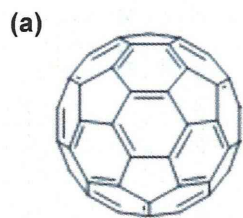


図 87 血中フラレン抽出物を用いた検量線の作製. 血液 500 µL に DMSO にて溶解したプロリン型フラレンを加え、飽和食塩水、少量の塩酸、THF を加え超音波処理を行った。これに少量のメタノールを加えて抽出操作を行い、THF 層を回収した。溶媒を取り除き、DMSO を用いて 1 mL に定容した後に HPLC により分析した。

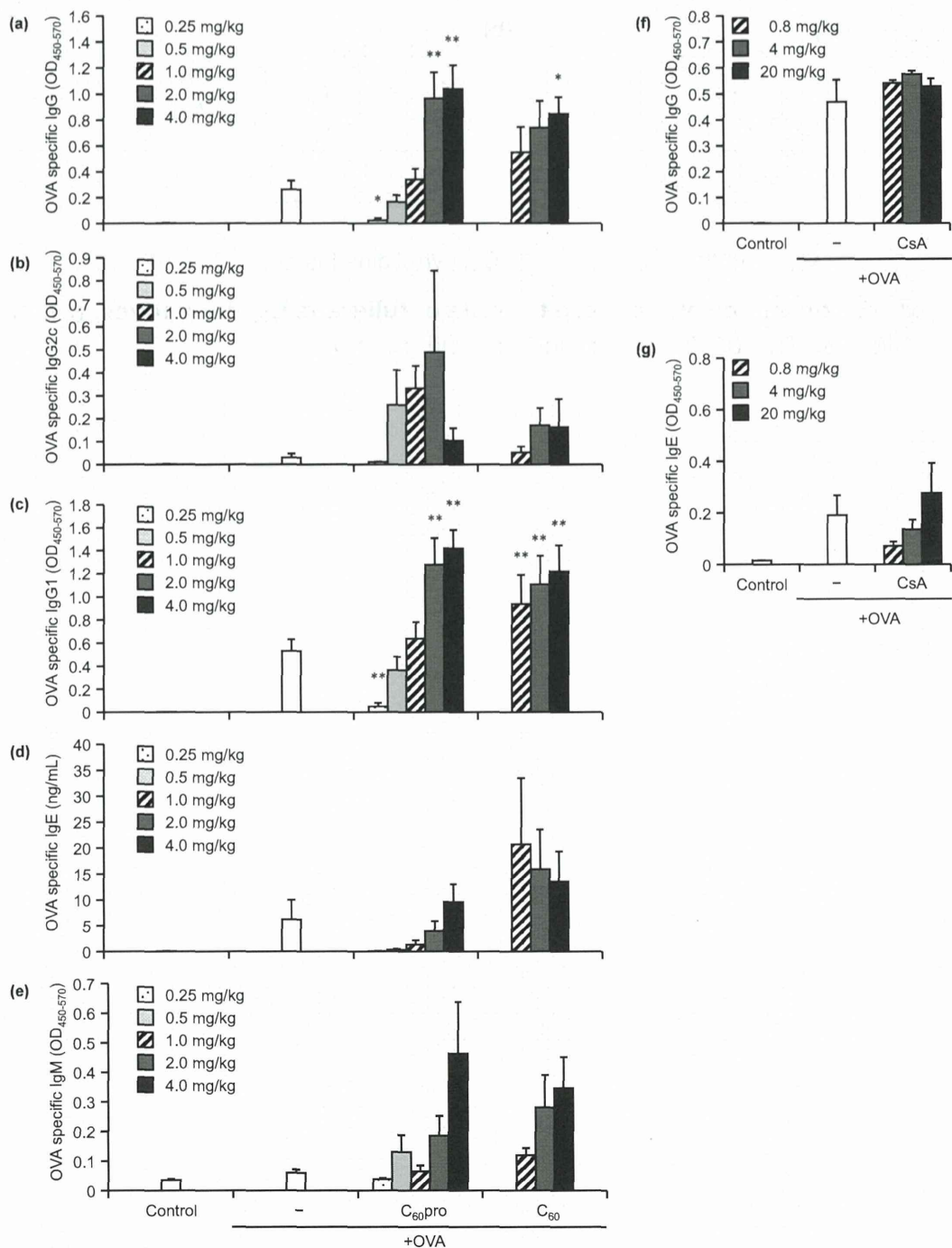


C_{60} fullerene (C_{60})



C_{60} pyrrolidine tris-acid ($C_{60}pro$)

Fig 88 The chemical structure formula of fullerene C_{60} derivatives. (a) C_{60} fullerene; C_{60} , (b) C_{60} pyrrolidine tris-acid; $C_{60}pro$.



89 The effects of intraperitoneal injection of C₆₀ fullerene derivatives on OVA specific antibody production. C57BL/6 mice were intraperitoneally injected with OVA alone or OVA plus C₆₀ fullerene derivatives in PBS on days 1, 8, and 15. OVA-specific IgG (a), IgG1 (b), IgG2c (c), IgE (d) and IgM (e) antibodies in the plasma were measured by ELISA on day 22. Data are presented as mean ± SEMs (n = 5). The symbols, * and **, represent significant difference from the OVA alone group by Dunnett's test ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively).

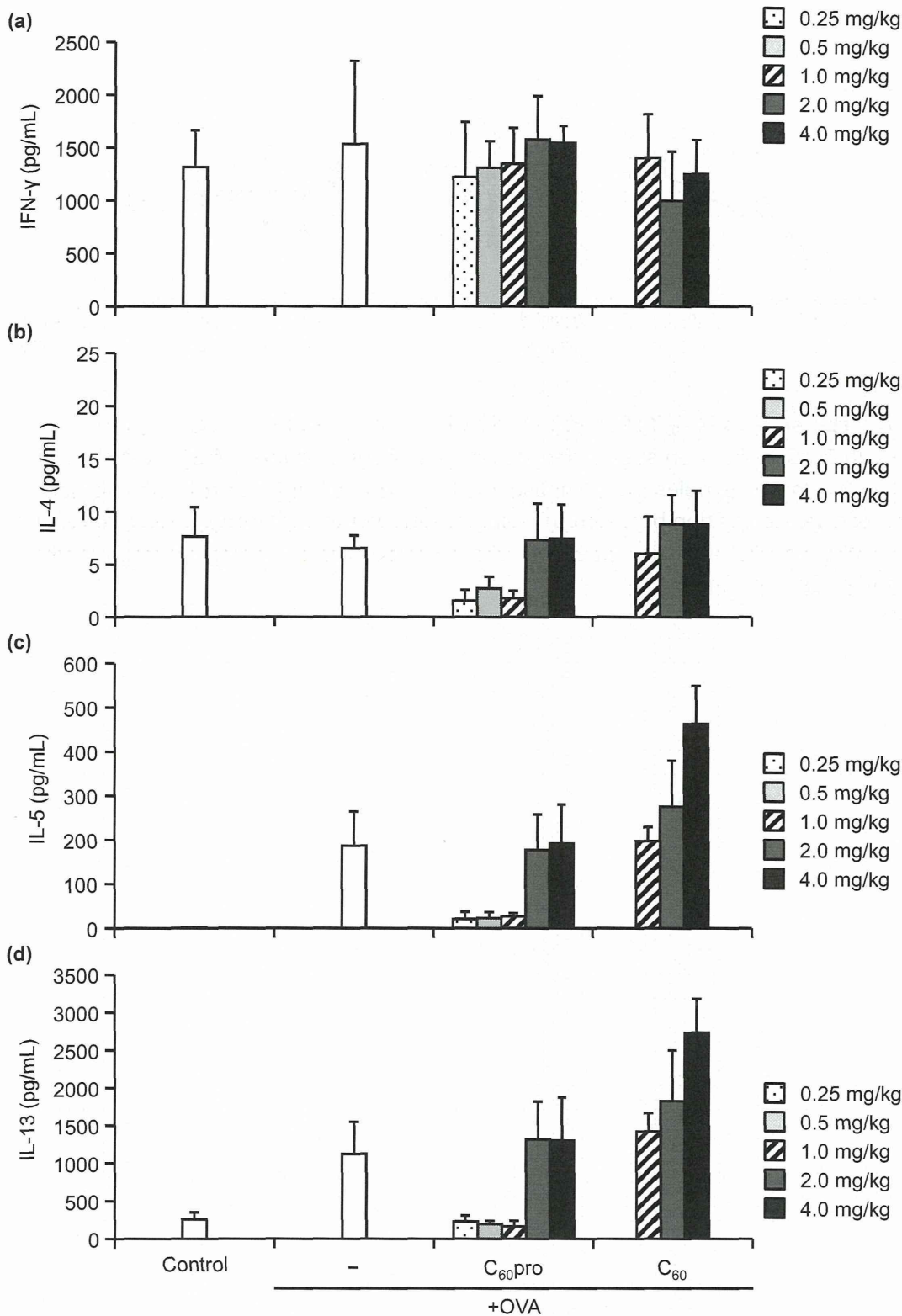


Fig. 90 Cytokine production of IFN- γ (a), IL-4 (b), IL-5 (c) and IL-13 (d) by spleen cells stimulated *in vitro* with OVA. C57BL/6 mice were intraperitoneally injected with OVA alone or OVA plus C₆₀ fullerene derivatives in PBS on days 1, 8, and 15. Seven days after the last intraperitoneal injection, splenocytes were collected from each group and cultured for 3 days with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OVA. Cytokine levels in the culture supernatants were determined by ELISA. Data are presented as mean \pm SEMs (n = 5).

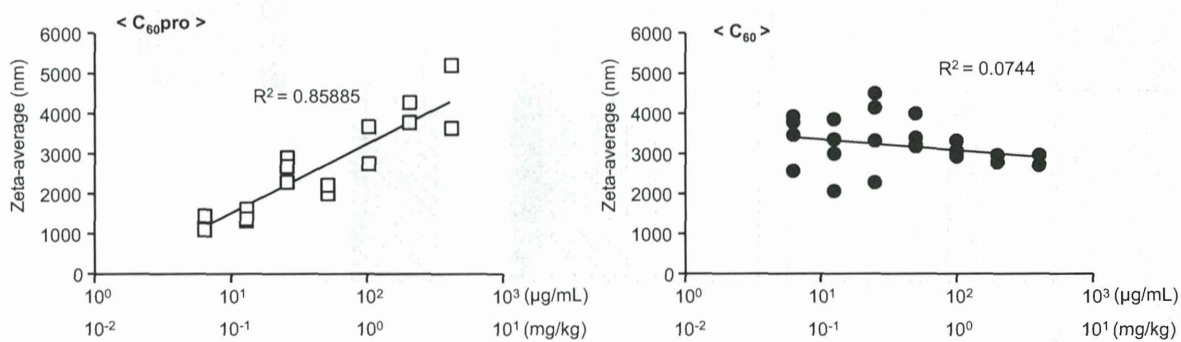


Figure 91 Particle size of C₆₀ fullerene derivatives. C₆₀ fullerene and C₆₀pro were suspended in DMSO and then suspended in phosphate buffer saline (PBS). Particle size distributions of these samples were measured by a dynamic light scattering method. The graph shows the relation between the concentration of C₆₀ fullerene derivatives and their diameter. The numbers in upper line can be converted as the numbers in lower line, the given dose to mice.

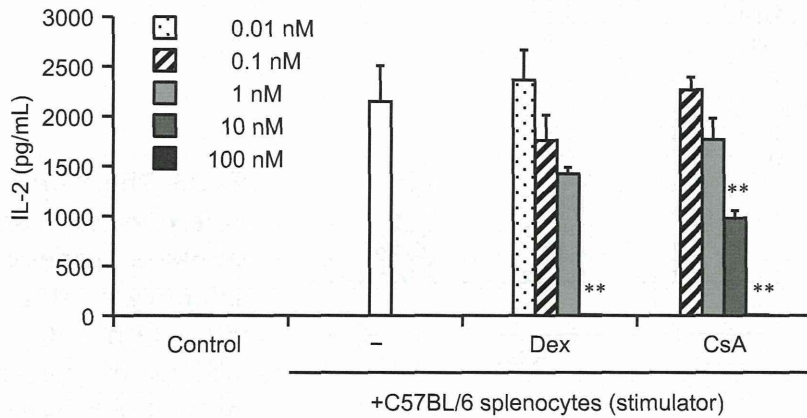
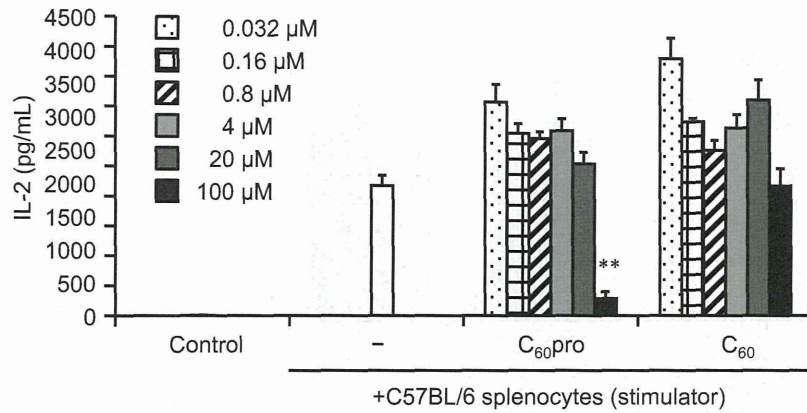
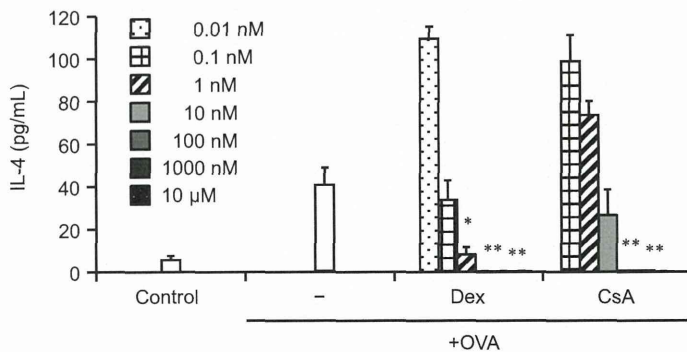
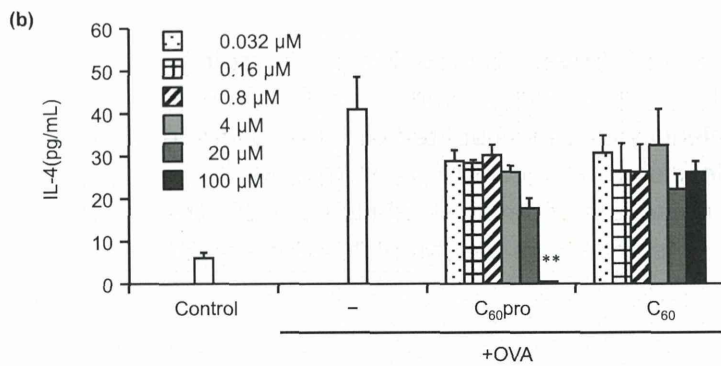
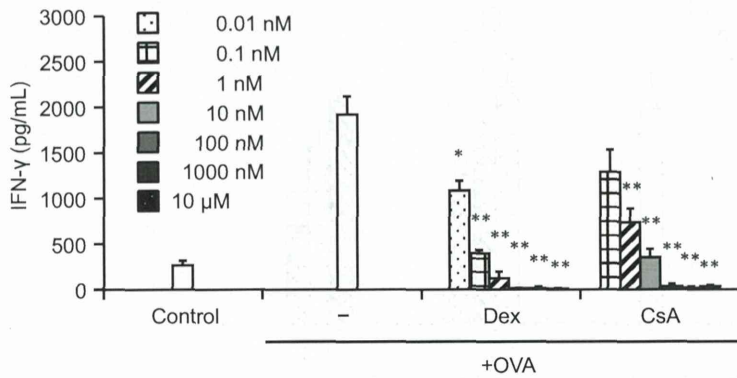
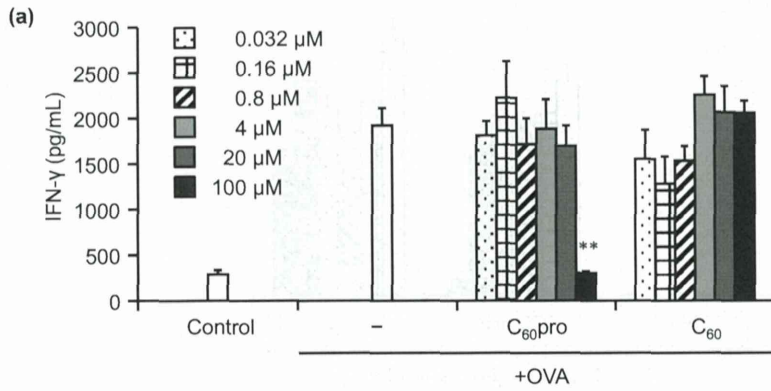


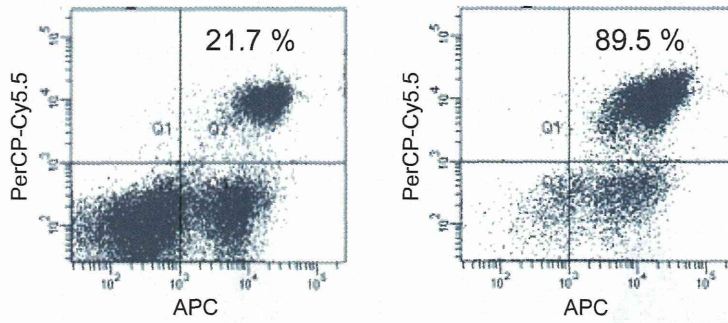
Figure 92 The effects of C₆₀ fullerene derivatives on cytokine production in primary, one-way MLR. BALB/c splenocytes were stimulated with mitomycin C-treated C57BL/6 splenocytes and incubated with C₆₀ fullerene derivatives for 3 days. IL-2 levels in the culture supernatants were determined by ELISA. Data are presented as mean ± SEMs (n = 3). The symbol, ** represents significant difference from the stimulator alone group by Dunnett's test (p < 0.01).



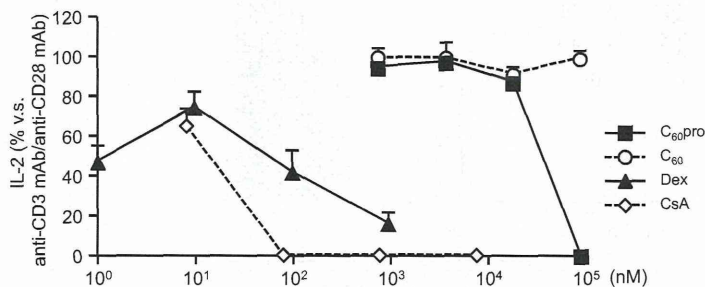
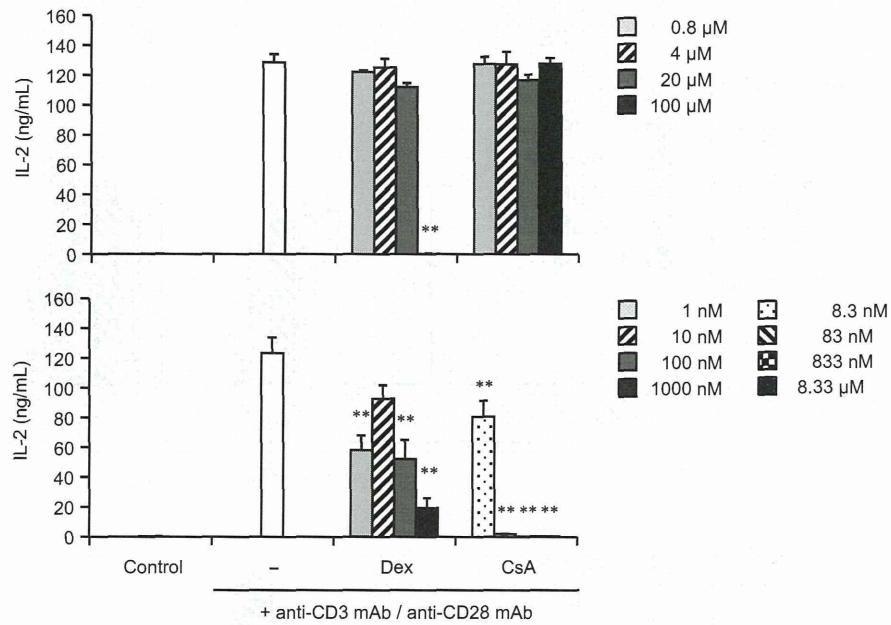
93 The effects of C₆₀ fullerene derivatives on cytokine production by splenocytes stimulated *in vitro* with OVA. C57BL/6 mice were intraperitoneally injected with OVA plus alum on days 1, 8, and 15. Seven days after the last intraperitoneal injection, splenocytes were collected. Splenocytes were co-cultured with C₆₀ fullerene derivatives and 100 μ g mL⁻¹ OVA. Three days after IFN- γ (a) and IL-4 (b) levels in the culture supernatants were determined by ELISA. Data are presented as mean \pm SEMs (n = 3). The symbols, * and **, represent significant difference from the OVA alone group by Dunnett's test ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively).

(a) Before purification

After purification



(b)



94 The effects of C₆₀ fullerene derivatives on cytokine production by splenic CD4⁺ T cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28. CD4⁺ T cell-enriched splenocytes were purified with MACS CD4⁺ T cell isolation kit. CD4⁺ T cells were stained with APC-conjugated anti-CD3 and PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD4. FACS histogram shows the result of CD4⁺ T cell enrichment (a). CD4⁺ T cell-enriched splenocytes were co-cultured with C₆₀ fullerene derivatives under stimulation with anti-CD3 and anti-CD28. Three days after incubation IL-2 levels in the culture supernatants were determined by ELISA (b). Data are presented as mean ± SEMs (n= 3). The symbol, **, represents significant difference from the anti-CD3 mAb plus anti-CD28 mAb alone group by Dunnett's test (*p* < 0.01).

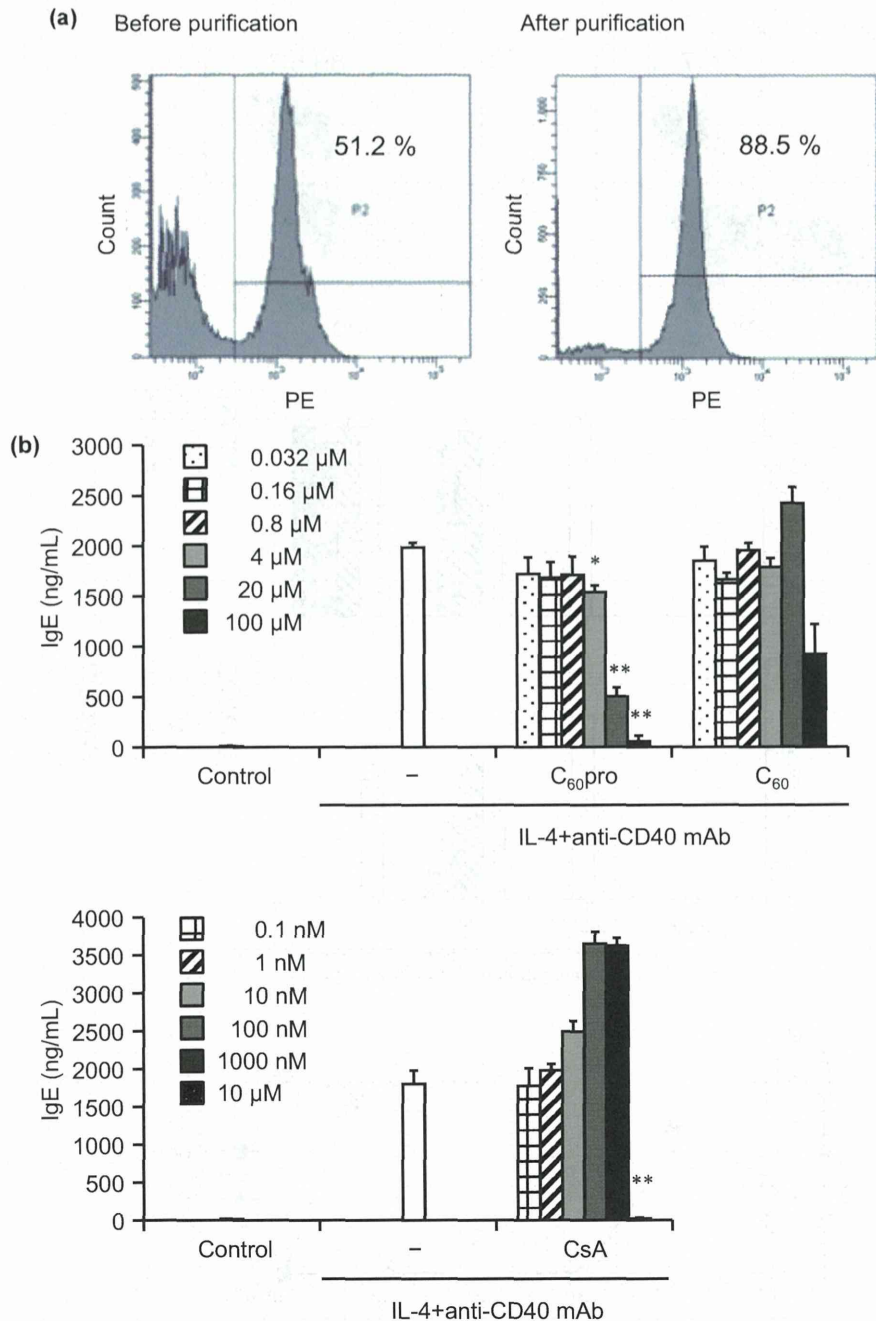
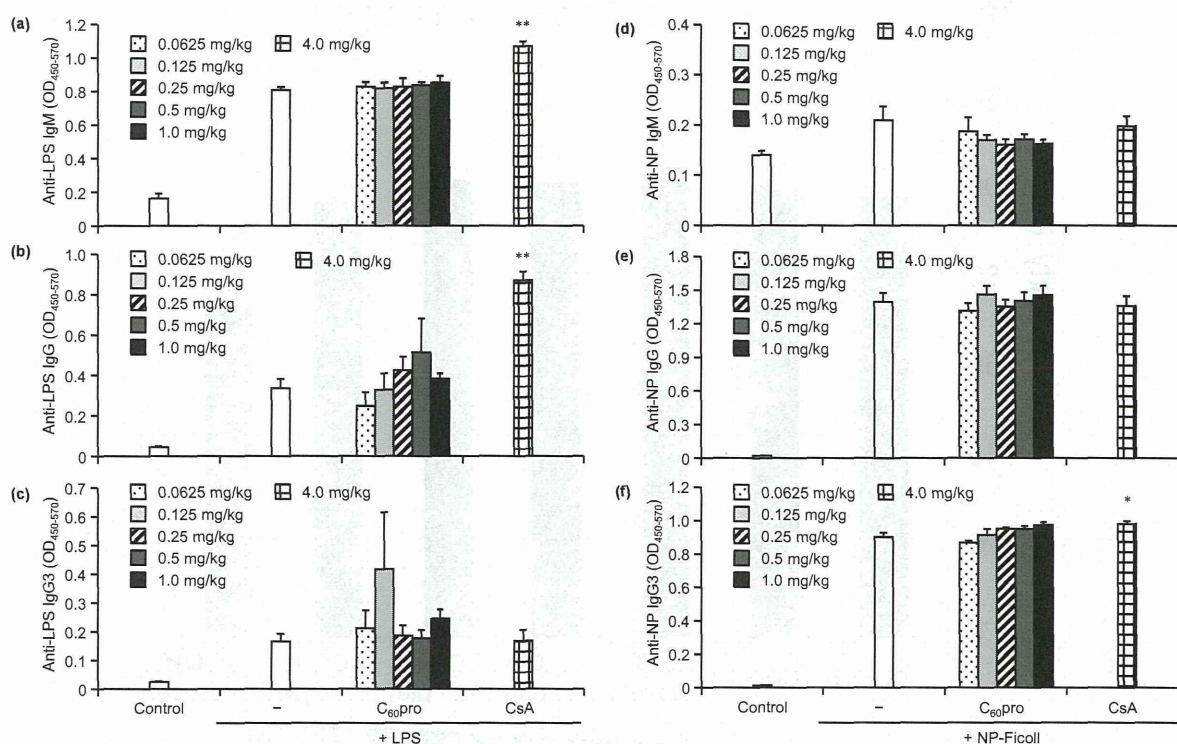
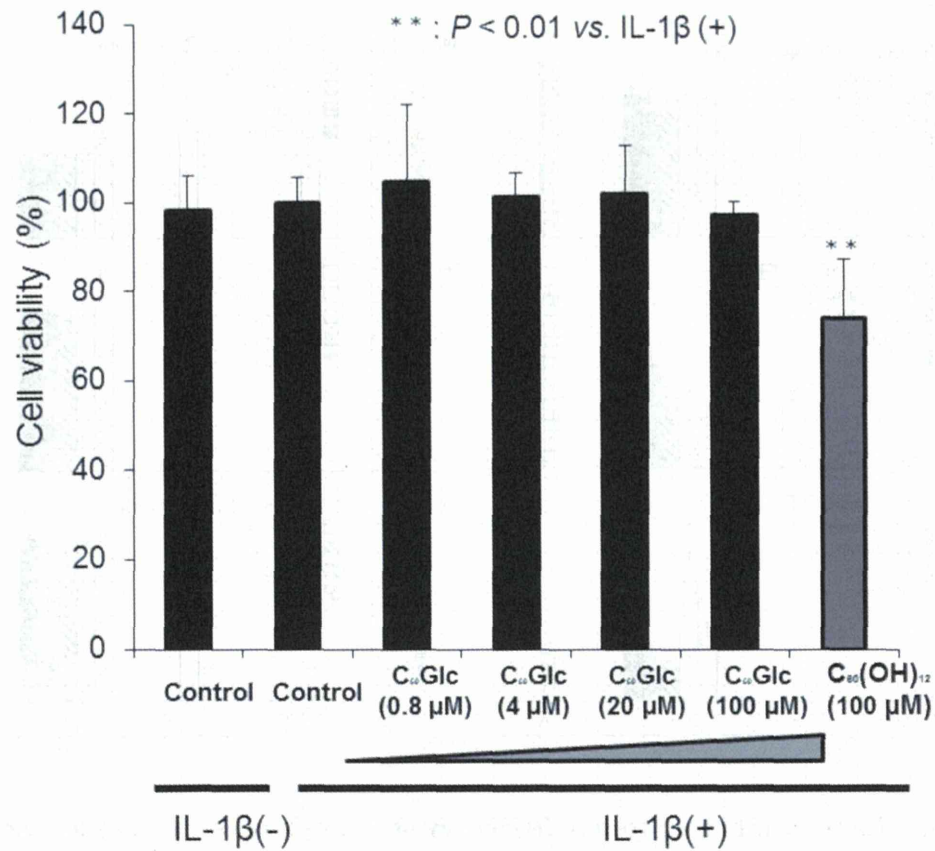


Figure 95 The effects of C₆₀ fullerene derivatives on IgE production by splenic B cells stimulated with anti-CD40 and IL-4. B cell-enriched splenocytes were purified with MACS B cell isolation kit. B cells were stained with PE-conjugated anti-B220. FACS histogram shows the result of B cell enrichment (a). B cell-enriched splenocytes were co-cultured with C₆₀ fullerene derivatives under stimulation with anti-CD40 and IL-4. Total IgE levels in the culture supernatants on day 10 were determined by ELISA (b). Data are presented as mean ± SEMs (n = 3). The symbols, * and **, represent significant difference from the IL-4 plus anti-CD40 mAb alone group by Dunnett's test (p < 0.05 and p < 0.01, respectively).



96 The effects of intraperitoneal injection of C₆₀ fullerene derivatives on LPS or NP specific antibody production. C57BL/6 mice were intraperitoneally (i.p.) injected with LPS alone or LPS plus C₆₀ fullerene derivatives in PBS on days 1 and 8. LPS-specific IgM (a), IgG (b) and IgG3 (c) antibodies in the plasma were measured by ELISA on day 15. Data are presented as mean ± SEMs (n = 5). C57BL/6 mice were intraperitoneally injected with NP-Ficoll alone or NP-Ficoll plus C₆₀ fullerene derivatives in PBS on days 1 and 8. NP-specific IgM (d), IgG (e) and IgG3 (f) antibodies in the plasma were measured by ELISA on day 15. Data are presented as mean ± SEMs (n = 5).



☒ **97 Cytotoxicity of fullerene C₆₀ derivatives in the Caco-2 cells.** Caco-2 cells were treated with fullerene derivatives for 24 h. Cell viabilities were assessed by LDH Assay kit. Data are expressed as the mean \pm S.D.

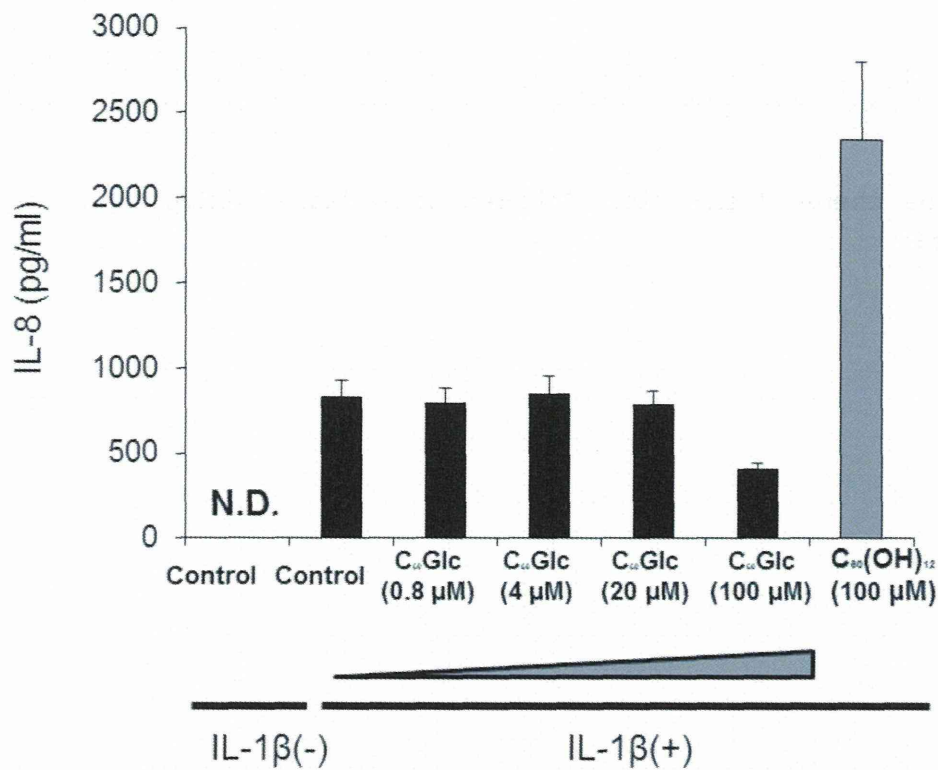
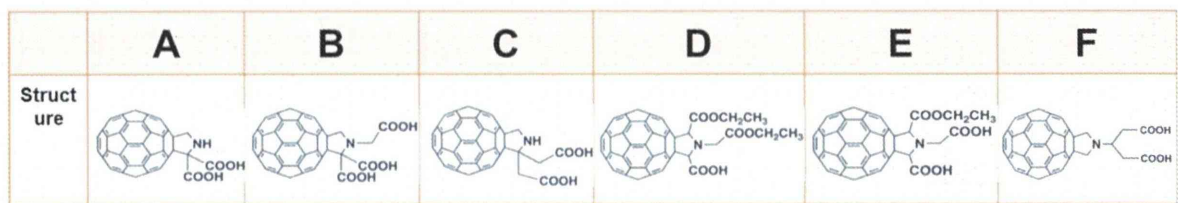


Figure 98 Inhibitory effects of fullerene C₆₀ derivatives on IL-1β-induced IL-8 secretion in the Caco-2 cells. Caco-2 cells were treated with fullerene C₆₀ derivatives for 30 min, and then, stimulated with IL-1β (125 ng/ml) for 24 h. Secreted IL-8 protein level in the culture supernatant was measured by IL-8 ELISA kit.



99 The chemical structure formula of proline-modified fullerene C₆₀ derivatives.

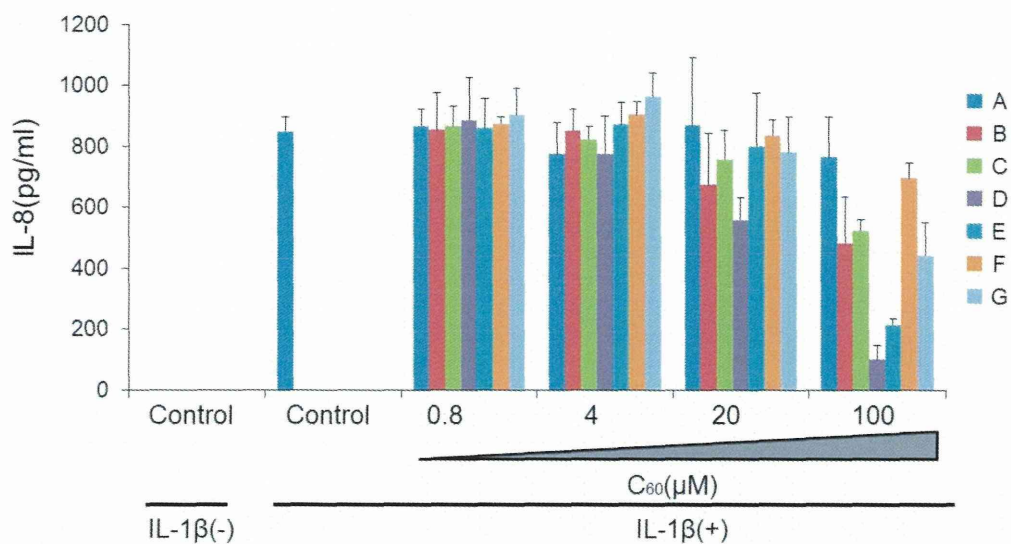


图 100 Inhibitory effects of fullerene C₆₀ derivatives on IL-1β-induced IL-8 secretion in the Caco-2 cells. Caco-2 cells were treated with fullerene C₆₀ or fullerene C₆₀ derivatives for 30 min, and then, stimulated with IL-1β (125 ng/ml) for 24 h. Secreted IL-8 protein level in the culture supernatant was measured by IL-8 ELISA kit.

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
Yamashita K, Yoshioka Y, Pan H, Taira M, Ogura T, Nagano T, Aoyama M, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda SI, Aoshima H, Nabeshi H, Yoshikawa T, Tsutsumi Y.	Biochemical and hematologic effects of polyvinylpyrrolidone-wrapped fullerene C60 after oral administration.	Pharmazie.	68	54-7	2013
Ueno H, Kokubo K, Kwon E, Nakamura Y, Ikuma N, Oshima T.	Synthesis of a New Class of Fullerene Derivative $\text{Li}^+\text{@C}_{60}\text{O}^-(\text{OH})_7$ as a "Cation-Encapsulated Anion Nanoparticle".	Nanoscale.	5	2317-21	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	7376-8	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
絹田 精
西野 鎮
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

1 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) までもが台頭し、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「ナノリポソーム製剤」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

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材料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材料は、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。これらナノ材料の画期的機能は、ナノ医薬品としての主薬あるいはナノ添加剤としてだけではなく、薬物治療の最適化

者らは、ナノ医薬品の開発を推進するべく、ナノ材料の投与により誘発される生体影響とナノ材料の物性、細胞内・体内動態との関連を解析し、体系化(Nano-Safety Science; ナノ安全科学)していくことで、ナノ医薬品の品質や有効性/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材料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材料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、ナノ医薬品開発に必須であるナノ材料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。

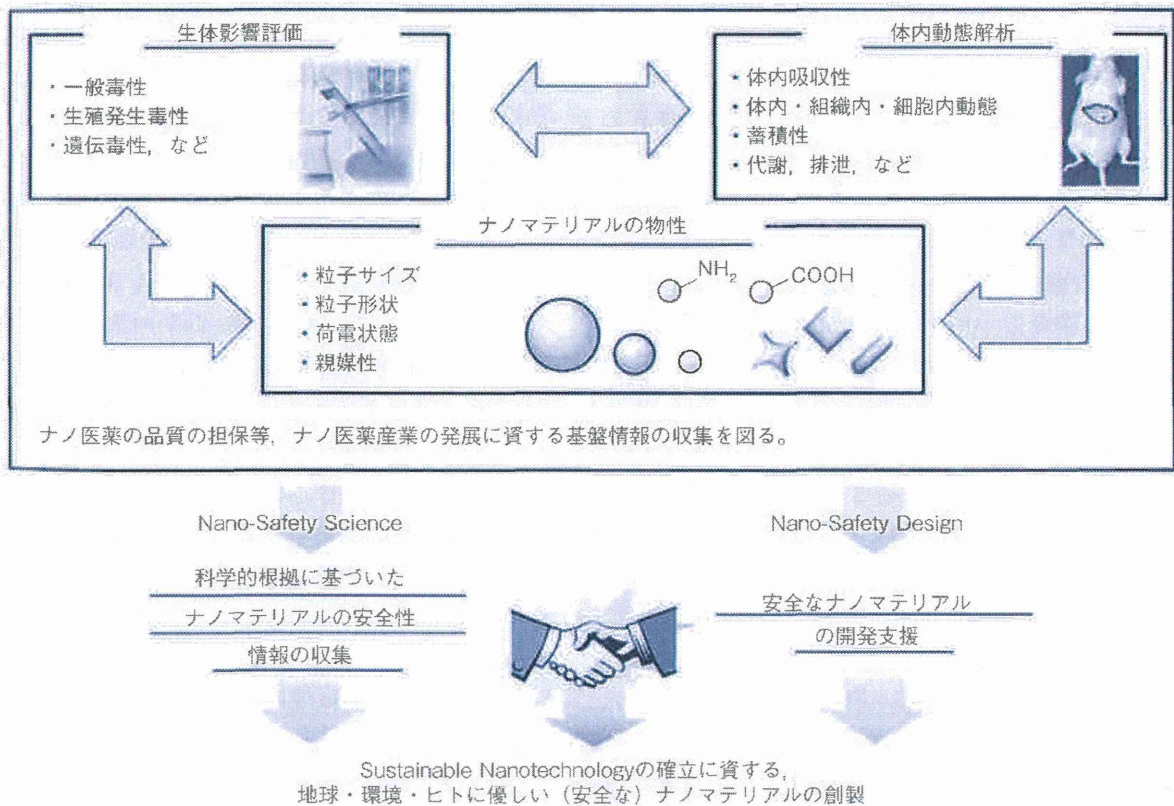


図1 ナノ安全科学研究

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ベ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、フラベ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、安全性との関連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、ハザード発現との関連解析を実施した。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