

平成21年 6月 2日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19310069

研究課題名（和文） 破骨細胞応答型薬剤溶出ナノ粒子の開発

研究課題名（英文） Preparation of drug eluting nano-particles responding to cell activities

研究代表者

田中 順三（TANAKA JUNZO）

東京工業大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：10343831

研究成果の概要： 本研究は、転移性骨腫瘍の進行を防ぐ薬剤（ビスフォスフォネート：Bp）を長期間放出する薬物送達システム（DDS）の開発を目的とする。特に、生体親和性に優れ、骨と直接結合するリン酸カルシウムに着目して、細胞活動に応答して薬剤を放出する能動的な機能の付加を目指す。薬剤を表面に吸着して複合化することによって、Bpの担体としてはハイドロキシアパタイト（HAp）よりリン酸八カルシウム（OCP）が優れていることを示した。さらに Bp を取り込んだアモルファスのリン酸カルシウムを新規に合成し、表面吸着型の約4倍の Bp を複合化できることを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
年度			
総計	12,100,000	3,630,000	15,730,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノDDS、骨代謝・骨免疫制御、ソフトナノテクノロジー、破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

骨は、骨を分解する破骨細胞と、骨を作る骨芽細胞がバランスよく活動して、常に造りかえられている。健康時には、骨の量と質は安定している。しかし、骨格系の難病（転移性骨腫瘍・ガン、骨粗しょう症、関節リウマチ）にかかると、破骨細胞が活性化され、骨の代謝バランスが崩れる。その結果、骨が吸収されてもろくなり、病的骨折・脊髄圧迫・高カルシウム症・疼痛などの骨格系合併症を引き起こす。

骨転移ガンは、ガン細胞の直接浸潤ではな

く、ガン細胞が破骨細胞を活性化して骨を溶かす疾患である。したがって、骨転移ガンになると骨粗しょう症と同じように、骨量が低下して、脊髄圧迫・骨折を引き起こす。このため、破骨細胞の活動を抑制する薬剤を用いて、その副作用を軽減しつつ、転移性病変の根治療法につなげる材料技術の開発が強く求められている。破骨細胞の制御技術は、短期的には転移ガンの治療に利用できるが、将来的には、高齢者の骨粗しょう症や関節リウマチの低侵しゅう性・局所投与療法に応用できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、転移性骨腫瘍の進行を防ぐ薬剤（ビスフォスフォネート: Bp）を長期間放出する薬物送達システム (DDS: Drug Delivery System) の開発を目的とする。DDS 担体として、生体親和性に優れ、骨と直接結合するリン酸カルシウムに着目した。本 DDS 担体は、がん細胞によって破骨細胞が活性化されると担体自身が溶解して、Bp を放出して破骨細胞の働きを抑制する「細胞応答型 DDS 担体」である。

リン酸八カルシウム (OCP: $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) は層状化合物であるため、層間に Bp をインターカレーションできれば、破骨細胞の働きに応じて OCP が溶解され Bp を放出する「細胞応答型 DDS 担体」としての応用が期待される。一方、OCP は準安定物質のため、合成時の pH やカルシウム/リン比によって容易に他のリン酸カルシウムとなる。そのため、Bp を OCP と複合化し DDS 担体とするためには、Bp の OCP 形成過程に及ぼす影響を明らかにすることが重要である。

リン酸カルシウムへの Bp の担持については、以下の 2 点について検討することを目的とした。①ナノ結晶の表面吸着による複合化、②ナノ結晶中に Bp を取り込む複合化。

3. 研究の方法

(1) OCP の合成と Bp の OCP 形成過程に及ぼす影響: OCP の合成には、2 つのプロセスを検討した。1 つ目のプロセスでは、リン酸源として、0.04 M のリン酸二水素ナトリウム水溶液と 0.04 M のリン酸一水素ナトリウム水溶液を混合したリン酸緩衝液を用いた。OCP は、この 0.04 M のリン酸緩衝液に 0.04 M の酢酸カルシウム水溶液 250 ml を滴下・攪拌して合成した。合成時間は、滴下開始から 17~180 分間とした。Bp は、0.04 M のリン酸緩衝液に添加した後、酢酸カルシウム水溶液を滴下した。

2 つ目のプロセスでは、OCP を α -リン酸三カルシウム (α -TCP: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) の加水分解によって合成した。Bp は、 α -TCP 水溶液に共存させた。作製したサンプルの結晶相は、X 線回折法 (XRD) を用いて調べた。

(2) リン酸八カルシウムとヒドロキシアパタイトに対する薬剤 Bp の吸着特性: OCP と HAp に対する Bp の吸着特性を調べるための実験を行った。このとき Bp としてはリセドロネートを用いた。リセドロネートは R_1 にベンゼン環を有しているため 262nm のスペクトル吸収がみられ紫外・可視光光度計での測定が可能である。50mM の HEPES 緩衝液に適量のリセドロネートを添加した。

その溶液を紫外・可視光光度計により吸光度を出し、検量線から濃度を求めた。その溶液 15ml をバイアル瓶に取り出した。そこに第 3 章で作製した OCP または HAp を添加した。バイアル瓶にゴム栓をしてその上からアルミ栓をした。30°C に保ちながらシェイクングバスで 120 回/min で 24 時間振とうさせた。その後バイアル瓶中の溶液を 0.20 μm のフィルターで粒子を除去し、紫外・可視光光度計により波長 262nm を測定した。振とう前後の Bp の濃度差を吸着量として算出した。飽和吸着量と吸着平衡定数は Langmuir の吸着等温式から算出した。

(3) ナノ結晶中に Bp を取り込む複合化: リン酸二水素ナトリウム NaH_2PO_4 (和光純薬(株)、和光特級)、リン酸一水素二ナトリウム Na_2HPO_4 (和光純薬(株)、試薬特級) を各々 0.1mol とり、各々 250ml の蒸留水に溶かして 0.04M の溶液を作った。リン酸二水素ナトリウム水溶液を少量取り、そこにエチドロネート $\text{C}_2\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7\text{P}_2$ (和光純薬(株) または Toronto Research、薬理研究用: 以下エチドロネートという) を添加した。次にリン酸水素一ナトリウム水溶液を 60°C で pH6.70 となるまで加えた。残りのリン酸一水素二ナトリウム水溶液とリン酸二水素ナトリウム水溶液を混ぜ合わせて 60°C で pH6.70 を作った。この溶液をエチドロネートが添加されているリン酸緩衝液に足していき、200ml、pH6.70 の条件にした。

0.04M、250ml の酢酸カルシウムを用意し、15ml/min で 60°C に保ちながら、攪拌してあるリン酸緩衝液に滴下した。合成時間は 3 時間で行った。その後、沈殿した物質を吸引ろ過して 37°C で乾燥させた。

4. 研究成果

(1) Bp の OCP 形成過程に及ぼす影響: OCP を、Bp 非共存下でリン酸緩衝液と酢酸カルシウム水溶液から合成した場合、リン酸緩衝液の pH が低い時にはリン酸水素カルシウム二水和物 (DCPD: $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) が生成し、リン酸緩衝液の pH が 6.7 の時には、最も結晶性の良い OCP が得られた。図 1 に、合成時間を変化させて作製したサンプルの XRD パターンを示す。合成時間とともに結晶相が変化し、初期 (17 分) では DCPD 相が見られるが、時間が経つ (180 分) と OCP 単相となった。このことから、OCP は、前駆的に形成した DCPD を経て生成すると考えられる。OCP を、Bp を添加したリン酸緩衝液と酢酸カルシウム水溶液から合成した場合、図 1 の 180 分の場合でも Bp の添加量が多いときは DCPD が生成することがわかった。すなわち、Bp の共存下では、DCPD から OCP への形成が妨げられる。また、OCP への Bp の吸着量

は $0.23 \mu\text{mol}/\text{mg}$ であったことから、Bp と生成したリン酸カルシウムの化学結合が OCP 形成に影響を及ぼしていると考えられる。

次に、 α -TCP の加水分解から OCP を合成した結果、 70°C 、 $\text{pH}5$ で 180 分の反応によって OCP が形成することができた。一方、 α -TCP 水溶液に Bp を添加し同様の条件で反応させたところ、180 分でも OCP は形成せず、 α -TCP のままであった。すなわち、プロセスに関係なく合成系に Bp を添加することで、Bp は OCP 形成に影響を及ぼすことが明らかとなった。

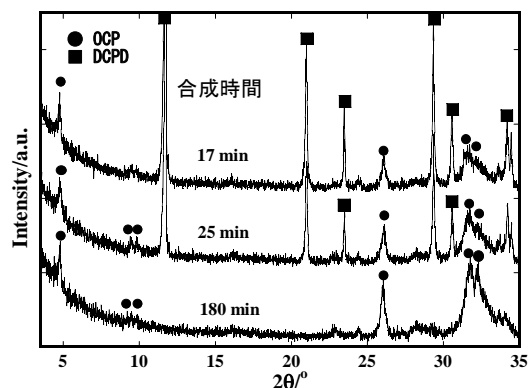


図1 合成したサンプルの XRD パターン

(2) リン酸八カルシウムとヒドロキシアパタイトに対する薬剤 Bp の吸着特性：OCP および HAp に対するリセドロネートの吸着試験の結果について示す。24 時間の吸着試験後の HEPES 緩衝液の pH の変化はどれも ± 0.05 以下であった。図 2 に OCP および HAp の各 HEPES 緩衝液中におけるリセドロネートの吸着等温線を示す。すべての pH において、HEPES 緩衝液中での OCP および HAp に対するリセドロネートの吸着は Langmuir 型吸着等温線に従った。

OCP に対するリセドロネートの飽和吸着量は $\text{pH} 7.00$ で $3.88 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 、 $\text{pH} 7.50$ で $3.32 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ および $\text{pH} 8.00$ で $3.16 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ であり、pH が低いほど飽和吸着量が多かった。また吸着平衡定数は $\text{pH} 7.00$ から順に 0.26 、 0.24 および $0.69 \text{ L}/\mu\text{mol}$ となった。

HAp に対するリセドロネートの飽和吸着量は $\text{pH} 7.00$ で $2.79 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 、 $\text{pH} 7.50$ で $2.58 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ および $\text{pH} 8.00$ で $1.95 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ であり、pH が低いほど飽和吸着量が多かった。また吸着平衡定数は $\text{pH} 7.00$ から順に 0.28 、 0.29 および $0.63 \text{ L}/\mu\text{mol}$ となった。

OCP と HAp の飽和吸着量を比較すると、各 pH で HAp より OCP の方がリセドロネートの飽和吸着量が多いことがわかった。

OCP と HAp のどちらも HEPES 緩衝液の pH が低いときほど飽和吸着量が多かった。リセドロネートと OCP の吸着は、リセドロネートの負に帯電したリン酸基と OCP の表

面にある Ca^{2+} との静電的な結合であると考えられる。HEPES 緩衝液の pH が上がると OCP の表面電位が下がってしまい、リセドロネートとの結合に不利になるからだと考えられる。このことは HAp にも同様のことが言える。よってリセドロネートの吸着量を多くするには pH が低い方が有利であるといえる。しかしあまり pH が低いと OCP や HAp が溶けてしまい相変化を起こしてしまう可能性もある。今回行った範囲では相変化がおきなかったため、 $\text{pH} 7.00$ で吸着させることがより多くの薬剤を吸着させるのに良いと考えられる。

次に OCP が HAp よりもリセドロネートの飽和吸着量が多かったことについて考察する。OCP の表面にはカルシウムイオンが HAp の表面よりも多く存在しているという報告がある。つまりリセドロネートの吸着サイトであると考えられるカルシウムが OCP 表面に多いので HAp よりも多くのリセドロネートを単位面積あたりに吸着できたと考えられる。

以上より、OCP は HAp よりも薬剤 Bp の担持に有効と結論した。

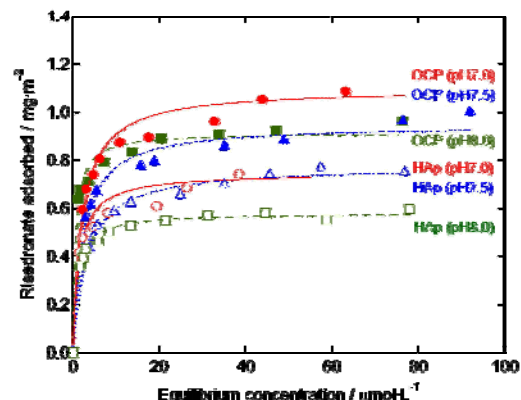


図2 OCP、HAp に対する Bp の吸着等温線

(3) ナノ結晶中に Bp を取り込む複合化：エチドロネートの添加量が 0 – 100 mg のとき、X 線回折測定より、エチドロネートの添加量が増えると DCPD 相が析出することがわかった。一方、エチドロネートの添加量が 1.8 mg であるとき、OCP が得られた。エチドロネートの添加量が 250 – 350 mg のときに得られた粉末の X 線回折測定結果を図 3 に示す。250 と 300 mg のときには DCPD 相が析出していることがわかるが、添加量が増えるとピークが小さくなっていることがわかる。一方 350 mg のときは DCPD 相もみられず、アモルファスリン酸カルシウムが得られた。炭素含有量を全有機炭素測定装置で測定したところ 2.57% であった。このため作製したアモルファスリン酸カルシウムは約 $22 \text{ wt}\%$ の Bp を含有した複合体と考えられる。この量は OCP 表面への Bp 吸着量の 4 倍に達した。本

複合体が、リン酸カルシウム形の新型のアモルファス構造をもつこと、および Bp の DDS 担体として有望であることを示した。今後、Bp の薬効を長期間・有効に持続させるため、DDS 担体の最適形態を制御する必要があると考えられる。

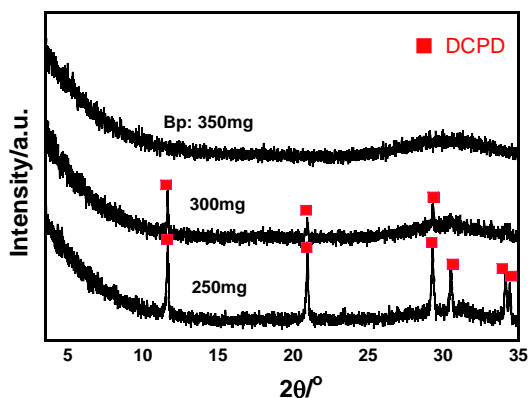


図 3 エチドロネートを添加して合成したサンプルの XRD パターン

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① T. Tonegawa, T. Ikoma, T. Yoshioka, K. Shinozaki, N. Hanagata, J. Tanaka, "Adsorption and Sustained Release of Insulin from Zinc Hydroxyapatite Microparticle with Poly (Lactic acid) Coating," *Key Engineering Materials Vols. 396-398* (2009) pp 507-510、査読無
- ② 田中順三、村岡桂舟、間宮朋彦、吉岡朋彦、生駒俊之、ガン治療のための機能性バイオセラミックスの開発、ケミカルエンジニアリング、52、828-832、2007、査読無
- ③ T. Abe, M. Sakane, T. Ikoma, T. Tonegawa, T. Yoshioka, J. Tanaka, N. Ochiai, "Novel Local Treatment with Paclitaxel-loaded Hydroxyapatite-alginate Gels for Spinal Bone Metastases," *Key Engineering Materials*, 330-332 pp. 857-860(2007)、査読無
- ④ T. Tonegawa, T. Ikoma, G. Chen, J. Tanaka, "Control of Protein Initial Burst From Zinc-Hydroxyapatite / Poly-(L-Lactide) System," *Key Engineering Materials*, 330-332 pp. 857-860(2007)、査読無
- ⑤ T. Ikoma, T. Tonegawa, H. Watanabe, G. Chen, J. Tanaka, Y. Mizushima, "Drug-Supported Microparticles of Calcium Carbonate Nanocrystals and its

Covering with Hydroxyapatite," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7, pp.822-827 (2007)、査読有

- ⑥ T. Tonegawa, T. Ikoma, G. Chen, J. Tanaka, "Synthesis and Characterization of Metal ions Containing Hydroxyapatite Microparticles with High Specific Surface Area," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7, pp.839-843 (2007)、査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① T. Mamiya, T. Yoshioka, T. Ikoma, K. Shinozaki, and J. Tanaka, Drug delivery system using calcium phosphates for bony metastatic carcinoma, IUMRS-ICA2008, 2008年12月9日, Nagoya Congress Center, Japan
- ② T. Tonegawa, T. Ikoma, T. Yoshioka, K. Shinozaki, N. Hanagata, and J. Tanaka, Adsorption and sustained release of insulin from zinc hydroxyapatite microparticle with poly(lactic acid) coating, 21th International Symposium of Ceramics in Medicine, 2008年10月23日, Atlantico Buzios Hotel, Buzios, Brazil
- ③ 利根川亨、生駒俊之、吉岡朋彦、篠崎和夫、花方信孝、田中順三、結晶子サイズの異なる水酸アパタイトのタンパク質吸着能評価、第21回日本セラミックス協会秋季シンポジウム、2008年9月18日、北九州国際会議場
- ④ T. Tonegawa, T. Ikoma, T. Yoshioka, N. Hanagata, K. Shinozaki, and J. Tanaka, Pharmacological protein adsorption on nano crystalline zinc containing hydroxyapatite, 8th World Biomaterials Congress, 2008年5月31日, RAI Congress Centre, Amsterdam, The Netherlands
- ⑤ 間宮朋彦、生駒俊之、吉岡朋彦、篠崎和夫、田中順三、骨転移ガン治療のためのCa-PO₄系DDS担体のプロセス探索、粉体粉末冶金協会平成20年度春季大会、2008年5月29日、早稲田大学国際会議場
- ⑥ T. Mamiya, T. Yoshioka, T. Ikoma, K. Shinozaki, and J. Tanaka, Synthesis of calcium phosphate particles containing bisphosphonate for drug delivery system, 第23回日本セラミックス協会関東支部研究発表会、2007年8月30日、ネオオリエンタルリゾート八ヶ岳高原

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 順三 (TANAKA JUNZO)
東京工業大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：10343831

(2) 研究分担者

生駒 俊之 (IKOMA TOSHIYUKI)
独立行政法人物質・材料研究機構・主任研究員
研究者番号：20370306

坂根 正孝 (SAKANE MASATAKA)
筑波大学・人間総合科学研究科・講師
研究者番号：30315684

吉岡 朋彦 (YOSHIOKA TOMOHIKO)
東京工業大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：50452016

(3) 連携研究者

なし