

原著論文

クロリンによる細菌および赤血球の細胞膜機能の 光不活性化

加藤 久登^{1)*}, 駒越 圭子²⁾, 勝 孝³⁾, 片岡 洋行¹⁾
¹⁾ 就実大学薬学部, ²⁾ 岡山大学薬学部, ³⁾ 安田女子大学薬学部

Chlorin-induced photoinactivation of membrane functions of bacteria and erythrocytes

Hisato Kato^{1)*}, Keiko Komagoe²⁾, Takashi Katsu³⁾, Hiroyuki Kataoka¹⁾

¹⁾ School of Pharmacy, Shujitsu University

²⁾ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University

³⁾ Faculty of Pharmacy, Yasuda Women's University

(Received 28 October 2015; accepted 13 November 2015)

Abstract: We analyzed the photoinactivation of the membrane functions of bacteria and erythrocytes induced by chlorin e4, chlorin e6 and talaporfin sodium (Laserphyrin). These chlorins inhibited respiration of *Staphylococcus aureus* cells, induced the leakage of K⁺ from the cells, and dissipated the membrane potential, in the order of chlorin e4 > chlorin e6 > talaporfin sodium. The chlorins also induced the leakage of K⁺ from bovine erythrocytes and hemolysis, as well as inhibition to the enzyme acetylcholinesterase, which is located on the outer layer of the erythrocyte membrane, in the same order as that observed with bacteria. Furthermore, the degrees of photoinactivation of the membrane functions were closely associated with chlorin-induced morphological changes of bovine erythrocytes, forming a crenated form from the normal discoid, which are the indices of the amounts of accumulation of chlorins in the outer leaflet of the cytoplasmic membrane. Because the ability of chlorins to produce singlet oxygen was little varied one another, we concluded that the amount of chlorins, bound to the outer leaflet of the cell membrane, was the most important factor to cause the photoinactivation of the cell membrane functions.

Keywords: chlorin; photoinactivation; *Staphylococcus aureus*; bovine erythrocytes; electrochemical sensor

緒言

クロリン類は光増感剤としてはたつき、細胞を光不活性化させることが知られている¹⁻³⁾。細胞の光不活性化は、光増感反応により一重項酸素等の活性酸素種が生成し、脂質、タンパク質、核酸等の生体分子が酸化されるためであると考えられている⁴⁻⁷⁾。特に、タラポルフィンナトリウム（レザフィリン）は、癌に対する光線力学療法用剤として臨床応用されている³⁾。光増感剤を用いた光線力学療法は、光照射の範囲を限定することで、局所的に作用を発現することができる。そのため、一般的な抗癌剤と比較して重篤な副作用が少ないとされている^{8,9)}。また、光増感剤は細菌を光不活性化することも知られており、感染症治療への応用が期待されている¹⁰⁻¹³⁾。

しかし、光増感剤による細胞の光不活性化機構には未解明な部分が多い。我々は、これまで光増感剤としてカチオン性ポルフィリンおよびキサントゲン系色素を用い、細胞膜に対する作用に注目して光不活性化機構について検討してきた^{14,15)}。

細胞膜に対する作用の測定は、細菌の呼吸障害、膜透過性亢進、膜電位消失の観点から、それぞれ、酸素電極、 K^+ 電極、テトラフェニルホスホニウム（TPP⁺）電極を用いて測定した¹⁴⁻¹⁶⁾。これらの電気化学センサーを用いることで、細胞に光照射をしながら短時間の変化を観察することが可能であった¹⁴⁻¹⁶⁾。その結果、これらの光増感剤は、10

分間の光照射のうちに細菌細胞膜機能を不活性化させることが明らかとなった^{14,15)}。さらに、キサントゲン系色素についてはウシ赤血球に対しても溶血、 K^+ 流出および形態変化について検討した。この結果、キサントゲン系色素は、細菌と同様に赤血球に対しても短時間で K^+ 流出、溶血を引き起こした。また、形態変化の観察より、色素の細胞膜への取り込み量と光不活性化作用の強さとは、相関性があることを明らかにした¹⁵⁾。

本研究では、古くから注目されてきたクロリン¹⁻³⁾を用いて、より詳細な光不活性化機構の解明を目的に、細菌および赤血球への作用を検討した。クロリンとしては、クロリン e4、クロリン e6 およびタラポルフィンナトリウムを用いた（図1）。細菌として黄色ブドウ球菌を用い、生存率、膜機能障害について検討を行った。膜機能は、呼吸障害、 K^+ 流出、膜電位消失の観点から、電気化学センサーを用いて測定した。ウシ赤血球に対しては、溶血作用および K^+ 流出の測定に加えて、赤血球膜表層部に存在するアセチルコリンエステラーゼ（AChE）¹⁷⁾の阻害の測定により、詳細な作用部位の検討を行った。同時に、赤血球の形態変化からクロリンの細胞膜への取り込み量を検討した。さらに、クロリンの一重項酸素生成効率についても検討した。

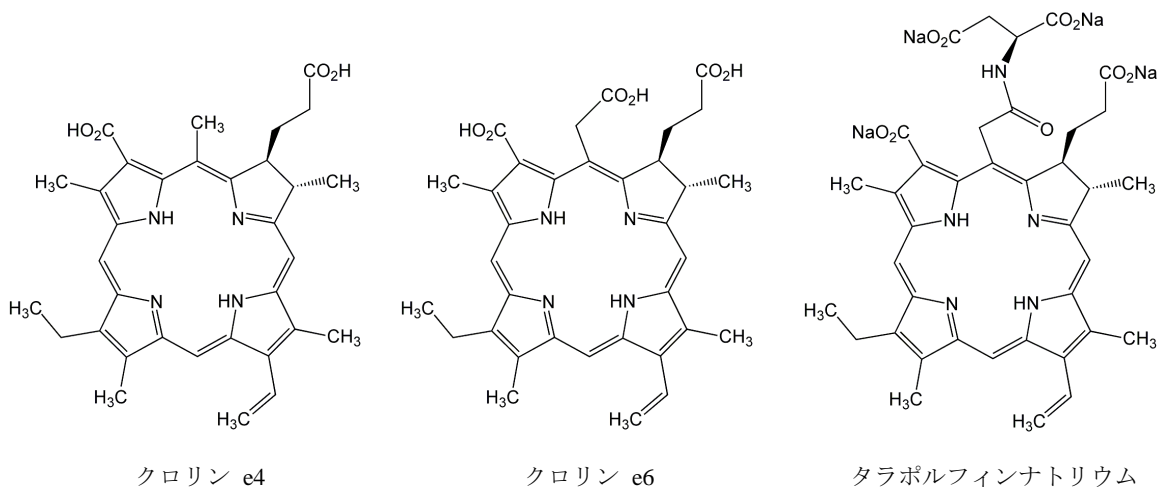


図1 クロリンの構造

方法

試薬

クロリン e4 およびクロリン e6 は Frontier Scientific (Logan, UT, USA) 製, タラポルフィンナトリウムは明治製菓 (東京) 製を使用した。

細菌の培養

黄色ブドウ球菌 (FDA 209P 株) を NB 培地 (1.5% peptone, 0.5% meat extract, 0.5% NaCl, 0.5% K_2HPO_4 含有) を用いて 37°C で振盪培養し, 対数増殖期の状態で使用した。

細菌の生存率の測定

L 型試験管内に, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 150 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 , pH 7.2) で, 菌濃度が 3×10^7 CFU mL^{-1} となるよう細菌を懸濁した。常温で, 全量が 6 mL となるようにクロリン (最終濃度 0.05 - 1 μM) を加えて 2 分間静置した後, オーバーヘッドプロジェクター (OHP; 400 W ハロゲンランプ) ^{14,15)} で 10 分間光照射した。この菌懸濁液を生理食塩水で, 1×10^2 倍または 1×10^4 倍に希釈し, 寒天培地 (1% polypepton, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar 含有) 上で, 37°C で一晩培養した。コロニーの計数より生存率を求めた ^{14,15)}。

細菌膜機能の測定

細菌膜機能として, 細菌が呼吸することによる溶存酸素消費, 細菌膜損傷による K^+ 流出および膜電位による TPP^+ 取り込みを, それぞれ酸素電極, K^+ 電極, TPP^+ 電極を用いて測定した ¹⁴⁻¹⁶⁾。

黄色ブドウ球菌は, 2×10^{10} CFU mL^{-1} となるように PBS 中に懸濁させ, 氷中に保存して 3 時間以内に使用した。

呼吸量の測定では, PBS に細菌を懸濁させクロリン (最終濃度 0.1 - 1 μM) を添加した後, シリコンゴムを用いて大気からの酸素の溶け込みが無くなるように酸素電極を固定した ^{14-16,18,19)}。マイクロシリンジを用いて sodium lactate (最終濃度

10 μM) を添加後 ^{14-16,20)}, プロジェクターランプ (1 kW タングステンランプ) ¹⁴⁻¹⁶⁾ で光照射しながら酸素消費量を 10 分間測定した。測定は 37°C の条件で行い, 検液の全量は 3.5 mL, 菌濃度は 2×10^8 CFU mL^{-1} とした。

K^+ 流出および膜電位の測定では, まず, sodium lactate (最終濃度 10 μM) を含む PBS に, 参照電極および, K^+ 電極または TPP^+ 電極 ¹⁴⁻¹⁶⁾ をセットした。膜電位の測定時はさらに TPP^+ (最終濃度 10 μM) を添加した。次に, 細菌を加えて 1 分後クロリン (最終濃度 0.1 - 1 μM) を添加し, さらに 1 分後, プロジェクターランプで 10 分間光照射しながら K^+ 濃度または TPP^+ 濃度を測定した。光照射後, melittin (最終濃度 10 μM) を添加し, K^+ 流出 100% または膜電位 0% を決定した ^{14-16,21,22)}。測定は 37°C の条件で行い, 検液の全量は 1 mL, 菌濃度は 1×10^9 CFU mL^{-1} とした。

ウシ赤血球の K^+ 流出および溶血活性の測定

L 型試験管にウシ赤血球をヘマトクリット値が 0.5% となるように PBS 中に懸濁し, クロリン (最終濃度 0.01 - 1 μM) を加え全量 6 mL とした。常温で 2 分間静置した後, OHP で 10 分間光照射を行った。この検液 1 mL を 1300 g で 5 分間遠心分離して上清を採取し, K^+ 流出率および溶血活性を測定した。 K^+ 流出率は K^+ 電極を用いて細菌の場合と同様に測定し, 溶血活性は 540 nm の吸光度から算出した ¹⁵⁾。100% の K^+ 流出および溶血活性の決定には, lysophosphatidylcholine (最終濃度 50 μM) を用いた ^{11,15,23,24)}。

ウシ赤血球の AChE 活性の測定

Worek らの方法を用いた ²⁵⁾。すなわち, K^+ 流出率および溶血活性の測定と同様に光照射した検液 300 μL を採取し, 0.1% tritonX-100 および 0.3 mM 5,5'-dithiobias (2-nitrobenzoic acid) を含む PBS に添加して全量 3 mL とした。37°C で 15 分間振盪培養した後, 最終濃度 500 μM になるように acetylthiocholine を加えた。生成した

5-thio-2-nitrobenzoic acidの増加速度を吸光度(436 nm)より追跡し、AChE活性を算出した。

ウシ赤血球の形態変化の観察

ウシ赤血球をヘマトクリット値が0.5%となるようPBSで懸濁した。クロリン(最終濃度0.05-1 μM)を加えて、10分間37°Cで振盪培養した。検液100 μLを採取し、1/30 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄(pH 7.4)に溶解した2% glutaraldehyde 100 μLと混和した。赤血球の形態は、光学顕微鏡により観察した^{15,24,26}。

一重項酸素生成効率の測定

一重項酸素による2-amino-3-hydroxypyridine(AHP)の減少量を吸光度法により測定した^{14,15,27}。すなわち、クロリン(最終濃度1 μM)とAHP(最終濃度200 μM)をPBSに溶解し、プロジェクターランプで1分間照射した照射前後のAHPの吸光度(318 nm)の差から一重項酸素生成効率を求めた。

結果

クロリンによる細菌膜機能に対する作用

クロリンの作用濃度を決定するため、黄色ブドウ球菌に対して生存率の測定を行った(図2)。

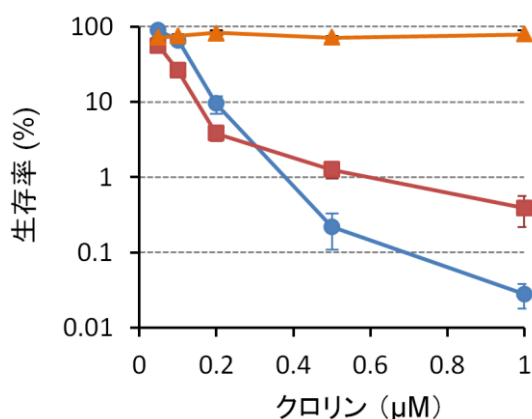


図2 黄色ブドウ球菌の生存率

クロリン e4 (●), クロリン e6 (■), タラポルフィンナトリウム (▲)存在下で、菌懸濁液(3×10⁷ CFU mL⁻¹)に常温で10分間照射した。各値は平均値 ± 標準偏差 (n=3) で表している。

クロリン e4, クロリン e6は1 μMで黄色ブドウ球菌の生存率を1%未満まで低下させた。一方、タラポルフィンナトリウムは1 μMでの黄色ブドウ球菌の生存率は79 ± 10% (n=3)であった。

そこで、1 μMの濃度において黄色ブドウ球菌に対する膜機能障害を、呼吸障害、膜透過性変化、膜電位消失の観点から検討した。すなわち、酸素消費抑制、K⁺流出、TPP⁺取り込み抑制を、それぞれ酸素電極、K⁺電極、TPP⁺電極を用いて測定した。図3は黄色ブドウ球菌の各膜機能のクロリンによる経時変化を示している。黄色ブドウ球菌はsodium lactateの添加により呼吸を開始し²⁰、酸素を消費するが、クロリン e4 およびクロリン e6 存在下では照射により、約2分で黄色ブドウ球菌の酸素消費量が減少し始め、呼吸障害を引き起こすことがわかった(図3a)。また、同じ時間でK⁺流出を引き起こすことが示され(図3b)、クロリン e4 およびクロリン e6 は呼吸障害および膜透過性増大を同時に引き起こすことがわかった。また、TPP⁺電極による測定から、膜電位も短時間で消失することが明らかとなった(図3c)。図4はクロリンによる黄色ブドウ球菌に対する膜機能障害の濃度依存性を示している。クロリン e4 およびクロリン e6 は低濃度より各膜機能に対し作用を示すことがわかる。膜機能損傷は、生存率の低下と相関性を示した。照射なしの条件では、いずれのクロリンも黄色ブドウ球菌に対して作用を示さなかった。

クロリンによるウシ赤血球膜機能に対する作用

次に、赤血球膜に対する作用を検討した。すなわち、細菌膜と赤血球膜からのK⁺流出率を比較するとともに、溶血活性および赤血球膜表層部に存在するAChE¹⁷⁾の障害を測定した。図5はクロリンによるウシ赤血球膜機能障害の濃度依存性を示している。クロリン e4 およびクロリン e6 は細菌に対する作用と同様に、低濃度よりK⁺流出を示した(図5a)。さらに、より高濃度では溶血を引き起こした(図5b)。一方、タラポルフィ

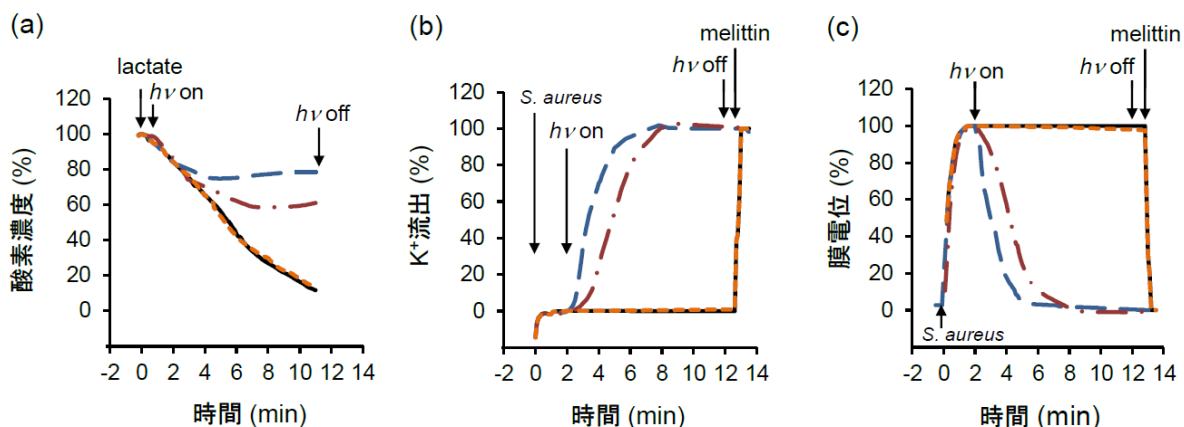


図3 クロリンによる黄色ブドウ球菌の (a) 呼吸, (b) K^+ 流出, (c) 膜電位の経時変化
 コントロール (—), クロリン e4 (- -), クロリン e6 (- · -), タラポルフィンナトリウム (- - -). 呼吸 (a) は, PBS に菌懸濁液 (最終菌濃度 2×10^8 CFU mL⁻¹) およびクロリン (最終濃度 $1 \mu\text{M}$) を添加して測定した. 最初の矢印は sodium lactate (最終濃度 $10 \mu\text{M}$) の添加を示す. 二番目および三番目の矢印は光照射の開始および終了を示す. K^+ 流出および 膜電位 (b および c) は, sodium lactate (最終濃度 $10 \mu\text{M}$) を含む PBS に菌懸濁液 (最終菌濃度 1×10^9 CFU mL⁻¹) およびクロリン (最終濃度 $1 \mu\text{M}$) を添加して測定した. 膜電位の測定時はさらに TPPCl (最終濃度 $10 \mu\text{M}$) を添加した. 最初の矢印は菌懸濁液の添加を示す. (b) では細菌から流出する K^+ により K^+ 濃度が上昇し, (c) では細菌の膜電位に依存して細菌内に TPP^+ が取り込まれる. 二番目および三番目の矢印は光照射の開始および終了を示す. 四番目の矢印において melittin (最終濃度 $10 \mu\text{M}$) を添加し, 黄色ブドウ球菌の細胞膜を破壊した. 測定は 37°C の条件で行った.

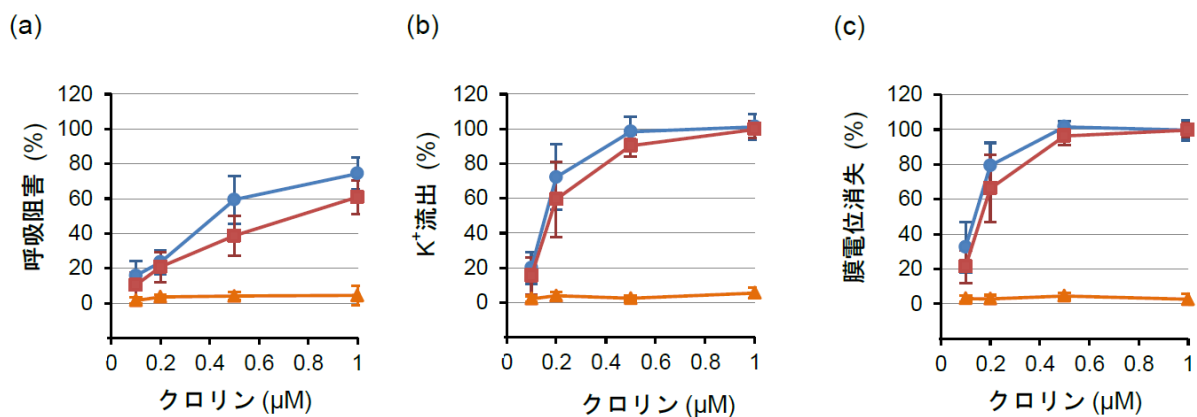


図4 クロリンによる黄色ブドウ球菌の (a) 呼吸阻害, (b) K^+ 流出, (c) 膜電位消失の濃度依存性
 クロリン e4 (●), クロリン e6 (■), タラポルフィンナトリウム (▲)存在下で, 菌懸濁液 (呼吸阻害: 2×10^8 CFU mL⁻¹, K^+ 流出および膜電位消失: 1×10^9 CFU mL⁻¹) に 37°C で 10 分間光照射した. 各値は平均値 \pm 標準偏差 ($n=3$) で表している.

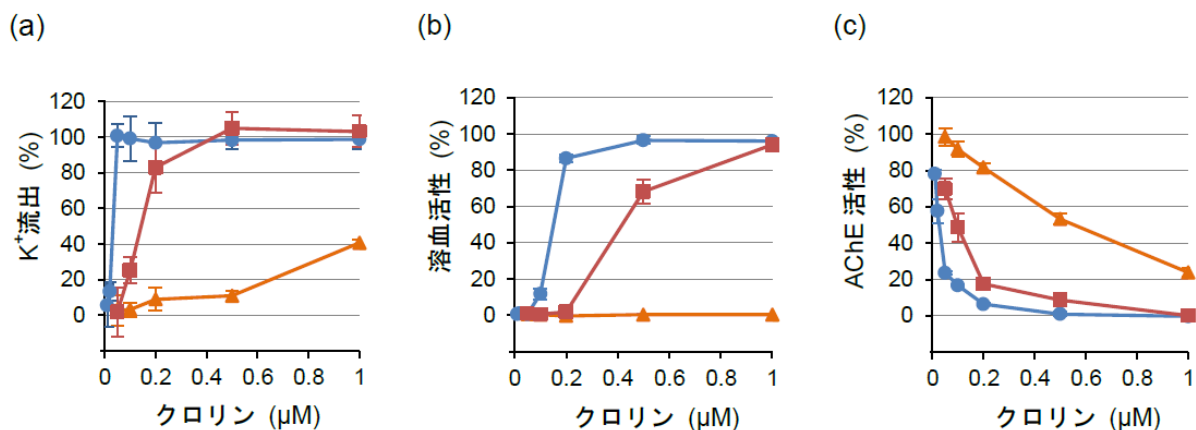


図5 クロリンによるウシ赤血球の (a) K⁺ 流出, (b)溶血活性, (c) AChE 阻害の濃度依存性
 クロリン e4 (●), クロリン e6 (■), タラポルフィンナトリウム (▲)存在下でウシ赤血球 (0.5%ヘマトクリット) に常温で10分間光照射した. 各値は平均値 ± 標準偏差 (n = 3) で表している.

ンナトリウムは1 μMで, K⁺を41 ± 2% (n = 3) 流出させたが, 溶血活性はみられなかった. クロリンはAChE活性の阻害も引き起こした. クロリン e4およびクロリン e6では強い阻害を示したが, タラポルフィンナトリウムによる阻害は1 μMで24 ± 3% (n = 3) までであった (図5c). 光照射しない場合, クロリンによるウシ赤血球に対する作用はみられなかった.

クロリンによるウシ赤血球の形態変化

物質が赤血球膜の脂質二重層に取り込まれると, その存在場所や取り込み量によって赤血球の形態が変化する²⁸⁾. 本研究ではウシ赤血球の形態変化の顕微鏡写真を示したものである. これらの結果より, 光不活性化作用の強いクロリン e4およびクロリン e6ではエキノサイト型への大きな形態変化が観測された. 図7はクロリン各濃度におけるウシ赤血球の形態変化を4段階で評価した結果を示している^{15,29)}.

クロリンによる一重項酸素の生成効率

クロリンが光不活性化作用を示すためには, 一

重項酸素の生成が必要である^{4,7)}. クロリンの一重項酸素の生成効率を, AHPをプローブとして測定した^{14,15,27)}. クロリンのPBS溶液中の一重項酸素の生成効率を測定すると, 表1に示すような結果となった. 一重項酸素の生成効率は, クロリン e4を基準とした. 各クロリン間で, 一重項酸素の生成効率に大きな差はみられなかった.

表1 クロリンの一重項酸素生成効率

クロリン ^{a)}	一重項酸素生成効率 ^{b)}
クロリン e4	1.00 ± 0.02
クロリン e6	0.96 ± 0.03
タラポルフィンナトリウム	1.12 ± 0.05

^{a)}濃度 1 μM; ^{b)}クロリン e4を基準として平均値 ± 標準偏差 (n = 3) で示している.

考察

クロリンは, 光照射により細菌を不活性化させることが知られている^{1,2)}. 細菌の光不活性化は短時間で引き起こされる^{14,15)}ことより, 作用点が細胞膜であることが予想される. 細菌の細胞質膜に存在する呼吸鎖や膜脂質が, 光増感反応で生成した一重項酸素により損傷を受けると, 電子伝達系の阻害や膜透過性亢進を引き起こし, その結果, 膜電位が消失すると考えられる^{4-7,30)}. 本研究で

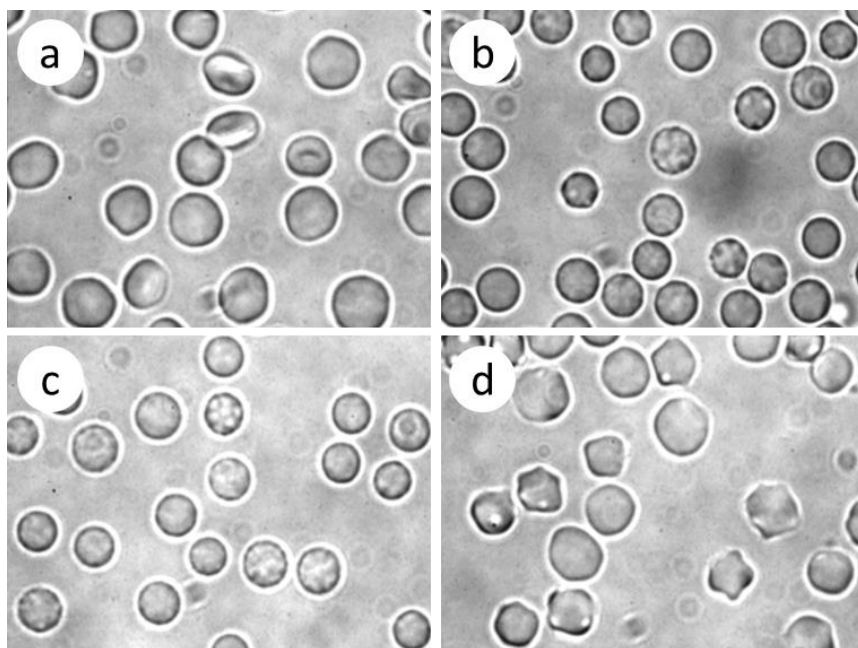


図6 クロリンによるウシ赤血球形態変化の顕微鏡写真

(a)正常細胞. (b) クロリン e4, (c) クロリン e6, (d) タラポルフィンナトリウム存在下(1 μM)でウシ赤血球 (0.5%ヘマトクリット) を 37°Cで 10 分間振盪培養した.

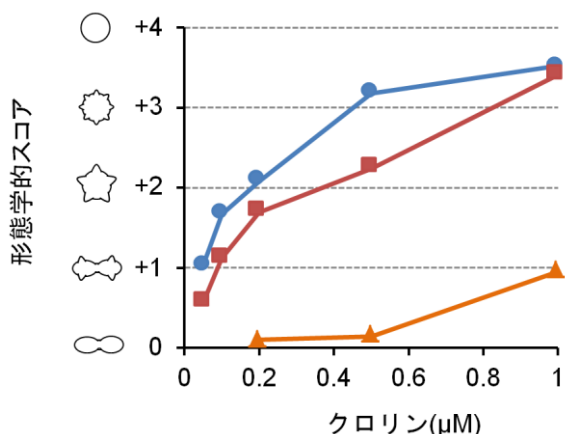


図7 クロリンによるウシ赤血球形態変化の濃度依存性

クロリン e4 (●), クロリン e6 (■), タラポルフィンナトリウム (▲)存在下でウシ赤血球 (0.5%ヘマトクリット)を 37°Cで 10 分間振盪培養した.

は, 黄色ブドウ球菌に対し電気化学センサーを用いて, 呼吸障害, K⁺流出および膜電位消失を測定し, 抗菌作用と膜機能障害の相関性を検討した.

黄色ブドウ球菌に対して, クロリン e4 およびクロリン e6 は, 1 μM で強い抗菌作用を示し, 同濃度において, 呼吸障害および膜透過性亢進を引

き起こした. さらに, これらのクロリンは光照射後, 数分のうちに膜電位を 100%消失させた. 一方で, タラポルフィンナトリウムは抗菌作用, 膜機能障害ともにほとんど示さなかった. 実験結果より, 黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用および膜機能障害の強さは, いずれもクロリン e4>クロリン e6>>タラポルフィンナトリウムの順番となり, 作用の強さには相関性が確認された. すなわち, クロリン e4 やクロリン e6 による黄色ブドウ球菌の光不活性化は, 呼吸障害や膜透過性亢進による膜電位の消失に起因すると考えられる.

さらに, 細胞膜に対する作用を詳細に検討するため, ウシ赤血球を用いて K⁺流出, 溶血活性, AChE 障害を測定した. クロリンにより膜脂質等が損傷を受ければ, 細胞内部の K⁺が流出する. また, 損傷の程度が大きければ溶血を引き起こすと考えられる. 同時に, AChE の活性を測定することで, 細胞膜表層部に対する作用を検討した.

クロリン e4 およびクロリン e6 はウシ赤血球に対して, 低濃度より強い K⁺流出や, AChE 障害を示し, 表層部等をはじめとした細胞膜に損傷を与

えることが明らかとなった。さらに高濃度では溶血活性も示し、強い膜損傷がみられた。一方で、タラポルフィンナトリウムは K^+ 流出率が約 40% であり AChE 活性を約 24% まで低下させたが、溶血活性はみられず、光不活性化作用は比較的弱いことが示された。クロリンの赤血球に対する作用の強さは、いずれもクロリン e4 > クロリン e6 >> タラポルフィンナトリウムの順番となり、黄色ブドウ球菌と同様の傾向を示した。

このように、クロリンは黄色ブドウ球菌およびウシ赤血球の細胞膜に対して光不活性化作用を示した。一般に、光増感剤が光不活性化作用を引き起こすためには、一重項酸素の生成が必要である⁴⁷⁾。一重項酸素は、脂質やタンパク質を酸化する強い能力をもつものの、その寿命は非常に短いため⁹⁾、細胞膜を効率よく不活性化させるためには、より多くのクロリンが膜に取り込まれることが重要であると考えられる。すなわち、光増感剤による細胞の光不活性化作用の強さを決定する要因として、一重項酸素の生成効率および光増感剤の細胞への取り込み量の 2 つが挙げられる。

本研究で用いたクロリン間では、一重項酸素の生成効率に大きな差はみられなかった。すなわち、一重項酸素の生成効率の差が光不活性化作用の強さの差に影響を与えていないといえる。

続いて、赤血球の形態変化の観察によりクロリンの細胞への取り込み量を推測したところ、抗菌作用の強いクロリン e4 およびクロリン e6 は、10 分間で効率よく細胞質膜に取り込まれていたが、抗菌作用の弱いタラポルフィンナトリウムは取り込みが小さいことがわかった。従って、クロリンによる光不活性化作用の強さと赤血球形態変化の傾向にはよい相関性が得られたといえる。また、クロリンは、赤血球をエキノサイト型に変形させたことから主に脂質二重層の外層部分に多く取り込まれていると考えられる²⁹⁾。

以上より、赤血球に対して、脂質二重層の外層部分に主に存在するクロリンは、光増感反応により一重項酸素を生成することで、AChE 阻害に

示されるように、細胞膜表層部を中心とした膜機能に損傷を与えると考えられ、膜脂質等の酸化により溶血に至ることが示唆された。細菌膜に対しても同様の機構で膜機能を光不活性化すると推測される。また、タラポルフィンナトリウムは光線力学療法用剤として、癌に対して臨床応用されているが³⁾、今回の結果から、細菌や赤血球に対する光不活性化作用は弱いことが明らかとなった。

結論

光増感作用をもつクロリンは、細胞膜の表層部に主に取り込まれ、生成された一重項酸素が膜機能に損傷を与え、細胞を死に至らしめることが明らかとなった。さらに、光不活性化作用の強さはクロリンの細胞膜への取り込み量に依存しており、赤血球の形態変化が光不活性化作用の強さを評価する良い指標になることが示された。

謝辞

本研究は JSPS 科研費 25460036 の助成を受けたものです。本研究において、ご協力をいただいた中西由佳氏に感謝いたします。

引用文献

- 1) Spikes J.D.: New trends in photobiology: chlorins as photosensitizers in biology and medicine., *J. Photochem. Photobiol. B*, 6, 259-274 (1990).
- 2) Western A., Moan J.: Action spectra for photoinactivation of cells in the presence of tetra-(3-Hydroxyphenyl)porphyrin, chlorin e6 and aluminium phthalocyanine tetrasulphonate., *Light Biol. Med.*, 1, 85-89 (1988).
- 3) Horimatsu T., Muto M., Yoda Y., Yano T., Ezoe Y., Miyamoto S., Chiba T.: Tissue damage in the canine normal esophagus by photoactivation with talaporfin sodium (Laserphyrin): a preclinical study., *Plos One*, 7, e38308 (2012).
- 4) Jori G., Brown S.B.: Photosensitized inactivation

- of microorganisms., *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3, 403-405 (2004).
- 5) Chakraborti A.S.: Interaction of porphyrins with heme proteins—a brief review., *Molecul. Cell. Biochem.*, 253, 49-54 (2003)
- 6) Stark G.: Functional consequences of oxidative damage., *J. Memb. Biol.*, 205, 1-16 (2005).
- 7) Chekulayeva L.V., Shevchuk I.N., Chekulayev V.A., Ilmarinen K.: Hydrogen peroxide, superoxide, and hydroxyl radicals are involved in the phototoxic action of hematoporphyrin derivative against tumor cells., *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 25, 51-77 (2006).
- 8) Sharman W.M., Allen C.M., van Lier J.E.: Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications., *Drug Discov. Today*, 4, 507-517 (1999).
- 9) Berg K., Selbo P.K., Weyergang A., Dietze A., Prasmickaite L., Bonsted A., Engesaeter B.Ø., Angellpetersen E., Warloe T., Frandsen N., Høgset A.: Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications., *J. Microsc.*, 218, 133-147 (2005).
- 10) Hamblin M.R., Hasan T.: Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3, 436-450 (2004).
- 11) Maisch T.: Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future?, *Lasers Med. Sci.*, 22, 83-91 (2007).
- 12) Dai T., Huang Y., Hamblin M.R.: Photodynamic therapy for localized infections—state of the art., *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 6, 170-188 (2009).
- 13) Kharkwal G.B., Sharma S.K., Huang Y., Dai T., Hamblin M.R.: Photodynamic therapy for infections: clinical applications., *Laser Surg. Med.*, 43, 755-767 (2011).
- 14) Komagoe K., Kato H., Inoue T., Katsu T.: Continuous real-time monitoring of cationic porphyrin-induced photodynamic inactivation of bacterial membrane functions using electrochemical sensors., *Photochem. Photobiol. Sci.*, 10, 1181-1188 (2011).
- 15) Kato H., Komagoe K., Nakanishi Y., Inoue T., Katsu T.: Xanthene dyes induce membrane permeabilization of bacteria and erythrocytes by photoinactivation., *Photochem. Photobiol.*, 88, 423-431 (2012).
- 16) Kato H., Komagoe K., Inoue T., Katsu T.: *In situ* monitoring of photodynamic inactivation of the membrane functions of bacteria using electrochemical sensors., *Anal. Sci.*, 26, 1019-1021 (2010).
- 17) Igisu H., Matsumura H., Matsuoka M.: Acetylcholinesterase in the erythrocyte membrane., *J. UOEH*, 16, 253-262 (1994).
- 18) Komagoe K., Takeuchi H., Katsu T.: Oxygen electrode as a new tool to evaluate hydroxyl radical-scavenging ability., *Sens. Actuators, B*, 134, 516-520 (2008).
- 19) Komagoe K., Takeuchi H., Inoue T., Katsu T.: Application of an oxygen electrode to evaluate superoxide anion-scavenging ability., *Anal. Sci.*, 26, 903-906 (2010).
- 20) Tsuchiya T., Rosen B.P.: Respiratory control in *Escherichia coli*., *FEBS Lett.*, 120, 128-130 (1980).
- 21) Katsu T., Nakashima K.: Simultaneous determination of changes in the permeability of two different liposomes mimicking bacterial and eukaryotic cellmembranes using ion-selective electrodes., *Analyst.*, 124, 883-886 (1999).
- 22) Ohmizo C., Yata M., Katsu T.: Bacterial cytoplasmic membrane permeability assay using ion-selective electrodes., *J. Microbiol. Methods*, 59, 173-179 (2004).
- 23) Collier H.B.: Factors affecting the hemolytic action of "lysolecithin" upon rabbit erythrocytes.,

- J. Gen. Physiol.*, 35, 617-628 (1993).
- 24) Katsu T., Nakao S., Iwanaga S.: Mode of action of an antimicrobial peptide, tachyplesin I, on biomembranes., *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 178-181 (1993).
- 25) Worek F., Mast U., Kiderlen D., Diepold C., Eyer P.: Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood., *Clin. Chim. Acta*, 288, 73-90 (1999).
- 26) Nakao S., Komagoe K., Inoue T., Katsu T.: Comparative study of the membrane-permeabilizing activities of mastoparans and related histamine-releasing agents in bacteria, erythrocytes, and mast cells., *Biochem. Biophys. Acta*, 1808,490-497 (2011).
- 27) Amat-Guerri F., Pajares A., Gianotti J., Haggi E., Stettler G., Bertolotti S., Miskoski S., Garcia N.A.: Singlet molecular oxygen-mediated photooxidation of 2-substituted 3-hydroxypyridines., *J. Photochem. Photobiol. A*, 126, 59-64 (1999).
- 28) Sheetz M.P., Singer S.J.: Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 4457-4461 (1974).
- 29) Fujii T., Saito T., Tamura A., Wakatsuki M., Kanaho Y.: Shape changes of human erythrocytes induced by various amphipathic drugs acting on the membrane of the intact cells., *Biochem. Pharmacol.*, 28, 613-620 (1979).
- 30) Vedel F., Lalanne É., Sabar M., Chétrit P., Paepe R.De: The mitochondrial respiratory chain and ATP synthase complexes: composition, structure and mutational studies., *Plant Physiol. Biochem.*, 37, 629-643 (1999).