

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790062

研究課題名（和文） 次世代型の光増感用 DDS 担体を企図した C₆₀ ナノ粒子製剤の構築研究課題名（英文） Design and Evaluation of Stable Hydrophilic Fullerene C₆₀ Nanoparticles as Next Generation Photosensitizer in Photodynamic Therapy

研究代表者

庵原 大輔 (IOHARA DAISUKE)

崇城大学・薬学部・助手

研究者番号：40454954

研究成果の概要（和文）：フラーレン C₆₀ は炭素原子が球状のネットワーク構造をしている分子であり、一重項酸素、スーパーオキシドアニオンラジカルなどの活性酸素種を効率よく生成する光増感物質として注目を集めている。本研究では C₆₀ の光増感剤としての医薬への応用を目的とし、可溶化剤として医薬品での使用実績がある 2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンを用いて C₆₀ をナノ粒子化し、その複合体構造を解明するとともに、物理化学的特性や生物活性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Fullerene C₆₀ has been appealing as an efficient photosensitizer in photodynamic therapy. The objective of this study is to prepare C₆₀ nanoparticles via 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin, which is clinically used as a safe solubilizing agent for several preparations. We elucidated its nanostructure, physical properties and biological activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：フラーレン、シクロデキストリン、がん光線力学療法、活性酸素種、ナノ粒子、光増感剤

1. 研究開始当初の背景

フラーレン C₆₀ は炭素原子が球状のネットワーク構造をしている化合物の総称である。C₆₀ は既存の光増感剤と比較して非常に高い量子効率や長波長の吸収スペクトルを持つことから、一重項酸素、スーパーオキシドアニオンラジカルなどの活性酸素種 (ROS) を効率よく生成する光増感物質としても注目を集めている。このような性質を利用し、C₆₀

の癌光線力学療法 (PDT) への応用が期待される。しかし、C₆₀ の著しく低い水への溶解性は、医薬分野への実際応用を困難なものにしている。C₆₀ を可溶化する方法には C₆₀ を化学修飾する方法や、水溶性のホスト-ゲスト複合体形成を利用する方法あるいは界面活性剤を用いた可溶化方法が報告されている。しかし、C₆₀ に置換基を導入するとその活性は

一般に低下すること、これらの可溶化法は操作が煩雑であり、トルエンなどの低極性溶媒を用いる必要があることから、安全で簡便な方法による可溶化が望まれる。さらに、可溶化が達成されたとしても、 C_{60} は周囲の環境変化（極性、濃度等）により不溶性凝集体や沈殿を容易に生じることから、 C_{60} の光化学的・生物学的性質に著しく影響を与えることが報告されている。溶解性、活性の低下などの問題点を克服し、PDT における光増感剤として応用するには C_{60} を化学修飾なしに安定な親水性ナノ粒子とすることが最適な手段となる。

本研究では HP- β -CyD による C_{60} のナノ粒子化・凝集安定化効果ならびに C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子の複合体構造を解明するとともに、生物活性や物理化学的特性を明らかにし、 C_{60} ナノ粒子を基盤とした光増感剤、抗酸化剤、DDS 用担体として効果的な C_{60} ナノ粒子製剤の最適処方構築する。

2. 研究の目的

本研究では 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 C_{60} ナノ粒子化・凝集安定化効果の解明ならびに C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子の構造、生物活性、物理化学的特性を明らかにし、 C_{60} ナノ粒子を基盤とした、光増感剤、DDS 用担体として効果的な C_{60} ナノ粒子製剤を構築する。

3. 研究の方法

(1) 親水性 C_{60} /CyD ナノ粒子の調製

C_{60} /CyD ナノ粒子は C_{60} と HP- β -CyD および γ -CyD を自動マグネット乳鉢粉砕機を用いて減圧下、4°C で 3 時間混合粉砕後、水中へ超音波により分散させることで調製した。

(2) C_{60} /CyD ナノ粒子の水中における凝集安定性

C_{60} ナノ粒子の凝集安定性は C_{60} /HP- β -CyD および C_{60} / γ -CyD コロイド溶液 (C_{60} = 1.0 mM) を遮光下に保存し、動的光散乱光度計 (DLS) を用いて、経時的に粒子径測定することにより評価した。また、 ζ -電位測定、

透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察から C_{60} ナノ粒子の物性について検討した。

(3) C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子の構造と凝集抑制機構

固体状態における C_{60} と CyD の相互作用は粉末 X 線回折測定および ^{13}C 固体 NMR 測定により評価し、コロイド状態での C_{60} と CyD の相互作用は溶液 NMR 測定により評価した。また、 C_{60} ナノ粒子表面への疎水性色素ローズベンガルの吸着量測定から C_{60} ナノ粒子の表面物性を検討した。

(4) C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子の *in vitro*, *in vivo* 光線力学活性

① 可視光照射下における C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子の活性酸素生成能

C_{60} は光照射下でスーパーオキシドアニオンラジカルや一重項酸素などの活性酸素種 (ROS) を生成することが報告されている。スーパーオキシドアニオンラジカル生成能は酸化型チトクロム C 溶液に C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子を添加し、可視光を照射した時の還元型チトクロム C の 548 nm における吸光度の変化により評価した。同様に ESR スピントラップ法を用いて、可視光照射下における C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子のスーパーオキシドアニオンラジカルおよび一重項酸素生成能を検討した。ESR スピントラップ剤には DMP0 (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) および TEMP-OH (一重項酸素) を用いた。

② C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子の細胞障害活性および *in vivo* 抗腫瘍効果

可視光照射条件下における C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子の細胞障害活性はヒト肺癌細胞由来 A549 細胞およびヒト子宮頸がん細胞由来 HeLa 細胞を用いて WST-1 法により評価した。*in vivo* 抗腫瘍効果は、担癌マウスに C_{60} ナノ粒子を腫瘍内に投与し、可視光 (光源: キセノンライト (波長 400~700 nm)) を照射した時の腫瘍体積の変化をコントロール群 (生理食塩液、光照射なし) および

C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子と比較し、評価した。担癌マウスはマウス肉腫 S-180 細胞を ddy マウスの後肢付け根に皮下注射することで作製した。

4. 研究成果

(1) 親水性 C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子の調製と凝集安定性

各種親水性 CyD を用いて、C₆₀ ナノ粒子を調製し、水中におけるナノ粒子の凝集挙動ならびに凝集安定性に及ぼす CyD の影響について検討した。以下に得られた知見を要約する。

- ① C₆₀ と HP-β-CyD および γ-CyD を減圧下、4°C で混合粉砕すると、混合粉砕時間および添加する CyD 濃度依存的に C₆₀ の粒子径は小さくなり、混合モル比 1:2 (C₆₀:CyD)、3 時間の混合粉砕で平均粒子径が 100 nm 以下の C₆₀ ナノ粒子を高収率に調製できた (Fig. 1)。
- ② 透過型電子顕微鏡観察の結果、コロイド溶液中で C₆₀/CyDs ナノ粒子は均一な球形の粒子として存在することが示唆された。
- ③ HP-β-CyD および γ-CyD との混合粉砕により調製した C₆₀ ナノ粒子の 25°C、遮光条件下の水中における凝集挙動を検討した。その結果、C₆₀/γ-CyD ナノ粒子の場合、保存とともに粒子の凝集・沈殿がみられ、粒子径は 28 日後に約 800 nm まで増大した。一方、C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子ではそのような粒子の凝集はみられず、小さな粒子径を長期間維持した (Fig. 2)。
- ④ 長期間保存しても C₆₀/HP-β-CyD および C₆₀/γ-CyD ナノ粒子の ζ-電位の値に変化はみられなかった。しかし、CyDs 存在下における ζ-電位の絶対値は C₆₀ 単独の値よりも小さくなり、C₆₀ ナノ粒子表面での CyD との相互作用が示唆された。
- ⑤ HP-β-CyD の競合包接剤として p-ヒドロキシ安息香酸エチルを添加すると、競

合包接剤の濃度依存的に C₆₀ の粒子径は大きくなる傾向がみられた。

以上の知見より、C₆₀ と HP-β-CyD および γ-CyD を混合粉砕することで平均粒子径が 100 nm 以下のナノ粒子を調製可能なことが明らかとなった。また、C₆₀ の凝集に対する HP-β-CyD の抑制効果は、γ-CyD に比べて著しく大きいことが明らかとなった。





	Glucose	HP-β-CyD (D.S. 5.6)	β-CyD	γ-CyD
Mean particle diameter		90 ± 5 nm	103 ± 14 nm	56 ± 10 nm
Appearance				

Fig. 1. Mean particle diameter and appearances of the C₆₀/CyDs and C₆₀/glucose colloidal solutions.

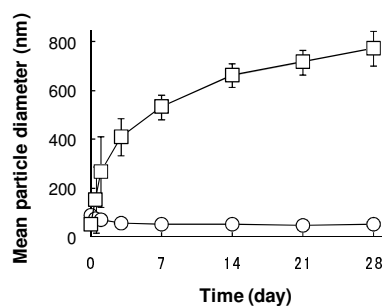


Fig. 2. Changes in particle size of C₆₀/HP-β-CyD and C₆₀/γ-CyD colloidal solutions as a function of storage time.

Each point represents the mean ±S.E. of 3-6 experiments.

○: C₆₀/HP-β-CyD (1:2) colloidal solution, □: C₆₀/γ-CyD (1:2) colloidal solution.

(2) C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子の構造と凝集抑制機構

粉末 X 線回折測定、固体・溶液 NMR スペクトル測定および粒子表面分析より C₆₀ と CyD の相互作用を検討し、C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子の構造ならびに HP-β-CyD による C₆₀ ナノ粒子の凝集安定化機構を推定した。

以下に得られた知見を要約する。

- ① C₆₀ と HP-β-CyD および γ-CyD を混

合粉碎すると、 C_{60} に特徴的な粉末 X 線回折ピークはハローに近いブロードなピークとなり、 C_{60} は非晶質あるいは結晶性の低い微粒子として CyD マトリックス中に分散することが明らかとなった。

- ② ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルにおいて、 $C_{60}/\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ および $C_{60}/\gamma\text{-CyD}$ 混合粉砕物は 142.9 ppm に鋭い C_{60} の炭素ピークを与えた。一方、両者の物理的混合物やグルコース粉砕物では C_{60} のピークは観察されなかった。CP 法を用いた NMR スペクトル結果より、 C_{60} と $\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ あるいは $\gamma\text{-CyD}$ を混合粉砕すると、両者は数 Å 内に近接した状態にあることが示唆された。
- ③ $C_{60}/\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ および $C_{60}/\gamma\text{-CyD}$ 混合粉砕物の DD/MAS NMR スペクトルの結果より、 $\gamma\text{-CyD}$ 粉砕物において C_{60} は遊離状態、強く包接された状態、弱く相互作用した状態で存在することが示唆された。一方、 $\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ 粉砕物では、 C_{60} は遊離状態と弱く相互作用した状態で存在するものと推定された。
- ④ C_{60} 単独の T_1^c 値 (13.7 s) は $\gamma\text{-CyD}$ との混合粉砕で著しく減少した (4.4 s)。また、 $\gamma\text{-CyD}$ の環炭素 (C1~C5) の T_1^c 値は $\gamma\text{-CyD}$ 単独の場合と比較して長くなり、一方、1 級水酸基の C6 の T_1^c 値は僅かに短くなった。これらの結果は、 C_{60} および $\gamma\text{-CyD}$ の運動性が包接複合体形成により抑制されたことを示す。一方、 $\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ 系では C_{60} の T_1^c 値は C_{60} 単独よりも僅かに短くなり、 $\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ の炭素の T_1^c 値は $\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ 単独とほぼ同じであった。これらの結果より、空洞径の小さな $\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ は CyD 空洞内に C_{60} を包接しないが、粒子表面で C_{60} と弱く相互作用することが示唆された。
- ⑤ 溶液 NMR スペクトルにおいて、 $C_{60}/\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ および $C_{60}/\gamma\text{-CyD}$ コロイド溶液は 145.5 ppm に小さなショルダーピークを伴った C_{60} ナノ粒子のピークを与え、コロイド溶液中においても、 CyD が C_{60} ナノ粒子表面で弱く相互作用することが示唆された。

- ⑥ C_{60} ナノ粒子表面への疎水性色素ローズベンガルの最大吸着量を比較すると、 $\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ ナノ粒子の最大吸着量は $\gamma\text{-CyD}$ ナノ粒子よりも小さいことから、 $\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ は $\gamma\text{-CyD}$ よりも広く C_{60} ナノ粒子表面を覆い、親水性の層を形成することが示唆された。

以上の知見より、 $\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ は C_{60} ナノ粒子表面で弱く相互作用 (吸着) し、 C_{60} ナノ粒子表面を覆い、安定な親水性の層を形成していることが明らかとなった。(Fig. 3) 一方、 $C_{60}/\gamma\text{-CyD}$ ナノ粒子の場合、 $\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ よりも C_{60} ナノ粒子表面を覆う面積が小さいため、長期保存時において凝集が引き起こされたものと推察された。

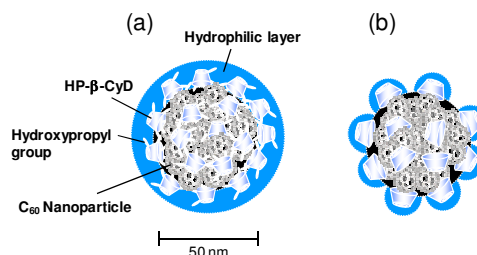


Fig. 3. Proposed nanostructure of $C_{60}/\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ (a) and $C_{60}/\gamma\text{-CyD}$ (b) nanoparticles.

(3) $C_{60}/\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ ナノ粒子の *in vitro*, *in vivo* 光線力学活性

$C_{60}/\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ ナノ粒子の ROS 生成能をチトクロム C 法ならびに ESR スピントラップ法を用いて検討した。また、A549 細胞、HeLa 細胞を用いて $C_{60}/\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ ナノ粒子の可視光照射下での細胞障害活性を明らかにした。さらに、担がんマウスを用いて $C_{60}/\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ ナノ粒子の抗腫瘍効果を検討した。

以下に得られた知見を要約する。

- ① チトクロム C 法および ESR スペクトル測定より、 C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子は Type I の ROS 生成経路を介してスーパーオキシドアニオンラジカルを可視光照射時間依存的に生成した。
- ② C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子は可視光照射において高い一重項酸素生成能を有することが示された。さらに本実験条件下では、 C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子は、PDT の光増感物質である protoporphyrin IX よりも有意に高い一重項酸素生成能を示した。この C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子の高い一重項酸素産生には HP- β -CyD による微視的溶媒効果が関与することが示唆された。
- ③ C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子の ROS 生成能は粒子径の影響を著しく受け、ROS を効率的に生成させるためには粒子径を 150 nm 以下に制御する必要があることが明らかとなった。
- ④ C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子は、可視光照射条件下において高い細胞障害活性を示した。さらに、 C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子は非照射条件下では細胞障害性を示さないことから安全性の高いナノ粒子であることが示唆された。
- ⑤ 担がんマウスに C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子を腫瘍内投与後、可視光を照射するとコントロール群（生理食塩液投与）と比較して腫瘍の成長は著しく抑制された。また、体重の増減も見られなかった (Fig. 4)。

以上の結果より、HP- β -CyD を用いて C_{60} をナノ粒子化することで可視光照射条件下において高い ROS 生成能を有する C_{60} を調製可能ことが明らかとなった。また、 C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子は可視光照射条件下においてのみ細胞障害活性および抗腫瘍効果を示すことから、生体に安全な PDT における光増感剤として有用であることが示唆された。

これまでに、 C_{60} を可溶化する方法として、

C_{60} に親水性置換基を導入する方法、水溶性ホスト-ゲスト複合体形成を利用する方法、水溶性高分子を利用する方法などが報告されている。しかし、 C_{60} に置換基を導入するとその活性は一般に低下すること、さらに、これらの可溶化法はヘキサンやトルエンなどの有機溶媒を用いることから、生体に安全で簡便な方法による可溶化が望まれる。本研究で用いた HP- β -CyD は、イトラコナゾールなどの難溶性薬物の可溶化剤として実際製剤に使用されており、安全性は保証されている。また、HP- β -CyD 濃度を調節することで粒子サイズの調整が可能であり、EPR 効果による腫瘍組織への特異的な集積も期待できる。また、本手法は C_{60} をナノ粒子として安定かつ高濃度 (>5 mg/ml) に可溶化できることから、ナノ粒子の表面修飾を容易にし、 C_{60} ナノ粒子表面をポリエチレングリコール、スチレン無水マレイン酸コポリマー等の高分子で適切に修飾することで抗腫瘍活性の増大が期待される。さらに、 C_{60} は連続する共役 π 電子系を有するため、ナノ粒子表面での π - π 相互作用を利用した薬物担体としての応用も期待される。本研究は優れた光増感作用を有し、ナノマテリアルとして注目を集めている C_{60} を生体適合性に優れた HP- β -CyD を用いてナノ粒子化し、その汎用性を高めるものであり、本研究で調製した C_{60} /HP- β -CyD ナノ粒子は次世代型の光増感剤、DDS 用素材として有力な候補物質になるものと考えられる。

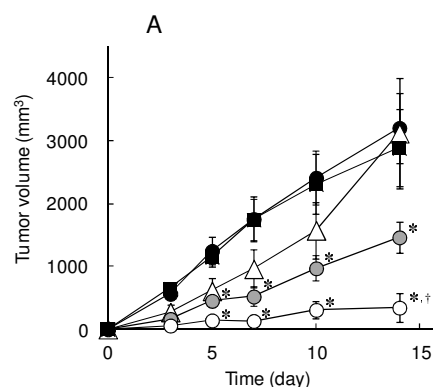




Fig.4 Photodynamic Effects of C₆₀/HP-β-CyD Nanoparticles on Tumor Growth (A), Appearances of Tumor (B) after Intratumor Injection to the Tumor-bearing Mice plus Light Irradiation
 ●: saline, ■: C₆₀/HP-β-CyD, △: saline plus light irradiation (63 J/cm²), □: C₆₀/HP-β-CyD (0.4 mg/kg) plus light irradiation (63 J/cm²), ○: C₆₀/HP-β-CyD (2.0 mg/kg) plus light irradiation (63 J/cm²).

Each value represents the mean ± S.E. of 6-9 experiments.

*, $p < 0.05$ versus saline. †, $p < 0.05$ versus C₆₀/HP-β-CyD (0.4 mg/kg) plus light irradiation (63 J/cm²)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) D. Iohara, M. Hiratsuka, F. Hirayama, K. Takeshita, K. Motoyama, H. Arima and K. Uekama, Evaluation of Photodynamic Activity of C₆₀/2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin Nanoparticles, J. Pharm. Sci., 査読有, Vol. 101, 2012, pp.3390-3397.
DOI: 10.1002/jps.23045
- (2) D. Iohara, F. Hirayama, K. Higashi, K. Yamamoto and K. Uekama, Formation of Stable Hydrophilic C₆₀ Nanoparticles by 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin, Mol. Pharmaceut, 査読有, Vol. 8, 2011, pp.1276-1284.
DOI: 10.1021/mp200204v

[学会発表] (計 4 件)

- ① 梅崎至高、庵原大輔、安楽誠、上釜兼人、平山文俊、親水性シクロデキストリンを用いた水酸化フラーレンのナノ粒子化と物性評価, 第 29 回シクロデキストリンシンポジウム、東京、9/6-7 (2012).
- ② D. Iohara, F. Hirayama, M. Anraku and K. Uekama, Preparation of Hydrophilic C₆₀ Nanoparticles by 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin and It's Application to Photodynamic Therapy, The 16th International Cyclodextrin Symposium, Tianjin, China 5/6-10 (2012).
- ③ 庵原大輔、平山文俊、東 颯二郎、安楽誠、山本恵司、上釜兼人、親水性 C₆₀/2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンナノ粒子の構造と光線力学活性の評価, 日本薬学会第 132 年会、北海道、3/28-31 (2012).
- ④ 庵原大輔、平山文俊、東 颯二郎、安楽誠、山本恵司、上釜兼人、C₆₀/2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンナノ粒子の調製と光線力学活性の評価, 第 28 回シクロデキストリンシンポジウム、秋田、9/8-9 (2011).

[その他]

ホームページ等

<http://www.ph.sojou-u.ac.jp/~dio/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庵原 大輔 (IOHARA DAISUKE)

崇城大学・薬学部・助手

研究者番号: 40454954