原 著

Photosensitizer を用いた Sonodynamic Therapy (SDT) の基礎的検討

佐々木啓吾¹ 上之原広司² 高橋 昇¹ 吉田昌弘¹ 吉本高志¹¹東北大学脳神経外科²国立仙台病院脳神経外科

Basic Study of Sonodynamic Therapy (SDT) Using Photosensitizers

Keigo SASAKI¹, Hiroshi UENOHARA², Noboru TAKAHASHI¹, Masahiro YOSHIDA¹, Takashi YOSHIMOTO¹¹Department of Neurosurgery, Tohoku University School of Medicine²Department of Neurosurgery, Sendai National Hospital

Sonodynamic therapy (SDT), a new approach to the treatment of cancer, is based on synergistic cell killing through a combination of sonosensitization and ultrasound, although the mechanism responsible for the effect remains to be elucidated. We have been interested in the emission of light due to acoustic cavitation induced by ultrasound irradiation, defined as sonoluminescence, and have been studying SDT for its potential application to secondary photodynamic therapy (PDT). We carried out a quantitative study to determine the waveforms and peak wavelengths of luminescence in an aqueous solution subjected to ultrasonic excitation and also those of light obtained through ultrasound exposure by adding a photosensitizer to the solution. We then compared the resulting spectrograms with respect to the absorption wavelength and fluorescence wavelength of the drug. We confirmed that the fluorescence wavelength spectra obtained by ultrasound excitation of aqueous solutions of photosensitizers were formed due to absorption of some of the sonoluminescence and additional drug-specific fluorescence. We also found that the specific excitation spectrum of each photosensitizer was considerably decreased when DABCO, a singlet oxygen scavenger, was added to this experimental system.

Key words: sonodynamic therapy, ultrasound, sonoluminescence, photosensitizer, photodynamic therapy

はじめに

時代の推移とともに医療に対する社会の求める声も変化し、医療行為、手技においてより簡易的、低侵襲、低負荷であることが強く求められている。

これまで超音波は様々な分野において広く用いられ、医学領域においてもその非侵襲性、簡易性を生かし、臨床診断に広く使用されると共に近年、主に悪性新生物に対する新しい治療法として研究されている^{4,7,10)}。しかし、その作用機序に対する探究は温熱効果、直接的な破壊などの物理的效果に関する事がほとんどであり、音響化学的效果についての検討は極めて少ない。これまで我々は、超音波照射により引き起こされる acoustic cavitation にともない発生する sonoluminescence と定義される発光に着

目^{2,3,8)}、音響化学療法: sonodynamic therapy (SDT) にはこの発光を用いる二次的な光力学的治療: photodynamic therapy (PDT) の可能性があると考え、検討してきた。本報告は、これまで光感受性物質としての働きを有する事が知られている anthracycline 系抗腫瘍剤¹⁾を検討薬として以下を検討したものである。水溶液中での超音波照射により得られる微弱発光の波形および peak 波長と、超音波照射により薬剤の水溶液より得られた波形および peak 波長を検討薬剤の吸収波長と励起蛍光波長を踏まえ比較検討することで、超音波による検討薬剤の励起を証明し、更に PDT においてその殺細胞効果の一因とされている singlet oxygen の scavenger を条件に付加することで specific excitation spectrum: SES の変化をみるという、いずれも定性的な研究である^{5,9,12)}。

Reprint request

佐々木啓吾: 〒980-8574 仙台市青葉区星陵町 1-1 東北大学脳神経外科

Keigo SASAKI: Department of Neurosurgery, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai 980-8574, Japan

[Received September 29, 1999; Accepted October 27, 1999]

Fig. 1 Waveforms of fluorescence in DNR solutions exposed to ultrasound

a: Waveform obtained from PBS alone, without DNR. Waveforms obtained in the presence of DNR at b: 0.01 mM, c: 0.1mM, d: 1.0mM.

対象と方法

本研究で sonosensitizer として検討した anthracycline 系薬剤は Daunorubicin hydrochloride: DNR と MX2: 3'-deamino-3'-morpholino-13-deoxy-10-hydroxycarbonylmycin である。DNR と singlet oxygen の scavenger である DABCO: 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane は Sigma Chemical (St. Louis, MO) より購入し、また MX2 は Kirin Brewery 製を用い、Phosphate buffer solution (PBS, pH7.4) を用いて濃度を調整した。

Ultrasonic apparatus and spectrometer を以下に示す。transducer は Fuji ceramics 製で照射面が 15×30 mm 奥行き 10 mm、共振周波数 361kHz のものを用いた。Hewlett Packard 製の function generator により 361kHz の正弦波を作り、power amplifier (Thamway) で増幅させ、transducer を駆動した。power amplifier は oscilloscope (Lecroy: 9374M) と接続されておりモニタリングし、一定の有効な電圧で駆動されていることを確認しながら実験を進める事ができる。spectrometer, image intensifier は浜松フォトニクス社製のものを用いた。exposure chamber は polystyrene 製の $40 \times 80 \times 50$ mm で、この内腔底面に照射面を光計測面に向け transducer を固定した。また駆動電圧に対する US 照射出力の校正は、PBS の進行波型音場において、Imotec Messtechmic: PVDF-needlehydrophone により transducer の照射面から 10 mm の中心軸付近にて微調整しながら測定した。照射条件は 361 ± 3 kHz, 1 W/cm^2 の出力、count 時間である 400 秒間。測定は常温、暗所下の環境にて行うとともに、暗箱と暗幕にて system を覆うことにより、一切の外部からの光を遮断した。exposure chamber 内に検討する水溶液 100 ml を注入し、power amplifier の駆動電圧をモニターしながら transducer を 361 ± 3 kHz, 1 W/cm^2 の照射条件で駆動し、超音波照射を行った。

結 果

PBS のみに超音波照射をした際にとらえられた発光である sonoluminescence の波形は、約 270nm より上昇し、415nm 付近に peak を有し、580nm あたりまで直線的に下降した後、緩やかな減少を示した (Fig. 1a)。

DNR の水溶液に対する超音波照射では以下のように濃度依存性に変化した。0.01mM の低濃度では PBS での波形とほぼ同様の波形を示し、0.1, 1.0mM と濃度が濃くなるにつれ徐々に第 2 の peak が現れ、それとともに第 1 の peak は低波長側にシフトした。1.0mM 以上の濃度では、第 2 の peak 値はほぼ一定し、約 590nm となり、第 1 の peak は約 390nm となった。 (Fig. 1)。

次に DNR の濃度を 1.0mM と一定にし、DABCO を濃くしながら変化をみた。DABCO が 1.0mM では付加しないものに比して第 1, 2 の peak にほぼ変化なく、濃度を上げるにつれ、第 2 の peak は減少し、10mM では著しい低下が起り、550~650nm においてはほぼ直線といえる波形となった。また第 1 の peak の波長値はこの間、どの濃度においても約 390nm と不変であった (Fig. 2)。

また MX2 においても DNR と同様に DABCO の濃度依存性に変化し、第 2 の peak を約 580nm に示すとともに、第 1 の peak は低波長側にシフトし約 390nm となり、DABCO の 10mM 付加により、第 2 の peak はほぼ消失した (Fig. 3)。

考 察

生活様式、環境の移り変わりと同様、我が国における健康、疾患に対する考え、医療に対する社会の求める声も変化し、生活の質: Quality of life という観点からもその検査、治療においてより簡易的、低侵襲であることが当然のごとく求められている。また我が国の高齢化にともなう高齢患者の増加は、検査、治療を行う上で身体にかかる負

Fig. 2 Waveforms of fluorescence in DNR solutions exposed to ultrasound
a: Waveform obtained from PBS alone, without DNR. Waveforms obtained in the presence of DNR at b: 1.0 mM. Waveforms obtained by addition of DABCO to the 1.0 mM DNR solution at c: 1.0 mM DABCO, d: 10mM.

Fig. 3 Waveforms of fluorescence in MX2 solutions exposed to ultrasound
a: Waveform obtained from PBS alone, without MX2. Waveforms obtained in the presence of MX2 at b: 1.0 mM. Waveforms obtained by addition of DABCO to the 1.0 mM MX2 solution at c: 1.0 mM DABCO, d: 10mM.

担が問題となるのは医療の場において多々あり、今後更に重要な課題になることは避けようがない。これらが医学の進歩の一つのベクトルとなり、様々な治療法が開発されている。そのひとつであるSDTは、1989年の弓田らにより Hematoporphyrin: HP を sonosensitizer として使用した殺細胞効果の検討に始まり、同グループの梅村らにより Sonodynamic therapy: SDT という名で、動物腫瘍モデルに対する HP derivative を用いた *in vivo*, *in vitro* の検討が行われ、その効果が報告されている^{11,13,14)}。しかしこのSDTについては sonosensitizer への超音波照射に際して生じる free radicals が関与していることが示唆されているが、その機序は未だ説明されていない^{6,11)}。

DNR の吸収および励起蛍光スペクトルと (Fig. 4), 超音波照射による spectrogram (Fig. 2) を照らし合わせると、300nm から sonoluminescence の peak である 415nm を

含む 450nm 付近までに比して、450~530nm は高吸収域であるためこの波長帯の減衰は大きく、第1の peak は sonoluminescence より低波長側に変位し約 390nm となり、それとともに第1の peak から高波長側への傾きが強くなったものとする。逆に約 585nm を peak とする 530~700nm の急峻な励起蛍光帯があるため、第2の peak を生じることとなり、DNR の濃度が 1.0mM 以上においてもこの第2 peak の波長は一定し、その値が DNR の励起波長である約 590nm とほぼ一致することから SES と考えた。またこの SES の出現とともに第1の peak が低波長側にシフトしたことは、この sonoluminescence の光を吸収したことを意味し、DNR が sonoluminescence を光源とし、光感受性物質として働くことを示唆する。つまり SDT の薬剤励起のメカニズムには、超音波照射により引き起こされる現象の一つである sonoluminescence とい

Fig. 4 Fluorescence and absorption curves of DNR
The dotted line and the solid line indicate absorption and fluorescence curves, respectively.

う光により薬剤が励起されるという間接的光力学的励起が一つの要素と考えられる。

次に我々は PDT における殺細胞効果の一因であることが示唆されている singlet oxygen が、この SDT の実験系においても発生し、何等かの形で関係していると考え、その証明を狙い singlet oxygen の scavenger である DABCO を同じ実験系に付加した。その結果 DABCO が 10mM の濃度において、いずれも SES の著しい減少を得るとともに、第 1 peak 波長の変化は認めなかった。それに対し PBS においてはそれ以上の濃度の DABCO を付加しても波形、peak 波長に対しては大きな変化はおこらなかった。この結果は、SDT の作用、効果機序において singlet oxygen が、何等かの関与をもつことを意味し、またその作用機序の一旦を担っているものと考え、また類似した吸収、励起蛍光スペクトルを持つ MX2 においても DNR と同様の現象が起きており、同様の作用を持つものとする。

結 語

1. SDT の作用機序には、超音波照射による acoustic cavitation にともない発生する sonoluminescence と称される発光による二次的な PDT が関連している可能性がある。
2. sonoluminescence の peak 波長である 415nm 付近に強い吸収帯を持つ薬剤は、sonosensitizer となる可能性がある。

文 献

- 1) Alessandra A, Alberto C, Vincenzo M, Giuseppe R: Photocytotoxicity of Anthracyclines upon Laser excitation in their long-wavelength absorption bands. *Radiation Res* 127: 24-29, 1991
- 2) Barber BP, Putterman SJ: Observation of synchronous picosecond sonoluminescence. *Nature* 352: 318-323, 1991
- 3) Carstensen EL, Flynn HG: The potential for transient cavitation in pulse sound. *J Ultrasound Med (Suppl)* 1: 140, 1982
- 4) Kessel D, Jeffer R, Fowlkes JB, Cain C: Effects of sonodynamic and photodynamic treatment on cellular thiol levels. *J Photochem Photobiol B* 32: 103-106, 1996
- 5) Kubat P, Zelinger Z, Jirsa M: The effect of the irradiation wavelength on the processes sensitized by protoporphyrin IX dimethyl ester. *Radiation Res* 148: 382-385, 1997
- 6) Misik V, Miyoshi N, Riesz P: EPR spin trapping study of Azo compounds in aqueous solutions by ultrasound: Potential for use as sonodynamic sensitizers for cell killing. *Free Rad Res* 25: 13-22, 1996
- 7) Miyoshi N, Misik V, Riesz P: Sonodynamic toxicity of gallium-porphyrin analogue ATX-70 in human leukemia cells. *Radiation Res* 148: 43-47, 1997
- 8) Riesz P, Kondo T: Free radical formation induced by ultrasound and its biological implication. *Free Radical BioMed* 13: 247-270, 1992
- 9) Salet C, Moreno G, Ricchelli F, Bernardi P: Singlet oxygen produced by photodynamic action causes inactivation of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 272: 21938-21943, 1997
- 10) Uchida T, Tachibana K, Hisano, S, Morioka E: Elimination of adult T cell leukemia cells by ultrasound in the presence of porfimer sodium. *Anti-Cancer Drugs* 8: 329-335, 1997
- 11) Umemura S, Yumita N, Nishigaki R, Umemura K: Mechanism of cell damage by ultrasound in combination with hematoporphyrin. *Jpn J Cancer Res* 81: 962-966, 1990
- 12) Yuan J, Mahama-Relue PA, Fournier RL, Hampton JA: Predictions of mathematical models of tissue oxygen during photodynamic therapy. *Radiation Res* 148: 386-394, 1997
- 13) Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, Umemura S: Hematoporphyrin as a sensitizer of cell-damaging effect of ultrasound. *Jpn J Cancer Res* 80: 219-222, 1989
- 14) Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, Umemura S: Synergistic effect of ultrasound and hematoporphyrin on sarcoma 180. *Jpn J Cancer Res* 81: 304-308, 1990