

論文の内容の要旨

論文題目 Functionalization of Poly(Ethylene Glycol) – Poly(D,L-Lactide) Block
Copolymer Micelles and Characterization as Drug Carrier

(和訳 ポリエチレングリコール-ポリ D,L-乳酸ブロック
共重合体ミセルの機能化と薬物担体としての特性評価)

氏名 山本裕二

相反する溶解性を示す 2 成分以上の高分子連鎖がそれぞれブロックを形成して存在するブロック共重合体は、選択溶媒中において高分子ミセルと呼ばれる会合体を形成する。この様な高分子ミセルは、相分離した内殻を有していることから、この内殻に薬物を保持した薬物担体としての利用が考えられ、高分子ミセルは現在、血中で安定に抗癌剤などの疎水性薬物を保持する薬物担体として非常に有望なもの 1 つである。この様な高分子ミセルにおいて、内核を形成する高分子としては親水性で血流中において血漿タンパクの吸着や単核貪食細胞への取り込みを阻害するポリエチレングリコール (poly(ethylene glycol)、(PEG)) が広く用いられている一方で、内殻を構成する高分子としては、抗癌剤などの疎水性薬物内包のための各種の疎水性高分子をはじめとして、様々な高分子の利用が試みられている。この中で、疎水性高分子であるポリ乳酸 (Poly (lactic acid) or Poly (lactide)、(PLA)) は、実際に医用縫合糸の成分として使用されていることから分かるように、毒性が極めて低く、生分解性という biomaterial として非常に重要な特性から内殻を構成する高分子として広く注目されている。よって外殻 PEG/内殻 PLA という組み合わせは薬物担体を目的とした高分子ミセルとして理想的なポリマー構成の一つと考えられており、多少の材料や粒子調整法の違いはあるが、物性、薬物封入といった基本的なものから動物への投与後の血中循環性や臓器への分布を評価した研究まで、非常に多

くの研究が報告されている。しかしながら、これらの研究の動物実験においては、肝臓や脾臓へなどの非特異的な分布が顕著であり、際だった成果を上げていないのが現状である。

本研究においては、この PEG-PLA ミセルの薬物担体としての能力を正確に見極めるため、適切な粒径分布を有する poly(ethylene glycol)-Poly (D,L-lactide)ミセル (PEG-PDLLA ミセル) を用い、その物理化学的性質や、体内動態などの総合的評価を通して詳細な研究を行なった。これらの評価は、分子修飾によって機能性を付与した機能性 PEG-PLA ミセルを通して行ない、このミセル機能化のドラッグデリバリーシステム (DDS) における有用性も同時に検討した。

以下に本論文の各章の概要を示す。

第1章 緒論として、本論文の背景となる DDS の概要と、その中での高分子ミセルの占める位置を、主に長期循環性薬物担体としての観点から様々な研究例を通して述べた。また、本論文で使用した高分子である PEG、PDLLA の主な性質、近年の PEG-PDLLA ミセルにおける研究例等についても記述した。

第2章 本章は2つの節で構成される。前節では PEG-PDLLA ミセルの温度特性を、後節では蛍光物質を内核に修飾した機能性 PEG-PDLLA ミセルを用いてその温度特性と生体条件下での安定性を評価した。

PDLLA は生体温度範囲である約 40°C 付近にガラス転移点 (T_g) を有する。このことは、PEG-PDLLA ミセルがこの温度範囲において、その性質を変化させる可能性を示唆しているが、このような PEG-PDLLA ミセルの熱的性質は未だ明確に示されていない。そこで本章では、薬物担体として重要な物理化学的因子である PEG-PDLLA ミセルの臨界会合濃度 (critical associate concentration, c.a.c.) と見かけの分子量の温度依存性を評価した。研究に使用したポリマーは、potassium methoxy-1-propanolate を開始剤として用いた ethylene oxide と D,L-lactide の逐次開環重合によって重合した。PEG と PDLLA の分子量はそれぞれ 5700、5400 であり、ブロック共重合体の分子量分布は 1.10 であった。透析による溶媒交換によって調製されたミセルの粒径は 34.2nm、多分散度 0.85 であり、数十 nm の平均粒径を持つ分布の狭い会合体であることが示された。存在環境の極性に対応した蛍光スペクトルを示すピレンを用いて算出した c.a.c. の温度依存性は図 1 の様に示され、見かけ上 PDLLA の c.a.c. は PDLLA

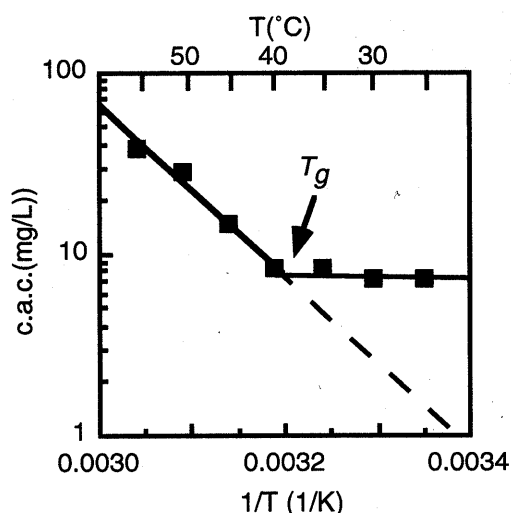


図1 PEG-PDLLAミセルの臨界会合濃度 (c.a.c.) と温度との関係

のTgである37-40℃以上において増加していることが示された。またTg以上におけるc.a.c.の1/Tとの関係を基準として考えると、Tg以下においてはc.a.c.の温度変化が微小でありentropy-drivenなミセル形成/崩壊が示唆された。また静的光散乱によりPEG-PDLLAミセルの見かけの分子量変化を検討したところ、Tg以上での分子量の減少が観察された。この様なc.a.c.、分子量の生体温度範囲での変化は顕著ではないが、以上のようにTg前後での異なる会合体の性質が観察され、温度による薬物担体としての特性、安定性への影響が示唆された。

後節においては内核を構成するPDLLAの末端に蛍光物質ピレン(pyrene)を導入した。このピレンの導入により低濃度でのミセルの検出が可能になったため、ゲルクロマトグラフィー(GPC)による分子量分布の評価を行なった。結果として、静的光散乱と同様にTg以上での分子量の低下が観察されたが、多くのミセルは依然として50万程度の分子量を維持していることも同時に示唆され、生体内を仮定した37℃のアルブミン溶液中においても分子量はほとんど変化がないことが確認された。また、このピレン分子は内核のPDLLAに高度に濃縮されることから、エキサイマー発光を示した。このピレンの蛍光特性の温度依存性を検討したところ、Tg以上において有意なエキサイマー発光の減少が見られ、PDLLA内核の流動性の増加と、それに伴うミセルの分子量低下などを反映するプローブとしての応用性が示唆された。このピレンを導入したPEG-PDLLAミセルのアルブミン溶液、血漿中での蛍光スペクトルは、24または48時間後において、PEG-PDLLAミセルが会合体としての性質を維持していることを示した。

第3章 従来のPEG-PLAミセル薬物担体の報告においては、肝臓・脾臓など細網内皮系臓器への非特異的な分布が無視できない結果が示されている。このような肝臓・脾臓へ取り込み減少させることを念頭に、100nm以下の適切かつ分布の狭い粒径を持つ反応性PEG-PDLLAミセルを用い、荷電分子のPEG末端へ修飾により弱アニオン性の表面電荷を有するPEG-PDLLAミセルを調製し、ミセル表面の機能化を検討した。結果としてアニオン性ジペプチド(チロシルグルタミン酸:Tyr-Glu)の表面修飾率を変化させることにより、微少な表面電荷を精密に制御できることが示された。比較として中性の電荷を有するチロシン(Tyr)も修飾し、この様な異なる表面電荷を有するPEG-PDLLAミセルの Mausにおける尾静脈より投与後の体内動態を評価した。

実験に使用したPEG-PDLLAミセルは中性の電荷(ゼータ電位~0mV)をもつTyr-PEG-PDLLAミセル、弱アニオン性の電荷(ゼータ電位~-10mV)をもつTyr-

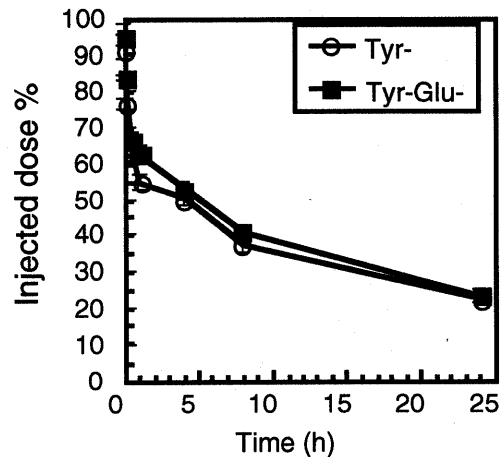


図2 荷電ペプチドを導入したPEG-PDLLAミセルの Maus静脈投与後の血中濃度推移

Glu-PEG-PDLLA ミセルは、共に約 40nm の狭い粒径分布を示した。これらのミセルの静脈投与後の血中消失パターンを図 2 に示す。表面荷電が中性である Tyr-ミセルとアニオン性である Tyr-Glu-ミセルともに投与後直後から 1 時間までの約 70 injected dose % までの迅速な減少と、投与後 1 時間から 24 時間までの約 25 injected dose % までの緩やかで連続的な減少を示唆する二相性のプロファイルを示した。後期の緩やかな減少と 24 時間における約 25 injected dose % という血中残存量の値は PEG-PDLLA ミセルの高い長期循環性を示している。また中性の Tyr-ミセルとアニオン性の Tyr-ミセルとに顕著な違いはなく PEG-PDLLA ミセルにおける表面の微小な表面荷電は血中残存量には影響を与えないことが示唆された。両ミセルの主な組織における分布（肝臓、脾臓、腎臓、肺）も検討した。腎臓と肺における分布は、両ミセルともに図 2 の血中残存率と平行な経過を示し、1 injected dose % 程度と非常に低レベルであった。両臓器での分配係数 K_b 値は 0.2 程度であり血管体積 (0.1) とほぼ同じ程度で、分配のほとんどが血管へのものであることを示した。一方で、肝臓と脾臓への分布は血中消失パターンとは異なり、投与後 24 時間まで時間依存的に増加した。しかしこれら臓器の K_b 値も投与後 8 時間までは血管体積 (0.1ml/g organ) に近く、細胞表面への結合や内部への取り込みは僅かであった。この結果を従来の PEG-PLA ミセルと比較すると、肝臓や脾臓への分布は約一桁小さく、血中消失も非常に遅く、実際に臨床でも用いられている PEG-liposome と同等、またはそれ以上の特性を示すことが示された。特に肝臓と脾臓への分布は他の担体に例を見ないほど低く抑えられており、PEG-PDLLA ミセルの長期循環性薬物担体としての優れた能力が示された。また尿と糞への排泄を 1、24 時間のグループにおいて調べた結果、量ミセル共に 1 時間において約 14 injected dose % が尿へ移出されていることが確認され、血中プロファイルにおける初期の減少の相のうち、この尿への排泄が約半分を占めることが示唆された。GPC における実験においてこれら尿から検出された低分子量物質は PEG 換算で 4000-10000 程度の分子量であることが確認され、分解によって PDDL A 鎖の短くなった共重合体、または血中で解離した共重合体の腎からの排泄が示唆された。一方で、投与後 24 時間における血中内でのミセルの分子量分布は投与前とほぼ同様であることが示され、ミセルが血中で会合体として存在していることが示唆され、第 2 章の安定性評価との相関が見られた。

以上の研究により、PEG-PDLLA ミセルの長期循環性薬物担体としての高い可能性と、その留意すべき特性を物理化学的、生物学的両観点から明らかにした。また、ミセル機能化の確立とその有用性についても示した。

第 4 章 総括として本論文全体の内容をまとめると共に、PEG-PLA (PEG-PDLLA) ミセルの展望、ミセル機能化の応用性についても示した。