効果的腫瘍親和性蛍光物質 Fluorescent Agents for Cancer Diagnosis

阪田 功, 中島 進¹, 竹村 健²

東洋薄荷工業(株)技術部

〒719-03 岡山県浅口郡里庄町浜中75-1

TEL 0865-64-3131 FAX 0865-64-3133

¹旭川医科大学手術部

²北海道大学電子科学研究所

Isao SAKATA, Susumu NAKAJIMA¹ and Takeshi TAKEMURA²

Toyo Hakka Co., LTD.

75-1 Hamanaka Satoshio, Okayama, 719-03

¹Asahikawa Medical College

²Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University

要 旨

光毒性のない腫瘍蛍光診断剤の戦略的合成法について述べる。種々の腫瘍蛍光診断剤を合成し、光毒性、生体内分布、蛍光収率を検討した結果、異分子二量体のMn錯体—無錯体ポルフィリン誘導体であるHAT-D01が有望であると思われた。

キーワード：無光毒性腫瘍蛍光診断剤、異分子ポルフィリン二量体、Mn錯体—無錯体ポルフィリン誘導体

Abstract

This paper deals with the strategical synthesis method for fluorescent cancer diagnosis agents without phototoxicity.

Hetero-molecular dimers, combined with both the metalloporphyrins and porphyrins, were focused for fluorescent agents.

From the result of their dansyl-methionine test, biodistribution and fluorescence yield etc., Mn complex-free base are chosen.

One of them, HAT-D01, was found to be promising tumor fluorescent agent without phototoxicity.

Key words : Fluorescent cancer diagnosis agent without phototoxicity, Hetero-molecular porphyrin dimer, Mn complex-free base porphyrins

Fig. 1 現在用いられている蛍光ラベル化剤の構造

Fig. 2 Carbocyanine 類

はじめに

世の中には蛍光物質が多数ある。中でも蛍光ラベル化剤として例えば benzofurazan 類を始めとして (Fig. 1 参照) phenylenediamine 類, benzofuran 類, benzothiazole 類, coumarin 類, quinoxalinone 類, acridine 類, fluorescein 類, dithiobisnaphthalene 類などを挙げることができる¹⁾。しかし有機溶媒中でのみ強い蛍光を示し、水溶液中では蛍光を示さないか又は弱いものが多い。またこれら化合物の最長吸収ならびに蛍光波長端は550nm以下である。従って生体内透過性の良いより赤外波長側 (例えば650nm以上) に移動した吸収ならびに蛍光を持つ化合物は今のところ見当たらない。また, carbocyanine 類 (Fig. 2) は吸収波長が700~900 nm とより長波長側で、波長については申し分のない化合物であるが、水溶性に乏しく、生体に適用することはできない。その上、これらの蛍光化合物群単独では腫瘍組織親和性は見当たらない。

これらを総合的に考えると、効果的腫瘍親和性蛍光物質を得るにはポルフィリン関連化合物がターゲットになる。

光化学反応性

ポルフィリン化合物は、1924年に Policard がその効果を提唱して以来、医薬用特に光物理化学的療法 [Photodynamic Therapy (PDT)] 用薬剤としてレーザーとの組合せにより Dougherty, 早田, 加藤らの努力により着実に発展してきた²⁾。そしてポルフィリン類を用いた癌の治療や診断は昨年我が国で photofrin II® [日本レダグリー(株), 商品名ポルフィマーナトリウム注] が医薬品許可承認となって更に盛んになった。

この PDT における光物理化学的作用の主な反応過程の模式を Fig. 3 に示す。生体内における光化学的作用はある種のを除いて、ほとんどが酸素酸化反応である。ここで光酸化反応は機構の違いから、Fig. 3 に示す最低三重項状態 ($^3M^*$) から直接に生体組織と反応する Type I と $^3M^*$ から組織中の酸素へのエネルギー移動により一重項酸素 ($^1O_2^*$) を生成し、この $^1O_2^*$ が生体組織と反応する Type II に大別される。いずれの Type にしても光酸化反応は最低三重項状態 ($^3M^*$) を経て進行する。従ってこの光化学反応性 (酸化作用効率) は色素増感剤の最低三重項状態寿命に左右される³⁾。

腫瘍蛍光物質

本稿では効果的腫瘍親和性蛍光物質と云うことで、PDT 効果を強く進める化合物の話ではない。現在腫瘍診断のために、ポルフィリン関連化合物を用いた蛍光診断が世界中で活発に行われている。しかし、大分部の化合物が PDT 用に開発された光増感剤で光毒性の問題を

Fig. 3 PDTにおける酸化反応機構

- A. 触媒
1. エネルギー変換
 2. $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2$
 3. 自動酸化反応
 4. 光増感酸化反応
- B. 半導体
- C. 指示薬
1. 高感度比色試薬
- D. 医薬
- a. 癌領域
- イ. 診断薬
1. 内視鏡
 2. 術中
 3. RI
 4. MRI
 5. ESR
 6. X線
- b. 眼科(新生血管)領域
1. 糖尿病性網膜症
 2. 加齢性黄斑変性症
- E. その他
1. 臓器指向性

Fig. 4 ポルフィリン誘導体の応用化学

抜きにしてそのまま用いられている。すなわち、光毒性を有した薬剤が診断のために使用されている。ポルフィリン関連化合物の応用化学には Fig. 4 に示すような用

途が考えられる。その中で、我々はポルフィリン関連化合物の医薬への応用研究の一環として光毒性のない効果的な腫瘍組織集積性蛍光ポルフィリン類の開発(イ. 診断薬, 1. 内視鏡用, 2. 術中用)を進めている。

ところで腫瘍組織集積性ポルフィリン誘導体は Fig. 5 に示すように増感色素の三重項寿命の長さによって用途別, すなわち診断剤と治療剤に分けられる。すなわち寿命の長いものは PDT 用ならびに超音波用の治療剤に用い、寿命の短いものは治療剤であるニトロイミダゾール系放射線増感剤¹⁾、 ^{10}B に代表される中性子捕捉剤²⁾、制癌剤等と結合させ治療用に、一方 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{67}Ga などの短半減期放射性金属物質³⁾、MRI 用造影剤⁷⁾、蛍光剤などと結合させ診断用に向けられる。

そして、蛍光腫瘍診断剤としては次の3つの条件を満たしていなければならない。

- 1) 腫瘍集積性があること
- 2) 高い蛍光収率があること
- 3) 光毒性がないこと

合成

これまでの我々の研究より1)の条件, すなわち集積性についてはある程度のデータ蓄積があり⁸⁾、PDT 用増感剤⁹⁾、シンチ用造影剤¹⁰⁾、MRI 用造影剤¹¹⁾の開発を行ってきており、それなりの成果を収めている。この内蛍光用増感剤を除く診断剤についてはいずれもポルフィリン骨格内に Mn 金属を有し、3)の光毒性を

Fig. 5 用途別腫瘍組織集積性ポルフィリン誘導体

無効にするために三重項寿命 ($^3M^*$) の短い化合物を用いてきた。光毒性を無効にするポルフィリン骨格内金属錯体は Mn 体を初めとする遷移金属錯体すなわち Fe, Co, Cu 体などが挙げられる。

これらの金属錯体はポルフィリン誘導体の光感受性をなくすのに有効である。しかしここで問題なのは、蛍光診断剤のためにある程度の蛍光を効率良く発生しなければならないことである。完全に消光してしまえば蛍光診断剤にならないのである。上記 Mn を初めとする金属錯体では光感受性は無感作であるが蛍光も無くなる。

またポルフィリン化合物を遷移金属錯体に誘導体化し光毒性を完全に無くし、冒頭に述べた benzofuran 類を始めとする蛍光ラベル化剤 (Fig. 1) と結合させる手もある。しかしもしこれらの doking 化合物が合成できたとしても蛍光波長そのものは 550nm 以下であり、生体内透過性が良く、生体内迷光の少ない 650nm 以上の化合物は得られない。これらのことから、異種ポルフィリン二量体を検討することにした。

一般的に一分子化合物内で光毒性のない蛍光物質を得るのは難しい。これは Fig. 3 に示す様に理論的には三重項寿命 $^3M^*$ の減少と共に蛍光強度が減少するからである。従って、光毒性が無い事と蛍光収率がある程度高いこと(検出可能であること) この 2 点の相反する性質を満足させるために、我々は異分子ポルフィリン二量体を合成することにした。

そこで金属ポルフィリン体とフリーベースポルフィリン体を種々のスペーサーを介して結合させ、その分光学的特性を検討した。金属錯体として短りん光寿命を示す

遷移金属である Mn 及び Cu 体 (比較のために無金属体も調製した) を選び、スペーサーとしては $-(CH_2)_n-$ [$n = 1$ or 4], phenylene (meta or para) をそれぞれ用いた。なお母体であるポルフィリンには最長波長吸収端が 650nm 以上に吸収をもつクロリン誘導体を採用した。これは生体組織中の自家蛍光からの迷光を避けるためである。

これら二量体の合成を 4 段階で行った。まず protoporphyrin dimethylester (PP-Me) を光酸化反応処理し、母体である photoporphyrin dimethylester (新規 chlorin 誘導体, P-Me) を得た。これが本法の特徴で、670nm 以上に最長波長吸収端を持つホルミルクロリン誘導体をここで調製した。

次いで調製した P-Me を Mn 又は Cu 錯体 (Metal-P-Me) とした。本錯体を種々のスペーサーを持つ dihydrazine 類と反応させ、金属 (Mn 又は Cu, 2H) ポルフィリン monohydrazone 体 (Hydrazone-P-Me) を得た。一方二量体の癌親和性及び水溶性を増すために、前に調製した P-Me をアスパラギン酸誘導体 (P-Asp-Me) とした。本アスパラ体と先に得られた hydrazone-P-Me とを再度縮合させ、目的とする最長波長吸収端が 679nm 以上に吸収を持つ異種ポルフィリン二量体を合成した。これらの合成ルートを chart 1 に示す。

結果と考察

合成した異分子二量体の物理化学的諸性質を調べた。その結果 (発光特性、光化学反応性及びアルブミンによる可視部の変動テスト) を Table 1 及び Fig. 6 に示す。

Table 1 ヘテロポルフィリン二重体の発光特性と光化学反応性

M	Spacer				
		$-\text{CH}_2-$	$-(\text{CH}_2)_4-$
2H	Fluores., λ max(intensity)		680nm(560)	679nm(800)	680nm(650)
	Photooxy. Strength	8	8	7	7
Mn	Fluores., λ max(intensity)	678nm(40)	678nm(60)	676nm(80)	
	Photooxy. Strength	0	0	0	0
Cu	Fluores., λ max(intensity)	665nm(12)	668nm(50)	680nm(70)	
	Photooxy. Strength	trace	trace	trace	trace

Fig. 6 HAT-D01のアルブミンテスト
(VIS 吸収スペクトル)

なお光化学反応性の評価は我々が先に考察したダンシルメチオニンテスト (d-Met test)⁹⁾ によった。すなわち本 Table 中で数字が大きければ大きいほど (最大で10)

光反応性が強いことを示している。また Table 中における相対蛍光強度は410~420nm付近の蛍光励起スペクトルの極大値における励起で行って得られた値である。

以上を考えあわせると Mn-Free base 量体が特に有望で、スパーサーとして phenylene を持った化合物、中でも腫瘍組織集積性 (アルブミンテストならびに表面蛍光法による生体内分布) の結果から (Fig. 6 と Fig. 7) meta 位結合のもの (HAT-D01 と名称) を光毒性の無い蛍光腫瘍診断剤の候補化合物として絞り込んだ。その構造式を Fig. 8 に示す。現在、内視鏡的手法による実験動物の腫瘍診断にも適用し効果を確認している¹³⁾。今後は改良スパーサー型異分子ポルフィリン二量体、670

Fig. 7 HAT-D01の表面蛍光法による生体内分布
(癌/組織 比)

Fig. 8 HAT-D01の化学構造式

nm以上に蛍光を有するラベル化剤担持ポルフィリン誘導体、及び長寿命遅延蛍光特性を持つ希土類錯体¹⁾担持ポルフィリン誘導体の3化合物群に重点を置いて合成に取り組みたいと思っている。

文 献

- 1) Dojindo 総合カタログ 19 : 26~43, 1994.
- 2) Winkelmann, J., Cancer Res., 27 : 2060, 1967.
Dougherty, T. J., Cancer Res., 39 : 146, 1979.
Hayata, T., Chest, 81 : 269, 1982.
Hisazumi, H., J. Urol., 130 : 685, 1983.
Kessel, D., Cancer Res., 43 : 994, 1983.
Foster, N., J. Nucl. Med., 26 : 756, 1985.
- 3) 竹村 健, 中島 進, 阪田 功, 日本レーザー医学会誌, 14 : 21, 1993.
- 4) Shibamoto, Y. et al., J. Radiation Oncology, Biol. Phys., 12 : 1063, 1986. *ibid.*, 16 : 1045, 1989.
- 5) 根本尚夫, 化学と工業, 46 : 74, 1993.
山本嘉則, 化学, 41 : 774, 1986.
Miura, M. et al., Biochemical Pharmacology, 43 : 467, 1992.
Kahl, S. B. et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1990 : 1770, 1990.
- 6) Maric, N. et al., Nucl. Med. Biol., 15 : 543, 1988.
Wong, P. W. et al., I. J. Nucl. Med. Biol., 10 : 211, 1983.
- 7) Lyon, R. C. et al., Magnetic Resonance in Med., 4 : 24, 1987.
Furmanski, P. et al., Cancer Res., 48 : 4604, 1988.
- 8) 中島 進, 阪田 功, 竹村 健, 現代化学, 1995 : 209, 1995.
Nakajima, S., Takemura, T., Sakata, I. et al., J. Photochem. Photobiol., B : Biol., 7 : 189, 1990.
竹村 健, 中島 進, 阪田 功, 日本レーザー医学会誌, 10 : 221, 1989.
阪田 功, 中島 進, 竹村 健, 日本レーザー医学会誌, 11 : 97, 1991.
- 9) 中島 進, 竹村 健, 阪田 功, 日本レーザー医学会誌, 10 : 225, 1989.
Nakajima, S., Sakata, I., Takemura, T., et al., Frontiers of Photobiology, 1993 : 493, 1993.
竹村 健, 中島 進, 阪田 功, 日本レーザー医学会誌, 14 : 21, 1993.
阪田 功, 中島 進, 竹村 健, 日本レーザー医学会大会論文集, 13 : 153, 1992.
阪田 功, 中島 進, 竹村 健, 日本レーザー医学会誌, 14 : 31, 1993.
Takemura, T., Nakajima, S., Sakata, I., Photochem. Photobiol., 59 : 366, 1994.
阪田 功, 中島 進, 竹村 健, 日本レーザー医学会大会論文集, 15 : 1, 1994.
- 10) Yamazaki, K., Nakajima, S., Sakata, I., J. Cancer Res., 79 : 880, 1988.
阪田 功, 池内昌子, 中島 進, 薬学雑誌, 110 : 916, 1990.

Nakajima, S., Sakata, I., Takemura, T., J.
Photochem. Photobiol. B : Biol., 8 : 409, 1991.
中島 進, 油野民雄, 阪田 功, 核医学, 31 : 1379,
1994.

- 11) 中島 進, 阪田 功, 竹村 健, Oncologia, 26 :
242, 1993.
- 12) 竹村 健, 中島 進, 阪田 功, 化学と生物, 33 :
238, 1995.
- 13) 中島 進, 阪田 功, 竹村 健, ポルフィリン・ヘ
ムの生命科学, 209, 東京化学同人, 1995.
- 14) 辻 章夫, 化学と工業, 48 : 1351, 1995.