新しいDDS剤型としての高分子ミセルの設計と機能開発

東京理科大学生命科学研究所

片岡一則

Supramolecular structures, such as lipoproteins and viruses, occur *in vivo* as natural carrier systems. In mimicking such vehicles, we have been studying micelle-forming polymeric drugs as a novel type of drug carrier. Polymeric micelles based on AB block copolymers of polyethylene oxide (PEO) and poly-b-benzyl-L-aspartate (PBLA) were prepared. Such polymeric micelles are expected to physically incorporate drugs. AB block copolymers were synthesized using amino-terminated PEO to initiate the polymerization of β -benzyl-L-aspartate-N-carboxyanhydride (BLA-NCA). The composition and molecular weights of the block copolymers were established by 'H-NMR. Micellar solutions of PEO-PBLA block copolymer were characterized by dynamic light scattering. Fluorescence probe techniques were used to study the polymeric micelles. From changes in the fluorescent intensity and shifts in the excitation spectrum of pyrene upon micellization, critical micelle concentrations (CMC) of PEO-PBLA block copolymers were obtained. The vibrational structure of monomer pyrene fluorescence was altered in PEO-PBLA micellar solutions consistent with low polarity within the PBLA core. In PEO-PBLA micellar solutions, 1,3-(1,1'dipyrenyl)-propane intramolecular eximer emission, relative to monomer emission was very small; this indicated very low mobility of PBLA segments within the micellar core. Further evidence for the limited motion of PBLA segments in the micellar core was obtained by 'HNMR. This limited motion of the PBLA segments in the micellar core is in contrast to low molecular weight surfactants which commonly show a higher degree of motion within their cores. The ability of PEO-PBLA micelles to solubilize hydrophobic molecules was studies by UV and fluorescence spectroscopy using pyrene. Enhanced solubility of pyrene was determined with increasing concentrations of PEO-PBLA. Then, potential of entrapping Adriamycin (ADR) within micelles based on PEO-PBLA block copolymers was investigated. The loading process involved bringing ADR and PEO-PBLA into an aqueous milieu from N,N-dimethylformamide (DMF) through a simple dialysis procedure. Evidence for the physical entrapment of ADR within the micelles was derived from fluorescence spectroscopy, where considerable quenching of fluorescence was observed for ADR associated with the micelles. In addition, quenching experiments, using a water-soluble quencher (iodide (I⁻)), showed that the fluorescence of ADR, present in micellar solutions, was largely uneffected by I⁻, whereas the fluorescence of free ADR was readily quenched. As a result of the entrapment of ADR within the polymeric micelles, the drug slightly binds serum albumin as evidenced by gel permeation chromatography (GPC). In contrast, free ADR readily binds serum albumin in aqueous solutions. The finding suggests that ADR is stably entrapped within PEO-PBLA micelles. The ADR imbued within the micelles is expected to display markedly dissimilar pharmacokinetics relative to free ADR.

Design of Polymeric Micelles for Novel Carriers in Drug Delivery Systems

Kazunori Kataoka

Research Institure for Biosciences Science University of Tokyo 1.緒 言

近年、経皮あるいは経粘膜的に、薬物等の生理 活性物質を体内に制御されたモードで供給する薬 物送達システム(DDS)の研究が国内外で大き な注目を集めている¹⁾。このようなシステムは、

体内で作用する薬物のみならず、皮膚角質層など の体表部位に作用する生理活性物質や香料成分の 制御放出の実現を通じてコスメトロジー分野にお いても大きな貢献をなすことが期待される。薬物 等を制御されたモードで供給するためには、薬物 を安定に保持し、また、必要に応じて制御放出さ れる機能を有する担体システムの設計が重要な課 題である。本研究では、親水性連鎖と疎水性連鎖 とからなるブロック共重合体が、水溶液中で疎水 性連鎖を内核、親水性連鎖を外殻とする安定な多 分子会合体(高分子ミセル)を形成することに着 日し、その内核を薬物のミクロ・リザーバーとし て利用する新規薬物担体システムの構築を行った。 このような高分子ミセルには、〔1〕難溶性物質 の包接化による溶解性向上、〔2〕凍結乾燥状態 あるいは溶液状態での優れた安定性、〔3〕内核 からの薬物制御放出、〔4〕外殻表面への生体組 織親和性分子あるいは刺激応答分子(インテリ ジェント化)の連結、等の様々な利点が期待され、 DDS用の新剤型として高い有用性が見込まれ 32-4)0

本研究の目的を達成せしめるためのブロック共 重合体としては、〔1〕ミセルの外殻を形成する 親水性のセグメントとミセルの内核としてミクロ 環境を形成するセグメントの2種類の役割分担の 明確なセグメントを有すること、〔2〕薬物等を 導入可能な官能基を有すること、〔3〕良好な生 体適合性を有すること、という3つの特色を備え たポリエチレンオキシド/ポリアミノ酸ブロック 共重合体に着目した。第1年度においては疎水性 ブロックとしてポリ(*B*-ベンジル-L-アスパ ルテート)(PBLA)を選び、種々連鎖長を変え た PEO-PBLA ブロックコポリマーを合成し、 そのミセル形成能と疎水性モデル薬物(ピレン) の取り込み能(Fig.1参照)を評価した。また、 第2年度においては、実際の薬物として疎水性制 ガン剤アドリアマイシン(ADR)の導入を行い、 高分子ミセル型ドラッグとしての有用性について 検討した。



Fig.1 Drug loading of polymeric micelles

2.実験

PEO-PBLA ブロックコポリマーは Fig.2に 示すように、 β -ベンジル-L-アスパルテート-N-カルボン酸無水物(BLA-BCA)を片末端 に一級アミノ基を有するポリエチレンオキサイド を開始剤として、重合することによって合成し た⁵¹。この際、PEOと PBLAの分子量を種々変 えたブロックコポリマーを合成した。これを水溶 液中に溶解し、PEO-PBLAミセルを得た。



Fig.2 Synthesis of micelle-forming AB block copolymers based on PEO and poly (amino acids)

PEO-PBLA ミセルの特性解析については、 蛍光プローブ法により行い、蛍光プローブとして ピレン(Py)を使用した⁶、水溶液中のブロッ クコポリマーの濃度変化に伴うPyモノマーの光 強度変化、および励起スペクトルシフトより、分 子量の異なる各PEO-PBLA ブロックコポリ マーにつきCMCを測定した。その際、Pyモノ マーの蛍光スペクトルの第一ピーク、第三ピーク 比(I/II)より、ミセル内のミクロ極性を調べ た。また、ミセル内核PBLAセグメントの運動 性について、蛍光プローブとして1、3-ビス(1 -ピレニル)プロパン(P3CP)を使用して検討 した。すなわち、P3CPのエキサイマーピーク、 モノマーピーク強度比(Ie/Im)より、PEO-PBLAミセルのミセル内核のミクロ粘性を解析 し、ミセル内PBLAセグメントの運動性を評価 した。さらに、PEO-PBLAミセルへの疎水性 プローブの可溶化については、Pyのエキサイ マー形成、およびPyモノマーの蛍光スペクトル のI/III比変化の導入量依存より導入を確認し、 種々の導入法について検討を行った。

ミセル中へのADR導入は以下のように行った。 ADR塩酸塩をDMF下に少量のトリエチルアミ ンを入れて溶解し、さらにそこにPEO-PBLA ブロックコポリマーを溶かした。一晩暗所で撹拌 の後、溶液を0.1M酢酸バッファー(pH5.5)に 対して透析し、引き続いて蒸留水で透析を行い、 ミセルを得た。ミセル中に捕捉されたADRの量 は485nmの吸光度より算定した。

3. 結果と考察

3.1 ブロック共重合体ミセルの調製とモデル薬物(ピレン)の導入

PEO-PBLAブロックコポリマーは、PEOと PBLA鎖の分子量を種々変えたものについて合 成を行った。PBLA中のBLAユニット数が20 以下でPEOセグメントの分子量が5000以上の試 料は水溶性を示した。また、いずれの試料も水溶 液中でミセルを形成することが動的光散乱測定よ り明らかとなった。平均粒径は約20nm程度であ る。重量平均分布より少量の二次凝集体と考えら れる粒子が平均粒径100nm程度に観察された。 一方、5-10について静的光散乱よりミセル分子 量を算定すると、2.8×10⁶と求められた。これ より、会合数はおよそ400となる。但し、この値 には、二次凝集体の寄与も含まれている。 次に、ピレンの蛍光挙動からこれらブロック共 重合体ミセルの臨界ミセル濃度(CMC)を評価 した。異なる濃度のブロック共重合体共存下にお けるピレンの蛍光スペクトルならびに励起スペク トルをそれぞれFig.3とFig.4に示す。ブロック



Fig.3 Excitation spectra of pyrene in PEO-PBLA aqueous solutions. Sample is 5-10. The Concentration of pyrene is 6.0xe⁻⁷ M.

共重合体の濃度上昇に伴って赤色シフトが認めら れる。特に、ピレンの(0、0)バンドに由来す る334nmのピークがミセルに取り込まれること によって339nmにシフトしていることがわかる。 この励起スペクトルにおける334nmとのピーク 比からCMCを見積ることが可能である"。また、 ピレンの蛍光強度は周囲の極性に依存するため、 蛍光強度変化からもCMCを決定することができ る⁸⁾。Fig.5には、蛍光強度及び339nmと334 nmの強度変化比をブロック共重合体濃度に対し てプロットした結果を示す。図より、約5-10mg/ 1の範囲で蛍光強度あるいはピーク強度比が急激 に変化しており、CMCがこの濃度領域にあるこ とが明らかである。

また、ピレンの蛍光スペクトルにおいて、その 振動微細構造はピレンの置かれている局所極性に



Fig.4 Fluorescence spectra of pyrene in PEO-PBLA aqueous solutions. Sample is 5-10. The concentration of pyrene is 6.0xe⁻⁷M.

敏感であることが知られている(Ham効果)⁹。 そこでバンドI((0、0)バンド)とバンドⅢ ((0、2)バンド)の比(I/Ⅲ比)を取り、ブ ロック共重合体濃度に対してプロットした結果を Fig.6に示す。CMC以下の領域においては、I



Fig.6 I/II vibrational band ratio of pyrene as a function of logarithm PEO-PBLA concentration. The concentration is expressed in units of mg/ml.

✓Ⅲ比は水溶液中のピレン(約1.87)と同程度 の高い値を示すが、CMCを境にその値は小さく なり約1.45程度の値となる。これは、ブロック 共重合体のミセル形成に伴ってピレンがミセル内 核に取り込まれたものと考えられる。アスパラギ ン酸ユニットの保護基であるベンジルアルコール 中では、ピレンのI/Ⅲ比は1.24であり、ミセ ル中の値の方がやや大きい。このことについては、 PBLA 骨格のアミド構造の寄与や内核と外殻界 面に位置するピレンの寄与等が考えられる。以上 の結果より、ブロック共重合体ミセル内核に疎水 性物質を非共有結合的に導入することが可能であ り、さらに低いCMC値からは、このミセル形態



Fig.5 The total fluorescent intensity of monomer emission and the intensity ratio (339/334) from the excitation spectra of pyrene versus logarithm PEO-PBLA.

が熱力学的に極めて安定であることが示された。

3.2 ミセル内核の粘性評価

薬物を安定に内核に保持するためには、内核が 固体状態であることが望ましい。すなわち、内核 局所の粘性が高ければ薬物の局所拡散が妨げられ、 外部へのリリースが抑制されるからである。そこ で、ミセル内核の局所粘性をピレンダイマー(P 3CP)(Fig.7参照)のエキサイマー発光強度か ら見積もることとした。P3CPは粘性の低い環境 下では分子内回転が容易な為、顕著なエキサイ



Fig.7 Structure of 1,3- (1,1'-dipyrenyl) propane (P3CP)

マー発光を480nm付近に示すことが知られてい る10)。このエキサイマー発光強度はミクロ粘性 の上昇とともに低下することから、エキサイマー 発光強度(Ie)とモノマー発光強度(Im)の比 (Ie/Im)より P3CP 周囲のミクロ粘性を評価 することができる¹¹⁾。Fig.8に例を示したが、 SDSミセルに比して、ブロック共重合体ミセル 中ではP3CPエキサイマー発光はほとんど認めら れず、Ie/Im 値も極めて低いことが明らかと なった。すなわち、ブロック共重合体ミセル内核 では、高分子鎖の運動性がかなり低く、そのため に内核に保持された物質の動きも大幅に束縛さ れているものと考えられる。このことは、別途、 'H-NMRにおいてフェニル環のプロトンに由来 するピークがミセル形成後は極端に小さくまたブ ロードになることからも支持された。

次にピレンのミセル内への導入を促進する目的 で、通常の撹拌での導入の他に加温処理、超音波 処理の効果を調べた。Fig.9より、導入量は PEO-PBLAの濃度に依存することが示され、



Fig.8 Fluorescence spectra of 1,3-(1,1'dipyrenyl) propane in PEO-PBLA and SDS micellar solutions. Samples are 12-20 at a concentration of 0.10 mg/ml and SDS at a concentration of 3.0 mg/ml. The concentration of 1,3-(1,1'dipyrenyl) propane is 2.0xe⁻⁷M.

加温処理、超音波処理効果により、水中でのピレンの溶解度(6.0xe⁻⁷M)の500倍を溶解可能であることが示された。この疎水性薬物モデルとしてのピレンの導入測定から、導入法を工夫するこ



Fig.9 The solubilization of pyrene in PEO-PBLA micellar solutions. The loading of pyrene was facilitated by heating at 80°C, sonication. Pyrene has a solubility in water of 6.0xe⁻¹M.

とにより、疎水性物質の導入量をかなり増加する ことが可能であり、PEO-PBLA ブロックコポ リマーの薬物担体としての有用性が期待された。

3.3 ブロック共重合体ミセル中へのアドリアマ イシン(ADR)の導入と安定性の評価

ピレンでの結果をふまえ、実際の薬物として ADRの取り込みを行った。導入法は、実験の項 に詳述したように有機溶媒(DM下)から緩衝 液への透析平衡法である。ミセル中に取り込まれ ないフリーのADRは限外口過により除去した。 この方法により、ミセル重量に対して10%の割 合でADRを導入可能であることがミセルの吸光 度測定より明らかとなった。また、動的光散乱よ り ADR内包ミセルの直径は約35nmと求められ た。この値は、ADRを内包しない場合に比して 若干大きめの値となっている。ADR内包ミセル は凍結乾燥保存が可能であり、再溶解後もミセル 直径に変化のないことが確認された。

次にミセル内に保存されたADRの安定性をゲ ルロ過クロマトグラフィー(GPC)により評価 した。結果をFig.10に示す。Fig.10は、PBS 中に保存したミセルのGPCであるが、排除限界 に単分散のミセルピークが認められる。この試料 を10mg/ml濃度のアルブミン溶液中に共存させ た時の時間経過をあわせてFig.10に示す。5時 間経過後もミセルピークの強度に変化は認められ ず、その安定性が確認された。なお、ウサギ血清 を用いて評価した場合にも同様の結果が得られて いる。また、ミセル内包ADRについては内部遮 蔽効果による著しい消光が認められた。時間経過 とともにわずかな蛍光強度の増加が観察されたが、 その程度は極めて小さく、内核に保持された ADRは、少なくともPBS中ではほとんど外部 に放出されないことが判明した(Fig.11)。

さらに蛍光の消光剤であるヨウ素イオンによる ADR 蛍光の消光度合を調べることから ADRの ミセル内存在状態を評価した。ヨウ素イオンは負 荷電を有しかつ水和しているため、ミセル内核の



Fig.10 Stability of PEO-PBLA micelles after incubation with albumin (10 mg/ml in PBS, 0.1, pH7.4), analyzed by gel permeation chromatograms (GPC). The concentration of ADR is 10 mg/ml.



Fig.11 Fluorescence emission spectra of ADR and PEO-PBLA/ADR micelles in PBS buffer (0.10M, pH7.4). The concentration of ADR is 10 mg/m ℓ .

ような疎水的ミクロ環境には浸透しにくいはずで ある。したがって、ADRがミセル内核に確かに 保持されていればヨウ素イオンにより消光しにく いことになる。その評価は(1)式に示すStern -Volmerの式で行われる。

$$Fo/F=1+Ksv [I^{-}]$$
(1)

ここでFとFoは、I⁻存在下あるいは非存在下 でのADR蛍光強度、Ksvは消光定数でありこの 値が大きい程、消光されやすいこととなる。 Fig.12に結果を示すように、フリーのADRに



Fig.12 Stern-Volmer plots for ADR incorporated into PEO-PBLA micelles in PBS buffer (0.1M, pH7.4). The concentration of ADR is 5 mg /ml.

比してミセル内包ADRではKsvの値が極めて小 さいことがわかる。Ksvは正確には、消光速度 定数(kq)と蛍光寿命(τo)の積であらわさ れる。τoはフリーADRと比べてミセル内包 ADRでは同程度かあるいはむしろ小さい値を示 すことが別途、蛍光寿命の測定から明らかとなっ ている。したがって、ミセル内包ADRで観測さ れた小さいKsv値は、消光速度定数kqが小さい ことに由来するためと結論される。すなわち、 ADRはミセル内核に安定に保持される結果、 I-との衝突頻度が下がり、消光されにくいもの と考えられる。この結果は、ミセル内包ADRが 化学的に安定であることとも一致するものである。

4. 総括

以上の結果より、PEO-PBLA ブロック共重 合体は水溶液系でミセルを形成し、また、その内 核に疎水性薬物を内包可能であることが明らかと なった。ミセル内核は、通常の界面活性剤ミセル と異なり固体状態であるため、保持された薬物は 外部に拡散することなく安定に存在できることが 特徴である。事実、ミセルに保持されたアドリア マイシンはI による消光を受けず化学的にも安 定であることが示された。このブロック共重合体 ミセルは凍結乾燥状態での保存も可能であり製剤 上の利点も大きい。内核に保持し得る薬物として は、アドリアマイシン以外に消炎剤インドメタシ ンも適用可能であることも予備的に確認している。 内包薬物の選択が広く、優れた安定性を有する本 ブロック共重合体ミセルは、薬物や香料等のキャ リアーとして、薬学ならびに化粧品分野において 広範な応用が今後期待できるものと考えられる。

文 献

- Advances in Drug Delivery Systems, Vol. 5, Eds. J. M. Anderson, S. W. Kim, J. Kopecek, Elsevier, Amsterdam, 1993
- K. Kataoka, G. S. Kwon, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, J. Controlled Release <u>24</u>, 119 (1993)
- 3) M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, H. Ekimoto, C. Shibazaki, K. Kataoka, Cancer Res. <u>51</u>, 3229 (1991)
- 4) G. S. Kwon, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, Pharm. Res. <u>10,</u> 970 (1993)
- M. Yokoyama, S. Inoue, K. Kataoka, N. Yui,
 T. Okano, Y. Sakurai, Makromol. Chem. <u>190</u>,
 2041 (1989)
- 6) K. Kalyansundaram, J. Thomas, J. Amer. Chem. Soc. <u>99</u>, 2039 (1990)
- 7) C. Zhao, M. Winnik, G. Riess, M. D. Croucher, Langmuir <u>6</u>, 514 (1990)
- R. C. Mast, L. V. Haynes, J. Colloid Interface Sci. <u>53</u>, 35 (1975)
- 9) A. Nakajima, Bull. Chem. Soc., Jpn. <u>44</u>, 3272

新しいDDS剤型としての高分子ミセルの設計と機能開発

(1971)

- K. A. Zachariasse, W. Vaz, C. Sotomayor, W. Kunhnle, Biochem. Biophys. Acta, <u>688</u>, 323 (1982)
- 11) H. Dangreau, M. Joniau, M. Cuyper, I. Hanssens, Biochemistry, <u>21</u>, 3594 (1982)
- 12) P. Bahadur, N. V. Sastry, T. K. Rao, Colloids and Surfaces <u>29</u>, 343 (1988)