

平成 28 年 2 月 16 日




崇城大学大学院  
薬学研究科委員会

研究科長 小田切 優樹 殿

論文審査委員  
主査 平山 文俊



論文審査結果の報告 (甲)

論文提出者	梅崎 至高 (1231D01)
論文題名	酸化ストレス性疾患への応用を目的とした親水性 C <sub>60</sub> (OH) <sub>10</sub> /シクロデキストリンナノ粒子製剤の構築
審査委員	主査 教授 平山 文俊 
	副査 教授 小田切 優樹 
	副査 教授 原武 衛 

学位論文の要旨

C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub> はフラーレン (C<sub>60</sub>) に水酸基を約 10 個導入した化合物であり、優れた抗酸化能を有することが報告されている。しかし C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub> は、ほぼ炭素原子のみで構成される化合物であるため、その利用は有機溶媒に溶かした状態、もしくは水中へ懸濁した状態に限られる。したがって C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub> を医薬分野へ応用するためには水への溶解性を改善する必要がある。そこで本研究では、C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub> の抗酸化剤としての医薬分野への応用を目的として、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン (HP-β-CyD) による C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub> の水溶性ナノ粒子化を検討し、その抗酸化能を *in vitro* で評価した。さらに、酸化ストレスモデル疾患の一つであるアセトアミノフェン誘発肝障害 (APAP 肝障害) に対する C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub> ナノ粒子の抑制効果を *in vitro* および *in vivo* で検討するとともに、その肝障害抑制メカニズムについて検討した。以下に得られた知見を要約する。

- 1) 各種 CyDs との相互作用を利用して、C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub> のナノ粒子化を検討した。その結

果、 $C_{60}(OH)_{10}$  と HP- $\beta$ -CyD または  $\gamma$ -CyD を混合粉砕すると、均一な球形の親水性  $C_{60}(OH)_{10}/CyDs$  ナノ粒子が得られた。(  $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子：粒子径  $46.7\pm 10.9$  nm、溶解度約  $716.6\pm 9.5$   $\mu$ M、ゼータ電位  $-35.5\pm 1.9$  mV、 $C_{60}(OH)_{10}/\gamma$ -CyD ナノ粒子：粒子径約  $81.3\pm 10.3$  nm、溶解度約  $692.1\pm 4.9$   $\mu$ M、ゼータ電位約  $-38.9\pm 1.5$  mV)。  $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子および  $C_{60}(OH)_{10}/\gamma$ -CyD ナノ粒子は水中において 4 週間以上凝集はみられず、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子は約 50 nm、 $C_{60}(OH)_{10}/\gamma$ -CyD ナノ粒子は約 80 nm の粒子径を安定に維持した。

2)  $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子および  $C_{60}(OH)_{10}/\gamma$ -CyD ナノ粒子は濃度依存的な DPPH ラジカル、ABTS ラジカル、 $\bullet OH$  および  $O_2^{\bullet -}$  消去能を示し、その効果は水溶性ナノ粒子化していない分散状態の  $C_{60}(OH)_{10}$  よりも大きかった。また、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子はこれらのラジカル種に対して、 $C_{60}(OH)_{10}/\gamma$ -CyD ナノ粒子よりも高い消去率を示した。これは、HP- $\beta$ -CyD ナノ粒子の粒子径が  $\gamma$ -CyD ナノ粒子よりも小さく、各ラジカル種との接触面積が増大した結果、高いラジカル消去能を示したものと考えられる。また、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子は HepG2 細胞および A549 細胞に対して、過酸化水素により誘発される酸化ストレスを抑制し、細胞保護効果を示した。

3) マウスに APAP を過量投与(400 mg/kg)すると、ALT 値 および AST 値は約 10000 IU/L 前後まで上昇し、肝障害が引き起こされた。この APAP 肝障害モデルマウスに  $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子を腹腔内投与 (200 mg/kg) または静脈内投与 (1.5 mg/kg) すると、ALT や AST の上昇がほぼ正常値まで回復した。また APAP 投与後 60 時間以降における生存率を比較すると、APAP 単独投与群では 12.5 %であったのに対して、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子腹腔内投与群では 80 %、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子静脈内投与群では 100 %の生存率を示した。

4)  $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子の APAP 肝障害抑制機構を明らかにするため、肝臓の CYP2E1 発現や GSH 濃度を測定した結果、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子はこれらの値には影響しなかった。そこで、APAP 肝障害モデルマウスの肝臓に対して抗ニトロチロシン免疫染色を行うと、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子は Control 群と比較し、顕著にニトロチロシン陽性率を低下させた。また、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子は NO、 $O_2^{\bullet -}$ 、 $ONOO^{\bullet -}$  に対して、濃度依存的な抑制効果を示した。以上の結果より、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子は APAP 肝障害発症に関与する  $ONOO^{\bullet -}$  等のラジカル種を消去することで酸化ストレスを抑制し、肝臓保護効果を示すものと推定された。

以上の結果より  $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子は安全で有効性の高い抗酸化剤として APAP 肝障害のみならず各種酸化ストレス性疾患への応用が期待された。

## 論文審査結果の要旨

フラーレン (C<sub>60</sub>) に水酸基を導入した水酸化フラーレンは抗酸化剤として様々な分野への応用が期待されているが、C<sub>60</sub> と同様に水溶性が低いため、その利用は制限されている。本研究では、生体適合性に優れるシクロデキストリン (CyD) あるいはその誘導体の包接機能に着目して、水酸化フラーレン(C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub>) の親水性ナノ粒子化、酸化ストレス性疾患治療への応用を目的とし、以下の知見を得ている。

1) C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub> は 2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン(HP-β-CyD) または γ-CyD と混合粉砕すると均一な球形の親水性ナノ粒子を形成し、その水溶性は顕著に増大した。C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub>/HP-β-CyD ならびに γ-CyD ナノ粒子は水中において 4 週間以上 100 nm 以下の粒子径を安定に維持した。

2) C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub>/HP-β-CyD および γ-CyD ナノ粒子は DPPH ラジカル、ABTS ラジカル、•OH および O<sub>2</sub><sup>•-</sup> に対して高い消去能を示し、その効果は HP-β-CyD ナノ粒子の方が γ-CyD ナノ粒子よりも高かった。C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub>/HP-β-CyD ナノ粒子は HepG2 細胞および A549 細胞に対して、過酸化水素により誘発される酸化ストレスを抑制し、細胞保護効果を示した。

3) アセトアミノフェン (APAP) 誘発肝障害モデルマウスに C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub>/HP-β-CyD ナノ粒子を腹腔内または静脈内投与すると、肝障害の指標であるトランスアミナーゼ値はほぼ正常値まで回復した。APAP 投与後の生存率は APAP 単独投与群に比べて HP-β-CyD ナノ粒子投与群で顕著に上昇した。

4) C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub>/HP-β-CyD ナノ粒子は CYP2E1 発現や GSH 濃度にはほとんど影響しなかった。一方、APAP 肝障害モデルマウスの肝臓に対して抗ニトロチロシン免疫染色を行うと、C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub>/HP-β-CyD ナノ粒子は顕著にニトロチロシン陽性率を低下させたことから、HP-β-CyD ナノ粒子は ONOO<sup>-</sup> 等のラジカル種を消去することで酸化ストレスを抑制し、肝臓保護効果を示すことを明らかにした。

本研究では、HP-β-CyD を用いて C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub> の水溶性ナノ粒子化に成功し、得られたナノ粒子は優れた抗酸化能を有することを *in vitro*, *in vivo* で確認するとともに、APAP 誘発肝障害を抑制することを明らかにした。これらの知見は、酸化ストレス性疾患治療薬の創製において有用な基礎資料となり、博士の学位論文に値する内容を有していると考えられる。加えて、申請者は口頭試問においても適切に対応し、十分な学力を有し、博士の学位論文に値すると判断された。

## 最終試験結果の要旨

本論文は、C<sub>60</sub>(OH)<sub>10</sub>/HP-β-CyD 親水性ナノ粒子の調製と酸化ストレス性疾患の治療への応用に関する研究であり、研究の目的・背景、実験、結果、考察が明確に記述されている。本研究で得られた結果は新規性、独創性に富むものであり、博士の学位論文としての内容を満たしている。加えて、審査委員会および公聴会における質問に対しても適切に答えていた。以上の結果に基づき、本論文提出者は、博士(薬学)の学位を得る資格を有していると判定した。