

生体イオン媒体からなる生体適合性DDS製剤の開発

大分大学 理工学部理工学科

信岡 かおる

1. はじめに

イオン液体(Ionic liquids, ILs)は室温で液体となる塩であり、フルオラス流体や超臨界流体と共に水や有機溶媒に代わる次世代媒体として、有機合成や電気化学へを始めとする多様な分野への応用が報告されてきた。近年、イオン液体と同じイオン物質であり、水素結合供与体(Hydrogen-bond donor, HBD)と水素結合受容体(Hydrogen-bond acceptor, HBA)間の水素結合形成による共晶融点降下により液体化する深共晶溶媒(Deep eutectic solvents, DESs)が仲間に加わり、混ぜ合わせるだけで調製可能な簡便さも相まって、研究が急速に拡大している。我々のグループではこれらを“イオン媒体”と総称し、生命体の媒体は水であるという既存概念を破り、生体分子のみから構成される生体適合性を持つイオン液体(IL)や深共晶溶媒(DES)中での生命科学を探究する新しい研究領域、「生体イオン媒体生命科学」の創出に取り組んでいる。現在の創薬、生命科学では利便性や効率に重きを置いて、毒性やアレルギーの原因になるジメチルスルホキシド(DMSO)やポリエチレングリコール(PEG)などの物質が多用されている。我々が提案する領域では生体分子のみで構成される生体イオン媒体を、安全安心な材料として、創薬、生命科学へ展開する。

現在、ドラッグデリバリーシステム(Drug delivery system, DDS)ではキャリアに生分解性ポリマーや脂質ナノ粒子、タンパク質などが用いられ、安定性や生体親和性向上のためPEGで表面修飾する手法が採用されている。しかし、先に述べたようにPEGはアレルゲンでありアナフィラキシーショックを引き起こす。一方、生体イオン媒体は、生体親和性、生分解性、ナノ粒子化も可能なデザイン性、細胞膜透過性に優れている。また、イオン化合物のため、DDS製剤が水中で安定に分散可能である。本研究では生体イオン媒体のこれら優位性に着目し、安全安心なDDS製剤を提供する。

2. イオン液体微粒子(DDS キャリア)の作成

イオン液体はカチオンとアニオンから構成される。生体イオン媒体の基本骨格となる生体分子には、コリン類や脂肪酸、アミノ酸類などが挙げられるが、本研究ではコリン類(アセチルコリンを含む)に焦点を当て、架橋部位を導入したモノマーを懸濁重合することでイオン液体微粒子の獲得を目指した。

**らの報告を参考に¹⁾、モノマーとなる生体由来のアセチルコリン誘導体であるイオン液体[MTMA][TFSI]を合成した後、ラジカル開始剤にAIBN、分散安定剤にPVPを用いて懸濁重合することで微粒子であるpoly[MTMA][TFSI]を得た。懸濁重合においてはモノマーと溶媒との親和性が粒子形成に影響を及ぼし、一方、アルコールのアルキル鎖が長くなるとイオン液体との親和性が低下する^{2, 3)}。そこで、溶媒にメタノール、エタノール、及び

表 1. 懸濁重合で得られた生体イオン媒体微粒子 poly[MTMA][TFSI] の粒子サイズに与える溶媒効果

エントリー	MeOH/g	EtOH/g	反応時間/h	数平均直径/ μm	収量/g
a	0	5.0	5	1.85	0.48
b	0	5.0	10	3.10	0.40
c	2.5	2.5	5	1.93	0.38
d	2.5	2.5	10	2.65	0.38

[MTMA][TFSI] 1.1 mmol, AIBN 10 mg, PVP 45 mg
 攪拌子 $\Phi = 2.0 \text{ cm}$, 回転数 300 RPM, 反応温度 74°C

メタノール/エタノール混合溶媒を用いて粒子径への影響を評価した (表 1)。メタノールを溶媒に用いた場合, 平均粒子直径 $3.64 \mu\text{m}$ の粒子が得られた。しかし, エタノールを用いることで粒子径の減少が観察された (表 1, 図 1)

がん治療への DDS の応用は, がん細胞付近に形成する粗造な新生血管からの透過性による EPR 効果を利用したものが多い。このため, DDS キャリアはサブマイクロサイズである事が望ましい。そこで, イオン液体モノマー [MTMA][TFSI] が疎水性なことを考慮し, 水系媒体中での懸濁重合を試みた。重合剤は溶媒と同じ水溶性の 2,2'-アゾビス[2-メチル-N-(2-ヒドロキシエチル)プロピオンアミド] (VA-086) に変更した (表 2 エントリー e)。

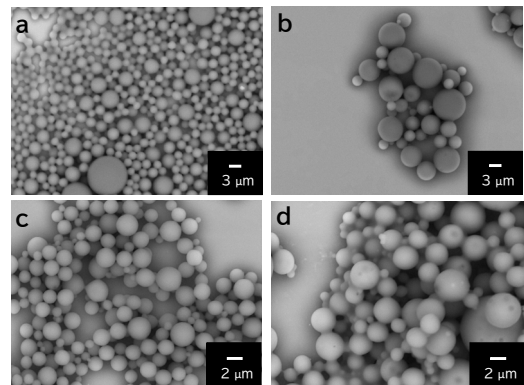


図 1 表 1 の各条件で得られた微粒子の SEM 画像

表 2. 懸濁重合で得られた生体イオン媒体微粒子 poly[MTMA][TFSI] の粒子サイズに与える溶媒効果

エントリー	水/mL	MeOH/mL	反応時間/h	数平均直径/ μm
e	10	0	1	0.60
f	6.4	3.6	1	0.41

反応条件 : [MTMA][TFSI] 2.2 mmol, VA-086 70 mg, PVP 100 mg
 攪拌子 $\Phi = 2.0 \text{ cm}$, 回転数 3500 RPM, 反応温度 74°C

メタノールのメチル基が疎水性相互作用によってポリマー鎖の別の疎水性基と容易に相互作用することを利用し, メタノールの添加による粒子径減少が報告されている⁴⁾。そこでエントリー f ではこれを利

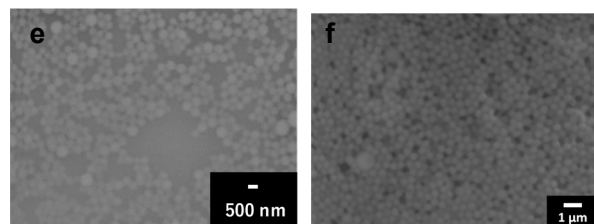


図 2. 表 2 の各条件で得られた微粒子の SEM 画像

用して粒子サイズの減少を試みた。すると平均直径約 400 nm の微粒子が得られた。粒子径の減少については現在も検討中である。

3. イオン液体微粒子への薬物モデルの搭載, および放出挙動

重合によって得られた微粒子への薬剤搭載能を検討した。図 3 に示したように DDS キャリアへの薬剤搭載法は主に, キャリア内部への内包, 表面へのファンデルワールス力などによる物理吸着, DDS キャリアと薬剤を共有結合による担持の 3 つの方法がある。本研究で得られた微粒子へは吸着による搭載能を評価した。搭載量の数値化のため, 蛍光分子を薬剤モデルに用いて蛍光分子を含む溶液の吸収スペクトル変化で評価した。

吸着量は液相の溶質の濃度に依存する。一定の温度で吸着平衡状態にある溶質濃度と吸着量の関係を表したものが吸着等温線であり, 吸着量論を示す最も一般的な方法である。今回は, Langmuir 式 (1) から算出した。

$$W = \alpha W_{\max} C / (1 + \alpha C) \quad (1)$$

W_{\max} ; 最大吸着量, α ; 吸着平衡定数

また, 薬剤モデルとなる蛍光分子には類似構造を持つが電荷状態が異なるローダミン 6G, エオシン Y, フルオレセインを用いた (表 3)。

表 3. 薬物モデルに使用した蛍光分子 (ローダミン 6G (左), エオシン Y (中央), フルオレセイン (右)) の構造, および Langmuir 式から算出した微粒子 1.0 g あたりに対する各蛍光分子の最大吸着量

蛍光色素	微粒子 1.0 g に対する蛍光色素の最大吸着量 W_{\max} ($\mu\text{mol/g}$)	微粒子 1.0 g に対する蛍光色素の最大吸着量 W_{\max} (mg/g)
ローダミン6G	67.3	32.2
エオシンY	14.3	9.89
フルオレセイン	5.46	1.82

本研究で用いた微粒子 poly[MTMA][TFSI] は, カチオンとアニオンからなるイオン性物質である。重合部位をカチオン構造内に設計しているため, 微粒子の周りをアニオンが取り囲んでいる状態が想定される。このため, 正電荷を持つローダミン 6G が静電相互作用により最も効果的に微粒子に吸着したと考えられる。poly[MTMA][TFSI] はアニオンに TFSI

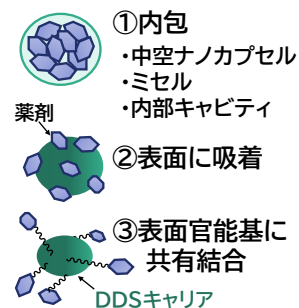
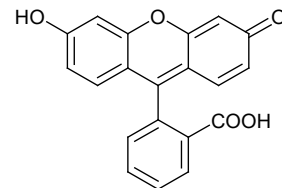
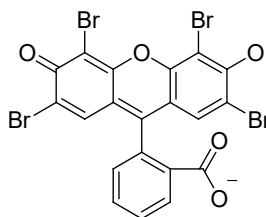
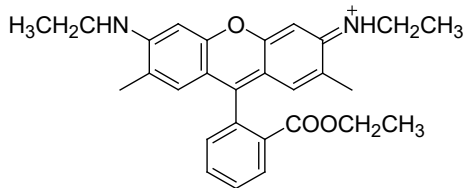


図 3. DDS キャリアへの薬剤搭載法



を持つため疎水性が高い。本吸着実験は水溶液中で行ったが、疎水性相互作用による疎水性薬物の吸着については今後疎水性溶媒を用いて検討する必要がある。

続いて薬剤放出能を検討した。図4はフルオレセインの吸着前(①)後(②)、および吸着後に pH5.0 の PBS 緩衝液中で1時間インキュベートした溶液(③)の吸収スペクトルである。フルオレセイン水溶液の吸収は微粒子へのフルオレセインの吸着により減少する。つまり①から②を差し引いた分が微粒子に結合したフルオレセインに相当する。これをがん細胞が弱酸性のため、やや酸性ががん細胞より強い緩衝液で1時間インキュベートしたところ③に相当するフルオレセインが放出された。本実験ではまだ長期間の放出実験や、ローダミン6G, エオシン Y では実施していないが、薬剤の適切な選択により目的部位への選択的薬剤運搬だけでなく、徐放性 DDS としても期待される。

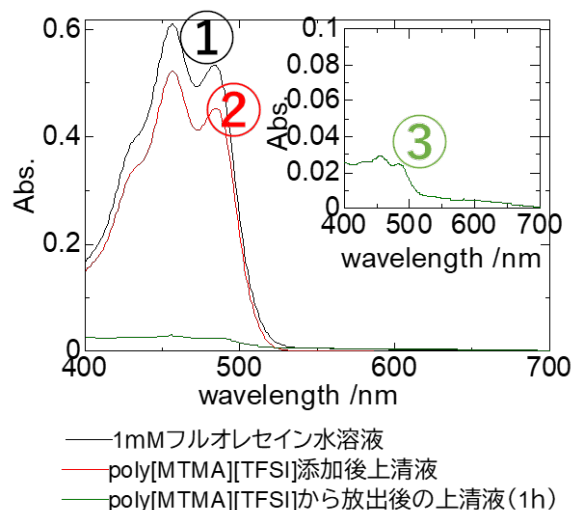


図4. 微粒子へのフルオレセインの吸着, 放出の吸収スペクトルによる観察

4. イオン液体微粒子の生体親和性

poly[MTMA][TFSI]微粒子の生体親和性を子宮頸がん細胞である HeLa 細胞を用いて検討した。粒子は細胞に添加する前にエタノール, もしくは紫外線により滅菌し, 細胞添加72時間後に細胞の形態観察と細胞生存率を WST-1 アッセイによって算出した(図5)。

エタノール滅菌では 100 mg/L の高濃度で細胞に微粒子を添加しても細胞の生存率が100%であり, 高い生体親和性が示唆された。尚, 紫外線滅菌(添加直前に15分紫外線ランプを照射)では細胞の死滅が観察され, 100 mg/L ではすべてが死滅した。これは紫外線照射時間

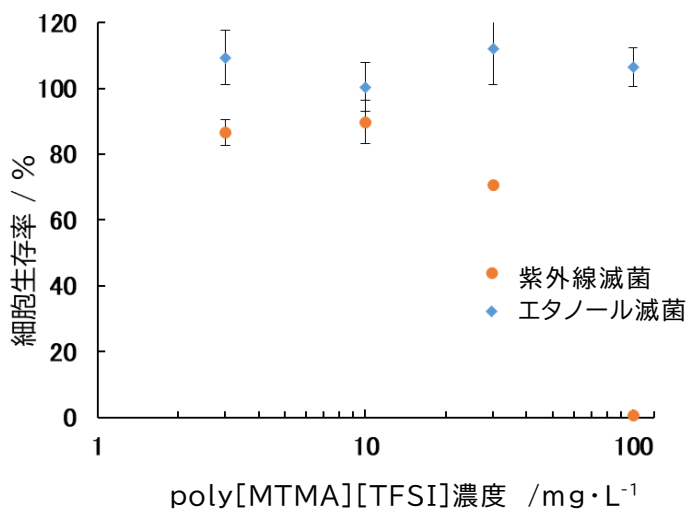


図5. HeLa 細胞の生存率に対する微粒子量の効果
初期細胞濃度 1×10^4 cell/100 μ L
培養条件 37°C, 5%CO₂, 72h

時間が短い, または粒子全体に紫外線が照射されず, 滅菌が不十分であったことが考えられる。実際に DDS 製剤として用いられる際は, このような心配は不溶ではあるが, 実験室レベルでの検討にはエタノール滅菌が有効である。

5. まとめ

本研究では、DDS キャリアとして生体分子であるアセチルコリン型イオン液体 [MTMA][TFSI] をモノマーに用い、懸濁重合することで poly[MTMA][TFSI] 微粒子を作製した。この微粒子は薬剤モデルである蛍光分子の吸着・放出が可能であり、特に微粒子がカチオン性ポリマーであり、微粒子外側に存在するアニオンと静電的相互作用するカチオン性薬剤の搭載に優れていると考えられる。また、HeLa 細胞を用いた細胞生存率の観察から、生体に高い親和性を持つことが明らかとなり、今後 DDS キャリアとしての実用化に期待が持てる。我々の研究グループでは本研究をさらに発展させ、多様な構造、性質を持つ微粒子を開発し、吸着以外の薬剤搭載法についても検討している。今後は実際の薬剤を搭載し、抗がん DDS 製剤としての実用化を目指す。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。また、SEM 観察では大分大学研究マネジメント機構准教授西口宏泰先生にご指導いただきました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- 1) Hou. S, Chen. S, Dong. Y, Gao. S, Zhu. B, Lu. Q “Biodegradable Cyclomatrix Polyphosphazene Nanoparticles: A Novel pH-Responsive Drug Self-Framed Delivery System” ACS Appl. Mater. Interfaces., vol. 10, issue. 31, pp.25983–25993, 2018.
- 2) Domańska U., Marciniak A., “Solubility of Ionic Liquid [emim][PF₆] in Alcohols” J. Phys. Chem. B, vol. 108, issue 7, pp.2376–2382, 2004.
- 3) Crosthwaite J. M., Aki S. N. V. K., Maginn E. J., Brennecke J. F. “ Liquid Phase Behavior of Imidazolium-Based Ionic Liquids with Alcohols” J. Phys. Chem. B, vol. 108, issue 16, pp.5113–5119, 2004.