

博士論文

薬剤搭載高分子ナノミセルによる胎盤通過性を制御した
新規早産治療薬の開発

鈴木 研 資

薬剤搭載高分子ナノミセルによる胎盤通過性を制御した
新規早産治療薬の開発

東京大学大学院医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻

指導教員：藤井 知行

申請者：鈴木 研資

目次

目次.....	2
略語一覽.....	3
要旨.....	6
序文.....	7
方法.....	18
結果.....	38
考察.....	63
参考文献.....	86
謝辭.....	109

略語一覽

Ar : Argon

BLA-NCA : 3- (Benzyloxycarbonyl)-N-carboxy-L-alanine anhydride

BMI : 1,1'-(Methylenedi-4,1-phenylene) Bismaleimide

cffDNA : cell-free fetal DNA

CL-IND/m : Cross-linked Indomethacin micelle

CL-IND-polymer : Cross-linked IND-polymer

CMC : Critical micellar concentration

COX : Cyclooxygenase

DCR : Derived count rate

DDS : Drug Delivery System

DLS : Dynamic Light Scattering

DMAP : 4-Dimethylaminopyridine

DAMPs : Damage-associated molecular patterns

DMEM : Dulbecco's modified eagle's medium

DMF : N,N-Dimethylformamide

EDC : 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride

EPR : Enhanced permeation and retention effect

FBS : Fetal bovine serum

GNPs : PEG-coated Gold nanoparticles

HMGB1 : High mobility group box 1

IL : Interleukin

IND : Indomethacin

IND/m : Indomethacin micelle

IND-polymer : Indomethacin polymer

IUFD : Intrauterine fetal death

LPS : Lipopolysaccharide

MeO-PEG-NH₂ : α -Methoxy- ω -amino poly (ethylene glycol)

MQW : Milli Q water

NCL-IND/m : Non Cross-linked Indomethacin micelle

NS : Normal Saline

PBS : Phosphate buffered saline

PDA : Patent Ductus Arteriosus

PDI : Polydispersity index

PEG : Polyethylene glycol

PEG-PBLA : Poly(ethylene glycol)-b-poly(γ -benzyl L-aspartate

PG : Prostaglandin

SDS : Sodium dodecyl sulfate

TNF : Tumor necrosis factor

要旨

インドメタシン (IND) は強力な子宮収縮抑制作用を有し早産の治療薬として有効な薬剤であるが、胎盤を通過して胎児毒性をきたすために使用が制限されている。本研究では高分子ナノミセルに IND を搭載し、胎盤通過性を制御したインドメタシン搭載高分子ナノミセル (IND/m) の開発を行った。IND/m はマウス胎盤、ヒト胎盤において胎児通過性が極めて少なく、マウスにおいて子宮・胎盤に分布して早産抑制効果を示し、胎仔の動脈管、新生仔の生命予後、体重増加に影響を与えなかった。本研究の成果は、胎盤通過性が極めて低く、胎児毒性の懸念なく使用可能な新規早産治療薬となる可能性がある、IND/m の開発に成功したことである。

序文

妊娠中の薬剤使用には大きな障壁が存在する。薬剤の効果よりも安全性が重視され、病態生理から効果が期待できる薬剤であっても、胎児への安全性のエビデンスに乏しい薬剤の使用は避けられ、妊婦への使用経験の乏しい薬剤の投与は敬遠される。一方で、妊婦を対象にした臨床試験は倫理的な観点から困難を極め、それ故妊婦を対象とした薬剤の開発は、基礎的研究成果の報告こそ散見されるものの、臨床で使用される薬剤の開発は実現されていない。患者を目の前にして効果が期待できる薬剤を使用できないという葛藤は、医師にとって耐えがたいものであり、解決すべき喫緊の課題である。

早産は妊娠 37 週未満の分娩、もしくは最終月経開始日より 259 日未満の分娩と定義される¹。世界では年間 1500 万人が早産児として出生しており、これは 10 人に 1 人の児が早産で出生していることに相当する。新生児死亡の原因の 35%、5 歳以下の乳幼児死亡の原因の 16%を占めており^{2,3}、出生児の予後に影響し、高血圧、心血管疾患、閉塞性肺疾患、慢性腎臓病、脳血管疾患、2 型糖尿病、およびメンタルヘルス障害の発症とも関連する⁴⁻¹⁰。早産の原因は、子宮への感染と炎症の波及、子宮筋の過伸展、子宮頸管要因、脱落膜の老化、心的因子の関与、と多岐にわたるが¹¹、近年の研究により子宮内感染とそれに伴う上行性の炎症の波及が早産の病態形成において中心的な役割を担うこ

とが明らかにされている¹²⁻¹⁵。この感染性早産は、腔内から子宮頸管に上行性に起こる感染とそれに伴う炎症の波及により、子宮にマクロファージをはじめとした炎症細胞が誘導され、この炎症細胞の活性化により分泌されるインターロイキン（Interleukin : IL）-1 β 、IL-6、腫瘍壊死因子（Tumor necrosis factor : TNF）- α といった炎症性サイトカインの働きによりプロスタグランジン

（Prostaglandin : PG）の産生が亢進し、子宮収縮や子宮頸管の熟化が引き起こされることにより発症する¹⁶⁻¹⁹（図1）。細胞膜リン脂質へのホスホリパーゼ A₂ の作用によりアラキドン酸が遊離し、シクロオキシゲナーゼ

（Cyclooxygenase : COX）の作用によりアラキドン酸が PGH₂ へと変換され²⁰、合成酵素やイソメラーゼの作用によって PGH₂ が PGE₂ や PGF_{2 α} へと代謝されることにより PG は生理活性を得る（図2）²¹。感染性早産においては、細菌がホスホリパーゼを分泌することが知られ²²、アラキドン酸の産生が増加することで、PG の産生も増加する^{23,24}。アラキドン酸カスケードにおいて PG 産生を誘導する COX には COX-1 と COX-2 の2つのサブタイプが存在し²⁵、COX-1 はほとんど全ての細胞、組織において構成的に発現し、血小板凝集、腎機能、消化管粘膜の維持などの重要な役割を果たす。また、急性炎症により高濃度のアラキドン酸が発現した場合には、PG は COX-1 を介して産生される。一方、

COX-2 は、炎症の発生に伴い、炎症性サイトカインや炎症メディエーターによって誘導され、PG を産生する²⁶。

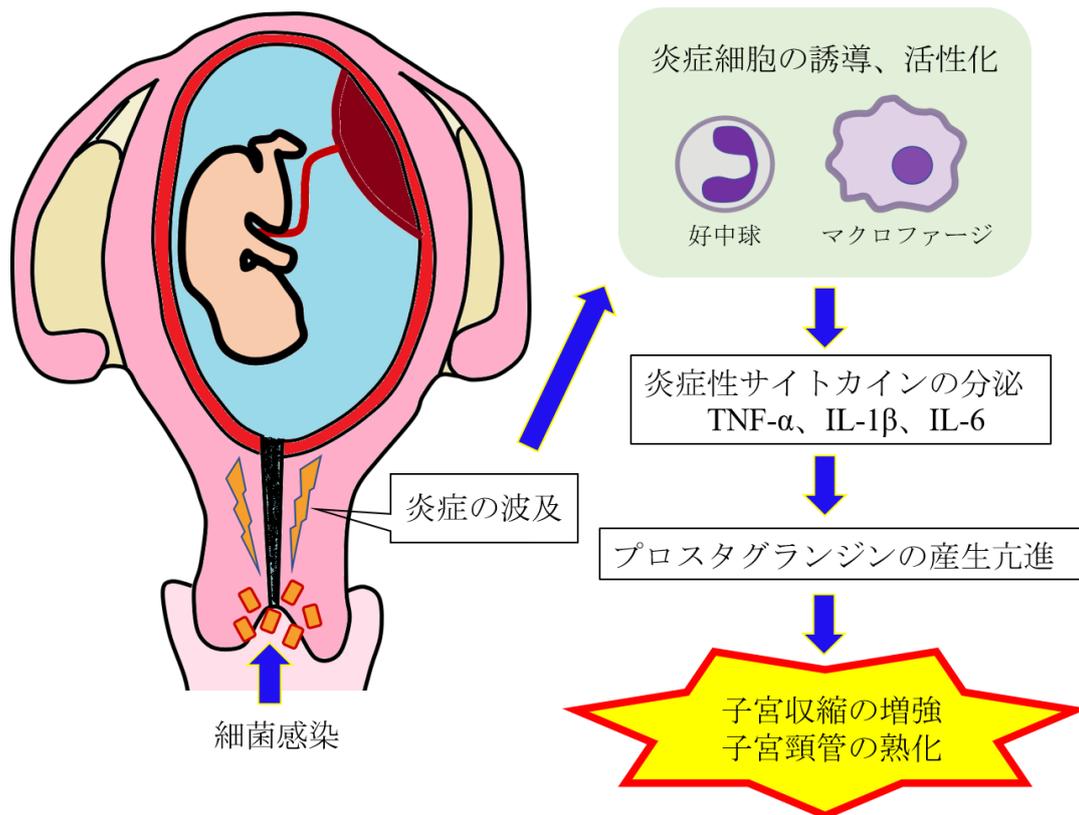


図 1：早産のメカニズム

膣から細菌感染が起こると、上行性の炎症の波及が生じる。炎症が波及すると、マクロファージや好中球などの炎症細胞が活性化され、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6などの炎症性サイトカインが分泌される。炎症性サイトカインはプロスタグランジンの産生を亢進させ、子宮収縮の増強と子宮頸管の熟化が起こり、早産が発症する。

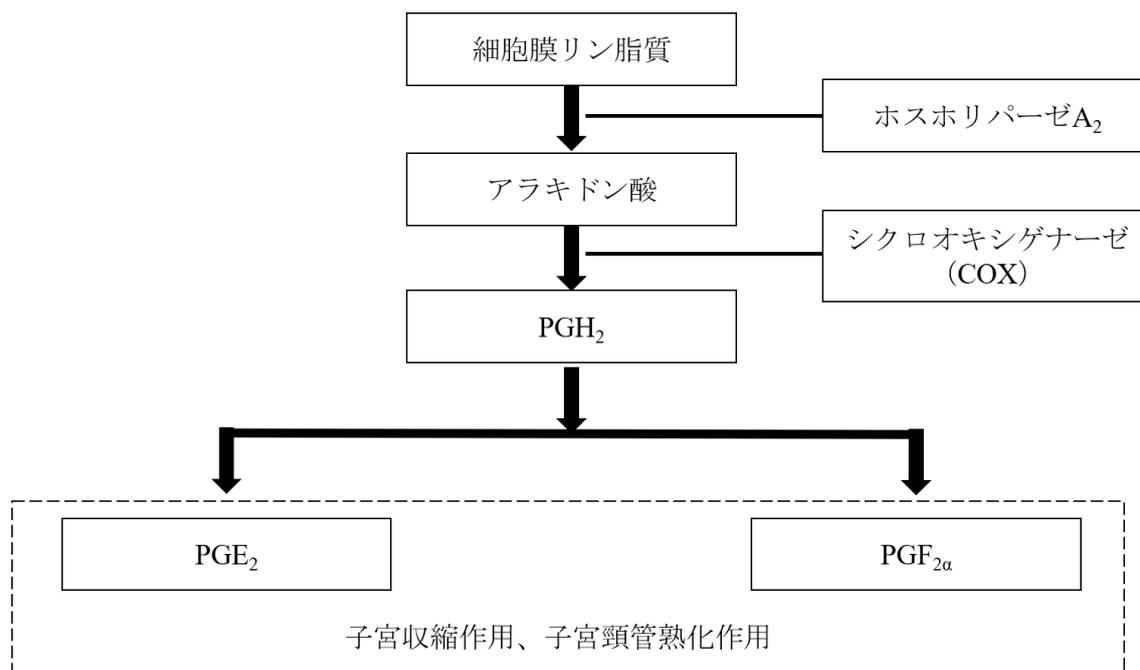


図 2 : アラキドン酸カスケードを介したプロスタグランジンの産生経路

上行性感染が起これると、細胞膜リン脂質へのホスホリパーゼ A₂ の作用によりアラキドン酸が遊離する。アラキドン酸は、シクロオキシゲナーゼ (COX : Cyclooxygenase) の作用により PGH₂ へと変換され、合成酵素やイソメラーゼの作用によって PGE₂ や PGF_{2α} へと代謝され、子宮収縮、子宮頸管熟化をもたらす。

早産の予防法、治療法に関してはこれまでも研究が重ねられてきたが、早産率は年々増加傾向にあり^{27,28}、より良い予防方法、治療方法の確立は産科領域における重要な課題と言える。早産の原因が多岐にわたり、前述した要因が複合的に関与していることを考慮すると、早産の予防を確立することは困難であり、我々は早産の治療に焦点を当て本研究に取り組んだ。早産の治療は主症状である子宮収縮と子宮頸管の熟化の抑制にあり、PG が子宮収縮作用、子宮頸

管熟化作用といった早産の主症状に直接的に関与していることを考慮すれば、PG 阻害剤は早産の病態生理に即した、合理的な治療である。実際に PG 阻害剤は、早産治療薬として有効性が知られている β 刺激薬、カルシウム拮抗薬、硫酸マグネシウム、オキシトシン受容体拮抗薬、硝酸塩などの他の治療薬²⁹ に比べて高い早産抑制効果を示す^{30,31}。特にインドメタシン (Indomethacin : IND) は、アラキドン酸カスケードにおいて COX-1、COX-2 の双方を阻害することから、強力な PG 産生阻害作用を持ち、早産治療における有効性が知られている³²⁻³⁷。しかし、IND は胎盤を通過し³⁸、胎児の動脈管収縮、新生児動脈管開存症、胎児腎不全、胎児腸穿孔、羊水過少症、壊死性腸炎といった胎児毒性をきたすことが知られている³⁹⁻⁴¹。そのため、米国などの欧米諸国では、切迫早産に対する子宮収縮抑制の目的において妊娠 32 週未満かつ 48 時間以内の投与期間に IND の使用は制限されている。さらに、本邦においては妊娠中の使用は禁忌とされている。我々は早産の病態生理に即した、高い有効性が期待できる IND が、胎児毒性の懸念無く、また妊娠週数や使用期間の制限なく使えるようになることで、より良い早産治療が可能になるのではないかと考えた。

薬剤の胎盤通過のメカニズムとして、「単純拡散」「受動拡散」「能動輸送」「ピノサイトーシス」が知られている⁴²。多くの薬剤の胎盤通過には単純拡散が関与しており、単純拡散により薬剤が胎盤を通過するか否かは、薬剤の「分

子量」すなわち「大きさ」、「脂溶性の程度」、「イオン化の程度」、「血中蛋白結合率」により決定される^{42,43}。「大きさ」として、分子量が 500 Da 未満の物質は胎盤を通過しやすく、1000 Da 以上の物質は胎盤を通過しにくいことが知られている。「脂溶性の程度」として、胎盤の細胞膜の大部分が脂質で構成されているため、脂溶性の高い物質は胎盤を通過しやすいとされている。「イオン化の程度」についてだが、薬剤には pKa と呼ばれる酸解離定数が存在する。この薬剤が持つ酸解離定数と薬剤が存在する溶液の pH の関係によって、薬剤はその構造を分子型・イオン型へと変化させている。イオン化していない分子型の薬剤は脂溶性が高いことから胎盤を通過しやすく、イオン型の薬剤は胎盤を通過しにくい。酸性の薬剤は、pKa 値より pH が高い溶液中においてイオン型の割合が増え、一方塩基性の薬剤は、PKa 値より pH が低い溶液中においてイオン型の割合が増え、胎盤を通過しにくくなる。「血中蛋白結合率」については、血中において血中蛋白との結合率が低い物質は血中で遊離型として存在する割合が高く、胎盤を通過しやすいとされている。

以上を考慮すると、サイズが大きく、水溶性の、血中でイオン型として存在する、血中蛋白結合率の高い薬剤が、胎盤を通過しない薬剤であると言える（表 1）。

薬剤の特徴	薬剤の胎盤通過性	
	通過しやすい	通過しにくい
大きさ	500 Da未満	1000 Da以上
脂溶性	脂溶性	水溶性
イオン化	酸性薬剤：pKa > 血液pH 塩基性薬剤：pKa < 血液pH	酸性薬剤：pKa < 血液pH 塩基性薬剤：pKa > 血液pH
血中蛋白結合率	低い	高い

表 1：薬剤の特徴と胎盤通過性

薬剤の胎盤通過性は、薬剤の「大きさ」「脂溶性」「イオン化」「血中蛋白結合率」によって評価される。

これらの薬剤の特徴と胎盤通過性の観点から、IND について評価すると、血中蛋白結合率は 99 % と高く、また pKa は 4.3 であることから、血液中 pH7.4 において分子型の形で存在している IND は存在せずほとんどがイオン化していることが想定されるため、血中蛋白結合率、イオン化という観点からは胎盤通過性が低い、と考えられる。しかし、IND は基本的に腸管から吸収される内服、もしくは坐薬であることから脂溶性の高い構造をしており、分子量も 357.79 g/mol と小さく、大きさと脂溶性の観点からは胎盤を通過しやすい薬剤であると言える。

そこで我々は、IND の大きさと脂溶性を改善し、IND の胎盤通過性を制御する方法として、ナノテクノロジーを用いた薬剤送達システム (Drug Delivery System : DDS) に着目した。ナノテクノロジー-DDS とは、高分子ミセルやリポ

ソームなど親水性部分と疎水性部分の両方を有する両親媒性を特徴とする薬物送達物質に薬剤を搭載し、治療標的に選択的に薬剤を送達する技術である。ナノテクノロジー-DDS に着目して IND 搭載リポソームを開発した研究では⁴⁴⁻⁴⁶、IND をリポソームに搭載することにより胎盤通過性が制御されたことが報告されている。しかしながら、これらの研究においては胎児への IND の移行は減少したものの、リポソーム搭載 IND の早産抑制効果は十分と言える結果ではなかった。早産抑制効果を発揮するためにはオキシトシン受容体を標的とした修飾を必要としており、オキシトシン受容体の発現に左右される構造であった。そこで我々は、100-200 nm の大きさであるリポソームより小さな構造を持つ、高分子ナノミセルに注目した。

高分子ナノミセルは親水性を示すポリエチレングリコール (Polyethylene glycol : PEG) 鎖と疎水性を示すポリアミノ酸鎖から成るポリマーが自己会合することで形成される。高分子ナノミセルの主要な構成成分である PEG は生体への安全性が高い物質として、ナノ医薬品開発の分野においては広く用いられている⁴⁷⁻⁵⁰。PEG 鎖の伸長によりポリマーの大きさは自由に設計でき、それ故にミセル自体の大きさも自由に設計することが可能である。ナノ毒性学の分野においては、これまでも高分子ミセルの胎盤通過に関する研究が行われてきた⁵¹⁻⁵⁴。これらの研究は、高分子ナノミセルと胎盤の通過にはミセルの大きさが

密接に関与していることを示しており、前述した単純拡散による物質輸送機序を考慮すると、水溶性でサイズが可変な高分子ナノミセルは胎盤通過を制御する上で適した DDS であると言える。そこで、本研究ではミセルを構成するポリマー中のアミノ酸ヒドロキシル基と IND のヒドロキシル基をエステル結合により置換することでポリマー内に IND を結合し、このポリマーを自己会合させることで、インドメタシン搭載高分子ナノミセル (Indomethacin micelle : IND/m) の開発を目指すこととした (図 3)。

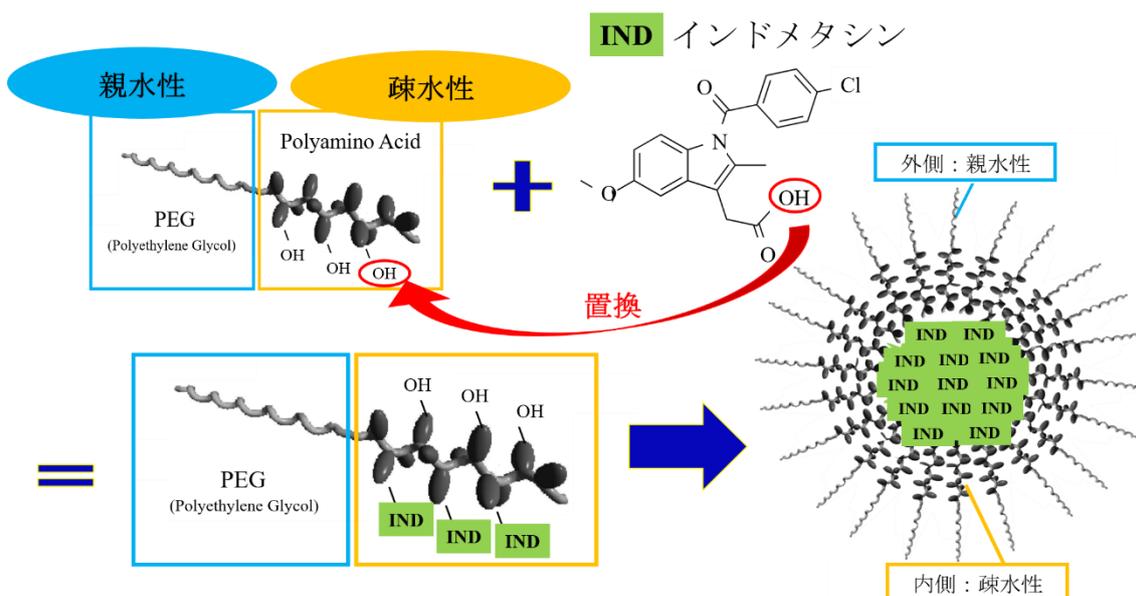


図 3 : IND/m の開発

高分子ナノミセルは親水性を示すポリエチレングリコール鎖と疎水性を示すポリアミノ酸鎖から成るポリマーが自己会合することで形成される。このアミノ酸のヒドロキシル基と IND のヒドロキシル基をエステル結合により置換することでポリマー内に IND を結合させ、この IND が結合したポリマーを自己会合させることで、IND/m の開発を目指した。

研究の目的

IND は、早産において子宮収縮を誘導する中心的機序である PG の産生経路を阻害することで、病態に即して有効性が期待できるにも関わらず、胎児毒性の懸念からその使用は制限されている。そこで本研究では、IND の胎盤通過による胎児毒性を回避しつつも IND の薬効を示して早産の発症を抑制することのできる新規薬剤の開発を目指すことを目的とした。この目的を達成するうえで本研究では、高分子ナノミセル技術を用いた DDS を利用して IND を搭載した IND/m を開発することを目指した。

本研究では、

- ・高分子ナノミセル技術を用いた DDS を利用して IND を搭載した IND/m を開発すること
- ・高分子ナノミセルの胎盤通過について検討し、胎盤通過性を制御した IND/m の設計を行うこと
- ・IND/m の薬物動態、ミセルの分解による IND の放出機構について検証すること
- ・IND のミセル化がマウス胎盤、ヒト胎盤において胎盤通過性を減少させることを検証すること
- ・IND/m の早産抑制効果、胎児毒性について評価すること

上記を通して、薬剤搭載高分子ナノミセルによる胎盤通過性を制御した新規早産治療薬の開発を目指し、研究に取り組んだ。

仮説

本研究を行うにあたり、以下の仮説を立て、検証を行った。

- IND を高分子ナノミセルに搭載することで IND が胎盤を通過する要因である大きさと脂溶性を改善し、IND の胎盤通過性を低減する。
- ヒト胎盤、マウス胎盤双方において IND/m は IND と比べて胎盤通過性が減少する。
- マウスにおいて、IND/m は IND と同様に早産抑制効果を有する。
- マウスにおいて、IND/m は IND と比べて胎児、新生仔への毒性が低い。

方法

1. 実験動物

全ての動物実験は東京大学医学部動物実験委員会の承認（承認番号：医-P17-022）を受けて施行した（承認番号：医-P17-022）。母獣齢 12 週の C57BL/6J マウスを Japan SLC, Inc.（静岡、日本）、Charles River Co.（神奈川、日本）から購入し、妊娠 9 日目（膣プラグ確認日を妊娠 1 日目と定義）に動物飼育室に搬入した。飼育は東京大学が定める施設動物実験規則を遵守して行い、マウスは 1 ケージに 1 匹の飼育とし、室温で 12 時間の明暗周期下に飼育した。

2. 早産マウスモデル

動物を用いた早産モデルは早産研究の分野において広く用いられており⁵⁵、その中でも LPS 投与による早産マウスモデルは代表的な炎症性早産の動物モデルである。LPS の投与経路としては腹腔内投与⁵⁶⁻⁵⁹、経静脈投与⁶⁰、経子宮投与⁶¹、経子宮頸管投与⁶²⁻⁶⁵、経膣投与⁶⁶が報告されている。我々は、細菌性膣症から上行性感染を引き起こし、子宮頸管や子宮体部に強い炎症が生じ早産を発症するという感染性早産の病態を反映したモデルである、LPS を子宮頸管に投与する方法を用いて早産マウスモデルを作成した。

妊娠 15 日目にイソフルランを用いて吸入麻酔を行い、子宮頸管組織内に Lipopolysaccharide (LPS) を 3 $\mu\text{g}/\text{body}$ 投与した。マウス経口投与用のソフトチューブ (エグゼック、奈良、日本) を外筒、23 ゲージのカテラン針 (テルモ、東京、日本) を内筒として、カテラン針の先端 2 mm が外筒より出るように予め調節した穿刺用針を作成した。穿刺用針の外筒をマウスの腹腔内に挿入し、内筒を子宮頸管組織内に刺入して投与を行った。LPS は O111: B4 (Sigma-Aldrich Japan、東京、日本) を使用した。4.5 μg の LPS を Phosphate buffered saline (PBS) 300 μl に溶解し、200 μl を投与することで 3 $\mu\text{g}/\text{body}$ の投与とした。

マウスの正常妊娠期間は妊娠 19 日から 21 日であることから、妊娠 19 日未満の分娩を早産と定義した。LPS 投与後 72 時間の観察を行い、早産の有無を確認した。マウスは LPS 投与後 72 時間に安楽死させ、開腹して胎仔の生死を観察した (図 4)。

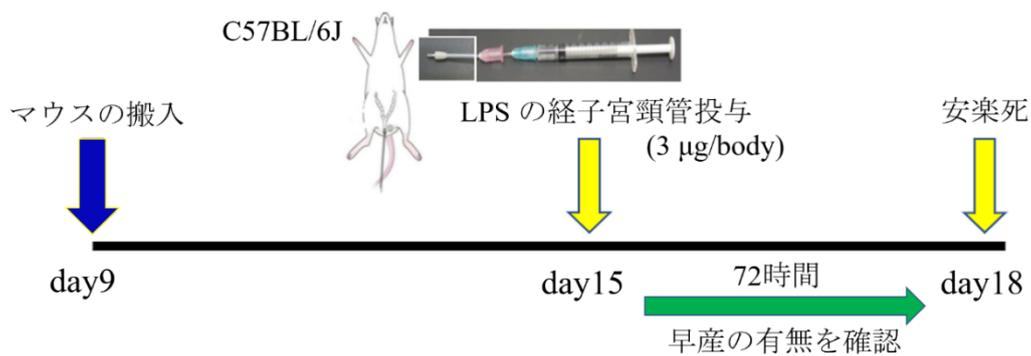


図 4：子宮頸管組織内への LPS 投与による早産マウスモデル

膣からの上行性感染を引き起こし子宮頸管や子宮体部に強い炎症が生じ早産を発症する、感染性早産の病態を模倣して、LPS の子宮頸管組織内投与による早産マウスモデルを作成した。妊娠 15 日目にイソフルランを用いて吸入麻酔を行い、子宮頸管組織内に LPS を 3 $\mu\text{g}/\text{body}$ 投与した。LPS 投与後 72 時間の観察を行い、早産の有無を確認した。母獣は LPS 投与後 72 時間に安楽死させ、開腹して胎仔の生死を観察した。

3. ヒト胎盤を用いた薬剤の胎盤通過性の検証（ヒト胎盤灌流モデル）

ヒト胎盤灌流モデルは、分娩後の実際の胎盤を用いて胎児循環・母体循環を模倣したもので、実際の妊婦に薬剤を投与することなく物質の胎盤通過を検証することが可能なモデルである^{67,68}。妊娠 37 週から妊娠 40 週までの間に自然頭位経膣分娩もしくは帝王切開術で分娩に至った患者から娩出された胎盤を使用した。帝王切開の適応は既往帝王切開術後妊娠、骨盤位とし、妊娠高血圧症候群や妊娠糖尿病などの産科合併症を有する患者、胎盤病理検査を必要とした患者は除外した。研究のプロトコルは、東京大学医学部倫理委員会の承認を得

て行った（承認番号：11409）。事前に本研究に関する説明を行い、同意書を取得した。

胎盤娩出後 20 分以内に実験を開始した。臍帯動脈と臍帯静脈が一对になって胎盤小葉に分布している部分を選択し、臍帯動脈と臍帯静脈をそれぞれ 18 ゲージサーフロー留置針（テルモ、東京、日本）で穿刺した。血管内に留置したサーフロー針外筒は、3-0 vicryl 糸（ジョンソン・エンド・ジョンソン、東京、日本）で結紮して固定した。血管内に存在する血液の凝固により血管内血栓を形成することを予防し、穿刺した動脈と静脈が同一胎盤領域の灌流に関与していることを確認することを目的に、PBS で 20 単位/ml に調整したヘパリンナトリウム（持田製薬、東京、日本）100ml を臍帯動脈から投与し、臍帯静脈からの流出を確認した。ヘパリンナトリウムの灌流により灌流に関わる胎盤小葉には色調の変化が生じる。灌流に関与する小葉を含む周囲の 2-3 胎盤小葉を切断して実験に用いた。臍帯動脈の分枝により胎盤小葉断端で切断された血管からヘパリンナトリウムの漏出を認める場合は、同血管を 3-0 vicryl 糸で結紮した。

次に、胎児側の循環を確立した。臍帯動脈から 37 °C に維持した Krebs-Ringer-bicarbonate Buffer⁶⁹ を灌流して、胎児循環を平衡化した。Krebs-Ringer-bicarbonate Buffer は塩化ナトリウム 118 mM、塩化カリウム 4.6 mM、硫酸マグ

ネシウム 1.3 mM、D (+)-グルコース 1 g/l、デキストラン 1 g/l、ヘパリンナトリウム 125000 IU/l (フジフィルム和光純薬、大阪、日本)、塩化カルシウム 2.5 mM、炭酸水素ナトリウム 24.2 mM、Albumin from human serum lyophilized powder \geq 96% (agarose gel electrophoresis) 2 g/l (Sigma-Aldrich Japan、東京、日本) を Milli Q water (MQW) 2 L に溶解し攪拌後、0.22 μ m 親水性フィルター (RhephiLe Bioscience、上海、中国) で濾過して作成した。胎児循環は 5 V の定圧電源供給装置 (エー・アンド・デイ、東京、日本) に繋ぎ、灌流圧は血圧モニタリングキット (日本光電、東京、日本) とデジタルマルチメーター (日置電機、長野、日本) を用いて、60 mmHg 以下になるようにモニタリングした。臍帯動静脈を穿刺後、胎盤小葉はプラスチックで作成した実験装置の上に、胎盤母体面を上にして設置した。

続いて母体側の循環を確立した。三又ガラス管に 3 本の 18 ゲージサーフロー留置針の内筒を装着した母体側薬剤投与針を、灌流に関与する胎盤小葉領域に約 7 mm の深さで穿刺した。37 °C に維持した Krebs-Ringer-Bio-carbonate Buffer を灌流し母体側循環を平衡化した。胎児側灌流速度、母体側灌流速度は、EYELA peristaltic tube pump (東京理科器械、東京、日本) を用いてそれぞれ 3 ml / min、18 ml / min になるように調節し、30 分間灌流した。胎盤小葉は HL-1 HEAT LAMP (Physitemp、ニュージャージー、アメリカ) を用いて表面温

度を 37 °C に維持した。灌流の平衡化を行った後、母体側の灌流液は検証用物質を含有し、酸素で飽和した Krebs-Ringer-bicarbonate Buffer に交換した。酸素は FeCl₃ と H₂O₂ の化学反応によって生成し、灌流液中に投与した。

PEG 化金ナノ粒子 (PEG-coated Gold nanoparticles : GNPs) の胎盤通過性検証実験においては検証用物質として GNPs は NANOCS™ Gold Nanoparticles, PEG coated (NANOCS Inc. アメリカ) を用いた。GNPs の濃度は 10 nm GNPs は 11.4×10^9 particles/mL、20 nm GNPs は 1.4×10^9 particles/mL、30 nm GNPs は 4.0×10^8 particles/mL とした。

IND、架橋インドメタシン搭載高分子ナノミセル (Cross-linked Indomethacin micelle : CL-IND/m) の胎盤通過性検証実験においては検証用物質として IND と CL-IND/m を用いた。IND はインダシン静注用 (ノーベルファーマ、東京、日本) を用い、濃度は 2.0 µg/ml とした。CL-IND/m は IND 濃度として 2.0 µg/ml とした。

灌流は 60 分間行い、5 分毎に胎児側臍帯静脈からの流出液 1.5 ml をサンプルとして回収した。(図 5)。コントロールとして、母体側灌流液 1.5 ml も回収した。回収したサンプルは、2000 Rpm で 5 分間遠心分離 (トミー精工、東京、日本) し、その上清を 4 °C で冷蔵保存した。検証用物質の測定について、GNPs は可視分光光度計ナノドロップ (テルモ、東京、日本) を用いて定量した。

IND、CL-IND/m の測定は高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography : HPLC、日本分光、日本）で行い、胎児側臍帯静脈からの検証用物質回収量を分子、母体側灌流液への検証用物質投与量を分母とし、胎盤通過率を算出した。

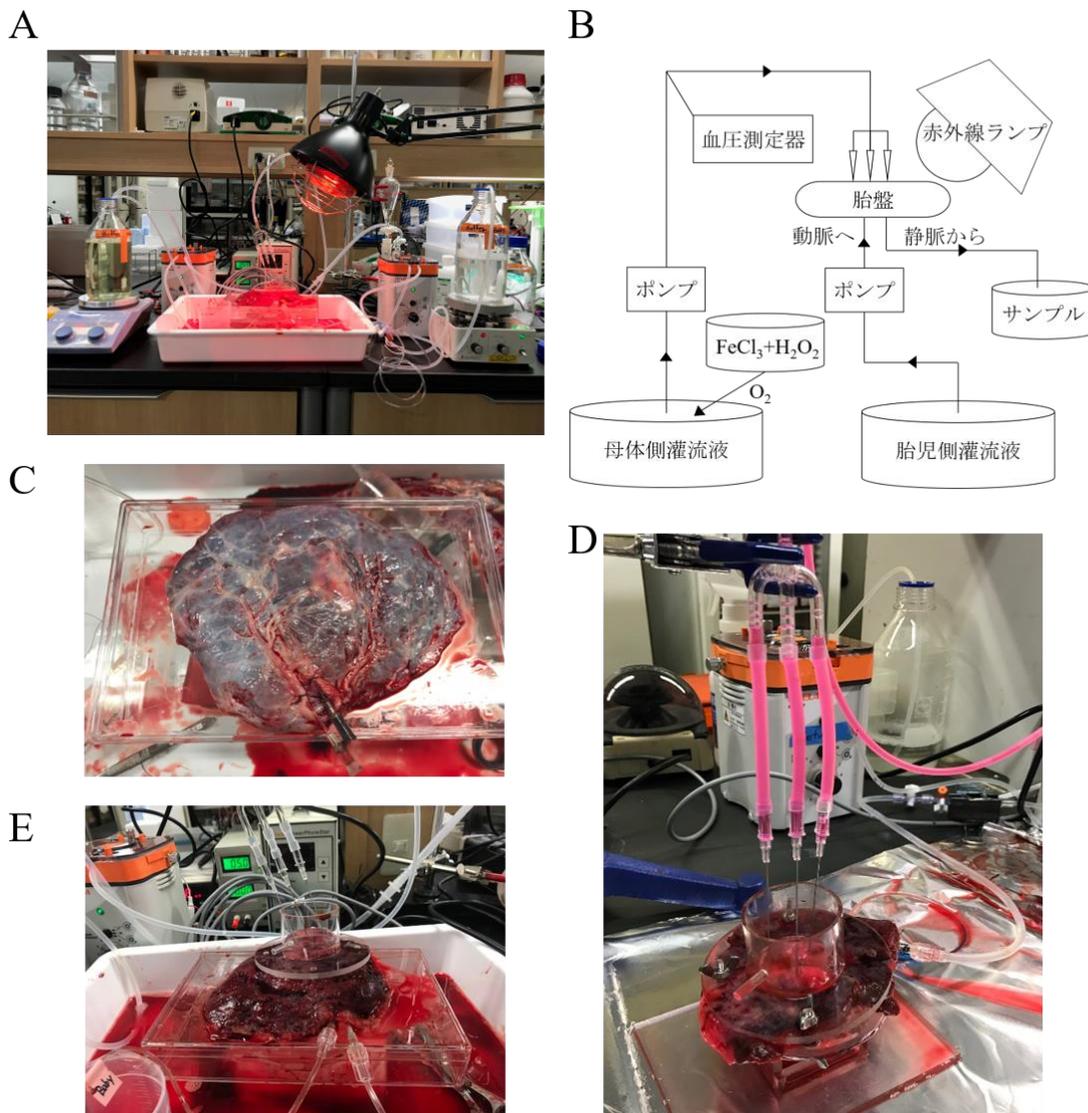


図 5：ヒト胎盤灌流モデル

実際の灌流モデル (A) 灌流モデルのシェーマ (B) 灌流に用いた胎盤小葉と臍帯動静脈への穿刺 (C) 胎盤母体面の穿刺 (D) 胎児-母体循環の確立 (E)

自然経膣頭位分娩もしくは帝王切開術後のヒト胎盤を用いて、胎盤胎児面の臍帯動脈と臍帯静脈、胎盤母体面への穿刺を行い、胎児側・母体側の循環をそれぞれ確立した。胎児側の灌流液は Krebs-Ringer-Bio-carbonate Buffer、母体側の灌流液は Krebs-Ringer-Bio-carbonate Buffer に検証用薬剤を加え、 $\text{FeCl}_3+\text{H}_2\text{O}_2$ の化学反応によって得られる O_2 を付加した。灌流速度はポンプにより胎児側灌流速度を 3 ml / min 、母体側灌流速度を 18 ml / min に維持し、灌流圧は血圧測定器により 60mmHg 以下になるようモニタリングし、60 分間灌流した。5 分毎に臍帯静脈からの流出液 1.5 ml をサンプルとして回収した。

4. インドメタシンポリマーの合成

α -Methoxy- ω -amino poly (ethylene glycol) (MeO-PEG-NH₂、日油、東京、日本) をベンゼンで脱水し、一晩凍結乾燥し、N,N-Dimethylformamide (DMF、フジフィルム和光純薬、大阪、日本) に溶解した。この溶液に、アルゴン (Argon : Ar) ガス環境下に DMF に溶かした 3- (Benzyloxycarbonyl)-N-carboxy-L-alanine anhydride (BLA-NCA、中央化成品、東京、日本) を添加し、37 °C で 3 日間、開環重合反応させ、Poly(ethylene glycol)-b-poly(γ -benzyl L-aspartate) (PEG-PBLA) を得た。PEG-PBLA は、エーテル沈殿を 2 回行い精製した (図 6-1A)。

精製した PEG-PBLA をベンゼン中で一晩凍結乾燥し、100 mg/ml 濃度の DMF に溶解した。Ar ガス環境下で、[-COO-:-NH₂ =1:2]となるように、4-amino-1-butanol (東京化成工業、東京、日本) と 2-aminomethylfuran (東京化成工業、東京、日本) を PEG-PBLA 溶液に加え、室温で 6 時間維持し、PEG-pAsp-furan-OH polymer を得た。PEG-pAsp-furan-OH polymer はエーテル沈殿を 2 回行い精製した (図 6-1B)。

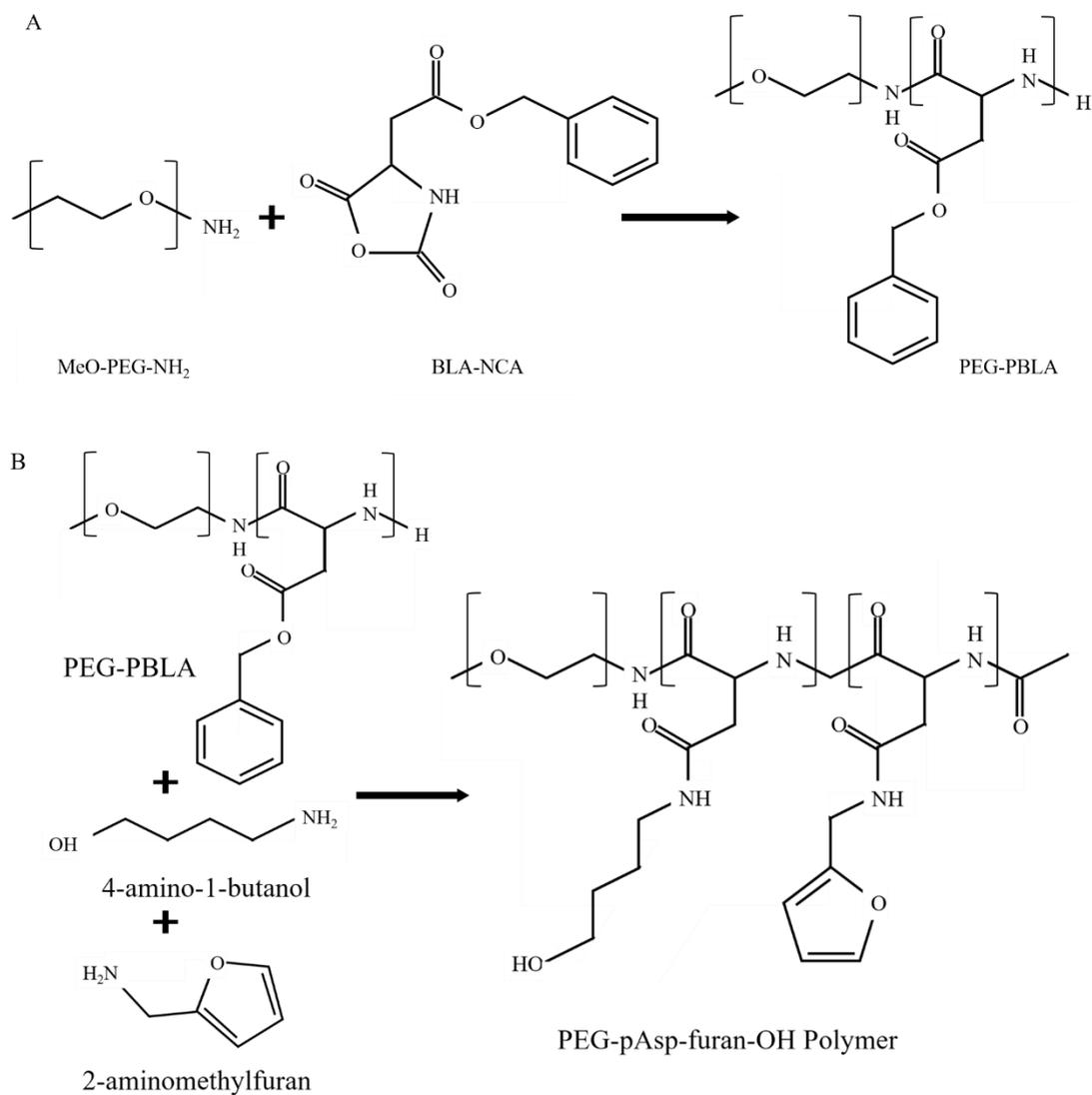


図 6-1 : IND-polymer の合成

一晚凍結乾燥させた MeO-PEG-NH₂ を DMF に溶解し、Ar ガス環境下に DMF に溶解した BLA-NCA を添加し、37 °C で 3 日間、開環重合反応させ、PEG-PBLA を得た (A)。一晚凍結乾燥させた PEG-PBLA を DMF に溶解し、Ar ガス環境下で 4-amino-1-butanol と 2-aminomethylfuran を加え、室温で 6 時間維持し、PEG-pAsp-furan-OH polymer を得た (B)。

IND (フジフィルム和光純薬、大阪、日本) に 4-dimethylaminopyridine (DMAP、東京化成工業、東京、日本) と 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC、フジフィルム和光純薬、大阪、日本) を [DMAP: EDC: -COOH (IND)= 1:1.5:0.5]となるように添加し、これを DMF に溶解し、15 分間攪拌した。この溶液を PEG-pAsp-furan-OH polymer に [-COOH (IND): -OH (polymer) = 4:1]となるように加え、一晩、室温下で反応させ、PEG-pAsp-furan-IND を得た。PEG-pAsp-furan-IND はエーテル沈殿を 2 回行い精製した (図 6-2C)。

PEG-pAsp-furan-IND を DMSO に溶解し 0.22 μm のフィルターで濾過し、MQW に対して透析を行い、インドメタシンポリマー (Indomethacin polymer : IND-polymer) を完成させた。

IND-polymer は、フラン環と cross linker である 1,1'-(methylenedi-4,1-phenylene) bismaleimide (BMI、Sigma-Aldrich Japan、東京、日本) の間で Diels-Alder 反応により架橋した。IND-polymer に BMI を加え、インキュベーターを用いて 50 °C で 2 日間反応させ、架橋インドメタシンポリマー (Cross-linked IND-polymer : CL-IND-polymer) を得た (図 6-2D)。CL-IND-polymer は 0.22 μm フィルターで再度濾過した。

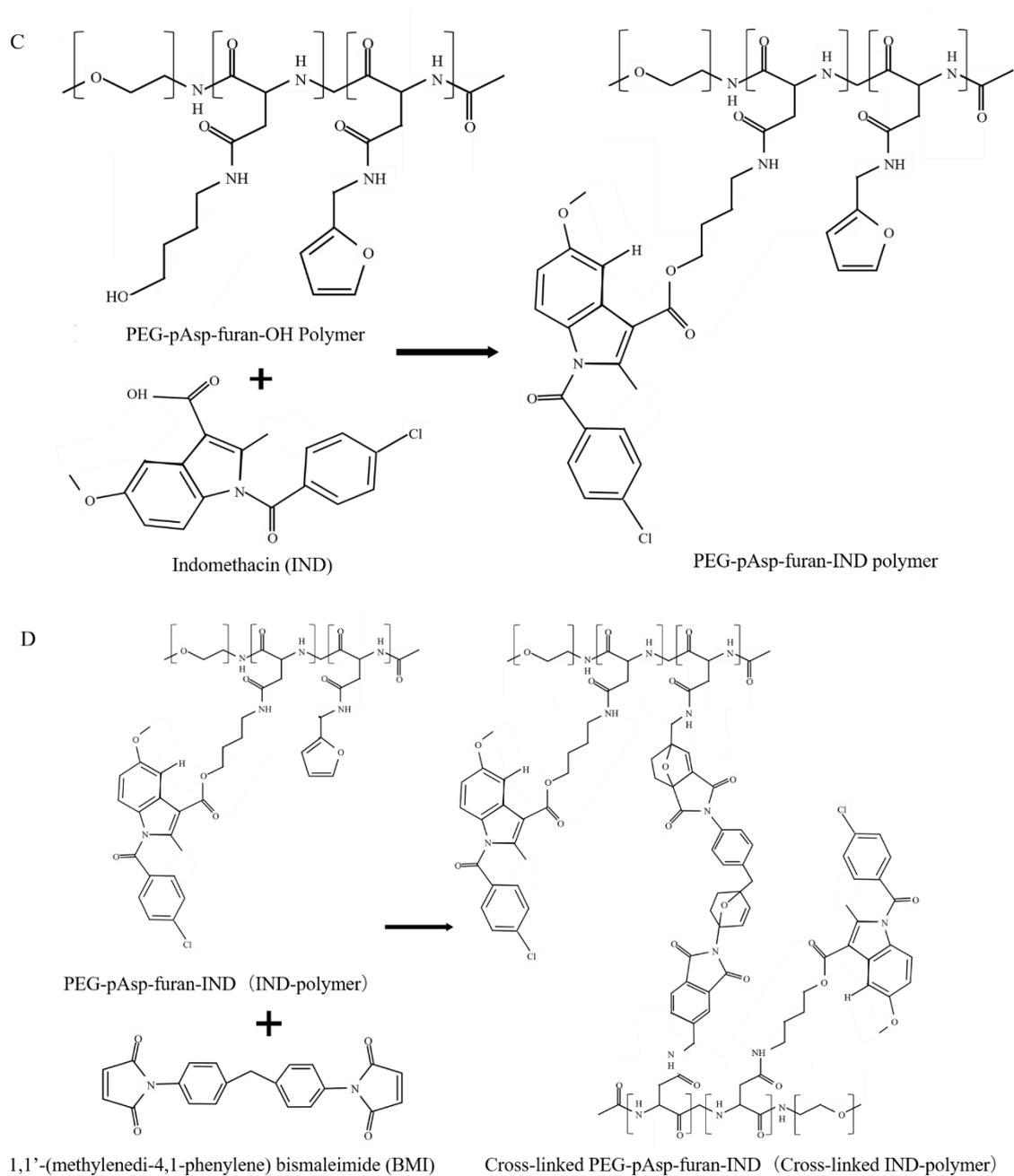


図 6-2 : IND-polymer の合成

IND に DMAP と EDC を加え、DMF に溶解し、15 分間攪拌した。この溶液を PEG-pAsp-furan-OH polymer に加え、一晩、室温下で反応させ、PEG-pAsp-furan-IND を得た (C)。PEG-pAsp-furan-IND を自己会合させ得られた IND/m に、cross linker である BMI を加え、50 °C で 2 日間、Diels-Alder 反応により架橋し CL-IND-polymer を得た (D)。

本研究における IND/m の濃度については、マウス実験においては、IND は既報^{45, 46, 58, 70}を参考に 1.0 mg/kg、CL-IND/m は IND 濃度として 10 mg/kg とした。我々が開発した IND/m は、マクロファージ内でのミセルの分解と薬剤の放出を意図しており、マクロファージ内で放出される薬剤量が投与した IND/m の一部であることを考慮すると、ミセル化していない遊離薬剤より高容量の薬剤をミセルに搭載することが必要になる。実際に、高分子ナノミセルを用いた DDS において、キャリアに搭載する薬剤量は元となる薬剤量よりも高容量に設定している既報が多く、Bae らは、遊離薬剤より高用量の薬剤をミセルに投与した際の効果と毒性について報告している⁷¹。Kaga らは 10 mg/kg の IND を妊娠マウスに投与すると、その毒性により胎児死亡を引き起こすことが報告し⁵⁷、さらに Gross らは、10 mg/kg 以上の IND の投与は母体死亡を引き起こすことを報告している⁵⁹。本研究はミセル化によって胎児毒性を回避することを目的とした研究であることから、IND が胎仔、母獣の双方に毒性を示すとされる 10 mg/kg の IND/m を投与しても胎仔への毒性を示さないことを明らかにすることで IND/m の安全性について言及することを意図し、全てのマウスを用いた動物実験における CL-IND/m 投与用量を 10 mg/kg に設定した。ヒト胎盤灌流実験においては、ヒト動脈管に影響を与える量として、ヒト動脈管開存症の治療時

における IND 静脈注射薬使用時の平均血中濃度から IND は 2.0 µg/ml、CL-IND/m は IND 濃度として 2.0 µg/ml とした⁷²。

5. CL-IND/m からの IND 放出機構の検証

CL-IND/m が分解し、IND が放出される機構を検証するために、透析膜と pH を調整した MQW 水を用いた IND の放出実験、RAW264.7 細胞を用いた細胞実験を行った。透析膜と pH を調整した MQW 水を用いた IND の放出実験においては、生理的環境を pH7.3、エンドソーム内環境を pH5.3 として、pH を調整した MQW 水に対して CL-IND/m を透析し、透析液中の IND 含有量を HPLC で測定した。

RAW264.7 細胞を用いた細胞実験では、マウスマクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞を 10 % Fetal bovine serum (FBS、大日本住友製薬、大阪、日本) および 1 % ペニシリンを含有した Dulbecco's modified eagle's medium

(DMEM、Sigma-Aldrich Japan、東京、日本) で培養し、プレートに $2 \times 10^5 / 2$ ml/well で播種し、24 時間培養した。24 時間後に細胞を PBS (フジフィルム和光純薬、大阪、日本) で洗浄し、プレートに 0.5 mg/ml 濃度の IND 2 ml、IND 濃度として 0.5 mg/ml の CL-IND/m 2 ml をそれぞれ添加し、細胞培養培地を加えて培養した。各プレートの培地は、薬剤添加後 48 時間で回収し、PBS で洗

浄した後 2% sodium dodecyl sulfate (SDS、フジフィルム和光純薬、大阪、日本) 1 ml で 10 分間処理し、細胞を回収した。回収した細胞内に含有される IND 量を HPLC で測定した。

6. マウスにおける CL-IND/m の生体内分布と胎盤通過性の検証

マウスにおいて、母獣に CL-IND/m を投与した際の、薬剤生体内分布についての検討、CL-IND/m の胎盤通過性についての検討を行う目的で、IVIS Imaging system (住商ファーマインターナショナル株式会社、東京) を用いた検証を行った。IVIS Imaging system は、蛍光標識した薬剤を超高感度冷却 CCD カメラで撮影する光 *in vivo* イメージングシステムで、薬剤の生体内分布と分布量を可視化して評価することが可能である。IND 量として 10 mg/kg の CL-IND/m のポリマーに Cyanine5 NHS ester (Lumiprobe、メリーランド、アメリカ) を用いて蛍光標識を行い、早産マウスモデルに投与した。CL-IND/m の母獣尾静脈投与は早産マウスモデル妊娠 15 日目に LPS を子宮頸管に投与した直後に行い、薬剤投与後 1 時間、4 時間、8 時間、24 時間にマウスを安楽死させ、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、膵臓、両側腎臓、胎盤、臍帯、胎児、羊膜、子宮体部、子宮頸部、大腿骨、大腿の筋肉を摘出した。胎盤-臍帯-胎児-羊膜は各々を離断する

ことなく、全ての組織が連続した状態で摘出した。これらをシャーレに並べ、IVIS Imaging system で撮影を行い、Living Image (64 bit) ソフトで解析した。

また、妊娠マウスにおける IND、CL-IND/m 投与時の薬剤生体内分布について比較検証する為、妊娠 18 日目のマウスに、1 mg/kg 濃度の IND、IND 量として 10 mg/kg 濃度の CL-IND/m を母獣尾静脈より投与し、投与後 1 時間、4 時間、8 時間、24 時間にそれぞれマウスを安楽死させ、胎児、胎盤、肝臓、腎臓、脾臓の各臓器を摘出した。各臓器をホモゲナイズし、臓器への IND、CL-IND/m の蓄積量を HPLC で測定した。CL-IND/m の蓄積量については、CL-IND/m が分解して遊離した IND として各臓器に蓄積している量を考慮し、CL-IND/m 蓄積量と IND 蓄積量の総和として算出した。薬剤分布量は、臓器への薬剤蓄積量を分子、薬剤投与量を分母として薬剤蓄積率を算出し、臓器 1 g 当たりの薬剤蓄積率を薬剤分布量として計算した。薬剤投与後 1 時間、4 時間、8 時間、24 時間の薬剤分布率をグラフに表し、比較検討した。

7. IND、CL-IND/m の投与による早産抑制効果と胎仔への影響、出生仔の出生後生命予後と出生後体重増加の検討

早産マウスモデルを用いて、妊娠 15 日目の 3 $\mu\text{g}/\text{body}$ の LPS を子宮頸管に投与した直後に、生理食塩水 (Normal Saline : NS)、1 mg/kg 濃度の IND、IND 濃度として 10 mg/kg の CL-IND/m を 24 時間毎に母獣尾静脈から投与した。72 時間以内の分娩を早産と定義し、早産率を比較した。母獣は LPS 投与後 72 時間に安楽死させ、開腹して胎仔の生死を観察した。

また、IND/m 投与後の出生仔への影響について検討する目的で、出生仔の出生後生命予後と、出生後体重増加について観察した。妊娠マウスの妊娠 15 日目に NS を投与した母獣から出生した仔をコントロール群として、早産マウスモデルにおいて LPS 投与直後から 24 時間毎に IND (1 mg/kg) を投与した群、および 24 時間毎に CL-IND/m (IND 濃度として 10 mg/kg) を投与した群から出生した仔との間で、出生後生命予後、出生後の仔の体重増加についても比較検討を行った。出生後生命予後は出生後 72 時間までの出生仔の生死を観察して比較した。出生後体重増加については出生後 2 日から 8 日まで、毎日同じ時間に仔の体重を計測し、母獣の体重で標準化した。

8. マウス動脈管の組織学的評価

妊娠 15 日目のマウスに、NS、1mg/kg 濃度の IND、IND 量として 10mg/kg 濃度の CL-IND/m を母獣尾静脈より投与し、各薬剤最終投与後 24 時間にマウスを安楽死させ、胎仔を摘出した。胎仔の頸部と横隔膜直下の腹部を切断し、上肢、胸部の皮膚・皮下組織を切除して胸郭を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。G-Chelate Mild (Genostaff、東京、日本) を用いて 2 日間脱灰し、キシレンの代替品として低毒性溶剤である G-Nox (Genostaff、東京、日本) を用いて、パラフィン包埋装置 CT-Pro20 (Genostaff、東京、日本) でパラフィン包埋し、6 μm の厚さで薄切した。

HE 染色は、脱パラフィン後水洗し、Hematoxylin (#H9627、Sigma-Aldrich Japan、東京、日本) で 5 分染色後、10 分間水洗処理を行い、エオシン Y (#E6003、Sigma-Aldrich Japan、東京、日本) で 2 分間染色した。脱水、透徹処理を行い、マリノール (#2009、武藤化学、東京、日本) で封入した。下行大動脈 (Descending Aorta : dAo) と肺動脈 (Pulmonary Artery : PA) を連絡する動脈管 (Ductus Arteriosus : DA) 部分を含む切片を光学顕微鏡で観察し、動脈管の狭窄について評価した。

9. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

サンプル中の IND は HPLC を用いて測定した。サンプル溶液 1 ml に対して 4 ml の酢酸エチルを付加して 1 分間攪拌した後、500 G で 1 分間遠心分離し、IND を含有する上清層を採取した。下層に再度 4 ml の酢酸エチル付加し攪拌、遠心分離、上清の採取を計 4 回繰り返し行った。採取した上清層は室温で 72 時間、酢酸エチルを気化させ、HPLC 測定用サンプルを作成した。

逆相カラム (ODS-100 V 4.6 mm×150 mm、5 μm、TSKgel) を使用し、測定用サンプルを移動相 [リン酸二水素ナトリウム (NaH₂PO₄) (50 mM、pH3) : アセトニトリル (クロマトグラフィー用、フジフィルム和光純薬、大阪、日本) = 39 v : 61 v] に溶解し、流量 0.8 ml / min、温度 50 °C、検出は UV 波長 340 nm に設定して測定した。

10. 統計解析

IND、CL-IND/m の治療的効果に関する検討において、各群の早産率の比較は Fisher の直接確率検定を用いて行った。また、早産抑制効果の比較は Kaplan-Meier 法を用いて行い、各群間の比較はログランク検定を用いて行った。

IND と CL-IND/m 投与後の出生仔の出生後生命予後についての比較は Kaplan-Meier 法を用いて行い、各群間の比較はログランク検定を用いて行った。

出生仔の出生後体重増加の p 値は等分散検定を行い、その後 student の t 検定を用いて算出した。

統計解析ソフトは StatMate Ver5.01 を用いて行い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

結果

薬剤搭載高分子ナノミセルに類似した構造を持つ PEG 化金ナノ粒子は大きさに依存してヒト胎盤灌流モデルにおける通過性が低下し、30 nm の PEG 化金ナノ粒子はほとんど胎盤を通過しない（方法 3）

IND/m の設計に際して、類似した構造をもつ物質が胎盤を通過する大きさの閾値を検証するために、大きさの異なる GNPs を用いて、ヒト胎盤灌流モデルで検証を行った。先行研究において、GNPs は粒子径により胎盤の通過性が異なり、5 nm 未満の GNPs においては高い胎盤通過性を有する一方、10-30 nm 以上の大きな粒子径の GNPs は胎盤通過性が低いことが報告されている^{54,73}。これらの先行研究の結果を参考に、 11.4×10^9 particles/mL 濃度の 10 nm GNPs、 1.4×10^9 particles/mL 濃度の 20 nm GNPs、 4.0×10^8 particles/mL 濃度の 30 nm GNPs について、ヒト胎盤灌流モデルにおける胎盤通過性を検証した。胎児循環臍帯静脈からの GNPs 回収量を分子、母体側灌流液への GNPs 投与量を分母とし、胎盤通過率を算出した。

60 分の灌流において、10 nm GNPs の胎盤通過率は 4.58 ± 1.84 % (n=2)、20 nm GNPs の胎盤通過率は 2.21 ± 0.59 % (n=2)、30 nm GNPs の胎盤通過率は 0.049 ± 0.93 % (n=2) であり、PEG 化高分子ナノミセルに類似した構造を GNPs

は大きさに依存して胎盤通過性が低下し、30 nm の GNP はほとんど胎盤を通過しないことが示唆された (図 7)。

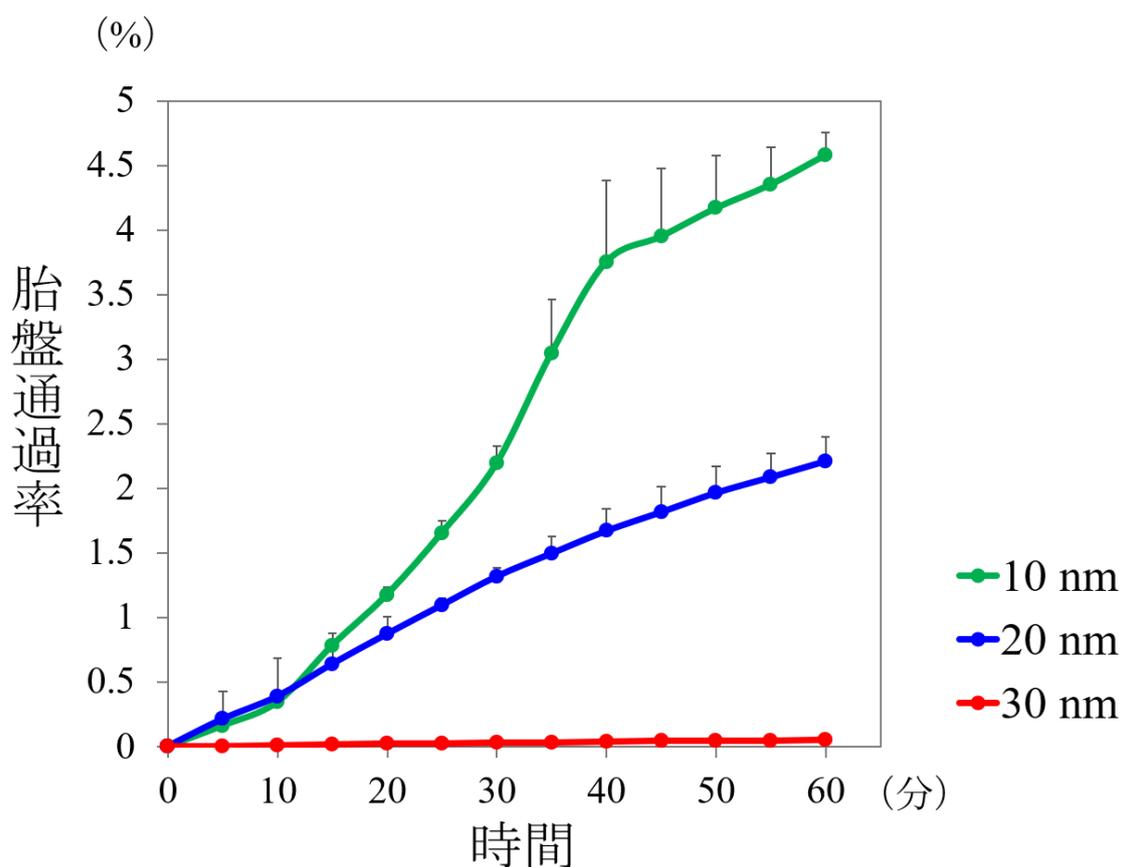


図 7 : PEG 化金ナノ粒子によるヒト胎盤灌流実験

ヒト胎盤灌流モデルに 10 nm、20 nm、30 nm の GNP を投与し、60 分間灌流した (各群とも $n=2$)。胎児循環臍帯静脈からの GNP 回収量 $\times 100$ / 母体側灌流液への GNP 投与量 = 胎盤通過率と定義し、時間毎の胎盤通過率の平均と標準偏差をグラフに示した。GNP の測定は可視分光光度計ナノドロップを用いて行った。GNP は大きさに依存して胎盤通過性が低下し、30 nm の GNP は胎盤をほとんど通過しなかった。

IND-polymer の合成 (方法 4)

IND-polymer の合成は MeO-PEG-NH₂ と BLA-NCA の開環重合反応により PEG-PBLA を合成し、PEG-PBLA に 4-amino-1-butanol と 2-aminomethylfuran を付加して PEG-pAsp-furan-OH polymer を合成、さらに PEG-pAsp-furan-OH polymer に IND を付加することで PEG-pAsp-furan-IND polymer を合成し、IND-polymer を得た。

高分子ナノミセルには臨海ミセル濃度 (Critical micellar concentration : CMC) というミセルが形成される濃度が存在する。親水基を持つ IND-polymer は、ポリマー濃度が低い時には水溶性の液体中でポリマーの形で存在している。ポリマー濃度が CMC 以上になると、ポリマーは自己会合してミセルを形成する。胎盤通過を制御するには、血中で IND-polymer の形ではなく、IND/m の形で存在することが重要である。ミセルが分解し、IND が血中で放出されれば、放出された IND は胎盤を通過することが想定される。IND/m が血中においてミセル構造を維持するためには、CMC に依存しない安定した構造が必要である。ポリマーを架橋することによってミセルの安定性が増すという既報に基づき⁷⁴、Diels-Alder 反応を利用してポリマー同士を架橋することで⁷⁵、血中で分解しない、安定した CL-IND-polymer を生成した。

生成した架橋インドメタシン高分子ナノミセルの大きさは 44 nm で、IND/m は架橋構造により、より高い安定性を示す（方法 4）

生成した CL-IND-polymer の自己会合によってミセル化した架橋インドメタシン搭載高分子ナノミセル（Cross-linked Indomethacin micelle : CL-IND/m）は動的光散乱法（Dynamic Light Scattering : DLS、マルバーン、ドイツ）を用いて評価した。DLS は、粒子径が小さい程ブラウン運動の速度が速いという事実を利用して、溶液中でブラウン運動をしている粒子にレーザー光を照射し、粒子からの散乱光検出することで、粒子径と粒子の分布を測定する。DLS では、粒子の大きさ、粒子径の分布幅、粒子の濃度の測定が可能である。DLS において、粒子径の分布幅は、多分散性指数（Polydispersity index、PDI）で、0 から 1 の範囲の値で測定され、0 に近い程粒子径の分布がない、均一な懸濁液であることを表す。0.1 以下の PDI 値を有する分布は単分散と定義される。

Diels-Alder 反応による架橋前の、非架橋インドメタシン搭載高分子ナノミセル（Non Cross-linked Indomethacin micelle : NCL-IND/m）は 43 nm、PDI : 0.043、CL-IND/m は 44 nm、PDI : 0.057 といずれも 30 nm 以上で、単分散分布であった。

また、粒子の濃度は Derived count rate（DCR）として測定された。DCR は、レーザー光を照射した際の、受光光学系で検出される 1 秒間当たりの光子パ

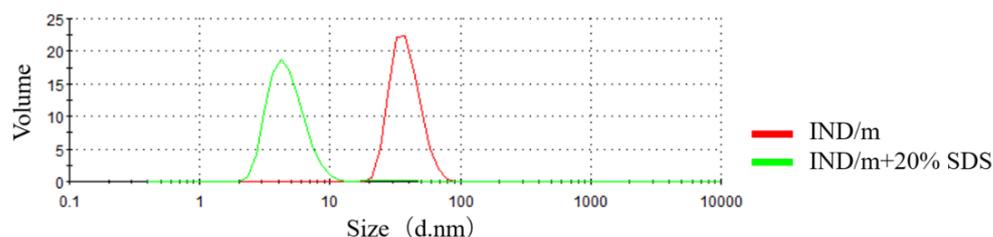
ルス数のことで、散乱光強度に比例する。DCR が大きい程、粒子は大きく、濃度が高いことを意味する。CL-IND/m の安定性を検証する目的で、ミセルを不安定化させる界面活性剤として 20 %SDS を NCL-IND/m、CL-IND/m にそれぞれ添加した⁷⁶。SDS は、変性作用を持つアニオン性界面活性剤で、水とポリマーの混和性を高めることにより、ミセル構造を崩壊させる。

NCL-IND/m の DCR は 52543 であったが、20 %SDS を添加すると DCR は 6486 と大きく低下した。測定している粒子の大きさが同一であることを考慮すると、この結果は 20 %SDS の添加により NCL-IND/m の濃度が低下した、つまり NCL-IND/m が分解したことを示唆する。一方、CL-IND/m の DCR は 69153 であり、20 %SDS を添加したところ、DCR は 72778 と変化しなかった。このことから、CL-IND/m は 20 %SDS の添加を行ってもミセルが分解せず、生化学的に安定であることを示唆している。以上より、IND/m は Diels-Alder 反応による架橋構造により、生化学的に安定した構造になったことが分かった (図 8)。

A

	大きさ (nm)	PDI	DCR
Non Cross-linked IND/m	43	0.043	52543
Non Cross-linked IND/m + 20 % SDS	33	0.678	6486
Cross-linked IND/m	44	0.057	69153
Cross-linked IND/m + 20 % SDS	52	0.072	72778

B (%)



C (%)

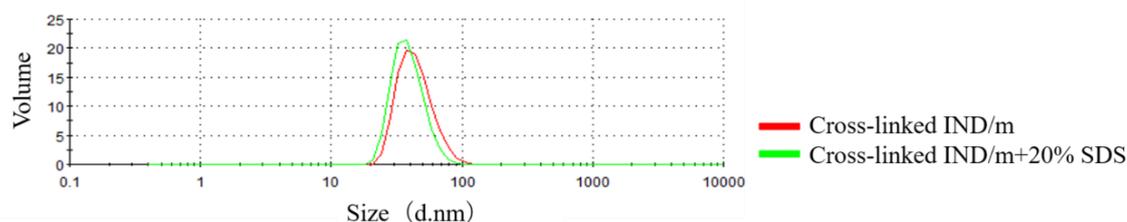


図 8 : DLS による、NCL-IND/m、CL-IND/m のサイズ、PDI、DCR の測定

NCL-IND/m、CL-IND/m はいずれも 30nm 以上の大きさで、 $PDI \leq 0.1$ と単分散であった。また、20 %SDS を添加すると、NCL-IND/m においては DCR が大きく低下し、IND/m が分解したことを示唆した結果であったのに対して、CL-IND/m においては DCR が変化せず、20 %SDS を添加しても CL-IND/m が分解していない、安定性の高い構造であることが示唆された (A)。NCL-IND/m と 20 %SDS 添加 NCL-IND/m における粒子のサイズの分布は全く異なっており、SDS 添加により、NCL-IND/m の構造が変化したことが示唆された (B)。CL-IND/m と 20 %SDS 添加 CL-IND/m における粒子サイズの分布はほとんど一致しており、SDS 添加によって CL-IND/m の構造が変化していないことが示唆された (C)。

CL-IND/m は pH の変化によっては分解せず、マクロファージ内で分解し、IND を放出する (方法 5)

CL-IND/m は安定性の高い構造であることは立証できたが、容易に分解してミセル構造が崩壊しない、高い安定性を持つ CL-IND/m が薬効を示すためには、標的部位においてミセルを分解し、IND を放出させる機構が必要である。CL-IND/m が分解して薬効を示す機構について、以下 2 つの仮説を立て、仮説に基づいた検証を行った。

仮説 1. エンドソーム内の pH 変化により、CL-IND/m が分解し、IND が放出される

標的臓器に到達した IND/m は、エンドサイトーシスによりエンドソーム内に取り込まれることが想定される。エンドソーム内の pH は pH4.5-6.5 と血液中の pH に比べて低いことが報告されており⁷⁷、この pH の変化により IND/m は安定性を失い分解する、という仮説を立てた (図 9)。

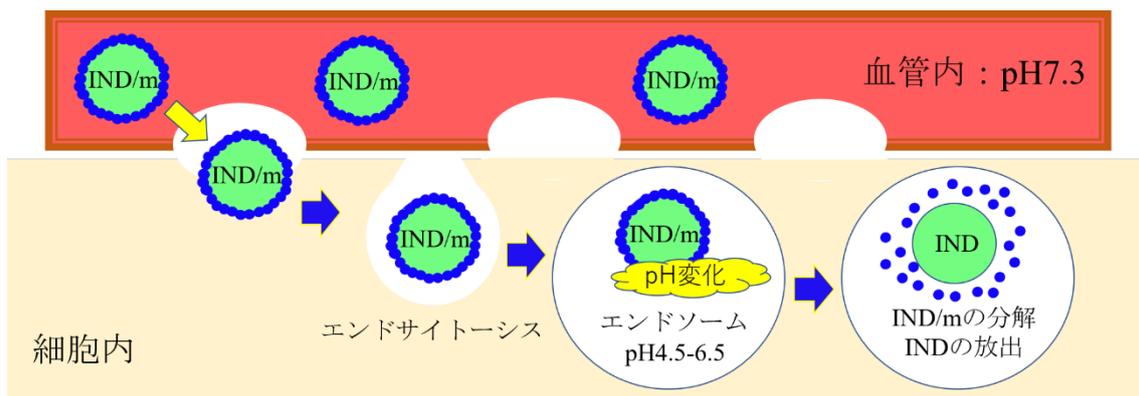


図9：仮説1. エンドソーム内のpH変化により、CL-IND/mが分解し、INDが放出される

標的臓器に到達したCL-IND/mは、エンドサイトーシスによって細胞内エンドソームに取り込まれる。血管内のpHが7.3であるのに対し、エンドソーム内のpHは4.5-6.5と低く、このpH変化によってCL-IND/mが分解し、INDが放出されるという仮説を立てた。

仮説2. マクロファージ内のエステラーゼによってCL-IND/mが分解し、INDが放出される

妊娠中、胎盤には胎盤マクロファージが豊富に存在しており、この胎盤マクロファージは他の組織に分布する他のマクロファージと同様に貪食作用、炎症性サイトカインの分泌作用を有することが知られている⁷⁸。また、早産患者において膣から上行性に炎症が波及すると、子宮や胎盤に抗炎症性マクロファージが誘導され、炎症性サイトカインの分泌を介してPGを産生することにより、早産の病態形成に関与している^{21,79}。胎盤に豊富に存在し、早産の病態形

成に寄与するマクロファージを薬物送達のターゲットとすることは、DDS の観点からも有用である。マクロファージ内には種々のエステラーゼが存在し⁸⁰
⁸¹、これらのエステラーゼによって CL-IND/m 中に存在する、エステル結合が分解され、IND が放出されるという仮説を立てた (図 10)。

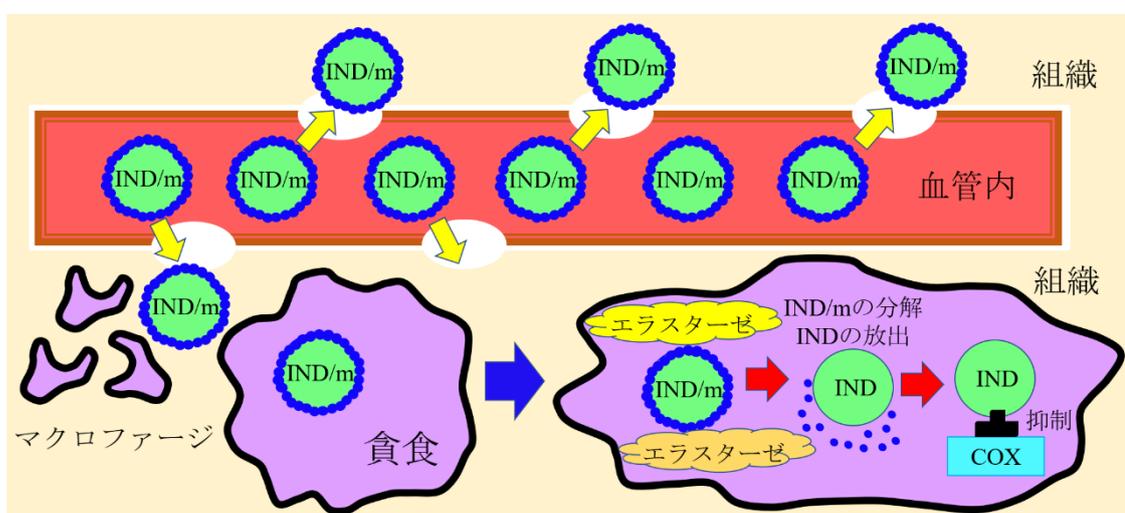


図 10 : 仮説 2. マクロファージ内のエステラーゼによって CL-IND/m が分解し、IND が放出される

マクロファージ内には種々のエステラーゼが存在し、このエステラーゼによって、IND をポリマーに結合させているエステル結合が分解し、CL-IND/m が分解され、IND がマクロファージ内に放出し、COX の働きを抑制する。

仮説 1 の検証は透析膜と pH を調整した MQW 水を用いて行った。生理的環境を pH7.3、エンドソーム内環境を pH5.3 として、pH を調整した MQW 水に対して CL-IND/m を透析し、透析液中の IND 含有量を HPLC で測定した。透析膜

中に CL-IND/m として付加した IND 量を分母、透析液中の IND 含有量を分子として、その比を IND 放出率として pH7.3、pH5.3 それぞれの環境下における CL-IND/m からの IND 放出率を算出した。

IND は、pH7.3、pH5.3 いずれの透析液中からも検出されず (図 11A)、CL-IND/m は pH の変化によって分解せず、IND を放出することはないことが示唆された。この結果は CL-IND から IND を放出するのに pH の変化だけでは不十分である、という仮説 1 を否定する結果であったが、一方で、周囲環境の変化によらず CL-IND/m が構造を維持できる、安定性の高いものであることを示唆する結果であった。

仮説 2 の検証は RAW264.7 細胞を用いて行った。RAW264.7 細胞をプレートに $2 \times 10^5 / 2 \text{ ml/well}$ で播種し、培養後 24 時間に 0.5 mg/ml 濃度の IND 2 ml、IND 濃度として 0.5 mg/ml の CL-IND/m 2 ml をそれぞれ添加してさらに 48 時間培養し、細胞を回収した。細胞内に含有される IND 量を HPLC で測定した。IND、CL-IND/m として付加した IND 量を分母、回収された細胞内から検出された IND 量を分子として、その比を IND 放出率として RAW264.7 細胞内における IND、CL-IND/m からの IND 放出率を算出した。

薬剤投与後 48 時間後において、IND を付加した RAW264.7 細胞、IND/m を付加した RAW264.7 細胞からは同程度の IND が検出された (図 11B)。IND 量

として同量の IND、CL-IND/m を付加した際に同程度の IND が RAW264.7 細胞内から検出されたことは、RAW264.7 が CL-IND/m を細胞内に取り込み、細胞内に IND を放出したことを示しており、RAW264.7 細胞内で CL-IND/m が分解したことを示唆し、仮説 2 を指示する結果であった。

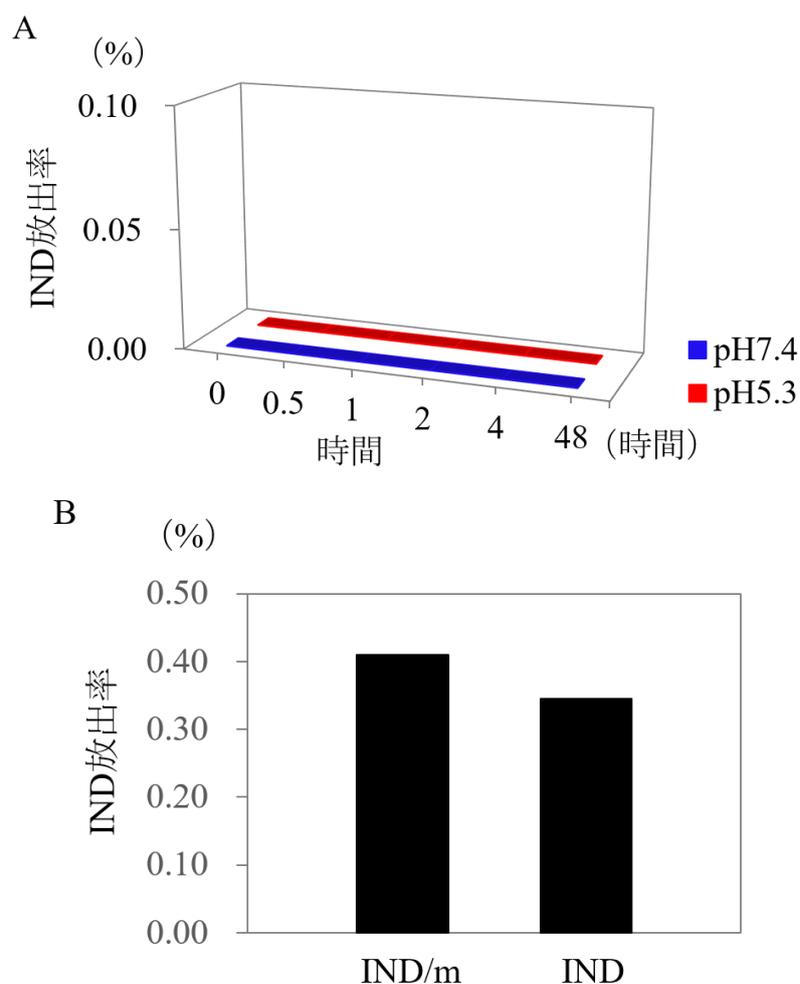


図 11 : CL-IND/m からの IND 放出機構の検証

pH を pH7.3、pH5.3 に調整した MQW 水に対して CL-IND/m を透析し、透析液中の IND 含有量を HPLC で測定した。透析膜中に CL-IND/m として付加した IND 量を分母、透析液中の IND 含有量を分子として、その比を IND 放出率として pH7.3、pH5.3 それぞれの環境下における CL-IND/m からの IND 放出率算出した。IND は、pH7.3、pH5.3 いずれの透析液中からも検出されなかった

(A)。RAW264.7 細胞をプレートに $2 \times 10^5 / 2 \text{ ml/well}$ で播種し、培養後 24 時間に 0.5 mg/ml 濃度の IND 2 ml、IND 濃度として 0.5 mg/ml の CL-IND/m 2 ml をそれぞれ添加してさらに 48 時間培養し、細胞を回収した。細胞内に含有される IND 量を HPLC で測定した。IND、CL-IND/m として付加した IND 量を分母、回収された細胞内から検出された IND 量を分子として、その比を IND 放出率として RAW264.7 細胞内における IND、CL-IND/m からの IND 放出率算出した。薬剤投与後 48 時間後において、IND 付加細胞、CL-IND/m 付加細胞からは同程度の IND が検出された (図 B)。

CL-IND/m は IND に比べてヒト胎盤灌流モデルでの胎盤通過性が低い（方法
3)

開発した CL-IND/m と IND のヒト胎盤通過性について、ヒト胎盤灌流モデルを用いて検証した。母体側灌流液中の薬剤濃度は、動脈管に影響を与える量として、動脈管開存症の治療時における IND 静脈注射薬使用時の平均血中濃度から IND : 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 、CL-IND/m は IND 濃度として 2.0 $\mu\text{g/ml}$ とした⁷²。胎児側臍帯静脈からの回収量を分子、母体側灌流液への投与量を分母とし、胎盤通過率を算出した。

60 分の灌流において、IND の胎盤通過率の平均値 (n=3) は 17.6 %であった。一方、IND/m の胎盤通過率の平均値 (n=3) は 0.034 %であり、胎盤通過率は IND/m において IND 投与時に比べて低かった (図 12)。

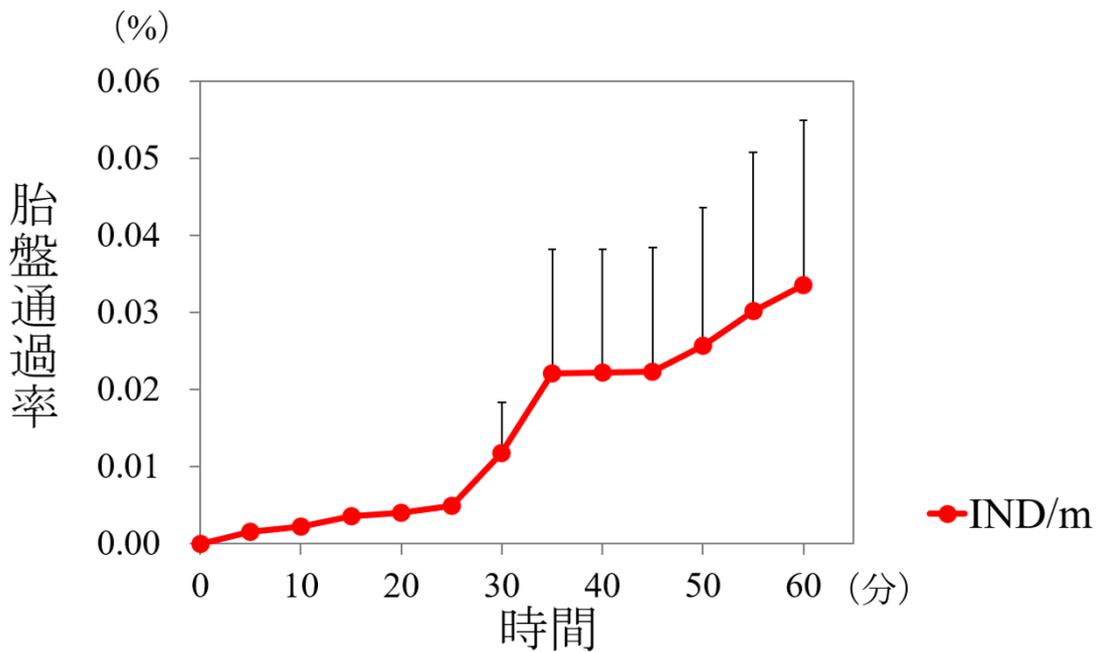
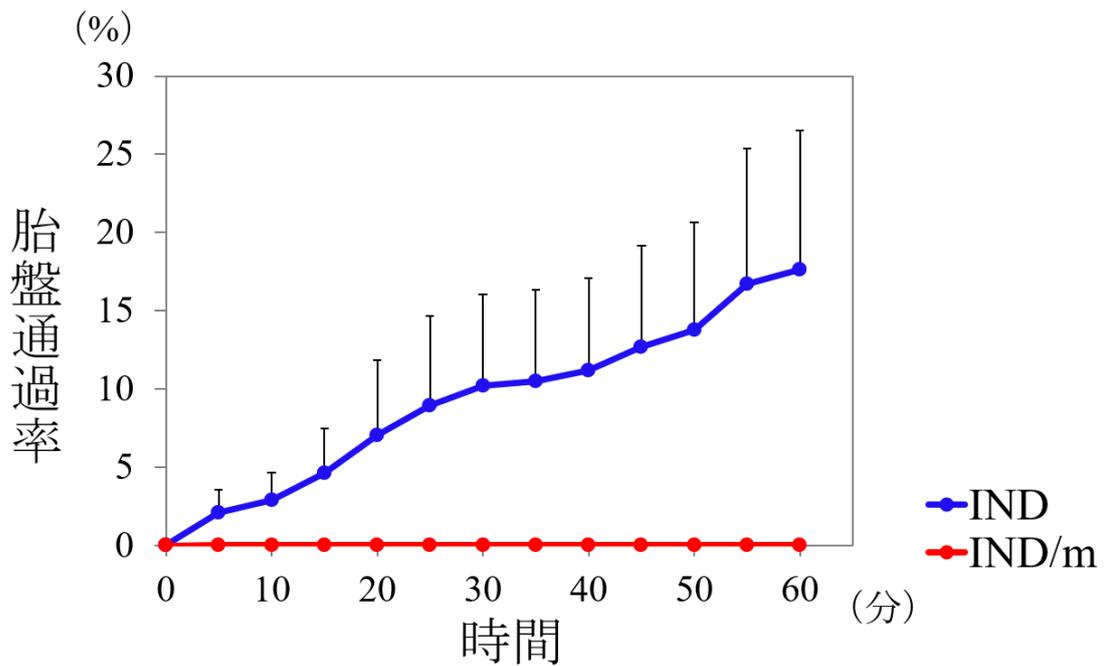


図 12 : IND と IND/m のヒト胎盤灌流実験

ヒト胎盤灌流モデルに 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の IND、IND 濃度として 2.0 $\mu\text{g/ml}$ の CL-IND/m を投与し、60 分間灌流した (各群とも $n=3$)。胎児側臍帯静脈からの回収量 $\times 100$ / 母体側灌流液への投与量 = 胎盤通過率と定義し、時間毎の 3 回の平均と標準偏差をグラフに示した。IND、CL-IND の測定は HPLC で行った。60 分後の CL-IND/m の胎盤通過率は IND の通過率に比べて低かった。

CL-IND/m はマウス胎盤をほとんど通過しない (方法 6)

マウスにおいて、母獣に CL-IND/m を投与した際の、薬剤生体内分布についての検討、CL-IND/m の胎盤通過性についての検討を行う目的で、IND 量として 10 mg/kg の蛍光標識 CL-IND/m を早産マウスモデルに投与し、薬剤投与後 1 時間、4 時間、8 時間、24 時間の各臓器の薬剤蓄積について評価した。

CL-IND/m の蓄積量は、肝臓、腎臓、脾臓、子宮、胎盤において、経時的に増加していた。一方、胎盤-臍帯-胎児-羊膜の部分に着目すると、胎盤の CL-IND/m 蓄積量は経時的に増加していたのに対して、胎児は CL-IND/m 投与後 1 時、4 時間、8 時間、24 時間のいずれの時点において明らかな CL-IND/m の蓄積を認めなかった (図 13)。

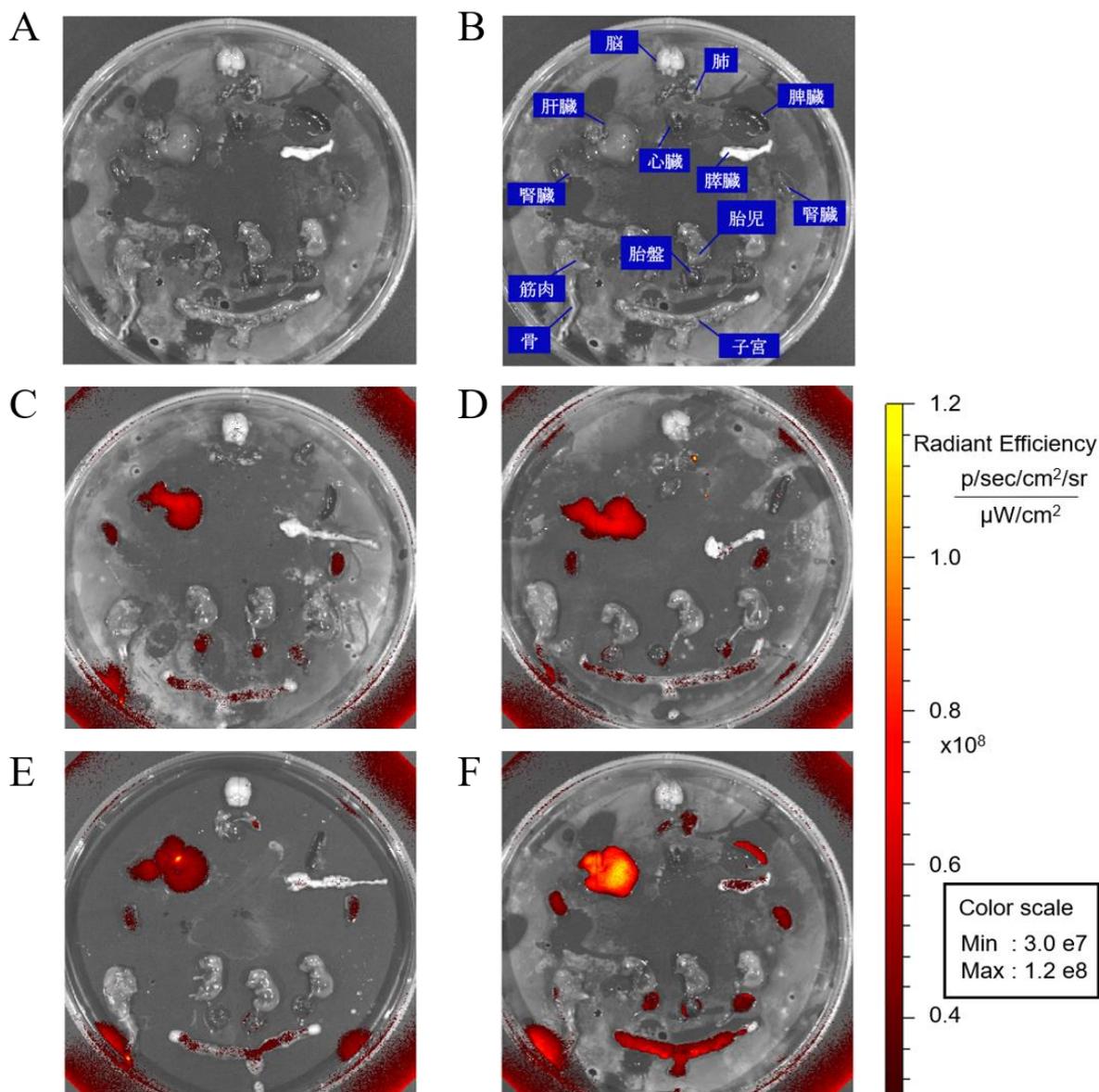


図 13 : 蛍光標識 CL-IND/m の母獣尾静脈投与による、CL-IND/m 薬剤分布

IND 量として 10 mg/kg の蛍光標識した CL-IND/m を、早産マウスモデル妊娠 15 日目、LPS 投与直後に尾静脈より投与し、投与後 1 時間、4 時間、8 時間、24 時間にマウスを安楽死させ、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、膵臓、両側腎臓、胎盤、臍帯、胎児、羊膜、子宮体部、子宮頸部、大腿骨、大腿の筋肉を摘出した。摘出した組織を IVIS Imaging System で撮影した。

摘出した各臓器 (A)、各臓器の名称 (B)、投与後 1 時間 (C)、投与後 4 時間 (D)、投与後 8 時間 (E)、投与後 24 時間 (F)

また、妊娠マウスにおける IND、CL-IND/m 投与時の薬剤生体内分布について比較検証する為、妊娠 18 日目のマウスに、1 mg/kg 濃度の IND、IND 量として 10 mg/kg 濃度の CL-IND/m を母獣尾静脈より投与し、投与後 1 時間、4 時間、8 時間、24 時間の各臓器における IND、CL-IND/m の蓄積量を HPLC で測定した。CL-IND/m の蓄積量については、CL-IND/m が分解して遊離した IND として各臓器に蓄積している量を考慮し、CL-IND/m 蓄積量と IND 蓄積量の総和として算出した。薬剤分布量は、臓器への薬剤蓄積量を分子、薬剤投与量を分母として薬剤蓄積率を算出し、臓器 1 g 当たりの薬剤蓄積率を薬剤分布量として計算した。薬剤投与後 1 時間、4 時間、8 時間、24 時間の薬剤分布率をグラフに表し (図 14)、比較検討した。

胎児への薬剤分布率は、IND 投与群において投与後 24 時間に最大の 0.57 ± 0.21 %であったのに対して、CL-IND/m 投与群においては 0.013 ± 0.0058 %とより低い分布率を示した。

胎盤における薬剤分布率は、IND 投与群において投与後 4 時間に最大の 4.03 ± 2.24 %を示し、投与後 24 時間には 2.07 ± 0.95 %であったのに対し、CL-IND/m 投与群においては、投与後 24 時間に 7.10 ± 1.40 %と最大の薬剤分布率を示し、投与後 24 時間において CL-IND/m 投与群でより高い分布率を示した。

肝臓における薬剤分布率は、IND 投与群において投与後 24 時間に最大の 3.70 ± 1.25 %であったのに対し、CL-IND/m 投与群においては、投与後 24 時間に 12.3 ± 3.20 %と最大の薬剤分布率を示し、投与後 24 時間において CL-IND/m 投与群でより高い分布率を示した。

腎臓における薬剤分布率は、IND 投与群において投与後 24 時間に最大の 2.53 ± 1.23 %であったのに対し、CL-IND/m 投与群においては投与後 8 時間に最大の 4.75 ± 1.63 %を示し、投与後 24 時間には 4.60 ± 0.79 %であり、投与後 24 時間において CL-IND/m 投与群でより高い分布率を示した。

脾臓における薬剤分布率は、IND 投与群において投与後 24 時間に最大の 4.27 ± 1.57 %であったのに対し、CL-IND/m 投与群においては、投与後 24 時間に 3.90 ± 1.51 %と最大の薬剤分布率を示し、投与後 24 時間において、IND 投与群、CL-IND/m 投与群の薬剤分布率は同等であった。

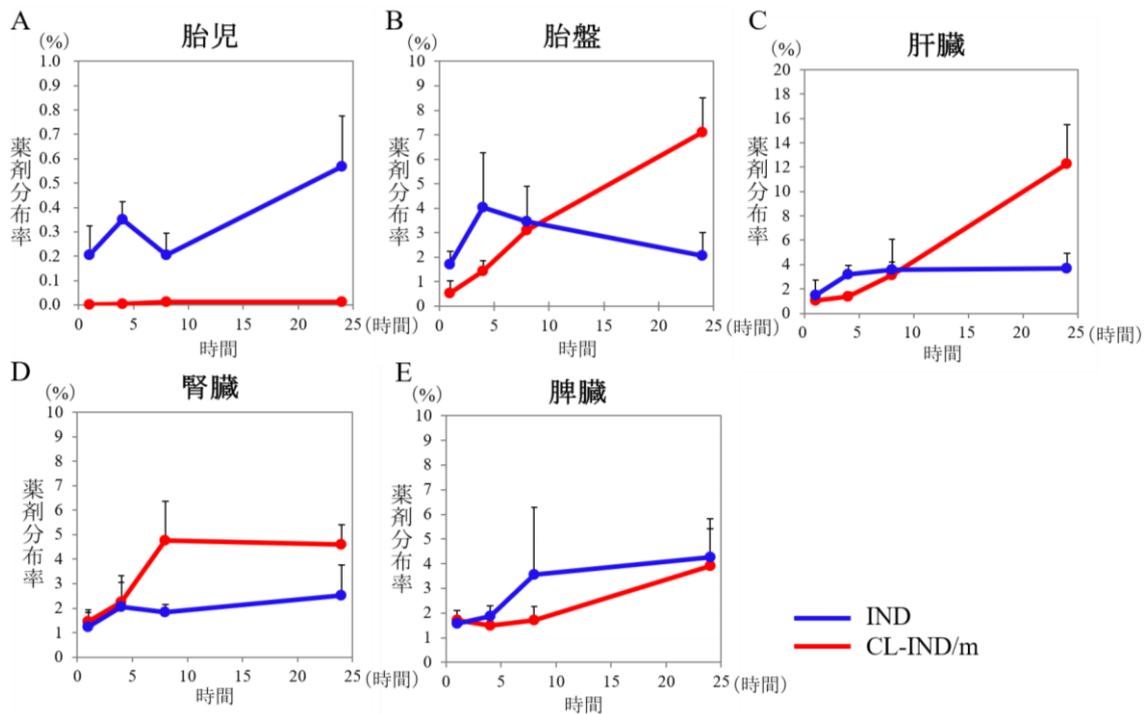


図 14：妊娠マウスにおける IND、CL-IND/m 投与時の薬剤生体内分布

1 mg/kg の IND、IND 量として 10 mg/kg の CL-IND/m を、妊娠マウス 18 日目に尾静脈から投与し、胎児 (A)、胎盤 (B)、肝臓 (C)、腎臓 (D)、脾臓 (E) への薬剤蓄積量を HPLC で測定し、薬剤蓄積量/薬剤投与量を薬剤蓄積率と定義し、組織 1 g あたりの薬剤蓄積率を薬剤分布率として、投与後 1 時間、4 時間、8 時間における薬剤分布率の平均と標準偏差をグラフに示した (各群とも n=3)。

CL-IND/m 投与群においては、薬剤蓄積量は CL-IND/m 蓄積量と IND 蓄積量の和で計算した。

投与後 24 時間において、CL-IND/m の胎児への薬剤分布率は IND 投与群と比べて低かった。また、CL-IND/m の胎盤への薬剤分布率は IND 投与群と比べて高かった。

IND/m は LPS 誘導性早産マウスモデルにおいて早産を抑制する (方法 1,2)

早産モデルマウスにおいて、3 $\mu\text{g}/\text{body}$ の LPS を子宮頸管に投与した直後に、NS、1 mg/kg 濃度の IND、IND 濃度として 10 mg/kg の CL-IND/m を 24 時間毎に母獣尾静脈から投与した。72 時間以内の分娩を早産と定義し、早産率を比較した。

NS 投与群において早産率は 85.7%であったのに対し、IND 投与群では 15.4%、CL-IND/m 投与群では 16.7%と有意に早産率が低かった。IND 群と CL-IND/m 投与群の間には有意差は認めなかった (図 15A)。

また、NS 投与群、IND 投与群、CL-IND/m 投与群のそれぞれについて、投与後から分娩に至るまでの時間を観察し、 Kaplan-Meier 法で比較した (図 15B)。その結果、早産マウスモデルにおいて、IND 投与群、CL-IND/m 投与群では NS 投与群に比べて有意に妊娠継続率が高かった。また、早産に至った例の平均分娩時間は NS 群においては LPS 投与後 22.0 時間、IND 投与群においては LPS 投与後 22.5 時間、CL-IND/m 投与群においては 23.0 時間であった。

以上より、早産モデルマウスにおいて、IND と CL-IND/m はいずれも有効な治療的効果を有し、その効果は同等であることが示された。

さらに、早産に至らず、妊娠が継続した例に関して、LPS 投与後 72 時間後に開腹して胎仔の状態を確認したところ、NS 投与群においては胎児生存例が

100 % (2/2 例)、子宮内胎仔死亡 (Intrauterine fetal death : IUFD) 例が 0 % (0/2 例) であったのに対して、IND 投与群では胎仔生存例が 72.7 % (8/11)、IUFD 例が 27.3 % (3/11 例)、CL-IND/m 投与群では胎児生存例が 100 % (10/10 例)、IUFD 例が 0 % (0/10 例) であった。統計学的な有意差は認めなかったものの、この結果は IND 投与群の胎児毒性を反映した結果である可能性が示唆される。

A

	n	早産あり (72時間以内の分娩)	早産なし
3 μ g LPS+NS	14	12 (85.7%)	2 (14.3%) [胎仔生存例: 2 (100%)、胎仔死亡例: 0 (0%)]
3 μ g LPS+IND	13	2 (15.4%)	11 (84.6%) [胎仔生存例: 8 (72.7%)、胎仔死亡例: 3 (27.3%)]
3 μ g LPS+CL-IND/m	12	2 (16.7%)	10 (83.3%) [胎仔生存例: 10 (100%)、胎仔死亡例: 0 (0%)]

B

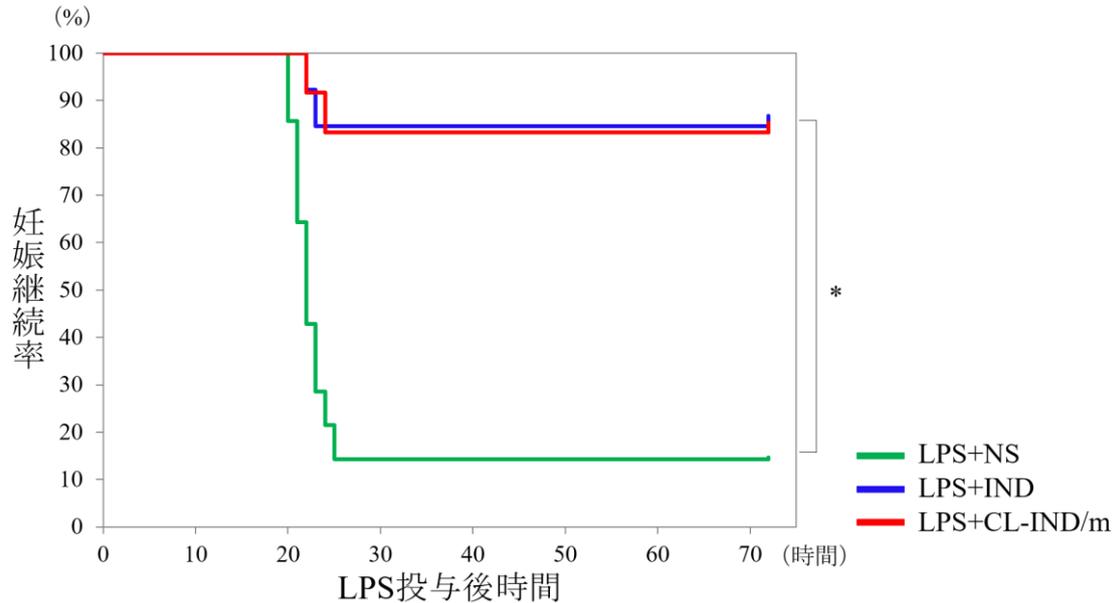


図 15：早産マウスモデルにおける IND、IND/m の早産抑制効果の比較

早産マウスモデルにおいて、LPS 投与直後から 24 時間毎に NS、IND (1 mg/kg)、CL-IND/m (IND 濃度として 10 mg/kg) を投与した。NS 投与群に対して IND 投与群、CL-IND/m 投与群はいずれも早産率が有意に低かった

($p < 0.05$ 、Fisher の直接確立検定)。IND 投与群と CL-IND/m 投与群の間には早産率に有意差は認めなかった (A)。 Kaplan-Meier 法において NS 投与群に対して IND 投与群、CL-IND/m 投与群では早産マウスモデルにおける妊娠継続率が高かった (B)。

は有意差があることを示す。 $p < 0.05$ (ログランク検定)

マウスへの CL-IND/m 投与は出生仔の出生後生命予後、出生後体重増加に影響しない（方法 7）

IND/m 投与後の出生仔への影響について検討する目的で、出生仔の出生後生命予後と、出生後体重増加について観察した。妊娠マウスの妊娠 15 日目に NS を投与した母獣から出生した仔（n=21）をコントロール群として、早産マウスモデルにおいて LPS 投与直後から 24 時間毎に IND（1 mg/kg）を投与した群（n=22）、および 24 時間毎に CL-IND/m（IND 濃度として 10 mg/kg）を投与した群（n=23）から出生した仔との間で、出生後生命予後の比較検討を行った。NS 投与群では 4 匹の仔が、IND 投与群と CL-IND/m 投与群ではそれぞれ 5 匹の仔が、出生後 72 時間以内に死亡した。72 時間以降の仔の死亡は認めなかった。3 群間における仔の生存率について Kaplan-Meier 法を用いて検討したが、各群の間に統計学的に差を認めなかった（図 16A）。

また同群間において、出生後の仔の体重増加についても比較検討を行った。仔の体重は、母獣の体重で標準化した。出生後 8 日目の時点で、NS 投与群で 68.7 ± 13.3 mg/g、LPS+IND 投与群で、 60.8 ± 15.3 mg/g、LPS+CL-IND/m 投与群で 63.5 ± 9.1 mg/g の体重増加を認めた。これら 3 群の間には統計学的に差を認めなかった（図 16B）。これらの結果より、IND および CL-IND/m の投与は、出生仔の出生後生命予後や出生後体重増加に影響を与えないことが示された。

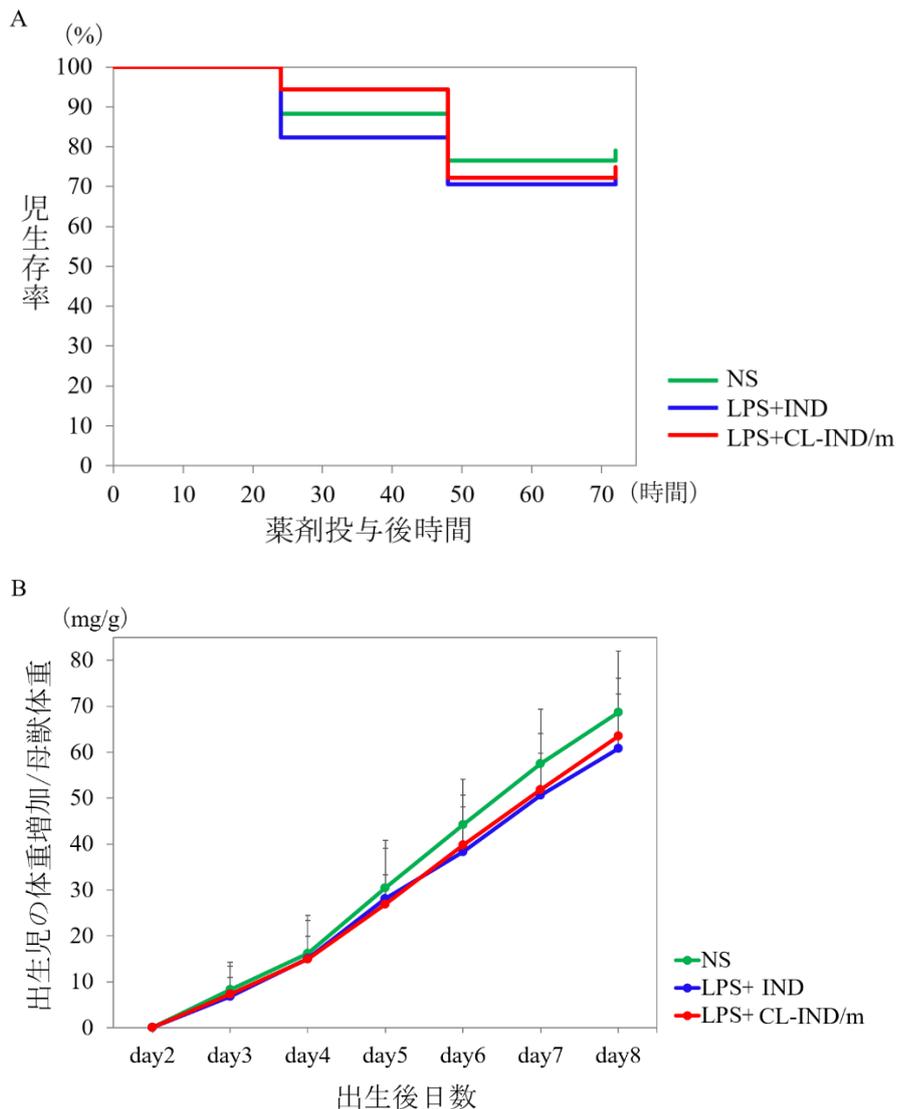


図 16 : CL-IND/m 投与後出生仔における出生後生命予後、出生後体重増加の

検討

妊娠マウスの妊娠 15 日目に NS を投与した群 (n=21)、早産マウスモデルにおいて LPS 投与直後から 24 時間毎に IND (1 mg/kg) を投与した群 (n=22)、24 時間毎に CL-IND/m (IND 濃度として 10 mg/kg) を投与した群 (n=23) における出生仔の出生後生命予後を Kaplan-Meier 法で比較した。各群の間にはいずれも統計学的有意差を認めなかった (p=NS、ログランク検定) (A)。また、3 群間における出生後日数毎の体重増加量を母獣の体重で標準化した平均体重増加量と標準偏差を比較検討した。3 群の間にはいずれも統計学的に差を認めなかった (p=NS、student の t 検定) (B)。

CL-IND/m は、マウス胎仔の動脈管を狭窄させない（方法 8）

妊娠マウスにおける IND、CL-IND/m 投与時の胎仔動脈管への影響について比較検証する為、妊娠 15 日目のマウスに、NS、1mg/kg 濃度の IND、IND 量として 10mg/kg 濃度の CL-IND/m を母獣尾静脈より投与し（n=3）、各薬剤最終投与後 24 時間にマウスを安楽死させ、胎仔の胸部を摘出し、動脈管の狭窄・閉鎖の有無について組織学的に評価した。IND 投与群では狭窄した DA を認めた例が存在したのに対して、NS 投与群、CL-IND/m 投与群においては DA に狭窄を認めた例は存在しなかった（図 17）。

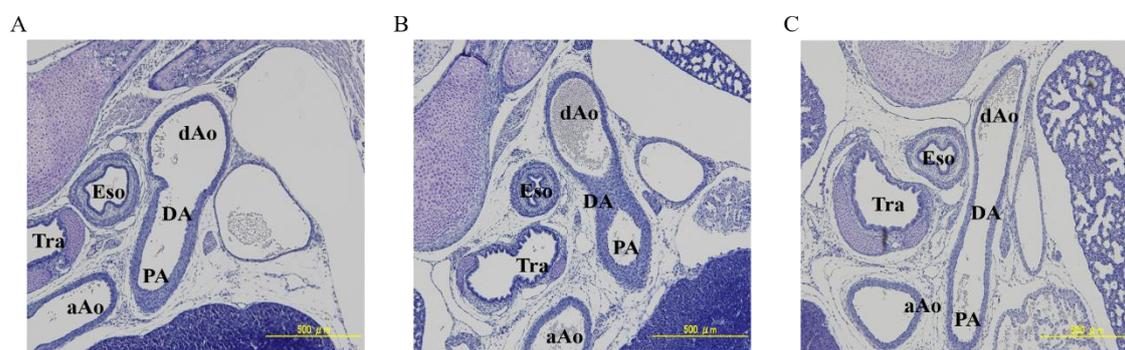


図 17：NS、IND、CL-IND/m 投与時の動脈管狭窄についての検討

妊娠 15 日目のマウスに、NS、1 mg/kg 濃度の IND、IND 量として 10 mg/kg 濃度の CL-IND/m を母獣尾静脈より投与し（n=3）、各薬剤最終投与後 24 時間にマウスを安楽死させ、胎仔の胸部を摘出し、動脈管の狭窄・閉鎖の有無について組織学的に評価した。NS 投与群においては動脈管の狭窄を認めた例は存在しなかった（A）。IND 投与群においては動脈管の狭窄を認めた例が存在した（B）。CL-IND/m 投与群においては動脈管の狭窄を認めた例は存在しなかった（C）。

DA : Ductus Arteriosus、dAo : descending Aorta、aAo : ascending Aorta、PA : Pulmonary Artery、Tra : Trachea、Eso : Esophagus

考察

早産に対する治療薬として、子宮収縮抑制を目的としたプロスタグランジン阻害剤、 β 刺激薬、カルシウム拮抗薬、硫酸マグネシウム、オキシトシン受容体拮抗薬、硝酸塩などの投与が行われているが、これらの治療は、児の成熟を促す目的に行われるステロイド投与の効果が得られる時間、もしくは高次施設への母体搬送に要する時間として 48 時間に限定して行われている^{31,82}。医療の進歩と周産期医療に関わる医療従事者の懸命な努力にも関わらず、早産率は増加しており^{27,28}、より良い治療方法の確立は産科領域における重要な課題である。現在、早産に対する治療に時間的な制限が設けられている理由は、子宮収縮抑制剤による分娩遅延効果、新生児死亡率の改善効果、新生児の呼吸窮迫症候群の罹患率低下についてのエビデンスが、子宮収縮抑制剤投与開始後 48 時間にとどまることにあるが³¹、早産児として出生した児の長期予後に着目すると、妊娠 34 週 0 日から妊娠 36 週 6 日までの間に出生した後期早産期児であっても正期産児比較して乳児期死亡率が高く⁸³、脳性麻痺や発達遅滞の発症率も高い⁸⁴、という事実は重要視されるべきである。

感染性早産の病態生理は、膣内における細菌性感染から上行性に子宮への感染、炎症の波及が広がることにより炎症細胞が誘導され、炎症細胞から分泌される炎症性サイトカインがアラキドン酸カスケードの活性化し PG が産生され

ることである⁸⁵。アラキドン酸カスケードにおける PG の産生は COX が関与しており²¹、COX を抑制して PG の産生を阻害する IND は病態生理に即した合理的で、有効性の高い治療薬であるにも関わらず、胎盤を通過して胎児毒性を示すことから、IND の使用は本邦では禁忌、米国などの欧米諸国では、切迫早産に対する子宮収縮抑制の目的において妊娠 32 週未満かつ 48 時間以内の投与期間に制限されている。私は現行治療のような限定的な子宮抑制ではなく、長期間にわたって胎児毒性の懸念がなく、有効に子宮収縮を抑制し 1 日でも長い妊娠期間の延長を実現できる早産の治療こそが、新生児期のみならず出生後の児の長期的予後を改善する理想的な治療薬であると考え、子宮収縮抑制効果という観点において最も効果的な薬剤である IND³⁰ に注目し、IND の胎児毒性を回避するために、IND の胎盤通過性を制御する仕組みとして、ナノテクノロジーを用いた DDS に着目した。

ナノテクノロジーを用いた DDS は治療標的臓器への有効な送達と、非標的臓器への薬剤分布の回避を意図した技術であり⁸⁶、癌治療などの分野においてはこの技術を用いて、腫瘍への薬剤分布と多臓器の副作用の低減を可能としたナノ医薬品が実際に臨床応用されている⁸⁷⁻⁸⁹。産科領域においても胎盤通過性の制御を目的としたナノテクノロジーの利用についての研究が行われ、サイズや物質の持つ化学特性が胎盤通過性の制御に関与し得る可能性が報告されてい

るが⁹⁰⁻⁹⁴、臨床応用に至っている医薬品は現時点では存在しない。研究段階においても、その全てはリポソームに関する報告であり、我々が用いた高分子ナノミセルによる胎盤通過性の制御を意図した薬剤開発の報告は存在しない⁹⁵。

早産に対する IND の有効性に着目し、ナノテクノロジーを利用した DDS についての研究は少数ではあるが報告があり、これらの研究はリポソームに IND を搭載し、オキシトシン受容体関連分子を標的分子としてリポソームに修飾することで、IND が有効に子宮に送達されること、胎児への IND の移行が減少したことを報告している^{45,46}。ナノテクノロジーを用いた DDS の治療戦略の基本は標的指向型の薬物送達にあり、これらの先行研究においても同様に、子宮に発現し子宮収縮と関係があるオキシトシン受容体に関連する分子を標的化し、子宮を標的とした IND の有効な送達を意図している^{44-46,96,97}。オキシトシン受容体は、分娩開始時に子宮において急激な発現レベルの上昇が起こることが知られており^{98,99}、ヒトにおいてもオキシトシン受容体拮抗薬の子宮収縮抑制効果が示されていることから、オキシトシン受容体を標的とした治療は合理的であると言える¹⁰⁰。しかし、オキシトシン受容体の発現の増加は分娩開始直前に起こるとされ、満期産、早産いずれにおいても、オキシトシンの分娩開始における役割については明らかではない¹⁰¹。オキシトシン受容体を標的にした治療の奏功にはオキシトシン受容体の発現の増加が必要であり、早産に対する治療が

48 時間に限定されていることを考慮すると、治療開始時期にオキシトシン受容体の発現増加が起こっていないならば、十分な早産治療効果は期待できない可能性があるのではないかと考える。

一方本研究における治療の標的である PG は早産、満期産いずれにおいても分娩における中心的な役割を担っていることが知られている¹⁰²。分娩の開始、進行には子宮収縮と子宮頸管の熟化の二つの要素が必要とされ、これらは切迫早産の主症状でもある。子宮収縮作用に関して PG は、子宮平滑筋 PG 受容体に作用し、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度を増加させ、子宮平滑筋の収縮をもたらす。子宮頸管熟化作用に関して、子宮頸管は線維芽細胞とプロテオグリカン複合体により構成され、線維芽細胞の細胞間隙はコラーゲンによって強固に結合している¹⁰³。このコラーゲンの分解とプロテオグリカン複合体の変化による細胞外マトリックスの変化が子宮頸管の熟化である^{104, 105}。PG は子宮頸部におけるコラーゲナーゼ活性を上昇させることでコラーゲンの分解を促し、プロテオグリカン複合体の組成を変化させることで細胞外マトリックスの変化を引き起こし、子宮頸管の熟化を促す¹⁰⁶。このように PG は分娩の開始と進行における重要な要素である子宮収縮と子宮頸管の熟化の双方に密接に関与しており^{106, 107}、早産に対する治療の標的として最も合理的であると言える。

先行研究におけるリポソームを利用した DDS では、標的指向型であるという特徴から子宮に発現するオキシトシン受容体に関連した標的分子をリポソーム表面に修飾している。Refuerzo らは、IND 搭載リポソームは胎児への IND の移行を減らし、胎盤通過性を制御したことを明らかにしたが⁴⁴、Paul らは、オキシトシン受容体に関連した標的分子修飾をしていない IND 搭載リポソームは、早産の抑制効果を示さなかったと報告した⁴⁵。本研究において開発した CL-IND/m は標的に対する表面修飾を必要とせず、胎盤の通過性を制御し、早産抑制効果を示した。本研究において CL-IND/m を標的臓器に有効に送達する方法として、我々は Enhanced permeation and retention effect (EPR) 効果に着目した。腫瘍や炎症部位においては、血管内皮細胞間には 200 nm 程度の間隙が開口しており、正常血管では透過しない、100nm 以下に制御された大きさの物質が血管を透過して組織に移行する、EPR 効果が知られている¹⁰⁸ (図 18)。

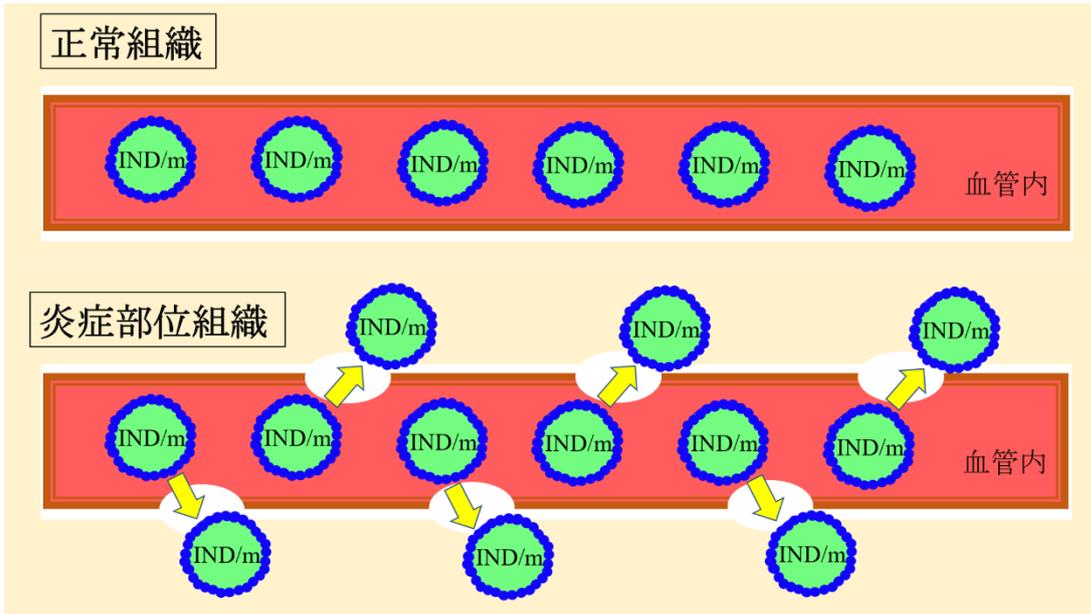


図 18 : Enhanced permeation and retention effect 効果

腫瘍や炎症部位においては、血管内皮細胞間には 200 nm 程度の間隙が開口しており、正常血管では透過しない、100nm 以下に制御されたの大きさの物質が血管を透過して組織に移行する

早産においては、膣から上行性に炎症が波及し、子宮や胎盤の炎症が起こることが病態形成に関与していることから、子宮や胎盤の血管においても血管内皮細胞間に間隙開口が生じていることが想定され、EPR 効果が期待できる。この EPR 効果によって、静脈投与された IND/m が治療標的臓器である子宮や胎盤に送達されるのではないかと考えた。蛍光標識した CL-IND/m による生体内分布実験は、CL-IND/m が子宮や胎盤に送達され、集積することを明らかにした。この結果は我々の仮説を指示するものであった。

本研究はナノテクノロジーを利用した IND の DDS において、高分子ナノミセルを薬物送達物質として用いた最初の報告である。開発した CL-IND/m は既報の IND 搭載リポソームと異なりオキシトシン受容体を標的とした表面修飾を必要とすることなく胎盤通過性を制御し、早産抑制効果を示した。既報における IND 搭載リポソームは 120-200 nm の大きさであり、EPR 効果を十分に活かすには大きすぎる設計である。本研究において CL-IND/m は、疎水基であるポリアミノ酸のヒドロキシル基と IND 内のヒドロキシル基を置換し、エステル結合させることでポリマー内に導入し、IND を含む疎水基が内側、PEG 鎖で構成される親水基が外側の、全体として親水性を示す構造に設計した。また、PEG 鎖は自由に伸長することが可能であるため、PEG 鎖の伸長によって IND/m 全体のサイズを 43 nm に設計した。

EPR 効果によって炎症部位近傍の血管から漏出し、炎症組織内に到達した CL-IND/m が IND を放出して作用するメカニズムとして、「エンドソーム内の pH 変化により CL-IND/m が分解し、IND が放出される」、「マクロファージ内のエステラーゼによって CL-IND/m が分解し、IND が放出される」という2つの仮説を立てた。バッファーと透析膜を用いた実験では、CL-IND/m は pH 変化によって分解されず、IND が放出されることはなかった。この結果は、炎症組織内に到達した CL-IND/m がエンドサイトーシスによって細胞内に取り込ま

れ、血液中の pH7.3 から pH5.3 へと急激な pH 変化に曝されることにより CL-IND/m が分解し IND が放出される、という仮説を否定する結果であったが、同時に pH 変化のような環境の変化によらず CL-IND/m がミセル構造を維持することが可能であることを示唆し、CL-IND/m の安定性の高さを示す結果であった。

一方、IND、CL-IND/m を RAW264.7 細胞 と共培養した実験では、IND 投与群、CL-IND/m 投与群の RAW264.7 細胞内から同程度の IND が検出された。この結果は RAW264.7 細胞内で IND/m が分解され、RAW264.7 細胞内に IND を放出したことを示唆する結果であり、我々の仮説を指示する結果であった。マクロファージの内部で CL-IND/m が分解され、IND をマクロファージ内に放出したことは、開発した CL-IND/m がマクロファージを介して薬効を示すことを意味している。前述したように、感染性早産における PG の産生には炎症性サイトカインの分泌によるアラキドン酸カスケードの活性化が関与している⁸⁵。この炎症性サイトカインは炎症細胞である好中球やマクロファージが分泌しており、感染性早産の病態においてマクロファージは中心的な役割を担っていると言える。したがって、マクロファージを介した薬効の発現は、感染性早産に対する治療において大変合理的な機序であると考えられる。感染性早産は子宮内の細菌感染によってもたらされる絨毛膜羊膜炎の存在を特徴とし、妊娠 20-24

週において早産の原因の 66 %を占めるが、その割合は妊娠 28 週以降次第に低下し、妊娠 34 週には 16 %に低下する¹⁰⁹。一方、近年子宮内の細菌感染が明らかでない、無菌性の炎症が子宮内へと波及し早産を発症する非感染性早産の存在が報告され¹¹⁰⁻¹¹²、Romero らの報告によれば、妊娠 30 週未満の早産における非感染性早産の割合は 60 %に及び、妊娠 34 週においても 47 %を占めるという¹¹¹。非感染性早産における無菌性の炎症は、子宮組織の障害や出血、低酸素、虚血性変化などにより障害組織より放出される、High mobility group box 1 (HMGB1)¹¹³、IL-1 α ¹¹⁴、Cell-free fetal DNA (cffDNA)¹¹⁵⁻¹¹⁷、S100 蛋白¹¹⁸などの内因性分子によって引き起こされる。これらの内因性分子はダメージ関連分子パターン (Damage-associated molecular patterns : DAMPs) もしくは Alarmins と呼ばれ、Toll 様受容体、NOD 様受容体、C 型レクチン受容体、終端糖化産物受容体などのパターン認識受容体を介して、樹状細胞やマクロファージを活性化し¹¹⁹⁻¹²¹、サイトカインストームを引き起こすことで炎症を誘導する¹²²。Kato らは非感染性早産における子宮収縮の開始に、マクロファージが関与していることを報告しており¹²³ これらの知見によれば、マクロファージを標的としている CL-IND/m は感染性早産のみならず、非感染性早産においても有効性を示す可能性があると考えられる。早産の原因における感染性早産と非感染性早産を合計した割合は、妊娠 30 週未満において 85 %、34 週未満において 70%と非常

に大きな割合を占めることから¹¹¹、CL-IND/m は早産の原因によらず使用することが可能な治療薬になり得るかもしれない。

本研究においては、マクロファージ内に存在するエステラーゼによって、IND をポリマーに結合させているエステル結合が分解し、CL-IND/m が分解され、IND がマクロファージ内に放出する、という仮説を立て、RAW264.7 細胞実験による検証においてマクロファージの内部で CL-IND/m が分解され、IND をマクロファージ内に放出したことを示したが、現時点ではまだ仮説の域を出ない。生体内組織におけるマクロファージの分布や組織中のマクロファージと CL-IND/m の共染色、フローサイトメトリーなどを行い、更なる検証を行う必要がある。CL-IND/m の分解にマクロファージが関与している可能性が高いことは示せたものの、エステラーゼの関与については本研究においては未検討であることから、CL-IND/m の分解機構についても更なる検討を行う必要がある。

また本研究の結果から、CL-IND/m はマウスにおいて子宮・胎盤に蓄積し、胎仔への移行は極めて少なかった。早産抑制効果は IND と同等で、子宮内胎仔死亡や胎仔動脈管の狭窄をもたらすことはなかった。出生仔においても生命予後や出生後の体重増加に影響を与えなかった。LPS 誘導性早産マウスモデルへの蛍光標識 CL-IND/m の尾静脈投与実験と、正常妊娠マウスへの CL-IND/m の

尾静脈投与実験の結果は、CL-IND/m の胎盤通過性が、正常妊娠マウスと LPS 誘導性の早産マウスモデルのいずれにおいても極めて低いことを示唆する結果であった。

正常妊娠マウスへの CL-IND/m の投与実験において、肝臓への CL-IND/m の蓄積率は IND に比べて高く、これは細網内皮系組織によって CL-IND/m が補足されたことを反映した結果である可能性がある、と考えられる。数百ナノメートル程度のリポソームや高分子ミセルなどのナノ医薬品は、肝臓や脾臓などの細網内皮系により異物として認識され捕捉され、生体内から排除される。生体膜親和性の高い構造のリポソームであっても、投与 30 分以内に 85 % ものリポソームが細網内皮系に捕捉されることが知られ、この捕捉は粒子径が大きければより強く働くことが報告されている^{124, 125}。ナノテクノロジー-DDS の分野においてこの細網内皮系による捕捉を回避することは、薬剤が効果を示すために重要である。Klibanov らは PEG 修飾により細網内皮系によるリポソームの捕捉が減少することを報告した¹²⁶。これらの知見によれば、正常妊娠マウスへの CL-IND/m による肝臓への蓄積が投与後 1 時間において 1.07 ± 0.31 %、投与後 24 時間において 12.3 ± 3.20 %、脾臓への蓄積が投与後 1 時間において 1.70 ± 0.40 %、投与後 24 時間において 3.90 ± 1.51 %であったという本研究の結果は、CL-IND/m が細網内皮系による生体内異物排除機構を十分回避したと言え

る結果であり、この要因は CL-IND/m がリポソームよりも小さい 40 nm 程度に設計されたことや、CL-IND/m の主成分が PEG で構成されていることにあるのではないかと考えられる。

一方、腎臓からの排泄も、ナノ医薬品が生体内から排除される機構として重要である。Choi らは、10 nm 未満のナノ粒子は腎臓からの排泄率が高いことを報告した¹²⁷。本研究において腎臓への CL-IND/m の分布は IND の分布と同程度であった。Miyata らは、腎臓からの排泄と細網内皮系への捕捉を回避し、EPR 効果によって標的臓器に薬剤の送達が行われるのに最適な高分子ミセルのサイズは、数十ナノメートル-100 nm であると報告している¹²⁸。本研究において、胎盤通過性を制御した PEG 化高分子ナノミセルのサイズが 30nm 以上であったことを考慮すると、胎盤通過性の制御を目的とした高分子ナノミセルが細網内皮系による異物排除機構、腎臓からの排泄機構を回避し、EPR 効果によって標的臓器への薬物送達を達成するのに最適な PEG 化ナノミセルのサイズは 30-100 nm であると言える。

また、正常妊娠マウスの胎盤への CL-IND/m の蓄積率は IND に比べて高かった。また、LPS 誘導性早産マウスモデルへの蛍光標識 CL-IND/m の投与実験においても CL-IND/m は胎盤への集積を認めた。これは胎盤に存在するマクロファージが CL-IND/m を貪食したことを反映した結果である可能性がある、と考

えられる。前述したように、胎盤には胎盤マクロファージが豊富に存在しており、この胎盤マクロファージは他の組織に分布する他のマクロファージと同様に貪食作用を有することが知られている⁷⁸。胎盤への CL-IND/m の蓄積は絨毛膜羊膜炎のような胎盤における炎症の治療を考える上で非常に合理的であると言える。本研究においても、LPS 誘導性早産マウスモデルにおいて、CL-IND/m は IND と同様に早産抑制効果を示した。

本研究においては、CL-IND/m の胎盤通過性が低く胎児への移行が極めて少ないことを検証することを主要な目的としており、時間的、費用的な制約から薬剤分布の評価は 24 時間までとしたが、今後 CL-IND/m の臨床応用を目指す上では、多臓器への蓄積率がプラトーに達するまでの時間と、その蓄積率の評価が必要となる。今後の検討課題としていきたいと考えている。

胎仔や出生胎仔への毒性に関しては、本研究において CL-IND/m は胎仔の子宮内死亡、動脈管狭窄、出生胎仔の生命予後と体重増加に影響を与えなかった。ヒト、マウス、ラット、羊など様々な動物において、妊娠中の IND 投与による胎児、胎仔の動脈管狭窄が報告されている¹²⁹⁻¹³³。しかし、この変化は一過性のものであり^{41, 129, 134, 135}、ヒトの研究においては IND を妊娠中に投与した場合の胎児動脈管狭窄発症率は 25-50%とされ^{40, 129, 134, 136}、中には 6.5%という報告が存在する程ばらつきが大きい¹³⁷。また、32 週未満における投与であれ

ば IND による胎児動脈管狭窄の発生率は上昇しないとする報告も複数存在し¹³⁸⁻¹⁴⁰、IND の投与時期による影響や、可逆的変化を評価するタイミングなどによって結果が大きく左右する可能性が高いと考える。動物においても、ラットを用いた研究で、妊娠満期（妊娠 21 日目）と満期前（妊娠 19 日目）における投与では、IND による胎仔動脈管狭窄作用には大きな違いがあり、これは妊娠時期による IND への感受性の違いが起因しているという報告がある¹³⁰。妊娠 20 日目の投与ではわずかな変化しか確認できず、妊娠 18 日目以前の投与では動脈管狭窄は起こらないという報告も存在する¹⁴¹。本研究においては他の早産実験や薬剤分布実験のプロトコルに合わせて、妊娠 15 日目に IND、IND/m の投与を行い、投与後 24 時間後に胎仔の動脈管を評価する、というプロトコルで検証を行った。マウス胎仔の動脈管は 200 μm 程度とサイズが小さく、切片の作成や切り出しにおいても極めて難易度が高かった。今回、統計学的な有意差を認めるほどの十分な検証が行えなかった原因として、妊娠 15 日目の投与が動脈管狭窄を引き起こすのには早すぎる投与であった可能性、投与後 24 時間では、可逆性に生じた動脈管狭窄が改善してしまっていた可能性があると考えられる。IND の血中最大濃度は投与後 4 時間程度であり、投与後 4 時間程度で検証を行えば、この可逆性変化をとらえられた可能性があるかもしれないと考察する。また、動脈管狭窄が起こる頻度を考慮すると、より多い n 数で検証を

行うことが求められる。胎仔の大きさがより大きな哺乳動物を用いて、妊娠満期により近い時期に、可逆性変化をとらえられる可能性の高い投与後時間に動脈管の摘出を行えば、異なる結果が得られるかもしれないが、妊娠満期に近い時期の実験では投与プロトコル中に分娩に至ってしまう動物が存在し、この条件で研究を行うには時間的、人件的、費用的に大きな負担があり、今回は実現に至らなかった。

一方で、ヒトにおける動脈管開存症（Patent Ductus Arteriosus : PDA）の治療に関する研究において、動脈管閉鎖の成功には児の IND 血漿中の濃度が関係していることが報告されている^{142,143}。また、IND への暴露が増えれば、動脈管収縮反応が増えることも報告されている^{72,144}。Yeh らの報告によれば、児の IND 血漿中濃度が一定以上であれば、50%の例に動脈管閉鎖が得られる¹⁴⁵。これらの知見は、妊娠中の IND 投与による、胎児動脈管狭窄が 50%程度に生じる、という前述した文献的報告に矛盾せず、IND 投与による動脈管狭窄には IND の胎児血漿中濃度が関与している可能性が高いと考えられる。本研究において、IND に比べて CL-IND/m の胎盤通過性は低く、CL-IND/m を投与した胎仔から IND の検出が非常に少なかったことを考慮すると、理論上は CL-IND/m の投与による胎仔の動脈管狭窄は生じない可能性が高いと考察する。

マウス胎盤においては胎仔毛細血管内皮細胞と母体血の間に3層の栄養膜層が存在する。一方ヒト胎盤においては妊娠初期には絨毛に細胞性栄養膜細胞と合胞体栄養膜細胞の2層の栄養膜層が存在するが、中期には細胞性栄養膜細胞は退縮し、胎児の毛細血管と母体血を隔てる栄養膜は合胞体栄養膜細胞層1層に近い形になることが報告されている¹⁴⁶。また、ヒト胎盤における合胞体栄養膜細胞層には、栄養膜チャンネルと呼ばれる20 nm程度の間隙が存在する¹⁴⁷。このように、マウスの胎盤とヒトの胎盤には構造上の違いが存在するため、マウスにおける物質の胎盤通過性がヒトと同様であるとは言い切れず、CL-IND/mのヒトへの適応を目指す上で、ヒトにおける検証は必須であると言える。しかし、ヒト妊婦への薬剤投与を伴う検証は、安全性と倫理的観点から非現実的である。本研究ではヒト胎盤灌流モデルを用いて、ヒト胎盤における物質の胎盤通過性の検証を行った。

ヒト胎盤灌流モデルにおけるナノ粒子の胎盤通過性についての先行研究において、Wickらは、ポリスチレン粒子により表面をコーティングされたナノ粒子では240 nmまでの粒子は胎盤を通過する一方、240 nm以上のナノ粒子は大きさ依存性に胎盤通過性が制御されることを報告した¹⁴⁸。Wickらは、PEGでコーティングされた30 nmの金ナノ粒子が胎盤を通過しなかったというMyllynenらの報告⁷³について言及し、ナノ粒子の成分と表面をコーティングする物質に

よって胎盤通過性が異なることを報告している。今回我々が開発した IND/m は、ポリマーの主成分が PEG であることから、PEG でコーティングされた 10 nm-30 nm の金ナノ粒子を用いて胎盤灌流モデルで検証した。我々の結果は、PEG 化金ナノ粒子はサイズ依存性に胎盤通過性が低下し、30 nm の金ナノ粒子はほとんど胎盤を通過しない、という Myllynen らの報告と一致するものであった。この結果をもとに 44 nm の CL-IND/m を開発した。開発した CL-IND/m のヒト胎盤灌流モデルにおける胎盤通過率は 0.034 % であり、IND の胎盤通過率 17.6% に比べて低く、ほとんど胎盤を通過しないことが示唆された。本研究において、20 nm までのナノ粒子が胎盤を通過し、30nm 以上のナノ粒子が胎盤を通過しなかった。前述したようにヒト胎盤合胞体栄養膜細胞層には 20 nm 程度の間隙の存在することを考慮すると、ヒト胎盤における薬剤の通過性にはこの間隙が寄与している可能性があると考えられる。

ヒト胎盤灌流モデルは実際のヒト胎盤を用いて、妊婦に薬剤を投与することなく薬剤のヒト胎盤通過性を検証することが可能なモデルであるが、このモデルを用いた検証には限界が存在する。まず、満期産の正常胎盤を用いている性質上、妊娠末期における薬剤の胎盤通過性についての検証は可能であるが、妊娠初期から中期の胎盤における胎盤通過性については評価出来ていない。薬剤の胎盤通過性は妊娠週数の進行とともに増大する胎盤の表面積に依存するとき

れているため⁴²、妊娠末期において最大になることが想定される。従って満期産の胎盤を用いて検証することは合理的であるが、妊娠期間全体の薬剤通過性の評価として十分であるとは言えない。また、胎盤灌流モデルは血液を模倣した Krebs-Ringer-bicarbonate Buffer⁶⁹ を酸素で飽和し、灌流圧をモニタリングすることで、生体内の環境に近似してはいるものの、妊娠継続中の生体内の胎盤と娩出後の胎盤では細胞、組織や生理学的な条件が一致しているとは言えず、生体内と同様の薬物動態を呈している確証はない。また胎盤灌流モデルは、薬剤の胎盤通過における主要な機序である単純拡散について検証可能なモデルであるが、薬剤の胎盤通過に関わる機序としては単純拡散の他に、トランスポーターを介しての輸送、ピノサイトーシスなどの様々な機序が知られ、これらを完全には網羅してはいない。更に、絨毛膜羊膜炎やその他の産科合併症である妊娠高血圧症候群や妊娠糖尿病などの患者においては、胎盤絨毛組織が障害されていたり、胎盤通過性に関わる血中蛋白やイオン化の状態が正常状態とは異なることが想定される。胎盤灌流モデルにおける今回の検証は、このような疾患状態における胎盤の薬剤通過性を評価できているとは言えない。

前述したように、種による胎盤構造の違いが存在する以上、実臨床での使用を目指した妊婦に対する薬剤の開発において、ヒトでの検証は重要なプロセスである。しかしながら、安全性や倫理的観点から実際の妊婦に薬剤を投与する

ことは許容されず、それ故妊婦に対する薬剤の開発には大きな障壁が存在する。臨床試験における患者登録のハードルも高く、開発費用と開発に要する時間を考えるとコストパフォーマンスに優れているとは言えず、実際に現在妊婦を対象とした薬剤開発は行われていない。

従来、諸外国において切迫早産に対する子宮収縮抑制は、児の成熟を促すステロイドの効果が得られる 48 時間に限定した **Short term tocolysis** が行われてきたが、これは子宮収縮抑制剤の効果が 48 時間に限られるという研究報告に基づいた治療である^{31,82}。一方本邦においては、子宮収縮抑制が達成された後も再発を予防する目的で子宮収縮抑制薬を投与する **Long term tocolysis** が行われてきたが、早産の抑制や新生児予後を改善するエビデンスに乏しく、近年は切迫早産に対する治療が見直され、本邦においても **Short term tocolysis** が切迫早産の治療の主流となりつつある。しかしながら、長年 **Long term tocolysis** を行ってきた日本の周産期死亡率が世界トップクラスに低いことや、現行の治療において早産率が上昇傾向にあること、前述した早産として出生した児における将来的な合併症の予後を考慮すると、胎児毒性が少なく、子宮収縮抑制効果が現存している子宮収縮抑制剤に優る新規早産治療薬の出現は、今後の世界的な早産治療を大きく変化させる可能性を秘めていると考える。本研究における **CL-IND/m** の開発は、胎盤通過性の低い薬剤として、**IND** の持つ強力な子宮抑

制効果を胎児毒性への懸念を少なく使用することを目指した、画期的な研究である。既に分娩が開始した急性期の切迫早産の患者への使用のみならず、急性期を脱した切迫早産患者への維持療法としての投与を含め、実臨床での使用を目指して今後の研究を進めていきたい。本研究において開発した CL-IND/m の評価として、マウスを用いた動物実験とヒト胎盤灌流モデルを用いた検証、細胞実験を行ったが、臨床応用を目指すにあたり、ミセルを使用した際の胎盤での CL-IND/m やミセルの構成成分の蓄積についての組織学的検証、薬物動態についての検証、CL-IND/m が分解し IND が放出される機序についての検証など、研究段階においても更なる検討が必要である。実臨床でのヒトへの使用に際して、薬剤搭載高分子ナノミセルを妊婦に投与した報告は皆無であることを考慮すると、まずは生命予後が不良な疾患である悪性腫瘍などに対する治療薬を用いた薬剤搭載高分子ナノミセルを開発し、その有効性と安全性を示した上で、早産治療薬の適応を目指すといった段階を踏む必要があるのではないかと考える。マウス実験の結果やヒト胎盤灌流モデルを用いた実験結果をそのまま実際のヒト妊婦への使用に当てはめることはできず、現段階では代替する方法がないことが、妊婦に対する薬剤開発の大きな障壁となっている。薬剤搭載高分子ナノミセルは、ポリアミノ酸が持つヒドロキシル基を薬剤が持つヒドロキシル基と置換することで生成しており、理論上はヒドロキシル基をもつ薬剤

は高分子ナノミセルへの搭載が可能である。高分子ナノミセルへの搭載によって、薬効に変化が起こらないかどうかの検証、ミセル化した薬剤の薬物動態、毒性に関しては個別に検証することが必要であるが、薬剤搭載高分子ナノミセルは妊娠中の薬物治療を大きく進歩させる可能性を秘めており、本研究における薬剤の高分子ナノミセルへの搭載技術を他の薬剤への応用することも検討している。

総括

本研究では、早産の治療薬としての有効性が知られていながら、胎盤を通過し胎児毒性を有するために使用が制限されている IND を、高分子ナノミセルに搭載することにより、胎盤通過性を制御した IND/m の開発を行った。我々は、本研究において、以下のことを明らかにした (図 19)。

- ・ 薬剤搭載高分子ナノミセルに類似した構造を持つ GNP_s は大きさに依存してヒト胎盤灌流モデルにおける通過性が低下し、30 nm の GNP_s はほとんど胎盤を通過しなかった。
- ・ 生成した CL-IND/m の大きさは 44 nm で、IND/m は架橋構造により、より高い安定性を示した。
- ・ CL-IND/m は pH の変化によっては分解されなかったが、マクロファージ内で分解し、IND を放出した。

- ・ CL-IND/m は IND に比べてヒト胎盤灌流モデルでの胎盤通過性が低かった。
- ・ CL-IND/m はマウス胎盤をほとんど通過しなかった。
- ・ IND/m は LPS 誘導性早産マウスモデルにおいて早産を抑制した。
- ・ マウスへの CL-IND/m 投与は出生仔の出生後生命予後、出生後体重増加に影響しなかった。
- ・ CL-IND/m は、マウス胎仔の動脈管を狭窄させなかった。

以上の結果は、IND を薬剤搭載高分子ナノミセルに搭載した CL-IND/m が、マウス胎盤、ヒト胎盤における胎盤通過性を制御し、マウスにおいては胎仔、出生仔に毒性を与えることなく早産抑制効果を示す結果であった。 CL-IND/m は、胎盤通過性が極めて低く、胎児毒性の懸念なく使用可能な新規早産治療薬となる可能性がある。

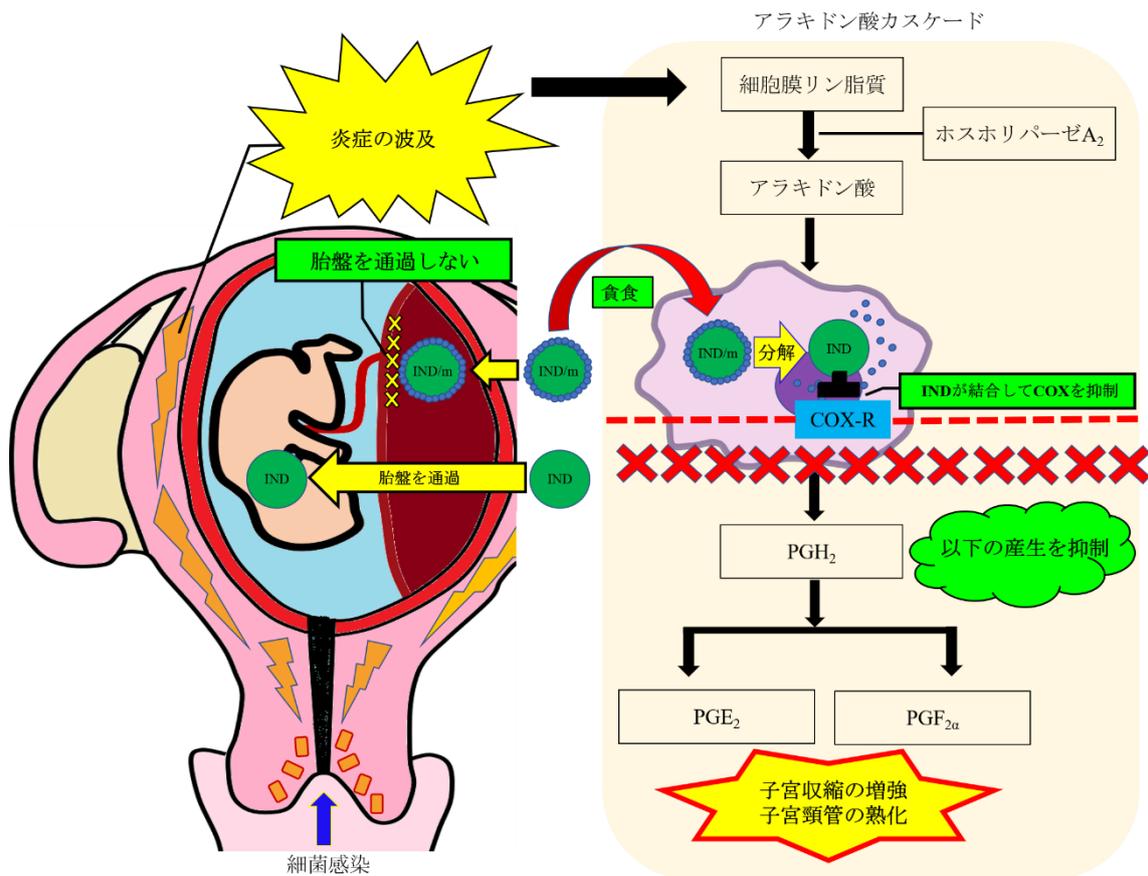


図 19 : IND/m による炎症性早産の抑制メカニズム

膣からの細菌感染により上行性に炎症が波及すると、アラキドン酸カスケードが活性化され、PGの産生が亢進する。INDは胎盤を通過するが、IND/mは胎盤を通過することなく、マクロファージに貪食され、マクロファージ内でミセルが分解してINDを放出する。マクロファージ内でINDはCOXレセプターに結合し、COXを阻害することにより、PGの産生を抑制し、子宮収縮の増強や子宮頸管の熟化を抑制する。

参考文献

1. WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. *Acta Obstet Gynecol Scand* 56, 247-253 (1977).
2. UNICEF, W., World Bank Group and United Nations Levels and Trends in Child Mortality Report 2017. UNICEF (2017).
3. Liu, L. et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet* 388, 3027-3035 (2016).
4. Luu, T.M., Rehman Mian, M.O. & Nuyt, A.M. Long-Term Impact of Preterm Birth: Neurodevelopmental and Physical Health Outcomes. *Clin Perinatol* 44, 305-314 (2017).
5. Raju, T.N.K. et al. Long-Term Healthcare Outcomes of Preterm Birth: An Executive Summary of a Conference Sponsored by the National Institutes of Health. *J Pediatr* 181, 309-318.e301 (2017).
6. Bolton, C.E., Bush, A., Hurst, J.R., Kotecha, S. & McGarvey, L. Lung consequences in adults born prematurely. *Thorax* 70, 574-580 (2015).

7. de Jong, F., Monuteaux, M.C., van Elburg, R.M., Gillman, M.W. & Belfort, M.B. Systematic review and meta-analysis of preterm birth and later systolic blood pressure. *Hypertension* 59, 226-234 (2012).
8. de Jong, M., Verhoeven, M. & van Baar, A.L. School outcome, cognitive functioning, and behaviour problems in moderate and late preterm children and adults: a review. *Semin Fetal Neonatal Med* 17, 163-169 (2012).
9. Kajantie, E. et al. Insulin sensitivity and secretory response in adults born preterm: the Helsinki Study of Very Low Birth Weight Adults. *J Clin Endocrinol Metab* 100, 244-250 (2015).
10. Lawlor, D.A., Ronalds, G., Clark, H., Smith, G.D. & Leon, D.A. Birth weight is inversely associated with incident coronary heart disease and stroke among individuals born in the 1950s: findings from the Aberdeen Children of the 1950s prospective cohort study. *Circulation* 112, 1414-1418 (2005).
11. Romero, R., Dey, S.K. & Fisher, S.J. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science (New York, N.Y.)* 345, 760-765 (2014).
12. Goldenberg, R.L., Hauth, J.C. & Andrews, W.W. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 342, 1500-1507 (2000).

13. Torbé, A. & Czajka, R. Proinflammatory cytokines and other indications of inflammation in cervico-vaginal secretions and preterm delivery. *Int J Gynaecol Obstet* 87, 125-130 (2004).
14. Døllner, H., Vatten, L., Halgunset, J., Rahimipoor, S. & Austgulen, R. Histologic chorioamnionitis and umbilical serum levels of pro-inflammatory cytokines and cytokine inhibitors. *Bjog* 109, 534-539 (2002).
15. Romero, R. et al. The role of infection in preterm labour and delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol* 15 Suppl 2, 41-56 (2001).
16. Harris, A.N., Perlman, M., Schiller, S.L., Romero, R. & Mitchell, M.D. Characterization of prostaglandin production in amnion-derived WISH cells. *Am J Obstet Gynecol* 159, 1385-1389 (1988).
17. Romero, R., Hobbins, J.C. & Mitchell, M.D. Endotoxin stimulates prostaglandin E2 production by human amnion. *Obstet Gynecol* 71, 227-228 (1988).
18. Gibbs, R.S. Chorioamnionitis and bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 169, 460-462 (1993).
19. Steinborn, A. et al. Cytokine release from placental endothelial cells, a process associated with preterm labour in the absence of intrauterine infection. *Cytokine* 11, 66-73 (1999).

20. Smith, W.L., Urade, Y. & Jakobsson, P.J. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chem Rev* 111, 5821-5865 (2011).
21. Herschman, H.R. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1299, 125-140 (1996).
22. Flores-Díaz, M., Monturiol-Gross, L., Naylor, C., Alape-Girón, A. & Flieger, A. Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 80, 597-628 (2016).
23. Delmis, J. Placental lipid contents in preterm labor complicated by chorioamnionitis. *J Perinat Med* 17, 417-422 (1989).
24. Romero, R. et al. Infection in the pathogenesis of preterm labor. *Semin Perinatol* 12, 262-279 (1988).
25. Kujubu, D.A., Fletcher, B.S., Varnum, B.C., Lim, R.W. & Herschman, H.R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266, 12866-12872 (1991).
26. Morita, I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 165-175 (2002).

27. Blencowe, H. et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet* 379, 2162-2172 (2012).
28. Yorifuji, T. et al. Trends of preterm birth and low birth weight in Japan: a one hospital-based study. *BMC Pregnancy Childbirth* 12, 162 (2012).
29. Simhan, H.N. & Caritis, S.N. Prevention of preterm delivery. *N Engl J Med* 357, 477-487 (2007).
30. Haas, D.M., Caldwell, D.M., Kirkpatrick, P., McIntosh, J.J. & Welton, N.J. Tocolytic therapy for preterm delivery: systematic review and network meta-analysis. *Bmj* 345, e6226 (2012).
31. Haas, D.M. et al. Tocolytic therapy: a meta-analysis and decision analysis. *Obstet Gynecol* 113, 585-594 (2009).
32. Niebyl, J.R. et al. The inhibition of premature labor with indomethacin. *American journal of obstetrics and gynecology* 136, 1014-1019 (1980).
33. Zuckerman, H., Shalev, E., Gilad, G. & Katzuni, E. Further study of the inhibition of premature labor by indomethacin. Part II double-blind study. *J Perinat Med* 12, 25-29 (1984).

34. Besinger, R.E., Niebyl, J.R., Keyes, W.G. & Johnson, T.R. Randomized comparative trial of indomethacin and ritodrine for the long-term treatment of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 164, 981-986; discussion 986-988 (1991).
35. Kurki, T., Eronen, M., Lumme, R. & Ylikorkala, O. A randomized double-dummy comparison between indomethacin and nylidrin in threatened preterm labor. *Obstet Gynecol* 78, 1093-1097 (1991).
36. Morales, W.J., Smith, S.G., Angel, J.L., O'Brien, W.F. & Knuppel, R.A. Efficacy and safety of indomethacin versus ritodrine in the management of preterm labor: a randomized study. *Obstet Gynecol* 74, 567-572 (1989).
37. Morales, W.J. & Madhav, H. Efficacy and safety of indomethacin compared with magnesium sulfate in the management of preterm labor: a randomized study. *Am J Obstet Gynecol* 169, 97-102 (1993).
38. Moise, K.J., Jr. et al. Placental transfer of indomethacin in the human pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology* 162, 549-554 (1990).
39. Huhta, J.C. et al. Detection and quantitation of constriction of the fetal ductus arteriosus by Doppler echocardiography. *Circulation* 75, 406-412 (1987).

40. Moise, K.J., Jr. Effect of advancing gestational age on the frequency of fetal ductal constriction in association with maternal indomethacin use. *American journal of obstetrics and gynecology* 168, 1350-1353 (1993).
41. Rasanen, J. & Jouppila, P. Fetal cardiac function and ductus arteriosus during indomethacin and sulindac therapy for threatened preterm labor: a randomized study. *American journal of obstetrics and gynecology* 173, 20-25 (1995).
42. Griffiths, S.K. & Campbell, J.P. Placental structure, function and drug transfer. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 15, 84-89 (2015).
43. Pacifici, G.M. & Nottoli, R. Placental transfer of drugs administered to the mother. *Clin Pharmacokinet* 28, 235-269 (1995).
44. Refuerzo, J.S. et al. Liposomes: a nanoscale drug carrying system to prevent indomethacin passage to the fetus in a pregnant mouse model. *American journal of obstetrics and gynecology* 212, 508 e501-507 (2015).
45. Paul, J.W. et al. Drug delivery to the human and mouse uterus using immunoliposomes targeted to the oxytocin receptor. *Am J Obstet Gynecol* 216, 283 e281-283 e214 (2017).
46. Refuerzo, J.S. et al. Uterus-targeted liposomes for preterm labor management: studies in pregnant mice. *Sci Rep* 6, 34710 (2016).

47. Bré, L.P., Zheng, Y., Pêgo, A.P. & Wang, W. Taking tissue adhesives to the future: from traditional synthetic to new biomimetic approaches. *Biomaterials Science* 1, 239-253 (2013).
48. Suk, J.S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J. & Ensign, L.M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced drug delivery reviews* 99, 28-51 (2016).
49. Veronese, F.M. & Pasut, G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug discovery today* 10, 1451-1458 (2005).
50. Alconcel, S.N.S., Baas, A.S. & Maynard, H.D. FDA-approved poly(ethylene glycol)-protein conjugate drugs. *Polymer Chemistry* 2, 1442-1448 (2011).
51. Yamashita, K. et al. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nature nanotechnology* 6, 321-328 (2011).
52. Huang, J.P. et al. Nanoparticles can cross mouse placenta and induce trophoblast apoptosis. *Placenta* 36, 1433-1441 (2015).
53. Grafmueller, S. et al. Bidirectional Transfer Study of Polystyrene Nanoparticles across the Placental Barrier in an ex Vivo Human Placental Perfusion Model. *Environmental health perspectives* 123, 1280-1286 (2015).

54. Chu, M. et al. Transfer of quantum dots from pregnant mice to pups across the placental barrier. *Small* (Weinheim an der Bergstrasse, Germany) 6, 670-678 (2010).
55. Elovitz, M.A. & Mrinalini, C. Animal models of preterm birth. *Trends Endocrinol Metab* 15, 479-487 (2004).
56. Buhimschi, I.A., Buhimschi, C.S. & Weiner, C.P. Protective effect of N-acetylcysteine against fetal death and preterm labor induced by maternal inflammation. *Am J Obstet Gynecol* 188, 203-208 (2003).
57. Kaga, N., Katsuki, Y., Obata, M. & Shibutani, Y. Repeated administration of low-dose lipopolysaccharide induces preterm delivery in mice: a model for human preterm parturition and for assessment of the therapeutic ability of drugs against preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 174, 754-759 (1996).
58. Lee, P.R. et al. Therapeutic effect of cyclo-oxygenase inhibitors with different isoform selectivity in lipopolysaccharide-induced preterm birth in mice. *Am J Obstet Gynecol* 189, 261-266 (2003).
59. Gross, G. et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents inflammation-mediated preterm labor in the mouse. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 278, R1415-1423 (2000).

60. Harper, M.J. & Skarnes, R.C. The role of prostaglandin in endotoxin-induced abortion and fetal death. *Adv Biosci* 9, 789-793 (1973).
61. Elovitz, M.A., Wang, Z., Chien, E.K., Rychlik, D.F. & Phillippe, M. A new model for inflammation-induced preterm birth: the role of platelet-activating factor and Toll-like receptor-4. *Am J Pathol* 163, 2103-2111 (2003).
62. Yoshikawa, M. et al. ASK1 promotes uterine inflammation leading to pathological preterm birth. *Sci Rep* 10, 1887 (2020).
63. Reznikov, L.L. et al. Utilization of endoscopic inoculation in a mouse model of intrauterine infection-induced preterm birth: role of interleukin 1beta. *Biology of reproduction* 60, 1231-1238 (1999).
64. Furuya, H. et al. Resveratrol Protects Against Pathological Preterm Birth by Suppression of Macrophage-Mediated Inflammation. *Reprod Sci* 22, 1561-1568 (2015).
65. Yamashita, A. et al. Increased tissue levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids prevents pathological preterm birth. *Sci Rep* 3, 3113 (2013).
66. Gonzalez, J.M., Franzke, C.W., Yang, F., Romero, R. & Girardi, G. Complement activation triggers metalloproteinases release inducing cervical remodeling and preterm birth in mice. *Am J Pathol* 179, 838-849 (2011).

67. Panigel, M. Placental perfusion experiments. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 84, 1664-1683 (1962).
68. Au - Grafmüller, S., Au - Manser, P., Au - Krug, H.F., Au - Wick, P. & Au - von Mandach, U. Determination of the Transport Rate of Xenobiotics and Nanomaterials Across the Placenta using the ex vivo Human Placental Perfusion Model. *JoVE*, e50401 (2013).
69. Nagai, M. et al. Characterization of transplacental transfer of paroxetine in perfused human placenta: development of a pharmacokinetic model to evaluate tapered dosing. *Drug Metab Dispos* 41, 2124-2132 (2013).
70. Karadas, B. et al. Comparison of effects of cyclooxygenase inhibitors on myometrial contraction and constriction of ductus arteriosus in rats. *European Journal of Pharmacology* 485, 289-298 (2004).
71. Bae, Y. et al. Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy. *Bioconjugate chemistry* 16, 122-130 (2005).

72. Vert, P., Bianchetti, G., Marchal, F., Monin, P. & Morselli, P.L. Effectiveness and pharmacokinetics of indomethacin in premature newborns with patent ductus arteriosus. *European journal of clinical pharmacology* 18, 83-88 (1980).
73. Myllynen, P.K. et al. Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta. *Reprod Toxicol* 26, 130-137 (2008).
74. Talelli, M. et al. Core-crosslinked polymeric micelles: Principles, preparation, biomedical applications and clinical translation. *Nano Today* 10, 93-117 (2015).
75. Pyo, K.-h., Lee, D.H., Kim, Y. & Kim, J.-W. Extremely rapid and simple healing of a transparent conductor based on Ag nanowires and polyurethane with a Diels–Alder network. *Journal of Materials Chemistry C* 4, 972-977 (2016).
76. Rijcken, C.J., Snel, C.J., Schiffelers, R.M., van Nostrum, C.F. & Hennink, W.E. Hydrolysable core-crosslinked thermosensitive polymeric micelles: synthesis, characterisation and in vivo studies. *Biomaterials* 28, 5581-5593 (2007).
77. Hu, Y.B., Dammer, E.B., Ren, R.J. & Wang, G. The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener* 4, 18 (2015).

78. Chang, M.D., Pollard, J.W., Khalili, H., Goyert, S.M. & Diamond, B. Mouse placental macrophages have a decreased ability to present antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 462-466 (1993).
79. Phillippe, M. Cell-free fetal DNA--a trigger for parturition. *N Engl J Med* 370, 2534-2536 (2014).
80. Rojas-Espinosa, O., Arce-Paredes, P., Dannenberg, A.M. & Kamaenetz, R.L. Macrophage esterase: identification, purification and properties of a chymotrypsin-like esterase from lung that hydrolyses and transfers nonpolar amino acid esters. *Biochim Biophys Acta* 403, 161-179 (1975).
81. Needham, L.A. et al. Drug targeting to monocytes and macrophages using esterase-sensitive chemical motifs. *J Pharmacol Exp Ther* 339, 132-142 (2011).
82. Neilson, J.P., West, H.M. & Dowswell, T. Betamimetics for inhibiting preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev*, Cd004352 (2014).
83. Raju, T.N., Higgins, R.D., Stark, A.R. & Leveno, K.J. Optimizing care and outcome for late-preterm (near-term) infants: a summary of the workshop sponsored by the National Institute of Child Health and Human Development. *Pediatrics* 118, 1207-1214 (2006).

84. Petrini, J.R. et al. Increased risk of adverse neurological development for late preterm infants. *J Pediatr* 154, 169-176 (2009).
85. Bennett, P.R., Rose, M.P., Myatt, L. & Elder, M.G. Preterm labor: stimulation of arachidonic acid metabolism in human amnion cells by bacterial products. *Am J Obstet Gynecol* 156, 649-655 (1987).
86. Petros, R.A. & DeSimone, J.M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov* 9, 615-627 (2010).
87. Ragelle, H., Danhier, F., Pr at, V., Langer, R. & Anderson, D.G. Nanoparticle-based drug delivery systems: a commercial and regulatory outlook as the field matures. *Expert Opin Drug Deliv* 14, 851-864 (2017).
88. Barenholz, Y. Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release* 160, 117-134 (2012).
89. Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. & Farokhzad, O.C. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced drug delivery reviews* 66, 2-25 (2014).
90. Pereira, K.V., Giacomeli, R., Gomes de Gomes, M. & Haas, S.E. The challenge of using nanotherapy during pregnancy: Technological aspects and biomedical implications. *Placenta* 100, 75-80 (2020).

91. Fournier, S.B., D'Errico, J.N. & Stapleton, P.A. Engineered nanomaterial applications in perinatal therapeutics. *Pharmacol Res* 130, 36-43 (2018).
92. de Araújo, T.E. et al. Experimental models of maternal-fetal interface and their potential use for nanotechnology applications. *Cell Biol Int* (2019).
93. Menezes, V., Malek, A. & Keelan, J.A. Nanoparticulate drug delivery in pregnancy: placental passage and fetal exposure. *Curr Pharm Biotechnol* 12, 731-742 (2011).
94. Cartwright, L. et al. In vitro placental model optimization for nanoparticle transport studies. *Int J Nanomedicine* 7, 497-510 (2012).
95. Zhang, B., Liang, R., Zheng, M., Cai, L. & Fan, X. Surface-Functionalized Nanoparticles as Efficient Tools in Targeted Therapy of Pregnancy Complications. *Int J Mol Sci* 20 (2019).
96. Hua, S. & Vaughan, B. In vitro comparison of liposomal drug delivery systems targeting the oxytocin receptor: a potential novel treatment for obstetric complications. *Int J Nanomedicine* 14, 2191-2206 (2019).
97. Hua, S. Synthesis and in vitro characterization of oxytocin receptor targeted PEGylated immunoliposomes for drug delivery to the uterus. *J Liposome Res* 29, 357-367 (2019).

98. Wathes, D.C., Borwick, S.C., Timmons, P.M., Leung, S.T. & Thornton, S. Oxytocin receptor expression in human term and preterm gestational tissues prior to and following the onset of labour. *J Endocrinol* 161, 143-151 (1999).
99. Fuchs, A.R., Fuchs, F., Husslein, P. & Soloff, M.S. Oxytocin receptors in the human uterus during pregnancy and parturition. *Am J Obstet Gynecol* 150, 734-741 (1984).
100. Thornton, S. et al. Treatment of spontaneous preterm labour with retosiban: a phase 2 proof-of-concept study. *Br J Clin Pharmacol* 80, 740-749 (2015).
101. Goldenberg, R.L. The management of preterm labor. *Obstet Gynecol* 100, 1020-1037 (2002).
102. Ivanisević, M., Djelmis, J. & Buković, D. Review on prostaglandin and oxytocin activity in preterm labor. *Coll Antropol* 25, 687-694 (2001).
103. Buckingham, J.C., Selden, R. & Danforth, D.N. Connective tissue changes in the cervix during pregnancy and labor. *Ann N Y Acad Sci* 97, 733-742 (1962).
104. Uldbjerg, N., Ekman, G., Malmström, A., Olsson, K. & Ulmsten, U. Ripening of the human uterine cervix related to changes in collagen, glycosaminoglycans, and collagenolytic activity. *Am J Obstet Gynecol* 147, 662-666 (1983).

105. Huszar, G. Biology and biochemistry of myometrial contractility and cervical maturation. *Semin Perinatol* 5, 216-235 (1981).
106. Calder, A.A. Prostaglandins and biological control of cervical function. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 34, 347-351 (1994).
107. Bakker, R., Pierce, S. & Myers, D. The role of prostaglandins E1 and E2, dinoprostone, and misoprostol in cervical ripening and the induction of labor: a mechanistic approach. *Arch Gynecol Obstet* 296, 167-179 (2017).
108. Matsumura, Y. & Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46, 6387-6392 (1986).
109. Lahra, M.M. & Jeffery, H.E. A fetal response to chorioamnionitis is associated with early survival after preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 190, 147-151 (2004).
110. Nadeau-Vallée, M. et al. Sterile inflammation and pregnancy complications: a review. *Reproduction* 152, R277-r292 (2016).
111. Romero, R. et al. Prevalence and clinical significance of sterile intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Reprod Immunol* 72, 458-474 (2014).

112. Yoneda, S. et al. Antibiotic Therapy Increases the Risk of Preterm Birth in Preterm Labor without Intra-Amniotic Microbes, but may Prolong the Gestation Period in Preterm Labor with Microbes, Evaluated by Rapid and High-Sensitive PCR System. *Am J Reprod Immunol* 75, 440-450 (2016).
113. Bredeson, S. et al. HMGB1 promotes a p38MAPK associated non-infectious inflammatory response pathway in human fetal membranes. *PLoS One* 9, e113799 (2014).
114. Puchner, K. et al. Mid-trimester amniotic fluid interleukins (IL-1 β , IL-10 and IL-18) as possible predictors of preterm delivery. *In Vivo* 25, 141-148 (2011).
115. Jakobsen, T.R., Clausen, F.B., Rode, L., Dziegiel, M.H. & Tabor, A. High levels of fetal DNA are associated with increased risk of spontaneous preterm delivery. *Prenat Diagn* 32, 840-845 (2012).
116. Farina, A. et al. High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 193, 421-425 (2005).
117. Leung, T.N., Zhang, J., Lau, T.K., Hjelm, N.M. & Lo, Y.M. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 352, 1904-1905 (1998).

118. Friel, L.A. et al. The calcium binding protein, S100B, is increased in the amniotic fluid of women with intra-amniotic infection/inflammation and preterm labor with intact or ruptured membranes. *J Perinat Med* 35, 385-393 (2007).
119. Yang, D., Han, Z. & Oppenheim, J.J. Alarmins and immunity. *Immunol Rev* 280, 41-56 (2017).
120. Koga, K. & Mor, G. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *Am J Reprod Immunol* 63, 587-600 (2010).
121. Lappas, M. NOD1 and NOD2 regulate proinflammatory and prolabor mediators in human fetal membranes and myometrium via nuclear factor-kappa B. *Biol Reprod* 89, 14 (2013).
122. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045 (1994).
123. Kato, M. et al. Inappropriate activation of invariant natural killer T cells and antigen-presenting cells with the elevation of HMGB1 in preterm births without acute chorioamnionitis. *Am J Reprod Immunol*, e13330 (2020).
124. Allen, T.M. & Everest, J.M. Effect of liposome size and drug release properties on pharmacokinetics of encapsulated drug in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 226, 539-544 (1983).

125. Allen, T.M., Murray, L., MacKeigan, S. & Shah, M. Chronic liposome administration in mice: effects on reticuloendothelial function and tissue distribution. *J Pharmacol Exp Ther* 229, 267-275 (1984).
126. Klibanov, A.L., Maruyama, K., Torchilin, V.P. & Huang, L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 268, 235-237 (1990).
127. Choi, H.S. et al. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol* 25, 1165-1170 (2007).
128. Miyata, K., Christie, R.J. & Kataoka, K. Polymeric micelles for nano-scale drug delivery. *Reactive and Functional Polymers* 71, 227-234 (2011).
129. Vermillion, S.T., Scardo, J.A., Lashus, A.G. & Wiles, H.B. The effect of indomethacin tocolysis on fetal ductus arteriosus constriction with advancing gestational age. *American journal of obstetrics and gynecology* 177, 256-259; discussion 259-261 (1997).
130. Momma, K. & Takao, A. In vivo constriction of the ductus arteriosus by nonsteroidal antiinflammatory drugs in near-term and preterm fetal rats. *Pediatric research* 22, 567-572 (1987).

131. Coceani, F., White, E., Bodach, E. & Olley, P.M. Age-dependent changes in the response of the lamb ductus arteriosus to oxygen and ibuprofen. *Can J Physiol Pharmacol* 57, 825-831 (1979).
132. Clyman, R.I. Developmental responses to oxygen, arachidonic acid, and indomethacin in the fetal lamb ductus arteriosus in vitro. *Prostaglandins Med* 1, 167-174 (1978).
133. Reese, J., Anderson, J.D., Brown, N., Roman, C. & Clyman, R.I. Inhibition of cyclooxygenase isoforms in late- but not midgestation decreases contractility of the ductus arteriosus and prevents postnatal closure in mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 291, R1717-1723 (2006).
134. Moise, K.J., Jr. et al. Indomethacin in the treatment of premature labor. Effects on the fetal ductus arteriosus. *N Engl J Med* 319, 327-331 (1988).
135. Sawdy, R.J., Lye, S., Fisk, N.M. & Bennett, P.R. A double-blind randomized study of fetal side effects during and after the short-term maternal administration of indomethacin, sulindac, and nimesulide for the treatment of preterm labor. *American journal of obstetrics and gynecology* 188, 1046-1051 (2003).

136. Respondek, M., Weil, S.R. & Huhta, J.C. Fetal echocardiography during indomethacin treatment. *Ultrasound Obstet Gynecol* 5, 86-89 (1995).
137. Savage, A.H., Anderson, B.L. & Simhan, H.N. The safety of prolonged indomethacin therapy. *Am J Perinatol* 24, 207-213 (2007).
138. Gardner, M.O., Owen, J., Skelly, S. & Hauth, J.C. Preterm delivery after indomethacin. A risk factor for neonatal complications? *J Reprod Med* 41, 903-906 (1996).
139. Vermillion, S.T. & Newman, R.B. Recent indomethacin tocolysis is not associated with neonatal complications in preterm infants. *Am J Obstet Gynecol* 181, 1083-1086 (1999).
140. Niebly, J.R. & Witter, F.R. Neonatal outcome after indomethacin treatment for preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 155, 747-749 (1986).
141. Sharpe, G.L., Larsson, K.S. & Thalme, B. Studies on closure of the ductus arteriosus. XII. In utero effect of indomethacin and sodium salicylate in rats and rabbits. *Prostaglandins* 9, 585-596 (1975).
142. Brash, A.R. et al. Pharmacokinetics of indomethacin in the neonate. Relation of plasma indomethacin levels to response of the ductus arteriosus. *N Engl J Med* 305, 67-72 (1981).

143. Smyth, J.M. et al. Intravenous indometacin in preterm infants with symptomatic patent ductus arteriosus. A population pharmacokinetic study. *Br J Clin Pharmacol* 58, 249-258 (2004).
144. Thalji, A.A. et al. Pharmacokinetics of intravenously administered indomethacin in premature infants. *J Pediatr* 97, 995-1000 (1980).
145. Yeh, T.F., Achanti, B., Patel, H. & Pildes, R.S. Indomethacin therapy in premature infants with patent ductus arteriosus--determination of therapeutic plasma levels. *Dev Pharmacol Ther* 12, 169-178 (1989).
146. Erlich, J. et al. Tissue factor is required for uterine hemostasis and maintenance of the placental labyrinth during gestation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8138-8143 (1999).
147. Dupressoir, A., Lavalie, C. & Heidmann, T. From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. *Placenta* 33, 663-671 (2012).
148. Wick, P. et al. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ Health Perspect* 118, 432-436 (2010).

謝辞

本研究の遂行に際し、研究のご支援、ご指導を賜りました東京大学医学部産科婦人科 主任教授 藤井知行先生、教授 大須賀穰先生に深謝申し上げます。

また、研究課題の立案から論文執筆に至るまで直接ご指導を賜りました東京大学医学部産科婦人科 講師 入山高行先生に深く感謝の意を表します。

東京大学医学部産科婦人科 准教授 永松健先生、講師 熊澤恵一先生、吉川美登里先生、松井遥香先生、稲岡直子先生にはご指導、ご助言、ご協力を賜りました。

東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 准教授 Cabral Horacio 先生、宮崎 拓也先生はじめ、同研究室の先生方には高分子ミセルの作成から論文の執筆に至るまで、ご指導、多大なるご協力、ご助言をいただきました。深く感謝申し上げます。