

バイオイメージングを目指したフラーレン・高分子複合体の調製

## Preparation of fullerene/Polymer Assembly for High Performance Bioimaging

代表研究者 筑波大学 長崎幸夫 University of Tsukuba Yukio Nagasaki

Acetal-PEG/polycation was synthesized by our original method. The acetal-PEG/polyamine thus prepared can be utilized for a solubilization of fullerenes in aqueous media with the size of several nanometer. The obtained complex was fairly high dispersion stability under high ionic strength conditions. The complex was confirmed to show an oxidization ability of superoxide. When Ga incorporated-fullerene was used, the pH dependent relaxation time of water molecule was observed, which is anticipated as new type of bioimaging materials.

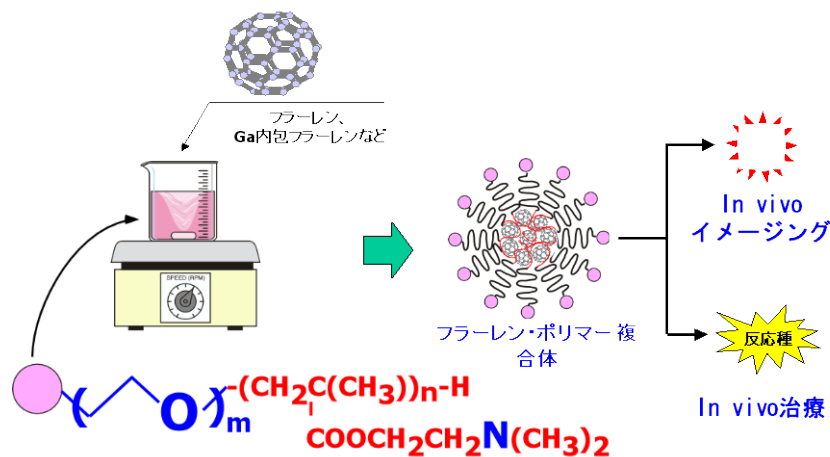
### 研究目的

C60 に代表されるフラーレンは新しい炭素化合物として各方面から期待されている。最近では安価で選択的な合成法も開発され、工業化に向けて検討されている。フラーレンはそのユニークな構造のため、様々な角度から詳細に物性が研究され、種々の特性を示すことが見いだされてきた。特に光増感生物作用、活性ラジカル消去作用、酵素活性阻害作用などの生理活性を示すことも明らかにされ、バイオ関連領域でも注目されている化合物である。しかしながら、フラーレン自身は水に極めて難溶であるため、化学修飾による水溶性置換基の導入などの水溶化への試みがなされているものの、官能基の導入により、フラーレン自身の特性を低下させるトレードオフの関係が解決できていない。

申請者らは、パイ電子雲の広がったフラーレンとポリカチオンが相互作用することに着目し、申請者らが長年合成してきた末端に反応性官能基を有するアセタール-PEG/ポリカチオンブロック共重合体との複合化によってフラーレンそのままの状態でも水溶化することを見いだした。ブロック共重合体のカチオンセグメントがフラーレンとコア中に取り込まれるとともに PEG 鎖がブラシ上に広

がるため、生体環境下でバイオ分子の非特異吸着をおさえるだけでなく、分散安定性も極めて高いナノサイズの粒子を与えることが期待される。本研究ではこの複合体の物理化学特性を評価するだけでなく、フラーレンが引き起こす生理的活性を利用し、フラーレンをベースにしたバイオナノ粒子の創出を進めた。具体的には水の緩和時間を大きく変化させることが知られているガドリニウム内包フラーレンを用いて、pH 依存的に MRI イメージングを可能にする高性能造影剤の創成を行った。さらに、パイ共役系の発達したフラーレンは活性酸素消去能を有するため、これら生理活性についても検討を加えた。

## フラーレン・ブロックポリマー複合体の調製



### 実験

PEG/ポリカチオンブロック共重合体によるフラーレンの可溶化は、これまでに得られている知見を基に以下のように検討を行った。

- 1) 末端に官能基を有するPEG/ポリカチオンの分子設計:我々オリジナルの重合反応<sup>1</sup>を利用し、様々な鎖長のPEG/ポリカチオンブロック共重合体の合成を行った。PEG末端にはアルデヒド基に変換可能なアセタール基を導入した。
- 2) フラーレン・ブロックポリマー複合体（フラーレン複合体）の調製:上で合成された鎖長の異なるブロック共重合体をフラーレンと混合攪拌あるいは透析混合することにより可溶化を試みた。

<sup>1</sup> Kataoka, Kazunori, et al., (1999), 32(20), 6892

ここで調製した粒子は光散乱およびゼータ電位計によりサイズ、および表面電位を測定るとともに、溶液の透過率（分散性）のイオン強度依存性を検討した。

- 3) フラーレン複合体溶液の水緩和時間の pH 依存性：このようにして調製したフラーレン粒子による水分子の緩和時間の pH 依存性を核磁気共鳴装置によって行った。
- 4) フラーレン複合体の毒性評価：MTT アッセイを利用して調製した複合体の細胞毒性を評価した。
- 5) フラーレン粒子の活性酸素消去能(in vitro)：別途フラーレン複合体の活性酸素消去能を電子スピンスペクトルを用いて行った。スピントラップ法により消去しきれなかった活性酸素濃度の定量を行った。

## 結果と考察

### Acetal-PEG/PMAMA ブロックコポリマーを用いてのフラーレン粒子水溶液の調製

様々なフラーレン／アセタール-PEG/PMAMA 混合比における複合体の粒径を図 1 に示す。フラーレン 1mg に対して加えたブロックポリマー量を増加するにしたがって、得られる粒子の粒径が低下し、4mg 以上で数ナノメートル以下になることが確認された。これは図 2.に示す TEM 写真でも確認された。このような方法で、3mg/mL まで水溶化することに成功した。これまで報告されているフラーレンの様々な可溶化剤と比較して、数十倍以上の可溶化能を示した。これはポリカチオンセグメントの静電相互作用と PEG の高い水溶性に基づく結果と考察された。フラーレン-ブロックポリマー複合体のイオン強度に対する安定性は極めて高く、1mol/L 以上のイオン強度下でも安定に分散して

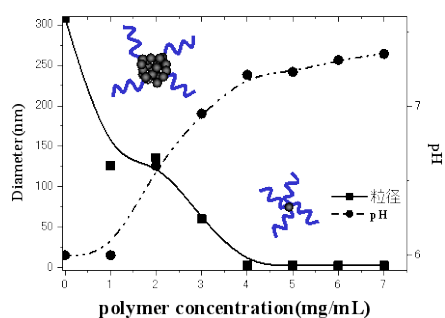


Figure 1. Change in size of fullerene-polymer complex with the block copolymer concentration

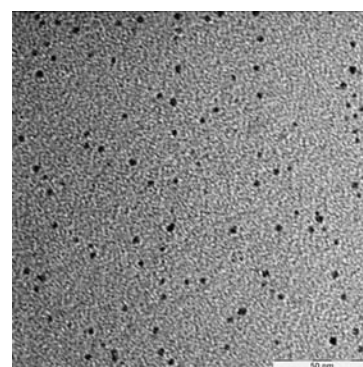


Figure 2. TEM photograph of Acetal-PEG/PMAMA stabilized fullerene particles

いることが確認された (図 3.)。このように水中で数ナノメートルのクラスター構造をとり、分散安定性の高いフラーレン・ポリマー複合体の調製が可能となった。

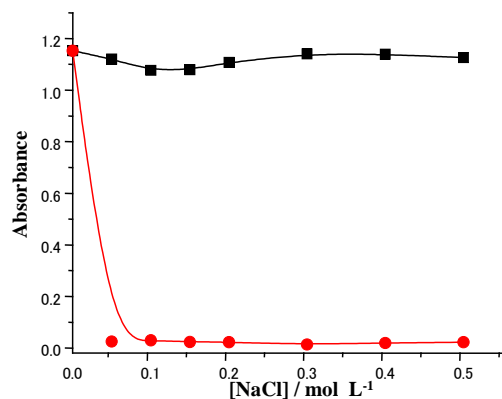


Figure 3. Dispersion stability of fullene-polymer complex with the block as a function of ionic strength

このようにして調製したフラーレン・ポリマー複合体のバイオ環境下の機能として、活性酸素消去能及び水の緩和時間に及ぼす影響を検討した。スピントラップ剤である 5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide(DMPO)水溶液 30 $\mu$ L、5mM Hypoxanthine(HPX)の PBS 溶液 50 $\mu$ L、9.625mM

Diethylenetriamine-N,N,N',N'',N''-pentaacetic acid(DTPA)を 20 $\mu$ L 混合させフラーレン溶液複合体 50 $\mu$ L、0.4U/mL Xanthine oxidase (XOD)と混合することによって HPX から生じた活性酸素を ESR によって定量した。図 4.ではにフラーレンの活性酸素消去能を、活性酸素消去タンパク質であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の活性とともにプロットした。SOD に比べて効果は  $IC_{50}(SOD)=0.27\text{mg/mL}$  に対しフラーレン複合体では  $IC_{50}(\text{Fullerene})=360\text{mg/mL}$  と活性は SOD ほどではないものの、生体由来タンパクによらない活性物質の創出が可能となった。

ガドリニウム内包フラーレンは水の緩和時間を大きく変えるため、MRI 用イメージング剤として期待されているものの、水溶性に乏しく、問題がある。上述の方法で  $\text{Ga}@C_{82}$  のアセタール-PEG/PAMA との複合化を行い、水緩和時間に対する影響を測定した。調製した a)  $\text{Gd}@C_{82}$ /ポリマー複合体を

$\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}=50:50$  の混合溶媒中に溶かし、NMR によって緩和時間を測定した。右式で表される緩和能  $R_1$ ( $C$  は造影剤濃度、 $T_{1p}$ 、 $T_{10}$  はそれぞれサンプル及び溶媒の緩和時間)

$$R_1 = \frac{\frac{1}{T_{1p}} - \frac{1}{T_{10}}}{C}$$

を求め、pH に対してプロットした結果を図 4.に示す。現在実用化されている MRI イメージング剤

(Gd-DTPA キレート錯体)の  $R_1=67.8$  に対し、Gd@C<sub>82</sub>-ポリマー複合体は生理条件下では  $R_1=20$  程度であった。しかしながら複合体の  $R_1$  は pH が下がるにつれて上昇し、pH=5 では  $R_1=60$  程度と Gd-DTPA キレート錯体と同程度の  $R_1$  を示した。これはアセタール-PEG/PAMA のポリアミンセグメントの pH 応答性が反映された結果であり、pH 応答性のイメージング剤として期待される。

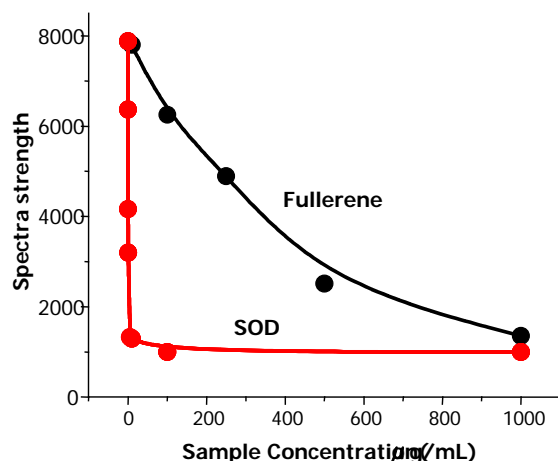


Figure 4. Superoxide elimination activity determined by and ESR spectra

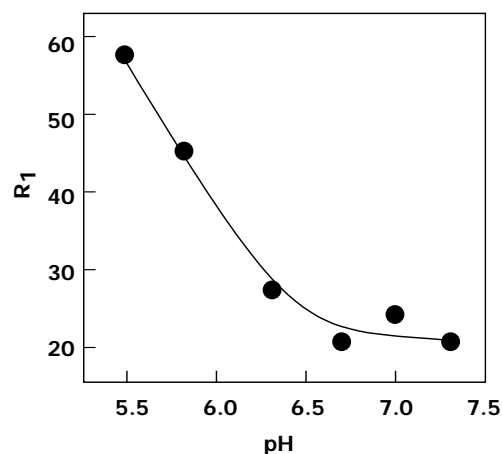


Figure 5. Change in R1 as a function of pH

本研究で合成したブロック共重合体の PEG 末端にはリガンド導入可能なアセタール基を配していることから、このようにブロックポリマーで安定化した多孔ナノ粒子はアクティブターゲッティング可能な新しい薬物及びイメージング剤として期待できる。

## 研究発表

1. Yukio Nagasaki, “Design of Bionanoparticles”, Japan-India Science and Technology Initiative Meeting, October 16-17, Mita International Conference Center, Tokyo, Japan
2. Yukio Nagasaki, “PEG-Engineering surface having both non-fouling and high-sensing characters”, 230<sup>th</sup> American Chemical Society Meeting, August 28 – September 2, 2005, Washington D.C., U.S.A

## 紙上発表

1. Yukio Nagasaki, Syosuke Kodaka, “Design of fullerene/Polymer Assembly for High Performance Bioimaging”, in preparation.