

(3)を比較すると、(3)のIC₅₀は、(1)の1/3程度であった。この結果は、官能基のカルボン酸がLOO・消去に影響を及ぼす可能性を示唆している。

水酸化フラレーン：本研究で合成したC₆₀(OH)₂₄のIC₅₀=304.3 uMであったのに対して、MTR社製のC₆₀(OH)_{~24}は、全く消去作用を示さなかった。MTR社製の水酸化フラレーンは、本研究で採用している合成法とは異なり、構造内に相当数のNaが含まれていると予想され、フラレーンの骨格構造が保持されていないのかもしれない。平成24年度、・OH消去作用を測定した結果からは、水酸基数と・OH消去作用に相関性は認められなかった(表2)。一方、LOO・においては、水酸基数が少ない方が低いIC₅₀になる、即ち、水酸基数が少ないほどLOO・消去作用が高い傾向が認められた(図7)。この結果から、LOO・の消去作用は、フラレーン骨格の共役結合が寄与すると考えられた。

・OH消去作用 vs LOO・消去作用：各測定試料における・OH消去作用およびLOO・消去作用を表2に示した。総体的に、・OH消去作用に比べると、LOO・に対する消去作用は低い傾向にあることが明らかになった。中でも、プロリン型誘導体(3)に関しては、他の誘導体と比べて、両ラジカルに対して良好な抗酸化作用を示した。

今後、プロリン型誘導体(3)を用いたフラレーン創薬開発を進めるためには、5-AsA製剤であるサラゾスルファビンやメサラジンが、ベンチマークになると思われる。これら既存薬の薬理的特徴をまとめて表3に示した。測定方法が異なるため、現時点で正確な比較はできないが、スーパーオキサイドは速やかに・OHになることから、・OH消去作用≒スーパーオキサイド消去作用や過酸化水素イオン消去作用と比較できると仮定した場合、プロリン型誘導体(3)のIC₅₀=0.14uMは、既存薬を凌駕/匹敵する消去作用といえる。

平成26年度は、プロリン型誘導体(3)にフォーカスし、薬理学的特徴を明らかにする予定である。

3. 新規な¹⁴C]C₆₀合成方法の検討

昨年度は、先行文献を参照し、アーク放電法を用いて¹⁴C]C₆₀の合成方法を最適化し、高効率なRI合成方法を確立した。研究開始当初、**比放射能=7 μCi/mg**を目標としていたが、最終的に得られた¹⁴C]C₆₀の**比放射能=18.6 μCi/mg** (Total Activity: 198.6 μCi)であり、**収量=11.8 mg**であった。先行文献と比較して、20倍効率良く¹⁴C]C₆₀を合成することに成功した。

しかしながら、アーク放電法を用いた場合、大きく2つの課題があった。① ¹⁴Cを含む中間体であるフルフルアルアルコールポリマー由来の¹⁴Cは、C₆₀を形成する過程で、炭素棒由来の¹²Cに希釈されるため、比放射能の値を高めることが難しい。② アーク放電に用いるチャンバー内に生成した¹⁴C]C₆₀を含む煤は、二硫化炭素(CS₂)で100%回収することは難しい。また、CS₂は比較的沸点(46.3℃)が低いこともあり、CS₂が蒸発する際に残存している¹⁴Cも一緒に蒸発・飛散し、管理区域内の¹⁴C濃度が増加してしまう。以上のことから、RI管理区域内を汚染させることなく、より高い感度で薬物動態試験を行うために、より安全な方法で、今よりも高い比放射能を有する¹⁴C]C₆₀の合成方法を検討する必要があった。

本年度は、上記課題を解決するため、C₆₀H₃₀を前駆体としてC₆₀を全合成する論文³⁾を参照し、¹⁴C]C₆₀の合成を試みることにした。現時点においては、COLDの3-PPAを用いて、Truxene~中間体I~中間体IIの合成方法の最適化を検討している。引き続き、平成26年度も検討を続け、¹⁴C₃]C₅₇の全合成を目指す予定である。文献情報から、3-PPAからC₆₀への合成効率は、約20%であると考えられるため、合成効率20%以上を目標値として合成方法を検討している。

E. 結論

細胞障害性、抗酸化・抗炎症作用の観点から、最も優れていたプロリン型誘導体(3)に着目し、

プロリン型誘導体(3)を2回合成し、IR、¹H-NMR、LC/MS等の分析を行うことにより、ロット間の品質比較を行った。また、市販品のプロリン型誘導体(3)である C₆₀ Pyrrolidine tris-acid と品質を比較した結果、本事業で合成したプロリン型誘導体(3)は、市販品と比較すると総体的に純度も高く、目的構造を有する化合物が多く合成されていた。しかしながら、いずれのロットにおいても不純物が 30~40%含まれるため、医薬品原体としての物性を正確に評価するためには、不純物の除去・目的物の高純度化が今後の課題である。

ESR を用いて、脂質ペルオキシラジカル (LOO·)に対する消去作用を測定し、昨年度の結果と比較することにより、ラジカル種と消去作用の関係を考察した結果、フラレーン誘導体、一般的な抗酸化物質、抗酸化をメカニズムとする既存薬は、いずれも LOO·よりも・OHに対する消去作用の方が優れていた。水酸化フラレーン誘導体による・OH 消去作用と水酸基数の間に相関性は認められなかったが、LOO·の場合には、水酸基が増加することによりラジカル消去作用が低下する傾向が認められたことから、LOO·の消去作用は、フラレーン骨格に存在する共役結合に依存することが示唆された。プロリン型誘導体(1)および(3)による LOO·消去作用を比較した結果、フラレーン誘導体の官能基に含まれるカルボン酸の数も LOO·消去作用に影響を与える可能性が示唆された。

フラレーン骨格に¹⁴C を導入した¹⁴C₆₀の合成方法の確立を試みた結果、先行文献よりも約 20 倍以上効率よく、¹⁴C を C₆₀へ導入することに成功した (比放射能 = 18.6 μCi/mg, Total Activity = 198.6 μCi, 収量 = 11.8 mg)。本研究では、Ba¹⁴C₃O₃を出発原料として、アーク放電法を用いて¹⁴C₆₀を合成したが、本方法では、アーク放電チャンバー内で生成した¹⁴C₆₀を含む煤を二硫化炭素で溶解・回収する過程で¹⁴C汚染が生じる、またアーク放電法を用いた場合には、現状以上に比放射能の高い¹⁴C₆₀を合成す

ることは困難である。そのため、¹⁴C]-3-フェニルプロピオン酸を出発原料として、全合成で¹⁴C₆₀を合成すべく、合成方法の最適化に着手した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

なし

【総説・その他】

なし

② 学会発表

【シンポジウム等：合計 0 件】

なし

【国内学会発表：合計 5 件】

1. 吉岡靖雄, 平 菜由, 山下浩平, 青島央江, 角田慎一, 中山博之, 藤尾 慈, 小久保 研, 大島 巧, 大江知之, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤康央: 新規経口ナノ DDS 医薬の開発に向けた C₆₀ フラレーン誘導体の Nano-Safety Design., 第 29 回日本 DDS 学会, 京都, 2013 年 7 月.
2. T. Tadai, K. Akiyama, R. Ibuki, H. Aoshima, S. Kubuki: Synthesis of ¹⁴C labeled C₆₀ with higher specific activity., APSORC2013., 金沢, 2013 年 9 月.
3. 吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎, 佐上公一, 植村瑛一郎, 角田慎一, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 大江知之, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: 新規ナノ医薬の開発に向けた C₆₀ フラレーンの T 細胞への影響評価., 日本薬学会 第 134 年会., 熊本, 2014 年 3 月.
4. 植村瑛一郎, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 高橋秀樹, 宇高麻子, 佐上公一, 角田慎一, 青島央江,

小久保 研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: エンドトキシンショックモデルマウスにおける水酸化 C₆₀ フラーレンの抗炎症効果., 日本薬学会 第 134 年会., 熊本, 2014 年 3 月.

5. 佐上公一, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 高橋秀樹, 宇高麻子, 植村瑛一郎, 角田慎一, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: グルコース修飾 C₆₀ フラーレンの *in vitro* における抗炎症作用の解析., 日本薬学会 第 134 年会., 熊本, 2014 年 3 月.

首都大学東京大学院 理工学研究科 助教 秋山和彦 先生

理化学研究所 有機光電子工学研究チーム リーダー 田島右副 先生

FLOX 株式会社 重光靖郎 先生、小幡信允 様
ビタミン C60 バイオリサーチ(株) 山名修一 代表取締役、林源太郎常務取締役、伊吹リン太 技術顧問、長島一男 研究員、伊藤雅之 研究員、兵頭小百合 研究員、村上美緒 研究員

【国際学会発表：合計 0 件】

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

発明の名称：炎症性腸疾患の予防または治療剤と新規フラレン誘導體

出願日：平成 25 年 2 月 19 日

国際出願：平成 26 年 2 月 19 日

出願番号：特願 2013-030455

国際出願番号：PCT/JP2014/053950

発明者：堤 康央、吉岡 靖雄、東阪 和馬、増野匡彦、大江 知之、山名 修一、青島 央江

出願人：国立大学法人大阪大学、ビタミン C60 バイオリサーチ株式会社、増野匡彦、大江知之

② 実用新案登録

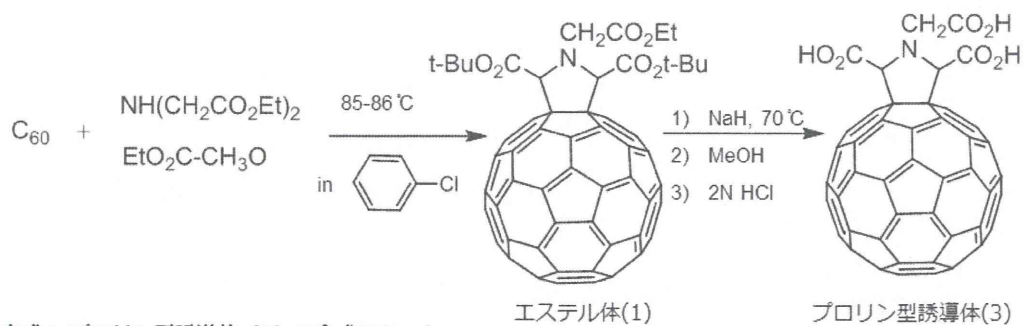
なし

その他

特記事項なし

研究協力者

東邦大学薬学部副薬学部長 薬剤学教室 教授
寺田勝英 先生



反応式1. プロリン型誘導体 (3) の合成スキーム

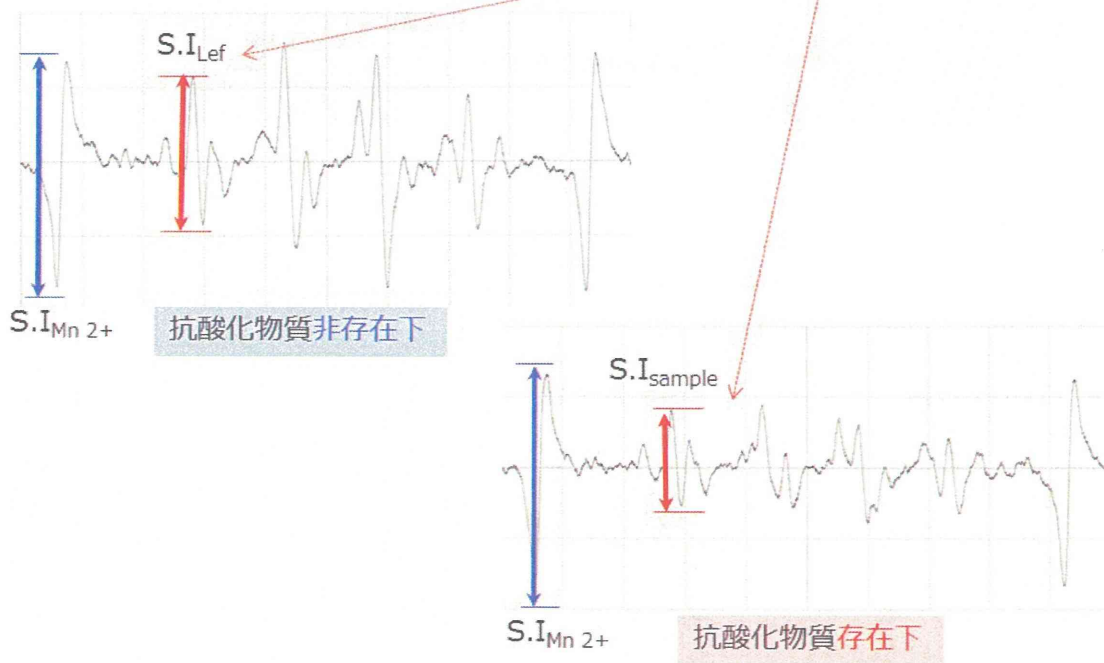
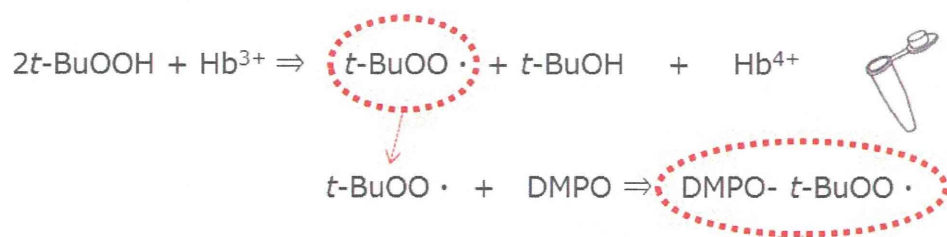


図1. 脂質ペルオキシラジカルの生成およびESRによる検出

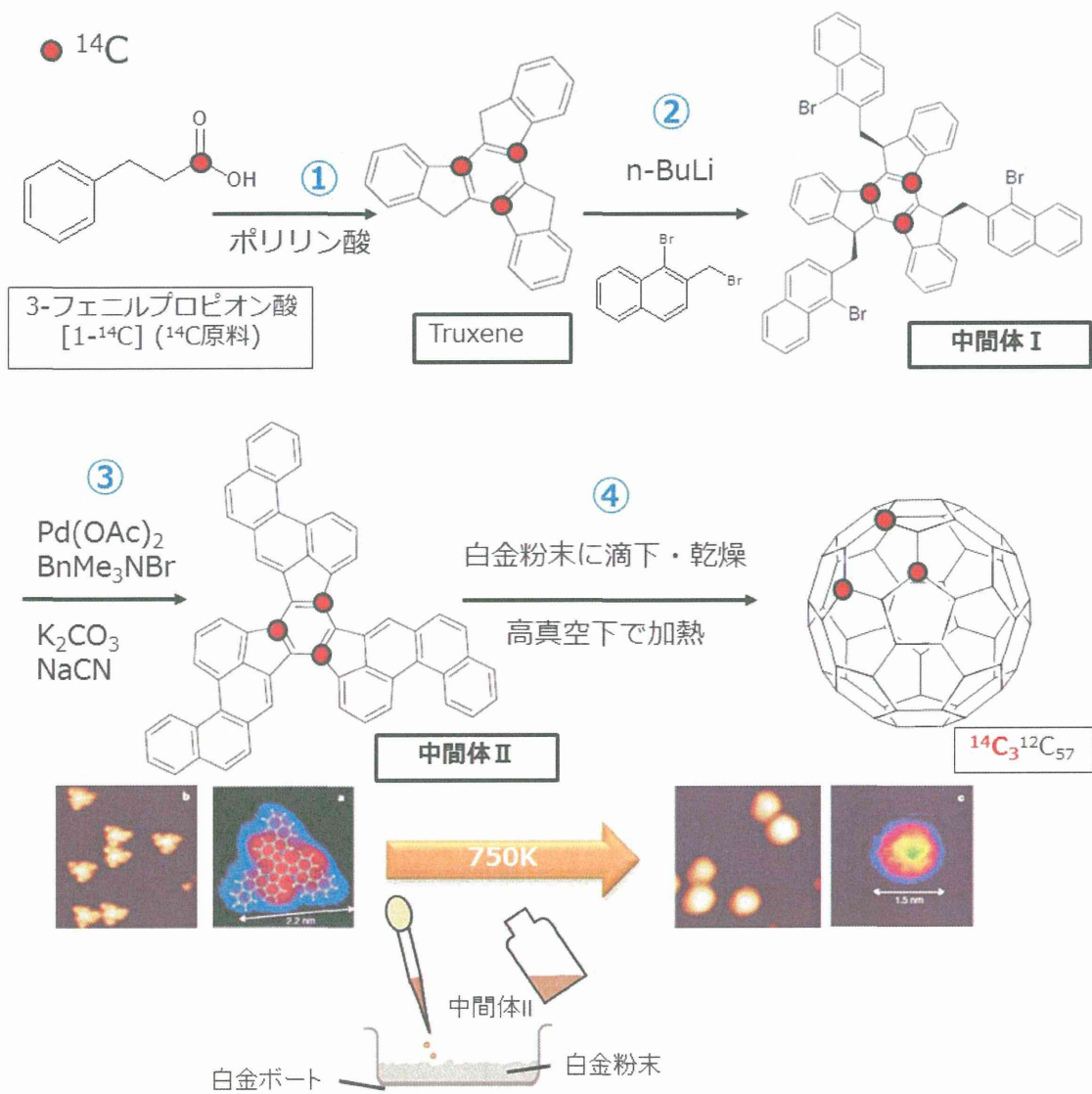
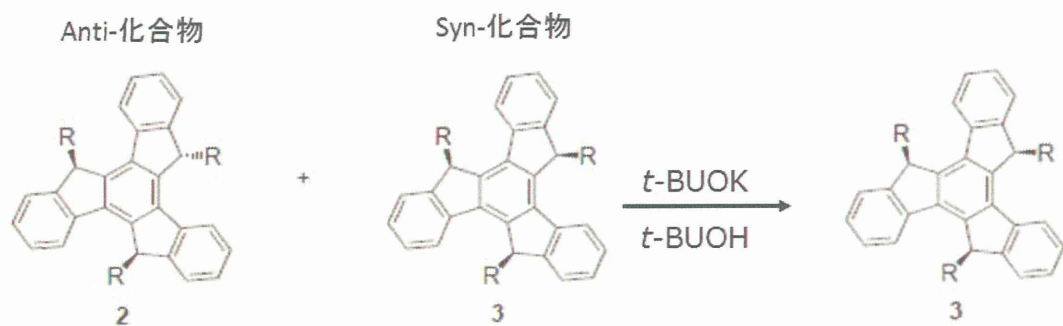


図2. 3-フェニルプロピオン酸 \rightarrow [$^{14}\text{C}_3$] $^{12}\text{C}_{57}$ の合成プロセス概略図



反応式2. 中間体 I : anti-化合物 \rightarrow syn-化合物

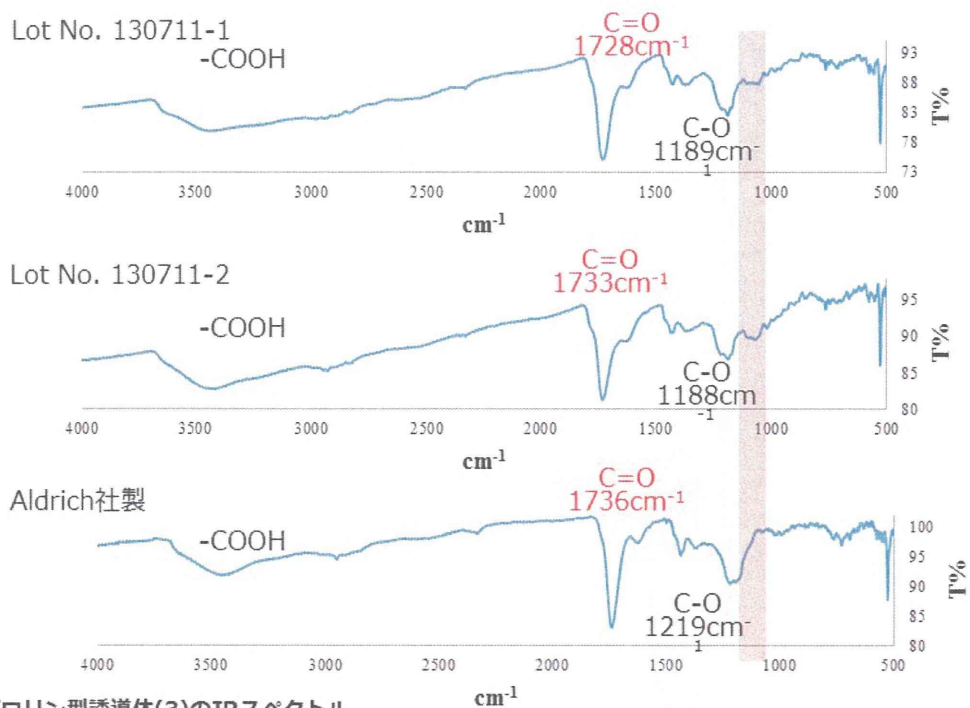


図3. プロリン型誘導体(3)のIRスペクトル

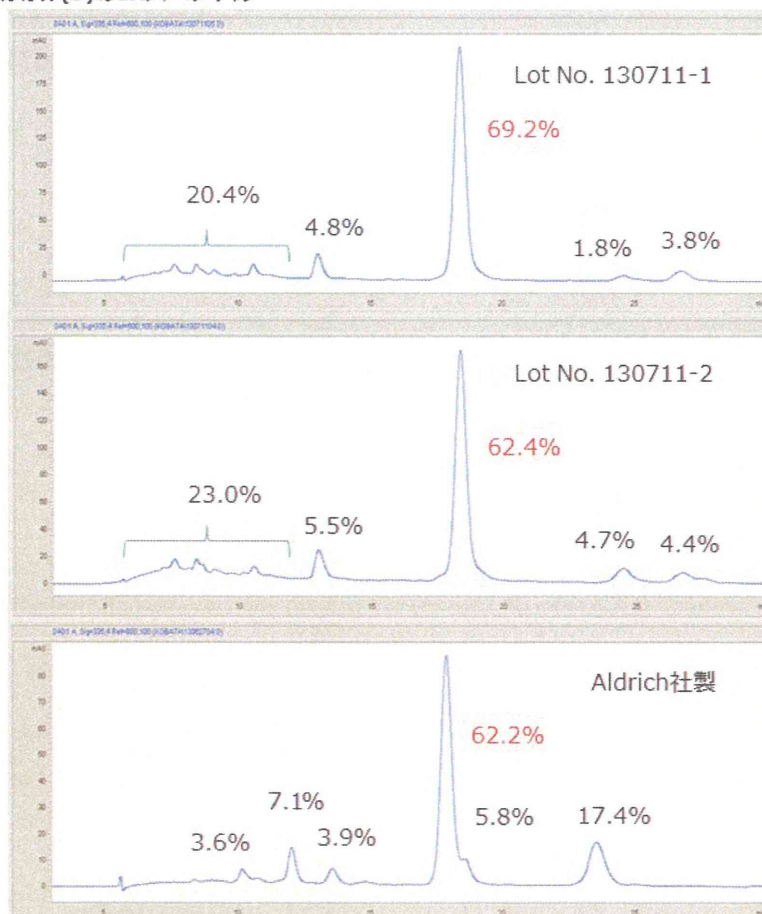


図4. プロリン型誘導体(3)のLCチャート

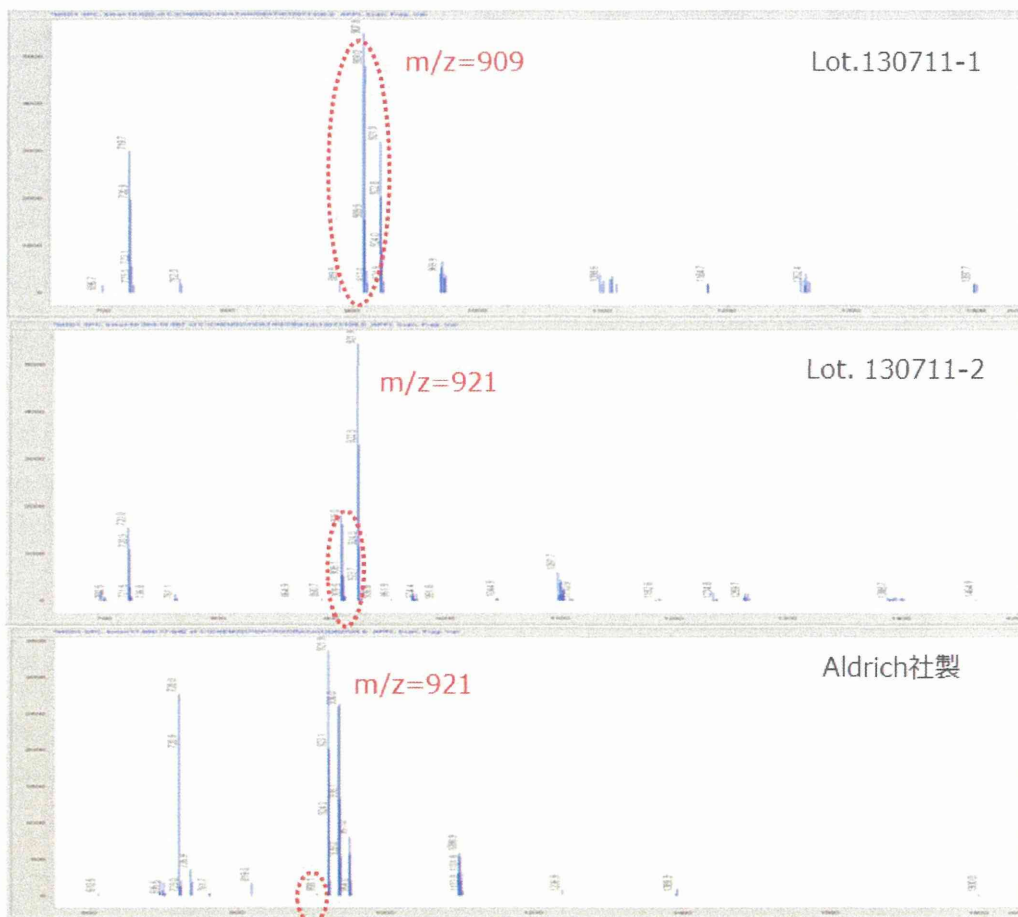


図5. プロリン型誘導体(3)のMSスペクトル

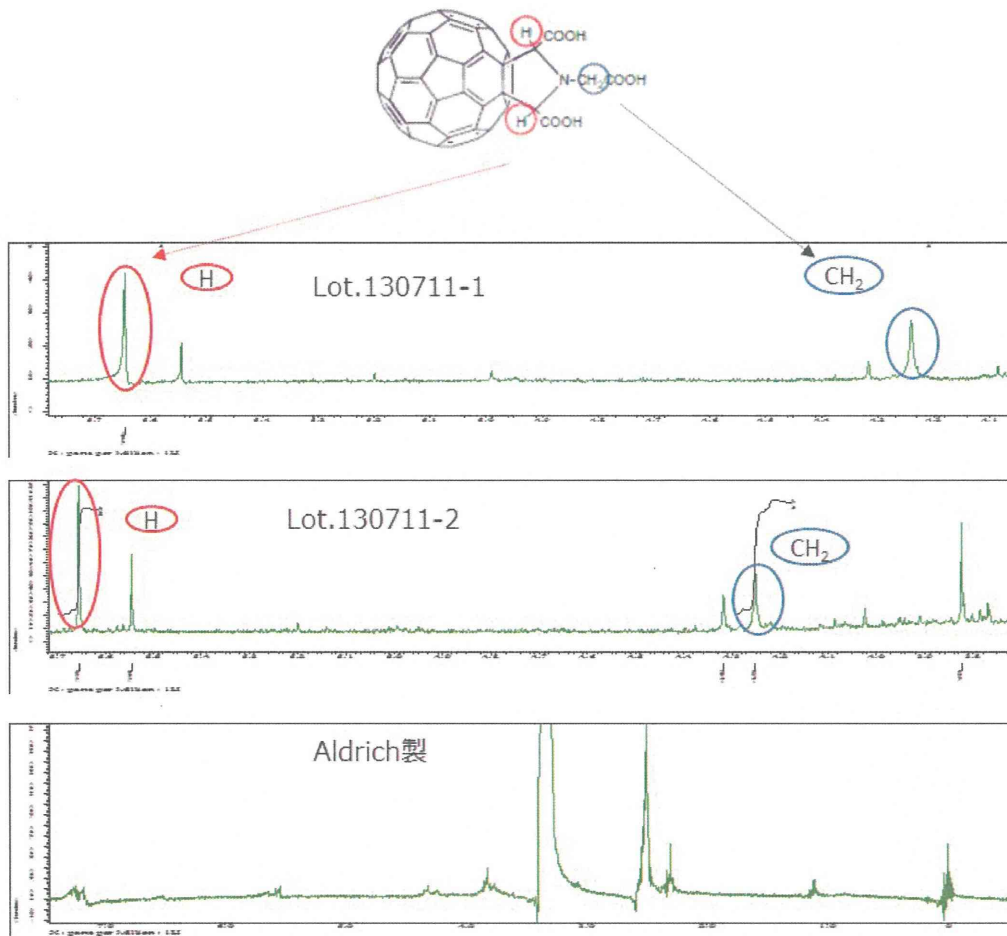


図6. プロリン型誘導体(3)の¹H-NMR

表1. 脂質ペルオキシラジカル消去作用：各測定試料におけるIC₅₀

| 分類 | 化合物 | IC ₅₀ (mM)±標準誤差 |
|----------|---|----------------------------|
| 水酸化フラーレン | C ₆₀ (OH) ₄₄ | 3208.8±547.2 |
| | C ₆₀ (OH) ₄₀ | 2754.8±43.5 |
| | C ₆₀ (OH) ₃₆ | 2454.8±43.5 |
| | C ₆₀ (OH) _{~24} (MTR社製) | 消去作用なし |
| | C ₆₀ (OH) ₂₄ | 304.3±22.1 |
| | C ₆₀ (OH) ₁₂ | 94.02±4.9 |
| プロリン型誘導体 | プロリン型(1) | 658.0±3.46 |
| | プロリン型(3) (Lot.130711-2) | 227.2±20.6 |
| | プロリン型(3) (Aldrich社製) | 443.1±26.0 |
| 比較対照 | 5-ASA | 消去作用なし |
| | NAC | 消去作用なし |
| | エダラボン | 55.48±3.71 |
| | アスコルビン酸 | 消去作用なし |

表2. 各測定試料における・OHおよびLOO・消去作用：IC₅₀の比較

| 分類 | 化合物 | ・OH消去作用 IC ₅₀ (mM)±標準誤差 | LOO・消去作用 IC ₅₀ (mM)±標準誤差 |
|--------------|--|---------------------------------------|--|
| 水酸化 フラーレン | C ₆₀ (OH) ₄₄ | 33.73±1.83 | 3208.8±547.2 |
| | C ₆₀ (OH) ₄₀ | 85.9±1.32 | 2754.8±43.5 |
| | C ₆₀ (OH) ₃₆ | 9.80±0.12 | 2454.8±43.5 |
| | C ₆₀ (OH) _{~24} (MTR社製) | 38.66±0.58 | 消去作用なし |
| | C ₆₀ (OH) ₂₄ | 1.01±0.01 | 304.3±22.1 |
| | C ₆₀ (OH) ₁₂ | 7.83±0.16 | 94.02±4.9 |
| プロリン型 誘導体 | プロリン型(1) | 0.18±0.01 | 658.0±3.46 |
| | プロリン型(3) | 0.14±0.004 | 227.2±20.6 |
| 比較対照 | 5-ASA | 消去作用なし | 消去作用なし |
| | NAC | 消去作用なし | 消去作用なし |
| | エタラボン | 31.06±0.02 | 55.48±3.71 |
| | アスコルビン酸 | 210.8±24.4 | 消去作用なし |
| | PVP包接C ₆₀ | 7.80±0.46 | 消去作用なし |

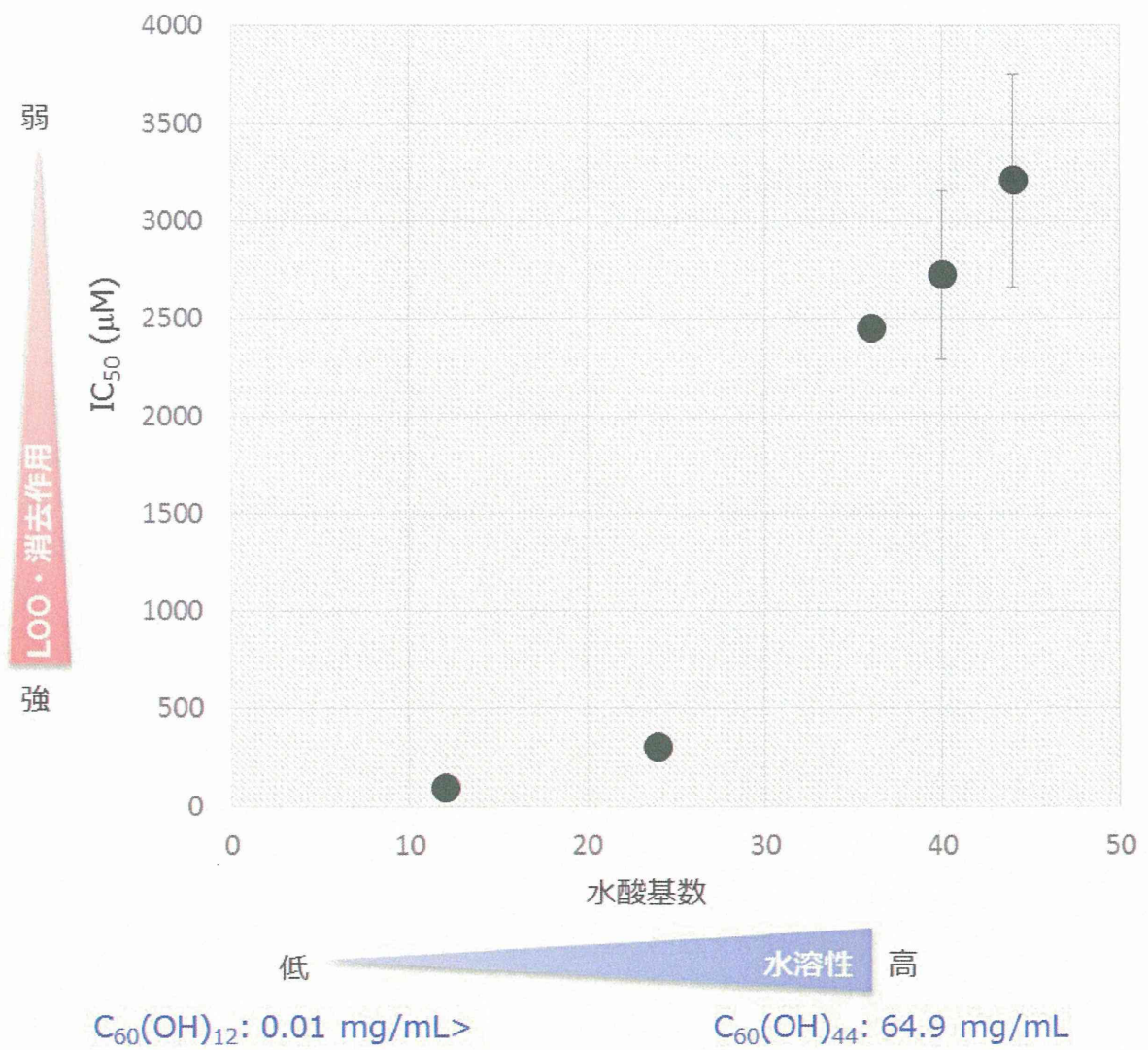
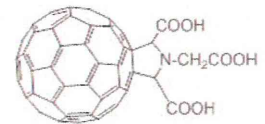
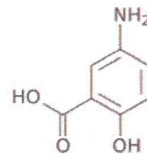
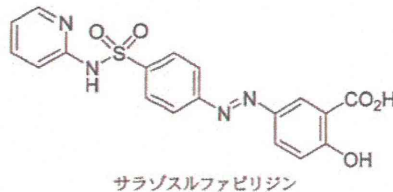


図7. 水酸化フラーレン中の平均水酸基数に対するIC50のプロット

表3. 炎症性腸疾患の既存治療薬の薬理学的特徴

| 試験項目 | 被験薬 | サラゾスルファピリン | メサラジン | プロリン型誘導体(3) |
|---|-----|--|---------------------------|----------------------------|
| DPPH還元作用 | | 消去作用なし | IC ₅₀ =9.5 mM | |
| スーパーオキシド消去作用 (チトクロームC還元法) | | 100 mMで 37.6%消去 | 消去作用なし | |
| 過酸化水素イオン消去作用 | | 消去作用なし | IC ₅₀ =0.7 mM | |
| 次亜塩素酸イオン消去作用 | | 150 mMで 57.5%消去 | IC ₅₀ =37.0 mM | |
| 過酸化脂質抑制作用 (Buege & Aust法) | | 消去作用なし | IC ₅₀ =12.6 mM | |
| 脂質ペルオキシラジカル 消去 | | データなし | データなし | IC ₅₀ =227.2 mM |
| LTB ₄ 生成抑制作用 (ラット腹腔好中球 (EIA法)) | | 1×10 ⁻⁴ Mの抑制率 =23.5% 1×10 ⁻³ Mの抑制率 =82.7% | IC ₅₀ =44.9 mM | |



研究成果の刊行に関する一覧表

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 |
|----------------------|---|--|-------------------------|--------|-----|------|-------|
| 東 阪 和 馬 , 堤 康央 | 安全・安心な最先端医薬としてのDDS開発とレギュラトリーサイエンス-ナノDDSの安全性評価・確保の現状と今後. | 寺田 弘, 中川晋作, 辻 考三, 牧野公子, 絹田精鎮, 西野 敦. | 応用が広がるDDS 人体環境から農業・家電まで | NTS 出版 | 日本 | 2013 | 140-5 |

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 |
|---|--|----------------------------------|----|-----------|------|
| Kokubo K, Masuda H, Ikuma N, Mikie T, Oshima T. | Synthesis and characterization of new acetalized [60]fullerenes | Tetrahedron Lett. | 54 | 3510-3513 | 2013 |
| Nakamura Y, Ueno H, Kokubo K, Ikuma N, Oshima T. | Magic number effect on cluster formation of polyhydroxylated fullerenes in water-alcohol binary solution | J. Nanopart. Res. | 15 | 1755-1762 | 2013 |
| Ueno H, Kokubo K, Nakamura Y, Ohkubo K, Ikuma N, Moriyama H, Fukuzumi S, Oshima T. | Ionic conductivity of $[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{PF}_6^-)$ in organic solvents and its electrochemical reduction to $\text{Li}^+\text{@C}_{60}^{\bullet-}$ | Chem. Commun. | 49 | 7376-7378 | 2013 |
| Yasuda D, Takahashi K, Ohe T, Nakamura S, Mashino T. | Antioxidant activities of 5-hydroxyoxindole and its 3-hydroxy-3-phenacyl derivatives: the suppression of lipid peroxidation and intracellular oxidative stress | Bioorg Med Chem | 21 | 7709-7714 | 2013 |
| Kokubo K, Yamakura S, Nakamura Y, Ueno H, Oshima T. | Radical-scavenging ability of hydrophilic carbon nanoparticles: from fullerene to its soot | Fuller. Nanotub. Carbon Nanostr. | 22 | 250-261 | 2014 |
| Ikuma N, Inaba S, Kokubo K, Oshima T. | First synthesis and aggregation behavior of periconjugated triazoliumfullerene | Chem. Commun. | 50 | 581-583 | 2014 |

| | | | | | |
|--|--|---------------------|----|---------|------|
| Kobayashi K, Kokubo K, Yudasaka M, Yasuda H. | Effect of functional group polarity on the encapsulation of C ₆₀ derivatives in the inner space of carbon nanohorns | Carbon | 68 | 346-351 | 2014 |
| Funakoshi-Tago M, Tsukada M, Watanabe T, Mameda Y, Tago K, Ohe T, Nakamura S, Mashino T, Kasahara T. | Effect of chemical modification on the ability of pyrrolidinium fullerene to induce apoptosis of cells transformed by JAK2 V617F mutant. | Int Immunopharmacol | 20 | 258-263 | 2014 |
| 小久保 研 | 分子軌道論を援用した高溶解性フラーレン多付加体の開発 | 生産と技術 | 65 | 76-80 | 2013 |

応用が広がる DDS

人体環境から農業・家電まで

編著 寺田 弘
中川 晋作
辻 孝三
牧野 公鎮
絹田 精敦
西野 敦



NTS

安全・安心な最先端医薬としての DDS 開発とレギュラトリーサイエンス

■ ナノ DDS の安全性評価・確保の現状と今後

1. はじめに

近年のナノテクノロジー (Nanotechnology) の発展に伴い、フラーレンやナノ酸化チタンといったナノマテリアルの開発と実用化が世界的に進展している。このうち、フラーレン (C60) やカーボンナノチューブ (CNT) に関しては、日本が多くの物質特許、用途特許を保有しており、カーボン系ナノマテリアルに対する日本の期待は特に計り知れないものがある。最近では、安全性に懸念が残る CNT に代わる素材として、フラーレンを CNT 様に加工し、フラーレンナノウィスカーやフラーレンナノチューブといった鉄を含まないものまで、日本で開発されている。最近では、分子とナノマテリアルとのちょうど中間サイズ、大きさだけで見ると、アルブミンや抗体サイズのサブナノマテリアル (1 nm~10 nm の粒径) までが台頭し、分子の特性と粒子 (ナノマテリアル) の特性を併せ持ったものまでが実用化されつつある。一般に、少なくとも一次元が 100 nm 以下の素材であるナノマテリアルは、従来までのサブミクロンサイズ (数百 nm) 以上の素材と比較して、①粒子径の減少に伴う組織浸透性の増大、②従来素材とは異なる生体内動態、③比表面積増大による薬物吸着能の増大など、医薬品素材として革新的機能を発揮する。したがって、薬学・医学分野において、21 世紀産業の根幹を担う素材として期待され、ドラッグデリバリーシステム (薬物送達法・薬剤伝達法: DDS) への応用による、ナノ医薬 (ナノメディシン) ともいうべき新たな治療戦略への展開が図られている。たとえば、悪性腫瘍を標的とした「ナノリボソーム製剤」や「高分子ナノミセル」は、がん組織への薬物送達効率や標的組織へ

の浸透性、標的細胞内への導入効率などの点で、がん治療に劇的な革新をもたらすものと有望視されている。さらに、このナノ医薬の台頭は、従来までの低分子医薬品やサブミクロン素材では得られなかった画期的な薬理活性を発揮するナノ医薬品シーズとしても期待され、次世代医薬の筆頭として注目されている。すなわち、薬物担体 (ナノキャリア) としての展開のみならず、昨今では、主剤 (主薬) がナノマテリアルである、狭義のナノ医薬も開発が進んでいる (HIV や肝炎ウイルス、リウマチなどに対してフラーレンの応用が期待されている)。しかしながら、医薬品開発においては、製剤の物性・品質と安全性の担保が必要不可欠であることはいうまでもない。特に、iPS 細胞を含めた細胞医薬、抗体やサイトカインといったタンパク医薬、ナノ医薬、遺伝子・核酸医薬、もちろん、DDS 医薬といった最先端医薬品には有効なのは当たり前で、これまで以上に、品質の確かさや高度なまでの安全性が要求されてくる。この点、いわゆる、医薬品の承認・審査、レギュラトリーサイエンスの遅れも当然の課題ながら、ナノ医薬の根幹をなすナノマテリアルの定義すらいまだ曖昧であるとともに、物性・品質と有効性・安全性の連関評価もほとんど進展していない。そのため、ナノマテリアルの安全性評価研究は、世界的に見ても不十分であり、欧米ではナノマテリアルの影の部分 (ハザード) ばかりが注目され、その結果、残念なことに、光の部分であるナノ医薬品の開発が遅れてしまっている。周知のとおり、医薬品の安全性は、そのものが持つ毒性 (ハザード) と曝露される時間・量の積算 (リスク) によって運命づけられ (ハザードだけでは議論できない点にご留意頂きたい)、ベネフィットとの兼ね合いの中で、その実用化や利用方法が決まっていく。本観点から筆

2. ナノ DDS 医薬品開発の現状

者らは、ナノ医薬の開発を推進するべく、ナノマテリアル投与により誘発される生体影響とナノマテリアルの物性、細胞内・体内動態との連関を解析し、体系化 (Nano-Safety Science ; ナノ安全科学) していくことで、ナノ医薬の品質や有効性/安全性の担保など、Nano-Safety Design (ナノ最適デザイン) に適う基盤情報の収集を図っている (図 1)。すなわち、ナノ医薬品の開発に向けては、単に細胞傷害性を検討して、安全性を議論するようなことはやめ、科学的根拠に基づいたナノマテリアルの安全性情報を幅広く収集し、これら情報を基盤として、有効かつ安全なナノマテリアルを設計していくことが今後のキーポイントとなろう。これが、Sustainable Nanotechnology とも呼ぶべき、次世代のナノ DDS 研究と位置づけられる。そこで本総説では、まだまだ世界的に未成熟ではあるが、ナノ医薬品開発の現状について紹介するとともに、ナノ医薬品の開発に必須であるナノマテリアルの安全性確保に向けてわれわれが推進しているナノ安全科学研究について、緒についたばかりの最新の知見に少し触れてみたい。

近年、医薬品や化粧品、食品といったヒトが直接曝露される領域で、非晶質ナノシリカなど、従来素材と比較して有用性が向上あるいは新たな機能を獲得したナノマテリアルの開発が急速に進んでおり、すでに実用化までもが世界的に進展している。一次元が 100 nm 以下の素材であるナノマテリアルは、サイズや形状、比表面積などの点で、従来までのサブミクロンサイズ以上 (数百 nm 以上) の素材とは一線を画した特徴的な物性を持ち、この特徴的な物性を反映して低分子化合物やタンパク質 (抗体・サイトカインなど) では得られなかった画期的な薬理活性を発揮するナノ医薬品シーズになるものと期待されている。蛇足ではあるが、いわゆる、サブナノ素材 (0.1~10 nm) もすでに台頭してきており、まさに目が離せなくなっている。これらナノマテリアルの画期的機能は、ナノ医薬としての主薬あるいはナノ添加剤としてだけでなく、薬物治療の最適化

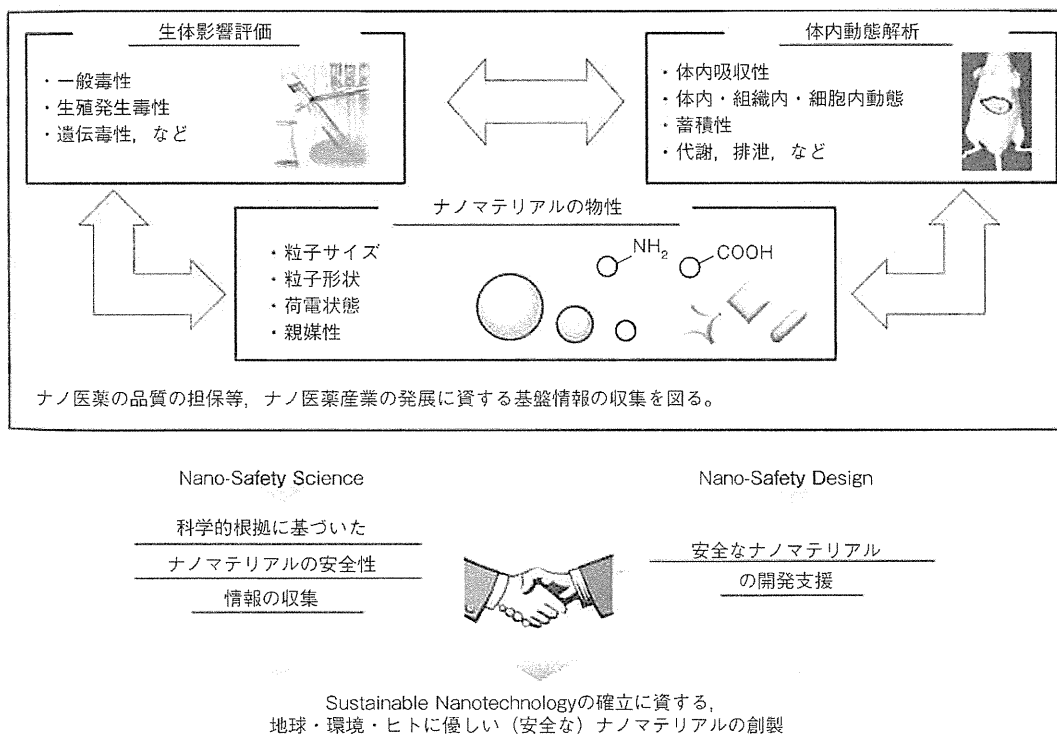


図 1 ナノ安全科学研究

が
て
の
っ
と
れ
し
ナ
ん
し
な
と
も
サ
伝
先
上
れ
査
が
す
効
い
。
世
ア
の
品
曝
び
意
そ
筆

を目指した DDS への応用も期待されている。ナノマテリアルを薬物の送達物質（キャリア）として用いるナノ DDS 医薬品開発は、2000 年頃から急速に進展している。本国においては、日本発の医薬品向けのナノマテリアル開発を目指す「ナノメディシン・プロジェクト」を厚生労働省が指定型プロジェクトとして推進するなど、ナノ医薬品の開発・研究が進行している。

現在、日本では 10 製品のナノ DDS 医薬品が上市されており、用いられるナノ素材としては、主に、リポソームや水溶性高分子、高分子ミセルなどが挙げられる。これらのナノ素材は、①水溶性の高分子に薬物を化学的に結合させる方法、②高分子の集合体に薬物を包み込ませる方法、③脂質二重膜小胞に薬物を内包する方法、などにより薬物を標的部位へと到達させ、現在では主に抗がん剤に対する適用が進んでいる。さらに最近では、金属ナノ粒子のように古くから使用されていた素材を 100 nm 以下に微小化した素材や、フラーレンやカーボンナノチューブをはじめとするナノカーボン素材のように、新たに考案・開発された素材を応用したナノ医薬品の開発研究が進展しつつある。これらは、その調整の容易さや粒子表面修飾の多様性を有することから、各種リガンド・抗体を用いたターゲティング能の付加による治療効果増大・副作用低減を目指した試みも精力的になされている。今後、既存のナノ素材をより洗練させるだけではなく、新規ナノマテリアルの開発が進むことで、ナノ DDS 医薬品産業の目覚ましい発展が期待される。本稿では、紙面の都合上、新規ナノ DDS 医薬として期待されているナノカーボン素材について概説したい。

ナノカーボン素材は、炭素間結合を介す長い電子共役系を持つなど特殊な物性を有し、高い薬物保持能や生体内安定性、柔軟な構造（表面修飾の容易さ）といった、DDS 素材としてきわめて有望な性質を発揮する。そのため、前述したように、これらナノカーボン素材を用いた DDS 医薬の開発が注目を浴びており、その特性を活かした、低分子医薬、タンパク質医薬、核酸医薬の送達キャリアとしての開発が前臨床段階ではあるものの、世界中で進められている。たとえば、カーボンナノチューブ（直径は数 nm と細く、その長さはマイクロメートルからミリメートルまで多様に存在する）やカーボンナノホーン（直径 2~5 nm、長さが 40~50 nm のチューブ状

構造を示す）は、グラファイトからなるナノカーボン素材であり、薬物内包素材・ターゲティング素材として医療・薬学分野でその応用が期待されている。これらの素材は、いずれも内腔を持つ特殊な構造を有するため、表面だけではなくその内腔に薬物を保持させ、徐放化を試みる検討が進められている。湯田坂らは、カーボンナノホーンに内包されたシスプラチンが数十時間をかけて徐放され、顕著な抗がん作用を示すことを報告している¹⁾。このように、腫瘍組織、炎症組織や細胞内リソソームなど低 pH 環境において薬剤が放出されるといった DDS 機能を有するナノカーボン素材の開発も進められている。

ナノテクノロジー産物としてのフラーレン（直径 1 nm 程度）は、グラファイト、ダイヤモンドに次ぐ第三の炭素同素体であり、その革新的有用機能を活用し、美白剤・老化防止剤などとして広く実用化されている。フラーレンは中空の球状構造を有するため、原子を内包することが可能であり、金属元素を内包したものは金属内包フラーレンと呼ばれる。これまでに、セシウムやガドリニウムなどを内包したフラーレンが得られており、MRI の造影剤などへの応用研究が進められている。また、ナノカーボン素材特有の長い電子共役系によって、光照射で励起され、活性酸素を効率よく発生する光増感物質としての性質を有することが知られている。この性質は、がんの光線力学的治療法、フォトダイナミックセラピーに応用することが可能であり、田畑らはこの性質を利用し、*in vivo* において顕著な腫瘍退縮効果が得られることを報告している²⁾。さらに、従来薬とは全く異なった作用点での抗ウイルス活性（酵素阻害活性）や抗菌活性、さらにはラジカルスポンジと呼ばれるほど圧倒的な抗炎症活性（抗酸化活性；活性酸素・ラジカル消去活性）を有しており、活性酸素が原因となり発症・悪化する各種炎症性疾患への適用も進められている。この点において筆者らは、C60 フラーレンの修飾体が、炎症性腸疾患の代表的モデルマウスであるデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発大腸炎モデルマウスに対し、顕著な治療効果を発揮可能であることを先駆けて明らかとしている。その詳細な作用機序については明らかとなっていないが、C60 フラーレンの修飾体が ROS などの酸化ストレス因子の産生、炎症性サイトカインの分泌を抑制する可能性を見出している。

現在、より有効な炎症性腸疾患治療薬の開発を目指し、腸管吸収性や体内動態について詳細に評価することで、腸管で最も効果を示す製剤形態などの有効性情報を収集するとともに、より高い抗酸化作用を有する他のフラレン誘導体の探索を推進している。

3. ナノマテリアルの安全性に関する懸念

このように、ナノ医薬品の開発研究は世界的にも盛んに進められているが、世界的に見てもナノ医薬品の成功例はさきわめて少ない。ナノ医薬品におけるボトルネックは、ナノマテリアル特有の画期的な機能が、逆に、二面性を呈してしまい、予想外の部位で未知の副作用(NanoTox)を発現する可能性を有することである。たとえば、先に紹介したカーボンナノチューブが、アスベストと同様に悪性中皮腫や肺がんなどを誘発してしまう可能性³⁾や、フラレンが体内に侵入した後、循環血中を介して脳組織へ移行し、障害性を示す可能性⁴⁾、などが指摘されている。しかしながら、ナノ医薬品の根幹をなすナノマテリアルの安全性評価研究に関して、現状では、細胞毒性や遺伝毒性といった一部のハザード研究しかされておらず、世界的に見ても不十分かつ科学的根拠に乏しいため、ナノ医薬品の開発が遅れている1つの要因となっている。本観点から筆者らは、これまでに、有効なナノ医薬品として応用可能なナノマテリアルのスクリーニングを実施するとともに、ナノマテリアルの有効性と物性、安全性との連関評価を推進してきた。たとえば、さまざまなナノマテリアルを用いたスクリーニングにより、細胞内への薬物送達キャリアとして期待される非晶質ナノシリカが、①抗体産生誘導能の強い表皮の樹状細胞サブセットに局在する傾向を持ち、さらにその活性化などを引き起こすこと⁵⁾、②経鼻投与することで抗原特異的免疫誘導能を示すこと⁶⁾から、ナノマテリアルの経皮抗原キャリア・経鼻粘膜ワクチンキャリアとしての可能性を有すること、などを見出してきた。さらに、これまでの検討から、ナノマテリアルは、従来までの低分子医薬品やサブミクロン素材とは決定的に異なる体内・細胞内動態特性を有することを明らかとしている。一方で、ナノマテリアルの体内・細胞内での動態特性や有効性・安全性は、①

粒子サイズ(一次粒子径、二次粒子径【分散・凝集】)、②粒子形状(球状、針状など)、③荷電状態(表面電荷)、④水溶性・脂溶性といった親媒性(親水-疎水バランス)の4つのパラメータにより規定される⁷⁾などの知見を得ている。そこで、筆者らが推進してきたナノ安全科学研究の中から、非晶質ナノシリカを用いた先行研究について紹介したい。

非晶質ナノシリカ(微粒二酸化ケイ素)は、局法においては従来サイズの素材と区別なく収載されており、固結防止剤などの食品添加物として日本においてもすでに、食塩やインスタント食品をはじめとした多くの食品に使用されている。また、医薬品の助剤としてすでに汎用されているのみならず、遺伝子送達キャリアなどのDDS素材としても期待され、その使用量・範囲の拡大は今後ますます進むと考えられる。筆者らはこれまでの検討から、粒子径100 nm以下の非晶質ナノシリカが、経皮・経口・経鼻投与により、生体バリアを通過し、組織内・全身血流内に移行すること、さらには、全身血流から選択的かつ効率よく胎盤に移行することを最初に見出した⁸⁾。また非晶質ナノシリカの粒子表面性状を制御することで、胎盤への移行性はそのままに、安全性を高度に確保できること、さらには胎盤組織内の各種細胞への選択性や核内・細胞質内といった細胞内局在性を制御できることを唯一認めている⁹⁾。本結果は、非晶質ナノシリカがこれまで送達不可能であった部位への薬物送達をも可能とする新規キャリアになり得ることを示すものであり、前述したように、筆者らも核酸送達キャリアやワクチンキャリアとしての適用を試み、興味深い知見を得つつある。そこで、粒子径70 nmの非晶質ナノシリカ(nSP70)と、対照群として粒子径300、1000 nmの従来型シリカ(nSP300, mSP1000)、さらには実際に使用されている非晶質ナノシリカがさまざまな表面修飾を施されている場合があることを考慮し、nSP70の表面がアミノ基、カルボキシル基で修飾された非晶質ナノシリカ(nSP70-N, nSP70-C)を用い、物性と、体内動態・局在、ハザード発現との連関解析を実施した。なお、以後の検討では、試薬グレードの非晶質シリカを用い、各検討を実施した。各シリカを妊娠マウスに尾静脈内投与し体内動態・局在を透過型電子顕微鏡により定性的に評価した結果、nSP70のみが胎盤に集積するとともに、血液胎盤関門を通過し胎仔にまで移行することを見出

した(図2)。次に、過剰量を静脈内投与することで、非晶質ナノシリカの妊娠マウスに対するハザード同定を試みた。その結果、nSP70-N、およびnSP70-C投与群において異常が認められなかった一方で、nSP70投与群でのみ、胎仔吸収率の増加とともに、胎仔体重がコントロール群よりも10%以上減少するなど、胎仔発育不全を誘発していることが明らかとなった。なお、これら粒子の胎盤への集積や胎仔への移行、および胎仔への影響は、nSP300、およびmSP1000では認められていない。このことから、多くの非晶質ナノシリカ素材が、生殖発生毒性学的視点からも安全であるものの、一部の素材については注意を払う必要があることが示された。以上の検討で見出されたnSP70のハザードは、過剰量における検討ではあるものの、従来型非晶質シリカであるnSP300、mSP1000では認められなかったものであり、一部の非晶質ナノシリカが従来型の非晶質シリカとは異なる生体影響を誘発する可能性を示している。一方でnSP70-N、nSP70-Cは、過剰量を静脈内に投与するという実験系にもか

かわらず、目立ったハザードは認められなかったことから、これらはきわめて安全性の高い素材であると考えられる。また、これらの知見は逆に、ごく一部の安全性に懸念のあるものについても、適切な表面修飾を施すことにより、安全性を担保できる可能性を示している。ナノマテリアルの中にも安全性が高いものとそうでないものがあることはよく知られているが、今後、安全なナノマテリアルを創製するための方法論といったナノ安全科学研究に関する情報をより多く収集することが、ナノマテリアルの安全性評価研究の最重要課題の1つであると考えている。

4. おわりに——ナノ DDS 医薬品の将来像

本総説では、ナノ DDS への適用の現状とともに、最も急がれる安全性確保に関する検討を中心に紹介した。最近では、カーボンナノ素材や非晶質ナノシリカに加え、抗酸化・抗菌活性などを有した白金や

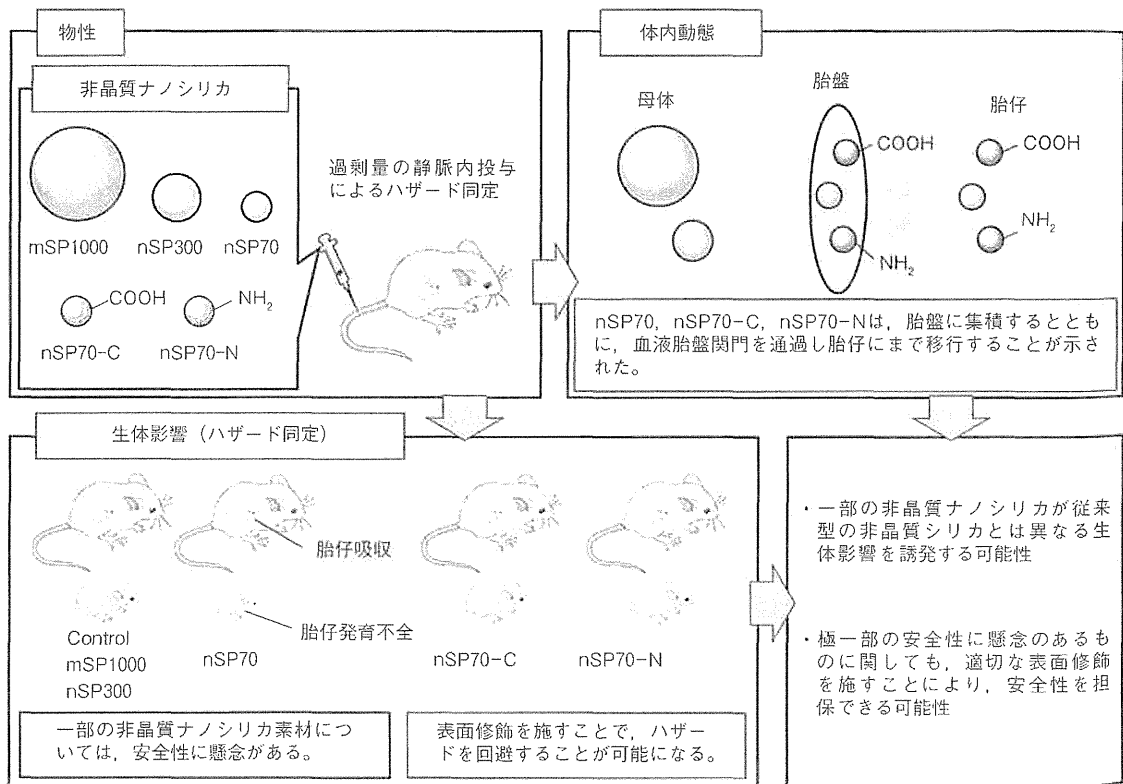


図2 生殖発生毒性学的視点からの非晶質ナノシリカの安全性評価