

コア - コロナ型高分子ナノスフェアの合成とDDS分野への応用

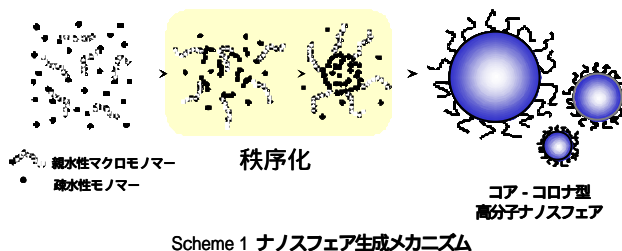
明石 満 (鹿児島大学大学院理工学研究科)

1. はじめに

親水性マクロモノマーと疎水性ビニルモノマーのラジカル共重合により、親水性コロナ - 疎水性コア型高分子ナノスフェアが合成できることを明らかにしてきた¹⁾。単分散性を保ったままで、100 nm から数 μm の範囲で粒径を制御することができ、分離・精製も容易な超微粒子である。これまで、白金や銀等の貴金属コロイド触媒の担体²⁻⁵⁾、カルシトニンを例としてペプチド薬の経口DDS⁶⁻¹⁰⁾、集積材料素材¹¹⁾、医療診断薬への応用等についての研究を進めてきた。また、最近、ポリエチングリコールマクロモノマーとスチレンの共重合体であるコア - コロナ型高分子ナノスフェアの構造を、その超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察し、また XPS 分析により明確にしている¹²⁾。本フォーラムでは、まずコア - コロナ型高分子ナノスフェアの合成と構造について説明し、この微粒子を用いた DDS 分野への応用から、“**エイズウイルス捕捉とエイズワクチン開発**” を取り上げ紹介する。

2. コア - コロナ型高分子ナノスフェアの合成と構造

1985 年に、水溶性マクロモノマーとスチレンのラジカル共重合を水 / エタノール混合溶媒で行うと球状の高分子微粒子が生成することを初めて報告した¹³⁾。水溶性マクロモノマーは、一般的に、水溶性モノマーを退化的連鎖移動剤



の存在下重合し、末端に連鎖移動剤由来の官能基 (水酸基、カルボキシル基など) を導入、次に、例えばクロロメチルスチレンとの反応により二重結合を高分子末端に導入する手法で得られる。基礎研究を進めるために、マクロモノマーとして市販のポリエチングリコール(PEG)マクロモノマー (末端はメタクリロイル基) と、市販の PEG (片末端メトキシ基、片末端水酸基) にクロロメチルスチレンを反応させ末端をビニルベンジル基としたものを用いてきた。また、疎水性モノマーにはスチレン (St) 及びメチルメタクリレート (MMA) を用いている。Scheme 1 にはナノスフェア生成メカニズムを示した¹⁴⁾。水中ではミセルが形成されるが、疎水性モノマーを溶解させるためにエタノールを加え、水 / エタノール混合溶媒中で共重合を行う。つまり均一系で重合は始まるが、

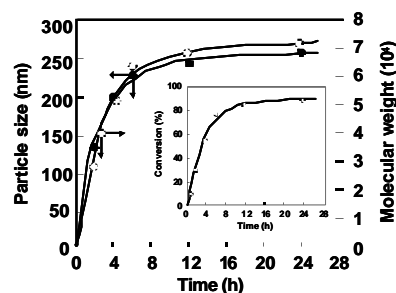


図 1 共重合挙動

生成するグラフト共重合体の背骨格は溶媒に溶解せず、高分子の秩序化を駆動力として疎水性コア - 親水性コロナが得られる。化学構造は疎水性幹 - 親水性枝型グラフトポリマーであり、PEG マクロモノマーと St の共重合体の場合、クロロホルムや DMF に溶解し、分子量測定や NMR 測定が容易に出来る。

図 1 には典型的な共重合挙動を示した。ラジカル重合であるが分子量は時間と共に増大し、通常、均一重合で得られる場合と比較して、10 倍の分子量のものを得ることができる¹⁵⁾。また、分子量増加、収量、粒径は連動し、生長ラジカルは主として微粒子コアに存在し長寿命であると予測される。重合率、分子量、粒径の重合時間依存性を調べると全て同じ傾向を示し、明らかに通常のラジカル重合とは異なっている。疎水性モノマーを生成した高分子ナノスフェアのコアに取り込みながら重合が進行すると考えると理解できる挙動が観測されることは興味深い。しかしながら分子量分布は通常のラジカル重合と同様に広く、完全なりビング重合系とは異なることもまた明らかである。

何故、粒径分布が単分散性を持つことができるか疑問が残っているが、単分散性を維持した条件での粒径に及ぼす各パラメータの影響を詳細に検討している(図 2)^{16,17)}。例えば、粒径の小さい微粒子が得られる場合は系全体で大きな表面積を持つことになり、粒子を分散安定化させるに足りるに十分な親水性マクロモノマーが存在している。

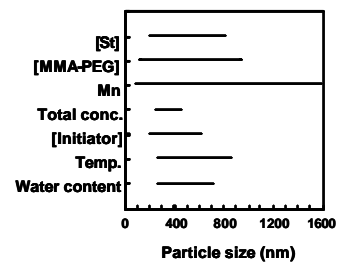


図 2 粒径を制御するパラメーター

まとめると、この自己秩序化コア - コロナ型高分子ナノスフェアは次のような特徴を持っている。1) 通常のラジカル重合で容易に得られ工業化可能である。2) 分離精製が容易で凍結乾燥によって固体(微粉末)が得られ安定な状態で長期保存できる。3) 単分散性を維持した状態で粒径を 0.1 から 2~3 ミクロンオーダーまで制御できる。4) 高密度で高分子鎖が集積できる。5) コア、コロナの高分子鎖が設計できる。6) 水分散性が高く、生体分子固定化に相応しい機能を持つ。

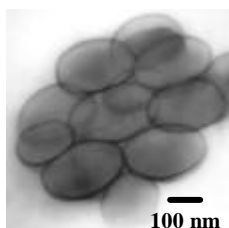


図 3 四酸化オスミウム染色したナノスフェアのTEM観察像

次に構造に関して得られている知見を述べる。まず ESCA 解析(表面から約 10 nm 程度の情報)から、親水性グラフト鎖がナノスフェア表面に集積していることが明らかである。最近、TEM 観察により直接マクロモノマー由来の親水性グラフト鎖の観察に成功した¹²⁾。通常の生細胞観察と同様の手法で行った。ナノスフェア

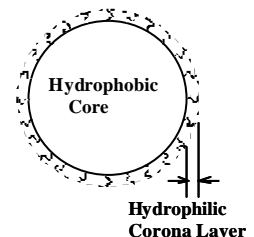


図 4 ナノスフェアのコア - コロナ構造

をエポキシ樹脂に包埋し、マイクロトームで超薄切片を切り出し、

四酸化オスミウム蒸気で親水性の部分を選択的に染色し TEM 観察した例を図 3 に示す。マクロモノマーの分子量を変化させてナノスフェアを合成し詳細に検討した結果、ほぼマクロモノマー鎖一層が表面に集積していることが観察されている。図 4 には想定される構造を示したが、当然ながらコアにも親水性鎖が存在し、いわゆる相分離構造（ミクロドメイン構造）を観察できる。

3. レクチン固定化ナノスフェアとエイズウイルス捕捉

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1、俗称エイズウイルス) (図 5) は粒径が約 100 nm の微粒子であり、表面は gp120 といわれる糖タンパク質で覆われている。この糖鎖部位にはマンノースが多く含まれているために糖認識レクチンと強く相互作用することが知られている。我々の研究グループは高分子ナノスフェアに糖鎖を導入し、高分子ナノスフェア表面での糖 - 糖認識レクチンの相互作用を詳細に調べている¹⁸⁻²¹⁾。均一系の相互作用に比較して極めて強く相互作用することが明らかである。HIV-1 捕捉を目的にすると、レクチ

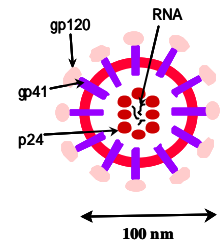


図5 ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1)の構造

ンを適当な大きさの高分子微粒子に固定することにより達成可能であると判断した。100 nm のウイルス捕捉には数倍以上の粒径を持つナノスフェアが適当だと判断した。まず、ポリメタクリル酸マクロモノマーとスチレンのラジカル共重合によりポリスチレンコア - ポリメタクリル酸コロナの高分子ナノスフェアを合成した。次に、マンノース結合性レクチンであるコンカナバリン A を水溶性カルボジイミドを用いて固定化した (図 6)。

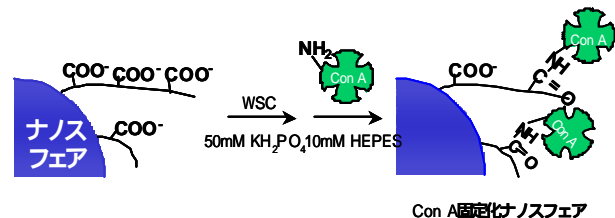


図6 ナノスフェアへのレクチン (コンカナバリン A) の固定化

図 7 に示すように、HIV-1 浮遊液にコンカナバリン A 固定化高分子ナノスフェアを加え、遠心分離し、上澄み液中の gp120 量とウイルス感染価を測定した (図 8)²²⁾。コンカナバリン A を固定化しない場合も高分子ナノスフェアの負電荷が作用し、静電的相互作用により若干の HIV-1 捕捉は可能であった。コンカナバリン A を固定化した場合は 97% のウイルスが捕捉されており、実験誤差を考えると恐らく 100% のウイルス捕捉が可能だと結論した。

また、沈澱物の電子顕微鏡観察 (図 9)²³⁾ も、効率良く HIV-1 捕捉が達成されていることを示している。粒径 100 nm のウイルス表面に存在する糖タンパク質 gp120 の糖鎖 (マンノース) を高分子ナノスフェア表面のレクチンが認識し、捕

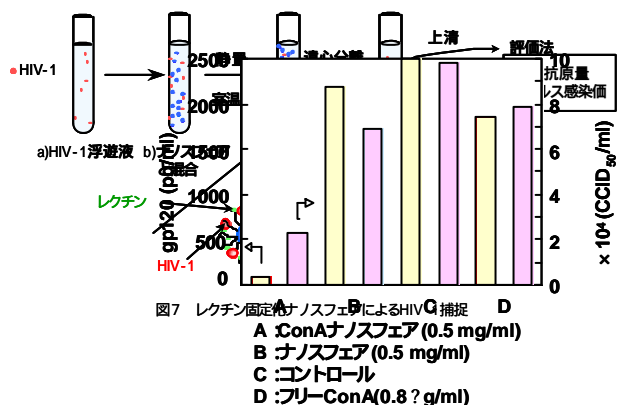


図8 レクチン固定化ナノスフェアによるHIV-1捕捉後の

捉さ

れたわけである。捕捉実験前にマンノースで相互作用部位を覆うとこのシステムが機能しないこと、また、コンカナバリンAがこれまでは最もウイルスの捕捉効率が良いことなども明らかにしている。さらに、実際に東南アジア、アフリカで使用することを想定し、粉末化や保存法も検討しているが、取り扱いが容易で極めて安定な HIV-1 捕捉システムが構築されている。

4. エイズウイルス捕捉高分子ナノスフェアを用いるワクチン

実際に血液中にある HIV-1 捕捉を考えた場合、糖鎖には特異性があっても、血液成分に糖鎖を含むものが多くある場合には、目的とする HIV-1 捕捉を我々の開発したシステムによって切れ味良く行うことは極めて困難であろう。血液中なら、恐らくまず赤血球と強く相互作用することが予想される。実際の生体系では捕捉システムを機能させるにかなりの困難が予想される。このような背景から、エイズ治療・予防を広く考慮し、HIV-1 捕捉高分子ナノスフェアの抗エイズワクチンへの発展応用を図った。ワクチンは古くから行われている病原性のウイルスや細菌に対する予防方法である。不活化あるいは弱毒化したウイルスや細菌、またはその構成成分や外毒素のタンパク質などの免疫原を宿主に投与することにより、宿主が投与されたウイルスや細菌に対する防御システムを整えることである。これまでに、破傷風、インフルエンザ、ポリオなどのワクチンが開発され現在使用されているが、HIV-1 に対するワクチンは未だ開発されていない。この理由としては、ウイルスが激しく変異することや宿主の細胞に潜伏感染することなどが挙げられる。血液中に HIV-1 に対する抗体が存在していたとしても、宿主の細胞内に潜伏している HIV-1 に作用することは不可能ということである。これまでのエイズワクチンは血液中に多く存在する IgG 抗体がよく調べられていたが、最近では、ウイルスや細菌の侵入ゲートである粘膜組織で機能する IgA 抗体が注目されている^{24,25)}。つまり、消化器、呼吸器、生殖器などの粘膜面に IgA 抗体のバリアーを設けようという方法である。粘膜組織で IgA 抗体を産生させるには、注射による免疫原投与よりも粘膜組織を介した免疫原投与が有効であると考えられ、経粘膜投与が一般的な方法である²⁶⁾。親水性高分子を表面にもつコア - コロナ型ナノスフェアを利用すれば、粘膜付着性の向上が期待でき、粘膜上に免疫原を濃縮し、長時間提示できれば間違いなく効果が高くなると考えた。エイズワクチンの免疫原となるペプチドを高分子微粒子に結合させ用いることも可能であると考えられるが、現在までのところ前項で示した HIV-1 捕捉高分子ナノスフェアを免疫原として用いて研究を進めている。

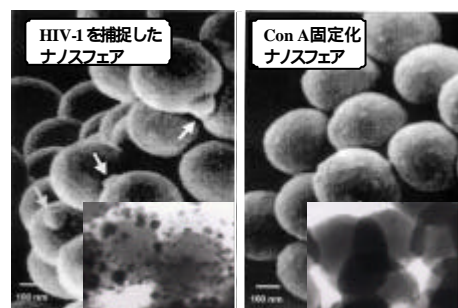


図9 HIV-1捕捉レクチン固定化ナノスフェアのSEM観察像

現在、HIV-1 の感染経路の大部分は性的接触によるものであるので、HIV-1 侵入の第一関門である膣粘膜において、抗 HIV-1 抗体が誘導できれば、有効な防御方法となりうる。HIV-1 捕捉高分子ナノスフェアの免疫応答性について調べるため、熱処理により不活化した HIV-1 を捕捉した高分子ナノスフェアを免疫原として用い、図 10



図10 不活化HIV-1捕捉ナノスフェアを用いたマウス免疫実験

に示すようなマウスでの免疫実験を行った。その結果を図 11 に示す。マウス膣洗浄液中の HIV-1 特異的 IgA および IgG を ELISA を用いて検出したところ、レクチン固定化ナノスフェアに捕捉された HIV-1 を投与した群のみに高い IgA の誘導が確認された。また、IgG の誘導はいずれの投与群においても認められなかつた。

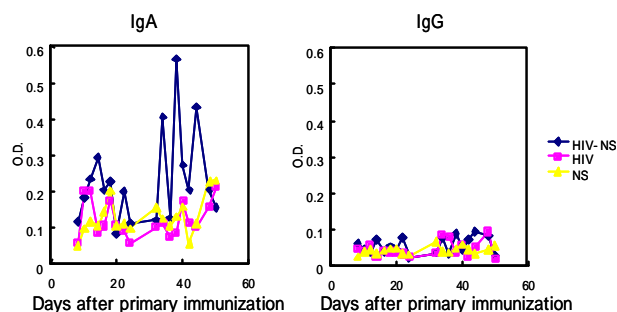


図11 膣洗浄液中の抗HIV-1抗体の検出

これは HIV-1 をレクチン固定化ナノスフェアに捕捉させることにより、HIV-1 の免疫原性が高められ、一般的に免疫応答性が低いと言われている膣粘膜に IgA を誘導できたものと推測できる²⁷⁾。このメカニズムは未だ不明であるが、レクチン固定化ナノスフェアが粘膜組織における免疫応答に大きく関与していることは確かなようだ。また、疫学的調査によれば、HIV-1 への暴露が頻回にあるにも関わらず感染に抵抗性をもつ女性の膣液中には HIV-1 特異的 IgA 抗体が有意に検出されていることも報告されている²⁸⁻³⁰⁾。これらの女性には HIV-1 に感染した細胞を攻撃する細胞障害性 T 細胞 (CTL) の関与も示唆されており、図 12 に示すような IgA の役割だけで HIV-1 への感染を予防できるかどうかは分からない。しかしながら、性周期の影響を受けるものの膣粘膜組織に HIV-1 特異的 IgA 抗体の誘導を人為的に達成したことで、HIV-1 捕捉高分子ナノスフェアが未だ開発されていないエイズワクチンへの展開が十分見込めると思われる。また、最近、ワクチン投与をより普遍的に行うことを目的に、経鼻投与を行った結果³¹⁾、この方法によっても膣粘膜への IgA 抗体産生が認められた。経鼻投与が抗原投与時の性周期の影響を受けず、また最終的には性別を問わず免疫可能であることから、高分子ナノスフェアの特徴を生かした、より優れた粘膜免疫の普遍性の高い投与経路であると考えている。

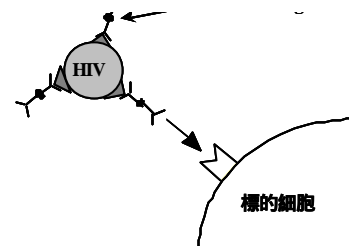


図12 抗HIV-1IgA抗体による感染阻害

エイズウイルス捕捉とエイズワクチンの開発に関する研究は、本学医学部附属難治性ウイルス疾患センターの馬場昌範教授、(株)日本抗体研究所と共に行っている。また、本講演要旨の大部分は、化学工業、Vol.52, No.9, 41-47(2001)に記載したものである。

引用文献

- 1) 明石 満, 高分子, **48**, 148-152 (1999).
- 2) C.-W. Chen, M.-Q. Chen, T. Serizawa, M. Akashi, *Chem. Commun.*, 831-832 (1998).
- 3) C.-W. Chen, M.-Q. Chen, T. Serizawa, M. Akashi, *Adv. Mater.*, **10**, 1122-1126 (1998).
- 4) C.-W. Chen, T. Serizawa, M. Akashi, *Chem. Mater.*, **11**, 1381-1389 (1999).
- 5) C.-W. Chen, T. Serizawa, M. Akashi, *Langmuir*, **15**, 7998-8006 (1999).
- 6) S. Sakuma, N. Suzuki, H. Kikuchi, K. Hiwatari, K. Arikawa, A. Kishida, M. Akashi, *Int. J. Pharm.*, **149**, 93-106 (1997).
- 7) S. Sakuma, N. Suzuki, H. Kikuchi, K. Hiwatari, K. Arikawa, A. Kishida, M. Akashi, *Int. J. Pharm.*, **158**, 69-78 (1997).
- 8) S. Sakuma, Y. Ishida, R. Sudo, N. Suzuki, H. Kikuchi, K. Hiwatari, A. Kishida, M. Akashi, M. Hayashi, *Int. J. Pharm.*, **159**, 181-189 (1997).
- 9) S. Sakuma, R. Sudo, N. Suzuki, H. Kikuchi, M. Akashi, M. Hayashi, *Int. J. Pharm.*, **177**, 161-172 (1999).
- 10) S. Sakuma, M. Hayashi, M. Akashi, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **47**, 21-37 (2001).
- 11) T. Serizawa, K. Taniguchi, M. Akashi, *Colloids Surf.*, **169**, 95-105 (2000).
- 12) T. Serizawa, S. Takehara, M. Akashi, *Macromolecules*, **33**, 1759-1764 (2000).
- 13) M. Akashi, I. Kirikihira, N. Miyauchi, *Angew. Makromol. Chem.*, **132**, 81-89 (1985).
- 14) M. Akashi, T. Yanagi, E. Yashima, N. Miyauchi, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **27**, 3521-3530 (1989).
- 15) M. Akashi, D. Chao, E. Yashima, N. Miyauchi, *J. Appl. Polym. Sci.*, **39**, 2027-2030 (1990).
- 16) M.-Q. Chen, T. Serizawa, M. Akashi, *Polym. Adv. Tech.*, **10**, 120-126 (1999).
- 17) M.-Q. Chen, T. Serizawa, A. Kishida, M. Akashi, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. Ed.*, **37**, 2155-2166 (1999).
- 18) T. Serizawa, T. Uchida, M. Akashi, *J. Biomat. Sci. Polym. Edn.*, **10**, 391-401 (1999).
- 19) T. Uchida, T. Serizawa, M. Akashi, *Polym. J.*, **31**, 970-973 (1999).
- 20) T. Serizawa, S. Yasunaga, M. Akashi, *Biomacromolecules*, **2**, 469-475 (2001).
- 21) 明石 満, 化学総説, **48**, 56-68 (2001).
- 22) M. Akashi, T. Niikawa, T. Serizawa, T. Hayakawa, M. Baba, *Bioconjugate Chem.*, **9**, 50-53 (1998).
- 23) T. Hayakawa, M. Kawamura, M. Okamoto, M. Baba, T. Niikawa, S. Takehara, T. Serizawa, M.

- Akashi, *J. Medical Virology*, **56**, 327-331 (1998).
- 24) H.F. Staats, W.G. Nichols, T.J. Palker, *J. Immunol.*, **157**, 462-472 (1996).
 - 25) T.C. VanCott, R.W. Kaminski, J.R. Mascola, V.S. Kalyanaraman, N.M. Wassef, C.R. Alving, J.T. Ulrich, G.H. Lowell, D.L. Birx, *J. Immunol.*, **160**, 2000-2012 (1998).
 - 26) 窪田 満、藤橋浩太郎、清野 宏, *化学と生物*, **35**, 415-420 (1997).
 - 27) M. Kawamura, T. Naito, M.Ueno, T. Akagi, K. Hiraishi, I. Takai, M. Makino, T. Serizawa, K. Sugimura, M. Akashi, M. Baba, *J. Med. Virol.*, **66**, 291-298 (2002).
 - 28) S. Mazzoli, D. Trabattoni, S.L. Caputo, S. Piconi, C. Ble, F. Meacci, S. Ruzzante, A. Salvi, F. Semplici, R. Longhi, M.L. Fusi, N. Tofani, M. Biasin, M.L. Villa, F. Mazzotta, M. Clerici, *Nat. Med.*, **3**, 1250-1257 (1997).
 - 29) R. Kaul, D. Trabattoni, J.J. Bwayo, D. Arienti, A. Zagliani, F.M. Mwangi, C. Kariuki, E.N. Ngugi, K.S. MacDonald, T.B. Ball, M. Clerici, F.A. Plummer, *AIDS*, **13**, 23-29 (1999).
 - 30) C. Beyrer, A.W. Artenstein, S. Rugpao, H. Stephens, T.C. VanCott, M.L. Robb, M. Rinkaew, D.L. Birx, C. Khamboonruang, P.A. Zimmerman, K.E. Nelson, C. Natpratan, *J. Infect. Dis.*, **179**, 59-67 (1999).
 - 31) 赤木隆美、上野真路、平石勝也、芹澤 武、明石 満、河村正輝、馬場昌範、第15回日本エイズ学会学術集会・総会 (2001).