

Table 4

Compositions of sample solutions for the separation experiments and percent recovery of DMDA and Am80.

Entry	Feed		Am80 mg (μmol)	DMDA/Am80 ^a	% Recovered					
	DMDA mg (μmol)	Polymer 1 mg			DMDA Sample solution	Retentate ^b	Filtrate ^b	Am80 Sample solution	Retentate ^b	Filtrate ^b
1	1.2 (5.69)	20.0	2.0 (5.69)	1	75.8	50.7 ± 1.5	9.7 ± 1.2	83.9	63.2 ± 0.4	0.2 ± 0.0
2	1.2 (5.69)	-	-	-	0	-	-	-	-	-
3	6.5 (30.5)	-	-	-	10.7	0	8.7 ± 0.5	-	-	-
4	1.2 (5.69)	20.0	-	-	28.6	4.5 ± 0.4	13.3 ± 1.7	-	-	-
5	1.2 (5.69)	-	2.0 (5.69)	1	0	-	-	0.4	-	-
6	6.5 (30.5)	-	2.0 (5.69)	5.4	17.7	N.D. ^c	13.5 ± 0.5	100.1	N.D. ^{***}	35 ± 0.7

^a Molar ratio.^b Mean ± SD (n = 3).^c N.D. means not determined.

Entry 1). This recovered DMDA remained in the retentate (50.7% of the feed) even after the ultrafiltration (Table 4; Entry 1). Simultaneously, we observed that Am80 in this sample solution was 83.9% of the feed. Moreover, after the ultrafiltration, 63.2% of the feed remained in the retentate, and only 0.2% of the feed was found in the filtrate. In contrast, in the examination for DMDA alone, we observed that a serious loss of feed DMDA (only recovered < 11% of the feed) probably caused by adsorption of DMDA to a 0.22 μm filter in the sample preparation process (Table 4; Entries 2 and 3). Moreover, almost all of the recovered DMDA was ultrafiltered into the filtrate, and no DMDA was found in the retentate (Table 4; Entry 3). Remaining DMDA (ca. 20%) was probably adsorbed to a Microcon YM-100 filter. These results support the assertion that both Am80 and DMDA were encapsulated into polymeric micelles. Although the encapsulation of DMDA into polymeric micelles was also observed in the absence of Am80 (Table 4; Entry 4), DMDA in the sample solution was only < 30% of the feed (Table 4; Run 4). In addition, a half of the recovered DMDA was ultrafiltered into the filtrate. Therefore, the stable encapsulation of DMDA in the micelles of polymer 1 was achieved by means of the co-encapsulation of DMDA with Am80.

When DMDA was mixed with Am80 at an equal molar ratio (DMDA/Am80 = 1), an insoluble aggregate was formed during sonication. After removal of the aggregate by means of centrifugation, no DMDA and only 2 μg/ml of Am80 (< 1% of the feed) remained in the supernatant (Table 4; Entry 5). Under the same conditions in the

presence of polymer 1, such an insoluble aggregate was not observed, and a high encapsulation yield of Am80 (84%) was obtained (Table 4; Entry 1). These contrast results indicate two points: first, the complex of Am80 and DMDA that formed at DMDA/Am80 = 1 was insoluble in water, and second, the solubilization of the complex depended on encapsulation of the complex into the polymeric micelles. In contrast to the results at DMDA/Am80 = 1, the mixture at DMDA/Am80 = 5.4 provided a transparent solution by means of sonication. This solution contained 17.7% and 100% of the feed for DMDA and Am80, respectively, indicating that DMDA both formed a low-molecular micelle and encapsulated Am80 (Table 4; Entry 6). This Am80-DMDA solution, however, formed an insoluble aggregate in the retentate during the ultrafiltration procedure. Almost all of the recovered DMDA was ultrafiltered into the filtrate. In contrast, only 3.5% of the feed Am80 was found in the filtrate. This result implied that the Am80-encapsulating DMDA micelles were dissociated in the ultrafiltration and that the Am80 was no longer encapsulated in the DMDA micelles. In addition, this result also indicated that the retardation of the Am80 release was not caused by a sustained release from the Am80-encapsulating DMDA micelle. If Am80 had been dominantly encapsulated in the DMDA micelle but not the polymeric micelle, the aggregate would have been observed in the ultrafiltration of the experiment for Entry 1. In fact, no such aggregate was observed. Therefore, the retarded release of Am80 was accomplished by the co-encapsulation of the drug and DMDA in the polymeric micelles.

3.4. Effects of an additive's structure on the release of Am80

We investigated the effects that chemical structure of an additive has on the retardation of Am80 release by using six kinds of amines, as shown in Chart 2. We added these amines to the encapsulation process of the Am80. The added amounts of the additives were adjusted to additive/Am80 molar ratio of 1. The micelles were prepared from polymer 1 in order to ignore the influence of the carboxyl groups of the polymer. High Am80 encapsulation yields between of 61% and 96% were obtained in all additives examined as summarized in Table 5.

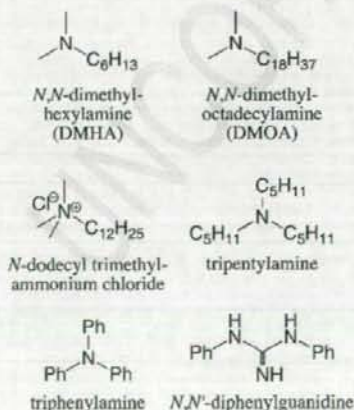


Chart 2. Amines examined for the retardation effect on the Am80 release.

Table 5 Encapsulation of Am80 into the polymeric micelles in the presence of various additives.

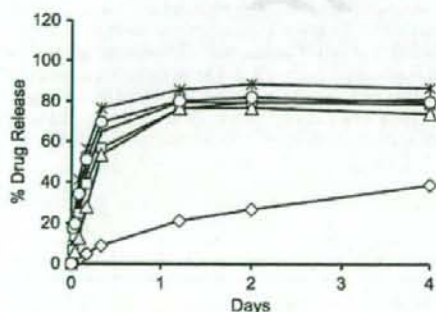
Entry	Additive	% Am80 encapsulated weight fraction	Particle size (nm);
1	<i>N,N</i> -dimethylhexylamine	96	86 ± 14; 79%, 215 ± 36; 21%
2	<i>N,N</i> -dimethyloctadecylamine	80	74 ± 13; 22%, 231 ± 45; 78%
3	<i>N</i> -dodecyltrimethylammonium chloride	78	69 ± 13; 71%, 195 ± 37; 29%
4	Tripropylamine	61	65 ± 11; 86%, 185 ± 33; 14%
5	Triphenylamine	88	79 ± 14; 76%, 224 ± 41; 24%
6	<i>N,N'</i> -diphenylguanidine	91	34 ± 6; 87%, 138 ± 24; 13%

547 The Am80 release was measured once for each additive-co-
 548 encapsulating micelle, as shown in Fig. 6. Of the six additives, *N,N*-
 549 dimethyloctadecylamine (DMOA) demonstrated the largest retardation
 550 effect on the Am80 release. The other five additives showed only
 551 small effects for the retardation. These results were likely caused
 552 either by undesired steric hindrance, inhibiting the interaction
 553 between Am80 and the amines, or by an insufficient increase in the
 554 hydrophobicity of the Am80-complex. A series of the *N,N*-
 555 dimethylalkylamines exhibit a decrease the release rates of Am80
 556 with an increase of the alkyl chain length. This effect was confirmed
 557 in separate triplicate examinations as shown in Fig. 7. A comparison
 558 of three *N,N*-dimethylalkylamines, i.e., DMOA, DMDA, and *N,N*-
 559 dimethylhexylamine (DMHA), clearly showed the effect of the chain
 560 length. This result indicates that the counter additive selection can
 561 control the release rate of Am80 from a polymeric micelle. At 1 day of
 562 the release period, the retardation effects by means of DMOA or
 563 DMDA addition were statistically significant (DMOA; $P < 0.001$ and
 564 DMDA; $P < 0.01$) in comparison with the control group (encapsulation
 565 of Am80 alone; filled square in Fig. 7). On the other hand, a difference
 566 from the control system by means of DMHA addition was
 567 statistically insignificant at $P > 0.05$.

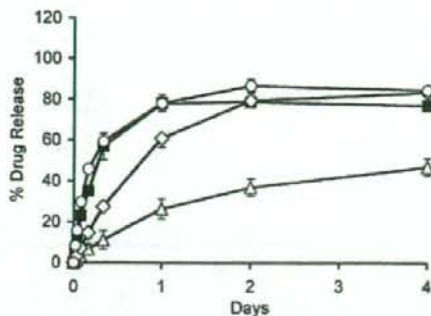
568 Cytotoxicities of *N,N*-dimethylalkylamines were evaluated by
 569 means of a standard in vitro cytotoxicity test; see Supplementary
 570 Fig. S1. The results were compared with that of 1-octadecylamine
 571 (stearylamine), frequently used in vivo as a component of liposomal
 572 carriers [35]. DMDA and DMOA, two additives that showed sufficient
 573 retarded release effect, exhibited a similar cytotoxicity to 1-
 574 octadecylamine. These results indicate that toxicity of these additives
 575 can be acceptable to use in vivo depending on toxicity of encapsulated
 576 drugs. DMHA, hardly effective for retarded release, exhibited no
 577 cytotoxicity up to 100 μM . The next challenge is in vivo studies to
 578 validate this release rate control by means of the ion-pairing technique.

579 4. Conclusions

580 Two synthetic retinoids, Am80 and LE540, were encapsulated into
 581 block copolymer micelles, and the encapsulation was both highly
 582 efficient and exceptionally facile. An in vitro release examination for
 583 LE540 demonstrated very stable encapsulation of this drug. As for
 584 Am80, it was rapidly released in D-PBS in contrast to Am80's sustained
 585 release in water. We triggered a retardation of the release rate of Am80
 586 by adding DMDA into the encapsulation process. This retardation was
 587 due to an increase in the hydrophobicity of Am80, itself caused by the
 588 ion-pairing of this retinoid with hydrophobic DMDA. The retardation



589 Fig. 6. Release of Am80 from the micelles of polymer 1 at r.t. in D-PBS ($n=1$). The
 590 Am80-encapsulating micelles were prepared in the presence of various amine additives
 591 at an equal molar ratio to Am80 (circle = *N,N*-dimethylhexylamine, diamond = *N,N*-
 592 dimethyloctadecylamine, triangle = *N*-dodecyltrimethylammonium chloride, square =
 593 tripropylamine, asterisk = triphenylamine, and cross = *N,N'*-diphenylguanidine). The
 594 amounts of drug encapsulated in polymeric micelles were normalized to 100%.



595 Fig. 7. Release of Am80 from the micelles of polymer 1 at r.t. in D-PBS (mean \pm SD,
 596 $n=3$). The Am80-encapsulating micelles were prepared in the presence of various
 597 *N,N*-dimethylalkylamines at an equal molar ratio to Am80 (circle = *N,N*-dimethylhexylamine,
 598 diamond = *N,N*-dimethyloctadecylamine, triangle = *N,N*-dimethylhexylamine, and
 599 filled square = no additive). The results of *N,N*-dimethyloctadecylamine represented in
 600 Fig. 3 and no additive group represented in Fig. 1 were shown again for the comparison
 601 with the results of the other groups. The amounts of drug encapsulated in polymeric
 602 micelles were normalized to 100%.

603 effect increased with increase in the alkyl chain length of additive
 604 amines, suggesting that proper choice of an additive amine leads to
 605 optimum control of drug release. This is the first report concerning the
 606 ability of ion-pairing between a drug and an additive to promote
 607 control a drug's release rate in a polymeric micelle carrier system. This
 608 ion-pairing technique requires only the mixing of an adequate
 609 additive without any chemical modification of the drug or the
 610 polymers. Thus, it appears highly promising that this simple technique
 611 is applicable to various drugs possessing an ionic group.

612 Appendix A. Supplementary data

613 Supplementary data associated with this article can be found, in
 614 the online version, at doi:10.1016/j.jconrel.2009.02.024.

615 References

- 616 [1] S.R. Croy, G.S. Kwon, Polymeric micelles for drug delivery, *Curr. Pharm. Des.* 12 602
 617 (2006) 4669–4684.
- 618 [2] Y. Matsumura, H. Maeda, A new concept for macromolecular therapeutics in
 619 cancer chemotherapy: mechanisms of tumorotropic accumulation of protein and
 620 the antitumor agent SMANCS, *Cancer Res.* 46 (1986) 6387–6392.
- 621 [3] M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, S. Fukushima, K. Okamoto, K. Kataoka, Selective
 622 delivery of adriamycin to a solid tumor using a polymeric micelle carrier system,
 623 *J. Drug Target.* 7 (1999) 171–186.
- 624 [4] M.L. Forrest, J.A. Yáñez, C.M. Reimsberg, Y. Ohgami, G.S. Kwon, N.M. Davies, B10
 625 Paclitaxel prodrugs with sustained release and high solubility in poly(ethylene
 626 glycol)-*b*-poly(ϵ -caprolactone) micelle nanocarriers: pharmacokinetic disposition,
 627 tolerability, and cytotoxicity, *Pharm. Res.* 25 (2008) 194–205.
- 628 [5] M. Watanabe, K. Kawano, M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani, B11
 629 Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of their
 630 incorporation and circulation stability, *Int. J. Pharm.* 308 (2006) 183–189.
- 631 [6] M. Sumitomo, F. Koizumi, T. Asano, A. Horiguchi, K. Ito, T. Asano, T. Kakizoe, M. B12
 632 Hayakawa, Y. Matsumura, Novel SN-38-incorporated polymeric micelle, NK012, B13
 633 strongly suppresses renal cancer progression, *Cancer Res.* 68 (2008) 1631–1635.
- 634 [7] S. Kawakami, P. Opanasopit, M. Yokoyama, N. Chansri, T. Yamamoto, T. Okano, F. B20
 635 Yamashita, M. Hashida, Biodistribution characteristics of all-trans retinoic acid
 636 incorporated in liposomes and polymeric micelles following intravenous admin-
 637 istration, *J. Pharm. Sci.* 94 (2005) 2606–2615.
- 638 [8] T. Okuda, S. Kawakami, M. Yokoyama, T. Yamamoto, F. Yamashita, M. Hashida, B24
 639 copolymer design for stable encapsulation of *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide
 640 into polymeric micelles in mice, *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 318–322.
- 641 [9] IUPAC-JUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (IUBN), Nomenclature
 642 of retinoids. Recommendations 1981, *Pure Appl. Chem.* 55 (1983) 721–726.
- 643 [10] A.L. Fields, D.R. Soprano, K.J. Soprano, Retinoids in biological control and cancer, B20
 644 *J. Cell Biochem.* 102 (2007) 886–898.
- 645 [11] E. Garattini, M. Gianni, M. Terao, Retinoids as differentiating agents in oncology: B31
 646 a network of interactions with intracellular pathways as the basis for rational
 647 therapeutic combinations, *Curr. Pharm. Des.* 13 (2007) 1375–1400.
- 648 [12] Z.Y. Wang, Z. Chen, Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable, B34
 649 *Blood* 111 (2008) 2505–2515.

- 636 [13] M.B. Sporn, A.B. Roberts, D.S. Goodman (Eds.), *The Retinoids*, 2nd ed., Raven Press,
637 New York, 1994.
- 638 [14] B. Davidović, V. Tüzün, R. Wolf, Retinoid receptors, *Dermatol. Clin.* 25 (2007)
639 525–530.
- 640 [15] E. Garattini, M. Gianni, M. Terao, Retinoid related molecules an emerging class of
641 apoptotic agents with promising therapeutic potential in oncology: pharmacological
642 activity and mechanisms of action, *Curr. Pharm. Des.* 10 (2004) 433–448.
- 643 [16] N. Hail, H. Kim, R. Lotan, Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis, *Apoptosis*
644 11 (2006) 1677–1694.
- 645 [17] H. Kagechika, Novel synthetic retinoids and separation of the pleiotropic retinoid
646 activities, *Curr. Med. Chem.* 9 (2002) 591–608.
- 647 [18] H. Kagechika, K. Shudo, Synthetic retinoids: recent developments concerning
648 structure and clinical utility, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 5875–5883.
- 649 [19] T. Tobita, A. Takeshita, K. Kitamura, K. Ohnishi, M. Yanagi, A. Hiraoka, T. Karasuno,
650 M. Takeuchi, S. Miyawaki, R. Ueda, T. Naoe, R. Ohno, Treatment with a new
651 synthetic retinoid, Am80, of acute promyelocytic leukemia relapsed from
652 complete remission induced by all-trans retinoic acid, *Blood* 89 (1997) 967–973.
- 653 [20] T. Sanda, T. Kuwano, S. Nakao, S. Iida, T. Ishida, H. Komatsu, K. Shudo, M. Kuwano,
654 M. Ono, R. Ueda, Antimyeloma effects of a novel synthetic retinoid Am80
655 (Tamibarotene) through inhibition of angiogenesis, *Leukemia* 19 (2005) 901–909.
- 656 [21] N. Takeda, I. Manabe, T. Shindo, H. Iwata, S. Jimuro, H. Kagechika, K. Shudo, R.
657 Nagai, Synthetic retinoid Am80 reduces scavenger receptor expression and
658 atherosclerosis in mice by inhibiting IL-6, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26
659 (2006) 1177–1183.
- 660 [22] H. Umemiya, H. Fukasawa, M. Ebisawa, L. Eyrolles, E. Kawachi, G. Eisenmann, H.
661 Gronemeyer, Y. Hashimoto, K. Shudo, H. Kagechika, Regulation of retinoid
662 actions by diazepinylbenzoic acids. Retinoid synergists which activate the RXR-
663 RAR heterodimers, *J. Med. Chem.* 40 (1997) 4222–4234.
- 664 [23] M.L. Forrest, C.Y. Won, A.W. Malick, G.S. Kwon, In vitro release of the mTOR
665 inhibitor rapamycin from poly(ethylene glycol)-*b*-poly(ϵ -caprolactone) micelles,
666 *J. Control. Release* 110 (2006) 370–377.
- 667 [24] W.H. Daly, D. Poche, The preparation of *N*-carboxyanhydrides of α -amino acids
668 using bis(trichloromethyl) carbonate, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 5859–5862.
- [25] M. Yokoyama, G.S. Kwon, M. Naito, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, Preparation of
670 micelle-forming polymer-drug conjugates, *Bioconjug. Chem.* 3 (1992) 295–301.
- [26] T. Yamamoto, M. Yokoyama, P. Opanasopit, A. Hayama, K. Kawano, Y. Maitani, What
671 carriers? Consideration on physical and chemical characters of the micelle inner
672 core, *J. Control. Release* 123 (2007) 11–18.
- [27] M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, K. Kawano, Y. Maitani, Polymer design and
675 incorporation methods for polymeric micelle carrier system containing water-
676 insoluble anti-cancer agent camptothecin, *J. Drug Target.* 12 (2004) 373–384.
- [28] V. Saudek, H. Pivcová, J. Drobník, NMR study of poly(aspartic acid). II. α - and β -
677 peptide bonds in poly(aspartic acid) prepared by common methods, *Biopolymers*
678 20 (1981) 1615–1623.
- [29] P. Opanasopit, M. Yokoyama, M. Watanabe, K. Kawano, Y. Maitani, T. Okano, Block
681 copolymer design for camptothecin incorporation into polymeric micelles for
682 passive tumor targeting, *Pharm. Res.* 21 (2004) 2001–2008.
- [30] A. Lavasanifar, J. Samuel, G.S. Kwon, Micelles self-assembled from poly(ethylene
684 oxide)-block-poly(*N*-hexyl stearate)-*b*- γ -spartamide by a solvent evaporation
685 method: effect on the solubilization and haemolytic activity of amphotericin B,
686 *J. Control. Release* 77 (2001) 155–160.
- [31] M. Yokoyama, S. Fukushima, R. Uehara, K. Okamoto, K. Kataoka, Y. Sakurai, T. Okano,
688 Characterization of physical entrapment and chemical conjugation of
689 adriamycin in polymeric micelles and their design for in vivo delivery to a solid
690 tumor, *J. Control. Release* 50 (1998) 79–92.
- [32] J.D. Meyer, M.C. Manning, Hydrophobic ion pairing: altering the solubility
692 properties of biomolecules, *Pharm. Res.* 15 (1998) 188–193.
- [33] H. Zhou, C. Lengsfeld, D.J. Claffey, J.A. Ruth, B. Hybertson, T.W. Randolph, K.Y. Ng, M.C.
694 Manning, Hydrophobic ion pairing of isoniazid using a prodrug approach, *J. Pharm.
695 Sci.* 91 (2002) 1502–1511.
- [34] M. Trotta, E. Ugazio, E. Peira, C. Pulitano, Influence of ion pairing on topical delivery
697 of retinoic acid from microemulsions, *J. Control. Release* 86 (2003) 315–321.
- [35] E. Kajiwara, K. Kawano, Y. Hattori, M. Fukushima, K. Hayashi, Y. Maitania, Long-
699 circulating liposome-encapsulated ganciclovir enhances the efficacy of HSV-TK
700 suicide gene therapy, *J. Control. Release* 120 (2007) 104–110.
- 701
702

703

高分子ミセルターゲティング

横山昌幸*

合成高分子が多数会合して形成する高分子ミセルが、近年薬物キャリアーとして研究開発されている。高分子ミセルは直径が数十～100 nm の微粒子で、この粒径はまさにナノテクノロジーが扱う中心的なサイズである。よって、高分子ミセル薬物キャリアーシステムは、ナノテクノロジーというキーワードの下に、医学と工学が融合しての研究開発の1つの代表例である。本総説では、この高分子ミセル薬物キャリアーシステムの概要を説明し、抗癌剤ターゲティングへの応用の現状をまとめ、将来の発展方向についての意見を述べる。

はじめに

薬物ターゲティングとは、「薬物治療が必要な部位に選択的に薬物を送りこみはたらかせること」であり、このために用いられるのが薬物キャリアーである。近年、ナノテクノロジーの医療応用の観点から、ナノサイズの薬物キャリアーへの応用が注目されている。本総説では、このナノサイズの薬物キャリアーのなかから、世界に先駆けて日本で発明・開発されてきた高分子ミセルシステムについて、ナノテクノロジーとの関連を盛り込みながら述べてゆく。

1. 高分子ミセル薬物キャリアーとは¹⁾²⁾

高分子ミセルは、合成高分子からなるミセルのことで、水に溶けやすい部分(ここではAとする)

[キーワード]
ターゲティング
EPR 効果
固形癌
高分子ミセル
DDS

と溶けにくい部分(Bとする)が共存した場合に、Bの部分が会合して形成する構造である。図1に最も典型的なAB型ブロックコポリマーからなる高分子ミセル型薬物キャリアーシステムを示す。数十～数百個の高分子鎖が会合して疎水性の内核と親水性の外殻からなる球状構造を形成する。薬物は、B鎖に化学的に結合するか、B鎖が形成するミセル内核に物理的に封入される。

高分子ミセルが薬物キャリアーとして有するおもな長所と短所を表1にまとめた(これ以外の項目については文献1)2)を参照されたい)。第一の長所は、10～100 nm の直径の超微粒子が容易に得られることである。一般的にこのサイズの範囲の微粒子を得ることは高度な技術が必要であるのに対し、高分子ミセルでは通常のことである。この範囲の粒径は、次項で述べる固形癌組織へのターゲティングで有用な大きさである。このことから、高分子ミセルは薬物キャリアーのためのナノテクノロジーとして生来の利点を有していると言える。

第二の長所は、水に難溶性の薬物を封入することである。水に溶けない薬物は血液中に投与できないので、有毒な有機溶剤に溶かして血中に投与

*YOKOYAMA Masayuki/財団法人 神奈川科学技術アカデミー

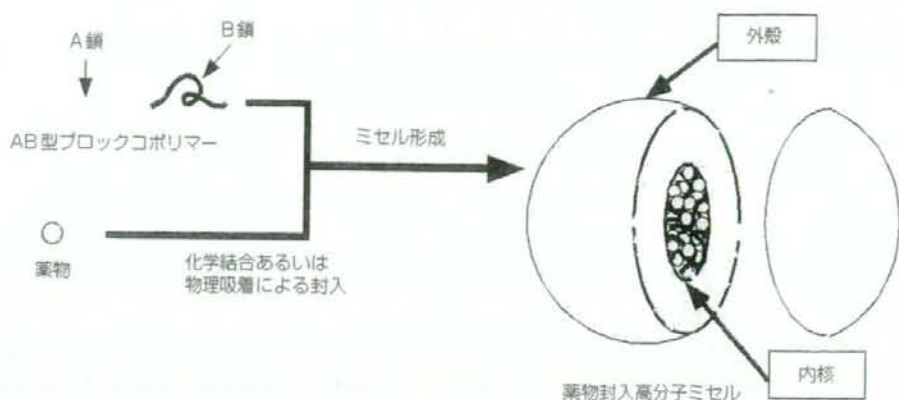


図 1. 高分子ミセル薬物キャリアーシステムの構築

表 1. 薬物キャリアーとしての高分子ミセルの長所と短所

長所	
1.	ナノ領域の超微粒子径が容易に得られる
2.	水溶性に乏しい薬物封入に好適
3.	生体への毒性が低い
短所	
1.	高分子材料の入手が容易でない
2.	薬物の徐放化に高い技術が必要

するか、吸収の変動に妥協しても経口投与とするかの選択となるが、高分子ミセルを用いると容易に血液中投与が可能となる。海外では、ターゲティング能はもたないが、難溶性抗癌剤の可溶性化に高分子ミセルを用いている例がある³¹。

第三の長所は生体内での毒性の低さである。これまで筆者がかかわった研究開発において、動物実験と臨床試験をとおしてキャリアーシステムに基づくと考えられる副作用・毒性は見出されていない。このことが高分子ミセルは無毒ということではなく、抗癌剤の副作用(100%標的に運搬されないので抗癌剤の副作用は起こる)にくらべて無視できる程度であるということである。しかし、認可されたターゲティングシステムでは、元の抗癌剤にない意外な副作用が引き起こされたり、

キャリアーに基づく副作用を抑制するために、別の薬の前投与が必要になったりする場合がよく起こる^{41,51}。よって、第三の長所の臨床的価値は決して低くない。

つぎに、高分子ミセル薬物キャリアーとしての短所について述べてみたい。高分子ミセル特有の課題は、合成高分子としては珍しい部類のブロックコポリマーが必要なことである。とくに、ターゲティングを達成するには単にブロックコポリマーであるのみならず、その化学構造と鎖長が厳密に制御されて合成される必要がある⁶¹。また、高分子ミセルにかぎらずナノサイズのキャリアーシステムで共通の問題は、キャリアーがナノサイズであることによる、薬物の放出速度制御である。DDSの領域ではミクロンサイズのデバイスから薬物を徐放する研究開発は広範におこなわれてきた。薬物がキャリアーから放出する機構は多くの場合、薬物分子の拡散であるので、キャリアー(デバイス)が小さくなると格段にその制御が難しくなる。リポソームの場合には、薬物放出が速すぎるか、ほとんど放出しないかになりやすい。高分子ミセルの場合には、ミセル内核からの薬物放出速度の得られる幅が広いこと(数分から数十時間の時間スケールで)が特徴であるが、その速度をターゲティングに最適なものに制御するには、高分子構造の厳密な制御が必要である場合が多い。

2. 高分子ミセルによる抗癌剤ターゲティングの現状

ここでまず、薬物ターゲティングの方式について短く解説したい。高分子ミセルを用いた固形癌へのターゲティングを理解するのに、必須な事柄であるからである。薬物ターゲティングは標的選択性を得る方式によって、アクティブターゲティングとパッシブターゲティングの2つの方法論に分類される⁷⁾。第一の方法論の、アクティブターゲティング (active targeting) は標的との明確な特異的相互作用を利用してターゲティングをおこなう。具体的には抗体や磁性微粒子などをキャリアーとする場合である。第二の方法論はパッシブターゲティング (passive targeting) で、これはキャリアーの物理的・化学的な性質をうまく利用してデリバリーをおこなうものである。

高分子ミセルをキャリアーに用いる場合には、パッシブターゲティングが基本になるが、どのようにして癌ターゲティングが可能になるのだろうか？ それは固形癌局所の組織学的、生理学的特性を巧みに利用することによる。癌組織では血管内皮の透過性は異常に充進していると同時に、リンパ系による排出が抑制されているために、ナノサイズのキャリアーは本質的に固形癌部位に選択的に蓄積する。これは EPR 効果 (enhanced permeability and retention effect) とよばれ、1986年に前田、松村ら⁸⁾⁹⁾によって提唱された。血管の透過性充進現象は、炎症部位で一般的にみられる諸現象のうちの1つである。「癌は癒されることなき創傷」¹⁰⁾と表現した Dvorak の有名な句は、炎症が癌組織1つの重要な性格であることを示している。

ここで、EPR 効果に基づいた固形癌ターゲティングを図2に示す。1986年の最初の論文では、EPR 効果は天然高分子のアルブミンを用いて示された。図2Aに示すように、アルブミンが正常皮膚にくらべ固形癌に約10倍もの量が蓄積し、

その高い濃度が長期間維持されていた。1986年以降、EPR 効果は天然高分子のみではなく、合成高分子¹¹⁾やリポソームなどの他のタイプのキャリアーシステムにも適用できることが示されている。高分子ミセルの場合の例を図2Bに示す。抗癌剤アドリアマイシンを高分子ミセルに封入することで、この抗癌剤を単独で投与したときにくらべて投与24時間後に、9倍ほどの量がマウス癌に到達していた。図2AとBでは縦軸の意味も、くらべている対照も異なるのであるが、ターゲティングがない場合にくらべて10倍程度の量が24~48時間かけて癌に蓄積することは一致している。この一致は、キャリアーシステムを適切に設計・作製すれば、EPR 効果に基づいたターゲティングが達成しうることを示している。

この結果を癌の化学療法の観点からみると、ある抗癌剤の効果が10倍にも増強しうることは驚異的なことである。ただし、図2の結果で注意しなければならないのは、これらは癌組織への送達量であって、抗癌活性と等価でないことである。等価でない理由は第一に、抗癌作用を発揮するためには癌組織内で、キャリアーシステムから抗癌剤が放出して癌細胞に入る必要があるからである。理由の第二は、抗癌活性は癌細胞への殺細胞効果 (薬物の主作用) と正常部位への副作用のバランスによって規定されるので、主作用と同様に副作用も増強すれば、トータルとしての抗癌活性は上がらないからである。幸いにも図2Bの高分子ミセルの場合には抗癌活性も著しく上昇した。この事実は、上述した2つの点がこのシステムでは問題となっていなかったことを示す。

2007年9月現在では表2に示す4つの高分子ミセル製剤の臨床試験が進行中である^{12)~15)}。シスプラチンとSN-38のシステムは2006年に第I相を開始した。これらのうち、バクリタキセルを封入したシステムは臨床第I相試験を無事終了し、臨床第II相試験に進む予定であるとともに、4つの製剤のなかでは臨床試験を最も重点を置いて展

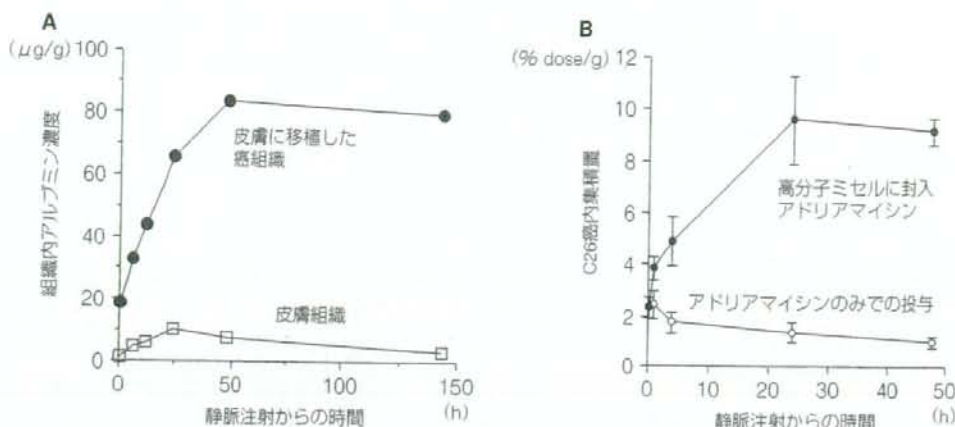


図 2. EPR 効果による固形癌へのターゲティング

A : アルブミンを用いた EPR 効果の実証 (Matsumura Y *et al*, 1986⁸⁾より筆者作成)

B : 高分子ミセルによるターゲティング (Yokoyama M *et al*, *J Drug Targeting* 7 : 171-186, 1999より筆者作成)

表 2. 臨床試験中の高分子ミセル抗癌剤

封入抗癌剤	臨床試験レベル	実施場所
アドリアマイシン	第Ⅱ相	日本(国立がんセンター)
パクリタキセル	第Ⅰ相終了	日本(国立がんセンター)
シスプラチン	第Ⅰ相	イギリス
SN-38(カンプトテシン誘導体)	第Ⅰ相	日本(国立がんセンター)

開してゆくものと位置づけられている。

おわりに 今後の発展方向

前項で述べたように、抗癌剤高分子ミセルシステムは臨床治験中であるので、4~5年後には評価が定まっているであろう。最後のこの項では、高分子ミセル薬物キャリアーの今後の新たな発展方向を3つだけまとめたい。臨床的要素の高いものから基礎科学的なもの順番で述べてゆく。

まず第一の方向は、抗癌剤以外への展開である。抗癌剤が最初の応用例として選択された大きな理由の1つとして、キャリアー自体の副作用の懸念がある。もし、この副作用が発生しても、抗癌剤の応用では相当な程度まで許容されるからである。

幸いにも、上記の4つの抗癌剤としての臨床試験ではキャリアー自体の副作用は見出されていない。正確なことは臨床試験の報告を待たねばならないが、抗癌剤よりも副作用が低い薬物への応用、より長期に投与する薬剤への応用が期待される。なかでも、固形癌組織との特徴を共有する炎症部位にはたらかせる薬物は、有力な候補と言える。

第二の発展方向は、画像診断への応用である。抗癌剤がターゲティングできるならば、造影剤をターゲティングすることによって癌診断を進歩させようとするのは自然なことである。この観点から筆者らは近年、高分子ミセル型MRI造影剤の研究に取り組んでいる。従来から、天然や合成高分子をMRI造影剤であるガドリニウム(Gd)イオンの癌特異的キャリアーとして用いる研究はお

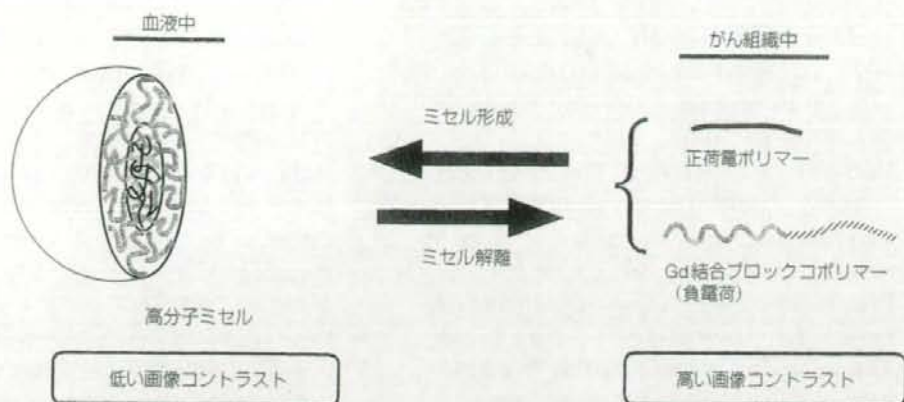


図 3. 高分子ミセル型 MRI 造影剤のアイデア

こなわれてきたが、抗癌剤のターゲティングにくらべて臨床的な応用は遅れているという現状である^{16)~18)}。その理由の1つは、抗癌剤のデリバリーの場合と違って、造影剤の場合は血中濃度が高い状態であることが好ましくないことがある。上述した、EPR 効果を利用した癌組織ターゲティングでは、高い血中濃度を長時間保つことが必要条件となる。しかし、造影剤の場合には血液中にある造影剤は不要なバックグラウンドとして癌選択的画像の障害となりうる。血管は癌組織のみではなく正常組織にも通っているからである。

この問題の解決のために高分子ミセルの形成と解離現象を利用するのが、抗癌剤ターゲティングの場合にはなかった仕掛けである。図3に示すようにミセル構造形成によってミセル内に位置する Gd イオンが周囲の水分子から隔離されることで、T1 緩和時間短縮能(緩和能)を抑制する。ミセル形態で血液を循環しているあいだは、血液の画像コントラストは抑制される一方、癌組織内でミセル構造からブロックコポリマーに解離すると、Gd イオンは周囲の水に自由に接触することができ、T1 緩和能を発揮して癌組織をコントラスト高く映し出す。この高分子ミセルシステムは、*in vitro* でミセル構造の形成・解離によって約4倍の T1 緩和能の変化を得ることに成功した¹⁹⁾。今後は、*in vivo* でのターゲティングと癌選択画像取

得に進んでゆくこととなる。

第三の発展方向は、薬物の封入と放出の制御である。この制御がある程度達成しているからこそ現状でもターゲティングできているのは事実であるが、まだ十分とは言えないのである。もともと、薬物をキャリアーに封入あるいは結合することは、標的に到達するまでに薬効を示さない状態に保持することであり、標的での薬効発揮のための薬物放出とは反対の現象である。よって、薬物の保持と放出という相反する現象を、1つのキャリアーシステムのなかで最適化することは技術的に難しい問題なのである。この問題に対して、技術的に最も明確な解決法は、癌選択的な薬物放出技術である。これらの技術はまだ基礎研究のレベルではあるが²⁰⁾、次世代の技術として期待される。

文 献

- 1) Yokoyama M: Polymeric micelles as nano-sized drug carrier systems. In: *Nanoparticles for Pharmaceutical Applications*, ed by Domb AJ et al, American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, 2007, pp. 63-72
- 2) Yokoyama M: Polymeric micelles for the targeting of hydrophobic drugs. In: *Polymeric Drug Delivery Systems*, ed by Kwon GS, Drug and Pharmaceutical Sciences, vol. 148, Taylor & Francis, 2005, pp. 533-575
- 3) Kim TY et al: Phase I and pharmacokinetic

- study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* **10** : 3708-3716, 2004
- 4) Hamann PR *et al* : Mylotarg : The first antibody-targeted chemotherapy agent. In : *Tumor Targeting in Cancer Therapy*, ed by Page M. Humana Press, Totowa, 2002, pp. 239-254
 - 5) Drummond DC *et al* : Liposomal drug delivery systems for cancer therapy. In : *Drug Delivery Systems in Cancer Therapy*, ed by Brwon DM, Humana Press, Totowa, 2004, pp. 191-213
 - 6) Yamamoto T *et al* : What are determining factors for stable drug incorporation into polymeric micelle carriers? Consideration on physical and chemical characters of the micelle inner core. *J Control Release* **123** : 11-18, 2007
 - 7) 高倉喜信ほか : パッシブターゲットングの意義. *Drug Delivery System* **14** : 425-426, 1999
 - 8) Matsumura Y *et al* : A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy : Mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* **46** : 6387-6392, 1986
 - 9) Maeda H *et al* : Advantages of macromolecular therapeutics *in vivo*. *Bioconjugate Chem* **3** : 351-361, 1992
 - 10) Dvorak HF : Tumors : wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* **315** : 1650-1659, 1986
 - 11) Seymour LW *et al* : Tumor tropism and anti-cancer efficacy of polymer-based doxorubicin prodrugs in the treatment of subcutaneous murine B16F10 melanoma. *Br J Cancer* **70** : 636-641, 1994
 - 12) Matsumura Y *et al* : Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin. *Br J Cancer* **91** : 1775-1781, 2004
 - 13) Hamaguchi T *et al* : NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend *in vivo* antitumor activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. *Br J Cancer* **92** : 1240-1246, 2005
 - 14) Uchino H *et al* : Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. *Br J Cancer* **9** : 678-687, 2005
 - 15) Koizumi F *et al* : Novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors. *Cancer Res* **66** : 10048-10056, 2006
 - 16) Rebizak R *et al* : Polymeric conjugates of Gd³⁺-diethylenetriaminopentaacetic acid and dextran 1. Synthesis, characterization, and paramagnetic properties. *Bioconjug Chem* **8** : 605-610, 1997
 - 17) Wang SC *et al* : Evaluation of Gd-DTPA-labelled dextran as an intravascular MR contrast agent : Imaging characteristics in normal rat tissues. *Radiology* **17** : 483-488, 1990
 - 18) Bogdanov A *et al* : A long-circulating co-polymer in "passive targeting" to solid tumors. *J Drug Targeting* **4** : 321-330, 1997
 - 19) Nakamura E : A polymeric micelle MRI contrast agent with changeable relaxivity. *J Control Release* **114** : 325-333, 2006
 - 20) Nakayama M *et al* : Polymer terminal group effects on properties of thermoresponsive polymeric micelles with controlled outer-shell chain lengths. *Biomacromolecules* **6** : 2320-2327, 2005

ターゲティングを用いたMRI造影剤

特集 分子イメージングとDDS

白石貢一・横山昌幸*

MRI contrast agents with targeting ability

In recent several years, the drug targeting methodology has been actively applied to MRI contrast agents, particularly to "selective MRI contrast agents" that can only enhance image contrasts at target sites. This situation is one part of reflection of fusion between DDS and molecular imaging fields. This review describes how and for what purpose drug targeting can be applied to developments of novel MRI contrast agents. This review is composed of the following contents: concept of selective MRI contrast agents, methodological differences between the targetings of drugs and contrast agents, mechanisms of selective contrasts, and the authors' study of polymeric micelle MRI contrast agents.

MRI 造影剤、特に対象部位のみを選択的に画像化できる造影剤に、ターゲティング研究の成果が積極的に用いられはじめています。この状況は、DDS と分子イメージングが融合する領域で、今後の大きな発展が期待される。本総説は、DDS 側からみてこの融合領域にどのようにアプローチしうるかについて、筆者らの研究例を盛り込んで解説した。具体的には、選択的 MRI 造影剤の概念、薬物と造影剤の場合のターゲティングの相違点、造影剤で選択性を得る方法、高分子ミセルキャリアを用いた造影剤の研究例である。

Kouichi Shiraishi・Masayuki Yokoyama*

key words: targeting, MRI, contrast agent, molecular imaging, diagnosis

ターゲティングを用いた選択的造影剤

造影剤とは、観察したい対象の画像コントラストを高めてより見やすく、診断しやすい画像を得るために投与される化合物である。最も単純な造影剤の使われ方は、X線の血管造影剤が代表例である。カテーテルによって導かれた部位に造影剤を注入し、その部位の血流を造影剤の高いX線吸収能によって可視化する。この場合、造影剤の生体内動態・分布の要素はまったく問題にならず、投与部位から速やかに近傍に拡散すればよいのである。

一方、少数ではあるが造影剤が投与されたあとに特定の所に集積する、あるいは集積しないことを通して、特定の部位のみを選択的に可視化する場合がある。後述する脳腫瘍診断で用いるMRI造影剤がこの例である。

本総説では、このようなターゲティングを用いた選択的造影剤をMRIに焦点を当てて、DDSターゲティング技術との関連を述べる。

まずここで強調しておきたいことは、DDSと造影剤は歴史的にはまったく別個といってもよい発展の道をたどってきたことである。後述する低分子のMRI造影剤はGdイオンのキレート化合物で、その設計の鍵は配位定数(いかにGdイオンをしっかりと結合するか)と化合物の荷電による体内での浸透圧調節であった。この設計にはDDS的な観点は存在しない。

一方、DDSのターゲティング研究でも、体内分布測定のための画像を撮ることはあっても、それをMRI診断までに実用化しようとする研究は1990年代まではほとんどなかった。デキストラン¹⁾、アルブミン²⁾、リポソーム³⁾にキレート化合物を結合・内封させることによる高分子型のMRI造影剤研究がわずかに行われていたにすぎない。1990年代になり、DDSを応用したMRI造影剤研究数の増加を

* Yokoyama "Nano-medical polymer" project, Kanagawa Academy of Science and Technology. 神奈川科学技術アカデミー横山「高分子ナノメディカル」プロジェクト

表1 選択的MRI造影剤の種類

造影剤の種類	造影剤	キャリア	ターゲット 作用
T ₁ 強調型	MS-325	アルブミン	アルブミンとの結合
	EGad	なし	β -ガラクトキシダーゼ
	Gd-bis-5-HT-DTPA	なし	ミエロペルオキシダーゼ
	MPEG-PL-Gd-DTPA	Poly(L-lysine)-PEG	EPR 効果
T ₂ 強調型	cRGD-CLIO(Cy5.5)	デキストランコーティング	$\alpha_v\beta_3$ インテグリン
	MnMEIO-herceptin	デキストランコーティング	HER2

みたが、わずかなものにとどまっていた。

この状況が一変するのは、最近5年ぐらいの“分子イメージング”研究開発の急速な発展である。分子イメージングとは「特定の細胞・組織・臓器が産生する分子、あるいはその分子によって誘起された現象を画像化すること」と定義される。一方、ターゲティングが「特定の細胞・組織・臓器に薬物を選択的に運搬して働かせること」であるので、原理的な類似性は明白である。リポソームや高分子ミセルキャリアによる抗がん剤の臨床試験が盛んになってきた2000年代のターゲティングの状況と分子イメージング研究の勃興が時代的に重なり合っている現在が、まさに選択的MRI造影剤を推し進める好機であると考えられる。

ただし、この好機を有効に活用するためには、薬物のターゲティングと造影剤のターゲティングとの間の相違点を正確に把握することが重要である。と筆者らは考えている。その相違点として考えられるのはつぎの3点であり、以下に具体例として抗がん剤のターゲティングとの比較を述べる。

1. 送達する量の問題

この量の側面には二つある。まず第1に、Gdイオンを利用した造影剤はかなり投与量が多いことである。代表的なMRI造影剤のMagnevistの標準投与量は55 mg/kg(最大は165 mg/kg)とかなり多い(抗がん剤の投与量は臨床では体表面積(mg/m²)であらわされることが多いので比較には注意が必要である)。抗がん剤にくらべると5~50倍くらい大きな投与量である。これくらい投与量が大きいとキャリア自体の量も問題となる。投与に必要なキャリアの量が膨大になり、その高い粘度によってマウスへの投与時に問題がある例が散見される⁴⁾。

量に関する第2の点は、造影剤の場合には標的に

到達させるべき割合に具体的な目標値が設定できない場合がある。抗がん剤のターゲティングの場合には、投与量のうちどれくらいの割合ががんへ送達されないとターゲティング効果が発揮されないという最低割合が存在する。がん以外の正常部位に到達したものは副作用を起こすので、がんへ到達する割合を高めることが重要なのである。造影剤の場合には、造影に必要な絶対量(投与量に対する割合でなく)が送達され、そのときに標的と見分けるべき部位の送達量が十分に低ければよい、この見分けるべき部位が血管(血液)である場合には、抗がん剤の場合の正常組織・臓器への分布は無視できることとなる。

2. キャリア設計

抗がん剤ターゲティングでは、キャリアの選択のみならず、抗がん剤とキャリアの重量比がターゲティング性能を決める重要な因子であることが広く認識されている。

しかし、これまでのMRI造影剤研究では、たんにキャリアに結合さえすればキャリアの性能を100%引き出せるという仮定に基づいて行われた研究が多く、造影剤構成比がその物理化学的性質の変化を通して体内動態・分布に及ぼす影響を検討した研究はほとんどない(モノクローナル抗体が実用的に得られるようになった1980年代に、抗がん剤を抗体に結合さえすれば必ずターゲティング効果が発揮されると信じられたことと類似する)。この側面からも、現時点でDDSターゲティング技術が造影剤技術に寄与できることが多いと筆者らは信じている。

3. 毒性

治療と診断では許容される危険度が大きく異なる

のは自明なことである。抗がん剤治療ではかなり重篤な副作用の出現も、ある範囲内であれば許容されるが、対象ががんであっても、診断では重篤な副作用は限りなくゼロに近づけることが求められる。

よって、キャリア自体の毒性も抗がん剤ターゲットングでは問題にならないレベルでも、MRI造影剤を対象とした場合には大きな問題となることがありうる。したがって、キャリア研究においても抗がん剤ターゲットングで得られた情報を生かしつつも、より広範な副作用解析が求められる。

MRI造影剤の原理と種類

MRI造影剤には T_1 強調型と T_2 強調型の大きく二つに分けることができる(表1)。 T_1 は縦緩和時間、 T_2 は横緩和時間とよばれ、どちらも造影剤近傍に存在する水分子のH(プロトン)の T_1 、 T_2 緩和時間を短くしてMRIの信号強度に影響を及ぼすパラメーターである。それぞれの T_1 、または T_2 緩和時間を短くし、画像を強調する能力は T_1 緩和能または T_2 緩和能という値で数値化されている。

T_1 強調型MRI造影剤は陽性造影剤とよばれ画像上を白くあらわす造影剤であるのに対して、 T_2 強調型MRI造影剤は画像上において黒く表現する陰性造影剤とよばれる。 T_1 強調型のMRI造影剤は、主にGdイオンを有する錯体化合物からなっている。Gdイオン自身は毒性が高く、そのままでは用いることは出来ないが、キレート化剤を用いて錯体化することによってその毒性を無毒化している。こういったキレート化剤の一部を高分子鎖に結合させると高分子型のMRI造影剤となる。

1. 低分子の選択的MRI造影剤

Gd-DTPA(マグネビスト)やGd-DOTA(マグネスコープ)は、全体として負のイオン性を有している(DTPAとDOTAはキレート化合物の種類を指す)。キレート化剤DOTAの四つのカルボキシル基のうち一つを変えたGd-HP-DO3A(プロハンス)は非イオン性のMRI造影剤であり、浸透圧が低く高投与量が可能となる。これらの造影剤は、静脈内投与によって血管にコントラストを与え、そして血

管から容易に浸透する組織にも同様にコントラストを与える。このことを利用して脳腫瘍を選択的に造影することが出来る。脳腫瘍は血管の漏洩性が亢進しており、通常、漏れないような薬剤でも血管外へ漏出する。その結果、脳腫瘍部に造影剤が到達し、選択的に脳腫瘍を強調して造影することが出来る。

一方、Gdイオンを囲むキレート化剤に芳香族環を導入することによって上述したMRI造影剤よりも脂溶性を高めることが出来る。Gd-BOPTAやGd-EOB-BOPTAはそういった例であり、肝細胞特異的MRI造影剤として用いられている。Gd-EOB-BOPTAのような肝細胞特異性MRI造影剤は、肝臓がんのヘパトサイトの減少により肝臓がんの検出にその効果を発揮する⁵⁾。こういった生体内の正常部位と病変部位との相違を造影剤が取り込まれる、または取り込まれないことによって造影する手法は従来から用いられてきた。

2. キャリアを用いた選択的MRI造影剤

キャリアを用いた造影剤として、まずあげられるのが T_2 強調型MRI造影剤、いわゆる磁性微粒子である。磁性微粒子はそのもの自身を投与するわけではなく、SPIO(super paramagnetic iron oxide)とよばれる5~35 nmの磁性酸化鉄や、USPIO(ultrasmall super paramagnetic iron oxide)とよばれる4~6 nmの磁性酸化鉄をそれぞれデキストランで7~8 nmの厚みにコーティングした粒子として加工されている。これらのMRI造影剤は主に肝臓の細網内皮系に取り込まれ、正常な肝臓の信号強度の低下させることで特異的な可視化を可能にしている。デキストランコーティングされた磁性微粒子はキャリアを有するMRI造影剤となる。最近では、このデキストランコーティングされた磁性微粒子のサイズを自由に制御し、 T_2 緩和能を変化させる研究も行われている。

アミノ化CLIO(cross linked iron oxide)とよばれる磁性微粒子は、デキストランコーティングされた磁性微粒子の外側にアミノ基を有し、種々の官能基を結合させることが可能な微粒子である。このアミノ化CLIOのアミノ基の一部にcRGD部位を、残ったアミノ基に蛍光標識を導入したcRGD-CLIO

(Cy5.5)は $\alpha_v\beta_3$ インテグリンをターゲットとして、腫瘍の血管新生や動脈硬化を検出するMRI造影剤として*in vivo*評価も報告もされている⁶⁾。

延世大学のJ. Cheon教授らは、磁性微粒子の性質・サイズを自由に制御できることを報告し、*in vivo*への応用を示した。磁性微粒子は通常、一般式 MOFe_2O_3 であらわされる。Mの金属種をたとえばMn, Co, Ni, Feに変えると、その磁気モーメントが異なり、それぞれの持つ T_2 緩和能が異なる。また、それらの磁性微粒子は、そのサイズによっても磁気モーメントが異なり、同教授らは4 nm, 6 nm, 9 nm, 12 nmとサイズの異なるMEIO (magnetic engineering iron oxide)とよばれる磁性微粒子を作製し、 T_2 緩和能が異なることを示した。この磁性微粒子にハーセプチンを結合させたMEIOは、HER2感受性のMRI造影剤となり、*in vivo*においてMnを有したMnMEIO-herceptinは、最大35%程度の T_2 緩和能の変化が観察されている⁷⁾。

T_1 強調型MRI造影剤の場合は、水との相互作用が T_1 短縮作用に影響を与える。一方で、Gdキレート合成高分子や蛋白に結合すると、それ自身が高分子量化し T_1 短縮作用、つまり画像コントラストをつけるための T_1 緩和能が向上する。これは高分子の運動性が低分子にくらべて落ち、水との相互作用が効率よく行われることが原因である。この第1世代といわれる高分子量化によって造影剤の感度(緩和能)を上げる試みは、いわゆる高分子型MRI造影剤(macromolecular MRI contrast agent)として、さまざまな高分子化されたMRI造影剤が合成された。

血管プール造影剤(blood pool agent)は、至適造影時間を長くすることによって血液プール相で高いコントラスト分解能と空間分解能の血管撮像を行うことが出来る。そのもの自身は低分子のGdキレートであるMS-325は、投与後に血液中のアルブミンと結合して高分子量化され、血管からの漏出しにくくなる。MS-325の高分子量化は血液中の滞留性が向上するばかりではなく、 T_1 緩和能が向上するという利点もある。このほかに分子量が約17,000のGadomer-17やデンドリマーを用いたMRI造影剤

も同様に高分子化されることで、血中滞留性が向上するとともに T_1 緩和能が高まる血管プール造影剤として報告されている。

T_1 強調型MRI造影剤もキャリアを有するMRI造影剤の研究が進められている。リポソームの内水層にGdキレートを内包する手法や、Gdキレートの脂質を用いてリポソームやミセル(低分子からなるもの)を作製する。こういったリポソームやミセルの例は、外側にアクティブな抗体を結合させた例が多くみられる。

そういったなかでハーバード大学のR. Weissleder教授らは、ポリリシン鎖のアミノ基にGdキレートを部分的に導入し、残ったポリリシン鎖のアミノ基にPEG鎖を導入した分子量69万のMPEG-PL-Gd-DTPAを用いて、明確に腫瘍選択的なMRI造影剤を目的とした研究を報告した⁸⁾。側鎖にPEG鎖を導入することでEPR効果を十分に発揮できるほどの血中滞留性を持ったMRI造影剤であった。このポリマーの分子量の大きさに対応して血中半減期が長くなり、腫瘍に充分に集めるためには分子量69万のような大きな分子量が必要となる。その反面、血中濃度が高くなり、腫瘍・血液におけるGdキレートの濃度比が小さくなってしまふことがわかってい

3. 感度を増幅できるMRI造影剤

最近では、さらに生体内の特定の細胞・組織・臓器で引き起こされる現象を、分子・細胞レベルで無侵襲で計測し、画像化する分子イメージングが活発に研究されている。分子イメージングの手法は、日本ばかりでなく世界的にもPET(positron emission tomography)や近赤外画像法のような測定方法が主流となり、分子イメージングの中核が形成されているといっても過言ではない。MRIは、生体内の分子分布情報をもとにして画像化する観点からすると分子イメージングに則った領域であり、さまざまな計測手段を持つMRIは、これからの将来、そのブローブ開発とともにさらなる展開が期待される。

MRIは空間分解能と解像度に利点を持つ反面、PETや近赤外画像に対して検出感度という不利な点を有する。この欠点をいかに克服していくかが

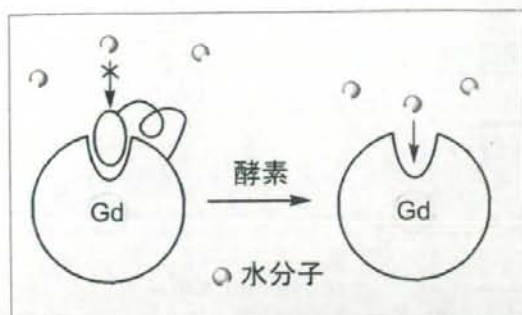


図1 酵素による化学結合切断を利用したEGad造影剤

MRI造影剤を開発する研究者にとっての課題となっている。

こうしたなかで、MRIにおける検出感度をMRI造影剤によって補うことは自然の流れのように思われる。Weissleder教授らは分子イメージングの方向性を以下のように示している⁹⁾。

- ① 適切な体内動態で高い選択性を有する。
- ② 生体内に目的部位へのデリバリーを行える。
- ③ 感度を増幅できる。
- ④ 高感度、高速、高解像度でイメージングする。

このなかで③にあげた感度を増幅できるプローブ(造影剤)がMRIにおける欠点を補うことが出来ると考えられる。マサチューセッツ大学のA. Bogdanov教授らも同様に、MRIプローブにおける感度増幅のための戦略(amplification strategy)を提唱している¹⁰⁾。

ここでは、ある特定酵素をターゲットとしてMRI造影剤の感度を向上させる“Sensitive MRI Contrast Agent”の研究例を以下にあげる。これらの研究は、病変部のバイオマーカーを主に造影剤の活性源として用いており、研究の初期段階ではあるが第2世代のMRI造影剤の例といえる。

1997年にノースイースタン大学のT. Meade教授らは、 β -ガラクトキシダーゼに認識されるMRI造影剤、EGadを合成した(図1)¹¹⁾。この化合物EGad自身はGd-DOTAがもとになっている化合物であるが、D-ガラクトピラノースによって、Gdイオンへの水のアクセスが制限されており、MRI造影剤としての T_1 緩和能を十分に発揮することが



図2 酵素による酸化反応を利用したGd-bis-5-HT-DTPA



図3 ウイルスによる磁性微粒子の凝集構造

出来ない。しかしながら、 β -ガラクトキシダーゼによって、このD-ガラクトピラノース基が切断されると水のアクセスが容易に行われるようになり、MRI造影剤としての活性を発揮する性質を有する造影剤である。また同教授らは、 Ca^{2+} や Zn^{2+} によって同様に水のアクセスを制御する化合物の合成に成功している^{12,13)}。

Bogdanov教授らは、5-ヒドロキシトリプトミドをキレート化剤に導入したMRI造影剤、Gd-bis-5-HT-DTPAを合成している。合成されたGd-bis-5-HT-DTPAは、炎症部位に特異的に産生するミエロペルオキシダーゼの酸化作用によってオリゴマー化され(～5量体)、緩和能がおおよそ2倍程度に増大する。さらに、そのオリゴマーが蛋白質に結合することによって高分子量化し、 T_1 緩和能がはじめに比べておおよそ5.6倍に向上するMRI造影剤を合成した(図2)。このような酸化作用は、他のGd-DTPAを用いた場合には確認されず、5-ヒドロキシトリプトミドを有するGd-bis-5-HT-DTPAだけがミエロペルオキシダーゼの酸化力を受け、酸化カップリングを起こすことがわかっている¹⁴⁾。

上記に示したMeade教授らの β -ガラクトキシダーゼ感受性MRI造影剤は*in vitro*の試験結果であるが、後者のミエロペルオキシダーゼ感受性MRI造影剤は*in vivo*においてもその造影効果の増大が確認されている。

磁性微粒子を用いて、その緩和能を変化させる

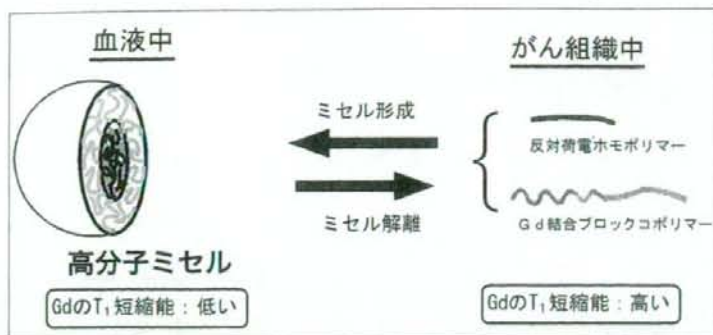


図4
ミセル構造形成・解離による
緩和能の制御

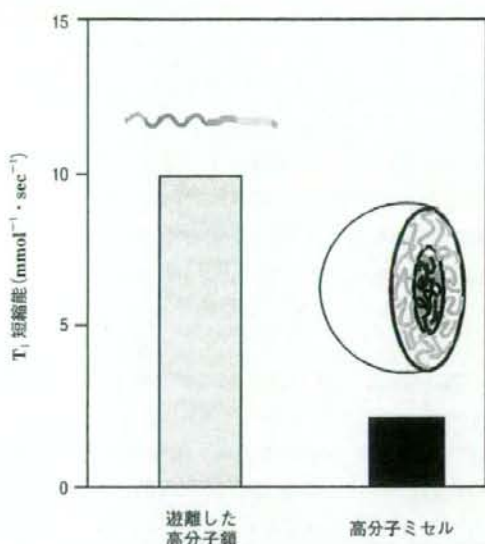


図5 高分子ミセルの形成・解離に基づく T_1 短縮能の変化

MRS (magnetic relaxation switching) 法の研究が進められている。MRS 法とは、磁性微粒子自身が有する T_2 緩和時間をターゲット部位で特定の反応によって T_2 緩和時間を早める、または遅くすることを目的とした方法である。具体的には、磁性微粒子をリバーシブルな反応を用いて自己凝集-解離を行う。先に述べたように、磁性微粒子はそのサイズによって磁気モーメントが変わる、つまり T_2 緩和時間が変化する。DNA-DNA 間、または蛋白質-蛋白質間の相互作用や、酵素を使うことでそれらの反応を起こすことが出来る。たとえば、アデノウイルスを用いると、100 nm ほどのサイズを有するアデノウイルス 1 分子が磁性微粒子の凝集を引き起こし、

微粒子サイズがもとの 46 nm からおよそ 10 倍の 500 nm 以上に変化する(図3)。これにより磁性微粒子の T_2 緩和時間は劇的に変化することが報告されている^{15,16)}。

以上にターゲット部位で造影効果を発揮する造影剤の例をキャリアの有無にかかわらずいくつかあげさせていただいた。今後、DDS ターゲティング技術のもと、キャリア設計とともにこうした造影剤の研究・開発が進められてゆくことであろう。

高分子ミセルを MRI 造影剤キャリアとした研究

最後に筆者らが行っている研究例を紹介させていただき、DDS と分子イメージングの接点を探ってゆきたい。

筆者らが設計した、高分子ミセルをキャリアとした MRI 造影剤は図4に示すような構造である。高分子ミセルはブロックコポリマー分子が多数会合してできる構造で、抗がん剤の場合はミセルの疎水性内核に抗がん剤を内封してターゲティングするとともに、疎水性場に薬物を保持することで薬物分子の体内での不活性化を抑制する効果もある^{17,18)}。MRI 造影剤においては、ミセル構造形成によってミセル内に位置する Gd キレートが周囲の水分子から隔離されることで、 T_1 緩和時間短縮能(緩和能)が抑制されることを意図する。

すなわち、ミセル形態で血液を循環している間は、血液の画像コントラストは抑制される一方、がん組織内でミセル構造からブロックコポリマーに解離すると、Gd キレートは周囲の水に自由に接触す

ることができ、 T_1 緩和能を発揮してがん組織をコントラスト高く映し出す。がん組織内では分子量1万程度のブロックコポリマーでもEPR効果によって長時間組織内にとどまるのであるが、血液内でミセル構造が解離して生じたブロックコポリマーは、その分子量が腎臓の分画分子量より小さいので速やかに排出されて、血液の画像バックグラウンドは低く保たれる。すなわち、抗がん剤ターゲティングの場合には、ミセル内核に抗がん剤を封じ込めて高分子ミセルの特性による選択的送達のみであったが、MRI造影剤の場合にはこの選択的送達に加えて、ミセル構造の解離現象を画像選択性を得る手段として活用するのである。

この高分子ミセルシステムで、ポリアスバラギン酸にGdキレート結合させてミセル内核高分子鎖とし、ポリアリルアミンを反対荷電ホモポリマーとしたものの結果を図5に示す。ミセル構造の形成する場合としない場合で約4倍の T_1 短縮能の変化を得ることに成功した。この結果は、まだ*in vitro*のものであるが¹⁹⁾、今後は、*in vivo*でのターゲティングとがん選択画像取得の最適化に進んでゆく。

文 献

- 1) Wang SC, Brasch RC et al.: Evaluation of Gd-DTPA-labeled dextran as an intravascular MR contrast agent: Imaging characteristics in normal rat tissues. *Radiology* 175: 483-488, 1990.
- 2) Schmiedel U, Brasch RC et al.: Magnetic resonance imaging of myocardial infarction using albumin-(Gd-DTPA), a macromolecular blood-volume contrast agent in a rat model. *Investigative Radiology* 22: 713-721, 1987.
- 3) Unger E, Tilcock C et al.: Biodistribution and clearance of liposomal gadolinium-DTPA. *Investigative Radiology* 25: 638-644, 1990.

- 4) Corot C, Meyer D et al.: Physical, chemical and biological evaluations of CMD-A2-Gd-DOTA. *Acta Radiologica* 38: Supplement 412: 91-99, 1997.
- 5) Modo M, Hoeft M, Bulte JWM: Cellular imaging. *Molecular Imaging* 4: 143-164, 2005.
- 6) Jaffer FA, Libby P, Weissleder R: Nanoparticle imaging of integrins on tumor cells. *Circulation* 116: 1052-1061, 2007.
- 7) Lee JH, Huh YM, Jun YW, Seo JW, Jang JT et al.: Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nature Medicine* 13: 95-99, 2007.
- 8) Bogdanov Jr A, Wright SC, Marecos EM, Bogdanova A, Martin C et al.: A long-circulating co-polymer in "passive targeting" to solid tumors. *J Drug Targeting* 4: 321-330, 1997.
- 9) Weissleder R, Mahmood U: Molecular imaging. *Radiology* 219: 316-333, 2001.
- 10) Querol M, Bogdanov Jr A: Amplification strategies in MR imaging: activation and accumulation of sensing contrast agent. *J Magn Reson Imaging* 24: 971-982, 2006.
- 11) Moats RA, Fraser SE, Meade TJ: A "smart" magnetic resonance imaging agent that reports on specific enzymatic activity. *Angew Chem Int Engl* 36: 726-728, 1997.
- 12) Li WH, Fraser SE, Meade TJ: A calcium-sensitive magnetic resonance imaging contrast agent. *J Am Chem Soc* 121: 1413-1414, 1999.
- 13) Major JL, Parigi G, Luchinat C, Meade TJ: The Synthesis and *in vitro* testing of a zinc-activated MRI contrast agent. *PNAS* 104: 13881-13886, 2007.
- 14) Chen JW, Querol SM, Bogdanov Jr A, Weissleder R: Imaging of myeloperoxidase in mice by using novel amplifiable paramagnetic substrates. *Radiology* 240: 473-481, 2006.
- 15) Perez JM, Josephson L, O'Loughlin T, Hagemann D, Weissleder R: Magnetic relaxation switches capable of sensing molecular interactions. *Nature Biotechnology* 20: 816-820, 2002.
- 16) Perez JM, Simeoni FJ, Saeki Y, Josephson L, Weissleder R: Viral-induced self-assembly of magnetic nanoparticles allows the detection of viral particles in biological media. *J Am Chem Soc* 125: 10192-10193, 2003.
- 17) Yokoyama M et al.: Characterization and anti-cancer activity of micelle-forming polymeric anti-cancer drug, adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *Cancer Res* 50: 1693-1700, 1990.
- 18) Opanasopit P et al.: Influence of serum and albumins from different species on stability of camptothecin-loaded micelles. *J Controlled Release* 104: 313-321, 2005.
- 19) Nakamura E et al.: A polymeric micelle MRI contrast agent with changeable relaxivity. *J Controlled Release* 114: 325-333, 2006.

薬物キャリアに用いられる高分子材料

特集 DDSに利用される高分子化学

横山 昌幸*

Polymeric materials for drug carriers

This review article describes synthetic polymers used as drug carriers with a clear focus on the consideration "what are important factors in the appropriate choice of polymers for specified purposes of drug targeting". First, the review explains classifications, structures, and syntheses of polymers from the viewpoint of their applications for drug carriers. Second, the review describes four methodologies for polymeric drug-carrier designs, followed by brief introduction of three examples of the polymeric drug carriers.

血液内に投与する薬物キャリアに使われる合成高分子を解説する。高分子の分類・構造・合成について、高分子化学全般を述べるのではなく、薬物キャリアへの応用の観点に焦点を絞って説明を加える。つぎに、高分子キャリアの設計論を解説したのち、三つの高分子キャリアの研究例を解説する。全体を通して、「なぜこの高分子材料が特定のキャリアの用途に用いられるのか」を高分子化学の観点から述べることを目的としている。

Masayuki Yokoyama*

key words: polymer, synthetic polymer, polymerization, targeting, drug carrier

本稿では、血液内に投与する薬物キャリアに使われる高分子を、主に合成高分子に焦点を当てて外観する。そのなかで、高分子の構造や合成といった基礎的な面も解説させていただく。理由は、高分子はその種類により、化学構造式に書いた構造の高分子のみが得られる場合と、そうではなくかなりの副生成物といえる構造を含む場合があるからである。後者の場合でも、(高分子科学者としては当然のことなので)特に、目的とする高分子以外の構造について述べることはほとんどない。

一方、医薬品として合成高分子が用いられるのは、このような副生成物の構造・量については最も厳しく問われる応用の一つといえよう。よって、薬物キャリアとして研究・開発される場合には、このような問題がクリアされている、あるいはクリアしやすい高分子が注意深く選ばれていることが多い。この点は高分子合成に関わった経験がない方には、最も見えにくい点である。

本稿では、この点が見えやすくなる、あるいは推察することができる、問うことができるための一助となることを一つの重要な目的とした。

高分子を用いた薬物キャリアのタイプ

合成高分子を用いた薬物キャリアのタイプを図1に示す。まず、水溶性高分子に薬物を化学結合させたものが図1aのタイプである。このタイプは天然高分子の代表である抗体にも用いられる。図1bは、反対に非水溶性の高分子を用いて微粒子としたものである。そのサイズによってマイクロスフィアあるいはナノスフィアとよばれる。図1cは、リポソームを高分子でコーティングしたもので、これについては本特集の他稿において、河野健司教授が詳説しているので参照されたい。

図1dの蛋白修飾は、ポリエチレングリコールに代表される高分子をインターフェロンなどの蛋白質に修飾する場合である。有名な合成高分子を使った抗がん剤のスマンクスもこのタイプである。図1eの高分子ミセルは、複数の高分子鎖が会合して形成

* Yokoyama "Nano-medical polymer" project, Kanagawa Academy of Science and Technology 財団法人神奈川科学技術アカデミー 横山「高分子ナノメディカル」プロジェクト

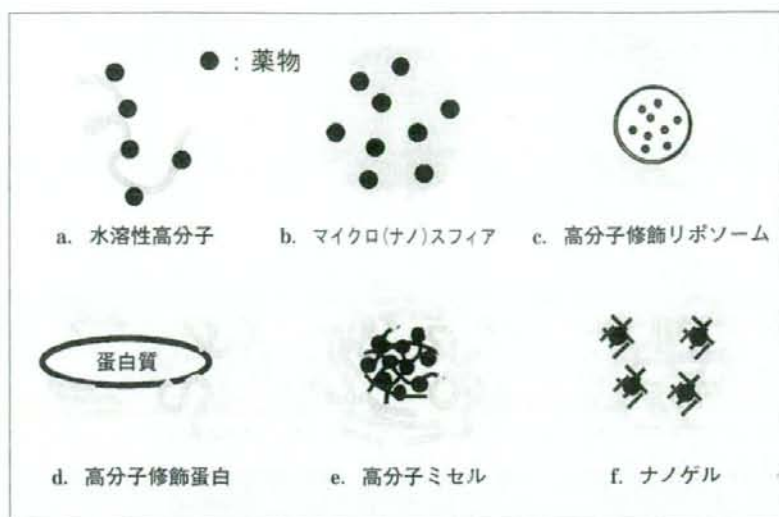


図1
合成高分子を用いた
薬物キャリア

するミセル構造である。図1fにあげたナノゲルも高分子の会合体であるが、いくつかの点が高分子ミセルと異なる。大きな相違点は疎水性の核が多数存在すること(高分子ミセルの場合は一つ)である。東京医科歯科大学の秋吉一成教授がこのナノゲルの研究を活発に展開されている^{1,2)}。

高分子の種類

高分子の種類は天然と合成から述べさせていただく。どちらに分類すべきかわかりにくい例も多少あるからである。

天然高分子は、ポリペプチド(蛋白質)、多糖、核酸の3種であり、薬物キャリアとして利用されている(図2)。抗体、アルブミン、トランスフェリンがポリペプチドキャリアの代表例で、認可されたキャリアシステムも少なからず存在する。多糖もこれについて研究されていて、デキストラン³⁾、デキストリン^{4,5)}、プルラン^{1,2)}などがよく知られている。核酸は、DNAにインターカレーとする薬物として研究された例⁶⁾が1970年代にあるが、それ以降キャリアとして研究された例は、おそらくないであろう。

乳酸、グリコール酸、アミノ酸などの天然化合物が原料であっても、それを合成化学的手段で作製し

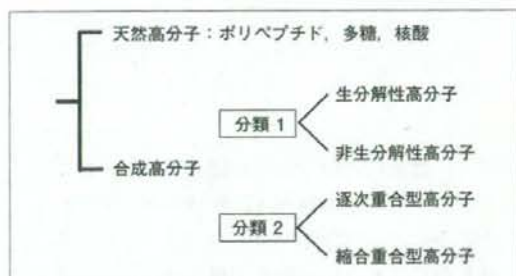


図2 高分子の種類

た高分子は合成高分子のカテゴリーに分類されることに注意が必要である。特に、ペプチド合成の手法で一つひとつアミノ酸を厳密な配列で結合させたものは天然高分子として扱われることが多いが、同じポリペプチドでも高分子化学の手法で重合して得たものは“ポリアミノ酸”とよばれ、合成高分子に分類される。

合成高分子はいくつかの基軸で分類されうるが、本稿の目的を鑑み、ここでは二つの軸による分類のみを説明する(図2)。

第1の軸は、体内で分解性か非分解性かである。ここで問題となるのは、主に長期的な生分解性である。たとえば、水溶性のビニル系の合成高分子(詳しくは次項で述べるが、ポリマーの主鎖がポリエチレンと同じであるもの)を血液内に投与すると、そ

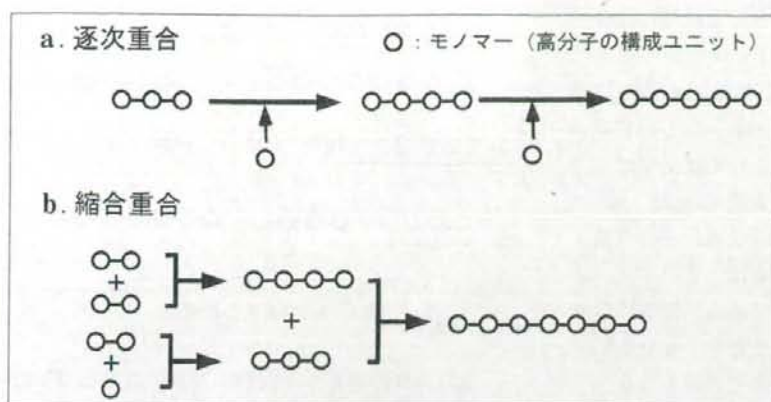


図3
高分子の重合法

れが腎臓の濾過作用を経て尿とともに体外へ排出できる上限の分子量は4万程度と知られている⁷⁾。もちろん、これよりも大きな分子量の非体内分解性高分子でも肝臓からの胆汁排泄の経路で体外への排出は可能である。しかし、「非分解性的高分子は腎臓の排出経路を確保すべき」というのが現状の趨勢である。胆汁排泄のみに依存するシステムの長期の安全性を確立するよりは、高分子材料側の工夫によって腎臓の排出経路を確保するほうが容易であるとの判断である。

以上の長期的な毒性懸念の観点からは、生体内分解性的高分子ならば、どれほど分子量が大きくても血液内投与のキャリアとして使用することが可能であるが、実際には目的とするデリバリーの時間スケールに適合するように、分子量と分解の速度を考慮する必要がある。たとえば、投与後1日程度の期間の薬効を得ようとする場合に、投与2週間を経過しても相当量の高分子システムが血液中に残存しているのは好ましくないと考えられる。

合成高分子分類の第2の軸は、重合形式である。ここでは高分子を合成する重合法について少し詳説を加えるが、「高分子はその種類によって重合様式が異なり、その重合様式によって得られる分子量・分子量分布が決定される」ということが本項の解説で伝えたい要旨である。逐次重合とは図3aに示すように、高分子の反応性を有した末端(ラジカル種など)に高分子の単位構成単位(モノマーとよぶ)が連鎖的に反応して、高分子鎖の鎖長が長くなっていく

形式である。もう一つの形式は、図3bに示す縮合重合方式で、両端に反応性を有した高分子鎖同士が結合して鎖長を増していく。前者が一つずつの鎖長増大に対して、後者では反応初期こそモノマー同士の結合であるが、重合反応が進むにつれ、1回の結合で増える分子量は大きくなる(たとえば、分子量1万同士の高分子が結合すると、一挙に分子量は2倍の2万となる。)

合成高分子は、唯一の分子量である蛋白質とは異なり、多数の鎖長の高分子の集合体として得られるので、その分子量は平均分子量と分子量分布という二つの要素によって表現される。分子量分布は、分子量の分布の広さを示す尺度で、「広い」「狭い」と表現する。高分子科学では重量平均分子量と数平均分子量の比($\overline{M}_w/\overline{M}_n$ と表現する)値で評価する。蛋白質のように単一の分子量の高分子は厳密に1であり、分布が広がるにつれてこの値が大きくなる。

現在、最も分子量分布が狭い合成高分子の場合には $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ の値は1.10以下となり、一般にこの値が1.3程度より小さければ、「分子量分布は非常に狭い」といわれるのが通例である。合成高分子のなかでも遺伝子を利用した特殊なものや、 dendrimerとよばれる高分子は分子量が単一である。特に、 dendrimerはその樹状構造とともに、分子量が単一であることをもって遺伝子や造影剤のキャリアとしての応用が期待されている⁸⁾。しかし、 dendrimerは原理的に分子量が単一であるのではな

く、合成のステップごとに目指す分子量以外の高分子を分離して精製する操作によって得たものである。よって、これをキャリアとして応用する際には、蛋白質のように完全に分子量が単一なものではなく、目的とする分子量がどれくらいの純度で含まれるものであるかという捉え方が現実的である。

さて、前置きが長くなったが、合成高分子の鎖長を規定する平均分子量と分子量分布は、そのキャリアとしての応用では重要な2要素である。図3に示した重合形式の違いは、平均分子量と分子量分布に大きな影響があることは容易に想像できると思う。ただし、同じ逐次重合といっても分子量分布が狭い場合と広い場合があり、詳細を知っていただくためには高分子化学の教科書^{9,10)}で学んでいただく以外にはない。本項で理解いただきたいのはつぎの2点である。

- ① 高分子はその種類によって、重合形式が異なった結果、得られる平均分子量と分子量分布が大きく異なることがある。
- ② 異なる重合形式の高分子を直接(化学的な工夫を加えることなく1段階の反応でという意味)にブロックポリマーやグラフトポリマー(いずれも2種類の高分子鎖が結合したもの)を合成することはできない。

ここでまた、読者を混乱させる説明を付け加えさせていただきます。高分子ミセルキャリアなどでよく使われるポリエチレングリコール-b-ポリ乳酸のブロックポリマーがあるが、このポリ乳酸はポリエステル的一种である。合成繊維として衣料に汎用されるポリエステルは縮合重合で得られる高分子の代表例である。一方、ポリ乳酸はそのモノマー(高分子の構成単位)である乳酸を環状の活性体としてから、逐次重合で得ることができる。ポリエチレングリコール-b-ポリ乳酸のブロックポリマーの合成では、両者の重合が1段階で得られたり、1段階目から2段階目への重合の移行が容易な系で重合できたりする。このブロックポリマーが数多くの研究・開発で利用されるのは、その生体適合性および生分解性が主要因であるが、合成の容易さも重要な因子である。このように、合成高分子は望んだ組み合わせや分子量がどれも容易に得られるわけではな

副反応がない場合 : 長い直鎖状高分子



副反応が起きた場合 : 短い・分岐状高分子

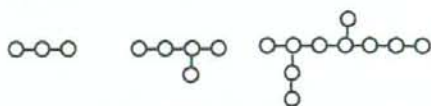


図4 高分子重合での副反応

く、その合成の容易さが研究・開発の重要な因子になることがよくある。

高分子の構造と合成

前項と同様に、本項でも多くの読者にとって説明が多少微細にわたりすぎる部分が多いので、理解していただきたいことを先にまとめておく。

- ① 表示された構造式とは異なった構造の高分子が含まれていることがある。
- ② 重合方法によっては副反応が起こり、その結果として上記の表示と異なった構造の高分子が生成する。
- ③ 上記いずれも、高分子化学では当然のこととしてこれらの事項を記述することが省略される場合が多い。

本項では、図3aに示した逐次重合を例にして説明する。副反応がなく理想的に重合反応が進行すると、図4の上側に示した高分子が得られるとする。たとえば、重合活性種とモノマーのモル比が1:100とすると、このポリマーの平均重合度(何個のモノマーが結合したかを示す値)は100である。鎖状のポリマーが得られる。ところが、最も汎用されるラジカル重合では、副反応が起こることで、図4の下側に示すような枝分かれ状のポリマーや、重合が途中で停止してしまった100の重合度より遙かに短いポリマーが副生成物をして生成する。一方、アニオン重合とよばれる方法では、このような副反応はほとんど発生しない。逆にアニオン重合では、適用できるモノマーの種類に制限が多い、重合時に純度の高い溶媒が必要などの短所もある。「副反応が