機能性リン酸 カルシウムナノ粒子 の液相合成とバイオ メディカル応用

Liquid-phase Synthesis and Biomedical Applications of Functional Calcium Phosphate Nanoparticles **Key-words** : Calcium phosphate, Functional material, Composite nanoparticle

中村 真紀・大矢根 綾子

Maki NAKAMURA and Ayako OYANE (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST))

1. はじめに

ヒトの骨や歯の主要無機成分であるリン酸カルシウム(CaP)は、優れた生体親和性を示す、身体に優しい安全な材料である.CaPをナノ粒子(本稿では直径1~1000nmの粒子とする)化すると、細胞内への取り込みや血管壁の通過が可能となる.また、CaPは分解すると、ヒトの体液に元々含まれる無機イオン(カルシウムイオン・リン酸イオンなど)になる.従って、CaPのナノ粒子は、薬剤・イメージング剤・遺伝子などの様々な機能性物質を生体内に送達・局所放出するための担体として有用と期待されている.

筆者らは、近年、機能性物質を担持した CaP ナノ 粒子の簡便・迅速な液相合成技術を開発している.具 体的には、電荷を帯びたイオン性分子(2章,図1a)、 あるいは、レーザー光(3章,図1b)を利用するこ とで、機能性物質の担持・複合化反応、ならびに、ナ ノ粒子の構造・状態を制御する技術を開発してきた. 本稿では、これらのナノ粒子合成技術と、得られたナ



 図1 (a) イオン性分子ならびに(b) レーザーを利用した CaPナノ粒子合成技術の模式図

ノ粒子のバイオメディカル応用の可能性について述べ る.

イオン性分子を利用した CaP ナノ粒子合成 技術

機能性物質を担持した CaP ナノ粒子の合成におい ては、生体環境に近い温和な条件(室温~37℃、常圧) でも反応を行うことのできる均一沈殿法が、熱に不安 定な機能性物質にも適用可能であるため特に有用であ る. 均一沈殿法では. CaP 過飽和溶液中. 均一核形 成により析出した CaP がナノ粒子に成長する.この CaP 過飽和溶液中に機能性物質をあらかじめ添加し ておくことで、共沈複合化反応により機能性物質を担 持した CaP ナノ粒子を合成できる.一方で、本法の 課題として、ナノ粒子の構造(粒子径・形状)や分散 性の制御の難しさが挙げられる.これらの制御には, 界面活性剤の添加が有効であるが、生体応用には安全 性への懸念があった.これに対し、筆者らは、電荷を 帯びたイオン性の生体由来分子や認可済み薬剤分子な どを利用することによって、安全性への懸念の少ない 原料のみで、これらの制御を実現した、また、CaP 原料としても, 認可済みの医療用注射液を用いること で安全性を高めた.本章では、機能性物質として DNA あるいは磁性酸化鉄を用い,遺伝子導入機能(2.1 節)あるいは MRI 造影機能(2.2節)を付加した CaP ナノ粒子を合成する技術について紹介する.

2.1 遺伝子導入機能を備えた CaP ナノ粒子の合成 目的の遺伝子を細胞に導入する技術は,遺伝子治療 や再生医療における要素技術としで重要である. CaP ナノ粒子は安全性の高い遺伝子導入用の DNA 担体(遺 伝子導入剤)として,研究用途で長年使用されてきた. 一方で,他の担体(リポソームなど)と比較すると導 入効率に劣ることが課題であった.

筆者らはまず,Sogoらの手法¹⁾を参考に,電解質 補液などの医療用注射液を原料とした DNA 担持 CaP ナノ粒子の合成技術を確立した²⁾.具体的には,複数 の医療用注射液と DNA (プラスミド)を適量比で混 合して得た CaP 過飽和溶液を 37℃で静置(0~3時間) することで DNA を CaP と共沈複合化し,DNA 担持 CaP ナノ粒子を得た²⁾.本ナノ粒子は大きな負のゼー タ電位(-23mV)を持ち,粒子生成 3時間後にも, 形状(球状)および粒子径(300~400nm)の揃った 単分散粒子であった.一方で,DNA 非添加の過飽和 反応液中で生成した CaP 粒子は,わずかなゼータ電 位(+4mV)しか持たず,ナノからマイクロスケー ルまでの広いサイズ分布を示した.この結果は,アニ オン性の DNA がナノ粒子に取り込まれることで,静 電反発による粒子の分散性向上と粒子径制御(成長抑



図2 DNA-Fer-CaP 粒子の(a) 透過電子顕微鏡像,(b)分 散液の粒子径分布,(c)磁石を用いた遺伝子導入の模 式図,(d)磁石存在下ならびに非存在下における CHO-K1 細胞への遺伝子導入効率(Elsevierより許 可を得て文献4より転載)

制)に寄与したことを示している.これらの結果を基 に、さらに精緻な合成条件の検討・最適化を行った結 果、市販の CaP 系遺伝子導入剤よりも1桁高い導入 効率を示す DNA 担持 CaP ナノ粒子の合成に成功した³⁾.

さらに筆者らは、上記のナノ粒子に磁性を付加する ため、過飽和溶液に磁性酸化鉄ナノ結晶(核磁気共鳴 イメージング(MRI)用の認可済み造影剤であるフェ ルカルボトラン)を添加した.添加濃度を調節するこ とで、DNAならびにフェルカルボトランを共担持し た CaP の磁性ナノ粒子(DNA-Fer-CaP 粒子)を得 た(図 2a)⁴⁾.フェルカルボトランを共担持しても粒 子の分散性および遺伝子導入機能は保たれており、平 均粒子径は300nm程度であった(図 2b).また、三 次元ペレット状の細胞(より生体組織に近い系)への 遺伝子導入において、細胞ペレットの下に磁石を設置 することで(図 2c)、導入効率を向上させることがで きた(図 2d).本粒子を、マウス一過性脳虚血モデル に動脈内投与し、磁石による患部への磁気ターゲティ ングと遺伝子導入を示唆する予備的な結果を得ている⁵⁾.

以上, 医療用注射液のみからなる過飽和溶液中で, アニオン性の生体由来分子である DNA と, フェルカ ルボトラン, ならびに CaP の共沈複合化反応を制御し, 安全で高効率な遺伝子導入用の CaP ナノ粒子を開発 した.

2.2 MRI 造影機能を備えた CaP ナノ粒子の合成

免疫細胞の一種であるマクロファージは多くの炎症 性疾患の患部に集積する性質と、ナノ粒子等の異物を 取り込む性質(貪食性)を有する.炎症性疾患の早期 発見のため、生体内のマクロファージの安全かつ高効 率なイメージング剤が求められている.筆者らは、前 出のフェルカルボトランを担持した CaP ナノ粒子が 有望と考え、医療用注射液を原料とした合成法の検討 を行った⁶.



図3 (a)Fer-CaP粒子(上)ならびにHep-Fer-CaP粒子(下)の水分散液の写真(分散後1時間),(b)Hep-Fer-CaP粒子の高角環状暗視野走査透過電子顕微鏡像(左上),元素マッピング像(Ca:右上,Fe:左下,S:右下,それぞれCaP,フェルカルボトラン,ヘパリンに含まれる),(c)RAW264.7細胞およびHUVECのHep-Fer-CaP粒子取り込み率(左)ならびに粒子を取り込んだRAW264.7細胞の光学顕微鏡像(茶色:Hep-Fer-CaP粒子)(右),(d)Hep-Fer-CaP粒子のMRI 画像(粒子濃度を変化させた際のT2強調画像)(Elsevierより許可を得て文献6より転載)

まず、フェルカルボトランを含む複数の医療用注射 液を混合して得た CaP 過飽和溶液を 37℃で 30 分静 置し、共沈複合化反応によりフェルカルボトラン担持 CaP ナノ粒子(Fer-CaP 粒子)を合成した.しかし. この Fer-CaP 粒子のゼータ電位は+2mV と小さく. 単分散状態を保てずに短時間のうちに凝集・沈降した (図 3a 上). そこで, アニオン性分子として, ヘパリ ン(認可済み薬剤)を過飽和溶液に添加し、フェルカ ルボトランならびにヘパリンを共担持した CaP ナノ 粒子(Hep-Fer-CaP 粒子)を得た(図 3b). Hep-Fer-CaP 粒子は比較的大きな負のゼータ電位(-15 mV)を有し、分散性の向上が確認された(図 3a下). 貪食性のマウスマクロファージ様細胞(RAW264.7) に対する Hep-Fer-CaP 粒子の取り込み率は、フェル カルボトラン単独と比較して2~3倍高く, CaPとの 複合化が取り込み率向上に有効であることが明らかと なった(図 3c). また本粒子は、非貪食性のヒト臍帯 静脈内皮細胞(HUVEC)にはほとんど取り込まれず (図 3c), マクロファージ選択的な取り込みが示唆さ れた. MRI 測定において、Hep-Fer-CaP 粒子濃度の 増加につれて T2 強調画像のシグナルが減少した(画 像が暗くなった)ことから、本粒子が MRI 造影機能 を有することを確認した(図 3d).

以上, 医療用注射液のみを原料として, MRI 造影 機能を備え, マクロファージに取り込まれやすい Hep-Fer-CaP 粒子を開発した. 本粒子は, 炎症性疾 患におけるマクロファージのイメージング剤として有 用と期待される.

3. レーザーを利用した CaP ナノ粒子合成技術

前章のナノ粒子合成技術では, CaP 過飽和溶液を 反応場とする均一沈殿法をベースとし、イオン性分子 との共沈複合化という化学的アプローチにより、CaP ナノ粒子の構造・分散性を制御した。筆者らは、均一 沈殿法に液中レーザー溶融法⁷⁾という物理的アプロー チを組み合わせることによって、機能性物質を担持し た CaP ナノ粒子の新しい合成技術を開発した⁸⁾.本 技術では、機能性物質源(兼光吸収剤)として、ある 種の金属イオンを添加した CaP 過飽和溶液を反応場 として用いる. この溶液に低エネルギーのパルスレー ザー光を照射することで(図1b), 生成する金属イオ ン含有 CaP ナノ粒子を液中で局所的・瞬間的に加熱 する. これによって、ナノ粒子を溶融・球状化すると 同時に、同粒子内に機能性物質(金属酸化物や金属の ナノ結晶)をin situで析出(粒内析出)させること ができる、本技術によれば、以下に例示する通り、ユ ニークな構造・機能を有する複合ナノ粒子を、単純な 無機イオン原料から簡便 (ワンポット)・迅速に合成 できる、本章では、機能性物質として磁性酸化鉄ある いは金属銀を粒内析出させることで、磁性(3.1節) あるいは抗菌性(3.2 節)を付加した CaP ナノ粒子を 合成する技術について紹介する.

3.1 磁性を備えた CaP ナノ粒子の合成

磁性酸化鉄ナノ結晶は、前章で紹介した磁気ターゲ ティング剤や MRI 造影剤の他、磁気温熱療法用の発 熱体など、様々なバイオメディカル用途を持つ、磁性 酸化鉄ナノ結晶を CaP ナノ粒子に担持することで、 多量の磁性酸化鉄をナノ粒子内に集積させ、生体内の 目的の部位に効率よく送達できると考えられる。前章 では、予め準備された磁性酸化鉄ナノ結晶(フェルカ ルボトラン)を CaP と共沈複合化したが、ここでは、 鉄イオンを添加した過飽和溶液へのレーザー光照射に よって、CaP ナノ粒子の合成と同時に、磁性酸化鉄 ナノ結晶を粒内析出させることを試みた。

筆者らはまず,機能性物質源(兼光吸収剤)として 鉄(III)イオンを添加した CaP 過飽和溶液に,Nd:YAG パルスレーザー光を数十分照射することで,球状の鉄 含有 CaP ナノ粒子を合成した(図4a)⁹⁾.ここで,鉄(III) イオンは生成するナノ粒子に取り込まれ,同粒子のレー ザー光吸収性を高めることで,球状化に寄与している. 実際,鉄(III)イオン非添加の過飽和溶液にレーザー



図4 (a)鉄(III)イオン添加ならびに(b)鉄(III)イオン非添加のCaP 過飽和溶液へのレーザー光照射により得られた粒子の走査電子顕微鏡像(Royal Society of Chemistryより許可を得て文献9より転載)



 図5 IO-CaP 粒子の(a) 走査電子顕微鏡像,(b) 水分散液の 写真(磁石への吸引)(PCCP Owner Societies より許 可を得て文献10より転載),(c) 断面透過電子顕微鏡 像(スケールバー:100nm)(MDPIより許可を得て 文献11より転載)

光を照射しても、CaPの不定形ナノ粒子しか生成し なかった(図4b).また、鉄(III)イオンを添加した過 飽和溶液にレーザー光を照射しなかった場合にも、不 定形ナノ粒子しか生成しなかった、本反応ではまず、 鉄を含む不定形ナノ粒子が均一核形成により生成する. この不定形ナノ粒子がレーザー光を吸収し、ナノ秒の パルス幅で瞬間的に加熱されて溶融液滴となることで 球状化すると考えられる.

ただし、得られた鉄含有 CaP ナノ粒子はアモルファ スの非磁性体であり、磁性酸化鉄結晶を含んではいな かった.磁性酸化鉄結晶を析出させるためには,適切 な pH 条件下において鉄(II) イオンと鉄(III) イオンの 共存状態が必要と考えられた. そこで,機能性物質源 を鉄(II)イオンに代えるとともに,pH 調整剤として 水酸化ナトリウム水溶液を過飽和溶液に添加し、レー ザー光照射を行った.すると.磁性酸化鉄ナノ結晶を 粒内析出した CaP ナノ粒子(IO-CaP 粒子)を得るこ とができた(図 5a)¹⁰⁾.過飽和溶液中での鉄(II)イオ ンの部分的な酸化により、鉄(II)イオンならびに鉄(III) イオンの共存状態が生まれたと考えられる. IO-CaP 粒子は、球状の形態を持ち、超音波処理などにより容 易に再分散可能であった。また、磁石によって分離・ 回収できることも確認した(図5b).なお、IO-CaP 粒子には、均一な磁性酸化鉄ナノ結晶(10nm 以下) を粒内析出した構造(図 5c, A)と,不均一な磁性酸



 図6 Ag-CaP 粒子の(a) 走査電子顕微鏡像(左) ならびに 断面透過電子顕微鏡像(スケールバー:100nm)(右), (b) う蝕原因菌の懸濁液の濁度(細菌数の相対値に対応), (c) 細菌懸濁液中で予想される粒子の構造変化の模式 図(Elsevier より許可を得て文献12より転載)

化鉄ナノ結晶(数10nm以上)を粒内析出した構造 (図5c, B)の,2タイプの構造が認められた¹¹⁾.バ イオメディカル応用に向けてさらなる構造制御法の開 発が望まれる.

3.2 抗菌性を備えた CaP ナノ粒子の合成

う蝕(虫歯)や歯周病などの口腔内疾患は,病原性 の口腔内細菌により引き起こされる.筆者らは,細菌 の増殖しやすい口腔内の狭い空間(歯と歯,歯と歯肉 の間など)の除菌治療において,銀ナノ結晶などの抗 菌剤を担持した CaP ナノ粒子が有用と考えた.

筆者らは,機能性物質源(兼光吸収剤)として銀イ オンを添加した CaP 過飽和溶液を用い、同溶液にレー ザー光を照射することで、 粒内だけでなく粒子表面に も多数の銀ナノ結晶を析出した CaP ナノ粒子(Ag-CaP 粒子)を得た(図 6a)¹²⁾.本反応では、レーザー光照 射による銀イオンの光還元により、銀ナノ結晶が析出 したと考えられる. Ag-CaP 粒子を細菌懸濁液に添加 すると、粒子濃度依存的にう蝕原因菌(図 6b)や歯 周病原細菌の増殖が抑制された.細菌懸濁液中,細菌 が産生した酸によって CaP が溶解し、担持していた 銀ナノ結晶を放出したことで抗菌作用を発揮したと考 えられる (図 6c). また, Ag-CaP 粒子は, 自らが溶 解することで、細菌繁殖による周辺環境の酸性化を抑 制することも確認された.溶解の際に放出されるカル シウムイオン、リン酸イオンには、歯質の脱灰(歯質 内の CaP 成分の溶解) を抑制し、再石灰化を促進す る副次効果も期待される.以上のように、Ag-CaP 粒 子は、口腔内疾患の治療や予防に役立つ高機能抗菌剤 となりうることが示唆された.

4. まとめ

本稿で紹介した CaP ナノ粒子の合成技術はいずれも, 簡便かつ迅速であり,多彩なバイオメディカル機能を ナノ粒子に付加できる.本技術により得られる機能性

CaP ナノ粒子が、疾患の診断・治療技術の高度化、ひいては患者の QOL 向上に貢献すること期待している.

謝 辞 本稿で紹介した筆者らの研究は、JSPS 科研費(JP 26560250, JP15F15030, JP16H03831)などの助成を受けて実 施された.研究実施に当たっては、産業技術総合研究所のQ.T. Shubhra博士,筑波大学の鶴嶋英夫博士,北海道大学の宮治裕 史博士,宮田さほり博士,その他関係各位からご協力いただいた.

文 献

- Y. Sogo, A. Ito, K. Fukasawa, N. Kondo, Y. Ishikawa, N. Ichinose and A. Yamazaki, *Curr. Appl. Phys.*, 5, 526–530 (2005).
- A. Oyane, H. Araki, M. Nakamura, Y. Shimizu, Q. T. H. Shubhra, A. Ito and H. Tsurushima, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 141, 519–527 (2016).
- Q. T. H. Shubhra, A. Oyane, H. Araki, M. Nakamura and H. Tsurushima, *Biomater. Sci.*, 5, 972–981 (2017).
- Q. T. H. Shubhra, A. Oyane, M. Nakamura, S. Puentes, A. Marushima and H. Tsurushima, *Mater. Today Chem.*, 6, 51–61 (2017).
- Q. T. H. Shubhra, A. Oyane, M. Nakamura, S. Puentes, A. Marushima and H. Tsurushima, *Data in Brief*, 18, 1696– 1701 (2018).
- M. Nakamura, A. Oyane, K. Kuroiwa, Y. Shimizu, A. Pyatenko, M. Misawa, T. Numano and H. Kosuge, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 162, 135–145 (2018).
- H. Wang, A. Pyatenko, K. Kawaguchi, X. Li, Z. Swiatkowska-Warkocka and N. Koshizaki, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49, 6361-6364 (2010).
- M. Nakamura, A. Oyane, J. Mater. Chem. B, 4, 6289–6301 (2016).
- M. Nakamura, A. Oyane, I. Sakamaki, Y. Ishikawa, Y. Shimizu, K. Koga, K. Kawaguchi and N. Koshizaki, *RSC Adv.*, 4, 38442–38445 (2014).
- M. Nakamura, A. Oyane, I. Sakamaki, Y. Ishikawa, Y. Shimizu, K. Kawaguchi, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17, 8836–8842 (2015).
- 11) M. Nakamura and A. Oyane, *Materials*, 12, 4234 (2019).
- M. Nakamura, A. Oyane, Y. Shimizu, S. Miyata, A. Saeki and H. Miyaji, *Acta Biomater.*, 46, 299–307 (2016).



中村 真紀(なかむら まき)

2009 年東京大学大学院薬学系研究科博士後期 課程修了,博士(薬学).博士研究員を経て, 2013 年産業技術総合研究所に入所.ナノ炭素材 料による薬剤送達研究を経て,現在、リン酸カル シウム系ナノ材料の合成技術開発とバイオメディ カル応用研究に従事.

[連絡先] 〒 305-8565 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 5-41 国立研究開発法人産業技術総合研 究所ナノ材料研究部門

E-mail: ma-ki-nakamura@aist.go.jp

大矢根 綾子(おおやね あやこ) 2002年京都大学大学院工学研究科博士後期課 程修了,博士(工学).同年産業技術総合研究所 に入所.リン酸カルシウムの成膜・ナノ複合化技 術開発とバイオメディカル応用研究に従事.