

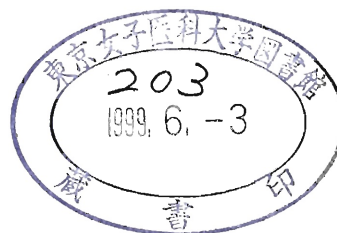
# 高分子ミセルと細胞 の相互作用解析

09651002

平成9年度～10年度科学研究費補助金  
(基盤研究C) 研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 横山昌幸  
(東京女子医科大学医学部講師)



## 序

本報告書は平成9年度～10年度にかけて、文部省科学研究費補助金（基盤研究C）を受けて成された研究成果をまとめたものである。

不均質な構造のブロックコポリマーの1成分の凝集力を利用し、図1に示すような薬物を内包した高分子ミセルを形成させ、それを薬物ターゲティングに用いる研究を本申請者は展開してきた。

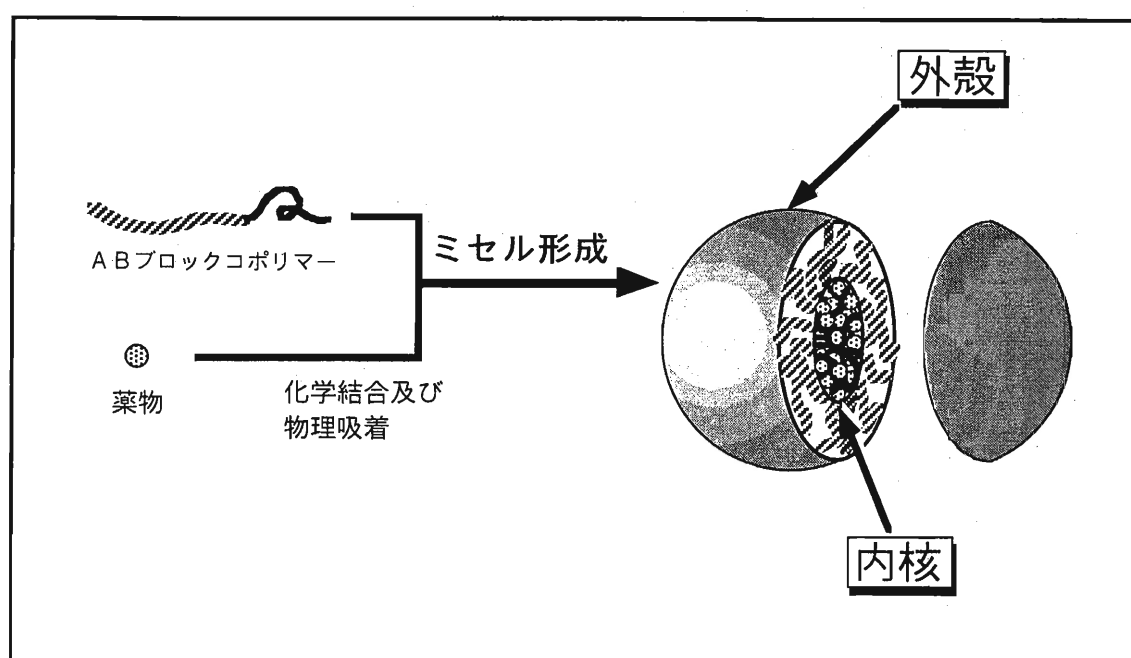


図1 高分子ミセルドラッグキャリアーシステム

高分子ミセルの内核には疎水性薬物を初めとし、様々な薬物を多様な相互作用によって内包可能なシステムである。その中で、抗ガン剤アドリアマイシンをポリチレングリコール-ポリアミノ酸から成る高分子ミセルに内包したシステムでは、マウス固形ガン局所に選択的にデリバリーして、抗ガン活性を飛躍的に高めることに成功している。このシステム

はガン部位での血管内皮細胞の透過性の亢進という固形ガンに共通の性質を有効に活用していることがわかっている。また、抗ガン活性は主に、物理的に内包された抗ガン剤がミセルより放出されて発現されることが知られている。さらに、この物理的内包は非常に安定であるために、血液中を移動している間は漏れることが少なく、ガン部位に長期間滞留している間に放出されて薬効を発現すると考えられている。

本補助金により成された研究は本申請研究は、高分子ミセルと細胞の相互作用を調べることにより、ガン局所での血液中 細胞間質 ガン細胞の物質移動及び薬物放出による活性発現の段階を定量的に解析することを目的とする。具体的には、高分子ミセル内核に内包された薬物を物理的・化学的に詳細にキャラクタリゼーションした上で、培養細胞に対する取り込み挙動を観察・解析した。

## 研究組織

研究代表者 : 横山昌幸 (東京女子医科大学医学部講師)

(他の研究分担者はない)

## 研究経費

平成 9 年度 1、500 千円

平成 10 年度 1、200 千円

計 2、700 千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. G. Kwon, M. Naito, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, and K. Kataoka, "Block Copolymer Micelles for Drug Delivery: Loading and Release of Doxorubicin", *J. Controlled Release*, **48**, 195–201 (1997)
2. Masayuki Yokoyama, Shigeto Fukushima, Ryuji Uehara, Kazuya Okamoto, Kazunori Kataoka, Yasuhisa Sakurai, and Teruo Okano, "Characterization of Physically Entrapment and Chemically Conjugation of Adriamycin in Polymeric Micelles and Their Design for In Vivo Delivery to a Solid Tumor", *J. Controlled Release*, **50**, 79–92 (1997)

3. Masayuki Yokoyama, Ayumi Satoh, Yasuhisa Sakurai , Teruo Okano Yasuhiro Matsumura , Tadao Kakizoe, Kazunori Kataoka, "Incorporation of water-insoluble anticancer drug into polymeric micelles and control of their particle size",  
*J. Controlled Release*, **55** , 219–229 (1998)

4. Yasuhiro Matsumura, Masayuki Yokoyama, Kazunori Kataoka, Teruo Okano, Yasuhisa Sakurai, Takanori Kawaguchi, and tadao Kakizoe, "Reduction of the adverse effects of an antitumor agent, KRN 5500 by incorporation of the drug into polymeric micelles", *Japanese J. Cancer Research*, **90** (1), 122–128 (1999)

(2) 口頭発表

1. M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, K. Shimizu, K. Okamoto, M. Machida, and S. Fukushim, Design of polymeric micelle with PEG outer shell for drug targeting to tumors, 23rd Annual meeting of the Society for Biomaterials, 1997.5.3

2. 横山昌幸、パッシブターゲティングのためのドラッグキャリアシステム、第3回創剤フォーラムシンポジウム、1997年5月23日

3. 松本剛、片岡一則、青柳隆夫、横山昌幸、岡野光夫、桜井靖久、ドキソルビシン内包PEG-PBLAブロック共重合体ミセルの調製とその制ガン活性、第13回日本DDS学会、1997年7月10日
  
4. 廖嘉鴻、青柳隆夫、横山昌幸、鈴木憲、桜井靖久、岡野光夫、原田敦、片岡一則、Visualization and characterization of PEO-PBLA-pyrene polymeric micelles by atomic force microscopy and fluorescence measurements、第26回医用高分子シンポジウム、1997年7月25日
  
5. 松村保広、横山昌幸、岡野光夫、桜井靖久、片岡一則、垣添忠生、Spicamycin内包ミセル系抗ガン剤の抗腫瘍効果、第56回日本癌学会総会、1997年9月25日
  
6. 横山昌幸、岡野光夫、桜井靖久、片岡一則、高分子ミセル構造による種々の薬物のナノ粒子化、第19回日本バイオマテリアル学会、1997年12月7日
  
7. Masayuki Yokoyama, Yasuhisa Sakurai, Teruo Okano, and Kazunori Kataoka, Polymeric micelles as a nano-sized drug carrier system、1998 Conference on Pharmaceutical Science and Technology、1998.4.3

8. M. Yokoyama, A. Sato, Y. Sakurai, T. Okano, K. Kataoka, Y. Matsumura, and T. Kakizoe, Incorporation of water-insoluble drug into polymeric micelle: Control of incorporation efficiency and micelle size, 25th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, 1998.6.22
9. 松村保広、小池浩代、小林恭子、垣添忠生、横山昌幸、佐藤あゆみ、岡野光夫、桜井靖久、片岡一則、疎水性抗ガン剤KRN5500のミセル封入体の意義、第14回日本DDS学会、1998年7月21日
10. 松村保広、垣添忠生、横山昌幸、岡野光夫、桜井靖久、片岡一則、川口隆憲、Spicamycin内包ミセル系抗ガン剤の抗腫瘍効果、第57回日本癌学会総会、1998年9月30日

### (3) 出版物

1. Masayuki Yokoyama, "Novel Passive Targetable Drug Delivery with Polymeric Micelles" in Teruo Okano Ed., "Biorelated Polymers and Gels: Controlled Release and Applications in Biomedical Engineering", Academic Press, San Diego, pp. 193–230 (1998)
2. 横山昌幸、岡野光夫 「高分子ミセル型薬物キャリアー」、緒方直哉、寺野稔、由井伸彦編、機能性超分子の設計と将来展望、シーエムシー、161–166 (1998)

3. 横山昌幸、「高分子ミセドラッグキャリアーによる固形ガンのターゲティング治療」、生体材料、16(5)、276-281(1998)
  
4. 横山昌幸、岡野光夫「ナノキャリアーによるガンの標的治療」、日本臨床、56(12)、3227-3234(1998)



## 研究成果

本研究の背景は高分子ミセル型ドラッグキャリアシステムにある。不均質な構造のブロックコポリマーの1成分の凝集力を利用し、薬物を内包した高分子ミセルを形成させ、それを薬物ターゲティングに用いる研究を本申請者は展開してきた。高分子ミセルの内核には疎水性薬物を初めとし、様々な薬物を多様な相互作用によって内包可能なシステムである。その中で、抗ガン剤アドリアマイシンをポリチレングリコール-ポリアミノ酸から成る高分子ミセルに内包したシステムでは、マウス固形ガン局所に選択的にデリバリーして、抗ガン活性を飛躍的に高めることに成功している。このシステムはガン部位での血管内皮細胞の透過性の亢進という固形ガンに共通の性質を有効に活用していることがわかっている。また、抗ガン活性は主に、物理的に内包された抗ガン剤がミセルより放出されて発現されることが知られている。さらに、この物理的内包は非常に安定であるために、血液中を移動している間は漏れることが少なく、ガン部位に長期間滞留している間に放出されて薬効を発現すると考えられている。

このなかで、本補助金による研究は、高分子ミセルと細胞の相互作用を調べることにより、ガン局所での血液中 細胞間質 ガン細胞の物質移動及び薬物放出による活性発現の段階を定量的に解析することを目的とする。

本研究の独創的な点は、高分子ミセルという超分子集合体を薬物キャリアーとして用いることにある。この高分子ミセル超分子構造を薬物ターゲティングに応用し、成功を収めている唯一の例である。本申請研究によりこの薬物キャリアーシステムの体内での物質移動・薬効発現の過程が明らかにされ得る。特に、ガン組織レベルでの物質移動を解析することはドラッグデリバリーシステム（DDS）研究において非常に高い意義を有する。本研究は、組織レベルでの物質移動というDDSでの最先端の領域の解明と合成化学の手法を用いた相互作用の系統的な解析を含むことから、極めて集学的要素が強い点も特徴となっている。

本補助金の期間内に具体的には、培養細胞に対する取り込み挙動を観察・解析した。また、平成9年度初頭に高分子ミセル内核に内包された薬物を物理的・化学的に詳細にキャラクタリゼーションする方法が確立できた。このキャラクタリゼーションは細胞との相互作用による薬物の放出ならびに殺細胞活性と密接に関連しており、本研究の目的達成には極めて重要であったので、多くの時間を割いてこのキャラクタリゼーションを遂行した上で、培養細胞に対する取り込み挙動を観察・解析した。そのために当初の研究計画平成9年度（3）と平成10年度（1）（2）は研究が完了しなかった。また、培養細胞に対する取り込み挙動解析のための基盤データとなる殺細胞活性を様々な

接触時間で調べることを行った。成果報告項目は以下の3つから成る。

(1) 内包薬物のキャラクタリゼーション

本項目については詳細は出版された論文で示すこととし、本文中には背景と結果の簡単なまとめのみを記す。

(2) 殺細胞活性の測定

次項目の観察のためには、ある接触時間で培養細胞が活着しているのかあるいは薬物の作用で死んでいるのかを知っておくことは必須である。

(3) 内包薬物アドリアマイシンの取り込み及び細胞内分布

## (1) 内包薬物のキャラクタリゼーション

抗ガン剤アドリアマイシンの高分子ミセルへの封入は以下の図 2 に示すように 2 段階で行うことを既報 (Masayuki Yokoyama, et al., "Improved synthesis of adriamycin-conjugated poly(ethylene oxide)-poly(aspartic acid) block copolymer and formation of unimodal micellar structure with controlled amount of physically entrapped adriamycin", *J. Controlled Release*, 32, 269-277 (1994)) で報告している。しかし、この論文では抗ガン活性を示すほどに多くのアドリアマイシンを物理的に内包させるところまでに及んでいないことと、物理的封入に伴って生成する新たな物質については不明な点を残していた。

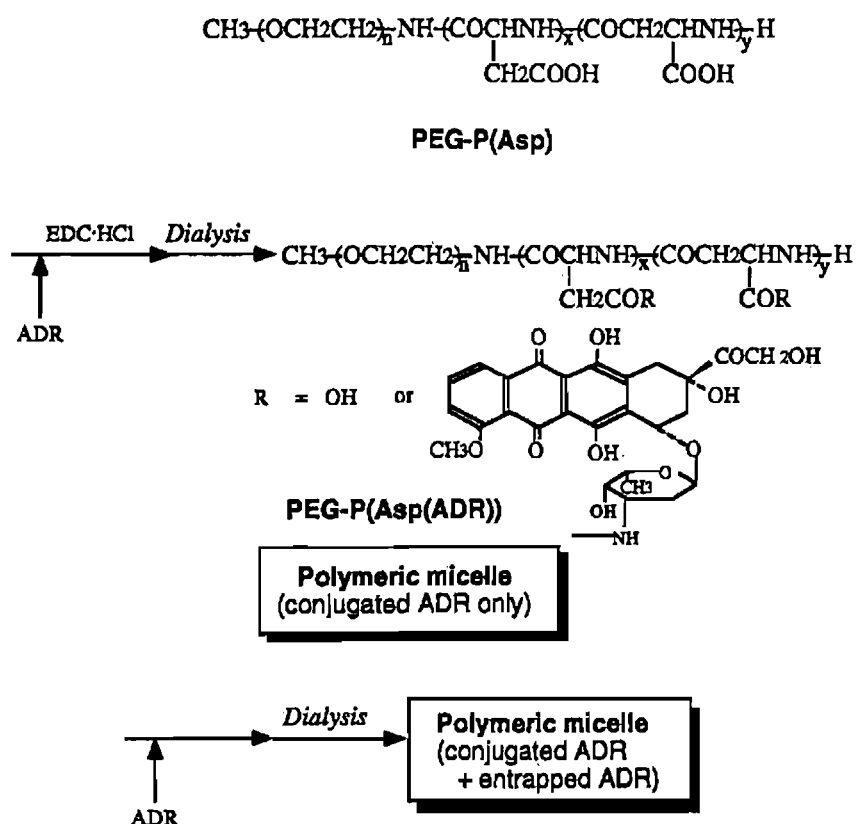


図 2 高分子ミセルの作製および  
抗ガン剤アドリアマイシンのミセルへの内包

以上の点を解決するために、アドリアマイシンの物理的内包の方法と内包後の安定性の検討をポリエチレングリコール-ポリ ( $\beta$ -ベンジル-L-アスパルテート) ブロックコポリマーをモデルとして行った。この結果が後出の論文 (G. Kwon, M. Naito, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, and K. Kataoka, "Block Copolymer Micelles for Drug Delivery: Loading and Release of Doxorubicin", *J. Controlled Release*, **48**, 195–201 (1997)) である。ここで得られた結果をもとに、マウスでの固形ガンに対する抗ガン活性テスト用のシステム (ポリエチレングリコール-ポリ (アスパラギン酸) ブロックコポリマーのアスパラギン酸残基に抗ガン剤アドリアマイシンをアミド結合で化学的につなげて高分子ミセルを形成させたもののミセル内核に物理的に新たにアドリアマイシンを封入する) に物理的に多量のアドリアマイシンの内包を行い、in vivoでの抗ガン活性を得ることに成功した。また、アドリアマイシンの物理的封入に伴って新たに生成するものはアドリアマイシンの2量体であることが判明した。この結果は後出の論文 (Masayuki Yokoyama, Shigeto Fukushima, Ryuji Uehara, Kazuya Okamoto, Kazunori Kataoka, Yasuhisa Sakurai, and Teruo Okano, "Characterization of Physically Entrapment and Chemically Conjugation of Adriamycin in Polymeric Micelles and Their Design for In Vivo Delivery to a Solid Tumor", *J. Controlled Release*, **50**, 79–92 (1997)) に報告した。さらに、アドリアマイシンの物理的封入量を最適化し、次ページ図3に示すような高いin vivo抗ガン活性を示すに到った。

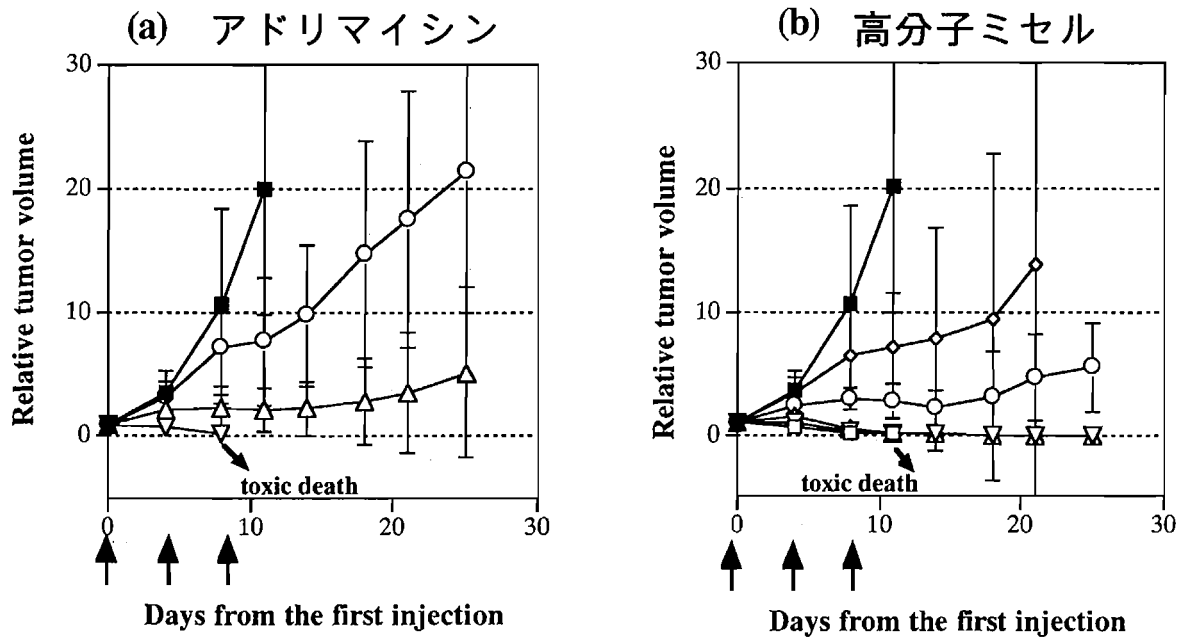


図3 C26マウスガンに対するIn vivo抗ガン活性

一方、アドリアマイシンのミセル内核への物理的内包方法の確立に伴い、他の薬物を高分子ミセルに内包させることの成功につながった。その結果は後出の2論文（[Masayuki Yokoyama, Ayumi Satoh, Yasuhisa Sakurai, Teruo Okano Yasuhiro Matsumura, Tadao Kakizoe, Kazunori Kataoka, "Incorporation of water-insoluble anticancer drug into polymeric micelles and control of their particle size", \*J. Controlled Release\*, 55, 219–229 \(1998\)](#)と [Yasuhiro Matsumura, Masayuki Yokoyama, Kazunori Kataoka, Teruo Okano, Yasuhisa Sakurai, Takanori Kawaguchi, and tadao Kakizoe, "Reduction of the adverse effects of an antitumor agent, KRN 5500](#)

by incorporation of the drug into polymeric micelles", *Japanese J. Cancer Research*, **90** (1), 122–128 (1999) に示す。ここでミセル内核に封入した抗ガン剤は水に不溶であることがアドリアマイシンと異なっている。非水溶性の抗ガン剤は投与時に有害な有機溶媒や界面活性剤を使用せざるを得ず、この使用によって深刻な副作用を起こしている現状である。よって本研究の成果によりこの副作用を抑制できる有効な方法論を手に入れたことになり、今後この面での発展も期待される。

以上の結果から、

- 1、抗ガン剤アドリアマイシンを化学的結合量、物理的吸着量を個別に変えて高分子ミセルに封入する方法論を確立した。化学的に結合したアドリアマイシンはそのin vitro殺細胞作用がアドリアマイシンの1/1000程度であることから、専らミセル形成のための疎水性内核として働き、抗ガン作用には関係していないと考えられた。
- 2、アドリアマイシンを物理的に封入する際に、図3に示す構造の2量体が生成することがわかった。この2量体はin vitro殺細胞作用がもとのアドリアマイシンに比べて1/100程度と低いことがわかっており、in vivoにおいて抗ガン作用の主体はアドリアマイシンであると考えられた。
- 3、アドリアマイシンの化学的結合量、物理的吸着量を最適化することで高い抗ガン活性を示す高分子ミセルシステムが構築できることが

わかった。

以上の結果より、内包薬物が詳細にキャラクター化されていて高い抗ガン活性を示す高分子ミセルシステムが得られたので、これを用いて培養細胞との相互作用を詳細に検討する準備が整った。

## (2) 殺細胞活性の測定

測定は以下の系で行った。

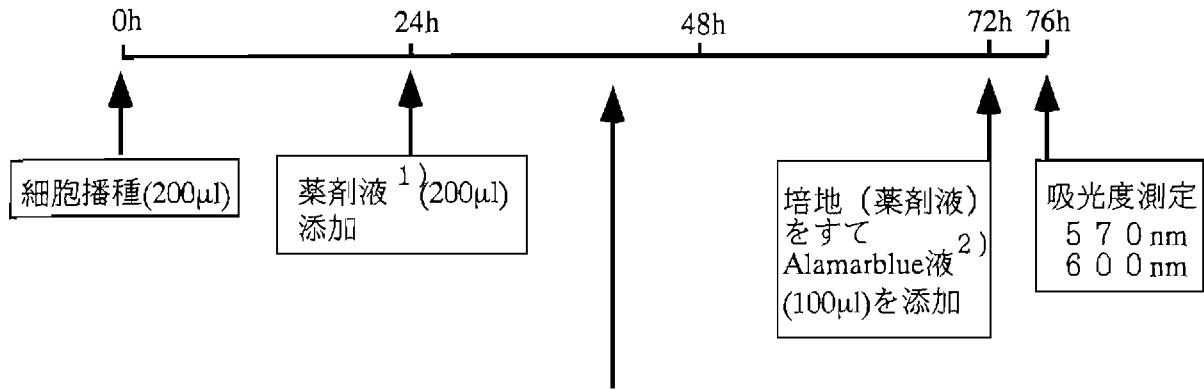
- ・細胞 B 1 6 マウスメラノーマ細胞
- ・培養液 Eagle MEM + 10% Fetal Calf Serum
- ・培養条件 37° C、5% CO<sub>2</sub>、95% humidity
- ・96-well プレート使用
- ・細胞活性測定法 Alamarblue試薬によるミトコンドリア酸化還元酵素の活性測定による

測定は細胞数が指数的に増加している状態 (A) と細胞がconfluentになり細胞数が増えない状態 (B) の2つで計測した。



(A) 細胞数が指数的に増加している状態

図 4 に示した手順で測定を行った。



24h~72hの間で薬剤液を培地(200μl)に交換する

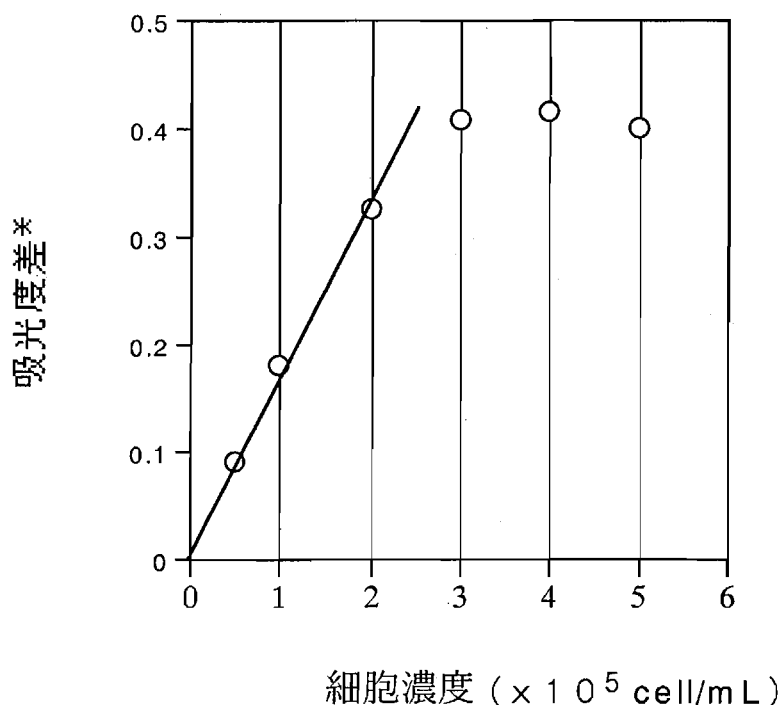
薬剤液との接触時間 (h)	交換時期
1	25
3	27
6	30
10	34
24	48
48	交換無し

1) 培地に2倍ずつ希釈

2) 市販のAlamarblue液を培地で10倍希釈したもの

図 4 細胞数が指数的に増加している状態での殺細胞活性評価スキーム

また、このスキームで細胞数が指数的に増加するための細胞播種の度を求めたところ図5に示すようにほぼ  $2.0 \times 10^4$  cell/mlであることがわかったので、実験ではそれより低い  $1.5 \times 10^4$  cell/mlで行った。



$$* \text{吸光度差} = (A_{570\text{nm}} - A_{600\text{nm}})_{\text{sample}} - (A_{570\text{nm}} - A_{600\text{nm}})_{\text{negative control}}$$

図5 初期細胞播種濃度の決定

用いたポリマーミセルサンプルは次ページ表1に示すものである。また、対照としたアドリアマイシン結合ブロックコポリマー（これ自身高分子ミセル構造を形成する）はアドリアマイシンを内包したポリマーミセル作製の第1段階（アドリアマイシンを化学結合する）終了後のものである。

表1 アドリアマイシン内包高分子ミセルの組成

ポリエチレングリコール鎖の分子量	15,000
ポリアスパラギン酸鎖のユニット数	28
化学結合アドリアマイシンの割合	24.2 wt%
物理吸着アドリアマイシンの割合	5.0 wt%
物理吸着2量体の割合	8.4 wt%

測定の結果を図<sup>6</sup> a~cにまとめる。

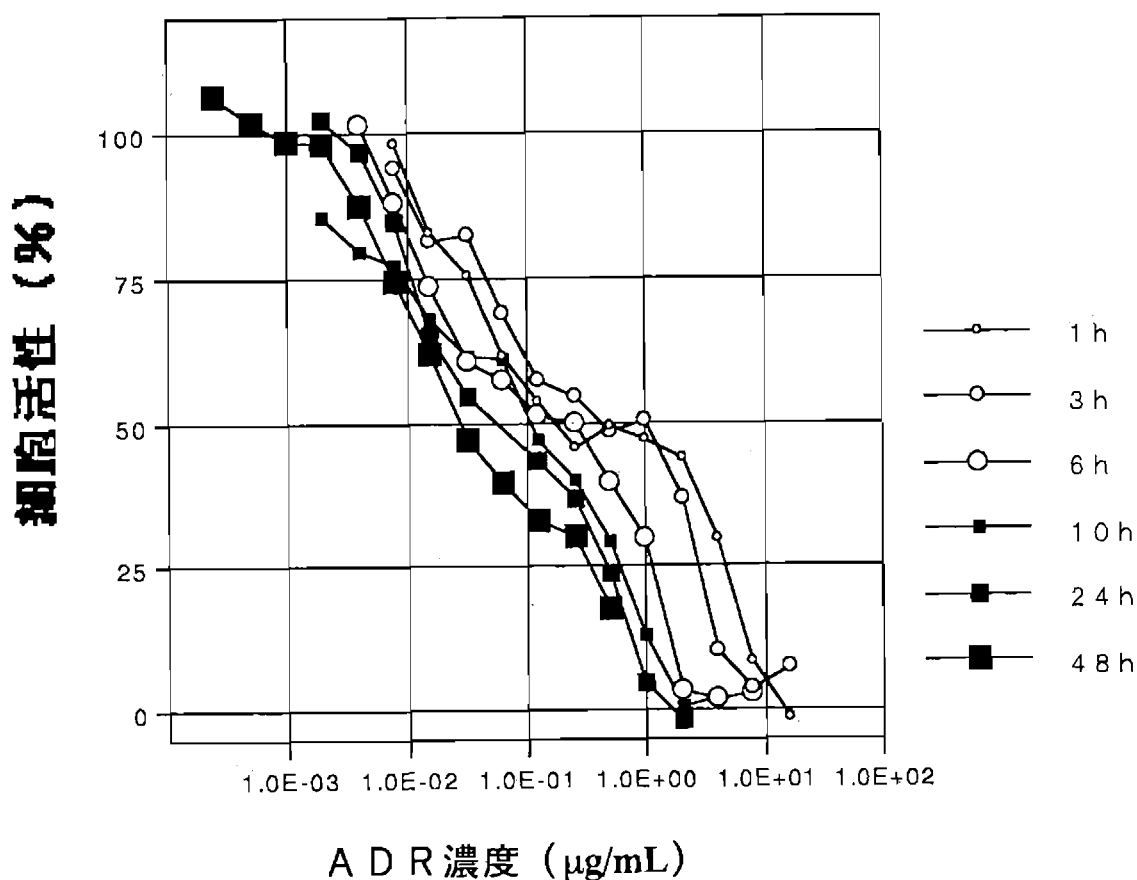
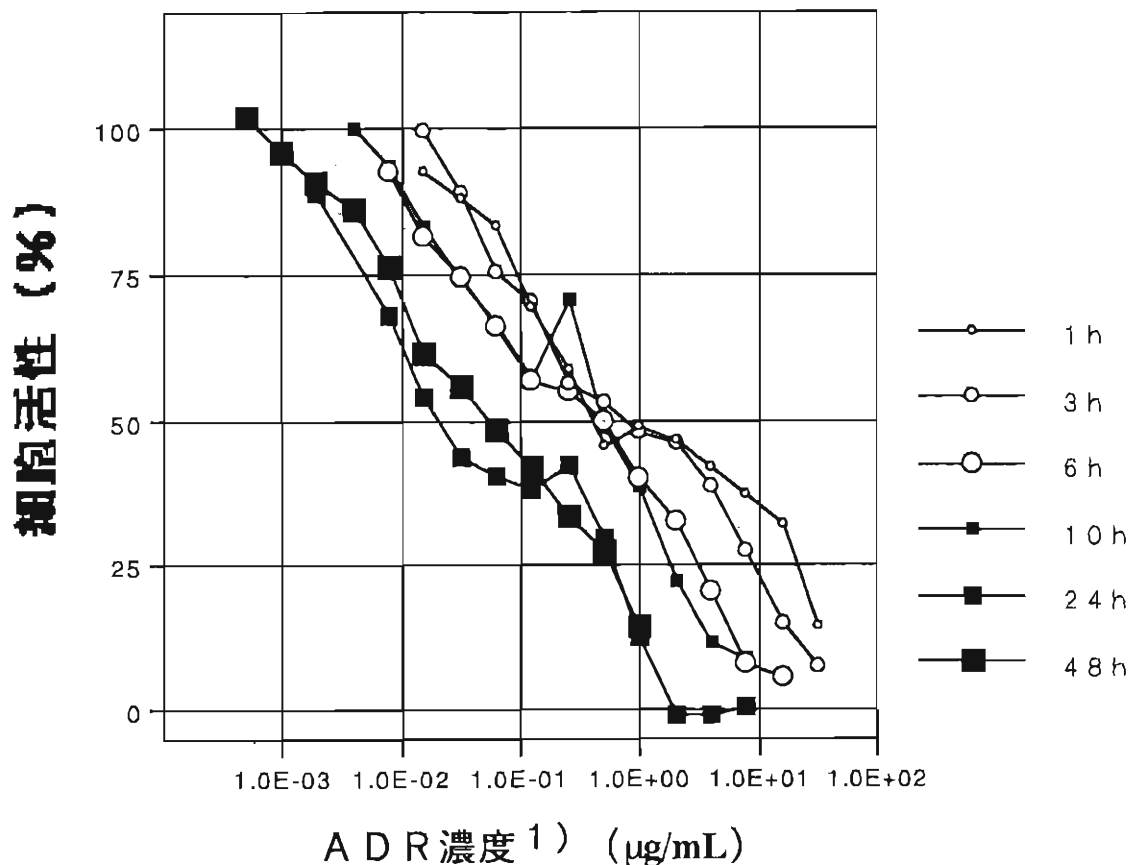


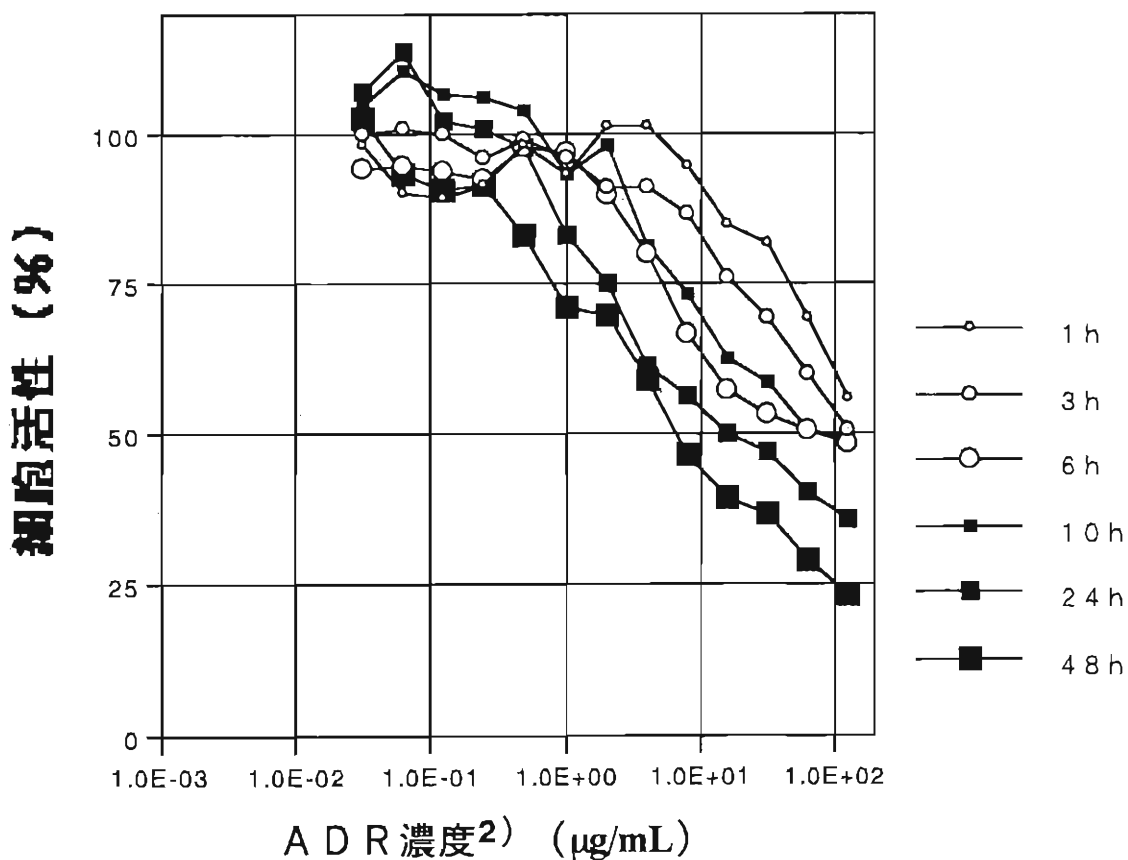
図6 a アドリアマイシン (ADR) の殺細胞活性

(b) ポリマーミセル



A D R 濃度<sup>1)</sup> (μg/mL)  
 1)物理的に内包した (アドリアマイシン+2量体) の合計量

(c) ポリマー



A D R 濃度<sup>2)</sup> (μg/mL)  
 2)化学的に結合したアドリアマイシン量

図 6 in vitro 殺細胞活性

図6よりIC50（50%成長阻害濃度）を求めまとめたのが表2である。単位はADR換算（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）

表2 IC50値の比較

薬剤接触時間	ADR	ミセル	ポリマー
1 h	0.1	0.3	>128
3 h	0.4	0.6	100
6 h	0.2	0.4	80
10 h	0.1	0.4	90
24 h	0.05	0.02	20
48 h	0.02	0.04	6

なお、ミセルの場合は物理的に内包した（アドリアマイシン+2量体）の合計量、ポリマーの場合には化学的に結合したアドリアマイシン量で示してある。

ここで求めた殺細胞効果は細胞が指数的にその数を増やしているときにどのくらいの接触時間で殺細胞効果があるかを調べたものである。また、（48時間を除き）薬剤との接触時間の後には培地に交換して、生き残った細胞がその数を指数関数的に増加させた後で細胞活性を評価している。つまり、細胞の増殖活性をいかに阻害できるかに焦点を当てての測定である。

一方、次項目（B）で示すのは細胞がconfluentになり、その数を増やさなくなった状態で、かつ薬剤との接触直後の細胞活性を測定している。

これは薬剤と接した細胞が失って行く細胞活性を測定するものである。  
測定結果の比較検討、考察は次項目の結果を示した後にまとめて行う。

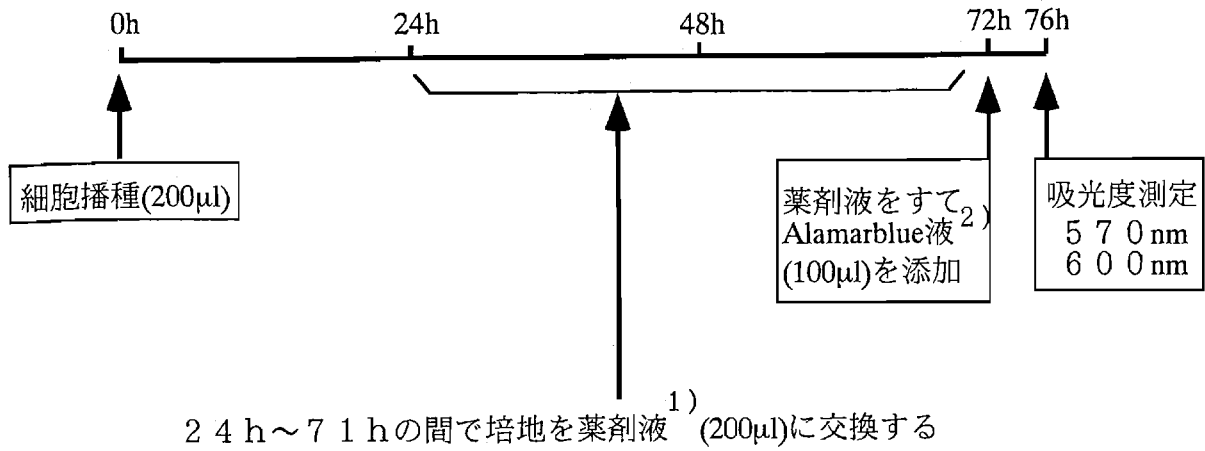
### (B) 細胞がconfluentになり細胞数が増えない状態

細胞播種は $1.0 \times 10^5$  cell/mlで行った。この濃度では、播種24時間後に既にAlamarblue液を用いた細胞活性は飽和していることを確認している。つまり、24時間から72時間の間は、細胞はその数を増やすことなく生きて活性を一定に保持している。

実験は図7に示すスキームに従って行った。その結果を図8および表3にまとめる。

表3 IC<sub>50</sub>値の比較（条件B）

薬剤接触時間	ADR	ミセル	ポリマー
1 h	>64	>64	>128
3 h	>64	>64	>128
6 h	>64	>64	>128
24 h	>16	>16	>128
48 h	0.4	0.6	>128



薬剤液との接触時間 (h)	交換時期
1	71 h
3	69 h
6	66 h
24	48 h
48	24 h

1) 培地に2倍づつ希釈

2) 市販のAlamarblue液を培地で10倍希釈したもの

図7 細胞confluentになっている状態での殺細胞活性評価スキーム

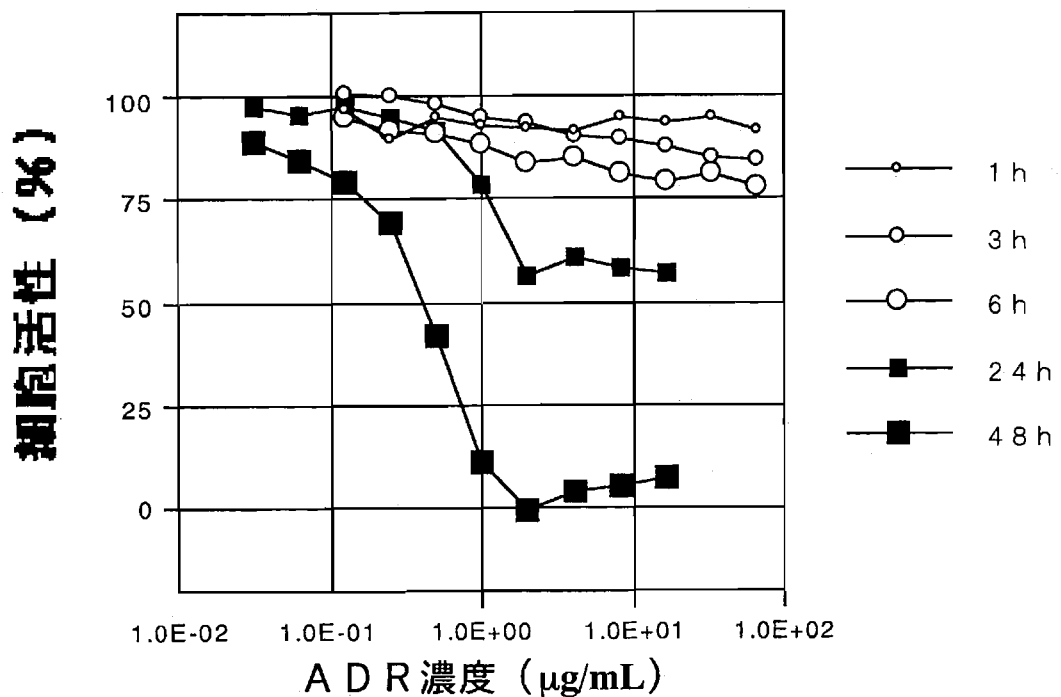
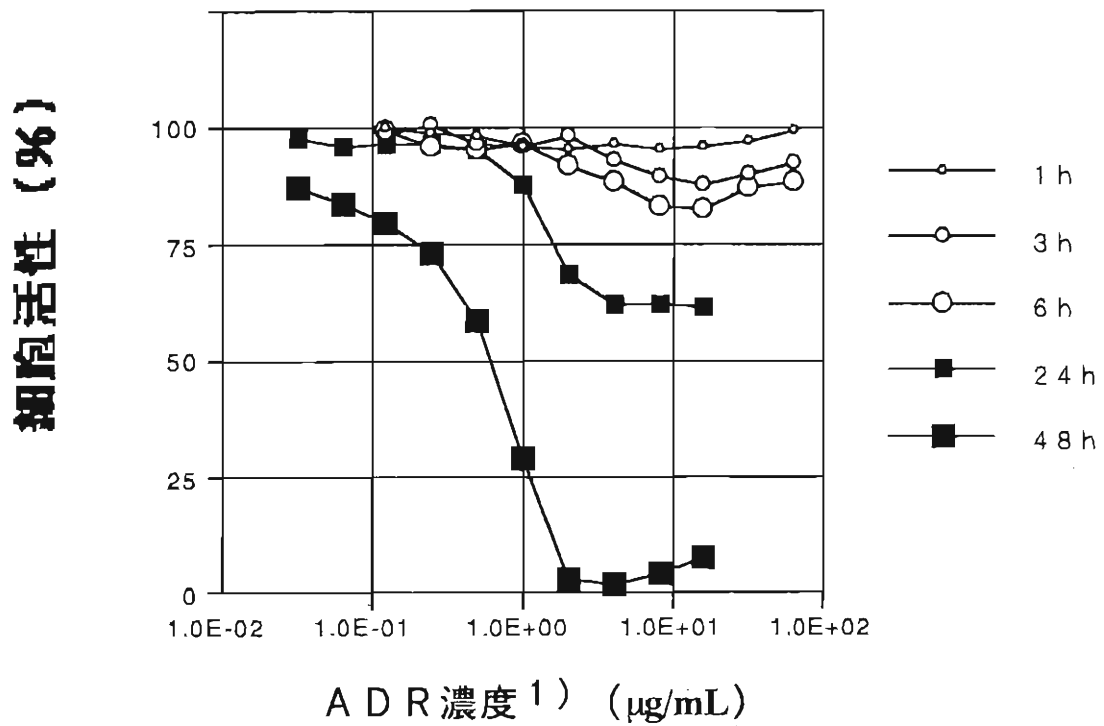


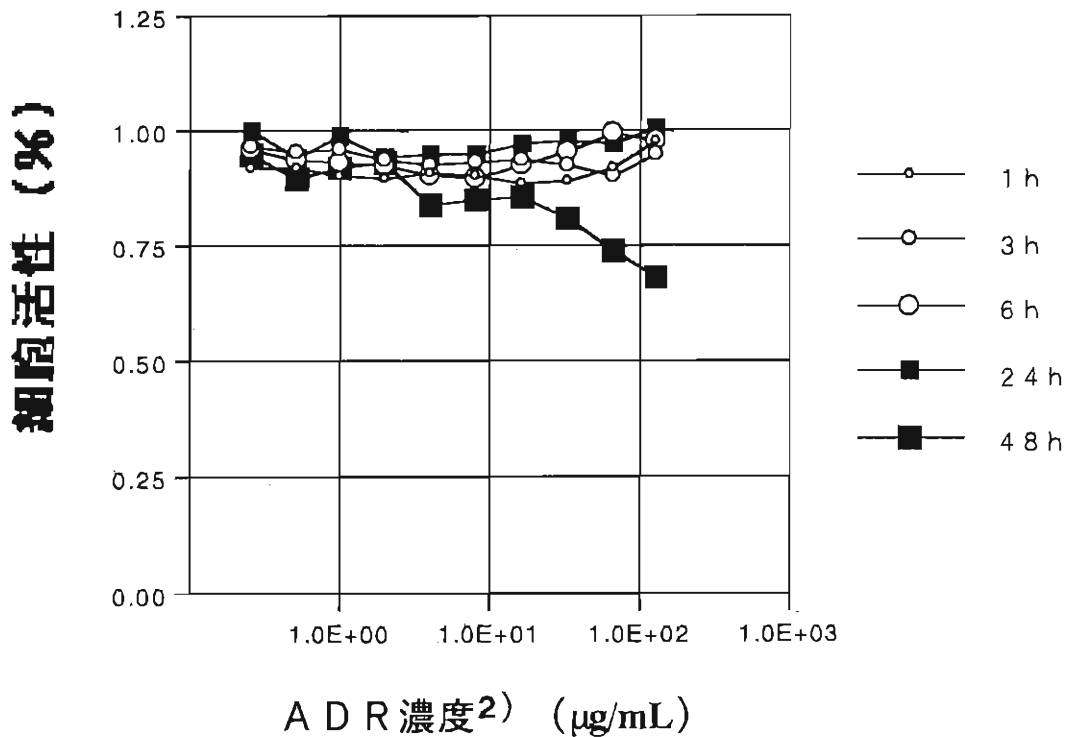
図8a アドリアマイシン (ADR) の殺細胞活性

(b) ポリマーミセル



1)物理的に内包した (アドリアマイシン+2量体) の合計量

(c) ポリマー



2)化学的に結合したアドリアマイシン量

図 8 in vitro 殺細胞活性



以上の殺細胞活性の測定からわかったことは

- ・化学結合のアドリアマイシンの殺細胞活性は無いが、有ってもアドリアマイシンの1/100以下と極めて小さい。（認められている活性が化学結合のアドリアマイシンのものと決定できないのは、未結合のアドリアマイシンが1%未満ではあるが混入しているためである。
- ・同じ接触時間でもconfluentな状態で接触後にすぐに活性を測定する（B）の条件では、ADRと高分子ミセルはかなりの濃い濃度（10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）でも比較的高い細胞活性50%（24 hの接触時間）、75%（6時間までの接触時間）を保っている。この結果を利用して1 h、3 hの接触時間後の細胞内の分布の様子を次項目で観察した。
- ・どの測定条件に置いてもADRと高分子ミセル（物理的に内包した量で比較）は同程度の殺細胞活性を示した。ミセル内核に物理的に内包された状態では化学結合したアドリアマイシンと同様に殺細胞活性は無いが極めて低いと考えられるので、細胞外あるいは細胞内でミセル内核より放出されたアドリアマイシンによって殺細胞活性が得られていると考えられる。接触時間が1時間という短時間の場合を考慮すると、細胞との相互作用（細胞外あるいは細胞内）により速やかに内核に物理的に保持されていたアドリアマイシンが放出されるか、細胞のミセル取り込みが極めて速やかであることを示唆する。

以上の事柄と、過去に得られた長い血液中半減期（10時間程度）を考

え合わせると、内包薬物の放出は血液中の成分（タンパクなど）との相互作用では比較的遅く、細胞との相互作用では比較的速いと考えられる。このことは、血液中の安定性（目的部位に到達させるために重要）と細胞と接したときの薬物放出性（目的部位での薬効発現に重要）を個別の *in vitro* 実験により評価して、その結果をより効率的なドラッグキャリアシステムの設計・構築に活用する展望が開けたことを意味し、極めて重要な方法論の発見がこの研究で成されたと考えられる。

### (3) 内包薬物アドリアマイシンの取り込み及び細胞内分布

測定は以下の系で行った。

- ・細胞 B 1 6 マウスメラノーマ細胞
- ・培養液 Eagle MEM + 10% Fetal Calf Serum
- ・培養条件 37° C、5% CO<sub>2</sub>、95% humidity
- ・Biocoat Human Fibronectin Cellware 8-well Culture Slide (Beckton & Dickinson社製)使用

B 1 6 マウスメラノーマ細胞 1.0 x 10<sup>5</sup> cell/mL を各wellに400 μLずつ播いて24時間後に薬剤液500 μLを入れる。薬剤液の濃度はポリマーは10 μg/mL, ADRと高分子ミセルは1,3,10 μg/mLを用いた。1または3時間後に4% パラフォルムアルデヒドで20分間固定した後、DulbeccoのPBS 500 μLで3回洗浄して蛍光顕微鏡で観察する。結果を図9に示す。

これらの結果から分かったことは、

- ・ADRと高分子ミセルはアドリアマイシンの蛍光で細胞が染まっているのが見えた。さらに、可視像と比べると両方とも核が染まっておることがわかる。これに対しポリマーのみでは蛍光視野では何も見えなかった。
- ・ADRと高分子ミセルの蛍光の強さを比較すると、高分子ミセルの10 μg/mLとADRの1 μg/mLがほぼ等しい。

以上のことから

- ・殺細胞活性測定（B）の結果を考慮すると、この時間、濃度では細胞活性は十分高い（70%以上）ので、細胞本来の取り込み、分布の様子を観察しているとみなすことができる。
- ・殺細胞活性はADRと高分子ミセルの間でほとんど差がないのに対して、蛍光の観察では約10倍の濃度の差が核で見られた。この事は高分子ミセルでの殺細胞活性がADRと同じではないことを示唆する。高分子ミセル内に内包されるとADRの蛍光が消光することが知られているので、この観察では見えてない部分があるかもしれない。

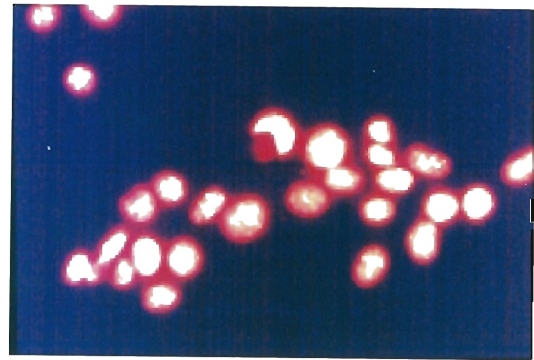
今後の展望としては、

- 1、高分解能のレーザー共焦点顕微鏡を用い、核以外の部分に分布しているアドリアマイシン分子を観察する。
- 2、各種阻害剤（代謝阻害剤、細胞骨格系の機能阻害）を用い、それらのアドリアマイシン分子細胞内分布への影響を見る。

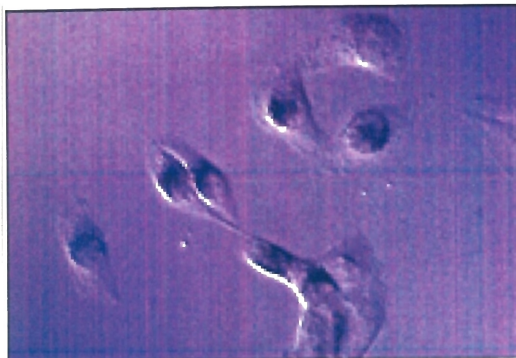
以上の検討により、抗ガン剤のような細胞を殺す薬剤のみならず、様々な作用を及ぼす薬物のキャリアーとしての高分子ミセルの可能性が広く議論できうるものと確信する。



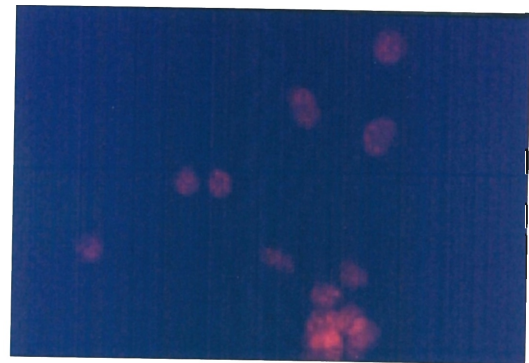
ADR 10 $\mu$ g/mL, 3h  
可視像



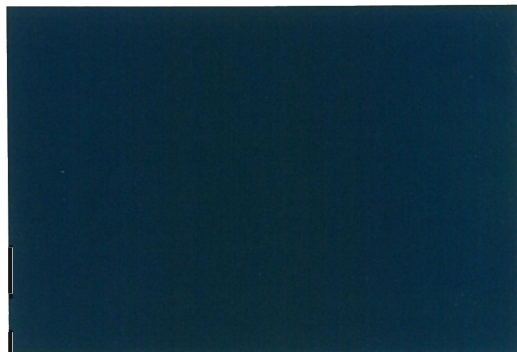
ADR 10 $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



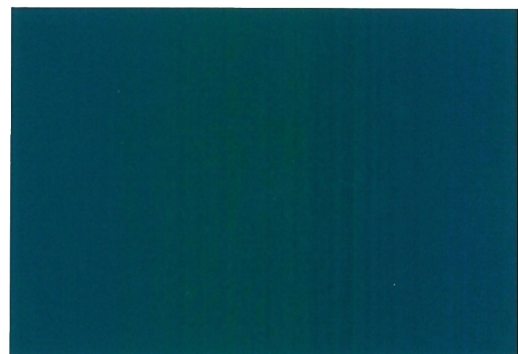
ミセル 10 $\mu$ g/mL, 3h  
可視像



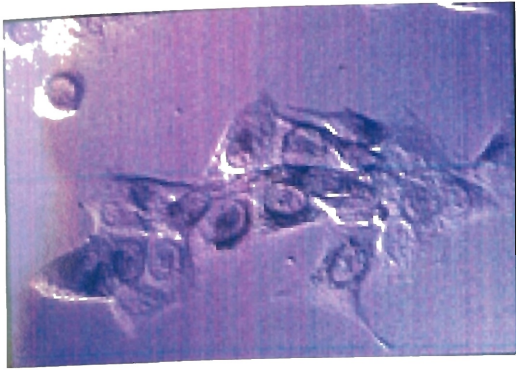
ミセル 10 $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



ポリマー 10 $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



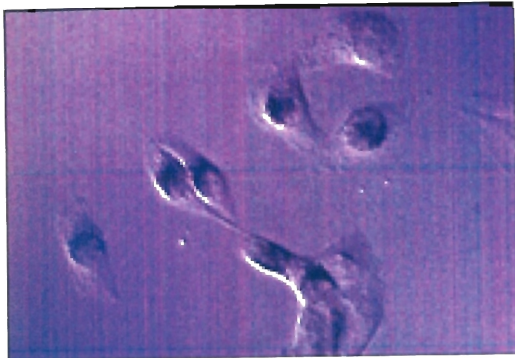
ミセル 10 $\mu$ g/mL, 1h  
蛍光像



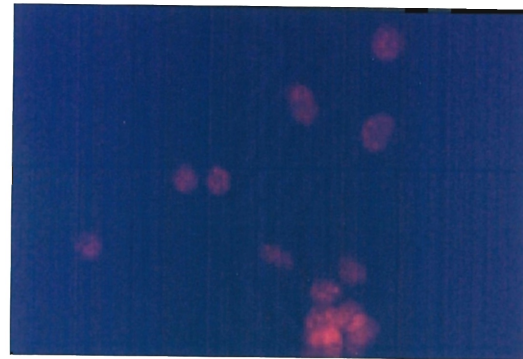
ADR 10 $\mu$ g/mL, 3h  
可視像



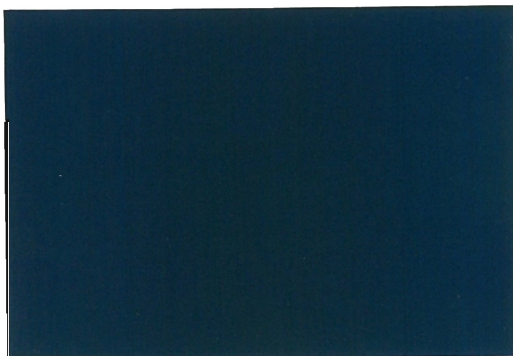
ADR 10 $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



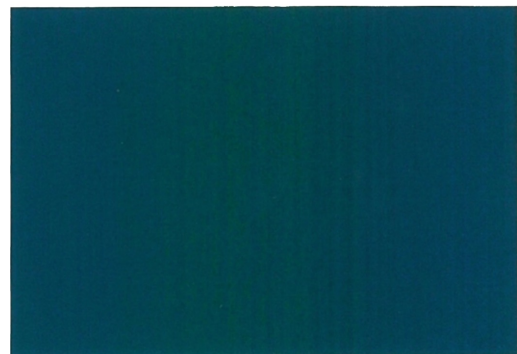
ミセル 10 $\mu$ g/mL, 3h  
可視像



ミセル 10 $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



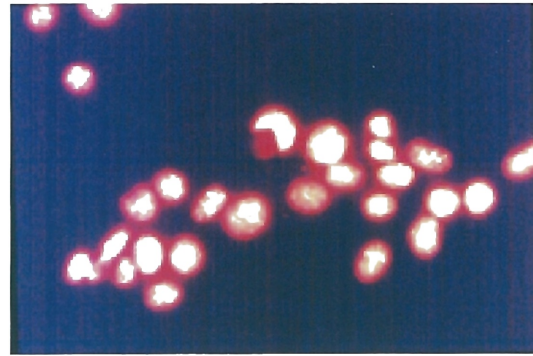
ポリマー 10 $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



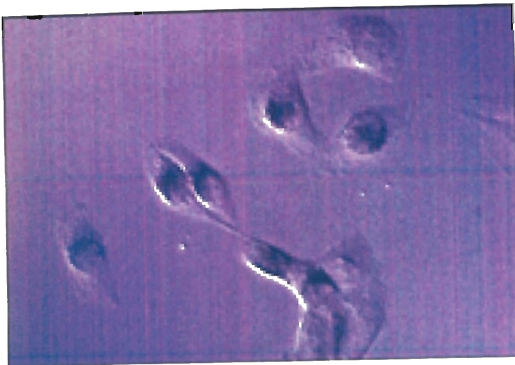
ミセル 10 $\mu$ g/mL, 1h  
蛍光像



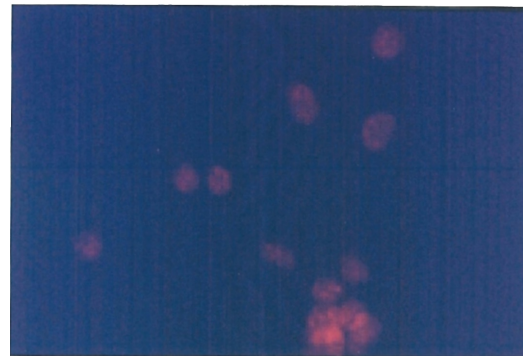
ADR 10 $\mu$ g/mL, 3h  
可視像



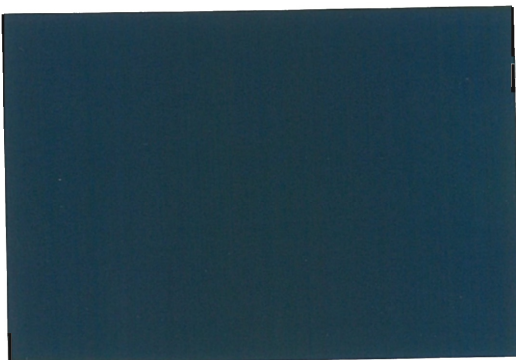
ADR 10 $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



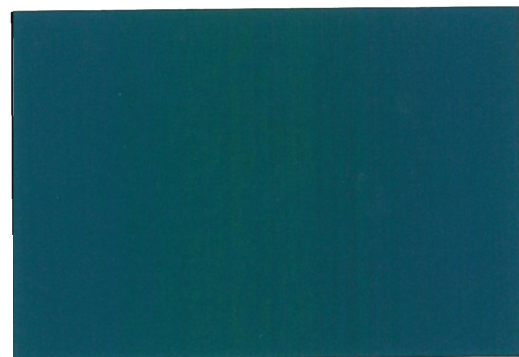
ミセル 10 $\mu$ g/mL, 3h  
可視像



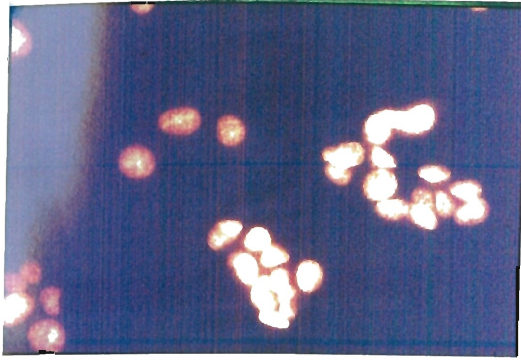
ミセル 10 $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



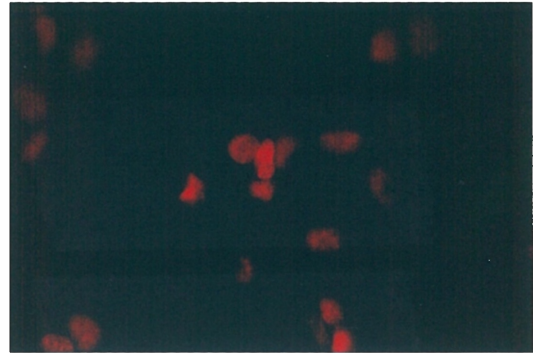
ポリマー 10 $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



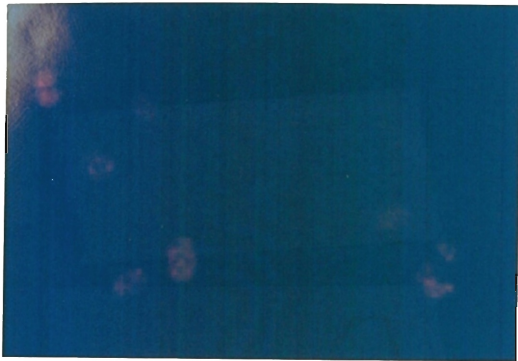
ミセル 10 $\mu$ g/mL, 1h  
蛍光像



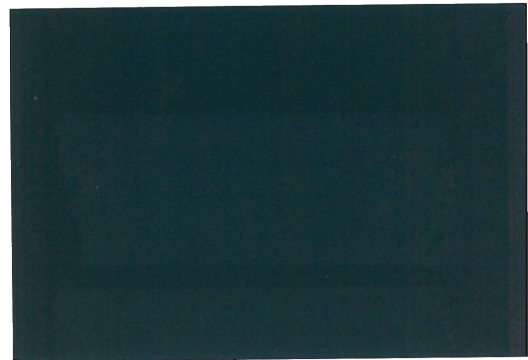
ADR 3 $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



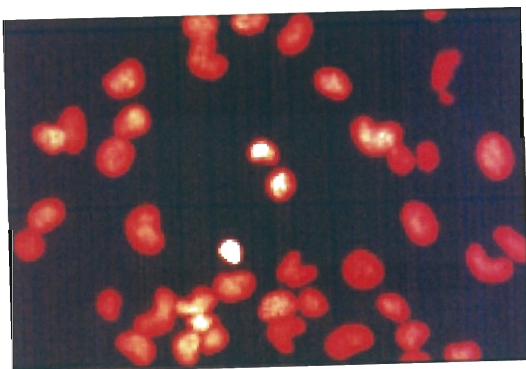
ADR 3 $\mu$ g/mL, 1h  
蛍光像



ADR 1  $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



ADR 1  $\mu$ g/mL, 1h  
蛍光像

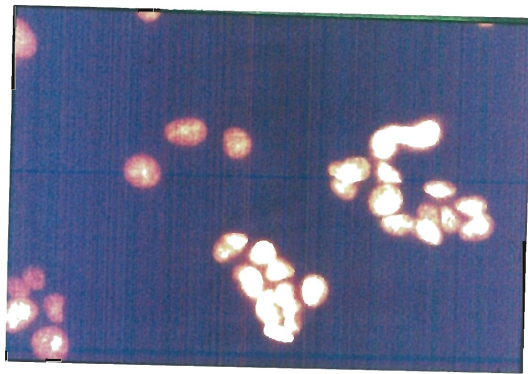


ADR 10 $\mu$ g/mL, 1h  
蛍光像

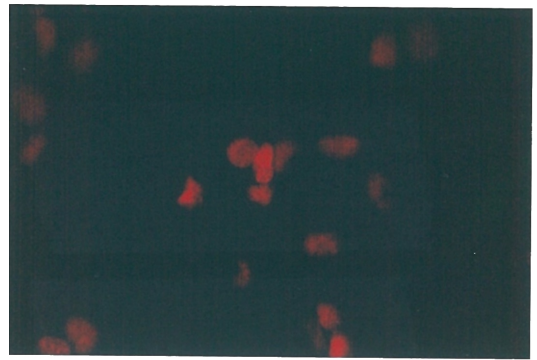


ミセル 3 $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像





ADR 3 $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



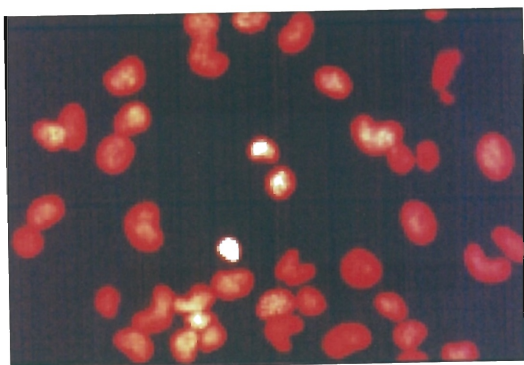
ADR 3 $\mu$ g/mL, 1h  
蛍光像



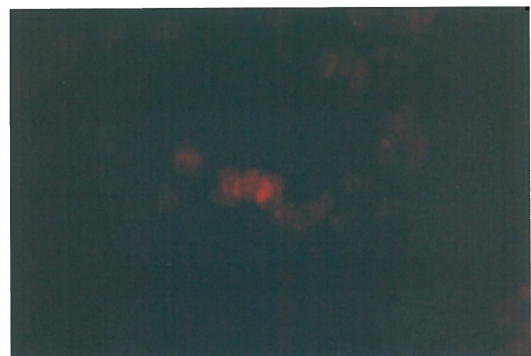
ADR 1  $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



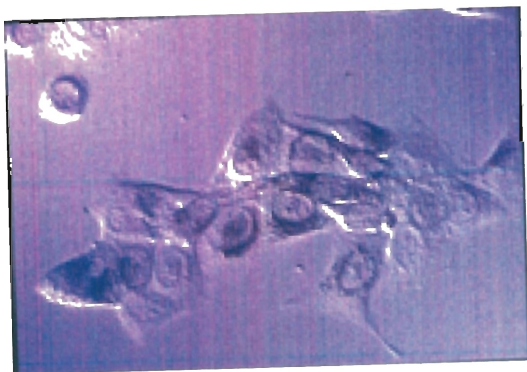
ADR 1  $\mu$ g/mL, 1h  
蛍光像



ADR 10 $\mu$ g/mL, 1h  
蛍光像



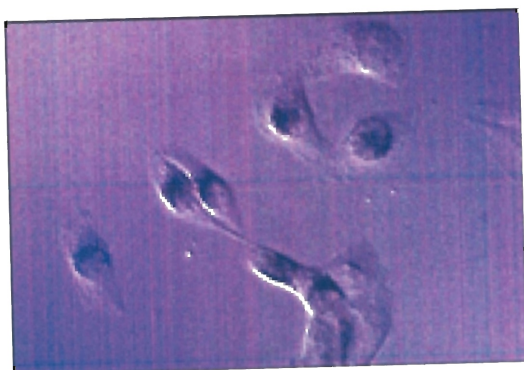
ミセル 3 $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



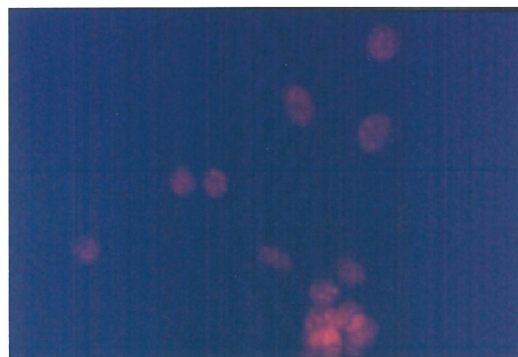
ADR 10 $\mu$ g/mL, 3h  
可視像



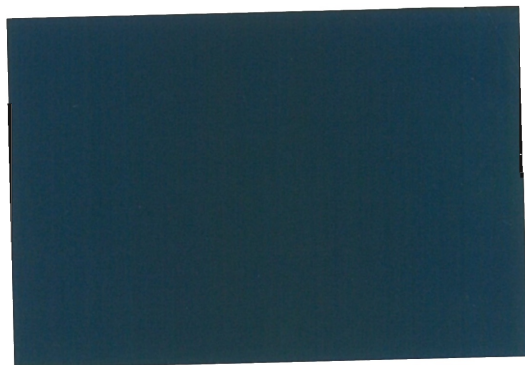
ADR 10 $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



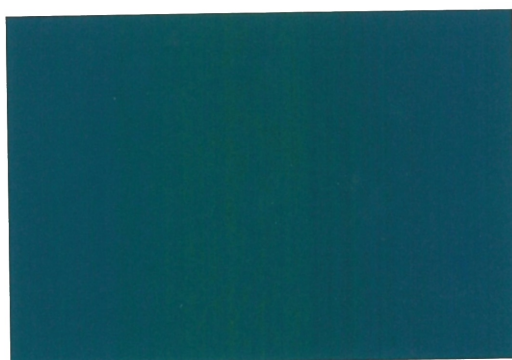
ミセル 10 $\mu$ g/mL, 3h  
可視像



ミセル 10 $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



ポリマー 10 $\mu$ g/mL, 3h  
蛍光像



ミセル 10 $\mu$ g/mL, 1h  
蛍光像