

逆ミセルの微細構造を利用した生理活性物質内包型ナノカプセルの創製

九州大学大学院 工学研究院化学工学部門

小 野 努

Reversed micelles and water-in-oil microemulsions can disperse nano-size water droplets in a polar solvents. The nano water droplets stably solubilize biomolecules such as proteins, peptides and DNA, and the size is controllable by adjusting water contents. On the other hand, the sol-gel method is a low temperature process widely used to produce optically transparent, microporous glasses by the polycondensation of liquid phase alkoxide precursors. Reversed micellar solution facilitates forming nano-size glasses in the hydrophilic core containing bioactive molecules. The hydrophilic nano sphere is favorable for solubilizing biomolecules and for hydrolysis of the alkoxide precursors. To create a novel nano carrier for bioactive materials, therefore, my strategy is based on the sol-gel encapsulation of the nano-size water droplets solubilizing biomolecules. Transmission electron microscope (TEM) observation shows that nano particles can be produced by the AOT and NP-5 reversed micellar droplets. The monodispersed particles with 10 - 20 nm diameter were obtained. However, in fact, almost all the immobilized protein preparations we obtained are a micro-size aggregate of the nano particles. In addition, the protein encapsulation profiles indicate that proteins solubilized in reversed micelles are completely incorporated into them with the growth of silica particles. The efficiency of protein encapsulation into the nano silica particles depends on the water droplet pH, Wo value (= [water]/[surfactant]), and the composition of alkoxide precursors. It seems that these factors affected not only the surface condition of cytochrome c but also the sol-gel processing. The encapsulated cytochrome c and subtilisin Carlsberg in nano silica particles retain their catalytic activities. Subtilisin Carlsberg entrapped in nano silica particles shows 40-fold greater transesterification activity than any other immobilized subtilisin Carlsberg. Protein encapsulation in silica gel prevents from denaturing protein by organic solvent. Molecular isolation of proteins in nano silica particles enhances the effective enzyme quantity and the surface area to contact with bulk substrate solution. These effects facilitate the high performance of subtilisin Carlsberg entrapped in nano silica particles for transesterification reaction in organic media. Hereafter we will develop new nanocapsules including biomolecules with high dispersibility and good reactivity.

1. 緒 言

生命活動を司る酵素や核酸はナノレベルの機能性分子であり、医療、美容、触媒など今後更に広い範囲で利用されている。そのため、これらの極めて特異的な機能を様々な媒体へ安定かつ高効率に適応させるための手法は、今後重要な技術になると期待される。近年、「ナノテクノロジー」と呼ばれる分野が世界的規模で注目されるようになっていくが¹⁾、本研究もナノスケールのバイオ分子を効率よく使いこなすためのデザインという面で、広義のナノテクノロジーと言えるであろう。

従来の生理活性物質包括担体は小さいものでもマイクロスケール (10^{-6} m オーダー) の担体であり、回収・再利用性に長けてはいるものの極めて高価なバイオ分子を効率よく利用することには十分でなく、生体への適応範囲も限定されてしまう。これに対して、ナノカプセルはそのサイズから角質層間隙へも浸透できるほどであり、安定に包括した

ドラッグキャリアとして、またナノカプセル表層へのターゲティング機能の付与することにより、目的細胞への特異的な遺伝子導入やサイトカイン放出が期待できる²⁾。

このようなナノキャリアを創製するために、筆者は有機溶媒中で特殊な界面活性剤が自己組織化によって形成する逆ミセルのナノオーダーの微小水滴核に着目し、この微小水滴核にバイオ分子を可溶化した後に外部からマトリクス形成因子となるシリカ前駆体を投入し、高効率でバイオ分子を包括したナノカプセル調製法を提案している。既往の研究において、逆ミセル内で金属アルコキシドなどのゾルーゲル反応を行うことによって、金属触媒を担持するシリカ微粒子^{3, 4)} や半導体への応用を目指した金属酸化物のナノ微粒子調製^{5, 6)} あるいは単なるナノシリカ微粒子調製^{7~10)} のツールとして利用されている。また一方、低温ゾルーゲル反応は穏和な条件で生体物質を包括固定化できる手法として知られている^{11, 12)}。それ故、生体分子の可溶化能力に優れた逆ミセルの微小液滴¹³⁾ をゾルーゲル反応でカプセル化することによって、極めて効率的な生体分子包括法となることが期待される。

本研究では、逆ミセルに可溶化したタンパク質分子がいかにして効率よくナノカプセルに包括されるかを、AOT 逆ミセルの微小液滴におけるシトクロム c の包括挙動について検討した。また包括されたタンパク質 (酵素) の触媒特性に関しては、NP-5 逆ミセルを用いて調製したナノシリ



Development of nano particles encapsulating bioactive molecules by using microstructure of reversed micelles

Tsutomu Ono

Department of Chemical Engineering,
Faculty of Engineering, Kyushu University

カ包括 subtilisin Carlsberg を用いて W_o 値の影響や他の固定化酵素との比較を行った。

2. 実験

2-1. 試薬

包括実験のモデルタンパク質として Horse heart cytochrome *c* (分子量 12,384, Sigma 社製)、ナノ微粒子包括固定化酵素の実験のモデル酵素として *Bacillus licheniformis* 由来の subtilisin Carlsberg を精製等をせずそのまま用いた。シリカゲル前駆体としては、東京化成工業社製のテトラメトキシシラン (TMOS)、メチルトリメトキシシラン (MTTrMOS)、ジメチルジメトキシシラン (DMDMOS)、アミノプロピルトリメトキシシラン (APTTrMOS) を用いた。また、逆ミセル構成因子である界面活性剤には、ジ-2-エチルヘキシルスルホコハク酸ナトリウム (AOT) と非イオン性界面活性剤であるポリエチレングリコールモノ-4-ノニルフェニルエーテル (NP-5) を用いた。酵素活性測定用の基質には、東京化成工業社製の (2,2'-Azinodi (2-Ethyl Benzthiazoline Sulfonic Acid)) Diammonium Salt (ABTS)、酢酸ビニル、ベンジルアルコールを用いた。

2-2. タンパク質含有ナノ微粒子の調製

タンパク質に Tris-HCl 緩衝液と 250mM AOT/イソオクタン溶液あるいは NP-5/シクロヘキサン溶液を添加し、所定の W_o ($=[H_2O]/[Surfactant]$) 値となるタンパク質含有逆ミセル溶液を調製した。シトクロム *c* の最終的な溶液濃度は 0.2 mg/ml になるように、subtilisin Carlsberg は 10 mg/ml となるように設定した。これらの逆ミセル溶液へ 150mM となるようにシリカ前駆体を溶解させ、恒温往復振盪器 (25°C) で所定の反応時間インキュベーションすることによってゾル-ゲル反応を進行させてシリカ微粒子の成長を促した。所定時間後、3,500rpm, 10min の遠心分離によって調製されたシリカ微粒子を沈殿物から回収した。シトクロム *c* の包括率は、このときの上澄み液のシトクロム *c* 濃度とシリカ前駆体投入前の逆ミセル溶液中のシトクロム *c* 濃度と比較して算出した。シトクロム *c* 濃度の測定は、分光光度計 (Shimadzu UV-2500PC) により 408nm の吸光度より求めた。遠心分離によって回収されたナノシリカ微粒子包括 subtilisin Carlsberg は、24 時間凍結乾燥させ、得られた標品を各種水活 $a_w = 0.44$ を有する飽和 KCO_3 溶液で 24 時間水和処理して反応実験に用いた。

2-3. 包括シトクロム *c* の酵素活性測定

遠心分離によって回収したナノカプセル包括シトクロム *c* は、24 時間凍結乾燥させ、得られた標品を所定濃度の ABTS 水溶液へ再分散させて、過酸化水素添加後における ABTS の吸光度の時間変化から、ナノカプセル包括シ

トクロム *c* の酵素活性を測定した。

2-5. 包括 subtilisin Carlsberg の酵素活性測定

エステル交換反応実験は、0.2M 酢酸ビニルと 0.02M ベンジルアルコールを含むシクロヘキサン溶液中へ調製したナノカプセル包括 subtilisin Carlsberg 標品を分散させ、反応温度 35°C で往復振盪器で振盪させながら行った。所定反応時間後の試料中の生成物濃度をガスクロマトグラフィー (Shimadzu GC-14B) によって測定して初期反応速度および反応率を求めた。

2-4. 透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察

ゾル-ゲル反応を開始して 24 時間後の溶液サンプルをマイクログリッド上の垂らし、十分乾燥させた後に、日本電子製透過型電子顕微鏡 (JEM-200CX, 加速電圧 200kV) を用いて観察を行った。

3. 結果

3-1. シトクロム *c* のナノカプセル中への包括

シトクロム *c* を溶解させた逆ミセル内相の pH を 4, 8, 12 としたときのシトクロム *c* の包括挙動を Figure 1 に示した。また、それぞれの pH で調製されたシトクロム *c* 含有シリカ微粒子の TEM 写真を Figure 2 に示した。

Fig.1 より、pH が高くなるほどシトクロム *c* の包括が早くなることが明らかである。また、調製時の pH が高くなるにつれて、得られたシリカ微粒子の粒径も大きくなるのが TEM 観察の結果明らかとなった。(Figure 2)。上記 pH 領域では、シトクロム *c* の電荷状態も大きく変化して微細空間を形成する界面活性剤である AOT との相互作用にも大きな影響を与えられ考えられる。しかしながら、い

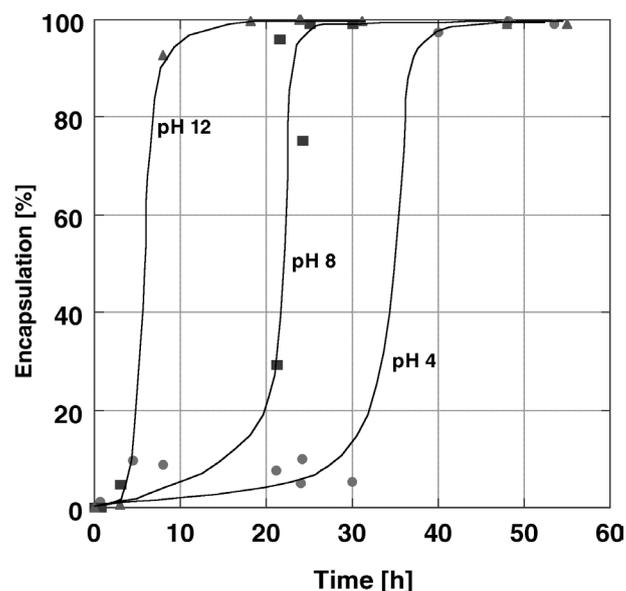


Figure 1. Effect of pH on the cytochrome *c* encapsulation in nano-silica particles prepared by AOT reversed micelles.

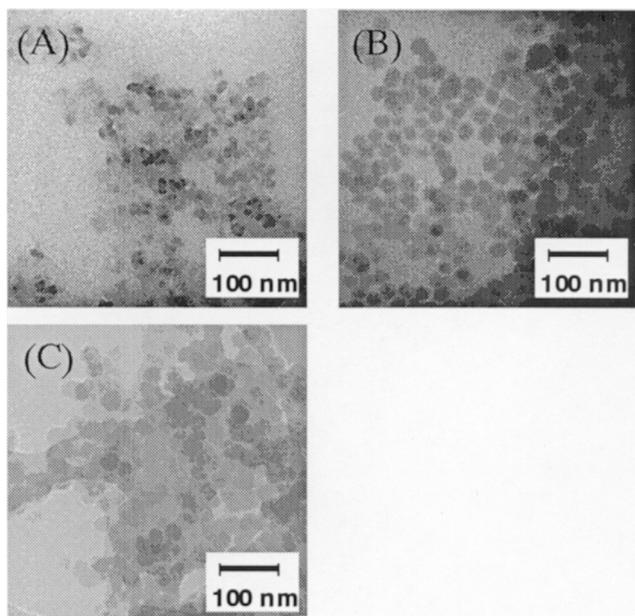


Figure 2. TEM images of nano silica particles prepared by AOT reversed micelles: (A) pH 4, (B) pH 8, (C) pH12.

ずれの pH においてもほぼ 100% のシトクロム *c* がシリカ微粒子内に包括されており、シトクロム *c* 非存在下でもほぼ同様の粒子成長過程を示すことから、各 pH におけるシトクロム *c* の包括挙動は、主にシリカゲル微粒子の成長速度によって支配されていると考えられる。

Figure 3 にはシトクロム *c* の包括率に及ぼす W_o 値の影響を示した。溶液中の界面活性剤濃度に対する水分子濃度として定義される W_o 値は、逆ミセル溶液の特徴を示す数値としてしばしば用いられる。界面活性剤濃度一定な逆ミセル溶液中で水分量が増加すると（すなわち、 W_o 値が増加すると）、逆ミセルは各分子集合体の数を増やすのではなく、分子集合体が抱える微小水滴核の径を増加させることになる。既往の実験事実より、 W_o 値と逆ミセル半径には一次の相関があることが知られている¹⁴⁾。本実験結果では、 W_o 値が小さい場合に、すなわち逆ミセルのサイズが小さい場合に、より迅速にシトクロム *c* の包括が達成されている。

また、無機シリカ前駆体である TMOS と有機シリカ前駆体である MTrMOS や DMDMOS あるいは表面電荷をカチオン性に変えるアミノ基含有シリカ前駆体である APTTrMOS を混合して調製したハイブリッドナノシリカカプセルに関する検討も行ったが、シトクロム *c* 包括挙動にはほとんど影響を与えなかった。さらに、包括されたシトクロム *c* は、ナノカプセル内の包括後もペルオキシダーゼ様の酵素活性を十分に維持していることが、ABTS を用いた実験より明らかとなった。

3-2. ナノカプセル包括 subtilisin Carlsberg の触媒特性 非イオン性界面活性剤である NP-5 によって形成された

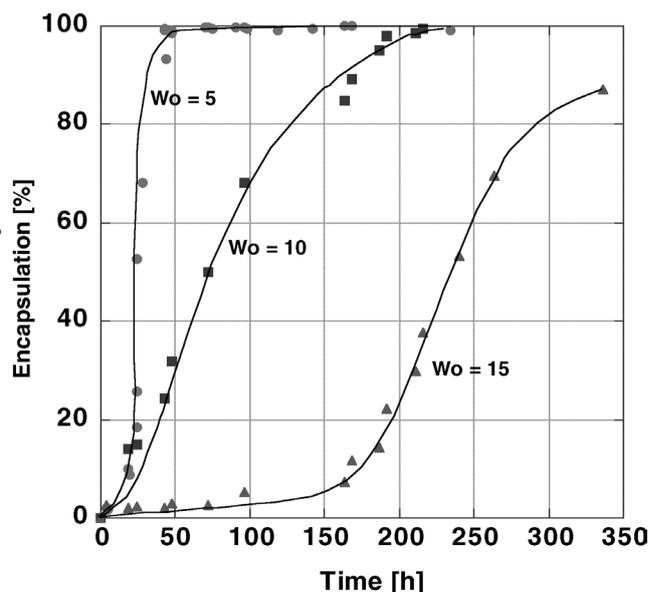


Figure 3. Effect of W_o value, the molar ratio of water to surfactant in reversed micellar solution, on the cytochrome *c* encapsulation in nano-silica particles prepared by AOT reversed micelles.

逆ミセル液滴を利用して、subtilisin Carlsberg を包括したナノシリカ微粒子を調製した。NP-5 逆ミセルによって調製されたナノシリカ微粒子は、AOT 逆ミセルで調製されたナノシリカ微粒子に比べて単分散性が高く、本実験では平均粒径が約 13 nm の単分散シリカ微粒子が調製できる条件で subtilisin Carlsberg を包括した。酢酸ビニルとベンジルアルコールのエステル交換反応において、同量の subtilisin Carlsberg を用いて調製したその他の固定化酵素に比べて、ナノシリカ包括 subtilisin Carlsberg では約 40 倍ほど初期反応速度が高いことが明らかとなった (Figure 4)。また Fig.4 の挿入図より、通常の酵素反応と同様の反応挙動を示し、24 時間で約 80% 近くの生成物を与えていることも明らかである。

粉末酵素よりも凍結乾燥処理で有機溶媒中での酵素活性を大きく向上することができるという報告^{15, 16)}もあるが、ナノシリカ包括酵素はそれよりも非常に高い酵素活性を示すことができた。また、セライトのような無機担体に吸着させた場合よりも高い酵素活性を示し、さらに酵素なしで調製したナノシリカ微粒子にその後酵素を吸着させたナノシリカ微粒子吸着 subtilisin Carlsberg よりも大幅に高い初期反応速度を得たことから、ナノシリカ微粒子内へ包括することによって有機溶媒による失活を抑制されていることが酵素活性の大幅な向上に影響していると考えられる。さらに、NP-5 逆ミセル溶液中における均一反応系よりもナノシリカ包括 subtilisin Carlsberg の不均一反応系の方が触媒活性の点で勝っているところは、酵素分子への基質のアクセシビリティが原因になっていると思われる。逆ミセルの液滴中へ可溶

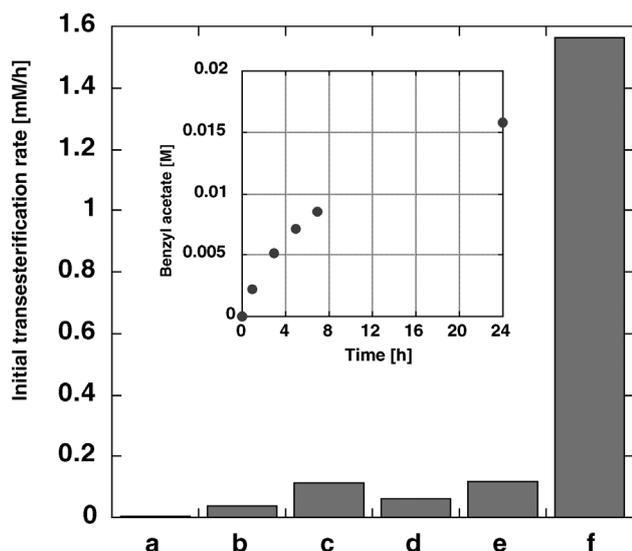


Figure 4. Transesterification activity of subtilisin Carlsberg immobilized by various method. Modes of immobilization of subtilisin Carlsberg: a, without immobilization (powder enzyme); b, lyophilized from aqueous buffer; c, solubilized into reversed micelles; d, attached onto Celite 545; e, attached onto nano silica particles; f, encapsulated in nano silica particles. Inset, the time course of the product concentration from transesterification by subtilisin Carlsberg encapsulated in nano silica particles are shown. Initial concentration of vinyl acetate and benzyl alcohol are 0.2 M and 0.02 M, respectively.

化した subtilisin Carlsberg は、周囲を水と界面活性剤層で覆われているために求核種であるベンジルアルコールの接近が強く抑制された結果、エステル交換活性はナノシリカ包括 subtilisin Carlsberg よりも低くなったと推察される。上記のように有機溶媒による失活抑制は、ナノシリカ包括 subtilisin Carlsberg が高い酵素活性を示す大きな要因のひとつと考えられるが、ナノシリカ微粒子に酵素を包括することでさらにもうひとつの大きな効果が得られていることも示唆されている。Figure 5 は遠心分離によって回収された凝集物を TEM で観察したものであり、多数のナノシリカ微粒子が連結して多孔性の凝集物となっていることがわかる。この結果から、ナノシリカ包括酵素は、膨大な表面積を獲得することで埋没による酵素の無効化を防ぎ、酵素へのアクセシビリティも向上させたことも今回の活性向上の大きな要因であると考えられることができる。

Figure 6 ではナノシリカ包括 subtilisin Carlsberg のエステル交換活性に与える微粒子調製時の W_o 値の影響を示した結果である。その結果、 $W_o < 5$ においては極めて低いエステル交換活性を示した。これに対して、 $W_o > 5$ で調製されたナノシリカ包括 subtilisin Carlsberg はほぼ一定の触媒活性を示している。

4. 考察

一般に、ゾルーゲル反応はケイ素アルコキシドの加水分

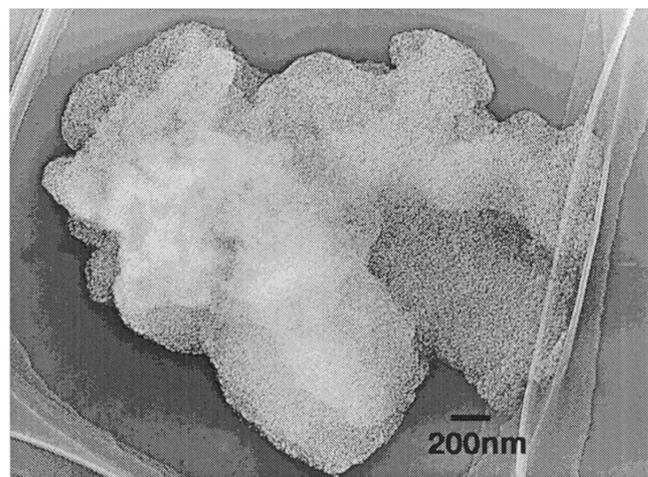


Figure 5. TEM images of the aggregate of nano silica particles prepared by NP-5 reversed micelles.

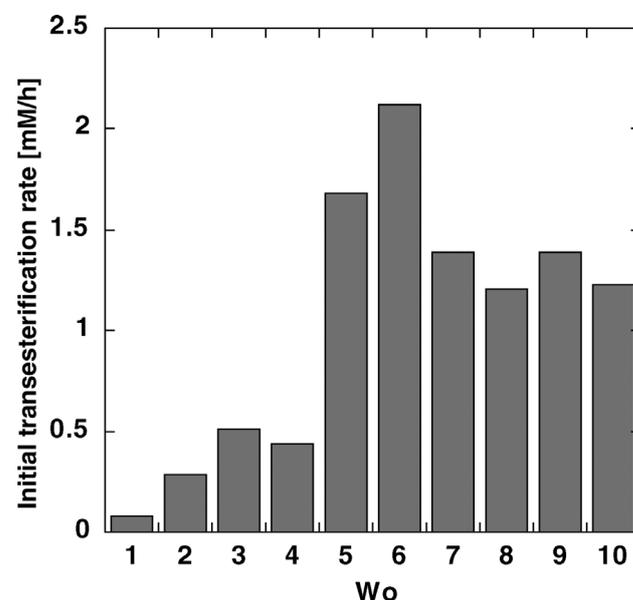


Figure 6. Effect of water content, W_o , on the transesterification activity of subtilisin Carlsberg encapsulated in nano silica particles.

解とその加水分解によって生じるシラノール基間の重縮合反応によって三次元シリカマトリックスが形成され、そのうち、重縮合反応はアルカリ性において促進されることが知られている。従って、今回得られた実験結果より、シトクロム c の包括挙動はシリカゲルの形成と密接に関係していることが示唆された。逆ミセル液滴内の pH が高くなるにつれて、ゾルーゲル反応の進行が促進され、それによってシリカ粒子の成長が進むとともに、逆ミセルの液滴交換時におけるシリカ粒子の合一も盛んになることが Fig. 2 より明らかである。シリカ微粒子どうしの合一によって、溶液中に均一に分散できるナノシリカ微粒子としては存在が難しくなるが、タンパク質を包括したシリカ微粒子凝集体 (Fig. 5) はナノシリカ微粒子の性質を残しているため、固定化された酵素による反応実験の

際にはその固定化状態が大きく反映された結果となった (Fig. 4)。ナノシリカ包括酵素は、粉末酵素や凍結乾燥処理酵素と同様に有機溶媒中で不均一系を呈している。しかしながら、粉末酵素や凍結乾燥処理酵素が多数の酵素分子の凝集体であり埋没しているがゆえ有効に酵素機能を発揮できない酵素の割合は極めて多いと考えられるが、ナノシリカ包括酵素の場合は各逆ミセル液滴中に酵素分子を分散して固定化されており、得られた凝集体は多孔性の極めて大きな表面積を有した固定化酵素となっている点で、ナノスケールで包括して効果が明瞭に現れている。

また、逆ミセルの形状に大きく影響を与える水分量 (W_o 値) は、包括挙動においては顕著な違いを示したが、包括された subtilisin Carlsberg の酵素活性にはそれほど大きな影響を与えることはなかった。ただし、Fig. 3 および Fig. 5 の結果からみると、 $W_o=5$ 付近で包括挙動、酵素活性ともに良好な結果が得られている。一般に、ゾルーゲル反応が油水界面近傍で開始すると考えられており、タンパク質周辺においてゾルーゲル反応が進行することが可能な逆ミセル径の小さな $W_o=5$ の系で最も効率的に包括が行われているためだと推察されるが、現在のところその詳細については不明である。

これより低水分量の逆ミセル液滴中でゾルーゲル反応を行った場合には、シリカ微粒子の成長は小さく、凝集体を形成するには不十分であったと考えられる。 $W_o<5$ の逆ミセルにおいては、液滴中の水分子はほとんどが界面活性剤による相互作用によって束縛されており、通常の水分子と異なる性質を有していると言われており、ゾルーゲル反応の進行にも何らかの影響を及ぼしていると考えられる。

5. 総括

本年度の研究成果より、逆ミセルのナノスケールの微細構造を利用することによって、生体分子であるタンパク質をナノシリカ微粒子内に包括することが可能であることが明らかとなった。さらにナノシリカカプセル内に包括されたタンパク質は本来の触媒機能を保持しており、ゾルーゲル反応を経て安定にシリカ微粒子内に包括固定化されることが明らかとなった。しかしながら、実際に得られているタンパク質固定化シリカゲルは、これらのナノカプセルの凝集体であり、溶液中に均一に分散できるほどの細かなサイズではないことも同時に明らかとなった (Fig. 5)。ただ、多孔性の固定化酵素としては極めて有効であることが subtilisin Carlsberg の触媒特性から示された。今後はナノカプセル形成後の各粒子間の凝集を巧みに制御することが必要であり、目的に応じてナノカプセルのモルフォロジーを設計することも極めて重要であることが示唆されたこととなる。生理活性物質内包型ナノシリカカプセルの表面化学修飾によって凝集力の抑制を行い、溶液への分散性の向

上を達成できれば、均一系でありながら生体分子とは異なる表面特性を有した生体分子溶液を調製できる。固定化担体に生分解性や徐放性のような機能を付与することによって、サイトカイン徐放特性を有した培地などの開発が可能となる。

なお本実験結果から、生体物質の包括挙動はする逆ミセルの性質だけでなく、シリカゲル形成および成長挙動と深く関連していることが示唆されており、効率的な生体物質の包括方法に関してはさらなる詳細な検討が必要であろう。

生理活性物質内包型ナノカプセルは、そのサイズから皮膚中の細胞層に対して効率よく浸透することが可能であり、そこで内包する生理活性物質の効果を発揮させることが期待できる¹⁾。それゆえ、本技術を利用して高機能性皮膚浸透キャリアの開発や生体内の患部へとドラッグターゲティングを行うナノキャリアの開発へと研究を展開したいと考えている。

(参考文献)

- 1) 川合知二 監修：図解 ナノテクノロジーのすべて、工業調査会
- 2) Lawrence MJ, Rees GD : Microemulsion-based media as novel drug delivery systems, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 45, 89-121, 2000.
- 3) Blum J, Avnir D, Schumann H : Sol-gel encapsulated transition-metal catalysts, 1999, 32-38, 1999.
- 4) Kishida M, Hanaoka T, Kim WY, Nagata H, Wakabayashi K : Size control of rhodium particles of silica supported catalysts using water-in-oil microemulsion, *Appl. Surf. Sci.*, 121/122, 347-350, 1997.
- 5) Kawai T, Usui Y, Kon-no K : Synthesis and growth mechanism of GeO_2 particles in AOT reversed micelles, *Colloids Surf. A*, 149, 39-47, 1999.
- 6) Pileni MP, Tanori J, Filankembo A : Biomimetic strategies for the control of size, shape and self-organization of nanoparticles, *Langmuir*, 13, 561-573, 1997.
- 7) Arriagada FJ, Osseo-Asare K : Phase and dispersion stability effects in the synthesis of silica nanoparticles in a non-ionic reverse microemulsion, *Colloids Surf.*, 69, 105-115, 1992.
- 8) Arriagada FJ, Osseo-Asare K : Synthesis of nanosize silica in Aerosol OT reverse microemulsions, *J. Colloid Interf. Sci.*, 170, 8-17, 1995
- 9) Osseo-Asare K, Arriagada FJ : Growth kinetics of nanosize silica in a nonionic water-in-oil microemulsion: A reverse micellar pseudophase reaction model, *J.*

- Colloind Interf. Sci., 218, 68-76, 1999
- 10) Arriagada FJ, Osseo-Asare K : Synthesis of nanosize silica in a nonionic water-in-oil microemulsion: Effects of the water/surfactant molar ratio and ammonia concentration, J. Colloid Interf. Sci., 211, 210-220, 1999.
 - 11) Furukawa S, Ono T, Ijima H, Kawakami K : Enhancement of activity of sol-gel immobilized lipase in organic media by pretreatment with substrate analogues, J. Mol. Catal. B., 15, 65-70, 2001.
 - 12) Edmiston PL, Wambolt CL, Smith MK, Saavedra SS : Spectroscopic Characterization of albumin and myoglobin entrapped in bulk sol-gel glasses, J. Colloid Interf. Sci., 395-406, 1994.
 - 13) Ono T, Kawakami K, Goto M, Furusaki S : Catalytic oxidation of o-phenylenediamine by cytochrome c encapsulated in reversed micelles, J. Mol. Catal. B., 11, 955-959, 2001.
 - 14) Pileni MP, Zemb T, Petit C : Solubilization by reverse micelles: Solute localization and structure perturbation, Chem. Phys. Lett., 118, 414-420, 1985.
 - 15) Klibanov AM : Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents, Trends Biochem. Sci., 14, 141-144, 1989.
 - 16) Ke T, Klibanov AM : On Enzymatic activity in organic solvents as a function of enzyme history, Biotechnol. Bioeng., 57, 746-750, 1998.