

磁力によるウロキナーゼのターゲティング

善本隆之・斎藤佑尚^{*1)}杉林堅次・森本雍憲^{*2)}塙田理康^{*3)}・上松瀬勝男^{*4)}小寺 洋・松島瑞子・稻田祐二^{*5)}

Drug Delivery System rapid communication

Targeting of urokinase by magnetic force

In vivo targeting of urokinase by magnetic force was examined in mice. Urokinase was labeled with ¹²⁵I and was further conjugated with magnetite through a polyethylene glycol derivative. The magnetic urokinase was injected into the tip part of a tail vein of a mouse, while magnetic force (0~12000 G) was applied to the root part of the tail as a target site. The distribution of radioactivity among various parts of a mouse was measured after the animal was sacrificed. By magnetic force of 12000 G, approximately as much as 60% of magnetic urokinase injected were localized in the target, the tail root. By applying magnetic force of 12000 G to the heart, approximately 20% of magnetic urokinase injected were attracted in the heart. There was almost no retention of magnetic urokinase in the tail root when the magnetic force of 12000 G was applied even 10 sec after the injection of the magnetic urokinase. It seems that if the magnetic urokinase misses the chance to be attracted by magnetic force and passes through the lung and the liver, it is readily trapped there. It is possible that magnetic urokinase might be used for targeting in the future.

Takayuki Yoshimoto・Yuji Saito^{*1)},

*1) Department of Biological Sciences, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152 東京工業大学理学部生体機構学科

*2) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Keyakidai, Sakado, Saitama 350-02 城西大学薬学部製剤学教室

*3) Division of Hematologic Research, Toranomon Hospital and Okinaka Memorial Institute of Medical Research, Toranomon, Minato-ku, Tokyo 105 虎の門病院血液学科, 冲中記念成人病研究所

*4) Department of Cardiology, School of Medicine, Nihon University, Surugadai Hospital, Kanda Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101 日本大学医学部駿河台病院循環器科

*5) Department of Materials Science and Technology, Toin University of Yokohama, Kurogane-cho, Midori-Ku, Yokohama, Kanagawa 227 桐蔭学園横浜大学工学部材料工学科



図 1 電磁石

Kenji Sugibayashi・Yasunori Morimoto^{*2)},
Toshiyasu Tsukada^{*3)}, Katsuo Kanmatsuse^{*4)},
Yoh Kodera・Ayako Matsushima・Yuji Inada^{*5)}
key words : targeting, urokinase, magnetic force

従来より、心筋梗塞などの血栓症の治療には、ヒト由来の血栓溶解剤であるウロキナーゼの静注が行われている¹⁾。しかし、血中には多量のインヒビターが存在し、さらに、フィブリンに対する親和性も低いため、十分な治療効果を得るために大量投与が必要である。しかし、この療法には、血中で急速に大量のプラスミンが生ずることにより、フィブリノゲンなどの血液凝固因子までも分解されて失活し、全身的な出血傾向を招くという危険性がある。そこで、筆者らは、マグネタイト-ポリエチレンゴル複合体をウロキナーゼに結合させた磁性化ウロキナーゼを調製し、*in vitro* の系で、磁力によりウロキナーゼを血栓に集め、局所的に線溶系を亢進させる試みについてすでに報告した^{2,3)}。

今回は、磁力による磁性化ウロキナーゼのターゲティングの *in vivo* における有効性を確認する目的で、ヨード標識した磁性化ウロキナーゼをマウスに投与し、磁力による誘導・生体内分布について検討した。

実験

ヒト由来の高分子量ウロキナーゼ(比活性: 1.58 × 10⁵ 単位/mg 蛋白質)は、ミドリ十字より提供された。

ウロキナーゼは、ラクトペルオキシダーゼを用い、ヨード(¹²⁵I, アマシャムジャパン)で標識した⁴⁾。ヨード標識ウロキナーゼにマグネタイト-ポリエチレンゴル複合体を結合させ、ヨード標識磁性化ウロキナーゼを調製した³⁾。ウロキナーゼのフィブリン溶解活性は、フィブリン平板法により測定した⁵⁾。

マウス(ddY雄, 25~35 g)をペントバルビタールナトリウム(60 mg/kg, i.p)で麻酔し、マウスの尾の中枢側部分および心臓が電磁石の間に位置するように固定した(図 1)。つぎに、0~12,000 ガウス(G)の磁力を発生させながら、ヨード標識磁性化ウロキナーゼ(2 mg/0.2 mL)を尾の先端の静脈より投与した。投与 10 分後に、断首または飽和塩化カリウムの静注(心臓にターゲ

表 1 磁力による磁性化ウロキナーゼのターゲティングと体内分布

磁力(G)	n ^{①)}	体内分布 ^{②)} (mean±SE, %)							
		尾の中核側	尾の先端	肝臓	脾臓	腎臓	肺	心臓	
磁性化ウロキナーゼ									
A. 尾の中核側部分に磁力をかける									
0	3	0.7±0.2	0.6±0.2	32.1±6.9	2.5±0.5	4.5±1.0	50.8±6.5	0.6±0.1	
4,000	3	14.2±3.6	2.9±1.3	20.0±3.1	1.5±0.6	3.7±0.7	43.3±8.3	0.4±0.1	
8,000	5	32.9±8.3	2.2±0.8	17.9±3.0	1.8±0.8	5.9±2.9	28.7±8.9	0.5±0.1	
12,000	6	60.8±7.2	1.5±0.2	8.2±1.7	0.7±0.1	1.6±0.3	20.4±8.3	0.7±0.4	
B. 心臓に磁力をかける									
12,000	7	2.0±0.6	2.0±0.5	7.9±1.9	0.3±0.2	1.9±0.6	39.0±5.7	18.2±2.2	
C. 投与 10 秒後に尾の中核側部分に磁力をかける									
12,000	3	0.8±0.1	0.5±0.2	30.6±3.9	1.6±0.3	3.8±0.9	50.8±4.4	0.4±0.1	
未修飾ウロキナーゼ									
D.	4	1.5±0.4	2.5±1.0	42.1±1.9	1.3±0.2	21.7±0.7	1.5±0.4	0.5±0.2	

*1) n : 使用したマウスの例数, *2) 投与量に対する尾の各部分および各臓器中の放射活性の相対値

ティングの場合)により屠殺し, 磁力をかけた部分と, 静注した尾の先端部分, および主な臓器(肺, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓)を分離し, おののの放射活性をガムマーカウンターで測定し, 体内分布を投与量に対する相対値で表した(表 1).

結果

マウスの尾(全長約 8 cm)を中枢側部分および先端部分の二つに便宜上わけ, 実験を行った. 表 1 A は, マウスの尾の中核側部分に磁力をかけながら, ヨード標識磁性化ウロキナーゼを尾の先端より静注し, 投与 10 分後の体内分布を調べた結果を示す. 磁力が 0 (G) のときは, 主に肺と肝臓に集まり, 静注した尾の先端部分にはほとんど放射活性が残らない. 磁力の強さの増加に伴い, 肺や肝臓での分布の割合が減り, 磁力をかけた尾の中核側部分の活性が徐々に増加し, 12,000 G の磁力により, 投与量の約 60% の磁性化ウロキナーゼを尾の中核側部分に集めることができた. この分布は, 磁力をかける時間を 10 分から 30 分に延長してもほとんど変化しない.

表 1 B は, マウスの心臓に磁力をかけ, 同様な実験を行った結果である. 12,000 G の磁力により, 投与量の約 20% を心臓に集めることができた.

つぎに, 磁性化ウロキナーゼ静注 10 秒後に, 12,000 G の磁力を尾の中核側部分に 10 分間かけ, その体内分布を調べた結果を表 1 C に示す. 尾の中核側部分には磁性化ウロキナーゼを集めることができず, その分布は, 磁力をかけない場合とほぼ同様な結果である.

表 1 D は, ヨード標識した未修飾ウロキナーゼを用いて, 磁性化ウロキナーゼと同様に尾の先端の静脈より投与し, その体内分布を調べた結果である. 磁性化ウロキナーゼと異なり, 主に肝臓と腎臓に集まつた.

考按

マウス尾静脈の先端より投与した磁性化ウロキナーゼは, 主に肺と肝臓に集まる. 尾の中核側部分あるい

は心臓に磁力をかけることにより, おののの部位に磁性化ウロキナーゼを集めることができとなり, 磁力を利用したターゲティングの有効性が *in vivo* においても示された. しかし, 磁性化ウロキナーゼ投与 10 秒後に, 尾の中核側部分に磁力をかけた場合には, 磁性化ウロキナーゼは磁力適用部位にほとんど集積しない. このことは, 磁性化ウロキナーゼが肝臓や肺における初回通過時にその多くが集積したことに起因すると考えられ, ターゲット部位における初回通過時に磁性化薬物を保持・集積化させることが重要であることを示唆している.

現在, 血栓をつくったラットやイスを用い, 磁力を利用しターゲティングを行った際の血栓溶解能力について検討を行っている.

文献

- 1) Mannucci, P. P., D'Angelo, A. (eds) : *Urokinase: Basic and clinical aspects*. London, Academic Press, 1982.
- 2) Inada, Y., Ohwada, K., Yoshimoto, T., Kojima, S., Takahashi, K. et al. : Fibrinolysis by urokinase endowed with magnetic property. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148 : 392-396, 1987.
- 3) Yoshimoto, T., Ohwada, K., Takahashi, K., Matsushima, A., Saito, Y. et al. : Magnetic urokinase: Targeting to fibrin clot. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152 : 739-743, 1988.
- 4) Thorell, J. I., Johansson, B. G. : Enzymatic iodination of polypeptides with ^{125}I to high specific activity. *Biochim. Biophys. Acta* 251 : 363-369, 1971.
- 5) Ploug, T., Kjeldgaard, N. O. : Urokinase, an activator of plasminogen from human urine. I. Isolation and properties. *Biochim. Biophys. Acta* 24 : 278-282, 1957.