光化学治療の ESR による解析

Analysis of photodynamic therapy by ESR

有山重美, 藤村 寛, 大下芳人, 大谷達夫, 岡崎幸紀, 竹本忠良

Shigemi Ariyama, Hiroshi Fujimura, Yoshito Ohshita,
Tatsuo Ohtani, Yukinori Okazaki, Tadayoshi Takemoto

山口大学医学部第1内科

The first Department of Internal Medicine, School of Medicine,
Yamaguchi University

ABSTRACT

By using of the method of ESR (electron spin resonance), we tried to analyze the mechanism of photodynamic therapy. After this therapy we took biopsy specimens under the endoscopy with the patient of gastric cancer. ESR spectrum of specimens showed triplet signal, which we proved σ -radical ($R_2NO\cdot$). As the results, we considered that singlet Oxygen destroyed Hematoporphyrin under this therapy.

はじめに

最近, 胃癌に対する新しい治療法として, laserを用いた hematoporphyrin derivative (HpD)による photodynamic therapy (PDT) が注目されている。しかし, 本法の詳細な mechanism, 効果判定, 最適条件の設定などには多くの問題点が残されている。そこでわれわれは電子スピン共鳴法 (ESR) の手法を導入し, photoradiation effectの解析を分子化学的に行ない, その結果, 興味ある知見を得たので報

告する。

器具および使用薬剤

本研究に使用したのは, Spectra physics 社製 Model 770 型 Argon laser 発振器, 町田製 laser 用内視鏡装置, 西坂らの開発した round tip 型 quartz fiber, Oncology research 製 HpD, 日本電子製 ESR spectrometer, JES-ME-1X (Fig. 1), 石英製 ESR 用試料管, 液体窒素, 画像解析用コンピューターシス

テムなどである。

Fig. 1 ESR spectrometer

対象および方法

測定にあたっては、胃癌患者を対象として、HpD 2.5mg/kg 静注 72 時間後に Argon laser (波長 488~514.5nm) 500mW, 20 分間の照射を行ない、その前後に直視下生検によ

り組織を採取する。これを冷却した生理食塩水で洗浄した後に 4~5 片を内径 4mmφ の石英性試料管に詰めて窒素ガスを用いて溶封する。ジュワーびんに液体窒素を満たし、その中に試料管を挿入し固定して -196°C に冷却しマイクロ波の X-band を用いて 0 ~ 5000 G の scan を行ない、スペクトルを記録した。

成績および考按

最初にコントロールとして 1m mol に調製した HpD 溶液に Argon laser の照射を行ない、ESR スペクトルの測定を行った。その結果 3270 G 付近に強い ESR シグナルが検出された。周囲の等間隔、等強度のシグナルは内部標準物質の Mn^{2+} である。

このようにして得られた ESR スペクトルを画像解析用コンピュータで処理してみた (Fig. 2)。シグナルは g 値が 2.0015 であり、三浦らの報告しているポルフィリン・ベースの π -cation radical の g 値と一致している。なお、この radical の ESR 信号強度は HpD の濃度と良好な直線関係を示していた。

Fig. 2 laser 照射後における ESR spectrum

Fig. 3は同じ1m molのHpD溶液に対してArgon laserの照射時間を変えて Mn^{2+} を基準として信号強度の変化をみたものであるが、注目すべきことはlaser照射を行っていない溶液中にも π -cation radicalが検出される

Fig. 3 laser照射時間によるESRの変化

ることである。これは自然光や照明光によるradicalの発生と考えられる。また、このradicalは温度変化や時間経過に対しても安定なもので、その理由として、不対電子がN核の π 軌道にあり、 π 電子の分子内共役による共鳴効果や置換基における常磁性中心の保護のため

であると思われる。ポルフィリン核の π 電子系ではlaserを照射することによって活性化され、不対電子の中の1個はより高いエネルギー・レベルに遷移して不対電子を持つ状態となって存在し、しかもこの不対電子は分子内の原子上に非局在化しているものと考えられる。

photodynamic therapy後の胃癌細胞のESRスペクトルでは3300 G付近に3本のESRシグナルが認められた。ESRシグナルをコンピュータにより解析してみた(Fig. 4)。これらはg値が1.9998, 2.0099, 2.0201の位置に等強度でしかも15.1 Gの等間隔な3本のシグナルであった。このスペクトルの信号強度は内部標準物質のそれよりやや弱く、HpD溶液にみられたシグナルとは全く異なるものであった。

Argon laserの照射時間を変えてみると、Fig. 5のようにESR信号強度も変化しており、照射前では特異的な信号は全く検出されなかった。照射後20分までは急速に信号の強度が増加することが観察された。このシグナルも温度変化や時間経過に対しては安定なものであった。

Fig. 4 光化学治療後のESRスペクトル

このようにして得られた 3 本線の等間隔, 等強度のシグナルについて, われわれは $R_2NO\cdot$

Fig. 5 laser 照射時間による ESR の変化

radical と考えた。Fig. 6 にみられるように ^{14}N 核のスピ量子数は 1 であるから, 各電子

Fig. 6 N 核による超微細構造

スピンの準位は 3 となり, 電子スピン M_S の準位は ^{14}N 核の核スピンとの相互作用により 3 つの準位に分裂し, 選択律により 3 本の等間隔, 等強度の ^{14}N 核の超微細構造が観察されと考えられる。

$R_2NO\cdot$ radical では Fig. 7 のように ^{14}N 核の周囲でスピンの交換相互作用が起きることが知られている。 ^{14}N の $2p_z$ 軌道のスピンは内殻の $2s$ 軌道のスピンと交換し, その結果 ^{14}N 核には α スピンが誘起し, このために弱い等方性超微細相互作用が生じる。つまり, π 軌道のス

Fig. 7 N 核における σ - π 相互作用

ピンによる $2s$ 軌道や σ 軌道のスピン分極効果によって ^{14}N 核の $2p_z$ 軌道の電子スピンは $2s$ 軌道に微小な不対電子密度を誘起すると考えられた。

このような σ -radical の出現する原因としては Fig. 8 にみられるようにポルフィリン骨

Fig. 8 ポルフィリン骨格の破壊

格が矢印に示すように共役結合の部でoxidationにより切断され、 $R_2NO \cdot$ radical が発生すると考えた。われわれはこの際の酸化は photodynamic therapy によって生じた1重項の酸素によるものと推測した。

このように考えると Dougherty らの説の通りに光化学反応が起こるとすれば、その時に発生した1重項の酸素が HpD をも破壊しているのではないかと考えられ、逆に radical を解析することにより1重項酸素発生の証明になり得る可能性があると思われた。

さらに σ -radical の ESR 信号強度の定量を行なうことにより現在の Argon laser 500mW, 20分照射の条件は比較的良好なものであると考えられた。

今後さらにさまざまな条件下での測定を行なうことによって、より最適な条件を設定することが可能と思われた。

ま と め

- 1) 胃癌患者に内視鏡下で光化学治療を行ない、Argon laser 照射部の細胞を生検により採取し、ESR スペクトルの測定を行なった。
- 2) コントロールとして HpD 溶液に Argon laser を照射して ESR を測定したところ π -cation radical の発生が認められた。
- 3) 光化学治療後の胃癌細胞からは $R_2NO \cdot$ と考えられる σ -radical が出現し、これは1重項の酸素により HpD が破壊された結果であると推測された。

本研究にあたり御指導、御助言を下さいました宇部工業高等専門学校 村上定瞭助教授、山口大学教育学部 右田耕人助教授、同工学部 右田たい子技官に深く感謝致します。

文 献

- 1) 石津和彦編：実用 ESR 入門，講談社，1982
- 2) 三浦真理子 他：ESR によるヘマトポルフィリンの検出，第5回臨床医学のための磁

気共鳴研究会抄録全集，1983

- 3) 西坂 剛，米川元樹：レーザー光の生体作用，とくに生体光化学反応の基礎，レーザーの臨床；p. 49, メディカル・プランニング，1981
- 4) J. C. Baird, M. Bersohn：電子スピン共鳴序説，化学同人，1968
- 5) M. C. R. Symons：電子スピン共鳴，東京化学同人，1978
- 6) Dougherty, J. J. et al: Photo-radiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. J. Natl. Cancer Inst., 55: 115 ~121, 1975