刺激に応答する高分子材料とその時間および
空間制御型 DDS への展開

岡 野 光 夫*

Stimuli-responsive polymers and their application to special and temporal controlled drug delivery system

Poly(N-isopropylacrylamide) (PIPAAm) is well-known to change its structure in response to temperature in aqueous solutions. Polymer chains of IPAAm hydrate to form expanded structures in water at lower solution temperatures (< 32°C). At temperatures above 32°C, however, the chains form compact structures by dehydration manifested as a lower critical solution temperature (LCST). Telomerization chemistry is expected to control oligomer molecular weight and create synthetic routes to semitelechelic oligomers averaging one functional end group per oligomer chain. Thiol compounds having functional groups as telogens are known to be effective in introducing functional groups to the ends of growing polymeric chains and regulating polymer molecular weight by radical telomerization via chain-transfer reactions.

The research described in this paper is directed toward development and fundamental studies of biomedically relevant modulation systems using the temperature-responsive polymer, PIPAAm with a functional end group, as switching sequence. Temperature responsive semitelechelic PIPAAm polymer was attached to biomolecules, crosslinked hydrogels and solid surfaces to create new, modified bioconjugates, graft type gels and grafted surfaces, respectively.

Teruo Okano*

key words : Poly(N-isopropylacrylamide), surface modification, hydrogels, biomolecule conjugates, temperature-responsibility

治療したい細胞・組織への薬の作用が、正常な細胞・組織への作用に比較して大きいこと、すなわち薬の作用部位への選択性が高ければ高いほどその薬の副作用を小さくし、薬物治療を効果的にする。本来、薬の化学構造に基づく生体内での分布は、薬自体の活性と同様に分子的にデザインされるべきである。しかし、従来きわめて薬理活性の高い薬が、たまたまその構造によって治療部位に移行しやすい、偶然性に頼る方法で新薬の開発が進められてきている。このため、薬の動態制御

を考慮した分子構造設計はされず、新薬の開発成功率はきわめて低くなっている。このことは、薬の構造のなかに、活性と動態の両方を制御することのできる手法を持ち込むことによって、新薬開発に新しい局面を作ること示している。すなわち、従来の薬の活性制御に加えて、生体内での薬の行き先(空間的制御)と経時変化(時間的制御)を規定する手法に基づいた薬の分子設計法を確立させ、合目的的に薬を開発して行くことがきわめて大切である。

このような観点で、高い活性を持つ薬の構造とは独立に薬の空間的・時間的制御を可能にする薬物キャリアの構造を、分子レベルと分子の集合レベルで設計を可能にすることに期待が集められて

* Institute of Biomedical Engineering, Tokyo Women's Medical College, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku, Tokyo 162 東京女子医科大学医工学研究施設
Offprint requests to : Teruo Okano, Ph. D.

いる¹⁻³⁾。この領域は、ドラッグデリバリーシステム(DDS)として世界的に注目され、今後の発展が期待されている。薬物を標的部位に送り届けたり、必要なときにキャリアから薬物が放出されたりすることのできる DDS は、ただ単に従来の製剤学としての薬学の一領域にとどまらず、新しい薬物治療システム学として高分子化学、医用工学、生物学などの知見と手法を積極的に取り入れた、学際領域として位置づけることができる。従来の学問領域からの集学的アプローチを可能とする新学問領域として、DDS 研究を進展させていかなければならない。

空間的制御

治療に必要な細胞や組織に、選択的に薬物を集積することができれば、薬の毒性はまったく考える必要がなく、革命的な薬物治療が達成できることはいうまでもない。しかし、この標的指向性を意図的に分子設計する試みは、必ずしも既成の化学、薬学や医学で対応することができず、広範な領域からの集学的アプローチこそが、この重要な課題を実現して行くものと思われる。標的部位に、選択的に薬物を作用させる標的指向性(ターゲティング)は、選択的な反応を生起させる抗体や糖鎖に薬物を結合させる考えかた(能動的ターゲティング)によって、研究が進められてきた。

特に抗体を用いた場合、特異性の高い抗原-抗体反応によって、薬物が標的部位と選択的に結合することが期待でき、このような抗体に薬物を結合させた分子を“ミサイルドラッグ”という名でよび、その現実には大きな期待が寄せられてきている。事実、*in vitro* で癌細胞の膜に対する抗体に抗癌剤を結合させたミサイルドラッグを、癌細胞と正常細胞の混合系に作用させると、顕著に癌細胞のみを死滅させることができる。

しかし、このようなミサイルドラッグを *in vivo* で作用させると、期待していたほどの効果を得ることができない。というのは、ミサイルドラッグが自分自身で推進力を持って癌部位に飛んで行くのではなく、血液の流れに乗って癌部位に近づき、血管から外に出て初めて癌細胞と接触する機会を

持つことになる。ミサイルドラッグという異物が静脈注射されると、白血球、マクロファージ、肝 Kupffer 細胞など、細網内皮系の細胞と接触して貪食され、標的部位に到達する前に、非特異的に正常細胞や正常組織に移行してしまう。*in vitro* で効果を示した癌細胞と接触できる状況下に達する前に、生体システムによって処理される問題を解決することなく、ただたんに抗体に薬を結合することによって生体中で効果を示す“ミサイルドラッグ”は実現しない。

東京女子医大-東京理科大の共同研究グループは、親水性のポリエチレングリコール(PEG)とポリアスパラギン酸からなるブロック共重合体を合成した⁴⁻⁶⁾。このポリアスパラギン酸にアドレアマイシン(ADR)を結合させると、この分子は生理食塩水中あるいは血清中で安定なミセルを形成した。20~50 nm サイズの球形ミセルは、外側は水和した PEG の親水性鎖が取り囲み、内側はアドレアマイシンを担持した疎水性鎖を核とするような、コア-シェル構造となっている。すなわち、内核の制癌活性のコアとは別に、体内動態を規定する親水性のシェル構造を持つことで、高分子ミセルは分子設計されているのが特徴である。この親水性の高い表面のために、高分子ミセルは細網内皮系に移行しにくくなる。事実、長期間にわたってこの高分子ミセルが血流に乗って体内を回っていることが観察された。このように、非特異的に正常細胞、組織に移行することが抑制された。一方、癌部位での物質の血管透過性は顕著に亢進しているため、アドレアマイシンを担持した高分子ミセルは、癌部位に選択的に集積された。癌部位で正常組織の数十倍の濃度にアドレアマイシンが集積し、ヒトの大腸癌を移植したヌードマウスの実験で、癌が完全に治療されることが確認された⁷⁻⁹⁾。

この例は、前述した能動的ターゲティングに対し、受動的ターゲティングの例であり、正常組織への抗癌剤の移行を最小限とし、癌部位にできるだけ集積する試みである。図1に、この空間的制御によるターゲティングと、時間的制御技術を対比させて示した。時間的制御技術は後述するが、

図 1 ドラッグデリバリーによる薬物治療の空間的、時間的制御

空間的制御技術は、局所場のみで刺激応答性薬物放出を行う時間的制御と併用させて、ダブルターゲティングという新しい領域(図 1)が創出でき、今後ますます活発になるものと考えられる。

時間的制御

(1) 薬の制御放出システム

薬物の徐放性、0 次放出などのコントロールリリースシステムは、DDS 技術のなかでもっとも古くから研究が進められており、新しい治療システムに应用されている。ハイドロゲルや膜で高分子鎖を巧みに利用し、短期あるいは長期の制御放出が実現され、経口薬、経皮吸収薬などに应用されていることはよく知られている。この技術は本来、薬物の有効血中濃度を長時間持続させ、副作用を最小にし、効果を最大にすることを目的として検討されてきている。

特に 0 次放出を実現するハイドロゲルや生体内分解性高分子の構造が追究されており、今後の発展が期待されている。最近、0 次放出にしたときに、従来の静注などでは達成できない治療効果が見出された。このことは、注射で薬物を投与したときと制御放出したときで薬物の治療効果が異なるという点で、きわめて興味ある例であろう。

武田薬品では最近、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)誘導体である酢酸リュープロライドを、生体内分解性の高分子であるポリグルコール酸-ポリ乳酸の共重合体ビーズ中に担持させ、1 カ月以上にわたってほぼ一定速度で徐放させることに成功した¹⁰⁾。この製剤は、アメリカより前立腺

表 1 刺激応答型薬物放出システム

1. on-off 放出制御
 - ←パルス型薬物放出システム
2. 自己制御型薬物放出システム
 - ←グルコース応答型インスリン放出システム
 - ←熱応答性解熱剤放出システム
3. 外的刺激によるターゲティング
 - ←局所刺激型薬物放出システム
4. 生体内特異的環境検知型物理的ターゲティング
 - pH 変化(消化器系, リソソームなど)
 - バクテリア(大腸など)
 - ヒドロキシラジカル(炎症部位など)
 - 酵素(リソソームなど)

癌の治療製剤として上市され、最近わが国においても販売が開始された。通常、酢酸リュープロライドは強く性腺を刺激するアゴニストとして作用するのであるが、長期徐放によって脳下垂体からの黄体形成ホルモンや卵胞刺激ホルモンの放出を抑制し(アンタゴニストとして作用)、前立腺や子宮の退縮をもたらした。薬物放出量の制御が薬物の治療効果を制御する好例である。このことは、将来 DDS がただたんに副作用を軽減して効率的な治療を行うにとどまらず、新しい治療をも可能にする革新的な薬物治療技術であることを示している。

(2) 刺激応答型薬物放出システム

必要なときにのみ薬物放出するシステムは、インテリジェント材料の開発と一体化して、夢の DDS として世界的に検討が開始されている。すなわち、温度、光、超音波、マイクロ波、磁場などの物理的刺激あるいは pH、グルコースなど化学的刺激を信号として検知し、構造・機能を変化させるインテリジェント材料を用いて、薬を刺激によって on-off 放出制御しようとするシステムは、薬の時間的制御を積極的に行う点できわめて重要である。

表 1 に、刺激応答型薬物放出システムを分類し、それぞれの代表的な課題を整理して示した。刺激にตอบสนองして薬物を放出させることができるのであれば、生体外からの光、電流、熱などの物理信号で、生体内の刺激応答性製剤をリモートコントロールすることが可能となる。このとき、癌など

図 2

片末端官能性ポリイソプロアクリルアミド (PIPAAm) を温度スイッチにして固体表面、ゲル、生理活性蛋白質などに導入することによって温度に応答するインテリジェントシステムが実現される。

の特定部位に信号を集中することで、物理的にターゲティングを達成することも可能となる。空間的制御で前述したターゲティングと両方の機能を分子的に設計することができれば、空間・時間の両方を制御したダブルターゲティングシステムが実現され、癌治療などに革命的な効果が期待できる(図 1)ことはすでに述べた。

さらに、生体内の特定環境に基づく、物理的あるいは化学的な信号を検知することができれば、自己制御型の薬物放出あるいはターゲティングが実現されよう。血中グルコース濃度に応答してインスリンを放出するシステムは、自己制御放出の例である。このシステムは人工膵臓^{11,12)}ともみることができよう。人工心臓や人工腎臓などポンプ機能や、ろ過機能の物理機能を代行する人工臓器研究が、人工肝臓(ただ単に吸着による解毒機能ではないシステムを意味する)や人工膵臓など代謝系の人工臓器に向けて研究が活発化し、新しい段階に入った今日と、正に同期するように自己制御放出の DDS 研究が発展し、学際色の強い興味ある新たな領域が誕生するに至っている。

(3) 分子刺激応答機能を持つ材料

ここでは、熱に応答して機能を変化する材料の分子設計法について、筆者らの研究を例に議論したい。

ポリイソプロピルアクリルアミド (PIPAAm) は低温側で水に溶解し、水和によりその高分子連鎖は大きく広がった構造を示す。32°C で急激な脱水和が起こり、疎水性相互作用により高分子鎖が凝集し、水に溶解していた高分子が不溶化する相分離現象を引き起こす。この相分離を引き起こす温度(下限臨界溶液温度, lower critical solution temperature: LCST)は、共重合組織によって種々に制御可能となった。たとえば、高分子を水に溶解させ、温度を変化させたときの光の透過性を調べ、狭い温度範囲内で高分子が溶解性から不溶性に変化していることが明らかにされた。さらにポリマー中の疎水性モノマー組成を増大させることによって、LCST を 32°C より低い温度にすることもできる。逆に親水性モノマー組成を増大させることにより、LCST を高温側にシフトさせることができる。

このようなモジュレーション分子を、合成材料表面や生理活性物質に導入する新しい挑戦に取り組み、外的信号に応じて機能を制御できるインテリジェント高分子が実現された。すなわち図 2 に示したように、応答時に溶解し、反応後に不溶化することにより反応系から分離される酵素や、温度で親水性と疎水性が変化するコマンド応答表面¹³⁾を、分子的にデザインすることが可能になったのである。

固体表面に温度応答性 PIPAAm を共有結合で固定すると、温度で親水性と疎水性を大きく変化させる表面が実現される。すなわち、低温側で水和した PIPAAm が表面を覆い、LCST (32°C) 以上では水に不溶化した収縮鎖が表面を覆っていることによる。この温度変化に伴う表面自由エネルギーの変化量とその感受性は、PIPAAm の片末端で表面に固定し、他方の片末端が自由末端鎖となっているときにきわめて大きくなることを見出された¹⁴⁾。これは自由末端鎖の運動性によりきわめて高い親水性を示し、収縮プロセスでは収縮鎖

図3 表面接触による血小板内カルシウムイオン濃度変化

IDc20 は IPAAm と DMAAm の共重合体をアミノセファデックスビーズ(直径 1 μ m)に表面固定した表面。PSt はポリスチレンラテックス表面を示す。

図4 PIPAAm ハイドロゲルの収縮

10°Cで膨潤した厚さ 2 mm, 直径 15 mm の平板型のハイドロゲルを 40°Cに温度上昇させると、ゲルは収縮を開始させた。その速度は、同一組成、架橋密度が同じであるにもかかわらず大きな相違が観察された。

の凝集構造がより強く疎水性の高い構造となっているためであると考えられた。事実、IPAAm とジメチルアクリルアミド(DMAAm)共重合体 P (IPAAm-co-DMAAm) (LCST が 39°C) の片末端にカルボキシル基を導入し、アミノセファデックスビーズ表面に固定した。

このビーズと血小板との相互作用に関し、血小板内の Ca^{2+} 濃度について色素(Fura2)を用いた蛍光測定から調べた。図3にその結果を示した。トロンピンで血小板を刺激したとき、細胞内 Ca^{2+} 濃度の顕著な増大が測定の温度範囲で認められた。また、ポリスチレンラテックスも血小板を刺激することが確認された。一方、刺激応答性 P (IPAAm-co-DMAm) を血小板とインキュベートしたとき、LCST 以下では Ca^{2+} 濃度は変化せず、LCST 以上で顕著な増大が観察された。このことは、LCST 以下ではビーズ表面が高度に水和され親水性となっているため、血小板と相互作用していないことを示している。一方、LCST 以上ではビーズ表面が疎水性となり、血小板に吸着していることを示唆している¹⁵⁾。すなわち、このような固体表面を用いることによって、細胞との接着を on-off することが可能であり、物理的ター

ゲティングの基礎技術として位置づけることができる。今後このような領域の発展により、新しいターゲティングが実現されて行くことに期待したい。

刺激応答性のハイドロゲルは LCST 以下で膨潤構造をとり、LCST 以上で収縮構造となる。この膨潤変化を利用して薬物放出の on-off 制御が実現されてきている¹⁶⁻²⁰⁾。さらに最近、図2に示したようなくし型構造のハイドロゲルの開発に成功した。このゲルを通常の IPAAm ハイドロゲルと比較して考えると、組成および架橋密度は同じにしてあるため、分子の構築構造の相違のみが議論できよう。事実、このくし型構造のハイドロゲルの温度に応答する収縮変化を調べると、図4のように、通常のゲルにくらべその速度は非常に大きくなっていることが明らかにされた。これはくし型構造の場合、自由末端鎖となっているグラフト鎖が温度に敏感に応答し、素早く収縮・凝集する。この高分子鎖が凝集した疎水性の高い凝集体同士が、互いに強い疎水性相互作用によって、さらに大きな収縮力を作って急速に膨潤から収縮に変化する興味ある現象が発見された。従来のゲルの収縮メカニズムをまったく変える新しい概念が提出された²¹⁾。

以上のような、低温側で膨潤し、高温側で収縮する系に加えて、低温側で収縮、高温側で膨潤するゲルに関しても新しい展開をみせている²²⁾。すなわち、高分子と水の相互作用に加えて高分子-高分子の相互作用を導入することによって、低温側で収縮、高温側で膨潤するゲルの新しい設計が進められている。これらのゲルを用いることによって、ゲルの膨潤/収縮変化を利用し、温度で薬物放出を完全にon-offできることが示された。またグルコース濃度変化によって高分子コンプレックスの形成-開裂が確認された。グルコース濃度に特異的に膨潤が増大し、薬物透過性を増大させるグルコース応答型薬物放出システムも検討が進んでいる。今後、インテリジェント DDS の実現に向かって発展して行くことが期待される。

文 献

- Okano, T., Yoshida, R.: Intelligent polymeric materials for drug delivery. *Biomedical Applications of Polymeric Materials*. (eds. Tsuruta, T., Kimura, Y.), CRS Press, 1993, p 407-428.
- Okano, T., Yoshida, R.: Thermo-responsive property of Poly(N-isopropyl-acrylamide-co-alkyl methacrylate). *New Functionality Materials*, (Volume B). *Synthesis and Function Control of Biofunctionality Materials*. (eds. Tsuruta, T., Doyama, M., Imanishi, Y.), Elsevier Science Publishers B. V., 1993, p 189-196.
- Okano, T., Yui, N., Yokoyama, M., Yoshida, R.: Advances in polymeric systems for drug delivery. *Japanese Technology Reviews*, Section E. *Biotechnology* 4(2), 1994.
- Yokoyama, M. et al.: Molecular design for missile drug: Synthesis of adriamycin conjugated with immunoglobulin using poly(ethylene glycol)-block-poly(aspartic acid) as intermediate carrier. *Makromol. Chem.* 190: 2041-2054, 1989.
- Yokoyama, M. et al.: Polymer micelles as novel drug carrier adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block-copolymer. *J. Controlled Release* 11: 269-278, 1990.
- Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y.: 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.
- Yokoyama, M. et al.: Toxicity and antitumor activity against solid tumors of micelleforming polymeric anticancer drug and its extremely long circulation in blood. *Cancer Research* 51: 3229-3236, 1991.
- Yokoyama, M. et al.: Characterization and anticancer activity of the micelleforming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *Cancer Res.* 50: 1693-1700, 1990.
- Kwon, G., Suwa, S., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Kataoka, K.: Enhanced tumor accumulation and prolonged circulation times of micelleforming poly(ethylene oxide-aspartate) block copolymer-adriamycin conjugated. *J. Controlled Release* 29: 17-23, 1994.
- 戸口 始, 小川泰亮, 岡田弘晃, 山本眞樹: 酢酸リユープロレリン徐放性注射剤. *薬学雑誌* 111: 397-409, 1991.
- Okano, T.: Controlled release system for insulin. *Current Therapy* 10(6): 29-33, 1992.
- Kikuchi, A., Okano, T.: Drug delivery system for new therapy. *Jpn. J. Artif. Organs* 23(5): 1062-1069, 1994.
- 岡野光夫: 分子モジュレーションとその新しい生医学的展開. *BME* 8(2): 22-28, 1994.
- Takei, Y. G., Aoki, T., Sanui, K., Ogata, N., Okano, T., Sakurai, Y.: Dynamic contact angle measurement to temperature-responsive surface properties for poly(N-isopropylacrylamide) grafted surfaces. *Macromolecules* 27(21): 6163-6166, 1994.
- Takei, Y. G., Aoki, T., Sanui, K., Ogata, N., Sakurai, Y., Okano, T.: Temperature-modulated platelet and lymphocyte interactions with poly(N-isopropylacrylamide)-grafted surfaces. *Biomaterials* 16: 667-673, 1995.
- Bae, Y. H., Okano, T., Hsu, R., Kim, S. W.: Thermosensitive polymers as on-off switches for drug release. *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 8: 481-485, 1987.
- Okano, T., Bae, Y. H., Jacobs, H., Kim, S. W.: Thermally on-off switching polymers for drug permeation and release. *J. Controlled Release* 11: 255-265, 1990.
- Katono, H., Maruyama, A., Sanui, K., Ogata, N., Okano, T., Sakurai, Y.: Thermo-responsive swelling and drug release switching of interpenetrating polymer networks composed of poly(acrylamide-co-butyl methacrylate) and poly(acrylic acid). *J. Controlled Release* 16: 215-228, 1991.
- Yoshida, R., Sakai, K., Okano, T., Sakurai, Y., Bae, Y. H., Kim, S. W.: Surface modulated skin layers of thermal responsive hydrogels as on-off switches; I. drug release. *J. Biomaterial Sci. Polymer Edn.* 3(2): 155-162, 1991.
- Yoshida, R., Sakai, K., Okano, T., Sakurai, Y.: Surface modulated skin layers of thermal responsive hydrogels as on-off switches; II. drug permeation. *J. Biomaterial Sci. Polymer Edn.* 3(3): 243-

- 252, 1992.
- 21) Yoshida, R., Uchida, K., Kaneko, Y., Sakai, K., Kikuchi, A., Sakurai, Y., Okano, T. : Comb-type grafted hydrogels with rapid de-swelling response to temperature changes. *Nature* 374(6519) : 240-242, 1995.
- 22) Okano, T. : Molecular design of temperature-responsive polymers as intelligent materials. *Advances in Polymer Science.* (ed. Dusek, K.), Springer Verlag, Berlin, 1993, p 179-197.