金ナノロッドのフォトサーマル効果を利用したドラッグデリバリーシステム

Drug Delivery System Using Photothermal Effect of Gold Nanorods

新留 琢郎

熊本大学 大学院自然科学研究科 産業創造工学専攻 物質生命化学講座

〒860-8555
熊本市中央区黒髪 2-39-1

Takuro NIIDOME
Department of Applied Chemistry and
Biochemistry, Graduate School of Science and
Technology, Kumamoto University
2-39-1, Kurokami Chuo-ku, Kumamoto 860-8555, Japan

論文要旨：金ナノロッドは近赤外域に吸収バンドをもち、吸収した光エネルギーは熱へ変換される。したがって、近赤外光により発生する熱を使って、薬物の放出をコントロールするドラッグデリバリーシステムが構築できる。まず、我々は二本鎖 DNA で金ナノロッドを修飾した。すなわち、この金ナノロッドに近赤外光を照射すれば、フォトサーマル効果で金ナノロッドは発熱し、その熱で一本鎖 DNA が遊離するというシステムである。また、加熱されることにより進行する逆 Diels-Alder 反応をつかった PEG 鎖のコントロールリリースシステムも構築した。一方で、フォトサーマル効果により亢進されるタンパク質の経皮デリバリーシステムも構築した。実際に、皮膚に発熱素子となる金ナノロッドを塗布し、オボアルブミン水溶液をのせ、近赤外光を照射した結果、皮膚の温度は上昇し、皮内へのオボアルブミンの透過が認められた。このように、近赤外光でコントロールされるドラッグデリバリーシステムは、さらに他の機能も組み合わせ、機能的なデリバリーシステムへと発展すると期待される。

Abstract: Gold nanorods have absorption bands in the near-infrared region. The absorbed light energy is converted into heat by gold nanorods. Therefore, drug delivery systems that can be controlled by the heat produced by near-infrared light irradiation will be constructed. First, we modified gold nanorods with double-stranded DNA. That is, release of single stranded DNA is induced by the produced heat from the gold nanorods. We also constructed a controlled release system of PEG chain mediated by retro Diels-Alder reaction induced by the photothermal effect. Next, we designed transdermal protein delivery system enhanced by the photothermal effect. We first casted gold nanorods, acting as a heating device in response to near-infrared light irradiation, onto the skin surface. After applying an aqueous solution of ovalbumin to the skin, the skin was irradiated by near-infrared laser light. The irradiation increased the skin temperature resulting in an efficient translocation of ovalbumin into the skin. Thus, the controlled-release systems and enhanced transdermal protein delivery system triggered by near-infrared light irradiation will be further expanded to development of functional drug delivery system.

Key words: drug delivery system, near-infrared light, gold nanorods, photothermal effect, transdermal protein delivery

1 はじめに

金は古代インドや中国において、薬として利用されていたという。実は金は医療の分野と古くから結びついて

いた。現在ではインフルエンザや妊娠の簡易検査キットの色素としてよく目にする。これは金ナノ粒子の赤色素としての機能と、表面の抗体修飾が容易であることから、このような応用を可能にしているわけだが、やはりこの色素として機能する分光特性は興味深い。通常金ナノ粒子は 520 nm 付近にプラズモンバンドをもち、したがっ

連絡者：新留 琢郎
E-mail : niidome@kumamoto-u.ac.jp

て、赤色に見え、ステンドグラスはもちろんのこと、あの美しい金赤といわれる薩摩切り子の赤色素にもなっている。有機色素のように退色することはないので、その美しさは永遠で、芸術作品にもなる。いつか手に入れたいと企んでいる筆者であるが、未だその希望はかなえられていない。

さて、本章で紹介する金ナノ粒子は球状ではなく、ロッド状の金ナノ粒子、すなわち、金ナノロッドである (Fig. 1)¹⁾。1997年にYuらによって報告された金ナノロッドはカチオン性界面活性剤、hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) のミセル中で作製される。一般的に長軸長 50~80 nm、短軸長 10 nm 程度で、それぞれの方向の電子振動に由来する 800~900 nm (近赤外域) および 520 nm (可視光域) 付近に吸収バンドをもつ。これらのサイズを変えることで、分光特性をチューニングすることが可能で、超短パルスレーザーを照射すれば、二光子励起発光も起こる。また、吸収した光エネルギーを熱に変換するフォトサーマル効果をもつ。

筆者はこれまで、ドラッグデリバリーシステムの研究を行ってきた。薬物を特定の部位に、特定の量、特定の時間作用させるこの技術は薬物の副作用を軽減するばかりではなく、投与する薬剤の量も減らすことができる。このドラッグデリバリーシステムでは、一般に薬物を様々な機能をもつキャリア (運び屋) に修飾し、目的は達成される。その機能とは、薬物の体内成分との非特異的な吸着や取り込みを防ぐ、薬物の分解を防ぐ、標的組

織あるいは細胞表面に結合する、薬物のその場で放出する、放出するスピードをコントロールする等である。そして、複数の機能を1つのシステムに盛り込み、自律的に機能を順序よく発現させる必要がある。例えば、ポリマーをキャリアとした場合、投与後は、薬物はポリマーに保護されており、体内を安定に循環する。標的組織あるいは細胞に結合すると、その保護が解け、薬物が患部に作用するというシナリオとなる。しかし、これら機能を一つのシステムに詰め込むことは現時点では極めて困難だ。小惑星探査機「はやぶさ」は打ち上げ後、何の外部からの制御もなしに、自律的に「イトカワ」まで飛んでいくわけではない。機能は予め搭載されるが、常に地球との通信でその機能は制御され、ミッションは達成される。ドラッグデリバリーシステムでも同じことではないかということで、体外からの刺激、例えば光、磁場、超音波で、そのキャリアの機能をコントロールできれば、複雑な機能を正確かつ簡単に制御できるのではないかと考えるのである。

そんな中、筆者は新留康郎先生 (九州大学大学院工学研究院) から金ナノロッドという新しいナノ材料のことを紹介して頂いた。そのとき考えたことが、金ナノロッドをキャリアとすれば、近赤外光はその通信手段になるのではないかということ。もう1つ、近赤外光は比較的体内組織を透過しやすいというのも重要なポイントである²⁾。具体的には、金ナノロッドの表面に熱に応答するリンカーを介して薬物を修飾しておく。それに近赤外光を照射すれば、金ナノロッドは発熱し、そして、その熱で薬物が放出される。それは修飾する際のリンカーの種類や、光照射の時間で、時間的にも量的にも制御できるはずだと。

2 二本鎖 DNA の解離を使ったコントロールリリースシステム

二本鎖 DNA は加熱すると一本鎖に解離する。そこで、金ナノロッド表面に二本鎖 DNA を修飾し、近赤外光を照射すると、金ナノロッドが発熱し、一本鎖 DNA に解離する。この一本鎖 DNA を核酸医薬 (アンチセンスや siRNA) とすれば、核酸医薬のコントロールドリリリースシステムとなるし、これに抗がん剤を修飾すれば、抗がん剤のコントロールドリリリースシステムともなる (Fig. 2)。筆者らはまずそのモデルとして、解離する鎖に蛍光基を修飾し、フォトサーマル効果による二本鎖 DNA の解離を蛍光変化で評価した。その結果、金ナノロッド表面で消光していた蛍光が、近赤外光 (連続光レーザー) を照射することにより回復する様子を観察した。また、実際の光照射時の溶液温度を測定した結果、300 mW の

Fig. 1 金ナノロッドの電子顕微鏡写真と吸収スペクトル

Fig. 2 二本鎖 DNA 修飾金ナノロッドと光照射による一本鎖 DNA の解離

強度で照射した場合、二本鎖 DNA の解離が認められたが (Fig. 3A), このときの溶液温度は 50℃ 程度までしか上昇しておらず、二本鎖 DNA の融点 (61℃) より低い温度であった (Fig. 3B)。このことから、金ナノロッドの周辺の局所的な温度は溶液全体の温度より高くなっていることが示された。さらに、担がんマウスの腫瘍部位にこの DNA 修飾金ナノロッドを局所投与し、近赤外光を照射した結果、照射部位選択的に蛍光が観察された³⁾。マウス体内においても、金ナノロッドのフォトサーマル効果による一本鎖 DNA の解離をトリガーすることに成功したのである。今後、実際の核酸医薬や抗がん剤を搭載して、その薬効について評価したい。

次に、修飾する二本鎖 DNA の配列を変更し、その融点 (解離する温度) を変えてみた。61℃ と 80℃ の融点をもつ 2 種類の二本鎖 DNA を金ナノロッド表面に修飾し、近赤外光を照射した結果、61℃ のものが先に解離して、それに遅れて、80℃ のものが解離してきた (Fig. 3C)⁴⁾。これは複数の DNA 鎖を時間差で放出する技術となる。もし、異なるサイズ of 金ナノロッドを組み合わせれば、近赤外光の波長をスイッチすることで、それに対応する金ナノロッドのみを加熱することができる。これらを組み合わせることで、さらに高次の核酸リリースシステムへと発展できる。

3 逆 Diels-Alder 反応を使ったコントロールリリースシステム

共役ジエンとアルケンが環化付加反応する Diels-Alder

Fig. 3 光照射による一本鎖 DNA の解離。レーザー強度を変えて照射した場合の DNA の解離 (A) と溶液温度 (B)。融解温度の異なる二本鎖 DNA の解離速度の違い (C)

der 反応は有機化学の教科書にも出てくる基本的な化学反応である。筆者も大学院の受験勉強の際、ウッドワード・ホフマン則と一緒に数週間限定の短期記憶エリアにたたき込んだ。その後、長い間 (20 年くらい) 忘れていたが、ふとしたことからこのアイデアが浮かんできた。最近大学院入試にも推薦制度があって、試験なしに合格する場合もあるが、やはり、プレッシャーの下、苦勞して勉強することは大切なのだ。

さてそのアイデアとは、次の通りである。Diels-Alder 反応は 60℃ 程度で進行するといわれているが、さらに温度を上げると、逆 Diels-Alder 反応が起こり、環化付加体が共役ジエンとアルケンに解離する。そこで、金ナノロッドの表面にこの環化付加体を介して、ポリエチレングリコール (PEG) 鎖を修飾した (Fig. 4)。これに、

Fig. 4 Diels-Alder 環化付加物修飾金ナノロッドと光照射による PEG 鎖の遊離

Fig. 5 Diels-Alder 環化付加物修飾金ナノロッド (A) と光照射後 (B) の電子顕微鏡像

近赤外光を照射して、金ナノロッドを加熱すれば、逆 Diels-Alder 反応が起こり、PEG 鎖が解離するだろう。PEG 鎖は金ナノロッドを水中で分散させるために必須であるので、PEG 鎖が外れると金ナノロッドは凝集し、そのスペクトルは大きく変化するだろうという算段である。実際に、この修飾金ナノロッドに近赤外光（連続光レーザー）を照射した結果、吸収スペクトルは大きく変化し、電子顕微鏡観察においても、金ナノロッドの凝集が観察された（Fig. 5）。また、この凝集の度合いは、溶液自体を 80～90℃ に加熱した場合と同様であったため、実際金ナノロッド表面の局所的な温度は 80～90℃ になっていたと考えられた⁵⁾。しかし、現状では応答に数分かかり、レスポンスが決してよいとは言えないが、このような熱で進行する化学反応も金ナノロッドの表面構造の変換や薬物放出に利用可能であることを示すことができた。

4 角質層の透過性亢進による経皮デリバリーシステム

これまでのトピックは金ナノロッド表面から薬物が遊離するというシステムであったが、これからは、金ナノロッドから発生する熱が、薬物の通る道をつくるという話を紹介したい。

皮膚の表面にある角質層は生体防御の点で重要なバリアである。一方で、薬物の投与ルートとしても、簡単にアクセスでき、その大きな面積の大きさで、多くのメリットがある。また、皮内には多くの免疫担当細胞が配置され、様々な免疫応答もコントロールできるため、ワクチンの投与ルート（経皮ワクチン）としても期待されている。しかしながら、タンパク質や核酸といった水溶性の高分子にとって、そのバリアは極めて高く、いかに効率的に薬物を皮内へ移行させる手法や、超音波で角質層の物質透過性を高める方法、角質層（数十マイクロメートル）のみを通過できる針（マイクロニードル）を使った手法等が数多く報告されているが⁶⁾、そういう状況の中、金ナノロッドの発熱効果が皮膚の角質層を局所的に傷害し、物質透過性を上げることができないかと考えた（Fig. 6）。また、この手法では皮膚を加熱することになるので、この熱で熱ショックタンパク質が皮膚組織内に誘導され、これが様々な免疫応答を増強することも期待される。

筆者らはアルコールに分散した金ナノロッド（シリカコートしたもの⁷⁾）を皮膚に塗り、乾燥させ、そこにモデル抗原タンパク質として蛍光ラベルしたオボアルブミンを添加し、近赤外光（連続光レーザー）を照射した。その結果、皮膚の温度が上昇し、皮内に移行したオボアルブミンが蛍光顕微鏡下で観察された。そして、他のコントロール実験から、確かに金ナノロッドのフォトサーマ

Fig. 6 金ナノロッドのフォトサーマル効果による角質層の局所的傷害と物質透過性の向上

ル効果が角質層の透過性を亢進していることが示された。一方, パルス光レーザーを利用した場合, 連続光レーザーと同じ出力で照射したにもかかわらず, 皮膚の温度上昇は見られなかった。しかし, 皮内へのオボアルブミンの透過は少ないながらも観察された⁸⁾。パルス光レーザーの場合, 瞬間的に金ナノロッドが加熱され, 角質層にも傷害を与えるが, すぐにロッド状の形状が球状に変形してしまい, そうなると, 近赤外光の吸収はすでになくなってしまい, もはや加熱されることはない⁹⁾。この一過性の加熱で, 皮膚全体の温度は上昇させないが, 角質層の局所的な傷害は達成できるということなのである。さらに, マウスを使った *in vivo* の実験から, 連続光レーザーでは, 皮内組織において熱ショックタンパク質の誘導や好中球の浸潤がみられ, 炎症も含め, 様々な免疫応答が起こっていることが示された。今後, がんワクチンの応用も視野に入れながら, 安全な経皮デリバリー, さらに, 経皮ワクチンシステムの開発を進めていきたい。

5 おわりに

金ナノロッドの近赤外域に吸収バンドをもち, フォトサーマル効果をもつという特性を活かして, 近赤外光でコントロールするドラッグデリバリーシステムについて, いくつか紹介した。これ以外にも, 発生する熱で直接腫瘍を傷害する手法や¹⁰⁾, 腫瘍に金ナノロッドを集積させる方法^{11, 12)}, 温度感受性ポリマーと組み合わせ, マウスの光照射した部位に金ナノロッドを集積させる方法⁷⁾ など, 金ナノロッドの様々な活用法を我々は開発してきた。近赤外光照射という外部刺激を利用するこの手法は, オンデマンドに必要な機能をオンオフでき, 時間依存的あるいは環境応答性官能基による自律的な機能

発現システムに比べ, より正確に機能をコントロールができる。これら自律的なコントロールシステムも含め, 様々なしくみを組み合わせることで, より高度で実用的なドラッグデリバリーシステム, コントロールリリースシステムを開発していきたい。

文 献

- 1) Y.-Y. Yu, S.-S. Chang, C.-L. Lee, C. R. C. Wang, *J. Phys. Chem. B.*, **101**, 6661-6664 (1997).
- 2) W. Weissleder, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 316-317 (2001).
- 3) S. Yamashita, H. Fukushima, Y. Akiyama, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 2130-2135 (2011).
- 4) H. Fukushima, S. Yamashita, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, *Chem. Lett.*, **41**, 711-712 (2012).
- 5) S. Yamashita, H. Fukushima, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, *Langmuir*, **27**, 14621-14626 (2011).
- 6) M. Y. Lee, M. C. Shin, V. C. Yang, *BMB Rep.*, **46**, 17-24 (2013).
- 7) A. Shiotani, Y. Akiyama, T. Kawano, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, *Bioconjugate Chem.*, **21**, 2049-2054 (2010).
- 8) H. Tang, H. Kobayashi, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, *J. Controlled Release*, **171**, 178-183 (2013).
- 9) S. Yamashita, Y. Niidome, Y. Katayama, T. Niidome, *Chem. Lett.*, **38**, 226-227 (2009).
- 10) T. Niidome, Y. Akiyama, M. Yamagata, T. Kawano, T. Mori, Y. Niidome, Y. Katayama, *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.*, **20**, 1203-1215 (2009).
- 11) T. Niidome, M. Yamagata, Y. Okamoto, Y. Akiyama, H. Takahashi, T. Kawano, Y. Katayama, Y. Niidome, *J. Controlled Release*, **114**, 343-347 (2006).
- 12) Y. Akiyama, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, *J. Controlled Release*, **139**, 81-84 (2009).