

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 3 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590183

研究課題名（和文）カーボンナノチューブを用いた組織指向型薬物送達システムの構築

研究課題名（英文）Strategy for targeted delivery of drugs using single-walled carbon nanotube

研究代表者

灘井 雅行（NADAI MASAYUKI）

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：00295544

研究成果の概要（和文）：

本研究では、Drug Delivery のキャリアとして注目されている Single-walled Carbon Nanotube (SWCNT) に polyethylene glycol (PEG) と蛍光色素 Cy5 を結合させた水溶性蛍光 SWCNT (Cy5-PEG-CNT) を合成し、その体内動態特性について検討した。Wistar 系ラットにおいて、Cy5-PEG-CNT の血漿中からの消失挙動は分子量により異なり、分子量の小さいものの方が速やかに消失した。一方、Cy5-PEG-CNT は投与後 180 分までに投与量の 60~70% が尿中および胆汁中に排泄され、また分子量の小さいものは主に尿中に、分子量の大きいものは主に胆汁中に排泄された。以上の結果から、SWCNT の物理化学的特性を変化させることにより、体内動態特性をコントロールできる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Recently, clinical application of single-walled carbon nanotube (SWCNT) has been proposed as drug delivery agents. In the present study, water-soluble fluorescent SWCNT (Cy5-PEG-CNT) has been synthesized by binding to fluorescent dye Cy5 and polyethylene glycol (PEG) in order to elucidate the pharmacokinetic properties of SWCNT. When Cy5-PEG-CNT was administered intravenously in Wistar rats, elimination rate from plasma was affected by its molecular weight. Disappearance of Cy5-PEG-CNT with low molecular weight from plasma was faster than that with high molecular weight. Cy5-PEG-CNT was excreted into urine and bile and the total cumulative amount of excretion was 60–70% of the dose administered. Cy5-PEG-CNT with low and high molecular weights was mainly excreted into the urine and bile, respectively. These findings suggest that the pharmacokinetics of SWCNT is able to control by changing the physicochemical properties.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：カーボンナノチューブ、水溶化、蛍光ラベル化、体内動態特性

1. 研究開始当初の背景

カーボンナノチューブ (CNT) は炭素原子のみから成る、直径が約 0.4–50 nm、長さが約 1–数 10 μm のグラファイトシートを筒状に巻いた構造を有し、その軽量高強度性、高熱伝導性、耐摩耗性、高電流密度等の性質から 21 世紀の新素材として注目されている。また、CNT は薬物輸送システムにおけるドラッグキャリアーとして医療分野への応用が期待されている。これまでに、CNT は受動拡散により脂質二重膜を通過すること、また CNT はその物理化学的性質から、薬物や抗体などの標的指向性リガンドを共有結合あるいは非共有結合により付加することが可能であること、さらに広い表面積を持つため一分子につき多くの薬物の導入が可能であることが報告されている。したがって、CNT に薬物とともに、癌組織などの特定組織に親和性を有する標的指向性リガンドとして抗体やペプチド、さらに DNA や RNA などが付加できれば、組織指向性を有する新たなナノスケールの構造体のデザインが可能となる。しかし、現時点において CNT 自身の体内動態特性、特に組織移行特性や体内からの消失機序についての研究報告は皆無である。また、CNT に抗体、ペプチドなどを付加することにより組織移行性を与えることができるか、薬物を結合した組織指向性を持つ CNT が、目標組織で期待する薬物放出特性を示し、薬物治療の有効性、安全性を向上させることができるかについてはほとんど検討されていない。したがって、CNT の医療分野への応用を目指して CNT の薬物体内動態学特性とその安全性を明らかにするとともに、CNT のドラッグキャリアーとしての有用性についての検討が必要である。

2. 研究の目的

医療分野において、単層カーボンナノチューブ (single-walled carbon nanotube, SWCNT) は、その円筒構造の広い表面積を利用して、多くの薬物や標的指向性リガンドを物理的・化学的に導入し、標的組織に薬物を送達することが可能であると考えられており、新規のドラッグキャリアーとして応用が期待されている。しかし、SWCNT は水への分散性・溶解性が乏しく、生体適合性が低いと考えられることから、SWCNT をドラッグキャリアーとして利用するためには、水への分散性・溶解性を改善した SWCNT 誘導体を作成する必要があると考えられる。

一方、SWCNT に薬物および標的指向性リガンドを導入し、ドラッグキャリアーとして利用するためには SWCNT 自身、ならびに誘導化により水溶性を向上させた SWCNT の体内動態特性を解明することが不可欠であ

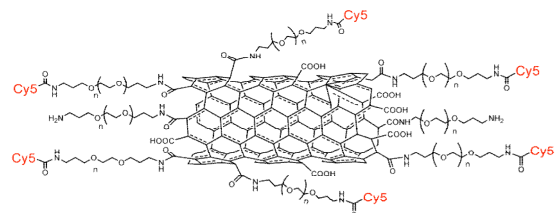
る。しかし、炭素のみで構成される SWCNT は高分子であり、また紫外光や蛍光を用いた測定ができないことから、ラマンスペクトルを利用した測定が行われているが、小動物などにおける SWCNT の体内動態特性を解明するための経時的な血中や組織中濃度の測定法としては、感度、精度ともに十分であるとは言い難い。

そこで本研究では SWCNT の水への分散性・溶解性を向上させた誘導体を合成し、さらにその体内動態を可視化し、高感度かつ高精度な濃度測定を行うため、蛍光ラベルを導入した水溶性蛍光ラベル化 SWCNT を用いて、マウスおよびラットにおける体内動態特性について検討した。さらに物理化学的性質の異なる水溶性蛍光ラベル化 SWCNT を合成し、その体内動態特性の差異について検討した。

3. 研究の方法

(1) 水溶性蛍光ラベル化 SWCNT の合成

SWCNT は安定な炭素のみから構成されて



Structure of Cy5-PEG-CNT

いるため、その構造上に直接的に薬物などを導入することは困難である。したがって SWCNT の化学修飾は水への分散性・溶解性の向上を目的とするのみならず、薬物や抗体などの標的組織指向性を有するリガンドを結合させることが可能な官能基を導入することが必要である。そこで、アーク放電法により作製した未精製 SWCNT からの炭素不純物、金属触媒の除去および SWCNT 表面へのカルボキシル基の導入のため SWCNT を HCl 水溶液で処理した後、 H_2SO_4 : HNO_3 (3:1) 溶液で酸処理を行った。続いて SWCNT 表面のカルボキシル基を利用して末端にアミノ基を有した polyethylene glycol (PEG) を導入し、アミノ化 SWCNT とした。さらに共有結合によりアミノ化 SWCNT を蛍光色素 Cy5 で標識し、水溶性蛍光ラベル化 SWCNT (以下、Cy5-PEG-CNT と表記) を合成した。

(2) 蛍光 in vivo イメージングシステムによる Cy5-PEG-CNT の体内動態特性の検討
合成した Cy5-PEG-CNT および Cy5 を 1% Tween 80 生理食塩水に分散・溶解した試料溶液、8-10 週齢の雄性 BALB/c マウ

スに体重当たり Cy5 として 0.13 $\mu\text{g/g}$ となるよう尾静脈内投与し、以後経時的に全身の蛍光強度を蛍光 *in vivo* イメージングシステム IVIS200 を用いて、励起波長 640 nm、蛍光波長 680 nm にて測定した。さらに試料溶液投与 24 時間後に肺・腎臓・脾臓・肝臓・盲腸を摘出し、その蛍光強度を測定した。また試料溶液投与 6-7 時間後に回収したマウスの尿をゲルろ過することで尿中に排泄された成分を分析した。

(3) 物理化学的性質の異なる水溶性蛍光ラベル化 SWCNT の合成

(1) に示した水溶性蛍光ラベル化 SWCNT の合成過程において、SWCNT の酸処理回数を 2 回および 5 回とすることで、物理化学的性質の異なる Cy5-PEG-CNT(2) および Cy5-PEG-CNT(5) を合成した。

(4) 物理化学的性質の異なる水溶性蛍光ラベル化 SWCNT の体内動態の検討

合成した Cy5-PEG-CNT の体内動態の検討には 8 - 10 週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。麻酔下においてラットの頸静脈、膀胱、胆管にカニューレを施した後、1% Tween 80 生理食塩水に分散・溶解した Cy5-PEG-CNT(2) または Cy5-PEG-CNT(5) 1.6 mg/kg を静脈内投与し、一定時間ごとに、採血、採尿および採胆汁を行った。各サンプルの Cy5-PEG-CNT の蛍光強度は IVIS200 を用いて測定した。得られた各サンプルの濃度から Cy5-PEG-CNT の薬物速度論パラメーターを、常法に従ってモデル非依存的に解析した。

4. 研究成果

(1) 水溶性蛍光ラベル化 SWCNT の合成

未精製 SWCNT を酸処理し、走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡 (TEM)、熱質量測定分析およびエネルギー分散型 X 線分析により炭素不純物、金属触媒の除去および SWCNT 表面へのカルボキシル基の導入を確認した。次に SWCNT 表面に PEG を導入し、透析にて精製後、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル、ラマンスペクトルおよび TEM 写真により、アミノ化 SWCNT の合成を確認した。さらに共有結合によりアミノ化 SWCNT に Cy5 を導入し、透析にて精製後、励起波長 649 nm を照射し、670 nm の Cy5 特有の蛍光を観測することにより Cy5-PEG-CNT の合成を確認した。

(2) 蛍光 *in vivo* イメージングシステムにおける Cy5-PEG-CNT の体内動態特性

合成した Cy5-PEG-CNT をマウスに静脈内投与した後、全身の蛍光強度の時間推移を、IVIS200 を用いて観察したところ、投与後 2

時間における全身蛍光強度は、Cy5 のみを投与したマウスよりも速く低下する傾向が認められた。しかし、Cy5-PEG-CNT 群では Cy5 投与群とは異なり、投与 6 時間後にふたたび蛍光強度のピークが認められ、投与 24 時間後には Cy5 群と同様に蛍光強度が低下した。また Cy5-PEG-CNT 投与 24 時間後における各臓器での蛍光強度は、肺、腎臓、脾臓、盲腸では Cy5 のみを投与した場合より低く、逆に肝臓では Cy5-PEG-CNT 投与の方が高かった。一方、臓器間の蛍光強度を比較したところ、蛍光強度は盲腸において最も高く、また盲腸内容物が蛍光を発していたことから、Cy5-PEG-CNT は糞便中に排泄されると考えられた。また Cy5-PEG-CNT 投与 6-7 時間後に回収した尿からも蛍光が観察されたことから、一部は尿中に排泄される可能性が示唆された。さらに尿中の蛍光物質の分子量をゲルろ過クロマトグラフィーにより検討したところ、Cy5-PEG-CNT を投与したマウスの尿中には Cy5 よりも分子量の大きな蛍光物質が存在することが明らかとなり、少なくとも投与された Cy5-PEG-CNT の一部は体内で分解されることなく、尿中に排泄されることが推察された。過去の報告では、未修飾 SWCNT をマウスおよびウサギに静脈内投与した場合、投与 24 時間後には肺・肝臓・脾臓に分布し、さらに尿中、糞便中への排泄はなく投与 28 日後にもこれら臓器に蓄積していたことから、本研究で合成した Cy5-PEG-CNT は未修飾 SWCNT とは異なった体内動態特性を示すことが明らかとなった。

(3) 水溶性蛍光ラベル化 SWCNT の物理化学的性質の差異の検討

酸処理回数を変更して合成した 2 種類の水溶性蛍光ラベル化 SWCNT の分子量をゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより検討し、Cy5-PEG-CNT(2) の分子量が Cy5-PEG-CNT(5) よりも大きいことを確認した。

(4) 物理化学的性質の異なる水溶性蛍光ラベル化 SWCNT の体内動態の差異

物理化学的性質の異なる両 Cy5-PEG-CNT 投与後の血漿中濃度推移には二相性の消失が認められ、またその消失は Cy5-PEG-CNT(2) よりも Cy5-PEG-CNT(5) の方が速やかであった。Cy5-PEG-CNT の体内動態パラメーターを算出したところ、Cy5-PEG-CNT(5) の全身クリアランスは Cy5-PEG-CNT(2) の約 3 倍であった。一方、両 Cy5-PEG-CNT とも胆汁および尿中に排泄され、その排泄率は Cy5-PEG-CNT(2) 群では、尿中、胆汁中ともに約 40% であり、Cy5-PEG-CNT(5) 群ではそれぞれ尿中約 35%、胆汁中約 30% であった。また腎クリア

ランス、胆汁中排泄クリアランスとも Cy5-PEG-CNT(2)群よりも Cy5-PEG-CNT(5)群の方が高値を示した。Cy5-PEG-CNT(5)は Cy5-PEG-CNT(2)に比べ分子量が小さく、また導入された水溶化分子も多いと考えられることから、これら Cy5-PEG-CNT における体内動態の差異は、物理化学的特性の違いに起因すると考えられた。

(5) 考察

今回合成した Cy5-PEG-CNT は尾静脈内投与後、比較的速やかに排泄されたことから、ドラッグキャリアーとして薬物を標的組織および細胞に送達後、生体に滞留することなく排泄されるものと推察された。また SWCNT の酸化状態など、物理化学的性質を変化させることにより、その体内動態特性をコントロールできる可能性が示唆された。今後 Cy5-PEG-CNT の PEG 鎖末端のアミノ基に抗体などを結合することで組織細胞指向性が付与できれば、ドラッグキャリアーとしての体内動態のコントロールをより詳細に検討することが可能と考えられ、医療への応用が期待できるものと思われる。

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 4 件)

- ① Kotaro Hitoshi, Miki Katoh, Tomoko Suzuki, Yoshinori Ando, and Masayuki Nadai : Single-walled carbon nanotubes downregulate stress-responsive genes in human respiratory tract cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 35 (4), 2011, 455–463. (査読有)
DOI: 10.1248/bpb.35.455
- ② Kotaro Hitoshi, Miki Katoh, Tomoko Suzuki, Yoshinori Ando, and Masayuki Nadai : Differential effects of single-walled carbon nanotubes on cell viability of human lung and pharynx carcinoma cell lines. *J.Toxicol. Sci.*, 36 (3), 2011, 379–387. (査読有)
DOI: 10.2131/jts.36.379
- ③ Kotaro Hitoshi, Miki Katoh, Tomoko Suzuki, Yoshinori Ando, and Masayuki Nadai : Changes in expression of drug-metabolizing enzymes by single-walled carbon nanotubes in human respiratory tract cells. *Drug Metab. Dispos.*, 40 (3), 2011, 579–587. (査読有)
DOI: 10.1124/dmd.111.043455
- ④ 加藤美紀、等浩太郎、鈴木智子、安藤義則、灘井雅行 : カーボンナノチューブの安全性評価研究、名城大学総合研究所紀

要 15、2010、153-156.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 松本紘典、高岡龍蔵、加藤美紀、鈴木智子、安藤義則、春名光昌、灘井雅行 : 酸化状態の異なる水溶性蛍光 Single-walled Carbon Nanotube のラットにおける体内動態の差異に関する検討. 日本薬学会第 132 年会 (札幌) 平成 24 年 3 月 31 日
- ② 等浩太郎、加藤美紀、鈴木智子、安藤義則、灘井雅行 : 単層カーボンナノチューブがヒト肺チトクロム P450 に及ぼす影響とそのメカニズムの解明. 日本薬学会第 132 年会 (札幌) 平成 24 年 3 月 30 日
- ③ 高岡龍蔵、松本紘典、加藤美紀、鈴木智子、安藤義則、春名光昌、灘井雅行 : 新規合成水溶性蛍光 Single-walled Carbon Nanotube のマウスにおける体内動態特性の検討. 日本薬学会第 132 年会 (札幌) 平成 24 年 3 月 29 日
- ④ Kotaro Hitoshi, Miki Katoh, Kazuko Kitagawa, Yoshinori Ando, Masayuki Nadai : Effect of Single-walled Carbon Nanotubes on Hepatic Drug-metabolizing Enzymes in Rats. 日本薬物動態学会第 26 回年会 (広島) 平成 23 年 11 月 16 日
- ⑤ 北川加寿子、加藤美紀、等浩太郎、灘井雅行 : ラット肝薬物代謝酵素の発現に及ぼす単層カーボンナノチューブの影響. 第 57 回日本薬学会東海支部総会大会 (名古屋) 平成 23 年 7 月 9 日
- ⑥ 石川恵里華、等浩太郎、松本紘典、加藤美紀、鈴木智子、安藤義則、春名光昌、灘井雅行 : 体内動態の可視化を目的とした傾向カーボンナノチューブの合成. 日本薬学会第 131 年会 (静岡) 平成 23 年 3 月 31 日
- ⑦ 等浩太郎、加藤美紀、鈴木智子、安藤義則、灘井雅行 : 単層カーボンナノチューブが肝臓、腎臓および大腸由来細胞に及ぼす影響. 日本薬学会第 131 年会 (静岡) 平成 23 年 3 月 30 日
- ⑧ Kotaro Hitoshi, Miki Katoh, Tomoko Suzuki, Yoshinori Ando, Masayuki Nadai : Differential Effects of Single-walled Carbon Nanotubes on Human Hepatic, Renal, and Colorectal Carcinoma Cell Lines. Society of Toxicology 50th Annual Meeting (Washington D.C.) 平成 23 年 3 月 8 日
- ⑨ Kotaro Hitoshi, Miki Katoh, Tomoko Suzuki, Yoshinori Ando, Masayuki Nadai : Effect of Single-walled Carbon Nanotubes on Drug-Metabolizing Enzymes in Normal Human Bronchial

- Epithelial Cells. 日本薬物動態学会第25回年会（東京）平成22年10月9日
- ⑩ Kotaro Hitoshi, Miki Katoh, Tomoko Suzuki, Yoshinori Ando, Masayuki Nadai : Gene Profiling of Drug-metabolizing Enzymes in Normal Human Bronchial Epithelial Cells Exposed to Single-walled Carbon Nanotubes. 9th International ISSX Meeting (Istanbul) 平成22年9月5日
- ⑪ 等浩太郎、加藤美紀、鈴木智子、安藤義則、灘井雅行：単層カーボンナノチューブによるヒト呼吸器系細胞のストレス関連遺伝子に及ぼす影響. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会（沖縄）平成22年6月17日
- ⑫ 等浩太郎、加藤美紀、平光彩乃、安藤義則、灘井雅行：単層カーボンナノチューブがヒト由来細胞株に及ぼす影響の差異. 日本薬学会第130年会（岡山）平成22年3月28日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

灘井 雅行 (NADAI MASAYUKI)
名城大学・薬学部・教授
研究者番号：00295544

(2) 研究分担者

加藤 美紀 (KATOH MIKI)
名城大学・薬学部・准教授
研究者番号：70345594

(3) 連携研究者

安藤 義則 (ANDO YOSHINORI)
名城大学・理工学部・教授
研究者番号：30076591

春名 光昌 (HARUNA MITSUMASA)
名城大学・薬学部・教授
研究者番号：10076755