

博士論文

光増感剤による細菌および赤血球の膜機能の 光不活性化機構の解析

平成 28 年 3 月

就実大学大学院医療薬学研究科

疾病治療薬学専攻 病態解析診断薬学分野

加藤 久登

目次

第1章 諸言

1.1 光増感剤について	1
1.2 クロリン類について	4
1.3 キサンテン系色素について	6
1.4 研究の目的と論文の構成	8

第2章 細菌に対する光増感剤の作用

2.1 序論	9
2.2 電極法について	11
2.2.1 酸素電極	11
2.2.2 K^+ 電極・ TPP^+ 電極	11
2.2.3 検量線の作成	14
2.3 方法	15
2.3.1 試薬および試液の調整	15
2.3.2 細菌の培養	15
2.3.3 細菌の生存率の測定	15
2.3.4 細菌膜機能の測定	17
2.4 結果	19
2.4.1 生存率の測定	19
2.4.2 呼吸阻害	21
2.4.3 K^+ 流出	23
2.4.4 膜電位	25
2.4.5 光増感剤による膜機能変化の濃度依存性	27
2.5 考察	31

第3章 赤血球に対する光増感剤の作用

3.1 序論	34
3.2 溶血活性の測定について	35
3.3 方法	37
3.3.1 試薬および試液の調整	37
3.3.2 ウシ赤血球	37
3.3.3 ウシ赤血球の K^+ 流出および溶血活性の測定	37
3.4 結果	38
3.4.1 K^+ 流出の測定	38
3.4.2 溶血活性の測定	40
3.5 考察	42

第4章 光増感剤による赤血球の形態変化	
4.1 序論	43
4.2 赤血球の形態変化について	43
4.3 方法	46
4.3.1 試薬および試液の調整	46
4.3.2 ウシ赤血球	46
4.3.3 形態変化の観察	46
4.4 結果	46
4.5 考察	51
第5章 光増感剤による一重項酸素の生成効率	
5.1 序論	52
5.2 方法	52
5.2.1 試薬および試液の調整	52
5.2.2 一重項酸素生成効率の測定	52
5.3 結果	55
5.4 考察	56
総括	57
発表論文目録	62
参考文献	63
謝辞	69

略語

本論文で使用した略語を以下に示す。

AHP	2-Amino-3-hydroxypyridine
BEHS	Bis(2-ethylhexyl) sebacate
CFU	Colony forming unit
DMSO	Dimethyl sulfoxide
NaHFPB	Sodium tetrakis[3,5-bis(2-methoxyhexafluoro-2-propyl)-phenyl]borate
NaTFPB	Sodium tetrakis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]borate
OHP	Overhead projector
PBS	Phosphate buffered saline
PDT	Photodynamic therapy
PVC	Poly(vinyl chloride)
THF	Tetrahydrofuran
TPP ⁺	Tetraphenylphosphonium
TPPCL	Tetraphenylphosphonium chloride

第1章 諸言

1.1 光増感剤について

色素は主に可視光領域に吸収波長をもち、物質に色を与える性質をもつ。古来より色素は日常生活をはじめ様々な用途で使用されてきた。また、ポルフィリンをはじめとした色素は、生体内においても重要な役割を担っている。これら色素の中には光増感剤としてはたらき、光照射することで細胞を不活性化させるものがあることが知られている^{1),2)}。

光増感剤は、光の吸収により得たエネルギーや電子を他の分子等に移すことで反応を引き起こす物質であり、その反応機構は次の通りである³⁾⁻⁷⁾。

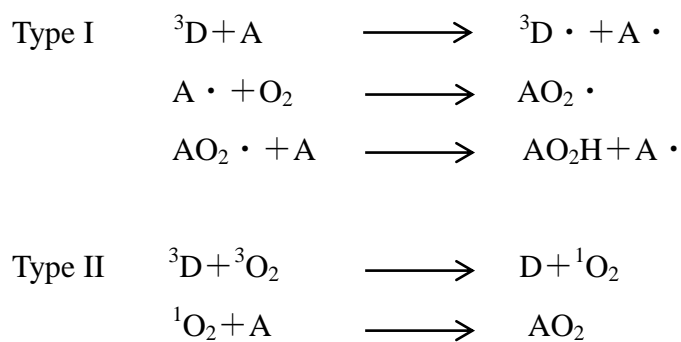
基底状態にある光増感剤の分子は光エネルギーを吸収すると励起一重項状態となる。その後、項間交差を経て励起三重項状態へと遷移する。この励起三重項状態の分子が、酸素をはじめとした基質と反応する。この一連の反応は、光増感反応と呼ばれる。光増感反応は、励起三重項状態の光増感剤と基質との反応機構により2つのタイプに分けられている。

一つ目は、電子移動を伴う機構であり Type I と呼ばれる。すなわち、励起三重項状態の分子が基質から水素原子を引き抜きラジカル化させ、ラジカル化した基質と酸素が反応するとスーパーオキシドを生成し、ラジカル連鎖反応を引き起こす。

二つ目は、エネルギー移動を伴う機構であり Type II と呼ばれる。すなわち、励起三重項状態の分子が、酸素へエネルギーを移動させることで一重項酸素を生成し、一重項酸素が他の基質と反応する。

Type I と Type II の反応様式を以下に示す。基底状態の光増感剤を D, 励起一重項状態の光増感剤を ¹D, 励起三重項状態の光増感剤を ³D と示す。また、基質を A として示す。





光増感剤による細胞の光不活性化は、主に **Type II** の機構により生成した一重項酸素が、細胞に存在する脂質、タンパク質、核酸等の生体分子を酸化することで細胞死に至ると考えられている⁴⁾⁻⁹⁾。図 1-1 は光増感剤による細胞の光不活性化機構の概略図を示している。

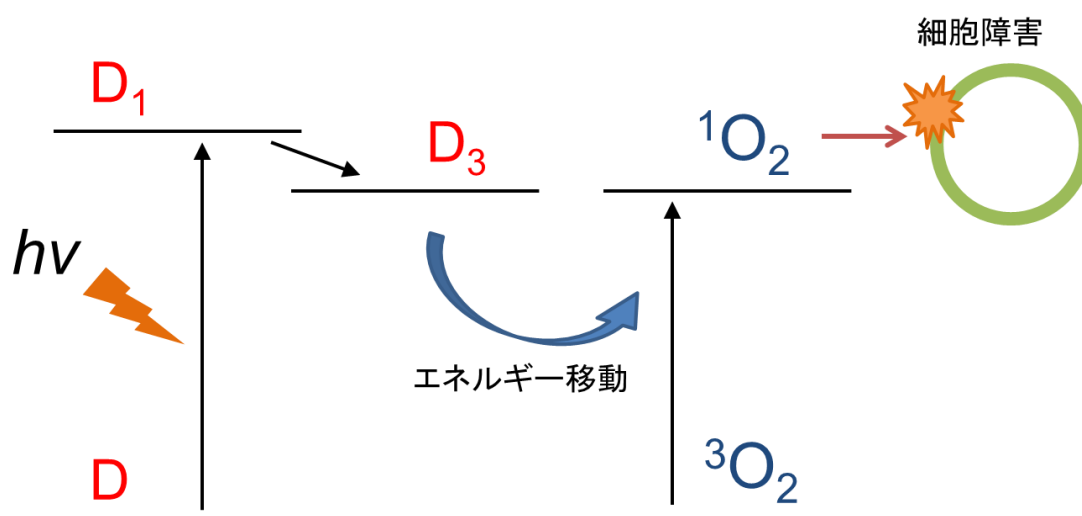


図 1-1 光増感剤による細胞の光不活性化機構

光増感剤による光不活性化作用は、古くはポルフィリン症の原因として知られてきた。ポルフィリン症は、ヘムの生合成経路の異常により起こる疾病である。中間代謝物であるポルフィリンが体内に蓄積し、可視光線が当たることによって皮膚障害等が引き起こされる¹⁰⁾。そして近年では、この光不活性化作用が注目されるようになり、光増感剤は医療へと利用され始めている^{11), 12)}。特に、光増感剤は癌に対する光線力学療法 (PDT) へ応用されている。光増感剤は前述の通り、光照射することではじめて作用を発現するため、光照射の範囲や光量の調節により作用範囲や作用強度を制限することができる。このため、通常細胞への影響を抑えることが可能であり、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¹¹⁾⁻¹⁴⁾。PDT に対する第一世代の光増感剤としてポルフィリンの重合体であるヘマトポルフィリン誘導体やポルフィマーナトリウムが開発された。これらの光増感剤は癌に対して効果が認められたものの、癌細胞に対する選択性が悪く、また、体内に数週間残存するため光線過敏症がおこるなどの問題点が存在した。そこで、第二世代の光増感剤としてタラポルフィンナトリウムやベルテポルフィンが開発された。これらの光増感剤は、分子を修飾することで標的細胞への移行性を高め、さらに体内への残存時間を短縮することができ、第一世代の光増感剤の問題点を改善している。現在日本国内においては、第一世代であるポルフィマーナトリウム (商品名フォトフリン) および第二世代であるタラポルフィンナトリウム (商品名レザフィリン)、ベルテポルフィン (商品名ビスダイン) が医療用医薬品として認可されており、癌や加齢黄斑変性などに対する PDT に臨床応用されている¹¹⁾⁻¹³⁾。

さらに、光増感剤は、細菌を光不活性化することも知られている¹⁵⁾⁻¹⁶⁾。今日、耐性菌の出現により従来の抗生物質だけでなく、新たな抗生物質の開発や治療法の確立が求められている¹⁷⁾⁻¹⁹⁾。光増感剤による抗菌作用は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌をはじめとした耐性菌に対して抗菌作用を示すことが確認されている¹⁷⁾⁻¹⁹⁾。現在、光増感剤による光不活性化作用は、新たな治療法として感染症治療への臨床応用が研究されている¹⁷⁾⁻²⁶⁾。例として、Wilson はトルイジンブルーが、歯周病や歯根感染症に対して有効であることを見出した²⁴⁾。また、Dai らは、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の皮膚感染症モデルマウスに対して、クロリン e6 が効果を示すことを明らかにした。²⁵⁾

光増感剤としてはたらく色素の中には、古くからポルフィリン骨格をもつものが知られている²⁷⁻²⁹⁾が、その他にポルフィリン骨格と類似したクロリン骨格をもつもの³⁰⁾⁻³³⁾や、食用色素としても使用されるキサントゲン系色素^{1), 34)-37)}など様々なものが存在する。本章ではクロリン類およびキサントゲン系色素について記述する。

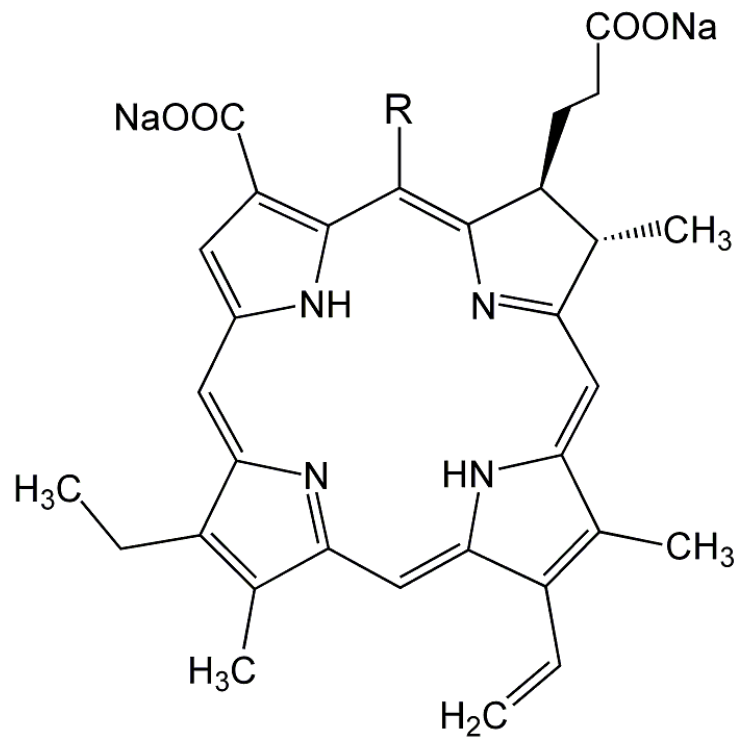
1.2 クロリン類について

クロリンは図 1-2 に示すように、3つのピロールと1つのピロリンが4つのメチン基により繋がった環状の骨格をもつ化合物である。クロリン骨格はポルフィリン骨格と似た構造をしている。ポルフィリンが主に動物内のヘムやシトクロム等として存在するのに対し、クロリンは主に植物内にクロロフィルとして存在し、葉緑体の中心物質として光合成に深く関わっている³⁸⁾。光合成におけるクロロフィルと光の反応は、光増感反応によるものであり、光エネルギーを化学エネルギーに変え、植物の生命活動を維持するために必要なエネルギーを供給するのに重要なはたらきを担っている。さらに光合成の過程で二酸化炭素を酸素へと変換するため、大気中の酸素濃度の維持にも重要な役割を有している³⁸⁾。

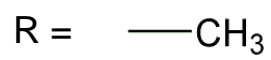
このようにクロロフィルをはじめとしたクロリンは光増感反応を示し、クロリンの中には細胞を光不活性化させるものもあることが知られている³⁰⁾⁻³³⁾。

PDT に臨床応用されているタラポルフィンナトリウムはクロリン骨格をもつ分子である。タラポルフィンナトリウムは現在日本においては早期肺癌，原発性悪性脳腫瘍，化学放射線療法または放射線療法後の局所遺残再発食道癌に適応がある。

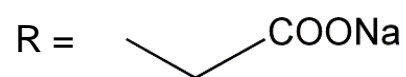
図 1-2 にクロリンの例として、クロリン e4，クロリン e6 およびタラポルフィンナトリウムの構造を示す。これらのクロリンは、骨格上の置換基が異なり、クロリン e6 では1つのカルボキシ基，タラポルフィンナトリウムでは2つのカルボキシ基を含んでおり、このため各分子の脂溶性が異なることが予想される。



Chlorin e4



Chlorin e6



Talaporfin sodium

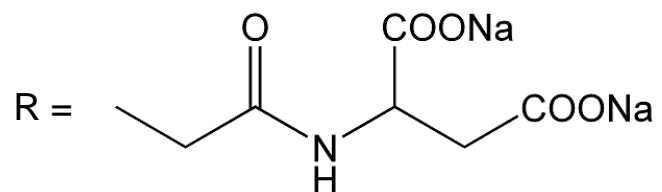


図 1-2 クロリンの構造
構造はすべてナトリウム塩として示している。

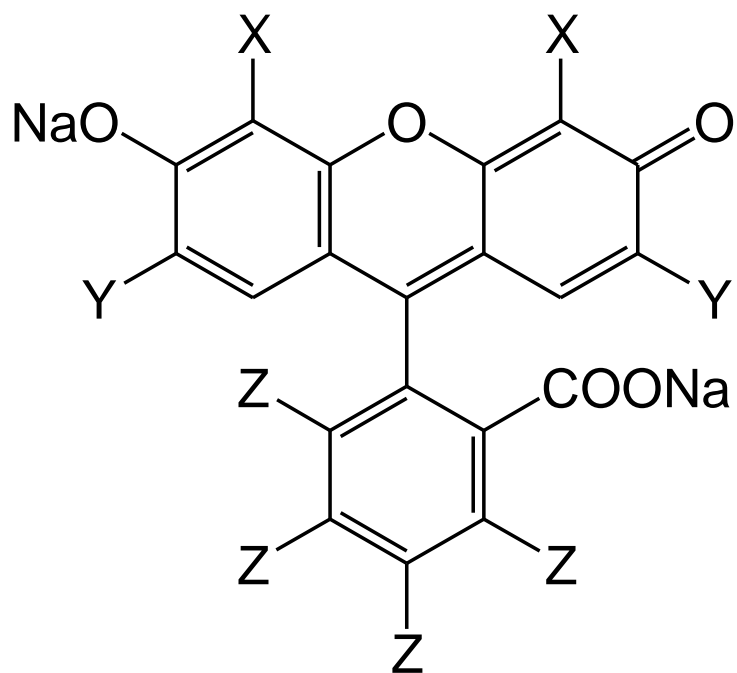
1.3 キサンテン系色素について

キサンテン系色素は分子内にキサンテン環を有するヘテロ環式化合物の総称である。これらの色素は波長 500~600 nm に吸収をもち、赤色に発色する。このため着色料として食品，医薬品，口紅をはじめとした化粧品等に使用されている¹⁾。キサンテン系色素のうち，日本国内ではローズベンガル（赤色 105 号），フロキシシン B（赤色 104 号）およびエリスロシン B（赤色 3 号）が食用色素として認可されている³⁹⁾⁻⁴⁰⁾。

キサンテン系色素は，コールタールを原料として製造されるタール色素と呼ばれる合成色素であり，タール色素のなかでも，最も古くから作られている色素の一つである。合成色素は天然色素よりも発色がよく，また，製造が容易で安価なことから，幅広く使用されるようになった^{1), 34)}。しかし現在では，キサンテン系色素は光分解性が高いことや，多量の摂取による毒性が危惧されるようになり，食品への使用量は減少傾向にある¹⁾。

キサンテン系色素は，光増感剤としてはたらき，細胞を光不活性化させることが知られている^{1), 34)-37)}。着色料として使用されてきたキサンテン系色素は，新たに光増感剤として医療へ応用が期待されるようになった。現在，感染症治療への応用を中心に研究がなされている^{1), 34)-37)}。

図 1-3 は代表的なキサンテン系色素（ローズベンガル，フロキシシン B，エリスロシン B，エオシン B）の構造を示している。これらの色素は，ハロゲンやニトロ基が置換基として存在する。



Xanthene dye	X	Y	Z
Rose bengal	I	I	Cl
Phloxine B	Br	Br	Cl
Erythrosine B	I	I	H
Eosin B	Br	NO ₂	H

図 1-3 キサンテン系色素の構造
構造はすべてナトリウム塩として示している。

1.4 研究の目的と論文の構成

前述の通り，クロリンやキサントフェン系色素により細胞が光不活性化することが知られているが，その作用部位および作用機構については未解明な部分が多い。しかし，光増感剤による光不活性化は短時間で引き起こされることがわかっている⁴¹⁾。そこで私は，作用部位は細胞膜にあると考え，光増感剤による細胞膜機能に与える影響に興味を持ち研究を行った。

本研究では，クロリンおよびキサントフェン系色素による細胞の光不活性化機構の解析を目的に，細菌および赤血球の細胞膜に対する作用を検討した。クロリンとして，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。キサントフェン系色素として，ローズベンガル，フロキシシン B, エリスロシン B, エオシン B を用いた。細菌に対しては，黄色ブドウ球菌を用いて，生存率，膜機能の測定を行った。膜機能は，呼吸阻害， K^+ 流出，膜電位消失の観点から，電極法を用いて測定した。赤血球に対しては，ウシ赤血球を用いて溶血作用および K^+ 流出の測定により，膜損傷の程度を検討した。同時に，赤血球の形態変化から光増感剤の細胞膜への取り込み量を検討した。さらに，光増感剤の一重項酸素生成効率についても検討した。

本論文は次のように構成されている。

第1章では序論として本論文の全般的な背景について述べる。

第2章ではクロリンおよびキサントフェン系色素が黄色ブドウ球菌の細胞膜機能に与える影響を明らかにする。

第3章ではクロリンおよびキサントフェン系色素が，ウシ赤血球の細胞膜損傷の程度を検討する。

第4章では赤血球の形態変化の観察より，クロリンおよびキサントフェン系色素のウシ赤血球への取り込み量を評価する。

第5章ではクロリンおよびキサントフェン系色素による一重項酸素の生成効率の測定結果を報告する。

第2章 細菌に対する光増感剤の作用

2.1 序論

本章ではクロリンおよびキサントレン系色素による細菌の光不活性化機構を解明することを目的に、光増感剤が細菌の細胞膜機能に与える影響を検討した。

細菌の細胞質膜は、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルセリンのリン脂質を主成分とする脂質二重層で構成されている。また、細胞質膜には様々なタンパク質が存在し、生命活動を維持するために必要となる機能が存在する⁴²⁾。細菌の細胞質膜に存在するタンパク質である呼吸鎖複合体では、酸素を消費して呼吸を行った際に電子伝達系により ATP を産生し、生命活動に必要なエネルギーを作り出している。この ATP 産生の過程において細胞内外にプロトン濃度勾配を作り出し、膜電位を発生させる^{43), 44)}。また、細菌は細胞質膜に存在するイオンチャンネルにより、細胞内外のイオン濃度差を制御し膜電位を維持している⁴²⁾。

光増感剤の作用部位が細胞膜であるならば、光増感剤存在下で光照射を行うと、細菌の細胞質膜に存在する生体分子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ことが予想される。このとき、呼吸鎖の損傷や、細菌の不活性化により呼吸阻害が引き起こされる。また、膜脂質等が損傷を受けることで膜透過性亢進が引き起こされ、その結果イオンバランスが変化する。これらの膜損傷を引き起こすと、同時に膜電位が消失すると考えられる。したがって、細菌の呼吸量の変化や、細胞膜の膜透過性変化を測定することで細菌の生命活動を維持するために必要な膜機能を調べることができる。

細菌の呼吸および膜透過性は電極法を用いることで測定できる^{45), 46)}。呼吸は、細菌の呼吸による酸素の消費量を、酸素電極を用いて細胞外液中の溶存酸素濃度の減少量の変化から追跡・定量できる^{45), 46)}。膜透過性は、生細胞中には K^+ が高濃度 (100~200 mM) で含まれていることから K^+ をマーカーとして、 K^+ 電極を用いて K^+ の細胞外への流出量を指標として追跡・定量できる^{45), 46)}。

さらに、膜電位の変化を、 TPP^+ をプローブとして TPP^+ 電極により測定することができる。 TPP^+ は細胞膜に生じている膜電位に依存して細胞質に取り込まれ

るため、 TPP^+ 電極により TPP^+ の細胞への取り込み量を測定することで膜電位変化を追跡・定量できる^{45), 46)}。

本研究では、細菌としてグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌を用いて検討した。まず光増感剤による作用濃度を決定するため、生存率の測定を行った。続いて、光増感剤による細菌膜機能に対する作用を検討するため、電極法を用いて、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。図 2-1 に膜機能損傷の測定原理の概略図を示す。

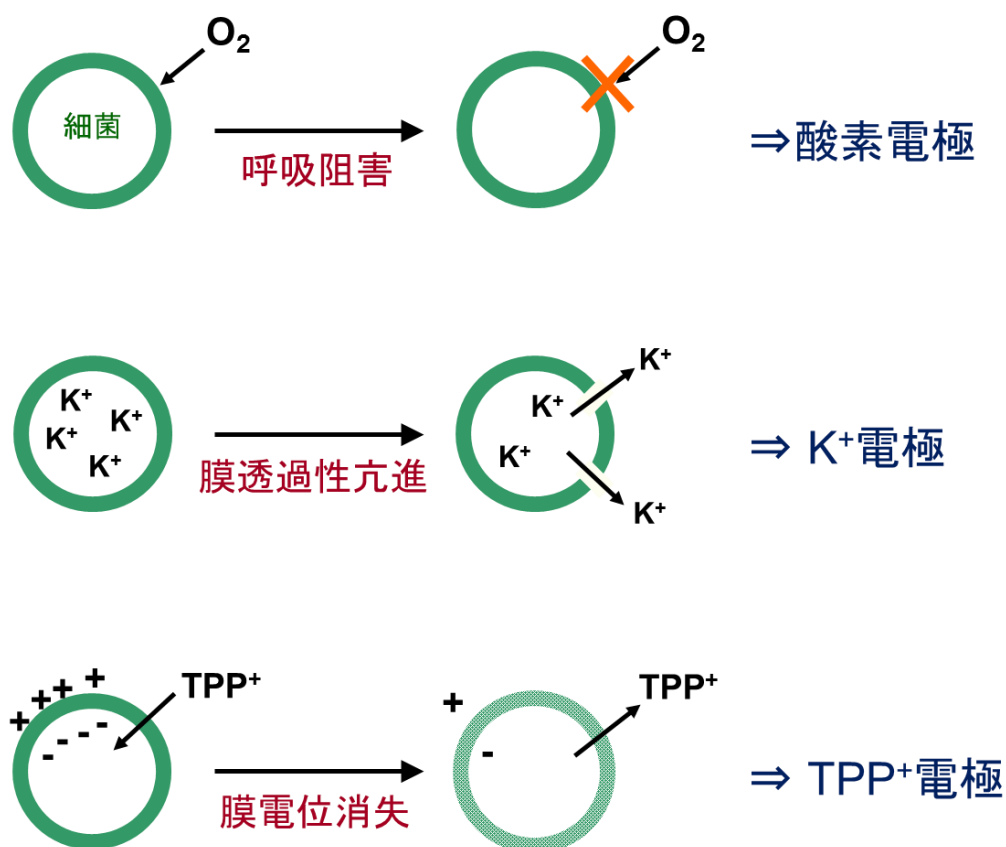


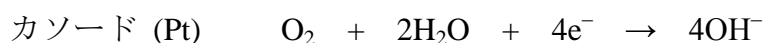
図 2-1 膜機能損傷の測定原理

2.2 電極法について

本研究では、膜機能の測定において酸素電極、 K^+ 電極および TPP^+ 電極の3種類の電極を用いた。以下に各電極について記述する。

2.2.1 酸素電極

酸素電極はクラーク型酸素電極(P型 DO 電極; エイブル株式会社)を用いた。電極内部の電解液は飽和 KCl 溶液を用いた。本電極はアノード(陽極)を Ag, カソード(陰極)を Pt で構成しており、印加電圧を 700 mV とするポーラロ式である。電極表面のテフロン膜(酸素透過膜)を透過した酸素分子は白金電極上で還元され、アノードではこの還元電流に相当する銀の酸化反応が進行する。両極における電極反応は次式で表せる。



酸素透過膜を通過する酸素量は酸素の分圧に比例するので、酸素濃度に比例した電位を得ることができる。酸素濃度の測定は、飽和溶存酸素量における電位を酸素濃度 100%として算出する。

2.2.2 K^+ 電極・ TPP^+ 電極

これらの電極はイオン選択性電極と呼ばれるもので、特定のイオンを認識するイオノフォア等を用いた感応膜を用いて、膜の界面における化学ポテンシャルの差に応じて発生した電位差から、イオン濃度を測定することができる^{45), 46)}。

K^+ 電極は、イオノフォアとしてバリノマイシンを使用した。また、 TPP^+ 電極は、 TPP^+ が脂溶性の高いイオンであるため、イオノフォアの代わりにイオン交換体として NaHFPB を使用した⁴⁶⁾。

本研究では K^+ 電極および TPP^+ 電極は自作のものを用いた。作成手順は次の通りである⁴²⁾。

- ① K^+ 電極の場合はイオノフォアとしてバリノマイシンを 1 mg, イオン交換体として NaTFPB 0.08 mg を THF に溶解する。TPP⁺電極の場合はイオン交換体として NaHFPB 0.5 mg を THF に溶解する。各溶液に支持体として PVC を 30 mg 加えよく攪拌する。さらに膜溶媒として BEHS を 60 μ L 加える。
- ② 溶液をシャーレ (直径 28 mm) に入れ一晩放置し, THF を自然蒸発させる。
- ③ シャーレ中にできた膜を PVC チューブ (外径 4 mm, 内径 3 mm) に貼り付け, 30 分程度乾燥させる。
- ④ チューブ内に内液(K^+ 電極: 10 mM KCl, TPP⁺電極: 1 mM TPPCl, 10 mM KCl) を注入する。
- ⑤ 出来上がった電極を, 内液と同じ組成の溶液に浸しコンディショニングを行う。

作成したイオン選択性電極を用いて測定を行う際には参照電極が必要となる。参照電極は 10 mM KCl を内液とし, 1M NH_4NO_3 を塩橋とした。液絡部分は, 内径 3 mm, 外径 4 mm のガラス管中に直径 0.8 mm の白金線を封じ込めることにより作製した。ガラスと白金は熱膨張率が異なるため, 溶融後冷えるまでにひび割れが生じ液絡部分となる。多量の電解質の移動を防ぐために塩橋の内液は寒天で固めた⁴⁶⁾。

K^+ 電極および TPP⁺電極を用いた測定系の電気化学セルは次の通りであり, 各電極の構造を図 2-2 に示す。

Ag,AgCl/内液/センサー膜/測定溶液/1 M NH_4NO_3 (塩橋) /10 mM KCl/Ag,AgCl

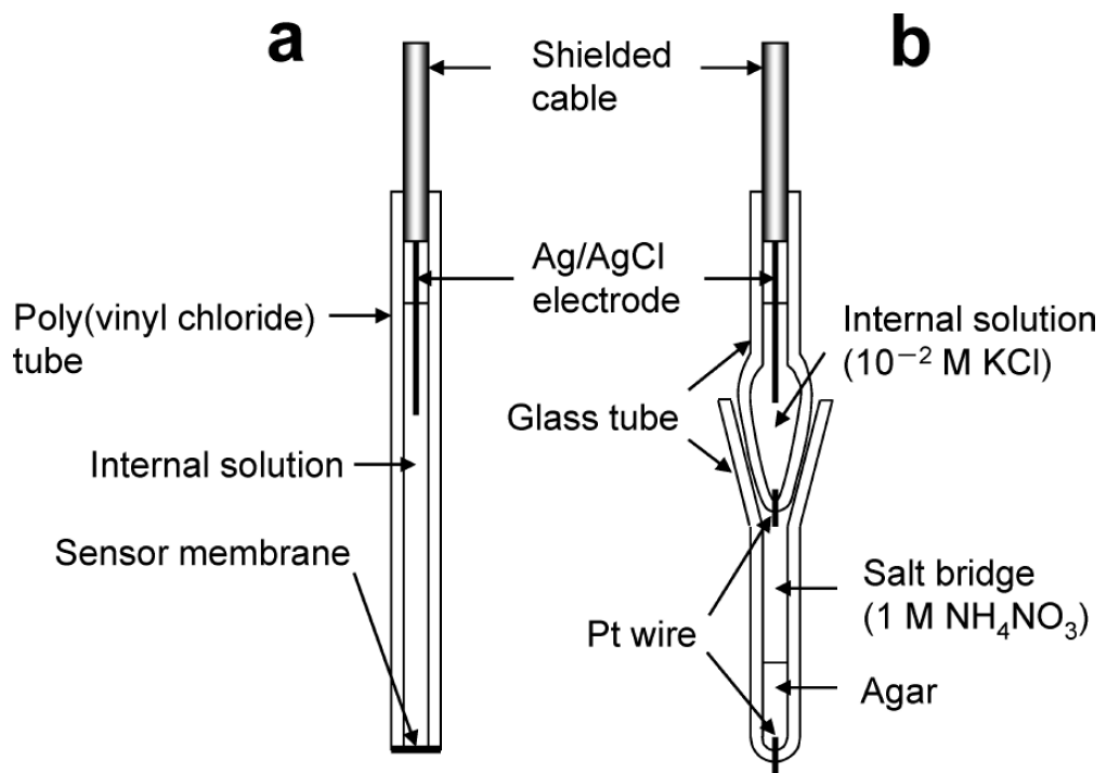


図 2-2 イオン選択性電極 (a) および参照電極 (b) の構造
 (文献 46 : 勝孝 ほか, 2013)

2.2.3 検量線の作成

K⁺電極および TPP⁺電極を用いて測定する際には、得られた電位とイオン濃度を対応させるため、検量線を作成した。検量線の作成方法は、各電極で PBS に溶解した、標準溶液 (K⁺電極 : 10⁻⁴~10⁻² M の KCl, TPP⁺電極 : 10⁻⁵~10⁻³ M の TPPCl) を低濃度側から測定する。横軸にイオン濃度, 縦軸に電位をとったグラフを作成し検量線とする。図 2-3 に K⁺電極および TPP⁺電極の検量線を示す。

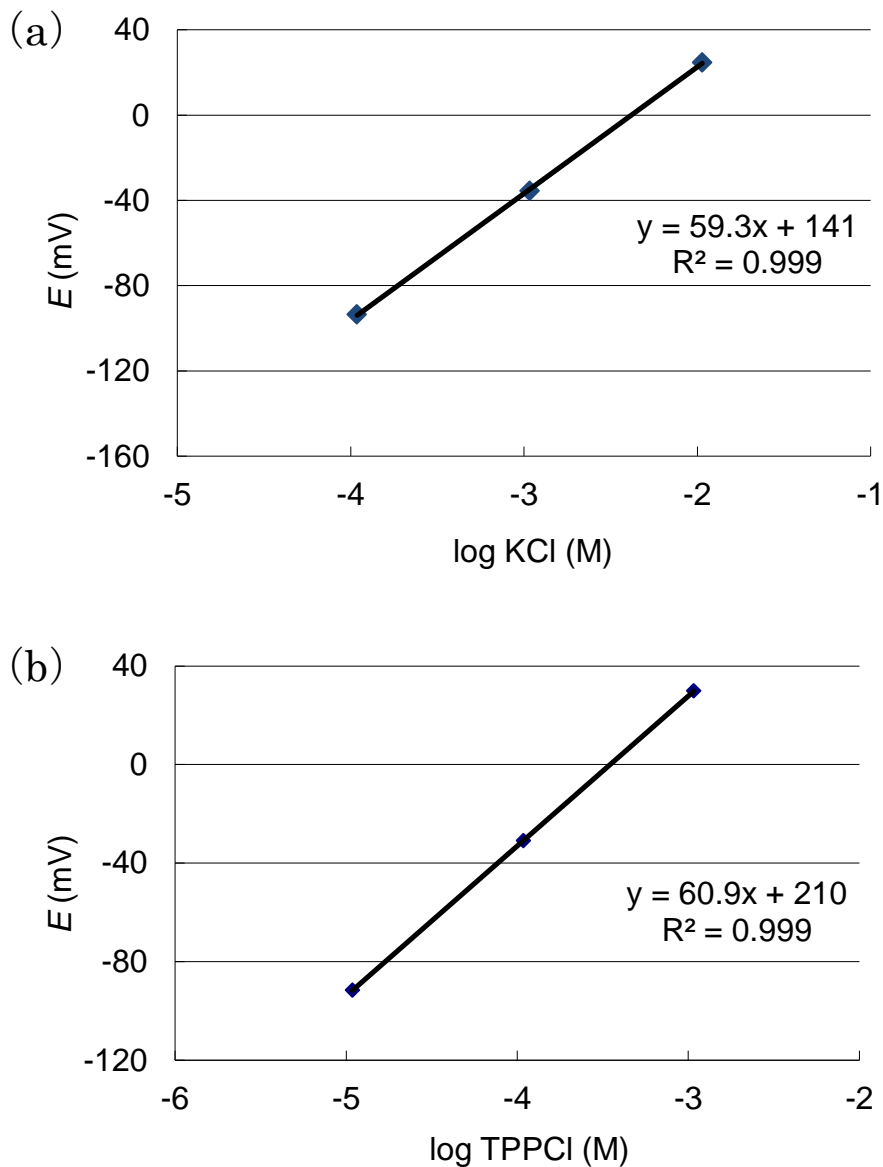


図 2-3 K⁺電極 (a) および TPP⁺電極 (b) の検量線

2.3 方法

2.3.1 試薬および試液の調整

クロリン e4 およびクロリン e6 は Frontier Scientific (Logan, UT, USA) 製 (純度 >95%) を DMSO に溶解して使用した。タラポルフィンナトリウムは明治製菓 (東京) 製を水溶液として用いた。ローズベンガルは Aldrich (Milwaukee, WI, USA) 製 (純度 >90%)、フロキシシン B、エリスロシン B、エオシン B は東京化成 (東京) 製 (純度 >90%) をそれぞれ水溶液として使用した。TPPCI は同仁化学研究所 (東京) 製 (特級品) を使用し、水溶液として使用した。メリチンは Sigma (St. Louis, MO, USA) 製 (純度 >85%) を水溶液として用いた。その他試薬は特級品のものを用いた。

2.3.2 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% K₂HPO₄ 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。

2.3.3 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 NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 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) またはキサントゲン系色素 (最終濃度 0.1~5 μM) を加えて 2 分間静置した後、図 2-4 のように OHP (9700 ; 3M, Maplewood, MN, USA) で下方から 10 分間光照射した。この時、光源には 400 W ハロゲンランプを用いて⁴⁷⁾、検液に対して光度が 100 mW/cm² になるように調節した。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 で一晚培養した。コロニーの計数より生存率を求めた。



図 2-4 OHP による光照射

2.3.4 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。

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 μ M）またはキサントゲン系色素（最終濃度 0.1~5 μ M）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^{48), 49)}。マイクロシリンジを用いて乳酸ナトリウム（最終濃度 10 μ M）を添加後⁵⁰⁾、プロジェクターランプ（Master HiLUX-H130, 理化学精機, 東京）で光照射しながら酸素消費量を 10 分間測定した。この時、光源には 1 kW タングステンランプ⁴⁷⁾を用いて検液に対して 100 mW/cm² の光度になるよう調節した。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。図 2-5a に実験装置の概略を示す。

K^+ 流出または膜電位の測定では、まず、乳酸ナトリウム（最終濃度 10 μ M）を含む PBS に、参照電極および、 K^+ 電極または TPP^+ 電極をセットした。膜電位の測定時はさらに TPP^+ （最終濃度 10 μ M）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 μ M）またはキサントゲン系色素（最終濃度 0.1~5 μ M）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、メリチン（最終濃度 10 μ M）を添加し、 K^+ 流出 100%または膜電位 0%を決定した^{51), 52)}。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。図 2-5b に実験装置の概略を示す。

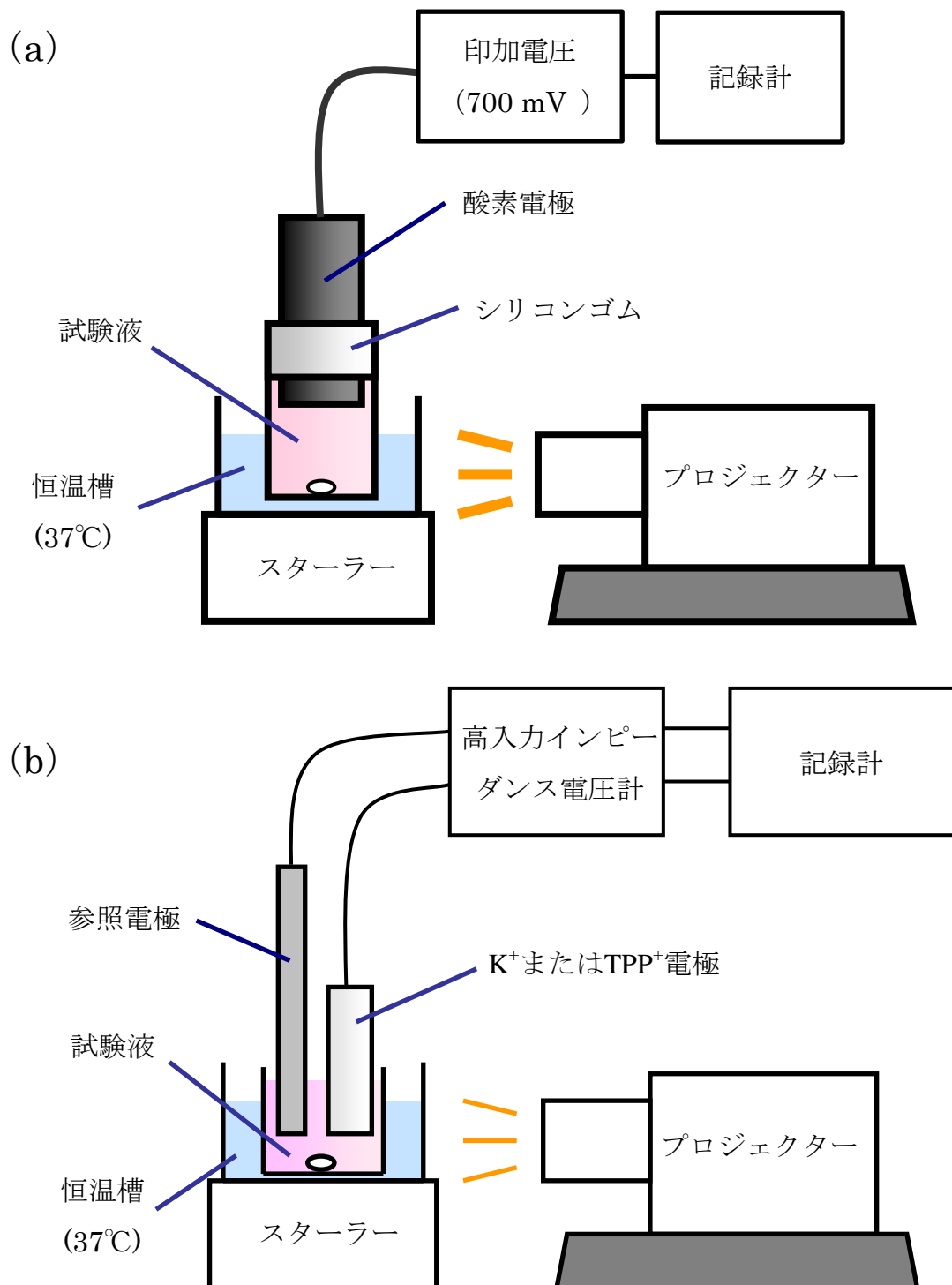


図 2-5 電極法による測定装置

(a) 酸素電極, (b) K⁺および TPP⁺電極

2.4 結果

2.4.1 生存率の測定

クロリンおよびキサントン系色素による黄色ブドウ球菌の生存率を図 2-5 に示す。

クロリン (図 2-6a) において、クロリン e4 およびクロリン e6 は 10 分間の光照射により低濃度より強い抗菌作用を示した。1 μM ではいずれのクロリンも黄色ブドウ球菌の生存率を 1%未満まで低下させている。一方、タラポルフィンナトリウム 1 μM による黄色ブドウ球菌の生存率は $79 \pm 10\%$ ($n=3$) であり、強い抗菌作用はみられなかった。

キサントン系色素 (図 2-6b) において、ローズベンガルは 10 分間の光照射により、1 μM で $0.017\% \pm 0.012$ ($n=3$) まで黄色ブドウ球菌の生存率を低下させた。また、ローズベンガルは、0.1 μM でも生存率を $0.053\% \pm 0.02$ ($n=3$) まで低下させ、低濃度より強い抗菌作用を示すことがわかる。フロキシシン B およびエリスロシン B は 1 μM での黄色ブドウ球菌の生存率が、それぞれ $27\% \pm 8$ ($n=3$)、 $67\% \pm 15$ ($n=3$) であったが、5 μM においては生存率をそれぞれ $0.092\% \pm 0.1$ ($n=3$)、 $0.059\% \pm 0.04$ ($n=3$) まで低下させた。一方、エオシン B では抗菌作用はほとんど見られなかった。

以上の結果より、これらのクロリン e4、クロリン e6 およびローズベンガルは 1 μM で強い抗菌作用がみられた。したがって、光増感剤 1 μM の濃度において黄色ブドウ球菌の膜機能障害の測定を行った。

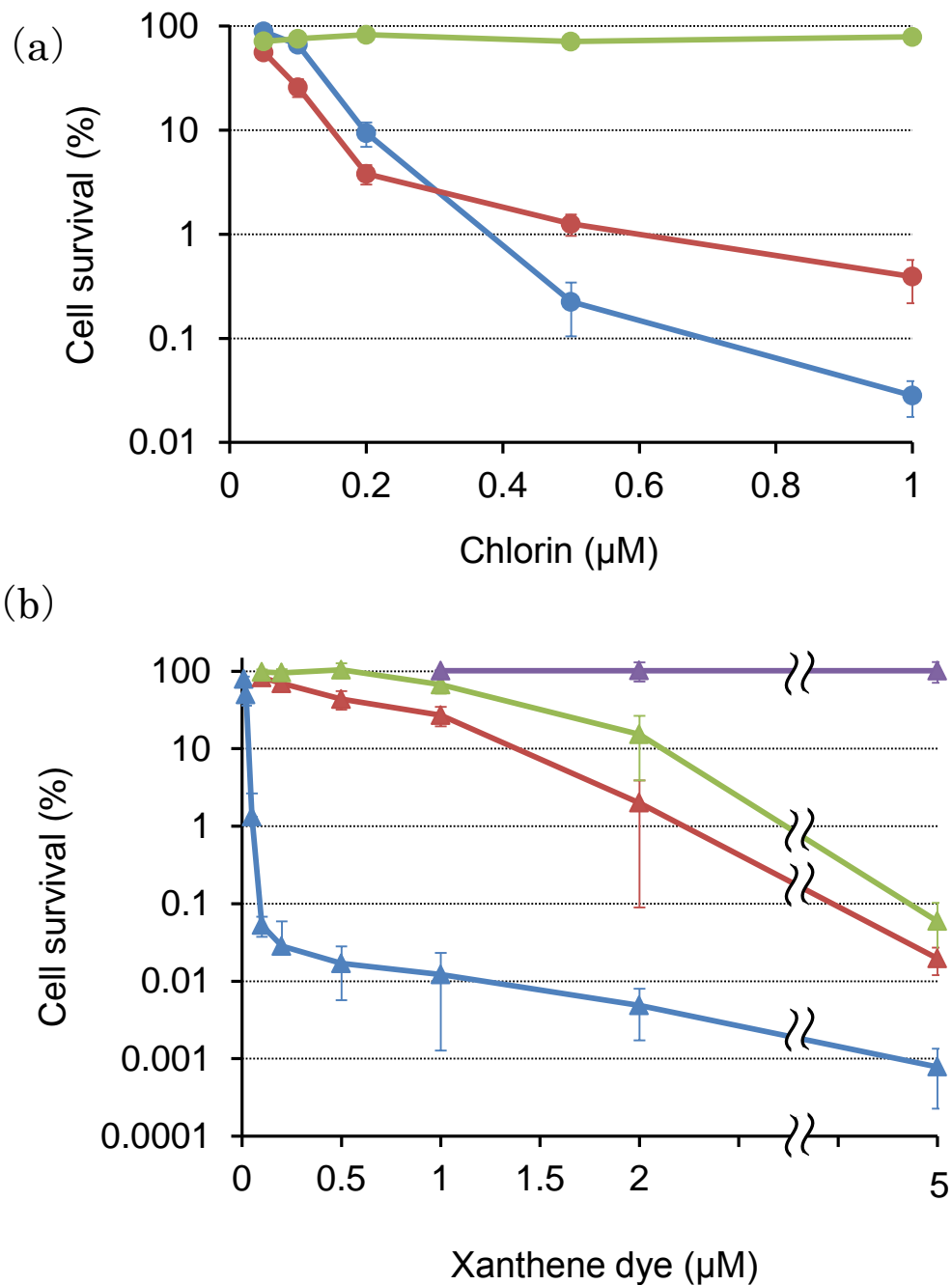


図 2-6 クロリン(a)およびキサントン系色素(b)による黄色ブドウ球菌の生存率の変化

クロリン e4 (●), クロリン e6 (●), タラポルフィンナトリウム (●), ローゼベンガル (▲), フロキシシン B (▲), エリスロシン B (▲), エオシン B (▲) 存在下で, 菌懸濁液 (3×10^7 CFU mL⁻¹) 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。

2.4.2 呼吸阻害

図 2-7 はクロリンおよびキサントレン系色素による黄色ブドウ球菌の酸素消費量の変化を示したグラフである。細菌は乳酸ナトリウムの添加により呼吸を開始し酸素を消費する⁴⁶⁾。菌懸濁液はシリコンゴムで密封しているため酸素の供給ができず、細菌による酸素の消費量にしたがって溶存酸素量が減少する。クロリン 1 μM を添加した場合 (図 2-7a), クロリン e4, クロリン e6 では光照射により, 黄色ブドウ球菌の酸素消費量が抑制され, 呼吸阻害を引き起こしていることがわかる。一方, タラポルフィンナトリウムでは呼吸阻害はほとんど見られなかった。キサントレン系色素 1 μM では (図 2-7b), ローズベンガルは, 黄色ブドウ球菌の酸素消費量を減少させ, 呼吸阻害を引き起こしていることが示された。一方でフロキシシン B, エリスロシン B, エオシン B では呼吸阻害はみられなかった。

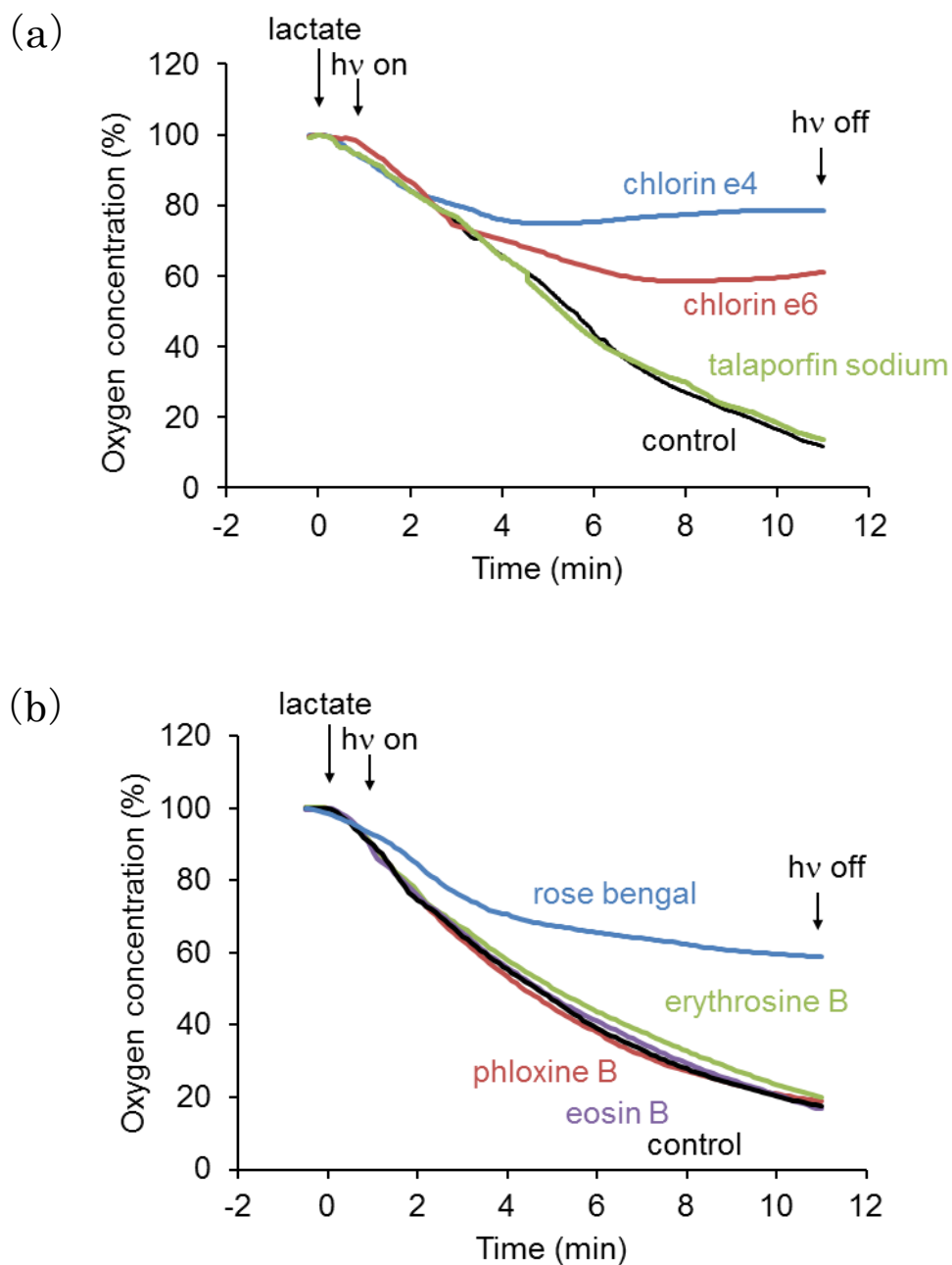


図 2-7 クロリン(a)およびキサントン系色素(b)による黄色ブドウ球菌の酸素消費量の経時変化

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 μ M）またはキサントン系色素（最終濃度 1 μ M）を添加して測定した。最初の矢印は乳酸ナトリウム（最終濃度 10 μ 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。測定は 37°C の条件で行った。

2.4.3 K⁺流出

図 2-8 はクロリンおよびキサントフェン系色素による黄色ブドウ球菌の K⁺流出量の変化を示したグラフである。10 分間の照射後、メリチンの添加により、細胞膜を破壊したときの K⁺流出率を 100%として示している。クロリン 1 μM では (図 2-8a), クロリン e4, クロリン e6 は照射後、数分のうちにほぼ 100%K⁺を流出させた。一方、タラポルフィンナトリウムでは、K⁺流出はほとんど見られなかった。キサントフェン系色素 1 μM では (図 2-8b), ローズベンガルは照射後 5 分程度で K⁺がほぼ 100%流出している。フロキシシン B およびエリスロシン B は 10 分の照射でそれぞれ 80%±3 (n=3), 48%±5 (n=3) K⁺を流出させた。一方、エオシン B では、K⁺流出はほとんど見られなかった。強い抗菌作用を示したクロリン e4, クロリン e6 およびローズベンガルは呼吸阻害および K⁺流出を同時に強く引き起こしていることがわかった。また、フロキシシン B やエリスロシン B は、呼吸阻害はみられなかったが、K⁺流出は引き起こされることが示された。

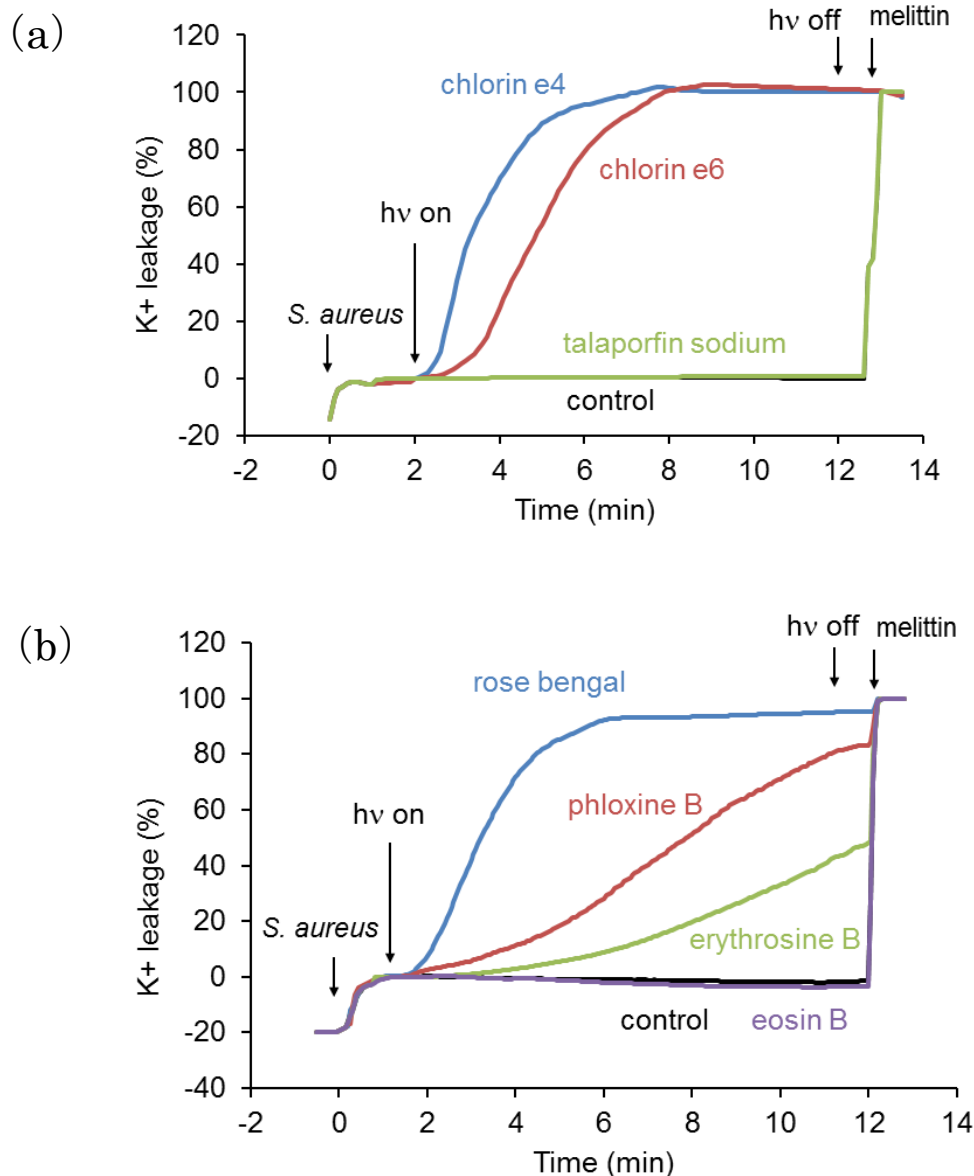


図 2-8 クロリン(a)およびキサンテン系色素(b)による黄色ブドウ球菌からの K⁺流出の経時変化

乳酸ナトリウム（最終濃度 10 μM）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 μM）またはキサンテン系色素（最終濃度 1 μM）を添加して測定した。最初の矢印は菌懸濁液の添加を示し、細菌から流出する K⁺により K⁺濃度が上昇する。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メリチン（最終濃度 10 μM）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。

2.4.4 膜電位消失

図 2-9 はクロリンおよびキサントレン系色素による黄色ブドウ球菌の膜電位の変化を示したグラフである。菌液の添加により細菌が TPP^+ を取り込むため電位が発生する。2 分後の電位が安定したときを膜電位 100% とした。また、 K^+ 流出と同様、光照射後メリチンの添加により細菌膜を破壊し TPP^+ をすべて流出させたときの電位を膜電位 0% としている。強い呼吸阻害および K^+ 流出を引き起こしたクロリン e4, クロリン e6 およびローズベンガルは光照射によりすぐさま膜電位が消失した。 K^+ 流出のみ引き起こしたフロキシシン B やエリスロシン B では K^+ 流出量に対応した膜電位の消失がみられた。呼吸阻害および K^+ 流出ともにみられなかったエオシン B およびタラポルフィンナトリウムは膜電位の消失もみられなかった。

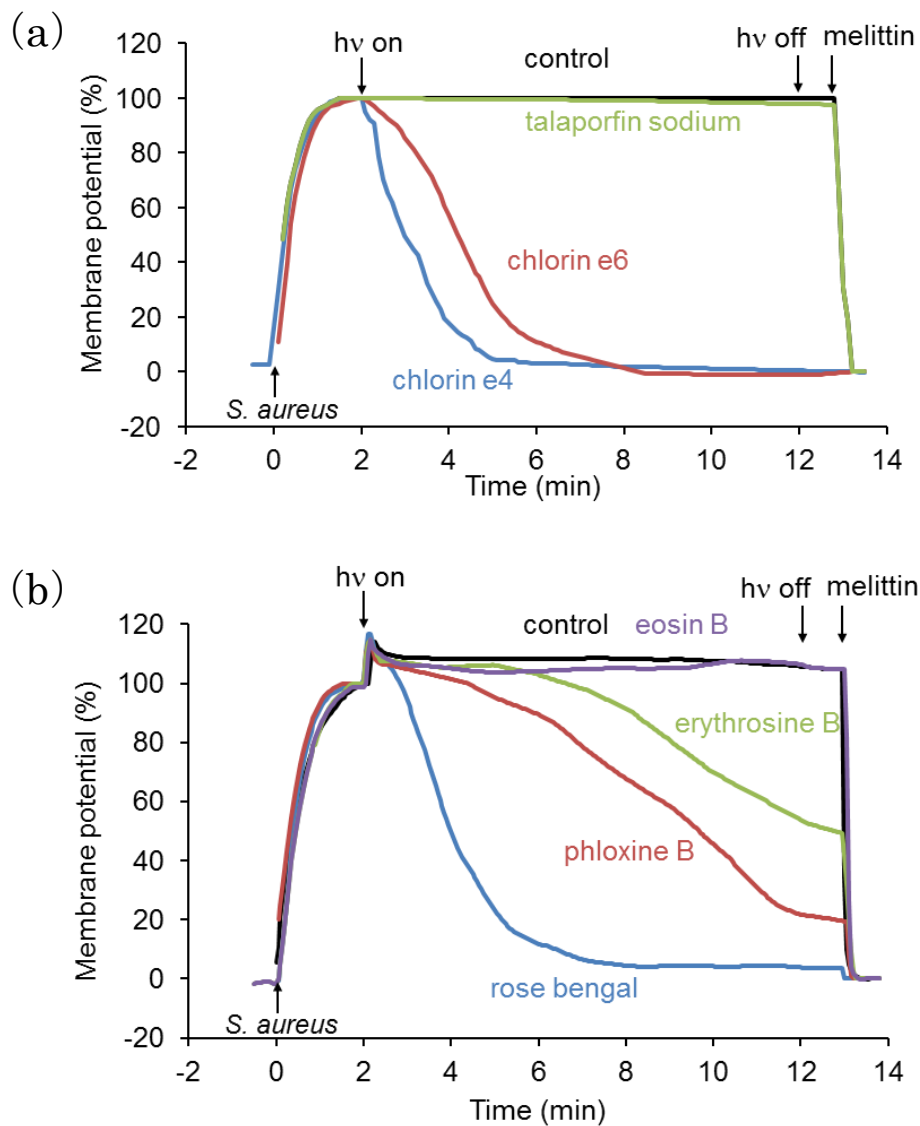


図 2-9 クロリン(a)およびキサントン系色素(b)による黄色ブドウ球菌の膜電位の経時変化

乳酸ナトリウム（最終濃度 $10 \mu\text{M}$ ）を含む PBS に TPPCl（最終濃度 $10 \mu\text{M}$ ）、菌懸濁液（最終菌濃度 $1 \times 10^9 \text{ CFU mL}^{-1}$ ）およびクロリン（最終濃度 $1 \mu\text{M}$ ）またはキサントン系色素（最終濃度 $1 \mu\text{M}$ ）を添加して測定した。最初の矢印は菌懸濁液の添加を示し、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メリチン（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。

2.4.5 光増感剤による膜機能変化の濃度依存性

図 2-10, 図 2-11 および図 2-12 は光増感剤による黄色ブドウ球菌の各膜機能変化の濃度依存性を示したグラフである。クロリン e4, クロリン e6 およびローズベンガルは低濃度より各膜機能に対して作用を示し, 濃度依存的に作用を示していることがわかる。またフロキシシン B およびエリスロシン B においても濃度の上昇とともに K^+ 流出率および膜電位消失率が増加しており濃度依存性を示している, また, 1 μ M において呼吸阻害はみられなかったが, 5 μ M ではそれぞれ $32\% \pm 5$ (n=3), $28\% \pm 5$ (n=3) の呼吸阻害を引き起こした。エオシン B およびタラポルフィンナトリウムはいずれの濃度でも作用を示さなかった。

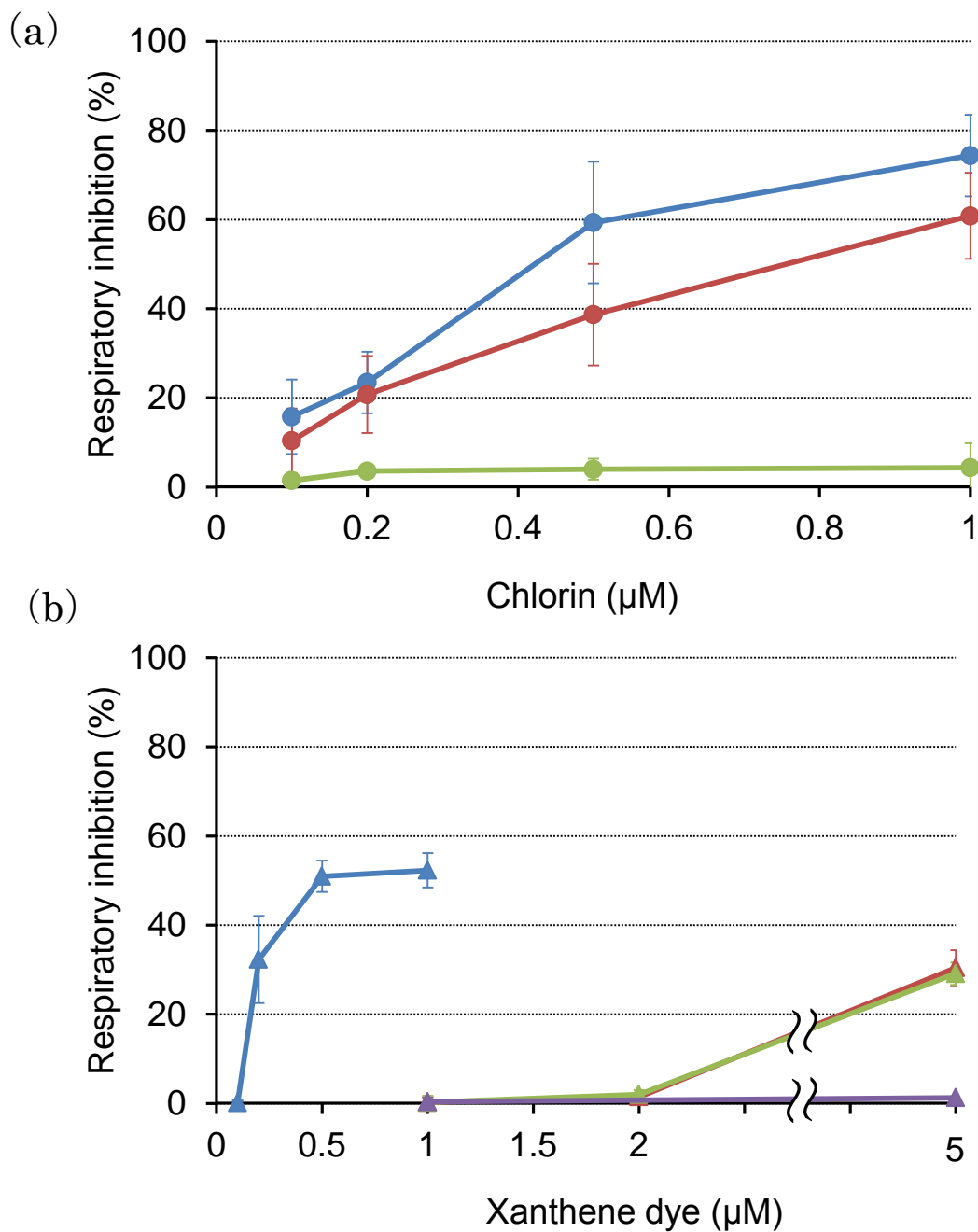


図 2-10 クロリン(a)およびキサントン系色素(b)による黄色ブドウ球菌の呼吸阻害の濃度依存性

クロリン e4 (●), クロリン e6 (●), タラポルフィンナトリウム (●), ローゼベンガル (▲), フロキシシン B (▲), エリスロシン B (▲), エオシン B (▲) 存在下で, 菌懸濁液 (2×10^8 CFU mL⁻¹) に 37°C 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。

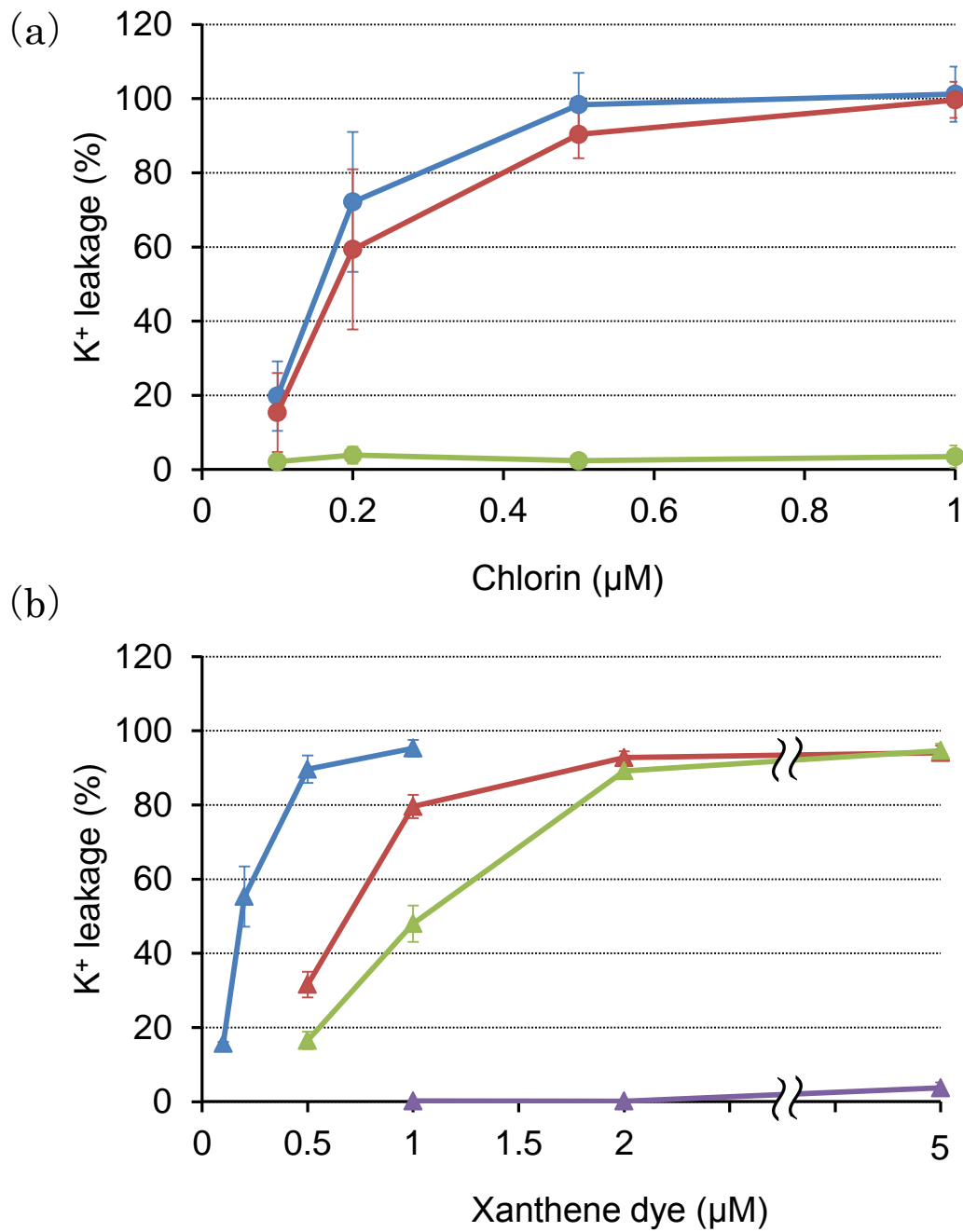


図 2-11 クロリン(a)およびキサントン系色素(b)による黄色ブドウ球菌からの K⁺流出の濃度依存性

クロリン e4 (●), クロリン e6 (●), タラポルフィンナトリウム (●), ローゼベンガル (▲), フロキシシン B (▲), エリスロシン B (▲), エオシン B (▲) 存在下で, 菌懸濁液 (1×10^9 CFU mL⁻¹) に 37°C 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。

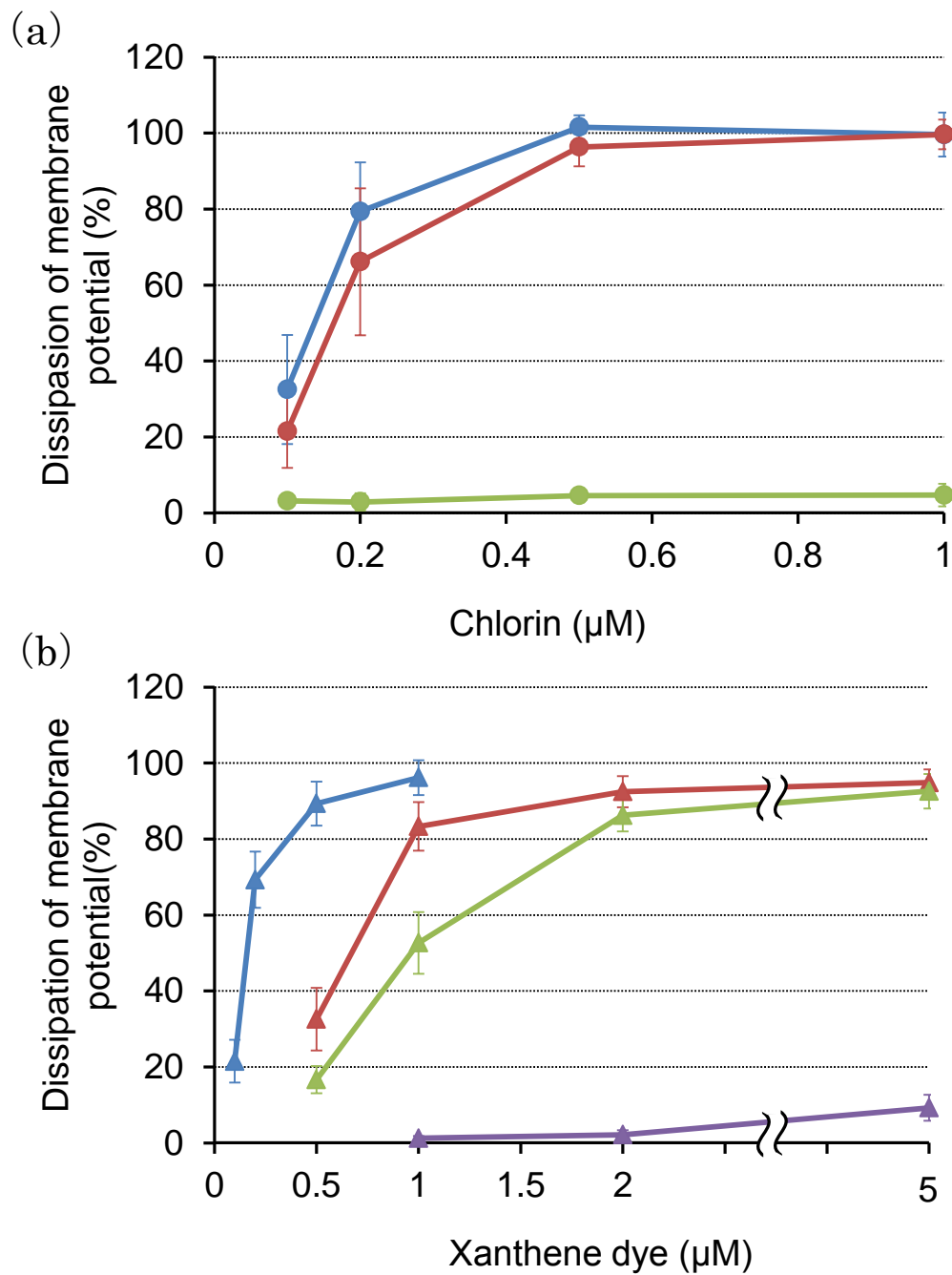


図 2-12 クロリン(a)およびキサントン系色素(b)による黄色ブドウ球菌の膜電位消失の濃度依存性

クロリン e4 (●), クロリン e6 (●), タラポルフィンナトリウム (●), ローズベンガル (▲), フロキシシン B (▲), エリスロシン B (▲), エオシン B (▲) 存在下で, 菌懸濁液 (1×10^9 CFU mL⁻¹) に 37°C 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。

2.5 考察

本章では、クロリンおよびキサントレン系色素による黄色ブドウ球菌に対する生存率の測定および細菌膜機能の測定を行った。

生存率の測定において、光照射の装置として OHP を用いた。OHP は広範囲に光を照射できる性質をもつため、複数の試料に対し同時に光照射を行うことができる。したがって、OHP を用いることで効率的に測定することができた。また、膜機能の測定には電極法を用いた。酸素電極、 K^+ 電極および TPP^+ 電極を用いることで、光増感剤が細胞膜機能に及ぼす影響を呼吸阻害、膜透過性変化および膜電位変化の三つの観点から検討でき、細菌の光不活性化作用機構を詳細に解明することができた。さらに、電極法を用いた測定は非破壊的に行われるため、細胞を生きたまま測定することができる。したがって、細菌の膜機能の変化を光照射しながらその場で測定することが可能であった。

生存率の測定より、黄色ブドウ球菌に対してクロリンでは、クロリン e4 およびクロリン e6 は $1 \mu M$ で強い抗菌作用を示し、 $1 \mu M$ における抗菌作用はクロリン e4 > クロリン e6 >> タラポルフィンナトリウムの順となったが、低濃度においては、クロリン e6 はクロリン e4 よりも抗菌作用が比較的強いという結果となった。したがって、低濃度域で使用する際にはクロリン e6 のほうがより効果的である可能性が示された。

細菌膜機能に対して、クロリン e4 およびクロリン e6 は $1 \mu M$ で、強い呼吸阻害および膜透過性亢進を引き起こした。さらに、これらの光増感剤は光照射後、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、膜機能阻害ともにほとんど示さなかった。これらの結果よりクロリン $1 \mu M$ による黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用および膜機能損傷の強さは、クロリン e4 > クロリン e6 >> タラポルフィンナトリウムの順となり、抗菌作用と膜機能損傷の作用の強さには相関性が確認された。以上より、クロリンは黄色ブドウ球菌に対し、呼吸阻害および膜透過性亢進を強く引き起こし、同時に膜電位を消失させていることが示された。本研究で用いたクロリンは、図 1-2 に示した通り置換基が異なり、それにより分子の脂溶性は、クロリン e4 > クロリン e6 > タラポルフィンナトリウムの順であることが予想される。これらの光増感

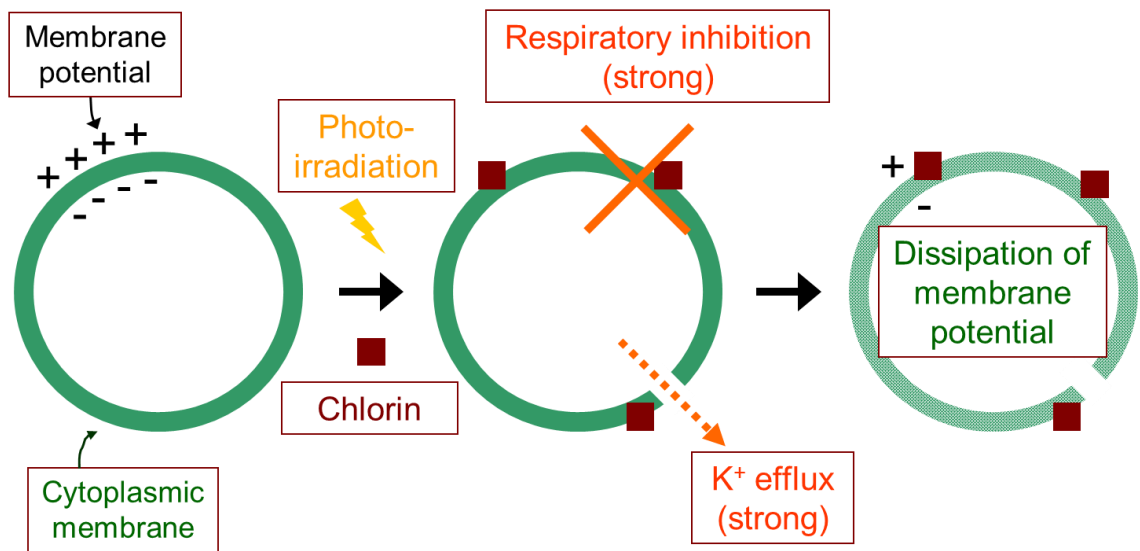
剤は細菌細胞膜に対して作用することから細菌膜への移行性が高いものほど作用が強くなると考えられる。したがって、脂溶性が高く、細胞膜への移行性が高いクロリン e4 が強い光不活性化作用をもつことが示された。

キサントレン系色素では、1 μM における黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用および膜機能損傷の強さは、ローズベンガル>フロキシシン B>エリスロシン B>>エオシン B の順となった。ローズベンガルは、低濃度より強い抗菌作用を示し、クロリン同様呼吸阻害および膜透過性亢進を引き起こし、膜電位を消失させた。しかし、フロキシシン B およびエリスロシン B は、1 μM において、 K^+ 流出を引き起こしたものの呼吸阻害はみられず、 K^+ 流出に対応する膜電位の低下が引き起こされた。すなわち、これらの色素は K^+ 流出量に対して、呼吸阻害の程度が弱く、濃度変化させた場合、フロキシシン B およびエリスロシン B は 5 μM ではじめて呼吸阻害がみられた。すなわちキサントレン系色素では呼吸阻害よりも膜透過性亢進が先行して引き起こされると考えられる。すなわち、キサントレン系色素による黄色ブドウ球菌の光不活性化は、呼吸阻害よりも膜透過性亢進が強く引き起こされ、同時に膜電位を消失させていることが示された。本研究で用いたキサントレン系色素の中では、ローズベンガルは置換基としてヨウ素等のハロゲンを含むため比較的脂溶性が高いことが予想され、細胞質膜への移行性が高く、強い光不活性化作用を示したと考えられる。

図 2-13 にクロリンおよびキサントレン系色素による細菌の不活性化機構の想定図を示す。

また、暗所の条件においては、いずれの光増感剤も作用を示さなかった。

(a)



(b)

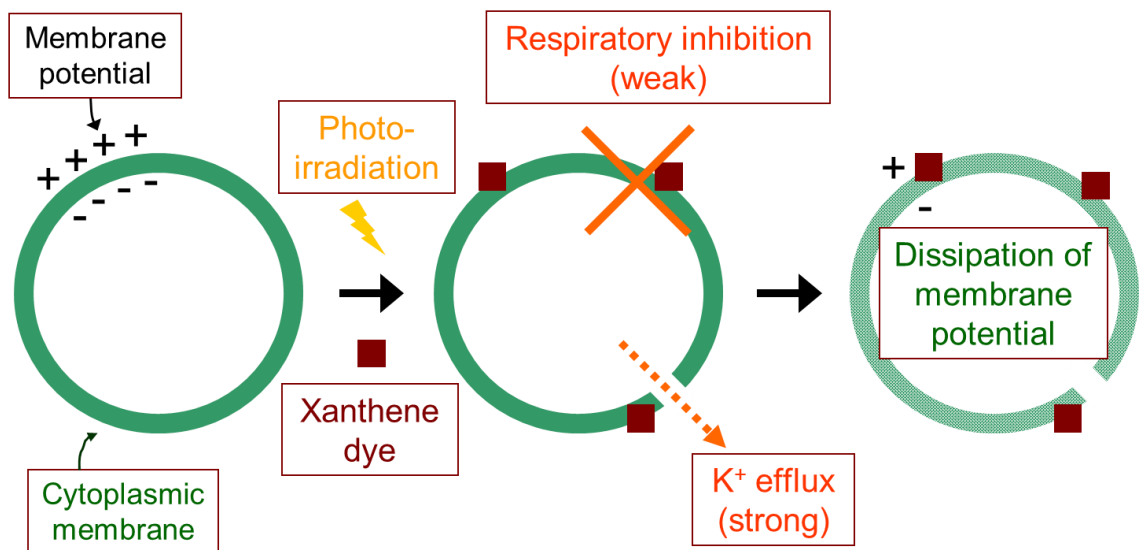


図 2-13 クロリン (a) およびキサントン系色素 (b) による細菌の光不活性化機構の想定図

第3章 ウシ赤血球に対する光増感剤の作用

3.1 序論

第2章において黄色ブドウ球菌に対する作用が示された。本章ではさらに細胞膜に対する作用を詳細に検討するため、赤血球を用いた検討を行った。

赤血球は生体の血管内に存在する細胞であるため、薬物との相互作用が重要であり、さらに、遊離型の浮遊細胞であるため電極法を用いた測定が容易であることから、生体膜モデルとして優れていると考えられる^{53), 54)}。

赤血球の細胞膜はリン脂質とコレステロールを主成分とする脂質二重層で構成されている⁵⁵⁾。光増感剤存在下で光照射を行うことにより、光増感反応により一重項酸素が生成し、細胞質膜の脂質等が酸化作用により損傷を受ける。損傷を受けた細胞では、内部に存在する電解質の流出が起こり、その損傷の程度が大きいとヘモグロビンをはじめとした高分子の原形質の漏出が起こり溶血に至ると考えられる。したがって、赤血球に対して電解質の流出および溶血活性を測定することで、光増感剤が細胞質膜に与える損傷の程度を評価することが可能である。

電解質の流出は、細菌同様 K^+ をマーカーとして K^+ 電極を用いた K^+ 流出量の定量より評価することができる。また、溶血活性は漏出したヘモグロビンの可視光領域の吸収を測定することにより算出することができる。

本研究では、10分間の光照射におけるクロリンおよびキサントゲン系色素による赤血球膜に対する作用を明らかにすることを目的とし、膜透過性および溶血活性の観点から検討した。赤血球としてウシ赤血球を用いて、 K^+ 流出を細菌同様に K^+ 電極を用いて測定を行い、さらに第2章において測定した黄色ブドウ球菌からの K^+ 流出量と比較した。溶血活性は、吸光光度法を用いて測定した。

3.2 溶血活性の測定について

赤血球が溶血すると細胞内からヘモグロビンが漏出する。ヘモグロビンは可視領域に吸収ピークをもつため、分光光度法により定量可能である。ヘモグロビンは、ソーレー帯と呼ばれる吸収ピーク（波長 400 nm 付近）と Q 帯と呼ばれる吸収ピーク（波長 500 - 600 nm 付近）を有している⁵⁶⁾。図 3-1 はヘモグロビンの吸収スペクトルを示している。

本研究で用いた光増感剤において、キサントゲン系色素は波長 550 nm 付近に吸収ピークを有するため、ヘモグロビンのソーレー帯の吸収波長と互いに重なり合わないため、キサントゲン系色素による溶血活性の測定には吸光度の大きいソーレー帯のピーク波長である 414 nm で測定した。一方クロリンは、400 nm 付近に吸収ピークを有するため、ヘモグロビンのソーレー帯とピークが重なる。したがって、クロリンによる溶血活性の測定には、Q 帯のピーク波長の一つである 540 nm で測定を行った。図 3-2 はクロリン e4 およびローズベンガル 1 μ M の PBS 中の吸収スペクトルを示している。

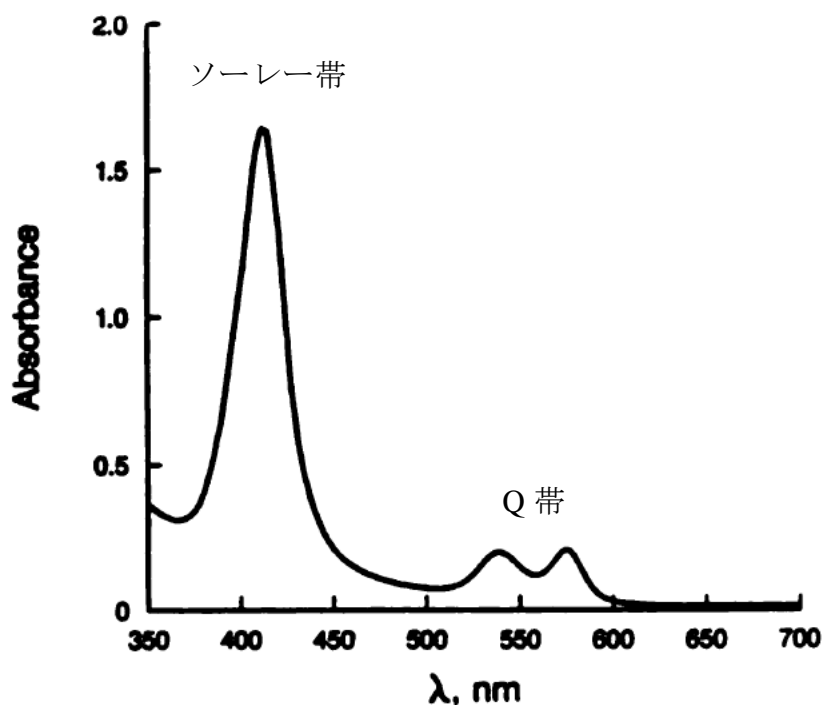


図 3-1 ヘモグロビン (0.30 g/L ; pH 7.4) の吸収スペクトル
(文献 56 : Fairbanks etc., 1992, 一部改変)

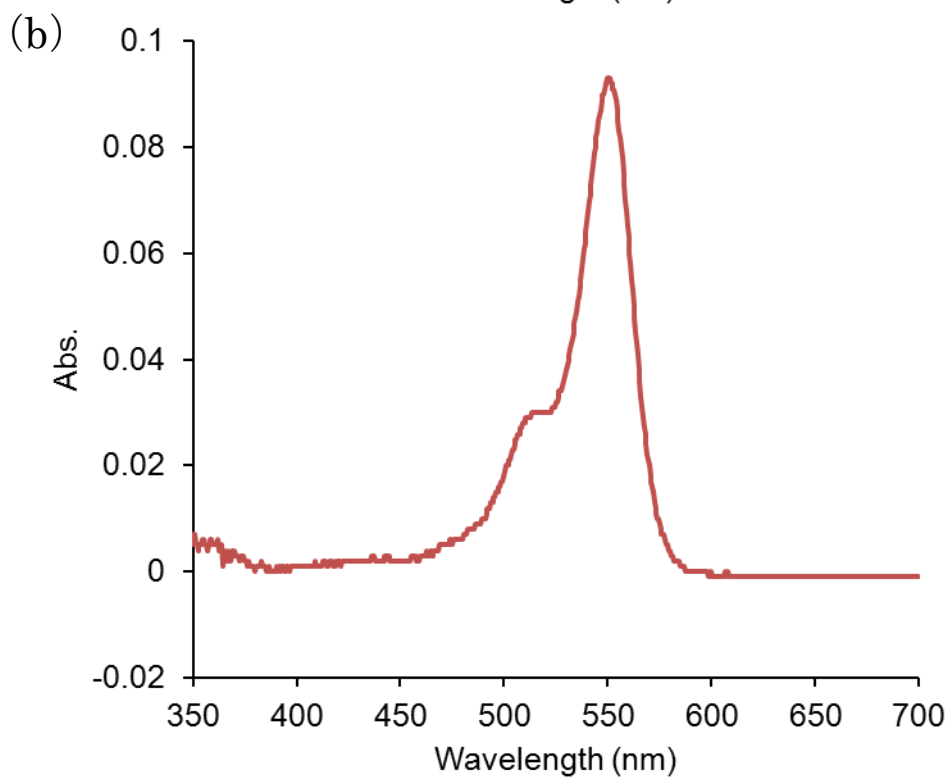
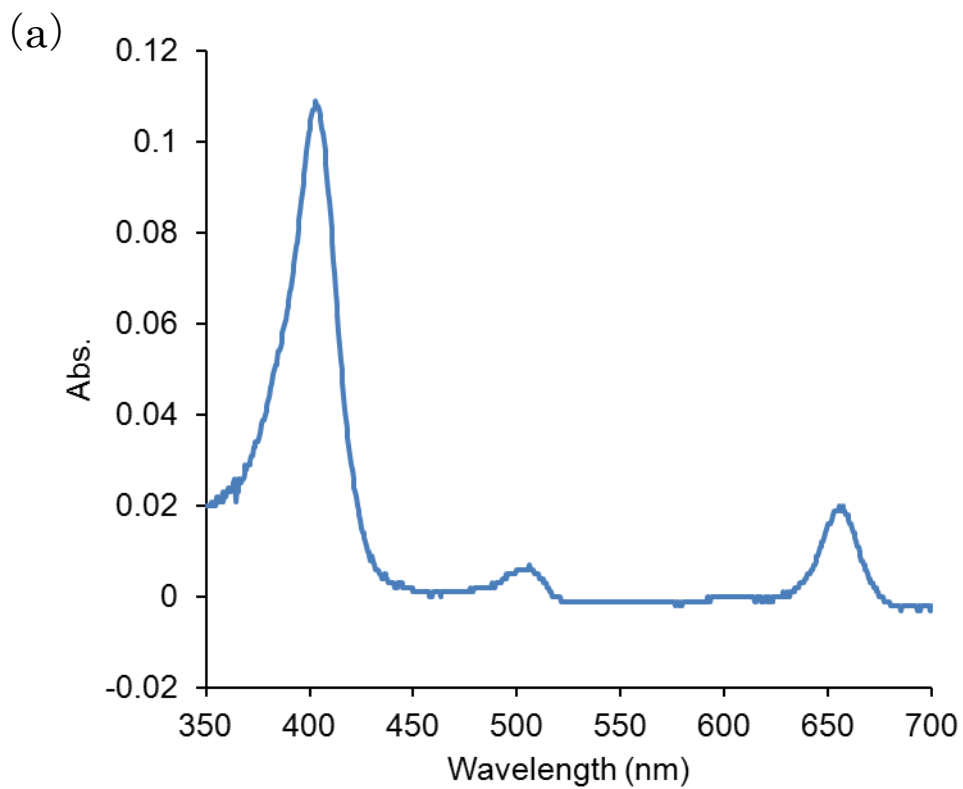


図 3-2 クロリン e4 (a)およびローズベンガル(b) の吸収スペクトル
光増感剤 1 μM を PBS に溶解したときのスペクトルを示している。

3.3 方法

3.3.1 試薬および試液の調整

クロリンおよびキサントン系色素は第2章を参照。L- α -lysophosphatidylcholine は Sigma (St. Louis, MO, USA)製 (純度 >99%) を水溶液として用いた。その他試薬は特級品のものを用いた。

3.3.2 ウシ赤血球

ウシ赤血球は、ジャパンラム (広島) より購入した。使用の際にはウシ保存血を採血管にとり、生理食塩水で2回洗浄した後、PBS でヘマトクリット値が10% となるように懸濁し、氷中に保存しながら使用した。

3.3.3 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 μ M) またはキサントン系色素 (最終濃度 0.1~5 μ M) 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。光照射後、検液 1 mL を遠心管に移し 1300 g で5分間遠心分離した。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、溶血活性は分光光度計 (UVmini-1240; 島津, 京都) を用いて、ヘモグロビンの吸光度から算出した。100%のK⁺流出および溶血の決定には、L- α -lysophosphatidylcholine (最終濃度 50 μ M) を用いた^{57), 58)}。

3.4 結果

3.4.1 K⁺流出の測定

図 3-3 はクロリンおよびキサントン系色素によるウシ赤血球からの K⁺流出の濃度依存性を示したグラフである。クロリンにおいては (図 3-3a), クロリン e4 およびクロリン e6 は黄色ブドウ球菌からの K⁺流出と同様に低濃度より K⁺流出を示し, 1 μM ではほぼ 100%の K⁺が流出した。一方, タラポルフィンナトリウムによる K⁺流出は 1 μM で, 41 ± 2% (n = 3) であった。キサントン系色素では (図 3-3b), ローズベンガルは 1 μM でほぼ 100%と大きな流出がみられた。フロキシシン B およびエリスロシン B は 1 μM で K⁺流出がそれぞれ 64 ± 6% (n = 3), 14 ± 2% (n = 3) であり, 特にエリスロシン B では低い値となったが, 5 μM においてはそれぞれ 98 ± 5% (n = 3), 79 ± 13% (n = 3) まで K⁺流出が引き起こされた。エオシン B では K⁺流出はほとんどみられなかった。

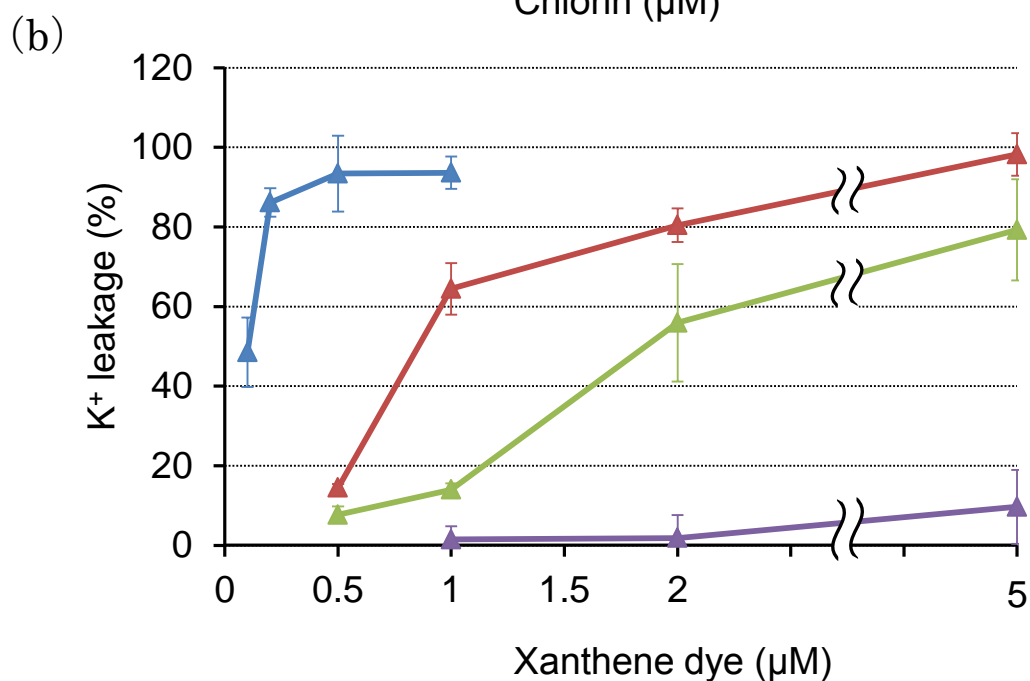
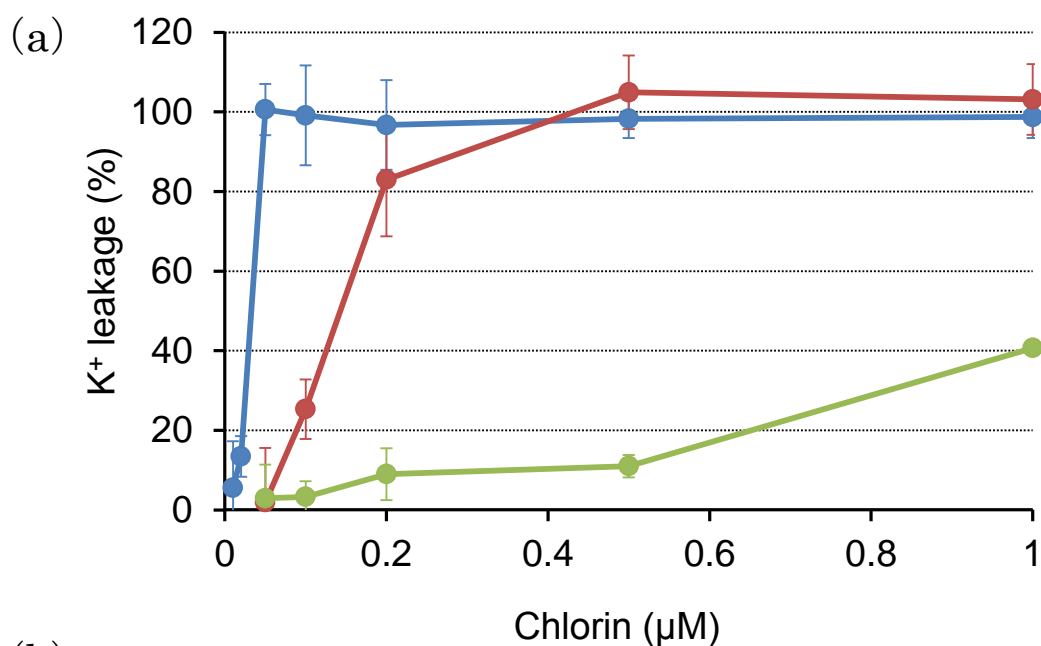


図 3-3 クロリン(a)およびキサントン系色素(b)によるウシ赤血球からの K^+ 流出の濃度依存性

クロリン e4 (●), クロリン e6 (●), タラポルフィンナトリウム (●), ローズベンガル (▲), フロキシシン B (▲), エリスロシン B (▲), エオシン B (▲) 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。

3.4.2 溶血活性の測定

図 3-4 はクロリンおよびキサントゲン系色素によるウシ赤血球の溶血活性の濃度依存性を示したグラフである。クロリンにおいては (図 3-4a), クロリン e4 およびクロリン e6 は K^+ 流出よりも高濃度領域において溶血活性がみられ, 1 μ M でほぼ 100%が溶血した。一方, タラポルフィンナトリウムでは溶血はほとんど引き起こさないことが示された。キサントゲン系色素では (図 3-4b), ローズベンガルは低濃度より溶血がみられ, 1 μ M でほぼ 100%が溶血した。フロキシでは, 低濃度では溶血活性はみられず 5 μ M で $42 \pm 7\%$ ($n = 3$) 溶血が引き起こされている。エリスロシン B およびエオシン B では溶血活性はみられなかった。

光照射しない場合, クロリンおよびキサントゲン系色素はウシ赤血球に対し, K^+ 流出および溶血ともにみられなかった。

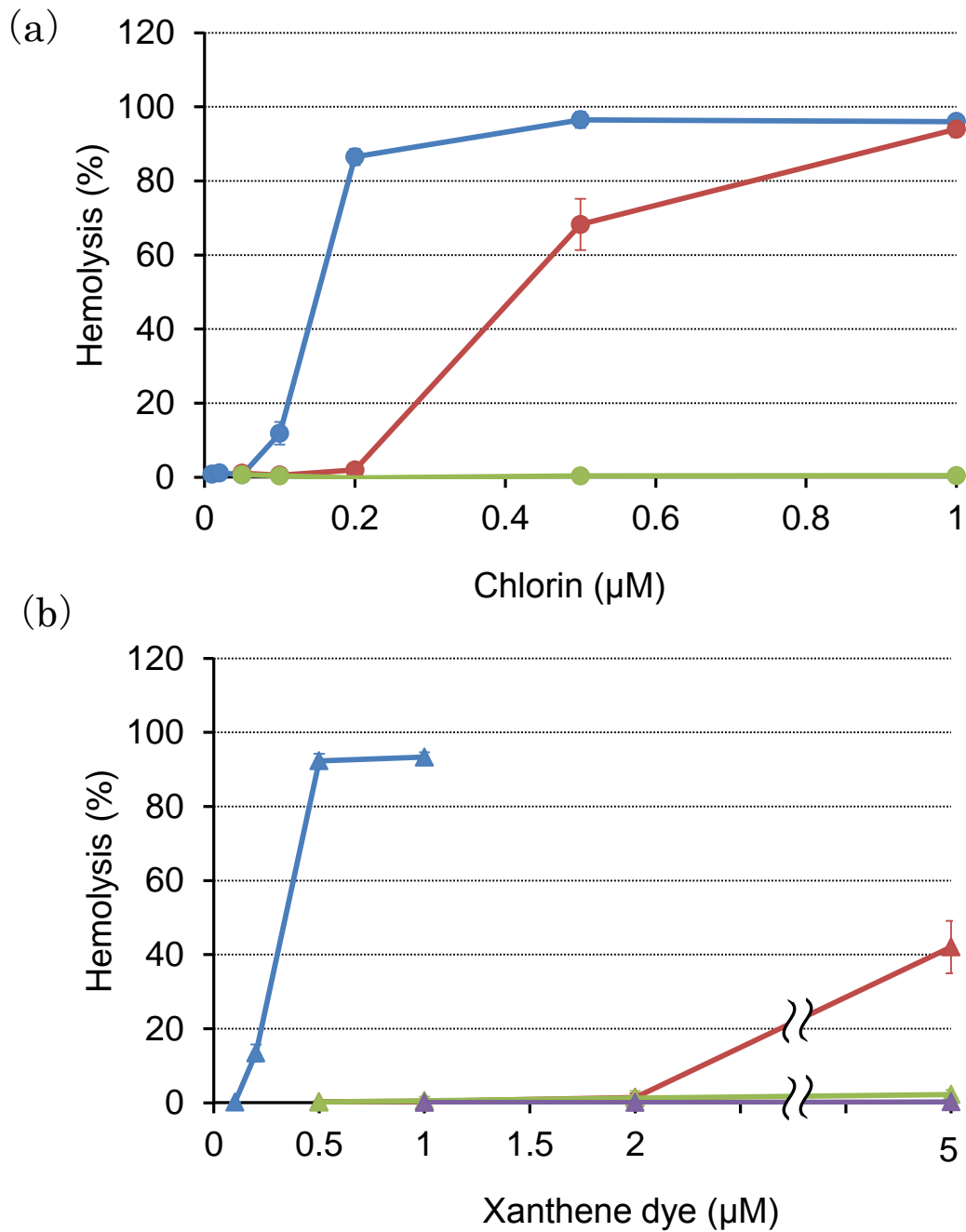


図 3-4 クロリン(a)およびキサントン系色素(b)によるウシ赤血球の溶血活性の濃度依存性
 クロリン e4 (●), クロリン e6 (●), タラポルフィンナトリウム (●), ローゼベンガル (▲), フロキシシン B (▲), エリスロシン B (▲), エオシン B (▲) 存在下でウシ赤血球 (0.5%ヘマトクリット) に常温で 10 分間光照射した。各値は平均値 \pm 標準偏差 ($n=3$) で表している。

3.5 考察

本章では、キサントゲン系色素およびクロリンによるウシ赤血球に対する細胞膜の損傷を、 K^+ 流出、溶血活性の観点から検討した。

クロリンやキサントゲン系色素が光照射により赤血球を溶血させることは知られていたが、溶血活性に加えて K^+ 流出を同時に測定することで、より詳細な膜損傷の程度を調べることができた。

クロリン e4, クロリン e6 およびローズベンガルはウシ赤血球に対して、低濃度より強い K^+ 流出を示し、その流出率は黄色ブドウ球菌に対する K^+ 流出率と同程度であった。これらの光増感剤は、さらに高濃度領域では溶血活性も示し、強い膜損傷を引き起こすことが示された。フロキシシン B およびエリスロシン B は、1 μM では K^+ 流出を引き起こしたが、溶血活性はみられなかった。すなわち、膜損傷を引き起こしているものの溶血に至るほどその損傷の程度が大きくないことがわかる。フロキシシン B およびエリスロシン B は、黄色ブドウ球菌に対しても 1 μM ではローズベンガルほどの強い作用はみられず、ウシ赤血球および黄色ブドウ球菌に対する作用の強さは同程度であることがわかる。また、フロキシシン B は 5 μM においては溶血作用を引き起こすため、より高濃度では比較的強い膜損傷を引き起こすことが示された。一方で、エオシン B やタラポルフィンナトリウムは高濃度では K^+ 流出が少量みられたが、溶血活性はいずれの濃度でもみられず、黄色ブドウ球菌と同様に光不活性化作用は弱いことが示された。

以上より、これらの光増感剤は光照射により赤血球膜に損傷を与え、 K^+ 流出および溶血活性を引き起こすことが示され、その膜損傷の強さは、クロリンでは、クロリン e4 > クロリン e6 >> タラポルフィンナトリウムの順となり、キサントゲン系色素では、ローズベンガル > フロキシシン B > エリスロシン B >> エオリンの順となり、黄色ブドウ球菌と同様の傾向を示した。これらの光増感剤による赤血球の光不活性化も、分子構造の違いによる脂溶性の差が作用の強さに影響を与えていることが予想される。

第4章 光増感剤による赤血球の形態変化

4.1 序論

光増感剤により細胞が不活性化する際には一重項酸素の生成が必要である。しかし、光増感反応により生成した一重項酸素は寿命が非常に短いため⁵⁹⁾、細胞外に遊離している光増感剤が一重項酸素を生成したとしても光不活性化作用は引き起こさない¹¹⁾。したがって、光増感剤が細胞を光不活性化させるには、細胞内に光増感剤が取り込まれる必要があると考えられる。第3章において、クロリンおよびキサントレン系色素はウシ赤血球に対して膜損傷を引き起こすことが示された。したがって、これらの光増感剤は細胞膜中に取り込まれていることが予想される。

そこで、本章ではクロリンおよびキサントレン系色素の赤血球膜への取り込み量を検討するため、赤血球の形態変化の観察を行った。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性質をもっている^{54), 60), 61)}。その性質を利用し、光増感剤の赤血球膜への取り込み量を推定した。

4.2 赤血球の形態変化について

赤血球は通常、中くぼみの円盤状の形をしている。しかし、赤血球膜は内的・外的因子により形態を変化させる。赤血球の脂質二重層に薬物を取り込まれると、その存在場所や取り込み量により形態が変化する^{54), 60), 61)}。例えば、脂質二重層の外層部分に主に薬物を取り込まれた場合には、赤血球は正常な円盤状細胞 (discocyte) からトゲ状の突起が生じる。このとげ状の状態は echinocyte または外方突出型変形 (crenation) と呼ばれる。薬物濃度が上昇し、形態の変化が進むと最終的にはほぼ完全な球状細胞 (spherocyte) に至る。また、脂質二重層の内層部分に薬物を取り込まれた場合には、赤血球は discocyte から、膜の内方へ陥没するようになる。このように陥没した形態を stomatocyte または内方陥没型

変形（invagination）と呼ぶ。stomatocyte への変化も、形態の変化が進行すれば最終的には spherocyte に至る。図 4-1 は Sheetz らによって見出された赤血球の脂質二重層への薬物の取り込みと形態の変化を示す。

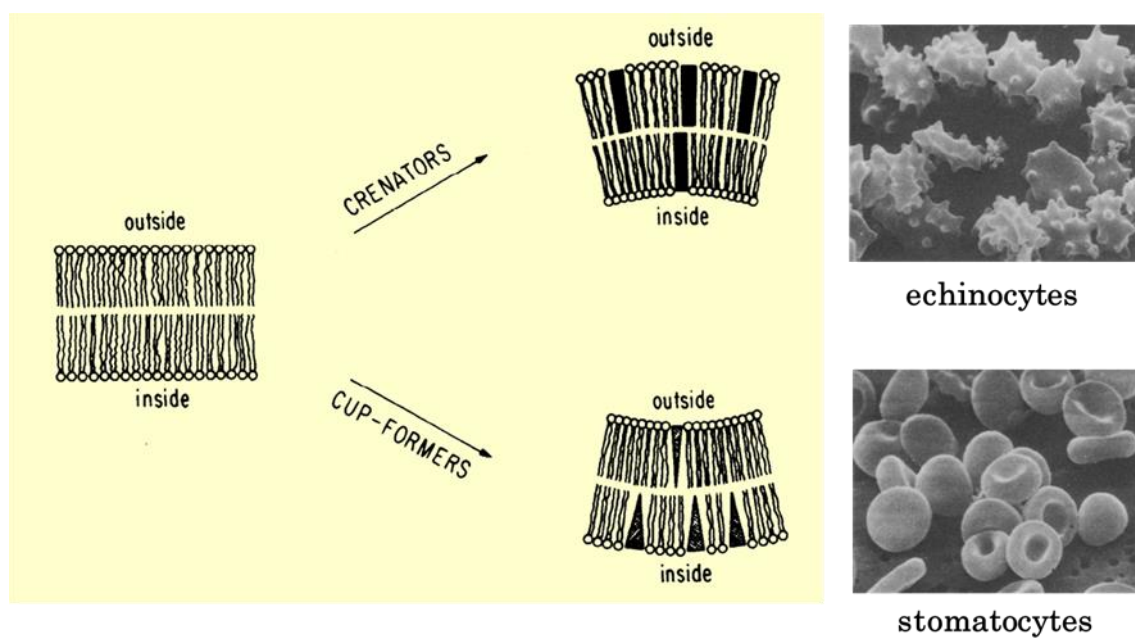


図 4-1 赤血球の形態変化
(文献 60 : Sheetz and Singer, 1974)

このように赤血球の形態変化を観察することで、薬物の細胞膜への取り込み場所及び取り込み量を推測することができる。形態変化を評価する際には、Sheetz らの方法に従い、変化の過程を 4 段階に分けて評価した^{54), 60)}。discocyte の状態を 0 として、echinocyte に変化し、最終的に spherocyte に至るまでの段階を+1 から+4 とする。また、stomatocyte に変化し spherocyte になるまでの段階を-1 から-4 としている。図 4-2 は各段階における形態変化の状態を示している。通常この段階分けの評価法はヒト赤血球に対して使用されるものであるが、本研究ではウシ赤血球に適用した。ウシ赤血球はヒト赤血球と比較して細胞のサイズは異なるものの、膜構造は基本的に同様であるため、ウシ赤血球に対しても形態変化を 4 段階に分けて評価した⁶²⁾。

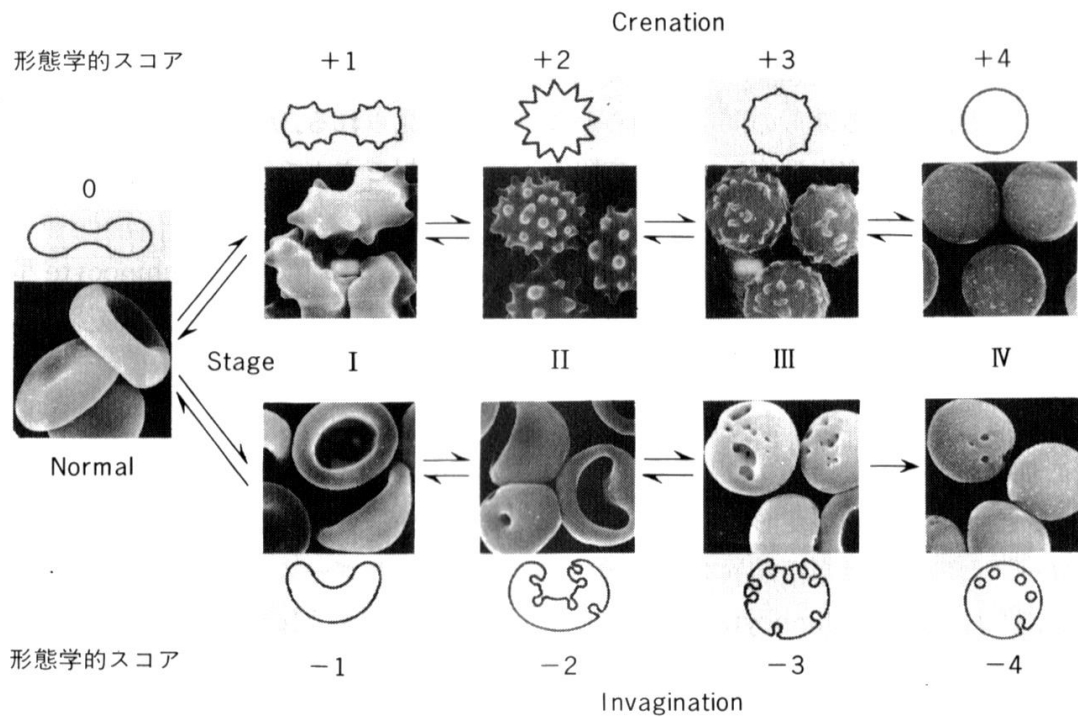


図 4-2 赤血球の形態変化の段階
(文献 54 : 藤井達三 ほか, 1987)

4.3 方法

4.3.1 試薬および試液の調整

クロリンおよびキサントン系色素は第 2 章を参照。グルタルアルデヒドは和光純薬（大阪）製（特級品）を用いた。その他試薬は特級品のものを用いた。

4.3.2 ウシ赤血球

ウシ赤血球については第 3 章を参照。

4.3.3 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。その後、クロリン（最終濃度 0.05~1 μM ）またはキサントン系色素（最終濃度 0.1~5 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 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.4) に溶解した 2% グルタルアルデヒド 100 μL と混和し、赤血球を固定した。

赤血球の形態は、光学顕微鏡（ニコン，東京）を Photonic microscope system（Argus-100；浜松ホトニクス，静岡）によりモニターへと接続し、記録および観察を行った。

4.4 結果

図 4-3 は、クロリン 1 μM による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。光増感剤を添加していない赤血球は円盤状の discocyte であるのに対し、光不活性化作用の強いクロリン e4 およびクロリン e6 を添加した場合、赤血球の形態が spherocyte に近い echinocyte まで変化しているのがわかる。また、タラポルフィンナトリウムでも echinocyte への形態変化がみられたがその形態学的スコアは+1.0 であった。

図 4-4 は、キサントン系色素 5 μM による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。ローズベンガルでは、echinocyte への大きな形態の変化が

観察され、その形態学的スコアは+3.3であった。フロキシシン B、エリスロシン B およびエオシン B でも echinocyte への形態変化がみられ、その形態学的スコアはそれぞれ+1.7, +1.0, +0.9 であり、エリスロシン B とエオシン B は同程度であった。

図 4-5 はクロリンおよびキサントレン系色素におけるウシ赤血球の形態変化の濃度依存性を示している。各光増感剤による赤血球の形態変化を 4 段階で評価している。各光増感剤は濃度依存的に形態変化の段階が進んでおり、その形態学的スコアの大きさは、光不活性化作用の強さと相関性を示している。

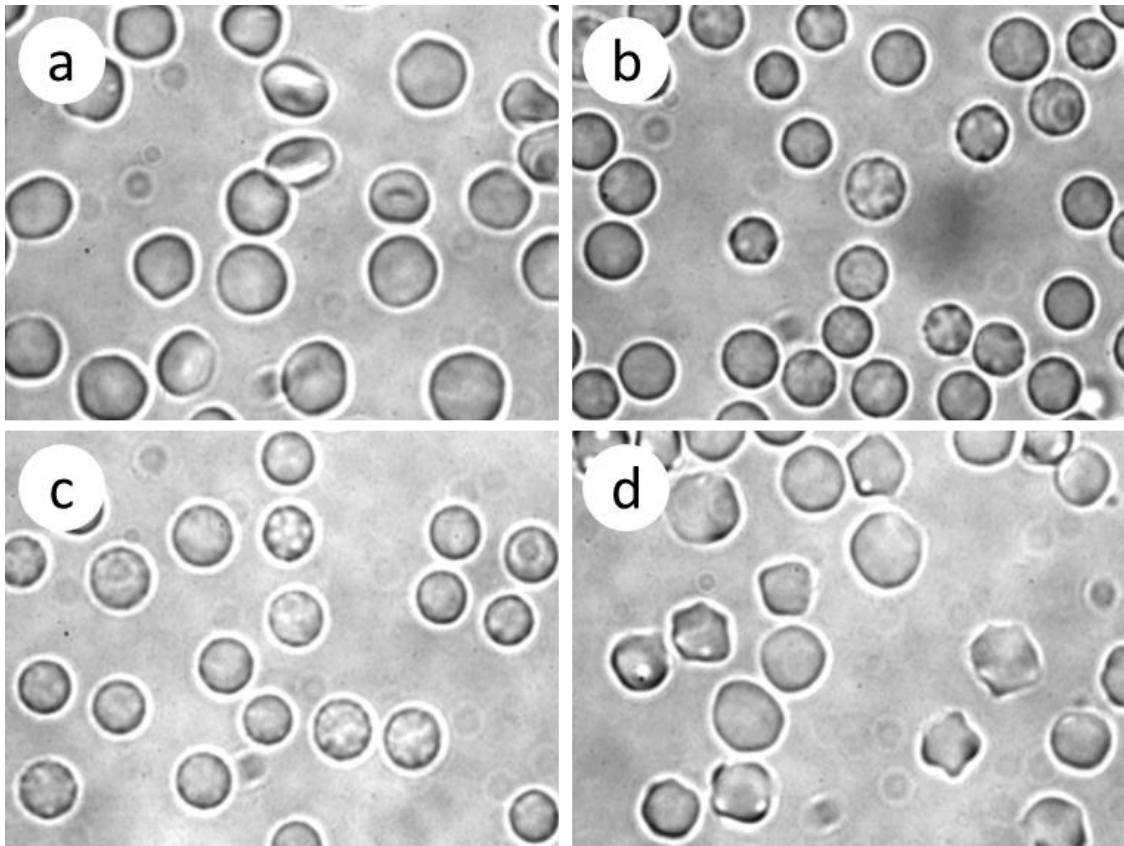


図 4-3 クロリンによるウシ赤血球形態変化の顕微鏡写真

(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 μ M)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。

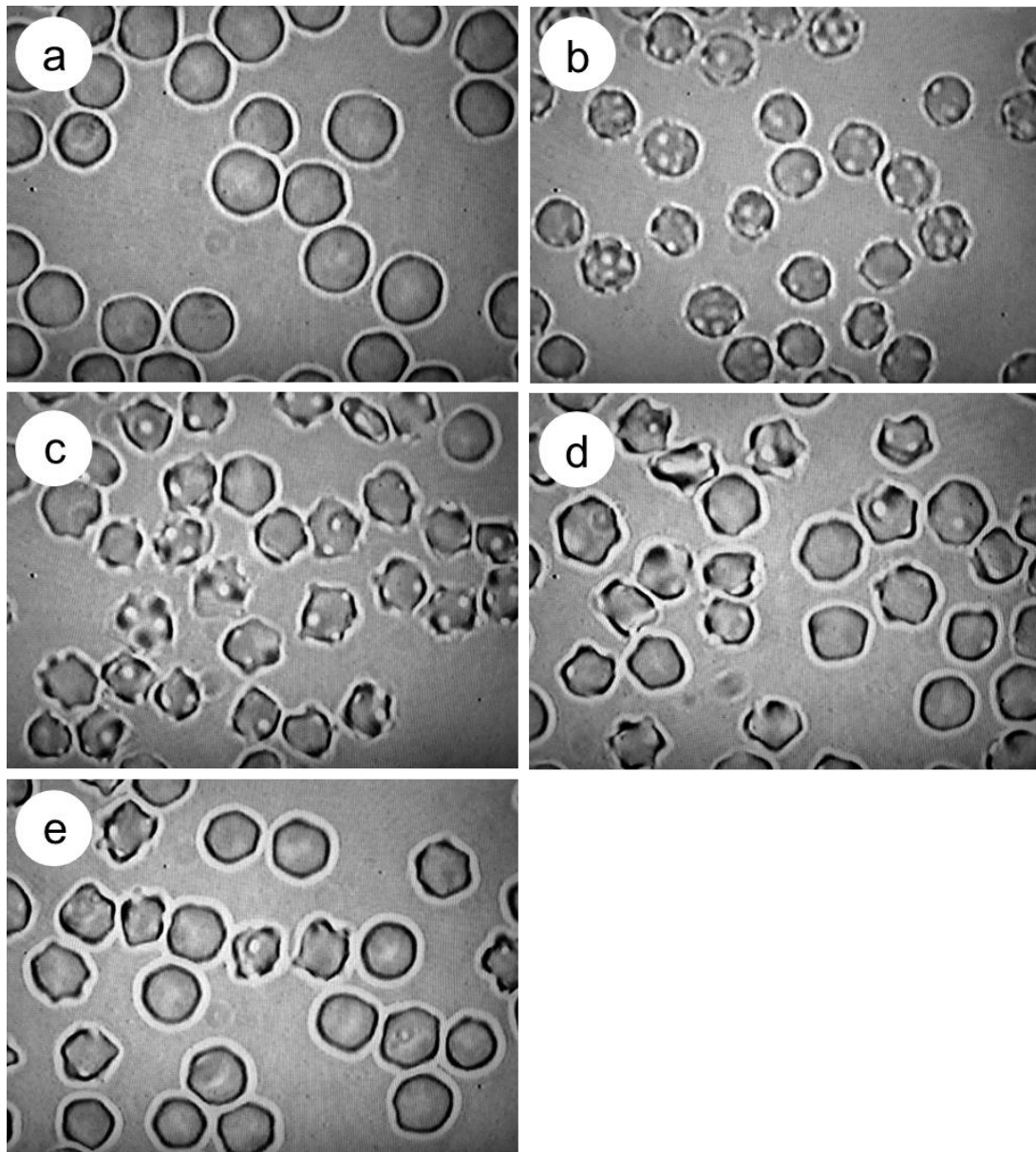


図 4-4 クロリンによるウシ赤血球形態変化の顕微鏡写真
(a)正常細胞 (b) ローズベンガル, (c) フロキシシン B, (d) エリスロシン B,
(e)エオシン B 存在下(1 μ M)でウシ赤血球 (0.5%ヘマトクリット) を 37°Cで
10 分間振盪培養した。

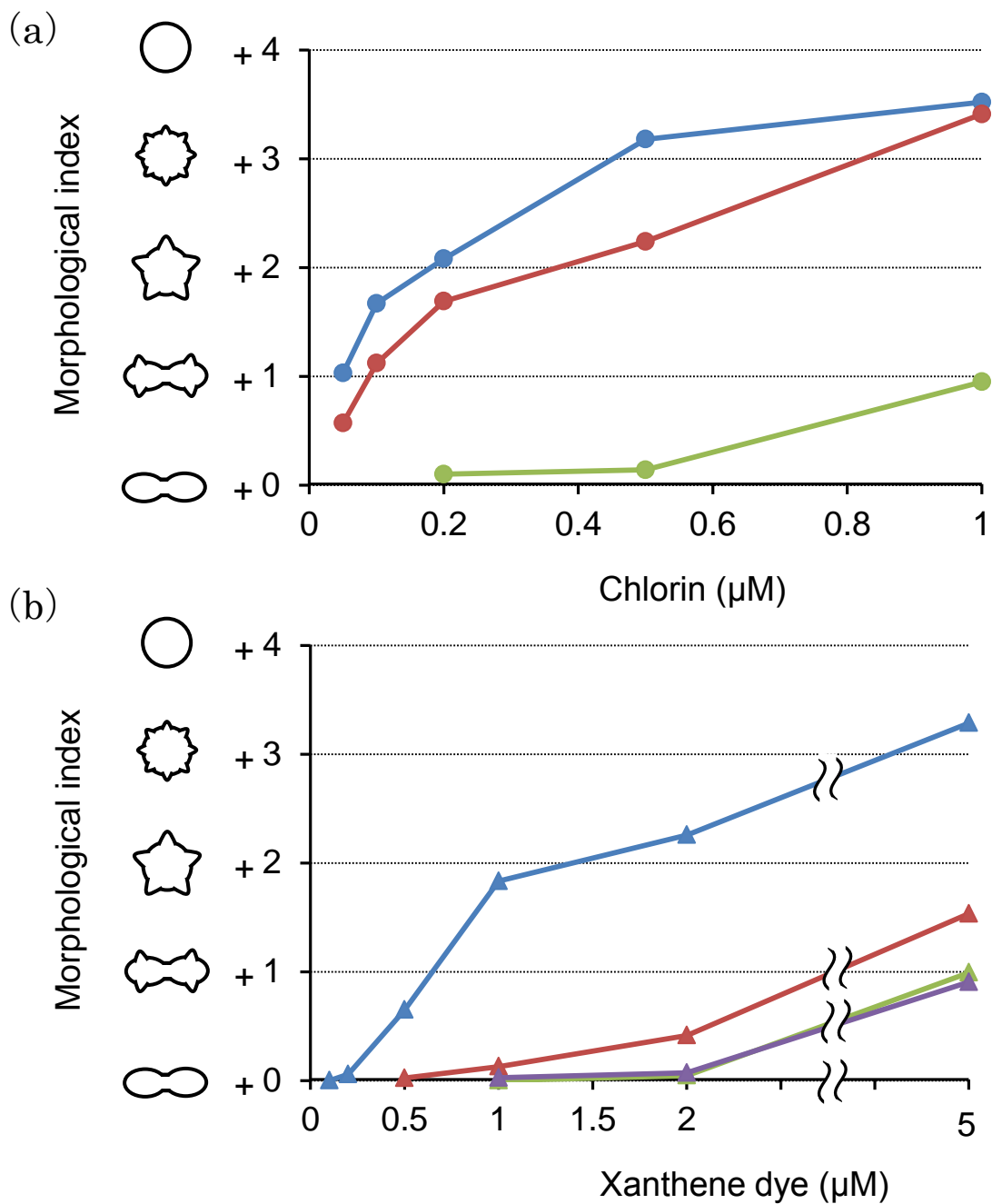


図 4-5 クロリン(a)およびキサントン系色素(b)によるウシ赤血球形態変化の濃度依存性

クロリン e4 (●), クロリン e6 (●), タラポルフィンナトリウム (●), ローゼベンガル (▲), フロキシシン B (▲), エリスロシン B (▲), エオシン B (▲) 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。

4.5 考察

本章では、クロリンおよびキサントゲン系色素によるウシ赤血球の形態変化の観察により光増感剤の細胞への取り込み量を検討した。

クロリンにおいて、光不活性化作用の強いクロリン e4 およびクロリン e6 は、10 分間でウシ赤血球の形態を大きく変化させていたことより、効率よく細胞質膜に取り込まれていることがわかる。一方で、光不活性化作用の弱いタラポルフインナトリウムでは、形態の変化の段階は低く、あまり細胞膜に取り込まれていないことが明らかとなった。したがって、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。キサントゲン系色素において、ローズベンガルはウシ赤血球への取り込み量は大きく、フロキシシン B のウシ赤血球の取り込み量も光不活性化作用と同様の傾向であったが、エリスロシン B およびエオシン B では、ウシ赤血球に対して同程度の取り込みがみられ、光不活性化作用と必ずしも同様の結果にはならなかった。

これらの光増感剤はいずれもウシ赤血球を *echinocyte* 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。

クロリンおよびキサントゲン系色素では、同じ骨格をもつ光増感剤においてウシ赤血球への取り込み量に差がみられた。赤血球の細胞膜は脂質二重層で構成されているため、脂溶性の高い分子構造をもつ光増感剤が効率よく細胞膜に取り込まれると考えられる。クロリンでは、各クロリンの分子構造内のカルボキシ基の数の違い、キサントゲン系色素においては、ハロゲンなどの置換基の違いが脂溶性に差を生じさせていると予想される。この脂溶性の差により、細胞質膜への親和性が異なり、赤血球膜への取り込み量に差が生じていると考えられる。

第5章 光増感剤による一重項酸素の生成効率

5.1 序論

光増感剤が光細胞を光不活性化するためには，光増感反応による一重項酸素の生成が必要となる⁴⁾⁹⁾。したがって，各光増感剤の間で一重項酸素の生成効率に差があれば，光不活性化作用の強さに影響を与える事が考えられる。

本章では，光照射したキサントゲン系色素およびクロリンによる水溶液中での一重項酸素の生成効率を測定し，一重項酸素の生成効率の差が光不活性化作用に与える影響を検討した。

一重項酸素の生成効率は，AHPをプローブとして測定した⁶³⁾。AHPは水溶液中で波長318 nmに吸収ピークをもつが，一重項酸素により酸化されると，波長318 nmの吸収を失う。したがって，一重項酸素の生成によるAHPの減少量を吸光度法により定量することで，一重項酸素の生成効率を算出することができる。

5.2 方法

5.2.1 試薬および試液の調整

クロリンおよびキサントゲン系色素は第2章を参照。AHPはSigma (St. Louis, MO, USA)製（純度 >98%）を水溶液として用いた。その他試薬は特級品のものを用いた。

5.2.2 一重項酸素生成効率の測定

試験管中にクロリン（最終濃度 1 μM ）またはキサントゲン系色素（最終濃度 1 μM ）と AHP（最終濃度 200 μM ）を PBS に溶解し全量 3 mL とする。この検液を吸光セルに移し吸光度（318 nm）を測定する。その後，図 5-1 に示すように常温で攪拌しながらプロジェクターランプで 1 分間光照射する。光照射後の AHP の吸光度（318 nm）を測定し，光照射前後の波長 318 nm の吸光度の差から AHP の減少量を定量し，一重項酸素生成効率を算出した。図 5-2 はローズベンガル存在下での AHP の吸収スペクトルの光照射前後における変化を示している。

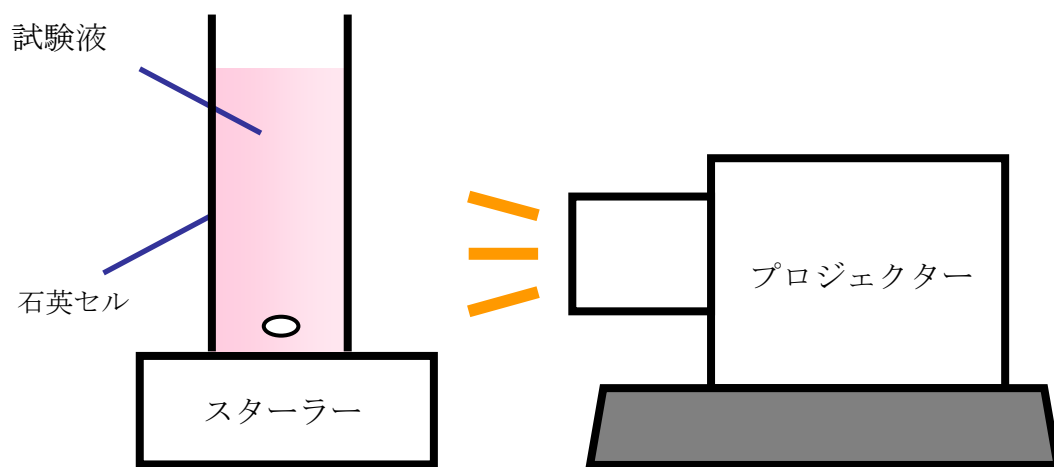


図 5-1 光照射の装置

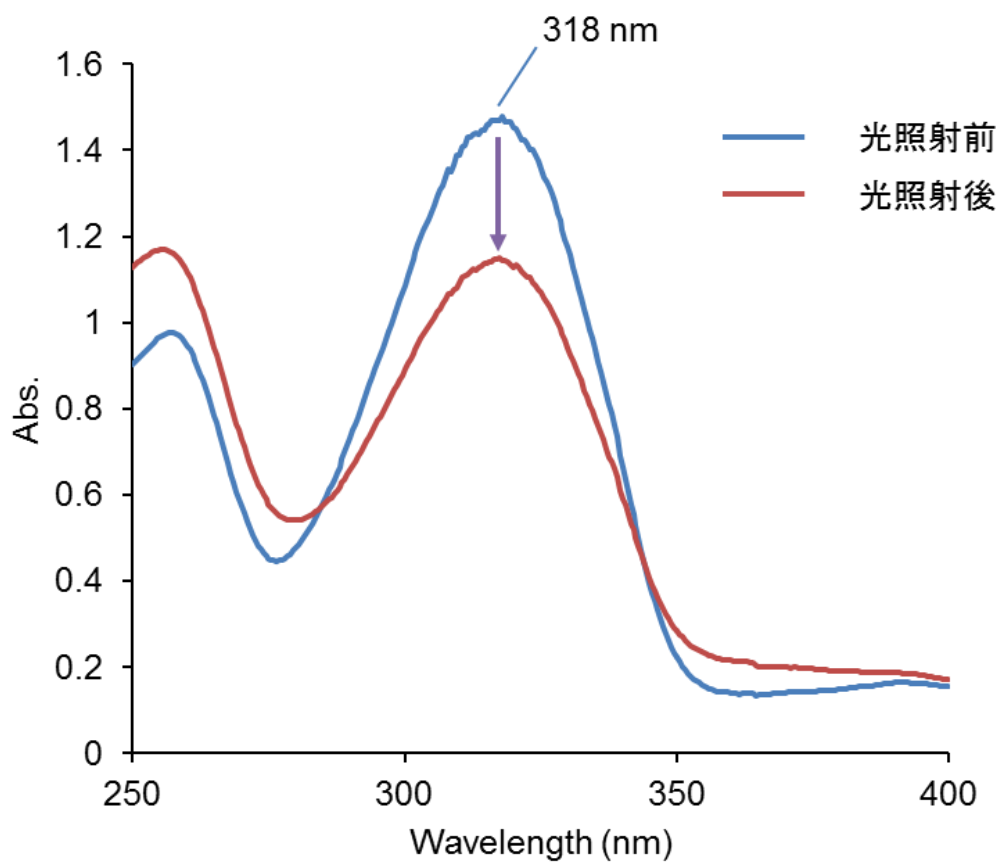


図 5-2 ローズベンガルによる AHP の吸収スペクトルの変化
 PBS 中にローズベンガル (最終濃度 $1 \mu\text{M}$) および AHP (最終濃度 $200 \mu\text{M}$) を溶解して吸収スペクトルを測定した。青線は照射前, 赤線は 1 分間の照射を行った後の吸収スペクトルを示している。照射により一重項酸素が生成し, AHP の吸収極大である波長 318 nm の吸光度が減少している。

5.3 結果

クロリンおよびキサントン系色素による PBS 溶液中での一重項酸素の生成効率の測定結果を表 5-1 に示す。これらの値は、1 分光照射を行った際の AHP の減少量から算出しており、一重項酸素の生成効率は、クロリン e4 を基準として相対値で示している。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の間では、一重項酸素の生成効率に大きな差はみられなかった。一方、キサントン系色素では、ローズベンガル>フロキシシン B>エリスロシン B となりやや差がみられた。また、これらの色素は、クロリンと比較して一重項酸素の生成効率は高い傾向があった。一方、エオシン B の一重項酸素の生成効率は他の光増感剤と比較して小さな値となった。

表 5-1 光増感剤による一重項酸素の生成効率

Photosensitizer ^{a)}	Singlet oxygen generation ^{b)}
Chlorin e4	1.00±0.02
Chlorin e6	0.96±0.03
Talaporfin sodium	1.12±0.05
Rose bengal	1.80±0.05
Phloxine B	1.63±0.05
Erythrosine B	1.45±0.04
Eosin B	0.42±0.02

a)濃度 1 μ M; b)クロリン e4 を基準として平均値 \pm 標準偏差 ($n = 3$) で示している。

5.4 考察

本章では光増感剤による一重項酸素の生成効率の測定を行った。AHP をプローブとすることで、吸光度法により簡便に測定することが可能であった。

光増感反応による一重項酸素の生成は、光増感剤の基底状態と三重項励起状態のエネルギー差と、酸素の三重項状態と一重項状態のエネルギー差が近いときに効率よく起こる³⁾。したがって、一重項酸素の生成効率は、光増感剤の分子構造および溶媒に依存する。本研究では PBS 溶液における一重項酸素の生成効率を測定した。

本研究で用いたクロリン間における 1 分間の光照射における一重項酸素の生成効率には、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は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。

キサントゲン系色素では、一重項酸素の生成効率はローズベンガル>フロキシシン B>エリスロシン B>>エオシン B の順であり、光不活性化作用の強さと同様の傾向であった。しかし、ローズベンガル、フロキシシン B およびエリスロシン B の間では生成効率に大きな差はみられなかったため、光不活性化作用の強さに大きな影響を与えているとは言い切れない。一方、エオシン B は一重項酸素の生成効率は低く、光不活性化作用の強さに影響を与えることが予想される。

総括

I 本研究のまとめ

本研究では、キサントゲン系色素およびクロリンによる細胞の光不活性化機構の解析を目的に、黄色ブドウ球菌およびウシ赤血球の細胞膜に対する作用を検討した。

表 6-1 は、本研究で用いた各光増感剤の黄色ブドウ球菌への作用、ウシ赤血球への作用および一重項酸素の生成効率の強さをまとめたものである。

第 2 章および第 3 章で、黄色ブドウ球菌およびウシ赤血球の細胞膜に対する作用を明らかにしたが、クロリンによる各膜機能に対する作用の強さは、クロリン e4>クロリン e6>>タラポルフィンナトリウムの順となり、キサントゲン系色素での作用の強さはいずれも、ローズベンガル>フロキシシン B>エリスロシン B>>エオシン B の順となり、細菌に対する作用と赤血球に対する作用の間には相関性が確認された。グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌の細胞質膜は、リン脂質としてホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルセリンを主成分とする脂質二重層であり、ペプチドグリカンの主成分とする細胞壁で覆われているのに対し⁴²⁾、赤血球の細胞質膜はリン脂質およびコレステロールで構成される脂質二重層であるため⁵⁵⁾、これらの細胞膜は膜構造および膜組成が異なるが、本研究で用いた光増感剤はこれらの細胞膜の違いに依存せず作用を示すことが明らかとなった。

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⁴⁾⁻⁹⁾。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⁵⁹⁾、細胞膜を効率よく不活性化させるためには、より多くの光増感剤が細胞膜に取り込まれることが重要であると考えられる。また、光増感剤の間で一重項酸素の生成効率が異なれば、光不活性化作用の強さに差が生じることが考えられる。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、光増感剤の細胞への取り込み量および一重項酸素の生成効率の 2 つが挙げられる。

表 6-1 光増感剤による作用のまとめ

Photo sensitizer	<i>S. aureus</i>				Bovine erythrocyte			
	Cell survival	Respiratory inhibition	K ⁺ leakage	Dissipation of membrane potential	K ⁺ leakage	Hemolysis	Shape change	Genelation of singletoxygen
Chlorin e4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Chlorin e6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Talaporfin sodium	+	-	-	-	+	-	+	++
Rose bengal	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Phloxine B	++	+	++	++	++	+	++	+++
Erythrosine B	++	+	++	++	++	+	+	+++
Eosin B	-	-	-	-	+	-	+	+

+ : 作用あり - : 作用なし

第 4 章において、赤血球の形態変化の観察からクロリンおよびキサントニン系色素の細胞への取り込み量を推測したところ、クロリンにおいては、作用の強いクロリン e4 およびクロリン e6 は細胞膜への取り込み量が多く、作用の弱いタラポルフィンナトリウムでは、細胞質膜への取り込み量は少ないことが示された。すなわち、光不活性化作用と細胞への取り込み量の間により相関性があることが明らかとなった。キサントニン系色素において、作用の強いローズベンガルは細胞膜への取り込み量が大きく、フロキシシン B やエリスロシン B でも取り込み量と光不活性化作用の強さとの間に相関性が得られた。一方、エオシン B はエリスロシン B と同程度の取り込み量であったが、光不活性化作用の強さはエリスロシン B > エオシン B であり、光不活性化作用の結果と取り込み量の結果は一致しなかった。

続いて、第 5 章において、一重項酸素の生成効率を測定したところ、各クロリン間では、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はクロリンによる光不活性化作用の強さの差に影響を与えていないと考えられる。キサントニン系色素の一重項酸素の生成効率は、ローズベンガル > フロキシシン B > エリスロシン B > エオシン B の順となったが、ローズベンガル、フロキシシン B、エリスロシン B の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。しかし、エオシン B では一重項酸素の生成効率が小さく、光不活性化作用の強さに影響を与えることが考えられる。すなわち、エリスロシン B とエオシン B は細胞への取り込み量は同程度だが、一重項酸素の生成効率がエオシン B では低いため光不活性化作用が弱いことが明らかとなった。

以上より、クロリンやキサントニン色素による光不活性化作用の強さは一重項酸素の生成効率および赤血球形態変化を指標とすることにより評価できることが示された。

また、形態変化の観察からこれらの光増感剤は、いずれも赤血球を echinocyte 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。すなわち、赤血球の脂質二重層の外層部分に存在する光増感剤が、光照射により膜損傷を与えることが示された。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。したがって、クロリンおよびキサント

ン系色素は細菌細胞膜に取り込まれ、光照射により膜機能に損傷を与えることで不活性化させることが示唆された。

本研究により、クロリンおよびキサントニン系色素の中でも、クロリン e4、クロリン e6 およびローズベンガルは、短時間で細菌膜機能に損傷を与え、強い抗菌作用を示すことが明らかとなったが、同時に、これらの光増感剤は赤血球に対しても膜損傷作用を示し、赤血球を溶血させることが示された。光増感剤を感染症治療薬として応用する際には、光増感剤を感染部位へ局所的に投与した後、感染部位に限定して短時間のうちに光照射を行う方法が検討されている。この方法で光増感剤を用いる場合、通常細胞への影響は少ないことが報告されている¹⁷⁾⁻²⁶⁾。

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、本研究より、短時間における細菌や赤血球に対する光不活性化作用はクロリン e4 やクロリン e6 よりも弱いことが示された。タラポルフィンナトリウムを臨床で使用する際は静脈注射により全身投与し、長時間（22～26 時間）かけて癌細胞に移行させてから光照射を行う。一方、本研究では短時間による作用を検討したため比較的作用が弱かったと考えられる。

以上より、光増感剤を感染症治療などの目的で、短時間で局所的に使用する場合には、タラポルフィンナトリウムのような従来の PDT に用いる光増感剤よりも、クロリン e4、クロリン e6 およびローズベンガルのような短時間で強い作用を示す光増感剤がより有効であると考えられる。

II 結論

本研究を通して以下の結論を得た。

- 1 細胞の脂質二重層の外層部分に主に取り込まれたクロリンおよびキサントニン系色素は、光増感反応により一重項酸素を生成することで、細胞質膜に存在する生体分子に損傷を与え、細胞を不活性化させることが明らかとなった。

- 2 光増感剤による細胞の光不活性化の強さは、一重項酸素の生成効率および赤血球の形態変化を指標として評価できることが示された。
- 3 短時間で強い光不活性化作用を示したクロリン e4、クロリン e6 およびローズベンガルは、感染症治療に対して有効であると考えられる。

発表論文目録

本研究の一部は次の論文に公表した。

【主論文】

- 1) Kato H., Komagoe K., Nakanishi Y., Inoue, T. Katsu, T., Xanthene dyes induce membrane permeabilization of bacteria and erythrocytes by photoinactivation, *Photochem. Photobiol.*, 88(2) 423-431, 2012.
- 2) 加藤久登, 駒越圭子, 勝孝, 片岡洋行, 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, 就実大学薬学雑誌, 第3巻, 37-46, 2016

【副論文】

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 勝孝, 駒越圭子, 増田和文, 加藤久登, 井上剛: センサーを用いる薬物作用の *in situ* モニタリング, 分析化学, 62(2), 121-130, 2013

参考文献

- 1) Waite. J.G., Yousef A.E.: Antimicrobial properties of hydroxyxanthenes, *Adv. Appl. Microbiol.* 69, 79-98, 2009.
- 2) Luksiene Z., Zukauskas A.: Prospects of photosensitization in control of pathogenic and harmful micro-organisms, *J. Appl. Microbiol.*, 107, 1415-1424, 2009.
- 3) 伊藤敦, 伊藤隆: 可視光・紫外光 - 光増感過程による活性酸素の生成, 蛋白質 核酸 酵素, 33(16), 2795-2802, 1988.
- 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 membrane 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) Jarvi. M.T., Niedre M.J., Patterson M.S., Wilson B.C.: The influence of oxygen depletion and photosensitizer triplet-state dynamics during photodynamic therapy on accurate singlet oxygen luminescence monitoring and analysis of treatment dose response, *Photochem. Photobiol.*, 87, 223-234, 2011.
- 9) Pattison D.I., Rahmanto A.S. Davies M.J.: Photo-oxidation of proteins, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 11, 38-53, 2012.
- 10) Thadani H., Deacon A., Peters T.: Diagnosis and management of porphyria, *Brit. Med. J.*, 320, 1647-1651, 2000.
- 11) Sharman W.M., Allen C.M., van Lier J.E.: Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications., *Drug Discov. Today*, 4, 507-517, 1999.
- 12) 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.
- 13) 川城巖, 六訂 食品衛生学, 光生館, 東京, 1980.
 - 14) 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.
 - 15) Dai T., Huang Y., Hamblin M.R.: Photodynamic therapy for localized infections—state of the art., *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 6, 170-188, 2009.
 - 16) Durantini E.N.: Photoinactivation of bacteria, *Curr. Bioact. Compound*, 2, 127-142, 2006.
 - 17) Jori G., Brown S.B.: Photosensitized inactivation of microorganisms, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3, 403-405, 2004.
 - 18) Hamblin M.R., Hasan T.: Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3, 436-450, 2004.
 - 19) Maisch T.: Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future?, *Lasers Med. Sci.*, 22, 83-91, 2007.
 - 20) 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.
 - 21) Olivia R.R.de, Schwartz-Filho H.O., Novaes A.B., Taba M.: Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study, *J. Periodontol.* 78, 965-973, 2007.
 - 22) Wainwright M.: 'Safe'photoantimicrobials for skin and soft-tissue infections, *Int. J. Antimicrobial Agents*, 36, 14-18, 2010.
 - 23) Calzavara-Pinton P.G., Venturini M., Sala R.: A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin, *J. Photochem. Photobiol. B* 78, 1-6, 2005.
 - 24) Wilson M.: Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections, *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 412-418, 2004.

- 25) Dai T., Tegos G.P., Zhiyentayev T., Mylonakis E., Hamblin M.R.: Photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a mouse skin abrasion model, *lasers Surg. Med.* 42, 38-44, 2010.
- 26) Konopka K., Goslinski T.: Photodynamic therapy in dentistry, *J. Dent. Res.* 88, 694-707, 2007.
- 27) Dietel W., Pottier R., Pfister W., Schleier P., Zinner K.: 5-Aminolaevulinic acid (ALA) induced formation of different fluorescent porphyrins: a study of the biosynthesis of porphyrins by bacteria of the human digestive tract, *J. Photochem. Photobiol.*, 86, 77-86, 2007.
- 28) Paolis A.D., Chandra S., Charalambides A.A., Bonnett R. Magnus I.A.: The effect on photohaemolysis of variation in the structure of the porphyrin photosensitizer, *Biochem. J.*, 226, 757-766, 1984.
- 29) Nitzan Y., Shainberg B. Malik Z.: The mechanism of photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* by deuteroporphyrin, *Curr. Microbiol.* 1989, 19, 265-269.
- 30) Spikes J.D.: New trends in photobiology: chlorins as photosensitizers in ybiology and medicine., *J. Photochem. Photobiol. B*, 6, 259-274, 1990.
- 31) 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.
- 32) Roeder B., Wabnitz H.: Time-resolved fluorescence spectroscopy of hematoporphyrin, mesoporphyrin, pheophorbide a and chlorin e6 in ethanol and aqueous solution, *J. Photochem. Photobiol. B*, 1, 103-113, 1987.
- 33) Frolov A.A., Gurinovich G.P.: The laws of delayed photohaemolysis sensitized by chlorin e6, *J. Photochem. Photobiol. B*, 13, 39-50, 1992
- 34) Banks J.G., Board R.G., Carter J., Dodge A.D.: The cytotoxic and photodyna, mic inactivation of micro - organisms by Rose Bengal, *J. Appl. Bacteriol.*, 391-400, 1985.
- 35) Ergaieg K., Seux R.: A comparative study of the photoinactivation of bacteria by meso-substituted cationic porphyrin, rose Bengal and methylene blue, *Desalination*, 246, 353-362, 2009.

- 36) Wang H., Lu L., Zhu S. Li Y., Cai W.: The phototoxicity of xanthene derivatives against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Microbiol.*, 52, 1-5, 2006.
- 37) Valenzeno D.P.: Photohemolytic lesions: stoichiometry of creation by phloxine B, *Photochem. Photobiol.* 40, 681-688, 1984.
- 38) 加藤栄: 光合成入門, 共立出版, 東京, 1973
- 39) Shrestha S., Bhattarai B.R., Lee K.-H., Cho H.: Some of the food color additives are potent inhibitors of human protein tyrosine phosphatases, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 27, 1567-1571, 2006.
- 40) Downham A., Collins P.: Colouring our foods in the last and next millennium, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 35, 5-22, 2000.
- 41) 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.
- 42) Franklin D., Lowy M.D.: *Staphylococcus aureus* infections, *New England J. Med.*, 339, 520-532, 1998.
- 43) 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.
- 44) Schäfer G.: Membrane-associated energy transduction in bacteria and archaea, *Encyclopedia Biol. Chem.* 2, 637-645, 2004
- 45) 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.
- 46) 勝孝, 駒越圭子, 増田和文, 加藤久登, 井上剛: センサーを用いる薬物作用の *in situ* モニタリング, *分析化学*, 62(2), 121-130, 2013
- 47) Treharne R.W.: Light intensity measurement; characteristics of light source; Filters and monochromators, *Methods Enzymol.*, 24, 268-293, 1972.

- 48) 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.
- 49) 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.
- 50) Tsuchiya T., Rosen B.P.: Respiratory control in *Escherichia coli*., *FEBS Lett.*, 120, 128–130, 1980.
- 51) 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.
- 52) Ohmizo C., Yata M., Katsu T.: Bacterial cytoplasmic membrane permeability assay using ion-selective electrodes., *J. Microbiol. Methods*, 59, 173-179, 2004.
- 53) 藤井達三：赤血球膜について，蛋白質 核酸 酵素，19(1), 59-72, 1974.
- 54) 藤井達三，寺田弘，野村靖幸：薬物作用と生体膜，南江堂，東京，1987.
- 55) 水上茂樹：赤血球の生化学，東京大学出版会，東京，1977
- 56) Fairbanks V.F., Ziesmer S.C., O'Brien P.C.: Methods for measuring plasma hemoglobin in micromolar concentration compared, *Am. Assoc. Clin. Chem.*, 38, 132-140, 1992.
- 57) Collier H.B.: Factors affecting the hemolytic action of "lysolecithin" upon rabbit erythrocytes., *J. Gen. Physiol.*, 35, 617-628, 1993.
- 58) Katsu T., Nakao S., Iwanaga S.: Mode of action of an antimicrobial peptide, tachyplesin I, on biomembranes., *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 178-181, 1993.
- 59) Ogilby P.R., Foote C.S., Chemistry of singlet oxygen. 42. Effect of solvent, solvent isotopic substitution, and temperature on the lifetime of singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g$), *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 3423-3430, 1983.
- 60) 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.
- 61) 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.

- 62) Smith J.E., Mohandas N., Shohet S.B.: Interaction of amphipathic drugs with erythrocytes from various species, *Amer. J. Vet. Res.*, 43, 1041-1048, 1982.
- 63) 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.

謝辞

本研究の実施にあたり，終始熱心な御指導並びに御助言を賜りました就実大学大学院医療薬学研究科 片岡 洋行 教授に心から深く感謝いたします。

また，本論文の作成に際して，有益なる御助言と御校閲を賜りました就実大学大学院医療薬学研究科 鈴木 利典 教授，増田 和文 准教授に深く感謝いたします。

さらに，種々の有益なる御助言並びに御指導を賜りました安田女子大学薬学部 勝 孝 教授，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 井上 剛 准教授，岡山大学薬学部 駒越 圭子 技術専門員に深く感謝いたします。

さらに，実験の一部に御協力戴きました岡山大学薬学部 中西 由佳 学士に深く感謝いたします。