超臨界水熱法による Gd 中性子捕捉療法用 新規無機ナノ粒子の調製

Preparation of Inorganic Gd (OH)₃ Nanoparticles for Gd Neutron Capture Therapy by Using Supercritical Hydrothermal Synthesis

佐々木 隆史,^a 大原 智,^a 梅津 光央,^a 名嘉 節,^a 阿尻 雅文,^a

Takafumi Sasaki, Satoshi Ohara, Mitsuo Umetsu, Takashi Naka, Tadafumi Adschiri,

鍋田 千賀,^b 市川 秀喜,^b 福森 義信^b

Chika Nabeta, Hideki Ichikawa, Yoshinobu Fukumori

Received 10 February 2006 ; Accepted 6 April 2006

Fine Gadolinium hydroxide (Gd (OH)₃) nanoparticles with a high crystallinity for neutron capture therapy were prepared via supercritical hydrothermal synthesis. An amorphous Gd (OH)₃ suspension was pressurized to 30MPa at room temperature and rapidly heated to the reaction temperature by mixing it with supercritical water. When the reaction temperature was raised from 300 to 500 °C, the particle size of Gd (OH)₃ nanoparticles with a narrow particle size distribution was decreased. In addition, the particles synthesized in the medium containing succinic acid were reduced by the capping effect, and the particle size was as small as 30nm. The tissue distribution of these Gd (OH)₃ nanoparticles was investigated by using tumor-bearing hamsters.

Keywords : Gadolinium hydroxide, Nanoparticle, Neutron capture therapy, Supercritical hydrothermal synthesis

1. 緒 言

日本の疾病構成における悪性腫瘍（がん）の比重は、年々増大してきており、高齢化社会への移行につれて患者数の急速な増加が見込まれる。このような事象を背景とし、がん治療における治療効率の増大および副作用の低減を目指して薬剤の体内動態を制御する試み、いわゆるドラッグデリバリーシステム（DDS）に関する研究が盛んに行われている。近年では特に、熱やγ線を用いた物理的な手法によるがん治療が注目を集めている。このようなものの一例として、中性子線を捕捉しγ線を放射するガドリニウム（Gd）を利用

した中性子捕捉療法^{1~3)}や磁場による磁性の発熱を利用した温熱療法^{4~6)}がある。

これら DDS の中核をなす研究課題に、薬剤を狙い通りの箇所へ送り込む標的化がある。一般的に、がん細胞を取り囲む血管の管壁に存在する細孔は 100nm 程度であり、これは通常細胞の 10nm と比べて約 10 倍大きいことが知られている。従って、サイズが数十 nm で、極めて狭い粒径分布を有する DDS 用ナノ粒子の開発は、がん細胞へのターゲティングを実現する最重要課題の一つである。

これまでの Gd 中性子捕捉療法では、それ単独では重金属毒性を示すため、Gd のキレート化合物のみを扱ってきており、この Gd キレート化合物を固定化した有機ナノ粒子を対象にして研究が行われている。Gd の腫瘍蓄積量を増加させ、治療効率を増大させるためには、粒子 1 個あたりに含まれる Gd 濃度をさらに上げる必要がある。しかし、有機物を用いた場合には分子量の大きなキレート剤などが必要になるため、化合物自体の中での Gd 含有率は低くなり、粒子中

a 東北大学多元物質科学研究所
(〒980-8577 仙台市青葉区片平 2-1-1) TEL 022-217-5629
Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials
(2-1-1, Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan)

b 神戸学院大学薬学部
(〒651-2180 神戸市西区伊川谷町有瀬 518) TEL 078-974-4542
Faculty of Pharmaceutical Science, Kobe Gakuin University
(518, Arise, Ikawadani-cho, Nishi-ku Kobe 651-2180, Japan)

Gd 含有率を上げるのには限界がある。このような観点から、無機 $\text{Gd}(\text{OH})_3$ ナノ粒子は上記の問題を解決することが出来ると考えた。固相合成ではその粒径を 10–100nm にすることが出来ず、また、低温下の液相法ではアモルファス $\text{Gd}(\text{OH})_3$ は合成できても安定な $\text{Gd}(\text{OH})_3$ ナノ粒子は合成できない。

我々はこれまで、超臨界水を反応場とした無機ナノ粒子の合成について幅広く研究を行ってきた^{7, 8)}。超臨界状態では、温度や圧力を調節することで誘電率やイオン積といった諸特性を制御できる。このような諸特性の変化を利用することで、高結晶性ナノ粒子の合成やそのサイズ制御を行ってきた。また最近では、有機分子と無機ナノ粒子のハイブリッド化⁹⁾も検討しており、ナノ粒子の分散挙動の制御に関しても研究している。

そこで本研究では、現行の Gd 系有機ナノ粒子に変わる Gd 無機化合物ナノ粒子の調製を超臨界水熱合成により試み、また、合成したナノ粒子の体内動態評価を行った。

2. 実験方法

2.1 実験装置

本研究では、流通式超臨界水熱合成装置を用いて粒子を作製した。Fig. 1 に、流通式装置の模式図を示す。本装置のライン作製には、SUS316 を用いた。本装置では、高压送液ポンプにより供給された出発原料（金属塩溶液または水酸化物スラリー）を、別のラインから高温電気炉で加熱して得られた超臨界水と接触できる。そのため、反応溶液は急速に超臨界状態にまで昇温され、超臨界水中で水熱合成が生じる。 $\text{Gd}(\text{OH})_3$ アモルファスは水溶液中で一部溶解し

て、高温では脱水反応が支配的になり高結晶性の $\text{Gd}(\text{OH})_3$ が合成される。また、外部冷却で急冷されるため、冷却過程の影響が無い。合成した粒子は、装置に取り付けたインラインフィルターで回収される。フィルターを通過したものは、粒子分散液として回収し減圧濾過により粒子を捕集できる。

2.2 粒子合成

出発原料である 0.01mol/l 水酸化ガドリニウム ($\text{Gd}(\text{OH})_3$) 懸濁液の調製には、硝酸ガドリニウム ($\text{Gd}(\text{NO}_3)_3$ 、高純度化学 (株)) と水酸化カリウム (KOH、和光純薬 (株)) を用いた。室温下で $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3$ 水溶液と KOH 水溶液を混合し、生成させた $\text{Gd}(\text{OH})_3$ に対して遠心分離と精製水による洗浄を繰り返した。洗浄後、精製水に $\text{Gd}(\text{OH})_3$ を懸濁させ、出発原料とした。

反応時の圧力を 30MPa に固定し、合成温度を 300 ~ 500 °C まで変えて水熱合成を行った。また、反応溶液中に KOH で中和したコハク酸 ($\text{HOOC}_2\text{H}_4\text{COOH}$ 、和光純薬) 0.1mol/l を添加して合成を行った。

合成した粒子に対し、透過型電子顕微鏡 (TEM)、X線回折 (XRD) を用いて解析した。合成した粒子と原料 $\text{Gd}(\text{OH})_3$ の溶解度を測定した。粒子を懸濁させたリン酸緩衝液を、36 °C で 24 時間振とうさせた。その後上澄みを取り出し、誘導結合プラズマ (ICP) 発光分光分析により溶解した Gd 濃度を測定した。

2.3 動物実験

ナノ粒子 (ガドリニウム 1.5mg 相当) を精製水 1ml に分散させ、この製剤をメラノーマ細胞 (D₁179) 移植担がん Syrian hamster (メス、体重約 100g) へ投与量 1ml/hamster にて単回静脈内投与した²⁾。投与 12 時間後に血液、腫瘍、肝臓、脾臓、腎臓、肺、皮膚、筋肉を摘出し、ICP 発光分光分析で Gd 濃度を測定した。

3. 結果と考察

反応温度 300, 400, 500 °C で合成した全てのサンプルは、XRD 測定より結晶性の高い $\text{Gd}(\text{OH})_3$ であることを確認した。Fig. 2 に、合成した $\text{Gd}(\text{OH})_3$ ナノ粒子の TEM 像を示す。どの温度で合成した場合も、棒状の粒子が生成していた。温度上昇につれて、アスペクト比が小さくなり、粒子サイズが減少していく傾向を示した。合成した粒子の粒度分布を求め、そこから長軸と短軸の平均粒径とアスペクト比を算出したところ、300 °C では 192nm × 50nm (アスペクト比 3.8)、400 °C では 164nm × 51nm (3.2)、500 °C で

Fig. 1 Schematic diagram of flow type apparatus

Fig. 2 TEM images of synthesized $\text{Gd}(\text{OH})_3$ nanoparticles with different reaction temperature ; a : 300, b : 400, c : 500 °C

は $94\text{nm} \times 43\text{nm}$ (2.2) であった。常温常圧の水の誘電率は、80 程度であるが、高温高压状態では誘電率が極度に小さくなる。圧力一定の場合、温度の上昇につれて誘電率は減少する。これにより、 $\text{Gd}(\text{OH})_3$ の溶解度も小さくなる。300 °C では、オストワルド熟成により大きな結晶が形成されるが、500 °C の反応溶液中では、溶解度が低くなるためにオストワルド熟成が抑圧され、粒径が減少する。また、溶解再析出過程を経ずに一挙に結晶化するために、棒状への成長が抑えられ、アスペクト比が小さくなったと考えられる。

原料 $\text{Gd}(\text{OH})_3$ と 400 °C で合成した粒子の XRD パターンを、**Fig. 3** に示す。原料の回折ピーク幅は非常に大きく、またピークの S/N 比も小さいことから、

Fig. 3 XRD profiles of $\text{Gd}(\text{OH})_3$
a : synthesized at 400 °C, b : raw material,
c : JCPDS reference

Fig. 4 TEM image of synthesized $\text{Gd}(\text{OH})_3$ nanoparticles at 300 °C, 30MPa with succinic acid

アモルファスであることが示唆された。水熱処理後の粒子は、回折ピークがシャープであることから、結晶性の高いものであることが分かる。この原料と水熱処理した粒子のリン酸緩衝溶液中における溶解度を測定した。その結果、水熱処理した粒子の溶解度 (Gd 濃度) は、 $\text{pH}5.41 \sim 7.34$ の範囲で約 1.1ppm であった。原料 $\text{Gd}(\text{OH})_3$ の溶解度は、 $\text{pH}7.5$ で 1.5ppm であり、水熱処理したものは約 30 % 溶解度が低くなっていることが分かった。XRD の結果からも、水熱処理後の粒子は結晶性が高い。このことが、溶解度の減少に影響を与えていると考えている。以上、超臨界水熱合成により、安定な $\text{Gd}(\text{OH})_3$ ナノ粒子が合成可能であることが明らかとなった。しかし、腫瘍蓄積性の観点から、さらなるダウンサイズ化が必要になるため、続いて有機分子の粒子キャッピングを利用した粒子合成を試みた。

反応溶液にコハク酸カリウムを添加して合成した粒子の TEM 像を **Fig. 4** に示す。なお XRD 測定の結果より結晶構造や結晶性に違いが無いことを確認した。若干ばらつきはあるものの、長軸 30~50nm、短軸 15~30nm の $\text{Gd}(\text{OH})_3$ ナノ粒子が生成していた。コハク酸を添加せずに、同じ温度で合成した粒子 (**Fig. 2-a**) と比べると、粒子サイズがかなり減少していることが分かる。コハク酸を添加した反応溶液の pH は、無添加系のものと同様であり、 $\text{Gd}(\text{OH})_3$ の溶解度に変化はないと考える。従って、コハク酸のカルボキシル基が粒子表面にキャッピングし、成長を抑制した結果であると考えている。このように、表面キャッ

Table 1 Tissue distribution of Gd (ppm) 12h after intravenous administration of Gd-01 and Gd-02 (n = 3)

	Blood	Tumor	Liver	Spleen	Kidney	Lung	Skin	Muscle
Gd-01	0.0	0.3	162.8	184.4	0.6	60.1	0.0	0.1
Gd-02	3.3	7.3	177.7	321.9	2.4	155.0	2.8	3.0

Fig. 5 Size distribution of Gd(OH)₃ nanoparticles
a : Gd-01, b : Gd-02

ピング剤を用いることで、Gd(OH)₃ ナノ粒子を 50 nm 以下にサイズ制御することが可能になった。

次に、合成した粒子に対する体内動態評価を行った。有機分子を添加せずに、500℃で合成した粒子 (Gd-01) と、コハク酸を添加して合成した粒子 (Gd-02) に対し、担がんハムスターを用いた体内動態評価を行った。粒子懸濁液投与後もハムスターは生存しており、生体適合性を確認することが出来た。今回作製した粒子は、サイズ制御された粒度分布の比較的狭いものであること、さらに、高結晶性で安定なものである。これらのことが、Gd 系無機ナノ粒子としては初めて、体内動態評価を可能にしたといえる。

体内動態評価を Table 1 に示す。表中の結果は、血液 1ml あるいは組織 1g 当たりの Gd 量 (μg) を表している。500℃で合成した Gd-01 は、肝臓や脾臓、肺に多く集積しており、腫瘍への移行はほとんど見られない。コハク酸を添加してサイズ制御した粒子 Gd-02 は、Gd-01 と同様に肝臓、脾臓、肺に集積しやすい傾向を示した。しかしながら、この粒子に関しては腫瘍への明確な移行を確認することができ、その集積量は Gd-01 と比べ約 24 倍に増大した。投与する懸濁液中に分散している粒子の平均サイズを、動的光散乱により評価すると、Gd-01 は 178.6nm、Gd-02 は 116.4nm であった (Fig. 5)。どちらも、TEM

観察による粒径より大きく、1次粒子としてではなく凝集体として存在していることが分かった。Gd-01 のように、100nm を超えて分散している粒子は、肝臓や脾臓といった細網内皮系組織に取り込まれ、結果として腫瘍へ移行することが難しくなる。Gd-02 は、投与液中に約 100nm で分散しているため、腫瘍への移行が飛躍的に増大した。このことから、投与懸濁液中における粒子の分散状態が体内動態に大きな影響を与えることが明らかとなった。今回の腫瘍蓄積量は、現行の Gd 含有有機ナノ粒子の 1/4 程度である²⁾。今後、さらなるダウンサイズ化や分散性の向上、さらには粒子への生体適合性のある有機分子の固定化等を検討する必要がある。

4. まとめ

超臨界水熱合成により、DDS 用 Gd(OH)₃ 無機ナノ粒子の合成とその体内動態評価を行った。反応溶液中にコハク酸を添加することで、粒子サイズを 30～50nm 程度に制御することが可能となった。合成した粒子の体内動態評価を行ったところ、粒径の減少に伴い、腫瘍への蓄積量が増大した。投与懸濁液中での粒子の分散状態が腫瘍への移行に大きな影響を与えていることが分かった。

References

- 1) Tokumitsu, H., J. Hiratsuka, Y. Sakurai, T. Kobayashi, H. Ichikawa and Y. Fukumori : "Gadolinium neutron-capture therapy using novel gadopentetic acid-chitosan complex nanoparticles : in vivo growth suppression of experimental melanoma solid tumor", *Cancer Letts.*, **150**, 177-182 (2000)
- 2) Watanabe, T., H. Ichikawa and Y. Fukumori : "Tumor accumulation of gadolinium in lipid-nanoparticles intravenously injected for neutron-capture therapy of cancer", *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **54**, 119-124 (2002)
- 3) Shikata, F., H. Tokumitsu, H. Ichikawa and Y. Fukumori : "In vitro cellular accumulation of gadolinium incorporated into chitosan nanoparticles designed for neutron-capture therapy of cancer", *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **53**, 57-63 (2002)
- 4) Mornet, S., S. Vasseur, F. Grasset and E. Duguet : "Magnetic nanoparticles design for medical diagnosis and therapy", *J. Mater. Chem.*, **14**, 2161-2175 (2004)
- 5) Ito, A., H. Honda and T. Kobayashi : "Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles : a novel concept of "heat-controlled necrosis" with heat shock protein expression", *Cancer Immunol. Immunother.*, **55**, 320-328 (2006)
- 6) Bioa, L.E., M. Shinkai, T. Kitade, H. Honda, J. Yoshida, T. Wakabayashi and T. Kobayashi : "Preparation of tumor-specific magnetoliposomes and their application for hyperthermia", *J. Chem. Eng. Japan*, **34**, [1], 66-72 (2001)
- 7) Adschiri, T., Y. Hakuta, K. Sue and K. Arai : "Hydrothermal synthesis of metal oxide nanoparticles at supercritical condition", *J. Nanoparticle Res.*, **3**, 227-235 (2001)
- 8) Adschiri, T., Y. Hakuta and K. Arai : "Hydrothermal synthesis of metal oxide fine particles at supercritical conditions", *Ind. Eng. Chem. Res.*, **39**, 4901-4907 (2000)
- 9) Tahereh, M., S. Takami, M. Umetsu, S. Ohara and T. Adschiri : "Supercritical hydrothermal synthesis of organic-inorganic hybrid nanoparticles", *J. Mater. Sci.*, (in press)