

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24710133

研究課題名(和文)潰瘍性大腸炎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

研究課題名(英文) Application of carbon nanotubes to oral drug carriers for the treatment of ulcerative colitis

研究代表者

中村 真紀 (NAKAMURA, MAKI)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・ナノ材料研究部門・研究員

研究者番号：00568925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ナノメートルサイズの炭素材料であるカーボンナノチューブ(CNT)は、薬物を患部に選択的に運ぶための運搬体としての応用が期待されている。我々は、難治性疾患である潰瘍性大腸炎の治療薬をCNTと合体させ、それを口から投与することで、患部である大腸に選択的に治療薬を運搬するようなシステムの構築を目指している。本研究では、効果的なシステムの構築のための検討を行い、治療薬と合体させたCNTを高分子で包む技術を開発し、そのCNTが炎症を抑制する効果のあることを細胞実験で示した。

研究成果の概要(英文)：Carbon nanotubes (CNTs) are nanometer-sized carbon materials, and are expected to be applicable to drug carriers for selective drug delivery to the diseased part. Our goal is to establish oral drug delivery system that carries drugs selectively to colon by using composites of CNT and drugs for ulcerative colitis. In this study, for the establishment of effective systems, we developed a technique for surface modification of the CNT-drug composites with polymers, and showed the anti-inflammatory effects of the composites by cell experiments.

研究分野：材料科学

キーワード：ナノ材料 ナノホーン 経口投与 潰瘍性大腸炎 薬物送達

1. 研究開始当初の背景

難治性疾患である潰瘍性大腸炎において、代表的な治療薬であるステロイド剤は、その大部分が大腸に到達する前に吸収されるため、長期服用により全身性の副作用を生じさせ、患者の生活の質 (QOL) の低下を招くという課題がある。そのため、患部である大腸に特異的に薬物を送達し、持続的にそれを放出する技術の開発が望まれている。

カーボンナノチューブの一種である、カーボンナノホーン (CNH) は、単層カーボンナノホーン (ホーン部) とグラファイト様シート (シート部) を主な構成要素とする、直径約 100 nm の球状集合体である (図 1)^①。先端の閉じたチューブ状の形状であり、優れた物質吸着能力を示すホーン部を有していることから、CNH は新しい薬物送達担体として注目されている。また、酸や塩基に強い CNH を担体に用いることで、胃や小腸における過酷な環境下 (胃酸・消化酵素の存在) において薬物を保護し、大腸に滞留して薬物を放出するようなシステムを構築可能と考えた。

従来、CNH を用いる薬物送達に関する研究においては、経口投与を試みた例はほとんどなかった。そこでまず、先行研究として、CNH を正常マウスと大腸炎モデルマウスに経口投与し、体内挙動を検討した (中村真紀, 若手研究 (B), 「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」, 2010-2011)。その結果、どちらのタイプのマウスにおいても、CNH は消化管から体内には吸収されず、ほぼすべて体外にふんとして排泄されることが明らかとなった。すなわち、経口投与においては、CNH の体内蓄積やそれに伴う毒性発現を懸念しなくてよいことが分かった。

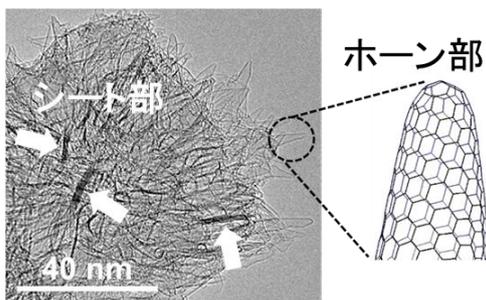


図 1: カーボンナノホーン (CNH) の透過型電子顕微鏡像

2. 研究の目的

本研究では、CNH による潰瘍性大腸炎治療薬の経口投与薬物送達システムの構築を目指し、以下の検討を行うことを当初の目的とした。

・潰瘍性大腸炎治療薬 (ステロイド剤であるプレドニゾロン) を担持した CNH を作製し、

その炎症抑制効果などを、細胞・動物実験により評価する。

・必要に応じて、CNH に表面修飾やサイズ制御を施し、細胞・動物実験による評価をもとに、薬物送達に適した構造を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) プレドニゾロンを担持した未修飾 CNH の炎症抑制効果の評価 (動物実験)

開孔した未修飾 CNH と、プレドニゾロンの溶解液を混合し、プレドニゾロンを担持した未修飾 CNH (以下、プレドニゾロン担持 CNH) を作製した。これを、デキストラン硫酸ナトリウムの自由飲水により大腸に炎症を惹起させた大腸炎モデルマウス (BALB/cA、メス) に経口投与し、炎症抑制効果の指標となる大腸の長さを測定した。

(2) ポリエチレングリコール (PEG) 修飾を施した CNH の細胞毒性評価

開孔した未修飾 CNH と phospholipid-PEG (PL-PEG) を溶液中で様々な重量比で混合し、CNH に PEG 修飾を施した。得られた PEG 修飾 CNH を、マウスマクロファージ様細胞である RAW264.7 に添加し、Bradford assay ならびに G6PD assay により細胞毒性を評価した。

(3) 高分子修飾プレドニゾロン担持 CNH の炎症抑制効果の評価 (細胞実験)

PL-PEG あるいはキトサンの溶解液と、プレドニゾロン担持 CNH を混合し、高分子修飾プレドニゾロン担持 CNH を作製した。これらを RAW264.7 に添加した後に、リポポリサッカライド (LPS) を添加して炎症を惹起させた。炎症抑制効果は、炎症性サイトカインであるインターロイキン-6 (IL-6) の放出量で評価した。

(4) 化学的な表面修飾のための酸化型官能基の導入制御

CNH を室温で一定時間 (1 時間~28 日) 過酸化水素に浸漬させた。浸漬後、超純水で洗浄し、得られた試料の構造を熱重量測定装置、熱重量測定-質量分析装置、透過型電子顕微鏡、フーリエ変換赤外分光分析装置などを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) プレドニゾロン担持 CNH の炎症抑制効果の評価 (動物実験)

プレドニゾロン担持 CNH を大腸炎モデルマウスに経口投与したが、炎症抑制効果は見られなかった。要因として、大腸における滞留効率が良くなかったこと、分散性が悪く凝集したため、薬物放出が充分ではなかったことなどが考えられた。そこで、高分子を CNH 表

面に修飾することで、CNHの体内挙動の制御、ならびに、分散性の向上を目指した。

(2) PEG 修飾 CNH の細胞毒性評価

CNH 表面を修飾する高分子として、比較的
安全な CNH の分散剤である PL-PEG を用いる
こととした²⁾。それに先駆けて、様々な重量
比で CNH と PL-PEG を混合して物理的吸着に
より PEG 修飾 CNH を作製し、細胞毒性を評価
した。その結果、PL-PEG/CNH = 0.5 の際に最
も毒性が低く、PL-PEG がそれより少なくても、
多くても毒性が高まることが明らかとなった
(図 2)。従って、CNH を PEG 修飾する際
には、PL-PEG の使用量に注意する必要がある
ことが判明した。

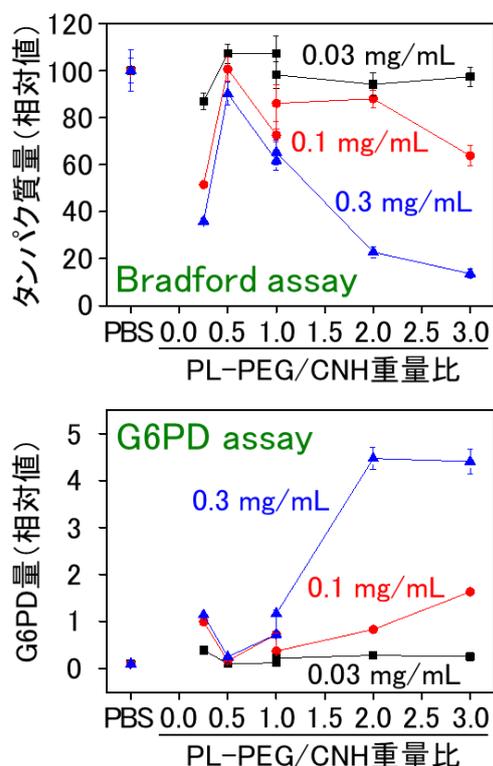


図 2: PL-PEG/CNH 重量比を変化させた際の PEG 修飾 CNH の毒性評価 (上: Bradford assay, 下: G6PD assay)

(3) 高分子修飾プレドニゾロン担持 CNH の炎症抑制効果の評価 (細胞実験)

CNH 表面を修飾する高分子として、PL-PEG の他に、生体親和性を備えた天然高分子であり、大腸の腸内細菌により特異的に分解されるキトサンを用いた。これらの高分子をプレドニゾロン担持 CNH と物理的吸着により複合化し、高分子修飾プレドニゾロン担持 CNH を作製した。

高分子修飾プレドニゾロン担持 CNH の炎症抑制効果は、LPS で炎症を惹起した RAW264.7 を用いて評価した。CNH を添加しないコントロール (LPS 刺激のみ) の系と比較して、高分子修飾プレドニゾロン担持 CNH を添加した系ではいずれも、IL-6 の放出が大きく抑制さ

れており、炎症抑制効果が確認された。顕微鏡観察の結果、細胞内に CNH 由来と思われる黒い物質の取り込みが認められたことから、添加された高分子修飾プレドニゾロン担持 CNH は細胞内に取り込まれ、プレドニゾロンを放出したと考えられる。

一方で、プレドニゾロンを担持しない高分子修飾 CNH を添加した系では、LPS 刺激下、コントロールの系と比較して、IL-6 の放出が促進されており、LPS による炎症惹起効果が CNH により増加するという副作用が顕著であった。この副作用は、培養液中で CNH に吸着した LPS が CNH とともに細胞内に持ち込まれたことが原因と考えられる。一方で、プレドニゾロンを CNH に担持させた場合には、LPS の CNH への吸着が妨げられたため LPS の副作用が現れにくく、CNH により細胞内に運び込まれたプレドニゾロンにより炎症抑制効果が顕著に現れたと推定される。

以上、PEG やキトサンで修飾したプレドニゾロン担持 CNH が炎症抑制効果を示すことを明らかにした。しかし、LPS と CNH の共存による副作用も現れたことから、CNH の炎症抑制効果の評価系については今後再検討する必要があると言える。

(4) 化学的な表面修飾のための酸化型官能基の導入制御

高分子の CNH への修飾を確実なものにするためには、物理的吸着より化学的結合の方が望ましい。CNH への化学的な修飾においては、CNH に酸化型官能基 (主にカルボキシル基) を導入し、そこを反応点として高分子を修飾する方法が開発されてきた。しかし、従来の過酷な化学処理条件では、物質吸着を担うホーン部 (図 1) にカルボキシル基が導入されてしまい、CNH の物質吸着能力を低下させることが問題となっていた。そこで、本研究では、ホーン部とともに CNH を形成しているシート部 (図 1、層数 2-12 枚程度のグラファイト様シート²⁾) に着目し、シート部のみを選択的にカルボキシル化できる酸化条件を検討した。

室温で一定時間 (1 時間~28 日) 過酸化水素に浸漬させるという、従来よりも温和な条件で CNH を酸化し、浸漬時間による構造変化を解析した。熱重量測定-質量分析の結果から、CNH にカルボキシル基が作られ、それに加えて、カルボニル基、キノン基などの酸化型官能基も生じていることがわかった (図 3)。また、こうした酸化型官能基の種類や量は浸漬時間により変化した。熱重量測定、透過型電子顕微鏡観察、赤外吸収スペクトルなどによる結果もあわせて解析した結果、シート部選択的なカルボキシル化のために最適な過酸化水素への浸漬時間は、1 時間であることを明らかにした (図 4)。また、シート部においては、表面部のみが酸化され、シート内部はほとんど酸化されないことも判明した。

シート部のカルボキシル基を反応点として、化学修飾を行うことで、ホーン部の物質吸着能力を保持したままCNHを修飾できれば、より高効率な薬物送達の実現が期待される。

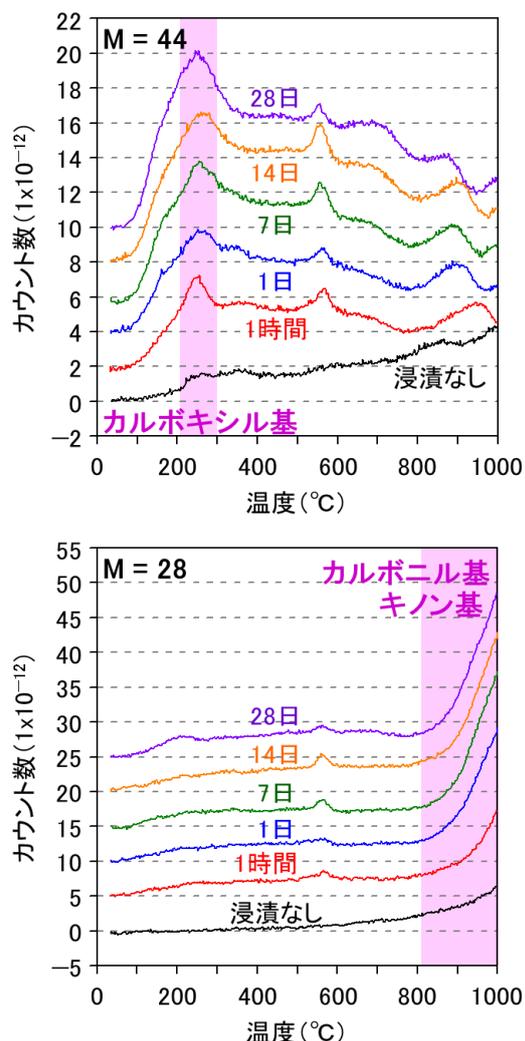


図3: 熱重量測定-質量分析による CNH に導入された酸化型官能基の解析

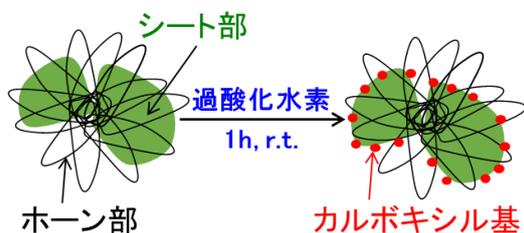


図4: 過酸化水素によるシート部の選択的カルボキシル化の模式図

(5) まとめ

本研究では、CNH による経口投与薬物送達システムの構築のため、新たな CNH 表面修飾技術の開発を行い、高分子修飾プレドニゾン担持 CNH の細胞に対する炎症抑制効果を示した。これらの成果をもとに、今後、CNH による潰瘍性大腸炎治療薬の経口投与薬物送

達の実現すれば、難治性疾患に対する新たな治療システムが示されるという点でその意義は大きい。

<引用文献>

- ① S. Iijima, M. Yudasaka, R. Yamada, S. Bandow, K. Suenaga, F. Kokai, K. Takahashi, "Nano-aggregates of single-walled graphitic carbon nano-horns", Chem. Phys. Lett, Vol. 309, 1999, pp.165-170
- ② M. Yang, M. Wada, M. Zhang, K. Kostarelos, R. Yuge, S. Iijima, M. Masuda, M. Yudasaka, "A high poly(ethylene glycol) density on graphene nanomaterials reduces the detachment of lipid-poly(ethylene glycol) and macrophage uptake", Acta Biomater., Vol. 9, 2013, pp. 4744-4753
- ③ M. Nakamura, T. Kawai, M. Irie, R. Yuge, S. Iijima, S. Bandow, M. Yudasaka, "Graphite-like thin sheets with even-numbered layers", Carbon, Vol. 61, 2013, pp. 640-649

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2件)

- ① 中村真紀、河合孝純、弓削亮太、坂東俊治、飯島澄男、湯田坂雅子, "Evidence of selective oxidation in surface layers of graphite-like thin sheets by mild oxidation", Carbon, 査読有, Vol. 71, 2014, pp. 70-75
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2014.01.014>
- ② 中村真紀、田原善夫、村上達也、飯島澄男、湯田坂雅子, "Gastrointestinal actions of orally-administered single-walled carbon nanohorns", Carbon, 査読有, Vol. 69, 2014, pp. 409-416
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2013.12.043>

[学会発表] (計4件)

- ① 中村真紀、田原善夫、深田伸介、張民芳、飯島澄男、湯田坂雅子, "Cytotoxicity of carbon nanohorns enhanced by too much PLPEG", 第48回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム, 2015年2月23日, 東京
- ② 中村真紀、入江路子、弓削亮太、市橋鋭也、飯島澄男、湯田坂雅子, "Selective carboxylation of graphite-like thin sheet edges in carbon nanohorn aggregates", 第46回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム,

2014年3月3日，東京

- ③中村真紀、田原善夫、村上達也、飯島澄男、湯田坂雅子，「経口投与したカーボンナノホーンの挙動～経口薬剤キャリアへの応用に向けて～」，日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012，2012年11月27日，仙台
- ④中村真紀、田原善夫、村上達也、飯島澄男、湯田坂雅子，“Gastrointestinal behavior of orally-administered single-walled carbon nanohorns”，第43回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム，2012年9月7日，仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 真紀 (NAKAMURA, Maki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・ナノ材料研究部門・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