

# 光増感性色素の細胞への影響

寺嶋昌代 (自然科学)

## 1-1 光治療とは

光と色素を利用して、悪性の細胞や病変組織に対して損傷をもたらすことによって治療することを光治療という。光治療における光とは電磁波照射（赤外線、可視光線、紫外線(UV)）である。光治療は、光を吸収する色素として、生体に内在する生体分子を利用するものか、それとも人為的に外から与えたものを利用するものかに分けることができる。前者の例としては、新生児の高ビリルリン症(新生児黄だん)に対する光治療がある。ビリルピンは血色素ヘモグロビンの正常代謝産物で、胆汁の中に含まれる色素である。高ビリルピン症に対する光治療はビリルピンの自己光増感酸化反応におけるビリルピンの分解を利用する方法である。後者の例は、外から光増感性薬剤を与える場合である。そもそも光増感作用とは、化学反応において、反応物質に添加されたほかの物質(光増感剤)が、まず光

のエネルギーを吸収して励起され、つぎにこの励起エネルギーを反応物質に委譲して反応を起こさせることをいう。図1に、光増感剤が光のエネルギーを得て、励起一重項状態から励起三重項状態になり、酸素(基底三重項状態)にエネルギーを移動して活性酸素(励起一重項状態)を生じる機構を表した Jablonski ダイアグラムを示す。つまり、光増感性薬剤とは、光を照射されると励起状態というエネルギーの高い状態になり、その薬剤が局在する細胞や組織を損傷する性質のものである。このような、外から光増感性の薬剤を与えて光治療する方法の発展は、薬学における二つの大きな歴史的発見に基礎をおいている。それは、1) ソラーレン(psoralen) + UVA (近紫外線) と、2) 光力学的作用である。本稿では光治療に用いられる色素が、どのような機構で細胞に損傷を与えるのかを概観する。

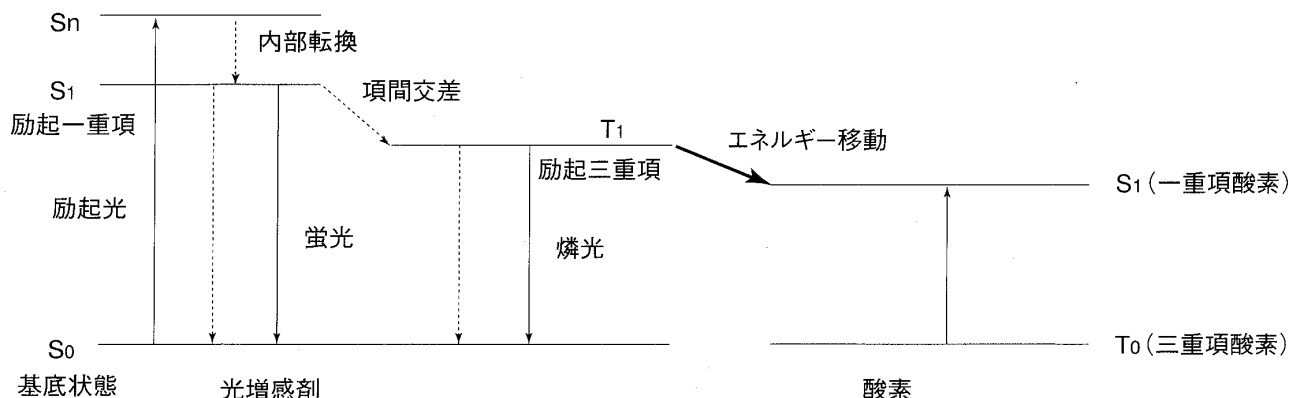


図1 光増感剤から酸素へのエネルギー移動のJablonskiダイアグラム

## 1-2 ソラーレン (psoralen) +UVA の作用

紫外線は太陽からくる光線のうち約6%を占め、可視光線(46%)、赤外線(48%)とともに生物と光の関わりの中でかなりの影響力をもっている。紫外線は電磁波としての波長が短いため、エネルギーが大きく、化学作用生理作用が強い。身近な現象としては日焼けの原因にもなっている。波長によって長いほうから、UVA(320-400nm)、UVB(290-320nm)、UVC(190-290nm)に分けられる。UVCはオゾン層で吸収され地表にはほとんど届かない。

ソラーレン(psoralen)(図2)とは、ある種の高等生物Ficus属やAngelica属の植物等に見い出されるヘテロ多環式化合物およびその天然誘導体と半人工的誘導体の一群の化合物の総称であり、8-メトキシソラーレン、4,5',8-トリメチルソラーレンなどがその仲間である。これらはウイルス、細菌、高等生物の培養細胞に光増感作用をもつ<sup>1)</sup>。ソラーレンは暗所でデオキシリボ核酸(DNA)と可逆的に結合し、UVAの照射によりDNAの相補鎖間架橋(interstrand crosslink)を形成し、致死的作用をしめす。一方、ソラーレンは褐色の皮膚をもった人々における白斑病に対する光治療薬として、すでに3500年以上前から、India-Egypt地方で用いられていた。ナイル流域に生育する植物Ammi majus Lなどから得た成分を注射等し、皮膚を太陽光にあてると、白い部分に色素が生成してくるのである。この反応はT細胞性白血病や他の病気の治療にも用いられている。

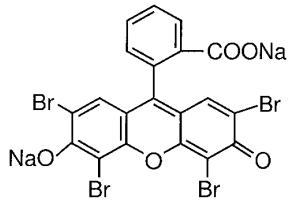
## 1-3 光力学的作用 (photodynamic action)

色素と酸素が生体内に同時に存在するとき、可視光(その色素の吸収する光)照射で生じる生体内分子の酸化作用により細胞障害が起こることを光力学的作用という。これは色素による光増感反応で生じる一重項酸素や酸素

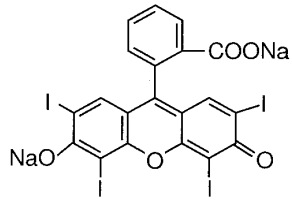
ラジカル(スーパーオキシドラジカル)によることが多い。紫外線よりエネルギーの弱い可視光を用いることができるため、適当な色素を組織にとりこませ、強力レーザーの細いビームで照射すれば、標的だけを選択的に不活性化できるので、癌の治療などに用いられる。ここで、光力学的作用発見の歴史を振り返ってみる。

1888年 Marccaci は植物のアルカロイドであるキニン(quinine)、シンコナミン(cinchonamine)が、暗黒中よりも光を当てた時の方が毒性が強くなることを発見した。しかし、このときは本質的重要性に気がつかなかった。1900年 Oscar Raab はアクリジン(acridine)の毒性がゾウリムシに対し、光の強度によって変わることを発見した。すなわち、暗条件では毒性でないくらいの低い濃度のアクリジンに、光をあてると直ちにゾウリムシを殺すことがわかった。同様の現象はキニン、メチルホスフィン(methyl phosphine)、エオシン(eosin)でも観察された。以降、アントラセン(anthracene)、テトラピロール(tetrapyrrole)であるクロロフィル(chlorophyll)、ヘマトポリフィリン(hematoporphyrin)、チアジン(thiazine)、キサントレン(xanthene)など、蛍光を出す光増感性色素が次々発見された。また、これらの色素は酵素や蛋白質、ウイルス、細菌、原生動物、真菌類、細胞、高等動物を光増感して損傷することがわかってきた。このような生体系における酸素を必要とする光増感反応を光力学的作用(photodynamic action)と呼んだ。フルオレセインのハロゲン化により、蛍光が減少し、光力学効果が増大することもみいだされた。1931年 Kautsky と deBruijn が、励起した色素分子から基底状態の酸素にエネルギーが移動することにより、一重項酸素が生じることを示唆した。現在では、光力学的作用は、type I の機構(励起三重項状態にある色素が基質と電子あるいは水素移動によって反応し、フリーラジカルを生じ、酸化生成物を生じる)か、type II の機構(色素の励起三重項のエネルギーが基底状態の酸素に移動

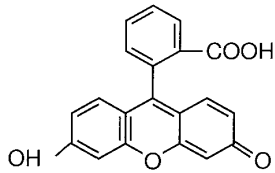
光増感性色素の細胞への影響



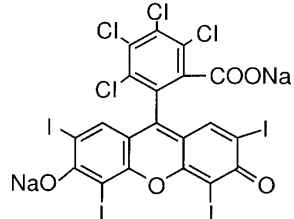
eosin Y



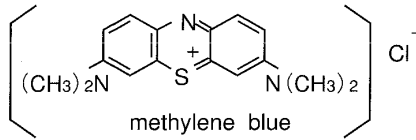
erythrosine B



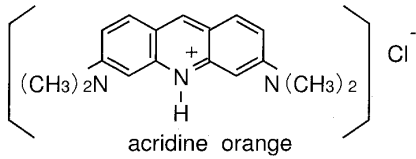
fluorescein



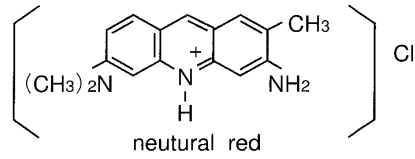
rose bengal



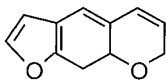
methylene blue



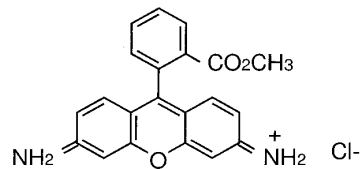
acridine orange



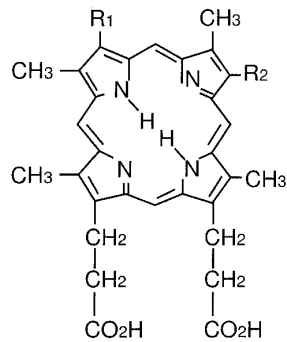
neutral red



psoralen



rhodamine 123



hematoporphyrin (Hp)  $R_1=R_2=-CHOH-CH_3$

protoporphyrin (PP)  $R_1=R_2=-CH=CH_3$

図2

し、活性な一重項酸素を生ずる)により、不飽和脂肪酸や、アミノ酸、蛋白質、核酸を酸化することによって、細胞に損傷を与えると考えられている。

この作用はすぐに医療に応用され、エオシン+光が皮膚疾患であるヘルペスや皮膚癌に適用された。1942年には、ヘマトポルフィリンがラットの移植癌に適用され、癌を壊死(necrosis、ネクロシス)に至らしめた。1960年代にはポルフィリンの癌細胞における局在と蛍光が研究され、ヘマトポルフィリン誘導体(HpD)が光増感剤として適用され、光学的治療(photodynamic therapy, PDT)として定着していった。また、レーザー照射と組み合わせることにより、病変組織のみを選択的に破壊し、回りの正常組織には損傷を与えないようにできるようになった。最近、フォトフリン(Photofrin, a mixture of oligometric porphyrins prepared from HPD, manufactured by QLT phototherapeutics)の使用が食道癌に対してUSA、フランス、オランダ、カナダ、日本で認可された(1995)。現在では、第二世代の光増感剤として、ベンゾポルフィリン(benzoporphyrin)誘導体やテキサフィリン(texaphyrin)、クロリン(chlorin)、パープリン(purpurin)、フタロシアニン(phthalocyanine)などが研究されるようになってきた。これ等の色素は癌治療だけでなく、ウイルス疾患の治療や、アテローム、皮膚病にも適用されている。

また、合成した光増感剤だけでなく、植物あるいは動物由来の光増感作用をもつ生体色素のヒペリシン(hypericin)<sup>2,3)</sup>、ヒポクレリンA(hypocrellin A)<sup>4)</sup>、ブレファリズミン(blepharismine)<sup>5,6)</sup>も注目されている。光照射の光源についても半導体レーザーの改善が進んでいる。

最近の話題として、プロトポルフィリンIX(protoporphyrin IX (PPIX))の代謝的前駆体である5-アミノレブリン酸(5-aminolevulinic acid(ALA))がある<sup>7)</sup>。ALAは癌細胞に局在化し、細胞内にとりこまれたのち、細胞内の

酵素で分解されPPIXになる。ALAはポルフィリン症というポルフィリンが体内に蓄積する病気や鉛毒の結果蓄積するヘム前駆体で、鉄に触媒されて活性酸素を生じ、その結果、脂質の過酸化やDNAの切断を導くと考えられている。前駆体を利用するもう一つの例をあげる。ローズベンガル(rose bengal)という色素は低濃度では陰イオンのため細胞の中にはならず、膜にとどまるといわれているが、アセチル化してローズベンガルアセテート(rose bengal acetate)にすると疎水性になり脂質二重層である細胞膜を通過しやすくなる<sup>8)</sup>。アセチル基は細胞内でカルボキシリックエステラーゼに認識されて分解し、もとのローズベンガルになる。このように前駆体を利用して、細胞への取り込みを多くするために色素をエステル化して細胞膜を透過しやすく色素の化学的誘導体を改良することが多く行なわれるようになった。このような色素の改良は、細胞に蛍光色素を取り込ませ、蛍光顕微鏡で観察する蛍光色素法に用いられる色素においても行われている<sup>9)</sup>。例えば、細胞のカルシウム量を指示する色素としてカルシウムのキレート剤であるエチレンジアミン四酢酸(EGTA)に発光基をつけたquin 2が作られたが、これは親水性で細胞膜を通過しないので、quin 2を細胞内に入れるためquin 2のアセトキシメチルエステルであるquin 2/AMが作られた。quin 2/AMは疎水性で細胞膜を通過して細胞質へ入るが、そこで細胞質に存在するエステル水解酵素によって加水分解されquin 2に戻る。こうして、quin 2を細胞内に封入することができる<sup>10)</sup>。このように、現在では多くの色素が合成、改良されている。

光増感性色素の中でも、光治療に適する色素とは、細胞に到達しうる長波長(600~700 nm)で励起され、励起三重項状態になりやすく活性酸素の収率が高く、細胞障害をおこしやすい標的に選択的に集まり、しかも回りの正常細胞の損傷などの副作用の少ない色素である。

## 2 光増感性色素の細胞への作用

### 2-1 光増感性色素の細胞内での局在

光増感性色素の細胞への作用を考える上でまず重要なことは、細胞のどの部分に色素が局在する傾向があるかということである。光増感性色素の毒性は主に一重項酸素と考えられている。一重項酸素の寿命は短いので色素の存在するほぼその付近 ( $0.1\mu\text{m}$ ) でしか酸化的作用を及ぼすことができない。そのため、色素の局在するその組織が光増感作用の標的として重要になる。色素の性質 (電荷、親媒性、大きさ等) によって、細胞のどの部分に局在するかが決まる。細胞障害をおこしやすい細胞の部分として、細胞膜、ミトコンドリア、リソソーム、核等がある。

細胞膜は基本的には脂質 (磷脂質) の二重膜構造と、その表面および内部に存在する種々の蛋白質から構成されている。その他にコレステロールや糖蛋白、糖脂質も膜の構成成分として存在する。細胞膜は細胞と外界との境界であり、その意味で外来色素の作用を最初に受ける場であり、標的になると考えられる。膜の構成成分である磷脂質に色素が取り込まれ、そこで光増感作用により活性酸素が生じると、ラジカル連鎖反応を介して過酸化脂質を生成する。脂質の過酸化は組織障害の原因となり、赤血球では溶血を生じる。また、膜の物質輸送に関わる蛋白質である  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATP}$  アーゼや  $\text{Ca}^{2+}\text{ATP}$  アーゼに作用し、その不活性化をもたらすと、膜の物質輸送や細胞膜の構築に影響し、細胞を損傷する。細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  量は通常低く保たれているが、活性酸素により、 $\text{Ca}^{2+}$  量が乱れると、細胞膜の水泡化 (blebbing) が観測されることがある。これは、 $\text{Ca}^{2+}$  動態の変化に関連した細胞骨格系の乱れ (アクチンの減少および高分子アクチン凝集物の生成) によっておこる現象と考えられている。

ミトコンドリアは細胞内の呼吸の場であり、細胞は呼吸により生じたエネルギーを利用して、正常な機能を営んでいる。従って、外来物質によるミトコンドリアの機能の障害は細胞の基本的働きの喪失につながる。ミトコンドリアは内外2枚の単位膜につつまれ、アデノシン三リン酸 (ATP) を生成する場である。ミトコンドリアの外膜にはコレステロールとフォスファチジルイノシトールが多く、カルディオリピンはない。外膜はポリリンとよばれる輸送蛋白質が脂質二重層を貫通して多数存在し、大型の親水性チャネルを形成し、分子量一万以下の分子は比較的よく通すルーズな膜である。内膜にはカルディオリピンという真核細胞では珍しい磷脂質が見られる。また、蛋白質含量が多く、蛋白質は疎水性のものが多く、内膜に埋没している。ATP合成系のATPアーゼ ( $\text{F}_1$ ) も内膜にある。内膜は  $\text{H}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  も通さない選択性の高い膜である。

リソソームは酸性加水分解酵素を含んだ単膜構造体である。これらの酵素はすべて酸性側に至適 pH をもっており、リソソーム膜が色素の光増感作用によって破壊されると、これらのリソソーム酵素が細胞質へ流れ込み、蛋白質、核酸、多糖質、脂質など細胞を構成しているすべての物質を分解してしまい、それによって細胞を損傷することになる。

核は細胞の分裂や生存にとって不可欠なもので、核には塩基性色素に染まりやすい染色質 (クロマチン) と呼ばれるものが細胞分裂時に観測される。クロマチンの化学的実体はDNA-蛋白質複合体であり、DNAの構造のなかに遺伝情報が含まれていることがわかっている。すなわち、核は遺伝情報の発現 (DNAから mRNA の合成、RNA の搬出)、遺伝情報の修復、遺伝情報の複製と分配、遺伝情報の組み替えなど細胞活動の指令塔としての重要な機能をもつ。光増感性色素が核に集まりそこでDNA切断などの損傷を与えれば、細胞にとって致命的損傷となる。

細胞のなかにおいて標的となりやすいこれらの部分にはどのような色素が集まりやすい

か、また、そこで色素の光増感作用は細胞機能にどのように影響するかを次にまとめた。

## 2-2 光増感性色素の膜への作用

細胞に色素を作用させたとき、最初に色素の影響を受けるのは細胞膜である。色素の細胞への取り込みは、まず、この細胞膜を通過するかが問題となる。色素は負電荷をもつアニオン性のものと、陽電荷をもつカチオン性のものに分けられる。このうち、アニオン性のものは膜非透過であるが、カチオン性のシアニン類は膜透過性といわれる。膜透過性のシアニン色素は膜電位の変化により、膜の内と外の存在量に変化する。膜電位をよりプラスに(脱分極)すると、プラス電荷の色素は膜の内から外に移動する。たとえば、 $\text{diS-C}_3^-$  (5) という色素は膜の内では凝集しているため、蛍光の消光がおこって非蛍光性であるが、膜の外側ではモノマーとして存在するので、強い蛍光を発する。このように、膜に局在する色素のなかで、膜電位測定用に用いられるものもある<sup>13)</sup>。

主に細胞膜の外側の溶媒に接する面に集まる色素としては、それ自体、負の電荷をもつ酸性色素のローズベンガル、エオシン、エリスロシンB (erythrosin B) などが考えられる。これらの色素は水溶性であることと、細胞の膜電位のために、膜のなかにあまり溶け込まず、外膜に集まるといわれている。しかし、著者は、エオシン、エリスロシンBなどに細胞質が良く染まることを観察しているし、これらの色素は生体染色色素としても使われていることから、かなり膜を通過していると考えられる。ローズベンガルについては、膜に作用するという報告が多くあるので、膜に集まる色素の代表はローズベンガルと考えてもよい。そこでローズベンガルの膜への作用をまとめてみる。

ローズベンガルはウイルス、グラム陽性(グラム染色法で、先に染めた色素の色調を示す細菌で、外層にリポ多糖を欠き、リゾチーム

に感受性大である。ブドウ球菌など) バクテリア、原生動物を光増感する<sup>12,13)</sup>。ローズベンガルをグラム陰性菌(グラム染色法で後染色の色を示し、細胞壁はうすく、外側にリポ多糖をもつ。この層をエチレンジアミン四酢酸(EDTA)で損傷させない限り、リゾチームには非感受性。大腸菌、サルモネラ菌、赤痢菌など)であるサルモネラ菌(*Salmonella typhimurium*)に作用させると、野性型のものはローズベンガルに感受性が低いが、リポ多糖を作れない株(TA1975)ではローズベンガルに感受性になった<sup>14)</sup>。外膜のリポ多糖は疎水性のバリアーになり、高分子も通さないし、低分子のアニオンや疎水性のものも通さない。ローズベンガルは水にとけて569nmの吸収極大をもつが、*n*-オクタノール(*n*-octanol)と水との分配係数は36.5で親油性でもある。分配係数とは、一定の温度、圧力のもとで、ある溶質が互いに混ざらない二つの液体に溶解し平衡に達したときの、各溶液中の濃度の比である。ローズベンガルの蛍光は、野性型の細胞に作用させた時は、水に溶けたときの蛍光と同じであるが、TA1975に作用させたときは脂質に溶けたときの蛍光であった。このことからみて、TA1975に作用させたときは、ローズベンガルは膜の中に入っていることがわかった。このように、膜に作用する色素の場合、細胞膜の構成成分によって光増感性色素に対する感受性が違うことはよく観られる現象である。ローズベンガルは $10^{-4}\text{M}$ の濃度では膜に局在し、そこで膜を光増感する。最近では、さらに非水性のローズベンガル誘導体のローズベンガルアセテート(無色)を作り、膜を通過させ、細胞質中でカルボキシリクエステラーゼで認識されて、分解され、もとの蛍光を発するローズベンガルに戻し、細胞の中で光増感させるということもおこなわれている<sup>8)</sup>。ローズベンガルはまた、平面の脂質黒膜中のグラミシジンAというイオンチャンネル蛋白を、可視光下で不活性化する作用もある<sup>15)</sup>。ローズベンガルの光増感作用で膜のコンダクタンスが2桁

減少する<sup>16)</sup>。これは、type I の光増感作用により、グラミシジンAのトリプトファン残基が酸化され、チャンネルのコンダクタンスを失わしめたためと考えられている。ローズベンガルはこのような細胞質膜電位を決めている蛋白質と結合し、カリウムイオンのリーク<sup>17,18)</sup>、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ ATPアーゼの不活性化をもたらす<sup>18)</sup>、細胞を損傷する。メロシアニン-540もローズベンガルと同じく、溶媒との界面の細胞膜に結合して<sup>19)</sup>、同様の光増感作用をするが、ローズベンガルのほうが作用が強い<sup>20)</sup>。

ローズベンガル、エリスロシンB、エオシンはフルオレセイン (fluorescein) という高い蛍光収率をもつ蛍光体の重原子置換体である。重原子効果により一重項-三重項間の項間交差が増加し、励起三重項状態の生成が増加して基底状態にある酸素へのエネルギー移動が増加し、活性な一重項酸素の収率が増大する。色素の励起三重項状態からの一重項酸素の量子収率はフルオレセインが0.03、エオシンが0.57、エリスロシンBが0.65、ローズベンガルが0.75 (水中) で、蛍光が減少するとともに一重項酸素の収率が増大して、光増感性が増す<sup>21)</sup>。これらは類似の膜局在性を示すと考えられるが、なかでもローズベンガルが一番作用が大きいと考えられる。しかし、エオシンは分子量が一番小さいため膜を通しやすいかもしれない。

フタロシアニン ( $\text{ZnPcS}_2$ ) による光増感作用により、マウスのでミエローマ細胞の細胞膜は脱分極し、カチオン全体の浸透性 (permeability) ( $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^+$ ) が増加し、 $\text{K}^+$ の選択性が失われることも報告されている。クロロアルミニウムフタロシアニンテトラサルフォネイトによる光増感作用によっても、赤血球においてカリウムイオンのリークがおこり、この際には極性のものとおす孔の形成が示唆されている<sup>22)</sup>。

メチレンブルー (methylene blue) は光増感作用により、ゾウリムシの  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを損傷し、 $\text{Ca}^{2+}$  を流入させ、続いて  $\text{Ca}^{2+}$  依

存の  $\text{K}^+$  チャンネルを損傷し、カリウムイオンのリークがおこり、細胞に致死的作用をする<sup>23,24)</sup>。

いずれの場合も、光増感作用により、膜電位の変化やイオンの選択的透過性に異常が生じている。

## 2-3 光増感性色素のミトコンドリアへの作用

癌細胞のミトコンドリアは正常細胞と比べて、ミトコンドリアの形態、膜成分やマトリックス成分も異なる。癌細胞のミトコンドリアは  $\text{Ca}^{2+}$  や他のカチオンを正常細胞と比べて多く保持している。癌細胞はエネルギー源としてグルコースをほとんど使わず、脂肪酸やアミノ酸を使う。このように、癌細胞は正常細胞と比べて、ミトコンドリアに大きな違いがあるので、特にミトコンドリアに集まる色素は光治療に有用性があると期待されている<sup>25)</sup>。癌の光治療あるいはマーカーとして光増感性色素を使用するとき、悪性の細胞だけに色素が選択的に取り込まれることが望ましいが、フルオレセイン、エオシン、テトラサイクリン、アクリジンオレンジなどは選択性がほとんどない。

しかし、ある種のポルフィリンは癌に選択的に集まる<sup>26)</sup>。これは、ミトコンドリアの高い膜電位によりカチオン性の色素が引き付けられるからである。ミトコンドリアではカチオン性色素が1万倍濃縮されるという。また、表在性のベンゾジアゼピン (benzodiazepine) レセプターサイトを経て、ミトコンドリアに結合することも考えられる。このレセプターはミトコンドリアの外膜にあるといわれる。さらに、ミトコンドリア内膜の負の電荷をもった磷脂質のカルディオリピンにカチオン性の色素がひきつけられることも考えられる。ポルフィリンが膜<sup>27)</sup>、細胞質を経てミトコンドリアに局在するには約24時間かかるといわれている<sup>28)</sup>。

1992年 Woodburn は15種のポルフィリンを  $\text{C}_6$  神経膠腫 (glioma cell) に作用させ、細胞

毒性、光毒性、細胞内局在を調べた<sup>29)</sup>。細胞毒性は2-オクタノール/水の分配係数に依存し、分配係数が大きいほど暗条件での毒性がつかった。光毒性は分配係数が10くらいのときが一番光毒性が強かった。光毒性の最も強いポルフィリンはすべてカチオン鎖をもち、ミトコンドリアに局在した。ローダミンの誘導体においても、正に帯電している Rh-123、Rh-6G、Rh-3B はミトコンドリアを特異的に染めることがわかった<sup>30)</sup>。Rh-123 は光増感作用により  $F_0F_1$  ATPase 錯体を破壊するという。電荷をもたないローダミンB、19、110、116や負の電荷をもつフルオレセインはミトコンドリアを染めない。Rh-123 は Rh-6G のような細胞毒性がほとんどないので、光治療にはより望ましい。Rh-123 は水溶液中ではイオンになっているが、電荷が分子の環状構造全体に非局在化しているので親油性 (lipophilic) である。そのため、細胞膜、ミトコンドリア膜、脳脊髄関門も通過する。

脳脊髄関門とは酸性色素のセルレクンSを動物に静注すると、すべての臓器が良く染色されたのに、脳のみ染色されないことから発見された、脳の強い選択機能のことである。これは脳の防御機能とも考えられる。脳の中枢神経のノイロンが物質の供給を受けるにはグリア細胞が介在することが原因と考えられている。

ヤヌスグリーンBもミトコンドリアにやや特異的に集まるが、暗条件下での細胞毒性があるため光治療に適しているとはいえない。ビクトリアブルー (victoria blue) もミトコンドリアに集まり、光増感作用を起こし、小胞体に存在するカルシウム結合性ストレス蛋白質 GRP78を誘導する<sup>31)</sup>。

#### 2-4 光増感性色素のリソソームへの作用

リソソームとは細胞小器官のひとつで、一枚のりん脂質二重膜で包まれ、加水分解酵素 (glycosidase, acid phosphatase, elastase, cathepsin, carboxypeptidase 等) を含む小胞である。

リソソームに集まる色素としてニュートラルレッド、アクリジンオレンジ、アントラセン、インドメタシン<sup>32,33)</sup> やアニオン鎖をもつポルフィリン<sup>29)</sup> がある。ニュートラルレッドは古くから植物細胞のリソソームに選択的にしかも能動的に吸収されることが知られている。ニュートラルレッドがリソソーム内に蓄積されるのはリソソームが酸性の細胞小器官 (オルガネラ) であることと関係がある。細胞膜を通過したニュートラルレッドは細胞質が pH7.4 付近の弱塩基性であるため、電荷を持たず、リソソーム膜を容易に通過する。リソソーム内に入ったニュートラルレッドはリソソーム内が pH5.5 付近の弱酸性であるため、プラスの電荷をもち、リソソーム膜を通過しにくくなり、リソソームに蓄積される<sup>34)</sup>。また、生きていた動物細胞によっても取りこまれ、リソソームに蓄積されることが知られている。

リソソームに局在した色素の光増感作用により、リソソーム膜の透過性が増し、リソソーム酵素が細胞質に流出することにより、細胞を損傷する。リソソームに集まる色素は膜透過性で中性か負の電荷をもっているものが多い。

#### 2-5 光増感性色素の核への作用

メチレンブルーの光増感反応における標的は核酸であることが M13 バクテリオファージによって確かめられている<sup>35,36)</sup>。メチレンブルーは DNA と結合し、光力学的作用によってウイルス等に損傷を与える。メチル化したメチレンブルーのウイルス不活性化の能力が調べられ、1、9-ジメチルメチレンブルーが最も核酸との親和性が高く、大きな一重項酸素の生成収率をもち、正常の赤血球に対する損傷を最小にしながら、著しいウイルスの不活性化の能力を持つことがわかった<sup>37)</sup>。メチレンブルーをメチル化して1、9-ジメチルメチレンブルーとすることにより、一重項酸素の生成収率は0.5から0.76へと上昇し、分配係数 (2-オクタノール/水) は0.11か



ら4.12へと上昇した。分配係数の上昇は、脂質二重層である膜に溶けやすく細胞内へのとりこみが大きくなることを意味している。しかも、この分配係数の値では、分配係数が大きすぎて膜の蛋白質や脂質に溶けすぎてかえってDNAとの結合性が減少することもない。このように、メチル化することによって核酸への結合が増加することは、ソラーレンにおいても観察されている。

メチレンブルーの光増感反応には一重項酸素が生成する機構によるものと、三重項の光増感剤が基質に直接に水素か電子を移動する酸素に依存しない機構があると考えられている。実際、酸素のない条件下でもメチレンブルーによるDNAの開裂が観測されている。

メチレンバイオレットも暗条件でDNAと共有結合し、可視光で照射されたとき、DNAに切れ目をいれる。メチレンバイオレットは電荷を持たないため、細胞内に浸透しやすく、細胞内のウイルスも不活性できる<sup>38)</sup>。

## 2-6 光増感性色素によるアポトーシス誘導

2-1から2-5までの光増感性色素の細胞への作用は一般にネクローシス(壊死)をもたらすものであるが、光増感作用により、アポトーシスが誘導される場合があることがわかった。アポトーシスとは細胞内のミトコンドリアなどの顆粒は無傷のまま、DNAと続いて核が断片化し、それを取り巻くように、アポトーシス小体が形成され、貧食細胞により貧食され、まわりに害を及ぼすことなく消滅する死に方である。アポトーシスにおいては、エンドヌクレアーゼが働くためオリゴヌクレオソームサイズのはしご状(ladder pattern)のDNAの断片化が、アガロースゲル電気泳動において観測される。また、最近では、アポトーシスの初期に、膜の脂質の構成成分の非対称性(外膜にはホスファチジルコリンやスフィンゴミエリンが多く、内膜にはホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルセリンが多い)が崩れ、外膜にホス

ファチジルセリンが出てくるのを、ホスファチジルセリンに特異的に結合するアネキシンV-フルオレセインと膜の破壊を検出するプロピディウムアイオダイドという色素を用い、フローサイトメトリーで蛍光を観測することによってもアポトーシスが検出できる。これらの方法によって、フタロシアニン(Pc4)の光増感作用により、マウスリンパ腫細胞やヒト白血病細胞において、ストレス誘起二次メッセンジャーであるセラミドが蓄積され、アポトーシスが誘導されることがわかった<sup>39)</sup>。光増感作用後10~30分でセラミドの蓄積がみられ、1時間後にはDNAのラダーが観測された。光増感作用により、ネクローシスに至るかアポトーシスが誘導されるかは、光増感性色素の細胞内局在位置や光増感性色素のドース、光の強さなどの実験条件によって違ってくる。一般的には、ミトコンドリアを標的にする光増感性色素で低ドース、比較的弱い光の時、アポトーシスになることが多いが、色素の種類によっても条件がちがってくる。膜が標的となったり、強い光のときは膜が損傷されネクローシスとなることが多い。

## 3 まとめ

以上、色々な色素の細胞内での局在の傾向と、そこにおける光増感作用の影響を概観した。主な色素の細胞内での局在を表1にまとめた。色素のもつ化学的性質が、細胞内での局在する位置や、作用機構に関連していることがわかった。今回中心的に扱った光増感性の色素は光治療に大きく貢献するし、光増感作用が少なく蛍光が強い色素は、細胞内の動態を共焦点レーザー顕微鏡を用いて研究するために、なくてはならないものになっている。光と色素の研究は生物学のみならず、写真や光ディスクなどの産業技術や医学、薬学、化学とも深い関係があり、レーザー光の技術革新と共に今後益々興味深い課題となっていくと思われる。

表1 色素の細胞内での局在

細胞内の色素の局在箇所	色素の種類
細胞膜	ローズベンガル、メロシアニン-540、トルイジンブルー、エオシン、エリスロシンBなど酸性染料、プリムリン、ヘペリシン、diS-C <sub>3</sub> -(5)
ミトコンドリア	ローダミン (123, 6G, 3B)、カチオン鎖をもつポルフィリン、ヘペリシン、テトラサイクリン、シアニン、キサンテン、チアジン、ビクトリアブルー、カルコゲナピリリウム、テトラメチルローザミン、nonyl-アクリジンオレンジ
リソソーム	ニュートラルレッド、アクリジンオレンジ、アントラセン、インドメタシン、アニオン鎖をもつポルフィリン、キニン、クロロキン、マパクリン
核	アクリフラビン、ヤヌスグリーンB、メチレンブルー、ヘペリシン、デオキシグアノシン、シアニン、アクリジンオレンジ、DAPI、エチジウムブロマイド、プロピディウムアイオダイド、アクチノマイシンD、ソラーレン

## References

- Spikes, J. D. (1997) *Photochem. Photobiol.* 65S, 142-147.
- Vandenbogaerde, A. L., E. M. Delaey, A. M. Vantieghem, B. E. Himpens, W. J. Merlevede and P. A. de Witte (1998) *Photochem. Photobiol.* 67, 119-125.
- Losi, A (1997) *Photochem. Photobiol.* 65, 791-801.
- Hirayama, J., K. Ikebuchi, H. Abe, K.-S. Kwon, Y. Ohnishi, M. Horiuchi, M. Shinagawa, K. Ikuta, N. Kamo and S. Sekiguchi (1997) *Photochem. Photobiol.* 66, 697-700.
- Giese, A. C., The photobiology of *Blepharisma*, in K. C. Smith (ed.), *Photochemical Photobiological Reviews*, Plenum, New York, 1981, pp.139-180.
- Checucci, G., F. Lenci and F. Ghetti (1991) *J. Photochem. Photobiol.* B11, 49-55.
- Wilson, B. C., M. Olivo and G. Singh (1997) *Photochem. Photobiol.* 65, 166-176.
- Bottiroli, G., A. C. Croce, P. Balzarini, D. Locatelli, P. Baglioni, P. Lo Nostro, M. Monici and R. Pratesi (1997) *Photochem. Photobiol.* 66, 374-383.
- Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Sixth Edition, Haugland, R. P., Molecular Probe (1996)
- カルシウムと細胞情報 小島至 羊土社
- 感光色素 速水正明 産業図書
- Joshi, P. C. and R. B. Misra (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 139, 79-84.
- Lozina-Lozinsky, L. K. (1979) *Acta Protozoologica.* 18, 609-628.
- Dahl, T. A., W. R. Midden and D. C. Neckers (1988) *Photochem. Photobiol.* 48, 607-612.
- Kunz, L., U. Zeidler, K. Haegele, M. Przybylski and G. Stark (1995) *Biochemistry* 34, 11895-11903.
- Strable, M. and G. Stark (1992) *Photochem. Photobiol.* 55, 461-463.
- Arriaga E., A. Frolov, M. Tarr and D. P. Valenzeno (1994) *Photochem. Photobiol.* 59, 637-642.
- Kochevar, I. E., J. Bouvier, M. Lynch and C.-W. Lin (1994) *Biochem. Biophys. Acta* 1196, 172-180.
- Fukuzawa, K., Y. Inokami, A. Tokumura, J. Terao and A. Suzuki (1998) *BioFactors.* 7, 31-40.
- Valenzeno, D. P., J. Trudgen, A. Hutzenbuhler and M. Milne (1987) *Photochem. Photobiol.* 46, 985-990.
- Valenzeno, D. P. and J. P. Pooler (1982) *Photochem. Photobiol.* 35, 343-350.
- Specht, K. G. and M. A. J. Rodgers (1991) *Biochem. Biophys. Acta* 1070, 60-68.
- Saitow F. and Y. Nakaoka (1996) *Photochem. Photobiol.* 63, 868-873.
- Saitow F. and Y. Nakaoka (1997) *Photochem. Photobiol.* 65, 902-907.
- Powers, S. K. (1987) *SPIE New Directions in Photodynamic Therapy.* 847, 74-89.
- Woodburn, K. W., N. J. Vardaxis, J. S. Hill, A. H. Kaya and D. R. Phillips (1991) *Photochem. Photobiol.* 54, 725-732.
- Strauss, W. S. L., R. Sailer, M. H. Gschwend, H. Emmert, R. Steiner and H. Schneckenburger (1998) *Photochem. Photobiol.* 67, 363-369.
- Salet, C. and G. Moreno (1990) *J. Photochem.*

- Photobiol. B5, 133-150.
- 29) Woodburn, K. W., N. J. Vardaxis, J. S. Hill, A. H. Kaye, J. A. Reiss and D. R. Phillips (1992) Photochem. Photobiol. 55, 697-704.
- 30) Johnson, L. V., M. L. Walsh and L. B. Chen (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 990-994.
- 31) Morgan J., J. E. Whitaker and A. R. Oseroff (1998) Photochem. Photobiol. 67, 155-164.
- 32) Allison, A. C. and M. R. Young (1964) Life Science, 3, 1407-1414.
- 33) Allison, A. C., I. A. Magnus and M. R. Young (1966) Nature, 209, 874-878.
- 34) 緑藻 *Microsterias pinnatifida* の細胞内へのニュートラルレッドの取り込み 江原恵 奈良女子大学修士論文
- 35) Abe, H., S. J. Wagner, M. Kuwabara, N. Kamo, K. Ikebuchi and S. Sekiguchi (1997) Photochem. Photobiol. 65, 873-876.
- 36) Abe, H., K. Ikebuchi, S. J. Wagner, M. Kuwabara, N. Kamo and S. Sekiguchi (1997) Photochem. Photobiol. 66, 204-208.
- 37) Wagner, S. J., A. Skripchenko, D. Robinette, J. W. Foley and L. Cincotta (1998) Photochem. Photobiol. 67, 343-349.
- 38) Morrison, H., T. Mohammad and R. Kurukulasuriya (1997) Photochem. Photobiol. 66, 245-252.
- 39) Separovic, D., K. J. Mann and N. L. Oleinick (1998) Photochem. Photobiol. 68, 101-109.