ヘマトポルフィリン・オリゴマーの光酸化物の光増感反応性について

三好憲雄¹⁾, 西坂剛²⁾, 久住治男³⁾, 市村厚一⁴⁾, 小林孝嘉⁴⁾, 桜井勝清⁵⁾, 石原聖也⁶⁾, 沢田道一⁶⁾, 中西和夫¹⁾, 福田優¹⁾

1) 福井医大・病理 I, 2) 東京農工大・健康管理センター, 3) 金沢大・医・泌尿器,
4) 東大・理・物理, 5) 生化学工業 (株), 6) 浜理薬品工業 (株)・開発部

Photoreactivity of Photoproduct of Hematoporphyrin oligomers.

N.Miyoshi*, T.Nishizaka, H.Hisazumi, K.Ichimura, T.Kobayashi, K.Sakurai, K.Nakanishi*, M.Fukuda*

*Dept. of Pathol., Fukui Med. Sch.

Abstract

Hematoporphyrin oligomers in cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) micellar solution were irradiated by an argon laser. The spectroscopic property of the solution before and after the photoirradiation was investigated by the measurements of spectra of fluorescence and triplet-triplet (T_n-T_1) absorption, and lifetimes of the excited singlet and triplet states. From the results, the irradiated oligomers were concluded to form stable aggregates which would be photoactive sensitizers.

はじめに

レーザー光と色素による光力学的治療 (PDT) 効果の向上を目差すにはこの治療前に使用する光増感剤の開発が必要である。腫瘍組織内に選択的に取込まれ易いものとしては比較的高分子量のヘマトポルフィリン誘導体のオリゴマー (HpO) であろうと考え¹⁾、これを使用した。また、光増感剤の必要条件の一つに、組織内への光深達性のある長波長に大きな吸収を持つことも挙げられる。

そこで今回、HpO にアルゴン・レーザー光を照射すると、照射前の吸収スペクトルよりも更に長波長側に吸収帯が見付られたので、その光化学反応生成物の分光学的検討を行い、その光増感反応性を予測した。

その結果、光化学反応生成物の蛍光スペクトルと蛍光強度の時間依存性の測定からレーザー光照射前に比べて照射後は、HpO

の会合体に由来する発光帯 677 nm のピークを見出し、会合体の蛍光の短寿命成分の増加が見られた。また、三重項-三重項 (T_n-T_1) 吸収スペクトルと T_n-T_1 の吸光度の時間的依存性の測定から、その会合体に由来する T_n-T_1 吸収帯が照射前の吸収ピーク (455 nm) から照射後の 470 nm に長波長シフトし、その吸光度も約 1.5 倍増加した。さらに照射後の燐光の寿命は照射前の 4.43 μ s の約 115 倍の 509 μ s にも達した。以上の分光学的検討から、アルゴン・レーザー光照射による HpO の光生成物は光酸化反応による会合体生成によって、光増感反応性の高いものに変化したものと示唆された。

実験材料と方法

(1) サンプル

サンプルは 2 μ M の HpO (平均分子量 3000, HpD 分子が 5 個結合) を含む 10 mM と 0.1 mM の Cetyl trimethyl ammonium bromide (= CTAB) ミセル溶液をそれぞれ 2.5 ml とした。HpO は生化学工業 (株) の桜井により合成・精製された。また、CTAB は半井化学 (株) の特級のものを使用した。光化学反应用光源には、アルゴン・イオンレーザー (スペクトラ・フィジックス社、171-07 型、マルチライン、600 J/cm²) を用い溶存酸素下で照射を行った。

(2) 吸収と蛍光スペクトル測定

照射前後の吸収スペクトル変化は島津の自記分光光度計を、蛍光スペクトル変化は日立の蛍光分光光度計 (850 型) を用いて調べた。

(3) 蛍光寿命測定

照射前後の蛍光寿命測定には、アルゴン・イオンレーザー光 (488.0 nm、パルス幅 = 200-300 ps) を励起光とする単一光子計測法によった。詳細な測定条件及びデータ解析法は、櫛田と木下の方法²⁾によった。

(4) T_n-T_1 吸収スペクトル及び燐光の寿命測定

照射前と後のサンプルは凍結-脱気と融

解を3回繰り返して、脱酸素状態で測定した。 T_n-T_1 吸収スペクトル及び蛍光の寿命測定は、ナノ秒時間分解分光システム³⁾を使用し、励起光にはNd:YAGレーザーの3倍波(355 nm, 60 J)を用い、パルスは1/0.8 Hzの繰り返しにて、直径3 mmのピンホールを通してサンプルに当てるようにした。検索光源は、スペクトル測定の場合にフラッシュランプを用いた。励起光と検索光とは、サンプルの検索側の表面で5度以下の角度で交差するように光軸を合せた。スペクトル測定の場合、励起光のパルスから検索までの遅延時間は、中心値に近い位置のパルス幅で150 nsであった。シグナルの積算回数は、10000回とした。検出器は、スペクトル測定時には多チャンネルフォトダイオードを用い、寿命測定時に光電子増倍管を用いた。データの集積及び解析にはミニコンを使用した。

実験結果

(1) 照射前後における吸収スペクトル変化
2 μ M の HpO を含む 10 mM 或いは 0.1 mM の CTAB ミセル水溶液 2.5 ml にゆっくり酸素ガスの bubbling を 20 分間行って、吸収スペクトルの測定をした(図1)。さらにアルゴン・レーザー光(1 W/cm²)を10分間照射した(600 J/cm²)後の10 mM-CTAB 溶液での吸収スペクトルも測定した。図1の曲線1が照射前で照射後が曲線2である。Soret 帯での照射後の変化は単に吸光度の32%の減少を示した。一方、Q バンドでの変化は図1で明らかのように、照射によって630 nm (d バンド)の吸光度の減少と共に670 nm (e バンド)の新しい吸収帯が出現した。その他のバンド(a, b, c)の吸光度の25%-40%の減少も見られた。しかしながら、酸素の代りに窒素を bubbling した場合は、照射前との変化が僅かであった。

(2) 照射前後における蛍光スペクトル変化
図2の蛍光スペクトル変化からも明らかのように408 nm で励起すると、10 mM-

図 1

カチオン性界面活性剤(10 mM-CTAB)におけるアルゴン・レーザー照射前後(マルチライン、600 J/cm²)の HpD オリゴマー(分子量=30000)の可視部(Q バンド)の吸収変化(曲線1:照射前; 曲線2:照射後)

図 2

カチオン性界面活性剤(10 mM, 0.1 mM-CTAB)におけるアルゴン・レーザー照射前後(マルチライン、600 J/cm²)の HpD オリゴマー(分子量=30000)の蛍光スペクトル変化(曲線1:10 mM-CTAB での照射前; 曲線2:10 mM-CTAB での照射後; 曲線3:0.1 mM-CTAB での照射前; 励起波長=408 nm)

表 1 カチオン性界面活性剤(10 mM, 0.1 mM-CTAB)におけるアルゴン・レーザー照射前後(マルチライン、600 J/cm²)の HpD オリゴマー(分子量=3000)の蛍光寿命測定の結果

Oligomer	630 nm				670 nm			
ns (%)	a	(A)	b	(B)	a	(A)	b	(B)
3000/ 10mM • CTAB	19	(79)	5.0	(21)	12	(60)	4.0	(40)
0.1mM • CTAB	9.0	(44)	0.40	(56)	4.5	(40)	0.60	(60)
After irradiation								
3000/ 10 mM-CTAB	12	(97)	2.0	(3)	9.0	(54)	2.0	(46)
0.1mM-CTAB	10	(46)	0.25	(54)	5.0	(37)	0.40	(63)

図 3

カチオン性界面活性剤(10mM, 0.1mM-CTAB)におけるアルゴン・レーザー光照射前後 (マルチライン、600J/cm²) の HpD オリゴマー (分子量 = 3000) の三重項-三重項吸収スペクトル変化

CTAB 溶液での照射前のスペクトルは曲線 1 のように 636 nm と 677 nm に発光ピークを示しているが、照射後は曲線 2 のように 636 nm の発光強度は著しく減少し、その分 677 nm の発光強度比 ($I_f 677/I_f 636$) は 0.88 から 2.30 へと増加した。一方、0.1 mM-CTAB 前期ミセル溶液での照射前の発光スペクトルは曲線 3 のように、677 nm の発光強度比が 4.03 と著しく増加している。

(3) 蛍光寿命測定の結果

10 mM-CTAB ミセル溶液における HpO の照射前後の蛍光寿命測定を行い、その減衰曲線の convolution による fitting には $A/a \cdot \exp(-t/a) + B/b \cdot \exp(-t/b)$ の式のように二つの指数関数を仮定し、コンピューター fitting によって、 a , b , A , B を求めた。すなわち、 a と b は長寿命と短寿命成分の寿命であり、 A と B は長寿命と短寿命成分の割合である。求められたパラメータ a , b , A , B を表 1 に示す。まず、670 nm で観測した方が 630 nm の時よりも寿命は短くなりしかも短寿命成分が増大していることが明らかである。同じように 0.1 mM の CTAB 溶液では寿命が短くなり、短寿命成分が多くなっている。このことが照射前と後で、同じ傾向として、特に 10 mM の CTAB ミセル溶液で 670 nm で観測した時に現れた。つまり、寿命が 12 ns から 9.0 ns に、4.0 ns から 2.0 ns に短くなり、短寿命成分が 40 % から 46 % に増大している。

(4) 照射前後における T_n-T_1 吸収スペクトル変化と蛍光寿命測定結果

T_n-T_1 吸収スペクトルは三重項と一重項との差スペクトルに対応する。10 mM の CTAB 水溶液中での HpO の照射後のスペクトルパターンは 0.1 mM の CTAB ミセル溶液と類似して、照射前に比して、430 nm-

図 4

カチオン性界面活性剤(10mM-CTAB)におけるアルゴン・レーザー光照射前後 (マルチライン、600J/cm²) の HpD オリゴマー(分子量=3000)の蛍光減衰曲線 (曲線 1: 照射前 (445nm で観測) 曲線 2: 照射後 (470nm で観測))

500 nm の領域では、448 nm から 470 nm に red-shift している。また、そのピークの吸光度差 (ΔA) を比較しても約 8 割の増大を見ている。Q バンドにおいても 10 mM の CTAB ミセル溶液では照射前後で基底状態での吸収スペクトルのピークの位置関係は良く類似していることが図 1 と 3 の比較において明らかである。また、0.1 mM のスペクトルの ΔA が 1/10 であるが、10 mM の CTAB の照射後のものと良く類似していることがわかる。特に照射前の d バンドはなくなり新しく e バンドが出現している。しかしながら、0.1 mM の照射後の T_n-T_1 吸収スペクトルのシグナルは微弱過ぎ、測定が不可能であった。

蛍光すなわち三重項の減衰曲線は図 4 に示す如くである。照射前後の寿命の大小が異なり過ぎて、同じ横軸で示すのは困難であった。つまり、曲線 1 は 10 mM の CTAB 溶液中で照射前のもの (445 nm で観測) で、曲線 2 は照射後 (470 nm で観測) である。寿命は照射前で (4.43 ± 0.10) μs 、照射後は照射前の 115 倍の (509 ± 6) μs であった。

考察と総括

従来より我々は培養細胞や実験腫瘍組織内への HpD の取込みのメカニズムや局在を HpD の分光学的検討で明らかにしてきた⁴⁻⁸⁾。その結果、腫瘍細胞内に取込まれるにつれて、HpD 分子は会合体を形成していることが判明した。それは、蛍光スペクトルで 677 nm のバンドが増大することおよび、蛍光寿命の寿命成分が増大することなどで特徴づけられる。

一方、カチオン性界面活性剤 (CTAB) を使用したのは、従来より界面活性剤水溶液で光増感反応を反応速度論的に研究してきた実績を活かすためである。すなわち、10 mM の CTAB 溶液ではミセル形成濃度 (cmc=8 mM) 以上の濃度域なので、色素分子、特にこの HpO はカルボキシル基を側鎖に持つため、静電気相互作用により、一つ一つのミセルに結合して、単量化しやすくなっていると考えられる。0.1 mM では cmc 以下の濃度域であるので、色素分子が存在すると、色素分子と CTAB 分子が会合状態で可溶化していると考えられる。従って、0.1 mM の CTAB ミセル溶液 (前期ミセル溶液) と類似した蛍光スペクトル (図 2) と T_n-T_1 吸収スペクトル (図 3) が 10 mM の CTAB 溶液においても溶存酸素下でのアルゴン・レーザー光照射後に得られている。このことは、レーザー光照射によって、HpO の会合体が形成されている可能性を裏づける。また、表 1 の短寿命成分の増加も以上の事実を確実なものにしている。さらに、照射後に形成される会合体の光増感反応性を検討するために、三重項の寿命を測定した。その結果、照射後は照射前に比して、著しく長くなった。すなわち光生成物ができることにより、光反応の収率が増加することを十分期待できるものである。

また、どのようにして、このような光生成物が形成されたのか以下のように推測した。それは、恐らく自らの光増感反応により励起一重項酸素が生成し、それにより酸化反応を受けて、HpO 自身の会合体の形成が考えられる。あるいは、その時ポルフィリン環の二重結合が切れて、一重結合になっている可能性も否定出来ない。なんとなれば、吸収スペクトルの 670 nm のピークが出現することと、照射後のサンプルに EtOH を加えると黄色くなることから十分考えられる。

以上を総括すると、酸素溶存下でのアルゴン・レーザー光照射によって、HpO はより光増感作用の大きい光生成物に変化する可能性を示し得た。今後種々の光増感剤による励起一重項酸素の生成収率の詳細な比

較検討を行う予定であるが、レーザー光照射後の光生成物は効率良い光増感剤に成り得ると思われる。

参考文献

- 1) Miyoshi, N., Hirata, A., Kunimi, K., Sakurai, K., Hisazumi, H., Fukuda, M.: Spectroscopic study of HpD polymer in tumor tissue, Clayton Foundation Conference on "Photo-dynamic Therapy" (Los Angeles, February 17, 1987).
- 2) 櫛田孝司、木下修一: 単一光子計数法によるピコ秒分光、応用物理、52: 920-930, 1983).
- 3) 小林孝嘉: ピコ秒分光法、医学のあゆみ、127: 1005-1009, 1983.
- 4) Miyoshi, N., Hisazumi, H., Ueki, O., Nakajima, K.: Cellular binding of hematoporphyrin derivative in human bladder cancer cell line: KK-47, Photochem. Photobiol., 39, 359-364, 1984.
- 5) Miyoshi, N., Hisazumi, H., Nakajima, K., Ueki, O., Fukuda, M.: The similarity between the fluorescence spectra of hematoporphyrin derivative incorporated by rat bladder cancer tissue and cetyltrimethylammoniumbromide micelles, Photobiophys., 8: 115-121, 1984.
- 6) 三好憲雄、久住治男、峰岸久子: 生体系におけるヘマトポルフィリン誘導体 (HpD) の蛍光スペクトルの測定法と解析、The Hitachi Scientific Instrument News, 27: 2368-2371, 1984.
- 7) 三好憲雄、福田優: ヘマトポルフィリン誘導体 (HpD) の取込みとその温度効果、及び加温による殺細胞効果、日本ハイパーサーミア誌、1: 139-145, 1985.
- 8) Miyoshi, N., Hisazumi, H., Ueki, O., Nakajima, K., Fukuda, M.: Photodynamic inactivation of cultured human bladder cancer cells (KK-47) sensitized by hematoporphyrin derivative and argon-dye laser light, Photobiophys., 9: 241-252, 1985.