

新規方法によるポリ乳酸誘導体の合成と  
それを用いたナノパーティクルの特性

笹津備尚

## 目次

論文リスト	1
略語表	2
緒言	3
第1章 ホルミル基を有する PLA 誘導体を用いた PLA-PEG ブロックコポリマーの 合成とそのポリマーを基剤とするナノパーティクルへの応用	5
1-1 序論	5
1-2 実験の部	6
1-2-1 材料	6
1-2-2 ホルミル基を末端に有する PLA 誘導体(PLA-aldehyde)の合成	6
1-2-3 PLA-(MeO-PEG(N)) および PLA-(MeO-PEG(O))の合成	8
1-2-4 <sup>1</sup> H-核磁気共鳴スペクトル及び GPC による誘導体の確認	9
1-2-5 液中乾燥法によるナノパーティクルの調製	10
1-2-6 溶媒拡散法によるナノパーティクルの調製	10
1-2-7 粒子の特性	11
1-2-8 DiD 封入ナノパーティクルの調製とその粒子特性	11
1-3 結果	13
1-3-1 PLA-acetal および PLA-aldehyde の合成	13
1-3-2 PLA-(MeO-PEG(N))および PLA-(MeO-PEG(O))の合成とその特性	14
1-3-3 PLA-(MeO-PEG(N))および PLA-(MeO-PEG(O))を用いたナノパーティクルの 粒子特性	16
1-3-4 DiD 封入 PLA-(MeO-PEG(N))ナノパーティクルの調製と粒子特性	18
1-4 考察	20

1-5 小括	26
第2章 PLA-(MeO-PEG)を基剤としたナノパーティクルの <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> に おける特性	27
2-1 序論	27
2-2 実験の部	28
2-2-1 試料および試薬	28
2-2-2 動物	28
2-2-3 ポリマー合成	28
2-2-4 <sup>1</sup> H-NMR とゲル浸透クロマトグラフィー	31
2-2-5 未封入および DiD 封入ナノパーティクルの調製	32
2-2-6 <i>In vitro</i> におけるナノパーティクルの特性	33
2-2-7 体内分布の検討	34
2-2-8 血漿と血球における DiD の分布	35
2-3 結果及び考察	36
2-3-1 PLA-(MeO-PEG)の合成とその特性	36
2-3-2 <i>In vitro</i> における、未封入および DiD 封入ナノパーティクルの粒子特性	38
2-3-3 尾静脈内投与後の DiD の体内分布	41
2-4 小括	44
第3章 PLA-Pyrene を封入した PLA-(MeO-PEG)ブロックコポリマーを基剤とした ナノパーティクルの調製と体内分布	45
3-1 序論	45
3-2 実験の部	46
3-2-1 試料および試薬	46

3-2-2	動物	46
3-2-3	ポリマーの合成	46
3-2-4	PLA-Pyrene の合成	48
3-2-5	$^1\text{H-NMR}$ とゲル浸透クロマトグラフィー	50
3-2-6	PLA-Pyrene 封入ナノパーティクルの調製	50
3-2-7	In vitro における粒子特性	52
3-2-8	担がんマウスの作成	52
3-2-9	体内分布の検討	53
3-3	結果および考察	55
3-3-1	PLA-(MeO-PEG)の合成と特性	55
3-3-2	PLA-Pyrene の合成と特性	57
3-3-3	In vitro における粒子特性	58
3-3-4	尾静脈内投与後のナノパーティクルの体内分布	62
3-4	小括	66
	総括	67
	謝辞	69
	引用文献	70

## 論文リスト

本論文は、以下の発表論文から構成されている。

- 1) Preparation of a PLA-PEG block copolymer using a PLA derivative with a formyl terminal group and its application to nanoparticulate formulation, Sasatsu, M., Onishi, H., Machida, Y., *Int. J. Pharm.* 294, 233–245 (2005).

(第1章)

- 2) In vitro and in vivo characterization of nanoparticles made of MeO-PEG amine/PLA block copolymer and PLA, Sasatsu, M., Onishi, H., Machida, Y., *Int. J. Pharm.* 317, 167–174 (2006).

(第2章)

- 3) Preparation and biodisposition of methoxypolyethylene glycol amine-poly (dl-lactic acid) copolymer nanoparticles loaded with pyrene-ended poly(dl-lactic acid), Sasatsu, M., Onishi, H., Machida, Y., *Int. J. Pharm.* 358, 271–277 (2008).

(第3章)

## 略語表

本論文においては、以下の略語を使用する。

CPT	camptothecin
DMSO	dimethylsulfoxide
DDS	drug delivery system、薬物送達システム
DiD	1,1-Dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindodicarbocyanine
EPR	enhanced permeability and retention
GPC	gel permeation chromatography
<sup>1</sup> H-NMR	proton nuclear magnetic resonance
HPLC	high-performance liquid chromatography
MeOH	methanol
MW <sub>GPC</sub>	GPC より算出した分子量
MW <sub>n</sub>	数平均分子量
MeO-PEG	methoxypolyethylene glycol
MeO-PEG-NH <sub>2</sub>	methoxypolyethylene glycol amine
PBS	phosphate buffered saline
PEG	polyethylene glycol
PLA	poly (dl-lactic acid)
PLA-(MeO-PEG(N))	} MeO-PEG-NH <sub>2</sub> と PLA-aldehyde を用いて合成した ブロックコポリマー
PLA-(MeO-PEG)	
PLA-(MeO-PEG(O))	MeO-PEG と DL-ラクチドを用いて合成したブロックコポリマー
PLA-Pyrene	ポリ乳酸の末端に Aminopyrene を導入した誘導体

## 緒言

薬物療法において、**Quality of life** やコンプライアンスの向上を図る目的で、薬効の改善や副作用の軽減は重要な課題となっている。特にカンプトテシン (CPT) やパクリタキセルなどの脂溶性の抗悪性腫瘍薬は強い効果を有する半面、低い水溶性や副作用などが問題になっている。このような問題に対し、薬物担体を応用することで薬物の投与を容易にし、薬効の改善や副作用を軽減することが試みられている。高分子ナノパーティクル、リポソーム、**solid-lipid** ナノパーティクルを代表とする薬物担体（微粒子担体）は、近年、薬物送達システム (DDS) の概念を基本として、抗悪性腫瘍薬を用いた薬物療法の改善を目的として研究されている<sup>1-6)</sup>。このような薬物担体による改善は、受動的ターゲティングにより、患部つまり標的とする部位に薬物を集積させることにより達成される。その条件として、薬物担体の粒子径を数十~400 nm にすること、また担体表面を親水化することなどが挙げられるが、それらの条件を満たすことで血中での滞留性が向上し、血管透過性が亢進した腫瘍組織等に集積しやすくなることが明らかになっている。このような現象は、**EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention Effect)** と呼ばれている<sup>7-12)</sup>。

著者は、薬物担体の中でも特に高分子に注目し研究を進めてきた。高分子担体の基剤としては、生体内分解性及び生体適合性を有するものが安全性の面から頻繁に利用され、ポリ乳酸 (PLA) や乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) な

どは、これら両方の機能を有することが知られている<sup>13, 14)</sup>。さらに、近年、PLA や PLGA の誘導体が、新たな薬物担体としての可能性探索を目的として、研究開発されている。特に、PLA-PEG 共重合体はその DDS への利用が盛んに試みられている高分子である<sup>16, 17)</sup>。PLA-PEG 共重合体の合成法としては、DL-ラクチドと PEG または MeO-PEG を開始剤とした開環重合法が一般的である<sup>2, 17-19)</sup>。しかしながら、この方法では PLA に導入できるリガンドが開始剤により決定されるため、PEG や MeO-PEG 以外のリガンドを導入した PLA 誘導体を合成することは難しい。

第 1 章では、PLA への PEG 誘導体及びその他の種々のリガンドの導入を可能にする、より応用範囲の広い合成法について検討を行った。すなわち PLA に新たなリガンドを導入するために、PLA の末端に反応性の高いホルミル基を導入した誘導体の合成に着手し、得られた誘導体のホルミル基と、アミノ基を有する化合物との間の還元的アミノ化により、種々のリガンドの導入が可能かどうか検討を行った。さらに、得られた誘導体のナノパーティクルへの利用を試みた。

第 2 章では PLA 誘導体合成法の改善を行い、得られた PLA 誘導体を担体として利用し、脂溶性蛍光物質を薬物モデルとして調製したナノパーティクルの特性およびナノパーティクルの分布について検討した。

第 3 章では開発した新規合成法を用いた蛍光 PLA 標識体の合成とそれを用いたナノパーティクルの特性の解明について検討した。

## 第1章 ホルミル基を有する PLA 誘導体を用いた PLA-PEG ブロックコポリマーの合成とそのポリマーを基剤とするナノパーティクルへの応用

### 1-1 序論

PLA-PEG の合成法に関しては、PEG を開始剤として合成するものがほとんどである。そこで、本章では PLA 誘導体の新規合成法について検討した。すなわち、PLA の末端に反応性の高いアルデヒドを有する PLA 誘導体を合成し、アルデヒドを介してアミノ基を有する化合物を還元アミノ化により PLA に結合させる方法である。PLA-aldehyde は、まず DL-ラクチドと 3,3-diethoxy-1-propanol を開環重合して末端にアセタールを有する PLA を合成し、そのアセタールを加水分解してアルデヒドに変換することによる調製を検討した。

また、得られた誘導体の特性を調べるとともに、その誘導体を用いて MeO-PEG-NH<sub>2</sub> を還元アミノ化により結合させ PLA-(MeO-PEG(N)) として、その特性と粒子化への応用も検討した。粒子の調製法として、液中乾燥法および溶媒拡散法を検討し、粒子径やゼータ電位を測定した。さらに従来の合成法で得られた PLA-(MeO-PEG(O)) につき、ポリマーの特性やそれから調製された粒子について、新規方法による PLA-(MeO-PEG(N)) と比較検討を行った。また、脂溶性蛍光物質である DiD をモデル薬物としてナノパーティクルに封入し、その粒子特性についても検討した。

## 1-2 実験の部

### 1-2-1 材料

MeO-PEG(分子量; 2,000)、MeO-PEG-NH<sub>2</sub>(分子量; 2,000)、3,3-diethoxy-1-propanol、オクチル酸スズは Sigma 社から購入し、DL-ラクチドは東京化成社製のものを使用した。その他の試薬は、すべて市販の特級品を使用した。

### 1-2-2 ホルミル基を末端に有する PLA 誘導体(PLA-aldehyde)の合成

PLA の末端にホルミル基を導入した PLA-aldehyde は、Fig. 1-1 のように、開環重合法を用いて PLA にアセタールを導入したもの(PLA-acetal)を介して合成した。

酢酸エチルからの再結晶により精製した DL-ラクチド 6 g と 3,3-diethoxy-1-propanol (50、100、150 mg)を窒素置換した三口フラスコ内に入れ、無水トルエン 45 mL を加え 200 rpm で攪拌し、オイルバス中 120-160°C で完全に溶解した。そこへ、無水トルエン 5 mL に溶かしたオクチル酸スズ 30 mg を加え、約 5 時間 120-160°C で加熱還流を行った。還流終了後反応を完了させるため冷却し、1 日放置した。その後 60°C でロータリーエバポレーターによりトルエンを完全に留去し、残留物にジクロロメタン 120 mL を加え完全に溶解し吸引ろ過を行った。得られたろ液は 60°C の激しく攪拌(400 rpm)した精製水 200 mL 中に投入した後、ジクロロメタンを蒸発させ再沈殿させた。さらに一晚放置した後、水相を除去することで沈殿物を採取した。

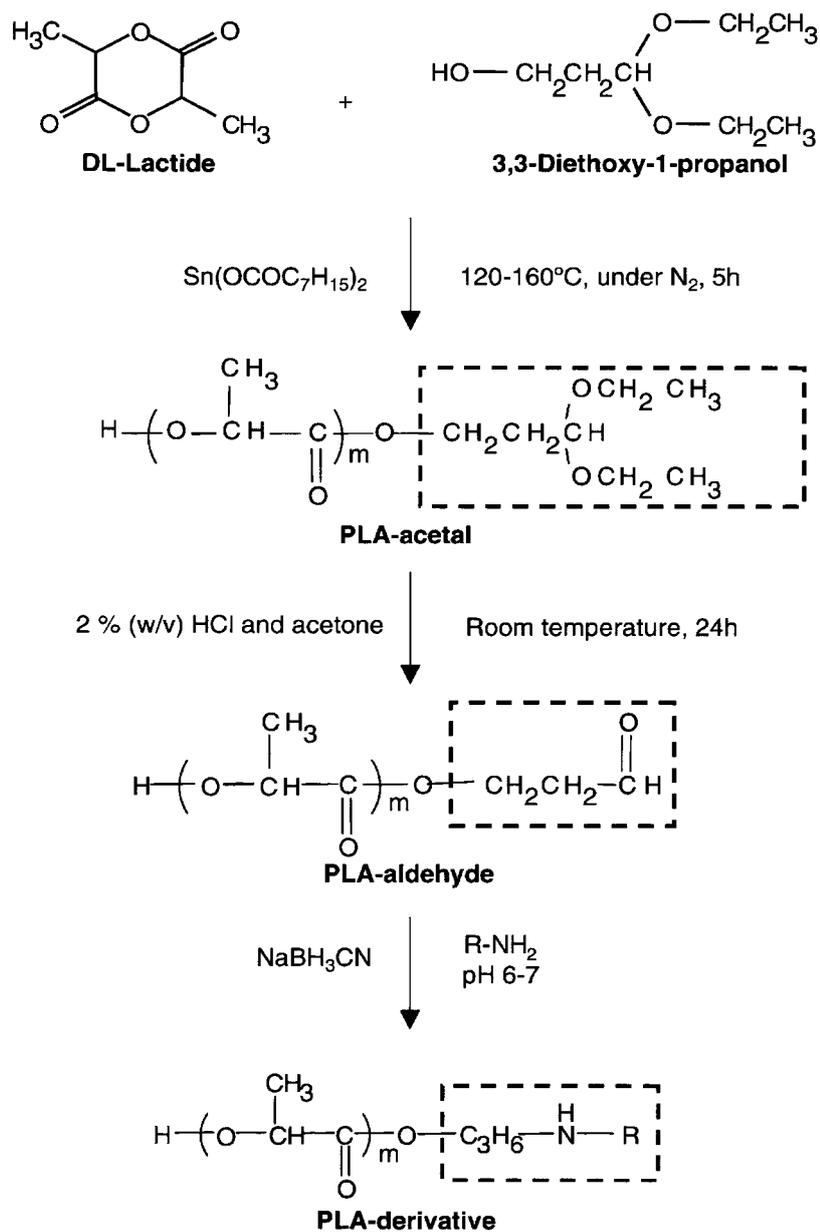


Fig. 1-1. Synthetic procedure of PLA-derivatives

その後、沈殿物をジクロロメタンに再溶解し、水分を無水硫酸ナトリウムを使って完全に除去し、溶媒を留去して PLA-acetal を得た。

PLA-aldehyde は PLA-acetal を加水分解することで得た。すなわち、得られた PLA-acetal 200 mg をアセトン 80 mL に溶解し、そこに 2 % (w/v) HCl を 30 mL

加えて懸濁させ、室温で 24 時間マグネチックスターラーを用いて攪拌した。これにより PLA-acetal のアセタールを酸加水分解によりホルミル基に変換した。反応後、アセトンを除去することで沈殿物を得た。沈殿物は水で洗い、乾燥させることで PLA-aldehyde を得た。

### 1-2-3 PLA-(MeO-PEG(N)) および PLA-(MeO-PEG(O))の合成

アミノ基を有する分子量 2,000 の MeO-PEG-NH<sub>2</sub> 300 mg と、(2)で得られた PLA-aldehyde 200 mg を混合し、シアノ水素化ホウ素ナトリウム 25 mg 触媒下、テトラヒドロフラン (THF) /メタノール (MeOH) (1:1、 v/v) 混液 25 mL 中、室温で 12 時間マグネチックスターラーを用いて攪拌した。この反応中、pH 6-7 を保つように 0.1N HCl と 0.1N NaOH を用いて調整した。反応後は有機溶媒を完全に留去し、残った懸濁液を凍結乾燥した。その後、凍結乾燥したものをクロロホルムに溶解し、HPLC を用いた GPC と限外ろ過を行うことで、未反応の MeO-PEG-NH<sub>2</sub> や不純物を除去し、PLA-(MeO-PEG(N))を得た。

PLA-(MeO-PEG(O))は、以下に示す開環重合により合成した。まず、酢酸エチルからの再結晶により精製した DL-ラクチド 5 g と MeO-PEG 0.84 g を窒素置換した三口フラスコ内に入れ、トルエン 15 mL を加え 200 rpm で攪拌し、約 120°C のオイルバス中で完全に溶解した。そこへ、トルエン 5 mL に溶かしたオクチル酸スズ 0.02 g を加え、約 6 時間 120°C で加熱還流を行った。還流終了後反応を完了させるため冷却し、1 日放置した。その後 70°C でロータリーエバポレー

ターによりトルエンを完全に留去し、残留物にジクロロメタン 20 mL を加え完全に溶解し吸引ろ過を行った。得られたろ液は 60℃の激しく攪拌(400 rpm)した精製水 200 mL 中に投入した後、ジクロロメタンを蒸発させ再沈殿させた。さらに 2 時間攪拌し 5 時間ほど放置した後、沈殿物を目皿ロートを用い吸引し採取した。その後、沈殿物をジクロロメタンに再溶解し、水分を無水硫酸ナトリウムを使って完全に取り除き、溶媒を留去し、PLA-(MeO-PEG(O))を得た。

#### 1-2-4 <sup>1</sup>H-核磁気共鳴スペクトル及び GPC による誘導体の確認

合成した各反応生成物の構造及び分子量は、重クロロホルムを溶媒として<sup>1</sup>H-核磁気共鳴スペクトル (<sup>1</sup>H-NMR) (JNM-GX 270 分光計:日本電子株式会社)によって確認した。

また、反応により得られた PLA 誘導体の分子量を GPC により測定した。ここで HPLC による GPC は、以下の条件で行った。

クロマトパック : C-R7A plus [島津製作所]

検出器 : RID-10A [島津製作所]

ポンプ : LC-6AD [島津製作所]

カラム : GPC K-800 8 mm×300 mm [Shodex]

カラム温度 : 室温

流速 : 1.0 mL/min

移動相 : クロロホルム

分子量マーカー：Polystyrene (分子量;  $3.00 \times 10^3$ ,  $1.09 \times 10^4$ ,  $2.86 \times 10^4$ ) [Shodex]

#### 1-2-5 液中乾燥法によるナノパーティクルの調製

PLA-(MeO-PEG(N)) 30 mg をジクロロメタン 2 mL に溶解し、これを精製水 20 mL 中に投入した。その後、ボルテックスミキサー(AUTOMATIC LAB-MIXER HM-10H: iuchi)を用い 3 分間攪拌し、45 kHz (100 W)の超音波照射(VS-100III SUNPAR: iuchi)を 5 分間行うことにより O/W 型エマルジョンを得た。この O/W 型エマルジョン中に存在するジクロロメタンを除去するために、室温で 2 時間、ドラフト内でマグネチックスターラーを用いて攪拌を行い、最終的に、ナノパーティクルの水性懸濁液を得た。

#### 1-2-6 溶媒拡散法によるナノパーティクルの調製

溶媒拡散法によるナノパーティクルの調製は、以下に示す A、B、C の 3 法により行った。

A : PLA-(MeO-PEG(N)) 30 mg をアセトン 10 mL 及びエタノール 5 mL の混液に溶解し、これにアセトンと等量の精製水を徐々に加え乳化させた後、18℃でロータリーエバポレーターにより有機溶媒を除去し、ナノパーティクルの水性懸濁液を得た。

また PLA-(MeO-PEG(O))についても、本法によりナノパーティクルの調製を行った。

B : PLA-(MeO-PEG(N)) 30 mg をアセトン 2 mL 及びエタノール 1 mL の混液に溶解し、これを攪拌している精製水 5 mL 中に徐々に滴下することで乳化させた。その後、室温でロータリーエバポレーターにより有機溶媒を除去し、ナノパーティクルの水性懸濁液を得た。

C : PLA-(MeO-PEG(N)) 30 mg をアセトン 2 mL 及びエタノール 1 mL の混液に溶解し、これをボルテックスミキサーで攪拌中の精製水 5 mL に滴下することで乳化させ、45 kHz (100 W)の超音波を 1 分間照射した。その後、18℃でロータリーエバポレーターにより有機溶媒を除去し、ナノパーティクルの水性懸濁液を得た。

PLA-(MeO-PEG(O))についても、本法によりナノパーティクルの調製を行った。

#### 1-2-7 粒子の特性

ナノパーティクルの粒子径、粒度分布およびゼータ電位は、精製水に懸濁した状態で ELS-800 動的光散乱光度計(大塚電子株式会社)を用いて測定した。

#### 1-2-8 DiD 封入ナノパーティクルの調製とその粒子特性

DiD 封入ナノパーティクルは溶媒拡散法 B を用いて調製した。PLA-(MeO-PEG(N)) 30 mg と DiD 1 mg をアセトン 2 mL 及びエタノール 1 mL の混液に溶解し、これを攪拌している精製水 5 mL へ徐々に滴下することで乳化させた。その後、室温でロータリーエバポレーターにより有機溶媒を除去し、ナノパー

ティクルの水性懸濁液を得た。未封入の DiD はゲルろ過により取り除いた。ゲルろ過には Sephadex G-50 column (2.5 cm×15 cm) を用い、移動相には 0.45 % 塩化ナトリウム水溶液を用いた。

封入された DiD 量および調製時における DiD の回収率を Beckman DU-640 spectrophotometer (644 nm) により測定した。また、4'-methoxyacetophenone を標準物質として、<sup>1</sup>H-NMR によりポリマー量および調製時におけるポリマーの回収率を測定した。

さらにそれらのデータから含有率及び封入効率を計算した。

### 1-3 結果

#### 1-3-1 PLA-acetal および PLA-aldehyde の合成

PLA にホルミル基を導入するにあたり、ジメチルホルムアミドを溶媒として acetaldehyde diethylacetal bromide を用いて PLA に直接アセタールの導入を試みた。しかしながらこの反応におけるアセタールの導入率は、約 10 %以下と非常に低く、その後の反応への応用が困難であった。その為、開環重合法による PLA-acetal 合成につき検討を行った。本実験においては、3,3-diethoxy-1-propanol を開始剤、オクチル酸スズを触媒として DL-ラクチドの開環重合を行った。PLA-acetal の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを Fig. 1-2 に示す。

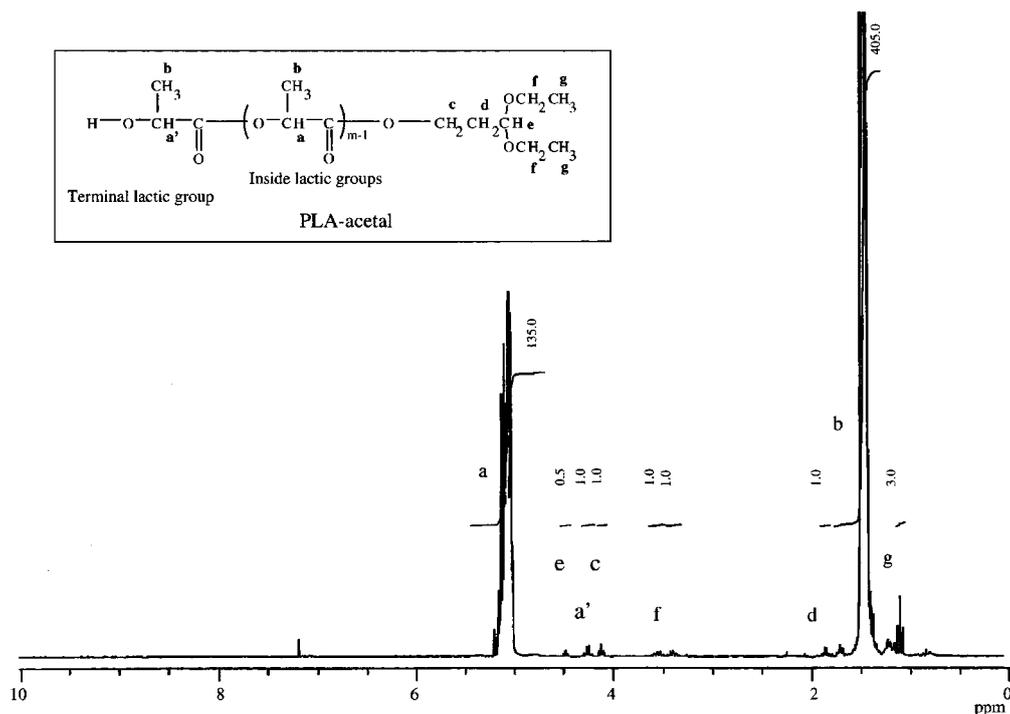


Fig. 1-2. Representative  $^1\text{H-NMR}$  spectra of PLA-acetal. The spectrum is for the product obtained with the formulation 4.

また 3,3-diethoxy-1-propanol の導入率は  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルにおける 3,3-diethoxy-1-propanol のメチンと PLA の末端のメチンの積分強度の比率により算出した(Fig. 1-2)。Table 1-1 には各処方における PLA-acetal の特性を示す。ポリマーの重合度とアセタールの導入率は、3,3-diethoxy-1-propanol と DL-ラクチドの比率ではなく、反応温度による影響が強いことがわかる。すなわち、反応温度を上げることにより、重合度とアセタールの導入率は高くなる結果となった。

PLA-acetal のアセタールを加水分解しアルデヒドに変換するために、反応溶媒として HCl 水溶液を用いたが、その反応は不十分なものとなった。そこで、反応溶媒としてアセトンと 2% (w/v) HCl の混液を用いたところ、十分な反応が得られた。この反応により得られた PLA-aldehyde の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルでは、Fig. 1-2 におけるシグナル e, f そして g が消失し、ホルミル基のプロトンが 9.74 ppm (溶媒 :  $\text{CDCl}_3$ ) に出現した。また、PLA-aldehyde の PLA 部位における重合度は PLA-acetal の PLA 部位とほとんど変化はなかった。積分強度によりアセタールからアルデヒドの反応効率を算出したところ、反応により多少変化はあるものの、その反応効率は約 80%であった。

### 1-3-2 PLA-(MeO-PEG(N))および PLA-(MeO-PEG(O))の合成とその特性

PLA-(MeO-PEG(N))は PLA-aldehyde と MeO-PEG(N)との間でシッフ塩基を形成させ、シアノ水素化ホウ素ナトリウムにより還元することによって得た。

Table 1-1.  
Structural characteristics of PLA-acetal produced under various preparative conditions

Formulation	D,L-lactide (g)	3,3-Diethoxy-1-propanol (g)	Reaction temperature (°C)	Polymerization degree of PLA moiety <sup>a</sup>	Diethoxy/PLA <sup>a</sup> (% mol/mol)
1	6	0.05	120	68-71	22-45
2	6	0.1	120	58-67	42
3	6	0.15	120	67-82	40
4	6	0.05	140	123-135	49-54
5	6	0.05	160	179-244	70-85

<sup>a</sup> The values were determined by <sup>1</sup>H-NMR measurement in CDCl<sub>3</sub>.  
The results are expressed as the range given by some experiments (*n* = 2-3).

Table 1-1 より、処方 5 で合成した PLA-acetal のアセタール導入率は非常に高く、それを加水分解させて得た PLA-aldehyde を PLA-(MeO-PEG(N))の材料とした。PLA に対する MeO-PEG(N)の導入率は <sup>1</sup>H-NMR スペクトルから算出した。Fig. 1-3 は、同じロットの PLA-acetal と PLA-(MeO-PEG(N))の GPC の結果である。これらの結果から、標準物質により検量線を作成し分子量(MW<sub>GPC</sub>)を算出した。

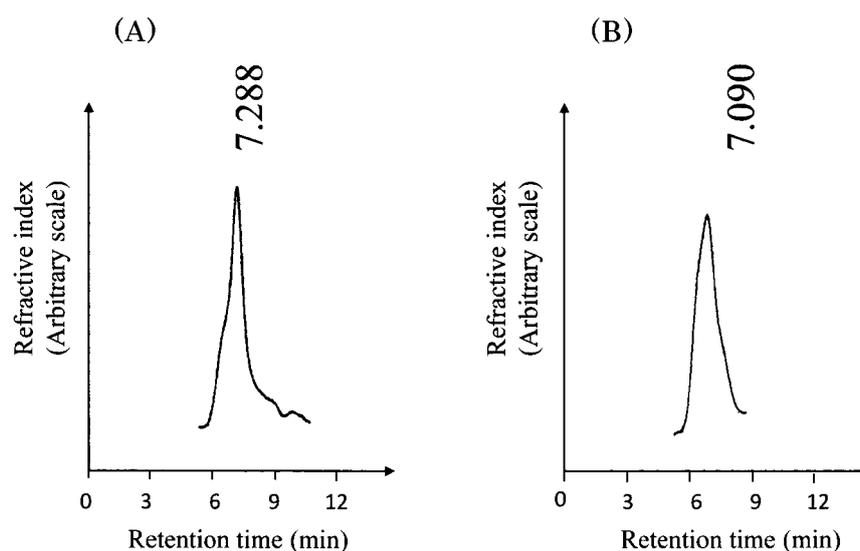


Fig. 1-3. Gel permeation chromatograms of PLA-acetal (A) and PLA-(MeO-PEG(N)) (B). Retention time of PS standard markers (min): PS(MW  $2.86 \times 10^4$ ) 6.86; PS(MW  $1.09 \times 10^4$ ) 7.83; PS(MW  $3 \times 10^3$ ) 9.14. The PLA-acetal (A) was obtained with the formulation 5 (Table 1). The PLA-(MeO-PEG(N)) (B) was prepared using PLA-aldehyde (51% (mol/mol) formyl/PLA), derived from the PLA-acetal (A)

その結果、Table 1-2 に示すように  $MW_{GPC}$  は  $MW_n$  と相関することがわかった。

Table 1-2.  
Molecular weight characteristics of PLA-acetal and PLA-(MeOPEG(N))

PLA derivative <sup>a</sup>	$MW_{GPC}$ <sup>b</sup>	$MW_n$ <sup>c</sup>	$MW_{GPC}/MW_n$
PLA-acetal	22900	13100	1.7
PLA-(MeO-PEG(N)) <sup>d</sup>	25300	15800	1.6

<sup>a</sup> The derivatives are the polymers shown in Fig. 1-3.

<sup>b</sup> Determined by GPC.

<sup>c</sup> Determined by <sup>1</sup>H-NMR spectra in CDCl<sub>3</sub>.

<sup>d</sup> This product was synthesized using PLA-aldehyde (51% (mol/mol) formyl/PLA).

Table 1-3 には Fig. 1-2 と Table 1-2 で示した PLA-(MeO-PEG(N))と PLA-(MeO-PEG(O))における PEG の導入率および反応効率の比較を示す。

Table 1-3.  
Introduction degree of Me-PEG(N) or MeO-PEG(O) to PLA

PLA derivative	PEG/PLA <sup>a</sup> (%, mol/mol)	Reaction efficiency <sup>a</sup> (%)
PLA-(MeO-PEG(N)) <sup>b</sup>	39	76
PLA-(MeO-PEG(O))	73	73

<sup>a</sup> Determined by <sup>1</sup>H-NMR spectra in CDCl<sub>3</sub>.

<sup>b</sup> This product was the polymer shown in Fig. 1-3 and Table 2, and synthesized using PLA-aldehyde (51% (mol/mol) formyl/PLA).

使用した PLA-(MeO-PEG(N))の反応効率は 39 %であり、Table 1-4、Table 1-5 で示した他のロットのものより高い値となった。しかしながら、PLA-(MeO-PEG(O))の PEG 導入率は 73 %とさらに高い値となった。

### 1-3-3 PLA-(MeO-PEG(N))および PLA-(MeO-PEG(O))を用いたナノパーティクル

#### ルの粒子特性

Table 1-4 には、ロットの異なる PLA-(MeO-PEG(N))を用いて、液中乾燥法お

よび溶媒拡散法で得られたナノパーティクルの粒子特性について示した。また、使用したポリマーの分子量や PEG 導入率の相違についても示した。

Table 1-4.  
Particle characteristics of PLA-(MeO-PEG) nanoparticles produced by various polymer species and different preparative methods

Nanoparticles	Polymer	MWn of polymer	PEG/PLA (% mol/mol)	Method	Mean diameter <sup>a</sup> (nm)
NP-N1	PLA-(MeO-PEG(N))	17600	33	Emulsification-evaporation	337.8 ± 48.2
NP-N2	PLA-(MeO-PEG(N))	27900	30	Solvent diffusion A	244.7 ± 9.2
NP-O1	PLA-(MeO-PEG(O))	10100	73	Solvent diffusion A	58.5 ± 0.4
NP-N3	PLA-(MeO-PEG(N))	17600	31	Solvent diffusion B	107.7 ± 3.6
NP-N4	PLA-(MeO-PEG(N))	19000	25	Solvent diffusion B	134.8 ± 4.4
NP-N5	PLA-(MeO-PEG(N))	27900	30	Solvent diffusion C	59.4 ± 0.3
NP-N6	PLA-(MeO-PEG(N))	19000	25	Solvent diffusion C	71.5 ± 0.6
NP-O2	PLA-(MeO-PEG(O))	10100	73	Solvent diffusion C	58.2 ± 1.1

<sup>a</sup> The results are expressed as the mean ± S.D. ( $n = 3$ )

Table 1-4 より、液中乾燥法で調製したナノパーティクルは粒子径が 300-400 nm であったのに対し、溶媒拡散法 A を用いて調製したナノパーティクルは粒子径 240 nm であった。また、溶媒拡散法 B を用いた場合には、その粒子径が 100-140 nm であった。アセトンと水の混液を使用し、さらに超音波処理を行った溶媒拡散法 C を用いた場合、粒子径は 50-80 nm と最も小さいものとなった。この結果により、今回調製した PLA-(MeO-PEG(N))ナノパーティクルの粒子径は、ポリマーの分子量や PEG の導入率よりも調製法に依存することがわかった。

PLA-(MeO-PEG(O))を用いて溶媒拡散法 A と C で調製したナノパーティクルは、約 60 nm とほぼ同様の粒子径であることが判明した(Table 1-4)。

Table 1-5.  
Comparison of electric surface potential of PLA-(MeO-PEG) derivative nanoparticles

Nanoparticles	Polymer	MWn of polymer	PEG/PLA (%, mol/mol)	Mean diameter (nm)	Zeta potential <sup>a</sup> (mV)
NP-O2	PLA-(MeO-PEG(O))	10100	73	58.2	-13.2
NP-N5	PLA-(MeO-PEG(N))	27900	30	59.4	-22.2
NP-N7	PLA-(MeO-PEG(N))	17900	24	62.3	-43.2

<sup>a</sup> The results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 1-2$ )

Table 1-5 には同程度の粒子径を示した各ナノパーティクルのゼータ電位を示した。どのナノパーティクルも負電荷を帯びているものの、ポリマーの性質によりその電位が異なることがわかる。すなわち、PEG の導入率が低いものの方がより高い負電荷を帯びている結果となった。

#### 1-3-4 DiD 封入 PLA-(MeO-PEG(N))ナノパーティクルの調製と粒子特性

DiD 封入 PLA-(MeO-PEG(N))ナノパーティクルは溶媒拡散法 B を用いて調製した。この調製法を選択した理由として、Table 1-4 に示したように、得られた粒子が 100-140 nm の大きさを有することがある。この粒子の大きさは、PEG コーティングされたリポソームにおいて、固形がんに対するターゲティングには最適な粒子径であるとの報告がなされている<sup>20)</sup>。

Table 1-6 は DiD 封入 PLA-(MeO-PEG(N))ナノパーティクルの粒子径、DiD 含有率、ポリマーの回収率、DiD の回収率および DiD の封入効率を示したものである。Table 1-6 の結果より、DiD 封入 PLA-(MeO-PEG(N))ナノパーティクルの粒子径は  $218.5 \pm 2.1$  nm、ポリマーの回収率は  $55.8 \pm 2.1$  % (w/w)、DiD の含有率  $2.7 \pm 0.3$  %、DiD の回収率は  $52.0 \pm 4.0$  %であった。また、DiD の封入効率は

96.1 ± 10.3 % (w/w)であった。

Table 1-6.

Particle characteristics of DiD-containing PLA-(MeO-PEG(N)) nanoparticles obtained by the modified solvent diffusion method B

Mean diameter (nm)	DiD content (% w/w)	Recovery of polymer (% w/w)	Recovery of (% w/w)	Incorporation efficiency (%)
218.5 ± 2.1	2.7 ± 0.3	55.8 ± 2.0	52.0 ± 4.0	96.1 ± 10.3

All the results are expressed as the mean ± S.D. ( $n = 3$ ).

#### 1-4 考察

PLA-PEG diblock copolymer<sup>15,16)</sup>、poly(l-lactide)-PEG-poly(l-lactide) triblock copolymer<sup>21)</sup>、PLGA-PEG-PLGA triblock copolymer<sup>22)</sup>などの PLA 誘導体は、ナノパーティクルの水性懸濁液を安定化させることで注目を集めている。また、PLA はその生体内適合性および生体内分解性より、薬物担体としてしばしば選択される。しかしながら、PLA のみからなるナノパーティクルは脂溶性である点とオプソニン化を受けやすい性質により、急速に全身クリアランスの影響を受ける<sup>15, 16, 23-26)</sup>。しかしながら、PLA ナノパーティクルの表面構造を改善することで、その薬物動態的性質を変えることができる。ナノパーティクルをブロックコポリマーで調製すると、その表面に形成される PEG 層により補体や細胞表面への接触を抑えることができ、その結果血中滞留性を向上させることができる<sup>15, 16, 25)</sup>。このような脂溶性ポリマーと PEG からなるブロックコポリマーで調製されたナノパーティクルは、固形腫瘍などの病巣部位に対し、EPR 効果による受動的ターゲティングに応用されている<sup>7, 27)</sup>。PEG-PLA ナノパーティクルを薬物担体として使用することで、抗悪性腫瘍薬の効果を大幅に改善できたという報告もある<sup>28)</sup>。

高分子やリポソームなどの担体は、糖鎖や抗体などで修飾することが既に試みられている。そのような修飾により高分子-薬物複合体や薬物封入リポソームの薬物動態的特性は改善される。近年、高分子ナノパーティクルにより良い機能を付加するために、PLA-PEG の改良がさらに試みられ、PLA-PEG がナノパ

ーティクルの生物学的特性を変化させることが報告されている<sup>2, 17-19)</sup>。そこで本研究では、様々な PLA 誘導体を容易に得られる合成法について検討した。すなわち、PLA を容易に修飾できるように、PLA の末端を反応性が高く有用なアルデヒドで修飾した PLA(PLA-aldehyde)の合成法について試みた。

はじめに PLA の末端にアセタールを導入するために、acetaldehyde diethylacetal bromide を直接 PLA に導入することを試みたが、十分な結果が得られなかった。一方、3,3-diethoxy-1-propanol を開始剤とした DL-ラクチドの開環重合による反応では、アセタールの導入率が 30-80%(mol/mol)という結果が得られた。また反応温度が高いほど高い導入率と重合度が得られ、160°Cが至適温度と考えられた。すなわち、高温下において重合が促進されると考えられる。しかしながら、誘導体化は完全には行われず、ロットによってアセタールの導入率や重合度に変化の生じることが確認された。副反応物質として得られたものは PLA であり、これは開環してしまった DL-ラクチドもしくは周辺に存在する水分子が開始剤となり得られたものであると考えられる。

PLA-aldehyde は PLA-acetal を加水分解することにより得られた。しかしながら、HCl 水溶液による単純な PLA-acetal の加水分解では、PLA-aldehyde は十分に得られなかった。この理由として PLA-acetal の水に対する溶解度が低いことが考えられた。そこで、PLA-acetal をアセトン・HCl 水溶液の混液中に懸濁させることで、PLA の分解を抑制して、効率よくホルミル基へ変換させることができた。アセタールからアルデヒドへの変換効率は約 80 % (mol/mol)

であったが、ロットによって多少変換効率に相違がみられた。以上の結果より、アセタールが完全に変換されていないことから、得られたポリマー中には PLA-acetal または加水分解された 3,3-diethoxy-1-propanol や分解した PLA がある程度混在しているものと考えられる。得られた PLA-aldehyde を  $^1\text{H-NMR}$  により測定したところ、PLA 部位の重合度は出発物質である PLA-acetal のそれとほぼ同じ値が算出された。この結果より、PLA 部位が分解することなく、アセタールからアルデヒドへ変換することができたと考えられる。

Borch らの報告を参考とし<sup>29)</sup>、PLA-aldehyde に MeO-PEG(N)を導入する際に行う還元アミノ化は pH 6-7 で行った。Table 1-1 に示したように、他の処方よりも処方 5 の条件において、3,3-diethoxy-1-propanol を効率よく PLA に導入できた。従って、以後 PLA-(MeO-PEG(N))を還元アミノ化で合成する際は、処方 5 で得られた PLA-acetal を使用することとした。本研究で検討した PLA-(MeO-PEG(N))の合成法および精製法により、未反応の MeO-PEG(N)はほぼ完全に除去されていると考えられる。また、GPC により測定された分子量  $MW_{\text{GPC}}$  と  $MW_n$  との間には良好な対応がみられたことから、GPC によって PLA 誘導体の精製および分子量の算出が可能であることがわかった (Fig. 1-3、Table 1-2)。PLA に対する MeO-PEG(N)の導入率は 25-40 % (mol/mol)だったが、還元アミノ化のみの反応率は、最高で 80 % (mol/mol)近くを示した (Table 1-3)。しかしながら、MeO-PEG(N)が PLA に完全に導入されなかったのは、ホルミル基自体が還元を受けてしまったか、ホルミル基がエステル結合と接触することによ

り、部分的に開裂してしまった可能性が考えられた。一方、Me-PEG(O)を開始剤として開環重合法により合成された PLA-(MeO-PEG(O))は、PEG の導入率が 70-80 % (mol/mol)であった。この反応は一段階で行える上、高い PEG の導入率を得ることができた(Table 1-3)。

PLA-(MeO-PEG(N))より調製したナノパーティクルは、調製法により異なる粒子特性を示した。また、粒子径は基剤であるポリマーの分子量や MeO-PEG(N)の導入率よりも、調製法による影響を強く受けることがわかった(Table 1-4)。すなわち、液中乾燥法を用いると粒子径が大きくなる傾向がみられた。さらにアセトンに水を滴下する溶媒拡散法 A を用いても粒子径は大きくなった。一方、PLA-(MeO-PEG(O))を用いた場合、溶媒拡散法 A で調製してもより小さい粒子径を示した。Bazile らによれば、PLA-(MeO-PEG(O))と PLA でナノパーティクルを調製する際、PLA の比率が PLA-(MeO-PEG(O))より高くなると粒子径が大きくなる<sup>16)</sup>。従って、PLA-(MeO-PEG(N))は PLA-(MeO-PEG(O))より MeO-PEG の導入率が低く、ゆえにそれを用いたナノパーティクルの粒子径も、後者より前者の方が大きくなったものと考えられる。これらの現象は粒子表面上の PEG 密度に関係しているものと考えられる。溶媒拡散法 B および C を用いると粒子径は小さくなり、超音波処理をすることにより、さらに粒子径を小さくすることができた。しかしながら、溶媒拡散法 C で調製した PLA-(MeO-PEG(O))のナノパーティクルは、溶媒拡散法 A で調製した粒子と、粒子径に相違は見られなかった。PEG の導入率の少ない PLA-(MeO-PEG(N))は

調製法による影響を受けやすく、PLA-(MeO-PEG(O))は溶媒拡散法 A においても小さな粒子径を示し、溶媒拡散法 C においてもあまり粒子径に影響がなかったものと考えられる。

ゼータ電位は約 60 nm の粒子を用いて測定した。Table 1-5 より PLA-(MeO-PEG(O))は高いゼータ電位を示した。これは、エステル結合により結合している MeO-PEG(O)が負電荷を有する末端のカルボキシ基をマスクしてしまったためと考えられる。PLA-(MeO-PEG(N))で調製した粒子に関しては、MeO-PEG(N)の導入率が高い方がゼータ電位も高い結果となった。しかしながら、たとえ MeO-PEG(N)が正電荷の要因であったにせよ、基剤である PLA-(MeO-PEG(N))はその導入率が低いため、PLA-(MeO-PEG(N))のナノパーティクルでは PLA-(MeO-PEG(O))のナノパーティクルよりも高いゼータ電位は得られなかった。

Table 1-4 より、溶媒拡散法 B で調製した PLA-(MeO-PEG(N))のナノパーティクルは固形腫瘍への受動的ターゲティングに有用な 100-140 nm の粒子径を有することから、DiD 封入 PLA-(MeO-PEG(N))のナノパーティクルも溶媒拡散法 B によって調製した<sup>20)</sup>。しかしながら、DiD 封入 PLA-(MeO-PEG(N))ナノパーティクルは、未封入の PLA-(MeO-PEG(N))より大きな粒子径を示した。この DiD 封入 PLA-(MeO-PEG(N))ナノパーティクルの粒子径(約 220 nm)は、最適とは言えないが十分に受動的ターゲティングを行える大きさであると考えられる<sup>20)</sup>。粒子が大きくなった原因として、封入した DiD が影響したのと考えられる。

従って、薬物をナノパーティクルに封入する際は、粒子径の変化について注意を払うべきであると言える。今回使用した脂溶性蛍光色素である DiD の PLA-(MeO-PEG(N))ナノパーティクルに対する封入効率は、非常に高いものとなった(Table 1-6)。また、粒子化の際、ポリマーや DiD の回収率もそれぞれ高かった(Table 1-6)。この結果より、PLA-(MeO-PEG(N))には脂溶性薬物を効率よく封入できることが示唆された。

PLA-aldehyde に対し蛍光ヒドラジン誘導体や polyethylene glycol diamine などの導入を試みた際に、これらの分子は PLA-aldehyde に、効率よく導入された(未発表データ)。PLA-aldehyde と蛍光ヒドラジン誘導体などとの反応は、攪拌するだけで進行し、得られた結合体は蛍光を発することから、in vivo において PLA 自体の動態を検討するのに非常に有用であると考えられる。また、PLA-aldehyde と polyethylene glycol diamine から還元アミノ化により PLA 誘導体が合成できることから、PLA-aldehyde が他のブロックコポリマーを合成するのに利用できることが証明された。

以上より、本検討における試みは、DDS における薬物担体としての PLA 誘導体の開発や、PLA 誘導体を基剤としたナノパーティクルの in vivo における動態を検討するのに有用であることが示唆された。

## 1-5 小括

新規に開発した末端にアセタールを有する PLA (PLA-acetal)は、DL-ラクチドの開環重合により効率よく合成することができた。また、PLA-acetal はそのアセタール部位を効率よくアルデヒドに変換することができ、末端にアルデヒドを有する PLA (PLA-aldehyde)を得ることができた。

PLA-aldehyde を用いることにより、PLA にアミノ基を有する化合物を還元アミノ化により合成することができる。PLA-aldehyde と MeO-PEG-NH<sub>2</sub> の還元アミノ化により得られた PLA-(MeO-PEG(N))から、粒子径 60-340 nm のナノパーティクルを調製することができ、その粒子径は調製法により左右された。PLA-(MeO-PEG-(N))ナノパーティクルに DiD を効率よく封入することができ、その粒子径は受動的ターゲティングに十分な大きさであった。

以上の結果より、PLA-aldehyde は新たな PLA 誘導体を得るために有用であり、本研究で得られた PLA-(MeO-PEG)は高分子ナノパーティクルの調製に利用できることが示唆された。

## 第2章 PLA-(MeO-PEG)を基剤としたナノパーティクルの in vitro および in vivo における特性

### 2-1 序論

第1章では PLA の末端にアルデヒド導入した誘導体(PLA-aldehyde)を合成し、そのアルデヒドとアミノ基を還元することで、あらたな PLA 誘導体を合成することを試みた。反応には PLA-aldehyde と MeO-PEG-NH<sub>2</sub> を用いて PLA に MeO-PEG を導入し、その誘導体を用いてナノパーティクル基剤としての応用性について検討した。しかしながら、反応に用いた PLA-aldehyde のアルデヒド導入率から考えると、得られた PLA-(MeO-PEG)の MeO-PEG 導入率はそれほど高くないという結果となった。

そこで本章では、合成法や GPC での精製法などの改善について検討し、MeO-PEG-NH<sub>2</sub> の導入率を高めることを試みた。合成法に関しては、反応溶媒を再検討し、安定に反応が進む混液の組成について検討した。また GPC に関しては、ろ液を分取するポイントについて検討した。さらに、得られた PLA-(MeO-PEG)を基剤として、ナノパーティクルの調製条件について検討した。その際、脂溶性蛍光物質である DiD をモデル薬物として粒子内に封入し、得られた DiD 封入ナノパーティクルについてその粒子特性を検討した。また、DiD 封入ナノパーティクルを ddY 系、6 週齢の雄性正常マウスに尾静脈内投与し、DiD の体内分布を探ることで、ナノパーティクルの体内分布について検討を行った。

## 2-2 実験の部

### 2-2-1 試料および試薬

MeO-PEG-NH<sub>2</sub> (MW 2,000)、3,3-diethoxy-1-propanol およびオクチル酸スズはシグマ-アルドリッチ社(USA)、DL-ラクチド(東京化成工業)、DiD は Molecular Probe 社(USA)のものを使用した。その他の試薬は、すべて市販の特級品を使用した。

### 2-2-2 動物

動物実験には、ddY 系雄性マウス(6-7 週齢、約 30 g)を東京実験動物株式会社より購入して使用した。

なお、動物実験は星薬科大学動物実験ガイドラインに基づいて行なった。

### 2-2-3 ポリマー合成

これまでの結果に基づき、末端にアセタールを有するポリ乳酸(PLA-acetal)は開環重合法により合成し、末端にアルデヒドを有するポリ乳酸(PLA-aldehyde)は PLA-acetal を加水分解することで得た<sup>30)</sup>。酢酸エチルからの再結晶により精製した DL-ラクチド 6 g と 3,3-ジエトキシ-1-プロパノール 50 mg を窒素置換した三口フラスコ内に入れ、無水トルエン 45 mL を加え 200 rpm で攪拌し、オイルバス中 160°C で完全に溶解した。そこへ、無水トルエン 5 mL に溶かしたオクチル酸スズ 30 g を加え、約 5 時間 160°C で加熱還流を行った。

還流終了後反応を完了させるため冷却し、1日放置した。その後 60 °C でロータリーエバポレーターによりトルエンを完全に留去し、残留物にジクロロメタン 120 mL を加え完全に溶解し吸引ろ過を行った。得られたろ液は 60 °C の激しく攪拌(400 rpm)した精製水 200 mL 中に投入した後、ジクロロメタンを蒸発させ再沈殿させた。さらに一晩放置した後、水相を除去することで沈殿物を採取した。その後、沈殿物をジクロロメタンに再溶解し、水分を無水硫酸ナトリウムを使って完全に除去し、溶媒を留去して PLA-acetal を得た。出来上がったものは実際には PLA-acetal と PLA の混合物であるが、そのものを PLA-acetal(n) として用いた (n はロット番号)。

PLA-aldehyde は PLA-acetal を加水分解することで得た。PLA-acetal 200 mg をアセトン 80 mL に溶解し、そこに 2 % (w/v) HCl を 30 mL 加えることで懸濁させ、室温で 24 時間マグネチックスターラーを用いて攪拌した。これにより PLA-acetal のアセタールを酸加水分解によりホルミル基に変換した。反応後、アセトンを除去することで沈殿物を得た。次に沈殿物を採取し、80 mL のアセトンに溶解し、2 % (w/v) HCl 30 mL を加え攪拌し、上記の工程を 2 回繰り返した。最後に採取した沈殿物は水で洗い、乾燥させることで PLA-aldehyde を得た。PLA-acetal と同様に、得られたものは PLA-aldehyde と PLA を含んでいるが、これを PLA-aldehyde(n)とした (n はロット番号)。

PLA-(MeO-PEG)は、PLA-aldehyde と MeO-PEG-NH<sub>2</sub> を還元アミノ化することで得られた。PLA-aldehyde 200 mg、MeO-PEG-NH<sub>2</sub> 300 mg、シアノ水素化ホウ

素ナトリウム 25 mg を、ジクロロメタン/メタノール (1:1、v/v) 混液 25 mL に溶解し、室温で 24 時間攪拌した。この反応中 pH は 6-7 を保つように 0.1 N HCl と 0.1 N NaOH を用いて調整した。反応後は有機溶媒を完全に留去し、残った懸濁液を凍結乾燥した。その後、凍結乾燥したものをクロロホルムに溶解し、HPLC を用いた GPC と限外ろ過を行った。GPC の分離法については、Fig. 2-1 に示すように開始点より、A、B、C の三点までそれぞれろ液を採取した。

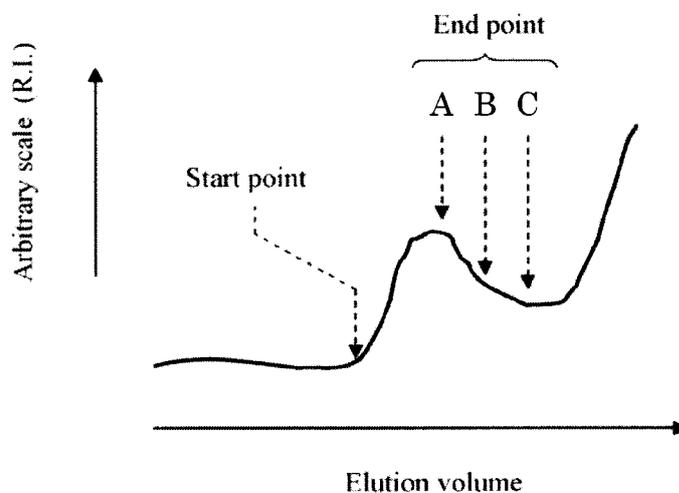


Fig. 2-1. Separation manner of the product after reductive amination between PLA-aldehyde and MeO-PEG(N). The starting point for collection is the same, but the end point for the fractions collected are different (A, B and C).

ろ液は、エバポレーターにより溶媒を除去し、得られた残留物をアセトンに溶解した。そのアセトン溶液に水を加えて懸濁させ、アセトンエバポレーターにより除去した。その後、懸濁液につき分子量 10,000 以上の物質を除去できる膜を使用して限外濾過を行った。この溶解から限外濾過までの工程を 2 回行った。限外濾過を行った水性懸濁液を凍結乾燥することで、PLA-(MeO-PEG)を

得た。得られたポリマーは PLA-(MeO-PEG)と PLA の混合物であるが、PLA-(MeO-PEG)(n)と表記することとした(n はロット番号)。PLA-(MeO-PEG)と PLA の混合物である PLA-(MeO-PEG)(n)は、以後の実験においてそのまま使用することとした。

#### 2-2-4 $^1\text{H-NMR}$ とゲル浸透クロマトグラフィー

PLA 誘導体の化学構造は JEOL JNM-GX270 spectrometer (JEOL)により測定して得た  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルにより確認した。PLA 誘導体の PLA 部位の重合度は、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトルにおける PLA 鎖の末端のメチンのプロトンとその他のメチンのプロトン積分強度の比率より算出した。また、 $MW_n$  も重合度より算出した。PLA に対する diethylacetal、ホルミル基、MeO-PEG-NH<sub>2</sub> の導入率についても、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトルから算出した。すなわち、PLA 末端にあるメチンのプロトンと導入した部位特有の積分強度より算出した。

GPC を用いて室温で、ポリマーの精製を行った。以前の報告と同様に<sup>31)</sup>、GPC のカラムには GPC K-800 (8 mm×300 mm, Shodex)及び GPC K-2003 (20 mm×300 mm, Shodex)を用い、移動相としてクロロホルムを選択し、PLA 誘導体の精製を行った。HPLC のポンプとして LC-6AD(島津製作所)を用い、検出器は示差屈折分光光度計(RID-10A, 島津製作所)を用いた。その他の条件として、移動相の流速は GPC K-800 もしくは GPC K-2003 を用いた場合、各々1または 3.5 mL/min とし、分子量の異なるポリスチレン(昭和電工株式会社)を分子量の標準

品として使用した。

#### 2-2-5 未封入および DiD 封入ナノパーティクルの調製

本検討において、DiD を封入していない未封入のナノパーティクルと DiD 封入ナノパーティクルを、PLA-(MeO-PEG)(n)を用いて調製した。未封入のナノパーティクルは以下に示すように溶媒拡散法で調製した。すなわち、PLA-(MeO-PEG)(n) 30 mg をアセトン 2 mL とエタノール 1 mL の混液に溶解し、その溶液を攪拌中の精製水 5 mL に徐々に滴下した。有機溶媒を 18°C でエバポレーターにより除去することで、ナノパーティクルの水性懸濁液を得た。DiD 封入ナノパーティクルの調製法を以下に示す。PLA-(MeO-PEG)(n) 30 mg と DiD 1 mg をアセトン 1 mL とエタノール 0.5 mL の混液に溶解し、その溶液を攪拌中の精製水 5 mL に徐々に滴下した。次に、18°C でエバポレーターにより有機溶媒を除去することで、ナノパーティクルの水性懸濁液を得た。得られたナノパーティクルは 0.45 %塩化ナトリウム溶液を移動相として Sephadex G-50 で調製したカラム(2.5 cm×15 cm)によりゲルろ過を行い、未封入の DiD を取り除いた。得られたナノパーティクルはアセトンに溶解し、紫外可視分光光度計を用い 644 nm の波長で測定し、封入されている DiD 量を算出した。さらに残渣を重クロロホルムに溶解し、4-methoxyacetophenone を基準物質として加え、<sup>1</sup>H-NMR により測定した。<sup>1</sup>H-NMR の測定結果より、PLA 部位のメチンのプロトンと 4-methoxyacetophenone のアセチル基のメチンのプロトンの積分強度を比較す

ることでポリマー量を算出し、そこから粒子調製に使用したポリマー(PLA および PLA-(MeO-PEG))の回収率を求めた。また、得られた結果より DiD の含有率、DiD の封入効率を算出した。DiD の封入効率は、DiD 含有率の実測値と理論値の比率により求めた。

#### 2-2-6 In vitro におけるナノパーティクルの特性

ナノパーティクルの粒子径およびゼータ電位は、ELS-800 動的光散乱光度計(大塚電子株式会社)により測定した。また、JEOL JEM-1011 transmission electron microscope (日本電子株式会社)を使用し、ナノパーティクルを観察した。観察にあたりサンプルはナノパーティクルを 3%(w/v)ウラニル酸尿素水溶液により染色し、銅のグリッドに設置したものを使用した。

さらに in vitro において、ナノパーティクルからの DiD の放出を測定した。濃度を 0.084、0.21、0.42 mg/mL とした 3 種の DiD 封入ナノパーティクルの懸濁液を PBS とエタノールの混液(7 : 3、v/v)中で、37°C、60 strokes/min でインキュベートした。次に 1、5、24 時間後にサンプリングし、40,000 rpm ( $15 \times 10^4 \times g$ )で 20 分超遠心分離を行った。その後上清を採取し、放出された DiD 量を Beckman DU-640 spectrophotometer を用い 644 nm の波長にて測定し算出した。

### 2-2-7 体内分布の検討

DiD 封入ナノパーティクル(DiD 量として 18  $\mu\text{g}$ )を 0.45 %塩化ナトリウム水溶液に懸濁したものを 0.3 mL、または DiD を DMSO と生理食塩水の混液(10 : 1、v/v)に溶解した DiD 溶液(DiD 量として 18  $\mu\text{g}$ ) 0.04 mL をマウスに尾静脈内投与した。投与後、1、8、24 時間に頸椎脱臼処置をしたマウスの心臓から、ヘパリンで前処理したシリンジを使用して採血し、腎臓、脾臓、肺、肝臓を摘出した。血液は 3,000 rpm (1700 $\times$ g)、10 分間遠心分離することで血漿を得、その 0.1 mL にアセトン 1 mL を加えた。血漿とアセトンの混液をボルテックスミキサーにより 3 分間攪拌したのち、3,000 rpm、15 分間遠心分離し、上清を得た。摘出した臓器については、ろ紙により拭き取った後、臓器と同重量の生理食塩水を加え、ホモジネーターによりホモジネート液を調製した。得られたホモジネート液をアセトンで 5.5 倍(v/v)に希釈し、3 分間ボルテックスミキサーで攪拌した。次にその混液を 3,000 rpm、15 分間遠心分離し上清を得た。得られた上清は希釈し、JASCO FP-777 分光蛍光光度計 (日本分光株式会社)によって励起波長 644 nm、蛍光波長 677 nm の条件で DiD の蛍光強度を測定し、検量線から DiD 濃度を算出した。DiD の回収率における検討は、既定濃度のナノパーティクル懸濁液を新鮮な血漿と組織に添加し、分布実験と同様の操作法で処置した。その後、得られた上清の DiD 濃度を測定した。この結果より、実験操作における回収率は高いことが確認され、実験における測定値はそのまま使用することとした。

#### 2-2-8 血漿と血球における DiD の分布

2-2-7 と同様の実験操作により、血液を採取した。DMSO と生理食塩水の混液 (10 : 1、v/v) により、DiD を 0.225、0.45、2.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の各濃度で溶解した DiD 溶液 0.01 mL を血液 0.5 mL に加え、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した。それを 5 分間 37°C でインキュベートし、その後 3,000 rpm (1700 $\times$ g)、10 分間遠心分離を行った。得られた DiD を含有する血漿は 2-2-7 と同様の実験操作により処理し、蛍光強度から DiD の濃度を測定し、血液中での分布を測定した。

## 2-3 結果及び考察

### 2-3-1 PLA-(MeO-PEG)の合成とその特性

Table 2-1 に、PLA-aldehyde(n)の MWn、ホルミル基および MeO-PEG の導入率を示した。<sup>1</sup>H-NMR スペクトル(CDCl<sub>3</sub>)により測定すると、4.32 (q, *J* = 7 Hz), 5.05–5.30 (m) および 9.72 (s)にそれぞれ特徴的なプロトンのピークが得られ、その積分強度の比率は PLA-aldehyde(1): 1/99/0.70、PLA-aldehyde(2): 1/186/0.60、PLA-aldehyde(3) : 1/154/0.55、PLA-aldehyde(4) : 1/221/0.55 であった。PLA-MeO-PEG の分子量および PLA に対する MeO-PEG の導入率も <sup>1</sup>H-NMR スペクトル(CDCl<sub>3</sub>)に基づいて算出した。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルには 3.61 (s), 4.32 (q, *J* = 7 Hz) および 5.03–5.30 (m)に特徴的なプロトンのピークが認められ、その積分強度の比率は、それぞれ PLA-(MeO-PEG)(1): 43/1/223、PLA-(MeO-PEG)(2) : 54/1/363、PLA-(MeO-PEG)(3) : 65/1/159、PLA-(MeO-PEG)(4) : 99/1/216 であった。

Table 2-1.  
Characteristics of the products obtained by reductive amination of PLA-aldehyde and MeO-PEG amine

Product	PLA-aldehyde used		Condition		PLA-(MeO-PEG) produced	
	MWn	Formyl ratio (% mol/mol)	Solvent	Separation manner of first peak <sup>a</sup>	MWn	PEG/PLA (% mol/mol)
PLA-(MeO-PEG)(1)	7900	70	THF-MeOH	A	17900	24
PLA-(MeO-PEG)(2)	13500	60	THF-MeOH	A	23300	30
PLA-(MeO-PEG)(3)	11100	55	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	B	14400	36
PLA-(MeO-PEG)(4)	15900	55	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	C	17400	55

<sup>a</sup> A, B and C represent the fractions from the start point to the end points A, B and C were collected.

これまで、PLA-(MeO-PEG)の調製は、PLA-aldehyde と MeO-PEG-NH<sub>2</sub> との間

にシッフ塩基を形成させ、そのシッフ塩基を還元剤にシアノ水素化ホウ素ナトリウムを用いた還元アミノ化により結合させて行った<sup>30)</sup>。しかしながら、反応条件や精製方法などの問題により、PLA に対する MeO-PEG-NH<sub>2</sub> の導入率はそれほど高くなかったため、反応条件と精製法を再検討した。これまでの検討において、還元アミノ化を行う際の溶媒はテトラヒドロフランとメタノールの混液(1 : 1, v/v)を用い、pH を 0.1 N HCl と 0.1 N NaOH で調整し、未反応の MeO-PEG-NH<sub>2</sub> と完全に分離するために、かなり高い分子量のところまでゲルろ過によりポリマーを分取していた(Fig. 2-1)。しかしながら、この方法では pH を 6-7 に安定して保つことが難しく、さらにはポリマーの分解を引き起こしてしまうことが判明した。従って、ホルミル基を利用した PLA に対する MeO-PEG-NH<sub>2</sub> の導入率が低いものとなったと考えられる。この還元アミノ化反応において至適 pH での安定化が重要であるとの報告があるように<sup>29)</sup>、条件の不安定さが反応の進行を妨げていたと考えられる。さらに、MeO-PEG-NH<sub>2</sub> の導入率の低さの理由として、分取するポイントがかなり高分子側であったことも考えられる。実際 Table 2-1 より、ポイント A まで分取した PLA-(MeO-PEG) と PLA は高い分子量を示している。

一方で、反応溶媒をジクロロメタンとメタノールの混液(1 : 1, v/v)に変更して還元アミノ化反応を行ったところ、0.1 N HCl と 0.1 N NaOH を用いて容易に pH 6-7 に調整できた。さらに、GPC の分取ポイントも、Fig. 2-1 に示したポイント B、C に変更した。その結果、PLA に対する MeO-PEG の導入率は各々 36 %、

55%に増加した。また、得られたポリマーの分子量は PLA-aldehyde の分子量と良好な対応がみられた。Table 2-1 の PLA-(MeO-PEG)(3)と PLA-(MeO-PEG)(4)の間における MeO-PEG 導入率の相違は、分取するポイントの相違によるものと考えられる。PLA-(MeO-PEG)(1)および PLA-(MeO-PEG)(2)の結果より、PLA-(MeO-PEG)は PLA が含まれている最初のピークの比較的分子量が低い部分に存在していることが考えられる。また、PLA-(MeO-PEG)(4)の合成を繰り返し行ったところ ( $n = 2$ )、得られたものは比較的同等の MeO-PEG の導入率および分子量を示した。以上の結果より、反応条件および精製法は PLA-(MeO-PEG)(4)のものが最適であり、この反応における PLA-aldehyde(4)と MeO-PEG の回収率も約 50%へと改善された。

Table 2-2.  
Physicochemical characteristics of plain nanoparticles

Nanoparticles	PLA-(MeO-PEG)(n)	Mean diameter <sup>a</sup> (nm)	Zeta potential <sup>a</sup> (mV)
NP1	PLA-(MeO-PEG)(1)	62.3	-43.2
NP2	PLA-(MeO-PEG)(2)	59.4	-22.2
NP3	PLA-(MeO-PEG)(4)	112.1	22.8

<sup>a</sup> These are shown as the mean value ( $n = 2$ ).

### 2-3-2 In vitro における、未封入および DiD 封入ナノパーティクルの粒子特性

未封入のナノパーティクルは PLA-(MeO-PEG)(1)、(2)、(4)を用いて溶媒拡散法により調製した。その粒子径は、動的光散乱法により測定した。Table 2-2 に平均粒子径とゼータ電位を示した。

PLA-(MeO-PEG)(4)により調製したナノパーティクルは他のものより大きく  
なり、平均粒子径が 100 nm 以上であった。これは PLA-(MeO-PEG)(4)の分子量  
の分布が広がったために、粒子径が大きくなったものと考えられる。また、  
PLA-(MeO-PEG)(4)は第二級アミンを PLA に対して 55 %も有していることから、  
ナノパーティクルがプラスに帯電したものと考えられる。

Table 2-3.  
Physicochemical characteristics of DiD-loaded nanoparticles

Nanoparticles	PLA-(MeO-PEG)(n)	Drug content (% w/w)	Encapsulation efficiency (%)	Mean diameter (nm)
NP4	PLA-(MeO-PEG)(3)	3.2 ± 0.3	99.2 ± 9.6	188.6 ± 13.6
NP5	PLA-(MeO-PEG)(4)	2.9 ± 0.0	95.3 ± 1.2	154.3 ± 3.1

The results are shown as the mean ± S.D. ( $n = 3$ ).

Table 2-3 に DiD 封入ナノパーティクルの粒子特性を示す。DiD 封入ナノパー  
ティクルの平均粒子径は、未封入のものに比べて大きくなる結果となった。ま  
た、DiD は効率的にナノパーティクルに封入されていることが判明した。NP5  
の粒子について測定したゼータ電位は 5.2 mV であった。PLA-(MeO-PEG)(4)を  
用いた DiD 封入ナノパーティクルを重クロロホルムに溶解し、<sup>1</sup>H-NMR を測定  
した。その結果、PLA に対する PLA-(MeO-PEG)の比率は、PLA-(MeO-PEG)(4)  
に比べ減少していた(未発表データ)。粒子径と PLA-(MeO-PEG)の含有率におけ  
る相違が、未封入および DiD 封入ナノパーティクルのゼータ電位の相違を引き  
起こしたのではないかと考えられる。

Fig. 2-2 には、PLA-(MeO-PEG)(3)を用いた未封入および DiD 封入ナノパー  
ティクルの透過型電子顕微鏡写真を示す。DiD 封入ナノパーティクルの写真中の

粒子径は、動的光散乱法を用いたものと良好な対応が得られた。さらに、未封入のナノパーティクルは、動的光散乱法による測定では平均 150 nm を示したが、これも Fig. 2-2 の結果と同様の大きさであった。

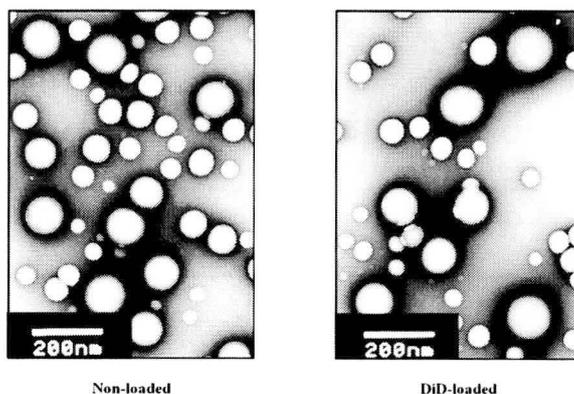


Fig. 2-2. TEM micrographs of non-loaded and DiD-loaded PLA-(MeO-PEG) nanoparticles. PLA-(MeO-PEG)(3) was used for the preparation of both the nanoparticles.  
The length of the white bar is 200 nm.

In vitro におけるナノパーティクルからの DiD の放出試験は、NP5 を PBS とエタノール(7 : 3、v/v)混液中、37°Cでインキュベートして行った。インキュベート開始から 1、4、24 時間後において、溶出した DiD は各々1% (w/w)以下であり(未発表データ)、そのナノパーティクルを超遠心により沈殿させると、DiD 特有の青色はほぼ完全にナノパーティクル内に残存していた。以上より、DiD はナノパーティクル内に残留しやすいことがわかった。これは、DiD の脂溶性が高く、ナノパーティクルのコアである PLA に安定に封入されているためと考えられる。さらに、通常の PEG-PLA を用いたナノパーティクル内に DiD が封

入されることにより、細胞へ移行し難くなるとの報告がある<sup>24)</sup>。以上のことより、DiD の体内分布がナノパーティクルの体内分布を正確に反映するということを示唆された。

### 2-3-3 尾静脈内投与後の DiD の体内分布

DiD 溶液および DiD 封入ナノパーティクル(NP4、NP5)を体内分布の実験に使用した。Fig.2-3 はマウスに DiD として 0.6 mg /kg を尾静脈内投与後の、血漿および主要組織における総 DiD 濃度(遊離および封入)を測定した結果である。

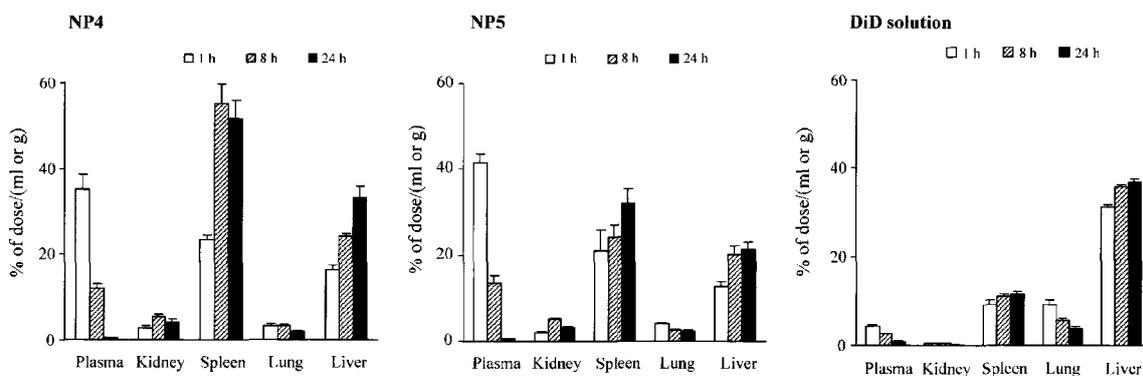


Fig. 2-3. Tissue distribution of DiD after bolus i.v. injection of DiD-loaded nanoparticles and DiD solution at a dose of 0.6 mg DiD equiv./kg in mice. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 4$ ).

投与後 1 時間値および 8 時間値において、NP5 では血漿における DiD 値が DiD 溶液投与後に比べ、それぞれ 10 倍および 5 倍高い値を示した。また、NP4 投与後の血漿における DiD 値は、DiD 溶液投与後に比べ 1 時間、8 時間においてそれぞれ 8 倍、4 倍高い値を示した。投与後 24 時間において、両ナノパーテ

ィクルにおける DiD 値は、DiD 溶液に比べ低い値となった。以上の結果より、両ナノパーティクルともゼータ電位がプラスであるにも関わらず、血漿中に DiD を滞留させ得ることが確認された。さらに、ナノパーティクルとして MeO-PEG/PLA の比率が高いもの(NP5)を使用した場合、DiD をより多く血漿に滞留させられることがわかった。これは、ナノパーティクル表面の高い PEG 密度により、ナノパーティクルと細胞や生体内高分子などとの接触を抑制することができることと Mosqueira らや Nguyen らが報告していることと合致する<sup>24, 26)</sup>。以上の結果より、MeO-PEG/PLA の比率の高い PLA-(MeO-PEG)と PLA の混合物を用いてナノパーティクルを調製することで、血漿中に薬物をより多く残留させ得ることが示唆された。DiD 溶液を投与した場合、DiD の肝臓への分布が高くなる傾向がみられた。一方、ナノパーティクルを投与した場合、DiD は肝臓および脾臓により多く分布する傾向がみられた。

DiD は脂溶性が高いことから、DiD は血漿を取り除いた血球の方に分布していると考えられた。Fig. 2-4 に示したように、DiD の血液濃度が低い場合には、血球中の DiD 分布が増加している結果となった。従って、DiD の血漿中濃度が低くなると、より多く血球中に分布するものと考えられる。マウスの血球と血漿の比率が 3 : 5 であることと、マウスの血液が 77.8 mL/kg であることから、Fig. 2-3 に示したように、DiD 投与後にほとんどの DiD が血液や臓器から回収できたものと考えられる。また、血球と血漿における DiD の分布を考えると、投与後 1 時間においてナノパーティクルは DiD 溶液に比べさらに高い値を示し

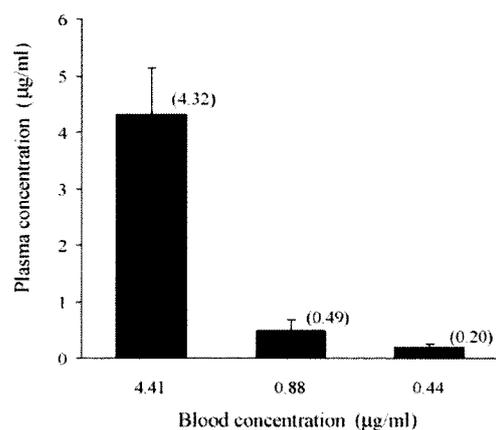


Fig. 2-4. Partition of DiD between plasma and blood cells. The DiD solution (0.01 ml) in the mixture of dimethyl sulfoxide and saline (10:1, v/v) containing 0.225, 0.45 and 2.25 g were added to 0.5 ml of the blood, mixed and incubated at 37°C, then the plasma was separated by centrifugation. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). Each value in parentheses represents the mean plasma concentration.

ていることがわかる。ナノパーティクルにおけるかなり高い血中濃度は、他の血中滞留性 DDS に類似している。これらの結果より、本研究で調製したナノパーティクルは血漿中薬物滞留性を向上させることのできる担体として有用であることが示唆され、固形腫瘍のような血管透過性の向上した部位に EPR 効果を用いて受動的ターゲティングを行えることがわかった<sup>7)</sup>。

## 2-4 小括

本検討では、PLA-(MeO-PEG)についてさらなる検討を行った。PLA-aldehyde と MeO-PEG-NH<sub>2</sub> を還元アミノ化する際に、ジクロロメタンとメタノールの混液(1 : 1、v/v)を使用し、GPC において分取するポイントを変更することで、PLA-(MeO-PEG)をより簡単に再現性よく得ることができた。PLA-(MeO-PEG)と PLA の混合物(55:45、mol/mol)を用いて調製した DiD 封入ナノパーティクルは、平均粒子径が 154 nm であり、ゼータ電位もわずかにプラス側であった。マウスに尾静脈内投与すると、ナノパーティクルは DiD 溶液に比較して DiD をより多く体内に滞留させた。以上の *in vitro* および *in vivo* の結果より、高い MeO-PEG/PLA 比を示した PLA-(MeO-PEG)で調製したナノパーティクルは、血漿中薬物滞留性を有する DDS として有用であることが示唆された。

### 第 3 章 PLA-Pyrene を封入した PLA-(MeO-PEG)ブロックコポリマーを基剤としたナノパーティクルの調製と体内分布

#### 3-1 序論

第 2 章では、PLA 誘導体の新規合成法の改善を行い、得られた PLA-(MeO-PEG)を基剤として脂溶性蛍光色素である DiD を封入したナノパーティクルを調製し、その粒子特性や体内動態などについて検討した。ナノパーティクルの体内分布については、実験結果より脂溶性の DiD がナノパーティクルの内殻に安定に封入されていることが確認できたため、DiD の分布を基にナノパーティクルの分布を推察したものであった。しかしながら、血球や細胞などとの接触により、DiD がナノパーティクルから遊離している可能性は否定できず、DiD 分布がナノパーティクルの分布を完全に反映しているとは断言できないものと考えられる。

そこで本章では、PLA-誘導体の合成法を応用し、PLA の末端に蛍光物質である Aminopyrene を導入した誘導体を合成し、この PLA 蛍光誘導体を標識としてナノパーティクルに封入し、ナノパーティクルの体内分布をより確実に検討することを試みた。得られた PLA 蛍光誘導体についてその Aminopyrene 導入率や蛍光波長について測定した。またナノパーティクルに封入し、その粒子特性について検討した。さらに ddY 系、6 週齢、雄の正常マウスおよび Sarcoma-180 を移植した ddY 系、7 週齢の雄性担がんマウスに投与し、その体内分布につい

て検討した。

## 3-2 実験の部

### 3-2-1 試料および試薬

MeO-PEG-NH<sub>2</sub>(MW 2,000)、3,3-diethoxy-1-propanol およびオクチル酸スズはシグマ・アルドリッチ社(USA)、DL-ラクチドは東京化成工業、DiD は Molecular Probes 社(USA)のものを使用した。その他の試薬は、すべて市販の特級品を使用した。

### 3-2-2 動物

動物実験には、ddY 系雄性マウス(6-7 週齢、約 30 g)を東京実験動物株式会社より購入して使用した。

なお、動物実験は星薬科大学動物実験ガイドラインに基づいて行なった。

### 3-2-3 ポリマーの合成

これまでの研究結果に従い、末端にアセタールを有するポリ乳酸(PLA-acetal)を開環重合法により合成し、末端にアルデヒドを有するポリ乳酸(PLA-aldehyde)は PLA-acetal を加水分解することで得た<sup>30)</sup>。酢酸エチルからの再結晶により精製した DL-ラクチド 6 g と 3,3-diethoxy-1-propanol 50 mg を窒

素置換した三口フラスコ内に入れ、無水トルエン 45 mL を加え攪拌し、オイルバス中 160°C で完全に溶解した。そこへ、無水トルエン 5 mL に溶かしたオクタール酸スズ 30 mg を加え、約 5 時間 160°C で加熱還流を行った。還流終了後反応を完了させるため冷却し、1 日放置した。その後 60°C でロータリーエバポレーターによりトルエンを完全に留去し、残留物にジクロロメタン 120 mL を加え完全に溶解し吸引ろ過を行った。得られたろ液は 60°C の激しく攪拌(400 rpm)した精製水 200 mL 中に投入した後、ジクロロメタンを蒸発させ再沈殿させた。さらに一晩放置した後、水相を除去することで沈殿物を採取した。その後、沈殿物をジクロロメタンに再溶解し、水分を無水硫酸ナトリウムにより完全に除去し、溶媒を留去して PLA-acetal を得た。これは PLA-acetal (PLA/acetal、1 : 1、mol/mol)と PLA の混合物であるが、そのものを PLA-acetal として使用した。

PLA-aldehyde は PLA-acetal を加水分解することで得た。すなわち、PLA-acetal 200 mg をアセトン 80 mL に溶解し、そこに 2 % (w/v) HCl を 30 mL 加えて懸濁させ、室温で 24 時間マグネチックスターラーを用いて攪拌した。これにより PLA-acetal のアセタールを酸加水分解によりホルミル基に変換した。反応後アセトンを除去することで沈殿物を得た。次に沈殿物を採取し、それを 80 mL のアセトンに溶解し、2 % (w/v) HCl 30 mL を加え攪拌し、上記の工程を 2 回繰り返した。最後に採取した沈殿物を水で洗い、乾燥させることで PLA-aldehyde を得た。PLA-acetal と同様に、得られたものは PLA-aldehyde (PLA/aldehyde、1 : 1、mol/mol)と PLA を含んでいるが、これを PLA-aldehyde として使用した。

PLA-(MeO-PEG)は、PLA-aldehyde と MeO-PEG-NH<sub>2</sub> を還元アミノ化することで得られた<sup>30)</sup>。PLA-aldehyde 200 mg、MeO-PEG-NH<sub>2</sub> 300 mg、シアノ水素化ホウ素ナトリウム 25 mg を、ジクロロメタン/メタノール (1 : 1, v/v) 混液 25 mL に溶解し、室温で 24 時間攪拌した。この反応中 pH 6-7 を保つように 0.1 N HCl と 0.1 N NaOH を用いて調整した。反応後は有機溶媒を完全に留去し、残った懸濁液を凍結乾燥した。その後、凍結乾燥したものをクロロホルムに溶解し、HPLC を用いた GPC と限外ろ過を行った。GPC については、MeO-PEG-NH<sub>2</sub> のピークの前まで分取した。得られたろ液は、エバポレーターにより溶媒を除去し、残留物をアセトンに溶解した。そのアセトン溶液に水を加えることで懸濁させ、アセトンをエバポレーターにより除去した。その後、懸濁液につき分子量 10,000 以上の物質を除去できる膜を使用して限外濾過を行った。これらの溶解から限外濾過までの工程を 2 回繰り返した。限外濾過を行った水性懸濁液を凍結乾燥することで、PLA-(MeO-PEG)を得た。得られたポリマーは PLA-(MeO-PEG)(PLA/MeO-PEG、1 : 1, mol/mol)と PLA の混合物であるが、PLA-(MeO-PEG)と表記し、これ以上の精製はせず、以後の実験ではそのまま使用した。

#### 3-2-4 PLA-Pyrene の合成

末端にピレンを有する PLA (PLA-Pyrene) は Fig. 3-1 に示すように PLA-(MeO-PEG)とほぼ同様の方法で合成した<sup>30)</sup>。PLA-aldehyde(700 mg)、

Aminopyrene (60 mg)、シアノ水素化ホウ素ナトリウム(82 mg)をジクロロメタンとメタノールの混液(1 : 1、v/v) 77 mL に溶解し室温で 24 時間攪拌した。その際 0.1 N の HCl と NaOH を用いて pH 6-7 になるように調整した。反応後有機溶媒を除去し、合成したものは沈殿物として取り出した。次に、得られた沈殿物をアセトンとエタノールの混液(1 : 1、v/v) 80 mL に溶解し、その後アセトンを除去することで、再沈殿させた。この精製法を 2 回繰り返した。得られた沈殿物は PLA-Pyrene (PLA/Pyrene、1 : 1、mol/mol) と PLA の混合物であるが PLA-Pyrene と表記し、これ以上は精製せず以後の実験ではそのまま使用した。

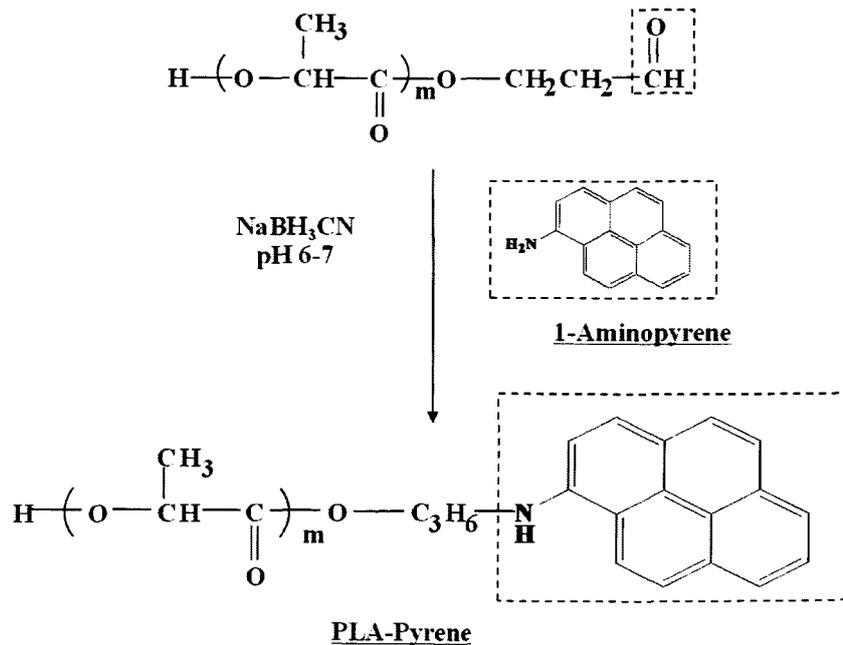


Fig. 3-1. Synthesis and chemical structure of PLA-Pyrene

### 3-2-5 $^1\text{H-NMR}$ とゲル浸透クロマトグラフィー

PLA 誘導体の化学構造は JEOL JNM-GX270 spectrometer (JEOL)により測定した  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルにより確認した。PLA 誘導体の PLA 部位の重合度は、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトルにおける PLA 鎖の末端のメチンのプロトンとその他のメチンのプロトン積分強度の比率より算出した。また、数平均分子量(MW<sub>n</sub>)も重合度より算出した。PLA に対する diethylacetal、ホルミル基、MeO-PEG-NH<sub>2</sub> の導入率についても、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトルから算出した。すなわち、PLA 末端にあるメチンのプロトンと導入した部位特有の積分強度より算出した。

前章と同様に、カラムには GPC K-800 (8 mm × 300 mm, Shodex)または GPC K-2003 (20 mm × 300 mm; Shodex)を用い、移動相としてクロロホルムを選択し、GPC により PLA 誘導体の精製を行った<sup>30)</sup>。HPLC のポンプとして LC-6AD(島津製作所)を用い、検出器は示差屈折分光光度計(RID-10A, 島津製作所)を用いた。その他の条件として、移動相の流速は GPC K-800 または GPC K-2003 を用いた場合、それぞれ 1 または 3.5 mL/min で行い、分子量の異なるポリスチレン(昭和電工株式会社)を分子量の標準品として使用した。

### 3-2-6 PLA-Pyrene 封入ナノパーティクルの調製

PLA-Pyrene 封入ナノパーティクルは PLA-(MeO-PEG)を用いて調製した。未封入のナノパーティクルは以下のように調製した。PLA-(MeO-PEG) 30 mg をアセトン 1 mL とエタノール 0.5 mL の混液に溶解し、その溶液を攪拌中の精製水

2.5 mL に徐々に滴下した。そして、有機溶媒を 18℃ でエバポレーターにより除去することで、ナノパーティクルの水性懸濁液を得た。PLA-Pyrene 封入ナノパーティクルの調製法を以下に示す。PLA-(MeO-PEG)(n) 30 mg と PLA-Pyrene 9 mg をアセトン 1 mL とエタノール 0.5 mL の混液に溶解し、その溶液を攪拌中の精製水 5 mL に徐々に滴下した。そして、有機溶媒を 18℃ でエバポレーターにより除去することで、ナノパーティクルの水性懸濁液を得た。得られたナノパーティクルにつき 0.45 % 塩化ナトリウム溶液を移動相として Sephadex G-50 で調製したカラム (2.5 cm × 15 cm) によりゲルろ過を行なった。得られたろ液について PLA-Pyrene 濃度を測定し、ナノパーティクルの PLA-Pyrene 含有率を算出した。PLA-Pyrene の含有率は、ナノパーティクルをアセトニトリルに溶解し、紫外可視分光光度計により 400 nm の波長で測定し、検量線から算出して求めた。さらに残渣についても重クロロホルムに溶解し、4-methoxyacetophenone を基準物質として加え、<sup>1</sup>H-NMR により測定した。<sup>1</sup>H-NMR の測定結果より、PLA 部位のメチンのプロトンと 4-methoxyacetophenone のアセチル基のメチンのプロトンの積分強度を比較することでポリマー量を算出し、そこから粒子調製に使用したポリマー(PLA および PLA-(MeO-PEG))の回収率を求めた。次に得られた PLA-Pyrene の含有率やポリマーの回収率などから封入効率についても算出した。封入効率は以下に示す式より計算した。

$$\text{封入効率 (\%)} = 100 \times (\text{含有率の実質値} / \text{含有率の理論値})$$

### 3-2-7 In vitro における粒子特性

ナノパーティクルの粒子径は、ELS-800 動的光散乱光度計(大塚電子株式会社)により測定した。また、JEOL JEM-1011 transmission electron microscope (日本電子株式会社)を使用し、ナノパーティクルを観察した。観察にあたりサンプルはナノパーティクルを 3% (w/v)ウラニル酸尿素水溶液により染色し、銅のグリッドに設置したものを使用した。

さらに in vitro において、ナノパーティクルからの PLA-Pyrene の放出を測定した。濃度の異なる 3 つの PLA-Pyrene 封入ナノパーティクルの懸濁液(粒子濃度として 84、210、420  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を PBS とエタノールの混液(7:3、v/v)中および粒子濃度 210  $\mu\text{g}/\text{mL}$  として PBS と正常マウスの血漿の混液(1:1、v/v)中、37°C、100 strokes/min の条件でインキュベートした。1、4、24 時間後にサンプリングし、40,000 rpm( $15 \times 10^4 \times g$ )で 20 分超遠心を行なった。その後上清を採取し、放出された PLA-Pyrene およびピレン部位の総量を JASCO FP-777 分光蛍光光度計(日本分光株式会社)を用い、励起波長 400 nm、蛍光波長 438 nm の波長にて測定した。

### 3-2-8 担がんマウスの作成

腫瘍細胞は Sarcoma-180 固形腫瘍細胞( $1 \times 10^6$  cells)を ddY 系雄性マウスの腹腔内で継代したものをを用いた。増殖させた Sarcoma-180 固形腫瘍細胞( $1 \times 10^6$  cells)を 6 週齢の ddY 系雄性マウスの腋窩部に移植し、移植後 7 日目のものを担がん

マウスとして実験に使用した。

### 3-2-9 体内分布の検討

PLA-Pyrene 封入ナノパーティクルを 0.45 %塩化ナトリウム水溶液に懸濁させ、正常マウスに尾静脈内投与した。投与量はナノパーティクルとして 20 mg/kg とした。投与後、1、8、24 時間に頸椎脱臼処置をしたマウスの心臓から、ヘパリンで前処理したシリンジを使用して採血し、腎臓、脾臓、肺、肝臓を摘出した。次に、血液を 3,000 rpm (1700×g)、10 分間遠心分離することで血漿を得て、血漿 0.1 mL にアセトニトリル 1 mL を加えた。その後、血漿とアセトニトリルの混液をボルテックスミキサーにより 3 分間攪拌し、3,000 rpm、15 分間遠心分離し、上清を得た。摘出した臓器はろ紙により拭き取った後、臓器と同重量の生理食塩水を加えホモジネーターによりホモジネート液を調製した。得られたホモジネート液をアセトニトリルで 5.5 倍 (v/v) に希釈し、3 分間ボルテックスミキサーで攪拌した。次にその混液を 3,000 rpm、15 分間遠心分離し上清を得た。得られた上清は希釈し、JASCO FP-777 分光蛍光光度計によって励起波長 400 nm、蛍光波長 438 nm の条件で蛍光強度を測定した。較正は、サンプルの蛍光強度からブランクサンプルの蛍光強度を引いて正味の蛍光強度を求めて行った。さらに、PLA-Pyrene 封入ナノパーティクルを正常マウスと同様の投与量(20 mg nanoparticles/kg)で、Sarcoma-180 を移植してから 7 日後の担がんマウスに尾静脈内投与した。次に投与後、1、8、24 時間の血漿、臓器および腫瘍を正常マウ

スと同じ方法により採取し処置した。回収率の検討は、既定濃度の PLA-Pyrene 封入ナノパーティクル懸濁液を新鮮な血漿と組織に添加し、分布実験と同様の操作法で処置し、得られたものの蛍光強度を測定して行なった。また較正は、サンプルの蛍光強度からブランクサンプルの蛍光強度を引いて正味の蛍光強度を求めて行った。回収率は較正された実測値と理論値より求めた。この結果、すべての組織について回収率は 80-90 % (未発表データ)であり、データは実際の濃度を良好に反映していることが確認された。

### 3-3 結果および考察

#### 3-3-1 PLA-(MeO-PEG)の合成と特性

合成して得た PLA-(MeO-PEG)について、<sup>1</sup>H-NMR により確認した。PLA-acetal の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル(溶媒:重クロロホルム)は、第 1 章<sup>30)</sup>と同様に測定した。PLA-aldehyde についても同様に、PLA-acetal が有する dimethyl acetal 固有のピーク(1.1 ppm (triplet), 3.2–3.7 ppm (multiplet), 4.47 ppm (triplet) in CDCl<sub>3</sub>)が消失し、代わりにホルミル基に起因する特徴的なピーク(9.74 ppm (singlet) in CDCl<sub>3</sub>)の出現により確認した。

Table 3-1. Characteristics of PLA-(MeO-PEG) obtained by reductive amination of PLA-aldehyde and MeO-PEG(*N*)

	MW of polymer <sup>a</sup>	(MeO-PEG)/ Pure PLA (1:1) block copolymer (% , mol/mol) <sup>a</sup>
PLA-(MeO-PEG)(1)	16,700	56
PLA-(MeO-PEG)(2)	16,500	52

<sup>a</sup> Determined by <sup>1</sup>H-NMR measurement in CDCl<sub>3</sub>. The results are expressed as the mean ± S.D. (*n* = 3).

Table 3-1 には、本実験で用いた 2 つのロットの PLA-(MeO-PEG)の MWn および MeO-PEG-NH<sub>2</sub> の導入率を示している。MWn と MeO-PEG-NH<sub>2</sub> の導入率は、<sup>1</sup>H-NMR により算出した。すなわち、得られた PLA-(MeO-PEG)(1)および PLA-(MeO-PEG)(2) の特徴的なプロトンの化学シフト、3.61 ppm

(PEG-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-: s)、 4.32 ppm (terminal lactic group-COCH(OH)CH<sub>3</sub>: q,  $J = 7$  Hz) および 5.03-5.30 ppm (inside lactic group -COCH(CH<sub>3</sub>)O-: m)の積分強度は、それぞれ 99/1/216 および 93/1/215 であり、それらの値を用いて算出した。その結果、PLA-(MeO-PEG)(1)および PLA-(MeO-PEG)(2)の MW<sub>n</sub> は、それぞれ 16,700 と 16,500 であった。また、MeO-PEG-NH<sub>2</sub>の導入率は 56 %および 52 % という結果になった。Fig. 3-2 に示した PLA-(MeO-PEG)(1)の GPC のチャート (peak top、11.8 min)より、PLA-(MeO-PEG)(1)は完全に MeO-PEG-NH<sub>2</sub>と分離できていることがわかり、PLA-(MeO-PEG)(2)についても同様の結果が得られている(未発表データ)。また標準品を用い算出された GPC による PLA-(MeO-PEG)の MW は、ほぼ <sup>1</sup>H-NMR で算出された MW<sub>n</sub>と一致していることがわかった。

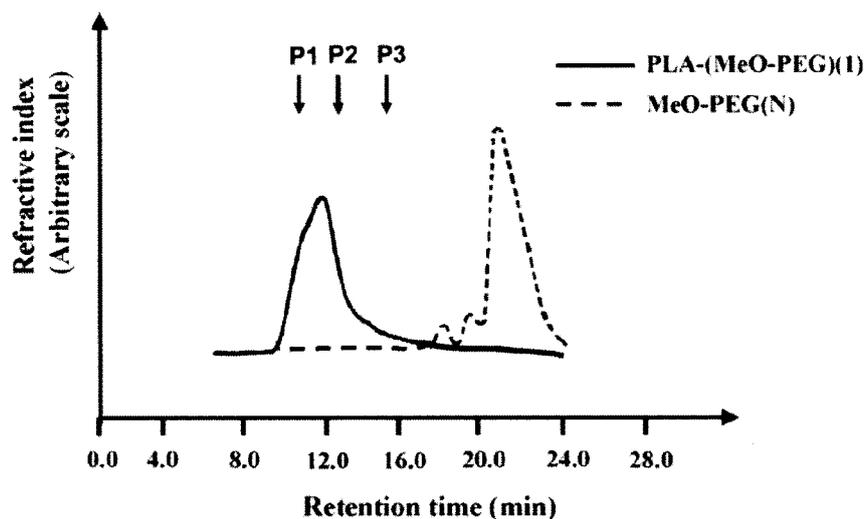


Fig. 3-2. Gel permeation profiles of PLA-(MeO-PEG) and Me-PEG (N). A column, GPC K-2003, was used with chloroform as an eluent at the flow rate of 3.5 mL/min. Each sample solution in chloroform (0.2 mL) with the concentration of 10 mg/mL was injected. P1, P2 and P3 show the elution peak positions of PS standards with the molecular weight of 28.6, 10.9 and 3.0 kDa, respectively.

### 3-3-2 PLA-Pyrene の合成と特性

PLA-Pyrene の MW<sub>n</sub> とピレン導入率は <sup>1</sup>H-NMR スペクトル(溶媒: CDCl<sub>3</sub>)より算出した。すなわち特徴的なプロトンの化学シフト 4.32 ppm (terminal lactic group -COCH(OH)CH<sub>3</sub>: q, *J* = 7 Hz) 、 5.03–5.30 ppm (inside lactic group -COCH(CH<sub>3</sub>)O-: m)、7.50–8.60 ppm (pyrene aromatic group protons: m)の積分強度 1、143 ± 2.6、3.0 ± 0.1 (それぞれ *n* = 3)から算出した。使用した PLA-aldehyde は、ホルミル基/PLA(mol/mol)の比率が 50 %であることから、反応効率は約 70 %であることがわかった。Table 3-2 に PLA-Pyrene の化学的特徴を示した。

Table 3-2. Characteristics of PLA-Pyrene obtained by reductive amination of PLA-aldehyde and Aminopyrene

	MW of polymer <sup>a</sup>	Pyrene /PLA <sup>a</sup> (%, mol/mol)
<b>PLA-Pyrene</b>	<b>10,500 ± 400</b>	<b>37.5 ± 1.7</b>

<sup>a</sup> Determined by <sup>1</sup>H-NMR measurement in CDCl<sub>3</sub>. The results are expressed as the mean ± S.D. (*n* = 3).

紫外可視分光光度計による PLA-Pyrene の測定の結果、Table 3-2 に示した <sup>1</sup>H-NMR スペクトルより算出された置換基の導入率とほぼ同程度の値を示していたことから、紫外可視分光光度計を用いて PLA-Pyrene の総量を測定できることが示された。また、溶媒としてアセトニトリルを用いて測定した際、励起波長 400 nm における PLA-Pyrene の蛍光スペクトルは Fig. 3-3 に示す結果となった。

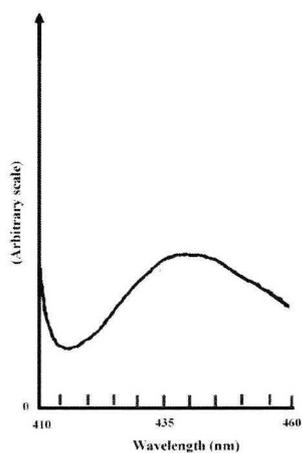


Fig. 3-3. Fluorescence spectrum of PLA-Pyrene.

### 3-3-3 In vitro における粒子特性

未封入の PLA-ナノパーティクルは、PLA-(MeO-PEG)を基剤として溶媒拡散法により調製した。動的光散乱法によりこの平均粒子径を測定したところ、112 nm であった。Fig. 3-4 に示した透過型電子顕微鏡の写真より、粒子はほぼ同程度の粒子径であり球形を示すことが判明した。

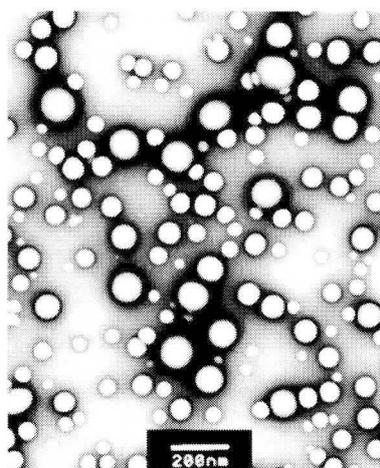


Fig. 3-4. TEM photomicrographs of plain PLA-(MeO-PEG) nanoparticles obtained by solvent diffusion method. The white bar is 200 nm long.

PLA-(MeO-PEG)(1)およびPLA-(MeO-PEG)(2)を用いて調製したPLA-Pyrene封入ナノパーティクルの粒子特性を Table 3-3 に示す。

Table 3-3. Particle characteristics of fluorescence probe-loaded PLA-(MeO-PEG) nanoparticles obtained by solvent diffusion method

	PLA-(MeO-PEG)	Mean diameter (nm)	Aminopyrene content <sup>a</sup> (% w/w)	Incorporation efficiency (%)
PLA-Pyrene NP (1)	PLA-(MeO-PEG)(1)	161.9 ± 7.5	0.16 ± 0.00	106.7 ± 2.7
PLA-Pyrene NP (2)	PLA-(MeO-PEG)(2)	221.6 ± 9.6	0.18 ± 0.05	114.6 ± 29.0

<sup>a</sup> This is shown as weight % of Aminopyrene in the nanoparticles. The results are expressed as the mean ± S.D. (*n* = 3).

PLA-PyreneNP(1)はPLA-PyreneNP(2)より小さな粒子径を示した。また標識物質の含有率は両粒子とも同程度であった。Table 3-1 に示したように、PLA-(MeO-PEG)(1)の MW<sub>n</sub> は PLA-(MeO-PEG)(2)とほぼ同程度であったが、MeO-PEG-NH<sub>2</sub> の導入率は PLA-(MeO-PEG)(2)に比べ PLA-(MeO-PEG)(1)の方が少し高かった。Bazile らによれば、同様なブロックコポリマーである MeO-PEG-PLA (MW 12,000 もしくは 32,000)および PLA(MW 60,000)で調製したナノパーティクルでは、PLA-MeO-PEG の比率が PLA に比べ高くなるとその粒子径は小さくなると報告しており、今回の結果はそれに近いものであると考えられる<sup>16)</sup>。従って、PLA に導入された MeO-PEG-NH<sub>2</sub> と導入されていない PLA との比率の相違が、粒子径に影響したと考えられる。しかしながら両粒子とも

EPR 効果を期待するのに適した粒子径であるといえる。PLA-Pyrene 封入ナノパーティクルの粒子径は未封入のものより大きかった。また PLA-Pyrene の封入効率は、100 %もしくはそれ以上を示していることから、PLA-Pyrene は DiD と比較してより安定に効率よく封入できることが示唆された。これは PLA-Pyrene がナノパーティクルのコアを形成する PLA 鎖と同じ構造の PLA 部位を有するためであると考えられる。

ナノパーティクルからの標識体の放出実験は、PBS とエタノールの混液(7:3、v/v)または PBS と正常マウス血漿の混液(1:1、v/v)中、37°C でインキュベートして行った(Fig. 3-5)。PLA-Pyrene は PBS とエタノール混液中、24 時間後においてそのほとんどが粒子内に残存していることがわかった。これは PLA-Pyrene が蛍光標識された PLA として機能できることを示唆している。さらに PBS と血漿混液中でも 24 時間後において標識体が 95 % (w/w) 残存していることが示された。また、ナノパーティクルを超遠心により沈殿させると、上清ではなく沈殿物が標識体の色を維持していた。

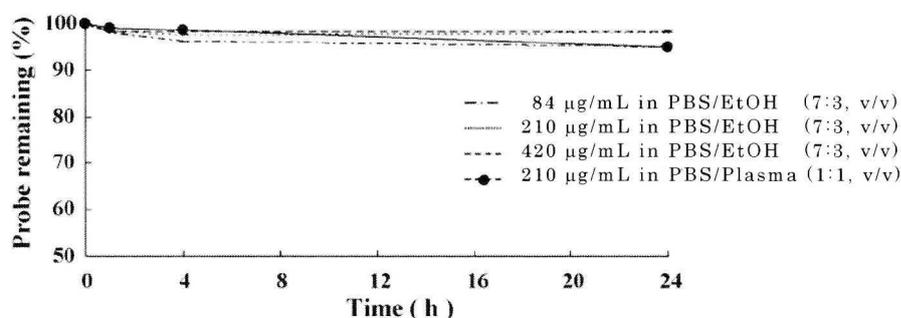


Fig. 3-5. Maintenance of the probe in PLA-Pyrene-loaded nanoparticles during the incubation at 37°C at a particle concentration of 84 mg/mL, 210 mg/mL and 420 mg/mL in the PBS/EtOH (7:3, v/v) mixture or at a particle concentration of 210 mg/mL in the PBS/plasma (1:1, v/v) mixture. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

近年、PLA もしくは PLA/PEG-PLA を基剤としたマイクロパーティクルおよびナノパーティクルの血漿タンパクによる吸着が検討されている<sup>31-35)</sup>。血漿タンパクは急速にそれらの粒子を吸着するが<sup>31, 33, 34)</sup>、生理的条件下では PLA のエステル結合の加水分解によるマトリックス構造の分解に数週間もしくは数ヶ月と長期間を要することで、粒子のコアが長く維持できるとされている<sup>14, 36)</sup>。これらの考え方より、粒子中の PLA は安定にコア内に残存していることが考えられる。PLA-Pyrene は PLA と同様の構造を有することから、PLA とほぼ同じ挙動を示し、PBS/血漿混液中において PLA-Pyrene およびピレン部位の放出が抑えられている結果になったと考えられる。また、血漿タンパクとの接触によって生じた沈殿物から PLA-Pyrene やピレン部位の放出はなかった。これらは、吸着したタンパク質をタンパク質可溶化剤で洗い流すこと<sup>33, 34)</sup>や得られた沈殿物、封入された標識体の総量など化学的特性を分析することで明確にできると考えられ、今後の検討が必要な課題である。以上の *in vivo* における検討より、PLA-Pyrene がナノパーティクル内に安定に封入され、ナノパーティクルの標識体として優れていることが示唆された。Yamamoto らは、MeO-PEG-PLA-pyrene、lactose-PEG-PLA により調製された PLA-PEG について報告している<sup>37)</sup>。PLA-Pyrene は PLA の標識体として有益であり、また安定にナノパーティクル化でき、さらにナノパーティクルの標識体としても利用できると考えられる。

### 3-3-4 尾静脈内投与後のナノパーティクルの体内分布

最初に PLA-Pyrene 封入ナノパーティクルの正常マウスにおける体内分布を検討した。PLA-Pyrene 封入ナノパーティクルとしては PLA-Pyrene NP(1)を使用し、その平均粒子径は 162 nm であった(Table 3-3)。この粒子径は以前報告した DiD 封入ナノパーティクル(平均粒子径、154 nm)とほぼ同程度の粒子径である<sup>38)</sup>。血漿や主要臓器における標識体の分布を Fig.3- 6 に示す。

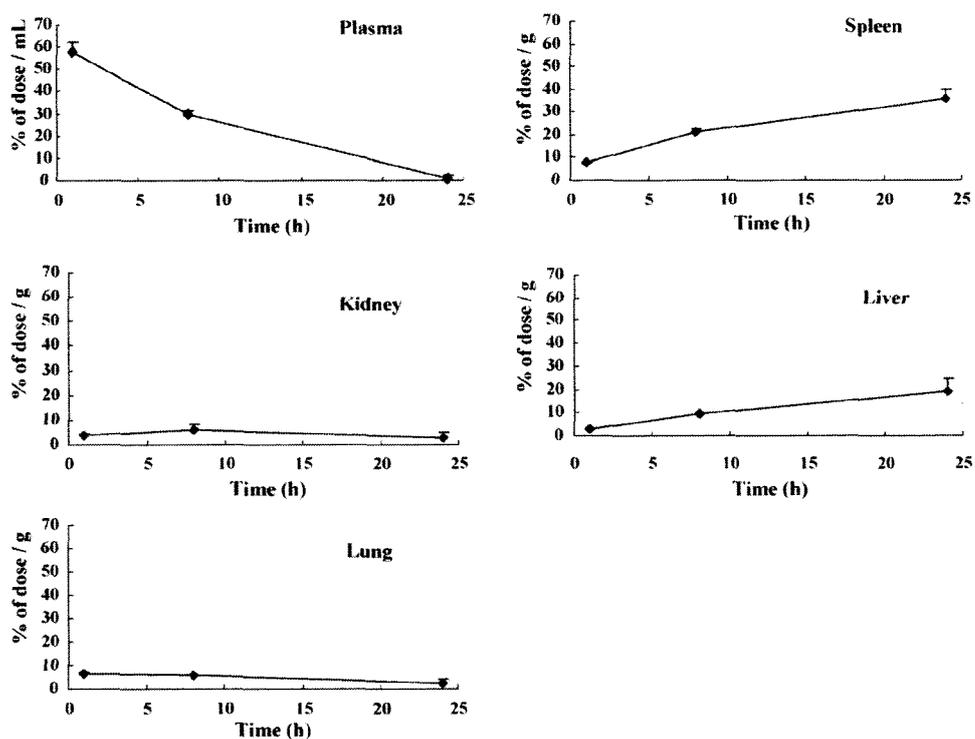


Fig. 3-6. Biodistribution profiles of the probe in plasma and organs after i.v. injection of PLA-Pyrene-loaded nanoparticles to normal mice at a dose of 20 mg/kg. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 4$ ).

PLA-Pyrene 封入ナノパーティクルは、最初血漿中に高い標識体の値を示し、主要臓器中の値は低かった。その後、血漿中での標識体の値は徐々に低下し、

一方で脾臓と肝臓に集積がみられた。また腎臓と肺についてはわずかばかりの集積しかみられなかった。以前報告した DiD 封入ナノパーティクルの体内分布と比較すると<sup>38)</sup>、PLA-Pyrene 封入ナノパーティクルの方が血漿中の値が高く、脾臓および肝臓の値はより低かった。PLA-Pyrene NP(1)と DiD 封入ナノパーティクルの平均粒子径はほぼ同程度であったことから、粒子径や投与量が分布の相違に影響したものではないと考えられる。DiD は *in vitro* の実験において、安定にナノパーティクル内に封入されることが明らかとなっているが<sup>38)</sup>、DiD の特性として赤血球に容易に吸着され、細胞との接触および吸着により DiD が PLA ナノパーティクル内から移行してしまうことが報告されている<sup>24)</sup>。一方、PLA-Pyrene は PLA と同様の構造を有することから、PLA とほぼ同じ挙動を示し脂溶性のコアへ安定に封入されると考えられる。これらの特徴的な相違が、体内分布の相違を引き起こしていると考えられる。しかしながら、これらの問題を明確にするためには、細胞存在下などでの安定性などさらに検討が必要である。

次に Sarcoma-180 固形腫瘍担がんマウスにおける、ナノパーティクルの腫瘍への受動的ターゲティングについて検討した。当研究室で以前検討した薬物封入ナノパーティクルの平均粒子径が約 200-250 nm であったことから<sup>28, 39)</sup>、その粒子と比較するためにも、本検討では平均粒子径 220 nm の PLA-Pyrene 封入ナノパーティクル、PLA-Pyrene(2)(Table 3-3)を使用した。体内分布の結果を Fig. 3-7 に示した。

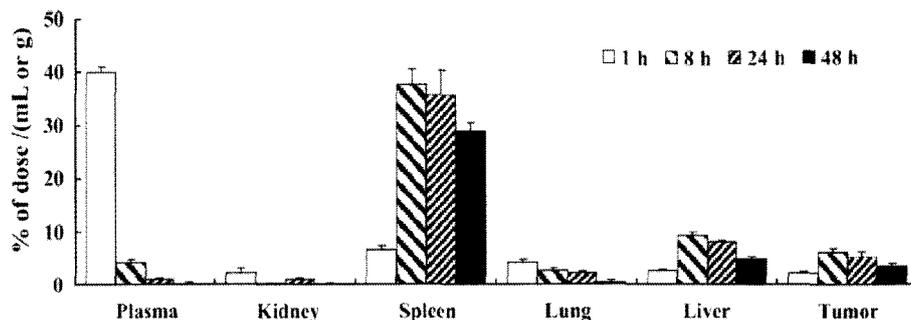


Fig. 3-7. Tissue distribution profiles of the probe after i.v. injection of PLA-Pyrene-loaded nanoparticles to Sarcoma-180 solid tumor-bearing mice at a dose of 20 mg particles/kg. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 4$ ).

投与後 1 時間値において血漿中には投与量の 40 % と高く、腫瘍中の値も数%を示した。また 8 時間値において腫瘍での値が高くなっていることから、ナノパーティクルが腫瘍に集積していることが示唆された。さらに、腫瘍の値は 48 時間後においても、明確に高い値を維持していた。血漿からの消失、脾臓への集積は正常マウスでの結果より高かった。これは粒子径の相違によるものと考えられる。また腫瘍への集積は、血漿からのナノパーティクルの速い消失が寄与していると考えられる。Fig. 3-8 に腫瘍中濃度/血漿中濃度の比率を示しているが、経時的に増加しているのがわかり、その比率が 10 (tumor/plasma) を超えていることから、ナノパーティクルが効率的な腫瘍へのターゲティング能を有することが示された。この腫瘍への局在は EPR 効果によるナノパーティクルの腫瘍への集積であると考えられる<sup>7-12)</sup>。本検討で用いたナノパーティクルは脾臓に集積してしまう傾向があるものの、220 nm の PLA-(MeO-PEG) ナノパーティクルは腫瘍への受動的ターゲティング能を有していることが示された。同

様の理由で、CPT 封入 PEG-PLA ナノパーティクルを投与した後の CPT の体内分布でも、近似した特徴が観察されている<sup>28)</sup>。

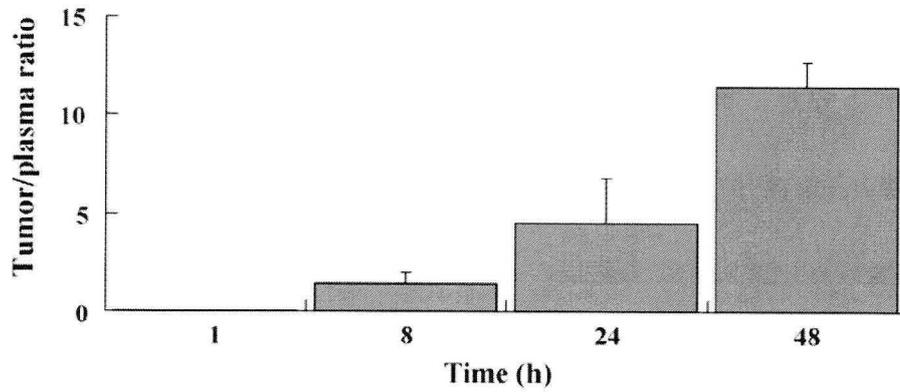


Fig. 3-8. Tumor localization of the probe after i.v. injection to Sarcoma-180 solid tumor-bearing mice at a dose of 20mg particles/kg. The injection was performed 7 d after inoculation. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3-4$ ).

### 3-4 小括

新規に開発した標識体、PLA-Pyrene を PLA-aldehyde と Aminopyrene の還元アミノ化により合成した。この標識体は PBS とエタノール混液および血漿存在下において、安定にナノパーティクルに内封されていることがわかった。さらに、PLA-Pyrene は PLA と同様の構造を有していることから、コアを形成する PLA と同様の挙動を示し、ナノパーティクルの体内分布をより確実に反映できることがわかった。標識体は、脾臓と肝臓にある程度集積するものの、血漿から徐々に消失することから、ナノパーティクルが効果的に EPR 効果により腫瘍に蓄積することを示すものであると考えられた。PLA-(MeO-PEG)ナノパーティクルは平均粒子径が 220 nm であり、腫瘍に集積して長い時間維持されたことから、本研究で調製したナノパーティクルは受動的ターゲティングの担体として有用であることが示唆された。

## 総括

PLA 誘導体の新規合成法および得られた誘導体を基剤とするナノパーティクルへの応用について検討した。

合成法については末端に反応性の高いアルデヒドを有する PLA 誘導体とアミノ基を有する化合物の間で形成するシッフ塩基を還元することで可能とした。また得られた PLA-誘導体である PLA-(MeO-PEG)を基剤としてナノパーティクルが調製可能であることが示唆された(第 1 章)。

還元アミノ化の反応を行う際に、溶媒としてジクロロメタンとメタノール(1:1、v/v)混液を用いることで、反応は安定した。さらに GPC を行う際にろ液を分取するポイントを検討することで、PLA-(MeO-PEG)における MeO-PEG の導入率を高めることに成功した。さらに得られた PLA-(MeO-PEG)を基剤として DiD を封入したナノパーティクルを調製し正常マウスに尾静脈内投与したところ、血漿中に DiD を維持させることができた(第 2 章)。

ナノパーティクルの正確な体内分布を検討するために、本合成法を利用して PLA の末端に蛍光色素を導入した誘導体、PLA-Pyrene を合成した。この蛍光 PLA 誘導体を PLA-(MeO-PEG)ナノパーティクルに封入し、正常マウスでの分布について検討したところ、血漿中濃度は維持され、脾臓および肝臓に分布することがわかった。また、組織への分布はその粒子径や PEG の導入率に影響を受けることが判明した。さらに PLA-Pyrene 封入ナノパーティクルを Sarcoma-180

を移植した担がんマウスに投与したところ腫瘍組織に集積し、血漿中量と比較しても、より長く腫瘍組織に分布していることが判明した(第3章)。

以上の結果より、本研究で検討した PLA 誘導体の新規合成法は、ナノパーティクルの基剤や標識体などの新たな誘導体を合成できるなど、応用範囲も広く有用であると考えられる。また、得られた PLA 誘導体を用いたナノパーティクルは、脂溶性抗悪性腫瘍薬などの薬物担体として利用し得ることが示され、抗悪性腫瘍薬を代表とする薬物治療の改善に有益であることが示された。

## 謝辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました星薬科大学 医療薬剤学教室 教授、町田良治先生に深く感謝致します。

また、有益な御指導とご助言を賜りました、星薬科大学 医療薬剤学教室 准教授、大西 啓先生に謹んで深く御礼申し上げます。

さらに、本研究において御助言、ご協力を頂きました星薬科大学 医療薬剤学教室の諸氏に感謝致します。

最後に、本研究の遂行にあたりご協力頂いた、星薬科大学 医療薬剤学教室、小久江伸介氏、桐ヶ谷知史氏、瀧田賢司氏、植木賢一氏、北原菜実氏、中村昌史氏、秋山真美氏ならびに中谷美保氏に感謝します。

## 引用文献

- 1) Yang, S.C., Lu, L.F., Cai, Y., Zhu, J.B., Liang, B.W., Yang, C.Z., Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. *J. Control. Release* 59, 299–307 (1999).
- 2) Nagasaki, Y., Yasugi, K., Yamamoto, Y., Harada, A., Kataoka, K., Sugar-installed block copolymer micelles: their preparation and specific interaction with lectin molecules. *Biomacromolecules* 2, 1067–1070 (2001).
- 3) Charrois, G.J., Allen, T.M., Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1663, 167–177 (2004).
- 4) Brannon-Peppas, L., Blanchette, J.O., Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1649–1659 (2004).
- 5) Shenoy, V.S., Vijay, I.K., Murthy, R.S., Tumour targeting: biological factors and formulation advances in injectable lipid nanoparticles. *J. Pharm. Pharmacol.* 57, 411–422 (2005).
- 6) Abraham, S.A., Waterhouse, D.N., Mayer, L.D., Cullis, P.R., Madden, T.D., Bally, M.B., The liposomal formulation of doxorubicin. *Methods Enzymol.* 391, 71–97 (2005).
- 7) 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).
- 8) Jain, R.K., Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Metastasis Rev.* 6, 559–593 (1987).
- 9) Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Ekimoto, H., Shibasaki, C., Kataoka, K., Toxicity and antitumor activity against solid tumors of micelle-forming polymeric anticancer drug and its extremely long circulation in blood. *Cancer Res.* 51, 3229–3236 (1991).

- 10) Woodle, M.C., Lasic, D.D., Sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1113, 171–199 (1992).
- 11) Unezaki, S., Maruyama, K., Ishida, O., Suginaka, A., Hosoda, J., Iwatsuru, M., Enhanced tumor targeting and improved antitumor activity of doxorubicin by long-circulating liposomes containing amphipathic poly(ethylene glycol). *Int. J. Pharm.* 126, 41–48 (1995).
- 12) Zhang, X., Burt, H.M., Mangold, G., Dexter, D., Von Hoff, D., Mayer, L., Hunter, W.L., Anti-tumor efficacy and biodistribution of intravenous polymeric micellar paclitaxel. *Anticancer Drugs* 8, 696–701 (1997).
- 13) Ogawa, Y., Yamamoto, M., Takada, S., Okada, H., Shimamoto, T., Controlled-release of leuprolide acetate from polylactic acid or copoly(lactic/glycolic) acid microcapsules: influence of molecular weight and copolymer ratio of polymer. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 1502–1507 (1988a).
- 14) Ogawa, Y., Okada, H., Yamamoto, M., Shimamoto, T., In vivo release profiles of leuprolide acetate from microcapsules prepared with polylactic acids or copoly(lactic/glycolic) acids and in vivo degradation of these polymers. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 2576–2581 (1988b).
- 15) Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., Langer, R., Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 263, 1600–1603 (1994).
- 16) Bazile, D., Prud'homme, C., Bassoullet, M.T., Marlard, M., Spenlehauer, G., Veillard, M., Stealth Me.PEG–PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J. Pharm. Sci.* 84, 493–498 (1995).
- 17) Otsuka, H., Nagasaki, Y., Kataoka, K., Surface characterization of functionalized polylactide through the coating with heterobifunctional poly(ethylene glycol)/polylactide block copolymers. *Biomacromolecules* 1, 39–48 (2000).
- 18) Yamamoto, Y., Nagasaki, Y., Kato, Y., Sugiyama, Y., Kataoka, K., Long-circulating poly(ethylene glycol)–poly(dl-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge. *J. Control. Release* 77, 27–38 (2001).
- 19) Jule, E., Nagasaki, Y., Kataoka, K., Lactose-installed poly(ethylene

- glycol)–poly(dl-lactide) block copolymer micelles exhibit fast-rate binding and high affinity toward a protein bed simulating a cell surface. A surface plasmon resonance study. *Bioconjug. Chem.* 14, 177–186 (2003).
- 20) Ishida, O., Maruyama, K., Sasaki, K., Iwatsuru, M., Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice. *Int. J. Pharm.* 190, 49–56 (1999).
- 21) Ah, Y.C., Choi, Y., Kim, S.Y., Kim, S.H., Lee, K.S., Byun, Y., Effects of ethylene oxide gas sterilization on physical properties of poly(l-lactide)–poly(ethylene glycol)–poly(l-lactide) microspheres. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 12, 783–799 (2001).
- 22) Jeong, J.H., Kim, S.W., Park, T.G., Biodegradable triblock copolymer of PLGA–PEG–PLGA enhances gene transfection efficiency. *Pharm. Res.* 21, 50–54 (2004).
- 23) Dunn, S.E., Coombes, A.G.A., Garnett, M.C., Davis, S.S., Davies, M.C., Illum, L., In vitro cell interaction and in vivo biodistribution of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres surface modified by poloxamer and poloxamine copolymers. *J. Control. Release* 44, 65–76 (1997).
- 24) Mosqueira, V.C., Legrand, P., Gref, R., Heurtault, B., Appel, M. Barratt, G., Interactions between a macrophage cell line (J774A1) and surface-modified poly(dl-lactide) nanocapsules bearing poly(ethylene glycol). *J. Drug Target.* 7, 65–78 (1999).
- 25) Panagi, Z., Beletsi, A., Evangelatos, G., Livaniou, E., Ithakissios, D.S., Avgoustakis, K., Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA–mPEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 221, 143–152 (2001).
- 26) Nguyen, C.A., Allemann, E., Schwach, G., Doelker, E., Gurny, R., Cell interaction studies of PLA–MePEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 254, 69–72 (2003).
- 27) Luo, Y., Prestwich, G.D., Cancer-targeted polymeric drugs. *Curr. Cancer Drug Targets* 2, 209–226 (2002).
- 28) Miura, H., Onishi, H., Sasatsu, M., Machida, Y., Antitumor characteristics of

- methoxypolyethylene glycol-poly(dl-lactic acid) nanoparticles containing camptothecin. *J. Control. Release* 97, 101–113 (2004).
- 29) Borch, R.F., Bernstein, M.D., Durst, H.D., The cyanohydroborate anion as a selective reducing agent. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2897–2904 (1971).
- 30) Sasatsu, M., Onishi, H., Machida, Y., Preparation of a PLA–PEG block copolymer using a PLA derivative with a formyl terminal group and its application to nanoparticulate formulation. *Int. J. Pharm.* 294, 233–245 (2005).
- 31) Allèmann, E., Gravel, P., Leroux, J.C., Balant, L., Gurny, R., Kinetics of blood component adsorption on poly(D,L-lactic acid) nanoparticles: evidence of complement C3 component involvement. *J. Biomed. Mater. Res.* 37, 229–234 (1997.).
- 32) Lacasse, F.X., Fillion, M.C., Phillips, N.C., Escher, E., McMullen, J.N., Hildgen, P., Influence of surface properties at biodegradable microsphere surfaces: effects on plasma protein adsorption and phagocytosis. *Pharm. Res.* 15, 312–317 (1998.).
- 33) Zambaux, M.F., Bonneaux, F., Gref, R., Dellacherie, E., Vigneron, C., MPEO-PLA nanoparticles: effect of MPEO content on some of their surface properties. *J. Biomed. Mater. Res.* 44, 109–115 (1999).
- 34) Gref, R., Lück, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., Blunk, T., Müller, R.H., ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 18, 301–313 (2000).
- 35) Atthoff, B., Hilborn, J., Protein adsorption onto polyester surfaces: is there a need for surface activation? *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 80, 121–130 (2007.).
- 36) Yoo, H.S., Oh, J.E., Lee, K.H., Park, T.G., Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin-PLGA conjugate for sustained release. *Pharm. Res.* 16, 1114–1118 (1999).
- 37) Yamamoto, Y., Yasugi, K., Harada, A., Nagasaki, Y., Kataoka, K., Temperature related change in the properties relevant to drug delivery of poly(ethylene

- glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles in aqueous milieu. *J. Control. Release* 82, 359–371 (2002).
- 38) Sasatsu, M., Onishi, H., Machida, Y., In vitro and in vivo characterization of nanoparticles made of MeO-PEG amine/PLA block copolymer and PLA. *Int. J. Pharm.* 317, 167–174 (2006).
- 39) Kunii, R., Onishi, H., Machida, Y., Preparation and antitumor characteristics of PLA/(PEG-PPG-PEG) nanoparticles loaded with camptothecin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 9–17 (2007).