

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：11201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2013

課題番号：23750233

研究課題名（和文）層状複水酸化物ナノスフィアの合成と新規なドラッグデリバリー材料への応用

研究課題名（英文）Synthesis and characterization of layered double hydroxide nanosphere and its application for novel drug delivery material

研究代表者

會澤 純雄（AISAWA SUMIO）

岩手大学・工学研究科・助教

研究者番号：40333752

研究成果の概要（和文）：ドラッグデリバリー材料への応用が期待される層状複水酸化物（LDH）を用い、LDH を介した細胞内への薬剤輸送効率の向上を目的とし、カーボンナノスフィアをテンプレートに用いた LDH ナノスフィア（LDH-NS）の合成、LDH-NS への抗がん剤（5-FU）の取り込みならびに 5-FU/LDH-NS の細胞毒性について検討した。その結果、LDH-NS の合成に成功し、LDH-NS への 5-FU の取り込み方法を確立した。さらに、5-FU/LDH-NS の細胞毒性は HeLa 細胞（ヒト子宮頸がん由来）に対して、5-FU に比べ約 3 倍高くなることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Layered double hydroxide (LDH) has been considerable attentions as materials for drug delivery in pharmaceutical field. In this study, the synthesis of LDH nanosphere (LDH-NS) by using carbon nanosphere template and the intercalation of anticancer drug, 5-fluorouracil (5-FU), into the LDH-NS by the reconstruction method have been investigated in order to promote the cellular uptake of 5-FU. The XRD patterns of the 5-FU/LDH-NS showed that the interlayer distance was expanded with the intercalation of 5-FU. The results of HeLa cytotoxicity assay indicated that the 5-FU/LDH-NS performed well cytostatic effect, which is three times higher than that of 5-FU.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学・無機工業材料

キーワード：層状・層間化合物，ドラッグデリバリーシステム，抗がん剤，カーボンナノスフィア，細胞毒性

## 1. 研究開始当初の背景

新薬の開発には多額な予算が必要であり、また、薬剤の特許切れに伴う収入減や審査厳格化にともなう承認遅延のため、新薬の開発環境は難しくなりつつある。これらの問題を解決するために、既存の薬剤を患部や標的部位へ任意の時間・量を制御しながら徐放させることで薬理効率を向上させるドラッグデリバリーシステム（DDS）が注目されている。DDS の目標は、薬剤の投与形態を工夫し、薬剤を必要ときに、必要な場所へ、必要な量だけを標的部位へ到達させ、副作用を低減させる

ことである。これらの条件を満たすために、ドラッグデリバリー材料に付与したい機能は、(1) 薬剤の放出制御、(2) 薬剤の標的指向（ターゲティング）、(3) 薬剤の吸収促進、(4) 薬剤の安定化である。現在、薬剤や遺伝子デリバリーを目的としたナノ粒子に関する研究・開発が行われており、ナノレベルでその構造を制御した様々なドラッグデリバリー材料が報告されている。例えば、アデノウィルスやレトロウィルスなどのウィルスベクターおよびリポソーム、高分子ミセル、カーボンナノホーンなどの非ウィルスベクターを

用いた研究・実用例も報告されている。しかし、いずれも副作用、安全性、安定性、細胞への輸送効率、コストなどの問題や新しい機能付与が必要である。

一方、各種無機ナノ粒子はドラッグデリバリー材料への応用が期待されており、なかでも無機層状化合物は医薬品において外用薬の基剤、内服薬の主剤・添加剤として利用されている。本研究で用いた層状複水酸化物(LDH)は、無機層状化合物の一種であり、(1)多種多様なゲスト分子をその層間へ取り込むことができる、(2)取り込んだゲスト分子を徐放できる、(3)層間のゲスト分子の安定性を向上させるなどの性能を持っている。そのため、LDHの層間はナノレベルで制御可能な分子貯蔵領域として利用することが可能であり、薬剤のコンテナやデリバリー材料への応用を目指した研究が注目されている。LDHへの薬剤の取り込みに関する研究は活発に行われているが、薬剤/LDHの細胞毒性や細胞への薬剤の輸送効率の向上に関する研究例は少ない。とくに、細胞への無機ナノ粒子の輸送機構の解明はドラッグデリバリー材料を設計する上で重要なポイントである。細胞は細胞外の物質を細胞内へ取り込む機構であるエンドサイトーシスにより必要な物質を細胞内へ取り込み、その経路は取り込む物質の大きさや作用する受容体により変化することがわかっている。しかし、エンドサイトーシスを介したLDHの細胞内輸送におよぼすLDHの粒子形状や粒子径の影響ならびに細胞内におけるLDHの挙動については明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

高性能なドラッグデリバリー材料を構築するためには、細胞への吸着、エンドサイトーシスの経路、エンドソームからの脱出、細胞内における薬剤放出、核移行など細胞の内外の動態を制御することが重要な課題である。本研究では、とくにエンドサイトーシスによる細胞へ取り込まれやすいLDHの形状ならびにサイズの最適化を目的とし、有機テンプレート法によるLDHナノスフィア(LDH-NS)の合成を試みた。また、これに抗がん剤を取り込ませた、抗がん剤/LDH-NSの合成も行い、ドラッグキャリアとしての性能評価を検討した。各年度に実施した項目は以下のとおりである。

平成 23 年度

- (1) LDH-NS の合成法の確立
- (2) LDH-NS の細胞内への取り込み挙動ならびに細胞毒性について

平成 24 年度

- (1) LDH-NS への抗がん剤の取り込み挙動
- (2) 抗がん剤/LDH-NS の合成方法の確立と複合体の細胞毒性

## 3. 研究の方法

### (1) LDH-NS の合成

①LDH-NS の合成に必要な有機テンプレートとなるカーボンナノスフィア(CNS)の合成を試みた。CNSはD-グルコース水溶液を水熱処理することで、D-グルコースの脱水・重合・炭化により合成した。CNSはLDH-NSの粒子サイズを決定するコア材料となるため、CNSの合成条件(D-グルコース濃度、水熱温度、反応時間)が粒子サイズにおよぼす影響を調べ、粒径600-700 nmと300-400 nmの二種類のCNSを実験に用いた。

②Mg-Al系LDH(Fig. 1)は、小粒径のLDHを合成できる、メタノール溶媒を用いた共沈法により作製した。

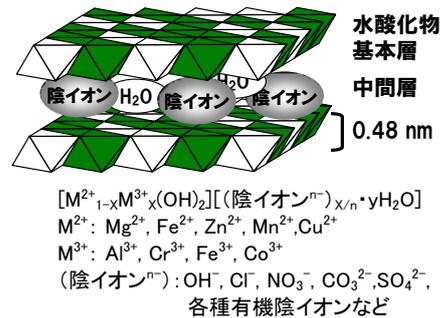


Fig. 1 Structure and chemical formula of LDH.

③LDH-NSの前駆体となるCNS/LDHは、前述のCNSとLDHをメタノールに分散し、表面が負電荷のCNSを正電荷のLDHにより被覆することで合成した。その際、被覆するLDHの厚さや量などの制御を試みた。

### (2) LDH-NS への抗がん剤の取り込み

LDH-NSへの抗がん剤の取り込みは再構築法により行った。CNS/LDHを500°C、3h焼成することでCNSを除去し、LDH-NS酸化物とした。LDH-NS酸化物を抗がん剤(5-fluorouracil, 5-FU)水溶液に加え、24h振とうすることでLDH構造を再構築させ5-FU/LDH-NS

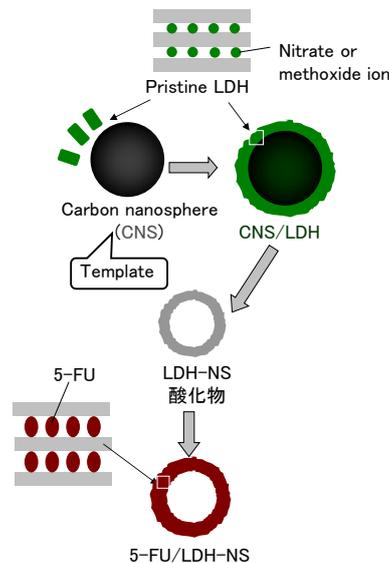


Fig. 2 Experimental procedure of LDH-NS.

を合成した。

各生成物は、XRD, FT-IR, DLS, SEM, TEM などによって評価した。Fig. 2 に合成方法のスキームを示す。

### (3) 細胞毒性試験

各種 LDH の細胞毒性試験は WST-8 法を用いて評価した。なお、試験には HeLa 細胞 (ヒト子宮頸がん由来) を用いた。

WST-8 法: 96 ウェルプレートに播種した細胞に LDH を所定量分散させた培地を添加し、インキュベーター内で培養する。所定時間培養した後、細胞計数試薬を添加し発色させ、マイクロプレートリーダーを用い、所定波長により吸光度を測定することで細胞の生存率を相対的に求めた。

## 4. 研究成果

### (1) CNS/LDH の合成

LDH の合成について検討を行った結果を示す。合成した LDH の組成は、化学分析により以下のとおりである。

$[Mg_{0.68}Al_{0.32}(OH)_2](NO_3)_{0.05}(CH_3O)_{0.32} \cdot xH_2O$   
この結果から、生成物の  $Mg^{2+}$  と  $Al^{3+}$  のモル比はおよそ仕込み比と一致し、 $Mg^{2+} : Al^{3+} = 2 : 1$  であることが示された。層間に取り込まれた陰イオンは、原料の硝酸塩由来の硝酸イオンとメタノール由来のメトキシドイオンと考えられた。XRD の結果 (Fig. 3 Pristine LDH) から、LDH 構造を示す面間隔  $d_{003}$ ,  $d_{006}$  および  $d_{009}$  の倍角な回折ピークがそれぞれ見られ、LDH の生成が確認された。面間隔値 0.92 nm は硝酸型 LDH のとりうる範囲内の値であるが、層間に硝酸イオンとメトキシドイオンも取り込まれているため、面間隔値はわずかに拡大したと考えられた。FT-IR スペクトル図か

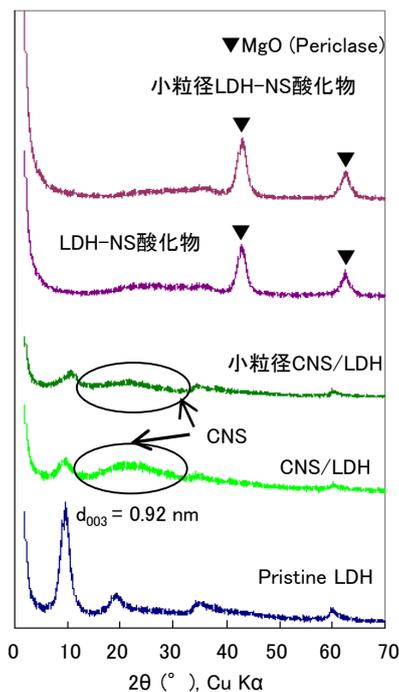


Fig. 3 XRD patterns of solid products.

らも、LDH 基本層および層間水に起因する OH 伸縮振動、OH 変角振動の吸収ピークがそれぞれ  $3400\text{ cm}^{-1}$  付近と  $1600\text{ cm}^{-1}$  付近に見られた。また、 $2900\text{ cm}^{-1}$  付近にメトキシドイオン、 $1385\text{ cm}^{-1}$  に硝酸イオン由来の吸収ピークが観察された。

CNS の合成について示す。様々な合成条件を検討した結果、D-グルコース水溶液を  $180^\circ\text{C}$  で所定時間、水熱処理にすることで CNS の黒褐色粉末を得た。SEM 写真 (Fig. 4 CNS) から、球状粒子である CNS の生成が確認された。CNS は直径約  $600\text{--}700\text{ nm}$  で、ほぼ全てが良好な球状であることが示された。水熱処理時間 12 h の CNS は 24 h の場合と大きさが変わらず直径  $600\text{--}700\text{ nm}$  であったのに対し、水熱処理時間 6 h の CNS は直径約  $300\text{--}400\text{ nm}$  とサイズの小さい粒子が得られた。また、CNS の表面はいずれも滑らかであった。

SEM 写真から (Fig. 4 CNS/LDH)、CNS 表面に LDH が膜状に付着している様子がみられ、CNS を LDH で被覆することで CNS/LDH を作製した。XRD 図 (Fig. 3 CNS/LDH と小粒径 CNS/LDH) からは LDH 構造を示す回折パターンと CNS によるアモルファス構造に由来するブロードなパターンが観察され、FT-IR スペクトル図からも複合化を示す吸収ピークが見られた。CNS/LDH のサイズは鑄型の CNS に依存することも SEM 写真からわかった。

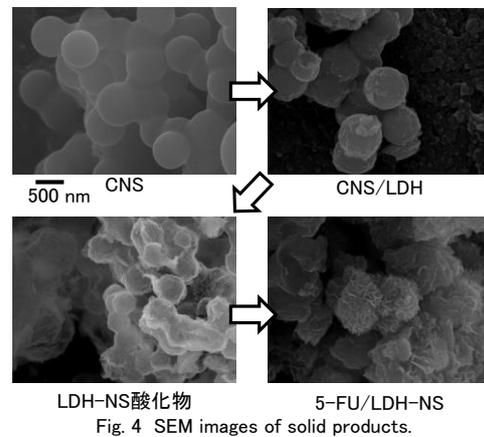
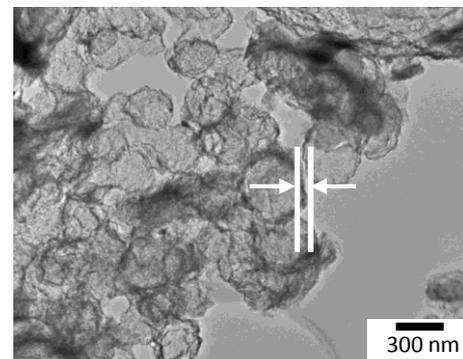


Fig. 4 SEM images of solid products.



Diameter of LDH-NS: 300-450 nm  
Thickness of LDH-NS: 20-30 nm

Fig. 5 TEM image of LDH-NS oxide.

CNS/LDH は CNS に由来する黒褐色粉末であるが、焼成後は白色粉末となった。CNS/LDH を焼成した LDH-NS 酸化物の SEM 写真を Fig. 4, LDH-NS 酸化物, TEM 写真を Fig. 5 に示す。形状観察の結果から、LDH-NS 酸化物の粒子は球殻形状を焼成後に保持しており、中空であることがわかった。球殻形状となっている部分は直径約 300–450 nm, LDH の厚さは 20–30 nm 程度であった。また、小粒径 CNS/LDH 酸化物についても、直径約 100–150 nm の中空 LDH-NS 酸化物が得られた。しかし、一部板状粒子や凝集部分が観察され、焼成に伴う球殻構造の崩壊が示された。小粒径 LDH-NS 酸化物においても焼成に伴い、球殻構造は破壊され、凝集部分が多くなることがわかった。また、CNS/LDH 質量比が 1.50 の CNS/LDH を焼成した場合、球殻粒子が多く、再構築の前駆体として適していることも明らかとなった。

LDH-NS 酸化物および小粒径 LDH-NS 酸化物の XRD 図 (Fig. 3) では、LDH および CNS にみられていた回折ピークが消失し、MgO (Periclase) の回折ピークが確認され、LDH 酸化物であることが示された。FT-IR スペクトル図からはどちらも炭酸イオンおよび水分の吸着によると思われる吸収ピークが観察された。

#### (2) LDH-NS への抗がん剤の取り込み

前述のとおり、LDH-NS 酸化物が得られたので、つぎに再水和反応にともなう LDH-NS への 5-FU の取り込みについて検討を行った。固体生成物の XRD 図を Fig. 6 に示す。比較として、NaCl 水溶液による、Cl/LDH-NS の合成も行った。その結果、粒径に関わらず再水和反応に伴い LDH 構造が再構築され、その面間隔値は 5-FU/LDH-NS では 0.80 nm であった。この値は、共沈法またはイオン交換法で合成した 5-FU/LDH の面間隔値と一致した。Fig. 7 に 5-FU/LDH-NS の層間予想図を示す。この際、5-FU は LDH 基本層に対して水平に配向して LDH 層間に取り込まれていると考えられた。また、NaCl 水溶液を用いた場合、結晶化した NaCl の回折ピークも観察されたが、面間隔値は 0.81 nm となり文献値とも一致した。SEM 写真 (Fig. 4 5-FU/LDH-NS) から、凝集がみ

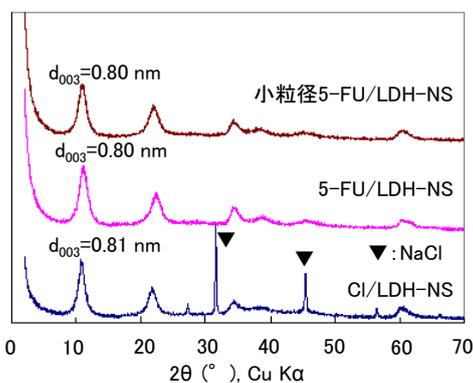


Fig. 6 XRD patterns of solid products.

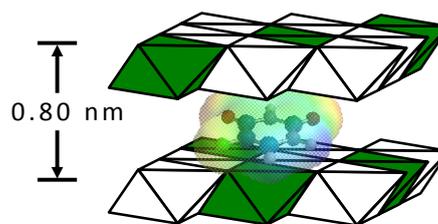


Fig. 7 Schematic model of 5-FU/LDH-NS.

られるものの、球殻形状を保持し、その表面にはサンゴ状の凹凸が観察された。通常 LDH の結構形態は六角板状であり、このような形状はこれまでに報告例のない結果である。

各種 LDH の粒度分布ならびに ζ-電位の結果を Table 1 に示す。小粒径 LDH-NS 酸化物については、大部分が測定用セル内で沈降し、水中に分散せず測定できなかったことから、数十 μm 以上の凝集体であると予想された。5-FU/LDH-NS の平均粒径は 728 nm であった。また、通常イオン交換法または共沈法で合成した 5-FU/LDH の粒径はそれぞれ 10–20 μm であるという報告もあることから、今回合成した 5-FU/LDH-NS は粒径が小さく、分散性も高いことが示唆された。また、ゼータ電位の測定結果から、5-FU/LDH-NS および Cl/LDH-NS は表面が正に帯電していることが明らかとなった。粒子の分散性はドラッグデリバリー材料の基材としての性質に関して重要なファクターであり、分散性の高い LDH-NS の有用性が期待できる結果である。

Table 1 Average particle size and ζ-potentials of LDH

Solid product	Average particle size (nm)	ζ-potential (mV)
Cl/LDH-NS	577	+41.0
5-FU/LDH-NS	728	+39.0
Plate 5-FU/LDH	652	+40.2

#### (3) 5-FU/LDH-NS の細胞毒性試験

つぎに、5-FU/LDH-NS の細胞毒性について述べる。

WST-8 法による 5-FU/LDH-NS の HeLa 細胞に対する細胞毒性試験の結果を Fig. 8 に示す。半数致死濃度である LC<sub>50</sub> を比較すると、Cl/LDH-NS は添加量が増加しても細胞の生存率に変化はなく、LDH 自体の毒性は低いことが明らかとなった。5-FU/LDH-NS の場合、5-FU ならびに板状 5-FU/LDH に比べ細胞毒性が高くなり、その効果は約 3 倍増加することが明らかとなった。Fig. 9 に示した細胞切片の TEM 写真から、5-FU/LDH-NS がエンドサイトーシスによって細胞内に移行し、エンドソームを形成する様子が観察された。

5-FU/LDH-NS の細胞毒性の向上は、細胞内へ輸送された LDH がエンドソームやリソソーム内の pH の低下に対し、LDH の溶解とその pH 緩衝効果、いわゆる高分子ミセル系のドラッグデリバリー材料で見られる「プロトンスポンジ効果」と同様な性質を発現し、細胞内における 5-FU の放出量の増加に起因すると考えられた。しかし、LDH の形状やサイズがエンドサイトーシスならびに細胞内への輸送効率の向上におよぼす影響については解明することができなかった。これらを明らかにするため、阻害剤を用いた受容体の判別やエンドサイトーシスに關与する膜たんぱく質の特定、*in vivo* の評価な

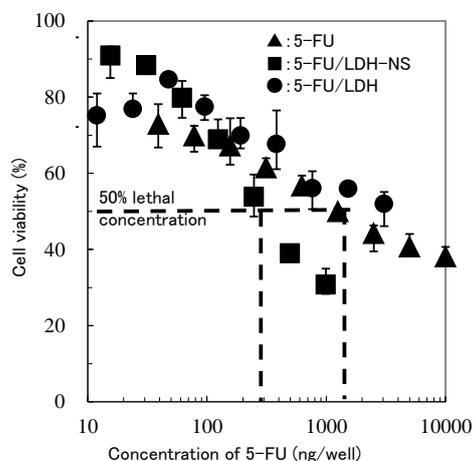


Fig. 8 Cell viability of HeLa cell for 5-FU.

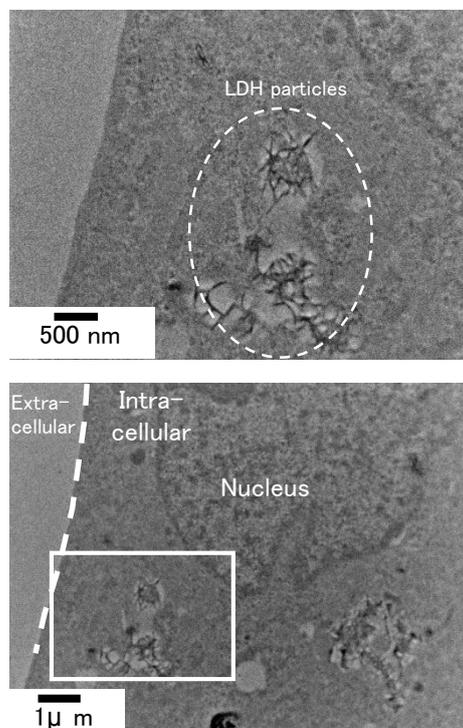


Fig. 9 TEM images of cellular section after incubation for 1 h.

ども必要である。今後、LDH が高機能性ドラッグデリバリー材料として応用・発展するようにこれらの課題解決に向けて取り組む予定である。

#### 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 4 件)

- ① 會澤純雄, 層状無機ナノ粒子を用いたドラッグデリバリー材料の開発, 化学と工業, 査読無, **66**, 214-215 (2013)
- ② M. Tanaka, S. Aisawa, H. Hirahara, E. Narita, S. Yin, T. Sato, Cellular Uptake Behavior of Fluorescein-intercalated Layered Double Hydroxide, *Functional Mater. Lett.*, 査読有, **5** (2012)  
DOI: 10.1142/S179360471260003X
- ③ 平原英俊, 會澤純雄, 成田榮一, 陰イオン性粘土(層状複水酸化物)を用いるエコナノ材料の創製, 粉体工学会誌, 査読無, **49**, 39-49 (2012)
- ④ 會澤純雄, 安武愛子, 高橋諭, 平原英俊, 成田榮一, ペプチド/抗がん剤/層状複水酸化物ナノ複合体の合成とその細胞毒性, *J. Soc. Inorg. Mater., Japan*, 査読有, **19**, 230-236 (2012)

〔学会発表〕(計 19 件)

- ① 會澤純雄, 菊池亮太, 菅大輔, 高橋諭, 平原英俊, 成田榮一, 中空構造を有する抗がん剤/層状複水酸化物の合成とその細胞毒性効果, 日本化学会第93春季年会, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県), 2013. 3. 24
- ② 田中みゆき, 會澤純雄, 董強, 殷しゅう, 平原英俊, 成田榮一, 佐藤次雄, 層状複水酸化物ナノ複合体の細胞内動態, 日本化学会第93春季年会, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県), 2013. 3. 23
- ③ 會澤純雄, 菅大輔, 高橋海, 高橋諭, 平原英俊, 成田榮一, 球殻構造を有する抗がん剤/層状複水酸化物の合成とその細胞毒性, 第51回セラミックス基礎科学討論会, 仙台国際センター(宮城県), 2013. 1. 9
- ④ 會澤純雄, 菅大輔, 平原英俊, 成田榮一, 佐藤次雄, 抗がん剤/層状複水酸化物ナノスフィアの合成とその細胞増殖抑制効果, 第12回東北大学多元物質科学研究所研究発表会, 東北大学片平さくらホール(宮城県), 2012. 12. 10
- ⑤ 菅大輔, 高橋海, 會澤純雄, 高橋諭, 平原英俊, 成田榮一, 球殻構造を有する抗がん剤/層状複水酸化物の合成とその

- 細胞内移行, 平成24年度日本セラミックス協会東北北海道支部発表会, 岩手大学復興祈念銀河ホール(岩手県), 2012. 11. 9
- ⑥ 高橋 海, 會澤純雄, 平原英俊, 成田榮一, 佐藤次雄, 抗がん剤/層状複水酸化物ナノスフィアの合成と抗がん剤輸送への応用, 平成24年度化学系学協会東北大会, 秋田大学手形キャンパス (秋田県), 2012. 9. 16
- ⑦ 菊池亮太, 會澤純雄, 高橋 諭, 平原英俊, 成田榮一, カーボンナノスフィアの化学修飾と細胞内への輸送, 平成24年度化学系学協会東北大会, 秋田大学手形キャンパス (秋田県), 2012. 9. 15
- ⑧ 阿部朋子, 會澤純雄, 高橋 諭, 平原英俊, 成田榮一, 田中みゆき, 佐藤次雄, ポルフィリン類/Mg-Al 系層状複水酸化物の合成と物理化学的特性, 平成24年度化学系学協会東北大会, 秋田大学手形キャンパス (秋田県), 2012. 9. 15
- ⑨ S. Aisawa, D. Suga, S. Takahashi, H. Hirahara, E. Narita, Synthesis and Cytotoxicity of 5-Fluorouracil-intercalated Layered Double Hydroxide Hollow Nanosphere, The 2nd Asian Clay Conference, Ewha Womans University, Seoul, Korea, 2012. 9. 6-8
- ⑩ S. Aisawa, D. Suga, Satoshi T., H. Hirahara, E. Narita, Synthesis and Its Cytotoxicity of Hollow 5-Fluorouracil-intercalated Layered Double Hydroxide Nanosphere, ICTA2012, The Emerald Hotel, Bangkok, Thailand, 2012. 8. 23
- ⑪ 會澤純雄, 菊池亮太, 堀田真人, 高橋諭, 平原英俊, 成田榮一, カーボンナノスフィアの合成とその細胞内への輸送, 第28回日本DDS学会, 札幌コンベンションセンター (北海道), 2012. 7. 5
- ⑫ 菅 大輔, 會澤純雄, 高橋 諭, 平原英俊, 成田榮一, 層状複水酸化物ナノスフィアの合成とその細胞毒性, 無機マテリアル学会第124回講演会, 船橋市民文化創造館 (千葉県), 2012. 6. 8
- ⑬ 會澤純雄, 堀田真人, 高橋 諭, 平原英俊, 成田榮一, カーボンナノスフィアの合成とその細胞毒性, 日本化学会第92春季年会, 慶應義塾大学日吉キャンパス・矢上キャンパス (神奈川県), 2012. 3. 25
- ⑭ 菅 大輔, 會澤純雄, 高橋 諭, 平原英俊, 成田榮一, 層状複水酸化物ナノスフィアの合成とドラッグデリバリーへの応用, 第49回粉体に関する討論会, いわて県民情報交流センター アイーナ (岩手県), 2011. 11. 16
- ⑮ 會澤純雄, 堀田真人, 高橋 諭, 平原英俊, 成田榮一, カーボンナノスフィアの合成とドラッグデリバリー材料への応用, 第49回粉体に関する討論会, いわて県民情報交流センター アイーナ (岩手県), 2011. 11. 16
- ⑯ D. Suga, S. Aisawa, S. Takahashi, H. Hirahara, E. Narita, Fabrication and Characterization of Hollow 5-Fluorouracil/Layered Double Hydroxide using Carbon Nanosphere Template, Euroclay 2011, Antalya, Turkey, 2011. 6. 28
- ⑰ S. Aisawa, J. Kumasaka, S. Takahashi, H. Hirahara, E. Narita, Synthesis and Cytotoxicity of 5-Fluorouracil Intercalated Layered Double Hydroxide Nanohybrid Particles, Euroclay 2011, Antalya, Turkey, 2011. 6. 28
- ⑱ 會澤純雄, 熊坂 惇, 高橋 諭, 平原英俊, 成田榮一, 表面修飾した抗がん剤/層状複水酸化物の合成とその細胞毒性, 第27回日本DDS学術集会, 東京大学本郷キャンパス (東京都), 2011. 6. 9
- ⑲ 會澤純雄, 熊坂 惇, 高橋 諭, 平原英俊, 成田榮一, 抗がん剤/層状複水酸化物ナノ複合体の合成とその細胞増殖抑制効果, 無機マテリアル学会 第122回学術講演会, 船橋市民文化創造館 (千葉県), 2011. 6. 3

[その他]

ホームページ等

[http://www.eng.iwate-u.ac.jp/jp/seeds/docs12/12\\_sumio\\_AISAWA\\_1.pdf](http://www.eng.iwate-u.ac.jp/jp/seeds/docs12/12_sumio_AISAWA_1.pdf)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

會澤 純雄 (AISAWA SUMIO)  
岩手大学・工学研究科・助教  
研究者番号: 40333752