

炎症性疾患の治療を指向したカーボンナノホーン 薬剤キャリアの開発

中村 真紀*・湯田坂雅子

カーボンナノホーン (carbon nanohorn, CNH) は、物質吸着能力に優れることなどから、薬剤送達システムにおいて薬剤を患部に送り届ける薬剤キャリアとしての応用研究が進められている。筆者らは、関節炎や潰瘍性大腸炎といった炎症性疾患に着目し、CNH薬剤キャリアを用いた治療の有用性について検討を進めてきた。本稿では、これらの研究を中心に解説する。

CNHの概要

ナノカーボンの一種であるCNHは、単層CNHなどから構成されている直径約100 nmの球状集合体である¹⁾ (図1左上)。単層CNHは、長さ40~50 nm、太さ2~

5 nm程度の先端の閉じた単層のチューブであり(図1右上)、通常、約2000本の単層CNHが放射状に集まり、CNHを形成している。CNHは、室温、アルゴン中、760 Torrの条件下で、グラファイトターゲットへの炭酸ガスレーザーアブレーションにより生成する(これをas-grown CNH, asCNHとする)。多くの他のナノカーボンと異なり、触媒や鋳型を使用せず、簡便かつ大量(1 kg/day)に作製できるのが特徴である²⁾。

CNH中の単層CNH表面は、酸素、硝酸、硫酸、過酸化水素などを用いた酸化処理によって開孔することができ、酸化CNH (oxidized CNH, oxCNH) が生成する(図1中)³⁾。酸化処理により、CNHの表面積は約300 m²/gから約1420~1460 m²/gに増大する^{4,5)}。広い表面積を有するoxCNHはさまざまな物質を大量に吸着することができる(図1下、フラーレンの吸着例)。その他、CNHは、細胞内への取込みや血管壁の通過に適したサイズを持ち、表面修飾が容易で目的に応じた修飾が可能であり、触媒や鋳型を使用しないため金属や有機物などの不純物を含まないなど、薬剤キャリアに適した特徴を有する。そのため、がん治療を中心に応用が期待されており、動物実験により抗がん剤や光増感剤を担持させたoxCNHの有用性が示されている^{6,7)}。

CNHへのステロイド剤の担持⁸⁾

筆者らは、炎症性疾患の進行に関与している免疫細胞(マクロファージ)をターゲットとする薬剤送達に着目し、関節炎や潰瘍性大腸炎の治療へ応用することを考えた。炎症性疾患の代表的な治療薬であるステロイド剤は、強い全身性の副作用を防ぐ観点から、患部選択的に薬剤を送達することが望ましい。CNHは、動物への静脈投与によりマクロファージに蓄積することが報告されていることから^{9,10)}、薬剤キャリアとして最適であると考えた。そこでまず、ステロイド剤を担持したoxCNHを作製することとした。

ステロイド剤であるプレドニゾロン(prednisolone, PSL)を溶解したエタノール・水混合液中にoxCNHを分散させ、PSLをoxCNHに吸着させた。ろ過によりPSL担持oxCNH(PSL-oxCNH)を回収し、乾燥させた。

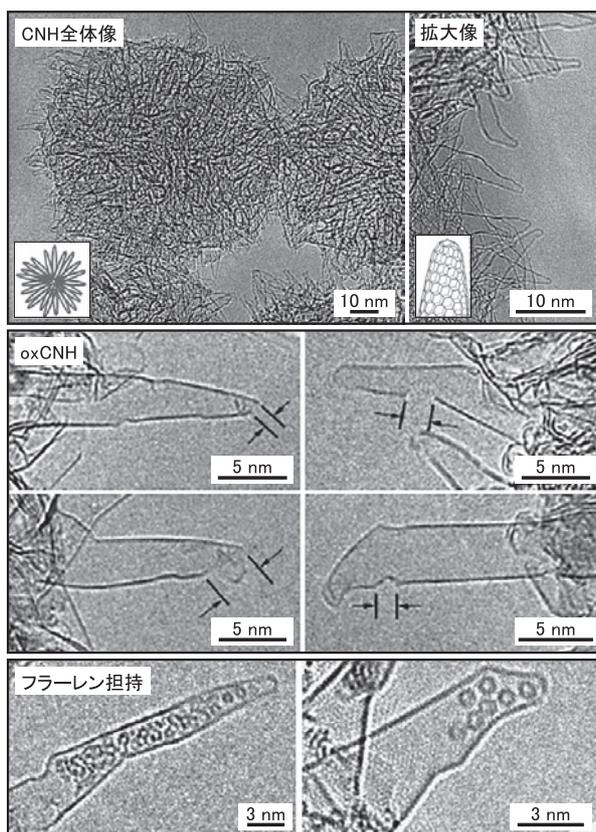


図1. CNH (上, 全体像(左), 拡大像(右)と模式図), oxCNH (中, 矢印部分が開孔), フラーレン担持oxCNH (下, チューブ内の丸い像が吸着したフラーレン)の透過型電子顕微鏡像(文献1, 3より改変)

著者紹介 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(主任研究員) E-mail: ma-ki-nakamura@aist.go.jp

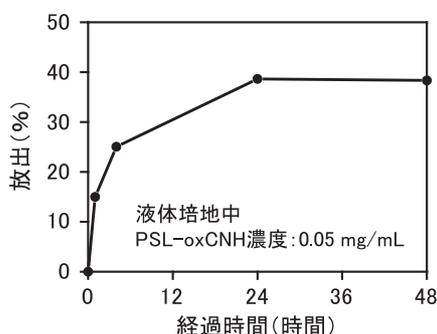


図2. PSL-oxCNHからのPSLの放出 (文献8より改変)

PSL-oxCNH中のPSL担持量は、oxCNH 1 gあたり0.50 gだった(担持量は酸化処理方法によって異なる)。また、asCNHで同様の操作を行った場合、asCNH 1 gあたりのPSL担持量は0.14 gであった。oxCNHでは、酸化処理によりCNH表面が開孔することで、表面積が増大し、PSL担持量が増加したと考えられる。培地中におけるPSLの放出挙動を検討した結果、初めの数時間に初期バーストが見られた後に徐放されるようになり、約24時間で平衡に達した(図2)。平衡時の放出率は、培地中におけるPSL-oxCNHの濃度によって異なり、0.05 mg/mLでは約40%であった。

細胞におけるPSL-oxCNHの炎症抑制評価

PSL-oxCNHの炎症抑制効果をマウスマクロファージ様細胞であるRAW264.7細胞を用いて評価した。炎症の惹起にはリポポリサッカライド (lipopolysaccharide, LPS) を使用した(条件①)。PSL-oxCNHの炎症抑制効果を確かめるために、PSL-oxCNHを添加した後にLPS添加する系(条件②)、PSL-oxCNHの代わりにoxCNHを添加した後にLPSを添加する系(条件③)、PSL-oxCNH添加もLPS添加も行わない系(条件④)について検討した。炎症抑制効果の評価には、炎症性サイトカインであるインターロイキン-6 (interleukin-6, IL-6)の放出量を用いた。

図3に示した結果によると、LPS刺激のみの系(条件①)と比較して、PSL-oxCNHを添加した系(条件②)では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と言える。顕微鏡観察の結果、細胞内にoxCNH由来と思われる黒い物質の取込みが認められたことから、添加したPSL-oxCNHは細胞内に取り込まれ、PSLを放出したと考えられる。一方で、oxCNHを添加した系(条件③)では、LPS刺激のみの系(条件①)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oxCNHにより増加するという副作用

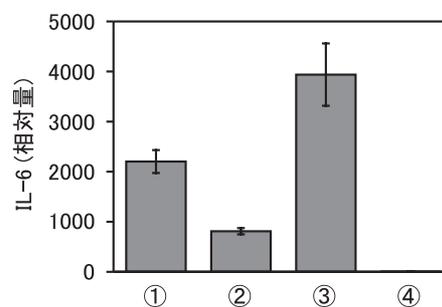


図3. RAW264.7から放出されたIL-6量 (条件①: LPSのみ添加, 条件②: PSL-oxCNHを添加後にLPSを添加, 条件③: oxCNHを添加後にLPSを添加, 条件④: 処理なし)

が顕著に現れた。この副作用は、培養液中でLPSがoxCNHに吸着し、oxCNHとともに細胞内に持ち込まれたことが一因と考えられる。そのような副作用がPSL-oxCNHに現れなかったのは、LPSのoxCNHへの吸着がPSLによって妨げられたためであると推定される。

以上、PSL-oxCNHが炎症抑制効果を示すことを明らかにした。しかし、LPSとoxCNHの共存による副作用も現れたことから、oxCNH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。

関節炎モデルラットにおける炎症抑制評価⁸⁾

関節炎は、関節リウマチなど関節の炎症を伴う疾患の総称であり、患部の腫れ、こわばり、痛みなどにより、日常生活に支障をきたす疾患である。ここでは、関節炎モデルラットの足根関節にPSL-oxCNHを投与し、炎症抑制効果を検討した。リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline, PBS)のみを投与したコントロール群では、足根関節の組織写真に関節炎の症状の一つである骨破壊や炎症細胞浸潤が見られた(図4左上)。また、骨破壊に関与していると考えられるCD68陽性破骨細胞様多核巨細胞も見られた(図4 [1], [2])。一方、PSL-oxCNH投与群では、そのような症状がほとんど見られないことから、炎症抑制効果が確認されたと言える(図4右上, [3], [4])。また、CD68陽性マクロファージ様細胞と考えられる細胞が存在し、その中にCNH由来と考えられる黒色物質が取り込まれていることも確認した(図4 [5], [6])。これらの結果より、PSL-oxCNHは患部に生じたマクロファージに取り込まれて薬剤(PSL)を局所的に放出することで、炎症抑制効果をもたらしたと考えられた。

以上より、関節炎モデルラットの足根関節に投与したPSL-oxCNHの炎症抑制効果が示された。将来的には、静脈投与など応用に適した投与経路での評価が必要になると考えられる。

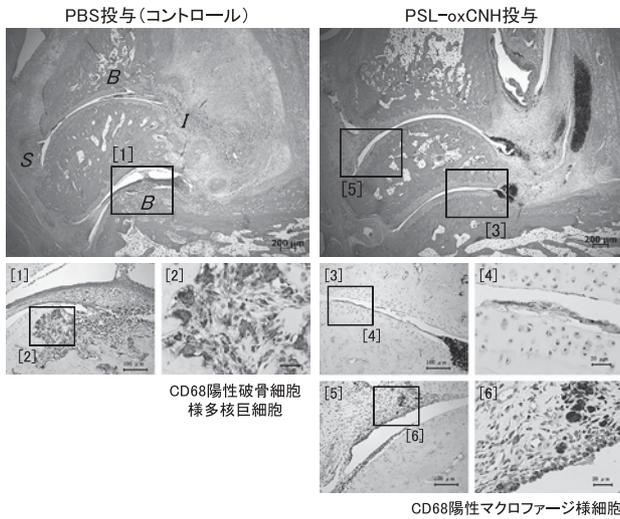


図4. 関節炎モデルラットの足根関節の組織写真（左：PBS投与，右：PSL-oxCNH投与，上：ヘマトキシリン・エオジン染色，中・下：CD68染色，S：滑膜増殖，B：骨破壊，I：炎症細胞浸潤）（文献8より改変）

マウスに経口投与したCNHの挙動
—潰瘍性大腸炎治療に向けて—¹¹⁾

潰瘍性大腸炎は、下痢や腹痛など日常生活に支障をきたす症状を有し、難治的で長期的な治療が必要である。筆者らは、酸や塩基に強いCNHの特性に着目し、CNHを薬剤キャリアに用いることで、胃や小腸における過酷な環境下（胃酸・消化酵素の存在下）で薬剤を保護し、患部である大腸に滞留して薬剤を放出する潰瘍性大腸炎治療システムを構築可能と考えた。CNHを用いた薬剤送達に関する従来研究において、経口投与を試みた例はほとんどなかったことから、まず、正常マウスと大腸炎モデルマウスに経口投与したCNHの体内挙動を検討した。

定量用の金属ガドリニウム（Gd）の酸化物をCNHにラベルしたGd-CNH（図5）を既報⁹⁾に従って作製し、正常マウスと大腸炎モデルマウスに経口投与して各臓器に含まれるGdの量を測定した。その結果、正常マウスと大腸炎モデルマウスの両者において、消化管やフンからGdが検出されたが、肝臓・脾臓・血液からは検出されなかった。消化管にはGd-CNHが取り込まれたと考えられる。そこで、胃・小腸・盲腸・大腸に滞留するGd-CNH量を、Gd量を計測することで算出し、Gd-CNH投与量にどのように依存するかを調べた（図6）。正常マウスの各消化管内のGd-CNHは投与後24時間でほぼすべて排泄された。大腸炎モデルマウスでは、正常マウスより排泄が遅くなる傾向にあったが、最終的

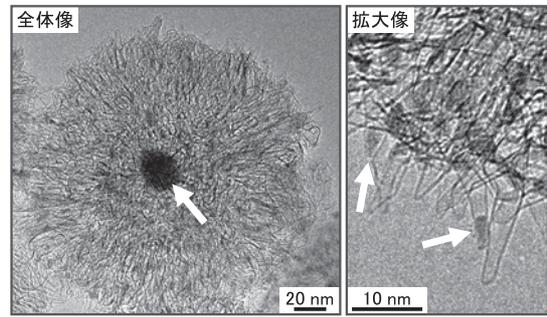


図5. Gd-CNHの透過型電子顕微鏡像，白い矢印はガドリニウム酸化物（文献11より改変）

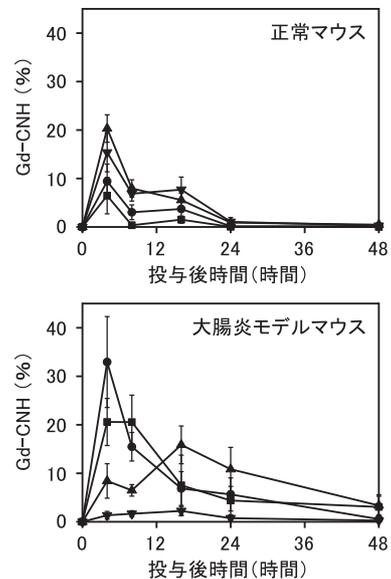


図6. 正常マウス（上）と大腸炎モデルマウス（下）に投与したGd-CNHの胃（■），小腸（●），盲腸（▲），大腸（▼）への分布の割合（文献11より改変）

にはほぼすべて排泄された。以上より、大腸炎の有無にかかわらず、経口投与したCNHは消化管から体内には吸収されず、フンとして体外に排泄されることが明らかになった。

また、CNHのサイズや表面修飾の違いによる影響を検討するために、通常のCNHに比べてサイズが小さいCNH、表面をカルボキシル化またはポチエチレングリコールコーティングして分散性を向上させたCNHなど、5種類のCNHをそれぞれ準備し、Gd-CNHと同様に経口投与した。各組織の切片を観察した結果、肝臓・脾臓では黒い物質の分布は認められなかった。また、フン中にはCNHと思われる黒い物質の存在が認められた。すなわち、これらのCNHは体内挙動においてGd-CNHとの大きな違いがないと考えられた。

以上、経口投与されたCNHに関しては体内に吸収さ

れないことから、CNHの体内蓄積やそれに伴う毒性発現の可能性は非常に低いことが分かった。すなわち、CNHは経口投与による大腸への薬剤キャリアとしての基礎的要件を満たすことが示された。今後、治療薬を担持させたCNHの薬剤送達による疾患治療が期待される。

おわりに

CNHキャリアを用いた薬剤送達研究は、がん治療への応用を中心に進んでいる。本稿では、マクロファージをターゲットとした薬剤送達に注目し、関節炎治療や潰瘍性大腸炎治療へ向けた試みについて解説した。薬剤送達システムにおいては、患部への集積効率の向上、薬剤の放出挙動の制御、治療効果の検証、副作用の軽減、薬剤キャリアの生体内分布の制御ならびに安全性の検証など、重要となる課題が数多くあり、本稿で示したものはほんの一部にしかすぎない。しかし、これらの課題を一

つひとつ乗り越えれば、臨床応用の可能性も広がると期待している。

文 献

- 1) Iijima, S. *et al.*: *Chem. Phys. Lett.*, **309**, 165 (1999).
- 2) Azami, T. *et al.*: *J. Phys. Chem. C*, **112**, 1330 (2008).
- 3) Ajima, K. *et al.*: *Adv. Mater.*, **16**, 397, (2004).
- 4) Utsumi, S. *et al.*: *J. Phys. Chem. B*, **109**, 14319 (2005).
- 5) Yang, C. M. *et al.*: *Adv. Mater.*, **17**, 866 (2005).
- 6) Ajima, K. *et al.*: *ACS Nano*, **2**, 2057 (2008).
- 7) Zhang, M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14773 (2008).
- 8) Nakamura, M. *et al.*: *Nanotechnology*, **22**, 465102 (2011).
- 9) Miyawaki, J. *et al.*: *ACS Nano*, **3**, 1399 (2009).
- 10) Tahara, Y. *et al.*: *Nanotechnology*, **22**, 265106 (2011).
- 11) Nakamura, M. *et al.*: *Carbon*, **69**, 409 (2014).