

博士論文

多糖によって水溶化された疎水性分子を用いた
機能性材料の開発に関する研究

(Development of Functional Materials Using Hydrophobic Molecules
Solubilized by Polysaccharides in Water)



2021年3月

広島大学大学院 工学研究科 応用化学専攻

日野 彰大

第1章 緒言

1.1 序	5
1.2 バイオアベイラビリティ(Bioavailability)と水溶性	5
1.3 がん治療の現状と光線力学療法	6
1.4 難水溶性物質の水溶化法	9
1.4.1 親水性基の修飾	9
1.4.2 分子構造の非平面化・非対称化	10
1.4.3 ハイドロトロープ(Hydrotrope)の利用	11
1.4.4 ホスト-ゲスト化学・超分子化学の利用	12
1.5 問題提起	13
1.6 本博士論文の構成	14
1.7 参考文献	16

第2章 β -グルカンによるポルフィリン類縁体の水溶化と光線力学治療薬への適用

2.1 序	21
2.2 実験結果と考察	22
2.2.1 高速振動粉碎法を用いた β -グルカンによるポルフィリン類縁体の水溶化	22
2.2.1.1 アルカリ処理 β -グルカンの調製	22
2.2.1.2 ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の調製	22
2.2.2 ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の分光学的性質と濃度決定	23
2.2.2.1 ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の UV-Vis 吸収スペクトル測定	23
2.2.2.2 ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定	25
2.2.2.3 ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の蛍光スペクトル測定	27
2.2.3 複合体調製法としての高速振動粉碎法の優位性	28
2.2.4 ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体のモルフォロジー	28
2.2.4.1 動的光散乱(DLS)法による粒径測定	28
2.2.4.2 透過型電子顕微鏡(TEM)によるモルフォロジーの観察	30
2.2.5 ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の長期安定性の評価	31
2.2.6 ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の一重項酸素発生能評価	32
2.2.7 ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の光線力学活性の評価	34
2.2.7.1 細胞実験の準備	34

2.2.7.1.1	液体培地の調製	34
2.2.7.1.2	リン酸緩衝生理食塩水(1×PBS)の調製	34
2.2.7.1.3	トリプシン-エチレンジアミン四酢酸(EDTA)の調製	34
2.2.7.1.4	細胞の培養	34
2.2.7.2	HeLa 細胞に対する光線力学活性評価	35
2.2.7.2.1	光照射サンプルの調製	35
2.2.7.2.2	細胞への光照射	35
2.2.7.2.3	WST-8 アッセイによる細胞生存率の算出	36
2.2.7.3	HeLa 細胞に対する蛍光染色実験	38
2.2.7.4	HeLa 細胞へのポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の取り込み量評価	40
2.2.8	光線力学活性スイッチング能のメカニズム解明	41
2.2.8.1	仮説①:ポルフィリン類縁体の DNA インターカレーション	41
2.2.8.2	仮説②:リソソーム内酵素の糖分解作用によるポルフィリン類縁体の放出	42
2.2.8.3	仮説③:細胞膜との相互作用による複合体の状態変化	43
2.2.8.3.1	リポソームの準備	43
2.2.8.3.2	リポソーム水溶液とポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体水溶液との混合	44
2.2.8.3.3	ジャイアントリポソーム(GUV)を用いた複合体吸着の直接観察	46
2.2.8.3.4	リポソーム水溶液混合後の一重項酸素発生能評価	47
2.2.8.4	仮説④:細胞膜との相互作用によるゲスト分子の移行	48
2.2.8.4.1	[60]フラレーンを用いた蛍光消光によるポルフィリン類縁体の位置の推定	48
2.2.8.4.2	脂溶性カルボシアニン色素を用いたポルフィリン類縁体の位置の推定	49
2.2.8.4.3	$^1\text{H-NMR}$ を用いたポルフィリン類縁体の移行の観測	51
2.3	結言	53
2.4	参考文献	54

第 3 章 ポルフィリン類縁体の水溶化に対する食品添加物用多糖類の適用

3.1	序	58
3.2	実験結果と考察	59
3.2.1	高速振動粉碎法を用いた多糖類によるポルフィリン類縁体の水溶化	59
3.2.2	ポルフィリン類縁体・多糖複合体の分光学的性質	59
3.2.2.1	ポルフィリン類縁体・多糖複合体の UV-Vis 吸収スペクトル測定	59
3.2.2.2	ポルフィリン類縁体・多糖複合体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定	60
3.2.2.3	ポルフィリン類縁体・多糖複合体の蛍光スペクトル測定	61
3.2.2.4	動的光散乱(DLS)法による粒径測定	62
3.2.3	多糖による水溶化メカニズムと水溶化能の予測	63
3.2.3.1	持続長による検討	64

3.2.3.2	ゼータ電位による検討	65
3.2.4	ポルフィリン類縁体・多糖複合体の長期安定性の評価	70
3.2.5	ポルフィリン類縁体・多糖複合体の一重項酸素発生能評価	70
3.2.6	ポルフィリン類縁体・多糖複合体の光線力学活性の評価	71
3.2.6.1	HeLa 細胞に対する光線力学活性評価	71
3.2.6.2	HeLa 細胞への蛍光染色実験	73
3.2.7	リポソーム水溶液とポルフィリン類縁体・多糖複合体の混合	74
3.2.7.1	UV-Vis 吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルの変化	74
3.2.7.2	一重項酸素発生能に対する影響	75
3.3	結言	77
3.4	参考文献	78

第 4 章 多糖類を用いた不斉結晶のキラル情報を維持する水溶化法の開発

4.1	序	80
4.2	実験結果と考察	81
4.2.1	4-ヒドロキシテトラフェニルエテンの合成	81
4.2.2	高速振動粉碎法を用いた多糖類によるテトラフェニルエテン誘導体の水溶化	82
4.2.3	テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体の分光学的性質と濃度決定	83
4.2.3.1	テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体の UV-Vis 吸収スペクトル測定	83
4.2.3.2	テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体の蛍光スペクトル測定	84
4.2.3.3	テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体の ¹ H-NMR スペクトル測定	85
4.2.4	テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体のモルフォロジー	86
4.2.4.1	動的光散乱(DLS)法による粒径測定	86
4.2.4.2	透過型電子顕微鏡(TEM)によるモルフォロジーの観察	87
4.2.5	テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体の HeLa 細胞への導入	88
4.2.6	テトラフェニルエテン誘導体を持つキラル情報の水溶液中における維持	89
4.2.6.1	不斉結晶としてのテトラフェニルエテン	89
4.2.6.2	テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体の円偏光二色性スペクトル測定	90
4.2.6.3	テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体のキラリティ形成メカニズム	91
4.2.6.3.1	仮説①:多糖によるテトラフェニルエテンのキラリティ誘起	91
4.2.6.3.2	仮説②:結晶状態におけるキラル情報の維持	93
4.2.6.3.2.1	テトラフェニルエテンの不斉結晶化	93
4.2.6.3.2.2	テトラフェニルエテン不斉結晶の水溶化	94
4.2.6.4	キラル情報および複合体の安定性評価	95
4.3	結言	97
4.4	参考文献	98

第 5 章 結 言	100
使用機器一覽	102
使用試薬一覽	103
研究成果一覽	106
謝辞	108

第1章 緒言

1.1 序

水 (H₂O) は、人間の体重の約半分から三分の二を占めており^[1]、生命維持に必要不可欠な物質である。医薬品においては、疾病部位や薬理活性部位に薬効分子を送り届けるために、体内の水を溶媒・分散媒として用いる必要がある。すなわち、医薬品は水溶性を持つことが条件の一つとなる。本章では、医薬品開発における薬効分子の水溶性がもつ重要性を、バイオアベイラビリティの観点から概観し、現状の医薬品水溶化技術が抱える諸問題を提起する。

1.2 バイオアベイラビリティ(Bioavailability)と水溶性

日本の総人口に占める 65 歳以上の高齢者の割合は 28.4%^[2]で、世界でも類を見ない超高齢化が進んでいる。このような状況においては、高齢者のみならずその家族、国が抱える負担、特に医療費等の経済的負担は年々増加しているといえる。したがって、化学的観点から超高齢化へ対応するためには、新薬開発の推進が必要である。

医薬品開発において、薬効成分そのものの水溶性は体内動態や薬効などに大きな影響を与えるため、非常に重要なファクターの一つとなっている。なかでも、バイオアベイラビリティ (Bioavailability; 生物学的利用能) と水溶性の間には密接な関係がある。バイオアベイラビリティとは、薬物が体内を循環し、作用する部位に到達する割合のことである^[3]。経口投与された薬物は、腸壁から吸収され肝臓に到達するため、多くの薬物はここで代謝を受け (= 初回通過効果)、十分な血漿中の薬物濃度が得られないことがある^[3]。すなわち、水に溶けにくく、吸収が遅い薬物においては、血漿中の薬物濃度がそもそも低い上に、初回通過効果による代謝の影響も受けることになる。このことから、このような薬剤はバイオアベイラビリティが低い薬剤に該当する。したがって、バイオアベイラビリティの向上には水溶性の向上が必要不可欠であると言える。

近年では、先発医薬品と有効成分や薬効、安全性が同等と認定されたジェネリック医薬品の開発が急速に進んでいる。これは、平成 29 年 6 月 29 日の閣議決定において、「2020 年 9 月までに、後発医薬品の使用割合を 80 % とし、できる限り早期に達成できるよう、更なる使用促進策を検討する。」と定められる^[4, 5]など、患者の金銭的負担の軽減や医療保険財政の改善に資するものとして政府・製薬会社一体となって推進しているためである。本来、ジェネリック医薬品開発において先発医薬品との有効性および安全性の同等性を評価するためには、生物学的同等性 (Bioequivalence; BE) 試験と呼ばれる臨床試験をヒトに対して行う必要がある。しかし、現状のジェネリック医薬品利用促進を求められている中で、このような開発規制は開発の遅延を招く恐れがある。さらに、BE 試験には健康な被験者に対して行われることが多く、健康被験者に対する不要な薬剤曝露が懸念されるなど、その実

施に対する課題が多く残っている^[6]。

そこで、*in vitro* での試験結果を基に BE 試験を免除 (バイオウエーバー) する考え方として BCS (Biopharmaceutics Classification System) を適用する方法論が普及し始めている。BCS とは、1995 年に Amidon らが提唱した医薬品原料の溶解性および膜透過性に基づいた薬剤分類システムである^[7]。BCS では、クラス I :高い水溶性・高い膜透過性、クラス II :低い水溶性・高い膜透過性、クラス III :高い水溶性・低い膜透過性、クラス IV :低い水溶性・低い膜透過性、の四つのクラスに分類される。BCS に基づくバイオウエーバーでは、クラス I (高水溶性・高膜透過性) およびクラス III (高水溶性・低膜透過性) に属する薬剤が BE 試験免除には必須であるとされている (図 1-1)^[6]。すなわち、高いバイオアベイラビリティには高い水溶性が必要条件であることがいえる。

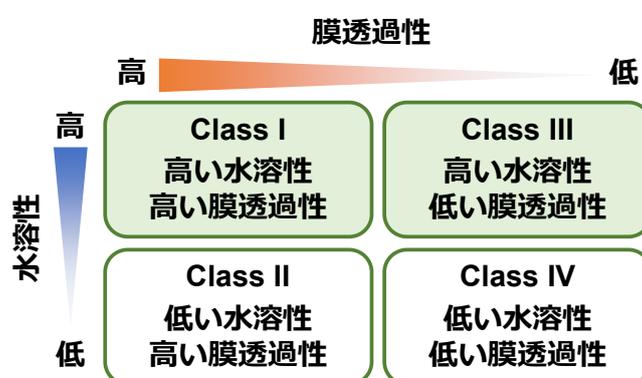


図 1-1. BCS のクラス分類と、それに基づくバイオウエーバー Class I および III がバイオウエーバー適用可能とされる

我が国の薬事規制には、BCS に基づくバイオウエーバーの考え方は未だ導入されていないが、2020 年 10 月現在、医薬品規制調和国際会議 (ICH) において BCS に基づくバイオウエーバーに関するガイドラインが最終合意・採択されている (Step 4)^[8] ことから、まもなく我が国においても規制当局において、それぞれの手続きに従ってガイドラインが実施されることになると思われる。

以上のように、近年の医薬品開発を取り巻く環境の変化から、バイオアベイラビリティと水溶性の重要性がますます高まっている。

1.3 がん治療の現状と光線力学療法

我が国の国民平均寿命は男性が 81.41 歳、女性が 87.45 歳 (令和元年度)^[9] であり世界一の長寿国である。しかし一方で、未だに治療法が確立していない難病や、日本のみならず先進国を中心に死因の上位を占めるがんに苦しむ人々が依然として多い実情がある。

20 世紀の死亡原因として最も多かった疾病は、結核をはじめとした感染症である。当時は不治の病として恐れられていたが、1943 年に Waksman らによって発見されたストレプト

マイシン (図 1-2)^[10, 11] を抗生物質として利用したことにより、死亡率が激減した。今日では、多くの抗生物質が開発され、医療技術が進歩したことで感染症によって亡くなる人は少なくなった。

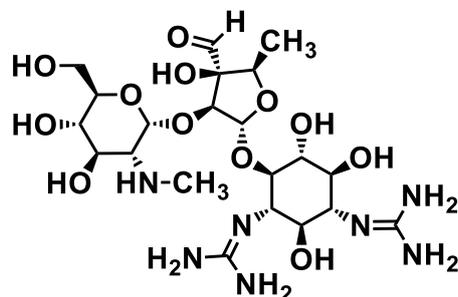


図 1-2. ストレプトマイシンの構造式

感染症に代わり台頭してきたのが悪性新生物、すなわちがんである。がんによる死亡率は今日に至るまで右肩上がりである^[12]。がん細胞は、正常な増殖制御機構が機能せず、異常に増殖し、隣り合う組織に浸潤し、身体他の場所に転移する性質を持っている^[13]。がんの死亡率に歯止めがかからないのは、これらの性質に対する有効的治療法が未だに確立されていないためであると考えられる。

がんの治療法として、外科療法、化学療法、放射線療法、免疫療法の四つに大別される。外科療法は古くから用いられてきた治療法で、がんに侵された部位を切除することで他の臓器への転移を抑制する方法である。化学療法は、化学物質である抗がん剤を血中に投与し、全身に循環させることでがんの増殖を抑える方法である。放射線療法は、放射線が持つ細胞の DNA に直接作用して細胞増殖能を消失させる機能^[14]を用いて、がんの患部に X 線や γ 線、電子線といった放射線を照射し、アポトーシスを誘導する治療法である。免疫療法は、近年世界的に注目されている新しいがん治療法である。免疫チェックポイントと呼ばれる、がん細胞に対して免疫細胞 (T 細胞) が攻撃させないようにする“ブレーキ”の役割を果たす受容体の働きを阻害し、T 細胞の活性化を持続させがん細胞を攻撃させる治療法である^[15]。例えば、1992 年に Ishida と Honjo (2018 年ノーベル化学賞受賞) らが発見した免疫チェックポイント PD-1 受容体^[16]のシグナル阻害によって抗腫瘍効果があることが報告され^[17]、この受容体を阻害するモノクローナル抗体ニボルマブ (商品名: オプジーボ) として上市されている。これら四つの治療法は、それぞれがんの種類や症状によって適切に選択し、複数の治療法を併用する必要がある。

しかし、いずれの治療法も患者に対する負担が大きい治療法である共通の問題点がある。外科療法では、がんの切除という大きな侵襲に対して体力を消耗することから、基礎体力の無い高齢者に対しては、その適用には慎重にならざるを得ない。また、化学療法・放射線療法・免疫療法では、用いる抗がん剤や放射線、免疫阻害剤が持つ機能が正常な部位に対して働いた場合、非常に強い副作用として現れる。このような侵襲の激しい治療法は、患者自身の尊厳を保ち、社会的に人間らしい生活を送ることを困難とさせる。こういった背景から、

現在では患者の生命の質 (Quality of Life; QOL) の向上を求める声が大きくなっており、さらなる医療の発展や新治療法の開発が求められている。

近年、生体に対して穏和な刺激である光を用いた光線力学療法 (Photo Dynamic Therapy; PDT) が、低侵襲的がん治療法として注目されている。PDT は、光照射によって励起した光感受性物質 (Photosensitizer; PS) から、血液中に溶存する三重項酸素へのエネルギー移動によって生じる活性酸素 (一重項酸素やスーパーオキシドアニオンなど) が細胞攻撃種となり、標的細胞を直接破壊し、腫瘍組織周辺の微小血管の破壊を行うことで細胞を死滅させる治療法である (図 1-3)^[18]。光感受性物質によって発生した活性酸素は、生体内では非常に短時間 (40 ns 以下) しか存在できず、短距離 (20 nm 以下) しか移動できない特徴がある^[19]。この特徴は、腫瘍組織に集積した光感受性物質が正常細胞を傷つけることなくがん細胞にのみ攻撃を与えることができることを示しており、このような利点を持つ PDT は重篤な副作用を示さない低侵襲的治療法としてその普及が求められている。

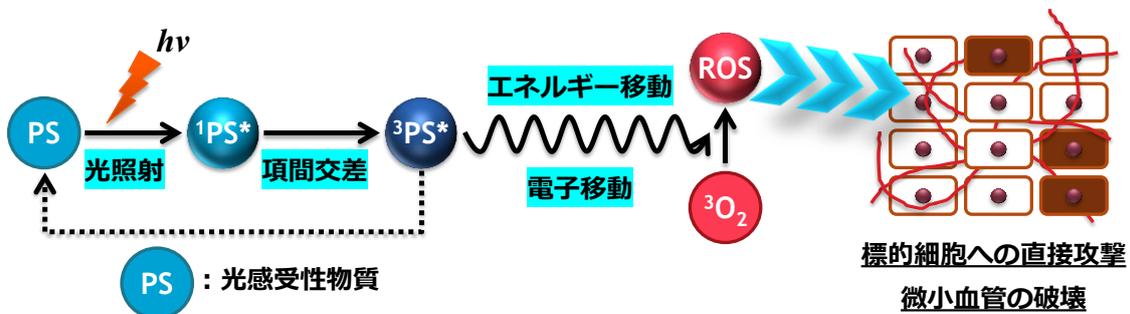


図 1-3. PDT 治療原理の概略図

PDT においては、ポルフィリンが光感受性物質として主に用いられている。ポルフィリンは、自身の持つ豊富な π 電子によりタンパク質との高い親和性を示し、特に低比重リポタンパク質 (Low-Density Lipoprotein; LDL) に対して強い親和性を持つ^[20]。この性質を利用することで LDL 受容体の活性が上昇している腫瘍組織においては、ポルフィリン-LDL 複合体が多く取り込まれる^[21]。また、腫瘍組織ではリンパ系が未発達であるため、取り込まれたポルフィリンが腫瘍組織選択的に蓄積する^[22]。このようなメリットから、1994 年に第 1 世代ポルフィリン系光増感剤のフォトフリン^[23, 24]が当時の厚生省に認可された。フォトフリンを皮切りに、第 2 世代光増感剤としてレザフィリン^[25]やビスダイン^[26]といった、より副作用を軽減させた PDT 薬剤が開発されている (図 1-4)。

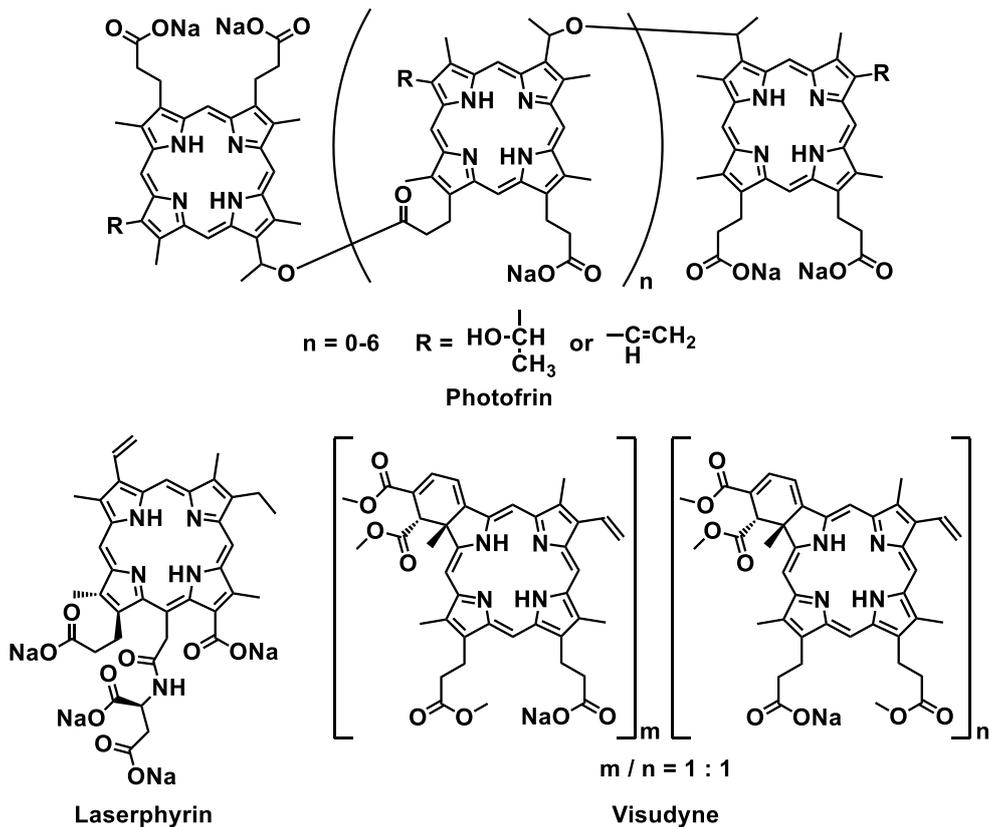


図 1-4. フォトフリン, レザフィリンおよびビスダインの構造式

1.4 難水溶性物質の水溶化法

一般に、ポルフィリンのような π 電子系化合物は、水に難溶であることが多い。そのためポルフィリンを薬剤として用いるためには、水溶化を試みる必要がある。前述のフォトフリンとレザフィリンの構造式を見ると、多数のカルボキシ基が存在しナトリウム塩となっていることから、結果として両者は水に溶けやすい性質を持つ^[27, 28]。一方、ビスダインはカルボキシ基の数が少ないため、水にほとんど溶けない^[29]。そこで、水に溶解させるための添加物として、リン脂質をビスダインに対して 5 モル当量添加し^[29]、日本薬局方注射用水に分散させることで、ミセルもしくはリポソームの複合体として溶解させている。このように、様々な工夫によって難水溶性物質であるポルフィリンの水溶化を達成し、バイオアベイラビリティを高めて上市されている。本項では、主に医薬品開発において生体利用を目指すために開発された難水溶性物質の水溶化法について述べる。

1.4.1 親水性基の修飾

最も一般的な水溶化の方法として、親水基の修飾が挙げられる。ポルフィリン類縁体のような π 電子系化合物は高い電子親和性を持ち化学修飾を行うことが容易である。例えば、ベンゼンにカルボキシ基が修飾した安息香酸、スルホン基が修飾したベンゼンスルホン酸

はいずれも水に可溶である。また、ポルフィリンも同様に親水性の置換基を修飾することで水溶化が可能である。前述のフォトフリンやレザフィリンはこの手法を用いて水溶化を実現している。さらに、 dendrimer と呼ばれる、中心から規則的に枝分かれした構造を持つ樹状の水溶性高分子を用いてポルフィリンを水溶化する例も多数ある^[30-32]。

1.4.2 分子構造の非平面化・非対称化

最も単純な定義では、溶媒中の化合物の熱力学的溶解度は、平衡状態において化合物が取り得る最も安定な結晶形態として、ある温度および圧力下で溶媒中に留まることができる最大量のことを指す^[33]。最も安定な結晶形態とは、化合物が取り得る結晶形態のうち、最も高い融点を持つ結晶形態を意味する。すなわち、溶解度に影響を与えるパラメーターには、水-オクタノール分配係数 ($\log P$) だけでなく結晶のパッキングの強さも含まれるということになる。実際、Banerjee と Yalkowsky らは、半経験的に有機物の水溶性 (S) と分配係数の関係式に融点が含まれている、以下式 1-1 のような一般式が成立することを報告している^[34]。

$$\log P = a(\log S) + b(m.p.) + c \quad \dots(1-1)$$

ここで、 $m.p.$: 融点 (°C), a, b, c は定数を表す。したがって、化合物と溶媒との相互作用の方が化合物同士の相互作用よりも上回るようになれば、溶解しやすくなると考えられるため、融点を低下させる (= 結晶のパッキング力が低下) 方法は化合物の水溶性向上に有効な戦略であると言える。

Ishikawa らはこの戦略に着目し、難水溶性物質の平面性および対称性を、置換基導入によって崩すことで、医薬品の薬効分子の基本骨格を変えることなく、水溶性を最大 2700 倍まで向上させることに成功している (図1-5)^[35]。一般に、平面性および対称性が高い化合物は、結晶のパッキングが密であるために、融点が高くなることが知られている。この性質を崩すことは、すなわちパッキング力の低下と融点の低下を引き起こす。この方法を用いることで、親水性基の修飾による方法よりも効果的に水溶性を向上させることができ、さらに疎水性 (= 膜透過性) も親水性 (= 水溶性) も同時に向上させることができる^[36]という、バイオアベイラビリティの観点から優れた利点を持つ。

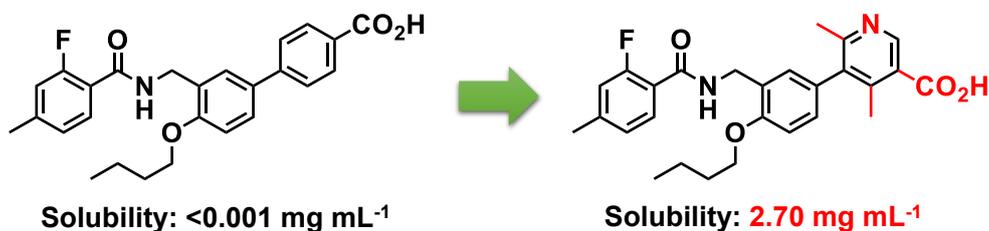


図 1-5. 難水溶性物質の非平面・非対称化による水溶性の向上^[35]

1.4.3 ハイドロトロープ(Hydrotrope)の利用^[37, 38]

ハイドロトロープ (Hydrotrope) とは、難水溶性物質の水への溶解度を高める化合物を指し示すために Neuberg によって用いられた言葉である^[39]。ハイドロトロープ性を持つ化合物の特徴として、比較的分子量の有機化合物であり、水溶性を示し、分子中に親水性基と疎水性基が共存している。具体的には、安息香酸ナトリウムやクエン酸ナトリウム、尿素などが挙げられる。これらの分子構成としては、界面活性剤と類似している。実際、古典的な論文ではハイドロトロープと、ミセルやマイクロエマルジョンとの区別が明確ではない記述が見られる^[40, 41]。これらの違いとして、ミセルやマイクロエマルジョンを構成する界面活性剤は、疎水性基が大きく長いものに対して、ハイドロトロープの疎水性基は一般に小さく、それだけでは自発的な凝集体の形成が起こらない点にある^[42]。

ハイドロトロープによる難水溶性物質の水溶化メカニズムについて説明する。界面活性剤に臨界ミセル濃度 (Critical Micelle Concentration; CMC) があるように、ハイドロトロープにも最小ハイドロトロープ濃度 (Minimum Hydrotrope Concentration; MHC) と呼ばれる特定の閾値を持っている。MHC 以上の時、ハイドロトロープ分子が溶質の周りに集まり、クラスターを形成する。さらに、このクラスターを構成するハイドロトロープ分子に多数の水分子が会合することで、一つの新しい「溶媒」ができるものとみなされる。したがって、このクラスターは水中で安定に分散できるため水溶化が可能となる (図 1-6)。

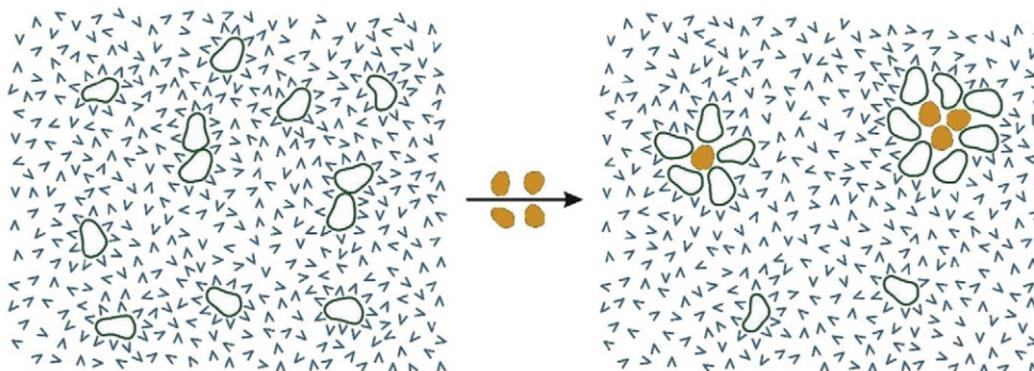


図 1-6. ハイドロトロープによる水溶化メカニズムの概略図^[38]

v は水分子、緑白抜きはハイドロトロープ分子、オレンジ中塗りは難水溶性物質を表す

This article was published in *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2016**, 22,

W. Kunz, K. Holmberg, and T. Zemb, “Hydrotropes”, 99–107, (Graphical Abstract)

Copyright© Elsevier 2020.

この水溶化法では、水溶化の特性は pH に依存しないこと、水中で難水溶性物質とハイドロトロープ分子を混合するだけで簡便に調製が可能であること、難水溶性物質の化学修飾および有機溶媒の使用、エマルジョンを必要としないという利点^[42]を持つ。

1.4.4 ホスト-ゲスト化学・超分子化学の利用

「鍵と鍵穴」の関係のように、特定の分子を選択的に認識する分子をホスト分子と呼び、ホスト分子にある空間に取り込まれる分子をゲスト分子と呼ぶ。ホスト分子とゲスト分子は、van der Waals 力といった比較的小さな相互作用によって引き合っている。これまでに、難水溶性物質を認識して水溶化した例に、シクロデキストリンが挙げられる。

シクロデキストリンは、デンプンに微生物由来の酵素を作用させることで得られる環状オリゴ糖の一種である。D-グルコースが 6 個、7 個、8 個環状に結合したものをそれぞれ α 、 β 、 γ -シクロデキストリンと呼ぶ。中心の空孔内部は疎水的な環境であり、疎水性分子（難水溶性物質）を空孔内に取り込むことができる。特に、[60]フラーレン (C_{60}) や C_{60} 誘導体は γ -シクロデキストリンを用いることで水溶化することが可能であり、 C_{60} 1 分子に対してシクロデキストリン 2 分子の複合体を形成していることがわかっている^[43, 44]。また、カチオン性 C_{60} 誘導体-シクロデキストリン錯体には、HeLa 細胞に対して光照射下においてのみ細胞毒性を有することが確認されている^[45]。ポルフィリン類縁体に対しては、D-グルコースの持つ三種類のヒドロキシ基すべてがメチル化された、トリメチル- β -シクロデキストリンを用いることで錯形成し、水溶化することが分かっている^[46, 47]。シクロデキストリンには、C3 水酸基と隣接する D-グルコースの C2 水酸基の間に分子内水素結合が存在し、環構造を固定化している。しかし、メチル化によって分子内水素結合が無くなるため、また C3 水酸基に結合したメチル基に立体障害があるため環構造が著しくゆがむ^[48]。その結果、トリメチル- β -シクロデキストリンは未修飾のシクロデキストリンに比べ、D-グルコースのコンフォメーションが変化できるようになり、環構造の柔軟性が高くなっている^[49]。そのため、未修飾シクロデキストリンと錯体を形成しない分子でも、空孔内にゲスト分子が入りやすくなり^[50]、ポルフィリン類縁体においても水溶化が可能になる。

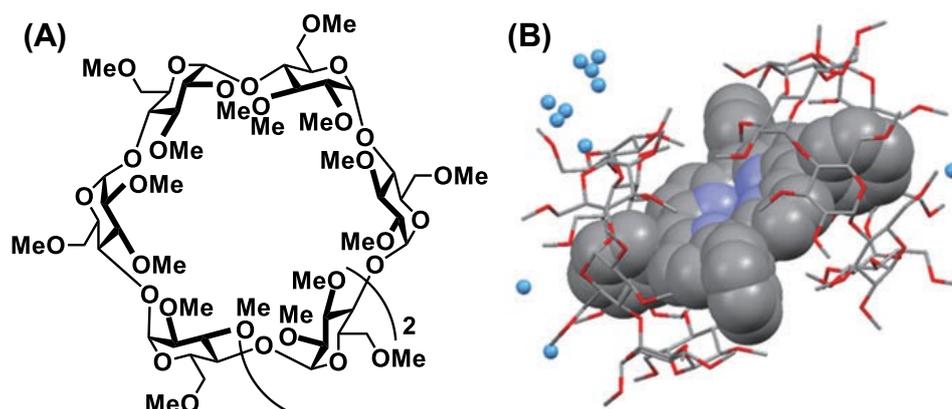


図 1-7. (A) トリメチル- β -シクロデキストリンの構造式
(B) トリメチル- β -シクロデキストリンと錯形成したポルフィリンの X 線構造解析結果^[46]

Adapted with permission from *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 456–465. (Figure 3c)

Copyright© 2020 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

シクロデキストリンのように環状に結合した多糖類だけでなく、直鎖状多糖類を用いた場合も、ゲスト分子を超分子化学的に複合化し水溶化することが可能である。Sakurai と Shinkai らは、直鎖状多糖のうち、通常三重らせん構造を持つシゾフィランやカードラン (β -1,3-グルカン) をホスト分子として、リネイチャー法と呼ばれる手法により、ポリチオフェンやカーボンナノチューブといった難水溶性物質を、超分子複合体の形成によって水溶化することに成功している^[51, 52]。さらに、Ikeda らは高速振動粉碎法^[53]と呼ばれるボールミル法の一様を用いることで、 β -1,3-グルカンと C_{60} および C_{70} が複合化し、リネイチャー法のように有機溶媒を使用せず、かつ簡便に C_{60} を高濃度で水溶化できることを見出した^[54, 55]。

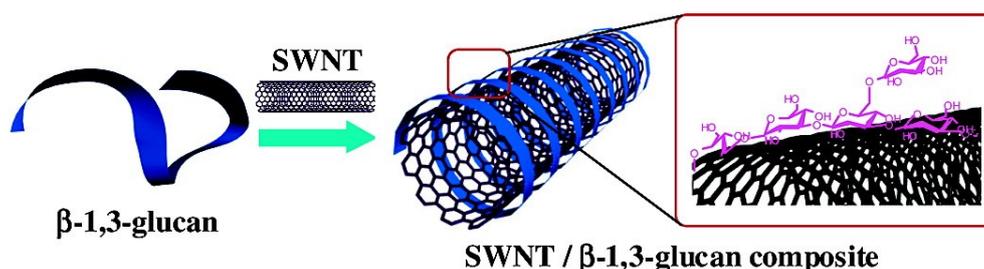


図 1-8. リネイチャー法を用いた多糖類によるカーボンナノチューブの水溶化の模式図^[52]

Reprinted with permission from *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 5875–5884. (Graphical Abstract)

Copyright© 2020 American Chemical Society.

超分子化学的手法によって難水溶性物質を水溶化する方法で、既に医薬品として上市された例がある。例えば、リン脂質二重膜構造を持つリポソームに抗がん剤を内包させたドキシソルビシン内包リポソームが挙げられる^[56, 57]。このように、超分子化学的手法による水溶化は、ホスト分子の生体適合性の高さによっては医薬への応用が容易であり、かつ水溶化のための化学修飾も必要ないことから、難水溶性物質の性質を大きく変えることなく水溶化が可能である。前述のハイドロトロブ分子による水溶性の向上は、溶質とハイドロトロブ分子のクラスター形成によるものであることから、広義の超分子化学的手法による水溶化法であると言える。

1.5 問題提起

以上のように、医薬品化合物の水溶性はバイオアベイラビリティの観点から、最も重要なファクターであり、医薬品開発において最も考慮すべき性質の一つである。したがって、これまでに様々な水溶化技術が研究・開発されてきた。前述の難水溶性物質の水溶化法を方法論として分類すると、①化合物を化学修飾することによって水溶性を高める方法、②化合物を他の化合物と非共有結合的に複合化することで水溶性を高める方法、の二つに大別される (表 1-1)。

表 1-1. 難水溶性物質の水溶化法の分類

① 化学修飾による方法	② 非共有結合的複合化による方法
<ul style="list-style-type: none"> ➤ 親水性基の修飾 ➤ 分子構造の非平面化・非対称化 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ ハイドロトロープの利用 ➤ ホスト-ゲスト化学・超分子化学の利用

本論文では、医薬品水溶化技術として主流である、①化学修飾による方法における問題点を次のように提起する。化学修飾による方法は、置換基の導入によって本来持っていたはずの優れた薬効が失われる、もしくは生体に好ましくない影響を与える物質に変化してしまう可能性がある点が、この方法で最も懸念される。様々な視点からリード化合物が大量に合成され、その中でも優れた薬効を示す分子をスクリーニングすることで医薬品原薬が開発される。しかし、優れた薬効を示していたにもかかわらず水溶性が乏しいという理由などの生物薬剤学的性質でドロップアウトしてしまうリード化合物が全化合物のおよそ 40 % を占めると言われている^[58, 59]。医薬品として実際に上市される確率は数万分の一と言われるほど困難な医薬品開発において、これほどドロップアウトする薬剤が多いことは、開発のさらなる遅延を招くため、我が国の超高齢化への対策としても早急に対処すべき課題である。しかし、前述のようなバイオアベイラビリティの観点から優れた利点を持つ水溶化法が開発されているにもかかわらず、このような状況を打破できないのは、化学修飾による水溶化の向上によって必ずしも薬効が保持されないためであると推察される。すなわち、この問題を解決する「**薬効が保持される水溶化法**」が求められる。

この問題の解決策として、本論文では②非共有結合的複合化による方法のうち、直鎖状多糖類を可溶化剤とする超分子化学的手法による水溶化法を提案する。1.4.4 で解説したように、ホスト-ゲスト化学を利用した水溶化法ではゲスト分子を選択的に認識し、包接錯体を形成することで水溶化が可能であったが、適用できるホストおよびゲスト分子の組み合わせが限られていた。しかし、Ikeda らが高速振動粉碎法を用いた直鎖状多糖類による C₆₀ の高濃度の水溶化を報告している^[54]ことから、直鎖状多糖類を用いることでゲスト分子に対する特異性が低下し、水溶化の適用範囲が広がると予想された。また、この方法で水溶化された C₆₀ の光化学的機能性はほとんど維持されていた。したがって、前述の問題点に対する解決策として、直鎖状多糖類と薬剤を超分子化学的に複合化させて水溶化する方法が最も適当であると考えられる。

1.6 本博士論文の構成

前述のように、直鎖状多糖類と薬剤を超分子化学的に複合化することで、難水溶性物質を水溶化した例はいくつか報告があるものの、この複合体を薬剤として応用することを目的とした水溶化例は極めて少なく、難水溶性物質の持つ薬効を *in vitro* において検討した例は β-1,3-グルカンと C₆₀ および C₇₀ の組み合わせに関する報告に限られている^[54, 55]。

そこで本論文では、直鎖状多糖類として天然由来であり、かつ食品添加物に使用されている毒性の低い安価な多糖類を選択し、これを可溶化剤として様々な難水溶性物質の水溶

化を試み、その水溶化能や超分子複合体の持つモルフォロジー、さらに *in vitro* における薬効を評価することで、超分子化学的手法による水溶化に関する新たな知見を得ることを目的とする。

本博士論文は全 5 章で構成される。第 1 章では、研究背景として、医薬品開発における薬効分子の水溶性がもつ重要性を、バイオアベイラビリティの観点から概観し、現状の医薬品水溶化技術が抱える諸問題を提起、この解決策に関して言及する。第 2 章は、先行研究で用いられていた β -1,3-グルカン可溶化剤として選択し、各種ポルフィリン類縁体をモデル薬剤として水溶化を試み、複合体の薬剤としての性質や細胞との相互作用に関する検討を行った。第 3 章では、より汎用的な多糖類を可溶化剤として、ポルフィリン類縁体の水溶化を試み、直鎖状多糖類を用いたゲスト分子の水溶化法の高い汎用性を示し、多糖の違いによる水溶化能の違いや水溶化メカニズムに関する考察を行った。第 4 章では、モデル薬剤としてテトラフェニルエテン誘導体を選択し、細胞イメージング材料としての活用に関する検討を行い、さらに不斉結晶という性質を利用して、ゲスト分子の性質維持に関する検討を分光学的測定によって行った。第 5 章では、本論文で得られた知見を総括し、今後の展開について考察する。

1.7 参考文献

- [1] J. L. Lewis III, “About Body Water”, MSD MANUAL Consumer Version, 2020 年 11 月 11 日閲覧.
(<https://www.msdmanuals.com/en-jp/home/hormonal-and-metabolic-disorders/water-balance/about-body-water>)
- [2] 内閣府, “令和 2 年版高齢社会白書(全体版)”, 2020 年 11 月 18 日閲覧.
(https://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2020/zenbun/02pdf_index.html)
- [3] J. Le, “Drug Bioavailability”, MSD MANUAL Professional Version, 2020 年 11 月 16 日閲覧.
(<https://www.msdmanuals.com/en-jp/professional/clinical-pharmacology/pharmacokinetics/drug-bioavailability>)
- [4] 首相官邸, “平成 29 年 6 月 27 日(火) 定例閣議案件”, 2020 年 11 月 17 日閲覧.
(<https://www.kantei.go.jp/jp/kakugi/2017/kakugi-2017062701.html>)
- [5] 厚生労働省, “後発医薬品(ジェネリック医薬品)の使用促進について”, 2020 年 11 月 17 日閲覧. (https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/iryuu/kouhatsu-iyaku/index.html)
- [6] 栗林 秀明, “BCS に基づくバイオウエーバー ICH M9 ガイドライン案の概説”, *ファルマシア*, **2019**, 55, 514–518. (DOI: 10.14894/faruawpsj.55.6_514)
- [7] G. L. Amidon, H. Lennernäs, V. P. Shah, and J. R. Crison, “A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of *in Vitro* Drug Product Dissolution and *in Vivo* Bioavailability”, *Pharm. Res.*, **1995**, 12, 413–420. (DOI: 10.1023/A:1016212804288)
- [8] 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構, “ICH トピック&ガイドライン 進捗状況 (2020 年 10 月 1 日現在)”, 2020 年 11 月 17 日閲覧
(<https://www.pmda.go.jp/files/000236884.pdf>)
- [9] 厚生労働省, “令和元年簡易生命表の概況”, 2020 年 11 月 12 日閲覧
(<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/life/life19/index.html>)
- [10] S. A. Waksman, and A. T. Henrici, “The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes”, *J. Bacteriol.*, **1943**, 46, 337–341. (DOI: 10.1128/jb.46.4.337-341.1943)
- [11] A. Sakula, “Selman Waksman (1888–1973), discoverer of streptomycin: A centenary review”, *Br. J. Dis. Chest*, **1988**, 82, 23–31. (DOI: 10.1016/0007-0971(88)90005-8)
- [12] 厚生労働省, “平成 30 年人口動態統計”, 2020 年 11 月 12 日閲覧
(<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/houkoku18/dl/all.pdf>)
- [13] W. M. Becker, L. J. Kleinsmith, and J. Hardin, “細胞の世界”, 西村書店, **2005**.
- [14] 久保田 進, “放射線治療ハンドブッカーガンとは? 放射線治療とは?—”, ERC 出版, **1997**.
- [15] 北野 滋久, “がん免疫療法の最前線”, *日本内科学会雑誌*, **2017**, 106, 2645–2658. (DOI: 10.2169/naika.106.2645)
- [16] Y. Ishida, Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo, “Induced expression of PD-1, a novel

- member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death.”, *EMBO J.*, **1992**, *11*, 3887–3895. (DOI: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x)
- [17] Y. Iwai, S. Terawaki, and T. Honjo, “PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells”, *Int. Immunol.*, **2005**, *17*, 133–144. (DOI: 10.1093/intimm/dxh194)
- [18] 加藤 治文, “PDT ハンドブック 光線力学的治療のアドバンステクニック”, 医学書院, **2002**.
- [19] S. Pervaiz, “Reactive oxygen - dependent production of novel photochemotherapeutic agents” *FASEB J.*, **2001**, *15*, 612–617. (DOI: 10.1096/fj.00-0555rev)
- [20] S. Vitols, G. Garthon, A. Ost, and C. Peterson, “Elevated low density lipoprotein receptor activity in leukemic cells with monocytic differentiation”, *Blood*, **1984**, *63*, 1186–1193. (DOI: 10.1182/blood.V63.5.1186.1186)
- [21] Y. Shibata, A. Matsumura, F. Yoshida, T. Yamamoto, K. Nakai, T. Nose, I. Sakata, and S. Nakajima, “Competitive uptake of porphyrin and LDL via the LDL receptor in glioma cell lines: flow cytometric analysis”, *Cancer Lett.*, **2001**, *166*, 79–87. (DOI: 10.1016/S0304-3835(00)00717-5)
- [22] 山本 哲哉, 上月 暎浩, 鶴淵 隆夫, 松田 真秀, 阿久津 博義, 石川 栄一, 高野 晋吾, 松村 明, “悪性脳腫瘍に対する光線力学的療法 (PDT) の基礎”, *脳神経外科ジャーナル*, **2016**, *25*, 905–911. (DOI: 10.7887/jcns.25.905)
- [23] M. Triesscheijn, P. Baas, J. H. Schellens, and F. A. Stewart, “Photodynamic therapy in oncology”, *The Oncologist*, **2006**, *11*, 1034–1044. (DOI: 10.1634/theoncologist.11-9-1034)
- [24] R. R. Allson, R. E. Cuencaa, G. H. Downiea, P. Camnitz, B. Brodish, and C. H. Sibata, “Clinical photodynamic therapy of head and neck cancers—A review of applications and outcomes”, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **2005**, *2*, 205–222. (DOI: 10.1016/S1572-1000(05)00092-X)
- [25] J. Usuda, S. Ichinose, T. Ishizumi, H. Hayashi, K. Ohtani, S. Maehara, S. Ono, H. Honda, N. Kajiwara, O. Uchida, H. Tsutsumi, T. Ohira, H. Kato, and N. Ikeda, “Outcome of Photodynamic Therapy Using NPe6 for Bronchogenic Carcinomas in Central Airways >1.0 cm in Diameter”, *Clin. Cancer. Res.*, **2010**, *16*, 2198–2204. (DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2520)
- [26] R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, X. H. Hu, C. J. H. Childs, and C. H. Shibata, “Photosensitizers in clinical PDT”, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **2004**, *1*, 27–42. (DOI: 10.1016/S1572-1000(04)00007-9)
- [27] ファイザー株式会社, “フォトフリン® 静注用 75 mg”, 医薬品添付資料, **2010**.
- [28] Meiji Seika ファルマ株式会社, “注射用レザフィリン® 100 mg”, 医薬品添付資料, **2019**.
- [29] クリニジェン株式会社, “ビスダイン® 静注用 15 mg”, 医薬品添付資料, **2020**.
- [30] R. -H. Jin, T. Aida, and S. Inoue, “‘Caged’ porphyrin: the first dendritic molecule having a core photochemical functionality”, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, 1260–1262.

(DOI: 10.1039/C39930001260)

- [31] P. J. Dandliker, F. Diederich, M. Gross, C. B. Knobler, A. Louati, and E. M. Sanford., “Dendritic Porphyrins: Modulating Redox Potentials of Electroactive Chromophores with Pendant Multifunctionality”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1994**, *33*, 1739–1742. (DOI: 10.1002/anie.199417391)
- [32] W. -S. Li and T. Aida, “Dendrimer Porphyrins and Phthalocyanines”, *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 6047–6076. (DOI: 10.1021/cr900186c)
- [33] S. N. Bhattachar, L. A. Deschenes, and J. A. Wesley, “Solubility: it's not just for physical chemists”, *Drug Discov. Today*, **2006**, *11*, 1012–1018. (DOI: 10.1016/j.drudis.2006.09.002)
- [34] S. Banerjee, S. H. Yalkowsky, and C. Valvani, “Water solubility and octanol/water partition coefficients of organics. Limitations of the solubility-partition coefficient correlation”, *Environ. Sci. Technol.*, **1980**, *14*, 1227–1229. (DOI: 10.1021/es60170a013)
- [35] J. Kasuga, M. Ishikawa, M. Yonehara, M. Makishima, Y. Hashimoto, and H. Miyachi, “Improvement of water-solubility of biarylcarboxylic acid peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ -selective partial agonists by disruption of molecular planarity/symmetry”, *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 7164–7173. (DOI: 10.1016/j.bmc.2010.08.041)
- [36] M. Ishikawa, and Y. Hashimoto, “Improvement in Aqueous Solubility in Small Molecule Drug Discovery Programs by Disruption of Molecular Planarity and Symmetry”, *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 1539–1554. (DOI: 10.1021/jm101356p)
- [37] 荻野 圭三, “混ぜる —分散と溶解”, *油化学*, **1984**, *33*, 563–572. (DOI: 10.5650/jos1956.33.563)
- [38] W. Kunz, K. Holmberg, and T. Zemb, “Hydrotropes”, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2016**, *22*, 99–107. (DOI: 10.1016/j.cocis.2016.03.005)
- [39] C. Nerberg, “Hydrotropic phenomena”, *Biochem. Z.*, **1916**, *76*, 107–176.
- [40] P. A. Winsor, “Hydrotropy, solubilization and related emulsification processes. Part I”, *Trans. Faraday Soc.*, **1948**, *44*, 376–398. (DOI: 10.1039/TF9484400376)
- [41] Y. Chevalier, and T. Zemb, “The structure of micelles and microemulsions”, *Rep. Prog. Phys.*, **1990**, *53*, 279–371. (DOI: 10.1088/0034-4885/53/3/002)
- [42] K. Nidhi, S. Indrajeet, M. Khushboo, K. Gauri, and D. J. Sen, “Hydrotropy: A Promising tool for solubility Enhancement”, *Int. J. Drug Dev. Res.*, **2011**, *3*, 26–33.
- [43] T. Andersson, K. Nilsson, M. Sundahl, G. Westman, and O. Wennerström, “C₆₀ embedded in γ -cyclodextrin: a water-soluble fullerene”, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, *28*, 604–606. (DOI: 10.1039/C39920000604)
- [44] A. Ikeda, R. Aono, N. Maekubo, S. Katao, J. Kikuchi, and M. Akiyama, “Pseudorotaxane structure of a fullerene derivative—cyclodextrin 1 : 2 complex”, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 12795–12797. (DOI: 10.1039/C1CC15229G)
- [45] A. Ikeda, T. Iizuka, N. Maekubo, R. Aono, J. Kikuchi, M. Akiyama, T. Konishi, T. Ogawa,

- N. Ishida-Kitagawa, H. Tatebe, and K. Shiozaki, “Cyclodextrin Complexed [60]Fullerene Derivatives with High Levels of Photodynamic Activity by Long Wavelength Excitation”, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2013**, *4*, 752–756. (DOI: 10.1021/ml4001535)
- [46] 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. (DOI: 10.1002/chem.201102075)
- [47] 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. (DOI: 10.1021/acsmchemlett.7b00098)
- [48] M. L. ベンダー, 小宮山 真, “シクロデキストリンの化学”, 学会出版センター, **1979**.
- [49] 日本化学会, “超分子をめざす化学”, 学会出版センター, **1997**.
- [50] J. Szejtli, “Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry”, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 1743–1754. (DOI: 10.1021/cr970022c)
- [51] C. Li, M. Numata, A.-H. Bae, K. Sakurai, and S. Shinkai, “Self-Assembly of Supramolecular Chiral Insulated Molecular Wire”, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 4548–4549. (DOI: 10.1021/ja050168q)
- [52] M. Numata, M. Asai, K. Kaneko, A.-H. Bae, T. Hasegawa, K. Sakurai, S. Shinkai, “Inclusion of Cut and As-Grown Single-Walled Carbon Nanotubes in the Helical Superstructure of Schizophyllan and Curdlan (β -1,3-Glucans)”, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 5875–5884. (DOI: 10.1021/ja044168m)
- [53] K. Komatsu, K. Fujiwara, Y. Murata, and T. Braun, “Aqueous solubilization of crystalline fullerenes by supramolecular complexation with γ -cyclodextrin and sulfocalix[8]arene under mechanochemical high-speed vibration milling”, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1999**, 2963–2966. (DOI: 10.1039/a904736k)
- [54] A. Ikeda, T. Iizuka, N. Maekubo, K. Nobusawa, K. Sugikawa, K. Koumoto, T. Suzuki, T. Nagasaki, and M. Akiyama, “Water-Solubilization of Fullerene Derivatives by β -(1,3-1,6)-D-Glucan and Their Photodynamic Activities toward Macrophages”, *Chem. Asian J.*, **2017**, *12*, 1069–1074. (DOI: 10.1002/asia.201700182)
- [55] A. Ikeda, M. Akiyama, K. Sugikawa, K. Koumoto, Y. Kagoshima, J. Li, T. Suzuki, and T. Nagasaki, “Formation of β -(1,3-1,6)-D-glucan-complexed [70]fullerene and its photodynamic activity towards macrophages”, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 1990–1997. (DOI: 10.1039/C6OB02747D)
- [56] E. A. Forssen and Z. A. Tokes, “*In vitro* and *in vivo* studies with adriamycin liposomes”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1979**, *91*, 1295–1301. (DOI: 10.1016/0006-291X(79)91207-5)
- [57] 持田製薬株式会社・ヤンセンファーマ株式会社, “ドキシル®注 20 mg”, 医薬品添付資

料, **2019**.

[58] S. Venkatesh, and R. A. Lipper, “Role of the Development Scientist in Compound Lead Selection and Optimization”, *J. Pharm. Sci.*, **2000**, *89*, 145–154. (DOI: 10.1002/(SICI)1520-6017(200002)89:2<145::AID-JPS2>3.0.CO;2-6)

[59] 芦澤 一英, “医薬品開発における物性評価の重要性”, *日本薬理学雑誌*, **2006**, *127*, 213–216. (DOI: 10.1254/fpj.127.213)

第 2 章 β -グルカンによるポルフィリン類縁体の水溶化と光線力学治療薬への適用

2.1 序

本章では、 β -グルカンを可溶化剤として各種ポルフィリン類縁体の水溶化を、高速振動粉砕法を用いて試み、これらの分光学的測定、モルフォロジー観察によって、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の光線力学治療薬としての性能を評価する。また、がん細胞に対する光照射による細胞障害性を評価することで光線力学治療薬としての適用可能性を検討する。さらに、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体が持つ活性のスイッチングメカニズムを解明し、複合体が持つ性質および細胞との相互作用に関する知見を得る。

本章で用いたポルフィリン類縁体および β -グルカンの構造を以下図 2-1 に示す。

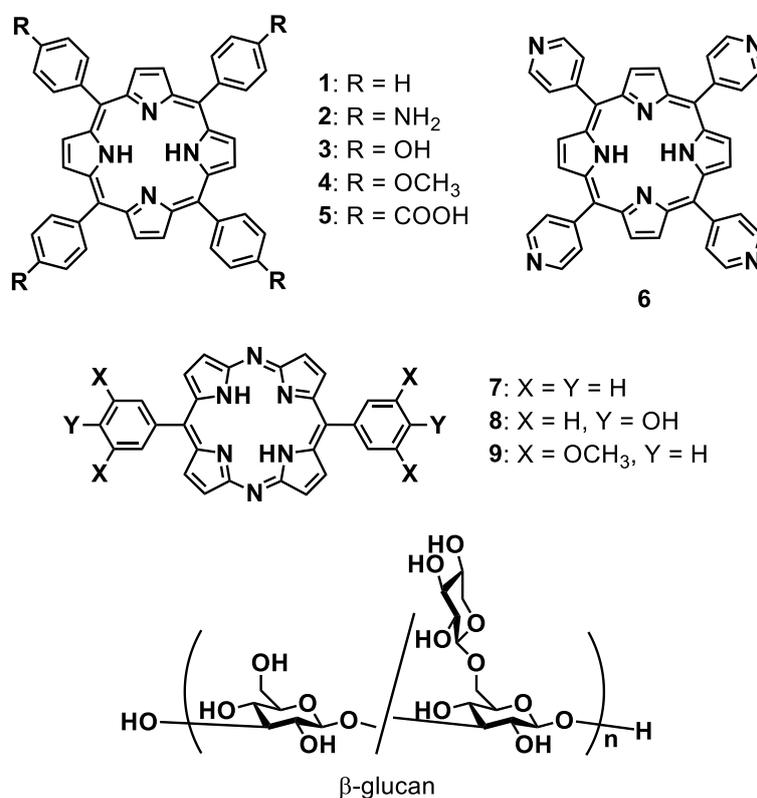


図 2-1. 本章で用いたポルフィリン類縁体および β -グルカンの構造

2.2 実験結果と考察

2.2.1 高速振動粉碎法を用いた β -グルカンによるポルフィリン類縁体の水溶化

2.2.1.1 アルカリ処理 β -グルカンの調製

β -グルカンは、黒酵母 (*Aureobasidium pullulans*) から精製した β -(1,3-1,6)-グルカンを用いた (Lot. K-1 170502, M_w : 5.08×10^6 , M_n : 2.33×10^6 , $M_w/M_n = 2.18$)。この β -グルカンは通常 3 本の分子鎖が三重のらせん構造を取っているため難水溶性であるが、アルカリ処理を行うことによってらせん構造が解け、易水溶性へと変化する^[1]。

1.0 M 水酸化ナトリウム水溶液 20 mL に対して三重らせん β -グルカンを 50 mg 分散させ、60 °C で 12 時間以上加熱攪拌した。この溶液に超純水 180 mL を加えて 10 倍に希釈し、5.0 M クエン酸水溶液を用いて pH 4-6 になるよう中和した。中和後、エタノール沈殿法によって溶けた糖鎖を析出させ、遠心分離 (10000 rpm [9170 \times g], 20 min) によって回収した。回収した β -グルカンを 70 v/v% エタノール水溶液で洗浄した後、超純水 2.0 mL に溶解させ凍結乾燥を行い、アルカリ処理 β -グルカンを得た (収量: 36 mg, 収率: 72 %)。

2.2.1.2 ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の調製

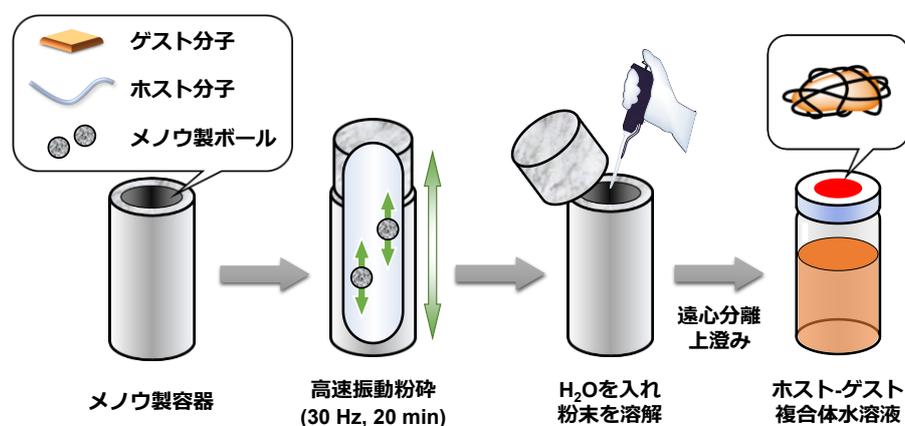


図 2-2. 高速振動粉碎法の概略図

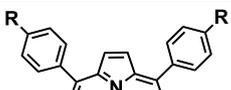
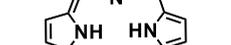
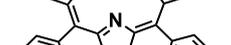
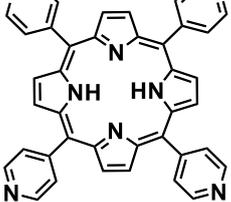
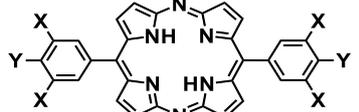
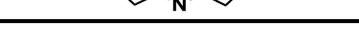
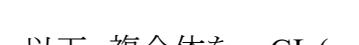
(ゲスト分子:ポルフィリン類縁体, ホスト分子: β -グルカン)

水溶化には、高速振動粉碎法^[2]を用いた。ポルフィリン類縁体 2.0 μ mol とアルカリ処理 β -グルカン 10.0 mg をメノウボール二個とともにメノウ容器に入れ、高速振動粉碎法 (30 Hz, 20 min) により混合した。この混合物に超純水 2.0 mL を加えて抽出した。この抽出液を遠心分離 (4500 rpm [1860 \times g], 20 min) により不溶なポルフィリン類縁体を沈降させた。得られた上澄みを分取し、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体水溶液を得た。

使用したポルフィリン類縁体は以下表 2-1 に示す化合物を用いた。いずれのポルフィリン類縁体も、600–800 nm 付近に吸収を持つことから、生体透過性に優れた赤色光を用いて

活性酸素を発生させるために優れた性能を有すると考えられるため、本研究の光線力学治療モデル薬剤として採用した。

表 2-1. 今回用いたポルフィリン類縁体の構造式および混合量

構造式	番号	置換基	略称	混合量
	1	R = H	TPP	1.2 mg
	2	R = NH ₂	TAPP	1.3 mg
	3	R = OH	THPP	1.4 mg
	4	R = OMe	TMOPP	1.5 mg
	5	R = COOH	TCPP	1.6 mg
	6	(Pyridyl)	TPyP	1.2 mg
	7	X = Y = H	PhDAP	0.9 mg
	8	X = H, Y = OH	4-OHDAP	1.0 mg
	9	X = OMe, Y = H	3,5-OMeDAP	1.2 mg

以下、複合体を *n*-GL (*n* = 1-9) と略して標記した。また、比較として高速振動粉碎法で調製したポルフィリン類縁体・2,3,6-トリ-*O*-メチル-β-シクロデキストリン錯体のデータを適宜示した。この錯体は *n*-CD_x (*n* = 1-9) と略して標記した。

2.2.2 ポルフィリン類縁体・β-グルカン複合体の分光学的性質と濃度決定

2.2.2.1 ポルフィリン類縁体・β-グルカン複合体のUV-Vis吸収スペクトル測定

2.2.1.2で得られたポルフィリン類縁体・β-グルカン複合体を 30 μL 分取し、超純水 270 μL 加えることで 10 倍に希釈した。この水溶液のUV-Vis吸収スペクトルを測定した。結果を以下図2-3に示す。

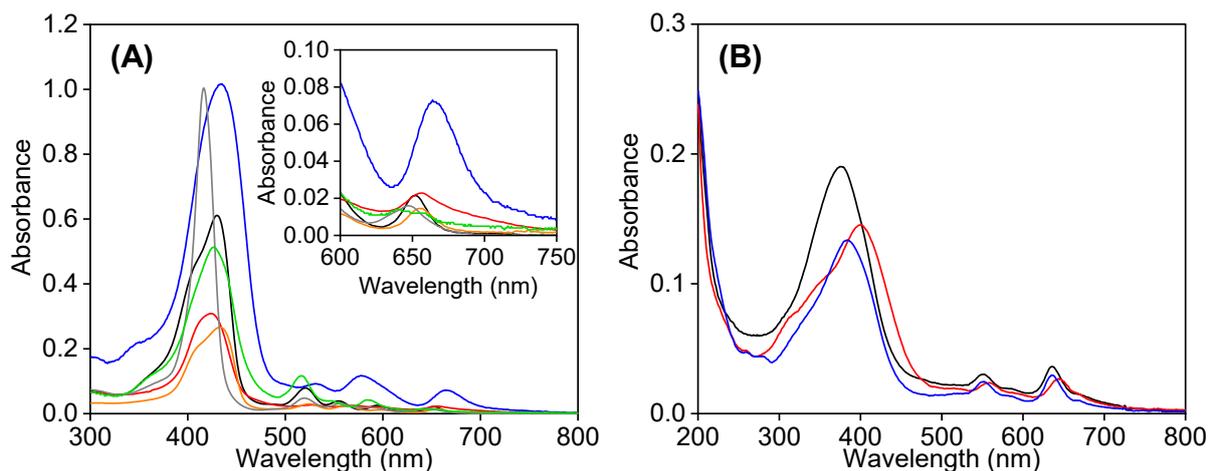


図2-3. ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体水溶液のUV-Vis吸収スペクトル
(25 °C, 1 mm 石英セル, 抽出液を 10 倍希釈)

(A) 黒線: 1-GL, 青線: 2-GL, 赤線: 3-GL, 橙線: 4-GL, 灰線: 5-GL, 緑線: 6-GL
(B) 黒線: 7-GL, 赤線: 8-GL, 青線: 9-GL

図2-3より, 高速振動粉碎法によって β -グルカンと複合化し, ポルフィリン類縁体が水溶化していることが明らかになった。

いずれのポルフィリン類縁体においても, 400 nm 付近の Soret 帯および 600–800 nm 付近の Q 帯が, 1–9-CDx 錯体水溶液の吸収^{3, 4)}と比較して大きくブロード化していた。このことから, ポルフィリン類縁体は多糖複合体中で凝集した状態で存在しているものと推察される。逆に, 5-GL は Soret 帯の吸収が比較的シャープであったことから, 単分散の状態に近いものと考えられ, 複合体を形成せずに化合物 5 のみで水溶化していると予想された。

この水溶液をそれぞれ凍結乾燥し DMSO で再溶解した際の吸光度と, 濃度 ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) が既知であるポルフィリン類縁体・DMSO 溶液を用いて決定した DMSO 中のモル吸光係数 (ϵ_{DMSO}) を用いて, 以下に示すランベルト・ベールの式 (式2-1) から濃度および水中でのモル吸光係数 ($\epsilon_{\text{H}_2\text{O}}$) を決定した。

$$\text{Abs} = \epsilon c \ell \quad \dots(2-1)$$

ここで, Abs:吸光度, ϵ :モル吸光係数 ($\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), c :溶液濃度 ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), ℓ :光路長 (cm) を示す。それぞれのモル吸光係数を以下表2-2に示す。

表2-2. 各種ポルフィリン類縁体・β-グルカン複合体の極大吸収波長とモル吸光係数

略称	ポルフィリンの 略称	極大吸収波長(nm)	モル吸光係数 ϵ_{H_2O} ($dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
1-GL	TPP	430	1.78×10^5
2-GL	TAPP	431	1.31×10^5
3-GL	THPP	424	1.73×10^5
4-GL	TMOPP	433	1.25×10^5
6-GL	TPyP	427	1.12×10^5
7-GL	PhDAP	360	5.72×10^4
8-GL	4-OHDAP	400	4.79×10^4
9-GL	3,5-OMeDAP	380	4.34×10^4

* 化合物5は複合体を形成していないと考えられるため除外

2.2.2.2 ポルフィリン類縁体・β-グルカン複合体の¹H-NMRスペクトル測定

2.2.1.2と同様に調製したポルフィリン類縁体・β-グルカン複合体を D₂O 2.0 mL で抽出し、遠心分離 (4500 rpm [1860 ×g], 20 min) により不溶なポルフィリン類縁体を沈降させた。得られた上澄みを 600 μL 分取し、外径 5 mm の石英 NMR 管に注入した。これをサンプルとして ¹H-NMR スペクトルを測定した。また、比較としてβ-グルカンのみを同様の条件で高速振動粉碎し、抽出・遠心分離したβ-グルカン水溶液も測定した。結果を以下図2-4に示す。

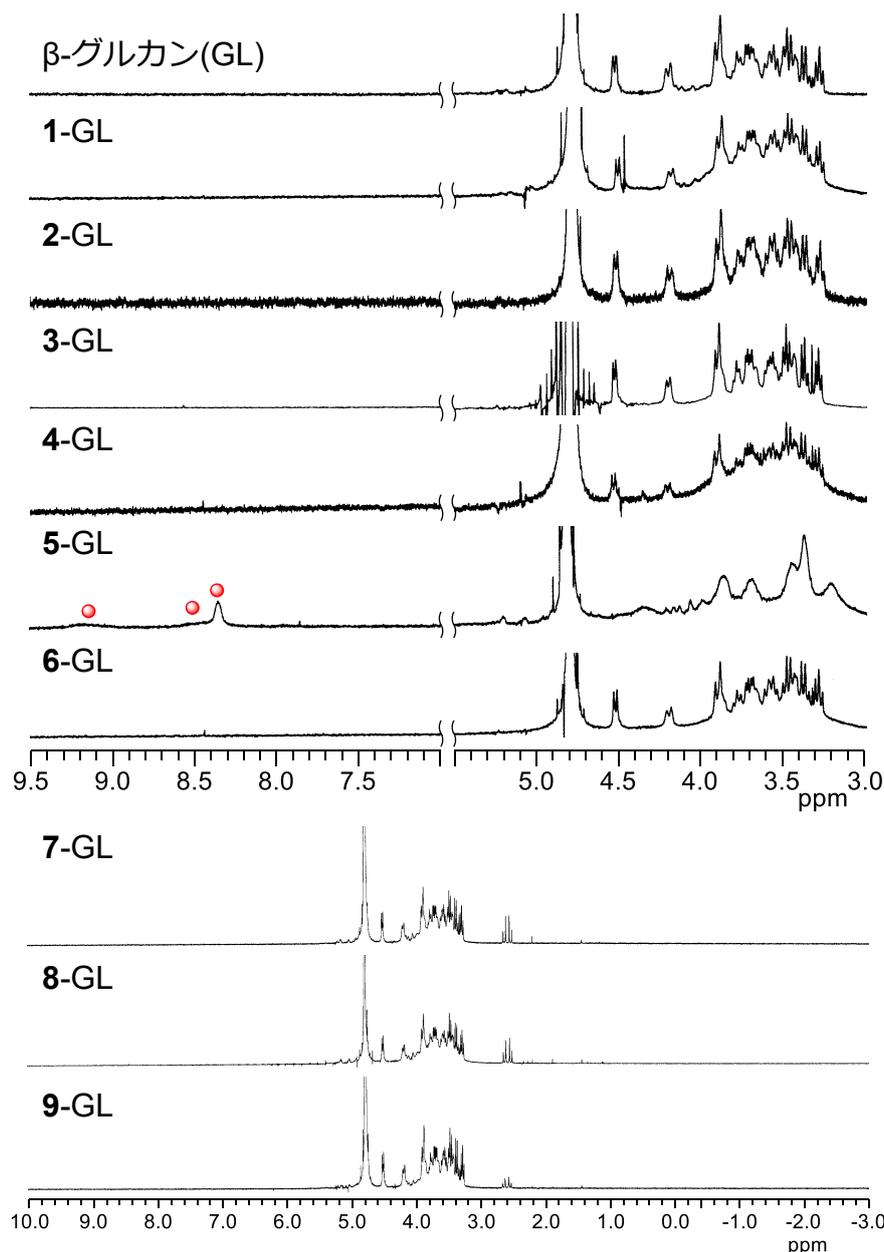


図2-4. ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体水溶液の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル
(400 MHz, 25 °C, 積算回数: 64回, 溶媒: D_2O)
●: フリーのポルフィリン類縁体由来のピーク

図2-4より、5-GL を除く全てのポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体において、ポルフィリン類縁体由来するプロトンのシグナルは検出されなかった。これは、ポルフィリン類縁体が多糖と複合化することで見かけ上高分子量化し、運動性が低下したことによるシグナルの平均化が起こっているものと考えられる。このようなゲスト分子のシグナルが消失する現象は、ゲスト分子をリポソームの脂質二重膜内へ導入した際にも同様に見られる^[5-8]。これらのことから、ポルフィリン類縁体は多糖に包接されて水中に分散していると考えられる。

一方で、5-GL では、8.2–9.5 ppm 付近にポルフィリン由来のシグナルが観測された。こ

これは、化合物 **5** が持つカルボキシル基による比較的高い水溶性によって、複合化した多糖から漏れ出しているものと推察される^[7, 8]。これは、**2.2.2.1**で述べたように **5-GL** の UV-Vis 吸収スペクトルの Soret 帯が比較的シャープになっているということに矛盾しない (図 2-3)。したがって、化合物 **5** は β -グルカンと複合化しておらず水中に単分散している分子も系中に存在していることから、これ以降の実験において **5-GL** を用いることは不適當であると判断し、除外した。

さらに、 β -グルカン水溶液とポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の 3.0–4.5 ppm 付近に見られる多糖由来のシグナルを比較すると、複合化の有無にかかわらずピーク位置や分裂にほとんど変化が無く一致している。この現象については第 3 章にて詳しく検討する。

2.2.2.3 ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の蛍光スペクトル測定

2.2.1.2で得られたポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体を、**2.2.2.1**で算出した水中でのモル吸光係数を用いてそれぞれ希釈した。この水溶液の蛍光スペクトルを測定した。結果を以下図2-5に示す。

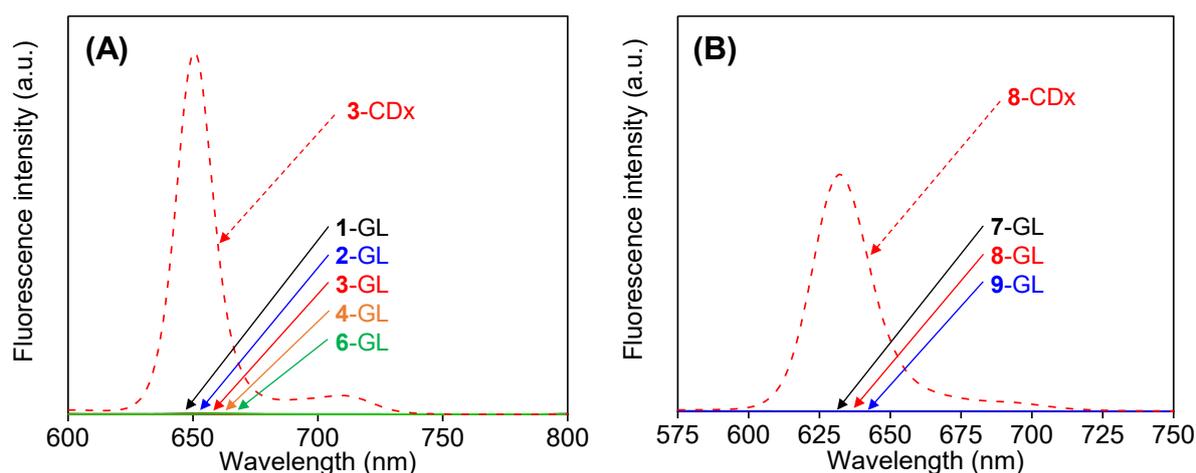


図2-5. ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体水溶液の蛍光スペクトル

(25 °C, 1 cm 蛍光セル, Ex = 540 nm)

(A) 黒線: 1-GL, 青線: 2-GL, 赤線: 3-GL, 橙線: 4-GL, 緑線: 6-GL ([1–4, 6] = 5.0 μ M)

(B) 黒線: 7-GL, 赤線: 8-GL, 青線: 9-GL ([7–9] = 3.0 μ M)

破線: 3-CDx, 8-CDx錯体 ([3-CDx, 8-CDx] = 30 μ M)

(スリット幅: 励起・蛍光側ともに 10 nm, ホトマル電圧: 400 V)

図2-5より、全てのポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の蛍光は非常に微弱であり、観測することができなかった。一方で、**3-CDx** および **8-CDx** 錯体水溶液を同様に測定すると非常に強い蛍光が観測された。これらのことから、ポルフィリン類縁体が複合体内でランダムに凝集したことで、自己失活による消光、すなわち凝集起因消光 (Aggregation Caused Quenching; ACQ) が起きているものと考えられる。

2.2.3 複合体調製法としての高速振動粉碎法の優位性

ここで、他の水溶化法を用いた場合の水溶化能を比較する。今回、単純に化合物 **2** のみを高速振動粉碎した場合 (多糖非共存下; 30 Hz, 20 min), β -グルカン水溶液に化合物 **2** を分散させ超音波照射を行った場合 (超音波照射法; 120 min), β -グルカンと化合物 **2** を水中で加熱攪拌した場合 (加熱攪拌法; 80 °C, 120 min) の三種類の方法和比較検討した。結果を以下図2-6に示す。

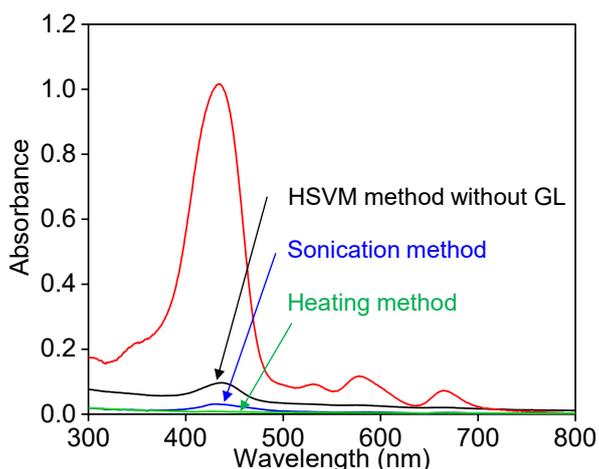


図2-6. 各種調製法で調製した複体の UV-Vis 吸収スペクトル (25 °C, 1 mm 石英セル)
黒線: 多糖非共存下, 赤線: 高速振動粉碎法, 青線: 超音波照射法, 緑線: 加熱攪拌法
(**2**: 2.0 μmol , [β -グルカン] = 5.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 遠心分離 (4500 rpm, 20 min) 後の上清)

図2-6より、高速振動粉碎法を用いた場合 (赤線) と比べて三種類とも著しく吸光度が低かった。Wennerström らは、 γ -シクロデキストリンと [60]フラーレン (C_{60}) を加熱攪拌法^[9]で錯体を調製しているが、今回の結果と同様に高速振動粉碎法の水溶化能と比較すると著しく低いことが分かっている^[2]。これらのことから、高濃度でポルフィリン類縁体を水溶化する方法として、高速振動粉碎法を用いることが最も適当であり、優位な方法であることが分かった。

2.2.4 ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複体のモルフォロジー

2.2.4.1 動的光散乱(DLS)法による粒径測定

光線力学治療薬としての適用を目指す上での条件の一つとして、粒子の大きさが重要である。これは、腫瘍組織に見られる EPR 効果^[10]によって、光感受性物質を患部に集積するために粒径を制御する必要があるためである。

まず、今回調製したポルフィリン類縁体・ β -グルカン複体の粒径を動的光散乱 (DLS) 法によって測定した。DLS は、試料にレーザー光を照射し、その散乱光の“ゆらぎ”を検出することで粒子径を得る方法である。今回測定に使用した動的光散乱測定装置 (Malvern

製, Zetasizer NanoZS Zen3600型) の構成を以下図2-7に示す。

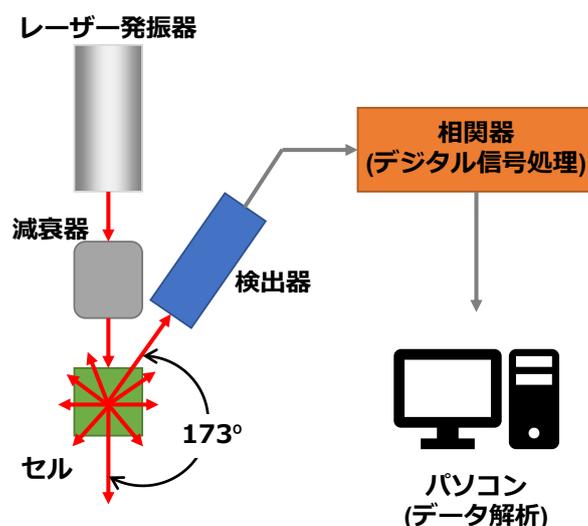


図2-7. DLS 測定装置の構成

まず, 本装置による測定原理を説明する^[11, 12]。レーザー光 (633 nm, 赤色光) を試料に照射すると, ブラウン運動する粒子によって拡散係数 D に応じたゆらぎが生じる。ブラウン運動は大きい粒子ほど動きがゆっくりで遅く, 小さい粒子ほど早く動くため, このゆらぎ方の違いが拡散係数の違いとして反映されることを意味する。この散乱光のゆらぎを, 入射光に対して 173° の位置にある検出器で光の強度信号として検出し, さらにこの信号を相関器で処理したデータに基づき, 自己相関関数に変換する。自己相関関数は, 測定直後の散乱強度を 1 とした時, ブラウン運動によって粒子がランダムに動くことで 0 の状態へ収束する。この時間 (μsec) に対する“1”から“0”へ収束する挙動から拡散係数 D を見積もることができる。カーブフィッティングにより算出した拡散係数 D を基に, ストークス・アインシュタインの式 (式2-2) から粒径が算出される。

$$d = \frac{kT}{3\pi\eta D} \times 10^{12} \quad \dots(2-2)$$

ここで, d : 流体力学的直径 (nm), k : ボルツマン定数 ($1.38 \times 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$), T : 絶対温度 (K), η : 粘度 (mPa·s), D : 拡散係数 ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) を示す。

さらに本装置では, 自己相関関数から粒子径別の収束速度を抽出するアルゴリズムを用いて粒子径分布を求めることができる。この方法で得られた分布は光強度分布と呼び, 本論文では特に断りが無い限り光強度分布をデータとして採用した。

2.2.1.2で得られたポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体を, 2.2.2.1で算出した水中でのモル吸光係数を用いてそれぞれ $5.0 \mu\text{M}$ に希釈し, この水溶液の粒径を測定した。結果を以下図2-8に示す。

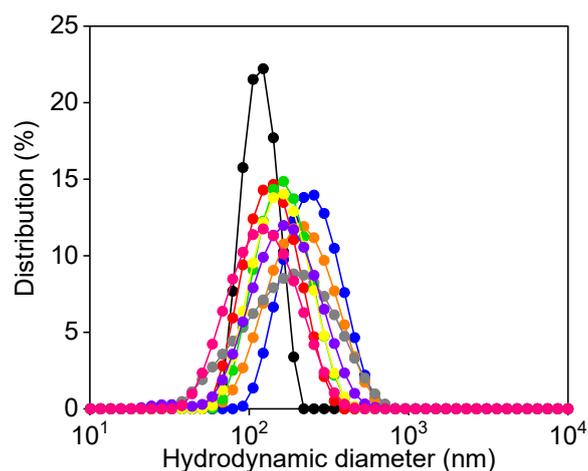


図2-8. ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の粒径分布 (25 °C)
 黒: β -グルカン, 青: 1-GL, 赤: 2-GL, 橙: 3-GL, 灰: 4-GL, 緑: 6-GL
 黄: 7-GL, 紫: 8-GL, ピンク: 9-GL

また, それぞれの平均流体力学的直径と多分散度 (Polydisperse Intensity; PDI) を以下表2-3にまとめた。

表2-3. ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の平均粒径

略称	ポルフィリン類縁体の略称	平均流体力学的直径 (nm)	PdI
GL	β -グルカンのみ	119	0.23
1-GL	TPP	262	0.17
2-GL	TAPP	148	0.13
3-GL	THPP	231	0.22
4-GL	TMOPP	207	0.26
6-GL	TPyP	173	0.14
7-GL	PhDAP	170	0.16
8-GL	4-OHDAP	184	0.22
9-GL	3,5-OMeDAP	136	0.20

以上の結果から, いずれの複合体もおおよそ 100–200 nm の粒径を持つことが示唆される。したがって, EPR 効果による腫瘍組織への蓄積が期待される粒径に制御できていると考えられる。

2.2.4.2 透過型電子顕微鏡(TEM)によるモルフォロジーの観察

2.2.4.1では DLS による粒径の測定により, ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体のおおよその粒径が示唆されたため, 透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope;

TEM) により直接観察することで、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の粒径を評価した。

本評価では、2.2.1.2で得られたポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体のうち、2-GL を評価に用い、像のコントラストを付けるためにリンタングステン酸溶液によるネガティブ染色による観察方法を採用した。2.2.1.2で得られた 2-GL 水溶液を 100 μ M に希釈したのち、カーボン支持膜グリッド上に約 1 分間溶液を浸した。その後溶液を濾紙で吸い取り、その上に 2.0 wt% リンタングステン酸水溶液を約 10 秒間浸したのちに溶液を濾紙で吸い取った。これをサンプルとして観察を行った。以下図2-9に結果を示す。

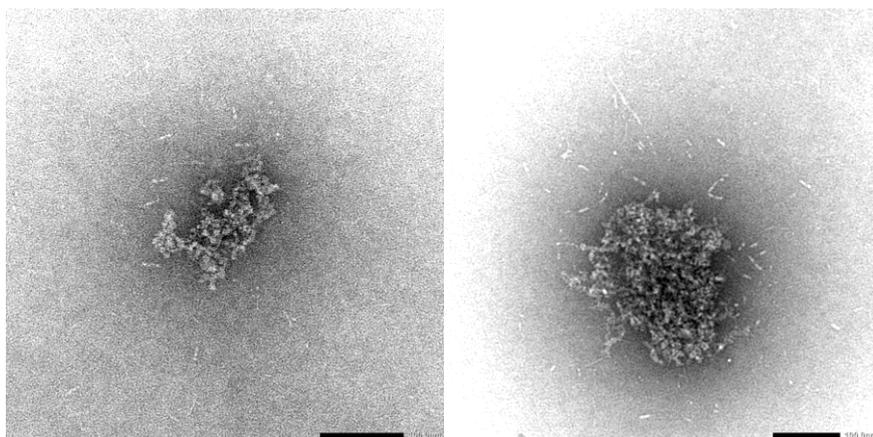


図2-9. 2-GL のTEM観察画像
(ネガティブ染色; 2.0 wt% リンタングステン酸, Scale bar: 100 nm)

図2-9より、2-GL と思われる凝集体の像が観察された。この凝集体はおおよそ 100 nm 程度であった。このことから、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体は EPR 効果を発現する適切な粒径であると考えられる。

2.2.5 ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の長期安定性の評価

続いて、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体が分散している状態をどれだけ維持できるか、長期安定性を評価した。水中に分散した状態を長期間維持し、性質もほとんど変わらないことが、薬剤としての適用にあたり好ましい条件であるといえる。

2.2.1.2で得られた 1-4-GL および 6-GL を 20 μ M , 7-9-GL を 100 μ M に希釈し、これを室温下で静置した。希釈直後を 0 日として 0.5 (12 h), 1, 2, 3, 5, 7 日後の上清液の UV-Vis 吸収スペクトルを測定し、0 日に対するそれぞれの極大吸収波長における吸光度の減少率を算出した。以下図2-10に結果を示す。

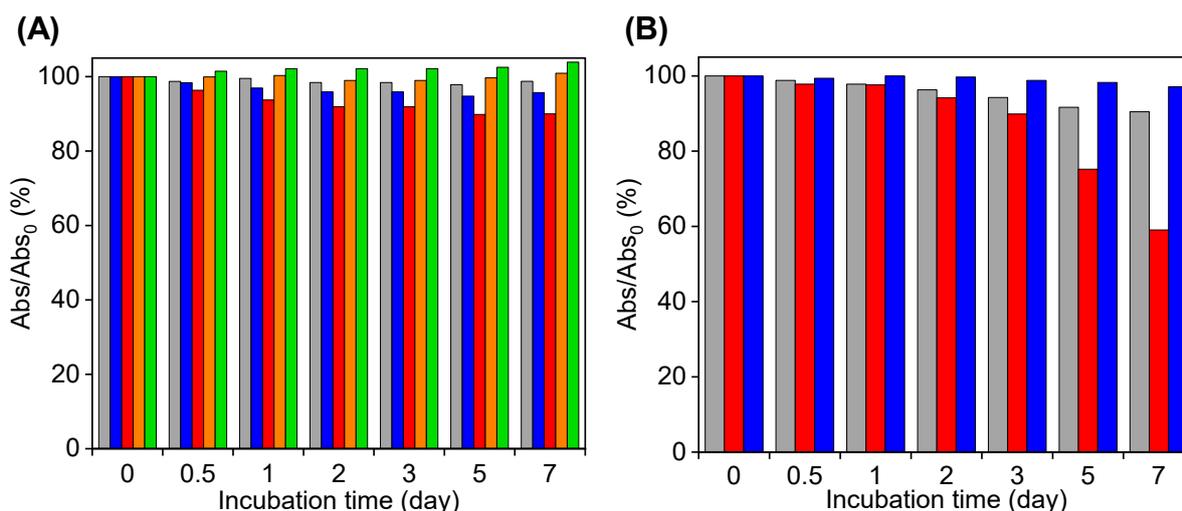


図2-10. ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体を室温下に静置した際の吸光度の減少率 (25 °C, 1 mm 石英セル, Abs₀: 希釈直後の吸光度)

(A) 灰: 1-GL, 青: 2-GL, 赤: 3-GL, 橙: 4-GL, 緑: 6-GL

(B) 灰: 7-GL, 赤: 8-GL, 青: 9-GL

図2-10より, 8-GL を除いて, ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体は水中で 7 日後においてもおよそ 80 % 以上保持していた。8-GL については 2 日後以降から徐々に減少を続け, 7 日後には 60 % 程度まで低下した。これは, 化合物 8 が持つヒドロキシ基に加え, ポルフィリン環に挿入された窒素原子上にある孤立電子対の影響によって, 粒子同士の凝集が促進されたことで, 分散性が低下したためであると考えられる。

いずれのポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体においても, 1-9-CDx と比較すると長期安定性は向上した^[3, 4]。一般にシクロデキストリン錯体では, 錯化していないフリーのシクロデキストリンと, 錯化したシクロデキストリンとの間で交換が起こっており, その影響でゲスト分子が脱落しやすく, 結果的に不安定になる^[13, 14]。今回, β -グルカンのような直鎖状多糖類を用いることで分子の交換が起こらず, 安定性が向上したものと考えられる。

2.2.6 ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の一重項酸素発生能評価

光線力学治療薬の最も重要な役割は, 光励起によって得たエネルギーを溶存酸素 (三重項酸素) にエネルギー移動もしくは電子移動によって受け渡し, 活性酸素を発生させることである。この活性酸素発生能が治療効率に直接関与することになる。そこで, 活性酸素の一種である一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) のポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体による発生能を評価した。評価方法には9,10-アントラセンジイルビス(メチレン)ジマロン酸 (ABDA) を用いる ABDA ブリーチング法を適用した^[15]。ABDA は, アントラセン部位に一重項酸素をエンドペルオキシドの形で捕捉する。380 nm もしくは 400 nm 付近にみられるアントラセン由来の吸収の減少を経時的に追うことで, 一重項酸素の発生能を評価した。なお, 光照射は生体に対して低侵襲であり, かつ生体透過性の高い 620 nm 以上の波長の赤色光を用いた。

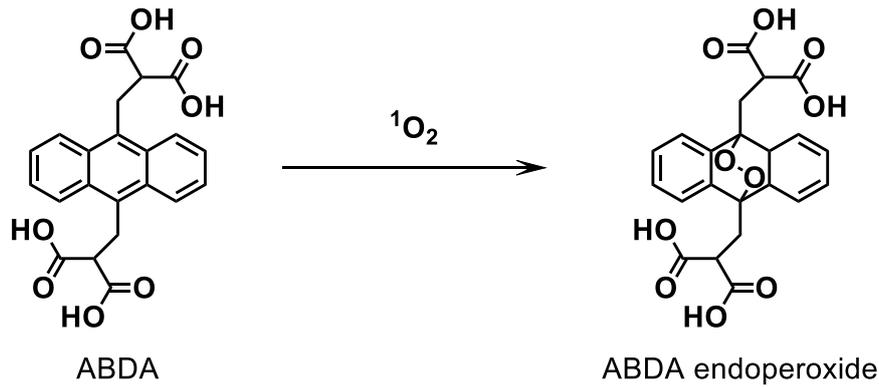


図2-11. ABDA ブリーチング法の原理

2.2.1.2で得られた 1-4-GL および 6-GL を 15 μM , 7-9-GL を 3.0 μM に希釈した後、この水溶液を 1 cm 石英セルに 2970 μL 入れ、遮光しながら 30 分間酸素ガスによるバブリングを行った。30 分後、UV-Vis 吸収スペクトルを測定し、このスペクトルをブランクとした。次に、2.5 mM ABDA \cdot DMSO 溶液 30 μL 加え、再び UV-Vis 吸収スペクトルを測定した。この時のスペクトルを光照射時間 0 分後として光照射をおこない、7.5, 15, 30, 60 分後における UV-Vis 吸収スペクトルを測定した。測定時の最終濃度は [1-4, 6] = 15 μM , [7-9] = 3.0 μM , [ABDA] = 25 μM である。本実験はそれぞれ 3 回行い、平均値および標準偏差を算出した。以下図2-12に結果を示す。

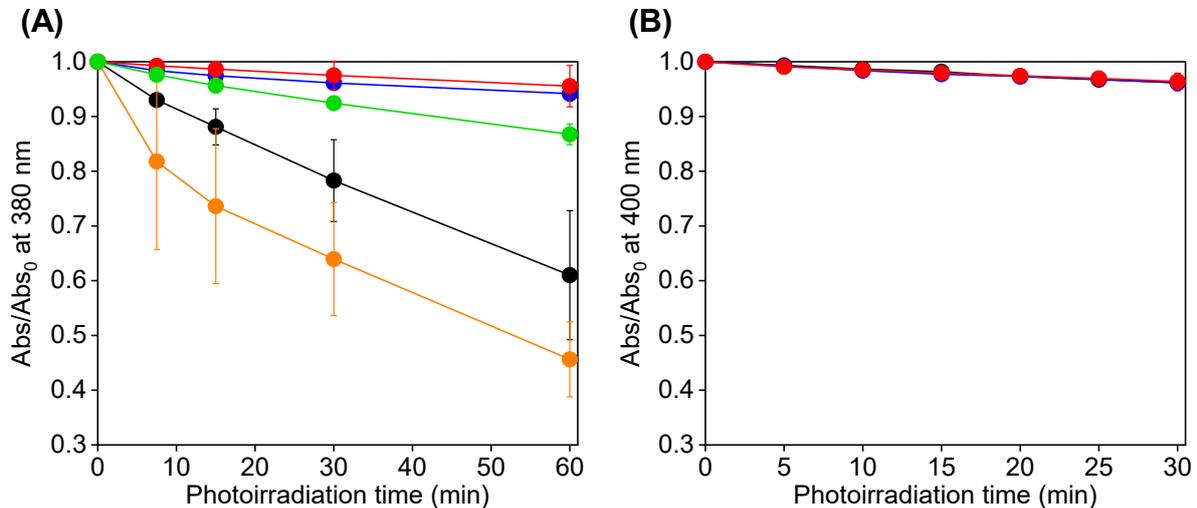


図2-12. ポルフィリン類縁体 \cdot β -グルカン複合体からの一重項酸素発生による ABDA の吸光度変化

(25 $^{\circ}\text{C}$, 1 cm 石英セル, [1-4, 6] = 15 μM , [7-9] = 3.0 μM , [ABDA] = 25 μM)

(A) 黒線: 1-GL, 青線: 2-GL, 赤線: 3-GL, 橙線: 4-GL, 緑線: 6-GL

(B) 黒線: 7-GL, 赤線: 8-GL, 青線: 9-GL

図2-12より、1-GL, 4-GL および 6-GL においては 380 nm もしくは 400 nm 付近の吸

収の減少がみられたことから、一重項酸素の発生を確認した一方で、**2-GL**, **3-GL** および **7-9-GL** においては同吸収の減少がほとんどみられなかった。この結果から、**1-GL**, **4-GL** および **6-GL** は赤色光によって一重項酸素を発生させることができ、これを用いた光線力学治療薬としての効果が期待されると予想した。

2.2.7 ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の光線力学活性評価

ここまでは、細胞外におけるポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の光線力学治療薬としての評価を行ってきた。前項でそれぞれの複合体のおおよその活性を把握したことから、ここからは *in vitro* (細胞内) におけるポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の光線力学治療薬としての評価を行う。本項では、がん細胞としてヒト子宮頸がん由来細胞株 (HeLa細胞) に対する光照射による細胞障害性と細胞内挙動を評価した。

2.2.7.1 細胞実験の準備

2.2.7.1.1 液体培地の調製

HeLa 細胞用液体培地は、フェノールレッドおよびL-グルタミン含有の最小必須培地 (Minimum Essential Media; MEM) 44.5 mL に対して、安定化された抗生物質-抗真菌剤混合溶液 (100 \times) 500 μ L およびウシ胎児由来血清 (Fetal Bovine Serum; FBS) 5.0 mL をクリーンベンチ内にて無菌状態で混合し、4 $^{\circ}$ C で保存した。

2.2.7.1.2 リン酸緩衝生理食塩水(1 \times PBS)の調製

塩化マグネシウムおよび塩化カルシウム不含の 10 倍濃縮リン酸緩衝生理食塩水 (10 \times PBS, pH 7.4) 50 mL に対して、オートクレーブ滅菌処理済み超純水 450 mL を加え、1 \times PBS を調製し、4 $^{\circ}$ C で保存した。

2.2.7.1.3 トリプシン-エチレンジアミン四酢酸(EDTA)混合溶液の調製

0.5 % トリプシン-EDTA 混合溶液 (10 \times) 2.0 mL に対し、2.2.7.1.2で調製した 1 \times PBS 18 mL 加えることで 0.05 % トリプシン-EDTA 混合溶液 (1 \times) を調製し、4 $^{\circ}$ C で保存した。

2.2.7.1.4 細胞の培養

-80 $^{\circ}$ C で凍結保存していた HeLa 細胞のクライオチューブを 37 $^{\circ}$ C の恒温槽で急速に解凍した。このクライオチューブを 70 v/v% エタノール水溶液で滅菌した後、クリーンベンチ内で 15 mL のコニカルチューブに移し取り、液体培地 4 mL 加えて遠心分離した

(1500 rpm, 3 min)。細胞が底部に沈殿していることを確認した後、上清の液体培地を取り除いた。沈殿した細胞に対し 4 mL の液体培地を加え、ピペッティングを行うことで十分に分散させた。この細胞懸濁液を、あらかじめ 10 mL の液体培地を入れた 10 cm 培養ディッシュに 300–500 μL 加え、37 °C、5 % CO_2 の条件に設定した CO_2 インキュベーター内に保管し、細胞を培養した。

2.2.7.2 HeLa細胞に対する光線力学活性評価

2.2.7.2.1 光照射サンプルの調製

2.2.7.1で調製した液体培地、1×PBS、トリプシン-EDTA 混合溶液を 37 °C の恒温槽で温めた。前もって培養した細胞が 80 % コンフルエントに達していることを確認した後、クリーンベンチ内でディッシュ中の液体培地をアスピレーターで除き、1×PBS 5 mL を加え洗浄した。1×PBS をアスピレーターで除き、トリプシン-EDTA 混合溶液 500 μL を添加し、ディッシュ全体に行きわたらせた。これを 5 % CO_2 インキュベーター内で 5 分程度温めることで、細胞をディッシュから剥離させた。細胞がディッシュから剥離していることを顕微鏡で確認した後、液体培地 1.5 mL を加え浮遊する細胞を 15 mL コニカルチューブに回収し、遠心分離 (1500 rpm, 5 min) した。細胞が底部に沈殿していることを確認した後、上清の液体培地をアスピレーターで取り除いた。沈殿した細胞に対し 4 mL の液体培地を加え、ピペッティングを行うことで十分に分散させた。この細胞懸濁液中の細胞数を、トリパンブルー染色による細胞の生死を区別した上で、フックス-ローゼンタール血球計算板を用いてカウントした。この細胞懸濁液の濃度を $8.55 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{cm}^{-3}$ となるように希釈し、48 wells plate に希釈後の細胞懸濁液を 200 μL ずつ播種し、37 °C、5 % CO_2 の条件に設定した CO_2 インキュベーター内で 24 時間インキュベートした。24 時間後、あらかじめ調製したポルフィリン類縁体 $\cdot\beta$ -グルカン複合体水溶液を規定した濃度になるようにそれぞれ添加し、さらに 24 時間インキュベートした。24 時間後、48 wells plate から液体培地をアスピレーターで取り除き、1×PBS 200 μL で洗浄することで取り込まれていないポルフィリン類縁体 $\cdot\beta$ -グルカン複合体を除いた。ここに、再び液体培地を 200 μL 加えたものを光照射サンプルとした。

2.2.7.2.2 細胞への光照射

2.2.7.2.1で作製した 48 wells plate 光照射サンプルを 25 °C インキュベーター内に移し、石英ファイバー付きキセノンランプ光源を用いて光照射を行った (610–740 nm, 30 min, 9.0 $\text{mW} \cdot \text{cm}^{-2}$)。その後、37 °C、5 % CO_2 の条件に設定した CO_2 インキュベーター内で 24 時間インキュベートした。

2.2.7.2.3 WST-8アッセイによる細胞生存率の算出^[16]

本研究における細胞生存率の定量法として、WST-8 アッセイ法を採用した。WST-8 は水溶性テトラゾリウム塩であり、細胞内脱水素酵素によって還元されることで水溶性ホルマザンを生成する。このホルマザンは 450 nm 付近に極大吸収を持つことから、液体培地中の吸光度を直接測定することで、容易に生細胞数を算出できる。以下に測定の原理を示す。

水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 はその高い水溶性から、生細胞膜を透過することなく細胞外の液体培地中に存在する。一方、共存する電子伝達物質 1-メキシ PMS は容易に生細胞膜を透過し細胞内外を行き来できる。ここで、生細胞内では乳酸脱水素酵素の補酵素である NADH から 1-メキシ PMS へ電子移動が起こる。電子を受け取った 1-メキシ PMS は細胞外の WST-8 を還元させることで、水溶性ホルマザン WST-8 ホルマザンが生成する^[17]。この WST-8 ホルマザンは NADH 濃度、すなわち生細胞数に比例して産生される^[18]ことから、450 nm 付近の吸光度を測定することで細胞生存数を定量可能である。本実験では、あらかじめ作製した検量線 (細胞濃度 $8.55 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{cm}^{-3}$ を 100% とし、0, 25, 50, 75, 100, 150% 細胞分散液を 48 wells plate で 3 日間培養)との比較により細胞生存率を算出した。

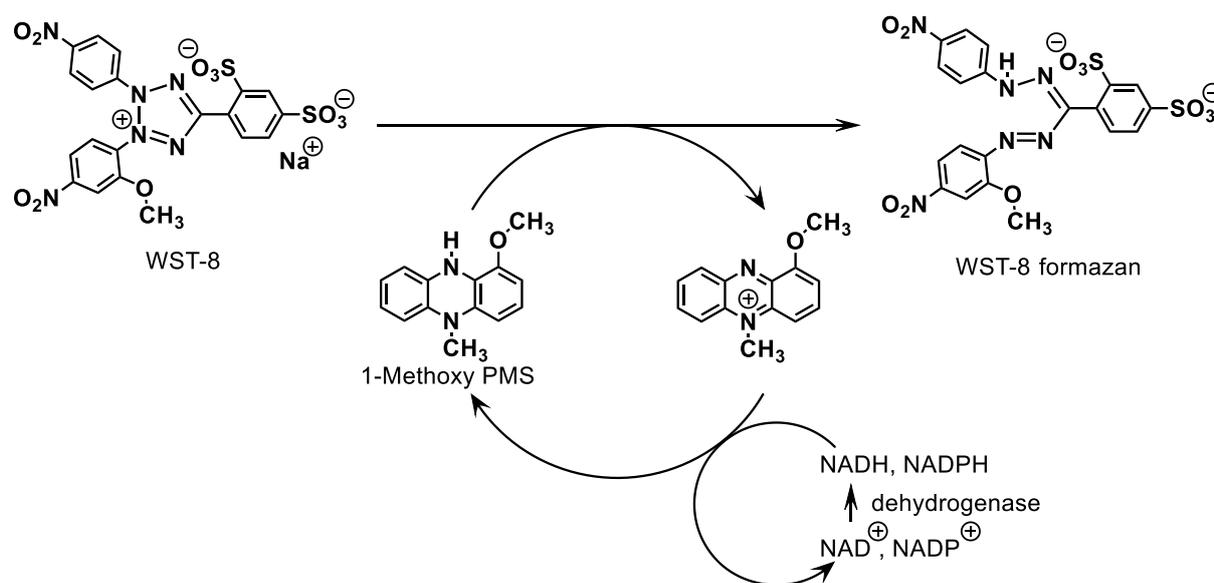


図2-13. WST-8 を用いた生細胞数測定の原理^[16]

光照射 24 時間後の 48 wells plate 光照射サンプルおよび、光照射を行わなかった同様のサンプル (暗所サンプル) をインキュベーターから取り出し、液体培地をアスピレーターで除き、5 v/v% に希釈した Cell Counting Kit-8 (1-メキシ PMS と WST-8 の混合溶液) 液体培地溶液を 200 μL ずつ加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 の条件に設定した CO_2 インキュベーター内で 30 分間インキュベートした。その後、呈色した液体培地を 96 wells plate に 100 μL 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、生細胞数の定量を行った。本実験はそれぞれ 3 回行い、平均値および標準偏差を算出した。以下図2-14に結果を示す。

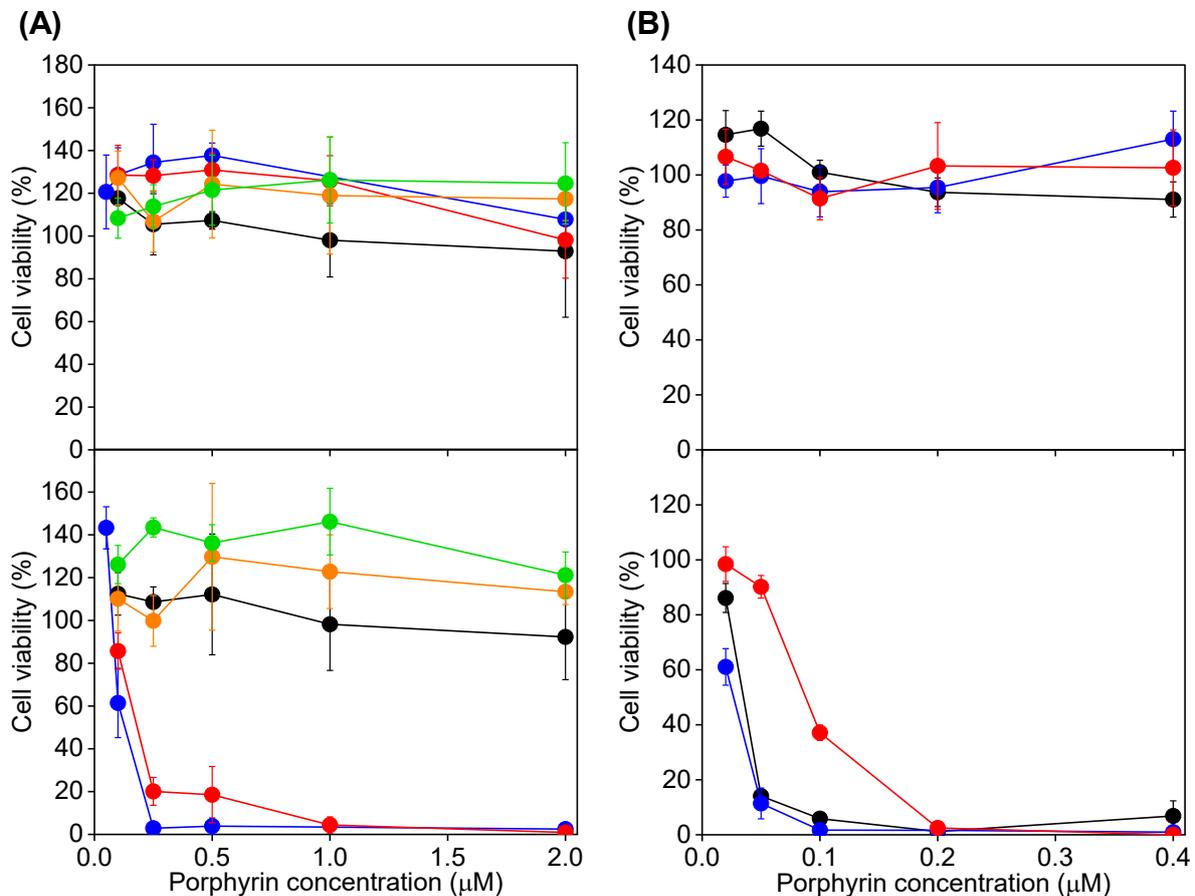


図2-14. 細胞生存率に対するポルフィリン類縁体・β-グルカン複合体の濃度依存性

(A) 黒線: 1-GL, 青線: 2-GL, 赤線: 3-GL, 橙線: 4-GL, 緑線: 6-GL

(B) 黒線: 7-GL, 赤線: 8-GL, 青線: 9-GL

(上段: 暗所サンプル, 下段: 光照射サンプル)

暗所サンプルにおいては、いずれのポルフィリン類縁体・β-グルカン複合体も細胞生存率が大きく低下することはなかったことから、ポルフィリン類縁体・β-グルカン複合体そのものが持つ毒性は低いということが明らかになった。また、いずれのサンプルも細胞生存率が 100 % 以上となっていた。これは、複合化していないフリーのβ-グルカンが細胞増殖を促進させたためであると考えられる^[19]。

一方で、光照射サンプルにおいては 2-GL, 3-GL および 7-9-GL を投与した場合のみ細胞生存率が大きく低下した。この複合体が持つ毒性を定量的に比較するため、細胞の生存率が 50% にあたる濃度である半数阻害濃度 (IC₅₀) を算出し、以下表2-4にまとめた。さらに 2-CDx, 3-CDx および 7-9-CDx における結果と比較した。

表2-4. 各種水溶化ポルフィリン類縁体の IC₅₀ 値

番号	名称	IC ₅₀ (μM)	
		β-グルカン複合体	シクロデキストリン錯体 ^[3, 4]
2	TAPP	0.08	0.08
3	THPP	0.18	0.15
7	PhDAP	0.035	0.047
8	4-OHDAP	0.087	0.15
9	3,5-OMeDAP	0.027	0.022

既に光線力学治療薬として上市されているフォトフリンの IC₅₀ は 3.02 μM^[20, 21] であることから、2-GL, 3-GL および 7-9-GL はフォトフリンよりも低濃度で治療が可能であると思われる優れた光線力学活性を持つことが明らかとなった。また、シクロデキストリンで水溶化した場合の IC₅₀ 値と比較すると、ほとんど同様の値が得られており毒性に変化はなかった。これは、光線力学活性の違いがそれぞれのポルフィリン類縁体の特徴に依存していることを示唆している。

ここで、2.2.6で測定した一重項酸素発生能と光線力学活性の関連性を検討する。2.2.6では、1-GL, 4-GL および 6-GL は一重項酸素発生能があり、光線力学活性があるものと予想していた。しかし、活性を有していたのは一重項酸素発生能がほとんどなかった 2-GL, 3-GL および 7-9-GL であった。この原因として、一重項酸素発生能がある 1-GL, 4-GL および 6-GL において光毒性が無いことから、細胞への取込みの有無がこの違いに寄与していると考えた。そこで、細胞内へのポルフィリン類縁体・β-グルカン複合体の取込みに関する検討を行った。

2.2.7.3 HeLa細胞に対する蛍光染色実験

2.2.2.3で述べたようにポルフィリン類縁体・β-グルカン複合体は、自己失活による消光が起きているが、完全に消光しているわけではなく微弱な蛍光は観測することができる。この微弱な蛍光を利用して、細胞内への取込みに関する情報を得ようと考えた。

培養した HeLa 細胞が入ったディッシュ中の培地をアスピレーターで取り除き、調製した 1×PBS 5 mL で洗浄した後、調製したトリプシン-EDTA 混合溶液 500 μL を加え、37 °C、5 % CO₂ インキュベーターで 5 分間インキュベートした。5 分間の処理後遊離した HeLa 細胞を、1 mL の培地を入れた 2.7 cm ガラス製ディッシュに 10 μL 入れ、37 °C、5 % CO₂ インキュベーターで 24 時間培養した。プラスチック製ではなくガラス製ディッシュを用いたのは、ポルフィリン類縁体のディッシュへの吸着を抑えるためである。

HeLa 細胞を培養した 2.7 cm ガラス製ディッシュから培地をアスピレーターで取り除き、1×PBS 1 mL で洗浄した後、[1-4, 6] = 8.0 μM, [7-9] = 4.0 μM に希釈したポルフィリン類縁体・β-グルカン複合体を 10 μL ディッシュに加え、同条件で 24 時間インキュベートした。24 時間後上清を取り除き、フェノールレッド不含 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-

MEM) を 1 mL 加え, 蛍光顕微鏡で観察した。蛍光フィルターは G2-A (励起光:510–560 nm, 蛍光: ≥ 590 nm) を用いた。ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の最終濃度は, [1–4, 6] = 0.8 μ M, [7–9] = 0.4 μ M である。以下図2-15に結果を示す。

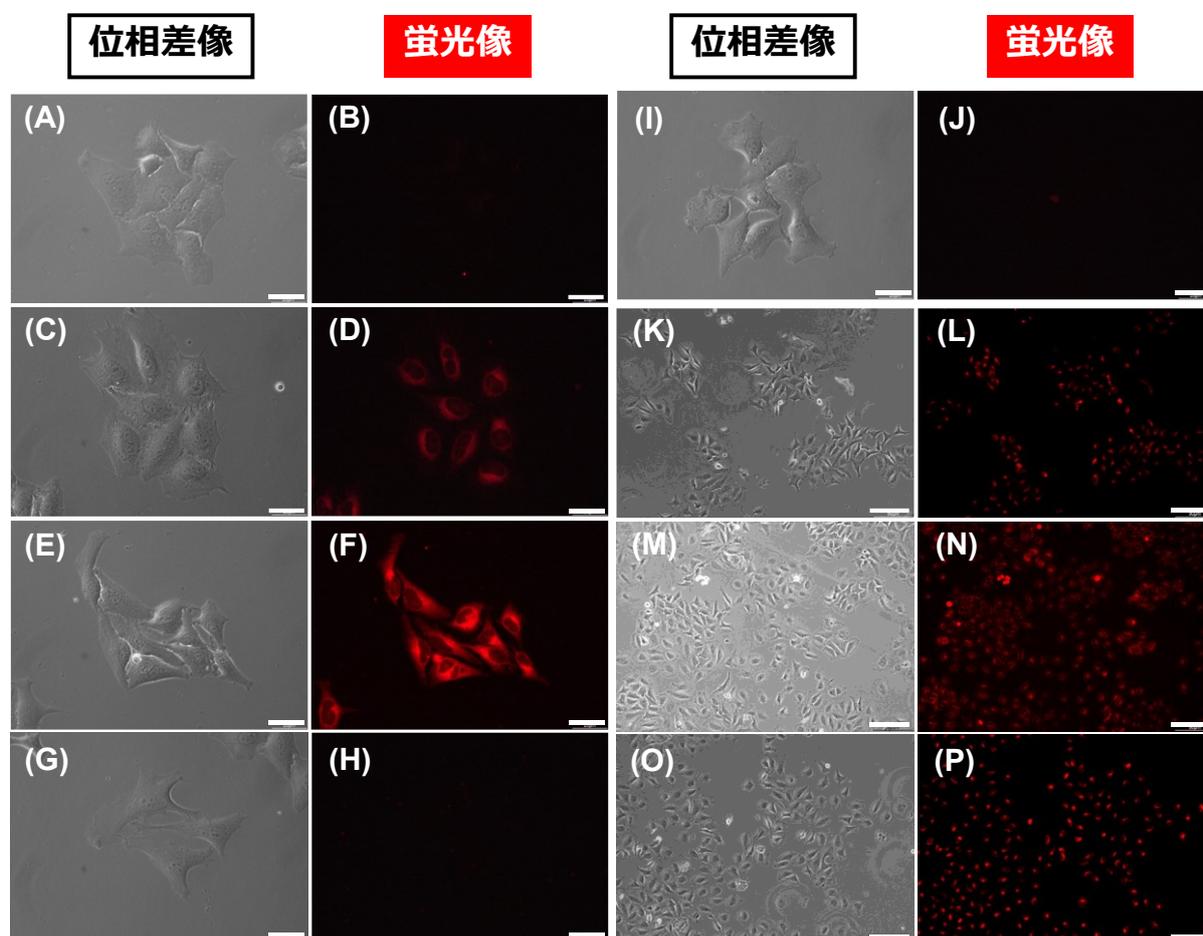


図2-15. ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体添加時における細胞蛍光染色像
 (A, B) 1-GL, (C, D) 2-GL, (E, F) 3-GL, (G, H) 4-GL, (I, J) 6-GL
 (K, L) 7-GL, (M, N) 8-GL, (O, P) 9-GL
 Scale bar: (A–J) 20 μ m, (K–P) 90 μ m

図2-15より, 1-GL, 4-GL および 6-GL では蛍光像を確認することができなかった。一方, 2-GL, 3-GL および 7–9-GL ではポルフィリン類縁体由来の蛍光と思われる像を観測した。これは, 光線力学活性の有無のトレンドと一致しており, 光線力学活性と細胞内への複合体の取込みに相関があることを示唆している。

さらに, 細胞内へ複合体が取り込まれた 2-GL, 3-GL および 7–9-GL において, 非常に微弱であったはずのポルフィリン類縁体由来の蛍光が大きく増大していた。これは, 細胞内への複合体の侵入がトリガーとなり, ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の蛍光強度を増大させているのではないかと考えられる。

2.2.7.4 HeLa細胞へのポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の取り込み量評価

前項では、細胞内へポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体が取り込まれていることを示唆するデータが得られた。そこで、取り込み後の細胞を破碎することで、細胞内部にポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体が存在することを直接観測することを試みた。今回、細胞の蛍光像が観測されなかった **1-GL** と、蛍光像が観測できた **2-GL** の二種類をピックアップしてその違いを比較した。

2.7 cm ガラス製ディッシュにあらかじめ 1.0×10^5 cells \cdot cm $^{-3}$ に希釈した HeLa 細胞懸濁液を 1 mL 入れ、37 °C、5 % CO $_2$ インキュベーターで 24 時間培養した。24 時間後、あらかじめ 40 μ M に希釈した **1-GL** および **2-GL** 水溶液を 100 μ L ずつそれぞれ添加し、さらに 24 時間インキュベートした。24 時間後、ディッシュから液体培地をアスピレーターで取り除き、1 \times PBS 1 mL で洗浄することで取り込まれていない **1-GL** および **2-GL** を除いた。ここに、細胞や組織を溶解し、細胞内成分の抽出時に用いられる RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) バッファーを 1 mL 添加し、氷浴で冷やしながら 30 分間静置した。上澄みをマイクロチューブにすべて回収し、遠心分離 (4500 rpm, 5 min, 4 °C) を行い、不溶物を沈殿させた。回収した上澄み 1 mL に対して、クロロホルム 1 mL を加えポルフィリン類縁体のみを抽出した。このクロロホルム抽出液の蛍光スペクトルを測定することで、取り込み量の相対的な比較を行った。以下図2-16に結果を示す。

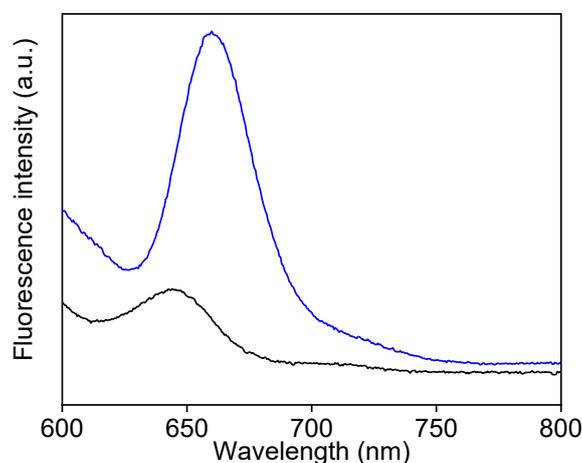


図2-16. 細胞内から抽出したポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の蛍光スペクトル
(25 °C, 1 cm 蛍光セル, Ex = 540 nm)

黒線: **1-GL**, 青線: **2-GL**

(スリット幅: 励起・蛍光側ともに10 nm, ホトマル電圧: 400 V)

図2-16より、化合物 **2** 由来の蛍光が大きく観測されたため、これらの複合体は細胞内に取り込まれ、**2-GL** を効率よく細胞内へ輸送できていることを示した。

2.2.8 光線力学活性スイッチング能のメカニズム解明

ここまで得られたポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の特徴をまとめると、光線力学活性については、水溶液中における一重項酸素発生能を有するもの (1-GL, 4-GL および 6-GL) は、細胞内へ取り込まれないことから光線力学活性を有しなかった。一方、水溶液中における一重項酸素発生能を有しないもの (2-GL, 3-GL および 7-9-GL) は、細胞内へ取り込まれており、かつ光線力学活性を有していた。すなわち、後者は細胞内へ複合体が侵入することで、蛍光強度の増大および一重項酸素発生能が“OFF 状態”から“ON 状態”へとスイッチングしていることを意味している (図2-17)。

β -グルカン複合体	一重項酸素発生能	光線力学活性	細胞内蛍光	水溶液中蛍光
1, 4, 6	◎	×	×	×
2, 3, 7, 8, 9	×	◎	◎	×

図2-17. ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の特徴

本項では、このようなスイッチング現象について主に 3 つの仮説を立て、それぞれ検証することで現象のメカニズムの解明を試みた。

2.2.8.1 仮説①:ポルフィリン類縁体のDNAインターカレーション

インターカレーション (Intercalation) とは、分子の集合体に存在する間隙に他の分子が挿入される現象のことを指す。DNA は 2 本のポリヌクレオチド鎖が水素結合によって二重らせん構造を形成しており、塩基対間に π - π スタッキングしやすい平面性の高い分子がインターカレートする場合がある^[22]。なかでもポルフィリン環は平面性が高く、DNA へインターカレートしやすいことが知られている^[23]。これまでに、ポルフィリン類縁体・シクロデキストリン錯体は、酸性条件下において DNA にインターカレートし、中性条件下では元の錯体に可逆的に交換が起こることが報告されている^[24]。そこで、本現象も細胞内の DNA に対してポルフィリン類縁体がインターカレートすることでスイッチングが起きているのではないかと考えた。本項では、スイッチング能を持つ 2-GL について検討した。

2-GL を 0.9 w/v% 生理食塩水にて調製し、これを 10 μ M に希釈した。この溶液 1500 μ L と、200 μ g \cdot mL⁻¹ に希釈した DNA 生理食塩水溶液を 1500 μ L ずつ混合し、およそ 1 分後に UV-Vis 吸収スペクトルを測定した。最終濃度は [2] = 5.0 μ M, [DNA] = 100 μ g \cdot mL⁻¹ である。以下図2-18に結果を示す。

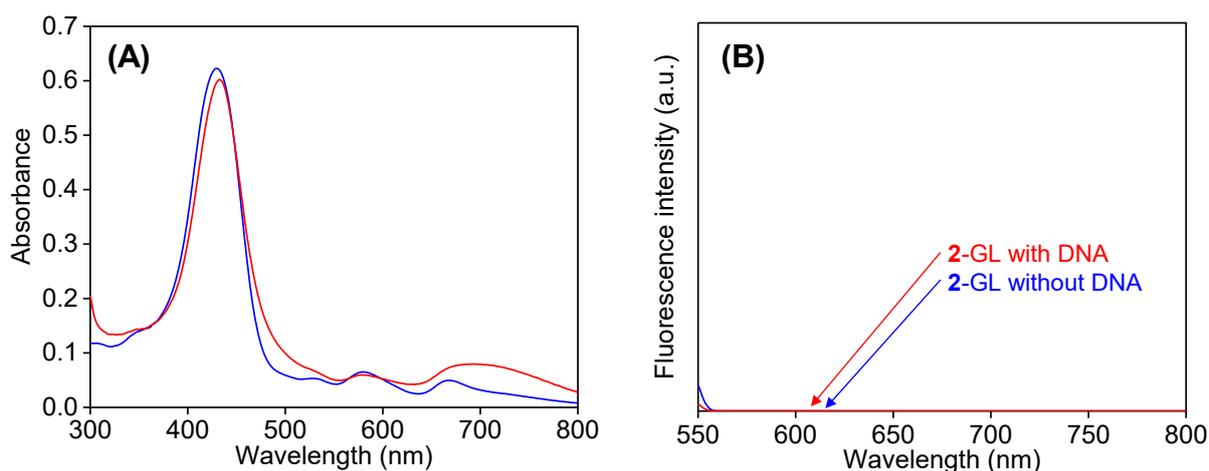


図2-18. DNA 存在下における 2-GL の
(A) UV-Vis 吸収スペクトルおよび (B) 蛍光スペクトル

青線:DNA 非存在下, 赤線:DNA 存在下

(25 °C, 1 cm 蛍光セル, Ex = 540 nm, ホトマル電圧:400 V)

([2] = 5.0 μM , [DNA] = 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

図2-18より, UV-Vis 吸収スペクトルの概形および蛍光スペクトルにほとんど変化が無かったことから, DNA とのポルフィリン類縁体との間に相互作用が無いことが示唆された。したがって, ポルフィリン類縁体のインターカレートは起こっておらず, 仮説①の可能性は低いと考えられる。

2.2.8.2 仮説②:リソソーム内酵素の糖分解作用によるポルフィリン類縁体の放出

リソソームは細胞小器官の一つであり, 細胞内の消化を担っている部位である。リソソーム内には加水分解酵素が多く存在しており, エンドサイトーシスによって取り込まれた物質は最終的にリソソームに輸送され, 加水分解により分解される。ナノ粒子で構成された薬剤も, エンドサイトーシスによって細胞内へ輸送される場合がある^[25]。これまでに, ポルフィリン類縁体・シクロデキストリン錯体がエンドサイトーシスによって取り込まれ, リソソーム内に位置していることを共染色実験によって確認している^[26]ため, リソソーム内における加水分解酵素の作用によってポルフィリン類縁体が放出されるのではないかと予想した。そこで, リソソーム内の酵素機能を阻害する作用を持つ塩化アンモニウム水溶液^[27]を細胞へ投与し, 酵素機能を阻害した際の蛍光染色像に変化があるかどうかを検討した。機能阻害することで蛍光染色像が得られなくなれば, 本仮説を支持する結果と言える。本項では, スwitching能を持つ化合物 2- β -グルカン複合体について検討した。

2.7 cm ガラス製ディッシュにあらかじめ $1.0 \times 10^5 \text{ cells}\cdot\text{cm}^{-3}$ に希釈した HeLa 細胞懸濁液を 1 mL 入れ, 37 °C, 5 % CO_2 インキュベーターで 24 時間培養した。24 時間後, あらかじめ 100 mM に希釈した塩化アンモニウム水溶液を 100 μL 添加し, 24 時間インキュベートした。インキュベート後, 8.0 μM に希釈した 2-GL 水溶液を 100 μL ずつそれぞれ

添加し、さらに 24 時間インキュベートした。24 時間後、ディッシュから液体培地をアスピレーターで取り除き、1×PBS 1 mL で洗浄することで取り込まれていない 2-GL を除いた。ここに、フェノールレッド不含 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) を 1 mL 加え、蛍光顕微鏡で観察した。蛍光フィルターは G2-A (励起光:510–560 nm, 蛍光: ≥ 590 nm) を用いた。最終濃度は $[2] = 0.8 \mu\text{M}$, $[\text{NH}_4\text{Cl}] = 10 \text{ mM}$ である。以下図2-19に結果を示す。

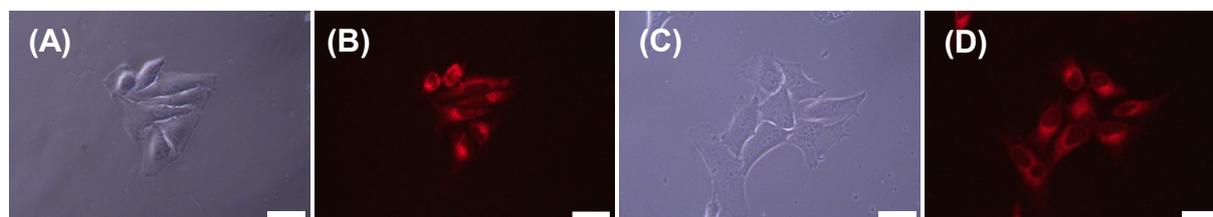


図2-19. 酵素機能阻害剤を添加した際の細胞蛍光染色像

(A, C:位相差像, B, D:蛍光像, Scale bar: 20 μm , $[2] = 0.8 \mu\text{M}$, $[\text{NH}_4\text{Cl}] = 10 \text{ mM}$)

(A, B) 塩化アンモニウム非存在下, (C, D) 塩化アンモニウム存在下

図2-19より、塩化アンモニウム非存在下および存在下にかかわらず、細胞の蛍光染色像が観測された。このことから、リソソーム内の酵素の影響はほとんどないことが示唆された。したがって、仮説②の可能性は低いと考えられる。

2.2.8.3 仮説③:細胞膜との相互作用による複合体の状態変化

2.2.8.1および2.2.8.2では、主に細胞内における現象に焦点を当てて仮説を検証した。これは、本来持つポルフィリン類縁体の性質が細胞内において活性化されていることから着想している。しかし、いずれの仮説についても可能性が低いことが明らかとなった。そこで、細胞内の機能から着眼点を変え、細胞膜の機能に焦点を当てることにした。

細胞膜はリン脂質を構成脂質とした、細胞の内外を隔てる膜を指す。細胞膜は脂質二重膜構造を取っており、表面には様々な糖鎖が修飾され、タンパク質が膜を貫通するなど、生命活動を維持するために必要な機能を有している^[28]。本項では、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体と細胞膜との関連性を検討するが、細胞膜は非常に複雑な機能を多数有しているため、関係性をピンポイントに解明することは困難を極めることが予想される。そこで、細胞膜が持つ脂質二重膜構造を単純化した、人工細胞膜モデルであるリポソームを用いて検証を行った。

2.2.8.3.1 リポソームの準備

単層リポソーム (Small Unilamellar Vesicle; SUV) はエクストルージョン法によって調製した。1,2-ジミリストイル-*sn*-グリセロ-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、50 mM ストック溶液を調製した。ストック溶液から 160 μL を

バイアル瓶に分取し、クロロホルムを留去することで脂質薄膜を形成した。このバイアル瓶に超純水 2.0 mL を加え、ボルテックスミキサーを用いて水和させた。脂質溶液を $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$ の液体窒素を用いて急速に凍結させ、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ の湯浴で速やかに溶解させた。この凍結-融解サイクルを 8 回繰り返すことで、多層リポソームから単層リポソームへと変化させる。最後に、この脂質溶液を孔径 100 nm のフィルターに 11 回エクストルージョンすることで、粒径を整えた SUV を調製した。最終濃度は $[\text{DMPC}] = 4.0\text{ mM}$ である。

ジャイアントリポソーム (Giant Unilamellar Vesicle; GUV) はエレクトロフォーメーション法^[29]によって調製した。1-パルミトイル-2-オレオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスファチジルコリン (POPC) 1.5 mg (2.0 μmol) をクロロホルム 2 mL に溶解させ、1 mM ストック溶液を調製した。酸化インジウムスズ (Indium Tin Oxide; ITO) 透明電極に、ストック溶液 100 μL を乗せ、薄く伸ばし窒素ガスを吹きかけて乾燥することで、電極上に脂質薄膜を形成させた。この薄膜をシリコンカバーで囲み、超純水 1 mL をゆっくりと薄膜の上へのせ、もう一枚の ITO 透明電極で挟み込んだ。2 V, 10 Hz の交流電圧を 30 分間印加することで、10 μm 以上の大きさを持つ GUV を調製した。最終濃度は $[\text{POPC}] = 100\text{ }\mu\text{M}$ である。

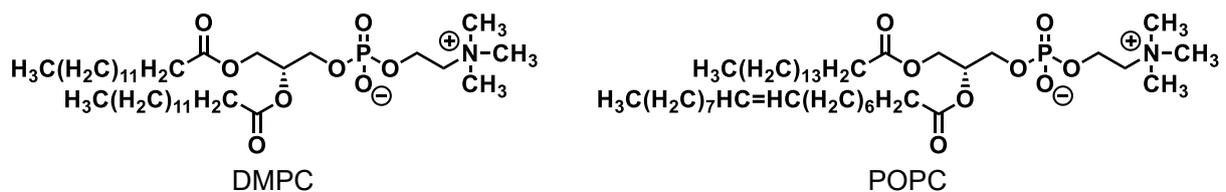


図2-20. リポソームの調製に用いた脂質分子の構造

2.2.8.3.2 リポソーム水溶液とポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体水溶液との混合

2.2.8.3.1で調製した 4.0 mM DMPC-SUV 水溶液 750 μL , 超純水 750 μL を混合した溶液に対して、あらかじめ調製した 10 μM ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体水溶液 1500 μL を混合し、湯浴にて $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 時間加熱攪拌した。最終濃度は、 $[\mathbf{1-4}, \mathbf{6}] = 5.0\text{ }\mu\text{M}$, $[\mathbf{7-9}] = 3.0\text{ }\mu\text{M}$, $[\text{DMPC}] = 1.0\text{ mM}$ である。この溶液の UV-Vis 吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定した。以下図2-21および22に結果を示す。

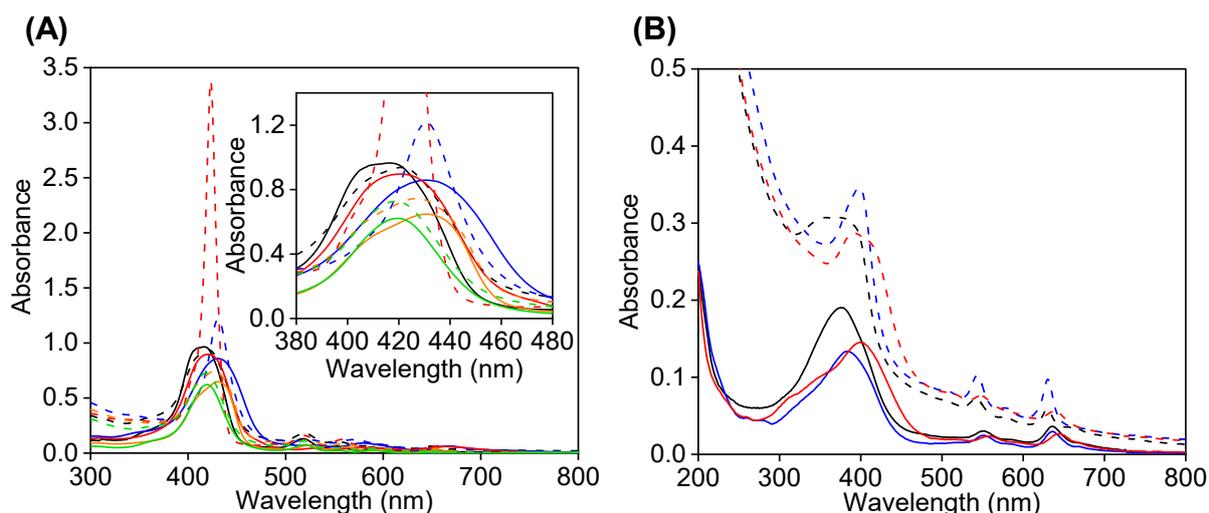


図2-21. DMPC-SUV 存在下における

ポルフィリン類縁体・β-グルカン複合体水溶液の UV-Vis 吸収スペクトル
(25 °C, 1 mm 蛍光セル, [1-4, 6] = 5.0 μM, [7-9] = 3.0 μM, [DMPC] = 1.0 mM)

(A) 黒線: 1-GL, 青線: 2-GL, 赤線: 3-GL, 橙線: 4-GL, 緑線: 6-GL

(B) 黒線: 7-GL, 赤線: 8-GL, 青線: 9-GL

実線: DMPC-SUV 非存在下, 破線: DMPC-SUV 存在下

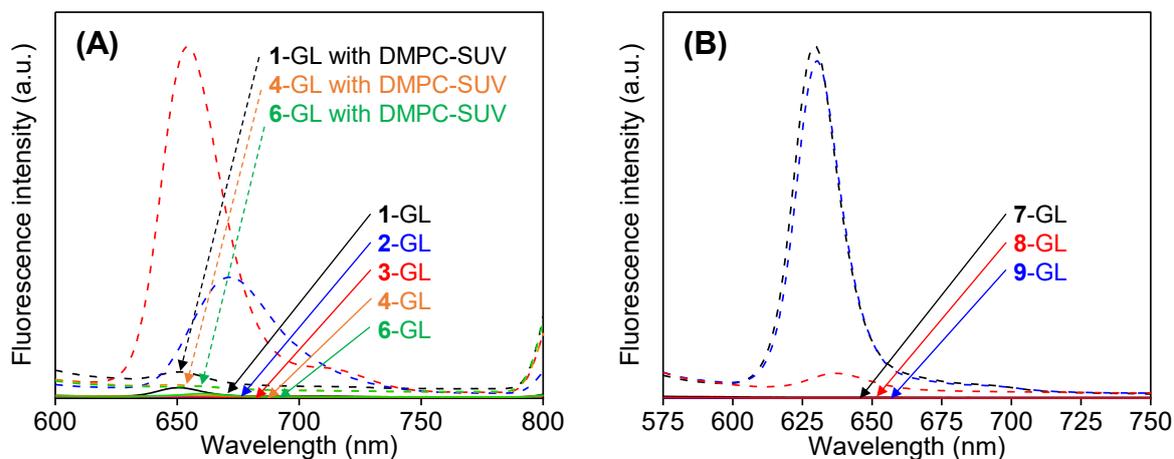


図2-22. DMPC-SUV 存在下における

ポルフィリン類縁体・β-グルカン複合体水溶液の蛍光スペクトル

(25 °C, 1 cm 蛍光セル, Ex = 540 nm, [1-4, 6] = 5.0 μM, [7-9] = 3.0 μM, [DMPC] = 1.0 mM)

(A) 黒線: 1-GL, 青線: 2-GL, 赤線: 3-GL, 橙線: 4-GL, 緑線: 6-GL

(B) 黒線: 7-GL, 赤線: 8-GL, 青線: 9-GL

実線: DMPC-SUV 非存在下, 破線: DMPC-SUV 存在下

(スリット幅: 励起・蛍光側ともに 10 nm, ホトマル電圧: 400 V)

図2-21および22より, 2-GL, 3-GL および 7-9-GL に DMPC-SUV を混合した場合のみスペクトルに変化があった。UV-Vis 吸収スペクトルにおいては, Soret 帯および Q 帯の

吸収がブロードであったものが比較的シャープに変化した。また蛍光スペクトルにおいては、蛍光強度が著しく増大した。ただし、**8-GL** については変化の程度は他のポルフィリン類縁体と比較すると限定的であった。これら変化のあったポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の組み合わせは、これまでに述べた光線力学活性を有するものと細胞内蛍光を発する組み合わせと一致している。さらに、既報^[30, 31]によれば、多糖類はリポソーム膜表面と相互作用し吸着することが知られている。これらのことから、**2-GL**, **3-GL** および **7-9-GL** が持つ光線力学活性のスイッチング能は脂質二重膜、すなわち細胞膜との相互作用によって膜に吸着することで引き起こされているものと示唆される。また、この吸着現象はゲスト分子の置換基(ここでは、アニリンやフェノール部位) に大きな影響を受けていると考えられる。

2.2.8.3.3 ジャイアントリポソーム(GUV)を用いた複合体吸着の直接観察

前項では、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体がリポソーム膜表面への吸着していることを示唆するデータが得られた。そこで、マイクロメートルオーダーの大きなリポソームを作製し、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体を混合することで、光学顕微鏡を用いて吸着現象を直接観察することを試みた。本項では、スイッチング能を持つ **2-GL** について検討した。

2.2.8.3.1で調製した POPC-GUV に対して、あらかじめ調製した 100 μ M **2-GL** 水溶液 10 μ L をマイクロシリンジで注入した。この ITO 電極を顕微鏡用パネルヒーターで 37 $^{\circ}$ C, 30 分間加熱した。これを観察サンプルとして、蛍光顕微鏡で観察した。蛍光フィルターは G2-A (励起光: 510–560 nm, 蛍光: \geq 590 nm) を用いた。最終濃度は、 $[2] = 1.0 \mu$ M, $[POPC] = 100 \mu$ M である。以下図2-23に結果を示す。

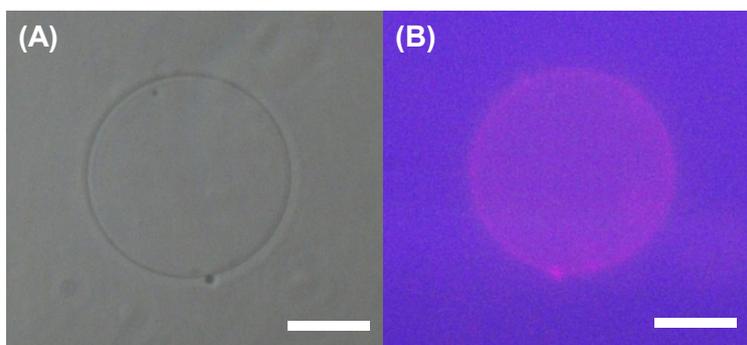


図2-23. POPC-GUV へ **2-GL** を添加した際の GUV 蛍光染色像
(Scale bar: 10 μ m, $[2] = 1.0 \mu$ M, $[POPC] = 100 \mu$ M)
(A) 位相差像 (B) 蛍光像

図2-23より、GUV 膜表面が蛍光染色されている像を観測することに成功した。この結果から、脂質二重膜に **2-GL** が相互作用によって吸着していることを明らかにした。**3-GL** および **7-9-GL** においても同様に吸着していると考えられる。

2.2.8.3.4 リポソーム水溶液混合後の一重項酸素発生能評価

前項の結果から、ある特定の置換基を持つポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体は、リポソーム膜表面に吸着し、蛍光を発することを確認した。そこで、リポソーム膜表面への吸着と一重項酸素発生能への影響の関連性を検討した。本項では、スイッチング能を持つ化合物のうち、**2-GL** および **7-9-GL** をピックアップして検討した。

2.2.8.3.2と同様の手順で得た **DMPC-SUV**・**2-GL** および **DMPC-SUV**・**7-9-GL** を 1 cm 石英セルに 2970 μ L 入れ、遮光しながら 30 分間酸素ガスによるバブリングを行った。30 分後、UV-Vis 吸収スペクトルを測定し、このスペクトルをブランクとした。次に、2.5 mM **ABDA**・**DMSO** 溶液 30 μ L 加え、再び UV-Vis 吸収スペクトルを測定した。この時のスペクトルを光照射時間 0 分後として光照射をおこない、7.5, 15, 30, 60 分後における UV-Vis 吸収スペクトルを測定した。測定時の最終濃度は **[2]** = 15 μ M, **[7-9]** = 3.0 μ M, **[DMPC]** = 1.0 mM, **[ABDA]** = 25 μ M である。本実験はそれぞれ 3 回行い、平均値および標準偏差を算出した。以下図2-24に結果を示す。

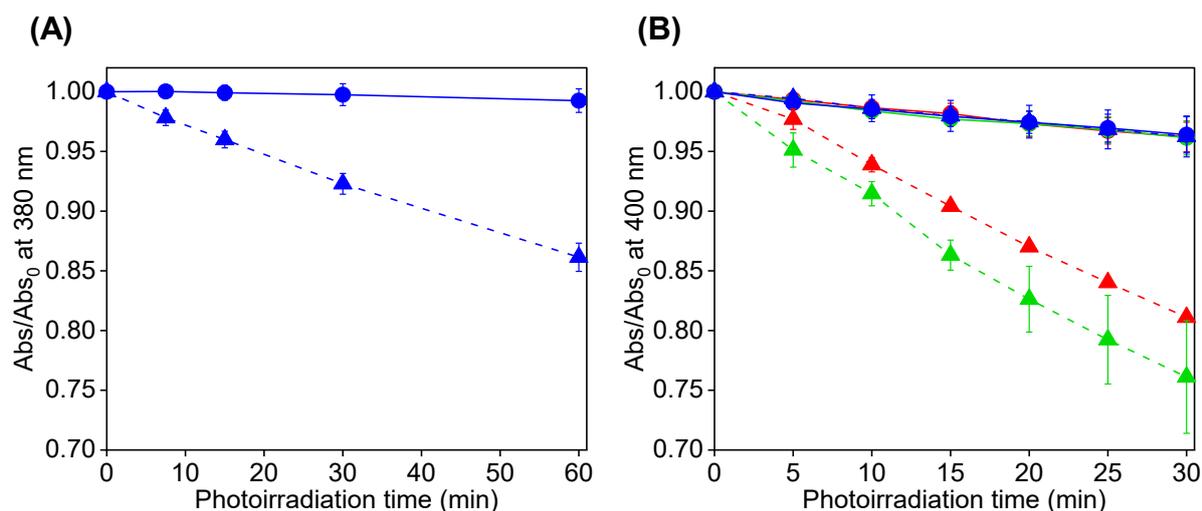


図2-24. **DMPC-SUV** 存在下におけるポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体からの一重項酸素発生による **ABDA** の吸光度変化

(25 °C, 1 cm 石英セル, **[2]** = 15 μ M, **[7-9]** = 3.0 μ M, **[DMPC]** = 1.0 mM, **[ABDA]** = 25 μ M)

(A) 青線: **2-GL** (B) 赤線: **7-GL**, 青線: **8-GL**, 緑線: **9-GL**

実線, ●: **DMPC-SUV** 非存在下 破線, ▲: **DMPC-SUV** 存在下

図2-24より、いずれのポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体においても **DMPC-SUV** 存在下で一重項酸素発生能が向上した。**8-GL** については、**2.2.8.3.2**と同様に変化の程度は他のポルフィリン類縁体と比較すると限定的であった。このことから、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の脂質二重膜への吸着が一重項酸素発生能にも大きく影響を及ぼしていることが明らかになった。これは、細胞に取り込まれることで光線力学活性がスイッチングする現象を、細胞外で再現していると言える。

2.2.8.4 仮説④:細胞膜との相互作用によるゲスト分子の移行

2.2.8.3における検証によって、仮説③を支持する結果が得られた。しかし、疑問点も残る。それは、疎水性相互作用などの比較的弱い相互作用で起きている吸着という駆動力だけで、自己消光が起きるほどの凝集体構造を変化させる力があるのかどうか、という点である。自己消光している状態から蛍光を発する状態にするためには、① J会合体のような秩序のある凝集状態に変化する^[32]、② 完全に単分散な状態に変化する必要がある。両者は、ポルフィリン類縁体同士の距離がある一定程度離れている状態にある点で共通している。これを今回の系に適用するならば、① リポソームに吸着後、 β -グルカン複合体内でポルフィリン類縁体の凝集状態が秩序ある状態へと変化する、② リポソームに吸着後、 β -グルカンからポルフィリン類縁体が脂質二重膜中へ移行する、と考えることができる。現時点での結果からは、この両者のどちらかを区別することができない。言い換えると、リポソーム・ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体におけるポルフィリン類縁体の存在位置が不明である。そこで本項では、この状態変化がポルフィリン類縁体の脂質二重膜中への移行を意味していると考え、検証を行った。

2.2.8.4.1 [60]フラーレンを用いた蛍光消光によるポルフィリン類縁体の位置の推定

[60]フラーレン (C_{60}) は色素に対して良好な消光剤として働く^[33]。さらに、SUV の脂質二重膜中に導入された C_{60} は、脂質の末端アルキル鎖付近、すなわち膜中央付近に存在していることが明らかになっている^[34]。そこで、 C_{60} が導入された DMPC-SUV (Lipid Membrane Incorporated C_{60} ; LMIC₆₀) 水溶液をポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体と混合させた時の、蛍光消光を確認し、ポルフィリン類縁体の存在位置を推定することを試みた。本項では、スイッチング能を持つ 2-GL について検討した。

既報^[35]の方法で調製した C_{60} ・ γ -CDx 錯体を 100 μ M に希釈した。ここに、2.2.8.3.1で調製した 4 mM DMPC-SUV 1000 μ L と 100 μ M C_{60} ・ γ -CDx 錯体水溶液 1000 μ L をバイアル瓶内で混合し、これを 80 $^{\circ}$ C で 1 時間加熱攪拌することで LMIC₆₀ を得た。混合後の最終濃度は [DMPC] = 2 mM, [C_{60}] = 50 μ M である。加熱後の溶液は紫色から黄色へ変化した。

あらかじめ 2-GL を 10 μ M に希釈した。1 cm 蛍光セルに、10 μ M 2-GL 1500 μ L と、調製した LMIC₆₀ を 1500 μ L を混合し、37 $^{\circ}$ C, 30 分間加熱した。この時の最終濃度は [2] = 5.0 μ M, [C_{60}] = 25 μ M, [DMPC] = 1 mM, [2]/[DMPC] = 0.5 mol% である。この溶液の UV-Vis 吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定した。以下図2-25に結果を示す。

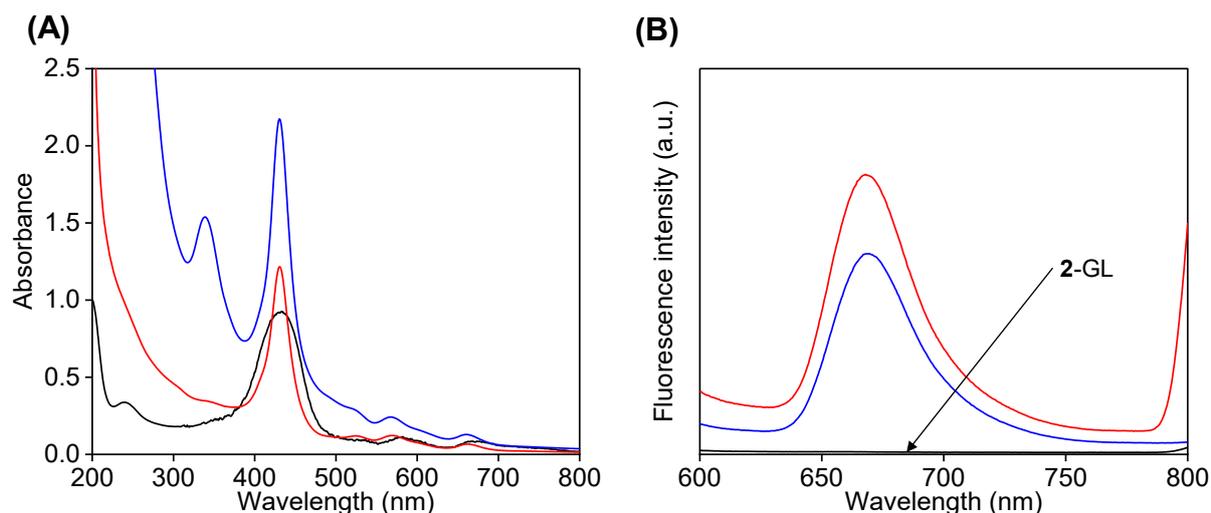


図2-25. LMIC₆₀ 存在下における 2-GL 水溶液の
(A) UV-Vis 吸収スペクトル (B) 蛍光スペクトル

黒線: 2-GL, 赤線: 2-GL と DMPC-SUV を混合, 青線: 2-GL と LMIC₆₀ を混合
(25 °C, 1 cm 蛍光セル, Ex = 540 nm, ホトマル電圧: 400 V)
([2] = 5.0 μM, [C₆₀] = 25 μM, [DMPC] = 1 mM)

図2-25より, LMIC₆₀ に 2-GL を混合した際の蛍光強度は, C₆₀ 不含の DMPC-SUV と比較して, 約 30 % 強度が低下していた。このことから, 脂質二重膜中央付近に存在する C₆₀ と比較的近い位置にポルフィリンが存在していることを示した。したがって, ポルフィリン類縁体はβ-グルカンから脂質二重膜中へと移行していることが示唆される。

2.2.8.4.2 脂溶性カルボシアニン色素を用いたポルフィリン類縁体の位置の推定

シアニン系色素のうち, 長鎖炭化水素を持つ脂溶性カルボシアニン色素は脂質二重膜を容易に標識することができ, 蛍光団は膜表面に存在している。これまでに, この色素を光アンテナ分子として用い, 脂質二重膜中の C₆₀ へ効率よくエネルギーを伝達し, 一重項酸素発生能を向上させた例が報告されている^[36, 37]。この時, エネルギーはフェルスター共鳴エネルギー移動 (Förster Resonance Energy Transfer; FRET) による機構で移動しており, その分子同士はおよそ 10 nm 以内で近接していることが分かる。また, 適切な吸収を持つ脂溶性カルボシアニン色素を選択することで, FRET が起きる条件の一つである, 蛍光スペクトルと励起スペクトルの重なりを持たせることができる。そこで, 蛍光スペクトルがポルフィリン類縁体の励起スペクトルと大きく重なる, 1,1'-ジオクタデシル-3,3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニン (DiI) を用いて, FRET に起因するエネルギー移動を観測することで, ポルフィリン類縁体の存在位置を推定することを試みた。本項では, スイッチング能を持つ 2-GL について検討した。

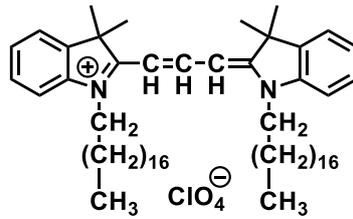


図2-26. DiIの構造式

2.2.8.3.1で調製した 50 mM DMPC ストック溶液 160 μ L とあらかじめ調製した 2.0 mM DiI メタノール溶液 10 μ L をサンプル瓶に入れ、クロロホルムを留去することで脂質薄膜を形成した。このバイアル瓶に超純水 2.0 mL を加え、ボルテックスミキサーを用いて水和させた。その後、2.2.8.3.1と同様の操作を行い、DiI 含有 DMPC-SUV を得た。最終濃度は [DMPC] = 4.0 mM, [DiI] = 10 μ M である。調製した DiI 含有 DMPC-SUV 750 μ L と、超純水 750 μ L を混合し、そこにあらかじめ調製した 10 μ M 2-GL 水溶液 1500 μ L を混合し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間加熱した。最終濃度は [DMPC] = 1.0 mM, [DiI] = 2.5 μ M, [2] = 5.0 μ M である。この溶液の UV-Vis 吸収スペクトルと蛍光スペクトルを測定した。以下図2-27に結果を示す。

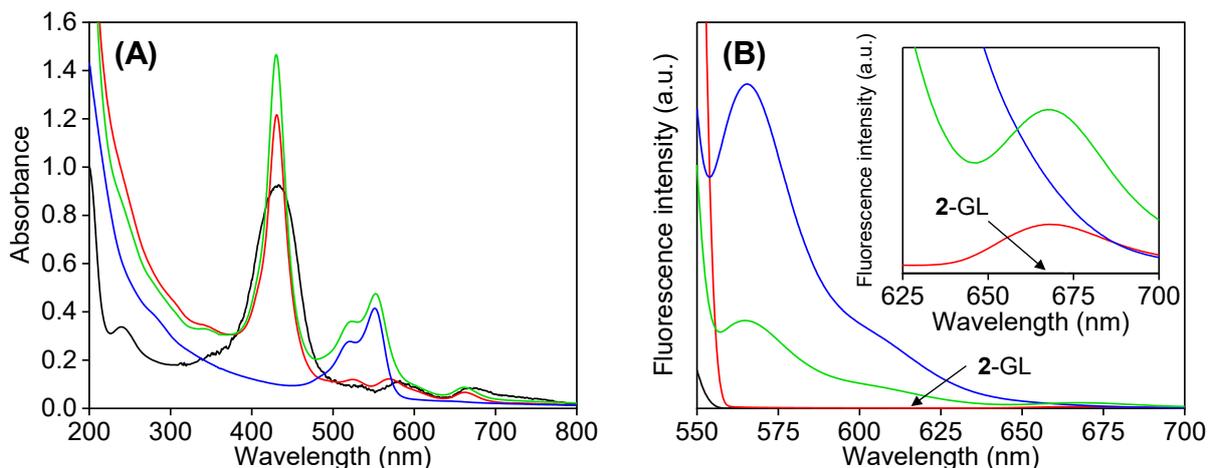


図2-27. DiI-DMPC-SUV 存在下における 2-GL 水溶液の

(A) UV-Vis 吸収スペクトル (B) 蛍光スペクトル

黒線:2-GL, 赤線:2-GL と DMPC-SUV を混合

青線:DiI 含有 DMPC-SUV 水溶液, 緑線:2-GL と DiI 含有 DMPC-SUV を混合

(25 $^{\circ}$ C, 1 cm 蛍光セル, Ex = 540 nm, ホトマル電圧:400 V)

([DMPC] = 1.0 mM, [DiI] = 2.5 μ M, [2] = 5.0 μ M)

図2-27より, DiI 由来の蛍光 (570 nm 付近) の強度が 2-GL 存在下で減少しており, また DiI 存在下で化合物 2 由来の蛍光ピーク (670 nm付近) の強度が上昇していた。DiI の消光率は 73 % であった。このことから, 脂質二重膜表面付近に存在するカルボシアン色素と比較的近い位置にポルフィリンが存在していることがわかった。2.2.8.4.1の結果

と併せると、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体はリポソーム存在下において一部のポルフィリン分子が脂質二重膜内へ移行しつつも、膜内の広い範囲に存在していることが示唆された。ここで、POPC を構成脂質とした脂質二重膜と化合物 **3** に関して、膜外に存在する化合物 **3** 一分子がどのような挙動を示すか、分子動力的シミュレーションを行ったところ、200 ナノ秒後に脂質二重膜中へ移行することが報告されている^[38]。この報告は、ポルフィリン類縁体の膜内への移行が実際に起こり得ることを強く示唆する結果である。

2.2.8.4.3 ¹H-NMRを用いたポルフィリン類縁体の移行の観測

最後に、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体からゲスト分子が移行していることを ¹H-NMR スペクトルで検討した。しかし、2.2.2.2で示したようにポルフィリン類縁体は複合体中で会合していることによってシグナルが消失している。さらに、ゲスト分子が脂質二重膜中へ移行した場合も、運動性の低下によるブロード化が起り、ゲスト分子由来のシグナルが消失することが分かっている^[6-8]。このことから、ゲスト分子の移行を ¹H-NMR で観測することはできない。そこで、同じ疎水性の脂質部位を持つミセルへの移行、およびシクロデキストリンへの移行の有無を観測することを試みた。ポルフィリン類縁体のミセル複合体およびシクロデキストリン錯体は、単分散な状態と類似しており、運動性の低下もほとんどないことから ¹H-NMR スペクトルにおいてポルフィリン類縁体由来のシグナルを観測することができる。本項では、スイッチング能を持つ **2-GL** について、ミセルを構成する脂質としてセチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB)、シクロデキストリンとして 2,3,6-トリ-O-メチル- β -シクロデキストリン (CDx) を用いた。

D₂O で調製した **2-GL** を 100 μ M に希釈し、1 cm 蛍光セルに 1500 μ L を加えた。ここに、D₂O 1200 μ L と、あらかじめ調製した 20 mM CTAB・D₂O 溶液および 2.0 mM CDx・D₂O 溶液を 300 μ L 混合した。この時の最終濃度は [**2**] = 50 μ M, [CTAB] = 2.0 mM, [CDx] = 0.2 mM である。なお、比較のため同濃度の **2-CDx** 錯体を既報^[3]の方法で調製した。この溶液の ¹H-NMR スペクトルを測定した。以下図2-28に結果を示す。

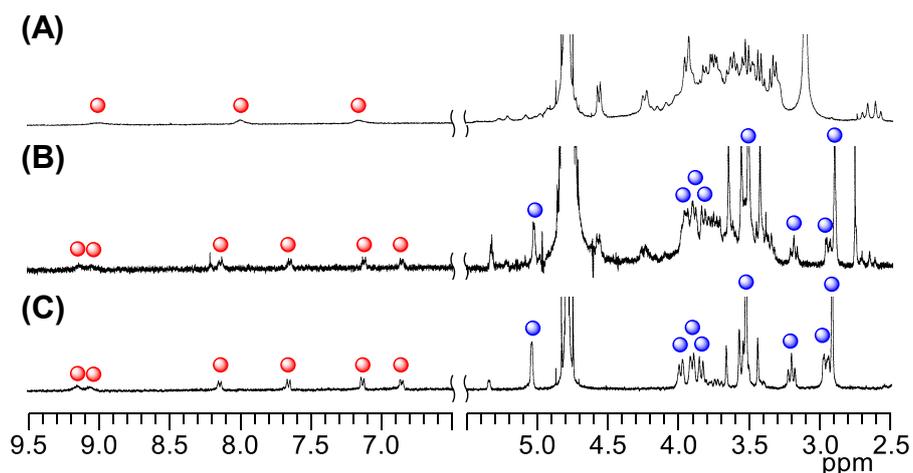


図2-28. CTAB および CDx 存在下における 2-GL の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル
(400 MHz, 25 °C, 積算回数: 64回, 溶媒: D_2O)

(A) 2-GL と CTAB を混合 (B) 2-GL と CDx を混合 (C) 2-CDx 錯体

●:化合物 2 由来のシグナル, ●:錯体の CDx 由来のシグナル

さらに同様の方法によって溶媒として H_2O を用い, 最終濃度を $[\text{2}] = 5.0 \mu\text{M}$, $[\text{CTAB}] = 2.0 \text{ mM}$, $[\text{CDx}] = 20 \mu\text{M}$ に調製した溶液の UV-Vis 吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定した。以下図2-29に結果を示す。

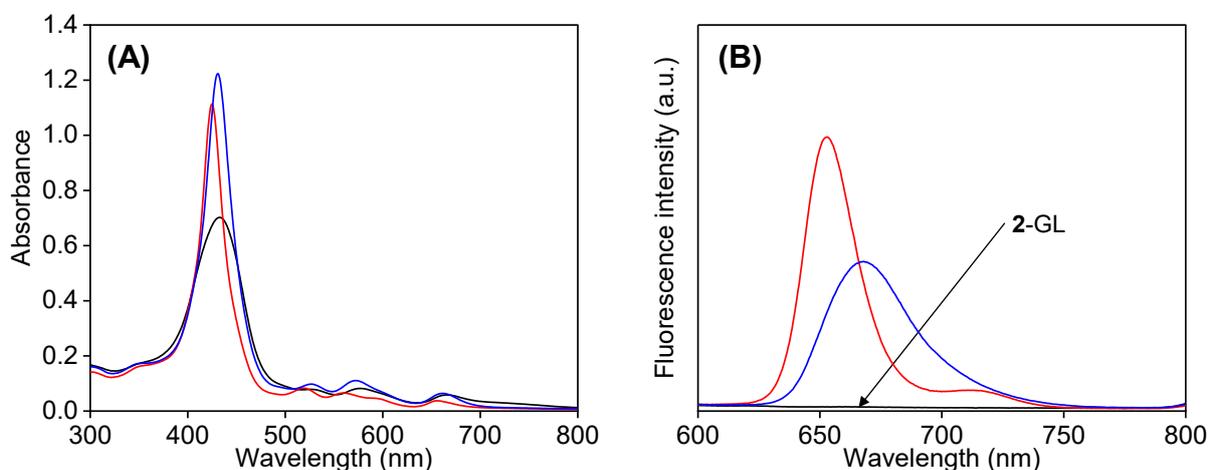


図2-29. CTAB および CDx 存在下における 2-GL の

(A) UV-Vis 吸収スペクトル (B) 蛍光スペクトル

黒線:2-GL, 赤線:2-GL と CDx を混合, 青線:2-GL と CTAB を混合

(25 °C, 1 cm 蛍光セル, $E_x = 540 \text{ nm}$, ホトマル電圧:400 V)

($[\text{2}] = 5.0 \mu\text{M}$, $[\text{CTAB}] = 2.0 \text{ mM}$, $[\text{CDx}] = 20 \mu\text{M}$)

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルより, 2-GL に CTAB および CDx を加えると化合物 2 由来のシグナルが観測された。さらに, CDx を加えた際に検出されたシグナルの化学シフト値が, 別途

調製した **2-CDx** 錯体の化合物 **2** 由来の化学シフト値と一致していた。また、UV-Vis 吸収スペクトルでは、化合物 **2** の吸収のうち Soret 帯がシャープに変化し、かつ蛍光スペクトルでは蛍光強度の増大を観測した。これらは、**2.2.8.3.2**のリポソーム存在下における挙動と一致している。なおかつ、**CDx** を混合した際に得られた UV-Vis 吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルの極大波長の位置は、別途調製した **2-CDx** 錯体の極大波長の位置と一致する^[3]。

以上の結果から、**2-GL** は CTAB および **CDx** に対してゲストを受け渡し、移行していることを明らかにした。これは、リポソーム存在下においても同様の挙動を示していることを示唆している。したがって、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体が持つ光線力学活性のスイッチング能は、細胞膜へ複合体が吸着し、そこから一部のポルフィリン類縁体が細胞膜内へ移行するメカニズムによるものと結論付けた。

2.3 結言

ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体は、その可溶化能、長期安定性に関して、ポルフィリン類縁体・シクロデキストリン錯体と比べると大幅に向上しており、医薬への適用に際して優れた性質を持つことが分かった。さらに、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体はナノ粒子として存在し、おおよそ 100 nm 程度の粒径で分散していることから、EPR 効果を用いた腫瘍組織への受動的送達も期待される。また、一部のポルフィリン類縁体においては一重項酸素発生能を有していることも明らかとなり、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の光線力学治療薬への適用が可能であると示唆された。

次に *in vitro* での評価では、HeLa 細胞に対してポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体水溶液を投与し、生体透過性に優れた赤色光を照射すると、一部のポルフィリン類縁体において細胞死を引き起こすことが分かり、既に上市されている光線力学治療薬と比較すると、およそ 15 倍以上の活性があることから、優れた光線力学活性を有していることが明らかとなった。したがって、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体は、光線力学治療薬への適用が可能であり、既に上市されている薬剤と比較しても優位な薬剤であることを示した。

しかし、水溶液中での評価と *in vitro* での評価において、光線力学活性のトレンドが全く異なっていた。このうち、**2-GL**、**3-GL** および **7-9-GL** は水溶液中で活性が無いにもかかわらず、*in vitro* では活性があり、これは細胞内に取り込まれることによって **2-GL**、**3-GL** および **7-9-GL** の活性が“OFF 状態”から“ON 状態”へとスイッチングしていることが分かった。このメカニズムを解明するため、人工細胞モデルであるリポソームを混合することで検討したところ、細胞膜へポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体が相互作用によって吸着し、ポルフィリン類縁体が膜内へ移行するメカニズムによって、スイッチングが起きていると結論付けた。

2.4 参考文献

- [1] Y. Nonoguchi, A. Kodama, R. Unesaki, N. Doi, T. Suzuki, and K. Koumoto, “Modification of the Release Rate of Curcumin from the Cavity of Renatured β -1,3-1,6-Glucan Nanoparticles by Changing the Molecular Weight of the Constituent Polysaccharide Chains”, *Chem. Lett.*, **2020**, *49*, 1150–1153. (DOI: 10.1246/cl.200366)
- [2] K. Komatsu, K. Fujiwara, Y. Murata, and T. Braun, “Aqueous solubilization of crystalline fullerenes by supramolecular complexation with γ -cyclodextrin and sulfocalix[8]arene under mechanochemical high-speed vibration milling”, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1999**, 2963–2966. (DOI: 10.1039/a904736k)
- [3] 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. (DOI: 10.1021/acsmchemlett.7b00098)
- [4] S. Satake, H. Shinmori, S. Kawabata, K. Sugikawa, H. Funabashi, A. Kuroda, and A. Ikeda, “High photodynamic activities of water-soluble inclusion complexes of 5,15-diazaporphyrins in cyclodextrin”, *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, *17*, 3141–3149. (DOI: 10.1039/C9OB00101H)
- [5] A. Ikeda, M. Nagano, M. Akiyama, M. Matsumoto, S. Ito, M. Mukai, M. Hashizume, J. Kikuchi, K. Katagiri, T. Ogawa, and T. Takeya, “Photodynamic Activity of C₇₀ Caged within Surface-Cross-Linked Liposomes”, *Chem. Asian J.*, **2009**, *4*, 199–205. (DOI: 10.1002/asia.200800271)
- [6] 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. (DOI: 10.1039/C5OB00240K)
- [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. (DOI: 10.1039/C5RA24985F)
- [8] 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. (DOI: 10.1039/C6RA18635A)
- [9] T. Andersson, K. Nilsson, M. Sundahl, G. Westman, and O. Wennerström, “C₆₀ embedded in γ -cyclodextrin: a water-soluble fullerene”, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 604–606. (DOI: 10.1039/C39920000604)
- [10] 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.*, **1986**, *46*, 6387–6392.

- [11] Malvern Instruments Ltd., Zetasizer Nano ユーザーマニュアルMANO0317, **2007**, 14-1–14-5.
- [12] 芦澤 一英, “ナノ粒子に対する動的光散乱法 (DLS) による粒子径測定 of 検討”, *薬学雑誌*, **2019**, *139*, 237-248. (DOI: 10.1248/yakushi.18-00171-1)
- [13] A. Ikeda, T. Mae, K. Sugikawa, K. Komaguchi, T. Konishi, T. Hirao, and T. Haino, “Slow Intermolecular Complexation–Decomplexation Exchanges of Cyclodextrins in Fullerene and Its Derivative Complexes”, *ChemistrySelect*, **2017**, *2*, 11322–11327. (DOI: 10.1002/slct.201702319)
- [14] S. Mieda, A. Ikeda, Y. Shigeri, and W. Shinoda, “Thermodynamic Stability of [60]Fullerene and γ -Cyclodextrin Complex in Aqueous Solution: Free Energy Simulation”, *J. Phys. Chem. C*, **2014**, *118*, 12555–12561. (DOI: 10.1021/jp5029905)
- [15] N. A. Kuznetsova, N. S. Gretsova, O. A. Yuzhakova, V. M. Negrimovskii, O. L. Kaliya, and E. A. Luk'yanets, “New Reagents for Determination of the Quantum Efficiency of Singlet Oxygen Generation in Aqueous Media”, *Russ. J. Gen. Chem.*, **2001**, *71*, 36–41. (DOI: 10.1023/A:1012369120376)
- [16] 株式会社同仁化学研究所, Cell Counting Kit-8, 2020年10月7日閲覧.
(<https://www.dojindo.co.jp/products/CK04/>)
- [17] M. Ishiyama, Y. Miyazono, K. Sasamoto, Y. Ohkura, and K. Ueno, “A Highly Water-Soluble Disulfonated Tetrazolium Salt as a Chromogenic Indicator for NADH as Well as Cell Viability”, *Talanta*, **1997**, *44*, 1299–1305. (DOI: 10.1016/S0039-9140(97)00017-9)
- [18] H. Tominaga, M. Ishiyama, F. Ohseto, K. Sasamoto, T. Hamamoto, K. Suzuki, and M. Watanabe, “A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay”, *Anal. Commun.*, **1999**, *36*, 47–50. (DOI: 10.1039/A809656B)
- [19] Y. -M. Wang, F.-J. Wu, L. Du, G.-Y. Li, K. Takahashi, Y. Xue, and C.-H. Xue, “Effects of polysaccharides from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) on HepG2 cell proliferation”, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2014**, *66*, 354–361. (DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.01.032)
- [20] D. Kessel, “Photosensitization with Derivatives of Haematoporphyrin”, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **1986**, *49*, 901–907. (DOI: 10.1080/09553008514553131)
- [21] D. Kessel, “Proposed Structure of the Tumor-Localizing Fraction of HPD (Hematoporphyrin Derivative)”, *Photochem. Photobiol.*, **1986**, *44*, 193–196. (DOI: 10.1111/j.1751-1097.1986.tb03585.x)
- [22] H.-K. Liu and P. J. Sadler, “Metal Complexes as DNA Intercalators”, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, *44*, 349–359. (DOI: 10.1021/ar100140e)
- [23] R. J. Fiel, J. C. Howard, E. H. Mark, and N. Datta Gupta, “Interaction of DNA with a porphyrin ligand: evidence for intercalation”, *Nucleic Acids Res.*, **1979**, *6*, 3093–3118. (DOI: 10.1093/nar/6.9.3093)
- [24] S. Notsu, K. Sugikawa, and A. Ikeda, “Reversible Supramolecular System of Porphyrin Exchange between Inclusion in Cyclodextrin and Intercalation in DNA by Change in pH”, *ChemistrySelect*, **2018**, *3*, 5900–5904. (DOI: 10.1002/slct.201801070)

- [25] G. Sahay, D. Y. Alakhova, and A. V. Kabanov, “Endocytosis of nanomedicines”, *J. Control. Release*, **2010**, *145*, 182–195. (DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.01.036)
- [26] K. Yamana, R. Kawasaki, K. Sugikawa, and A. Ikeda, “Solubilization of Tetrahydroxyphenylchlorin in Water and Improved Photodynamic Activity after Complexation with Cyclic Oligo- and Polysaccharides”, *ACS Appl. Bio Mater.*, **2020**, *3*, 3217–3225. (DOI: 10.1021/acsabm.0c00211)
- [27] P. D. Hart, M. R. Young, M. M. Jordan, W. J. Perkins, and M. J. Geisow, “Chemical inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages also inhibit saltatory lysosomal movements”, *J. Exp. Med.*, **1983**, *158*, 477–492. (DOI: 10.1084/jem.158.2.477)
- [28] M. Edidin, “Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2003**, *4*, 414–418. (DOI: 10.1038/nrm1102)
- [29] M. I. Angelova and D. S. Dimitrov, “Liposome electroformation”, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **1986**, *81*, 303–311. (DOI: 10.1039/DC9868100303)
- [30] J. Sunamoto, K. Iwamoto, H. Kondo, and S. Shinkai, “Liposomal Membranes: VI. Polysaccharide-Induced Aggregation of Multilamellar Liposomes of Egg Lecithin”, *J. Biochem.*, **1980**, *88*, 1219–1226. (DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133089)
- [31] K. Iwamoto and J. Sunamoto, “Liposomal Membranes. XII. Adsorption of Polysaccharides on Liposomal Membranes as Monitored by Fluorescence Depolarization”, *J. Biochem.*, **1982**, *91*, 975–979. (DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133788)
- [32] F. Würthner, T. E. Kaiser, and C. R. Saha-Möller, “J-Aggregates: From Serendipitous Discovery to Supramolecular Engineering of Functional Dye Materials”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 3376–3410. (DOI: 10.1002/anie.201002307)
- [33] 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. (DOI: 10.1039/C7CC00302A)
- [34] 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. (DOI: 10.1039/C1CC14650E)
- [35] A. Ikeda, T. Genmoto, N. Maekubo, J. Kikuchi, M. Akiyama, T. Mochizuki, S. Kotani, and T. Konishi, “Water-soluble Inclusion Complexes of [60]Fullerene Derivatives Using γ -Cyclodextrin”, *Chem. Lett.*, **2010**, *39*, 1256–1257. (DOI: 10.1246/cl.2010.1256)
- [36] D. Antoku, S. Satake, T. Mae, K. Sugikawa, H. Funabashi, A. Kuroda, and A. Ikeda, “Improvement of Photodynamic Activity of Lipid-Membrane-Incorporated Fullerene Derivative by Combination with a Photo-Antenna Molecule”, *Chem. Eur. J.*, **2018**, *24*, 7335–7339. (DOI: 10.1002/chem.201800674)
- [37] D. Antoku, K. Sugikawa, and A. Ikeda, “Photodynamic Activity of Fullerene Derivatives Solubilized in Water by Natural-Product-Based Solubilizing Agents”, *Chem. Eur. J.*, **2019**, *25*, 1854–1865. (DOI: 10.1002/chem.201803657)

- [38]M. Dzieciuch, S. Rissanen, N. Szydłowska, A. Bunker, M. Kumorek, D. Jamróz, I. Vattulainen, M. Nowakowska, T. Róg, and M. Kepczynski, “PEGylated Liposomes as Carriers of Hydrophobic Porphyrins”, *J. Phys. Chem. B*, **2015**, *119*, 6646–6657. (DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b01351)

第3章 ポルフィリン類縁体の水溶化に対する食品添加物用多糖類の適用

3.1 序

本章では、食品添加物に用いられている汎用的な多糖類を可溶化剤として、ポルフィリン類縁体の水溶化を高速振動粉碎法によって試み、これらの分光学的性質から、ポルフィリン類縁体・多糖複合体の光線力学治療薬としての性能を評価する。またがん細胞に対する光照射による細胞障害性を評価することで光線力学治療薬としての適用可能性を検討する。さらに、第2章の結果と比較することで、ホスト分子適用範囲の拡張の可能性を検討し、多糖類を用いた高速振動粉碎法によるゲスト分子の水溶化法の高い汎用性を示す。

また、多糖による水溶化メカニズムとしてコロイド分散系モデルを適用し、多糖の違いによる水溶化能の違いやその予測に関する知見を得る。

本章で用いたポルフィリン類縁体および多糖類の構造を以下図3-1に示す。

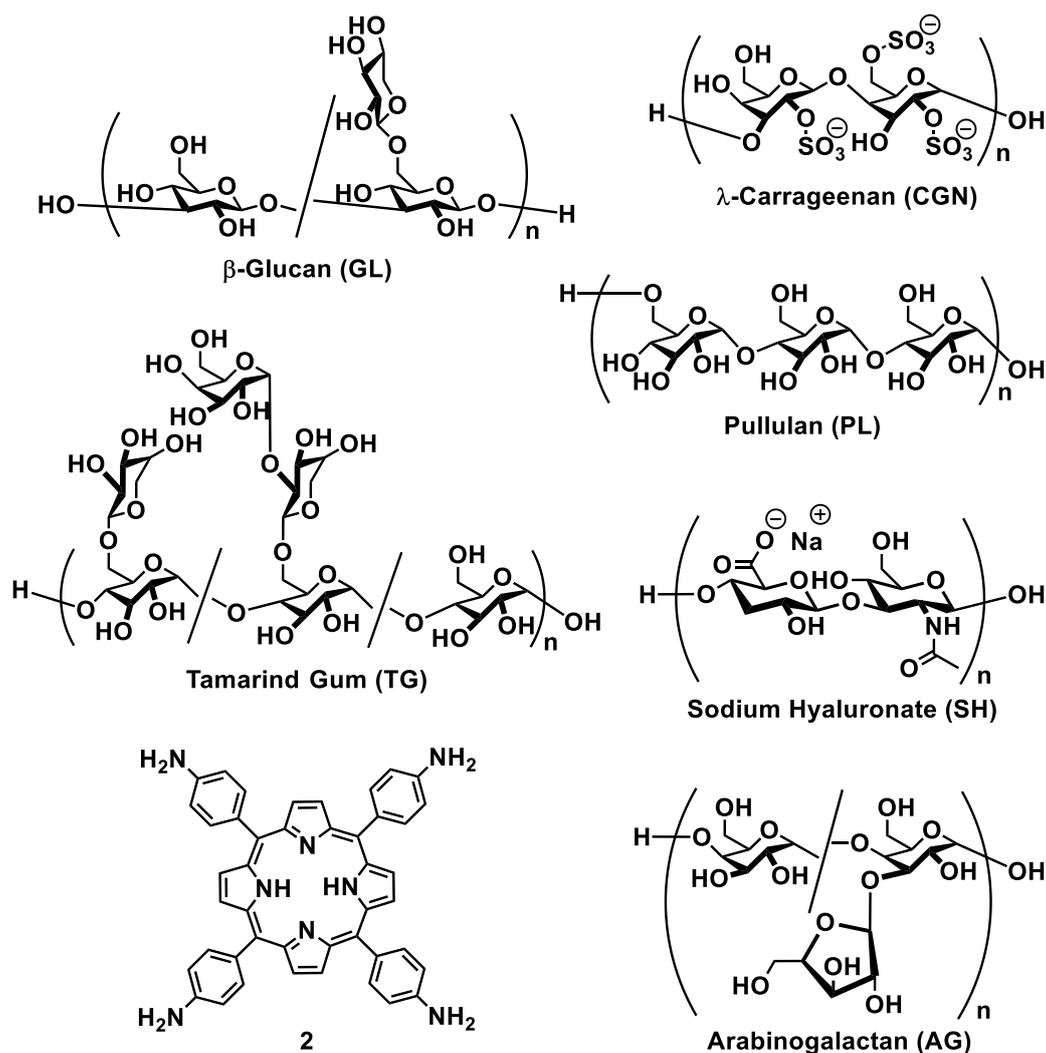


図3-1. 本章で用いたポルフィリン類縁体および多糖類の構造(カッコ内は多糖類の略称)

なお、アラビノガラクトサン (AG) は抽出植物によって構造が異なる。本論文ではカラマツ由来のものを用いた。

以下、それぞれの複合体を **2-XX** (XX = GL, CGN, TG, PL, AG, SH) と略して標記した。また、比較として化合物 **2**・2,3,6-トリ-O-メチル- β -シクロデキストリン錯体のデータを適宜示した。この錯体は **2-CDx** と略して標記した。

3.2 実験結果と考察

3.2.1 高速振動粉碎法を用いた多糖類によるポルフィリン類縁体の水溶化

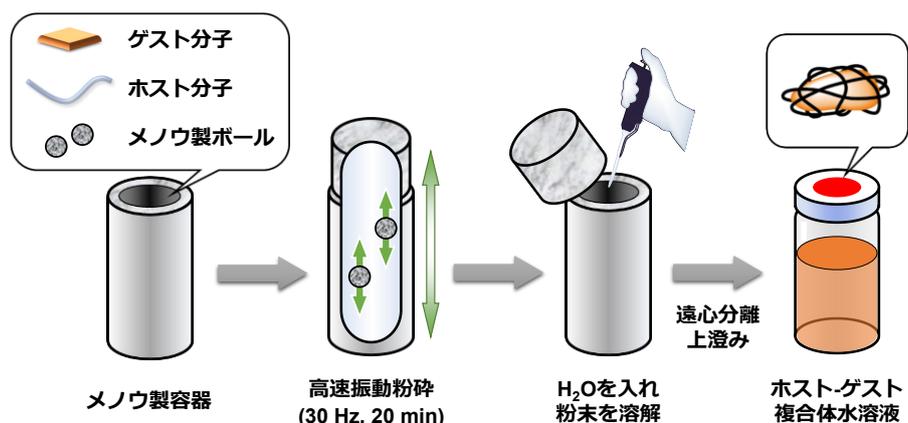


図 3-2. 高速振動粉碎法の概略図
(ゲスト分子: 化合物 **2**, ホスト分子: 各種多糖類)

水溶化には、**2.2.1.2** と同様に高速振動粉碎法^[1]を用いた。化合物 **2** 2.0 μmol (1.3 mg) と各種多糖類 10.0 mg をメノウボール二個とともにメノウ容器に入れ、高速振動粉碎法 (30 Hz, 20 min) により混合した。この混合物に超純水 2.0 mL を加えて抽出した。この抽出液を遠心分離 (4500 rpm [1860 \times g], 20 min) により不溶性化合物 **2** を沈降させた。得られた上澄みを分取し、化合物 **2**・多糖複合体水溶液を得た。

3.2.2 ポルフィリン類縁体・多糖複合体の分光学的性質

3.2.2.1 ポルフィリン類縁体・多糖複合体の UV-Vis 吸収スペクトル測定

3.2.1で得られた化合物 **2**・多糖複合体を 30 μL 分取し、超純水 270 μL 加えることで 10 倍に希釈した。この水溶液の UV-Vis 吸収スペクトルを測定した。結果を以下図3-3に示す。

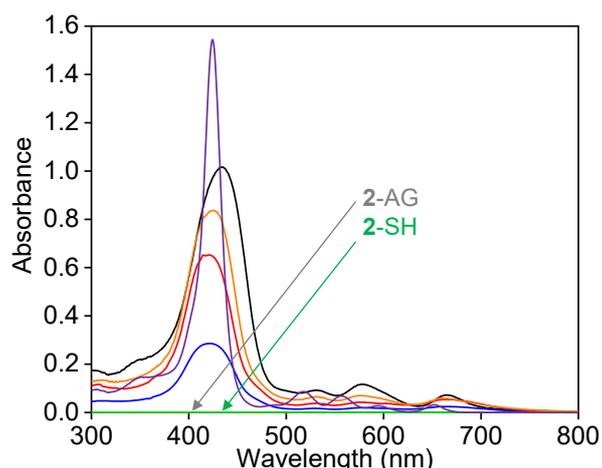


図3-3. 化合物 **2**・多糖複合体水溶液の UV-Vis 吸収スペクトル
(25 °C, 1 mm 石英セル, 抽出液を 10 倍に希釈)
黒線: **2**-GL, 青線: **2**-CGN, 赤線: **2**-TG, 橙線: **2**-PL
灰線: **2**-AG, 緑線: **2**-SH, 紫線: **2**-CDx

図3-3より, 高速振動粉碎法によって AG および SH を除く多糖類と複合化し, 化合物 **2** を水溶化していることが明らかになった。

いずれの多糖複合体においても, 400 nm 付近の Soret 帯および 600–800 nm 付近の Q 帯が **2**-CDx 錯体の吸収と比較して大きくブロード化していた^[2, 3]。このことから, 化合物 **2** は多糖複合体中で凝集した状態で存在しているものと推察される。この結果は, **2.2.2.1** におけるポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体の結果と一致するため, β -グルカンが形成する複合体と同様の形態で水溶化していると考えられる。これらの結果を基に, これ以降の実験において濃度の算出に用いるモル吸光係数は, 多糖の種類にかかわらず β -グルカン複合体と同じである $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}} = 1.31 \times 10^5 \text{ (dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ を用いた。

一方で, AG および SH を用いた場合は, 吸収スペクトルを観測することができなかったため, 水溶化することができないと判断した。以降の実験ではこの二種の多糖は除外した。このように多糖によって水溶化能の違いが現れる理由については, 後述の **3.2.3** にて詳しく検討する。

3.2.2.2 ポルフィリン類縁体・多糖複合体の ¹H-NMR スペクトル測定

3.2.1と同様に調製した化合物 **2**・多糖複合体を D₂O 2.0 mL で抽出し, 遠心分離 (4500 rpm [1860 ×g], 20 min) により不溶な化合物 **2** を沈降させた。得られた上澄みを 600 μL 分取し, 外径 5 mm の石英 NMR 管に注入した。これをサンプルとして ¹H-NMR スペクトルを測定した。また, 比較としてそれぞれの多糖類のみを同様の条件で高速振動粉碎し, 抽出・遠心分離した多糖水溶液も測定した。結果を以下図3-4に示す。

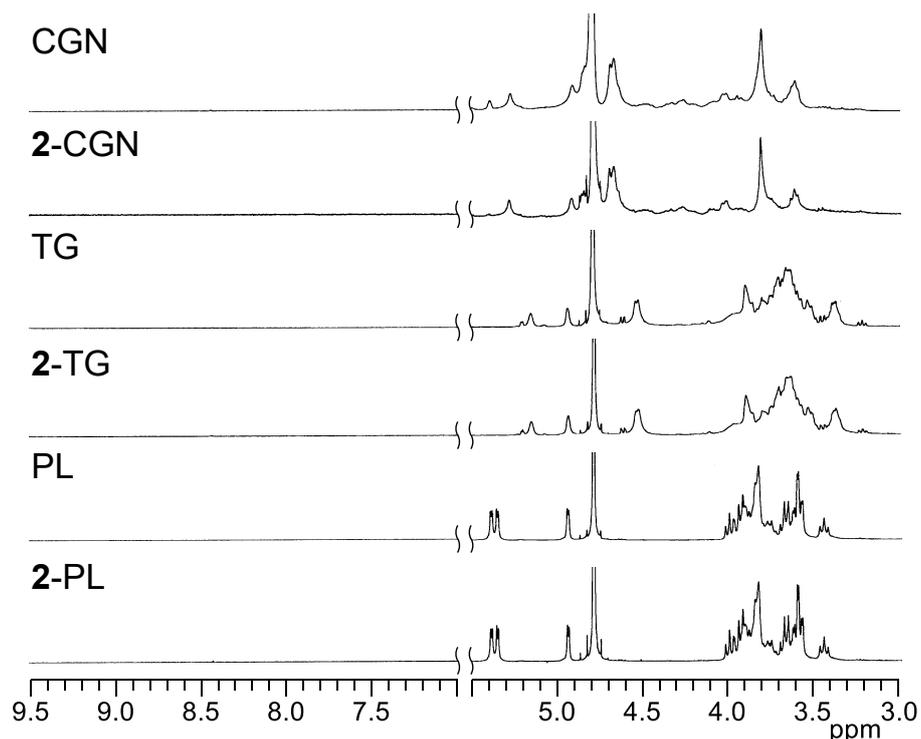


図3-4. 多糖類および化合物 **2**・多糖複合体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル
(400 MHz, 25 °C, 積算回数:64 回, 溶媒: D_2O)

図 3-4 より, 全ての多糖複合体において, 化合物 **2** に由来するプロトンのシグナルは検出されなかった。これは, **2.2.2.2** におけるポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体と同様に化合物 **2** が多糖と複合化することで見かけ上高分子量化し, 運動性が低下したことによるシグナルの平均化が起こっているものと考えられる。したがって, 化合物 **2** は多糖に包接されて水中に分散していると考えられる。

また, **2.2.2.2** と同様に 3.0–5.5 ppm 付近に見られる多糖由来のシグナルを比較すると, 複合化の有無にかかわらずピーク位置や分裂にほとんど変化が無く一致している。この考察は後述の **3.2.3** にて詳しく検討する。

3.2.2.3 ポルフィリン類縁体・多糖複合体の蛍光スペクトル測定

3.2.1で得られた化合物 **2**・多糖複合体を, それぞれ 5.0 μM に希釈した。この水溶液の蛍光スペクトルを測定した。結果を以下図3-5に示す。

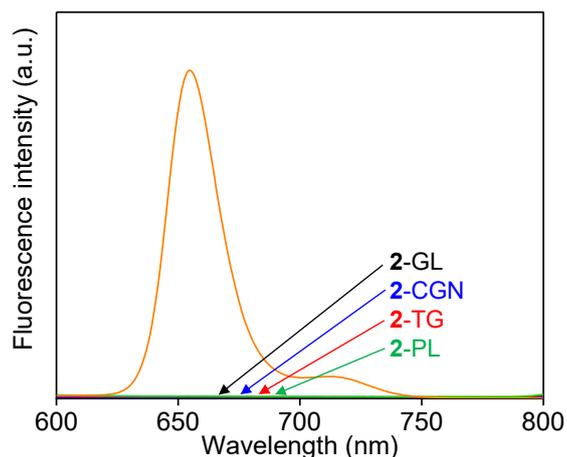


図3-5. 化合物 2・多糖複合体の蛍光スペクトル

(25 °C, 1 cm 蛍光セル, Ex = 540 nm, [2] = 5.0 μM)

黒線: 2-GL, 青線: 2-CGN, 赤線: 2-TG, 緑線: 2-PL, 橙線: 2-CDx

(スリット幅:励起・蛍光側ともに10 nm, ホトマル電圧:400 V)

図 3-5 より, 全てのポルフィリン類縁体・多糖複合体の蛍光は非常に微弱であり, 観測することができなかった。この結果は, 2.2.2.3 におけるポルフィリン類縁体・β-グルカン複合体の結果と一致するため, これらと同様に凝集起因消光による自己失活が起きているものと考えられる。

3.2.2.4 動的光散乱(DLS)法による粒径測定

さらに, 複合体の粒径に関しても β-グルカン複合体との類似性を検討した。

3.2.1で得られた化合物 2・多糖複合体を, それぞれ 5.0 μM に希釈した。さらに, 多糖のみを高速振動粉碎によって処理した水溶液も準備し, これらの水溶液の粒径を測定した。結果を以下図3-6に示す。

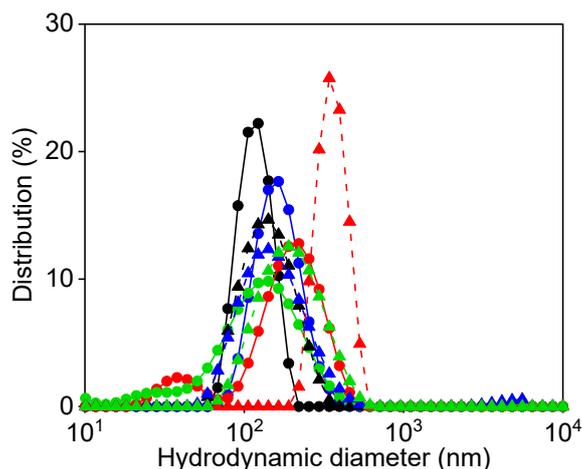


図3-6. 化合物 2・多糖複合体の粒径分布 (25 °C)
 黒線: 2-GL, 青線: 2-CGN, 赤線: 2-TG, 緑線: 2-PL
 実線, ●: 複合化前, 破線, ▲: 複合化後

また, それぞれの平均流体力学的直径と多分散度 (Polydisperse Intensity; PDI) を以下表3-1にまとめた。

表3-1. 各種化合物 2・多糖複合体の平均粒径

略称・名称	平均流体力学的直径(nm)	PdI
GL	120	0.23
2-GL	148	0.13
CGN	213	0.27
2-CGN	249	0.23
TG	216	0.32
2-TG	361	0.15
PL	131	0.54
2-PL	210	0.18

以上の結果から, いずれの複合体もおおよそ 100–300 nm の粒径を持つことが示唆される。したがって, ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体と同様に EPR 効果による腫瘍組織への蓄積が期待される粒径に制御できていると考えられる。

3.2.3 多糖による水溶化メカニズムと水溶化能の予測

ここまで, β -グルカン以外の汎用的な多糖類を用いても, 高速振動粉砕法によってポルフィリン類縁体を水溶化できることを示した。しかし, 多糖の種類によっては全く水溶化できないことから, 多糖による水溶化能は, ホスト分子とゲスト分子の組み合わせの“相性”に依存していることが示唆される。したがって, “相性”を理解するためには水溶化のメカニズムにつ

いて検討する必要がある。

ここで、2.2.2.2や3.2.2.2で述べたように、ポルフィリン類縁体・多糖複合体の¹H-NMR スペクトルについて、3.0–4.5 ppm 付近に見られる多糖由来のシグナルを比較すると、複合化の有無にかかわらずピーク位置や分裂にほとんど変化が無く一致していることから、系中の多糖とゲスト分子との相互作用はほとんど無いことが示唆される。この結果から、多糖による水溶化メカニズムの仮説として「トレイン-ループ-テール」モデル^[4, 5]の適用を考えた。

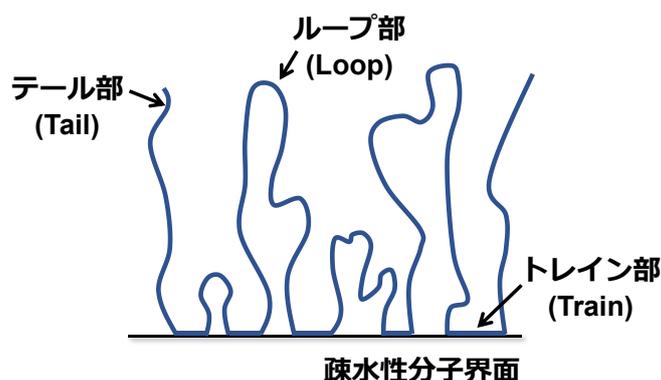


図3-7. 「トレイン-ループ-テール」モデルの模式図^[6]

本モデルについて説明する^[6]。高分子を粒子の分散剤として用いる場合、粒子に対してその高分子が吸着することで粒子同士の凝集を防いでいる。この時、粒子に吸着した高分子は図3-7のように疎水性分子の界面に接着した部分 (=トレイン部) と、分散媒に広がった部分 (=ループ部およびテール部) を有している。分散系の安定性は、ループ部とテール部が主に寄与している。

ここで、このモデルをポルフィリン類縁体・多糖複合体の系に適用すると、ポルフィリン類縁体が粒子として、高分子が多糖として考えることができる。このモデルにおいて、ポルフィリン類縁体と多糖が相互作用している部分はトレイン部に相当することになる。ただし多糖分子中で吸着に関与するセグメント当たりで考えると、そのセグメントすべてが吸着に関与するわけではない。文献^[6]によると全セグメント中三割ないし七割程度の値が報告されている。さらに、吸着していないフリーの多糖分子も同時に存在している。すなわち、多糖分子がポルフィリン類縁体と相互作用を受ける部位はわずかであると考えられる。これは、前述の¹H-NMR スペクトルの変化が複合化の有無にかかわらずほとんど無いことに矛盾しない。

そこで、本項における水溶化メカニズムのモデルとして「トレイン-ループ-テール」モデルを採用し、このモデルから水溶化能の予測を試みた。

3.2.3.1 持続長による検討

「トレイン-ループ-テール」モデルでは、多糖がポルフィリン類縁体粒子表面に吸着したトレイン部から、屈曲してループ部およびテール部が伸びている。これが多糖一分子でいくつ

ものトレイン部を有している場合もある。このことから、多糖分子は高い柔軟性を有しているほどポルフィリン類縁体粒子表面に吸着しやすいと考えられる。そこで、高分子鎖の剛直性・柔軟性の指標として用いられる持続長 (Persistence length; L_p) を比較することで、多糖による粒子表面への吸着のしやすさを比較した。 L_p は高分子鎖の直線として存在することができる長さを指し、値が大きいほど剛直性が高く、値が低いほど柔軟性に高いといえる。以下表3-2に各種多糖類の L_p をまとめた。

表3-2. 各種多糖類の持続長 L_p ^[7-11]

名称	L_p (nm)
CGN	2.3–3.0
TG	6–8
PL	< 2
AG	6–9
SH	4–6

表3-2より、文献により値の幅があるがおおよそ 10 nm 以内の L_p を持つことが分かった。化合物 2 の水溶化能が非常に低い AG および SH において、水溶化能が良好であった他三種の多糖類と比較しても剛直性は高くなく、大きな差が見られなかったことから、水溶化能との明確な相関が無いことが明らかになった。ここで、水溶液中で三重らせん構造を取るため非常に剛直性の高いことが知られている多糖類シゾフィランの L_p はおおよそ 150–200 nm であり^[12, 13]非常に大きな値を持つ。このことから、今回用いた多糖類の剛直性に大きな差は無いことが分かる。

以上の結果から、ポルフィリン類縁体の水溶化能には、多糖分子の剛直性ではない別のファクターが関与しているものと考えられる。

3.2.3.2 ゼータ電位による検討

前項の結果から、いずれの多糖も「トレイン-ループ-テール」モデルによる吸着が可能な柔軟性を持つことが分かった。そこで、ポルフィリン類縁体と多糖との相互作用の強さが水溶化能に寄与しているのではないかと考え、コロイド分散系に対する分散安定性の指標となるゼータ電位 ζ の測定を試みた。

以下にゼータ電位の概要と測定原理を示す^[6, 14, 15]。粒子表面では、水中のイオン吸着もしくは表面からの解離によって表面電荷を帯びる。この表面電荷と反対の符号を持つイオン(対イオン)は、静電引力によって引き寄せられ、結果的に表面に近い領域では対イオン濃度が増加する。これによって各粒子の周囲には電気二重層が形成する。電気二重層のモデルとして Gouy-Chapman モデルや Stern モデルが知られているが、ここでは Stern モデルを用いて説明する。

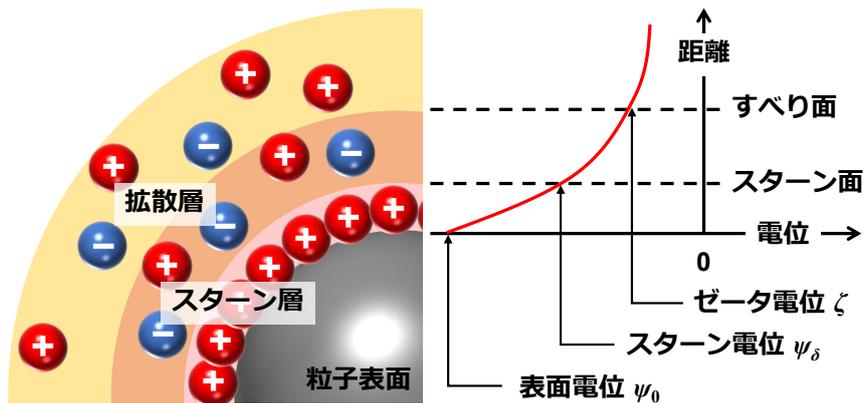


図3-8. 電気二重層モデルの概略図^[6, 15]

電気二重層の内側はスターン層と呼ばれ、前述のように表面との静電引力によってイオンが強く結合している。これに対して外側の層を拡散層と呼び、スターン層ほど強く結合していない領域が存在する。この境界の電位をスターン電位と呼ぶ。この時、拡散層中に仮想的な境界が存在し、この境界の内側の領域に存在するイオンは、スターン層とは独立して存在するものの表面電荷の影響をある程度受ける。そのため、重力の作用などで粒子が移動する際には、この仮想的境界の内側のイオンは粒子と共に移動することになる。この境界層を流体力学的剪断面またはすべり面と呼ぶ。この境界の電位をゼータ電位と呼ぶ。

今日では、Gouy-Chapman モデル (表面電位＝スターン電位とみなすモデル) と Stern モデルを両方適用したモデルを考えることが多く、表面電位をスターン電位とみなし、かつスターン電位をゼータ電位とみなすことによって間接的に表面電荷を実測するようになった。

今回測定に使用したゼータ電位測定装置 (Malvern製, Zetasizer NanoZS Zen3600型) では、電気泳動移動度を測定し、これにヘンリーの式を適用することでゼータ電位を算出する。以下図3-9に装置構成を示す。

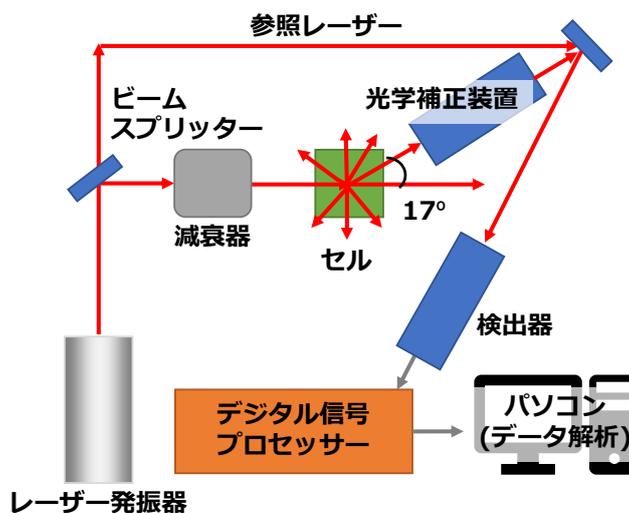


図3-9. ゼータ電位測定装置の構成^[15]

本装置では、レーザードップラー法と呼ばれる、散乱光強度の変動率と粒子速度（移動度）が比例する関係を用いた方法によって電気泳動移動度を算出する。両端に電極を持つセルに電圧をかけ、そこにレーザー光を照射する。この時、入射光に対して 17° の位置にある検出器で光の強度信号を検出し、この信号をデジタル信号プロセッサが処理した後にコンピューターに送られ、周波数スペクトルを作成し、電気泳動移動度を算出する。これを基に、ヘンリーの式 (式3-1) からゼータ電位を算出した。

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta} \quad \dots(3-1)$$

ここで、 ζ :ゼータ電位, U_E :電気泳動移動度, ε :溶媒の誘電率, η :溶媒の粘度, $f(\kappa a)$:ヘンリー関数を示す。ヘンリー関数として、通常 1.5 および 1.0 の近似値を用いるが、本装置ではスモルコフスキー近似を適用し、近似値を 1.5 とした。

一般にゼータ電位の絶対値が 0 に近いほど静電斥力が働かなくなることを意味するため、粒子同士が凝集しやすいと考えることができる。また異種の粒子においては、それぞれの粒子のゼータ電位が同符号であるときは、ゼータ電位の差の絶対値が小さい方が、異符号であるときはゼータ電位の差の絶対値が大きい方がそれぞれ凝集（吸着）しやすいといえる。

各種多糖類 10 mg をメノウボール二個とともにメノウ容器に入れ、高速振動粉碎法 (30 Hz, 20 min) により混合した。この混合物に超純水 2.0 mL を加えて抽出した。この抽出液を遠心分離 (4500 rpm [1860 ×g], 20 min) により不溶な多糖類を沈降させた。得られた上澄みを分取し、これを測定サンプルとした。最終濃度は、[Polysaccharide] = 5.0 g·L⁻¹ である。さらに、再沈法^[16, 17]によってポルフィリン類縁体ナノ粒子を調製した。3.0 mM 化合物 2・DMSO 溶液を調製し、これを 20 μL 分取し、超純水 1980 μL と混合・攪拌することでナノ粒子を調製した。最終濃度は [2] = 30 μM, H₂O/DMSO = 200:1 (v/v) である。

それぞれの溶液をゼータ電位測定用キャピラリーセルに入れ、ゼータ電位を測定した。以下表3-3に結果を示す。

表 3-3. 各種多糖類およびポルフィリン類縁体のゼータ電位 (pH 7.0) と水溶化能の関係

略称	ゼータ電位 (mV)	化合物 2 とのゼータ電位の差の絶対値(mV)	水溶化順位
2	7.3	—	—
GL	-3.3	10.6	1
CGN	-34.7	42.0	4
TG	-11.7	19.0	3
PL	-32.1	39.4	2
AG	-26.6	33.9	×
SH	-40.9	48.2	×

表 3-3 より化合物 2 ナノ粒子の表面は正に帯電しているのに対し、各種多糖類は全て負に帯電していることが分かった。両者は異符号であるため、静電引力が起きると予想される。また、その強さは両者のゼータ電位の差の絶対値が大きいほど強いと考えられる。

水溶化能の順位と比較すると、最もゼータ電位の差の絶対値が大きい SH は水溶化ができなかった。これは、水中の化合物 2 を強い静電引力によって過剰に引き付け、非常に大きな凝集体を形成してしまうため、水中に分散できず沈殿し、結果的に水溶化できなかったものと考えられる。一方、最も絶対値が小さい GL は最も水溶化能に優れていた。これは、静電引力によって引き付けられた化合物 2 の表面に、多糖が適当量吸着することで、立体反発の効果が現れ水中に分散、水溶化できていると考えられる。このことから、ゼータ電位の差の絶対値が大きくなるほど水溶化が難しいという傾向がわかり、ゼータ電位による水溶化能の予測ができる可能性を示した。

しかし、一部例外が存在する。AG に関しては水溶化できている PL よりもゼータ電位の差の絶対値が小さいにもかかわらず水溶化できていない。また CGN および PL に関してはゼータ電位の差の絶対値が SH に匹敵するほど大きいにもかかわらず水溶化できている。これらのような矛盾が生じる要因について、次の二点が考えられる。

一点目は、複合体の粒子径や密度の影響である。溶媒に球形粒子が分散した系を考えた時、重力によって沈殿する際の粒子の沈降速度 v ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) は以下式 3-2 のように表すことができる^[14]。

$$v = \frac{2}{9} \cdot \frac{(\rho_p - \rho_f)gr^2}{\eta} \quad \dots(3-2)$$

ここで、 η : 溶媒の粘度 ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) , g : 重力加速度 ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-2}$) , r : 粒子の半径 (cm) , ρ_p : 粒子の密度 ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) , ρ_f : 溶媒の密度 ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) である。この式から分かるように、沈降速度は粒子半径の二乗に比例し、粒子の密度に比例する。したがって、ゼータ電位の比較上分散状態が有利な状況であっても、複合体形成後の粒子密度が高い場合や粒子径が大きい場合には沈殿が促進される、すなわち水溶化できない場合がある。

二点目は、枯渇効果^[6, 18]の影響である。粒子表面に吸着していない高分子が存在する場合、粒子同士が接近すると、ある大きさを持つ溶存高分子が粒子の間隙から排除され、高分子が存在しない(枯渇した)領域が現れる。この領域は領域外と比べて高分子濃度差が著しく大きくなることから、これに由来する浸透圧が発生する。この浸透圧の影響で、ますます粒子同士が接近させることになり、結果として凝集を引き起こす。これを枯渇凝集と呼ぶ。

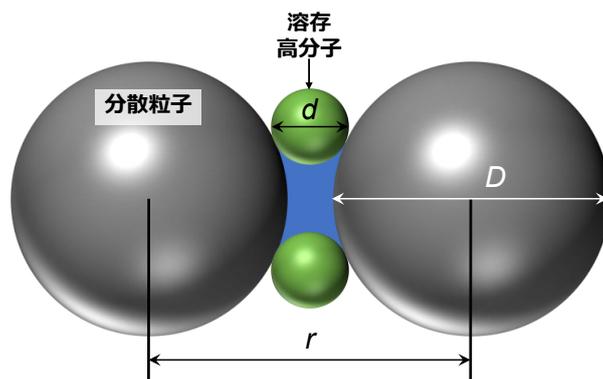


図 3-10. 枯渇効果による凝集の概略図^[6]

青く塗りつぶされている領域が溶存高分子の枯渇領域にあたる。

枯渇効果を考慮した際の二粒子間に働くポテンシャルエネルギー ΔG は以下式 3-3 のように表すことができる。

$$\Delta G = \frac{NkT\pi c}{2M_n} (D + d - r)^2 (2D + 2d + r) \quad \dots(3-3)$$

ここで D : 粒子の直径, d : 溶存高分子の広がり (直径), r : 分散粒子間の中心間距離, N : アボガドロ定数, k : ボルツマン定数, T : 溶液の温度, c : 高分子濃度, M_n : 高分子の数平均分子量である。この式からわかるように, 枯渇効果によって生じる二粒子間の引力は, 高分子濃度に比例し, 粒子の直径と溶存高分子の広がりの三乗に比例して増大する。

ポルフィリン類縁体・多糖複合体の系では, 2.2.2.2 や 3.2.2.2 で述べたように $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの結果から, 粒子に吸着していないフリーの溶存多糖が多く存在することが示唆されている。したがって, 多糖の種類によっては枯渇効果による凝集が起こる可能性がある。

以上の検討結果から, 多糖による水溶化能の予測は, ゲスト分子と多糖とのゼータ電位の差の絶対値を比較することによって大まかに予測は可能であるが, 複合体形成後の粒子径および密度, 溶存多糖の濃度, 分子量, 広がりを考慮する必要がある, 現時点では正確な予測はできないと結論付けた。今後の様々な疎水性分子と多糖の組み合わせによる水溶化の検討の中で, 水溶化能の予測が期待される。

3.2.4 ポルフィリン類縁体・多糖複合体の長期安定性の評価

続いて、化合物 **2**・多糖複合体が分散している状態をどれだけ維持できるか、長期安定性を評価した。

3.2.1で得られた化合物 **2**・多糖複合体を20 μM に希釈し、これを室温下で静置した。希釈直後を 0 日として 0.5 (12 h), 1, 2, 3, 5, 7日後の上清液の UV-Vis 吸収スペクトルを測定し、0 日に対するそれぞれの極大吸収波長における吸光度の減少率を算出した。以下図3-11に結果を示す。

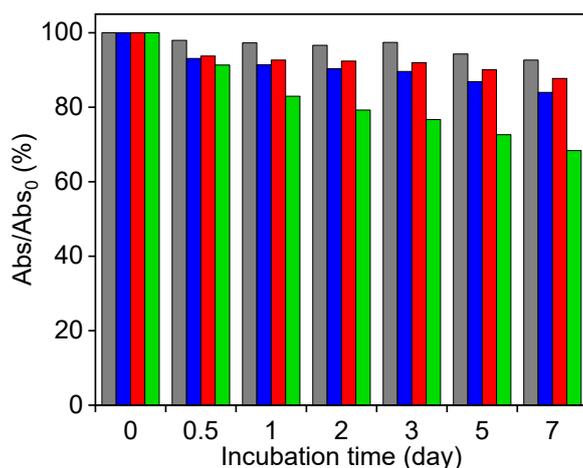


図3-11. 化合物 **2**・多糖複合体を室温下に静置した際の吸光度の減少率
(25 °C, 1 mm 石英セル, [2] = 20 μM)
灰: **2**-GL, 青: **2**-CGN, 赤: **2**-TG, 緑: **2**-PL

図3-11より、**2**-GL, **2**-CGN および **2**-TG 複合体は水中で 7 日後においても 80 % 以上保持していた。一方で、**2**-PL は日を追うごとに漸減しており、7 日後には保持率が 70 % 以下であった。いずれの化合物 **2**・多糖複合体においても、既報^[2, 3]の **2**-CDx とそれぞれ比較すると長期安定性は向上した。これは、2.2.4でも述べたように直鎖状多糖類によるゲスト分子の脱落・交換が起こりにくいために安定性が向上したものと考えられる。

3.2.5 ポルフィリン類縁体・多糖複合体の長期安定性の評価

また、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の化合物 **2**・多糖複合体による発生能も β -グルカン複合体同様に ABDA ブリーチング法によって検討した。

3.2.1で得られた化合物 **2**・多糖複合体を 15 μM に希釈した後、この水溶液を 1 cm 石英セルに 2970 μL 入れ、遮光しながら 30 分間酸素ガスによるバブリングを行った。30 分後、UV-Vis 吸収スペクトルを測定し、このスペクトルをブランクとした。次に、2.5 mM ABDA・DMSO 溶液 30 μL 加え、再び UV-Vis 吸収スペクトルを測定した。この時のスペクトルを光照射時間 0 分後として光照射 ($>620 \text{ nm}$, $15 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) を行い、7.5, 15, 30, 60

分後における UV-Vis 吸収スペクトルを測定した。測定時の最終濃度は $[2] = 15 \mu\text{M}$, $[\text{ABDA}] = 25 \mu\text{M}$ である。本実験はそれぞれ 3 回行い、平均値および標準偏差を算出した。以下図 3-12 に結果を示す。

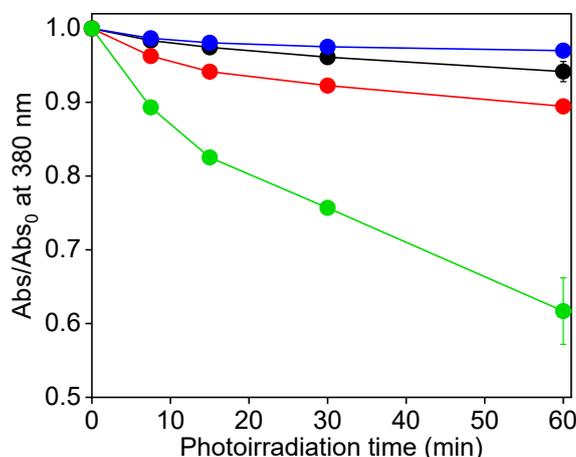


図3-12. 化合物 **2**・多糖複合体からの一重項酸素発生による ABDA の吸光度変化 (25 °C, 1 cm 石英セル, $[2] = 15 \mu\text{M}$, $[\text{ABDA}] = 25 \mu\text{M}$)
黒線: **2-GL**, 青線: **2-CGN**, 赤線: **2-TG**, 緑線: **2-PL**

図3-12より, **2-GL** および **2-CGN** 複合体においては 380 nm 付近の吸収の減少がほとんど見られなかったことから, 一重項酸素は発生していないと考えられる。一方で, **2-TG** および **2-PL** は, 吸収の減少が確認されたことから, 一重項酸素が発生していると示唆される。特に, **2-PL** は他の三種類の多糖複合体と比べて減少率が高かった。しかし, 第2章で述べたように, ポルフィリン類縁体・多糖複合体の系においては, 一重項酸素の発生能の程度がそのまま細胞に対する光線力学活性の程度を反映するとは限らず, 光線力学活性は細胞への取り込みの大きが大きく影響する。したがって, この結果から光線力学活性のトレンドを知ることはできないため, 細胞への投与および光照射による細胞障害性を検討した。

3.2.6 ポルフィリン類縁体・多糖複合体の光線力学活性評価

細胞内における化合物 **2**・多糖複合体の光線力学治療薬としての評価を行った。本項では, がん細胞としてヒト子宮頸がん由来細胞株 (HeLa 細胞) に対する光照射による細胞障害性と細胞内挙動を評価した。細胞実験の準備は, **2.2.7.1** と同様の方法で行った。

3.2.6.1 HeLa細胞に対する光線力学活性評価

2.2.7.2 と同様の手順で調製したサンプルを光照射した後, WST-8 アッセイによって細胞生存率を算出した。本実験はそれぞれ 3 回行い, 平均値および標準偏差を算出した。以下図 3-13 に結果を示す。

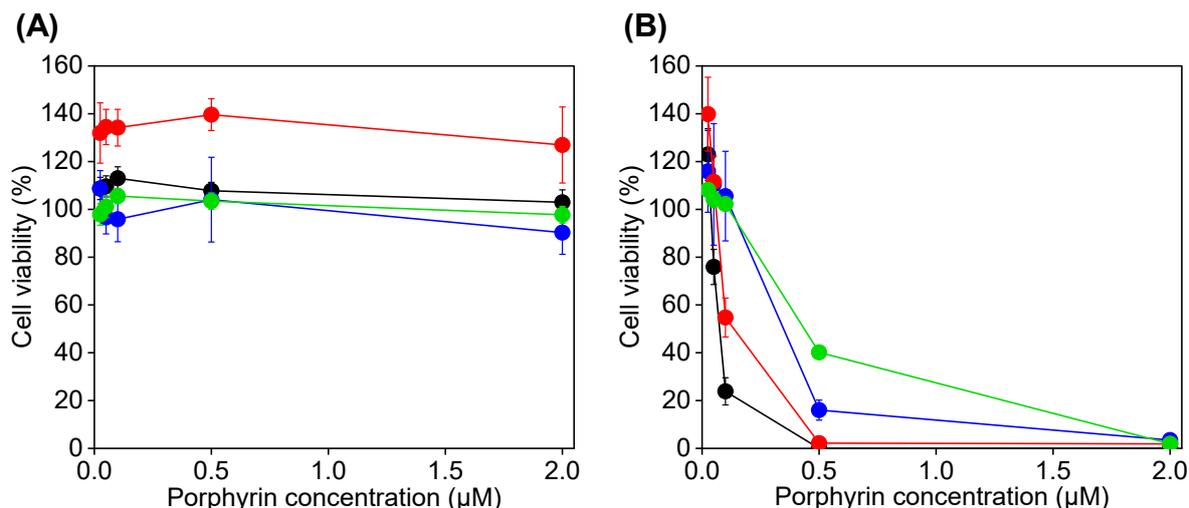


図3-13. 細胞生存率に対する化合物 2・多糖複合体の濃度依存性

黒線: 2-GL, 青線: 2-CGN, 赤線: 2-TG, 緑線: 2-PL

(A) 暗所サンプル, (B) 光照射サンプル

暗所サンプルにおいては、すべての化合物 2・多糖複合体で細胞生存率が大きく低下することがなかったことから、化合物 2・多糖複合体自身の暗所毒性は低いということが明らかになった。

一方で、光照射サンプルにおいてはすべての化合物 2・多糖複合体で細胞生存率が大きく低下した。この複合体が持つ光毒性を定量的に比較するため、細胞の生存率が 50 % にあたる濃度である半数阻害濃度 (IC₅₀) を算出し、以下表 3-4 にまとめた。

表3-4. 化合物 2・多糖複合体の IC₅₀ 値

名称	IC ₅₀ (μM)
2-GL	0.08
2-CGN	0.35
2-TG	0.14
2-PL	0.45

既に光線力学治療薬として上市されているフォトフリンの IC₅₀ は 3.02 μM^[19, 20] であることから、化合物 2・多糖複合体はフォトフリンよりも低濃度で治療が可能であると思われる優れた光線力学活性を持つことが明らかとなった。また、これら多糖複合体は一重項酸素発生能が低いにもかかわらず毒性が非常に高いため、β-グルカン複合体と同様に光線力学活性が“OFF 状態”から“ON 状態”へとスイッチングしているといえる。さらに、多糖の種類によって IC₅₀ 値に差があることが分かった。この違いの理由については後述の 3.2.6.2 で考察する。

3.2.6.2 HeLa 細胞に対する蛍光染色実験

さらに、細胞内への取り込みに関する情報を得るため、蛍光染色像による検討を行った。**2.2.7.3**と同様の手順で顕微鏡観察サンプルを作成し、蛍光顕微鏡で観察した。蛍光フィルターは G2-A (励起光:510–560 nm, 蛍光: ≥ 590 nm) を用いた。化合物 **2**・多糖複合体の最終濃度は、 $[2] = 0.8 \mu\text{M}$ である。以下図 3-14 に結果を示す。

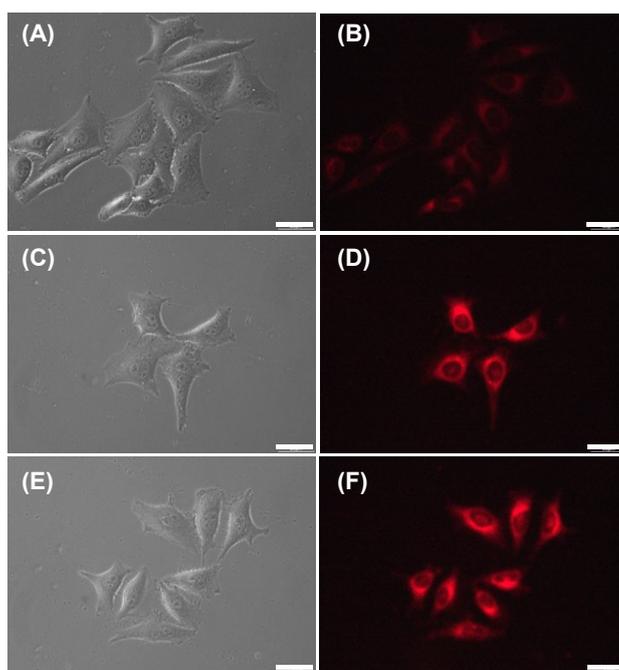


図3-14. 化合物 **2**・多糖複合体添加時における細胞蛍光染色像
(左:位相差像, 右:蛍光像, Scale bar: 20 μm , $[2] = 0.8 \mu\text{M}$)
(A, B) **2**-CGN, (C, D) **2**-TG, (E, F) **2**-PL

図 3-14 より、全ての化合物 **2**・多糖複合体でポルフィリン類縁体由来の蛍光と思われる像を観測した。この結果は、**2.2.7.3** で述べたように、光線力学活性は細胞内への複合体の取り込みと相関があることを示唆している。また、水溶液中においては蛍光が消光しているにもかかわらず細胞内での蛍光像を観測したため、 β -グルカン複合体と同様に光線力学活性が“OFF 状態”から“ON 状態”へとスイッチングしているといえる。

蛍光顕微鏡像における蛍光強度に着目すると、多糖の種類によって異なっており、細胞内への取り込み効率に違いがあることが示唆される。ここで、ナノ粒子の細胞への取り込み効率は、それぞれの表面電荷、つまりナノ粒子と細胞表面との間に起こる静電相互作用による引力および静電反発による斥力に大きく影響することが知られている^[21–23]。なかでも、CGN においては構成する糖に硫酸基を持っていることから強い負電荷を示す。また HeLa 細胞表面においても負電荷を帯びているため、両者の間に静電反発による斥力が生じ、結果として取り込み量が少なくなっているものと考えられる。したがって、他の二種の多糖と比

べると蛍光顕微鏡像における蛍光強度が弱くなっていると推察される。この結果は、**3.2.6.1** で評価した光線力学活性において、**2-CGN** の毒性が若干低くなっていることから支持される結果である。これに対して **2-PL** においては、毒性が低いにもかかわらず蛍光強度が高くなっている。この原因として、**2-PL** の長期安定性について最も安定性が低い (図 3-11) ことから、液体培地中における安定性の低さによって、複合体の崩壊が促進され膜中へと移行する効率が高くなったためであると考えられる。これが毒性を低くさせる理由については、後述の **3.2.7.2** で考察する。

3.2.7 リポソーム水溶液とポルフィリン類縁体・多糖複合体の混合

第 2 章において結論付けたように、ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体では細胞膜との相互作用により、ポルフィリン類縁体が脂質二重膜中へと移行している。前項までに、化合物 **2**・多糖複合体においても、移行によって起きたとみられるスイッチング能を有していることが明らかとなった。そこで、ホスト分子が変わったポルフィリン類縁体・多糖複合体も同様に移行するかどうか、リポソーム水溶液 (DMPC-SUV) を用いて検討した。

3.2.7.1 UV-Vis 吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルの変化

2.2.8.3.1 で調製した 4.0 mM DMPC-SUV 水溶液 750 μ L, 超純水 750 μ L を混合した溶液に対して、あらかじめ調製した 10 μ M 化合物 **2**・多糖複合体水溶液 1500 μ L を混合し、湯浴にて 37 $^{\circ}$ C, 2 時間加熱攪拌した。最終濃度は、 $[2] = 5.0 \mu\text{M}$, $[\text{DMPC}] = 1.0 \text{mM}$ である。この溶液の UV-Vis 吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定した。以下図 3-15 に結果を示す。

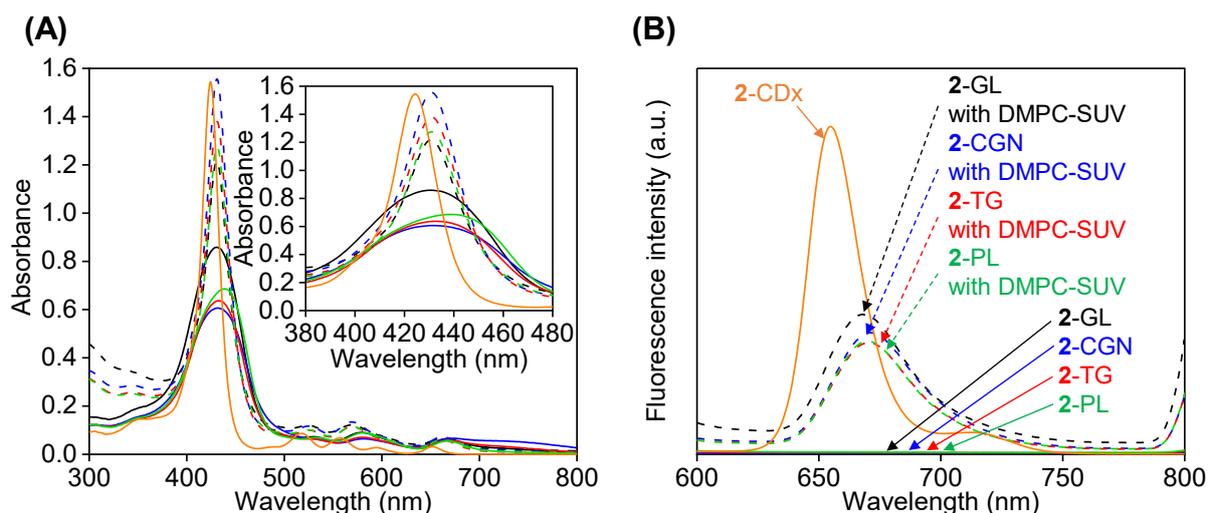


図3-15. DMPC-SUV 存在下における化合物 2・多糖複合体水溶液の
(A) UV-Vis 吸収スペクトル (B) 蛍光スペクトル

黒線: 2-GL, 青線: 2-CGN, 赤線: 2-TG, 緑線: 2-PL, 橙線: 2-CDx

実線: DMPC-SUV 非存在下, 破線: DMPC-SUV 存在下

(25 °C, 1 cm 蛍光セル, 励起波長: 540 nm, ホトマル電圧: 400 V)

([2] = 5.0 μM, [DMPC] = 1.0 mM)

図 3-15 より, 化合物 2・多糖複合体に DMPC-SUV を混合した際にスペクトルの変化があった。UV-Vis 吸収スペクトルにおいては, Soret 帯および Q 帯の吸収がブロードであったものが比較的シャープに変化した。また蛍光スペクトルにおいては, 蛍光強度が著しく増大した。さらに, 2-CDx のスペクトルと比較すると, 多糖複合体由来の吸収および蛍光ともにレッドシフトしており, かつそれぞれの極大波長はほぼ一致していることが分かった。したがって, 化合物 2 は CDx 錯体ではない別の分散状態にあることが示唆される。これらのことから, 多糖複合体も β-グルカン複合体と同様にポルフィリン類縁体が脂質二重膜中へと移行していることが示された。

3.2.7.2 一重項酸素発生能に対する影響

3.2.7.1 と同様の手順で得た DMPC-SUV・2-CGN および 2-PL 複合体を 1 cm 石英セルに 2970 μL 入れ, 遮光しながら 30 分間酸素ガスによるバブリングを行った。30 分後, UV-Vis 吸収スペクトルを測定し, このスペクトルをブランクとした。次に, 2.5 mM ABDA・DMSO 溶液 30 μL 加え, 再び UV-Vis 吸収スペクトルを測定した。この時のスペクトルを光照射時間 0 分後として光照射をおこない, 7.5, 15, 30, 60 分後における UV-Vis 吸収スペクトルを測定した。測定時の最終濃度は [2] = 15 μM, [DMPC] = 1.0 mM, [ABDA] = 25 μM である。本実験はそれぞれ 3 回行い, 平均値および標準偏差を算出した。以下図 3-16 に結果を示す。

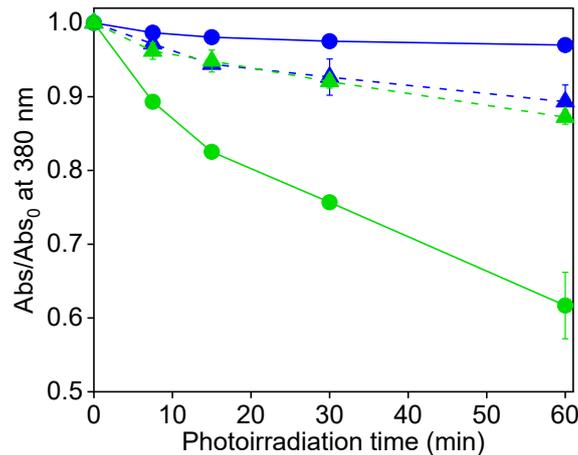


図3-16. DMPC-SUV 存在下における化合物 **2**・多糖複合体からの一重項酸素発生によるABDAの吸光度変化
(25 °C, 1 cm 石英セル, [2] = 15 μM, [DMPC] = 1.0 mM, [ABDA] = 25 μM)
青線: **2**-CGN, 緑線: **2**-PL
実線, ●:DMPC-SUV 非存在下 破線, ▲:DMPC-SUV 存在下

図 3-16 より, **2**-CGN において DMPC-SUV 存在下で一重項酸素発生能が向上した。これに対して, **2**-PL は DMPC-SUV 存在下で一重項酸素発生能が低下した。これは, **2**-PL がなんらかの要因で光励起による三重項励起状態をとりやすい環境となり, 一重項酸素発生能が高くなっていたにもかかわらず, 脂質二重膜中へと移行したことによって逆に一重項励起状態を取りやすい環境になったためであると考えられる。**2**-PL そのものが三重項励起状態を取りやすくなった要因の詳細は不明であるが, 高度に秩序化した自己組織化ナノ粒子は光触媒活性を高める例^[24]があることから, **2**-PL に形成するポルフィリン類縁体同士のパッキングが秩序化し適切に配置されることで, 項間交差の効率が向上し, 結果として酸素分子に対する電子およびエネルギーの交換効率が高まったためであると推察される。

さらに3.2.6.2の結果より, **2**-PL を HeLa 細胞へ作用させた際の細胞内蛍光の強度が他の多糖複合体と比べて強くなっているが, これは **2**-PL の長期安定性の低さから分かるように複合体の崩壊が起こりやすく, 他の多糖複合体と比べてポルフィリン類縁体が膜中でより高分散な状態になりやすいと考えられる。すなわち, 一重項励起状態 (= 蛍光を発する励起状態) を取りやすく, 三重項励起状態 (= りん光を発する励起状態) の割合が減っているためであると考えられる。つまり, 一重項酸素発生効率が低下することを意味しており, 本項における結果と, 3.2.6.1 における細胞への光毒性が低くなった結果とも矛盾しない。

以上の結果から, 汎用的な多糖類をポルフィリン類縁体の可溶化剤として用いた時, β-グルカン複合体と同様の性質を持っていることから, ホスト分子の適用範囲を拡張でき, 高速振動粉碎法による水溶化法が汎用性の優れた機能化法であることを明らかにした。

3.3 結言

初めに、食品添加物に用いられている汎用的な多糖類を用いた水溶化について、ポルフィリン類縁体として化合物 **2** をピックアップし、第2章と同様に高速振動粉碎法によって水溶化が可能であるかを検討した。今回使用した六種類の多糖類のうち、GL, CGN, TG, PL の四種類で水溶化が可能であることを示した。一方で、AG および SH においては水溶化ができなかった。この水溶化能の違いについて、水溶化メカニズムとして「トレイン-ループ-テール」モデルを適用し、多糖のポルフィリン類縁体表面への吸着によるコロイド分散系として検討した。しかし、多糖の持続長の比較による剛直性の違いでは、水溶化能に対する明確な関連性が見いだせなかった。さらにポルフィリン類縁体および多糖類の水溶液中におけるゼータ電位の比較について、大まかな予測が可能であることを示しつつも、高分子コロイド分散系に特徴的な枯渇効果による凝集の影響や、複合体自体の粒子径・密度による影響が大きく現れる可能性があるために、正確な水溶化能の予測には至らなかった。今後の様々な疎水性分子と多糖の組み合わせによる水溶化の検討の中で、水溶化能の予測が期待される。

次に、水溶液中の化合物 **2**・多糖複合体の性質について検討した。長期安定性に関して、ポルフィリン類縁体・シクロデキストリン錯体と比べると大幅に向上しており、医薬への適用に際して優れた性質を持つことが分かった。さらに、化合物 **2**・多糖複合体はナノ粒子として存在し、おおよそ 100–300 nm 程度の粒径で分散していることから、EPR 効果を用いた腫瘍組織への受動的送達も期待される。

さらに、HeLa 細胞に対して化合物 **2**・多糖複合体水溶液を投与し、生体透過性に優れた赤色光を照射すると、すべての多糖類との組み合わせにおいて細胞死を引き起こすことが分かり、既に上市されている光線力学治療薬と比較すると、およそ 6 倍以上の活性があることから、優れた光線力学活性を有していることが明らかとなった。化合物 **2**・多糖複合体の活性が第 2 章の β -グルカン複合体と同様に“OFF 状態”から“ON 状態”へとスイッチングしている様子が観測されたため、人工細胞モデルであるリポソームと混合した際の挙動を検討したところ、 β -グルカン複合体と同様に細胞膜へ複合体が相互作用によって吸着し、ポルフィリン類縁体が膜内へ移行するメカニズムによって、スイッチングが起きていることを示した。

したがって、ポルフィリン類縁体は、様々な安価で汎用的な多糖類を用いても水溶化が可能であること、形成した複合体は光線力学治療薬への適用が可能であることから、多糖を用いた高速振動粉碎法による水溶化法が、汎用性に優れた機能化法であることを明らかにした。

3.4 参考文献

- [1] K. Komatsu, K. Fujiwara, Y. Murata, and T. Braun, “Aqueous solubilization of crystalline fullerenes by supramolecular complexation with γ -cyclodextrin and sulfocalix[8]arene under mechanochemical high-speed vibration milling”, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1999**, 2963–2966. (DOI: 10.1039/a904736k)
- [2] 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. (DOI: 10.1021/acsmchemlett.7b00098)
- [3] S. Satake, H. Shinmori, S. Kawabata, K. Sugikawa, H. Funabashi, A. Kuroda, and A. Ikeda, “High photodynamic activities of water-soluble inclusion complexes of 5,15-diazaporphyrins in cyclodextrin”, *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, 17, 3141–3149. (DOI: 10.1039/C9OB00101H)
- [4] A. Silberberg, “The Adsorption of Flexible Macromolecules. PART I. The Isolated Macromolecule at a Plane Interface”, *J. Phys. Chem.*, **1962**, 66, 1872–1883. (DOI: 10.1021/j100816a023)
- [5] J. M. H. M. Scheutjens and G. J. Fleer, “Statistical theory of the adsorption of interacting chain molecules. 2. Train, loop, and tail size distribution”, *J. Phys. Chem.*, **1980**, 84, 178–190. (DOI: 10.1021/j100439a011)
- [6] 日本化学会編, コロイド科学 I – 基礎および分散・吸着 –, 東京化学同人, **1995**.
- [7] R. L. Cleland, “The persistence length of hyaluronic acid: An estimate from small-angle X-ray scattering and intrinsic viscosity”, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1977**, 180, 57–68. (DOI: 10.1016/0003-9861(77)90008-X)
- [8] U. Adolphi, and W. M. Kulicke, “Coil dimensions and conformation of macromolecules in aqueous media from flow field-flow fractionation/multi-angle laser light scattering illustrated by studies on pullulan”, *Polymer*, **1997**, 38, 1513–1519. (DOI: 10.1016/S0032-3861(96)00675-1)
- [9] I. Lizaso, M. E. Muñoz, and A. Santamaría, “Transient rheological behavior of lyotropic solutions of ethyl cellulose in *m*-cresol”, *Rheol. Acta.*, **1999**, 38, 108–116. (DOI: 10.1007/s003970050161)
- [10] G. Dervilly-Pinel, J.-F. Thibault, and L. Saulnier, “Experimental evidence for a semi-flexible conformation for arabinoxylans”, *Carbohydr. Res.*, **2001**, 330, 365–372. (DOI: 10.1016/S0008-6215(00)00300-1)
- [11] S. Mukherjee, M. M. Waegle, P. Chowdhury, L. Guo, and F. Gai, “Effect of macromolecular crowding on protein folding dynamics at the secondary structure level”, *J. Mol. Biol.*, **2009**, 393, 227–236. (DOI: 10.1016/j.jmb.2009.08.016)
- [12] T. M. McIntire, and D. A. Brant, “Observations of the (1→3)- β -D-Glucan Linear Triple Helix to Macrocycle Interconversion Using Noncontact Atomic Force Microscopy”, *J. Am.*

- Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 6909–6919. (DOI: 10.1021/ja981203e)
- [13] T. Norisuye, “Triple-stranded helical structure of schizophyllan and its antitumor activity in aqueous solution”, *Macromol. Chem. Phys.*, **1985**, *14*, 105–118. (DOI: 10.1002/macp.1985.020141985110)
- [14] 大島広行訳, コロイド科学 –基礎と応用–, 東京化学同人, **2014**.
- [15] Malvern Instruments Ltd., Zetasizer Nano ユーザーマニュアル MANO0317, **2007**.
- [16] 日本化学会編, 現代界面コロイド化学の基礎 –原理・応用・測定ソリューション, 丸善出版, **2018**.
- [17] M. M. Kashani-Motlagh, R. Rahimi, and M. J. Kachousangi, “Ultrasonic Method for the Preparation of Organic Porphyrin Nanoparticles”, *Molecules*, **2010**, *15*, 280–287. (DOI: 10.3390/molecules15010280)
- [18] S. Asakura, and F. Oosawa, “On Interaction between Two Bodies Immersed in a Solution of Macromolecules”, *J. Chem. Phys.*, **1954**, *22*, 1255–1256. (DOI: 10.1063/1.1740347)
- [19] D. Kessel, “Photosensitization with Derivatives of Haematoporphyrin”, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **1986**, *49*, 901–907. (DOI: 10.1080/09553008514553131)
- [20] D. Kessel, “Proposed Structure of the Tumor-Localizing Fraction of HPD (Hematoporphyrin Derivative)”, *Photochem. Photobiol.*, **1986**, *44*, 193–196. (DOI: 10.1111/j.1751-1097.1986.tb03585.x)
- [21] 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. (DOI: 10.1002/chem.200801090)
- [22] C. R. Miller, B. Bondurant, S. D. McLean, K. A. McGovern, and D. F. O'Brien, “Liposome-Cell Interactions in Vitro: Effect of Liposome Surface Charge on the Binding and Endocytosis of Conventional and Sterically Stabilized Liposomes”, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 12875–12883. (DOI: 10.1021/bi980096y)
- [23] M. Akiyama, A. Ikeda, T. Shintani, Y. Doi, J. Kikuchi, T. Ogawa, K. Yogo, T. Takeya, and N. Yamamoto, “Solubilisation of [60]fullerenes using block copolymers and evaluation of their photodynamic activities”, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 1015–1019. (DOI: 10.1039/B719671G)
- [24] Z. Bian, T. Tachikawa, and T. Majima, “Superstructure of TiO₂ Crystalline Nanoparticles Yields Effective Conduction Pathways for Photogenerated Charges”, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2012**, *3*, 1422–1427. (DOI: 10.1021/jz3005128)

第 4 章 多糖類を用いた不斉結晶のキラル情報を維持する水溶化法の開発

4.1 序

第 2 章および第 3 章では、ポルフィリン類縁体・多糖複合体が優れた光線力学活性を持ち、さらに細胞イメージング材料としての活用が期待できることを示した。しかし、水溶液中においては蛍光が著しく消光しており、これは複合体中でポルフィリン類縁体が凝集起因消光 (ACQ) を引き起こしているためであると考えられる。そこで、これとは逆の性質である凝集誘起発光 (Aggregation Induced Emission; AIE)^[1] を用いることで蛍光が増強するのではないかと予想し、本章の着想に至った。

本章では、AIE 物質であるテトラフェニルエテン (Tetraphenylethene; TPE) 誘導体を用い、多糖類を可溶化剤として水溶化を高速振動粉碎法によって試み、これらの分光学的測定、モルフォロジー観察によって、TPE をゲスト分子として多糖との複合化が可能であるかを検討する。また、複合体の細胞への投与を行い、細胞イメージング材料としての活用を試みる。さらに、TPE 誘導体が持つ不斉結晶という性質^[2]を基に、結晶中のキラリティを維持したまま水溶化していることを、分光学的測定から明らかにする。

本章で用いたテトラフェニルエテン誘導体および多糖類の構造を以下図 4-1 に示す。

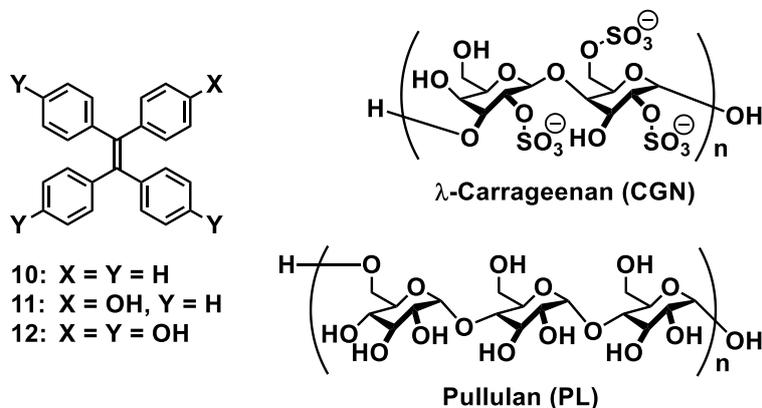


図 4-1. 本章で用いたテトラフェニルエテン誘導体および多糖類の構造

4.2 実験結果と考察

4.2.1 1-(4-ヒドロキシフェニル)-1,2,2-トリフェニルエテン (11) の合成^[3]

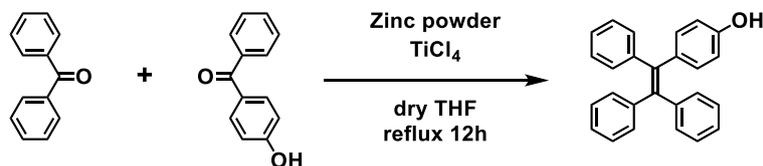


図 4-2. 化合物 11 の合成スキーム

ベンゾフェノン (2.0 g, 10 mmol), 4-ヒドロキシベンゾフェノン (2.2 g, 12 mmol), 亜鉛粉末 (2.9 g, 44 mmol) を 1000 mL 三口フラスコに入れ, 脱水テトラヒドロフラン 200 mL に溶かして 30 分間攪拌した。フラスコを, 食塩を加えた氷浴で冷やしながら塩化チタン(IV) (2.5 mL, 22 mmol) を窒素雰囲気下でゆっくり滴下し, 氷浴上で 1 時間攪拌した。その後, 氷浴を外して油浴に代えて 12 時間加熱還流した。還流後, 室温まで放冷し 10 % 炭酸カリウム水溶液 100 mL を加え 5 分間激しく攪拌した。吸引ろ過によって沈殿を取り除き黄色の溶液を分取し, ジクロロメタンと飽和食塩水で分液し黄色の有機層を得た。硫酸ナトリウムで脱水した有機層を減圧留去し, 橙色の油状物質を得た。これをシリカカラムクロマトグラフィー (展開溶媒:ジクロロメタン, $R_f = 0.43$) で分離し, 橙色の半固形物を得た。さらにこれを加熱したヘキサンに溶かしてろ過することで, 白色の粉末を得た (収量:727.9 mg, 収率: 21 %, 文献値^[3]:44 %)。化合物の同定は ¹H-NMR スペクトルにて行った。

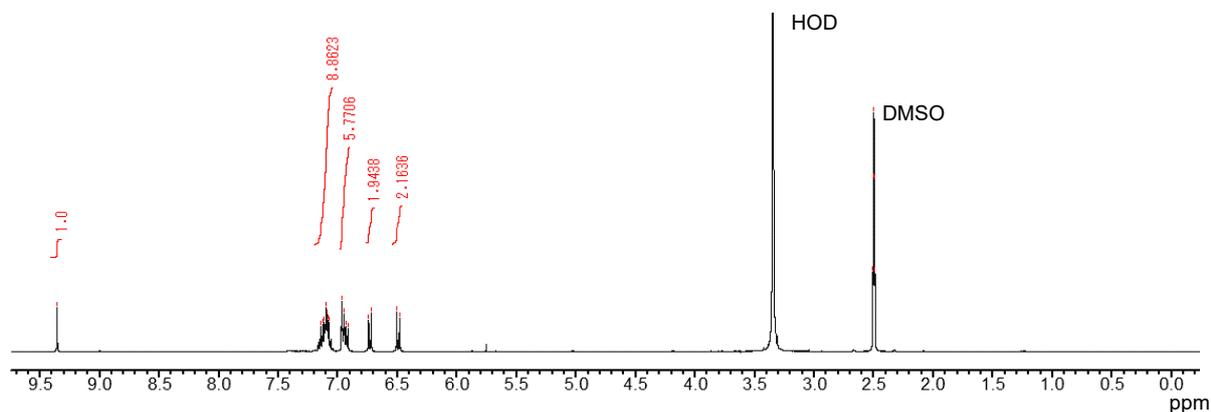


図 4-3. 化合物 11 の ¹H-NMR スペクトル
(400 MHz, 25 °C, 積算回数: 32 回, 溶媒: DMSO-d₆)

表 4-1. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの帰属

	文献値 ^[3]	実測値
a	9.35 (s, 1H)	9.36 (s, 1.0H)
b	7.1 (d, 9H)	7.16–7.07 (m, 8.9H)
c	6.98 (s, 6H)	6.97–6.92 (m, 5.8H)
d	6.73 (s, 2H)	6.73 (d, 1.9H)
e	6.51 (s, 2H)	6.49 (d, 2.2H)

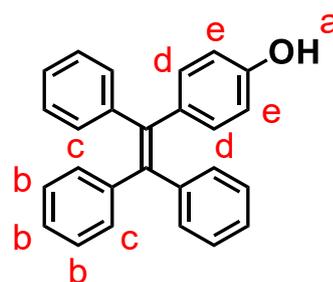


図 4-3 および表 4-1 から一部の分裂が異なるものの、化学シフト値と積分値がほぼ一致したため合成に成功したと判断した。

4.2.2 高速振動粉碎法を用いた多糖類によるテトラフェニルエテン誘導体の水溶化

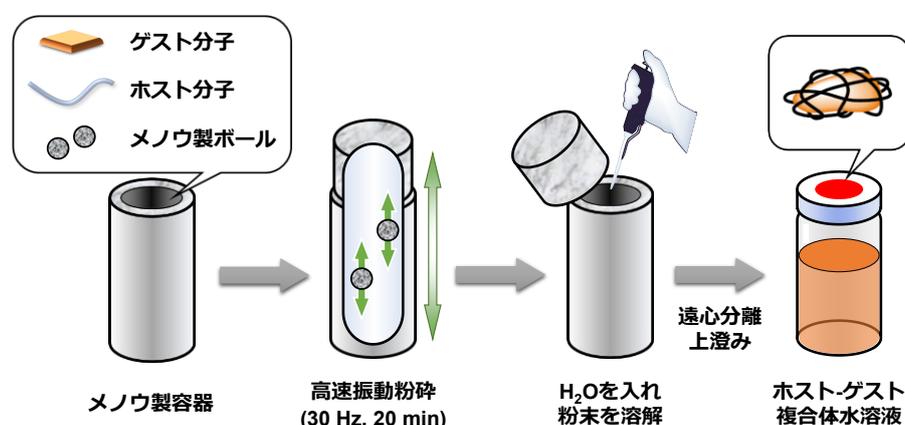


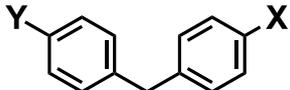
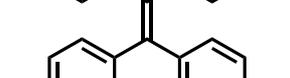
図 4-4. 高速振動粉碎法の概略図

(ゲスト分子: 化合物 **10-12**, ホスト分子: CGN および PL)

水溶化には、**2.2.1.2** および **3.2.1** と同様に高速振動粉碎法^[4]を用いた。化合物 **10-12** $5.0 \mu\text{mol}$ と各種多糖類 10.0 mg をメノウボール二個とともにメノウ容器に入れ、高速振動粉碎法 (30 Hz , 20 min) により混合した。この混合物に超純水 2.0 mL を加えて抽出した。この抽出液を遠心分離 (4500 rpm [$1860 \times g$], 20 min) により不溶な化合物 **10-12** を沈降させた。得られた上澄みを分取し、化合物 **10-12**・多糖複合体水溶液を得た。

使用したテトラフェニルエテン誘導体は以下表 4-2 に示す化合物を用いた。

表 4-2. 今回用いたテトラフェニルエテン誘導体の構造式および混合量

構造式	番号	置換基	略称	混合量
	10	X = Y = H	TPE	1.7 mg
	11	X = OH, Y = H	TPE-OH1	1.7 mg
	12	X = Y = OH	TPE-OH4	2.0 mg

以下、それぞれの複合体を n -XX ($n = 10-12$, XX = CGN, PL)と略して標記した。

4.2.3 テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体の分光学的性質と濃度決定

4.2.3.1 テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体の UV-Vis 吸収スペクトル測定

4.2.2で得られた化合物 10-12・多糖複合体水溶液を 30 μ L 分取し、超純水 270 μ L 加えることで 10 倍に希釈した。この水溶液の UV-Vis 吸収スペクトルを測定した。結果を以下図4-5に示す。

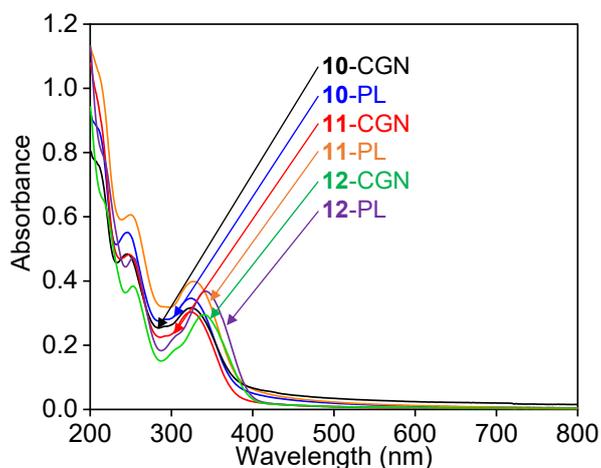


図4-5. 化合物 10-12・多糖複合体水溶液のUV-Vis吸収スペクトル
(25 $^{\circ}$ C, 1 mm 石英セル, 抽出液を 10 倍に希釈)

黒線: 10-CGN, 青線: 10-PL, 赤線: 11-CGN, 橙線: 11-PL, 緑線: 12-CGN, 紫線: 12-PL

図4-5より、高速振動粉碎法によって多糖と複合化し、テトラフェニルエテン誘導体が水溶化していることが明らかになった。

この水溶液をそれぞれ凍結乾燥し DMSO で再溶解した際の吸光度と、濃度 ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) が既知であるテトラフェニルエテン誘導体・DMSO 溶液を用いて決定した DMSO 中のモル吸光係数 (ϵ_{DMSO}) を用いて、2.2.2.1に示したランベルト・ベールの式から濃度および水中でのモル吸光係数 ($\epsilon_{\text{H}_2\text{O}}$) を決定した。なお、多糖の種類によってスペクトルの概形にほ

とんど変化が無かったことから、いずれの複合体も同様の形態で水溶化していると考えられる。この結果を基に、これ以降の実験において濃度の算出に用いるモル吸光係数は、多糖の種類にかかわらず PL 複合体の値を用いた。それぞれのモル吸光係数を以下表4-3に示す。

表 4-3. 各種テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体水溶液の極大吸収波長とモル吸光係数

略称	TPE誘導体 略称	極大吸収波長 (nm)	モル吸光係数 $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}}$ ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
10-PL (10-CGN)	TPE	329	1.82×10^4
11-PL (11-CGN)	TPE-OH1	325	1.64×10^4
12-GL (12-CGN)	TPE-OH4	342	1.29×10^4

4.2.3.2 テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体の蛍光スペクトル測定

4.2.2で得られた化合物 **10-12**・多糖複合体水溶液を、それぞれTPE誘導体の濃度が $10.0 \mu\text{M}$ になるように希釈した。これら水溶液の蛍光スペクトルを測定した。結果を以下図4-6に示す。

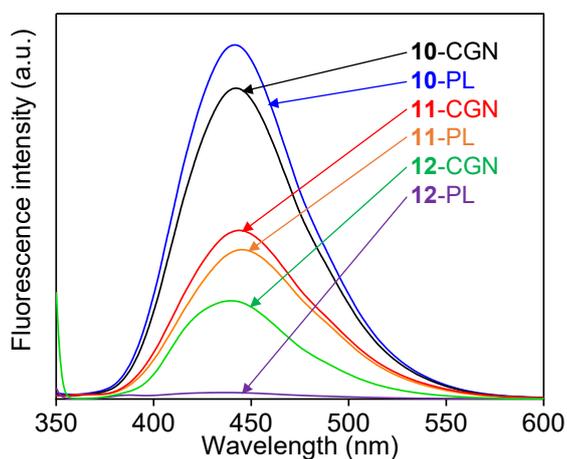


図4-6. 化合物 **10-12**・多糖複合体水溶液の蛍光スペクトル
(25°C , 1 cm 蛍光セル, $[\mathbf{10-12}] = 10.0 \mu\text{M}$)

黒線: **10-CGN**, 青線: **10-PL**, 赤線: **11-CGN**, 橙線: **11-PL**, 緑線: **12-CGN**, 紫線: **12-PL**
($\text{Ex} = 329 \text{ nm}$ (**10**), 325 nm (**11**), 341 nm (**12**))
(スリット幅: 励起・蛍光側ともに 10 nm , ホトマル電圧: 400 V)

図 4-6 より、全てのテトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体で非常に強い蛍光を観測した。このことから、多糖による複合化によって凝集誘起発光が引き起こされ、蛍光が増強しているものと考えられる。

ここで、それぞれのスペクトルを比較すると、置換基が多く結合しているほど蛍光強度が低下していた。特に、**12-PL** に関しては **10-PL** に比べて約 400 分の 1 にまで低下していた。テトラフェニルエテン誘導体は凝集によって蛍光が誘起される物質であり、その蛍光強度は凝集力に比例するものと考えられる。したがって、この違いはヒドロキシ基自身の立体障害や、高速振動粉碎後の水による抽出時にヒドロキシ基付近に水が配位することで嵩高さが増大し、凝集力に影響しているものと推察され、それが蛍光強度の低さにつながっていると考えられる。

このように化合物 **12** を用いた複合体は、蛍光増強の程度が他の二種に比べて小さいことから、これ以降の実験において化合物 **12**・多糖複合体を用いることは不適當であると判断し、除外した。

4.2.3.3 テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定

4.2.2と同様に調製した化合物 **10** および **11**・多糖複合体を D_2O 2.0 mL で抽出し、遠心分離 (4500 rpm [1860 \times g], 20 min) により不溶な化合物 **10** および **11** を沈降させた。得られた上澄みを 600 μL 分取し、外径 5 mm の石英 NMR 管に注入した。これをサンプルとして $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。また、比較としてそれぞれの多糖類のみを同様の条件で高速振動粉碎し、遠心分離した多糖水溶液も測定した。結果を以下図4-7に示す。

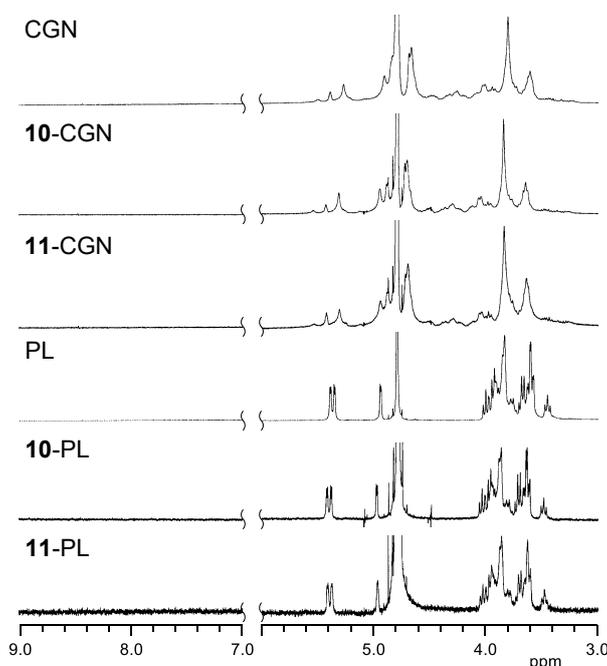


図4-7. 多糖類および化合物 **10** および **11**・多糖複合体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (400 MHz, 25 $^{\circ}\text{C}$, 積算回数:64 回, 溶媒: D_2O)

図 4-7 より、全ての多糖複合体において、化合物 **10** および **11** に由来するプロトンのシグナルは検出されなかった。これは、**2.2.2.2** および **3.2.2.2** におけるポルフィリン類縁体・多糖複合体と同様に、化合物 **10** および **11** が多糖と複合化することで見かけ上高分子量化し、運動性が低下したことによるシグナルの平均化が起こっているものと考えられる。したがって、化合物 **10** および **11** は多糖に包接されて水中に分散していると考えられる。

また、**2.2.2.2** および **3.2.2.2** と同様に 3.0–5.5 ppm 付近に見られる多糖由来のシグナルを比較すると、複合化の有無にかかわらずピーク位置や分裂にほとんど変化が無かった。これは **3.2.3** で述べたように、テトラフェニルエテン誘導体の粒子表面に、多糖類が一部吸着している「トレイン-ループ-テール」構造を持つことを示唆している。

4.2.4 テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体のモルフォロジー

4.2.4.1 動的光散乱(DLS)法による粒径測定

4.2.2で得られた化合物 **10** および **11**・多糖複合体を、それぞれ 10.0 μM に希釈した。さらに、多糖のみを高速振動粉碎によって処理した水溶液も準備し、これらの水溶液の粒径を測定した。結果を以下図4-8に示す。なお、本章では光強度分布から算出した粒子数分布を示した。

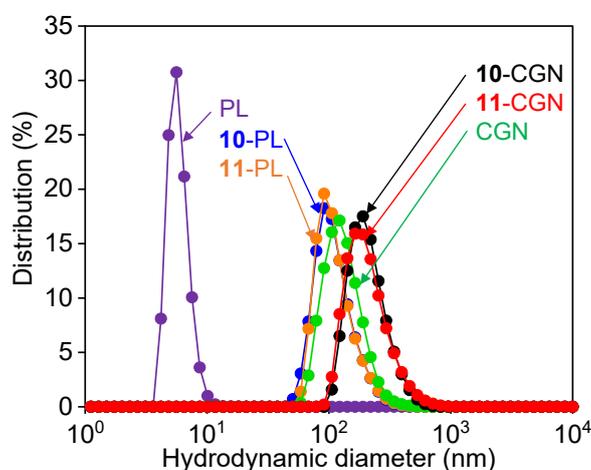


図4-8. 多糖類と化合物 **10** および **11**・多糖複合体の粒径分布 (25 °C)

黒線: **10**-CGN, 青線: **10**-PL, 赤線: **11**-CGN, 橙線: **11**-PL, 緑線: CGN, 紫線: PL

また、それぞれの平均流体力学的直径と多分散度 (Polydisperse Intensity; PDI) を以下表4-4にまとめた。

表4-4. 多糖類と化合物 **10** および **11**・多糖複合体の平均粒径

略称・名称	平均流体力学的直径(nm)	PdI
PL	5.9	0.536
10 -PL	114.7	0.141
11 -PL	116.1	0.145
CGN	135.0	0.265
10 -CGN	216.1	0.136
11 -CGN	217.3	0.184

以上の結果から、いずれの複合体も多糖類のみの粒径より大きくなっており、平均 100–200 nm の粒径を持つことが示唆された。

4.2.4.2 透過型電子顕微鏡(TEM)によるモルフォロジーの観察

4.2.2 で得られた化合物 **10**・多糖複合体水溶液を 100 μM に希釈したのち、カーボン支持膜グリッド上に約 1 分間溶液を浸し、その後溶液を濾紙で吸い取った。その上に 2.0 wt% リンタングステン酸水溶液を約 10 秒間浸したのち溶液を濾紙で吸い取った。これをサンプルとして観察を行った。以下図 4-9 に結果を示す。

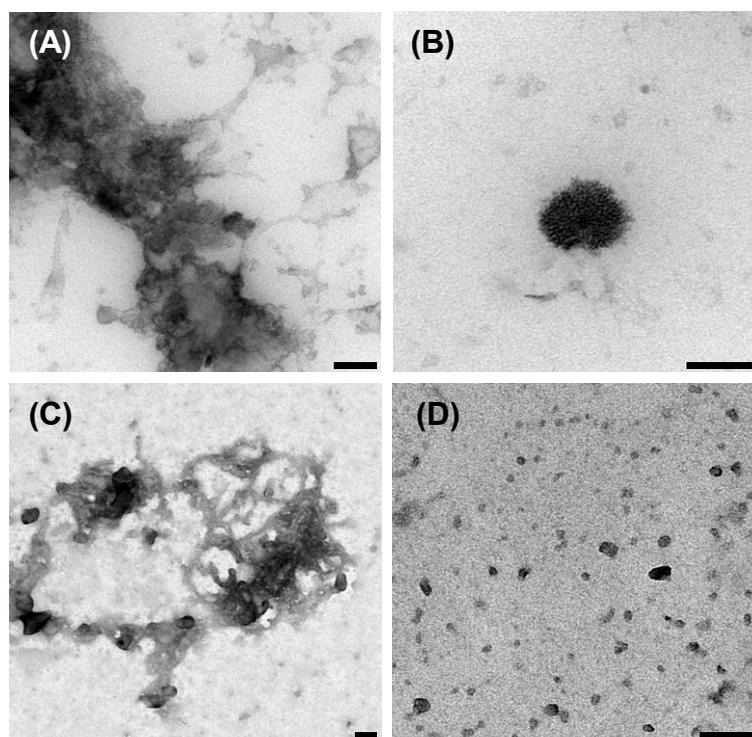


図4-9. 多糖類および化合物 **10**・多糖複合体のTEM観察画像
(A) CGN, (B) **10**-CGN, (C) PL, (D) **10**-PL
(ネガティブ染色; 2.0 wt% リンタングステン酸, Scale bar: 100 nm)

図 4-9 より、多糖類のみを観察した場合には明確な構造体を観測することができなかった。一方で、**10**-CGN および **10**-PL においては、直径がおよそ 100–200 nm のグロビュール状の構造体を観測することができた。これらのことから、高速振動粉碎法によって多糖類とテトラフェニルエテン誘導体が複合化して水中に分散していることを確認した。

4.2.5 テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体の HeLa 細胞への導入

さらに細胞蛍光イメージング材料としての活用を期待し、細胞内への取り込みに関する情報を得るため、蛍光染色像による検討を行った。**2.2.6.3** と同様の手順で顕微鏡観察サンプルを作成し、蛍光顕微鏡で観察した。蛍光フィルターは U-MNUA2 (励起光:360–370 nm, 蛍光:420–460 nm) を用いた。最終濃度は、[**10** or **11**] = 5.0 μ M である。以下図 4-10 に結果を示す。

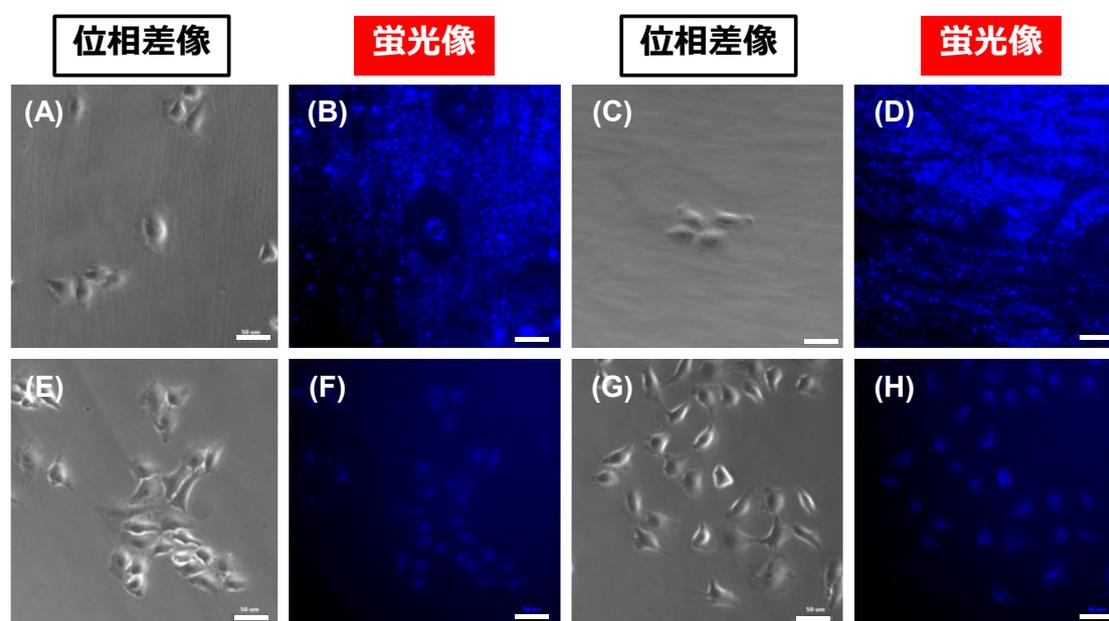


図4-10. 化合物 **10** および **11**・多糖複合体添加時における細胞蛍光染色像

(Scale bar: 50 μ m, [**10** or **11**] = 5.0 μ M)

(A, B) **10**-CGN, (C, D) **10**-PL, (E, F) **11**-CGN, (G, H) **11**-PL

図 4-10 より、**10**-CGN および **10**-PL 添加時における蛍光像では、細胞内での蛍光はほとんど無く、ガラスディッシュ表面からの蛍光が観測された。このことから、**10**-CGN および **10**-PL は細胞内に取り込まれることなくガラスディッシュ表面に吸着し、PBS による洗浄で剥ぎ取ることができなかったと考えられる。

これに対して、**11**-CGN および **11**-PL は細胞内の蛍光が観測できた。したがって、**11**-CGN および **11**-PL は細胞内へ導入されていることが明らかとなった。このように、ヒドロキシ基を持つ疎水性分子が細胞内へと導入されやすいことは、**3**-CDx や 5,10,15,20-テトラ

(ヒドロキシフェニル)クロリンのようなポルフィリン類縁体を用いた場合にも起きることが既に報告されており^{5, 6)}, なおかつ第 2 章で述べたように **3-GL** でも同様の傾向が見られることが分かっている。すなわち, 細胞内への取り込み作用が, 細胞膜に存在するフェノールレセプター (例えば, エストロゲンレセプター⁷⁾など) の認識によって引き起こされていると示唆される。

また, 細胞内の蛍光強度を比較すると, **11-CGN** が **11-PL** よりも低くなっていることが分かる。これは, **CGN** を構成する糖にある硫酸基による強い負電荷と, HeLa 細胞表面の負電荷間での静電反発による斥力が生じたためであると考えられる^[8-10]。これは, **3.2.6.2** において **2-CGN** の蛍光強度が低くなっているという結果と矛盾しない。

以上の結果から, テトラフェニルエテン誘導体を高速振動粉碎法によって多糖と複合化させることで水溶化することができ, これを細胞イメージング材料としての活用が可能であることを示した。

4.2.6 テトラフェニルエテン誘導体が持つキラル情報の水溶液中における維持

4.2.6.1 不斉結晶としてのテトラフェニルエテン

ある同じ示性式を持つ化合物同士について, 人間の右手と左手の関係のように重ね合わせることができない鏡像の関係にあるものをキラル分子と呼び, その一对の立体異性体を鏡像異性体 (エナンチオマー) と呼ぶ。また, この鏡像の関係にある性質のことをキラリティと呼ぶ。例えば, 炭素に対して四つすべて異なる原子団が結合している場合にエナンチオマーが発生する。物質質量や結合エネルギーは全く等しいため, エナンチオマー同士の物理的性質はほとんどが等しい。しかし, それぞれの分子の持つ電気双極子モーメントのベクトルが異なるため, その分子近傍を通過する電磁波 (すなわち, 光) と相互作用することで偏光面が異なる方向に傾く。このような性質を旋光性と呼び, 右旋光および左旋光によってキラル分子を区別することができる。さらに, 生理活性物質においてはその高い基質選択性からエナンチオマーを区別することができ, その反応性・生理活性も全く異なる。睡眠薬であるサリドマイドのエナンチオマーによる胎児催奇性が最もよく知られた一例である^[11]。

また, 化合物の結晶状態において, 結晶構造の対称性を示す際に用いられる **230** の空間群のうち, キラルな空間群を持つ **65** 種のいずれかの空間群を持つことで, 分子構造のキラル・アキラルにかかわらずキラリティを示すことがある^[12, 13]。この結晶を不斉結晶と呼ぶ。二酸化ケイ素の結晶である水晶は, 右水晶・左水晶と呼ばれる光学活性を持つ結晶を作ることによく知られている。また, ベンゾフェノンのような有機化合物でも同様に光学活性な結晶が合成できる。この現象は, 有機・無機化合物および錯体のいずれを問わず起こりうる。特にアキラルな分子が不斉結晶化する要因として, ①コンフォメーションの固定による結合のねじれによるキラリティの発生, ②分子が集団としてヘリックス構造のようなねじれ構造を作ることによるキラリティの発生, の二つが挙げられる^[10]。このように, 結晶中の分子の運動が著しく制限された状態であるからこそキラリティが発生するため, 溶媒に溶解させる, もしく

は高温で溶融させると、速やかにラセミ化しキラリティは失われる^[10, 11]。

本章で用いたテトラフェニルエテン (化合物 **10**) も不斉結晶となることが知られている^[10]。結晶中でフェニル基の運動性が制限され、一方向に傾いた状態で固定されることで $P2_1$ 空間群を持ち、 P 型 (右巻きらせん) 構造と M 型 (左巻きらせん) 構造を持つ。

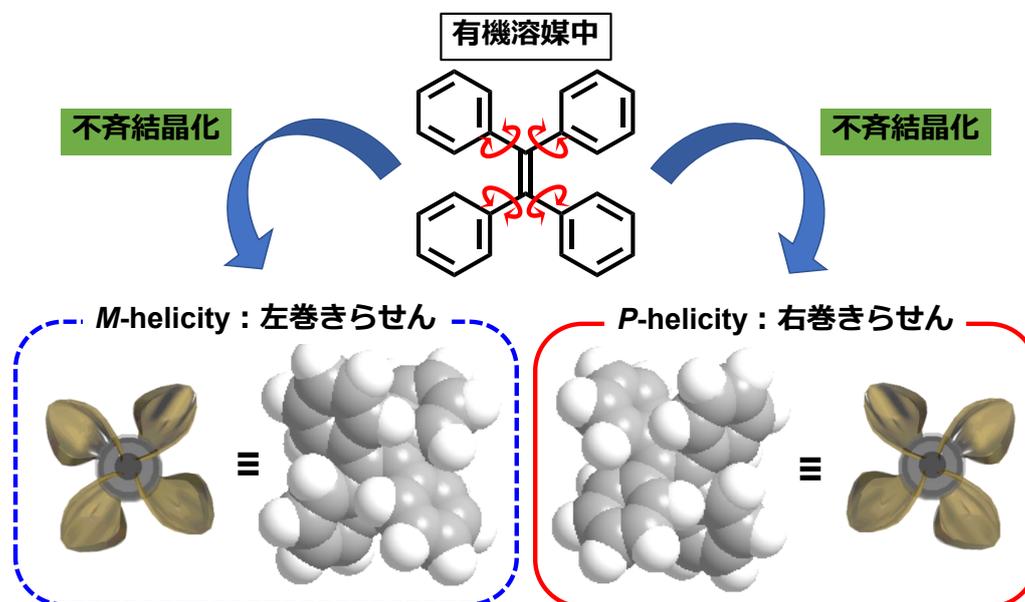


図 4-11. 化合物 **10** の有機溶媒中および結晶中における分子構造

4.2.6.2 テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体の円偏光二色性スペクトル測定

第 2 章から本章にかけて、高速振動粉碎法によって多糖と複合化して水中に分散した疎水性分子は、ポルフィリン類縁体においては凝集起因消光、テトラフェニルエテン誘導体においては凝集誘起発光を観測していることから、多糖複合体中で凝集していることを明らかにしている。したがって、この凝集状態がある程度秩序を持っていると仮定すれば、この複合体は結晶性を持っている、すなわち複合体が旋光性を有しているのではないかと予想された。そこで、テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体の円偏光二色性 (Circular Dichroism; CD) スペクトルを測定することで、旋光性の有無を確認した。

4.2.2 で得られた化合物 **10** および **11**・多糖複合体を、それぞれ 250 μM に希釈し、円二色性分散計を用いて CD スペクトルを測定した。円二色性分散計で得られるデータは楕円率 θ_{obs} (mdeg) であるため、以下式 4-1 を用いてモル楕円率 $[\theta]$ ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) に換算した。

$$[\theta] = \theta_{\text{obs}} / 10cl \quad \dots(4-1)$$

ここで、 c : モル濃度 ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), l : 光路長 (cm) を表す。結果を以下図 4-12 に示す。

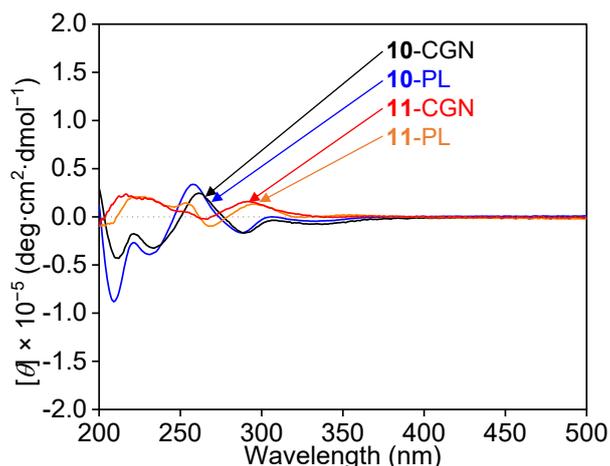


図 4-12. テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体の円偏光二色性スペクトル (25 °C, 1 mm 石英セル, バンド幅: 3 nm, 走査速度: 100 nm·min⁻¹, 積算回数: 4 回)
 黒線: 10-CGN, 青線: 10-PL, 赤線: 11-CGN, 橙線: 11-PL

図 4-12 より, テトラフェニルエテン誘導体の吸収領域において, 負のコットン効果が観測された。さらに, 10-CGN および 10-PL のスペクトルは既に報告されている, 固体 CD スペクトル測定における *P* 型結晶の結果とほぼ一致していた^[14]。この結果から, 10-CGN および 10-PL は *P* 型結晶のキラリティを持っていることが分かった。したがって, 多糖複合体中で凝集したテトラフェニルエテン誘導体は不斉を持つことが明らかになった。また, モル楕円率の強度は, ヒドロキシ基が導入された化合物 11・多糖複合体の方が弱くなっていた。これは, 4.2.3.2 で述べた蛍光強度の低下の原因と同様に, 凝集力が低下することで, フェニル基に生じるねじれが解消しやすくなっているためであると考えられる。

4.2.6.3 テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体のキラリティ形成メカニズム

前項の結果より, テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体はキラリティを有していることが明らかになった。そこで, 本項ではこのキラリティがどのように形成されたのかを検討する。考えられるメカニズムとして以下二つの仮説を立て, それぞれ検証することでキラリティの形成メカニズム解明を試みた。

4.2.6.3.1 仮説①: 多糖によるテトラフェニルエテンのキラリティ誘起

多糖を形成する糖ユニットには, 不斉炭素が存在する。また, 多糖の種類によってはらせん構造を有することがある。したがって, 多糖は不斉源としての役割を果たすことができると考えられる。したがって, 様々な種類の多糖類を用いてテトラフェニルエテン誘導体と複合化すれば, *P* 型および *M* 型のキラリティを持つ複合体を作り分けることができるのではないかと考えた。そこで, 今回用いた CGN および PL と主鎖構造は同じだが, 側鎖に枝分かれを持つ多糖を二種類 (第 3 章で用いた TG および AG) を用いて, 利き手の作り分けが

可能であるかどうかを検討した。

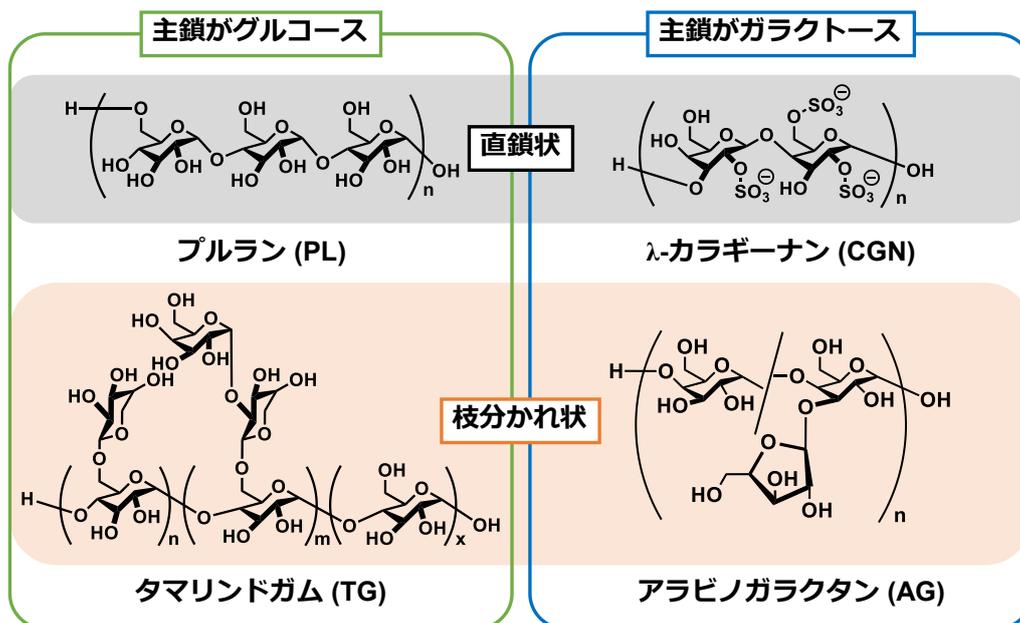


図 4-13. 今回用いた多糖類の構造式

4.2.2 と同様の方法によって得られた **10-TG** および **10-AG** を、それぞれ **10-PL** と同じモル吸光係数を用いて $250 \mu\text{M}$ に希釈し、円二色性分散計を用いて CD スペクトルを測定し、式 4-1 を用いてモル楕円率 $[\theta]$ ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) に換算した。結果を以下図 4-14 に示す。

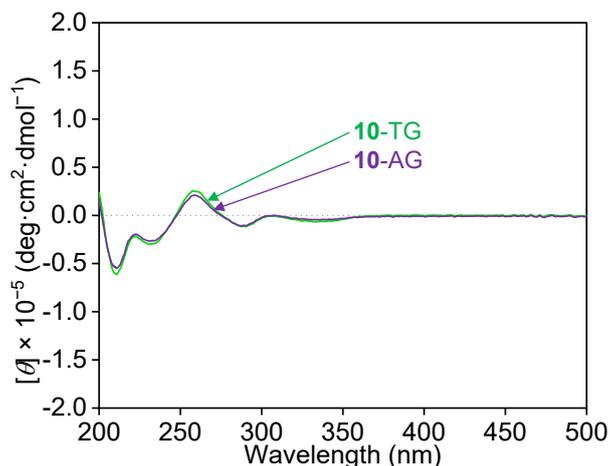


図 4-14. **10-TG** および **10-AG** の円偏光二色性スペクトル
(25°C , 1 mm 石英セル, バンド幅: 3 nm , 走査速度: $100 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$, 積算回数: 4 回)
緑線: **10-TG**, 紫線: **10-AG**

図 4-14 より、すべての多糖も *P* 型のキラリティを示しており、多糖の違いで利き手の作り分けをすることはできなかった。*P* 型に収束する多糖を偶然選択した可能性もあるが、この結果から仮説①の可能性は低いと判断した。

4.2.6.3.2 仮説②:結晶状態におけるキラル情報の維持

ラセミ体が結晶化する際に、両方のエナンチオマーが別々に結晶化し、理論上それぞれ 50% ずつ生成する^[15]。一方、不斉結晶化においては結晶成長が一方向に進行し、一方のエナンチオマーのみが 100 % 生成する^[12]。したがって、市販されている化合物 **10** の粉末においても、製造段階で行った再結晶時において発生する不斉の偏りを持ったまま販売されていると推察される。つまり、4.3.2 で観測された円偏光二色性は、市販の化合物 **10** のキラリティを維持しているのではないかと考えられる。そこで、化合物 **10** の *P* 型および *M* 型結晶を作成し、それぞれを高速振動粉碎法によって多糖と複合化した際に得られる CD スペクトルを比較することで、結晶状態におけるキラリティが維持されているかどうか検討した。

4.2.6.3.2.1 テトラフェニルエテンの不斉結晶化

化合物 **10** は数ある不斉結晶の中で、偶然結晶構造からキラリティを判別でき、*P* 型および *M* 型のキラル結晶を分取できる稀な化合物である^[16]。そこで、不斉結晶の作り分けを行った。

化合物 **10** 100 mg を量り取り、これをトルエン 3.5 mL に溶解させ、60 °C で 2 時間加熱した。同時に、ガラスチューブを 10 本程度用意し、これらはマッフル炉を用いて 50 °C に予備加熱した。加熱した溶液を、予備加熱したガラスチューブに取り分け室温まで徐冷した。室温程度まで冷ましたのち、冷蔵庫に入れ 3 日間程度静置した。3 日後、チューブの底に結晶が生成していることを確認し、ろ紙にその結晶を回収した。回収した結晶は 120 °C で 2 時間真空乾燥した。小さい結晶は、種結晶として数回成長させ、目視で結晶の形が確認できる程度まで成長させた。この結晶を、拡大鏡を用いて目視で *P* 型および *M* 型結晶に選別し、実体顕微鏡 (OLYMPUS 製, SZX7 型) を用いて写真撮影を行った。各結晶は以下図 4-15 を基に判別した。

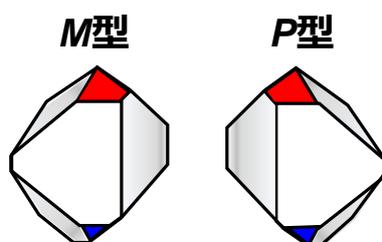


図 4-15. 化合物 **10** 不斉結晶の形状の違い^[16]

以下図 4-16 に実体顕微鏡を用いて観察した結晶観察像を示す。

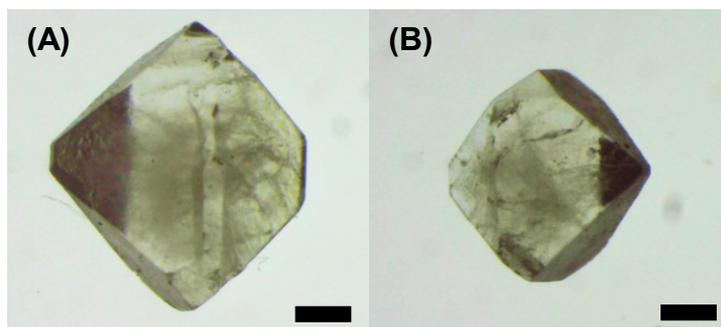


図 4-16. 化合物 10 不斉結晶の実体顕微鏡観察像 (Scale bar: 500 μm)
(A) *M* 型, (B) *P* 型

図 4-16 より, テトラフェニルエテンの *P* 型および *M* 型不斉結晶を作り分けることに成功した。

4.2.6.3.2.2 テトラフェニルエテン不斉結晶の水溶化

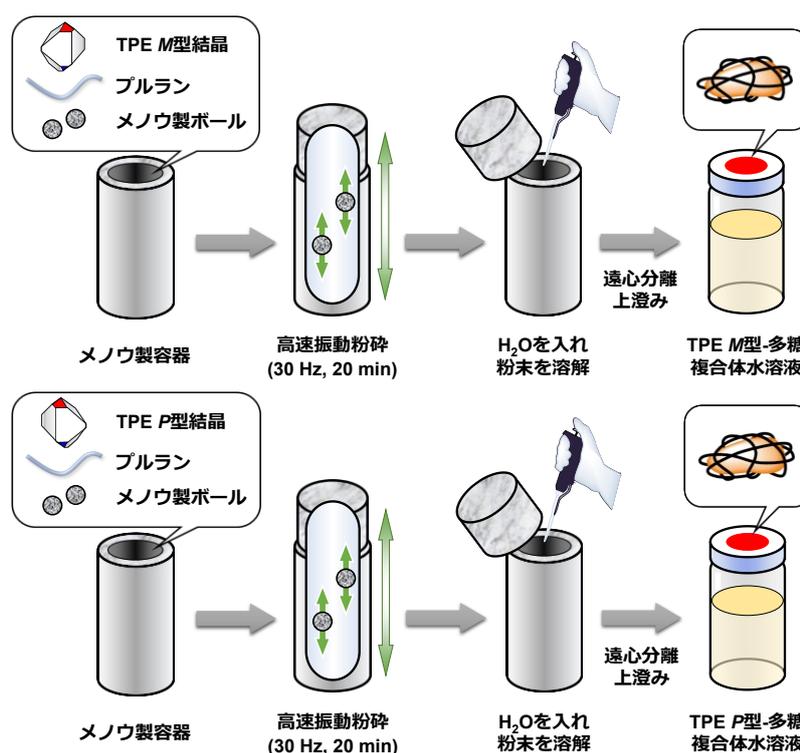


図 4-17. テトラフェニルエテン不斉結晶の水溶化の概略図

化合物 10 *P* 型および *M* 型結晶 5.0 μmol とプルラン 10.0 mg をメノウボール二個とともにメノウ容器に入れ, 高速振動粉砕法 (30 Hz, 20 min) により混合した。この混合物に超純水 2.0 mL を加えて抽出した。この抽出液を遠心分離 (4500 rpm [1860 \times g], 20 min)

により不溶性化合物 **10** を沈降させた。得られた上澄みを分取し、化合物 **10** *P* 型および *M* 型・多糖複合体水溶液を得た。これら複合体を 30 μL 分取し、超純水 270 μL 加えることで 10 倍に希釈し、この水溶液の UV-Vis 吸収スペクトルを測定した。さらにこれら複合体をそれぞれ 250 μM に希釈し、円二色性分散計を用いて CD スペクトルを測定、式 4-1 を用いてモル楕円率 $[\theta]$ ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) に換算した。なお、これら複合体を以下 **10(P)-PL**, **10(M)-PL** と略して標記する。結果を以下図 4-18 に示す。

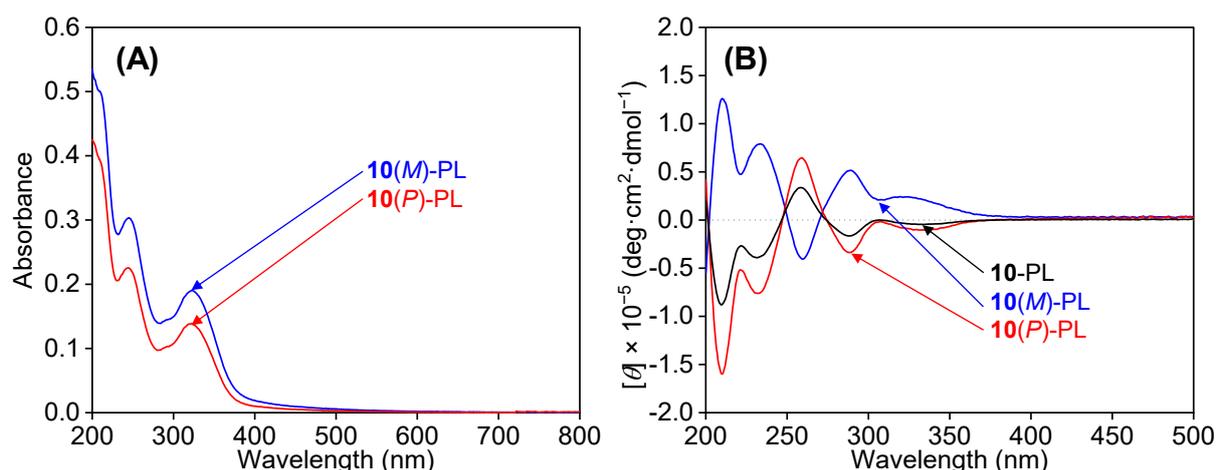


図4-18. **10(P)-PL**, **10(M)-PL**水溶液の分光学的性質

(A) UV-Vis 吸収スペクトル (25 $^{\circ}\text{C}$, 1 mm 石英セル, 抽出液を 10 倍に希釈)

(B) CD スペクトル ($[\mathbf{10}] = 250 \mu\text{M}$)

(25 $^{\circ}\text{C}$, 1 mm 石英セル, バンド幅: 3 nm, 走査速度: 100 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$, 積算回数: 4 回)

黒線: **10-PL**, 青線: **10(M)-PL**, 赤線: **10(P)-PL**

図 4-18 より、両者共に水溶化が可能であり、かつ CD スペクトルは鏡面对称なスペクトルとして観測された。さらに、既に報告されている固体 CD スペクトル測定における *P* 型および *M* 型結晶の結果と、それぞれほぼ一致していた^[14]。以上の結果から、結晶状態のキラル情報が維持されていることが確認され、仮説②がメカニズムとして最も適当であると結論付けた。

なお、4.2.6.2 で観測された負のコットン効果 (図 4-18 黒線) は、純粋な *P* 型結晶を水溶化した際に得られたスペクトル (図 4-18 赤線) の強度よりも弱くなっていることから、初めに述べたように市販の化合物 **10** が、製造段階に発生した不斉の偏りを既に持っているためであると考えられた。

4.2.6.4 キラル情報および複合体の安定性評価

最後に、このキラル情報および複合体の熱力学的安定性を検討した。4.2.6.3.2.2 で得られた **10(P)-PL** および **10(M)-PL** を 250 μM に希釈し、この水溶液を 80 $^{\circ}\text{C}$, 24 時間加熱した。この時水溶液は攪拌せず、静置した状態で行った。加熱前後の UV-Vis 吸収スペ

クトルを測定し、そのスペクトルを比較した。結果を以下図 4-19 に示す。

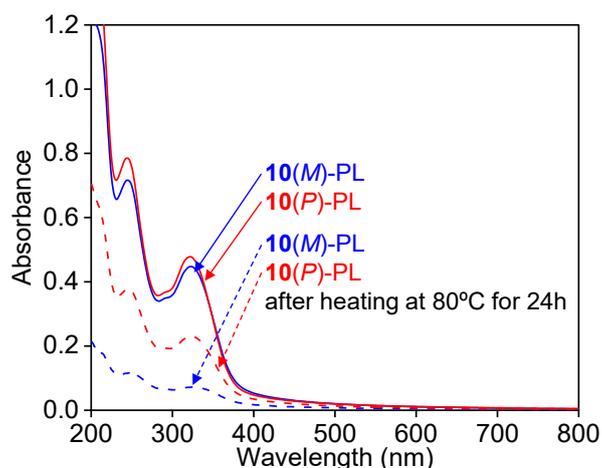


図4-19. 80 °C, 24 時間加熱後の **10(P)-PL**, **10(M)-PL** 水溶液の UV-Vis 吸収スペクトル (25 °C, 1 mm 石英セル, $[10] = 250 \mu\text{M}$)

青線: **10(M)-PL**, 赤線: **10(P)-PL**, 実線: 加熱前, 破線: 加熱後

図 4-19 より, それぞれの複合体で加熱後に吸収が減少していた。さらに, 目視でも沈殿が発生していることを確認した。なかでも, **10(M)-PL** は加熱後に吸光度が約 80 % 減少していることから, **10(M)-PL** の安定性は低いものと考えられる。

さらに, 同様の溶液を用いて CD スペクトルを測定し, 式 4-1 を用いてモル橢円率 $[\theta]$ ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) に換算した。なお, 加熱後のスペクトルを換算する際に用いた濃度は, 図 4-19 で得られた加熱後の吸光度を使って算出した濃度を用いた。結果を以下図 4-20 に示す。

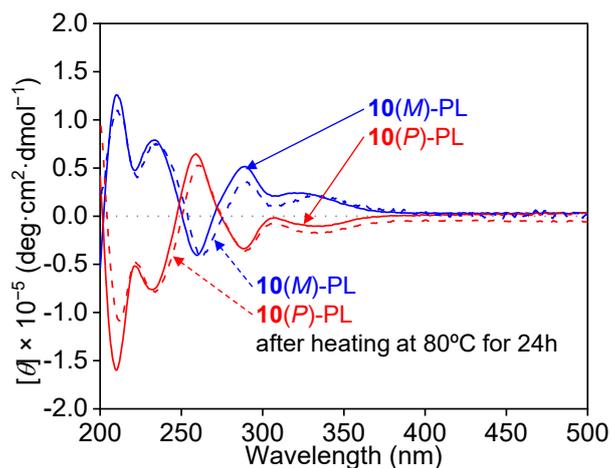


図4-20. 80 °C, 24 時間加熱後の **10(P)-PL**, **10(M)-PL** 水溶液の CD スペクトル (25 °C, 1 mm 石英セル, バンド幅: 3 nm, 走査速度: $100 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$, 積算回数: 04 回)

青線: **10(M)-PL**, 赤線: **10(P)-PL**, 実線: 加熱前, 破線: 加熱後

図 4-20 より、モル楕円率の強度は *P* 型および *M* 型共に加熱前後でほとんど変化がなかった。したがって、キラル情報の熱力学的安定性は高く、*P* 型および *M* 型の間に差が無いことが分かった。

このように、複合体自体の安定性に差があっても、キラル情報の安定性にほとんど差がないことから、高速振動粉碎時の化合物 **10** が持つキラル情報 (= 熱力学的安定性が高い結晶構造) をそのまま水溶液中でも反映しているということを示唆している。

4.3 結言

テトラフェニルエテン誘導体について、ヒドロキシ基の数が異なる化合物 **10–12** を選択し、第 2 章および第 3 章と同様に高速振動粉碎法によって水溶化が可能であるかを検討した。多糖類として CGN および PL を選択したところ、いずれの多糖を用いても水溶化が可能であることを示した。また、全てのテトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体で非常に強い蛍光を観測した。このことから、多糖による複合化によって凝集誘起発光が起こることで、複合体の蛍光が増強したと考えられる。また、テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体のモルフォロジーを観察したところ、ナノ粒子として存在しており、平均 100–200 nm 程度の粒径で分散していることから、ポルフィリン類縁体・多糖複合体と同様の形態で水中に分散していることを明らかにした。

また、HeLa 細胞に対してテトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体水溶液を投与し、蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、化合物 **10** では細胞内に取り込まれなかったのに対してヒドロキシ基を持つ化合物 **11** は細胞内に取り込まれた像を観察できた。これは第 2 章における **3-GL** でも同様の傾向がみられることから、細胞内への取り込み作用は細胞膜に存在するフェノールレセプターが関与していることが示唆された。この結果から、テトラフェニルエテン誘導体・多糖複合体は細胞イメージング材料としての活用が可能であることを示した。

さらに、化合物 **10** は不斉結晶と呼ばれる性質を持つことが知られており、複合体内で疎水性分子が凝集して存在しているという、これまでに分かっている事実を踏まえると、複合体は不斉を持つのではないかと推察された。そこで、CD スペクトルを測定すると化合物 **10** の吸収領域において負のコットン効果が観測された。したがって、複合体中で凝集している化合物 **10** は不斉を有していることを明らかにした。この不斉がどのように形成されたのかを、化合物 **10** の *P* 型および *M* 型結晶の二種類の不斉結晶として作り分け、それぞれを多糖と複合化することで検討した。その結果、それぞれの複合体は鏡面对称な CD スペクトルを示すことから、それぞれのキラリティが維持されたまま水溶化していることが確認された。

このように、水溶液中において結晶が持つ情報を維持したまま水溶化した例はこれまでになく、本研究が唯一の例である。

4.4 参考文献

- [1] Y. Hong, J. W. Y. Lam, and B. Z. Tang, “Aggregation-induced emission”, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 5361–5388. (DOI: 10.1039/C1CS15113D)
- [2] M. Sakamoto, “Spontaneous chiral crystallization of achiral materials and absolute asymmetric photochemical transformation using the chiral crystalline environment”, *J. Photochem. Photobiol. C.*, **2006**, *7*, 183–196.
(DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2006.11.002)
- [3] Y. Guo, D. Shi, Z. -W. Luo, J. -R. Xu, M. -L. Li, L. -H. Yang, Z. -Q. Yu, E. -Q. Chen, and H. -L. Xie, “High Efficiency Luminescent Liquid Crystalline Polymers Based on Aggregation-Induced Emission and “Jacketing” Effect: Design, Synthesis, Photophysical Property, and Phase Structure”, *Macromolecules*, **2017**, *50*, 9607–9616. (DOI: 10.1021/acs.macromol.7b01605)
- [4] K. Komatsu, K. Fujiwara, Y. Murata, and T. Braun, “Aqueous solubilization of crystalline fullerenes by supramolecular complexation with γ -cyclodextrin and sulfocalix[8]arene under mechanochemical high-speed vibration milling”, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1999**, 2963–2966. (DOI: 10.1039/a904736k)
- [5] 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.
(DOI: 10.1021/acsmchemlett.7b00098)
- [6] R. Bonnett, R. D. White, U. J. Winfield, and M. C. Berenbaum, “Hydroporphyrins of the *meso*-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers”, *Biochem. J.*, **1989**, *261*, 277–280. (DOI: 10.1042/bj2610277)
- [7] R. J. Pietras, and C. M. Szego, “Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells”, *Nature*, **1977**, *265*, 69–72. (DOI: 10.1038/265069a0)
- [8] M. Akiyama, A. Ikeda, T. Shintani, Y. Doi, J. Kikuchi, T. Ogawa, K. Yogo, T. Takeya, and N. Yamamoto, “Solubilisation of [60]fullerenes using block copolymers and evaluation of their photodynamic activities”, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 1015–1019. (DOI: 10.1039/B719671G)
- [9] C. R. Miller, B. Bondurant, S. D. McLean, K. A. McGovern, and D. F. O'Brien, “Liposome-Cell Interactions in Vitro: Effect of Liposome Surface Charge on the Binding and Endocytosis of Conventional and Sterically Stabilized Liposomes”, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 12875–12883. (DOI: 10.1021/bi980096y)
- [10] 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. (DOI: 10.1039/B701767G)
- [11] M. T. Miller, and K. Strömland, “Teratogen update: thalidomide: a review, with a focus on

- ocular findings and new potential uses”, *Teratology*, **1999**, *60*, 306–321. (DOI: 10.1002/(SICI)1096-9926(199911)60:5<306::AID-TERA11>3.0.CO;2-Y)
- [12] T. Matsuura, and H. Koshima, “Introduction to chiral crystallization of achiral organic compounds: Spontaneous generation of chirality”, *J. Photochem. Photobiol. C.*, **2005**, *6*, 7–24. (DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2005.02.002)
- [13] B. S. Green, M. Lahav, and D. Rabinovich, “Asymmetric synthesis via reactions in chiral crystals”, *Acc. Chem. Res.*, **1979**, *12*, 191–197. (DOI: 10.1021/ar50138a001)
- [14] D. Li, R. Hu, D. Guo, Q. Zang, J. Li, Y. Wang, Y. -S. Zheng, B. Z. Tang, and H. Zhang, “Diagnostic Absolute Configuration Determination of Tetraphenylethene Core-Based Chiral Aggregation-Induced Emission Compounds: Particular Fingerprint Bands in Comprehensive Chiroptical Spectroscopy”, *J. Phys. Chem. C*, **2017**, *121*, 20947–20954. (DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b06679)
- [15] E. D’Oria, P. G. Karamertzanis, and S. L. Price, “Spontaneous Resolution of Enantiomers by Crystallization: Insights from Computed Crystal Energy Landscapes”, *Cryst. Growth Des.*, **2010**, *10*, 1749–1756. (DOI: 10.1021/cg9014306)
- [16] T. Kawasaki, M. Nakaoda, N. Kaito, T. Sasagawa, and K. Soai, “Asymmetric Autocatalysis Induced by Chiral Crystals of Achiral Tetraphenylethylenes”, *Orig. Life Evol. Biosph.*, **2010**, *40*, 65–78. (DOI: 10.1007/s11084-009-9183-4)

第5章 結 言

本論文では、難水溶性物質を超分子化学的手法によって水溶化を試み、その複合体の持つ性質・機能性を評価することで新たな知見を得ることを目的とし、分光学的、モルフォロジー、および *in vitro* の観点から研究を行った。

第2章では、 β -グルカンを可溶化剤とし、各種ポルフィリン類縁体をモデル薬剤として、高速振動粉碎法を用いて水溶化を試みた。また、この複合体が持つ光線力学治療薬としての適用可能性を検討した。

ポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体は、その可溶化能、長期安定性、モルフォロジー、および一重項酸素発生能においてポルフィリン類縁体・シクロデキストリン錯体と比べて優れた性質を有していることが明らかとなり、この複合体は光線力学治療薬として適用可能であることを示した。また、*in vitro* での評価においても、生体透過性に優れた赤色光の照射によって細胞死を引き起こすことが分かり、既に上市されている光線力学治療薬と比較して約15倍の活性があることから、優位性の高い光線力学治療薬であることを示した。さらに、この複合体が持つ *in vitro* における活性のスイッチング現象は、細胞膜へポルフィリン類縁体・ β -グルカン複合体が相互作用によって吸着し、ポルフィリン類縁体が膜内へ移行することによって引き起こされていることを明らかにした。

第3章では、食品添加物に用いられている汎用的な多糖類を可溶化剤とし、ポルフィリン類縁体を高速振動粉碎法によって水溶化を試みた。また第2章と同様に、この複合体が持つ光線力学治療薬としての適用可能性を検討した。

食品添加物用多糖類として六種類を選択し、ポルフィリン類縁体として化合物 **2** を高速振動粉碎法によって水溶化を試みたところ、そのうち四種類の多糖で水溶化が可能であり、多糖間で水溶化能が異なることを明らかにした。この違いを、水溶化メカニズムとして「トレイン-ループ-テール」モデルを適用し、多糖のポルフィリン類縁体表面への吸着によるコロイド分散系として検討した。ポルフィリン類縁体と多糖類のゼータ電位の測定を比較すると、その相互作用の強弱による大まかな水溶化能の予測が可能であることを示したものの、高分子コロイド分散系に特徴的な性質による影響が大きく現れるために、正確な水溶化能の予測までは至らなかった。また、複合体の光線力学活性について検討したところ、第2章での結果と同様に、既に上市されている光線力学治療薬よりも優れた活性を持つことを明らかにした。このように第2章の結果を踏まえると、多糖を用いた高速振動粉碎法による水溶化法は、汎用性に優れた機能化法であることを示した。

第4章では、凝集誘起発光による蛍光増強を企図し、テトラフェニルエテン誘導体を水溶化することで、細胞イメージング材料としての活用を試みた。また、不斉結晶という性質を利用して、ゲスト分子の性質維持に関する検討を分光学的測定によって行った。

ヒドロキシ基の数が異なるテトラフェニルエテン誘導體 **10-12** を、多糖類として λ -カラギーナンとプルランを選択し、第2章および第3章と同様に高速振動粉碎法によって水溶化が可能であるかを検討したところ、いずれの多糖を用いても水溶化が可能であることを示

した。また、この複合体の水溶液は、多糖による複合化によって凝集誘起発光が引き起こされ、非常に強い蛍光を有していた。さらに、*in vitro* での評価においては、ヒドロキシ基を有するテトラフェニルエテン誘導体のみが細胞内へ取り込まれた蛍光像を観測できたことから、細胞イメージング材料としての活用が可能であることを示した。さらに、化合物 **10** は不斉結晶と呼ばれる性質を有していることから、多糖との複合化後におけるゲスト分子の性質に関する検討を行ったところ、複合体は不斉結晶の性質を維持したまま分散していることが明らかになった。このように、結晶が持つ不斉情報を維持したまま水溶化した例はこれまでに無く、本研究が唯一の例である。

最後に今後の展望について、本論文で得た知見を踏まえて考察する。高速振動粉碎法を用いることで、多糖類と複合化し水溶化した例はこれまでに C₆₀ および C₇₀ の二つの例に限られていた。本研究では、ゲスト分子をポルフィリン類縁体やテトラフェニルエテン誘導体といった、比較的平面性の高い分子に範囲を拡張しても水溶化が可能であることを示した。さらに、ホスト分子についても、 β -グルカンだけでなく汎用的な多糖類を用いても水溶化が可能であることを明らかにした。このことから、適切なホスト分子と組み合わせることによって、高速振動粉碎法を用いれば、どのようなゲスト分子に対しても水溶化が可能であることを示唆している。非特異的に水溶化が可能となる方法は、医薬品開発スピードの向上の観点から興味深い。第 1 章で述べた、医薬品開発においてドロップアウトする薬剤が多い問題に対して本研究を適用することによって、リード化合物の早期のドロップアウトを防止できることを意味する。今後は、ドロップアウトした難水溶性の医薬品リード化合物の製剤化再検討法としての展開を期待できる。

また、第 4 章では、多糖複合体として分散したゲスト分子は、性質(光学的性質や結晶における情報)を維持したまま水溶化していることを明らかにした。これを医薬品化合物に置き換えて考えると、薬効を保持した状態で水溶化が可能であることを示している。医薬品開発においては、結晶多形によって水溶性や薬効の違いが発生することが多い。そこで、この方法を用いることで、より薬効が優れた結晶多形をそのまま水溶化することで、より優れた薬剤の開発が可能となる。今後は、医薬品性能の向上を目的とした利用展開が期待される。近年では、SDGs (Sustainable Development Goals; 持続可能な開発目標) 達成のために環境配慮型の材料開発が求められているが、既存の油性材料から有機溶媒を使用しない新たな水性材料への転換方法としての利用も期待される。

さらに、結晶学という化学的・物理学的・光学的性質の研究分野と、超分子化学の分野との融合という新たな分野としての発展が期待される。これまで、固体超分子化学と呼ばれる超分子化学的性質を利用して結晶を作成し、その性質を研究する分野は存在するが、均一溶媒中において両方の分野を同時に扱う研究は、本研究が初めてである。本論文における研究手法は様々な結晶に適用可能であると考えられることから、結晶を水溶液として扱うための新たな分野として展開が期待される。

以上のように、本論文で得られた知見は、医薬品開発、あるいは工業的材料開発における種々の問題解決法として寄与することができ、結晶学を融合した新たな研究分野の創出により、超分子化学のさらなる発展に貢献することが期待される。

使用機器一覧

1. 水溶化実験関連装置

高速振動粉碎装置	Restsch 製, MM200 型
ボルテックスミキサー	Scientific Industries 製
小型微量遠心機	Beckmann 製, Microfuge 22R 型
リポソーム調製器	Avestin 製, LF-1 型
超純水製造装置	Millipore 製, Direct-Q 3UV 型
マッフル炉	デンケン製, KDF-S70 型

2. 分析機器

紫外-可視分光光度計	Shimadzu 製, UV3600 型
蛍光分光光度計	日立ハイテクサイエンス製, F-2700 型
動的光散乱測定装置	Malvern 製, Zetasizer NanoZS ZEN3600 型
ゼータ電位測定装置	
核磁気共鳴分光装置 400MHz	Varian 製, 400-MR 型
円二色性分散計	日本分光製, J-1500 型
透過型電子顕微鏡	日本電子製, JEM-1400 型
光照射電源装置	ウシオ電機製, BA-X500 型
光照射光源装置	ウシオ電機製, SX-UID500X 型
倒立型リサーチ顕微鏡・蛍光顕微鏡	Nikon 製, ECLIPSE Ti2 型
実体顕微鏡	OLYMPUS 製, SZX7 型
電圧印加装置	TEXIO 製, FG-274 型

3. 細胞実験装置

クリーンベンチ	三洋電機製, MCV-131BNF 型
オートクレーブ装置	ALP 製, KTR-3045A 型
CO ₂ インキュベーター	三洋電機製, MCO-175 型
マイクロプレートリーダー	AS ONE 製, MPR-A100 型
石英ファイバー付きキセノンランプ光源	朝日分光製, MAX-301 型

使用試薬一覧

1. 溶媒

メタノール	富士フィルム和光純薬(株) 試薬特級
エタノール	富士フィルム和光純薬(株) 試薬特級
ジメチルスルホキシド(DMSO)	富士フィルム和光純薬(株) 試薬特級
クロロホルム	富士フィルム和光純薬(株) 和光一級
ジクロロメタン	富士フィルム和光純薬(株) 試薬特級
ヘキサン	富士フィルム和光純薬(株) 試薬特級
無水テトラヒドロフラン(THF)	東京化成工業(株)
トルエン	富士フィルム和光純薬(株) 和光一級
重水 (D ₂ O) 99.8 %	富士フィルム和光純薬(株) NMR 用
ジメチルスルホキシド- <i>d</i> ₆ (DMSO- <i>d</i> ₆)	
99.8 atom % d, contains 0.05 % TMS (v/v)	Sigma-Aldrich

2. ホスト分子

β-グルカン(GL)	甲南大学 甲元先生より提供
λ-カラギーナン(CGN)	富士フィルム和光純薬(株) 生化学用
タマリンドガム(TG)	東京化成工業(株)
プルラン(PL)	東京化成工業(株)
アラビノガラクトサン(AG)	東京化成工業(株)
ヒアルロン酸ナトリウム(SH) 鶏冠由来	富士フィルム和光純薬(株) 生化学用
γ-シクロデキストリン	富士フィルム和光純薬(株) 和光特級
2,3,6-トリ-O-メチル-β-シクロデキストリン	富士フィルム和光純薬(株) 生化学用

3. ゲスト分子

テトラフェニルポルフィリン(TPP)	東京化成工業(株)
テトラ(4-アミノフェニル)ポルフィリン(TAPP)	東京化成工業(株)
テトラ(4-ヒドロキシフェニル)ポルフィリン (THPP)	東京化成工業(株)
テトラ(4-メトキシフェニル)ポルフィリン (TMOPP)	東京化成工業(株)
テトラ(4-カルボキシフェニル)ポルフィリン (TCPP)	東京化成工業(株)
テトラピリジルポルフィリン(TPyP)	東京化成工業(株)

ジフェニルジアザポルフィリン(PhDAP)	山梨大学 新森先生より提供
ビス(4-ヒドロキシフェニル)ジアザポルフィリン(4-OHDAP)	山梨大学 新森先生より提供
ビス(3,5-ジメトキシフェニル)ジアザポルフィリン(3,5-OMeDAP)	山梨大学 新森先生より提供
テトラフェニルエテン(TPE)	東京化成工業(株)
1-(4-ヒドロキシフェニル)1,2,2-トリフェニルエテン(TPE-OH1)	自身で合成
テトラキス(4-ヒドロキシフェニル)エテン(TPE-OH4)	東京化成工業(株)
[60]フラーレン(C ₆₀)	Frontier Carbon Corpration ナノムクス ST から抽出

4. 細胞実験関連試薬

最小必須培地(MEM, 1×)	Gibco™
フェノールレッドおよび L-グルタミン含有抗生物質-抗真菌剤混合溶液(安定化, 100×)	ナカライテスク(株)
ウシ胎児由来血清(FBS)	Hyclone™
リン酸緩衝生理食塩水(10×PBS, pH 7.4)	Gibco™
0.5% トリプシン-EDTA 混合溶液	Gibco™
CELL BANKER® 1	タカラバイオ(株)
0.4 w/v% トリパンブルー溶液	富士フィルム和光純薬(株) 細胞染色用
Cell Counting Kit-8	(株)同仁化学研究所
フェノールレッド不含 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(D-MEM)	富士フィルム和光純薬(株) 細胞培養用
Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA)バッファー	ナカライテスク(株)

5. 合成試薬

ベンゾフェノン	富士フィルム和光純薬(株) 和光特級
4-ヒドロキシベンゾフェノン	東京化成工業(株)
亜鉛粉末	富士フィルム和光純薬(株) 和光一級
塩化チタン(IV)	富士フィルム和光純薬(株) 和光特級

6. その他試薬

水酸化ナトリウム	富士フィルム和光純薬(株) 試薬特級
クエン酸	富士フィルム和光純薬(株) 食品添加物
炭酸カリウム	富士フィルム和光純薬(株) 試薬特級
硫酸ナトリウム	富士フィルム和光純薬(株) 和光一級
リンタングステン酸ナトリウム	富士フィルム和光純薬(株) 和光一級
9,10-アントラセンジイルビス(メチレン)ジマロ ン酸(ABDA)	Sigma-Aldrich
デオキシリボ核酸(DNA) サケ精液由来	富士フィルム和光純薬(株)
塩化アンモニウム	富士フィルム和光純薬(株) 和光一級
1,2-ジミリストイル- <i>sn</i> -グリセロ-3-ホスファチジ ルコリン(DMPC)	(株)日油 [コートソーム MC-4040]
1-パルミトイル-2-オレオイル- <i>sn</i> -グリセロ-3- ホスファチジルコリン(POPC)	(株)日油 [コートソーム MC-6081]
1,1'-ジオクタデシル-3,3',3'-テトラメチルイ ンドカルボシアニン(Dil)	Invitrogen™
セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB)	富士フィルム和光純薬(株)
シリカゲル 60N(球状, 中性)	関東化学(株) カラムクロマトグラフィー用

研究成果一覧

【本博士論文を構成する原著論文】

- [1] **Shodai Hino**, Rikushi Funada, Kouta Sugikawa, Kazuya Koumoto, Toshio Suzuki, Takeshi Nagasaki and Atsushi Ikeda, "Turn-on fluorescence and photodynamic activity of β -(1,3-1,6)-D-glucan-complexed porphyrin derivative inside HeLa cells", *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2019**, *18* (12), 2854–2858. (DOI:10.1039/C9PP00208A)
- [2] **Shodai Hino**, Shuhei Satake, Hideyuki Shinmori, Shigeki Kawabata, Kazuya Koumoto, Toshio Suzuki, Takeshi Nagasaki, Kouta Sugikawa, Riku Kawasaki and Atsushi Ikeda, "Improved Stability and Photodynamic Activity of Water-Soluble 5,15-Diazaporphyrins Incorporated in β -(1,3-1,6)-D-Glucan with On–Off Switch", *Chem. -Asian J.*, **2020**, *15* (3), 365–370. (DOI:10.1002/asia.201901582) (**FRONT COVER**)
- [3] **Shodai Hino**, Kouta Sugikawa, Riku Kawasaki, Hisakage Funabashi, Akio Kuroda and Atsushi Ikeda, "Aggregation-Induced Emission and Retention of Crystal Chiral Information of Tetraphenylethylene Incorporated by Polysaccharides in Water", *ChemPhotoChem*, **2020**, *4* (8), 577–581. (DOI:10.1002/cptc.202000022)
- [4] **Shodai Hino**, Rikushi Funada, Kouta Sugikawa, Riku Kawasaki, Kazuya Koumoto, Toshio Suzuki, Takeshi Nagasaki, and Atsushi Ikeda, "Mechanism Toward Turn-on of Polysaccharide–Porphyrin Complexes for Fluorescence Probes and Photosensitizers in Photodynamic Therapy in Living Cells", *ChemMedChem*, *in press*. (DOI:10.1002/cmdc.202000656) (**FRONT COVER**)

【その他原著論文】

- [1] Toshimi Nakaya, Banri Horiguchi, **Shodai Hino**, Kouta Sugikawa, Hisakage Funabashi, Akio Kuroda and Atsushi Ikeda, "Stabilisation of Lipid Membrane-Incorporated Porphyrin Derivative Aqueous Solutions and Their Photodynamic Activities", *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2019**, *18* (2), 459–466. (DOI:10.1039/C8PP00350E)
- [2] Atsushi Narumi, Tatsufumi Nakazawa, Kosuke Shinohara, Hiroki Kato, Yoshinori Iwaki, Haruya Okimoto, Moriya Kikuchi, Seigou Kawaguchi, **Shodai Hino**, Atsushi Ikeda, Montaser Shaykoon Ahmed Shaykoon, Xiande Shen, Qian Duan, Toyoji Kakuchi, Kazuma Yasuhara, Akihiro Nomoto, Yuji Mikata and Shigenobu Yano, "C₆₀ Fullerene with Tetraethylene Glycols as a Well-Defined Soluble Building Block and Saccharide-Conjugation Producing PDT Photosensitizer", *Chem. Lett.*, **2019**, *48* (10), 1209–1212. (DOI:10.1246/cl.190492)
- [3] Yuya Goto, **Shodai Hino**, Kouta Sugikawa, Riku Kawasaki and Atsushi Ikeda, "Water Solubilization of Phthalocyanine Derivatives via Interactions of Long Alkyl Chains and Cyclodextrins: Potential Complexes for Photodynamic Therapy", *Asian J. Org. Chem.*, **2020**, *9* (10), 1589–1596. (DOI:10.1002/ajoc.202000076)

- [4] Takehiro Yumoto, Shuhei Satake, **Shodai Hino**, Kouta Sugikawa, Riku Kawasaki and Atsushi Ikeda, "Improved water solubility and photodynamic activity of hydroxy-modified porphyrins by complexation with cyclodextrin", *Org. Biomol. Chem.*, **2020**, *18* (34), 6702–6709. (DOI: 10.1039/D0OB01379J)

【学会発表】

- [1] **日野 彰大**・杉川 幸太・河崎 陸・甲元 一也・鈴木 利雄・長崎 健・池田 篤志, 「Turn-on 型光線力学治療薬および診断薬の機能を有するポルフィリン誘導体-多糖複合体の調製」, 日本化学会第 100 春季年会(口頭), 1D5-13, 千葉, 2020 年 3 月
- [2] **日野 彰大**・杉川 幸太・河崎 陸・舟橋 久景・黒田 章夫・池田 篤志, 「多糖によって水溶化した不斉結晶の水溶液中におけるキラル情報の維持」, 第 10 回 CSJ 化学フェスタ 2020(ポスター), P2-108, オンライン, 2020 年 10 月
- [3] **日野 彰大**・杉川 幸太・河崎 陸・甲元 一也・鈴木 利雄・長崎 健・池田 篤志, 「食品添加物用多糖によって水溶化されたポルフィリン類縁体を用いた Turn-on 型光線力学治療薬の開発」, 日本化学会第 101 春季年会(口頭), オンライン, 2021 年 3 月

【解説記事】

- [1] **日野 彰大**・池田 篤志, 「均一溶液中でもキラル情報は維持できる!?—トップダウン手法で水溶性の円偏光発光材料を目指す」, 月刊化学, **2020**, Vol.75, No.9, 53–56.

【セミナー講演】

- [1] **日野 彰大**, 「水溶性多糖によって水溶化された疎水性分子を用いた機能性材料の開発」, 2020 年度 第 2 回応用化学セミナー(学内限定), 広島大学大学院 先進理工系科学研究科, 2020 年 9 月 30 日

【その他研究成果】

- [1] 池田 篤志・**日野 彰大**, 「【研究成果】不斉結晶中のキラル情報を保存したまま水溶化する方法を開発」, 広島大学プレスリリース, 2020 年 4 月 1 日
- [2] **日野 彰大**, 「キラル情報を保存したまま水に溶ける不斉結晶」, Chem-Station スポットライトリサーチ, 2020 年 6 月 11 日

謝 辞

本研究を行うにあたり、懇切なる御指導ならびに御助言を賜りました広島大学大学院 先進理工系科学研究科 池田篤志教授に心より感謝いたします。

また、本論文を審査していただきました広島大学大学院 先進理工系科学研究科 大下浄治教授，同 大山陽介教授に深く感謝いたします。

そして、本研究を行うにあたり、的確な御助言と御助力を賜りました広島大学大学院 先進理工系科学研究科 杉川幸太助教，同 河崎 陸助教に心より感謝いたします。

さらに、本研究を行うために数々の試料の御提供を賜りました甲南大学 フロンティアサイエンス学部 甲元一也教授，ならびに山梨大学 生命環境学部 新森英之准教授に深く感謝いたします。

共通機器利用に関しまして、多くの御助言と御助力を賜りました広島大学 デジタルものづくり教育研究センター 中谷都志美特任助教に深く感謝いたします。

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 先進理工系科学研究科 有機超分子化学研究室の後輩諸君，多くの激励を頂いた友人の皆様に心より感謝いたします。

最後に、学生生活全般にわたり支援していただき、研究に対する理解，応援をしていただいた父，母に心より深く感謝いたします。

2021年3月

日野 彰大