

201128145B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

カルパイン阻害剤による角膜内皮細胞の
アポトーシス抑制効果の評価

平成 22 年度～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 馬場 耕一

平成 24 (2012) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

カルパイン阻害剤による角膜内皮細胞の
アポトーシス抑制効果の評価

平成 22 年度～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 馬場 耕一

平成 24 (2012) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告	
カルパイン阻害剤による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価	----- 1
馬場 耕一	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 9
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----10

総合研究報告

カルパイン阻害剤による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価

研究代表者 馬場 耕一 （大阪大学医学系研究科眼科教室）

研究要旨

フックス角膜内皮変性症は、角膜内皮細胞のアポトーシス（細胞死）の進行により角膜内皮細胞の機能が障害され、重篤な視力障害が生じる難治性疾患である。現在、本疾患に対し角膜移植のほかに良好な治療法はない。しかし角膜移植はドナー不足の問題や拒絶反応など患者への負担も大きく、角膜移植にかわる治療法に高い関心が寄せられている。我々は簡便な点眼液の使用により角膜内皮細胞のアポトーシスを抑制する方向から本疾患の治療法を探索することに着目した。アポトーシスにカルパインの活動が関与することに注目しカルパインの活動を点眼液で抑制するため、第一にカルパイン阻害剤ナノ粒子からなる点眼液の新規作製に着手した。その結果、ナノスプレードライヤー法によりカルパイン阻害剤のナノ粒子の作製に成功した。薬剤粒子サイズは1 μm 程度以下であった。ポリソルベート80等の界面活性剤を併用しナノ粒子を水に分散化させることで点眼液の作製を行った。第二にカルパイン阻害剤のアポトーシス抑制効果を培養角膜内皮細胞実験系で検証した結果、培養ウサギ角膜内皮細胞に対して酸化ストレス障害下における角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果が示唆された。ヒト角膜内皮セルライン (HCEC-B4G12) および培養ヒト角膜内皮細胞でも検証を進めている。第三に経角膜的にクライオ処置を施した角膜内皮障害モデルのウサギ動物実験系でカルパイン阻害剤の薬理効果を検証した。その結果、クライオ処置直前からカルパイン阻害剤の高濃度点眼を続けた系で角膜内皮細胞死に伴う角膜混濁の進行の遅延が認められたことから、カルパイン阻害剤による角膜内皮細胞死の抑制効果が示唆された。本研究課題では、将来的なトランスレーショナルリサーチも視野に入れ、カルパイン阻害剤ナノ粒子の点眼液の使用による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果を検証し、フックス角膜内皮変性症の新しい治療法開発の可能性を検討した。

研究分担者

西田幸二 大阪大学医学系研究科 眼科教室 教授

本疾患は優性遺伝性疾患とされるが女性に多いなど優性遺伝では説明のつかない遺伝形式をとり原因遺伝子も十分に明らかでなく老化や環境因子など多因子疾患である可能性も高い。本邦での患者数は数千～数万人と推定される。主な症状として両眼性に角膜浮腫による混濁が進行し、最終的には水疱性角膜症に至り手動弁ないし光覚弁にまで視力が低下する。また角膜浮腫に伴い角膜上皮びらんを生じやすくなり眼痛を繰り返す。角膜上皮びらんが遷延化すると角膜感染症の合併を生じや

A. 研究目的

眼難治性疾患であるフックス角膜内皮変性症は原発性に角膜内皮が障害されアポトーシスによって進行性に内皮細胞数の減少をきたし視力が低下する疾患であり、疾患原因が遺伝子にあると考えられるが根治療法が確立されておらず、症状が悪化すると失明にいたる場合もある重篤疾患である。

すくなるなどの症状があげられる。フックス角膜内皮変性症の遺伝子レベルでの原因解明には今後とも時間を要し、現在角膜移植以外に有効な治療法はない。しかし角膜移植は拒絶反応やドナー不足などの問題があり患者への負担も大きく、より簡便な手段での本疾患の治療が強く望まれている。

我々は本疾患が角膜内皮細胞のアポトーシスに関与する点に着目し角膜移植に変わりアポトーシスを抑制することで疾患治療ないしは病気の進行を遅らせることを考えた。細胞のアポトーシスには様々な要因が関与しておりタンパク分解酵素カルパインの活動もその一つである。本研究ではカルパイン阻害剤を使用することで角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価を目的とした。これまでに多くのカルパイン阻害剤が合成されている(図1)。本研究課題で使用するカルパイン阻害剤は動物実験レベルで神経細胞に対するアポトーシス抑制効果の有効性が報告されている。

眼疾患治療法の第一選択として簡便な点眼治療が望ましいが、本カルパイン阻害剤は難水溶性であるため水に分散させることが難しく、点眼液には不向きであり、通常水に懸濁させた経口投与での使用が考えられる。しかしながら経口投与では薬剤が全身に分布するため疾患部に薬物を有効濃度で到達させるためには、それ以上の過剰な薬物投与が必要であり、それに伴う薬剤の全身暴露による副作用の懸念などが問題として挙げられる。

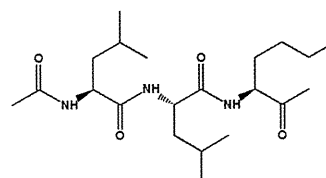
そのため患者に負担が少なく効果的に本疾患を治療するためには難水溶性カルパイン阻害剤の点眼液の開発が新たに必要である。

我々は長年ナノ粒子の研究に携わってきておりその基盤技術を用いて第一にカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液を作製し、第二に角膜内皮障害を施した培養ウサギ・ヒト角膜内皮細胞およびウサギ動物の実験系で点眼による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果を検証した。

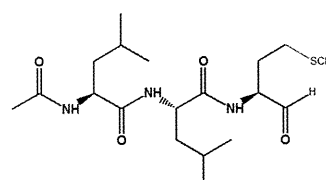
本研究課題の遂行によりカルパイン阻害剤による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果を明らかにし、かつナノ粒子点眼液によりカルパイン阻害

剤を効果的に角膜内皮細胞に送達できれば、角膜移植によらない患者に負担の少ない新しい治療法への道筋をつけることになる。このように現在の眼科医療にカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液を取り入れることは、難病フックス角膜内皮変性症の治療の安全性を向上させると共に治療効果の向上が期待でき、医学的・社会的貢献度は高いと考えている。

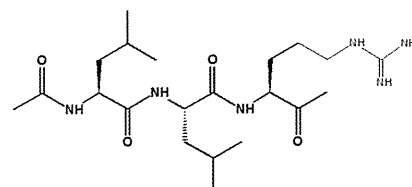
動物実験にあたり事前に動物実験専門委員会により実験計画書の審査が行われた。本研究課題遂行において動物愛護上の配慮は十分に行った。



カルパインインヒビター I



カルパインインヒビター II



ロイバプテン

B. 研究方法

研究項目1~3を本研究の遂行課題とした。

研究項目1: カルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液の作製と構造物性評価

ステロイドに代表される難水溶性の薬剤の点眼液は通常薬剤を水中に懸濁・分散させた状態で用いられる。懸濁液中の薬剤粒子の大きさはおよそ数 μm ~数十 μm 程度(マイクロ粒子)である。しかしながら、粒子サイズに起因した薬剤の水への低溶解性および大きな粒子サイズによる角膜への取り込みの悪さにより一般的に薬剤の眼内移行性は

高くない。本研究課題で使用するカルパイン阻害剤もまた難水溶性であるため、難水溶性のカルパイン阻害剤を点眼液として使用する場合、薬剤形態は懸濁型となり、また懸濁液中の薬剤粒子サイズは数 μm ~数十 μm オーダー(マイクロ粒子)であるため粒子サイズの要因から薬剤の溶解性および角膜への取り込み効率はきわめて低いことが推測される。一方で難水溶性の化合物類を点眼により眼内に効率よく移行させるためには第一に薬剤粒子の微小化(ナノサイズ化)が効果的であることが最近の我々の研究により明らかになった(C. 研究結果：ナノ粒子点眼剤の眼内移行性評価についてを参照)。そのため効果的な薬剤の眼内移行性を確保するためには薬剤のナノ粒子化が薬剤の溶解性及び角膜移行性の向上に極めて有効であると考へた。今回、薬剤の眼内移行性向上を目的としたカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液の作製を行った。カルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液を作製する手段として下記3種類のナノ粒子化技術を検討した。これらの技術はナノ粒子化においてそれぞれ特徴を備えており比較検討を行うことで点眼液作製の最適化を図った。

その1：再沈法

有機ナノ粒子の作製法である再沈法を用いた。再沈法とは、再沈澱効果を利用して、有機ナノ粒子を水中に析出・安定分散させ、同時に粒子サイズ・構造を制御する手法である。粒子サイズおよび構造制御は溶液の濃度、水温、溶媒の種類、攪拌速度等の調整により行った。作製に使用した有機溶媒は有機ナノ粒子水分散液から透析を用いて除去した。粒子サイズ・構造は主に走査型電子顕微鏡観察により評価した。

その2：有機化合物微粒子化装置1；ナノマイザー

トップダウン型で薬剤をナノメートルオーダーに粒子化する装置を用いてナノ粒子作製を行った。ナノマイザーは湿式の処理装置で、スラリーを高

圧のプランジャーポンプにて中心部のジェネレータ部に送り込みジェネレータ通過時に発生する高速剪断力によって薬剤バルク粉体は瞬時に微細化処理される。具体的には薬剤を分散させた水溶液(100 mg/10 ml)をナノマイザー処理に施した。使用した処理圧力は200 Mpa (最大流速290 m/sec)であり、ランニングタイムは6h程とした。ナノ粒子の構造物性評価は上記再沈法の場合と同様に行った。

その3：有機化合物微粒子化装置2；ナノスプレードライヤー

ナノスプレードライヤーはピエゾ式電圧ノズルを使用した全く新しいタイプのスプレードライヤー法であり、従来の二流体ノズル方式では微細化の限界であった粒子径 $2\mu\text{m}$ を下回る微粒子を得ることができる。また上記ナノマイザーでは数百mgの薬剤が1回の処理量として必要であるがナノスプレードライヤーには1回のナノ粒子化に数mg程度の薬剤が必要量である。最小限のサンプル量から効率よく微細粒子を回収(回収率90%)することが可能なため本装置は貴重な薬剤の取り扱いに向いている。1回の薬剤使用量が少ないことから多くの実験条件を検討可能で粒子サイズ制御され優れた眼内移行性を有するナノ粒子点眼液の作製に最適な装置である。薬剤が粉体として得られるため、水と任意の割合で混合させることができ、点眼液の濃度を低濃度から高濃度まで調整可能である。本研究課題では特にこの手段によるナノ粒子作製に注目した。ナノ粒子の構造物性評価は上記再沈法の場合と同様に行った。典型的な作製条件は、薬剤を溶解したエタノール溶液(50 mg/30 ml)をスプレードライヤーにかけ(ランニングタイム1-2h程)、粉体化された薬剤が静電的に電極に捕集され、続いてゴム製のヘラにより薬剤粉体を回収した。

これまでの知見から薬剤が眼球内に効率よく移行するためには粒子サイズの制御が重要であると考へている。そのため角膜内皮細胞に効果的に薬

剤が浸透可能な最適粒子サイズの目標値を粒子サイズ1 μm 以下とした。

研究項目2：培養ウサギ・ヒト角膜内皮細胞の障害モデル作製及びカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価

カルパイン阻害剤の角膜内皮細胞に対するアポトーシス抑制効果の評価した。培養ウサギ角膜内皮細胞系に過酸化水素を添加し細胞に酸化ストレス障害を与えカルパイン阻害剤によるアポトーシス抑制効果の評価した。本実験は低酸化ストレス下でカルパイン活動を介したアポトーシスが認められた既報を参考とした (Eur. J. Pharm., 547, 1, 2006)。アポトーシス抑制効果は TUNEL 法により評価した。

家兎の眼球から角膜内皮を剥離し、D-MEM 培養液 (10% FBS, L-Gln, bFGF, Anti-Anti 含有) で培養した角膜内皮細胞実験系 (passage 2) を用いた。20 μM のカルパイン阻害剤を添加して 0.5h 後に 50 μM の過酸化水素を加え 37 $^{\circ}\text{C}$ インキュベータで 21h 保持した後パラフォルムアルデヒド固定を行なった。続いて TritonX-100 (0.1%), sodium citrate (0.1%) で処理した後 TUNEL 法に基づきフルオレセイン蛍光試薬およびヘキスト色素で所定の時間染色した。続いて蛍光顕微鏡観察によりアポトーシスの結果フルオレセインで核染色された細胞数をカウントしヘキストで核染色された細胞数との割合からタネル陽性率を算出した。同酸化ストレス系でカルパイン阻害剤の無添加群をコントロールとした。ヒト角膜内皮セルライン (HCEC-B4G12) および培養ヒト角膜内皮細胞についても同様の検証を行った。

研究項目3：ウサギ動物実験の障害モデル作製及びカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価

動物実験系での *in vivo* におけるカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液の角膜内皮細胞のアポトーシ

ス抑制効果について評価した。

麻酔を施した白色ウサギにクライオ処置により経角膜的に角膜内皮に障害を与えた。薬理効果の評価にあたり二つのモデルで検証した。一つの系はクライオ処置を施し角膜内皮にダメージを与え、角膜が混濁したことを確認後、点眼を開始し、角膜懸濁の進行抑制もしくは懸濁の消失が生じるかを観察した。もう一つの系は、クライオ処置前から薬剤点眼を開始し、クライオ処置後も直ちに点眼を続けた。点眼を施さないコントロール群と比較して角膜の混濁具合に差がみられるかを検証した。点眼は1日3回行った。前者の系は2週間点眼を続け、後者の系は1週間点眼を続けた。

C. 研究結果

研究項目1：カルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液の作製と構造物性評価

ナノ粒子の作製にあたり再沈法、ナノマイザー及びナノスプレードライヤーの使用を検討した。その結果、再沈法やナノマイザー法では薬剤のナノ粒子化が認められるものの薬剤粒子の水中での結晶成長等により最終的には粒子がマイクロからミリメートルオーダーまで成長する傾向があり、粒子サイズ制御及び水中での粒子分散安定性の確保を達成するために更なる検討が必要であることが明らかとなった。

ナノ粒子作製にナノスプレードライヤーを使用した実験系で、薬剤を溶解したエタノール溶液をスプレードライすることで、粒子サイズ1 μm 以下程度の薬剤ナノ粒子を得ることに成功した (図2)。また同装置の機能・汎用性を検証する上で難水溶性のステロイド薬剤も使用したところ、同様の実験条件でデキサメタゾンやフルオロメトロンでナノ粒子の作製に成功した。薬剤は粉体で得られるため点眼液として使用するにあたり薬剤の水への再分散化を検討した結果、ポリソルベート80等の界面活性剤の使用により水への粒子分散化が認められたが、さらなる粒子安定分散のため水中での粒子成長抑制因子の検討も要すると考えて

いる。

ナノ粒子点眼剤の眼内移行性評価について

ナノ粒子点眼液を点眼投与した際、ナノ粒子の眼内移行性及びその眼内動態については他に知見が少なく不明な点も多い。我々はカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液を用いた研究に先立ち、蛍光能を有するナノ粒子点眼液を用いて検証を行ったが、この度ナノ粒子の眼内移行性及びその眼内動態を蛍光分光法及び共焦点レーザー顕微鏡観察により明らかにすることに成功した(論文; K. Baba et al, Journal of Controlled Release, 153, 278-287, 2011)。結果、蛍光強度から定量するとナノ粒子点眼液の使用は同化合物のマイクロ粒子点眼液(粒子サイズ: 数~数十マイクロメートル)の使用より数十倍も眼内移行性を高めることが明らかとなった。また共焦点レーザー顕微鏡により眼球の蛍光観察を行ったところナノ粒子点眼後、ナノ粒子由来の化合物が角膜上皮、角膜実質を通過し角膜内皮にまで高濃度で浸透していることが明らかとなった。同マイクロ粒子点眼には観察されないナノ粒子特有の現象でありナノ粒子点眼液の眼内移行性に対する有効性を示している。また関連する国内特許及びPCTを出願済みであることも付記する(国際出願番号: PCT/JP2009/68851)。カルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液の研究を遂行する上で参考となる重要な研究成果であると考えている。

尚、ナノ粒子の作製法である再沈法についてはその作製法および研究報告の数例を総説としてまとめた(著書; K. Baba et al, *in Nanocrystal*, pp. 397-414, 2011)。今後のナノ粒子点眼液の作製法において有益な情報源・メソッドになると考えている。

またドラッグナノクリスタルの作製と物性評価(Recent Patents on Nanomedicine, 1, 123-129, 2011)および蛍光性量子ドットを用いた単一分子イメージング法(Theranostics, 2012, in press)のそれぞれについて難病疾患治療の方策の一助となることを期待し総説を著したことも付記する。

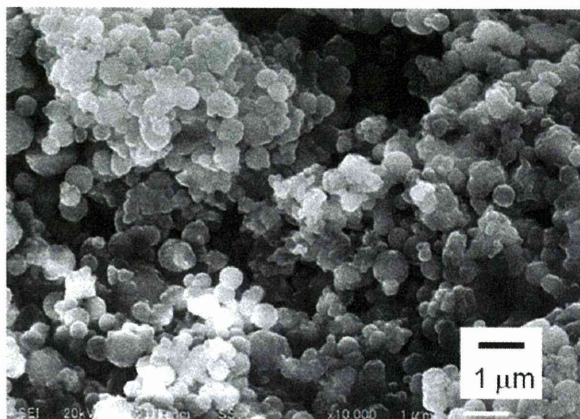


図2: ナノスプレードライヤーによるナノ粒子作製の一例

研究項目2: 培養ウサギ・ヒト角膜内皮細胞の障害モデル作製及びカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価

過酸化水素添加により低酸化ストレス障害を与えた培養ウサギ角膜内皮細胞系で、カルパイン阻害剤の使用によるアポトーシス抑制効果が示唆された(図3)。ヒト角膜内皮セルライン(HCEC-B4G12)および培養ヒト角膜内皮細胞系については最適な評価系の構築等を含め現在も薬理効果について検証を進めている。

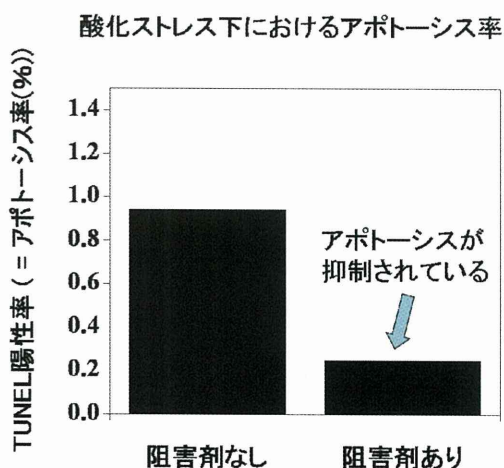
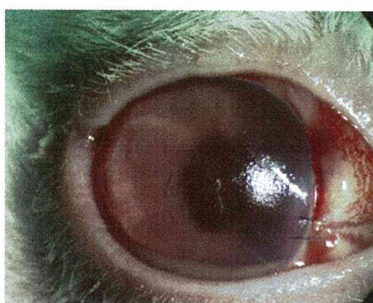


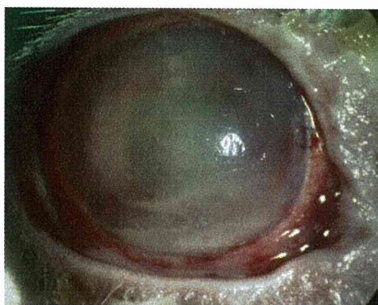
図3: 低酸化ストレス濃度(過酸化水素: 50 μM)下におけるアポトーシス評価の結果。20 μMのカルパイン阻害剤を添加した系でアポトーシスの抑制が示唆された(図の右側)

研究項目3：ウサギ動物実験の障害モデル作製及びカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価

クライオ処置を施し角膜が混濁したことを確認したのち点眼を開始した系では、ナノ粒子点眼、懸濁液点眼、コントロールで比較を行なったが、三者に優位差は見られず全ての角膜の混濁が経時的に進行した。一方、クライオ処置を施す直前から点眼を施し、処置後も直ちに点眼を続けた系では、特に高濃度点眼（5%）を3日続けた系で角膜の白濁の進行が抑制されている様子が観察された（図4：上）。点眼を施さないコントロールの系では3日目には混濁が進行していた（図4：下）。また超音波診断により角膜の厚みを測定したところ、白濁したコントロールの系は角膜内皮のポンプ機能が破壊されていることが推測され実質が膨潤しており平均膜厚が523 μm であったが、高濃度点眼を施した系は平均膜厚が314 μm であったため、点眼による角膜内皮細胞の細胞死抑制が示唆された（表1）。



高濃度点眼



コントロール

図4：クライオ処置後の角膜の様子。
（上）高濃度点眼、（下）点眼処置なし

表1：角膜の厚み測定の結果

	膜厚 (μm)					平均膜厚 (μm)
	332	312	288	297	339	314
高濃度点眼	332	312	288	297	339	314
コントロール	525	539	520	536	495	523

D. 考察

研究項目1：カルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液の作製と構造物性評価

我々の先行研究から薬剤を眼内に効率よく移行させるためには粒子サイズの制御、特に薬剤ナノ粒子化が重要と考えた。ナノスプレードライヤーの使用は薬剤のナノ粒子化に有益な手段であることがわかった。本ナノスプレードライヤーは、ピエゾ式電圧ノズルを使用した全く新しいタイプのスプレードライヤー法であり、従来の二流体ノズル方式では得ることが困難であった微小サイズ液滴の形成を可能にする。つまり薬剤を溶かした溶液のスプレー後の液滴サイズがナノ粒子を作製可能な程十分に小さく、液滴サイズを反映したナノ粒子の生成が可能であったためと考えている。カルパイン阻害剤だけでなくステロイド薬剤においても同様のナノ粒子の作製に成功した。本装置の使用は広範な種類の薬剤のナノ粒子化に有効な手段であると考えられる。得られた粉体を点眼液として使用のため水に再分散させる手段を検討したが、点眼液で使用可能なポリソルベート80等の界面活性剤を使用することで薬剤粉体を水に再分散化させた。但し長期的にナノ粒子が安定分散するためには粒子の水中での成長を抑制させる手段を講じる必要も考えられ、今後とも検証を進める。

研究項目2：培養ウサギ・ヒト角膜内皮細胞の障害モデル作製及びカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価

酸化ストレスにより細胞のアポトーシスが進行

することが知られるが、本カルパイン阻害剤の使用により培養ウサギ角膜内皮細胞でのアポトーシス抑制効果が示唆された。カルパイン阻害剤の使用はフックス角膜内皮変性症における酸化ストレスを介したアポトーシス抑制効果に寄与できると期待でき、新しい治療法の一つとして検証していく価値があると考えている。現在ヒト角膜内皮セルライン (HCEC-B4G12) および培養ヒト角膜内皮細胞においても検証を進めている。

研究項目3：ウサギ動物実験の障害モデル作製及びカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価

クライオ処置を施した動物実験モデルにおいて角膜が混濁したのち点眼を施しても、すでに角膜内皮が死滅していると推測されるため、角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果を得ることができなかったと考えている。一方でクライオ処置直前より点眼を開始した系においては角膜混濁進行の遅延が観察されたためカルパイン阻害剤による角膜内皮細胞死の抑制が示唆された。詳細な検証は今後とも進めていく予定である。

E. 結論

ナノスプレードライヤーの使用によりナノ粒子粉体の作製に成功した。得られた粒子サイズは1 μm 程度以下であった。本粉体を点眼液として使用可能にするため粉体の水分散化を行った結果、ポリソルベート80等の界面活性剤の使用により薬剤の水分散化が認められたが、長期的に安定な薬剤ナノ粒子水分散液を維持するために、今後とも最適化された作製条件を検討していく必要がある。

培養ウサギ角膜内皮実験系で酸化ストレス下におけるカルパイン阻害剤によるアポトーシス抑制効果の評価を行った。その結果、カルパイン阻害剤により培養ウサギ角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果が示唆された。ヒト角膜内皮セルライン (HCEC-B4G12) および培養ヒト角膜内皮と合わせて

詳細な検証を進めていく。

クライオ処置を施し角膜内皮障害を施したウサギ実験系においてクライオ処置直前よりカルパイン阻害剤の点眼を開始した系においては角膜混濁の進行の遅延が認められたことにより、カルパイン阻害剤による角膜内皮細胞死の抑制が示唆された。組織学的評価やタネル染色評価等による薬理効果の詳細検証も今後とも進めていく。本研究課題の成果によってカルパイン阻害剤による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果が実証されれば、フックス角膜内皮変性症に対して新しいタイプの薬剤治療の可能性が期待できる。

F. 健康危険情報 該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

① Koichi Baba, Yuji Tanaka, Akira Kubota, Hitoshi Kasai, Shunji Yokokura, Hachiro Nakanishi, Kohji Nishida: A method for enhancing the ocular penetration of eye drops using nanoparticles of hydrolyzable dye: J. Controlled Release, 2011, 153, 278-287.

② Koichi Baba, Hitoshi Kasai, Kohji Nishida, Hachiro Nakanishi: Functional Organic Nanocrystals: *in* Nanocrystal, Yoshitake Masuda ed., pp. 397-414, Chap. 15, Intec, Croatia, June 2011.

③ Koichi Baba, Kohji Nishida: Drug Nanocrystals: their physicochemical properties and production technologies, Recent Patents on Nanomedicine, 1, 123-129, 2011.

④ Koichi Baba, Kohji Nishida: Single molecule tracking in living cells using single quantum dot applications, Theranostics, 2012, in

press.

2. 学会発表

① 国内招待講演) 馬場耕一, 「有機ナノ結晶の現在と製剤への応用」, 創薬フォーラム, 48回 薬剤学懇談会研究討論会プログラム: 先端科学技術と薬剤学の接点を探る, 山形県上山市 ホテル古窯, (2011年7月8日).

② 国際眼科フォーラム) Koichi Baba, Yuji Tanaka, Akira Kubota, Hitoshi Kasai, Shunji Yokokura, Hachiro Nakanishi, Kohji Nishida, Enhancing the ocular penetration of eye drops by using nanoparticles, Osaka University/The Chinese University of Hong Kong, Ophthalmology Forum 2011, Osaka, August 4, 2011

③ 国際招待講演) Koichi Baba, Nanoparticles of hydrolysable dye achieved the high ocular penetration by passing through the corneal barrier function, BIT's 2nd Annual World Congress of NanoMedicine-2011, Shenzhen, China (3 Nov. 2011)

④ 国内招待講演) 馬場耕一, 有機ナノ結晶の新展開: 材料化学からバイオ分野へー作製技術とアプリケーション, 第六回 DDS 熊本シンポジウム, 熊本大学薬学部宮本記念館コンベンションホール, 熊本, (2012年3月6日)

⑤ 国際招待講演) Koichi Baba, A method for enhancing the ocular penetration of eye drops using nanoparticle formulation as a potential drug delivery system in ophthalmology, The 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress April 15 (Sun), 2012; BEXCO, Busan, Korea.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

① 西田幸二, 馬場耕一, 笠井均, 田中佑治, 久保田亨, 横倉俊二, 「眼内移行性の高い点眼剤および蛍光イメージング剤ならびにそれらの製造方法」 (国際出願番号: PCT/JP2009/68851)

② 馬場耕一, 西田幸二, 橋田徳康, 特願 2012-99285 (出願日 H24. 4. 24)

2. 特許取得 なし

3. 実用新案登録 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社 名	出版地	出版年	ページ
<u>Koichi Baba</u> , Hitoshi Kasai, <u>Kohji</u> <u>Nishida</u> , Hachiro Nakanishi	Functional organic nanocrystals	Yoshitake Masuda	Nanocrystal	INTECH	Croatia	2011	pp. 397 -414 (C hap. 15)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号・ページ	出版年
<u>Koichi Baba</u> , Yuji Tanaka, Akira Kubota, Hitoshi Kasai, Shunji Yokokura, Hachiro Nakanishi, <u>Kohji</u> <u>Nishida</u>	A method for enhancing the ocular penetration of eye drops using nanoparticles of hydrolyzable dye	Journal of Controlled Release	153, 278-287	2011
<u>Koichi Baba</u> , <u>Kohji</u> <u>Nishida</u>	Drug nanocrystals: their physicochemical properties and production technologies	Recent Patents on Nanomedicine	1, 123-129	2011
<u>Koichi Baba</u> , <u>Kohji</u> <u>Nishida</u>	Single molecule tracking in living cells using single quantum dot applications	Theranostics	in press	2012

研究成果の刊行物・別刷

Functional Organic Nanocrystals

Koichi Baba¹, Hitoshi Kasai^{2,3}, Kohji Nishida¹ and Hachiro Nakanishi²

¹*Osaka University*

²*Tohoku University*

³*PRESTO, Japan Science and Technology Agency
Japan*

1. Introduction

The topic in this chapter concerns organic nanocrystals. Numerous scientific researches of nanocrystals are focusing on inorganic compounds such as a metal and a semiconductor. The research related to organic nanocrystals is relatively new compared to that of inorganic nanocrystals. Nearly two decades ago, our research team had developed a novel preparation method of organic nanocrystals, what we call the reprecipitation method. Since then, we have been leading the research area of organic nanocrystals. The reprecipitation method has bottom-up type with a wet process procedure to prepare organic nanocrystals, and organic nanocrystals are obtained as their water dispersion. Numerous numbers of organic compounds are allowed to be a candidate for a targeting of organic nanocrystals by means of using the reprecipitation method. Functional organic nanocrystals have been attracted in a scientific and technological area of materials. In this chapter, first we mention the research back ground of organic nanocrystals, and then introduce the preparation method of organic nanocrystals, i.e. the reprecipitation method, and their improved ones. Then, several kinds of functional organic nanocrystals relating to optoelectrical materials, nanomedicine, and biophotonics are mentioned. Recent topics of organic nanocrystals achieved by several groups are briefly introduced. In this chapter, the topics are proceeding as follows:

1. Back ground of the research of organic nanocrystals
2. Preparation method of organic nanocrystals
3. Several functional organic nanocrystals
4. Recent topics of organic nanocrystals achieved by several groups

2. Back ground of the research of organic nanocrystals

Fabrication of nanocrystals and their nanostructure has been investigated extensively for metals (Ung et al., 1997) and semiconductors (Murray et al., 1993), and many characteristic properties have already been shown. For example, a novel and unique optical property called the quantum size effect (Nakamura, 1992) was found for such inorganic nanocrystals in a size of a few nanometres (e.g. nonlinear optics, semiconductor lasing, and quantum dot applications).

For organic nanocrystals, however, nanocrystals fabrication has so far rarely been investigated, owing to their thermal instability, except for the thermally stable

phthalocyanine and a kind of low molecular weight aromatic compounds which were nanocrystallized by an evaporation method in an inert gas (Granqvist et al., 1976) or by a crystal growth technique in a porous polymer (Matsui et al., 1995). Recently, we have proposed a simple and convenient method for the fabrication of organic nanocrystals, what we call the reprecipitation method (Kasai et al., 1992). In brief, the hydrophobic solution in which hydrophobic compounds dissolved is injected into water, which results in a reprecipitation owing to its insolubility in water to give nanocrystal dispersion. By this method, many kinds of organic compounds such as polydiacetylene (Katagi et al., 1996), phthalocyanine (Yanagawa et al., 1997), perylene (Kasai et al., 1996) and so on can be nanocrystallized successfully. Interestingly, size-dependent optical properties are observed for these organic nanocrystals even in the 100 nm size range, an order of magnitude larger than the scale where the inorganic nanocrystals usually show size-dependent optical properties. These aqueous organic nanocrystals dispersions may have great potential for use in fundamental and applied optics, e.g. as nonlinear optical (NLO) materials having large $\chi^{(3)}$ without optical loss (Kasai et al., 1995) and having easy process ability to other material forms.

Until now, not only the investigation of fundamental optoelectrical properties of organic nanocrystals, but also their interesting physiochemical properties and their peculiar advantages compared to inorganic nanocrystals have been extended to nanomedicine and biophotonics. First we introduce the fabrication technique of organic nanocrystals; the reprecipitation method.

3. Preparation method of organic nanocrystals

3.1 The reprecipitation method

The reprecipitation method, which is a solvent displacement method, was first reported by our research groups (Fig. 1a) (Kasai et al., 1992). It provides a very simple and versatile way to prepare organic nanocrystals dispersions. The method involves a rapid mixing of a small amount of concentrated stock solution of the target compound dissolved in a good solvent with excess of a poor solvent. The great disparity between the solubilities of the target compound in the good and poor solvents, and the good compatibility of the two solvents are essential for this method. The rapid mixing of the stock solution and the poor solvent changes the micro-environment of the target compound molecules. The molecules are exposed to the poor solvent surroundings in a very short time, inducing the nucleation and growth of the molecules to nanocrystals. The size and morphology of nanocrystals can be controlled (Fig. 1b and 1c) by tuning a concentration, temperature, stirring speed, and adding surfactant. Then the precipitation creates nanocrystals dispersed in water. Many kinds of organic compound such as π -conjugate compounds, NLO dyes (Kaneko et al., 2005), fluorescent dyes (Fig. 1d), fullerene (Tan et al., 2008), and several polymers (Ishizaka et al., 2006; Zhao et al., 2009) are candidate for nanocrystals (nanoparticles for polymer). However some kinds of rigid compounds such as phthalocyanine having π - π stack structure are quite hard to be solved in usual organic solvent, thus for the nanocrystal preparation of these attractive functional compound, an advanced preparation technique is required. A supercritical fluid is a candidate for dissolving this problem.

3.2 Supercritical fluid crystallization method

The properties of phthalocyanine are very interesting in both optics and electronics in the fields of nonlinear optics, organic photoconductors, and pigments. Phthalocyanine is known

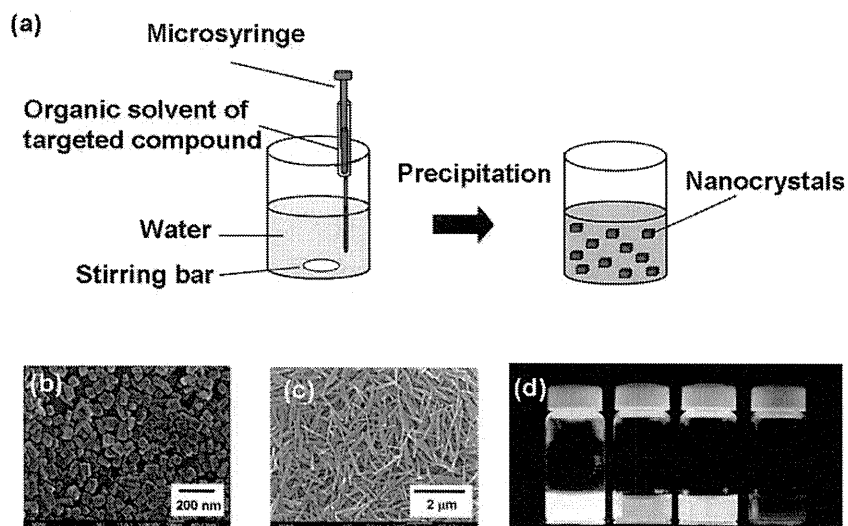


Fig. 1. (a) Scheme of the reprecipitation method. (b,c) Size controlled organic nanocrystals in same compound. (d) Fluorescence images of organic nanocrystals in water.

to have large $\chi^{(3)}$ and ultrafast optical response in the crystalline state (Matsuda et al., 1990).. However, it is almost impossible to make large single crystals of phthalocyanine, because its solubility is very poor in almost all kinds of solvent. Thus, one of the best ways for the application of phthalocyanine crystals would undoubtedly be to make devices with constructed by nanocrystals. Even this, commercial phthalocyanine nanocrystals have been prepared and refined only by the acid-pasting method, and these phthalocyanine nanocrystals have been used as materials for organic photoconductor. However, this method may give rise to environmental problems in the near future due to the use of much sulphuric acid.

On the other hand, supercritical fluid (SCF) has been expected to have a high solubility against insoluble organic compounds, since it shows high solubility under high temperatures and high pressure. Thus, we expected the SCF approach to be an alternative method for making phthalocyanine nanocrystals, instead of the acid pasting method. On the basis of this idea, the use of SCF was examined for the purpose of improving the reprecipitation method. The new method is called supercritical fluid crystallization (SCFC) method (Fig. 2) (Komai et al., 1998). The preparation of phthalocyanine nanocrystals using the SCFC method was used in order to demonstrate this usefulness. The size and modification control of titanly phthalocyanine crystal have been attempted using the reprecipitation method from SCFC. The fabrication *r*-form of titanly phthalocyanine nanocrystals was achieved, which is a hopefully candidate for materials for organic photoconductor. Recently, further application using SCFC method has been developed as new one including several organic pigments and inorganic semiconductors. As shown in this section, the applying the additional outsources energy like SCF to the reprecipitation method is quite useful for extending the preparation possibility of organic nanocrystals. As a further extension, the approach using a microwave irradiation was also demonstrated as a useful procedure for preparing organic nanocrystals.

3.3 Microwave-irradiation reprecipitation method

Recently, as a novel fabrication technique of functional materials, a microwave irradiation process is much noted in the field of organic and inorganic synthesis and nanoparticles. For example, high critical temperature superconductors, mono-dispersed nickel, gold, silver nanoparticles, and organic-metal complexes were successfully prepared by using this technique.

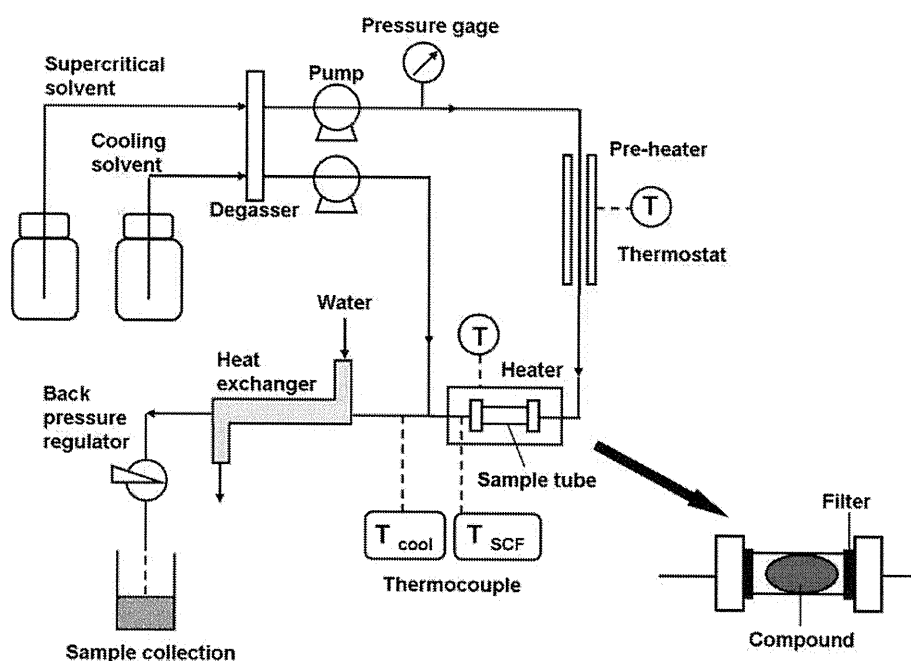


Fig. 2. Scheme of the supercritical fluid crystallization method.

We focused on the unique aspect of microwave at 2.45 GHz. One of the aspects of microwave (2.45 GHz) is that the microwave is well absorbed by water molecule, resulting in effective homogeneous and rapid heating of water is realized. Since nanocrystals are prepared in water environment by the reprecipitation method, we have attempted to apply the microwave-irradiation process to the reprecipitation method for the purpose of fabricating well-defined organic nanocrystals (Fig. 3). Upon microwave-heating was applied to the reprecipitation method, homogeneous and rapid heating increased the homogeneous crystal growth and then the crystallization was completed without particle aggregation. This homogeneous heating resulted in making fine narrow-sized homogeneous nanocrystals dispersed in water (Baba et al., 2000). If the conventional conductive heating such as hot plate heating was used, this gradient heating induced large-sized and random-size distributed crystal growth in aqueous dispersion system.

We demonstrated that the narrow size distributed nanocrystals of TPB, perylene (Fig. 4) (Baba et al., 2000), and DCHD were successfully fabricated within a short time by applying microwave heating just after our conventional reprecipitation procedure. Furthermore, there

was finding that the size and morphology of DCHD nanocrystals and nanofiber were controlled well under using the open- and closed-type vessel (Fig. 5) (Baba et al., 2007a). The next stage of our interest was how to mass produce these attractive organic nanocrystals for the sake of industrial approach.

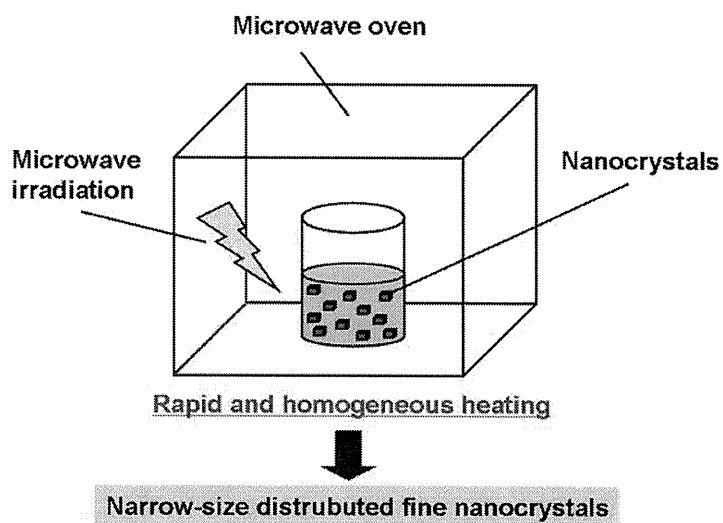


Fig. 3. Scheme of the microwave-irradiation reprecipitation method.

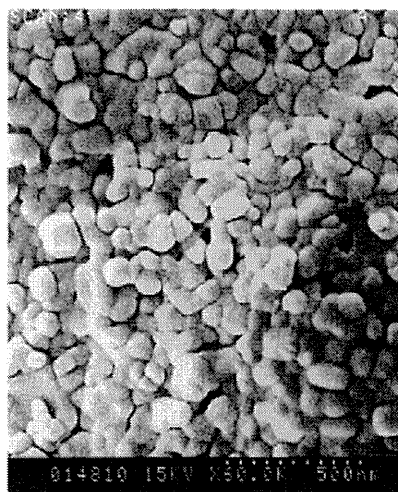


Fig. 4. Perylene nanocrystals prepared by the microwave-irradiation reprecipitation method. (Reprinted from (Baba, et al., 2000): Japanese Journal of Applied Physics. Vol. 39 (2000) pp. L1256-L1258, Part 2, No. 12A, DOI: 10.1143/JJAP.39.L1256. Copyright 2000 The Japan Society of Applied Physics)