

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	抗腫瘍抗体結合型光増感剤を用いた光線力学治療
Title(English)	
著者(和文)	小倉俊一郎
Author(English)	Shun-ichiro OGURA
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第4909号, 授与年月日:2001年9月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor of Engineering, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第4909号, Conferred date:2001/9/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

# 抗腫瘍抗体結合型光増感剤を用いた 光線力学治療

バイオテクノロジー専攻  
大倉研究室 小倉俊一郎

## 目次

### 第一章 緒論

1.1 はじめに .....	2
1.2 光線力学治療 .....	4
1.2.1 光線力学治療の概念 .....	4
1.2.2 光線力学治療における光増感反応 .....	6
1.3 第一世代および第二世代の光線力学治療用光増感剤 .....	10
1.3.1 ヘマトポルフィリン誘導体(HpD) .....	10
1.3.2 第二世代の光増感剤 .....	13
1.3.3 フタロシアニン類縁体 .....	19
1.3.4 クロリン類縁体 .....	22
1.4 腫瘍選択性の高い光増感剤の開発 .....	24
1.4.1 抗腫瘍抗体結合型薬剤 .....	24
1.4.2 抗腫瘍抗体結合型光増感剤 .....	26
1.4.3 その他の腫瘍選択性のある光増感剤 .....	27
1.5 本研究の意義と目的 .....	28
1.6 参考文献 .....	30

### 第二章 亜鉛フタロシアニンの光線力学的効果と腫瘍選択性の付与

2.1 はじめに .....	36
2.2 実験方法 .....	37
2.3 結果と考察 .....	51
2.3.1 水溶性亜鉛フタロシアニンの構造と吸収スペクトル .....	51
2.3.2 水溶性亜鉛フタロシアニンの抗腫瘍効果および光線過敏症の評価 ..	54

2.3.3 水溶性亜鉛フタロシアニンの腫瘍選択性 .....	59
2.3.4 抗体結合型 ZnTCPc の調製 .....	60
2.3.5 抗体結合型 ZnTCPc の吸収スペクトル .....	65
2.3.6 抗体結合型 ZnTCPc のアセトン沈殿 .....	67
2.3.7 トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) によるアミノ基の定量 ..	71
2.3.8 抗体結合型 ZnTCPc の MM46 細胞への取り込み量 .....	72
2.3.9 抗体結合型 ZnTCPc の MM46 細胞に対する光毒性 .....	75
2.3.10 MM46 担癌マウスの各臓器中における抗体結合型 ZnTCPc 蓄積量 ..	78
2.4 まとめ .....	82
2.5 参考文献 .....	83

第三章 抗腫瘍抗体結合型クロリン e6 の調製とその光線力学的効果

3.1 はじめに .....	86
3.2 実験方法 .....	87
3.3 結果と考察 .....	95
3.3.1 Ce6 の吸収スペクトルと蛍光スペクトル .....	95
3.3.2 抗体結合型 Ce6 の調製 .....	97
3.3.3 抗体結合型 Ce6 の吸収スペクトルと結合比の算出 .....	99
3.3.4 抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞への取り込み量 .....	102
3.3.5 抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞への取り込み阻害 .....	105
3.3.6 抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞への局在部位 .....	108
3.3.7 抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞に対する殺細胞効果 .....	112
3.3.8 抗体結合型 Ce6 の一重項酸素生成能と光励起三重項寿命 .....	116
3.4 まとめ .....	119
3.5 参考文献 .....	120

## 第四章 抗腫瘍抗体結合型クロリン e6 の腫瘍細胞認識能と光増感作用に対するクロリン結合数の影響

4.1 はじめに .....	122
4.2 実験方法 .....	123
4.3 結果と考察 .....	128
4.3.1 Ce6 結合数の異なる抗体結合型 Ce6 の調製と吸収スペクトル .....	128
4.3.2 抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞への取り込み量 .....	131
4.3.3 抗体結合型 Ce6 の腫瘍細胞認識能の評価 .....	134
4.3.4 抗体結合型 Ce6 の一重項酸素生成能 .....	136
4.3.5 抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞への光毒性 .....	141
4.3.6 抗体結合型 Ce6 の取り込み量に対する殺細胞効果 .....	143
4.4 まとめ .....	146

## 第五章 総括

5.1 総括 .....	149
5.2 今後の展望 .....	153

# 第一章

## 緒論

## 1.1 はじめに

先進国における死因の第一位は悪性腫瘍（癌）であり、世界保健機関（WHO）の統計では、全世界で年間約600万人が癌で死亡している。現在、癌の治療法としては外科手術による腫瘍の切除、放射線療法、および化学療法が用いられている。しかし、外科手術では腫瘍周辺を広範に切除するため、患者の負担が大きく高齢者には適用できない。また、術後の患者の生活の質（QOL）を考えた場合においても外科手術による患者の負担は計り知れない。外科手術以外の癌の治療法として用いられている放射線療法および化学療法は、腫瘍細胞のみならず正常細胞をも無差別に攻撃してしまう問題点があり、これらにかわる有力な癌の治療法の開発が望まれている。

これまでの癌の治療法の欠点を補う治療法として光線力学治療（PDT）が用いられている。この治療法は、腫瘍に集積する性質のある光増感剤とレーザー光の局部照射を組み合わせた癌の治療法である。光線力学治療用光増感剤は腫瘍集積性があり、レーザー光照射により腫瘍を選択的に破壊することができる。また、近年のレーザーと内視鏡の発達により、その適用範囲も拡大されている。さらに、光増感剤の発する蛍光を利用した癌診断も行われるようになってきた。このように光線力学治療は比較的新しい治療法であることから光増感剤の開発など改良の余地が多く残されている。

現在、光線力学治療用光増感剤としてヘマトポルフィリン誘導体（HpD）であ

るPhotofrin®が臨床で用いられている。しかし、Photofrin®は腫瘍選択性が乏しいため治療効果が低いという欠点がある。また、現在開発が進んでいる光増感剤も腫瘍選択性が低いものが多く、腫瘍選択性の高い光増感剤の開発が望まれている。

そこで本研究では腫瘍選択性の高い光増感剤を開発するため抗腫瘍抗体結合型の光増感剤を合成し、その光線力学治療への応用を検討した。

本章では、光線力学治療の概念と臨床で用いられている光線力学治療用光増感剤について概観する。また、フタロシアニンおよびクロリンなどの新しいタイプの光増感剤および抗体結合型光増感剤について従来の研究成果を述べ、本研究の背景、意義および目的を述べる。

## 1.2 光線力学治療

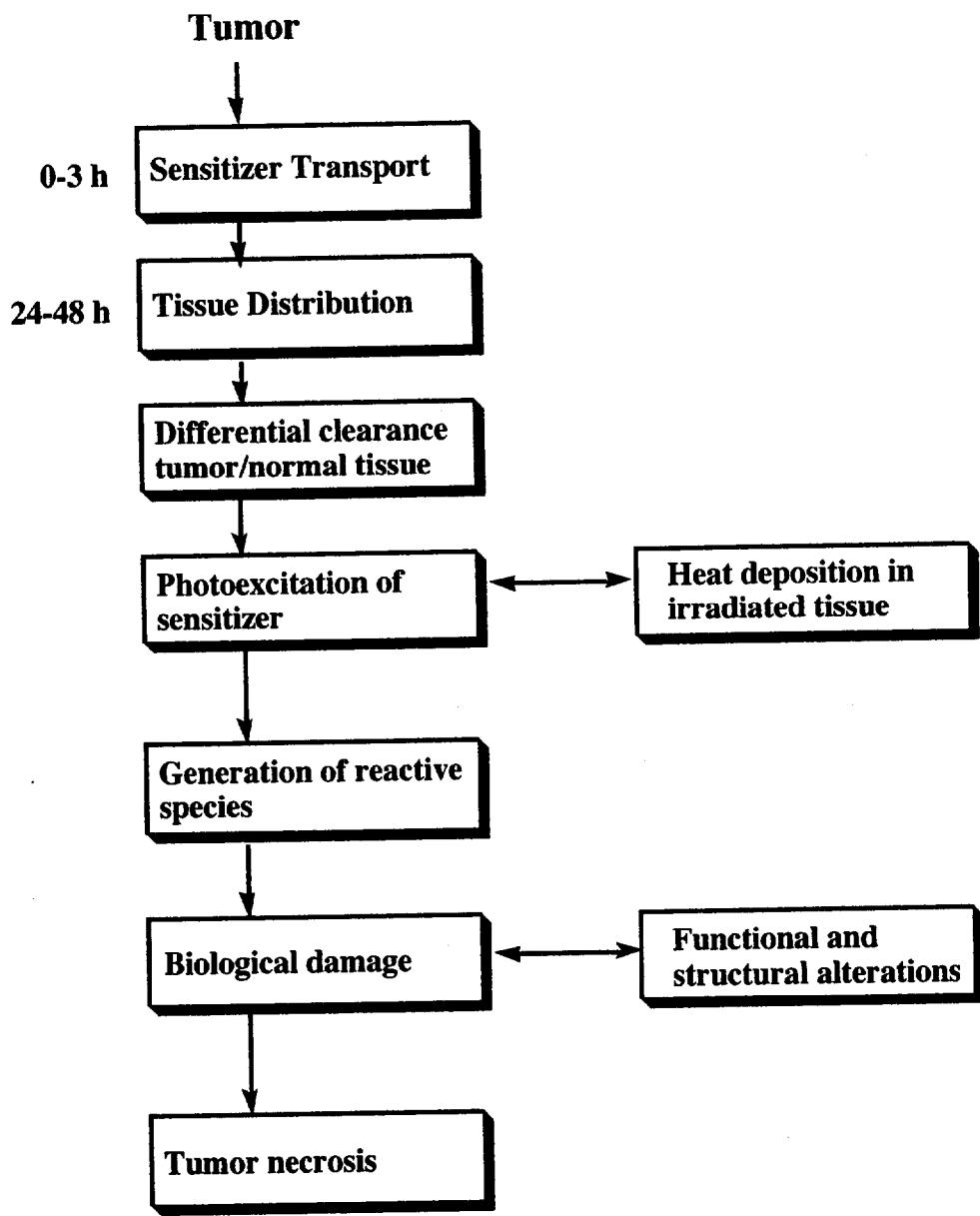
### 1.2.1 光線力学治療の概念

光線治療(Phototherapy)とは、一般に臨床治療薬として可視または近赤外の光を用いる方法である。光線治療の一つである光線力学治療(Photodynamic therapy)は、腫瘍に集積した光増感剤を光励起することにより腫瘍を局部的に破壊する方法である。

光線力学治療の手順を Scheme1-1 に示す[1]。まず、癌患者に腫瘍集積性のある光増感剤を静脈注射あるいは腫瘍に直接投与する。光増感剤は腫瘍組織を含むほとんどの組織に運搬される。光増感剤の組織への取り込みと排出の速度は組織によって異なる。腫瘍組織では正常組織に比べて光増感剤排出速度は遅く、光増感剤投与後 24 ~ 72 時間後に腫瘍組織の光増感剤濃度と正常組織の光増感剤濃度の差は最大となる。この時、腫瘍組織に可視光または近赤外光を照射する。光照射により光増感剤が光励起し、腫瘍周辺に活性種が生成する。この活性種が腫瘍組織を選択的に傷害し、壞死に陥らせる。

これまでに臨床試験の結果から光線力学治療によって以下に示すような多くの早期癌が長期にわたって抑制されることが分かっている。

- ・皮膚癌
- ・早期胸部皮膚癌

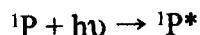


Sheme 1-1 Sequence of events in photodynamic therapy

- ・胃癌
- ・早期肺癌
- ・表在性頭部、頸部癌
- ・非侵襲性の膀胱癌
- ・気管支や食道癌の進行の抑制

### 1.2.2 光線力学治療における光増感反応

光感受性物質 (P) は光照射されると光エネルギーを吸収し、励起一重項状態に遷移する



励起された電子は様々な経路により基底状態へ遷移するがこの時一部の電子は項間交差により光励起三重項状態に遷移する。

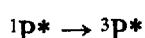


Figure 1-1 に示すように、光増感剤に光照射することにより生じる細胞傷害性物質である活性酸素は、タイプIとタイプIIの二つの経路で生成される [2]。いずれの反応も、長寿命である光増感剤の励起三重項状態を経由して進行する [3]。

タイプI反応は光増感剤や種々の生体成分による還元的消光あるいは酸素分子による酸化的消光といった光誘起電子移動反応であり、種々のラジカルが生成する。このラジカル種の中にはスーパーオキサイド ( $\text{O}_2^{-\cdot}$ ) も含まれる。

CHEMICAL REACTIONS (Type I)  
(Free radical, superoxide, redox)

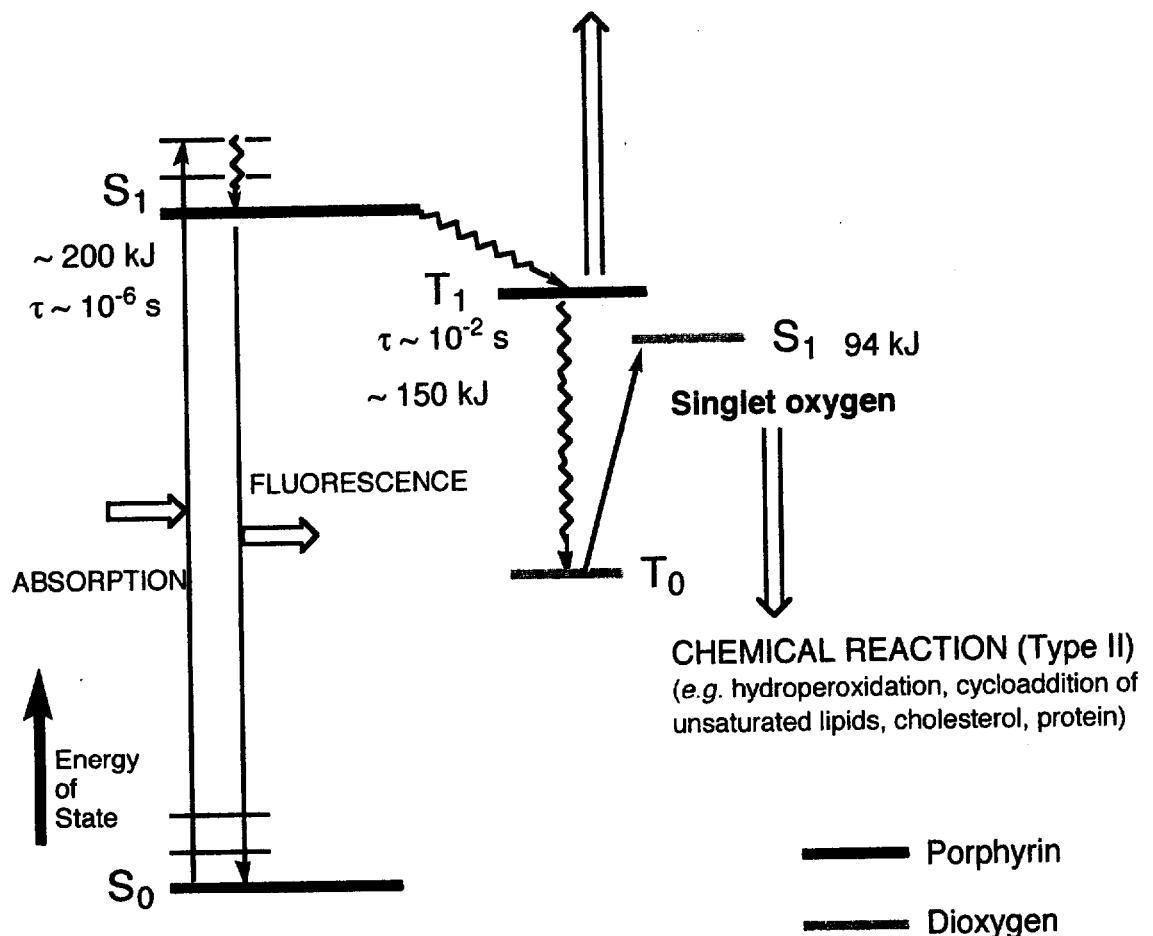
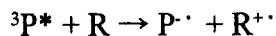
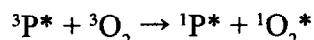


Fig. 1-1 Generation of excited porphyrin states and reactive dioxygen species[2].

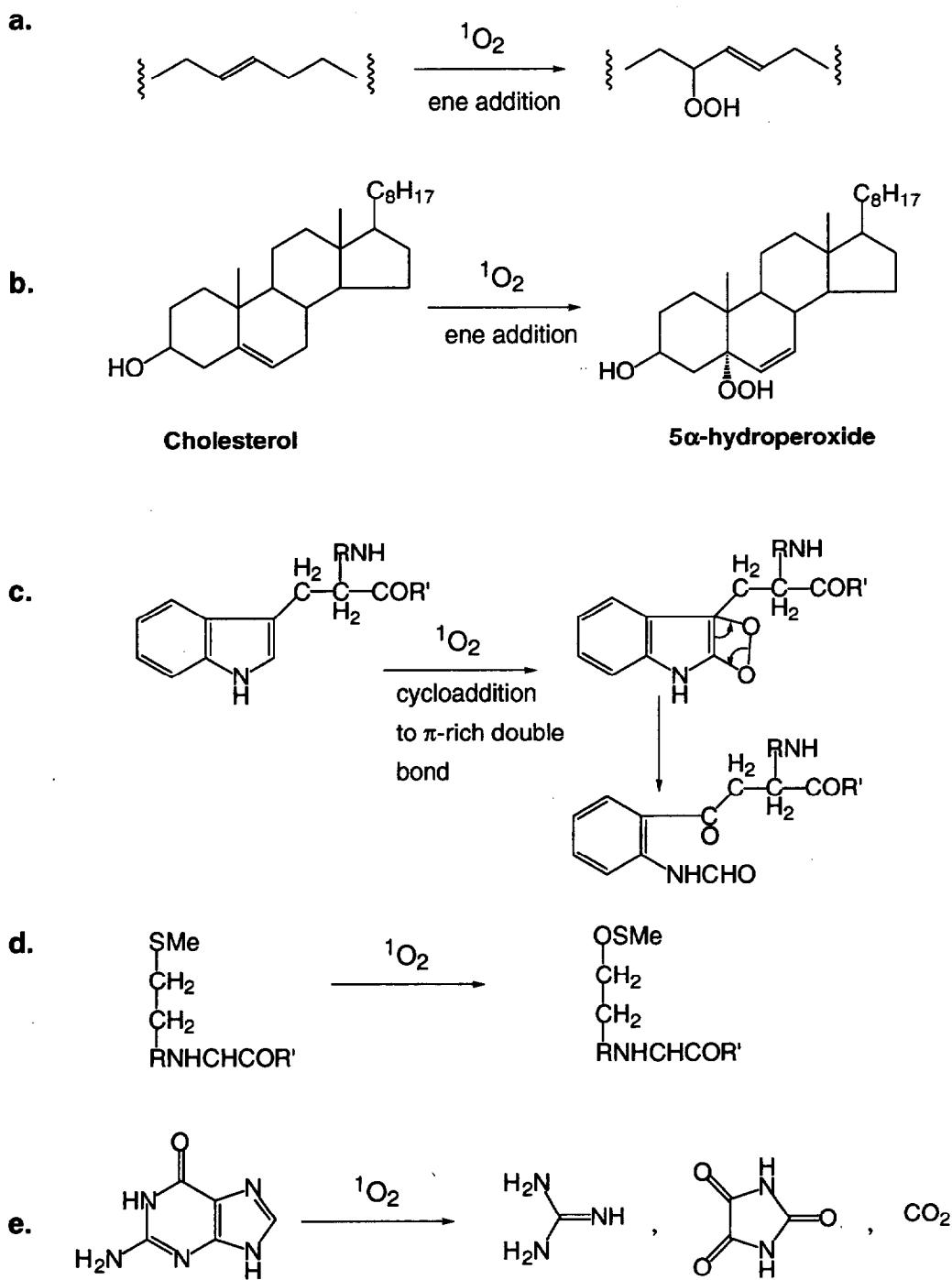


タイプII反応は、光増感剤の励起三重項状態から酸素分子にエネルギー移動が起こり、一重項酸素 ( ${}^1O_2$ ) が生成する機構である。

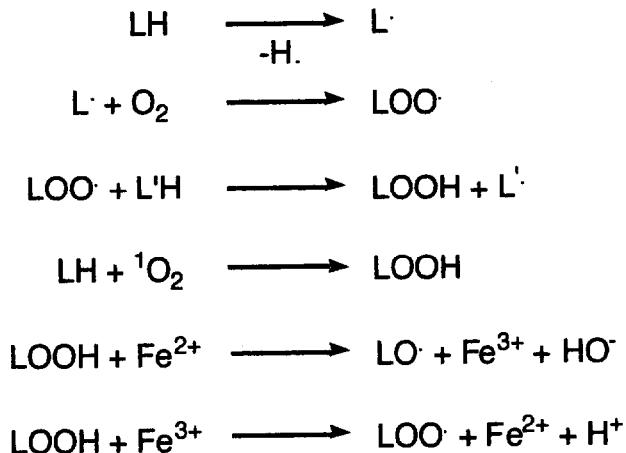


活性酸素種は反応性が高く寿命が短いため、実際の治療時にどちらの反応が進行しているかを明らかにすることは非常に困難である。一般にはタイプII機構を経由して生成する  ${}^1O_2$  が光線力学治療における主な活性種であることが示唆されている [4,5]。しかし、電子スピン共鳴法 (ESR) を用いた研究により、タイプI 機構を経由して生成するラジカル種も検出されており [6]、実際にどちらの反応が進行しているかは明らかとなっていない。

これらの活性酸素のうち、 ${}^1O_2$  は Scheme 1-2 に示すように、種々の生体分子と反応する非常に強力な酸化剤である。また、 $O_2^\cdot$  はそのままでは反応性は低いが、Haber-Weiss 反応によりヒドロキシラジカル (OH) を生じる。OH は非常に反応性が高く、拡散律速に近い速度で種々の生体分子と反応する [7]。また、細胞殺傷における重要な反応として、細胞の膜成分である脂質の過酸化反応がある。脂質過酸化反応はラジカル連鎖反応により進行する (Scheme 1-3) [2]。脂質過酸化反応は OH などのラジカルによって開始されるほか、コレステロールと  ${}^1O_2$  の反応により生成した 5a-コレステロール過酸化物 (5a-ChOOH) が 2 個鉄と反応して生成するラジカル種によっても引き起こされる [8]。



Scheme 1-2 Reactions of singlet oxygen with biomolecules. a; unsaturated lipid, b; cholesterol, c; tryptophan, d; methionine, e; guanine



Scheme 1-3 Lipid peroxidation

### 1.3 第一世代および第二世代の光線力学治療用光増感剤

#### 1.3.1 ヘマトポルフィリン誘導体(HpD)

HpD は 1961 年 Lipson らによって初めて合成され、癌診断の目的で使用された [9]。HpD を投与されたマウスに対し、紫外線照射によりポルフィリンの蛍光を観察することによって癌の検出を行ったものである。腫瘍治療の目的に用いられたのはそれから 11 年後で、担癌ラットに HpD を投与し白色光を照射するというものであった [10]。以来、HpD の薬理学的性質、治療条件、腫瘍壊死の作用機構に

について多くの研究者により調べられ、HpDは光線力学治療用の光増感剤として初めて臨床応用された光増感剤となった。

HpDは、ヘマトポルフィリン(Fig.1-2,a-1)を5%硫酸を含む酢酸中で反応させることによって、いくつかのポルフィリン誘導体の混合物として得られる (HpD stage 1)。その主な成分はヘマトポルフィリンジアセテート (Fig.1-2,a-2) である。注射液としてはアルカリで中和した物を用いる (HpD stage2)。中和操作によりヘマトポルフィリン、ビニルデューテロポルフィリン(Fig. 1-2,a-3)、プロトポルフィリン(Fig. 1-2,a-4)が生成する。このほかに生成物中には高分子化合物が存在する。これらは、エーテル結合、エステル結合、炭素共有結合により架橋されたポルフィリンの二量体やオリゴマーである (Fig. 1-2,b)。実際の治療における HpD 中の活性成分は高分子量の成分であると考えられており、Photofrin®として実際に商品化されているのは、HpDから高分子成分のみをゲルろ過やHPLCにより分離したものである [2]。

HpD は光線力学治療用の光増感剤として最初に開発された物質であり、カナダ、日本、オランダでは実際の治療に用いられているが、いくつかの欠点をもっている。第一に組織集積の選択性が低い。そのため HpD を用いた光線力学治療では治療効果が低い。また、数週間にわたって HpD が皮膚組織に残存するため、副作用である光線過敏症がおこる。第二に、組織透過性の良い赤色領域の光の吸収が小さいため、深部の癌に対する治療が困難である。第三に、非常に複雑な混合物のため活性成分のみを単離・精製できないことが挙げられる [2]。

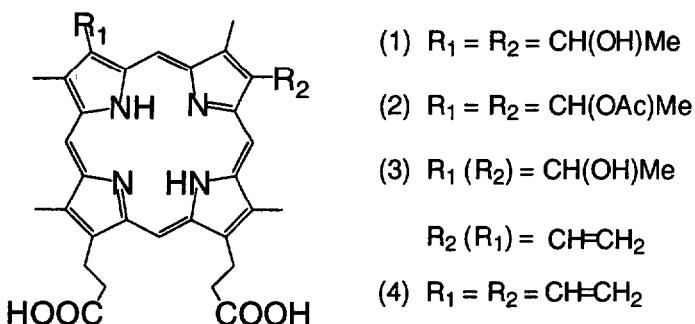
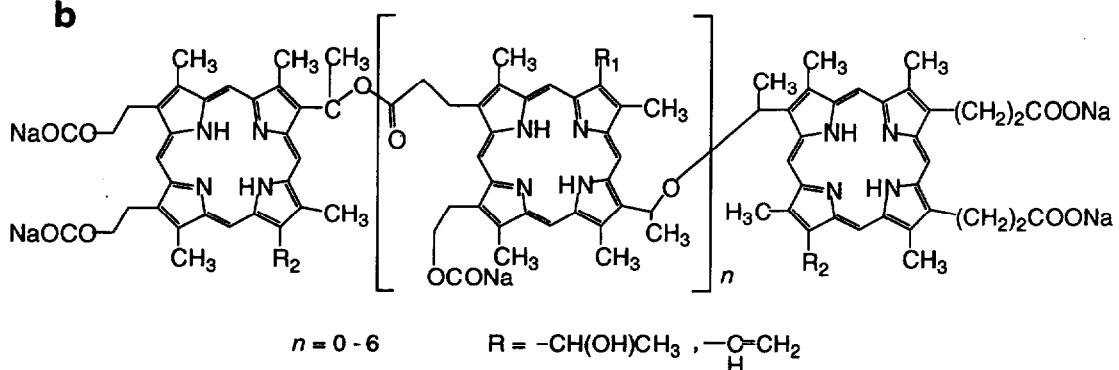
**a****b**

Fig. 1-2 Structure of hematoporphyrin derivative (HpD). **a.** Porphyrin monomers **(1)** hematoporphyrin, **(2)** hematoporphyrin diacetate, **(3)** 3(8)-hydroxyethyl-8(3)-vinylduteroporphyrin, **(4)** protoporphyrin. **b.** Higher molecular weight material in HpD (porphyrin dimers and oligomers with ether, ester and carbon-carbon linkages).

### 1.3.2 第二世代の光増感剤

'第一世代' の光増感剤である HpD は前節に述べたような欠点がある。そこで HpD に代わる新しい光増感剤の開発が求められてきた。光線力学治療に利用するのに理想的な光増感剤として求められる性質は次の通りである [1,2,11]。

(1) 赤色領域または近赤外領域の吸光係数が大きいこと。

Fig.1-3 に示すように生体組織は 400-500 nm にヘモグロビンの吸収があるため [2]、この波長領域での光透過性は低い。600 nm 以上で長波長の光ほど組織透過性が良いため、この領域に吸収極大をもつ化合物が望ましい。しかし、吸収極大が長波長側にシフトするに従い、蛍光の最大発光波長も長波長側にシフトする。そのため、吸収極大があまり長波長側にあるものは励起三重項状態のエネルギーが一重項酸素のエネルギー (94kJ / mol) を下回り、一重項酸素を殆ど生成しない。また、場合によってはこのような光増感剤は一重項酸素の消光剤として働く。即ち、光線力学的活性を考慮した場合、光増感剤の吸収極大があまり長波長領域にあるものは好ましくない。以上を考慮すると吸収極大が 600 nm ~ 800 nm に存在する化合物が望ましいと考えられている。

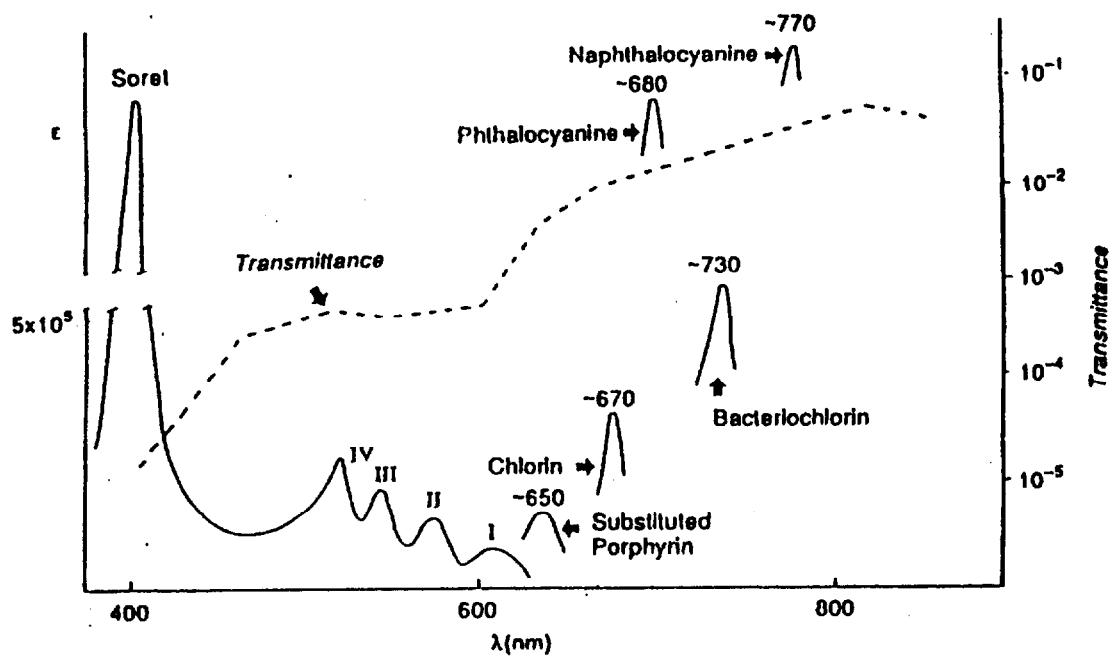


Fig. 1-3 Photosensitizer absorbance in relation to tissue transmittance[3].

The absorption spectra are schematic: only Band I is shown, except for the porphyrin absorprion spectrum on the left. The transmittance curve refers to a sample of human scrotal sac, 7 mm thick. The broad feature at 500 - 600 nm is attributed to absorption by hemoglobin.

(2) 腫瘍に選択的に蓄積すること。

腫瘍組織以外の部位への蓄積は副作用の原因となる。例えば、腫瘍周辺の正常組織への蓄積は治療時の正常組織の傷害を引き起こす。特に筋組織の傷害は回復も遅く、生体に対する影響も大きい。また、皮膚への蓄積は治療後における光線過敏症を引き起こす。HpDにおいては治療後約三週間たっても皮膚への蓄積が観測されている。そのため日光により、重度の炎症を引き起こす。また、腫瘍選択性のほかに治療後における生体内からの排出が速いことも重要である。

(3) 暗所毒性のこと。

光増感剤そのものの毒性が低く、光照射を行ったときのみに細胞毒性を示す化合物が望ましい。

(4) 励起三重項の量子収率が高く、一重項酸素の生成能が高いこと。

前節で述べたように光線力学治療における活性種の生成は励起三重項状態を経由して起こる。そのため、励起三重項状態の量子収率が高く、光励起三重項寿命が長ければ、活性種の生成も多く、光線力学治療用光増感剤としてより効果的であると考えられる。また、一般に光線力学治療における主な細胞毒性種は一重項酸素であると考えられている。そのため、一重項酸素の生成能が高い方が望ましい。

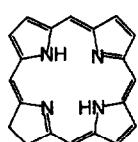
(5) 化学構造が明らかになっていること。できれば水溶性であること。

単一物質であることは投与量と治療効果の関係が容易に調べられる。また、投与する際には水溶性の化合物のほうが光増感剤の取り扱いが容易になる。

以上の性質をもつ‘第二世代’の光増感剤の開発は1980年代より行われてきた。クロリン、ベンゾポルフィリン、フタロシアニン、ナフタロシアニン等のポルフィリン類縁体が、光線力学治療用光増感剤としての可能性について研究されている(Fig. 1-4)。これらの光増感剤のQバンドの吸収極大波長はTable 1-1に示すように、いずれも組織透過性の良い600 nm以上である[12,13]。また、これらの光増感剤はPhotofrin®に比べ励起三重項状態の寿命が長く、一重項酸素生成の量子収率も高いことが明らかとなっている[14]。

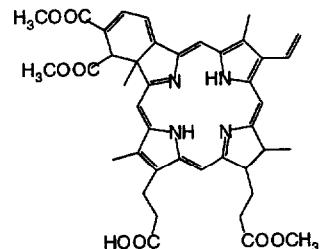
しかし、これらの光増感剤もHpDと同様に腫瘍選択性が低いことが明らかとなり、腫瘍選択性が高い光増感剤の開発が望まれている。

a.



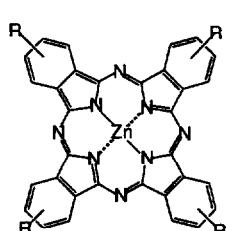
**Chlorin**

b.



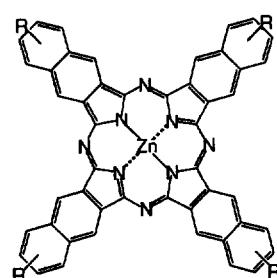
**Benzoporphyrin  
monoacid**

c.



**Phthalocyanine**

d.



**Naphthalocyanine**

Fig. 1-4 Structures of the second generation photosensitizers.

Table 1-1 Proposed ‘second generation’ photosensitizers for PDT [12].

Photosensitizer	Hydrophobicity	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}^{\text{a}}$
Mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6, MACE)	water soluble	660 (9)
Sulfonated aluminum phthalocyanine (AlSPc)	water soluble	670 (40)
Benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD-MA)	hydrophobic	690 (5)
Tin octaethylpurpurin (SnET2)	hydrophobic	650 (15)
Cationic dye (CPS)	hydrophobic	b)

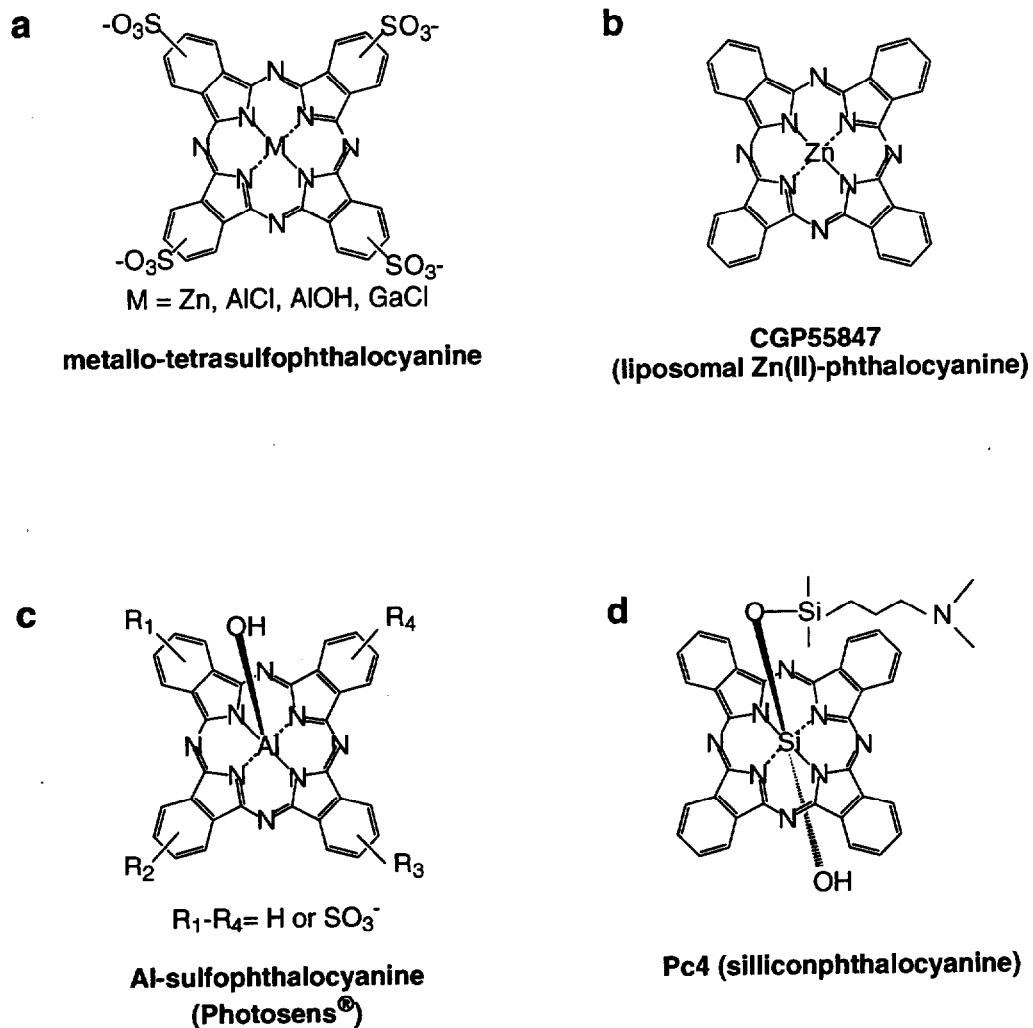
- a) The approximate location of the longest wavelength absorption band is indicated with the absorption intensity relative to Photofrin at 630nm in parenthesis.
- b) Many different types of CPS have been suggested for PDT with absorptions from 600-900 nm.

### 1.3.3 フタロシアニン類縁体

フタロシアニンが腫瘍組織に親和性があるということが報告されたのは、約30年以上前のことである[15]。フタロシアニンの長波長領域の強い吸収や高い化学的安定性や光安定性が注目され、フタロシアニンは第二世代の光線力学治療用光増感剤としての実用的な候補なってきた。

フタロシアニンは基本骨格のピロール環にベンゼン環が結合しており、ピロール環は窒素原子によって結合されている(Fig.1-4,e)。ポルフィリンに比べて、π電子系が拡大されているため、Qバンドの吸収は組織透過性の良い長波長領域にあり、そのモル吸光係数は非常に大きい(650-700 nmで $\varepsilon > 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )。さらに太陽光スペクトルのうちで最も光強度の強い500 nm付近に吸収がないために、HpDで問題となった皮膚の光線過敏症も抑えられ、理想の吸収波長特性を持つている化合物といえる。

これまでにさまざまなフタロシアニンが光線力学治療用として合成してきた(Fig.1-5)。フタロシアニンは中心金属にさまざまな金属を挿入できるが、効率よく光増感反応を起こすためには、励起三重項状態が長寿命であることが必要である。そのため、中心金属としてアルミニウムや亜鉛などの反磁性金属が配位したものが合成されている。しかし、フタロシアニンは無側鎖では水に不溶であり、医薬品としては不適当である。そこで、側鎖を持たない亜鉛フタロシアニンをリポソームに包括し、投与する方法が用いられている[16]。このリポソーム包括型



**Fig. 1-5** Structures of various phthalocyanines applied for photodynamic therapy.

の亜鉛フタロシアニンはすでにイタリアで臨床使用されている。

さらにフタロシアニン自身に水溶性を持たせるため側鎖に水溶性の官能基を  
持ったフタロシアニンが合成されている[17-19]。水溶性の官能基としてスルホ基  
を持ったフタロシアニンの研究が進んでおり、アルミニウムフタロシアニンや亜  
鉛フタロシアニンの側鎖にスルホ基がついたフタロシアニンが合成されている。  
側鎖に異なる数のスルホ基を持つアルミニウムフタロシアニンの混合物である  
Photosens<sup>®</sup>は1994年頃からロシアで臨床使用が始まり、多くの種類の早期癌に対  
して効果があることが明らかとなっている[20,21]。

フタロシアニンは巨大で平面的な分子構造のため、親水基を持つフタロシアニンの多くは、水に溶解すると疎水性の骨格と水との接触をさけるためにスタッキングした凝集体を形成している。この凝集体の存在は吸収スペクトルの浅色効果として現れる。凝集体は、光励起しても、内部変換によって基底状態へ失活するため、蛍光を出さず、光増感反応もおこらない。有機溶媒や界面活性剤、血清タンパク質をフタロシアニン水溶液に加えることによって、単量体に解離することが知られている[22,23]。また、新しい試みとしてM.E.Kenneyらによって、中心金属にシリコンが挿入されたフタロシアニンであるPc4が合成された[24]。このフタロシアニンは環の上下にアミノシロキシ基と水酸基を有するため、立体的な障害によりフタロシアニンがスタッキングしにくい構造をとり、高い光線力学的活性を持ちアメリカを中心として多くの研究者が研究を行っている。

### 1.3.4 クロリン類縁体

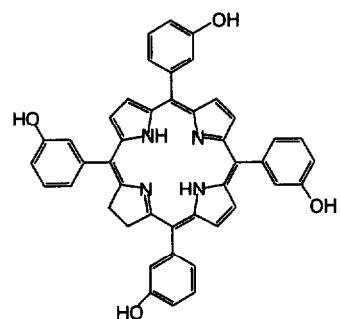
クロリン類縁体はフタロシアニンと同様に長波長領域に強い吸収を持ち、光安定性などが注目され、第二世代の光増感剤として有力な候補となってきた。

クロリンは、ピロール環の外側の二重結合が還元されたポルフィリンの類縁体である (Fig. 1-4, a)。ポルフィリンに比べ、Q バンドの吸収は組織透過性のよい長波長領域にあり、そのモル吸光係数は非常に大きい (650-700 nm で  $\epsilon > 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )。さらに、太陽光スペクトルのうちで最も光強度の強い 500 nm 付近の吸収が小さいために、HpD で問題となった光線過敏症が抑えられるという利点がある。

これまでに様々なクロリンが光線力学治療用として合成されてきた (Fig. 1-6)。クロリンはそのままでは水に不溶であるため、側鎖に水溶性の官能基をもったクロリンの研究が進んでいる。なかでも、水酸基を付与した meta-tetrahydroxyphenyl chlorin (m-THPC, Fig. 1-6, a) である Foscan® は臨床で用いられおり、良好な治療効果があがっている [25,26]。

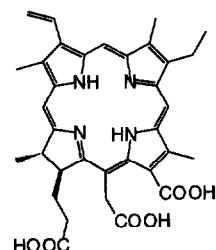
1980 年代後半にカルボキシル基を有するクロリンであるクロリン e6 が合成され (Fig. 1-6, b)、非常に高い殺細胞効果を示し、盛んに研究が進められた [27,28]。この化合物は水溶液中で凝集体を形成しにくく、容易に活性化エステル体へ変換できるため、側鎖にポリペプチドやタンパク質を結合したクロリン誘導体も多く開発されている (Fig. 1-6, c,d) [29-31]。

a.



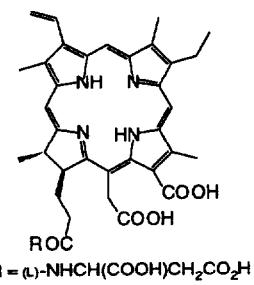
**meta-tetrahydroxyphenyl chlorin  
(*m*-THPC)**

b.



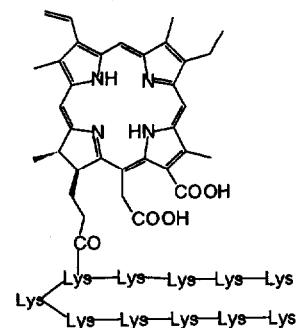
**Chlorin e6  
(Ce6)**

c.



**Mono-L-aspartyl chlorin e6  
(MACE)**

d.



**pI-Ce6**

**Fig. 1-6 Structures of various chlorins applied for photodynamic therapy.**

## 1.4 腫瘍選択性の高い光増感剤の開発

第二世代の光増感剤は1.3.2で述べたように光線力学的活性は高いものの腫瘍選択性という面では、HpDと比べて改善されなかった。そこで腫瘍選択性の高い光増感剤の開発が切望されている。腫瘍選択性の高い光増感剤として抗腫瘍抗体結合型光増感剤が考えられる。本節では抗腫瘍抗体結合型薬剤および抗腫瘍抗体結合型光増感剤について概観し、これ以外の腫瘍選択性の高い光増感剤の開発について述べる。

### 1.4.1 抗腫瘍抗体結合型薬剤

抗腫瘍抗体結合型薬剤とは、抗腫瘍抗体が特異的に腫瘍を認識することにより結合した薬剤が腫瘍に運搬され、腫瘍のみで薬効を示すというものであり、癌治療における理想的な薬剤であると考えられる。抗腫瘍抗体結合型の薬剤を初めて開発したのは1958年のG. Matheらの研究にさかのぼる。彼らは、マウス白血病細胞であるL1210細胞を用い、ハムスター抗L1210細胞抗体に抗癌性薬物メトトレキセートを結合して治療実験を行った[32]。しかしこの実験では抗体と薬剤を結合する際に活性が失われ、十分な治療効果を示すには至らなかった。1975年にKöhlerとMilsteinらによってモノクローナル抗体が初めて産生された[33]。モノクローナル抗体の特徴として、免疫グロブリン分子種の均一なものを安定供給で

きるという点にある。これに伴い抗腫瘍抗体結合型の薬剤が多く合成された[34-37]。

この抗体結合型薬剤は盛んに研究が行われているにもかかわらず、実用化の域に達していない。抗体結合型薬剤の実用化にあたっての問題点は次の通りである[38]。

(1) 抗体の抗原特異性が十分でない。

抗体結合型薬剤は腫瘍に蓄積するほか肝臓や腎臓に多く蓄積してしまう。抗体に結合する抗癌剤は非常に強力な薬剤の場合が多く、正常な臓器に蓄積すると、深刻な副作用をもたらしてしまう。

(2) 作用薬物の一分子あたりの効果が低い。

抗癌剤として一般に使用されているような薬物では、1個の細胞を殺すのに多数の分子を必要とする。そのため、抗体との結合比が小さい場合では薬剤の大量投与が必要となる。

#### 1.4.2 抗腫瘍抗体結合型光増感剤

光線力学治療において、1.3で述べたように腫瘍選択性の高い光増感剤の開発が求められていた。抗腫瘍抗体が光線力学治療に用いられるはじめたのは1980年代後半からであり、さまざまな抗腫瘍抗体結合型光増感剤が合成されはじめた[39,40]。これは抗腫瘍抗体が光増感剤を腫瘍に運搬するものであり、これまでに用いられていた光増感剤の欠点を補うものである。抗体結合型薬剤と異なり、抗体結合型光増感剤は抗腫瘍抗体の有用性を十分に活用できると考えられる。抗体結合型光増感剤が抗体結合型薬剤と比較して優れている点は次の二点である。一点目として、抗体結合型光増感剤は、光照射をおこなわない部位には細胞毒性を示さないことがあげられる。そのため抗体結合型光増感剤が蓄積しやすい肝臓や腎臓への副作用は起こりにくい。二点目として、光増感剤は少ない分子でも繰り返し活性種を生成することがあげられる。

しかし抗腫瘍抗体結合型光増感剤の開発は、比較的新しく研究が始まったものであるため、未だ充分な成果は上がっていない。単に抗腫瘍抗体と光増感剤を結合し、*in vitro*における効果を調べたにとどまっている[41-44]。抗腫瘍抗体と光増感剤の結合様式や、実際に担癌動物に対する詳しい知見は全く得られていない。

### 1.4.3 その他の腫瘍選択性のある光増感剤

抗腫瘍抗体を用いずに光増感剤に腫瘍選択性を持たせる研究もなされている。

他の腫瘍選択性のある光増感剤は以下の通りである [45]。

#### (1) 低密度リポタンパク (LDL) およびステロイド結合型光増感剤

腫瘍細胞では LDL レセプターが多く発現し、LDL の取り込みが上昇することが知られている。そのため LDL 結合型光増感剤は腫瘍選択性的に取り込むことが考えられ、LDL 結合型光増感剤が合成されている [46,47]。また、ステロイドは LDL に取り込まれるため、ステロイド結合型光増感剤も腫瘍選択性があることが期待され研究が進められている [48]。

#### (2) 高分子結合型光増感剤

腫瘍細胞では正常細胞に比べてエンドサイトーシスによって高分子を効果的に取り込むことが知られている [49]。そこで光増感剤を高分子と結合することにより、選択性的に光増感剤が取り込まれることが考えられる。結合する高分子としてはポリ L-アミノ酸 [50,51] やミクロスフェア [52,53] やインシュリン [54] などが用いられている。またリポソーム包括型光増感剤も腫瘍細胞に効果的に取り込まれることが知られている [55,56]。

## 1.5 本研究の意義と目的

第一世代の光増感剤であるヘマトポルフィリン誘導体 (HpD) には以下のようないい問題点があった。一点目として、組織透過性のよい長波長領域の光を治療に用いることができないことがあげられる。そのため、深部の癌の治療が困難であった。二点目として腫瘍選択性が低いことがあげられる。そのため、治療効果が低く、副作用である光線過敏症を起こしてしまうといった問題点があった。そのため、HpD にかわる光増感剤の開発が望まれている。

本研究では、HpD にかわる光増感剤の開発を目的とし、以下の長所をもった光増感剤の開発をおこなった。

### (1) 長波長領域の光を治療に用いることのできる光増感剤の開発

本研究では亜鉛フタロシアニンおよびクロリンを光増感剤として用いた。これらの光増感剤は前述のように組織透過性のよい長波長領域の光に対し強い吸収極大を有する。そのため深部の癌の治療が可能になる。

### (2) 腫瘍選択性の高い光増感剤の開発

光増感剤に腫瘍選択性を付与するため、抗腫瘍抗体結合型光増感剤の開発を試みた。抗体結合型光増感剤は抗体が腫瘍を認識するため、腫瘍のみに取り込まれることが期待される。これに光照射をおこなうことによって、腫瘍のみが破壊さ

れることが期待される。さらに抗体結合型光増感剤は光照射をおこなわない条件では毒性がないため、従来の抗体結合型薬剤より優れていると考えられる。

本研究で開発された抗腫瘍抗体結合型光増感剤は、腫瘍選択性が高く、組織透過性のよい長波長領域の光を治療に用いることが出来るという特色を持つ。これは先に述べた HpD の問題点を克服した新しい光増感剤といえる。

本論文の構成を以下に示す。

第二章では亜鉛フタロシアニンの光線力学的効果を調べ、この光増感剤に腫瘍選択性を付与した。

第三章では、抗腫瘍抗体結合型クロリンの調製とその光線力学的効果を調べた。

第四章では抗腫瘍抗体結合型クロリン e6 の腫瘍細胞認識能と光増感作用に対するクロリン結合数の影響を調べた。

第五章では本論文を総括した。

## 1.6 参考文献

- [1] Jori, G. (1990) *Photochem. Photobiol.* **38**, 745-75
- [2] Bonnett, R. (1995) *Chem. Soc. Rev.* **24**, 19-33
- [3] Girotti, A. W. (1983) *Photochem. Photobiol.* **38**, 745-751
- [4] VanStevenick, K. Tijssen, J. P. J. Boeghem. J. van D.Zee and T. M. A. R. Dubbelman (1986) *Photochem. Photobiol.* **44**, 711-716
- [5] Hadjur, C., G. Wagnieres, P. Monnier and H. van den Bergh. (1997) *Photochem. Photobiol.* **65**, 818-827
- [6] Selman, J., J. A. Hampton, A. R. Morgan, R. W. Keek, A. D. Balkany and D. Skalkos (1993) *Photochem. Photobiol.* **57**, 681-685
- [7] Sies, H. (井上正康訳) (1987) 脂質過酸化反応—その分子論的メカニズムと生物学的意義,”活性酸素と疾患”, pp. 281-322. 学会出版センター
- [8] Geiger, P. G., W. Korytowski and A. W. Girott (1995) *Photochem. Photobiol.* **62**, 580-587
- [9] Lipson, R., E. Baldes and A. Olsen (1961) *J. Natl. Cancer Inst.* **26**, 1-8
- [10] Diamond, I., S. Granelli, A. F. McDonaph, S. Nielsen, C. B. Wilson and R. Jaenicke (1972) *Lancet* **2**, 1175-1177
- [11] Sharman, W. M., C. M. Allen and J. E. van Lier (1999) *Drug Discov. Today* **4**, 507-

- [12] Wan, S., J. A. Parrish, R. R. Anderson and M. Madden (1981) *Photochem. Photobiol.* **34**, 679-681
- [13] Boyle, R. W., J. Rousseau, S. V. Kudrevish, M. O. K. Obouchi and J. E. van Lier (1996) *Br. J. Cancer* **73**, 49-53
- [14] McGarvey D. J. and T. G. Truscott (1990) in photodynamic therapy of neoplastic disease (ed. D. kessel) Vol 2, pp. 179-189. CTC Press, Boca Ration, Florida.
- [15] Rosenthal, I. (1991) *Photochem. Photobiol.* **53**, 859-870
- [16] Schieweck, L., H. G. Capraro, U. Isele, P. Hoogevest, M. Ocsner, T. Maurer and E. Batt (1994) *SPIE Proc.* **2078**, 107-118
- [17] Spikes, J. D. and J. C. Bommer (1986) *Int. J. Radiat. Biol.* **50**, 41-45
- [18] Rosenthal, I., C. M. Krishna, P. Rieszand and E. Ben-Hur (1986) The role of molecular oxygen in the photodynamic effect of phthalocyanines
- [19] Ben-Hur, E., M. Green, A. Prager, R. Kol and I. Rosenthal (1987) *Photochem. Photobiol.* **46**, 651-656
- [20] Zharkova, N. N., D. N. Kozlov, V. V. Smirnov, V. V. Sokolov, V. I. Chissov, E. V. Filonenko, D. G. Sukhin, M. G. Galpern and G. N. Vorozhtsov (1994) *SPIE Proc.* **2325**, 400
- [21] Sokolov, V. V., E. F. Stranadko, N. N. Zharkova, R. I. Iakubovskaia, E. V. Filonenko, and T. A. Astrakhankina (1995) *Voprosy Onkologii* **41**, 134
- [22] J. P. Reyftmann, P. Morliere, S. Goldstein, R. Santus, L. Dubertret and D. Lagrange

- (1984) *Photochem. Photobiol.* **40**, 721-729
- [23] Hopkinson, H. J., D. I. Vernon and S. B. Brown (1999) *Photochem. Photobiol.* **69**, 482-488
- [24] Oleinick, N. L., A. R. Antunez, M. E. Clay, B. D. Rihter and M. E. Kenney (1993) *Photochem. Photobiol.* **57**, 242-247
- [25] Ris, H. B., H. J. Altermatt, R. Inderbitzi, R. Hess, B. Nachbur, J. C. M. Stewart, Q. Wang, C. K. Lim, R. Bonett, M. C. Berenbaum and U. Althaus (1991) *Br. J. Cancer* **64**, 1116-1120
- [26] Fan, K. F. M., C. Hopper, P. M. Speight, G. A. Buonoaccorsi and S. G. Bown (1997) *Int. J. Cancer* **73**, 25-32
- [27] Gurinovich, G. P., T. E. Zorina, S. B. Melnov, N. I. Melnova, I. F. Gurinovich, L. A. Grubina, M. V. Sarzhevskaya and S. N. Cherenkevich (1992) *J. Photochem. Photobiol. B* **13**, 51-57
- [28] Roeder, B and H. Wabnitz (1987) *J. Photochem. Photobiol. B* **1**, 103-113
- [29] Nelson, J. S., W. G. Roberts and M. W. Berns (1987) *Cancer Res.* **47**, 4681-4685
- [30] Akhlynina, T. V., A. A. Rosenkranz, D. A. Jans, P. V. Gulak and N. V. Serebryakova (1993) *Photochem. Photobiol.* **58**, 45-48
- [31] Soukos, N. S., M. R. Hamblin and T. Hasan (1997) *Photochem. Photobiol.* **65**, 723-729
- [32] Mathe, G. (1958) *Compt. Rend. Acad. Sci.* **246**, 1626

- [33] Köhler, G. and C. Milstein (1975) *Nature* **256**, 495-497
- [34] Byers, V. S. and R. W. Baldwin (1988) *Immunology* **65**, 329-335
- [35] Woo, D. V., D. Li, J. A. Mattis and Z. Steplewski (1989) *Cancer Res.* **49**, 2952-2958
- [36] Blakey, D. C., E. J. Wawrzynczak, P. M. Wallace and P. E. Thorpe (1988) *Prog. Allergy* **45**, 50-90
- [37] Yang, H. M. and R. A. Reisfeld (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1189-1193
- [38] 金光修 (1994) 抗体工学入門, pp. 145-166 地人書館
- [39] Oseroff, A. R., D. Ohuoha, T. Hasan and J. C. Bommer (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8744-8748
- [40] Goff, A. B., M. Bamberg and T. Hasan (1991) *Cancer Res.* **51**, 4762-4767
- [41] Governatore, M. D., M. R. Hamblin, E. E. Piccinini, G. Ugolini and T. Hasan (2000) *Br. J. Cancer* **82**, 56-64
- [42] Hamblin, R. M., M. P. Bamberg, J. L. Miller and T. Hasan (1998) *Applied Optics* **37**, 7184-7192
- [43] Hirth, A., B. Bartik., T. Bogdahn-Rai, D. Wöhrle and S. Kaul (1998) *SPIE* **3191**, 309-314
- [44] Morgan, J., H. Lottman, C. C. Abbou and K. Dominique (1994) *Photochem. Photobiol.* **60**, 486-496
- [45] Sternberg, E. D. (1998) *Tetrahedron* **54**, 4151-4202
- [46] Schmidt-Erfurth, U., H. Diddens, R. Birngruber and T. Hasan (1997) *Br. J. Cancer*

**75**, 54-61

- [47] Mosley, S. T., J. L. Goldstein, M. S. Brown, J. R. Falck and R. G. W. Anderson (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 5217-5271
- [48] Hombrecher, H. K. and S. Ohm (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5198
- [49] Duncan, R. (1992) *Anticancer Drugs* **3**, 175-210
- [50] Zunino, F., G. Savil, F. giuliani, R. Gambetta, R. Supino, S. Tinelli and G. Pezzoni (1984) *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **20**, 421-425
- [51] Kornguth, S. E., T. Kalinke, H. I. Robins, J. D. Cohen and P. Turski (1989) *Cancer Res.* **49**, 6390-6395
- [52] Bachor, R., C. R. Shea, R. Gillies and T. Hasan (1991) *Proc. Natl. Sci. USA* **88**, 1580-1584
- [53] Latina, M. A., P. H. Kobsa, S. L. Rakestraw, E. A. Crean, T. Hasan and M. L. Yarmush (1988) *SPIE Proc.* **997**, 32-41
- [54] Tamara, V. A. A. Akhynina, D. A. J. Rosenkranz and S. S. Alexander (1995) *Cancer Res.* **55**, 1014-1019
- [55] Jori, G., E. Reddi, I. Cozzani and L. Tomio (1986) *Br. J. Cancer* **53**, 615-621
- [56] Reddi E., G. LoCastro, R. Biolo and G. Jori (1987) *Br. J. Cancer* **56**, 597-600

## 第二章

亜鉛フタロシアニンの光線力学的効果  
と腫瘍選択性の付与

## 2.1 はじめに

ヘマトポルフィリン誘導体 (HpD) は、光線力学治療用光増感剤として臨床で用いられている。しかし、HpDは組織透過性のよい長波長領域の光を治療に使えず、腫瘍選択性が低いこと、副作用である光線過敏症をおこすという問題がある。そこで本章ではこれらの問題点を克服する光増感剤の開発を目的とした。

本章では従来のポルフィリンに比べて長波長側に吸収極大をもつ水溶性亜鉛フタロシアニンの光線力学的効果を調べた。亜鉛フタロシアニンは、組織透過性のよい長波長領域の光に対し、強い吸収を持つことからHpDにかわる光増感剤として、1985年以降盛んに研究されるようになった[1,2]。さらに亜鉛フタロシアニンは、太陽光スペクトル中最も光強度の強い 500 nm 付近に吸収が全くないため、HpDで問題となっている皮膚の光線過敏症も抑えられ、理想的な吸収波長特性を持った化合物といえる [3]。

さらに腫瘍選択性の高い亜鉛フタロシアニンの開発を行った。フタロシアニンに腫瘍選択性のある抗腫瘍抗体を結合することで、腫瘍選択性の高い亜鉛フタロシアニンの開発を目的とした。この抗腫瘍抗体結合型亜鉛フタロシアニンは、亜鉛フタロシアニンの光化学的性質に腫瘍選択性を付与した光増感剤であるため、光線力学治療においてより理想的な光増感剤であると考えられる。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 試薬

亜鉛フタロシアニン TX-101A は（株）日本触媒より提供されたものである。

N-hydroxysuccinimide (NHS) は東京化成より、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) は同人化学から、無水トリメリット酸、尿素、塩化亜鉛、モリブデン酸アンモニウムは関東化学から購入した。HiTrap<sup>®</sup> Protein A、Sephacryl<sup>®</sup> S-300 HR は Pharmacia Biotech 社より購入した。さらに、イーグル MEM 培地はコスモバイオから、ウシ胎児血清 (FBS) は JRH BIOSCIENCES から、培地調製に用いた炭酸水素ナトリウムは IRVINE SCIENTIFIC から、MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) は 同人化学から購入した。その他の試薬は市販特級品を使用した。

### 2.2.2 亜鉛テトラスルホフタロシアニン (ZnTSPc) の合成

ZnTSPc は以下に示す方法で合成して使用した。合成は、Weber らの方法を改変して行った [4]。4-スルホタル酸ナトリウム 43.2 g、塩化アンモニウム 4.7 g、尿素 58 g、モリブデン酸アンモニウム 0.68 g、硫酸亜鉛 7 水和物 13.8 g をよく混合し、一晩真空脱水した。以上の試薬の混合物を 500 ml 三つ口フラスコに入れて、

260°Cで30分間加熱還流した。生成した暗緑色の固体を、塩化ナトリウム飽和1N塩酸500mlに溶解し、加熱沸騰させた。その後、室温まで冷却し、濾過した。沈殿を0.1N水酸化ナトリウム水溶液100mlに溶解し、80°Cで加熱した。これを濾過し、濾液中に青色の粗生成物を得た。粗生成物中には大量の塩が含まれているため、次のようにして脱塩を行った。ガラスオープンカラム（直径2cm、高さ30cm）に、メタノールで安定化させたODS（山村化学製、ODS-A 60-200 / 60）を充填し、水で平衡化した。粗生成物を添加し、水で洗浄、脱塩を行った。脱塩後、メタノールで溶出させ、精製ZnTCPcを得た。

### 2.2.3 亜鉛テトラカルボキシフタロシアニン（ZnTCPc）の合成

ZnTCPcは白井らの方法を改変して合成した[5]。無水トリメリット酸10g、尿素30g、塩化亜鉛4g、モリブデン酸アンモニウム1gをよく混合し、ニトロベンゼン150mlに溶解し、150～170°Cで3時間加熱還流する。得られた暗緑色の固体（亜鉛テトラカルボキサミドフタロシアニン）をメタノールで洗浄する。ZnTCPcは亜鉛テトラカルボキサミドフタロシアニンを加水分解することにより、合成した。3g亜鉛テトラカルボキサミドフタロシアニンを2MのKOH水溶液75mlに懸濁し、100°Cで20分間加熱還流する。加水分解されたZnTCPcはKOH水溶液に溶解する。反応液を吸引濾過し、得られた濾液をHClを用いて酸性にすることによりZnTCPcを沈殿させ、吸引濾過によりZnTCPcを回収し、1N HCl水

溶液、蒸留水、アセトン、ジエチルエーテルの順で洗浄する。最後に少量のNaOH水溶液に溶解し、大量のメタノール中に滴下し、再沈殿することにより、精製ZnTCPcを得た。

#### 2.2.4 装置

実験に使用した装置を以下に示す。

ダブルビーム型分光光度計：日立 U-2000

分光蛍光光度計：日立 F-4010

OPO-Nd-YAG Laser

Nd-YAG Laser : Spectra-Physics GCR-100

OPO : Spectra-Physics MOPO-700

卓上遠心分離器：日立 HIMAC CENTRIFUGE CT4, Eppendorf 5415C

カラムクロマトグラフシステム：Pharmacia Biotech FPLC システム

ポンプ：ペリスタリティックポンプ P-1

コントローラー内蔵型フラクションコレクター：Gradi Frac

吸収検出器：JASCO UV-970

CO<sub>2</sub> インキュベーター：YAMATO IT43

クリーンベンチ：HITACHI PCY-750A PC

純水製造器：ミリポア MilliQ Jr.

顕微鏡：OLYMPUS CK2

定常光照射装置

ハロゲンランプ：東芝ネオハロクール H,425WN-EH,500W型

光学フィルター：HOYA R-60

パワーメーター：SCENTECH356

ソニケーター：Fine FU-926

ホモジナイザー：KONTES PELLET PESTLE

#### 2.2.5 細胞および実験動物

マウス移植性癌 MH134 細胞は北陸先端科学技術大学院大学の西坂剛先生より提供されたものを使用した。マウス腹水化乳癌MM46細胞および、抗MM46モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマである3-3-C細胞は愛知ガンセンターの瀬戸加大先生より提供されたものを使用した。C3H/HeJ系マウスは（株）日本SLC社より購入した。

#### 2.2.6 マウス固形腫瘍に対する抗腫瘍効果

マウスはC3H/HeJ系6週齢雄を用いた。また、腫瘍細胞はマウス移植性癌であるMH134細胞を使用した。固形腫瘍の形成は以下のようにして行った。MH134

細胞をマウス腹腔内に投与し、癌性腹水を生じさせる。これを採取し、生理食塩水で洗浄後、再び生理食塩水に懸濁する。 $0.1\text{ ml}$  ( $1.0 \times 10^7$  cells) の細胞浮遊液を剃毛したマウス背部に皮下注射する事により固形腫瘍を形成した。固形腫瘍の直径が約  $0.6\text{ mm}$  になったマウスに対し、光増感剤を  $1 \times 10^{-5}\text{ mol / kg body weight}$  腹腔内投与した。投与 24 時間後、マウスをネンプタール®により麻酔し、光照射を行った。光照射は OPO-YAG レーザーを用い、 $680\text{ nm}$ 、 $100\text{ mW / cm}^2$  の光を 20 分行った。光照射 5 日後において固形腫瘍の面積を測定し、コントロールと比較することにより、抗腫瘍効果を求めた。

#### 2.2.7 マウスに対する光線過敏症の評価

C3H/HeJ 系 6 週齢雄マウスに対し、光線過敏症の評価を行った。マウスに  $1.6\text{ mg / kg body weight}$  となるように光増感剤を腹腔内投与した。投与 24 時間後、マウスをネンプタール®により麻酔し、右耳に対し光照射を行った。光照射は、定常光照射装置を用い、波長  $300\text{ nm}$  以下の光を光学フィルター (HOYA UV-30) によって除去した。 $69\text{ mW / cm}^2$  の光を 10 分間照射した。光照射 24 時間後、右耳の厚さを測定し、光増感剤投与前の厚さと比較することにより、光線過敏症を評価した。耳の厚さはノギス (Model G, Peacock) を用いて測定した。

#### 2.2.8 フタロシアニンの担癌マウスへの蓄積量の測定

2.2.6 と同様の方法で固形腫瘍を形成した担癌マウスに対し、光増感剤を  $1 \times 10^{-5}$  mol / kg body weight 腹腔内投与した。投与 24 時間後、頸椎脱臼によりマウスを安楽死させ、腫瘍と皮膚を採取した。各臓器をホモジナイズし秤量した後、ジメチルスルホキシド (DMSO) 1.2 ml を加えて、1 時間ソニケーションし、1 晩振とうすることにより光増感剤を抽出した。遠心により組織片を除いた後、蛍光強度を測定することにより臓器中の光増感剤量を求めた。

#### 2.2.9 ハイブリドーマの in vivo 培養

ハイブリドーマ 3-3-C 細胞は、(株)免疫生物研究所で受託培養した。ヌードマウスに 3-3-C を腹腔内投与し、2 ~ 3 週間後に腹水を採取した。この腹水中に抗 MM46 モノクローナル抗体が含まれている。抗 MM46 モノクローナル抗体はイムノグロブリン G (IgG) であり、サブクラスは IgG2b である。

## 2.2.10 抗体の精製[6]

前節で得られたヌードマウスの腹水からProtein Aアフィニティーカラムを用いて抗体を精製した。マウス由来のIgGはProteinAと非常に強い親和性があるので抗体のみがカラムに吸着する。アフィニティーカラムはPharmaciaBiotech社のHiTrap® Protein A (1ml) を用いた。使用した緩衝液を以下に示す。

結合液 : 0.1M リン酸緩衝液 pH 8.0

溶離液 I : 0.1 M クエン酸緩衝液 pH 6.0

溶離液 II : 0.1 M クエン酸緩衝液 pH 4.5

溶離液 III : 0.1 M クエン酸緩衝液 pH 3.5

再生液 : 0.1 M クエン酸緩衝液 pH 3.0

精製は上記の緩衝液を用いて以下のようにして行った。結合液で平衡化したカラムに腹水をロードし、腹水に含まれている抗体以外のタンパクを溶出させる。次に溶離液 I に緩衝液を変えると Protein A に弱く結合した IgG1 が溶出する。溶離液 II に緩衝液を変えると IgG2a が、溶離液 III に緩衝液を変えると IgG2b が溶出する。溶出してきた IgG 溶液は酸性条件下では不安定であるので、溶出後、直ちに 1 M トリス塩酸緩衝液(pH 9.0)で pH を 7.5 に中和した。カラムは再生液で洗浄後、繰り返し使用した。

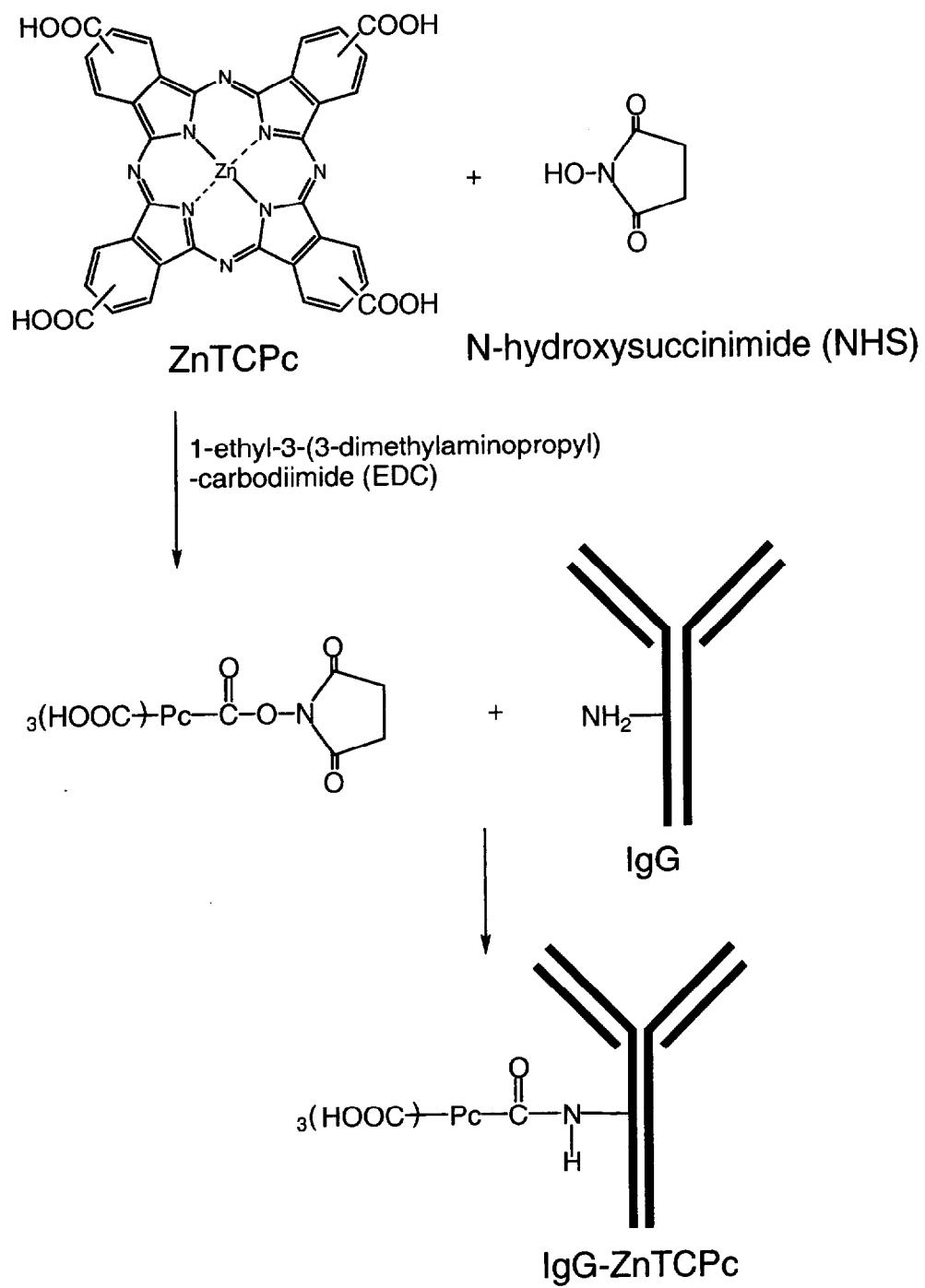
### 2.2.11 抗体結合型 ZnTCPc の調製

抗体のアミノ基とZnTCPcのカルボキシル基をペプチド結合を形成させることにより、抗体結合型亜鉛フタロシアニンを調製した (Scheme 2-1)。20mM MES buffer (pH=6.0) 中で ZnTCPc と 10 倍等量の N-hydroxysuccinimide (NHS)、および 1-ethyl 3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) を加え、室温で 15 分間攪拌することにより ZnTCPc のカルボキシル基を活性化エステルに変換した。活性化エステルとなった ZnTCPc は MES buffer に不溶であるため、8000 x g で 5 分間遠心することにより ZnTCPc の活性化エステルの沈殿を得る。これを MES buffer に再懸濁し、再び遠心することにより活性化エステルを洗浄した。この操作を 5 回繰り返した後、活性化エステルを 100 μl のジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、1ml の IgG 溶液 (1 mg / ml PBS) を加える。反応は 2 時間室温で攪拌した後、4°C で 16 時間攪拌した。抗体結合型 ZnTCPc の精製は次のようにして行った。反応液中に含まれる未反応の ZnTCPc の活性化エステルは遠心分離により除去し、上清に含まれる抗体結合型 ZnTCPc はゲル濾過によって精製した。ゲル濾過の条件を以下に示す。

ゲル濾過カラム : Sephadex® S-300 HR、1.0 cm x 45 cm

緩衝液 : 145mM NaCl を含む 10 mM Hepes buffer (pH 7.3)

流速 : 0.13 ml / min



Scheme 2-1 Synthesis of IgG-ZnTCPc

得られたフラクションを限外濾過により濃縮し、PBSに緩衝液を交換した。使用した限外濾過膜は YM-30 である。

濃縮後のフラクション中の ZnTCPc 濃度を吸光度から、抗体のタンパク質濃度を Lowry 法[7]により測定し、フラクション中の ZnTCPc および抗体濃度を算出した。

#### 2.2.12 抗体結合型 ZnTCPc のアセトン沈殿

ゲル濾過後の抗体結合型 ZnTCPc 中の抗体と共有結合した ZnTCPc の数を求めるため、アセトン沈殿を行った。アセトン沈殿を行うことにより、抗体は分子周辺の水分子を奪われるため沈殿するが、遊離の ZnTCPc は沈殿しないため、抗体と共有結合した ZnTCPc と共有結合していない ZnTCPc を分離することができる。

実験は以下に示す方法で行った。ゲル濾過後の抗体結合型 ZnTCPc 溶液 300  $\mu$ l に冰浴中で冷アセトンを 900  $\mu$ l 加え、5 分間冰浴中に静置する。得られたタンパクの沈殿を遠心分離によって回収し、蒸留水 300  $\mu$ l に沈殿した抗体を溶解する。アセトン沈殿前の抗体結合型 ZnTCPc 溶液とアセトン沈殿後の抗体結合型 ZnTCPc の吸収スペクトルによって ZnTCPc 濃度を、Lowry 法によって抗体濃度を決定した。

### 2.2.13 トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) によるアミノ基の定量

アミノ基の定量は、TNBSによる比色定量法を用いて行った[8]。TNBSはアルカリ性においてタンパク質のアミノ基と結合する。その結果、345 nmの吸光度が増加し、この吸光度変化からアミノ基の数を求めることができる。アミノ基の定量にはゲル漉過後の抗体結合型 ZnTCPc およびZnTCPc の結合していない抗体を用いた。

測定は以下のようにして行った。タンパク試料を含む50 mMほう酸緩衝液 (pH 9.5) に 0.5% TNBS 水溶液を 20  $\mu$ l 加え、16 時間反応させた。反応は 4°C で行い、反応中はアルミホイルで遮光した。16 時間後、5% SDS 溶液を 250  $\mu$ l、2 N HCl を 250  $\mu$ l 加えて反応を停止させる。その後、345nmにおける吸光度を測定し、反応したアミノ基の個数を決定した。ブランクにはタンパク試料を含まないほう酸緩衝液と TNBS を同様に16時間反応させたものを用いた。反応した TNBS のモル吸光係数は  $\epsilon_{345}=1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  である [9]。

### 2.2.14 MM46 細胞の培養

MM46細胞は、*in vivo* においてマウス腹水内で培養した系と、シャーレを用いて *in vitro* において培養した系の二つの系で培養した。

*In vivo* における培養方法を以下に示す。MM46細胞を C3H / HeJ 系のマウスの

腹腔内に投与すると、癌性腹水が生じる。これを採取した後、生理食塩水で洗浄し再びマウス腹腔内に投与し、*in vivo*において培養した。

*In vitro*における培養方法を以下に示す。MM46担癌マウスの腹腔内より採取したMM46細胞をMEM培地の中で37°C、5%二酸化炭素霧囲気下で培養した。MEM培地の調製は次のように行った。MEM粉末11分に培地調製用炭酸ナトリウムを2.2 gを加え、ミリQ水に溶解しペニシリン、ストレプトマイシンを加え、pH7.4にしたものメスフラスコを用いて11に調製した。これに濾過滅菌して10%FBSを加えたものを培地として用いた。

リン酸緩衝生理食塩水（PBS）の調製は次のようにして行った。塩化ナトリウム8 g、塩化カリウム0.2 g、リン酸水素二ナトリウム1.1 g、リン酸二水素カリウム0.2 gをミリQ水に溶解したものをpH7.4に合わせ、11に調製した。培養にはオートクレーブ滅菌したものを使用した。

#### 2.2.15 抗体結合型ZnTCPcのMM46細胞への取り込み量

抗体結合型ZnTCPcのMM46細胞への取り込み量を以下に示す方法により測定した。MM46担癌マウスより採取したMM46細胞をΦ35 mmシャーレに $5 \times 10^5$ 個となるようにFBS不含MEM培地1mlに継代した。これに抗体結合型ZnTCPcあるいはZnTCPcを $5 \times 10^{-7}$  Mとなるように培地中に添加し、37°Cで所定時間インキュベートした。抗体結合型ZnTCPcは抗体に結合したZnTCPcの濃度が $5 \times 10^{-7}$  M

となるように調製した。細胞は所定時間インキュベートした後、遠心分離により回収し、PBSで洗浄し、ジメチルスルホキシド（DMSO）1mlに懸濁した。この溶液を15分間超音波破碎することにより細胞抽出液を得た。細胞内ZnTCPc濃度はこの超音波破碎溶液の蛍光強度を測定することにより決定した。励起波長は670 nm、観測波長は695 nmで測定した。

#### 2.2.16 抗体結合型 ZnTCPc の光毒性

抗体結合型 ZnTCPc の光照射による光毒性を以下に示す方法により測定した。マウス腹水中で培養した細胞は状態が均一ではなく生死判定には向かないため、MEM 培地で *in vitro* において培養した MM46 細胞を用いた。MM46 細胞を  $\phi 35$  mm シャーレに  $1 \times 10^4$  個となるように FBS 不含 MEM 培地 1ml に継代した。この培地中に ZnTCPc および抗体結合型 ZnTCPc を添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。その後、培地を取り除き、細胞を PBS で洗浄し、FBS を含む MEM 培地を 1 ml 加え、光照射を行った。光源は 500 W ハロゲンランプで、 $50 \text{ mW/cm}^2$  の光を 8 分間照射した。また、600 nm 以下の波長の光を光学フィルターにより除去し、熱の影響を減らすために水フィルターを用いた。光照射後、20 時間、37°C、暗所にてインキュベートし、生存率を測定した。生存率は、光増感剤を加えず光照射を行っていないものをコントロールとして、MTT 法により測定した。

### 2.2.17 MTT 法

MTT 法は Carmichael の方法に従って以下のように行った [10]。光照射から 20 時間後、5 mg / ml の MTT / PBS 溶液を 100 µl 加え、37°C、4 時間インキュベートした。その後、ホルマザンの結晶を除去しないように培地を取り除き、DMSO を 1.5 ml 加えてホルマザン結晶を溶解し、540 nm の吸光度を測定した。

### 2.2.18 MM46 担癌マウスの各臓器中における抗体結合型 ZnTCPc 蓄積量の測定

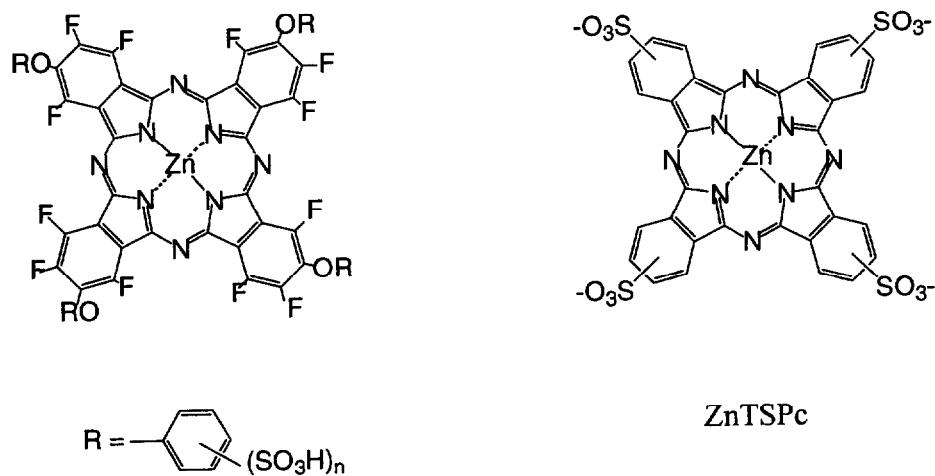
担癌マウスに抗体結合型 ZnTCPc および ZnTCPc を投与したときの各臓器への蓄積量を以下に示す方法により測定した。マウス腹水から採取した MM46 細胞を生理食塩水に懸濁し、 $1 \times 10^7$  cells / ml を 100 µl 腹腔内投与し、5 日後の担癌マウスを実験に使用した。マウスは C3H / HeJ 系 5 週齢の雄を使用した。担癌マウスに  $1 \times 10^{-7}$  mol / kg body weight となるように抗体結合型 ZnTCPc および ZnTCPc を腹腔内投与した。24 時間後マウスを解剖し、各臓器を摘出した。摘出した臓器は腫瘍、肝臓、腎臓、皮膚、筋肉である。各臓器をホモジナイズし秤量した後、DMSO 1.2 ml を加えて、1 時間ソニケーションし、1 晚振とうすることにより ZnTCPc を抽出した。遠心により組織片を除いた後、蛍光強度を測定することにより臓器中の ZnTCPc 量を求めた。励起波長は 670 nm、観測波長は 695 nm で測定した。

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 水溶性亜鉛フタロシアニンの構造と吸収スペクトル

水溶性亜鉛フタロシアニンの構造をFig. 2-1 に示す。TX-101A は、フタロシアニン環に側鎖としてフェノキシ基を4個もち、スルホン基を一分子当たり5-6個持つ。亜鉛テトラスルホフタロシアニン (ZnTSPc) はスルホン基を一分子あたり4個持つ。

これらの水溶性亜鉛フタロシアニンおよびヘマトポルフィリン誘導体 (HpD) の吸収スペクトルをFig. 2-2に示す。図のようにフタロシアニンは、いずれも650



TX-101A (Number of sulfo groups = 5-6)

Fig. 2-1 Structures of phthalocyanines

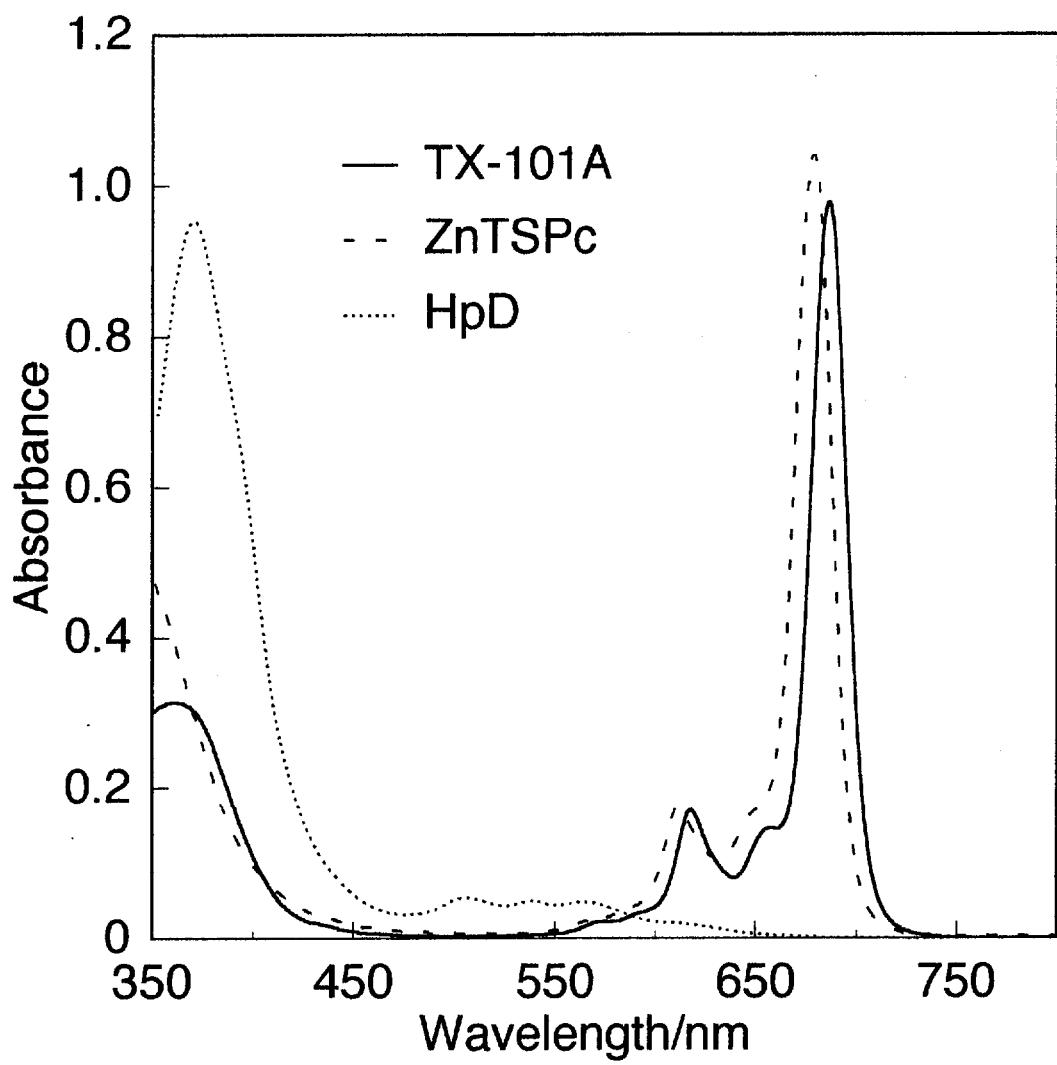


Fig. 2-2 Absorption spectra of TX-101A, ZnTSPc and HpD in 1% Tween 20.

nm 以上の組織透過性のよい領域に強い吸収極大を示す。さらに太陽光スペクトル中最も光強度の強い 500 nm 付近に吸収が全くないため、HPD で問題となる皮膚の光線過敏症も抑えられ、理想の吸収波長特性を持った化合物といえる。水溶性亜鉛フタロシアニンの極大吸収波長と最大発光波長を Table 2-1 に示す。これまでよく研究されてきた ZnTSPc は 1% Tween 20 溶液中において 676 nm に極大吸収を有するが、TX-101A では 686 nm とさらに長波長領域に極大吸収を有する。一般にフタロシアニン環へのアルコキシ基の導入は Q 帯の波長を長波長側にシフトさせる [11]。そのため、これらの側鎖によって極大吸収波長が長波長側にシフトしたと考えられる。

Table 2-1 Wavelength of absorption and fluorescence emission maxima (nm) of phthalocyanine

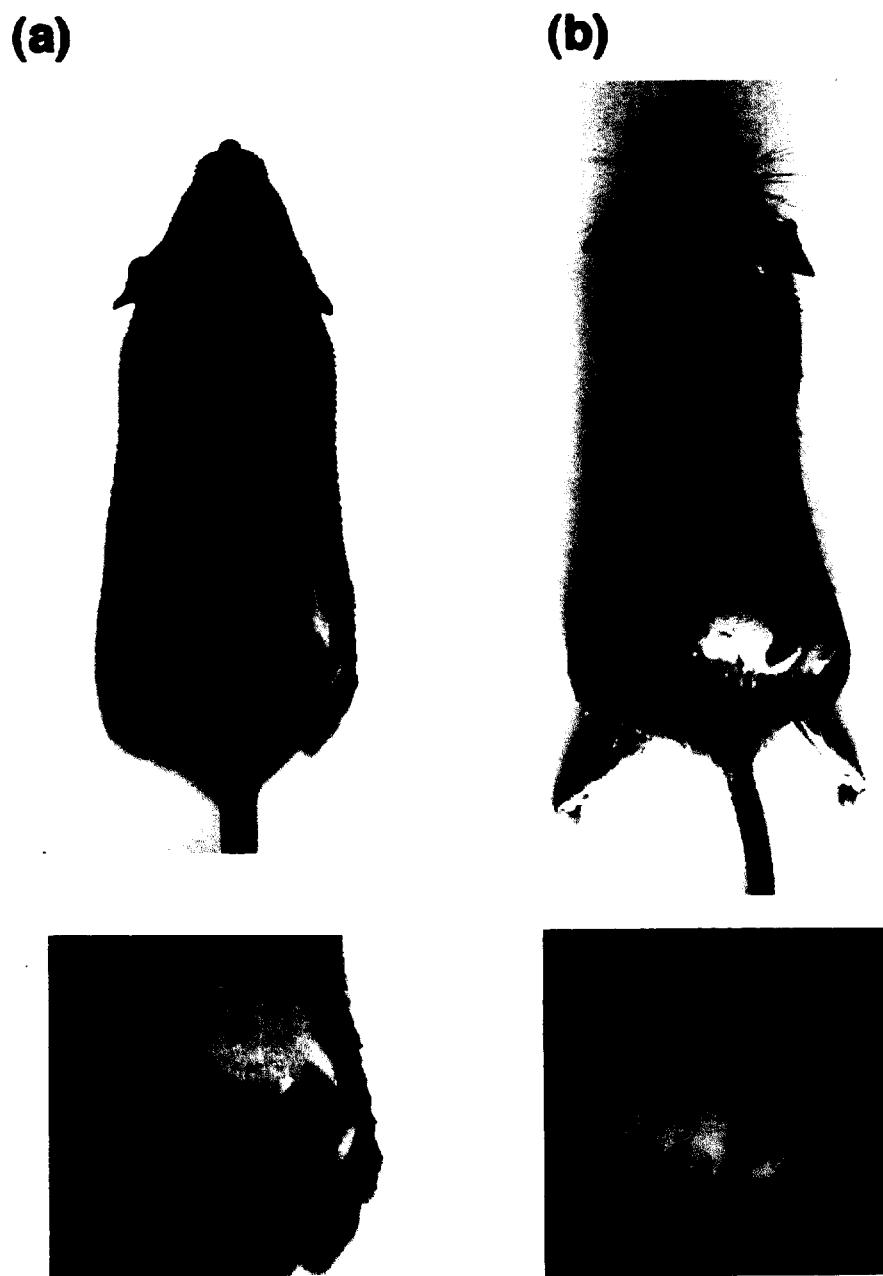
Phthalocyanine	Absorbance max	Emission max
ZnTSPc	337, 636, 676	688
TX-101A	368, 618, 687	696

All data were measured in 1% Tween 20 solution

### 2.3.2 水溶性亜鉛フタロシアニンの抗腫瘍効果および光線過敏症の評価

水溶性亜鉛フタロシアニンのマウス固形腫瘍に対する抗腫瘍効果を調べた。背部に固形腫瘍を形成したマウスに対し、光増感剤を投与した24時間後、光照射を行い、5日後における腫瘍の大きさを比較した。Fig. 2-3 に光照射前と光照射後のマウス固形腫瘍の写真を示す。光増感剤としてTX-101Aを用いた。光照射前の固形腫瘍は赤く腫れ上がっているのに対し、光照射後は固形腫瘍部分の壊死と縮小が認められる。

光照射 5 日後の腫瘍の大きさを比較した結果を Fig. 2-4 に示す。図の値は光照射前の腫瘍の面積を 100 とした相対値を示している。治療を行っていないコントロールの固形腫瘍では 5 日間で腫瘍の面積が約 3 倍に増加したのに対し、フタロシアニンでは抗腫瘍効果が観測された。特に TX-101A では腫瘍の生育がほぼ抑制された。これより水溶性亜鉛フタロシアニンはマウス固形腫瘍に対して高い抗腫瘍効果があることが分かった。



**Fig. 2-3** Photodynamic effect for mouse solid tumor. (a); before irradiation and (b); after irradiation.

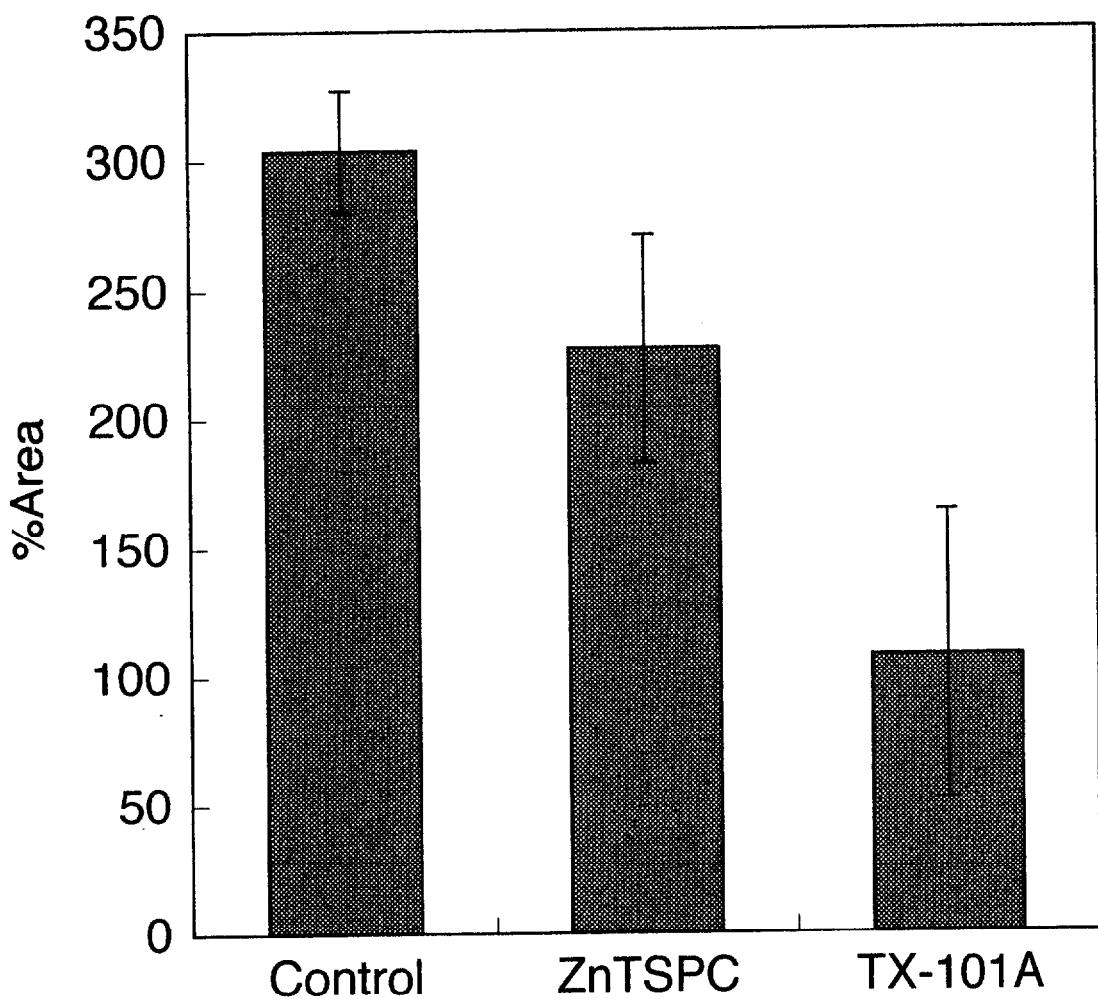


Fig. 2-4 Photodynamic effect of phthalocyanine for mouse solid tumor.  $1 \times 10^{-5}$  mol / kg of phthalocyanine was injected (i.p.). After 5 days, area of the tumor was measured.

次に水溶性亜鉛フタロシアニンの光線過敏症の評価を行うため、マウスの耳に対する光増感作用を測定した。光増感剤を腹腔内投与した24時間後、マウスの耳に光照射を行い、24時間後に耳の厚さを測定した。光照射はハロゲンランプを用い、光学フィルターによって波長300 nm以下の光を除去して行った。結果をFig. 2-5に示す。図のようにHpDを投与し光照射を行った場合は光照射前と比較して約1.8倍に耳が腫れ上がった。このことからHpDを用いた光線力学治療では光線過敏症が大きいことが分かった。一方、水溶性亜鉛フタロシアニンであるZnTSPcおよびTX-101Aは光照射前後であまり差がみられなかったことから、光線過敏症が小さいことが分かった。

Fig. 2-4およびFig. 2-5の結果より水溶性亜鉛フタロシアニンは高い抗腫瘍効果を持ち光線過敏症が小さいことが分かった。これは水溶性亜鉛フタロシアニンが優れた光増感剤であることを示している。

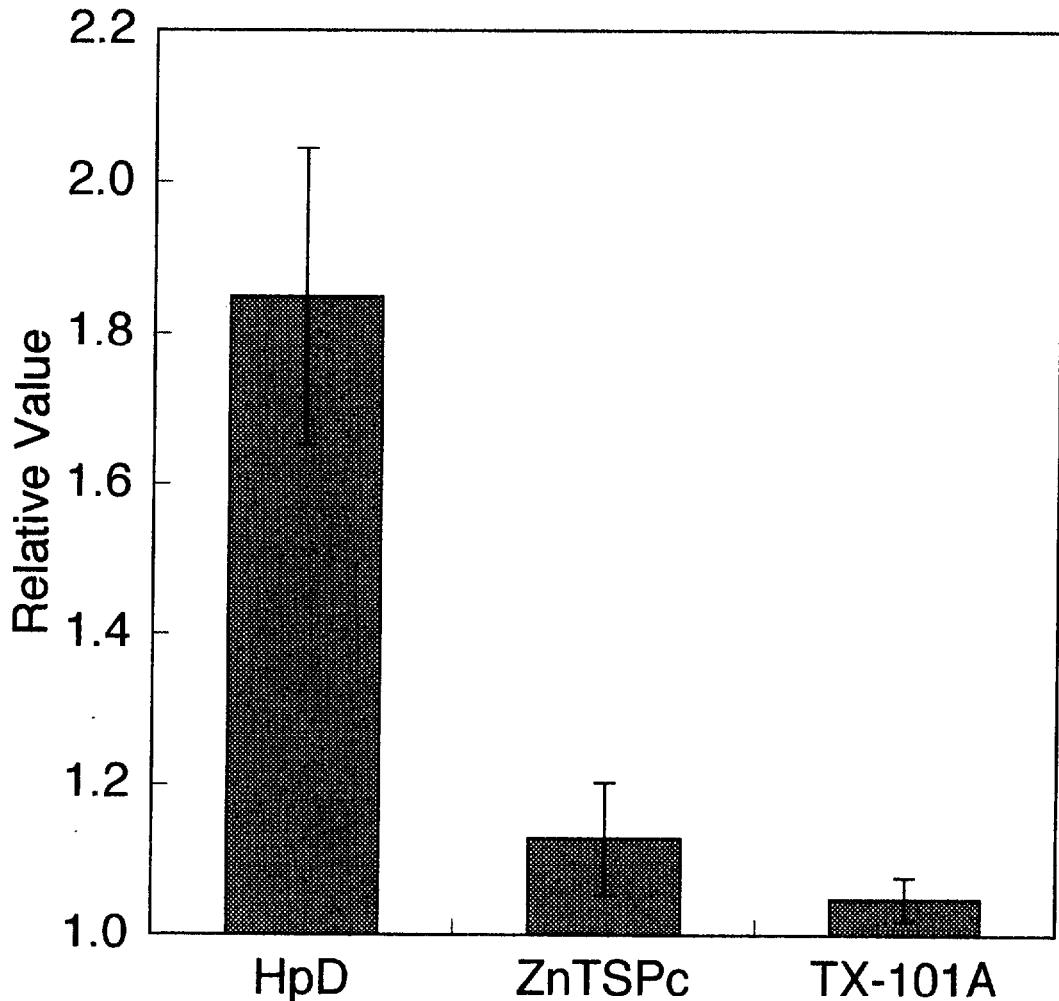


Fig. 2-5 Photosensitized changes in ear thickness. 1.6 mg / kg of photosensitizers were injected (i.p.). After 24 h, ear was irradiated and the thickness of ear were measured.

### 2.3.3 水溶性亜鉛フタロシアニンの腫瘍選択性

水溶性亜鉛フタロシアニンであるZnTSPcおよびTX-101Aの腫瘍選択性を調べた。光増感剤を腹腔内投与した後、腫瘍および皮膚への光増感剤蓄積量を測定した。結果をTable 2-2に示す。光線力学治療の光増感剤に求められる性質の一つとして腫瘍選択性があげられる。ここでは腫瘍と皮膚の蓄積量の比を調べることで腫瘍選択性を評価した。ZnTSPc、TX-101Aいずれの場合においても皮膚と比較して腫瘍に約2倍程度多く蓄積した。Wöhrle らの報告によれば HpD の皮膚に対する腫瘍への蓄積の割合は約2倍であるといわれている[12]。すなわちこれらの水溶性亜鉛フタロシアニンの腫瘍選択性は HpD と同程度でしかないことが分かった。

Table 2-2 Distribution of phthalocyanine in tumor-bearing mice

	Pc accumulation / $10^{-9}$ mol g <sup>-1</sup>		Ratio (Tumor / Skin)
	Tumor	Skin	
ZnTSPc	7.95	4.06	2.0
TX-101A	4.07	2.10	1.9

Mice were i.p. injected with  $10^{-5}$  mol / kg of phthalocyanine

### 2.3.4 抗体結合型 ZnTCPc の調製

水溶性亜鉛フタロシアニンは良好な光化学的性質を持つにも関わらず、腫瘍選択性が低いことが明らかとなったため、腫瘍選択性の高いフタロシアニンの開発を行った。腫瘍を選択的に認識するため抗腫瘍抗体を用い、光増感剤と結合した。光増感剤としてカルボキシル基を有する水溶性亜鉛フタロシアニンである亜鉛テトラカルボキシフタロシアニン (ZnTCPc) を用いた。構造を Fig. 2-6 に示す。

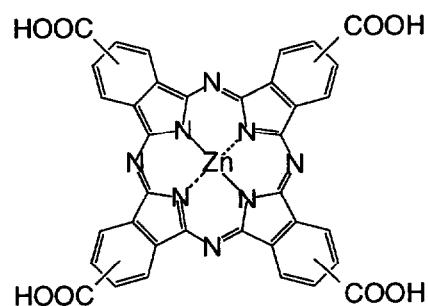


Fig. 2-6 Structures of ZnTCPc

Fig. 2-7(a) に ZnTCPc の PBS 中および DMSO 中での吸収スペクトルを示す。いずれの溶媒でも ZnTCPc 濃度は  $5 \times 10^{-5}$  M とした。Q バンドの極大吸収波長は水溶液中では 647 nm、702 nm であり、DMSO 中では 685 nm、618 nm であった。これらの波長と 280 nm におけるモル吸光係数を Table 2-3 に示す。また、Fig. 2-7(b) に ZnTCPc の PBS 中および DMSO 中での蛍光スペクトルを示す。濃度はどちらの溶媒中でも  $5 \times 10^{-7}$  M とした。励起波長はいずれの場合も 647 nm において測定

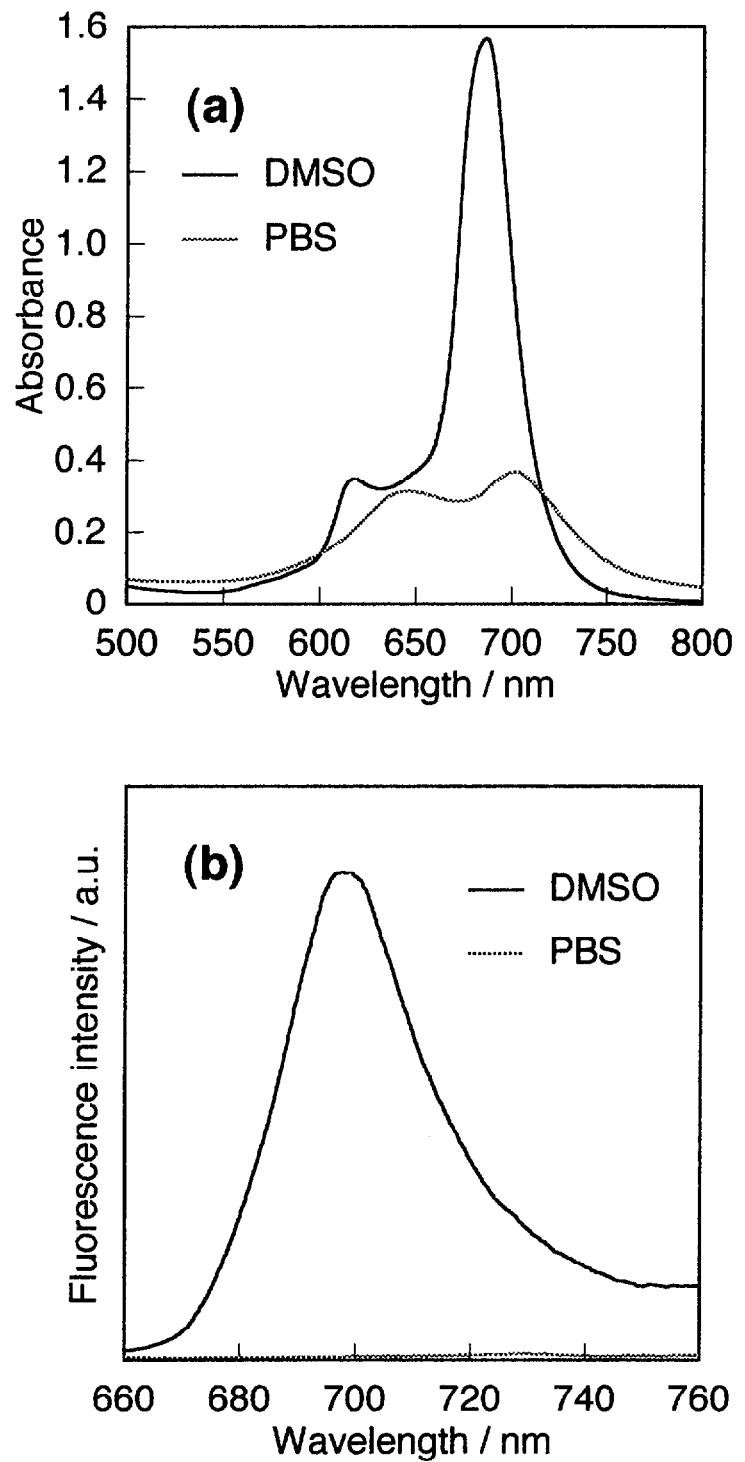


Fig. 2-7 (a) Absorption spectra of ZnTCPc in DMSO and in PBS. (b) Fluorescence emission spectra of ZnTCPc in DMSO and in PBS. The excitation wavelength was 647 nm.

Table 2-3 Molar absorption coefficient of ZnTCPc

Solvent	Molar absorption coefficient / mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>				
	ε 280	ε 618	ε 647	ε 685	ε 702
PBS	30	-	7.0	-	8.2
DMSO	37	7.3	-	30	-

した。この波長においては、PBS 中、DMSO 中で同程度の吸光度を示す。結果より DMSO 中では 695 nm に極大を持つ強い蛍光が観測されたが、水溶液中では蛍光は観測されなかった。1.3.3 で述べたように親水基を持つフタロシアニンは水溶液中でスタッキングした凝集体を形成し、蛍光を出さないことが知られている [13]。ZnTCPc も水溶液中で凝集体を形成し、蛍光を出さなかったと考えられる。また、DMSO 中ではフタロシアニンは単量体に解離することが知られているが、ZnTCPc も DMSO 中で強い蛍光が観測されたため、DMSO 中で単量体に解離したと考えられる。

抗体結合型 ZnTCPc (IgG-ZnTCPc) を 2.2.11 に示す方法により調製した。IgG-ZnTCPc はゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって精製した。溶出曲線を Fig. 2-8 に示す。各フラクションは 10 分ごとにフラクションコレクターによって 1.3 ml ずつ回収し、その画分の 280 nm、702 nm における吸光度を測定した。280 nm ではタンパク質の吸収に加えて ZnTCPc の吸収が存在する。そこで Table 2-3 で求めた ZnTCPc の水溶液中でのモル吸光係数の比 ( $\epsilon_{280} / \epsilon_{702}$ ) から 280 nm における ZnTCPc の吸光度を算出し、280 nm の吸光度から引くことによりタンパク質の吸光度を求めた。 $\epsilon_{280} / \epsilon_{702} = 3.7$  であるため、"Abs<sub>280</sub> - Abs<sub>702</sub> × 3.7" がタンパク質の吸光度を示す。

結果より、溶出時間が 100 分後から 210 分後までの画分 (F1) と、220 分後から 340 分後までの画分 (F2) の二つの画分が得られた。F1 には ZnTCPc の吸収が存在するがタンパク質の吸収は存在しないのでこの画分には結合していない遊離の ZnTCPc が含まれていると考えられる。また、F2 にはタンパク質の吸収とフタロシアニンの吸収が観測されるので、この画分中に IgG-ZnTCPc が含まれていると考えられる。以後の実験にはこの F2 を限外濾過により濃縮したサンプルを IgG-ZnTCPc として用いた。

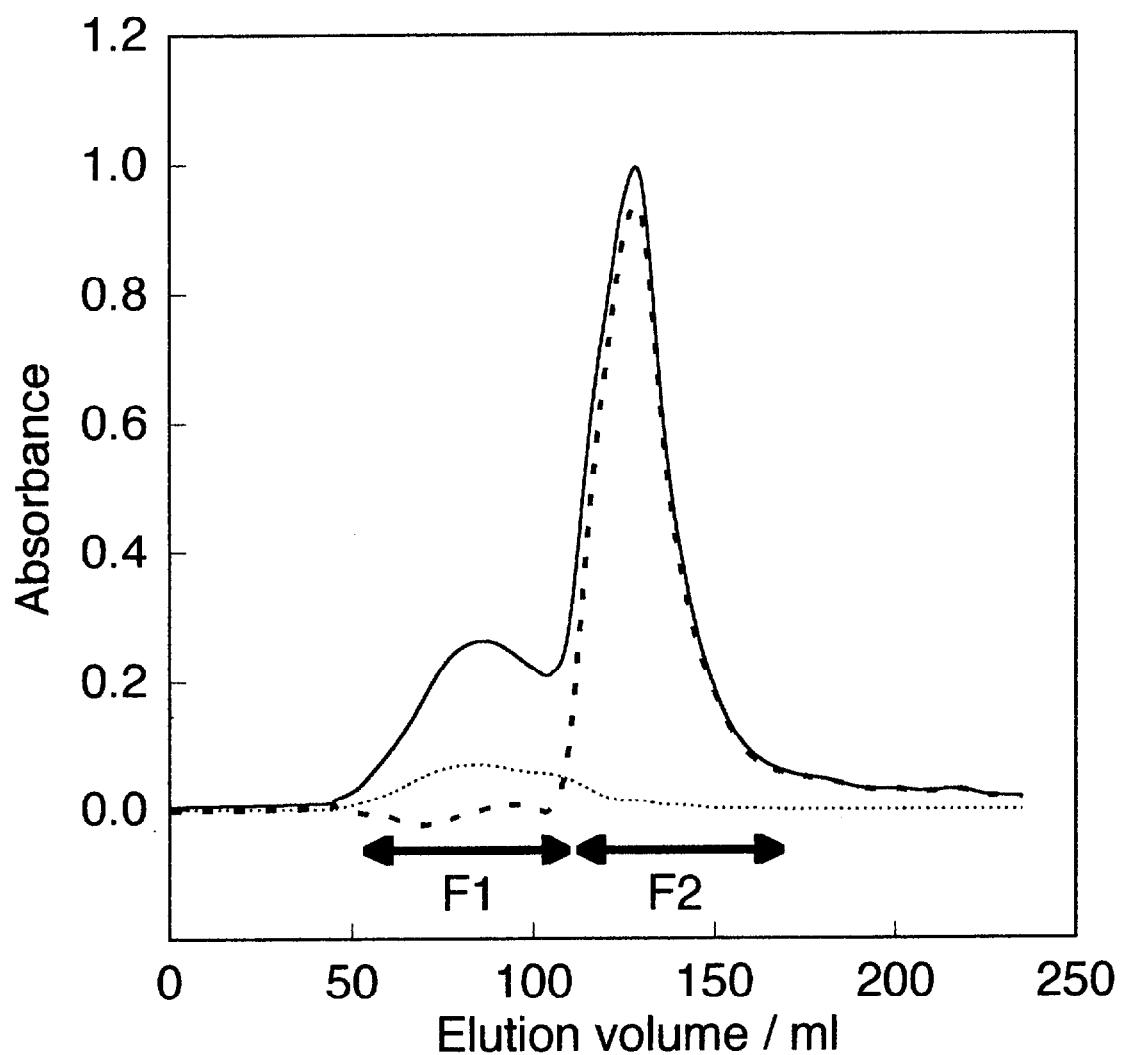


Fig. 2-8 Elution profile of gel filtration. Absorbance was measured at 702 nm (dotted line), 280 nm (solid line). The value of  $\text{Abs}_{280} - \text{Abs}_{702} \times 3.7$  (broken line) was calculated.

### 2.3.5 抗体結合型 ZnTCPc の吸収スペクトル

調製した IgG-ZnTCPc 溶液の吸収スペクトルを測定した。結果を Fig.2-9 に示す。

IgG-ZnTCPc は ZnTCPc と比較すると 280 nm 付近にタンパク質に由来する強い吸収が観測される。この溶液中には ZnTCPc とタンパク質である IgG が含まれていることがわかった。

IgG-ZnTCPc 溶液中に含まれる ZnTCPc の濃度は、702 nm における IgG-ZnTCPc 溶液の吸光度と ZnTCPc のモル吸光係数を用いて決定した。その結果 IgG-ZnTCPc 溶液中の ZnTCPc 濃度は、 $1.02 \times 10^{-5}$  M であった。また、Lowry 法により IgG-ZnTCPc 溶液中のタンパク質濃度を測定することにより、溶液中の IgG 濃度を決定した。IgG 濃度は  $2.78 \times 10^{-7}$  M であった。それぞれの濃度より IgG-ZnTCPc 溶液中における IgG および ZnTCPc の比を算出したところ、ZnTCPc / IgG = 37 であった。

さらに、IgG-ZnTCPc および ZnTCPc の Q バンドに由来する吸収は同じ形を示している。このことから IgG-ZnTCPc 中の ZnTCPc は、遊離の ZnTCPc とほぼ同じ状態にあると考えられる。またスペクトルの形状から、IgG-ZnTCPc 中の ZnTCPc はスタッキングした凝集体を形成していることが分かる。そのため、ZnTCPc の一部はスタッキングによって IgG-ZnTCPc に含まれていると考えられる。

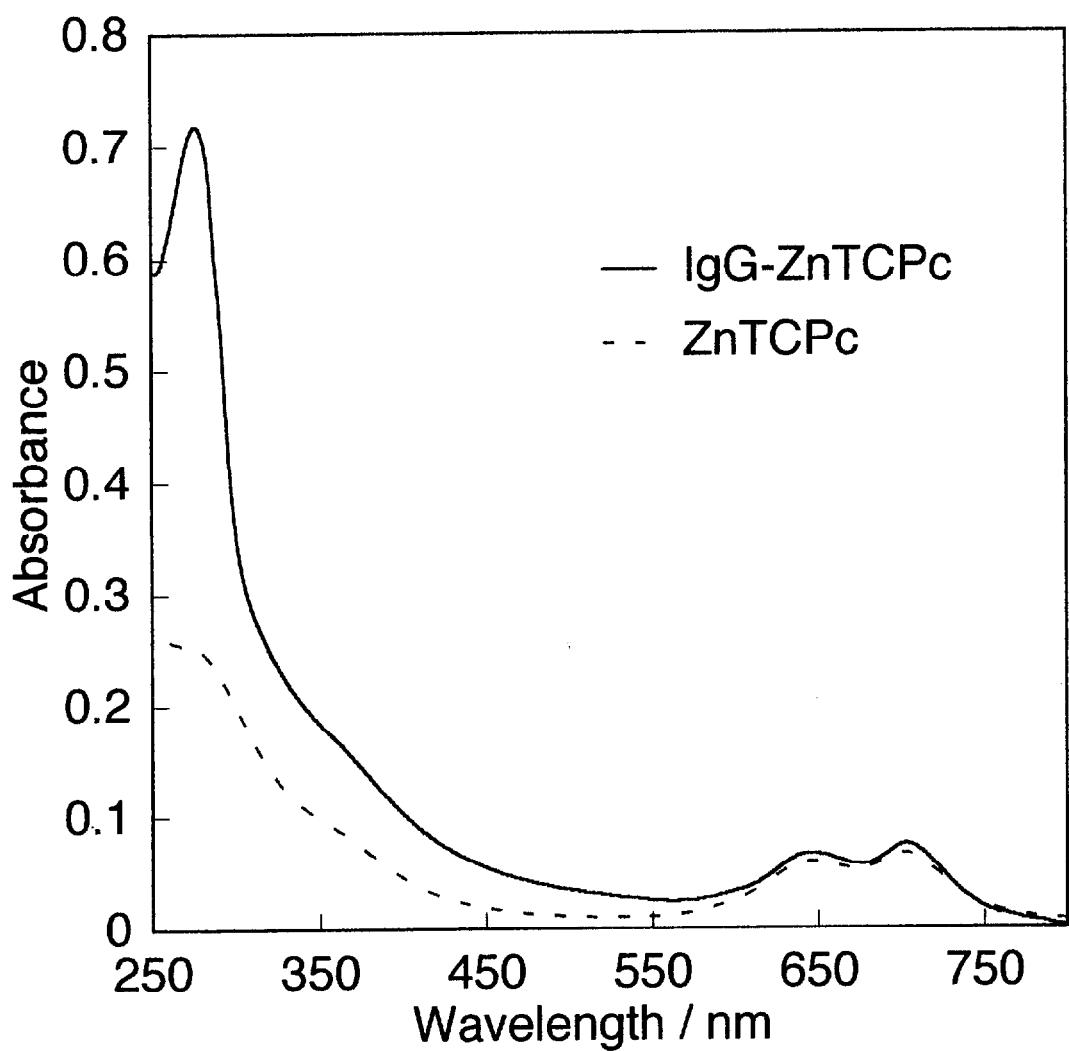


Fig. 2-9 Absorption spectra of IgG-ZnTCPc and ZnTCPc.

### 2.3.6 抗体結合型 ZnTCPc のアセトン沈殿

IgG-ZnTCPc溶液中のZnTCPcのすべてが抗体と共有結合しているかを調べるためにIgG-ZnTCPc溶液のアセトン沈殿をおこなった。ZnTCPcはスタッキングしやすいため IgG-ZnTCPc 溶液中の抗体と共有結合していない ZnTCPc は抗体と共有結合した ZnTCPc とスタッキングしていることが考えられる。そのスタッキングした ZnTCPc をアセトン沈殿によって除くことにより共有結合した数を求める。アセトン沈殿は IgG-ZnTCPc 溶液に対し 3 倍等量のアセトンを加え、タンパク質を沈殿させることによりおこなった。

Figure 2-10 に ZnTCPc の水溶液、DMSO 溶液、水 / アセトン溶液 (1:3, v / v) の吸収スペクトルを示す。いずれの溶媒中での ZnTCPc 濃度は  $5 \times 10^{-5}$  M である。結果より、ZnTCPc は水 / アセトン溶液中では ZnTCPc は DMSO 中でのスペクトルに近いスペクトルを示すため、ほぼ単量体に解離していることがわかった。さらに水 / アセトン溶液 (1:3, v / v) 中ではタンパク質周辺の水分子が奪われるため、タンパク質が沈殿してくることが知られている。そこでアセトン沈殿によって沈殿したタンパク質を回収することにより、IgG-ZnTCPc 溶液中に含まれる遊離の ZnTCPc を除くことができる。

IgG-ZnTCPc 溶液 300 μl に対しアセトン沈殿をおこない、沈殿を 300 μl の水に溶解した。アセトン沈殿前とアセトン沈殿後の吸収スペクトルをFig. 2-11に示す。アセトン沈殿によって IgG-ZnTCPc 溶液中の ZnTCPc 濃度が減少した。ここで残

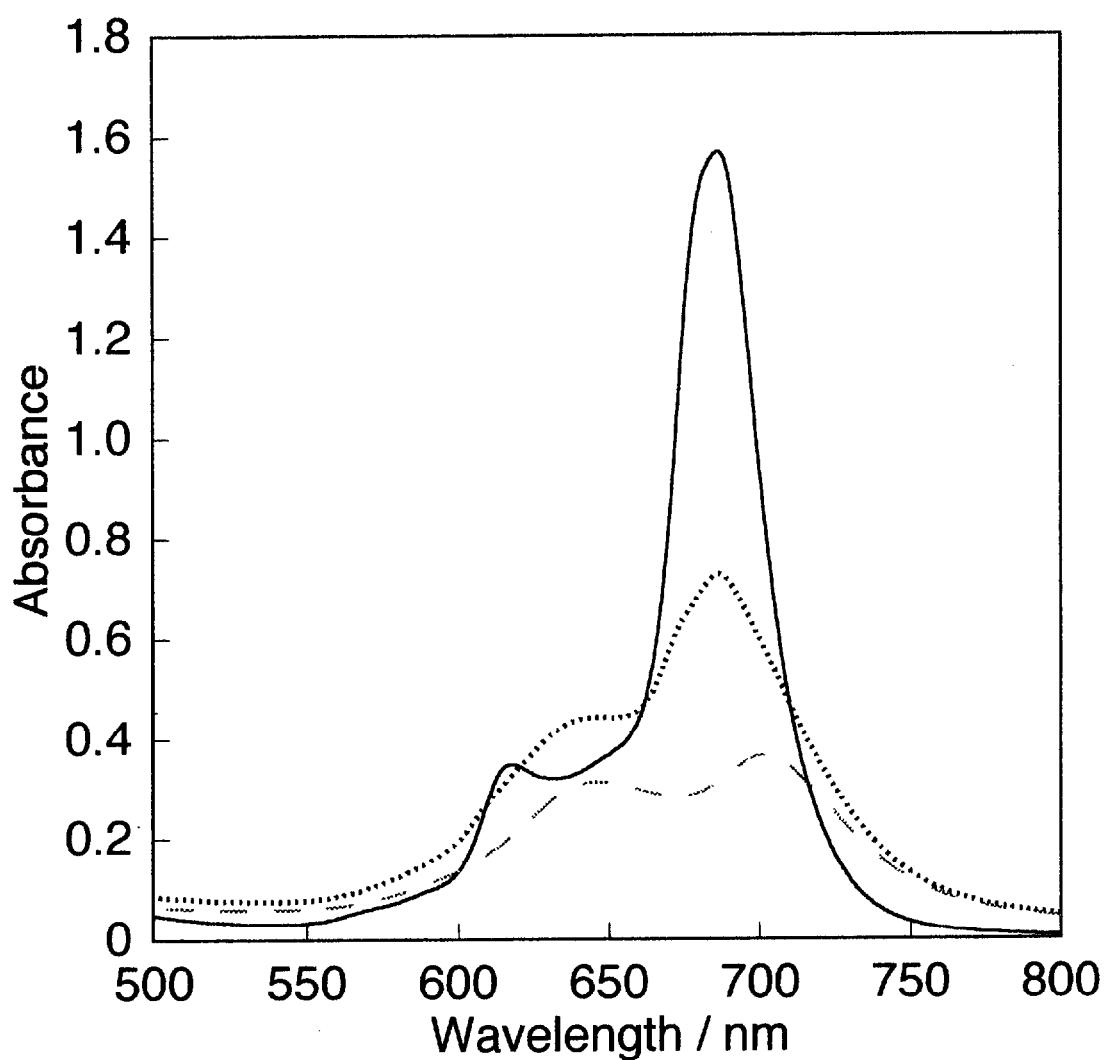


Fig. 2-10 Absorption spectra of ZnTCPc in DMSO (solid line), in PBS (broken line) and in 1:3 PBS / acetone (dotted line).

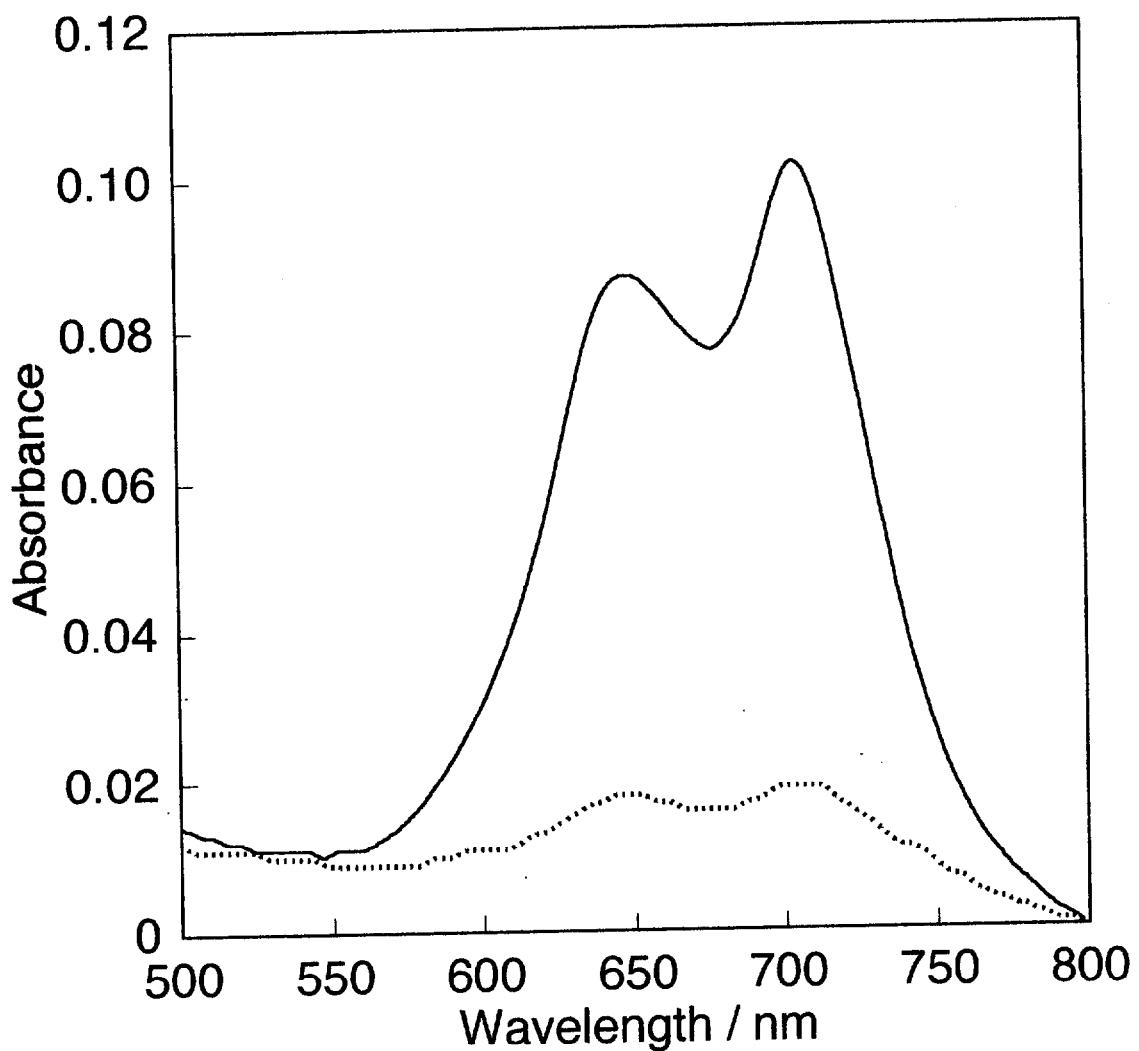


Fig. 2-11 Absorption spectra of IgG-ZnTCPc before acetone precipitation (solid line), and after acetone precipitation (dotted line).

存する ZnTCPc は抗体と共有結合していると考えられる。

吸収スペクトルの 702 nm における吸光度から溶液中の ZnTCPc 濃度を決定した。さらにアセトン沈殿前と後の溶液中のタンパク質濃度を Lowry 法によって定量し、溶液中の IgG 濃度を決定した。結果を Table 2-4 に示す。ゲル濾過で精製した IgG-ZnTCPc 溶液中には抗体一分子あたり約 37 個の ZnTCPc が含まれている。この溶液に対しアセトン沈殿をすることにより、抗体一分子あたり約 20 個の ZnTCPc が抗体と共有結合していることがわかった。また、アセトン沈殿により抗体と分離された残りの ZnTCPc は抗体と共有結合しておらず、抗体と共有結合した ZnTCPc とスタッキングし、ゲル濾過では抗体と同じフラクションに溶出したと考えられる。

Table 2-4 Acetone precipitation of IgG-ZnTCPc

	ZnTCPc conc. / $10^{-7}$ M	IgG conc. / $10^{-7}$ M	Ratio (ZnTCPc / IgG)
Before acetone precipitation	102	2.78	37
After acetone precipitation	11.6	0.58	20

### 2.3.7 トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）によるアミノ基の定量

IgG-ZnTCPc溶液中の抗体と共有結合したZnTCPcの数を調べるため、抗体のアミノ基の定量をおこなった。ZnTCPcと結合した抗体はZnTCPcと結合していない抗体に比べ、ZnTCPcの共有結合した数だけアミノ基が少なく定量されると考えられる。

アミノ基の定量は、345nmにおいてTNBSによる呈色反応を用いて行った。IgG-ZnTCPcおよびZnTCPcと結合していないIgGを測定用の試料として用いた。ただしZnTCPcは345 nmに吸収が存在するため、IgG-ZnTCPc溶液中のIgGとZnTCPcと結合していないIgGの比較はできない。そこでZnTCPcと結合していないIgGに、IgG-ZnTCPc中のIgGとZnTCPcの比と同じようになるようにZnTCPcを加えたものをIgGの測定用のサンプルとした。

結果をTable 2-5に示す。IgGと比較してIgG-ZnTCPcは約15個のアミノ基が少ないことがわかった。これは抗体のアミノ基がZnTCPcと結合したためであり、IgG-ZnTCPc溶液中のZnTCPcは抗体一分子あたり約15個が共有結合していると考えられる。

2.3.6のアセトン沈殿の結果と考慮すると、IgG-ZnTCPc中の抗体と共有結合したZnTCPcはおよそ15-20個であると考えられる。

Table 2-5 Determination of amino groups of IgG-ZnTCPc

	IgG	IgG-ZnTCPc	Difference
Number of amino groups	94	79	15

### 2.3.8 抗体結合型 ZnTCPc の MM46 細胞への取り込み量

抗体結合型 ZnTCPc の MM46 細胞への取り込み量を *in vitro* において測定した。

抗体結合型 ZnTCPc は IgG2b 結合型 ZnTCPc (IgG2b-ZnTCPc) と、IgG1 結合型 ZnTCPc (IgG1-ZnTCPc) の二種類を用いた。このうち IgG2b が MM46 細胞を特異的に認識する抗 MM46 モノクローナル抗体であり、IgG1 は MM46 細胞を認識しない [6]。IgG1-ZnTCPc は 2.2.10 で精製した IgG1 を 2.2.11 に示す方法により ZnTCPc と結合した。

Figure 2-12 に  $5 \times 10^{-7}$  M の抗体結合型 ZnTCPc および ZnTCPc の MM46 細胞への取り込み量を示す。いずれの光増感剤を接触した場合でも細胞内取り込み量は速やかに一定値に達することがわかる。光増感剤と細胞を 120 分間接触させたとき

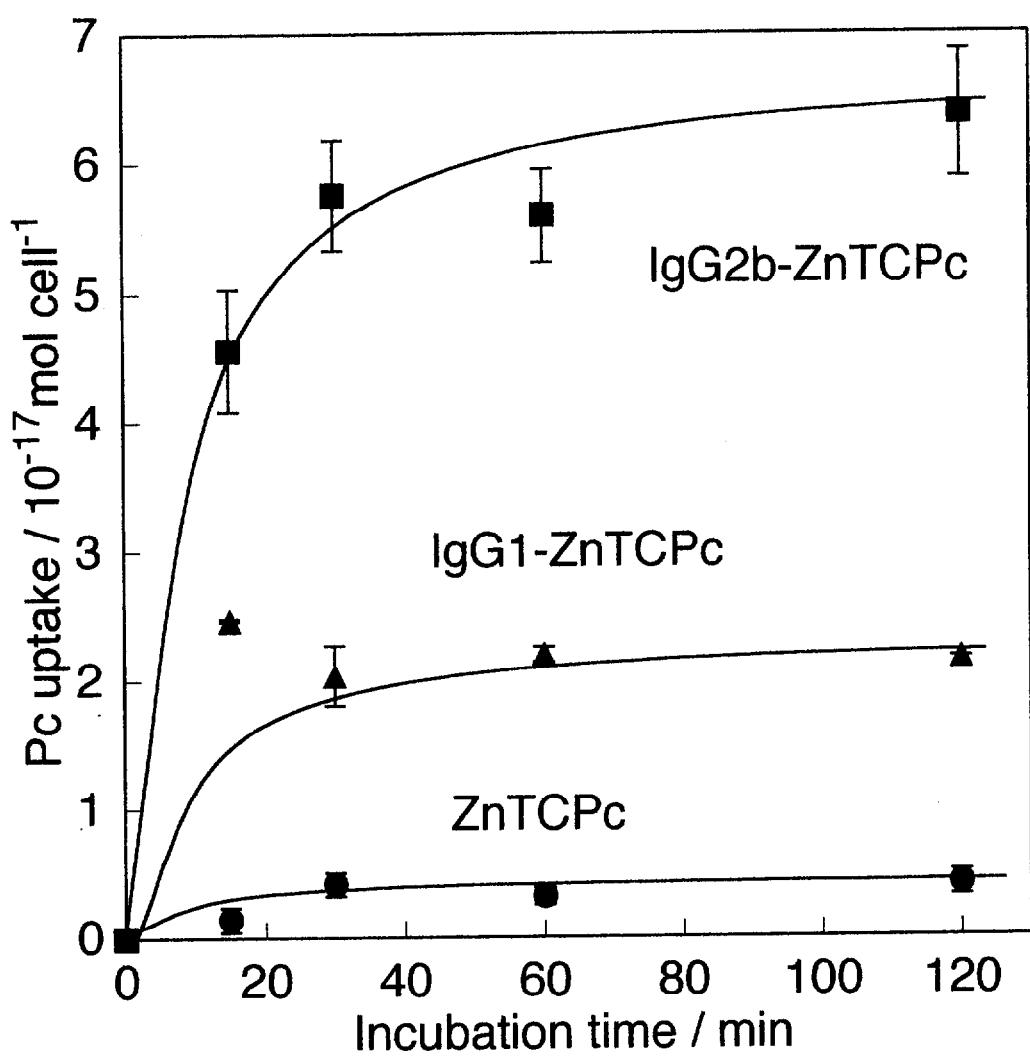


Fig. 2-12 Cellular uptake of ZnTCPc (●), IgG2b-ZnTCPc(■) and IgG1-ZnTCPc(▲). MM46 cells were incubated with  $5 \times 10^{-7}$  M of phthalocyanines.

の細胞への取り込み量は、IgG2b-ZnTCPc は  $6.4 \times 10^{-17}$  mol / cell であり、ZnTCPc は  $4.1 \times 10^{-18}$  mol / cell であった。この条件では IgG2b-ZnTCPc は ZnTCPc と比べて約 16 倍高く飛躍的に取り込み量が増加していることがわかった。これは抗 MM46 モノクローナル抗体である IgG2b が特異的に MM46 細胞を認識したため、取り込み量が増加したと考えられ、抗 MM46 モノクローナル抗体は MM46 細胞に光増感剤を運搬する良好なキャリアーとなることが示唆された。

IgG1-ZnTCPc は 120 分間細胞と接触させたとき、 $2.2 \times 10^{-17}$  mol / cell 取り込まれた。この条件では IgG1-ZnTCPc は ZnTCPc と比べて約 5.3 倍高い取り込み量を示した。一般に腫瘍細胞ではエンドサイトーシスによって、効果的に高分子を取り込むことが知られている [14]。そのため、高分子である抗体が結合した IgG1-ZnTCPc は ZnTCPc と比較して高い蓄積量を示したと考えられる。しかし、IgG1-ZnTCPc は特異的に MM46 細胞を認識しないため IgG2b-ZnTCPc よりも低い取り込み量を示した。

### 2.3.9 抗体結合型 ZnTCPc の MM46 細胞に対する光毒性

抗体結合型 ZnTCPc および ZnTCPc の MM46 細胞に対する光毒性を調べた。所定濃度の光増感剤と MM46 細胞を 2 時間接触させた後、洗浄後光照射を行い、20 時間後に MTT 法により細胞生存率を測定した。MTT 法はミトコンドリア内の脱水素酵素の活性を測定する細胞生死判定法である。

結果を Fig. 2-13 に示す。ZnTCPc および IgG1-ZnTCPc は光照射後の細胞生存率はほとんど変化しなかったのに対し、IgG2b-ZnTCPc は光照射後の細胞生存率が減少し高い光毒性を示した。光増感剤を  $5 \times 10^{-7}$  M 添加した場合の光照射後の細胞生存率は ZnTCPc を添加した場合では 80%、IgG1-ZnTCPc を添加した場合では 88%、IgG2b-ZnTCPc を添加した場合では 38% であった。

いずれの光増感剤においても活性種を生成するのは ZnTCPc である。同一の光増感剤を用いたにもかかわらず、IgG2b-ZnTCPc が良好な光毒性を示した理由として、以下の二点があげられる。

#### (1) 細胞への ZnTCPc 取り込み量が異なる

細胞に取り込まれた光増感剤量が増加すると生成する活性種が増加し、良好な光毒性を示すといえる。Fig.2-12 で示されたように IgG2b-ZnTCPc の細胞への取り込み量が飛躍的に上昇したため、IgG2b-ZnTCPc は良好な光毒性を示したと考えられる。

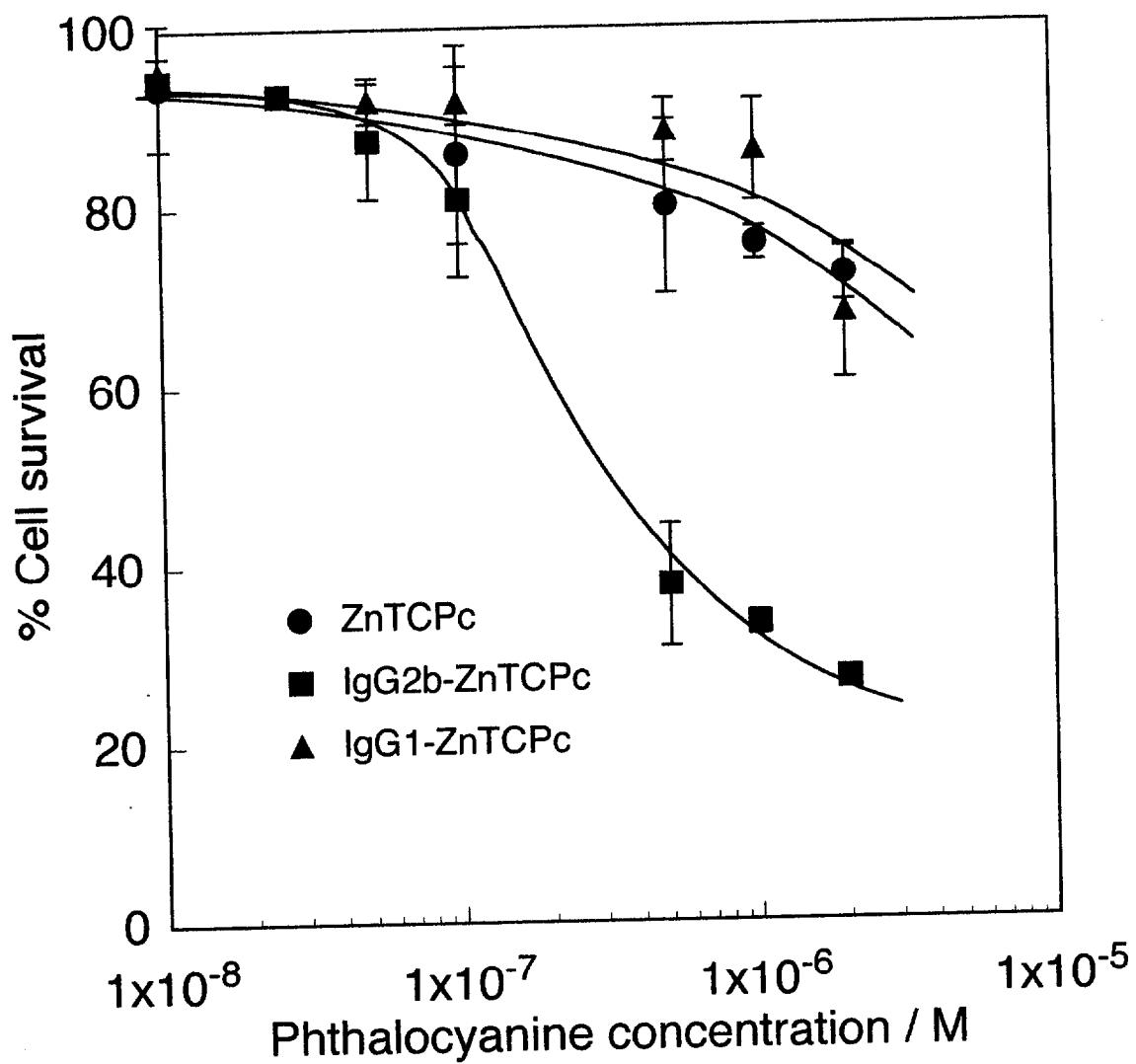


Fig. 2-13 Photocytotoxicity of ZnTCPc (●), IgG2b-ZnTCPc(■) and IgG1-ZnTCPc(▲). MM46 cells were incubated for 2 h.

しかし、IgG1-ZnTCPc は ZnTCPc と比較して高い取り込み量を示すにも関わらず、光毒性は ZnTCPc とあまり変わらなかった。このため、細胞への ZnTCPc 取り込み量のみでは、光毒性の違いの説明はつかない。

## (2) ZnTCPc の細胞に取り込まれる部位が異なる

抗腫瘍抗体結合型薬剤を用いた研究において、腫瘍を認識する抗体と結合した場合と、腫瘍を認識しない抗体と結合した場合を比較する研究がなされている。その結果、腫瘍を認識する抗体と結合した抗体結合型薬剤のほうが致死ダメージを与えやすい部位に集積し、良好な細胞毒性を示すことが知られている [15,16]。IgG2b も腫瘍を認識する抗体であるため、IgG2b-ZnTCPc はより致死ダメージを与えやすい部位に集積し、良好な光毒性を示したと考えられる。一方、IgG1-ZnTCPc および ZnTCPc は細胞に致死ダメージを与えづらい部位に集積したと考えられる。

細胞への局在部位を測定する方法として蛍光顕微鏡観察があげられる。しかし、本研究で調製した抗体結合型 ZnTCPc は蛍光量子収率が低いため、ZnTCPc の蛍光は観察されず、局在部位についての詳細な知見は得られなかった。

いずれにしても、IgG2b-ZnTCPc は高い光毒性を示し、有効な光増感剤であることが示唆された。

### 2.3.10 MM46 担癌マウスの各臓器中における抗体結合型 ZnTCPc 蓄積量

抗体結合型 ZnTCPc および ZnTCPc を MM46 担癌マウスに腹腔内投与したときの各臓器中の ZnTCPc 蓄積量を測定した。抗体結合型 ZnTCPc (IgG-ZnTCPc) は MM46 細胞を特異的に認識する IgG2b 結合型 ZnTCPc を用いた。光増感剤を  $1 \times 10^{-7}$  mol / kg body weight 投与し、24 時間後に各臓器中の ZnTCPc を定量した。

IgG-ZnTCPc および ZnTCPc の各臓器中の蓄積量を Fig.2-14 に示す。IgG-ZnTCPc は ZnTCPc と比較して腫瘍での蓄積量が約 1.5 倍増加していることが分かった。これは抗 MM46 モノクローナル抗体が腫瘍細胞である MM46 細胞を特異的に認識したためと考えられる。腫瘍に多く蓄積したため、IgG-ZnTCPc を用いた光線力学治療は治療効果が高いことが期待される。また、肝臓、腎臓、皮膚、筋肉では IgG-ZnTCPc は ZnTCPc と同程度あるいは若干少ない蓄積量を示した。特に副作用である光線過敏症がおこりやすい筋肉や皮膚での IgG-ZnTCPc の蓄積量は ZnTCPc より少ない蓄積量を示した。

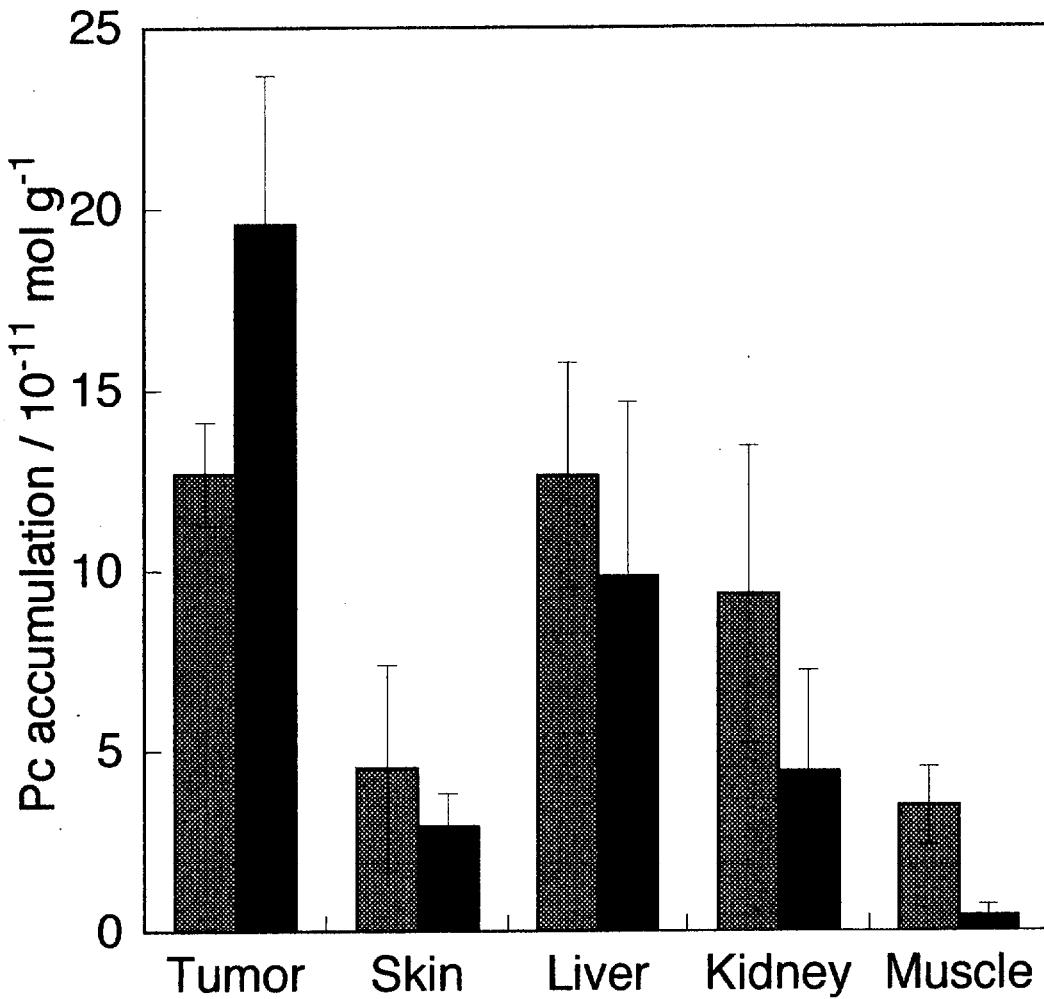


Fig. 2-14 Distribution of IgG-ZnTCPc (■) and ZnTCPc (▨) in tumor-bearing mice. MM46 bearing mice were i.p. injected with photosensitizers ( $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol / kg}$ ). Tissue distribution was determined 24 h after injection. Each bar and line represent the mean  $\pm$  SD ( $n=4$ ).

抗体結合型ZnTCPcおよびZnTCPcの各臓器中の蓄積の割合をTable 2-6に示す。表中の値は腫瘍における蓄積量を1としたときの割合を示す。すなわち IgG-ZnTCPcおよびZnTCPcの腫瘍での蓄積量が等しいときの他の臓器のZnTCPcの蓄積量を表す。結果より、ZnTCPcは肝臓や腎臓などの臓器に多く蓄積するのに対し、IgG-ZnTCPcは腫瘍以外の臓器にほとんど蓄積せず、腫瘍選択的に蓄積することが分かった。このことから IgG-ZnTCPcはZnTCPcと同程度の光線力学的効果を示す条件では他の臓器に蓄積しないため、光線過敏症が少ないことが示唆される。

Table 2-6 Relative accumulation of IgG-ZnTCPc and ZnTCPc in tissues

	Tumor	Skin	Liver	Kidney	Muscle
IgG-ZnTCPc	1.0±0.2	0.2±0.1	0.5±0.3	0.2±0.1	0.02±0.0
ZnTCPc	1.0±0.1	0.4±0.2	1.0±0.3	0.7±0.3	0.3±0.1

本章で用いた亜鉛フタロシアニンおよび抗体結合型亜鉛フタロシアニンを担癌マウスに投与した際の皮膚に対する腫瘍への蓄積量の比をTable 2-7に示す。いずれの亜鉛フタロシアニンも蓄積量の比は2前後であったのに対し、IgG-ZnTCPcは6.7であった。このことから抗体結合型亜鉛フタロシアニンは、第一世代の光増感剤であるHpDおよび第二世代の光増感剤であるフタロシアニンと比較して腫瘍選択性が向上したことが分かった。

Table 2-7 Accumulation ratio of photosensitizers

Photosensitizer	Accumulation ratio (Tumor / Skin)
HpD [12]	~2
TX-101A	1.9
ZnTSPc	2.0
ZnTCPc	2.8
IgG-ZnTCPc	6.7

## 2.4 まとめ

本章では長波長領域に吸収を有する亜鉛フタロシアニンのキャラクタリゼーションおよび抗腫瘍抗体結合型亜鉛フタロシアニンを調製しその効果を調べた。

水溶性亜鉛フタロシアニンであるTX-101AおよびZnTSPcは長波長領域の光を治療に用いることができ、治療効果が高く、光線過敏症が少ないことが分かった。しかし、HpDと同様に腫瘍選択性は低いことが明らかとなった。

そこで腫瘍選択性の高い亜鉛フタロシアニンの開発を行った。腫瘍を選択性に認識するため抗腫瘍抗体を用い、亜鉛フタロシアニンと結合した抗腫瘍抗体結合型ZnTCPcを調製した。その結果、抗体一分子当たり37個のZnTCPcが結合した抗体結合型亜鉛フタロシアニンを調製できた。また、抗体結合型ZnTCPc中の抗体と共有結合したZnTCPcは抗体一分子当たり15-20個であることが分かった。抗体結合型ZnTCPcは*in vitro*において効果的に細胞に取り込まれ、良好な光毒性を示した。これは抗体が腫瘍細胞を特異的に認識したためと考えられる。さらに抗体結合型ZnTCPcは担癌マウスにおいて、腫瘍選択性に取り込まれることが分かった。

## 2.5 参考文献

- [1] McGarvey D. J. and T. G. Truscott (1990) in photodynamic therapy of neoplastic disease (ed. D. kessel) Vol 2, pp. 179-189. CTC Press, Boca Ration, Florida.
- [2] Rosenthal, I. (1991) *Photochem. Photobiol.* **53**, 859-870
- [3] Bonnett, R. (1995) *Chem. Soc. Rev.* **24**, 19-33
- [4] Weber, J. and D. H. Busch (1964) *Inorg. Chem.* **4**, 469-471
- [5] Shirai, H., A. Maruyama, K. Kobayashi and N. Hojo (1980) *Makromol. Chem.* **181**, 575-584
- [6] Seto, M., N. Umemoto, M. Saito, Y. Masuho, T. Hara and T. Takahashi (1982) *Cancer Res.* **42**, 5209-5215
- [7] Lowry, O. H., N. J. Roserbrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- [8] 大野素徳, 金岡祐一, 崎山文夫, 前田浩 (1981) タンパク質の化学修飾(上)  
学会出版センター, pp36
- [9] Plapp, B. V., S. Moore and W. H. Stein (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 939
- [10] Carmichael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna and J. B. Mitchell (1987)  
*Cancer Res.* **47**, 936-942
- [11] Ford, W. E., B. D. Rihter, M. E. Kenny and M. A. J. Rodgers (1989) *Photochem.  
Photobiol.* **50**, 277-283.

- [12] Wöhrle, D., A. Hirth, T. Bogdahn-Rai, G. Schnurpfeil and M. Shopova (1998) *Russ. Chem. Bull.* **47**, 807-816
- [13] Ishikawa, N., O. Ohno, Y. Kaizu and H. Kobayashi (1992) *J. Phys. Chem.* **96**, 8832-8839
- [14] Duncan, R. (1992) *Anticancer Drugs* **3**, 175-210
- [15] Seto, M., T. Takahashi, M. Tanimoto and Y. Nishizuka (1982) *J. Immunol.* **128**, 201-205
- [16] Yang, H. M., R. A. Reisfeld (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1189-1193

### 第三章

## 抗腫瘍抗体結合型クロリン e6 の調製と その光線力学的効果

### 3.1 はじめに

本章では、光増感活性が高く、腫瘍選択性をもった光増感剤の開発を目的として、抗腫瘍抗体結合型のクロリンe6 (Ce6) を調製した。Ce6の構造を Fig. 3-1 に示す。Ce6には次のような特徴が挙げられる [1-2]。(1) 組織透過性のよい650 nm付近に強い吸収極大を有しているため、深部の癌の治療が可能である。(2)光励起三重項状態の寿命が、数百マイクロ秒と長いことが知られている。光増感反応は光励起三重項状態を経由するため、この化合物は効果的に活性種を生成する。(3)水溶性で、水溶液中で凝集しにくいため、医薬品としての取り扱いが容易である。しかし、フタロシアニン類と同様に腫瘍選択性が低いことが問題点としてあげられる。

そこで本章では Ce6 に腫瘍選択性を持たせた抗腫瘍抗体結合型 Ce6 を調製し、その光線力学的効果を調べた。Ce6は亜鉛フタロシアニンと異なり水溶液中で単量体として存在するため[3]、全分子が共有結合を介して抗体と結合し、高い光増感活性が期待される。

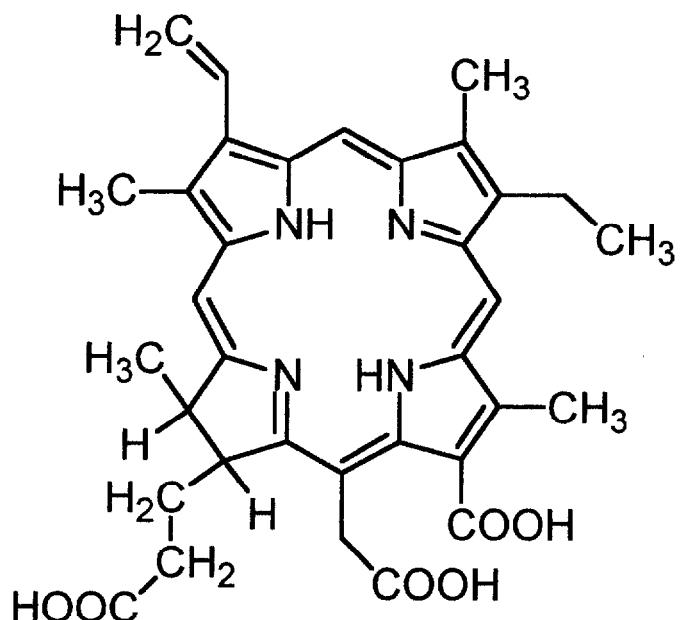


Fig. 3-1 Structure of chlorin e6 (ce6)

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 試薬

Chlorin e6 (Ce6) は Porphyrin Products から、N, N'-Dicyclohexyl-carbodiimide (DCC) は関東化学から、N-hydroxysuccinimide (NHS) は東京化成から購入した。 RPMI-1640 は Sigma から、ウシ胎児血清 (FBS) は JRH Biosciences から購入した。ジフェニルイソベンゾフラン (DPBF) は東京化成から購入した。ゲル濾過用分子量マーカーは SIGMA から購入した。その他の試薬は市販特級品を使用した。

### 3.2.2 実験装置

実験に使用した装置を以下に示す。

ロータリーエバポレーター：YAMATO RE47

蛍光顕微鏡システム

蛍光顕微鏡：ORYMPUS IX 70

冷却CCDカメラ：浜松ホトニクス ORCA ER

画像解析システム：浜松ホトニクス Aqua Cosmos

定常光照射装置

ハロゲンランプ：東芝ネオハロクールH、425WN-EH、500W型

光学フィルター：HOYA R-60

Flash Photolysis

励起光源：Spectra Physics Nd-YAG Laser (Quanta Ray DCR-3)

モニター光源：Applied Photophysics、Xe Arc Lamp

デジタルストレージオシロスコープ：SONY-Tektronix TDS 360

### 3.2.3 抗体結合型クロリン e6 の調製

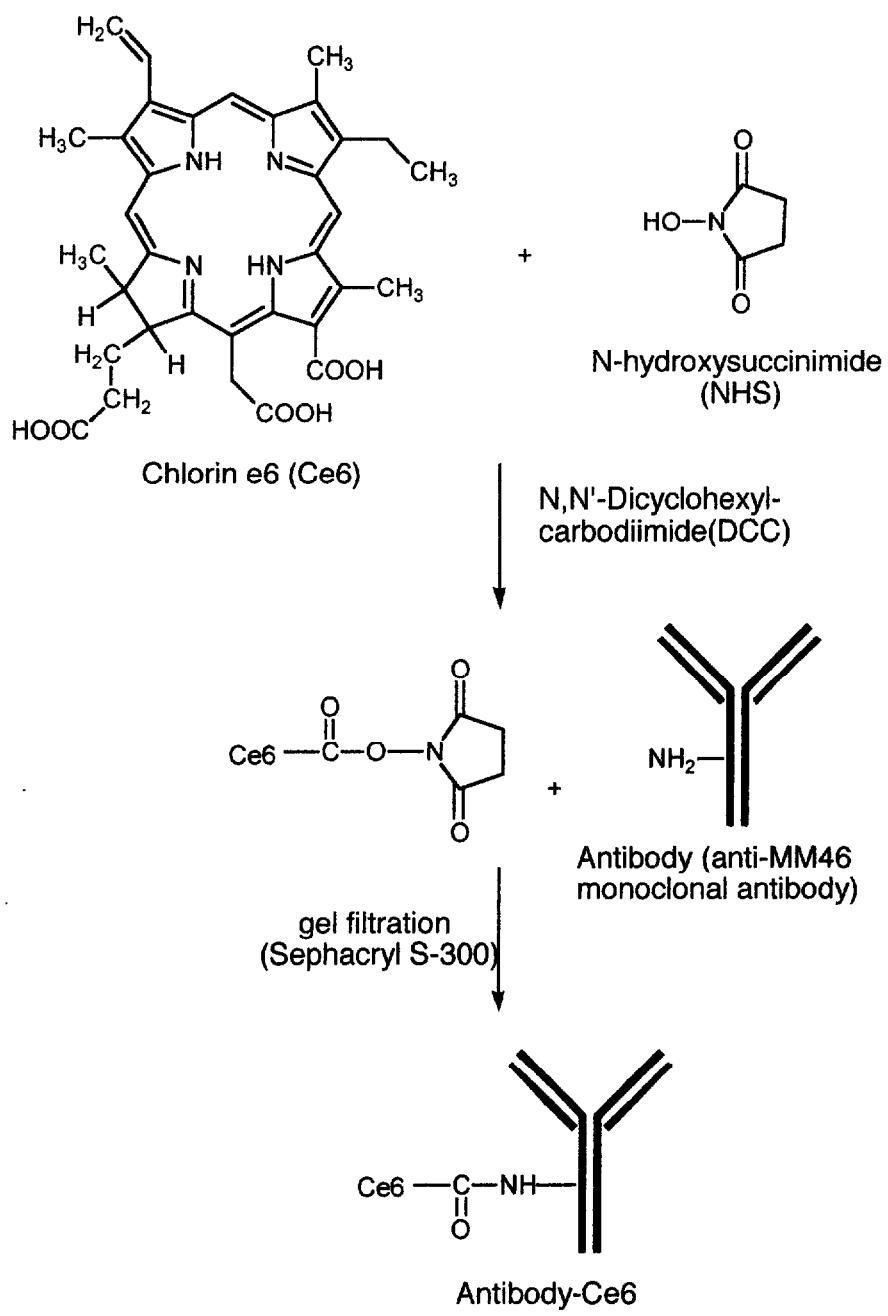
2.2.10 で精製した抗体を用いて、抗体結合型 Ce6 を以下の方法で調製した (Scheme 3-1)。抗体のアミノ基と Ce6 のカルボキシル基をペプチド結合を形成させることによって抗体結合型クロリン e6 を調製した。DMF 中で、Ce6 と等量の DCC および NHS を加え、室温で 24 時間反応し、Ce6 のカルボキシル基を活性化エステルに変換した。反応溶液中の Ce6 は  $1.0 \times 10^{-6}$  mol とした。反応終了後、エバポレーターによって溶媒を除去し、100  $\mu$ l のジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、800  $\mu$ l の抗体溶液 (1 mg / ml) および 200 mM EPPS (pH 8.0) を加え、pH 8.0において抗体と活性化工ステルを反応させた。反応は室温で 2 時間行った。抗体結合型 Ce6 はゲル濾過によって精製した。ゲル濾過の条件を以下に示す。

ゲル濾過カラム : Sephadex® S-300 HR、1.0 cm x 45 cm

緩衝液 : 10 mM PBS buffer (pH 7.4)

流速 : 0.2 ml / min

溶出したフラクション中の Ce6 濃度を 402 nm の吸光度から、抗体のタンパク質濃度を Lowry 法 [4] により決定した。



**Scheme 3-1** Synthesis of IgG-ZnTCPc

### 3.2.4 MM46 細胞の培養

MM46 細胞は以下のように培養した。2.2.14 と同様にマウスの腹腔内で培養した MM46 細胞を採取し、PBS で洗浄後、10% FBS を含む RPMI-1640 培地で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 霧囲気下で培養した。

### 3.2.5 抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞への取り込み量の測定

抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞への取り込み量を以下に示す方法により測定した。MM46 細胞を  $\phi 35\text{ mm}$  シャーレに  $2 \times 10^5$  個となるように FBS 不含 RPMI-1640 培地 1ml に継代した。これに抗体結合型 Ce6 あるいは Ce6 を所定濃度となるよう培地中に添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。細胞は所定時間インキュベートした後、セルスクレーパーによって回収し、遠心分離した後 PBS で洗浄した。0.2 M NaOH 水溶液を 1 ml 加え、2 時間室温で振とうし、細胞を溶解させた。得られた細胞溶解液 700  $\mu\text{l}$  に対し、700  $\mu\text{l}$  の 2% SDS を加え一晩振とうすることで細胞抽出液を得た。細胞への Ce6 取り込み量は細胞抽出液の蛍光強度を測定することにより決定した。励起波長は 400 nm、観測波長は 665 nm で測定した。細胞タンパク質量は Lowry 法によって決定した。

### 3.2.6 蛍光顕微鏡観察

抗体結合型Ce6のMM46細胞への局在部位を調べるため、抗体結合型Ce6を取り込んだ細胞の蛍光顕微鏡観察を行った。MM46細胞を $\phi 35\text{ mm}$ のガラスベースディッシュに、 $5 \times 10^3$ 個となるようにFBS不含のRPMI-1640培地(1ml)に継代し、抗体結合型Ce6またはCe6を $1 \times 10^{-7}\text{ M}$ となるように添加した。所定時間経過後、細胞をPBSで洗浄した後、PBSを1ml加えて蛍光顕微鏡観察を行った。対物レンズは100倍、接眼レンズは10倍のものを用いた。光源は水銀ランプを用い、光学フィルターにより励起光を400 nm-440 nmとした。発光は光学フィルターによって、580 nm以上の光を観察した。

### 3.2.7 抗体結合型Ce6の殺細胞効果の測定

抗体結合型Ce6の光照射による殺細胞効果を以下に示す方法により測定した。MM46細胞を $\phi 35\text{ mm}$ シャーレに $2 \times 10^4$ 個となるようにFBS不含RPMI-1640培地1mlに継代した。これに抗体結合型Ce6あるいはCe6を所定濃度となるように培地中に添加し、 $37^\circ\text{C}$ で2時間インキュベートした。その後、培地を取り除き、細胞をPBSで洗浄し、FBSを含むRPMI-1640培地を1ml加え、光照射を行った。光源は500Wハロゲンランプで、 $50\text{ mW/cm}^2$ の光を8分間照射した。また、600 nm以下の波長の光を光学フィルター(R-60、HOYA)により除去し、熱の影響を

減らすために水フィルターを用いた。光照射後、20時間、37°C、暗所にてインキュベートし、生存率を測定した。生存率は、光増感剤を加えず光照射を行っていないものをコントロールとして、MTT法により測定した。MTT法は2.2.17に準じて行った。

### 3.2.8 一重項酸素の検出

抗体結合型Ce6の光照射による一重項酸素の生成を測定した。一重項酸素の検出はジフェニルイソベンゾフラン（DPBF）の酸化分解反応により行った。実験方法はMichelsenらの方法に準じて行った[5]。DPBF  $5 \times 10^{-5}$  M、抗体結合型Ce6またはCe6を $5 \times 10^{-8}$  Mを含む全量1 mlのDMSO溶液を反応液とし、これに酸素を導入しながら定常光照射を行った。定常光照射は3.2.7の光照射の条件に準じて行い、50 mW / cm<sup>2</sup>の光を所定時間照射した。反応は30°Cの水浴中でマグネットィックスターラーで攪拌して行った。所定時間経過後、100 μlの反応液を採取し、DMSOで15倍希釈し、415 nmにおける吸光度を測定した。DPBFは415 nmに特徴的な吸収を持ち、酸化分解されると吸光度が減少する。

### 3.2.9 光励起三重項寿命の測定

抗体結合型 Ce6 の光励起三重項寿命を測定した。光励起三重項寿命の測定は、レーザーフラッシュフォトリシスを用いて行った。抗体結合型Ce6 またはCe6 を  $1 \times 10^{-5}$  M 程度となるように PBS に溶解し、寿命測定用のサンプルとした。サンプルは5回凍結脱気を行い、溶存酸素を除去して使用した。励起光源にはNd-YAG レーザーの第2高調波（532 nm）を用いた。また T-T 吸収の減衰は 470 nm における透過度の時間変化を測定することにより求めた。

### 3.3 結果と考察

#### 3.3.1 Ce6 の吸収スペクトルと蛍光スペクトル

Figure 3-2 (a) に Ce6 の PBS 中、および DMSO 中での吸収スペクトルを示す。Ce6 濃度はいずれの溶媒中でも  $1 \times 10^{-5}$  M とした。Soret バンドの極大吸収波長は PBS 中では 402 nm、DMSO 中では 405 nm であり顕著なスペクトルの変化は観察されなかった。また Q バンドの極大吸収波長は PBS 中では 654 nm、DMSO 中では 665 nm であり、スペクトルの形状は若干変化している。Soret バンドにおける吸収スペクトルの形状が余り変化せず、402 nm における PBS、DMSO 中でのモル吸光係数が同等の値を示したため、以後の実験では 402 nm における吸光度とモル吸光係数から Ce6 濃度を決定した。PBS 中での Ce6 のモル吸光係数は  $1.34 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  であった。

また、Fig. 3-2 (b) に Ce6 の PBS 中、および DMSO 中での蛍光スペクトルを示す。濃度はいずれの溶媒中でも  $1 \times 10^{-7}$  M とした。また、励起波長はいずれの溶媒でも同程度の吸光度を示した 624 nm において測定した。DMSO 中では 670 nm に、PBS 中では 662 nm に極大をもつ蛍光が観測された。第二章で用いた ZnTCPc は PBS 中でスタッキングした凝集体を形成し、蛍光を発しないことが示された (Fig. 2-7)。これと比較して Ce6 は強い蛍光が検出され、いずれの溶媒中でも単量体に解離し、高い光増感作用が期待される。

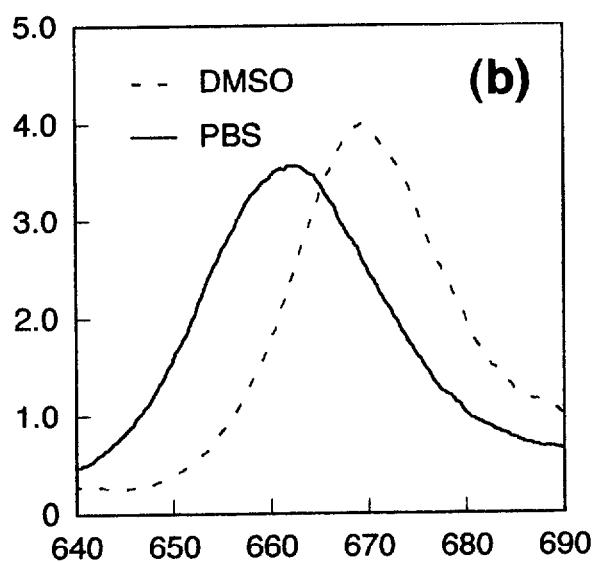
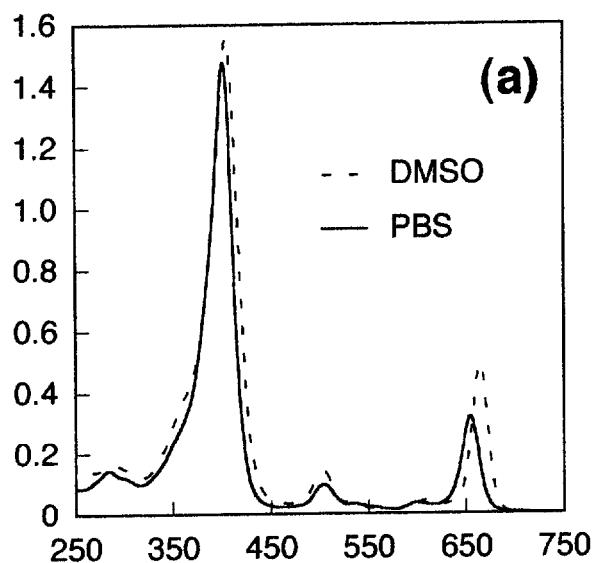


Fig. 3-2 (a) Absorption spectra of Ce6 in DMSO and in PBS. (b) Fluorescence emission spectra of Ce6 in DMSO and in PBS. The excitation wave length was 624 nm.

### 3.3.2 抗体結合型 Ce6 の調製

抗体結合型 Ce6 (IgG2b-Ce6) を 3.2.3 に示す方法により調製した。本章で調製に用いた抗体は、抗 MM46 モノクローナル抗体である IgG2b である。

IgG2b-Ce6 はゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって精製した。溶出曲線を Fig. 3-3 に示す。各フラクションはフラクションコレクターによって 2 ml ずつ回収し、そのフラクションの 280 nm、および Ce6 に特徴的な吸収が存在する 402 nm における吸光度を測定した。

Fig. 3-3 (a) より、20 ml 前後の画分は 402 nm の吸収と 280 nm の吸収が存在する。溶出体積 0-30 ml における溶出曲線を Fig. 3-3 (b) に示す。溶出体積が 14 ml から 20 ml までの画分 (F1) と、22 ml から 24 ml までの画分 (F2) の二つの画分が得られた。また、F1 および F2 中にはタンパク質が検出されたため、この画分中に抗体結合型 Ce6 が含まれていると考えられる。さらに 36 ml 前後に溶出した画分中にはタンパク質は含まれていなかったため、調製に用いた緩衝液の成分またはゲル濾過の際に同時に添加したショ糖が溶出したと予想される。さらに 53 ml 前後に溶出した画分はスペクトルの形状が Ce6 と一致したことから未反応の Ce6 である。

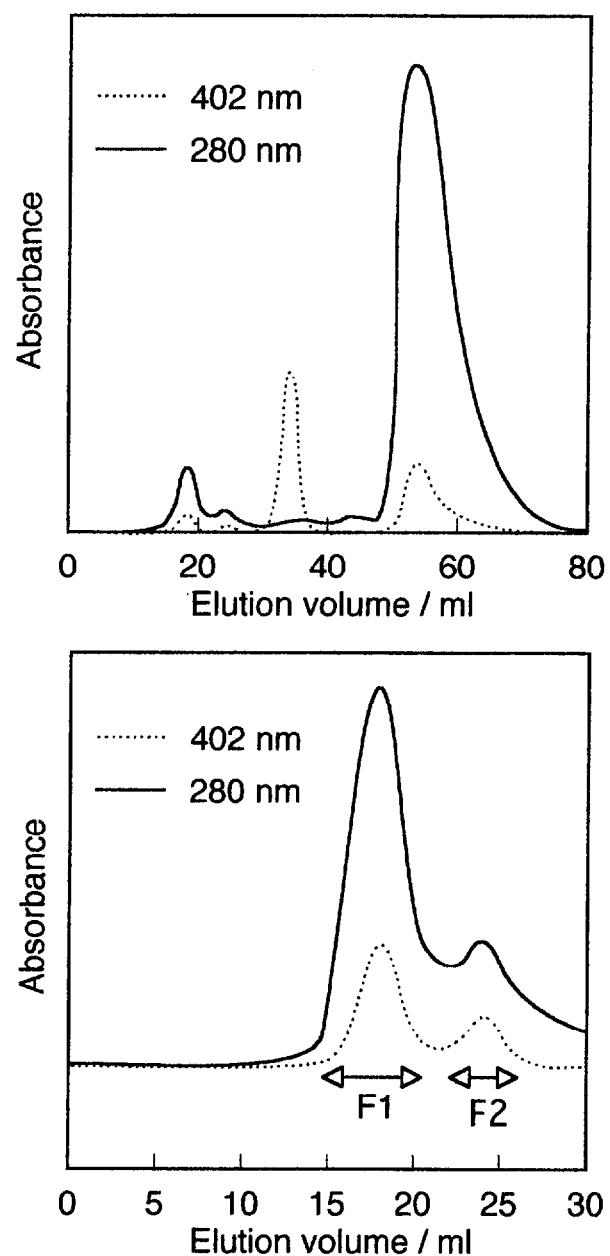


Fig. 3-3 Elution profile of gel filtration.

F1およびF2の分子量を概算するため、F1とF2の溶出体積を分子量マーカーの溶出体積と比較した。結果をFig. 3-4に示す。排除体積を求めるためにBlue dextran（分子量：2,000,000）を用い、分子量マーカーとして、 $\beta$ -amylase (200,000)、IgG (150,000)、Bovine serum albumin (66,000)、Carbonic anhydrase (29,000)、Cytochrome C (12,400) を用いた。図のようにF1の分子量は約170,000でF2は約34,000と概算された。抗体の分子量は150,000であるため、F1の分子量は抗体より大きく、F2の分子量は抗体より小さいことが分かった。このことからF2中の抗体は分子構造が壊れていることが示唆される。

### 3.3.3 抗体結合型 Ce6 の吸収スペクトルと結合比の算出

前節で調製したF1の吸収スペクトルを測定した。結果をFig. 3-5に示す。F1のスペクトルはCe6および抗体に由来する吸収が観測される。また、F2のスペクトルもF1とほぼ同様の形になった。

F1とF2におけるCe6と抗体との結合比を調べた。Ce6の濃度は、402 nmにおける吸光度と、Ce6のモル吸光係数を用いて決定した。また、Lowry法により抗体の濃度を決定した。結果をTable 3-1に示す。F1は抗体1分子に対して約11個のCe6が結合し、F2は約8個のCe6が結合していた。

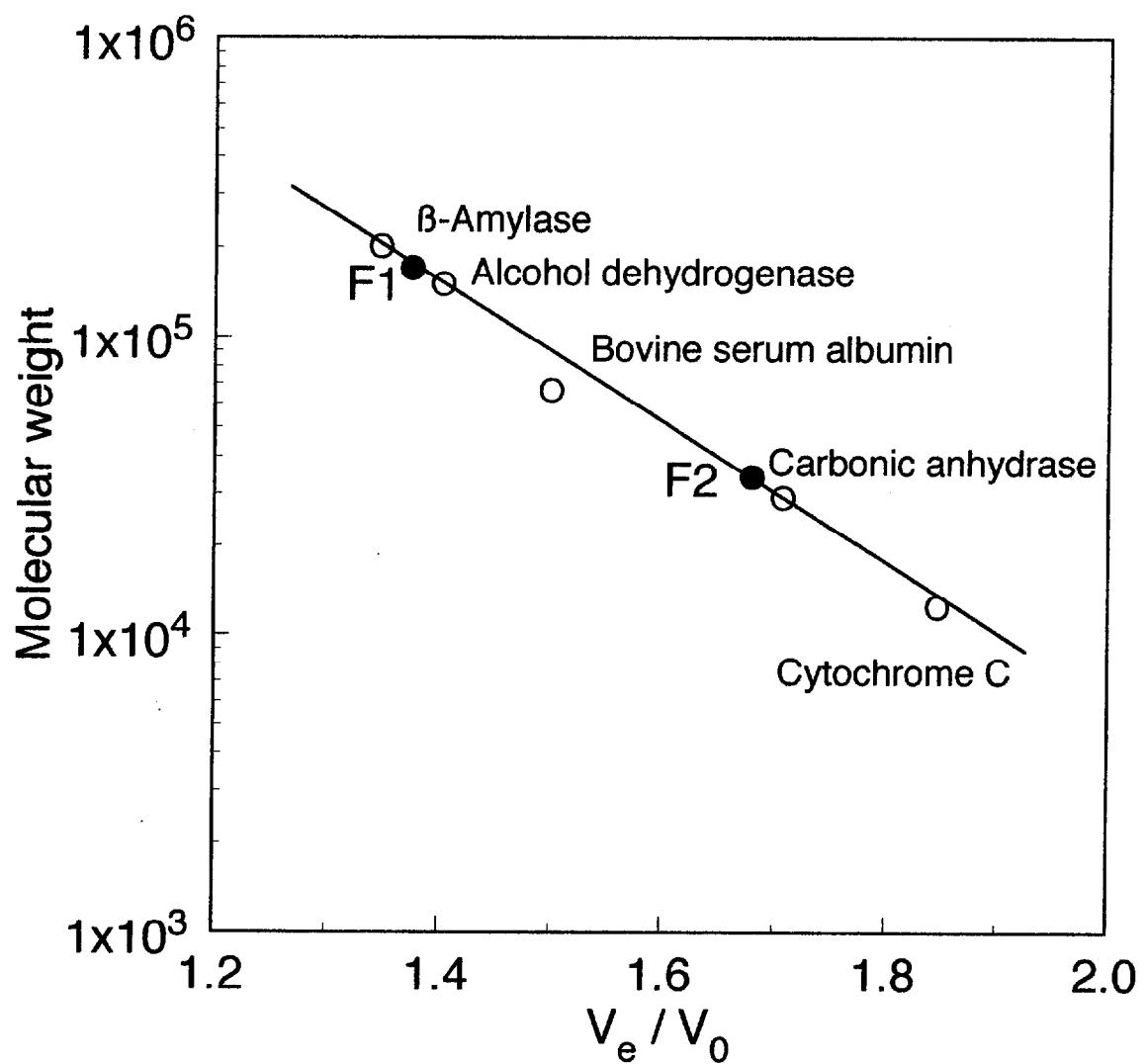


Fig. 3-4 Estimation of molecular weight of F1 and F2 using gel filtration.

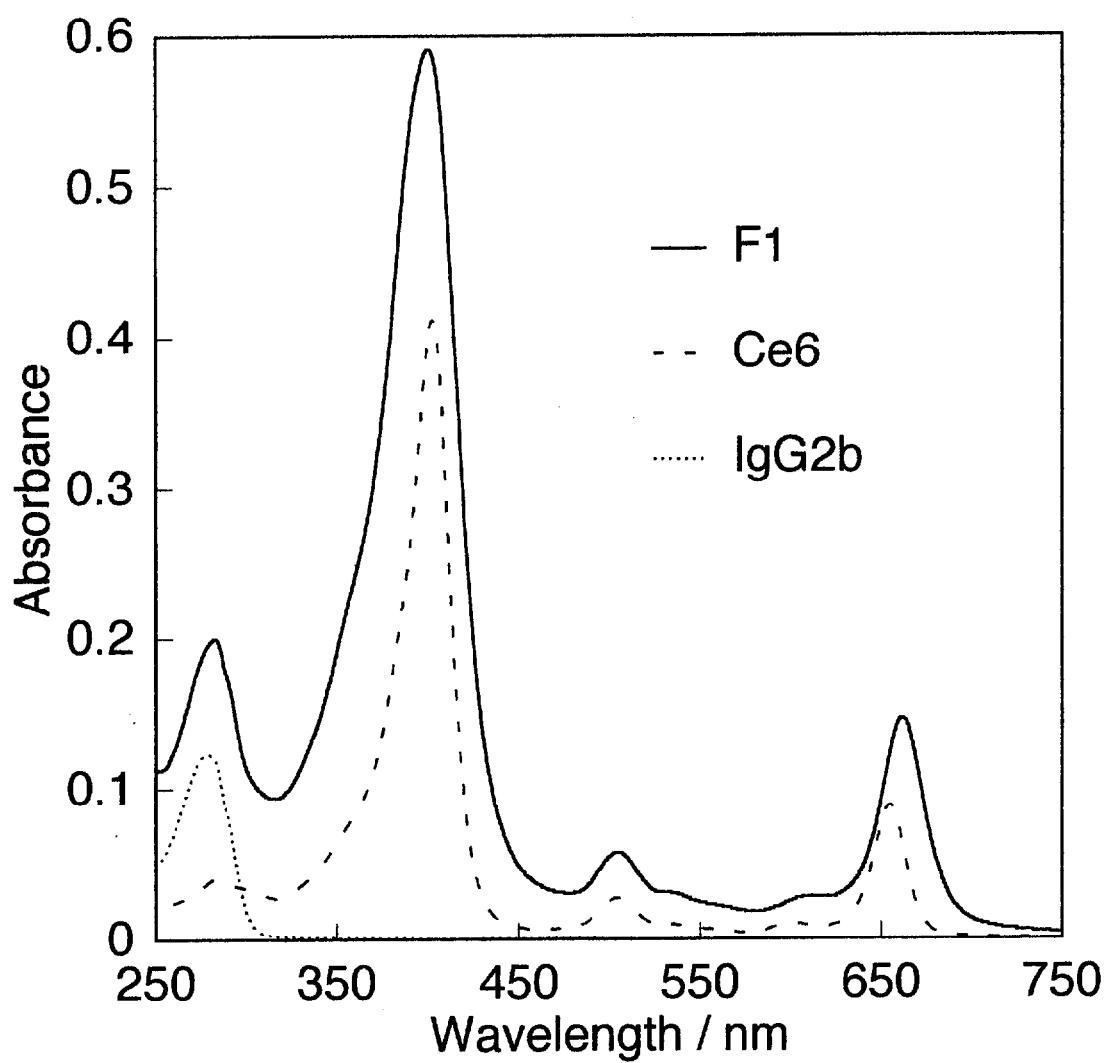


Fig. 3-5 Absorption spectra of F1, Ce6 and IgG2b.

Table 3-1 Conjugate ratio of F1 and F2

Conjugate	Conjugate ratio (Ce6 / IgG)
F1	10.5
F2	8.4

### 3.3.4 抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞への取り込み量

前節で調製した抗体結合型 Ce6 であると考えられる F1 および F2 の MM46 細胞への取り込み量を *in vitro* において測定した。また、比較のために IgG1 結合型 Ce6 (IgG1-Ce6) の取り込み量を調べた。IgG1 は MM46 細胞を特異的に認識しない抗体である [6]。IgG1-Ce6 は、2.2.10 で精製した IgG1 を 3.2.3 に示す方法により Ce6 と結合した。IgG1-Ce6 は抗体 1 分子に対して約 7 個の Ce6 が結合していた。

Figure 3-6 に F1、F2、IgG1-Ce6、および Ce6 の MM46 細胞への取り込み量を示す。取り込み量は細胞のタンパク質あたりの値で示している。いずれの光増感剤も、培地中の Ce6 濃度が増えるにつれて、細胞への取り込み量が増加していることが分かる。培地中の Ce6 濃度が  $1 \times 10^{-7}$  M のとき、F1 は  $2.5 \times 10^{-10}$  mol / mg 取り込まれ、Ce6 は  $3.8 \times 10^{-12}$  mol / mg 取り込まれた。この条件では、F1 は Ce6 に

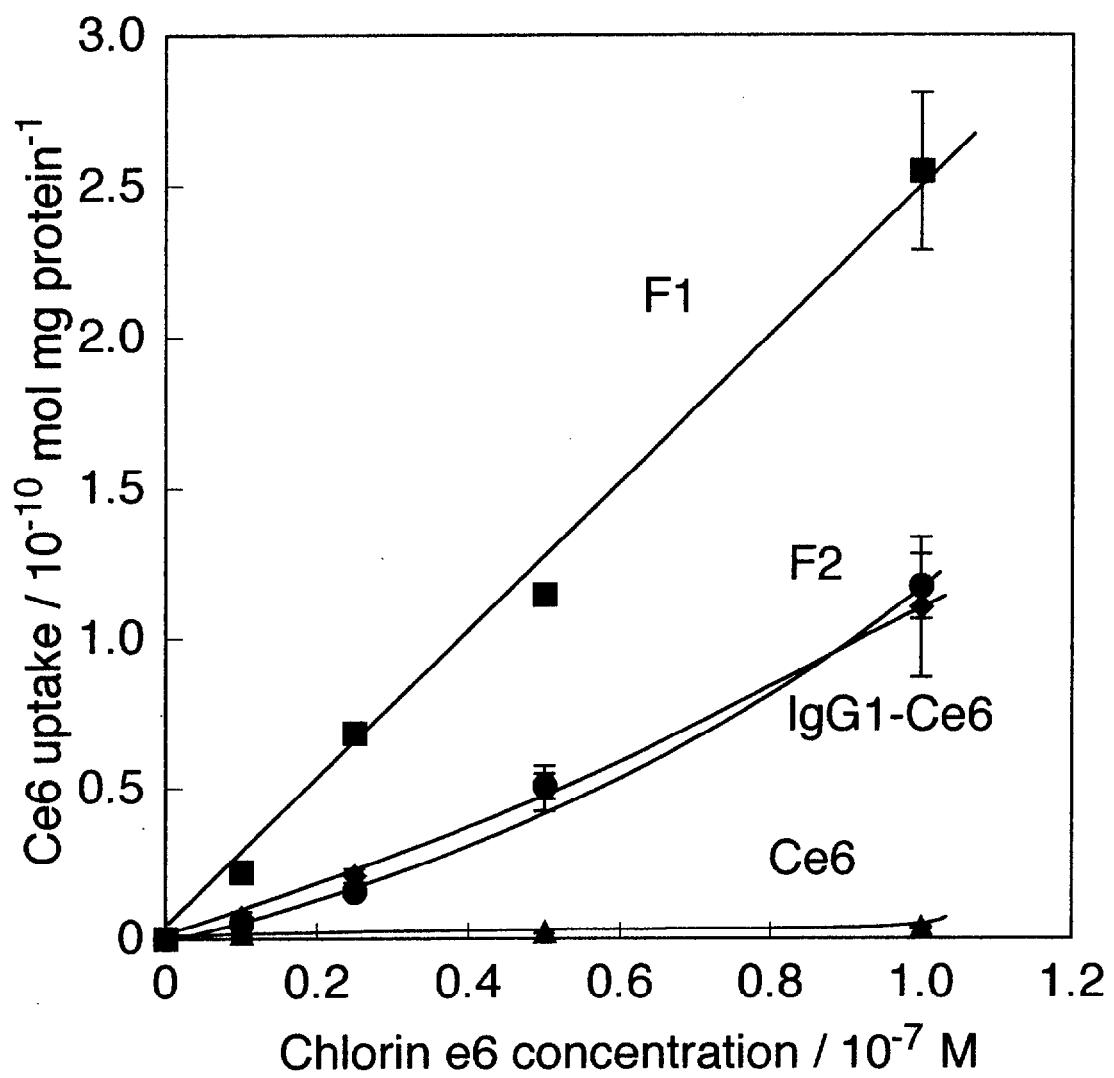


Fig. 3-6 Cellular uptake of F1(■), F2(●), IgG1-Ce6(◆) and Ce6(▲). MM46 cells were incubated for 2h.

比べて取り込み量が約60倍と、著しく増加していることがわかった。一方、F2と比較しても倍以上と高い取り込み量を示した。これはF1中のIgG2bが腫瘍細胞を認識したため、高い取り込み量を示したと考えられる。

また、IgG1-Ce6もCe6に比べて高い取り込み量を示した。一般に腫瘍細胞ではエンドサイトーシスによって、効果的に高分子を取り込むことが知られている[7]。そのため、高分子である抗体が結合したIgG1-Ce6はCe6と比較して、高い取り込み量を示したと考えられる。F2とIgG1-Ce6は取り込み量がほぼ同一であった。しかし、IgG1-Ce6は特異的にMM46細胞を認識しないため、F2においてもMM46細胞を認識していない可能性がある。そこで、次の実験においてF1とF2における抗体の腫瘍細胞認識能の評価を行った。

### 3.3.5 抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞への取り込み阻害

F1 および F2 中の抗体が腫瘍細胞を実際に認識しているかを調べるために、過剰の抗体を添加した際の取り込み阻害を測定した。実験の概念を Fig.3-7 に示す。まず、前処理として細胞に過剰量の抗体を接触させる (Fig.3-7 (a))。このとき、細胞表面の抗体認識部位はほぼこの抗体で覆われていると考えられる。次に、抗体結合型光増感剤を加えると、その特異的な結合が阻害される (Fig.3-7 (b))。このときの抗体結合型光増感剤は、特異的な結合を介さずにエンドサイトーシスなど非特異的に取り込まれる。よって、前処理をせずに取り込ませたものに比べて取り込み量が減少していれば、その抗体結合型光増感剤は、細胞を認識して取り込

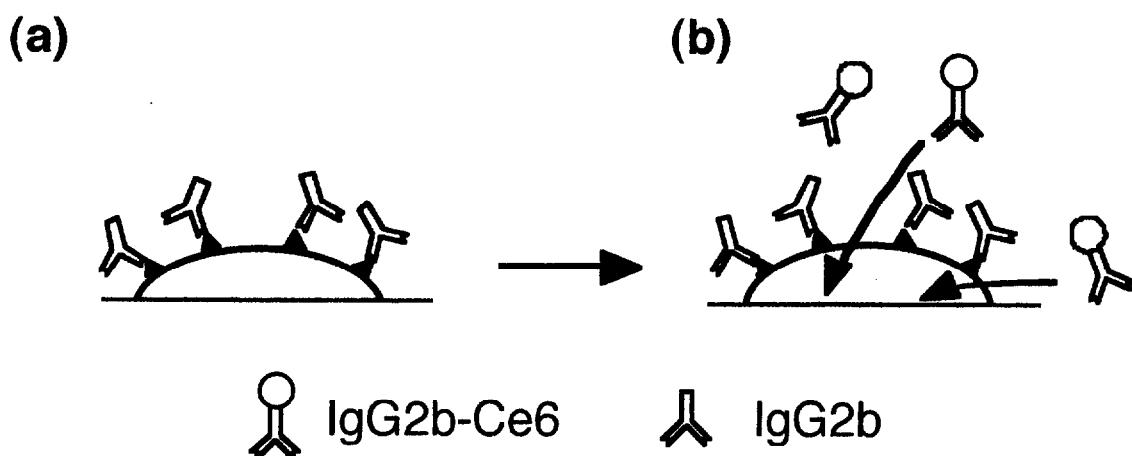


Fig. 3-7 Image of inhibition of cellular uptake. (a) Cells were preincubated with IgG2b. (b) After preincubation, cells were incubated with IgG2b-Ce6.

まれていたと考えられる。逆に、取り込み量が変わらなければ、その抗体結合型光増感剤は特異的な結合を介さずに、非特異的に取り込まれていると考えられる。本実験では、それぞれの抗体結合型 Ce6 を加える直前に 10 倍等量の IgG2b と 15 分間接触させ、PBS で洗浄後、3.2.4 に示す方法と同様に取り込ませた。

結果を Fig. 3-8 に示す。この実験では、F1、F2、IgG1-Ce6 を MM46 細胞と接触した。それぞれの培地中 Ce6 濃度は  $5 \times 10^{-8}$  M で行った。阻害なしのグラフは、3.2.4 に示す方法と同様に行ったものである。

結果から、F1 がもっとも強く阻害されており、阻害されないときに比べ約 3 分の 1 に取り込み量が減少している。これは、F1 が腫瘍細胞認識能を有しているために、過剰に加えた抗体によって特異的な結合が阻害されたものと考えられる。また、F2 では阻害の程度が低く、取り込み量に大きな変化はなかった。このことから、F2 は抗体としての機能が失われ非特異的に細胞に取り込まれていると考えられる。また、阻害ありのグラフでは 3 種類の抗体結合型 Ce6 の取り込み量に違いはなく、すべて非特異的に取り込まれているといえる。

以上のことから、F1 は MM46 細胞を特異的に認識しているのに対し、F2 は特異的な認識はしていないことが分かった。F2 では抗体分子が壊れ、分子量が小さくなっていることが 3.3.2 でゲル濾過の溶出体積から示された。その結果、細胞認識能が失われ MM46 細胞への取り込み量が減少したと考えられる。

以上の結果から F1 に含まれる IgG2b-Ce6 が腫瘍細胞認識能を保持していると考えられるため、以後の実験には F1 を IgG2b-Ce6 として用いた。

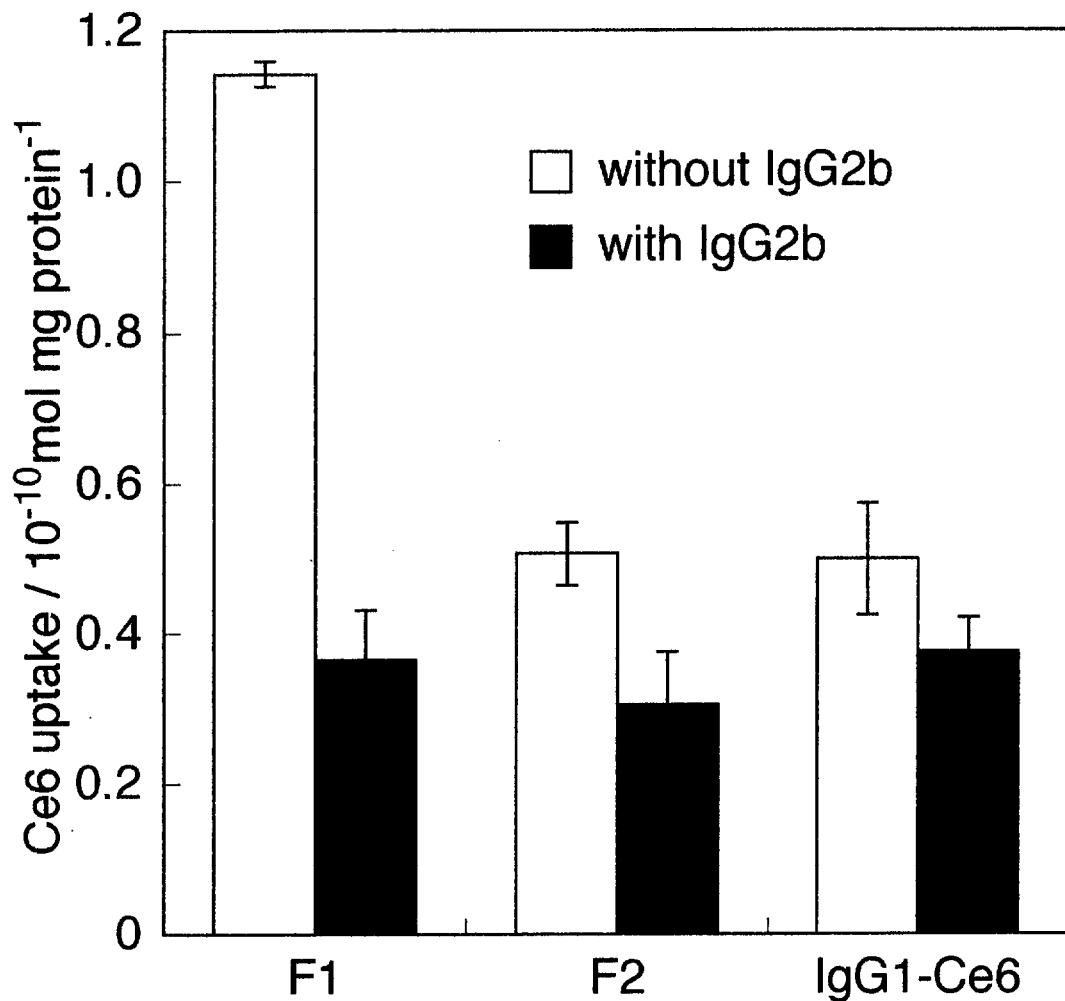


Fig. 3-8 Inhibition of cellular uptake. Cells were incubated with IgG2b ( $5 \times 10^{-8}$  M) for 15 min and then incubated with the indicated conjugates ( $5 \times 10^{-8}$  M).

### 3.3.6 抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞への局在部位

抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞への局在部位を調べるために、細胞に取り込まれた IgG2b-Ce6 および Ce6 の蛍光顕微鏡観察を行った。水銀ランプを励起光として用い、励起波長を 400 nm-440 nm、発光は 580 nm 以上とし、Ce6 の蛍光を直接観察した。培地中 Ce6 濃度は  $1 \times 10^{-7}$  M とし、5 分間または 2 時間インキュベートし、洗浄後、蛍光顕微鏡観察を行った。

結果を Fig. 3-9 に示す。Fig. 3-9-1 では光増感剤と細胞を 5 分間接触した。図のように Ce6 は細胞膜を中心に蛍光を発しているのに対し、IgG2b-Ce6 は細胞内の小器官を中心に蛍光を発している。このことから IgG2b-Ce6 は細胞内に Ce6 は主に細胞膜に蓄積していることが分かった。

IgG2b は細胞膜を認識する抗体であることがわかっている[6]。そのため IgG2b-Ce6 は、始めに細胞膜表面に結合すると考えられる。しかし、5 分後の蛍光顕微鏡観察では細胞膜に結合した IgG2b-Ce6 は観察できなかった。そのため細胞膜に結合した IgG2b-Ce6 はエンドサイトーシスなどの作用で速やかに細胞内に取り込まれることが分かった。一般にエンドサイトーシスで取り込まれた光増感剤などの物質は最終的にはリソソームに取り込まれることが知られている[8]。このことから蛍光顕微鏡観察で IgG2b-Ce6 を取り込ませた際、細胞内で蛍光を発していた部位はリソソームであると考えられる。

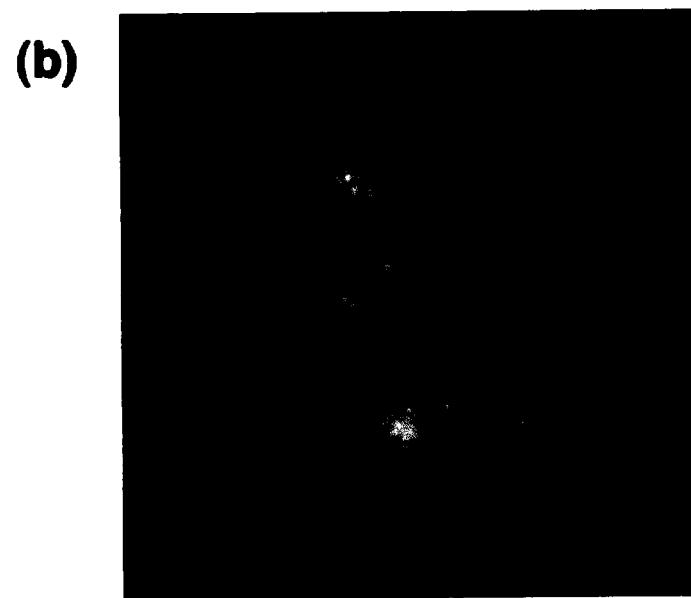
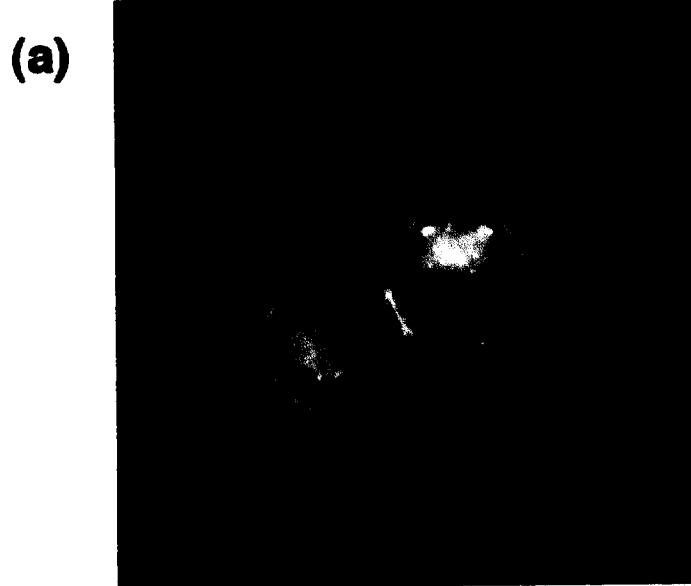
一方、Ce6 などの疎水性の強い光増感剤は膜成分と親和性があり、細胞内に入

り難いことが知られている[9,10]。そのため、Ce6は主に細胞膜に蓄積したと考えられる。

一般的に光線力学治療において、光増感剤が細胞膜に蓄積した場合と細胞内に蓄積した場合では細胞内に蓄積したほうが良好な殺細胞効果を示すことが知られている[11]。IgG2b-Ce6は細胞内に蓄積するため良好な殺細胞効果が期待される。

光増感剤を2時間インキュベートし、蛍光顕微鏡観察を行った結果をFig. 3-9-2に示す。Ce6、IgG2b-Ce6いずれの光増感剤もFig. 3-9-1と比較して細胞内での蛍光が増加している。これは時間経過に従って光増感剤が細胞内に多く蓄積したことを見ている。さらにIgG2b-Ce6はCe6と比較して強い蛍光が観察された。これはFig. 3-6で示したようにIgG2b-Ce6の細胞への取り込み量が高いためであると考えられる。

以上の結果からIgG2b-Ce6はCe6と比較して細胞内に多く蓄積することが分かった。



**Fig. 3-9-1** Fluorescence micrographs of MM46 cells incubated with  $1 \times 10^{-7}$  M of Ce6 (a), or IgG2b-Ce6 (b) for 5 min.

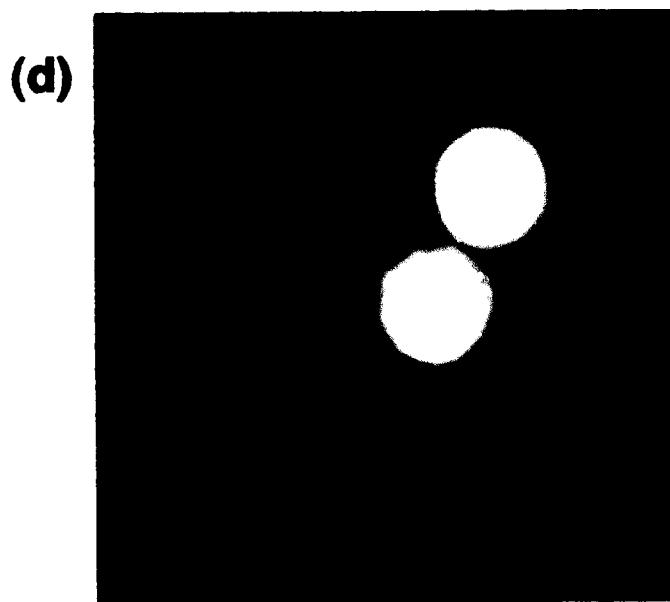
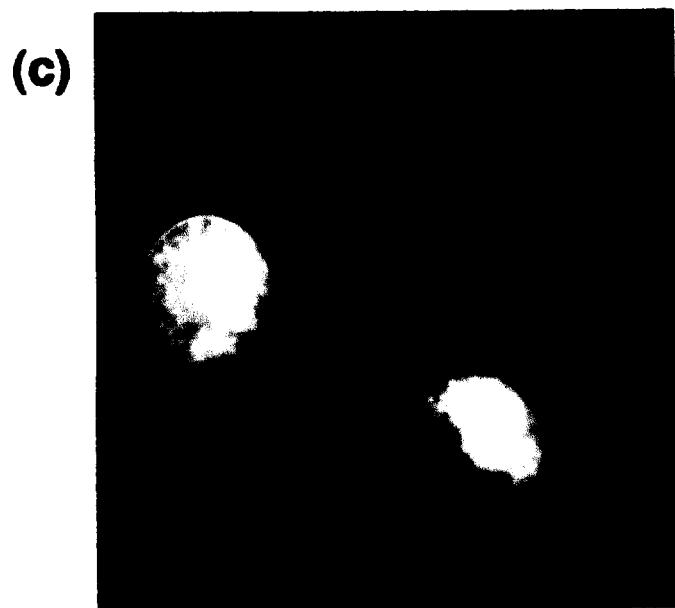


Fig. 3-9-2 Fluorescence micrographs of MM46 cells incubated with  $1 \times 10^{-7}$  M of Ce6 (c), or IgG2b-Ce6 (d) for 2 h.

### 3.3.7 抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞に対する殺細胞効果

IgG2b の MM46 細胞への細胞毒性を調べた。所定濃度の IgG2b と MM46 細胞を 2 時間接触させた後、洗浄後 20 時間後に MTT 法により細胞生存率を測定した。MTT 法は、ミトコンドリア内の脱水素酵素の活性を測定する細胞生死判定法である。結果を Table 3-2 に示す。図のように培地中の抗体濃度が  $5 \times 10^{-8}$  M までは顕著な細胞毒性は観測されなかった。本研究では培地中の抗体濃度がこれ以下となるようにして実験を行った。

Table 3-2 Cytotoxicity of IgG2b

IgG2b concentration / $10^{-8}$ M	% Survival
1	$94.9 \pm 9.6$
5	$91.0 \pm 15.9$
10	$87.6 \pm 3.5$

IgG2b-Ce6 および Ce6 の MM46 細胞に対する光照射による光毒性を測定した。所定濃度の光増感剤と MM46 細胞を 2 時間接触させた後、洗浄後光照射を行い、20 時間後に MTT 法により細胞生存率を測定した。

結果を Fig. 3-10 に示す。IgG2b-Ce6 は培地中 Ce6 濃度が  $1 \times 10^{-8}$  M を超えると、光照射後の細胞生存率が減少し、高い光毒性を示した。一方、Ce6 は培地中の Ce6 濃度が  $2 \times 10^{-7}$  M までは、光照射後の細胞生存率に大きな変化を示さなかった。培地中の Ce6 濃度が  $5 \times 10^{-8}$  M のときの光照射後の細胞生存率は、Ce6 を添加した場合では 90%、IgG2b-Ce6 を添加した場合では 14% であった。さらに Table 3-2 で示されたように IgG2b の毒性がない濃度であるため、この光毒性の違いは光増感剤である Ce6 の取り込み挙動の違いによるものと考えられる。すなわち前節までに示されたように、IgG2b-Ce6 は Ce6 に比べ細胞への取り込み量が多く細胞内に蓄積するため、良好な光毒性を示したことが考えられる。

IgG2b-Ce6 および Ce6 を細胞に取り込ませた場合、光増感作用を示すものはいずれの場合でも Ce6 である。そこで細胞への Ce6 取り込み量に対する殺細胞効果を測定した。結果を Fig. 3-11 に示す。図のように Ce6 を添加した場合のほうが少ない細胞への取り込み量で高い殺細胞効果を示した。3.3.6 までに IgG2b-Ce6 は Ce6 と比較して細胞への取り込み量が高く、細胞内に蓄積していることが示された。しかし、細胞への取り込み量に対する殺細胞効果が Ce6 よりも低いため、抗体に結合した Ce6 は抗体と結合していない Ce6 と比較して、光増感剤としての活性が低いことが示唆される。

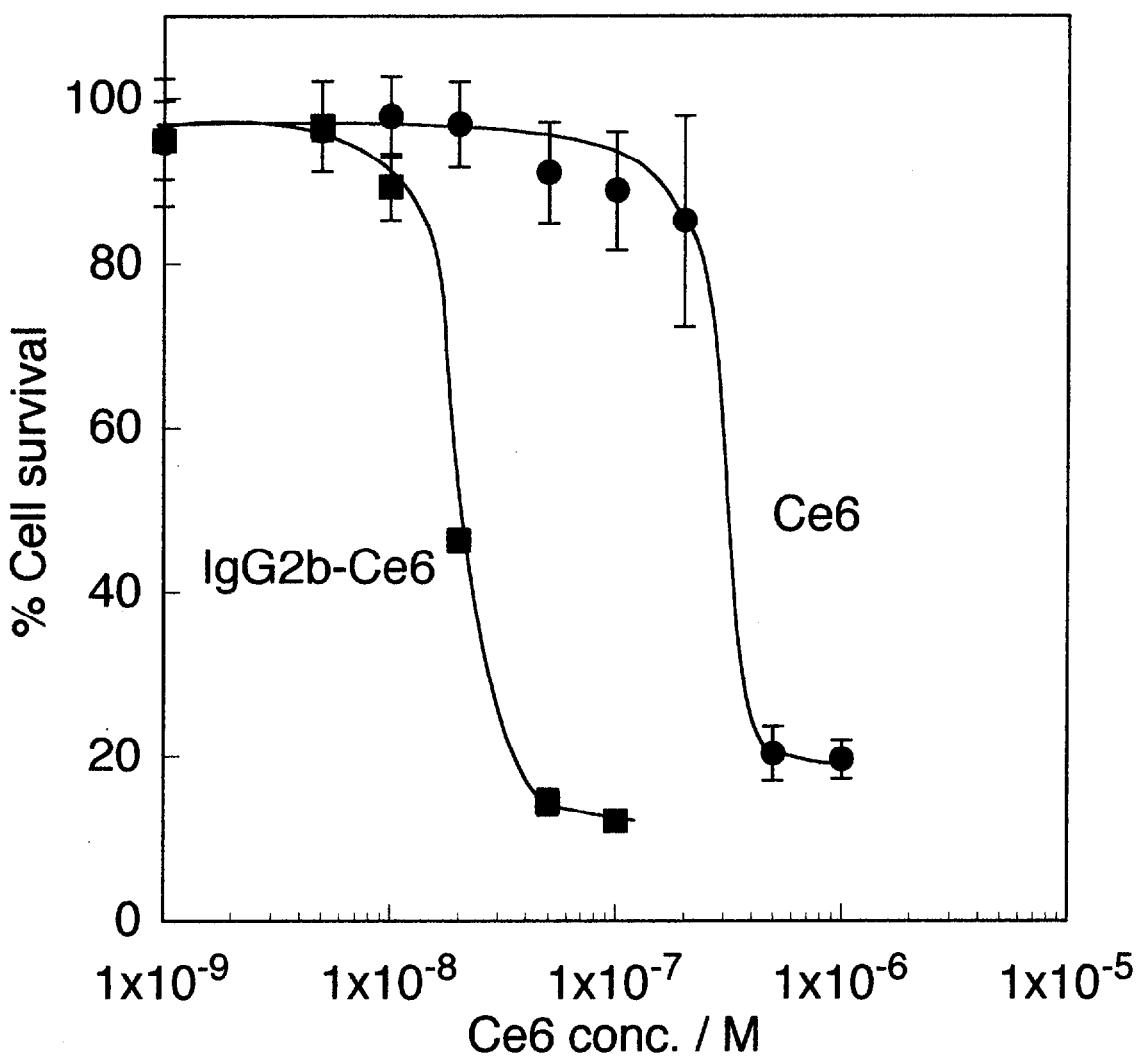


Fig. 3-10 Phototoxicity of IgG2b-Ce6 and Ce6. F1 was used as the IgG2b-Ce6 source. Cells were incubated for 2 h at 37°C in the dark and then irradiated (>600 nm, 24J / cm<sup>2</sup>).

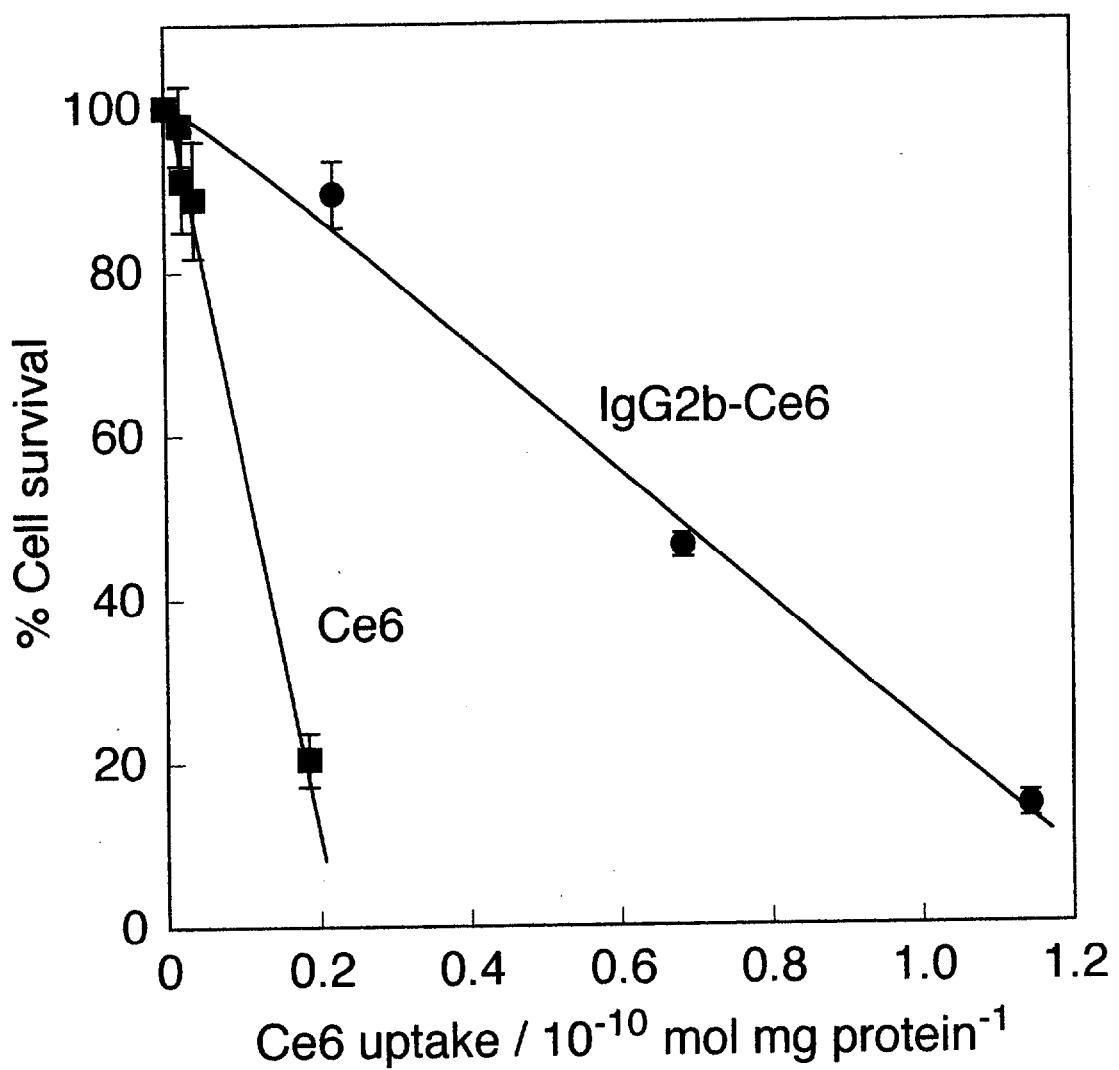


Fig. 3-11 Photocytotoxicity as a function of Ce6 uptake.

### 3.3.8 抗体結合型 Ce6 の一重項酸素生成能と光励起三重項寿命

抗体に結合したCe6は、抗体と結合していないCe6と比較して光増感剤としての活性が低いことが前節で予想された。そこでIgG2b-Ce6およびCe6の光照射による一重項酸素生成能を測定した。測定は一重項酸素によるジフェニルイソベンゾフラン(DPBF)の酸化分解反応により行った。

結果をFig. 3-12に示す。Ce6、IgG2b-Ce6いずれの場合でもDPBFの減少がみられ、光照射により一重項酸素が生成していることが分かった。次に一重項酸素によるDPBFの減少は一次の反応であるため[5]、その反応速度定数の比較を行った。反応速度定数の相対値をTable 3-3に示す。結果から、IgG2b-Ce6はCe6と比較して約4分の1の速度で一重項酸素を生成していることが分かった。このようにIgG2b-Ce6中のCe6は一重項酸素生成能が低いため、Fig. 3-11のように取り込まれたCe6に対する殺細胞効果が低いと考えられる。

Table 3-3 Relative rate constant of DPBF degradation

Photosensitizer	Relative rate constant
Ce6	1.00
IgG2b-Ce6	0.26

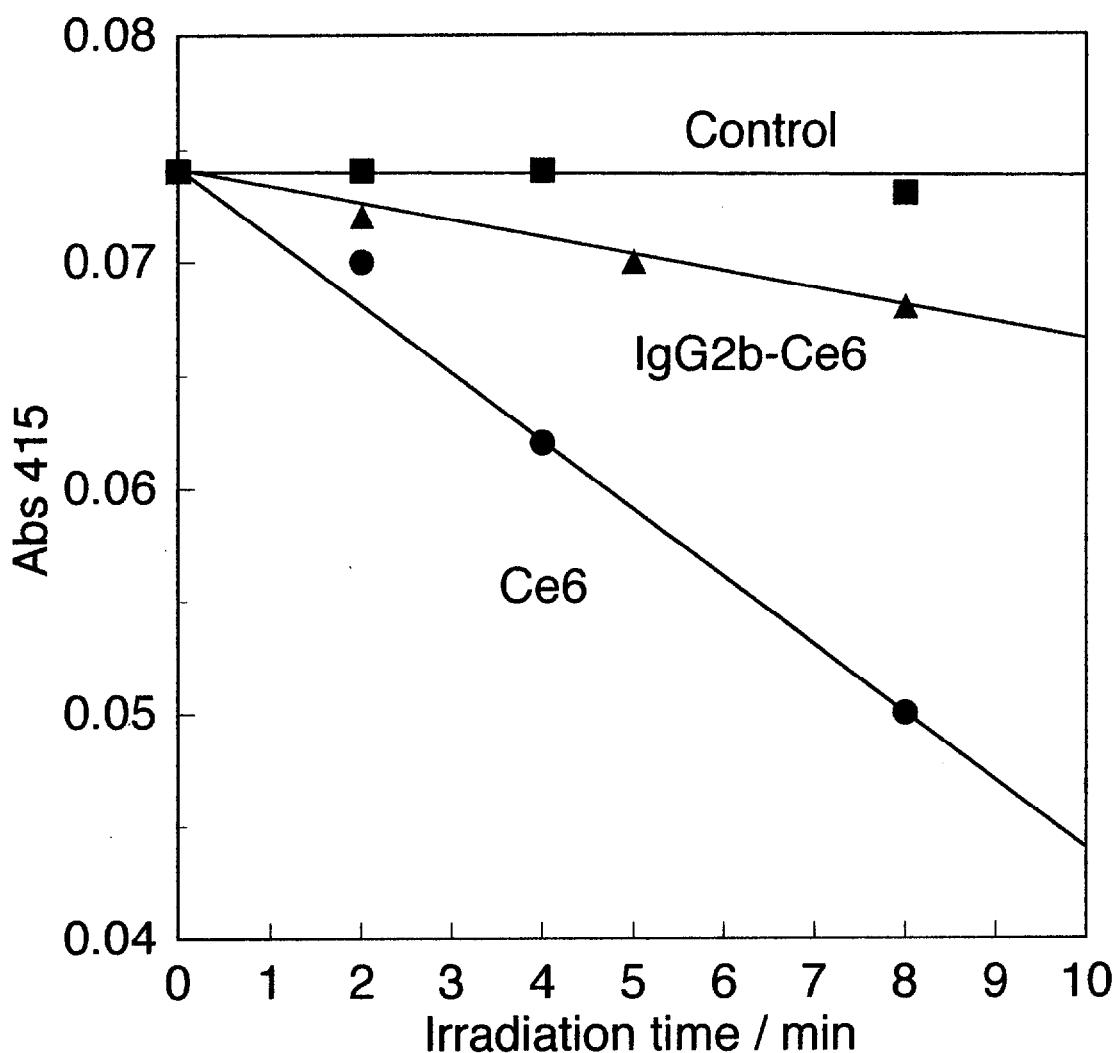


Fig. 3-12 Degradation of DPBF by singlet oxygen generated from IgG2b-Ce6 and Ce6. Concentration of Ce6 was  $5 \times 10^{-8}$  M.

IgG2b-Ce6 は Ce6 と比較して一重項酸素生成量が少ない理由として以下の二点が挙げられる。

1. IgG2b-Ce6 中の Ce6 は基質である酸素分子と接触し難いため、一重項酸素の生成量が低い。
  2. IgG2b-Ce6 中の Ce6 は抗体とエネルギー移動を起こし、光励起三重項状態の Ce6 から酸素分子にエネルギー移動が起きにくく、一重項酸素の生成量が低い。
2. の理由で一重項酸素生成量が少ないと、光励起三重項状態の寿命が短くなっていることが予想される。

そこで Ce6 および IgG2b-Ce6 の光励起三重項状態の寿命を測定した。その結果、Ce6 および IgG2b-Ce6 の光励起三重項状態の寿命はいずれも 200 μs 前後であった。このことから、IgG2b-Ce6 中の Ce6 は一重項酸素を生成するには十分な寿命を持つことが分かった。さらに Ce6 と同等の寿命を持つため、Ce6 と比較して一重項酸素の生成量が減少したのは光励起三重項状態の寿命が短くなったためではないといえる。

即ち、IgG2b-Ce6 が Ce6 と比較して一重項酸素の生成量が低いことは IgG2b-Ce6 中の Ce6 が基質である酸素分子と接触し難いためと考えられる。

### 3.4 まとめ

本章では、光増感活性が高く、腫瘍選択性をもった抗体結合型光増感剤の開発を目的とし、抗体結合型のクロリン e6 (Ce6) を調製した。Ce6 は水溶液中で単量体として存在するため、全分子が抗体と共有結合を介して結合し、高い光増感活性をもつことが期待される。その結果、抗体一分子当たり約11個のCe6が結合した抗体結合型 Ce6 を調製した。

腫瘍細胞への取り込み量を調べたところ、抗体結合型 Ce6 は Ce6 と比較して飛躍的に高い取り込み量を示した。また細胞内での局在部位を調べた結果、Ce6 は細胞膜に蓄積したのに対し、抗体結合型 Ce6 は細胞内に蓄積した。これは抗腫瘍抗体が腫瘍細胞を認識したために抗体結合型 Ce6 は細胞内に多く蓄積したと考えられる。さらに光照射による光毒性を調べたところ、抗体結合型 Ce6 は Ce6 と比較して高い光毒性を示した。これは抗体結合型 Ce6 が効果的に細胞に蓄積したためと考えられる。しかし、抗体に結合した Ce6 は結合していない Ce6 と比較して一重項酸素の生成量は低いため、取り込まれた Ce6 に対する殺細胞効果は抗体結合型 Ce6 のほうが低いことが分かった。

### 3.5 参考文献

- [1] Nelson S. J., W. G. Roberts and M. W. Berns, (1987) *Cancer Res.* **47**, 4681
- [2] Boyle, R. W. and D. Dolphin (1996) *Photochem. Photobiol.* **64**, 469-485
- [3] Boeder, B. and H. Wabnitz (1987) *J. Photochem. Photobiol. B.* **1**, 103-113
- [4] Lowry, O. H., N. J. Roserbrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) *J. Bio. Chem.* **193**, 265-275
- [5] Michelsen, U., H. Kliesch, G. Schurpfeil, A. K. Sobbi and D. Wöhrle (1996) *Photochem. Photobiol.* **64**, 694-701
- [6] Seto, M., T. Takahashi, M. Tanimoto and Y. Nishizuka (1982) *J. Immunol.* **128**, 201-205
- [7] Duncan, R. (1992) *Anticancer Drugs* **3**, 175-210
- [8] Berg, K., J. Moan, J. C. Bommer and J. W. Winkelman (1990) *Int. J. Radiat. Biol.* **58**, 475-487
- [9] Kessel, D., D. Woodburn, C. J. Gomer, N. Jagerovic and K. M. Smith (1995) *J. Photochem. Photobiol. B.* **28**, 13-18
- [10] Morgan, J., W. R. Potter and A. R. Oseroff (2000) *Photochem. Photobiol.* **71**, 747-757
- [11] Tabata, K., S. Ogura and I. Okura (1997) *Photohem. Photobiol.* **66**, 842-846

## 第四章

抗腫瘍抗体結合型クロリン e6 の  
腫瘍細胞認識能と光増感作用に対する  
クロリン結合数の影響

## 4.1 はじめに

抗腫瘍抗体結合型光増感剤において、抗体の腫瘍細胞認識能と光増感剤の光増感活性が保持されている抗体結合型光増感剤が望ましい。第二章および第三章では、特異的に腫瘍を認識する抗体および認識しない抗体に光増感剤を結合し、両者の認識力を調べることによって腫瘍細胞認識能を評価してきた。

本章では、抗体に異なる数の光増感剤が結合した抗体結合型光増感剤を調製し、それらの腫瘍細胞認識能と光増感活性に対する結合数の影響を調べた。抗体結合型光増感剤の光増感剤結合量が増えると、腫瘍細胞認識能が低下すると考えられる。腫瘍細胞認識能を保持し、良好な光増感作用を持つ抗体結合型光増感剤の開発を目的とした。光増感剤として、前章で用いたクロリンe6を用いた。この光増感剤は水溶液中で単量体として存在するため、全分子が共有結合を介して抗体と結合し、活性に対する結合数の影響を明らかにすることができると考えられる。

## 4.2 実験方法

### 4.2.1 試薬

Chlorin e6 (Ce6) は Porphyrin Products から、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) は同人化学から、N-hydroxysulfosuccinimide (S-NHS) は PIERCE から購入した。RPMI-1640 は Sigma から、ウシ胎児血清 (FBS) は JRH Biosciences から購入した。ジフェニルイソベンゾフラン (DPBF)、L-ヒスチジンは東京化成 から購入した。Sulphanilic acid、亜硝酸ナトリウムは関東化学から購入した。その他の試薬は市販特級品を使用した。

### 4.2.2 抗体結合型クロリン e6 の調製

2.2.10 で精製した抗体を用いて、抗体結合型 Ce6 を以下の方法で調製した。本章で用いた抗体はすべて腫瘍細胞を認識する IgG2b である。抗体のアミノ基と Ce6 のカルボキシル基をペプチド結合を形成させることによって抗体結合型クロリン e6 を調製した。20mM MES buffer (pH=6.0) 中で、Ce6 と等量の EDC および S-NHS を加え、室温で 15 分間反応し、Ce6 のカルボキシル基を活性化工ステルに変換した。反応溶液中の Ce6 は  $1.0 \times 10^{-6}$  mol とした。ここで生じる NHS エステルはスルホ基が導入されているため、MES buffer に可溶である。この活性化

エステル溶液に対し、800 µl の抗体溶液（1 mg / ml）および 200 mM EPPS（pH 8.0）を加え、pH 8.0において抗体と活性化エステルを反応させた。結合数の異なる抗体結合型 Ce6 は、活性化エステルと抗体の仕込み比を変化させて調製した。反応は室温で 2 時間行った。抗体結合型 Ce6 はゲル濾過によって精製した。ゲル濾過の条件を以下に示す。

ゲル濾過カラム : Sephadex<sup>®</sup> S-300 HR、1.0 cm x 45 cm

緩衝液 : 10 mM PBS buffer (pH 7.4)

流速 : 0.2 ml / min

溶出したフラクション中の Ce6 濃度を 402 nm の吸光度から、抗体のタンパク質濃度を Lowry 法 [1] により決定した。

#### 4.2.3 MM46 細胞の培養

MM46 細胞は以下のように培養した。2.2.14 と同様にマウスの腹腔内で培養した MM46 細胞を採取し、PBS で洗浄後、10% FBS を含む RPMI-1640 培地で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養した。

#### 4.2.4 抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞への取り込み量の測定

抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞への取り込み量を以下に示す方法により測定した。MM46 細胞を  $\phi 35\text{ mm}$  シャーレに  $2 \times 10^5$  個となるように FBS 不含 RPMI-1640 培地 1 ml に継代した。これに抗体結合型 Ce6 を所定濃度となるように培地中に添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間インキュベートした。細胞は所定時間インキュベートした後、セルスクレーパーによって回収し、遠心分離した後 PBS で洗浄した。0.2 M NaOH 水溶液を 1 ml 加え、2 時間室温で振とうし、細胞を溶解させた。得られた細胞溶解液 700  $\mu\text{l}$  に対し、700  $\mu\text{l}$  の 2% SDS を加え一晩振とうすることで細胞抽出液を得た。細胞への Ce6 取り込み量は細胞抽出液の蛍光強度を測定することにより決定した。励起波長は 400 nm、観測波長は 665 nm で測定した。細胞タンパク質量は Lowry 法によって決定した。

#### 4.2.5 抗体結合型 Ce6 の殺細胞効果の測定

抗体結合型 Ce6 の光照射による殺細胞効果を以下に示す方法により測定した。MM46 細胞を  $\phi 35\text{ mm}$  シャーレに  $2 \times 10^4$  個となるように FBS 不含 RPMI-1640 培地 1 ml に継代した。これに抗体結合型 Ce6 を所定濃度となるように培地中に添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間インキュベートした。その後、培地を取り除き、細胞を PBS で洗浄し、FBS を含む RPMI-1640 培地を 1 ml 加え、光照射を行った。光源は 500W ハロ

ゲンランプで、 $50 \text{ mW/cm}^2$  の光を 8 分間照射した。また、600 nm 以下の波長の光を光学フィルター (R-60、HOYA) により除去し、熱の影響を減らすために水フィルターを用いた。光照射後、20 時間、37°C、暗所にてインキュベートし、生存率を測定した。生存率は、光増感剤を加えず光照射を行っていないものをコントロールとして、MTT 法により測定した。MTT 法は 2.2.17 に準じて行った。

#### 4.2.6 DMSO 中における一重項酸素生成の測定

抗体結合型 Ce6 の光照射による DMSO 中での一重項酸素の生成を測定した。一重項酸素の検出はジフェニルイソベンゾフラン (DPBF) の酸化分解反応により行った。実験方法は Michelsen らの方法に準じて行った [2]。DPBF  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、抗体結合型 Ce6 を所定濃度含む全量 1 ml の DMSO 溶液を反応液とし、これに酸素を導入しながら定常光照射を行った。定常光照射は 3.2.7 の光照射の条件に準じて行い、 $50 \text{ mW/cm}^2$  の光を所定時間照射した。反応は 30°C の水浴中でマグネティックスターラーで攪拌して行った。所定時間経過後、100  $\mu\text{l}$  の反応液を採取し、DMSO で 15 倍希釈し、415 nm における吸光度を測定した。DPBF は 415 nm に特徴的な吸収を持ち、酸化分解されると吸光度が減少する。

#### 4.2.7 PBS 中における一重項酸素生成の測定

抗体結合型Ce6の光照射によるPBS中での一重項酸素の生成を測定した。一重項酸素の検出はL-ヒスチジンの酸化分解反応により行った[3,4]。実験方法を以下に示す。所定濃度の抗体結合型Ce6と64.4 mM(10 mg / ml)のヒスチジンを含む全量200 μlのPBS溶液に定常光照射を行った。定常光照射は3.2.7の光照射の条件に準じて行い、50 mW / cm<sup>2</sup>の光を所定時間照射した。所定時間経過後、10 μlの反応液を採取し、ヒスチジンの定量を行った。定量は以下のように行った。反応液に、Sulphanilic acid(10 mg / ml) 亜硝酸ナトリウム(50 mg / ml)を含む水溶液を200 μl加え、よく攪拌し5分間静置する。その後、炭酸ナトリウム(200 mg / ml)を600 μlと2 mlの20%エタノールを加える。3倍希釀して498 nmでの吸光度測定により溶液中のヒスチジンの定量を行った。また所定濃度のヒスチジンのPBS溶液で検量線を作成し、濃度を求めた。

## 4.3 結果と考察

### 4.3.1 Ce6 結合数の異なる抗体結合型 Ce6 の調製と吸収スペクトル

Ce6 結合数の異なる抗体結合型 Ce6 を 6 種類調製した。調製した際の条件および結合数を Table 4-1 に示す。ここで用いた抗体はすべて腫瘍細胞を認識する IgG2b である。IgG-Ce6 中の Ce6 濃度は 402 nm における吸光度から、抗体濃度は Lowry 法によって決定した。調製する際の抗体と Ce6 の仕込み比を変えることにより、Ce6 結合数の異なる抗体結合型 Ce6 を調製した。調製時の他の条件はすべて一定である。

調製した IgG-Ce6 の吸収スペクトルを Fig. 4-1 に示す。すべての IgG-Ce6 は結合体の濃度が  $1 \times 10^{-7}$  M とした。グラフより、結合比が増加するにつれ、Ce6 の吸収が増加しているのが分かる。さらに、Soret バンドおよび Q バンドでのピークの顕著なシフトは観測されなかった。このことから、結合比が増加しても IgG-Ce6 に結合した Ce6 はほぼ同じ環境にあることが分かる。

Table 4-1 Conjugate ratio of IgG-Ce6.

Conjugate	Conjugate ratio (Ce6 / IgG)	Preparation ratio (Ce6 / IgG)
IgG-2C	2.1	40
IgG-9C	9.0	45
IgG-11C	11	50
IgG-18C	18	100
IgG-26C	26	200
IgG-30C	30	400

Activated Ce6 and IgG were mixed in EPPS buffer (pH 8.0) for 2 h. IgG-Ce6 were purified by gel filtration. Concentration of Ce6 was determined by absorbance at 402 nm and concentration of IgG was determined by Lowry method.

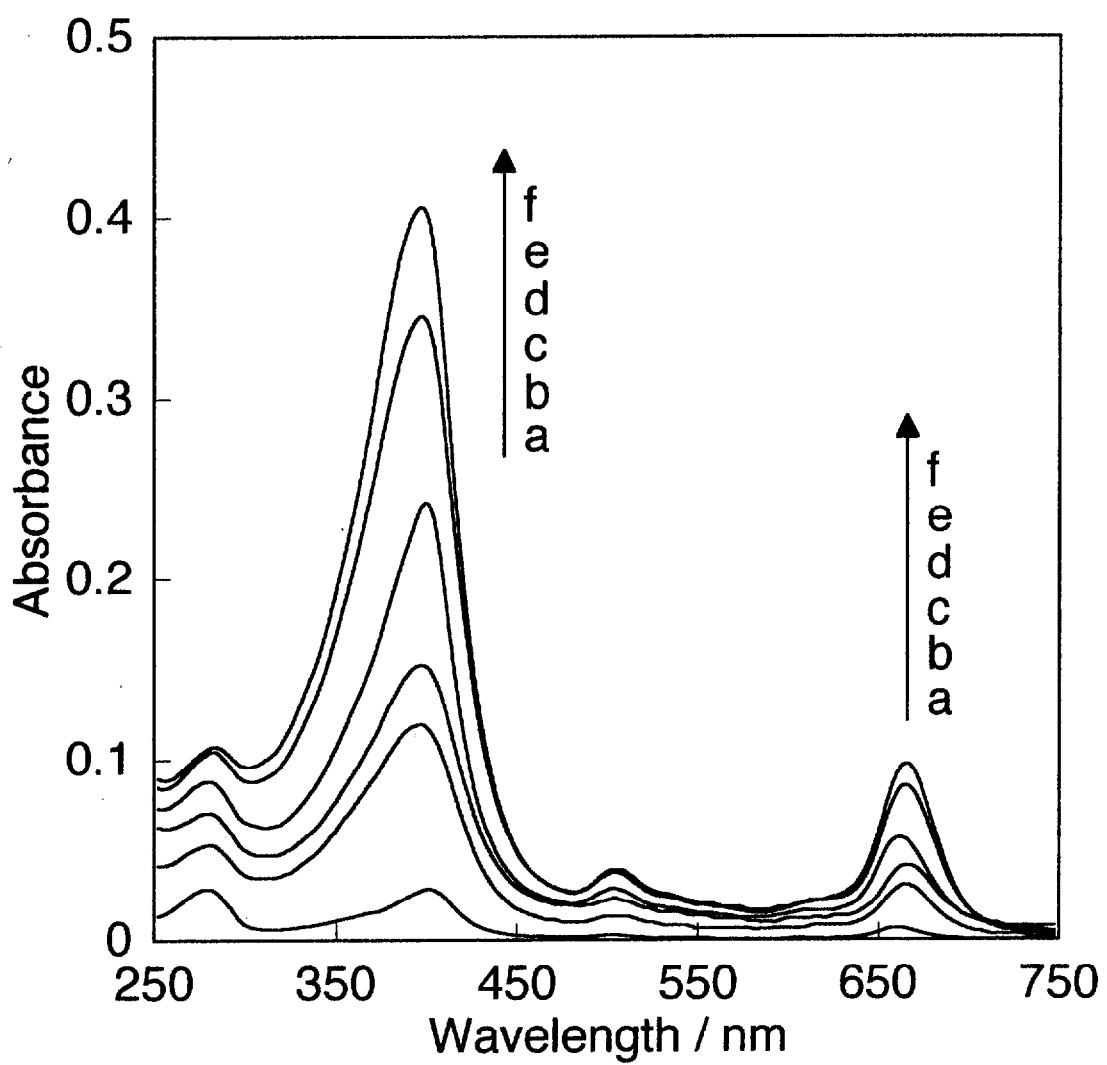


Fig. 4-1 Absorption spectra of IgG-2C (a), IgG-9C (b), IgG-11C (c), IgG-18C (d), IgG-26C (e) and IgG-30C (f) in PBS. Concentration of all conjugates was  $1 \times 10^{-7}$  M.

#### 4.3.2 抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞への取り込み量

IgG-Ce6 の MM46 細胞への取り込み量を測定した。結果を Fig. 4-2 に示す。IgG-Ce6 は結合体の濃度が  $5 \times 10^{-10}$  M となるようにして、2 時間 37°C にてインキュベートした。グラフの横軸は抗体に対する Ce6 の結合数で縦軸は Ce6 の取り込み量を示す。結果から、Ce6 結合数が増加するにつれ Ce6 取り込み量が増加し、結合数が 18 前後ではほぼ一定となることが分かった。抗体の腫瘍細胞認識能が結合数によって変化しないときは、Ce6 結合数と Ce6 取り込み量は比例関係になるはずである。しかし、飽和する曲線になったため、結合数が増加すると抗体の腫瘍細胞認識能は減少することが示唆された。

縦軸を結合数で割ることにより、細胞に取り込まれた結合体の量を算出した。結果を Fig. 4-3 に示す。図より結合数が増加するにつれ、結合体の取り込み量が徐々に減少していくことが分かった。また結合数が 26 以上の IgG-Ce6 の取り込み量は余り変化がないことから 26 以上の IgG-Ce6 は腫瘍を認識していない可能性が示唆される。

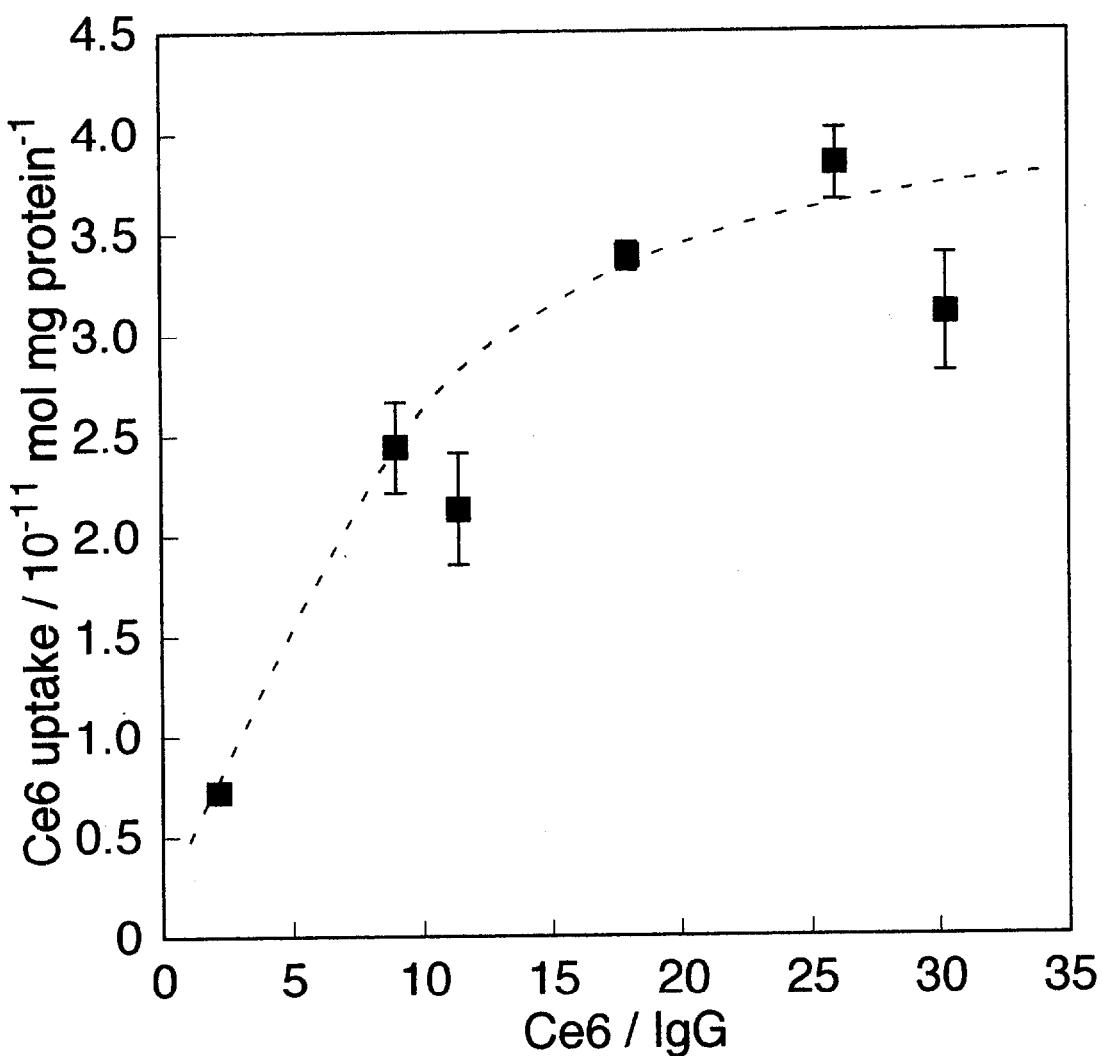


Fig. 4-2 Cellular Ce6 uptake as a function of conjugate ratio. Cells were incubated for 2 h at 37°C in the dark. Concentration of all conjugates was  $5 \times 10^{-10}$  M. Bars represent SD of the means of three replicate experiments.

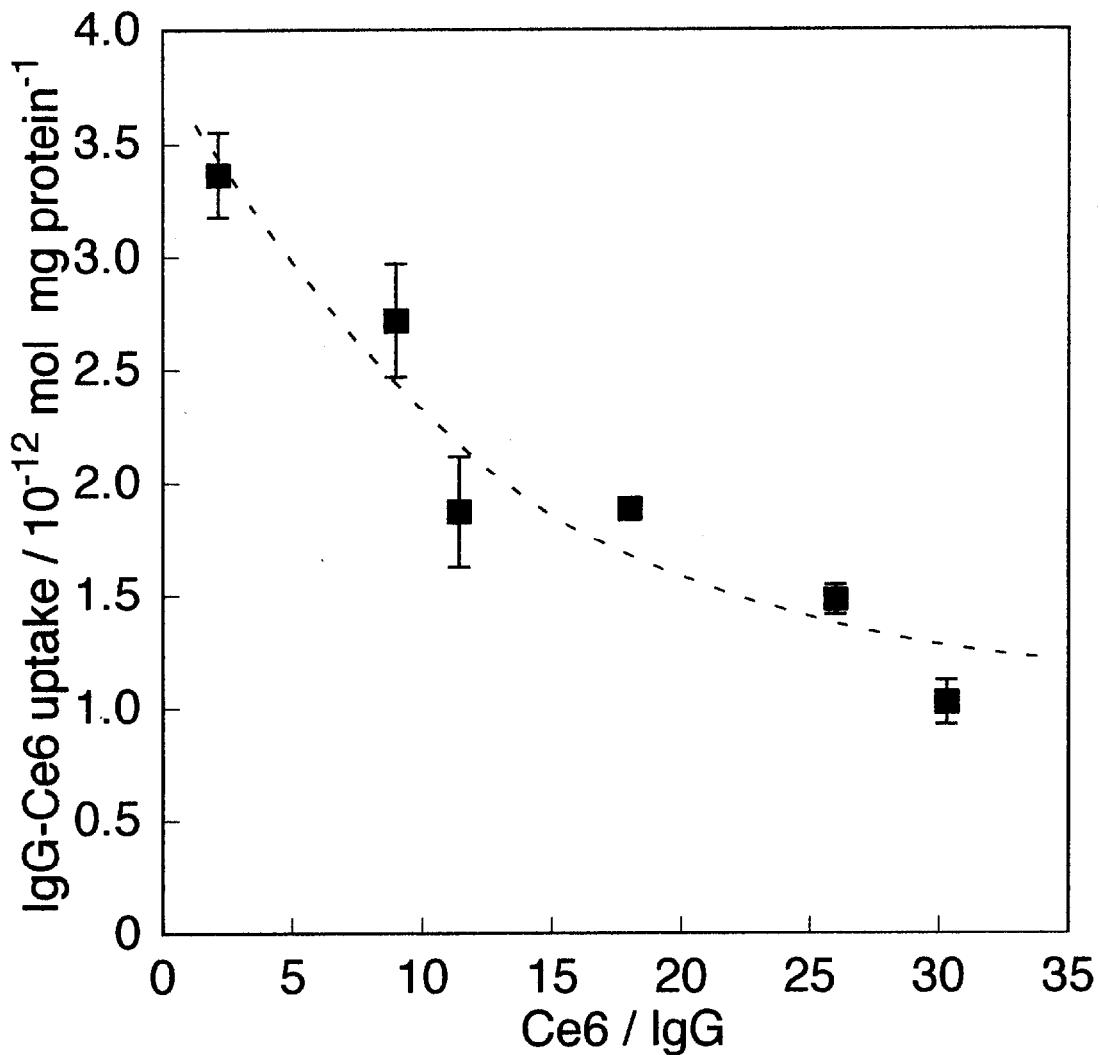


Fig. 4-3 Cellular IgG-Ce6 uptake as a function of conjugate ratio. Cells were incubated for 2 h at 37°C in the dark. Concentration of all conjugates was  $5 \times 10^{-10}$  M. Bars represent SD of the means of three replicate experiments.

#### 4.3.3 抗体結合型 Ce6 の腫瘍細胞認識能の評価

前節の結果から、結合数が増加すると腫瘍細胞認識能が低下することが示唆された。そこで、結合数が 2、9、26 の IgG-Ce6（それぞれ IgG-2C、IgG-9C、IgG-26C）に対し腫瘍細胞を認識能を調べるため、過剰の抗体を添加した際の取り込み阻害を測定した。実験の概念を Fig. 3-7 および 3.3.5 に示す。本実験では、 $5 \times 10^{-8}$  M の抗体を細胞に 15 分間接触し、洗浄した後、 $5 \times 10^{-10}$  M の IgG-Ce6 を 2 時間接触し、取り込み量を測定した。

結果を Fig. 4-4 に示す。グラフから IgG-2C は強い阻害を受け、阻害を受けていない場合に比べ取り込み量が約 5 割減少した。また、IgG-9C は約 4 割減少し、IgG-26C は顕著な阻害効果はなかった。強く阻害をうけた IgG-Ce6 ほど腫瘍細胞認識能が高いと考えられるため、IgG-2C が最も腫瘍細胞認識能が高く、次に IgG-9C が高く、IgG-26C は特異的な認識は殆どしていないことが分かった。

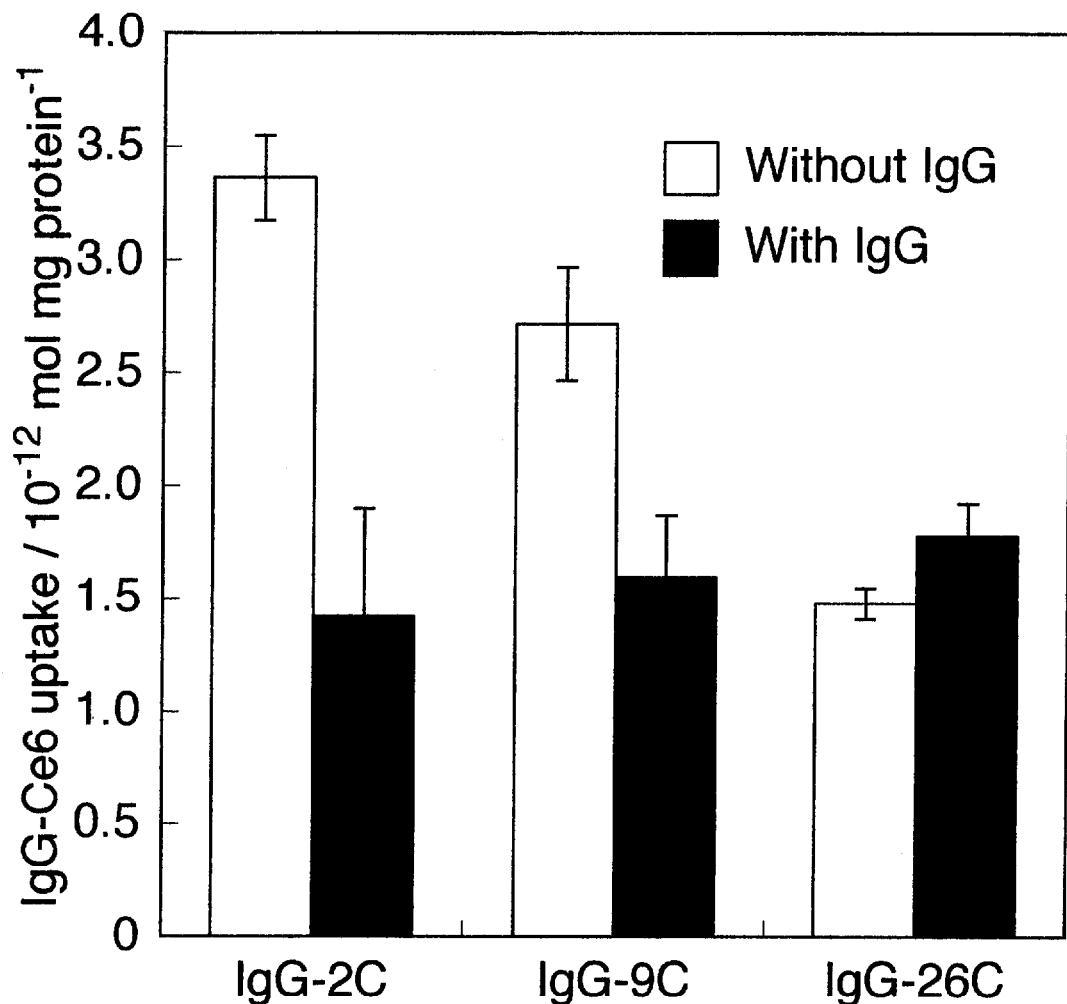


Fig. 4-4 Inhibition of cellular uptake. Cells were incubated with IgG ( $5 \times 10^{-8}$  M) for 15 min and then incubated with the indicated conjugates ( $5 \times 10^{-10}$  M). Line bars represent SD of the means of three replicate experiments.

#### 4.3.4 抗体結合型 Ce6 の一重項酸素生成能

##### 4.3.4.1 DMSO 中での抗体結合型 Ce6 の一重項酸素生成能

IgG-Ce6 の DMSO 中での光照射による一重項酸素生成能を測定した。測定は一重項酸素によるジフェニルイソベンゾフラン(DPBF)の酸化分解反応により行った。また、IgG-Ce6 は結合体の濃度が  $1 \times 10^{-8}$  M となるようにした。結果を Fig. 4-5 に示す。いずれの IgG-Ce6 も照射時間に対して DPBF は直線的に分解した。

そこで、IgG-2C 溶液中の DPBF の分解速度定数を 1 とした値を Fig. 4-6 に示す。図の横軸は抗体に結合した Ce6 の結合数で、各 IgG-Ce6 溶液中の結合体の濃度は一定である。縦軸は DPBF の分解速度定数の比を表している。結果から、結合数と DPBF の分解速度定数はほぼ比例関係であった。このことから、IgG-Ce6 に含まれる Ce6 すべてが有機溶媒中で一重項酸素を生成することが分かった。

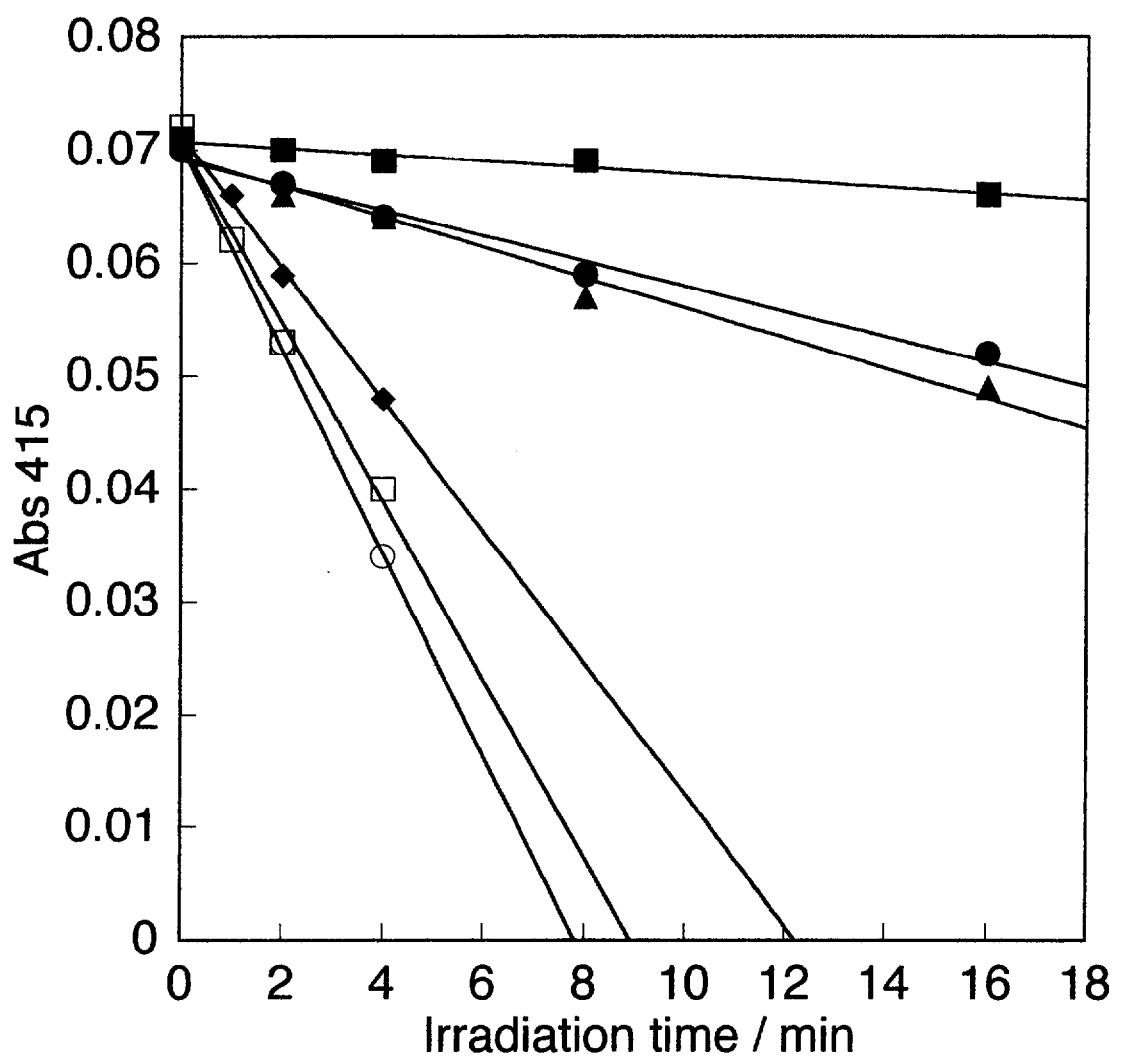


Fig. 4-5 Degradation of DPBF by singlet oxygen generated from IgG-2C(■), IgG-9C(●), IgG-11C(▲), IgG-18C(◆), IgG-26C(□) and IgG-30C(○). Concentration of IgG-Ce6 was  $1 \times 10^{-8}$  M.

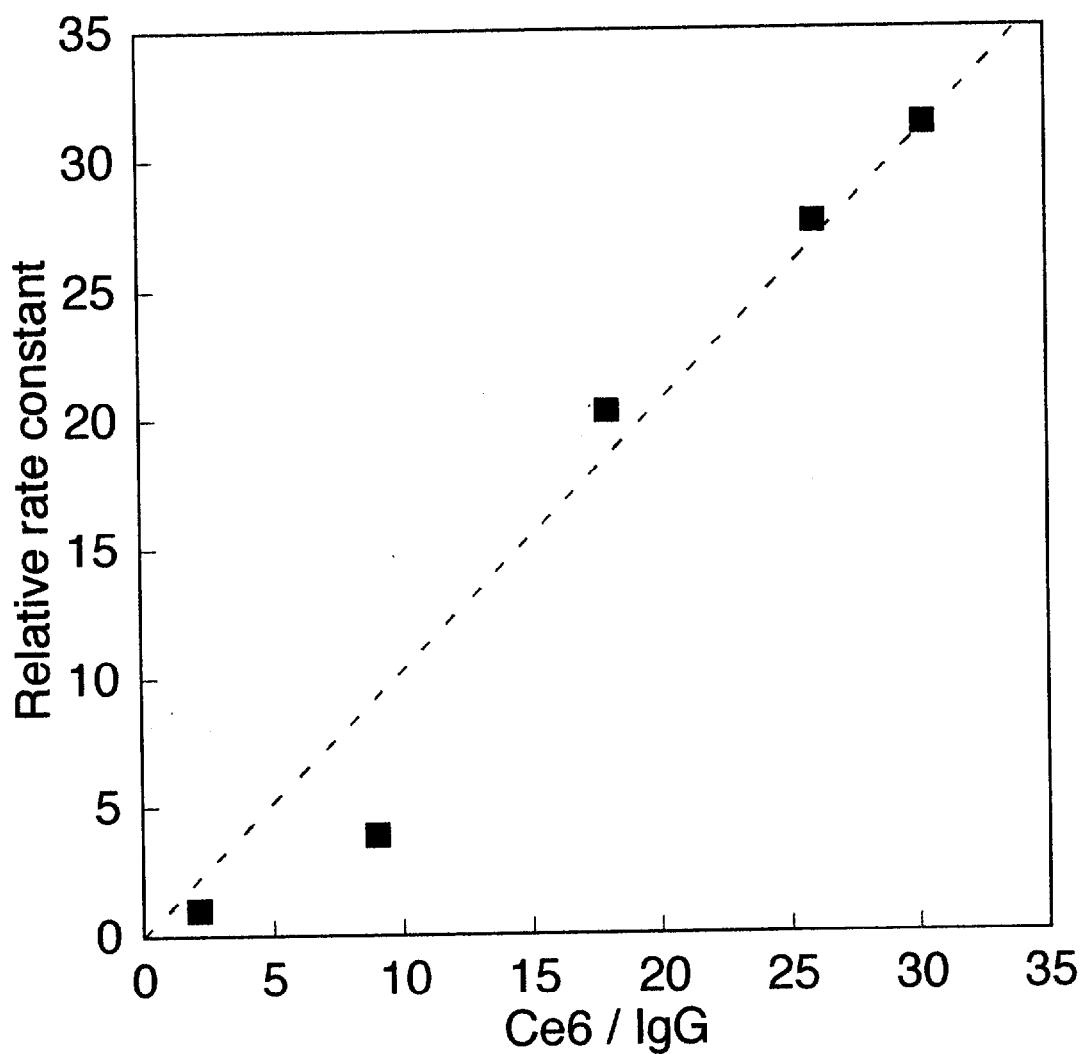


Fig. 4-6 Relative rate constant of degradation of DPBF by singlet oxygen generated from IgG-Ce6 as a function of conjugate ratio. Concentration of IgG-Ce6 was  $1 \times 10^{-8}$  M and irradiated for 4 min.

#### 4.3.4.2 PBS 中での抗体結合型 Ce6 の一重項酸素生成能

IgG-Ce6 の PBS 中での光照射による一重項酸素生成能を測定した。測定は一重項酸素による L- ヒスチジンの酸化分解反応により行った。IgG-Ce6 は結合体の濃度が  $2.5 \times 10^{-8}$  M となるようにし、8 分間光照射を行った。結果を Fig. 4-7 に示す。図の縦軸は 8 分間の照射で酸化されたヒスチジンの濃度を示す。結果より、結合数が 11 あたりまでは直線的に一重項酸素を生成し、18 以上では一重項酸素生成量はほぼ一定となった。Fig. 4-6 の結果では DMSO 中ではすべての Ce6 が一重項酸素を生成することが示されたため、PBS 中と DMSO 中での IgG-Ce6 の状態が変化していると考えられる。すなわち、PBS 中では抗体の立体構造が維持されているため、抗体内部に存在した一部の Ce6 は一重項酸素を生成しなかったのである。

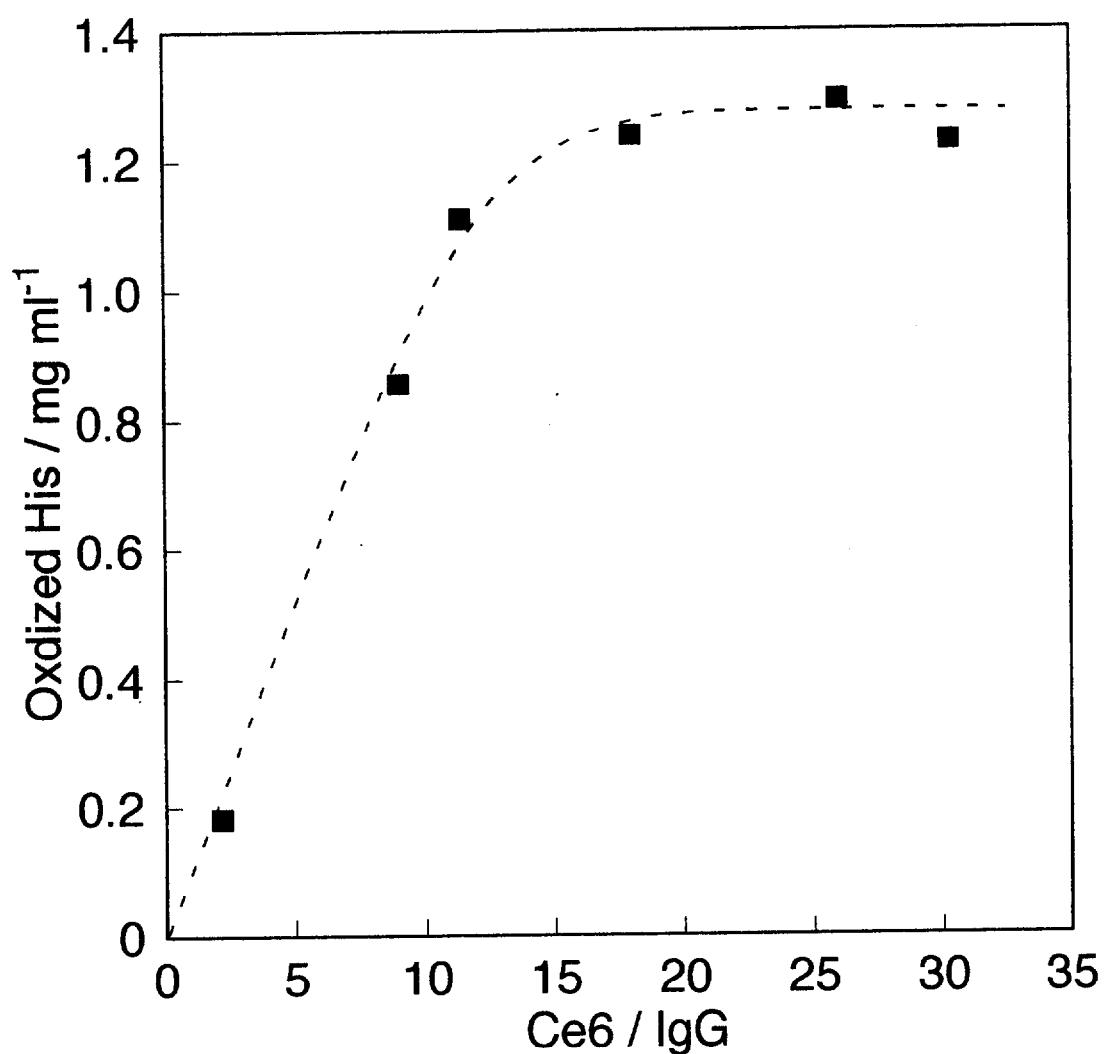


Fig. 4-7 Degradation of His by singlet oxygen generated from IgG-Ce6 as a function of conjugate ratio. Concentration of IgG-Ce6 was 2.5 x 10<sup>-8</sup> M and irradiated for 16 min.

#### 4.3.5 抗体結合型 Ce6 の MM46 細胞への光毒性

IgG-Ce6 の光毒性測定した。結果を Fig. 4-8 に示す。IgG-Ce6 は結合体の濃度が  $5 \times 10^{-10}$  M となるようにして、2 時間 37°C で MM46 細胞とインキュベートした後、光照射を行い、20 時間後に MTT 法により細胞の生存率を求めた。グラフの横軸は抗体に対する Ce6 の結合数で縦軸は光照射後の細胞生存率を示す。

結果より、結合数が 18 までの IgG-Ce6 は直線的に細胞生存率が減少し、良好な光毒性を示すが、18 以上の IgG-Ce6 は細胞生存率が約 40% となり、光毒性が変わらないことが分かった。このようになる理由として、以下の二点が考えられる。一点目は、Fig. 4-2 で示されたように結合数が 18 以上の IgG-Ce6 では抗体の腫瘍細胞認識能が減少するため、細胞に Ce6 が取り込まれにくくなることがあげられる。また二点目は、Fig. 4-7 で示されたように、水溶液中で一重項酸素生成量は、結合数が 18 以上の IgG-Ce6 ではほぼ一定となったことがあげられる。

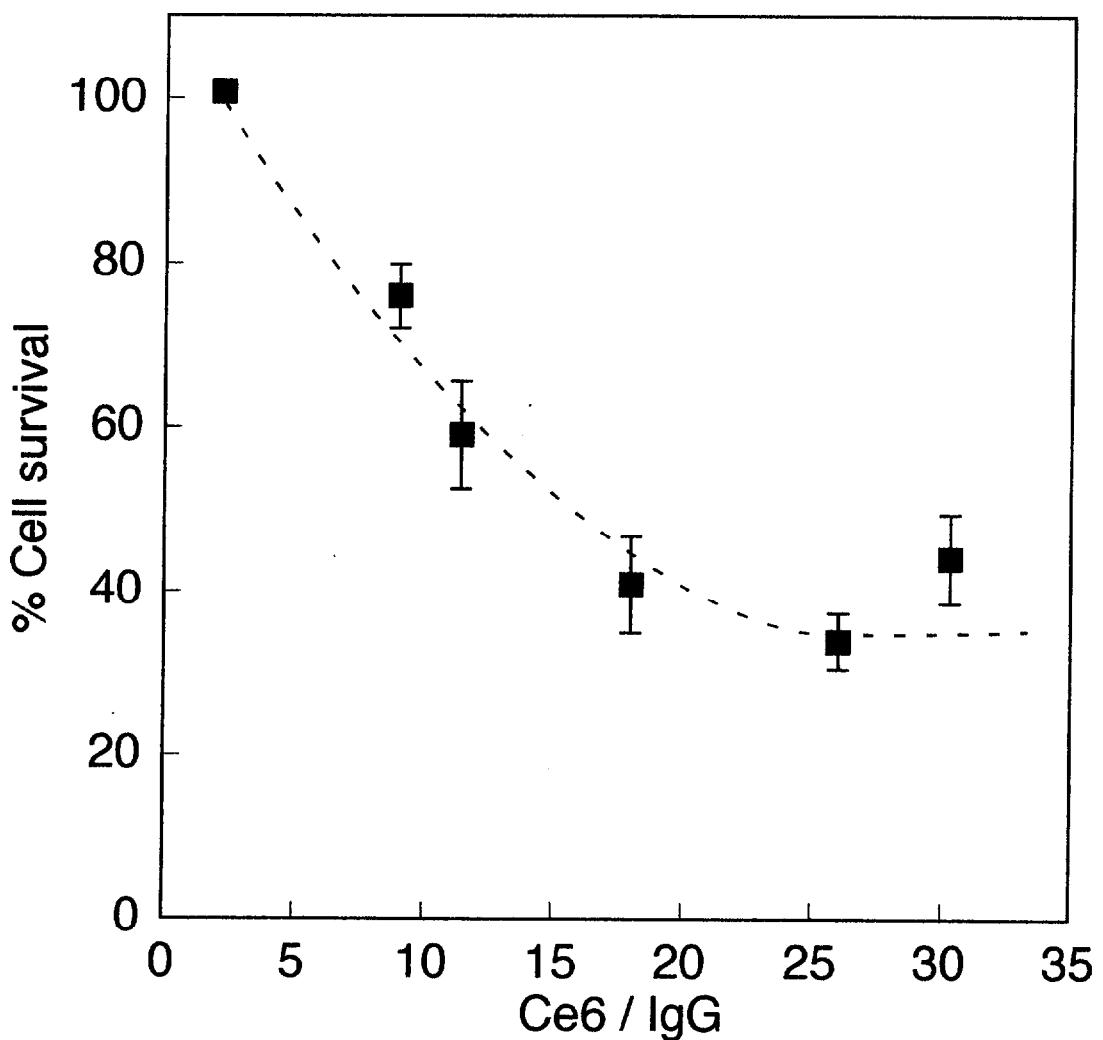


Fig. 4-8 Photocytotoxicity of IgG-Ce6 as a function of conjugate ratio. Cells were incubated with  $5 \times 10^{-10}$  M of IgG-Ce6 for 2 h.

#### 4.3.6 抗体結合型 Ce6 の取り込み量に対する殺細胞効果

IgG-2C の Ce6 取り込み量および光毒性を調べた。それぞれの結果を Fig. 4-9 (a) および Fig. 4-9 (b) に示す。これらの結果から、IgG-2C の Ce6 取り込み量に対する殺細胞効果を算出した。結果を Fig. 4-10 に示す。また、Fig. 4-3 の Ce6 取り込み量および Fig. 4-8 の光毒性の結果から IgG-9C、IgG-18C の Ce6 取り込み量に対する殺細胞効果を算出し、Fig. 4-10 に併せて示した。

結果より、IgG-2C は細胞への Ce6 取り込み量が  $7 \times 10^{-12} \text{ mol mg protein}^{-1}$  以上では良好な殺細胞効果を示した。また IgG-9C、IgG-18C と比較して少ない Ce6 取り込み量で高い殺細胞効果を示した。IgG-2C が良好な殺細胞効果を示した理由として、細胞内での局在部位が IgG-9C と異なることが挙げられる。すなわち IgG-2C は細胞にとってより致死ダメージを受けやすい部位に取り込まれたため、高い殺細胞効果を示したと考えられる。IgG-2C は IgG-9C と比較して腫瘍細胞認識能が高いことから、細胞を認識して取り込まれる場合のほうがより致死ダメージを受けやすい部位に取り込まれることが示唆される。

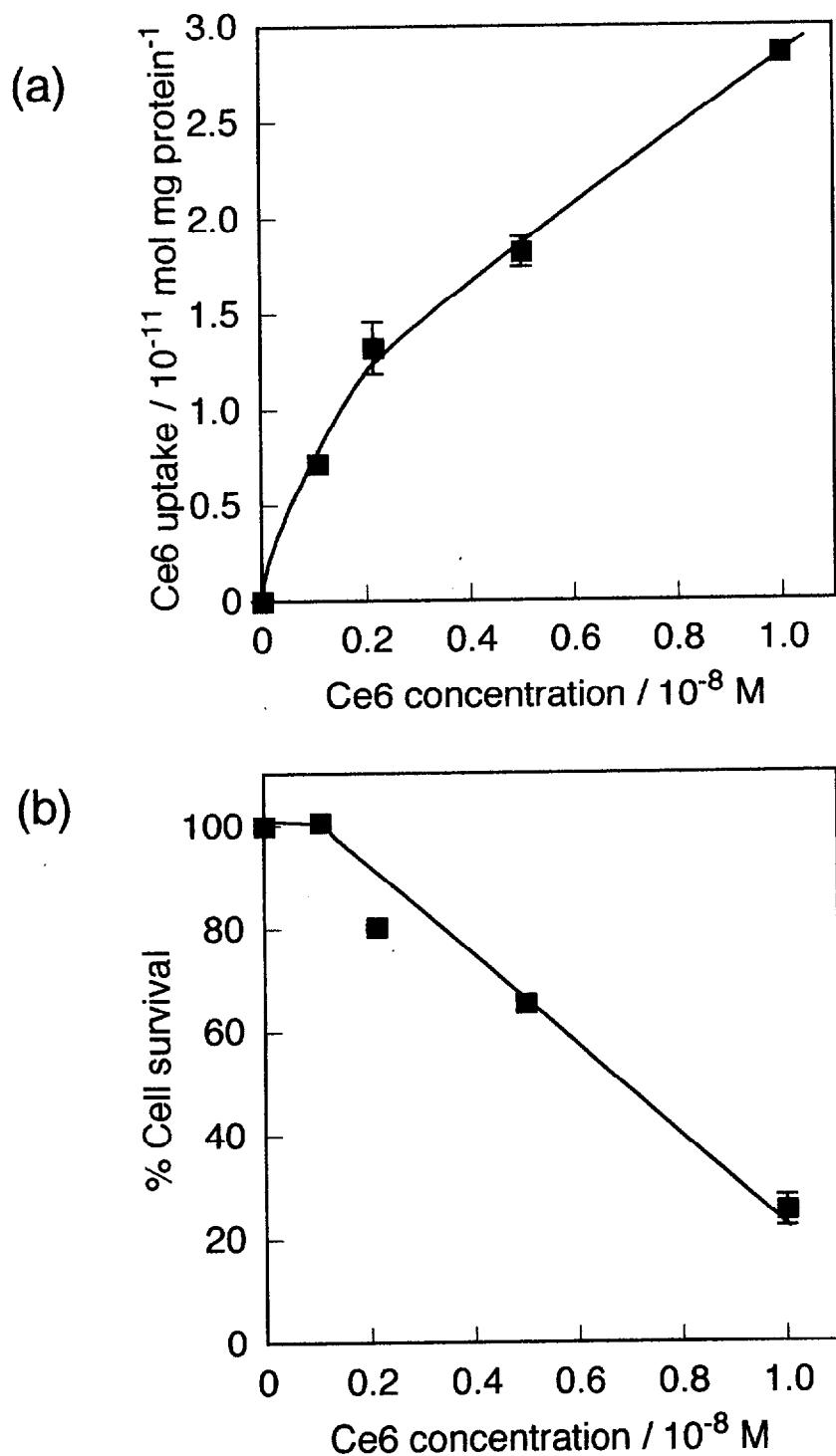


Fig. 4-9 Cellular Ce6 uptake of IgG-2C (a), and photocytotoxicity of IgG-2C (b).

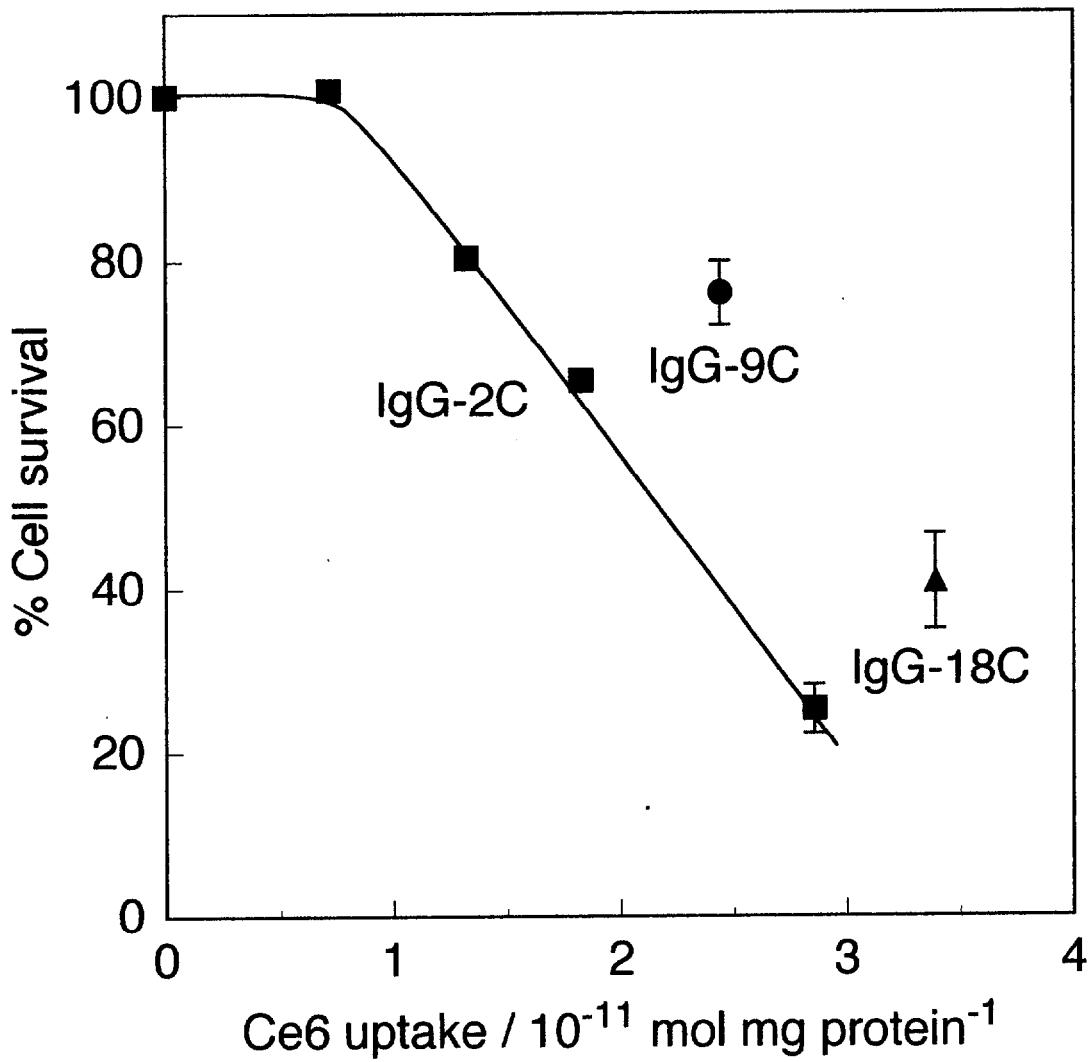


Fig. 4-10 Photocytotoxicity as a function of Ce6 uptake.

#### 4.4 まとめ

本章では、Ce6結合数の異なる抗体結合型Ce6を調製し、結合数がIgG-Ce6の腫瘍細胞認識能および光増感作用に与える影響を調べた。腫瘍細胞認識能を調べた結果、抗体に結合したCe6の結合数が多くなるほど腫瘍細胞認識能が低下することが分かった。さらに、細胞へのCe6取り込み量に対する殺細胞効果を調べたところ、結合数が最も低いIgG-Ce6が良好な殺細胞効果を示した。以上の結果から、結合数が低いIgG-Ce6ほど腫瘍細胞を認識した後、効果的に取り込まれ、殺細胞効果が高いことが分かった。

## 4.5 参考文献

- [1] Lowry, O. H., N. J. Roserbrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- [2] Michelsen, U., H. Kliesch, G. Schurpfeil, A. K. Sobbi and D. Wöhrle (1996) *Photochem. Photobiol.* **64**, 694-701
- [3] Kraljic, I. and S. E. Moshini (1978) *Photochem. Photobiol.* **28**, 577-581
- [4] Blazek, E. R., J. G. Peak and M. J. Peak (1989) *Photochem. Photobiol.* **49**, 607-613

## 第五章

### 總括

## 5.1 総括

第一世代の光増感剤であるヘマトポルフィリン誘導体 (HpD) では組織透過性のよい長波長領域の光を用いることができず、腫瘍選択性が低いといった問題点があった。そのため、HpDにかわる光増感剤の開発が望まれている。本研究では、HpDにかわる光増感剤の開発を目的とし、以下の長所をもった光増感剤の開発をおこなった。

### (1) 長波長領域の光を治療に用いることのできる光増感剤

本研究では亜鉛フタロシアニンおよびクロリンを光増感剤として用いた。これらの光増感剤は組織透過性のよい長波長領域の光に対する吸光係数が大きいため、深部の癌の治療が可能になる。

### (2) 腫瘍選択性の高い光増感剤

光増感剤に腫瘍選択性を付与するため、抗腫瘍抗体結合型光増感剤の開発を試みた。抗体結合型光増感剤は抗体が腫瘍を認識するため、腫瘍のみに取り込まれる。これに光照射をおこなうことによって、腫瘍のみが破壊されることが期待される。さらに抗体結合型光増感剤は光照射をおこなわない条件では毒性がないため、従来の抗体結合型薬剤より優れていると考えられる。

本研究で開発された抗腫瘍抗体結合型光増感剤は、腫瘍選択性が高く、組織透過性のよい長波長領域の光を治療に用いることが出来るという特色を持つ。これは先に述べた HpD の問題点を克服した新しい光増感剤といえる。

以下に各章で得られた知見をまとめると。

第二章では長波長領域に吸収を有する亜鉛フタロシアニンのキャラクタリゼーションおよび抗腫瘍抗体結合型亜鉛フタロシアニンを調製し、その効果を調べた。水溶性亜鉛フタロシアニンである TX-101A および ZnTSPc は長波長領域の 680 nm の光を治療に用いることができ、治療効果が高く、光線過敏症が少ないことが分かった。しかし、HpD と同様に腫瘍選択性は低いことが明らかとなった。

そこで腫瘍選択性の高い亜鉛フタロシアニンの開発を行った。腫瘍を選択性に認識するため抗腫瘍抗体を用い、亜鉛フタロシアニンと結合した抗腫瘍抗体結合型 ZnTCPc を調製した。その結果、抗体一分子当たり 37 個の ZnTCPc が結合した抗体結合型亜鉛フタロシアニンを調製できた。また、抗体結合型 ZnTCPc 中の抗体と共有結合した ZnTCPc は抗体一分子当たり 15-20 個であることが分かった。残り 20 個前後の ZnTCPc はスタッキングなどによって抗体結合型 ZnTCPc に含まれていると考えられる。そのため、抗体結合型 ZnTCPc は共有結合した ZnTCPc 以外にスタッキングした ZnTCPc も腫瘍に運搬することが示唆された。抗体結合型 ZnTCPc は *in vitro* において効果的に細胞に蓄積し、良好な光毒性を示した。これ

は抗体が腫瘍細胞を特異的に認識したためと考えられる。さらに抗体結合型 ZnTCPc は担癌マウスにおいて、腫瘍選択的に取り込まれることが分かった。

第三章では、光増感活性が高く、腫瘍選択性をもった抗体結合型光増感剤の開発を目的とし、抗体結合型のクロリン e6 (Ce6) を調製した。Ce6 は水溶液中で単量体として存在するため、全分子が抗体と共有結合を介して結合し、高い光増感活性が期待される。その結果、抗体一分子当たり約11個の Ce6 が結合した抗体結合型 Ce6 を調製した。また、抗体結合型 Ce6 は Ce6 と比較して飛躍的に高い取り込み量を示した。これは抗腫瘍抗体が腫瘍細胞を認識したために高い取り込み量を示したためと考えられる。細胞内での局在部位を調べた結果、Ce6 は細胞膜に蓄積したのに対し、抗体結合型 Ce6 は細胞内に蓄積した。さらに光照射による光毒性を調べたところ、抗体結合型 Ce6 は Ce6 と比較して高い光毒性を示した。これは抗体結合型 Ce6 が効果的に細胞に蓄積したためと考えられる。しかし、抗体に結合した Ce6 は結合していない Ce6 と比較して一重項酸素の生成量は低いため、取り込まれた Ce6 に対する殺細胞効果は抗体結合型 Ce6 のほうが低いことが分かった。

第四章では、Ce6 結合数の異なる抗体結合型 Ce6 を調製し、結合数が IgG-Ce6 の腫瘍細胞認識能および光増感作用に与える影響を調べた。腫瘍細胞認識能を調べた結果、抗体に結合した Ce6 の結合数が多くなるほど腫瘍細胞認識能が低下す

ることが分かった。さらに、細胞へのCe6取り込み量に対する殺細胞効果を調べたところ、結合数が最も低いIgG-Ce6が良好な殺細胞効果を示した。以上の結果から、結合数が低いIgG-Ce6ほど腫瘍細胞を認識し、効果的に取り込まれ、殺細胞効果が高いことが分かった。

## 5.2 今後の展望

光線力学治療において、新しい光増感剤の開発が求められていた。そこで本研究は、HpDにかわる光増感剤として抗腫瘍抗体結合型光増感剤の開発をおこなった。抗腫瘍抗体結合型光増感剤は組織透過性のよい長波長領域の光を治療に用いることができ、腫瘍選択性が高いという特徴を持つ。

従来の抗腫瘍抗体結合型薬剤は共有結合によって抗体と薬剤を結合したものであった。抗体残基を直接修飾するため、抗体の活性が低下することが問題となっていた。本研究は光増感剤の特性を生かし、凝集によっても抗体と結合した抗体結合型光増感剤を開発した。血中では解離せず、腫瘍のみで解離するような抗体結合型光増感剤が開発できれば、効果的に光増感剤を運搬できるであろう。

本研究では抗体結合型光増感剤において、腫瘍を認識して蓄積する場合は、認識しないで蓄積する場合と比較して、殺細胞効果が高いことが示された。このことから腫瘍を認識する抗体結合型光増感剤は細胞内でよりダメージを与えやすい部位に集積していると考えられるが、詳しい知見は得られなかった。抗体が腫瘍を認識した後の集積部位の同定は非常に興味深いものであり、今後の抗腫瘍抗体の設計につながる知見であると考えられる。さらに、より細胞にダメージを与えるやすい部位に集積する光増感剤の開発にもつながると考えられる。

## 謝辞

本研究をおこなうにあたり、終始懇切丁寧なご指導を賜りました東京工業大学生命理工学研究科、大倉一郎教授に心から御礼申し上げます。

本研究をおこなうにあたり、常に有意義な御助言、御指導を賜りました東京工業大学生命理工学研究科、蒲池利章講師に心から御礼申し上げます。

本研究をおこなうにあたり、多大なる御援助をいただきました愛知がんセンター化学療法部、瀬戸加大博士に心から御礼申し上げます。

共同実験者として本研究に関わり、多くの助言と協力をいただきました織田和生氏、加藤学氏、堀内保臣氏、藤田裕氏、長田喜博氏、小出智和氏、矢崎恵子氏に深く感謝いたします。

最後に五年半の長きにわたる研究生活において御協力、御援助をいただきました大倉研究室の皆様に深く感謝いたします。