

論文要旨

酸化ストレス性疾患への応用を目的とした親水性 C₆₀(OH)₁₀/シクロデキストリン ナノ粒子製剤の構築

薬物治療設計学講座 製剤学研究室
梅崎至高

C₆₀(OH)₁₀ はフラーレン (C₆₀) 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 C₆₀(OH)₁₀ 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 C₆₀(OH)₁₀ 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、C₆₀(OH)₁₀ 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 C₆₀(OH)₁₀ 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1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 C₆₀(OH)₁₀ ナノ粒子の抑制効果を *in vivo* で検討し、さらに、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) C₆₀(OH)₁₀ と HP-β-CyD または γ-CyD を混合粉砕すると、均一な球形の親水性 C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子が得られた。(C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子: 粒子径 46.7±10.9 nm、溶解度約 716.6±9.5 μM、ゼータ電位 -35.5±1.9 mV、C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD ナノ粒子: 粒子径約 81.3±10.3 nm、溶解度約 692.1±4.9 μM、ゼータ電位約 -38.9±1.5 mV)。また C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子および C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD ナノ粒子は水中において 4 週間以上凝集はみられず C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子は約 50 nm、C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD ナノ粒子は約 80 nm の粒子径を安定に維持した。

2) C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子および C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD ナノ粒子は濃度依存的な DPPH ラジカル、ABTS ラジカル、•OH および O₂•⁻ 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 C₆₀(OH)₁₀ よりも高い値を示した。また、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子は全てのラジカル種に対し、C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD ナノ粒子よりも高いラジカル消去率を示した。これは C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子のほうが C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD ナノ粒子よりも粒子径を小さく調製可能であり、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と考えられる。また、C₆₀(OH)₁₀/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) マウスに APAP を過量投与 (400 mg/kg) することで、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。一方、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 肝障害抑制メカニズムの検討において、肝臓の CYP2E1 発現や GSH 濃度を測定したところ $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子はそれらの変動には関与しないことが示唆された。そこで、APAP 肝障害モデルマウスの肝臓に対し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 $^-$ に対して、濃度依存的に顕著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 $^-$ 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考えられる。(Fig. 1.)

$C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ 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る。

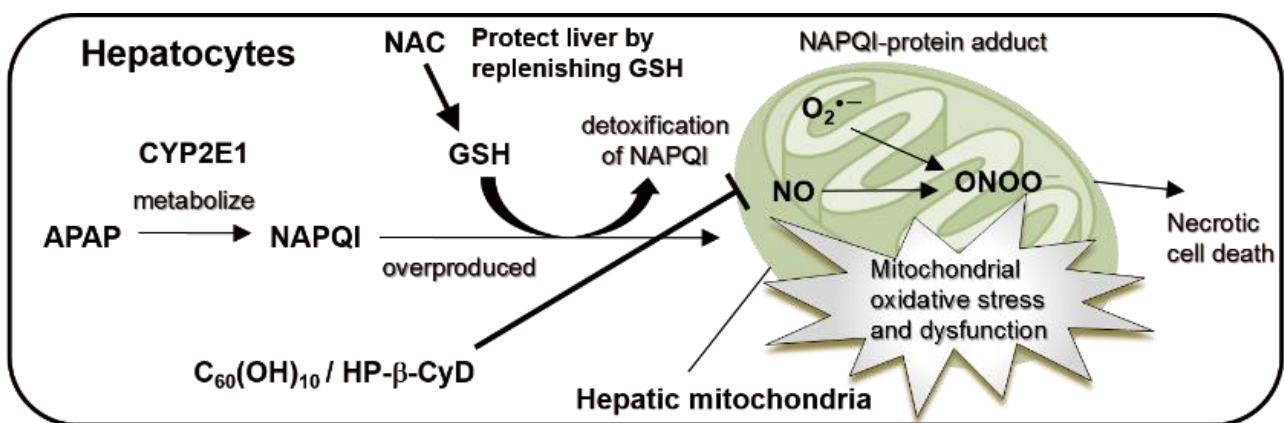


Fig. 1. Protective Mechanism of $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ Nanoparticles against APAP Induced Hepatotoxicity