

学 位 論 文 題 名

DRUG DELIVERY SYSTEM AND ITS MECHANISM

BY 6-O-CARBOXYMETHYL-CHITIN

(6-O-カルボキシメチルキチンによる薬物送達とその機構)

学位論文内容の要旨

〔緒言〕医薬の化学修飾あるいは高分子化合物や小胞体を利用して医薬の有効利用が図られており、ドラッグデリバリーシステム(DDS)と呼ばれている。その中でも特に、薬物の生体内挙動や血中濃度を制御するために、薬物を高分子化合物に結合させて高分子化医薬とする試みは、非常に期待されるものである。一般に、普通用いられる薬物は低分子化合物であるために細胞や組織に容易に拡散していくが、反面、代謝や体外への排泄も速く、一定量の医薬が長期にわたり供給されることが望まれる(徐放性)。本研究は、リゾチームにより分解される生体内消化性多糖であるキチンの水溶性誘導体6-O-カルボキシメチルキチン(CM-キチン)を低分子医薬を運搬するための薬物担体に用いて、薬物を徐放しうる高分子化医薬の構築を目的とした。毒性・抗原性等を考慮に入れ、アミノ酸あるいはジペプチドをスパーサーに用いてモデルドラッグをCM-キチンに共有結合により導入して、数種の高分子化医薬を合成した。CM-キチンは、リゾチームによって加水分解されるので、薬物を担持する結合を蛋白質分解酵素に受容性を有するように分子設計すると、薬物の放出には少なくとも二段階の加水分解が介在することとなる。この過程を「二段階徐放」と位置付け、調製されたCM-キチン-医薬結合体の酵素加水分解によるモデルドラッグの放出挙動と分子量依存性の観察からCM-キチンを用いた高分子化医薬による薬物徐放性の発現およびその機構を検討した。

〔実験〕高分子化医薬中での薬物の結合様式を、アミド結合とエステル結合とするため、モデル薬物として

-

ニトロアニリン(pNA)と

-

ニトロフェノール(ONp)を用いた。フェニルアラニン(-Phe-)・グリシルフェニルアラニン(-Gly-Phe-)・アラニルフェニルアラニン(-Ala-Phe-)及び4-アミノブチリルフェニルアラニン(-Abu-Phe-)のフェニルア

ラニンのカルボキシル基にpNAを導入して、アミド系の高分子化医薬を設計した。エステル系の分子設計では、一般的に言われるその不安定性を考慮して、非天然アミノ酸である4-アミノ酪酸・アミノイソ酪酸・アミノカプロン酸を用いてONpを導入した。薬物放出にかかる加水分解酵素としてリゾチームと α -キモトリプシンを指標として用い *in vitro* モデル系での二段階徐放発現を評価した。薬物徐放性と高分子化医薬の分子量との関連を見るため、それぞれのモデル化合物をあらかじめ第一段階であるリゾチーム加水分解反応により担体高分子の分子量を小さくしておき、第二段階の酵素加水分解反応を行なった。さらに、医薬結合体の分解過程を見積るためにリゾチームによる加水分解反応を詳細に観察した。毒性(免疫原性)の検討には、ウサギをCM-キチン-薬物結合体のモデル化合物で免疫し、それらの免疫応答をみた。また、CM-キチン- Ca^{2+} 複合体の疎水性アミノ酸吸着能を利用したペプチド医薬の安定化についても耐酵素加水分解反応性から検討を試みた。CM-キチン- Ca^{2+} 複合体による吸着能解明の一環として、X線吸収端微細構造(EXAFS)法により、カルシウムのCM-キチン中における局所環境を観察した。

〔結果・考察〕アミド型医薬結合体の α -キモトリプシンとリゾチームによる同時加水分解を行なったところ、特にスペーサーがアミノ酸一残基からなる化合物では、薬物の放出が顕著に薬物結合体の分子量によって支配されることが明らかとなった。 α -キモトリプシンによる活性医薬放出の過程を種々の分子量の薬物結合体を用いて速度論的に解析した。その結果、スペーサーの分子設計と医薬結合体の分子量が「二段階徐放」発現に大きく寄与することが示唆された。つまり、高分子量時においては、担体のCM-キチン分子がカルシウムとのキレートによる疎水性アミノ酸吸着能を含んだ様式で医薬を包接することで酵素の接近を妨げ、リゾチームによって低分子化されるにつれて、スペーサー-薬物部分が露出されることとなり、そこでは低分子基質として容易に活性薬物が放出されることが明らかとなった。一方、エステル型薬物結合体では、天然のアミノ酸をスペーサーに用いても有意な医薬の徐放性が達成されなかったが、非天然アミノ酸をスペーサーに用いることで所期の目標を達成しうることが示された。

CM-キチン-薬物結合体の生体内分解を類推するため、薬物導入量の異なる医薬結合体と担体のCM-キチンそれぞれのリゾチームによる加水分解反応の速度論的解析を

行なったところ、薬物分子のCM-キチン分子への導入は、酵素受容性を顕著に増大させることが見いだされた。またそれに伴いリゾチームは、CM-キチンの薬物結合部位近傍を優先的に切断していくことも示唆された。その結果、比較的高分子量の医薬結合体が残されながらも、次の酵素加水分解に受容性の高い低分子量医薬結合体が生成されることが確認された。以上の結果は、「二段階徐放」の発現を理論的に説明する有力な証拠となるであろう。

また、担体高分子自体に免疫原性が無くとも他の分子を導入することで免疫原性を示す場合があるため、毒性に関する評価も重要な課題である。そこで、アミド型とエステル型のCM-キチン-薬物結合体をそれぞれウサギに免疫した。その結果、三ヶ月間にわたる免疫でもそれらの抗血清はCM-キチン-薬物結合体に対して有意な免疫応答を示さず、本研究における分子設計では安全性も高いことが示唆された。これはおそらく、CM-キチンの水溶性と高い生体内消化性に起因するもので、CM-キチンの薬物担体としての優位性が示されたといえる。

疎水性分子吸着能を有するCM-キチン- Ca^{2+} 複合体をX線回折法で調べたところ、低置換度CM-キチンでは部分的にキチンの結晶構造が保たれていた。またその複合体のカルシウムの局所構造をEXAFS法で観察すると、高置換度CM-キチン及び酢酸カルシウムには共通の情報が得られたが、低置換度CM-キチンに特異的なカルシウムの局所的存在が観察された。従って、CM-キチンのカルシウムの特異結合にはその結晶構造に由来するN-アセチルグルコサミン残基の立体配置が大きく寄与していることが示唆された。また、そのCM-キチン- Ca^{2+} 複合体への吸着によってペプチド性医薬が酵素の攻撃に対して安定化され、CM-キチン- Ca^{2+} 複合体から徐放されうることが見いだされた。

以上の結果から、CM-キチンの薬物徐放性担体としての有効性が明確に示され、「二段階徐放」の達成が適切な分子設計のもとになされることが見いだされた。また、その徐放を制御する因子についても同定されたので、分子設計へフィードバックされることで実用的な医薬結合体も調製されうると思われる。これらの知見は、CM-キチンにとどまらず、高分子化医薬を設計する際の普遍的な指標ともなりうるであろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 倉 清 一
副 査 教 授 引 地 邦 男
副 査 教 授 山 岸 皓 彦
副 査 助 教 授 西 則 雄

学 位 論 文 題 名

DRUG DELIVERY SYSTEM AND ITS MECHANISM BY 6-O-CARBOXYMETHYL-CHITIN

(6-O-カルボキシメチルキチンによる薬物輸送とその機構)

近年医薬の著しい進歩により人間の寿命が延びた反面、医薬の副作用による被害も非常に多くなり、社会的な注目を浴びる事件も多く成りつつある。従って新しく医薬を開発するためには、この副作用を念頭に置いた研究が要求されるようになってきた。しかし医薬の副作用を投与形態の側から見ると経口投与にしる注射にしる、動物体内での拡散速度が高いため一度に多量投与する結果、医薬の血中濃度が異常に高く成るためである。また多量投与しなければ有効医薬濃度を保てない。このような副作用を軽減するため高分子物質を用いて医薬を固定化してから投与し、医薬が徐々に血中へ放出されるように分子設計された徐放性医薬が考え出された。しかしながら使われた高分子化合物の免疫原性等の毒性のため実用化されているのは極く僅かである。

本申請者はムコ多糖類のキチンが生体内消化性に加えて低毒性である点に注目し、医薬を生体内へ輸送する担体として利用することを考えついた。しかしキチンはほとんどの溶媒に難溶性のため、キチン粉末をアルカリ性溶液に分散した不均一系で位置特異的にカルボキシメチル化して6-O-カルボキシメチル・キチン(CM-キチン)なる水溶性誘導体とした。更にその生体内消化性から薬物輸送担体としての適合性を検討した。論文ではペンダント型徐放性医薬をモデルとしてスパーサーペプチドのアミノ酸構成と免疫原性及び生理条件下での医薬安定化についても検討している。

この研究は異物に対し非常に敏感に反応して抗体を産生するケースを想定した場合、最も初歩的な研究として要求されるものを対象としている。即ちアミノ酸2-3残基から成るスペーサーペプチドの末端残基を免疫原性の比較的高いフェニルアラニン(Phe)を配置して医薬との結合点がキモトリプシン系ペプチダーゼで加水分解されるように分子設計しても抗体産生は見られないことを明らかにしている。この場合医薬とスペーサーペプチドとの結合がアミド結合の場合生体条件下でも、担体のCM-キチンが加水分解されて低分子量化が起こるまでは医薬の遊離が見られないが、エステル結合の場合は生体条件下では直ちに加水分解されて医薬の遊離が観察されることを報告している。この現象はCM-キチンがカルシウムイオンを特異的にキレートし、更にそのキレート面にPhe側鎖のベンジル基が吸着される現象と密接に関連することを示唆している。この医薬の生体内安定化は医薬の副作用や医薬を特定の臓器等へ輸送するに際して重要な知見として評価されるものである。さらに申請者はムコ多糖のグリコシド結合と医薬とスペーサー間の結合との加水分解反応の動力学的解析を行い、担体側のグリコシド結合の加水分解速度がスペーサー医薬結合のそれより高く成るように分子設計することにより、不活性医薬であるプロドラッグをまず血中に徐放させ、次いで生体内の特定の部位でスペーサー-医薬間結合が加水分解され活性医薬に転換されると言う、全く新しい高分子医薬による“二次元徐放機構”を提案している。申請者等が見い出したマウス静脈注射後のCM-キチンが、生体内消化でオリゴマー化され骨髄に特異的に集約されることを考え併せ、リンパ球産生制御等の面から非常に興味深い機構として注目されている。なお、この研究が1992年度アメリカ化学会春季年会“高分子医薬の生体内輸送に関するシンポジウム”(サンフランシスコ)及び“第6回国際医薬輸送シンポジウム”(1993年2月23日ユタ大学)で各々招待講演に指定されたことは注目度の高さを表わしているものと考えられる。

以上の様に、本申請者は医薬徐放に関して担体に求められる諸機能の中でも最も基本的な、担体の生体内加水分解作用、二次元徐放機構に於けるスペーサーの特性、医薬の生体内安定性と担体分子量との関係及び安全性の基準ともなる免疫原性等について詳しく検討し、新しいタイプの高分子医薬への道を切り拓いたと言える。審査員一同は、申請者が博士(理学)の学位を受けるのに十分な資格を持つものと認めた。