各種光増感剤の蛍光特性についての検討

石田武之, 三好憲雄*, 南後 修, 打林忠雄, 内藤克輔, 久住治男

金沢大学医学部泌尿器科, *福井医科大学第一病理

A STUDY OF FLUORESCENCE PROPERTIES OF SEVERAL PHOTSENSITIZERS

TAKEYUKI ISHIDA, NORIO MIYOSHI*,
OSAMU NANGOU, TADAO UCHIBAYASHI,
KATUSUKE NAITO, HARUO HISAZUMI

Department of Urology, School of Medicine,
Kanazawa University

*Department of Pathology, Fukui Medical
School

Abstract

The absorption and fluorescence spectra, and fluorescence lifetime of hematoporphrin oligomers(HpOs)(mean molecular weights 2000, 3000, 5000 and 12000), Photofrin I' and Photofrin II' have been measured in distilled water and cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) aqueous solution. Two different lifetimes were observed from the fluorescence decay curve of the several photosensitizers dissolved in distilled water and CTAB aqueous solution. In distilled water, the fraction rate of the long lifetime increased with increasing of the concentration. Using 0.1mM and 10mM CTAB aqueous solutions, the fraction rates were less than 20% and more than approx. 50%, respectively. From these results, it was thought that the long lifetime component may be resulted from several photosensitizers aggregated in distilled water and the short lifetime component from several photosensitizers aggregated in 0.1mM CTAB aqueous solution.

はじめに

最近, レーザーと光増感剤による癌の光力学的治療が盛んに行なわれるようになってきた。癌の光力学的治療 (PDT) の基礎的研究として各種光増感剤の光増感効率を比較検討することは重要な課題である。また, 生体内における光増感剤分子は会合状態をとりやすいといわれ, この会合状態が光増感効率を大きく左右しているので, 光増感効率の高い感受性色素を検索するためには, 生体系における会合形成状態を明らかにする必要がある。したがって今回は, 生体モデル溶媒系における種々の増感剤の分光特性, 特に蛍光寿命測定結果を中心に検討した。同じポルフィリン色素分子でも光増感効率は, 癌組織内のポルフィリン色素分子形態によって大きく左右されることが予測されるので, 色素分子の形態を詳しく知るために蛍光寿命測定を中心に行なった。

実験材料および方法

光増感剤として, Photofrin II (Photofrin Medical Inco.), Photofrin I'・II' (生化学工業) と Hematoporphyrin Oligomers (HpO : 生化学工業) (平均分子量が 2000, 3000, 5000 および 12000 のもの) を使用した。それら各種光増感剤の蒸留水中およびより生体内類似の不均一溶媒としての cetyl trimethyl ammonium bromide (以下, CTAB) 界面活性剤水溶液中における吸収, 蛍光スペクトルの測定およびそれらの蛍光寿命の測定を行なった。CTAB は半井化学 (株) のものを使用した。

吸収スペクトルの測定には島津の UV-190 型自動分光光度計を, 蛍光スペクトルの測定には日立の 850 型蛍光分光光度計を使用した。蛍光寿命の測定には堀場の NAES-500 型蛍光寿命測定装置を使用した。

結果および考察

光増感剤分子は腫瘍組織に取り込まれると会合体を形成していると報告されている。一般に会合体を形成すると蛍光収率は小さくなるといわれている。そこで光増感剤の濃度依存性を調べた。

Fig. 1 の横軸は濃度、縦軸は最大発光強度をSoret band における吸光度で割った値いわゆる蛍光相対発光収率を表している。蛍光相対発光収率の光増感剤の濃度依存性を求めた。

Fig. 1 Dependence of Concentration for the Relative Quantum Yield of Fluorescence

蒸留水および Fig. 1 に示した 10mM CTAB 水溶液では、すべての光増感剤において、それらの濃度の増加とともにほぼ指数関数的に相対発光収率の減少が認められたが、0.1mM CTAB 水溶液ではそのような傾向は認められず、HpO-3000 が例外的に濃度の増加とともにわずかであるが相対発光収率の増加を認めた。

HpO-3000 分子は他の光増感剤とは異なり前期ミセル領域である 0.1mM CTAB 水溶液では濃度の増大とともに、発光収率は逆に増大している。これは、会合体を形成しても、蛍光相対発光収率が減少していないことを示している。この 0.1mM CTAB 水溶液における会合体の発光メカニズムは複雑ではあるが、現象的には興味ある事実である。

Fig. 2 Dependence of Concentration for the Relative Quantum Yield of Fluorescence

生体内の会合状態でも蛍光発光収率が高くなり、癌診断にも有利であると思われる。

溶媒の CTAB 水溶液の濃度を变化させ各光増感剤の 1 および 4 $\mu\text{g/ml}$ の濃度における蛍光相対発光収率について検討してみた (Fig. 2)。1 および 4 $\mu\text{g/ml}$ 両濃度において CTAB 水溶液の濃度が 1mM までは急峻な増加を示したが、それ以上の濃度ではその値はほぼ一定の傾向を示した。

次に溶媒の濃度を一定にした時の、蛍光寿命の各光増感剤の濃度依存性について検討した。Fig. 3 は、蒸留水中での蛍光寿命の長寿命と短寿命の変化を示す。短寿命は平均 0.22ns でほぼ一定であったが、長寿命は平均 10.4ns で濃度の増大とともに長くなる傾向が認められた。

Fig. 3 Long and Short Fluorescence Lifetime

0.1 および 10mM CTAB 水溶液中における蛍光寿命の変化を Fig. 4 で表わした。0.1mM CTAB 水溶液中では、各光増感剤間の短寿命 ($0.18 \pm 0.04\text{ns}$) と長寿命 ($6.3 \pm 0.6\text{ns}$) は、ほぼ一定であった。一方、10mM では平均短寿命が 3.57ns、平均長寿命が 13.7ns であり、蒸留水中で測定した結果よりも両寿命が濃度の増大とともに長くなる傾向が認められた。これは、cationic なミセルと anionic のポルフィリン側鎖のカルボン酸との静電氣的結合の効果の現われと思われる。

Fig. 4 Long and Short Fluorescence Lifetime

蒸留水中における長寿命成分比の濃度依存性をみると、光増感剤の濃度の増加とともに徐々にその比率が増加している (Fig. 5)。蒸留水中では濃度の増加とともに長寿命成分比が増大していることより、蒸留水中では長寿命成分が会合状態を表わしているものと考えられた。

Fig. 5 Fraction of Long Component

0.1および10mM CTAB水溶液中での短寿命成分比の光増感剤濃度依存性を示す (Fig. 6)。光増感剤の濃度変化によらず0.1mM CTAB水溶液ではいずれの光増感剤において、短寿命成分比は、80%以上であった。一方、10mM CTAB水溶液では短寿命成分比が約50%以下であった。

Fig. 6 Fraction of Short Component

10mMのCTAB溶液ではミセル形成濃度以上の濃度域なので、色素分子、特にHpOはカルボキシル基を側鎖に持つため、静電的相互作用により一つ一つのミセルに結合して、単量化し易くなっていると考えられる。0.1mMではミセル形成濃度以下の前期ミセル濃度域であるので、色素分子が存在すると、この濃度域では色素分子とCTAB分子が会合状態で可容化していると考えられる。したがって、0.1mMのCTABミセル溶液での蛍光寿命成分比の測定結果より、80%にも達している短寿命成分は色素分子がCTAB分子を介している短

寿命成分は色素分子がCTAB分子を介して会合状態を形成しているものを表わしていると考えられた。

おそらく、生体系では0.1mM CTABミセル溶液系のような会合体を形成しているものと考えられる。このことは以前の報告にもあるように、培養細胞に濃縮して取り込まれた光増感剤分子の短寿命成分比が80%近くに達していた事実からも明らかである。

次に、光増感剤の濃度を1および4 μg/mlと固定し、溶媒のCTAB水溶液の濃度を変化させ蛍光寿命を測定した (Fig. 7)。両濃度においてCTAB水溶液の濃度が1mMまでは短寿命および長寿命成分共に急峻な寿命の延長が認められた。

Fig. 7 Long and Short Fluorescence Lifetime

短寿命成分比をみると、1mMまでは急峻な減少を示し、その後は徐々に減少した (Fig. 8)。1mMまでは、会合体の占める比率が多いものの、それ以上の濃度においては急激な減少を示すものと考えられた。

Fig. 8 Fraction of Short Component

先に述べた結果と合わせると、CTAB水溶液の1mMの濃度を境として、光増感剤の分子形態に何らかの変化が生じ、ここにミセル臨界濃度が存在することが示唆され、既知のCTAB水溶液の

ミセル臨界濃度0.9mMと相関するものであった。

ま と め

- (1) 蛍光相対発光収率の結果から、HpO-3000 分子は前期ミセル領域である0.1mM CTAB 水溶液ではその濃度の増大とともに発光収率は増大しており、癌診断には有利であると思われた。
- (2) 蒸留水中で光増感剤の会合状態を表わすのは、蛍光寿命の濃度依存性の結果より、長寿命成分であると考えられた。
- (3) 0.1mM CTABミセル水溶液での蛍光寿命の測定結果より、80%にも達している短寿命成分は、CTAB分子を介する色素分子の会合状態を表わしていると考えられた。
- (4) おそらく、生体系でも0.1mM CTABミセル水溶液系のような会合体を形成しているものと考えられた。
- (5) 蛍光寿命のCTAB水溶液の濃度依存性の結果より、CTAB水溶液の1mM付近にミセル臨界濃度が存在することが示唆され、事実、既知のミセル臨界濃度は0.9mMであった。

結 語

以上、生体内においては色素分子が生体内物質を介して会合体を形成しているという報告もあるように、腫瘍組織内における光増感剤の分子形態や分子周囲の環境を知るためには、会合体形成について十分検討すること¹⁾⁻⁶⁾は重要であると考えられた。今後、さらにより生体内に近い条件の溶媒において、各種光増感剤の分光学的検討を深めていきたいと考えている。

参 考 文 献

- 1) Miyoshi, N., Hisazumi, H., Nakazima, K., Ueki, O., Fukuda, M. : The similarity between the fluorescence spectra of hematoporphyrin derivative incorporated by rat bladder cancer tissue and cetyl trimethyl ammonium bromide micelles, *photobiochem. photobiophys.*, 8 : 155-121, 1984.
- 2) Miyoshi, N., Hisazumi, H., Ueki, O., Nakazima, K. : Cellular binding of hematoporphyrin derivative in human bladder cancer cell line : KK-47, *photochem. photobiol.*, 39 : 359-364, 1984.
- 3) Miyoshi, N., Hisazumi, H., Ueki, O., Nakazima, K., Fukuda, M. : photodynamic inactivation of cultivated human bladder cancer cells (KK-47) sensitized by hematoporphyrin derivative and argon-dye laser light, *Photobiochem. Photobiophys.*, 9 : 241-252, 1985.
- 4) Miyoshi, N., Matsumoto, N., Hisazumi, H., Fukuda, M. : Temperature-dependence of hematoporphyrin derivative uptake in vitro, *Laser in Med. Sci.*, 3 : 179-184, 1988.
- 5) 石田武之ほか：種々のポルフィリン誘導体の光増感剤としての分光学的検討，*日本レーザー医学会誌*，10(3)：217-220，1989.
- 6) T., Ishida, N., Miyoshi, et al., : A spectroscopic study of various hematoporphyrin derivatives as photosensitizer, *Photomed. Photobiol.*, 11 : 85-89, 1989.