新しい光感受性物質 meta-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin(m-THPC)の 生体内分布に関する研究

筒井英光、曾沢勝夫*、奥仲哲弥、渋谷 洋、イリアル・X*、古川欣也、山田公人、酒井治正、
小中千守、加藤治文

東京医科大学外科第一講座、*同第二生理

BIODISTRIBUTION AND PHOTODYNAMIC POTENCY OF m-THPC

Hidemitsu Tsutsui, Katsuo Aizawa*, Tetsuya Okunaka, Hiroshi Shibuya, Ilyal Xiahedini*, Kinya Furukawa,
Kimito Yamada, Harumasa Sakai, Chimori Konaka, Harubumi Kato

Department of Surgery, *Physiol, Tokyo Medical College

Abstract: Photofrin is the only photosensitizer which has been given governmental approval and is currently put to clinical use. However, the fact that Photofrin is not a single compound, that the absorption at over 600nm is extremely low and that there is the possibility of skin photosensitivity are a few of the specific problems that have become an issue. For more effective clinical application, second-generation sensitizers such as Mono-L-aspartyl chlorin e₆ and ALA are being developed, moreover meta-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin (m-THPC) is evaluated as one of the most promising photosensitizers. In Europe, Phase I study of m-THPC has already proceeded, although there are many unacknowledged facts such as the biodistribution of the drug. As regards to studies in Japan, no published results have been reported. The accumulation of m-THPC on the tumor and the normal internal organs were measured by a fluorescence analyzing microscope system.

1×10⁶ Meth-A fibrosarcoma cells were transplanted into the right hind legs of 4-week old male BALB/c mice (fed on chlorophyll free food). Approximately one week after transplantation, a tumor measuring about 10mm in diameter and about 5mm in height was developed. After an intravenous injection of m-THPC at a dose of 1mg/kg, the normal internal organs and the tumor were extracted from the body at 24, 48, 72, 96, 120 hours. M-THPC which was accumulated in each of the internal organs was excited with 420nm and its fluorescence image was recorded.

In comparison with the other internal organs, the fluorescence in the tumor showed the maximum amount continuously after 48 hours after administration. The highest intensity of fluorescence in the tumor was observed 24 hours after administration, decreasing with the lapse of time but still after 120 hours, 70% of the fluorescence observed at the highest intensity retained. The fluorescence in the skin showed the same intensity as in the tumor after 24 hours administration, but decreased after 48 hours showing 80% of the fluorescence intensity compared with the tumor. This ratio of tumor to skin retained until 120 hours. The fluorescence in the liver showed approximately the same intensity as the muscle at 24 hours after administration. The fluorescence could not be identified after 48 hours, but after 72 hours and 96 hours fluorescence was visible but also weak. The fluorescence intensity in the muscle retained until after 72 hours but decreased to half at 96 hours and retained its intensity even after 120 hours. The ratio of the fluorescence intensity of tumor to muscle was approximately 5 to 1 until after 72 hours, subsequently increasing to 10 to 1 after 96 hours. The fluorescence in the brain could not be observed at either point.

In conclusion, after 24 hours administration, each internal organ showed the highest accumulation of m-THPC, followed by a very slow decrease, resulting to only the slightest change in biodistribution from after 96 to 120 hours.

1. 緒言

Photofrinを光感受性物質として用いたエキシマダイレーザーによる光線力学的治療法(PDT)は平成6年11月に厚生省の認可を受け、新しい癌治

療法としての地位が確立されつつある¹⁾。しかし、

Photofrinは単一の化合物ではないこと、ヘモグロビンの吸収帯を避けることの出来る600nm以上での吸収が小さいこと、皮膚の光過敏性を生

ずることなどの問題を持っている²⁾。これらの諸問題を解決すべく、Mono-L-aspartyl chlorin e⁶³⁾、ALA⁴⁾等の第2世代の腫瘍親和性光感受性物質が開発されているが、クロリン系の光感受性物質である meta-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin(m-THPC)も有望な物質の1つである。m-THPCは既にヨーロッパにおいて、Phase I studyが開始されているが⁵⁾、本剤の生体内分布など不明な点は多く、本邦での報告もない。我々はm-THPCの癌および正常臓器への集積を手術顕微鏡蛍光画像解析システムによって観察した。

II. 研究方法

1. 実験動物

4週齢のBALB/c雄性マウス(17~20g)の右大腿部皮下にMeth-A線維肉腫細胞 1×10^6 個を移植し、約1週間で腫瘍径8~10mm、高さ5mmとなった担癌マウスを作製した。

2. 光感受性物質 (m-THPC)

本研究で使用した m-THPC(Scotia Pharmaceuticals Ltd, Guildford, UK)はクロリン環の周辺にフェノール基が4つ付いた構造であり、分子量は680.76である(Fig.1)。

Fig.1 Chemical Structure of m-THPC

3. 実験方法

m-THPCを担癌マウスの尾静脈より体重1kgあたり1mg投与し、投与後24、48、72、96、120時間の各時点でエーテル麻酔下に犠牲死させ、種々正常組織および腫瘍を摘出した。それぞれのm-THPCを波長420nmで励起した蛍光画像を手術顕

微鏡蛍光画像解析システムを用いて観察すると共に、その蛍光強度を測定し蛍光強度の検量線に対応させ集積状態を比較した。

4. 手術顕微鏡蛍光画像解析システム

手術顕微鏡(TOPCON.OMS-600)を改造してシステムを作製した(Fig.2)。水銀ランプ光を問腔ファイバーに導入し、420nmのバンドパスフィルターにて波長を選択し、m-THPCの励起に用いた。各組織に集積したm-THPCの表面蛍光は550nm以下の波長をカットするハイパスフィルターにより励起光の入力を除き、モノクロCCDカメラによって撮影した。映像はS-VHSビデオで記録し、その蛍光画像はMediaGrabber2.2を用いてコンピュータに取り込み、NIH Image1.57で解析した。蛍光強度は1ピクセル当たりの256段階のグレー値の平均として示した。

Fig.2 手術顕微鏡蛍光画像解析システム

III. 研究結果

1. 吸収および蛍光スペクトル測定

m-THPC、Photofrin、ヘモグロビンの吸収スペクトルを示す(Fig.3)。m-THPCの溶媒は99.6%エタノール2gとポリエチレングリコール400 3gを蒸留水で10mlと希釈したものをを用いた。PhotofrinはPBS中のものを示す。m-THPC溶液中の吸収帯は420nmのSoret帯、519、545、597、651nmのQ帯にそれぞれピークを示す。PhotofrinはPBS中において、ヘモグロビンへの吸収の少ない600nm以上では620nmに小さなQ帯を持つに過ぎない。対してm-THPCは650nm付近にPhotofrinと比べ、

約8倍の大きな吸収帯を持つ。これはPDTを行う際にヘモグロビンの吸収帯を避けることが出来ると同時に励起効率が為に有利であることを示している。

m-THPC溶液をSoret帯の420nmで励起したときの蛍光スペクトルを示す(Fig.4)。スペクトルは単峰性であり、ピーク蛍光波長は652nmであった。

Fig.3 The Absorption Spectra of Photosensitizers

Fig.4 m-THPC FLUORESCENCE

写真1 TUMOR IMAGES

2. 蛍光観察

パソコン内に取り込んだ腫瘍の画像を示す(写真1)。マウス右後足の移植腫瘍の白色光における画像をAに、同部位の蛍光画像をBに示した。腫瘍に集積したm-THPCの蛍光が認められる。また、摘出した腫瘍の断面の蛍光画像をCに示した。

3. 蛍光スペクトルによる経時的臓器集積状態の解析

腫瘍、皮膚、肝臓、筋肉、脳の蛍光強度を経時的に示す(Fig.5)。

Fig.5 m-THPC DISTRIBUTION

m-THPC投与後の時間を横軸に、蛍光強度を縦軸に示した。投与前における各臓器の蛍光は自家蛍光を示しており、皮膚のみで認められた。m-THPCの蛍光は投与後48時間以後、いずれの時点においても他臓器と比べ腫瘍に高く観察された。腫瘍の蛍光強度の最高値は投与後24時間で生じ、時間経過と共に減少したが、120時間後においても最高値の約70%の蛍光を認めた。皮膚の蛍光強度は投与後24時間で腫瘍と同程度に認められたが、48時間以後は減少し、腫瘍の約80%の蛍光値を示し、この比率は120時間後まで変わらなかった。肝臓の蛍光は投与後24時間で筋肉とほぼ同じ強度で観察され、48時間後では観察されず、再び72時間、96時間後に小さな蛍光として観察された。筋肉の

蛍光強度は72時間後まではほぼ同じ値を示したが、96時間では約半分に減少し、120時間後も変わらなかった。腫瘍と筋肉の蛍光強度の比をとると、72時間後までは約5倍、96時間以後が約10倍であった。脳の蛍光は、いずれの時点においても観察されなかった。

IV. 考察

吸収スペクトル測定の結果より、m-THPCの最長波長吸収帯は651nmにあり、Photofrinの最長吸収ピークに比べ31nm程、長波長側にシフトしていた。また、m-THPCの最長波長での吸光度はPhotofrinの8倍以上であった。これは癌組織内の血流中のヘモグロビンの吸収帯を避けることが出来るという点、より長波長側での励起が可能なので、深い組織浸透性を持つレーザー波長を使用できるという点、また吸収が大きいので、励起効率が良いという点で、PDTに際し、Photofrinよりも有利である可能性を示している。

担癌マウスを用いたm-THPCの生体内分布の実験において、48時間以後はいずれの時点においても、他の臓器と比べ腫瘍は高い集積状態を認めた。

我々は皮膚の蛍光をマウスの毛の自家蛍光の影響を除く為、切除した皮膚を皮下側より観察したが、皮下脂肪組織へのm-THPCの集積があり、毛剃りを完全に行った皮膚の表面蛍光よりは高く測定されていた。

肝臓の蛍光は低かったが、これは肝臓が血液を多く含む臓器であり、今回の実験が420nm励起であることより、レーザー光がヘモグロビンに吸収されてしまった為であると考えられる。また、48時間後には認められなかった肝臓の蛍光は72、96時間後において観察された。これはm-THPCの生体内分布において、肝臓に集積後、胆道系を経て腸管から排泄される間にその一部が小腸で再吸収され肝臓に戻るといった腸肝循環の関与が推測される。

脳の蛍光はいずれの時点においても観察されなかったことより、m-THPCがBBB(血液-脳関門)を通過しない薬剤であることが示された。

以上より、m-THPCは投与後24時間で各臓器に最も高い集積を示した後、緩やかに減少するが、96時間から120時間後にかけては生体内分布の変化は少ないことが示唆された。しかし、有効性と選択性を鑑みたPDTの最適施行時期の決定には今後の研究が必要である。

V. 文献

- 1) H.Kato, et al. Photodynamic Therapy for Cancers - A Clinical Trial of Porfimer Sodium in Japan, *Jpn.J.Cancer.RES.* 84,1209-1214, November 1993
- 2) T.Katsumi, K.Aizawa, H.Kato, et al. Photodynamic Therapy Using a Diode Laser with Mono-L-aspartyl Chlorin e6 for Implanted Fibrosarcoma in Mice, *Jpn.J.Cancer.RES.* 85, 1165-1170, November, 1994
- 3) K.Aizawa, T.Okunaka, H.Kato, et al. Localization of Mono-L-aspartyl Chlorin e6 in Mouse Tissues, *Photochemistry and Photobiology* Vol.46, No.5, 789-793, 1987
- 4) J.C.Kennedy, R.H.Pottier, et al. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy, *J.Photochem.Photobiol.B*, Vol.14, 275-292, 1992.
- 5) H.-B.Ris, H.J.Altermatt, B.Nachbur, J.C.M.Stewart, Q.Wang, C.K.Lim, R. et al. Effect of drug-Light Interval on PDT with m-THPC in malignant mesothelioma, *Int.J. Cancer*, 53, 141-146, 1993.