

— 粘土基礎講座 I —

粘土基礎講座 I ワーキンググループ連載解説

層状複水酸化物のドラッグデリバリー材料への応用

會 澤 純 雄

岩手大学大学院 工学研究科 フロンティア材料機能工学専攻

〒020-8551 岩手県盛岡市上田4-3-5

e-mail: aisawa@iwate-u.ac.jp

Application of Layered Double Hydroxide for Drug Delivery Material

Sumio AISAWA

Department of Frontier Materials and Function Engineering,

Graduate School of Engineering, Iwate University,

4-3-5 Ueda, Morioka, Iwate 020-8551, Japan

1. はじめに

近年、環境への負荷が低い材料や生体親和性の高い材料の開発が求められ、これらの問題を解決できる材料として粘土鉱物が挙げられます。現在、粘土鉱物は、フィラー、塗料、化粧品、医薬品など様々な分野の製品に利用されています。とくに医薬品において、タルク、カオリン、セピオライトなどは外用薬の基剤、内服薬の主剤・添加剤として使われています¹⁾。粘土鉱物は交換できるイオンから「陽イオン性粘土」と「陰イオン性粘土」に大別されます。本稿でとり上げる層状複水酸化物 (Layered Double Hydroxide; 以後, LDH と略記します) は、一般式 $[M^{2+}_{1-x}M^{3+}_x(OH)_2][A^{n-}_{x/n} \cdot yH_2O]$ で表され、陰イオン性粘土に分類されます (図1)。なかでもすでに工業化されているハイドロタルサイト (Hydrotalcite; 組成式 $Mg_3Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$) は様々な分野において利用されています。また、C, O, Al, Mg のような自然の物質循環に対応できる元素から構成されており、かつ人体への安全性も持ち合わせています。そのため、医薬用制酸剤、陰イオン交換体、高分子材料のハロゲン捕捉剤や熱安定剤などに応用されています。ハイドロタルサイト (合成ヒドロタルサイト) は「胃酸に対する強い中和力」、「pH 3 ~ 5を長時間維持」、「抗ペプシン作用」

など、制酸剤として優れた性能をもっており、多くの胃薬に含まれています。他にも、血清中に存在する過剰なリン酸の除去剤への検討がされています。

このような性質をもつ LDH は、陰イオン性の薬物を LDH 層間へ取り込んだ薬物 /LDH の合成からさらに発展し、薬物 /LDH による薬物のキャリアあるいはデリバリー材料への応用、つまりドラッグデリバリー材料への進展が期待されています。そこで本稿では、LDH への機能付与の観点から、ドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System; 以後, DDS と略記します) へ

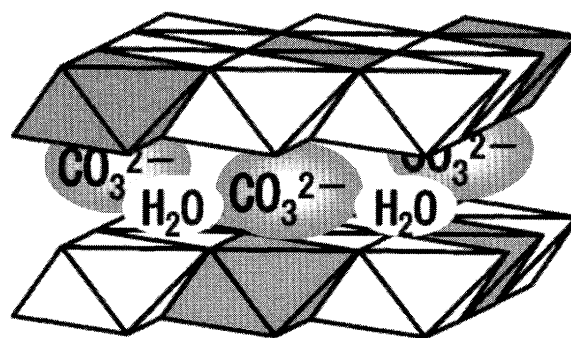


図1 層状複水酸化物の構造

の応用を目指した、LDH への各種薬物の取り込み・放出、保持・安定性、さらに薬物 /LDH による薬物ならびに LDH の細胞への輸送機構について述べることにします。粘土基礎講座の趣旨に合致しない内容も多数ありますがご了承ください。なお、LDH の構造、合成、熱分解ならびにインターカレーション方法などの基本的な性質については、本基礎講座において、日比野氏が「21. ハイドロタルサイトの合成と利用」、また成田氏が「25. 層状複水酸化物のインターカレーション特性とその利用」について詳しく述べているのでこれらを参考してください。

2. ドラッグデリバリーシステムについて

DDS についてはじめに触れておきます。薬物の治療効果は、薬物に対する標的細胞の感受性と標的作用部位への薬物の到達性によって決まります。しかし、投与された薬物は、標的作用部位へわずかししか到達せず、大部分は代謝あるいは体外へ排出されてしまいます。これらを解決するために、DDS は薬物の投与形態を工夫し、薬物を必要なとき、必要な場所へ、必要な量だけ到達させることを目標にしています (図 2)。これが実現できれば、副作用を減らし、薬物の有効性を効率的に発揮させることができます。これまで製剤学の分野において、DDS はまったくの理想論でしたが、近年の目覚ましい医・工・薬学の進歩により、高性能な薬物の徐放が可能となりました。DDS 材料には、薬物の徐放化、安定化、吸収促進、作用部位へのターゲティングなどが要求されます。これまで、いずれかの機能をもった DDS 材料は開発されてきましたが、薬物の多様化、医療技術の高度化にともない、種々の機能を併せもつ材料の研究開発が大学・研究機関・企業などにおいて行われています。現在、臨床試験や実用化まで進展している DDS 材料としては、ウィルスベクター、リポソーム、高分子ミセル、デンドリマー、カーボンナノチューブ、カーボンナノホーンなどが挙げられます。なかでもリポソームは 1980 年代にカチオン性リポソームを用いた細胞への遺伝子導入が試みられてから、ウィルスベクターに替わる安全性の高い非ウィルスベクターとして様々な研究が行われています。現在、DDS 製剤として認可されているの

は一部の高分子材料を除けばリポソームのみといえます。リポソームは、生体内で水と二酸化炭素に代謝されるため、他の DDS 材料と比較して生体親和性の高い材料であるといわれています。カーボンナノチューブやカーボンナノホーンはその安定性ゆえに体内で分解されないため、生体内への蓄積が懸念されていますが、違う捉え方をすれば患部への蓄積性が優れていることになります。一方、無機材料を DDS 材料に用いた研究例は少なく、生体親和性の高いハイドロキシアパタイトを薬物の徐放担体にする研究²⁾やモンモリロナイトを経口遺伝子導入剤として利用する研究が報告されています。

LDH は比較的簡単に LDH 層間へ各種陰イオンを取り込ませることができるため、最近ではとくに有機陰イオンや生体分子などを取り込んだ生体分子 /LDH に関する研究が増加しています。以前から薬物の取り込みに関しても検討されており、薬物の保持剤としての可能性は期待されていました。我々の研究グループも、LDH へ苦味の強い薬物の取り込みによる苦味のマスキング剤としての有効性について報告をしています³⁾。しかし、LDH を DDS 材料の基盤材料として用い、培養細胞やマウスを用いた *in vitro*, *in vivo* 試験による評価が始まったのはここ数年のことです。このように、LDH の二次元層空間は、ナノスケールで制御可能な分子貯蔵領域、つまり、分子コンテナや分子キャリアとして捉えられ、DDS 材料の観点からも非常に興味深い材料になりつつあります。

3. 経口投与を目的とした薬物 /LDH

経口投与は一般的な薬物の投与方法であり、錠剤、カプセル剤、散剤、液剤などさまざまな形態が存在します。また、経口投与では消化管内の移動にともなう環境の変化に適応できる DDS 材料が求められます。本章では、経口投与を目的とした薬物 /LDH の合成、薬物の放出ならびに耐酸性 LDH の合成について紹介します。

3.1. 薬物 /LDH の合成とその性質

1 章で述べたとおり、陰イオン性粘土である LDH は陰イオン性の薬物を様々な取り込み方法により LDH 層間へ取り込むことができます。非ステロイド性抗炎症薬 (以後、NSAID と略記します) は、鎮痛薬として効果が高いため広く普及しており、経口投与時の胃腸障害などの副作用が知られています。そこで、NSAID を LDH と複合化することによりカプセル化し、副作用の軽減を試みています。

Arco らは、古くから解熱鎮痛薬として用いられてきたサリチル酸およびリュウマチや痛風などの鎮痛薬として広く利用されているナプロキセン (Naproxen; 以後、Nap と略記します) の 2 種類の NSAID を再構築法と共沈法により Mg-Al 系 LDH への取り込みについて検討を行いました⁴⁾。その結果、モノカルボン酸である

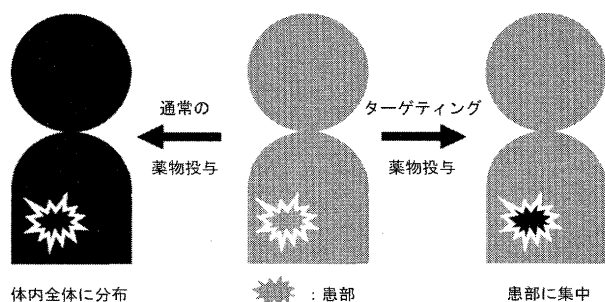


図2 ドラッグターゲティングの模式図

NSAID は一価の陰イオンとして LDH との静電的相互作用により 2 分子層を形成して LDH 層間へ取り込まれることを明らかにしました。また、Nap/LDH の熱安定性を調べたところ、Nap の分解温度は 170°C であるのに対し、Nap/LDH の分解温度は 300°C にまで上昇します。すなわち、LDH 層間へ取り込むことで薬物の熱安定性を高めることが可能となります⁵⁾。

NSAID の副作用の軽減を目指し、NSAID/LDH をマウスに投与する *in vivo* 試験による潰瘍形成試験が調べられています⁶⁾。インドメタシン (Indomethacin; 以後、InD と略記します) の副作用として、消化性潰瘍が知られています。Arco らは、InD/Mg-Al 系 LDH を共沈法および再構築法により合成し、InD が共沈法では 2 分子層、再構築法では単分子層を形成して LDH 層間へ取り込まれることを明らかにしました。つぎに、InD、InD/LDH (共沈法) ならびに InD と CO₃/LDH の混合物を InD 相当量に換算してマウスに経口投与し、マウスの胃潰瘍形成試験を検討しています。投与 5 時間後、マウスの胃を摘出し潰瘍形成率を測定した結果、InD のみでは $0.401 \pm 0.100\%$ であるのに対し、InD/LDH では 4 分の 1 の $0.106 \pm 0.033\%$ 、InD + CO₃/LDH 混合物では $0.229 \pm 0.037\%$ となり、InD/LDH は InD の副作用である潰瘍形成を軽減できることを明らかにしました。また、InD に比べ InD + CO₃/LDH 混合物の潰瘍形成率は CO₃/LDH が制酸剤として作用するため減少したと推測されています。

3.2. 耐酸性 LDH の合成とその性質

この他にも様々な薬物を取り込んだ LDH に関する研究は多く見られますが、経口投与で最も重要な点は、胃酸による LDH の溶解です。LDH は制酸剤として優れていますが、腸で吸収されやすい薬物と LDH を複合化した場合、胃酸による LDH の溶解にともない放出されては複合化のメリットが得られません。そこで、胃酸による LDH の溶解を抑えるために、さまざまな被覆剤による LDH の耐酸性化が試みられています。

Kameshima らはオレイン酸に着目し、LDH の耐酸性の向上を試み、再構築法によるオレイン酸の Mg-Al 系 LDH への取り込みならびに LDH の表面修飾に成功しています⁷⁾。また、オレイン酸/LDH と CO₃/LDH の模擬胃酸中 (HCl 水溶液, pH 2.0, 37°C) における耐酸性を比べたところ、CO₃/LDH は 50% 以上溶解したのに対し、オレイン酸/LDH はほとんど溶解しません。つまり、オレイン酸の被覆により LDH の溶解を抑制することができます。このことから、オレイン酸/LDH の耐酸性は経口投与による胃を経由した腸への薬物輸送に耐えられる材料であることが示された研究例です。

Li らは、鎮痛・消炎剤であるフェンブフェン (Fenbufen; 以後、FBF と略記します) を共沈法により Mg-Al 系 LDH に取り込み、さらに腸溶性ポリマーであるオイドラギット® (Eudragit®; 以後、Eud と略記します) により被覆した Eud/FBF/LDH と Eud/FBF からの FBF の

放出挙動について報告しています⁸⁾。それぞれのサンプルを胃 (pH 1.2, 保持時間 2 時間)、十二指腸 (pH 6.8, 保持時間 2 時間) および小腸 (pH 7.4, 保持時間 5 時間) を想定し、順に pH を変化させ FBF の放出を比較したところ、FBF は pH 1.2 において FBF/LDH から 10 分以内に 100% 放出され、Eud/FBF からはほとんど放出されません。しかし、Eud の溶解する pH 7.4 になると約 1 時間で急速に FBF は放出されます。一方、Eud/FBF/LDH は徐放性に優れており、pH 7.4, 保持時間 5 時間の条件においても FBF の放出率を 67% に抑えることに成功しています。

4. 抗がん剤/LDH の合成とその細胞毒性

3 章では経口投与を目的とした薬物/LDH について述べましたが、本章では抗がん剤/LDH について紹介します。抗がん剤/LDH に関する研究は 2004 年頃から増え始め、これまでに多くの抗がん剤が LDH に取り込まれています。抗がん剤/LDH の評価方法として、がん細胞に対する細胞毒性や細胞増殖抑制効果を調べなければなりません。そこで、様々な培養細胞を用いた *in vitro* 試験ならびにマウスによる *in vivo* 試験を利用した抗がん剤/LDH の評価が行われています。

4.1. 細胞毒性の評価方法

ここでは *in vitro* 試験による細胞毒性の評価方法について説明します。例えば、新しい生物活性のある薬物が完成した場合、薬物の毒性の有無や生物活性を調べるために細胞毒性試験を行います。細胞毒性や感受性を調べる方法は、コロニー形成法、クリスタルバオイオレット法、MTT 法や WST 法などが一般に利用されています。コロニー形成法は、細胞の増殖能力を指標としてコロニーを形成させ、その数を計測する方法です。一方、MTT 法または WST 法は、還元発色試薬と生細胞中の脱水素酵素活性を利用して発色させ、吸光度から細胞の生存率を測定する方法です。これらの方法は比較的操作が簡便で精度も高いことから、細胞毒性などの評価を行う際に広く利用されています。抗がん剤/LDH や CO₃/LDH についても、いずれかの方法により、細胞毒性や細胞増殖抑制効果などを調べている論文が多く見られます。なお、細胞毒性試験の詳細なプロトコルなどは Cell Bank や組織培養学会の HP などで紹介されていますので参考にしてください⁹⁾。

4.2. がん細胞について

つぎに、抗がん剤/LDH の標的であるがん細胞について説明します。がん細胞は増殖が速く、エネルギーや葉酸などのビタミン類を多く必要とするため、がん組織周辺には新生血管が多く見られます。しかし、この新生血管は急速に形成されるため、血管内皮細胞の並び方が正常血管に比べて粗雑 (有窓血管壁) でリンパ管も未発達で

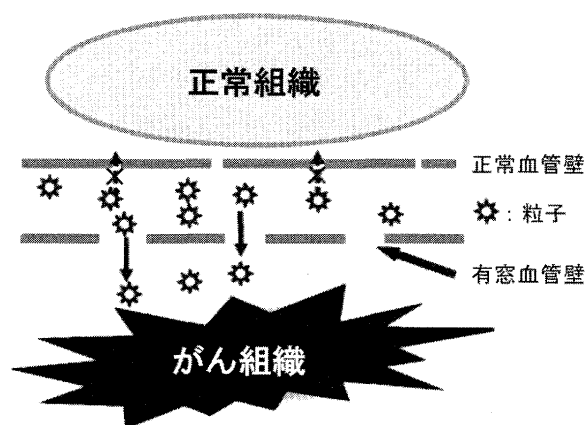


図3 EPR 効果の模式図

あることが知られています。そのため、静脈注射によって投与された粒子は、新生血管の内皮細胞に漏れ出しやすく、リンパ系に回収されずがん組織周辺に蓄積されます。これはEPR効果(Enhancement Permeability and Retention Effect)とよばれており、DDS材料設計における基礎となっています(図3)¹⁰⁾。抗がん剤/LDHについても、血中に投与した際、EPR効果によりがん組織の細胞間質へLDHが蓄積し、抗がん剤を徐放することが期待されます。しかし、抗がん剤/LDHについて、このような*in vivo*試験による評価はあまり検討されていません。また、*in vitro*試験の結果が*in vivo*試験にそのまま反映されないことは多々あります。したがって、EPR効果におよぼすLDHの粒子サイズ、形状、表面特性や電荷などの影響を調べる必要があり、効率的・選択的にがん組織へ輸送されるLDH粒子の合成方法の確立が今後の課題になります。

4.3. 抗がん剤/LDHの細胞毒性

ピリミジン系代謝拮抗系の抗がん剤である5-フルオロウラシル(5-Fluorouracil; 以後、5-FUと略記します)は、主に静脈内投与によって使用され、現在でも一般的に使われています。5-FUは、水への溶解度が比較的高く、pHを変化させることにより陰イオンとしてLDHへ取り込むことができます。5-FUはMg-Al系LDHへ、再構築法¹¹⁾、共沈法^{12,13)}、イオン交換法¹³⁾といずれの方法を用いても容易に取り込むことができます。また、リン酸緩衝溶液中におけるLDHからの5-FUの放出挙動についても検討されており、5-FUの放出は、リン酸イオンとのイオン交換反応により進行し、およそ120分で平衡に達すると報告されています。とくに、pH 4.0の酸性条件下では、開始20分で50%以上の5-FUが放出されます。これは、LDHの一部が溶解することにより放出が促進されるためです。

また、5-FU/LDHの細胞毒性についても検討されており、ヒト子宮頸がん由来のHeLa細胞へ共沈法とイオン交換法により合成した5-FU/LDHを添加し、コロニー

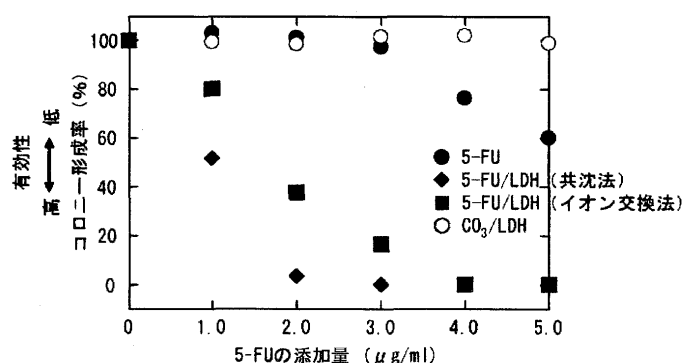


図4 コロニー形成率におよぼす5-FU添加量の影響
HeLa細胞, ●5-FU, ◆5-FU/LDH(共沈法), ■5-FU/LDH(イオン交換法), ○CO₃/LDH

形成法による細胞増殖抑制効果を調べています。5-FU/LDHの抑制効果は5-FUに比べて高くなり、また、CO₃/LDHの細胞毒性は低いことがわかります(図4)。この他にも、ヒト肝がん由来のHep1細胞、ヒト肺がん由来のA549細胞、ヒト骨肉腫由来のHOS細胞に対する細胞増殖抑制効果も調べられています。5-FUの細胞増殖抑制効果は、核孔を通過した5-FUが、核内においてTMPの合成を阻害することにより細胞死を引き起こすことで発現します。5-FUの抑制効果は濃度の上昇にとまらなく高くなりますが、5-FUは親水性が高く陰イオンのため、細胞膜透過による細胞内への輸送は起こりにくいことが予想されます。つまり、5-FUはLDHと複合化することで細胞内へ取り込まれやすくなり、5-FUの輸送効率を顕著に向上させることができます。

葉酸代謝拮抗系の抗がん剤であるメトトレキサート(Methotrexate; 以後、MTXと略記します)をMg-Al系LDHへ共沈法により取り込んだMTX/LDHを合成し、MTX/LDHの*in vitro*試験による細胞増殖抑制効果が報告されています¹²⁾。MTX/LDHの細胞増殖抑制の評価は、ヒト腱由来の線維芽細胞およびヒト骨肉腫由来Saos-2細胞に対して行い、MTXよりもMTX/LDHの方がSaos-2の細胞増殖を効果的に抑制することができます。また、線維芽細胞に対しては有効性が見られないため、MTX/LDHは、正常細胞に対して増殖抑制効果が低く、がん細胞に対しては高いことから細胞選択性をもっているといえます。

4.4. アンチセンスオリゴヌクレオチド/LDHの細胞増殖抑制

これまで、LDHへのヌクレオチドやDNAの取り込みに成功しており、DNA/LDHは遺伝子ベクターとしても注目されています。抗がん剤以外にも、c-アンチセンスオリゴヌクレオチド(c-Antisense Oligonucleotide; 以後、As-mycと略記します)はアポトーシス(細胞死)を誘発することから、遺伝子治療やがん細胞の増殖抑制に有効です。そこで、細胞へのAs-mycのトランスフェク

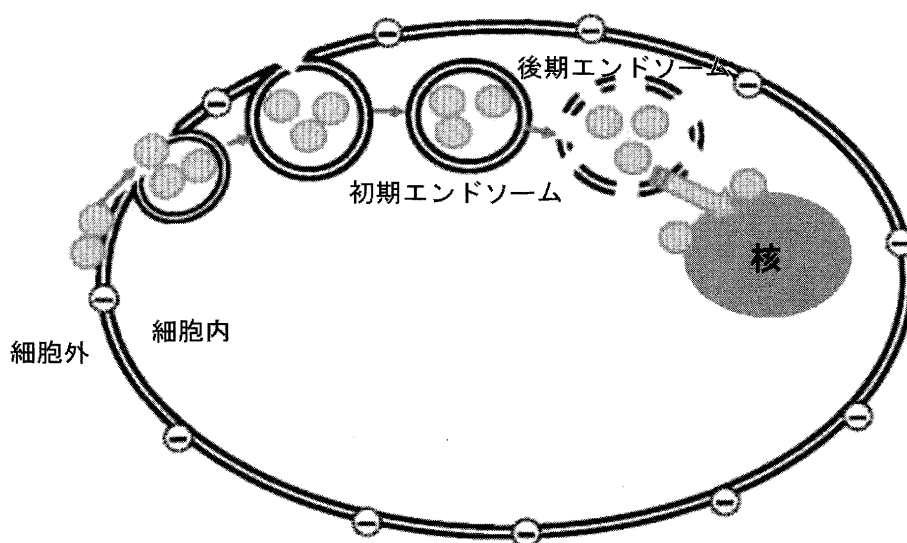


図5 エンドサイトーシスの模式図

シオンによる抗がん性の発現を目指し、イオン交換法により Mg-Al 系 LDH に As-myc を取り込んだ As-myc/LDH の合成を試みています¹⁴⁾。

As-myc は、表面に存在しているリン酸が負電荷をもつことから、静電的相互作用によって LDH 層間へ取り込まれます。つぎに、ヒト白血病由来の HL-60 細胞に対して、As-myc/LDH を作用させたところ、コントロールの細胞増殖率 100% に対し、As-myc では 91%、As-myc/LDH では 61% となり、As-myc/LDH は高い細胞増殖阻害効果を示します。一般に細胞の表面は負電荷を帯びており、As-myc と細胞膜との間に電荷の反発が生じるため、細胞への輸送効率は減少します。しかし、As-myc/LDH の場合、As-myc は、正電荷をもつ LDH 層間に保持されているため、細胞膜との電荷の反発を抑えることで細胞膜に吸着し、細胞内へ取り込まれたのち、放出されたことが阻害効果から推測できます。また、NO₃/LDH は最大曝露時間 4 日、最大添加量 1,000 μg/mL の条件下においても細胞増殖率に影響しないことから、NO₃/LDH の細胞毒性が非常に低いことも明らかにしています。

5. 細胞への LDH の輸送機構

前章において、抗がん剤 /LDH は細胞内へ輸送されたのち、LDH からの抗がん剤の放出により細胞毒性や細胞増殖抑制効果が発現されることを述べました。薬物の治療効果は標的細胞への薬物の到達性に依存するため、LDH が標的細胞へ輸送され、薬物の生物活性を発現させる機構は DDS 材料を設計するうえで重要なファクターになります。一方、細胞の器官を局所的に観察する手法として、蛍光標識法や免疫蛍光抗体法が一般的に利用されています。とくに、細胞組織・器官を認識する蛍光色素や量子ドットなどを用いることにより、細胞器

官の多重染色や細胞へのタンパク質 (GFP など)、薬物、遺伝子などの輸送機構を可視化する研究などが報告されています。ここでは、蛍光色素 /LDH の合成と蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡やフローサイトメトリーなどを用いた細胞への LDH の輸送機構について最近の研究例を紹介します。

5.1. エンドサイトーシスについて

タンパク質など細胞に有用な物質の多くは、極性を持ち、分子サイズが大きいため、疎水性の細胞膜を透過することができません。そのため、細胞を包んでいる細胞膜は、特異的なチャンネルによってイオンなどを透過させたり、受容体を介して細胞外からのシグナルを受け取る機能や細胞膜の一部を用いながら細胞内へ必要な物質を取り込むなど、細胞にとって重要な機能を担っています。この機構はエンドサイトーシスとよばれ (図 5)、取り込む物質の大きさや作用する受容体によりその経路が違います。また、エンドサイトーシスと逆のプロセスであるエキソサイトーシスは、膜で囲まれた小胞が細胞膜と融合して内容物を細胞外へ放出する機構をいいます。LDH もこれらの機構により、細胞内へ輸送・放出されていると考えられています。

5.2. 蛍光色素 /LDH による細胞への輸送

蛍光色素であるフルオレセインに親タンパク性のイソチオシアネート基を結合させたフルオレセインイソチオシアネート (Fluorescein Isothiocyanate; 以後、FITC と略記します) は、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、酵素などの蛍光ラベルに用いられ、細胞内の物質の追跡に適しています。そこで、細胞への LDH の輸送機構を解明するために、FITC を共沈法により Mg-Al 系 LDH へ取り込み、LDH の細胞内への輸送機構や LDH の代謝について検討しています。

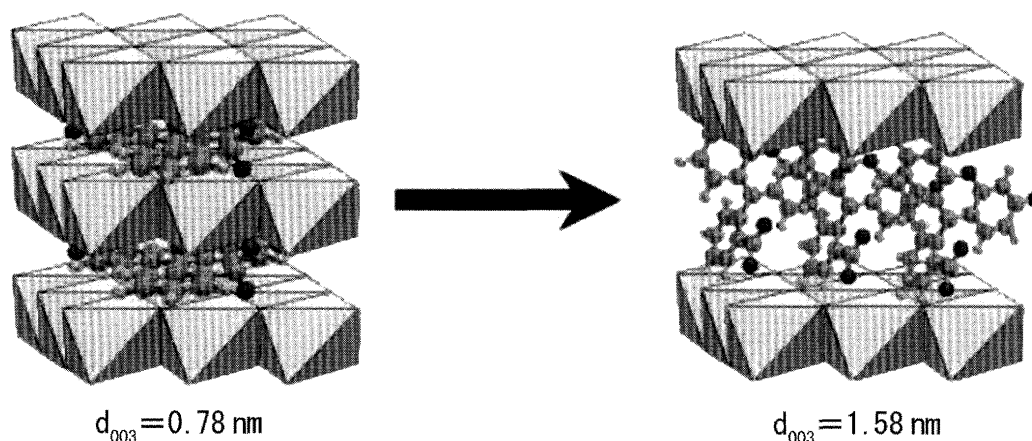


図6 Fluo/LDHの層間予想図

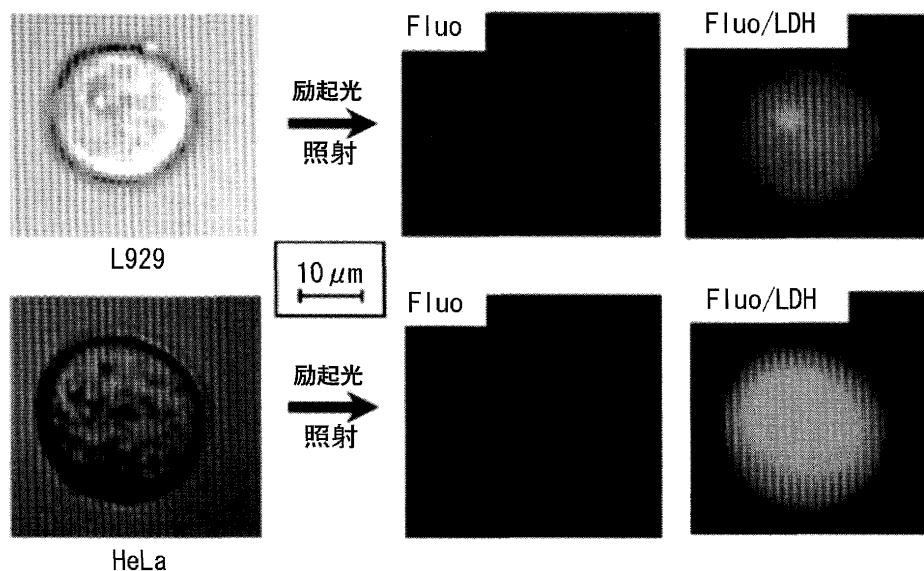


図7 L929細胞ならびに HeLa 細胞の蛍光顕微鏡写真

FITCは陰イオン性の蛍光色素のため、LDHへ容易に取り込むことができます¹⁵⁾。ヒト骨肉腫由来のHOS細胞に対するFITC/LDHの輸送は、免疫蛍光抗体法によりFITC/LDH、DAPI、Texas-redを使い細胞を染色し、さらにクラスリン介在エンドサイトーシス阻害剤であるChlorpromazineを用いて、各種顕微鏡によりFITC/LDHの輸送経路を判断することができます。これらの結果、FITC/LDHとTexas-redの染色されている器官が一致していることから、FITC/LDHはカベオラ介在エンドサイトーシスではなく、クラスリン介在エンドサイトーシスにより細胞内へ輸送されていることが示された興味深い例です。

蛍光色素であるFITCは高価であることから、比較的安価な蛍光色素であるフルオレセインジナトリウム(Fluorescein Disodium Salt; 以後、Fluoと略記します)に着目し、細胞内へのLDHの輸送機構を明らかにするため、可視化プローブとしてFluo/Mg-Al系LDHの合

成を試み、さらにFluo/LDHの細胞内への輸送について検討しています¹⁶⁾。Fluo/LDHの面間隔値は、Fluo含有率の増加にともない、0.78nmから1.58nmに拡大します(図6)。つまり、Fluo分子はLDH基本層に対して平行方向に配向し、Fluo含有率の増加にともない、LDH層間へ密に充填されるため、面間隔が拡大すると推測されます。また、マウス結合組織由来のL929細胞およびHeLa細胞をFluoまたはFluo/LDHを添加した培地中において培養したのち、蛍光顕微鏡により細胞の発光を観察しています。Fluoは水溶性のため疎水性の細胞膜を透過できず細胞の発光は観察されません。しかし、Fluo/LDHは細胞へ取り込まれ、Fluoが細胞内に放出されるため、細胞全体が緑色発光する様子が観察できます(図7)。また、Fluo/LDH粒子が細胞内へ取り込まれている様子は、共焦点レーザー顕微鏡の断層写真からも観察できます。これらの結果はFluo/LDHの細胞内可視化プローブとしての可能性を示しています。

5.3. 細胞への輸送におよぼす LDH の粒子サイズ・形状の影響

エンドサイトーシスは取り込む物質のサイズによって取り込み機構が異なります。そこで、細胞への輸送機構におよぼす LDH の形状・サイズの影響についても調べられています。LDH を従来の方法で合成した場合、粒子形状は六角板状になります。Xu らは、六角板状とロッド状の FITC/LDH (FITC/LDH_{HEX} または FITC/LDH_{ROD} と略記します) をイオン交換法により合成し、細胞への輸送について報告しています¹⁷⁾。

FITC/LDH_{ROD} の面間隔値は FITC の取り込み量が少ないため大きく変化しないものの、FT-IR から FITC の取り込みが確認できます。この方法で合成した FITC/LDH_{ROD} の平均粒径は 68nm であり、SEM 写真からもロッド状の粒子が観察されています。これらの FITC/LDH を細胞へ添加後、蛍光または共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、FITC/LDH_{HEX} の場合、細胞質は発光しますが、核の発光は見られません。一方、FITC/LDH_{ROD} の場合、細胞質より核の発光強度が高い、すなわち、核への蓄積性が高いことを示しています。そこで、細胞分画により細胞器官 (細胞質、細胞膜、核) へ輸送された FITC を定量し、LDH の輸送量を見積もることができます。この結果から、FITC/LDH_{ROD} の核への輸送量は、時間の経過にともない増加し、FITC/LDH_{HEX} に比べ多くなります。これは、FITC/LDH_{ROD} の形状・サイズが、核孔への輸送に優位に働くと考えられます。つまり、FITC/LDH 粒子はエンドソーム内において溶解し、FITC/LDH_{ROD} の粒子サイズは核孔に輸送されやすいサイズまで減少したと考えられます。しかし、六角板状の FITC/LDH_{HEX} は、溶解しても粒子サイズも大きく、形状も核孔と一致しないため、核孔へ輸送されにくいと推測されます。

5.4. 細胞への輸送機構に及ぼす LDH の葉酸修飾の影響

葉酸はすべての細胞が正常に機能するため必要とされる重要なビタミンですが、とくにがん細胞は多くの葉酸を必要とします。そのため、一部のがん細胞は、できる限り多くの葉酸を吸収できるように、葉酸受容体が細胞膜上に過剰発現しています。このような、がん細胞の性質を利用し、標的指向性をもたせた DDS 材料に関する研究も検討されています。そこで、LDH にシランカップリング剤を介して葉酸を修飾することにより、がん細胞への標的指向性を LDH に付与させる研究が行われています¹⁸⁾。論文をもとに簡略化した合成スキームを示します (図 8)。4.3. で述べた MTX/LDH を出発物質とし、シランカップリング、葉酸のカルボキシル基とアミンとのアミド結合を経て葉酸 /MTX/LDH を合成し、XRD, FT-IR, 組成分析, 細胞毒性試験などにより評価しています。

LDH の構造は修飾前後で変化せず、また、一部未反応のアミンの存在も観察されましたが、葉酸で LDH 表

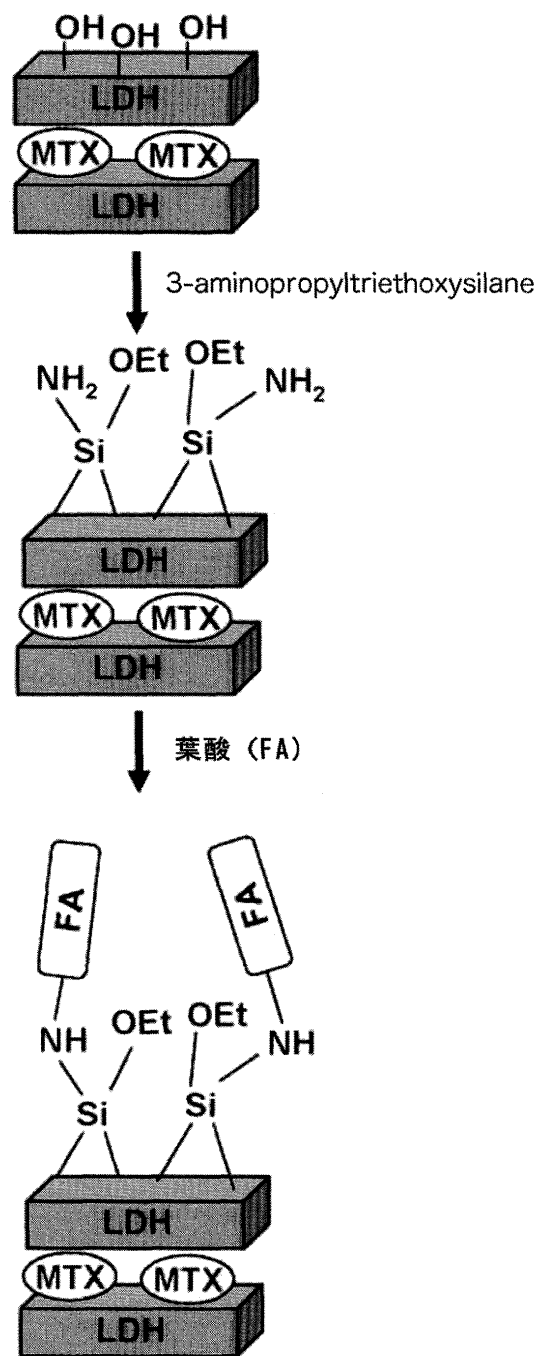


図 8 葉酸 /MTX/LDH の合成スキーム

面を修飾することができます。つぎに、細胞への輸送効率の変化を比較するため、葉酸受容体が過剰発現しているヒト咽頭がん由来の KB 細胞と発現していない A549 細胞に対して葉酸 /MTX/LDH を作用させ、MTX の輸送量について調べています。MTX の輸送量は、A549 細胞では葉酸修飾の有無に影響されず、KB 細胞に対しては、葉酸を修飾していない MTX/LDH に比べ 1.5 倍に増加します。この方法は、LDH に葉酸受容体が過剰発現している細胞に対する標的指向性を付与することに成功した研究例になります。

6. まとめ

LDH はユニークな性質をもつ粘土鉱物であるにも関わらず、スメクタイト系粘土に比べて実用例が少ないといわれています。しかし、LDHの研究はここ数年急増し、なかでも本稿で紹介したような生体高分子であるタンパク質、遺伝子、酵素、薬物の取り込みや DDS 材料への応用を目指した論文が多数見られます。DDS 材料に求められる機能は、高い薬物の徐放性能、ターゲティングや安定性などであり、副作用の低減や薬物の治療効果に直結する課題です。1章でも述べましたが、これらの課題解決に向けた DDS 材料はリポソーム、生体適合性高分子、カーボンナノホーンなどが主流であり、LDH をはじめ粘土化合物や各種無機材料を DDS 材料として捉えた研究はまだスタートしたばかりです。そのため、解決しなければならない問題は多く残っています。それには医・工・薬学の連携や学際的研究協力が必要だと思いますので、本稿がこのような連携・協力の糸口になれば幸いです。

最後に、本稿を執筆する機会を与えて頂いた鹿児島大学・河野元治先生に深く感謝いたします。また、本稿をまとめるにあたり、ご協力を頂いた研究室スタッフ・メンバーに感謝の意を表します。

引用文献

- 1) 日本粘土学会編 (2009) 技報堂出版, 粘土ハンドブック第三版, 東京, pp.654-657
- 2) Kim H. W., Knows J. C. Kim H. E. (2004) Hydroxyapatite/ poly (epsilon-caprolactone) composite coating on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery, *Biomaterials*, **25**, 1279-1287.
- 3) 成田榮一, 佐々木邦明, 対馬勇禧 (1998), ファームテックジャパン, **14**, 513-552.
- 4) Arco M., Gutierrez S., Martin C., Rives V., Rocha J. (2004) Synthesis and characterization of layered double hydroxides (LDH) intercalated with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), *J. Solid State Chem.*, **177**, 3954-3962.
- 5) Wei M., Shi S., Wang J., Li Y., Duan X. (2004) Studies on the intercalation of naproxen into layered double hydroxide and its thermal decomposition by in situ FT-IR and in situ HT-XRD, *J. Solid State Chem.*, **177**, 2534-2541.
- 6) Arco M., Cebadera E., Gutierrez S., Martin C., Montero M. J., Rives V. Rocha J., Sevilla M. A. (2004) Mg, Al Layered double hydroxides with intercalated indomethacin: synthesis, characterization, and pharmacological study, *J. Pharm. Sci.*, **93**, 1649.
- 7) Kameshima Y., Yoshizaki H., Nakajima A., Okada K. (2006) Preparation of sodium oleate/layered double hydroxide composites with acid-resistant properties, *J. Colloid Interface Sci.*, **298**, 624-628.
- 8) Li B., He J., Evans D. G., Duan X. (2004) Enteric-coated layered double hydroxides as a controlled release drug delivery system, *Int. J. Pharm.*, **287**, 89-95.
- 9) <http://www.brc.riken.jp/lab/cell/> または <http://jtca.umin.jp/> など
- 10) 田畑泰彦 (2006) コロナ社, 再生医療のためのバイオマテリアル, 東京, p.165, p.185.
- 11) Wang Z., Wang E., Gao L., Xu L. (2005) Synthesis and properties of Mg₂Al layered double hydroxides containing 5-fluorouracil, *J. Solid State Chem.*, **178**, 736-741.
- 12) Choi S. J., Oh J. M., Choy J. H. (2008) Anticancer drug-layered hydroxide nanohybrids as potent cancer chemotherapy agents, *J. Phys. Chem. Solids*, **69**, 1528-1532.
- 13) Yasutake A., Aisawa S., Kobashi N., Takahashi S., Hirahara H., Narita E. (2008) Intercalation behavior of 5-fluorouracil into Mg-Al layered double hydroxides, *Clay Sci.*, **14**, 49-54.
- 14) Kwak S. Y., Jeong Y. J., Park J. S., Choy J. H. (2002) Bio-LDH nanohybrid for gene therapy, *Solid State Ionics*, **151**, 229-234.
- 15) Oh J.-M., Choi S.-J., Kim S.-T., Choy J.-H. (2006) Cellular uptake mechanism of an inorganic nanovehicle and its drug conjugates: Enhanced efficacy due to clathrin-mediated endocytosis inorganic drug-delivery nanovehicle conjugated with cancer-cell-specific ligand, *Bioconjugate Chem.*, **17**, 1411-1417.
- 16) 田中みゆき, 會澤純雄, 安武愛子, 高橋諭, 平原英俊, 成田榮一, 日本化学会第89春季年会講演予稿集 (2009) 4B3-32.
- 17) Xu Z. P., Niebert M., Porazik K., Walker T. L., Cooper H. M., Middelberg A. P. J., Gray P. P., Bartlett P. F., Lu G. Q., (2006) Subcellular compartment targeting of layered double hydroxide nanoparticles, *J. Control. Release*, **130**, 86-94.
- 18) Oh J.-M., Choi S.-J., Lee G.-E., Han S.-H., Choy J.-H. (2009) Inorganic drug-delivery nanovehicle conjugated with cancer-cell-specific ligand, *Adv. Funct. Mater.*, **19**, 1-8.