超音波照射による光増感剤(ATX-70)の活性化と活性酸素

三好憲雄*, Vladimir Misik*, 阪田功**, 中島進***, 竹村健一****,
福田優, Peter Riesz*
福井医科大学病理学, *Radiation Biology, NCI, NIH, **東洋薄荷工業,
旭川医科大学手術部, *北大電科研

Activation of a photosensitizer (ATX-70) by ultrasound irradiation and generation of active oxygen species

Norio Miyoshi*, Vladimir Misik*, Isao Sakata**, Susumu Nakajima***, Ken-ichi Takemura****, Masaru Fukuda
Dept. of Pathol., Fukui Medical School, *Radiat. Biol., NCI, NIH, **Toyo-Hattuka Kogyo Ltd., ***Dept. of Surg., Asahikawa Med. School, ****Inst. of Electronic Science, Hokkaido Univ.

Abstract

Sonodynamic therapy, a new modality for cancer treatment, is based on the synergistic effect of the combination of ultrasound and a photosensitizer. It has been suggested that the enhancement of yields of nitroxide (TMP-NO) from a secondary amine 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone hydrochloride (TMP) in aqueous solutions containing ATX-70 exposed to ultrasound is evidence for the formation of singlet oxygen due to the sonoluminescent excitation of the sensitizer.

We show that the surfactant cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) can mimic the ATX-70-induced increase of the TMP-NO signal but fails to reproduce the behavior of ATX-70 in D₂O. However, the increased TMP-NO yields in D₂O are paralleled by an increased concentration of ATX-70 dimer, a photochemically inactive form. The temperature dependence of the ATX-70-induced TMP-NO formation is inconsistent with the sonoluminescent excitation of ATX-70: the ATX-70-dependent enhancement of TMP-NO signal increased from 10 to 25 °C while the intensity of sonoluminescence of aqueous solutions is known to decrease with increasing temperature.

Finally, our finding that the ATX-70-dependent increase of TMP-NO signal was highest at ~20% O₂, both in N₂/O₂ and Ar/O₂ mixtures, and decreased with increasing oxygen concentration, is inconsistent with the singlet oxygen mechanism.

I 著言

近年、超音波照射による光増感剤分子の活性化により、癌細胞や実験腫瘍の殺細胞効果や腫瘍退縮が報告されて来ている(1)。

そこで今回、超音波照射による光増感剤の増感作用のメカニズムを明らかにするため、電子スピン共鳴(ESR)測定装置とスピントラップ剤を使用して検討した。

II 方法

活性酸素種の捕捉剤には2,2,6,6-trimethyl-4-piperidone hydrochloride (=TMP)を使用し、新しい光増感剤のガリウム錯体ポルフィリン誘導体(ATX-70)の水溶液中に超音波(50kHz)を種々の条件下で照射し、ESRでTMP-NO(Nitroxide)のシグナル強度を計測した。

従来、TMPと活性酸素との反応にはFig.1の様にOHと励起一重項酸素($^1O_2^*$)の中間体を經由する反応経路が考えられている(1,2)。今回の反応条件下では、どちらの中間体が主に生成しているかを検討した。

III 結果と考察

ATX-70の化学構造からしてアルキル鎖(C12)が二本存在していることから、これらアルキル鎖による界面活性作用が超音波による増感作用に関与しているか否かをFig.2で調査した。その結果、C16のCTAB(cetyl trimethyl ammonium bromide)の濃度依存性から確かに増感作用に寄与していることを示唆している。一方、アルキル鎖の無いTetramethyl ammonium bromide(TAB)には増感作用は示していない。

TMPと $^1O_2^*$ との反応はMoanとWoldがpH依存性を報告している(3)。我々のデータも高pH効果や重水の効果によりTMP-NOのシグナルは増大した。しかしながら、Fig.3のスペクトルとTABLE-Iのように、重水中ではATX-70の二量体由来の627nmの蛍光強度が単量体由来の576nmに比して大であり、401nmの単量体由来の吸光度と負の相関が得られた。このことから、重水での $^1O_2^*$ 生成の増大には必ずしも合理的ではなく、従来の我々のESRのデータ(4)からは、むしろ

OH-radical mechanism :

Fig.1.

FIG. 2. Singlet oxygen and $^{\bullet}OH$ radical-dependent mechanisms of the formation of TMP-NO nitroxide from cyclic amine TMP.

Fig.2

Effect of surfactant CTAB (—○—) or its non-surfactant analogue TAB (—□—) on the formation of TMP-NO produced during 3 min of ultrasound exposure of air-saturated 50 mM phosphate (pH 9) in the presence of 40 mM TMP. (·····) CTAB concentration dependence of DMPO/OH formation under the same experimental conditions except that 40 mM DMPO replaced TMP during sonolysis. Data represent average $\pm$ SD from at least three experiments.

:OHの生成の優位的環境と判断した。

さらに、Fig.4の超音波照射浴槽水の温度依存性を見ると、ATX-70共存ではTMP単独に比して対照的温度依存を示した。すなわち光化学的エネルギー移動による $^1\text{O}_2^*$ 生成には低温程効率は良くなるはずであるにもかかわらず、対照的温度依存を示したことからも、光化学的エネルギー移動以外の増感反応プロセスを示唆している。

IV 結語

超音波照射によるATX-70の増感作用の中間体には励起一重項酸素の他に、:OHラジカルが生成していることが判明した。

参考文献

- (1) S.Umemura, K.Kawabata, N.Yumita, R.Nishigaki and K.Umemura, Sonodynamic approach to tumor treatment. *Proc.IEEE Ultrasonics Symp.* 1231-1240 (1992).
- (2) T.Kondo and P.Riesz, Effect of ultrasound and ionizing radiation on sterically hindered cyclic secondary amine: an ESR study. *Radiat.Res.* 127, 11-18 (1991).
- (3) J.Moan and E.Wold, Detection of singlet oxygen production by ESR. *Nature* 279, 450-451 (1979).
- (4) N.Miyoshi, Detection of active oxygen species in the photosensitizing reaction in vitro by ESR measurements. *Proc.SPIE (5th Int. Photodynamic Assoc. Biennial Meeting)* 2371, 606-609 (1995)

Fig.3

Fluorescence emission spectra of 0.1 mM ATX-70 in 50 mM phosphate in H_2O , pH 9 (*), and in D_2O , pD 9 (●), excited at 402 nm. The maximum fluorescence emission of the ATX-70 monomer is at 576 nm and the maximum of the dimer is at 627 nm. The fluorescence peaks at 603 nm originate from the light scattered by the solid sample holder.

TABLE I

Effect of Deuterium Substitution and pH (pD) on the Ratio of Fluorescence Intensities of ATX-70 Dimer and Monomer and on the Concentration of the ATX-70 Monomer in Air-Saturated ATX-70 Solutions in 50 mM Phosphate

pH (pD)	Fluorescence dimer/monomer ^a $I_{627\text{nm}}/I_{576\text{nm}} (\pm \text{SD})$	Monomer ^b OD _{401nm}
pH 9.0	0.595 ± 0.035	2.55
pH 10.6	0.475 ± 0.023	2.89
pD 9.0	0.955 ± 0.052	1.60
pD 10.6	0.675 ± 0.043	2.33

^aCalculated from the maxima of the fluorescence intensity of ATX-70 monomer at 576 nm and dimer at 627 nm (excitation wavelength 402 nm) in 0.1 mM ATX-70 solutions.

^bOptical density at the absorption maximum of ATX-70 monomer at 401 nm in 10 μM ATX-70 solutions.

Fig.4

Temperature dependence of TMP-NO formation after 3 min of ultrasound exposure of air-saturated 50 mM phosphate (pH 9) containing 40 mM TMP in the absence (open bars) and in the presence of 0.1 mM ATX-70 (shaded bars). Data represent average $\pm$ SD from at least three experiments.