

## 簡易的手法によるシルクナノ粒子の調製

### The formation of silk nano-particles by a simplified technique.

中 村 和 吉・藤 倉 沙 織\*

Kazuyoshi Nakamura, Saori Fujikura\*

#### 1. 緒言

ナノ粒子とは、ナノメートルオーダーの大きさの粒子のことであり、このナノ粒子を生体適合性素材のひとつであるシルク（フィブロインタンパク質）で調製したものが現在医学研究レベルでドラッグデリバリーシステム（DDS）に用いられようとしている(1, 2)。抗がん剤のDDSを例にとると、がん細胞と選択的に結合しないし親和性を有するアンカーと呼ばれる化学種を抗がん剤に直接結合させると、分子構造が変化してしまい効果を減じる可能性がある。これを回避するため、アンカーと薬剤の間を取り持つような物質を介した構造を持たせれば、有効なDDSとして機能を有することが期待される(3)。

現在報告されているシルクナノ粒子調製方法は、高濃度無機塩水溶液でシルク繊維を溶解し、透析・脱塩後にアセトンなどの有機溶剤を添加して、フィブロインタンパク質を変性・難溶化させることで得られる。この調製過程において数万Gクラス的大型遠心分離機を使用する必要があり、調製コストを大幅に引き上げている。

本研究では、大出力でかつ高価な遠心分離機を用いず、簡易的な方法で同等のシルクナノ粒子を調製することを目的とし、従来の製法で作られたシルクナノ粒子の特徴との差違の有無について調査・比較を試みたので報告する。

#### 2. 実験

##### 2.1 試料

シルク原料は市販の布団わた用真綿（近江真綿社製）を購入し、50℃に加熱した過剰量のエタノール中で15時間以上静置することで脱脂を行い、後に自然乾燥した。これを90℃に加熱した1.0 wt%炭酸水素ナトリウム水溶液中で20分間ゆるやかに攪拌し、セリシン除去を行い水洗後自然乾燥したものをシルク繊維原料とした。

シルク溶液は、シルク繊維1gに対し、50wt%塩化カルシウム二水和物（シグマアルドリッチ社製）水溶液20g、エタノール（キシダ化学社製特級品）5gの混合溶剤を50 mLふた付きバイアル内に取り、80℃に保った水浴中で攪拌して完全に溶解させた。これをヴィスキングチューブ（日本メディカルサイエンス社製；孔径5.0 nm）に取り、イオン交換水内で透析・脱塩をおこなった。透析・脱塩の終点は、透析水に0.5 wt%硝酸銀水溶液を滴下しても塩化銀の白沈が生じなくなるところとした。

##### 2.2 シルクナノ粒子の調製

前項にて得られたシルク水溶液に体積比で6倍以上となる量のアセトン（キシダ化学社製）を攪拌しながら

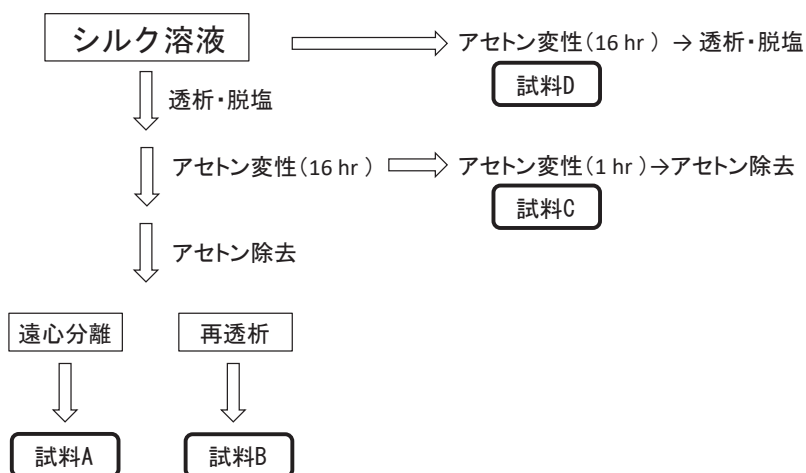
---

2019.10.21 受理

\* 平成30年度本学部卒業生

ら 10 mL/min の速度で滴下し、16 時間撹拌を続けてシルクナノ粒子を調製した。下記スキームに示す調製方法の差違により試料 A ～ D を得た。すなわち、アセトン除去する過程において、先行研究に準じて高速遠心分離（クボタ社製 model-6800; 14,000 G, 30 min）によって除去した試料を A、再度水中で透析を行いアセトン除去した試料を B、変性のための試料撹拌時間を短時間にした試料を C、透析・脱塩せず直接アセトン変性を施した試料を D とした。

調製後の各試料は 4℃ にて保管し、他の測定へ供した。



## 2.3 走査型電子顕微鏡観察

シルクナノ粒子の各試料を 8 mm 四方のアルミホイル上に取り、10 分間静置後にろ紙で余分の水分を吸い取り、自然乾燥したものを走査型電子顕微鏡（JEOL 製 JSM-6330F）にて観察を行った。乾燥試料は白金を厚さ 10 nm でコーティングを施し、加速電圧 3.0 kV にて観察した。

## 2.4 シルクナノ粒子の粒度分布測定

レーザー回折・散乱型ナノ粒子径分布測定装置（島津社製 SALD-7500nano）を用いて、各試料の粒径および粒度分布を測定した。試料は適宜脱イオン水で希釈を行い測定に供した。

## 2.5 シルクナノ粒子のタンパク質二次構造解析

赤外線分光光度計（日本分光社製 FT/IR-460）および同装置に付設したタンパク質二次構造解析プログラム（同社製）を用いて、シルクナノ粒子を構成しているタンパク質二次構造（ $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -シート、ランダムコイル等）の構成比を求めた。測定は液膜透過法（窓材には CaF<sub>2</sub> を使用）にて行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 製法の差違によるシルクナノ粒子の形状変化

先行研究の製法で得たシルクナノ粒子（試料 A）と本研で調製したシルクナノ粒子（試料 B ～ C）は、外観は薄青い散乱光による呈色を示す分散安定なサスペンションだった。試料 D については透明な上澄みと懸濁相に分離し分散不安定だった。

これらの走査型電子顕微鏡像を図 1 に示す。試料 A および B は、直径 100 nm 程度の球状粒子が観察視野全体を占めていた。試料 C は A、B と比較するとサイズ分布に幅があり、直径 200 nm 以上の粒子も多く見られた。また、複数のナノ粒子が凝集し一つの粒子形状を多面体状に変化させた凝集塊も観察できた。シルク溶液へのアセトン添加に際してタンパク質の変性による水溶性の低下が契機となり、溶媒中へシルク粒子として凝析する。この過程において、外部から充分な撹拌を加えることでシルク粒子の凝集と粗大化を抑

制できることを示している。一方、脱塩操作をしていない試料Dは、直径200～500 nmサイズの非球状粒子が互いに接着・連結している状態が観察できた。高濃度の無機塩共存下において、アセトン添加によるタンパク質変性の進行が阻害されたものと考えられる。

以上より、本研究における製法Bで調製したシルクナノ粒子が、先行研究の製法Aと類似したサイズおよび形状を得ていると考えられる。

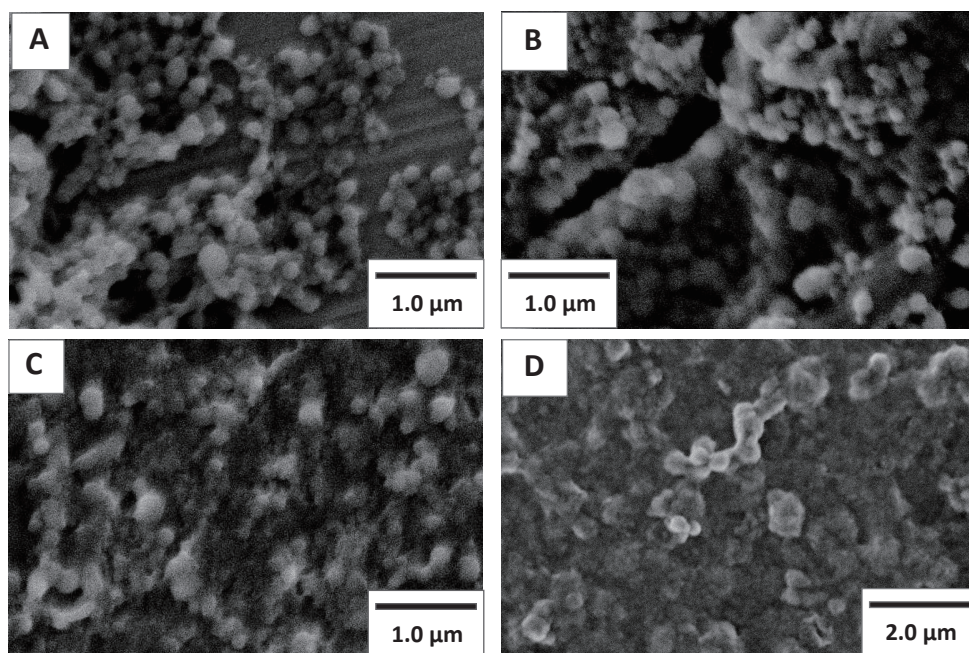


図1 調製方法の異なるナノ粒子の走査型電子顕微鏡像。図内の記号（A～D）は、調製方法に準ずる。

製法の異なる試料A、B中のシルクナノ粒子は電顕微鏡下での目視測定ではサイズに大きな違いが無いことが明らかとなった。この二試料について詳細なサイズ分布を求めた。図2に試料A、Bの粒度分布測定結果を示す。

図は粒子径分布測定によって得られた結果のヒストグラムである。いずれの試料もナノ粒子単体と思われる小サイズ粒子からなる分布と、複数集合した二次粒子ないし粗大化した粒子と思われる大サイズ分布が得られた。小サイズ粒子の分布について試料Aの平均サイズは $0.18 \pm 0.08 \mu\text{m}$ で、試料Bは $0.16 \pm 0.12 \mu\text{m}$ となり、平均値だけ見れば粒子サイズはほぼ等しいと言える。しかし試料Bは標準偏差が大きくヒストグラムも試料Aに比較して多分散性が優勢となっている。これは試料Aが遠心分離操作によって粗大粒子および小サイズの粒子（先行研究では『変性できなかったフィブロインの断片』と称している）が除去できているために単分散性が優位となり、透析操作のみで調製した試料Bはこれらの除去がなされず多分散性が残ったと考えられる。

DDS素材として使用するにあたり、これらの粗大粒子や断片が薬剤の効果に対して抑制的に作用するのであれば、これらを除去する方法を別途検討する必要がある。マイクロメートルサイズの大粒子については、安価な数百G程度の遠心分離機で除去が可能となるが、本研究ではこれ以上の検討は行わないものとする。

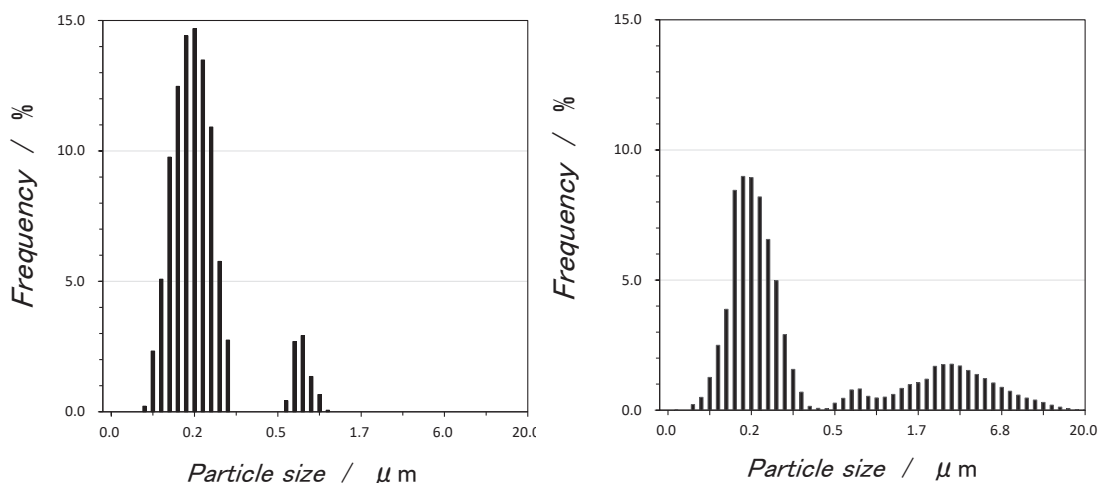


図2 試料AおよびBの粒子系分布測定ヒストグラム

### 3.2 製法の差違によるシルクナノ粒子の構造変化

従前の方で調製されたシルクナノ粒子試料Aと本研究の簡易的製法で得られた試料Bは、形態およびサイズについては類似した結果を得た。粒子を構成しているタンパク質であるシルクフィブロインの構造について差違があるか否か、赤外線分光法を用いて検討した。

一般にタンパク質の赤外線吸収スペクトルには、ペプチド主鎖カルボニル基の振動に帰属される吸収帯(アミドIバンド;  $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ )が存在する。このバンドの振動数はペプチド主鎖の二次構造の種類によって異なり、 $\alpha$ ヘリックス、 $\beta$ シート( $\beta$ ターン含む)およびランダムコイルの組成比によりアミドIバンドの形状が変化する。

図3に本研究で調製した試料BのアミドIバンドに相当する赤外線吸収スペクトルを示す。図内の太線で示したピークがオリジナルピークで、これを各種二次構造のピークでフィッティングを行うことによって、二次構造の比率が求められる(4)。本研究で調製した試料について二次構造の割合を求めた。結果を表1に示す。

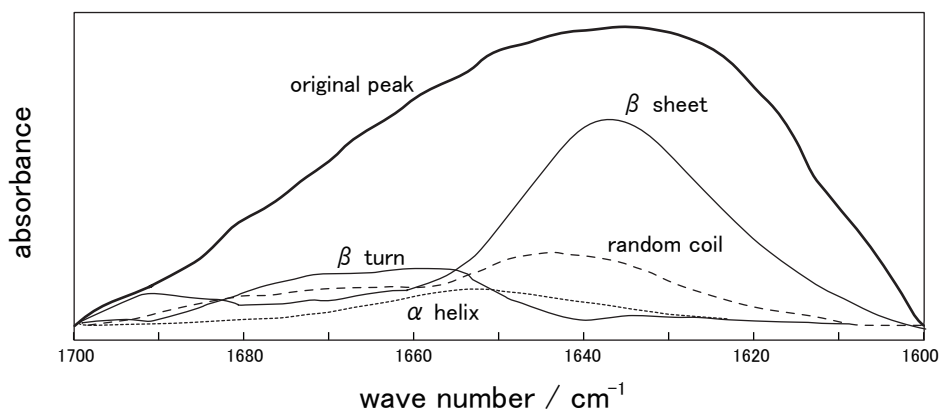


図3 試料Bにおける赤外線吸収スペクトル(アミドIバンド)および二次構造フィッティング解析結果

表1 赤外線分光法による各シルク試料におけるタンパク質二次構造の割合

	$\alpha$ -helix	$\beta$ -structure	random coil
シルク繊維	0	75	25
シルク溶液	17	60	23
#A	5	75	20
#B	8	72	20
#C	3	74	23
#D	15	63	22

表よりシルク繊維のタンパク質二次構造は、75%が $\beta$ シート構造をとり $\alpha$ ヘリックスは含まれていない。一方、溶剤で溶解したシルク溶液は $\beta$ 構造が減少し、変わりに $\alpha$ ヘリックスが増加しているように見える。これはカイコガ幼虫の絹糸腺から直接採取したフィブロインの二次構造が大半をランダムコイル状態で占めているのに対象的な結果である。すなわち繊維を無機塩で溶解したいわゆる「regenerated」な溶液は、 $\beta$ 構造の大半は維持されたまま液状化していることを示している(5, 6)。

従前の製法で調製された試料Aおよび本研究の製法B, Cについては、二次構造の割合が大きく変わらないことから、シルク繊維に近い $\beta$ 構造の多い状態でナノ粒子化していると考えられる。一方、透析・脱塩を省いた製法Dは、 $\alpha$ ヘリックスがシルク容器と同程度の値を得た。すなわち、高濃度の塩の共存によって、有機溶剤添加による $\alpha \rightarrow \beta$ への構造変化が抑制されていることを示し、この試料だけナノ粒子化が進行しにくくなっている理由として考えられる。

## まとめ

フィブロイン水溶液からナノ粒子を形成する過程において、変性剤としての有機溶剤の除去に大型・高出力の遠心分離機を用いなくても、透析によって除去が可能となり、ナノ粒子を調製できることが分かった。また、繊維溶解に用いた無機塩が共存したままでは、じゅうぶんな変性が進行せずナノ粒子化を阻害することが明らかになった。

加えて本研究の調製法では、粗大粒子と未変性のフィブロイン断片が除去できず、ナノ粒子と共存することがわかった。DDSへの用途として排除が必要かどうかについては今後検討していきたい。

## 謝辞

走査型電子顕微鏡観察および粒径分布測定では、新潟県工業技術総合研究所下越技術支援センターのご協力を賜りました。また大型遠心分離機の使用に際しては、本学部山口智子准教授のお取り計らいをいただきました。ここに記して謝意を表します。

## 参考文献

- (1) Yu Q., Hui W., Kai W., Ya Y., RuYue Z., Ick Soo K., Ke-Qin Z., "A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Leel Structures", *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, pp. 237-258 (2017)
- (2) Manfred F., Claudia S., Thidarat W., Manuela H., Carsten W., F. Philipp S., "Biocompatibility assessment of silk nanoparticles: hemocompatibility and internalization by human blood cells", *Nanomedicine*, vol. 13, pp. 2633-2642 (2017)
- (3) Thidarat W., Petra U., Andrew J. U., F. Philipp S., "PEGylated Silk Nanoparticles for Anticancer Drug Delivery", *Biomacromolecules*, vol. 16, pp. 3712-3722 (2015)
- (4) 平松博嗣, 「赤外吸収スペクトルを用いた二次構造解析法」, 蛋白質科学会アーカイブ, vol. 2, e054 (2009)
- (5) 馬越淳, 「絹フィブロインの転移機構」, 高分子論文集, vol. 31, pp. 765-770 (1974)

- (6) Shun-Ichi I., Jun M., Toshihisa T., Yoshiko M., Mary B., "Atomic force microscopy: Bombyx mori silk fibroin molecules and their higher order structure", J. Polym. Sci. prt.B, vol. 38, pp.1436-1439 (2000)