レーザー光励起色素水溶液光増感系で生成する一重項酸素分子の分光検出

II クロリン e_6Na

Spectroscopic Measurement of Singlet Oxygen Molecules
Generated in Laser-Excited Photosensitive Dye Aqueous
Solutions II Chlorin- e_6Na

町田 博^{*}、 益子信郎^{**}、 水本巖^{*}、 木村修一^{***}、
田口喜雄^{****}、 稲場文男^{****}

H.Machida^{*}, S.Mashiko^{**}, I.Mizumoto^{*}, S.Kimura^{***},
Y.Taguchi^{****} and H.Inaba^{****}

^{*}東北大学電気通信研究所、

^{**}新技術開発事業団稲場生物フォトンプロジェクト、

^{***}東北大学農学部食糧化学科、

^{****}東北大学医学部第二外科

^{*}Research Institute of Electrical Communication, Tohoku Univ.

^{**}Biophoton Project, Research Development Corporation of Japan

^{***}Laboratory of Nutrition, Faculty of Agriculture, Tohoku Univ.

^{****}The 2nd Department of Surgery, School of Medicine, Tohoku Univ.

Following to the previous paper as referred to I, we have performed the experimental study on the spectroscopic detection of excited singlet oxygen molecules generated in laser-excited photosensitive dye aqueous solution containing chlorin e_6Na . Chlorin e_6Na has similar structure with pheophorbide a, one of decomposition products from chlorophyll a, which has been demonstrated for the first time by our reserch group to be more efficient and appropriate dye for the PDT than hematoporphyrin derivative (HpD). Using this dye aqueous solution, we succeeded to detect near-infrared emission spectrum around $1.27\mu m$ from 1O_2 molecules generated by the irradiation of Ar-laser light by the use of a highly sensitive near-infrared spectrometer as described in the previous paper I. This emission intensity was found to be approximately five times larger than that for HpD aqueous solution under the same condition. Furthermore, we have succeeded for the first time to detect by in vitro experiment the near-infrared emission of 1O_2 molecules from chlorin e_6Na uptaken in mouse FM3A tumor cells using similar spectroscopic method.

1. はじめに

前報(1)で我々は、レーザーを使用して腫瘍細胞を選択的に破壊する光化学治療法、または光力学治療法(PDT)に有効な光増感色素であるヘマトポルフィリン誘導体(HpD)について、 $^1\text{O}_2$ 分子の寿命が極めて短い($\sim 10^{-6}\text{s}$)ため従来測定が困難であったHpD水溶液からの $1.27\mu\text{m}$ 付近の $^1\text{O}_2$ 分子の近赤外域発光スペクトルを検出し、このような色素光増感系における $^1\text{O}_2$ 分子の生成を明らかにした¹⁾。しかし、HpDは生体組織透過性に優れた長波長域の光に対する吸収効率が低い上に、生体内からの代謝が遅いため光障害などの発生の問題があり、PDTの目的に最適とはいえない。そこで本文では、PDTにより適した新しい色素を検索する研究の一環として、光増感色素に水溶性物質であるクロリン $e_6\text{Na}$ を用いた水溶液中でレーザー光照射により生成される $^1\text{O}_2$ 分子の近赤外域発光特性を前報と同様の高感度検出法により計測することを試みた。さらに、生体への応用としてクロリン $e_6\text{Na}$ を取り込ませた腫瘍細胞を用いたin vitroな実験においても、 $^1\text{O}_2$ 分子の近赤外域発光スペクトルを検出することに初めて成功したので、それらの結果についても報告する。

2. 実験方法

1) クロリン $e_6\text{Na}$

Fig.1にクロリン $e_6\text{Na}$ の構造式を示す。この色素は、我々の研究グループが以前にPDTに有効な色素であることを最初に明らかにしたフェオホーバイド $a^{2)}$ と類似の構造をもつ物質である。フェオホーバイド a と同様に、 670nm 付近に強い吸収帯(Fig.2参照)があるため、HpDを用いた場合より生体に対する透過性の優れた長波長のレーザー光により効率よく励起できる特徴を有している。さらにクロリン $e_6\text{Na}$ は、生体組織への取り込みや排泄が速く、腫瘍組織への集積度も投与後2-8時間で最大になる(HpDの場合は24-48時間後)ことなどが最近明らかにされている³⁾。また正常組織との濃度比も高いことが認められている。これらのことから、クロリン $e_6\text{Na}$ にはPDTにおいてより優れた治療効果が期待されている。ここではクロリン $e_6\text{Na}$ の水溶液色素光増感系を用い、Arレーザ

Fig.1 クロリン $e_6\text{Na}$ の構造式

ー光(全波長)励起にともなう $^1\text{O}_2$ 分子の近赤外域発光特性を測定した。使用した実験装置は前報(1)と同様のものである。

2) 腫瘍細胞(FM3A)を用いたin vitro実験

in vitroにおける実験では、クロリン $e_6\text{Na}$ のPBS溶液中で 37°C 、一時間培養して色素を取り込ませたマウス由来のFM3A腫瘍細胞を用いた。クロリン $e_6\text{Na}$ の濃度は $1 \times 10^{-4}\text{mol/l}$ と一定にした。励起光源にはArレーザー(514.5nm)を用い、 $20\text{mW}/\text{cm}^2$ のエネルギー密度で照射した。実験装置はフローセルの代わりに細胞を収めたシャーレを用いた他は、前報(1)と同様である。

3. 測定結果

1) 分光計測

Fig.2にクロリン $e_6\text{Na}$ 水溶液の吸収スペクトル及び蛍光スペクトルの測定結果を示す。吸収スペクトルは実線で示すように 400nm 付近に大きな

Fig.2 クロリン $e_6\text{Na}$ 水溶液の吸収スペクトル及び蛍光スペクトル

ピークを持ち、さらに650nmにも比較的大きなピークを持つ。このことは、前述したようにPDTへの応用に有利な条件である。蛍光スペクトルは破線で示すように670nm付近にピークを持つ形になっている。

Fig.3に励起レーザー光の変調周波数と検出された $1.27\mu\text{m}$ 付近の蛍光成分(×)および $^1\text{O}_2$ 分子の発光成分(○)の強度との測定データを示す。実線は理論計算から得られたものであるが、実験値とほぼ一致した傾向を示す。この結果からArレーザー光に30kHz付近で変調を加えることにより、最も効率よく $1.27\mu\text{m}$ における $^1\text{O}_2$ 分子の発光を検出できることが判明した。

Fig.4は濃度 $1\times 10^{-4}\text{ mol/l}$ のクロリン e_6Na 水溶液を試料として、31.8kHzで振幅変調したArレーザー光励起(全波長)により得られた $1.27\mu\text{m}$ 帯の近赤外域発光スペクトルの測定例である。ピーク波長における発光強度は、H₂O水溶液の場合に比べて約5倍強いことが明らかになった。この溶液は酸素飽和状態では $1.27\mu\text{m}$ 付近にピークがみられるが、窒素雰囲気下におくとこのピークが消失することから、 $^1\text{O}_2$ 分子の発生によるものと判定される。この測定結果から、クロリン e_6Na は生体中で

Fig.3 Arレーザー光励起クロリン e_6Na 水溶液からの $1.27\mu\text{m}$ 帯における蛍光強度及び $^1\text{O}_2$ 分子の発光強度の励起レーザー光変調周波数依存性

Fig.4 Arレーザー光励起クロリン e_6Na 水溶液光増感系からの近赤外発光スペクトルの測定結果

Fig.5 Arレーザー光励起クロリン e_6Na 水溶液からの $1.27\mu\text{m}$ 帯における蛍光強度及び $^1\text{O}_2$ 分子の発光強度の色素濃度依存性

も光増感反応により $^1\text{O}_2$ 分子を生成し、H₂Oよりも速やかに腫瘍細胞を破壊する能力を有するものと推定される。

Fig. 6 Arレーザー光励起クロリン e_6Na 水溶液からの $1.27\mu m$ 帯における蛍光強度及び 1O_2 分子の発光強度のレーザー光強度依存性

次に、Fig. 5にクロリン e_6Na 水溶液の $1.27\mu m$ 帯における蛍光強度及び 1O_2 分子の発光強度の色素濃度依存性を示す。 1O_2 分子の発光と色素の蛍光の両者は共にクロリン e_6Na の濃度に比例して増加していくことが判る。

また、Fig. 6には同じ色素光増感系の $1.27\mu m$ 帯における発光強度及び 1O_2 分子の発光強度のレーザー光強度依存性を示す。 1O_2 分子の発光と色素の蛍光の強度はいずれもレーザー光の励起強度に比例して増加しており、前報 (I) のHpD水溶液系の測定データと比べてはるかに優れた直線性が得られていることが明かである。

2) 腫瘍細胞(FM3A)を用いたin vitro実験

Fig. 7に前報で述べたような手順によりクロリン e_6Na を取り込ませたFM3A腫瘍細胞にArレーザー光を照射して検出された近赤外域発光スペクトル特性を示す。クロリン e_6Na を含む細胞の場合には $1.27\mu m$ 付近に発光のピークが見られるが、取り込ませなかった細胞の場合にはそのピークが消失することから、in vitroな系においてもこの色素から 1O_2 分子が発生することが初めて実験的に明らかにされたわけである。

4. おわりに

Fig. 7 Arレーザー光励起によるクロリン e_6Na を取り込ませたFM3A腫瘍細胞からの近赤外域発光スペクトルの測定結果

クロリン e_6Na 水溶液をArレーザー光で励起した光増感系において $1.27\mu m$ 付近の近赤外の発光スペクトルが検出されたことより、このような系における 1O_2 分子の発生を分光学的に高い信頼性を持って確認することができた。さらに、FM3A腫瘍細胞を用いたin vitro実験において、クロリン e_6Na を取り込んだ腫瘍細胞にArレーザー光を照射することにより全く同様の方法で 1O_2 分子の生成を初めて確認することができた。現在、in vitroの実験と併せて、腫瘍細胞を用いたin vivoの実験においても 1O_2 分子の近赤外発光スペクトルの検出に成功しており、この結果については近々改めて報告する予定である。

参考文献

- 1) 町田、益子、田口、稲場、第9回日本レーザー医学会大会論文集 (1988) 投稿中
- 2) S. Takahashi, S. Sato, H. Ito, H. Inaba, S. Kimura, T. Akashi, Y. Taguchi and M. Kasai, J. Jpn. Soc. Laser Medicine, 4-1-57 (1984)
- 3) K. Iwai, Y. Ichihara, S. Kimura, Photomed. Photobiol., 10 (1987) (in press)