

水溶性増感剤の開発と細胞の光不活性化

—日本光医学光生物学会 2020 年度学会賞受賞—

保田 昌秀

要約

生物に紫外線を照射すると細胞死が起こる。これが光殺菌である。癌細胞も紫外線照射で殺すことができるが、正常細胞も死滅させるので、正常細胞の損傷を少なくして癌細胞だけを死滅させる方法が光線力学療法である。光線力学療法では、静脈注射によって患者の腫瘍部に集積させた色素に、光ファイバーを通じてレーザー光を照射することで、色素から酸素分子へエネルギーを移動させ、活性酸素を発生させる。活性酸素が細胞内の遺伝子やミトコンドリアを損傷して細胞死を引き起こす。ここでは正常細胞に害のない赤色レーザーなどの色のついた光（可視光線）が用いられている。私たちの研究グループは、可視光線によって癌細胞（ヒト胆管癌細胞・HeLa 細胞）や微生物（レジオネラ属菌、大腸菌、酵母菌）を死滅できる色素（増感剤）の開発と光不活性化反応（可視光殺菌）の研究を行ってきた。その結果、ヒト胆管癌細胞に対して、従来の色素に比べて 100 倍以上の活性を持つ色素の開発に成功した。また、色素をシリカゲルに吸着させた光触媒を用いて、市中の噴水やクーリングタワーなどの生活環境場の水中にあるレジオネラ属菌に対する殺菌実証実験を行った。噴水の殺菌を太陽光で行えることを実証した。これらの研究成果に対して、2020 年度日本光医学光生物学会賞（生物・化学領域）が受賞することになったので、受賞研究の内容を紹介する。

キーワード：大腸菌、ヒト胆管癌細胞、HeLa 細胞、水溶性増感剤、光不活性化

1. はじめに

植物は太陽光を吸収して光合成を行い、二酸化炭素を原料にデンプンを作り、エネルギー源として貯蔵して成長している。また、動物はそれを食糧とし、人間もその恩恵に浴しており、生態系のエネルギーのほとんどは太陽光で賄われている。太陽光中の高エネルギーの光（紫外線）は、遺伝子損傷の原因になるが、紫外線の大部分は大気中のオゾン層によってカットされ地表にほとんど到達していない。このように、生物は紫外線の少ない環境で、太陽光由来のエネルギーを使って生命活動をしている。

人間は紫外線による細胞死を防ぐための色素を皮膚に持っており、色素によって日焼けや皮膚癌の発症を防いでいる。一方で紫外線は、体内でビタミン D を作るために必須であり、紫外線を含む太陽光を適度に浴びることも必要である。しかし、微生物は紫外線に対して無防備であり、紫外線照射によって遺伝子の損傷が起こり、細胞死が起こる。これが光殺菌である。癌細胞も紫外線で殺すことができるが、正常細胞も死滅させるので、正常細胞の損傷を少なくして癌細胞だけを死滅させる方法が光線力学療法である。

仕組みは、静脈注射によって腫瘍部に集積させた色素に、光ファイバーを通じてレーザー光を照射することで、色素から酸素分子へのエネルギー移動が起こり、活性酸素が発生して細胞死を引き起こす（図 1）。ここでは、正常細胞に害のない赤色レーザーな

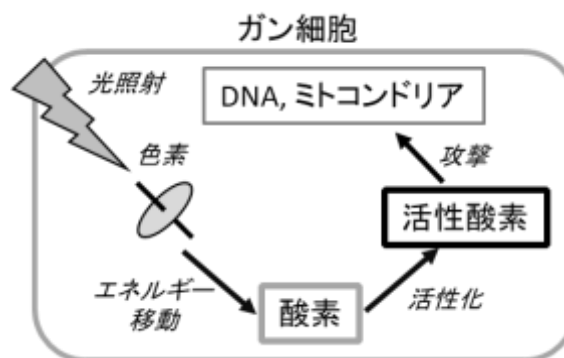


図 1. 光線力学療法の概念図

どの色のついた光（可視光線、**脚注1**）が用いられる。私たちの研究グループにおいても、可視光線で微生物を死滅できる色素の開発を行い、微生物やガン細胞の殺菌反応を研究してきた。この度、それらの研究に対して日本光医学光生物学会から 2020 年度学会賞（生物・化学領域）が授与されることになったので、受賞研究の内容を紹介する。

2. 水溶性色素（増感剤）

低濃度でも多くの可視光を吸収できる有機化合物として、私たちが注目したものがポルフィリン（**図2**）である。ポルフィリンは、4つの含窒素五員環（ピロール環）が環状に縮合した11個の二重結合を持つ芳香族化合物であり、可視光領域に強い吸収を持つ。中心に金属（M）を配位させて金属ポルフィリン錯体としても用いることもできる。ポルフィンなどの有機化合物は、一般に水に不溶性である。しかし、微生物や細胞は水に囲まれて存在しているので、ポルフィンを細胞と接触させるためには、ポルフィンを水溶化する必要がある。有機化合物の水溶化の方法として、プラスやマイナスの電荷を持つ形（イオン）にすることが一般的である。私たちがイオン性置換基の導入によって水溶性ポルフィンの合成を行った（Matsumoto・Shiragami・Hirakawa 2015）。

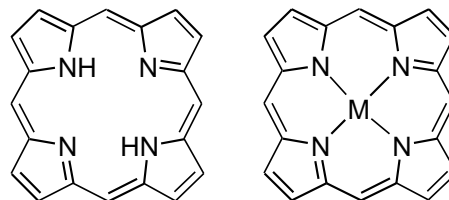


図2. ポルフィリン（左）および金属ポルフィリン（右）の構造図

3. 生活環境場での殺菌

私たちは、金属ポルフィリンの中心にアンチモンを導入した錯体（**脚注2**）を合成した。アンチモン・ポルフィリン錯体は+1の正電荷を持つイオンであり、わずかに水に溶けるが、難溶性であるので、アンチモン・ポルフィリンを粒状のシリカゲル（粒径 1.7~4.0 mm）に吸着して、水中に分散して用いた（Shiragami・Matsumoto・Inoue 2005）。シリカゲル吸着アンチモン・ポルフィリン（以下、光触媒）を用いて、空調用クーリングタワーおよび循環式噴水などの生活環境場に存在するレジオネラ菌の殺菌実証実験を行った（Fueda・Hashimoto・Nobuhara 2005）。

レジオネラ属菌（*Legionella pneumophila*）は、水温 40°C 程度の藻あるいはバイオフィームのある場所に生息している。温泉での感染被害で知られているように、レジオネラ属菌は肺炎を発症させる病原性細菌であり、1976年にアメリカのホテルにて在郷軍人会への参加者が原因不明の重症肺炎を発症したことからその発見に至っている。この細菌は、浴槽や空調用クーリングタワー冷却水、噴水等の修景用水、滞留型加湿器等で繁殖する特徴がある。

私たちは多くの噴水が屋外にあることに着目し、自然光（太陽光）を利用したレジオネラ属菌の殺菌実験を行った。最初に、宮崎市内の噴水（水量 13 トン、**図3A**）中に存在するレジオネラ属菌体数の測定を半年間にわたって行った。レジオネラ属菌の発生量は気温に依存し、25°Cを超えると 500 菌体/100 mL 程度にな

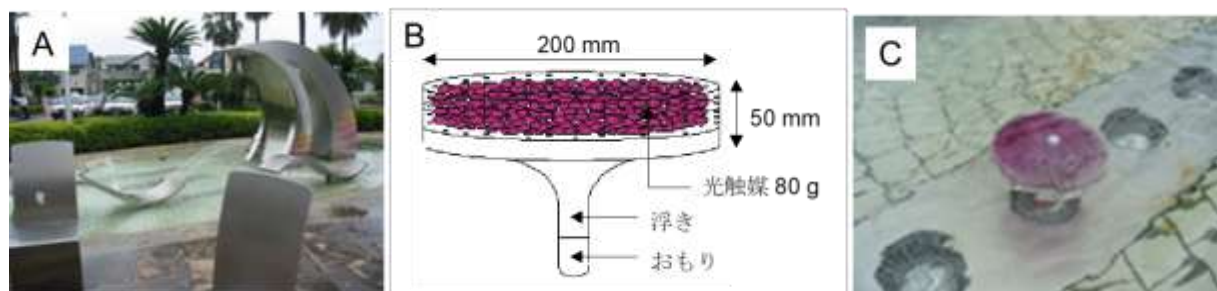


図3. 噴水でのレジオネラ属菌の殺菌実証実験

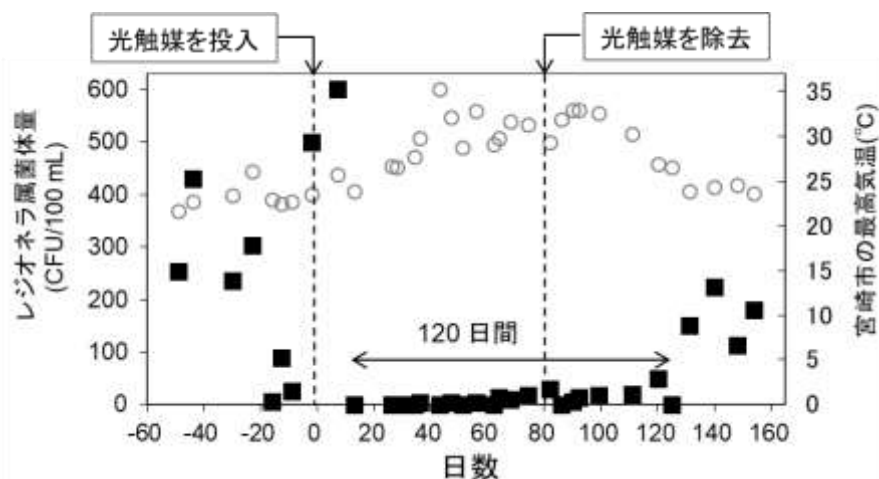


図 4. 噴水でのレジオネラ属菌殺菌実証実験におけるレジオネラ属菌の菌体量 (■) とサンプリング当日の宮崎市の最高気温 (○)

ることがわかった。

次に、ハスの葉型の装置 (図 3B) に光触媒 (80 g、アンチモン・ポルフィリン含量 40 mg) を詰め込み、同噴水内に投入した (図 3C)。その結果、図 4 に示すように、投入直後からレジオネラ属菌の発生が抑制された。80 日後に光触媒を撤収した後も、約 1 ヶ月間、環境基準値の 100 菌体/100 mL 以下の菌体濃度に抑制することに成功した。このようにして、120 日間、少ない触媒量で太陽光下での光殺菌に成功した。

市中に設置されている噴水のほとんどは循環式であり、一部の噴水にはレジオネラ属菌が存在することが私たちの調査でわかっている。ヨーロッパの暖かい地方、特にスペインでは噴水による観光客のレジオネラ菌の感染例が年間 55 件報告されている。通常、日本の水道水には塩素が投入されているが、循環中に塩素が揮発して、噴水中の塩素濃度が低下する傾向にある。私たちが調査した結果、東京都下 55 カ所の噴水において、塩素濃度が環境基準 0.1 ppm に満たなかった噴水が 45 ヶ所あることが判明した。これは噴水には様々な雑菌が存在し、健康被害の危険性があることを示しており、私たちが開発した光触媒法による殺菌は非常に有効であることが分かった。

4. 光不活性化用増感剤

研究の最終目的は、医療で使える光線力学療法用の色素 (増感剤) の開発であるが、基礎研究として、微生物や癌細胞をモデル細胞とする光殺菌実験を行った。これを光不活性化という。最初に微生物の光不活性化に用いる水溶性ポルフィリンの開発を行った。私たちは、金属ポルフィリンの中心金属をリンにしたリン・ポルフィリンを合成した。図 5 に合成したリン・ポル

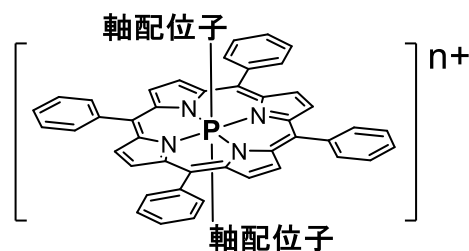


図 5. リン・ポルフィリンの概念図。軸配位子にイオン性基と疎水性アルキル基を導入した色素

フィリンの概念図を示す。光不活性化は細胞内に増感剤が取り込まれることで起こる。多くの細胞の細胞膜は疎水的であるために、増感剤が水溶性であると同時に疎水部も持つことが必要であると考えられている。

私たちは、リン・ポルフィリンの軸配位子に水溶性のエチレングリコール基と疎水性のアルキル基を導入した色素 1 (保田・白上・松本 2011) とイオン性のピリジニウム基とアルキル基を導入した色素 2 (Matsumoto・Yasuda 2018) の二種類の水溶性ポルフィリンを合成した。脚注 3 に詳細な構造式を示す。アルキル基の長さを変えて、色素の疎水性を調節した。色素 1 は +1 の価数を、色素 2 は +3 の価数を持った水溶性増感剤である。合成した色素 (増感剤) の分光学的性質などを調べた。代表的な性質として、溶解度 (C_w)、

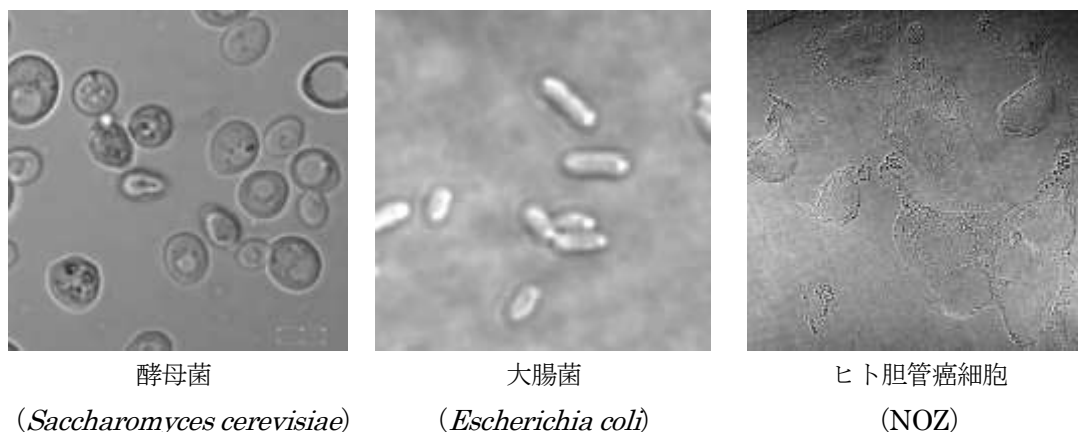


図 6. 光不活性化反応の研究に用いられたモデル細胞

吸光係数 (ϵ)、活性酸素の一種の一重項酸素の生成量子収率 (Φ_{Δ})、蛍光寿命 (τ_F) などがある。諸性質の詳細な説明は脚注 4 に示した。光不活性化に大きく関係する Φ_{Δ} が高いことが、リン・ポルフィリンの特徴である。これらの合成色素を使って、酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*)、ヒト胆管癌細胞 (NOZ) および大腸菌 (*Escherichia coli*) などのモデル細胞 (図 6) の光不活性化実験を行った。

5. 酵母菌の光不活性化実験

微生物の光不活性化実験は、L 字型反応管 (10 mL) に菌体懸濁液、色素 (1 または 2) の水溶液、および緩衝液を入れ、空気下で振とうしながら、蛍光灯で光照射を行う方法で行った (図 7)。20 分ごとに反応溶液からサンプル (0.1 mL) を採取して平面寒天培地 3 枚に塗布した。30 °C で 30 時間培養して出現するコロニー数を計測して、菌体数 (B) を求めた。光不活性化実験の詳細な方法は、脚注 5 に示す。反応時間 0 時間の菌体数 (B_0) に対する反応時間ごとの菌体数 (B) の割合を生菌率 ($100B/B_0$) とし、生菌率を反応時間に対してプロットして生菌曲線を作成した。生菌曲線の例を図 8 に示す。空気下での光照射によって、酵母菌の生菌率が減少している。一方でアルゴン下や非照射下では生菌率が減らず、酸素と光が必要なことを示している。異なる色素間で活性を比較するために最低有効濃度 ($[P]$) と半減期 ($T_{1/2}$) を用いて式 (1) で光殺菌活性 (A_F) を求めた。 $[P]$ が低いほど、または $T_{1/2}$ が短いほど色素の光殺菌活性が高いことを示している。

モデル細胞に酵母菌を用いた不活性化実験を、色素 1 を用いて行った。色素 1d (脚注参照、ブチル基 (炭素数 4) を持つ色素) を用いた酵母菌の生菌曲線 (図 8) では、 $T_{1/2}$ が 55 分、 $[P]$ が 50 nM と求められ、 A_F は $21.9 \mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$ と計算された。同様にしてアルキル基の長さの異なる色素 1 について酵母菌の光不活性化反応を行った。その結果、今まで報告されている色素に比べて、色素 1 の $[P]$ は極めて低濃度であるこ

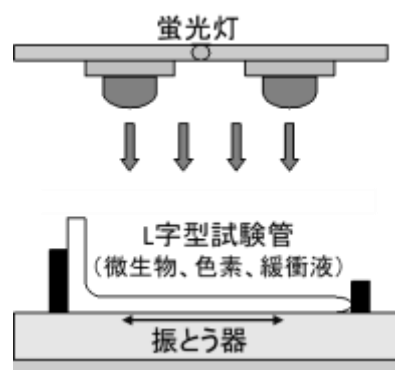


図 7. 光不活性化実験装置

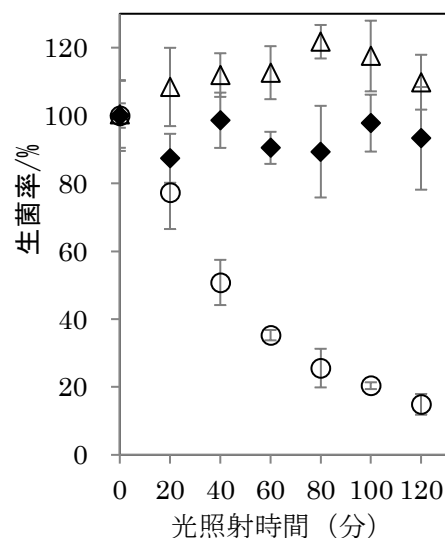


図 8. 色素 1d による酵母菌の可視光殺菌実験の生菌曲線。反応条件：空気下の光照射 (○)、アルゴン雰囲気下の光照射 (△)、空気下の非照射 (◆)

$$\text{生菌率 (\%)} = \frac{\text{照射後の菌体数 (B)}}{\text{照射前の菌体数 (B}_0\text{)}}$$

最低有効濃度[P] = 照射時間 20~120 分で、菌体濃度を初濃度の半分にできる色素の濃度

半減期 $T_{1/2}$ = 菌体濃度を初濃度の半分にするために要する時間 (単位 分)

$$\text{色素の光殺菌活性 } A_F = \frac{1}{T_{1/2} \times [P]} \quad (\text{単位 } M^{-1} h^{-1}) \quad \text{式 (1)}$$

とが分かった。酵母菌の細胞膜は疎水的であるので、疎水性の高いヘキシル基 (炭素数 6) を持つ色素 **1e** (脚注 3 参照) では、[P] は 5 nM と低濃度で活性を示した (Matsumoto・Shinbara・Tanimura 2011)。数ナノモルの低濃度の[P] を持つ色素の報告は殆どない。

また、ヒト血清アルブミン蛋白に色素 **1** を吸着して用いることで、[P]をより低減できることも見出した。図 9 に示すように、色素 **1** がヒト血清アルブミンと複合化することで、エンドサイトーシスによって酵母菌の細胞膜を通過しやすくなったと考えられる (Matsumoto・Kai・Yokoi 2016)。



図 9 エンドサイトーシス機構による色素の酵母菌体内への取り込み

6. 癌細胞の光不活性化反応

現在、光線力学療法用色素 (増感剤) として臨床的に実用化されている増感剤には、フォトフリンとレザフィリンがある (詳細は脚注 6 に記載)。フォトフリンはブタ血液由来のヘマトポルフィリンから作られる水溶性ポルフィリンであり、エキシマダイレーザーによる 630 nm 励起に対応している。レザフィリンは、生体組織の影響が最も少ない波長領域 (650~850 nm) にある 664 nm の長波長レーザーで励起できるクロリン骨格を有している。宮崎大学医学部七島篤志教授の研究グループは、胆管癌の治療に外科手術と併用してレザフィリンを用いた光線力学療法を活用している。

酵母菌に対して活性を持つ色素 **1c~1e** を用いたヒト胆管癌細胞の光不活性化実験を、七島研究室との共同で行った (Matsumoto・Suzuki・Yasuda 2017)。ヒト胆管癌細胞の不活性化反応は、光源に LED (発光ダイオード光源、発光極大 610 nm) を、反応容器には 96 穴マイクロ・プレートを用いた。反応装置を図 10 に示す。不活性化実験の詳細は脚注 7 に示すその結果、ヒト胆管癌細胞の光不活性化における **1c-1e** の半数阻害濃度 (IC₅₀)

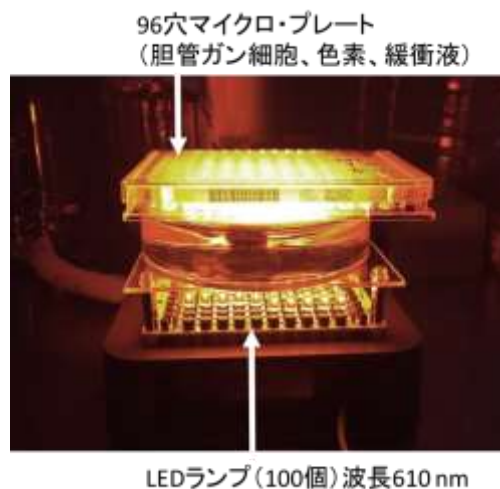


図 10. 癌細胞の光不活性化に用いた実験装置

は 33.7~55.5 nM と求められた。比較のために行った市販のレザフィリンを用いる不活性化では、 IC_{50} 値は 7.57 μ M と求められ、**1** の IC_{50} に比べて 100 倍以上高濃度であった。**1** の活性が極めて高いことを示している。また、HeLa 癌細胞 (脚注 8) に対する色素 **1c-1e** の IC_{50} も 27.8~37.7 nM と低い値となり、癌細胞全般に高い活性を持つことが示された。

このように、色素 **1** は、低濃度で高い活性を示すことが分かった。その理由として、色素 **1** の会合が抑制されていることが考えられている。会合とは、複数の分子が凝集して、水への溶解度が下げる現象を言う (脚注 9)。色素の水中の会合挙動は、表面張力および紫外可視吸収スペクトルの変化によって解析することができる。私たちの解析の結果、色素 **1** は 20 μ M まで会合を起こさず、光不活性化実験の濃度範囲では単量体として存在していることを明らかにした (Matsumoto・Tanimura・Shiragami 2012)。単量体として存在することで、一般の色素に比べて、水中での実効濃度が高くなると考えられる。色素 **1** は、正電荷を帯びているために正電荷同士の反発があり、軸配位子の立体障害で会合が起こりにくい構造となっていると思われる。一方、市販のレザフィリンは正電荷を持たず、立体障害のないために、会合しやすいと思われる。会合の抑制が、高い活性を持つ色素 (増感剤) の開発のための一つの指針となると思われる。

7. 大腸菌の光不活性化実験

大腸菌の光不活性化についても検討した。大腸菌などのグラム陰性菌の細胞膜は三層構造 (脚注 10) になっており、一般に薬剤耐性がある。そのために、効率よく大腸菌を殺菌できる増感剤は少ない。我々の実験においても、**1** を用いた光不活性化では大腸菌は死滅しないことが分かっている (Yasuda・Matsumoto・Matsumoto 2018)。一方、多価カチオン性ポルフィリンは DNA や蛋白などに対して高い親和性を持つことが知られている。三価カチオン性の色素 **2** が大腸菌体内に取り込まれることは、蛍光顕微鏡画像で確認することができる (図 11)。色素 **2** を用いた大腸菌の光不活性化を、酵母菌の光不活性化と同様の実験方法で行った (Matsumoto・Yasuda 2018)。アルキル基の炭素数を変化させて、 A_F を比較した結果、ヘプチル基 (炭素数 7、脚注 3 参照) を持つ色素 **2j** で A_F が最大となり、 $[P]$ は 400 nM と決定された。このことから多価カチオン性ポルフィリンを用いれば、大腸菌の光不活性化を行えることが分かった。しかし、色素 **2** は酵母菌やヒト胆管癌細胞に対しては、活性を示さなかった。このように、光不活性化には、細胞膜の性質によって、色素を使い分けることが必要となる。

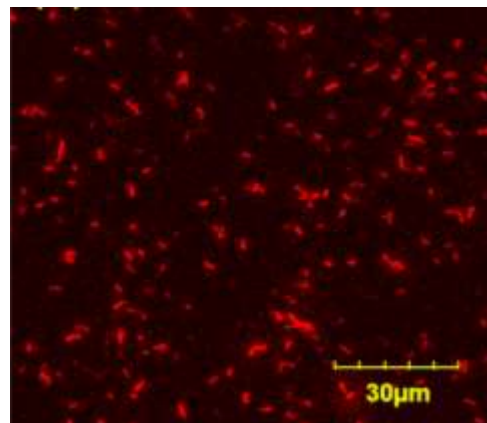


図 11、色素 **2** を大腸菌溶液に加えた時の蛍光顕微鏡画像：大腸菌内の色素からの蛍光が観測できる

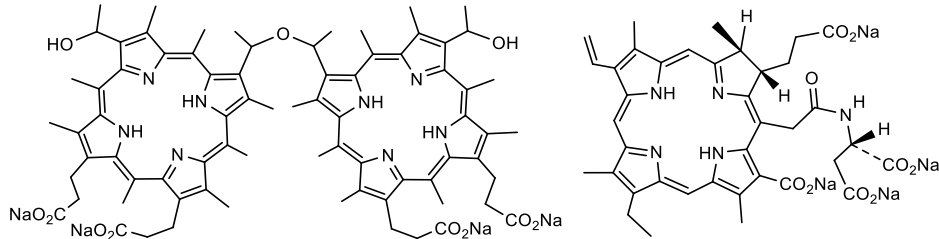
8. おわりに

開発したリン・ポルフィリンは、1) 軸配位子の導入によって水溶化が容易に行える、2) 軸配位子に疎水性基を容易に付与できる、3) 五価 P の配位によって励起状態での酸化力が強い、4) 多価カチオン錯体の合成が容易である、5) 軸配位子の立体効果および静電反発で会合が防げるなどの特徴がある (松本・保田 2018)。

ポルフィリン錯体は水に対する溶解性が低く、一般に水溶液中の反応には適さない。当初、我々はシリカゲルにポルフィリン錯体を吸着させた複合体を用いて、レジオネラ属菌や大腸菌の光不活性化をクーリングタワーや噴水などの生活環境場で行った。その結果、ポルフィリンは可視光殺菌効果を持つことが示された。そこで、リン・ポルフィリン錯体の軸配位子に水溶性の置換基を導入して水溶化し、細胞内での光不活性化

をL字型反応管に入れ、空気下で振とうしながら、発光極大波長 550 nm の蛍光灯（光強度 5.4 Wm^{-2} ）で光照射を行った。20 分ごとに反応溶液からサンプル(0.1 mL)を採取して平面寒天培地 3 枚に塗布した。遮光下 30°C で 30 時間培養して出現するコロニーを計測して菌体数 (B) を求めた。

脚注 6) 市販の光線力学用薬剤：フォトフリン (ファイザー株式会社、左) およびレザフィリン (Meiji Seika ファルマ株式会社、右)



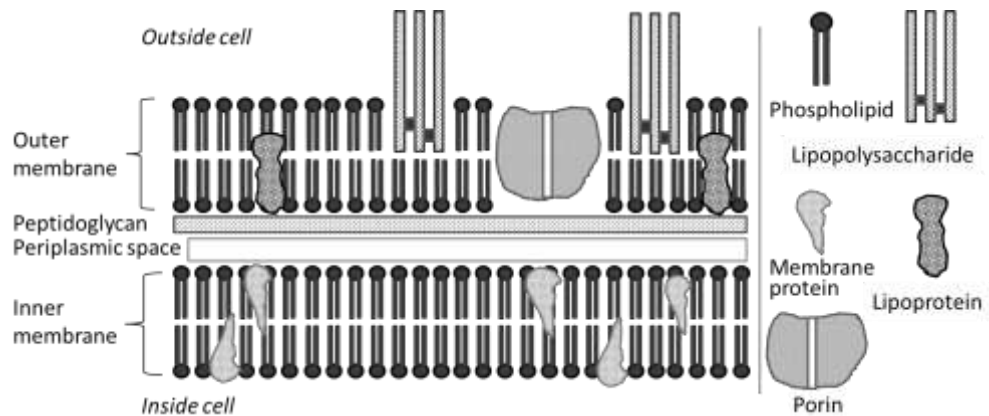
脚注 7) 癌細胞の光不活性化の実験方法：胆管癌細胞の DMEM 培養液 ($2000 \text{ cell well}^{-1}$, 0.1 mL)を各ウェルに入れ、 37°C 、5% CO_2 雰囲気下で 24 時間 培養した。培養液を、別途用意した色素 1 (0.1 mL、0~400 nM) を含む DMEM 培養液と交換し、さらに 24 時間培養して 1 を胆管癌細胞に取り込ませた。胆管癌細胞数は $10^4 \text{ cells well}^{-1}$ まで増殖した。DMEM 培養液を、1 を含まない DMEM 培養液と交換した。1 の吸収の長波長末端に近い 610 nm 光を、LED (発光ダイオード) 光源を用いてマイクロ・プレートの下から 30 分間光照射した。照射後 24 時間培養し、細胞数を MTT アッセイ法で測定した。

脚注 8) HeLa 細胞：1951 年に子宮頸癌で亡くなった 30 代黒人女性の腫瘍病変から分離され、株化された。この細胞の名称は、原患者氏名ヘンリエッタ・ラックスから命名された。以後、ヒト由来の最初の細胞株で、幅広く用いられている。

脚注 9) 色素 1 の水中での挙動：色素 1 では軸配位子の立体障害と正電荷反発によって会合が抑制されている。



脚注 10) 大腸菌の細胞膜構造の模式図：大腸菌の細胞膜は、外膜・細胞壁 (ペプチド・グルカン)・内膜の三層構造になっている。



文献

Fueda, Y. · Hashimoto, M. · Nobuhara, K. · Yokoi, H. · Komiya, Y. · Shiragami, T. · Matsumoto, J. · Kawano, K. · Suzuki, S. · Yasuda M. (2005). Visible-light bactericidal effect of silica gel-supported porphyrinatoantimony(V) catalyst on Legionella species occurring in the living environmental fields,

- Biocontrol Science*, 10, 55–60
- Matsumoto, J. · Shinbara, T. · Tanimura, S. · Matsumoto, T. · Shiragami, T. · Yokoi, H. · Nosaka, Y. · Okazaki, S. · Hirakawa, K. · Yasuda M. (2011). Water-soluble phosphorous porphyrins with high activity for visible light-assisted inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **218**, 178-184
- Matsumoto, J. · Tanimura, S. · Shiragami, T. · Yasuda M. (2012). Concentration-dependent aggregation of water-soluble phosphorous porphyrin in an aqueous solution, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **16**, 210-217
- Matsumoto, J. · Shiragami, T. · Hirakawa, K. · Yasuda M. (2015). Water-solubilization of P(V) and Sb(V) porphyrin and their photobiological application, *International J. Photoenergy*, Article ID 148964
- Matsumoto, J. · Kai Y. · Yokoi, H. · Yasuda M. (2016). Assistance of human serum albumin to photosensitized inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* with axially pyridinio-bonded P-porphyrins, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 161, 279-283
- Matsumoto, J. · Suzuki, K. · Yasuda, M. · Yamaguchi, Y. · Hishikawa, Y. · Imamura, N · Nanashima A. (2017). Photodynamic inactivation of human biliary cancer cell line using combination of phosphorus porphyrins and light emitting diode, *Bioorg. Med. Chem.*, 25, 6536-6541
- Matsumoto, J. · Yasuda M. (2018). Optimal alkylyridinium-bonded tricationic P-porphyrin in photodynamic inactivation of *Escherichia coli*, *Med. Chem. Res.*, 27, 1478–1484
- 松本 仁・保田昌秀 (2018). 会合しないポルフィリン：高機能 PDT 増感剤開発の指針、*有機合成化学協会誌*, 76, 566-574
- Shiragami, T. · Matsumoto, J. · Inoue, H. · Yasuda, M. (2005). Antimony porphyrin complexes as visible-light driven photocatalyst, *J. Photochem. Photobiol. C: Review*, **6**, 227-248
- 保田昌秀 · 白上努 · 松本仁(2011). 水溶性ポルフィリン及びその製造方法 (Water-soluble porphyrin and process for production thereof), 特許、特願2011-535418 国際出願番号PCT/JP, 2010/067530
- Yasuda, M. · Matsumoto, J. · Matsumoto, T. · Yasuda K. (2018). Drug resistance of *Escherichia coli* towards PDI sensitizers, *The Universe of Escherichia coli* Edited by Marjanca Starčić Erjavec, Chapter 7, 121-136, Intech Open