

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略 研究事業）  
分担研究報告書

蛍光内視鏡に使用する蛍光ナノプローブに関する研究

研究分担者 中村 秀明 崇城大学 DDS 研究所/薬学部 助教

### 研究要旨

PHPMA-ZnPP は、EPR 効果により腫瘍組織に集積し、可視光を照射することで、蛍光および活性酸素（一重項酸素）を発生する。蛍光は腫瘍の検出に、一重項酸素の生成は抗腫瘍効果に寄与する性質であるため、PHPMA-ZnPP の蛍光性ならびに一重項酸素生成効率を調節することは、腫瘍の検出ならびに抗腫瘍効果において重要である。

しかし、ZnPP の蛍光性および一重項酸素の生成効率は ZnPP の状態（凝集体または非凝集体）に大きく依存する。ZnPP の状態は PHPMA への ZnPP の付加率によって大きく変化すると考えられるため、本研究期間では PHPMA への ZnPP の付加率を変化させ、物理化学的な特性（ミセルサイズや安定性など）を測定した。蛍光および一重項酸素の発生能を総合的に判断し、蛍光ナノプローブとしての HPMA-ZnPP の最適化を目指した。

## 研究成果

### ZnPP 含有率の異なる HPMA-ZnPP の作成

#### A. 研究目的

ZnPP 含有率の異なる HPMA-ZnPP を作成し、以下の研究に用いる。

#### B. 方法

HPMA-ZnPP は、HPMA ポリマーの 2 級ヒドロキシル基と、ZnPP のカルボキシル基の脱水縮合反応により合成した。反応終了後、ゲル浸透クロマトグラフィー（Bio-Beads S-X1）および限外ろ過装置（100 kDa cutoff）を用いて、低分子未反応物および触媒を除去し、凍結乾燥により HPMA-ZnPP の粉末を得た。

#### C. 結果

HPMA ホリマー-ZnPP 結合体 各種	ZnPP 含有量 (% w/w)
HPMA-ZnPP (3.8)	3.8 %
HPMA-ZnPP (7.0)	7.0 %
HPMA-ZnPP (16.7)	16.7 %
HPMA-ZnPP (24.1)	24.1 %

#### D. 考察

ZnPP 含量として 3.8 % (wt/wt)、7.0 % (wt/wt)、16.7 % (wt/wt)、24.1 % (wt/wt) の 4 種類を作成した。合成時の HPMA ポリマーと ZnPP の仕込み比率によって、定量的に ZnPP 含有率のコントロールが可能であった。

## PHPMA-ZnPP の ZnPP 導入率と分子サイズの変化

### A. 研究目的

で作成した ZnPP 含量の異なる分子サイズ、HPMA-ZnPP の蛍光特性、一重項酸素生成能に関して検討を行う。

### B. 方法

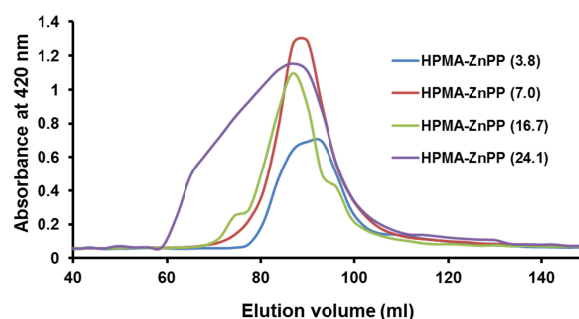
(1) Sephacryl HR-400 をパッキングしたクロマトカラム( 1.5cm × 59cm )に、1ml の HPMA-ZnPP 溶液 ( 5mg/ml ) をアプライ、PBS で溶出し、各フラクションごとに 420nm(ZnPP の吸収)を測定した。

(2) PBS 中または界面活性剤存在下( Tween 20 )における HPMA-ZnPP の蛍光強度を測定した ( Ex. 420nm, Em. 590nm )。HPMA-ZnPP の濃度は ZnPP 当量で 0 ~ 120  $\mu\text{g/ml}$  となるように調整した。

(3) PBS 中または界面活性剤存在下( Tween 20 )における HPMA-ZnPP の光増感作用 ( 一重項酸素発生能 ) の検討を行った。HPMA-ZnPP は ZnPP 当量で 40 $\mu\text{g/ml}$  となるように溶液を調整し、キセノン光源を用いて、400mW/cm<sup>2</sup> の強度で、30sec ~ 300 sec 間光照射を行った。発生した一重項酸素は TEMP を用いて補足し、ESR( 電子スピン共鳴装置 ) を用いて測定した。

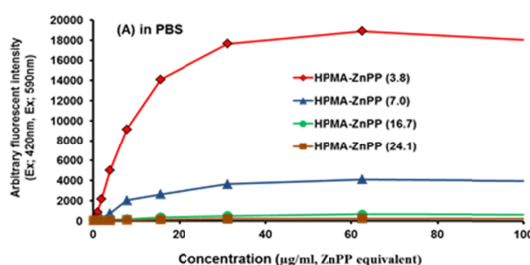
### C. 結果

(1) HPMA-ZnPP の ZnPP 導入率と分子サイズの変化

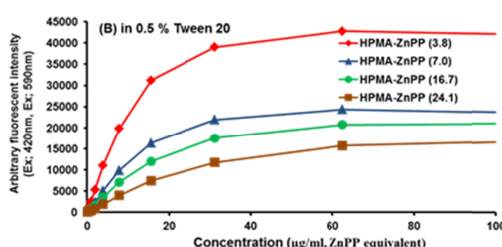


PHPMA-ZnPP 中の ZnPP 含量は、PHPMA-ZnPP の流体力学的サイズに影響し、ZnPP 含量が多いほど、HPMA-ZnPP の分子サイズが大きくなる。

(2) HPMA-ZnPP の蛍光強度の変化  
PBS 中における HPMA-ZnPP の蛍光

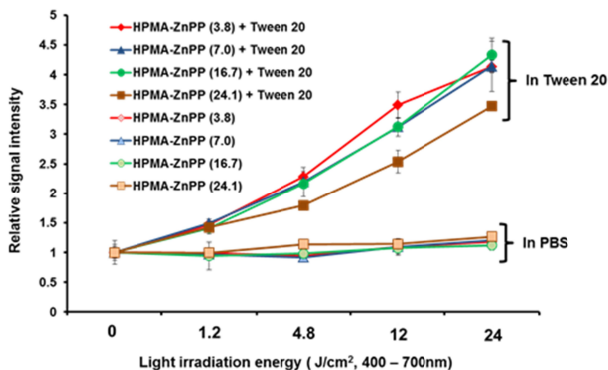


界面活性剤中における HPMA-ZnPP の蛍光



ZnPP 含量の少ない HPMA-ZnPP ほど、強い蛍光を発する。特に HPMA-ZnPP (3.8) は強い蛍光を発し、HPMA-ZnPP (16.7) や HPMA-ZnPP (24.1) と比べると、50 ~ 100 倍程度の蛍光強度を示した。Tween 20 などの界面活性剤で HPMA-ZnPP のミセル構造を壊すと、すべての HPMA-ZnPP において、蛍光の回復が認められたが、依然として ZnPP 含量の低いものにおいて高い蛍光が観察された。

### (3) PHPMA-ZnPP の一重項酸素生成能



## D. 考察

サイズ排除クロマトグラフィを用いて、各 HPMA-ZnPP の流体力学的サイズを検討したところ、ZnPP 含量の増加に伴い、HPMA-ZnPP ミセルサイズの増大が観察された ( -C-1 )。次に PHPMA-ZnPP の蛍光特性に関して検討を行った。PBS 中においては、PHPMA-ZnPP (3.8) が最も高い蛍光を発すること、ZnPP 含量が多くなるに伴い、蛍光の消光が観察された ( -C-2 )。これは、PHPMA 鎖に結合した ZnPP が多くなると、ZnPP 同士の凝集が起こりやすくなるために、消光が起こったと考えられる。HPMA-ZnPP で見られる消光は界面活性剤 ( Tween20 ) の添加によって解消された ( -C-2 )。一重項酸素の発生能に関しては、ZnPP 含量の違いによる差異は認められなかった。つまり、PBS 中において、HPMA-ZnPP に可視光を照射しても、顕著な一重項酸素の発生は認められなかったが、界面活性剤の添加により一重項酸素の発生が認められた ( -C-3 )。上記の結果をまとめると、HPMA-ZnPP の含量を変化させることで、粒子サイズを調整することが可能である。粒子サイズは腫瘍集積性などの薬物動態に大きな影響を及ぼすため、今回作製した、各 HPMA-ZnPP 群の薬物動態にも違いが見られる可能性が高く、今後検討したい課題である。蛍光強度の測定に関しては、少なくとも、

in vitro においては、ZnPP 含量の低いものほど、高い蛍光性を示すことから、腫瘍集積性が同じであれば、ZnPP 含量の低い HPMA-ZnPP ほど高い感度で腫瘍の検出が出来ると思われる。しかし、これまでの研究結果より、生体内では細胞膜成分により、HPMA-ZnPP のミセル構造が破壊され、蛍光強度が増強することも報告している。そのため、各 HPMA-ZnPP を担癌マウスに投与し、蛍光イメージングを行う必要がある。蛍光強度ならびに一重項酸素の発生に関しても、ミセル構造の破壊により、その発生効率は格段に増強される ( -C-2, 3 ) ことから、ZnPP 含量の高い安定なミセル構造よりも、多少ゆるいミセル構造を持つ HPMA-ZnPP の方が、腫瘍検出および治療において優れていると考えられる。この点に関しては今後の検討課題としたい。

## 腫瘍の蛍光イメージング

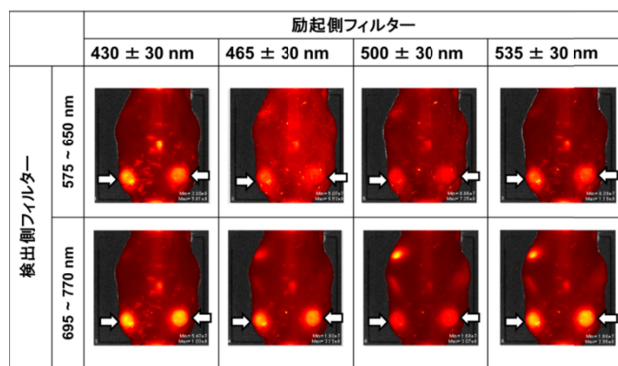
### A. 研究目的

In vivo における HPMA-ZnPP のイメージングに最適な励起光および蛍光フィルタを選択する。

### B. 方法

マウス肉腫 ( S-180 細胞 ) を ddY マウス背部皮下に移植し、その直径が 3~5mm になったときに、HPMA-ZnPP を 15mg/kg の投与量となるように、尾静脈より投与した。投与 5 時間後に IVIX Lumina-XR を用い、in vivo 蛍光イメージングを行った。

## C. 結果



矢印は腫瘍を示す

HPMA-ZnPP(7.0)を静脈注射し、5時間後の腫瘍集積と蛍光イメージング。異った波長帯の励起フィルタと蛍光フィルタを用いた際の蛍光像の違いの検討。

## D. 考察

ZnPPはソーレーバンドに420nmの強い吸収を持ち、Qバンドに530nm, 560nmの比較的小さな吸収を持つ。また、蛍光として590nmおよび630nm付近になだらかな蛍光を発する。しかし、生体内を考慮すると、波長による光の透過率に大きな違いが見られるため、*in vitro*における励起光および蛍光波長フィルタが最適とはいえない。そこで、S-180担癌マウスを用い蛍光イメージングを行った。ここではHPMA-ZnPP(7.0)を用い、投与5時間後の蛍光イメージング結果を示す(-C)。ZnPPの分光特性のみを考慮にいたった場合は、励起(430 ± 30 nm)と蛍光(575 ~ 650 nm)の組み合わせが最も適している。腫瘍の検出は可能であり、蛍光強度も最も強いが、非特異的な蛍光も強く見られる。一方、蛍光フィルタを695 ~ 770nmにしたものでは、腫瘍がより均一かつ選択的に検出されていることが分かる。

### P-THPによる腫瘍の蛍光イメージング

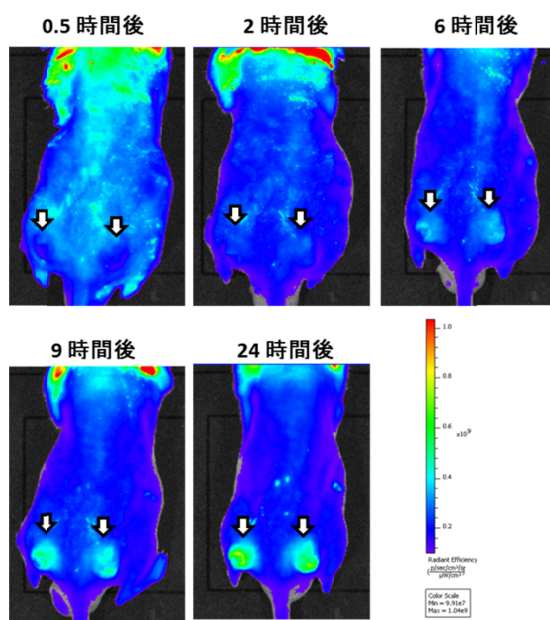
#### A. 研究目的

*In vivo*における腫瘍の蛍光イメージングがP-THPにより可能かを検討する。

## B. 方法

マウス肉腫(S-180細胞)をddYマウス背部皮下に移植し、その直径が3~5mmになったときに、20 mg/kgのP-THPを尾静脈より投与し、経時的にIVIX Lumina-XRを用い、*in vivo* 蛍光イメージングを行った。

## C. 結果



矢印は腫瘍を示す

P-THPの投与後、時間の経過と共に、腫瘍部に強い蛍光が認められた。

## D. 考察

P-THPの投与直後(0.5時間後)では全身に蛍光が認められるが、時間経過とともに徐々に腫瘍部のみに蛍光が見られるようになっていくことが分かる。P-THPはおよそ26nmの大きさの分子として挙動し、EPR効果により、徐々に腫瘍組織に集積していることを示している。

## 研究発表

### 1. 論文発表

- 1 H. Nakamura, T. Etrych, P. Chytil, M. Ohkubo, J. Fang, K. Ulbrich, H. Maeda., Two step mechanisms of tumor selective delivery of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer conjugated with pirarubicin via an acid-cleavable linkage., **J. Control. Release.** 174, 81-87 (2014)
- 2 Y. Hitaka, A. Nakano, K. Tsukigawa, H. Manabe, H. Nakamura, D. Nakano, J. Kinjo, T. Nohara, H. Maeda, Characterization of Carotenoid Fatty Acid Esters from the Peels of the Persimmon Diospyros kaki., **Chem. Pharm. Bull.**, 61, 666-669 (2013)
- 3 J. Fang, T. Seki, T. Tsukamoto, H. Qin, H. Yin, L. Liao, H. Nakamura, H. Maeda., Protection from inflammatory bowel disease and colitis-associated carcinogenesis with 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) involves suppression of oxidative stress and inflammatory cytokines." **Carcinogenesis** 34, 2833-2841(2013)
- 4 中村 秀明, PEG 化製剤に光明 - ABC 現象は回避できるか? - **ファルマシア**, 49, 985 2013

### 2. 学会発表

- 1 H. Nakamura, T. Etrych, P. Chytil, K. Tsukigawa, J. Fang, K. Ulbrich, H. Maeda., Double selective tumor toxicity of Pirarubicin-conjugated N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer. The 40th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, 2013年7月

- 2 中村 秀明、Tomas Etrych、Petr Chytil、月川 健士、方 軍、Karel Ulbrich、前田 浩., ヒドラゾン結合PHPM A-ピラルビシンは、pH応答的にピラルビシンを遊離し抗腫瘍効果を発揮する, 第29回日本DDS学会学術集会, 2013年7月
- 3 H. Nakamura, T. Etrych, P. Chytil, K. Tsukigawa, J. Fang, K. Ulbrich, H. Maeda., Two step tumor-selective action of pirarubicin-conjugated N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer. 日本癌学会学術集会, 2013年10月
- 4 中村 秀明、T. Etrych、P. Chytil、方 軍、K. Ulbrich、前田 浩、腫瘍選択的に活性抗癌剤を放出する、高分子制癌剤 (P-THP) の作成と抗腫瘍作用の検討、日本薬学会第134年会 (熊本)、2014年3月

### III. 知的財産権の出願・登録状況

#### 特許出願

発明の名称：高分子型蛍光分子プローブ  
国際出願番号：PCT/JP2012/072640  
国際出願日：2012年9月5日  
発明者：前田 浩、方 軍、中村 秀明 他  
状況：公開

発明の名称：スチレン-マレイン酸共重合体の誘導體

出願番号：特願 2013-239222  
国際出願日：2013年11月19日  
発明者：前田 浩、方 軍、中村 秀明  
状況：出願