

博士学位論文要旨等の公表

学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条に基づき、当該博士の学位の授与に係る論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

氏名	白銀 玲
学位の種類	博士（理工学）
報告番号	甲第11号
学位授与の要件	学位規程第4条第2項該当
学位授与年月日	平成22年3月20日
学位論文題目	「光線力学的診断・治療用光感受性物質 Talaporfinの光物性と励起光の組織透過性 および細胞自家蛍光の研究」
論文審査委員	主査 教授 雀部 博之 委員 教授 川辺 豊 委員 教授 Olaf Karthaus 委員 准教授 李 黎明

学位論文要旨

光科学研究科 光科学専攻

氏名：白銀 玲

光線力学的診断・治療用光感受性物質 Talaporfin の光物性と励起光の組織透過性および細胞自家蛍光の研究

特定波長の光線の組み合わせによる腫瘍の光線力学的診断 (Photodynamic Diagnosis: PDD)・光線力学的治療 (Photodynamic Therapy: PDT) の研究が進んでいる。光感受性物質はその PDD・PDT で重要な役割を担うものであり、特に Talaporfin (ME2906、別名 NPe6) は第 2 世代の光感受性物質として、現在注目されている。PDD・PDT で使用する光感受性物質が血中を運ばれる際には、血清アルブミン (Human Serum Albumin: HSA) と結合し可溶性となって運ばれる。そこで本研究では光感受性物質 Talaporfin と HSA コンプレックス状態の特性を調べ、HSA 存在下の Talaporfin の光物性を明らかにした。実験では Talaporfin と HSA のリン酸塩緩衝溶液を調整し、モル比 1:1 で結合させた。モル比を保ったまま溶液の濃度を $1.00 \times 10^{-4} \text{M}$ から $1.95 \times 10^{-7} \text{M}$ の範囲で変えて励起、蛍光スペクトルを測定した。図 1 では Talaporfin-HSA コンプレックスの蛍光強度が、Talaporfin の濃度の関数として示してある。濃度 $5.00 \times 10^{-5} \text{M}$ 以下では実線と良く一致しており、Talaporfin-HSA コンプレックスは孤立した分子でないにもかかわらず、孤立分子のように振舞っていることを明らかにした。これは蛍光が孤立した Talaporfin 分子の最低一重項励起状態から基底状態に帰属できることを示唆される。また、Talaporfin-HSA コンプレックスでは Talaporfin 単体の場合と比較して蛍光強度が強くなることを確認された。比較のために極性が小さい溶媒 (エタノール) 中に溶かすとエタノール溶媒の方が Talaporfin の蛍光強度が強いことが明らかとなった。Talaporfin-HSA コンプレックスで Talaporfin 単体の場合よりも蛍光強度が強くなるのは、HSA 結合部位周辺のアミノ酸残基の性質あるいは Talaporfin を取り囲む HSA アミノ残基の性質により、Talaporfin が極性の小さい溶媒に溶解

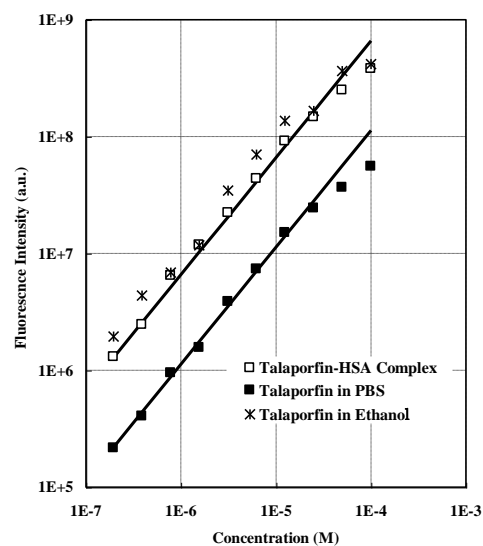


図1 濃度と蛍光強度の関係

したのと等価的に同じ状態になり、Talaporfin 分子中の分極が小さくなって蛍光強度が大きくなったものと考えられる。

PDT 用光源として使用されている連続波レーザーや ns パルスレーザーは、励起光が生体組織の深部に到達しないため、表在性の癌のみに適応となっている。光の照射で、より組織内に深達される励起光源の利用が望まれている。PDT 用光感受性物質 Talaporfin の長波長側の吸収波長である 664nm の励起光を用い、組織透過性の実験を行った。光源には、fs パルスレーザーとしてモード同期チタンサファイアレーザー、連続波のレーザーとして半導体レーザーを用いて、組織透過性の比較を行なった。豚の腿部のサンプルにおいて、fs パルスレーザーの平均出力が半導体レーザーの 3 分の 1 でも、同等の透過光強度が得られた(図 2)。

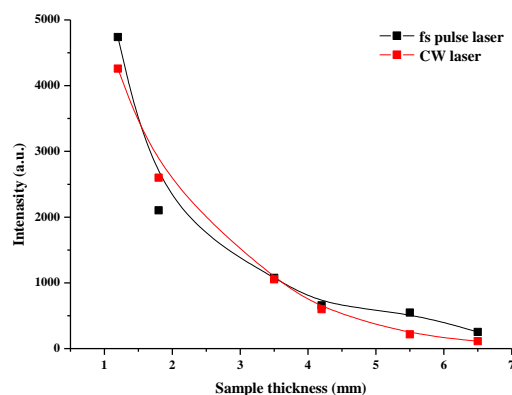


図 2 サンプルの厚さと透過光強度

一方、早期癌の診断法については、特定波長の光照射によって励起される腫瘍に特異的な自家蛍光を利用することも注目されているが、自家蛍光のメカニズム解明や細胞レベルの自家蛍光の研究は、ほとんど行なわれていない。我々は、レーザー照射による癌の新しい細胞診やスクリーニング法の確立を目指し研究を進めている。その基礎検討として、WKA ラット胎児由来線維芽細胞株 WFB 細胞と、これに H-ras 癌遺伝子を導入して形質転換した細胞株 W31 癌細胞を自家蛍光スペクトルにより、判別を行った。癌化した W31 癌細胞内のニコチンアミドアデニンヌクレオチド(NAD) 補酵素の還元型である NADH の蛍光強度が増大することを明らかにした(図 3)。癌化により NADH の量が増大したことが示唆される。また、赤外吸光法により波数 4000~500 cm^{-1} の範囲で赤外吸収スペクトルを得た。両細胞には波数 1635 cm^{-1} 付近にアミド I、波数 1548 cm^{-1} 付近にアミド II の赤外吸収が観測された(図 4)。特に 1500~900 cm^{-1} の範囲で両細胞の赤外吸収に大きな有意差のあった波数は、P=0 伸縮振動に帰属する 1234 cm^{-1} 、1172 cm^{-1} 、1083 cm^{-1} 、核酸あるいはリン酸化タンパク質の対称伸縮振動に帰属する 972 cm^{-1} の 4 つであった。また WFB 細胞では 1238.2 cm^{-1} に認められた吸収極大が、W31 癌細胞では 1234.4 cm^{-1} に認められ、癌化により吸収極大が約 4 cm^{-1} 変化した。これらの結果は、癌化により細胞内のリン酸化タンパク質が増加することに起因する。

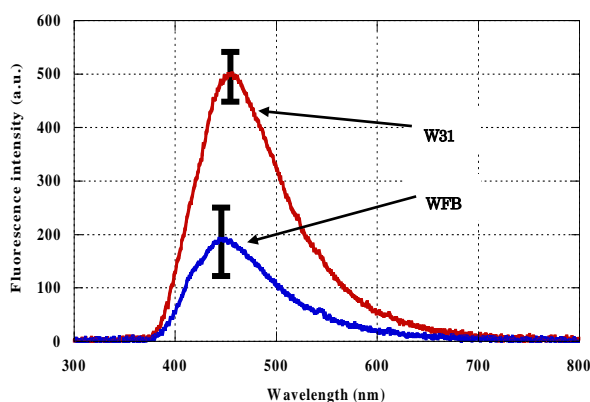


図 3 WFB と W31 の自家蛍光スペクトル

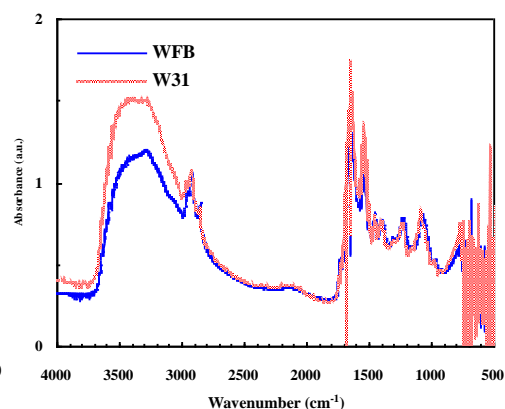


図 4 WFB と W31 の赤外吸収スペクトル

論文審査の結果の要旨

本研究は光線力学的診断(PDD)・治療(PDT)に関するシステマティックな研究であり、(1)通常使用される光感受性物質Talaporphinの光励起過程とその光物性及び癌細胞との相互作用、(2)励起用レーザー光の超短パルス加による組織深達度の評価、(3)光感受性物質を使用しない診断法としての細胞自家蛍光利用、に関して検討した。この研究成果の詳細を2010年2月9日の学位論文発表会(公聴会)において発表した。

(1)については、PDD/PDTで使用する光感受性物質が血中を運ばれる際には血清アルブミンHSAと結合し可溶性となることが必須であることから、TalaporphinとHSAコンプレックス状態の特性を光物性の観点から詳細に検討した。特筆すべき点は、Talaporphin単体でもPDD/PDTに有効な光感受性物質であるが、HASとコンプレックスを形成することによってさらに蛍光強度が増大することを見出した。その理由としてTalaporphinが極性の小さい溶媒に溶解したのと等価的状态となり、Talaporphin分子中の分極が小さくなるためであると推論した。

(2)については、PDT用光源として利用される連続波レーザーやナノ秒パルスレーザーは励起光が生体組織の深部に到達しないため表在性の癌のみに適用されている点に着目し、深達度を高めるためにはパルス幅の極めて小さいフェムト秒パルスレーザーの利用を検討した。豚の腿部のサンプルにおいて連続波の半導体レーザーに比べ、モード同期タンサファイアレーザー(フェムト秒レーザー)を用いると1/3の平均出力で同等の透過光強度を得られることを示した。

(3)については、早期癌の診断法としても期待されてはいるが自家蛍光のメカニズム解明や細胞レベルでの研究はほとんど行われていない現状を打破するものとして重要な成果を上げた。WKAラット胎児由来線維芽細胞株WFB細胞と、これにH-ras癌遺伝子を導入して形質転換した細胞株W31癌細胞について、両者の自家蛍光スペクトルを比較検討し、判別を行った。細胞の癌化に伴い、自家蛍光スペクトルの450nmにおけるピークは455nmにシフトするとともに蛍光強度も2.5倍程度増大する。線維芽細胞はニコチンアミドアデニンヌクレオチドNAD補酵素の還元型であるNADHを産出することから、450nmのピークはNADHに由来すると判断され、癌化によるNADH量の増大(蛍光強度の増大)、また細胞内のリン酸化タンパク質等の増大(ピークのシフト)がもたらされると推察した。

発表終了後の質疑応答では、①Talaporphinだけではなく他の光感受性物質の光物性についても言及すべきであった、②細胞の癌化はどのように行ったか、③(3)の位置づけが明確でない、等の質問・コメントがなされた。申請者はこれらの質疑に対して適切に説明することができた。

以上の結果により、本論文は千歳科学技術大学大学院学則第25条および千歳科学技術大学学位規定の定めるところにより、博士(理工学)の学位を授与するに十分との結論に達した。