

小角 X 線散乱による両親媒性ブロック共重合体ミセル中の
薬物の分散状態
**Drug Incorporation into an Amphiphilic Polymer Micelle Explored with
Synchrotron SAXS**

秋葉勇^a、寺田直隆^a、橋田智史^a、秋野雄亮^a、亀本康平^a、増永啓康^b、櫻井和朗^b
Isamu Akiba^a, Naotaka Terada^a, Satoshi Hashida^a, Yusuke Akino^a, Kohei Kamemoto^a, Hiroyasu Masunaga^b,
Kazuo Sakurai^a

^a北九州市立大学、^b高輝度光科学研究センター/SPring-8

^aThe University of Kitakyushu, ^bJASRI/SPring-8

ポリエチレングリコール-*b*-ポリ(α , β -ベンジル-L-アルパルテート)(PEG-PBLA)ミセル中への疎水性薬物(LE540)の内包挙動をシンクロトロン放射光を用いた小角 X 線散乱(SAXS)により検討した。LE540 含量の増加に伴い、疎水性コアを形成する PBLA の結晶長周期に由来するピークが消失したことから、LE540 は疎水性コア内に内包され、その中で均一に分散していることが分かった。また、コア-シェルモデルからの理論散乱曲線とのフィッティング解析から、LE540 の内包は、シェル部の溶媒和には変化は起こさず、疎水性コアの散乱長密度の低下、コアの体積膨張及び会合数の上昇を引き起こすことが分かった。

Incorporation of hydrophobic drug (LE540) into a micelle consisting of poly(ethylene glycol)-*block*-poly(α , β -benzyl-L-aspartate) (PEG-PBLA) was explored with synchrotron small-angle X-ray scattering (SAXS) measurements *in vacuo*. Because the diffraction peak attributed to long period of PBLA in hydrophobic core was vanished by adding LE540, the hydrophobic drug is incorporated into hydrophobic core of the PEG-PBLA micelle with core-shell architecture. Analyses of the absolute forward SAXS intensity and by fitting with theoretical model revealed that incorporation of LE540 into the hydrophobic core induced drastic reduction of the scattering-length density, volume expansion of the core and increment of aggregation number without any changes of solvation of hydrophilic PEG chain.

背景と研究目的

両親媒性ブロック共重合体は水溶液中で疎水性の内核と親水性の外殻からなるミセルを形成する[1]。このコア-シェル型のミセルは、疎水性内核への疎水性物質の選択的な取り込みのため、薬物輸送システム (DDS) の薬物キャリアー粒子として用いられる[2]。一般に水に難溶の薬物はDDS粒子内に物理的に封入される。それ故、薬物の経時的な放出があり、患部への薬物ターゲティングにおいては、この経時的放出を制御する必要がある。DDSにおける薬物の放出挙動は、DDS粒子内での薬物の分布や集合状態およびミセルの疎水性内核を形成する高分子鎖の集合状態(結晶性、非晶性など)が強く影響すると考えられ

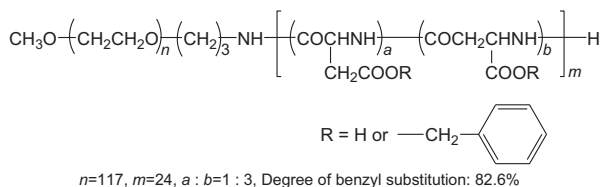
る。それ故、これらに関する情報を得ることは、DDS粒子の分子構造やDDS粒子中への薬物の封入方法を設計する際に極めて有用な知見を与える。本研究では、薬物を内包した両親媒性ブロック共重合体ミセルからの小角X線散乱(SAXS)を測定し、詳細に解析することで、ミセルの構造、疎水性内核での高分子鎖の集合状態および疎水性内核内での薬物の分布を明らかにすることを目的とする。

実験

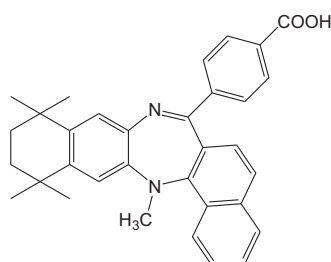
両親媒性ブロック共重合体には生体適合性が高いことが知られているポリエチレングリコール-*b*-ポリ(α , β -ベンジル-L-アルパルテート)(PEG-PBLA)を用いた[3]。疎水性薬剤に

は合成レチノイドのLE540を用いた。各試料の構造をScheme 1に示す。LE540を所定の混合比でPEG-PBLAとTHF中に溶解した。試料が完全に溶解した後、THFを蒸散させ、PEG-PBLA/LE540ブレンドフィルムを作成した。得られたブレンドフィルムをミセル濃度25mg/mlでバッファー中に溶解し、超音波ホモジナイザーを用いて均一に分散させた。得られたミセル溶液を1/40の濃度に希釈して試料溶液とした。作成したミセル溶液におけるPEG-PBLAに対するLE540の濃度(L_{LE540})は、0、1.3、3.0、5.8および8.3 wt%である。得られたミセル溶液に対してSAXS測定を行った。

SAXS測定は、SPring-8のBL-40B2にて行った。すべての測定は、検出器に30cm×30cmイメージングプレート(RIGAKU R-AXIS VII)を用い、カメラ長1.8mおよび0.7 m、波長1.0Åで行った。また、高S/N比での測定を行うために、別途開発した真空試料チャンバーを用いた。真空下で実験に対応するため、試料溶液を石英キャピラリーに封入して測定を行った。イメージングプレートにより得られた2次元SAXS像を円環平均し、1次元SAXSプロファイル($I(q)$ vs. q)を得た。ここで、 $I(q)$ は q における散乱強度、 q は散乱ベクトルの絶対値である。得られた散乱強度はGlatterらの方法に従い、水からの散乱強度を参照にして絶対強度へ変換した[4]。



(a) PEG-PBLA



(b) LE540

Scheme 1

結果および考察

Fig. 1にLE540を内包したPEG-PBLAミセルの中角領域のX線散乱プロファイルを示す。

4 nm⁻¹付近に見られるピークは疎水性内核を形成するPBLAの結晶長周期に由来するピークである。 L_{LE540} の増加に伴いこのピーク強度が減少し、 L_{LE540} が5.8 wt%以上ではピークが消失していることが分かる。このことは、LE540がPBLAの結晶化を阻害していることを意味している。したがって、LE540はPBLAで構成されている疎水性コアに内包され、コア内で均一に分散していることを示している。このことは、ミセルのサイズなどに変化をもたらすと考えられる。そこで、次に小角領域について解析を行った。

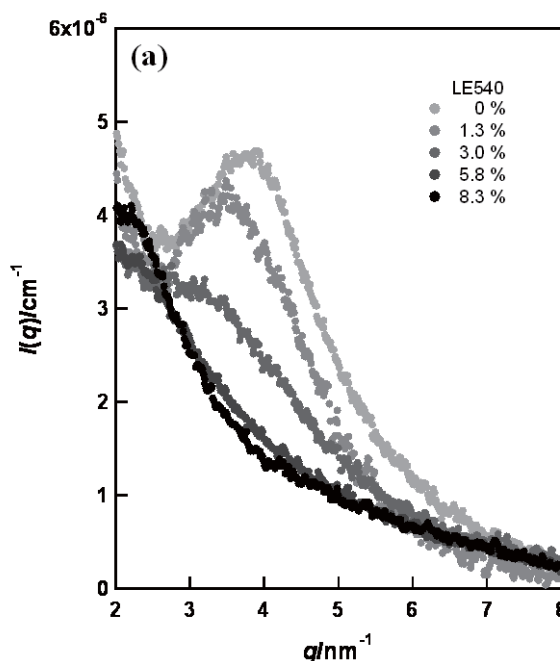


Fig. 1. MAXS profiles of PEG-PBLA micelles loaded with LE540.

Fig. 2に、薬物内包ミセル溶液からの散乱強度のGuinierプロット($\ln[I(q)]$ vs. q^2)を示す。 L_{LE540} によらず、良い直線関係が成り立っていることが分かる。また、 L_{LE540} が3.0 wt%以下ではプロットの傾きがほぼ一定で、切片($I(0)$)が L_{LE540} の増加に伴い上昇していることが分かる。一方、 L_{LE540} が3.0 wt%以上では $I(0)$ が一定で傾きが L_{LE540} の増加に伴い増加していることが分かる。Guinier則に従うと、散乱強度 $I(q)$ と q は次式で関係づけられる[5]。

$$I(q) = I(0) \exp(-q^2 R_g^2 / 3) \quad (1)$$

ここで、 $I(0)$ は $q=0$ における散乱強度、 R_g はミセルの慣性半径である。ここから、 L_{LE540} が3.0 wt%以下では R_g が変化せず、 L_{LE540} が

3.0 wt%以上では R_g が LLE540 の増加に伴い、増加することが分かる。一方、 $I(0)$ は電子密度(散乱長密度)と以下の関係がある。

$$I(0) = NV_M^2 (\bar{\rho} - \rho_0)^2 \quad (2)$$

ここで、 $\bar{\rho}$ はミセルの平均の電子密度、 ρ_0 は溶媒の電子密度、 V_M はミセルの体積、 N は単位体積中のミセルの数である。PBLA に比べて、LE540 の電子密度は低いことから、 L_{LE540} の増加に伴い、 $\bar{\rho}$ は低下すると考えられる。したがって、 L_{LE540} の増加に伴い、 $I(0)$ が増加あるいは一定であることは、 V_M の増加を意味している。この L_{LE540} の増加に伴う R_g および $I(0)$ の変化から、LE540 を内包することにより、PEG-PBLA ミセルの体積が増加していると考えられる。このミセルのサイズおよび電子密度の変化をより詳細に検討するために、コア-シェルモデル粒子からの理論散乱曲線とのフィッティング解析を行った。

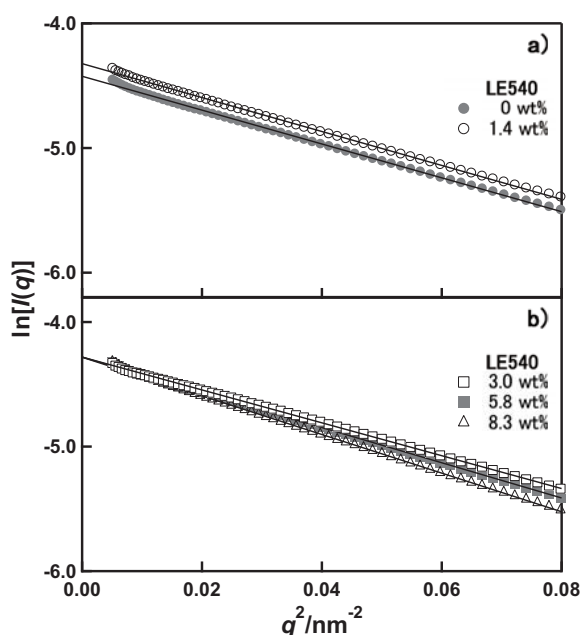


Fig. 2. Guinier plots of PEG-PBLA micelles loaded with LE540. a) $L_{LE540} = 0$, and 1.4 wt%, b) $L_{LE540} = 3.0$, 5.8, and 8.3 wt%

孤立した球状コア-シェル粒子からの散乱曲線は、次式により与えられる。

$$I(q) = NV_M^2 \left\{ \begin{aligned} & \left(\rho_C - \rho_S \right) \frac{V_C}{V_M} \frac{3[\sin(qR_C) - qR_C \cos(qR_C)]}{(qR_C)^3} \right]^2 \\ & + (\rho_S - \rho_0) \frac{3[\sin(qR_S) - qR_S \cos(qR_S)]}{(qR_S)^3} \end{aligned} \right\} \quad (3)$$

ここで、 ρ_C 、 ρ_S はそれぞれコア、シェルの電子密度(散乱長密度)、 R_C 、 R_S はそれぞれコア、ミセル全体の半径である。これらのパラメータをフィッティングパラメータに用いることで、実験から得られた SAXS プロファイルとのフィッティングを行うことができる。しかし、単に上式のみを用いると、4 つの変動因子があるため、解析結果に任意性が生じる。そこで、各変動因子の間に適切な関係を与え、制限する必要がある。まず、上式の各パラメータは、前述の Guinier プロットから得られた R_g と次の関係がある。

$$R_g^2 = \frac{3[V_C R_C^2 (\rho_C - \rho_S) + V_S R_S^2 \rho_S]}{5[V_C (\rho_C - \rho_S) + V_S \rho_S]} \quad (4)$$

式(4)および式(2)を用いることで、独立変数を2つにすることができる。また、PBLA、溶媒および非晶質の PEG の散乱長密度の値は既知である。シェルは PEG の水溶液と見なすことができることから、シェルの散乱長密度は PEG 単体と溶媒単体の値の間に制限される。これらの制限を用いると、独立変数は2つあるが、それらの取りうる範囲は極めて限定的となり、任意性を含まない解析結果を得ることができる。この条件を満たすようにパラメータを設定して散乱曲線を計算し、実験結果との比較を行った。

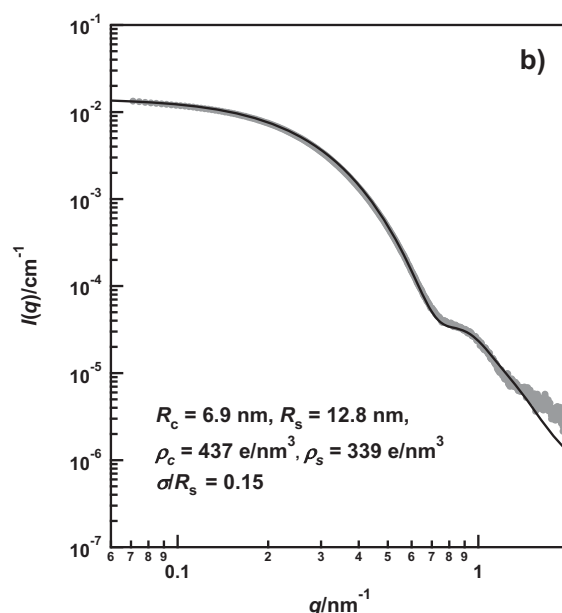


Fig. 3. SAXS profiles of the PEG-PBLA micelle with LE540 content of 8.3 wt% for PEG-PBLA. Solid lines are theoretical curves of the core-shell model taking the size distribution into account.

Fig.3 に一例として LLE540=8.3 wt% のミセルからの SAXS プロファイルと理論曲線との比較を示す。理論的な制限の範囲内で極めて良い一致を得ることができた。

理論と実験とのフィッティング解析から得られたコア、シェルの散乱長密度およびコア、ミセル全体の半径を Table 1 に示す。また、Fig. 3 から得られた R_c および会合数を L_{LE540} に対してプロットした図を Fig. 4 に示す。ただし、会合数 N_{agg} は次式から算出した。

$$N_{agg} = \frac{x_{PBLA} V_c N_A}{M_{PBLA} V_{PBLA}}$$

ここで、 M_{PBLA} は PBLA の分子量、 v_{PBLA} は PBLA の比容、 V_c はコアの体積、 x_{PBLA} はコア内における PBLA の体積分率である。Table 1 から、シェルの電子密度(散乱長密度)およびミセル全体の半径には L_{LE540} の増加に伴う顕著な変化が見られないことが分かる。一方、PBLA コアの半径は LLE540 の増加に伴い増大し、特に、3.0 から 5.8 wt% の間で劇的に大きくなることが分かった。この変化は、疎水性コア内で見られた PBLA の結晶化度の低下と極めて良い対応をしている。さらに、Fig. 4 を見ると、ミセルにおける PBLA の会合数も同様に変化していることが確認された。したがって、LE540 の内包に伴うミセルの疎水性コアの拡大は、LE540 が加わることおよび PBLA 結晶の融解による体積の膨張のみではなく、PEG-PBLA の会合数の増加によっても引き起こされていると考えることができる。

Table 1 Characteristic parameters for PEG-PBLA/LE540 micelles resulted from fitting analyses using core-shell sphere model.

L_{LE540} /wt% for PEG-PBLA	R_c /nm	R_s /nm	ρ_c /cm ⁻²	ρ_s /cm ⁻²
0	5.9	12.5	1.38×10^{11}	9.58×10^{10}
1.4	5.9	12.5	1.35×10^{11}	9.58×10^{10}
3.0	6.1	12.3	1.28×10^{11}	9.55×10^{10}
5.8	6.7	12.5	1.25×10^{11}	9.55×10^{10}
8.3	6.9	12.5	1.23×10^{11}	9.55×10^{10}

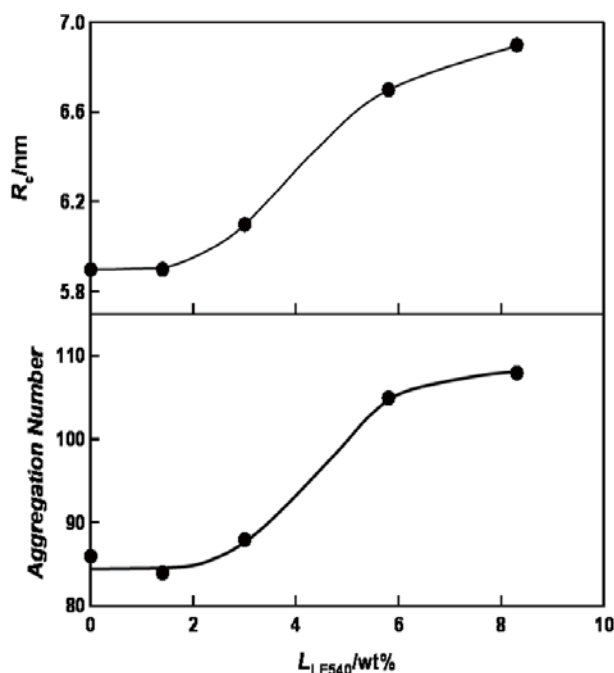


Fig. 4. Plots of R_c and aggregation number of PEG-PBLA for a micelle against L_{LE540} .

今後の課題

疎水性薬剤の内包に伴うミセルの状態の変化については、おおむね明らかにすることができた。今後は、この状態や構造の変化と実際の薬理効果との関係を明らかにすることがきわめて重要な課題となる。

参考文献

- Zhang, L. F.; Eisenberg, A. *Science* **1995**, *268*, 1728-1731.
- Kakizawa, K.; Kataoka, K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 203-222.
- Yokoyama, M.; Opanasopit, P.; Okano, T.; Kawano, K.; Maitani, Y. *J. Drug Targeting* **2004**, *12*, 373-384.
- Orthaber, D.; Bergmann, A.; Glatter, O. *J. Appl. Cryst.* **2000**, *33*, 218-225.
- Feigin, L. A.; Svergun, D. I. *Structure Analysis by Small-angle X-ray and Neutron Scattering*; Plenum Press: New York, 1987.

論文発表状況・特許状況

論文投稿準備中 1 件
国際学会発表 1 件 (SAS2009, Oxford, UK)

キーワード

Polymeric micelle, DDS, SAXS, Core-shell model