

ナノフォトンクスの医療応用への期待

—— ナノ粒子を併用した光線力学的癌診断と治療法の開発 ——

三好 憲雄<sup>†\*a)</sup> 金子 貞男<sup>†\*\*</sup> 福永 幸裕<sup>†\*\*\*</sup>

Hopefulness of Nano-photonics to Medical Application

——Development of Photodynamic Diagnosis and Treatment of Cancer Using Nano-particles——

Norio MIYOSHI<sup>†\*a)</sup>, Sadao KANEKO<sup>†\*\*</sup>, and Yukihiro FUKUNAGA<sup>†\*\*\*</sup>

あらまし 腫瘍組織に親和性があり集積性をもって腫瘍に選択的に取り込まれる光増感剤 (5-Aminolevulinic Acid = 5-ALA) が近年注目され、臨床でも元々ヘム代謝の前駆体であることから無毒であり、悪性脳腫瘍の外科手術にその代謝物 Protoporphyrin-IX (Pp-IX) の赤色蛍光を頼りに腫瘍部を見事に識別して超音波メスで腫瘍部を確実に取り除く方法 (蛍光診断切除術) に応用されつつある。この前駆体 5-ALA を腫瘍組織へのキャリアーとして、その水溶液を投与前に酸化チタンナノ粒子 (5 nm) と混合させると会合体を形成して、腫瘍モデル組織内に送り込ませることができた。①酸化チタンナノ粒子の会合体形成と②投与後の腫瘍モデル組織内の酸化チタンナノ粒子の検出及び③その治療効果を検討したので報告する。

キーワード 酸化チタンナノ粒子, 悪性脳腫瘍モデル, 超音波増感と光線力学治療

1. ま え が き

近年、ナノ粒子を併用した癌の診断や治療に関する技術の革新に伴い臨床現場にも導入されつつある。しかしながら、臨床応用にはあくまで慎重な基礎医学の実験・経験の蓄積が重要であることは、言うまでもない。そこでその観点に立ち、上記の課題で蓄積した実験・経験を異分野である貴分野での融合研究を求めてご紹介したい。

日本国内における光線力学的癌診断・治療 (PDD・PDT) は、33 年前当時厚生省がん研究助成金による班研究からスタートした。著者も協力研究員として参加してきた経験があるので、少し当初を振り返ってみたい。その班員 (20 人位) は各臨床領域の癌治療臨床家

教授やレーザー装置の技術系教授及び光化学の専門家教授達で構成され、班長は当時東京医科大学胸部外科教授の早田義博であり、後に同講座の教授加藤治文が厚生省より助成金を分配して、各臨床応用に具体的癌治療手技を確立していった。しかしどうしても PDT の導入治験で好成績を出せない癌治療科には、許可を出すことはできないことも出てきた。現在では食道癌、胃癌、肺癌及び子宮頸部癌の初期のものに限って、国の許認可が下りた。その許認可のための治験研究が主な目的であることには変わりなかった。

現在もそうであるが、いかに腫瘍選択的治療ができるかを常に議論を重ねられた。そのためには光増感剤の開発も製薬会社で委託され合成開発が進められた。また、その光源であるレーザーの開発技術も求められ、安価・安定でパワーがある程度確保されている必要もあった。増感剤及びレーザーも医療用の認可を受けるのに 10 年の単位で開発維持のできる資本も必要とされた。このように約 20 年に渡り継続が容共され、現在の臨床応用に至っている。

本論に戻し、腫瘍組織に親和性があり集積性をもって腫瘍に選択的に取り込まれる光増感剤 (5-

<sup>†</sup> 福井大学医学部腫瘍病理学, 福井県

Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, #23-3 Shimoaizuki, Eihei-ji-vho, Yoshidagun, Fukui-ken, 910-1193 Japan

\* 現在, 福井大学遠赤外線開発研究センター

\*\* 現在, 柏葉脳神経外科病院

\*\*\* 現在, SBI ファーマ株式会社・神戸研究所

a) E-mail: nmiyoshi@u-fukui.ac.jp

Aminolevulinic Acid = 5-ALA) が近年注目され、臨床でも元々ヘム代謝の前駆体であることから無毒であり、悪性脳腫瘍の外科手術にその代謝物 Protoporphyrin-IX (Pp-IX) の赤色蛍光を頼りに腫瘍部を見事に識別して超音波メスで腫瘍部を確実に取り除く方法（蛍光診断切除術）に応用されつつある。この前駆体 5-ALA を腫瘍組織へのキャリアーとして、その水溶液を投与前に酸化チタンナノ粒子 (5 nm) と混合させると会合体を形成して、腫瘍モデル組織内に送り込ませることができた。①酸化チタンナノ粒子の会合体形成と②投与後の腫瘍モデル組織内の酸化チタンナノ粒子の検出及び③その治療効果を検討したので報告する。

## 2. 実験材料と実験方法

### 2.1 酸化チタンナノ粒子の会合体形成実験及び検出実験「結果：図 1」

(1) 用いた酸化チタンナノ粒子は、リン酸塩結晶 [TKS-203:  $\text{Ti}_3(\text{PO}_4)_4$ ] で、サイズが 5–6 nm あり、水溶液ではゾルの形状をしていると報告され、大阪に本社をもつ紫外線をカットする化粧品のパルクを製造しているテिका株式会社から提供を受け、上記の以外の性状の情報は特許の関係で得られていない。

(2) 1 mM の 5-ALA 水溶液と酸化チタンナノ粒子ゾル（最終濃度 2%）を混合溶液（最終容量 1 ml）に対し、Brownson 社 (USA) 製の超音波洗浄器 (42 kHz, 70 W) にて 5 分間の照射した溶液と 5-ALA を加えない酸化チタン粒子ゾル溶液を比較サンプルとした。

(3) 走査電子顕微鏡 (SEM) は、JSM-6390 型の日本電子工業製の装置を使用した。

(4) 透過電子顕微鏡 (TEM) は H-7650 型の日立製作所製の装置を使用した。

### 2.2 投与後の腫瘍モデル組織内の酸化チタンナノ粒子の検出実験「結果：図 2」

(1) 投与する実験腫瘍モデルマウスは、 $\text{C}_3\text{H}/\text{He}$  系統のマウスの背中下の皮下に、 $2 \times 10^5$  cells/0.1 ml の扁平上皮癌 (NR-S1: SCC) 細胞を移植後、2 週間後（腫瘍サイズ =  $113 \text{ mm}^3 = 6 \text{ mm} \times 6 \text{ mm} \times 6 \text{ mm} \times \pi/6$  : だ円体の体積の近似計算式）に実験に使用した。

(2) 投与の容液は 1 mM-ALA 生理食塩水 (1 ml) に 20%- $\text{TiO}_2$  リン酸塩ゾル溶液を 10 倍に分散させ、45 kHz の超音波洗浄機 (70 W, Brownson 社製, USA) にて 5 分間の照射後、マウス 1 匹 (体重 20 g) あたり 0.2 ml (100 倍に希釈) を胃腸に直接ゾンデにて、経口投与した。

(3) 2.3 でレーザーと超音波照射で併用治療した 1 腫瘍組織内での酸化チタン成分の検出には、まず、腫瘍組織のホルマリン固定後、そのパラフィンブロックを作成後、研磨面出しして検出のサンプルとした。ラマン分光顕微鏡 (日本分光社製、近赤外光 785 nm 励起型) を使用し、酸化チタンのラマン散乱光  $2730 \text{ cm}^{-1}$  のピーク強度でマッピング像を作成し、形態組織像 (ヘマトキシリン・エオジ [H&E] 染色像) と対応させながら、酸化チタン粒子の集積部位を明らかにした。

### 2.3 投与後の実験腫瘍モデル動物を使用した治療効果の検証実験「結果：図 3」

(1) レーザー照射条件：1 mM の 5-ALA 生理食塩水を経口投与後 3 時間目に、ヘムの前駆体であるプロトポルフィリン-IX (Pp-IX) の赤色蛍光が腫瘍組織内で確認されたので、この時間帯で、635 nm の半導体 CW レーザー ( $150 \text{ mW}/\text{cm}^2$ ) の照射を 16 分 40 秒 (1,000 sec) 行った ( $150 \text{ J}/\text{cm}^2$ )。

(2) 超音波照射条件：レーザー照射後、当時日立製作所中央研究所の梅村晋一郎研究主幹との共同開発による実験動物用超音波プローブに連動した照射 (1 MHz, 70 W) 装置にて腫瘍部へ 10 分間行った。

(3) ①未照射群、② 5-ALA 投与後超音波単独照射群、③ 5-ALA/ $\text{TiO}_2$  投与後のレーザー照射群、④ ③の後の超音波照射群の 4 群に対して、各群 5 匹ずつの照射実験を行った。

(4) 照射後からの腫瘍サイズの計測 (縦 × 横 × 高 ×  $\pi/6 =$  だ円体の体積近似式) を 21 日目まで継続して、経過日数に対する腫瘍サイズのグラフ (成長曲線) を作成した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 酸化チタンナノ粒子の会合体形成結果 [図 1]

(1) 5-ALA を添加した酸化チタン粒子は、図 1 の A と B, C と D のように、両電顕像からも明らかに酸化チタン粒子が会合体の形成をしていることが確認できた。特に透過電顕像からは、粒径 50 nm のクラスター形成が確認できた。

(2) この会合体形成は、5-ALA 分子による弱い親和性と軽い超音波照射修飾能を有することが、ブタノール：酢酸：水溶液 (= 4 : 1 : 5) 混合液にて分離したことから実証化できた。

(3) 更に、この分画のナノ粒子粒度分布の計測結果からは、47 nm と 1,000 nm の粒度成分が存在していた。推測するに、超音波照射により、マイクロバブル

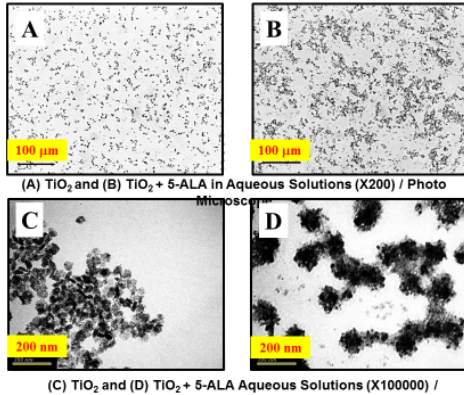


図1 酸化チタンナノ粒子の 5-ALA 溶液のないとき (左列 A, C) と有るとき (右列 B, D) の走査電顕像 (上段 A, B) と透過電顕像 (下段 C, D)

Fig. 1 The Scanning electron microscope (SEM) images [A and B] and Transmittance electron microscope (TEM) images [C and D] of  $TiO_2$  nanoparticles in the absence [A and C] and presence [B and D] of 5-ALA aqueous solution.

**Raman Imaging of  $TiO_2$  Distribution in Blood Serum and in the Vessel in SCC Tissue transplanted on Mouse with Oral-administration of ALA- $TiO_2$  Sol Solution**

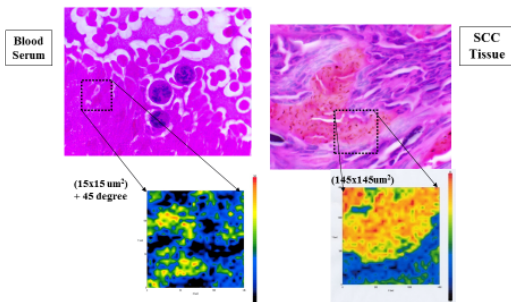


図2 血中 (左列) と扁平上皮癌モデル組織 (SCC) (右列) に於ける酸化チタン成分 (ラマン散乱吸収ピーク:  $2,730\text{ cm}^{-1}$ ) のラマン顕微鏡像

Fig. 2 Raman microscopic mapping images of  $TiO_2$  nanoparticles in the blood (Left) and the squamous cell carcinoma (SCC) tumor model tissue (Right).

を内包したクラスターの形成があるのではないかと思われる。これが浮力を得てより移動能力ができたものと考察する。

**3.2 投与後の腫瘍モデル組織内の酸化チタンナノ粒子の検出結果 [図2]**

(1) 図2の左上上段は血中と SCC 腫瘍組織の H&E 染色像を示している。左側上下の図から、血中では血液細胞とは独立して血清等に結合して  $3\text{--}4\text{ }\mu\text{m}$  サイズ

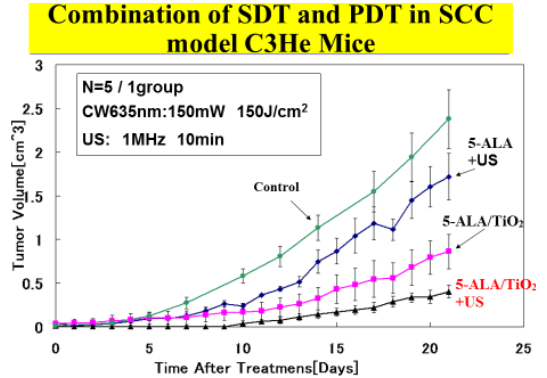


図3 扁平上皮癌モデル (SCC) の光線力学治療 (PDT) と超音波増感治療 (SDT) の単独及び併用治療効果の腫瘍成長曲線

Fig. 3 The growth curves of a squamous cell carcinoma (SCC) tumor treated by photodynamic therapy (PDT) and/or sonodynamic therapy (SDT).

の塊として血中を移動しているように思われる。

(2) 図2 右側上下の SCC 腫瘍内の血管中に酸化チタン粒子が分散しており、そのサイズがやはり  $1\text{--}3\text{ }\mu\text{m}$  サイズで分布しているように見える。

(3) 腫瘍内血管が、常時癌治療におけるターゲットとして言われているが、まさに理想的な治療効果に結びつく可能性のある存在分布と言える。

**3.3 その実験腫瘍モデル動物を使用した治療効果の検証結果 [図3]**

(1) 図3は実験 SCC 腫瘍モデルの成長曲線を示す。超音波照射によるナノ粒子に与えるキャビテーション効果により活性酸素の1種であるヒドロラジカル ( $OH^*$ ) が、酸化チタン粒子が存在すると存在しないときよりも約3倍の生成能が増加する事実は、溶液レベルで既に電子スピン共鳴法を用いて実証化していることから、レーザー照射後の超音波と酸化チタンナノ粒子の相乗的抗腫瘍効果として表れている。

これは従来より著者が提言している超音波増感効果 (Sonodynamic Therapy = SDT) [1]~[3] を実験動物でも実証化したことになる [1]。

(2) 5-ALA は酸化チタン粒子の腫瘍へのキャリアーとしてだけでなく、体内のポルフィリン代謝経路 (ヘム合成) の前駆体である Pp-IX が光増感剤として腫瘍組織に集積して、レーザー光照射による光線力学的治療 (Photodynamic Therapy = PDT) 効果を腫瘍組織の血管に対して発揮していることが、黄緑色のコントロールや青色の (5-ALA+US) に比較して、

桃色の (5-ALA/TiO<sub>2</sub>) のカーブが抗腫瘍効果を有意に示している。

#### 4. む す び

まだ、本酸化チタンナノ粒子と 5-ALA 水溶液の混合液を超音波で修飾後、溶液サンプルの向流クロマトグラフィーによる完全な精製・分離に成功したが、量的に確保できていない。今後、量的に粒度分画成分を集めて、各粒度分布成分を経口投与して、その取り込み状態を明らかにして、最適な併用治療条件を検証していきたい。

謝辞 著者 (NM) は、当時日立製作所 (株) 中央研究所の梅村晋一郎先生 (現東北大学工学部教授) に対し、本実験の超音波装置 (1 MHz) 揃える際に装置の型式の情報や実験腫瘍モデルマウス用の小型プローブを提供頂いたことに感謝申し上げます。また、酸化チタン粒子の提供を受けたチタニヤ (株) にも感謝致します。

約 20 年間の本研究には、以下の助成金の援助により推進できたものと思ひ、深謝致します。JST・先端計測分析技術機器開発事業、特別研究費 (17029024)、基盤研究費 (C-2: 11672293; B-2: 14370793; B-2: 11557116)。

また、レーザー機器開発に関し、次の民間企業: IHI (株)、ヤマキ (有) (現 YHTC (株))、コスモ石油 (株)、SBI ファーマ (株) からの研究助成を頂いたことにも深謝申し上げます。

最後に本研究の推進に関し、金沢大学名誉教授・久住治男先生に心よりお礼申し上げます。

#### 文 献

- [1] N. Miyoshi, S.K. Kundu, T. Tuziuti, K. Yasui, I. Shimada, and Y. Ito, "Combination of sonodynamic and photodynamic therapy against cancer would be effective through using a regulated size of nanoparticles," *Nanoscience and Nanoengineering*, in press., Dec. 2015.
- [2] N. Miyoshi, V. Misik, M. Fukuda, and P. Riesz, "Effect of gallium-porphyrin analogue ATX-70 on nitroxide formation from a cyclic secondary amine by ultrasound: on the mechanism of sonodynamic activation," *Radiation Research*, vol.143, pp.194–202, 1995.
- [3] N. Miyoshi, V. Misik, and P. Riesz, "Sonodynamic toxicity of gallium-porphyrin analogue ATX-70 in human leukemia cells," *Radiation Research*, vol.148, pp.43–47, 1997.

(平成 28 年 1 月 18 日受付, 2 月 16 日再受付,  
6 月 13 日公開)

#### 三好 憲雄



1981 年九州大学大学院農学研究科 (博士課程修了, 生物物理学専攻) 学位授与後, 金沢大学医学部博士研究員, 1984 年福井医科大学医学部第一病理学・病理細菌助手, 1988 年同大学医学部第一病理学助手, 平成 17 年大学法人福井大学医学部助教。平成 27 年 3 月末に福井大学医学部病因病態学講座腫瘍病理学教員を退官後, 郷里に戻り農業を続ける傍ら, 大学にて客員として今までの研究成果をまとめつつ年金生活を始めている。現在の趣味は古墳時代関連の資料集めに興味を見出している。

#### 金子 貞男



1970 北海道大学医学部医学科卒。1984 北海道大学医学部脳神経外科学講師。1985 岩見沢市立総合病院脳神経外科医長。1997 岩見沢市立高等看護学院学院長併任。2002 岩見沢市立総合病院副院長。2003 特定医療法人柏葉脳神経外科病院院長。2007 柏葉脳神経外科病院理事長・院長併任。留学: 1979 米国オハイオ州立大学, 脳腫瘍研究 (2 年間)。専門医: 日本脳神経外科学会専門医, 日本脳卒中学会専門医, 日本レーザー医学会専門医。賞罰: 2012.2 ボルフィリン・ALA 学会賞受賞。

#### 福永 幸裕



2002 福岡大学・理学部卒。2007 九州大学大学院博士取得。福井大学博士研究員, 九州大学博士研究員。現在, SBI ファーマ株式会社・神戸研究所・研究員。