

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710112

研究課題名（和文） 腸疾患治療を指向したカーボンナノチューブによる経口投与薬物送達に関する基礎研究

研究課題名（英文） Fundamental studies on application of carbon nanotubes to oral drug delivery for the treatment of bowel diseases

研究代表者

中村 真紀（NAKAMURA MAKI）

独立行政法人産業技術総合研究所・ナノチューブ応用研究センター・産総研特別研究員

研究者番号：00568925

研究成果の概要（和文）：カーボンナノチューブ（CNT）はナノメートルサイズの炭素材料であり、薬剤を患部選択的に運ぶための運搬体（薬剤キャリア）としての応用が期待されている。このCNTをマウスに経口投与した結果、消化管からの体内吸収は見られず、体外にフンとして排泄されたことから、CNTの体内への蓄積やそれに伴う毒性発現はないと考えられた。以上より、CNTは、炎症性腸疾患の薬剤治療において、安全な経口薬剤キャリアとなりうることが示された。

研究成果の概要（英文）：Carbon nanotubes are nanometer-sized carbon materials, which are expected to be applicable to drug carriers of drug delivery systems. In mice experiment, orally-administered carbon nanotubes were not absorbed from the gastrointestinal tract, and excreted in feces, suggesting that neither accumulation of orally-administered carbon nanotubes in body nor associated toxicity would be observed. These results indicated that carbon nanotubes could be riskless oral drug carriers in drug therapy of inflammatory bowel diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：ナノ材料，機能性材料，カーボンナノホーン，経口投与，薬物送達，腸疾患治療

## 1. 研究開始当初の背景

難治性の炎症性腸疾患治療においては、経口投与などによる薬剤治療が試みられている。さらに、薬剤の効果を高め、副作用を回避することを目的として、患部選択的に薬剤を送達、徐放することを目指した研究も行われているものの、より一層の進歩が望まれている。ところで、近年、ナノメートルサイズ

のカーボン材料を用いた薬物送達への応用研究が盛んに行われてきている。中でも、カーボンナノチューブ（CNT）は、その中空な内部に薬物を内包させること、さらには外壁に化学修飾を施すことが可能であり、多機能化が容易であることから、関連研究が多数行われている。これまでの研究は、静脈投与、局所投与による薬物送達がほとんどであっ

たが、酸や塩基に強いグラファイト質であるCNTは、胃酸や各種消化酵素といった化学的に苛酷な状況が備わっている消化管内の環境にも耐えうるため、経口投与による薬物送達にも適していると考えられる。しかし、CNTの経口投与に関する報告はほとんどなく、CNTが消化器官内でどのように振舞うのか、CNTと腸管粘膜がどのような相互作用をするのか、CNTが実際に腸管から取り込まれるのかどうか、など解明されていない点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、CNTによる経口投与薬物送達のための基礎研究として、以下の検討を行い、経口投与によるCNTの生体への影響、および、薬物送達治療の可能性を明らかにすることを当初の目的とした。

- ・経口投与されたCNTの腸管上皮との相互作用やそこから体内拡散など、生体内におけるすべての挙動を明らかにする。
- ・CNTのサイズ制御や化学修飾が、その挙動へ与える影響を調べ、薬物送達に適したCNTの構造について検討する。
- ・CNTにステロイド剤を担持し、炎症性腸疾患モデルマウスに経口投与することで、その効果を検討する。

## 3. 研究の方法

本研究では、CNTの一種であるカーボンナノホーン(CNH, 図1)を用いて研究を進めた。CNHは、純度が高く、精製なしでそのまま用いることができ、開孔・物質内包・サイズ制御・化学修飾などに関する研究も豊富であり、本研究で用いるのに適していると判断した。

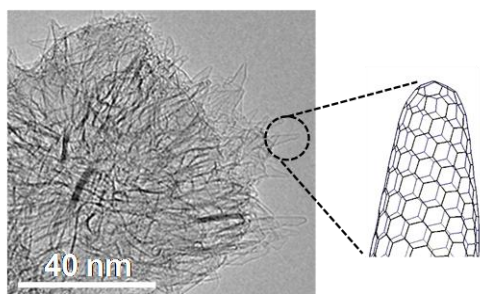


図1：カーボンナノホーン (CNH) の透過型電子顕微鏡写真

### (1) G d ラベル付き CNH の作製

CNHの生体内における挙動を調べる際に必要な、定量用のラベルとしてガドリニウム(Gd)酸化物を内包したラベル付きCNHを既報に基づき作製した(図2)。

具体的には、CNHを酸化処理により開孔させ、酢酸Gdをエタノール中にて内包させ

た。その後、1200℃、アルゴン雰囲気中で熱処理し、酢酸Gdを酸化Gdに変化させ、同時にCNHを開孔させた。この熱処理により、ラベルしたGd酸化物は、CNH内に完全に閉じ込められ、生体に投与しても直接触れることはなくなる。すなわち、作製したGdラベル付きCNHは、生体内における挙動を調べるのに適しているといえる。

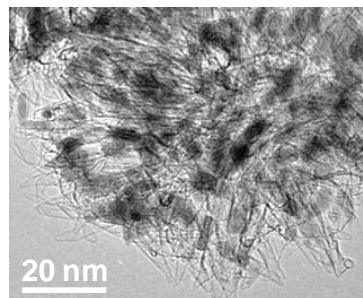


図2：Gdラベル付きCNHの透過型電子顕微鏡写真(黒く見える粒子がGd酸化物ナノ粒子)

### (2) プレドニゾロン担持CNHの作製

酸化処理により開孔させたCNHを用いて、CNHにステロイド剤であるプレドニゾロンを担持させた。

### (3) Gdラベル付きCNHのマウスへの経口投与実験

(1)で得られたGdラベル付きCNHをマウス(BALB/cA, メス)に経口投与し、4~48時間経過後の挙動を調べた。具体的には、解剖後、採取した各臓器・排泄物を燃焼させ、残滓を塩酸に溶解し、その溶解液中のGd量をICP発光分光分析法で定量した。また、腸管上皮にCNHが滞留するかどうかを明らかにするために、顕微鏡を用いて組織学的観察を行った。

なお、正常マウスの他に、病態マウスとして、炎症性腸疾患の1つである潰瘍性大腸炎のモデルマウスを用いた。このモデルマウスは、5%デキストラン硫酸ナトリウム溶液を正常マウスに7日間自由飲水させることにより作製した。

### (4) CNHのサイズ制御・化学修飾の影響

通常CNHに比べてサイズが小さいCNH、表面をカルボキシル化又はPEG化合物コーティングして分散性を向上させたCNHなど、5種類のCNHをそれぞれ正常マウス及び大腸炎モデルマウスに経口投与し、24時間経過後に解剖、採取した各臓器から作製した組織切片で分布の傾向を観察し、サイズ制御や化学修飾による挙動の違いについて考察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Gdラベル付きCNHの作製

既報を基に、より多くのGd酸化物を内包できるように、開孔条件の検討を行った。作製したGdラベル付きCNH中のGd酸化物の内包率は約6.4%であった。

##### (2) プレドニゾロン担持CNHの作製 (M. Nakamura *et al.* *Nanotechnology*, vol. 22, 2011, pp. 465102)

酸化処理により開孔させたCNHに、プレドニゾロンを効率的に担持させるため、開孔条件の検討を行った。その結果、乾燥空气中、1℃/分にて560℃まで昇温させ、ただちに自然放冷させるという低速酸化法により開孔したCNHが最適であった。この開孔CNHにプレドニゾロンをエタノール・水混合溶液中で担持させた結果、プレドニゾロンの担持量は0.45 g/gであった。

また、作製したプレドニゾロン担持CNHからのプレドニゾロンの放出を液体培地中にて調べた結果、24時間程度かけて徐々に放出することを確認した(図3)。24時間後における放出量は0.17 g/gであった。この放出量は、液体培地中のプレドニゾロン担持CNHの濃度が低下すると、増加する傾向にあり、局所的なプレドニゾロン濃度により放出がコントロールできる可能性が示唆された。

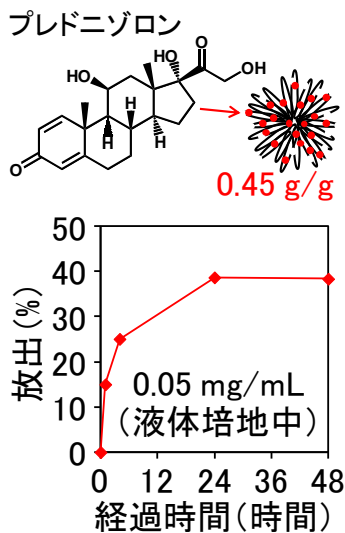


図3：【上段】プレドニゾロンの化学構造とプレドニゾロン担持CNHのイメージ図，【下段】プレドニゾロン担持CNHからのプレドニゾロンの放出

##### (3) Gdラベル付きCNHの Mausへの経口投与実験

採取した各臓器中のCNH含有量を計

測・算出した結果、正常マウス、大腸炎モデルマウス共に、消化管(胃・小腸・盲腸・大腸)及びフンからはCNHが検出されたが、肝臓・脾臓・血液からはCNHが検出されなかった。また、これらの臓器を取り出したマウスの残りの部分からもCNHは検出されなかった。

正常マウスでは、CNH投与24時間後には体内に残留するCNHがわずかとなり(24時間後に投与したCNHの約2%、48時間後に1%未満)、フンとして体外に排泄されていることが確認できた(図4)。

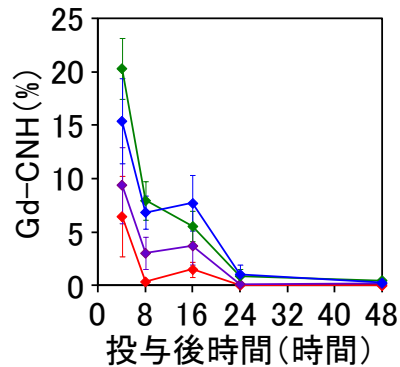


図4：正常マウスに投与したGdラベル付きCNH (Gd-CNH) の各臓器における割合 (赤：胃，紫：小腸，緑：盲腸，青：大腸)

一方、大腸炎モデルマウスでは、24時間後に体内に残留しているCNHが約20%と、正常マウスに比べて排泄が遅くなる傾向にあったが、48時間後に残留したCNH量は10%にも満たなく、時間の経過とともに徐々に排泄されていることを確認した(図5)。

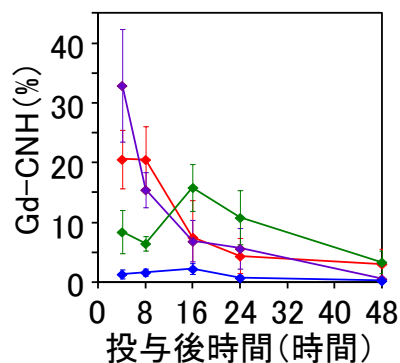


図5：大腸炎モデルマウスに投与したGdラベル付きCNH (Gd-CNH) の各臓器における割合 (赤：胃，紫：小腸，緑：盲腸，青：大腸)

また、光学顕微鏡における大腸の組織切片観察を行ったが、腸管組織中にCNHが取り込まれた様子は見られなかった。

以上の結果より、経口投与したCNHは消化管から体内に吸収されず、体外にフンとして排泄されることが明らかとなった。

#### (4) CNHのサイズ制御・化学修飾の影響

今回投与した5種類のCNHすべてにおいて、肝臓・脾臓への分布は認められなかった。また、大腸においては、フン中にCNHと思われる黒い物質の存在は認められたものの、腸管組織中へのCNHの取り込みは観察されなかった。以上の結果より、CNHのサイズ制御や化学修飾の違いによって、分布に大きな違いが見られないことが明らかとなった。

#### (5) まとめ

今回得られた結果により、経口投与したCNHは、使用目的に応じた化学修飾等に関わらず、体内への取込・蓄積やそれに伴う毒性発現を懸念しなくてよいことから、経口投与薬物キャリアとして適した特徴を有することが判明した。本研究成果は、これまでにほとんど検討されていない、ナノスケールのカーボン材料の経口投与による薬物送達治療の可能性を明らかにしたという点に意義がある。

今後、炎症性腸疾患に対してCNTを用いた経口投与治療の有効性が明らかになれば、難治性疾患に対する新たな治療システムが提示されるという点でその波及効果は大きく、さまざまな消化器官疾患に対しても同様の研究が発展すると期待される。

#### 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1件)

- ①中村真紀、田原善夫、池原譲、村上達也、土田邦博、飯島澄男、和賀巖、湯田坂雅子、  
“Single-walled carbon nanohorns as drug carriers: adsorption of prednisolone and anti-inflammatory effects on arthritis”  
Nanotechnology, 査読有, vol. 22, 2011, pp. 465102, <http://iopscience.iop.org/0957-4484/22/46/465102>

[学会発表] (計2件)

- ①中村真紀、田原善夫、池原譲、村上達也、土田邦博、飯島澄男、和賀巖、湯田坂雅子、  
「カーボンナノホーンの薬剤キャリアへの応用」, 日本薬学会第131年会(2011年3月, 静岡) [震災の影響で年会の開催は中止したが、発表は成立]

- ②中村真紀、田原善夫、村上達也、土田邦博、飯島澄男、和賀巖、湯田坂雅子、「ナノホーンのドラッグキャリアへの応用—ブレドニゾロンの担持と関節炎への抗炎症作用」, 第39回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム, 2010年9月, 京都

[図書] (計1件)

- ①中村真紀、張民芳、湯田坂雅子, コロナ社, 「カーボンナノチューブ・グラフェンハンドブック」, 2011年, pp. 75-77 (第3章第3節-1: ナノホーン)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中村 真紀 (NAKAMURA MAKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・ナノチューブ応用研究センター・産総研特別研究員

研究者番号: 00568925

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし