

200912037B

厚生労働科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究

光線力学的治療に有効な
多機能型薬剤内封ナノ運搬体の開発
に関する研究

平成 19 年度～ 21 年度 総合研究報告書

研究代表者 小 野 努

平成 22 (2010) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究

光線力学的治療に有効な多機能型薬剤内封ナノ運搬体の開発
に関する研究

平成19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 小野 努

平成22（2010）年 5月

目 次

I. 総合研究報告	
光線力学的治療に有効な多機能型薬剤内封ナノ運搬体の開発に関する研究	----- 1
小野 努	
（資料1）ポルフィリン内封ナノ粒子製剤の体内動態特性ならびに 光線力学療法による抗腫瘍効果の評価に関する研究	
（資料2）光増感剤の高効率内封ナノ粒子調製プロセスに関する研究	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 43
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 54

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業・ナノメディシン研究）
「光線力学的治療に有効な多機能型薬剤内封ナノ運搬体の開発」

総合研究報告書

光線力学的治療に有効な多機能型薬剤内封ナノ運搬体の開発に関する研究

研究代表者 小野 努 岡山大学大学院環境学研究科資源循環学専攻 准教授

研究要旨

現在、光線力学的治療（PDT）に用いられている水溶性光増感剤は、静脈投与によって正常細胞へも分布するために、副作用（光過敏症）をもたらすことが課題であったが、本研究で開発した光増感剤内封ナノ粒子を用いると、正常細胞への分布が極めて小さく高い血中滞留性を示し、EPR 効果によって腫瘍近傍へ集積することが可能である。

ポリ乳酸（PLA）-ポリエチレングリコール（PEG）共重合体（PLE）を用いたポリ乳酸系ナノ粒子の調製法を最適化し、光増感剤の高効率内封技術の確立と光増感剤内封ナノ粒子を用いた PDT によって、有意な抗腫瘍効果が得られることが明らかとなった。本製剤および製剤調製プロセスはシンプルで簡便なものであり、生体に対して安全性の比較的高い化合物のみで構成されることから、患者のクオリティオブライフ（QOL）を向上させることのできる低侵襲な抗がん治療へと応用が期待できる。

分担研究者

- (1) 大河原賢一・岡山大学大学院医歯薬総合研究科・准教授
- (2) 小野努・岡山大学大学院環境学研究科・准教授

A. 研究目的

光線力学的治療（PDT）は、通常の抗癌剤を用いた化学療法とは異なり、外部から腫瘍近傍にのみ光を照射することで、局所的な抗癌効果を期待する低侵襲性治療のひとつである。日本でも 1994 年に早期の肺癌、食道癌、胃癌、子宮頸部癌に対して厚生労働省（当時は厚生省）の認可を受け、1996 年には保険採用されている。PDT は腫瘍を選択的に壊死させることが可能なことから、安全性に優れ、外科手術を必要としない患者のクオリティオブライフ（Quality of life, QOL）にも考慮した低侵襲性の抗癌治療法あり、今後の普及が強く期待される治

療法である。

しかしながら、今日十分に普及できていない原因として、治療に必要なレーザーが大型で高価だったことや早期癌のみの適応だったことに加え、他に目立った副作用がないなかで唯一といえる副作用が光過敏症であり、それが意外に大きな問題であったことが原因だと考えられている。PDT で用いる薬物は一般に言う光増感剤である。光を感受して励起し、励起三重項状態から酸素へのエネルギー移動によって一重項酸素を生成し、その一重項酸素が細胞を壊死させていくというものである。そのため、静脈投与によって患部以外の細胞へ取り込まれた光感受性物質が自然光によっても作用することで光過敏症が生じるため、PDT を受けた患者は治療後に一定期間の暗室での生活を余儀なくされる。これまでに厚生労働省で認可されている光感受性物質には、Photofrin® , talaporfin sodium

(Laserphyrin®), 加齢黄斑変性症 (患者数約 35 万人) を対象とした Verteporfin (Visudyne®) の 3 種類があり, 第一世代の Photofrin® は投与後に約 4 週間の遮光が必要であったが, 第二世代の Laserphyrin は 3 ~ 7 日間に短縮されているものの依然遮光期間が不可欠である。このように, 患者の QOL を向上させるためには更なる副作用軽減が必要であり, PDT 用薬物キャリアによるドラッグデリバリーの改善には大きな期待が込められている。

本研究では, そのような研究背景をもとにして, PDT に有効な疎水性光増感剤を高効率で内封可能な薬物キャリア (ナノ運搬体) を開発し, 静脈棟よによる PDT への応用を研究目的としている。疎水性の高い光増感剤をナノスケールの薬物キャリアに内封し, そのキャリアには高い血中滞留性を付与することで, 長時間血液中を循環し, 腫瘍近傍における未成熟血管壁から内部へ浸透して滞留する EPR 効果 (enhanced permeation and retention effect) を利用した薬物の集積が期待できる。ここで, 血中滞留時の薬物徐放が大きいと正常細胞への光増感剤の分布が広がり, 上述のような光過敏症を誘発すると考えられるため, 本研究の DDS に関するコンセプトは, 薬物を安定にナノ粒子中へ保ちつつ (低徐放性), 高い血中滞留性を確保し, 高価なターゲティング素子を付与することなく, PDT の特性を活かした局所的低侵襲治療を実現することにある。体内動態制御を専門とする薬学系研究者と共同で研究を行うことによって, ケミカルエンジニアのエッセンスを活かした独自アプローチによってナノ運搬体を新たに構築し, PDT の臨床応用を目指して研究を進めることとした。

また, 本研究では, 複数の疎水性薬物を同時に内封可能な薬物キャリアの設計を目的としており, 多機能型薬剤内封ナノ運搬体へと発展させるために, 作用機序の異なる

抗がん剤開発と高波長域で吸収帯を有する光増感剤の開発など創薬部門との連携も図り多角的な製剤調製を目指して研究を開始した。

当初は様々な薬物内封ナノキャリア調製法を視野に入れて, 光増感剤の内封挙動について検討を行ってきたが, その中から, ポリエチレングリコール (PEG) とポリ乳酸 (PLA) のブロック共重合体 (PEG-PLA あるいは PLE) を用いたナノ粒子調製法を構築し, PDT へ最適な薬物ナノキャリアの選択を行った。その後は, PEG-PLA ナノ粒子の調製法を最適化し, 光増感剤内封 PEG-PLA ナノ粒子を実現することで, *in vitro* 実験および *in vivo* 実験への適用を行った。さらに, 作用機序の異なる抗腫瘍効果が期待されるレチノイド化合物の開発も進め, より低濃度で抗腫瘍効果をもたらすレチノイド化合物合成を進めた。

B. 研究方法

光増感剤内封ナノ運搬体調製法の検討

光増感物質のひとつであるポルフィリンは水溶性が非常に低い一方で, 油への溶解性は比較的高いことから, 水中油滴型 (O/W) エマルションの調製をベースにして最終的なナノ運搬体の開発をあらゆる方法でアプローチした。特に初年度は, 様々な包括様式, 徐放挙動を有するナノ運搬体候補を開発し, 実際に *in vitro* 系において殺細胞効果の優れたキャリア構造の設計指針を選択することを目指した。

抗がん剤を内封するエマルション製剤として, 大河原によって確立した油相組成を用いたナノエマルション製剤を調製する。油相としては, トリアセチン, トリブチリン, トリカプロイン, トリカプリリンのなかで, 最もポルフィリンの溶解性に富むことが明らかとなったトリカプリリンを, 界面活性剤としては一般的

に汎用されているツイーン80をそれぞれ選択した。光増感剤封入エマルションは、ポルフィリン誘導体を溶解させた油相にツイーン80を添加後、2.25%グリセリン溶液中に滴下し、プローブ型ソニケーターにより超音波照射することにより調製した。

また、小野は種々のナノ粒子調製法の中から、界面張力の温度変化を利用して微細なエマルション調製が可能な転相温度乳化法に着目して100 nm程度のポリスチレン粒子調製を試み、さらに血中滞留性に優れた効果を示すPEG鎖と生体内での代謝分解が可能なPLA鎖を併せ持つジブロックポリマーを用いてPLAをコアとするナノ粒子の調製を試みた。

粒子径ならびに表面電荷の指標となるゼータ電位の測定はMalvern社のZetasizer-Nanoを用いて動的光散乱法により行った。また、濃厚系での液滴径・粒子径測定には、濃厚系粒径アナライザー(FPAR)(FPAR-1200H, 大塚電子)により測定を行った。さらに、粒子として得られたものに関しては、走査型電子顕微鏡(SEM)(S-4700, HITACHI)により粒子形状を観察した。さらに光増感剤は所定の波長の光照射により蛍光を発することから、それらの細胞内でのイメージングを、本年度の研究費よりリースしている蛍光顕微鏡(BZ-8000, キーエンス)の利用も試みた。

生体透過性の高い波長域で機能する光増感剤の設計

可視領域の光の多くは、生体成分によって吸収されてしまうため、深部への光エネルギーの送達を目的とすると、PDTに有効な光増感物質は、600 nm以上の波長域の光を吸収して一重項酸素を産生することが望ましい。高波長側に吸収帯がシフトするほど、生体成分による光の減衰がなく、効率的なPDTが期待できる。

そこで、(株)光ケミカル研究所の阪田によって、光波長域に吸収帯を有するポルフィリン誘導体の開発を行った。

光増感剤内封ナノ運搬体による in vitro 系での殺細胞効果

様々な手法で光増感剤を内封した薬物ナノキャリアを調製し、光照射による in vitro 殺細胞効果の評価をMTT assayを用いて行った。

実験は接着細胞である colon26 細胞を96穴プレートに播種後、24時間後にポルフィリン内封PLEナノ粒子を一定量添加し、12時間後に光を1分間照射した。光照射24時間後における細胞生存率を求めた。

また、光増感剤内封ナノ運搬体が in vitro 条件下において殺細胞効果を示すのに有効な光増感剤放出特性について、上述のMTT assayにより検討した。光照射を行う前段階において培地交換を行う群と行わない群を評価し、殺細胞効果への影響を比較することで検討を行った。光増感剤放出特性については、ポルフィリン封入ポリマーミセル添加後、光照射を行うまでの時間を変化させることで、ポルフィリン放出に伴う殺細胞効果の変化をMTT assayにより計測し、間接的に光増感剤の徐放性を評価した。

レチノイド化合物の合成とその活性評価

加来田によって、光増感物質によるPDTと異なる作用機序を有するレチノイド誘導体として、タモキシフェン耐性乳がんやタキソール耐性肺がんなどの治療薬候補として注目されているレチノイドX受容体(RXR)を分子標的として、NEt-3IPと称するサブタイプ選択性のある新規なRXRアゴニストを開発している。

本年度は、本化合物の単独でのがん細胞増殖抑制効果および抗炎症効果について

て検討した。

開発化合物の RXR-PPAR α および RXR-PPAR γ などのヘテロダイマーに対する活性化能を評価するために、ルシフェラーゼレポータージーンアッセイを行った。活性化能は、PPAR パンアゴニストである TIPP-703 1 μ M での活性化能を 1 とした。実験動物は、雄性 ICR マウス (体重 15-30 g) および雄性 SD ラット (170-200 g) Charles River より購入し、4-7 日間岡山大学動物実験施設にてならした後、実験前日より絶食し、水飲みを与えた。なお動物実験は、岡山大学動物実験指針に従って行った。

抗炎症試験法には、マウスを用いたカラゲニン浮腫試験を用いた、マウス一群 7-8 匹に対し、1, 3, 10 mg/kg の NEt-3IP (1%エタノール, 0.5% CMC 水溶液) を 10 mL/kg で経口投与し、その 3 時間後に浮腫を発生させる物質であるカラゲニンの 1% 水溶液をマウス後肢足蹠に皮下注射した (0.1 mL/匹)。その後、1, 2, 3, 4 時間後ごとに後肢足蹠の体積を測定した。

C. 研究結果

光増感剤内封ナノ運搬体調製法の検討

トリカプリリン, ツイーン 80 を用いて調製した機能性ポルフィリン内封エマルションは、平均粒子径として 442 nm でゼータ電位はおおよそ -3.2 mV を示した。

また、転相温度乳化法を用いたナノエマルションは、POE (10)NPE とヘキサデカン, スチレンを用いて 100 nm 以下の粒径を有する単分散 O/W エマルションの調製を達成している。しかしながら、細胞毒性の少ない油相では同様の転相温度が得られず、光増感剤を内封することは可能であっても、*in vitro* 実験および *in vivo* 実験で実用可能な組成でのナノエマルション化は現実的に困難であった。そこで、

ナノエマルション液滴を利用してミニエマルション重合を行い、ナノ粒子化することでポルフィリンの内封を試みたが、ミニエマルション重合時にポリスチレンが溶媒と相分離を起こすため、疎水性化合物の高い内封効率を得るためには両者の溶解度を考慮して組成を操作する必要がある。

一方、PEG-PLA のジブロックコポリマーによって水溶液中で酢酸エチルを油相とした O/W エマルション分散系を構築し、溶媒除去によってポリ乳酸を疎水性コアとしたナノ粒子中へ光増感剤が内封可能なことが明らかとなった。用いるコポリマー組成を制御することで、60 nm 程度の粒径まで小さく調製することが可能であり、ポルフィリンの内封効率も 87% に達することが示された。他の調製手法に比べても大幅に高い内封率であり、安定に水溶液中に分散していることから、粒子表面が親水性高分子である PEG 層で覆われていることが示唆された。

生体透過性の高い波長域で機能する光増感剤の設計

光照射のエネルギーが生体内においてできる限り深部まで届くためには、PDT に高波長域の光を用いることが望ましい。そこで、(株)光ケミカル研究所によって 672 nm の光を吸収して一重項酸素を算出することのできる疎水性ポルフィリン誘導体、フォトプロトポルフィリン IX ジメチルエステル (特願 2008-118187) を合成した。本化合物は酢酸エチルへは溶解性を示し、一方、水へ全く溶解性を示さずマイクロスケールの凝集物を生じる。高波長側に吸収帯がシフトするほど、生体成分による光の減衰がなくなるため、現在用いられている光増感剤と比較しても非常に効率的な PDT を可能にする。

溶媒拡散法による光増感剤内封 PEG-PLA ナノ粒子調製プロセスの構築

上述のように、様々な光増感剤内封ナノ運搬体の調製を行ってきた結果、溶媒拡散法によって調製される PEG-PLA ナノ粒子が最も高効率でかつ安定に光増感剤を内封できることを見いだした。本手法は、先ず oil-in-water (O/W) エマルションを調製し、ジブロック共重合体の片方のユニットが溶解する有機溶媒を系中から除去することによって溶解性の乏しいユニット部分の析出を促し、結果として固体のコアを持ち、溶媒へ溶解性の高い高分子鎖を表面に持つナノ粒子が調製できるものである。

生体内への投与を考慮し、ナノ粒子を構成する成分として、抗原性を示さず生体適合性の高いポリエチレングリコール (PEG) 鎖と生分解性高分子であるポリ乳酸 (PLA) 鎖のジブロック共重合体 (PEG-PLA) を用いた (図1)。

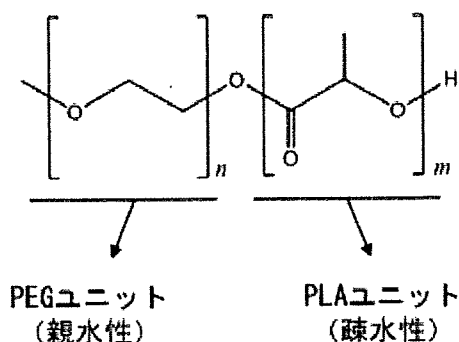


図1 PEG-PLA (PLE) の分子構造

表1. 本研究で用いた PEG-PLA (PLE) 組成

RUN No.	PLE M_w *	PLE M_w/M_n	PLA /PEG	HLB
w-PLE	5,200	1.07	0.20	16.63
o-PLE	33,000	1.32	6.47	2.68

*: PEG M_w は全て 4,400

PEG ユニットは水に易溶であるが、PLA ユニットは水に不溶であり、そのブロック共重合体 PEG-PLA は両ユニットの組成によって親水性か疎水性が決まる。本研究では、表1のような PLA 鎖長の異なる水溶性 PEG-PLA と油溶性 PEG-PLA の二種類を合成し、ナノ粒子調製を行った。さらに溶媒拡散法では、酢酸エチルを油相として用いることで、PEG-PLA によるエマルションの安定化が期待できる。なぜなら、酢酸エチルに対しては PLA ユニットが易溶であるのに対して PEG ユニットは不溶であるため、ジブロック共重合体は水-酢酸エチル界面へ配向しやすい状況を生み出している。

なお、本研究で用いている PEG と PLA はいずれも広く用いられている生体適合性および生分解性高分子であり、そのブロック共重合体もまた数多くの研究が行われている。当然、生体への安全性に優れていることから、ドラッグデリバリー担体としても数多くの研究が行われている。特に、疎水性抗癌物質であるパクリタキセル (Paclitaxel) を内封した PEG-b-PLA ミセル (Genexol-PM) は、現在、乳癌や肺癌を対象として Phase II 試験が行われているほどである。ほとんどの場合、PEG-PLA を用いた薬物内封体は高分子ミセルとして調製されており、ブロック共重合体中の PLA/PEG 比が比較的 1 に近いものがよく用いられている。これは、高分子ミセルが水媒体中で調製されるため、ポリマー自体の水溶性と有機溶媒の除去に伴う自己会合体形成に必要な親-疎水性バランスを考慮したものであるといえる。それ故、本研究のコンセプトに基づき、薬物キャリアを設計するためには、高分子ミセル構造よりも安定に薬物を内封させることを目的として、PLA ユニットを増やし、油溶性 PEG-PLA を有機溶媒に添加して固化させることで、PEG を表

面に持ち PLA をマトリックスとした PEG-PLA ナノ粒子の調製を行ってきた。粒子化した内部に薬物を内封することで、副作用の原因となる血中滞留時の薬物徐放は抑えられ、さらに担体への高効率な薬物内封が可能な調製プロセスの構築が期待される。

本実験で用いている酢酸エチルもまた同様に溶媒拡散法によって十分な除去を行う必要があるが、医薬品添加物規格、食品添加物公定書にも認められた比較的安全性の高い有機溶媒である。酢酸エチルはまた、水にも若干溶解することから、大量の水による希釈操作のみで常温で簡単に有機溶媒除去が可能な溶媒拡散法に適した有機溶媒といえる。

まず、酢酸エチル相に所定量の油性 PEG-PLA を溶解させ、超音波照射を行って O/W エマルション液滴を調製したところ、超音波出力の増加とともに得られる液滴が若干小さくなるのが分かった。溶媒拡散法によって最終的に得られたナノ粒子は、調製された液滴径を反映して平均径も減少するが、超音波出力を高くしても 220 nm 程度が限界であり、EPR 効果を期待するには粒径が大きすぎる。従来の研究においても、同様に比較的 PLA/PEG 比の大きな PEG-PLA を用いた場合は 200 nm 以上の粒子しか得られておらず、静脈注入する抗癌剤としては更なる調製手法の改良が求められていた。

そこで、本研究では超音波照射で調製される液滴径を小さくすることを目的として界面活性剤の導入を検討し、製剤調製時に余計な試薬の混入を防ぐために、界面活性剤としての役割を担う水溶性 PEG-PLA を合成した。そして、ナノ粒子マトリックス成分として重要な油性 PEG-PLA との同時使用を試みた。その結果、水溶性 PEG-PLA との併用によって超音波照射によるエマルション液滴径は大きく

低下し、100 nm 以下のナノ粒子を得ることに成功した。図 2 のように走査型電子顕微鏡 (SEM) の写真からも、100 nm 以下のナノ粒子が得られていることが示されている。

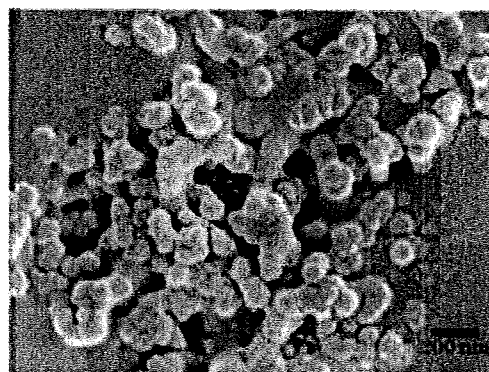


図 2 PEG-PLA (PLE) で調製したナノ粒子の SEM 画像

得られたナノ粒子組成を $^1\text{H-NMR}$ によって測定したところ、ナノ粒子を純水で洗浄することで、水溶性 PEG-PLA はほとんどナノ粒子内には残らないことが確認された。また、実際に高波長域に吸収帯を有する光増感剤であるフォトプロトポルフィリン IX ジメチルエステルを内封した際にも、ほぼ同等のナノ粒子調製が可能なことを確認している。調製時の光増感剤濃度を増加させると、内封率も大きく低下したが、これは光増感剤の酢酸エチルへの溶解度によるものであり、飽和溶解度以下の濃度であれば 100% 近くの薬物内封効率を達成することができる。

また、ナノ粒子内に内封されたポルフィリンに対する光照射の結果、水溶液中に溶解するダンシル-L-メチオニンの酸化反応物が薄層クロマトグラフィーによって観察され、PEG-PLA ナノ粒子中に存在している光増感剤から一重項酸素が産生し、水溶液中に溶解する化合物まで届いていることが示唆された。

光増感剤内封ナノ粒子の体内動態評価と PDT による抗腫瘍効果

まず, *in vitro* 系実験において, マウス結腸癌由来細胞 (C26 細胞) を播種した細胞培養ディッシュ上に, 本ナノ粒子分散水溶液を添加し, 一定時間培養後, 培地交換して光照射を行った。光照射装置は市販の光源ランプに 500 nm 以下の光を遮断するフィルターを装着したものを用い, 赤色光の照射を実施した。このときの細胞生存率を MTT assay により行ったところ, 光増感剤の最終濃度が約 50 nM でも光照射によりほぼ全ての細胞が死滅することが分かった。また, 細胞のナノ粒子への曝露時間の増加に伴い, 細胞生存率も低下することから, ナノ粒子から細胞へ光増感剤の物質移動が起こっていることが示唆された。

次に, 本ナノ粒子の体内での薬物動態を調査するために, ^3H 標識ナノ粒子を調製し, C26 細胞をマウス背部皮下に移植して腫瘍体積が約 500 mm³ に達した時点で ^3H 標識ナノ粒子を尾から静脈注射した。その結果, 血液中での滞留性の指標となる AUC (% of dose/mL·hr) 値を算出すると, 2070 と非常に高い値を得た。この値は一般的な PEG 化リポソーム製剤と同等あるいはそれ以上の高い値であり, 24 時間後でも 3 割以上の薬物が体内循環していることが分かった。このときの各臓器への移行も定量した結果, 5~10 時間までに一時的に肺や脾臓に集積するもののその後低下したのに対して, 図 3 から分かるように, 腫瘍への蓄積は 25 時間後まで着実に増加を続けており, EPR 効果による薬物集積が機能していることが確かめられた。また, 図 3 から筋肉への集積がほとんどないことが示唆されており, これは光過敏症などの副作用抑制を大きく期待させる結果であるといえる。

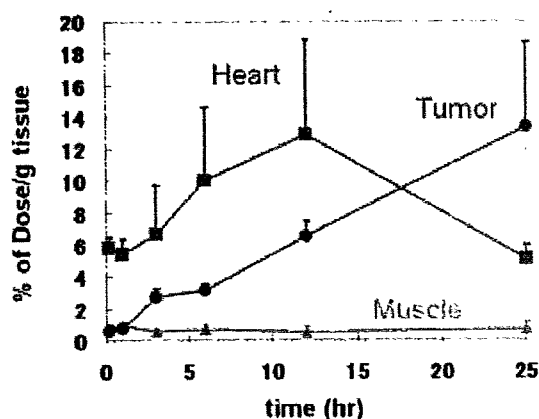


図 3 ^3H 標識ナノ粒子を用いた担癌マウスに対する静脈内投与後の各臓器への移行挙動

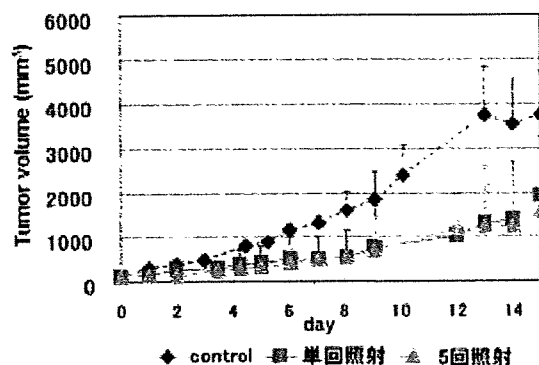


図 4 担癌マウスへの PDT 結果 (Control: ナノ粒子の代替として PBS 投与, 単回照射群: 投与 12 時間後に赤色光 ($\lambda > 500$ nm) を腫瘍局所に 5 分間照射, 5 回照射群: 投与 6, 12, 24, 36, 48 時間後に同様の光照射)

さらに, C26 細胞担癌モデルマウスを製作して, 担癌マウスへの PDT 効果を実証した。腫瘍体積が 100 mm³ に達した時点で, 3 mg/kg となるように光増感剤内封ナノ粒子水溶液を静脈投与した。図 4 にはその後の腫瘍サイズの増加を示す。その結果, 参照実験群と比較しても単回照射群で腫瘍抑制効果を有意に示していることがわかる。この間, マウスの体重変化は

ほとんどなく、PDTによる腫瘍の増殖抑制が達成されたことが *in vivo* 実験で示された。図3の結果と合わせて、本研究で目指す高い血中滞留性を保ち薬物徐放を抑えたナノ粒子は、PDTのためのドラッグキャリアとして極めて有効であると言える。

レチノイド化合物の合成とその活性評価

NEt-3IP のヘテロダイマーに対する活性化能を見たところ、高脂血漿治療薬の分子標的として知られる PPAR α に対する活性化能はなかったものの、抗炎症作用の期待できる PPAR γ に対する活性可能が認められた。

また、カラゲニン足浮腫試験より、顕著な抗炎症剤であるステロイド剤のプレドニゾロンの抗炎症作用が 10 mg/kg では見られないことから、本化合物の抗炎症作用は極めて強力と思われる。

十分な抗腫瘍効果を持つ化合物が合成されれば、今後は機能性ポルフィリンと同時に内封した相乗効果を示す多剤併用型ナノキャリアの開発に繋がる技術であるといえる。

D. 考察

以上、これまで3年間の研究成果として、PDTに有効な薬物ナノキャリアの設計指針が明確になり、高い血中滞留性を与える PEG 鎖と生体内での代謝能を有し、水溶液中で強固な粒子マトリクスを構成するポリ乳酸部位を併せ持つ PEG-PLA によって、疎水性薬物を高効率で内封できるナノ粒子調製プロセスが構築できた。

また、ナノ粒子に内封されたままでも光照射によって産生した一重項酸素はその短い寿命にもかかわらず、溶液中の基質と反応することが分かった。

本ナノ粒子を用いた *in vitro* 実験系においても、光照射による殺細胞効果実験

から、極めて低濃度の光増感剤投与によって、明確な殺細胞効果を示すことが明らかとなった。ただ、培地交換後の光照射においても十分な殺細胞効果が確認できたことから、ポルフィリンが僅かながら水中を拡散して細胞表面付近に取り込まれていることが示唆されるものである。このようなナノ粒子からの PDT 作用機序を明らかにすることによって、さらに高機能な PDT 用ナノ運搬体の開発が可能になると期待される。

現時点では、ポルフィリン誘導体の含有量は酢酸エチルへの溶解量によって制限を受けているが、今後は用いる有機溶媒やジブロックコポリマー組成を変更することによって、より低侵襲で副作用の少ないナノメディシン創製を実現していきたい。さらに、本ナノ粒子の特徴である疎水性化合物の高い包括率を活かして、高活性なレチノイド誘導体などの多剤併用ドラッグキャリアの創出も期待できる。

E. 結論

本研究の研究成果として、ポリ乳酸-ポリエチレングリコールジブロック共重合体を用いることで、光増感剤を高効率で安定に含有可能なナノキャリアを約 100 nm で調製する手法を確立した。その粒子サイズや内封量および含有量まで調整操作因子によって、任意で調製することが可能である。

さらに、この光増感剤内封 PEG-PLA ナノ粒子は、colon26 細胞を用いた *in vitro* 実験系において、50 nM という極めて低濃度でほぼ 100% の殺細胞効果を示した。

体内動態挙動においては、本ナノ粒子は通常の PEG 化リポソームに匹敵するほどの高い血中滞留性を示し、EPR 効果によって腫瘍近傍へ時間とともに確実に蓄積する結果を得ている。このような良好な体内動態挙動を基にして、C26 細胞担癌マウスへ

の静脈投与および患部への光照射による PDT を行った結果、抗腫瘍効果において有意な差をもたらした。

現在、厚労省から認可済みの PDT 用製剤のような正常細胞への分布が抑制でき、腫瘍近傍への集積も可能な本ナノ粒子は、副作用を低減した低侵襲がん治療へ向けて有望な実験結果を積み重ねてきた。本研究では、製剤の調製プロセスから安全性と簡便性に配慮して設計してきたため、臨床応用に向けて化合物の毒性に関するリスクは極めて小さく、調製プロセスもまた、連続的で安全に生産可能であることから、原料生産および製剤生産プロセスの cGMP 対応によって、即座に臨床応用の段階へと発展可能などころまで達することができた。

また、本製剤は多剤併用も可能な調製プロセスを有するため、今後は他の作用機序を有する抗がん剤との併用デリバリー療法への道を拓くと期待される。同時に開発を続けてきたレチノイド化合物に関しては、現時点では、併用して投与するには十分な抗がん効果までは得られていないため、今後の抗がん効果の向上を待つて検討を続けていくこととする。一方、既に抗がん治療に広く利用されているパクリタキセルの本製剤への内封には成功しており、同様に高い血中滞留性と腫瘍への高い集積性があることが確認できている。今後は最適な光増感剤とパクリタキセル内封条件を見いだすことで、強力な抗がん剤の局所投与も併用できる PDT による低侵襲抗がん治療の実現を目指していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) S. Nagayama, K. Ogawara, K. Minato, Y. Fukuoka, Y. Takakura, M. Hashida, K. Higaki, T. Kimura, Fetuin mediates hepatic uptake of negatively charged

nanoparticles via scavenger receptor. *Int. J. Pharm.*, 329, 192-198 (2007)

2) K. Furumoto, J. Yokoe, K. Ogawara, S. Amano, M. Takaguchi, K. Higaki, T. Kai and T. Kimura, Effect of coupling of albumin onto surface of PEG liposome on its in-vivo disposition. *Int. J. Pharm.*, 329, 110-116 (2007)

3) S. Nagayama, K. Ogawara, Y. Fukuoka, K. Higaki and T. Kimura, Time-dependent changes in opsonin amount associated on nanoparticles alter their hepatic uptake characteristics. *Int. J. Pharm.*, 342, 215-221 (2007)

4) S. Mutsuo, K. Yamamoto, T. Furuzono, T. Kimura, T. Ono, A. Kishida, Pressure-induced molecular assembly of hydrogen-bonded polymers. *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.*, 49, 743-750 (2008)

5) K. Takamatsu, A. Takano, N. Yakushiji, K. Morishita, N. Matsuura, M. Makishima, A. Tai, K. Sasaki, and H. Kakuta, Reduction of Lipophilicity at the Lipophilic Domain of RXR Agonists Enables Production of Subtype Preference: RXR α -Preferential Agonist Possessing a Sulfonamide Moiety, *ChemMedChem*, 3, 454-460, (2008)

6) E. Kamio, A. Kato, S. Yonemura, T. Ono, H. Yoshizawa, Preparation of monodisperse crosslinked polymelamine microcapsules by phase separation method., *Colloid Polym. Sci.*, 286, 787-793 (2008)

- 7) K. Takamatsu, A. Takano, N. Yakushiji, K. Morohashi, K. Morishita, N. Matsuura, M. Makishima, A. Tai, K. Sasaki, H. Kakuta. The First Potent Subtype-Selective Retinoid X Receptor (RXR) Agonist Possessing a 3-Isopropoxy-4-isopropylphenylamino Moiety, NEt-3IP (RXR β / β -dual agonist), ChemMedChem. 3, 780-787 (2008)
- 8) J. Yokoe, S. Sakuragi, K. Yamamoto, T. Teragaki, K. Ogawara, K. Higaki, N. Katayama, T. Kai, M. Sato and T. Kimura, Albumin-conjugated PEG liposome enhances tumor distribution of liposomal doxorubicin in rats. Int. J. Pharm., 353, 28-34 (2008)
- 9) K. Ogawara, K. Un, K. Minato, K. Tanaka, K. Higaki and T. Kimura, Determinants for in-vivo anti-tumor effects of PEG liposomal doxorubicin: Importance of vascular permeability within tumors. Int. J. Pharm., 359, 234-240 (2008)
- 10) T. Shehata, K. Ogawara, K. Higaki and T. Kimura, Prolongation of residence time of liposome by surface modification with mixture of hydrophilic polymers. Int. J. Pharm., 359, 272-279 (2008)
- 11) H. Takahashi, A. Ishida-Yamamoto, S. Nakajima, I. Sakata, H. Iizuka, ATX-S10 (Na)-photodynamic therapy inhibits cytokine secretion and proliferation of lymphocytes, J. Dermatological Sci., 49, 174-177 (2008)
- 12) K. Takeda, T. Kunisada, S. Miyazawa, Y. Nakae, T. Ozaki, Photodynamic therapy with ATX-S10-Na(II) Inhibits synovial sarcoma cell growth, Clin. Orthop. Relat. Res., 466, 1726-1733 (2008)
- 13) E. Kamio, S. Yonemura, T. Ono, and H. Yoshizawa "Microcapsules with Macroholes Prepared by the Competitive Adsorption of Surfactants on Emulsion Droplet Surfaces" Langmuir, 24(23), 13287-13298 (2008)
- 14) T. Nakashima, T. Ono "Effects of Dispersion Stabilizer and Reaction Solvent on Forming Monodisperse Polystyrene Microspheres by Dispersion Polymerization" Colloid Polym. Sci., 286, 1587-1592 (2008)
- 15) K. Tomita, T. Ono "Synthesis of polyaspartate macromonomer having a vinyl end group and application to dispersion copolymerization of styrene" Colloid Polym. Sci., 287, 109-113 (2009)
- 16) M. Muranaka, T. Ono "Preparation of Monodisperse Polylactide Microspheres by Dispersion Polymerization Using a Polymeric Stabilizer with Hydroxyl Groups" Macromol. Rapid Commun., 30, 152-156 (2009)
- 17) S. Mutsuo, K. Yamamoto, T. Furuzono, T. Kimura, T. Ono, A. Kishida, Release behavior from hydrogen-bonded polymer gel prepared by pressurization, J. Applied Polym. Sci., in press
- 18) K. Ogawara, K. Un, K. Tanaka, K.

- Higaki and T. Kimura, In Vivo Anti-Tumor Effect of PEG Liposomal Doxorubicin (DOX) in DOX-Resistant Tumor-Bearing Mice: Involvement of Cytotoxic Effect on Vascular Endothelial Cells, *J. Controlled Rel.*, 133(1), 4-10 (2009)
- 19) K. Tomita, T. Ono, Heterogeneous Polymerization with Polyaspartate Macromonomer Having Vinyl Pendant Groups. 1. Synthesis of Macromonomer and Dispersion Copolymerization of Styrene, *J. Polym. Sci. A*, 47, 762-770 (2009)
- 20) M. Muranaka, H. Yoshizawa, T. Ono, Design of polylactide grafted copolymeric stabilizer for dispersion polymerization of D,L-lactide, *Colloid Polym. Sci.*, 287, 525-532 (2009)
- 21) K. Tomita, T. Ono, Heterogeneous Polymerization with Polyaspartate Macromonomer Having Vinyl Pendant Groups. 2. Control of Particle Diameter and Diameter Distribution in Dispersion Copolymerization, *J. Polym. Sci. A*, 47, 2281-2288 (2009)
- 22) M. Muranaka, T. Ono, Role of Dispersion Stabilizer with Hydroxy Groups in Preparation of Monodisperse Polylactide Microspheres, *J. Polym. Sci.*, 47 5230-5240 (2009)
- 23) F. Tanimoto, Y. Kitamura, T. Ono, H. Yoshizawa, A versatile biodegradable polymer with a thermo-reversible/irreversible transition, *ACS Appl. Mater. Interf.*, 2, 606-610 (2010)
- 24) M. Muranaka, K. Hirota, T. Ono, PEG-PLA nanoparticles prepared by emulsion solvent diffusion using oil-soluble and water-soluble PEG-PLA, *Mater. Lett.*, 64, 969-971 (2010)
- 25) 小野努, 大河原賢一, ポリ乳酸系ナノ粒子の調製と光線力学的治療への応用, *ケミカルエンジニアリング*, 55, 63-69 (2010)
- 26) T. Harada, T. Kanda, K. Suzumori, T. Ono, S. Iwabuchi, K. Ito, K. Ogawara, K. Higaki, An emulsion generating microchannel device oscillated by 2.25MHz ultrasonic vibrator, *Japan J. Appl. Phys.*, in press
2. 学会発表
- 1) Tamer Shehata, Ken-ichi Ogawara, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura, Hepatic disposition characteristics of Liposomes Coated with Mixture of Hydrophilic Polymers. 日本薬剤学会第22年会、埼玉、2007年5月21-23日
- 2) 運 敬太, 大河原賢一, 西川元也, 高倉喜信, 檜垣和孝, 木村聰城郎、P-糖タンパク質高発現がん細胞に対するドキシソルビシン内封 PEG 修飾リポソームの in vivo 抗腫瘍効果に関する検討、第23回日本 DDS 学会、熊本、2007年6月14-15日
- 3) 渡 亮輔, 寺垣拓哉, 大河原賢一, 横江淳一, 甲斐俊哉, 檜垣和孝, 木村聰城郎、アルブミン修飾 PEG リポソームの体内動態特性とその抗腫瘍効果の評価、第23回日本 DDS 学会、熊本、2007年6月

14-15 日

4) 村中誠, 小野努, 水酸基を有する高分子安定剤を用いたアニオン分散重合による単分散ポリ(D,L-乳酸)ミクロスフェアの調製, 第56回高分子学会, 名古屋, 2007年9月19-21日

5) Ken-ichi Ogawara, Susumu Nagayama, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura, Time-Dependent Changes in Opsonin Amount Associated on Nanoparticles Alter Their Hepatic Uptake Characteristics. 8th International ISSX Meeting, Sendai, 2007年10月9-12日

6) Keita Un, Takaaki Nakao, Ken-ichi Ogawara, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura, In Vivo Anti-Tumor Effects of PEG-Modified Liposomal Doxorubicin on P-Glycoprotein Over-Expressing Tumor-Bearing Mice. 8th International ISSX Meeting, Sendai, 2007年10月9-12日

7) J. Kubota, A. Kato, T. Ono, Phase inversion temperature (PIT) method utilized preparation of O/W nano-emulsion by microreactor system, 2007 AIChE annual meeting, Salt Lake City, USA, 2007年11月4-8日

8) 富田恵介, 小野努, ポリアスパラギン酸ナトリウムを主鎖に持つマクロモノマーを用いた高分子微粒子の調製, 2007年日本化学会西日本大会, 岡山, 2007年11月10-11日

9) 加来田博貴, 高松佳代, 高野敦史, 薬

師寺信匡, 森下健一, 師橋一徳, 大澤史宜, 原田隼, 藤井周司, 鄭曉霞, 松浦信康, 槇島誠, Hamed Ismail Ali, 赤穂榮一, 永澤秀子, 杉本幸雄, 田井章博, 佐々木健二, RXR α / β 選択的アゴニスト NEt-3IP の開発と生理活性
第18回日本レチノイド研究会, 東京, 2007年11月23-24日

10) 高松佳代, 高野敦史, 薬師寺信匡, 森下健一, 大澤史宜, 藤井周司, 松浦信康, 槇島誠, Hamed Ismail Ali, 赤穂榮一, 田井章博, 佐々木健二, 加来田博貴, RXR アゴニスト脂溶性部位の脂溶性低減による RXR サブタイプ指向性の創出—リンカー部位にスルホンアミド基を有する—

第26回メディシナルケミストリーシンポジウム, 相模原, 2007年11月27-29日

11) 高松佳代, 高野敦史, 薬師寺信匡, 森下健一, 師橋一徳, 大澤史宜, 藤井周司, 松浦信康, 槇島誠, 田井章博, 佐々木健二, 加来田博貴, 高活性 RXR α / β 選択的アゴニスト NEt-3IP の開発—脂溶性部位にアルコキシ基を有する—
第26回メディシナルケミストリーシンポジウム, 相模原, 2007年11月27-29日

12) 高野敦史, 原田隼, 鄭曉霞, 薬師寺信匡, 森下健一, 大澤史宜, 藤井周司, 杉本幸雄, 田井章博, 槇島誠, 永澤秀子, 佐々木健二, 加来田博貴, RXR α / β デュアルアゴニスト NEt-3IP の抗炎症及び抗がん作用の検証, 第26回メディシナルケミストリーシンポジウム, 相模原, 2007年11月27-29日

13) 富田恵介, 小野努, 末端にビニル基を導入した縮合系マクロモノマーの合成と微粒子調製への応用, 高分子材料のた

めの俯瞰的シンポジウム, 東京, 2008 年
1 月 10-11 日

14) 村中誠, 小野努, 単分散ポリ乳酸ミ
クロスフェアの調製における高分子分散
剤の分子設計, 高分子材料のための俯瞰
的シンポジウム, 東京, 2008 年 1 月 10-11
日

15) 宇留嶋創, 小野努, 無乳化共重合に
よる単分散機能性微粒子の調製, 第 10 回
化学工学会学生発表会, 大阪, 2008 年 3
月 2 日

16) 大浦浩平, 久保田潤, 小野努, 田中
秀雄, 界面活性能を有する TEMPO 誘導体
の合成及び不均相重合への応用, 化学工
学会第 73 年会, 浜松, 2008 年 3 月 17-19
日

17) 久野優子, 久保田潤, 小野努, 転相
温度乳化法を適用したミニエマルジョン
重合による高分子ナノ粒子の調製, 化学
工学会第 73 年会, 浜松, 2008 年 3 月 17-19
日

18) 杉田直輝, 谷元史明, 小野努, 主鎖
末端に疎水基を導入した温度応答性ポリ
アスパラギン酸誘導体の会合特性, 化学
工学会第 73 年会, 浜松, 2008 年 3 月 17-19
日

19) 高松佳代, 高野敦史, 薬師寺信匡,
師橋一徳, 森下健一, 大澤史宜, 藤井周
司, 松浦信康, 槇島 誠, 永澤秀子, 杉
本幸雄, 田井章博, 佐々木健二, 加来田
博貴, RXR α / β デュアルアゴニスト NEt-3IP
の開発と生理活性評価
第 128 回日本薬学会, 横浜, 2008 年 3 月
27-29 日

20) 大河原賢一, 運 敬太, 檜垣和孝,
木村聰城郎, P-糖タンパク質高発現がん
細胞に対するドキソルビシン内封 PEG 修
飾リポソームの in vivo 抗腫瘍効果とそ
の機構解析, 第 23 回日本薬剤学会, 札幌,
2008 年 5 月 20-22 日

21) 大河原賢一, 運 敬太, 中尾隆明,
檜垣和孝, 木村聰城郎, 血管新生阻害薬
のエマルジョン製剤化とその抗腫瘍効果
の評価, 第 24 回日本 DDS 学会, 東京, 2008
年 6 月 29-30 日

22) Tamer Shehata, Ken-ichi Ogawara,
Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura,
Formulation and evaluation of
PEGylated niosomes for targeted drug
delivery. 第 24 回日本 DDS 学会, 東京,
2008 年 6 月 29-30 日

23) Yuta Yoshizawa, Yusuke Kono,
Yoshiko Fukuoka, Ken-ichi Ogawara,
Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura,
Development and evaluation of novel
nanoparticle formulation of paclitaxel.
第 23 回日本薬物動態学会, 熊本, 2008
年 10 月 30 日-11 月 1 日

24) Ryosuke Watari, Shuhei Nishiguchi,
Ken-ichi Ogawara, Jun-ichi Yokoe,
Kazutaka Higaki, Toshiya Kai, Makoto
Sato and Toshikiro Kimura, Improvement
of in-vivo disposition characteristics
and anti-tumor activity of PEG
liposomal doxorubicin by rHSA
conjugation onto surface of liposome.
第 23 回日本薬物動態学会, 熊本, 2008
年 10 月 30 日-11 月 1 日

25) 岡本芳晴, 田邊茂之, 柄武志, 南三郎, 中島進, 仲江良則, 阪田功, 早期照射による光増感物質 PAD-S31 の低用量化の検討, 第 18 回日本光線力学学会学術講演会, 名古屋, 2008 年 6 月 14-15 日

26) K. Tomita, T. Ono, Preparation of polymeric particles with poly(aspartic acid) hairy chains, 48th Microsymposium of Prague Meetings on macromolecules, Prague, Czech Republic, 2008 年 7 月 20-24 日

27) M. Muranaka, T. Ono, Design of polymeric dispersion stabilizer for preparation of monodisperse polylactide microspheres, 48th Microsymposium of Prague Meetings on macromolecules, Prague, Czech Republic, 2008 年 7 月 20-24 日

28) 富田恵介, 小野努, マクロモノマー分散共重合による単分散ヘア粒子の調製, 第 61 回コロイドおよび界面化学討論会, 福岡, 2008 年 9 月 7-9 日

29) 村中誠, 小野努, 分散重合における単分散ポリラクチドミクロスフェアの粒径制御, 第 61 回コロイドおよび界面化学討論会, 福岡, 2008 年 9 月 7-9 日

30) 安川政宏, 神尾英治, 小野努, 水性二相系を利用した W/W/O エマルションの調製, 化学工学会第 40 回秋季大会講演要旨集, 仙台, 2008 年 9 月 24-26 日

31) 廣田健, 村中誠, 小野努, 阪田功, 光線力学的治療に有効なポルフィリン内封ナノ粒子の開発, 化学工学会第 40 回秋季大会講演要旨集, 仙台, 2008 年 9 月

24-26 日

32) 安川政宏, 神尾英治, 小野努, 水性二相系を利用した W/W/O エマルションの調製, 第 15 回高分子ミクロスフェア討論会講演要旨集, 神戸, 2008 年 11 月 12-14 日

33) 大浦浩平, 久保田潤, 小野努, 界面活性 TEMPO 誘導体を利用した不均一系重合, 第 15 回高分子ミクロスフェア討論会講演要旨集, 神戸, 2008 年 11 月 12-14 日

34) 安川政宏, 小野努, 木村幸敬, 神尾英治, 水溶性高分子による相分離を利用した複合エマルションの調製, 高分子材料のための俯瞰的シンポジウム, 京都, 2009 年 1 月 13-14 日

35) 廣田健, 村中誠, 小野努, 木村幸敬, 白石太朗, 大河原賢一, 檜垣和孝, 木村聰城郎, ポルフィリン内封ナノ粒子の開発と光線力学的治療への応用, 高分子材料のための俯瞰的シンポジウム, 京都, 2009 年 1 月 13-14 日

36) 大河原賢一, 運 敬太, 檜垣和孝, 木村聰城郎, ドキソルビシン内封 PEG 修飾リポソームの P-糖タンパク質高発現がん細胞に対する in vivo 抗腫瘍効果とその機構解析, 第 2 回国際シンポジウム「第 2 回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム創薬パイライン: 抗がん剤・抗感染症薬の合成と評価系」, 岡山, 2009 年 2 月 5 日

37) 大河原 賢一, Tamer Shehata, 檜垣和孝, 木村 聰城郎, ドキソルビシン内封ニオソームの体内動態特性および抗腫瘍効果の評価, 日本薬剤学会第 24 年会, 静岡, 2009 年 5 月 21-23 日

38) 吉澤 雄太, 河野 裕允, 大河原 賢

二、檜垣 和孝、木村 聰城郎、パクリタキセル含有新規微粒子製剤の体内動態特性及び抗腫瘍効果の評価、第 25 回日本 DDS 学会、東京、2009 年 7 月 3-4 日

39) 西口 修平、渡 亮輔、大河原 賢一、檜垣 和孝、木村 聰城郎、ドキシソルピシン内封アルブミン修飾 PEG リポソームの体内動態特性とその抗腫瘍効果の評価、第 25 回日本 DDS 学会、東京、2009 年 7 月 3-4 日

40) Shigeki Abe, Keita Un, Taka-aki Nakao, Ken-ichi Ogawara, Toshikiro Kimura, Kazutaka Higaki, Anti-tumor effect of angiogenesis inhibitor SU5416 formulated in PEGylated emulsion, 第 24 回日本薬物動態学会年会、京都、2009 年 11 月 27-29 日

41) 白石太朗、大河原賢一、木村聰城郎、檜垣和孝、小野努、木村幸敬、ポルフィリン封入ポリ乳酸-ポリエチレングリコール共重合体ナノ粒子の体内動態特性と PDT による抗腫瘍効果の評価、第 130 回日本薬学会、岡山、2010 年 3 月 28-30 日

42) 鷺尾直紀、小野努、木村幸敬、単分散ゲル粒子内での大腸菌の増殖挙動、第 11 回化学工学会学生発表会【岡山大会(西日本地区)】、岡山、2009 年 3 月 7 日

43) 渡邊貴一、小野努、木村幸敬、液中乾燥法によるポリ乳酸ミクロスフェアの調製とその形態制御、第 11 回化学工学会学生発表会【岡山大会(西日本地区)】、岡山、2009 年 3 月 7 日

44) 大浦浩平、久保田潤、小野努、木村幸敬、界面活性 TEMPO 誘導体を用いた不均一系重合による高分子微粒子調製、化学工学会第 74 年会、横浜、2009 年 3 月 18-20 日

45) 小野努、廣田健、木村幸敬、白石太朗、大河原賢一、檜垣和孝、阪田功、光線力学的治療に有効な光増感剤内封ナノ粒子の開発、第 19 回日本光線力学学会学術講演会、横浜、2009 年 7 月 4 日

46) T. Ono, K. Hirota, T. Shiraishi, K. Ogawara, K. Higaki, I. Sakata, Preparation of nanoparticles containing photosensitizer with diblock copolymer, Particles 2009, Berlin, 2009 年 7 月 11-14 日

47) 渡邊貴一、小野努、木村幸敬、ポリ乳酸系ジブロックコポリマーを用いた多孔質ミクロスフェアの調製とその構造制御、化学工学会 第 41 回秋季大会、広島、2009 年 9 月 16-18 日

48) 土井堯、富田恵介、小野努、木村幸敬、ポリコハク酸イミド誘導体マクロモノマーを用いた分散共重合による温度応答性ヘア粒子の調製、化学工学会 第 41 回秋季大会、広島、2009 年 9 月 16-18 日

49) 吉田圭志、神尾英治、小野努、木村幸敬、単分散な架橋メラミンサブミリカプセルの調製と膜厚制御に関する検討、化学工学会 第 41 回秋季大会、広島、2009 年 9 月 16-18 日

50) 鷺尾直紀、小野努、木村幸敬、ハイスループットスクリーニングを目的とした単分散ゲル粒子内での大腸菌培養、第 61 回日本生物工学会大会、名古屋、2009 年 9 月 23-25 日

51) 平田征丈、小野努、木村幸敬、界面活性 TEMPO 誘導体を用いた中空構造をもつ高分子微粒子の調製、第 2 回化学工学 3

支部合同北九州大会，北九州，2009年10月30-31日

52) 岸佑磨，小野努，木村幸敬，生分解性高分子界面活性剤を用いた有機溶媒中へのDNA抽出，第2回化学工学3支部合同北九州大会，北九州，2009年10月30-31日

53) 岩渕草太郎，久野優子，久保田潤，小野努，木村幸敬，転相温度乳化法を利用した単分散ナノスフェア調製プロセスの開発，第18回ポリマー材料フォーラム，千葉，2009年11月26-27日

54) 渡邊貴一，村中誠，小野努，木村幸敬，ポリ乳酸系ジブロック共重合体を用いた多孔質微粒子の調製とその構造制御，第18回ポリマー材料フォーラム，千葉，2009年11月26-27日

55) 平田征丈，大浦浩平，小野努，木村幸敬，界面制御ラジカル重合を活用した高分子微粒子の調製，材料化学システム工学討論会2009，東京，2009年12月6-7日

56) 渡邊貴一，村中誠，小野努，木村幸敬，液中乾燥法によるポリ乳酸系多孔質ミクロスフェアの調製と構造制御に関する検討，材料化学システム工学討論会2009，東京，2009年12月6-7日

57) 小野努，廣田健，木村幸敬，白石太朗，大河原賢一，光線力学的治療に有効なポリ乳酸系ナノ粒子の開発，材料化学システム工学討論会2009，東京，2009年12月6-7日

58) 加藤貴士，小野努，木村幸敬，液中乾燥法によるポリコハク酸イミドをコア

としたコアシェル粒子の調製，第12回化学工学会学生発表会【福岡大会（西日本地区）】，福岡，2010年3月6日

59) 伊東一行，安川政宏，小野努，木村幸敬，マイクロ流路を利用した単分散複合エマルション調製における制御因子の検討，化学工学会第75年会，鹿児島，2010年3月18-20日

60) 渡邊貴一，小野努，木村幸敬，溶媒拡散法による単分散PLAミクロスフェアの調製，化学工学会第75年会，鹿児島，2010年3月18-20日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 特願2008-118187，阪田功他，「皮膚疾患治療剤」2008年4月30日
- 2) PCT/JP2008/53240，加来田他，Rexinoid compound having alkoxy group，2008年9月4日

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業・ナノメディシン研究）
「光線力学的治療に有効な多機能型薬剤内封ナノ運搬体の開発」
総合研究報告書（資料1）

ポルフィリン内封ナノ粒子製剤の体内動態特性ならびに 光線力学療法による抗腫瘍効果の評価に関する研究

分担研究者：大河原 賢一 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 薬学系

研究要旨

光線力学的治療（PDT）は、通常の抗がん剤を用いた化学療法とは異なり、外部から腫瘍組織選択的に印加する光刺激によって局所的な抗がん効果を期待するものであるため、安全性の高い治療と考えられるものの、進行性がんに対する治療成績の不良や、治療後の光過敏症等の副作用に関する問題を抱えており、臨床の場において汎用される治療法には至っていないのが現状である。PDT 治療は、光刺激により光増感剤から産生される一重項酸素のがん細胞に対する殺細胞効果に基づいているため、PDT 治療成績の鍵を握るのは、光増感物質を腫瘍組織に効率よく送達する技術基盤の確立であると言える。そこで本研究では、光増感剤である脂溶性のポルフィリン誘導体の腫瘍組織への送達効率の改善を目指し、本化合物を高効率、且つ安定に内封したナノ粒子製剤を調製し、本製剤の *in vitro* 殺細胞効果、*in vivo* 体内動態特性および *in vivo* 抗腫瘍効果に関して多面的な評価を加えた。脂溶性のポルフィリン誘導体に対するナノ粒子性薬物キャリアとして、ポリ乳酸-ポリエチレングリコール共重合体からなるナノ粒子（PLA-PEG ナノ粒子）を選択した。まず光照射に伴い産生した一重項酸素等によるがん細胞への殺細胞効果を *in vitro* 条件下検討したところ、本製剤をがん細胞に添加し、一定時間後に光照射を行うことで、種々のがん細胞においてポルフィリン濃度依存的な殺細胞効果が認められた。一方、本製剤添加直後に光照射を行った場合には、顕著な殺細胞効果は認められず、殺細胞効果の発現には、製剤からのポルフィリンの放出と、その後の細胞内移行が必要であることが示唆された。次に、ラット及び固形がんモデルマウスにおける静脈内投与後の体内動態特性の評価を行った。その結果、いずれの実験動物においても、他の血中滞留型の微粒子製剤と比べて遜色のない高い血中滞留性を示した。また、固形がんモデルマウスにおける腫瘍組織への移行量を評価した結果、本製剤が経時的に腫瘍組織へと移行することが明らかとなった。一方で、光過敏症の原因となる光増感剤の皮膚に対する移行性の指標として、製剤の皮下筋肉組織に対する移行性を評価したところ、その移行性は極めて低く、本製剤を利用した PDT 治療の安全性を示唆する結果であった。次に、本製剤の固形がんモデルマウスに対する抗腫瘍効果を評価した結果、本製剤投与後、腫瘍組織に対して局所的な光照射を行うことにより、無処置群と比較して有意な腫瘍増殖抑制傾向が認められ、本製剤を利用した治療の有用性が示された。