

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25年4月1日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300158

研究課題名（和文） フォトサーマル効果による経皮ワクチン増強に関する研究

研究課題名（英文） Study on enhancement of transdermal vaccination by photothermal effect

研究代表者

新留 琢郎 (NIIDOME TAKURO)

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：20264210

研究成果の概要（和文）：

タンパク質の経皮投与において、角質層が最大のバリアとなる。そこで、金ナノロッドの発熱効果で角質層の透過性を上げることを試みた。金ナノロッドとオブアルブミンを混合し、皮膚にのせ、近赤外光を照射すると、オブアルブミンの皮内移行や抗体産生が認められた。さらに、パルスレーザーを利用することで、皮膚深部を加熱することなしにタンパク質が移行した。経皮ワクチンシステムを構築する上で重要な知見となった。

研究成果の概要（英文）：

Stratum corneum is major barrier of transdermal protein delivery. We tried enhancing permeability of stratum corneum by photothermal effect of gold nanorods. Ovalbumin was mixed with gold nanorods, then, applied on skin. After irradiation of near infrared light, translocation of ovalbumin into skin and production of anti-ovalbumin antibody were observed. When a pulsed-laser was used, protein translocation without heating deeper part of skin was detected. These data would be important for development of dermal vaccination system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2012年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体制御・治療、薬物送達システム

1. 研究開始当初の背景

皮膚から薬物を投与する経皮投与は、既存の注射投与に比べて簡便で非侵襲的である。また、経口投与と比較して、消化管や肝臓を通過せずに皮膚から薬物を直接血流に乗せることができる点でも優れている。しかし、表皮表面は疎水的な角質層で構成されてい

るため、抗原タンパク質といった親水性高分子の皮膚透過は容易ではない。したがって経皮投与では親水性高分子の角質層透過性を向上させることが重要であり、近年、そのための技術開発が盛んに行われている。中でも熱によって皮膚浸透性を向上させる手法はサーマルポレーションと呼ばれ、臨床試験

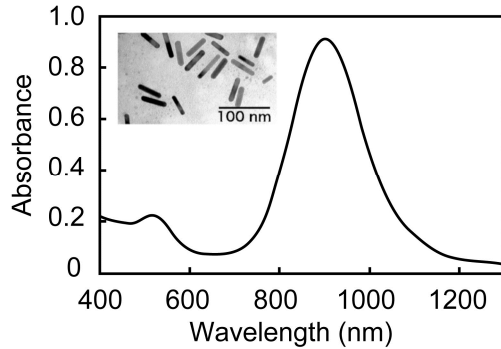


図1、金ナノロッドの吸収スペクトルと電子顕微鏡写真

も行われている。そこで我々は金ナノロッドを発熱素子として利用し、効果的な経皮デリバリーを達成できないかと発案した。

金ナノロッドは棒状の金ナノ粒子で、短軸方向に由来する 500 nm 付近（可視光域）の吸収と長軸方向に由来する 800~900 nm 付近（近赤外域）の吸収をもつ（図1）。そして、この吸収された光は効率よく熱エネルギーに変換される。

2. 研究の目的

本研究ではこれはでタンパク質の経皮デリバリーに効果が認められている Solid-in-oil (S/O) エマルジョン製剤に金ナノロッドを加えて、近赤外光照射によるオブアルブミンおよびインシュリンの皮内への移行効率を評価する。

また、金ナノロッドを直接皮膚に塗布し、近赤外光を照射し、角質層のみを効果的に傷害する方法についても検討し、臨床応用を視野に入れた技術開発も行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) In vitro での経皮デリバリー効率評価：

フランツ拡散セルにマウス皮膚をのせ、金ナノロッドを内部に含む S/O エマルジョンを上部チャンバーに入れた。あるいは、その皮膚にエタノールに分散させた金ナノロッドをキャストし、上部チャンバーを設置し、タンパク質溶液を入れた。近赤外光を 20 分間照射し、溶液の温度上昇は放射温度計を用いて測定した。そして、FITC 標識したオブアルブミン、インスリンをモデルタンパク質として、その皮内への移行を蛍光顕微鏡で評価した。

(2) In vivo での経皮デリバリー効率評価：

マウス背部に円筒カップを接着させ、その中に上記 S/O エマルジョンを入れ、近赤外光を 20 分間照射した。あるいは、マウス背部

に金ナノロッドをキャストし、その上に円筒カップを接着させ、タンパク質溶液を入れ、近赤外光を 20 分間照射した。その後、円筒カップを外し、S/O エマルジョンをしみこませたカーゼパッチを皮膚に接着させた。蛍光ラベルしたタンパク質の皮内への移行は蛍光顕微鏡にて評価し、オブアルブミンに対する抗体産生を ELISA 法で評価した。また、インシュリンを用いた実験では、ストレプトゾトシンを投与して作製した糖尿病モデルマウスに対して投与し、血糖値の低下を測定した。

また、光照射の皮膚の生理的応答を調べるために、H&E 染色により好中球の浸潤を評価し、熱ショックタンパク質 (HSP70) の誘導は免疫組織化学染色にて評価した。

4. 研究成果

(1) S/O エマルジョンを用いたシステム：

オブアルブミンと金ナノロッドを内包する S/O エマルジョンの皮内への移行効率について、フランツ拡散セルを用いて評価した。その結果、明確な皮膚内へのオブアルブミンの移行が認められ、また、2 週間後には抗オブアルブミン抗体の産生が認められた。

インシュリンを内包させた S/O エマルジョンでも同様の実験を行った。その結果、金ナノロッドの発熱効果により大幅にインシュリンの皮内への移行効率が向上した。また、糖尿病モデルマウスに対して投与した結果、金ナノロッドと近赤外光を組み合わせた場合において、有意な血糖値の低下が観察された。ただし、血糖値が下がるまで 6~10 時間かかり、インシュリンを単独で皮下に投与した場合と比べて、応答が緩やかで長期間現れることがわかった。

(2) 角質層のみを効果的に傷害するシステム：

S/O エマルジョンを使ったシステムではその溶液全体が加熱され、皮膚の方も深部まで加温され、その傷害も無視できなかった。そこで、金ナノロッドを皮膚に塗布し、皮膚表層の角質層のみを限定的に加熱するシステムを考案した。エタノールに分散させた金ナノロッドを皮膚にのせ、乾燥させた。この上にタンパク質溶液を加え、近赤外光を照射した。このとき、近赤外光の照射デバイスとして連続光 (CW) レーザーとパルス光レーザーを比較した。まず、マウス皮膚に金ナノロッドを塗布し、連続光レーザーを照射すると、皮膚の温度は上昇し、モデルタンパク質として利用した蛍光ラベルオブアルブミンの皮内への透過が認められた。また、熱ショックタンパク質の誘導が認められ、多数の好中球の浸潤も認められた。このことから、温度上昇に伴う炎症が誘導されていることが示された。

一方、パルスレーザーの場合、皮膚の温度は上昇しなかったが、オプアルブミンの透過は認められ、このとき、熱ショックタンパク質の誘導や好中球の浸潤は認められなかった。パルスレーザーは瞬間的に金ナノロッドを極めて高温に加熱するが、金ナノロッドはすぐに球状に変形してしまい、それ以上発熱できないためである。連続光レーザーを使用する場合は熱ショックタンパク質の関わる免疫応答を誘導するのに適しており、パルスレーザーの場合は、生理的な影響を殆ど与えずタンパク質を皮内に透過させるのに適していることがわかった。

以上のように、デリバリーするタンパク質と金ナノロッドをどのように製剤化し、投与するか、また、近赤外光の種類を変えることで、様々な生理的な応答をコントロールできることがわかった。今後、さらに詳細な条件検討を行うと同時に、システム全体の最適化を行い、臨床応用可能なタンパク質の経皮デリバリーシステムや経皮ワクチンシステムと発展させていきたい。

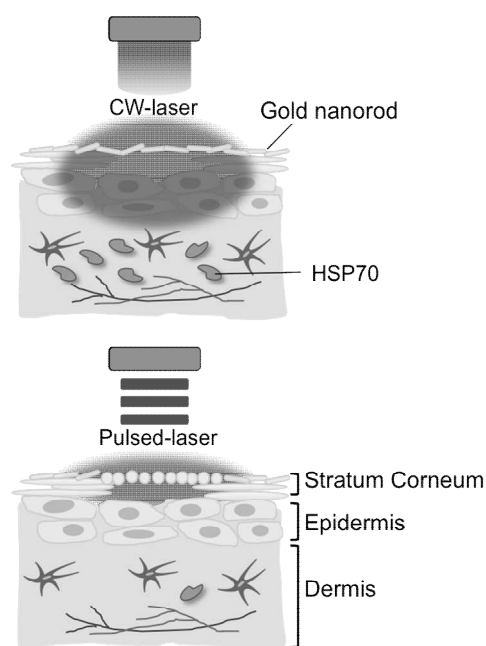


図2、CWレーザーとパルスレーザーでの加熱モードの違い。

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 11 件 : すべて査読あり)

1. Y. Sakamura, M. Yoshiura, H. Tang, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Thermal enhancement of gene transfection in tumor

- cells mediated by the photothermal effect of gold nanorods, *Chem. Lett. in press* (2013)
2. R. Kurihara, D. Pissuwan, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Biodistribution and tumor localization of PEG-modified dendritic poly(L-lysine) oligonucleotide complexes, *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.*, **23**, 2369-2380 (2012)
3. Y. Akiyama, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Conversion of rod-shaped gold nanoparticles to spherical forms and their effect on biodistribution in tumor-bearing mice, *Nanoscale Res. Lett.* **7**, 565 (2012)
4. H. Fukushima, S. Yamashita, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Sequential release of single-stranded DNAs from gold nanorods triggered by near-infrared light irradiation, *Chem. Lett.*, **41**, 711-712, (2012)
5. R. Toita, T. Mori, Y. Naritomi, J.-H. Kang, S. Shiosaki, T. Niidome, Y. Katayama, Fluorometric detection of protein kinase C activity based on phosphorylation-induced dissociation of a polyion complex, *Anal. Biochem.*, **424**, 130-136 (2012)
6. K. Nose, D. Pissuwan, M. Goto, Y. Katayama, T. Niidome, Gold nanorods in an oil-base formulation for transdermal treatment of Type 1 diabetes in mice, *Nanoscale*, **4**, 3776-3780 (2012)
7. S. Yamashita, H. Fukushima, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Controlled-release system mediated by a retro Diels-Alder reaction induced by the photothermal effect of gold nanorods, *Langmuir* **27**, 14621-14626 (2011)
8. S. Yamashita, H. Fukushima, Y. Akiyama, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Controlled-release system of single-stranded DNA triggered by the photothermal effect of gold nanorods and its in vivo application, *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 2130-2135 (2011)
9. D. Pissuwan, K. Nose, R. Kurihara, K. Kaneko, Y. Tahara, N. Kamiya, M. Goto, Y. Katayama, T. Niidome, A solid-in-oil dispersion of gold nanorods can enhance transdermal protein delivery and skin vaccination, *Small*, **7**, 215-220 (2011)
10. A. Shiotani, Y. Akiyama, T. Kawano, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Active accumulation of gold nanorods in tumor in response to near-infrared laser irradiation, *Bioconjugate Chem.*, **21**, 2049-2054 (2010)
11. T. Niidome, A. Ohga, Y. Akiyama, K. Watanabe, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, Controlled release of PEG chain

from gold nanorods: targeted delivery to tumor, *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 4453–4458 (2010)

[学会発表] (計 22 件)

1. 新留琢郎, 金属ナノ材料とポリマーを組み合わせた新しい医療材料の構築, 高分子学会第 21 回ポリマー材料フォーラム, 2012. 11. 01, 北九州市 (北九州国際会議場)
2. 新留琢郎, 金ナノロッドのフォトサーマル効果を利用した薬物デリバリーシステム, 第 4 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 2012. 10. 22, 北九州市 (北九州国際会議場)
3. 新留琢郎, 山下秀治, 福島寛満, 森 健, 片山佳樹, 近赤外光照射に应答して薬物を放出する金ナノロッド, 第 61 回高分子討論会, 2012. 09. 20, 名古屋市 (名古屋工業大学)
4. T. Niidome, Development of Novel Therapeutic Techniques using Photothermal Effect of Gold Nanorods, PT-BMES 2012, 2012. 09. 06, 台湾新竹市 (National Tsing Hua University)
5. T. Niidome, DRUG RELEASE SYSTEM CONTROLLED BY PHOTOTHERMAL EFFECT OF GOLD NANORODS, PEM 2012, 2012. 08. 21, 中国吉林省長春市 (Changchun Institute of Applied Chemistry)
6. D. Pissuwan, K. Nose, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Transdermal Insulin Delivery Enhanced by Photothermal Effect of GOLD Nanorods, The 39th Annual Meeting & Exposition of The Controlled Release Society, 2012. 07. 16, カナダ ケベックシティ (Centre des congrès de Quebec)
7. T. Niidome, S. Yamashita, T. Mori, Y. Katayama, Controlled release system responding heat produced by photothermal effect of gold nanorods, 9th World Biomaterials Congress, 2012. 06. 04, 中国成都 (The Century City New International Convention & Exhibition Center)
8. T. Niidome, S. Yamashita, H. Fukushima, Y. Niidome, T. Mori and Y. Katayama, Controlled Release Systems from Gold Nanorods Responding to Near Infrared Light Irradiation, 第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム, 2011. 12. 20, 神奈川県横浜市 横浜情報文化センター
9. D. Pissuwan, K. Nose, Y. Tahara, M. Goto, Y. Katayama, T. Niidome, Transdermal Insulin delivery using a solid-in-oil dispersion of gold nanorods, 2011 MRS Fall Meeting & Exhibit, 2011. 11. 30, 米国マサチューセッツ州ボストン
10. S. Yamashita, H. Fukushima, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Release of Single Stranded DNA Responding to Near Infrared Light Irradiation, The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2011. 11. 11, 北海道札幌市北海道大学
11. T. Niidome, A. Shiotani, T. Mori, and Y. Katayama, Preparation of Thermoresponsive Polymer-modified Gold Nanorods and Their Delivery to Specific Tissue, Pusan-Kyushu Joint Symposium on High Polymers (15th) and Fibers (13th), 2011. 10. 28, 韓国プサン
12. T. Niidome, S. Yamashita, H. Fukushima, Y. Niidome, T. Mori, and Y. Katayama, Controlled Release System Mediated by Retro Diels-Alder Reaction on Gold Nanorods, 38TH ANNUAL MEETING & EXPOSITION OF THE CONTROLLED RELEASE SOCIETY, 2011. 07. 02, 米国メリーランド州ナショナルハーバー
13. D. PISSUWAN, K. NOSE, R. KURIHARA, Y. NIIDOME, K. KANEKO, Y. TAHARA, N. KAMIYA, M. GOTO, Yoshiki KATAYAMA, T. NIIDOME, Enhancement of Transdermal Protein Delivery by Photothermal Effect of Gold Nanorods, 第 60 回高分子学会年次大会, 2011. 05. 25, 大阪市北区、大阪国際会議場
14. T. Niidome, D. Pissuwan, A. Shiotani, K. Nose, T. Mori, and Y. Katayama, Biomedical applications of gold nanorods: active accumulation system to tumor and enhancement of skin vaccination, The 10th China-Japan-Korea Foresight Joint Symposium on Gene Delivery and International Symposium on Biomaterials 2011, 2011. 05. 03, 中国桂林
15. 新留琢郎, 新留康郎, ピスワン ダークロン, 森 健, 片山佳樹, 金ナノロッドと近赤外光を組み合わせた新しいイメージング・治療技術の開発, 第 50 回日本生体医工学会大会, 2011. 04. 29, 東京都千代田区、東京電機大学
16. T. Niidome, A. Shiotani, T. Mori, Y. Katayama, Active accumulation of gold nanorods in tumor mediated by their photothermal effect, International Conference on Biomaterials Science

- 2011, 2011. 03. 15, つくば市 Tsukuba International Congress Center
17. 新留琢郎, 金ナノ粒子と近赤外光を組み合わせた新しい診断・治療法, 日本学術振興会「未踏・ナノデバイステクノロジー」第151委員会研究会, 2011. 01. 31, 東京都文京区 東京大学
 18. T. Niidome, A. Shiotani, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, Functional gold nanorods for bioimaging and photothermal therapy, International Chemistry Congress of Pacific Basin Societies, 2010. 12. 15, 米国ハワイ州ホノルル
 19. T. Niidome, A. Shiotani, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, Preparation of thermo-responsive polymer-coated gold nanorods and their accumulation to light irradiated site, 2010 Materials Research Society Fall Meeting, 2010. 11. 29, 米国マサチューセッツ州ボストン
 20. 新留琢郎, 塩谷 淳, ピスワン ダークロン, 新留康郎, 片山佳樹, 金ナノロッドのフォトサーマル効果を利用したデリバリーと治療システム, 第31回日本レーザー医学会 総会, 2010. 11. 13, 名古屋市中区 ウィンクあいち
 21. T. Niidome, A. Shiotani, T. Mori, Y. Katayama, Delivery of gold nanorods to tumor in response to near-infrared irradiation, The 9th China-Japan-Korea Foresight Joint Symposium on Gene Delivery and the International Workshop on Biomaterials 2010, 2010. 06. 21, 長春、中国
 22. 新留琢郎, 塩谷 淳, 森 健, 新留康郎, 片山佳樹, 温度感受性ポリマーゲルで修飾した金ナノロッドの体内デリバリー, 第26回日本DDS学会学術集会, 2010. 06. 17, 大阪市天王寺区、大阪国際交流センター

[図書] (計6件)

1. 新留琢郎, 近赤外光によりコントロールできる薬物放出, 薬学雑誌, 133, 369-372 (2013)
2. D. Pissuwan, T. Niidome, Gold nanoparticles for the development of transdermal delivery systems, ACS Symposium Series, Functional Nanoparticles for Bioanalysis, Nanomedicine and Bioelectronic Devices, Volume 2, Chapter 5, 69-80 (2012)

3. 新留琢郎, 金ナノロッドと近赤外光を組み合わせた新しい治療技術, 光学, 41, 568-572 (2012)
4. D. Pissuwan, T. Niidome, M. B. Cortie, The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems, *J. Controlled Release*, **149**, 65-71 (2011)
5. 新留琢郎, 塩谷 淳, 秋山泰之, 大賀 晃, 野瀬圭介, ピスワン ダークロン, 新留康郎, 金ナノロッドと近赤外光を用いた診断・治療システム, 薬学雑誌, 130, 1671-1677 (2010)
6. 新留琢郎, 新留康郎, 金ナノ粒子を用いたバイオイメージングおよびフォトサーマル治療; Bioimaging and Photothermal Therapy Using Gold Nanoparticles, レーザー研究, 38(6), 421-426 (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計4件)

①名称: 光応答性のパターンニングに用いるための基板およびその利用

発明者: 君塚信夫, 新留琢郎, 金 仁華, 飯田誠之, 副島哲朗, 渡部和人

権利者: 独立行政法人科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 特開 2012-95626

出願年月日: 2010年11月5日

国内外の別: 国内

②名称: プロテインキナーゼの検出及び活性測定方法

発明者: 片山佳樹, 新留琢郎, 森 健

権利者: 国立大学法人九州大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2010/065721

出願年月日: 2010年9月13日

国内外の別: 国外

③名称: タンパク質キナーゼの新規基質ペプチド

発明者: 片山佳樹, 新留琢郎, 森 健, 韓 暁明, 秦 彬斗, 矢山由洋, 下村 隆

権利者: 国立大学法人九州大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-137453, PCT/JP2011/063699

出願年月日: 2010年6月16日

国内外の別: 国外

④名称: 金ナノロッドを含有するS/O製剤

発明者: 新留琢郎, 新留康郎, 神谷典穂, 後藤雅宏, 片山佳樹, ダークロン・ピスワン, 野瀬圭介, 栗原亮介

権利者: 国立大学法人九州大学

種類: 特許

番号：特願 2010-136286
出願年月日：2010年6月15日
国内外の別：国内
○取得状況（計1件）
①名称：核酸デリバリー方法および核酸デリバリーデバイス
発明者：新留琢郎、和田富美夫、片山佳樹、
薬丸康介、河野喬仁、山下修蔵
権利者：国立大学法人九州大学、株式会社日本
ステントテクノロジー
種類：特許
番号：特許第 5105600
取得年月日：2012年10月12日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.kumamoto-u.ac.jp/~niidome>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新留 琢郎 (NIIDOME TAKURO)
熊本大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号：20264210

(3) 連携研究者

後藤 雅宏 (GOTO MASAHIRO)
九州大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：10211921