

ポルフィリンの存在位置がおよぼすポルフィリン含有
リポソームの安定性と光線力学活性への影響に関する研究

Effect of stability and photodynamic activity of lipid membrane-incorporated
porphyrins by location of porphyrins

2019年9月

中谷 都志美

ポルフィリンの存在位置がおよぼすポルフィリン含有リポソームの安定性と光線力学活性への影響に関する研究

目次

第1章 緒言

1-1	がん治療の現状と問題点	1
1-2	ポルフィリン誘導体を用いた光線力学療法	1
1-3	リポソーム	2
1-4	リポソームと細胞の相互作用	2
1-5	ドラッグデリバリーシステム (DSS) と Enhanced permeability and retention (EPR) 効果	3
1-6	NMR によるドラッグデリバリーの研究	4
1-7	研究目的	5
1-7-1	研究目的 I	6
1-7-2	研究目的 II	6
1-7-2	研究目的 III	7
1-8	参考文献	7

第2章 ポルフィリン誘導体とシクロデキストリン錯体の構造決定

2-1	序	9
2-2	実験	10
2-2-1	トリメチル- β -シクロデキストリン錯体の調製	10
2-2-2	UV-Vis 吸収スペクトル測定	10
2-2-3	$^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定	11
2-2-4	$^1\text{H-}^1\text{H COSY}$, $^1\text{H-}^1\text{H NOESY}$ スペクトル測定	15
2-2-5	単結晶 X 線構造解析による錯体構造の決定	17
2-3	結論	20
2-4	参考文献	20

第3章 ポルフィリン誘導体含有リポソームの安定性と光線力学活性評価

3-1	序	22
3-2	実験	23
3-2-1	DMPC リポソームの調製	23
3-2-2	カチオン性脂質を混合したリポソームの調製	23
3-2-3	トリメチル- β -シクロデキストリン錯体の調製	24
3-2-4	ポルフィリン誘導体含有リポソームの調製	24
3-2-5	一重項酸素発生能の評価	24

3-2-6	細胞実験	25
3-2-6-1	MEM 培地を用いた調製培地の調製	25
3-2-6-2	1×リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) の調製	25
3-2-6-3	0.05%トリプシン-EDTA の調製	25
3-2-6-4	HeLa 細胞の培養	25
3-2-6-5	光照射、未照射サンプルの調製	26
3-2-6-6	細胞への光照射	26
3-2-6-7	WST-8 アッセイによる細胞生存率の算出	26
3-2-6-8	蛍光顕微鏡による HeLa 細胞の観察	26
3-3	結果と考察	27
3-3-1	LMI1-7 形成の確認	27
3-3-2	水中でのポルフィリン誘導体含有リポソームの長期安定性評価	29
3-3-3	FBS を含む DMEM 中でのリポソームの長期安定性評価	33
3-3-4	ポルフィリン含有リポソームの一重項酸素発生能評価	35
3-3-5	ポルフィリン-CDx 錯体の一重項酸素発生能評価	36
3-3-6	HeLa 細胞を用いたリポソーム内包ポルフィリンの光線力学活性の評価	40
3-4	結論	44
3-5	参考文献	44
第 4 章 ポルフィリン誘導体含有リポソームの安定性と光線力学活性評価		
4-1	序	48
4-2	実験	49
4-2-1	卵黄フォスファチジルコリン (EggPC) リポソームの調製	49
4-2-2	1, 3, 4 および 7-TMe- β -CDx 錯体の調製	49
4-2-3	LMI1, 3, 4 および 7 の調製 (ポルフィリン交換反応)	50
4-2-4	LMI9-11 の調製 (事前混合法)	50
4-3	結果と考察	50
4-3-1	ポルフィリン含有リポソーム形成の確認	50
4-3-2	ナフタレン化合物含有リポソーム形成の確認	52
4-3-3	LMI1 のインキュベーション時間の変化による安定性評価	53
4-3-4	LMI1 中の沈殿物の確認	57
4-3-5	ポルフィリン化合物のメソ位の置換基が及ぼす影響	58
4-3-6	リポソーム内でのナフタレン分子の位置の決定	64
4-4	結論	66
4-5	参考文献	67

第 5 章 結言

結言	69
使用試薬一覧	71
使用機器一覧	73
謝辞	74

第1章 緒言

1-1 がん治療の現状と問題点

日本人の死亡原因第1位は、1981年以降、悪性腫瘍、いわゆる「がん」となっており、年間30万人以上ががんで亡くなり、さらに年間70万人以上の人新たにがんになっている状況である¹。現在のがん治療は、外科療法、化学療法、および放射線療法が主流になっている。病巣の切除が可能であれば、外科治療が行われるのが一般的であるが、目に見えないレベルの小さな転移があった場合や高齢者など体力的負担に耐えられない場合は適応が難しい。化学療法は、抗がん剤によってがん細胞を死滅させたり、増殖を抑えたりする治療法であり、抗がん剤が血液を通して全身をめぐるため、ごく小さな転移にも効果が期待できる。しかし、がん細胞だけでなく、正常細胞に対しても毒性を発揮してしまうために、重篤な副作用が起こる可能性がある²。放射線治療は、がんの病巣部に放射線を照射して、がん細胞を死滅させる局所療法で、がんの大きさや位置を正確に測り、その部分だけに集中的に照射することが可能である³。しかし、放射線の影響で照射部位の炎症などの放射線障害やめまいなどの全身症状が現れることもある。

がん治療は、患者に適した治療法を年齢、性別、環境、希望などを踏まえ、総合的に判断することが必要とされ、上記治療法を組み合わせた集学的治療を行うこともある。

1-2 ポルフィリン誘導体を用いた光線力学療法

1-1で述べたがん治療の問題点を解決すべく、近年、低襲撃で選択性の高い治療法として光線力学療法 (Photodynamic Therapy; PDT) が注目されている。PDTは1961年にLipsonが腫瘍親和性高感受性物質であるヘマトポルフィリン誘導体を合成し、がん腫瘍に特異的に集積させ、光照射により光線力学活性があることを証明した⁴。PDTは、薬剤となる光感受性物質を体内に投与し、患部に集積させた後、患部に光を照射すると、光感受性物質が励起され、励起一重項状態になる。その後、蛍光もしくは熱を発し、基底状態に戻るか、または系間交差を経て励起三重項状態になる。この励起三重項状態の寿命が長いため、光感受性物質が体内の酸素分子と衝突し、エネルギーが酸素分子へと移動する光化学反応が進行する。ここで生じた活性酸素種ががん細胞を死滅させる⁵。(図 1-1.)

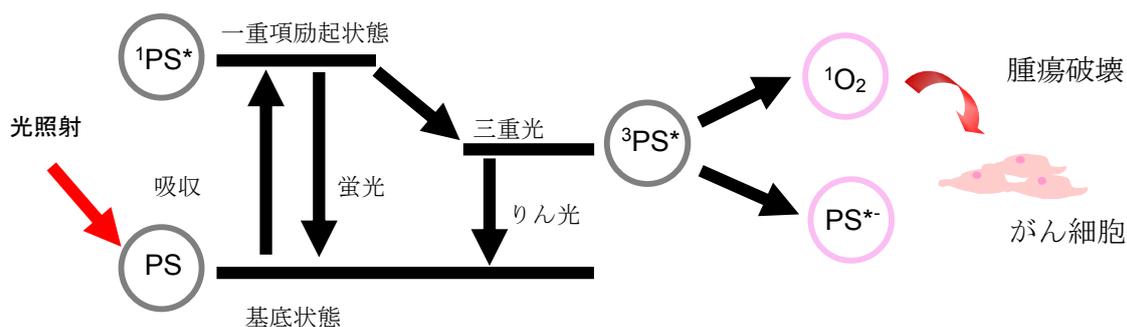


図 1-1. PDT の原理

PDT 製剤に求められることは、腫瘍親和性があることと、光化学反応に富んでいることである^{6,7}。これらの条件を満たす化合物で、特に腫瘍親和性の高いポルフィリン誘導体が PDT 製剤として多く用いられている⁸。ポルフィリンは 400-450 nm 付近の Soret 帯と 500-700 nm 付近の Q 帯に強い吸収を持っている。PDT で使用する照射光は、生体組織への吸収に影響しない、皮膚透過性の良い波長領域である 600-700 nm 付近であることから⁹、ポルフィリンの Q 帯が適している。また、豊富に π 電子を持つことからタンパク質との親和性が高く、特に低密度リポタンパク (Low density lipoprotein; LDL) と高い親和性を示す。腫瘍組織では、LDL 受容体活性が上昇しているため腫瘍組織に集積しやすいこともポルフィリンが PDT 製剤に利用される理由の一つである¹⁰。

しかし、ポルフィリンが豊富な π 電子を持つため水溶性に乏しい点が課題になっている。当研究室では、ポルフィリン誘導体の水溶化を検討し、リポソームやシクロデキストリンなどのドラッグキャリアを用いた超分子的アプローチで、上記問題を解決してきた¹¹。

1-3 リポソーム

リポソームは、リン脂質からなる膜小胞であり、細胞膜と同じ脂質二分子膜を有する。リポソームの構造が細胞膜に似ており、生体膜モデルとして脂質の物性研究や膜の透過性研究に広く用いられてきた¹²。1964 年に Bangham がリポソームを発見して以来、リポソームは天然の脂質のみならず、合成脂質を用いても形成できることや、リン脂質以外にコレステロールなどの含有量も目的に応じて調整できるなど、脂質組成を自由にコントロールできることが明らかになった。

脂質組成を自由に変わることが出来るリポソームの特徴を利用し、リポソーム表面にカチオン性分子やアニオン性分子、さらには種々のがん細胞認識部位を導入することができる。近年では、高分子、疎水性や両親媒性の物質も安定に脂質二分子膜中に保持できることが明らかとなり、リポソームがこれらのキャリアとして有用であると期待されている。

1-4 リポソームと細胞の相互作用

リポソームと生体膜は性質が似ていることから、細胞-細胞間、ウイルス・細菌-細胞間などの相互作用を解明する目的でも使用されてきた。リポソームと細胞間の相互作用を調べることで、薬物を投与した後の動態、目的部位に集積後の薬物の放出、そして標的細胞内への移行プロセスを解明することができる。これらの検証から得られた情報は、薬物送達システム (DSS) キャリアとしてリポソームを利用する際に、非常に重要なものとなる。

リポソームと細胞間の相互作用メカニズムは、

- ①リポソームの細胞表面への吸着および結合
- ②エンドサイトーシスあるいはファゴサイトーシスによるリポソームの細胞内への取り込み
- ③リポソーム膜と細胞膜との融合

に大別できる¹⁴。

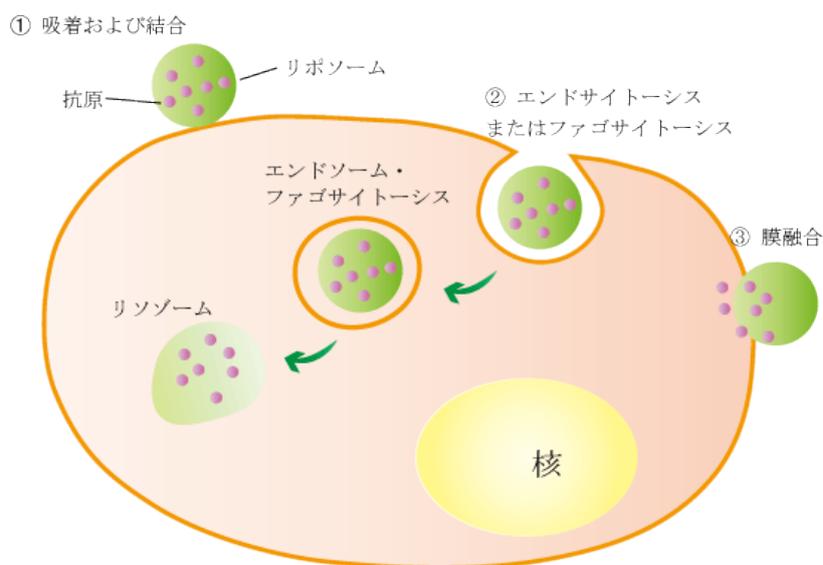


図 1-2. リポソームと細胞間の相互作用メカニズム

生体内での相互作用においては、これらの様式のいくつかが並行して起きている場合が多い。リポソームを DDS キャリアとして用いる場合は、細胞との相互作用がいずれの様式であれ、その内包物を細胞内に送達することはできる。しかし、内包物の細胞内での挙動は、リポソームを細胞内のどこに運ぶ必要があるかによってどの相互作用の様式を利用するかが決まる。これらの中からどの様式をとるかは、細胞の種類やリポソームの物理化学的性質（表面電荷、サイズ、膜流動性、表面修飾の有無など）によって異なる。

1-5 ドラッグデリバリーシステム (DSS) と Enhanced permeability and retention (EPR) 効果

疾患の治療、および健康促進を目指し、薬剤・薬物の投与を行っているが、ヒトの体には本来存在しない物質を体内に取り入れることで、人体への弊害を起こすことが危惧される。DSS とは、薬の投与の方法を工夫し、体内動態を精密にコントロールし、必要な場所に、必要な時、必要な量だけを作用させることで、薬の効果を最大限に発揮させることを実現させるものである。

本研究でドラッグキャリアとして使用したリポソームは、DDS の一手法として利用されており、他のドラッグキャリアに比べ以下の利点がある。

- ①薬剤の体内分布変化と標的器官への到達性の改善
- ②薬剤の除放化
- ③代謝酵素からの保護と毒性の軽減

リポソームを DDS のキャリアとして利用する場合、様々な薬物のキャリアとなり得る¹⁵。リポソームに内封された薬物で分類すると脂溶性の薬物は主にリポソームの脂質膜内に、水溶性の場合は内水相に内封可能である。また、たんぱく質のような高分子量のものを封入することも可能であり、薬物に限らずプラスミド DNA、siRNA などの核酸医薬を内封することが可能であることも分かった。また、リポソームに内封させることで、血中の様々な核酸分解酵素からの攻撃を回避することができ、ドラッグキャリアとしてリポソームは大いに期待されている。

1980 年代に前田・松村らによって腫瘍部位への高分子物質の蓄積・滞留が検証され^{16,17}、制がん剤の高分子プロドラッグ設計は一気に加速した。低分子薬物は腎糸球体ろ過によって対外排出されやすく、血中滞在時間が極めて短いものが多いが、水溶性高分子はその分子量が十分に大きければ腎糸球体ろ過を受けにくく、比較的長い血中半減期を示すことが知られている。また、山岡らは各種の水溶性高分子の体内動態を調べ、多くの水溶性分子の血中半減期が分子量 30,000 前後を境に急激に延長することを報告している^{18,19}。

これらの現象に対する原因は以下のことによるとされている。一般に腫瘍組織の血管は、腫瘍の増殖に伴う血管新生により形成されるため分岐が多く、血管壁が正常血管よりも粗造になっており、100-200 nm 程度の隙間が空いている。高分子物質は正常な血管壁からほとんど漏れ出すことはないが、固形腫瘍組織周辺の新生血管では血管壁の物質透過能が充進しており、比較的高分子量の物質も漏出し易いと同時に、漏出した物質を回収するためのリンパ管が未発達なため、高分子物質が癌組織周辺に集積・滞留しやすくなっている。これを EPR 効果 (Enhanced Permeation and Retention effect)^{16,17} と呼ぶ。現在では、この EPR 効果によって、100 nm 以下の微粒子に薬剤を担持させてがん患者へ投与する治療法で、正常組織には影響を及ぼさず、がん組織のみ効果を発揮することが可能となった²⁰。したがって、100 nm 程度の大きさを持つリポソームを含む水溶性ドラッグキャリアに薬物を包接させることでその血中寿命を著しく延長することが可能になる。

1-6 NMR スペクトルによるドラッグデリバリーの研究

ドラッグデリバリーの研究に用いられる物理化学的手法には、X 線回折、中性子散乱、紫外・可視吸収、赤外吸収、ラマン散乱、核磁気共鳴 (NMR)、電子スピン共鳴、蛍光、熱測定、分子動力学シミュレーションなどがある²¹。いずれも、規則構造における距離情報や特定時間スケールの動的情報を提供する。例えば、リポソームをドラッグキャリアとした系において NMR 法では、リポソームを用いた DDS の膜側・薬物側の各部位についての原子それぞれを別々に測定することができ²²、ピコ秒から秒レベルに及ぶ幅広い時間スケールの動的情報を得ることができる。NMR 法では遷移に伴う非常に小さなエネルギー変化を観測するために、従来、感度の点で不利とされてきた。しかし、現在ではパルスフーリエ変換の導入と装置や測定法の進化により、 μM 濃度レベルの定量的な測定が可能となった。

NMR 遷移に伴う非常に小さなエネルギー変化を観測するという事は、リポソームの DDS での薬物側、膜側の非常に小さなマイクロ環境の変化を NMR で検知できるということであり、DDS の分子レベルの研究に適した手法である。薬物や化学物質が膜に取り込まれた場合、膜のどの位置に取り込まれるかによってこれらの活性や毒性、薬効や副作用などの作用機構が変わってくる。膜内のマイクロ極性の差を利用すると、薬物の膜内の取り込み位置を以下の三つに分けることができる²³。

Category I : 膜の親水性表面への結合 (吸着)

Category II : 膜の親水部・疎水部の境界領域への浅い侵入

Category III : 膜の疎水性内部までの深い侵入

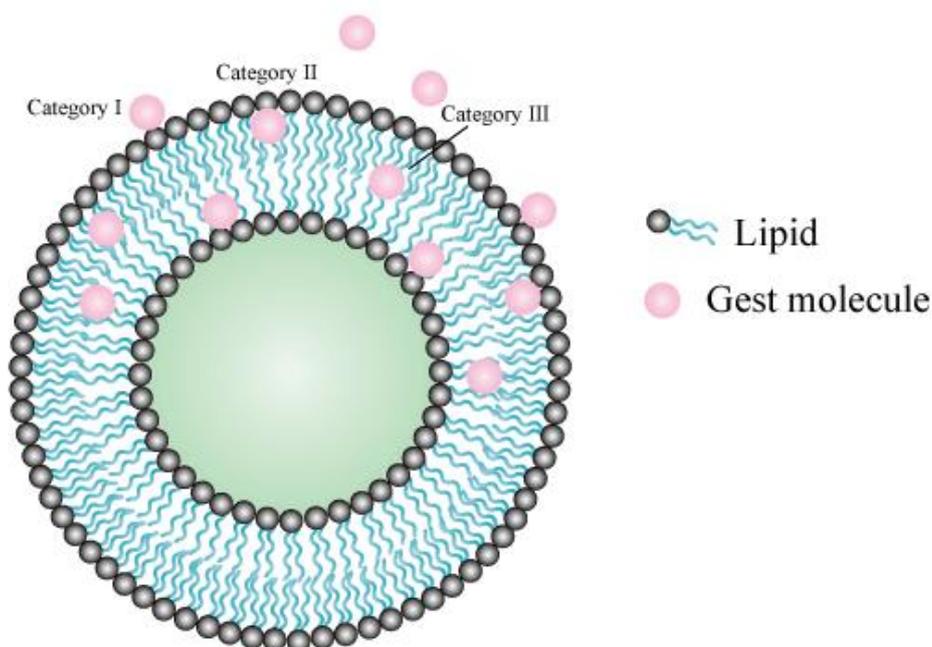


図 1-3. リポソーム膜

Okamura らは、薬物側、膜側の双方の NMR シグナルについて化学シフトや線幅・緩和時間などを解析し、次の二つの方法により薬物の膜内分布を相補的に識別する手法を確立した²¹。

1. 取り込まれた薬物そのもののシグナルを直接観測する。薬物の各部位についての原子が膜内の疎水的領域に深く侵入するほどその NMR シグナルは、高磁場側にシフトする。
2. 薬物の取り込みに伴う膜側の各サイトの摂動を観測する。薬物の取り込み位置に近いサイトほど摂動は大きくなる。

本研究では、上記 NMR 測定法の特徴を活かし、薬物、つまりゲスト分子を取り込んだ際の脂質分子の化学シフト変化を NMR で観測することでリポソーム膜内でのゲスト分子の位置決定を行った。

1-7 研究目的

1-7-1 研究目的I

本研究では、ポルフィリン誘導体を内包したドラッグ キャリアの構造を制御することで、この課題を解決することを目的としている。まず、ドラッグキャリアに内包させるポルフィリン誘導体の合成と同定を行った。ポルフィリン誘導体の合成法には、ローゼムント法¹、アドラロンゴ法²、リンゼイ法³などの合成法がある。本章のポルフィリン誘導体の合成では、置換基の極性、立体障害性を考慮し、各ポルフィリン誘導体に合った合成手順を選び、合成した。得られた合成化合物の構造確認を¹H-NMR 測定及びX線構造解析により同定した。

1-7-2 研究目的II

リポソームのドラッグキャリアとしての機能に着目し、膜表面または内部にゲスト分子を吸着、または内包させたゲスト分子含有リポソーム (LMIGs) を調製した。当研究室では、これまでリポソームやシクロデキストリンなどのドラッグキャリアを用いて、PDT 製剤の開発を目指してポルフィリン誘導体の水溶化を検討している。疎水性ゲスト分子であるポルフィリン誘導体とシクロデキストリンの錯体を形成し、脂質膜中にポルフィリン誘導体を取り込む交換反応によって調製した。しかし、リポソーム中ですぐにポルフィリン誘導体が自己会合を起こして沈殿してしまうため、安定した LMIGs を調製することは困難であった。

そこで、本研究では、まず極性基を有する非対称構造のポルフィリンを用いることで、脂質膜中に導入後も安定した状態を保つことができるポルフィリン誘導体含有リポソーム (LMIPors) の調製を目的とした。さらに、安定な LMIPors について、一重項酸素発生能を評価し、ポルフィリン誘導体の構造との関係を調べた。最後にヒト子宮頸がん由来の細胞である HeLa 細胞に対する光線力学活性の評価を行った。

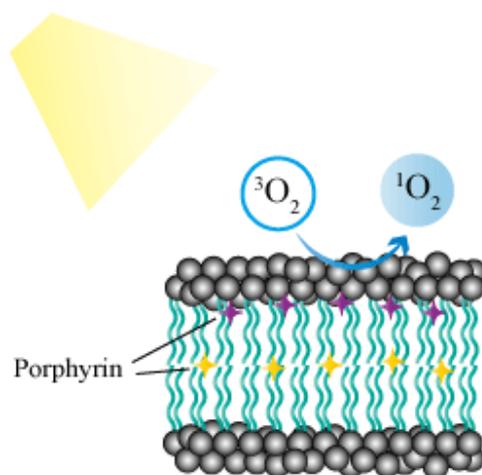


図 1-4. LMIPors の光線力学活性評価

1-7-3 研究目的Ⅲ

ポルフィリン誘導体を導入した脂質二分子膜 (LMIPors) は、ポルフィリンの種類の違いによって HeLa 細胞に対する光線力学活性が大きく異なった。その要因の一つとして、ポルフィリン誘導体の構造の違い、特に極性の違いによってリポソーム内での存在位置の違いが活性に大きく影響していることが示唆された。そこで、リポソーム中のポルフィリンの位置決定を $^1\text{H-NMR}$ 測定でのケミカルシフトの変化をもとに行った。リポソーム中の疎水基、あるいは親水基についたプロトンのシフトの変化を相対比較することで、ポルフィリンの位置を決定し、LMIPors の光線力学活性との相関を調べることを目的にした。

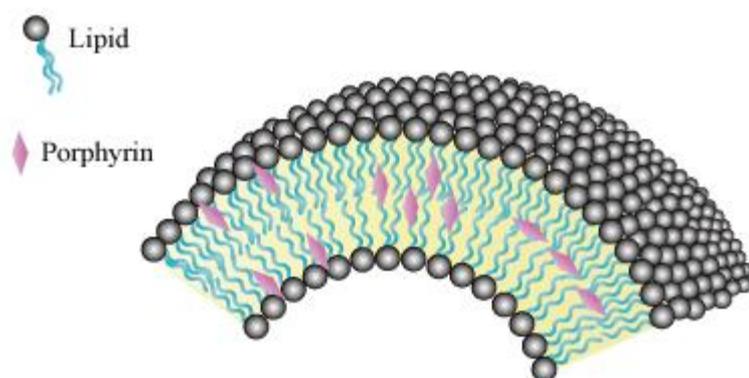


図 1-5. リポソーム中のポルフィリンの位置

1-8 参考文献

1. 2018 年版 がん治療の現状と展望 矢野経済研究所
https://www.yano.co.jp/market_reports/C60112600
2. 井村裕夫, “がんのバイオサイエンス 4 がんの新しい診断と治療”, 東京大学出版会, **1991**.
3. 竹中文良, “がん治療の前と後 納得できる治療を受けて、前向きに過ごす手引き”, **2010**, 法研
4. Lipson, R. L, Baldes, E.J, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1961**, 26, 1
5. S. Yano, S. Hirohara, M. Obata, Y. Hagiya, S. Ogura, A. Ikeda, H. Kataoka, M. Tanaka, T. Joh, *J. Photochem. Photobiol.C.*, **2011**, 12, 46-67
6. T. Takemura, S. Nakajima, I Sakata, *Photochem Photobiol.*, **1989**, 50. 339
7. T. Takemura, N. Ohta, S. Nakajima, I Sakata. *Photochem Photobiol.*, **1991**, 54. 683
8. 竹村健, “癌の光物理化学的治療法の基礎研究” ,**1996**, 北海道大学出版
9. B. W. Henderson, T. J. Dougherty, *Photochem. Photobiol*, **1992**, 55, 145-157.
10. S. Vitols, G. Gahrton, A. Ost, C.Peterson, *Blood*, **1984**, 63, 1186-1193

11. A. Ikeda, S. Satake, T. Mae, M. Ueda, K. Sugikawa, H. Shigeto, H. Funabashi, A. Kuroda, *ACS Medical. Chem Lett.*, **2017**, 8, 555.
12. 奥直人, “リポソームの調製と実験法”, 廣川書店, **1994**.7
13. Singer S. j., Nicholson G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes., *Science*, **1972**, 175, 720
14. 石田竜弘, 際田弘志, “リポソームと細胞の相互作用 (DDS への応用)”, 膜 (MEMBRANE) , 32 (1),
15. 宇都口直樹, DDS におけるリポソーム研究の最前線, *YAKUGAKU ZASSHI*, **2008**, 128 (2), 185-186
16. Y. Matsumura and H. Maeda, *SMANCS. Cancer Res.*, **1986**, 46, 6387-6392
17. H. Maeda and Matsumura, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.*, **1989**, 6, 193-210
18. T. Yamaoka, Y Tabata and Y. Ikeda, *Drug Delivery*, **1993**, 1, 75-82
19. T. Yamaoka, Y Tabata and Y. Ikeda, *J.Pharm. Pharmacol.*, **1995**, 47, 479-486
20. 大矢裕一, 大内辰郎, 高分子キャリア, *Drug Delivery System*, **2001**, 16 (3), 143-153
21. 岡村恵美子, “ドラッグデリバリーと膜中薬物の存在状態—NMR 研究の展望”, 膜 (MEMBRANE) , **2003**, 28 (3), 111-120
22. E.Okamura et al., *Liquid Interfaces in Chemical, Biological, and Pharmaceutical Applications*, A.G. Volkov, Ed., Marcel Dekker, New York, **2001**, 775-805
23. 岡村恵美子, “NMR による薬物の脂質二分子膜への取り込み機構の解明”, 高分子, **2001**, 50 巻 9 月号, 666

第2章 ポルフィリン誘導体とシクロデキストリン錯体の構造決定

2-1 序

本章では、ドラッグキャリアに内包させるポルフィリン誘導体の合成と同定を行った。ポルフィリン誘導体の合成法には、ローゼムント法¹、アドラーロンゴ法²、リンゼイ法³などの合成法がある。本章のポルフィリン誘導体の合成では、置換基の極性、立体障害性を考慮し、各ポルフィリン誘導体に合った合成手順を選び合成した⁴。得られたポルフィリン誘導体 UV-vis 吸収スペクトル、¹H-NMR 測定および X 線構造解析により同定を行った。

本研究で、調製した化合物を図 2-1 に示す。

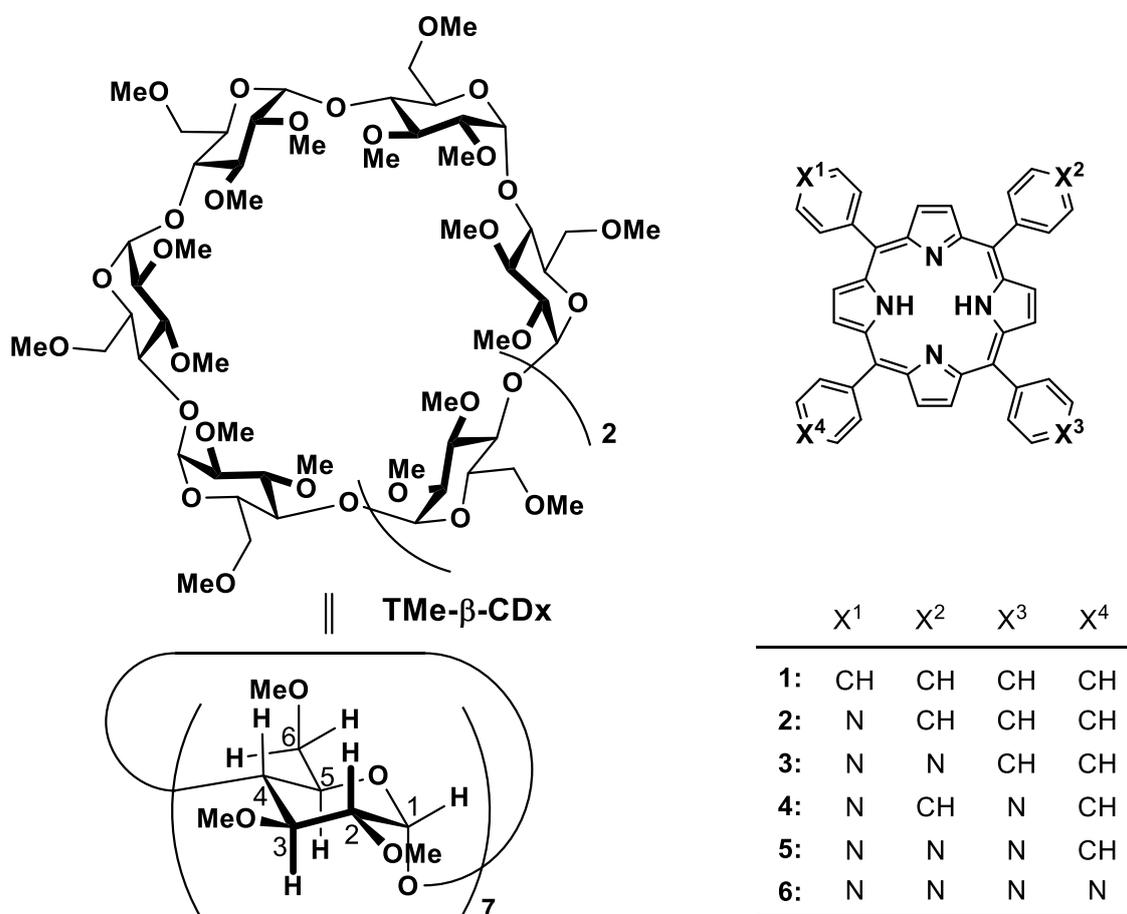


図 2-1. シクロデキストリン、ポルフィリンの構造

2-2 実験

2-2-1 トリメチル-β-シクロデキストリン錯体の調製

ポルフィリン誘導体 **1-6** (3.0 μmol) とトリメチル-β-シクロデキストリン (TMe-β-CDx) 8.6 mg (6.0 μmol) をメノウ容器に入れ、100℃で1時間、減圧乾燥を行った。乾燥後、高速振動粉砕 (20 min, 30 Hz) を行い、重水 1.5 mL で抽出し、遠心分離 (20 min, 14000 rpm) を行うことで不溶物を沈降させた。遠心分離後、メンブレンフィルター (DISMIC-13HP, 孔径 0.45 μm) で沈殿物を除去することで、ポルフィリン-シクロデキストリン (CDx) 錯体を調製した^{5,6,7}。

2-2-2 UV-Vis 吸収スペクトル測定

2-2-1 で調製したポルフィリン誘導体 **1-6**-CDx 錯体の UV-Vis 吸収スペクトルを測定した。1.0 mm セルを使用し、25℃で測定した結果を図 2-2 に示す。

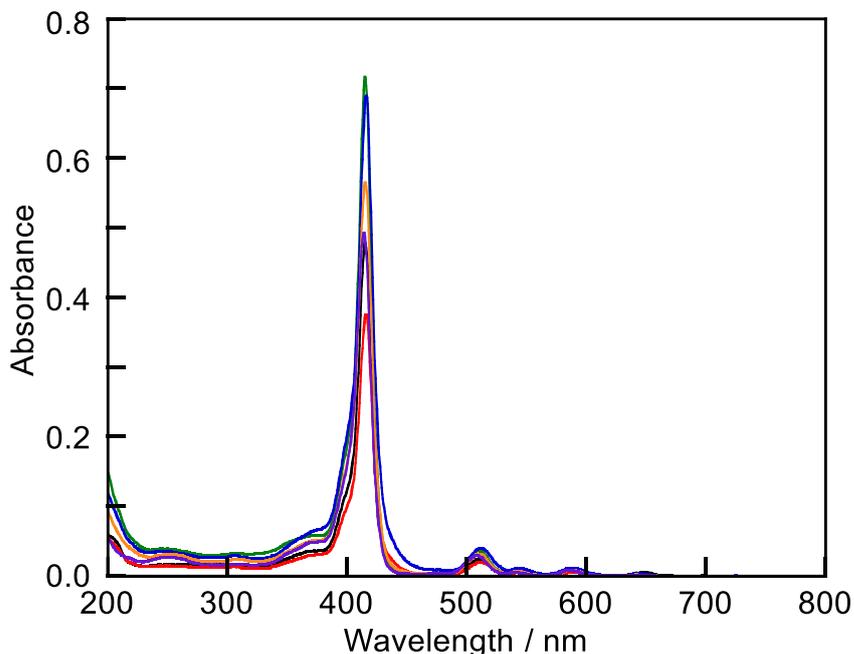


図 2-2. ポルフィリン誘導体 (**1-6**) -CDx 錯体の UV-Vis 吸収スペクトル
1-TMe-β-CDx (黒), 2-TMe-β-CDx (赤), 3-TMe-β-CDx (緑), 4-TMe-β-CDx (青), 5-TMe-β-CDx (橙),
6-TMe-β-CDx (紫) 錯体

1-6-TMe-β-CDx 錯体の UV-Vis 吸収スペクトルの結果は、全て鋭いピークをもった。例えば、**4**-TMe-β-CDx 錯体の 415nm での最大吸収ピークはポルフィリンの Soret 帯の吸収を示し、510、543、588、そして 642nm での四つの吸収はポルフィリンの Q 帯の吸収を示している。これらのスペクトルはすべてブロードニング化しておらず、クロロホルム中でのポルフィリン誘導体の吸収とほぼ同じであった。以上の結果より、ポルフィリン誘導体 **1-6** は、

TMe- β -CD_x と錯形成し、クロロホルム中と同様、孤立分散していると考えられる。この孤立分散は、それぞれ二つのシクロデキストリンの中に内包された構造を取っていると予測された。

2-2-3 ¹H-NMR スペクトル測定

次に、¹H-NMR スペクトル測定にて **1-6-TMe- β -CD_x** 錯体の形成の確認を行った結果を図 2-3 に示す。

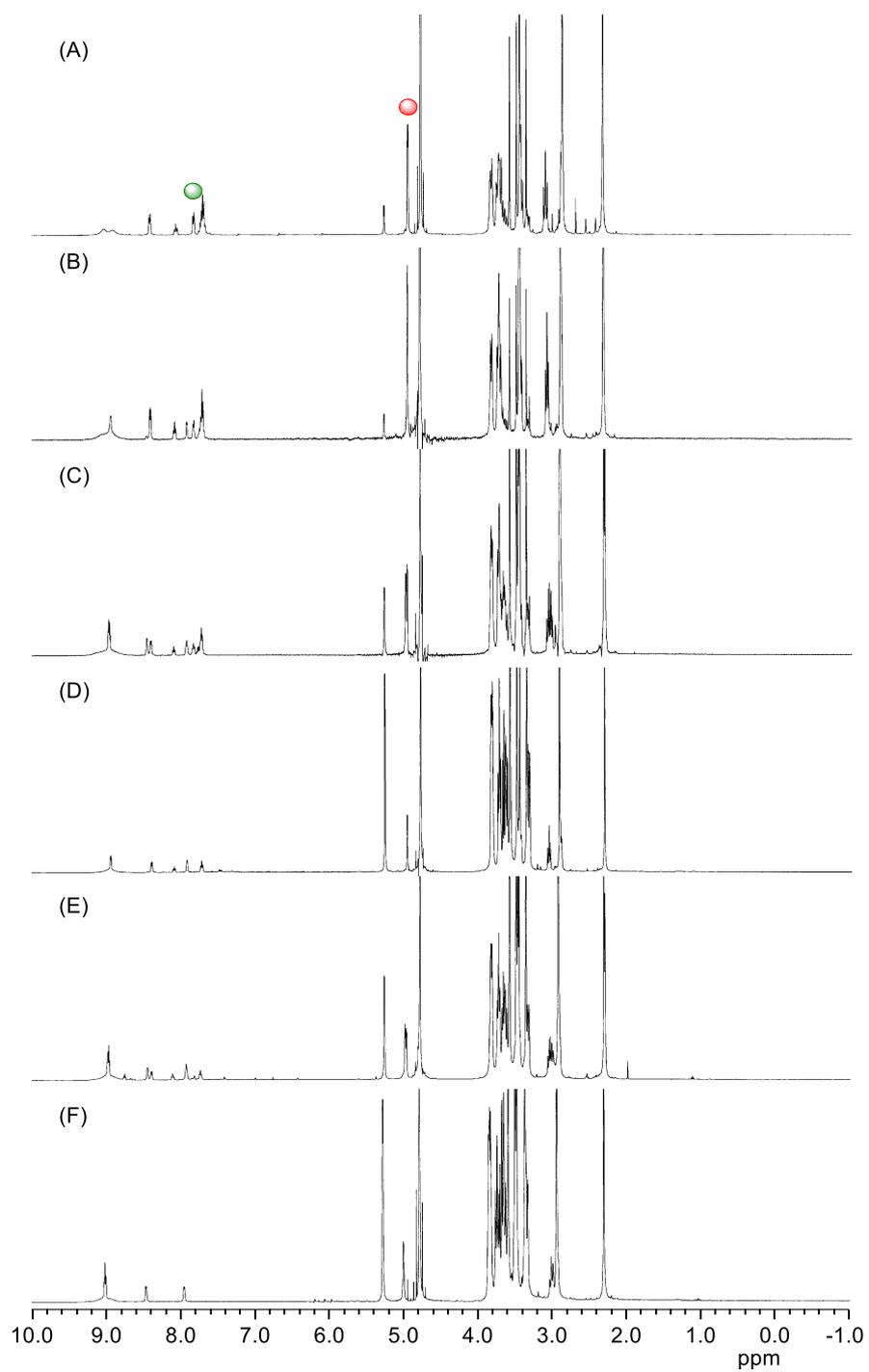


図 2-3. 1-6-CDx 錯体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (25°C, 積算回数 128 回)
 (A) 1-TMe- β -CDx, (B) 2-TMe- β -CDx, (C) 3-TMe- β -CDx, (D) 4-TMe- β -CDx, (E) 5-TMe- β -CDx, (F)
 6-TMe- β -CDx 錯体

7.8 ppm 付近のポルフィリン誘導体に帰属されるピーク (●) と 5.0 ppm 付近の CDx 錯体に帰属されるピーク (●) の積分比がモル数で考えると 1:2 の比であったことから、これらの錯体は全て[ポルフィリン誘導体 **1-6**] : [TMe-β-CDx]=1:2 で錯形成していることがわかった。1:2 錯体であるとする、図 2-4 に示すように、ポルフィリン誘導体 **1,3**, そして 6-TMe-β-CDx 錯体は一種類の構造であり、一方ポルフィリン誘導体 **2,4**, そして 5-TMe-β-CDx 錯体は二種類の構造をもつ可能性がある。

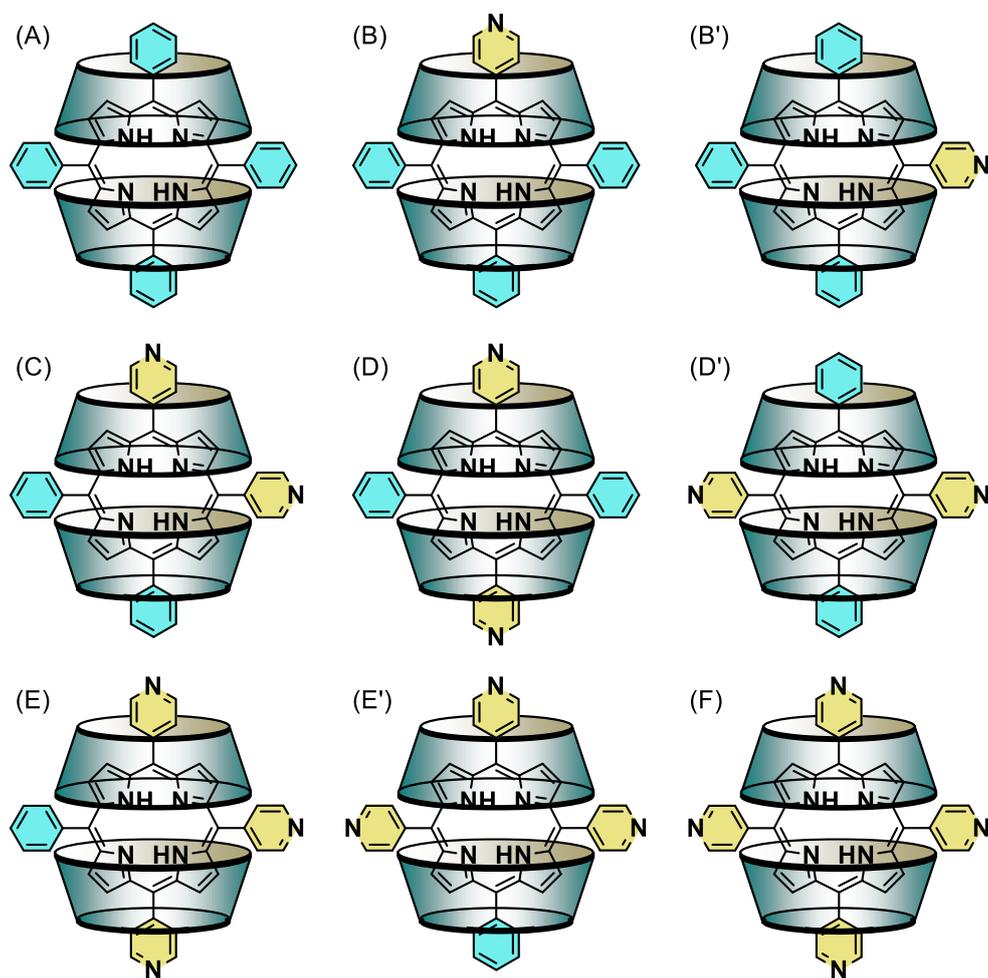


図 2-4. ポルフィリン誘導体 **1-6**-CDx 錯体の構造モデル

(A) **1**-TMe-β-CDx, (B) **2**-TMe-β-CDx, (B') **2**-TMe-β-CDx, (C) **3**-TMe-β-CDx, (D) **4**-TMe-β-CDx, (D') **4**-TMe-β-CDx, (E) **5**-TMe-β-CDx, (E') **5**-TMe-β-CDx, (F) **6**-TMe-β-CDx 錯体

そこで、ポルフィリン誘導体-TMe-β-CDx 錯体中の TMe-β-CDx に帰属される ¹H-NMR ピークを詳しく解析した (図 2-5)。

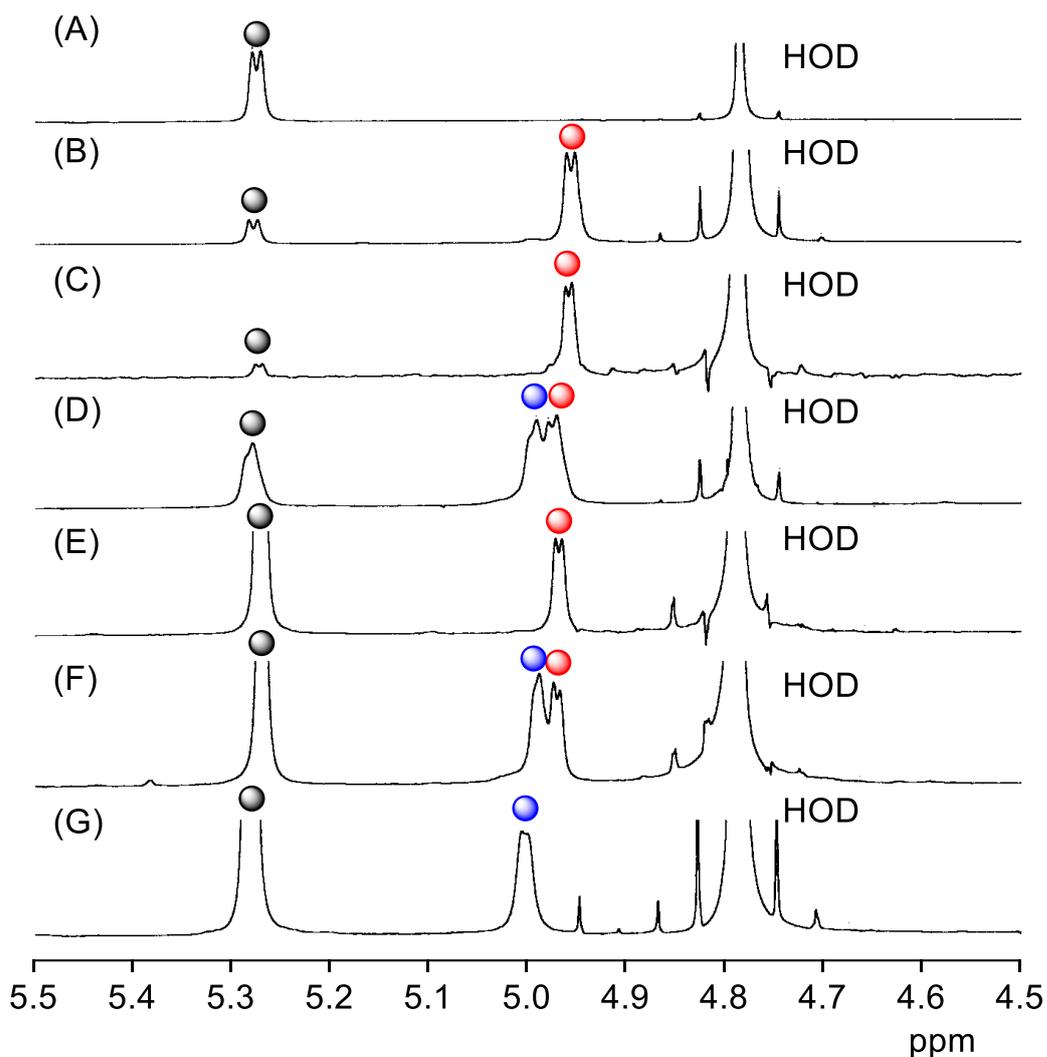


図 2-5. TMe- β -CDx、および 1-6 ポルフィリン-CDx 錯体の ^1H -NMR スペクトル
(25°C, 積算回数 128 回)

(A) TMe- β -CDx, (B) 1-TMe- β -CDx, (C) 2-TMe- β -CDx, (D) 3-TMe- β -CDx, (E) 4-TMe- β -CDx,
(F) 5-TMe- β -CDx, (G) 6-TMe- β -CDx

●: フリーの CDx, ●:ピリジル基が貫通した CDx, ●:フェニル基が貫通した CDx

1-TMe- β -CDx (図 2-4 (A)) と 6-TMe- β -CDx (図 2-4 (F)) は、一つの構造のみをとることから、図 2-5 に示すように CDx 錯体に帰属されるピークが一つ観測された (図 2-5 (B), (G))。図 2-4 (A) と (F) の構造モデルと図 2-5 (B) と (G) の ^1H -NMR スペクトルの結果から、CDx の小さい側の空孔をピリジル基が貫通した場合 (●)、TMe- β -CDx のピークが低磁場に、一方フェニル基が貫通した場合 (●)、TMe- β -CDx のピークがより高磁場に現れることが確認できた。ここで、3-TMe- β -CDx 錯体 (図 2-4 (C)) も一つの構造しかもたず、必ず CDx の小さい側の空孔からピリジル基とフェニル基がそれぞれ一つずつ貫通した構造

になる。このとき、図 2-5 (D) に示すように、ピリジル基が貫通した場合 (●) とフェニル基が貫通した場合 (●) の二つの CD_x 錯体に帰属されるピークが両方同時に観測された。それぞれのケミカルシフトは、1-TMe-β-CD_x のフェニル基が貫通した場合 (●) と 6-TMe-β-CD_x のピリジル基が貫通した場合 (●) のケミカルシフトとほぼ一致した。これに対して、2-TMe-β-CD_x、4-TMe-β-CD_x そして 5-TMe-β-CD_x 錯体はそれぞれ二つの構造を取ることが可能である (図 2-4 (B), (B'), (D), (D'), (E), (E'))。しかし、2-TMe-β-CD_x と 4-TMe-β-CD_x 錯体の ¹H-NMR スペクトルからは、CD_x の小さい空孔をフェニル基が貫通した場合 (●) に帰属される位置にのみピークが観測された (図 2-5 (C), (E))。これらの結果は、2-TMe-β-CD_x と 4-TMe-β-CD_x 錯体は、CD_x の小さい側の空孔をフェニル基が貫通した状態で錯形成していることを示唆した。また、5-TMe-β-CD_x 錯体の ¹H-NMR スペクトルからは、ピリジル基が貫通した場合 (●) とフェニル基が貫通した場合 (●) に帰属される二つの CD_x のピークが観測された (図 2-5 (F))。この結果から、5-TMe-β-CD_x 錯体は、図 2-4 のように (E) と (E') の二つの構造の可能性はあるが、(E') のみの構造となっていると示唆された。以上のことから、2-TMe-β-CD_x、4-TMe-β-CD_x、そして 5-TMe-β-CD_x 錯体はそれぞれ図 2-4 (B'), (D'), そして (E') の構造のみをとっており、CD_x の小さい側の空孔をピリジル基が貫通するよりは、フェニル基が貫通する構造を優先的にとることがわかった。

2-2-4 ¹H-¹H COSY, ¹H-¹H NOESY スペクトル測定

さらに、4-TMe-β-CD_x が図 2-4 (D') の構造をとっていることを確認するために 2 次元 ¹H-¹H COSY 測定 (図 2-6 (A))、および ¹H-¹H NOESY 測定 (図 2-6 (B)) を行った。

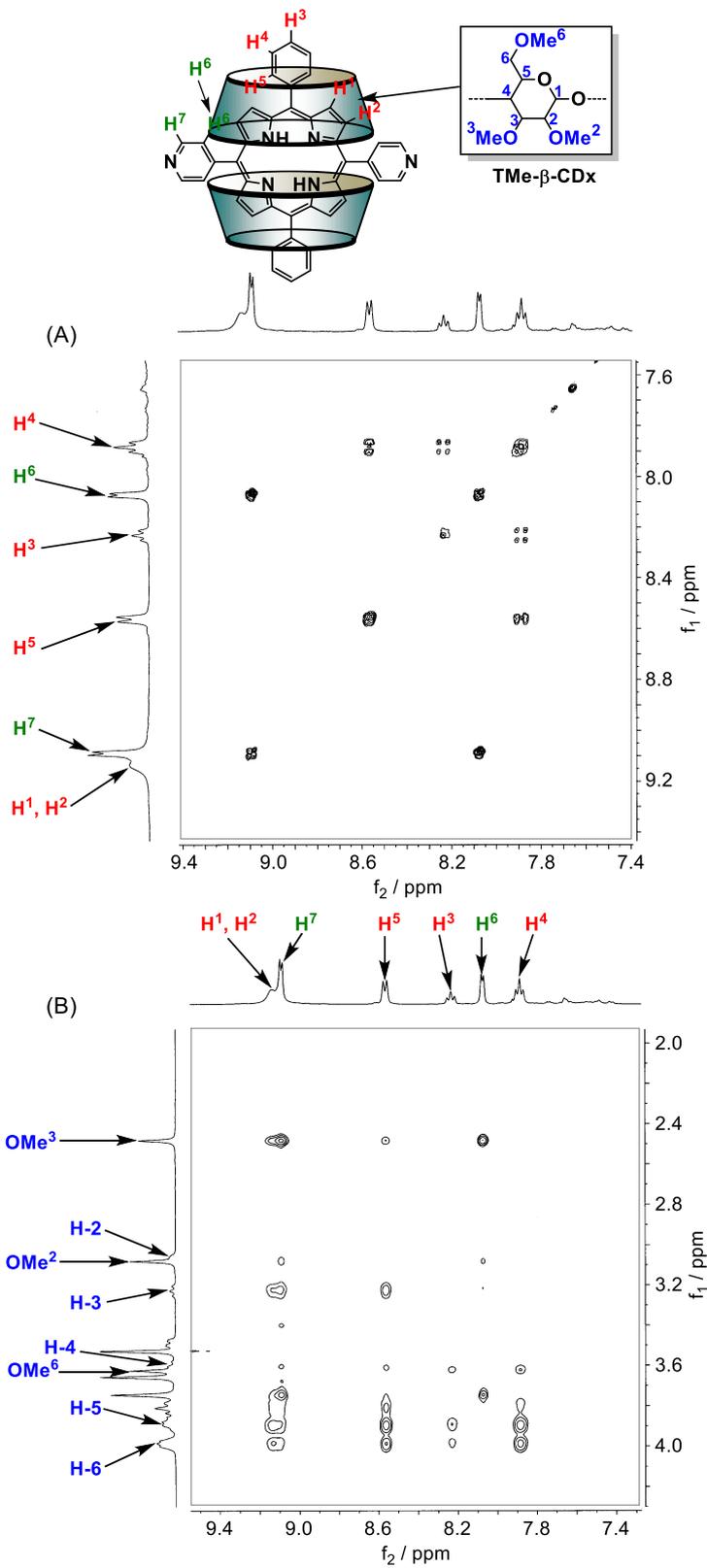


図 2-6. 4-TMe- β -CDx の ^1H - ^1H COSY、 ^1H - ^1H NOESY スペクトル
 (A) ^1H - ^1H COSY, (B) ^1H - ^1H NOESY スペクトル

^1H - ^1H COSY 測定から、**4**-TMe- β -CDx 中の **4** の帰属を行った。図 2-6 (A) に示すようにポルフィリンの H^3 と H^4 、 H^4 と H^5 にそれぞれのスピン結合を示す交差ピークが観測された。また、 H^6 と H^7 にもスピン結合を示す交差ピークが観測されたことから、 H^3 - H^4 - H^5 と H^6 - H^7 結合が帰属できた。次に、 ^1H - ^1H NOESY 測定では、TMe- β -CDx と **4** の相関を確認した (図 2-6 (B))。TMe- β -CDx の小さい空孔側に位置する H-5 や H-6 と **4** のフェニル基のプロトン H^4 と H^5 に交差ピークが観測されたことから、**4** のフェニル基は TMe- β -CDx の小さい側の空孔近くに位置することがわかった。つまり、**4**-TMe- β -CDx 錯体は図 2-4 (D') に示したフェニル基が CDx の小さい側の空孔を貫通した構造をとることが分かった。

ピリジル基よりも、フェニル基が TMe- β -CDx の小さい空孔を貫通した構造を優先的にとることは、カチオン性のポルフィリン誘導体は、アニオン性のポルフィリン誘導体のように TMe- β -CDx とは相互作用しないことが報告されている点でも裏付けられている⁸。つまり、アニオン性ゲスト分子が導入された場合、CDx の空孔内は微視的に正の環境が誘発され、カチオン性ゲスト分子が導入された場合は、CDx との相互作用を起こさないことを示している⁸。ここで、ポルフィリン誘導体 **4** のメソ位に位置するフェニル基と TMe- β -CDx の H-6 のプロトンがかなり近い位置に存在していることが ^1H - ^1H NOESY 測定から確認できた。**4** は電気的中性の化合物であるが、メソ位に位置するピリジル基が共鳴理論上、 $\delta+$ の電荷を持つ。(図 2-7) もし、ピリジル基が CDx の小さな側の空孔を貫通した場合は、ピリジル基と TMe- β -CDx の H-6 のプロトンがそれぞれ持つ $\delta+$ の電荷によって静電反発が起きることが予想できる。このため、ピリジル基よりもフェニル基が優先して CDx の小さい側の空孔を貫通したものと考えられる。

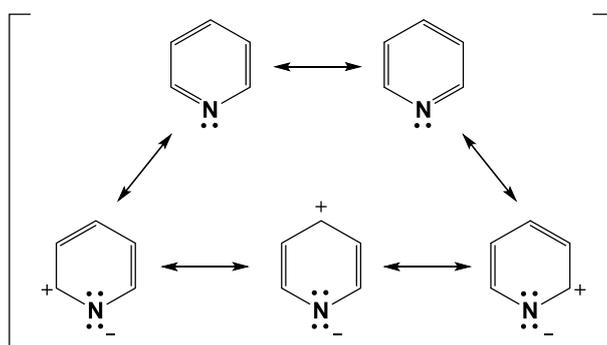


図 2-7. ピリジルの共鳴構造

2-2-5 単結晶 X 線構造解析による錯体構造の決定

2-2-2 で確認した **4**-TMe- β -CDx 錯体の構造の再確認を行うために、単結晶 X 線構造解析を行った。測定サンプルは、2-2-1 で調製した **4**-TMe- β -CDx 水溶液 1.5 mL (2.0 mM) をマイクロチューブに入れ栓をせずに 50°C に設定したマッフル炉内で 24 時間静置し、結晶を生成させた^{6,7}。

図 2-8、表 2-1 に 4-TMe- β -CDx の単結晶 X 線構造解析の結果を示す。

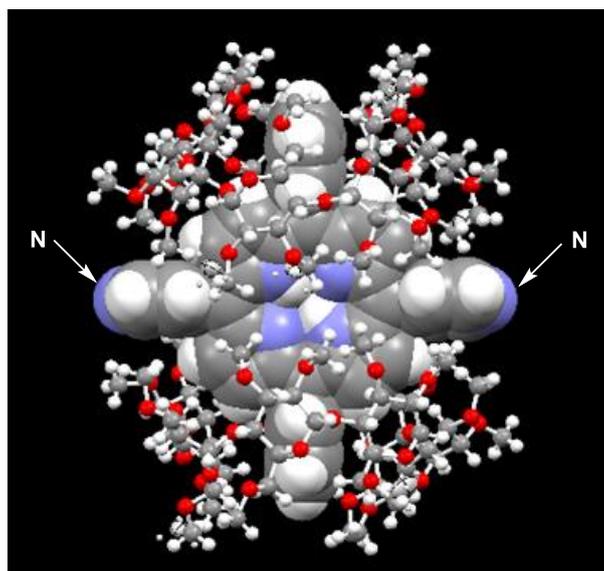


図 2-8. 単結晶 X 線構造解析による 4-TMe- β -CDx の構造

表 2-1. 4-TMe- β -CDx の単結晶 X 線構造解析の結果

Compound	4•TMe- β -CDx complex
Formula	C ₁₆₈ N ₆ O ₇₀ H ₂₅₂
MW	3475.74
Crystal system	Triclinic
Space group	<i>P</i> 1
<i>a</i> (Å)	16.770(6)
<i>b</i> (Å)	17.815(6)
<i>c</i> (Å)	18.023(7)
α (°)	98.228(5)
β (°)	102.877(5)
γ (°)	113.369(4)
<i>V</i> (Å ³)	4654(3)
<i>Z</i>	1
ρ_{calc} (g cm ⁻³)	1.240
<i>T</i> (K)	223(2)
λ (Å)	0.71073
$2\theta_{\text{min}}, 2\theta_{\text{max}}$	2.4, 57.78
Nref	19315
μ (Mo K α) (cm ⁻¹)	0.96
Size (mm)	0.30 × 0.17 × 0.07
<i>T</i> _{max} , <i>T</i> _{min}	0.99, 0.97
Data	19315
Restraints	353
Parameters	2290
<i>R</i> ₁ (obs)	0.0611
<i>wR</i> ₂ (all)	0.1656
<i>S</i>	0.978
CCDC Number	1822743

単結晶 X 線構造解析から、**4**-TMe- β -CDx 錯体の結晶は、**4** と TMe- β -CDx の組成比が 1:2 であることがわかった。また、**4**-TMe- β -CDx 錯体のフェニル基とピリジル基の結合長、結合角と、既に報告されているベンゼンとピリジンの結合長、結合角^{9,10}を比較した結果を表 2-2 に示す。

表 2-2. フェニル基、ピリジル基とベンゼン、ピリジンの結合長、結合角の比較

Bond	Bond length (Å)	Angle	Bond angle (°)
Average C (para)–C (meta)	1.362 (12) (1.361) ^(A)	Average C (meta)–C (para)–C (meta)	118.8 (7) (120±0.63) ^(A)
Average C–N	1.340 (11) (1.335) ^(B)	Average C–N–C	116.7 (7) (117.67) ^(B)

(A) ベンゼンの結合長、結合角の文献値^{9,10} (B) ピリジンの結合長、結合角の文献値^{9,10}

表 2-2 から TMe- β -CDx の空孔を貫通する置換基の結合長、結合角は、ベンゼンの結合長、結合角と一致し、空孔を貫通していない置換基の結合長、結合角は、ピリジンの結合長、結合角と一致した。以上より、**4**-TMe- β -CDx 錯体は、**4** のフェニル基が TMe- β -CDx の空孔を貫通する図 2-3 (D')の構造であり、これは 2-2-2 の 2 次元-¹H-NMR 測定の結果と一致した。

2-3 結論

四つのポルフィリン誘導体 **2-5** は、いずれもメソ位にフェニル基とピリジル基を有し、二つの TMe- β -CDx と錯形成することが確認できた。ポルフィリン誘導体のフェニル基が、TMe- β -CDx の空孔を貫通する構造をとるのは、ピリジル基側が空孔を貫通した場合 TMe- β -CDx の H-6 のプロトンとピリジル基の静電反発のために不安定になるためである。つまり、**2**-TMe- β -CDx や **4**-TMe- β -CDx 錯体はピリジル基が CDx の空孔を貫通する構造を取らない。さらに、**3**-TMe- β -CDx や **5**-TMe- β -CDx 錯体は、ピリジル基が CDx の空孔を貫通する一つの構造のみを取ることが確認できた。

2-4 参考文献

- 1 K. Kano, R. Nishiyabu, T. Asada, and Y. Kudoda, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 9937-9944.
- 2 K. Kano, R. Nishiyabu, and R. Doi, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 3667-3673.
- 3 K. Komatsu, K. Fujiwara, Y. Murata, and T. Braun, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1999**, , 2963-2966.
- 4 堀口万里, 広島大学大学院工学研究科 修士論文 (2018).
- 5 A. Ikeda, S. Hino, T. Mae, Y. Tsuchiya, K. Sugikawa, M. Tsukamoto, K. Yasuhara, H. Shigeto, H. Funabashi, A. Kuroda, and M. Akiyama, *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 105279-105287.
- 6 Y. Tsuchiya, A. Yamano, T. Shiraki, K. Sada, and S. Shinkai, *Chem Lett.*, **2011**, *40*, 99-101.

- 7 Y. Tsuchiya, T. Shiraki, T. Matsumoto, K. Sugikawa, K. Sada, A. Yamano, and S. Shinkai, *Chem Eur. J.*, **2012**, *18*, 456-465.
- 8 K. Kano, N. Tanaka, H. Minamizono, and Y. Kawakita, *Chem Lett.*, **1996**, *25*, 925-926.
- 9 T. M. Krygowski, H. Szatyłowicz, and J. E. Zachara, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 8859-8865.
- 10 Y. L. Slovokhotov, *Cryst. Growth Des.*, **2014**, *14*, 6205-6216.

第3章 ポルフィリン誘導体含有リポソームの安定性と光線力学活性評価

3-1 序

リポソームは疎水性のドラッグを含むゲスト分子を疎水性である脂質二分子膜中に取り込むことができ、一方親水性のゲスト分子を内部の水相に取り込むことが可能である。さらに、帯電したナノ粒子やポリマー等をリポソーム表面に吸着させることができる。これらゲスト分子を内包、もしくは吸着したリポソームは数十～数百 nm サイズであることを利用して EPR 効果 (Enhanced Permeation and Retention Effect) によって、もしくは細胞認識部位をリポソーム表面に導入することによって腫瘍などの疾患部位にこれらゲスト分子を運ぶことが可能になる¹⁻⁵。このような特性から、リポソームのドラッグキャリアとしての機能が広く研究されている。その一例として、疎水性の光増感剤 (PSs) を取り込んだリポソームの複合体が、PSs に親水基が存在せずとも、リポソームとの複合化で水溶化が可能となり、光線力学療法^{6,7}や光温熱治療^{8,9}などのがん治療のツールとして役立つことが挙げられる¹⁰⁻¹⁶。ここで、ゲスト分子を取り込んだ脂質膜 (LMIGs) を調製する際、いくつかの問題が生じる。これらは、

- 1) 親水性が高いゲスト分子は、脂質二分子膜から外れ易いこと、
- 2) 疎水性が高いゲスト分子であっても脂質分子のアルキル鎖との親和性が低いと、脂質二分子膜の外へ放出され、沈降すること、
- 3) 取り込むゲスト分子によっては、リポソームが不安定化する場合があること¹⁷、

である。2)の問題を回避する手法として、我々は LMIGs の新しい調製法を報告している。この調製法は、まず疎水性ゲスト分子とシクロデキストリンの錯体を形成し、次にリポソームとゲスト分子の交換反応により、脂質膜中にゲスト分子を取り込む手法である¹⁸⁻³⁰。この交換反応法では、従来法¹⁹⁻³⁰では難しかった高濃度の C₆₀ や C₇₀、アゾベンゼンなどの大きな π -分子を取り込み、安定したサンプルを調製することが可能になった。さらに、交換反応によって脂質膜中にテトラフェニルポルフィリン (**1**) を導入できたが、**1** はリポソーム中ですぐに自己会合を起こし、沈降した²⁹。そのため、LMI**1** の水溶液は長期安定性が低いという問題が残った。

本章では、極性基を有する非対称構造のポルフィリンを用いることで、ポルフィリンを脂質膜中に導入後も安定した状態を保つことができるポルフィリン誘導体含有リポソーム (LMIPors) の調製について報告する。さらに、可視光 (610-740 nm) を照射した際に、ヒト子宮頸がん由来の細胞である HeLa 細胞に対する光線力学活性を評価したので報告する³¹。

本研究で、調製した化合物を図 3-1.に示す。

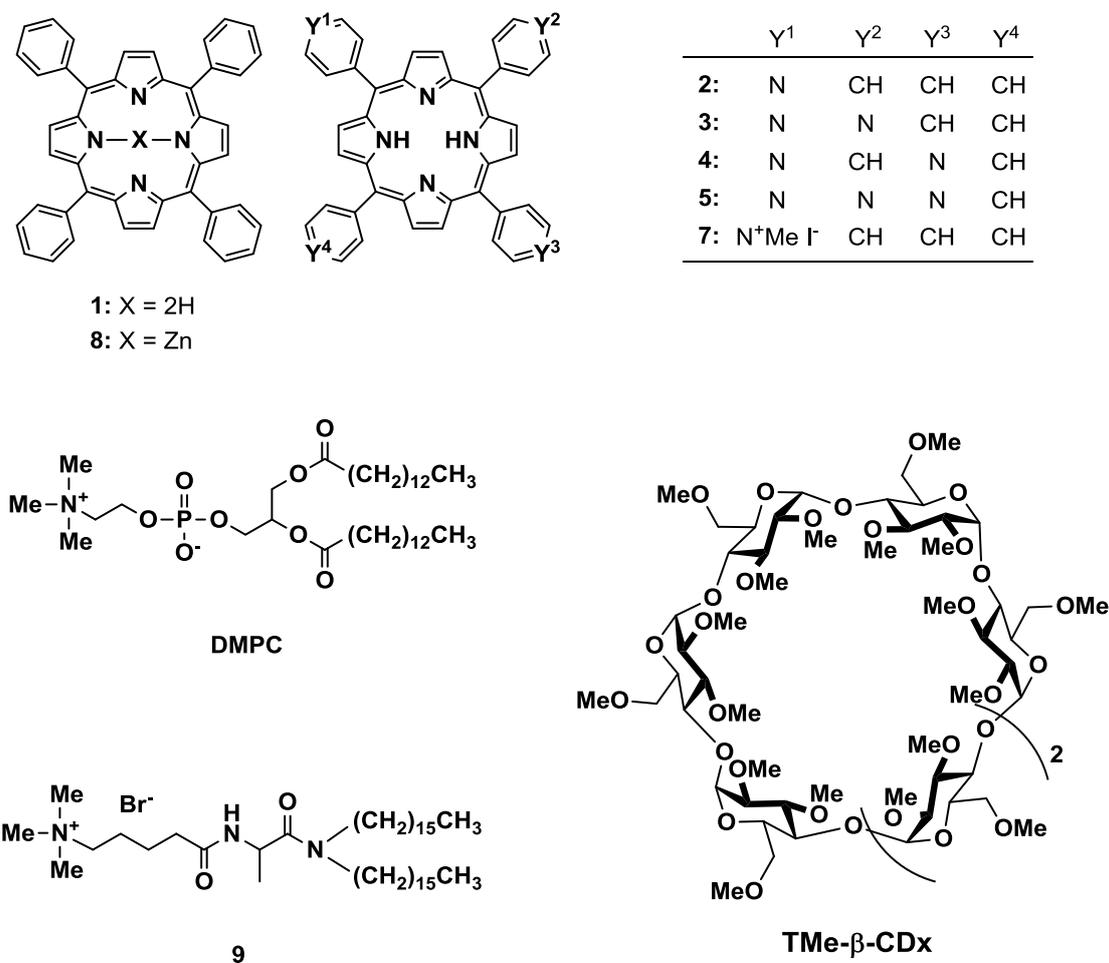


図 3-1. シクロデキストリン、DMPC、ポルフィリンの構造

3-2 実験

3-2-1 DMPC リポソームの調製

1,2-ジミリストール-*sn*-グリセロール-3-ホスファチジルコリン (DMPC) 33.9 mg (50 μmol) をクロロホルム 1.0 mL に溶解させた 50 mM ストック溶液から 80 μL を取り、窒素ガスを吹き付けて溶媒を飛ばし、脂質薄膜を形成した。ここに、重水 1.0 mL を加えボルテックスミキサーを用いて水和した。50°C の湯浴と -195°C の液体窒素を用いて凍結融解を 8 回行い、50 nm の Avestin フィルターに 11 回通すことで粒径を整えた単層リポソームを調製した。

3-2-2 カチオン性脂質を混合したリポソームの調製

DMPC 6.78 mg (10.0 μmol) とカチオン性の *N,N*-ジヘキサデシル-*N*^α-[6-(トリメチルアンモニオ)ヘキサノイル]アラニンアミド (9) 0.69 mg (1.0 μmol) を 10 mL のクロロホルムに溶解

した (DMPC : 9=9 : 1 mol/mol) 。窒素ガスを吹き付けて溶媒を飛ばし、脂質薄膜を形成した。ここに、重水 1.0 mL を加えボルテックスミキサーを用いて水和した。50°Cの湯浴と-195°Cの液体窒素を用いて凍結融解を 8 回行い、相転移温度以上で、50 nm の Avestin フィルターに 11 回通すことで粒径を整えたカチオン性 DMPC リポソームを調製した。ここで調製したリポソームは平均粒径 80 nm であった。

3-2-3 トリメチル-β-シクロデキストリン 錯体の調製

ポルフィリン誘導体 (3.0 μmol) と、トリメチル-β-シクロデキストリン (TMe-β-CDx) 8.6 mg (6.0 μmol) をメノウ容器に入れ、100°Cで 1 時間、減圧乾燥を行った。乾燥後、高速振動粉砕 (20 min, 30 Hz) を行い、重水 1.5 mL で抽出し、遠心分離 (20 min, 14000 rpm) を行うことで不溶物を沈降させた。遠心分離後、メンブレンフィルター (DISMIC-13HP, 孔径 0.45 μm) で沈殿物を除去することで、ポルフィリン誘導体-シクロデキストリン錯体を調製した^{29,35-38}。

3-2-4 ポルフィリン誘導体含有リポソームの調製

ポルフィリン誘導体含有リポソーム (LMI1-5, 7, 8) は、3-2-3 で調製したポルフィリン-シクロデキストリン錯体と DMPC の交換反応で調製を行った。3-2-2 で調製したカチオン性脂質 (DMPC-9) についても同様の手法で、調製を行った²⁸。最終濃度は [1-5, 7, 8] = 0.025 mM、[9] = 0.10 mM、[DMPC] = 0.90 mM、[1-5, 7, 8] / [脂質] = 2.5 mol%、[9] / [脂質] = 10.0 mol% である。

3-2-5 一重項酸素発生能の評価

一重項酸素 (¹O₂) の発生を評価する手段として、先に報告されている ABDA bleaching 法^{17,23} を用いた。ABDA bleaching 法で用いるアントラセン誘導体 (9,10-アントラセンジイル (メチレン) ジマロン酸、ABDA) は ¹O₂ をトラップし、図 3-2 に示すようにエンドペルオキシドを形成する^{17,23}。

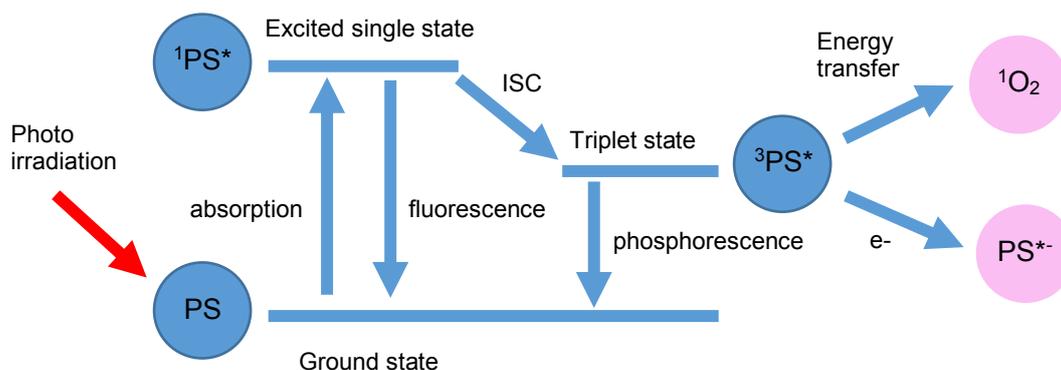


図 3-2. PDT の原理

ABDA 2.5 mM の DMSO 溶液 30 μ L と LMI2, **7** および **8** の水溶液 3000 μ L を混合した。また、ABDA 2.5 mM の DMSO 溶液 30 μ L と **2**, **7**, **8**-TMe- β -CDx 錯体 3000 μ L を混合した。ポルフィリン誘導体 (**2**, **7**, **8**) と ABDA の濃度をそれぞれ 5.0 と 27.5 μ M とした。サンプルは光照射を行う前に酸素置換を 10 分間行い、酸素の飽和溶液とした。次に、 $O_2^{\cdot-}$ 発生能を NBT 法で評価した³⁹。**2**, **7**, および **8**-TMe- β -CDx 錯体の濃度を 5.43 μ M (2760 μ L)、NBT の DMSO 溶液の濃度を 0.25 mM (240 μ L) とした。NADH (β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) を **7**-TMe- β -CDx 錯体に加え、最終濃度が [NADH] = 0.50 mM なるように調製した。

620 nm 以上の波長の光を照射するために、キセノンランプ (SX-UID500X, 500W; Ushio 製) を光源として 620 nm のカットフィルターを使用した。光照射はカットフィルターを水によって冷却しながら、16 mW cm⁻² (620 nm 以上) の強度で行った。

3-2-6 細胞実験

細胞実験は、広島大学大学院 先端物質科学研究科 黒田研究室にて行った。ポルフィリンの光線力学活性評価のため、モデル細胞として HeLa 細胞を使用した。

3-2-6-1 MEM 培地を用いた調製培地の調製

最小必須培地 (minimum essential media; MEM) 44.5 mL に、ペニシリン・ストレプトマイシン・アムホテリシン (penicillin streptomycin amphotericin B; PSAB) 500 μ L、ウシ胎児血清 (fetel bovine sesrum; FBS) 5 mL を無菌状態のクリーンベンチ内で混合し培地を調製した。調製後、培地は 4°C で保存した。

3-2-6-2 1×リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) の調製

500 mL のサンプル瓶に 10×リン酸緩衝生理食塩水 50 mL と事前にオートクレーブにて滅菌処理した超純水 450 mL を加えた。これをオートクレーブにて 121°C、15 分間処理することで、1×リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を調製し、4°C で保存した

3-2-6-3 0.05%トリプシン-EDTA の調製

凍結保存した 0.5%トリプシン (10×) を 37°C の恒温槽にて解凍し、0.5%EDTA 2.0 mL と 3-2-5-2 で調製した 1×PBS 18 mL を無菌状態のクリーンベンチ内で混合し、0.05%トリプシン-EDTA を調製し、4°C で保存した。

3-2-6-4 HeLa 細胞の培養

-80°C で凍結保存した HeLa 細胞を 37°C の恒温槽で解凍し、クリーンベンチ内で、細胞が入ったセルバンカー液 500 μ L と培地 10 mL を混合し、遠心分離を行った (1500 rpm, 5 min, 25°C)。遠心分離後、上澄みを取り除き、沈殿した細胞に培地 1.0 mL を加えて分散した。細胞培養用ディッシュに MEM 培地 10 mL と細胞懸濁液 1.0 mL を加えて、37°C、5%CO₂ に設

定したインキュベーターにて保存した。保存から3~4日ごとに継代作業を繰り返し、2~3週間経過した HeLa 細胞を細胞実験として用いた。

3-2-6-5 光照射、未照射サンプルの調製

3-2-6-4 で継代した HeLa 細胞培養ディッシュ内の培地をクリーンベンチ内でアスピレーターを用いて除去し、調製した PBS 5.0 mL を加え、ディッシュを洗浄した。洗浄後、アスピレーターを用いて PBS を除去し、調製した 0.05%トリプシン-EDTA 500 μ L を加え、インキュベーター (37°C, 5%CO₂) 内で5分間インキュベートした。顕微鏡で細胞が剥離したことを確認後、培地 500 μ L を用いて浮遊細胞をコンカルチューブに回収し、遠心分離 (1500 rpm, 5 min) を行った。上澄みを除去し、沈殿した細胞に調製培地 5 mL を添加し、懸濁後に染色液により染色された細胞数をカウントした。カウントした細胞数を 8.55×10^4 cells/cm³ となるように希釈し、光照射用と未照射用のサンプルとし、48 well plate に細胞懸濁溶液を 1 well に対して 200 μ L ずつ播種した。その後、インキュベーター (37°C, 5%CO₂) 内で24時間インキュベートした。24時間後、調製したポルフィリン含有 DMPC リポソームを 1 well あたりの細胞培養液 200 μ L に対し、ポルフィリンがそれぞれ 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 μ M となるように添加し、24時間インキュベート (37°C, 5%CO₂) した。

3-2-6-6 細胞への光照射

調製した光照射用と未照射用の 48 well plate をインキュベーターから取り出し、アスピレーターで培地を除去した。さらに、PBS 200 μ L で洗浄し、細胞内に取り込まれていないリポソームを除去した。その後、培地 200 μ L を加え、光未照射用の 48 well plate は24時間インキュベートした。光照射用の 48 well plate は25°Cのインキュベーター内で、石英ファイバー付きキセノンランプ光源を用いて 610-740 nm の光 (9 mW cm⁻²) で30分間光照射を行なった。光照射後、インキュベーター内で24時間インキュベートした。

3-2-6-7 WST-8 アッセイによる細胞生存率の算出

光照射用、および未照射用の 48 well plate の培地をアスピレーターで除去し、培地で任意の濃度に希釈した水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 溶液を 200 μ L ずつ添加し、30分間インキュベート (37°C, 5%CO₂) した。インキュベート後、呈色した溶液を 96 well plate に 100 μ L ずつ移し、マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm における吸光度を測定することで細胞生存率を評価した。

3-2-6-8 蛍光顕微鏡による HeLa 細胞の観察

HeLa 細胞の位相差像と蛍光像の観察を蛍光顕微鏡 IX-71 (オリンパス製、20倍レンズ) を行った。蛍光像は Imagem (C9100-13 EM-CCD Hamamatsu 製) を使い、光学フィルター (U-MINIBA2 Olympus 製) を通した、水銀ランプ照射下で観察した。

3-3 結果と考察

3-3-1 LMI1-5, 7, 8 形成の確認

LMIGs はポルフィリン-CDx 錯体とリポソームの交換反応で LMI1、および LMI8 と同様の方法で調製した²⁹。交換反応後に、二つの TMe- β -CDx からポルフィリンが外れていることを ¹H-NMR 測定で確認した (図 3-3.)。測定サンプルはリポソームとポルフィリン-TMe- β -CDx 錯体を 80°C、10 秒間で交換反応を行ったものである。DMPC から成るリポソームを使用し、錯体 (2-5, 7) 濃度が 2.5 mol%となるように調製した。2, 3 と 7 の TMe- β -CDx 錯体では、他のサンプルでは見られるピーク (赤丸と青丸) が見られない。これは、ポルフィリンが完全にシクロデキストリンから離れていることを示している。また、これらの錯体のピークがブロード化しているのは、リポソーム中に取り込まれているか、または、自己会合が進んだためと考えられる。これに対し、4 と 5 では交換反応後にも TMe- β -CDx 錯体由来のピークが観測された。(図 3-3. F, H の赤丸と青丸) この結果から、4 と 5 ではメソ位の極性基のため、疎水性のリポソーム膜中に入らなかったものと考えられる²⁹。

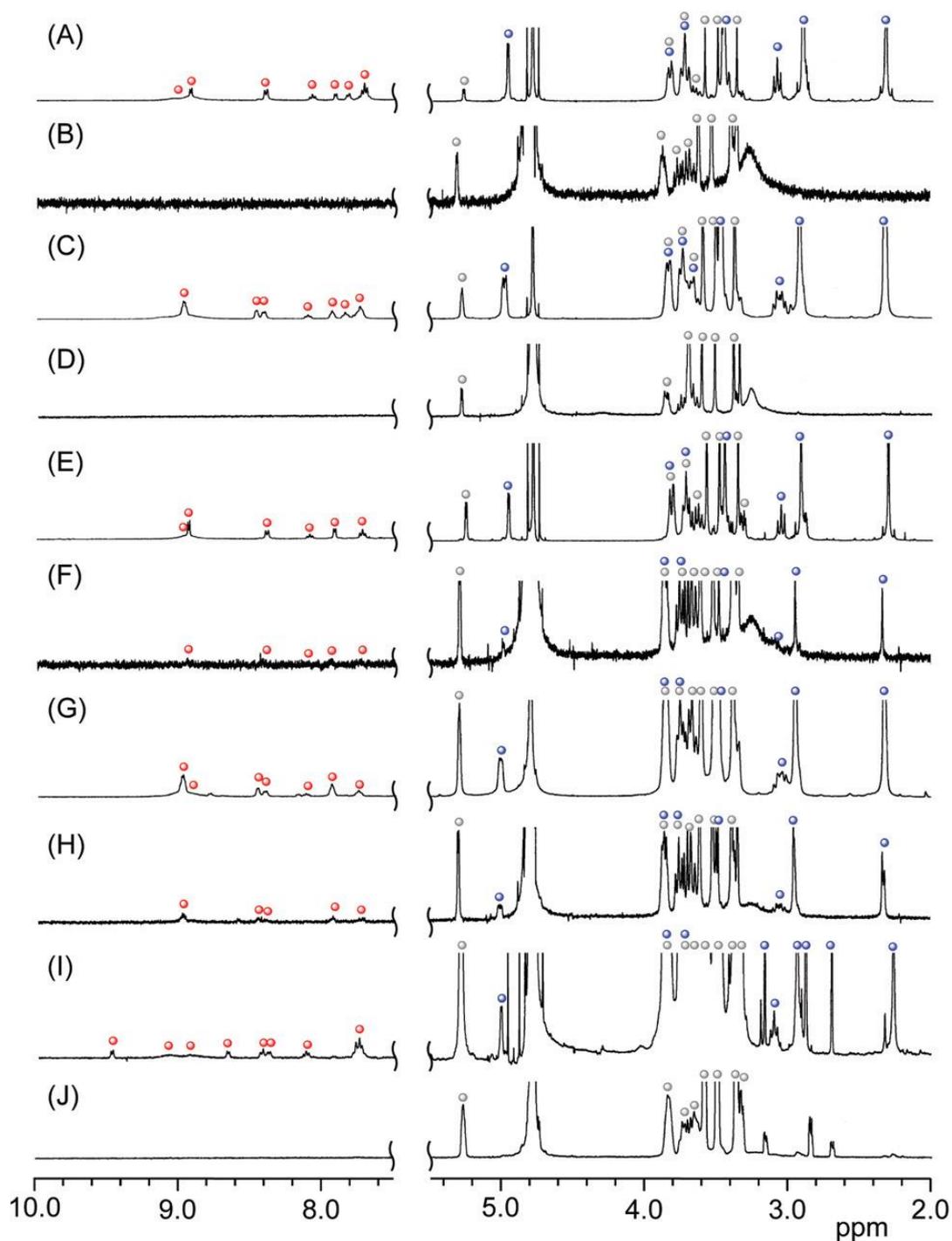


図 3-3. 2-5,7-シクロデキストリン錯体および2-5,7含有DMPCリポソーム (LMI2-5,7) の¹H-NMRスペクトル [3-7] = 25 μM, [3-7] / [DMPC] = 2.5 mol%

(A) 2-TMe-β-CDx 錯体, (B) LMI2, (C) 3-TMe-β-CDx 錯体, (D) LMI3, (E) 4-TMe-β-CDx 錯体, (F) LMI4, (G) 5-TMe-β-CDx 錯体, (H) LMI5, (I) 7-TMe-β-CDx 錯体, (J) LMI7

○ ; フリーのCDx, ● ; ポルフィリン-CDx錯体中のCDx, ● ; ポルフィリン-CDx錯体中の2-5,7

3-3-2 水中でのポルフィリン誘導体含有リポソームの長期安定性評価

次に、LMIGs の安定性を評価するために、LMI1-3 と 7,8 の水溶液について、一週間の UV-Vis 吸収スペクトル変化と DLS 測定による粒径変化を追った。

我々は、これまで LMI1 に比べ、LMI2 の安定性が高いことを報告した¹⁷。LMI1 では、UV-Vis 吸収スペクトルにおいて Soret 帯の吸収がブロード化したことから、脂質二分子膜内でポルフィリンの自己会合が起こっていることがわかった。このため、LMI1 は 1 の会合体形成によって膜内に存在できなくなり、LMI8 より不安定化が起きたと考えられる¹⁷。つまり、LMI1 と LMI8 の安定性の違いは、1の方が8より自己会合が起こりやすいことから支持された⁴⁰。そこで、LMI2 と LMI3、LMI7、および LMI8 のインキュベート時間を変化させた場合の動的光散乱 (DLS) 測定 (25°C) の結果を表 3-1, 2, 3, 4 に示す。

表 3-1. LMI2 の粒径測定の結果

インキュベート時間 /days	平均粒径 D_{hy} /nm	PDI ^a
0	89.3	0.129
0.5	99.6	0.099
1	110	0.079
2	95.0	0.129
3	99.2	0.110
5	97.0	0.153
7	96.9	0.198

^aPDI: 多分散指数

表 3-2. LMI3 の粒径測定の結果

インキュベート時間 /days	平均粒径 D_{hy} /nm	PDI ^a
0	91.6	0.172
0.5	97.1	0.168
1	123	0.175
2	110	0.227
3	90.9	0.298
5	96.2	0.169
7	90.6	0.244

^aPDI: 多分散指数

表 3-3. LMI7 の粒径測定の結果

インキュベート時間 /days	平均粒径 D_{hy} /nm	PDI ^a
0	91.1	0.132
0.5	89.4	0.105
1	91.7	0.217
2	86.6	0.175
3	95.9	0.099
5	93.9	0.185
7	91.7	0.094

^aPDI: 多分散指数

表 3-4. LMI8 の粒径測定の結果

インキュベート時間 /days	平均粒径 D_{hy} /nm	PDI ^a
0	92.3	0.100
0.5	90.4	0.109
1	87.4	0.101
2	99.5	0.104
3	94.0	0.077
5	85.2	0.116
7	86.0	0.110

^aPDI: 多分散指数

7日間の D_{hy} 値に大きな変化がないことから、これらのポルフィリン誘導体は膜融合や分裂を誘起しないことがわかる。

次に、溶液中でのポルフィリンの溶解性と二分子膜中での会合状態を評価するために、インキュベート時間を変化させた場合の LMI2-3 と 7, 8 の UV-Vis 吸収スペクトルを測定した (図 3-4.)。

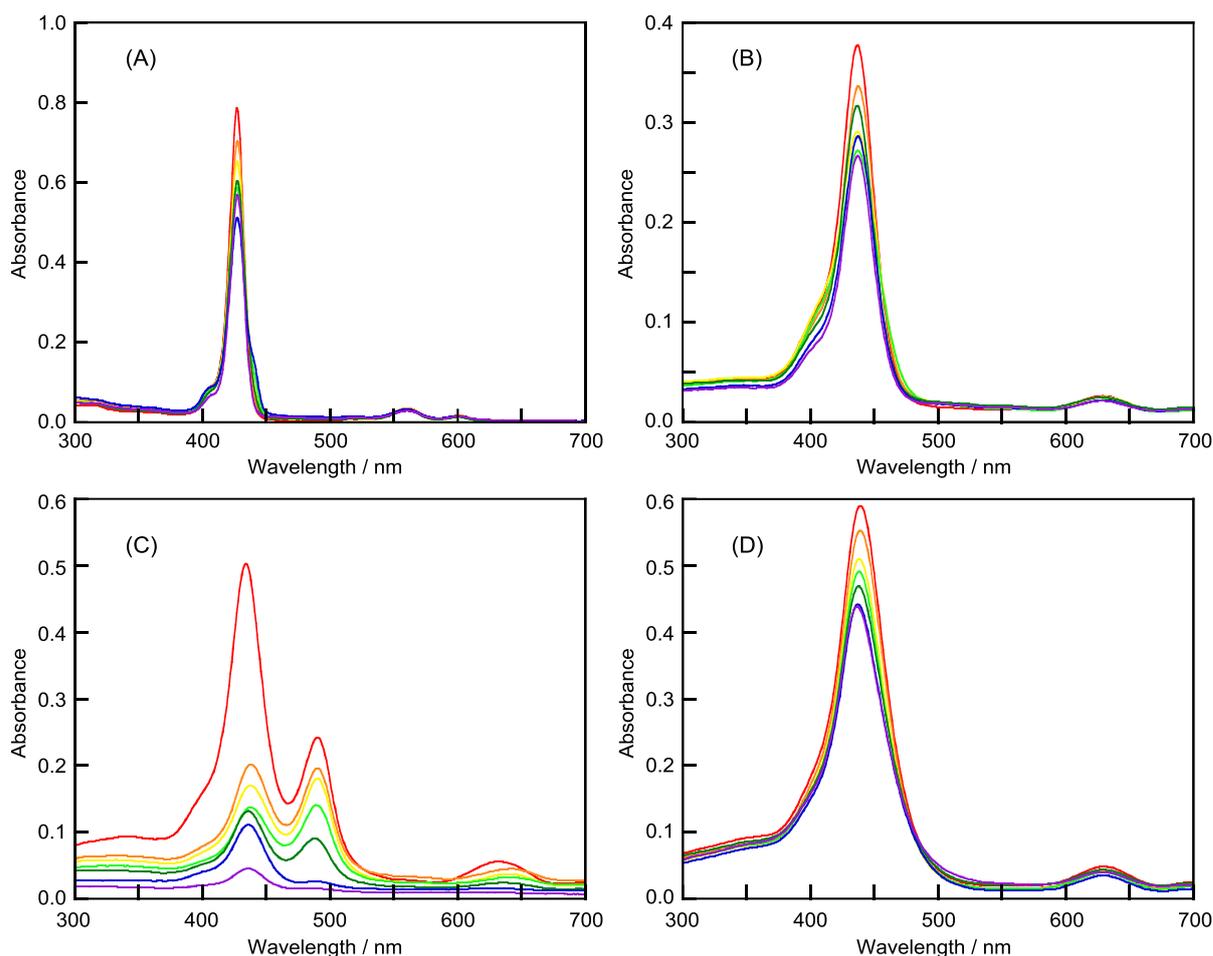


図 3-4. インキュベート時間による UV-vis 吸収スペクトルの変化
 (A) LMI8, (B) LMI2, (C) LMI3, (D) LMI7 [8, 2, 3 or 7]/[DMPC] = 2.5 mol%.
 0 (赤), 0.5 (橙), 1 (黄), 2 (黄緑), 3 (緑), 5 (青) and 7 (紫) 日

LMI2, 7, および 8 のスペクトルと LMI3 のスペクトルを比較すると、LMI2, 7, および 8 ではインキュベート時間が長くなるに従い、Soret 帯の吸収がわずかに減少しているが、ブロード化は起きていない。しかし、LMI3 では、インキュベート時間が長くなるに従い、Soret 帯の吸収が著しく減少し、ブロード化が起きている。つまり、LMI2, 7 および 8 の水溶液が LMI1 や 3 に比べより安定していることを示している。これらの吸収の減少は、① 1-3, 7, 8 の沈殿生成のため、もしくは、② 1-3, 7, 8 の自己会合によりピークがブロード化したためと考えられる。そこで、沈殿の有無を確認するために、水溶液中に溶存する 2 と 8 の量を測定した。各水溶液を遠心分離し (6250 g, 5 min, 20°C)、上澄み 100 μL を凍結乾燥した。残留物をクロロホルム 400 μL に再溶解し、Soret 帯域の吸収を測定した。その結果、2 と 8 のモル吸光係数はそれぞれ $\epsilon_{419} = 1.70 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ と $\epsilon_{423} = 1.43 \times 10^5$ と求まった。一方、7 は、ク

ロロホルムや DMSO などの有機溶媒に不溶なため、逆抽出ができず定量測定ができなかった。インキュベート時間変化に伴う、LMI1, LMI2, LMI3, LMI7, LMI8 の最大吸収波長 (λ_{\max}) での吸収の変化からリポソーム内に存在するポルフィリン濃度比について検討した。

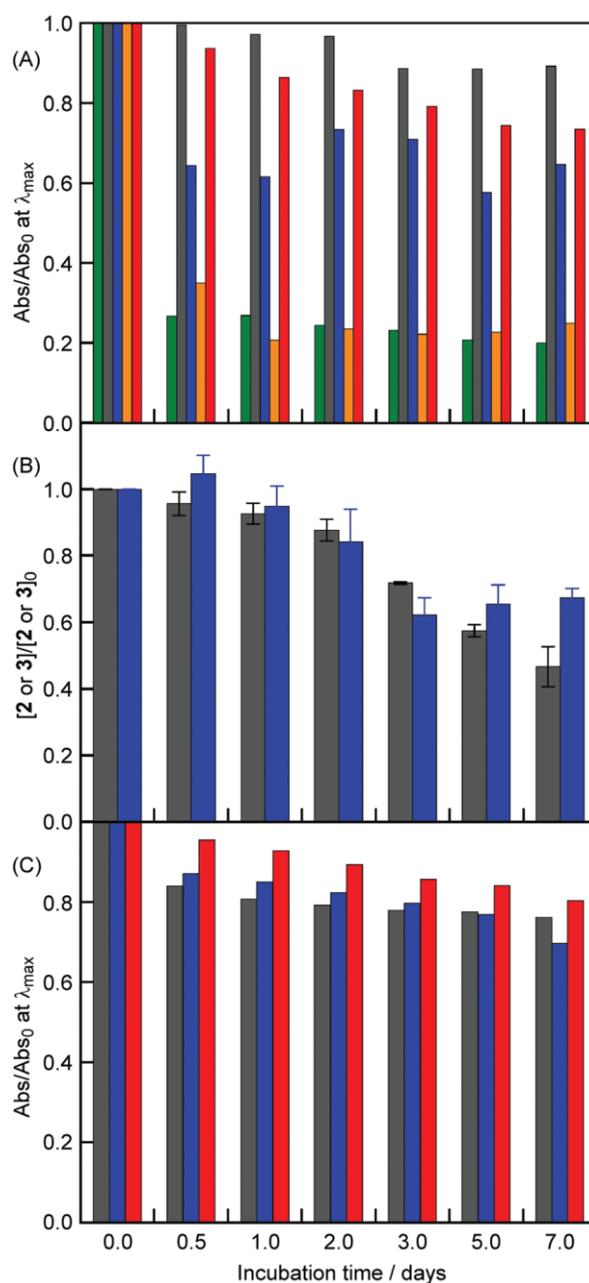


図 3-5. インキュベート時間変化に伴う λ_{\max} での吸光度の変化
 (A) LMI1 (緑), LMI8 (灰), LMI2 (青), LMI3 (橙), LMI7 (赤)
 (B) リポソーム中に残存したポルフィリン **8** (灰)、**2** (青)
 (C) FBS含有DMEM中でのLMI8 (灰), LMI2 (青), LMI7 (赤)
 [1–3 or 7, 8]/[DMPC] = 2.5 mol%

LM12 の 418 nm の吸収が減少していることからリポソーム中から **2** が外れていることが予測されたが (図 3-5.(A) 青) ⁴¹、遠心分離後の上澄み液から分取したサンプルの測定結果から、リポソーム中にまだ残存していることが分かった (図 3-5.(B) 青)。この結果から、初期段階で **2** の吸収が減少しているのは先述した理由②のように **2** の自己会合によるブロード化のため、418 nm の吸光度が減少したためであることが示された。しかし、3 日以上が経過すると取り込まれていた **2** は、理由①のようにリポソーム中から外れて、沈降していることが分かった (図 3-5.(B) 青)。

3-3-3 FBS を含む DMEM 中でのリポソームの長期安定性評価

3-3-2 の結果より、**2**、**7** および **8** についてはサンプル調製後 2 日間までは、70%以上がリポソーム中に存在することが確認できた。細胞実験を行うにあたり、培地中での LMIPors の安定性を評価することを目的として、FBS を含む DMEM 中での LM12, **7** および **8** の水溶液について、一週間の UV-Vis 吸収スペクトル変化を追った。図 3-5.(C)と図 3-6.に示すように、FBS を含む DMEM 中での UV-Vis 吸収スペクトル変化は水溶液中と同様の挙動を示したことから、培地中での LM12, **7** と **8** の安定性が確認できた。

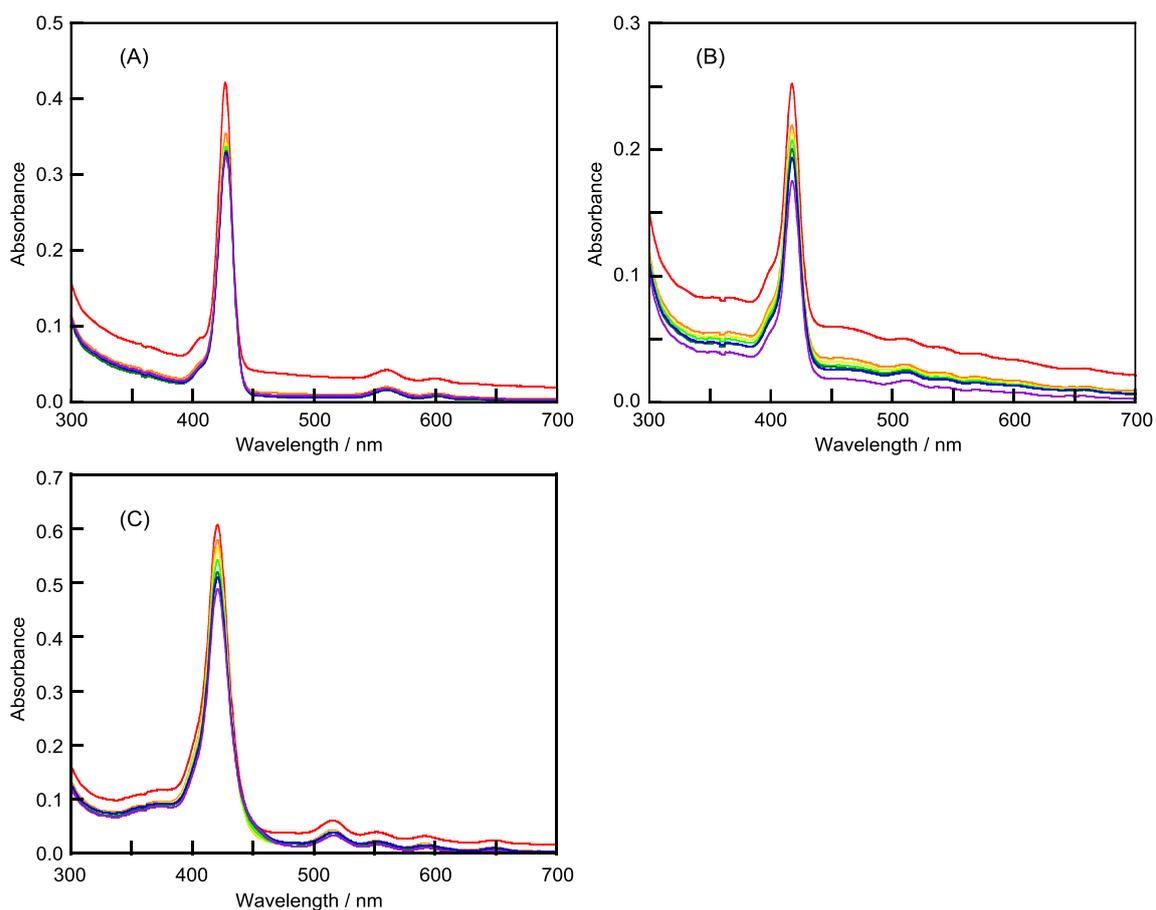


図 3-6. FBS含有DMEM中でのインキュベーション時間と吸収の相関

(A) LMI8 (B), LMI2 (C), LMI7 (in DMEM containing FBS)

インキュベート時間 (days) ; 0 (赤), 0.5 (橙), 1 (黄), 2 (黄緑), 3 (緑), 5 (青), 7 (紫)日

3-3-4 ポルフィリン含有リポソームの一重項酸素発生能評価

次に、FBSを含むDMEM中での安定性が確認できたLMI2, 7および8について一重項酸素($^1\text{O}_2$)の発生能を評価した。一重項酸素($^1\text{O}_2$)の発生能(Type II)の評価はABDA法^{20,42}により行った。LMI2, 7および8の活性について図3-7に、またABDAブリーチング法による一重項酸素発生能について図3-8に示す。

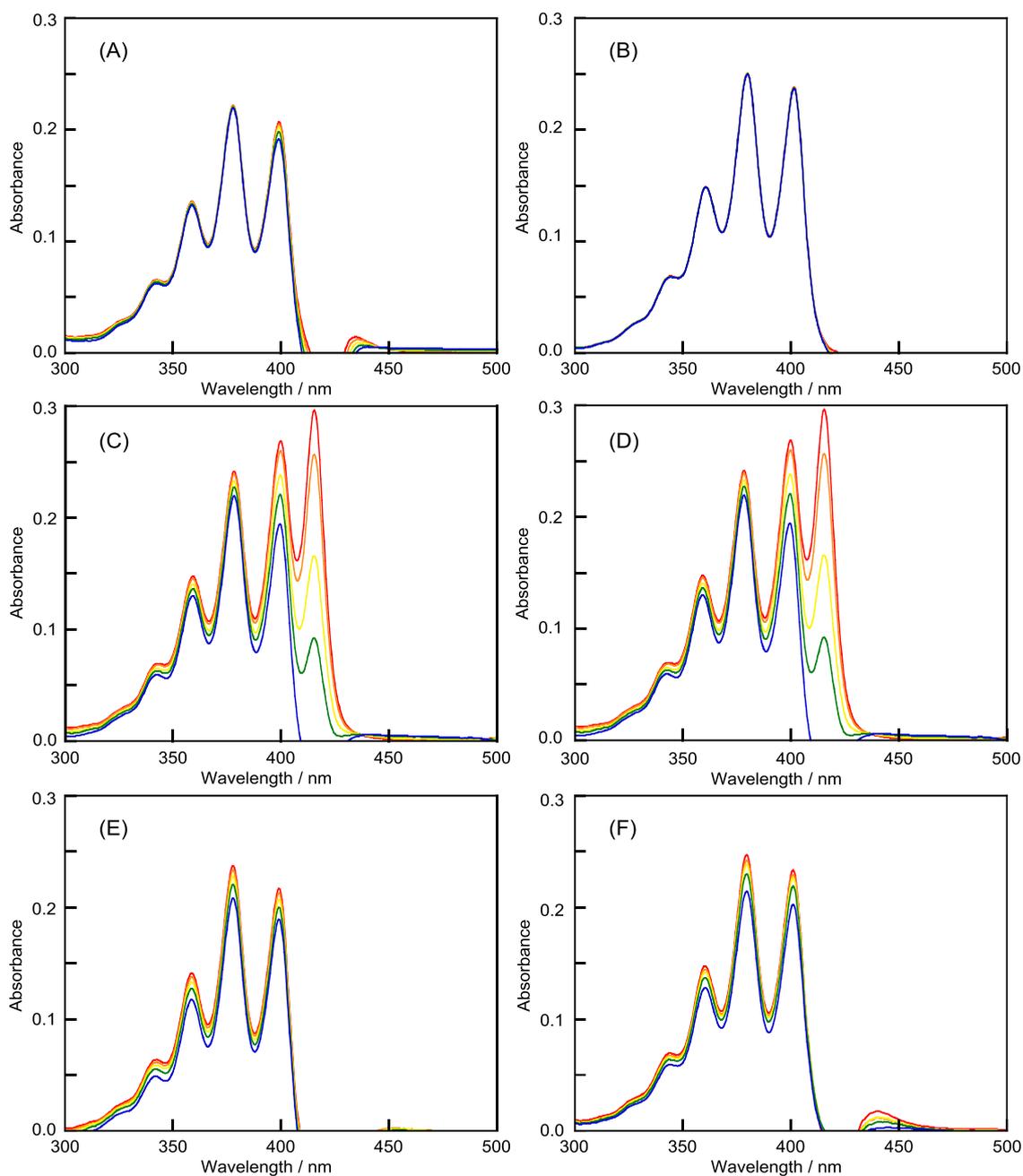


図 3-7. ABDA の UV-vis スペクトル変化
 (A) **8**, (C) **2**, (E) **7**-CDx 錯体、(B) **8**, (D) **2**, (F) **7** リポソームとの交換反応後
 0 (赤), 5 (橙), 15 (黄), 30 (緑), 60 (青) min.

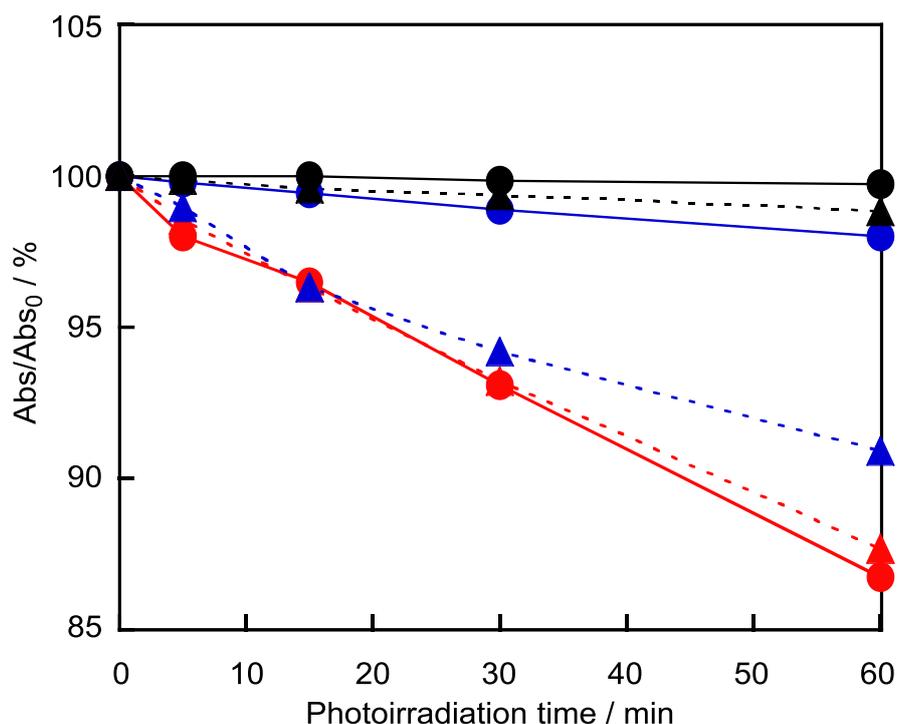


図 3-8. ABDA ブリーチング法(380 nm) による光照射時間に対する一重項酸素発生能の評価

▲ : 2-CDx 錯体, ▲ : 7-CDx 錯体, ▲ : 8-CDx 錯体, ● : LMI2, ● : LMI7, ● : LMI8

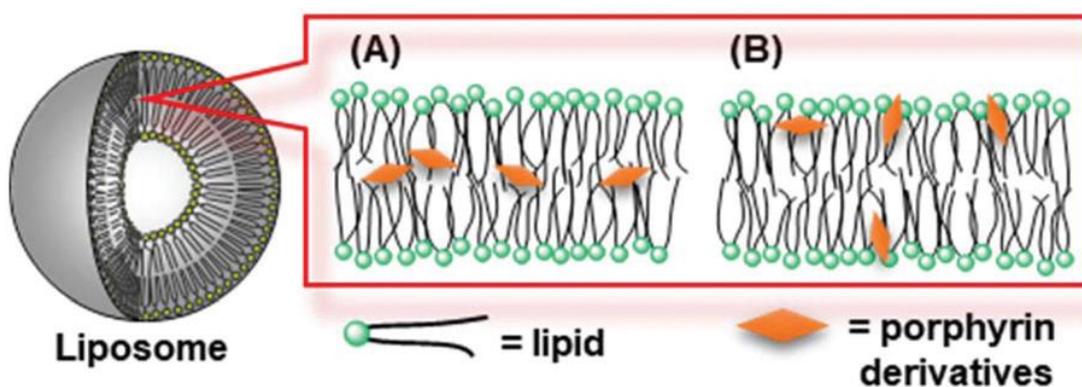
620 nm 以上の波長での光照射を行い、ABDA ブリーチング法では 380 nm、NBT 法では 560 nm での吸収を比較することで、 $^1\text{O}_2$ 発生能を評価した。ここで、ABDA ブリーチング法は $^1\text{O}_2$ を検出する手法であり、NBT は O_2^- を検出する手法である。図 3-8. から、光照射時間の増加に伴い、LMI7 の相対吸光度が低下していることから、LMI2 や 8 に比べ、LMI7 の $^1\text{O}_2$ 発生能は非常に高いことが分かった。

3-3-5 ポルフィリン-CDx 錯体の一重項酸素発生能評価

次に、CDx 錯体と比較することによって、ポルフィリン誘導体自身の $^1\text{O}_2$ 発生能の評価とリポソーム内に取り込まれることによる発生能に及ぼす影響を調べた。まず、CDx 錯体間での比較を行った。CDx 錯体間の $^1\text{O}_2$ 発生能の違いは、これら CDx 錯体の構造が類似していることから、CDx 内の各ポルフィリンの $^1\text{O}_2$ 発生能の違いを示しているといってもよい。したがって、2 や 7 のような構造のものに比べ、8 の $^1\text{O}_2$ 発生能が低いことを示している。次に、各ポルフィリンにおいて、CDx 錯体とリポソーム内包物間で比較を行った。LMI2 は 2-TMe- β -CDx 錯体に比べ $^1\text{O}_2$ 発生能が著しく低くなったが、LMI7 は 7-TMe- β -CDx 錯体の $^1\text{O}_2$ 発生能とほぼ同じ値を示した。ここで、カチオン基を有する C_{60} 誘導体を用いた LMIC₆₀

誘導体は LMIC₆₀ に比べ ¹O₂ 発生能が高いことが報告されている²⁷。この原因は C₆₀ が二つの脂質膜の間に存在するのに対して、C₆₀ 誘導体がリポソームの親水部表面近傍に存在するため、より溶存酸素と接触しやすいためであった。以上のことから、スキーム 3-1. に示すように脂質膜中の疎水部の中心に **2** が存在しており、カチオン基を有する **7** はリポソーム表面付近に存在していることが示唆された^{41,43}。

リポソーム中で高濃度のゲスト分子はその位置を決定することが可能である。膜中でのゲスト分子の存在位置については、次の章で詳しく議論する。



スキーム 3-1. リポソーム中での(A) **3** (B) **7** の模式図

一方、NBT 法によって O₂^{•-} 発生能の評価を行った。NBT の UV-vis 吸収スペクトル変化を図 3-9. に、また、NBT 法による O₂^{•-} 発生能について図 3-10. に示す。

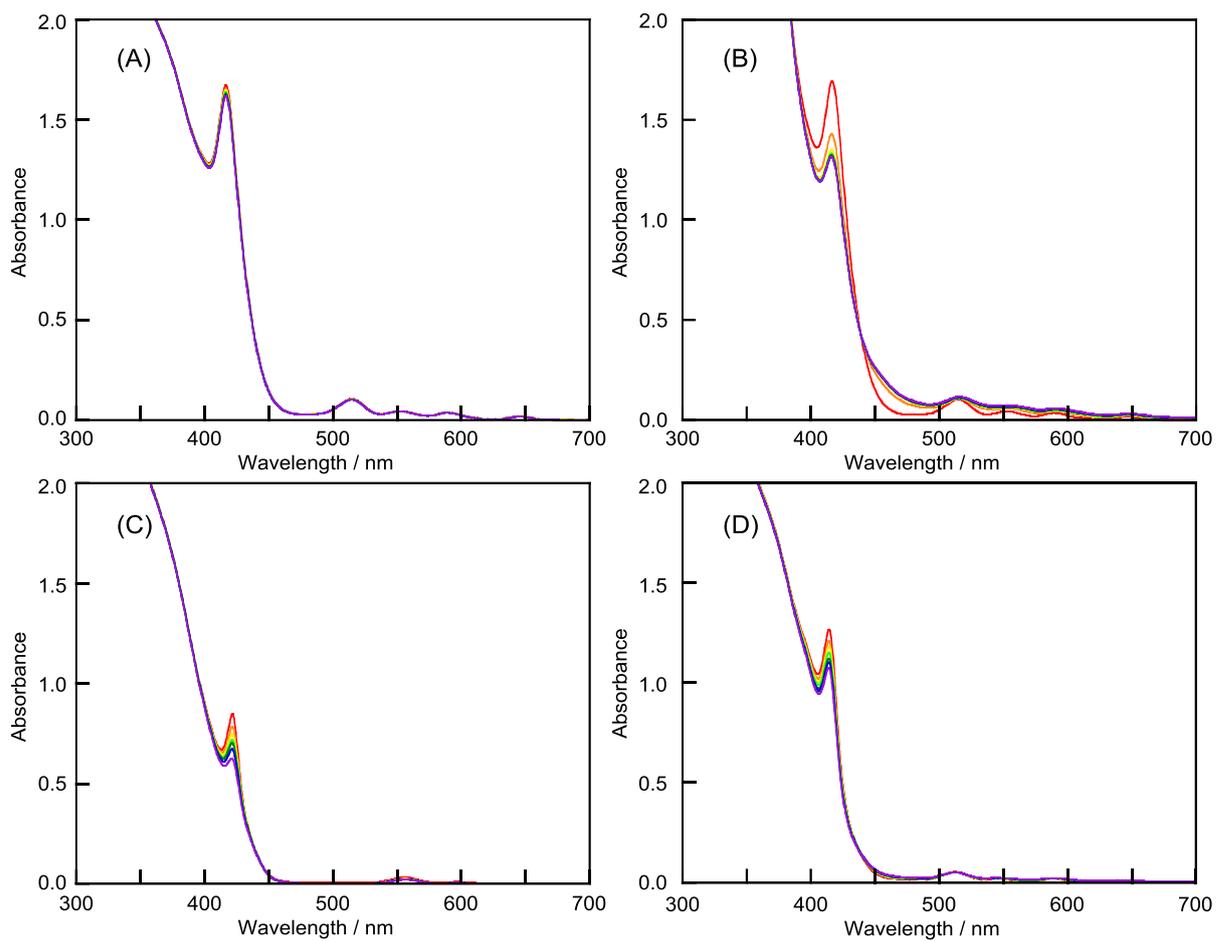


図 3-9. NBT の UV-vis 吸収スペクトル変化

(A) 8-CDx, (B) 2-CDx, (C) 7-CDx 錯体, (D) 7-CDx 錯体 (NADH 存在下)

光 (620 nm 以下) 照射時間 ; 0 (赤), 10 (橙), 20 (黄), 30 (黄緑), 40 (緑), 50 (青), 60 (紫) 分

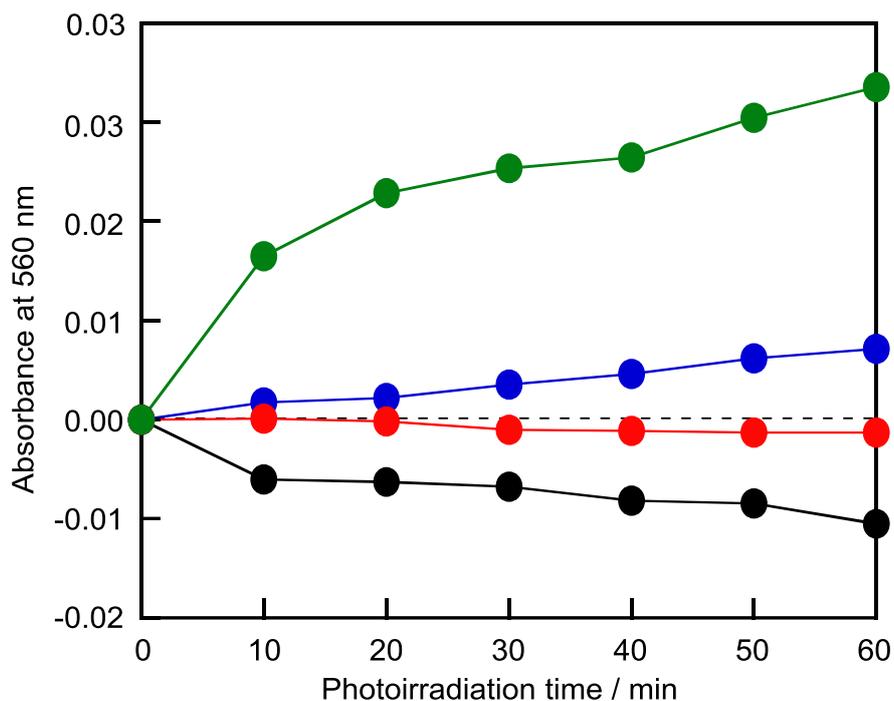


図 3-10. NBT 法 (560nm) による光照射時間に対するスーパーオキシドアニオン発生能の評価

8-CDx 錯体:●, 2-CDx 錯体:●, 7-CDx 錯体:●, 7-CDx 錯体(NADH 存在下):●

ここでは、LMI2, LMI7, および LMI8 の水溶液 (1.0 mL) は、NBT (250 μ L) の DMSO 溶液を添加すると **2, 7, 8** がそれぞれ析出してしまったため、**2, 7**, および **8-TMe- β -CDx** 錯体を使用した。7-TMe- β -CDx 錯体を用いた NADH 存在下で行ったポジティブコントロールと比較して、NADH 非存在下で行った **2, 7**, および **8-TMe- β -CDx** 錯体の実験ではホルマザンによる 560 nm の吸収の増加は非常に小さかった。以上のことより、**2, 7**, および **8-TMe- β -CDx** 錯体では、ほとんど $O_2^{\cdot -}$ が発生していないことがわかった³⁹。

以上の結果から、LMI7 は LMI2 および LMI8 に比べ活性酸素 (ROS) の発生量が多く、その発生した活性酸素のほとんどが 1O_2 であり、Type II (図 3-2.) の反応であることがわかった。

3-3-6 HeLa 細胞を用いたリポソーム内包ポルフィリンの光線力学活性の評価

光線力学活性の評価を行う前に、HeLa 細胞（ヒト子宮頸がん由来の細胞）内への LMI2, 7 および 8 の導入量を比較検討した。細胞内への導入は蛍光顕微鏡観察を用いて行い、結果を図 3-11. に示した^{19,20,23}。

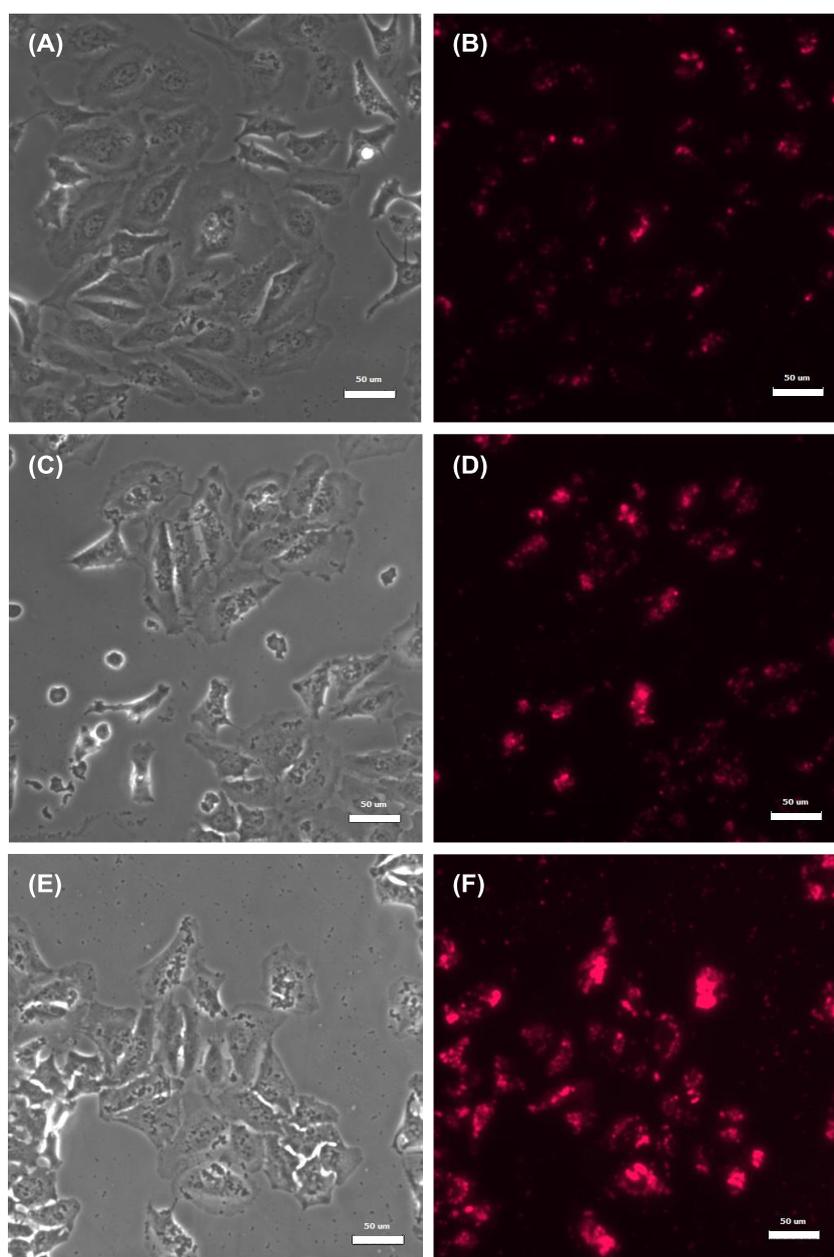


図 3-11. LMI2, 7 あるいは 8 の 24 時間インキュベート後の HeLa 細胞の蛍光顕微鏡観察 (37°C)
(A) LMI8 (位相差像), (B) LMI8 (蛍光像), (C) LMI2 (位相差像)
(D) LMI2 (蛍光像), (E) LMI7 (位相差像), (F) LMI7 (蛍光像)

がん細胞は表面が負電荷を帯びているので、静電相互作用の影響からアニオン性または中性のリポソームに比べ、カチオン性リポソームの方が細胞内に取り込まれやすいことが知られている^{19,44}。そこで、LMIPorsにカチオン性脂質 **9** を[**9**]/[DMPC + **9**] = 10 mol% となるように添加した。細胞に 0.1-2.0 μM の LMI**2**, **7** および **8** を添加し、24 時間インキュベート後に、光照射 (610-740 nm, 30 min) を行った。光照射後の蛍光顕微鏡観察から、HeLa 細胞中の LMI**7** の蛍光強度は、LMI**2** や LMI**8** に比べ、わずかに大きいことが分かった。これは、図 3-12. に示すように LMI**7** の蛍光スペクトル強度が LMI**2** や LMI**8** に比べ、約 3 倍大きいことに起因していると考えられた。以上のことより、HeLa 細胞内へ LMI**2**, LMI**7** や LMI**8** がほぼ同じ量取り込まれていると考えられる。この理由はカチオン性リポソームがドラッグキャリアとして機能したため、リポソーム表面の電荷はカチオン性脂質 **9** の電荷によって決まっているためであると考えられる^{19,44}。

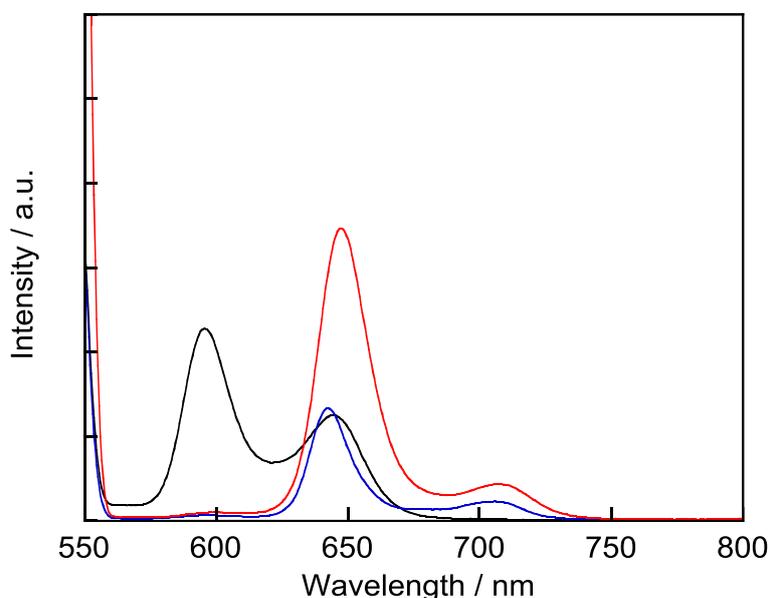


図 3-12. 蛍光スペクトル
LMI**3** (青), LMI**7** (赤), LMI**8** (黒)

次に、LMI**2**, **7** と **8** の HeLa 細胞中の光線力学活性について評価した。この光線力学活性評価は、細胞レベルで 9 mW cm^{-2} 以下の光で光照射を行った。細胞の生存率はセルカウンターキット Kit-8 の WST-8 アッセイを使用した。結果を図 3-12. に示す。暗所下においては、LMI**2**, **7**, および **8** はほとんど細胞毒性を持たなかった。これに対して、610-720 nm の波長の光を 30 分間照射後に 24 時間インキュベートすると、LMI**2**, **7**, および **8** からは明確な光毒性が観測された。光線力学活性に対する LMI**8**, **2**, および **7** の投与量依存性は、50% 阻害濃度 (IC_{50} 値) がそれぞれ >2 , 0.68, 0.23 μM となった。 IC_{50} 値が低いほど光線力学活性が高いため、LMI**7** は LMI**2** および LMI**8** より高い光線力学活性をもつことが示された。

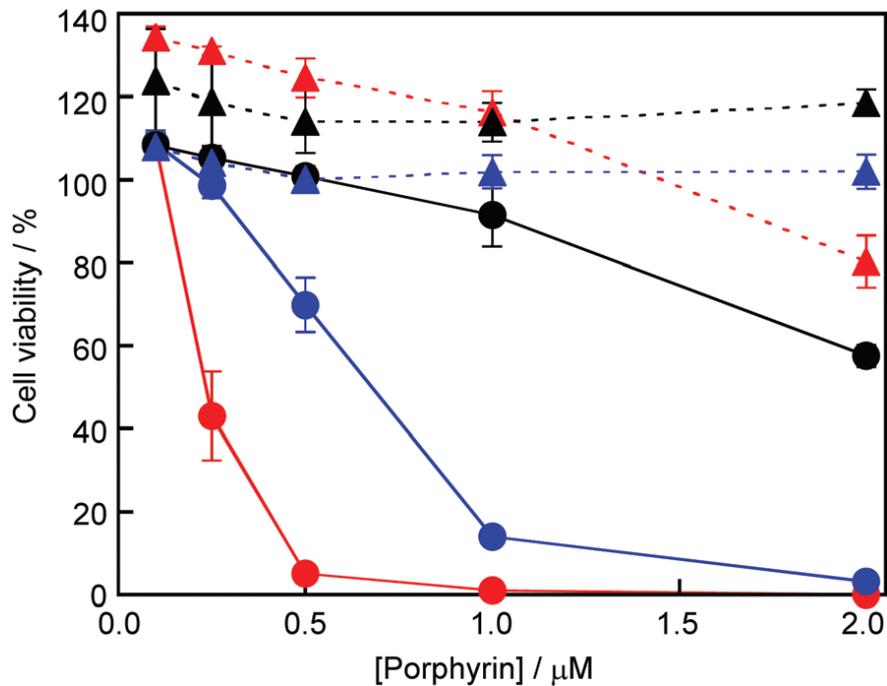
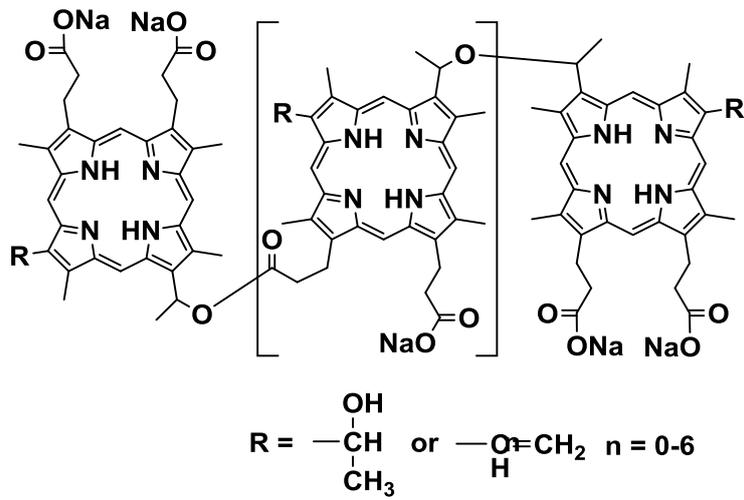


図 3-13. ポルフィリン含有リポソームの細胞毒性評価
 暗所下での LMI8 (▲), LMI2 (▲), LMI7 (▲)
 光照射下での LMI8 (●), LMI2 (●), LMI7 (●)

LMI7 の IC_{50} 値 ($0.23 \mu\text{M}$) が、LMI8 ($>2 \mu\text{M}$) や LMI2 ($0.68 \mu\text{M}$) に比べ低く、より光線力学活性が高い結果となったことは、それぞれの $^1\text{O}_2$ の発生能の結果と一致していた。LMI2 や 7 の IC_{50} 値は、現在、臨床で光増感剤として最もよく使用されているフォトフリンの IC_{50} 値 ($3.02 \mu\text{M}$) よりはるかに低い値であった (図 3-14. (B))。ここで、フォトフリンはモノマーからオリゴマーの混合物 (図 3-14. (A)) であるため、そのモル数は、ポルフィリンユニットのモル数として換算した。以上の結果から、LMI2 はフォトフリンに比べ約 4 倍、LMI7 は約 13 倍の光線力学活性を示すことが分かった。

(A)



フォトフリン

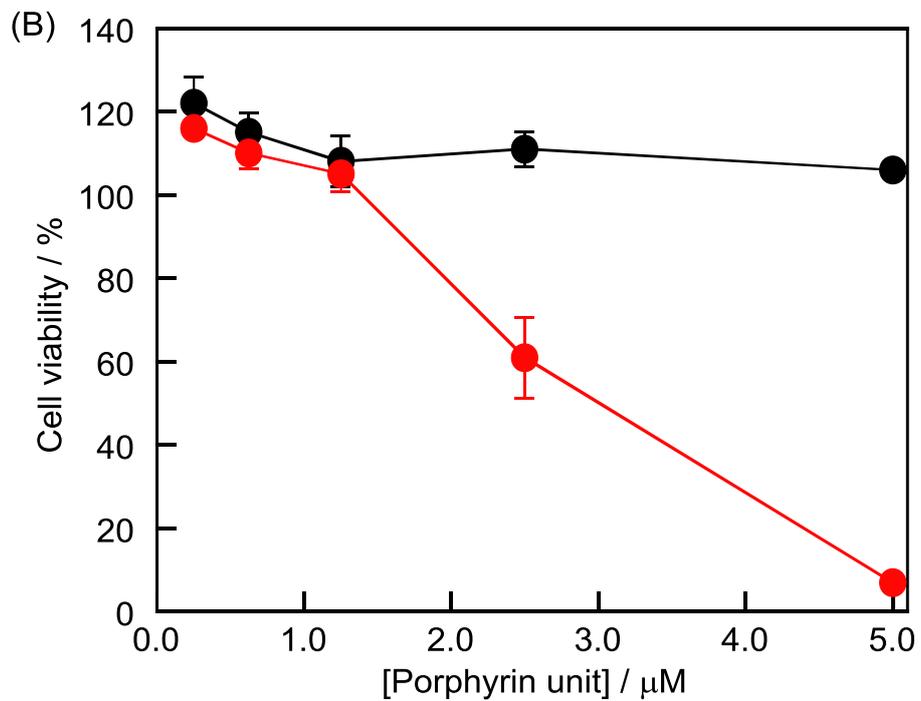


図 3-14. (A)フォトフリンの構造 (B) フォトフリンの細胞毒性
暗所下 (●)、光照射下 (●)

3-4 結論

極性基を有する非対称構造のポルフィリン誘導体をリポソームへ導入することを目的として、メソ位にピリジル基または、ピリジニウム基を有するポルフィリン誘導体を合成した。LMIPors 溶液の中でも、三つのフェニル基と一つのピリジルまたはピリジニウム基を有する **2** や **7** は、リポソーム中で安定であることが分かった。一方、ピリジル基をもたない **1** や二つ以上のピリジル基を有する **3**, **4** や **5** は脂質膜中に導入されない、もしくは導入されても LMIPors 水溶液が不安定で沈殿が直ぐに生成することが分かった。また、610 nm 以上の光照射下での、HeLa 細胞への光線力学活性については、LMI8 に比べ LMI2 や **7** の方が高いことが分かった。LMI2 や **7** の光線力学活性が高い要因は、LMI8 の $^1\text{O}_2$ 発生能に比べ、LMI2 や **7** の $^1\text{O}_2$ の発生能が高い点にあった。

LMI2 と **7** の光線力学活性は、フォトフリンの光線力学活性に比べ、それぞれ4倍、7倍高かった。LMI7 の光線力学活性が LMI2 より高い要因については、次章で詳しく述べる。我々は、高い光線力学活性を有する、安定した LMIPors の構築に成功したと言える。

3-5 参考文献

- 1 G. Sessa and G. Weissmann, Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes, *J. Lipid Res.*, **1968**, *9*, 310–318.
- 2 Y. Kaneda, Virosomes: evolution of the liposome as a targeted drug delivery system, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2000**, *43*, 197–205.
- 3 T. M. Allen and P. R. Cullis, Drug delivery systems: Entering the mainstream, *Science*, **2004**, *303*, 1818–1822.
- 4 V. P. Torchilin, Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2005**, *4*, 145–160.
- 5 X. Gao and L. Huang, Cationic liposome-mediated gene transfer, *Gene Ther.*, **1995**, *2*, 710–722.
- 6 M. Ethirajan, Y. Chen, P. Joshi and R. K. Pandey, The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 340–362.
- 7 L. B. Josefsen and R. W. Boyle, Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics, *Theranostics*, **2012**, *2*, 916–966.
- 8 C. S. Jin, J. F. Lovell, J. Chen and G. Zheng, Ablation of hypoxic tumors with dose-equivalent photothermal, but not photodynamic, therapy using a nanostructured porphyrin assembly, *ACS Nano*, **2013**, *7*, 2541–2550.
- 9 Q. Zou, M. Abbas, L. Zhao, S. Li, G. Shen and X. Yan, Biological photothermal nanodots based on self-assembly of peptide porphyrin conjugates for antitumor therapy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, 1921–1927.

- 10 H. I. Pass, Photodynamic therapy in oncology-mechanisms and clinical use, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1993**, *85*, 443–456.
- 11 T. J. Dougherty, C. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan and Q. Peng, Photodynamic therapy, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1998**, *90*, 889–905.
- 12 K. Lang, J. Mosinger and D. M. Wagnerová, Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy, *Coord. Chem. Rev.*, **2004**, *248*, 321–350.
- 13 F. Postigo, M. Mora, M. A. De Madariaga, S. Nonell and M. L. Sagrista, Incorporation of hydrophobic porphyrins into liposomes: characterization and structural requirements, *Int. J. Pharm.*, **2004**, *278*, 239–254.
- 14 S. Ben-Dror, I. Bronshtein, A. Wiehe, B. Röder, M. O. Senge and B. Ehrenberg, On the correlation between hydrophobicity, liposome binding and cellular uptake of porphyrin sensitizers, *Photochem. Photobiol.*, **2006**, *82*, 695–701.
- 15 H. Umakoshi, K. Morimoto, Y. Ohama, H. Nagami, T. Shimanouchi and R. Kuboi, Liposome modified with Mn-porphyrin complex can simultaneously induce antioxidative enzyme-like activity of both superoxide dismutase and peroxidase, *Langmuir*, **2008**, *24*, 4451–4455.
- 16 A. Ikeda, Photodynamic activity of fullerenes and other molecules incorporated into lipid membranes by exchange, *Chem. Rec.*, **2016**, *16*, 249–260.
- 17 A. Ikeda, K. Ashizawa, Y. Tsuchiya, M. Ueda and K. Sugikawa, Formation of lipid membrane-incorporated small π -molecules bearing hydrophilic groups, *RSC Adv.*, **2016**, *6*, 78505–78513.
- 18 A. Ikeda, T. Sato, K. Kitamura, K. Nishiguchi, Y. Sasaki, J. Kikuchi, T. Ogawa, K. Yogo and T. Takeya, Efficient photocleavage of DNA utilising water-soluble lipid membrane-incorporated [60]fullerenes prepared using a [60]fullerene exchange method, *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 2907–2909.
- 19 A. Ikeda, Y. Doi, K. Nishiguchi, K. Kitamura, M. Hashizume, J. Kikuchi, K. Yogo, T. Ogawa and T. Takeya, Induction of cell death by photodynamic therapy with water-soluble lipid-membrane-incorporated [60]fullerene, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 1158–1160.
- 20 Y. Doi, A. Ikeda, M. Akiyama, M. Nagano, T. Shigematsu, T. Ogawa, T. Takeya and T. Nagasaki, Intracellular uptake and photodynamic activity of water-soluble [60]- and [70] fullerenes incorporated in liposomes, *Chem. – Eur. J.*, **2008**, *14*, 8892–8897.
- 21 A. Ikeda, T. Sue, M. Akiyama, K. Fujioka, T. Shigematsu, Y. Doi, J. Kikuchi, T. Konishi and R. Nakajima, Preparation of highly photosensitizing liposomes with fullerene-doped lipid bilayer using dispersion-controllable molecular exchange reactions, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 4077–4080.
- 22 A. Ikeda, Y. Kawai, J. Kikuchi and M. Akiyama, Effect of phase transition temperature of liposomes on preparation of fullerene-encapsulated liposomes by the fullerene-exchange reaction, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 2847–2849.

- 23 A. Ikeda, M. Akiyama, T. Ogawa and T. Takeya, Photodynamic activity of liposomal photosensitizers via energy transfer from antenna molecules to [60]fullerene, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2010**, *1*, 115–119.
- 24 A. Ikeda, K. Kiguchi, T. Shigematsu, K. Nobusawa, J. Kikuchi and M. Akiyama, Location of [60]fullerene incorporation in lipid membranes, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 12095–12097.
- 25 A. Ikeda, M. Mori, K. Kiguchi, K. Yasuhara, J. Kikuchi, K. Nobusawa, M. Akiyama, M. Hashizume, T. Ogawa and T. Takeya, Advantages and potential of lipid-membraneincorporating fullerenes prepared by the fullereneexchange method, *Chem. – Asian J.*, **2012**, *7*, 605–613.
- 26 A. Ikeda, T. Hida, T. Iizuka, M. Tsukamoto, J. Kikuchi and K. Yasuhara, Dynamic behaviour of giant unilamellar vesicles induced by the uptake of [70]fullerene, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 1288–1291.
- 27 A. Ikeda, K. Kiguchi, T. Hida, K. Yasuhara, K. Nobusawa, M. Akiyama and W. Shinoda, [70]Fullerenes assist the formation of phospholipid bicelles at low lipid concentrations, *Langmuir*, **2014**, *30*, 12315–12320.
- 28 A. Ikeda, S. Hino, K. Ashizawa, K. Sugikawa, J. Kikuchi, M. Tsukamoto and K. Yasuhara, Lipid-membrane-incorporated hydrophobic photochromic molecules prepared by the exchange method using cyclodextrins, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 6175–6182.
- 29 A. Ikeda, S. Hino, T. Mae, Y. Tsuchiya, K. Sugikawa, M. Tsukamoto, K. Yasuhara, H. Shigeto, H. Funabashi, A. Kuroda and M. Akiyama, Porphyrin-uptake in liposomes and living cells using an exchange method with cyclodextrin, *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 105279–105287.
- 30 A. Ikeda, T. Mae, M. Ueda, K. Sugikawa, H. Shigeto, H. Funabashi, A. Kuroda and M. Akiyama, Improved photodynamic activities of liposome-incorporated [60]fullerene derivatives bearing a polar group, *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 2966–2969.
- 31 E. D. Sternberg, D. Dolphin and C. Brückner, Porphyrinbased photosensitizers for use in photodynamic therapy, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 4151–4202.
- 32 A. M. Slomp, S. M. W. Barreira, L. Z. B. Carrenho, C. C. Vandresen, I. F. Zattoni, S. M. S. Ló, J. C. C. Dallagnol, D. R. B. Ducatti, A. Orsato, M. E. R. Duarte, M. D. Nosedá, M. F. Otuki and A. G. Gonçalves, Photodynamic effect of meso-(aryl)porphyrins and meso-(1-methyl-4-pyridinium) porphyrins on HaCaT keratinocytes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2017**, *27*, 156–161.
- 33 R. Kubota, S. Imamura, T. Shimizu, S. Asayama and H. Kawakami, Synthesis of water-soluble dinuclear Mn-porphyrin with multiple antioxidative activities, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2014**, *5*, 639–643.
- 34 Y. Murakami, A. Nakano, A. Yoshimatsu, K. Uchitomi and Y. Matsuda, Characterization of molecular aggregates of peptide amphiphiles and kinetics of dynamic processes performed by single-walled vesicles, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 3613–3623.
- 35 Y. Tsuchiya, T. Shiraki, T. Matsumoto, K. Sugikawa, K. Sada, A. Yamano and S. Shinkai,

- Supramolecular dye inclusion single crystals created from 2,3,6-trimethyl- β -cyclodextrin and porphyrins, *Chem. – Eur. J.*, **2012**, *18*, 456–465.
- 36 K. Kano, R. Nishiyabu, T. Asada and Y. Kuroda, Static and dynamic behavior of 2:1 inclusion complexes of cyclodextrins and charged porphyrins in aqueous organic media, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 9937–9944.
- 37 A. Ikeda, S. Satake, T. Mae, M. Ueda, K. Sugikawa, H. Shigeto, H. Funabashi and A. Kuroda, Photodynamic activities of porphyrin derivative-cyclodextrin complexes by photoirradiation, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2017**, *8*, 555–559.
- 38 B. Horiguchi, T. Nakaya, M. Ueda, K. Sugikawa, T. Mizuta, T. Haino, N. Kawata and A. Ikeda, Controllable direction of porphyrin derivatives in two cyclodextrin cavities, *Eur. J. Org. Chem.*, **2018**, 2138–2143.
- 39 I. Nakanishi, S. Fukuzumi, T. Konishi, K. Ohkubo, M. Fujitsuka, O. Ito and N. Miyata, DNA cleavage via superoxide anion formed in photoinduced electron transfer from NADH to γ -cyclodextrin-bicapped C₆₀ in an oxygensaturated aqueous solution, *J. Phys. Chem. B*, **2002**, *106*, 2372–2380.
- 40 R. F. Pasternack, L. Francesconi, D. Raff and E. Spiro, Aggregation of nickel(II), copper(II), and zinc(II) derivatives of water-soluble porphyrins, *Inorg. Chem.*, **1973**, *12*, 2606–2611.
- 41 LMI3, **4** および **7** と eggPC からなる LMIPors の安定性については以下の論文に掲載: T. Nakaya, Y. Tsuchiya, B. Horiguchi, K. Sugikawa and A. Ikeda, ¹H NMR determination of incorporated porphyrin location in lipid membranes of liposomes, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2018**, *91*, 1337–1342.
- 42 B. A. Lindig, M. A. J. Rodgers and A. P. Schaap, Determination of the lifetime of singlet oxygen in water-d₂ using 9,10-anthracenedipropionic acid, a water-soluble probe, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 5590–5593.
- 43 F. M. Engelmann, I. Mayer, D. S. Gabrielli, H. E. Toma, A. J. Kowaltowski, K. Araki and M. S. Baptista, Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **2007**, *39*, 175–185.
- 44 J. W. McLean, E. A. Fox, P. Baluk, P. B. Bolton, A. Haskell, R. Pearlman, G. Thurston, E. Y. Umemoto and D. M. McDonald, Organ-specific endothelial cell uptake of cationic liposome-DNA complexes in mice, *Am. J. Physiol.*, **1997**, *273*, 387–404.

第4章 NMRによるリポソーム内のゲスト分子の分布と位置の決定

4-1 序

前章にてポルフィリン誘導体を導入した脂質二分子膜 (LMIPors) は、ポルフィリンの種類の違いによって HeLa 細胞に対する光線力学活性が大きく異なることが明らかになった。この原因として、ポルフィリン誘導体自身の一重項酸素発生能の違いもあるが、リポソーム内での活性の違いがあることが明らかになった。この最も大きな要因として、脂質膜中でのポルフィリン誘導体の存在位置が大きく影響していることが予測された。つまり、ポルフィリン誘導体のリポソーム中での存在位置を決定することは、この原因を探る上で非常に重要となり、高い光線力学活性をもつ光増感剤の分子設計においても重要なカギになるであろう。

我々は、これまでに ^{13}C -NMR 測定によって、脂質膜中の C_{60} の位置決定に成功した¹。リポソーム中では分子の運動性が低下するため、多くのゲスト分子と脂質のシグナルがブロード化することで、ピークが消失する。これに対して、 C_{60} は磁氣的等価な 60 個の炭素原子で構成されており、球状であることから脂質膜中においても高速で回転することができる。さらに ^{13}C を多く含む C_{60} (20~40%) を用いることで、リポソーム中でも ^{13}C -NMR 測定において C_{60} に基づくピークの確認ができた。この LMIC₆₀ に、アルキル鎖の異なる位置にラジカル部位を持つ脂質分子を共存させることで、ラジカルによる C_{60} のピークに及ぼす影響を調べた。ラジカル近傍に存在するプロトンやカーボンはそのピークが小さくなることが知られている¹。そこで、アルキル鎖末端とアルキル鎖中央にラジカルをそれぞれもつ脂質分子を添加したところ、前者による影響が大きかったことから、 C_{60} はアルキル鎖末端付近、つまり二分子膜の中央付近に存在することが明らかになった。しかし、本手法は C_{60} に対してのみ行える方法であり、他のゲスト分子には適用できない。

他の研究グループは、高濃度のゲスト分子と脂質膜の ^1H -NMR 測定のケミカルシフトの変化から、脂質膜中のゲスト分子の位置を決定した²⁻⁶。この手法において最も重要なのは、高濃度で ^1H -NMR 測定を行うことにあるため、高濃度でゲスト分子を含む LMIG を準備する必要がある。しかし、ポルフィリンをゲスト分子とした場合、安定した LMIPors 水溶液の調製が難しく、研究は困難を極めていた。今回、我々は交換反応法を用いること、および適当なポルフィリン誘導体を選択することによって比較的高濃度の LMIPors の調製に成功した⁷。ポルフィリンの環電流効果は、他のゲスト分子に比べると強く、広がりを持つことから、ポルフィリンの存在量が少ない場合においても、遮へい効果によって、空間的に近い位置にある脂質分子のプロトンのケミカルシフトが大きく変化するものと予測される。

本研究では、脂質二分子膜中のポルフィリンの位置決定を ^1H -NMR 測定でのケミカルシフトの変化をもとに行い、それらの LMIPors の光線力学活性との関係を明らかにした。

本章で用いた化合物を図 4-1.に示す。

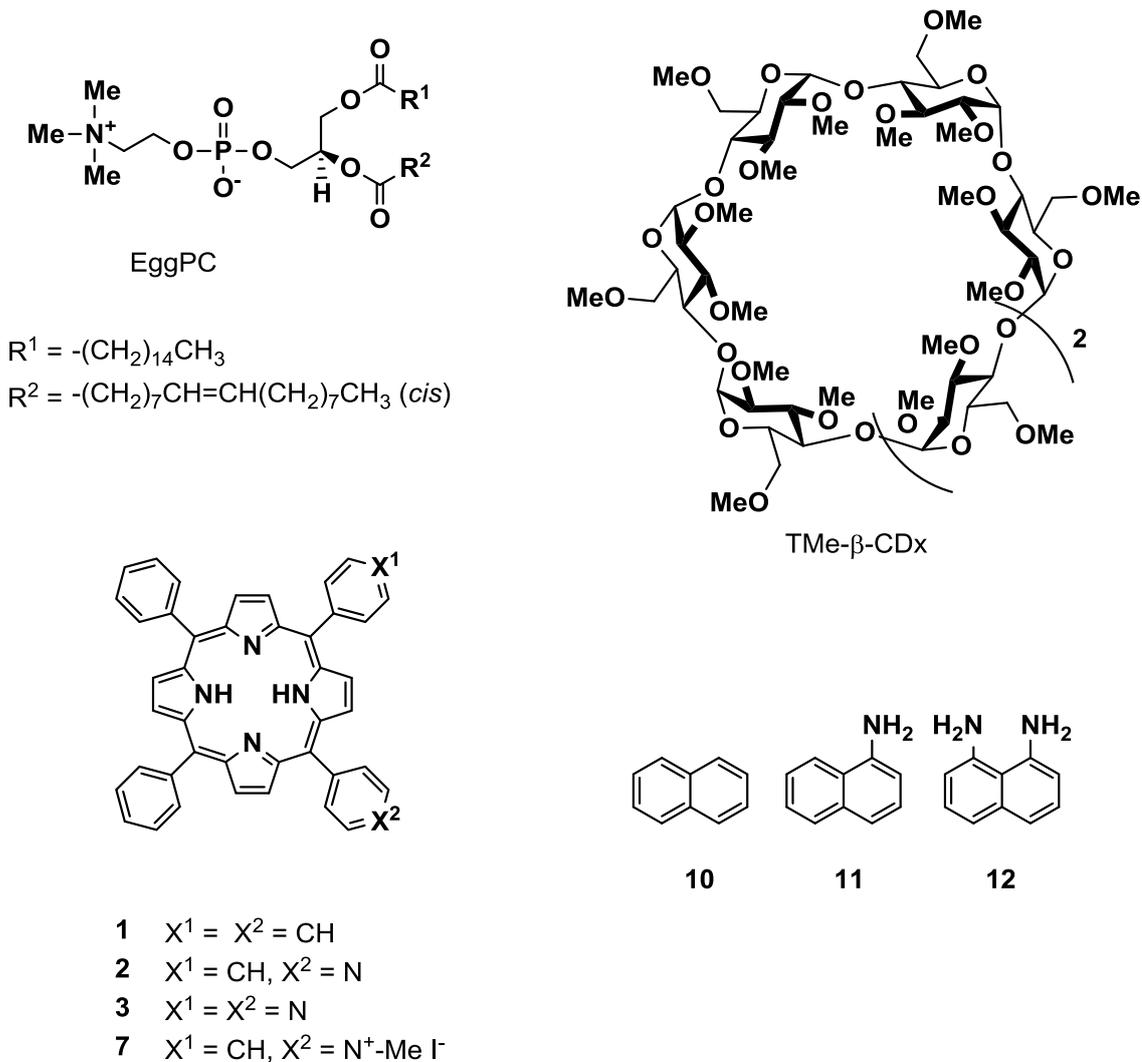


図 4-1. ポルフィリン、ナフタレン、トリメチル-β-シクロデキストリン、EggPC の構造

4-2 実験

4-2-1 卵黄フォスファチジルコリン (EggPC) リポソームの調製

50 mM の卵黄フォスファチジルコリン (EggPC) クロロホルムストック溶液 0.2 mL をバイアル瓶内で、窒素を吹き付けて瓶の壁面に薄膜を形成した。ここに 2.0 mL の重水を加え、ボルテックスミキサーを用いて水和した。50°C の湯浴と液体窒素を用いて凍結融解を 5 回繰り返す、50 nm の Avestin フィルターに 21 回通し、粒径を整えた単層リポソームを調製した。このときの EggPC の濃度を 5.0 mM とした。リポソームの粒径は DLS 測定の結果、約 80 nm であった。

4-2-2 1, 2, 3 および 7-TMe-β-CDx 錯体の調製

化合物 **1, 2, 3** および **7** (5.0, 1.8, 1.9, 6.9 mg / 8.1, 3.0, 3.0, 9.0 × 10⁻⁶ mol) と TMe-β-CDx (23.2, 8.6, 8.6, 25.8 mg / 16.3, 6.0, 6.0, 18.0 × 10⁻⁶ mol) を高速振動粉碎法 (30 Hz, 20 min) で混合した。この混合物に重水 1.5 mL を加えて、抽出した。不溶なポルフィリンを遠心分離 (1,400 rpm, 20 min) により沈降させ、得られた上澄みを分取した。TMe-β-CDx 錯体中の **1, 2, 3, 7** の濃度を 416, 416, 416, 418 nm の吸光度でそれぞれ決定した。**1, 2, 3, 7**-TMe-β-CDx 錯体のモル吸光度係数はそれぞれ ε₄₁₆=3.30 × 10⁵ M⁻¹cm⁻¹, ε₄₁₆=1.87 × 10⁵, ε₄₁₆=3.45 × 10⁵, ε₄₁₈=2.33 × 10⁵ M⁻¹cm⁻¹ と求められた。このモル吸光係数を用いると、溶液中の濃度はそれぞれ [1-TMe-β-CDx] = 3.1 mM, [2-TMe-β-CDx] = 0.9 mM, [3-TMe-β-CDx] = 1.2 mM, [7-TMe-β-CDx] = 0.7 mM であることがわかったので、それぞれを 0.25 mM になるように蒸留水で希釈した。なお、化合物 **2, 3** および **7** は先に報告した手順で合成を行った^{8,9}。

4-2-3 LMI1, 2, 3 および 7 の調製 (ポルフィリン交換反応)

LMI1, 2, 3 および 7 はリポソームと **1, 2, 3, 7**-TMe-β-CDx 錯体を 35°C で交換反応させることにより、調製した⁷。最終濃度はそれぞれ、[**1, 2, 3, 7**] = 0.125 mM, [eggPC] = 2.50 mM, [**1, 2, 3, 7**] / [eggPC] = 5 mol% となるように調整した。

4-2-4 LMI10-12 の調製 (事前混合法)

EggPC (38.5 mg, 5.00 × 10⁻⁵ mol) をクロロホルム 1.0 mL に溶かして、50 mM の EggPC クロロホルム溶液を用意した。一方、**10-12** (3.2, 3.6, 4.0 mg / 8.1, 7.5, 2.5 × 10⁻⁵ mol) を 1.0 mL のクロロホルムに溶かして、それぞれ 25 mM のクロロホルム溶液を得た。

50 mM EggPC クロロホルム溶液 1.0 mL と 25 mM の **10-12** のクロロホルム溶液 1.0 mL をバイアル瓶に入れ混合して、窒素を吹きかけることでクロロホルムを蒸発させ、瓶の壁面に脂質薄膜を形成した。ここに重水 1.0 mL を加えボルテックミキサーを用いて水和した。50°C の湯浴と液体窒素を用いて凍結融解を 8 回繰り返し、50 nm の Avestin フィルターに通すことで粒径を整えた単層リポソームの調製を行った。調製したナフタレン分子含有リポソームの濃度は、[EggPC] = 50 mM, [ナフタレン分子] = 25 mM であり、リポソームに対するナフタレン分子の濃度が 50 mol% となるように調製した。

4-3 結果と考察

4-3-1 ポルフィリン含有リポソーム形成の確認

ポルフィリン-TMe-β-CDx 錯体の ¹H-NMR スペクトルを図 4-2 に示す。**2, 3, 7**-TMe-β-CDx 錯体の ¹H-NMR スペクトルパターンは、[**1**] : [TMe-β-CDx] = 1:2 の錯体と同じく、7.8 ppm 付近のポルフィリン由来のピークと 5.0 ppm 付近の TMe-β-CDx 錯体由来のピークの積分比が 1:2 であったことから⁷、これらの錯体は全て [ポルフィリン] : [TMe-β-CDx] = 1:2 の比で存在していることが分かった¹⁰⁻¹²。

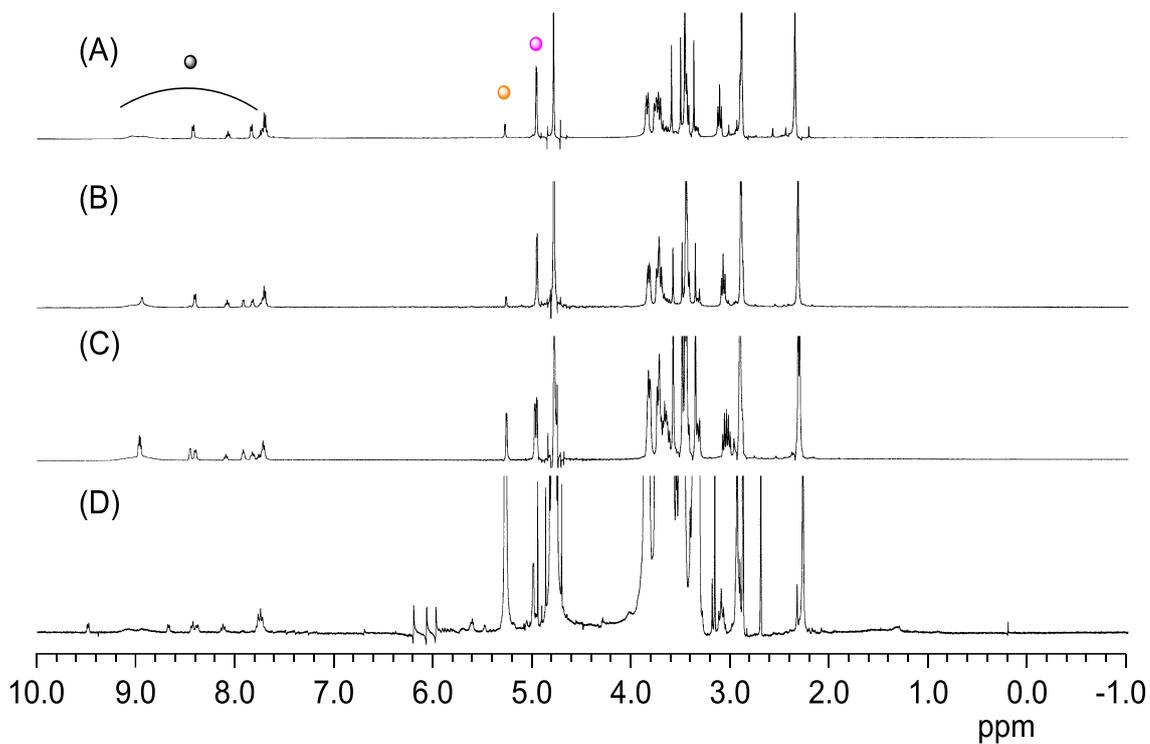


図 4-2. ポルフィリン-TMe- β -CD_x 錯体の ¹H-NMR スペクトル (400MHz, D₂O, 22°C)
 (A) **1**, (B) **2**, (C) **3**, (D) **7**-TMe- β -CD_x
 (●: TMe- β -CD_x 錯体, ○: TMe- β -CD_x, ○: ポルフィリン)

次に **1**, **2**, **3**, **7**-TMe- β -CD_x の錯体とリボソームを混合した際の ¹H-NMR スペクトルを図 4-3.に示す。

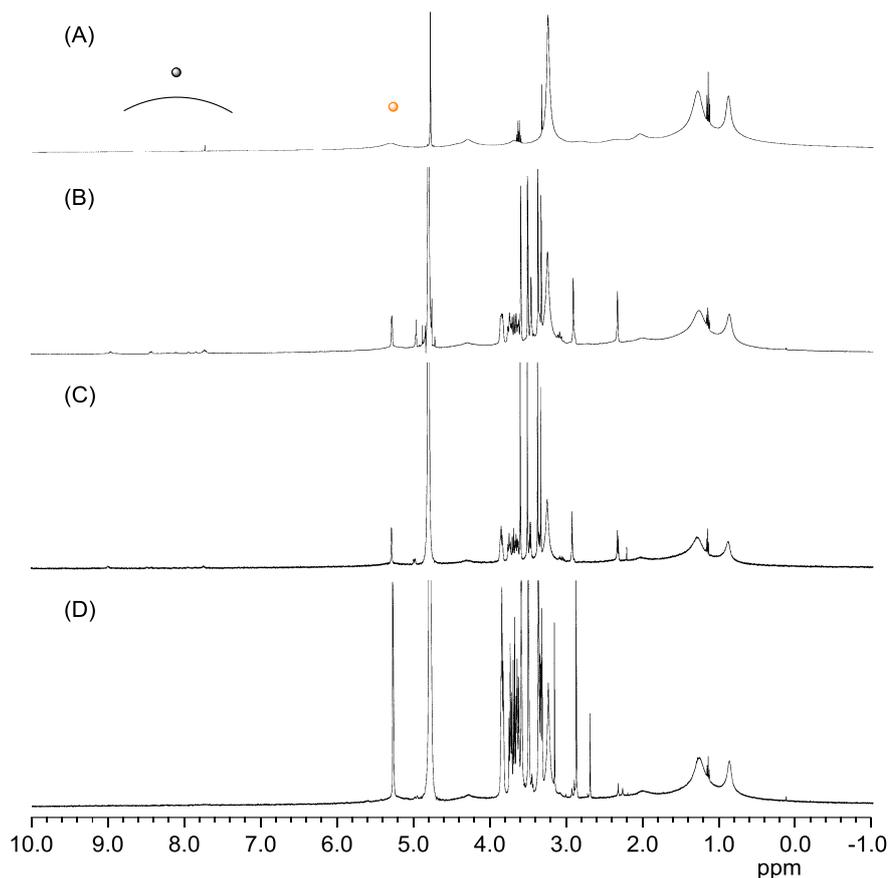


図 4-3. LMI1, 2, 3, 7 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

(A) LMI1, (B) LMI2, (C) LMI3, (D) LMI7

(\circ : TMe- β -CDx, \bullet : ポルフィリン)

図 4-2.で見られた 7.8~9.1ppm 付近のポルフィリン-CDx 錯体中のポルフィリン由来のピーク強度は、図 4-3.に示すように、**1, 2, 3, 7** 全てのリポソーム溶液中で減少した。この減少は、リポソームの中に導入されたポルフィリンの分子の運動性が低下し、シグナルがブロード化することによって消失したことによる。このことから、多くのポルフィリンが TMe- β -CDx から外れ、リポソーム内に導入されたことが示唆された。一方で、**1, 2, 3-TMe- β -CDx** については 7.8~9.1ppm 付近のピークが完全に消失していないことから、一部のポルフィリンが、ポルフィリン-CDx の錯体のまま存在していることも分かる。これは、混合後のインキュベーション時間が十分ではなかったため、ポルフィリンがシクロデキストリンから完全に脂質膜へ移動できなかったためと考える。さらに、ポルフィリン **1, 2, 3, 7** の殆どは脂質膜へ移動するが、脂質膜へ移動しなかったポルフィリン化合物は沈降した。

4-3-2 ナフタレン化合物含有リポソーム形成の確認

次に、ポルフィリン-リポソーム間の相互作用と、極性を持つゲスト分子-リポソーム間の

相互作用を比較することを目的として、ナフタレン化合物を含有させた LMI10-12 を調製した。LMI10-12 は、脂質と 10-12 をクロロホルム中で溶解、混合させる事前混合法により調製し、濃度調製、抽出は水で行った¹³⁻¹⁶。ナフタレン化合物とリポソームを混合した際の ¹H-NMR スペクトルを図 4-4. に示す。

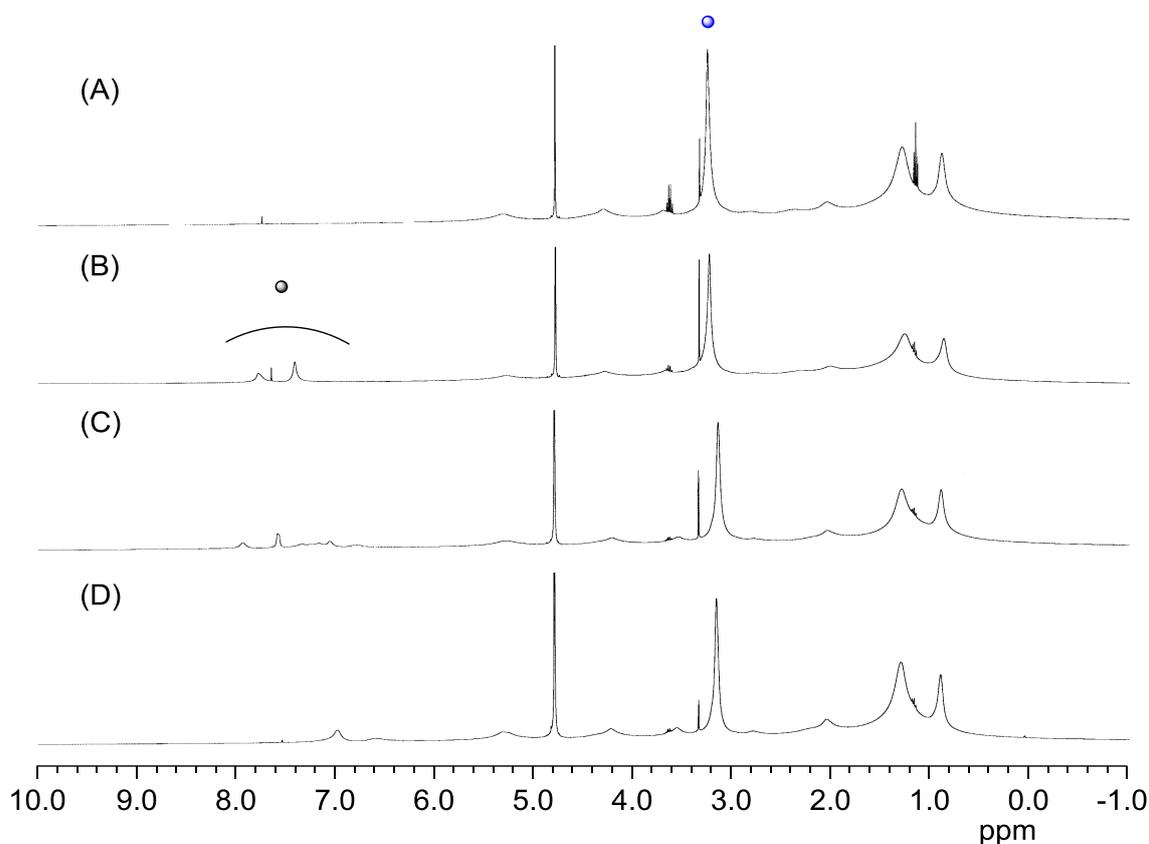


図 4-4. リポソームと LMI10-12 の ¹H-NMR スペクトル
 (A) リポソーム (B) LMI10, (C) LMI11, (D) LMI12
 (●: リポソーム中のコリン, ○: ナフタレン化合物)

3.3 ppm 付近に見えるリポソームのコリン由来のピークが、ナフタレン化合物と混合することでシフトしたことから、ナフタレン化合物がリポソーム内に導入されたことを確認した。

4-3-3 LMI1 のインキュベート時間の変化による安定性評価

ポルフィリン **1** がリポソーム内に取り込まれた際に脂質分子のピークにおよぼす影響を調べるため、リポソームへの 1-TMe-β-CDx の錯体の導入前後のケミカルシフトの変化と、導入後の経時変化について検討した。図 4-5. に示すように、EggPC 中のアルキル鎖のメチ

レン（赤丸）とメチル（青丸）は LMI1 を形成することにより、高磁場側へシフトした。

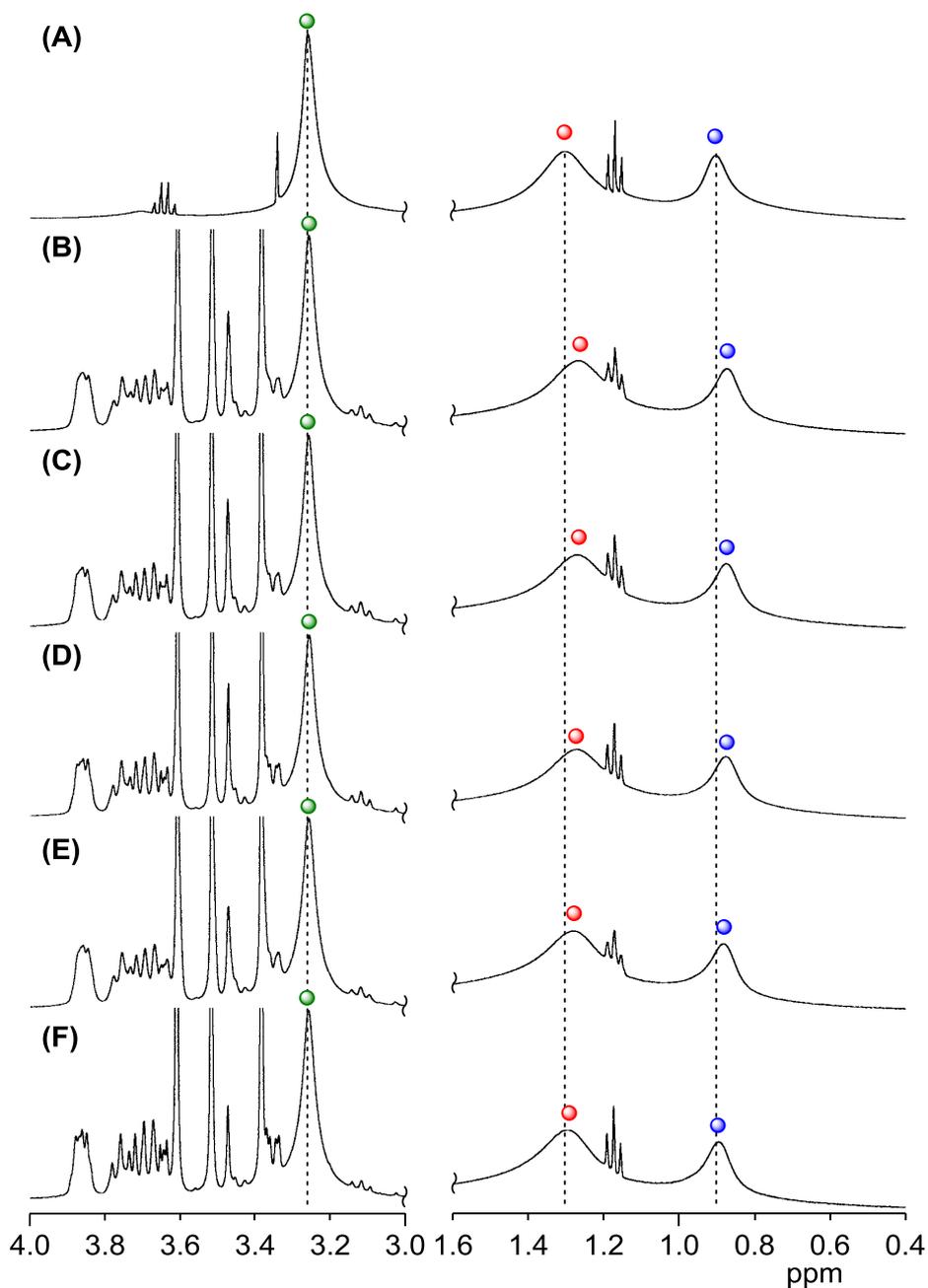
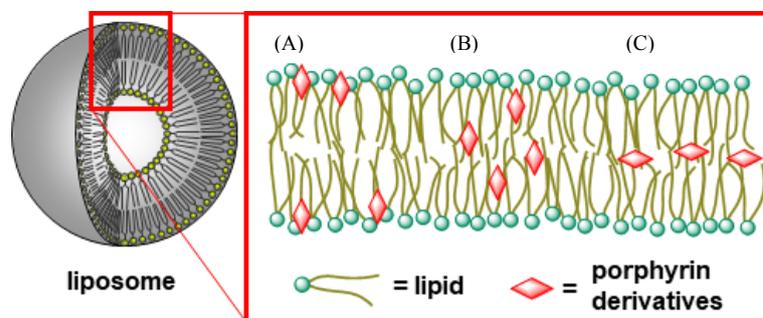


図 4-5. LMI1 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (400MHz, D_2O , 22°C)

(A) CDx 錯体混合前, CDx 錯体混合後 (B) 5, (C) 15, (D) 30, (E) 60, (F) 90 分後
 ([I] = 0.125 mM, [TMe- β -CDx] = 0.4 mM, [eggPC] = 2.5 mM).

(●): $-\text{N}^+\text{CH}_3$, (●): $-\text{CH}_2-$ in alkyl chains, (●): $-\text{CH}_3$ in alkyl chains of eggPC)

リポソームのアルキル鎖のメチレンやメチルが高磁場シフトしたことは、スキーム 4-1. の(B) および (C)に示すようにアルキル鎖の近くに **1** が存在していることを示している。



スキーム 4-1. 脂質膜内でのポルフィリンの位置

また、図 4-6.に、TMe- β -CDx 導入前後のリポソームの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。リポソームのプロトンのケミカルシフトの変化がないことから、TMe- β -CDx 単体ではリポソームに影響を及ぼさないことが確認できた。

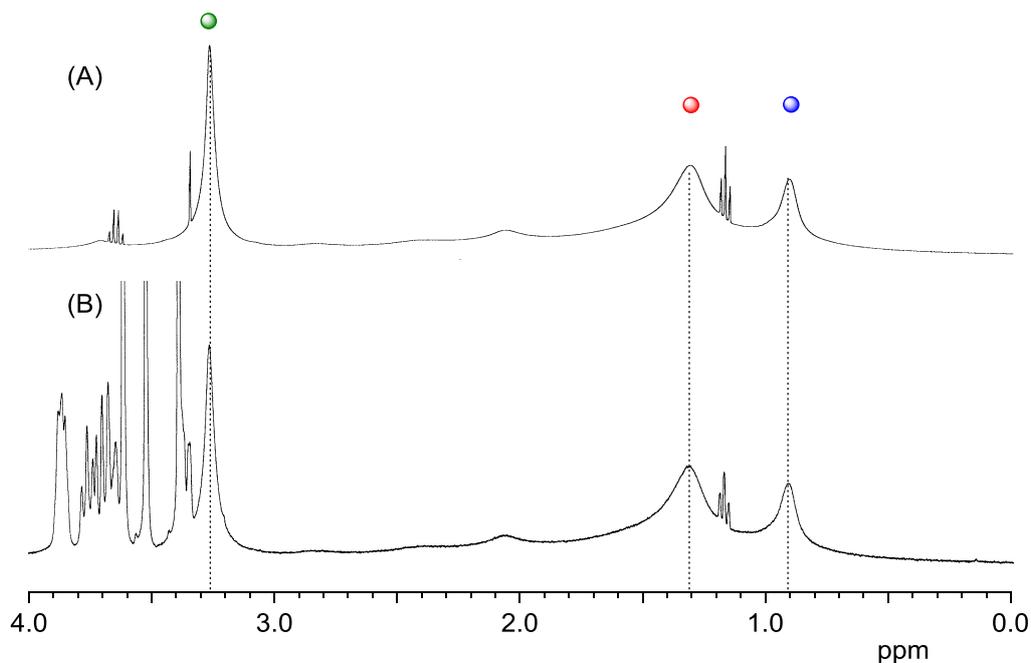


図 4-6. TMe- β -CDx 導入前後のリポソームの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル
 (A) 導入前, (B) 導入後 [TMe- β -CDx] = 1.0 mM, [eggPC] = 5.0 mM
 (●: $-\text{N}^+\text{CH}_3$, ●: $-\text{CH}_2-$ in alkyl chains, ●: $-\text{CH}_3$ in alkyl chains of eggPC)

次に、インキュベート時間がケミカルシフトの差に及ぼす影響について図 4-7.に示す。ケミカルシフトの差はインキュベート時間が増加するほど、減少していることが分かった。

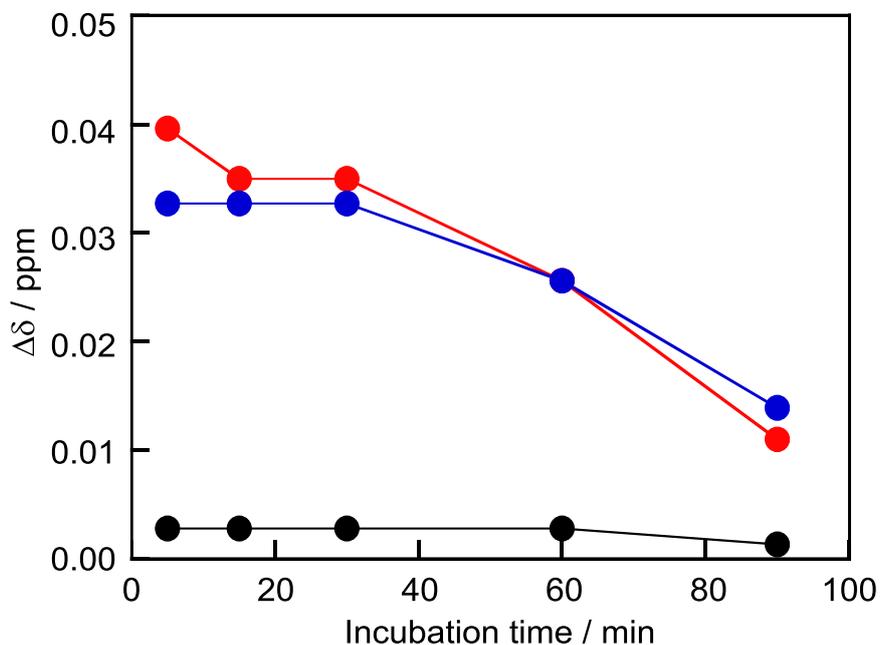


図 4-7. インキュベート時間とケミカルシフトの差の関係 (●: -N⁺CH₃, ●: -CH₂- in alkyl chains, ●: -CH₃ in alkyl chains of eggPC).

さらに、図 4-8.に 1-TMe-β-CDx 錯体とリポソームのインキュベート時間を変化させた場合の UV-vis 吸収スペクトル測定結果を示す。1-TMe-β-CDx 錯体とリポソームの混合から 60 分経過すると、目視によって沈殿が生じ始めていることを確認した。さらに、LMI1 の 418nm の吸収はインキュベート時間が長くなるほど、減少することが分かった。

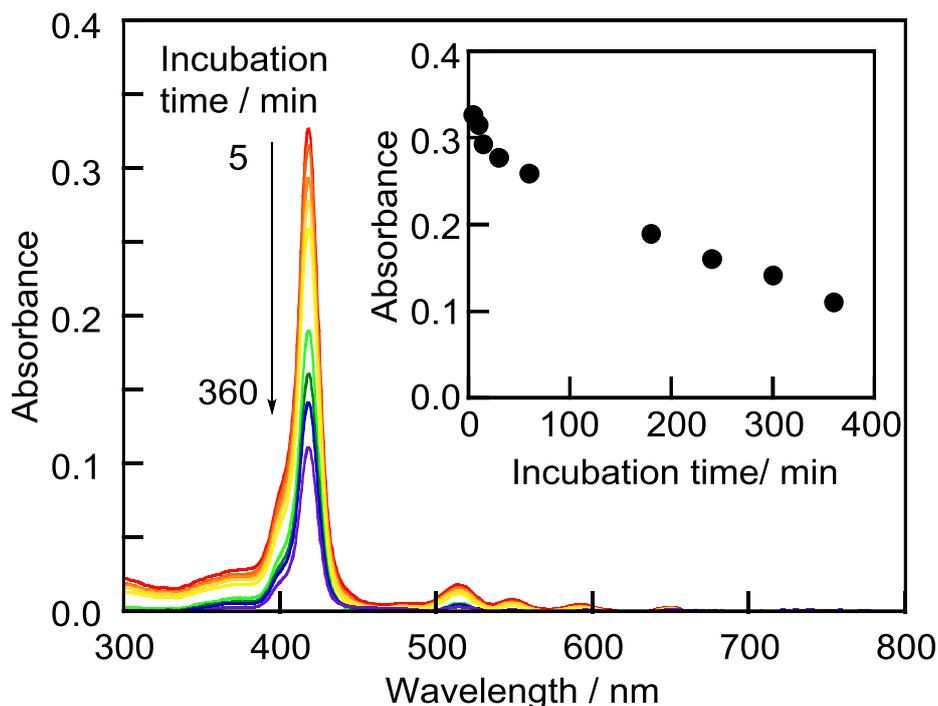


図 4-8. LMI1 の UV-vis 吸収スペクトル
 ([**1**] = 12.5 μ M, [TMe- β -CDx] = 40 μ M, [eggPC] = 250 μ M)

目視でも沈降の様子が確認できたことから、インキュベーション時間が 60 分以降は、**1** がリポソームの膜中から外れていることが予測できる。また、図 4-8. に示すように、420 nm 付近の Soret 帯ならびに 500~620 nm の Q 帯の吸収が減少したことから、**1** が二つの TMe- β -CDx と再び錯形成し、水溶化したのではなく、沈降したことが分かった。さらに、図 4-8. でスペクトルのブロード化が確認できなかったことから、**1** がリポソーム膜中で会合していないことも分かった。したがって、この沈殿化には、(i) ポルフィリンが膜中で自己会合すると直ちに膜外に放出され沈殿している、もしくは (ii) ポルフィリンの自己会合がリポソームを不安定化し、リポソームとともに沈殿となっている、という二つの仮説が立てられた。

4-3-4 LMI1 中の沈殿物の確認

前節のように、ポルフィリン誘導体の沈殿が **1** 単体であるか、LMI1 の状態であるかを確認するため、 $^1\text{H-NMR}$ 測定を行った。図 4-9. (A) は、**1**-TMe- β -CDx 錯体とリポソームの混合溶液の $^1\text{H-NMR}$ 測定結果を、図 4-9. (B) は、**1**-TMe- β -CDx 錯体とリポソームを混合し、24 時間インキュベーション後、生じた沈殿を重クロロホルムに溶解させた溶液の $^1\text{H-NMR}$ 測定結果を示す。

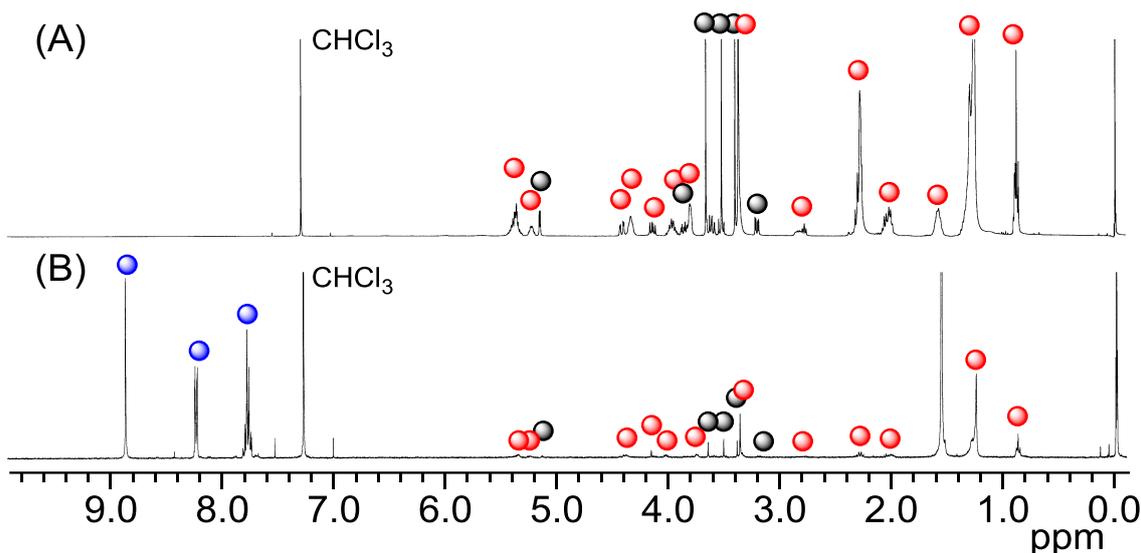


図 4-9. LMI1 の $^1\text{H-NMR}$ 測定 (400 MHz, CDCl_3 , 24 °C)

(A) LMI1, (B) 24 時間インキュベート後に生じた沈殿物

([**1**] = 0.5 mM, [TMe- β -CDx] = 1.6 mM, [eggPC] = 10.0 mM). (○: TMe- β -CDx, ●: eggPC, ◆: **1**)

測定サンプルは遠心分離により分取した沈殿物を乾燥後、重クロロホルムに再溶解し、調製した。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル結果から、**1**-TMe- β -CDx 錯体とリポソームの混合物から沈殿を取り除いた溶液中には **1** は含まれておらず脂質分子と TMe- β -CDx のみからなることがわかった。一方、沈殿物には **1** が多く含まれており、脂質分子と TMe- β -CDx は少量であることがわかった。そのモル比を、ピークの積分値から計算すると、

[**1**]: [EggPC]: [TMe- β -CDx]=1.00:0.35:0.02 (mol:mol:mol) となった。この結果から、仮説 (i) のように脂質膜中に存在した **1** は自己会合した後、リポソーム膜中から外れ、単独で沈殿したことがわかった。

4-3-5 ポルフィリン化合物のメソ位の置換基が及ぼす影響

ポルフィリン化合物のメソ位の置換基がリポソーム膜中の位置決定にどのように影響するかを解明することを目的として、脂質とシクロデキストリン錯体の交換反応を用いて、LMI2, **3**, **7** を調製した。初めに、動的光散乱 (DLS) 測定により流体力学直径 (D_{hy}) を調べた。交換反応により調製した LMI1, **2**, **3**, **7** の D_{hy} 平均値は 60-85nm であった。(表 4-1.)

表 4-1. リポソームおよびポルフィリン含有リポソームの平均粒径 D_{hy} (nm)

Liposomes	Average D_{hy} / nm	PDI ^a
Liposome (EggPC)	77	0.062
LMI1	63	0.167
LMI2	77	0.076
LMI3	66	0.075
LMI7	81	0.094

^aPDI: Polydispersity index.

2, 3 および 7 の D_{hy} 平均値は、交換反応前の EggPC や LMI1 に近い値になった。これらの結果から、脂質膜中で 2, 3, 7 のような非対称な構造を持つポルフィリンであっても、導入後にリポソームの径に大きく影響を及ぼさないことが分かった。また、ポルフィリン 2, 3 および 7 は、一つないし二つのピリジル基またはピリジニウム基を有し、メソ位に極性基を持つ。そこで、LMI2, 3, および 7 の UV-vis 吸収スペクトル測定を行い、ゲスト分子に導入された種々の極性基の違いが LMIPors の安定性に与える影響を調べた。

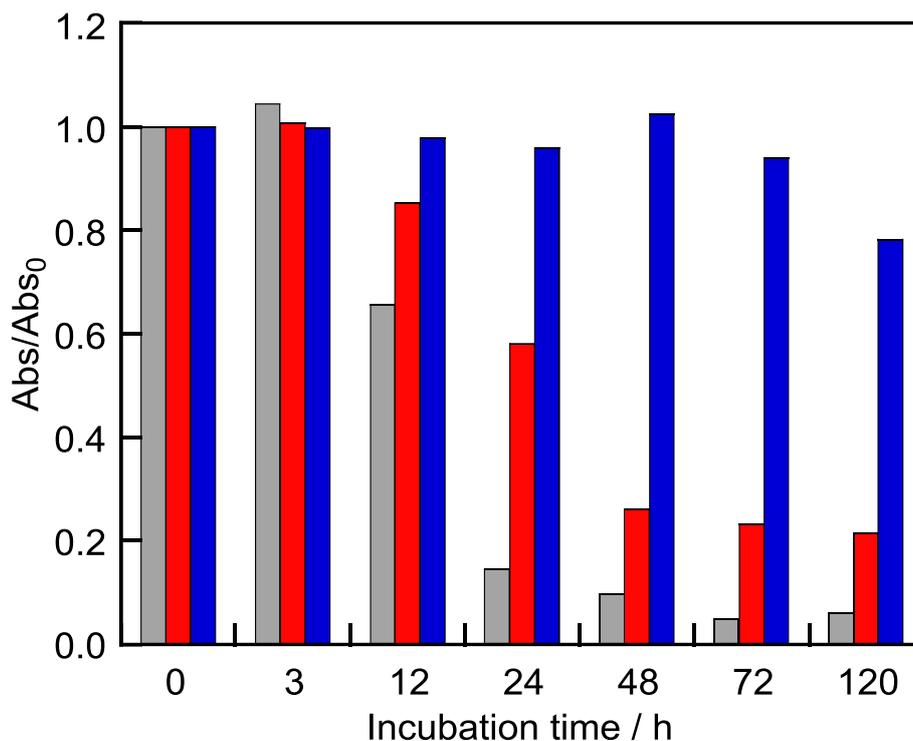


図 4-10. インキュベーション時間と λ_{max} での吸収の相関
LMI2 (灰), LMI3 (赤), LMI7 (青)
LMI2, LMI3, and LMI7. ([2, 3, 7] = 25 μ M, [eggPC] = 500 μ M)

図 4-10.に示すように、LMI2 と LMI3 の吸収は LMI1 と同様にインキュベート時間が長くなるにつれ急速に減少したが、LMI7 の 418 nm での吸収は、インキュベート時間の変化による大きな変化は見られなかった。これは LMI7 の水溶液が LMI2 や LMI3 に比べ、より安定していることを示している。

次に、リポソーム中でのポルフィリンの位置を決定することを目的として、LMI1, 2, 3, 7 の $^1\text{H-NMR}$ 測定を行った。図 4-11.と図 4-12.に示すように、 N^+CH_3 基のメチル (\bullet 、 $\Delta\delta_A$)、EggPC のアルキル鎖のメチレン (\circ 、 $\Delta\delta_B$)、EggPC のアルキル鎖の末端メチル (\circ 、 $\Delta\delta_C$)、の高磁場シフトが 1, 2, 3, 7 で観測された。

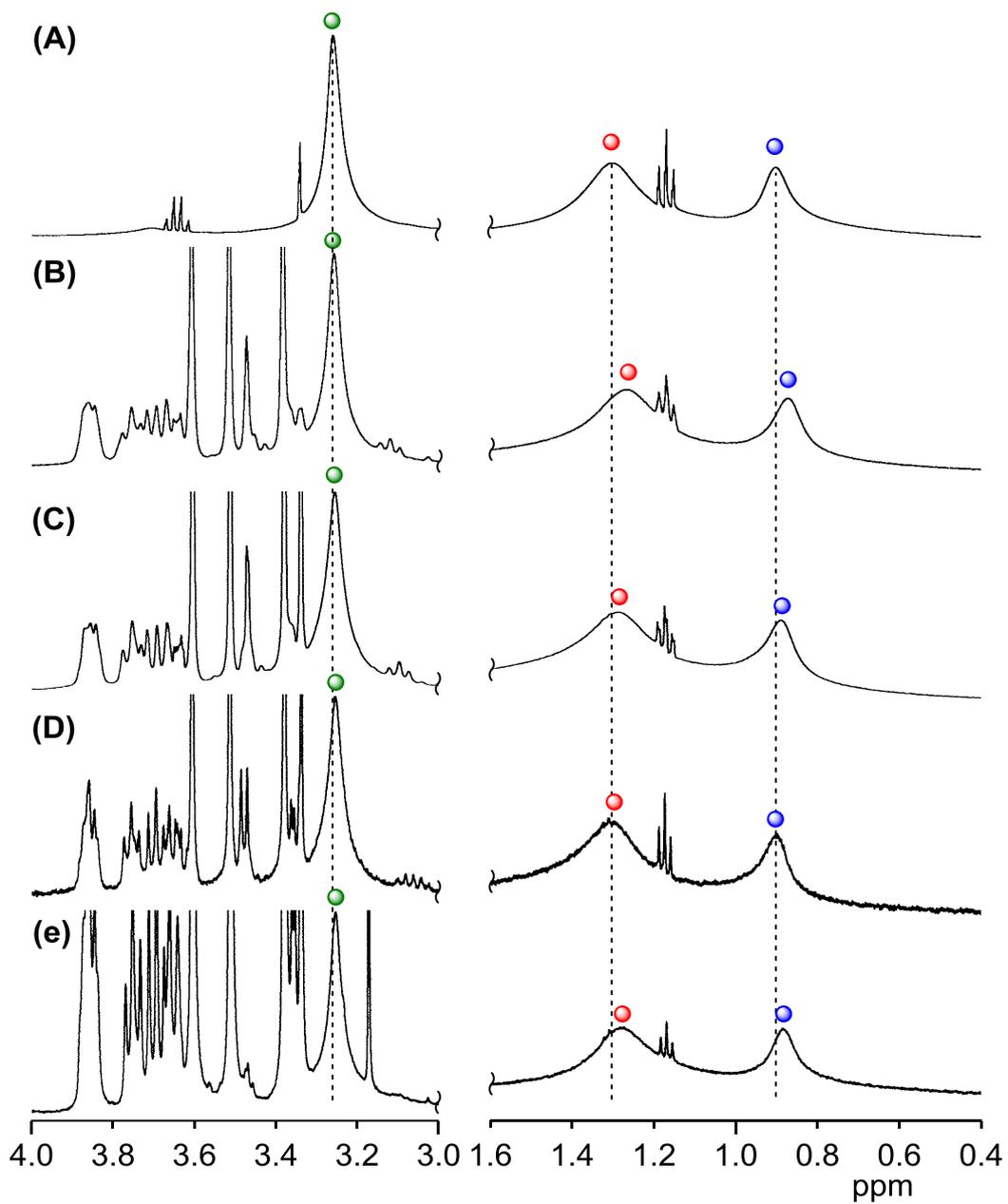


図 4-11. リポソームと LMI1, 2, 3, 7 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (拡大図)

(A) リポソーム, (B) LMI1, (C) LMI2 (D) LMI3 (E) LMI7

(\bullet): $-\text{N}^+\text{CH}_3$, (\bullet): $-\text{CH}_2-$ in alkyl chains, (\bullet): $-\text{CH}_3$ in alkyl chains of eggPC)

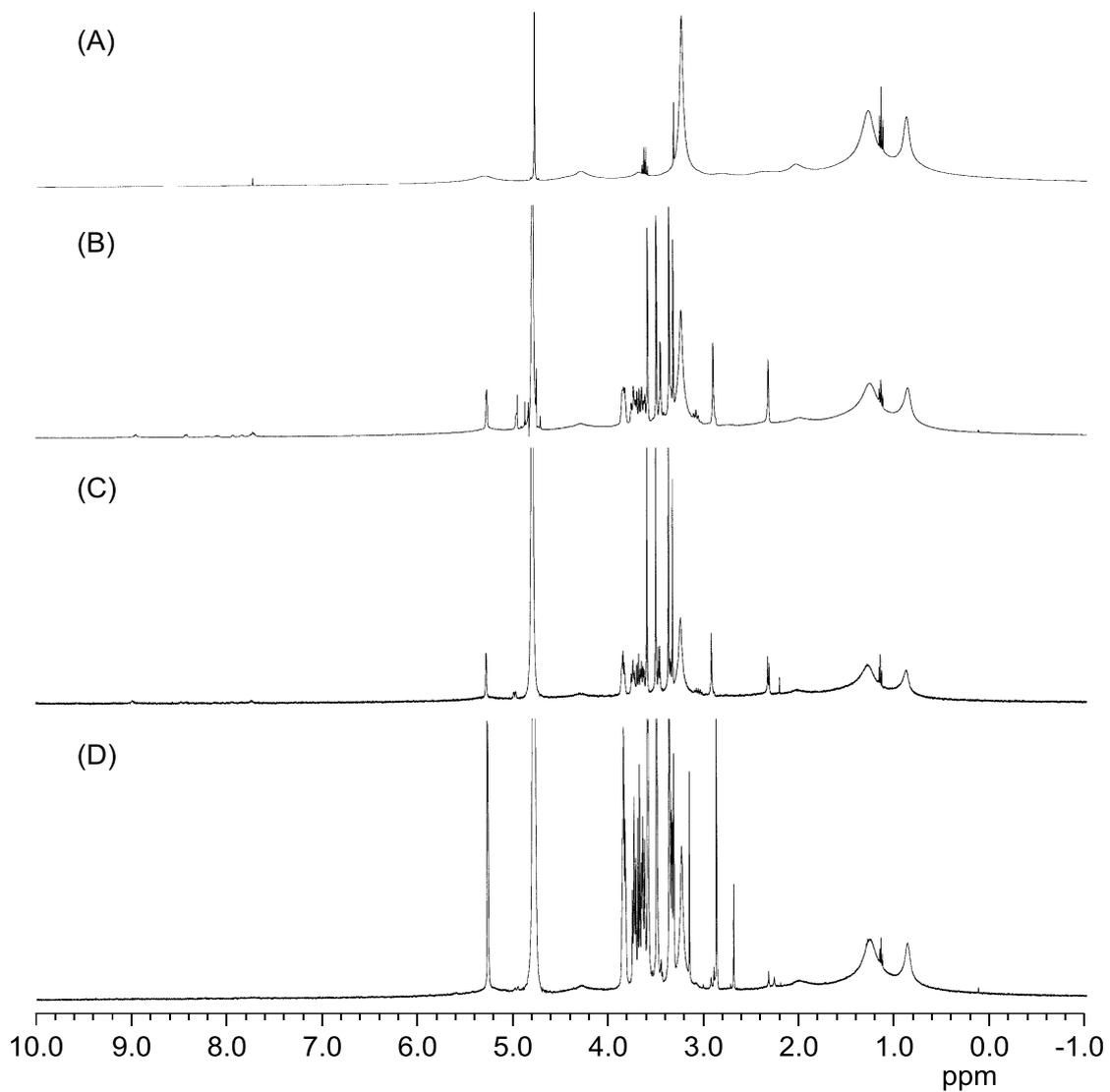


図 4-12. LMI1, 2, 3, 7 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (全体図)
 (A) LMI1, (B) LMI2 (C) LMI3 (D) LMI7

図 4-11, 12, 13, および 14 の $^1\text{H-NMR}$ 測定から得られたシフト値の変化を表 4-2 にまとめた。

表 4-2. ゲスト分子導入によるリポソームのケミカルシフトの変化

LMI	$\Delta\delta_A$ (N^+CH_3)	$\Delta\delta_B$ ($-CH_2-$) ^b	$\Delta\delta_C$ ($-CH_3$) ^b	$\Delta\delta_A/\Delta\delta_B$	$\Delta\delta_B/\Delta\delta_C$
LMI1 ^a	0.003	0.040	0.033	0.08	1.21
LMI2	0.002	0.025	0.017	0.08	1.47
LMI3	0.003	0.007	0.007	0.43	1.00
LMI7	0.006	0.019	0.017	0.32	1.12
LMI10	0.028	0.048	0.038	0.58	1.26
LMI11	0.120	0.025	0.019	4.80	1.32
LMI12	0.110	0.017	0.013	6.47	1.31

^aThe solution was measured within 5 min of mixing because the LMI9 solution is unstable.

^bThe methylene and methyl protons are in the alkyl chains of eggPC.

LMI1, 2, 3, および 7 のケミカルシフトの変化の大きさについては、ポルフィリンそれぞれのリポソーム内での含有量が異なり、脂質分子に及ぼすポルフィリンの環電流の影響に違いがあるため、直接的な比較をすることができない。そこで、LMI1, 2, 3, 7 の $\Delta\delta_A/\Delta\delta_B$ と $\Delta\delta_B/\Delta\delta_C$ の値を比較した。 $\Delta\delta_A/\Delta\delta_B$ と $\Delta\delta_B/\Delta\delta_C$ の値が大きくなればなるほど、ポルフィリンはリポソーム表面近くにいることが分かる (スキーム 4-1.(A))。これとは逆に、 $\Delta\delta_B/\Delta\delta_C$ の値が小さくなるほど、ポルフィリンは脂質膜の中心に位置することが分かる (スキーム 4-1.(C))。

LMI1 と LMI2 を比較すると LMI2 の $\Delta\delta_A/\Delta\delta_B$ 値は 0.08 であり、LMI1 の $\Delta\delta_A/\Delta\delta_B$ 値と同じ値となった (表 4-2)。この結果は、2 がピリジル基を有しているにもかかわらず、脂質膜の中心部に存在していることを示している (スキーム 4-1.(B)と(C))。つまり、極性基として一つのピリジル基が存在するだけでは、リポソーム表面近くにポルフィリンを集めることができないことを示す。これに対して、二つのピリジル基を持つ 3 やピリジニウム基を持つ 7 は、2 に比べより極性の高いポルフィリンである。その $\Delta\delta_A/\Delta\delta_B$ 値は LMI4 に対して 0.43 および LMI7 に対して 0.32 となり、LMI2 に対する 0.08 に比べ高いことから、3 と 7 はリポソーム表面に位置することが示唆された。(スキーム 4-1.(A))

次に $\Delta\delta_B/\Delta\delta_C$ の値を比較すると、LMI2 の $\Delta\delta_B/\Delta\delta_C$ 値は LMI1 の $\Delta\delta_B/\Delta\delta_C$ 値に比べ、ずっと高かった (表 4-2)。これは、2 がリポソームのアルキル鎖の末端メチルではなく、むしろメチレン鎖付近に近接していることを示している (スキーム 4-1.(C))。この結果は、2 が持つピリジル基の極性の影響で、1 に比べより膜表面近傍に存在するものと考えられる。

4-3-6 リポソーム内でのナフタレン分子の位置の決定

ポルフィリン誘導体との比較のため、リポソームに極性を持つナフタレン誘導体 (10-12) を導入した際の $^1\text{H-NMR}$ 測定を行った。ケミカルシフトの変化を図 4-14, 4-15., および表 4-2. に示す。

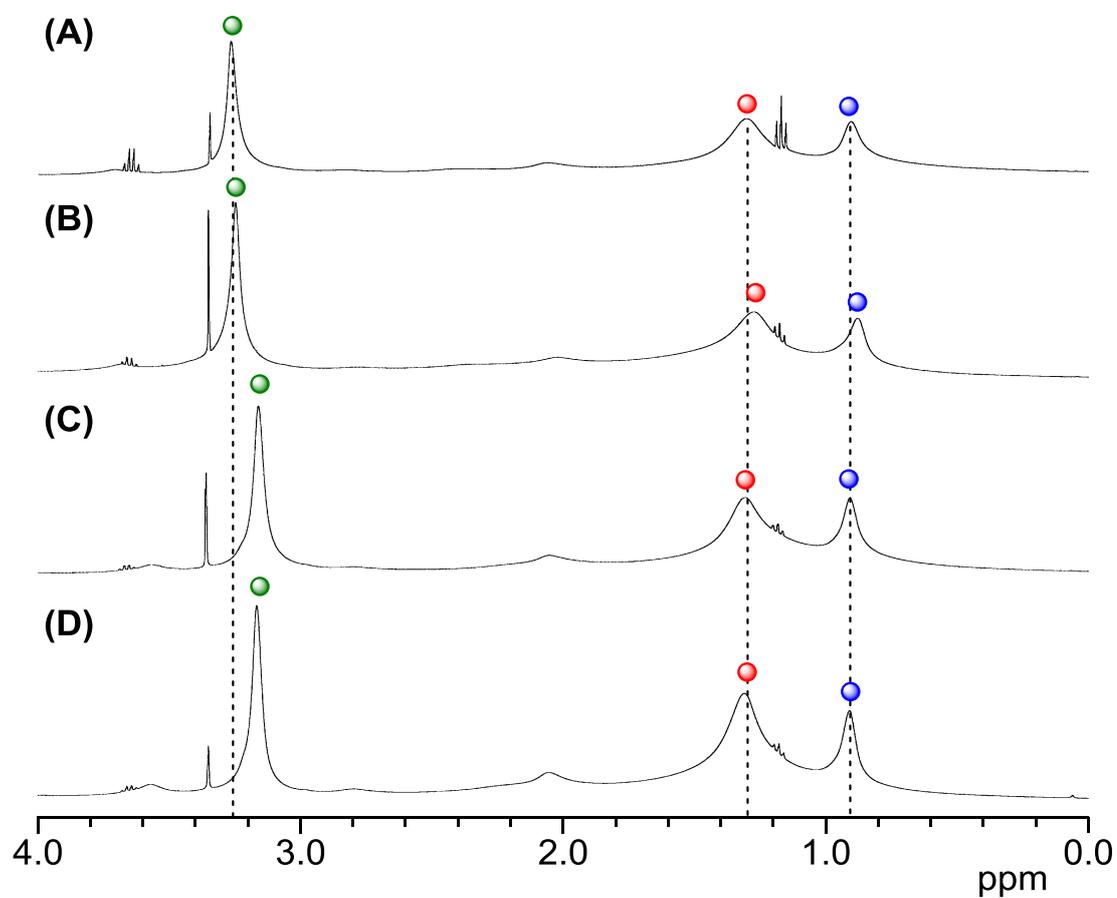


図 4-13. リポソームと LMI10-12 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (拡大図)
(A) リポソーム (B) LMI10, (C) LMI11, (D) LMI12
(\bullet : $-\text{N}^+\text{CH}_3$, \bullet : $-\text{CH}_2-$ in alkyl chains, \bullet : $-\text{CH}_3$ in alkyl chains of eggPC)

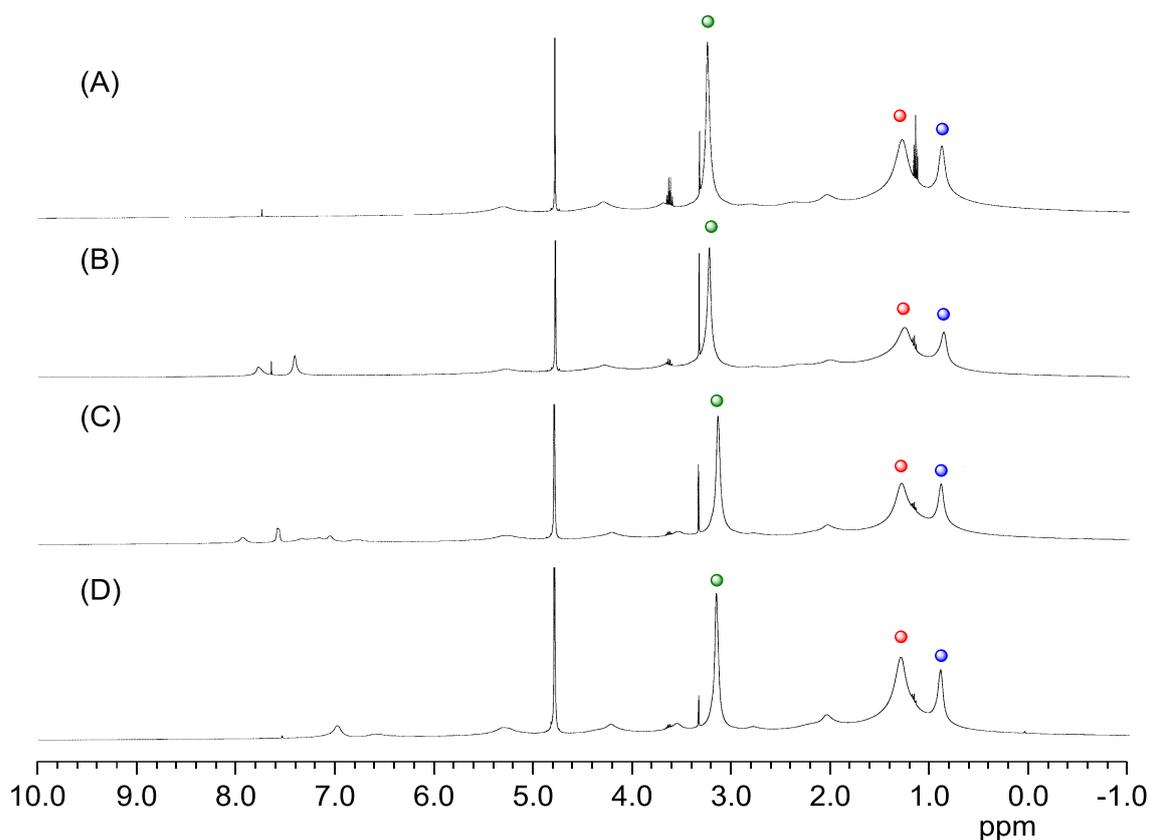
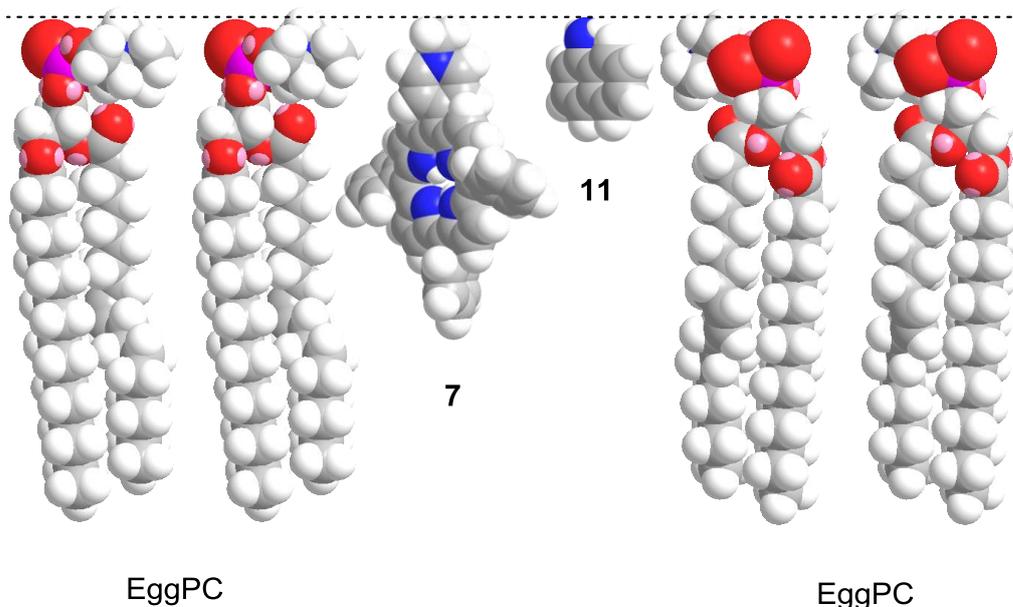


図 4-14. リポソームと LMI10-12 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (全体図)

(A) リポソーム (B) LMI10, (C) LMI11, (D) LMI12

(\bullet : $-\text{N}^+\text{CH}_3$, \circ : $-\text{CH}_2-$ in alkyl chains, and \circ : $-\text{CH}_3$ in alkyl chains of eggPC)

LMI10 の $\Delta\delta_A / \Delta\delta_B$ の値は 0.58 であり、LMI11 や LMI12 のそれぞれ 4.80 と 6.47 の値に比べ小さいことから、**10** は脂質膜中の中心部近くに存在し、一方 **11** や **12** はリポソームの表面近くに存在することが明確に示された (表 4-2)。このように、疎水性のゲスト分子はリポソームの内部に存在し、極性基を有するゲスト分子はリポソーム表面に存在するという結果は、すでに Okamura ら²により報告されている結果と一致した。一方、LMI11 と LMI12 の $\Delta\delta_A / \Delta\delta_B$ 値はそれぞれ 4.80 と 6.47 になり、先の LMIPors の $\Delta\delta_A / \Delta\delta_B$ 値 (0.08-0.43) に比べ、かなり大きな値となった。これらの結果は以下のように説明できる。スキーム 4-2 に示すように、サイズが小さいゲスト分子である **11** がリポソームの表面に位置し、EggPC 脂質の N^+CH_3 のメチルプロトンのみが、ナフタレンの環電流の影響を受けていると考えられる。これとは対照的に、**7** のようなポルフィリン環の環電流は、 N^+CH_3 のメチルプロトンだけでなく、EggPC 中のアルキル鎖のメチレンプロトンにも作用することが予測できる。したがって、LMI11 や LMI12 では $\Delta\delta_A$ のみが大きく変化し、 $\Delta\delta_B$ があまり変化しないため $\Delta\delta_A / \Delta\delta_B$ 値が大きな値をもつものに対して、LMI7 では、 $\Delta\delta_A$ と $\Delta\delta_B$ が両方とも変化するため $\Delta\delta_A / \Delta\delta_B$ 値があまり大きな値にならなかったものと考えられる。



スキーム 4-2. リポソーム中でのゲスト分子のモデル図

4-4 結論

我々は、リポソーム中にポルフィリン誘導体を導入する前後の $^1\text{H-NMR}$ 測定を行い、そのケミカルシフトの変化をもとにリポソーム中でのポルフィリン誘導体の存在位置を決定した。まず、LMI1, 2, 3, 7 の $\Delta\delta_{\text{A}}(\text{N}^+\text{CH}_3)/\Delta\delta_{\text{B}}(\text{アルキル鎖中の}-\text{CH}_2)$ 値をそれぞれ比較することで、脂質膜中のポルフィリン (1, 2, 3, 7) の位置を決定した。LMI1 溶液では低い $\Delta\delta_{\text{A}}/\Delta\delta_{\text{B}}$ 値を示したことから、脂質膜中の中心部にある疎水場にポルフィリン誘導体が存在していることが分かった。LMI2 については、極性基であるピリジル基を有するにもかかわらず、低い $\Delta\delta_{\text{A}}/\Delta\delta_{\text{B}}$ 値を示した。これとは対照的に、LMI3 や LMI7 は高い $\Delta\delta_{\text{A}}/\Delta\delta_{\text{B}}$ 値を示したことから、リポソーム膜表面付近にポルフィリン誘導体が存在していることが分かった。第3章で LMI7 の光線力学活性が LMI2 より高い結果が得られたが、これは LMI7 ではリポソーム膜表面付近にポルフィリン誘導体が存在するため、溶存酸素との接触効率が上がり、高い光線力学活性を示したと考えられる。

一方、極性を持つ他のゲスト分子として、ナフタレン化合物を用いて、同様にリポソーム内での存在位置の決定を行った。ポルフィリン誘導体に比べ、ナフタレン化合物を導入した場合の $\Delta\delta_{\text{A}}/\Delta\delta_{\text{B}}$ 値が高かったことから、 $\Delta\delta_{\text{A}}/\Delta\delta_{\text{B}}$ 値にはゲスト分子の環電流が及ぼす範囲の違いが影響することが分かった。つまり、 $\Delta\delta_{\text{A}}/\Delta\delta_{\text{B}}$ 値はゲスト分子の種類により大きく異なることがわかった。従って、構造の似たゲスト分子間で比較検討する必要があることが示された。また、低い $\Delta\delta_{\text{A}}/\Delta\delta_{\text{B}}$ 値を持つポルフィリンの場合には、 $\Delta\delta_{\text{B}}/\Delta\delta_{\text{C}}$ 値を比較する方が位置決定には有用であることがわかった。実際に、LMI2 の $\Delta\delta_{\text{B}}/\Delta\delta_{\text{C}}$ 値は、わずかに

LMI1 の $\Delta\delta_B/\Delta\delta_C$ 値に比べ大きかったことから、ポルフィリン **2** が **1** に比べ、EggPC のアルキル鎖の末端メチルではなく、メチレン鎖近傍に存在していることがわかった。

このように、 $\Delta\delta_A/\Delta\delta_B$ 値と $\Delta\delta_B/\Delta\delta_C$ 値を比較する手法は、リポソーム中でのポルフィリン誘導体の位置決定を行う際に、大変有効であることが分かった。

4-5 参考文献

- 1 A. Ikeda, K. Kiguchi, T. Shigematsu, K. Nobusawa, J. Kikuchi and M. Akiyama, Location of [60] fullerene incorporation in lipid membranes, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 12095-12097.
- 2 E. Okamura and M. Nakahara, NMR study directly determining drug delivery sites in phospholipid bilayer membranes, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 3505-3509.
- 3 E. Okamura, R. Kakitsubo, and, M. Nakahara, NMR determination of the delivery site of bisphenol A in phospholipid bilayer membranes, *Langmuir*, **1999**, 15, 8332-8335.
- 4 M. Vermathen, P. Vermathen, U. Simonis and P. Bigler, Time-Dependent interactions of the two porphyrinic compounds chlorin e6 and mono-l-aspartyl-chlorin e6 with phospholipid vesicles probed by NMR spectroscopy, *Langmuir*, **2008**, 24, 12521-12533.
- 5 M. Marzorati, P. Bigler and M. Vermathen, Interactions between selected photosensitizers and model membranes: an NMR classification, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **2011**, 1808, 1661.
- 6 N. Weizenmann, D. Huster and H. A. Scheidt, Interaction of local anesthetics with lipid bilayers investigated by ^1H MAS NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **2012**, 1818, 3010-3018.
- 7 A. Ikeda, S. Hino, T. Mae, Y. Tsuchiya, K. Sugikawa, M. Tsukamoto, K. Yasuhara, H. Shigeto, H. Funabashi, A. Kuroda and, M. Akiyama, Porphyrin-uptake in liposomes and living cells using an exchange method with cyclodextrin, *RSC Adv.* **2015**, 5, 105279-105287.
- 8 A. M. Slomp, S. M. W. Barreira, L. Z. B. Carrenho, C. C. Vandresen, I. F. Zattoni, S. M. S. Ló, J. C. C. Dallagnol, D. R. B. Ducatti, A. Orsato, M. E. R. Duarte, M. D. Nosedá, M. F. Otuki and, A. G. Gonçalves, Photodynamic effect of *meso*-(aryl)porphyrins and *meso*-(1-methyl-4-pyridinium)porphyrins on HaCaT keratinocytes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2017**, 27, 156-161.
- 9 R. Kubota, S. Imamura, T. Shimizu, S. Asayama, and H. Kawakami, Synthesis of water-soluble dinuclear mn-porphyrin with multiple antioxidative activities, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, 5, 639-643.
- 10 K. Kano, R. Nishiyabu and, R. Doi, Novel Behavior of *O*-methylated β -cyclodextrins in inclusion of *meso*-tetraarylporphyrins, *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 3667-3673.
- 11 Y. Tsuchiya, T. Shiraki, T. Matsumoto, K. Sugikawa, K. Sada, A. Yamano and, S. Shinkai, Supramolecular dye inclusion single crystals created from 2,3,6-Trimethyl- β -cyclodextrin and porphyrins, *Chem. – Eur. J.*, **2012**, 18, 456-465.

- 12 A. Ikeda, S. Satake, T. Mae, M. Ueda, K. Sugikawa, H. Shigeto, H. Funabashi and, A. Kuroda, Photodynamic activities of porphyrin derivative-cyclodextrin complexes by photoirradiation, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2017**, *8*, 555-559.
- 13 A. Ikeda, S. Hino, K. Ashizawa, K. Sugikawa, J. Kikuchi, M. Tsukamoto, and, K. Yasuhara, Lipid-membrane-incorporated hydrophobic photochromic molecules prepared by the exchange method Using Cyclodextrins, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 6175-6182.
- 14 A. Ikeda, K. Ashizawa, Y. Tsuchiya, M. Ueda, and, K. Sugikawa, Formation of lipid membrane-incorporated small π -molecules bearing hydrophilic groups, *RSC Adv.*, **2016**, *6*, 78505-78513.
- 15 M. Ueda, K. Ashizawa, K. Sugikawa, K. Koumoto, T. Nagasaki, and, A. Ikeda, Lipid-membrane-incorporated arylboronate esters as agents for boron neutron capture therapy, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 1565-1569.
- 16 *Liposomes: A Practical Approach*, 2nd ed., ed. by V. P. Torchilin and W. Weissig, Oxford University Press, Oxford, **2003**.

第5章 結言

本論文では、ポルフィリン誘導体を導入したリポソームの安定性とがん治療法の一つである PDT への適用にも繋がる光線力学活性の評価について報告し、さらにリポソーム中のポルフィリン誘導体の位置決定を $^1\text{H-NMR}$ 測定により行う手法について検討した。

第2章では、リポソームに内包させるポルフィリン誘導体の合成と同定を行った。ポルフィリン誘導体の合成では、置換基の極性、立体障害性を考慮し、各ポルフィリン誘導体に合った合成手順を選び、合成した。合成で得られたポルフィリン誘導体、さらにはシクロデキストリン錯体の構造確認を $^1\text{H-NMR}$ 測定及び X 線構造解析により同定した。

第3章では、2章で合成した極性基を有する非対称構造のポルフィリン誘導体をリポソームへ導入し、導入後も安定した状態を保つことができるポルフィリン誘導体含有リポソーム (LMIPors) を調製した。LMIPors の中でも、三つのフェニル基と一つのピリジルまたはピリジニウム基を有するポルフィリン誘導体は、リポソーム中で安定であることが分かった。これらの化合物に共通するのは、ダイポールを持ち、しかも疎水部と親水部が明確に分かれていることである。このことは、従来の有機 π 分子から成る色素などに膜親和性を付与する際、親水性の極性部と疎水性のアルキル鎖を導入するのと同じ手法である。一方、ピリジル基がない、または二つ以上のピリジル基を有するポルフィリン誘導体は、リポソーム中に導入されない、もしくは導入されても LMIPors が不安定となり、沈殿が直ぐに生じることが分かった。

安定した状態を保つことができる LMIPors については、HeLa 細胞 (ヒト子宮頸がん由来の細胞) に対する光線力学活性の違いを調べた。光線力学活性の違いは、ポルフィリン自体が持つ一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の発生能の高さにあることが分かった。しかし、リポソーム内でのポルフィリンの位置も活性の違いに寄与してしることが予測されたため、引き続き第3章では、ポルフィリン誘導体のリポソーム中での存在位置について検討した。また、今回調製した LMIPors の光線力学活性は、臨床で光増感剤として使用されているフォトフリンに比べ、4~7倍高いことが分かった。

第4章では、リポソーム中にポルフィリン誘導体を導入する前後の $^1\text{H-NMR}$ 測定を行い、そのケミカルシフトの変化をもとにリポソーム中でのポルフィリン誘導体の存在位置を決定した。リポソーム中のコリン、アルキル鎖のメチレン、アルキル鎖の末端メチルのケミカルシフトの変化をそれぞれ $\Delta\delta_A$, $\Delta\delta_B$, $\Delta\delta_C$ とし、 $\Delta\delta_A/\Delta\delta_B$ 値および $\Delta\delta_B/\Delta\delta_C$ 値を比較することで、リポソーム中でどのように位置するかを予測した。 $\Delta\delta_A/\Delta\delta_B$ 値が低いほど、脂質膜中心部の疎水場にポルフィリン誘導体が存在し、 $\Delta\delta_A/\Delta\delta_B$ 値が高いほどリポソーム表面付近に存在することが分かった。一方、極性を持つ他のゲスト分子として、ナフタレン化合物を用いて、同様にリポソーム内での存在位置の決定を行った。ポルフィリン誘導体に比べ、ナフタレン化合物を導入した場合の $\Delta\delta_A/\Delta\delta_B$ 値が高かったことから、 $\Delta\delta_A/\Delta\delta_B$ 値にはゲスト分子の環電流の違いが影響することが分かった。これに対し、低い $\Delta\delta_A/\Delta\delta_B$ 値を持つポ

ルフィリンの場合には、 $\Delta\delta_B / \Delta\delta_C$ 値を比較する方が位置決定には有用であることも分かった。 $\Delta\delta_B / \Delta\delta_C$ 値が大きいほど、リポソーム中のメチレン鎖近傍に存在していることが予測できる。

このように、 $\Delta\delta_A / \Delta\delta_B$ 値と $\Delta\delta_B / \Delta\delta_C$ 値を比較する手法は、リポソーム中でのポルフィリン誘導体の位置決定を行う際に大変有効であった。三つのフェニル基と一つのピリジニウム基を有するポルフィリン誘導体は、ピリジニウム基がピリジル基になった誘導体に比べ膜表面近傍に存在することがわかった。この結果は、前者のポルフィリン誘導体がりポソーム膜表面近傍に存在することで、溶存酸素との接触効率が向上したことで高い光線力学活性を持ったと考察できる。

これらの知見は、より高活性な PDT 薬剤の開発につながるものと期待できる。

使用試薬一覧

1. 溶媒

クロロホルム	和光純薬工業
プロピオン酸	和光純薬工業
メタノール	和光純薬工業
エタノール	和光純薬工業
ヘキサン	和光純薬工業
塩化メチレン	和光純薬工業
アセトン	和光純薬工業

2. 重水素化溶媒

重クロロホルム	和光純薬工業
ジメチルスルホキシド-d ₆	和光純薬工業
重水	和光純薬工業

3. ポルフィリン誘導体, ナフタレン化合物, 水溶化剤

5, 10, 15 20 - テトラフェニルポルフィリン (1)	和光純薬工業
Zn-5, 10, 15 20 - テトラフェニルポルフィリン (2)	和光純薬工業
ナフタレン (9)	東京化成工業株式会社
1-ナフチルアミン (10)	東京化成工業株式会社
1,8-ジアミノナフタレン (11)	東京化成工業株式会社
トリメチル-β-シクロデキストリン (TMe-β-CDx)	和光純薬工業
合成 化合物 3, 4, 5, 6, 7, 8	堀口万里, 広島大学大学院 工学研究科, 修士論文 (2018)

4. リン脂質

1,2-Dimyristoyl-glycero-3-phosphorylcholine (DMPC)	日油株式会社
N,N-ジヘキサデシル-N ^α -[6-(トリメチルアンモニオ)ヘキサノイル]アラニンアミド	
L-α-phosphatidylcholine (EggPC)	Avanti Polar Lipids, Inc
卵黄フォスファチジルコリン	

5. 一重項酸素補足剤

9,10-アントラセンジイル (メチレン) ジマロン酸	シグマアルドリッチ
-----------------------------	-----------

6. 細胞実験用試薬

MEM 培地

Thermo Fisher Scientific

10×リン酸緩衝生理食塩水

Thermo Fisher Scientific

0.5%トリプシン-EDTA

Thermo Fisher Scientific

Cell counting kit8

同人化学研究所

抗生物質

Thermo Fisher Scientific

細胞培養用ウシ胎児血清

HyClone

使用機器一覧

1. ポルフィリン水溶化・脂質調整機

検体乾燥機

iLW 製 HD-15D 型

高速振動粉碎装置

Retsch 製 MM200 型

遠心分離機

Beckman 製 Miicro

Voltex ミキサー

Scientific Industries 製

エクストルーダー

Avestin 製 LF-1 型

2. 分析機器

核磁気共鳴装置

Varian 製 400-MR 型

紫外可視分光光度計

Shimadzu 製 UV3600 型

動的光散乱測定装置

Malvern 製 Zetasizer NanoZS ZEN 3600 型

蛍光分光光度計

日立ハイテクノロジーズ F-4500

光照射機

ウシオ電機社製 SX-UID500X 型

3. 細胞実験用機器

クリーンベンチ

三洋電機製 MCV-131BMS 型

CO₂ インキュベーター

ASTEC 製 SCA-16DS 型

光照射装置

朝日分光製 MAX301 型

マイクロプレートリーダー

Molecular Devices 製 Spectra Max M5

蛍光顕微鏡

OLYMPUS 製 IX71 型

超微量高速冷却遠心分離機

日立工機製 CF16RX II 型

謝辞

本研究を行うにあたり、懇切なるご指導ならびにご助言を賜りました広島大学大学院 工学研究科 池田篤志教授に心より感謝致します。

さらに、本論文を審査して頂きました広島大学大学院 工学研究科 大下浄治教授、および大山陽介教授に深く感謝致します。

この研究に関しまして、的確なご助言とご助力を賜りました広島大学大学院 工学研究科 杉川幸太助教に深く感謝致します。

ならびに、研究室生活全般にわたり大変お世話になりました広島大学大学院 工学研究科 応用化学専攻 応用有機化学研究室関係者の皆さまに心より感謝致します。

2019年9月
中谷 都志美

論文題目

主論文

- Controllable Direction of Porphyrin Derivatives in Two Cyclodextrin Cavities

Banri Horiguchi, Toshimi Nakaya, Masafumi Ueda, Kouta Sugikawa, Tsutomu Mizuta, Tekeharu Haino, Naomi Kawata, Atsushi Ikeda

- Stabilisation of lipid membrane-incorporated porphyrin derivative aqueous solutions and their photodynamic activities

Toshimi Nakaya, Banri Horiguchi, Shodai Hino, Kouta Sugikawa,

Hisakage Funabashi, Akio Kuroda and Atsushi Ikeda *

Photochem. Photobiol. Sci., **2019**, *18*, 459–466

- ¹H NMR Determination of Incorporated Porphyrin Location in Lipid Membranes of Liposomes

Toshimi Nakaya, Yuki Tsuchiya, Banri Horiguchi, Kouta Sugikawa, Kenji Komaguchi, and Atsushi Ikeda*

Bull. Chem. Soc. Jpn., **2018**, *91*, 1337–1342

参考論文

• Adsorption of tetrakis(4-sulfophenyl)porphyrin onto liposomal surfaces composed of neutral diacylphosphatidylcholine and release by cyclodextrin

Yuki Tsuchiya, Toshimi Nakaya, Tomoyuki Kakigi, Kouta Sugikawa and Atsushi Ikeda

RSC Adv., **2018**, *8*, 11930–11934

• Controllable Direction of Porphyrin Derivatives in Two Cyclodextrin Cavities

B. Horiguchi, T. Nakaya, M. Ueda, K. Sugikawa, T. Mizuta, T. Haino, N. Kawata, A. Ikeda

Eur. J. Org. Chem., **2018**, *18*, 2138–2143

• Preparation of Helical Polyelectrolyte Networks by Polymerization of Hydrogen-Bonding Liquid Crystalline Monomers

Seiji Kurihara,^{*,†} Toshimi Mori, and Takamasa Nonaka^{*}

Macromolecules **1998**, *31*, 5940-5942

• Reactivity of a (Benzene)Ruthenium(II) Cation on Di-lacunary gamma-Keggin-type Silicotungstate and Synthesis of a Mono-(Benzene)Ruthenium(II)-Attached gamma-Keggin-type Silicotungstate"

M. Kikuchi, H. Ota, X. Lopez, T. Nakaya, N. Tsunoji, T. Sano, M. Sadakane

Euro. J. Inorg. Chem. **2018**, *2018*, 1778-1786.

• Tailoring a Thermally Stable Amorphous SiOC Structure for the Separation of Large Molecules: The Effect of Calcination Temperature on SiOC Structures and Gas Permeation Properties

Hiroki Inde,[†] Masakoto Kanezashi,^{*,†} Hiroki Nagasawa,[†] Toshimi Nakaya,[‡] and Toshinori Tsuru[†]

ACS Omega **2018**, *3*, 6369–6377

• Optimizing Lithium Ion Conduction through Crown Ether-Based Cylindrical Channels in [Ni(dmit)₂]⁻ Salts

Katsuya Ichihashi, Daisuke Konno, Takuya Date, Takumi Nishimura, Kseniya Yu. Maryunina, Katsuya Inoue, Toshimi Nakaya, Kazuhiro Toyoda, Yoko Tatewaki, Tomoyuki Akutagawa, Takayoshi Nakamura, Sadafumi Nishihara,

Chem. Mater., **2018**, *30*, 7130–7137

• Magnetic Switching by Desorption/Adsorption of an Organic Solvent Molecule from/on [Ni(dmit)₂]⁻ Salt

Katsuya Ichihashi, Takumi Nishimura, Daisuke Konno, Katsuya Inoue, Toshimi Nakaya, Tomoyuki Akutagawa, Takayoshi Nakamura and Sadafumi Nishihara, *Chem. Lett.*, **2019**, *48*, 329-332, **2019**