

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560238

研究課題名(和文) 特異な構造を有する粒子の発見に基づく新規粒子調製法の確立と経肺投与DDSへの応用

研究課題名(英文) Development of novel particle preparation based on the discovery of particles having unique structures for pulmonary DDS

研究代表者

村上 義彦 (Murakami, Yoshihiko)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00339748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：経肺投与の薬物送達システム(DDS)は、薬物(あるいは薬物の入れ物である薬物キャリア)を吸入して肺へ薬物を送達する手法である。現在までに、経肺投与DDS用の薬物キャリアの調製法として、「『両親媒性ブロック共重合体と疎水性高分子を溶解したo/wエマルション液滴』を乾燥する」ことによって、「疎水性高分子微粒子の表面に親水性高分子鎖を簡便に導入する技術」を提案し、ゴルフボール状の「表面凹型粒子」が得られることを発見した。さらに、「多孔質が得られないはずの条件」において「多孔質粒子」が得られることも発見している。本研究ではこれらの粒子の形成に及ぼす諸因子の影響を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：There are many methods for the administration of drugs, including oral, pulmonary, intravenous, subcutaneous, transdermal, transmucosal and rectal administrations. Of these routes, the pulmonary route has attracted growing interest. Pulmonary administration has various advantages over other routes, insofar as the administration is simple, shows early effects of drugs' pharmacological actions, and has no risk of drug decomposition. The present study clarifies the effects of the various preparation conditions on the morphology of dimpled and highly porous particles. The dimpled and highly porous particles are expected to be suitable drug carriers for pulmonary delivery. The results obtained in the present study show that a newly developed method can be a powerful and facile technique for preparing dimpled and porous polymeric particles.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：経肺投与 粒子 多孔質 表面修飾

## 1. 研究開始当初の背景

経肺投与の薬物送達システム (DDS) は、薬物 (あるいは薬物の入れ物である薬物キャリア) を吸入して肺へ薬物を送達する手法であり、「表面積が大きく毛細血管が豊富に存在する肺胞を利用するため、薬物の吸収効率が低い」「特に肺疾患に対しては、患部に薬物を直接送達することができるため治療効果が高い」「痛みをとまわらない」等の利点から、新たな投薬方法としての発展が期待されている。経肺投与に適した薬物キャリアは、(1) 粒子径が 1~3  $\mu\text{m}$  程度である (1  $\mu\text{m}$  以下: 呼気によって排出される、3  $\mu\text{m}$  以上: 気道に沈着する) (2) 粒子密度が低い (吸気の流れに乗りやすい) (3) 粒子表面の分子修飾が容易である (生体への吸収率向上のために、生体適合性分子や生体と相互作用を示す分子で表面修飾が可能) 等の条件を満たす必要がある。しかしこれらの条件を全て満たす粒子の調製は難しく、経肺投与 DDS の発展を妨げる大きな一因となっていた。

現在までに本研究代表者は、これらの条件を全て満たす粒子の調製法として、「『両親媒性ブロック共重合体と疎水性高分子を溶解した o/w エマルション液滴』を液中乾燥あるいは噴霧乾燥する」ことによって、「疎水性高分子微粒子の表面に親水性高分子鎖を簡単に導入する技術」を提案し、ゴルフボール状の「表面凹型粒子」が得られることを発見した。さらに研究を進めるうちに、「多孔質が得られないはずの条件」において「多孔質粒子」が得られることも発見した。これらの特異的な構造が得られる機構は不明であるが、経肺投与用の薬物キャリアとして適している特徴 (ゴルフボール状の表面、多孔質) を偶然有している。しかしこれらの粒子の形成機構は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、ゴルフボール状の「表面凹型粒子」の形成機構の解明や、「多孔質が得られないはずの条件」において得られる「多孔質粒子」の形成機構の解明、という二つの基礎的課題に挑戦することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 両親媒性ブロック共重合体の合成: 親水性ブロックとしてポリエチレングリコール (PEG) 疎水性ブロックとして生体適合性の高い高分子 (ポリ乳酸、PLA) を有するブロック共重合体の合成を検討した。開始剤/モノマー濃度比、モノマー濃度、重合反応時間等を変化させることによって、様々な組成のブロック共重合体を合成した。得られたブロック共重合体の構造評価は、 $^1\text{H}$  NMR、動的・静的光散乱装置、高速液体クロマトグラフィ

ーによって行った。

(2) 表面凹型粒子の形成機構の解明: エマルション調製条件 (有機溶媒の種類、有機溶媒/水体积比、両親媒性ブロック共重合体・疎水性高分子の組成、等) が、得られたエマルションの粒径分布および最終的な粒子形態 (粒子直径、表面構造、凹型部の大きさ・形、等) に及ぼす影響を、動的光散乱装置、走査型電子顕微鏡、蛍光顕微鏡を用いてしたに評価した (疎水性高分子としては、ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体 (PLGA) やポリ乳酸 (PLA) を用いる)。「粒径分布が異なり、それぞれの分布が非常に狭い複数の単峰性エマルションを調製する」「両者のエマルションを共存させたミストを噴霧乾燥する」「得られた粒子の表面の凹みの大きさや数と、各種調製条件との相関関係を評価する」等の実験を行うことによって、所望の大きさ・数の凹みを有する粒子を調製する方法論の確立を目指した。

(3) 多孔質粒子の形成機構の解明: 機械的攪拌あるいは自己乳化によって、w/o/w エマルションが擬似的に形成されていることの立証を目指した。エマルション調製条件 (有機溶媒の種類、有機溶媒/水体积比、両親媒性ブロック共重合体・疎水性高分子の組成、等) が、得られたエマルションの形態 (o/w エマルション、擬似的な w/o/w エマルション) や粒子表面の細孔構造に及ぼす影響を評価した。特に、(1) o/w エマルションの界面構造の光散乱特性評価や光学顕微鏡観察、(2) さまざまな攪拌回転数で調製した o/w エマルションの微視的構造評価、という検討を行うことによって、エマルションの形態と最終的な粒子の形態の相関関係を明らかにすることを目指した。

## 4. 研究成果

本研究では特に、表面凹型粒子の形成機構の解明を中心に検討した。

両親媒性ブロック共重合体の組成や、高分子の相分離、有機溶媒の混合組成は、表面凹型粒子の表面構造に影響を及ぼさないことが明らかになった。また、エマルション調製時に生じていた粒径が小さい油滴も、表面凹型粒子の表面構造に影響を及ぼしていなかった。PLGA と PEG-PLA の混合比は表面構造に影響を及ぼし、PEG-PLA の混合比の増加にともない、非凹型粒子が多く得られることがわかった。

本検討を進める過程において、SEM による観察が表面構造に影響を及ぼしている可能性が示唆された。そこで、SEM による電子線照射が試料温度の上昇や分子の架橋・切断に及ぼす影響を検討した。その結果、粒子を単純に加熱しただけでは粒子表面の凹みを再現できず、電子線照射による試料の温度上昇

は大きな影響を及ぼしていないことが分かった。一方、GPC を用いて分子の架橋・分解を評価したところ、SEM による電子線照射によって PLGA が分解することがわかった。また、表面に白金膜が形成している粒子を SEM で観察することによって、粒子表面に凹型構造が出現することも明らかになった。詳細に検討を進めた結果、白金膜のシェルと PLGA 粒子のコアによるコアシェル構造によって、粒子表面に凹型構造が形成されていることが示唆された。

表面に凹みが生じる機構について、「電子線照射によって高分子鎖が切断され、分子のパッキングが変化して密になることで PLGA 粒子の収縮が起こり、この収縮が白金膜が形成している状態で起こることで凹みが生じた」という仮説が得られたため、異なる高分子から形成した粒子を用いてさらに詳細に検証した。高分子フィルムを用いることによって、SEM の電子線照射による高分子の収縮挙動を評価した。SEM 観察に引き続き AFM 観察を行うことによって、SEM による観察範囲と同程度の大きさの凹みが確認され、PLGA や PEG-PLA が SEM による電子線照射で収縮することがわかった。また、表面凹型粒子の表面を AFM で測定し、収縮前後において表面積が変化していないと仮定して計算した収縮前後の粒子の収縮は、フィルムの収縮とほぼ同じ程度であった。したがって、粒子表面の凹みの形成にポリマーの状態変化にともなう高分子粒子の収縮が関与していることが示唆された。性質の異なるポリマーを用いて粒子を調製したところ、放射線耐性を有するポリスチレンは粒子表面の凹みおよびフィルムの収縮は認められず、凹みの形成に電子線照射が関わっていることの裏付けとなった。また、ポリ L 乳酸やポリメタクリル酸メチルから形成した粒子表面には凹みが観察され、フィルムの収縮も確認された。さらに、 $T_g$  や放射線に対する挙動の違いによって粒子表面の凹みの形態が変わり、高分子の性質が粒子の収縮の程度に影響を及ぼすことがわかった。以上の結果より、高分子粒子の収縮によって表面の凹みが形成されていることが明らかとなり、表面構造を制御できる可能性が示唆された。

従来より報告されている多くの高分子微粒子（主に、液中乾燥法や溶媒拡散法によって形成）は、表面が滑らかであり特徴的な構造は観察されない。しかし本研究代表者は、「両親媒性ブロック共重合体と疎水性高分子を溶解した o/w エマルション液滴を液中乾燥あるいは噴霧乾燥する」技術の検討を進めている際に、エマルションを「ブロック共重合体共存下で」乾燥した場合のみ、従来まったく報告されていなかった「ゴルフボール状の表面凹型粒子」が得られることをまず発見した。一般に、ゴルフボール表面のくぼみは、(1) ボールが飛ぶ際の空気の流れを乱し、ボール上下の空気の速度差を大きくする作用

があるため、揚力が高くなる（落ちにくい）、(2) ボール後方の空気の流れを乱すことによってボール近傍の真空領域の体積を減らす作用があるため、後方にボールを引っ張る空気抵抗が減る（飛距離が伸びる）という二つの効果を示す。つまり、発見した表面凹型粒子は、肺の気道を送達される粒子として極めて適している。さらに、粒子調製時にブロック共重合体の使用量を少しずつ増やす過程を詳細に観察することによって、エマルションを「ブロック共重合体共存下で」「液中」乾燥した場合のみ、「多孔質粒子が得られるはずがない条件（o/w エマルションから「非」多孔質粒子のみが得られる条件）」から「多孔質粒子が得られる」ことも発見した。このような多孔質粒子の密度は非常に低いと考えられるため、肺の気道を送達される粒子として極めて適している。さらに、ブロック共重合体によって粒子表面の分子修飾が容易であることから、従来の経肺投与用薬物キャリアの問題点を解決することができると期待される。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

Yoneki, N., Takami, T., Ito, T., Anzai, R., Fukuda, K., Kinoshita, K., Sonotaki, S., Murakami, Y., "One-pot facile preparation of PEG-modified PLGA nanoparticles: Effects of PEG and PLGA on release properties of the particles", *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, 469, 66-72 (2015), 査読有

DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.01.011

高見拓, 村上義彦, "薬物を肺へ送りこむための多孔質粒子", *化学と教育*, 63, 22-23 (2015), 査読無

村上義彦, "経肺投与製剤に応用可能な「表面凹型微粒子」「多孔質微粒子」作製技術～微粒子表面修飾技術の開発過程で発見した予想外のエマルションサイエンス～", *Pharm Tech Japan*, 30, 1553-1558 (2014), 査読無

### 〔学会発表〕(計 12 件)

高見拓, 村上義彦, "「一段階乳化」による PEG-PLA/PLGA 複合化マイクロ多孔質粒子の開発", 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 2015 年 11 月 9 日, 京都テルサ(京都府京都市)

安宅拓未, 高見拓, 村上義彦, "特異な「表面凹型構造」を有する PEG-PLA/PLGA 複合化マイクロ粒子の開発", 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 2015 年 11 月 9 日, 京都テルサ(京都府京都市)

須賀文子, 高見拓, 村上義彦, "新奇な「一

段階乳化」技術によって形成した多孔質粒子の薬物内包・放出特性", 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 2015 年 11 月 9 日, 京都テルサ(京都府京都市)  
村上義彦, "高分子自己組織化体を組み込んだハイブリッド型材料のデザインから、偶然見つけた粒子のサイエンスまで", 高分子同友会講演会, 2015 年 06 月 23 日, 高分子学会(東京都中央区)  
高見拓, 村上義彦, "「一段階乳化」による多孔質粒子調製の新技术の開発 ~ 経肺投与 DDS への応用を目指して ~", 平成 27 年度繊維学会年次大会, 2015 年 6 月 10 日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)  
村上義彦, "ハイブリッド材料のデザインから、偶然見つけた粒子のサイエンスまで", 第 88 回高分子学会千葉地域活動高分子研究交流講演会, 2015 年 06 月 9 日, 出光会館(千葉県市原市)  
高見拓, 村上義彦, "「一段階乳化」による多孔質粒子調製の新技术の開発 ~ 経肺投与 DDS への応用を目指して ~", 第 64 回高分子学会年次大会, 2015 年 5 月 27 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)  
安宅拓未, 高見拓, 村上義彦, "特異な「表面凹型構造」を有する PEG-b-PLA/PLGA 複合化マイクロ粒子の開発 ~ 経肺投与 DDS への応用を目指して ~", 第 64 回高分子学会年次大会, 2015 年 5 月 27 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)  
須賀文子, 高見拓, 村上義彦, "経肺投与 DDS への応用を目指した rifampicin 内包 PEG-b-PLA/PLGA 複合化マイクロ多孔質粒子の開発", 第 64 回高分子学会年次大会, 2015 年 5 月 27 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)  
高見拓, 村上義彦, "「一段階乳化」による PEG-PLA/PLGA 複合化マイクロ多孔質粒子の開発", 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会, 2014 年 11 月 17 日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)  
Takami, T., Murakami, Y., "Novel PEG-PLA/PLGA microparticles having porous surfaces for pulmonary drug delivery", 41st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2014 年 7 月 15 日, シカゴ(アメリカ)  
高見拓, 村上義彦, "「一段階乳化」による多孔質粒子の形成 ~ 経肺投与 DDS への応用を目指した PEG-b-PLA/PLGA 複合化マイクロ粒子の開発 ~", 第 63 回高分子学会年次大会, 2014 年 5 月 28 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

取得状況(計 0 件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上義彦(MURAKAMI, Yoshihiko)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号: 00339748

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)