

各種金属クロリンキレートの光力学作用について

¹⁾石 崎 太 一・¹⁾川 村 美 笑 子・²⁾井 戸 達 雄・¹⁾木 村 修 一
(¹⁾東北大学・農学部・栄養化学*, ²⁾東北大学・サイクロトロン RI センター**)

Photodynamic effect of metal chlorin chelates

Taichi ISHIZAKI¹⁾, Mieko KAWAMURA¹⁾

Tatsuo IDO²⁾, Shuichi KIMURA¹⁾

¹⁾Department of Food Chemistry, and

²⁾Cyclotron Radioisotope Center, Tohoku University

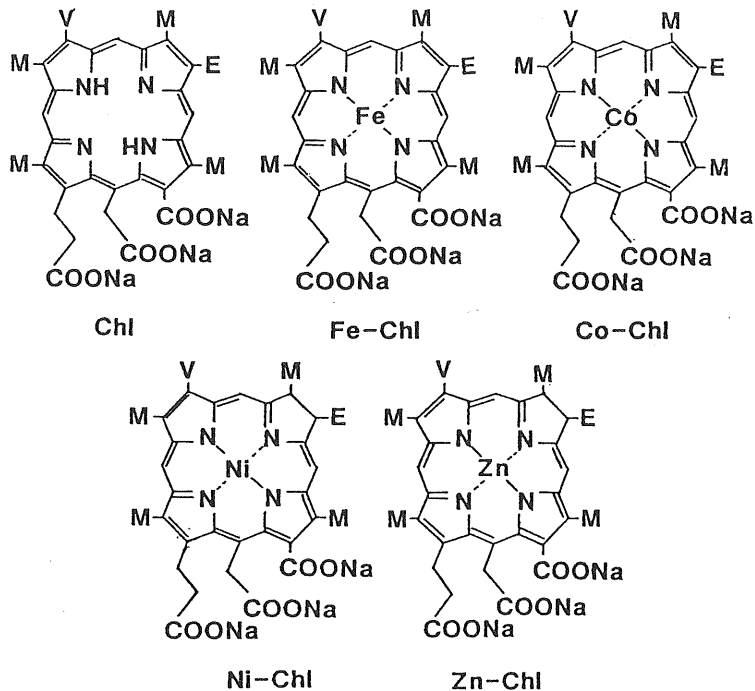
The mechanism of photodynamic action and application for tumor diagnosis of pheophorbide (Pheo) derivatives have been investigated in our laboratory^{1,2)}. Chlorin (Chl), which has a hydrophilic property, is more suitable for photodynamic therapy than pheophorbide, because accumulation of Chl in normal tissues was very low^{3,4)}. And we probed that ⁴⁸V-labeled Chl is useful as a tumor diagnostic agent for positron CT⁵⁾.

In this experiment, the cell-killing effect and hemolysis of new metal Chl chelates (Fe-Chl, Co-Chl, Ni-Chl, Zn-Chl) were studied. The cell-killing effect and hemolysis of metal Chl chelates under irradiation is much lower than free Chl. Fe-Chl have hemolysis action without irradiation. We suggested that the mechanism of hemolysis by Fe-Chl is the oxidation of substrates of cell membrane.

筆者らは、フェオホーバイド及びその誘導体の光力学作用ならびにその癌診断・治療への応用について研究を進めている^{1,2)}。この研究の過程において、水溶性で、さらに、癌組織への集積性と、より強力な光力学作用をもつ誘導体の合成を試み、もっとも効果的な物質としてクロリンを得ることができた。このクロリンは、フェオホーバイド同様に強い光力学作用をもち、かつ癌診断薬として高い可能性をもつという知見を得ている^{3,4)}。さらに、短寿命でポジトロン放射活性をもつ核種である⁴⁸Vをキレートさせた⁴⁸V-クロリンが、腫瘍をコントラスト良くイメージし、ポジトロンCTへの応用が充分期待できることも報告している⁵⁾。そこで、本実験では新たに合成された鉄、コバルト、ニッケルおよび亜鉛の各種金属クロリンキレート (Fig 1) の光力学作用について検討した。

*所在地：仙台市青葉区堤通雨宮町1-1 (〒981)

**所在地：仙台市青葉区荒巻字青葉 (〒981)



M, -CH₃, E, -C₂H₅, V, CH=CH₂.

実 験 方 法

以下の項目について検討した。

1) 吸収スペクトルの測定

各種金属クロリンを蒸留水に溶解させて、300-750nm の吸収スペクトルを分光光度計にて測定し、その最大吸収波長及び最大吸光係数を求めた。

2) 殺細胞効果

C3H/He マウスの乳線由来の腹水癌である FM3A 細胞^{6,7)}を用いた。腹水より得た腫瘍細胞を PBS (Phospho buffer saline) に懸濁 ($2.0 \times 10^6/\text{ml}$) させた。この細胞懸濁液 (1 ml) に各種金属クロリン (20nmol) を加えた。この反応液を暗所で 37°C で 30 分インキュベートした後、遠心分離によって過剰のクロリンを取り除き、再び PBS に懸濁させた。その懸濁液をシャーレに移して、光照射 (10000lux) を行った後、トリパンブルーで死細胞を染色して殺細胞効果 (死細胞/全生細胞 $\times 100$) を求めた。

3) 溶血試験

赤血球は体重 300g の Wistar ラットの腹大動脈より採血し、遠心分離によって得た。この赤血球を 2% になるように PBS に懸濁させた。この赤血球懸濁液 (1 ml) に各種金属クロリンを (20nmol) 加えた。この懸濁液を暗所で 37°C で 30 分インキュベートした後、遠心分離によって過剰のクロリンを取

り除き、再びPBSに懸濁させた。この赤血球懸濁液をシャーレに移した後、光照射（10000 lux）を行った。そして、PBSで希釈した後、遠心分離して、上清に溶出した血色素由来の535nmにおける吸収を測定することによって、溶血率を求めた。なお、PBSの代わりに蒸留水をもちいて溶血させたものを100%溶血とした。

4) 赤血球膜中の過酸化脂質（TBA 値）

5%赤血球懸濁液（1ml）にクロリン及び鉄クロリンを（100nmol）加えて、赤血球に取り込ませた。この赤血球から、クロロホルム：メタノール：水（1：2：0.8）を用いて、膜中の脂質を抽出し、それをDMSO溶液（300mg/ml）とした。このDMSO溶液50 μ lを0.67%のTBA試薬（2-thiobarbituric acid）と反応させて生じた赤色物質を535nmで比色定量することによって、膜のTBA値を測定した。

結 果 と 考 察

各種金属クロリンの最大吸収波長及び最大吸光係数をTable 1に示した。その結果、各種金属クロリンの最大吸光係数は、強い光力学作用をもつクロリンと比較して、非常に小さく、光エネルギーの利用効率が悪いと考えられる。

Table 2に各種金属クロリンの腫瘍細胞における殺細胞効果を示した。コントロールであるクロリンと比較して、各金属クロリンは非常に低い値を示した。ただ、亜鉛クロリンが10分後より、若干の高値をしめしたが、これは光によって亜鉛が解離し、フリーのクロリンが生じたものと考えうる。さらに、反応開始時に鉄クロリンが他のクロリンより、やや高い殺細胞効果をしめしたが、有為差は見られなかった。

Table 1. 各種金属クロリンの最大吸収波長及びそのモル吸光係数

	吸収波長 (nm)	モル吸光係数 ($M^{-1}cm^{-1}$)
クロリン	400	14.92×10^4
Fe-クロリン	398	3.60×10^4
Co-クロリン	422	1.28×10^4
Ni-クロリン	406	2.00×10^4
Zn-クロリン	404	6.23×10^4

溶媒：蒸留水

Table 3に各種金属クロリンの溶血試験の結果を示した。これも殺細胞効果と同様の結果が得られ、各種金属クロリンは強い光力学作用をもたないことがわかった。しかし、興味あることは、光を当てないときに、鉄クロリンが有為の高い溶血率を示した点である。

この鉄クロリンの高い溶血率について、さらに検討してみたところ、濃度にしたがって溶血率が高くなり、光エネルギーが存在しなくても鉄クロリンは溶血を引き起こすことが確認できた。

Table 2. Cell-killing effect of metallo-Chlorin e6Na on FM3A tumor cell *in vitro*

Cell-killing(%)					
Time	Chl	Fe-Chl	Co-Chl	Ni-Chl	Zn-Chl
0 min	0.00+0.00	0.72+0.41	0.23+0.23	0.35+0.26	0.43+0.25
5 min	7.09+1.95	6.01+1.39	2.65+1.08	2.93+1.05	5.74+1.63
10min	40.40+5.79	3.91+0.98*	3.82+1.05*	3.22+0.89*	13.66+0.27**
20min	61.22+3.78	3.69+1.59*	2.52+0.78*	6.30+1.26*	17.91+0.26*
30min	71.90+5.26	8.38+2.96*	2.64+0.56*	10.90+2.21*	22.30+5.18*

Irradiation was performed at 10000 lux.

Each value is a mean $\pm$ SE of 8 samples.

Significantly different from Chl group. (* $p < 0.001$, **0.01)

Table 3. Photodynamic effect of metallo-Chlorin e6Na on red blood cell *in vitro*

Photohemolysis(%)					
Time	Chl	Fe-Chl	Co-Chl	Ni-Chl	Zn-Chl
0 min	0.26+0.13	2.27+0.23*	0.11+0.07	0.24+0.05	0.44+0.25
5 min	3.70+0.73	5.83+0.55	1.54+0.48**	2.35+0.30	8.27+1.35
10min	34.70+7.93	5.90+0.39**	2.23+0.45**	1.61+0.08**	13.62+0.57**
20min	92.02+0.86	4.33+0.23*	1.76+0.24*	3.42+0.09*	19.91+0.06*
30min	86.01+1.58	5.76+0.13*	6.34+0.82*	8.01+0.90*	36.90+1.39*

Irradiation was performed at 10000 lux.

Each value is a mean $\pm$ SE of 8 samples.

Significantly different from Chl group. (* $p < 0.001$, ** $p < 0.05$)

Table 4. The effect of Fe-Chl on RBC membrane

Group	TBA value (nmol/mg)
Control	0.803+0.06
Chl	0.883+0.04
Fe-Chl	1.247+0.06*

Addition ; 160nmol/ml

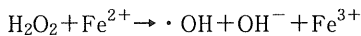
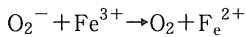
Each value is mean $\pm$ SE of 4 samples.

Significantly different from Chl group. (* $p < 0.001$)

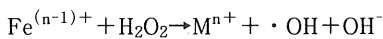
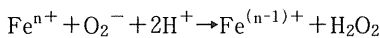
Table 4 にクロリン及び鉄クロリンを取り込ませた赤血球膜中における TBA 値について示した。鉄クロリンの TBA 値はクロリンと比較して有為に高く、膜脂質が酸化されているものと考えうる。

鉄は、溶液中に存在していてもトランスフェリンと結合していなくては赤血球に取り込まれない。しかし、クロリンは生体膜と高い親和性を有しているので⁸⁾、クロリンのキレートである鉄クロリンも膜に取り込まれやすいと考えられる。膜に取り込まれた鉄クロリンは鉄の価数が増加することによって活性酸素を生じ（フェントン反応）⁹⁾、それが膜の脂質を酸化したり、酸化促進¹⁰⁾をしたりして溶血を引き起こすものと考えられる。

（活性酸素の生成）



（脂質の酸化促進）



以上の結果より、各種金属クロリンはフェオホーバイドやクロリンの様に強い光力学作用を有しない事がわかった。鉄クロリンは光エネルギーが存在しなくても溶血能を有することが明らかとなり、その作用機構は鉄イオンの価数変化によって生じた活性酸素による膜脂質の酸化であると推察できる。

文 献

1. 木村修一，磯部明彦（1978）フェオホーバイドによる光過敏症成立時における過酸化脂質の役割。過酸化脂質研究，2：39
2. 木村修一，（1980）フェオホーバイド。医学のあゆみ，112：878
3. IWAI, K., Y. ICHIHARA and S. KIMURA (1989) J. Clin. Biochem. Nutr. 6：262
4. 木村修一，岩井邦久，井戸達雄，稲場文男（1990）フェオホーバイド関連物質による癌の診断と治療。フリーラジカルの臨床，4：59
5. IWAI, K., S. KIMURA, T. IDO and R. IWATA (1990) Nucl. Med. Biol. 17：775
6. 小山秀機（1980）FM3A 株。組織培養，6：235
7. 斎藤武郎（1962）C3H マウス乳癌の腹水型転換。福島医学雑誌，12：335
8. IWAI, K., S. KIMURA and T. IDO (1989) CYRIC annual report pp. 205
9. 伊藤 敦，伊藤 隆，（1988）可視光・紫外光。活性酸素，共立出版 pp.143
10. 小沢俊彦，（1988）放射線。活性酸素，共立出版 pp. 159