

---

半導体レーザー光照射による  
水中でのポルフィリン類縁体の一重項酸素発生能と抗がん性評価  
Singlet Oxygen Generation and Anticancer Activity of Porphyrin Derivatives in Water  
by Semiconductor Laser Light Irradiation

---

M22助自62

代表研究者 野 元 昭 宏 大阪公立大学 大学院工学研究科 准教授  
*Akihiro Nomoto Associate Professor, Graduate School of Engineering,  
Osaka Metropolitan University*

共同研究者 田 中 守 名古屋市立大学 大学院医学研究科 助教  
*Mamoru Tanaka Assistant Professor, Graduate School of Medical Science, Nagoya City University*

In this study, new PDT (photodynamic therapy) agents were investigated. These compounds were developed as anticancer agents generating singlet oxygen by laser light irradiation for PDT. Since chlorin has an absorption in the visible light region around 650 nm applicable to PDT and glucose is uptaken into cancer cells, we have synthesized effective photosensitizers and tested the effects of glucose-conjugated chlorin e6 as a photosensitizer for PDT. Herein, various porphyrin derivatives were synthesized and each absorption area was measured focusing on their efficacy in killing cancer cells.

First, we focused on bacteriochlorin. Bacteriochlorin is known as a photosensitive compound and it absorbs light in the longer wavelength region compared to chlorin. However, the synthetic methods of bacteriochlorin are limited and few examples are reported about its isolation and stability, so we tried to explore its chemical synthetic pathway. As a result, by using pyridine as a reaction solvent and monocarboxylic acid porphyrin ester as a substrate, the reaction proceeded and the desired bacteriochlorin derivative was successfully obtained. This synthesized bacteriochlorin derivative has an absorption in the visible light region around 740 nm applicable to PDT.

Next, the synthesis of chlorin e6 derivative conjugated with maltotriose was carried out because the previous glucose-conjugated derivative had poor solubility in water without surfactant. By using a protected maltotriose derivative, thio-maltotriose derivative was prepared and conjugated with chlorin e6 affording the desired compound. This compound exhibited high water solubility and its absorption region at 660 nm was revealed by UV-vis. measurement in an aqueous solvent. The anticancer effect was measured on human gastric cancer cells. As a result, the human cancer cells were killed, and the drug uptake into the cells was also confirmed.

## 研究目的

光がん治療 (PDT: Photodynamic Therapy) は、光感受性物質を薬剤として体内に投与し、内視鏡レーザーで光を照射することで、がん部位を治療するもので、内視鏡での治療が可能であることから身体への負荷が小さい治療方法であり、盛んな研究対象となっている。これまでに様々な薬剤が開発されているものの、現在の光線力学療法は非効率な色素が適用されており、用いている色素は驚くほど限られている。これを画期的に変革する新しい薬剤の開発が切望されている。本研究では、光感受性物質合成・光反応を担当する有機化学者、細胞実験を進める医学研究者が結束し、ヒトがん細胞、およびマウス実験を展開する。将来社会の安定という工学的な見地に立って、人に適用可能な光感受性色素を医学的に創出することに大きな意義があり、半導体レーザーまたはLED光波長と、水溶性ポルフィリン類緑体色素の吸収励起波長を合致させ、一重項酸素発生により腫瘍、がん部位を消滅可能なレーザーと生体適合性色素の組み合わせについて詳細に調べる。本研究でのベースとなる光感受性物質は、毒性が低く多様な合成法が知られているポルフィリン誘導体を用いることとし、ヘテロ原子の多彩な反応性を利用することで、手術室などで使用可能な小型半導体レーザーと内視鏡によるレーザー照射の最適化、および水中における光励起一重項酸素発生が可能な高安全性色素合成を進める。

## 概要

本研究は、光線力学療法 (photodynamic therapy: PDT) に適用可能な新しい薬剤を創出するための研究である。近年の盛んな研究の結果、がんを患ってからの生存率は飛躍的に

向上し、早期がんは高い確率で治る (寛解する) 病気となりつつあるが、今もって深刻な病であることに変わりはない。厚生労働省の統計によると、死亡数における死因の約3割を腫瘍が占めている。さらに年齢別の死因の構成割合では、男性で65-75歳、女性で55-64歳の4割以上ががんや腫瘍を原因として死亡している。外科治療、放射線療法、温熱療法、化学療法、遺伝子治療など様々ながん治療法について、研究が進められているが、未だその死亡率は高い。このような状況の中、PDTは身体への負荷が非常に少なく、体力のない小児や高齢者、長期入院患者にも有効で、特に我が国を始め、高齢化社会を迎える諸国においては高い注目を集めている。PDTでは、まず①光感受性物質をがん患者に投与し、②主に内視鏡レーザーを患部近くに導入する。③一定時間後に患部に対し光感受性物質に対応する波長の光線 (レーザー光) を照射することで一重項酸素を発生させる、という段階を経て治療を行う。原理的には、光によって励起された光感受性物質からエネルギーを受け取った酸素が、一重項酸素と呼ばれる高活性な状態となり周辺腫瘍を攻撃する。この光反応は光を照射する部分のみで起こるため、内視鏡レーザーの導入のみの、わずかな手術で一連の治療が可能となる。現在、我が国でも治療が進められているが、薬剤のがん細胞特異性、選択性が十分とは言えず、より抗腫瘍効果の高いPDT用薬剤色素の開発が望まれている。

我々の研究グループでは、このような治療のために必要な光感受性物質として、クロリン骨格を有する物質に着目した。PDT治療のためには、血液に含まれるヘモグロビンや水など生物の構成成分に妨げられることなく生体深部にある患部の色素にも到達可能な生体内を透過しやすい波長領域のレーザー光が望ましく、治

療効果を高めるために、生体における光学的窓と呼ばれる600–900 nm付近に吸収領域を有する色素がPDT用光感受性色素に適しており、クロリン骨格はこの領域に光吸収を有する良好な化合物である。これまでにがん細胞への親和性が高い糖鎖部位を有したクロリン誘導体を合成し、650 nm付近のレーザー光照射により、がん細胞を殺傷する化合物の開発に成功している。

そこで、本研究開発において種々の波長のレーザー光によって殺がん細胞効果を示す糖鎖連結光感受性物質の開発を進めた。

まず、より長波長の光吸収領域を有する化合物について、バクテリオクロリンに着目し、化学還元によるバクテリオクロリン化に関する検討を進めた。種々の反応条件を検討した結果、ピリジンを反応溶媒としてモノカルボン酸ポルフィリンのエステル体を基質として反応させたところ、バクテリオクロリン化の反応が十分に進行することを見出した。本化合物は740 nmに吸収領域を有しており、より生体深部での作用が期待され、現在、ヒトがん細胞に対する殺細胞効果について調査を進めている。

次に、これまでに開発してきたグルコース連結クロリンe6誘導体の高水溶性化と細胞内導入についても研究を進めた。この薬剤は良好な殺がん細胞効果を示したものの水溶性に乏しく、界面活性剤を用いて水溶性を得なければならぬという課題があった。そこで本研究では、新たにグルコースに代えて、3分子のグルコースが連結したマルトトリオースを導入した新規化合物を設計し、高収率な合成法の検討を進めた。その結果、グルコースの場合と異なり、マルトトリオースではアセチルチオマルトトリオースを用いた場合に高収率で目的の結合反応が良好に進行することが明らかとなり目的化合物を得た。本化合物は高い水溶性を

示すとともに、水溶液中での紫外可視吸収スペクトルの測定から660 nmに吸収領域を有しており、ヒト胃がん細胞での抗がん効果を測定したところ、細胞内への薬剤導入も確認され、薬剤濃度約5  $\mu\text{M}$ ほどでほとんどの細胞が死滅していることを確認した。

本研究は、単純な内視鏡治療、腫瘍部位の特定という範囲を超えて、がんを殲滅可能な薬剤開発と治療への応用に発展することが期待される。特に治療室への導入が容易な小型半導体レーザーのような装置開発は今後の医療に対し非常に重要な位置を占めると考えられる。

## 本文

がんは正常な細胞の遺伝子が、様々な要因により変異してできた異常な細胞が、近傍の組織を破壊、浸潤、増殖し、さらに他の臓器へ転移する悪性腫瘍のことである。近年の盛んな研究推進に基づく成果により、がんを患ったからの生存率は飛躍的に向上し、早期に発見すれば高い確率で治る（寛解する）病気となりつつあるが、今もって深刻な病であることに変わりはない。体組織に生じるがんは場所や種類によって癌や腫瘍などいくつかの表記はあるが、これらは主に腫瘍に大別され、厚生労働省の「令和2年（2020）人口動態統計月報年計（概数）の概況」(<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai20/>)によると、死亡数における死因の約3割を腫瘍が占めている。さらに年齢別の死因の構成割合では、男性で65–75歳、女性で55–64歳の4割以上が腫瘍が原因で死亡している。

そのため、外科治療、放射線療法、温熱療法、化学療法、遺伝子治療など様々な治療法について、継続的に研究が進められているが、未だその死亡率は高い。このような状況

の中、近年がん治療法の一つである光線力学療法 (photodynamic therapy: PDT) は高い注目を集めている。PDTとは、色素である光感受性物質を体内に投与(注射)し、腫瘍組織にも行き渡らせ、腫瘍部の光感受性物質に対し光を照射することで光化学反応を生起し、腫瘍部位を死滅させる治療法である。よく知られているレーザー治療は、例えばレーザーによって表皮組織自体を焼いたり、部分的な切除を行ったりするのだが、PDTでは化学反応によって生じる活性酸素種を利用して、腫瘍組織にダメージを与える。そのため身体への負荷が非常に少なく、体力のない小児や高齢者、長期入院患者にも有効で、特に我が国を始め、高齢化社会を迎える諸国においてはその開発が切望されている。

PDTの概略を図1に示す。まず、①光感受性物質をがん患者に投与し、②主に内視鏡レーザーを患部近くに導入する。③一定時間後に患部に対し光感受性物質に対応する波長の光線(レーザー光)を照射することで一重項酸素( $^1\text{O}_2$ )を発生させる。

図2に示す原理のように、光によって励起された光感受性物質は、照射前の基底状態に戻る際に、周囲の三重項酸素( $^3\text{O}_2$ )へエネルギーを遷移させる。我々の周辺に存在する酸素の

ほとんどは三重項酸素と呼ばれ、理論的には直接的に光感受性物質からエネルギーを受け取ることはできないのだが、励起された光感受性物質は初期的な一重項状態から項間交差と呼ばれる段階を経て三重項状態にシフトした後、酸素にエネルギーを遷移させることができる。エネルギーを受け取った酸素は一重項酸素と呼ばれる高活性な状態であり、それ自体が高い反応性を有するだけでなく、水などの周辺物質と反応して、同様の高活性な物質を産出し周辺腫瘍を攻撃する。この光反応は光を照射する部分のみで起こるため、内視鏡レーザーの導入のみの、わずかな手術で一連の治療が可能となる。

現在、我が国ではPorfimer sodiumが食道癌、胃癌、肺癌、子宮頸癌に、第2世代のTalaporfin sodiumが肺癌、脳腫瘍に用いられているが、がん細胞特異性、選択性が十分とは言えず、より抗腫瘍効果の高いPDT用薬剤色素の開発が望まれている。腫瘍集積性を向上させるために生体の免疫機能を利用し、色素を抗体に結合させた光免疫療法(Photoimmunotherapy: PIT)や、腫瘍細胞内に入った後に体内の生化学反応によって色素を形成する5-アミノレブリン酸(5-ALA)などが研究対象となって、様々な腫瘍への集積性や治療効果の向上に向けた努力が今も続けられている。

我々の研究グループでは、このような治療のために必要な光感受性物質として、クロリン骨

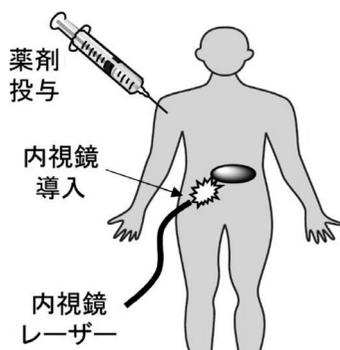


図1 光線力学療法 (PDT) の概略

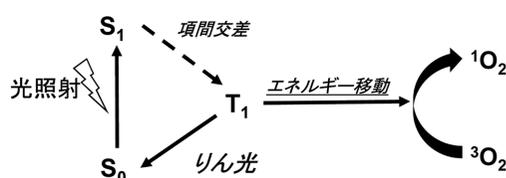


図2 光照射による一重項酸素発生原理

格を有する物質に着目した。PDT治療のためには、血液に含まれるヘモグロビンや水など生物の構成成分に妨げられることなく生体深部にある患部の色素にも到達可能な生体内を透過しやすい波長領域のレーザー光が望ましく、治療効果を高めるために、生体における光学的窓と呼ばれる600–900 nm付近に吸収領域を有する色素がPDT用光感受性色素に適しており、クロリン骨格はこの領域に光吸収を有する良好な化合物と言える(図3)。

これまでに種々の検討から、650 nm付近のレーザー光照射により、がん細胞を殺傷する能力が高い化合物の開発に成功している。重要視した点は、薬剤効果もちろんであるが、動物実験や薬剤安全性試験、薬剤動態試験など大量に化合物が必要となることである。実用的な観点から一般的な化学工業化が可能な反応、単離操作を用いて、一定量の化合物を取得可能な合成経路で実験を進め、グルコース連結クロリンe6誘導体(図4)を合成した。この化合物はがん細胞への親和性が高い糖鎖部位を有したクロリン誘導体であり、がん細胞内へ

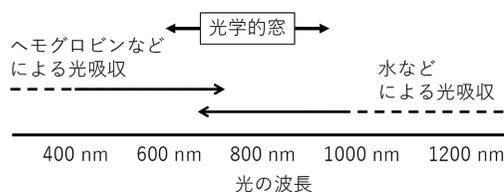


図3 PDTに適切な光波長領域

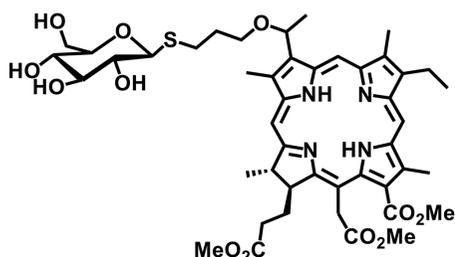


図4 グルコース連結クロリンe6誘導体

の導入についても確認している。

そこで、本研究開発において種々の波長のレーザー光によって殺がん細胞効果を示す糖鎖連結光感受性物質の開発を進めた。

まず、より長波長の光吸収領域を有する化合物について検討した。単純な長波長領域吸収物質は、太陽電池素子や近赤外センサなどで報告されているが、生体内での低毒性を確保する必要があるため、我々がこれまでに安全性試験を行ったポルフィリンやクロリン骨格を候補として調査を進めた。その中で、バクテリオクロリンに着目した(図5)。

クロリン骨格はポルフィリン環の二重結合の1つが単結合となっている化合物で600-650 nm付近に吸収領域を有し、バクテリオクロリンは二重結合の2つが単結合となりクロリンよりも長波長領域に吸収帯を有することが明らかになっている。ただし、これらの単結合はポルフィリン環に対し向かい合って配置されており、もう1つの可能性である隣り合った配置の化合物はイソバクテリオクロリンと呼ばれ、バクテリオクロリンほどの長波長領域の吸収を有しない。従ってポルフィリンを出発物質とした還元的手法では、バクテリオクロリンの選択的な合成は非常に困難であることが予想されたた

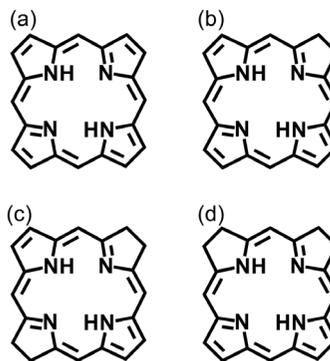


図5 (a) ポルフィリン (b) クロリン (c) バクテリオクロリン (d) イソバクテリオクロリン

め、我々の検討課題となっていた。立体選択性は低いものの酸化オスmium試薬によるアルケンのジオール化という有機合成化学では典型的な手法を用いた報告例はあるが、オスmium試薬が非常に高価であり、我々の研究グループでも追試験を行い目的化合物は得たものの数mgの非常に微量が単離できたのみであり、十分な化合物量の合成には至っていなかった。またバクテリオクロリン誘導体の安定性、特に糖鎖導入反応などの高反応性試薬の存在下における安定性については十分な報告例がなかった。そのような状況の中、オスmiumを用いないバクテリオクロリン化として、ごく数例であるがスルホニルヒドラジドを用いたヒドラジン還元によるバクテリオクロリン化の報告例を見出した。しかしながら十分な合成スケールでの化合物単離の例は我々が知る限り報告例がなかったことから、まずバクテリオクロリン化の反応条件について検討を始めた。将来的な糖鎖や中分子の導入を考慮して、報告例のないフッ素化ポルフィリン、またはモノカルボン酸ポルフィリンの各誘導体をターゲットにすることとした。

初めに報告例に従い、減圧条件下でのバクテリオクロリン化を行った(図6)。フッ素化ポ

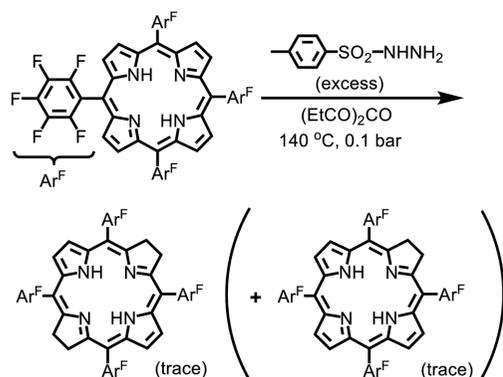


図6 フッ素化ポルフィリンのバクテリオクロリン化反応

ルフィリンに*p*-トルエンスルホニルヒドラジドと炭酸ジエチルをシュレンクナスフラスコに入れ、1時間減圧した。その後、140℃で15分加熱した。反応終了後、紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、650 nm付近にクロリン、710 nmにバクテリオクロリンに由来するピークが各々観測され、わずかではあるもののバクテリオクロリンの生成が観測された(図7)。

650 nm付近のピークはクロリンの生成に由来すると考えており、単離段階での除去が必要となる。本実験においては、出発物質であるポルフィリン、生成するバクテリオクロリン、副生するクロリンの各化合物の化学的構造が近似しているため、目的物のみの単離が非常に困難である。従って、反応終了後の段階において目的物がほぼ選択的に得られる反応条件を見出さなければならず、スクリーニングを重ねた。種々の反応条件を検討し、バクテリオクロリン由来のピークの上昇も観測したが、650 nm付近のピークが消滅することはなく、バクテリオクロリンの選択的合成には至らなかった。本条件ではこれ以上の反応進行は確認されず、他の反応条件についても検討した結果、ピリジンを反応溶媒としてモノカルボン酸ポルフィリンのエステル体を基質として反応させたところ、バクテリオクロリン化の反応が十分に

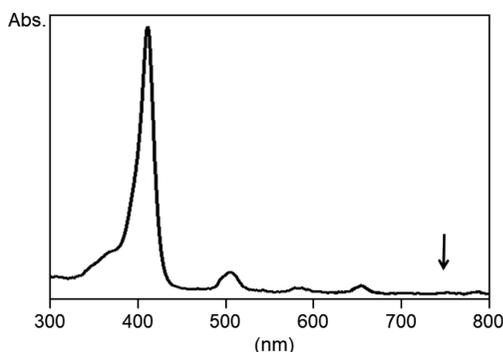


図7 反応直後の紫外可視吸収スペクトル

進行することを見出した。この反応において目的のバクテリオクロリンは高い選択性で生成し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーでの単離も可能であった。目的のカルボン酸はエステル体を加水分解することで合成することができ、加水分解の反応条件においても分解せずバクテリオクロリン骨格が保持され、化学的な合成手法によって、最終生成物であるモノカルボン酸バクテリオクロリンを得ることに成功した(図8)。本化合物は740 nmに吸収領域を有しており、より生体深部での作用が期待され、現在、ヒトがん細胞に対する殺細胞効果について調査を進めている。

次に、これまでに開発してきたグルコース連結クロリンe6誘導体の高水溶性化と細胞内導入についても研究を進めた。合成したグルコース連結クロリンe6誘導体は良好な殺がん細胞効果を示したものの水溶性に乏しく、界面活性剤を用いて水溶性を得なければならないという課題があった。そこで本研究では、新たにグルコースに代えて、グルコース3分子が連結したマルトトリオースを導入したマルトース連結クロリンe6誘導体を設計し、高収率な合成法の検討を進めた(図9)。

糖部位の立体化学を制御した合成を行うた

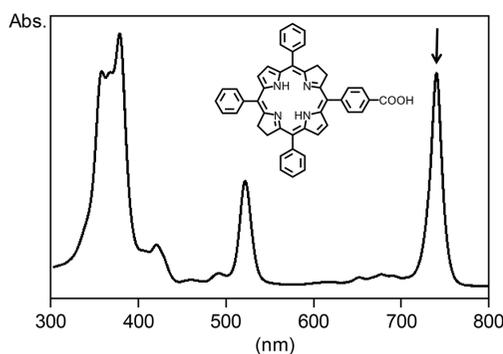


図8 モノカルボン酸バクテリオクロリンの構造と紫外可視吸収スペクトル

めに、アノマー効果を利用可能なマルトトリオースとクロリンe6を出発物質とした。糖鎖部位であるマルトトリオースをアセチル化した後に臭素化を行った。得られた臭素体にチオ尿素化を行い、メルカプト基(-SH)に変換することで目的のチオマルトトリオースのアセチル体を合成した。また比較物質としてメルカプト基がアセチル基で保護されたアセチルチオマルトトリオースのアセチル体についても合成した。各反応段階での分液操作、単離溶剤を検討することで、非常に高収率でメルカプト基を有するチオマルトトリオースの合成法を確立した。

次にこれらの糖鎖部位と臭化アルキル化したクロリンe6との結合反応について検討した。その結果、メルカプト基を有するチオグルコースの場合と異なり、マルトトリオースではアセチルチオマルトトリオースを用いた場合に高収率で目的の結合反応が良好に進行することが明らかとなった。最終段階として、一般法に従いナトリウムメトキシドを用いた糖部位の脱アセチル化を行った。グルコース連結体ではシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって容易に目的化合物が得られたが、マルトトリオース連結体ではシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる単離精製が困難であった。これは極性基であるヒドロキシ基が多いためであると考え、逆相カラムクロマトグラフィー(C-18, MeOH)を行うことで精製した。HPLCにより純度を確認し、精密質量分析および $^1\text{H}$  NMRにより目的化合物を200 mg得たことを確認した。

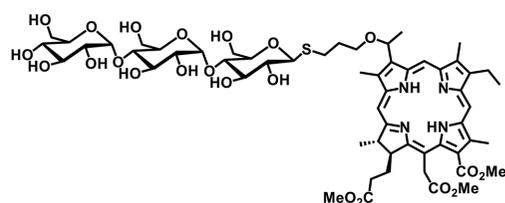


図9 マルトース連結クロリンe6誘導体

本化合物は高い水溶性を示し、水溶媒中での紫外可視吸収スペクトルの測定から660 nmに吸収領域を有していることが明らかとなり、単波長LED光源(660 nm、16 J/cm<sup>2</sup>)を用いて、ヒト胃がん細胞での抗がん効果を測定した。その結果、IC<sub>50</sub>は1.45 μMとグルコース連結体よりも効果は低かったものの、細胞内への薬剤導入も確認され(図10)、薬剤濃度約5 μMほどでほとんどの細胞が死滅していることを確認した。予想通り、マルトトリオース連結体はグルコース連結体比べて高い水溶性を示したことから医用薬剤として利用価値が高いことが考えられる。

本研究を通して、種々のLEDやレーザー波長に対して効果を発揮する一連の糖鎖連結PDT用光感受性物質を合成し、ヒトのがん細胞に対し高い殺傷能力を有することを明らかにした。単純な内視鏡治療、腫瘍部位の特定という範囲を超えて、がんを殲滅可能な薬剤開発と治療への応用に発展することが期待される。特に治療室への導入が容易な小型半導体レーザーのような装置開発は今後の医療に対し非常に重要な位置を占めることが考えられる。

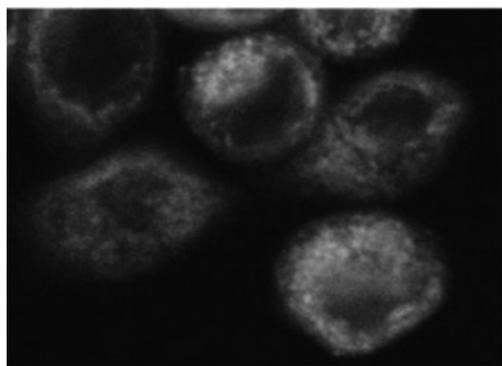


図10 がん細胞内に導入した薬剤からの発光観察

## 今後の研究の見通し

現在、合成した各薬剤について、細胞実験、マウス実験を進めており、より効果的なPDT薬剤の創出に向けて研究を進めている。幸い、いずれの薬剤についても、効果の大小はあるもののヒトがん細胞に対し一定の殺細胞効果を示したことから、マウス実験に移行している。単純な長波長吸収薬が高い効果を示すのか、または生体のより深部に光が到達し活性が発揮されるのか、各腫瘍部位において適切な波長領域はどの程度なのか、などが今後検討を進めるべき課題であり、調査すべき課題は多い。しかしながら、特に我が国のような高齢化が進む社会においては、医療費やQOLの面からもPDTは非常に重要な医療技術であり、またそれを支えるのは小型半導体レーザーに他ならない。SDGsの面からも、「3. すべての人に健康と福祉を」に直結するテーマであり、このような病に対する安心に基づく社会生活は「11. 住み続けられるまちづくりを」にもつながり、今後も研究開発を進めて行くべき領域であると思われる。

### 本助成金による主な発表論文、著書名

- 1) Precision Medicine 2023年1月号  
「イヌ乳がん細胞に対するグルコース連結クロリンe6を用いた光線力学療法に関する研究」  
大崎 智弘・岡本 芳晴・野元 昭宏・矢野 重信・田中 守・片岡 洋望
- 2) 日本レーザー医学会誌 2023年44巻1号 p.36-46  
「臨床応用のための光線力学療法用糖連結光増感剤の開発」  
矢野 重信, 片岡 洋望, 田中 守, 鳴海 敦, 野元 昭宏, 大崎 智弘, 岡本 芳晴
- 3) The 27th International SPACC Symposium (先端錯体工学研究会), 2022年12月(オンライン)  
「Synthesis of Sugar or Amino Acid Ester-Containing Compounds for Medical Materials」  
A. Nomoto, A. Shimmasu, H. Kataoka, S. Yano, A. Ogawa