

## (第13回) 2017年度・研究助成報告

研究題名	リン脂質で構成される多孔性粉体粒子の構造制御
研究期間	2017年4月1日～2019年3月31日
研究機関・所属 研究者名	国立研究開発法人物質・材料研究機構 国際ナノテクノロジクス研究拠点 川上亘作

## 1. 2017 (2018) 年度研究成果の概要

報告者らはリン脂質のみより構成される多孔性固体粒子 (Mesoporous Phospholipid Particle, MPP) を新規に開発したが、本研究においてはその詳細な物性評価および機能探索を行った。MPP は固体粒子でありながら 2 水和相当の水を保持することによって脂質二分子膜構造を維持しており、水性媒体への懸濁によって膨潤することが分かった。さらに粒子内部に油相を取り込むことが可能であり、油性物質の回収材料およびリザーバーとして機能すること、さらにそれを利用して医薬品、化粧品担体として利用できる可能性が示された。

## 2. 助成期間内での研究成果の概要

【背景】リン脂質はその生体適合性の高さや構造修飾の容易さから、薬物担体のための素材として広く利用されている。特にリポソームは代表的な薬物担体と言えるが、その効果的な利用は注射剤に限られており、医薬品の大半を占める固形製剤における効果は限定的であった。我々は、リン脂質のみで多孔性固体粒子である MPP (Fig.1) を調製する技術を開発した (J Phys Chem C119, 7255-7263 (2015))。MPP は低密度粒子であり、調製条件によっては  $0.02 \text{ g/cm}^3$  以下となることから、粉末吸入剤用担体等への利用が期待されるものの、粒子自体の詳細な物性が未知であった。本研究において、基礎物性評価と機能探索を行った。

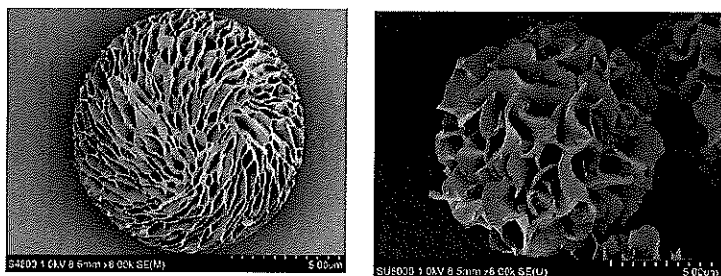


Fig.1 MPP の電子顕微鏡写真

【実験】MPP の構成脂質には、水添大豆ホスファチジルコリン (HSPC、日本油脂)、コレステロール (Chol、LKT Laboratories)、ジセチルホスフェート (DCP、ナカライテスク)、ステアリルアミン (東京化成) を用いた。まず脂質を 100 mM で t-ブタノールとシクロヘキサンの混液 (1:2) に 50°C で溶解させ、5°C で 1 日放置して沈殿物を形成させたのち、凍結乾燥によって MPP を調製した。5°C 環境下において液液相分離および分散相内での脂質の析出が起こるため、沈殿物は単分散の球形粒子に成形される。基礎物性は粉末 X 線回折、TG-DTA、FT-IR、水分吸脱着量測定、および走査型電子顕微鏡測定により評価した。

MPP への油性成分の取り込みは、イソオクタンを用いて評価した。まず 2 mg の MPP を 4 mL の 50mM リン酸緩衝液 (pH7) に分散したのち、所定量のイソオクタンを添加・混合し、可溶化挙動を目視、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡により観察した。適宜イソオクタン相にはナイルレッド、脂質には NBD-Chol を添加し、可視化を行った。粒子径は顕微鏡写真の画像解析より行い、レーザー光回折装置 (ゼータサイザーナノ ZS) によりゼータ電位を測定した。

【結果と考察】Fig. 2 に、HSPC MPP の粉末 X 線回折および TG-DTA 測定結果を示す。MPP が脂質二分子膜より構成されることは既に明らかとなっていたが、TG 測定の重量減より、それが二水和によって維持されていることが明らかになった。未処理の HSPC が水を保持しないことも、MPP 内の脂質分子の構造化を支持している。リン脂質の水和数には諸説あるが、強固な水和水は二水程度と考えられており、それが脂質二分子構造の維持に貢献していると考えられた。また室温付近における粉末 X 線回折より、脂質分子が構成する六方格子配列に由来する回折ピークも 21° 付近に認められた。昇温により 100°C 付近で吸熱ピークが観察されるが、これは親水基間の結合の切断によるものであり、それに伴って六方格子構造が流動化することが X 線回折結果より示唆された。180°C および 230°C の吸熱ピークは、それ

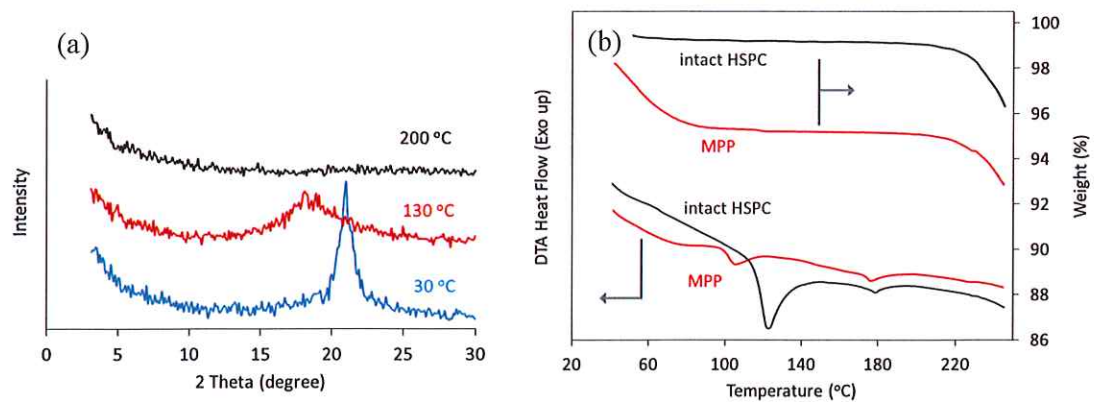


Fig. 2 (a) HSPC MPP の粉末 X 線回折 (温度可変ステージ使用)。図中に測定温度を示す。  
 (b) HSPC MPP の TG-DTA 測定結果。比較対象として無処理の HSPC 原末の測定結果も示す。

ぞれ液晶構造の融解および透明点と解釈できる。FT-IR 測定からも 80°Cで親水基間の水素結合が失われることが確認され、また水分吸脱着測定でも常湿付近では 2 水和物となり、高湿度 (> 85%RH) 条件では 6 水和まで水和数が増えることが分かった。

MPP を水性媒体に分散させたのち、油性成分を添加すると、可溶化が起こることが分かった。Fig.3 は 1mL あたり 0.125~1mg の MPP をリン酸緩衝液に分散し、25 $\mu$ L/mL のイソオクタン (ナイルレッド含有) を添加したときの外観である。経時 3 時間程度までは図のような可溶化状態が維持された。Table 1 には各 MPP にイソオクタンを可溶化したときのゼータ電位を示すが、荷電を有さない MPP より順にクリーミングが進行した (Fig.3)。ただしクリーミング後の濃縮相は、非荷電系 (HSPC, HSPC/Chol) は黄色に変化したのに対し、荷電系は (HSPC/DCP, HSPC/SA) は赤色のままであった。色素のナイルレッドの発色は環境依存性を持つため、荷電系の MPP は凝集であるのに対し、非荷電系においては合一が進行し、ナイルレッドがより極性の低い環境に移行したものと解釈できた。

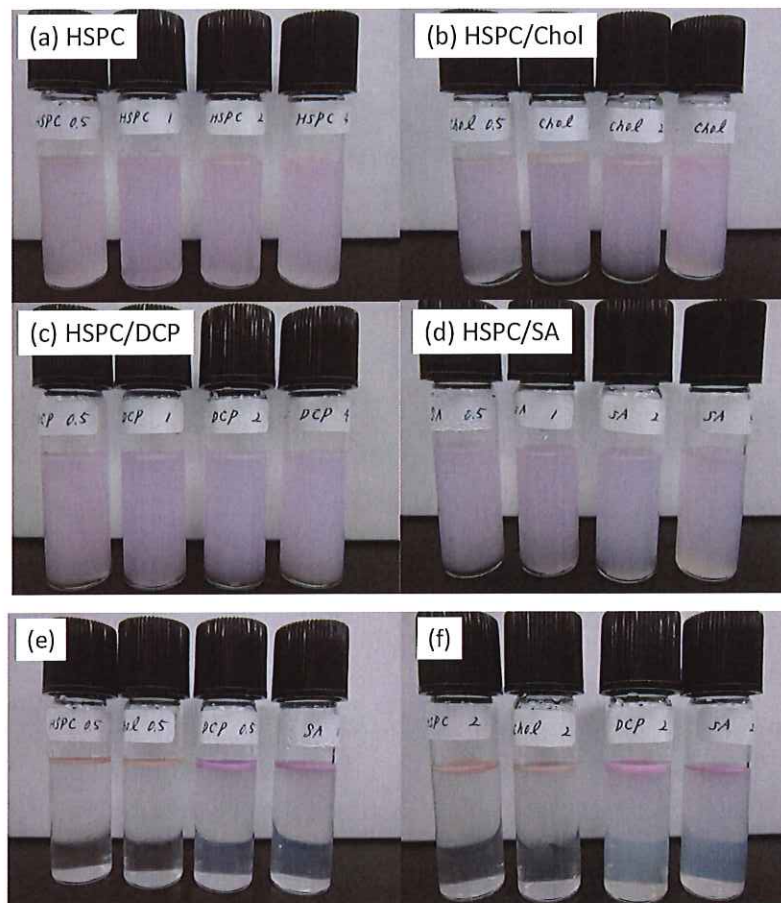


Fig. 3 MPP 分散液に 25 $\mu$ L/mL のイソオクタン (ナイルレッド含有) を添加したときの (a)–(d) 1 時間後 (e) (f) 24 時間後の外観。(a)–(d) 脂質組成は図中表記の通り、混合系はいずれもモル比 9/1。脂質濃度：いずれも左から 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/4mL。(e) (f) 脂質組成：いずれも左から HSPC, HSPC/Chol, HSPC/DCP, HSPC/SA、脂質濃度：(e) 0.125mg/mL, (f) 0.5mg/mL。

Table 1 MPP 分散液にイソオクタンを添加したときのゼータ電位  
(0.5mg/mL MPP に 25 $\mu$ L/mL のイソオクタン添加)

Lipid	Zeta potential (mV)
HSPC	3.33 $\pm$ 0.90
HSPC/Chol = 9/1	2.69 $\pm$ 0.18
HSPC/DCP = 9/1	-18.9 $\pm$ 2.6
HSPC/SA = 9/1	13.8 $\pm$ 1.9

Fig.4 に、MPP 分散液にイソオクタンを添加したときの光学顕微鏡写真と、粒子径の添加量依存性を示す。イソオクタン添加によって数 $\mu$ m から数十 $\mu$ m 程度の液滴が観察されるが、これらはもとの MPP の粒子径と大きく変わらず、さらに MPP は水性媒体内で膨潤することも分かっているため、その大きさから Pickering emulsion とは考えにくい。また顕微鏡像において液滴に多層構造が観察されることから、イソオクタンが MPP に侵入して膨潤しているものと思われる。また Pickering emulsion であれば粒子径がイソオクタン量の増加に比例して成長するはずであるが、Fig.4(b)に示す通り粒子径の成長は観察されず、これは MPP 内の空隙にイソオクタンが取り込まれているためと考えられる。すなわち MPP は、有機溶媒のリザーバーとして機能することが分かった。イソオクタン内のナイルレッドに加え、脂質膜にも NBD-Chol を取り込ませて蛍光顕微鏡観察を行ったところ、両蛍光分子はほぼ同じ位置で観察され、ここでも MPP がイソオクタンのリザーバーとなっていることが示された。

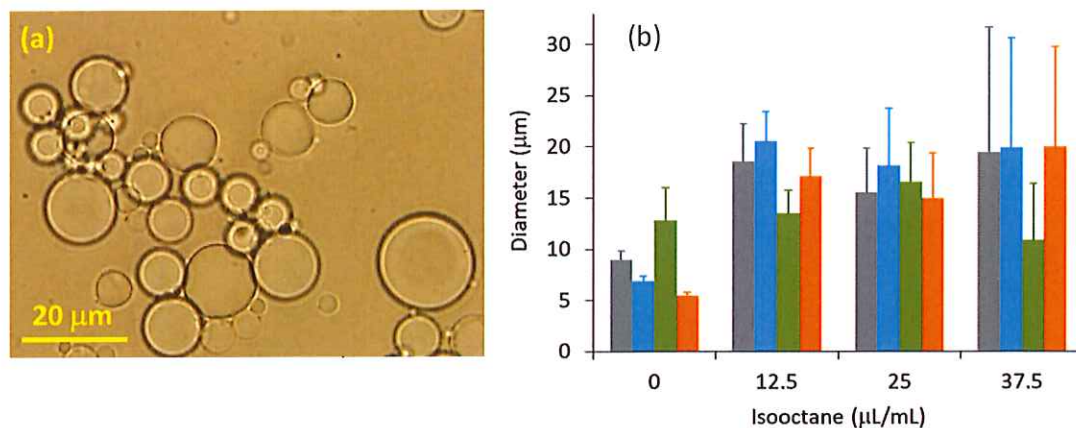


Fig. 4(a) 0.5mg/mL の HSPC MPP に 25 $\mu$ L/mL のイソオクタンを添加したときの光学顕微鏡写真。(b) 0.5mg/mL の MPP にイソオクタンを添加した時の粒子径変化。脂質組成は左から HSPC, HSPC/Chol=9/1, HSPC/DCP=9/1, HSPC/SA=9/1。添加量 0 は緩衝液分散前の MPP 粒子径。

#### 【まとめ】

以上の検討より MPP の詳細な構造が明らかとなり、さらに油性成分を取り込む機能を有することを見出した。MPP に荷電脂質を含有させることで、油相を保持した状態を安定化できることが分かった。従って MPP は、油性物質の回収材料およびリザーバーとして機能すること、さらにそれを利用して医薬品、化粧品担体として利用できる可能性が示された。

最後に、本研究に助成していただきました粉体工学情報センターに感謝致します。

### 3. 研究発表

#### 【学会発表】

川上亘作

新しい形成メカニズムに基づいた薬物粒子デザイン

NEPTIS-26、2018/1/26、東京

川上亘作、田中順子、福島繭子、片岡知歩

リン脂質で構成される多孔性粉体粒子の機能性評価

粉体工学会 2019 年度春季研究発表会、2019/5/9、東京

#### 【論文発表】

Kohsaku Kawakami, Junko Tanaka, Mayuko Fukushima, Chiho Kataoka

Mesoporous Phospholipid Particle as a Reservoir of Organic Phase

To be submitted