総合論文

シリカモノリスを用いたナノ粒子と低分子化合物の 一斉分析・精製法の開発

加藤 大¹

現在,機能性物質を内包した大きさ100 nm 以下のナノ粒子が,診断,治療,工業生産など,様々な分野 で使用されている.これまでにナノ粒子の量,大きさや形状などを評価するために,多くの優れた分析法が 開発されている.著者らは,大きさ数マイクロメートルの貫通孔と数10 nm の微細孔を有するモノリスカラ ムは,大きさが100 nm 程度のナノ粒子と低分子化合物の一斉分析に有効であることを見いだした.ナノ粒 子は主にハイドロダイナミッククロマトグラフィーによって大きさに基づいて分離され,低分子化合物は固 定相の表面官能基との相互作用によって分離された.それぞれが異なった機構で溶出するため,ナノ粒子と 低分子化合物の分離を個別に調節することが可能であり,薬物や蛍光物質を内包したシリカナノ粒子を40 分程度で分離することに成功した.

さらにカラム長を 1.5 mm 程度のフィルター状に成型したモノリス体 (MonoSpin) を用いることで,2分間の遠心 (2290×g) 操作によってナノ粒子の分散液中に共存する低分子化合物を除去することに成功した. 本手法は,短時間で緩和な条件で精製するため,ナノ粒子の変形や崩壊は起こりづらい.

このように2種類大きさの異なる孔を有するシリカモノリスを利用することで、ナノ粒子と低分子化合物 の一斉分析やナノ粒子の精製が容易に実現できるので、今後より一層の利用が予想されるナノ粒子の分析に シリカモノリスの利用が期待される.

1 はじめに

近年の科学技術の発展により、優れた機能を有する新し いナノ粒子の開発や天然のナノ粒子が環境中や生体内から 新たに発見されるようになっている^{1)~4)}.これらのナノ粒 子の機能や安全性を評価するには, 簡便, 迅速で, 精度の 優れた分析法が必要であり、これまでに様々な優れた方法 が開発されてきた^{5)~8)}.ナノ粒子の機能は、ナノ粒子自身 の粒子径、形状、表面状態、内包物質等に加え、ナノ粒子 の量によって変化し、さらにはナノ粒子と一緒に存在する 周囲の物質がナノ粒子の機能に影響を与えるため、ナノ粒 子の機能解析には、いろいろな項目の測定が必要である⁹⁾. 例えば、がんの治療に用いられる抗がん剤を内包したナノ粒 子の場合, EPR 効果 (Enhanced Permeation and Retention effect)によって腫瘍組織に集積するため大きさと治療効 果には密接な関係がある¹⁰⁾.また多くの抗がん剤は、その 強い毒性を抑えるために、ナノ粒子に内包し腫瘍組織に選 択的に送達されている. つまり少量の遊離の抗がん剤が存 在することで、重篤な副作用を引き起こす可能性が高まる

ため、共存物質の分析も重要である.

様々な物質の定量分析に利用されている高速液体クロマ トグラフィー (HPLC) は、ナノ粒子の定量分析や粒子径 の測定に利用されている¹¹⁾. HPLC は, 試料と固定相との 相互作用で分離することから、夾雑物質との分離や固定相 に作用するナノ粒子表面の分析に適していると考えられ る. しかし一般的な粒子充填型カラムでナノ粒子を分析す る場合,充填粒子(3~5μm)間の隙間(数100 nm)を 試料のナノ粒子が通過する必要があるため, 10 nm 以下の 小さなナノ粒子の分析への適用例がほとんどである¹²⁾¹³⁾. 大きさ 100 nm 付近のナノ粒子の場合は,充填粒子間の隙 間に詰まり、溶出しない恐れがある. そのため 100 nm 程 度のナノ粒子の分離には、高分子などの分析に汎用されて いるサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)が利用される が、ナノ粒子が入ることのできる数 100 nm の細孔径を持 ちながら十分な機械的な強度を持つ充填剤が必要になり、 現状では分離能の低い大きな充填剤(10 µm 以上)が用い られている¹⁴⁾¹⁵⁾. さらに SEC は、大きさでの分離を目的と しているため、試料との間に相互作用が生じない基材が利 用されており、大きさ以外の効果による分離には適してい ない.そのため大きさ数 10~100 nm 程度のナノ粒子の簡 便,迅速な定量分析法の要望は,非常に大きい.

E-mail : masaru-kato@umin.ac.jp

¹東京大学大学院薬学系研究科:113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

著者は、このようなナノ粒子を簡便・迅速に分析するた めにモノリスカラムに注目した.大きさの異なった2種類 の孔(um サイズの貫通孔とnm サイズの微細孔)を有す るモノリスカラムは¹⁶⁾¹⁷⁾,大きな貫通孔の効果で,ナノ粒 子がカラム内に詰まる、あるいはカラム内の高い背圧でナ ノ粒子が壊れるなどの問題が克服できる。実際にモノリス カラムによって、ナノ粒子や高分子がハイドロダイナミッ クの効果で、粒子径の大きなナノ粒子ほど速く溶出し、小 さくなるほど溶出に時間がかかることが報告されてい る^{18)~21)}.ナノ粒子は自身より小さい微細孔内部に入るこ とができないため、モノリスカラムによるナノ粒子の分離 には、微細孔は不要である.しかし試料として分析するナ ノ粒子分散液には、ナノ粒子だけではなく、他の物質も共 存しており、それらの物質の分離分析も重要である.一般 的なカラムの場合,多数の微細孔を作製することで,固定 相の表面積を増加させ、分離の選択性を向上させている. 特に、微細孔内部に存在する表面修飾基であるオクタデシ ル基、オクチル基等がカラムの分離特性を決定している. つまり微細孔内部は共存物質の分離に適した修飾基を導入 することで、ナノ粒子と共存物質の一斉分析が可能になる と期待された.また、ハイドロダイナミック効果による分 離は、移動相の流量を遅くするほど高分離が達成するた め²²⁾,最初にナノ粒子の分離に適した条件を用い,その後, 共存物質の分離に適した条件に変更することで, 良好な分 離が実現すると予想された. そこで本論文では, これまで に著者らが開発してきたモノリス体を利用したナノ粒子と 低分子化合物の一斉分離法とナノ粒子の精製法について紹 介する.

2 ナノ粒子試料

研究室で調製したシリカ及びポリエチレングリコール (PEG) ナノ粒子と市販のリポソーム製剤を試料に用いた. 機能性物質内包シリカナノ粒子の調製には、アルコキシシ ランのゾルーゲル反応を利用した²³⁾. アルコキシシランは 緩和な条件で加水分解及び重合反応し、網目構造を有する シリカネットワークを形成することが知られている.シリ カのネットワークは、調製溶液中に存在する機能性物質を 取り込みながらネットワーク構造を形成するため、本調製 法を用いることでいろいろな機能性物質を内包したシリカ ナノ粒子の調製が可能である、本反応では、粒度分布の狭 いナノ粒子が調製され、また原料に用いるアルコキシシラ ンの量を調節することで、異なった粒子径のナノ粒子が調 製できる.標準的な調製手順は,9 mL 水,10 mg アルギニ ン, 0.45 mL シクロヘキサン, 0.55 mL オルトケイ酸テト ラエチル (TEOS) に内包物質 (ローダミン 110, フルオレ セイン, アムホテリシン B, イリノテカン)を添加した溶 液を混合し, 60度で一晩反応させた.

ラジカル重合によって4腕 PEGモノマーを重合すること で、機能性物質内包 PEG ナノ粒子を調製した²⁴⁾²⁵⁾.重合時 に形成される網目構造を利用して機能性物質をナノ粒子に 内包した.PEG ナノ粒子の場合、モノマー濃度や静置時間 などによってナノ粒子の大きさを調節することができ る²⁶⁾.本ナノ粒子も上記のシリカナノ粒子と同様に反応溶 液に溶解している物質を取り込みながらナノ粒子が調製さ れるので、いろいろな機能物質を内包したナノ粒子の調製 が可能である.標準的な調製法は、35.7 μ L PEG モノマー、 52.5 μ L 水、15 μ L 過硫酸 アンモニウム (APS)、15 μ L N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)、内 包物質を混合し、20 分間激しく撹拌したのち、30 分間室 温で放置し、最後に 550 μ L 水を添加した.

卵巣がんの治療薬として臨床現場で利用されているドキシルは,購入したものを使用した²⁷⁾.ドキシルは表面が PEG 鎖で覆われた粒子径 80 nm 程度のリポソームであり,その 中心部に抗がん剤であるドキソルビシンを内包している.

3 ナノ粒子と低分子化合物の一斉分析法²⁸⁾

カラムには内径 3 mm, 長さ 250 mm で 2 μm 貫通孔と 18 nmの微細孔を有する表面修飾を行っていないシリカモ ノリスカラムと ODS 修飾したモノリスカラムを、ナノ粒 子にはシリカナノ粒子を用い、内包物質として蛍光の小分 子であり,励起波長と蛍光波長が共に 495, 520 nm 付近で あるフルオレセインとローダミン 110 を選択した. 移動相 には、水とアセトニトリルの混合溶液を用いた. シリカナ ノ粒子は、ボイド体積以前に溶出するため、固定相との作 用によって保持される化合物とは、溶出時間が大きく異 なっており、それぞれの物質が溶出する時間に適した移動 相条件を用いることで、良好な分離が達成すると考えた (Fig. 1). ナノ粒子は、非常に短時間に溶出したので、まず 低分子化合物の分離について調べた.流量を 0.05 mL min⁻¹とした時にナノ粒子は 20 分以前に溶出したので, 25 分以降は,低分子化合物の分離に適した移動相条件に変更 した. 低分子化合物は、カラムの背圧で崩壊する恐れがな いため, 流量を 0.5 mL min⁻¹ とし, 移動相中のアセトニト リルの割合を増加させるグラジエント溶離を用いた. ナノ 粒子の溶出時間は二つのカラムでほぼ同じであったが、2 種の低分子化合物の溶出順は、未修飾のシラノールカラム と ODS 修飾カラムで反対であった.シラノールカラムで は、疎水性の高いフルオレセインが早く溶出し、親水的な ローダミン 110 が遅く溶出した. つまりシラノールカラム は順相カラムとして機能し、ODS 修飾カラムは逆相カラム として機能した. これは微細孔内部に入ることができる低 分子化合物に対しては、表面官能基が溶出挙動を決定して いることを示唆している. Fig. 2には、それぞれのカラム による分離結果を示した. シラノールカラムでは、フルオ



Fig. 1 Schematic diagram of separation of nanoparticles and small molecules with a monolithic column



Fig. 2 Typical chromatograms for separation of nanoparticles and small molecules using unmodified (silica) and ODS-modified monolithic columns

Mobile phase A: water : acetonitrile, 95 : 5; B: acetonitrile, A100 % $(0 \rightarrow 25 \text{ min})$, $(100 \rightarrow 60 \% (25 \rightarrow 35 \text{ min})$ for silanol), $(100 \rightarrow 0 \% (25 \rightarrow 45 \text{ min})$ for ODS), Flow rate, 0.05 mL min⁻¹ $(0 \rightarrow 25 \text{ min})$, 0.5 mL min⁻¹ (25- min)

レセインが24分に, ローダミン110が28分に良好に分離 して検出された. ピークの溶出時間と面積の再現性は, RSD 値で0.6と4%以下と良好な結果が得られた. した がって本手法を用いることで,ナノ粒子と共存物質の同時 分離定量が可能になった. このようにモノリスカラムに よって,ナノ粒子と2種類の低分子化合物を40分程度で 分離することができた.

3·1 粒子径の影響²⁹⁾

ナノ粒子の粒子径は、ナノ粒子の物性に大きな影響を与 えるためその分析は非常に重要である.またナノ粒子を保 管している間に、崩壊や凝集が起こる場合があり、使用す る際にナノ粒子の大きさ等に変化がないことの確認が望ま れる.粒子径の測定法として、電子顕微鏡等を用いて個々 のナノ粒子を実際に観察し、大きさを求める方法がある. それ以外にも、ナノ粒子に光を照射した際に得られる散乱 光より粒子径を求める手法 (動的 (DLS) もしくは静的光 散乱) は簡便に平均粒子径を求める手法として汎用されて



Fig. 3 (a) DLS spectra and (b) chromatograms of 22 and 87 nm nanoparticles; (c) Calibration curve for the elution time versus nanoparticle size

いる. さらに HPLC でも SEC 用カラムによってナノ粒子の 粒子径の測定が行われてきた¹⁴⁾¹⁵⁾.

著者らは、5種類の粒子径の異なったフルオレセイン内 包シリカナノ粒子 $\{22, 25, 29, 56, 87 \text{ nm}$ (DLS による測定 値), Fig. 3a¹ を調製し、移動相の流量を 0.05 mL min⁻¹の 条件で、ナノ粒子の溶出時間を調べた.本条件でのカラム 背圧は 1.3 Mpa となり、カラム内でのナノ粒子の変形や崩 壊は起きないと考えられる。各ナノ粒子の溶出時間は、最 も大きい 87 nm のナノ粒子が 15.0 分に溶出し、粒子径が 小さくなるほど、保持時間が増加し、最も小さい 22 nm の ナノ粒子が 18.4 分に溶出した (Fig. 3b).各ピークの溶出 時間の再現性は、5%以下であった。DLS で測定した各シ リカナノ粒子の平均粒子径の対数と溶出時間との関係を Fig. 3c に示した、粒子径の対数と溶出時間との関係を Fig. 3c に示した、粒子径の対数と溶出時間との間には、良 好な負の相関関係 (R^2 =0.978)が見られ、シリカナノ粒子 は主にハイドロダイナミックな効果で溶出していると考え



Fig. 4 a) Chromatograms of drug-containing nanoparticles and free drug; b) Magnified chromatograms of the nanoparticles

Mobile phase A: 200 mM formic acid/ammonium formate (pH 3.6); B, acetonitrile; A 68 % $(0 \rightarrow 25 \text{ min})$, $68 \rightarrow 54$ % $(25 \rightarrow 35 \text{ min})$ for amphotericin B and rhodamine 110; A, 82 % $(0 \rightarrow 25 \text{ min})$, $82 \rightarrow 61$ % $(25 \rightarrow 35 \text{ min})$ for irinotecan, Flow rates: 0.2 mL min⁻¹ $(0 \rightarrow 25 \text{ min})$, 0.5 mL min⁻¹ (25- min).

られ、溶出時間から粒子径を見積もることが可能である. 今回用いたモノリスカラムの細孔径は18 nm であり、試料 に用いたシリカナノ粒子の中で最も小さいナノ粒子の粒子 径は20 nm であることから、シリカナノ粒子は微細孔内部 には入ることができず、貫通孔のみを移動していると予想 される.実際に、シリカナノ粒子の溶出時間は、未修飾の カラムとオクタデシル基を導入したカラムでほとんど変化 しなかった.つまり微細孔内部に入ることのできないシリ カナノ粒子は、表面官能基の影響を受けづらく、シリカナ ノ粒子の溶出挙動は表面官能基によって大きく変化しな い.以上の結果より、モノリスカラムは、多数の共存物質 が存在する試料中のシリカナノ粒子の分離分析に適してい ることが示唆された.

3·2 内包物質の影響²⁹⁾

薬物をはじめとした機能性物質を内包したナノ粒子の場 合、ナノ粒子の機能を決める重要な因子として内包物質の 種類がある.そこで内包物質として、実際にナノ粒子製剤 に内包されているポリエン系抗生物質であるアムホテリシ ンBと抗がん剤であるイリノテカン、さらに蛍光物質であ るローダミン110を選択し、それぞれを内包したナノ粒子 を調製し溶出挙動を比較した.アムホテリシンB、イリノ テカン、ローダミン110を内包したナノ粒子の粒子径は、 それぞれ、24,28,24 nm(DLSによる実測値)であった. Fig. 4a にそれぞれの内包ナノ粒子を分析した時のクロマ トグラムを示した.Fig.4bにはナノ粒子のピークを拡大し たクロマトグラムを示した.移動相の流量を 0.2 mL min⁻¹ とした時に、3種のナノ粒子の溶出時間はいずれも 7分程 度であった.つまり内包物質を変化させても、ナノ粒子の 溶出時間はほとんど変化せず、ハイドロダイナミックな効 果で溶出していると考えられる.つまり内包物質は、ナノ 粒子の溶出時間にほとんど影響を与えない.アムホテリシ ンBとイリノテカン内包ナノ粒子のピーク強度の再現性 は、それぞれ、6.7% と 1.6% であり、本手法によってナ ノ粒子の量の測定が可能だと考えられる.また、移動相に グラジエント溶離を用いることで、いずれのナノ粒子も、 遊離した低分子化合物と良好に分離された(Fig. 4a).

3・3 ナノ粒子量とピーク強度の関係²⁹⁾

まずナノ粒子のピーク強度の線形成を調べるために,ナ ノ粒子分散液の希釈率とピーク強度を比較した.薬物内包 ナノ粒子の場合,定量用の標準物質は存在せず,さらに薬 物がナノ粒子に内包されることで分光特性が変化する可能 性があるため,今回の検討では絶対量ではなく,相対値を 用いた.検出には,内包薬物に特徴的な波長であるアムホ テリシンBではUV410 nm を,イリノテカンは蛍光(励起 波長 365 nm,蛍光波長 440 nm)を用いた.これらの波長 で検出することで,シリカナノ粒子自身による妨害は見ら れず,ナノ粒子の量に加えて,内包薬物量も見積もれると 考えられる.ナノ粒子のピークは,試料の希釈率に応じて 変化した.つまりナノ粒子量(内包薬物量)に応じて,ピー ク強度が変化した(Fig.5).ピーク強度と薬物内包ナノ粒



Fig. 5 Calibration curves of drug-containing nanoparticlesA magnified calibration curve of the irinotecan-containing nanoparticles is shown in the insert.

子量との間には良好な線形性(アムホテリシンBとイリノ テカンでそれぞれ R²=0.981, 0.999)が見られた.このこ とから、ナノ粒子はカラム内での詰まりや崩壊などを起こ さず, 溶出していると考えられる. 蛍光で検出したイリノ テカン内包ナノ粒子の方が, UV で検出したアムホテリシ ンB内包ナノ粒子よりも定量範囲が広かった. これはナノ 粒子のピークがブロードな形状であるため、蛍光と比較し て感度の悪い UV で検出しているアムホテリシン B 内包ナ ノ粒子は低濃度での検出が難しいことに起因していると考 えられる.以上より、内包物質に特徴的な波長を検出に用 いることで、ナノ粒子や内包物質の量を評価できると考え られる. 今回は, UVや蛍光を用いてナノ粒子を検出した ため相対量で議論したが、カラムからの溶出液を回収し、 ナノ粒子の数を求める手法 (電子顕微鏡, 原子間力顕微鏡, ナノトラッキング法など) で分析することで絶対量である ナノ粒子の数量での議論が可能になると考えられる.

3・4 調製ロット間の内包物質の量の比較²⁹⁾

粒子径が同一のナノ粒子であっても、内包する機能性物 質の量が異なれば、ナノ粒子の機能は大きく変化する.例 えば、薬物内包ナノ粒子の場合、ナノ粒子の数が同じでも 内包薬物量が10倍増えれば、標的部位への薬物の送達効 率も約10倍になると期待される.したがってナノ粒子内 の機能性物質の量の測定は非常に重要である.ナノ粒子に 内包された機能性物質の量を測定する様々な手法が既に報 告されているが、その多くはナノ粒子を分解し、内包され ていた物質を抽出し測定するなど、前処理操作が必要なも のがほとんどである^{30)~34)}.カラムスイッチング HPLC を 用いることで、前処理操作を自動化した測定法なども報告 されているが³⁵⁾、より簡便で迅速な測定法の開発が望まれ ている.上記の検討で内包物質に選択的な手法で機能物質 内包ナノ粒子を検出することで、内包物質の量の評価も可 能であることが示唆された.そこで開発したナノ粒子と低 分子化合物の一斉分析法を用いて,ナノ粒子の内包物の量 がナノ粒子の溶出時間やピーク強度に与える影響を調べ た.

2種類の薬物(アムホテリシン B, イリノテカン)について調製時の薬物量(0.05, 0.25, 0.5 mg mL⁻¹)を変化させてナノ粒子を調製した.そして各条件で,3ロットのナノ 粒子を調製し、ロット間の比較を行った(Fig. 6a).同じ条件で調製したナノ粒子でも,粒子径や内包量に違いが見られ,特にイリノテカン内包ナノ粒子の粒子径はロット間の ばらつきが大きかった.一方,0.25 mg mL⁻¹の条件で調製 したアムホテリシン B 内包ナノ粒子は,粒子径も内包量も ロット間差は小さかった.同じ条件で調製しても粒子径や 内包量が変化する理由は、ナノ粒子の生成の律速となっている TEOS の加水分解反応が,水層と油層の液液界面で起 こっており,界面の形成が攪拌状況によって変化している ためと予想している.

Fig. 6b は、同一条件で調製したナノ粒子の内包薬物量の 平均値を示した.各薬物で最も薄い薬物量0.05 mg mL⁻¹で 調製したナノ粒子のピーク強度を基準とし、その相対ピー ク強度を求めた. どちらの薬物も調製時の濃度が増加する ほど、ナノ粒子のピーク強度が増加した. つまり内包量が 増加した. しかしその増加量は、二つの薬物で大きく異な り、反応液の薬物量が5倍、10倍と増加するに伴い、イリ ノテカンは3倍、7倍と増加したのに対して、アムホテリ シンBは1.5倍、2倍しか増加しなかった. この増加量の 違いは、アムホテリシンBは非常に疎水的な物質であるた め、親水的なシリカナノ粒子内部に取り込まれにくいため と予想している.

3·5 粒子径と内包量の関係²⁹⁾

次に, ロット間の変動が最も小さかった 0.25 mg mL⁻¹ア ムホテリシン B の条件で調製したナノ粒子について, 粒子 径と内包量の関係を調べた (Fig. 7). 粒子径の異なったナ



Fig. 6 a) Relationship between the particle size and the amount of encapsulated drug in various preparations; b) Effect of the drug concentration on encapsulation The longitudinal axis is the value relative to the peak intensity of the nanoparticle prepared from 0.05 mg drug. *p < 0.5, Student's t test.

ノ粒子 {20, 21, 22, 33, 38, 60 nm (DLS による測定値)} は、反応時間や添加する TEOS の量を変化させ調製した. Fig. 7 には、溶液中に内包されず遊離しているアムホテリ シンB量(残存量)も示した.反応時間が長くなるほど、 ナノ粒子の粒子径が大きくなり、溶液に残存するアムホテ リシンBの量が減少した.つまり粒子径の増加に伴い、ア ムホテリシンBの内包量は増加した.しかし粒子径が 20 nm から 60 nm に 3 倍増加すると表面積は 9 倍に増加する が、内包薬物量は約 4.5 倍程度しか増加しなかった.ナノ 粒子の成長に伴って、周囲に存在する遊離アムホテリシン Bがナノ粒子に内包されるため、内包量は表面積に比例し て増加すると期待されたが、表面積の増加割合よりも内包 量の増加割合は小さかった.これも疎水的なアムホテリシ ンBは親水的なシリカナノ粒子の内部に取り込まれにくい



Fig. 7 Effect of the nanoparticle size on encapsulation The longitudinal axis is the value relative to the peak intensity of the nanoparticle (diameter, 20 nm)

ことが原因であると考えている.このように本手法によって、内包されている薬物量を簡便に見積もることができた.

3·6 内包物の漏出評価²⁹⁾

開発した一斉分析法を用いて、ナノ粒子からの内包物質 の漏出を評価した.透析によって、あらかじめ遊離の低分 子化合物を除去したナノ粒子分散液を冷蔵庫で保存し、経 時的に分散液を採取し、分析した.2週間後の分散液でも ナノ粒子のピークの形状や強度に変化は見られなかった (Fig. 8a). 同溶液を DLS で分析した場合も, 顕著な変化は 見られなかった (Fig. 8b). つまりナノ粒子の崩壊や凝集は 2週間以内には起こっていないと考えられる.またナノ粒 子,低分子化合物(フルオレセイン,ローダミン110)の ピーク強度は、保存している2週間では大きな変動は見ら れなかった (Fig. 8c). つまり今回のように冷蔵庫に保存す ることで2週間位の間であればナノ粒子からの内包物質の 漏出は起こらないと考えられる. このように一斉分析法 は、ナノ粒子の安定性や内包物質の漏出の評価にも利用可 能であった.薬物内包ナノ粒子の場合,保存時には内包薬 物の漏出が起こらず、生体に投与され患部に送達すると薬 物を放出するように設計されている. このように周囲の環 境によって内包物質の漏出(放出)が大きく変化するナノ 粒子の評価に本手法は有効だと期待される.

4 ナノ粒子の精製法

4·1 精製法の比較²⁸⁾³⁶⁾

機能性物質内包ナノ粒子の分散液には、調製時にナノ粒 子内部に取り込まれなかった機能性物質や取り込まれたが 保管時に漏出した機能性物質が存在する.そしてこれらの 遊離物質が、ナノ粒子の機能に影響を与える可能性がある



Fig. 8 (a) Chromatograms and (b) DLS spectra of the dispersed solutions of the nanoparticles with different storage times, and (c) stability analysis of the nanoparticles and leakage assay of small molecules from the nanoparticles

ため、遊離物質を除去するナノ粒子の精製操作が必要になる. 遊離物質の除去法として、限外ろ過、透析、超遠心な どが汎用されている.またこれまでの検討でモノリスカラ ムが、ナノ粒子と低分子化合物を良好に分離することが明 らかとなり、モノリス体はナノ粒子の精製にも有効である と予想された.そこで、これらの四つの手法によるナノ粒 子の精製効率や低分子化合物の除去効率を比較した.精製 に用いるモノリス体として、迅速に精製を行うために分離 カラムに用いたモノリス体と比較して、カラム長を短く (250 mmから1.5 mm)、貫通孔を大きく (2 μmから5 μm) した市販のモノリス体である MonoSpin を使用した.

限外ろ過の検討には、分画分子量 30000 の Vivaspin concentrator を用いた. 1 mL のナノ粒子分散液を Vivaspin concentrator に載せ、遠心 ($3000 \times g$, 5 分) し、上層に残っ た約 0.15 mL (0.15 mL/1 mL = 15 %) の溶液を回収した 結果、90 % 以上のナノ粒子が回収された. 上層の溶液は、 ろ過膜に作用せずに上層に残っていると予想されるため, 低分子も15%程度が上澄みに存在すると予想される.実際に,ローダミン110は上層に15%存在したが,フルオ レセインは50%も存在した.多くのフルオレセインがろ 過膜を通ることなく,上層に残っている理由は,今回用い たろ過膜(ポリエチレンスルホン酸)が負電荷を帯びてい るため,負電荷のフルオレセインは静電的な反発によって 膜に近づけず,上層に残り,濃縮されたと考えられる.

透析膜に分画分子量 10000 の Spectra/Por を用いてナノ 粒子を精製した結果,65 % 程度のナノ粒子が回収された. 透析によってナノ粒子が消失した理由は,膜への吸着に加 えて,透析によって溶液の体積が増加したことで,見かけ の濃度が減少したためと考えている.透析では,共存して いた二つの低分子化合物がほぼ完全に除去されたので,低 分子化合物の除去に有効であった.他の精製法と比較して 低分子化合物の除去に透析は有効であるが,精製に1日以



Fig. 9 a) Comparison of the recovery ratios of the nanoparticles and small molecules; b) Effect of the purification methods on the size and size distribution of nanoparticles

上かかるため,分解や凝集しやすいナノ粒子で,精製を短 時間で行う必要がある場合には適していない.

超遠心では、0.5 mLの試料溶液を二つの異なった条件 (14200×g で 30 分,9100×g で 15 分)で遠心し、その下層 0.1 mL (0.1 mL/0.5 mL=20 %)を回収しナノ粒子と低分 子化合物の量を測定した.遠心力の影響を受けるナノ粒子 のすべてが完全に沈降すると、濃度は5倍に増加し、下層 からすべてのナノ粒子を回収することができる。一方、遠 心力の影響を受けない低分子化合物は、濃度は変化せず、 絶対量は分画した体積の割合に応じた 20 %存在すると計 算される.遠心力が強い条件 (14200×g)では、ナノ粒子 の濃度が 3倍、弱い条件 (9100×g)では 1.8 倍程度にな り、回収率は遠心力が強い条件時に 55 %、遠心力が弱い時 に 30 % であった。つまり今回の遠心条件では、強い条件 でも下層には一部のナノ粒子しか到達しておらず、半分近 くのナノ粒子は上層に残り、回収できなかった。また弱い 遠心条件でも一部のナノ粒子は下層まで沈降した。より多 くのナノ粒子を回収するには、遠心時間の延長、もしくは 回転速度を上げる必要がある.低分子化合物の回収率は、 回転速度に影響せず、どちらもほぼ20%であった.つま り、低分子化合物は、遠心力の影響を受けていなかった.

MonoSpin の検討では、ローダミン 110 のみを添加して 調製したローダミン 110 内包シリカナノ粒子を使用した. そのためナノ粒子内部や溶液中にフルオレセインは存在し ないため、フルオレセインの残存率は求めていない. モノ リス体に ODS が修飾されている MonoSpin C18 にローダ ミン 110 内包シリカナノ粒子の分散溶液を載せ、遠心 (2290×g, 2分間)し、素通りした成分を第1分画とし、 新たな溶離液を載せ、遠心し回収したフラクションを第2 分画とし、以後、同様な手法でフラクションを回収した. MonoSpin を用いた場合、ナノ粒子の回収率は 100 % 近く となり、一方、ローダミン 110 の残存率は 3 % 程度であっ た. つまりほとんどのローダミン 110 は MonoSpin に捕獲 され除去され、ナノ粒子の分散液は精製された.

Fig. 9a は各種精製法によるナノ粒子の回収率と低分子 化合物の残存率を示した. ナノ粒子の回収率は, 限外ろ過 と MonoSpin が高く、続いて、透析、超遠心(強)、超遠 心(弱)の順であった.四つの精製法が、ナノ粒子の大き さや形状に与える影響を調べるために精製した分散液を DLS で測定した. Fig. 9b に示すように, MonoSpin による 精製では、精製前後で平均粒子径や粒度分布に変化が見ら れなかった.一方,限外ろ過と透析による精製では,平均 粒子径が少し小さくなった. 超遠心の場合は, 新たに大き なナノ粒子が形成していた. このように精製法によって は、その操作の過程でナノ粒子の崩壊や凝集が起こり、粒 子径や粒度分布が変化していることが示唆された. MonoSpin による精製では、ナノ粒子の大きさや粒度分布 がほとんど変化しなかった理由は、緩和な遠心条件 (2290×g)で、短時間(2分間)で精製が行われ、さらに 精製溶液がろ液として回収されるため、過酷な条件を用い ていないためと考えている.

4·2 MonoSpin によるシリカナノ粒子の精製³⁶⁾

短時間で簡便に精製可能な MonoSpin は、ナノ粒子の精 製法として非常に優れていると考えられたため、さらに詳 細な検討を行った. Fig. 10a はローダミン 110 内包シリカ ナノ粒子をろ過した MonoSpin にさらに溶離液として水を 載せて、MonoSpin に捕捉された成分の溶出を試みたとこ ろ、第2分画目にはナノ粒子も、ローダミン 110 も存在し なかった. ローダミン 110 を溶出させるには、溶出力の強 い溶媒が適していると考え、溶離液をアセトニトリルに変 更し、第3分画目を回収したところ、ナノ粒子は溶出せず、 多量のローダミン 110 が溶出した. さらに追加したアセト ニトリルで溶出した第4分画目には、ナノ粒子は溶出せ



Fig. 10 a) Recovery ratios of the nanoparticles and free rhodamine in each fraction; b) The recovery ratios of nanoparticles and free rhodamine by three repeated MonoSpin treatments, and the effect of the MonoSpin treatment on the nanoparticle size in three different batches

ず, ローダミン 110 が僅かに溶出した. したがって, ほとんどのナノ粒子は MonoSpin を素通りして第1分画に溶出したのに対し, ローダミン 110 は水を溶離液に用いた時には MonoSpin に保持され溶出せず, 溶離液に有機溶媒を用いることで, 溶出された. つまり MonoSpin は, ローダミン 110 を捕捉するが, ナノ粒子は素通りするため, ナノ粒子の精製に有効である.

4・2・1 MonoSpin による繰り返し精製³⁶⁾ MonoSpin の1回の精製操作は2分で完了するため,繰り返し(3回) 精製した際の,ナノ粒子の回収率及びナノ粒子の粒子径の 変化,ローダミン110の残存率を調べた.上の実験で示し たように第1分画でほとんどのナノ粒子は回収されてお り,少量(2.8%)のローダミン110も溶出した(Fig. 10b). ナノ粒子の粒子径は,精製前後で共に22 nm であり,精製 によって変化しなかった.次に第1分画のろ液をそのまま MonoSpin にのせて,再度, MonoSpin による精製を行い,



Fig. 11 a) Effect of the nanoparticle size on the recovery of nanoparticles and free rhodamine; b) Comparison of the nanoparticle size before and after the MonoSpin treatment

さらにその第1分画を新たな MonoSpin に載せ,合計3回 の精製操作を行った.その結果,精製前と比較して78% のナノ粒子が回収され,粒子径は変わらず,22 nm であっ た (Fig. 10b).つまり3回精製を行ってもナノ粒子の崩壊 や凝集などは起こっていない.そしてローダミン110の残 存率はわずか0.3% であった.3回繰り返すことで,ほと んどのローダミン110を除去することができた.つまり本 手法を3回程度行うことで,ナノ粒子の分散液は精製され た.

4・2・2 ナノ粒子の大きさが MonoSpin による精製に与 える影響³⁶⁾ 次に、ナノ粒子の粒子径が、精製効率に与 える影響について調べた. 粒子径 21,60,87 nm (DLS によ る測定値)のローダミン 110 内包ナノ粒子を調製し、その 回収率を比較した (Fig. 11a). それぞれのナノ粒子が、87, 95,90 % の回収率で回収されたことから、今回検討した粒 子径の範囲では、粒子径による差異はあまり見られなかっ た (Fig. 11b). またいずれのナノ粒子も、精製の前後で粒 子径の変化は見られなかった、遊離のローダミン 110 も、 共存するナノ粒子の大きさにかかわらず、第1分画にそれ



Fig. 12 Recovery ratios for PEG and pegylated liposome nanoparticles (DOXIL)

ぞれ 2.9, 4.4, 2.3 % と僅かしか溶出しなかった. つまり, MonoSpin を通過する間に, ナノ粒子の崩壊や凝集は起こ らず, 共存している遊離ローダミンは効率的に捕捉され た. したがって, 本手法はナノ粒子の粒子径にかかわらず, 幅広い大きさのナノ粒子の精製に利用できると考えられ る.

4・3 異なった材料よりなるナノ粒子の MonoSpin によ る精製³⁶⁾

最後にシリカ以外の成分より構成されるナノ粒子につい て精製を試みた.検討には、内包物質として抗がん剤のド キソルビシンを内包した PEG ナノ粒子とドキソルビシン を内包した医薬品であるドキシルを用いた. ドキシルは, PEG が表面修飾されているリポソームであり、その内部に ドキソルビシンを含有している. ドキシルは疎水的な表面 に接触すると崩壊し、内包していたドキソルビシンを放出 するため³⁷⁾, ODS が修飾されている MonoSpin C18 で精製 した場合、ドキシルはほとんど溶出しなかった. そこで表 面にカルボキシ基を修飾した MonoSpin CBA で精製を 行った. PEG ナノ粒子及びドキシルの回収率は、それぞれ 85,93% であり,第1分画に溶出した遊離のドキソルビシ ンは 1.7, 3.1 % であった (Fig. 12). このように MonoSpin によって、材料の異なるナノ粒子も高い回収率で回収さ れ、共存していた遊離のドキソルビシンはほとんど捕捉さ れ, 第1分画に溶出しなかった. 以上の結果から. MonoSpin は多数の物質が共存する溶液に分散したナノ粒 子の精製に非常に有効であると考えられる.

5まとめ

既存の粒子充填型カラムによる分離分析が適さない粒子

径が数10~100 nm 程度のナノ粒子の分析に、2種類の孔 を有するモノリスカラムが適していることを明らかにし た.ナノ粒子の研究は、ますます盛んになっており、また 機能を向上するために表面修飾したナノ粒子など、より一 層構造が複雑なナノ粒子の開発が進んでいる。今後は、こ れらのより複雑な構造を有するナノ粒子の分析にモノリス カラムを利用し、効率的な分離精製法を開発したい.

謝 辞

本研究を遂行した東京大学の石垣潤一君,伊藤直樹君, また多大な援助等を頂いたエーザイ株式会社の山本栄一博 士,ジーエルサイエンス株式会社の青山千顕博士,宮崎将 太様に感謝します.本研究の一部は,科学研究費補助金と 日本学術振興会研究拠点形成事業(A.先端拠点形成型)か らの助成を受けて行った.記して謝意を表します.

文 献

- 1) H. Cabral, K. Kataoka : J. Control. Rel., 190, 465 (2014).
- E. G. Trams, C. J. Lauter, N. Jr Salem, U. Heine : Biochim. Biophys. Acta., 645, 63 (1981).
- 3) M. Kato : J. Pharma. Biomed. Anal., 118, 292 (2016).
- 4) 加藤 大: 分析化学 (Bunseki Kagaku) 64, 77 (2015).
- 5) D. R. Baer, D. J. Gaspar, P. Nachimuthu, S. D. Techane, D. G. Castner : *Anal. Bioanal. Chem.*, **396**, 983 (2010).
- 6) D. R. Baer, J. E. Amonette, M. H. Engelhard, D. J. Gaspar, A. S. Karakoti, S. Kuchibhatla, P. Nachimuthu, J. T. Nurmi, Y. Qiang, V. Sarathy, S. Seal, A. Sharma, P. G. Tratnyek, C.-M. Wang : *Surf. Interface Anal.*, 40, 529 (2008).
- A. L. Koh, C. M. Shachaf, S. Elchuri, G. P. Nolan, R. Sinclair : *Ultramicroscopy*, 109, 111 (2008).
- M. Kato, M. Sasaki, Y. Ueyama, A. Koga, A. Sano, T. Higashi, T. Santa : *J. Sep. Sci.*, 38, 468 (2015).
- 9) H. Sungi, S. Kimura, T. Fujita, T. Nagaoka : Anal. Sci., 31, 577 (2015).
- 10) Y. Matsumura, H. Maeda : Cancer Res., 46, 6387 (1986).
- 11) N. Ito, E. Yamamoto, T. Santa, T. Funatsu, M. Kato : *Pharmaceut. Res.*, **33**, 1440 (2016).
- 12) V. L. Jimenez, M. C. Leopold, C. Mazzitelli, J. W. Jorgenson, R. W. Murray : Anal. Chem., 75, 199 (2003).
- 13) Y. Song, V. Jimenez, C. McKinney, R. Donkers, R. W. Murray : Anal Chem., 75, 5088 (2003).
- 14) J. Zhang, Y. Pei, H. Zhang, L. Wang, L. Arrington, Y. Zhang, A. Glass, A. M. Leone : *Mol. Pharmaceutics*, 10, 397 (2013).
- 15) J. Zhang, R. M. Haas, A. M. Leone : Anal. Chem., 84, 6088 (2012).
- 16) N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, H. Nagayama, K. Hosoya, N. Tanaka : *Anal. Chem.*, 72, 1275 (2000).
- 17) M. Kato, K. Sakai-Kato, T. Toyo'oka, M. T. Dulay, J. P. Quirino, B. D. Bennett, R. N. Zare : *J. Chromatogr. A*, **961**, 45 (2002).
- 18) K. Ute, S. Yoshida, T. Kitayama, T. Bamba, K.

Harada, E. Fukusaki, A. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi : *Polym. J.*, **38**, 1194 (2006).

- 19) K. Sakai-Kato, S. Ota, T. Takeuchi, T. Kawanishi : J. Chromatogr. A, 1218, 5520 (2011).
- 20) K. Sakai-Kato, S. Ota, K. Hyodo, H. Ishihara, H. Kikuchi, T. Kawanishi : J. Sep. Sci., 34, 2861 (2011).
- 21) Siswoyo, L. W. Lim, T. Takeuchi: Anal. Sci., 28, 107 (2012).
- 22) A. M. Striegel, A. K. Brewer: Annual Rev. Anal. Chem., 5, 15 (2012).
- 23) T. Yokoi, Y. Sakamoto, O. Terasaki, Y. Kubota, T. Okubo, T. Tatsumi : J. Am. Chem. Soc., 128, 13664 (2006).
- 24) S. Murayama, B. Su, K. Okabe, A. Kishimura, K. Osada, M. Miura, T. Funatsu, K. Kataoka, M. Kato : *Chem. Commun.*, 48, 8380 (2012).
- 25) S. Murayama, T. Nishiyama, K. Takagi, F. Ishizuka, T. Santa, M. Kato: *Chem. Commun.*, 48, 11461 (2012).
- 26) Y. Shibata, T. Santa, M. Kato : RSC Advances, 5, 65909 (2015).
- 27) W. Jiang, R. Lionberger, L. X. Yu: Bioanalysis, 3,

333 (2011).

- 28) N. Itoh, A. Sano, T. Santa, M. Kato : Analyst, 139, 4453 (2014).
- 29) N. Itoh, T. Santa, M. Kato : Anal. Bioanal. Chem., 407, 6429 (2015).
- 30) N. M. Deshpande, M. G. Gangrade, M. B. Kekare, V. V. Vaidya : *J. Chromatogr. B*, 878, 315 (2010).
- 31) R. L. Thies, D. W. Cowens, P. R. Cullis, M. B. Bally, L. D. Mayer : Anal. Biochem., 188, 65 (1990).
- 32) L. D. Mayer, G. St-Onge : Anal. Biochem., 232, 149 (1995).
- 33) F. Yang, H. Wang, M. Liu, P. Hu, J. Jiang : J. Chromatogr. A, 1275, 61 (2013).
- 34) D. L. Chin, B. L. Lum, B. I. Sikic : J. Chromatogr. B, 779, 259 (2002).
- 35) E. Yamamoto, K. Hyodo, N. Ohnishi, T. Suzuki, H. Ishihara, H. Kikuchi, N. Asakawa : J. Chromatogr. B, 879, 3620 (2011).
- 36) N. Itoh, T. Santa, M. Kato : J. Chromatogr. A, 1404, 141 (2015).
- 37) K. D. Fugit, T.-X. Xiang, D. H. Choi, S. Kangarlou, E. Csuhai, P. M. Bummer, B. D. Anderson : J. Controlled Release., 217, 82 (2015).

Simultaneous Analytical and Purification Methods for Nanoparticles and Small Molecules Using a Silica Monolith

Masaru Kato¹

E-mail: masaru-kato@umin.ac.jp

¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033

(Received August 15, 2016; Accepted October 9, 2016)

Recently, nanoparticles, which are defined as particles of size 1-100 nm, have garnered considerable attention in many fields, since the properties of nanoparticles show many differences from, and advantages over, those of bulk materials. New functional nanoparticles are continually being developed for applications in such fields as diagnostics, therapeutics, catalysis, tissue engineering, and imaging. Encapsulating functional molecules within nanoparticles is an effective method to add functionality to nanoparticles. To analyze the size, shape and quantity of these nanoparticles, many excellent analytical techniques have been developed until now. We found that the bimodal pores (µm- and nm-sized pores) of silica monolithic columns were suitable for the separation of nanoparticles and small molecules. The size separation of nanoparticles was performed by the μ m-sized pores using the hydrodynamic chromatography, and small molecules were separated by the interaction with the Because these compounds were separated by different mechanisms, the stationary phase. elution patterns of the nanoparticles and small molecules were tunable independently. We achieved the simultaneous analysis of the silica nanoparticles and small molecules about 40 min using a silica monolith column. Furthermore, a rapid and mild purification method for the nanoparticles was developed using a monolithic silica disk (MonoSpin). Because the purification condition is rapid (2 min) and mild $(2290 \times g)$, the risk of collapse or cohesion of the nanoparticles was low. The bimodal structure of the monolithic has great potential for the analysis and purification of nanoparticles, and will be invaluable in determining the safety and reliability of nanoparticles.

Keywords: nanoparticle; silica monolith; quantification analysis; purification; encapsulated molecule.