

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560223

研究課題名(和文) 推進エンジン搭載型有機ナノ粒子の作製と組織浸透性評価

研究課題名(英文) Preparation of the propulsion engine-loaded nanoparticle and evaluation of its tissue permeability

研究代表者

馬場 耕一 (Baba, Koichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座准教授

研究者番号：00436172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：眼には様々なバリア機能が発達しているため、点眼液の眼内移行性は低いとされている。眼組織の奥まで薬剤を浸透させる目的でナノ粒子点眼液使用したとしてもその浸透性はまだまだ十分でない。これはナノ粒子の浸透エネルギーが濃度勾配による受動拡散だからである。ナノ粒子一個に推進力を生むエンジンを搭載させた、自動推進型ナノ粒子の作製を試み、ナノ粒子の生体組織浸透性を高める検証実験を行い、薬剤ナノ粒子の組織浸透性を格段に高める挑戦的研究に取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：Generally, it is recognized that the ocular penetration rate of eye drops into ocular globe is comparably low. This is because several barrier functions exist in ocular globe. Furthermore, we considered that the only the passive diffusion energy after eye drop administration is not enough for drug penetration into ocular globe. In this study we tried to prepare drug nanoparticle eye drops which has propulsion engine inside nanoparticles.

研究分野：有機ナノ材料化学

キーワード：ナノバイオ材料 点眼液 ナノ粒子薬剤

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 一般に点眼液の眼内移行性は比較的低いとされている。眼には涙液による排除機構や、角膜上皮にタイトジャンクションと呼ばれる物質透過の関門となるバリア機能が発現しているからである。点眼液の眼内移行性を向上させる手段としてナノ粒子技術の応用が有効である。

申請者は近年、ナノ結晶化技術を薬剤分野に応用してドラッグナノ結晶の研究に携わっている。例えば抗ガン剤形ドラッグナノ結晶を使用しガンの光線力学療法(Baba et al, Mol Pharmaceutics, 4, 289-97, 2007)や新規二量体ナノ純薬抗ガン剤 (Angew. Chem. Int. Ed. 51, 10315 -10318, 2012) において世界に先駆けその有用性を明らかにした。近年、ドラッグナノ結晶の技術を眼科学の点眼液に応用し、眼内移行性を高めたナノ粒子点眼液の作製に取り組んでいる。

ナノ粒子点眼液の研究開発に取り組む中で、明らかになってきたことがある。薬剤ナノ粒子化によって薬剤の眼内移行性が向上する傾向があるものの、その眼内移行性には限りがある。この原因は粒子を浸透させるための駆動力エネルギーが組織内で生じる濃度勾配等による受動拡散エネルギーのみでは十分でないためであると考えられるためである。申請者は長年、有機ナノ結晶の研究に取り組んできたが、試行錯誤の実験の苦労の末、この度、薬剤ナノ粒子を眼の奥に浸透させなければ、ナノ粒子を組織の奥まで移動・能動拡散するためのエネルギーが必要であるという考えに至った。眼の奥まで薬剤が浸透すればこれまで困難であった失明に関わる眼深遠部の網膜疾患を薬物治療することができるため極めて有望な技術になり得ると考えるに至った。

### 2. 研究の目的

(1) そこで本研究では、ナノ粒子一個に推進力を生むエンジンを搭載させた、自動推進型ナノ粒子を作製し、点眼により眼の深遠部までナノ粒子を移動させることが可能なことを実証し、眼科医療に新しい治療戦略を生むことを目的とする。ナノ粒子一個に推進力を生むエンジンを搭載させた、自動推進型ナノ粒子の作製を試み、ナノ粒子の生体組織浸透性を高める検証実験を行う。ナノ粒子に炭酸水素ナトリウム(重曹)を搭載させ水中でクエン酸と反応することにより、二酸化炭素を生じさせ発生した炭酸ガスの力でナノ粒子を動かす。自動推進型の薬剤ナノ粒子を作製することで、従来難しかった薬剤ナノ粒子の組織浸透性を格段に高める挑戦的研究に取り組むことを目的とする。

### 3. 研究の方法

(平成25年度)

エンジン搭載自動推進型ナノ粒子の作製と構造物性評価

#### 【エンジン搭載自動推進型ナノ粒子の作製】

本ナノ粒子の作製には申請者の長年の研究で用いてきた有機ナノ結晶の作製法、再沈法を基盤技術として利用した(K Baba, et al, Mol Pharmaceutics, 4, 289-97, 2007)。再沈法とは、再沈澱効果を利用し有機ナノ結晶を水中に析出・安定分散させ、同時に結晶サイズ・構造を制御する手法である。結晶サイズ及び構造制御は溶液濃度・水温・溶媒種・分散安定剤・攪拌速度等の調整より行う(例: 薬剤を溶解したエタノール溶液(10 mM)の200 $\mu$ lをマイクロシリンジを用いて攪拌中の水(10 ml)に素早く注入し再沈澱効果によりナノ結晶水分散液を得る)。作製に使用した有機溶媒は透析を用いて除去する。申請者の研究も含め再沈法に係る多くの論文報告があり(100報以上)、再沈法はナノ結晶の作製において優れた手法である。モデル薬剤としてステロイド剤と重曹を混ぜ合わせ共沈を行うことにより混合ナノ粒子を作製した(下記、共沈法参照)。比較検証用として自動推進をしない(重曹を含まない)ナノ粒子やマイクロ粒子懸濁点眼液(ミリングや超音波破碎法等により作製)を用いる。

共同沈法: 化合物AとBを混ぜ合わせた良溶媒を貧溶媒に同時に沈殿させ、AとBの混合ナノ粒子を作製する方法である。本手法を用いることで重曹(炭酸水素ナトリウム)と薬剤の混合ナノ粒子を作製することが可能である。AとBの混合化合物によってはナノ共結晶を作製可能であることを申請者が明らかにした(Baba et al, Jpn. J. Appl. Phys, 51, 2012, in press)。

【構造物性評価】 エンジン搭載自動推進型ナノ粒子点眼液の粒子サイズ・構造物性・水分散安定性および光学特性は、電子顕微鏡(SEM)、粒子径・粒子表面電位測定装置により評価した。

(平成26年度)

エンジン搭載自動推進型ナノ粒子の作製と点眼による眼内移行性評価

【エンジン搭載自動推進型ナノ粒子点眼液の動物への点眼】 作製したエンジン搭載自動推進型ナノ粒子点眼液を実験動物であるマウスやウサギに投与する。

【眼内移行性評価】 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用い点眼液の眼内移行性を評価する。点眼液をウサギの片眼に点眼し所定の保持時間後(例: 5, 30, 60, 120分)、ウサギに麻酔をかけ眼内の前房水を注射器で採取した。HPLCにより薬物濃度を測定した。HPLC測定前に、組織片から目的の薬剤を抽出する過程が必要である。その作業を適切に行うために、遠心濃縮機を用いた。尚点眼処置後の解析は論文等で確立された手法に基づき行った。尚、動物実験は、大阪大学動物実験指針、大阪大学医学部動物実験ガイドラインおよび関係法令(動物の愛護および管理に

関する法律)や基準(実験動物の飼養及び保管等に関する基準、動物の処分方法に関する指針)を遵守し、大阪大学医学部動物実験委員会の承認を得て行った。

#### 4. 研究成果

(1)一般的に重曹とクエン酸を混合することでCO<sub>2</sub>を発生させることは可能であり、予備的実験においてバルク状態の重曹とクエン酸粒子混合体から二酸化炭素の発生させることには作製には成功している。そこでナノ粒子化での挑戦となるが、重曹はエタノールに溶けない性質を利用して、エタノールを貧溶媒にして、重層のナノファーバーを作製することに成功した。続いて得られた重曹とクエン酸と反応させて二酸化炭素を発生させる試みを行った。しかしながら、重層のナノ粒子とクエン酸は反応して明確な二酸化炭素のバブルを発生しないことが明らかとなった。推測であるが、ナノ領域で起こる重曹とクエン酸の化学反応で生じる微小なバブリングは、直ちに水の中に溶解してしまうためだと考えられた。

(2)そのためまずは推進エンジンを搭載しないナノ結晶点眼液と用いてウサギに対する点眼による眼内移行性評価を行ったところ、ステロイドナノ結晶点眼液は、マイクロ結晶点眼液よりも約6倍ほど高い眼内以降移行性を示すことが明らかとなった。難水溶性薬剤は通常懸濁液として点眼液含有されているため、薬剤の眼内移行性は低いのが現状である。明らかにナノ粒子サイズ効果によって、薬剤の水への溶解性やおそらく細胞内への取り込みが向上した結果であると推測している。そのためナノ結晶点眼液に推進エンジンの燃料を搭載することで更なる眼内移行性が向上することが期待できたが、十分な量の重曹をステロイドナノ結晶と混合した点眼液を創ることが難しかった。従って、推進エンジンを搭載した点眼液による眼内移行性の向上を検証することは難しい結果となった。今後、更なる工夫を施し、推進エンジン搭載型のナノ結晶点眼液を作製を行っていく予定である。尚、蛍光ナノ結晶分散液は、点眼後のナノ結晶が眼内に移行する際の様子を可視的に捉えることができるため有効なツールである。そのため蛍光性ナノ結晶分散液の開発も行ったことを付記する。

#### 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)

Koichi Baba, Kohji Nishida, Preparation of 1,4-bis(4-methylstyryl)benzene nanocrystals by a wet process and evaluation of their optical properties, Nanoscale Research Letters 2014, 9:16.

[学会発表](計 3件)

学会名・国際)169th OMIC Group Conference, 4th International Conference and Exhibition on Pharmaceuticals & Novel Drug Delivery Systems  
タイトル) Nanoparticle eye drops demonstrate enhanced ocular penetration,  
日時場所) March 24-26, 2014 Hilton, San Antonio Airport, San Antonio, USA  
発表者) Koichi Baba

招待講演

学会名・国際) 2014 ARVO annual meeting  
タイトル) Preparation and evaluation of fluorometholone nanoparticle eye drops  
日時場所) 2014, May 4-8, 2014, Orlando, Florida, USA Antonio Airport, San Antonio, USA  
発表者) Koichi Baba, Noriyasu Hashida, Koichi Baba

招待講演

学会名・国際) 14th ICGP & JSNP Joint Congress  
タイトル) Introduction of drug nanocrystal technology - for the potential tool to treatment of neurodegenerative disorders  
日時場所) Tsukuba International Congress Center ,Tsukuba, Japan  
発表者) Koichi Baba

[図書](計 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者

馬場 耕一 (BABA, Koichi)  
大阪大学・大学院・医学系研究科・視覚再  
生医学寄附講座・寄附講座准教授  
研究者番号：00436172

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：