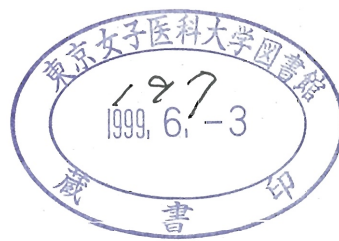


# 温度応答性と生分解性を兼ね備えた 高分子ミセル薬物運搬体

(課題番号) 08672569

平成8年度～平成10年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書



平成11年3月

研究代表者 青柳隆夫  
(東京女子医科大学医学部講師)

## 研究組織

研究代表者 : 青柳隆夫 (東京女子医科大学医学部講師)

研究分担者 : 桜井靖久 (東京女子医科大学医学部教授)

## 研究経費

平成8年度 600千円

平成9年度 800千円

平成10年度 800千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. J. E. Chung, M. Yokoyama, K. Suzuki, T. Aoyagi, Y. Sakurai and T. Okano, "Reversibly thermo-responsive alkyl-terminated poly(N-isopropylacrylamide) core-shell micellar structures", *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 9, 37-48 (1997)
2. J. E. Chung, M. Yokoyama, T. Aoyagi, Y. Sakurai, T. Okano, "Effect of molecular architecture of hydrophobically modified poly(N-isopropylacrylamide) on the formation of thermoresponsive core shell micellar drug carrier" *Journal of Controlled Release*, 53 (1-3), 119-130 (1998)
3. F. Kohori, K. Sakai, T. Aoyagi, M. Yokoyama, Y. Sakurai, T. Okano, "Preparation and Characterization of Thermally Responsive Block Copolymer Micelles Comprising Poly(N-isopropylacrylamide-*b*-DL-lactide)", *Journal of Controlled Release*, 55 (1), 87-98 (1998)

### (2) 口頭発表

- (1)小堀 深、酒井清孝、青柳隆夫、横山昌幸、桜井靖久、岡野光夫、  
“温度応答性高分子を用いたミセルの調製とその特性”、第46回高分子年次大会  
(97年5月25日)
- (2)小堀 深、酒井清孝、青柳隆夫、横山昌幸、桜井靖久、岡野光夫、  
“新規な薬物キャリアーとしての温度応答性高分子ミセル”、化学工学会第30回秋期大会  
(97年9月10日)
- (3)小堀 深、酒井清孝、青柳隆夫、横山昌幸、桜井靖久、岡野光夫、  
“新規な薬物キャリアーとしての温度応答性高分子ミセル”、第46回高分子討論会  
(97年10月2日)

- (4)小堀 深、酒井清孝、青柳隆夫、横山昌幸、桜井靖久、岡野光夫、“新規な薬物キャリアーとしての温度応答性高分子ミセル”、日本医工学治療学会第10回学術大会(98年2月15日)
- (5)小堀 深、酒井清孝、青柳隆夫、横山昌幸、桜井靖久、岡野光夫、“薬物キャリアーとしての感応性高分子ミセルの温度応答挙動” 第7回インテリジェント材料シンポジウム(98年3月19日)
- (6)小堀 深、酒井清孝、青柳隆夫、横山昌幸、桜井靖久、岡野光夫、“体温付近に相転移温度を持つ温度応答性高分子を用いた高分子ミセルの薬物キャリアーへの応用”、第47回高分子学会年次大会(98年5月29日)

## 1. 研究の背景

ドラッグデリバリーシステム (DDS) とは、投与部位から作用させる部位に到達するまでの薬物動態を1つのシステムとしてとらえて、薬物作用の量、部位及び時間を制御する新しい薬物治療技術である。すなわち、投与後の薬物の生体内運命が、薬物自身の化学構造で規定されるのではなく、薬物を作用させたい部位に正確に集積させ、制御した速度で作用させるシステムである。すなわち、薬物の効果を最大限に発揮させ、副作用を最小限にする薬物の新しい治療システムと考えることができる。このDDSを実現する一手法として薬物を高分子連鎖に結合させた高分子医薬がRingsdorf<sup>2)</sup>によって提唱され、盛んに研究された。薬物のみではなく、ある特定の部位に親和性を持たせるためにその抗体を結合させ、その部位への集積性を高めるというものである。しかしこのようなシステムは、*in vitro* においては確かに効果を発揮することができるが、血液中に投与された場合、多くは細網内皮系とよばれる異物認識機構に捕捉されてしまい、目的とする部位にまで行き着くことが困難である。このような問題点を克服する技術が薬物キャリアーと呼ばれる、薬物を保持しながら特定の部位に送り届ける運搬体である。なかでも体内で分解する生分解性高分子材料を用いてミクロンからサブミクロンサイズの小球体 (ミクロスフィア) やリポソームに薬物を包含させたシステムの研究例が多い。しかしこれらの材料では、サイズを小さくするのが困難であり、例えばリポソームでは曲率の関係から100nm以下にするのは困難である。また、ウイルスが体内に侵入した場合に長時間にわたって存在して感染を引き起こすのは、そのサイズが数十nmであることも関係していることが知られており、ナノサイズの薬物キャリアーの実現が望まれていた。

我々の研究グループでは、親水性のポリエチレングリコールとアスパラギン酸からなるブロック共重合体に抗ガン剤であるアドリアマイシンを結合させると水中で安定な会合体 (高分子ミセル) を形成することを見いだした<sup>3)</sup>。このアドリアマイシン担持ミセルは血液投与の5分後で、投与量の90%以上が血液中に存在し、血中半減期が大幅に延長していることが明らかとなった<sup>3)</sup>。さらに、担ガンマウスを用いて固形腫瘍に対する集積性を検討した結果、高分子ミセルが正常組織の比べ約50倍程度集まりやすくなっていることも明らかにした<sup>4)</sup>。さらに、疎水性のポリアミノ酸 (例えば、ポリアスパラギン酸ベンジルエステル) からなる親水-疎水型のブロック共重合体が、水中で安定なコア-シェル型の会合体 (高分子ミセル) を形成することを明らかにした<sup>5)</sup>。しかもそのサイズは数十nmであり、この会合体はコアの部分に疎水性薬物を安定に保持させることが可能

であることも証明した<sup>6)</sup>。

一方、ポリイソプロピルアクリルアミド(PIPAAmと略す)が相転移温度である32°Cを境に低温側で親水性になり溶解、一方、高温側で凝集・沈殿する現象に着目し、我々のグループでは温度に応答する高分子の研究を進めている。これまでの研究から、固体表面にPIPAAmを導入すると、32°C以上では疎水性の表面が、温度を低下させると親水性に変化し、細胞との相互作用を温度変化で制御できることを見いだした<sup>7)</sup>。さらに、酵素へPIPAAm連鎖をグラフトさせると活性を保持したままその相転移温度前後で溶解/沈殿を生起させることができた<sup>8)</sup>。

本研究では、PIPAAmと疎水性の生分解性連鎖を併せ持つブロック共重合体を合成し、温度応答性高分子ミセルへの展開を検討した。PIPAAmは相転移温度以下では親水性を示すことから、低温側で親水-疎水型のみセルを形成し、高温にすると分子全体が疎水性になり凝集・不溶化すると考えられた。すなわち、ある特定部位を局所的に加温すれば、安定に存在していたこの高分子ミセルが凝集し、集積する。このようなシステムを用いれば、外部からの温度変化という信号に応答した薬物ターゲティングが実現すると期待される。

## 2. 温度応答性高分子ミセルの調製

### 2.1 片末端に水酸基を有する PIPAAm の合成とキャラクタリゼーション

我々の研究室ではこれ

までに反応性基としてアミノ基やカルボキシル基を片末端に導入した

PIPAAm を合成し、マク

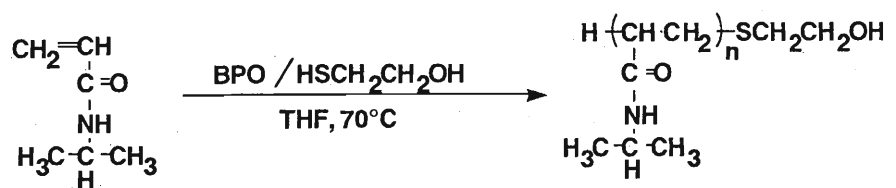


図1 片末端に水酸基を有するPIPAAmの合成

ロモノマーや酵素の修飾のために用いてきた。本研究では図1に示したスキームに従い、水酸基を有するチオール化合物を用いて従来より進めてきているテロメリゼーション法により片末端に水酸基を有するPIPAAmを合成した。合成したポリマーを分画分子量10,000の限外濾過膜を用いて分画を施すことにより、おおむね数平均分子量が5,000程度のものと2,500程度のものを得た。

合成したPIPAAmの1%水溶液を調製し、500nmにおける濁度測定を行うことにより、LCSTの測定を行った。結果を図2に示す。分子量が数万のPIPAAmのLCSTは32°C付近

であるが、PIPAAmのLCSTには分子量依存性があることは既に知られている。今回合成した PIPAAm-OH は比較的分子量が小さいために LCST が上昇したと考えられる。さらに示差走査型熱分析装置 (DSC) を用いて、PIPAAm-OH の相転移温度付近の熱分析を行った。表 1 に DSC より得られた LCST とエンタルピーを示した。表 1 から明らかなように LCST は濁度測定から得られた結果とほぼ一致した。また、エンタルピー変化量も分子量依存性が観察された。

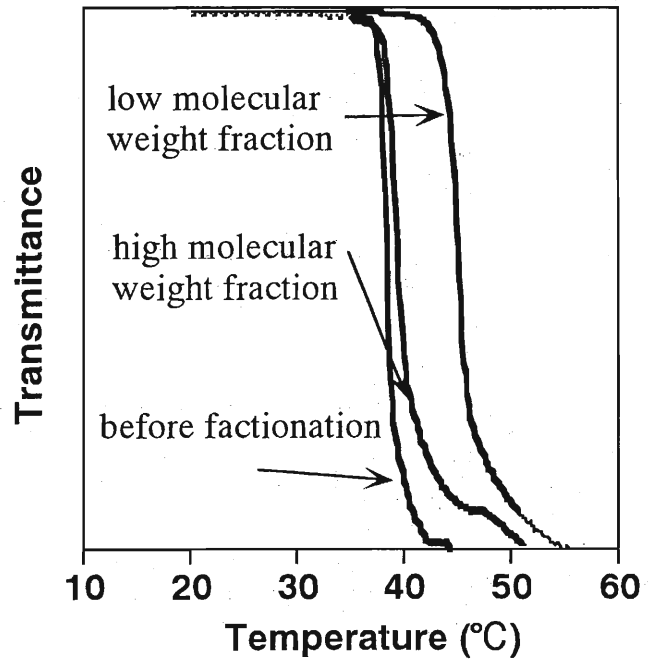


図 2 PIPAAm-OH の LCST 測定

表 1 片末端に水酸基を有する PIPAAm の DSC データ

サンプル	LCST(°C)	$\Delta H(\text{cal/g})$
分面前	42.3	$1.19 \times 10^{-5}$
1 万以上	39.88	$1.49 \times 10^{-5}$
1 万以下	49.93	$0.63 \times 10^{-5}$

## 2.2 PIPAAm の末端の水酸基を開始点とするラクチドの重合

図 3 に示したスキームに従い、PIPAAm の片末端の水酸基を利用して、D,L-ラクチドの開環重合を行い、PIPAAm-ポリ乳酸(PDLLA)のブロック共重合体を合成した。ポリ乳酸の合成において、触媒存在下、水酸基を開始点とする重合は既に知られており、ブロックコポリマー<sup>9)</sup>や架橋物<sup>10)</sup>が合成されている。本研究での反応においてもこの手法を用いた。

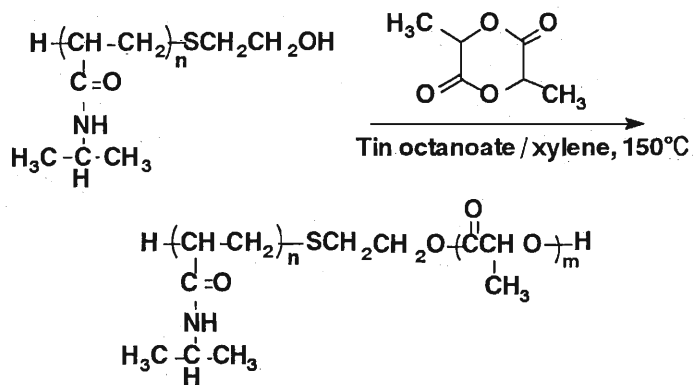


図 3 イソプロピルアクリルアミド-D,L-ラクチドブロックコポリマーの合成

ゲルパーミエーションクロマトグラフィーにより分子量を、また<sup>1</sup>H-NMR に PIPAAm と PDLLA の組成比を算出した。結果を表 2 に示す。表 2 より明らかなように、D,L-ラクチドの重合反応によって高分子量化しており、また、<sup>1</sup>H-NMR の測定結果によりポリ乳酸のピークが観察されたことから PIPAAm-PDLLA ブロック共重合体の合成が確認された。

PIPAAm		表2 PIPAAm-PDLLA ブロックコポリマーのキャラクタリゼーション		
のイソプ	サンプル	Mn*	Mw*	IPAAm/DLLA**
ロピル基 に基づく	分画前	3,400	5,500	-
	1万以上	5,000	7,500	5.1/1
	1万以下	2,600	3,600	3.9/1
メチンプ	*GPCより			
ロトンの	** <sup>1</sup> H-NMR 測定より			
ピークの				

積分値と、ポリ乳酸の主鎖のメチンプロトンのピーク比から算出した各連鎖のユニット比は、分画によって得た分子量が相対的に大きい PIPAAm-OH を用いた方が PIPAAm ユニットの割合は大きく、D,L-ラクチドの開環反応は均一に進行したものと考えられた。以上より、組成の異なる PIPAAm-PDLLA ブロック共重合体の合成が確認された。

### 2.3 PIPAAm-PDLLA からなる高分子ミセルの調製と温度変化させたときのミセルの粒径ならびに多分散度変化の測定

合成した PIPAAm-PDLLA ブロックコポリマーを N,N-ジメチルホルムアミドに溶解させ、透析チューブに入れた。5°Cで水に対して透析することにより高分子ミセルを調製した。調製したミセル溶液の動的光散乱測定(DLS)を行い、粒径および多分散度を測定した。すなわち、5°Cから5°Cおきに DLS を測定することにより、PIPAAm 連鎖の温度変化にตอบสนองした得られた会合体のサイズおよび会合体の均一性(粒径がそろっているかどうか)を観察した。

はじめに、分子量分布が比較的広い分画操作前の PIPAAm-OH を用いて D,L-ラクチドの開環重合を行った PIPAAm-PDLLA を用いて DLS 測定した。5°Cにおいては散乱光がほとんど観察されず、会合体ができていたとしても粒径などの測定は困難であった。10°C以上になると測定可能な散乱強度が得られ、おおむね平均粒径が 120nm 程度の会合体の生成が示唆された。その後 30°C付近まで温度上昇させても、粒径がほとんど変化しなかった。粒径の均一性もそれほど良好ではなく、粒径にばらつきのある会合体が生成しているものと考えられた。しかし、35°C付近になると粒径は急激に小さくなり、90nm程度になった。さらに温度を上昇させると会合体は凝集し始め、見かけの粒径は急激に上昇した。

次に分画操作によって分子量分布が比較的小さい高分子量側成分の PIPAAm-OH を用いて得られた PIPAAm-PDLLA ブロックコポリマーの DLS 測定を行った。このポリマーを用

いて調製された会合体における粒径変化を図4に示した。この会合体においても5°Cでは粒径の測定が困難であった。温度上昇に伴い、粒径が若干低下する傾向が観察された。その後、先の例と同様に35°Cにおいて急激に

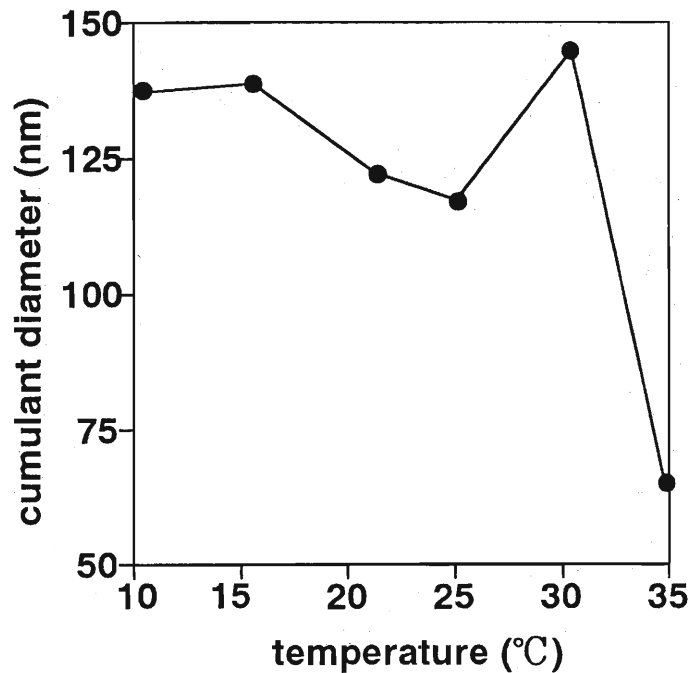


図4 温度変化させたときの高分子ミセルのサイズ変化

れ、約65nmの粒径の

会合体が得られた。このときの多分散度はほぼ0.1程度であった。DLS測定原理より多分散度が0.1以下であればほぼ球形の会合体の生成を示唆するものである。このような挙動は相対的に低分子量のPIPAAm-OHから得られたブロックコポリマーにおいても観察された。さらに温度を上昇させると会合体は凝集し始め、沈殿を生じた。

すなわち、比較的分子量分布の狭いPIPAAm-PDLLAブロックコポリマーから得られた会合体は、生体温度の近いところでほぼ球形に近い高分子ミセルを形成し、そのサイズも65nmと小さいものであった。この高分子ミセルは温度上昇に伴い会合体の凝集・沈殿を生起することが明らかとなった。

現在、この温度応答性高分子ミセルへの制ガン剤の埋包を検討中である。このシステムが成功すれば、生体温度において抗がん剤担持高分子ミセルは循環血液中を安定に存在し、腫瘍部位を温熱療法（ハイパーサーミア）の手法を適用して局所的に40°C付近に加温すれば、腫瘍部位に選択的にこの高分子ミセルを集積でき、結果として薬物を腫瘍部位にのみ作用させることができると考えられる。

#### 参考文献

1)橋田 充, ドラッグデリバリーシステム, 粟津荘司, 小泉 保編, 最新生物薬剤学, 南光堂, 1991年,



2)H. Ringsdorf, Structure and properties of pharmacologically active polymers, J. Polym. Sci. Polym. Symp. Ed., 51, 135(1975)

3)M. Yokoyama, M. Miyauchi, N. Yamada, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka and S. Inoue, Polymer Micelles as novel drug carrier: Adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer, J. Contr. Rel., 11, 269(1990)

4)G. S. Kwon, S. Suwa, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai and K. Kataoka, Enhanced tumor accumulation and prolonged circulation times of micelle-forming poly(ethylene oxide-aspartate) block copolymer-adriamycin conjugates, J. Contr. Rel., 29, 17(1994)

5)G. S. kwon, M. Naito, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai and K. Kataoka, Physical entrapment of adriamycin in AB block copolymer micelles, Pharm. Res., 12, 192(1995)

6)S. B. La, T. Okano, K. Kataoka, Preparation and Characterization of the Micelle-forming polymeric drug indomethacin-incorporated Poly(ethylene oxide)-poly(b-benzyl L-aspartate) block copolymer micelles, J. Pharm. Sci., 85, 85(1996)

7)T. Okano, A. Kikuchi, Y. Sakurai, Y. Takei and N. Ogata, Temperature-responsive poly(N-isopropylacrylamide) as a modulator for alteration of hydrophilic/hydrophobic surface properties to control activation/inactivation of platelets, J. Contr. Rel., 36, 125(1995)

8)M. Matsukata, Y. Takei, T. Aoki, K. Sanui, N. Ogata, Y. Sakurai and T. Okano, Temperature modulated solubility-activity alterations for poly(N-isopropylacrylamide)-lipase conjugates, J. Biochem., 116, 682(1994)

9)Y. J. Du, P. J. Lemstra, A. J. Nijenhuis, H. A. M. van Aert and C. Bastiaansen, ABA type of lactide with poly(ethylene glycol). Kinetic mechanistic, and model studies, Macromolecules, 28, 2124(1995)

10) T. Aoyagi, F. Miyata and Y. Nagase, Preparation of Cross-linked Aliphatic Polyester and Application to Thermo-responsive Material, J. Contr. Rel., 32, 87 (1994).