ポリオンコンプレックスを利用した ポリペプチド医薬の徐放化

筏 義 人*

Sustained release of polypeptide drugs through polyion complexation

Modern biotechnology has realized to produce polypeptide drugs on a large scale. Although some of them need controlled release because of the too short half-times in the blood, any good systems for their sustained release are not yet available. The major reason is a high susceptibility of polypeptides to denaturation.

To develop an effective system for the sustained release of polypeptides, we take advantage of polyion complexation that is defined as complex formation between two oppositely charged polyelectrolytes. Polypeptides are either positively or negatively charged in aqueous solution unless the solution pH is equal to the isoelectric point. Because the polymeric carrier being used for injectable drugs should be resorbable, we chose gelatin as a carrier of polypeptide drugs. Both negatively- and positively-charged gelatins are commercially available.

As an example we describe here a combination of negatively-charged gelatin with basic fibroblast growth factor (bFGF) that is a cell growth factor having an isoelectric point of 9.6. Upon mixing in aqueous solution, these two biomacromolecules form a polyion complex, allowing the sustained release of bFGF when injected in animals. *In vivo* studies revealed that the bFGF molecules released in the body still maintained the biological activities as a cell growth factor. This new drug delivery system was applied to vascularization and regeneration of cartilage and bone for mice and rabbits.

Yoshito Ikada*

key words : *sustained release, polypeptide drugs,
polyion complexation, gelatin, bFGF*

ポリペプチド医薬の徐放

サイトカインはポリペプチドである。それらが、個体発生、組織修復、自己防御などにきわめて重要な情報伝達物質であることは、周知のとおりである。

その中の生体組織の修復においては、細胞増殖因子、細胞分化因子、組織形成因子などよばれているポリペプチドが中心的役割を果たしている。これらは、インスリン、エリスロポエチン、

コロニー刺激因子などのサイトカインのように全身投与によっても有効であるのではなく、その生体修復の行われている局所だけに働かせるのが望ましい。もしも修復部位以外のところでこれらのサイトカイン濃度が正常値よりも異常に高くなると、望ましくない生体反応の引き起こされる可能性が高い。

したがって、この場合、そのポリペプチドサイトカインの局所徐放化を必要とする。表1に、現在、ポリペプチドの徐放化のために用いられているキャリアを列挙した。このように、すでに多くのキャリアが研究されているが、いずれも、製剤時のポリペプチドの失活やバースト放出などの間

* Research Center for Biomedical Engineering, Kyoto University, 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606 京都大学生体医療工学研究センター
Offprint requests to : Yoshito Ikada, Ph. D.

表1 Natural and synthetic materials being utilized for polypeptide release

Polymers natural : albumin, collagen, gelatin, fibrin, alginate, hyaluronic acid, cellulose derivatives, dextran etc.

synthetic : poly(ethylene glycol), poly(acrylic acid), poly(cyanoacrylate), poly(anhydride), poly(lactic acid), poly(glycolic acid), poly(lactic-co-glycolic acid), pluronic polyols etc.

Inorganic materials : hydroxyapatite, tricalcium phosphate(TCP), calcium sulfate(plaster of Paris), calcium carbonate(coral) etc.

図2 Schematic illustrations of polyelectrolyte complex and ionic crosslinking

図1 Conceptive illustrations of tissue engineering

題を抱えている。

組織工学の台頭

生体組織の損傷度がきわめて大きくて薬物療法が有効でない場合、これまで、人工臓器や人工組織などのような人工材料によって欠損組織を代替してきた。欧米では、さらに、臓器移植という手

段も用いられてきた。

ところが、最近、半永久的に体内に埋め込む人工材料を用いなくても、生体組織を再生できるという新しい技術、つまり組織工学(tissue engineering)が注目されている(たとえば、筏 義人: 最近のバイオマテリアル研究の動向. 細胞工学 14 : 1455-1459, 1995. "Tissue Engineering" MRS Bulletin, 21 : 1996, など). これは、細胞の力を利用して生体組織の修復および生体機能の回復を目指すものである。この目的を達成するには、一般には細胞のみでは困難であるため、細胞増殖のための足場、あるいは移植細胞に対する宿主の自己防御網から護るための免疫隔離膜を必要とする。さらに、細胞増殖のために足場を用いても、生体組織の修復速度が低い場合には、足場のみでなく、組織増殖・分化因子もさらに加える。このように足場を用いる組織再生工学のあらましをイラストで図1¹⁾に示した。このときに用いる細胞増殖因子に徐放化の必要なことはいうまでもない。

ポリイオンコンプレックスとは²⁾

細胞増殖因子であるポリペプチドの徐放化といっても、それは口でいうほど容易ではない。上述したように、ポリペプチドが失活したり、徐放パターンが要求どおりではない場合が多いのである。そこで、筆者らは、ポリイオンコンプレックス反応という方法を利用してポリペプチドの徐放化を試みている。

図3 Release of protein drug from biodegradable polymer carrier on the basis of polyelectrolyte complexation

表2 Biodegradable polymers with electrically charged groups

Proteins	: Albumin, Collagen, Gelatin (acidic and basic), Fibrin etc.
Polysaccharides	: Hyaluronic acid etc.

ポリイオンコンプレックスとは、図2 a に示したように、反対符号をもつ高分子電解質分子同士が、クーロン力による引き合いによって凝集体を生成する反応である。一分子中に多数個の解離基をもつ高分子電解質間のイオン結合が、すべて同時に切り放たれる確率はきわめて低い。その結果、低分子イオンと異なり、反対符号のポリイオン間に容易に引き裂かれない結合が生成するのである。この分子間相互作用はイオン結合によっているため、当然ながら、ポリイオンコンプレックスは、媒体のpHとイオン強度の影響を強く受ける。ポリイオンコンプレックスと類似の結合にイオン架橋とよばれるのがある。これは、図2 b に示したように、同符号のポリイオン間とそれと反対符号の低分子イオンでサイドイッチしてイオン結合するものである。この場合も、ポリイオンコンプレックスと同じく、水不溶性のヒドロゲルが生成する。

ポリイオンコンプレックスは、工業的には、高分子膜の製造に利用されている。生物界においては、それよりはるかに多く利用されていると思われる。たとえば、染色体のヒストンはカチオン性ポリペプチドであるのに対し、核酸がアニオン性

であるため、それら同士の結合にポリイオンコンプレックスが重要な働きを演じていると思われる。リゾチームのように等電点の高い、つまりカチオン性ポリペプチドが生体組織内に貯蔵されているのも、ポリイオンコンプレックス反応を利用しているのかもしれない。

ポリペプチドの徐放化のためにポリイオンコンプレックス反応を利用する場合には、生体安全性の高い高分子電解質をキャリアとする必要がある。もしそのキャリアに生体内分解性を望む場合には、用いられるキャリアは生体高分子にほぼ限られてしまう。表2に生体分解性で解離基をもつ高分子を示した。それらのイオン性キャリアとポリペプチドとがポリイオンコンプレックスを形成し、それからポリペプチドが外部に放出されている機構を図3に模式的に描いた。そこに示したように、ポリペプチド医薬は、キャリアの酵素分解あるいはイオン強度の変化の結果として、外液に放出されていくと考えられる。

キャリアとしてのゼラチン

表2に示したように、ゼラチンには酸性ゼラチンと塩基性ゼラチンとが存在する。いずれのゼラチンがコラーゲンから得られるかは、その原料の動物の骨、皮膚、腱などから抽出する方法に依存する。

ゼラチンは、3本鎖がヘリックス構造によって高次化したコラーゲンをバラバラにしたランダム

図4 Preparation process of acidic and basic gelatins from collagen

コイル状の共重合体であり、分子量は理論的には10万である。すなわち、3本鎖のコラーゲン体の分子量が30万であるため、その基本構成鎖にまでバラバラにすれば、分子量は10万となる。実際には、まだ完全にはヘリックスのほどけていない部分があったり、1本鎖がさらに加水分解を受けて低分子量化しているため、ゼラチン分子の中には分子量が10万以上や10万以下のものも含まれている。

工業的には、ゼラチンは図4に示した石灰法か酸処理法によって、動物の原料から抽出される。広く行われているのは石灰法である。

この方法の抽出媒体はアルカリであるため、コラーゲン分子中の酸アミド基の一部がアルカリ加水分解を受ける。その結果、抽出されるゼラチンはカルボキシル基に富むことになる。

一方、酸処理や酵素法による抽出の場合は、コラーゲン分子が化学反応を比較的受けにくいいため、もとのコラーゲンの構成鎖に近い分子が得られる。したがって、この場合に得られるゼラチンの等電点は、コラーゲンと同じ9近傍である。す

なわち、塩基性ゼラチンとなり、石灰法で得られる酸性ゼラチンとイオンの性質が異なることになる。

酵素法によってコラーゲンを動物組織から抽出する場合には、分子末端のテロ部が加水分解による切断を受けてアテロコラーゲンとなる。図4の方法によって得られるゼラチンも、そのテロ部はほとんど除去されており、抗原性は大きく低下していると考えられる。

徐放しようとするポリペプチド医薬が酸性ならば、キャリアとして塩基性ゼラチンを用い、ポリペプチドが塩基性ならば酸性ゼラチンを用いればよい。キャリアを水不溶性にするためには、グルタルアルデヒドや水溶性カルボジイミドを用いてゼラチンに架橋結合を導入する。

以下に、塩基性ポリペプチドの一種である塩基性繊維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)と酸性ゼラチンとの間のポリイオンコンプレックス反応によって作成した徐放ゲルを例にとって、ポリイオンコンプレックス製剤をより具体的に説明する。

図5 Turbidimetric titrations of various concentrations of bFGF in 1/15 M phosphate-buffered solution (pH 7.0) containing gelatin (5.0 mg/ml) at 25°C
A : Acidic gelatin with the isoelectric point (pI) of 5.0 : (○) 6, (●) 12, (△) 24, (▲) 48, and (□) 72 hr after mixing of gelatin and bFGF.
B : Basic gelatin with the pI of 9.0 : (○) 6, (●) 12, (△) 24, (▲) 48, and (□) 72 hr after mixing of gelatin and bFGF.

図6 The time course of polyion complexation of an amphoteric synthetic polymer [poly(dimethylaminoethyl methacrylate-co-methacrylic acid)] at pH 5.6 and at different polymer concentrations. The letter r in the legend indicates replication of the experiment

bFGF-ゼラチンヒドロゲル製剤

図5に、bFGF水溶液と酸性ゼラチン水溶液とを混合すると、ポリイオンコンプレックス反応が

実際に起こるという実験結果を示した(未発表)。図5の縦軸は混合液の濁り度であるが、混合してから時間が経過するとともに、濁り度の増大しているのがわかる。混合液が白濁してくるのは、水不溶性の凝集体が生成したためであり、この場合、それはポリイオンコンプレックス生成に基づくと考えるのが、もっとも合理的である。それをさらに裏付けるのは、図5中にも示したように、bFGFと塩基性ゼラチンとを混合した場合には、まったく白濁の生じないことである。

一般に、合成高分子同士のポリイオンコンプレックス反応は、極度に高分子濃度が低くない限り、図6に示したように³⁾、ポリイオンコンプレックス反応は速やかに進行する。したがって、図5にみられるゆっくりとしたポリイオンコンプレックス生成は、合成高分子電解質に比較してbFGFの解離基密度がきわめて低いためと思われる。

(1) ゲルの製法

図7にbFGF-ゼラチン製剤の製法を簡単に示した。この図からもわかるように、ゼラチンの架橋ヒドロゲルを作成しておいてから、それにbFGF水溶液を加えて、ゼラチン架橋鎖にbFGF

図7 Preparation scheme of bFGF-incorporating gelatin hydrogels crosslinked with glutaraldehyde

図8 *In vitro* release profiles of bFGF-incorporating hydrogels of gelatin with the pI of 5.0(○) and 9.0(●) in 1/15 M phosphate-buffered solution (pH 7.4) at 37°C

The water content of gelatin hydrogels is 95.2%, irrespective of the type of gelatin used. The hydrogels contained 100 μ g of bFGF in 260 mg wet hydrogels.

分子をポリイオンコンプレックス反応によってイオン固定させる。ポリイオンコンプレックス体を形成させておいてから架橋結合を導入した場合には、bFGF分子も架橋される可能性がある。

すでに述べたように、ポリイオンコンプレックス反応はイオン反応であるため、イオン強度の影響を強く受ける。イオン強度が高いほどイオン結合力は弱くなるため、筆者らは、できるだけ低いイオン強度下でコンプレックス形成を行い、得られたゲル製剤を体内に留置している。生体内においては酵素によってゼラチンキャリアが分解し、キャリアに固定化されていたbFGF分子がゲルから離れて外部に拡散していくと思われる。PBS中にbFGF-ゼラチンゲルを浸漬したときのbFGFの*in vitro*徐放結果を図8に示した⁴⁾。

PBS中に浸漬することによってbFGFは少しは放出しているが、かなりの部分はゲル内にとどまっている。参考までに図8には、塩基性ゼラチンゲルにbFGFを添加した結果も示した。この場合には、PBS中に浸漬することによって、ほとんどのbFGF分子が速やかに放出し、固定化は認められない。図8の結果によれば、多量のbFGFが酸性ゼラチンゲル内に残留しているが、これも、*in vivo*においては、ゼラチンの加水分解に伴って徐々に体内に放出されていくと思われる。

(2) 応用例
bFGF-ゼラチンゲル製剤からのbFGFの徐放を利用した組織工学の応用例を以下に示す。応用例といっても、まだ、動物実験の段階であり、ヒトへの応用はこれからである。

① 血管新生

生体組織の修復にとってその部位への血管新生

图 9 Photographs of tissue after subcutaneous implantation of bFGF-incorporating hydrogels

A : Untreated mouse.

B : Mouse injected with 0.1 ml of PBS solution containing 100 μ g bFGF.

C : Mouse implanted with 280 mg of wet hydrogel containing 100 μ g bFGF. The color of fascia having been in contact with the hydrogel turned red and neovascularization induced by bFGF incorporated in the hydrogel was observed.

D : Mouse implanted with 280 mg of bFGF-free wet hydrogel. The water content of hydrogel was 95.5 %. The bFGF-incorporating hydrogel was implanted or PBS solution containing bFGF was injected subcutaneously into the back of mice. Seven days later, the back skin was torn off and photographs of the tissue around the implantation or the injection site on both sides of fascia and skin were taken.

図 10 Influence of the hydrogel water content on tissue granulation induced by gelatin hydrogels containing 100 μ g bFGF 7 days after implantation

The weight of wet hydrogel changed from 40 to 390 mg depending on the hydrogel water content. A dotted line indicates the wet weight of tissue of normal, untreated mice.

** indicates significance at $p < 0.01$ against the value of group injected with 0.1 ml of PBS containing 100 μ g bFGF. (bFGF-free, bFGF-free wet gelatin hydrogel: the wet weight were 90 and 60 mg for hydrogel with the water content of 86.2 % and 77.6 %, respectively. Free, PBS containing 100 μ g bFGF.)

は、もっとも重要な生体の初期反応である。そこに毛細血管が張りめぐらされると、修復に必要な細胞増殖因子や栄養が十分に供給されるためである。bFGF は種々の生理活性をもつが、その中でもよく知られているのは血管新生作用である。筆者らは、このディスク状ゲル製剤をマウスの皮下に埋め込んだときの血管新生作用を、PBS に bFGF を溶解して水溶液の状態と同じ皮下に注入したときの結果と比較した⁴⁾。7 日後に得られた皮下組織の写真を図 9 に示す。明らかに、ゲル内に bFGF を固定した場合には、7 日後においても顕著な血管新生が認められるが、水溶液投与の場合には、処理をまったく施していない正常な場合とほとんど変わらない。血管新生に呼応して、図 10 に示すように、肉芽形成も、ゲルの含水率が低いほど、

表 3 Angiographic changes after implantation of bFGF-incorporating gelatin microspheres

Rabbit number	Time after implantation (weeks)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	+	++	++	++	+	+	+	±
2	+	+	+	+	+	±	±	-
3	+	+	++	+	+	+	+	±
4	+	++	++	+	+	+	+	±
5	+	+	+	+	+	±	±	-
6	±	±	+	+	+	+	+	±
7	+	++	++	++	++	++	+	±
8	+	+	+	+	+	+	+	±
9	±	±	±	±	-	-	-	-

Fluorescein leakage at late phase is defined as follows.

- = none. ± = faint. + = mild. ++ = moderate.

つまり架橋密度が高くてゲルの加水分解速度が低いほど、活発に進行している。図 10 の結果は、埋め込んでから 7 日後の結果であるが、水溶液投与の場合は、コントロールとまったく同じ低レベルである。

上述のように、生体組織の修復にとって旺盛な初期血管新生は望ましい現象であるが、網膜下に血管が新生すると、それは失明につながる避けるべき症状となる。この網膜下に新生した血管を消滅させる治療法を開発するためには、まず、血管新生動物モデルの確立が先決である。ところが、この網膜下の血管新生モデルの作成は、これまでにいろいろと試みられたにもかかわらず、よいモデルが得られなかった。そこで筆者らは、ミクロスフェア状の bFGF-ゼラチン製剤を作成し、それをウサギの網膜下に埋め込んだ。8 週間にわたって埋め込んだときの結果を表 3 に示す⁵⁾。明らかに、多くのウサギに血管の新生しているのがわかる。bFGF を包含していないゼラチンミクロスフェアを投与しただけでは、1 週間後にはまったく血管新生の徴候は認められなかった。

② 骨再生

骨組織の再生は、組織工学においてもっとも重要な研究対象であり、活発に研究が進められている。この骨再生促進のためにもっとも多く用いられるポリペプチドは、骨形成因子 (bone morphogenetic protein, BMP) である。筆者らは、よ

図 11 A histological section around the implantation site of a rhBMP-2-incorporating gelatin hydrogel

The section was stained with alizarin red S-light green 2 weeks after subcutaneous implantation. Newly formed bone with calcium deposition (arrows) was observed around the residual gelatin hydrogel (heavy arrow). Bar=250 μ m.

図 12 An operative photograph of skull defects of rabbit implanted with bFGF-free (right) and bFGF-incorporating gelatin hydrogels (left).

り研究例の少ない細胞形成因子として bFGF を選び、現在、研究を進めている。

図 11 に示したのは、本来は骨を生成することのない大腿筋中に、つまり異所性に BMP-ゼラチンディスク状製剤を埋め込んだときの組織写真である⁶⁾。用いた動物はラットであり、埋込み期間は 2 週間である。写真にみられるように、埋め込んだゲルの周囲に沿って骨組織が新生している。これが水酸アパタイトとコラーゲンとの複合構造をも

図 13 Enhancement of the bone mineral density (BMD) around the skull defect of rabbits 12 weeks after treatment with free bFGF (■) and bFGF-incorporating gelatin hydrogels of various water contents (□). (100 μ g bFGF/rabbit, 6 rabbits/group).

***: $p < 0.001$, $p < 0.01$ vs PBS-treated groups.

†: $p < 0.05$ vs groups treated with bFGF-incorporating hydrogels with a water content of 95 %.

††: $p < 0.01$ vs groups treated with bFGF-incorporating hydrogels with a water content of 98 %.

†††: $p < 0.001$ vs groups treated with free bFGF.

つ骨組織であることは透過電顕によって確認した。ゲルのみおよび bFGF の水溶液投与では、まったく骨の再生は認められなかった。

つぎに、骨内に bFGF-ゼラチンディスク状製剤を埋め込んで骨再生を調べた⁷⁾。

埋め込んだ部位はウサギの頭蓋骨であり、図 12 に示すように、左右に 5 mm の穴をあけ、片方に直径 5 mm のゲルのみを、もう一方に bFGF を包含している同じサイズのゲルを埋め込んだ。図 13 に、含水率の異なるゼラチンゲルに同一量の bFGF を含浸してから、12 週間埋め込んだときの骨生成量を示す。明らかに、bFGF の水溶液およびゲルのみを投与した場合に比較して、bFGF-ゼラチンゲルは骨再生を促進していることがわかる。

ゲルの含水率が低いほど、促進作用の大きいのは、図 10 に示した肉芽形成の結果と同じ傾向である。

おわりに

この小文においては、ポリイオンコンプレックス反応を利用して作成した製剤の反応例として、筆者らの bFGF-ゼラチン製剤についてしか述べなかった。その理由は、その他の組合わせを用いて詳しい動物実験まで行った研究例が見つからなかったためである。ゼラチンではなく、コラーゲンをポリペプチド医薬の徐放用キャリアに用いた詳しい研究は発表されているが⁸⁾、それがポリイオンコンプレックス反応を、本研究例のように、積極的に利用しているのかどうかは定かでない。一方、非生体吸収性の合成高分子電解質をキャリアに用いると、イオン性薬物をポリイオンコンプレックス反応によって固定でき、それが周囲の環境変化によって放出されるという報告は発表されている⁹⁾。しかし、それも詳しい動物実験までは行われていない。

筆者らのポリイオンコンプレックス製剤においても、ポリペプチド医薬のイオン結合による固定時に、どれほどの蛋白質失活が起こっているのかは、まだ測定していない。また、生体内におけるポリペプチドの徐放速度もまだ研究中である。このように、いろいろと問題が残っているが、bFGF は生体内において酸性のグリコサミノグリカンにイオン結合によって結合して存在している、すなわちポリイオンコンプレックスを形成している、といわれている¹⁰⁾。もしそれが正しければ、筆者らの bFGF-ゼラチンポリイオンコンプレックス製剤は生体の模倣ということができ、顕著な失活は

起こっていないように思われる。

上述したポリイオンコンプレックス反応は、他のポリペプチド医薬と、イオン性生体分解性キャリア高分子との組合わせにも十分に応用可能ならずである。

文 献

- 1) 筏 義人：再生医工学、学術月報 49(11)：1311-1312, 1996.
- 2) 例えば, Dubin P, Bock J, Davies RM, Schulz DN, Thies C: Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1994.
- 3) Patrickios CS, Hertler WR, Hatton TA: Biotech. Bioeng 44: 1031-1039, 1994.
- 4) Tabata Y, Hijikata S, Ikada Y: Enhanced vascularization and tissue granulation by basic fibroblast growth factor impregnated in gelatin hydrogels. J. Controlled Rel. 31: 189-199, 1994.
- 5) Kimura H, Sakamoto T, Hinton DR, Spee C, Ogura Y, Tabata Y, Ikada Y, Ryan SJ: A new model of subretinal neovascularization in the rabbit. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36: 2110-2119, 1995.
- 6) Yamamoto M, Kato K, Ikada Y: Effect of the structure of bone morphogenetic protein-carriers on ectopic bone regeneration. Tissue Engineering 2(4): 315-326, 1996.
- 7) Yamada K, Tabata Y, Yamamoto K, Miyamoto S, Nagata I, Kikuchi H, Ikada Y: Potentiality of bFGF incorporated in biodegradable hydrogels for skull bone regeneration. J. Neuro. Surg. 1996(in press).
- 8) Fujioka K, Takada Y, Sato S, Miyata T: Long-acting delivery system of interferon: IFN minipellet. J. Controlled Rel. 33: 317-323, 1995.
- 9) Nakamae K, Nishino T, Furukawa M, Nizuka T, Yamanaka A, Kanzaki Y, Hoffman AS: pH-sensitive enzyme release from polymer gel with phosphate groups. Proceedings in Fifth World Biomaterials Congress p 26, 1996.
- 10) Ritkin DB, Moscatelli DJ: Recent Developments in the Cell Biology of Basic Fibroblast Growth Factor. J. Cell Biol. 109: 1-6, 1989.