

亜鉛スルホフタロシアンを利用した光化学治療

東京工業大学 生命理工学部

大 倉 一 郎

Water-soluble zinc phthalocyanines substituted with different number of sulfonic acid groups were synthesized. ZnSPC_{mix} was readily incorporated in HeLa cells. Irradiation of HeLa cells with ZnSPC_{mix} resulted in cell damaged.

The cellular morphological changes due to irradiation were observed using SEM.

1 緒 言

腫瘍集積性光増感剤を、あらかじめ癌患者に投与し、その後レーザー光照射により癌を治療する、いわゆる光化学療法においては、副作用の少ない光増感剤の開発が切望されている。光化学療法用光増感剤としては、次の要素を備えていることが必要である。

- 1) 光化学的に安定である。
- 2) 腫瘍選択性が高い。
- 3) 光を照射しなければ細胞に無害である。
- 4) 組織透過性のよい長波長領域 (600~800nm) の吸光係数が大きい。
- 5) 励起三重項状態の寿命が長い。

現在、光化学療法用光増感剤の内、ヘマトポルフィリン誘導体が、臨床的に使用されている。しかし、この化合物は組織透過性のよい長波長領域の吸光係数が小さい。合併症として日光過敏症になりやすいなどいくつかの問題点がある。

フタロシアンは化学構造的にはポルフィリンと類似しているが組織透過性のよい長波長領域の

吸光係数が大きい。一例として亜鉛テトラスルホフタロシアンの吸収スペクトルを図1に示す。図には比較のためHpDの吸収スペクトルも点線で示してある。図のようにフタロシアンはポルフィリンと異なり長波長領域における吸光係数が大きく、深部の癌に対して有用であることが期待される。さらに腫瘍組織への集積性もよく¹⁾、光照射に対して安定であることから、光化学治療用の新しい感光色素としての期待は大きい。

フタロシアンは中心金属や側鎖を変えることにより様々な種類のフタロシアンが合成されている²⁻⁷⁾。とくに、アルミニウムや亜鉛を中心金

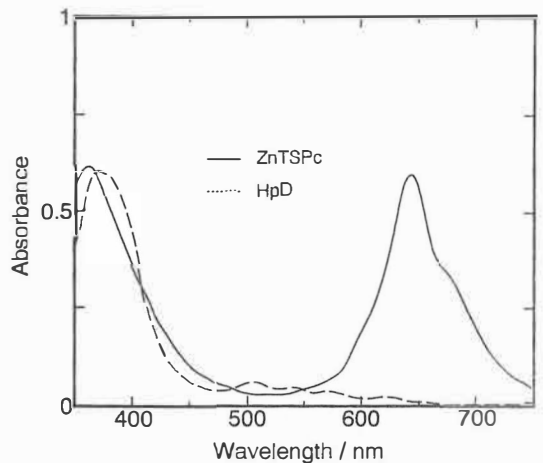


図 1 亜鉛テトラスルホフタロシアン (構造を図2に示す。ZnTSPc) と HpDの吸収スペクトル

Photodynamic Therapy by Sulfonated Zinc Phthalocyanines

Ichiro Okura

Faculty of Bioscience and Biotechnology

Tokyo Institute of Technology



属とするフタロシアニンは光照射に対して安定であり、光励起三重項寿命が、他のフタロシアニンに比べて長いことから、これらのフタロシアニンが有効であると考えられている。フタロシアニンを水溶性にするには側鎖をスルホン化するか、カルボキシル化することが行われる。とくにスルホ基の結合したフタロシアニンは抗腫瘍活性が高いといわれている⁸⁾。

そこで本研究では、中心金属として亜鉛を、側鎖としてスルホ基数が異なるフタロシアニンを合成し、その光化学的性質を調べるとともに光化学治療における効果を検討した。

2 実験

2.1 試薬

亜鉛スルホフタロシアニンは、Weberらの方法を改良して合成した^{9, 10)}。構造を図2に示す。スルホ基数の異なる亜鉛フタロシアニンは原料化合物のモル比を変えることにより調製した。

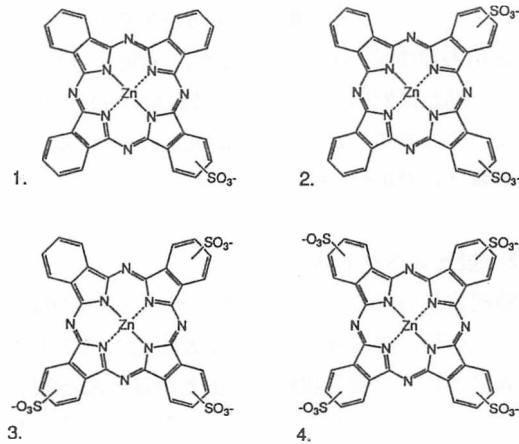


図2 亜鉛フタロシアニンの構造

- 1: 亜鉛モノスルホフタロシアニン
 - 2: 亜鉛ジスルホフタロシアニン
 - 3: 亜鉛トリスルホフタロシアニン
 - 4: 亜鉛テトラスルホフタロシアニン (ZnTSPc)
- ZnSPC_{mix}は1, 2, 3の混合物

HPLCによりこれらスルホ基数の異なる化合物の完全分離を試みたが、完全には単独物質が得られなかった。亜鉛テトラスルホフタロシアニン(スルホ基数4個の化合物、ZnTSPcと略記する)とそれ以外の化合物(スルホ基数1~3の混合物で平均スルホ基数2.3のものをZnTSPC_{mix}と略記する)とに分離し、それぞれについて光化学的挙動と光化学的治療効果とを比較検討した。

細胞は、MH134細胞をマウス腹腔中にて継代培養したもの、及び対数増殖期にあるHeLa細胞を用いた。培地はGIBCO社製F-10培地をそのまま用いた。

2.2 フタロシアニンの細胞への取り込み

フタロシアニンの細胞への取り込みにはHeLa細胞を用いた。フタロシアニンを濃度 4×10^{-6} Mとなるように培地に溶解し、この溶液をHeLa細胞と30分間接触させた。培地で細胞を洗浄した後、アルカリ水溶液で細胞を破壊し、蛍光の励起スペクトルを測定することにより取り込み量を求めた。図3は、殺細胞効果に関する実験方法を示したフローチャートである。まずHeLa細胞をシャーレで培養し、その後シャーレより培地を抜き取り、所定の濃度に調整したフタロシアニンの入った培地と交換する。30分間インキュベートすることにより、フタロシアニンをHeLa細胞に取り込ませた。その後、培地で洗浄し、レーザー光照射を行った。レーザー光照射には、アルゴンレーザー励起DCM色素レーザーを用いた。波長は680nm、出力は 100 mW/cm^2 である。殺細胞効果の判定には、光照射後4時間経過したところでトリパンブルー染色を用いて行った。また、細胞の形態変化は、走査電子顕微鏡を用いて観察した。

固形腫瘍としてはC3H/He系マウスの側腹部皮下に肝癌由来のMH134細胞を移植し、大きさが直径約10mmになった固形腫瘍を用いた。腫瘍が各臓器(肺、腎、脾、肝)におけるZnTSPc濃度の経時変化を測定するために、15mg/kgのZnTSPcをマウス腹腔内に投与した。ZnTSPc投与2, 4, 6, 12, 24、

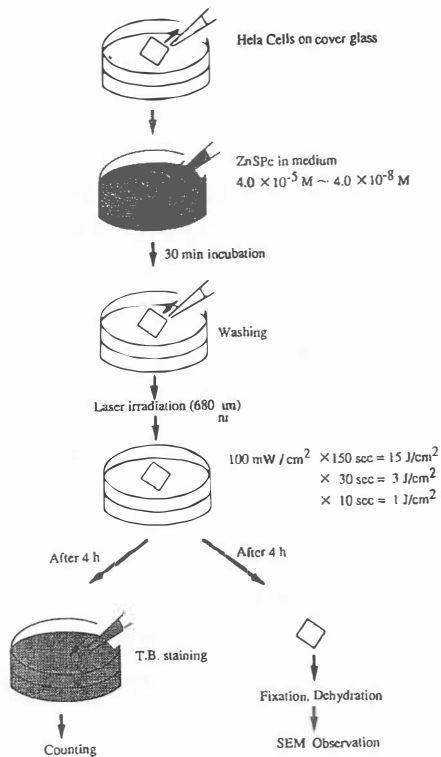


図3 殺細胞効果に関する実験方法のフローチャート

48時間後に屠殺し、ホモジネイト後腫瘍および各臓器の蛍光強度を測定した。

3 結果および考察

3.1 吸収スペクトルおよび励起三重項寿命

ZnTSPcの吸収スペクトルは図4に示すように636nm付近に極大吸収を有する。これは、フタロシアニンの会合体の吸収スペクトルであり、ZnTSPcは水溶液中で会合体になっていることを示している。この会合体は光励起寿命が短く、光化学治療には不適当である。この水溶液に、中性の界面活性剤であるトリトンX-100を添加すると、吸収スペクトルは2~4の様に変化し、トリトンX-100濃度が10%のときに、5の吸収スペクトルとなった。界面活性剤の濃度を増大させるに従い、636nmの吸収強度が減少し、678nmの吸収強度が増加した。これは、界面活性剤の添加により会合体

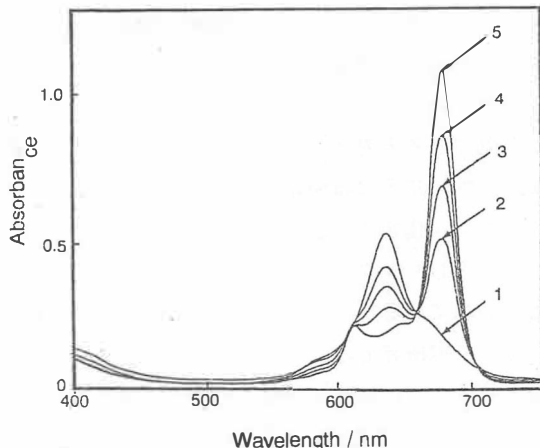


図4 ZnTSPcの吸収スペクトル

ZnTSPc濃度: $2.8 \times 10^{-2} \cdot \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
 トリトン×100、なし(1)、1(2)、
 2(3)、4(4)、10(5)

が解離して単量体になったためと考えられる。後述するように細胞に取り込まれたフタロシアニンは単量体で存在し、細胞は界面活性剤の添加と同様の効果を示す。

励起三重項寿命の測定は次の様に行った。界面活性剤を含む生理食塩水(TritonX-100; 10%)にフタロシアニンを溶解し、凍結脱気を5回行い、三重項寿命測定用の試料とした。測定にはYAGレーザー励起DCM色素レーザー(波長680nm)を使用した。その結果、ZnTSPc、ZnSPc_{mix}いずれも三重項寿命は約250μsであった。

3.2 蛍光スペクトル

励起波長610nmにおける蛍光スペクトルを図5に示す。ZnTSPc水溶液ではほとんど蛍光スペクトルが測定されず、会合状態では蛍光がほとんど観測されないことがわかる。トリトンX-100を添加すると、690nm付近に強い蛍光が観測され、ZnTSPcが単量体として存在すると強い蛍光が得られることがわかる。また、図5-BはMH134細胞にZnTSPcを取り込ませた前後における蛍光の差スペクトルである。図5-Aと比較すると、ZnTSPcは細胞内では単量体として存在していることが分かる。

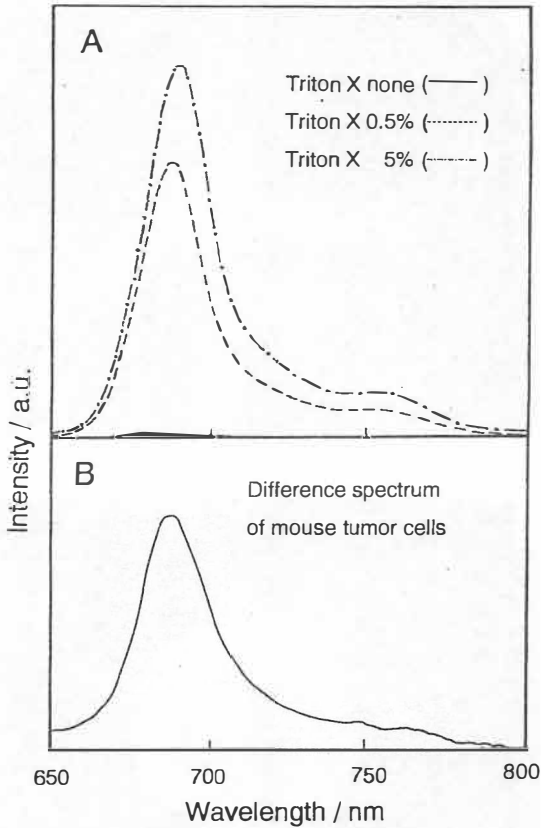


図 5 ZnTSPcの蛍光(A)およびマウスMH134細胞に ZnTSPcを取り込ませた前後における 蛍光スペクトル(B)

3.3 細胞への取り込み

細胞へのフタロシアニンの取り込みはフタロシアニンの励起スペクトルを測定することにより行った。結果を図6に示す。実線はZnSPc_{mix}、破線はZnTSPcの場合である。両者を比較するとZnSPc_{mix}がZnTSPcに比べ、はるかに細胞によく取り込まれていることが分かる。

固形腫瘍を用いた場合、マウス腫瘍の蛍光強度は投与12時間後に最大となり、これ以降24時間までの間は各臓器より高い値を保った。図7にZnTSPc投与12時間後の腫瘍および各臓器の蛍光スペクトルを、図8に経時的な蛍光強度の変化を示す。固形腫瘍および各臓器におけるZnTSPcの取り込みの測定において、腫瘍を含むすべての臓器は

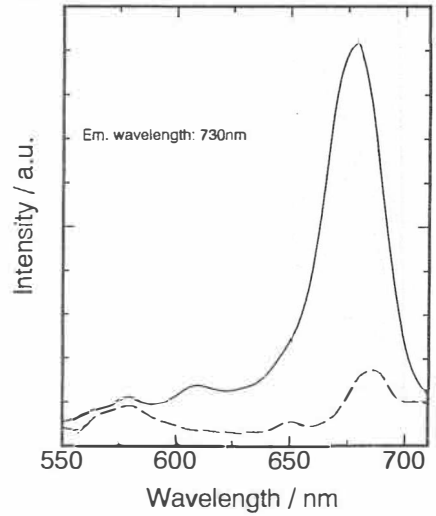


図 6 フタロシアニンの励起スペクトルによる HeLa細胞への取込み量の比較 ZnSPc_{mix}:実線 ZnTSPc:破線

投与12時間後で蛍光強度が最高値を示した。また腫瘍は10~24時間の間、各臓器よりも高値であった。ZnTSPcの排泄はきわめて早く、投与30分後には尿中に認められている。この様にZnTSPcは、腫瘍集積性が高く、腫瘍集積に要する時間が非常に短い。ヒトへのZnTSPc応用においてもこの状況が当てはまるなら、感光剤投与から治療開始までの時間短縮に大いに貢献するものと思われる。

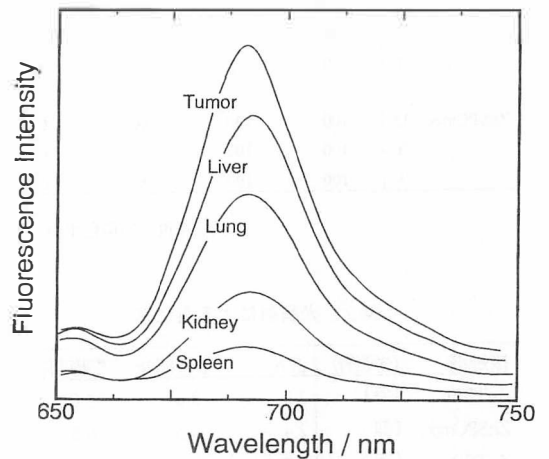


図 7 C3Hマウス各細胞におけるZnTSPcの 蛍光スペクトルZnTSPc取込み12時間後に測定

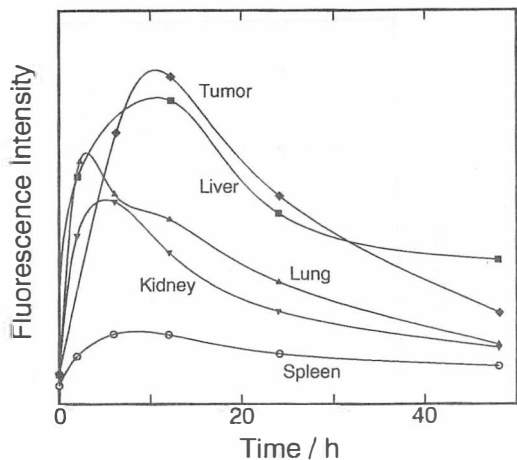


図 8 C3Hマウス各組織におけるZnTSPcの蛍光強度

3.4 殺細胞効果

表1に、殺細胞効果に対する照射エネルギー依存性およびフタロシアニンの濃度依存性を示す。表中の数字はトリパンブルーの被染色率を表し、数字が大きいほどよく死滅していることを示している。ZnTSPcでは、 $4.0 \times 10^{-5} \text{M}$ の濃度のとき、照射エネルギーが減少するに伴い、殺細胞効果が減

表 1 PDT後のトリパンブルー染色

照射エネルギー $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$		濃度 / M			
		4.0×10^{-5}	4.0×10^{-6}	4.0×10^{-7}	4.0×10^{-8}
ZnTSPc	15	100	0	0	-
	3	91	0	0	-
	1	30	0	0	-
ZnSPCmix	15	100	100	100	0
	3	100	100	100	0
	1	100	100	90	0

単位：被染色率/%

表 2 光照射による溶血率

接触液	(光照射)	直後	1時間後	5時間後
ZnTSPc	(無)	2.3	3.6	5.0
ZnSPCmix	(無)	2.4	4.5	6.5
ZnTSPc	(有)	2.7	6.5	10
ZnSPCmix	(有)	8.2	90	95<

(単位%)

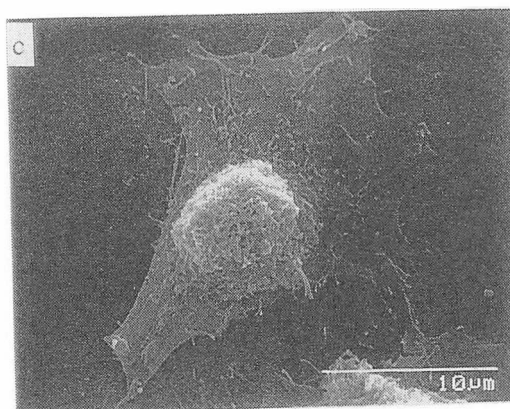
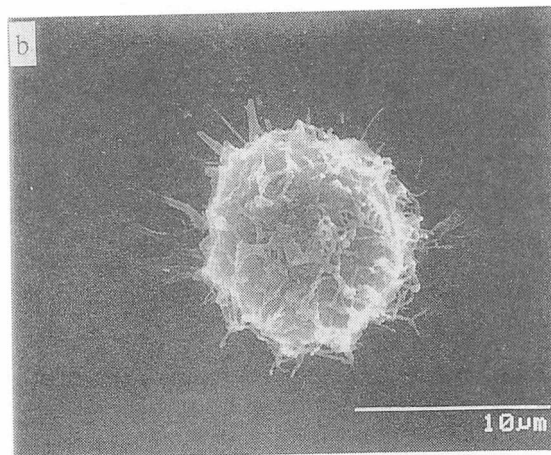
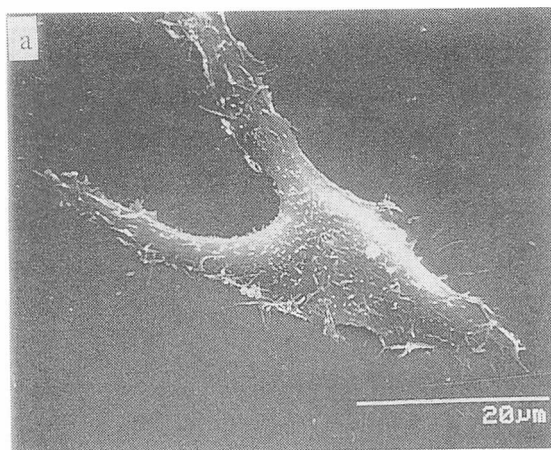


図 9 SEMによるHeLa細胞の形態観察

a: 光照射前のHeLa細胞

b: ZnTSPcを用い光照射後のHeLa細胞

c: ZnSPCmixを用い光照射後のHeLa細胞

少している。また、 $4.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 以下の濃度では、殺細胞効果が認められなかった。これに対し、 $\text{ZnSPc}_{\text{mix}}$ を用いた場合には $4.0 \times 10^{-7} \text{M}$ の濃度までは照射エネルギーに関係なく、強い殺細胞効果を示すことがわかった。これは、 $\text{ZnSPc}_{\text{mix}}$ の方がより細胞に取り込まれやすいためと思われる。

以上により、 ZnTSPc と $\text{ZnSPc}_{\text{mix}}$ との比較では $\text{ZnSPc}_{\text{mix}}$ の方がより低い濃度、および、より低いエネルギーでも、優れた殺細胞効果を示すことが判明した。

3.5 光溶血反応

細胞膜のモデルとしてヒト赤血球を用いた光照射の実験を行った。この実験で赤血球が溶血を起こせば、細胞膜が破壊されていることが示唆される。実験は、赤血球浮遊液と、生理食塩水に溶解したフタロシアニンとを接触させ、洗浄した後、再懸濁させて光照射を行った。照射光として、アルゴンレーザー励起DCM色素レーザーを用い（波長は680nmである）。所定時間経過後、遠心分離を行い、上澄みの吸光度を測定した。観測は長は415nmである。

結果を表2に示す。表中の数字は、完全に溶血したときの吸光度を100%とした割合で示してある。この結果より、赤血球は、 $\text{ZnSPc}_{\text{mix}}$ と接触させ、光照射を行った場合にのみ1時間後に90%、5時間後には95%以上の溶血を起こすことが判明した。

4 総括

本研究では、スルホ基数の異なる亜鉛フタロシアニンを合成し、光化学療法における有用性を検討した。蛍光分析の結果から、フタロシアニンは細胞内では単量体として存在し、 $\text{ZnSPc}_{\text{mix}}$ の方が ZnTSPc よりも効果的に細胞に取り込まれていることが判明した。

殺細胞効果の比較では、 $\text{ZnSPc}_{\text{mix}}$ の方が、より

低い濃度、より低いエネルギーにおいても、優れた殺細胞効果を示すことがわかった。電子顕微鏡による細胞の致死過程の形態学的観察（図9）、および溶血実験の結果から、 $\text{ZnSPc}_{\text{mix}}$ のおもな作用部位は細胞膜であり、光照射により細胞膜が大きなダメージを受けるものと思われる。

文献

- 1) 西坂 剛 他：水溶性亜鉛フタロシアニンを利用した光化学療法の研究（IV） ZnTSPc の臓器集積性について、日本レーザー医学会誌 997-99 1989
- 2) J. E. van Lier, N. Brasseur, B. Paquette, J. R. Wagner, H. Ali, R. Langlois and J. Rousseau: Phthalocyanines as Sensitizers for Photodynamic Therapy of Cancer. *NATO ASI. Ser.* H15435-444 1988
- 3) J. R. Wagner, H. Ali, R. Langlois, N. Brasseur and J. E. van Lier: Biological Activities of Phthalocyanines-IV. Photooxidation of L-Tryptophan by Selectively Sulfonated Gallium Phthalocyanine: Singlet Oxygen Yields and Effect of Aggregation. *Photochem. Photobiol.* 45587-594 1987
- 4) N. Brasseur, H. Ali, R. Langlois and J. E. van Lier: Biological Activities of Phthalocyanines-VII. Photoinactivation of V-79 Chinese Hamster cells by Selectively Sulfonated Gallium Phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 46739-744 1987
- 5) B. Paquette, H. Ali, R. Langlois and J. E. van Lier: Biological Activities of Phthalocyanines-VIII, Cellular Distribution in V-79 Chinese Hamster Cells and Photo-toxicity of Selectively Sulfonated Aluminium Phthalocyanines, *Photochem. Photobiol.* 47215-220 1988
- 6) N. Brasseur, H. Ali, R. Langlois and J.

- E. van Lier : Biological Activities of Phthalocyanines-VI. Photosensitization of V-79 Chinese Hamster Cells and EMT-6 Mouse Mammary Tumor by Selectively Sulfonated Zinc Phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 47705-711 1988
- 7) H. Ali, R. Langlois, J. R. Wagner, N. Brasseur, B. Paquette and J.E. van Lier: Biological Activities of Phthalocyanines-X. Syntheses and Analyses of Sulfonated Phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 47 713-717 1988
- 8) C.C. Leznoff, S. Vigh, P. I. Svirskaya, S. Greenberg, D. M. Drew, E. Ben Hur and I. Rosenthal : Synthesis and Photocytotoxicity of Some New Substituted Phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 49 279-284 1989
- 9) J. H. Weber and D. H. Busch : Complexes Derived from Strong Field Ligands. XVI. Magnetic Properties of Transition Metal Derivatives of 4, 4', 4'', 4'''-Tetra-sulfo phthalocyanine, *Inorg. Chem* 4 469-471 1965
- 10) T. Nishisaka, H. Nanasawa, Y. Sakuma and I. Okura : Photodynamic Therapy by Zinc phthalocyanine as Tumor Localizer, *日本レーザー医学会誌*, 1311-15 1992