特集／新しい光感受性物質の特性

循環器系における mono-L-aspartyl chlorin e6 の 診断と治療への応用

Application of Mono-L-aspartyl Chlorin e6 to the Cardiovascular Field

林 潤一¹⁾, 會沢 勝夫²⁾

¹⁾ 杏林大学医学部高齢医学

²⁾ 東京医科大学生理学

Junichi HAYASHI and Katsuo AIZAWA

¹⁾ Department of Gerontology and Medicine, Kyorin University

²⁾ Department of Physiology, Tokyo Medical College

要 旨

光力学的診断・治療はもっぱら癌関連領域で進展してきたが、第1世代ともいえるヘマトポルフィリン誘導体(HPD)を越える優れた光感受性物質の開発と半導体チューナブルレーザー装置などのレーザー機器の発展を背景に、その適応範囲は次第に広がり、循環器領域にも応用されるようになった。クロリン系の新しい光感受性物質 mono-L-aspartyl chlorin e6(NPe6)の特徴を概説し、循環器領域の光力学的治療および診断の現状を解説する。

キーワード：粥状動脈硬化，光感受性物質，ヘマトポルフィリン誘導体（HPD），NP6，
光力学的治療，光力学的診断

Abstract

Photodynamic therapy and diagnosis mainly developed in the field of cancer research. With the advancement of laser science and laser equipments such as a diode laser, photobiology have been introduced into the cardiovascular field. Mono-L-aspartyl chlorin e6 (NP6) is one of newly developed photosensitizers which overcame the first generation photosensitizer, hematoporphyrin derivative. NP6 was recently applied for photodynamic treatment and diagnosis of the atheroma with good results. This article reviews new trends in photodynamic therapy and diagnosis for the atherosclerotic disease.

Key Words : atheroma, photosensitizer, hematoporphyrin derivative (HPD),
NP6 photodynamic therapy, photodynamic diagnosis

緒 言

光感受性物質と医学との関わりは1900年にさかのぼることができる。この年に欧州で Raab¹⁾ が報告した卵巣癌の治療へ光エネルギーを利用する試みが光力学的生体反応を医学へ応用した最初とされる。しかしその後の研究は途絶え、半世紀以上が過ぎた1961年に米国でメイヨークリニックの Lipsson ら²⁾ が、ヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivative : HPD) を用いた成績を報告し、これが契機となり現在みるような癌治療への応用が始まった。表在性早期癌の治療法の一つとして確立されてきた光力学的治療 (Photodynamic Therapy : PDT, Photoradiation Therapy : PRT, Phototherapy) である。光力学的生体反応には光感受性物質とレーザーの2つの要素がある。光感受性物質は光エネルギーを吸収し、高エネルギーレベルの励起状態となった後、再び元の安定したエネルギー準位に戻るが、この際にエネルギー遷移を起こす。その一部は蛍光となり、他の大部分は光化学的反応に費やされる。光力学的治療には後者が利用され、前者の蛍光を用いて光感受性物質の局在を明らかにする試みが光力学的診断 (Photodynamic Diagnosis : PDD) として注目されてきている。レーザーについても、小型・軽量、機動性に優れた半導体レーザーが実用化されるなど、高度先進医療において重要な役割を担うレーザー関連技術は著しく進んでいる。こうした発展のなかで光力学的治療および診断は癌関連領域にとどまらず次第にその範囲を広げ、循環器

領域にも応用されるようになった。本稿では、新しい光感受性物質 mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) を中心に循環器領域の光力学的治療および診断について概説する。

新しい光感受性物質 NPe6 の特徴³⁻¹⁷⁾

歴史的にみて第1世代の光感受性物質ともいえる HPD は最も早く臨床に応用された光感受性物質でもある。1978年 Dougherty ら¹⁸⁾ が原発性および転移性皮膚癌の治療成功例を報告して以来、多くの臨床経験の蓄積と共に HPD のかかえる問題点も明らかにされてきた。NPe6 はその次点を補う新しい光感受性物質であり、ここでは NPe6 の特徴を HPD と対比して述べることにする。

物理化学的特性

NPe6 はクロリン系の代表的な光感受性物質であり、HPD のポルフィリン骨格と異なりクロリン骨格を有する化合物である。クロリン骨格にアスパラギン酸を付加した構造を有し、分子量は871.75 (図1)。暗青緑の単一化合物である。蛍光反応強度に優れ、単峰性の蛍光反応ピークを有し (図2)、水溶性で、安定した化合物である。HPD は水溶液で遮光と凍結保存でも比較的不安定のためその有効期限は6ヶ月と短いのに対し、NPe6 は粉末で遮光と凍結保存により長期安定である。

生体内での活性体

HPD が数種のポルフィリン類の混在したものであるのに対し、NPe6 は単一化合物であり、生体内に吸収されても代謝産物にはならず、それ自体が活性体である。HPD はhematoporphyrin(HP)を酸触媒アセチル化し、アルカリ化して作製するため、HP, protoporphyrin

図1 NPe6の構造式

図2 NPe6の蛍光スペクトル(右側)

図3 NPe6 静注後の血中濃度の時間経過

(PP), hydroxyethylvinyldeuteroporphyrin (HVD), Dihematoporphyrin ether or ester (DHE) が混在し、生体内で光感受性物質として活性を示すのは DHE とされる。

生体内分布

静脈内投与後 NPe6 は 1 : 3 でアルブミンとリポ蛋白に結合し、リポ蛋白との結合においては HDL:LDL = 5 : 1 である。HPD もアルブミンとリポ蛋白とに結合するが、成分によって結合性は異なり、HP や HVD は主としてアルブミンに、DHE は主としてリポ蛋白に結合し、リポ蛋白との結合においては HDL:LDL = 1 : 1 である。

静脈内投与後、HPD の一部は長期にわたり血中に存在 (2 ~ 10%) し、正常組織停滞時間も長い。正常組織においてはクッパー細胞、マクロファージ、肥満細胞にその多くが取り込まれている。一方、水溶性である NPe6 は血中よりすみやかに消失し (図 3)、その後、正常組織からは殆ど消失する。しかし粥状動脈硬化巣に優れた集積性を示し、正常動脈壁と粥状動脈硬化壁との NPe6 の濃度比は投与 6 時間後に 1 : 10.4、24 時間後に 1 : 20.8 と高いが、HPD の濃度比は 6 時間後に 1 : 2.6、24 時間後に 1 : 3.1 と低い¹⁷⁾。

吸収波長帯

HPD の主たる吸収波長帯 (Soret 帯) は 360 ~ 410nm の近紫外部にある。一般に Soret 帯を用いれば治療や

図4 NPe6 の吸収スペクトル

診断のために光感受性物質を効率良く励起できる。従って HPD の励起に波長 406nm のクリプトンレーザーなどが利用されてきた。しかし HPD の Soret 帯がある 400nm 前後にはヘモグロビンなどの吸収帯もあるため、治療の際に照射エネルギーが高くなった場合、レーザーのヘモグロビンへの影響が問題となる。また一般に紫外部の光は組織に様々な影響を及ぼすため、この波長帯を避け、できるだけ長波長側のレーザーが臨床には望ましい。従って吸収効率は格段に低下するが、Soret 帯のかわりに Q 帯が用いられる。HPD には可視部に 506, 538, 565, 610nm の弱い吸収帯 (Q 帯) があり、長波長側の 610nm の吸収帯が励起に用いられてきた (組織中では吸収帯はいずれも約 10nm ほども長波長側にシフトする)。初期は赤色光照射 (波長 > 600nm) がその励起に用いられ、その後 630nm の波長を有するアルゴン色素レーザーや 625nm のエキシマ色素レーザーが利用された。

NPe6 には燐酸緩衝液中で近紫外部に 400nm の強い吸収帯 (Soret 帯) と可視部に 502, 602, 654nm の弱い吸収帯 (Q 帯) がある³⁾ (図 4)。従って Soret 帯を用いて NPe6 を励起する場合には HPD と同じ問題が生じる。

NPe6 と HPD の大きな違いは、Q 帯の吸収強度にある。HPD の 610nm の吸収強度は Soret 帯の 1/15 と著しく低いのにに対し、NPe6 の 654nm の吸収強度は Soret 帯の 1/5 と比較的強く、しかも HPD より長波長側へ 40nm 以上もシフトしている。このことは NPe6 を励起するレーザーが組織深達性に優れていることに寄与する。

励起レーザーの組織深達性

HPD の励起レーザーの 630nm の波長では組織透過

性は1～3mmで、514nmでは0.5～1.5mmといわれ、表層部分しか光は到達しない。血管内面からの照射であれば粥状動脈硬化巣をカバーできる深度を得られそうだが、実際には血流が吸収してしまう欠点があり、また血管外面からの照射では不十分な深達度である。ただし、治療効果は波長特性に加え、レーザー光の強度、組織内薬物濃度、組織内散乱などに影響されるので励起レーザーの波長のみでは光学的治療の効果を予測できない。

照射エネルギー

粥状動脈硬化巣の光学的治療に必要なエネルギー量については確立していない。光感受性物質の種類や投与量、レーザーの種類、連続波かパルス波か、血管内照射か血管外照射か、また血管内照射でも血流がある場合と生食水でフラッシュした状態かなどの照射方法で、光感受性物質の体内動態にもとずき投与何時間後にレーザーを照射するか、などで異なってくると考えられる。

皮膚光線過敏症

HPDの毒性は肝障害が主である。肝障害を起こさない治療投与量でも正常組織に取り込まれしかも長く留まり、皮膚光線過敏症を起こす。そのため術中は全身をガウンで遮光し、その後も1ヵ月近く強い光を遮断した生活が必要とされる。

NPe6は血中から速やかに消失し、正常組織からも12～24時間後には消失するので、皮膚光線過敏症には投与日に注意が必要であろう。

NPe6の循環器領域への応用

光感受性物質の循環器領域への応用は、HPDの研究がもっぱら癌治療に向けられていた1983年に、実験的に作成した粥状動脈硬化巣にHPDが集積することをSpearsら¹⁹⁾が報告したのが最初である。以後、Kessel, Spokojny, Pernes, Deletireらの同様の報告²⁰⁻²³⁾が相次いだ。

粥状動脈硬化巣の光学的治療

粥状動脈硬化巣に対する光学的治療の試みは1985年Litvackら²⁴⁾が、コレステロール食による粥状動脈硬化家兎にHPD 5～20mg/kgを投与後、血管内カテーテルを介して胸部大動脈あるいは大動脈弓部にパルス波エキシマレーザー(636nm)を照射したのが最初である。その後1987年Pollockら²⁵⁾、1988年Neave²⁶⁾らが、赤色レーザーを照射して粥状動脈硬化巣に集積したHPDを励起し、組織学的変化を検討し、プラークの偏

平化や色調の変化、蒸散効果の増強、アテロームの除去など軽度から著効まで様々な程度の光学的治療効果を報告した。しかし、癌のような重症例の治療においては皮膚光線過敏症や長期の遮光生活などの好ましからざる要因も相対的に許容されるが、致死疾患とはいえ循環器系における心筋梗塞などの発生母胎である動脈硬化症は慢性経過であるため、動脈硬化性疾患患者への応用においては副作用は極力避けねばならない。HPDの皮膚光線過敏症は循環器領域へ臨床応用する場合には大きな壁になると思われる。

この点で興味深いのはテトラサイクリン系による光学的治療であろう。1985年Murphy-Chutorianら²⁷⁾はヒト動脈硬化巣にテトラサイクリンが集積し、その最大吸収波長が355nmであることから、Nd:Yagレーザーの第3高調波の355nmを用いて、動脈硬化巣蒸散がテトラサイクリン処理により有意に増強されることを示した。近年、ドキシサイクリンが検討されているが、これらは抗生物質としてその薬効薬理・副作用が明らかであり、臨床応用のうえでHPDに較べて有用といえる。しかし、励起レーザーの波長が紫外部のためレーザーそのものによる組織傷害が問題となろう。

我々は癌の治療を目的に開発されたクロリン系のNPe6が動脈硬化巣に蓄積することを認め報告²⁸⁻³¹⁾してきたが、NPe6は光学的治療にSoret帯の1/5の吸収強度を持つ664nmの吸収帯を利用できるので、励起効率が高く、励起レーザーの組織透過性もよく、血管内視鏡的にアプローチできるだけでなく、血管外からの照射でも血管内膜側までレーザーが到達する利点がある。これまで、我々の検討では、粥状動脈硬化巣の内皮細胞間隙の開大、泡沫細胞の遊走、内皮下組織の繊維網などを認めている²⁸⁾。

粥状動脈硬化巣の光学的診断

粥状動脈硬化巣に集積したHPDが近紫外レーザー光で励起された赤色蛍光を発することを認め、粥状動脈硬化巣をin vitroで検知したのが粥状動脈硬化巣の光学的診断の始めであろう。

我々はNPe6を用いて様々な血管の粥状動脈硬化巣の光学的診断をin vivoで試みた。

胸部大動脈の粥状動脈硬化巣の血管内視鏡的診断においては、血管内から血管内視鏡により粥状動脈硬化を分光学的に診断できることを報告した(図5)¹⁷⁾。

腹部大動脈の粥状動脈硬化巣の腹腔鏡的診断においては、血管外から腹腔鏡的に粥状動脈硬化を分光学的に診断できることを報告した(図6)²⁹⁾。

図5 血管内視鏡的アプローチによる胸部大動脈の粥状動脈硬化部位（星印）から得られた特異的蛍光スペクトル（674nm）

図6 腹腔鏡的アプローチによる腹部大動脈の粥状動脈硬化部位の外膜側（星印）から得られた特異的蛍光スペクトル（674nm）

SCHEME OF TWO - DIMENSIONAL IMAGING SYSTEM

図7 二次元画像化装置

蛍光手術顕微鏡を開発し、特異的に冠動脈の粥状動脈硬化巣に取り込まれた NPe6 を励起し、赤色蛍光を発生させその局在を診断できることを報告した³¹⁾。

大動脈弓部の粥状動脈硬化巣を無侵襲的に画像化できる可能性を報告した³¹⁾。即ち、同じ電磁波とはいえ0.1 nm 前後のX線と異なり380～780nm の可視光は生体を通り難いが、正常家兎各部でのパルス型 YAG-Dye レーザーの透過性を検討したところ、可視領域のレーザーが微弱ながら生体組織を透過し、紫外より赤外領域の長波長側のレーザーほど透過しやすいことが明らかになった。そこで粥状動脈硬化家兎に NPe6 を静脈投与し6時間後に664nm レーザーを胸部大動脈に照射し、大動脈弓部の二次元画像を CCD カメラで撮影したところ（図7）、胸部大動脈の画像と大動脈弓部で透過度が低下した濃淡像が得られた。組織に集積した光感受性物質は、その特異的吸収波長帯に合致する波長のレーザー

が生体組織を透過する際その光を吸収するので、光感受性物質のある部の透過効率は著しく低下する。光感受性物質を光透過にコントラストを与える光造影剤として用いた試みである。

循環器領域における展望

光力学的治療や診断には、目的とする組織に選択的に取り込まれる光感受性物質と、その光感受性物質を励起するためにその光感受性物質の持つ特異的吸収波長帯に一致した単波長の光を発信できるレーザー装置、の両者が必要で、いずれが欠けても診断・治療は不可能である。

これまでレーザー装置が発振できるレーザーの波長が特定されていたため、優れた光感受性物質が開発されてもその Soret 帯を励起できるレーザーがなければ役に立たず、光感受性物質の開発に制限があった。しかし最近、波長可変のチューナブルレーザー装置が開発され、

特定の波長帯しか使えないといった制限から解かれつつある。優れた特性を持つ新しい各種の光感受性物質の開発が積極的に行われる条件が整いつつあるといえよう。

新たに開発される光感受性物質に求められる特徴は、高純度に合成でき、単一化合物であるもの。保存が容易で、寿命の長いこと。血中および正常組織からの消失率が高いこと。粥状動脈硬化巣に対する集積性・局在性が高いこと。細胞毒性が低いこと、特に肝腎障害のないこと。吸収波長帯が長波長側にあり組織あるいは水の吸収帯を避け組織透過性が高いこと ($600\text{nm} < \lambda < 700\text{nm}$)。励起レーザーの吸収効率が低いこと。強い光化学反応があること、つまり標的細胞を確実に傷害できることなどであり、更に治療が終了したら失効させることのできる不活化剤があれば臨床使用を助け、ヒトと動物での体内動態が同じであれば作用機序の解明などに役立つと考えられる。NPe6 はこれらの特徴を一部有しており、また、NPe6 は副作用が少なく診断と治療のいずれにも用いることができるが、組織傷害を起こさない光感受性物質は診断専用として有用であり、これらの開発も今後必要であろう。

近年、光量子レベルで検知できる光測定装置が開発されたことから光感受性物質を用いた新たな展開を期待できる。既に可視領域レーザーの生体透過性を利用して生体機能計測、生体内の情報を無侵襲に得る光 CT が注目され、ヘモグロビン酸素飽和度の変化から脳の機能を探る頭部光 CT の試作機ができていますが、もし特定の部位に集積する光感受性物質があれば、造影剤を光感受性物質に、X線をレーザーに置き換え、レーザーの透過にコントラストを与え、極微弱な光を検知して二次元画像計測するコントラスト光 CT が可能であろう。我々は粥状動脈硬化を画像化できる可能性を示したが、光 CT を用いて粥状動脈硬化巣の画像診断が無侵襲にできれば、動脈硬化を背景に発症してくる成人病を予防する観点から、各人の動脈硬化の評価法としても役立ち、おそらく副作用はX線使用より格段に少なく、人間ドックを含め、スクリーニング法として多数の該当者を評価できよう。今後期待できる領域といえよう。

文 献

- 1) Raab C : Über die Wirkung fluoreszierenden Stoffe auf Infusoria, Z Biol, 39 : 524-526, 1990.
- 2) Lipson R, Baldes E and Olsen A : The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection, J Natl Cancer Inst, 26 : 1-8, 1961.
- 3) Aizawa K, Okunaka T, Ohtani T, et al :

Localization of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in mouse tissues, Photochem Photobiol, 46 : 789-793, 1987.

- 4) Nelson JS, Roberts WG and Berns MW : In vivo studies on the utilization of mono-L-aspartyl chlorin (NPe6) for photodynamic therapy, Cancer Res, 47 : 4681-4685, 1987.
- 5) Roberts WG, Shiau F-Y, Nelson JS, et al : In vitro characterization of monoaspartyl chlorin e6 and diaspartyl chlorin e6 for photodynamic therapy, J Natl Cancer Inst, 80 : 330-336, 1988.
- 6) Nelson JS, Liaw L, Orenstein A, et al : Mechanism of tumor destruction following photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative, chlorin, and phthalocyanine, J Natl Cancer Inst, 80 : 1599-1605, 1988.
- 7) Roberts WG and Berns MW : In vitro photosensitization I. Cellular uptake and subcellular localization of mono-L-aspartyl chlorin e6, chloro-aluminum sulfonated phthalocyanine, and photofrin II, Lasers Surg Med, 9 : 90-101, 1989.
- 8) Roberts WG, Liaw L-HL and Berns MW : In vitro photosensitization II. An electron microscopy study of cellular destruction with mono-L-aspartyl chlorin e6 and photofrin II, Lasers Surg Med, 9 : 102-108, 1989.
- 9) Kimel S, Tromberg BJ, Roberts WG, et al : Singlet oxygen generation of porphyrins, chlorins, and phthalocyanines, Photochem Photobiol, 50 : 175-183, 1989.
- 10) Roberts WG, Smith KM, McCullough JL, et al : Skin photosensitivity and photodestruction of several potential photodynamic sensitizers, Photochem Photobiol, 49 : 431-438, 1989.
- 11) Kessel D : Determinants of photosensitization by mono-L-aspartyl chlorin e6, Photochem Photobiol, 49 : 447-452, 1989.
- 12) Gomer CJ and Ferrario A : Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model, Cancer Res, 50 : 3985-3990, 1990.
- 13) Aizawa K, Kadowaki O, Kawabe H, et al : Effects of NPe6 or photofrin II with subsequent exposure to light, Lasers in the Life Sciences,

- 3 : 187-196, 1990.
- 14) Ferrario A, Kessel D and Gomer CJ : Metabolic properties and photosensitizing responsiveness of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model. *Cancer Res*, 52:2890-2893, 1992.
- 15) Kessel D, Whitcomb LK and Schulz V : Lipoprotein-mediated distribution of N-aspartyl chlorin e6 in the mouse. *Photochem Photobiol*, 56 : 51-56, 1992.
- 16) Lui H and Anderson RR : Photodynamic therapy in dermatology : Recent developments. *Dermatologic Clinics*, 11 : 1-13, 1993.
- 17) Yasunaka Y, Aizawa K, Asahara T, et al : In vivo accumulation of photosensitizers in atherosclerotic lesions and blood in atherosclerotic rabbit. *Lasers in the Life Sciences*, 4 : 53-65, 1991.
- 18) Dougherty TJ, Kaufman JK, Goldfarb A, et al : Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res*, 38:2628-2635, 1978.
- 19) Spears JR, Serur J, Shropshire D, et al : Fluorescence of experimental atheromatous plaques with hematoporphyrin derivative. *J Clin Invest*, 71 : 395-399, 1983.
- 20) Kessel D and Sykes E : Porphyrin accumulation by atheromatous plaques of the aorta. *Photochem Photobiol*, 40 : 59-61, 1984.
- 21) Spokojny AM, Serur JR, Skillman J, et al : Uptake of hematoporphyrin derivative by atheromatous plaques : Studies in human in vitro and rabbit in vivo. *J Am Coll Cardiol*, 8 : 1387-1392, 1986.
- 22) Pernes JM, Brault D, Angel CY, et al : Comparative study of the selective uptake of hematoporphyrin derivative components into experimental atheromatous plaques: Potential for laser angioplasty. *J Intervent Radiol*, 3 : 3-8, 1988.
- 23) Delettre E, Brault D, Bruneval P, et al : In vitro uptake of dicarboxylic porphyrins by human atheroma. Kinetic and analytical studies. *Photochem Photobiol*, 54 : 239-246, 1991.
- 24) Litvack F, Grundfest WS, Forrester JS, et al : Effects of hematoporphyrin derivative and photodynamic therapy on atherosclerotic rabbits. *Am J Cardiol*, 56 : 667-671, 1985.
- 25) Pollock ME, Eugene J, Hammer-Wilson M, et al : Photosensitization of experimental atheromas by porphyrins. *J Am Coll Cardiol*, 9 : 639-646, 1987.
- 26) Neave V, Giannotta S, Hyman S, et al : Hematoporphyrin uptake in atherosclerotic plaques: Therapeutic potentials. *Neurosurgery* 23 : 307-312, 1988.
- 27) Murphy-Chutorian D, Kosek J, Mok W, et al : Selective absorption of ultraviolet laser energy by human atherosclerotic plaque treated with tetracycline. *Am J Cardiol*, 55 : 1293-1297, 1985.
- 28) Hayashi J, Sato H, Aizawa K, et al : Photodynamic therapy of atheroma using a new photosensitizer. *International Conference of Photodynamic Therapy and Medical Laser Applications*, Milan, Italy, June, 1992.
- 29) Hayashi J, Kuroiwa Y, Sato H, et al : Transadventitial localisation of atheromatous plaques by fluorescence emission spectrum analysis of mono-L-aspartyl chlorin e6. *Cardiovasc Res* (in press)
- 30) Hayashi J, Aizawa K, Kuroiwa Y, et al : Accumulation of mono-L-aspartyl chlorine e6 on atherosclerotic lesion in the aorta and the coronary artery of rabbits. *11th International Congress on Photobiology*, Kyoto, Japan, September, 1992.
- 31) Hayashi J, Sato H, Aizawa K, et al : Imaging of the atherosclerotic aorta by YAG-Dye laser. *11th International Congress on Photobiology*, Kyoto, Japan, September, 1992.