目を集めている。薬物キャリアーとして用いられている高分子物質として、タンパク質 (25-35)、多糖類 (17, 36-50)、合成高分子 (51-66) などが挙げられ、現在多様な薬物に対してその応用が試みられている。しかしながら、このような高分子薬物の設計指針に対する理論構築に関しては必ずしも十分とはいえず、高分子キャリアー自身の体内動態特性に関する系統的情報も得られていないのが現状である。

本章では、高分子キャリアーのモデルとして多糖類を選択し、高分子物質の体内動態特性とそれを規定すると考えられる物理化学的な特性との関係を薬動的な手法を用いてマウス静脈内投与実験による全身レベルで検討し、整理した結果を論述する (67)。

I-1 Dextran 誘導体の合成と物理化学的特性

高分子薬物の体内動態特性に及ぼす分子サイズや電荷等の物理化学的性質の影響を調べるために、分子量、電荷の異なる dextran の誘導体を合成した。Dextran は高い水溶性を有し、化学修飾に適用しやすい水酸基を多数持つことから従来より種々の薬物のキャリアーとして汎用されてきた (17)。また、薬理活性がほとんどなく、生体内で安定であり、さらに生体適合性にも優れていることから血漿代用剤としても用いられている (68)。本節では、dextran を高分子キャリアーのモデルとして選択し、電荷の異なる各種誘導体の合成法、およびその物理化学的性質を検討した。

I-a Dextran 誘導体およびその放射標識体の合成

Dextran は、体内動態に及ぼす分子量の影響を検討するため平均分子量約 10,000 の dextran (T-10) と約 70,000 の dextran (T-70) を用いた。また、dextran (T-70) に関しては、glucose 残基の水酸基を化学修飾することにより、負電荷あるいは正電荷を持つ dextran 誘導体を合成した。すなわち、塩基存在下 diethylaminoethyl chloride を反応させることにより正電荷を有する dextran 誘導体 diethylaminoethyl-dextran (DEAE-Dex) を、また、塩基存在下 monochloroacetic acid を反応させることにより弱い負電荷を有する dextran 誘導体 carboxymethyl-dextran (CM-Dex) をそれぞれ合成した (69, 70)。さらに強い負電荷を有する dextran 誘導体として市販の dextran sulfate を用いた。Fig. 1 にその化学構造を示した。

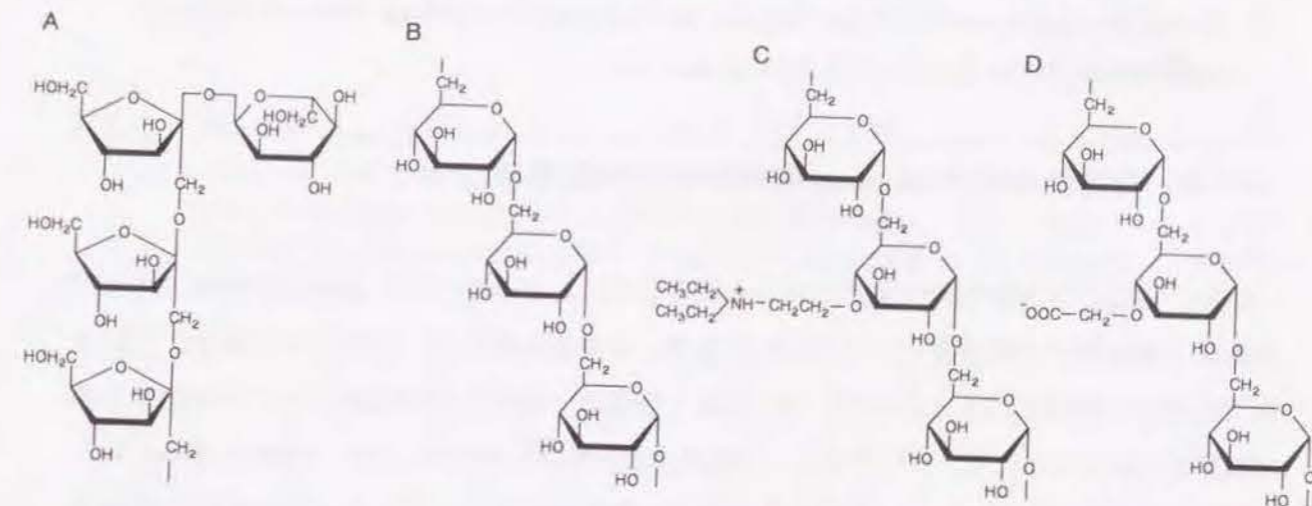


Fig. 1 Chemical structures of dextran derivatives and inulin (A) inulin, (B) dextran, (C) diethylaminoethyl-dextran (DEAE-Dex) and (D) carboxymethyl-dextran (CM-Dex).

I-b Dextran 誘導体の物理化学的特性

Dextran の放射標識は、Isbell らの方法に従い dextran の還元末端のアルデヒド基に ^{14}C を導入する増炭反応により行い、[Carboxy- ^{14}C]-dextran を得た (71)。この放射標識体を用いて非標識体と同様の方法で dextran 誘導体の放射標識体を合成した。また、 ^{14}C 標識 dextran sulfate は平均分子量が 8,000 の市販の [Carboxy- ^{14}C]-dextran sulfate を用いた。

Table 1 に dextran 誘導体の物理化学的性質を示した。また、後節で用いる inulin の特性も併せて示した。それぞれの dextran 誘導体は構造に応じて正、負あるいは中性と異なった電氣的性質を示すことが、イオン交換樹脂への吸着率あるいは中和滴定により確認された。

Table 1 Physicochemical characteristics of model polysaccharides

Compound ^a	Molecular Weight (original)	Electric ^b Charge	Type of Radiolabeling
Inulin	5,000	Neutral	¹⁴ C
Dextran sulfate	8,000	Negative	¹⁴ C
Dextran (T-10)	9,900	Neutral	¹⁴ C
Dextran (T-70)	64,400	Neutral	¹⁴ C
DEAE-Dex(T-70)	64,400	Positive	¹⁴ C
CM-Dex (T-70)	64,400	Negative	¹⁴ C

a DEAE-Dex: diethylaminoethyl dextran; CM-Dex: carboxymethyl dextran

b Electric charge of model polysaccharides was measured by the bach method using ion-exchange resins as described by Roos *et al.* (72).

I-2 全身投与時の dextran 誘導体の体内動態特性

高分子物質の体内動態特性を決定する要因としては、分子サイズ、油水分配係数、および電荷などの物理化学的性質と、生体の特定組織に特異的認識をうけるリガンド構造などの生物学的性質が挙げられる。したがって、高分子物質の一般的な体内動態とそれを規定する基本原理を把握することは、ターゲティング製剤の設計指針を構築するうえで重要と思われる。本節では放射標識した dextran 誘導体をマウスに静脈内投与した後の血中動態および臓器分布特性を検討し、薬動学的手法を用いてこれら dextran 誘導体の物理化学的性質と体内動態特性との関係を整理した。

2-a 血中動態および体内分布

放射標識 dextran 誘導体を投与量 100 mg/kg でマウスに投与した際の静脈内投与後 2 時間あるいは 24 時間までの血漿中濃度推移を Fig. 2、3 に示した。分子サイズ、電荷の差異により、血漿中濃度推移は異なった消失パターンを示した。平均分子量約 10,000 の dextran (T-10)、平均分子量約 8,000 の dextran sulfate は、いずれも投与後速やかに血漿中より消失した。その消失パターンは比較のため用いた平均分子量約 5,000 の inulin とほぼ同様であった。投与後 2 時間までに尿中に回収された放射活性は inulin で 88.6 %、dextran sulfate で 75.1 %、dextran (T-10) で 84.2 % と、投与された大部分が速やかに尿中に排泄されていることが示された。また、平均分子量が 70,000 で dextran の分子構造にカルボキシル基を導入

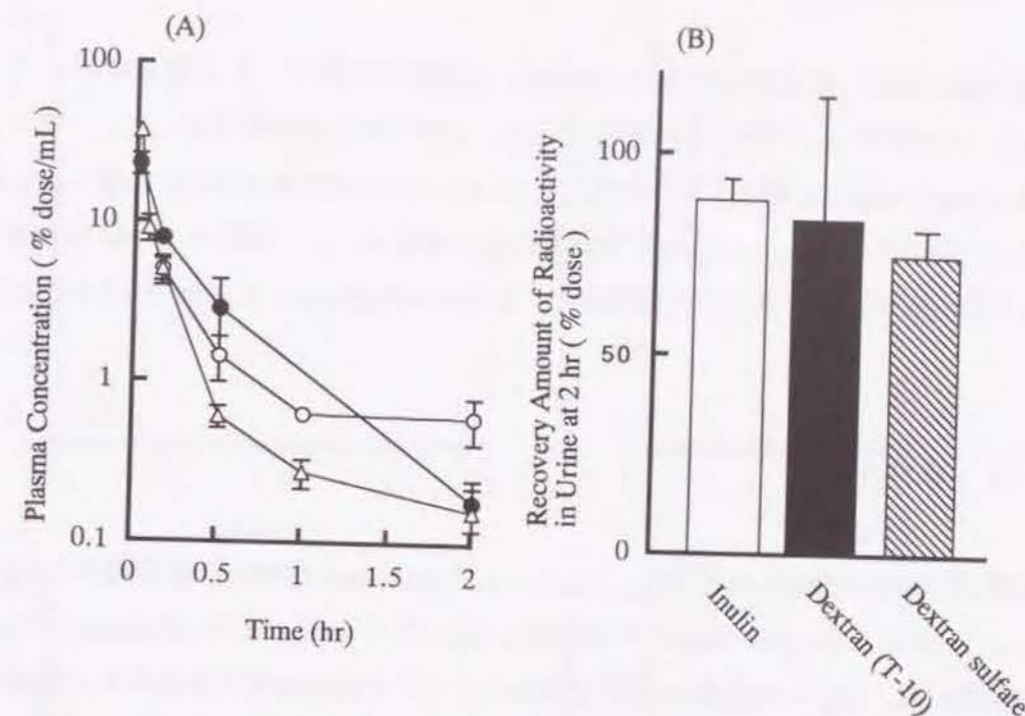


Fig. 2 Plasma concentration-time profiles (A) and amounts excreted in urine (B) of radioactivity following intravenous injection of ¹⁴C-labeled low-molecular weight polysaccharides into mice. Key: inulin (△); dextran (T-10) (○); dextran sulfate (●). Results are expressed as the mean±S.D. of three experiments.

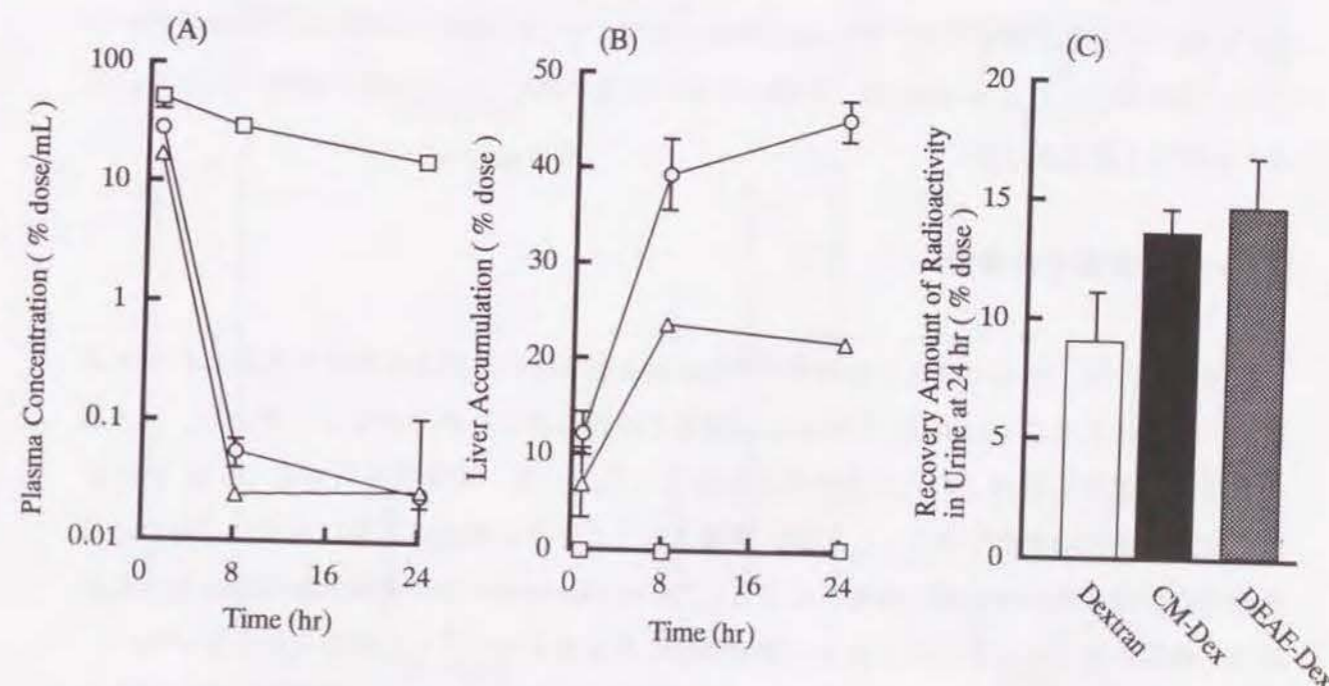


Fig. 3 Plasma concentration (A), liver accumulation (B) and amount excreted in urine of radioactivity (C) following intravenous injection of ¹⁴C-labeled dextran derivatives with average molecular weight of 70,000 into mice. Key: Dex (○); CM-Dex (□); DEAE-Dex (△). Results are expressed as the mean±S.D. of three experiments.

し、電気的には弱い負電荷を有する CM-Dex の血漿中濃度は、投与後 8 時間で 29.9 % of dose/mL、24 時間においても 15.8 % of dose/mL と高い血中滞留性を示した。一方、dextran に diethylaminoethyl 基を導入し正に荷電した DEAE-Dex は投与後速やかに血漿中から消失し、投与後 8 時間では 0.02 % of dose/mL と非常に低い値を示した。電気的に中性な dextran においてもその血漿中からの消失は比較的速く、投与後 8 時間において 0.05 % of dose/mL となった。

2-b 臓器分布

放射標識 dextran 誘導体の合成は、[Carboxy-¹⁴C]dextran を用いて非標識体と同様の方法で行った。また、dextran sulfate の標識体に関しては Sigma 社の [Carboxy-¹⁴C]dextran sulfate を用いた。Fig. 4 に各種 dextran 誘導体をマウスの尾静脈内に投与後の主要臓器中放射活性の経時変化を示した。図から明らかなように、分子サイズが 10,000 以下の dextran 誘導体、inulin では主要臓器中への放射活性の蓄積は見られなかった (Fig. 4A)。一方、平均分子量が 70,000 の dextran 誘導体においては電荷の付与による顕著な影響がみられ (Fig. 4B)、カルボン酸を導入し弱い負電荷を付与した CM-Dex においてはいずれの臓器中においても放射活性の蓄積はほとんど認められなかったのに対し、正電荷を付与した DEAE-Dex においては高い肝臓への蓄積が認められ、また他の臓器においても CM-Dex と比較し高い放射活性を示した。電気的に中性な dextran は、肝臓への高い蓄積が認められたが他の臓器への移行はほとんど認められなかった。

2-c 薬動学的解析

前項において、担癌マウスにおける [¹⁴C]dextran 誘導体の体内分布特性を検討した。その結果、分子サイズが 10,000 以下の dextran 誘導体は投与後速やかに血中より消失し、投与量の大部分が尿中に排泄されることが明らかとなった。一方、正電荷を有する DEAE-Dex は投与後速やかに血中より消失し、肝臓、脾臓をはじめとする網内系組織に高濃度に取り込まれることが示され、また弱い負電荷を付与した CM-Dex は高い血中滞留性を示し、徐々に肝臓等の臓器に取り込まれていくと共に腫瘍組織にも蓄積していくことが明らかとなった。

そこで本項においては、前項での結果を薬動学的に解析し、dextran 誘導体の体内挙動を定量的に評価することを試みた。静脈内投与された薬物は血流に乗って全身を循環するが、各組織への分布は血液中の薬物とその組織における血管内皮細胞を透過することにより起こると考えられる。従って、静脈内投与後の血中濃度推移が分布に大きく影響することが考え

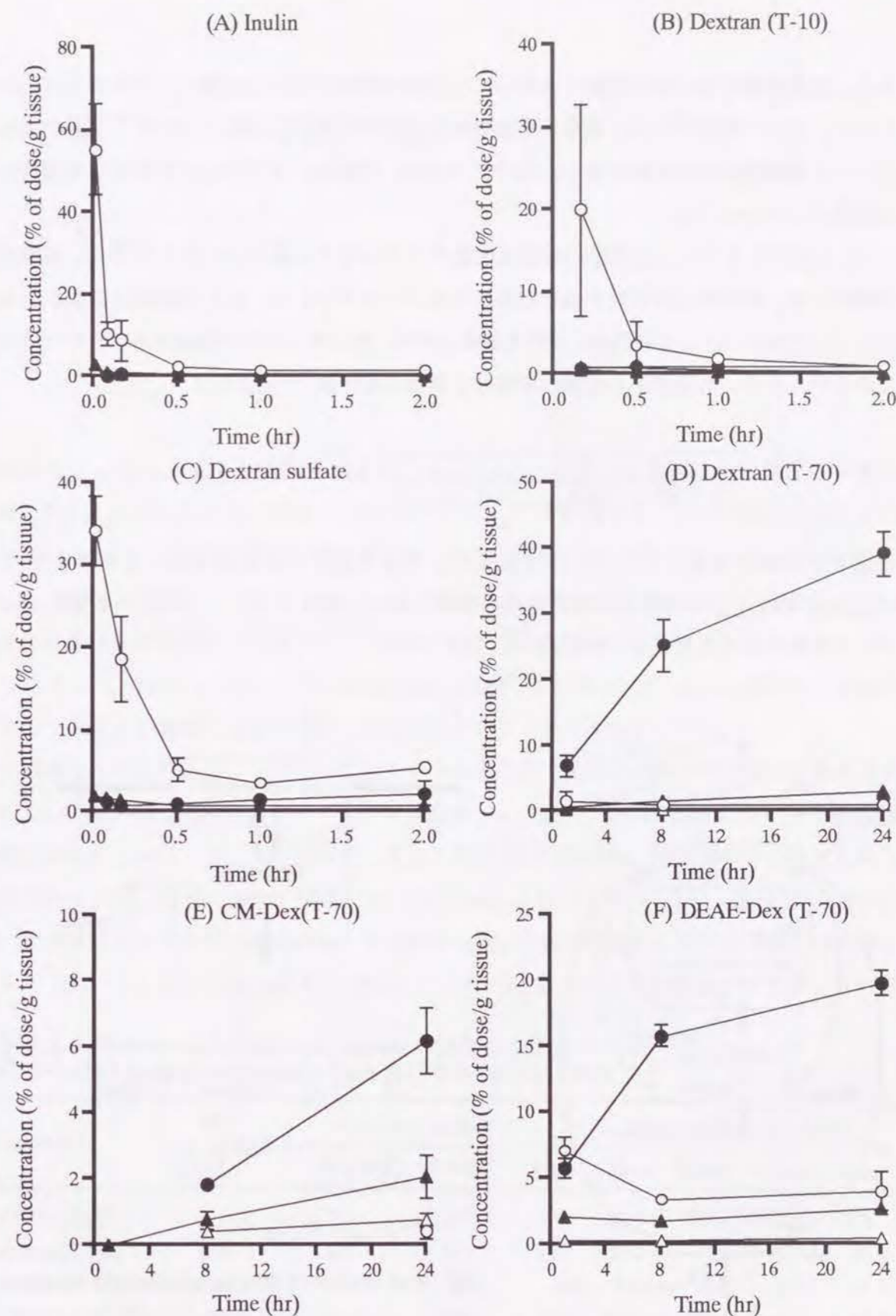


Fig. 4 Tissue distribution of radioactivity for ¹⁴C-labeled (A) inulin, (B) dextran (T-10), (C) dextran sulfate, (D) Dex, (E) CM-Dex and (F) DEAE-Dex after intravenous injection into mice. Key: kidney (○); spleen (▲); liver (●); heart (△). Results are expressed as the mean±S.D. of 3-4 mice.

られ、組織中濃度を単純に比較するのみでは薬物の組織移行性を定量的に評価することはできない。そこで本研究では、高分子薬物の移行特性を定量的に評価するため、以下の方法に従い、生理学的薬物速度論に基づいたモデルを用いて臓器クリアランスを求め、組織移行性の指標とした(46, 75)。

Fig. 5 に示すように、生理学的薬物速度論モデルの考えに基づいて考えた場合、各臓器への移行性は、総合的な移行性を表す臓器取り込みクリアランス、あるいは細胞による取り込みやリンパ移行のような各過程に関する速度定数等、種々のレベルで議論することができる。このモデルから、血管側から組織への高分子薬物の移行量 X_i^∞ は

$$X_i^\infty = \frac{1}{\frac{1}{Q} + \frac{1}{CL_1} + \frac{1}{(CL_{accum} + CL_{lymph})}} \times AUC_p \quad (1)$$

と表すことができる。ここで、 Q は血流を、 CL_1 は血管の内皮の透過クリアランスを、 CL_{accum} 、 CL_{lymph} はそれぞれ細胞内への取り込みクリアランス、リンパ系への移行クリアランスを表す。ここで式(1) 中において

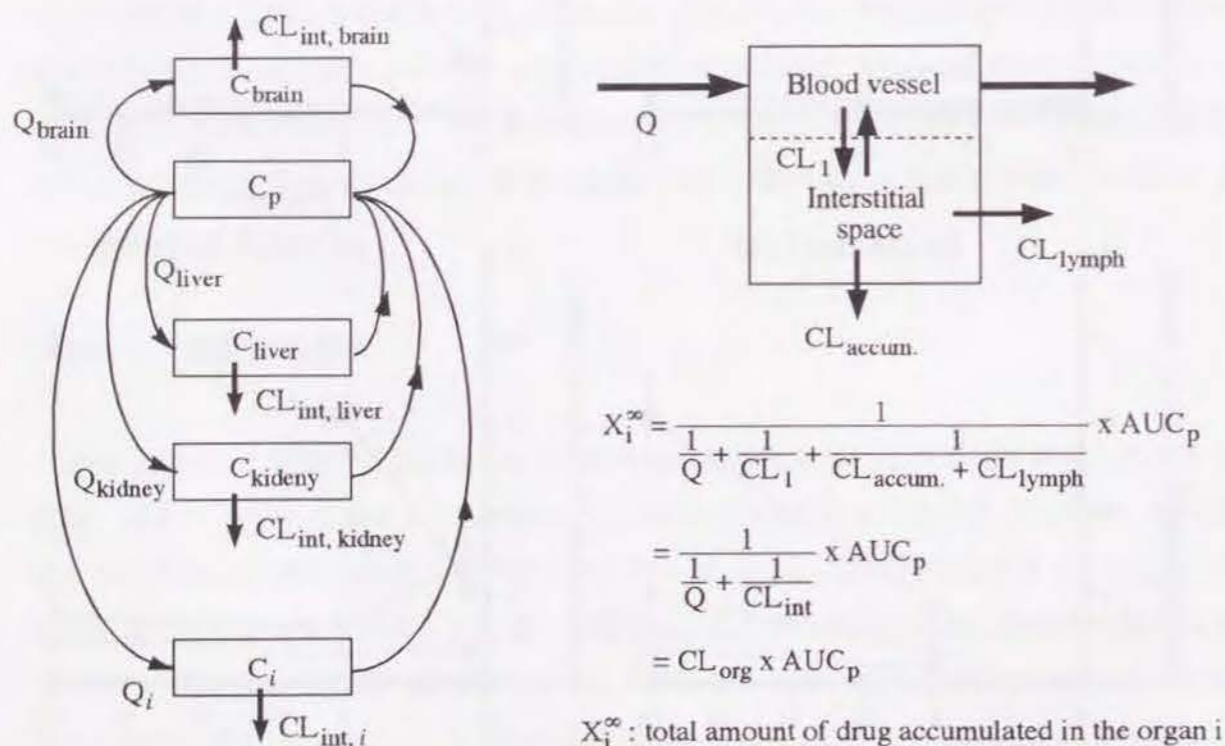


Fig. 5 Pharmacokinetic models and the corresponding equations applied for evaluating in vivo disposition of macromolecules after intravenous injection

$$\frac{1}{CL_{int}} = \frac{1}{CL_1} + \frac{1}{(CL_{accum} + CL_{lymph})} \quad (2)$$

$$\frac{1}{CL_{org,i}} = \frac{1}{Q} + \frac{1}{CL_{int}} \quad (3)$$

と整理することにより、

$$X_i^\infty = CL_{org,i} \times AUC_p \quad (4)$$

と表すことができ、高分子薬物の組織移行量 X_i^∞ と、血漿中薬物濃度—時間曲線下面積 AUC_p を求めることにより、臓器クリアランス $CL_{org,i}$ を計算することが可能となる。実際の計算は dextran 誘導体の臓器中蓄積量をその時点までの AUC で除することにより行い、 $CL_{org,i}$ を求めた(46)。AUC は、Fig. 2、3 で得られた血漿中濃度推移に対し 2-compartment model に基づき非線形最小二乗プログラム MULTI (73) を用いて当てはめ計算を行うことにより算出した。Table 2 には、マウス静脈内投与実験により得られた dextran 誘導体の全身クリアランスおよび腫瘍を含む各臓器への取り込みクリアランスをまとめた。

各臓器中への取り込みクリアランスはモデル高分子間で差異が認められ、低分子量の多糖類において高い臓器取り込みクリアランス値を示した。また、DEAE-Dex においても相対的に高い値を示した。こうした、各モデル高分子間における差異は、特に高分子の主たる消失臓器である肝臓と腎臓において顕著であった。Dextran (T-10) や dextran sulfate は、顕著に高い尿中排泄クリアランス値を示し、その値は inulin の尿中排泄クリアランス値にほぼ等しかった(74)。こうしたモデル高分子の全身クリアランスに占める尿中排泄クリアランスの割

Table 2 Pharmacokinetic parameters after intravenous injection of radiolabeled polysaccharides into S180-bearing mice

Compound	AUC (% of dose* hr/mL)	Clearance (μ L/hr)		Tissue uptake rate (μ L/hr)				
		CLtotal	CLurine	liver	spleen	kidney	muscle	tumor
Dextran (T-10)	6.6	15,200	12,800	191	26.6	210	65.4	236
Dextran (T-70)	146	685	257	190	20.5	7.7	2.5	23.9
CM-Dex (T-70)	1,010	99.1	66.1	9.0	3.0	0.6	1.1	15.5
DEAE-Dex (T-70)	51.1	1,960	1060	291	33.3	59.3	6.7	59.1
Dextran sulfate	5.4	18,500	10,900	419	140	1,000	45.1	n.d.
Inulin	3.5	28,850	26,770	168	60.1	700	34.6	n.d.

Results are expressed as the mean of 3-4 experiments.
n.d.: not determined.

合は80%以上であり、比較的分子量の小さい多糖類の血漿中からの著しく速い消失は、主として腎臓の糸球体濾過による尿中排泄クリアランスの大きさに依存していることが示唆された (Fig. 6A)。

糸球体濾過を受けにくいと思われる分子量約70,000の dextran 誘導体の場合、低分子量のモデル高分子と比べ比較的低い全身クリアランスの値を示したが、導入した電荷により全身クリアランスの値は大きく異なり、CM-Dex (T-70) は99.1 $\mu\text{L/hr}$ と非常に低い値を示したのに対し、DEAED-Dex (T-70) は1960 $\mu\text{L/hr}$ と約8倍高い値を示した (Fig. 6B)。

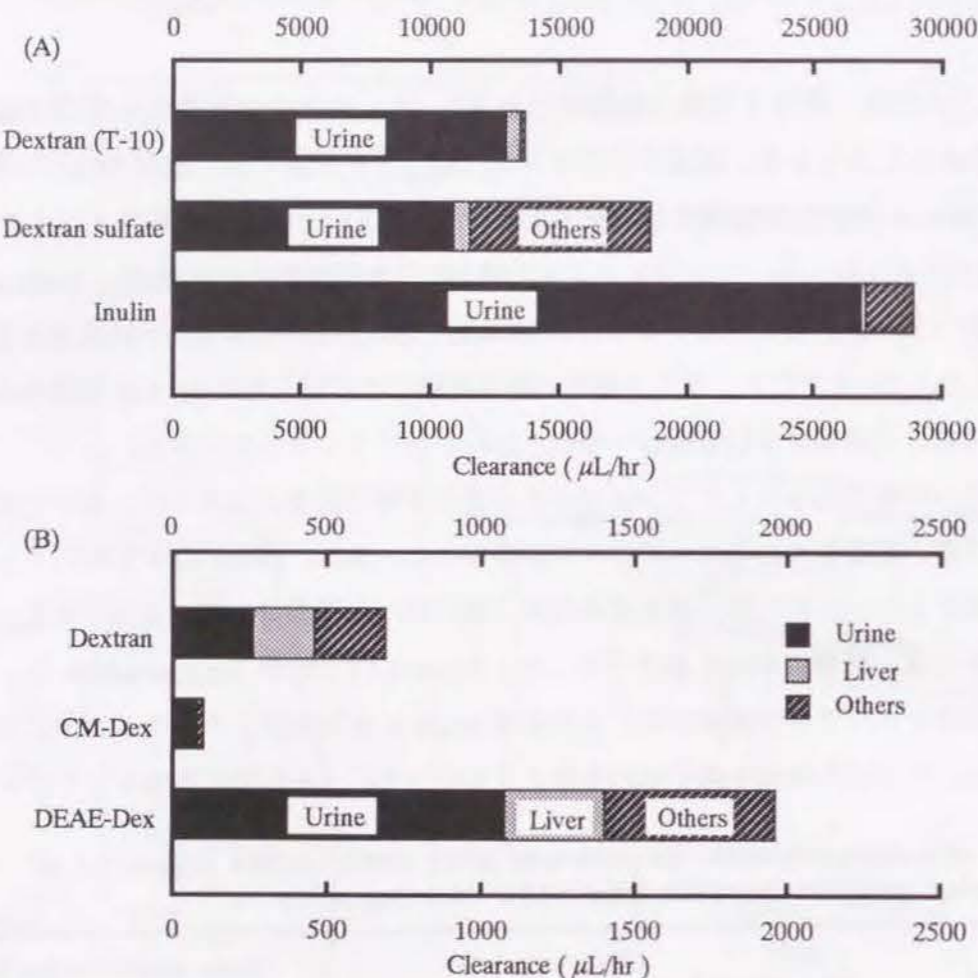


Fig. 6 Contribution of organ clearances to total-body clearance of radioactivity after intravenous administration of ^{14}C -labeled polysaccharides into mice

I-3 考察

本章では、高分子薬物のモデルとして物理化学的特性の異なる dextran 誘導体を合成し、その体内動態特性とそれを規定する物理化学的特性との関係を薬動的な手法によりマウス

静脈内投与実験を用いて検討した。

Dextran をはじめとする多糖類の体内動態特性は、分子サイズおよび電荷といった物理化学的性質に大きく影響を受けることが示され、とりわけ各臓器への移行過程のうち特に尿中排泄と肝臓への取り込みが、高分子の全身挙動を決定していることが示唆された。そこで本章で得られた結果に基づき、高分子の全身レベルでの体内動態を決定する主要過程である肝臓と腎臓における消失について、分子サイズや電気的性質など物理化学的性質がどのようにこれらに影響するかを Fig. 7 にまとめた。

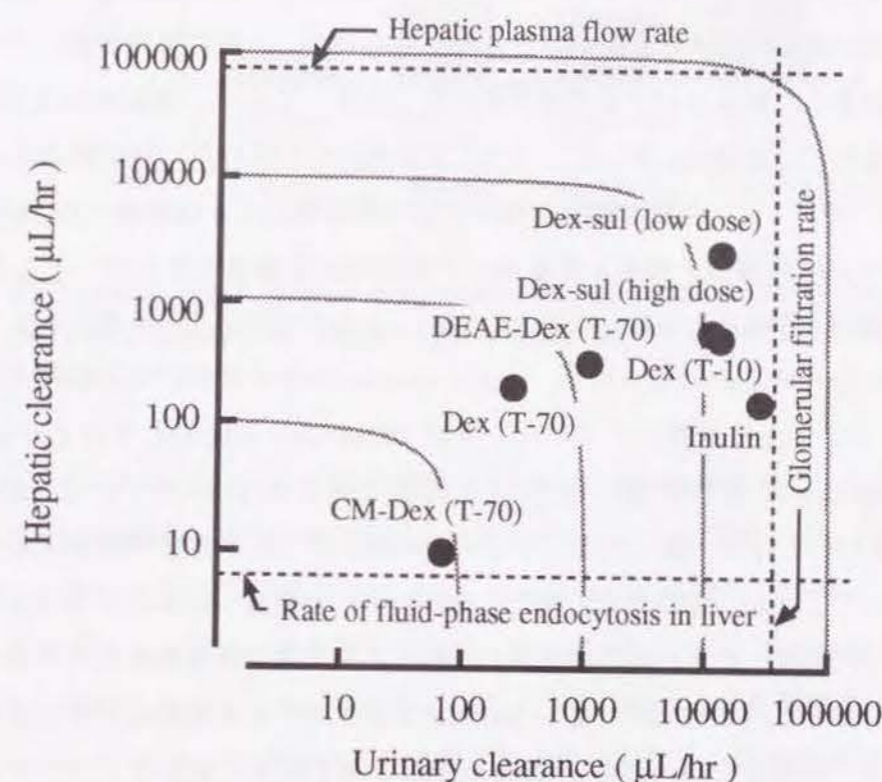


Fig. 7 Hepatic and urinary clearances of ^{14}C -labeled polysaccharides after intravenous injection in mice. Hepatic plasma flow rate (76), rate of fluid-phase endocytosis of liver (77), and glomerular filtration rate (74) were calculated assuming the weight of a mouse to be 25 g.

分子サイズの小さな inulin や dextran (T-10) などは尿中排泄が高分子の体内動態特性を大きく決定づけていることが示され、一方正電荷をもつ DEAE-Dex や強い負電荷をもつ dextran sulfate では肝臓への取り込みの寄与が大きいことが示された。これまでも生理学の分野において、高分子物質の糸球体濾過特性に関する検討が分子サイズの異なる dextran 誘導体を用いてヒト、ラットで詳細に検討されており、糸球体濾過膜が size barrier と charge barrier の2種類の障壁をもつことが明らかにされている (78-81)。本章においても、電気的

に中性な多糖類の尿中排泄クリアランスの差異により糸球体膜が size barrier として機能していること、また平均分子量約 70,000 の dextran 誘導体において著しい尿中排泄クリアランスの差異から charge barrier として機能していることが示され、高分子の物性の差異による腎臓での消失過程の差異をマウス全身投与実験でもある程度定量的に捉え得ることが明らかになった。

また、高分子の肝臓への移行特性に関しては、電荷の付与により顕著な影響が認められ、正電荷をもつ DEAE-Dex は静脈内投与後速やかに血中より消失し、その大部分が肝臓へ集積した。遊離肝細胞を用いた検討により、正電荷をもつ高分子は肝細胞表面との静電的な相互作用により細胞表面に吸着することが報告されている (82)。一般に細胞表面にはシアル酸が非還元末端に結合した糖タンパク質や糖脂質が多く分布しており、細胞表面は負に帯電していることが知られている (83)。従って、こうした静電的な相互作用は肝細胞のみに限定される現象ではないが、(1) 肝臓は類洞を構築する内皮細胞に大きな間隙 (約 100 nm) が存在し高分子が容易に肝細胞と接触し得る極めて特徴のある構造を有していること (84)、(2) 血流量が他の一般臓器と比較して大きい (76)、という理由により正電荷をもつ高分子は肝臓に高濃度に分布すると考えられる。一方、dextran にカルボキシル基を導入し弱い負電荷を付与した CM-Dex の肝移行クリアランスは DEAE-Dex と比較してはるかに低く、fluid-phase endocytosis により肝臓に取り込まれることが報告されている poly(vinylpyrrolidone) の値 (77) とほぼ一致したことから、CM-Dex はこれと同様の機構により緩徐に肝臓に取り込まれることが示唆された。また、他のいずれの臓器への移行クリアランスの値も小さく、こうした臓器への移行性の低さが CM-Dex の高い血中滞留性をもたらしたと考えられる。しかしながら、同じ負電荷をもつ dextran でも導入する官能基の差異により肝移行性は大きく異なり、硫酸基を導入した dextran sulfate の場合は高い肝移行クリアランス値を示した。肝臓の非実質細胞には、ポリアニオンの特異的な取り込みに関与する scavenger receptor の存在が知られている (85, 86)。この scavenger receptor の high-affinity ligand として acetylated low density lipoprotein、maleylated BSA、poly[I] などが報告されているが (86)、dextran sulfate に関しても同様の機構を介して肝臓に取り込まれると考えられる。scavenger receptor を介したポリアニオン高分子の *in vivo* における肝取り込みに関しては第 II 章で詳述する。

本研究では、各種 dextran 誘導体の腫瘍組織への移行性についても合わせて検討を行った (Fig. 8)。一般に腫瘍組織においては毛細血管透過性が亢進しており、またリンパ系も欠如していることが知られている (87)。したがって、高分子は静脈内投与後徐々に腫瘍部に蓄積すると考えられ、本検討においても検討したいずれの高分子においても腫瘍組織中への放射活性の蓄積が認められた。薬動学的解析の結果、特に分子サイズの小さな dextran (T-10) や

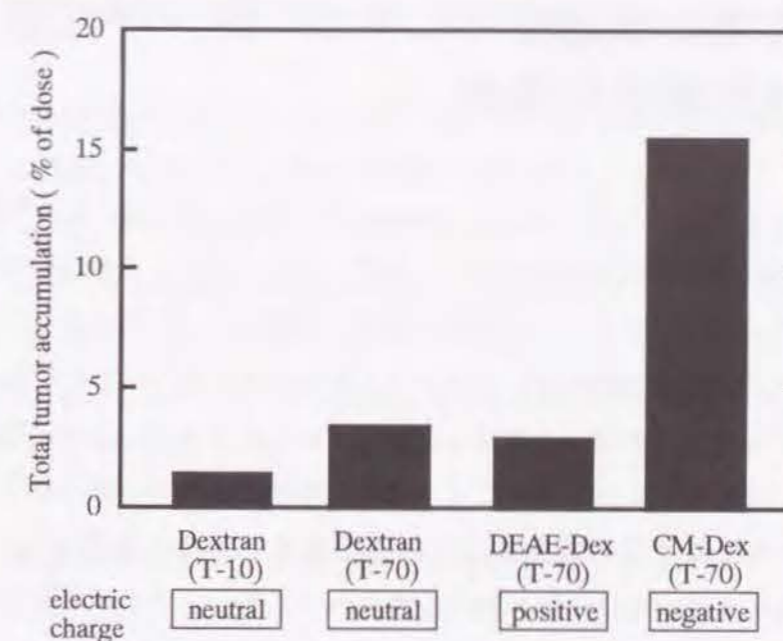


Fig. 8 Estimated total tumor accumulation of radioactivity for ^{14}C -labeled polysaccharides at infinite time after intravenous injection into S-180 bearing mice

正電荷を有する DEAE-Dex などでは比較的大きな tissue uptake rate を示したが、dextran 誘導体間での差異は肝臓への移行や尿中排泄と比較すると低いものであった。投与後無限時間までの腫瘍 1 g 中への高分子の移行量は tissue uptake rate x AUC で表わすことができる (88, 89)。Fig. 8 に示すように高い血中滞留性を示した CM-Dex は、15 % of dose 以上と非常に高い腫瘍部への集積を見積ることができる。このような結果は、分子量約 70 kDa で負に荷電した mitomycin C-dextran 結合体が、高濃度に腫瘍中に蓄積し、固形腫瘍に対して優れた抗腫瘍効果を示した Takakura らによる報告 (46) を裏付けるものである。

以上、分子サイズや電荷など物理化学的性質の異なる多糖類の静脈内投与後の体内分布特性を系統的に検討した結果、分子サイズの小さなものは尿中排泄クリアランスが、強い負電荷あるいは正電荷をもつものは肝取り込みクリアランスの寄与が大きいことが示され、また糸球体濾過速度、肝血流速度、肝臓の fluid-phase endocytosis 速度とのこれら高分子の pharmacokinetic parameter との関係を明らかにすることができた。本章における結果は、高分子物質の分子サイズや電荷を調節することにより肝臓や癌に対する標的指向化が可能であることを示すものであり、こうした情報は、高分子化修飾を利用したターゲティング製剤の開発を進める上で有用な基礎的知見を与えると考えられる。

第 II 章 物理化学的特性に基づくタンパク質の体内動態特性の整理

第 I 章では、マウス全身投与系を用いて dextran 誘導体をはじめとする多糖類の物理化学的特性と体内動態特性との関連を整理した。一方で、近年、サイトカインに代表される数多くの内因性生理活性ペプチド、タンパク質類が単離・精製され、医薬品としての数多く実用化されている。ところが、生理活性タンパク質は生体内のある特定の部位において必要なタイミングでのみ作用するものが多く、医薬品として用いられるためにはその体内動態の精密な制御が必要とされる。しかしながら、こうした生理活性ペプチドの体内動態特性に関しては、特定のペプチドに関する体内動態については非常に詳細に検討されているものの (90-98)、同じ評価系を用いて分子量の異なる数種のペプチド・タンパク質について定量的に検討した例はない。

そこで本章では、第 I 章と同様の実験系を用い、まず 8 種の分子量の異なるタンパク質をモデルとしてその体内挙動を検討した (67)。さらに、こうしたタンパク質分子に対して化学修飾の手法を用いてタンパク質分子上に直接電荷を導入することによる体内動態特性の制御、および種々の化学修飾を組み合わせ物理化学的特性を大きく改変することによる体内動態の制御についても検討し、タンパク質医薬品の物理化学的特性と体内動態特性との関連性に関する系統的な整理を試みた (99-101)。

II-1 モデルタンパク質の選択とその物理化学的性質

タンパク質の分子量と静脈内投与後の全身動態特性との関係を明らかにするため、本章では分子量の異なるモデルタンパク質に対して第 I 章と同様、マウス全身投与実験を行った。モデルタンパク質として [¹²⁵I]eel calcitonin (eCT; Mw 3,400) および neocarzinostatin (NCS; Mw 12,000)、interferon-β (IFN-β; Mw 20,000)、soybean trypsin inhibitor (STI; Mw 20,100)、superoxide dismutase (SOD; Mw 32,000)、bovine serum albumin (BSA; Mw 67,000)、uricase (UC; Mw 128,000)、immunoglobulin G (IgG; Mw 150,000) の 8 種を用いた。また、モデルタンパク質のうち、SOD、BSA、UC に対しては化学修飾によりそれぞれアニオン化 (99)、カチオン化 (101) を施し、タンパク質の体内動態に及ぼす電荷の影響に関しても検討を加えた。さらに、BSA に関してはカチオン化修飾に対して、さらにポリエチレングリコール (PEG) 修飾を組み合わせることにより肝指向性タンパク質の肝臓への移行性制御の可能性についても検討した (100)。

1-a 放射標識体の合成

In vivo マウス全身投与実験において、静脈内投与後のタンパク質の代謝・分解の影響を最小限に抑制し、組織からの efflux 過程を無視し得る標識方法としてタンパク質の標識は ¹¹¹In により行った。¹¹¹In 標識タンパク質は、組織内に取り込まれた後タンパク質自身は分解されるものの、¹¹¹In は組織内に蓄積されることが既に報告されている (104, 105)。タンパク質の ¹¹¹In 標識は、Hnatowich らの方法に従い、二官能性キレート剤である diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) anhydride をタンパク質に結合させた後、¹¹¹In を結合させることにより行った (106)。

1-b 各種モデルタンパク質の物理化学的性質

タンパク質の体内動態に及ぼす分子量の影響の検討には、分子量約 3,400 から 150,000 の eCT から IgG までの 8 種を用いた。Table 3 に今回用いたモデルタンパク質の分子量および生理的条件下における荷電状態を示した。

Table 3 Physicochemical characteristics of model proteins

Compound ^a	Molecular weight	Electric charge
eCT	3,364	positive
NCS	12,000	negative
STI	20,100	negative
rhIFNβ	20,000	negative
SOD	32,000	negative
BSA	67,000	negative
UC	128,000	negative
IgG	150,000	negative

^a eCT, eel calcitonin; NCS, neocarzinostatin; STI, soybean trypsin inhibitor; rhIFNβ, recombinant human interferon beta; SOD, superoxide dismutase; BSA, bovine serum albumin; UC, uricase; IgG, immunoglobulin G

II-2 タンパク質の体内動態に及ぼす分子量の影響

2-a 血中動態および体内分布

マウス静脈内投与後、2 もしくは 24 時間における ¹¹¹In 標識モデルタンパク質の血漿中濃

度推移を Figs. 9A、10A に示した。ほぼ分子サイズの増加に伴い血中滞留性の上昇が認められ、BSA 以上の分子量を有するモデルタンパク質は高い血中滞留性を示した。Figs. 9A、10A で得られた血漿中濃度—時間曲線を 2-exponential curve にあてはめ、第 1 章と同様の計算手法により AUC、 CL_{total} を算出し Table 4 に示した。分子量が約 30,000 以下のタンパク質においては非常に高い CL_{total} 値を示したのに対し、それ以上の分子量を有するタンパク質においては低い CL_{total} 値を示し、特に代表的な血漿タンパク質である BSA や IgG においては非常に低い CL_{total} 値、即ち非常に大きな AUC 値を示し、これらタンパク質が血液中を安定に循環していることが示唆された。

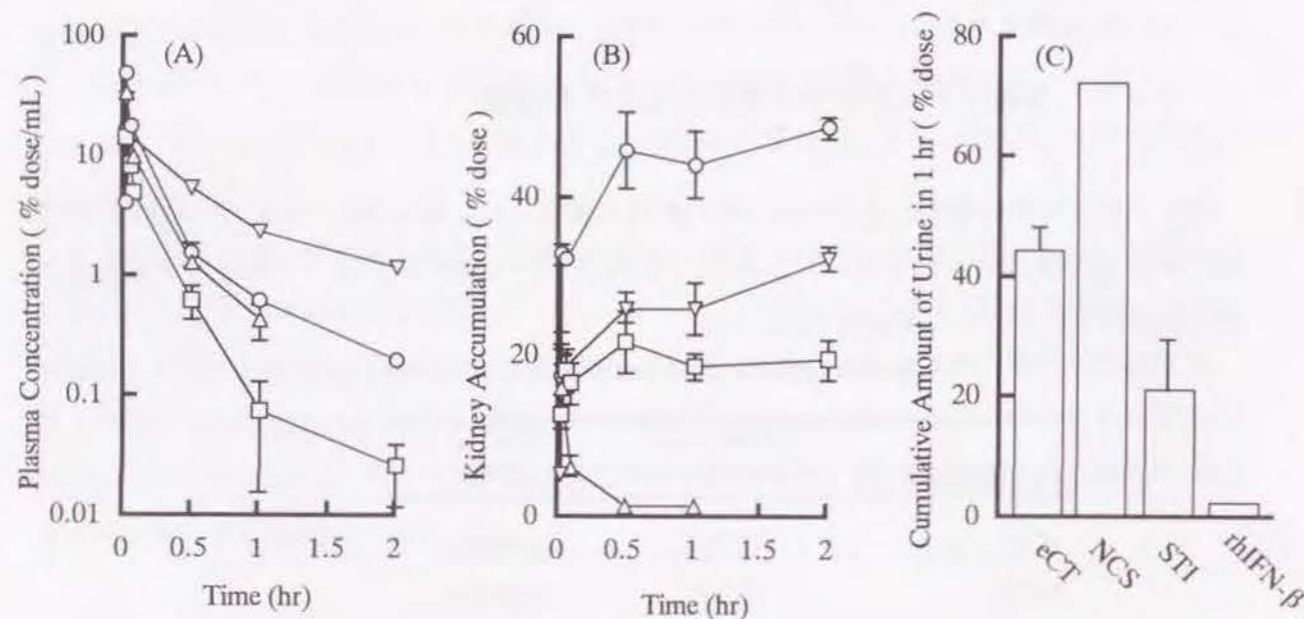


Fig. 9 Plasma concentration (A), kidney accumulation (B) and amount excreted in urine (C) of radioactivity after intravenous injection of ^{111}In -labeled low-molecular weight proteins into mice. Key: eCT (□); NCS (△); STI (○); IFN- β (▽). Results are expressed as the mean \pm S.D. of three mice.

Fig. 9B、10B には 8 種のタンパク質の静脈内投与後の腎臓への放射活性の蓄積の時間推移を示した。腎臓への取り込みは分子量が 20,100 の ^{111}In STI および 32,000 の ^{111}In SOD が高い値を示し、投与後 1 時間においてそれぞれ約 45%、51% の放射活性の蓄積が認められた。しかしながら、分子量が 12,000 の ^{111}In NCS においては腎臓への放射活性の蓄積がほとんど認められなかった。また、BSA より分子量の大きなタンパク質においても腎臓への蓄積はほとんど認められず投与後 24 時間においても約 10% 以下であった。

一方、Fig. 9C に示すように、尿中へ回収された放射活性は逆に ^{111}In NCS が最も高く、約 72% が投与後 1 時間までに尿中に排泄された。 ^{111}In IFN- β を除く、分子量が約 32,000

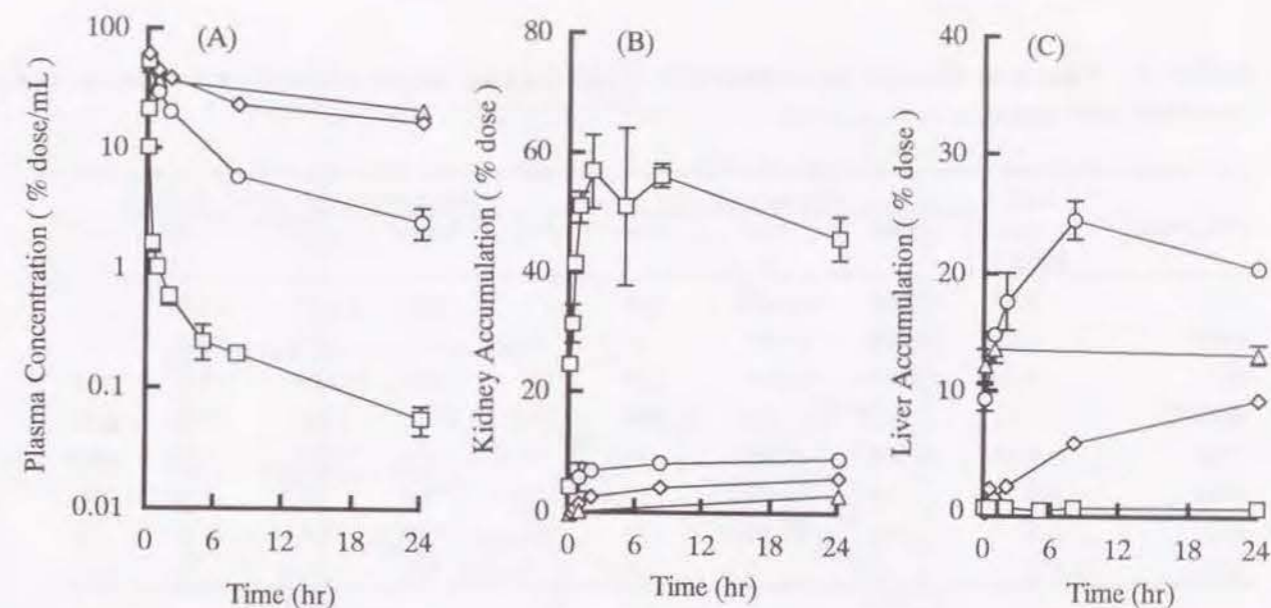


Fig. 10 Plasma concentration (A), kidney accumulation (B) and liver accumulation (C) of radioactivity after intravenous injection of ^{111}In -labeled relatively high-molecular weight proteins into mice. Key: SOD (□); BSA (◇); UC (○); IgG (△). Results are expressed as the mean \pm S.D. of three mice.

の 4 種のタンパク質、すなわち ^{111}In eCT、 ^{111}In NCS、 ^{111}In STI、 ^{111}In SOD においては、1 時間までの腎蓄積量と尿中排泄量の総和がほぼ 70% と一定の値となることから、腎臓における糸球体濾過後の尿細管での再吸収特性にこれら 4 種のタンパク質間で差異が存在することが推察された。

2-b 薬動学的解析

マウス静脈内投与後の各組織中の放射活性より分子量の異なる 8 種のモデルタンパク質の組織への移行量および組織中濃度を求めた。第 1 章・第 2 節と同様の方法に従って、血漿中濃度で補正したモデルタンパク質の主な組織への移行クリアランスを算出し組織移行性の指標とした。

Table 4 には AUC および全身クリアランス、尿中排泄クリアランス、肝取り込みクリアランスと肝臓、脾臓、腎臓、筋肉、腫瘍の組織 1 g あたりのクリアランス (tissue uptake rate index) を計算した結果をまとめた。表から明らかなように、尿中排泄クリアランス値および腎臓における tissue uptake rate index 値は、分子量が 32,000 以下の 5 種類のモデルタンパク質において分子量が 67,000 以上のモデルタンパク質と比較して有意に高い値を示した。また、 ^{111}In eCT、 ^{111}In NCS、 ^{111}In STI、 ^{111}In SOD の 4 種のモデルタンパク質において

Table 4 Pharmacokinetic parameters of ¹¹¹In-labeled model proteins after intravenous injection into mice

Compound	AUC (% dose · hr/mL)	Clearance (μL/hr)			Tissue uptake rate index (μL/hr/g)				
		total	urine	liver	liver	spleen	kidney	muscle	tumor
eCT	1.92	52,000	16,400	318	171	78.6	22,300	69.9	n.d.
NCS	3.82	26,200	20,000	40.7	27.0	19.7	1,050	26.6	132
STI	6.16	16,200	4,890	319	377	69.0	36,500	60.6	n.d.
rhIFNβ	12.3	8,140	428	2,850	2,080	671	8,090	43.5	69.4
SOD	9.49	10,500	1,230	34.8	30.3	18.6	17,200	7.23	29.8
BSA	1,340	74.6	7.1	15.8	15.0	7.4	27.8	1.40	18.1
UC	215	465	69.5	192	200	76.9	269	8.47	n.d.
IgG	1,620	61.6	2.4	20.5	17.4	5.4	4.6	1.2	12.8

n.d.: not determined

は全身クリアランスに対する尿中排泄クリアランスおよび腎取り込みクリアランスの割合（寄与率）は、他の臓器の寄与率と比較して極めて高いものであった。また、血漿タンパク質である [¹¹¹In]BSA や [¹¹¹In]IgG は、いずれの臓器におけるクリアランスおよび尿中排泄クリアランスも低い値を示し、各臓器中にほとんど取り込まれることもなく血中を安定に循環していることが示された (Fig. 11)。

また、[¹¹¹In]IFN-β は全身クリアランスに対する尿中排泄+腎取り込みクリアランスの寄与率と肝取り込みの寄与率がほぼ等しく、肝臓へも何らかの要因により高い移行性を示すことが明らかとなった。また、[¹¹¹In]UC は分子量が 128,000 であるにもかかわらず、[¹¹¹In]BSA や [¹¹¹In]IgG よりも高い全身クリアランス値を示し、尿中排泄クリアランスや腎臓における tissue uptake rate index も若干高い値を示した。UC は微生物由来の外因性タンパク質であることから肝臓への取り込みクリアランスが大きく、また分子量 32,000 の subunit からなる homotetramer 構造を有していることから、血液中ですぐに tetramer が分解し尿中に排泄されるものと考えられる。

一方、[¹¹¹In]NCS および [¹¹¹In]IFN-β、[¹¹¹In]SOD、[¹¹¹In]BSA、[¹¹¹In]IgG の 5 種のモデルタンパク質においては Sarcoma-180 腫瘍マウスを用いて腫瘍移行性についても検討した (Table 4)。その結果、腫瘍における tissue uptake rate index には分子量依存性が認められ、分子量の増大に伴いその値は減少した。しかしながら、第 I 章においても検討したように投与後無限時間までの腫瘍 1 g 中へのモデルタンパク質の移行量を tissue uptake rate index x AUC で見積った場合、AUC 値の小さな [¹¹¹In]NCS、[¹¹¹In]IFN-β、[¹¹¹In]SOD においてはその移行量はそれぞれ 0.5、0.9、0.3 % of dose であったのに対し、血中滞留性の高い [¹¹¹In]BSA、[¹¹¹In]IgG においてはそれぞれ 24、20 % of dose と非常に高い腫瘍部への集積性が見積られた。

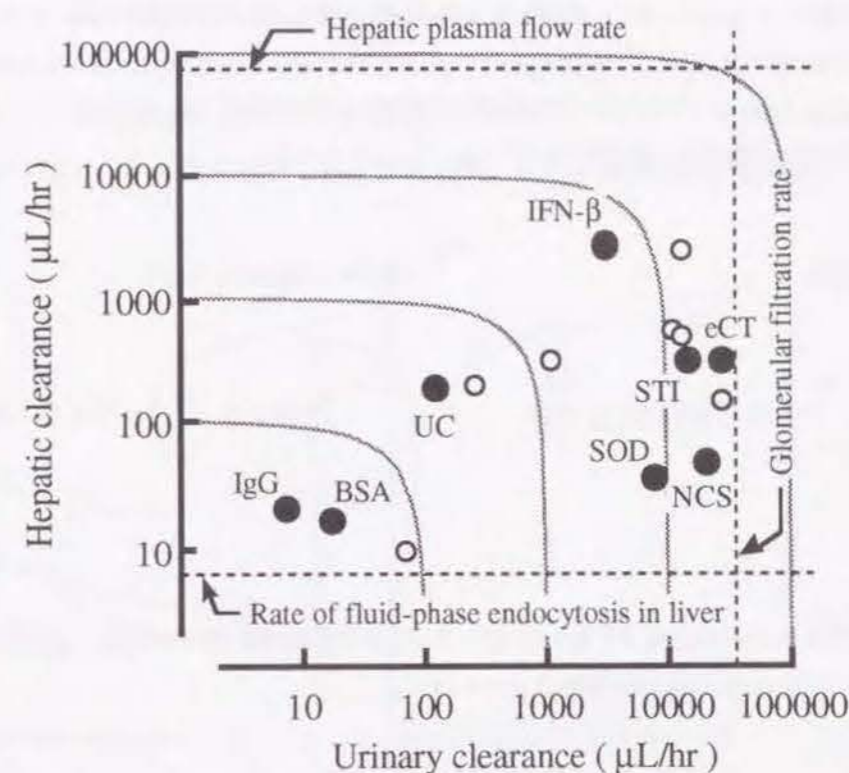


Fig. 11 Hepatic and urinary clearances of ¹¹¹In-labeled eight model proteins after intravenous injection into mice. Open symbols represent model polysaccharides (see Fig. 7). Hepatic plasma flow rate (76), rate of fluid-phase endocytosis of liver (77), and glomerular filtration rate (74) were calculated assuming the weight of a mouse to be 25 g.

II-3 体内動態に及ぼす電荷導入の影響

第 I 章および第 II 章第 2 節までで多糖類およびモデルタンパク質を用いた高分子の基本的な体内動態特性を整理することができた。本節では、分子量の異なる 3 種のモデルタンパク質 (SOD、BSA、UC) を用いて化学修飾の手法により直接タンパク質分子に正電荷あるいは負電荷を導入したカチオン化、アニオン化タンパク質を合成し、タンパク質の体内動態に及ぼす直接的な電荷導入の影響について検討した。

3-a 電荷導入タンパク質の合成

電荷の異なるモデルタンパク質の合成には、SOD、BSA、UC の 3 種を用いた。モデルタンパク質に正電荷の導入した cationized SOD (cSOD)、cationized BSA (cBSA)、cationized UC (cUC) は、タンパク質の構成アミノ酸の遊離のカルボキシル基に 1, 6-hexamethylenediamine を結合させることにより合成した (102, 103)。また、負電荷の導入は、タンパク質の N 末端

およびリジン残基の e-amino 基に succinic anhydride を結合することによりそれぞれ、succinylated SOD (sucSOD) および succinylated BSA (sucBSA)、succinylated UC (sucUC) を合成した。Fig. 12 にこれらモデルタンパク質の化学構造の模式図を示した。また、これら電荷導入タンパク質誘導体の物理化学的特性を Table 5 にまとめた。

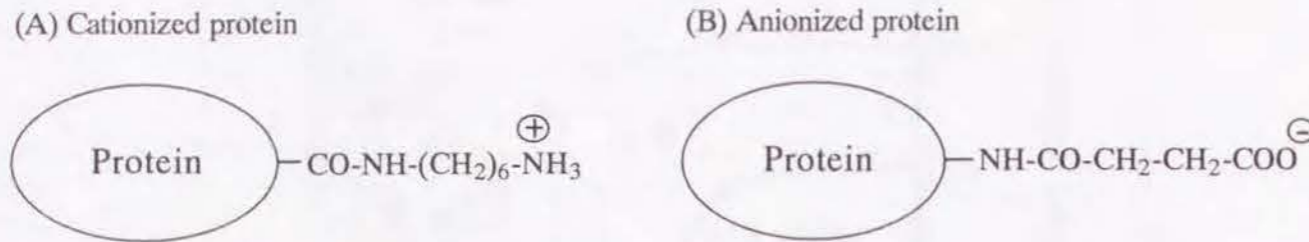


Fig. 12 Chemical structures of directly charge-induced proteins. (A) cationized and (B) anionized (succinylated) proteins.

Table 5 Physicochemical characteristics of directly charge-induced model proteins

Compound	Molecular weight ^a	Number of NH ₂ groups ^b	% remaining enzymatic activity ^c	Isoelectric Point ^d
SOD	32,000	24	100.0	5.0 - 5.2
sucSOD	34,000	2	55.0	< 4.0
cSOD	34,000	35	47.0	> 8.5
BSA	67,000	60	-	4.2 - 4.8
sucBSA	70,000	20	-	< 4.0
cBSA	70,000	75	-	9.0 - 9.4
UC	128,000	98	100.0	5.4
sucUC	130,000	85	43.0	< 4.0
cUC	130,000	120	5.0	> 8.5

^a The molecular weights of compounds were estimated by HPLC gel-filtration chromatography using a Shim-pack Diol-300 column (Shimadzu, Kyoto, Japan).

^b The number of amino groups were estimated by TNBS method.

^c SOD and UC enzymatic activities were assayed by the nitroblue tetrazolium reduction and uric acid oxidation methods, respectively.

^d Isoelectric points of compounds were confirmed by chromatofocusing using Polybuffer exchanger 94 resin and Polybuffer 74 elution buffer system (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

3-b 体内動態に及ぼす正電荷導入の影響

Fig. 13 に正電荷を導入した ¹¹¹In 標識モデルタンパク質 (cSOD、cBSA、cUC) のマウス静脈内投与後の(A) 血漿中濃度、(B) 腎蓄積量、(C) 肝蓄積量の時間推移を示した。

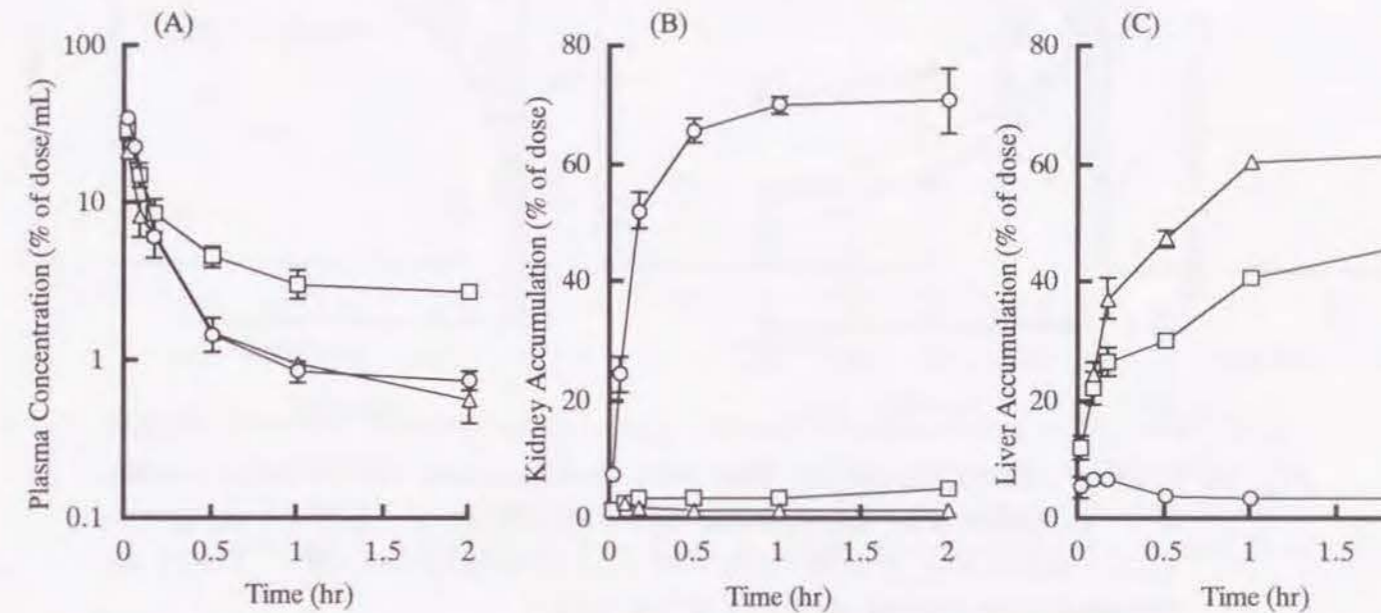


Fig. 13 Plasma concentration (A), kidney accumulation (B) and liver accumulation (C) of radioactivity after intravenous injection of ¹¹¹In-labeled cationized proteins into mice. Key: cSOD (○); cBSA (△); cUC(□). Results are expressed as the mean±S.D. of three mice.

分子量が 32,000 の [¹¹¹In]SOD の場合、血漿中濃度—時間推移はカチオン化によりほとんど影響を受けず、いずれも投与後速やかに血中から消失した (Fig. 13A)。一方、腎臓への [¹¹¹In]SOD の蓄積はカチオン化によりさらに上昇し、投与後 1 時間で約 70 % of dose が腎臓中に取り込まれた。こうした [¹¹¹In]cSOD の腎臓への蓄積に関しては濃度依存性が認められ、投与量を 100 倍の 10 mg/kg とした場合、腎臓への蓄積量は約 60 % of dose にまで減少し尿中排泄量は逆に上昇した。また、未修飾 [¹¹¹In]SOD ではほとんど認められなかった肝臓への取り込みもカチオン化により若干上昇したが、その程度は小さいものであった。分子量がそれぞれ 67,000、128,000 でほとんど腎糸球体濾過を受けない [¹¹¹In]BSA、[¹¹¹In]UC の場合、カチオン化により肝臓への著しい蓄積量の増加が認められ、その傾向は BSA においてより顕著であった (Fig. 13C)。

[¹¹¹In]cBSA は、投与量 0.1 ~ 20 mg/kg の範囲において血漿中濃度—時間推移および肝蓄積—時間推移にほとんど差異が認められなかったが、100 mg/kg の投与量において血中濃度、肝取り込みパターンに非線形性が確認された (Fig. 14)。また、腎臓への蓄積に関しては未修飾体との有意な差は認められなかった (Fig. 14B)。

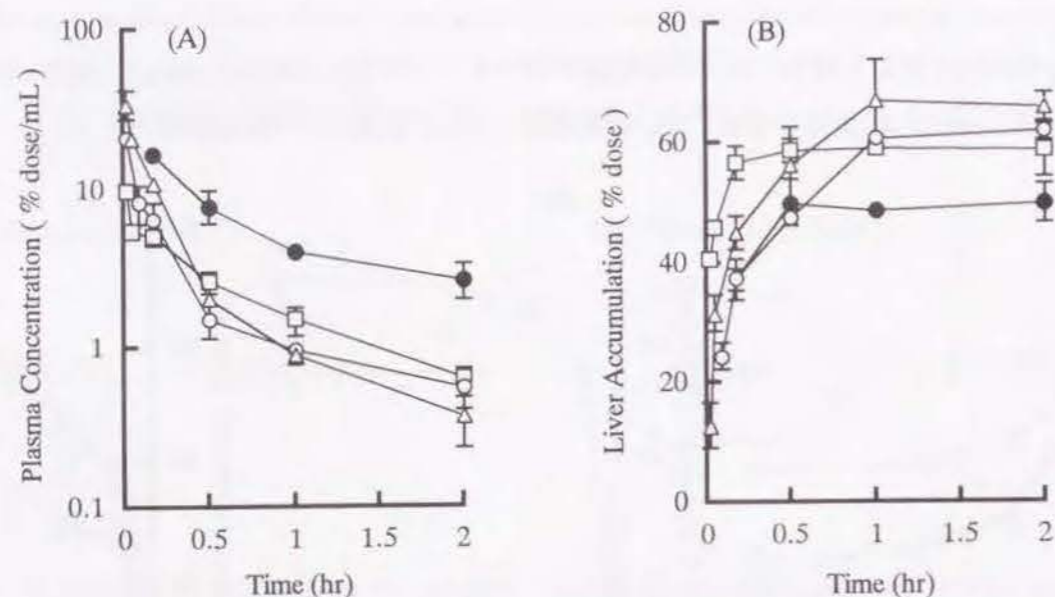


Fig. 14 Plasma concentration (A), and liver accumulation (B) of radioactivity of $[^{111}\text{In}]c\text{BSA}$ after intravenous injection into mice. Key: 0.1 mg/kg dose (Δ); 1 mg/kg dose (\circ); 20 mg/kg dose (\square); 100 mg/kg dose (\bullet). Results are expressed as the mean \pm S.D. of three or four mice.

3-c 体内動態に及ぼす負電荷導入の影響

Fig. 15 に succinyl 化により負電荷を導入した 3 種の ^{111}In 標識モデルタンパク質 (1 mg/kg) のマウス静脈内投与後の (A) 血中濃度、(B) 腎蓄積量、(C) 肝蓄積の時間推移を示した。 $[^{111}\text{In}]suc\text{BSA}$ は今回の検討に用いた 3 種の succinyl 化タンパク質の中で最も速く循環血液中から消失し、投与後 2 時間で約 80 % of dose が肝臓に蓄積した。 $[^{111}\text{In}]suc\text{BSA}$ の肝取り込みには非線形性が認められ、100 mg/kg の高投量投与では、 $[^{111}\text{In}]suc\text{BSA}$ の肝取り込みは 2 時間で 19.5 % of dose と有意に低下した。一方、分子量が 34,000 の $[^{111}\text{In}]suc\text{SOD}$ (1mg/kg) の静脈内投与においては有意な肝取り込みが認められず、投与後 2 時間までに約 60 % of dose が尿中に回収された。 $[^{111}\text{In}]suc\text{UC}$ は、3 種のモデルタンパク質のうちで最も循環血液中からの消失が遅かったが、30 % of dose 以上が肝臓へ取り込まれた。肝臓以外の組織への ^{111}In 標識 succinyl 化タンパク質の顕著な放射活性の取り込みはみられなかった。

3-d 薬動学的解析

これまでの検討と同様の解析方法によりカチオン化タンパク質およびアニオン化タンパク質の薬動学的パラメータを算出し Table 6 にまとめた。いずれのモデルタンパク質においても、正電荷の導入により肝臓の取り込みクリアランス値は、生理的条件下で弱い負電荷をも

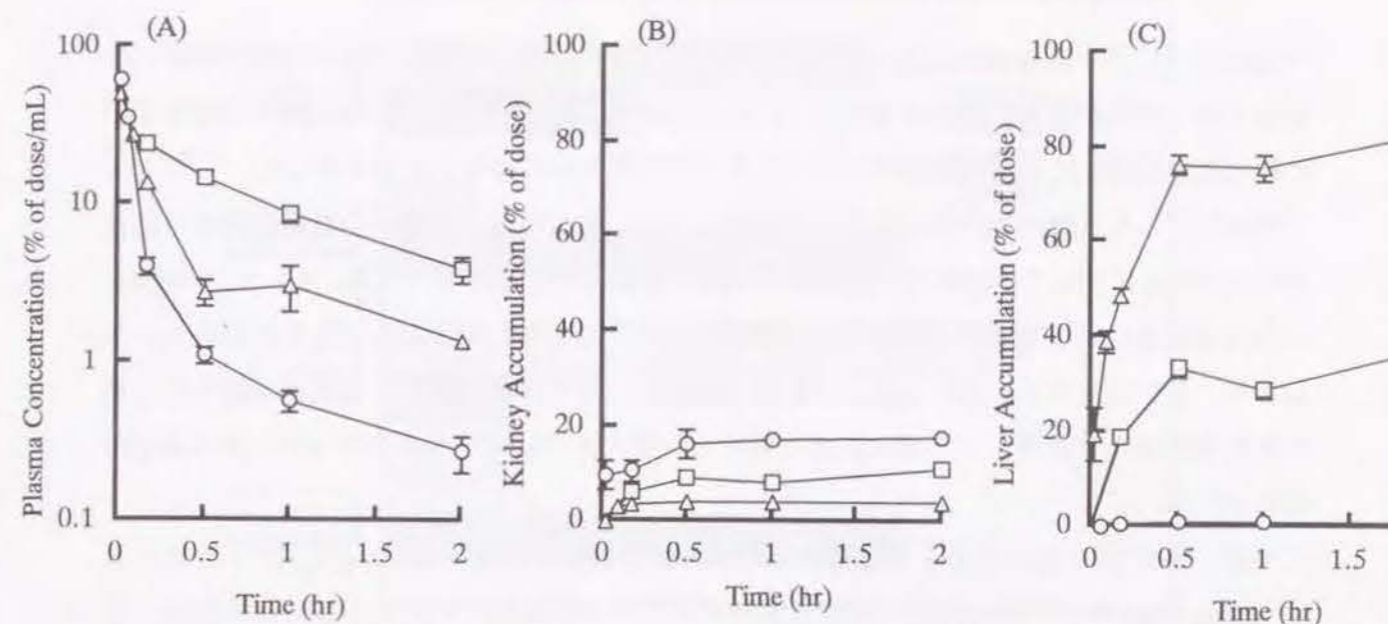


Fig.15 Plasma concentration (A), kidney accumulation (B) and liver accumulation (C) of radioactivity after intravenous injection of ^{111}In -labeled succinylated proteins into mice at a dose of 1 mg/kg. Key: sucSOD (Δ); sucBSA (\circ); sucUC (\square). Results are expressed as the mean \pm S.D. of three mice.

Table 6 Pharmacokinetic parameters of native, cationized and succinylated proteins, dextran sulfate and inulin after intravenous injection to Mice

Compound	Dose (mg/kg)	AUC (% of dose \cdot hr/mL)	Clearance ($\mu\text{L/hr}$)			Tissue uptake rate index ($\mu\text{L/hr/g}$)			
			total	liver	urine	liver	kidney	spleen	muscle
$[^{111}\text{In}]SOD$	1	9.5	10,500	42.7	1,230	26.2	23,700	20.7	7.2
$[^{111}\text{In}]cSOD$	1	7.3	13,700	2,470	42.3	1600	36,200	955	496
$[^{111}\text{In}]sucSOD$	1	6.1	16,400	238	12,100	242	10,400	34.3	n.d.
$[^{111}\text{In}]BSA$	1	1430	69.7	15.8	7.1	15.1	28.0	7.5	1.4
	100	764	131	20.4	161	18.5	21.2	15.6	1.8
$[^{111}\text{In}]cBSA$	0.1	5.7	17,600	11,900	1,490	10,000	1,960	29,300	160
	1	4.7	21,100	11,200	2,860	13,000	1,380	8,880	58.3
	20	4.6	21,900	12,900	2,760	14,800	8,050	14,000	140
$[^{111}\text{In}]sucBSA$	100	47.1	2,100	1,590	160	1,100	2,160	2,230	20.5
	1	18.1	5,510	3,760	504	3,350	442	82.2	27.0
	100	140	713	245	103	205	265	63.1	4.2
$[^{111}\text{In}]UC$	1	215	465	192	69.5	200	269	76.9	8.5
$[^{111}\text{In}]cUC$	1	17.0	5,870	2,160	530	2,940	1,670	5,500	17.2
$[^{111}\text{In}]sucUC$	1	22.8	3,600	1,380	337	1,530	1,730	320	7.9
$[^{14}\text{C}]dextran\ sulfate$	1	4.0	25,300	2,470	12,300	1,420	2,250	486	205
	100	5.4	18,500	553	10,900	419	1,000	140	45.1
$[^{14}\text{C}]inulin$	100	3.5	28,900	154	26,800	168	700	60.1	34.6

n.d.: not determined

つ native タンパク質と比較して 10 倍以上高く、高分子の体内分布とりわけ網内系組織への移行には、電荷が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、脾臓や筋肉などの他の組織についても正電荷の導入によりそのクリアランス値は大きく上昇した。

今回検討した 3 種のカチオン化タンパク質において最も顕著な肝臓への蓄積が認められた $[^{111}\text{In}]c\text{BSA}$ に関して体内動態特性における投与量依存性を検討した結果、0.1 ~ 20 mg/kg の投与量範囲において AUC 値および各臓器クリアランス値にはほとんど変化が認められなかった。しかしながら、100 mg/kg の高投与量投与により肝取り込みクリアランスをはじめとする各組織クリアランスの値は有意に減少し、またその結果を反映して AUC 値の増加が認められた。

一方、負電荷の導入によってもタンパク質の肝移行性は上昇し、1 mg/kg 投与における $[^{111}\text{In}]suc\text{BSA}$ や $[^{111}\text{In}]suc\text{UC}$ の肝取り込みクリアランス値はそれぞれ未修飾体の肝取り込みクリアランスの 15.8 倍、7.2 倍と高い値を示した。また、 $[^{14}\text{C}]dextran\ sulfate$ においても、1 mg/kg 投与時では高い肝取り込みクリアランス値を示し、 $[^{14}\text{C}]inulin$ や $[^{14}\text{C}]dextran$ (T-10) の 16.0 倍、4.9 倍となった。しかしながら、 $[^{111}\text{In}]suc\text{SOD}$ の肝取り込みクリアランスは他の ^{111}In 標識 succinyl 化タンパク質と比較し相対的に低い値を示した。また、 $[^{111}\text{In}]suc\text{SOD}$ と $[^{14}\text{C}]dextran\ sulfate$ の尿中排泄クリアランスは、糸球体濾過速度のマーカーとして用いられる $[^{14}\text{C}]inulin$ の尿中排泄クリアランス値とほぼ同じ値を示した。

3-e $[^{111}\text{In}]c\text{BSA}$ および $[^{111}\text{In}]suc\text{BSA}$ の肝構成細胞への分布

正電荷、負電荷いずれの電荷の導入によっても、モデルタンパク質の肝移行性の上昇が認められたことから、電荷導入タンパク質の肝移行機構を明らかにするために最も顕著な肝移行性が認められた BSA 誘導体を用いて肝構成細胞への分布を検討した。Fig. 16 には、マウス静脈内投与後 30 分における $[^{111}\text{In}]c\text{BSA}$ および $[^{111}\text{In}]suc\text{BSA}$ の実質細胞 (PC) および非実質細胞 (NPC) への分布パターンを糖認識レセプター介在エンドサイトーシスによりそれぞれ PC、NPC に特異的に分布する $[^{111}\text{In}]Gal\text{BSA}$ および $[^{111}\text{In}]Man\text{BSA}$ の結果とあわせて示した。 $[^{111}\text{In}]c\text{BSA}$ は PC:NPC の分布比が約 2:1 であり、肝臓中における血液と構成細胞との接触面積比にほぼ応じて分布したことから、肝構成細胞との静電的な相互作用により肝臓に取り込まれることが示唆された。一方、 $[^{111}\text{In}]suc\text{BSA}$ は $[^{111}\text{In}]Man\text{BSA}$ と同様に NPC に特異的に分布した。

3-f $[^{111}\text{In}]suc\text{BSA}$ の肝取り込みにおける BSA および dextran 誘導体との同時投与の影響

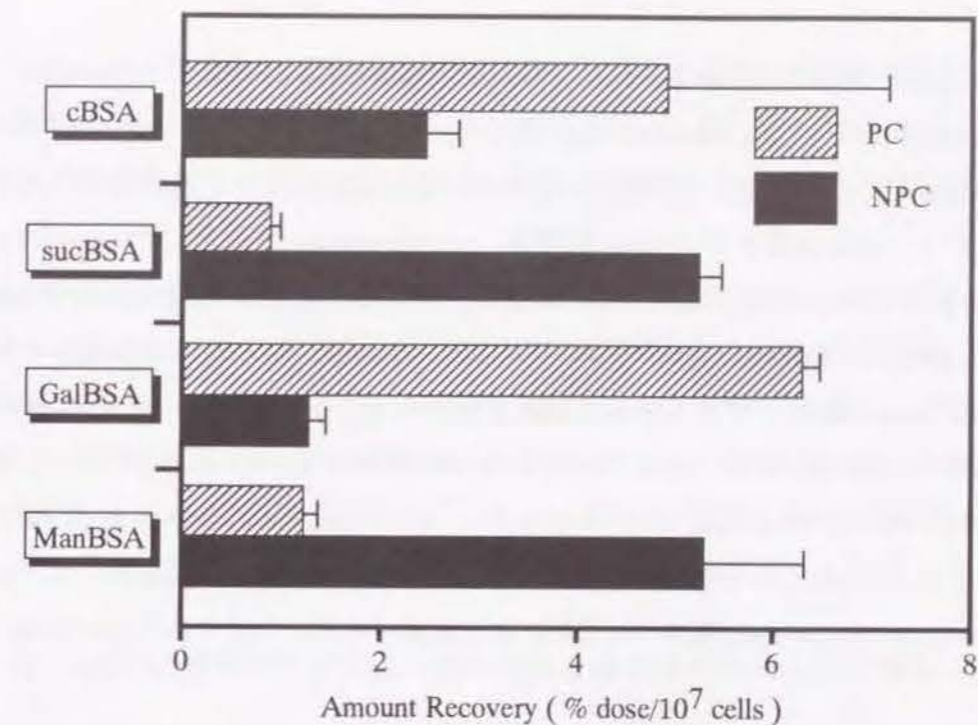


Fig. 16 Cellular localization of $[^{111}\text{In}]c\text{BSA}$ and $[^{111}\text{In}]suc\text{BSA}$ at 30 min after intravenous injection at a dose of 1 mg/kg. Results are expressed as the mean \pm S.D. of three experiments.

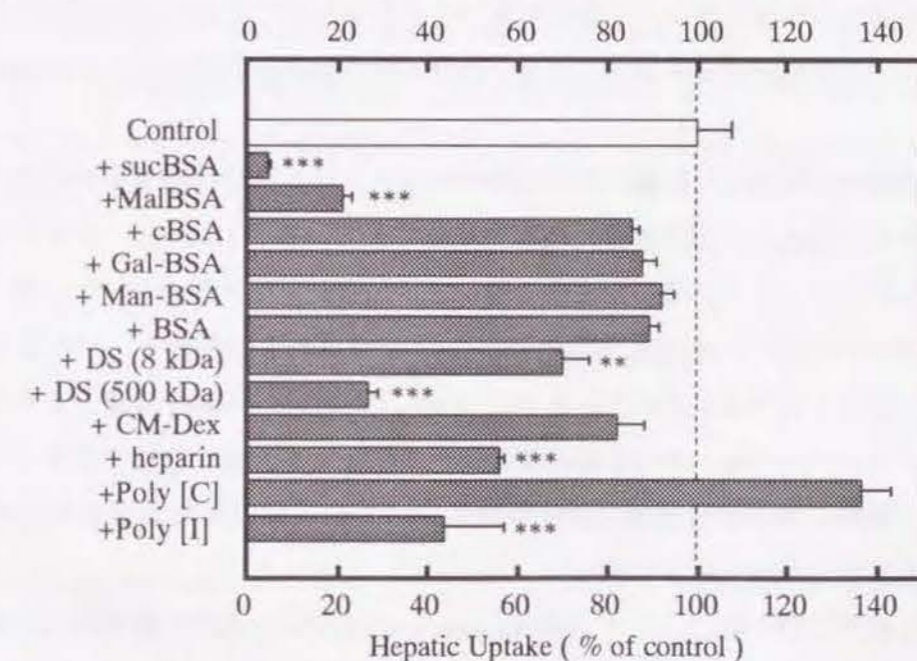


Fig. 17 Competition of hepatic uptake of $[^{111}\text{In}]suc\text{BSA}$ by coadministration with BSA and dextran derivatives and polyribonucleotides after intravenous injection into mice. $[^{111}\text{In}]suc\text{BSA}$ (1 mg/kg) was injected with unlabeled competitive macromolecules (20 mg/kg) and hepatic accumulation was determined at 30 min after intravenous injection. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

肝臓の Kupffer 細胞や内皮細胞、macrophage には polyanion を認識する scavenger receptor の存在が報告されている。Succinyl 化を施した BSA も構造的には polyanion ことから $[^{111}\text{In}]$ sucBSA もこの機構を介して肝比実質細胞に取り込まれている可能性が考えられる。そこで、種々の BSA 誘導体や dextran 誘導体、polyribonucleotides と $[^{111}\text{In}]$ sucBSA を同時投与に及ぼす $[^{111}\text{In}]$ sucBSA の肝取り込みの影響を検討した (Fig. 17)。SucBSA や MalBSA、heparin、dextran sulfate (Mw: 8,000 および 500,000)、poly[I] などの強い負電荷を有する高分子は、 $[^{111}\text{In}]$ sucBSA の肝取り込みを顕著に阻害した。しかしながら、正電荷を有する cBSA、糖修飾 BSA 誘導体である GalBSA や ManBSA、弱い負電荷を有する BSA や CM-Dex は有意な阻害効果を示さなかった。また、poly[C] との同時投与により $[^{111}\text{In}]$ sucBSA の肝取り込みは若干促進された。したがって、 $[^{111}\text{In}]$ sucBSA は、scavenger receptor-mediated endocytosis 機構により肝比実質細胞に特異的に取り込まれていることが示唆された。

II-4 化学修飾の組み合わせによるタンパク質の体内動態制御

第 I 章および第 II 章前節までの検討により、物理化学的特性の異なる多糖類およびタンパク質の体内動態特性をクリアランスの概念に基づく薬動的解析を通じてほぼ整理することができ、物理化学的特性の制御を通じて高分子物質の体内挙動を制御することが確かめられた。

一方、糖認識機構を利用した肝臓への標的指向化はタンパク質や遺伝子等を肝臓の特定の細胞に送達させる方法として近年非常に注目を集めてきている (110-116)。アシアロオロソムコイドやアシアロフェツイン等の血清中の脱シアル化糖タンパク質 (117-120) がこうした試みに用いられているが、いわゆる neoglycoprotein と呼ばれる合成糖タンパク質も有用な薬物キャリアーとして近年注目されている (121-130)。Neoglycoprotein は導入する糖の種類や残基数をコントロールでき、かつ目的とする単一の化合物を大量に合成できるという利点を有しており、細胞の糖鎖認識機構の研究や糖タンパク質の *in vivo* における体内動態の系統的な検討にも非常に有用である (131)。

また、生理活性タンパク質に対して polyethylene glycol (PEG) 等の生物学的に不活性な高分子を用いて化学修飾を施す試みは、生理活性タンパク質を臨床適用する上で問題となる抗原性・免疫原性や生体内での安定性等を解決するための有力な方法として期待されている (51-54, 132, 133)。タンパク質分子に対して PEG 修飾を施すことにより細胞表面上に存在するレセプター等への結合は抑制されることが考えられるが、一方、タンパク質分子への糖残基や前節までで検討した電荷の導入によりタンパク質の標的指向性は大きく亢進する。した

がって、こうした化学修飾を適当に組み合わせることによってタンパク質の体内動態をさらに精密に制御できる可能性が考えられる (134, 135)。このようなレセプターを介して取り込まれるタンパク質に対して PEG 修飾を施し、その体内動態特性を検討した例はほとんどない。

本節においては、全身投与後安定に血中を循環する BSA をモデルタンパク質として、正電荷を付与した誘導体 cBSA、および投与後肝臓の実質細胞および非実質細胞に選択的に取り込まれる糖修飾 BSA である lactose 修飾 BSA (LacBSA) および mannose 修飾 BSA (ManBSA) を選択し、これら BSA 誘導体に対して PEG 修飾を施した場合の全身動態を評価するとともに、化学修飾を組み合わせることによるタンパク質の精密な体内動態制御の可能性についても考察を加えた。

4-a 複合化学修飾アルブミン誘導体の合成とその物理化学的性質

正電荷を有する cBSA は、第 II 章第 3 節と同様に合成した。糖修飾 BSA は、BSA に lactose および mannose を導入した lactose 修飾 BSA (LacBSA) および mannose 修飾 BSA (ManBSA) をそれぞれ合成した。LacBSA は、Gray らの方法 (122) に従って、還元的アミノ化により lactose を BSA に結合させた。ManBSA は、Lee らの方法 (121) に従って、2-imino-2-methoxyethyl 1-thiomannoside と BSA を反応させることにより合成した。Fig. 18 には、これら BSA 誘導体の模式図を示した。PEG 修飾は、上記 3 種の BSA 誘導体に対して活性化 PEG [2, 4-bis (O-methoxypolyethylene-glycol)-6-chloro-s-triazine; Mw = 10,000] を反応させることにより行った (136)。

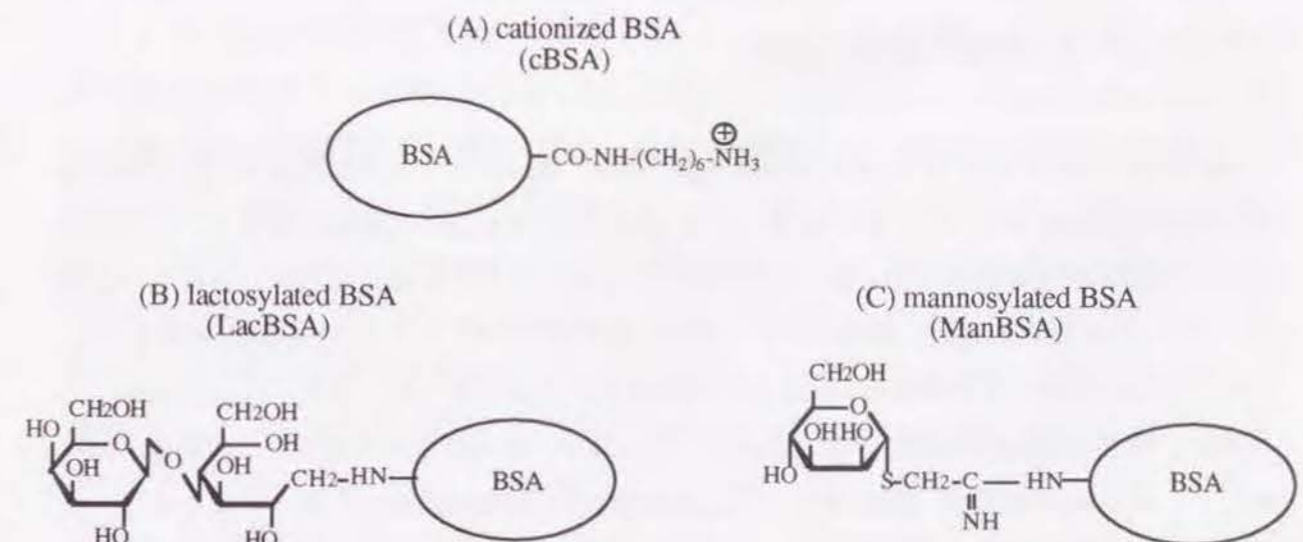


Fig. 18 Chemical structures of cationized and glycosylated BSA

Table 7 Physicochemical properties of BSA and its derivatives tested in this study

Compound	Percent ^a of Free NH ₂	Molecular ^b Weight (HPLC)	Adsorption at pH 7.4 ^c	
			DEAE-Sephadex	CM-Sephadex
BSA	100.0	67,000	+	-
cBSA	116.7	70,000	-	+
cBSA-PEG	105.2	170,000-200,000	-	+
LacBSA	47.7	70,000	+	-
LacBSA-PEG	34.4	80,000-110,000	+	-
ManBSA	73.7	70,000	+	-
ManBSA-PEG	60.0	90,000-110,000	+	-

^a: The numbers of amino groups were determined by TNBS method and that of native BSA was 60.

^b: The molecular weights of BSA derivatives were estimated by gel-filtration HPLC.

^c: The net electric charge of BSA derivatives was confirmed by a batch method (72).

Table 7 に得られた PEG 修飾 BSA 誘導体の物理化学的性質を整理した。比較のために PEG 未修飾の BSA 誘導体の結果も併せて示した。BSA 中の free のアミノ基数は化学修飾により 34-74% に減少した。また、正電荷および糖鎖導入による分子サイズの上昇はほとんど認められなかったが、PEG 修飾によりいずれの BSA 誘導体も顕著な分子サイズの上昇が認められた。また、PEG 修飾は電気的には元の BSA 誘導体と同様の電荷を有していることが確認された。

4-1-b 血中動態と肝移行特性

Fig. 19 に 3 種の PEG 修飾 BSA 誘導体を投与量 0.1 mg/kg でマウスに尾静脈内投与後の血漿中濃度時間推移を示した。PEG 修飾により cBSA の肝取り込みは顕著に減少し、その結果 BSA とほぼ同程度の非常に高い血中滞留性が得られた。また、肝臓以外の他の組織への蓄積も 1% of dose 以下と有意に抑制された。同様な血中消失のパターンは LacBSA-PEG についても認められたが、その程度は cBSA-PEG よりも低いものであった。また、LacBSA-PEG の肝取り込み量は LacBSA-PEG とほぼ同程度であったが、その取り込み速度は比較的低い値を示した。ManBSA-PEG は cBSA-PEG と ManBSA-PEG との中間的な血中濃度推移を示し、肝移行量も ManBSA と比較して抑制された。

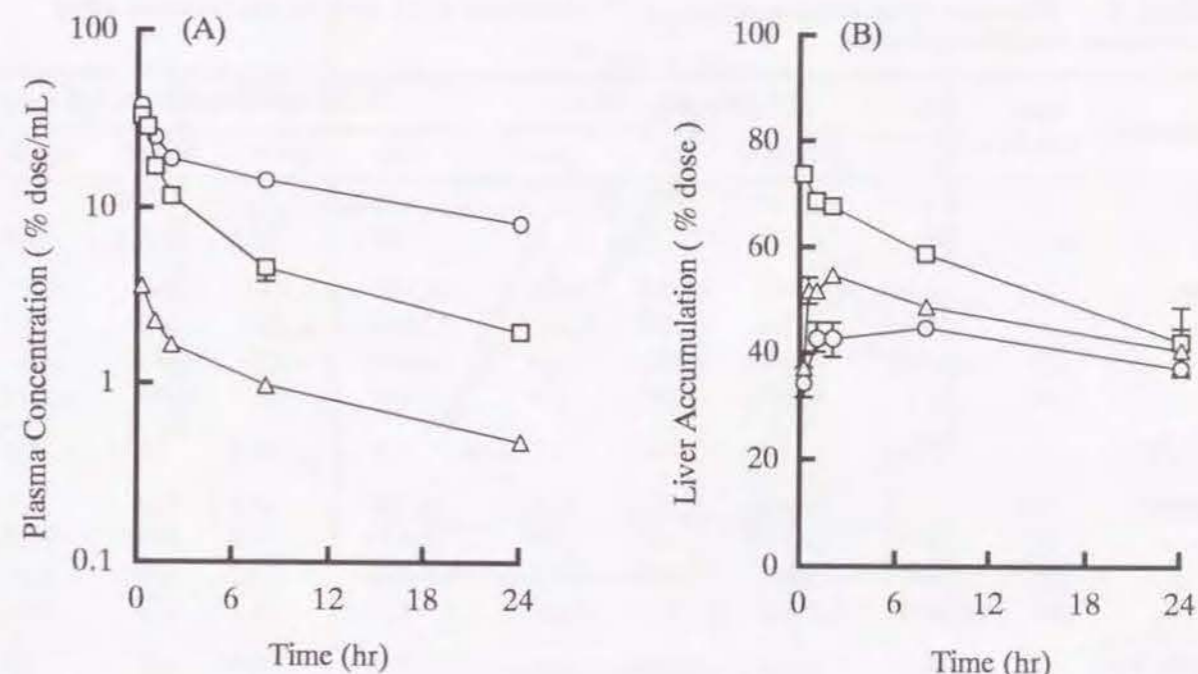


Fig. 19 Plasma concentration (A) and liver accumulation (B) of ¹¹¹In-labeled PEG conjugated BSA derivatives after intravenous injection at a dose of 1 mg/kg into mice. Key: LacBSA-PEG (Δ); ManBSA-PEG (\square); cBSA-PEG (\circ). Results are expressed as the mean \pm S.D. of three or four mice.

4-1-c 薬動学的解析

Table 8 にこれら PEG 修飾 BSA 誘導体のマウス静脈内投与後の薬動学的パラメータをまとめた。LacBSA や ManBSA などの糖修飾 BSA の場合、低投与量 (1 mg/kg 以下) では肝クリアランス値はほぼ全身クリアランス値と等しく、こうした糖修飾 BSA が肝臓により優先的に取り込まれることが明らかとなった。また、これら糖修飾 BSA の肝取り込みクリアランス値は投与量の増大に伴い減少したが、他の一般臓器における移行クリアランス値にはほとんど変化が認められず、その結果全身クリアランス値は有意に増大した。cBSA の肝取り込みクリアランス値は、20 mg/kg までの比較的高投与量域までその全身クリアランス値には有意な差が認められず、100 mg/kg において主として肝取り込みクリアランス値の低下に起因すると思われる全身クリアランス値の増大が認められた。一方、PEG 修飾により BSA 誘導体を示した大きな肝取り込みクリアランスは有意に低下し、LacBSA、ManBSA、cBSA のそれぞれ 7 分の 1、45 分の 1、130 分の 1 にまで減少した。しかしながら、全身クリアランス値に占める肝取り込みクリアランス値の比率は PEG 修飾体および PEG 未修飾体間で差が認められなかった。

TABLE 8 Pharmacokinetic parameters of ¹¹¹In-labeled BSA and its derivatives after intravenous injection to mice

Compound	Dose (mg/kg)	AUC (% dose* hr/ml)	Clearance (μL/hr)			Tissue uptake rate index (μL/hr/g)			
			total	liver	urine	liver	spleen	kidney	muscle
BSA	1	1430	69.7	15.8	7.1	15.1	7.5	28.0	1.5
	100	764	131	20.4	8.5	18.5	15.6	21.2	1.8
cBSA	0.1	5.69	17,600	11,900	1,490	10,000	29,300	1,960	160
	1	4.70	21,100	11,200	2,860	13,000	8,880	1,380	58.3
	20	4.58	21,900	12,900	2,760	14,800	14,000	8,050	140
	100	47.1	2,100	1,590	160	1,100	2,160	2,230	20.5
cBSA-PEG	1	558	179	113	17.3	116	46.0	39.3	1.4
LacBSA	0.1	7.13	14,000	12,800	642	15,700	47.1	414	4.6
	1	8.25	12,100	11,000	2,330	13,000	5.1	397	10.4
	20	36.8	2,720	1,510	123	1,280	15.5	159	13.6
	100	68.9	1,450	520	222	403	13.1	323	18.0
LacBSA-PEG	1	29.8	3,360	1,740	249	1,710	9.7	465	2.5
ManBSA ^a	0.05	3.36	27,300	18,000	360	17,700	9,450	n.d. ^b	n.d.
	0.1	3.67	27,200	19,300	100	11,300	5,930	300	19.6
	1	3.98	25,100	19,200	130	16,000	7,970	460	30.7
	10	24.8	4,040	3,200	41.6	2,710	1,320	110	13.2
	20	41.1	2,430	1,300	3.5	1,170	750	n.d.	n.d.
ManBSA-PEG	1	166	604	316	49.0	358	533	176	2.4

Results are expressed as mean, n = 3 - 4.

a: Data were obtained in previous report (194).

b: Not determined.

II-5 考察

本章では、タンパク質の電荷や分子量などの物理化学的特性が体内動態に与える影響を第I章と同様にマウス *in vivo* 全身投与の系を用いて検討を加えた。まず、8種の分子量の異なるタンパク質の全身投与後の体内動態を検討したところ、ほぼ分子量依存的な血中消失パターンが得られた。また、分子量が32,000以下のタンパク質の場合、静脈内投与後速やかに体内から消失し、その大部分が尿中に排泄されるかもしくは腎臓に蓄積した。こうした低分子量タンパク質の腎取り込み量と尿中排泄量の総和は、ほぼ一定の値を示した(約70%)。一方、糸球体濾過をほとんど受けないBSA(Mw; 67,000)およびIgG(Mw; 150,000)は、血液中を安定に循環し、いずれの臓器にもほとんど取り込まれなかった。

さらに、分子量の異なる3種のタンパク質(SOD、BSA、UC)に対して化学修飾の手法を用いて直接正または負の電荷を導入した誘導体を合成し、タンパク質の体内動態に及ぼす正

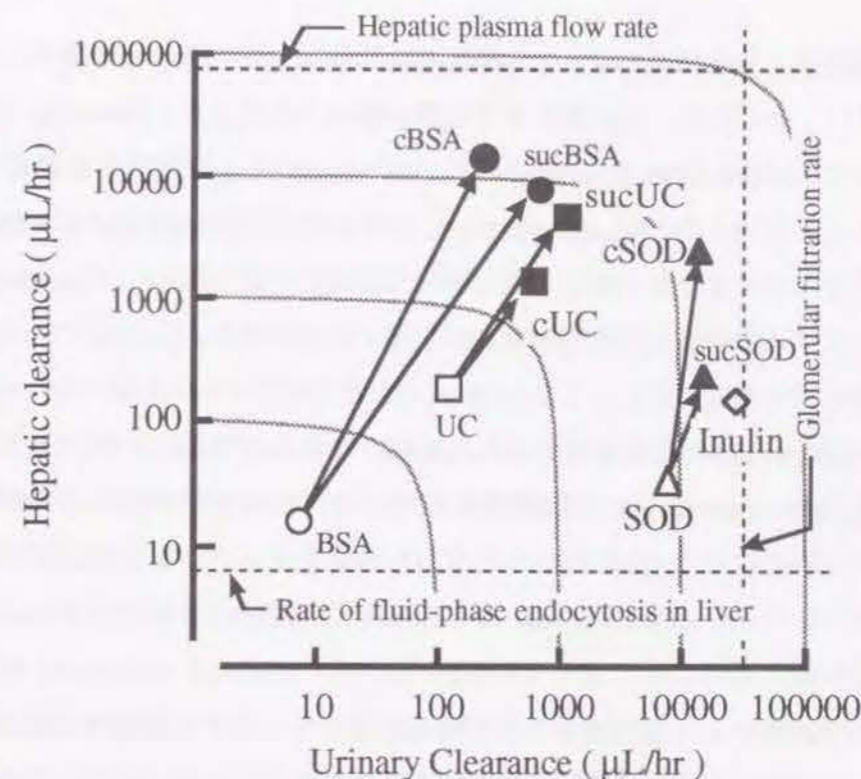


Fig. 20 Hepatic and urinary clearances of ¹¹¹In-labeled directly charge-induced proteins after intravenous injection into mice. Hepatic plasma flow rate (76), rate of fluid-phase endocytosis of liver (77), and glomerular filtration rate (74) were calculated assuming the weight of a mouse to be 25 g.

電荷、負電荷の影響を検討した。1,6-hexamethylenediamineを用いて正電荷を導入したタンパク質の体内動態特性は、基本的には第I章において検討した平均分子量70,000のDEAE-Dexとほぼ同じであり、静脈内投与後の肝取り込みクリアランス値は未修飾体と比較し大きく亢進した。また、分子量が32,000で血中からの消失経路が腎糸球体濾過に起因するSODの場合、肝臓への取り込みの増加とともに尿中排泄量の減少および腎臓への蓄積量の増加も認められた(Fig. 20)。

一方、acetyl-LDLやmaleyl-BSA、poly[I]、lipopolysaccharideなどの種々の polyanion は scavenger receptorの高親和性リガンドとして報告されている(86)。しかしながら、同じ polyanionであっても poly(D-glutamic) acidや poly[C]、コンドロイチン硫酸などはリガンドとはならない(86)。また、化学修飾アルブミンに関しても maleyl-BSAや formaldehyde-treated albuminは scavenger receptorに認識されるが(130, 137-139)、acetyl-albuminは認識されないことが報告されている。Franssenらは succinylated human serum albuminが scavenger receptorのリガンドとなり得ることを報告しているが(140)、こうした succinylated albuminや他の succinylatedタンパク質の scavenger receptorのリガンドとしての特性に関する詳細な検討はなされていない。

本章における結果より sucBSA はマウス静脈内投与後速やかに肝非実質細胞中に取り込まれることが示され、その取り込みに投与量依存性が認められること、scavenger receptor の典型的なリガンドである MalBSA や dextran sulfate や heparin などの硫酸化多糖の同時投与により阻害されることが明らかとなった。Heparin に関しては従来 scavenger receptor のリガンドではないと考えられてきたが (85)、最近の報告では低分子量 heparin が scavenger receptor を介して肝臓に取り込まれることが報告されている (141)。また、poly[I] や poly[C] などの polyribonucleotide の同時投与によっても sucBSA の肝取り込みに阻害が認められたことから、sucBSA も scavenger receptor を介して肝非実質細胞に取り込まれることが示唆された。

これまでも scavenger receptor 認識機構を利用して抗癌剤などの低分子薬物を肝臓に送達する報告はなされているが (142-146)、こうした機構をタンパク質医薬品に適用したアプローチはなされていない。本章では SOD や UC をモデルタンパク質として succinyl 基をこれらタンパク質に導入することにより scavenger receptor-mediated endocytosis 機構を介して肝非実質細胞にターゲティングし得ることが明らかとした。肝非実質細胞は肝障害を引き起こす原因の一つと考えられている活性酸素の発生源であることが知られており (147)、SOD

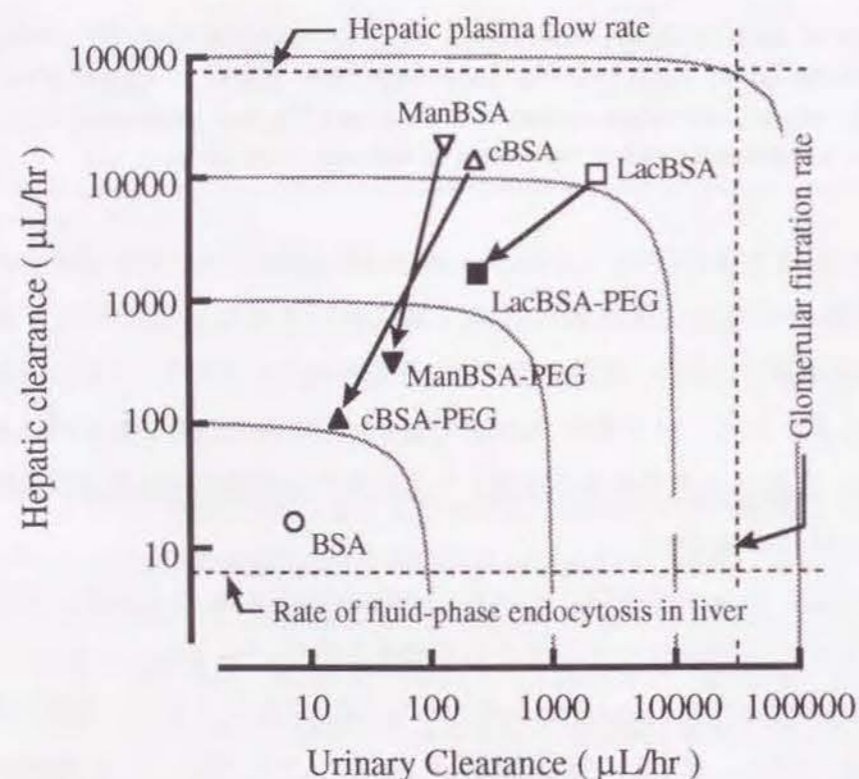


Fig. 21 Hepatic and urinary clearances of ^{111}In -labeled PEG conjugated BSA derivatives after intravenous injection at a dose of 1 mg/kg into mice. Hepatic plasma flow rate (76), rate of fluid-phase endocytosis of liver (77), and glomerular filtration rate (74) were calculated assuming the weight of a mouse to be 25 g.

のような抗酸化酵素を肝非実質細胞に送達させることは活性酸素による肝障害の治療という観点からも非常に有用であると考えられる。

また、正電荷や糖残基を付与した BSA に対して PEG 修飾を施すことにより、これら BSA 誘導体の高い肝指向性を抑制し得ることが明らかとなった (Fig. 21)。PEG は水に対し高い溶解性を有し、低毒性であり免疫原性も示さないといった優れた特性を備えており (148, 149)、これまでもタンパク質の抗原性の消失、生理活性の増強、IgE 産生の抑制等を目的とした数多くの報告がなされている (51-55, 60, 132, 150-153)。本章での結果は、PEG 修飾による糖タンパク質の galactose や mannose 残基を認識するレセプターとの affinity の低下や実質細胞との静電的な結合性の低下に起因すると考えられ、生理活性タンパク質がレセプターに高濃度で急速に結合することによる down regulation の回避や、目的とする薬理作用以外の生理活性の発現を抑制し得る可能性が示唆された。

以上、タンパク質の分子サイズや電荷等の物理化学的性質と体内動態特性との関連を系統的に整理することができ、さらに糖鎖や電荷の導入および高分子修飾素材を用いて化学修飾を施すことによりタンパク質の物理化学的性質を大きく改変し、タンパク質の肝臓や腎臓さらには血管内への標的指向性を達成し得ることも明らかにすることができた。こうした知見は、今後ますます臨床の場に提供されてくると思われるサイトカイン類に代表される生理活性タンパク質の体内動態特性の評価ならびに体内動態制御に有用な情報を提供するものと思われる。

第III章 高分子修飾大豆トリプシンインヒビターの合成と体内動態および薬理効果の改善

生体内に投与された生理活性タンパク質の多くは、生体内のタンパク分解酵素による分解や細網内皮系組織による非特異的な取り込み等により、また腎糸球体濾過における尿中排泄により静脈内投与後速やかに血中から消失することが知られている(154-159)。また、ヒト以外の種由来のタンパク質を用いる場合においては、抗原性・免疫原性といった問題も生ずる(152)。

一方、サイトカイン類に代表される生理活性タンパク質の多くは、タンパク質分子内に糖鎖を有するいわゆる糖タンパク質であるが、こうした糖タンパク質は酵素処理により糖鎖部分を除去することにより、その化学的・生物学的安定性が低下することが知られている(160)。また、大腸菌を用いて産生させた recombinant human interferon- β (rhIFN- β) は糖鎖構造が欠落しているが、この rhIFN- β は糖鎖を有する天然型の rhIFN- β とは異なった体内動態を示すことが報告されている(161, 162)。

前章までで、種々の多糖類・タンパク質の分子サイズや電荷等の物理化学的特性とその体内動態特性との関係を系統的に整理することができた。本章においては、前章までで得られた情報に基づき、soybean trypsin inhibitor (STI; Mw 20,100) に dextran を用いた高分子修飾を施し分子サイズを増大させることによる生理活性タンパク質の生体内動態特性の制御法の開発を試みた(163, 164)。

III-1 STI - dextran conjugates の合成とその物理化学的性質

Dextran は(1)高い水溶性を有している、(2)化学修飾に有利な水酸基を多数持つ、(3)免疫原性が低い、(4)血漿増量剤として臨床的に使用されている等の理由から従来より mitomycin C (42-47) や daunomycin (165, 166)、Adriamycin (167-170) 等の抗癌剤や asparaginase (37, 38) や carboxypeptidase G₂ (39, 40)、glutathione (25) 等のペプチド、タンパク質の運搬体として繁用されてきた。多糖類と薬物の結合方法に関しては、過ヨウ素酸酸化法(37, 171) や、臭化シアン法(172)、カルボジイミド法(173)、SPDP法(174)等様々な方法が報告されている。しかしながら、こうした修飾方法と得られる結合体の収率および残存活性を系統的に検討した報告はほとんど見当たらない。

著者は、Kunitz によってダイズより単離された分子量 20,100 の STI (175) をモデルタンパク質として選択し (Fig. 22)、dextran を修飾素材として種々の合成法により STI-dextran

(STI-D) 結合体を作成し、その結合体の合成収率および物理化学的特性に関して系統的な検討を加えた。

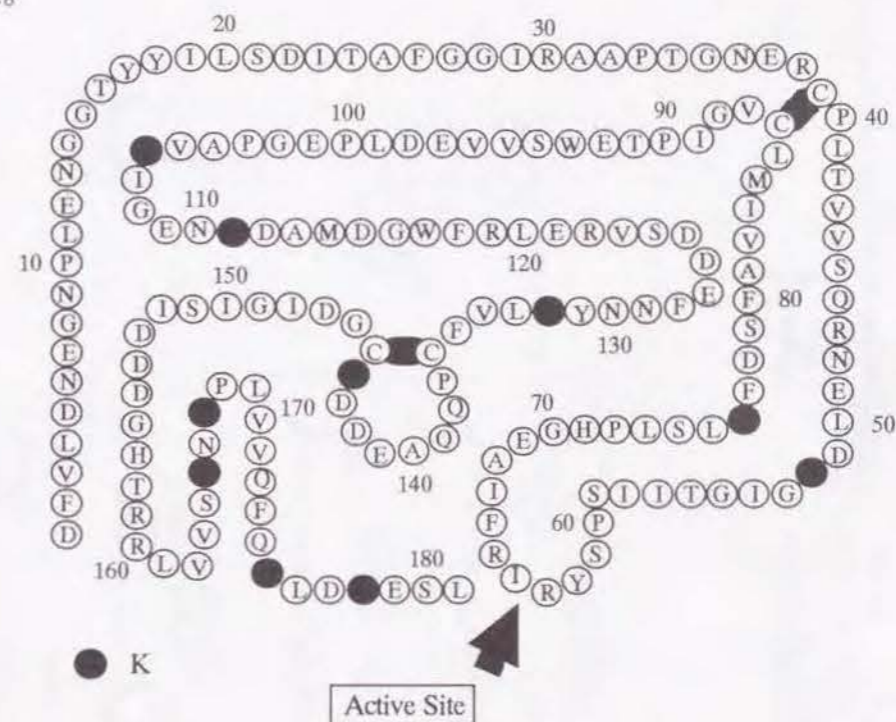


Fig. 22 Amino acid-sequence of soybean trypsin inhibitor. Closed symbols represent lysine residues (K).

1-a 合成法の検討

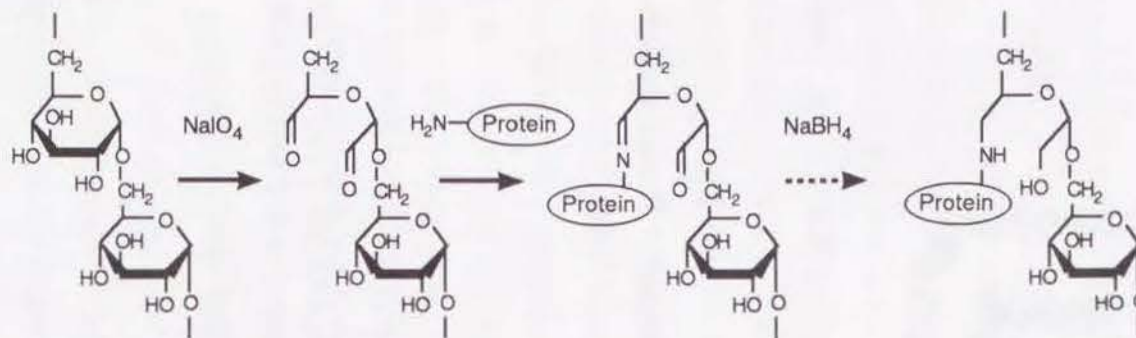
著者は、STI と dextran との結合方法として過ヨウ素酸酸化法(37, 171) および臭化シアン法(172)、カルボジイミド法(173)、塩化シアヌル法(176)、エピクロロヒドリン法(177)、SPDP法(174)の6種類を選択し、さらにポリエチレングリコールによる化学修飾法も比較のため用いることとした。各々の合成法の簡単なスキームを Fig. 23 に示した(178)。

1-b STI-D の物理化学的性質

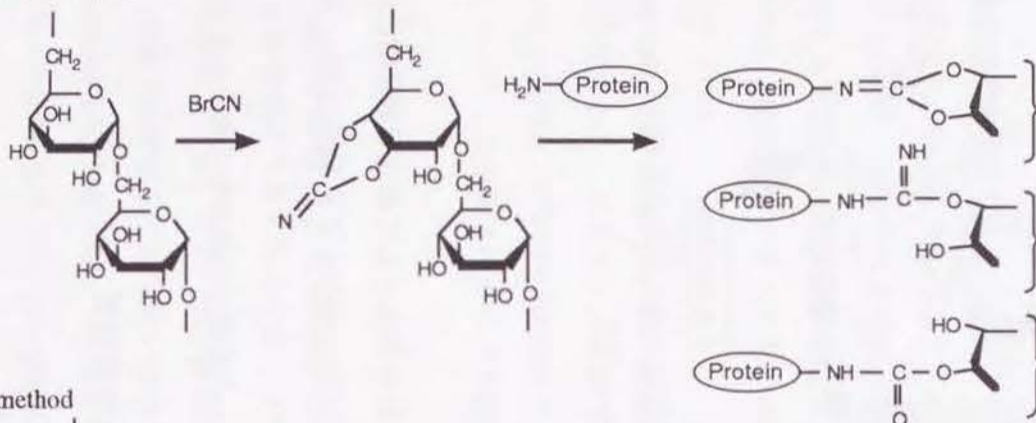
STI-D および STI-PEG の合成

Table 9 に種々の修飾法によって得られた STI-D の合成収率および物理化学的性質をまとめた。合成は、各々の方法に関して少なくとも2回以上行ったが、各バッチ間で生じる差異は比較的小さいものであった。合成収率は、限外濾過およびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した STI-D のタンパク含量より算出した。各結合方法により合成収率には大きな変

(1) Periodate oxidation method



(2) Cyanogen bromide method



(3) Carbodiimide method

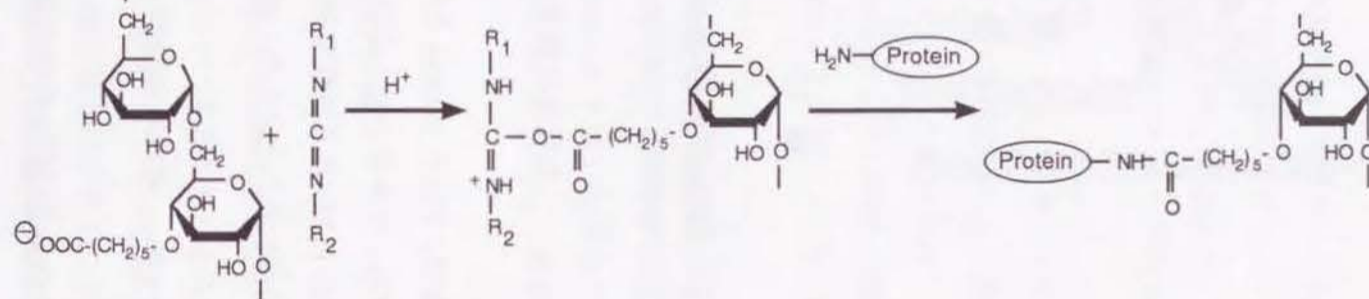
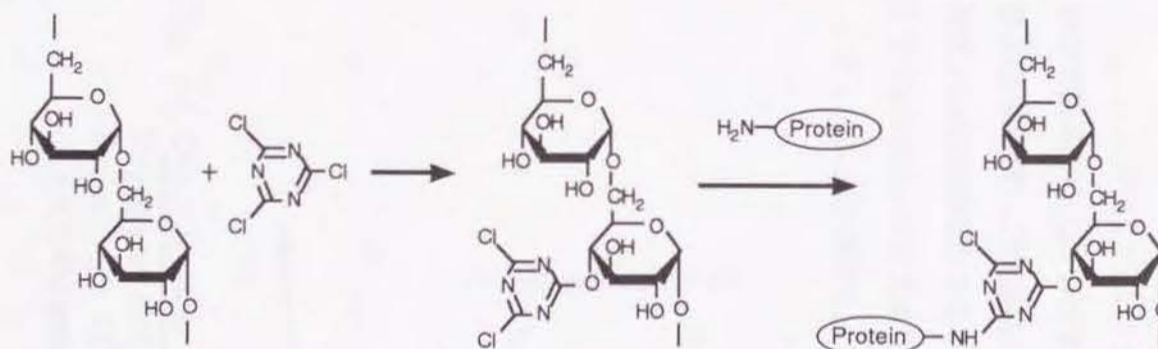
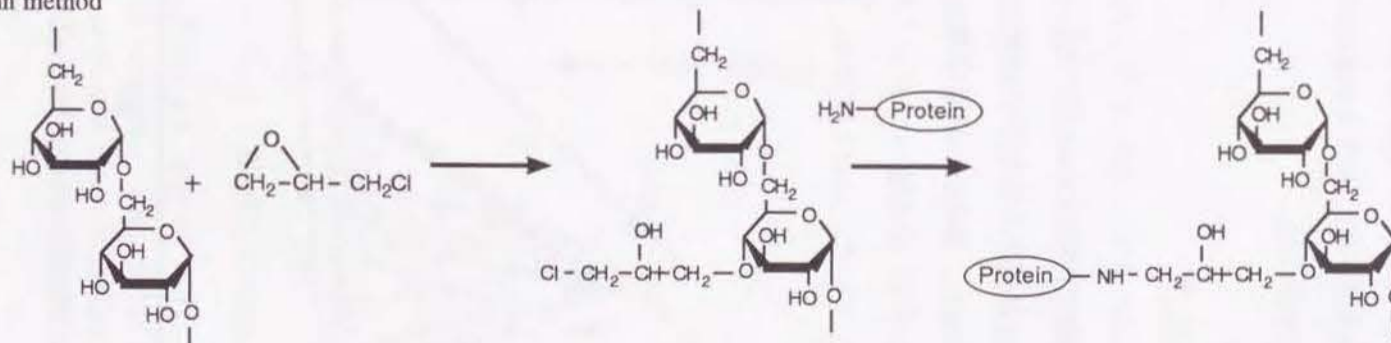


Fig. 23 Schematic diagrams of synthesis procedures of dextran conjugated soybean trypsin inhibitors.

(4) Cyanuric chloride method



(5) Epichlorohydrin method



(6) SPDP method

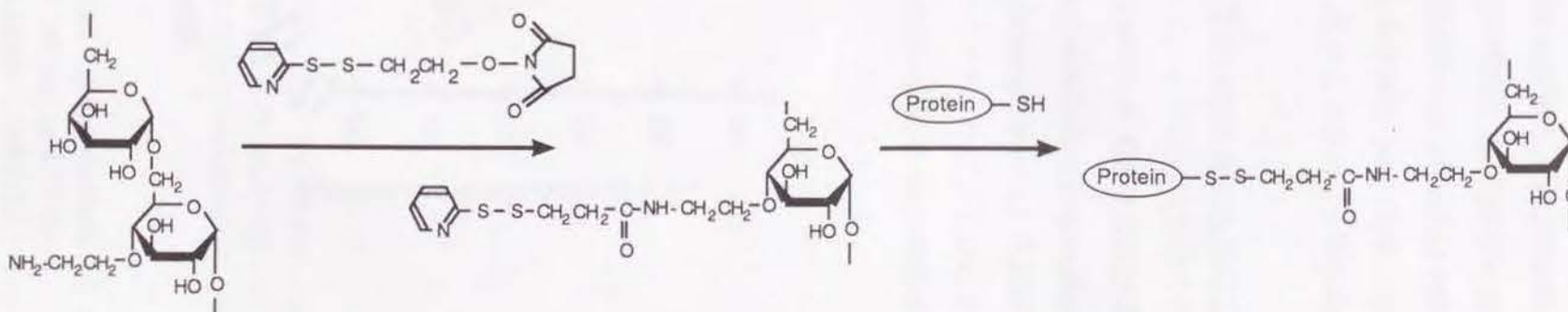


Fig. 23 Schematic diagrams of synthesis procedures of dextran conjugated soybean trypsin inhibitors. (Continued)

動が認められ、過ヨウ素酸酸化法 (95 %) が最も高い収率が得られ、以下臭化シアン法 (48 %)、カルボジイミド法 (34 %)、SPDP法 (15 %)、塩化シアヌル法 (9.4 %)、エピクロルヒドリン法 (7.5 %) の順で収率が低下した。また、TNBS法により算出される STI の遊離 NH₂ 基に結合した dextran 分子の数は 1.5 ~ 4.5 であった。一方、PEG を用いた結合方法 (STI-PEG) の場合、非常に高い合成収率 (96 %) が得られ、STI と PEG との結合比率も 1 : 5.8 と dextran を修飾素材とした場合より高い値が得られた。

STI-D の *in vitro* trypsin 活性の阻害効果

STI-D および STI-PEG の trypsin 阻害活性は Kassel らの方法 (179) に従い、合成基質である benzoylarginine *p*-nitroaniline (BAPA) の加水分解抑制を指標として測定した。未修飾 STI の比活性は約 2.5 units/mg protein であった。Dextran および PEG による化学修飾により、STI の活性は低下したが、エピクロルヒドリン法を除いてタンパク重量あたりの比活性はいずれも未修飾体の 60 % 以上の値を保持していた。しかしながら、異なった修飾法によって得ら

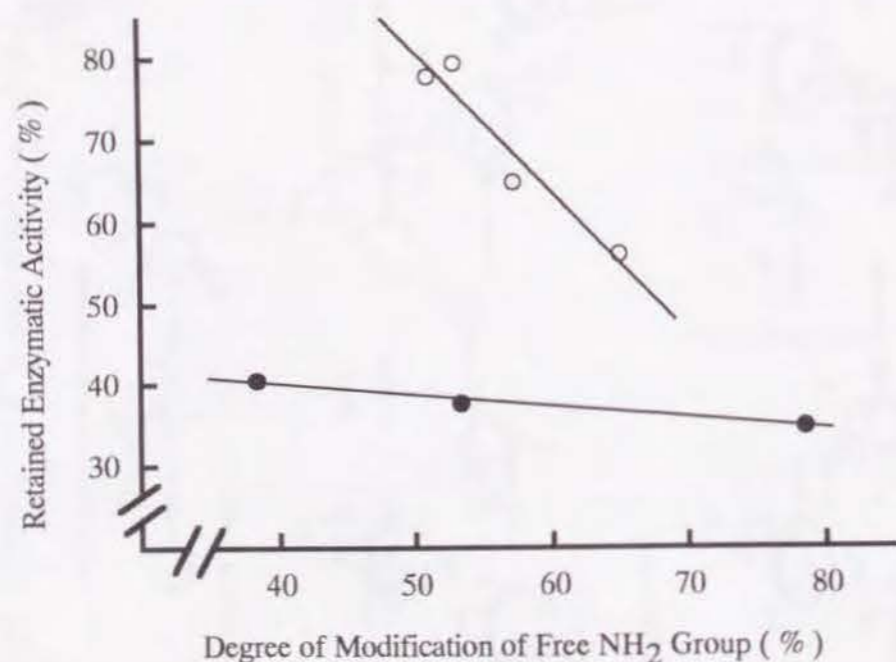


Fig. 24 Relationship between remaining activity of STI and degree of modification in STI-D prepared by periodate oxidation method and STI-PEG. Solid regression lines were fitted by the least-squares method. Key: STI-D, prepared by periodate oxidation method (○), $y = -1.9x + 177$, $r = -0.962$ ($p < 0.05$); STI-PEG (●), $y = -0.17x + 48$, $r = -0.998$ ($p < 0.05$).

れた STI-D の残存活性と dextran の修飾率との間には有意な相関が認められなかった。Fig. 24 に過ヨウ素酸酸化法により得られた STI-D の dextran 修飾率および PEG 法により得られた STI-PEG の PEG 修飾率と残存活性との相関を示した。過ヨウ素酸酸化法、PEG 法いずれの場合においても修飾率の増加に伴い活性の低下が認められたが、その低下の程度は PEG 法の方が過ヨウ素酸酸化法と比較して大きいものであった。

ゲル濾過クロマトグラフィー

Fig. 25 は STI-D および STI-PEG の Toyopearl HW-60S カラム (2.4 x 65 cm) におけるクロマトグラムを示した。いずれの結合体においても高分子修飾により分子サイズの増大が認められ、未修飾 STI よりも早いフラクションに溶出した。各々の結合体の分子量と Stokes' 半径は、市販の分子量測定マーカーによる検量線から算出し Table 9 にまとめた。

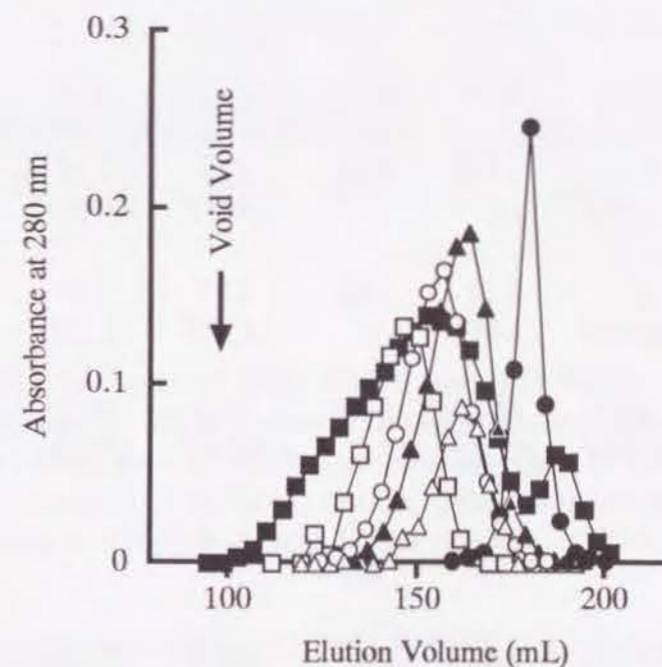


Fig. 25 Gel-filtration profiles of native STI, STI-D and STI-PEG on a Toyopearl HW-60S column. Key: native STI (●); STI-D, periodate oxidation method (○); STI-D, cyanogen bromide method (△); STI-D, cyanuric chloride method (▲); STI-PEG (■).

SDS-PAGE

Fig. 26 には、還元条件下における STI-D、STI-PEG の SDS-PAGE のパターンを示した。未修飾 STI は、その分子量 (20,100) に相当する位置に単一のバンドを示した。結合体は、未修飾 STI と比較して易動度は小さく、また修飾体である dextran や PEG の分子量分布を反映し

たブロードなバンドであった。Table 9にマーカータンパク質より見積った各結合体の分子量範囲をまとめた。さらに、densitometerにより求められた各結合体の最終精製物中の未修飾STI残存率も併せて示した。その結果、エピクロルヒドリン法 (25.7%) および PEG法 (16.7%) に比較的高い未修飾STIの混入が認められた。また、SPDP法により得られた結合体は、還元条件下においてSTIとdextran間のS-S結合が解離するため、Fig. 26ではほぼ全量が遊離STIとして出現した。

Table 9 Composition and physicochemical properties of STI-D and STI-PEG conjugates

	Compound ^a						
	1	2	3	4	5	6	7
Yield, %	95	48	34	9.4	7.5	15	96
STI content, % ^b	47.3 (42.2) ^f	39.7 (37.4) ^f	53.6	11.4 (10.4) ^f	62.2 (46.2) ^f	53.3	17.7 (14.7) ^f
Dextran content, %	52.3	67.4	44.4	94.3	36.8	42.4	
Molar ratio (Dextran:STI) ^c	4.26 (4.55) ^f	6.53 (6.92) ^f	3.03	31.9 (34.8) ^f	2.28 (3.06) ^f	3.06	
Number of modified NH ₂ ^d	4.17 (4.46) ^f	2.31 (2.45) ^f	1.63	3.77 (4.10) ^f	1.14 (1.53) ^f	2.05	4.81 (5.77) ^f
Retained biological activity (% of STI)	65.0 (62.6) ^f	65.5 (67.7) ^f	64.5	63.1 (59.8) ^f	50.2 (33.0) ^f	71.7	45.3 (34.3) ^f
Gel filtration Stokes' radius, Å	42.2	35.5	59.7	32.4			48.4
M _w (x 10 ³)	127	79	309	66			182
Electrophoresis M _w (x 10 ³)	36-121	32-107	>57	26-115	27-108		31-33 >48
Contamination with free STI, % ^e	6.5	5.7		8.1	25.7	93.8	16.7

^a1: STI-D (periodate oxidation method); 2: STI-D (cyanogen bromide method); 3: STI-D (carbodiimide method); 4: STI-D (cyanuric chloride method); 5: STI-D (epichlorhydrin method); 6: STI-D (SPDP method); STI-PEG.

^bContent as expressed as weight percent in the total preparation.

^cValues calculated from STI and dextran contents using molecular weight of 20,000 (STI) and 5,200 (dextran; M_n).

^dValues were determined by TNBS method.

^eValues were determined by densitometric analysis of SDS-PAGE.

^fResults corrected for free STI contamination are shown in parentheses.

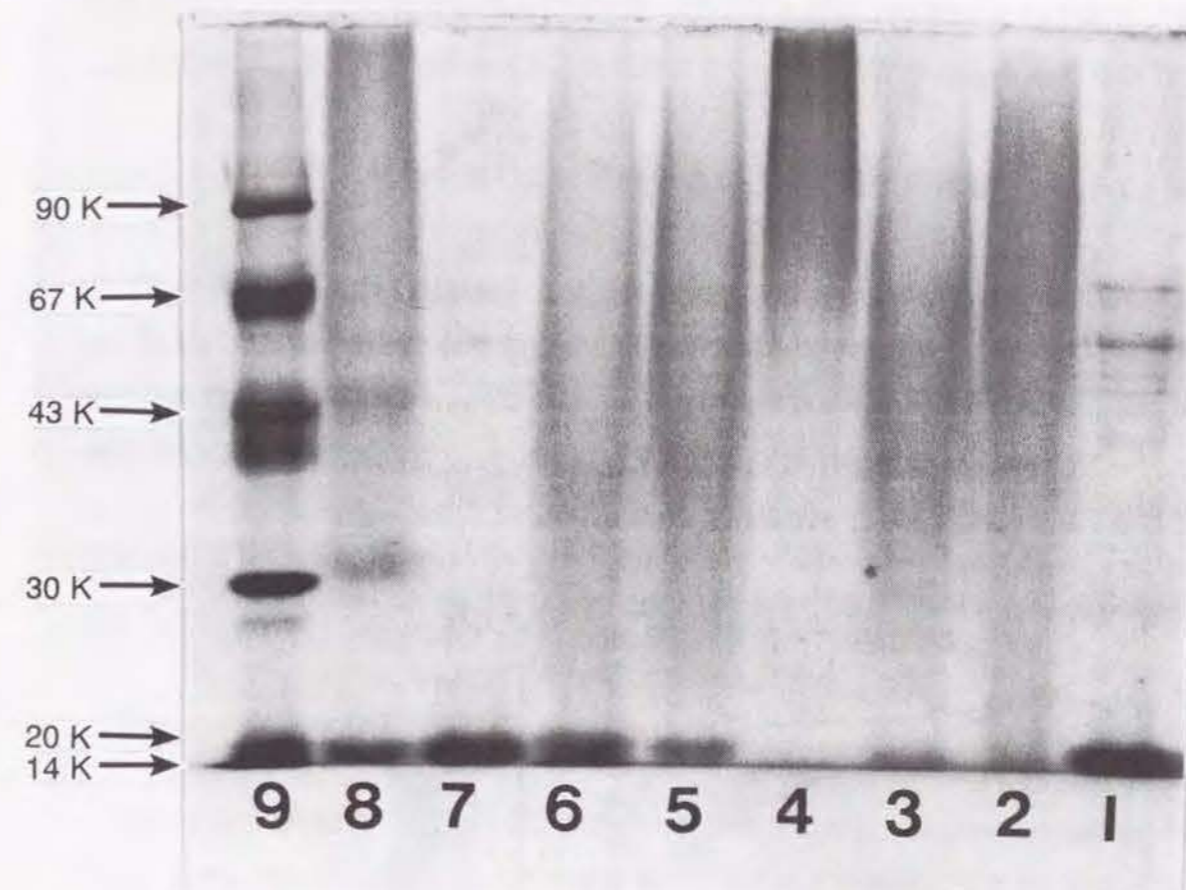


Fig. 26 SDS-PAGE patterns of STI, STI-D and STI-PEG. Key to lanes: Lane 1, native STI; Lane 2, STI-D (periodate oxidation method); Lane 3, STI-D (cyanogen bromide method); Lane 4, STI-D (carbodiimide method); Lane 5, STI-D (cyanuric chloride method); Lane 6, STI-D (epichlorhydrin method); Lane 7, STI-D (SPDP method); Lane 8, STI-PEG; Lane 9, marker proteins.

以上、本節では dextran を修飾素材として種々の合成法により STI に対して化学修飾を施し、得られた STI-D の化学的・物理化学的特性を精査した。その結果、過ヨウ素酸化法を用いた dextran 修飾が STI に関しては最も適当な修飾法であることが示された。そこで、以後過ヨウ素酸化法により STI-D を合成し、その体内動態特性および薬理学的特性を検討することとした。

III-2 STI-D の体内動態特性の検討

前節において STI-D の作成方法として 6 種類の合成法を検討し、過ヨウ素酸化法が

STI-Dの合成に最も適当な手法であることを明らかにした。本節では、過ヨウ素酸化法により合成したSTI-DおよびSTI-PEGを用いて、STIの体内動態特性におよぼす化学修飾の効果をSTIの有するtrypsin阻害活性および放射標識体を用いた放射活性を指標に検討した。

2-a Trypsin阻害活性を指標とした血中動態および尿中排泄

Fig. 27にSTIおよびSTI-D、STI-PEGをマウス尾静脈内投与後1時間までの血中STI活性一時間推移および尿中に回収されたSTI活性を示した。未修飾STIは静脈内投与後速やかに血漿中STI活性が消失し（血中半減期：約2分）、尿中に約60% of doseのSTI活性が認められた。一方、STI-DおよびSTI-PEGは投与後1時間においても血漿中に高いSTI活性を有しており、尿中に回収されたSTI活性も20% of dose以下であった。

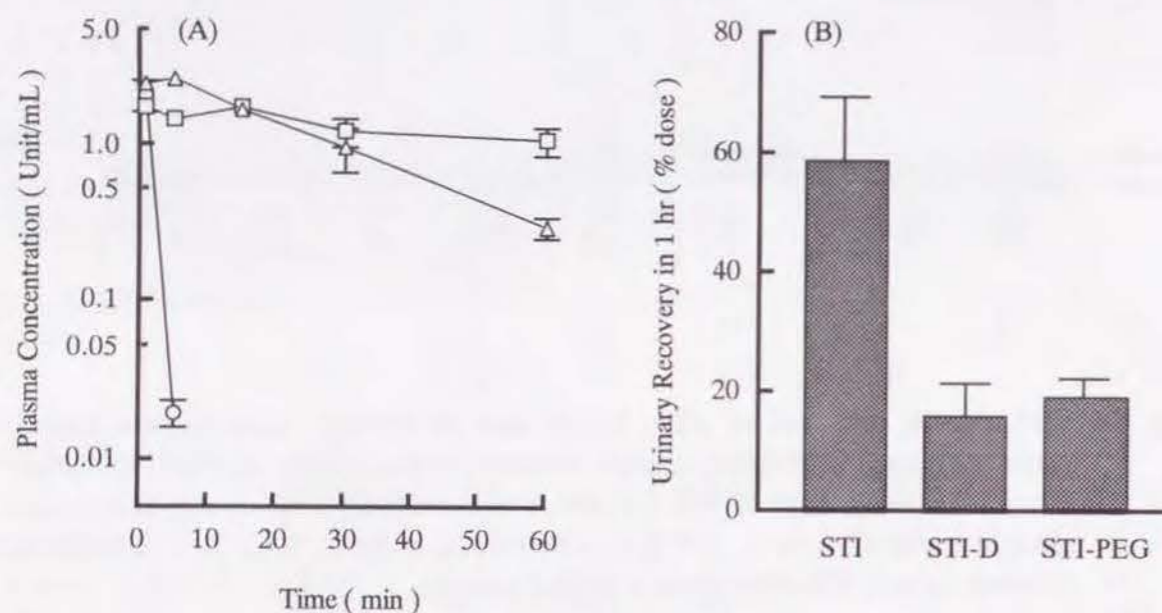


Fig. 27 Plasma concentration (A) and urinary recovery (B) of STI activity after intravenous injection of STI, STI-D and STI-PEG at a dose of 250 units/kg into mice. Key: STI (○); STI-D (△); STI-PEG (□).

2-b 放射活性を指標とした体内動態

STIおよびSTI-PEGに関しては、 ^{111}In で放射標識体を用いて投与量1 mg/kgでマウス尾静脈内投与後の血漿中濃度および臓器分布、尿中排泄量を検討した。Fig. 28にSTIの場合は投与後2時間、STI-PEGの場合は投与後8時間までの血中濃度一時間推移および腎蓄積量一時間推移を示した。2-aにおける検討結果と同様、未修飾STIは投与後速やかに血中から消失するのに対し、STI-PEGは高い血中滞留性を示した。

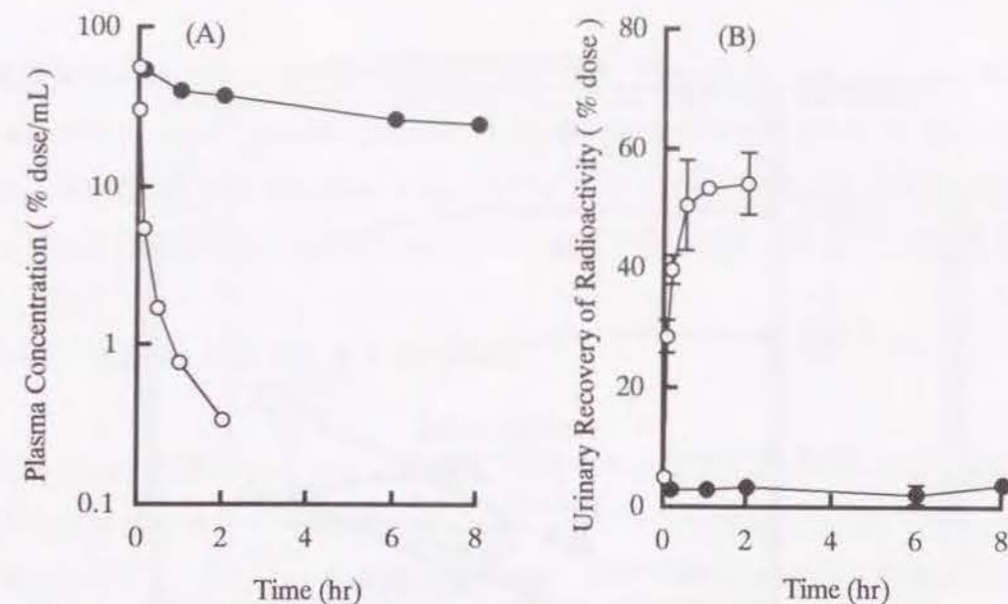


Fig. 28 Plasma concentration (A) and urinary accumulation (B) of radioactivity after intravenous injection of ^{111}In -labeled STI and STI-PEG at a dose of 1.0 mg/kg into mice. Key: STI (○); STI-PEG (●).

3-c 薬動的解析

Fig. 27および30で得られた血漿中濃度一時間推移に対し one-compartment modelあるいはtwo-compartment modelに基づき非線形最小二乗プログラムMULTI (73)を用いて解析し、AUC、 CL_{total} を算出するとともに、投与後各時間における組織中放射活性より第1章と同様の方法により CL_{liver} 、 CL_{urine} 、tissue uptake rate indexを求めTable 10に示した。

Table 10 Pharmacokinetic parameters after intravenous injection of STI and STI-conjugates to mice

	Dose (mg/kg)	AUC (% dose hr/mL)	Clearance ($\mu\text{L/hr}$)			Tissue uptake rate index ($\mu\text{L/hr/g}$)			
			total	urine	liver	liver	kidney	spleen	muscle
STI	0.1	4.64	21,500	17,400	454	671	47,300	146	96.5
	1.0	6.16	16,200	14,200	319	377	36,500	69.0	60.6
	250 ^a	3.09	32,400	19,100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
STI-D	250 ^a	26.1	3,830	683	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
STI-PEG	1.0	1530	65.3	49.1	17.8	15.7	28.7	12.6	1.59
	250 ^a	67.6	1,480	799	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Results are expressed as the mean of 3-5 experiments. n.d.: not determined. a Units for enzymatic assay system are units/kg (2.5 units = 1 mg protein).

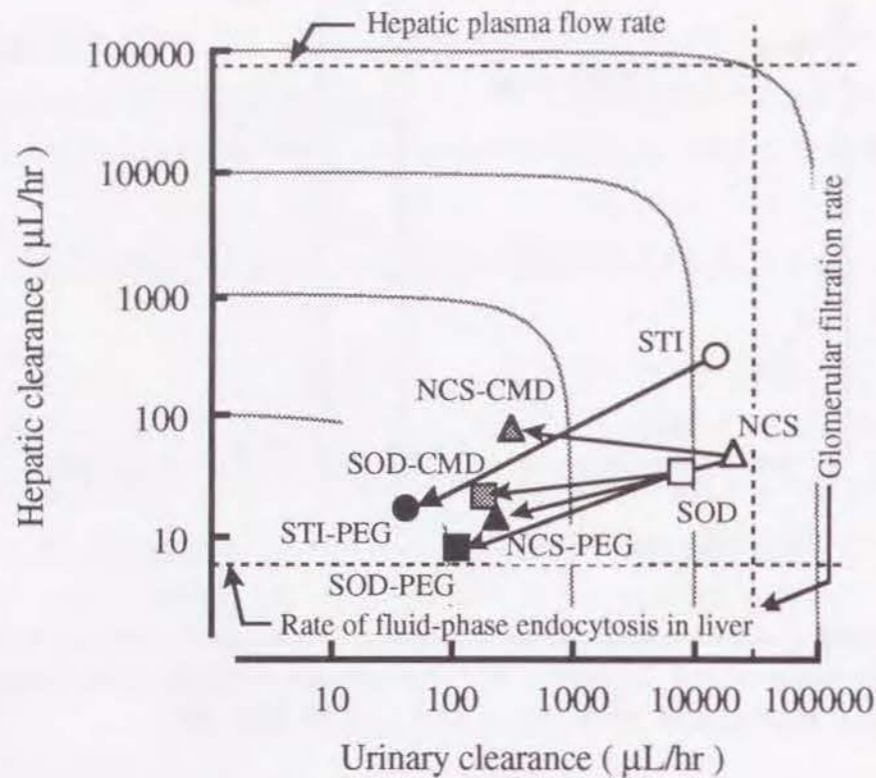


Fig. 29 Hepatic and urinary clearances of ^{111}In -labeled dextran or PEG conjugated STI, soybean trypsin inhibitor and neocarzinostatin. Hepatic plasma flow rate (76), rate of fluid-phase endocytosis of liver (77), and glomerular filtration rate (74) were calculated assuming the weight of a mouse to be 25 g.

未修飾 STI は、STI 活性を指標とした場合、放射活性を指標とした場合のいずれにおいても著しく高い CL_{urine} を示し、また、腎臓における tissue uptake rate index も他の組織と比較し非常に高い値を示した。一方、dextran 修飾および PEG 修飾ともに STI の CL_{urine} を大きく抑制していることが示され、また STI-PEG においては腎臓における tissue uptake rate index も大きく抑制していることから、腎臓における糸球体濾過の抑制が STI-D および STI-PEG の血中滞留性の向上に大きく寄与していることが示唆された (Fig. 29)。こうした、結果は Fig. 29 中にも示すように、neocarzinostatin (Mw: 12,000) や superoxide dismutase (Mw: 32,000) においても認められ、主として糸球体濾過により体内からの消失するタンパク質は PEG 修飾や dextran 修飾によりその血中滞留性を高め得ることが明らかとなった。

III-3 STI-D の薬理効果の検討

前節において dextran 修飾や PEG 修飾による STI の体内動態特性の改善に関して検討した結果、高分子修飾により STI の分子量を大きくすることで腎臓における糸球体濾過を抑制し

血中滞留性を高め得ることが明らかとなった。一方、trypsin は、chymotrypsin や elastase、kallikrein などの serine protease の活性型への変換に重要な役割を果たしていることが知られている。本節では、マウス trypsin ショックモデルおよびラット急性膵炎モデルの trypsin が関与している 2 種類のモデルを用いて、これら高分子修飾 STI の薬理学的特性を評価した。

3-a Trypsin ショックモデルの作成

Fig. 30 に trypsin-induced ショック実験の概要をまとめた (180)。STI およびその高分子修飾体を ICR 系雄性マウスに尾静脈内投与後、1分から5時間後に trypsin (25 mg/kg) を再度尾静脈より投与し、その生死を2時間観察した。また、膵炎治療薬として臨床使用されている低分子性薬物 camostat mesilate および gabexate mesilate についても同様の検討を行い、比較した。

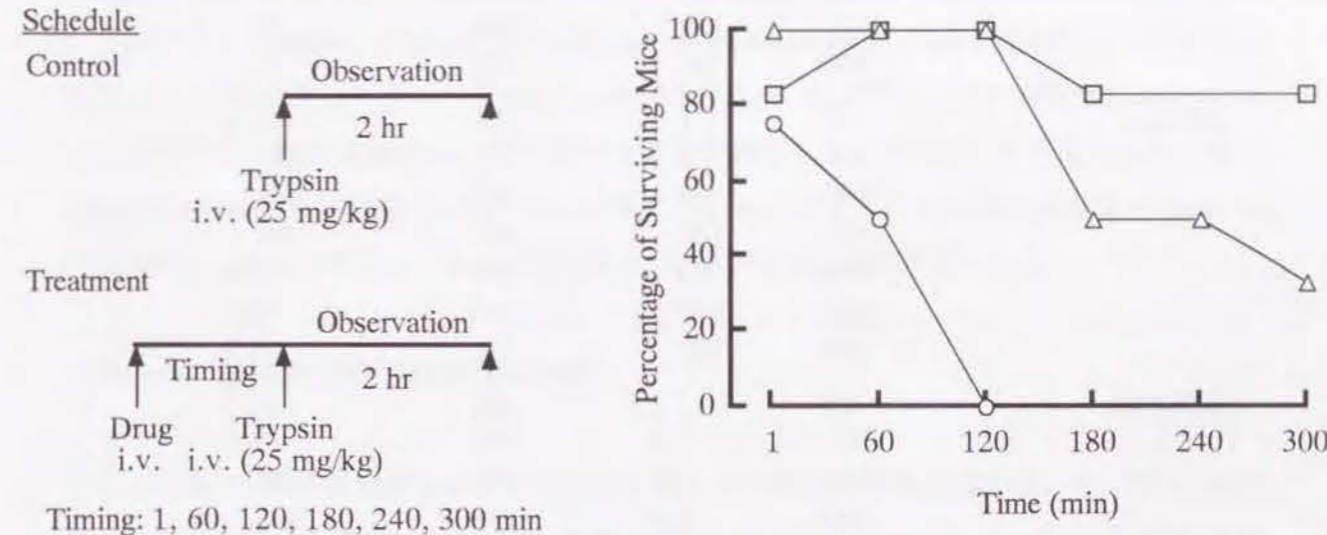


Fig. 30 Experimental procedure and preventive effects of STI, STI-D and STI-PEG on trypsin-induced shock in mice. Key: STI 100 units/kg (○); STI-D 100 units/kg (△); STI-PEG 100 units/kg (□).

3-b Trypsin ショックの治療効果の検討

Trypsin の i.v. 投与によるショック死を指標として STI とその高分子修飾体の *in vivo* 活性を評価した。Fig. 30 および Table 11 に各種 trypsin inhibitor i.v. 後の trypsin ショック抑制効果をまとめた。コントロール群においては、trypsin 投与後のショックにより 12 匹すべてのマウスが死亡した。しかしながら、低投与量の trypsin (15 mg/kg 以下) ではショック死は誘導されなかったが、これは α_2 -macroglobulin のような内因性の inhibitor と trypsin との相互

Table 11 Effects of gabexate mesilate, camostat mesilate, STI, STI-D and STI-PEG on trypsin-induced shock in mice

Drug	Dose ^a	Timing (min) ^b	Number of surviving mice ^c	Surviving ratio (%)
Saline		1	0/12	0
Gabexate mesilate	40	1	0/8	0
	80	1	0/8	0
Camostat mesilate	40	1	2/8	25.0
	60	1	3/8	37.5
	80	1	7/8	87.5
	80	60	0/8	0
	120	1	8/8	100
	120	60	0/8	0
STI	75	1	3/8	37.5
	100	1	6/8	75.0
	100	60	4/8	50.0
	100	120	0/8	0
	100	180	0/8	0
STI-D	75	1	2/6	33.3
	100	1	6/6	100
	100	60	6/6	100
	100	120	6/6	100
	100	180	3/6	50.0
	100	240	3/6	50.0
	100	300	2/6	33.3
STI-PEG	75	1	4/6	66.7
	100	1	5/6	83.3
	100	60	6/6	100
	100	120	6/6	100
	100	180	5/6	83.3
	100	300	5/6	83.3

^aUnits for gabexate mesilate and camostat mesilate are mg/kg; all other doses are expressed as in units/kg. One unit is equivalent to =0.4 mg/kg of STI.

^bInterval between i.v. pretreatment with inhibitors and i.v. injections of trypsin (25 mg/kg).

^cNumber of surviving mice among mice tested at 2 hr after injection of trypsin.

作用によるものと考えられる。一方、25 mg/kg trypsin 投与では、血漿中の内因性 trypsin inhibitors では阻害しきれない過剰の trypsin が serine proteases 前駆体の連続的な活性化を引き起こすため、ショック死に至ったと考えられる。また、gabexate mesilate 前投与群も検討した投与量範囲では、すべてのマウスが死亡した。Camostat mesilate は 80 mg/kg 以上の投与

で、前投与 1 分後における trypsin ショックに対する保護効果が認められた。しかしながら、前投与後 60 分では全く効果が認められず、trypsin 投与ですべてのマウスが死亡した。こうした結果は、低分子性の trypsin inhibitor が循環血中から速やかに消失してしまうためと考えられる。一方、未修飾 STI (100 units/kg) で前処理した群においては、60 分後においても半数のマウスが生存していたが、前投与後 120 分においては全く効果が認められなかった。また、STI-D および STI-PEG 前投与群においては、前投与後 240、300 分においても有意な trypsin ショック抑制効果が認められ、こうした結果は、高分子修飾 STI が i.v. 投与後、優れた血中滞留性を示した実験結果とよく対応していた (Fig. 29 and 30)。

3-c 急性膵炎モデルの作成

急性膵炎モデルは、Fric らの方法 (181) に準じて作成した。すなわち、ラットを開腹後、胆管を肝門部でクランプし、十二指腸内より胆管カニューレーションを施した。カニューレーションを通じて 1 % trypsin 10 μ L と 10 % sodium taurocholate 90 μ L の混液を胆管内に逆流させることにより急性膵炎モデルを作成した。モデル作成後、胆管クランプおよびカニューレーションを取り外し、腹部を縫合後しその生死を 2 日間観察した。治療は、1 % trypsin と 10 % sodium taurocholate の混液を注入する 1 分前に STI および STI-D を大腿静脈より 25 units/kg で投与することにより行い、saline 投与群 (control 群) を比較に用いた。

3-d 急性膵炎の治療効果の検討

Table 12 にラット急性膵炎モデルにおける STI と STI-D の治療効果を示した。Saline を投与したコントロール群においては、急性膵炎のため全例が死亡した。ラットの死因は、剖検により組織学的に膵炎の発症によるものであることを確認した。STI 治療群においては、13

Table 12 Effects of STI and STI-D on the mortality in rats with experimental pancreatitis^a

Drug	Number of rats	Number of rats died			Mortality at 36 hr, %
		0-12 hr	12-24 hr	24-36 hr	
Saline	13	8	0	0	61.5
STI	13	6	1	0	53.8
STI-D	13	3	0	0	23.1 ^b

^a Each compound was injected intravenously at the dose of 25 mg/kg units/kg, 1 min before the intraduodenal injection of trypsin and sodium taurocholate.

^b Significantly different ($p < 0.01$) from that of saline-treated group by χ^2 test.

例中7例が死亡し、コントロール群と比較し有意に生存率が上昇した。一方、STI-D 治療群においてもコントロール群と比較し有意な生存率の上昇が認められたものの STI 投与群との差異は認められなかった。こうした結果は、3-b の場合と同様 STI-D の体内動態特性より説明が可能となる。すなわち STI の血中滞留性を上昇させることにより脾臓における trypsin 阻害活性を亢進させることが可能であり、それにより急性膵炎の発生を発症を抑制し得ることが示唆された。

III-4 考 察

Dextran は血漿増量剤として臨床の場で広く使用されており、その生体適合性は確認されている。Dextran を修飾素材として insulin (182) や hemoglobin (36)、種々の酵素などのタンパク質 (37-41) に対して化学修飾を施し、その熱安定性やタンパク分解酵素に対する抵抗性を高めたり、血中滞留性を高めたりする報告は数多くなされている。しかしながら、こうした検討はいずれも1つの合成方法によって得られた結合体の結果を報告しているにすぎず、異なった修飾法間での結果を比較した報告はない。本研究では、STI をモデルタンパク質として6種類の修飾方法により dextran 結合体を作成して各修飾方法間の物性の差異を検討した。

STI は Kunitz により大豆より単離された181アミノ酸残基からなる分子量 20,100 のポリペプチドであり (175)、分子内に2ヶ所のジスフィド結合を有している (183, 184)。また、STI は trypsin と 1:1 の安定な複合体を形成することにより trypsin 阻害活性を示し、その活性部位は 63 残基目の Arg と 64 残基目の Ile 間にあることが報告されている (Fig. 22) (185, 186)。本研究では、dextran の結合部位は STI 分子中の遊離の NH_2 基 (すなわち、Lys 残基の $\epsilon\text{-NH}_2$ および N 末端の NH_2) であるため、STI の活性発現に直接的には影響しないと考えられる。

また、本検討においては平均分子量が 10,000 の dextran を用いた。TNBS 法により 1.5~4.5 分子の dextran が STI 分子に結合していることが示され、STI の活性発現様式から考えると dextran との結合により STI の活性が低下したのは、STI に高分子を導入することによる基質との立体障害によるものであると考えられる。しかしながら、未修飾体と比較して 60% 以上の残存 trypsin 阻害活性を有していることから、数分子の dextran 導入後も STI-D 中の活性部位 (63 残基目の Arg および 64 残基目の Ile) は trypsin との複合体を形成するためのスペースを有しているものと考えられる。また、平均分子量 70,000 の dextran を用いて過ヨウ素酸化法により STI-D を合成した場合、低い結合比 (STI : dextran = 1 : 1.24) にもかかわらず、40% の残存活性を保持しているにすぎなかった。以上のことより、dextran を用

いて STI を化学修飾する際には平均分子量が 10,000 程度の比較的分子量の小さなものを用いることが望ましいと考えられる。

今回検討した修飾法では過ヨウ素酸化法が最も dextran との結合比が高く (4.6 : 1)、また高い収率 (95%) が得られた。また、この方法は簡便であり、比較的緩和な反応条件下で結合体を得ることができるため、STI-D の合成には最も適当な合成法であると考えられる。

一方、ゲル濾過および SDS-PAGE 双方実験系において STI-D はブロードな分子量分布を示した (Figs. 27 and 28)。これは、STI に結合する dextran の分子数が各々の結合体で異なっていること、さらには dextran 自身が有する分子量分布に起因するものと考えられる。また、カルボジイミド法により得られた STI-D は dextran の修飾率が低い (STI : dextran = 1 : 1.6) にもかかわらず、高分子量領域にゲル濾過のピークおよび SDS-PAGE のバンドが認められた。この結果は、STI-D が dextran を介して分子間で crosslink している可能性を示唆すると考えられる。

PEG は生理活性ペプチドの化学修飾素材として広範に使用されており、こうした薬物の免疫原性の低下や血中滞留性の亢進に対して非常に有用であることが報告されている (51-55, 148-153)。著者の検討においても、活性化 PEG を用いることにより高い収率 (96%) および結合比で STI-PEG を得ることができた。その結果、分子サイズの大きな STI-PEG を得ることができたが、trypsin 活性の阻害活性は STI-D と比較し大きく減少した (Table 9 and Fig. 24)。活性化 PEG はトリアジン環を介して平均分子量 5,000 の PEG 鎖が2本結合した構造を有しており、タンパク質との結合部位はトリアジン環が有する塩素原子に限られている。一方、dextran の場合、種々の方法で活性化された dextran 分子中のすべての glucose 残基が結合部位となり得るため結合部位を特定することができない。活性化 PEG と dextran 間の結合様式の差異が、各々の STI 結合体の活性低下の程度の差異を反映しているひとつの原因であると考えられる。また、PEG 構造中の $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-$ の繰り返し構造の酸素原子に2~3分子の水が配位することが報告されており、このことが STI-PEG の分子サイズを大きくし trypsin との複合体形成を抑制していることも考えられる。

In vivo マウス静脈内投与実験の結果、dextran 修飾により STI の尿中排泄を抑制し、血中滞留性を大きく延長させることが明らかとなった。こうした結果は、高分子物質の分子サイズが糸球体濾過において重要な因子であることを示すものであり、高分子修飾により糸球体毛細血管の透過性が抑制されたためと考えられる。糸球体濾過においては、分子半径が 20 Å 以下の dextran は立体的な障害を受けることなく糸球体膜を透過するが、42 Å 以上では著しい障壁となりほとんど糸球体濾過を受けなくなる (78-81)。本検討で用いられた STI、STI-D の分子半径はゲル濾過クロマトグラフィーによりそれぞれ 18.8 Å、42.2 Å と見積られ

ることから、STI は inulin の糸球体濾過速度と同程度の速度で尿中に排泄され、STI-D はその分子サイズから糸球体濾過が大きく抑制されることが明らかとなった (Table 10)。また、STI-PEG は、STI-D と比較して血中滞留性や治療効果が若干高いものであったが、これは今回の検討に用いた STI-PEG の分子量 (182,000) が、STI-D の分子量 (127,000) よりも大きいこと、および修飾素材として用いた dextran が PEG と比較して肝臓等の細網内皮系の組織に取り込まれ易いことによるものと考えられる。しかしながら、STI-D は STI-PEG より STI の活性を大きく損なわずに合成可能であることから、同活性量を i.v. 投与する場合、STI-D は STI-PEG の数分の 1 の重量しか必要としないという利点がある。これは、大量の高分子の静脈内投与が血中のコロイド浸透圧などの生理的条件や体内動態特性に影響をおよぼす可能性があることから大きな利点であると考えられる。

抗原性・免疫原性はタンパク質医薬品の臨床適用を考えるうえでもっとも大きな問題のひとつであるが、こうした問題も高分子修飾により克服できる可能性がある。そこで、Freund's complete adjuvant を用いて STI と STI-D をウサギに感作したが、有意な抗体活性をもつ抗血清を得ることができなかった。Wileman らは、*Erwinia carotovora* から単離した asparaginase の抗原性が dextran 修飾により低下することを報告している (38)。同様の結果を著者も uricase-dextran 結合体に関して得ており、詳細は第 IV 章で論述する。

第 IV 章 高分子修飾によるウリカーゼの体内動態制御と免疫学的特性の改善

前章において、分子量が 20,100 で静脈内投与後の消失経路が主として腎糸球体濾過である STI をモデルタンパク質として選択し、体内動態特性および急性膵炎治療における dextran 修飾の効果を検討した。主な消失経路が糸球体濾過であるタンパク質の場合、これらの血中滞留性を増大させるためには糸球体濾過の抑制がポイントであり、前述したように dextran および PEG で化学修飾を施し分子サイズを増大させることにより血中濃度の持続化が得られ、この結果に対応して STI-D、STI-PEG では未修飾 STI と比較して急性膵炎モデルに対して有意な治療効果の増強が認められた。

本章では、高分子量で肝臓への取り込みが主たる消失経路である uricase (UC) に対して dextran を修飾素材として化学修飾を施し、まず UC-dextran 結合体の抗原性・免疫原性に関して検討を加えた (187)。さらに、第 I 章で検討した電荷の異なる dextran 誘導体を修飾素材として用いて化学修飾を施し、物性の異なる修飾素材による UC-dextran 結合体の体内動態特性に関して詳細に検討した (188, 189)。

IV—1 UC-dextran conjugates の合成とその物理化学的・免疫学的特性

Uricase (urate:oxygen oxidoreductase, EC 1.7.3.3.: UC) は、尿酸から allantoin への変換を触媒する肝 peroxisome 酵素であり、分子量 128,000 の homotetramer である (190)。本節では、第 III 章第 1 節と同様、まず dextran を修飾素材として種々の合成方法により UC-dextran 結合体 (UC-D) を作成しその物理化学的性質を検討した。

1— a UC-D の合成

UC-D の合成においても STI-D 同様に最も適当な合成法の検討を行った。修飾方法としては、過ヨウ素酸酸化法 (37, 171) および臭化シアン法 (172)、カルボジイミド法 (173)、塩化シアヌル法 (176) の 4 種類を選択し、また比較のため PEG 修飾体も合成した。Dextran は通常平均分子量 10,00 (T-10) のものを用いたが、平均分子量 70,000 の dextran (T-70) を用いた検討も一部行った。Fig. 31 に過ヨウ素酸酸化法により合成した UC-D の dextran 修飾率と UC の残存酵素活性の相関を示した。修飾率は UC と、dextran もしくは PEG との反応モル比を変化させることにより調節した。UC-D および UC-PEG の残存活性は修飾率の増加に比

例して減少した。他の合成法により作成した UC-D においても、過ヨウ素酸酸化法により合成した UC-D の場合と基本的にはほぼ同様な相関関係が得られた。以上の検討より、過ヨウ素酸酸化法が残存活性・再現性の面から最も適当であり、合成面からも簡便であることから、以降の検討には過ヨウ素酸酸化法により合成した UC-D を用いることとした。また、Fig. 31 に示すように dextran 修飾の方が、PEG 修飾と比較して若干高い残存活性を保持していた。

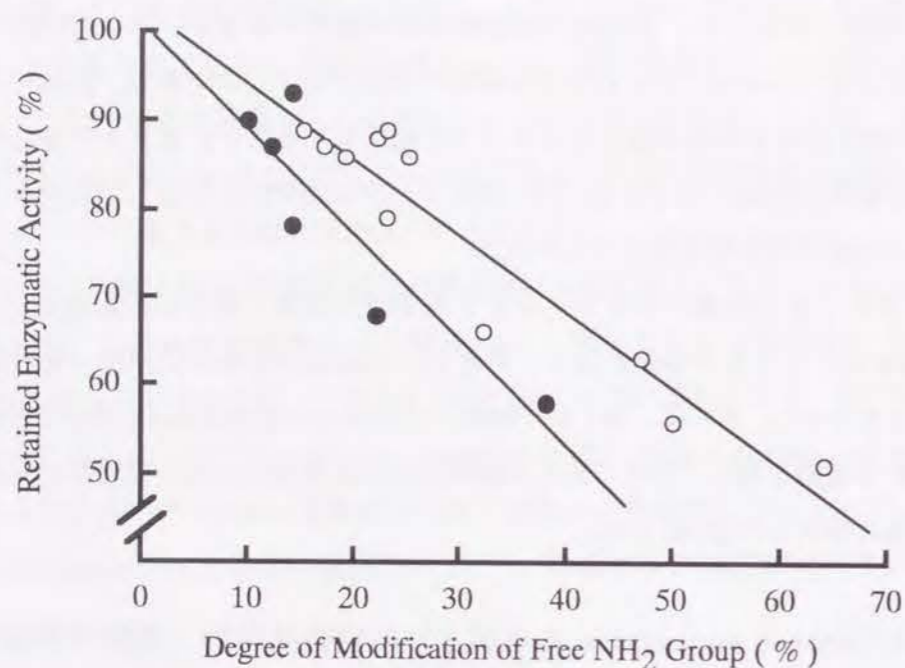


Fig. 31 Relationship between the percentage of amino-groups modified with dextran (T-10) or PEG and the percentage of remaining enzymatic activity in comparison with native UC. Solid regression lines were fitted by the least-squares method. Key: UC-D, prepared by periodate oxidation method (○), $y = -0.862x + 102.1$ ($r = -0.913$); UC-PEG (●), $y = -1.119x + 100.8$ ($r = -0.907$).

1—b UC-D の免疫学的特性に関する検討

UC および UC-D (T-10) に対する抗血清は、雄性日本白色家兎に対して 3 mg の UC もしくは UC-D (T-10) を 2 週間毎に 1 か月間感作することにより作成した。得られた血清の IgG および IgM に関して ring test により検討した。Table 13、14 に ring test により得られた UC、UC-D、UC-PEG に関する免疫原性・抗原性評価の結果を示す。抗 UC-D 抗体産生能（免疫原性）および UC の抗 UC 抗血清に対する反応性（抗原性）双方とも、dextran 修飾により抑制が認められた。抗原性に関しては、平均分子量が 70,000 の dextran で修飾することにより、さらに低下する傾向が示された。PEG 修飾によっても UC の抗原性は、UC-D (T-70) と同程度にまで低下することが明らかとなった。

Table 13 Effect of chemical modification of uricase with dextran (T-10) on an antibody production in rabbits

Antiserum	Test antigen	Ring test titers		
		Primary	Secondary	Tertiary
Anti-UC	UC	2	64	128
Anti-UC-D (T-10, 50%)	UC-D (T-10, 50%)	1	16	32

Each pair of rabbits received UC or UC-D immunization with complete Freund's adjuvant on day 0 and with incomplete Freund's adjuvant on day 14 and 28. The primary, secondary and tertiary responses were assayed 10 days after each antigen injection. Numbers in parentheses indicate the molar weight of dextran (T-10, Mw: 10,000) attached to uricase and the percentage of amino groups modified by dextran.

Table 14 Results of ring test for UC, UC-D and UC-PEG against antisera to UC and UC-D

Antiserum	Test antigen	Ring test titers
Anti-UC	UC	128
	UC-D (T-10, 50%)	64
	UC-D (T-70, 60%)	32
	UC-PEG (10,000, 38%)	32
Anti-UC-D (T-10, 50%)	UC	64
	UC-D (T-10, 50%)	32
	UC-D (T-70, 60%)	16

The molecular weight of dextran (T-10, Mw: 10,000; T-70, Mw: 70,000) and PEG (Mw: 10,000) attached to uricase and the percentage of amino groups modified by dextran and polyethylene glycol are indicated in parentheses.

1—c UC-D の安定性に関する検討

Fig. 32 に trypsin 溶液中 (5 mg/mL) における UC および UC-D の残存酵素活性—時間推移を示した。未修飾 UC は、速やかな酵素活性の低下が認められた。また、平均分子量 10,000 の dextran で修飾した UC-D (T-10) も未修飾 UC とほぼ同様の酵素活性—時間推移を示した。一方、平均分子量 70,000 の dextran で修飾した UC-D (T-70) においては、5 時間後においても 30% 以上の酵素活性を有していた。同様の結果が UC-PEG においても得られ、したがって、trypsin による UC の酵素分解に対する抵抗性は高分子量の dextran 修飾もしくは PEG 修飾によって高まることが明らかとなった。

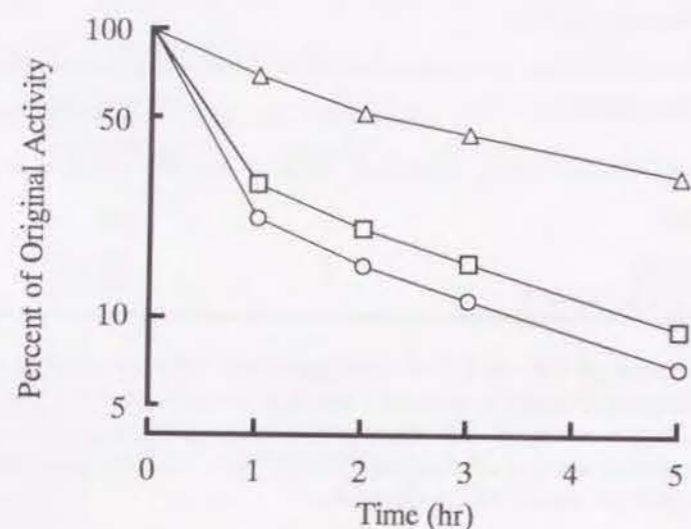


Fig. 32 Effects of chemical modification with dextran on the stability of UC in trypsin solution. Key: native UC (○); UC-D (T-10) (□); UC-D (T-70) (△).

また、ラット血漿中では UC、UC-D、UC-PEG いずれにおいても安定であり、24 時間インキュベーション後においても 90 % 以上の酵素活性を維持していた。

IV-2 ラット静脈内投与後の血中動態の検討

以上において、UC-D の物理化学的・免疫学的特性を整理することができた。そこで、これらの生体内動態が未修飾 UC と比較して dextran 修飾、PEG 修飾によりどのように変化するかを明らかにするため、基本的な全身投与時の体内動態をラットを用いて検討した。

2-a 血中動態

Fig. 33 はラット静脈内投与後の各種 UC 誘導体の血漿中 UC 活性濃度-時間曲線を示したものである。検討した 4 種類、すなわち UC、UC-D (T-10、T-70)、UC-PEG いずれの場合においても、静脈内投与後の血漿中 UC 活性はほぼ一次速度式に従って減少した。

UC は静脈内投与後速やかに血漿中より消失し、その濃度は投与 2 時間以降では検出限界以下となった。一方、高分子修飾により UC の血中滞留性は有意に延長したが、検討した 3 種の高分子修飾体間には差が認められなかった。

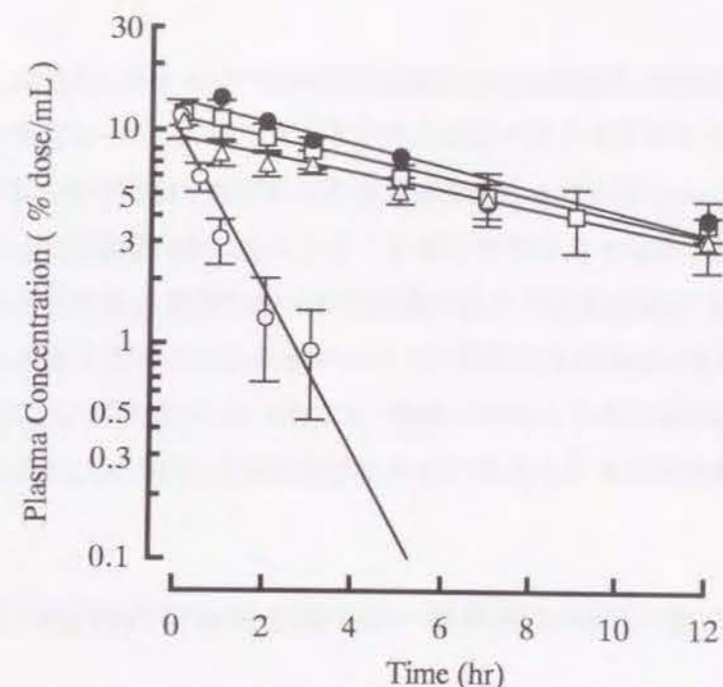


Fig. 33 Plasma UC activity-time profiles after intravenous injection of UC, UC-D and UC-PEG into rats. Key: UC (○); UC-D (T-10) with amino-group modification extent of 26 % (□); UC-D (T-70) with amino-group modification extent of 34 % (△); UC-PEG with amino-group modification extent of 24 % (●). Results are expressed as the mean±S.D. of 3-5 rats.

2-b 薬動学的解析

Fig. 33 で得られた血漿中濃度に対し one-compartment model に基づき非線形最小二乗法プログラム MULTI (73) を用いて解析し、血漿中濃度-時間曲線下面積 AUC、および全身クリアランス CL、定常状態分布容積 Vd、消失速度定数 kel、消失半減期 T_{1/2} を算出した結果を Table 15 に示した。

Table 15 Pharmacokinetic parameters after intravenous injection of UC and UC-conjugates to rats

Compound	AUC (% dose hr/mL)	CL (mL/hr)	Vd (mL)	kel (1/hr)	T _{1/2} (hr)
UC	11.5±2.26	9.08±2.06	10.1±1.66	0.91±0.18	0.80±0.17
UC-D (T-10)	110±24.5	0.96±0.23	8.83±1.16	0.11±0.02	6.56±1.05
UC-D (T-70)	102±15.5	1.01±0.15	10.8±1.09	0.09±0.02	7.67±1.39
UC-PEG	134±20.5	0.77±0.13	7.66±0.43	0.10±0.02	7.16±1.37

Results are expressed as the mean±SD of 3-5 rats.

AUCは高分子修飾により未修飾 UC と比較して約 10 倍大きくなったが、UC-D (T-10)、UC-D (T-70)、UC-PEG 間で有意な差は認められなかった。また、Vd はいずれの薬物においても約 10 mL であり、この値はラットの全血漿容積の文献値とほぼ一致していた (76)。UC およびその高分子修飾体がラット血漿中で安定であること、Vd 値間にほとんど差が認められないことから、AUC の増加すなわち血中滞留性の向上は循環血液中からの消失過程と関連するものと考えられる。UC の分子量が 128,000 であることを考慮すると糸球体濾過による尿中排泄の寄与はほぼ無視することができることから、高分子修飾により何らかの不可逆的な取り込み過程 (細網内皮系による取り込み) が抑制され AUC 値の上昇が起こったものと考えられる。

IV-3 電荷の異なる dextran 誘導体-UC 結合体の体内動態に関する検討

第 1 章において、物理化学的特性の異なる dextran 誘導体の体内動態特性についてマウス全身投与と実験系を用いて検討し、電荷や分子サイズなどの物理化学的特性が高分子の体内動態を決定する主要因であることを明らかにした。本節においては電荷の異なる 3 種の dextran 誘導体を UC に対する高分子修飾素材として用い、修飾素材間の物性の差異による UC の体内分布特性の制御の可能性について検討した。

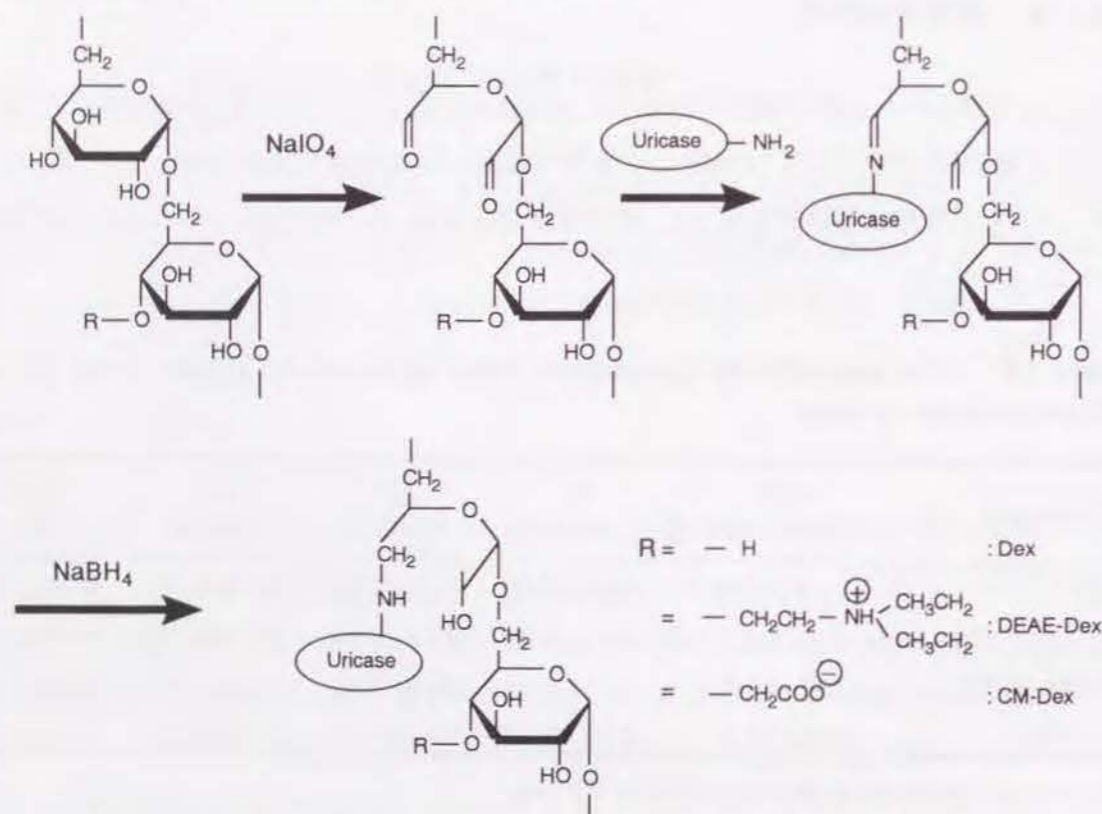


Fig. 34 Schematic diagrams of synthetic procedures of dextran derivatives conjugated uricase using periodate oxidation method

3-a Dextran 誘導体-UC 結合体の合成とその物理化学的特性

Dextran は平均分子量約 10,000 のものを用い、電荷の異なる dextran 誘導体として正電荷を付与した DEAE-dextran (DEAED)、弱い負電荷を有する CM-dextran (CMD) の 2 種類の dextran 誘導体を合成した。UC 誘導体の合成は過ヨウ素酸酸化法 (37, 171) により行った (Fig. 34)。Table 16 に以下の検討に用いた UC-D 誘導体の物理化学的性質をまとめた。いずれの UC-D 誘導体も未修飾 UC と比較して非常に大きな分子量を有しており、また dextran 誘導体の物性に対応した電気化学的性質を示すことが、イオン交換樹脂への吸着性 (72) から確認された。

Table 16 Physicochemical properties of UC and UC-conjugates tested in this study

Compound	Percent of modified NH ₂ ^a	Apparent molecular weight	Retained enzymatic activity (% original)	Electric charge at pH 7.4
UC	0	130,000	100	negative
UC-D	24.0	684,000	41	negative
UC-DEAED	16.1	442,000	54	positive
UC-CMD	7.0	544,000	80	negative
UC-PEG	22.0	500,000	68	negative

a The number of amino group was determined by TNBS method and that of native UC was 98.

3-b 全身投与時の体内動態

各修飾体の体内動態特性は ¹¹¹In により放射標識したものを用いて検討した。Fig. 35 に、各種 UC-D 誘導体のマウス静脈内投与後 24 時間までの血漿中濃度推移を示した。いずれの UC 誘導体においても、血漿中濃度曲線は二相性の消失パターンを示した。未修飾 UC の循環血液中からの消失は比較的穏やかであった。これに対し、電気的に中性の dextran で修飾した UC-D は血中からの速やかな消失が認められ、さらに正電荷をもつ DEAED で修飾した場合には一層早い消失が観察された。一方、UC-CMD では高い血中濃度の持続が認められ、弱い負電荷を有する CMD 修飾により UC の血中滞留性が大きく改善されることが示された。また、比較のため用いた PEG 修飾体 (UC-PEG) は UC-CMD 以上の高い血中滞留性を示した。

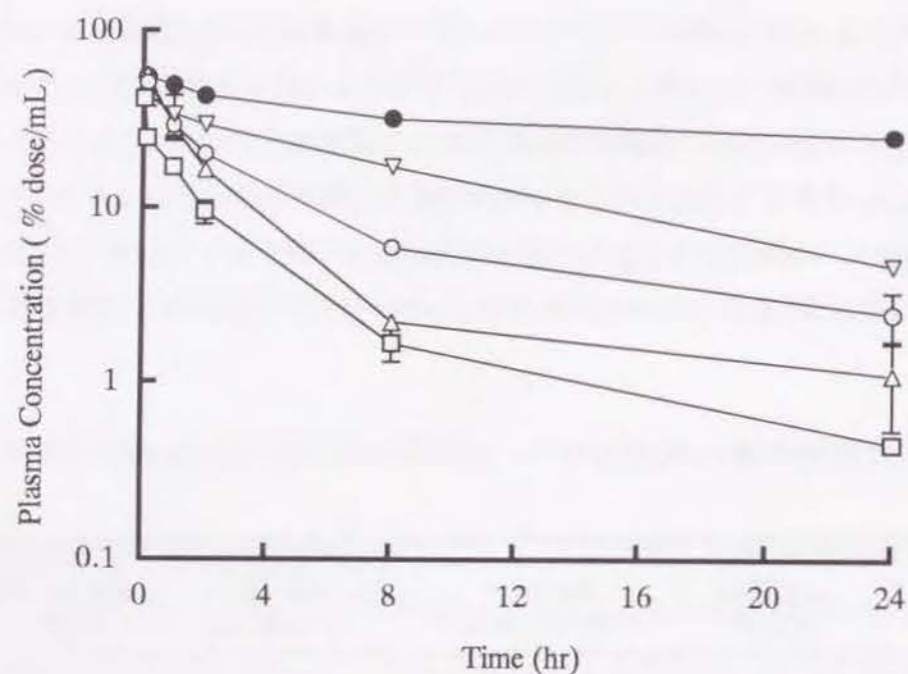


Fig. 35 Plasma concentration of radioactivity after intravenous injection of ^{111}In -labeled UC and its conjugates into mice. Key: UC (○); UC-D (△); UC-DEAED (□); UC-CMD (▽); UC-PEG (●). Results are expressed as the mean \pm S.D. of four mice.

Fig. 36 に ^{111}In 標識した UC 誘導体の静脈内投与後 24 時間までの腎臓および脾臓、肝臓、肺、筋肉における組織内放射濃度を示した。[^{111}In]UC は静脈内投与後、徐々に血漿中から消失し (Fig. 35)、肝臓および脾臓、腎臓中の放射活性の蓄積が認められた (Fig. 36A)。[^{111}In]UC-D は投与後速やかに血中より消失し、肝臓・脾臓中への著しい放射活性の蓄積が認められた (Fig. 36B)。[^{111}In]UC-D と [^{111}In]UC-DEAED においては血漿中濃度がほとんど消失した投与後 8 時間においても、肝臓・脾臓の放射濃度の上昇が認められたが、こうした結果は組織重量の減少によるものであり投与後 24 時間における肝臓・脾臓中の総放射活性は投与後 8 時間における値とほぼ等しかった。[^{111}In]UC-DEAED は投与後速やかに血漿中から消失し、肝臓への顕著な蓄積が認められた (Fig. 36C)。一方、CMD、PEG 修飾双方とも UC の組織移行性を抑制し (Figs. 38D and 38E)、この現象が [^{111}In]UC-CMD および [^{111}In]UC-PEG の静脈内投与後の高い血中滞留性 (Fig. 35) の賦与に参与していることが示唆された。特に [^{111}In]UC-PEG においては肝臓・脾臓に代表される細網内皮系組織への取り込みが顕著に抑制されており、PEG の有する細網内皮系組織による異物認識機構を大きく低下させる特性を反映したものであると考えられる。

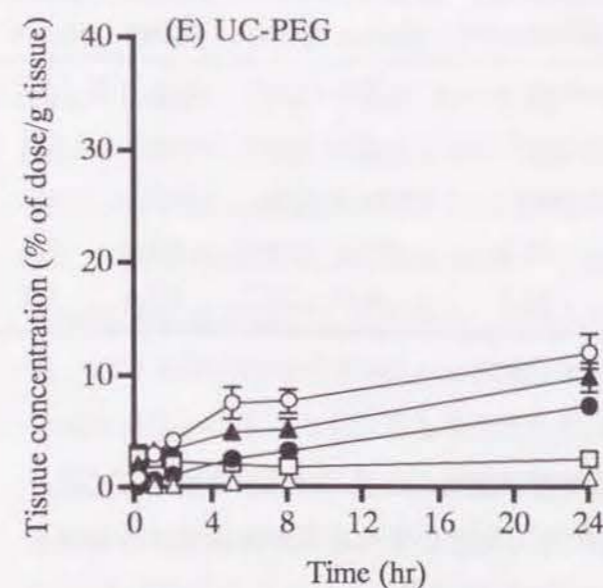
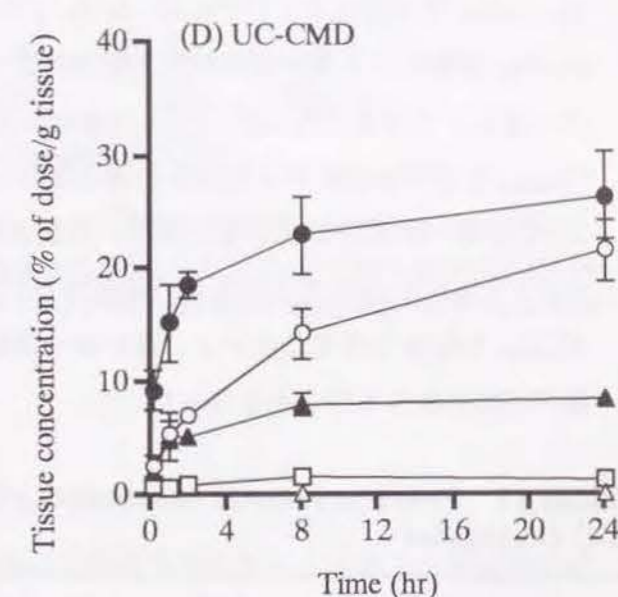
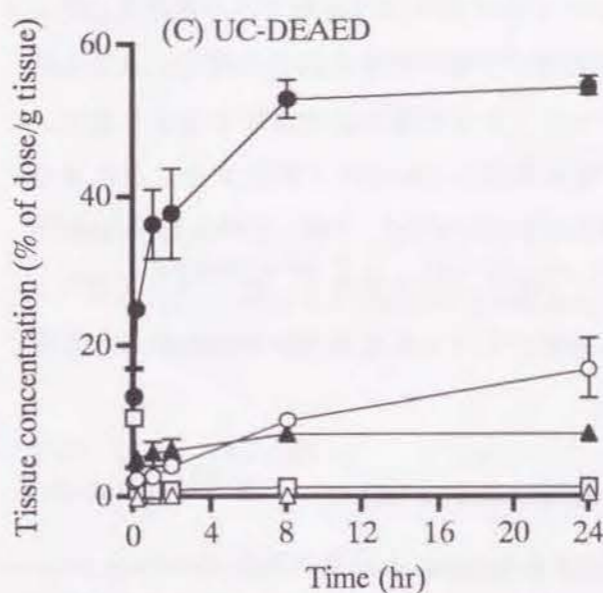
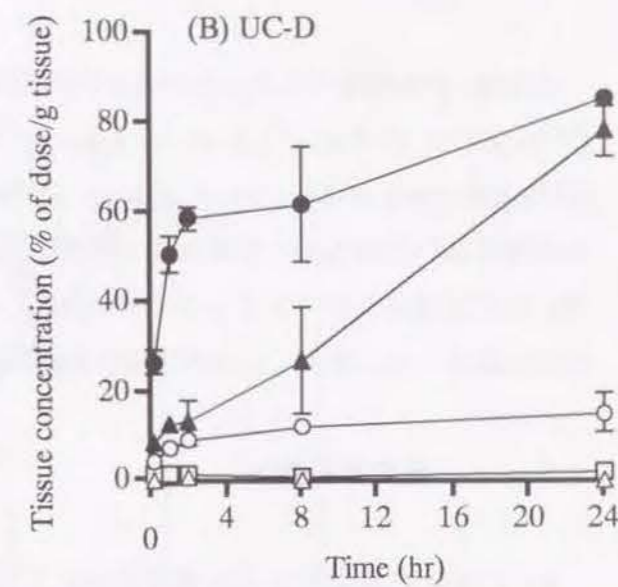
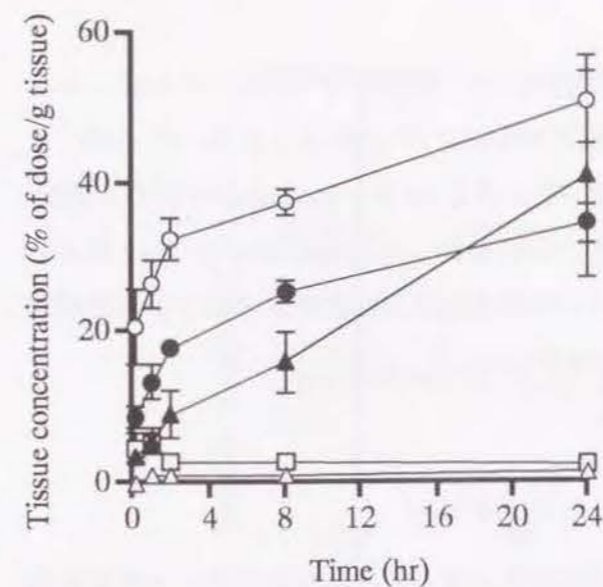


Fig. 36 Tissue distribution profiles of radioactivity after intravenous injection of ^{111}In -labeled (A) UC, (B) UC-D, (C) UC-DEAED, (D) UC-CMD and (E) UC-PEG into mice. Key: kidney (○); spleen (▲); liver (●); lung (□); heart (△). Results are expressed as the mean \pm S.D. of four mice.

投与後 24 時間までに尿中に回収された総放射活性は、 $[^{111}\text{In}]$ UC が 7.6 ± 1.0 % of dose、 $[^{111}\text{In}]$ UC-D が 7.4 ± 1.0 % of dose、 $[^{111}\text{In}]$ UC-DEAED が 8.0 ± 1.1 % of dose、 $[^{111}\text{In}]$ UC-CMD が 6.9 ± 0.8 % of dose、 $[^{111}\text{In}]$ UC-PEG が 1.4 ± 0.1 % of dose であり、PEG 修飾を除いては各 UC 誘導体間で有意な差は認められなかった。Sephadex G-75 カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーの結果、尿中の放射活性は UC 誘導体の低分子代謝画分のみ認められ、また UC の酵素活性も検出されなかった。

3-c 薬動的解析

各 $[^{111}\text{In}]$ UC 誘導体の血中濃度曲線および組織中放射活性より薬動的パラメータを算出し、Table 17 に示した。 $[^{111}\text{In}]$ UC-D は、 $[^{111}\text{In}]$ UC の約 3 倍大きな肝取り込み速度をもち、dextran 修飾による血中からの消失促進の主たる原因が肝臓への取り込みの増大によるものであることが示された。 $[^{111}\text{In}]$ UC-DEAED はさらに大きな肝取り込み速度を示すと共に、 CL_{urine} も $[^{111}\text{In}]$ UC の 5 倍以上の値となり、正電荷を持つ DEAED で修飾することにより UC の肝臓への移行および尿中排泄が促進されることが示された。一方、 $[^{111}\text{In}]$ UC-CMD および $[^{111}\text{In}]$ UC-PEG の肝取り込み速度は $[^{111}\text{In}]$ UC のそれぞれ 3 分の 1、12 分の 1 であり、 CL_{urine} も抑制されることから、高い血中濃度の維持がこうした現象で説明されることが薬動的観点からも明らかとなった。

Table 17 Pharmacokinetic parameters after intravenous injection of ^{111}In -labeled UC conjugates

Compound	charge	AUC (% of dose* hr/mL)	Clearance ($\mu\text{L/hr}$)		Tissue uptake rate index ($\mu\text{L/hr}$)			
			CL_{total}	CL_{urine}	liver	spleen	kidney	muscle
$[^{111}\text{In}]$ UC	-	172	582	69.5	203	241	300	10.6
$[^{111}\text{In}]$ UC-D	-	114	881	102	753	687	113	4.5
$[^{111}\text{In}]$ UC-DEAED	+	55.8	1,790	386	979	153	305	8.4
$[^{111}\text{In}]$ UC-CMD	-	425	235	45.3	77.2	24.8	63.1	0.8
$[^{111}\text{In}]$ UC-PEG	-	2370	42.0	11.3	9.5	12.7	15.6	1.2

Results are expressed as the mean of four mice.

以上の結果は、修飾に用いた dextran 誘導体を単独で投与した際に得られた第 I 章における結果とよく対応するものであり、dextran 修飾により UC の体内挙動が修飾素材の物理化学的性質に依存して変化することを示唆するものである (Fig. 37)。

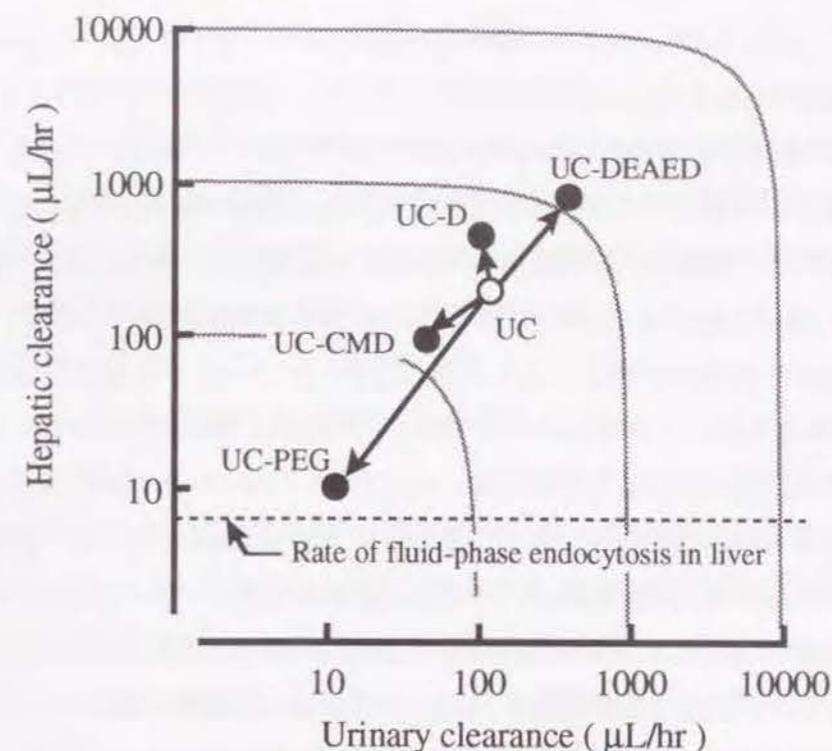


Fig. 37 Hepatic and urinary clearances of ^{111}In -labeled dextran or PEG conjugated UC. Hepatic plasma flow rate (76), rate of fluid-phase endocytosis of liver (77), and glomerular filtration rate (74) were calculated assuming the weight of a mouse to be 25 g.

IV-4 考察

UC に対して電荷の異なる dextran 誘導体を用いて化学修飾を施し、マウス全身投与実験を用いて修飾素材の物理化学的特性が UC の体内分布特性におよぼす影響について検討した。まず、電気的に中性な dextran を用いて UC を修飾した場合の抗原性・免疫原性に関して検討したところ、平均分子量が 10,000 の dextran で修飾するよりも 70,000 の dextran で修飾する方が UC に対する抗原性を抑制可能であることが示された。また、PEG 修飾は平均分子量 70,000 の dextran 修飾の場合とほぼ同程度の UC の抗原性の抑制を示すことが明らかとなった。PEG 修飾による UC の抗原性・免疫原性の抑制は、すでに Chen ら (54) および Abuchowski ら (55) によりマウス、ニワトリを実験動物として報告されている。本章の結果は、PEG 修飾のみならず dextran 修飾においても UC の頻回投与による抗原性・免疫原性の問題を克服し得ることを示すものと思われる。

UC をヒトに投与することにより血中および尿中の尿酸レベルの著しい減少が認められることから、高尿酸血症により生ずる痛風や尿酸腎症の治療薬としての可能性が期待され、1950 年代の後半よりブタ由来の UC (191) やキノコ由来の UC (192) などが臨床の場におい

て一部用いられてきた。しかしながら、UCは投与後数時間で血中より検出されなくなることから治療には頻回投与を必要し、前述したように抗原性・免疫原性の問題を生ずる(193)。従って、UCを臨床適用する場合には抗原性・免疫原性の抑制とともに、体内動態特性の制御法の開発も必要とされる。そこで電荷の異なる dextran 誘導体を用いて UC に対して高分子修飾を行い、その体内分布特性を未修飾 UC と比較・検討した。その結果、各 UC 誘導体は修飾素材として用いた dextran 誘導体の動態特性(67, 194)を反映した分布特性を示し、正電荷を有する DEAE を結合させることにより、肝臓をはじめとする細網内皮系組織への UC の取り込みが増大することが明らかとなった。これは第 1 章においても論述した様に、類洞を構成する内皮細胞間に大きな間隙(100 nm)が存在するという構造的な特徴と、大きな肝血流速度によるものと思われる。また、電氣的に中性な dextran を用いた修飾によっても高い肝蓄積が認められた。Nishikawa 等(194)は、著者と同様のマウス全身投与実験を用いて平均分子量 70,000 の dextran の体内動態特性を詳細に検討し、高投与量(100 mg/kg)では高い血中滞留性を示すものの、低投与量(1 mg/kg)では投与後速やかに血中より消失し、投与後 1 時間において肝臓に 60% 以上が取り込まれることを報告している。また、galactose 修飾 albumin により dextran の肝取り込みが抑制されることから、低投与量では肝実質細胞表面に存在する galactose receptor を介した肝取り込み機構の関与を示唆している。本章で用いた UC 誘導体の投与量は 20 units/kg (約 2~3 mg/kg)であることを考慮すると各 UC 誘導体中に含まれる dextran 投与量は 1 mg/kg 以下であると考えられる。従って、UC-D がマウス全身投与実験において高い肝移行性を示したのは修飾素材である dextran が肝実質細胞に存在する galactose receptor を介して取り込まれたものと考えられる。しかし、ラットを用いた同様の検討においては UC-D は高い血中滞留性を示したことから、dextran の galactose receptor を介した肝取り込みには種差が存在する可能性が示唆される。UC-CMD および UC-PEG では肝臓への取り込み速度が大きく抑制され、特に UC-PEG の肝取り込み速度値は polyvinylpyrrolidone を用いて検討された肝臓における fluid-phase endocytosis の速度(77)とほぼ等しく PEG 修飾により UC が肝臓とほとんど相互作用を示さなくなることが明らかとなった。

以上、本章では電荷の異なる dextran 誘導体を修飾素材として UC に対して分子構造修飾を施し、各種 UC 誘導体の体内分布特性を検討した。その結果、各種 UC 誘導体の体内動態特性は、修飾素材のもつ体内動態特性を反映していることが示され、こうした物理化学的性質の異なる修飾素材を選択することによりタンパク質医薬品の体内動態を厳密に制御できる可能性が示された。

結 論

以上、著者は四章にわたり、物理化学的特性の異なる dextran 誘導体やタンパク質誘導体をモデル高分子薬物として、高分子薬物の物理化学的特性と体内動態特性をマウス静脈内投与実験系を用いて全身レベルで検討し、得られた高分子薬物の薬動的知見に基づいて STI および UC に対して分子構造修飾を施し、次の結論を得た。

(I) 多糖類の物理化学的特性と体内動態特性の関連

薬物の標的指向化のための運搬体として繁用されている各種多糖類をモデル高分子薬物として選択し、分子サイズ、電荷等の物理化学的性質と体内動態特性との関連を全身レベルで明らかとするために、マウスに静脈内投与後の臓器分布特性を薬動的な手法を用いて解析した。解析の結果、腎臓及び肝臓における消失が高分子薬物の体内動態を決定する主要過程であり、さらに分子量が 10,000 程度の多糖類は大きな尿中排泄クリアランスをまた強い負電荷および正電荷を有するものは大きな肝取り込みクリアランスをもつこと等、物理化学的特性により両臓器における消失が大きく影響されることが示された。また、これらのクリアランス値と糸球体濾過速度、肝血流速度、肝臓における fluid-phase endocytosis 速度等生理学的パラメータとの関係も明らかとなった。

(II) 物理化学的特性に基づくタンパク質の体内動態特性の整理

生理活性タンパク質の体内動態を物理化学的な特性に基づいて整理することを目的として、分子量が約 3,400 から 150,000 までの 8 種のタンパク質を用いて薬動的な手法により整理した。¹¹¹In の放射活性を指標として追跡したタンパク質のマウス静脈内投与後の血中動態および臓器分布特性の解析より、分子サイズが体内からの消失特性に大きく寄与し、分子量が約 30,000 以下のタンパク質では血中からの消失クリアランスがほぼ糸球体濾過速度と等しいことが明らかとなった。また、糸球体濾過を受けない分子サイズのタンパク質の場合、その血中からの消失特性は等電点に依存し、等電点 4 以下のタンパク質は scavenger receptor を介して、等電点 8.5 以上のタンパク質は静電的な相互作用により、高い肝取り込みクリアランス値を示すことが明らかとなった。さらに以上の結果より、糖鎖や電荷の導入、高分子修飾等の化学修飾あるいはその組み合わせによりタンパク質の物理化学的性質を改変することで、肝臓や腎臓さらには血管内への標的指向化が可能となることを明らかにした。

(III) 高分子修飾大豆トリプシンインヒビターの合成と体内動態および薬理効果の改善

前章において、主として腎糸球体濾過により体内から速やかに消失することが明らかとなった STI (分子量 20,100) を対象とし、平均分子量約 10,000 の dextran を修飾素材に用いて化学修飾を施すことによる体内動態の改善を試みた。まず、合成法に関して 6 種類の方法を検討した結果、過ヨウ素酸化法が合成収率および修飾体の残存生物活性の観点より最も優れていること、また、高分子修飾素材として一般に広く用いられている polyethylene glycol を用いる方法と比較しても活性保持等に関して遜色のないことを明らかにした。高分子修飾 STI では、分子サイズの増大により尿中排泄クリアランスが未修飾 STI の数十分の一に抑制され高い血中滞留性を示した結果、マウスにおけるトリプシンショックやラットでの急性膵炎モデルに対して優れた治療効果が示された。

(IV) 高分子修飾によるウリカーゼの体内動態制御と免疫学的特性の改善

次に、主として肝臓に取り込まれることにより体内から消失する UC (分子量 128,000) を選択し、dextran およびその誘導体を用いた修飾による体内動態の精密な制御と免疫学的特性の改善を検討した。UC と dextran および電荷の異なる 2 種の dextran 誘導体、すなわち正電荷を有する diethylaminoethyl-dextran (DEAED)、弱い負電荷を有する carboxymethyl-dextran (CMD) との結合体は、それぞれ修飾素材の体内動態を反映した体内動態を示し、UC-DEAED は高い肝取り込みクリアランスによる血中からの速やかな消失、UC-CMD は臓器移行クリアランスの抑制に起因する高い血中濃度の持続化をもたらした。また、dextran で修飾することにより、UC の抗体反応性、免疫原性はいずれも大きく減少し、高分子修飾によりタンパク質医薬品の免疫学的特性の改善、すなわち投与後のアレルギーショックや中和抗体産生による活性低下の防止が可能であることが明らかとなった。

以上、著者は種々のモデル高分子薬物を用いて、その物理化学的特性と体内動態特性との関連を薬動的な観点から系統的に整理した。また、得られた結果に基づいて高分子修飾を適用することにより、STI および UC の体内動態特性の改善に成功した。以上の知見は、生理活性タンパク質をはじめとする高分子薬物に対する体内動態制御法の開発に有益な設計指針を提供するものと思われる。

謝 辞

終わりに臨み、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学橋田 充教授ならびに京都大学名誉教授・摂南大学瀬崎 仁教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

さらに、多くの有益な御助言と御指導を戴いた京都薬科大学村西昌三教授、京都大学高倉喜信助教授ならびに京都薬科大学山本 昌助教授に深く感謝します。また、実験に際し有益な御指導、御助言を戴くと共に、uricase を御提供戴きました東洋紡医薬品生産技術センター安田芳久主任に深く感謝します。さらに、種々の貴重な御助言を賜りました長崎大学西田孝洋助教授、京都大学西川元也助手、日本農薬医薬研究所大坪祥人主任ならびに京都大学薬学部薬剤学教室員一同に深く感謝します。

さらに、実験の一部に御協力戴いた、杉江美希子学士、大野純子学士、山下(玉木)智恵子学士、振津尚夫修士に深く感謝します。

実験の部

第 I 章 実験の部

[1] Dextran 誘導体の合成

(1) 試薬

平均分子量 10,000 (T-10)、70,000 (T-70) の dextran は Pharmacia 社より、平均分子量 8,000、500,000 の dextran sulfate はナカライテスク (株) より購入した。K^[14C]N は Amersham 社、[Carboxy-¹⁴C]dextran sulfate (平均分子量 8,000) は Sigma 社より購入した。その他の合成試薬は、ナカライテスク (株) または和光純薬 (株) の特級試薬を用いた。

(2) Carboxymethyl-dextran (CM-Dex) の合成 (70)

強アルカリ条件下、dextran (T-70) 1 g を精製水 50 mL に溶解し、monochloroacetic acid 2 g を加え、70 °C で 20 分間反応させた。反応終了後、精製水中で一昼夜透析し、限外濾過により濃縮後、凍結乾燥した。

(3) diethylaminoethyl-dextran (DEAE-Dex) の合成 (69)

強アルカリ条件下、dextran (T-70) 1 g を精製水 50 mL に溶解し、2-(diethylamino)ethyl chloride hydrochloride 2 g を加え、80 °C で 4 時間反応させた。反応終了後、精製水中で一昼夜透析し、限外濾過により濃縮後、凍結乾燥した。

(4) 放射標識体の合成

[carboxyl-¹⁴C]Dextran (T-10、T-70) の合成は Isbell らの方法 (71) により行った。Sephacryl S-200 で精製した Dextran 1.4 g を精製水 10 mL に溶解し、酸性条件下で K^[14C]N (Amersham 社) を 0.05 mmol 加え 50 °C で 7 時間加熱した後、45 °C で 24 時間放置した。反応生成物を Sephadex G-25 カラムを用いたゲル濾過により精製し、限外濾過法により濃縮した。

[¹⁴C]CM-Dex および [¹⁴C]DEAE-Dex の合成は、非標識体の合成法と同様の方法により [¹⁴C]dextran を用いてそれぞれ行った。

[2] Dextran 誘導体の物理化学的性質

(1) 分子量

Dextran 誘導体の分子量の測定は、TOYOPEARL HW-60S カラム (東ソー (株)) (2.4

cm × 65 cm、溶出液: 0.5 M NaCl) を用いたゲル濾過法を用い、分子量測定キット (Pharmacia 社) の既知分子量タンパク質の溶出位置から得られた検量線により dextran 誘導体のみかけの分子量、分子サイズを決定した。

(2) 電荷

イオン交換樹脂への吸着実験法に、Pharmacia 社の CM-Sephadex C-50 (陽イオン交換樹脂)、DEAE-Sephadex A-50 (陰イオン交換樹脂) を用いたバッチ法により行った。各イオン交換樹脂 20 mg を 20mM-HEPES saline (pH 7.20) 5 mL で平衡化させ、0.2 mg/mL の濃度に調整した dextran 誘導体の水溶液 0.5 mL を加えて 10 分間室温で振盪し、遠心分離後、上清中に残存した dextran 誘導体の濃度を測定することにより樹脂への吸着量を算出し電荷の強度を評価した。また、dextran 誘導体の pKa は、pH スタットを用いた酸-塩基滴定により測定した。

(3) Dextran の定量

Dextran の定量は、硫酸-Anthrone 法 (195) により行った。

[3] マウス静脈内投与後の dextran 誘導体の体内挙動

(1) 動物実験

Dextran 誘導体の体内挙動は sarcoma 180 担癌マウスを用いて行った。Sarcoma 180 細胞は雄性 ddY マウスの腹腔内に 1×10^7 個の癌細胞を 1 週間毎に移植継代したものを使用した。 1×10^7 個の癌細胞を雄性 ddY マウス (20 g 前後) の背部皮下に移植後 14 日目に、放射標識 dextran 誘導体の生理食塩水溶液を尾静脈より投与後、代謝ケージ内で飼育し、尿を採取した。経時的に大静脈採血により屠殺し、血漿中あるいは腫瘍を含む各臓器中の放射活性を測定した。また、[¹¹¹In]bovine serum albumin (BSA) を用いて同様の実験を行い、[¹¹¹In]BSA 投与 10 分後の臓器中濃度を測定し、臓器中の残存血液量を補正した。

(2) 放射活性の測定

生体組織中の ¹⁴C の測定は、各臓器の湿重量を測定した後、約 0.2 g をとり Soluen[®]-350 (Packard 社) で可溶化し、Clear-sol II (ナカライテスク) 5 mL を加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-5000C、Beckman) により測定した。クエンチングの補正は外部標準法により行った。

また、残存血液量補正に用いた [¹¹¹In]BSA の放射活性の測定は、特別な操作を行わずに Well 型 γ 線シンチレーションカウンター (ARC-500、Aloka) で測定した。

第 II 章 実験の部

[1] モデルタンパク質の選択とその物理化学的性質

(1) 試薬

[Asu¹⁷]-eel calcitonin (eCT) および recombinant human superoxide dismutase (SOD) は旭化成工業 (株) より、neocarzinostatin (NCS) はポーラ化粧品 (株) より、recombinant human interferon- β (IFB- β) は東レ (株) より、soybean trypsin inhibitor (STI) は不二製油 (株) より、*Candida utilis* 由来の uricase (UC) は TOYOBO (株) よりそれぞれ供与されたものを用いた。Bovine serum albumin (BSA) は ICN Biochemical 社より購入した。¹¹¹In]In₃ は日本メジフィジックス (株) より供与されたものを用いた。1,6-Diaminohexane は東京化成工業 (株) より、その他の試薬はナカライテスク (株) あるいは和光純薬 (株) より購入した。

(2) カチオン化タンパク質の合成

タンパク質分子への正電荷の導入は Pardridge ら (102) の方法に準じて行った。すなわち、2 M 1,6-diaminohexane 水溶液に、10 % 各種タンパク質 (SOD、BSA、UC) 溶液を 5 mL 滴下し、30 分間氷冷下でインキュベーションした後、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) 0.5 g を加え 30 分間反応後、さらにもう一度 EDC 0.5 g を加えた。全ての操作中、反応液の pH は pH スタットを用いて 6.5 に固定した。氷冷下で一昼夜反応させた後、SOD、BSA に関しては水に対して、UC に関しては 0.2 M borate buffer (pH 8.5) に対して透析を行い、限外濾過および凍結乾燥によりそれぞれ粗 cSOD、cBSA、cUC を得た。さらにクロマトフォーカシングにより等電点が 8.5 以上の画分を、さらに Sephadex G-75 (Pharmacia 社) もしくは TOYOPEARL HW-55S (東ソー (株)) を用いて非重合画分を分取し、限外濾過による濃縮後、凍結乾燥した。

(3) アニオン化タンパク質の合成

10 mL の 0.2 M Tris buffer (pH 8.65) に各種タンパク質 20 mg を溶解後、100 μ L の dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解した 120 モル当量の無水コハク酸を添加し 1 時間氷冷下反応させた。その後、クロマトフォーカシングにより等電点が 4.0 以下の画分を、さらに Sephadex G-75 (Pharmacia) もしくは TOYOPEARL HW-55S (東ソー (株)) を用いて非重合画分を分取し、限外濾過による濃縮後、凍結乾燥した。

(4) 糖修飾アルブミンおよび polyethylene glycol 修飾体の合成

Lac-BSA は、Gray らの方法 (122) に従って合成した。BSA 1 g、lactose monohydrate 1.5 g、

sodium cyanoborohydride 1.45 g を 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 8.0) 100 mL に溶解し、4 日間 37 °C で反応させた後、sephadex G-25 を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。ManBSA は Lee らの方法 (121) に従い、予め合成した 2-imino-2-methoxyethyl 1-thiomannoside (IME-thiomannoside) 0.1 mol を BSA 50 mg と 0.2 M borate buffer (pH 8.6) 中で 1 時間反応させ、sephadex G-25 を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。

cBSA、Lac-BSA、ManBSA の polyethylene glycol (PEG) 修飾体の合成は、それぞれの BSA 誘導体と活性化 PEG [2,4-bis (O-methoxypolyethylene glycol)-6-chloro-s-triazine] のモル比を 1: 100 となるように 50 mM borate buffer (pH 9.5) 中で 4 °C、2 時間反応させ、限外濾過による濃縮、洗浄の後、凍結乾燥した。

(5) 電荷導入タンパク質の物理化学的性質

(i) 分子量

分子量の測定は第 I 章 [2] の (1) と同様の方法で測定した。

(ii) タンパク質の定量

BSA を標準物質として Lowry らの方法 (196) に準じて定量した。

(iii) 残存アミノ基の定量

電荷導入後のタンパク質の残存アミノ基の定量は、Habeb の方法 (197) に準じて glycine を標準物質として trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) を用いた呈色反応により行った。

(iv) 電荷

電荷導入タンパク質の荷電の程度は第 I 章 [2] の (2) と同様の方法により測定した。等電点は polybuffer exchanger 94 resin (Pharmacia 社) を用いて、カチオン化タンパク質は polybuffer 96 により、アニオン化タンパク質は polybuffer 74 により溶出させ主ピークの pH を測定することにより行った。

(5) 放射標識体の合成

電荷導入タンパク質の放射標識は、Hnatowitch らの方法 (106) に従い二官能性キレート試薬 diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) anhydride ((株) Dojin) を用いて [¹¹¹In]Cl₃ で放射標識した。タンパク質 10 mg を 0.1 M HEPES buffer (pH 7.0) 1 mL に溶解し、DMSO に溶解した DTPA anhydride を 10 μ L (タンパク質の 2 倍モル量) 加え、30 分間室温で反応させた後、Sephadex G-25 カラムを用いたゲル濾過により未反応 DTPA を除去、限外濾過により濃縮 (約 1 mL) した。次いで、0.1 M acetate buffer (pH 6.0) 50 μ L と [¹¹¹In]Cl₃ 溶液 (74 MBq/mL) 50 μ L の混液に 100 μ L の DTPA 結合タンパク質を加え 30 分間室温で放置することにより放射標識を行った。Sephadex G-25 カラムを用いたゲル濾過により free ¹¹¹In を除去

し、限外濾過により濃縮し実験に供した。

[2] マウス静脈内投与後の各種モデルタンパク質の体内挙動

(1) マウス全身投与実験

第1章 [3] と同様の方法で行った。また、 ^{111}In sucBSA を 1.0 mg/kg の投与量で静脈内投与後 30 分にコラゲナーゼ灌流法 (198) により実質細胞と比実質細胞とに分離し、放射活性を測定することにより ^{111}In sucBSA の肝内分布分布を測定した。

(2) BSA および dextran 誘導体との同時投与による ^{111}In sucBSA の肝取り込み阻害実験

^{111}In sucBSA (1.0 mg/kg) と非標識 BSA および dextran 誘導体、RNA (20 mg/kg) をマウスに同時投与し、30 分後に肝臓中放射活性を測定した。

第 III 章 実験の部

[1] Soybean trypsin inhibitor - dextran conjugate (STI-D) の合成

Kunitz 型 STI および活性化 PEG はそれぞれ不二製油 (株)、生化学工業 (株) より供与されたものを用いた。Dextran (\overline{M}_w : 10,000) は、Pharmacia 社より購入した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

STI-D は以下の 6 種の合成法により室温で合成した。また、いずれの合成法においても基本的には STI と dextran の反応モル比は 1:10 とし、反応液は限外濾過により濃縮した後、Toyopearl HW-60S カラム (2.4 x 65 cm) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。Conjugate フラクションを回収した後、再び限外濾過により濃縮し凍結乾燥した。

過ヨウ素酸酸化法 (37, 171)

Dextran 1 g を 10 mL の蒸留水に溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム 107 mg により遮光下、一晩酸化した。酸化 dextran は限外濾過法により水で洗浄し、凍結乾燥した。その後、STI 50 mg を酸化 dextran 250 mg と 0.2 M bicarbonate buffer (pH 10) 中で遮光下、4 °C、一昼夜反応後させ conjugate を得た。さらに sodium borohydride 7.6 mg を添加し、4 °C、2 時間、未反応官能基を還元し、STI-D を得た。

臭化シアン法 (172)

Dextran 1 g を 100 mL の蒸留水に溶解し、pH を 10.7 に維持しながら臭化シアン 200 mg を徐々に加え dextran を活性化した。この水溶液中に STI (200 mg) を添加し pH を 9.0 に維持して一晩反応させ、STI-D を得た。

カルボジイミド法 (173)

アルカリ条件下、dextran 1 g と 6-bromohexanoic acid 2.8 g を反応させることにより dextran の水酸基にカルボキシル基を導入した。このカルボキシル基導入 dextran 250 mg を STI 50 mg 含有水溶液 10 mL に溶解した後、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide 60 mg を加え、pH を 5.0 から 5.5 の間に維持しながら一晩反応させ、STI-D を得た。

塩化シアヌル法 (176)

Usui と Matsubayashi の方法に従い、塩化シアヌルにより dextran を活性化した。すなわち、dextran 1 g を 60 mL の蒸留水に溶解し、dimethylformamide 40 mL に溶解した塩化シアヌル 1.85 g を pH 7.0 条件下、4 °C で 3 時間反応した。反応終了後、遠心により沈殿させた dextran (250 mg) をアセトンで洗浄後、0.2 M bicarbonate buffer (pH 10) 中で STI 50 mg と 2 時間反応させ、STI-D を得た。

エピクロルヒドリン法 (177)

Dextran 1 g を 2.5 % Zn (BF₄)₂ 1 mL、エピクロルヒドリン 5 mL の混液に溶解し、90 °C で

4時間反応させた。反応終了後、遠心により沈殿させた dextran (250 mg) をアセトンで洗浄後、0.2 M bicarbonate buffer (pH 10) 中で STI 50 mg と 4 °C 下、一晚反応させ、STI-D を得た。

N-Succinimidyl-3-(2-pyridylthio)propionate (SPDP) 法 (174)

Eldjarn と Jellum の方法により合成した aminoethyl-dextran 50 mg を 0.5 mL のエタノールに溶解した SPDP 試薬 (15.62 mg) と pH 7.5 のリン酸ナトリウム緩衝液中で 30 分間反応させた後、過剰の試薬を透析法により除去した。40 mM Dithiothreitol により還元することにより SH-基を導入した dextran を作成した。STI 50 mg と SPDP 0.13 mg を上記と同じ条件で反させた後、SH-基導入 dextran 50 mg と 3 時間反応させ、STI-D を得た。

STI-PEG conjugate の合成

第 II 章 [1] (5) と同様の方法により、STI 40 mg と活性化 PEG 200 mg を反応させ、conjugate は限外濾過とゲル濾過法により精製した。

[2] STI-D の物理化学的性質

(i) タンパク質の定量

BSA を標準物質として Lowry ら (196) の方法に準じて定量した。

(ii) Dextran の定量

硫酸-Anthrone 法 (197) により行った。

(iii) ゲル濾過法による分子量の測定

分子量の測定は第 I 章 [2] の (1) と同様の方法で測定した。

(iv) SDS-PAGE による分子量の測定

Laemmli の方法 (199) に準じて還元条件下で行った。電気泳動終了後、9 % Coomassie brilliant blue を用いて染色し、STI-D の分子量分布を分子量測定キット (Pharmacia 社) の既知分子量タンパク質の泳動位置から見積った。さらに、クロマトスキャナーにより未反応 STI の混入率についても定量を行った。

(v) 残存アミノ基の定量

第 II 章 [1] の (5) と同様の方法で測定した。

(vi) STI-D の trypsin 阻害活性の測定

STI-D の trypsin 阻害活性の測定は、Kassell らの方法 (179) に従い benzylarginine *p*-nitroanilide (BAPA) を基質として行った。

[3] マウス静脈内投与後の STI-D の体内挙動

第 II 章 [1] の (5) と同様の方法により ¹¹¹In で放射標識体を作成した後、第 I 章 [3]

と同様の方法で行った。また、trypsin 阻害活性を指標とした血中および尿中 STI 濃度についても測定を行った。

[4] STI-D の治療効果の検討

(1) Trypsin ショックに対する治療実験 (180)

ICR 系雄性マウス (16-20 g) に種々の trypsin inhibitor (STI、STI conjugate、camostat mesilate、gabezate mesilate) を静脈内投与後、適当な時間に trypsin を 25 mg/kg で静脈内投与し、その生存数を 2 時間まで観察した。

(2) 急性膵炎に対する治療実験 (181)

Wistar 系雄性ラットを用いて、Fric らの方法に従い急性膵炎モデルを作製した。ラットを開腹後、十二指腸部より胆管カニューレーションを施し、10 μL の 1 % trypsin と 90 μL の 10 % の Na-taurocholate の混合液を胆管内に投与した。処理後、胆管カニューレーションを抜き取り、腹部を縫合した。治療は、trypsin と Na-taurocholate の混合液を胆管内に投与する 1 分前に大腿静脈より各種 trypsin inhibitor を投与することにより行った。治療効果は、治療後 36 時間までのラットの死亡率により評価した。

第 IV 章 実験の部

[1] Uricase - dextran conjugate (UC-D) の合成

Candida utilis 由来の UC および活性化 PEG はそれぞれ TOYOBO (株)、生化学工業 (株) より供与されたものを用いた。Dextran T-10 (\overline{Mw} : 10,000)、T-70 (\overline{Mw} : 70,000) は、Pharmacia 社より購入した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

UC-D は、過ヨウ素酸酸化法 (37, 171)、臭化シアン法 (172)、カルボジイミド法 (173)、塩化シアヌル法 (176) の 4 種の合成法により行った。UC-D の合成は基本的には、第 III 章 [1] と同様の手法により行ったが、UC の活性の低下を考慮しすべて 4 °C 下で合成し、0.1 M borate buffer (pH 8.0) を用いて限外濾過による濃縮を行った。また、正電荷を有する DEAE-dex、負電荷を有する CM-dex を用いた conjugate についても過ヨウ素酸酸化法により合成した。

[2] UC-D の物理化学的性質

(i) タンパク質の定量

BSA を標準物質として Lowry らの方法 (196) に準じて定量した。

(ii) Dextran の定量

硫酸-Anthrone 法 (195) により行った。

(iii) 残存アミノ基の定量

第 II 章 [1] の (5) と同様の方法で測定した。

(iv) SDS-PAGE による分子量の測定

Laemmli の方法 (199) に準じて還元条件下で行った。電気泳動終了後、9 % Coomassie brilliant blue を用いて染色し、UC-D の分子量分布を分子量測定キット (Pharmacia 社) の既知分子量タンパク質の泳動位置から見積った。

(v) ゲル濾過法による分子量の測定

分子量の測定はゲル濾過 HPLC 法を用いて第 I 章 [2] の (1) と同様の方法で測定した。

(vi) UC-D の残存酵素活性の測定 (54)

UC の酵素活性は 100 mM 尿酸、0.001 % Triton X-100、1.0 mM EDTA を含む 50 mM borate buffer (pH 8.50) 中に UC を添加後の尿酸の減少速度を吸収波長 290 nm で吸光度測定することにより測定した。

[3] UC-D の免疫学的性質

UC および UC-D に対する抗血清は日本白色家兎を感作することにより作製した。UC およ

び UC-D (3 mg-protein) を含む Freund's complete adjuvant を背部皮下および大腿部筋肉に注射した。兎は、対応する抗原を含む Freund's incomplete adjuvant を用いて 2 週間毎に 1 ヶ月間感作した。各感作後 10 日目に耳静脈部より血液を採取し、分離した血清は -80 °C で保存した。得られた血清を reing test 法により IgG と IgM に関する抗体価として測定した。

[4] 動物実験

(1) ラット全身投与実験

Wistar 系雄性ラット (180-210 g) に pentobarbital 麻酔下 UC および UC-D、UC-PEG を投与量 20 units/kg で大腿静脈より投与し、経時的に頸静脈より血液 (200 μ L) を採取した。遠心分離により得られた血漿中の UC 活性を [2] の (vi) の方法により測定した。得られた血漿中濃度パターンを 1-compartment モデルに基づいて解析し、各種薬動学的パラメータを算出した。

(2) マウス全身投与実験

第 II 章 [1] の (5) と同様の方法により ^{111}In で放射標識体を作成した後、第 I 章 [3] と同様の方法で行った。

引用文献

- 1) Casteel, J.V., Geiger, T., Gross, V., Andus, T., Walter, E., Hirano, T., Kishimoto, T. and Heinrich, P.C.: *Eur. J. Biochem.* **177**, 357-361 (1988).
- 2) Metcalf, D. and Nicola, N.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3160-3164 (1988).
- 3) Borden, E.C.: *Pharmacol. Ther.* **37**, 213-229 (1988).
- 4) Kuiper, J., Otter, M., Rijken, D.C. and van Berkel, T.J.C.: *J. Biol. Chem.* **263**, 18220-18224 (1988).
- 5) Marleau, S., Ong, H., deLéan, A. and du Souich, P.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **251**, 328-333 (1989).
- 6) Transwell, P., Seifried, E., Su, P.C.A.F., Feuerer, W. and Rijken, D.C.: *Clin. Pharmacol. Ther.* **46**, 155-162 (1989).
- 7) Takagi, A., Masuda, H., Takakura, Y. and Hashida, M.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**, 537-543 (1995).
- 8) Sezaki, H., Takakura, Y. and Hashida, M.: *Adv. Drug Delivery Rev.* **3**, 247-266 (1989).
- 9) Hashida, M., Nishikawa, M. and Takakura, Y.: *J. Controlled Release* **36**, 99-107 (1995).
- 10) 瀬崎 仁編、薬物送達法、医薬品の開発第13巻、廣川書店、1989.
- 11) 水島 裕編、DDSの進歩1995-1996、Molecular Medicine 別冊、1995.
- 12) Gregoriadis, G. and Ryman B.E.: *Eur. J. Biochem.* **24**, 485-491 (1972).
- 13) Hughes, B.J., Kennel, S., Lee, R. and Huang, L.: *Cancer Res.* **49**, 6214-6220 (1989).
- 14) Illum, L., Hunneyball, I.M., Davis, S.S.: *Int. J. Pharm.* **29**, 53-65 (1986).
- 15) Gabizon, A. and Papahadjopoulos, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6949-6953 (1988).
- 16) Sezaki, H. and Hashida, M.: *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1**, 1-38 (1984).
- 17) Larsen, C.: *Adv. Drug Delivery Rev.* **3**, 103-154 (1989).
- 18) Ohkawa, K., Hatano, T., Yamada, K., Joh, K., Takada, K., Tsukada, Y. and Matsuda, M.: *Cancer Res.* **53**, 4238-4242 (1993).
- 19) Dang, W., Colvin, O.M., Brem, H. and Saltzman, W.M.: *Cancer Res.* **54**, 1729-1735 (1994).
- 20) Duncan, R. and Spreafico, F.: *Clin. Pharmacokinet.* **27**, 290-306 (1994).
- 21) Yamaoka, T., Tabata, Y. and Ikada, Y.: *J. Pharm. Sci.* **84**, 349-354 (1995).
- 22) Saito, Y., Buciak, J., Yang, J. and Pardridge, W.M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10227-10231 (1995).
- 23) Alpar, O.H. and Lewis, D.A.: *Biochem. Pharmacol.* **34**, 257-261 (1985).
- 24) Kravtsoff, R., Ropars, C., Laguerre, M., Muh, J.P. and Chassaingne, M.: *J. Pharm. Pharmacol.* **42**, 473-476 (1990).
- 25) Kaneo, Y., Fujihara, Y., Tanaka, T., Kozawa, Y., Mori, H. and Iguchi, S.: *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 218-220 (1989).
- 26) Poznansky, M.J., Halford, J. and Taylor, D.: *FEBS Lett.* **239**, 18-22 (1988).
- 27) Halbert, G.W. and Florence, A.T.: *J. Pharm. Pharmacol.* **41**, 222-226 (1989).
- 28) Jansen, R.W., Kruijt, J.K., van Berkel, T.J.C. and Meijer, D.K.F.: *Hepatology* **18**, 146-152 (1993).
- 29) Zenke, M., Steinlein, P., Wagner, E., Cotten, M., Beug, H. and Birnstiel, M.L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3655-3659 (1990).
- 30) Cotten, M., Längle-Rouault, F., Kirlappos, H., Wagner, E., Mechtler, K., Zenke, M., Beug, H. and Birnstiel, M.L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4033-4037 (1990).
- 31) Berczi, A., Barabas, K., Sizensky, J.A. and Faulk, W.P.: *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 356-363 (1993).
- 32) Bérczi, A., Ruthner, M., Szüts, V., Fritzer, M., Schweinzer, E. and Glodenberg, H.: *Eur. J. Biochem.* **213**, 427-436 (1993).
- 33) Taetle, R., Honeysett, J.M. and Houston, L.L.: *J. Natl. Cancer Inst.* **80**, 1053-1059 (1988).
- 34) Rakestraw, S.L., Tompkins, R.G. and Yarmush, M.L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4217-4221 (1990).
- 35) Trail, P.A., Willner, D., Lasch, S.J., Henderson, A.J., Hofstead, S., Casazza, A.M., Firestone, R.A., Hellström, I. and Hellström, K.E.: *Science* **261**, 212-215 (1993).
- 36) Tam, S.-C., Blumenstein, J. and Wong, J.T.-F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2128-2131 (1976).
- 37) Wileman, T., Bennett, M. and Lilleymann, J.: *J. Pharm. Pharmacol.* **35**, 762-765 (1983).
- 38) Wileman, T.E., Foster, R.L. and Elliott, P.N.C.: *J. Pharm. Pharmacol.* **38**, 264-271 (1986).
- 39) Melton, R.G., Wiblin, C.N., Foster, R.L. and Sherwood, R.F.: *Biochem. Pharmacol.* **36**, 105-112 (1987).
- 40) Melton, R.G., Wiblin, C.N., Baskerville, A., Foster, R.L. and Sherwood, R.F.: *Biochem. Pharmacol.* **36**, 113-121 (1987).
- 41) Hallaway, P.E., Eaton, J.W., Panter, S.S. and Hedlund, B.E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 10108-10112 (1989).
- 42) Hashida, M., Kato, A., Takakura, Y. and Sezaki, H.: *Drug Metab. Dispos.* **12**, 492-499 (1984).
- 43) Takakura, Y., Matsumoto, S., Hashida, M. and Sezaki, H.: *Cancer Res.* **44**, 2505-2510 (1984).
- 44) Matsumoto, S., Yamamoto, A., Takakura, Y., Hashida, M., Tanigawa, N. and Sezaki, H.: *Cancer Res.* **46**, 4463-4468 (1986).
- 45) Atsumi, R., Endo, K., Kakutani, T., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H.: *Cancer Res.* **47**, 5546-5551 (1987).
- 46) Takakura, Y., Takagi, A., Hashida, M. and Sezaki, H.: *Pharm. Res.* **4**, 293-300 (1987).
- 47) Ohkouchi, K., Imoto, H., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H.: *Cancer Res.* **50**,

- 1640-1644 (1990).
- 48) Wileman, T.E.: *Adv. Drug Delivery Rev.* **6**, 167-180 (1991).
- 49) Imoto, H., Sakamura, Y., Ohkouchi, K., Atsumi, R., Takakura, Y., Sezaki, H. and Hashida, M.: *Cancer Res.* **52**, 4396-4401 (1992).
- 50) Nishikawa, M., Kamijo, A., Fujita, T., Takakura, Y., Sezaki, H. and Hashida, M.: *Pharm. Res.* **10**, 1253-1261 (1993).
- 51) Abuchowski, A., van Es, T., Palczuk, N.C. and Davis, F.F.: *J. Biol. Chem.* **252**, 3578-3581 (1977).
- 52) Abuchowski, A., McCoy, J.R., Palczuk, N.C., van Es, T. and Davis, F.F.: *J. Biol. Chem.* **252**, 3582-3586 (1977).
- 53) Abuchowski, A. and Davis, F.F.: *Biochim. Biophys. Acta* **578**, 41-46 (1979).
- 54) Chen, R.H.-L., Abuchowski, A., van Es, T., Palczuk, N.C. and Davis, F.F.: *Biochim. Biophys. Acta* **660**, 293-298 (1981).
- 55) Abuchowski, A., Karp, D. and Davis, F.F.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **219**, 352-354 (1981).
- 56) Maeda, H., Matsumoto, T., Konno, T., Iwai, K. and Ueda, M.: *J. Protein Chem.* **3**, 181-193 (1984).
- 57) Maeda, H., Ueda, M., Morinaga, T. and Matsumoto, T.: *J. Med. Chem.* **28**, 455-461 (1985).
- 58) C. C. Chua, M. L. Greenberg, A. T. Viau, M. Nucci, W. D. Brenckman, Jr. and M. S. Hershfield: *Annal. Int. Med.* **109**, 114-117 (1988).
- 59) Suzaki, F., Pollard, R.B., Uchimura, S., Munakata, T. and Maeda, H.: *Cancer Res.* **50**, 3897-3904 (1990).
- 60) Knauf, M.J., Bell, D.P., Hirtzer, P., Luo, Z.-P., Young, J.D. and Katre, N.V.: *J. Biol. Chem.* **263**, 15064-15070 (1988).
- 61) Seymour, L.W., Ulbrich, K., Strohal, J., Kopecek, J. and Duncan, R.: *Biochem. Pharmacol.* **39**, 1125-1131 (1990).
- 62) Shen, W.-C.: *Biochim. Biophys. Acta* **1034**, 122-124 (1990).
- 63) Ladd, D.L. and Snow, R.A.: *Anal. Biochem.* **210**, 258-261 (1993).
- 64) Tang, G., White, J.E., Gordon, R.J., Lumb, P.D., and Tsan, M.-F.: *J. Appl. Physiol.* **74**, 1425-1431 (1993).
- 65) He, Y.Y., Hsu, C.Y., Ezrin, A.M. and Miller, M.S.: *Am. J. Physiol.* **265**, 252-256 (1993).
- 66) Furukawa, M., Kodera, Y., Uemura, T., Hiroto, M., Matsushima, A., Kuno, H., Matsushita, H. and Inada, Y.: *Biochem. Biophys Res Commun.* **199**, 41-45 (1994).
- 67) Takakura, Y., Fujita, T., Hashida, M. and Sezaki, H.: *Pharm. Res.* **7**, 339-346 (1990).
- 68) Mowry, R.W. and Millican, R.C.: *Am. J. Pathol.* **29**, 523-545 (1953).
- 69) Mackerman, W.M. and Rickettes, C.R.: *Biochem. J.* **76**, 117-120 (1960).
- 70) Peterson, E.A. and Sober, H.S.: *J. Am. Chem. Sci.* **78**, 751-755 (1956).
- 71) Isbel, H.S., Frush, H.L. and Moyer, J.D.: *Tech. Assoc. Pulp Paper Ind.* **40**, 739-742 (1957).
- 72) Roos, C.F., Matsumoto, S., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H.: *Int. J. Pharm.* **22**, 75-87 (1984).
- 73) Yamamoka, K., Tanigawara, Y., Tanaka, H. and Uno, T.: *J. Pharmacobio-Dyn.* **4**, 879-885 (1981).
- 74) Dedrick, R.L.: *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1**, 435-461 (1973).
- 75) 藤田卓也、橋田 充 : *ファームテクジャパン* **6**, 1031-1041 (1990).
- 76) Gerlowski, L.E. and Jain, R.K.: *J. Pharm. Sci.* **72**, 1103-1126 (1983).
- 77) Munniksmas, J., Noteborn, M., Kooistra, S., Bouma, J.M.W., Gruber, A., Dalen, D.P.V. and Knok, D.L.: *Biochem. J.* **192**, 613-621 (1980).
- 78) Arturson G., Groth T. and Grotte G., *Clin. Sci.* **40**: 137-158 (1971).
- 79) Chang R. L. S., Deen W. M., Robertosn C. R. and Brenner B. M., *Kidney Int.* **8**: 212-218 (1975).
- 80) Bohrer M. P., Baylis C., Humes H. D., Glassock R. J., Robertson C. R. and Brenner B. M., *J. Clin. Invest.* **61**: 72-78 (1978).
- 81) Brenner B. M., Hostetter T. H. and Humes H. D., *Am. J. Physiol.* **234**: F455-F460 (1978).
- 82) Nakane, S., Matsumoto, S., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H.: *J. Pharm. Pharmacol.* **40**, 1-6 (1988).
- 83) Simionescu, N.: *Physiol. Rev.* **63**, 1536-1579 (1983).
- 84) Goresky, C.A. and Groom, A.C. In Renkin E.M. and Michel C.C. (eds), *Handbook of Physiology: The Cardiovascular System IV*, American Physiological Society, Bethesda, MD, 1984, pp. 689-780.
- 85) Brown, M.S. and Goldstein, J.L.: *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 233-261 (1983).
- 86) Krieger, M., Acton, S., Ashkenas, J., Pearson, A., Penman, M. and Pesnick, D.: *J. Biol. Chem.* **268**, 4569-4572 (1993).
- 87) Jain, R.K.: *Cancer Metas. Rev.* **6**, 559-593 (1987).
- 88) Noguchi, A., Takahashi, T., Yamaguchi, T., Kitamura, K., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H.: *Jpn. J. Cancer Res.* **82**, 219-226 (1991).
- 89) Hashida, M. and Takakura, Y.: *J. Controlled Release* **31**, 163-171 (1994).
- 90) Sato, H., Sugiyama, Y., Kim, D.C., Yanai, S., Kurita, M., Fuwa, T., Iga, T. and Hanano, M.: *Biochem. Pharmacol.* **38**, 2663-2671 (1989).
- 91) Yanai, S., Sugiyama, Y., Iga, T., Fuwa, T. and Hanano, M.: *Am. J. Physiol.* **258**, C593-C598 (1990).
- 92) Sato, H., Sugiyama, Y., Sawada, Y., Iga, T., Fuwa, T. and Hanano, M.: *Am. J. Physiol.* **258**, G682-G689 (1990).
- 93) Kim, D.C., Sugiyama, Y., Fuwa, T., Sakamoto, S., Iga, T. and Hanano, M.: *Biochem. Pharmacol.* **38**, 241-249 (1989).

- 94) Sato, H., Sugiyama, Y., Sawada, Y., Iga, T., Sakamoto, S., Fuwa, T. and Hanano, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8355-8359 (1988).
- 95) Yachi, K., Sugiyama, Y., Sato, H., Kim, D.C., Fuwa, T., Iga, T. and Hanano, M.: *J. Biochem.* **103**, 448-451 (1988).
- 96) Yanai, S., Sugiyama, Y., Kim, D.C., Sato, H., Fuwa, T., Iga, T. and Hanano, M.: *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 4891-4897 (1987).
- 97) Sato, H., Sugiyama, Y., Sawada, Y., Iga, T. and Hanano, M.: *Biochem. Pharmacol.* **37**, 2273-2278 (1988).
- 98) Liu, K.-X., Kato, Y., Narukawa, M., Kim, D.C., Hanano, M., Higuchi, O., Nakamura, T. and Sugiyama, Y.: *Am. J. Physiol.* **263**, G642-G649 (1992).
- 99) Takakura, Y., Fujita, T., Furitsu, H., Nishikawa, M., Sezaki, H. and Hashida, M.: *Int. J. Pharm.* **105**, 19-29 (1994).
- 100) Fujita, T., Nishikawa, M., Ohtsubo, Y., Ohno, J., Takakura, Y., Sezaki, H. and Hashida, M.: *J. Drug Targeting* **2**, 157-165 (1994).
- 101) Fujita, T., Takakura, Y., Sezaki, H. and Hashida, M.: *Pharm. Sci.* **1**, 371-375 (1995).
- 102) Pardridge, W.M., Kumagai, A.K. and Eisenberg, J.B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**, 307-313 (1987).
- 103) Triguero, D., Buciak, J.B. and Pardridge, W.M.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **258**, 186-192 (1991).
- 104) Brown, B.A., Comeau, R.D., Jones, P.L., Liberatore, F.A., Neacy, W.P., Sands, H. and Gallagher, N.M.: *Cancer Res.* **47**, 1149-1154 (1987).
- 105) Duncan, J.R. and Welsh, M.J.: *J. Nucl. Med.* **34**, 1728-1738 (1993).
- 106) Hnatowich, D., Layne, W.W. and Childs, R.L.: *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **12**, 327-332 (1982).
- 107) Acton, S., Resnick, D., Freeman, M., Ekkel, Y., Ashkenas, J. and Krieger, M.: *J. Biol. Chem.* **268**, 3530-3537 (1993).
- 108) Doi, T., Higashino, K., Kurihara, Y., Wada, Y., Miyazaki, T., Nakamura, H., Uesugi, S., Imanishi, T., Kawabe, Y., Itakura, H., Yazaki, Y., Matsumoto, A. and Kodama, T.: *J. Biol. Chem.* **268**, 2126-2133 (1993).
- 109) Pearson, A.M., Rich, A. and Krieger, M.: *J. Biol. Chem.* **268**, 3546-3554 (1993).
- 110) Fujita, T., Nishikawa, M., Tamaki, C., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**, 971-978 (1992).
- 111) Fujita, T., Furitsu, H., Nishikawa, M., Takakura, Y., Sezaki, H. and Hashida, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 191-196 (1992).
- 112) Wu, G.Y. and Wu, C.H.: *J. Biol. Chem.* **262**, 4429-4432 (1987).
- 113) Wu, G.Y. and Wu, C.H.: *Biochemistry* **27**, 887-892 (1988).
- 114) Wu, G.Y., Wilson, J.M. and Wu, C.H.: *J. Biol. Chem.* **264**, 16985-16987 (1989).
- 115) Wilson, J.M., Grossman, M., Wu, C.H., Roy Chowdhury, N., Wu, G.Y. and Roy Chowdhury, N.: *J. Biol. Chem.* **267**, 963-967 (1992).
- 116) Wilson, J.M., Grossman, M., Cartera, J.A., Wu, C.H. and Wu, G.Y.: *J. Biol. Chem.* **267**, 11483-11489 (1992).
- 117) Ashwell, G. and Morell, A.G.: *Adv. Enzymol.* **41**, 99-128 (1974).
- 118) Kawasaki, T. and Ashwell, G.: *J. Biol. Chem.* **251**, 1296-1302 (1976).
- 119) Sharma, R.J., Woods, N.M., Cobbold, P.H. and Grant, D.A.W.: *Biochem. J.* **259**, 81-89 (1989).
- 120) Magnusson, S. and Berg, T.: *Biochem. J.* **257**, 651-656 (1989).
- 121) Lee, Y.C., Stowell, C.P. and Kranz, M.J.: *Biochemistry* **15**, 3956-3963 (1976).
- 122) Gray, G.R.: *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 426-428 (1974).
- 123) Fiume, L., Mattioli, A., Busi, C., Spinosa, G. and Wieland, Th.: *Experimantia* **38**, 1087-1089 (1982).
- 124) Fiume, L., Bassi, B., Busi, C., Mattioli, A. and Spinosa, G.: *Biochem. Pharmacol.* **35**, 967-972 (1988).
- 125) Molema, G., Jansen, R.W., Visser, J., Herdewijn, P., Moolenaar, F. and Meijer, D.K.F.: *J. Med. Chem.* **34**, 1137-1141 (1991).
- 126) Fiume, L., Busi, C., Stefano, D. and Mattioli, A.: *Adv. Drug Delivery Rev.* **14**, 51-65 (1994).
- 127) van der Sluijs, Bootama, H.P., Postema, B., Moolenaar, F. and Meijer, D.K.F.: *Hepatology* **6**, 723-728 (1986).
- 128) Taylor, M.E., Leaning, M.S. and Summerfield, J.A.: *Am. J. Physiol.* **252**, E690-E698 (1987).
- 130) Jansen, R.W., Molema, G., Ching, T.L., Oosting, R., Harma, G., Moolenaar, F., Hardonk, M.J. and Meijer, D.K.F.: *J. Biol. Chem.* **266**, 3343-3348 (1991).
- 131) Nishikawa, M., Ohtsubo, Y., Ohno, J., Fujita, T., Koyama, Y., Yamashita, F., Hashida, M. and Sezaki, H.: *Int. J. Pharm.* **85**, 75-85 (1992).
- 132) Dreborg, S. and Åkerblom, E.B.: *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **6**, 315-365 (1990).
- 133) Savoca, K.V., Abuchowski, A., van Es, T. and Davis, F.F.: *Biochim. Biophys. Acta* **578**, 47-53 (1979).
- 134) Kitamura, K., Takahashi, T., Takashina, K.-I., Yamaguchi, T., Noguchi, A., Tsurumi, H., Toyokuni, T. and Hakomori, S.-I.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 1387-1394 (1990).
- 135) Roseng, L. Tolleshaug, H. and Berg, T.: *J. Biol. Chem.* **267**, 22987-22993 (1992).
- 136) Matsushima, A., Nishimura, H., Ashihara, Y., Yokota, Y. and Inada, Y.: *Chem. Lett.* **7**, 773-776 (1980).
- 137) Horiuchi, S., Takata, K., Maeda, H. and Morino, Y.: *J. Biol. Chem.* **259**, 53-56 (1985).
- 138) Horiuchi, S., Takata, K. and Morino, Y.: *J. Biol. Chem.* **260**, 475-481 (1985).
- 139) Jansen, R.W., Molema, G., Harms, G., Kruijt, J.K., van Berkel, T.J.C., Hardonk, M. J. and Meijer, D.K.F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 23-32 (1991).
- 140) Franssen, E.J.F., Jansen, R.W., Vaalburg, M. and Meijer, D.K.F.: *Biochem. Pharmacol.*

- 45, 1215-1226 (1993).
- 141) Stehle, G., Friedrich, E.A., Sinn, H., Wunder, A., Harenberg, J., Dempfle, C.E., Maier-Borst, W. and Heene, D.L.: *J. Clin. Invest.* **90**, 2110-2116 (1990).
- 142) Mukhopadhyay, A., Chaudhuri, G., Arora, S.K., Sehgel, S. and Basu, S.K.: *Science* **244**, 705-707 (1989).
- 143) Chaudhuri, G., Mukhopadhyay, A. and Basu, S.K.: *Biochem. Pharmacol.* **38**, 2995-3002 (1989).
- 144) Basu, S.K.: *Biochem. Pharmacol.* **40**, 1941-1946 (1990).
- 145) Mukhopadhyay, A., Mukhopadhyay, B., Srivastava, R.K. and Basu, S.K.: *Biochem. J.* **284**, 237-241 (1992).
- 146) Basu, S., Mukhopadhyay, B., Basu, S.K. and Mukhopadhyay, A.: *FEBS Lett.* **342**, 249-254 (1994).
- 147) Jaeschke, H., Bautista, A.P., Spolarics, Z. and Spitzer, J.J.: *J. Leukoc. Biol.* **52**, 377-382 (1992).
- 148) 稲田祐二: 続タンパク質ハイブリッドーこれからの化学修飾ー、共立出版、1988、pp.1-40.
- 149) 稲田祐二、松島瑞子、西村裕之、小寺 洋: 生化学 **62**, 1351-1362 (1990).
- 150) Nucci, M.L., Shorr, R. and Abchowski, A.: *Adv. Drug Delivery Rev.* **6**, 133-151 (1991).
- 151) Schon, A.H.: *Adv. Drug Delivery Rev.* **6**, 203-217 (1991).
- 152) Delgado, C., Francis, G.E. and Fisher, D.: *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **9**, 249-304 (1992).
- 153) Katre, N.V.: *Adv. Drug Delivery Rev.* **10**, 91-114 (1993).
- 154) Tomlinson, E.: *Adv. Drug Delivery Rev.* **1**, 87-198 (1987).
- 155) Banga, A.K. and Chien, Y.W.: *Int. J. Pharm.* **48**, 15-50 (1988).
- 156) Tomlinson, E.: In Prescott, L.F. and Nimmo, W.S. (eds.) *Novel Drug Delivery and Its Therapeutic Application*, John Wiley & Sons, 1989, pp. 245-262.
- 157) Bocci, V.: *Adv. Drug Delivery Rev.* **4**, 149-169 (1990).
- 158) Gloff, C.A. and Benet, L.Z.: *Adv. Drug Delivery Rev.* **4**, 359-386 (1990).
- 159) Mihara, K., Hojo, T., Fujikawa, M., Takakura, Y., Sezaki, H. and Hashida, M.: *Pharm. Res.* **10**, 823-827 (1993).
- 160) Pazur, J.H., Knull, H.R. and Simpson, D.L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**, 110-116 (1970).
- 161) Gomi, K., Morimoto, M., Inoue, A., Kobayashi, H., Deguchi, T., Hara, T. and Nakamizo, N.: *Gann* **75**, 292-300 (1970).
- 162) Satoh, Y., Kasama, K., Kajita, A., Shimizu, H. and Ida, N.: *J. Interferon Res.* **4**, 411-422 (1984).
- 163) Takakura, Y., Kaneko, Y., Fujita, T., Hashida, M., Maeda, H. and Sezaki, H.: *J. Pharm. Sci.* **78**, 117-121 (1989).
- 164) Takakura, Y., Fujita, T., Hashida, M., Maeda, H. and Sezaki, H.: *J. Pharm. Sci.* **78**, 219-222 (1989).
- 165) Hurwitz, E., Wilchek, M. and Pitha, J.: *J. Appl. Biochem.* **2**, 25-35 (1980).
- 166) Trouet, A., Masquelier, M., Baurain, R. and Deprez-de Campeneere, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 626-629 (1982).
- 167) Dillan, R.O., Shawler, D.L., Johnson, D.E., Meyer, D.L., Koziol, J.A. and Frincke, J.M.: *Cancer Res.* **46**, 4886-4891 (1986).
- 168) Hurwitz, E.: *Biopolymers* **22**, 557-567 (1983).
- 169) Ueda, Y., Munechika, K., Kikukawa, A., Kanou, Y., Yamanouchi, K. and Yokoyama, K.: *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 1639-1641 (1989).
- 170) 藤田 浩、岡本公彰、高尾亜由子: *Drug Delivery Syst.* **6**, 133-138 (1991).
- 171) Bernstein, A., Hurwitz, E., Maron, R., Sela, M. and Wilchek, M.: *J. Natl. Cancer Inst.* **60**, 379-384 (1978).
- 172) Axén, R. and Ernback, S.: *Eur. J. Biochem.* **18**, 351-360 (1971).
- 173) Takakura, Y., Kitajima, M., Matsumoto, S., Hashida, M. and Sezaki, H.: *Int. J. Pharm.* **37**, 135-143 (1987).
- 174) Eldjarn, L. and Jellum, E.: *Acta Chem. Scand.* **17**, 2610-2621 (1963).
- 175) Kunitz, M.J.: *J. Gen. Physiol.* **29**, 149 (1946).
- 176) Usui, M. and Matsubayashi, T.: *J. Immunol.* **122**, 1266-1272 (1979).
- 177) Khomyakov, K.P., Virnik, A.D. and Rogovin, Z.A.: *Khim. Prirodn. Soedin.* **2**, 213-214 (1966).
- 178) 橋田 充: 瀬崎 仁編、ドラッグデリバリーシステム、南江堂、1986、pp.47-65.
- 179) Kassell, B.: *Method. Enzymol.* **19**, 840-844 (1970).
- 180) Aoyama, T., Ino, Y., Ozeki, M., Oda, M., Sato, T., Koshiyama, Y., Suzuki, A. and Fujita, M.: *Jpn. J. Pharmacol.* **35**, 203-227 (1984).
- 181) Fric, P., Kasafirek, E., Slaby, J. and Marek, J.: *Hepatogastroenterology* **32**, 206-209 (1984).
- 182) Suzuki, F., Daikuhara, Y., Ono, M. and Takeda, Y.: *Endocrinology* **90**, 1220-1230 (1972).
- 183) Koide, T., Tsunesawa, S. and Ikenaka, T.: *J. Biochem.* **71**, 165-167 (1972).
- 184) Koide, T. and Ikenaka, T.: *Eur. J. Biochem.* **32**, 417-431 (1973).
- 185) Ozawa, K., Laskowski, M., Jr.: *J. Biol. Chem.* **244**, 3955-3961 (1966).
- 186) Sweet, R.M., Wright, H.T., Janin, J., Chothia, C.H. and Blow, D.M.: *Biochemistry* **13**, 4212-4228 (1974).
- 187) Yasuda, Y., Fujita, T., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H.: *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 2053-2056 (1990).
- 188) Fujita, T., Yasuda, Y., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H.: *J. Controlled Release* **11**, 149-156 (1990).
- 189) Fujita, T., Yasuda, Y., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H.: *J. Pharmacobio-Dyn.* **14**, 623-629 (1991).

- 190) Altman, K.I., Smull, K. and Barron, E.S.G.: *Arch. Biochem. Biophys.* **21**, 158-165 (1949).
- 191) London, M. and Hudson, P.B.: *Science* **125**, 937-938 (1957).
- 192) Kissel, P., LaMarche, M. and Royer, R.: *Nature* **217**, 72-74 (1968).
- 193) Brogard, J.M., Coumaros, D., Frankhauser, J., Stahl, A. and Stahl, J.: *Eur. J. Clin. Biol. Res.* **17**, 890-895 (1972).
- 194) Nishikawa, M., Yamashita, F., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H.: *J. Pharm. Pharmacol.* **44**, 396-401 (1992).
- 195) Scott, T.A. and Melvin, E.H.: *Anal. Chem.* **25**, 1565-1661 (1953).
- 196) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
- 197) Habeeb, A.F.S.A.: *Anal. Biochem.* **14**, 328-336 (1966).
- 198) Nishida, K., Tonegawa, C., Nakane, S., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H.: *Int. J. Pharm.* **65**, 7-17 (1990).
- 199) Laemmli, U.K.: *Nature* **227**, 680-685 (1970).