

M306

多孔性炭酸カルシウム微粒子を鋳型に用いた架橋 DNA カプセルの作製

(神戸大院工) ○(学)藤井 昭宏・(正)丸山 達生・(正)大向 吉景
(正)神尾 英治・(正)曾谷 知弘・(正)松山 秀人*

1. 緒言

生体適合性・生分解性を有する高分子カプセルは、薬物送達キャリアとして非常に有用である。本研究では、多孔性炭酸カルシウム微粒子を鋳型に用いた、単一成分からなる高分子カプセルの新規作製法を開発した。鋳型である炭酸カルシウムは、様々な高分子電解質、タンパク質を吸着できるうえ、キレート剤により比較的穏やかな条件で除去できる。我々は、この方法により、これまで報告例のない天然由来 DNA からなるマイクロカプセルを作製した。また、得られた DNA カプセルの酵素分解性、物質透過性の評価を行った。

2. 実験

炭酸カルシウム(CaCO_3)微粒子は、等量の 0.33 M 塩化カルシウム水溶液と 0.33 M 炭酸ナトリウム水溶液を混合し、激しく攪拌することで作製した。架橋DNAカプセルの作製には、まず、サケ精巢由来DNAを CaCO_3 微粒子に吸着させ、架橋剤であるエチレングリコールジグリシジルエーテル(EGDE)を用いて、吸着したDNAを架橋させた。その後、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を添加し、 CaCO_3 微粒子を溶解させることで中空のDNAカプセルを得た (Fig. 1)。本研究では、EGDEにNaOH、またはテトラメチルエチレンジアミン(TEMED)を添加した2種類の条件でDNAを架橋した。

作製したDNAカプセルの酵素分解性は、1 mg/ml DNase I (100 mM CaCl_2 , 100 mM MgCl_2 添加) 溶液中にカプセルを浸漬させ、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (CLSM) 観察により評価した。また、物質透過性は、0.5 mg/ml 蛍光標識デキストラン (Dex) (pH 7.0) 溶液にカプセルを分散させ、12 時間後のカプセル内部の蛍光強度から評価した。

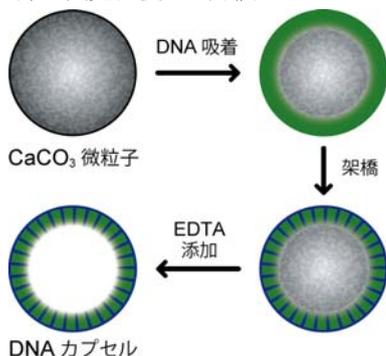


Fig. 1 架橋 DNA カプセル作製法の模式図。

3. 結果と考察

Fig. 2 に EGDE-NaOH により DNA を架橋した CaCO_3 微粒子、および EDTA 添加後に得られた DNA カプセルの CLSM 像を示す。DNA は CaCO_3 微粒子の内部に浸透しておらず、表面近傍にのみ吸着していた (Fig. 2a)。また、EDTA の添加

により、鋳型である CaCO_3 は溶解し、DNA は溶液中に分散することなく、カプセルの形状を維持していた (Fig. 2b)。

EGDE-TEMED による架橋で得られた DNA カプセルは、Fig. 3 に示したように、DNA 分解酵素により 40 min 以内に完全に分解した。しかし、この分解性は EGDE-NaOH で架橋した DNA カプセルには見られなかった。DNA の架橋の程度が、分解性に影響していると考えられる。

Fig. 4 に EGDE-TEMED による架橋で得られた DNA カプセルの物質透過性を示す。高分子量のデキストランはカプセル内部まで透過していないことから、薬物等を内包した DNA カプセルが作製できる可能性が示唆された。

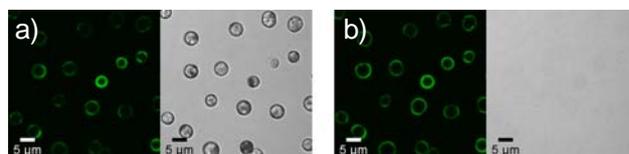


Fig. 2 DNA を吸着・架橋した CaCO_3 微粒子の CLSM 像。

a) EDTA 添加前, b) EDTA 添加後

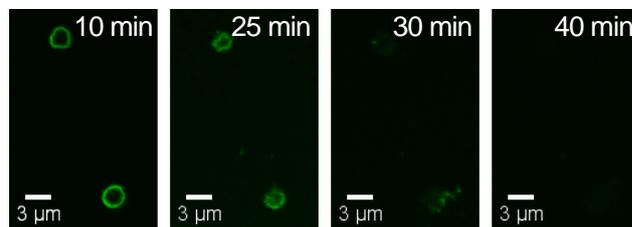


Fig. 3 DNase I による架橋 DNA カプセルの分解。

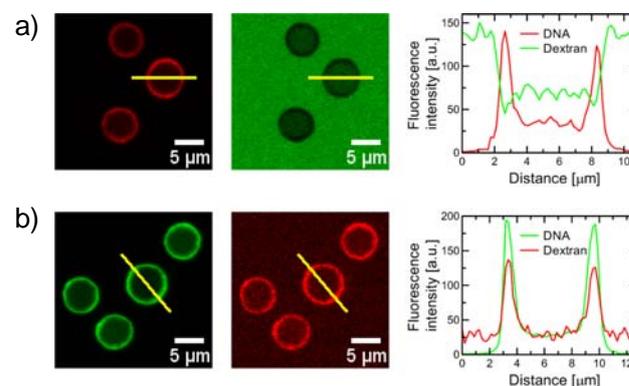


Fig. 4 架橋 DNA カプセルのデキストラン透過抑制。

a) Dex-FITC: $M_r \approx 250,000$, b) Dex-TRITC: $M_r \approx 4,400$

*TEL&FAX: 078-803-6180

E-mail: matuyama@kobe-u.ac.jp