

#### A. 研究目的

現在、がんは先進諸国において死因の上位に挙げられる疾病であり、本邦においても 1980 年頃から最大の死因となっている。がん治療には、外科手術、放射線療法、抗がん剤による化学療法のいわゆる三大療法が主流であり、これらを併用して行われることが多い。これらはいずれも優れた治療法でありながら、それぞれ固有の問題点を抱えているのが現状である。医学の進歩と共に高齢がん患者のさらなる増加が予測される本邦においても、医療におけるクオリティオブライフ (QOL) の改善は重要な課題となっており、従来の三大療法を改善することに限らず、より安全性のより高い新規の治療法を開発することが急務となっている。そうした中で、通常の抗がん剤を用いた化学療法とは異なり、外部から腫瘍近傍にのみ光を照射することで、局所的な抗腫瘍効果を期待する低侵襲性療法であり、今後の普及が強く期待されている新しい治療法として、光線力学療法が挙げられる。

上記のように光線力学療法は、非常に有望な治療法であるものの、がん治療における光線力学療法は、未だ汎用されるには至っていない。その原因として、治療に必要なレーザーが大型で高価であった点はさることながら、進行性のがんに対する治療効果が不十分である点に加え、唯一であるとも言える副作用の光線過敏症の為に、治療後暗室での生活を余儀なくされる事が挙げられる。しかし近年の研究開発により、ダイオードレーザーをはじめとした安価な光源が開発され、それに伴って再び光線力学療法の有用性が見直されるようになった。また光増感物質にも多くの改良が加えられ、従来の治療では約 4 週間の遮光期間が必要とされた第一世代 Photofrin に代わる光増感物質として、新たに Laserphyrin が認可され、これは QOL 低下の一因とも言えるこの遮光期間を 3~7 日にまで短縮した。

こうして PDT の治療効果ならびに患者

の QOL を改善する新規光増感物質の研究開発が活発に行われるようになった一方で、腫瘍組織に対して親和性が高く、強い一重項酸素産生能を持つものの、難水溶解性であるために十分な量を投与できない光増感物質が数多く見出されるようになってきている。またこれらの光増感剤に対して一定の溶解性を担保するために、界面活性剤を含む有機溶剤を使用する際には、有機溶剤による全身性の毒性を考慮しなければならず、これらの光増感剤の開発に際しては十分な注意を要する。こうした問題を克服するアプローチとして、ドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術の利用がある。各種 DDS 技術の中でも、光増感剤を十分に可溶化し、高効率、且つ安定に製剤中に搭載するための最適なアプローチとして、微粒子性薬物キャリアの利用が挙げられる。さらに用いる微粒子性薬物キャリアを適切に設計することにより、光増感剤の腫瘍組織に対する送達効率も改善できるため、本アプローチは PDT の治療効果そのものも大きく改善する事が期待できる。

そこで我々は本研究において、脂溶性ポルフィリンを、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) に内封した製剤を調製し、その PDT 治療への応用性を、製剤の物理化学的性質、*in vitro* 殺細胞効果、製剤の体内動態特性、及び抗腫瘍効果などの観点から多面的に評価することを試みた。

## B. 研究方法

### 【ポルフィリン封入ポリマーミセルの調製とその機能評価】

#### ポルフィリン封入ポリマーミセルの調製

今回検討に用いたポルフィリンは難溶性であることから、ブロックポリマー(PLE)を用いてミセル化する事で、実験に用いた。ポリ乳酸(疎水部)とポリエチレンオキサイド(親水部)からなるブロックポリマーは、共同研究者である小野先生より御供与頂いた。ブロックポリマーは以下の分子量(Mw)とHLB値を有するものを使用した。

#### 今回使用したポリマーの物性

ポリマー	PLA 鎖(Mw)	PEG 鎖(Mw)	総分子量(Mw)	HLB 値
脂溶性 PLA-PEG (A)	28520	4352	32872	2.65
脂溶性 PLA-PEG (B)	9553	4352	14005	6.21
水溶性 PLA-PEG	882	4352	4895	16.63

以下に調製方法を簡単に示す。ブロックポリマー並びにポルフィリンを酢酸エチルに溶解し、水溶性ブロックポリマーを溶解した水と共に超音波条件下で水中油滴型エマルジョンを形成した。これを十分量の水に添加する事で、酢酸エチルを水中に溶解させ、遠心分離を数回行うことで酢酸エチルを完全に除去し、最終的にポルフィリン封入ポリマーミセルを得た。調製法の詳細は本報告書、小野先生担当分を参照されたい。

#### 粒子径の測定

粒子径の測定は Malvern 社の Zetasizer-Nano を用いて動的光散乱法により行った。

#### ポルフィリン封入ポリマーミセルの照射による in vitro 殺細胞効果の評価

ポルフィリン封入ポリマーミセルの照射による in vitro 殺細胞効果の評価は MTT assay により行った。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封入ポリ

マーミセルを一定量添加し、12 時間後に光を 1 分間照射した。照射 24 時間後における細胞生存率を求めた。

#### ポルフィリン封入ポリマーミセルの in vitro ポルフィリン放出特性の評価

ポルフィリン封入ポリマーミセルが in vitro 条件下において殺細胞効果を示すためのポルフィリン放出の必要性和、その放出挙動を、上述の MTT assay により検討した。ポルフィリン放出の必要性については、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。ポルフィリン放出特性については、MTT assay ポルフィリン封入ポリマーミセル添加後、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観察し、間接的にポルフィリンの放出性を評価した。

#### 【体内動態特性の評価】

##### (1) 血漿中濃度推移

体内動態の評価は、トレーサーとして  $[^3\text{H}]\text{-CHE}$  を組み込んだナノ粒子を用いて行った。ラットはペントバルビタール麻酔下で、大腿静脈よりナノ粒子(ポルフィリンとして 0.3、3 mg/kg)を投与し、一定時刻に頸静脈よりヘパリナイズしたシリンジで採血を行った。C26 担がんモデルマウスは、ペントバルビタール麻酔下で開腹し、大静脈より同様に採血を行った。採取した血液を遠心(3,000×g, 3 min)し、血漿 50 μL を採取し、クリアゾルを 10 mL 加えた後、液体シンチレーションカウンター(Beckman Coulter 社)により、 $[^3\text{H}]\text{-CHE}$  の放射活性からナノ粒子の定量を行った。

##### (2) 薬物速度論パラメーターの算出

各パラメーターは得られたラット毎の血漿中濃度推移に対して、非線形最小二乗法プログラム MULTI を用いたあてはめ計算を行い算出した。

### (3) 臓器分布

固形がんモデルマウスの尾静注より投与後各時間において、マウスをペントバルビタール麻酔下で、大静脈よりヘパリナイズしたシリンジで採血した後、門脈、及び肝静脈を切断すると同時に大静脈を切断することにより脱血死させ、肝臓、脾臓、肺、腎臓、心臓、腫瘍、大腿筋を摘出した。摘出した臓器は生理食塩水で洗浄し、臓器全重量を測定後、その一部として約 50 mg を秤量した。ソルバブルを 1 mL 加えて 50°C で 2 時間インキュベートすることにより臓器を溶解させ、2 N HCl 286  $\mu$ L を加えて中和した後、クリアゾルを 10 mL 加え、定量を行った。

### (4) 担がんマウスを用いた抗腫瘍効果の評価

C26 細胞を培養フラスコ上で培養し、80%コンフルエントの状態の細胞を回収し、 $1 \times 10^7$  cells/mL の濃度に調製し、BALB/c マウスの背部に皮下投与 ( $1 \times 10^6$  cells/0.1 mL/mouse) した。腫瘍組織の体積が約 100 mm<sup>3</sup> に達した時点でポルフィリンとして 3 mg/kg で静脈内投与し、その後の腫瘍体積を継続的に測定した。腫瘍体積は、以下の式に従って算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = (\text{長径}) \times (\text{短径})^2 \times 0.52$$

## C. 研究結果

### 調製したポルフィリン封入エマルジョンの物性評価

調製したポルフィリン封入ナノ粒子の物理化学的特性を示した。

ナノ粒子	粒子径 (nm)	PdI	ζ 電位 (mV)
ポルフィリン封入ナノ粒子(A)	83.3	0.120	-7.11
ポルフィリン封入ナノ粒子(B)	78.8	0.225	+0.42
空ナノ粒子(A)	54.7	0.142	
水溶性ポリマー未使用時(B)	245.9	0.391	

PdI: polydispersity index (分散性の指標)

これまでの知見により、EPR 効果を効率的に発揮するために必要な粒子径は約 100 nm 前後であると考えられている。Table に示した通り、粒子径はポルフィリンを含まない空のナノ粒子で 50-60 nm、ポルフィリンを内封したナノ粒子で、共に 70-90 nm 程度の粒子径を示しており、EPR 効果を利用してポルフィリンを効率よく腫瘍組織への送達するために適当な粒子径を有することが示唆された。Table 中にも示したように、水溶性 PLA-PEG を使用しない条件において調製したナノ粒子は、200-300 nm 程度の粒子径、かつ比較的大きな PdI 値を示しており、水溶性 PLA-PEG を利用することにより、内封ポルフィリンの効率的な腫瘍組織への送達に必要な粒子径を有する微細なナノ粒子を、より均一に調製可能となることが示された。従って以降の検討においては、比較的 PdI 値が小さく、より単一のナノ粒子の形成が確認されたポリマー A を用いて調製したポルフィリン内封ナノ粒子 A を実験に使用することにした。

### ポルフィリン封入ポリマーミセルの光照射による in vitro 殺細胞効果の評価

まず調製したポルフィリン内封ナノ粒子の各種がん細胞に対する殺細胞効果を、in vitro 条件下、MTT assay により評価した。モデルがん細胞としては、接着細胞としてマウス結腸がん由来 Colon-26 (C26) 細胞、マウス悪性黒色腫由来 B16BL6 Melanoma (B16BL6) 細胞、マウス肺がん由来 Lewis Lung Cancer (LLC) 細胞、浮遊細胞としてマウス腹水がん由来 Ehrlich 細胞、マウス肉腫由来 Sarcoma-180 (S-180) 細胞、マウス繊維肉腫由来 Meth-A 細胞を用いた。得られた結果を Fig. 1 にまとめて示す。細胞生存率は、ポルフィリン内封ナノ粒子を添加せず、光照射も行っていない細胞の生存率を 100% として表している。光未照射群は、ポルフィリン内封ナノ粒子を添加した上で、光照射の過程のみを省いて暗条件下で同様の評価を行ったものを示す。検討の結果、付着、浮遊細胞を問わず、いずれのがん細胞に

においても光照射に伴った殺細胞効果が確認された。さらに暗条件化、光照射を行わない細胞群では、顕著な殺細胞効果は認められておらず、これら認められた殺細胞効果が、光照射に伴い発生した一重項酸素によるものであることが示唆された。

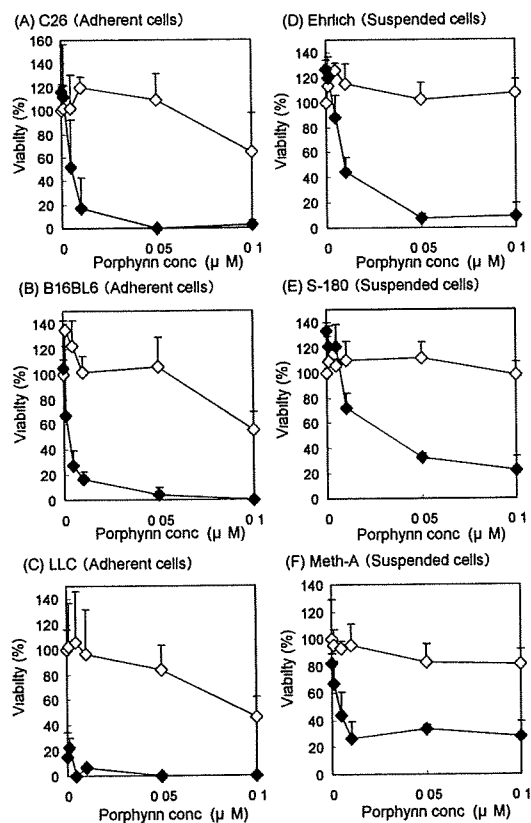


Fig. 1 Concentration-Dependent Phototoxicity of Porphyrin to Various Cancer Cells Evaluated by MTT Assay Keys; ◆, Light irradiated; ◇, Dark control. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n=3).

### ポルフィリン封入ポリマーミセルのポルフィリン放出特性の評価

PDTにおいて一重項酸素は、ポルフィリンが活性化し周囲の酸素へエネルギーを転移する事で産生され、最終的には標的組織の細胞膜中脂質の過酸化、タンパク質の変性、核酸の断裂を伴う事で、殺細胞効果を発現すると考えられている。一方で、一重項酸素の寿命は非常に短く、

発生後  $10^{-6}$  秒程度における可動範囲でのみ、その活性を発現できるとされている。従って、発生した一重項酸素がこれら細胞に対する作用を発揮するために、ポルフィリンが予め細胞内に取り込まれる必要があるか否かに関しては、本製剤を用いた治療効果の最適化を図る上でも非常に重要な因子となる。そこで本項ではまず、前節の MTT assay に適用したプロトコールに準じて、細胞の播種、ナノ粒子の添加を行い、光照射を行う直前に細胞培養液の交換を行うことで、細胞内に取り込まれていないポルフィリンを除去し、培地交換を行わない群 (no wash) との細胞生存率の比較検討を行った (Fig. 2A)。

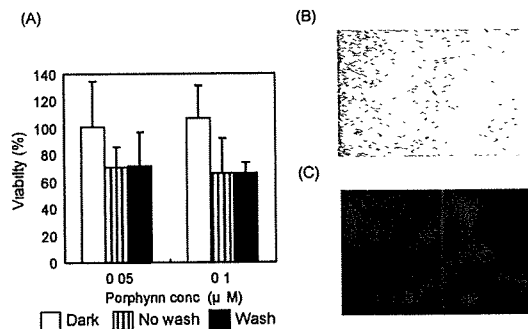


Fig. 2 (A) Effect of Medium Change (Wash) before Irradiation on Porphyrin-Dependent Phototoxicity in C26 Cells; Bright-Field Microscopic Observation (B) and Fluorescence Microscopic Observation (C) of C26 Cells after Addition of Porphyrin-Loaded Nanoparticles. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n=3).

検討の結果、培地交換の有無はポルフィリン活性化による殺細胞効果にほとんど影響を与えないことが示された。この事から殺細胞効果の発現には、細胞内に取り込まれたポルフィリン、あるいは細胞膜表面に吸着したポルフィリンが大きく寄与しており、培養液中に存在するナノ粒子中ポルフィリンの寄与は小さいことが示唆された。次に、MTT assay の条件下での細胞内におけるポルフィリンの分

布を、蛍光顕微鏡を用いて観察した (Fig. 2C)。観察は、96 穴マイクロプレートに C26 細胞を 5000 cells/ well で播種し、24 時間後にポルフィリン内封ナノ粒子をポルフィリンとして 1 $\mu$ M の濃度で添加、更に 12 時間インキュベートの後、培養液を交換し、観察を行った。Fig. 2C よりポルフィリンは細胞内にほぼ均一に分布している様子が観察された。これらのことから、ポルフィリンはナノ粒子から徐々に放出を受けた後、細胞内へと移行する事、さらに光照射に伴う殺細胞効果には、この細胞内に移行したポルフィリンから発生する一重項酸素が大きく寄与することが示唆された。

上述した評価において、殺細胞効果の発現には細胞内に取り込まれたポルフィリンの寄与が大きい事が示唆された。この時、細胞内へのポルフィリンの取り込みは、ナノ粒子からのポルフィリンの放出パターンを反映して経時的に起こっており、その取り込み過程はナノ粒子からのポルフィリンの放出過程に律速されていると考えられる。したがって、ポルフィリン内封ナノ粒子による経時的な殺細胞効果を評価することにより、ナノ粒子からのポルフィリンの放出挙動を間接的に評価することが出来ると考えられる。そこで、ポルフィリン内封ナノ粒子製剤を添加後、様々な時点において光照射を行い、その時点での細胞生存率を MTT assay により評価した。得られた結果を Fig. 3 に示す。横軸は MTT assay においてポルフィリン内封ナノ粒子を細胞に曝露してから光を照射するまでの時間を示しており、いずれのポルフィリン終濃度においても、細胞に対するナノ粒子の曝露時間依存的に、細胞生存率が徐々に低下することが明らかとなった。得られた結果より、ナノ粒子に内封されたポルフィリンは、メディウムへの添加に伴ったナノ粒子の崩壊によるバースト的な放出を示すのではなく、ナノ粒子から徐々に放出を受けていることが示唆された。

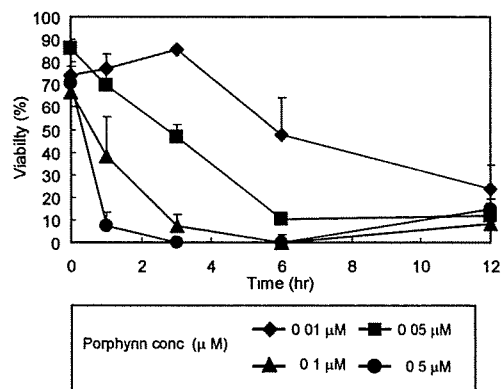


Fig. 3 Effect of Incubation Time before Light Irradiation on Porphyrin-Dependent Phototoxicity in C26 Cells. Results are expressed as the mean  $\pm$  S. D. (n=3).

#### ポルフィリン内封ナノ粒子の体内動態特性の評価

##### (1) 血漿中濃度推移

次に、調製したポルフィリン内封ナノ粒子静脈内投与後の体内動態特性を評価した。評価は、生体内非置換性、非代謝性物質として知られる [ $^3$ H] cholesteryl hexadecyl ether ([ $^3$ H]-CHE) を、ナノ粒子調製時の油相画分にトレーサーとして添加し、本成分に由来する放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定することで行った。尚、トレーサーとして添加した [ $^3$ H]-CHE が安定にナノ粒子中へと取り込まれることを、予めゲルろ過により確認している。実験には、同一個体から複数の血漿中濃度を測定出来る Wistar 系雄性ラットと、ナノ粒子の腫瘍組織への移行を含めた臓器分布を評価するために C26 細胞を背部皮下に移植することにより作製した固形がんモデルマウスを併せて使用した。

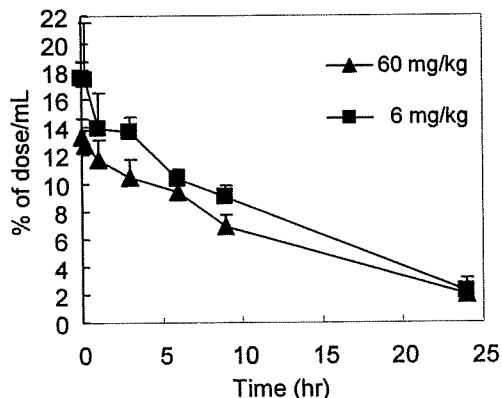


Fig. 4 Plasma Concentration-Time Profiles of Nanoparticles after Intravenous Injection into Normal Rats

高分子ミセルを用いた他の研究グループにより、ミセルの血中濃度がミセル形成に用いたブロックポリマーの臨界ミセル濃度以下に低下した際に、血中でのミセルの安定性が急激に低下する可能性が示唆されている。そこで今回我々が調製したナノ粒子が、同様の挙動を示すのか明らかにするため、10倍異なる2種類の投与量にて、ナノ粒子を正常ラットに静脈内投与した後の血中濃度推移に関して評価を加えた。ラット静脈内投与後の血漿中濃度推移は、ラット麻酔下、大腿部から静脈内投与し、各時間に頸静脈から少量ずつ採血を行い血漿中の $^3\text{H}$ CHE 標識ナノ粒子量を測定することにより評価した。投与量はナノ粒子を構成する油性ポリマー量として、60 mg/kg 及び 6 mg/kg にてそれぞれ投与した (Fig. 4)。さらに得られた結果より、各種薬動学的パラメーターを算出した (Table 1)。ラットにおける解析の結果、分布容積 (Vd) において投与量依存的な増大が認められたものの、他のパラメーターにおいては、用いた投与量による有意な差は認められず、いずれの投与量においてもほぼ同様の値が得られた。これらのことから、今回我々が調製したナノ粒子は、今回検討を加えたこれら投与量の範囲で、その体内動態特性が線形性を示すこと、

また血液において粒子としてのインテグリティを保っていることが示唆された。さらに得られた AUC の値は、これまでに当研究室において検討を加えてきた他の血中滞留型のナノ粒子と比べても遜色のない大きいものがあった。

次に、ナノ粒子の C26 固形がんモデルマウスにおける血漿中濃度推移を、PLA-PEG 量として 60 mg/kg の投与量にて静脈内投与することにより評価した。血漿の回収は投与後各時間においてマウスを開腹し、大静脈から採血することにより行った (Fig. 5)。その結果、正常ラットにおける結果と同様に、固形がんモデルマウスにおいても高い血中滞留性を示すことが明らかとなった。

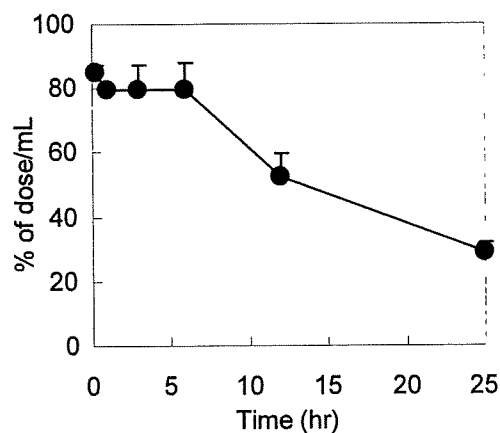


Fig. 5 Plasma Concentration-Time Profiles of Nanoparticles after Intravenous Injection into C26-Bearing Mice

Table 1 Pharmacokinetic Parameters of Porphyrin-Loaded Nanoparticles after Intravenous Injection into Normal Rats and C26-Bearing Mice

Pharmacokinetic parameters	Rat		Mouse
	60 mg/kg	6 mg/kg	60 mg/kg
AUC (% of dose/mL · hr)	176.71 ± 13.84	211.72 ± 37.09	2070.7
CL <sub>int</sub> (mL/hr)	0.57 ± 0.05	0.48 ± 0.08	0.048
V <sub>d</sub> (mL)	7.65 ± 0.71 **	5.32 ± 0.24	0.929
K <sub>el</sub> (hr <sup>-1</sup> )	0.075 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.052

## (2) 組織分布特性の評価

ポルフィリン内封ナノ粒子の組織分布特性は、PDTにおける治療効果だけでなく、治療後の光線過敏症に代表される副作用にも大きく影響する。そこで先ほど結果を示した C26 固形がんモデルマウスにおけるナノ粒子の血中濃度を測定するためにマウスから採血を行う際に、各種臓器中へのナノ粒子の蓄積量を併せて定量した (Fig. 6)

その結果、ナノ粒子は静脈内投与後、脾臓と肺に比較的多く移行することが示された。一方で、リポソームやエマルションといった一般的なナノ粒子の主要な移行臓器である肝臓への移行量は、それほど高くないことも併せて示された。一方で、PDTによるがん治療に直接的な影響を与えると考えられる腫瘍組織への移行量は、測定を行った時間範囲において、経時的に増加することが示され、これは前述した EPR 効果を駆動力としたものであると推察された。また、光線過敏症などの PDT 治療の副作用の原因となるポルフィリンの皮膚組織への移行性の指標として、ナノ粒子の皮下筋肉への移行量も測定したところ、ナノ粒子の皮下筋肉への移行は殆ど認められなかった。

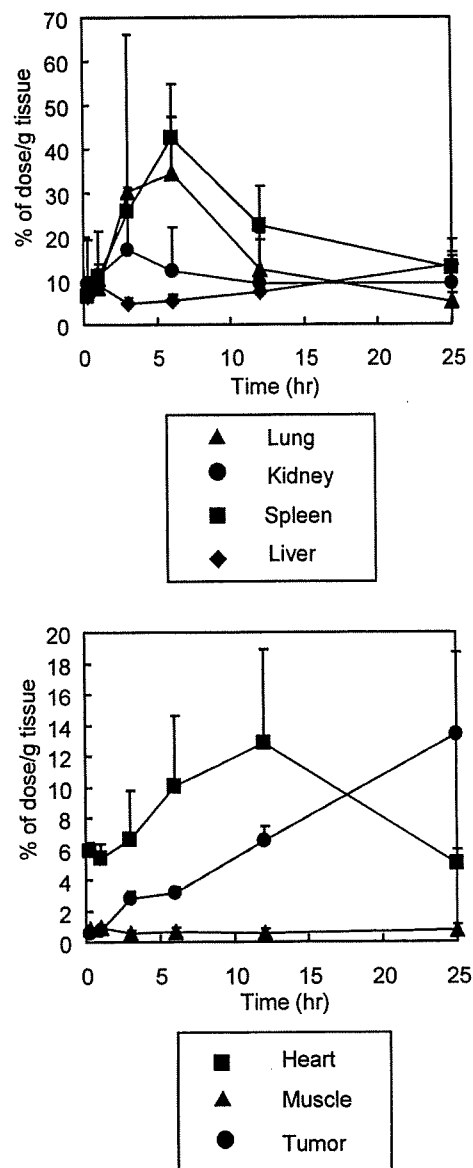


Fig. 6 Tissue Distribution of Nanoparticles after Intravenous Injection into C26-Bearing Mice

## (3) 光線力学療法による抗腫瘍効果の評価

ここまでの検討に用いてきたマウス結腸がん由来 Colon-26 (C26) 細胞は、マウス背部皮下に移植する事で、比較的早期に固形がんを形成し、短期間において増殖し、更にその腫瘍径が簡便に測定可能であることから、静脈内投与した製剤の

抗腫瘍効果を評価する方法として用いられている。そこで、この C26 固形がんモデルマウスにポルフィリン内封ナノ粒子を静脈内投与し、一定時間の後腫瘍組織に赤色光を照射する事で、光線力学療法による *in vivo* 抗腫瘍効果を評価した。実験は、腫瘍体積が約 100 mm<sup>3</sup> に達した時点でナノ粒子製剤をポルフィリンとして 3 mg/kg の投与量 (PLA-PEG 量として 60 mg/kg) で静脈内投与し、12 時間後にハロゲンランプにより単回 (単回照射群)、あるいは 5 回に分けて頻回照射 (5 回照射群) を行い、経日的に担がんモデルマウスの腫瘍体積測定を行った。

尚、5 回照射群では、ポルフィリン内封ナノ粒子製剤投与後 6, 12, 18, 24, 36 時間において、光照射を行った。

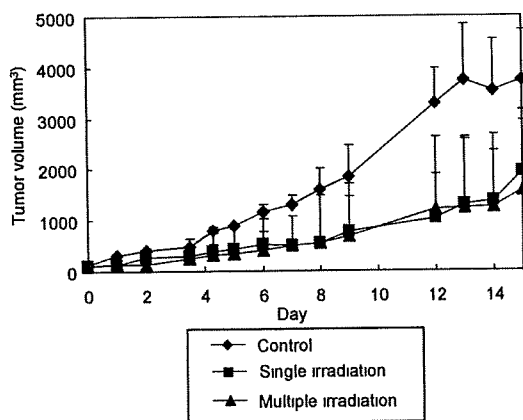


Fig. 7 In Vivo Anti-Tumor Effect of Porphyrin-Loaded Nanoparticles In C26-Bearing Mice  
Results are expressed as the mean  $\pm$  S. D. (n=3).

結果として Fig. 7 に示した腫瘍増殖曲線が得られ、PDT 治療群において、生理食塩水を投与したコントロール群と比較して腫瘍の増殖が抑制されている一方、光照射の回数によっては治療成績に差が認められないことが明らかとなった。

#### D. 考察

前述したように、ポルフィリン内封ナノ粒子製剤により産生された一重項酸素が、腫瘍組織において殺細胞効果を発揮するかどうかは、腫瘍組織へのナノ粒子の移行性、あるいはポルフィリンの放出特性に依存した一重項酸素の腫瘍局所での発生部位など多くの条件に左右される。そこで我々は、*in vitro* 条件下における、がん細胞に対する殺細胞効果の評価、ならびにナノ粒子製剤静脈内投与後の体内動態特性および光照射に伴った *in vivo* 抗腫瘍効果を評価した。

MTT assay による殺細胞効果の評価では、Fig. 1 に示した様に、浮遊細胞、接着細胞いずれのがん細胞種においても光照射により細胞生存率の低下が見られた。中でも C26 細胞、Ehrlich 細胞、B16BL6 細胞では、低濃度のポルフィリンの存在により高い殺細胞効果が得られた。一方 Meth-A 細胞においては、高濃度のポルフィリン存在下でも一定の生細胞数を保っており、本製剤における治療に対して何らかの耐性を持っている可能性が示唆された。*in vitro* 条件下での耐性を司る機構としてはいくつかのメカニズムが考えられ、中でも光線力学療法において、がん細胞の耐性に関する機構として最も重要なものとして、過酸化耐性が挙げられる。これは抗酸化作用のある分子 (ベータカロチン、ビタミン B2、ビタミン C、ビタミン E、尿酸等) が、がん細胞内に豊富に含まれる場合が該当する。実際に光線力学的な治療を長期に渡り継続する必要がある場合では、2 回目以降の治療効果が低下するケースも報告されており、過酸化物質に対するがん細胞の感受性・抵抗性は光線力学療法における抗腫瘍効果を決定する重要な因子のひとつであると言える。

6 種類の細胞の中で、LLC 細胞に関してはポルフィリンを添加しない条件においても光照射のみで細胞生存率の低下が観察された。これら光感受性の高いがん細胞を用いた検討においては、感光剤によ



る殺細胞効果を理解する上で適切な対照群を設定することが必要となり、さらに得られた結果の考察には十分な注意を要すると考えられる。一方で、こうしたがん細胞に対する光単独の毒性は、照射する光のエネルギー量に依存すると考えられるため、こうした特性を有するがん細胞を用いた治療効果の適切な評価においては、光の照射方法（強度、照射時間）を調節する事が必要になると考えられる。

次に、MTT assay において観察された殺細胞効果を、ナノ粒子からのポルフィリンの放出特性と関連付けてより詳細に考察する為に、C26 細胞を使用して検討を進めた。

光増感剤から発生する一重項酸素の寿命は  $10^{-6}$  秒程度と非常に短いため、発現後その活性を示せる領域は限定されている。従って、発生した一重項酸素ががん細胞に対する殺細胞作用を発揮するために、ポルフィリンが予め細胞内に取り込まれる必要があるか否かに関しては、本製剤を用いた治療効果の最適化を図る上でも非常に重要な因子となる。MTT assay を用いた検討の結果、殺細胞効果の発現には、細胞内に取り込まれたポルフィリンが大きく寄与しており、培養液中にナノ粒子に内封された状態で存在するポルフィリンの寄与は小さいことが示唆された (Fig. 2A)。

光増感剤に対する光照射に伴った細胞死においては、アポトーシスとネクローシスの2種類の寄与が大きいと考えられており、細胞内における感光剤の局在は、2つの細胞死の寄与を決定づける重要な因子となる。一般に感光剤は細胞内に取り込まれた後、リソソーム、ミトコンドリア、形質膜、ゴルジ装置等に局在するが、ミトコンドリアに多く蓄積する感光剤はアポトーシスを、形質膜に多く蓄積する感光剤はネクローシスを主に引き起こすと考えられている。今回行った蛍光顕微鏡による観察 (Fig. 2C) では、ポルフィリンの細胞内での主要な局在箇所までは確認できなかったが、ポルフィリンの細胞内での局在部位は、光照射後の細胞へ

の作用に多大な影響を与える重要な因子であると考えられるため、それらの関連性に関しては、今後詳細な検討を行うことで情報を整理し、より最適な製剤設計へと繋げることが重要であると考えられる。

次にナノ粒子からのポルフィリンの細胞培養液中における放出特性に関して検討を加えた。Fig. 3 にて示されているとおり、ポルフィリン内封ナノ粒子を細胞培養液に添加後、光照射までの曝露時間の増大に伴った殺細胞効果の増加が見られ、本結果は、ポルフィリンの経時的な取り込みを間接的に示したものであると解釈された。この時、ポルフィリンの細胞内への取り込みには2つの経路が考えられる。一つはポルフィリンを内封した状態のナノ粒子が、エンドサイトーシスによりナノ粒子ごとに取り込まれる経路、もう一つは細胞膜近傍でナノ粒子から放出されたポルフィリン分子が受動拡散により細胞内へ移行する経路である。本検討結果からだけでは2つの経路の寄与について詳細を述べることは難しいが、ナノ粒子が表面に PEG 鎖を持ち水和層を形成している点や、今回検討に用いたナノ粒子製剤の粒子径が小さいこと、さらに表面電荷の絶対値が小さいことといった、その物理化学的特性を考慮すれば、エンドサイトーシスによる取り込み機構の寄与は小さく、ポルフィリンは主に放出を受けた後、受動拡散により細胞内へ取り込まれていると考えられる。この点に関しては、エンドサイトーシス阻害剤などを併用した条件における殺細胞効果を評価するなど、より詳細な検討が必要であろう。

以上の結果より、本製剤を一定時間血中に滞留させ、EPR 効果を利用することにより腫瘍組織への効率的な送達が可能となれば、in vivo における光線力学療法効果が期待される。そこで次に、ポルフィリン内封ナノ粒子の静脈内投与後の体内動態特性を評価し、その DDS 製剤としての有用性を評価した。

まず、静脈内投与後の血中滞留性を評価

した。一般に微粒子は静脈内投与後、細網内皮系による異物除去を受けることが知られているが、EPR 効果を利用した腫瘍組織への送達を期待する場合、こうした取り込み機構を回避し、高い血中滞留性を持つ事が重要となる。本検討では実験動物としてラット及び固形がんモデルマウスを使用した。この内ラットは同一個体から経時的な血液の採取が可能である為、特に血中濃度推移を正確に評価するのに適したモデルであると言える。一方マウスは、同一個体から複数の時点での採血が困難であり、各時点で異なる個体から採血を行わなければならないが、in vitro 実験で使用した C26 細胞を皮下に移植した固形がんモデルを作製出来る為、in vivo 実験の結果を、in vitro 実験の結果と併せて総合的に解釈できるという利点がある。血中濃度推移をこれら両動物において評価した結果、いずれの動物においても当研究室でこれまでに検討を加えた他の微粒子製剤と比較して、遜色のない高い血中滞留性が得られた (Table 1)。これは、微粒子表面に存在する PEG 鎖により水和層が形成され、オプソニ化を抑制するという当初の目的を達成したものであると思われる。加えて、使用したナノ粒子の粒子径が 80 nm 程度と小さく、且つ均一性が高かった事も、血中滞留性上昇の一因になったといえる。

続いて、血中滞留性評価後のナノ粒子の組織分布特性について、C26 担がんモデルマウスを用いて評価した (Fig. 6)。腫瘍組織への経時的なナノ粒子の蓄積は、EPR 効果により特徴的に見られるものであり、得られた結果から 25 時間以降においても更にナノ粒子が更に蓄積してくる可能性が考えられた。光線力学療法において外部から光を照射する段階で、腫瘍組織におけるポルフィリン量が最大になっている事が望ましい為、今後、25 時間から後の蓄積性についても検討する必要があると考えられる。一方、光線力学療法における安全性の面で、特に問題となる光線過敏症は、全身に移行したポルフィリンの日光による活性化に起因するものである。

本検討ではマウス大腿部から抽出した皮下の筋肉組織への移行を評価し、全ての時間においてほとんど移行性は認められなかった。これらのことより、本検討において調製したポルフィリン内封ナノ粒子製剤は、PDT 治療の成果に影響を及ぼす光増感剤の腫瘍組織への送達効率の改善のみならず、治療後の副作用の低減も期待出来ることが示唆された。

最後に実際に担がんモデルマウスを用いた光線力学療法の評価を行った。Fig. 7 に示されるように、光線力学療法による治療を行う事で、コントロール群に対する腫瘍増殖の抑制が観察された。一方、光照射によりポルフィリンの活性化の回数を増やすことには、治療効果の改善は認められなかった。

この原因としてまず考えられるのが、PDT 後の腫瘍組織内の環境変化により、腫瘍組織に存在するポルフィリンの構造が破壊された可能性である。一般に、光線力学的治療後、腫瘍組織内では一重項酸素だけでなく、スーパーオキシドアニオンラジカル・ヒドロキシルラジカルなどの活性酸素種 (ROS) が産生され、連鎖的な過酸化反応が起こっている。こうした活性の強い化合物の作用で腫瘍に到達したポルフィリンが不活化し、2 回目以降の光照射による一重項酸素産生能が低下した事が考えられる。

5 回照射群において効果に改善が見られなかった原因としても一つ考えられるのは、最初に光を照射する段階において腫瘍組織に蓄積したポルフィリンが、がん細胞に対し殺細胞効果を発現後、死細胞内に取り残される事で、2 回目以降の光照射においては別の細胞に対する殺細胞効果に寄与できなくなる可能性である。この考察に基づくならば、ポルフィリンは経時的に腫瘍に到達し、その時点において腫瘍組織に存在するポルフィリン量に応じた一重項酸素が産生するものの、光照射の時点において生きてがん細胞内に存在し、有効な殺細胞効果を発揮可能なポルフィリン量が僅かである為、結果として得られた腫瘍増殖効果が限定され

たとえることができる。

これらの結果を受け、今後は、腫瘍組織に対するポルフィリンの移行パターンをより詳細に明らかにすることで、最適な光照射のタイミングを決定する必要があると考えられる。さらに光源については、今回は *in vitro* において使用した赤色光源を照射時間のみ変更して *in vivo* 実験にも適用したが、腫瘍内部まで十分な光が到達していたかに関しては不明であり、今後より適切な照射装置の使用を検討する必要がある可能性も考えられる。

また今回の検討により明らかとなった PDT による殺細胞効果については、がん細胞に対する作用に焦点を絞って考察を行ったが、光線力学療法には血管内皮細胞を標的にして血管組織を破壊し、腫瘍への栄養送達を制限する

Vascular-Targeted Photodynamic therapy (VTP) という手法もある。したがって、Fig. 7 で観察されたような腫瘍増殖の抑制に、血管内皮細胞への殺細胞効果が関与している可能性も有り、こうした血管内皮細胞に対する検討も加えていく必要があるだろう。

## E. 結論

以上、光線力学療法を利用した抗がん治療に応用可能な、より有効で安全なナノ粒子製剤を開発することを目的として、ポルフィリンを内封したブロック共重合体型ナノ粒子を調製し、種々の検討を行い、以下の結論を得た。

1. 難溶解性の光増感剤をナノ粒子に適切に内封することで、光の照射により一重項酸素を産生し、各種培養がん細胞に対して高い殺細胞効果を発現する事が示された。また、その作用発現にはナノ粒子から放出を受け、細胞内に移行したポルフィリンが大きく寄与していることが示唆された。

2. ナノ粒子製剤は、静脈内投与後高い血

中滞留性を示し、EPR 効果により経時的に腫瘍組織へ蓄積する事が明らかとなった。これは、ナノ粒子製剤表面の PEG 鎖の存在により、生体の異物認識機構を回避した為と推察された。さらに、本製剤は *in vivo* 条件においても抗腫瘍効果を発揮可能であることが示された。

本研究で得られた結果より、PLA-PEG ナノ粒子製剤を難溶解性ポルフィリンのキャリアとして適用することで、パッシブターゲティングによりポルフィリンを効率的に腫瘍組織へ送達することが可能となり、これら薬物動態学的な改善が、PDT 治療における有効性ならびに安全性の改善へと繋がる可能性が示された。以上、本研究により得られた知見は、有効かつ安全な PDT 治療を目指した光増感剤のナノ粒子製剤化に対して有益な設計指針を提供するものと考えられる

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) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)

7) 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)

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) 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
- 5) 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

6) 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シソルビシン内封 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

7) 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

8) 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

9) 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

10) 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

11) 大河原賢一、運 敬太、檜垣和孝、木村聰城郎、ドキシソルビシン内封 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

12) 大河原 賢一、Tamer Shehata、檜垣 和孝、木村 聰城郎、ドキシ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

13) 吉澤 雄太、河野 裕允、大河原 賢一、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

14) 西口 修平、渡 亮輔、大河原 賢一、檜垣 和孝、木村 聰城郎、ドキシソルビ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

15) 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

16) 白石太郎、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

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
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

分担研究者 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

低侵襲医療のひとつである光線力学的治療（PDT）では、体内に投与された光増感剤へ局所的局所的に光照射することで治療を行うものであるが、現在、厚生労働省で認可されている PDT 医薬品は水溶性の光増感剤であり、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る。本研究では、光増感剤を高効率で内封可能なナノ運搬体を、その調製プロセスから設計・開発することを目的としている。ナノエマルジョン、リポソーム、高分子ミセルなどについて検討を行ってきたが、疎水性薬物のキャリアとしてはナノ粒子が最も機能性、生産性に優れていることを見いだした。その結果として、ポリ乳酸（PLA）-ポリエチレングリコール（PEG）共重合体（PLE）を用いたナノ粒子に着目し、光増感剤の内封効率の向上を実現するナノ粒子の新規調製法の開発と PDT 用薬物キャリアとしての応用を検討した。

### A. 研究目的

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光線力学的治療（PDT）は、従来の抗がん剤を用いた化学療法とは異なり、抗がん剤の大量投与による正常細胞への副作用が少なく、局所的な治療が可能な今後有効な抗がん治療法のひとつと期待される。この PDT を実現するためには、光増感物質を腫瘍組織内部へ安定に送達する技術基盤の確立が不可欠であり、本研究では PDT に有効な光増感物質の安定なデリバリーを実現できるナノキャリアの創製に取り組む。ナノ粒子は正常組織においては血管外へ漏出しにくい一方で、血管の透過性が亢進している腫瘍組織では血管外へと漏出するため、静脈内投与後の血中滞留性が高いナノ粒子内部に薬物を封入することで、高い腫瘍中薬物濃度を達成できることが知られている。そのため、PDT に必要なポルフィリ

ン類を高効率で封入可能なナノ運搬体の調製技術を構築することに加えて、腫瘍組織への移行の駆動力となる高い血中濃度が維持可能な血中滞留型ナノ運搬体を創製することで PDT への適用を目指している。また、疎水性薬物を高効率で内封するといった機能は、殺細胞効果とは作用機序の異なる抗腫瘍効果をもたらすことの期待されるレチノイド化合物の同時使用にも展開が可能であり、複数の薬剤を併用可能な多機能型ナノ運搬体としての発展が期待される。

当初、ポルフィリン類のような疎水性の高い光増感物質を安定に内封できるナノサイズのキャリア創製を目的として、脂質二分子膜で覆われたリポソーム、水中油滴型（O/W）エマルジョン、ナノ粒子など様々なドラッグキャリア調製を試み、内封された光増感剤の機能を有効に発揮できるキャリアの選定を行ってきた。

その結果として、ポルフィリンを高効率

で含有可能で且つ 100 nm 以下にサイズ制御可能な生体適合性ナノ粒子が最も有望であることが示唆され、本研究ではこのジブロックコポリマーによって調製されるナノ粒子の設計因子について詳細に検討した。

## B. 研究方法

### 機能性ポルフィリンの合成

(株)光ケミカル研究所において、PDT に有効な機能性ポルフィリンの開発が進められ、PDT に用いる際の光の波長域が高波長側にシフトしたもののほど、生体成分による妨害を受けず、照射した光が深部に届くことが知られている。

本研究では、Figure 1 に示した (株)光ケミカル研究所製のフォトプロポルフィリン IX ジメチルエステル(I)を用いて検討を行った。600 nm 以下の光をカットしたフィルターにおいて十分な一重項酸素生成能力があり、実際の PDT においては、672 nm 付近の高波長域の光照射が可能な光増感剤である。

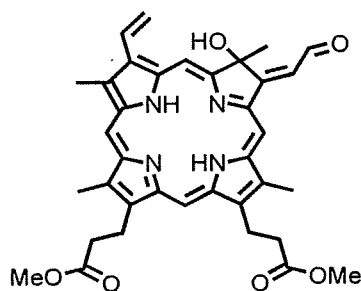


Figure 1. Photoporphyrin IX dimethyl ester (I) の構造式 (特願 2008-118187)

### ジブロックコポリマーの合成

PDT に有効なドラッグキャリアとしては、疎水性の高い光増感剤を高効率で内封するために疎水性のコアを有し、さらに血中滞留性を向上させるために必要なポリオキシエチレン鎖のような親水性高分子鎖で表面を覆われたナノ粒子が要求されるため、ポリエチレングリコール (PEG) 鎖とポリ

乳酸 (PLA) のジブロックコポリマー (PLE, Figure 2) を合成した。

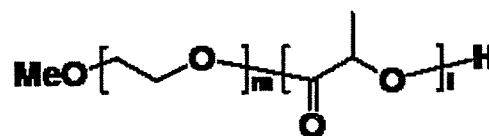


Figure 2. PLE の分子構造

PLE は末端をメトキシ化したポリエチレングリコール (MeOPEG) を開始剤とする D,L-ラクチドの開環重合によって合成した。洗浄後よく乾燥させたアンプル管へ、ラクチドと MeOPEG を入れ、触媒 (2-エチルヘキサン酸スズ(II)/トルエン) を加えた。そして、アンプル管内を 1 時間、減圧した後、封管した。封管後、あらかじめ 130°C にしておいたシリコンオイルバスに入れた。オイルバスに入れて約 10 分後にラクチドや開始剤が溶融するまで、よく振って溶液が均一になるようにした。その後オイルバス内でアンプル管を静置し、24 時間反応させた。反応終了後、オイルバスからアンプル管を取り出し室温で放冷した。

ポリマーをクロロホルムに溶解させ、ろ過を行いながらヘキサンの中に注ぎ、再沈殿を行った。ポリマーは再沈殿剤に溶解しないため、ヘキサン中に析出した。その後、未反応モノマー除去のため、析出したポリマーの 2-プロパノール中で再結晶操作を行った。析出物を 2-プロパノール中へ入れ、加熱し攪拌を行った。溶液が透明になり、ポリマーが完全に溶解したのを確認した後、加熱攪拌をやめ、室温で放置または氷水を用いて冷却を行った。その後析出したポリマーを遠心分離または濾過によって回収し乾燥を行った後、GPC(カラム: Super H-H (B0011), Super HM-H (B0026), Super HM-H (B0027), Super H2000 (B0025) 溶離液: Tetra hydro fulane (THF)) 及び <sup>1</sup>H NMR (溶媒: 重クロロホルム) により合成物の

確認を行った。

**Table 1.** HLB 値の検討で用いた PLE 組成

RUN No.	PLE <i>M<sub>w</sub></i> *	PLE <i>M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub></i>	PLA /PEG	HLB
w-PLE-1	5,500	1.06	0.26	15.82
o-PLE-1	14,000	1.34	2.18	6.28
o-PLE-2	11,000	1.14	1.43	8.23
o-PLE-4	40,000	1.61	8.05	2.21
o-PLE-5	33,000	1.32	6.47	2.68

\*: PEG *M<sub>w</sub>* は全て 4,400

**Table 2.** 本研究で用いた主な PLE 組成

RUN No.	PLE <i>M<sub>w</sub></i> *	PLE <i>M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub></i>	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<sub>w</sub>* は全て 4,400

様々な分子量を有する PLE を合成して、その分子量および親水性-疎水性バランス (HLB) が機能性ポルフィリン内封ナノ粒子調製に与える影響について検討した。なお、Table 1 には HLB 値について検討した際に用いた合成 PLE 組成についてまとめ、Table 2 では、そのうちで最適な HLB 組成を決定後、以降の実験で用いた主な合成 PLE 組成をまとめた。

#### PLE ナノ粒子の調製

合成した油溶性 PLE を 2 ml 酢酸エチルに溶解させ、これを油相とした。続いて、水溶性 PLE を 4 ml の超純水に溶解させ PLE 水溶液を調製した。そして、この PLE 水溶液又は超純水を水相として使用した。油相に水相を加え、超音波ホモジナイザーを用いて 160 W, 15 sec で O/W エマルションを調製した。調製の際ホモジナイザーの先端は油水界面になるようにした。そして、調製した O/W エマルションの 1 部を使用して、エマルションの液滴径をゼータサイザーに

より測定した。なお、エマルションは調製直後及び調製して 10 分後のものについて測定を行った。残りの O/W エマルションは調製直後とエマルションのゼータサイザー測定 (エマルション調製直後、エマルション調製から 10 分後) 終了時に超純水に添加することにより希釈した。そして、これらの粒径をゼータサイザーにより測定した。なお、ゼータサイザーによる測定は 23°C で行った。

#### ポルフィリン含有 PLE ナノ粒子の調製

所定量のポルフィリンを酢酸エチルに溶解させ、上記と同様の手順で PLE ナノ粒子を調製した。その際、ナノ粒子とポルフィリン凝集物を分離するため、0.22 μm の限外濾過を行い、2 回の洗浄後、凍結乾燥によりポルフィリン含有 PLE ナノ粒子を得た。

限外濾過を行ったフィルターをクロロホルムに溶解させ、紫外可視吸光度計により 672 nm における吸光度を測定し、検量線よりクロロホルム溶液中のポルフィリン濃度を算出することで、フィルター上のポルフィリン量を算出した。そして、算出したポルフィリン量を以下の式に代入することで、ポルフィリンの内封率を測定した。

$$\text{内封率 [\%]} = \{1 - (\text{フィルター上のポルフィリン量 [mg]} / \text{仕込みポルフィリン量 [mg]})\} \times 100$$

また、洗浄したポルフィリン内封 PLE ナノ粒子分散液を凍結乾燥し、ポルフィリン内封 PLE ナノ粒子を回収した。回収したポルフィリン内封 PLE ナノ粒子を所定量クロロホルムに溶解させ、紫外可視吸光度計により 672 nm における吸光度を測定し、検量線よりクロロホルム溶液中のポルフィリン濃度を算出することで、測定に使用したポルフィリン内封 PLE ナノ粒子中のポルフィリン量を導出した。算出した



ポルフィリン量を以下の式に代入することで、ポルフィリンの含有量を測定した。

$$\text{含有率 [wt\%]} = (\text{測定粒子中のポルフィリン量 [mg]} / \text{測定粒子 [mg]}) \times 100$$

一重項酸素発現の確認

回収したポルフィリン内封 PLE ナノ粒子を Dansyl-L-methionine を溶解させたリン酸緩衝液に分散させた。この分散液に照射し、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いることでポルフィリン内封ナノ粒子からの一重項酸素の発現を確認した。照射開始から 1~60 分後の分散液を TLC にうち、数時間静置しスポット中の溶媒を揮発させた。スポットの溶媒が揮発したのを確認した後、クロロホルム/メタノール = 3/2 の混合溶媒を用いて展開させ、展開溶媒が揮発した後に UV ランプを照射することでスポットの確認を行った。UV ランプの波長は 256 nm 又は 365 nm を使用した。測定に用いている Dansyl-L-methionine は一重項酸素の酸化作用により、Dansyl-L-methionine sulfoxide に変化する。また今回の条件下において Dansyl-L-methionine sulfoxide のスポットの Rf 値は 0.5 付近であることが報告 [2,3] されているため、このスポットを確認することにより一重項酸素発現の確認を行った。また、画像解析ソフト Image J を用いて、Dansyl-L-methionine のスポット (S1) と Dansyl-L-methionine sulfoxide のスポット (S2) の強度の比較を行った。

C. 研究結果

PLE ナノ粒子調製におよぼす PLE の HLB 値の影響

Figure 3(a)および(b)に液滴径と o-PLE の HLB 値との関係を示した。水溶性 PLE

を添加しない場合、HLB 値の増加に伴い液滴径が大きく減少した。これは、HLB 値の減少することで油溶性 PLE の水溶性が上昇し、それに伴い PLE 分子の界面活性能が増加し、水-酢酸エチル間の界面張力が減少することで液滴が小さな液滴径でも安定に存在できるようになったと考えられる。

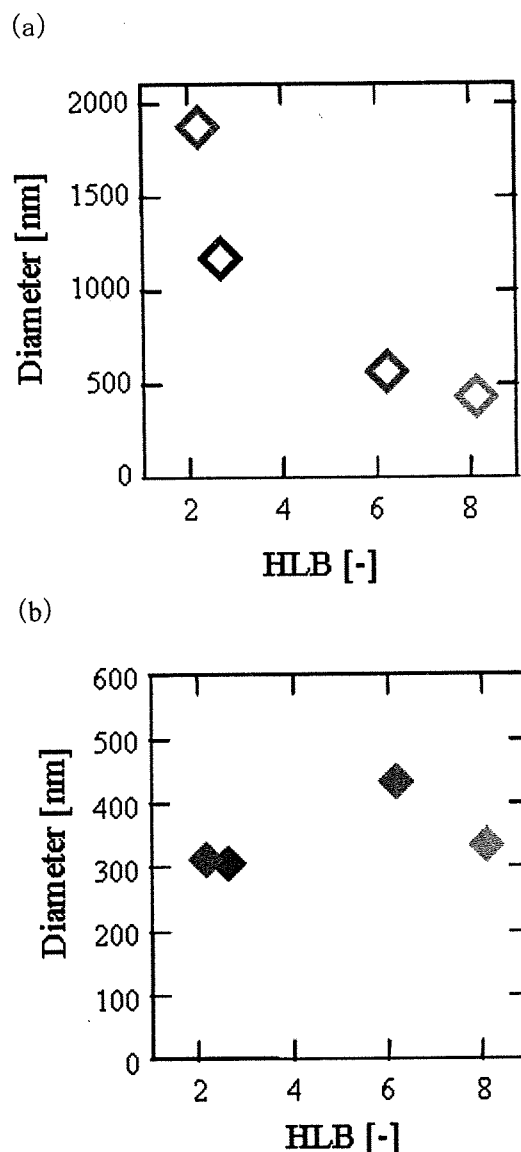


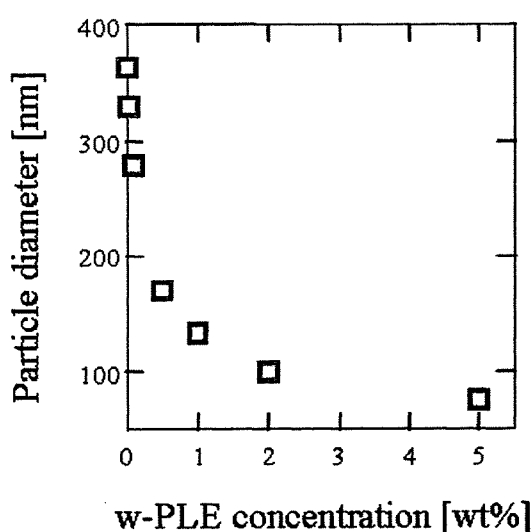
Figure 3. 液滴径におよぼす油溶性 PLE の HLB 値の影響 : (a) 水溶性 PLE なし, (b) w-PLE-1 1 wt% 添加

これに対して、水溶性 PLE を添加した系においては、HLB 値の違いによる液滴径の変化はほとんど無かった。これは、水溶性 PLE の存在下において、油性 PLE の界面張力に及ぼす影響がほとんど無視できるためであると考えられる。

液滴径について比較すると、水溶性 PLE の添加により、著しく液滴径が減少していることが明らかであり、このことは、界面活性剤として機能している水溶性 PLE の効果を明確にするものである。ナノ粒子は液滴からの溶媒拡散によって形成すると考えられるため、前駆体である液滴径を小さくすることは、より小さな PLE ナノ粒子を作製するうえで非常に重要であると言える。

以降の実験では、比較的小さな液滴径を調製可能な HLB 値 2.68 の油性 PLE (o-PL-5) を用いることとする。

PLE ナノ粒子径におよぼす水溶性 PLE の影響



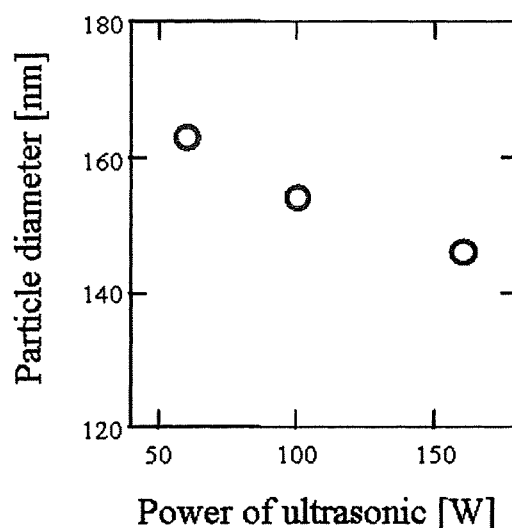
**Figure 4.** 水溶性 PLE 添加量とナノ粒子径の関係

**Figure 4** には、最終的に得られた PLE ナノ粒子径におよぼす水溶性 PLE 濃度の影響を示した。

ナノ粒子調製前の液滴径もまた、水溶性 PLE 濃度の増加とともに大きく低下することも観察しており、水溶性 PLE が水-酢酸エチル間の界面張力を減少させて、その結果、1 wt%以上の w-PLE を添加することで、体内における EPR 効果に有効な 150 nm 以下のナノ粒子調製が可能であることが確かめられた。

PLE ナノ粒子径におよぼす超音波照射強度の影響

水-酢酸エチル溶液は超音波照射によって微細な液滴に分散させている。この際に用いる超音波照射強度は、最終的に得られる PLE ナノ粒子径にも影響していると考えられるため、PLE ナノ粒子径におよぼす超音波出力強度の影響について検討した。**Figure 5** にその結果を示した。



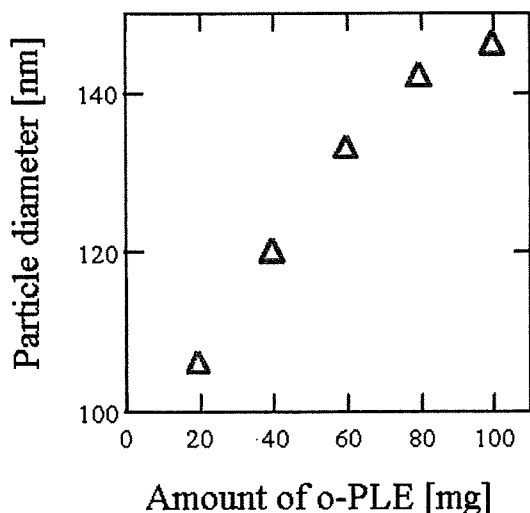
**Figure 5.** PLE ナノ粒子径におよぼす分散液調製時の超音波出力の影響

このように、超音波の出力増加とともに

に得られる PLE ナノ粒子の粒径は減少することが分かる。超音波の出力が増加すると、溶液中での剪断力が増加するため、その結果、より小さな液滴が生成したものと考えられる。

#### PLE ナノ粒子径におよぼす油溶性 PLE 量の影響

油溶性 PLE は最終的なナノ粒子骨格ともなるため、用いる油溶性 PLE 量もまた PLE ナノ粒子径に影響を与えると推測される。**Figure 6** に用いた油溶性 PLE 量と得



られる PLE ナノ粒子径の関係を示す。

**Figure 6.** PLE ナノ粒子径におよぼす油溶性 PLE 量の影響

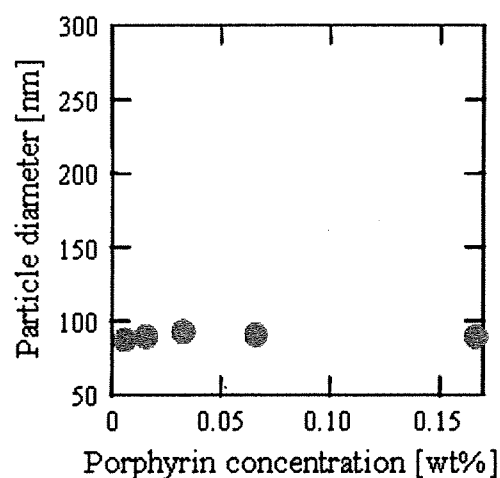
PLE 量の増加とともに、得られる PLE ナノ粒子の粒径は増加していくことが分かる。ナノ粒子化前の液滴状態では、油溶性 PLE 量の影響はほとんど見られないことから、油溶性 PLE が界面活性剤として作用することなく、溶媒拡散の段階でナノ粒子マトリクスの増加のために最終的な粒径を増加させていることが分かる。このことから、微小な PLE ナノ粒子を調

製するためには、比較的少ない油溶性 PLE 量を用いる必要があり、目的とする PLE ナノ粒子設計において重要な因子であることが示唆された。

#### 光増感剤含有 PLE ナノ粒子の調製

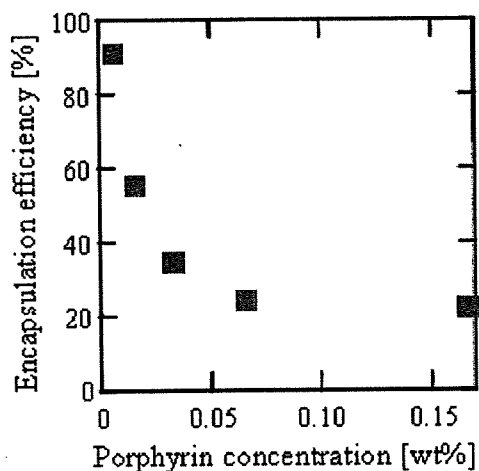
上述の操作因子を基に、実際に（株）光ケミカル研究所にて開発された光増感剤であるフォトプロトポルフィリン IX ジメチルエステル(I)（以下、ポルフィリンと略記）を内封した PLE ナノ粒子の調製を行った。添加したポルフィリン量がポルフィリン含有 PLE ナノ粒子に与える影響について、粒径・内封率・含有量の点から検討した。

PLE ナノ粒子径におよぼすポルフィリン添加量の影響を **Figure 7** に示した。この結果、添加するポルフィリン量を増加させてもほぼ変化なく 100 nm 以下の PLE ナノ粒子が得られていることが分かった。従って、ポルフィリンの含有によりナノ粒子同士の凝集や合一がほとんど起こらず、PLE によって目的とするサイズのナノ粒子調製が可能であることを示唆するものである。



**Figure 7.** PLE ナノ粒子径におよぼすポルフィリン添加量の影響

ポルフィリン添加量とその内封率について検討した結果, **Figure 8** のようになった。



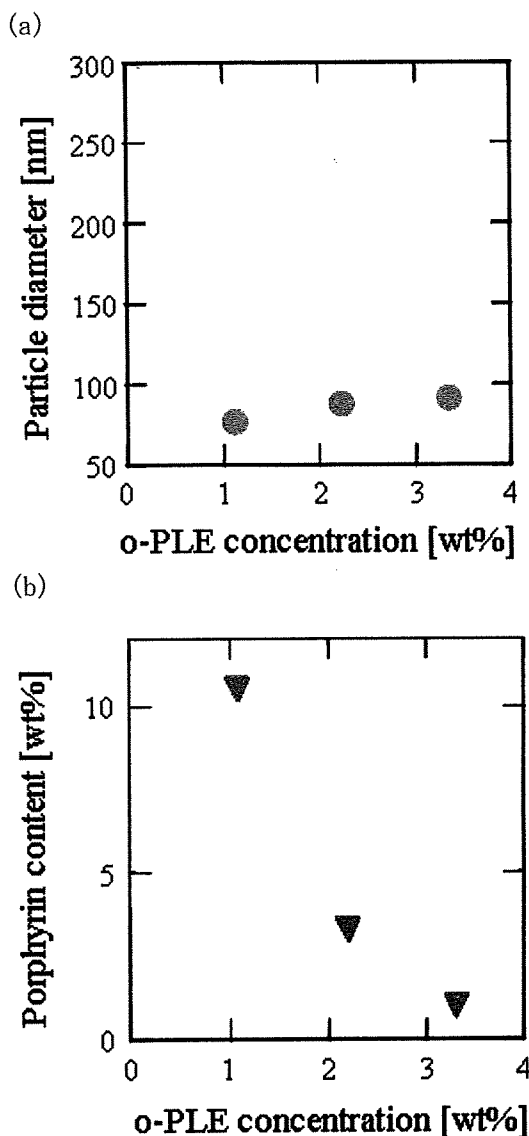
**Figure 8.** PLE ナノ粒子への内封率とポルフィリン添加量の関係

ポルフィリンの添加量の増加とともに内封率は大きく低下している。このことは、ポルフィリン内封量に上限があり、既に飽和していることを示唆しており、内封されていないポルフィリンのほとんどは凝集物としてフィルターによって濾過されていると考えることができる。詳細な検討を進めていった結果、このポルフィリン内封量の飽和現象は、酢酸エチルに対するポルフィリンの飽和溶解量と関連しており、PLE ナノ粒子への内封量も有機溶媒への溶解量によって制御できることが考えられる。

PLE ナノ粒子中へのポルフィリン含有量については、いずれのポルフィリン添加量においても1~2%で一定であり、上述の酢酸エチルへの飽和ポルフィリン溶解量が PLE ナノ粒子への内封率増加を妨げていることを支持するものであると言える。

なお、油溶性 PLE 量を変化させること

によってポルフィリン内封量を向上させることが本研究結果から明らかとなった (**Figure 9**)。油溶性 PLE 量の減少とともにナノ粒子径は減少して 1 wt% o-PLE では約 70 nm 程度となったが、そのときの PLE ナノ粒子中のポルフィリン含有量は 10 wt%を超えるものとなった。



**Figure 9.** 油溶性 PLE 量と PLE ナノ粒子径 (a) およびポルフィリン含有量 (b) との関係