

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：54601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18279

研究課題名(和文)テーラーメイド薬剤カプセル -自己集合体の特性に基づく薬剤カプセルのデザイン-

研究課題名(英文)Tailor-made drug carrier: Design and application of aggregates based on the physicochemical properties

研究代表者

林 啓太 (Hayashi, Keita)

奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・講師

研究者番号：10710783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では自己集合体のミセルやベシクルといった構造の違いに基づいた特性と、自己集合体を薬剤カプセルとして応用した場合の薬剤封入効率や細胞への送達効率といった機能との関係性について検討した。Span系およびTween系界面活性剤を種々の割合で混合することで球状ミセルや球状ベシクル、レンズ型ベシクルといった様々な自己集合体を調製に成功した。それらの自己集合体の構造依存的な特性を解析し、薬剤封入効率や血中安定性といった薬剤カプセルとしての機能評価を行うことで、目的に即した自己集合体を選択して薬剤カプセルへと応用する、所謂、テーラーメイド薬剤カプセルの可能性を議論した。

研究成果の概要(英文)：It has been investigated about the relationship between physicochemical properties of self-assembled aggregates and their functions as drug carriers. Span and Tween series surfactants were employed to prepare various kinds of self-assembled aggregates. Spherical micelle was prepared by Tween surfactants. Mixing with Span surfactants changed formation from a micelle to a vesicle. These aggregates were characterized by DSC, ¹H NMR and Laurdan. Micelles were dynamic, while vesicles were rigid state. Therefore, hydrophobic molecules easily entered hydrophobic region of micelles as compared with vesicles. This result shows the relationship between physicochemical properties of self-assembled aggregates and their functions as drug carriers, and it is important to understand systematically about the formation-dependent physicochemical properties of aggregates for "tailor-made drug carrier".

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：自己集合体 薬剤カプセル ドラッグ・デリバリー・システム

1. 研究開始当初の背景

薬剤療法において、薬剤の動態を制御することは、より高い薬理効果、副作用の軽減を達成する上で非常に重要である。動態の制御を達成するために検討されている方法の一つとして薬剤カプセルの開発が挙げられる。薬剤カプセルにはリン脂質や人工界面活性剤から構成されたベシクルや、高分子ミセル、シリカ粒子など様々なものが報告されている。しかし、これらの材料のうち、どれが最も薬剤カプセルとして適しているかは明らかとなっていない。多くの研究者は薬剤カプセルに別の機能、例えばポリエチレングリコール付加による血中滞留時間の亢進や抗体やペプチド、低分子化合物付加による患部へのアクティブターゲティングにより、より機能性の高い薬剤カプセルの調製について検討が行われている。

2. 研究の目的

本研究では、“最も適した”薬剤カプセルの調製ではなく、“より最適な”薬剤カプセルの調製について検討を行った。当研究室では既に化学構造の類似する2種類の非イオン界面活性剤(Span系界面活性剤、Tween系界面活性剤)を混合することで(Fig. 1)、様々な自己集合体が調製可能であることを報告している(K. Hayashi, et al., *Colloids Surf. B*, **135**, 235-242 (2015))。既存の研究においても、複数の界面活性剤を混合して構造の異なる自己集合体を調製する方法は報告されているが、それらは全く異なる構造、例えばカチオン性界面活性剤とコレステロールを用いたものであり、調製された自己集合体の構造に起因するか、自己集合体を構成する分子に起因するか判断が困難な場合がある。しかしこのSpan系界面活性剤とTween系界面活性剤を用いた方法の場合では、化学構造が類似していることから上記のような問題が解決できると考えられる。これら自己集合体を用いることで、ミセルとベシクル、どちらの自己集合体が薬剤カプセルとしてどのような項目において優れているかを検討することが可能である。

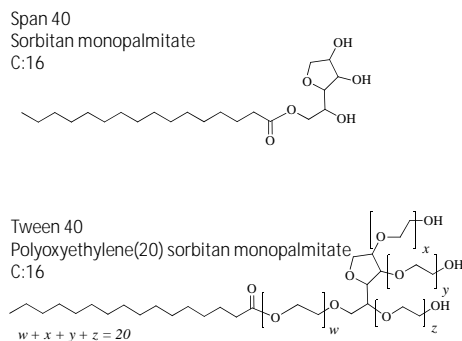


Fig. 1 Span 40 および Tween 40 の構造。

3. 研究の方法

まず、Span 20 と Tween 20、または Span 40 と Tween 40 を種々の割合で混合し、どのような自己集合体を形成するかについて cryo-TEM を用いて検討を行った。これらの自己集合体について、相転移温度については DSC、自己集合体を構成する分子の運動性については $^1\text{H NMR}$ 、疎水領域における親水・疎水性評価については環境応答性蛍光プローブである Laurdan を用いて自己集合体の特性評価を行った。これらの特性評価をもとに、薬剤カプセルとしての機能、つまり薬剤封入効率、血中安定性、取り込み効率などを議論した。薬剤封入効率に関してはモデル薬剤として Rhodamine 6G (Rho 6G)、または 1-Anilinonaphthalene-8-Sulfonic Acid (ANS) を混合することで検討した。血中安定性については自己集合体懸濁液に Albumin を添加して混合し、トリプトファン蛍光、および CD 測定から自己集合体の安定性を議論した。取り込み効率については自己集合体に蛍光プローブである Rho-PE を添加してフローサイトメーターにより測定した。

4. 研究成果

Tween 系界面活性剤のみで自己集合体を調製した場合はミセルを形成し、Span 系界面活性剤を添加していくことでレンズ型や多面型といったように構造は異なるがベシクルを形成しやすくなることが明らかとなった(Fig. 2)。これは一般的に知られている臨界充填パラメーターにより説明できるが、特に Span 40 を多く含む場合で球状以外のベシクルが多く観察された。これは Span 40 が固い脂質二分子膜を形成するため曲がった構造が形成しにくいためであると考えられる。

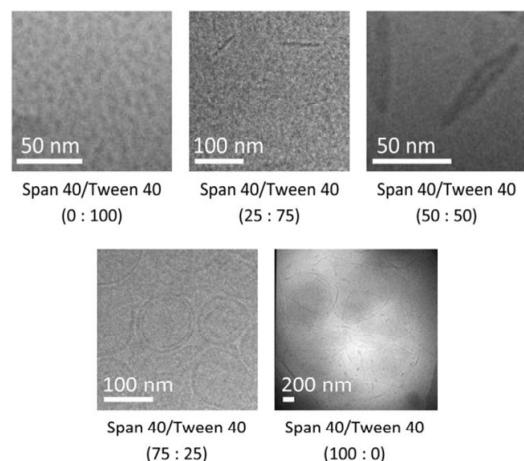


Fig. 2 cryo-TEM による自己集合体の観察。混合する Span 40 の割合を増加させることでミセルからベシクルへと変化した。

^1H NMR による測定の結果、ミセルは運動性が高く動的なものに対し、ベシクルは運動性が低いことが明らかとなった。ミセルの場合では各スペクトルの半値幅は小さく、ベシクルへと構造が変化するに伴い、半値幅は増大した (Fig. 3)。また 20 °C の場合では、Span 40 と Tween 40 から構成されるベシクルの NMR スペクトルは測定されなかった。これは、Span 40/Tween 40 ベシクルがゲル相と呼ばれる固い相を形成しているため、測定できなかったと考えられる。しかし、温度を 50 °C まで上昇させた場合ではゲル相から液晶相へと変化するため、NMR スペクトルは観察された。この相転移温度の存在は、DSC の結果からも示唆される。また、Laurdan による測定結果から、ミセルとベシクルの疎水領域における親水・疎水性を評価した場合では、ミセルの方がベシクルよりも GP_{340} 値が低かった (Fig. 4)。つまり、ミセルの方がより親水的であることが明らかとなった。これはミセルの方がより動的な構造のため、容易に水分子が疎水領域に侵入しやすいためであると考えられる。

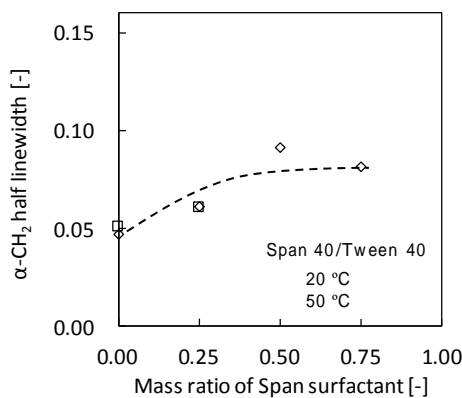


Fig. 3 ^1H NMR による分子運動性の評価。α 水素の運動性を NMR スペクトルによる半値幅により評価したところ、Span 系界面活性剤の混合比が増加するにともない、半値幅は増大した。つまり、分子の運動性は低下した。

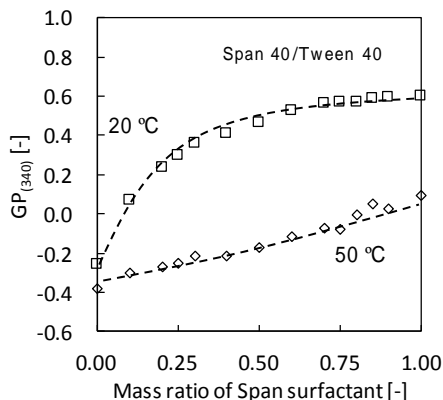
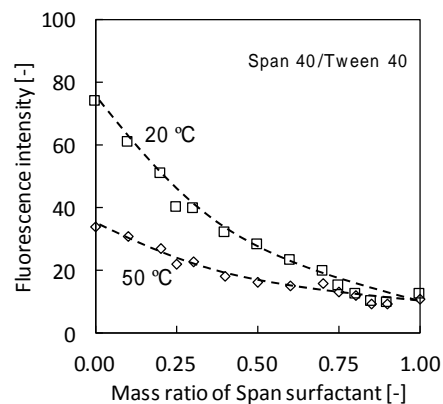


Fig. 4 Laurdan による Span 40/Tween 40 系自己集合体の親水・疎水性評価。

この特性は薬剤封入に大きく影響していると考えられる。ミセルは疎水性分子である Rho 6G を疎水領域内に速やかに取り込むがベシクルの場合ではその速度は遅かった。また、ANS を用いた検討の場合では、ベシクルと混合するよりもミセルと混合する方が高い蛍光強度を示した (Fig. 3(a))。ANS は疎水性環境であるほど高い蛍光強度を示すことが知られており、ANS はミセルと混合した方がより疎水的な環境に存在するということが明らかとなった。上記で述べた通り、ミセルの方が動的な構造であり、Laurdan を用いた検討からもミセルの方がより水分子が疎水領域に侵入しやすく、親水的な環境であることが示されていたが、全く逆の結果となった。これは、ANS が水分子と同様にミセルの内部に侵入しやすいのに対してベシクルの場合では ANS がベシクル膜内部にまで侵入せず、膜表面に留まっていたと考えられる。

(a)



(b)

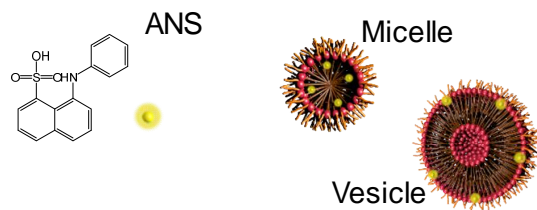


Fig. 3 (a) 各自己集合体と相互作用した場合の ANS 蛍光強度。ミセルの場合では高い蛍光強度を示すのに対し、ベシクルの場合では蛍光強度は低い。(b) ミセルおよびベシクルの ANS 封入モデル。ミセルの場合では ANS は内部にまで入り込むが、ベシクルの場合では ANS はベシクル膜表面に存在すると考えられる。

Albumin を各自己集合体に添加して混合した後、トリプトファン蛍光測定と CD スペクトル測定を行ったところ、優位な変化は観察されなかった。細胞との相互作用を考えた場合、より動的なミセルの方が細胞と相互作用しやすく、より多くの薬剤が送達可能であると考えられるが、実際にはベシクルの方がより多く細胞に取り込まれた。この原因は粒子径などが影響していると考えられるが詳細なメカニズムは未だ明らかではない。さらなる検討が必要である。

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2件)

Keita Hayashi, Hideka Iwai, Toshiyuki Kamei, Ayako Kato, Yusuke Murata, Hidemi Nakamura, Hiroshi Umakoshi, 査読有, *Colloids Surf. B*, **144**, 33-37 (2016)

DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.078

Keita Hayashi, Hideka Iwai, Toshiyuki Kamei, Kaede Iwamoto, Toshinori Shimanouchi, Sakiko Fujita, Hidemi Nakamura, Hiroshi Umakoshi, 査読有, *Colloids Surf. B*, **152**, 269-276 (2017)

DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.01.012

[学会発表](計13件)

分離技術会年会 2015 (2015年5月, 神奈川) "構造依存的な物理化学的特性解析に基づいた非イオン界面活性剤から成るソフトマテリアルのデザイン" 林 啓太, 盤井秀香, 加藤 綾子, 藤田 咲子, 馬越 大, 中村 秀美

第30回日本DDS学会学術集会 (2015年7月, 東京) "目的に適した薬剤カプセルの調製を目指して 非イオン性界面活性剤を用いた自己集合体の選択的調製と特性評価に基づいた薬剤カプセルへの応用" 林 啓太, 盤井 秀香, 島内 寿徳, 馬越 大, 岩崎 智之, 加藤 綾子, 藤田 咲子, 中村 秀美

化学工学会 第47回秋季大会 (2015年9月, 北海道) "目的に適した薬剤カプセルの選択的な調製を目指して" 林 啓太, 盤井秀香, 加藤 綾子, 中村 秀美

膜シンポジウム 2015 (2015年11月, 兵庫)" 界面活性剤を基本とする自己集合体の構造・特性制御と薬剤カプセルへの応用" 林 啓太, 盤井 秀香, 加藤 綾子, 中村 秀美

The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem) (2015, 12, Hawaii, USA) "Design of Self-assembling

Complexes Based on Formation-Dependant Physicochemical Properties for Application as Biomaterials" Keita HAYASHI, Hideka IWAI, Toshinori SHIMANOUCI, Toshiyuki KAMEI, Hiroshi UMAKOSHI, Ayako KATO, Tomoyuki IWASAKI, Hidemi NAKAMURA

化学工学会 第81年会 (2016年3月, 大阪) "構造依存的特性に基づいた自己集合体の Albumin との相互作用評価" 村田 祐輔, 林 啓太, 加藤 綾子, 中村 秀美

日本膜学会 第38年会 (2016年5月, 東京) "構造依存的特性に基づいた薬剤カプセルのデザインと応用" 林 啓太, 村田 祐輔, 加藤 綾子, 中村 秀美

分離技術会 年会 2016 (2016年5月, 千葉) "自己集合体の構造依存的特性と薬剤封入への影響" 林 啓太, 加藤 綾子, 村田 祐輔, 中村 秀美

第32回日本DDS学会学術集会 (2016年7月, 静岡) "薬剤カプセルの構造と Albumin との相互作用の関係" 林 啓太, 村田 祐輔, 加藤 綾子, 中村 秀美

The 10th Conference of Aseanian Membrane Society (AMS10) (2016, 7, Nara, Japan) "Preparation and Characterization of Self-assembled Aggregates and Application as a Drug Carrier" Keita Hayashi, Hideka Iwai, Yusuke Murata, Ayako Kato, Hidemi Nakamura

化学工学会 第48回秋季大会 (2016年9月, 徳島) "構造依存性特性に基づいた自己集合体における薬剤封入効率の評価" 村田 祐輔, 林 啓太, 加藤 綾子, 中村 秀美

The Symposium series of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC) (2016, 10, Miyazaki, Japan) "Relationship between formation of self-assembled aggregates and encapsulation efficiency based on formation-dependent properties" Yusuke Murata, Keita Hayashi, Ayako Kato, Hidemi Nakamura

第20回化学工学会学生発表会 (東広島大会) (2018年3月, 広島) "Span 20/Tween 20系界面活性剤からなる自己集合体内部の階層的極性評価" 杉村 春奈, 林 啓太, 亀井稔之, 島内 寿徳, 中村 秀美

化学工学会 第83年会 (2018年3月, 大阪) "構造依存的特性に基づいた自己集合体の薬剤カプセルへの応用" 村田 祐輔, 林 啓太, 盤井 秀香, 中村 秀美

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 啓太 (HAYASHI, Keita)

奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・講師

研究者番号：10710783