〔総合論文〕

ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)を組み込んだ
マイクロカプセルからの温度応答性放出制御

Tongjit KIDCHOB*¹・木村 俊作*¹・今西 幸男*²

(受付 1997 年 12 月 11 日・審査終了 1998 年 1 月 12 日)

要 旨 マイクロカプセルにポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm)を組み込んだ 2 種類の異なる温度応答性マイクロカプセルを調製し、親水性薬剤モデルの温度応答性放出を調べた。まず、ブロックポリペプチドマイクロカプセルの表面に開始剤を固定化し、*N*-イソプロピルアクリルアミドの重合を行って、マイクロカプセル表面に PNIPAAm をグラフト化したマイクロカプセルを調製した。PNIPAAm の下限臨界溶解温度より高温側では、マイクロカプセルの表面に密度の高いスキン層が形成され、内包した薬剤の放出が抑制されたのに対し、低温側ではスキン層の消失により放出が促進された。また、この薬剤放出の温度変化に対する応答は狭い温度範囲で素早く起こり、また、その応答は可逆的であった。もう一つの温度応答性マイクロカプセルとして、PNIPAAm ゲルを内部に充填したポリ乳酸マイクロカプセルを調製した。このシステムでは、下限臨界溶解温度より高温側ではゲルの収縮により含浸された薬剤の放出が促進された。また、マイクロカプセルからの放出は温度に応答して素早く起こり、放出量はマイクロカプセル内部の空孔のサイズと充填したゲルの量により調節可能であった。このように、生分解性ポリマーで調製したマイクロカプセルに、温度応答性ポリマーである PNIPAAm を組み込む方法を変えることで、負の温度応答性および正の温度応答性を示すマイクロカプセルシステムを構築できた。

1 緒 言

ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) ヒドロゲルは、下限臨界共溶温度 (LCST) をもち温度変化によって可逆的に膨潤-収縮することから^{1)~3)}、薬剤の放出制御システムへの利用が精力的に検討されている^{4)~6)}。

温度変化に対する薬剤放出制御システムは次の二つに分類できる。(1) 負の温度応答性を示す薬剤放出システム: 温度上昇により内部からの薬剤放出が停止するシステム^{4), 5)}。(2) 正の温度応答性を示す薬剤放出システム: 温度上昇により薬剤が放出されるシステム^{6), 7)}。本論文では、生分解性の温度応答性マイクロカプセルの調製を目的として、ブロックポリペプチドあるいはポリ乳酸マイクロカプセルに PNIPAAm ゲルを組み合わせたシステムを検討した。また、負の温度応答性と正の温度応答性を示す 2 種類の温度応答性薬剤放出制御システムを実

現するため、マイクロカプセルの修飾について次のような 2 種類の方法を考えた。(a) マイクロカプセルの表面に PNIPAAm をグラフトする。(b) マイクロカプセル内部に PNIPAAm のゲルを内包する。(a) のマイクロカプセルの表面に PNIPAAm 鎖をグラフトした場合、LCST より低温側では PNIPAAm グラフト鎖の水和により、マイクロカプセルの表面が親水性となって内包した薬剤の放出が促進されるが、高温側ではグラフト鎖の脱水和により、マイクロカプセルの表面が疎水性となり薬剤の放出が遅くなると考えられる (負の温度応答性薬剤放出システム)⁴⁾。一方、(b) での PNIPAAm ゲルをマイクロカプセル内部に充填し、薬剤をゲル中に閉じ込めた場合、LCST より高温側でゲルが収縮して薬剤が放出されるであろう (正の温度応答性薬剤放出システム)。

このように、同じ温度感受性ポリマーである PNIPAAm を使いながら、分子システムの組み上げ方の違いで薬剤放出の温度応答性を変えることができると考えられる。また、温度変化に対する応答速度について、(a) のマイクロカプセル表面に PNIPAAm をグラフトした場合速い応答が期待されるが、(b) の PNIPAAm ゲルを用いると遅くなることが予想される。そこで、後者については、小さなマイクロカプセルが数多く集合化

*¹ 京都大学大学院工学研究科材料化学専攻 (☎606-8501 京都市左京区吉田本町)

*² 奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科 (☎630-0101 生駒市高山町 8916-5)

したマイクロカプセルを調製し、その内部にゲルを種々の割合で充填した。これにより、数多くの小さな球状ゲルをマイクロカプセルに閉じこめることができ、トータルでのゲル表面積が大きくなることから、速い応答速度が期待できる。

2 実 験

2.1 表面にPNiPAAmをグラフトしたポリ (Glu(OMe)-co-Sar) マイクロカプセルの調製 (Scheme 1)

2.1.1 マイクロカプセルの調製 ポリ (Glu(OMe)-co-Sar) マイクロカプセルは W/O/W 型エマルション溶媒蒸発法により調製した⁹⁾。まず、界面活性剤 (PVA) を含むポリ (Glu(OMe)-co-Sar) (Glu(OMe) : Sar = 23 : 10, MW 4400) のクロロホルム溶液 (7.5 wt%) に、FITC-デキストラン (MW 70000, FITC; フルオレセイン) の水溶液 (3 wt%) を加えて、1 分間超音波処理して W/O 型エマルションを調製した。次に、これを大量の PVA 水溶液 (1 wt%) に注入して W/O/W 型エマルションを調製し、クロロホルムを蒸発させてマイクロカプセルを得た。シービングにより粒径 100~200 μm のものを用い

た。

2.1.2 マイクロカプセルのグラフト化 開始剤として 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) (ACV) を選び、これをポリアリルアミン (PAA) に結合した (PAA-ACV)。ACV 導入率を NMR 測定およびニンヒドリン法⁹⁾ により求めたところ、PAA (MW 10000) のアミノ基に対して ACV の導入率は 23 mol% となった。また、導入された ACV のうち、65 mol% は両末端で PAA 鎖に結合し、残り 35 mol% は片末端で結合していた。

ポリ (Glu(OMe)-co-Sar) マイクロカプセルを部分加水分解することで、表面にカルボキシル基を有するマイクロカプセルを得た¹⁰⁾。得られたマイクロカプセルの表面のカルボキシル基をローダミン法⁹⁾ により定量したところ、除去された OMe 基は約 25 mol% であった。

このマイクロカプセル表面に、PAA-ACV を縮合剤に WSC (水溶性カルボジイミド) を用いて結合した。これにより、1 mg のマイクロカプセルに約 64 μg の PAA-ACV がグラフト化された。この PAA-ACV で修飾したマイクロカプセル (30 mg) を、N-イソプロピルアクリルアミド (NiPAAm) (10 wt%) を含む水溶液に懸濁し、窒素雰囲気下、室温で 12 時間光照射によりグ

Scheme 1. Preparation scheme of PNiPAAm-grafted poly(Glu(OMe)-co-Sar) microcapsule.

ラフト重合を行った。調製したマイクロカプセルの IR 測定より、グラフト化された PNIPAAm の量は 1 mg のマイクロカプセル当たり 10 μ g と求められた。

ナイロンカプセル膜への PNIPAAm グラフト化は、すでに岡畑らによって報告されているが⁴⁾、ここでのグラフト化方法は次のような点で異なっている。まず、ナイロンカプセルへのグラフト化では水溶液中の開始剤を用いているのに対し、本研究ではグラフト重合に際して、開始剤の 80% 以上がマイクロカプセル表面に固定化されており、表面グラフト化効率が低い。また、ナイロンカプセルサイズがミリオーダーであるのに対し、ポリペプチドマイクロカプセルは 100~200 μ m であり、原理的にはさらにサイズの小さいマイクロカプセルの表面グラフト化も可能である。

2.2 PNIPAAm ゲルを内包したマイクロカプセルの調製 (Scheme 2)

2.2.1 マイクロカプセルの調製 ポリ乳酸マイクロカプセルは先に述べた W/O/W 型エマルション溶媒蒸

発法により調製した。界面活性剤 (Span 60) を含むポリ乳酸 (MW 60000) のクロロホルム溶液 (8 wt%) に、FITC-デキストラン (MW 70000) の水溶液 (3 wt%) を加え、磁気かくはんあるいは Vortex により W/O 型エマルションを調製した。次に、これを大量の PVA 水溶液 (1 wt%) に注入して W/O/W 型エマルションを調製し、クロロホルムを蒸発させてマイクロカプセルを得た。磁気かくはん法で得られたマイクロカプセルを MM, vortex mixing 法で得られたマイクロカプセルを MV で表す。

2.2.2 表面近くの内部空孔に PNIPAAm ゲルを充填したマイクロカプセルの調製 PNIPAAm (20 wt%) とメチレンビスアクリルアミド (1 mol%) を含む水溶液に、調製したマイクロカプセルを 8 時間または 48 時間浸せきした。その後、マイクロカプセルを取り出して、過硫酸アモニウムおよびテトラメチルエチレンジアミンを用いて、窒素雰囲気下、室温で 24 時間レッドックス重合を行った。MM を 8 時間および 48 時間浸せきして得

Scheme 2. Schematic illustration of PLLA microcapsules containing PNIPAAm (cross-section).

Preparation of PLLA microcapsules loading PNIPAAm gel in the surface inner-cavities

Preparation of PLLA microcapsules loading PNIPAAm gel in all the inner-cavities

Scheme 3. Schematic illustration of PLLA microcapsules. Left panel, PLLA microcapsule loading PNIPAAm gel in the surface of inner-cavities; right panel, PLLA microcapsule loading PNIPAAm gel in all the inner-cavities.

られたマイクロカプセルを、MM8およびMM48とそれぞれ表す。同様に、MVから得られたものを、MV8およびMV48と表す (Scheme 3)。

2.2.3 すべての内部空孔にPNIPAAmを充填したマイクロカプセルの調製 NIPAAm (10 wt%) とメチレンビスアクリルアミド (1 mol%) およびデキストランを含む水溶液を、界面活性剤 (Span 60) を含むポリ乳酸のクロロホルム溶液に注入し、10分間空素置換させた後、過硫酸アモニウムおよびテトラメチルエチレンジアミンを加えて、磁気かくはん法およびvortex mixing法によりW/O型エマルジョンを調製した。このエマルジョンを大量のPVA水溶液に注入してW/O/W型エマルジョンを調製した。室温で24時間かくはんして重合およびクロロホルムの蒸発を行い、PNIPAAmゲルを充填したマイクロカプセルを調製した。磁気かくはん法で得られたマイクロカプセルをMMG、Vortex mixing法により得られたマイクロカプセルをMVGと表す (Scheme

3)。

3 結果と考察

3.1 表面にPNIPAAmをグラフトしたポリ (Glu-(OMe)-co-Sar) マイクロカプセル

3.1.1 マイクロカプセルの顕微鏡観察 調製したマイクロカプセルを水中に懸濁させて、温度を25°Cから40°Cに変えて光学顕微鏡観察を行った。温度を25°Cから40°Cに昇温すると、5分以内にマイクロカプセル周囲に光学密度の高い薄層が観察され、表面に密度の高いスキン層が形成されたことが示唆された。さらに5分経過するとそのスキンに基づくと考えられる部分の濃さは少し強くなったが、それ以上時間が経過してもあまり変わらなかった。温度を40°Cから25°Cに降温すると、色の濃いスキン層が5分以内に消失した。一方、PNIPAAmをグラフト化していないマイクロカプセルの場合は、温度を変えてもマイクロカプセルの表面にこのよ

うな変化が認められなかった。このことから、マイクロカプセル表面に PNIPAAm が薄いフィルム状にグラフト化されたことがわかる。また、色の濃さの変化は、高温では PNIPAAm 鎖が凝集し、マイクロカプセルの表面に密度の高いスキン層が形成されるのに対し、低温では PNIPAAm 鎖が水和されるため密度の高いスキン層が消失したと考えられる。

3.1.2 放出実験 温度を 20℃ から 45℃ まで 5℃ 間隔で変えて、マイクロカプセルからのデキストラン放出速度の温度依存性を調べた (Fig. 1)。その結果、35℃ から 45℃ の範囲で放出が遅くなり、20℃ から 30℃ の範囲で放出が速くなることが観測された。また、放出速度の温度変化は PNIPAAm の LCST (32℃) の付近で急激に起こることがわかった。このことから、LCST より高温側ではポリマー鎖が凝集し、マイクロカプセルの表面に密度の高いスキン層が形成されたため、内部に含浸された薬剤の放出が遅くなったのに対し、LCST より低温側ではポリマー鎖が水和され、マイクロカプセルの表面が親水性となって、薬剤が漏れやすくなったと考えられる。

また、温度を 25℃ から 40℃ に、また 40℃ から 25℃ に繰り返して変化させたときの薬剤の温度依存性放出を調べたところ、40℃ では放出が抑制され、25℃ で放出が促進される様子が繰り返して認められた。

次に、放出速度の温度変化に対する応答速度を調べた結果を Fig. 2 に示す。温度を 30℃ から 40℃ に急激に上げたとき、薬剤放出の減少が短い時間 (2 分) で起

Fig. 1. FITC-dextran released from the PNIPAAm grafted microcapsule in a Tris buffer solution with changing the temperature; raising (□) and descending (■).

Fig. 2. The time course of the rate of FITC-dextran released from the PNIPAAm grafted microcapsule upon step-wise temperature change from 30°C to 40°C (□) and from 40°C to 30°C (■) in a Tris buffer solution.

こった。温度を 40℃ から 30℃ に下げたときも、薬剤放出の増大は約 4 分以内に完了した。この結果は先の光学顕微鏡でのマイクロカプセルの観察結果と対応する。このように、グラフト化マイクロカプセルの温度変化応答性は速いことがわかった。

3.2 温度応答性ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)ゲルを含むポリ乳酸マイクロカプセル

3.2.1 マイクロカプセルに充填されたゲル量 調製したそれぞれのマイクロカプセルの IR 測定より、マイクロカプセルに充填された PNIPAAm ゲルを定量した。ポリ乳酸のエステル基のカルボニル伸縮ピーク (1770 cm^{-1}) を基準にして、PNIPAAm のアミド基の NH 変角振動に基づくアミド II (1525 cm^{-1}) の相対ピーク強度は、ゲルを含まない MV に比べて、MV8, MV48 そして MVG となるに従い強くなり、この順で充填されたゲルの量が多くなることがわかった。また、MM, MM8, MM48, MMG のマイクロカプセルの場合にも、MV マイクロカプセルと同じように、MM に比べて MM8, MM48 そして MMG の順で充填されたゲルの量が多くなることがわかった。

3.2.2 マイクロカプセルの電子顕微鏡観察 調製した MV, MV8, MV48, MVG マイクロカプセルの表面を電子顕微鏡観察により調べた。MV, MV8, MV48 マイクロカプセルの表面に違いはほとんど認められなかった。しかし、MVG マイクロカプセルの場合、表面に数多くの孔が観測された。これはマイクロカプセルの調製

Fig. 3. Scanning electron micrographs (cross-section) of PLLA microcapsules prepared by a) magnetic stirring (magnification 300) and b) vortex mixing (magnification 1000).

において、隔壁とゲルとが同時に形成されるため、隔壁がまだ十分強くなっていないときにゲルが形成され、マイクロカプセルの表面に孔が生じたと考えられる。これと同じような亀裂は、MMG マイクロカプセル表面にも観測されたが、MM、MM8、MM48 マイクロカプセル表面には認められなかった。

かくはん法および vortex mixing 法で得られたマイクロカプセルの断面を TEM で調べたところ、どちらのマイクロカプセルの内部にも小さな数多くの内部空孔が観察された。ただし、そのサイズはかくはん法によるマイクロカプセルの場合が $5 \sim 25 \mu\text{m}$ であり、Vortex mixing 法で得られたマイクロカプセルの場合が $2 \sim 10 \mu\text{m}$ であった (Fig. 3)。

3.2.3 放出実験 調製したマイクロカプセルを緩衝液 (pH 7.5) に分散させ、温度を 25°C から 40°C に、または 40°C から 25°C に繰り返して変化させたときのデキストラン放出速度の温度応答性を Fig. 4 に示す。MM すなわちゲルを充填していない場合、デキストラン放出は速く、温度変化に対しても大きな変化は見られず、時間とともに放出速度は減少した。一方、ゲルを充填した MM8、MM48、および MMG マイクロカプセルの場合、 25°C では放出が抑制され、 40°C で放出が促進される様子が観測され、この温度応答性放出は温度変化を繰り返しても認められた。これは、LCST よりも低温側ではゲルが膨潤しており、高い分子量のデキストランがゲルを拡散するのが困難なため放出が遅くなったと考えられる。一方、高温側ではゲルが収縮することにより、ゲル内部に含浸されたデキストランが絞り出され、また、マイクロカプセルの内部空孔にゲルのない空間が生じ、薬剤の放出が促進されたと考えられる。

マイクロカプセルとモノマーとのインキュベートで 48 時間行ってから重合して得られたマイクロカプセル

Fig. 4. Release rate of FITC-dextran released from the PNIPAAm-loaded microcapsule in response to temperature change between 25°C and 40°C in a Tris buffer solution; MM ($\square$), MM8 ($\circ$), MM48 ($\bullet$), and MMG ($\blacksquare$) microcapsules. Two sets of experiments were averaged where the difference was within 9%.

(MM48) では、8 時間しかインキュベートしなかったマイクロカプセル (MM8) よりも、高温側にしたときの放出速度は増大した。また、完全に内部をゲルで充填した MMG の場合、高温側にしたときの放出速度は MM48 よりさらに速く、最初に高温側にする段階で、ゲルを含まないマイクロカプセルと同じくらい多くのデキストランが放出された。これらのことから、デキストランの放

Fig. 5. Release rate of FITC-dextran from the PNIPAAm-loaded microcapsule (MV48) in response to temperature change between 25°C and 40°C in a Tris buffer solution; constant temperature experiments at 25°C (—●—) and 40°C (—○—); temperature jump experiment between 25°C and 40°C (—▲—).

出速度は、マイクロカプセルに内包されたゲルの量に比例すると考えられ、ゲルからデキストランが絞り出されることが高温側でのデキストラン放出のおもな原因と考えられる。

vortex mixing 法で調製したマイクロカプセルからのデキストラン放出についても、同様の温度応答性が観測された (Fig. 5)。また、デキストラン放出速度は、内包されたゲルの量に比例し、MV8, MV48 そして MVG の順に大きくなった。しかし、一連の MV マイクロカプセルからの放出速度は、対応する一連の MM マイクロカプセルより遅かった。このことは、MV マイクロカプセルの内部空孔のサイズが小さく、内包されたゲルの量も少ないこと、また、内部のデキストランが放出されるためには数多くの内部空孔の隔壁を拡散する必要があるためと考えられる。

このように、マイクロカプセルの内部空孔に PNIPAAm ゲルを充填することで、ゲルの収縮する温度でマイクロカプセルからの放出が促進されることがわかった。また、放出量は、マイクロカプセルに内包するゲルの量で制御できることが示された。

4 結 論

温度応答性を示す PNIPAAm を表面にグラフトしたマイクロカプセルを調製し、負の温度応答性を示す薬剤放出システム、すなわち、高温側で放出が遅く、低温側で放出の速いシステムを構築できた。一方、PNIPAAm ゲルを内部に充填したマイクロカプセルを調製し、正の温度応答性を示す薬剤放出システム、すなわち、高温側で放出が速く、低温側で放出が遅いシステムを開発した。

PNIPAAm を表面にグラフトしたマイクロカプセルの調製では、マイクロカプセル表面に結合した開始剤を用いてラジカル重合を行う方法を開発し、得られたマイクロカプセルの温度応答性放出において、LCST 前後で明瞭に放出速度が変わり、また、温度変化に対して応答の速いマイクロカプセルを得た。

PNIPAAm ゲルを内部に充填したマイクロカプセルからの放出速度は、マイクロカプセル内部の空孔サイズおよび充填したゲルの量により制御でき、また、多数の小さな内部空孔をもつマイクロカプセルを用いたことから、温度変化に対して応答の速いシステムを実現できた。

文 献

- 1) M. Heskins and J. E. Guillet, *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A** **28**, 1441 (1968).
- 2) M. Marchetti, S. Prager, and E. L. Cussler, *Macromolecules*, **23**, 1760 (1990).
- 3) S. Hirotsu, Y. Hirokawa, and T. Tanaka, *J. Chem. Phys.*, **87**, 1392 (1987).
- 4) Y. Okahata, H. Noguchi, and T. Seki, *Macromolecules*, **19**, 493 (1986).
- 5) A. D'Emanuele and R. Dinarvand, *Int. J. Pharm.*, **118**, 237 (1995).
- 6) R. Yoshida, Y. Kaneko, K. Sakai, T. Okano, Y. Sakurai, Y. H. Bae, and S. W. Kim, *J. Controlled Release*, **32**, 97 (1994).
- 7) A. D'Emanuele and R. Dinarvand, *J. Controlled Release*, **36**, 221 (1995).
- 8) T. Kidchob, S. Kimura, and Y. Imanishi, *J. Controlled Release*, **40**, 285 (1996).
- 9) S. Moore and W. H. Stein, *J. Biol. Chem.*, **176**, 367 (1948).
- 10) T. Kidchob, S. Kimura, and Y. Imanishi, *J. Appl. Polym. Sci.*, **62**, 453 (1997).

[Comprehensive Papers]

Thermo-Responsive Microcapsules Using Poly(*N*-isopropylacrylamide)

Tongjit KIDCHOB^{*1}, Shunsaku KIMURA^{*1}, and Yukio IMANISHI^{*2}

^{*1}*Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University (Yoshida Honmachi, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8501 Japan)*

^{*2}*Graduate School of Material Science, Nara Institute of Science and Technology (Takayama-cho 8916-5, Ikoma, 630-0101 Japan)*

Two different types of thermo-responsive microcapsules were prepared by combining biodegradable polymer microcapsules and poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm). First, PNIPAAm was grafted on the surface of the polypeptide microcapsule by a new method of surface grafting. Dextran release from the microcapsule was faster below the lower critical solution temperature (LCST) of PNIPAAm than the rate above it. Then the temperature changed across the LCST, a reversible and thermo-responsive release from the microcapsule was observed. Notably, the transition of the release rate by changing the temperature occurred quickly in a narrow temperature range. Secondly, poly(L-lactic acid) (PLLA) microcapsules containing PNIPAAm gel were prepared. Internal cavities of PLLA microcapsules were filled partly or completely with PNIPAAm gel to obtain microcapsules for thermo-responsive drug release. The dextran release from the microcapsules showed a positively thermo-responsive release as the release was accelerated at the temperatures above the LCST, and nearly stopped below the LCST. The release rate of dextran was dependent on the amount of PNIPAAm gel loaded in the microcapsules as well as on the size of the internal cavities. The response rate of the microcapsules was also fast.

KEY WORDS Microcapsule / Poly(*N*-isopropylacrylamide) / Thermo-Responsive Release / Lower Critical Solution Temperature / Block Polypeptide / Poly(lactic acid) / Biodegradable Polymer / Surface-Graft / Gel /

(Received December 11, 1997; Accepted January 12, 1998)

[*Kobunshi Ronbunshu*, 55(4), 192—199 (1998)]