光感受性物質Mono-L-aspartyl chlorin e6(NPe6)のレーザーによる photobleachingに関する解析

渋谷 洋¹、斉藤光一^{2、3}、黒岩ゆかり^{2、3}、勝海東一郎^{1、2}、
會沢勝夫²、加藤治文¹

東京医科大学外科¹、東京医科大学生理²、明治製菓・薬総研³

Analysis Of Laser Photobleaching By Photosensitizer Mono-L-aspartyl chlorin e6(NPe6)

Hiroshi Shibuya¹, Yukari Kuroiwa^{2,3}, Toichiro Katsumi^{1,2}, Katsuo Aizawa², and Harubumi Kato¹.

Depts of Surgery¹ and Physiology², Tokyo Medical College
Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd.³

Because of absorption band and tissue distribution properties, Mono L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) is looked to as the useful photosensitizer for PDT. It is well known that NPe6 produces free radicals that induce tumor response. We performed quantitative analysis of NPe6 in saline using a diode laser (664nm). Our experiments showed the degradation rate of NPe6 solution of 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 $\mu\text{mol/l}$ exposed to 100mW and 100J light were around 60 %. Otherwise the degradation rate of NPe6 solution of 12.5 $\mu\text{mol/l}$ exposed to 50, 100, 150 mW and 100J light were also around 60 %. When absorbance at 654 nm decreased, the fluorescence of NPe6 at 664nm also decreased. Cleavage of the tetra pyrole structure was suggested.

Photobleaching of NPe6 did not depend on the initial concentration of NPe6 and laser power.

1. 緒言

近年、chlorinは光線力学的治療(PDT)の可能性を持つ光感受性物質として興味を持たれている。特に、NPe6は吸収波長が長波長であること、腫瘍集積性が優れていることなど、その光生理、生化学的な特性から、癌に対する PDT への応用

が期待されている。生体内で波長 664nm のレーザー光により励起された NPe6 は周辺の酸素分子にエネルギーを移行して 1 重項酸素を生成させ制癌効果を示すことが知られている。今回我々は波長 664 nm のダイオードレーザー励起による NPe6 の光化学反応に必要なエネルギー量を、

photobleaching に消費されたフォトン数と分解された NPe6 分子数との関係という観点からの解析を試みた。

2. 実験材料および実験方法

光感受性物質として用いた NPe6 は分子式が $C_{38}H_{37}N_3Na_4O_9$ で分子量 799.70 の単一で極めて安定な化合物である。構造式を [Fig.1] に示す。NPe6 の吸収帯は Soret 帯が 405nm、最長波長の Q 帯が 645 nm に各々存在している。これらの吸収帯はテトラピロール環構造に由来し、生理食塩水中で励起すると 664nm に蛍光を発することが知られている。今回の報告においてはこの Q 帯の減少、即ちテトラピロール環構造の開裂を NPe6 の photobleaching とみなした。[Fig.2] に NPe6 とビリルビンの蛍光吸収スペクトルを示す。

[Fig.1]

Mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6)

レーザーは波長 664nm を供給するダイオードレーザー装置（松下産業機器）を使用した。1 cm 角のキュベットに種々の濃度の NPe6 生理食塩水溶液 2 ml を入れ、キュベット側面約 2 cm の距離からレーザーを照射した。キュベッ

[Fig.2]

トを通過したレーザー光のエネルギーは対側面から約 3 cm の所に設置したパワーメーターにより測定した。生理食塩水への吸収、キュベット表面での散乱等を較正するため、パワーメーター入力エネルギーを 100mW となるようにレーザー照射出力を設定し、これをレーザー出力とした。NPe6 に吸収された総エネルギー量は初期設定エネルギー量と通過エネルギー量との差を計算することにより求めた。NPe6 に吸収された光子数は次に示される数式により求められる。

$$N = E / (hc / \lambda)$$

N は消費光子数、E は吸収されたエネルギー、h はプランク定数、c は光子速度、 λ は照射光の波長を示す。例えば、波長 664nm、100mW、100J の照射光における総光子数は、 3.34×10^{20} 個となる。各実験の計測値を前述の数式に入力して光子数を求めた。

photobleaching を受けた NPe6 の分子数は以下にしたがって求めた。

各濃度の NPe6 溶液についてレーザー照射前後の吸収スペクトルを測定し、[Fig.3] に示され

段階では photobleaching と PDT の直接的な関係が未だに明らかではないが、光化学反応という見地に立てば、本実験は NPe6 とダイオードレーザースステムの組み合わせによる PDT の至適条件決定の一助になると考えられる。今後 NPe6 における光化学反応の type I、type II の割合、クロリン環の開裂と活性酸素生成の関連性についてより深い研究が必要とされる。

5. 文献

1) Aizawa, K., Okunaka, T., Ohtani, T., Kawabe, H., Yasunaka, Y., O'hata, S., Ohtomo, N.,

Nishimiya, K., Konaka, C., Kato, H., Hayata, Y., Asito, T. (1987) Localization of Mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in mouse tissues. In Photochemistry and Photobiology vol. 46, No. 5, 789-793

2) Spikes, J. D. (1992) Quantum yield and kinetics of the photobleaching of Hematoporphyrin, Photofrin II, Tetra(4-sulfonatophenyl)-porphine and Uroporphyrin. In Photochemistry and Photobiology vol. 55, No. 6, 797-808

3) Gross, E., Ehrenberg, B., Johnson, F. M. (1993) Singlet oxygen generation by Porphyrins and the kinetics of 9,10-Dimethylanthracene photosensitization in liposomes. In Photochemistry and Photobiology vol. 57, No. 5, 808-813

4) Spikes, J. D., Bommer, J. C. (1993) Photobleaching of Mono-L-Aspartyl Chlorin e6 (NPe6): A candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors. In Photochemistry and Photobiology vol. 58, No. 3, 346-350

[Fig.3]

る検量線に従ってその 650nm 付近での極大吸収における吸光度の比から photobleaching を受けずに残存した NPe6 濃度を求めた。次に、これをレーザー照射前の既知の NPe6 濃度から差し引いて photobleaching を受けた NPe6 濃度を算出し、さらにアボガドロ数をかけて求めた。

実験 1 は photobleaching に要する光子数の NPe6 濃度依存性を検索した。レーザー出力、照射量を各々 100mW、100J に固定し、NPe6 濃度を 3.13、6.25、12.5、25.0、50.0、100 $\mu\text{mol/l}$ と変化させた。

実験 2 は photobleaching に要する光子数のレーザー出力依存性を検索した。NPe6 濃度、レーザー照射量を各々 12.5 $\mu\text{mol/l}$ 、100 J に固定し、レーザー出力を 50、100、150 mW と変化させた。

3. 結果および考察

NPe6 溶液にレーザーを照射すると、NPe6 の環構造に由来すると考えられる 650 nm 付近の吸光度が減少した。これらにより NPe6 のクロリン環はレーザーにより開裂したと考えられた。

[実験 1]

photobleaching に要する光子数と NPe6 濃度との関係を [Fig. 4] に示す。X軸は NPe6 濃度を、Y軸は photobleaching を受けた NPe6 1 分子当たりの光子数を表示した。グラフ中の直線は方程式

$$Y = 4628.606 X^{-0.025}$$

で表される各プロットの回帰直線を示す。

NPe6 1 分子を分解するのに要した光子数は NPe6 の濃度によらず約 5×10^3 個であった。

[Fig.4]

[実験 2]

photobleaching に要する光子数とレーザー照射量との関係を [Fig. 5] に示す。X軸はレーザー出力を、Y軸は photobleaching を受けた NPe6 1 分子当たりの光子数を常用対数で表示してある。実験 1 の結果と同様に NPe6 1 分子を分解するのに要する光子数はレーザー出力によらず約 5×10^3 個であった。

4. まとめ

今回我々は光子数と photobleaching を受けた NPe6 分子に着眼した実験系を組んだ。NPe6 に吸収される光子数と分解される NPe6 の分子数比は NPe6 濃度およびレーザー出力に関係なく約 5000 個で、ほぼ一定である事が示唆された。現