光感受性色素 Pheophorbide-a 静注時のイヌ臓器内分布の検討

Intravenous Administration of the Photoactivatable Dye Pheophorbide-a to Dogs-with Reference to Tissue Uptake and Distribution of the Dye-

門脇 徹, 中澤慶彦, 森田雅範, 坂本芳也, 鍵山惣一,
西岡隆見, 松本浩利, 山崎一明, 高橋佳伸, 西森 功,
田村 智, 中田博文, 岡崎和一, 山本泰朗, 山本泰猛

T. Kadowaki, Y. Nakazawa, M. Morita, Y. Sakamoto, S. Kagiya,
T. Nishioka, H. Matsumoto, K. Yamasaki, Y. Takahashi, I. Nishimori,
S. Tamura, H. Nakata, K. Okazaki, Y. Yamamoto, Y. Yamamoto

高知医科大学 第一内科

Pheophorbide-a (PpA) has been appreciated as a new photosensitizer for photodynamic therapy by radiation of Nd-YAG laser with less adverse effects, especially photosensitive dermatitis. Lineal relation was proved between the concentration of PpA and emission fluorescence (670 nm) using 410 nm excitation.

Tissue concentrations of PpA were calculated following intravenous administrations of the dye (3mg/kg body weight) in dogs.

Maximum uptake in canine tissues was achieved 1-3 hrs after the dye administration with rapid decline within 24hrs. PpA was distributed in the lung, liver and spleen, and excreted mainly into the bile.

現在 Photodynamic therapy (以下PDT) に用いられている光感受性物質は Hematoporphyrin derivatives (以下HpD) が代表的である。その励起光源である 630 nm 付近のレーザー光は生体に照射した場合、深達度が約 1 ～数 mm であり、また長期の日光過敏症の問題もあり、PDT の臨床的適用を妨げる原因となっている。

一方、Chlorophyll の分解産物である Pheophorbide-a (PpA) は二光子吸収により、組織透過性の強い長波長の Nd-YAG レーザー光 (1064 nm) で励起されうるので、PDT の効果を生体組織のより深部にまで及ぼすことが可能である(1)。また腫瘍選択性が高く、正常組織からの代謝が早いなどの特徴があり(2) (3)、光感受性物質として、最近注目を浴びている。

しかし PpA は脂溶性で、水に難溶であるため、その溶解法並びに PpA 摂取臓器よりの抽出方法が検討されている。今回我々は、雑種成犬に PpA を静脈内投与後、各組織中の濃度の経時変化を調べ、PpA による PDT のための基礎的検討を行った。

実験方法

(1) PpA の分光および蛍光分析: Dimethyl sulfoxide (DMSO), 溶解補助剤 propylene glycol (PG), 希釈用液 0.05 M PBS (pH 7.4) を溶媒として使用し、37℃での PpA 溶液の吸収スペクトルをユニオン技研製 SM-401 分光光度計で、また蛍光強度を AMINCO BOWMAN 製 SPF-500 蛍光光度計で測定した。

(2) PpA の検量曲線: PpA 3mg を DMSO 2ml, PG 0.5ml, PBS 0.5ml に溶解 (1mg/ml, 1.7×10^{-3} M/L, pH 7.25, 比重 1.101) 後、DMSO, PBS (4:1) を用いて、1 μ g/ml ～ 1ng/ml の希釈系列を作り、410nm の光で PpA を励起し、670nm の蛍光強度を測定し、最小 2 乗法により濃度と蛍光強度の検量線を作製した。

(3) 雑種成犬への PpA の静脈内投与: PpA 30mg を DMSO 2ml, PG 0.5ml, PBS 0.5ml に溶解し、5 頭の雑種成犬に 3mg/kg 静注した。注射後 1, 3, 6, 12, 24 時間で屠殺し各犬の 13 臓器 (血清, 胆嚢内胆汁, 尿を含む) より、それぞれ 0.3 ～ 2.0 g の組織を 3 検体ず

つとり細切後、PBS 20ml 中にて homogenate および sonicate し、その 1ml を DMSO 4ml と混和し、50℃ 60 分間 incubate, 攪拌した。その後 3000 rpm で 10 分間遠心沈澱し、上清を 37℃ で蛍光光度計にて 410 nm で励起し、670nm の蛍光強度を測定した。そして検量線より各組織湿重量 1g 当り (または 1ml 当り) の PpA 含有量に換算した。なお、3 時間後の肝組織について、遠心後の沈澱物を 2 回 PBS で洗浄し、同様に測定した蛍光強度は検出感度以下であった。PpA の血中半減期は時刻 t の血清 PpA 濃度を C , $t=0$ の血清 PpA 濃度を C_0 , 消失速度定数を K とし、 $\log C = -kt/2.303 + \log C_0$, 半減期 $T_{1/2} = 0.693/k$ より計算した(4)。

Fig. 1. Absorption spectra of pheophorbide-a in dimethyl sulfoxide (DMSO), propylene glycol and PBS solution (DMSO:PBS=4:1)

Fig. 2. Emission spectra of pheophorbide-a in dimethyl sulfoxide, propylene glycol and PBS solution (DMSO:PBS=4:1)

結 果

(1) PpA の分光および蛍光分析: PpA の吸収スペクトルのピークは, 410 nm (吸収最大), 510 nm, 540 nm, 615 nm, 670 nm (吸収大) であった (Fig. 1)。さらに 410 nm を励起波長とすると 670 nm に単一ピークをもつ蛍光を観察した (Fig. 2)。

(2) PpA の検量曲線: 1 μ g/ml 溶液の蛍光強度を 1000, PpA を含まない液の蛍光強度を 0 として測定した。蛍光強度 65 (1 μ g/ml の蛍光強度が 1000 の時, 濃度は 40 ng/ml) 以下の低濃度では, 40 ng/ml の蛍光強度を 1000 として測定した。

1 ng/ml から 40 ng/ml で $Y = 23.9X - 9.93$ (Y は蛍光強度, X は濃度 ng/ml, $r = 0.99$, $p < 0.001$, 40 ng/ml の蛍光強度を 1000 とする), 40 ng/ml から 1 μ g/ml では $Y = X + 33.15$ ($r = 0.99$, $p < 0.001$, 1 μ g/ml の蛍光強度を 1000 とする) の関係が示された (Fig. 3, 4)。

Fig. 3. Lineal relationship between concentrations of PpA (X ng/ml) and intensities of fluorescence at 670 nm (Y) (slit width 8 nm) using 410 nm excitation (slit width 5 nm) ($1 < X < 40$).

Fig. 4. Lineal relationship between concentrations of PpA (X ng/ml) and intensities of fluorescence at 670 nm (Y) (slit width 8 nm) using 410 nm excitation (slit width 5 nm) ($40 < X < 1000$).

(3) PpA を雑種成犬に静脈内投与した時の分布及びその経時的变化を table に示す。また PpA の血中半減期は $T_{1/2} = 1.53$ 時間であった。

	1 hour	3 hours	6 hours	12 hours	24 hours
Skin	<0.1	<0.1	0.1 ± 0.1	<0.1	<0.1
Brain	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	<0.1	<0.1
Retina	0.2	0.3	0.1	<0.1	<0.1
Lung	53.7 ± 8.1	35.7 ± 5.7	15.1 ± 3.3	1.1 ± 0.2	0.2 ± 0.0
Liver	9.9 ± 0.5	23.5 ± 1.1	9.9 ± 1.0	5.3 ± 0.1	4.7 ± 1.2
Bile	26.8 ± 0.2	79.8 ± 4.7	61.1 ± 0.6	37.1 ± 2.2	88.7 ± 1.4
Spleen	6.7 ± 0.3	29.8 ± 2.1	20.6 ± 1.1	3.8 ± 0.5	0.6 ± 0.0
Pancreas	0.3 ± 0.0	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.0
Stomach	0.1 ± 0.0	1.0 ± 0.5	0.4 ± 0.1	<0.1	0.2 ± 0.1
Colon	0.1 ± 0.0	2.1 ± 0.4	1.3 ± 0.2	1.6 ± 0.7	0.8 ± 0.1
Kidney	0.9 ± 0.0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Urine	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	<0.1	<0.1	<0.1
Serum	4.7 ± 0.0	1.9 ± 1.3	0.7 ± 0.0	<0.1	<0.1

Table: Kinetics of PpA uptake and retention following intravenous administration of the dye (3 mg/kg body weight) in dogs. Values are expressed as mcg/g wet tissue (or mcg/ml of bile, urine or serum) and each value represents the mean and standard deviation.

(4) PpA 静注 12~24 時間後の肺の組織標本では、1~6 時間後と比べて間質が著明に増加し、肺胞の破壊を認めた。

考 察

PpA は難溶性であるが、DMSO, PG で溶解後、PBS で希釈すれば、肉眼的には 1 ml 当り 10 mg を溶解可能に見える。しかし table に示したように静注 1 時間後肺に著明に PpA が多いこと、12~24 時間後の肺の組織標本で間質の著明な増加と肺胞の破壊を認めることより、PpA が一部懸濁状態で投与され、微小塊となった PpA が肺の毛細血管内で塞栓を起こした可能性が示唆される。DMSO はアミロイドーシスの治療に使用（静注）された報告があり、少量であれば溶解剤として臨床的に使用できる可能性がある(5), (6)。以上の結果より今後 PpA を *in vivo* で使用する際には、1~2 ml の DMSO 単独で溶解するのが適当と思われる。

PpA が一部懸濁状態となっている場合、完全溶解の場合と、多少臓器分布が変わる可能性がある。しかし、肺の毛細血管網を通過した PpA は、他の臓器の毛細血管をも通過すると思われるので、肺以外の PpA の臓器分布は、完全に溶解しているときと大差はないと思われる。

このような問題点があるが静脈内投与後の PpA の臓器分布は、主として肺、脾臓、肝に多く、皮膚、脳、網膜に摂取される量は極めて少ない。また尿中には殆ど排泄されず、胆管系がその主な排泄経路である。

他の光感受性物質に関しては、HpD 10 mg/kg のマウスへの腹腔内投与 72 時間後の肝内濃度は 23.5 $\mu\text{g/g}$ であり(7), Chloroaluminum Sulfonated Phthalocyanine 10 mg/kg のマウスへの静脈内投与 72 時間後の肝内濃度は 20 $\mu\text{g/g}$ 以上であった(8)。これに対し、PpA 3 mg/kg のイヌへの静脈内投与では 6 時間後と 24 時間後の肝内濃度はそれぞれ 9.9 $\mu\text{g/g}$, 4.7 $\mu\text{g/g}$ であり、他の色素に比べ PpA の肝組織よりの消失はかなり早い。またほとんどの臓器で PpA 静注後 3~6 時間以内に組織内濃度が最大となりその後急速に減少した。これらの成績は

PpA の腹腔内投与 6 時間以後の光照射では急性光線過敏症によるショック死は起こらないという報告(3)を支持する。従って臨床応用に際し、光線過敏症を含めた副作用は HpD より少ないと予想される。

以上、PpA 溶解に関する問題点と体内分布及びその経時変化について検討を加え報告した。

PpA は光感受性物質として多くの優れた特徴を有するので、今後の研究により臨床応用への道が開かれることが期待される。

文 献

- (1) 益子信郎, 他: 日本レーザー医学会誌, 6: 113-116, 1986.
- (2) 前田直徳, 他: Photomedicine and Photobiology. 6: 7-11, 1984.
- (3) 木村修一: 医学のあゆみ. 112: 878-885, 1980.
- (4) 林信一, 松本光雄編: 総合薬剤学, 医歯薬出版, 東京, 1977, 174-176.
- (5) Fumio Kodama et. al.: ACTA HAEMATOL. JPN. 44: 887-892, 1981.
- (6) Robert E. Gosserin et. al.: Clinical Toxicology of Commercial Products, 4th Edition, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1976, section II, 243.
- (7) Charles j. Gomer, Thomas j. Dougherty: Cancer Research, 39, 146-151, 1979.
- (8) Wai-Shun Chan et. al.: Cancer Research 48, 3040-3044, June, 1, 1988.