

## 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

黏膜傳輸 5-氨基酮戊酸( ALA )作為口腔癌前病變及口腔癌之螢光診斷法：  
<III>劑型研發  
Fluorescence Diagnosis of Precancerous Lesions and Oral Cancers by Mucosal  
Delivery of 5-ALA : Dosage Form Design <III>

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC - 91 - 2736 - L - 038 - 004

執行期間： 91 年 1 月 1 日至 91 年 12 月 31 日

計畫主持人：蔡翠敏 臺北醫學大學生物醫學材料研究所  
共同主持人：陳進庭 國立台灣大學醫學院光電生物醫學研究中心  
計畫參與人員：詹淑華、陳惠群

執行單位：臺北醫學大學生物醫學材料研究所

中華民國 92 年 3 月 25 日

## 一、中文摘要

本計畫中，我們利用體外細胞培養方式，探討時間、濃度、以及外來添加物對於細胞將 ALA 代謝生成 PpIX 的影響，並於考量劑型所應具有之物理特性之後，發展以黏膜吸附性材質的溫控式親水性凝膠，作為 ALA 口腔塗抹劑型的組成。此藥物輸送系統亦已由初步的動物實驗驗證其效益：以化學致癌物刺激八週之倉鼠頰囊袋內膜，在投予含有 ALA 之親水性凝膠後，所產生之 PpIX 的螢光強度明顯高於未以化學致癌物刺激過之對照側；並且在頰囊袋內膜以親水性凝膠塗抹等劑量之 ALA 所產生之 PpIX 的螢光強度也相當或高於以腹腔注射之結果。我們也測試含藥比例與基劑對於螢光偵測效果的影響。實驗結果顯示，適度的組成比例調整可獲致更好的實驗結果。然而此輸送系統並未能克服 ALA 在液體狀態中不穩定的事實，所有製備在 2 週內均有不安定的問題存在。為因應臨床試驗可能需監測血中濃度的需求，我們業已建立 ALA 血中濃度的高效液相層析分析方法。

**關鍵詞：**5-氨基酮戊酸；藥物輸送系統；高效液相層析法

## ABSTRACT

In this project, an *in-vitro* cell culture system was developed to study the effect of time, concentration, and the pharmaceutical excipients on the transformation of ALA into PpIX. Based on the studies and the physical properties of the excipients, we have developed a hydrophilic temperature-controlled mucoadhesive sol-gel system for ALA, which is used to be applied to the oral cavity. Animal studies have confirmed the fluorescent-effectiveness of this delivery system. When ALA sol-gel system was applied onto the side of the buccal pouch pretreated with carcinogen for 8 weeks, the PpIX fluorescence intensity was relatively stronger than the control site. The ALA sol-gel system also showed similar or stronger PpIX fluorescence at the detection site compared to the results by ALA i.p. injection. The effects of ALA concentration and the composition of the sol-gel system were evaluated. Animal studies also shown that proper adjustment on the concentration of ALA and the compositions gives better result. However, this sol-gel delivery system cannot help to stabilize ALA in aqueous conditions. In two weeks, all of the preparations were showing more or less instability. In order to meet the potential needs from further clinical studies, we have already developed a HPLC analyzing method to monitor the concentration of ALA in human blood.

**Keywords:** ALA; Drug delivery system; HPLC

## 二、緣由與目的

在台灣，口腔癌的致死率特別高的原因與病患對侵入性診斷法的排斥有相當直接的關係。就衛生署近幾年所公佈的國人十大癌症發生率排行榜顯示，口腔癌對於國內男性的威脅有逐年上升的趨勢。民國八十五年口腔癌已位居國內男性癌症發生率的第五名，而依據最新出爐的民國八十六年統計資料，口腔癌的排名更進一步上升至男性癌症發生率的第四名。由於口腔癌有效的治療和癌病變的早期發現有密切的關係，因此發展口腔癌前病變及口腔癌的早期診斷技術即有其必要性。利用組織所呈現的螢光光譜作為疾病診斷的依據，已有足夠的科學證據顯示其可行性，且因其為非侵入式的診斷方法，較易為病患所接受。本整合性計畫即希望發展螢光光譜作為口腔癌及癌前病變的廣泛篩檢方法，協助病患及早將病灶解除。在此整合計劃中，我們同時探討自體螢光以及染料螢光光譜用以診斷口腔癌及口腔癌前病變的可行性。我們除了可以利用組織本身因型態及生化代謝異常所造成之螢光光譜的變化，對應得知病程的發展之外，也可利用投予外加物質直接或經代謝之後所產生螢光光譜的變化，反應其與組織病變程度的關係。

染料螢光光譜的基本原理是將化學染料投予進入身體組織內，當這些外加之光感物質在受到激發光照射後，能釋放出螢光可供偵測。由於正常組織和病變組織對外加光感物質的親和力不同，造成光感物質會選擇性累積於腫瘤組織，因而產生不同的螢光變化。藉著這種外加光感物質的螢光光譜變化，疾病或癌病變組織得以被定位出來。染料螢光光譜和本群體計劃中其他子計劃擬發展的自體螢光光譜最大不同之處，在於外加光感物質所產生的螢光較強且將來可進一步發展造影技術，協助第一線臨床工作者進行即時診斷。本子計劃係利用第二代光感物質前驅物的 5-氨基酮戊酸（5-aminiolevulinic acid；ALA），進行相關研究。ALA 經由投予進入細胞後，會在粒腺體內藉由 heme 經一連串的酵素作用後，生合成代謝形成光感物質 protoporphyrin IX (PpIX)。而 PpIX 經過波長在 410 nm 左右的藍光照射後，可發射出 630 nm 左右範圍的紅光，亦即有螢光的產生。過去幾年，利用 ALA 進行光動力治療及癌前病變的診斷，相當受到臨床研究者的重視。由於口腔是不必使用侵入性方式就可直接在局部投藥的部位，開發易為病患認同的黏膜吸附性劑型以輸送 ALA，藉此提高局部的螢光效益並降低診斷劑在全身的殘留，是非常有意義的。因而在本計劃中，我們以具黏膜相容性的聚合物作為劑型製備所需之賦形劑，作成親水性凝膠，以協助將 ALA 傳送到黏膜組織內，並利用 ALA 代謝生成 PpIX 後之螢光光譜變化作為分析的要件。在賦形劑的篩選上，除了考量賦形劑本身的特性之

外，我們也利用細胞培養方法來確保所選的賦形劑不阻礙藥物的吸收。此外，為了瞭解所選擇的賦形劑在混合後是否相互影響，我們利用熱分析技術及紅外光吸收光譜來進行評估。配合動物實驗的結果，就 ALA 的輸送系統進行改良。

在 ALA 水膠輸送系統的發展上，有兩大問題需要面對：ALA 的安定性，以及 ALA 水膠輸送系統的診斷效益。這兩大問題，會因為輸送系統所選用的材質及製備條件，而有程度上的差異。以 ALA 而言，其安定性在酸性條件下較好，而在鹼性或中性的環境中則較容易變質。此外，ALA 不耐熱，其溶液也不耐久藏。因此，ALA 藥物輸送系統的組成應優先選擇在溶液中呈酸性的材質，如此將有助於 ALA 安定性的維持。本計劃最終我們以 1% Carbopol 及 25% PF127 製備成溫控式親水凝膠系統，於使用前才將 ALA 加入該系統中充分溶解成為含有 20% ALA 的製劑，並以 10 mg ALA/ 0.1 ml/1 cm<sup>2</sup> 的條件塗抹於倉鼠頰囊袋內側，經由多次的測試結果顯示，利用此製劑所衍生的螢光診斷效益均優於以腹腔注射同劑量 ALA 的結果，且於未塗藥之對照側所亦測得之螢光量亦相當微弱，接近背景值。

由於 ALA 需於濃度相當高的條件下（約需達 1 mg/ml 的濃度等級），才能在 265 nm 左右測得吸收波，就劑型製備階段需進行的成分安定性監控，以及往後因進行臨床試驗需要進行血中濃度的監控上而言，以一般的紫外光分光光度計所測的結果並不夠靈敏。因此我們也利用螢光衍生法，將 ALA 轉換成具螢光的衍生物，如此可將測試的靈敏度提高到  $\mu\text{g/ml}$  的濃度等級。我們在將 ALA 衍生成具螢光的物質之後，利用逆相高效液相層析法，以螢光偵測器對 ALA 的衍生物進行定量分析。此外，對於血中 ALA 濃度的監測，我們也建立了一套分析方法。在人體臨床試驗方面，由於考量到劑型在臨床使用時需容易操作，且需由臨床操作人員觀察後確認 ALA 的溶解狀況，因此，我們也將此劑型經由部分修飾後，使其在操作前及使用時能呈現完全澄清的液體狀態。經由數例臨床測試的結果證實此製劑的確具有用以建立口腔癌前病變螢光診斷的效益。

### 三、研究結果

#### 臨床試驗病例：

##### 口內白斑

病人有口內白斑，在口內疑似患病區域塗覆 0.1 ml/cm<sup>2</sup> 凝膠 (1% carbopol 971P + 20% PF-127 + 20% ALA HCl)，靜候一小時後，以 410 nm 激發光 (excitation wavelength) 照射塗覆區，並在不同時間點接收發射光譜。由圖 1 可知 630 nm 的螢光強度在該測試時段呈現隨時間增加的趨勢，因 630 nm 螢光增加的幅度隨病變程度而異，在 0-2 小時內，有白斑病變之組織在 630 nm 螢光增加的幅度高過正常組織的增加幅度。

##### 口頰內有嚴重組織變異

病人於左頰內側有嚴重的組織變異 (severe dysplasia)，在疑似患病區域塗覆 0.1 ml/cm<sup>2</sup> 凝膠 (1% carbopol 971P + 20% PF-127 + 20% ALA HCl)，靜候一小時後，以 410 nm 激發光 (excitation wavelength) 照射塗覆區，並在不同時間點接收發射光譜。圖 2 所呈現的是在不同時間點，將 630 nm 的螢光強度除以 460 nm 的比值 (RB ratio)。圖 2 中實線及虛線分別為正常及嚴重組織變異部位的測量結果，其 RB 比值如下表所示：

	0 hr	1 hr	2 hr
正常	0.008	0.034	0.053
嚴重組織變異	0.032	0.254	0.337

由圖 2 可知在 630 nm 的螢光在該測試時段呈現隨時間增加的趨勢，且嚴重組織變異部位的 630 nm 螢光增加較正常組織為明顯，藉此可診斷出哪些部位有組織變異，以便於醫療過程中可在正確之患處對症治療。

##### 舌部白斑

病人因舌部有白斑赴牙科檢查，在疑似患病區域塗覆 0.1 ml/cm<sup>2</sup> 凝膠 (1% carbopol 971P + 20% PF-127 + 20% ALA HCl)，靜候一小時後，以 410 nm 激發光 (excitation wavelength) 照射塗覆區，並在不同時間點接收發射光譜。

圖 3 所呈現的是在不同時間點之 RB ratio。圖 3 實線及虛線分別為正常及白斑部位的測量結果，其 RB 比值如下表所示：

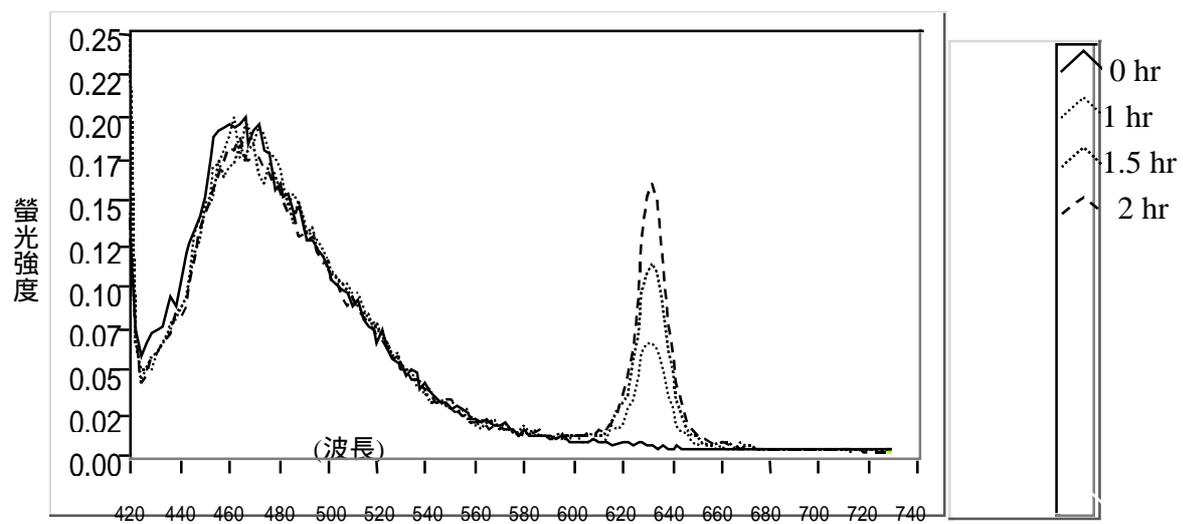
	0 hr	1 hr	2 hr
正常	0.023	0.055	0.058
白斑部位	0.101	0.179	0.435

由圖 3 可知在 630 nm 的螢光在該測試時段呈現隨時間增加的趨勢,且白斑部位的 630 nm 螢光增加較正常組織為明顯。

#### ALA 血中濃度分析方法的建立：

分析 ALA 螢光衍生物的高效液相層析系統的組成是使用 Shimadzu 的液相層析系統,主要組成是 LC 10-AT 幫浦, SIL-10AD 自動取樣器, 以及 RF-10 ALX 螢光檢測器。使用的分析管柱是 Inersil 5S ODS (4.6mm×150mm), 移動相是 water/methanol/acetic acid = 300 : 450 : 5, 流速為 0.7 ml / min。螢光檢測器的設定是 Ex : 363nm & Em : 473 nm。樣品的注射量為 5-10  $\mu$ l。螢光衍生是參考 Okayama 的方法, 將 ALA 衍生成為具螢光的 2-methyl-ideneamino-3,5-diacetyl-4,6-dimethylpropionic acid。圖 4 為與經過 ALA 相同衍生法之血清層析圖。圖 5 為含有不同濃度 ALA 血清, 經過螢光衍生之後的層析圖。比較此二圖可知, ALA 的位置是在滯留時間約為 7 分鐘的位置, 且此螢光衍生分析法並不受血清存在的干擾。此外, 血清中 ALA 螢光衍生物的濃度亦呈現相當不錯的線性關係 (如圖 6)。

圖 1



(波長)

圖 2

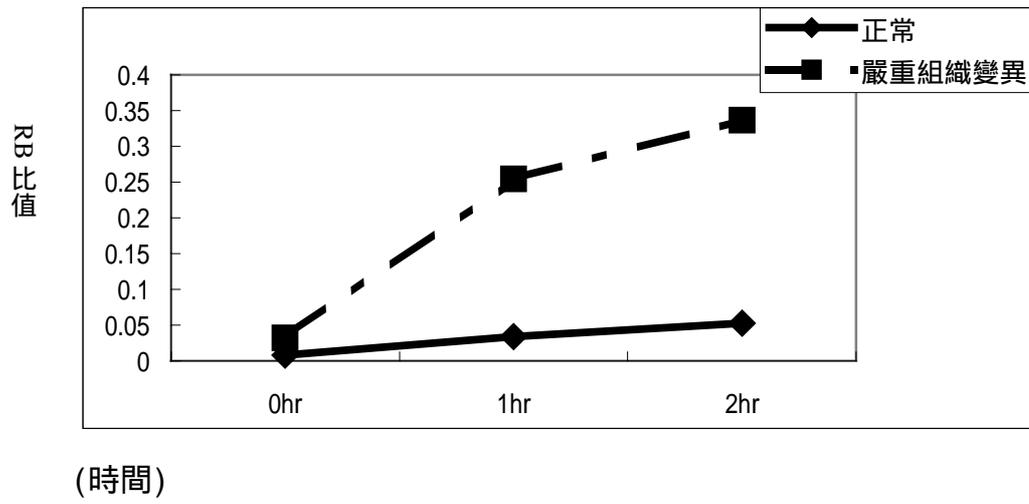


圖 3

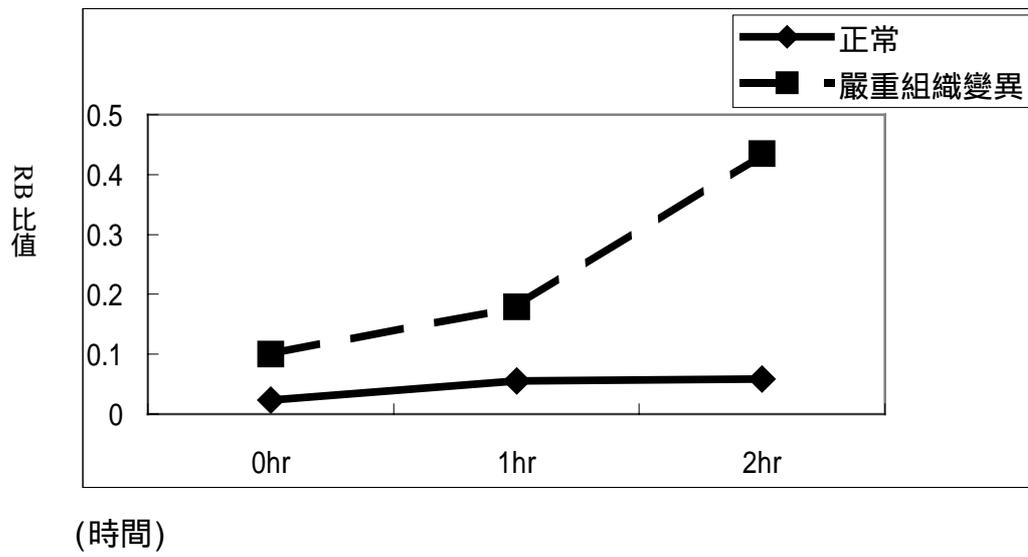


圖 4

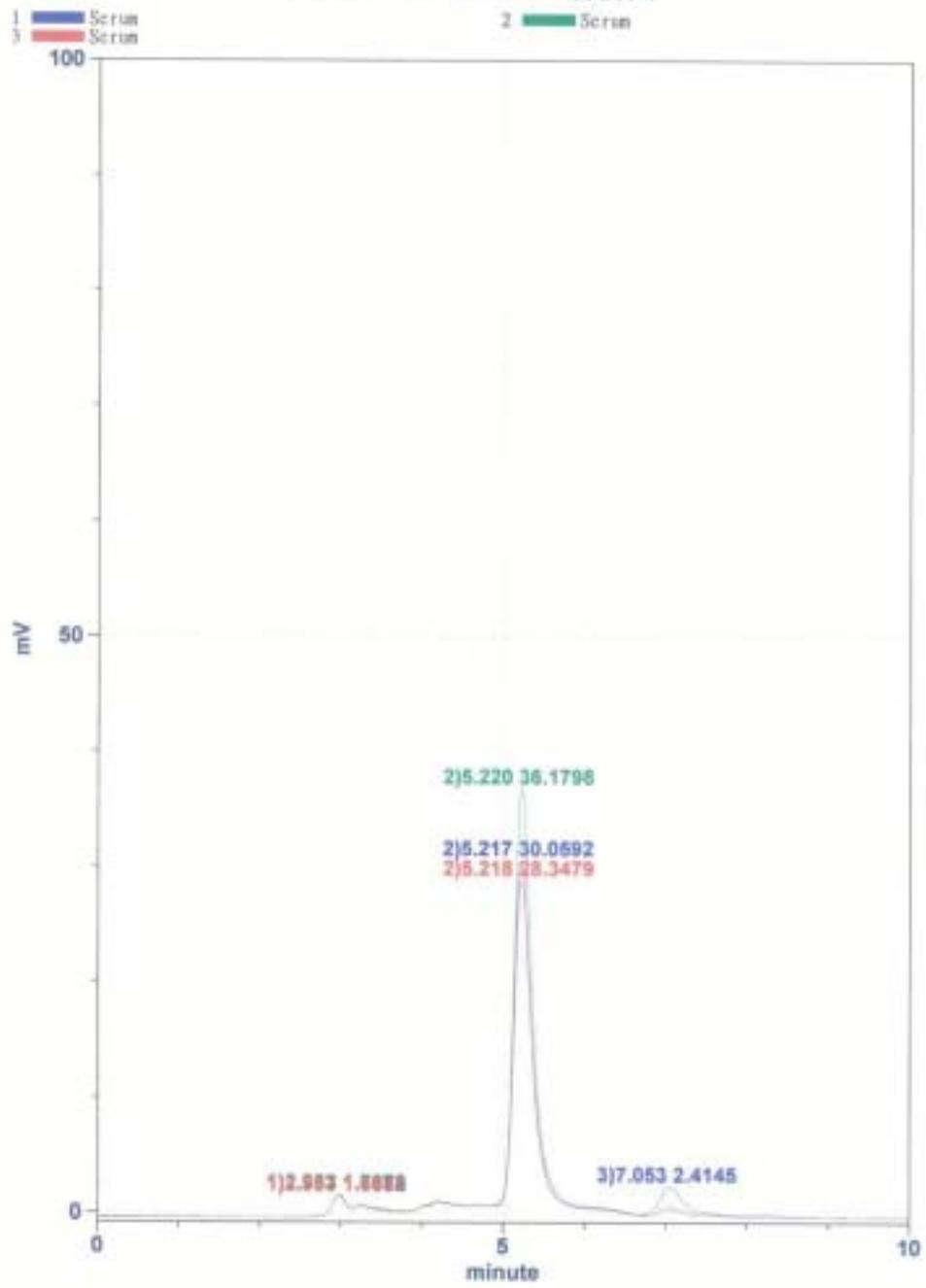
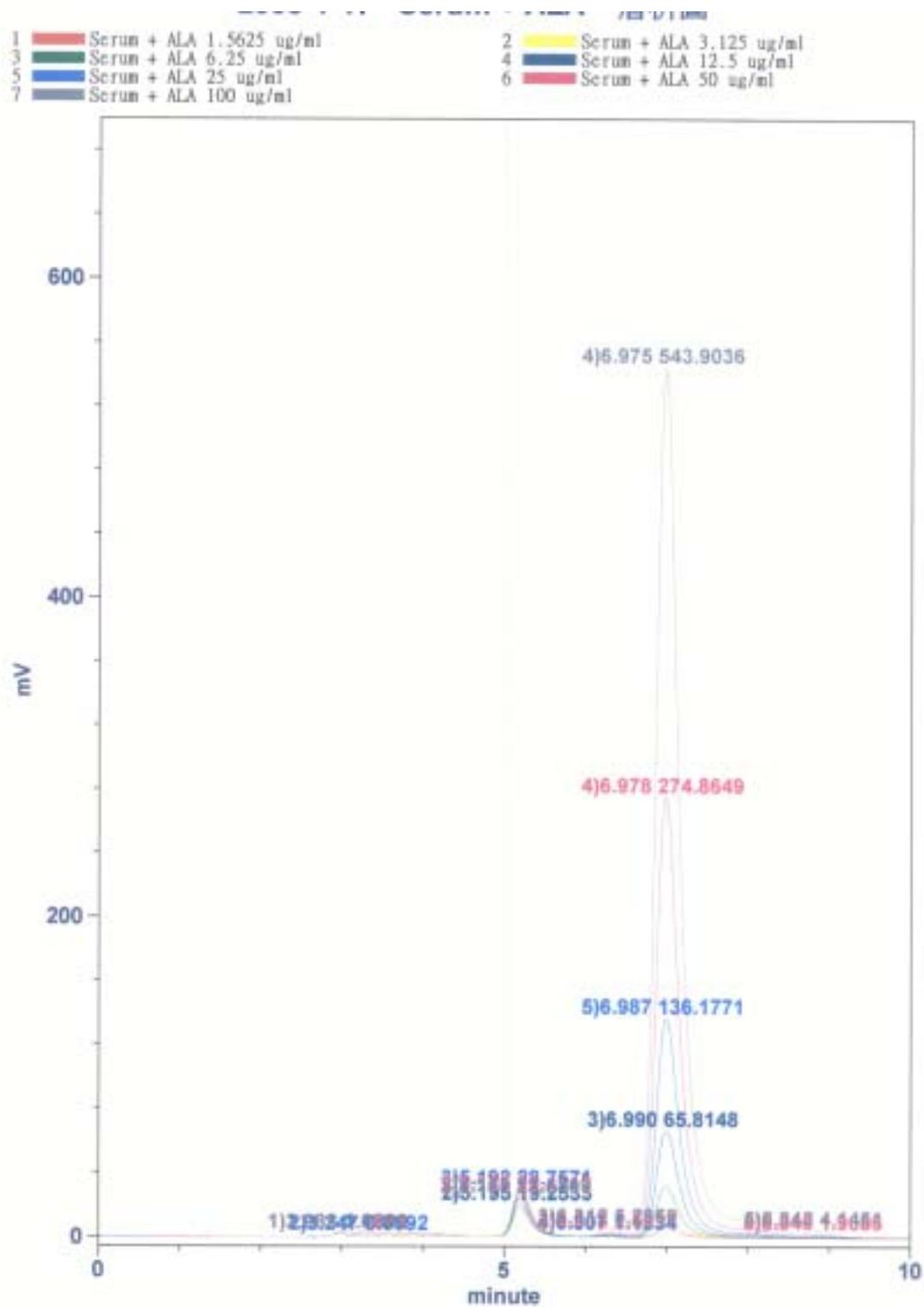


圖 5





#### 四、計畫成果討論

實驗中所採用的 ALA 螢光衍生分析法，所生成之衍生物，經不同溫度儲存後，發現是穩定度相當高的衍生物，所製備的測試樣品至少可置放於室溫下達 48 小時之久。血中濃度的監測，偵測底限尚未能達 1  $\mu\text{g/ml}$  的濃度範圍，可能是由於高效液相層析的分析中，未於螢光樣品儲存、流經管線、以及分析管柱等使用溫控裝置設備，因而因環境溫度的影響而造成螢光量的差異。因此，日後應一併將環境溫度的變化納入控制條件中，以期建立更精確的分析條件。

#### 五、參考文獻

1. A.Bunke, O. Zerbe, H. Schmid, et al. *J. Pharm. Sci.*, 89 (2000) 1335-1341
2. A.Okayama, *J.Chromatogr.*,426 (1988) 365.
3. A.Okayama, Y.Ogawa, K.Miyajima,et al. *Environ. Health*,61(1989) 297