

# リン酸カルシウムナノ粒子によるサイトカインの経皮送達システム

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

中村 真紀

Transdermal delivery system of cytokines by calcium phosphate (CaP) nanoparticles would be useful in the cosmetic and medical fields. In this study, we aimed to fabricate CaP nanoparticles containing a clinically approved cytokine, basic fibroblast growth factor (FGF-2). First, we used cytochrome C as a model basic protein, which has similar characteristics (isoelectric point and molecular weight) to FGF-2. Negatively charged heparin was co-immobilized within CaP nanoparticles as a dispersant. The CaP nanoparticles immobilizing both cytochrome C and heparin were fabricated from a reaction solution containing calcium ions, phosphate ions, carbonate ions, heparin, and cytochrome C. The immobilization efficiencies of cytochrome C in the CaP nanoparticles with heparin were about three times higher than those in the CaP nanoparticles without heparin, indicating that heparin improved immobilization efficiencies of cytochrome C within CaP nanoparticles. This might be due to the interaction between negatively charged heparin and basic protein, cytochrome C. The role of heparin as a dispersant was also confirmed: the cytochrome C-CaP nanoparticles with heparin were dispersed in water, whereas those without heparin did not. Next, we fabricated CaP nanoparticles immobilizing both FGF-2 and heparin in the same manner. The resulting nanoparticles slowly released FGF-2 in a culture medium for at least two days. These results indicate the potential of the resulting nanoparticles as cosmetic and medical materials, which are capable of releasing FGF-2.

## 1. 緒言

皮膚内へ有効成分を浸透させる経皮薬物送達システム (DDS) は、低侵襲であることから、美容ならびに医療の分野で注目されている。線維芽細胞増殖因子 (FGF) 等のサイトカイン (細胞から分泌され、細胞間の情報伝達等に関与するタンパク質) は、細胞増殖促進作用等を有することから、化粧品や医薬品の成分としても有用である。しかし、親水性のサイトカインの場合、細胞が密に並び強固なバリア機能を持つ皮膚表面の疎水性の角層を透過するのは容易ではない。皮膚を透過することのできるナノ粒子等のキャリア (運搬体) にサイトカインを複合化できれば、サイトカインを真皮層まで送りこむことができると期待される。

リン酸カルシウムは、歯や骨の主要無機成分であり、ファンデーション等のコスメトロジー素材としても使用されている。優れた生体親和性と生体吸収性 (例外もあり) を示し、汎用的な無機塩と水のみで合成できることから、安価で安全性に優れる DDS 用のキャリアとして注目されている。著者らはこれまで、リン酸カルシウムをキャリアとする DDS について研究を進め、様々な機能性物質 (DNA、磁性酸化鉄ナノ粒子、銀ナノ粒子等) を複合化したリン酸カルシウムナノ粒子の液相合成技術を開発し、得られたナ

ノ粒子の DDS 応用の可能性について検討してきた<sup>1,2)</sup>。

本研究では、サイトカインを真皮層まで送りこむことのできる経皮 DDS 構築に向けて、リン酸カルシウムとサイトカインの複合ナノ粒子の合成を試みた。著者らのリン酸カルシウムナノ粒子合成技術を発展させ、粒子構造や表面特性を制御することで、DDS に適した分散性ナノ粒子の設計を目指した。サイトカインとしては、褥瘡 (床ずれ) ・皮膚潰瘍治療剤等として臨床応用されている FGF-2 を選択した。また、粒子の分散性向上を期待して、負電荷を有し、血液凝固阻止剤として臨床応用されているヘパリンの共担持を試みた<sup>3)</sup>。まず、FGF-2 のモデルタンパク質としてシトクロム c (FGF-2 と類似した等電点・分子量を有し、安価で取り扱いや分析が容易) を用いた予備的な条件検討を行い、続いて FGF-2 を用いた検討を行った。さらに、得られたナノ粒子からの FGF-2 放出挙動について、予備的な評価を行った。

## 2. 方法

### 2.1. シトクロム c 担持リン酸カルシウムナノ粒子の合成

塩化カルシウム溶液 (500mM)、リン酸水素二カリウム溶液 (500mM)、生理食塩水 (0.9w/v%) は、無菌性・エンドトキシンフリーといった安全性の担保されている医療用注射液を用いた。炭酸ナトリウム、ヘパリンナトリウムは一般用試薬を用い、それぞれ、超純水、生理食塩水に溶解させた溶液を用いた (炭酸ナトリウム溶液: 500mM、ヘパリンナトリウム溶液: 5mg/mL)。まず、塩化カルシウム溶液、ヘパリンナトリウム溶液、生理食塩水を混合した A 液 (カルシウムイオン濃度: 80mM、ヘパリン濃度: 0、



Transdermal delivery system of cytokines by calcium phosphate nanoparticles

Maki Nakamura

Nanomaterials Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

1.0、2.0、2.5、3.0mg/mL)、ならびに、リン酸二カリウム溶液、炭酸ナトリウム溶液、生理食塩水を混合したB液(リン酸イオン濃度:80mM、炭酸イオン濃度:80mM)を調製した。また、シトクロムcを生理食塩水に溶解させた溶液をC液とした(シトクロムc濃度:2mg/mL)。15mLチューブに、B液1mL、C液1mL、A液2mLの順に加え、1分間ボルテックスで攪拌した後、振とう機(25℃、150rpm)で0、1、3、6、24、48、75時間反応させた。振とう後(振とう時間0時間では振とうせずに攪拌後すぐ)、遠心操作により析出物を回収した。また、遠心後の上澄みを希釈し(上澄み希釈液)、シトクロムcの担持量算出に用いた(詳細は2.3.)。

## 2.2. FGF-2 担持リン酸カルシウムナノ粒子の合成

A液ならびにB液は、2.1.と同様に調製した。FGF-2を遺伝子組み換えしたトラフェルミン製剤(褥瘡・皮膚潰瘍治療剤)を生理食塩水に溶解させた溶液をC液とした(FGF-2濃度:0、10、20、50、100 $\mu$ g/mL)。反応の際にタンパク質低吸着性の15mLチューブを用いた以外は、2.1.と同様の手順で反応を行い、析出物を回収した。

## 2.3. 構造・組成評価

得られた試料をシリコン基板上で乾燥させ、走査電子顕微鏡(SEM)観察ならびにエネルギー分散型X線分光法(EDX)による元素分析を行った。SEM観察においては、試料に金蒸着を行った。シトクロムc担持粒子では、紫外可視分光光度計により上澄み希釈液の吸光度(409nm)を測定し、検量線を用いて上澄みに含まれるシトクロムc量を算出、反応液中のシトクロムc量(2mg)との差分を担持量として算出した。担持率は、(粒子に担持されたシトクロムc量)/(反応液中のシトクロムc量:2mg) $\times$ 100(%)として算出した。また、得られた試料を超純水に懸濁させ、粒子径分布およびゼータ電位を、動的光散乱法(DLS)および電気泳動光散乱法(ELS)により調べた。

## 2.4. FGF-2の放出挙動評価

2.2.で得られた試料を細胞培養用の培地に懸濁し、懸濁後すぐ(0時間)ならびに37℃で24、48時間静置後に培地中に放出されたFGF-2の濃度をELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)で測定した。

## 3. 結果

### 3.1. シトクロムc担持リン酸カルシウムナノ粒子

#### 3.1.1. ヘパリンの有無の影響

ヘパリンの有無がシトクロムcの担持率や粒子分散性に与える影響を検討するため、A液のヘパリン濃度を2.5mg/mL(Hep(+))あるいは0mg/mL(Hep(-))として試

料を得た。振とう時間は0時間あるいは24時間とした。

振とう時間0時間では、ヘパリンの有無にかかわらず、一次粒子径50nm程度の球形に近い形状のナノ粒子が得られた(図1上)。EDXスペクトルでは、いずれの試料にもカルシウム(Ca)、リン(P)、酸素(O)の大きなピークが検出され、ヘパリンを添加して得られた試料では、ヘパリン特有の元素である硫黄(S)の小さなピークも検出された(図2)。これにより、ヘパリンがこれらの粒子中に担持されたことを確認できた。炭素(C)の小さなピークの一部は、担持されたヘパリンやシトクロムcに由来するものと考えられる。シトクロムc担持率は、ヘパリンを添加して得られた試料で37%、添加せずに得られた試料で13%と、ヘパリン添加により大きく増加した(図3)。負電荷を有するヘパリンと、塩基性タンパク質であるシトクロムcの静電的相互作用により、シトクロムcがヘパリンと共に粒子に

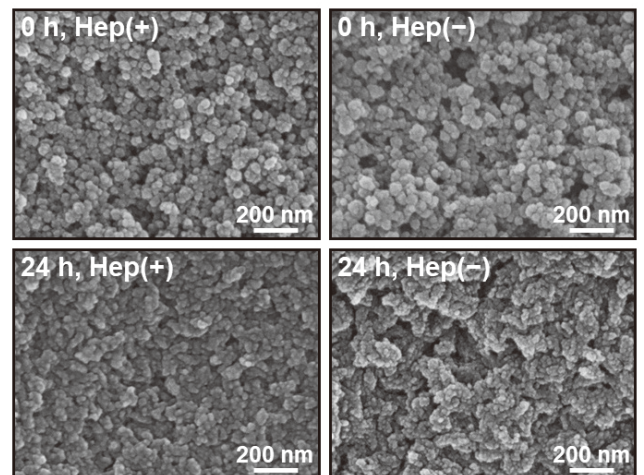


図1 得られた試料のSEM像

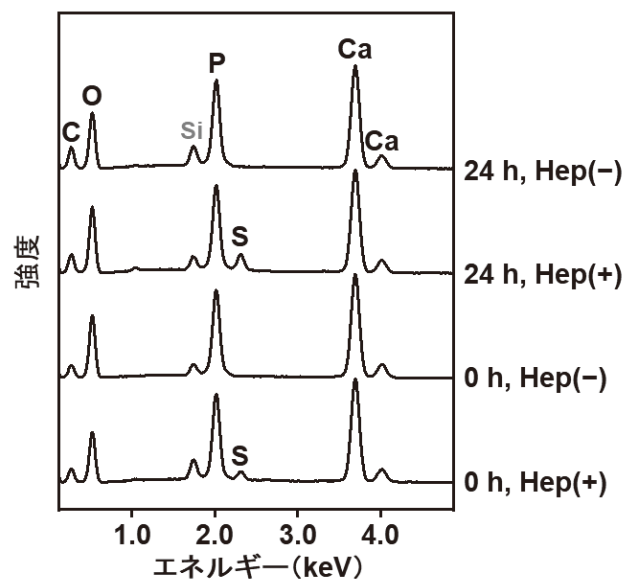


図2 得られた試料のEDXスペクトル(シリコン(Si)は基板由来)

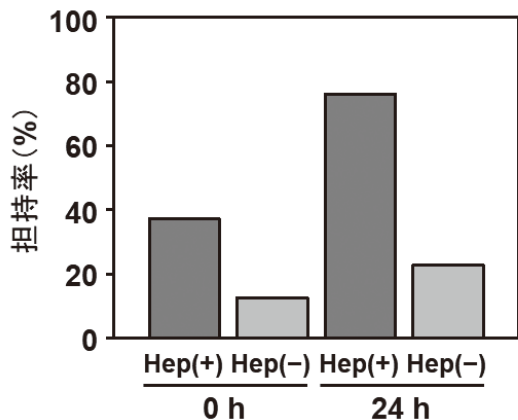


図3 得られた試料のシトクロム c 担持率

表1 得られた試料の平均粒子径およびゼータ電位

振とう時間	ヘパリン濃度	平均粒子径	ゼータ電位
0 h	2.5 mg/mL	143 nm	-15 mV
0 h	0 mg/mL	-	+6 mV
24 h	2.5 mg/mL	162 nm	-22 mV
24 h	0 mg/mL	-	+6 mV

担持されやすい状態となり、より多くのシトクロム c が担持されたと考えられた。DLS測定によると、ヘパリンを添加して得られた試料の平均粒子径は140nm程度であったが、添加せずに得られた試料は水中で沈降しやすく、信頼できる粒子径は得られなかった(表1)。また、ヘパリンを添加して得られた試料のゼータ電位は-15mVであり、添加せずに得られた試料の+6mVよりも絶対値が大きくなった(表1)。ヘパリンを添加して得られた試料では、粒子間の静電的反発が粒子の分散性に寄与したと考えられた。

振とう時間24時間では、ヘパリンの有無にかかわらず不定形の粒子が得られた(図1下)。EDXスペクトルでは、振とう時間0時間と同様に、カルシウム(Ca)、リン(P)、酸素(O)の大きなピークが検出され、ヘパリンを添加して得られた試料では硫黄(S)の小さなピークも検出された(図2)。ヘパリンを添加して得られた試料におけるS/Ca元素比(EDXピークにより算出)は、振とう時間0時間(S/Ca=0.068)よりも振とう時間24時間(S/Ca=0.116)で大きくなり、より多くのヘパリンが担持されたと考えられた。シトクロム c 担持率は、ヘパリンを添加して得られた試料で76%、添加せずに得られた試料で23%と、ヘパリン添加により大きく増加し、さらに振とう時間0時間よりも増加した(図3)。DLS測定によると、ヘパリンを添加して得られた試料の平均粒子径は160nm程度であったが、添加せずに得られた試料は水中で沈降しやすく、信頼できる粒子径は得られなかった(表1)。ヘパリンを添加して得られた試料のゼータ電位は-22mVであり、添加せずに得られ

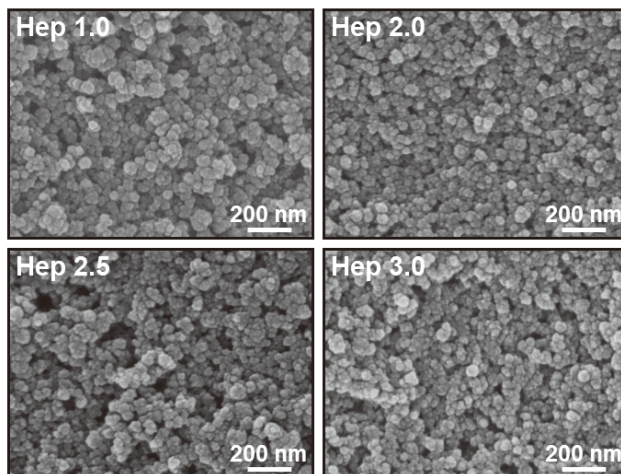


図4 ヘパリン濃度を変化させて得られた試料のSEM像

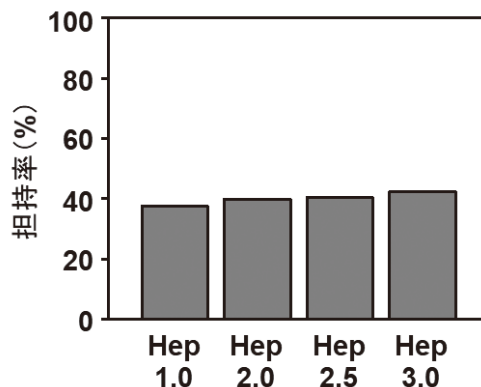


図5 ヘパリン濃度を変化させて得られた試料のシトクロム c 担持率

た試料の+6mVよりも絶対値が大きくなった(表1)。振とう時間0時間で得られた試料と同様、ヘパリンを添加して得られた試料では、粒子間の静電的反発が粒子の分散性に寄与したと考えられた。

以上より、ヘパリンは、シトクロム c の担持率向上ならびに生成粒子の分散性向上に大きく寄与することが示された。

### 3.1.2. ヘパリン濃度の影響

ヘパリンの濃度がシトクロム c の担持率や粒子分散性に与える影響を検討するため、A液のヘパリン濃度を1.0、2.0、2.5、3.0mg/mL(Hep 1.0、2.0、2.5、3.0)と変化させて試料を得た。振とう時間は0時間とした。

SEM観察によると、ヘパリン濃度にかかわらず、一次粒子径50nm程度の球形に近い形状のナノ粒子が得られた(図4)。シトクロム c 担持率は、ヘパリン濃度が増加するにつれてわずかに増加した(図5)。DLS測定によると、得られた試料の平均粒子径は130~180nm程度、ゼータ電位は-17~-16mV程度であり(表2)、ヘパリン濃度により大きな違いは見られなかった。

表2 ヘパリン濃度を変化させて得られた試料の平均粒子径およびゼータ電位

ヘパリン濃度	平均粒子径	ゼータ電位
1.0 mg/mL	176 nm	-16 mV
2.0 mg/mL	131 nm	-17 mV
2.5 mg/mL	165 nm	-17 mV
3.0 mg/mL	161 nm	-16 mV

以上より、今回変化させたヘパリン濃度の範囲内では、ヘパリン濃度はシトクロムcの担持率や粒子分散性に大きな影響を与えないことが示された。

### 3. 1. 3. 振とう時間の影響

振とう時間がシトクロムcの担持率に与える影響を検討するため、振とう時間を0、1、3、6、24、48、75時間と変化させて試料を得た。A液のヘパリン濃度は2.5mg/mLとした。

振とう時間1、3、6時間で得られた試料のSEM観察によると、振とう時間0時間(図1左上)と同様、一次粒子径50nm程度の球形に近い形状のナノ粒子が得られた(図6)。すなわち、振とう時間6時間から24時間(図1左下)にかけて不定形に形状が変化すると考えられた。この形状変化の理由の1つとして、長時間の反応によるリン酸カルシウムの結晶構造の変化が推測されることから、今後結晶構造解析を行う予定である。なお、シトクロムc担持率は、0時間から24時間では振とう時間が増加するにつれて増加したが、24時間以降はほぼ同じであった(図7)。

以上より、振とう時間が24時間あれば、シトクロムcを十分に担持できることが示された。

## 3. 2. FGF-2 担持リン酸カルシウムナノ粒子

### 3. 2. 1. FGF-2濃度の影響

3. 1.のシトクロムcに代えて、FGF-2の担持を試みた。その際、C液のFGF-2濃度を0、10、20、50、100 $\mu$ g/mLと変化させて試料を得た。A液のヘパリン濃度は2.5mg/mL、振とう時間は0時間あるいは24時間とした。

FGF-2濃度100 $\mu$ g/mLで得られた試料では、振とう時間にかかわらず、水中で沈降しやすく、DLS測定において信頼できる粒子径は得られなかった。FGF-2濃度0~50 $\mu$ g/mLで得られた試料では、振とう時間0時間で平均粒子径140~220nm程度、振とう時間24時間で平均粒子径150~240nm程度となった(表3)。ゼータ電位は、振とう時間0時間で-18~-15mV程度、振とう時間24時間で-24~-17mV程度となり、FGF-2濃度の低い方がゼータ電位の絶対値が大きくなる傾向にあった。

FGF-2濃度100 $\mu$ g/mLで得られた試料が沈降しやすかった理由として、FGF-2原料として用いた製剤に含まれ

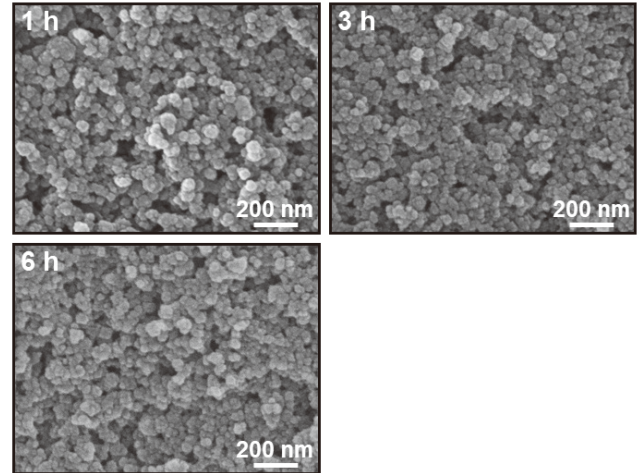


図6 振とう時間を変化させて得られた試料のSEM像

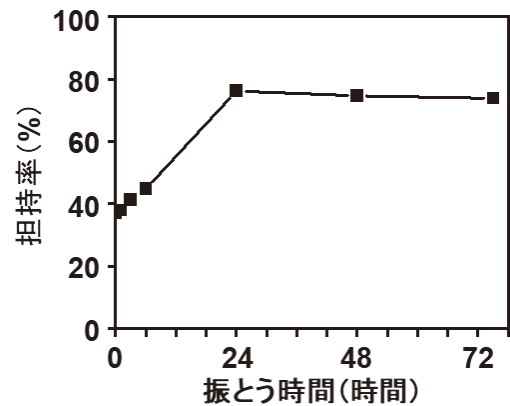


図7 振とう時間を変化させて得られた試料のシトクロムc担持率

表3 FGF-2濃度を変化させて得られた試料の平均粒子径およびゼータ電位

振とう時間	FGF-2濃度	平均粒子径	ゼータ電位
0 h	0 $\mu$ g/mL	143 nm	-18 mV
0 h	10 $\mu$ g/mL	172 nm	-17 mV
0 h	20 $\mu$ g/mL	170 nm	-17 mV
0 h	50 $\mu$ g/mL	218 nm	-17 mV
0 h	100 $\mu$ g/mL	-	-15 mV
24 h	0 $\mu$ g/mL	187 nm	-24 mV
24 h	10 $\mu$ g/mL	183 nm	-24 mV
24 h	20 $\mu$ g/mL	154 nm	-23 mV
24 h	50 $\mu$ g/mL	235 nm	-21 mV
24 h	100 $\mu$ g/mL	-	-17 mV

る添加物(エデト酸ナトリウム水和物等)の影響が考えられる。添加物を含まないFGF-2を用いた検討は今後の課題としたい。

### 3. 2. 2. FGF-2の放出挙動

C液中のFGF-2濃度10、20、50 $\mu$ g/mLで得られた試料について、培地中でのFGF-2放出挙動を評価した。振と

う時間0時間で得られた試料では、粒子を懸濁させた直後の培地中に、14ng/mL (C液中FGF-2濃度=10 $\mu$ g/mL)から70ng/mL (C液中FGF-2濃度=50 $\mu$ g/mL)のFGF-2が検出された。しかし、いずれの試料でも、24、48時間後にはほとんどFGF-2が検出されなくなった(図8左)。これは、培地中に放出されたFGF-2が構造変化を起こしたことによると考えられる(培地中でFGF-2が構造変化し、ELISAで検出される濃度が急減することが知られている)。従って、振とう時間0時間で得られた試料では、FGF-2が粒子より速やかに放出されたものの、持続的なFGF-2放出はなかったと考えられた。一方、振とう時間24時間で得られた試料では、24、48時間後であってもFGF-2が放出初期と同程度の濃度で検出されたことから(図8右)、FGF-2の放出が、24、48時間後でも継続していたと考えられた。後者の試料では、長時間の反応によって、表面だけでなく内部にもFGF-2の担持されたリン酸カルシウムナノ粒子が生成したと推定される。

以上より、振とう時間によってFGF-2の放出挙動が大きく変化すること、ならびに、振とう時間24時間で得られた試料ではFGF-2を少なくとも48時間にわたって徐放できることが示された。

#### 4. 総括

著者らのリン酸カルシウムナノ粒子合成技術をもとに、塩基性タンパク質であるシトクロムc (FGF-2のモデルタンパク質として条件検討に使用)ならびにFGF-2を担持した分散性リン酸カルシウムナノ粒子を合成した。ヘパリンの共担持が、タンパク質の担持率向上(本研究ではシトクロムcでのみ確認)や粒子分散性向上に大きく寄与することが明らかとなった。得られたナノ粒子は、FGF-2を持続的に放出できることから、美容や医療の分野への応用が期待される。今後の課題としては、皮膚の透過に適したナノ粒子構造の最適化等が挙げられる。

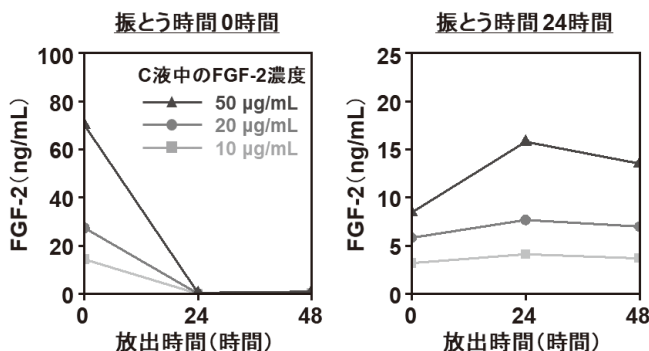


図8 FGF-2濃度を変化させて得られた試料のFGF-2放出挙動

#### 謝辞

本研究は、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団の助成を受けて行われたものである。研究の実施に当たっては、産業技術総合研究所の大矢根綾子博士、分領和歌子氏、黒岩輝代子氏、荒木裕子氏をはじめ、関係各位にご指導・ご協力を頂いた。

#### (引用文献)

- 1) 中村 真紀, 大矢根 綾子, 「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」, セラミックス, 55, 189-192 (2020).
- 2) 中村 真紀, 大矢根 綾子, 「遺伝子や造影剤を細胞へ送達するリン酸カルシウムナノ粒子の簡便・迅速な作製技術の開発」, NEW GLASS, 36, 22-24 (2021).
- 3) M. Nakamura, A. Oyane, K. Kuroiwa, Y. Shimizu, A. Pyatenko, M. Misawa, T. Numano, H. Kosuge, "Facile one-pot fabrication of calcium phosphate-based composite nanoparticles as delivery and MRI contrast agents for macrophages", *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 162, 135-145 (2018).