多くの水分子を保持した機能性親水コロイドの開発

昭和薬科大学

唐澤 悟

Hydrophilic-gels and -nanoparticles are paid much attention in medicinal and cosmetic fields. Especially in the field of contrast agents such MRI, fluorescence and RI, the functional nanoparticles, which form approximately 100 nm size in solutions, are passively accumulated in tumor tissues, thus many researchers have reported the tumor-accumulating nanoparticles based on the 100 nm. This tumor-accumulating behavior utilizing the nanoparticles is known as Enhanced Permeability Retention (EPR) effect. Moreover, there is a deep relationship between MRI contrast agents and water molecules; the high contrast ability is derived from presence of many water molecules around the contrast agents. Thus, the hydrophilic nanoparticles, in which many water molecules are taken the core of the particle into, are promising as MRI contrast agents with a high contrast ability. We have studied on the MRI contrast agents utilizing the organic radical. Because the typical MRI contrast agents in clinical, which are consisted of Gadolinium ions (Gd) as a metal spin source, have some issues; renal disorder and brain accumulation by an excess usage. Accordingly, instead of Gd ion, the metal free contrast agents consisting of organic radical are planned. This time, three nanoparticles consisted of radical species are prepared and the physical parameters such rotational correlation time (τ_R) bases on the ESR signal intensity and width, T_1 -weighed image with T_1 -relaxation time, hydrodynamic diameter (D_H) by a dynamic light scattering (DLS), and morphology observations of nanoparticles using a transmission electron microscopy (TEM). Due to checks of the hydrophilicity of the nanoparticles, clogP values of the nanoparticles were calculated by a ChemDraw Professional 16.0.

Three nanoparticles with organic radicals, **RNP-OTHP**, **-OH**, and **OAc**, were prepared according to a previous our report. In the DLS of the aqueous solutions, $D_{\rm H}$ values for all **RNP-X** showed the similar 100 - 200 nm size-distribution. In contrast, TEM images of **RNP-OH** and **-OTHP** showed the different morphology; film-like particles and spherical particles, for **RNP-OTHP** and **-OH**, suggesting that the former and latter are vesicle-like and micelle-like particles, respectively. In the contrast agent ability, the relaxivities (r_1) of **RNP-OH** and **-OAc**, which are calculated by a slope of the plot of inverse T_1 relaxation times vs concentration of contrast agents, showed 0.17 and 0.31 mM⁻¹s⁻¹, respectively, indicating that the latter is more than 1.7 time larger than that of the former, and the highest value among the radical nanoparticles reported by our group. To reveal the relationship between r_1 value and hydrophilicity, ClogP values were estimated to be -0.38 and 1.4 for **RNP-OH** and **-OAc**, respectively. In the previous our report, the micelle-like nanoparticle, PRO2, possesses the smaller ClogP (-0.037) and r_1 (0.17 mM⁻¹s⁻¹) values rather than those of **RNP-OAc**. The above-mentioned results indicate that the morphology of the nanoparticles are control by the ClogP value: the value of approximately 1.0 as a borderline, the nanoparticles with the smaller and larger ClogP value rather than 1.0, would form the micelle and vesicle-like morphology. Accordingly, the vesicle-like nanoparticle based on own ClogP value caused the high r_1 value of **RNP-OAc**.

Considering the above-mentioned results, by controlling the suitable ClogP value, the construction of the metal-free MRI contrast with the high contrast ability (relaxivity: r_1) is underway.

1. 緒 言

香粧品の素材として、多くの水分子を保持できるハイド ロゲルは魅力的であり、これらを基盤として香粧品素材研 究が発展してきた経緯がある。親水性コロイドはハイドロ ゲルと同様に多くの水分子を保持できる点と、ハイドロゲ ルに比べて機能性を付与しやすい点で魅力的な素材である。 我々のグループでは、機能性コロイド粒子の研究を進めて おり、最近では両親媒性側鎖を導入した超分子型ウレアベ ンゼン誘導体を基本骨格として、①MRI造影機能を有す



Development of Functional Hydrophilic Colloids Containing Many Water Molecules

Satoru Karasawa Showa Pharamaceutical University るガドリニウム錯体の導入、②金属を含まないメタルフリ ー造影剤のための有機ラジカルの導入、③マラリア・癌治 療効果を有するアルテミシニン類縁体導入などを行い、そ れらコロイド粒子の機能性について報告してきた^{1,2)}。

MRI造影剤は水分子との間に非常に密接な関係があり、 この関係性について我々が開発してきたナノ微粒子型造影 剤に加え、ガドリニウム原子と有機ラジカルのスピン量子 数(S)を使って説明する³⁾。画像診断法においては、MRI 造影剤が体内へ投与された組織画像はより強調される(輝 度が高い白い画像と黒い画像のコントラスト比が大きい) のが一般的である。これは造影剤の造影能によってT₁と T₂緩和時間(縦緩和と横緩和)の短縮効果がバックグラウ ンドと比べて著しく大きいことを意味する。造影能を大き くする即ち緩和時間短縮には、電子スピン(不対電子)を有 する分子即ち磁石のような物質がスピン源として働いて いる。短縮効果はスピン種のスピン量子数(S)に対して強 く反映するため、元素で最も大きいS=7/2を有するガド

リニウムを含む造影剤がひろく臨床現場で用いられてい る。またガドリニウム錯体のような金属を含まないメタル フリーの造影剤では、代替として有機ラジカルを用いる戦 略が示されており、ガドリニウム錯体で報告されているい くつかの副作用、例えば腎障害や脳蓄積などを示さない新 しいタイプの造影剤構築を目指している。しかしながら有 機ラジカルはS=1/2と小さく、緩和時間短縮効果が著し く低い欠点がある。この欠点を克服するために、我々はナ ノ微粒子化と微粒子中の水分子に着目した研究を実施して きた^{3,4)}。先に緩和時間短縮効果にはSの大きさが重要で あると述べたが、それ以外の要因も重要であり1)分子の 回転相関時間の延長、2)スピン結合水の最適化、などが挙 げられる。1)や2)は複雑な要因が絡んだ結果示されるパ ラメータであるが、平たく言うと1)はスピンを含んだ分 子のサイズが大きいほど分子運動が抑制されて回転相関時 間が延長となる。即ちナノ微粒子化することで緩和時間短 縮が予期される。2)については、短縮効果にはスピン源周 辺に十分な水分子が必要であり、数が少ないと短縮効果が 限定される。また、このスピン源周辺の水分子の拡散速度 の最適化が必要である。この2)が、MRI造影剤と水分子 との深い関係性を表すことになる。我々はFig.1に示す2 種類の五員環Proxvl ラジカル PRO1 と PRO2 を合成し物 性を評価してきた⁵⁾。それぞれには水分子と水素結合する ことで知られているエチレングリコール鎖を導入してお り、水分子を集める効果を狙った。**PRO1**はProxvl 骨格 のNOに対して左右にエチレングリコール鎖を導入し、一 方PRO2ではNOに対して片方のみにエチレングリコール 鎖を導入している。これら**PRO1**と2の緩和時間 (T_1) の 濃度変化を測定し、T₁の逆数を濃度に対してプロットし た傾きから造影能の指標である緩和能 (r1) を評価した結果、 **PRO1**は0.27m $M^{-1}s^{-1}$ に対して**PRO2**は0.17m $M^{-1}s^{-1}$ となり、 同じエチレングリコール鎖を導入しても緩和能に差が生 じることが分かった。次にPRO1とPRO2の緩和能の差 を検証するために、動的光散乱(DLS)による水溶液中の微 粒子のサイズと透過型電子顕微鏡 (TEM) による微粒子の



Fig. 1 PRO1と PRO2 の分子構造。極性置換基であるエチレ ングリコールを紫色で強調している。

形態観察を行った。さらに、環境応答型蛍光分子N15Cl を**PRO1**と**PRO2**中に導入し⁶、ラジカル周辺の水環境 について蛍光強度から考察を行った。その結果、PRO1 は100nm サイズのナノ微粒子であり、混合したN15Clの 蛍光強度低下や TEM 観察より、ナノ微粒子はベシクル状 構造であると判断した (Fig. 2と3)。一方 PRO2 について、 同様に100nm程度のナノ微粒子であるが、TEM観察や N15Clの蛍光強度からミセル状構造のナノ微粒子である と判断した (Fig. 2 と 3)。 ベシクル状の PRO1 は水分子が 微粒子内へ入り込んでいるため、スピン源である NOと接 触または水素結合しやすいのに対して、PRO2ではミセ ル状となるため、水分子が少ない疎水性部がナノ微粒子の 内側に存在し、その疎水部へNOが配置された可能性を考 えている。即ち、水分子が多く集まっている部位へNOが 配置されたPRO1の緩和能は大きくなり、水分子が少な い部位へNOが配置されているPRO2は緩和能が小さくな ると考えた。言い換えるとPRO1は親水性コロイドであ るため緩和能増大を示し、PRO2は疎水性コロイドであ るため緩和能低下を示した。

今回有機ラジカルを用いたメタルフリー造影剤に関して、 疎水性コロイドのProxylラジカルの**PRO2**の骨格に注目



Fig. 2 ミセル型とベシクル型の微粒子の構造。親水性部 (Hydrophilic part)にスピン源が配置している方が緩和能増大 を示す可能性が高い。



Fig. 3 PRO1とPRO2で予想されている形態と水分子が分散している様子。PRO1とPRO2のNO部が水分子と接触している方が緩和能増大を示す可能性が高い。

し、エチレングリコールの代わりに様々な置換基を導入したNOラジカルを合成した。置換基の疎水性度(ClogP値) に注目し、緩和能とClogPとナノ微粒子(コロイド)の形態 との相関関係を明らかとした。即ち疎水性コロイド(PRO 2)を親水性コロイドへ変換するアプローチの検討を行った。

2. 方法

Proxylラジカルに様々な置換基を導入するため、メトキ シエトキシテトラヒドロピラニル基 (OTHP)を導入した RNP-OTHP、メトキシエチルアセテート基(OAc)を導入 したRNP-OAc、メトキシエタノール基(OH)を導入した **RNP-OH**をFig. 4の方法に従って合成した⁷⁾。2-bromo-2-nitropropane-1.3-diolを出発物質とし4ステップでニト ロン体を得て、メチルマグネシウムブロミドによるグリ ニャール反応によりラジカル体を得た。脱アセタール化 後、目的とする置換基を変えた3種類のラジカル体を合成 した。得られたラジカルのESR測定により、ラジカル種 の性質をシグナル強度と線幅からキベルソンの式に従って 解析し、回転相関時間_{TR}を見積った。_{TR}からNO ラジカル 種の回転相関時間を見積ることが可能であり、粒子のサイ ズと一定の相関関係を有する。また水溶液中における粒子 径測定を動的光散乱法(DLS)で見積った。透過型電子顕微 鏡観察では(TEM)、水溶液試料をエラスチックカーボン グリッドへ塗布後、陰染色剤であるリンモリブデン酸を加

えた後乾燥させ、サイズと形態観察を行った。MR画像に ついては 1.5 = 7、スラーの磁場を用いて、濃度の異なる試料 の T_1 強調画像を撮像し、 T_1 緩和時間を見積った。得られ た T_1 緩和時間の逆数を濃度でプロットし、直線の傾きか ら緩和能を算出した。またラジカルの疎水性については ChemDraw Professional 16.0を用いてClogPを見積った。

3. 結果

3.1. RNP-XのESR 測定と回転相関時間の算出

RNP-OTHP, **-OH**, **-OAc**のClogP値は、それぞれ1.9, -0.38, 1.4 と見積られ、先に示した**PRO2**は-0.037 であった。1mM水溶液のESR測定によりシグナル強度と線幅から τ_{R} を見積った結果、それぞれ18.6×10⁻¹¹_s(**OTHP**)、7.96×10⁻¹¹_s(**OH**)、9.38×10⁻¹¹_s(**OAc**)が得られた。親水性基の水酸基が結合している**RNP-OH**が最も低い値を示し、値から**OH**<**OAc**<**OTHP**の順となりClogP値との相関が得られた(Fig. 4)。

3.2. RNP-XのDLS測定とTEM観察による微粒 子の形態の違い

DLSで得られた流体力学直径 $(D_{\rm H})$ は、すべて 100 ~ 200 nm サイズのナノ微粒子形成が示され (Table 1)、RNP 間でサイズによる大きな違いは観測されなかった。一方微 粒子の多分散指数 (PDI) では違いが観測され、**RNP-OH** は PDI が 0.1 以上で多分散な分布であったが、**RNP-OAc**



Fig. 4 RNP-X の合成ルート(上)と得られた RNP-X の水溶液中の ESR スペクトル(下)。

RNP	$\tau_{\rm R}/{\rm s}~{\rm (x10^{-11})}$	$r_1/mM^{-1}s^{-1}$	size/nm (PDI)	CMC	rate / s ⁻¹	ClogP	morphology
-OTHP	18.6	-	134 (0.071)	-	-	1.9	多層膜 orベシクル
-OH	7.96	0.13	154 (0.15)	5.5	0.034	-0.34	球状薄膜
-OAc	9.38	0.31	190 (0.057)	5.0	0014	1.4	-
TEMPO		0.10-0.20		_	0.070	_	-

Table 1 RNP の物理化学的パラメータ(τ_R、緩和能(r₁)、臨海ミセル濃度(CMC)、アスコルビン酸に対する消失速度と ClogP 値)、 粒子径 (PDI) と形態学的特徴 (morphology)





と-**OTHP**は0.1以下の0.057と0.07であり、ClogPが大きい疎水性が高いほど水溶液中で単分散のナノ微粒子として存在することが明らかとなった⁸。

TEM 観測では、試料として **RNP-OTHP**と-**OH**について観察した (Fig. 6)。サイズは DLS で得られた D_H と比較して大きな相違点は見られなかった。形態観察の結果、**RNO-OH**では球状のナノ微粒子の存在が示唆されたが、**RNP-OTHP**では球状が崩れた膜状物質が多く観察され、**RNP-OH**とは異なった集積構造であることが示唆された (Fig. 6)。

3.3. RNP-Xの緩和時間測定と緩和能 (r1)の算出

3種類のラジカルについて T_1 緩和時間測定を行った (Fig.7)。RNP-OHと-OAcについては、1-10mMの濃度 で、RNP-OTHPについては1mM以下の試料について実 施した。1mM以下のRNP-OTHPについては検出限度付 近であったため、高濃度で調整したRNP-OHと-OAcに ついて T_1 から r_1 を見積った。Fig. 7に示すように、 T_1 強 調画像は濃度に依存し、高濃度ほど輝度が強くなった。 r_1 について T_1 の逆数と濃度でプロットし、その直線の傾き から見積った結果 (Fig. 8)、興味深いことにより疎水性 の RNP-OAc (Clogp=1.4) が 0.31 mM⁻¹s⁻¹となり、 親水 性の高い RNP-OH (ClogP=2.1) が 0.17 mM⁻¹s⁻¹となり、 RNP-OAc が 1.7 倍以上高い値を示した。また RNP-OAc の 0.31 mM⁻¹s⁻¹の値は、先で述べた PRO1 よりも大きな 値であり、Proxyl 骨格を有するラジカルでは最も高い値 -OTHP



Fig. 6 RNP-THP (左) と-OH の TEM 画像。リンモリブデン 酸による陰染色による測定。

を示した。

3.4. アスコルビン酸に対するラジカルの消失速度

ProxylラジカルなどのNOラジカルは、生体内の還元物 質に対して高い反応性を示し、還元されヒドロキシアミ ン(NOH)へ変換されるため、ラジカルとしての機能を失 う。即ち、還元物質存在下では緩和時間短縮効果が抑制さ れる。そこで、還元物質であるアスコルビン酸と共存さ せることでのラジカル消失速度を基準物質であるTEMPO



Fig. 7 試験管中の RNP-X 水溶液の T₁ 強調ファントム画像。 外部磁場:1.5T, TR:10000.0ms, TE:12.0ms, SliceThickness:3.0mm.



Fig. 8 **RNP-OH** と -**OAc** 水溶液中の緩和時間の逆数と濃度 プロット。直線の傾きから緩和能(*r*₁)が算出される。

ラジカルと比較した。1mMの**RNP-OH**と**-OAc**に対し て、1mMのアスコルビン酸を加えESRシグナル強度の減 衰を時間プロットし、一次式により消失速度定数kを見積 った(Fig. 9)。その結果、**RNP-OH**と**-OAc**はそれぞれ、 0.034 と 0.014s⁻¹を示したが、TEMPOは 0.070s⁻¹であり、 **RNP-X**のkは小さくなった。この結果は、ナノ微粒子を 形成することでアスコルビン酸との反応性が抑制されたこ とを示唆している。

3.5. RNP-XのClogP値と緩和能と微粒子の形態 との相関性

今回得られた物理化学的パラメータ、粒子径と形態学的 情報をTable 1 にまとめた。緩和能について、疎水性の高 い RNP-OAc が親水性の高い-OH よりも高い緩和能を示 した。**RNP-OAc**の示した0.31 mM⁻¹s⁻¹の値は、**PRO1** (0.27 mM⁻¹s⁻¹)よりも大きくなり、我々が報告したラジカ ルナノ微粒子型造影剤で最も高い値であった点は評価でき る。またRNPシリーズと類似骨格のPRO2と比較すると、 **PRO2**の緩和能は0.17mM⁻¹s⁻¹であり、**RNP-OAc**の値 は顕著に大きな緩和能を示した。一方PRO2は先の研究 からミセル状の微粒子を形成していることが明らかであり、 ナノ微粒子の形態(ミセル状かベシクル状か)、緩和能と ClogPとの間に相関関係があることが示唆された。PRO2 の ClogP 値 が-0.037、RNP-OH が-0.38、RNP-OAc が 1.4 であることから、Proxvl 骨格を基本とした (PRO2 や RNPの骨格)分子会合体がミセルまたはベシクルを形成す るかの閾値はClogP値0.0~1.0付近にあることが示唆さ れる。PRO2やRNP-OHのようなミセル状のナノ微粒子 はNOラジカルが疎水性部に存在することが予想され、そ の結果低緩和能を示す。一方RNP-OAcやPRO1のよう なベシクル状のナノ微粒子はNOラジカル部周辺に水分子 がミセル状ナノ微粒子よりも多く存在することから、高緩 和能を示すことが示唆された。



Fig.9 ラジカル1 mM 水溶液(RNP-OH, -OAc と TEMPO)に対してアスコルビン酸1 mM 加えたときの ESR 強度変化 と消失速度の算出:TEMPO と RNP-OH の ESR スペクトル中の最も低磁場側のシグナルの強度変化(図左と真ん中)。 強度変化の時間プロット(図右)。実線は減衰を1次式でフィティングした結果。



Fig. 10 予想される RNP-OH と-OAc を使った分子変換によるスイチィングとT₁ 強調ファントム画像の変化。T₁ 緩和時間が長い RNP-OH ヘアセチラーゼを加えることで、T₁ 緩和時間が短い RNP-OAc へ変換されることで T₁ 強調画像の輝度が高くなり白くなる (左から右)。一方、RNP-OAc ヘエステラーゼを加えることで RNP-OH が生成し、輝度が下がった暗いT₁ 強調画像が得られる様子 (右から左)。

4. 考察

今回、PRO2と同様なProxyl骨格を有する有機ラジカ ルを使って、ClogP値、ナノ微粒子の形態と緩和能につい ての相関性を調べた。その結果、ある閾値以上のClogP値 を有するナノ微粒子はベシクル状となり高緩和能を示すこ とが明らかとなった。即ちClogP値を変えることによって、 ナノ微粒子の形態を制御することが可能であることが示さ れた。今回アセチル基を有する RNP-OAc が水酸基を有す る RNP-OHと比較すると 1.7 倍以上の高緩和能を示した。 このことを利用してFig. 10 に示すように、生体内のアセ チラーゼやエステラーゼにより緩和時間のスイッチングが 可能となることが期待される。

また我々は、MRI造影剤に加えて、蛍光性物質のナノ 微粒子化の研究も行っている⁹⁾。疎水性の高い芳香族炭化 水素にイオン性また非イオン性極性基を導入することによ って、ナノ微粒子の形態を制御することに成功しており、 今後疎水性コロイドと親水性コロイドの間のスイッチング や生体蛍光イメージングへ展開させたい。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、多大なご支援をいただきまし た公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より 感謝申し上げます。

電子顕微鏡測定では、公益財団法人九州先端科学技術研 究所の吉原大輔博士に有益なアドバイスをいただきながら 測定ができましたことを厚く御礼申し上げます。

緩和時間測定では、すべての試料の測定を日本レドック ス長沼辰弥博士に実施いただきました。厚く御礼申し上げ ます。

本研究内容は、昭和薬科大学 梅野智大博士、飯塚直子氏、

秋月唯花氏、馬場果奈恵氏、斎藤大朗氏をはじめ多くの研 究室のメンバーのご協力のもと進めてまいりました。厚く 御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) H. Hayashi, K. Ohkubo, S. Karasawa, and N. Koga Assemblies of Functional Small-Sized Molecules Having 4-Amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl Responsive to Heat and pH in Water and Their Water Proton Relaxivities *Langmuir 27*, 12709 (2011).
- H. Koi, N. Takahashi, Y. Fuchi, T. Umeno, Y. Muramatsu, H. Seimiya, S. Karasawa and H. Oguri Org. Biomol. Chem. 18, 5339 (2020).
- 3) K. Morishita, S. Ueki, Y. Fuchi, S. Murayama, T. Kaneko, N. Narita, S. Kobayashi, G. Hirai, I. Aoki, and S. Karasawa Self-Assembled Biradical Ureabenzene Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging ACS Appl. Nano Mater. 1, 6967 (2018).
- 4) R. Shiraishi, T. Kaneko, K. Usui, T. Naganuma, N. Iizuka, K. Morishita, S. Kobayashi, Y. Fuchi, Y. Matsuoka, G. Hirai, K. Yamada, and S. Karasawa Effects of Substituents on the Properties of Metal-Free MRI Contrast Agents ACS Omega 4, 20715 (2019).
- 5) R. Shiraishi, S. Matsumoto, Y. Fuchi, T. Naganuma, D. Yoshihara, K. Usui, K. Yamada, and S. Karasawa Characterization and Water-Proton Longitudinal Relaxivities of Liposome-Type Radical Nanoparticles Prepared via a Supramolecular Approach *Langmuir* 36, 5280 (2020).
- 6) J. Hirota, K. Usui, Y. Fuchi, M. Sakuma, S. Matsumoto, R. Hagihara, and S. Karasawa Fluorescence Properties and Exciplex Formation of Emissive

Naphthyridine Derivatives: Application as Sensors for Amines *Chem. Eur. J.* 25, 14943 (2019).

- T. Hirayama, M. Taki, M. Nakamura, T. Arata,
 Y. Yamamoto, Synthesis of a New Water Soluble
 2,2-Bifunctionalized Spin Label and Its Application to
 Troponin C, *Chem. Lett.*, 35, 834 (2006).
- 8) F. Babick *Suspensions of Colloidal Particles and Aggregates*, Springer, Switzerland, 2016, 40-44.
- 9) R. Hagihara, T. Umeno, S. Ueki, D. Yoshihara, Y. Fuchi, K. Usui, M. Sakuma, K. Yamada, and S. Karasawa Push-Pull Bisnaphthyridylamine Supramolecular Nanoparticles: Polarity-Induced Aggregation and Crystallization-Induced Emission Enhancement and Fluorescence Resonance Energy Transfer *Chem. Eur. J. 27*, 3039 (2021).