

ドラッグデリバリーシステムと光ファイバー技術を融合した光線力学的治療

守本 祐司*・西山 伸宏**・片岡 一則**

Photodynamic Therapy Combined with Drug-Delivery System and Fiber Optics Technology

Yuji MORIMOTO*, Nobuhiro NISHIYAMA** and Kazunori KATAOKA**

Photodynamic therapy (PDT) has already been established as anti-cancer therapy. However, topical irradiation of light by a conventional optical fiber results in an insufficient PDT effect in case that cancer proliferates multifocally and/or diffusely. Hence, we have developed a novel fiber probe that provides homogenous light irradiation on the mucosa of hollow organs. Widespread and homogenous irradiation in the mucosa of the bladder was achieved using the newly developed fiber probe. PDT using a combination of the fiber probe and a newly developed drug-delivery system (DDS) type photosensitizer based on micelle technology enhanced the anti-tumor effect without bladder shrinking.

Key words: rat, bladder tumor, drug-delivery system (DDS), micelle, dendrimer, homogenous light irradiation

光線力学的治療 (photodynamic therapy; PDT) は、感光物質 (光増感剤) が有する光増感作用を利用した、がんなどの増殖性疾患に対する治療法である。

光増感作用は、もともと銀塩写真において可視光に対する銀錯体の感光特性を増幅するための技術で、CD-R やリソグラフ等、現在でもさまざまな分野で利用されている普遍的な技術である¹⁾。PDT は、光増感剤としてポルフィリン化合物やフタルシアニン誘導体に代表される光増感剤を全身投与し、患部に対して光照射を行うことによって、光増感剤より産生される一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) 等の活性酸素 (reactive oxygen species; ROS) による酸化反応により患部における疾患細胞の細胞死を誘導する治療法であり、さまざまな疾患に対する局所治療法として広く普及している。本邦では、がんへの PDT は 1996 年に厚生省に認可され、光増感剤 2 種類 (ポルフィマーナトリウム、タラポルフィンナトリウム) が保険収載となっており、現在、早期中心型肺癌や早期胃癌、表在型食道がん、子宮頸部初期病

変において保険適用が認められている。また、悪性腫瘍のみならず、網膜疾患²⁾ や心血管病変³⁾ 等さまざまな疾患に対する治療法としても応用・研究がなされている。

腫瘍選択的破壊という優れた特長をもつ PDT ではあるが、本邦の保険上の制約とともに、次章で述べる光増感剤の特性に基づくいくつかの問題のため、広く普及するに至っていない。筆者らは、後者の問題を解決できると期待される方法論として、光増感剤のドラッグデリバリーシステム (DDS) 化を図るとともに、適切な光照射のための新しいデバイス開発を進めている。本稿ではこれらの取り組みを紹介し、将来展望を概説したい。

1. 現状の光線力学的治療における問題点

PDT に用いられるポルフィリン化合物等の光増感剤は、それ自体の生体毒性はきわめて低いが、特定波長の光により励起され、細胞傷害活性をもつ $^1\text{O}_2$ 等の ROS を産生する性質を有する。光増感剤は悪性腫瘍組織に親和性を有

*防衛医科大学校分子生体制御学講座 (〒359-8513 所沢市並木 3-2) E-mail: moyan@ndmc.ac.jp

**東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター臨床医工学部門 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

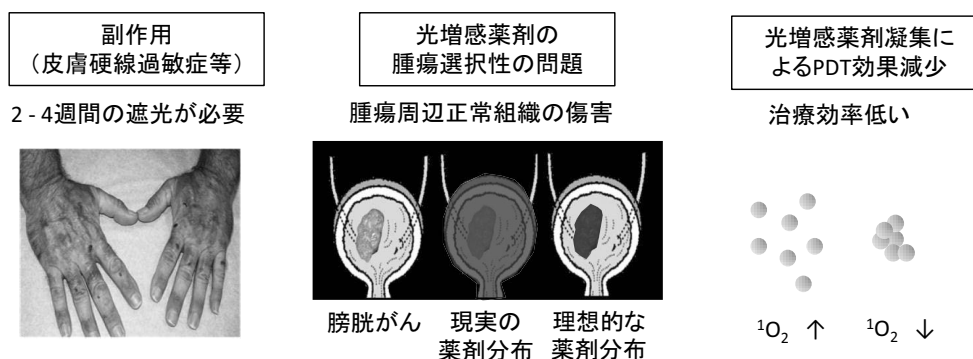


図1 現状の光線力学的治療における問題点.

し、全身投与された光増感剤は一定時間の後、標的とする病変に集積すると考えられているが、投与された光増感剤のすべてが病変に集積するわけではない。腫瘍部位においては後述するように、腫瘍増殖に伴う新生血管の構造が脆弱なため、血中に投与された数十～数百 nm サイズの物質はそこから容易に漏出し、腫瘍組織に蓄積する⁴⁾。しかし、従来用いられている光増感剤は低分子量(数百～数千)物質であり、サイズは最大でも一分子あたり 1 nm 以下で、このため、腫瘍血管のみならず正常血管をも比較的容易に通過してしまう。したがって、腫瘍以外の正常組織にも不可避免的に蓄積していく。そのため、正常組織としての皮膚に集積された状態で太陽光を浴びると、光線過敏症という激しい日焼け状態に類似した皮膚症状(光線の照射によって被照射部に丘疹、紅斑、水疱、膨疹などが生じる)を呈する⁵⁾(図1左)。そのため、光増感剤を投与された患者は、一定期間太陽光への曝露が制限され、たとえばフォトフリンでは4週間の制限が設けられている。この点に関して、認可の新しいタラポルフィンナトリウムでは、遮光制限が2週間までに短縮された。これはタラポルフィンナトリウムが水溶性であり、疎水性であるポルフィマーナトリウムと比較して体内から速やかに排泄されることによる。しかし別の、さらに深刻な副作用も考慮しないといけない。腫瘍周辺に存在する正常粘膜への影響である。PDTを施行する際は、腫瘍に局限して光が照射されるよう留意するわけだが、実際には腫瘍周辺の正常粘膜への照射は避けられない。正常粘膜にも光増感剤が集積された状態で、PDTのための光が照射されると、炎症や浮腫が惹起され、臓器によっては不可逆的な傷害となる⁶⁾(図1中、例として膀胱)。さらなるPDTの問題点として、光増感剤の物理化学的性質に起因する要因にも留意したい。光増感剤は一般的に大きな π 共役系をもつので、もともとの性質として凝集しやすく、そのため、光を照射した際の $^1\text{O}_2$ 産生に関する量子収率は低下する(この現象は濃度

消光とよばれる)(図1右)。

2. ドラッグデリバリーシステム型の光増感剤

上述した、光増感剤そのものと光増感剤の体内動態に起因する問題を解決する方法論として、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の考え方が注目されている。DDSとは、体内の薬物分布を量的・空間的・時間的に制御し、コントロールする薬物伝達システムと定義され、これまでも光増感剤を患部に選択的に送達するためのDDSの開発が活発に行われてきた^{7,8)}。DDSのうち、リポソームや高分子ミセルは、enhanced permeability and retention (EPR)効果⁴⁾(後述)によるがん選択的な集積に加えて、正常組織の血管壁は通過しないために正常組織への光増感剤の集積を顕著に抑制することができ、PDTの有効性と安全性を高めることができるものと考えられる。

2.1 デンドリマー型光増感剤内包高分子ミセルの開発

筆者らは、DDSによる光増感剤の患部選択的デリバリーの手段として高分子ミセルを選択し、研究開発を進めている。

高分子ミセルとは、ポリエチレングリコールなどの親水性ポリマーとポリアミノ酸誘導体などの疎水性ポリマーを水中で自己組織化させたもので、表面に親水性ポリマーが、内側に疎水性ポリマーが位置する二層構造をもつ。このような両親媒性高分子は従来合成が困難であり、鎖長や鎖長分布(分子量分布)が揃った、すなわち構造のよく制御された両親媒性高分子が合成できるようになったのは、近年の高分子合成技術の飛躍的進歩による。

低分子量の光増感剤を直接的にDDSキャリアーである高分子ミセルに内包させると、前述した光増感剤の凝集性に起因する濃度消光が起き、 $^1\text{O}_2$ 産生効率が著しく低下するので、筆者らはこれを回避する方法として、光増感剤分子を中心分子とする樹状高分子(デンドリマー光増感剤)を開発した^{9,10)}(図2中)。本研究では、中心の光増感剤と

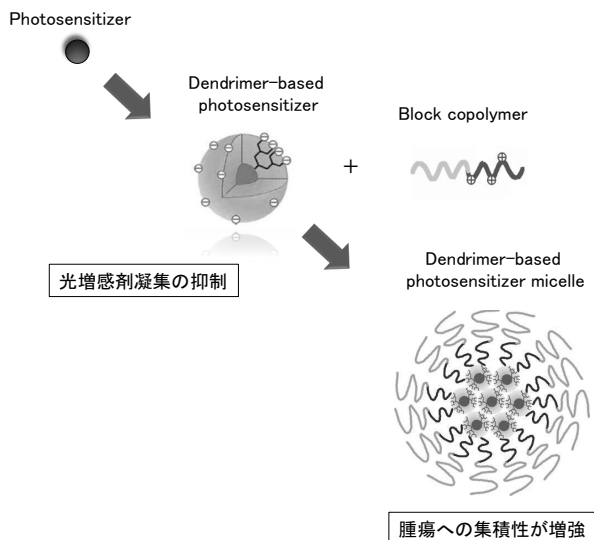


図2 デンドリマー型光増感剤内包高分子ミセル.

してフタルシアニンを選択し、これをデンドリマー化している。フタルシアニンは光の組織浸透性が要求されるがんの PDT においては、有利な赤色域 (680 nm) に光吸収帯を有する。そして、デンドリマーフタルシアニン (DPc) を両親媒性高分子で包み込み、DPc 内包高分子ミセル (DPc/m) を合成した (図2下)^{11,12)}。具体的には、DPc 表面のイオン性官能基を利用して反対電荷を有する poly (ethylene glycol)-poly (L-lysine) (PEG-PLL) ブロック共重合体と混合することにより、ポリイオンコンプレックスミセルを形成させることができる。この結果、デンドリマー構造に基づく中心色素の凝集抑制効果による効率的な 1O_2 の産生と、EPR 効果⁴⁾ (後述) に基づく効果的な DDS が可能となった。

2.2 デンドリマー型光増感剤内包高分子ミセルの DDS メカニズムと細胞内へのデリバリー

デンドリマー型光増感剤内包高分子ミセルが効果的な

DDS として機能する理由は、① EPR 効果、② 血中滞留時間の延長によると推測されている¹³⁾ (図3)。

上述したように、がん組織は正常組織に比べて血管壁の透過性が亢進しており、数十～数百ナノメートルの小孔 (ポア) を有する一方で、リンパ系の構築が未発達であるために高分子物質が集積し、そこ (がん組織) に滞留しやすい (図3左)。これは、EPR 効果⁴⁾ とよばれ、受動的な薬剤標的システムのひとつである。DPc/m は直径 30 nm ほどの、大ききの揃った (単分散) 球体であるため、EPR 効果によってがん組織への集積性は高く、一方で正常血管からの漏出は少ない¹³⁾。

他方、高分子ミセルを形成する基本骨格であるブロック共重合体の親水基が外方に配列するため、生体に投与された状態で、免疫機構による異物認識がされにくいという利点も有する。すなわち、高分子ミセルは生体において「ステルス」性 (免疫機構の監視を逃れる性質) を発揮して、異物除去のシステムである肝臓や脾臓等の細網内皮系によるトラップから免れている (図3右)。他方、サイズが数十 nm であるため、腎臓の糸球体から排泄されにくい (糸球体では 5 nm 以下サイズの物質は透過され排泄される)。このように、静脈内に投与された高分子ミセルは生体臓器による捕捉や排泄を回避することができ、その結果、血中を滞留する時間が大幅に延長し、上述の EPR 効果と相まって、がん組織への集積性は亢進する。

腫瘍血管から漏出した高分子ミセルは、脂質二重膜からなる細胞膜の表面に結合し、エンドサイトーシスによって細胞膜ごと細胞内に入り込む。細胞内ではライソゾームに存在することが確認されている¹¹⁾。

2.3 デンドリマー型光増感剤内包高分子ミセルを用いた光線力学的治療の効果

培養された状態におけるがん細胞を用いて検証したとこ

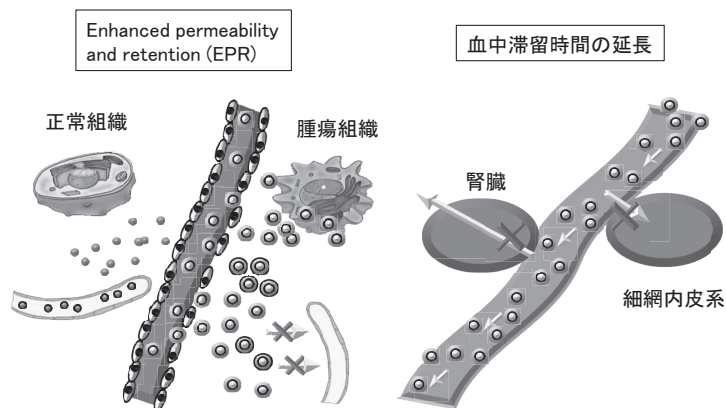


図3 高分子ミセルが腫瘍選択的に集積するメカニズム.

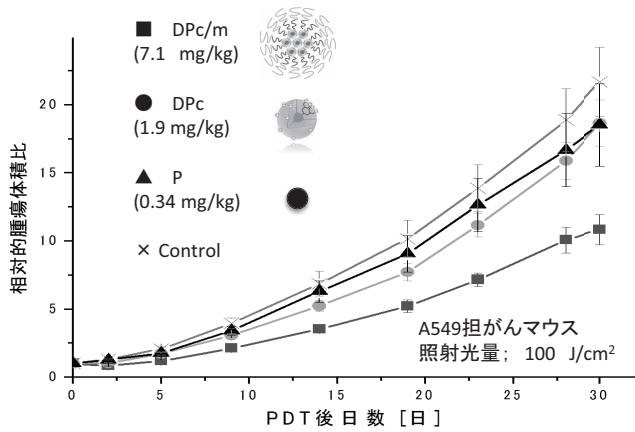


図4 DDS型光増感剤を用いたPDTによる腫瘍増殖の抑制。DPc/m： dendriマーフタルシアニン内包高分子ミセル，DPc： dendriマーフタルシアニン，P： ポルフィマーナトリウム。

ろ、DPc内包高分子ミセル(DPc/m)を使用したPDTでは、フタルシアニン単独やDPcを用いたPDTと比較して、モル比換算で約50倍の効果比を認めた。すなわち、光増感剤(この場合はフタルシアニン)1分子あたりの殺細胞効果は、高分子ミセル化したことで50倍増強したといえる。さらに、DPc/mをヒト肺がんA549細胞の皮下移植モデルマウスに静脈内投与してPDTを実施したところ、ポルフィマーナトリウムとの比較において、8分の1の投与量(モル換算)で2倍以上の優れた抗腫瘍効果が認められた¹¹⁾(図4)。さらに、DPc/mでは、先述した副作用としての光線過敏症を回避することができた。正常マウスの腹部皮膚を擬似太陽光に曝露して光線過敏症の発生を調べたところ、ポルフィマーナトリウムを事前に投与されたマウスにおいては、曝露された皮膚における激しい炎症ならびにその皮膚直下に位置する肝臓部分の変性がみられたが、事前にDPc/mを投与されたマウスにおいては、皮膚症状や肝臓傷害は確認されなかった¹¹⁾(図5)。以上の結果

は、DPc/mはDDS型の新しい光増感剤として、PDTの有効性と安全性を飛躍的に向上させることができることを示唆する。

3. ドラッグデリバリーシステム型光増感剤を用いた新しいコンセプトの光線力学的治療

腫瘍に対するPDTの従来のな方法論は、光増感剤が集積している病変部のみに局限して光照射するという局所的アプローチであり、光照射された部位でのみ光化学反応が生じ、抗腫瘍効果がもたらされる。しかし、局所に局限して光を照射するという事は、実は簡単ではない。

まず、生体は動く。腫瘍PDTの場合、100~200 mW/cm²の照射光強度密度で、10数分照射を続ける必要がある。この間、治療対象の臓器は呼吸や心拍出に伴う受動的な動きに加え、臓器自体のぜん動運動や自発運動による動きもあって、照射領域を腫瘍部位だけに限定し続けることは事実上不可能である。したがって、臓器が動くことを前提に照射範囲を広めに設定するか、もしくは照射部位を腫瘍領域より小さく絞り込み数回にわたって光を照射する方法が取られる。しかしいづれにせよ、腫瘍部位のみに局限照射することは難しく、周辺正常部位への光照射は免れない。また、「むらのない」光照射も困難である。腫瘍や臓器の形状はフラットではなく立体的で不規則な形状にあるため、腫瘍部位全体を一定の光強度で照射し続けることは難しく、一部の腫瘍部位では過大強度の照射となり、それ以外の一部の腫瘍部位では不十分な強度の光照射となりがちである。実際のPDTではこのような状況から、腫瘍周辺正常部位への不可避的光照射による組織傷害や、不均一な光照射による腫瘍のとりこぼしが起こる。

そこで筆者らは、まったく逆のアプローチで光照射することを着想した。治療対象とする腫瘍が存在する領域を含

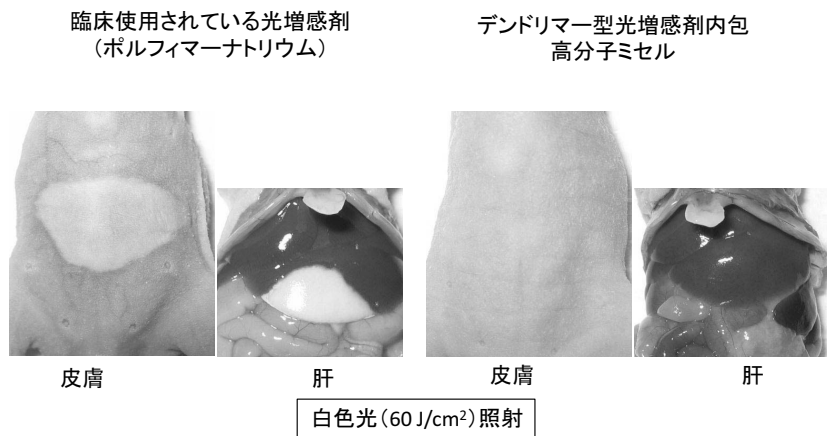


図5 ドラッグデリバリーシステム型光増感剤を用いた光線力学的療法による副作用発現の抑制。

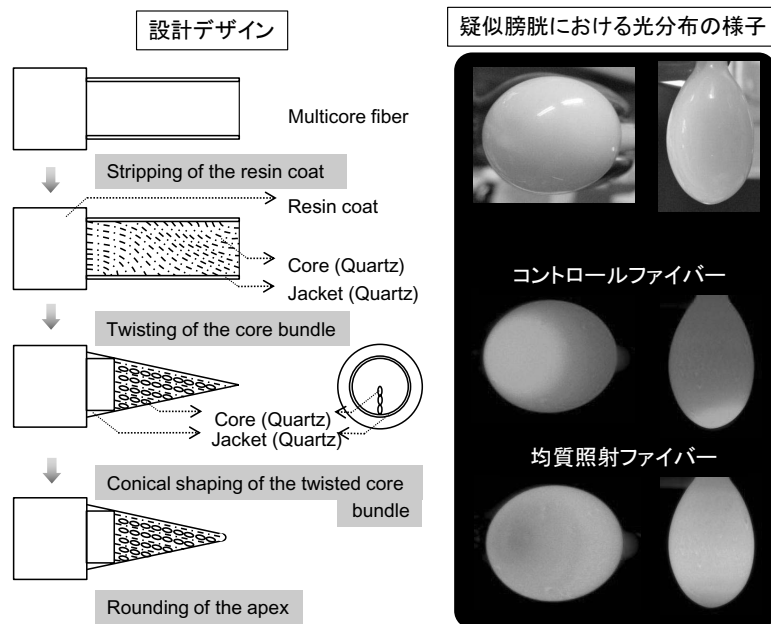


図6 開発した均質照射用ファイバークローブ (HIFiP). 図左は製造プロセス. 図右は光分布の可視化実験で, ラット膀胱を模造した艶消しの楕円体フラスコ (上) 内をコントロールファイバーを用いて光照射した場合には, フラスコの底部 (膀胱の頭側に相応) に光が集中した (中). 一方, HIFiPを用いて光照射した場合には, フラスコ内壁のほぼ全体を均質に光照射することが観察できた (下).

めて, 臓器の広い範囲に均質な光照射を行う, という発想である. DDS 型の光増感剤では, 正常部位への集積が従来の低分子量光増感剤と比べて劇的に低減できるので (従来薬剤で腫瘍部位への集積 / 正常部位への集積 = 2~3 倍. 一方, 著者らの開発した DPc/m では 10 倍以上), 正常部位での光化学作用による傷害はほとんど無視できる, という前提に立脚したアイデアだ. この照射方法のメリットは大きい. 臓器内に複数のがん病変がある場合 (とくに通常観察では発見できないような微小がん) や, がんがびまん性に臓器粘膜に広く分布している場合などの外科的切除の適用が困難な状況においても, 本法はその治療原理に照らして適用可能である. もちろん, DDS 型の光増感剤が微小な病変も含めて腫瘍に選択的に集積していることが前提であるが, がんの標準的治療法である外科的切除の手法をもってしても対処できない病変を一網打尽に治療してしまうという考え方は, 画期的といえよう.

筆者らはこの新しい PDT 手法, すなわち DDS 型光増感剤と均質光照射の組み合わせの有効性を確かめることに着手した. まず対象とするがんであるが, この手法を臨床応用することを前提に考えると, 膀胱がんがもっともよい適応になると判断した. 膀胱がんは多発性で, しかもびまん性に増殖・浸潤する性質をもつため, 上述した照射コンセプトを最大限に生かせる. 加えてこのような増殖・浸潤形態を示すので, 標準的な外科的切除術 (内視鏡を経尿道的に挿入して膀胱粘膜にあるがんを高周波メスで焼灼切除す

る方法) を行っても, 半数以上の症例が再発し, 根治が難しい. すなわち, 膀胱がんの外科的手法による根治治療は困難であり, 新しい治療法の出現が期待されていた.

3.1 均質光照射ファイバークローブの作製

そこで, ラットによる膀胱がんモデルを構築し, あわせて, ラット膀胱内腔面を均質に照射するための光ファイバークローブを開発した¹⁴⁾.

ラット膀胱内腔を均質に光照射するために, ラット膀胱内腔の立体形状と光強度密度が一致する光が放出されるような光ファイバークローブを設計した. 小動物用超音波イメージング装置を用いてラット膀胱の形状データを取得し, ラット膀胱内腔の立体形状に一致した光が出射されるように光ファイバーの先端を精密成型加工した. 図6左に示すように, 石英マルチコアファイバー (コア径 $370 \pm 15 \mu\text{m}$, ファイバー径 $400 \pm 15 \mu\text{m}$, コート径 $450 \pm 20 \mu\text{m}$, 屈折率 1.51, アッベ数 55 ± 5 , $NA = 0.41$) 先端のコーティングを取り除き, コアを含むクラッドおよびジャケット管を加熱し, 中心軸周りにねじり加工を施した. 次に, ねじられたファイバー先端を円錐状に研磨した. この加工によって, 光入射端 (未加工部) から光出射端 (加工部) の方向に, 外周側のコアから内周側のコアへと順次, 側面方向 (ファイバーの長軸に直交する方向) に開口するようになり, 側面方向への光照射が可能となった. さらに, ファイバー鋭尖頭における光の内部反射を増強させることを目的に, 鋭尖頭をわずかに球面研磨した. 結果として, 照射

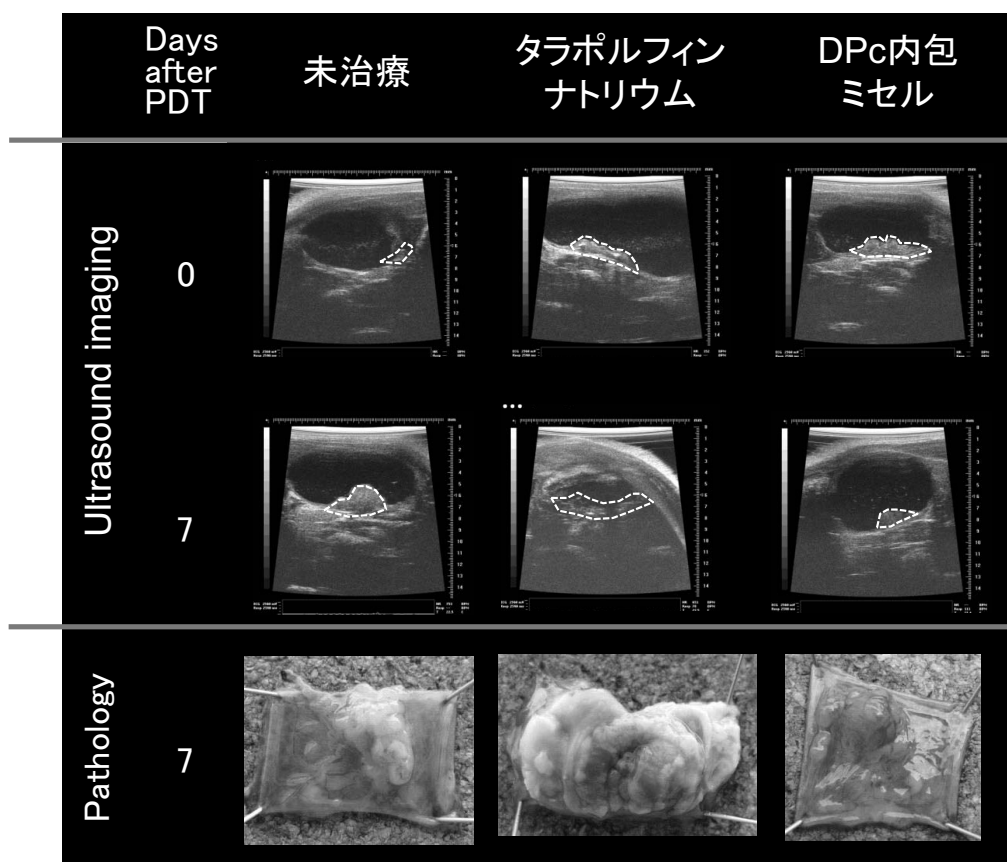


図7 ドラッグデリバリーシステム型光増感剤と均質照射用ファイバースコープを用いた光線力学的治療の抗腫瘍効果。超音波イメージング(上)と病理写真(下)。超音波イメージ中の腫瘍を白色点線で囲んだ。

中心領域の光集束を回避し、照射強度を均質にすることができた。さらに、研磨により尖った先端が膀胱壁に突き刺さることを防ぐために、石英ガラス製の保護キャップを装着した。以上の工程により、光分布が膀胱内腔に近似した、均質型照射ファイバースコープ (homogenous irradiation fiber probes: HIFiP) を作製することに成功した。

HIFiP の見かけの開口角は実測で 71.3 度となり、先端加工前のコントロールファイバー (flat cleaved end) の開口角 (31.3 度) の 2 倍以上であった。また、HIFiP を用いてラット膀胱内で光照射を行ったところ、膀胱粘膜面表面積の約 70% に光が照射され、これはコントロールファイバーを用いた場合の約 2 倍に達した (図 6 右)。

3.2 均質光照射ファイバースコープとドラッグデリバ

リーシステム型光増感剤を用いた新しい光線力学的治療開発された DPc 内包高分子ミセル (DPc/m) と HIFiP とを用いた PDT 効果の検証を行った。なお、対照実験として、タラポルフィンナトリウムを用いた PDT も行った。ラット膀胱内に膀胱がん細胞 (AY27) 播種後 3~5 日目に光増感剤を経静脈的に投与して、その 24 時間後に (タラポルフィンナトリウムでは臨床で使用される条件である薬

剤投与後 4 時間後に)、経尿道的に HIFiP を膀胱内へ挿入し、光照射 (150 mW/cm²) を行った。未治療群においては腫瘍は経時的に増大したが、DPc/m を用いた PDT 群では腫瘍は PDT によって縮退し、元のサイズの約 3 分の 1 程度まで減少した。病理学的観察では正常粘膜への影響はほとんどみられず、優れた抗腫瘍効果を膀胱内の副作用なしに発揮した。他方、タラポルフィンナトリウムを用いた PDT 群においては、膀胱粘膜に高度の炎症と浮腫がみられ、腫瘍と炎症の区別ができなくなった。超音波イメージによる腫瘍体積の計測においては、腫瘍と炎症の境が不明瞭による誤差を含むが、少なくとも腫瘍の縮小は認められなかった (図 7)。

筆者らが開発を進めている、DDS 型光増感剤と均質光照射システムを組み合わせた新しい PDT の膀胱がんへの取り組みを紹介した。この治療システムが臨床で機能すれば、膀胱がんの従来型治療方法のパラダイムを大きく変えることができる。すなわち、内視鏡観察で検知できない微小がんが存在していたとしても、高分子ミセルがそれらのがんに集積することによって、光照射による PDT 効果が

十分に期待できる。これは本 PDT システムの優位性であり、治療と予防の境界域の新しい医療ともいえ、標準的な外科的治療ではなしえない技術である。著者らは現在、本 PDT システムの臨床応用を目指して、さらなる最適化と大型動物実験による機能検証を進めている。

文 献

- 1) 速水正明:感光色素—その不思議な作用と多彩な機能—(産業図書, 1997).
- 2) A. Obana, Y. Gohto, K. Kaneda, S. Nakajima, T. Takemura and T. Miki: "Selective occlusion of choroidal neovascularization by photodynamic therapy with a water-soluble photosensitizer, ATX-S10," *Lasers Surg. Med.*, **24** (1999) 209-222.
- 3) Y. N. Hsiang, M. T. Crespo, L. S. Machan, R. D. Bower and M. E. Todd: "Photodynamic therapy for atherosclerotic stenoses in Yucatan miniswine," *Can. J. Surg.*, **37** (1994) 148-152.
- 4) Y. Matsumura and H. Maeda: "A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs," *Cancer Res.*, **46** (1986) 6387-6392.
- 5) M. D. Carbonare and M. A. Pathak: "Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging," *J. Photochem. Photobiol. B*, **14** (1992) 105-124.
- 6) J. I. Harty, M. Amin, T. J. Wieman, M. T. Tseng, D. Ackerman and W. Broghamer: "Complications of whole bladder dihematoporphyrin ether photodynamic therapy," *J. Urol.*, **141** (1989) 1341-1346.
- 7) A. S. Derycke and P. A. de Witte: "Liposomes for photodynamic therapy," *Adv. Drug Delivery Rev.*, **56** (2004) 17-30.
- 8) C. F. van Nostrum: "Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy," *Adv. Drug Delivery Rev.*, **56** (2004) 9-16.
- 9) W. D. Jang, N. Nishiyama, G. D. Zhang, A. Harada, D. L. Jiang, S. Kawauchi, Y. Morimoto, M. Kikuchi, H. Koyama, T. Aida and K. Kataoka: "Supramolecular nanocarrier of anionic dendrimer porphyrins with cationic block copolymers modified with polyethylene glycol to enhance intracellular photodynamic efficacy," *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, **44** (2005) 419-423.
- 10) Y. Li, W. D. Jang, N. Nishiyama, A. Kishimura, S. Kawauchi, Y. Morimoto, S. Miake, T. Yamashita, M. Kikuchi, T. Aida and K. Kataoka: "Dendrimer generation effects on photodynamic efficacy of dendrimer porphyrins and dendrimer-loaded supramolecular nanocarriers," *Chem. Mater.*, **19** (2007) 5557-5562.
- 11) N. Nishiyama, Y. Nakagishi, Y. Morimoto, P. S. Lai, K. Miyazaki, K. Urano, S. Horie, M. Kumagai, S. Fukushima, Y. Cheng, W. D. Jang, M. Kikuchi and K. Kataoka: "Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine," *J. Controlled Release*, **133** (2009) 245-251.
- 12) S. Herlambang, M. Kumagai, T. Nomoto, S. Horie, S. Fukushima, M. Oba, K. Miyazaki, Y. Morimoto, N. Nishiyama and K. Kataoka: "Disulfide crosslinked polyion complex micelles encapsulating dendrimer phthalocyanine directed to improved efficiency of photodynamic therapy," *J. Controlled Release*, **155** (2011) 449-457.
- 13) N. Nishiyama, Y. Morimoto, W. D. Jang and K. Kataoka: "Design and development of dendrimer photosensitizer-incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy," *Adv. Drug Delivery Rev.*, **61** (2009) 327-338.
- 14) K. Miyazaki, Y. Morimoto, N. Nishiyama, Y. Maekawa, W. Z. Hu, K. Nakatate, K. Kaneda, N. Shinomiya and K. Kataoka: "A novel homogeneous irradiation fiber probe for whole bladder wall photodynamic therapy," *Lasers Surg. Med.*, **44** (2012) 413-420.

(2012年7月3日受理)