

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590220

研究課題名(和文) DDS 応用に向けた新規組織指向型水溶性カーボンナノチューブの体内動態と安全性研究

研究課題名(英文) Safety Assessment and Pharmacokinetic Analysis of a Novel Organ-targeting-Water-Soluble-Carbon Nanotube Toward DDS Application

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：カーボンナノチューブ(CNT)のDDSへの応用に向けてpolyethylene glycolと蛍光色素Cy5を結合したCy5-PEG-CNTを合成した。Cy5-PEG-CNTはラット体内で代謝、分解されず、尿中、胆汁中に速やかに排泄された。均一な物理化学的性質を有するCy5-PEG-CNTを得るため、メンブレンフィルターによる分級、enhanced Direct Injective Pyrolytic Synthesis法で作成されたCNTの利用を試みたが、十分なCy5導入量のCy5-PEG-CNTが得られなかった。一方、CNTはラットとヒト肝細胞の複数のCYP分子種の発現を減少させた。

研究成果の概要(英文)：Recently, clinical application of carbon nanotube (CNTs) has been proposed as drug delivery agents. Polyethylene glycol and fluorescent dye, Cy5, was bound to CNTs to synthesize Cy5-PEG-CNT towards application of CNTs as DDS carrier. After intravenous administration, Cy5-PEG-CNT was not metabolized, nor degraded in rat body, and was excreted immediately into urine and bile. In order to obtain Cy5-PEG-CNT with uniform physicochemical properties, classification of length with membrane filter, or application of CNTs synthesized by enhanced Direct Injective Pyrolytic Synthesis method were attempted, but Cy5-PEG-CNT with sufficient amount of Cy5 was not obtained. On the other hand, exposure of CNTs down-regulated several types of CYP molecular species in rat and human liver derived cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：カーボンナノチューブ ドラッグデリバリー 水溶化 蛍光ラベル化 体内動態特性 異物代謝能 薬物代謝酵素

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り、直径が約 0.4 - 50 nm、長さが約 1 - 数 10 μm の円筒形を示す。この CNT は軽量高強度性、高熱伝導性、耐摩耗性、高電流密度を有することから、高精細ディスプレイや水素燃料電池自動車における水素吸蔵材料、スーパーコンピュータの半導体など、応用は広範囲に渡る。名城大学ではその CNT 研究の最先端を担っており、CNT の実用化、産業化の実現を目指し、研究開発が活発に行われている。その一方で、近年、CNT はドラッグキャリアとして医療分野への応用が期待されている。しかし現状では、理工学的な研究が世界中で活発に行われている一方、医療分野における研究は少なく、これから更なる需要が期待できる最も重要で意義ある応用分野と考えられる。

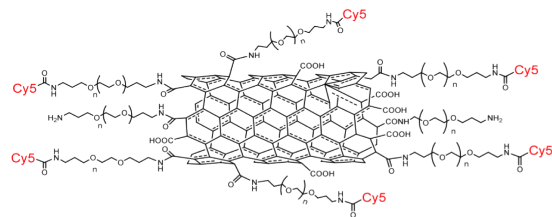
これまでの研究で、僅かではあるが、CNT が受動拡散により脂質二重膜を通過することが報告されており、CNT は薬物送達のための革新的なドラッグキャリアとなりうる可能性が議論されている。CNT はその物理化学的性質から、薬物やペプチドを共有結合あるいは非共有結合により付加することが可能である。実際にペプチドを付加した CNT がエンドサイトーシスにより細胞内へと移行することが報告されている。したがって、CNT に薬物とともに癌組織などの特定組織に親和性を有する抗体やペプチド、さらに DNA や RNA など付加することができれば、組織指向性を有する新たなナノスケールの構造体のデザインが可能となるため、医薬品開発における新たなブレイクスルーとして CNT の利用が期待されている。このような機能を有する CNT のデザインが可能となれば、
1. 強い薬理効果と毒性を併せ持つ薬物の治療効果向上と副作用軽減
2. 遺伝子デリバリー
3. ペプチドデリバリーなど、医療分野での有用性が大きく期待できる。しかし、その一方で、CNT 自身の体内での挙動や毒性についての情報は十分ではない。

2. 研究の目的

医療分野において、CNT 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として応用が期待されている。しかし、CNT 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、CNT をドラッグキャリア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 CNT 誘導体を作成する必要があり、また CNT 自身、ならびに誘導化により水溶性を向上させた CNT の体内動態特性を解明することが不

可欠である。申請者はこれまでの研究で単層カーボンナノチューブを酸化した後、ポリエチレングリコールを結合させることにより生体に投与可能な水溶性 CNT を合成し、さらにこの水溶性 CNT にモデル薬物として蛍光色素である Cy5 を結合させた Cy5-PEG-CNT を合成する手法を確立した。しかし、現時点において水溶性 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は不明な点が多い。また、CNT の分子サイズなどの物理化学的特性により、その体内動態が異なる可能性も考えられる。

さらに、水溶性 CNT をドラッグキャリアとして利用するためには、CNT および水溶性 CNT 自身の生体に対する安全性に関する知見も不可欠である。



Structure of Cy5-PEG-CNT

そこで本研究では Cy5-PEG-CNT の体内動態特性と消失機構について検討した。また分子サイズなどの物理化学的特性が、その体内動態に及ぼす影響を検討する目的で、分子サイズなど均一な物理化学的特性を有し、かつ高い蛍光強度を示す水溶性蛍光ラベル化 CNT の合成方法について検討した。さらに、CNT が生体の異物処理機構、すなわち肝臓の薬物代謝酵素の活性に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) 水溶性蛍光ラベル化 CNT (Cy5-PEG-CNT) の体内動態特性の検討

アーク放電法により作製した未精製 CNT (APJ) からの炭素不純物、金属触媒の除去および CNT 表面へのカルボキシ基の導入のため CNT 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 CNT 表面のカルボキシ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 CNT とした。さらに共有結合によりアミノ化 CNT を蛍光色素 Cy5 で標識し、水溶性蛍光ラベル化 CNT (Cy5-PEG-CNT) を合成した。この Cy5-PEG-CNT を 1% tween 80 生理食塩水に分散し、8-9 週齢の Wistar 系雄性ラットに 5.0 mg/kg を静脈内投与した後、一定時間ごとに、採血、採尿および採胆汁を行った。また、尿中、胆汁中に排泄された Cy5-PEG-CNT の分子量の確認を目的としてゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行

い、その生体内での安定性について検討した。なお、各サンプルの Cy5-PEG-CNT の蛍光強度は蛍光アナライザー IVIS200 を用いて測定した。

(2) メンブランフィルターを用いた均一な分子サイズを有する酸化 CNT の分級法の検討

未精製 CNT (APJ) を HCl 水溶液および $\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{HNO}_3$ (3 : 1) 溶液で酸処理した酸化 CNT (CNT-COOH) について、孔径の異なる 3 種のメンブランフィルターを用いてる過することにより、特定の分子サイズを有する CNT-COOH の分級を試みた。すなわち、CNT-COOH を界面活性剤として 1% carboxymethyl cellulose を含む精製水中に超音波ホモジナイザーを用いて超音波分散させた後、孔径が 1、5、10 μm のメンブランフィルターを用いて孔径の大きなものから順にろ過し、フィルター上の残渣、及びろ液を回収した。得られた残渣、ろ液については、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、塩酸処理、酸化処理による CNT からの不純物除去割合の定性的評価を行った。また、エネルギー分散型 X 線分析 (EDX) を用いて原料とした CNT および CNT-COOH の元素分析を行うことにより、CNT からの不純物除去割合の定量的評価、および CNT へのカルボキシル基導入の確認を行った。

(3) enhanced Direct Injective Pyrolytic Synthesis (eDIPS) 法により得られた CNT を原料とした Cy5-PEG-SWCNT 合成法の検討

eDIPS 法により得られた CNT (EC) は、これまでの Cy5-PEG-CNT の合成において原料として用いた未精製 CNT (APJ) よりも、不純物の含量が少ないことが知られている。そこで、分子量など、より均一な物理化学的特性、ならびに高い蛍光強度を有する Cy5-PEG-CNT を合成することを目的とし、EC を原料として、(1) に示した APJ を用いた方法に準じて Cy5-PEG-CNT の合成を試み、EC の酸化状態、PEG および Cy5 の導入量について検討した。

(4) 単層カーボンナノチューブがヒトおよびラット肝薬物代謝酵素の発現に及ぼす影響

5 週齢の雄性 Wistar 系ラットから初代培養肝細胞 (ヘパトサイト) を調製し、細胞培養液中に分散させた CNT (50~1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 24 時間暴露した。ヒト初代培養肝細胞 (BD Gentest 社製) には 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の CNT を 24 時間暴露した。各細胞から total RNA を回収し、リアルタイム PCR 法により CYP mRNA を定量した。また、ラット初代培養肝細胞に

おける CYP タンパク質をウエスタンブロット法により定量した。

4. 研究成果

(1) 水溶性蛍光ラベル化 CNT (Cy5-PEG-CNT) の体内動態特性

Cy5-PEG-CNT を 8 10 週齢の Wistar 系雄性ラットに静脈内投与したところ、血漿中濃度推移には二相性の消失が認められ、投与 180 分後の Cy5-PEG-CNT 血漿中濃度は投与 5 分後の血漿中濃度の 9.2% に低下した。また、Cy5-PEG-CNT は投与 180 分後までに尿および胆汁中に、それぞれ投与量の 54.2%、31.6% が排泄された。薬物速度論的パラメーターを算出したところ全身クリアランス、尿中排泄クリアランスおよび胆汁中排泄クリアランスはそれぞれ 0.16 L/hr/kg、0.09 L/hr/kg、0.05 L/hr/kg であり、尿中排泄クリアランスは胆汁中排泄クリアランスの 1.8 倍であった。

Cy5-PEG-CNT の生体内安定性について、投与に用いた Cy5-PEG-CNT 溶液、およびラットから採取した尿、胆汁についてゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行ったところ、すべてのサンプルについて各溶出フラクションでの蛍光の検出パターンが等しく、投与した Cy5-PEG-CNT は体内で分子量が変化することなく尿中および胆汁中に排泄されることが明らかとなった。

以上の結果より、本研究で合成した Cy5-PEG-CNT は生体内において安定であり、その血漿中濃度推移は Cy5-PEG-CNT としての体内動態を示すことが明らかとなった。

(2) メンブランフィルターを用いた均一な分子サイズを有する酸化 CNT の分級

酸化処理を施していない CNT の TEM 画像では、繊維状に観察される CNT のほか、カーボンシェルなどの炭素不純物と思われる灰色の塊や、金属触媒と考えられる黒色の粒子が数多く観察された。一方 CNT-COOH では、炭素不純物や残留金属触媒と考えられる像はほとんど消失し、CNT の繊維が明瞭に観察された。さらに EDX の結果、金属触媒である Ni および Y は未処理の CNT においてそれぞれ 5.17at%、0.55at% であったのに対し、CNT-COOH ではそれぞれ 2.72at%、0.25at% と半分程度に減少した。さらに O は未処理の CNT において 7.15at% であったのに対し、CNT-COOH では 13.98at% と 2 倍程度に増加した。これらのデータから、CNT の酸化処理により得られた CNT-COOH では、精製と酸化ができてることが明らかとなった。そこでこの CNT-COOH を分散した液を、各孔径のメンブランフィルターでろ過したところ、孔径 10 μm のフィルター上に残渣が得られ、またろ液は CNT-COOH 分散液と

同様の黒色を呈した。このろ液を孔径 1 および 5 μm のフィルターでろ過したところ、フィルター上に残渣は得られなかった。また、孔径 10 μm のフィルター上の残渣、およびろ液の TEM 画像を観察したところ、残渣中には CNT-COOH とと思われる像が多く確認されたのに対し、ろ液中にはほとんど確認されず、炭素不純物と思われる像が観察されるのみであった。CNT は TEM 画像などから強固な束状構造（バンドル構造）を形成して存在することが明らかとなっているが、ろ液中の炭素不純物は CNT-COOH 構造が超音波分散によって壊れてできたものと考えられ、分散液中の CNT-COOH はそのバンドル構造が十分に解消される前に分子構造自体が壊れてしまうことが推察された。

以上の結果より、CNT-COOH が水中でバンドルを形成している場合、特定の分子サイズの CNT-COOH を分級によって得ることは難しいと考えられた。

(3) enhanced Direct Injective Pyrolytic Synthesis (eDIPS) 法により得られた CNT を原料とした Cy5-PEG-SWCNT 合成法

APJ および EC を $\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{HNO}_3$ (3 : 1) で 5 回酸化処理を繰り返すことにより酸化 CNT (CNT-COOH) を作成したところ、APJ-COOH では酸素原子の含有濃度が、酸化処理前の約 2 倍に増加したのに対し、EC-COOH では約 1.1 倍と、変化が認められず、本検討の酸化条件では EC にカルボキシル基が導入されなかったことが推察された。

次に、CNT-COOH に PEG を導入した PEG-CNT (PEG-APJ および PEG-EC) を作成したところ、APJ-COOH の PEG 反応後の重量の増加率は、1.3 倍であったのに対し、酸化によりカルボキシル基が導入されなかった EC-COOH では 4.0 倍であった。この原因として、PEG が SWCNT の凝集体に付着するなど何らかの物理的理由により、見かけ上、導入反応が進んだ可能性が考えられた。さらに Cy5-PEG-SWCNT への Cy5 の導入量を評価したところ、Cy5-PEG-APJ および Cy5-PEG-EC 1 g 当たりの Cy5 の含有量はそれぞれ 0.24 mg、0.02 mg であった。EC-COOH では、APJ-COOH と比較して、PEG 導入量が高かったにもかかわらず、Cy5-PEG-SWCNT に含有された Cy5 量が少なかった原因として、PEG-EC が凝集した状態で Cy5 と反応させたため、SWCNT の立体障害により PEG と Cy5 の反応が進まなかった可能性が考えられた。

以上の結果、APJ と比較して不純物の少ない EC を用いても、より均一な物理化学的特性、ならびに高い蛍光強度を有する Cy5-PEG-CNT の合成には至らなかった。

(4) 単層カーボンナノチューブがヒトおよびラット肝薬物代謝酵素の発現に及ぼす影響

ラットヘパトサイトに 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CNT を暴露し、84 種の第 I 相薬物代謝酵素の mRNA 発現変動を網羅的に解析した結果、13 種の遺伝子の mRNA 発現が 1/2 以下に減少した。さらにラット肝に主要な Cytochrome P450 (CYP) の CNT 濃度依存的な mRNA 発現変動を解析したところ、1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CNT により CYP1A2、CYP2C13、CYP3A2、CYP3A23/3A1 mRNA が減少した一方で、CYP2C11 mRNA には変動は認められなかった。mRNA の減少が大きかった CYP1A2 および CYP3A のタンパク質発現の変動を解析したところ、CYP1A2 タンパク質発現は有意に減少したが、CYP3A タンパク質発現の変動は認められなかった。したがって、SWCNT の影響は分子種によって異なることが明らかとなった。

一方、ヒトにおける CNT による第 I 相薬物代謝酵素の発現変動を解析するために、ヒトヘパトサイトに 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の CNT を暴露した。84 種の第 I 相薬物代謝酵素の mRNA 発現変動を網羅的に解析し、14 種の遺伝子が 1/2 以下に減少し、CYP1A2 mRNA は 55% まで減少することを明らかにした。したがって、ヒトヘパトサイトにおいても CYP1A2 タンパク質発現および酵素活性の減少に繋がる可能性がある。

以上の結果より、CNT は複数のラットおよびヒト第 I 相薬物代謝酵素の発現を減少させることが明らかとなった。また、CYP1A2 mRNA はラットおよびヒトヘパトサイトで発現レベルの減少が認められたことから、ヒト *in vivo* での CYP1A2 酵素活性の減少に繋がる可能性があると考えられる。これより、CNT を輸送担体として用いる際に、薬物代謝能の変動を考慮する必要があると示唆された。

(5) 考察

合成した Cy5-PEG-CNT をラットに静脈内投与したところ、血漿中からの消失は二相性を示し、また比較的速やかに排泄された。一方、尿中および胆汁中に排泄された蛍光物質、すなわち Cy5-PEG-CNT の分子量をゲル過カラムクロマトグラフィーにより検討したところ、Cy5-PEG-CNT は体内で分子量が変化することなく尿中および胆汁中に排泄されることが明らかとなった。この結果から、水溶化した CNT はドラッグキャリア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。そこで、CNT の体内動態特性ならびに生体の異物処理機構に及ぼす影響に関するより詳細な知見を得るため、分子量など

の物理化学的性質が均一で、かつより高い蛍光強度を示す Cy5-PEG-CNT を、十分量合成することを目的として、メンブランフィルターによる CNT-COOH の分級および不純物含量の少ない EC を原料とした Cy5-PEG-CNT の合成について検討したが、十分な Cy5 導入量の Cy5-PEG-CNT を得るには至らなかった。したがって、今後もさらに合成法について検討が必要である。

その一方で、アーク放電法により作成され、精製された SO-SWCNT をラットおよびヒトへパトサイトに暴露したところ、複数の第 I 相薬物代謝酵素の発現が減少することが明らかとなり、CNT をドラッグキャリアに応用するためには、薬物代謝能の変動を考慮する必要があることが示唆された。

今後、CNT の誘導体合成法について更なる検討を加えるとともに、生体への影響を明らかにすることで CNT のドラッグキャリアとしての有用性を評価する必要がある。

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)

[学会発表](計 8 件)

Miki Katoh, Yukinori Kuwabara, Chiaki Kato, Kotaro Hitoshi, Yoshinori Ando, and Masayuki Nadai: Effect of Single-walled Carbon Nanotubes on Expression of Phase I Drug-metabolizing Enzymes in Humans. 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX Meeting (San Francisco) 平成 26 年 10 月 20 日
榊原有季子、加藤美紀、井上理香子、井上梨菜、灘井雅行: 単層カーボンナノチューブがヒト肝シトクロム P450 活性に与える影響. 第 60 回日本薬学会東海支部大会(鈴鹿)平成 26 年 7 月 5 日
桑原悠里、加藤美紀、加藤千晶、北川加寿子、等浩太郎、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シトクロム P450 の発現に及ぼす影響. 第 59 回日本薬学会東海支部総会・大会(名古屋)平成 25 年 7 月 6 日
加藤美紀、中村真依子、大池恵生、西原早紀、等浩太郎、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細胞生存および細胞接着分子に及ぼす影響. 第 59 回日本薬学会東海支部総会・大会(名古屋)平成 25 年 7 月 6 日
加藤美紀、等浩太郎、鈴木智子、安藤義則、灘井雅行: ヒト気管支上皮細胞のストレス関連遺伝子に及ぼすカーボンナノチューブの影響. フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー(名古屋)平成 24 年 10 月 25 日

Miki Katoh, Kotaro Hitoshi, Tomoko Suzuki, Yoshinori Ando and Masayuki Nadai: Effects of Single-walled Carbon Nanotubes on Stress-responsive Genes Expressed in Various Human Respiratory Tract Cells. 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX-VI) (Sendai) 平成 24 年 7 月 20 日

加藤美紀、等浩太郎、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種々のヒト呼吸器由来細胞のストレス関連遺伝子に及ぼす影響. 第 39 回日本毒性学会学術年会(仙台)平成 24 年 7 月 18 日

Miki Katoh, Kotaro Hitoshi, Tomoko Suzuki, Yoshinori Ando, Masayuki Nadai: Down-regulation of Human Cytochrome P450 1A1 and 1B1 by Single-walled Carbon Nanotube. 19th Microsomes and Drug Oxidations (MDO) and 12th European International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) meeting (Noordwijk aan Zee, Netherlands) 平成 24 年 6 月 18 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