

<平成19年度>

食品用乳化剤の新たな利用法：MRI 増感剤内包 ナノカプセルの合成

豊 田 太 郎

(千葉大学大学院工学研究科共生応用化学専攻)

1. 本研究の背景と目的

生体内の組織・器官を、生体に対してより低負荷で画像化する技術は、ヒトの病理診断・健康管理のための技術として期待が高まっており、研究が盛んに行われている。中でも核磁気共鳴画像法（MRI）は、磁場に応答する原子核の反応の時間が周辺の影響を受け変化することを利用し、人体において着目する元素の原子核について非侵襲で画像化できる方法¹⁾であり、すでに臨床の現場で用いられている。従来の MRI は、水の水素原子核に着目していたため、神経系の磨耗や水を多く含む組織・器官の形状変化という、健康管理の用途ではその威力を発揮するものの、細胞や組織への特異性がないことから組織病変の検出には限界があった。近年この問題を解決するため、着目する元素を造影剤として体内に導入してコントラストを上げて造影する手法が望まれている。特に、超常磁性を示す酸化鉄ナノ粒子は、MRI において周囲の磁場をゆがませることで高いコントラスト比を示す造影剤²⁾であるが、体内滞留時間に改善の余地が残されている。このような造影剤を、長時間体内に滞留させるための生体適合性カプセルの製法開発は急務である。

そこで本研究は、酸化鉄ナノ粒子のカプセル形成剤として、生体適合性の高い食品用乳化剤に着眼した。食品用乳化剤には、多糖類と両親媒性分子（親水性部位と疎水性部位を併せ持った分子で、水にも油にも可溶である性質をもつ）に大別され

るが、多糖類カプセルは酸化鉄ナノ粒子を分散包埋することになり、MRI のコントラスト比を下げることが問題となる。そこで本研究では両親媒性分子を用いることとした。両親媒性分子は水中で自発的に会合してカプセル膜を形成する。したがって、内包する酸化鉄ナノ粒子の MRI でのコントラスト比を下げないように、膜厚をナノメートルに抑えたカプセルの形成法が重要である。ところが、分子は水中で自発的に会合してカプセル構造を形成するため、従来法によって自己会合させると膜が多重膜化する。これは、本研究の目指すカプセルの膜の厚みを制御するには適切でないため、新しい両親媒性分子のカプセル製法が必要である。本研究では、両親媒性分子の膜で覆われた油中水滴エマルションをつくり、それにもう一つの両親媒性分子の膜を外から貼り合わせる製法³⁾でこの問題を解決する。この製法は原理上、遠心沈降によって水滴からカプセルを形成するため、カプセルの膜は1枚となり、分子長の約2倍の膜厚、つまりナノメートルの膜厚のカプセルを形成できる。以上より、本研究の目的は、両親媒性分子を用いて酸化鉄ナノ粒子を含むカプセル合成法の確立とした。

2. 実験方法

カプセルを構成する両親媒性分子として、食品用乳化剤である卵黄レシチンを用いた。卵黄レシチンにはフォスファチジルグリセロールおよびコレステロールを9:1:1（モル比）で配合し、流

動パラフィンに溶解させた。また、酸化鉄ナノ粒子である MRI 造影剤リゾビスト® (バイエル薬品) に対し、トリス塩酸緩衝液 (0.1 mol L^{-1} , pH 7.6), 塩化ナトリウム (0.1 mol L^{-1}) を溶解させた。このリゾビスト分散液を、両親媒性分子が溶解した流動パラフィンに添加し、機械的攪拌によって、油中水滴エマルションを得た。1.5 mL プラスチックチューブに、スクロースと塩化ナトリウム (0.1 mol L^{-1}) を溶解したトリス塩酸緩衝液 (0.1 M , pH 7.6) を $800 \mu\text{L}$ だけとり、これに $500 \mu\text{L}$ のエマルションを静かに重層した後、卓上型遠心機によって 4°C , 14000 rpm で 30 分間遠心沈降させた (図 1)。チューブ底面に形成されたペレットを底面から抜き取り、再分散させた後に光学顕微鏡で観測した。

これを血球計算盤で数密度を計測した後に、アクリルセルに導入し、7 Tesla の MRI 装置 (Bruker) で観測した。さらに、レーザー散乱型粒度分布計測によってサイズ分布を得ることで、酸化鉄ナノ粒子内包カプセルのサイズと MRI 造影効果について検討した。

3. 酸化鉄ナノ粒子カプセルの構造評価

酸化鉄ナノ粒子を含む油中水滴エマルションの水滴を遠心沈降して、下層のトリス塩酸緩衝液に沈降させる場合、膜の流動性が高ければ、水滴どうしが合一して、カプセルは形成しない。膜の流動性が低ければ、水滴をくるむ両親媒性分子の膜が破裂して、カプセルは形成しにくい。流動パラフィンに対して、溶解する両親媒性分子を卵黄レシチンのみとすると、カプセルはほとんど得られなかった。そこで、流動パラフィンに溶解する両親媒性分子として、卵黄レシチンに、水滴どうしの合一を抑制するためのアニオン性両親媒性分子であるフォスファチジルグリセロールと、膜の流動性を抑制するためのコレステロールを添加し、その配合比を検討したところ、モル比で 9:1:1 で平均粒径が約 $10 \mu\text{m}$ のカプセルを得ることができた。両親媒性分子にローダミン 6 G という蛍光色素を混ぜることで、両親媒性分子が自発的に会合してカプセルが形成したのではなく、エマルションが鋳型となってカプセルを形成したこと

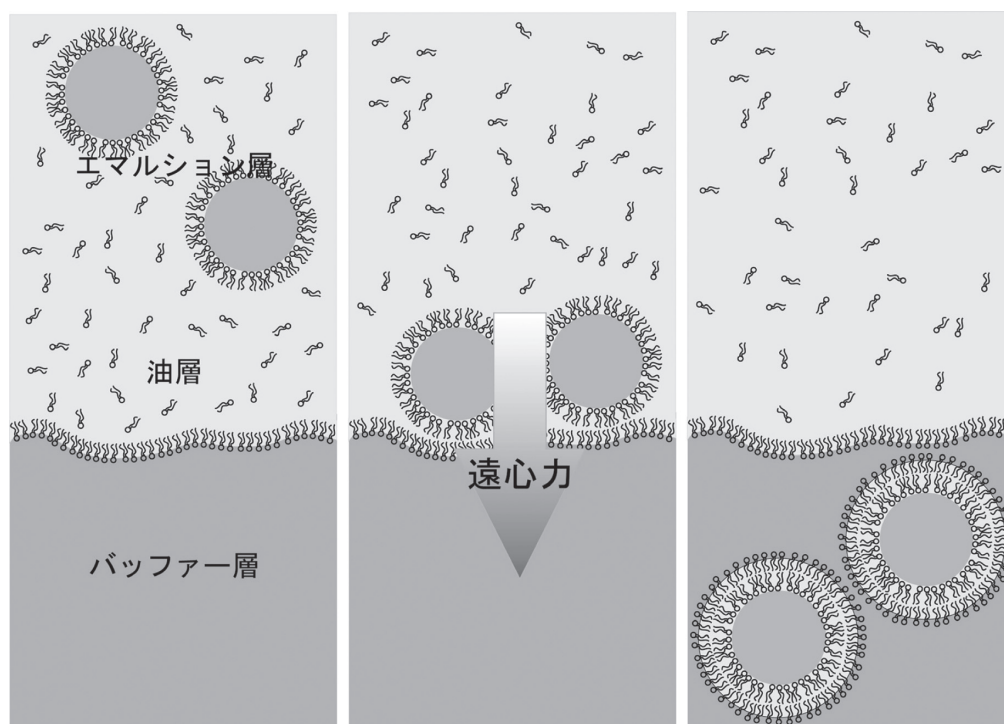


図 1 遠心沈降による油中水滴エマルションからカプセルを合成する手法の模式図

を示した（図 2）。フリーズフラクチャー法により透過型電子顕微鏡像で、このカプセルの膜の多重度と厚みを求めたところ、カプセル膜は 1 枚で、その厚みは約 10 nm であることが明らかになった。

次に、リゾビスト®を内包させ油中水滴エマルションを得、遠心沈降によりカプセルを形成させたところ、カプセルはほとんど得られず、また下層のトリス塩酸緩衝液全体に酸化鉄ナノ粒子が漏出して拡散したことが光学顕微鏡観測によってわ

かった。これは、遠心沈降する粒子にかかる力がその密度に依存することから、酸化鉄ナノ粒子を内包することでカプセルが重くなり、沈降中に膜が崩壊してしまったり、またカプセル膜自体が半透膜の性質を有することから、酸化鉄ナノ粒子を内包することで内部が高張となり、水が急激に浸透して破裂してしまったものと考察した。そこで、エマルションの下層のトリス塩酸緩衝液とカプセル内部との密度差や浸透圧差を調整するために、トリス塩酸緩衝液にスクロースを添加してカプセ

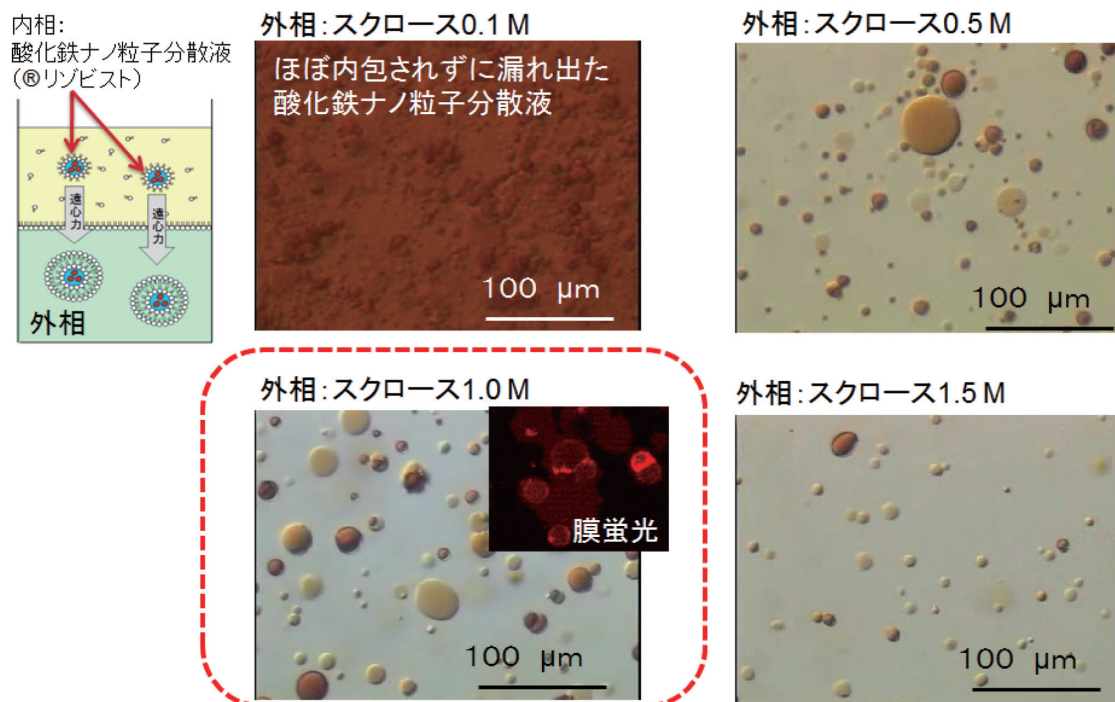


図 2 リゾビスト®を内包したカプセルの光学顕微鏡像。

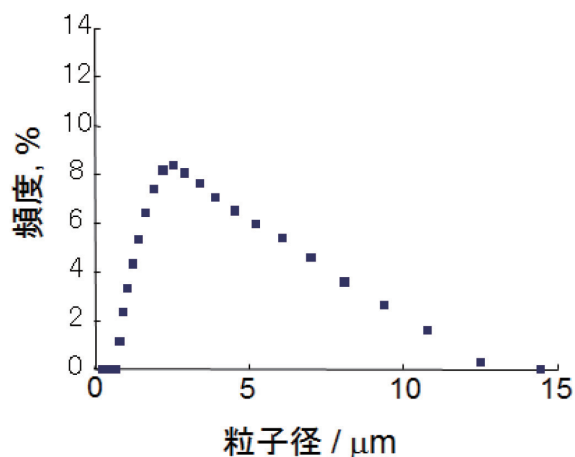


図 3 静的レーザー光散乱計測によって求められたカプセルの粒度分布

ルを形成した。光学顕微鏡で観測された限りでは、スクロースが 1.0 M の条件で酸化鉄ナノ粒子が緩衝液全体に漏出することなく、平均粒径が約 8 μm のカプセルを得ることができた（図 3）。

4. カプセル内鉄濃度測定

酸化鉄ナノ粒子は数密度が高いほど MRI でコントラスト比が強くなる造影剤であるので、リゾビスト®と同程度の数密度で酸化鉄ナノ粒子がカプセルに内包されていなければならない。酸化鉄ナノ粒子を透過型電子顕微鏡などで 1 つ 1 つカ

ウントすることは現実的に困難であるので、鉄濃度に換算して、このようにして得られたカプセルが、通常のリゾビスト®と同等の造影能があるかを調べた。

血球計算盤およびレーザー散乱型粒度分布測定により、カプセルの数密度と平均粒径を求めた。カプセル分散液 100 μL をとり、酸でカプセルと酸化鉄を完全に溶解させた後、JIS 法に従って鉄の定量分析を行った。また、カプセル分散液を 15°C、14000 rpm で遠心沈降させ、その上澄み 100 μL についても同様に鉄を定量し、その差分から、カプセル内の鉄濃度を求めた。これによって、カプセル内の鉄濃度は $32 \pm 9 \text{ mg mL}^{-1}$ と求まった。リゾビスト®そのものは、 25 mg mL^{-1} の鉄が含まれていることから、本質的には、リゾビストそのものの MRI 造影能と遜色ないことが示唆された。

5. *In vitro* での酸化鉄ナノ粒子カプセルの MRI

形成された酸化鉄ナノ粒子カプセルについて、7 Tesla の MRI 電磁コイルを用いて MR イメージングを行った。このとき、底面が 1 cm $\times$ 1 cm のプラスチックセルを用いコイル近傍のカプセルを MR イメージングした。カプセルはトリ

ス塩酸緩衝液よりも比重が大きいので、コイル近傍のセル底面に沈降する。したがって、セル底面をカプセルが埋め尽くさないよう、カプセルの数密度を調整し、光学顕微鏡で観測されるカプセルと MRI で観測される黒点とが一致する条件を見出した。MR イメージングの前では球形で分散していたカプセルは、イメージング後に光学顕微鏡で観測したところ、凝集し変形が認められた (図 4)。これは、MRI における傾斜磁場によって、酸化鉄ナノ粒子を含むカプセル内部にひずみの力がかかり、その結果セル底面でひきずられるように変形、凝集したもの⁴⁾と考えられる。このカプセルの凝集体について、光学顕微鏡では断面積が $2.8 \times 10^{-9} \text{ m}^2$ 、MRI の造影面積は $1.4 \times 10^{-6} \text{ m}^2$ と求まったことから、このカプセルは約 480 倍もの面積で造影効果をもたらすことがわかった。また、MRI のピクセルあたりの輝度のプロファイルから、カプセルの造影の分解能を求めたところ、350 μm であった。これにより、カプセル内であっても、通常とほぼ同様の空間領域で酸化鉄ナノ粒子が MRI で造影されることが明らかになった。また、粒子径が 20 μm 程度であれば MRI で一つ一つのカプセルの挙動を観測できることが示唆された。

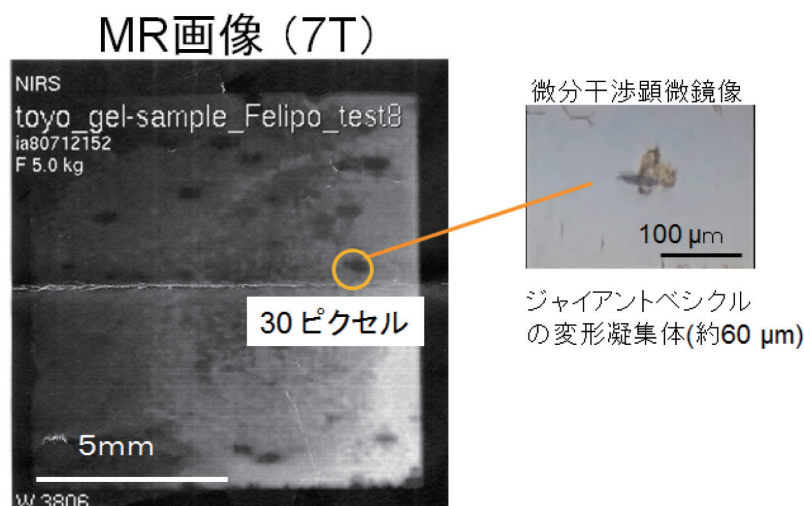


図 4 酸化鉄ナノ粒子内包型カプセルの MR 画像と微分干渉顕微鏡像の比較

6. おわりに

本研究は、食品用乳化剤である卵黄レシチンを主成分であるカプセルに MRI 造影剤である酸化鉄ナノ粒子を内包する製法の確立を目的とした。遠心沈降を利用するための膜配合や比重を調整することで、カプセル膜を 1 枚とし、厚みを約 10 nm に抑えた粒径約 8 μm の酸化鉄ナノ粒子内包カプセルを作製することができた。*In vitro* での MRI により、このカプセルが通常市販されているものと同程度の造影能をもつことがわかったため、モデル動物をつかった *In vivo* での試験が今後の課題である。本研究で作製されたカプセルが長い体内滞留時間で MR イメージングされれば、カプセル内に薬物を同時内包して、ドラッグデリバリーシステムにおける薬物放出過程をカプセル一つ一つのレベルで可視化する要素技術への応用などが期待される。

謝 辞

本研究は、本学大学院工学研究科の細井智浩氏、大栗直人氏の実験研究によっている。また、MRI

については放射線医学総合研究所分子イメージング研究センターの青木伊知男博士、菅野巖グループリーダーにご協力いただいた。ここに謝意を表します。また本研究を遂行するにあたり、貴重な研究助成を賜りました財団法人浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者各位に心より感謝いたします。

研究成果発表

- 1) 大栗直人, 豊田太郎, 米山操, 藤浪真紀, 小熊幸一, 菅野巖, 青木伊知男: 酸化鉄ナノ粒子内包型ジャイアント・ベシクルの作製と MRI への利用, 第 69 回分析化学討論会 (名古屋), 2008 年 5 月。

文 献

- 1) 巨瀬勝美, NMR イメージング, 共立出版 (2004).
- 2) E. M. Shapiro, S. Skrtic, K. Sharer, J. M. Hill, C. E. Dunbar, A. P. Koretsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 10901-10906 (2004).
- 3) S. Pautot, B. J. Frisken, D. A. Weitz, *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 10718-10721 (2003).
- 4) C. Ménager, D. Guemghar, R. Perzynski, S. Lesieur, V. Cabuil, *Langmuir* 24, 4968-4974 (2008).

Development on Preparation Method of Lipid Membrane Capsules Encapsulating MRI Contrast Agents

Taro Toyota

(Department of Applied Chemistry and Biotechnology,
Graduate School of Engineering, Chiba University)

The present study aimed at the development of the method of making a supramolecular capsule encapsulating nuclear magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents using emulsifying additives for food. MRI enables us nondestructive and non-invasive observation about the inside of the body by three dimensions and it is widely used as a clinical measurement instrument. Recently, in order to improve the accuracy of clinical judgement for tumors by MRI, MRI contrast agents have drawn much attention. Among the MRI contrast agents, iron oxide nanoparticles encapsulated in lipid membrane capsules (which are called as vesicles) are one of the attention-getting contrast agents, since the vesicles can let the iron oxide nanoparticles accumulate and stay for longer time in the organs than the bare iron oxide nanoparticles do. The uniformness of vesicles is important for the reproducibility of the MRI measurement. However, it is difficult to control the uniformness of membrane lamellarity and inner structure of vesicles, since the vesicles are formed by the autonomous self-assembly of lipid in the conventional methods. In present study, we propose a new method to prepare the MRI contrast agents of iron oxide nanoparticles encapsulated in uniform vesicles. The inner and outer leaflets are prepared separately by using the water-in-oil emulsion and water-oil interface. The centrifugation of the water-in-oil emulsion toward the water-oil interface affords the sticking of these leaflets, providing formation of spherical bilayer membranes, i. e. vesicles. Lecithin that is one of the emulsifying additives for food was dissolved to the oil phase, and the iron oxide nanoparticle dispersion was mixed to the oil phase and the water-in-oil emulsion was obtained. The emulsion was poured on the aqueous phase in a microtube and then the layered water-in-oil emulsion was centrifuged to form vesicles. The vesicles encapsulating the iron oxide nanoparticles had single membrane and the diameters in the range of 1- 15 μm , judged from the optical microscope observation and the static laser scattering measurement. The aggregated body of the vesicles which had the diameter of 60 μm was corresponded to be a black spot of MRI in a phantom body composed of pectin gel. It will be expected that the result of the present study contributes to the research and development of new imaging techniques for tracing the effect of the drug delivery system with MRI in the future.