原著

担癌マウスに投与した光増感剤, pheophorbide a および 10-hydroxypheophorbide a の臓器内分布

Distribution of pheophorbide a and 10-hydroxypheophorbide a in
organs of tumor-bearing mice after intravenous administration

市岡 稔, 小山隆子, 細谷英雄, 遠藤 寛
(株) ヤクルト本社中央研究所

Minoru ICHIOKA, Takako KOYAMA, Hideo HOSOYA, Hiroshi ENDO

Yakult Central Institute for Microbiological Research, Kunitachi, Tokyo 186, Japan

Abstract

We investigated the distribution of pheophorbide a (Phd) and 10-hydroxypheophorbide a (OH-phd) in organs of sarcoma 180-bearing mice after intravenous (iv) administration at the dose of 10mg / kg.

The blood concentration of Phd and OH-phd(Phds) showed the high-level at 1hr after iv administration, then rapidly decreased, and disappeared at 24hr.

Phds distributed mainly in the liver, spleen, lung, kidney, gastrointestinal tract and tumor tissue, then decreased with the course of time.

OH-phd as compared with Phd, was excreted rapidly from all normal organs and not detected at 48hr after iv administration, but remained in the tumor tissue preferentially even at 96hr.

和文要旨

Sarcoma 180担癌マウスにPhdおよびOH-phd(Phds)を10mg / kg静脈内投与し腫瘍, 臓器内分布を検討した。

1. Phdsの血中濃度は投与1時間後に高濃度を示すが以後速やかに減少し24時間後では検出限界以下となった。
2. 肝臓, 脾臓, 肺, 腎臓, 消化管および腫瘍に高濃度のPhdsがみられたが時間の経過とともに減少した。
3. OH-phdはPhdに比べて臓器からの排泄が速く, 投与48時間後には検出されなかったが,

腫瘍中には96時間後にも残留した。

キーワード；光線力学的治療法，フェオフォーバイド a，10-ハイドロキシフェオフォーバイド a、臓器内分布，担癌マウス

Photodynamic therapy, Pheophorbide a, 10-Hydroxypheophorbide a, Organs distribution, Tumor-bearing mouse

1. はじめに

新しい癌治療法として光増感剤を使用した光線力学的治療法(Photodynamic therapy, PDT)の研究が進んでいる^{1, 2)}。従来使用されているヘマトポルフィリン誘導体(HpD)はその励起光であるアルゴンダイレーザー(波長630nm)の組織誘過性が長波長のレーザー光に比べて低いこと²⁾，光線過敏症の副作用が強いことなどの理由からHpDに代わる光増感剤の開発が望まれている³⁾。

我々はすでに強い光力学作用を有するpheophorbide a(Phd) および 10-hydroxypheophorbide a(OH-phd)を見だし⁴⁾，これらの光力学的性質ならびにPDTによる抗腫瘍効果について検討を行ってきた^{5, 6)}。その結果，PhdおよびOH-phd(Phds)を各々担癌マウスに投与してその吸収波長の光を照射すると比較的正常細胞を損傷することなしに腫瘍組織が破壊されることを明らかにした。その後，QスイッチND:YAGレーザー(波長1063nm)とPhdの組合せによるPDTは組織深達性がよく，高い抗腫瘍効果が得られることが報告されている³⁾。

そこで我々は，投与されたPhdsの体内動態を調べる目的でマウス実験腫瘍の一つsarcoma 180を移植した担癌マウスにPhdsを静脈内投与したときの臓器内分布，腫瘍集積性について調べたのでその結果を報告する。

2. 方 法

1) 実験動物

生後7週令，体重25gの雄ICRマウスを1群5匹に区分けし，MF飼料（オリエンタル酵母製）および水道水を自由に摂取させ，24℃，55%の相対湿度の飼育室で飼育した。

2) 腫瘍細胞

マウス腹腔内で継代しているsarcoma 180の腫瘍細胞 1.25×10^6 個をマウス背部皮下に移植し，10日間飼育したのち，腫瘍の直径が約1cmの大きさになり，かつ，完

全に皮下に生着しているマウスを選び出し実験に供した。

3) Phdsの調製および投与

アルコール処理した生クロレラよりPhdsの結晶を調製し⁴⁾，PBS-salineにて溶解したのち，滅菌してマウスの尾静脈内に10mg/kg投与した。

4) Phdsの定量

マウスにPhdsを投与して，1，3，4，6，24，48，96時間後にネンプタール麻酔下で，腹部大動脈より採血したのち腫瘍ならびに臓器を摘出した。血中のPhdsの抽出は採血後速やかに行い，臓器は生理食塩水で洗浄後，-20℃で測定時まで凍結保存した。抽出は天野ら⁷⁾の方法にしたがって行ったが，血中からのPhdsの抽出はメタノールの代わりにアセトンで行った。また，Phdsの定量は各エーテル溶液の667nmにおけるBrown⁸⁾の比吸光係数($E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 70.2)を用いて算出した。なお，MF飼料を摂取したマウスの胃，小腸に飼料由来と考えられるPhdsが組織当たり各々0.33 $\mu\text{g/g}$ ，0.55 $\mu\text{g/g}$ 認められた。したがって，Phdsを投与したマウスの胃，小腸のPhds量は測定値より飼料由来のPhds量を差し引いた値を示した。

3. 結果および考察

Phd (10mg/kg)を静脈内投与したときの臓器，腫瘍中のPhd濃度の経時変化をTable 1に示す。

血中濃度は投与後1時間で高濃度(0.89 $\mu\text{g/ml}$)を示すがその後速やかに低下した。投与6時間後には投与1時間後の約1%に減少し，24時間後にはPhd検出限界(0.01 $\mu\text{g/ml}$)以下に低下した。

各臓器中のPhd濃度は投与1時間後高濃度を示し，以後漸時減少傾向を示した。心臓，腎臓からは24時間以内に消失したが，脾臓は48時間，肝臓，肺，腫瘍(0.05 $\mu\text{g/g}$)には96時間後も残留した。

また，OH-phd投与後の臓器中濃度の経時変化をTable 2に示した。血中濃度はPhdと同様な時間的推移を示し，投与1時間後の最大値(0.13 $\mu\text{g/ml}$)はPhdのその約1/7であった。

Table 1. Distribution of pheophorbide a in tissue and organs of tumor-bearing mice after intravenous administration at the dose of 10mg / kg

Tissue and organs	Concentration ($\mu\text{g eq./g}$ tissue or ml)						
	1 hr	3 hr	4 hr	6 hr	24hr	48hr	96hr
Blood	0.89 ± 0.44^a	0.19 ± 0.17	0.03 ± 0.04	0.01 ± 0.01	nd ^b	nd	nd
Tumor	0.93 ± 0.42	0.58 ± 0.26	0.68 ± 0.21	0.52 ± 0.26	0.40 ± 0.25	0.33 ± 0.33	0.05 ± 0.05
Liver	22.78 ± 3.19	7.24 ± 0.67	6.63 ± 1.85	6.58 ± 1.48	1.46 ± 0.65	0.82 ± 0.47	0.27 ± 0.15
Lung	4.91 ± 2.75	1.65 ± 1.07	0.97 ± 0.27	1.81 ± 0.86	0.52 ± 0.31	0.57 ± 0.56	0.26 ± 0.28
Spleen	17.09 ± 9.58	4.30 ± 2.38	3.22 ± 2.22	3.38 ± 0.98	0.28 ± 0.28	0.24 ± 0.15	nd
Kidney	2.37 ± 0.52	1.37 ± 0.49	1.00 ± 0.08	0.82 ± 0.22	nd	nd	nd
Heart	1.04 ± 0.46	0.64 ± 0.49	0.39 ± 0.17	0.10 ± 0.05	nd	nd	nd
Small intestine	9.91 ± 3.76	8.41 ± 3.53	2.96 ± 1.87	3.05 ± 0.91	0.25 ± 0.12	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.01

^aMean $\pm$ SD (n = 5) ^bNot detected

Table 2. Distribution of 10-hydroxypheophorbide a in tissue and organs of tumor-bearing mice after intravenous administration at the dose of 10mg / kg

Tissue and organs	Concentration ($\mu\text{g eq./g}$ tissue or ml)						
	1hr	3 hr	4 hr	6 hr	24hr	48hr	96hr
Blood	0.13 ± 0.06^a	0.11 ± 0.05	0.05 ± 0.09	0.05 ± 0.06	nd ^b	nd	nd
Tumor	0.19 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.36 ± 0.07	0.27 ± 0.11	0.09 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.01 ± 0.00
Liver	23.03 ± 1.22	8.74 ± 1.76	5.74 ± 1.72	4.38 ± 1.72	0.33 ± 0.19	nd	nd
Lung	0.78 ± 0.36	0.33 ± 0.07	0.16 ± 0.11	nd	nd	nd	nd
Spleen	2.58 ± 0.42	0.42 ± 0.10	0.32 ± 0.04	nd	nd	nd	nd
Kidney	1.56 ± 0.19	0.77 ± 0.17	0.73 ± 0.20	0.32 ± 0.08	nd	nd	nd
Heart	0.60 ± 0.43	0.14 ± 0.12	0.15 ± 0.09	nd	nd	nd	nd
Skin	0.05 ± 0.04	0.01 ± 0.02	nd	nd	nd	nd	nd
Muscle	0.12 ± 0.11	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.02	nd	nd	nd	nd
Stomach	2.56 ± 1.42	1.58 ± 0.56	1.79 ± 1.01	0.79 ± 0.42	0.80 ± 0.50	nd	nd
Small intestine	39.18 ± 5.24	27.35 ± 5.90	23.88 ± 4.39	9.73 ± 0.90	nd	nd	nd
Large intestine	3.93 ± 1.54	4.46 ± 1.00	3.80 ± 1.26	6.94 ± 2.14	nd	nd	nd
Caecum	3.15 ± 1.32	10.17 ± 4.29	10.02 ± 1.71	11.05 ± 1.67	nd	nd	nd

^aMEAN $\pm$ SD (n = 5) ^bNot detected

各臓器への移行はPhdと同様に速やかに進行し、肝臓および小腸、大腸、盲腸などの消化管において高い値を示した。そして大部分の臓器中の濃度は投与1時間後より低下したが、大腸、盲腸は投与後1時間より6時間まで上昇傾向を示した。以後急減し6～48時間以降には検出されなかった。これに対して腫瘍組織には投与1時間後は $0.19 \mu\text{g/g}$ であったが、徐々に増大して4時間後に最高値 $0.36 \mu\text{g/g}$ となりそれ以後は緩徐に減少したが、96時間後にも $0.01 \mu\text{g/g}$ 残留した。

OH-phdはPhdよりも正常臓器からの排泄が速い性質を有していることから光線過敏症などの副作用がPhd

よりも軽減されることが示唆される。また、OH-phdの光力学活性³⁾ (sarcoma 180培養細胞の致死作用、綿羊保存血の溶血活性、ヒスチジンの分解等)もPhdよりも高いことから光増感剤として有用な物質であることが考えられる。

今後は種々の腫瘍組織におけるPhdsの集積性および抗腫瘍効果についての検討が必要であると思われる。

本研究を行うにあたり、実験に協力いただいた古田富雄氏に深謝致します。

文 献

- 1) Y.Hayata and T.J.Dougherty; Lasers and Hematoporphyrin Derivative in Cancer, Igaku-Shoin, Tokyo (1983).
- 2) 益子信郎ほか;ND:YAGレーザー光照射によるフェオフィorbide a の光力学効果の基礎的検討, 日本レーザー医学会誌, 6, 113-116 (1986).
- 3) 藤島一郎ほか;ND:YAG Laser(acoustic Q switch)と Pheophorbide-Aを用いたPhotodynamic Therapy;日本レーザー医学会誌, 8, 57-58 (1987).
- 4) H.Endo, H.Hosoya, T.Koyama, M.Ichioka; Isolation of 10-Hydroxypheophorbide a as a Photosensitizing Pigment from Alcohol-treated *Chlorella* Cells; Agri.Biol.Chem., 46, 2183-2193 (1983).
- 5) 遠藤寛, 細田英雄, 市岡稔; “癌治療におけるレーザー医学”, 小黒八七郎編, 医学図書出版(1989)製本中.
- 6) 遠藤寛, 市岡稔, 細谷英雄, 小山隆子; クロロフィル誘導体を有効成分とする制ガン剤, 特許公報, 昭63-4805.
- 7) 天野立爾, 池慶子, 内山充; クロレラ中のクロロフィル分解物に関する化学的試験, 食品衛生研究, 28, 739-745 (1978).
- 8) S.R.Brown; Absorption Coefficients of Chlorophyll Derivatives; J.Fish Res. Bd. Canada, 25, 523-540 (1968).