

金ナノロッドと近赤外光を組み合わせた新しい治療技術

新 留 琢 郎^{*, **, ***}

New Therapeutic Techniques by Combining with Gold Nanorods and Near-Infrared Light

Takuro NIIDOME^{*, **, ***}

Gold nanorods, rod-shaped gold nanoparticles, have an adsorption band at near infrared light region, convert the adsorbed light energy to heat so-called photothermal effect. In this review, we introduce preparation of biocompatible gold nanorods that can be applied as nanodevice for medical use, application to photothermal therapy and to controlled release system based on photothermal effect of gold nanorods responding to near infrared light irradiation.

Key words: gold nanorods, photothermal effect, photothermal therapy, drug delivery

近赤外域はヘモグロビンといった有色たんぱく質と水の吸収バンドに挟まれた領域で、そのため、近赤外光の組織透過性は可視光に比べて高い¹⁾。したがって、光線力学療法や蛍光バイオイメージングといった光を使った治療や診断には、この近赤外光が好ましい。実際に、より長波長側に吸収をもつ光増感剤や蛍光色素の開発が盛んに行われている。

さて、近赤外域に吸収をもつ材料として、金ナノシェルや金ナノケージ、金ナノロッドが知られている(図1)²⁾。これらの形状(長さ、アスペクト比、シェル厚など)を変えることで、吸収バンドを変化させることができる。筆者らが注目している金ナノロッドは、500 nm 付近の吸収(単軸方向の電子振動に由来する)に加え、800~1000 nm の近赤外域にもシャープな吸収バンド(長軸方向の電子振動に由来する)をもつ(図2)³⁾。また、吸収した光を熱エネルギーに変換する(フォトサーマル効果)こともできる。したがって、もし金ナノロッドを腫瘍などの特定の部位に集積させれば、近赤外光を使ってその部位をイメージングできるだろうし、また、そこへ体外からさらに強い近

赤外光を照射することで、金ナノロッドを発熱させ、周辺組織を傷害することも可能になる。さらに、温度上昇に伴って応答するしくみを組み合わせれば、近赤外光照射でコントロールされるドラッグデリバリーシステムも開発できるだろう。

本稿では、まず金ナノロッドの生体適合化から、発熱効果を使ったがん治療システム、そして、近赤外光照射によりコントロールされる金ナノロッドからの薬物放出に関する最新の研究を紹介したい。

1. 金ナノロッドの生体適合化

金ナノロッドを作製する際に共存させる hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) は、そのミセル構造がロッド形成時の結晶成長をコントロールすることに加え、作製後の分散安定剤として働く。しかし、この CTAB はカチオン性の界面活性剤であり、強い細胞毒性をもつ。したがって、培養細胞や実験動物を対象に実験する場合には、分散安定性を保ちつつ CTAB を取り除き、かつ、生体適合化させる必要がある。そこでわれわれは、ポリエチレ

*九州大学大学院工学研究院応用化学部門 (〒819-0395 福岡市西区元岡 744)

**九州大学未来化学創造センター (〒819-0395 福岡市西区元岡 744)

***九州大学分子システム科学センター (〒819-0395 福岡市西区元岡 744) E-mail: niidome_t@kyudai.jp

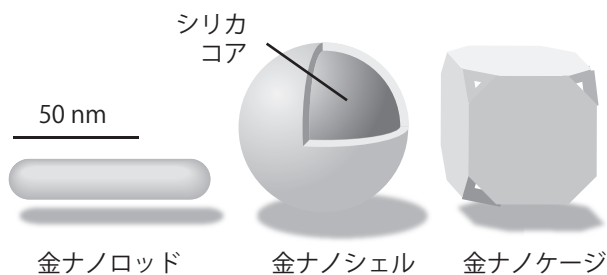


図1 さまざまな形状の金ナノ粒子。

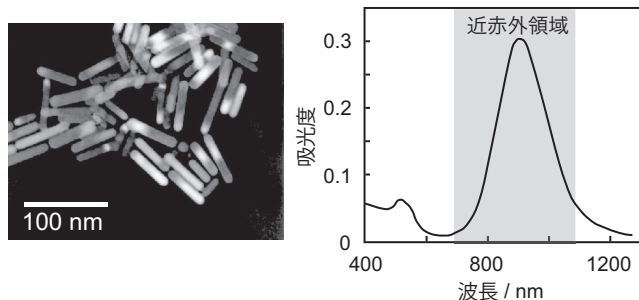


図2 金ナノロッドの電子顕微鏡写真と吸収スペクトル。

ングリコール (PEG) 鎖で金表面を修飾した⁴⁾。その結果、粒子のゼータ電位はほぼ中性となり、電子顕微鏡観察からも金ナノロッド周囲に PEG 鎖が密に修飾されていることがわかった。培養細胞に対する毒性は認められず、また、マウスへ静脈投与後、6 時間後においても、投与量の 30% が血中を循環し、高い血中滞留性をもつことがわかった。最終的に金ナノロッドは肝臓と脾臓に蓄積するが、短期的な肝毒性、腎毒性、サイトカイン応答といった副作用はみられなかった。

2. 体内を循環する金ナノロッドの分光分析

筆者らは金ナノロッドをマウスに投与し、体内の金ナノロッドを積分球を用いて検出できるかどうかを試みた。積分球は物体からの反射光を測定する装置で、その反射光スペクトルから吸収スペクトルも得られる装置である。麻酔下のマウスを積分球のポートに乗せ、PEG 修飾金ナノロッドを尾静脈より投与した (図 3)。その結果、金ナノロッドに由来する明確な吸収スペクトルが観察され、マウス体内を循環する金ナノロッドの直接検出に成功した⁵⁾。また、900 nm における吸収値の時間経過を追跡した結果、それは減少し、その減少速度から半減期を算出することができた。PEG 修飾金ナノロッドの場合は 200 分程度であり、CTAB で安定化している金ナノロッドの半減期は 0.8 分であったことから、PEG 修飾することにより血中安定性が飛躍的に向上していることを定量的に示すことがで

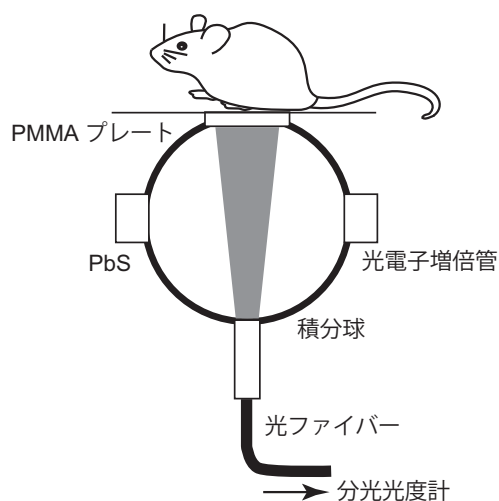


図3 積分球を用いたマウス体内の金ナノロッドの分光分析。

きた。この技術では、金ナノロッドの二次元あるいは三次元分布の情報を得ることはできないが、特定の部位のリアルタイムな金ナノロッドのモニタリングは可能であり、表面修飾の違いによる体内動態への影響などを知るためのツールとしては期待できる。あるいは、照射光を絞って照射し、反射光強度をマッピングすることで、二次元分布を知ることができるかもしれない。

3. がんのフォトサーマル治療

がん組織を局所的に加熱し、治療するハイパーサーミアという手法がある。金ナノロッドをがん組織に集積させ、近赤外光を照射すれば、そのフォトサーマル効果により同様の効果が期待される。PEG 修飾した金ナノロッドを担がんマウスの腫瘍部位へ局所投与し、腫瘍部位に近赤外パルスレーザー光を照射 (Nd:YAG レーザー、波長 1064 nm、パルス幅 7~8 ns、周波数 20 Hz、平均パワー ~750 mW、ビーム径 5 mm、時間 3 分) した結果、腫瘍組織の傷害が認められ、増殖も抑制された⁶⁾ (図 4)。

一方、PEG 修飾金ナノロッドを静脈投与し、その後腫瘍部位をレーザー光照射した場合にも、腫瘍の増殖抑制は認められたが、その効果は低かった。これは、PEG 修飾金ナノロッドは腫瘍組織の enhanced permeation and retention (EPR) 効果により正常組織より高濃度に蓄積してはいるが、腫瘍への局所投与の場合に比べればその量は少なく、そのために効果が弱かったと考えられる⁷⁾。EPR 効果とは、腫瘍組織では正常組織に比べ物質の血管透過性が亢進し、高分子やナノ粒子が血管外から組織内に浸出しやすく、同時に、リンパ系が発達していないために排出されにくいいため、数十~数百 nm の粒子は腫瘍に蓄積しやす

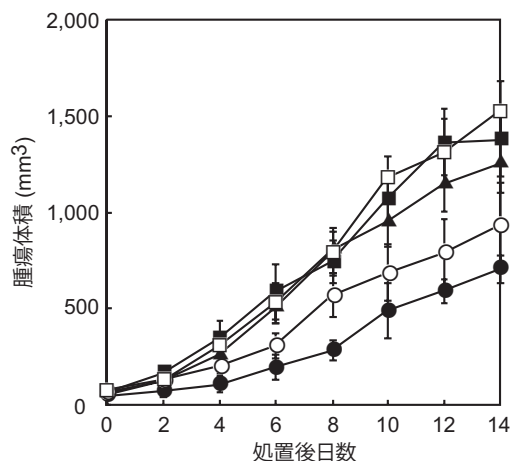


図4 フォトサーマル治療後の腫瘍の体積変化。●：腫瘍に金ナノロッドを局所投与後、近赤外光照射した群、○：金ナノロッドを尾静脈投与後、近赤外光照射した群、□：金ナノロッドを局所投与した群（近赤外光照射なし）、■：近赤外光照射のみ（金ナノロッドの投与なし）、▲：無処置。

いという現象をいう。したがって、より高い抗腫瘍効果を得るためには、金ナノロッドを腫瘍組織へ積極的に集積させる工夫をしなければならない。

4. 金ナノロッドの標的部位への集積技術

4.1 光照射部位に集積する金ナノロッドの構築

一般に、薬物を目的部位（病変部位）へ集積させる手法として、標的となる細胞を認識する化合物（リガンドや抗体など）で修飾するという手法が用いられる。金ナノロッドをこのような手法で目的部位に集積させることに成功した報告はすでにいくつかあるが^{8,9)}、筆者らは金ナノロッドのフォトサーマル効果を生かしたターゲティングができないかと考えた。つまり、親水性ポリマーである *N*-ポリイソプロピルアクリルアミドは、加熱すると相転移を起こし、疎水性になる。この温度感受性ポリマーを金ナノロッド表面に修飾すれば、フォトサーマル効果により光照射した場合にのみ相転移が起こると期待される。そして、生体組織中でこの現象を起こせば、光照射部位のみで相転移が起こるため、金ナノロッドが細胞表面や細胞間マトリクスに吸着するだろうというシナリオである（図5）。実際に、ポリ-*N*-ポリイソプロピルアクリルアミドで金ナノロッドを修飾し、その相転移挙動を調べた結果、34°C 付近で相転移を起こし、金ナノロッド表面が疎水性になることがわかった¹⁰⁾。しかし、この相転移温度はマウスの体温以下であり、静脈投与後すぐに相転移を起こしてしまうため、この相転移温度を体温以上にする必要がでてきた。そこで、*N*-ポリイソプロピルアクリルアミドにアクリルアミドを混合し、ポリ-*N*-ポリイソプロピルアクリルアミ

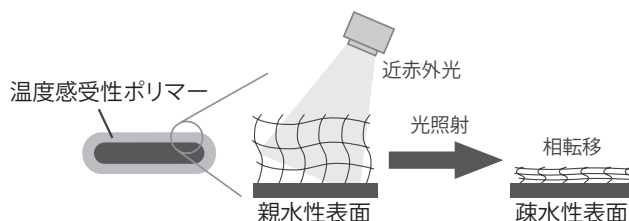


図5 温度感受性ポリマーで修飾した金ナノロッドとその光照射によるポリマーの相転移。

ド-*co*-アクリルアミド共重合体を金ナノロッド表面に修飾した。その結果、このポリマーの相転移温度は体温以上の42°C 付近となった。そして実際に、この金ナノロッドを左右に2つの腫瘍を移植したマウスへ尾静脈投与し、その後、右腫瘍のみに近赤外レーザー光（連続光半導体レーザー、波長 807 nm、平均パワー密度 3.8 W/cm²、時間 10 分）を照射した結果、右腫瘍への有意な金の蓄積が認められた¹¹⁾。この結果はレーザー照射可能な任意の部位に金ナノロッドを集積させることができることを示しており、腫瘍のみならず、さまざまな疾患への適用が期待される。

4.2 プロテアーゼの存在している部位に集積させる技術

マトリクスメタロプロテアーゼなど、腫瘍部位に特異的に発現しているプロテアーゼが知られている。このプロテアーゼ活性に反応して、金ナノロッド表面の性質が変換されるシステムを構築することができれば、金ナノロッドを選択的に腫瘍部位に集積されることが可能になる。そこで筆者らは、金表面にペプチド鎖を介して PEG 鎖を修飾した。このペプチド鎖を腫瘍選択的に発現しているプロテアーゼの基質配列とすれば、腫瘍部位でのみペプチド鎖が切断され、PEG 鎖が解離し、金ナノロッド表面は疎水性となる（図6）。体内においてこの現象が起これば、疎水性相互作用で金ナノロッドが周辺組織に非特異的に結合し、結果的にその部位に金ナノロッドが集積することになる。これまでに、マトリクスメタロプロテアーゼやウロキナーゼ様プラスミノゲンアクチベーターの基質配列ペプチドを使って、これらプロテアーゼ存在時のみ金ナノロッドが凝集することを確認した。また、担がんマウスにこの金ナノロッドを静脈投与し、腫瘍への集積についてスクランブルペプチド（プロテアーゼに切断されないように配列を変えたペプチド）を修飾した金ナノロッドと比較した結果、切断されるペプチドで修飾した場合において、多くの金ナノロッドが腫瘍に集積していることがわかった¹²⁾。しかし本システムは、PEG-ペプチドの修飾密度を高めると、血中循環安定性が上がるが、プロテアーゼのペプチドが悪くなり、腫瘍の集積効率が下がる。一方で、

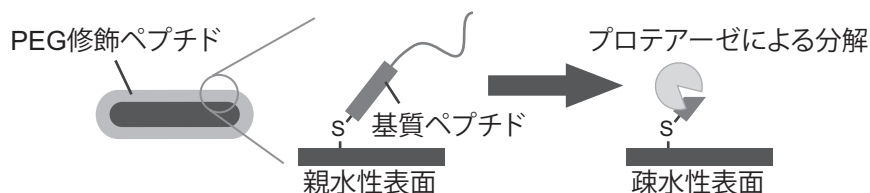


図6 プロテアーゼ活性に反応して、表面が疎水性になる金ナノロッド。

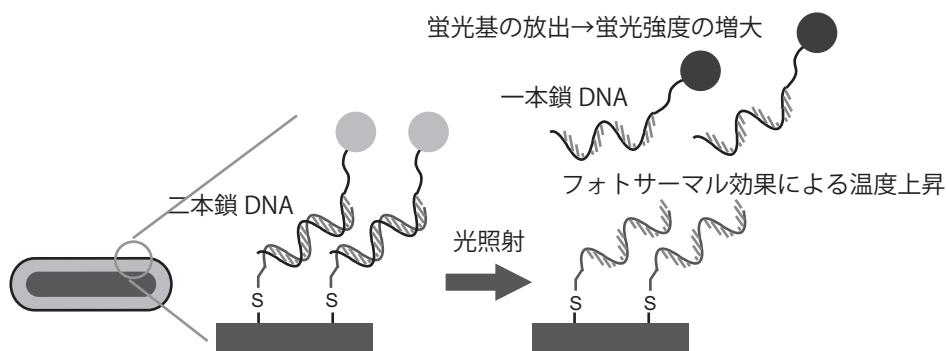


図7 二本鎖 DNA 修飾金ナノロッドと近赤外光照射による一本鎖 DNA の解離。

PEG-ペプチドの修飾密度を下げると、循環安定性が悪くなり、腫瘍組織へたどり着ける割合が減ってしまうというジレンマを抱えている。安定性とプロテアーゼのアクセスの両者を満足させるようなアイデアが必要である。

5. フォトサーマル効果を利用した薬物放出システム

5.1 二本鎖 DNA の解離を使った薬物放出システム

金ナノロッドのフォトサーマル効果によって薬物が放出されるシステムが構築できれば、体外からの近赤外光照射でその薬剤の実効濃度を時空間でコントロールでき、副作用の少ない安全な薬物治療法として発展できることが期待される。筆者らはまず、熱センサーとなる分子として、二本鎖 DNA に注目した。二本鎖 DNA は加熱されると一本鎖に解離する。そこで、金ナノロッド表面に二本鎖 DNA を修飾すれば、近赤外光照射により一本鎖 DNA を遊離させることが可能になり、それをアンチセンスや siRNA として機能させることができる。あるいは、解離する DNA 鎖に薬物を修飾しておけば、その薬物のコントロールリリースシステムともなる。そこで筆者らは、解離するほうの鎖に蛍光基を修飾し、フォトサーマル効果による二本鎖 DNA の解離を蛍光変化で評価した (図 7)。蛍光修飾した DNA が金ナノロッドに結合している状態では、その蛍光は消光されていたが、近赤外レーザー光 (連続光半導体レーザー、波長 807 nm, 平均パワー 500 mW, ビーム径 5.5 mm, 時間 10 分) を照射することにより、蛍光が回復する様子を観察できた。また、実際の光照射時の溶液温度

を測定した結果、二本鎖 DNA の融点より低い温度で解離が認められたことから、金ナノロッドの周辺の局所的な温度は溶液全体の温度より高くなっていることが示された^{13,14)}。さらに、がんモデルマウスの腫瘍部位にこの DNA 修飾金ナノロッドを局所投与し、近赤外光を照射した結果、照射部位選択的に蛍光が観察された¹³⁾。このことから、マウス体内においても、金ナノロッドのフォトサーマル効果による一本鎖 DNA の遊離をトリガーできることを証明できた。よって、このシステムを利用した抗がん剤のコントロールリリースシステムの構築が期待される。

5.2 逆 Diels-Alder 反応を使った薬物放出システム

Diels-Alder 反応は共役ジエンとアルケンの環化付加反応で、60°C 程度で進行する。しかし、それをより高温 (80~90°C) にすると、逆反応が起こり、環化付加物が共役ジエンとアルケンに遊離する。そこで筆者らは、Diels-Alder 反応の環化付加物を介して、金ナノロッドに PEG 修飾した (図 8)。これに近赤外レーザー光 (連続光半導体レーザー、波長 920 nm, 平均パワー 500 mW, ビーム径 5.5 mm, 時間 10 分) を照射すると、金ナノロッドが凝集を起こした。これは、発生する熱により金ナノロッド表面で逆 Diels-Alder 反応が起こり、PEG 鎖が解離したためである¹⁵⁾。現状では凝集体形成に数分が必要で、早いレスポンスとはいえないが、このような熱で進行する化学反応も金ナノロッドの表面構造の変換や薬物放出に利用可能であることを示すことができた。

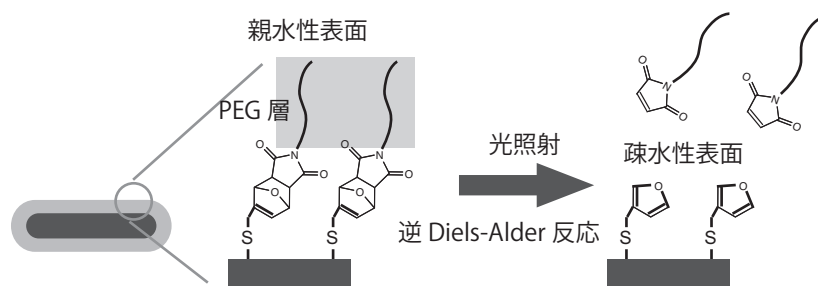


図8 Diels-Alder 環化付加物修飾金ナノロッドと近赤外光照射による PEG 鎖の遊離。

金ナノロッドは近赤外域における強い吸収バンドとフォトサーマル効果をもつことから、単なるフォトサーマル治療の発熱デバイスとしてだけではなく、薬物放出のコントローラーにもなる。金ナノロッドは組織透過性が高い近赤外光により加熱可能であり、また、図2に示すようにその吸収バンドはシャープであるため、アスペクト比の異なる複数の金ナノロッドと複数の薬剤を組み合わせ、高次の薬物放出システムを構築することも期待できる。また、照射光源として、パルス光レーザー、連続光レーザー、あるいは、キセノンランプからの近赤外光など、さまざまな光源を選択できる。パルスレーザーの場合、きわめて短い時間に高いエネルギーが金ナノロッドに与えられるため、ロッド状の形状が球状に変化し、それによって近赤外光の吸収特性は失われ、発熱しなくなる。一方、連続光レーザーやキセノンランプ光源の場合では、金ナノロッドの形状は変化せず、ずっと加熱され続ける。すなわち、前者では瞬間的に強烈に発熱され、後者では穏やかに継続的に加熱される¹⁶⁾。アプリケーションによって、このような発熱モードを使い分け、最適な照射方法を見いだすこともできるだろう。このように、分光学から化学、薬学、医学といったさまざまな分野のエッセンスを組み合わせ、新しいナノメディシンの発展に寄与できると期待している。

文 献

- 1) R. Weissleder: "A clearer vision for *in vivo* imaging," *Nat. Biotechnol.*, **19** (2001) 316-317.
- 2) A. S. Thakor, J. Jokerst, C. Zavaleta, T. F. Massoud and S. S. Gambhir: "Gold nanoparticles: A revival in precious metal administration to patients," *Nano Lett.*, **11** (2011) 4029-4036.
- 3) Y.-Y. Yu, S.-S. Chang, C.-L. Lee and C. R. C. Wang: "Gold nanorods: Electrochemical Synthesis and optical properties," *J. Phys. Chem. B.*, **101** (1997) 6661-6664.
- 4) T. Niidome, M. Yamagata, Y. Okamoto, Y. Akiyama, H. Takahashi, T. Kawano, Y. Katayama and Y. Niidome: "PEG-modified gold nanorods with a stealth character for *in vivo* applications," *J. Control. Release*, **114** (2006) 343-347.
- 5) T. Niidome, Y. Akiyama, K. Shimoda, T. Kawano, T. Mori, Y. Katayama and Y. Niidome: "*In vivo* monitoring of intravenously injected gold nanorods using near-infrared light," *Small*, **4** (2008) 1001-1007.
- 6) T. Niidome, Y. Akiyama, M. Yamagata, T. Kawano, T. Mori, Y. Niidome and Y. Katayama: "Poly(ethylene glycol)-modified gold nanorods as a photothermal nanodevice for hyperthermia," *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **20** (2009) 1203-1215.
- 7) Y. Akiyama, T. Mori, Y. Katayama and T. Niidome: "The effects of PEG grafting level and injection dose on gold nanorod biodistribution in the tumor-bearing mice," *J. Controlled Release*, **139** (2009) 81-84.
- 8) H. Liao and J. H. Hafner: "Gold nanorod bioconjugates," *Chem. Mater.*, **17** (2005) 4636-4641.
- 9) X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian and M. A. El-Sayed: "Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods," *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (2006) 2115-2120.
- 10) T. Kawano, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama and T. Niidome: "PNIPAM gel-coated gold nanorods for targeted delivery responding to a near-infrared laser," *Bioconjugate Chem.*, **20** (2009) 209-212.
- 11) A. Shiotani, Y. Akiyama, T. Kawano, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama and T. Niidome: "Active accumulation of gold nanorods in tumor in response to near-infrared laser irradiation," *Bioconjugate Chem.*, **21** (2010) 2049-2054.
- 12) T. Niidome, A. Ohga, Y. Akiyama, K. Watanabe, Y. Niidome, T. Mori and Y. Katayama: "Controlled release of PEG chain from gold nanorods: Targeted delivery to tumor," *Bioorg. Med. Chem.*, **18** (2010) 4453-4458.
- 13) S. Yamashita, H. Fukushima, Y. Akiyama, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama and T. Niidome: "Controlled-release system of single-stranded DNA triggered by the photothermal effect of gold nanorods and its *in vivo* application," *Bioorg. Med. Chem.*, **19** (2011) 2130-2135.
- 14) H. Fukushima, S. Yamashita, T. Mori, Y. Katayama and T. Niidome: "Sequential release of single-stranded DNAs from gold nanorods triggered by near-infrared light irradiation," *Chem. Lett.*, **42** (2012) 711-712.
- 15) S. Yamashita, H. Fukushima, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama and T. Niidome: "Controlled-release system mediated by a retro Diels-Alder reaction induced by the photothermal effect of gold nanorods," *Langmuir*, **27** (2011) 14621-14626.
- 16) S. Yamashita, Y. Niidome, Y. Katayama and T. Niidome: "Photochemical reaction of poly(ethylene glycol) on gold nanorods induced by near infrared pulsed-laser irradiation," *Chem. Lett.*, **38** (2009) 226-227.

(2012年6月20日受理)