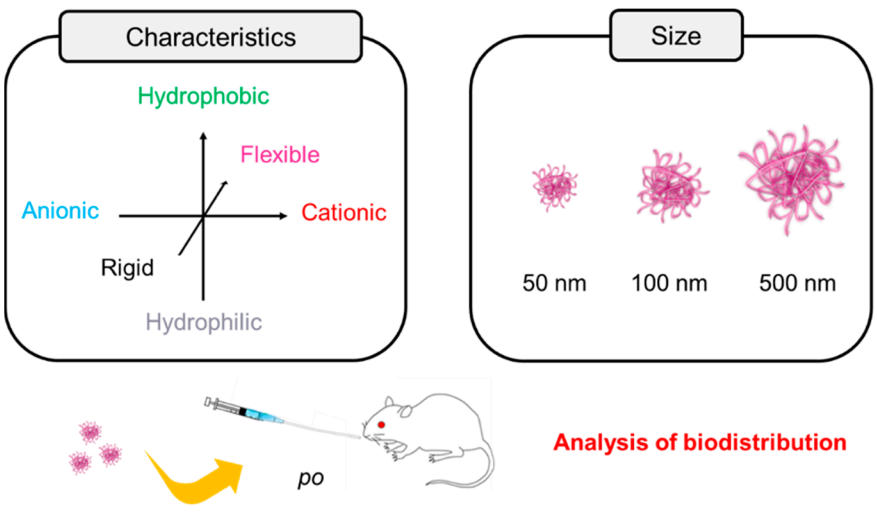
201　経口投与されたナノ粒子の体内動態制御技術の構築	小出　裕之

【目的】慢性腎不全や糖尿病などの特定の疾患下では、インドールやグルコースなど特定分子の消化管吸収を制限することが疾患の発症、増悪を予防する上で重要である。しかし、現在臨床で用いられている吸着剤は非特異的に標的分子を吸着してしまうために、投与量が多く、治療満足度が低い。そのため、消化管で標的分子を特異的に吸着する医薬品開発が望まれている。我々はこれまでに、標的分子と非共有結合が可能な種々の機能性モノマーを組み合わせて重合することで、消化管内で標的分子を特異的に認識し、吸着できる合成高分子ナノ粒子の開発を行い、経口投与製剤としての有用性を示してきた。しかし、合成するナノ粒子は非分解性であることから、消化管吸収されると臓器に長期間蓄積してしまうことから予期せぬ副作用を引き起こす可能性がある。そのため、ナノ粒子の臨床応用には、経口投与後の体内動態に関する情報が必要不可欠である。本研究では、経口投与されたナノ粒子の体内動態に関する知見を得るために、ナノ粒子を構成する様々な因子を変化させ、経口投与後の体内動態に与える影響を解析することを目的とした。

【方法・結果】ナノ粒子は *N*-isopropylacrylamide（NIPAm）と架橋剤である *N,N′*–Methylenebis（acrylamide）（Bis）を用いて合成した。まずナノ粒子を構成する因子として粒子径に着目した。ナノ粒子の粒子径は、機能性モノマーの濃度など反応手法・条件を変えることで精密に制御可能である。本研究では^{3}H にて放射標識した NIPAm を少量組み込んだ 50〜400 nm の放射標識ナノ粒子を合成した。様々な粒子径の放射標識ナノ粒子をマウスに経口投与し、24 時間後の体内動態を解析した。経口投与されたナノ粒子は、粒子径の増大により主要な臓器への蓄積量が減少した。一般的にリポソームやミセルなどの粒子の粒子径が増大すると、細胞への取り込み量が減少すると報告されている。本検討においても、ナノ粒子の粒子径を増大させることで腸管上皮細胞を介した消化管吸収量が減少した結果、主要な臓器への蓄積量が減少したものと考える。次に、架橋剤である Bis の組み込み比を変えることで、柔軟性の異なるナノ粒子の合成を試みた。本検討では、柔軟性以外の影響を排除すべく、同一の粒子径のナノ粒子が合成できる条件を最適化した。最後に、疎水性モノマーである *N*-*tert*-Butylacrylamide（TBAm）の組み込み量を変えることで疎水度の異なるナノ粒子の合成を行い、その体内動態を解析した。疎水度の異なる放射標識ナノ粒子の体内動態を解析した結果、経口投与されたナノ粒子はその疎水性の増大に比例して臓器への蓄積量は減少した。この結果より、ナノ粒子の疎水度が消化管固有の構造である親水性の粘膜層による排泄効率に深く関わっていることが示唆された。以上より、NPs のサイズ、柔軟性、疎水性は経口投与後の体内動態に大きな影響を与えることが明らかになった。

本研究ではナノ粒子の電荷、疎水性度、密度、粒子径が経口投与後の体内動態に与える影響を解析する。



201. 経口投与されたナノ粒子の体内動態制御技術の構築

小出　裕之

静岡県立大学 薬学研究院 医薬生命化学教室

Key words：ナノ粒子，経口投与，体内動態，粒子径，疎水性

緒　言

飲食物に含まれるタンパク質や電解質、炭水化物の摂取は生物的な機能の維持に必要不可欠である。しかし、慢性腎不全や糖尿病を始めとした疾患下では特定の分子の消化管吸収を制限する必要がある。現在臨床では、消化管内で標的分子を吸着し、その吸収を阻害する薬物としてクレメジン（インドール吸着剤）やビキサロマー（リン吸着剤）などが用いられている。しかし、現在上市されている吸着剤の多くは、標的分子だけでなく他の薬剤や栄養素なども非特異的に吸着してしまう。そのため、治療効果を示すには膨大な投与量が必要となり、コンプライアンスの悪さが課題となっている。そのため、消化管で標的分子を特異的に吸着して体外へ排泄可能な薬剤開発が望まれている。

我々はタンパク質間の強力な結合を模倣し、水素結合、疎水性相互作用、静電的相互作用などの非共有結合を生み出す機能性材料（モノマー）を用いてナノ粒子を合成することで、標的分子と抗体のように強く特異的に結合する『プラスチック抗体』の開発を行ってきた。これまでに、ミツバチの溶血性毒素であるメリチンペプチド［1］や血管内皮細胞増殖因子（VEGF）に対するプラスチック抗体を合成し［2，3］、マウスの血液中でこれら標的分子を吸着・中和することに成功している。さらに近年は、ナノ粒子の非分解性に着目して、経口投与後に酸や消化酵素によって分解されずに消化管で標的分子を吸着するナノ粒子の開発を試みている。そして、インドール［4］やグルコース［5］を吸着可能なナノ粒子を開発し、インドールやグルコースの消化管吸収を阻害することに成功している。しかし、ナノ粒子を経口投与すると僅かに消化管から吸収され、臓器に蓄積することが明らかになった［4］。ナノ粒子は非分解性であるため、投与後の消化管吸収により臓器に蓄積すると排泄されにくいことから、予期せぬ副作用を惹起する可能性がある。そのため、本研究では、経口投与されたナノ粒子の体内動態に関する知見を深め、消化管吸収されにくい条件を探索するため、粒子径、疎水性、柔軟性の異なるナノ粒子を合成し、経口投与後の体内動態への影響を解析した。

方法、結果および考察

1. 機能性モノマーと界面活性剤の濃度が粒子合成に及ぼす影響の解析

まず、粒子径の異なるナノ粒子ライブラリーの合成を試みた。粒子径の異なるナノ粒子の合成にあたり、用いる機能性モノマーの組成を変えてしまうと粒子の機能に影響を及ぼす可能性があるため、組成を変える事なく粒子径を制御する必要がある。そこで、粒子合成時の総モノマー濃度と界面活性剤の濃度が粒子径などナノ粒子の特徴に及ぼす影響を検討した。ナノ粒子合成には、*N*-isopropylacrylamide（NIPAm）、*N, N'*-Methylenebis（acrylamide）（Bis）を用いた。NIPAm が 98 mol%、Bis が 2 mol%の比率となるように、総モノマー濃度が最終 32.5、65、130、260 mM となるように溶解した。そこに界面活性剤である sodium dodecyl sulfate（SDS）を最終濃度として 0.0347、1.04、3.47 mM となるように添加し、3 時間ラジカル重合反応により粒子合成を行った。反応終了後のナノ粒子は、4 日間透析（Spectra/Por4、MWCO 12～14 kDa、Spectrum Laboratories、Inc.、Rancho Dominguez、CA、USA）することで精製した。合成したナノ粒子の粒子径は動的光散乱法（dynamic light scattering：DLS）により解析した。その結果、総モノマー濃度を上昇させるほど、界面活性剤濃度を低下させるほど粒子径が増大した（図 1a）。実際に合成した粒子の粒子径を視覚的に観察するために、1% molybdenum solution 10 μL にてナノ粒子をネガティブ染色し、透過型

電子顕微鏡（TEM）にて観察した。その結果、観察した粒子は凝集や会合する事なく単一の粒子で目的の粒子径の粒子が合成できていることが明らかになった（図 1b）。

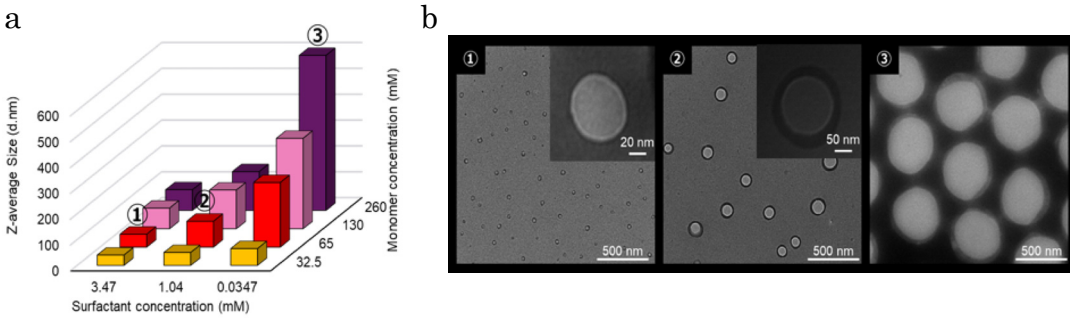


図 1. 機能性モノマーと界面活性剤濃度が粒子径に与える影響

a）機能性モノマーの濃度と界面活性剤の濃度を変えて粒子合成を行うことで、様々な粒子径の粒子を合成可能。

b）合成したナノ粒子の TEM 画像。

2. 粒子径の異なるナノ粒子の体内動態解析

粒子合成時の総モノマー濃度と界面活性剤の濃度を変えることで、粒子径の異なるナノ粒子の合成が可能であると判明したことから、次に体内動態を測定することとした。ナノ粒子の体内動態解析のために、粒子合成時に ^{3}H にて放射標識した NIPAm を少量組み込むことで、放射標識ナノ粒子を合成した。またナノ粒子の粒子径は、60±0.3 nm（Small）、94±0.3 nm（Control）、382±0.9 nm（Large）であった。それぞれのナノ粒子を BALB/c マウスに経口投与し、その 24 時間後に血液、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、消化管（胃、小腸、盲腸、大腸）を摘出した。さらに尿においても回収した。その後、それぞれのサンプルの放射活性を測定することで、ナノ粒子の分布を解析した（図 2）。その結果、粒子径を変えることで、臓器や尿への蓄積量が顕著に変化することが明らかになった。Small（60 nm）の粒子では、投与したナノ粒子の 20%程度が消化管から吸収され、その半分程度（10%）が肝臓に蓄積し、その他には血液中、肺、脾臓、腎臓に～1%程度蓄積していた。尿中には～7%程度排泄されていた。しかし、Control（100 nm）、Large（400 nm）のナノ粒子に関しては、消化管からの吸収量が Small のナノ粒子と比較して 1／5 程度減少しており、肝臓への蓄積量も 2%もしくは 1%程度であった。これは、粒子径の小さい粒子の方が大きい粒子を比較して、細胞への取り込み量が多いことに起因していると考える。この結果から、粒子径は経口投与後の体内動態に多大な影響を与え大きい粒子の方が消化管吸収されにくいことが示唆された。

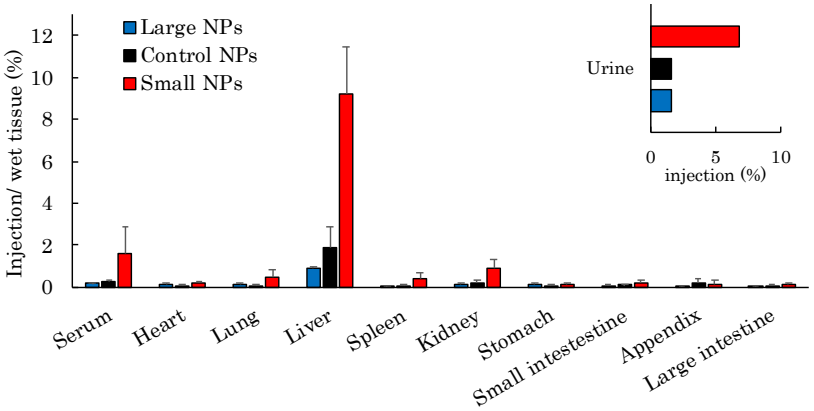


図 2. 粒子径の異なるナノ粒子の体内動態解析

Small NP（60 nm）、Control NP（100 nm）、Large NP（400 nm）をそれぞれマウスに経口投与し、24 時間後の体内動態解析した結果。

3. ナノ粒子の疎水度が体内動態に及ぼす影響

ナノ粒子を静脈内投与すると、構成モノマーの疎水性に比例して血中タンパク質との相互作用が増大し、結果として血中から速やかに除去、臓器への蓄積が増大してしまう。しかし、ナノ粒子の疎水性が経口投与後の体内動態に与える影響は定かではない。そこで次に、ナノ粒子の疎水度が経口投与後の体内動態に与える影響を解析した。ナノ粒子の疎水性向上には、*N-tert*-Butyl acrylamide（TBAm）を用いた。本検討では、TBAm の組み込み量を変えることで（0、20、40 mol%）疎水度の異なるナノ粒子を合成した。また、粒子径の影響を排除することを目的として、本検討では 100 nm となるように粒子を合成した。それぞれのナノ粒子をマウスに経口投与し、24 時間後の体内動態を解析した（図 3）。その結果、TBAm の含有量を 0 から 20、40%と増加させることで、消化管への吸収量が減少する傾向が見られた。TBAm の組み込み量が 0%と 40%の粒子を比較すると、40%にすることで消化管からの吸収量がおよそ半分程度になっていた。消化管内はムチンを主成分とする粘膜層に覆われており、疎水性分子の吸収を抑制するバリア機能を担っている。そのため、疎水性の高いナノ粒子はムチン層に排除されたことが考えられる。

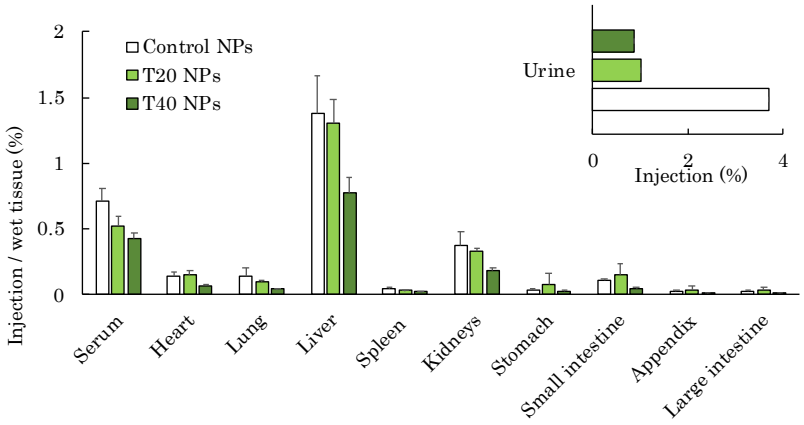


図 3. 疎水性の異なるナノ粒子の体内動態解析
Control NP（0% TBAm）、CT20 NP（20% TBAm）、T40 NP（40% TBAm）をそれぞれマウスに経口投与し、24 時間後の体内動態解析した結果。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は静岡県立大学薬学部の奥直人教授、九州大学大学院工学研究院化学工学部門の星野友准教授である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1） The rational design of a synthetic polymer nanoparticle that neutralizes a toxic peptide in vivo. Hoshino Y, Koide H, Furuya K, Haberaecker WW 3rd, Lee SH, Kodama T, Kanazawa H, Oku N, Shea KJ. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jan 3;109(1):33-8. doi: 10.1073/pnas.1112828109. Epub 2011 Dec 22. PMID: 22198772

2） A polymer nanoparticle with engineered affinity for a vascular endothelial growth factor (VEGF165). Koide H, Yoshimatsu K, Hoshino Y, Lee SH, Okajima A, Ariizumi S, Narita Y, Yonamine Y, Weisman AC, Nishimura Y, Oku N, Miura Y, Shea KJ. Nat Chem. 2017 Jul;9(7):715-722. doi: 10.1038/nchem.2749. Epub 2017 Mar 27. PMID: 28644480

3) Sequestering and inhibiting a vascular endothelial growth factor in vivo by systemic administration of a synthetic polymer nanoparticle. Koide H, Yoshimatsu K, Hoshino Y, Ariizumi S, Okishima A, Ide T, Egami H, Hamashima Y, Nishimura Y, Kanazawa H, Miura Y, Asai T, Oku N, Shea KJ. J Control Release. 2019 Feb 10;295:13-20. doi: 10.1016/j.jconrel.2018.12.033. Epub 2018 Dec 20. PMID: 30578808

4) Design of Synthetic Polymer Nanoparticles Specifically Capturing Indole, a Small Toxic Molecule. Okishima A, Koide H, Hoshino Y, Egami H, Hamashima Y, Oku N, Asai T. Biomacromolecules. 2019 Apr 8;20(4):1644-1654. doi: 10.1021/acs.biomac.8b01820. Epub 2019 Mar 15. PMID: 30848887

5) Design of synthetic polymer nanoparticles that inhibit glucose absorption from the intestine. Koide H, Hayashi N, Yasuno G, Okishima A, Hoshino Y, Egami H, Hamashima Y, Oku N, Asai T. Biochem Biophys Res Commun. 2021 Jul 5;561:1-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.05.005. Epub 2021 May 15. PMID: 34004514