

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08242

研究課題名(和文) 親水性面と疎水性面を併せ持つ高分子ナノフィルムの開発とそのDDSへの応用

研究課題名(英文) Fabrication of polymer nano-film possessing hydrophobic and hydrophilic surface and its application to DDS

研究代表者

近藤 伸一 (Kondo, Shin-ichi)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90240944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、流動性を有するリン脂質自己組織化膜表面において、親水性面と疎水性面を有する自立型の有機高分子ナノフィルムの構築を目指し、種々の条件にて調製した高分子ナノフィルムの形状、粒子サイズおよび薬物放出特性について検討した。その結果、架橋条件による粒子サイズの制御が可能であることを明らかとするとともに、溶媒によりその形状も大きく変化することを見出した。さらに、薬物封入高分子ナノフィルムからのモデル薬物の放出では、酸性環境下でのアミノ基のプロトン化による静電反発により薬物放出が惹起されることを明らかにし、本高分子ナノフィルムは薬物送達システムへの応用も期待されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、有機物のみからなる親水性面と疎水性面を持った高分子ナノフィルムの開発とその薬物放出特性について明らかにした。従来の高分子ナノフィルムは、有機材料と金属イオンから成るものであり、かつ両面とも同じ構造あるいは物性である。したがって、本方法により得られる高分子ナノフィルムは、既存のものよりも多様性が高く、原理的には親水性面と疎水性面だけでなく異なる官能基を導入した面を構築することも可能となり様々な応用への展開も期待される。さらに、pH応答性などの刺激応答性機能を本高分子ナノフィルムに導入することによりより広範な利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study we aimed to fabricate the self-standing amphiphilic polymer nano-film, which possessed both hydrophilic and hydrophobic side, on the self-assembled phospholipid layer having fluidity. We examined the particle size and shape of the amphiphilic polymer nano-film which was synthesized under various experimental conditions. It was revealed that the particle size of polymer nano-film could be controlled by the experimental condition (temperature and reaction time). It was also shown that the solvent could affect the shape of the polymer nano-film. The drug release profile from the polymer nano-film at pH 5.0 was discussed. The particle diameter at pH 5.0 was bigger than that at pH 7.4, due to the electric repulsion among amino groups which was protonated at pH 5.0. It was suggested that the drug release from the polymer nano-film could be induced by the increase of the particle diameter at pH 5.0.

研究分野：薬品物理化学

キーワード：高分子ナノフィルム リン脂質膜自己組織化膜 架橋反応 動的散乱測定 原子間力顕微鏡 pH応答性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 樹状高分子である dendrimer や炭素からなるナノスケールのシート状構造であるグラフェンを始め、特異な構造を有する材料は、従来の材料とは異なる機能性・特性が期待されることから、新機能性材料として高い関心が寄せられている。材料表面に他の高分子などをナノスケールの厚みで固定化したナノフィルムがあるが、このようなナノフィルムでは支持体上でなければ存在ができない。最近、気-液界面において有機材料と金属イオンのハイブリッドであり、大きさや厚みがナノスケールであるフィルム状の自立型(支持体が不要)の高分子、“高分子ナノフィルム”の合成も行われており、応用研究を含め様々な研究が展開されている。しかしながら、有機物のみから成る高分子ナノフィルムや、各面の特性が異なっている高分子ナノフィルムに関する報告はない。

(2) 本申請者らは、プラズマ表面処理を利用して高分子基材表面にリン脂質自己組織化膜を簡便に構築する方法を開発している。本リン脂質自己組織化膜の特徴として、1) 70 °C に加熱しても高分子基材から脱離しないことから熱的に安定であること、2) リン脂質膜中に脂肪酸など他の分子を容易に導入できること、3) 細胞膜と同様に流動性を有すること、が挙げられる。

(3) かかる背景より、本申請者らは、流動性を有する本リン脂質自己組織化膜表面、すなわち固-液界面において自立型の有機分子のみからなる高分子ナノフィルムの構築が可能になるのではないかとこの着想に至った。また、有機分子のみからなる高分子ナノフィルムは、有機材料と金属イオンのハイブリッドからなる高分子ナノフィルムよりもより高い屈曲性を持たせることができると考え、より多様性の高い材料の開発が期待されると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、流動性を有するリン脂質自己組織化膜表面において、親水性面と疎水性面を有する自立型の有機高分子ナノフィルムの構築を目指す。さらに、本高分子ナノフィルムは、水中において疎水面を内側とするチューブ状あるいは球状に近い形態をとると予想されることから、ドラッグキャリアとしての利用が期待される。そこで、両親媒性有機高分子ナノフィルム内への薬物の封入とその薬物放出特性についても明らかにすることを目指して、以下の項目について検討した。

#### (1) 高分子ナノフィルムの構築法の確立とフィルムサイズの制御

図1の模式図に従って固-液界面にて高分子ナノフィルムの構築を行い、有機溶媒(エタノールなど)を用いてリン脂質自己組織化膜を破壊して高分子ナノフィルムを単離する。親水性末端部の多官能基部分については、Per-6-amino- $\alpha$ -cyclodextrin (Per6ABCD) を用いる。フィルムサイズは、架橋反応の温度および反応時間で制御するとともに、導入したシクロデキストリン誘導体の密度によっても検討を行う。

#### (2) 高分子ナノフィルムの形状評価

図2のように両親媒性高分子ナノフィルムでは、希薄な水溶液中ではチューブ状あるいは球状に近い形状を取ると予想されるので、各種溶媒でのフィルム形状について評価を行う。

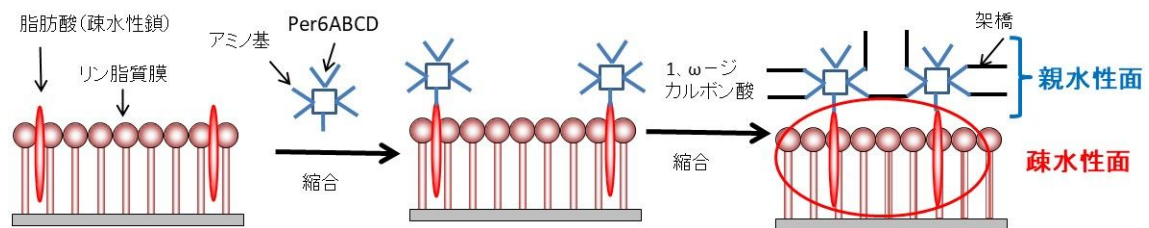


図1 両親媒性高分子ナノフィルム構築の模式図

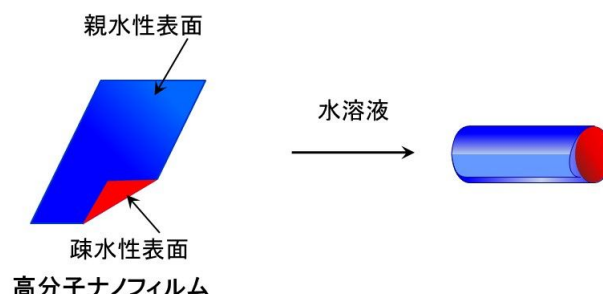


図2 高分子ナノフィルムの予想される水中での形状

### (3) 薬物ナノキャリアとしての応用

図2のように内側が疎水領域となるチューブ状あるいは球状に近い形状を取ると予想されるので、薬物を内包させ、薬物ナノキャリアとしての有用性について検討する。また、ナノフィルムからの薬物溶出特性についても評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) Per6-amino- $\beta$ -cyclodextrin を利用した高分子ナノフィルムの構築

高分子ナノフィルムの合成は、以下のように行った。

Per6ABCD あるいは Per6ABCD にポリエチレングリコール (PEG) モノカルボン酸を 1 : 1 で反応させた化合物を、脂肪酸 (例えばステアリン酸) を導入したリン脂質自己組織化膜と反応させる。(図1の中央の構造) 未反応物を洗い流した後、1, 2-ジカルボン酸と縮合試薬を用いて、シクロデキストリン誘導体を結合したフィルムと反応させることにより高分子ナノフィルムの調製を行った。(図1の右の構造) エタノールを用いて、リン脂質膜を破壊した後、溶媒としてメタノールを用いた透析操作 (分子量 1 万カットオフ) により高分子ナノフィルムの精製を行った。

### (2) 高分子ナノフィルムのサイズおよび形状評価

高分子ナノフィルムのサイズ評価を動的光散乱 (DLS) 測定により行った。また、DLS において測定角度に対する拡散係数の変化より形状 (球状やロッド状など) に関する情報が得られることより、DLS を用いた形状評価についても検討した。さらに、高分子ナノフィルムの溶液を基材 (雲母) 表面に滴下し、溶媒を蒸発させること (キャスト法) により基材表面に高分子ナノフィルムを付着させ、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いてその形状およびサイズを評価した。また、高分子ナノフィルムを各種重溶媒に溶解し NMR スペクトル測定を行った。高分子ナノフィルムの内側にある官能基はその分子運動が抑制されることからブロードなピークとなるため、親水性面と疎水性面のどちらが外側になっているか評価した。

### (3) 高分子ナノフィルムのサイズ制御

高分子ナノフィルムのサイズは、架橋反応の温度や反応時間により制御を試みるとともに、Per6ABCD の密度によるサイズ制御の可能性についても検討を行った。高分子ナノフィルムのサイズは DLS を用いて評価した。

### (4) 高分子ナノフィルム中への薬物の封入と放出特性

高分子ナノフィルムのメタノール溶液にモデル薬物として 5-フルオロウラシル (5-FU) を加え、この溶液を半透膜に入れ、この半透膜を pH 7.4 のリン酸緩衝液に浸漬することにより薬物封入高分子ナノフィルムを調製した。高分子ナノフィルムからの薬物放出特性については、上述の pH 7.4 リン酸緩衝液で調製した高分子ナノフィルム溶液を半透膜に封入し、pH 5.0 の酢酸緩衝液中に浸漬し、溶出した 5-FU を定量することにより評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 各種溶媒中での高分子ナノフィルムのサイズと形状評価

50、24 時間架橋反応を行って構築した高分子ナノフィルムを用いて各種溶媒中での NMR 測定、DLS 測定および AFM 測定を行った。図3はメタノール中の高分子ナノフィルムの測定結果である。DLS 測定の結果、平均粒子径は 56nm であり、角度に対する拡散係数の値の変化が小さいという特徴が示された。NMR スペクトルの測定結果では、ステアリン酸に由来するピークも Per6ABCD に由来するピークもともに強度が強くシャープなピークであることから、両者ともメタノールと接していることが示唆された。したがって、DLS と NMR の結果より、シート状の構造であるため親水性面、疎水性面ともにメタノールと接しており、屈曲性が大きいため等方性になることから角度に対する拡散係数の変化が小さいことと一致する。AFM の結果においても、四角の形状を示しており、シート状の構造であることを示唆している。

同一の高分子ナノフィルムをクロロホルム中で測定した結果を図4に示す。NMR スペクトルにおいてステアリン酸に由来するピークはシャープで強度が強いものに対して、Per6ABCD に由来するピークはブロードで図3と比較しても明らかにステアリン酸部位に対する相対強度の低下が認められた。この結果より、クロロホルム中では、Per6ABCD 部位 (親水性部位) が内部にありステアリン酸部位が外側にあることが示唆された。また、DLS から求めた平均粒子径は 120nm であり、メタノール中よりも大きな値を示した。さらに、角度に対する拡散係数の変化は、明らかに大きくロッド状の形状を取っていることが示唆された。AFM の結果もロッド状の構造を示唆しており、本高分子ナノフィルムはクロロホルム中では、ステアリン酸部位を外側にしたロッド状の形状を取り、溶媒和により引き延ばされた構造であることが示唆された。

最後に水中での各種測定結果を図5に示す。NMR スペクトルにおいてステアリン酸に由来するピークがブロードであることから、ステアリン酸部位が内部にあることが示唆された。また、DLS から求めた平均粒子径は 65nm であり、角度に対する拡散係数の変化は小さいことから、球状に近い形状であることが示唆された。この結果は、AFM 画像からも示唆された。

以上の知見より、本高分子ナノフィルムは溶媒の種類により様々な形状に変化することが明

らかになった。

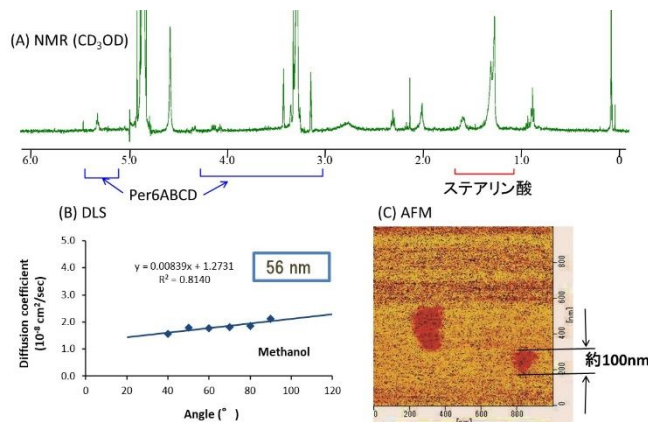


図3 メタノール中での高分子ナノシートの粒子径と形状評価

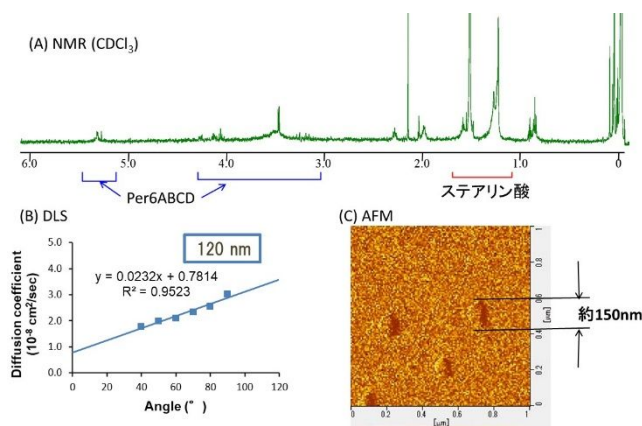


図4 クロロホルム中での高分子ナノシートの粒子径と形状評価

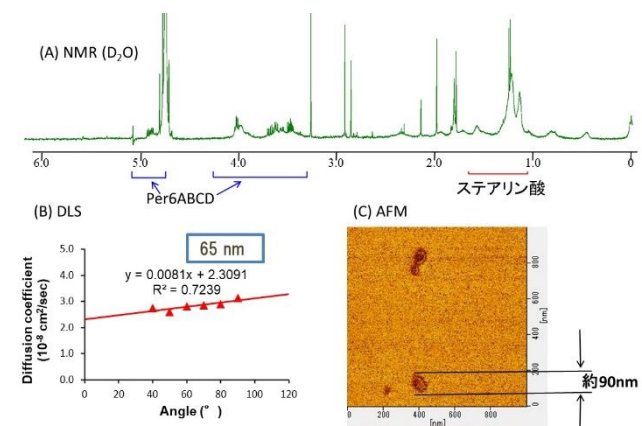


図5 水中での高分子ナノシートの粒子径と形状評価

(2) 反応時間と温度による高分子ナノフィルムのサイズ変化

図6は、30℃にて架橋反応を行った時のpH 7.4のリン酸緩衝液中における高分子ナノフィルムの粒子サイズの経時変化を示したものである。1時間から6時間までの範囲では、反応時間に比例して増加する傾向を示しているが、定常化する傾向にあり、6時間以降では粒子径の増大は認められなかった。したがって、架橋反応は速やかに進行するもの高分子ナノフィルムが大きくなるとリン脂質膜上での流動性が低下し、収束することが示唆された。

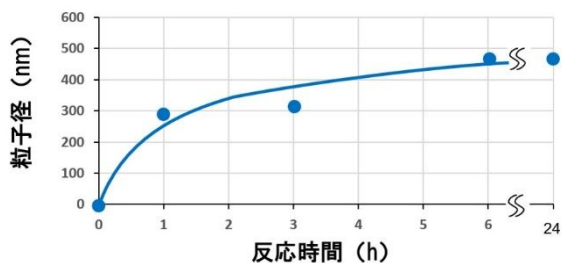


図6 高分子ナノフィルムの粒子サイズの経時変化



温度を変えて 24 時間架橋反応を行って調製した高分子ナノフィルムの平均粒子径を表 1 に示す。5、30 と温度を上げることにより平均粒子径は増大したが、50 の時には急激に低下した。その原因は、1、-ジカルボン酸を縮合試薬で活性エステルとして反応を行っているが、温度を上げることにより活性エステルの分解が進行し、架橋効率が低下したためと考えられる。Per6ABCD の密度を変えて検討を行ったが粒子サイズへの影響はほとんど認められなかった。

表 1 各温度における高分子ナノフィルムの平均粒子径

	5 °C	30 °C	50 °C
平均粒子径 (nm)	290	470	65

### (3) 薬物封入高分子ナノフィルムからの薬物放出性

図 7 は、pH 7.4 および pH 5.0 における薬物封入高分子ナノフィルムの粒度分布を示したものである。pH 7.4 は血中の pH であり、pH 5.0 はエンドソームやリソソームなどの酸性細胞小器官の pH に対応する。pH 5.0 の方が pH 7.4 よりも粒子径が大きくなっており、その理由としては Per6ABCD には架橋に関わっていないアミノ基が残存するため、酸性溶液中ではプロトン化され正電荷を帯びるため電気的な反発により粒子径が増大すると考えられる。

図 8 は、各 pH における角度に対する拡散係数の変化を示したものである。pH 7.4 に比べて pH 5.0 では拡散係数の変化はより小さくなっており、静電反発により粒子径が増大するとともに球形に近い形状に変化することが明らかとなった。

本研究で調製した薬物封入高分子ナノフィルムには、全重量の約 50% が薬物であることが明らかになった。また、pH 7.4 にて保存しても検出範囲内において薬物の溶出は認められなかった。図 9 は、pH 5.0 における薬物放出挙動の経時変化を示したものである。pH 5.0 の溶液に浸漬すると速やかに薬物放出が進行したものの 4 時間以降は定常化し 24 時間において約 15% の薬物放出で停止した。pH による粒子径変化の結果と合わせて考察すると、酸性溶液中でのアミノ基のプロトン化による粒子径の増大に伴い、高分子ナノフィルム内への水の流入が起こり薬物放出が進行したものと考えられる。しかしながら、高分子ナノフィルムの内部は疎水性環境であるため、さらなる水の流入が起こらず薬物放出が停止したものと考えられる。

今後はより定量的な薬物放出を目指し、架橋部分の分解などを視野に入れた高分子ナノフィルムの開発を目指す。

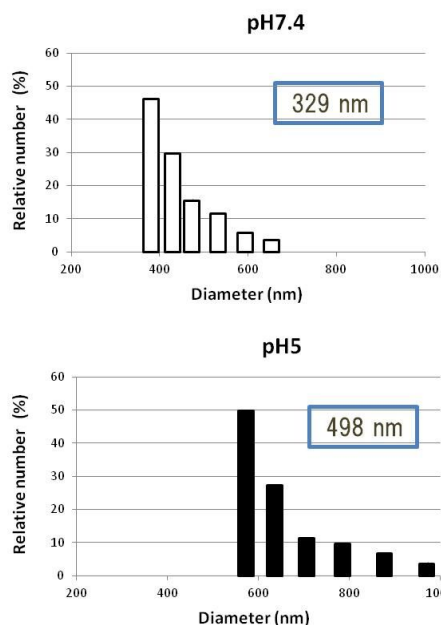


図 7 pH 7.4 および pH 5.0 における薬物封入高分子ナノフィルムの粒度分布

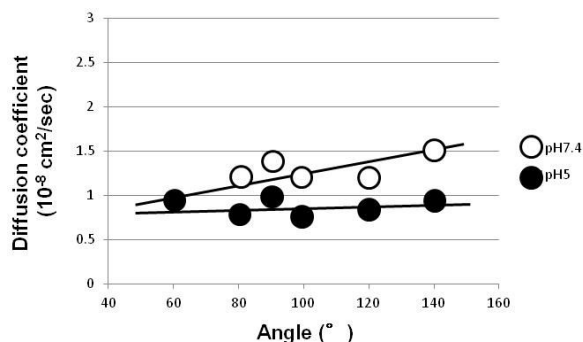


図 8 各 pH における角度に対する拡散係数の変化

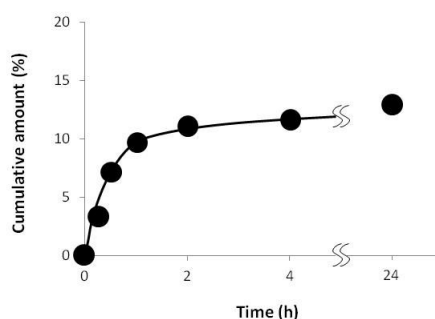


図 9 薬物封入高分子ナノフィルムからの薬物放出の経時変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 S. Kondo, Y. Sasai, Y. Yamauchi, M. Kuzuya	4. 巻 31
2. 論文標題 Application to Nano Drug Carrier Using Polymer Nano-Film Synthesized on Self-Assembled Phospholipid Layer Fabricated by Plasma-Assisted Method	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Photopolym. Sci. Technol.	6. 最初と最後の頁 385 - 388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.2494/photopolymer.31.385">https://doi.org/10.2494/photopolymer.31.385</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 S. Kondo, Y. Sasai, N. Doi, Y. Yamauchi, and M. Kuzuya	4. 巻 32
2. 論文標題 Application to Nano Drug Carrier Using Polymer Nano-Film Synthesized on Self-Assembled Phospholipid Layer Fabricated by Plasma-Assisted Method	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Photopolym. Sci. Technol.	6. 最初と最後の頁 541-544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.2494/photopolymer.32.541">https://doi.org/10.2494/photopolymer.32.541</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 近藤伸一、笹井泰志、山内行玄、葛谷昌之
2. 発表標題 プラズマを利用して構築したリン脂質膜を用いる高分子ナノフィルム開発の基礎研究
3. 学会等名 第35回国際フォトポリマーコンファレンス（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤 伸一、笹井 泰志、土井 直樹、山内 行玄、葛谷 昌之
2. 発表標題 プラズマを利用して構築した高分子ナノフィルムの薬物キャリアーとしての応用
3. 学会等名 第36回国際フォトポリマーコンファレンス（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Kondo, Y. Sasai, N. Doi, Y. Yamauchi, M. Kuzuya
2. 発表標題 Development of Polymer Nano-Film Synthesized on Self-Assembled Phospholipid Layer Fabricated by Plasma-Assisted Method
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	笹井 泰志  (Sasai Yasushi)  (60336633)	岐阜薬科大学・薬学部・准教授   (23701)	
研究分担者	土井 直樹  (Doi Naoki)  (00781436)	岐阜薬科大学・薬学部・助教   (23701)	