

PHOTOMEDICINE AND PHOTOBIOLOGY

Vol.45 2024



The Japanese Society for Photomedicine and Photobiology

Photomedicine and Photobiology

Vol.45

2024

Chief Editor

Daisuke Tsuruta, M.D.
Dermatology (Osaka)

Editing Secretaries

Toshiyuki Ozawa, M.D.
Dermatology (Osaka)

Former Editors

Nobuyuki Mizuno, M.D. Dermatology (1978-1990)
Muneo Ohkido, M.D. Dermatology (1991-1993)
Kunihiko Yoshikawa, M.D. Dermatology (1994-1997)
Masamitsu Ichihashi, M.D. Dermatology (1998-2002)
Itsuro Matsuo, M.D. Dermatology (2003-2004)
Takeshi Horio, M.D. Dermatology (2005-2006)
Katsumi Hanada, M.D. Dermatology (2007-2009)
Fujio Otsuka, M.D. Dermatology (2010-2012)
Chikako Nishigori, M.D. Dermatology (2013-2016)

Editorial Board

Hiroyuki Okamoto, M.D. (Moriguchi) Dermatology	Takeshi Toda, Ph.D. (Suita) Radiation Biology
Hiroshi Fukumura, Ph.D. (Sendai) Organic Physical Chemistry	Akimichi Morita, M.D. (Nagoya) Geriatric and Environmental Dermatology
Daisuke Sawamura, M.D. (Hirosaki) Dermatology	Yoshiki Tokura, M.D. (Hamamatsu) Dermatology
Atsushi Ito, Ph.D. (Hiratsuka) Energy Resources	Shinichi Moriwaki, M.D. (Takatsuki) Dermatology
Tadamichi Shimizu, M.D. (Toyama) Dermatology	Chikako Nishigori, M.D. (Kobe) Dermatology
Akira Kawada, M.D. (Sayama) Dermatology	Nobuhisa Naoi, M.D. (Miyazaki) Ophthalmology
Hiroshi Sugiyama, Ph.D. (Kyoto) Chemical Biology	Yasuteru Urano, Ph.D. (Tokyo) Chemical Biology and Molecular Imaging
Shosuke Kawanishi, Ph.D. (Suzuka) Hygiene	Masahide Yasuda, Ph.D. (Miyazaki) Materials Chemistry
Tadashi Suzuki, Ph.D. (Sagamihara) Photochemistry	Akihiro Ohira, M.D. (Izui) Ophthalmology
Tetsuro Majima, Ph.D. (Ibaraki) Molecular Excitation Chemistry	

The Japanese Society for Photomedicine and Photobiology
Founded in 1978

*Office : Department of Dermatology, Osaka Metropolitan University Graduate School of Medicine,
1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan*

CONTENTS

【Article】

太陽からの近赤外線による肌の光老化を防御する生地の開発 1

Development of fabric for protection of skin photo-aging by solar near-infrared radiation

宮川朋之¹⁾、佐々木政子²⁾

¹⁾ 瀧定名古屋株式会社 高機能商品開発販売課92課

²⁾ 東海大学 名誉教授

Ultraviolet-induced photoaging: The role of macrophage migration inhibitory factor 4

Tadamichi Shimizu¹

¹ Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Academic Assembly, University of Toyama, Sugitani 2630, Toyama 930-0194, Japan

Synthetic biomarker using the target-responsive molecular probes for the tumor diagnosis..... 10

Tatsuya Nishihara

Department of Chemistry and Biological Science, College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University, 5-10-1 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-5258, Japan

Fluorescence Lifetime Measurement and Its Applications Using Time-Correlated Single-Photon Counting..... 16

Yoshinobu Nishimura*

Faculty of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8571, Japan

光老化 -メカニズム、治療、予防- 24

川田 暁

近畿大学名誉教授

Photochemical protein damaging activity of tetrakis(*p*-allyloxyphenyl) porphyrin P(V) complexes 29

テトラキス(*p*-アリルオキシフェニル)ポルフィリンP(V)錯体が示す光化学的タンパク質損傷作用

Kazuho Fukaya¹, Shigetoshi Okazaki², Hideki Kawai¹, and Kazutaka Hirakawa^{1,3,4*}

¹ Applied Chemistry and Biochemical Engineering Course, Department of Engineering, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, Johoku 3-5-1, Chuo-ku, Hamamatsu, Shizuoka 432-8561, Japan

² Preeminent Medical Photonics Education and Research Center, Hamamatsu University School of Medicine, Handayama 1-20-1, Chuo-ku, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, Japan

³ Department of Optoelectronics and Nanostructure Science, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, Johoku 3-5-1, Chuo-ku, Hamamatsu, Shizuoka 432-8561, Japan

⁴ Cooperate Major in Medical Photonics, Shizuoka University, Johoku 3-5-1, Chuo-ku, Hamamatsu, Shizuoka 432-8561, Japan

太陽からの近赤外線による肌の光老化を防御する生地の開発

Development of fabric for protection of skin photo-aging by solar near-infrared radiation

宮川朋之¹⁾、佐々木政子²⁾

1) 瀧定名古屋株式会社 高機能商品開発販売課 92 課

2) 東海大学 名誉教授

*Corresponding author:

宮川朋之

瀧定名古屋株式会社 高機能商品開発販売課 92 課 名古屋市中区錦 2 丁目 13 番 19 号

TEL: +81 52-201-3385

FAX: +81 52-201-3386

E-mail: miyagawa-tomoyuki@takisada.com

ABSTRACT

This paper describes the development of fabric that protects against skin aging caused by solar near-infrared radiation. The base yarn is polyester. Cesium tungsten oxide and titanium oxide nanoparticles are kneaded into it. This yarn can absorb solar near-infrared radiation. The developed fabric gives protection ability against solar near-infrared radiation as well as ultraviolet radiation.

Key words: 太陽近赤外線、光老化、生地、セシウムタングステン酸化物ナノ粒子

1. 序論

今世界は、地球温暖化の時代から地球灼熱化の時代へと向かっている。各地で最高気温が更新され、猛暑日の日数が増加し、熱中症で倒れる人が続出している。この地球灼熱化を迎えた現状で、我々人類は灼熱化をくい止める取り組みを余儀なくされている。その一方で、地上に降り注ぐ太陽光から身を守っていくために、従来の方法以上の対策を真剣に考える必要性が出てきた。

地上に届く太陽放射エネルギーの約 42% が赤外線 (infrared radiation: IR) である。可視光線 (visible radiation: VIS) が約 52%、紫外線 (ultraviolet radiation: UV) が約 6%^{1) 2)}。なお、地上に届く赤外線の殆どは波長 780nm~2,600nm の近赤外線 (near-infrared radiation: NIR) といえる。

近赤外線は、熱線ともいわれるように体温上昇効果を持つ。近赤外線の温熱作用は、冬の日向ぼっこのように体を温めてくれるメリットとして知られていた。しかし、近年、近赤外線が肌の光老化に影響することが明らかとなってきた^{3) 4)}。

近赤外線は、紫外線が肌の表皮までには届かないのに対し、皮膚の深部にまで到達する透過性を持つ。このため、日常的に近赤外線に暴露されることで皮膚が菲薄化し、しわやたるみの原因ともなる。最近では脱毛やピーリングが普及し、本来太陽光から肌を守る体毛に含まれるタンパク質 (ケラチン) を欠如させ、光線過敏症の増悪化にも影響を与えている。この現状を踏まえ、近赤外線防御の必要性が報告され始めている^{3) 4) 5) 6)}。

以上に述べたように、肌の光老化を防ぐためには、紫

外線 (UV) と共に近赤外線 (NIR) の防御が必要といえる^{3) 4) 5) 6)}。夏場の近赤外線防御は、熱中症予防も加味すると日常生活での喫緊課題と考えられる。本研究の目的は、近赤外線防御機能を持つ生地の開発である。

2. 試料と実験法

2-1 近赤外線 (NIR) 防御機能を持つ生地の開発

1) 生地規格

- 生地組織: ベア天竺 目付: 150g/m² カラー: ホワイト
- 近赤外線を効率よく吸収するレアメタル由来のセラミック微粒子 (セシウムタングステン酸化物ナノ粒子)⁷⁾ を練り込んだポリエステル繊維
- 紫外線吸収剤酸化チタン微粒子を練り込んだポリエステル繊維
- b と c の繊維を併用して、a の生地を作成

2-2 開発生地の近赤外線防御機能 (遮蔽率) の検証試験

1) 測定試料

- 開発生地を使用したアームカバー
- 市販の酸化チタン入り繊維のみを使用したブラックのアームカバー

2) 光吸収発熱の検証試験

可視光線吸収による温度上昇差 (光吸収発熱) の測定を目的とする。

光吸収発熱試験は、繊維製品の光吸収発熱性評価 (JIS L 1926: 2019) に準拠した。人工太陽照明灯 (セリック (株) 製 XC-500EFSS) を試料に照射し、光照射後の温度上昇を計測する。光吸

収発熱試験装置の概略を図1に示す。

- a. 生地裏面に受熱体を接触させて配置し、生地が光を吸収して発生する熱を受熱体に吸収(伝導)させる。
- b. 光を照射して30分後に、生地を装着した受熱体と、生地を装着させていない受熱体(ブランク)について、サーモカメラ(日本アビオニクス(株)製 R550)で、上昇温度を測定する。
- c. 光吸収発熱温度差は次式で求める。

$$\text{光吸収発熱温度差 (}^\circ\text{C)} = \text{試料の平均上昇温度 (}^\circ\text{C)} - \text{ブランクの平均上昇温度 (}^\circ\text{C)}$$
 温度差が大きいほど光吸収発熱性が高いと評価する。

3) 近赤外線に対する遮蔽率の測定

近赤外線遮蔽率の算出は、紫外線遮蔽率の試験方法：JIS L 1925：2019に準拠し、分光光度計(日本分光(株)製 V-670)を使用し、波長領域800～2600nmの遮蔽率を測定し、下式で算出した。

$$\text{近赤外線遮蔽率 (\%)} = 100 - \text{近赤外線領域に対する全波長平均透過率 (\%)}$$

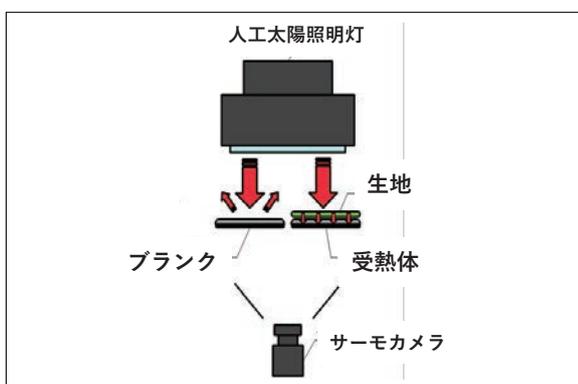


図1 光吸収発熱性試験装置略図

2-3 開発生地の紫外線(UVA、UVB、UPF値)防衛機能(遮蔽率)の測定

紫外線遮蔽率は試験方法：JIS L 1925：2019に準拠し、分光光度計(日本分光(株)製 V-670)を使用し、波長領域UV-A:360nm、UV-B:305nmの遮蔽率を測定した。

3. 開発した生地のアームカバーによる近赤外線遮蔽効果の検証結果

検証結果を表1に示す。市販の紫外線遮蔽に有利とされているブラックのアームカバーに比べて、開発した生地を使用したアームカバーは、ホワイトであるにも関わらず、紫外線の遮蔽率をほぼ変えることなく、近赤外線遮蔽率が10.9%高く、表面温度上昇が9.0℃抑えられるという結果となった。

従って、従来の紫外線防御対策で使用されてきた、酸化チタン練り込み繊維を使用した生地では近赤外線は十分に防御出来ず、開発した生地を使用すると、近赤外線遮蔽効果と紫外線遮蔽効果を共に高めることが出来ることが検証された。開発した生地の呼称は、英語のTrueとフランス語のBeauteを組合せて「Trubeaute™(トゥルーボーテ)」とした。これは、「真実の美」を意味する。

なお、開発生地は、近赤外線吸収剤セシウムタングステン酸化物ナノ粒子を繊維に練り込んでいることで、洗濯を繰り返すことによる機能性低下や、化粧品使用の際に衣服等で擦れて効果が低下するという懸念も解消出来る。

さらに、紫外線防御で普及しているブラック等の濃色にするのではなく、ホワイトを含めた淡色に仕上がるため、温度上昇が抑えられ熱中症対策に有効といえる。淡色の利点は、ファッション性も豊に創出することを可能とする点である。

4. アームカバー用以外の開発生地の作成とその光老化防御効果

上述した検証結果を基に、開発生地の製造法を用いて、アームカバー用に作成したベア天竺生地以外の4種の生地を作成した。これらに対してアームカバー用生地と同様に、近赤外線に対する遮蔽率と紫外線に対する遮蔽率を測定した。また開発生地の組織による密度の違い、目付の違いによる遮蔽率の比較も行った。

近赤外線遮蔽率の数値に多少の違いはあるが、4種の生地は、全て近赤外線及び紫外線防御生地として有効であると判定された。検証結果を表2に示す。

また、4種の開発生地の近赤外線遮蔽率を比較すると、作成した組織により密度が詰まり、且つ目付が2番目に重い開発生地(Trubeaute™ A)の遮蔽効率が最も高い結果となった。一方、紫外線遮蔽率は可視光領域の影響を受ける開発生地(Trubeaute™ D)を除き、

アームカバー/開発生地 #ホワイト 目付150g/m ²			アームカバー/市販品 #ブラック 目付150g/m ²		
紫外線遮蔽率	JIS L 1925 : 2019準用	97.0%	紫外線遮蔽率	JIS L 1925 : 2019準用	98.5%
紫外線遮蔽率 UV-A(360nm)		96.4%	紫外線遮蔽率 UV-A(360nm)		98.5%
紫外線遮蔽率 UV-B(305nm)		99.4%	紫外線遮蔽率 UV-B(305nm)		98.5%
UPF		50+	UPF		50+
近赤外線遮蔽率	測定波長 800nm~2600nm	76.0%	近赤外線遮蔽率	測定波長 800nm~2600nm	65.1%
光吸収発熱性	JIS L 1926 : 2019	光吸収発熱温度差 6.3℃	光吸収発熱性	JIS L 1926 : 2019	光吸収発熱温度差 15.3℃

表1 開発生地を使用したアームカバーの肌の光老化防御効果の検証結果

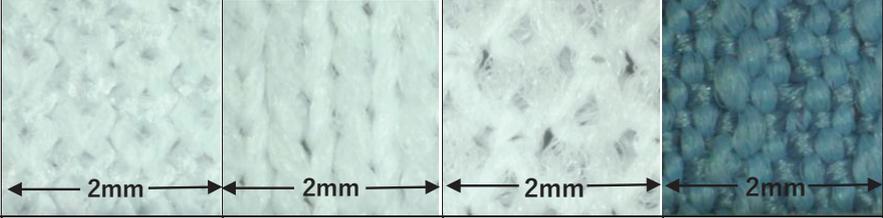
Trubeaute™ 開發生地	Trubeaute™ A	Trubeaute™ B	Trubeaute™ C	Trubeaute™ D
生地組織	スムーズ	プレーティング天竺	ダブル鹿の子	ピケ
カラー	ホワイト	ホワイト	ホワイト	サックスブルー
目付	190g/m ²	198g/m ²	164g/m ²	175g/m ²
生地の表面画像				
紫外線遮蔽率	98.0%	99.1%	98.0%	99.4%
紫外線遮蔽率 UV-A(360nm)	97.4%	99.0%	97.8%	99.3%
紫外線遮蔽率 UV-B(305nm)	99.9%以上	99.5%	99.1%	99.9%以上
UPF	50+	50+	50+	50+
近赤外線遮蔽率	85.7%	84.7%	77.1%	80.1%

表2 各種の開發生地の光老化防御効果の検証結果

生地のカラー、密度、目付に関わらず、大きな差が見られないという結果となった。

従って、波長の長い近赤外線防御の効果を高めるには、生地の密度と目付のバランス調整が重要であることが明らかとなった。

5. 結論

ポリエステル繊維にセシウムタングステン酸化物ナノ粒子を練り込んだ繊維と紫外線吸収剤酸化チタン微粒子を練り込んだポリエステル繊維を併用して近赤外線遮蔽効果を持つ生地を開発した。この開發生地は、ホワイトおよび淡色なので、従来のUVカット濃色生地の持つ欠点である可視光線吸収による温度上昇を防ぐという特徴を持つ。開発した生地 (Trubeaute™) は、肌の光老化を促進させる近赤外線だけでなく、紫外線も同時に防ぐことができるので、肌の健康を効果的に守れる光老化防御生地と結論される。

6. 展望

2006年に気象庁が紫外線対策を効果的に行えるようにUVインデックスを用いた紫外線情報を提供し始めてから、はや17年が経過した。

現在、紫外線防御は当たり前の時代になり、日焼け止め化粧品、繊維製品等、あらゆるものに「UVカット」の表示がある。甲子園で活躍した高校球児達が日々日焼け対策をして練習に励んでいたことも報道されている。しかし、近赤外線が肌の光老化の原因の一つという事は、未だに一般に周知されていない。

地球灼熱化時代の新たな肌の光老化・熱中症対策として、「紫外線防御と共に、近赤外線も防御する」ことが、今後は日常的に定着していくと考えられる。

謝辞

本報の執筆に当たり、種々ご教示頂きました川島眞先生と森田明理先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) CIE Publication No.20 (TC-2-2), 47 (1972): Recommendation for integrated irradiance and the spectral distribution of simulated solar radiation for testing purposes.
- 2) 佐々木政子：絵とデータで読む太陽紫外線 -太陽と賢く仲良くつきあう法- (独立行政法人 国立環境研究所 CGER-M018-2006)
- 3) 大塚製薬：近赤外線 (IRA) によるヒト表皮細胞の増殖抑制作用とそのメカニズム解明についての研究成果を光生物学専門誌で発表 | ニュースリリース | 大塚製薬 (otsuka.co.jp) (2020)
- 4) 資生堂：赤外線が肌に悪影響を与えるメカニズムを解明～進化を続ける資生堂の光研究は3つのタイプの光酸化へ対応～ | 株式会社資生堂のプレスリリース (prtimes.jp) (2021)
- 5) 森田明理：環境因子とシワ：日本化粧品学会誌 Vol. 37, No. 1, pp. 6-10 (2013)
- 6) 田中洋平、常深佑一郎、川島 眞：近赤外線の功罪：日本皮膚科学会雑誌 Vol. 130, No. 9, pp. 2047-2057 (2020)
- 7) 中倉修平、萩水崇：セシウムタングステン酸化物ナノ粒子の気層合成と透明赤外線吸収材料としての評価：The Micromeritics No.64 (2021) 18-27.

Ultraviolet-induced photoaging: The role of macrophage migration inhibitory factor

Tadamichi Shimizu¹

¹*Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Academic Assembly,
University of Toyama, Sugitani 2630, Toyama 930-0194, Japan*

*Corresponding author:

Tadamichi Shimizu, Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Academic Assembly, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

TEL: +81-76-434-7305

FAX: +81-76-434-5028

E-mail: shimizut@med.u-toyama.ac.jp

ABSTRACT

The skin is continuously challenged by different adverse influences, including solar radiation, chemicals and oxidative stress. The most common cause of physical injury to the skin is solar ultraviolet (UV) radiation, with long-term detrimental effects like cutaneous photoaging. Photoaged skin is clinically characterized by wrinkles, laxity, coarseness, loss of skin tone, and biochemically characterized by a predominance of abnormal elastic fibers in the dermis and a dramatic decrease in certain collagen types. Various types of UV-induced matrix degenerating metalloproteinases (MMPs), which are present in keratinocytes and dermal fibroblasts, have been reported to contribute to the breakdown of dermal interstitial collagen. Chronic skin exposure to UV radiation stimulates the production of proinflammatory cytokines, which are known to play a key role in the process of photoaging. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a cytokine that plays a critical role in several inflammatory conditions. UV-induced MIF strongly mediates the enhancement of collagen degradation and basement membrane damage, which occurs primarily through the activation of MMPs in the skin.

Key words: skin, cytokine, macrophage migration inhibitory factor, photoaging, ultraviolet radiation.

Introduction

Skin, the outer most layer of the body is constantly exposed to hazards like solar radiation, chemical challenges, and oxidative stress. Among these, solar ultraviolet radiation (UV) is the most important and common cause of skin injury. UV is sub-divided into three types based on the wavelengths: long-wave UVA (320 - 400 nm), mid-wave UVB (280 - 320 nm), and short-wave UVC (200- 280 nm). Most UVC is absorbed by the ozone layer, while UVA and UVB radiations reach the earth's surface and cause different skin disorders^[1]. Recent depletion in the stratospheric ozone resulted in an increased risk of skin damage due to enhanced UVA irradiation and penetration of UVB^[2]. Since the skin is in direct contact with the environment, exposure to UV irradiation causes various adverse effects, including edema, sunburn cells, hyperplasia, immunosuppression, photoaging and the development of skin cancers^[3,4].

Generally, the aging process of the skin is divided into intrinsic and extrinsic aging (photoaging). Extrinsic aging, which occurs mainly due to repeated UV exposure from the sun, is considered to be a different entity from the damage that occurs over the passage of time (chronologic aging), as it occurs in other organs of the body. Chronologically aged

skin is characterized as smooth, pale, and finely wrinkled. In contrast, photoaged skin is characterized by coarse wrinkles, laxity, dyspigmentation, a leathery appearance, roughness and telangiectasia. Photoaging affects various skin layers but the major histological differences and damage occur within the dermis^[5,6,7]. In addition, UVB irradiation of the skin, in particular, can cause DNA damage directly or indirectly. UVB directly damages the DNA and leads to the formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine 6-4 pyrimidone photoproducts (6-4 PPs), as the main photo-lesions in genomic DNA^[8]. Whereas UVB-induced reactive oxygen species (ROS) production causes indirect damage to DNA and facilitates DNA oxidation^[9,10]. Most of damaging UVB radiation is absorbed in the epidermis, and leads to massive apoptosis of keratinocytes, suppression of the immune system, and compromise of the natural barrier functions of the skin^[11]. Furthermore, UV radiation may also trigger a cutaneous inflammatory response and stimulates the release of cytokines, which are known to play a crucial role in photoaging. Among these, one important cytokine is macrophage migration inhibitory factor (MIF).

UV-induced inflammatory cytokines in the skin

UVB radiation, which is biologically very active, mostly penetrates the epidermis and to a lesser extent the upper part of dermis. Therefore, epidermal cells are considered a main target for UVB radiation. UV radiation stimulates and activates almost all nucleated cells like keratinocytes, melanocytes, Langerhans cells in the epidermis, and cells in the dermis, such as fibroblasts, endothelial cells, mast cells, and others to induce the production of various cytokines^[12]. It is known that UV radiation triggers a cutaneous inflammatory response by stimulating epidermal keratinocytes with the concurrent release of potent cytokines such as interleukin (IL)-1^[13, 14], IL-6^[15], and tumor necrosis factor (TNF)- α ^[16]. When activated, TNF- α , which is an important component of the inflammatory cascade in the skin, can affect various cell types^[17]. It increases the MHC class I expression on endothelial cells and dermal fibroblasts; induces the production of IL-1 α ^[18]; increases the expression of adhesion molecules, including ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin; and promotes the formation of sunburn cells^[19].

It is known that evidence of the dermal alterations of photoaging induced by UV radiation can mainly be seen in the dermis, with the massive accumulation of elastotic material in the upper and mid dermis, which is known as solar elastosis. UV-induced dermal alterations, which includes elastosis changes in collagens that are thought to be dependent on the growth and differentiation of dermal fibroblasts, and which are regulated by different factors including cytokines released from epidermal and infiltrating cells as well as from fibroblasts in an autocrine and paracrine manner. There is emerging evidence to support that growth regulated cytokines from fibroblasts like TGF- α , TGF- β , PDGF, FGF, IL-1, IL-6, and TNF- α play roles in the control of connective tissue formation and the remodeling phases of dermal fibrotic repair^[12, 20]. Therefore, these cytokines are of great importance in the course of photoaging and are not only involved in the mediation of local inflammatory reactions within the skin, but can also exert systemic effects through their entrance into the circulation.

UV-induced reactive oxygen species in the skin

There is growing evidence to support that UV radiation significantly increases the generation of ROS in the skin, including singlet oxygen, superoxide radicals, hydroxyl radicals, and hydrogen peroxide^[21], and this intracellular increase in ROS is responsible for the initiation of several inflammatory responses in the skin. The skin is equipped with a complex defense system of enzymatic and non-enzymatic components to counter the adverse biological effects of ROS. As the first line of defense, ROS are reduced by antioxidant enzymes like superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione peroxidase, as well as endogenous and exogenous small molecules, including glutathione, vitamin C and E. When biomolecules are

oxidized, they are repaired or replaced by biological protective systems. ROS are also generated as a part of the normal regulatory circuits; however, under normal conditions the cellular redox state is tightly regulated by the antioxidant defense system of the skin. In contrast, in situations like UV exposure, increased ROS generation can overwhelm the antioxidant defense mechanism, resulting in oxidative stress and oxidative damage to lipids, proteins and DNA, eventually leading to age-related diseases and photoaging of the skin^[22, 23, 24].

UV-induced ROS generation can promote photoaging and carcinogenesis via regulation of different molecular and signaling pathways, which has been reported in previous studies^[25, 26]. In particular, UV-induced ROS generation has also been known to stimulate the synthesis of matrix degenerating MMPs^[27]. MMPs play an important role in the aging process of the skin by targeting connective tissue molecules and basement membrane proteins. Interestingly, ROS are also able to inactivate a special class of tissue inhibitors of metalloproteases (TIMPS) via a direct oxidative attack, and thus contribute to the progression of photoaging and tumors^[28]. Accordingly, intense research has been focused on the use of antioxidants for the prevention of ROS-mediated photoaging and photocarcinogenesis^[29, 30].

Function of MIF

In the year 1966, approximately half a century ago, MIF was originally identified as a lymphokine that concentrates macrophages at inflammatory loci. It is a known potent activator of macrophages *in vivo* and is considered to play key role in cell-mediated immunity^[31, 32]. In 1989, with molecular cloning of MIF cDNA^[33], the concept of MIF has been re-evaluated as a pro-inflammatory cytokine and pituitary-derived hormone that potentiates endotoxemia^[34]. With progressive research MIF was found to be multifunctional, subsequent work has shown that T cells and macrophages secrete MIF in response to glucocorticoids as well as upon activation by various pro-inflammatory stimuli^[35]. MIF plays its role as a pleiotropic cytokine by participating in inflammation and immune responses^[36]. The expression of MIF is increased in many solid tumors^[37, 38], and in several cases the degree of MIF overexpression is strongly correlated with tumor progression and metastatic potential. MIF plays a key role in cell proliferation and invasion^[39, 40]. Furthermore, MIF has broader effects on glucocorticoid-induced immunomodulator^[41], D-dopachrome tautomerase activity^[42], innate immunity relevant to Toll-like receptor 4^[43], and it is a crucial effector of hypoxia-inducible factor 1 α that delays senescence^[44]. It has been reported that MIF is primarily expressed in T-cells and macrophages; however, more recent studies showed that this protein is ubiquitously expressed by a variety of cells, indicating more far-reaching non-immunological involvement in a variety of pathologic states^[37, 45]. In addition, a potentially broader role for MIF is reported in growth regulation

because of its ability to antagonize p53-mediated gene activation and apoptosis^[46].

In the skin, MIF is expressed in the epidermis, particularly in the basal layer^[47]. MIF has important implications in the skin with regard to inflammation, the immune response, and cutaneous wound healing, and also plays a crucial role in skin diseases like atopic dermatitis and systemic lupus erythematosus^[48] (Figure 1).

Role of MIF in UV-induced photoaging in the skin

Acute UV exposure has various deleterious cutaneous effects in the skin, including edema, sunburn cells, hyperplasia, production of inflammatory mediators, and immunosuppression. The long-term detrimental effects of repeated UV exposure lead to cutaneous photoaging or skin cancer. Skin cancer, which is one of the most prevalent forms of cancer in humans, most commonly occurs in photoaged skin. Photoaged skin is clinically characterized by wrinkles, laxity, coarseness, loss of skin tone, and biochemically characterized by a predominance of abnormal elastic fibers in the dermis and a dramatic decrease in certain collagen types. Interstitial collagens, the major structural components of the dermis, are particularly reduced in UV-irradiated actinically damaged skin^[49]. The MMP family is still growing and plays a crucial role in tissue destruction during pathological conditions, such as arthritis, skin aging, tumor invasion, and metastasis^[50]. Growing evidence clearly indicates the occurrence of morphological and biochemical changes, wherein the amount and normal structure of collagen type I is reduced in UV actinically damaged skin^[51]. Some MMPs, such as MMP-1 play, a main role in the photoaging process, while others, like MMP-2 and MMP-9, potentially promote the degradation of collagen type IV and VII, a major component of the basement membrane. The reduction of collagen type IV and VII at the dermal-epidermal junction has been associated with skin

wrinkling^[52].

It is known that UV-induced matrix-degenerating metalloproteinases present in keratinocytes and dermal fibroblasts contribute to the breakdown of dermal interstitial collagen and other connective tissue components. This skin damage mechanism, involves a number of secreted cytokines, including interleukin (IL)-1, IL-6 and TNF- α ^[13, 14, 15, 16]. Along with these cytokines, previous studies conducted in our lab demonstrated that UV also enhanced the production of MIF in the skin. UVA and UVB were found to increase the expression of MIF in human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes, respectively^[53, 54]. Recently, MIF was also found to be involved in basement membrane damage in chronically UVB-exposed skin in mice. MIF mRNA and protein levels were significantly increased in UVB-irradiated skin in MIF Tg mice. This increase in MIF production was also concurrent with the UVB-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9, and with the diminished level of type IV and VII collagen. In addition, when the effects of MIF were inhibited using a specific MIF inhibitor, ISO-1, the UVB-induced mRNA levels and the production of MMP-9 in keratinocytes and MMP-2 in fibroblasts were also suppressed^[55]. Therefore, it is quite evident that MIF plays its role in collagen degradation and basement membrane damage, which occurs primarily through the activation of the MMP-9 and MMP-2.

MIF upregulates the activity of MMP-1 and is also involved in the activation of UVA-induced MMP-1 in dermal fibroblasts. This MIF mediated MMP-1 activation in dermal fibroblasts is dependent on the MIF-induced stimulation of PKC-, PKA-, src-family tyrosine kinase, MAPK-, c-jun- and AP-1^[54]. Moreover, it was previously shown that IL-1 β is also involved in the upregulation of UVA-induced MMP-1 in dermal fibroblasts through p38-, JNK- and PKC-dependent pathways^[56]. Considering this fact, it is clear that the signal-transduction pathways

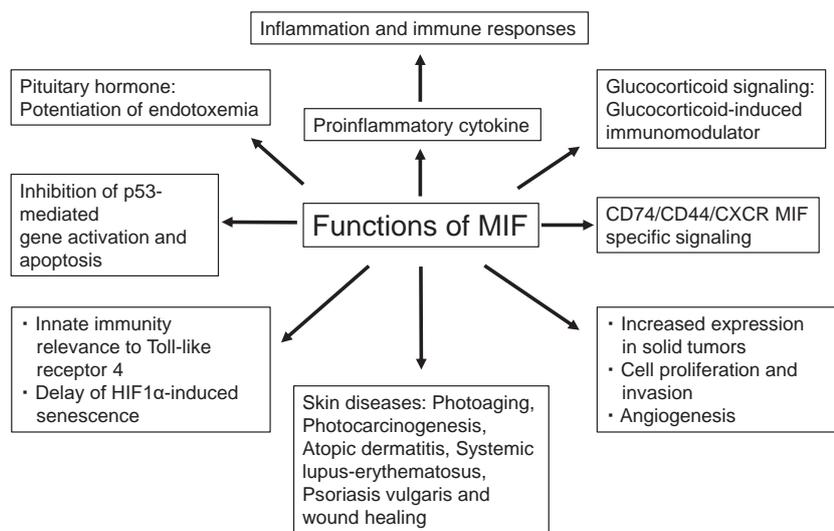


Figure 1. Schematic diagram showing the multiple functions of macrophage migration inhibitory factor (MIF).

involved in IL-1 β - or MIF- induced MMP-1 in dermal fibroblasts are different. Interestingly, IL-1 β stimulation itself caused a significant increase in specific MIF mRNA and protein levels in human dermal fibroblasts, while MIF is unable to stimulate the expression and production of IL-1 β in dermal fibroblasts. Further, neutralizing the effects of MIF with anti-MIF antibodies suppresses the expression of MMP-1 induced by IL-1 β . Therefore, UVA radiation possibly leads to the IL-1 β -induced expression of expression MMP-1 and IL-1 β -mediated MIF stimulation also enhances the MMP-1 expression in dermal fibroblasts. Consistently, dermal fibroblasts from MIF-deficient mice showed much less sensitivity to IL-1 β -induced MMP-13 production. Although MMP-13 is not very prominent role in human tissues and plays a restricted role, it is the predominant tissue collagenase in rodents^[56]. Therefore, there is a great possibility that IL-1 β may stimulate the production of MMP-13 via MIF in dermal fibroblasts. All of these findings strongly suggest that in fibroblasts UVA irradiation may stimulate IL-1 β production by an autocrine loop of both IL-1 β and MIF. Thus, both IL-1 β and MIF play their roles in the synthesis of MMP-1 (MMP-13). Furthermore, MIF has been involved in the induction of granzyme B (GrB) after UVA-radiation. UVA induces the redox-dependent release of MIF, which, in turn, activates the production of active GrB through the p38 MAPK pathway^[57]. The induction of GrB by UVA was able to degrade fibronectin. Taken together, the findings strongly suggest that MIF become a key modulator for matrix-degenerating proteases, MMPs

like MMP-1, MMP-2, and MMP-9, and granzyme B after UV radiation (Figure 2).

Conclusion

It has now become evident that UV radiation significantly stimulates the production of MIF in the skin. UV-induced MIF strongly mediates the enhancement of collagen degradation and basement membrane damage, which occurs primarily through the activation of MMP-9 and MMP-2 in the skin. Further, UV-induced IL-1 β and MIF interrelated loops also induce MMP-1 and thus may contribute to the loss of interstitial collagen. Therefore, the identification of these new mechanisms helps us to understand the role of MIF in UV-induced dermal connective tissue damage, which ultimately leads to photoaging.

References

1. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med.*, 2002, 4, 1-22.
2. Tenkate TD. Occupational exposure to ultraviolet radiation: a health risk assessment. *Rev Environ Health.*, 1999, 14, 187-209.
3. Cho HS, Kwak DH, Choi IS, et al. Inhibitory effect of proanthocyanidin on ultraviolet B irradiation-induced melanogenesis. *J Toxicol Environ Health A.*, 2009, 72, 1475-1483.
4. F'guyer S, Afaq F, Mukhtar H. Photochemoprevention

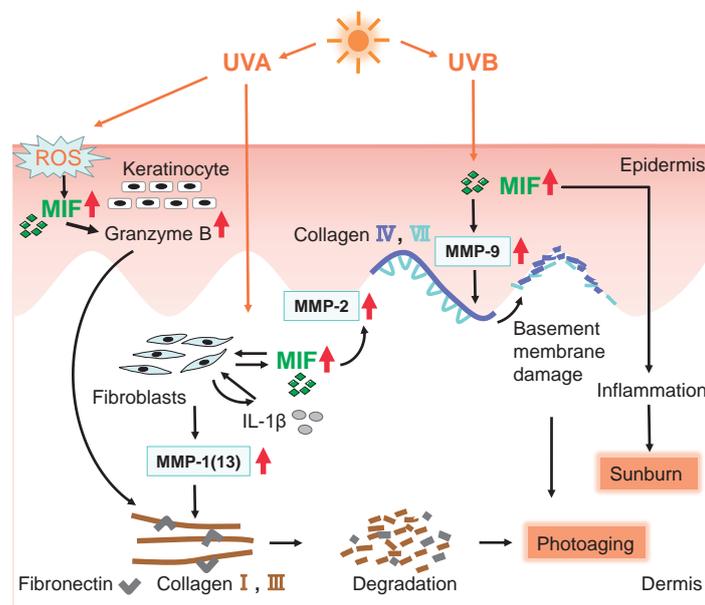


Figure 2. Schematic illustration of MIF related photoaging. UV radiation including both UVA and UVB, leads to the increased secretion of MIF by keratinocytes and fibroblasts, respectively. MIF increases the UVB-induced expression of MMPs, particularly MMP-2 in fibroblasts and MMP-9 in keratinocytes, which in turn contributes to the MIF-mediated basement membrane damage and specific collagen degradation of collagen IV and VII. Chronic UVA irradiation stimulates the production of MIF in dermal fibroblasts by an autocrine loop involving both MIF and IL-1 β . UVA also induces a redox-dependent release of MIF in keratinocytes, which, in turn, activates the production of active granzyme B. The MIF-mediated induction of granzyme B cause fibronectin degradation, and MIF also mediates the up-regulation of MMP-1(13), which ultimately leads to dermal collagen I and III degradation.

- of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.*, 2003, 19, 56-72.
5. Lavker RM. Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. *J Invest Dermatol.*, 1979, 73, 559-566.
 6. Lavker RM, Kligman AM. Chronic heliodermatitis: a morphologic evaluation of chronic actinic dermal damage with emphasis on the role of mast cells. *J Invest Dermatol.*, 1988, 90, 325-330.
 7. Gilchrist BA. Skin aging and photoaging: an overview. *J Am Acad Dermatol.*, 1989, 21, 610-613.
 8. Farkas B, Magyarlaki M, Csete B, et al. Reduction of acute photodamage in skin by topical application of a novel PARP inhibitor. *Biochem Pharmacol.*, 2002, 63, 921-932.
 9. Kulms D, Zeise E, Poppelmann B, et al. DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent pathway. *Oncogene.*, 2002, 21, 5844-5851.
 10. Kulms D, Schwarz T. Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol.*, 2002, 6, 837-841.
 11. Assefa Z, Laethem AV, Garmyn M, et al. Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. *Biochim Biophys Acta.*, 2005, 1755, 90-106.
 12. Kondo S. The roles of cytokines in photoaging. *J Dermatol Sci.*, 2000, 23, 30-36.
 13. Kupper TS, Chua AO, Flood P, et al. Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. *J Clin Invest.*, 1987, 80, 430-436.
 14. Rutter JL, Benbow U, Coon CI, et al. Cell-type specific regulation of human interstitial collagenase-1 gene expression by interleukin-1 beta (IL-1 beta) in human fibroblasts and BC-8701 breast cancer cells. *J Cell Biochem.*, 1997, 66, 322-336.
 15. Kirnbauer R, Köck A, Neuner P, et al. Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids. *J Invest Dermatol.*, 1991, 96, 484-489.
 16. Köck A, Schwarz T, Kirnbauer R, et al. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med.*, 1990, 172, 1609-1614.
 17. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. TNF-alpha production in the skin. *Arch Dermatol Res.*, 2009, 301, 87-91.
 18. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, et al. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med.*, 1986, 163, 1433-1450.
 19. Schwarz A, Bhardwaj R, Aragane Y, et al. Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells. *J Invest Dermatol.*, 1995, 104, 922-927.
 20. Yoshizumi M, Nakamura T, Kato M, et al. Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT. *Cell Biol Int.*, 2008, 32, 1405-1411.
 21. Peus D, Vasa RA, Meves A, et al. H₂O₂ is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol.*, 1998, 110, 966-971.
 22. Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev.*, 2004, 125, 811-826.
 23. Halliwell B. Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.*, 1999, 31, 261-272.
 24. Fuchs J, Huflejt ME, Rothfuss LM, et al. Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. *J Invest Dermatol.*, 1989, 93, 769-773.
 25. Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev.*, 2015, 21, 16-29.
 26. Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, et al. UV-Induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol Chem.*, 1997, 378, 1247-1257.
 27. Birkedal-Hansen H. Catabolism and turnover of collagens: collagenases. *Methods Enzymol.*, 1987, 144, 140-171.
 28. Stricklin GP, Hoidal JR. Oxidant-mediated inactivation of TIMP. *Matrix Suppl.*, 1992, 1, 235.
 29. Masaki H. Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. *J Dermatol Sci.*, 2010, 58, 85-90.
 30. Afaq H, Mukhtar H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp Dermatol.*, 2006, 15, 678-684.
 31. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science.*, 1966, 153, 80-82.
 32. David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1966, 56, 72-77.
 33. Weiser WY, Temple PA, Witek-Giannotti JS, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1989, 86, 7522-7526.
 34. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature.*, 1993, 365, 756-759.
 35. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, et al. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med.*, 1994, 179, 1895-1902.
 36. Nishihira J. Macrophage Migration inhibitory factor (MIF): Its essential role in the immune system and cell growth. *J Interferon Cytokine Res.*, 2000, 20, 751-

- 762.
37. Meyer-Siegler K, Hudson PB. Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology.*, 1996, 48, 448-452.
 38. Bando H, Matsumoto G, Bando M, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in human breast cancer: association with nodal spread. *Jpn J Cancer Res.*, 2002, 93, 389-396.
 39. Shimizu T, Abe R, Nakamura H, et al. High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1999, 264, 751-758.
 40. Chesney J, Metz C, Bacher M, et al. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med.*, 1999, 5, 181-191.
 41. Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature.*, 1995, 377, 68-71.
 42. Rosengren E, Bucala R, Aman P, et al. The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol Med.*, 1996, 2, 143-149.
 43. Roger T, David J, Glauser MP, et al. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature.*, 2001, 414, 920-924.
 44. Welford SM, Bedogni B, Gradin K, et al. HIF1 α delays premature senescence through the activation of MIF. *Genes Dev.*, 2006, 20, 3366-3371.
 45. Wistow GJ, Shaughnessy MP, Lee DC, et al. A macrophage migration inhibitory factor is expressed in the differentiating cells of the eye lens. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1993, 90, 1272-1275.
 46. Nemajerova A, Mena P, Fingerle-Rowson G, et al. Impaired DNA damage checkpoint response in MIF-deficient mice. *EMBO J.*, 2007, 26, 987-997.
 47. Shimizu T, Ohkawara A, Nishihira J, et al. Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human skin and its immunohistochemical localization. *FEBS Lett.*, 1996, 381, 199-202.
 48. Foot A, Kipen Y, Santos L, et al. Macrophage migration inhibitory factor in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.*, 2004, 31, 268-273.
 49. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, et al. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med.*, 1997, 337; 1419-1428.
 50. Zaid MA, Afaq F, Syed DN, et al. Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx. *Photochem Photobiol.*, 2007, 83, 882-888.
 51. Chiang HM, Chiu HH, Liao ST, et al. Isoflavonoid-rich *flemingia macrophylla* extract attenuates UVB-induced skin damage by scavenging reactive oxygen species and inhibiting MAP kinase and MMP expression. *Evid Based Complement Altern Med.*, 2013, 2013, 696879.
 52. Contet-Audonnet JL, Jeanmaire C, Pauly G. A histological study of human wrinkle structures: comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles, and sun-protected areas. *Br J Dermatol.*, 1999, 140, 1038-1047.
 53. Shimizu T, Abe R, Ohkawara A, et al. Ultraviolet B radiation up-regulates the production of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.*, 1999, 112, 210-215.
 54. Watanabe H, Shimizu T, Nishihira J, et al. Ultraviolet A-induced production of matrix metalloproteinase-1 mediated by macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem.*, 2004, 279, 1676-1683.
 55. Yoshihisa Y, Norisugi O, Matsunaga K, et al. Involvement of MIF in Basement Membrane Damage in Chronically UVB-Exposed Skin in Mice. *PLoS One.*, 2014, 9, e89569.
 56. Honda A, Abe R, Makino T, et al. Interleukin-1 β and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in dermal fibroblasts mediate UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *J Dermatol Sci.*, 2008, 49, 63-72.
 57. Hernandez-Pigeon H, Jean C, Charruyer A, et al. UVA induces granzyme B in human keratinocytes through MIF: implication in extracellular matrix remodeling. *J Biol Chem.*, 2007, 282, 8157-8164.

Synthetic biomarker using the target-responsive molecular probes for the tumor diagnosis.

Tatsuya Nishihara

Department of Chemistry and Biological Science, College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University, 5-10-1 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-5258, Japan

ABSTRACT

Several endogenous biomolecules such as protein, DNA have been focused on as biomarkers for the tumor diagnosis. However, the conventional biomarkers are limited to detect the tumor at an early stage when the tumor treatment is effective for most cancer types. Recently, synthetic biomarkers are being developed to overcome this issue. The exogenous agents can react with the tumor related biomolecules to amplify the synthetic biomarker in the tumor tissue. The tumor-selective amplification enables the sensitive tumor detection, which exceed the large background noise from the normal tissue. In this review, we summarize the history of synthetic biomarker briefly and highlighted small molecular based probe including our approaches using the acetaminophen derivatives as novel synthetic biomarkers for tumor detection.

Keyword: Synthetic biomarker, tumor antigen recognition, acetaminophen

序論

がんの早期発見は、がん治療において非常に重要な試みと言える。特に、転移などの進行が見られない状態での外科的処置の有効性は非常に高い⁽¹⁾。そのため、がんのリスク診断を通常の医療機関で実現可能となれば、がんの死亡リスクの減少に貢献可能となる。実際に、現在では様々な方法論が報告されている。例えば、乳がんにおけるマンモグラフィ、大腸がんにおける内視鏡検査、子宮頸がんにおけるパップテスト、肺がんCT検査など、様々な手法が開発されている⁽²⁻⁷⁾。しかしながら、これらの診断手法は、多くの患者に幅広く適用することは難しい。

より簡便な解析に向け、体液サンプルを用いた診断に向けた取り組みも多数行われている。現在、PSA検査などが、血液バイオマーカーを用いた診断も行われており、前立腺がんにおける死亡率の低下にも貢献している⁽⁸⁾。他にも血液やその他の体液サンプル中に含まれる内在性生体分子を活用する試みも多数行われている⁽⁹⁻¹⁷⁾。しかしながら、がんの早期検出にはまだ課題があり、特に症状が現れる前の段階では、高感度検出を可能とする装置の使用が必要となる。また、患者間における標的とするマーカーの放出量は変動しやすく、がんの不均一性、併発する疾病、通常細胞などの放出などがその評価を難しくする。

そのような背景から、近年、外因性分子を用いた新たながん診断手法にも注目が集まっている。がんの特徴的な性質を活用することで、早期にがん検出を行う方法論となる。例えば、がんの特有の代謝機構の一つである解糖系の亢進に着目したものが、フルオロデオキシグルコースを用いた陽電子放射断層撮影 (FDG-PET) となる。本方法論では、グルコースの類縁体である¹⁸Fで標識されたFDGを用い、がんの検出を行う。¹⁸Fから放出されるガンマ線を検出することによりがん検出が実現する^(18,19)。がん部位を特定可能にする非常に優れた方法論であるものの、イメージングに基づく診断

は、多くの患者に幅広く適用することは難しい。

以上を踏まえ、血液や尿など比較的サンプリングが容易なサンプルを用い、生体内でバイオマーカーを人工的に合成する方法論である『合成バイオマーカー』が新たに注目を集めている。本総説では合成バイオマーカーについてその開発の経緯を簡単に概説する。小分子ベースの合成バイオマーカー開発に焦点を当て、我々の研究例を中心に報告する。以上を通じ、合成バイオマーカー研究の課題、今後の展望について記載する。

合成バイオマーカーを用いたがんの早期診断

先述した通り、内因性分子をバイオマーカーとする場合、通常細胞由来の生体分子がバックグラウンドノイズになるため、診断の可否はマーカー分子の放出量に依存する。加えて、その放出量は腫瘍サイズにもよるため、早期検出には困難を伴う。以上の問題を解決するために、外因性分子を用い、がん関連分子との反応の結果生じる生成物をバイオマーカーとして活用するアプローチが近年、提案されている (図1)。本方法論で

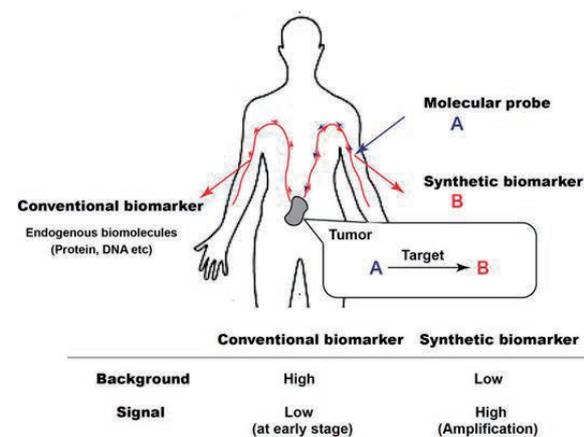


図1. 従来のバイオマーカーと合成バイオマーカーの比較

は、がんに関連する生体分子との間で特異的に反応する外因性分子（分子プローブ）を用いる。以上により、時間の経過とともに生成物（合成バイオマーカー）量を増幅することが可能となる。また、外因性分子を用いているため、内因性分子によるバックグラウンドノイズの課題を回避可能となる。そのため、内在性分子をバイオマーカーとして活用する場合と比較し、より早期にがんを発見する上で、非常に有用な方法論となる。こうした合成バイオマーカー開発は、このようにがん関連分子との間の化学反応を利用する方法論と、遺伝子操作技術を活用した方法論に大別される。本総説では、前者の方法論に焦点を当てる。

プロテアーゼ酵素活性評価に基づくがんの早期発見

合成バイオマーカーは、2013年にこれらプロテアーゼの活性評価を指向した研究報告に端を発する（図2）⁽²⁰⁾。マサチューセッツ工科大学のBhatia教授らは、ナノ粒子からなるキャリア表面に対して、プロテアーゼの基質となるペプチドを修飾し、がん組織におけるプロテアーゼ活性評価を試みた。まず初めに、本分子センサーを生体内に投与し、がん組織へ集積させる。その後、がん組織内に含まれるプロテアーゼにより反応が進行するため、そのペプチド断片を合成バイオマーカーとして用いる。ナノ粒子と比較し、ペプチド断片は分子サイズが小さいため、プロテアーゼとの反応の進行に伴い得られるペプチド断片は血液へ遊離し、最終的に尿排泄される。そのため、尿中に含まれるペプチド断片を検出することでがん検出を行う。この際、生成物として得られたペプチドに対して安定同位体標識を施すことで、質量分析計を用いた合成バイオマーカーを選択的に検出することに成功した。安定同位体標識は被曝のリスクを伴わないことに加え、内在性分子とは異なる分子量を与えるため、選択的な検出に有利となる。さらに同位体標識パターンを変えた質量分析バーコードを付与することで、多重解析にも成功している。

これまでに様々な合成バイオマーカーを用いた分子システムが開発され、質量分析計のようなハイエンドな分析機器を用いた解析だけでなく⁽²⁰⁻²⁵⁾、蛍光観察^(20, 22, 26-29)、ELISAやペーパーラテラルフローアッセイなど⁽³¹⁻³³⁾、ポイントオブケアに適した手法に至るまで、様々な方法論が報告されている。

多成分のプロテアーゼ活性の検出

プロテアーゼは多様な種類が存在するため、複数のペプチド断片を同時に検出することが可能となれば、基質カクテルを用いることで、プロテアーゼ活性の多重解析が実現する。先述した通り、安定同位体標識を行うことで得られるマスマークドを用いることにより、14成分^(22, 24)もしくは、19成分⁽²⁵⁾の多重解析がこれまでに実現している。その他にも、DNAやリガンドを標識したペプチド断片、及び抗体を組み合わせることで多重解析を実現した報告もある⁽³¹⁻³³⁾。キャリアに標識する基質構造を様々設計できるため、がんの種類に対応するプロテアーゼのセットのスクリーニングが可能となる。

プロテアーゼの活性異常はがんと強く関連することが知られている⁽³⁴⁾。例えば、マトリックスメタロプロテアーゼは、様々な種類が存在し、多くのがん細胞で過剰発現している。実際に、合成バイオマーカーの方法論を用いることで、がんの悪性度予測などに適用できる可能性が示唆されている^(25, 29)。そのため、プロテアーゼ活性評価は、がんの識別診断に非常に有用であると言える。

アセトアミノフェンを用いた小分子ベースの合成バイオマーカー開発

プロテアーゼが合成バイオマーカー研究の主な標的として開発が進んできた。一方で、がんに関連する生体分子はプロテアーゼ以外にも様々存在する。他の分子種への展開を指向し、小分子ベースのプローブ開発も行われている。

以下では我々の研究内容を中心に説明する。小分子ベースの研究を展開するにあたり、生じた生成物を安定に、血液中、もしくは尿中で検出する必要性が生じる。ただし、生体内では代謝、排泄機構が働くため、想定した分子構造のまま検出されるとは限らない。そこでまず初めに汎用的に適用可能な生成物構造の探索を進めた。その結果、生成物の候補として、解熱鎮痛剤の一つであるアセトアミノフェンを使用可能であることを明らかにした。アセトアミノフェンは、非常に安全性の高い薬剤として知られており、合成バイオマーカーとして使用しやすい。また、生体内における代謝経路も明らかになっており、低用量ではグルクロン酸、および硫酸抱合を受けることが知られている。そのため、アセトアミノフェン、および各種抱合体を検出す

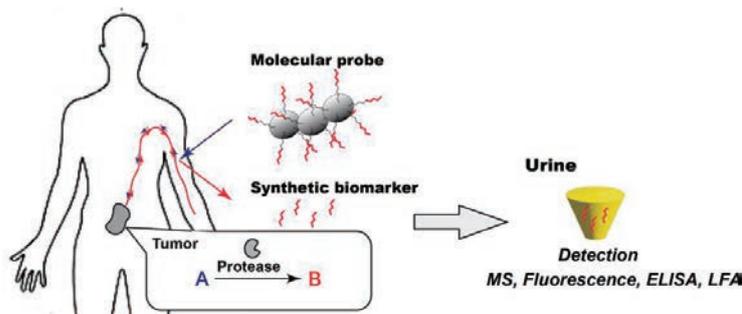


図2. プロテアーゼ活性を検出可能にする合成バイオマーカー。プロテアーゼとの反応の結果生じるペプチド断片を種々の方法で検出する。

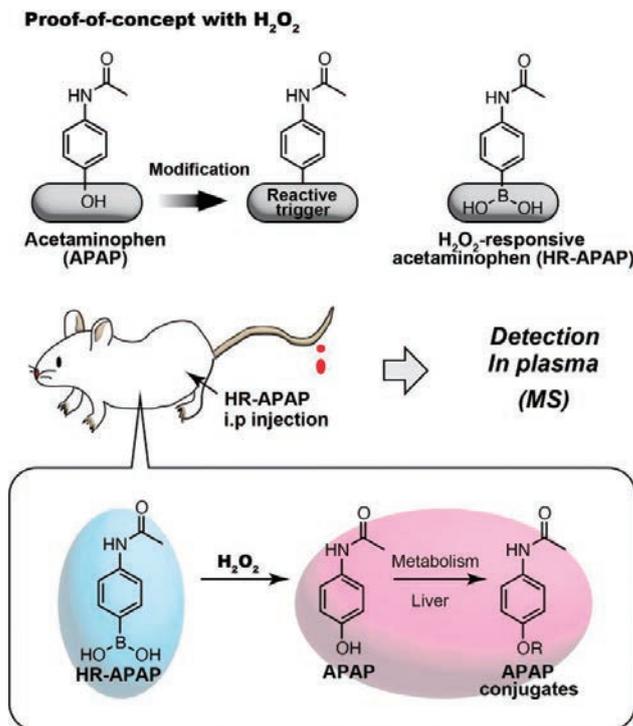


図3. アセトアミノフェンを用いた分子プローブ設計指針、及び過酸化水素応答性アセトアミノフェン (HR-APAP) を用いた過酸化水素検出メカニズム

ることにより、標的分子との反応の結果、生じる生成物を検出可能となる。

過酸化水素を検出可能にする合成バイオマーカーの開発⁽³⁵⁾

がんにおいて、過酸化水素の存在量が増えることが知られている。また、様々な炎症性疾患との関連も示唆されており、疾病診断において、非常に重要な分子種の一つであると言える。そこで、過酸化水素との反応に伴いアセトアミノフェンを生成物として与える分子プローブ設計を行った(図3)。具体的には、アセトアミノフェンのフェノール部位をフェニルボロン酸に置き換えたプローブ(HR-APAP)を設計した。フェニルボロン酸は、過酸化水素との反応に伴い、フェノール構造へ変換されることが知られている。実際に、本プローブ分子の物性評価を進めた結果、想定通りアセトアミノフェンを生成物として与え、過酸化水素に対する選択性も認められた。さらに、RAW264.7細胞を用いて、LPS刺激に伴う内在性の過酸化水素の増加をモニター可能であることも確かめられた。そこで、実際にマウス腹腔内で目的の反応を進行させた際に、アセトアミノフェン、及びその抱合体量が増加するか検証した。その結果、過酸化水素、及び分子プローブを腹腔内に投与したマウスにおいて、血漿中に含まれるアセトアミノフェン、及びその抱合体量が過酸化水素濃度依存的に増加することが確かめられた。以上より、合成バイオマーカー開発においてアセトアミノフェンは、非常に有用な分子であることが明らかとなった。

がん膜表層抗原の情報をコードした合成バイオマーカーの開発⁽³⁶⁾

従来の合成バイオマーカー開発は、プロテアーゼに代表されるように反応性を有している分子に解析対象が限定されていた。そこで、合成バイオマーカーの解析対象を、反応性を示さない分子種へ拡張する方法論の構築に取り組んだ。具体的には、レポーター酵素として汎用されているβ-ガラクトシダーゼ(β-gal)、及び、β-gal応答性アセトアミノフェン誘導体(β-GR-APAP)の利用を検討した。この際、アビジンとβ-galの複合体を用いた。アビジンは、正電荷を帯びたタンパク質であり、糖タンパク質であるレクチンと相互作用を起こすことが知られている。そこで、大腸がん由来の細胞下部であるLoVo細胞を用い腹膜播種モデルを作成し、本方法論の実現可能性を検証した。まず初めに、アビジンとβ-galの複合体を投与し、細胞膜表層抗原にβ-galを結合させる。一定時間経過後、結合しなかった複合体がクリアランスされたのち、β-GR-APAPを加え、がん表層で、アセトアミノフェンへの変換反応を惹起した。その後、血漿中に含まれるアセトアミノフェン、及びその抱合体を検出した。その結果、投与後60分の血漿サンプルを用いた際、腹膜播種モデルにおいて有意に合成バイオマーカー量が増加することを確かめた。以上より、がん細胞の膜抗原という反応性を有さない分子種の情報をコードした合成バイオマーカーの開発が可能であることを初めて明らかにした。抗原認識部位を標的に応じて変更することにより、多様ながん組織へ利用することができるため、その応用範囲は非常に広いと言える。

イメージングバイオマーカーとの併用

合成バイオマーカーは、従来の内因性分子をバイオマーカーとして活用する試みと比較して、感度面で非常に優れ、早期発見に適した方法論であると言える。また、合成バイオマーカーは、多成分の分子を同時解析可能であるという特徴を有している。そのため、がん検出のみならず、多重解析結果に基づくことにより、より正確な疾病診断、薬効予測などの応用可能性を秘めている。実際に、臨床前研究において、肺線維症の進行の程度⁽²⁰⁾、肺がんと良性肺炎の違い⁽²⁴⁾、チェックポイント阻害免疫療法の効果判定⁽²²⁾などへの利用可能性などが示されつつある。ただし、がんの形成箇所、及びサイズ判定には困難を伴うのが現状である。

そのため、がん診断における一つの方向性として、合成バイオマーカーとイメージングバイオマーカーとの併用が考えられる。近年、分子イメージング技術の進展に伴い、蛍光、発光などを用いる光計測手法、広く画像診断として臨床で使用されているCT、MRIなどの形態画像診断、及び、先述したFDGに代表される放射性薬剤^(18,19)を用いたPETなどの核医学検査法といったように様々な方法論が構築されてきた。

実際に、PET-CTは、PETとCTを連続して撮影し、機能画像と形態画像を重ね合わせて表示する手法となり、がん部位やがんサイズの評価が可能である。また、肝機能や循環機能検査薬として臨床利用されていたインドシアニングリーン (ICG) を用いた術中がん診断も行われている^(37,38)。ICGは胆汁排泄性の色素であるが、肝細胞癌や転移性肝がんにおいて主要部位で明瞭なICG蛍光発色が認められることが知られている。そのため、特に、腹腔鏡下手術において非常に有用な方法論となる。このように、がん部位の判定において、イメージングバイオマーカーは、合成バイオマーカーには見られない特性を有していると言える。一方で、がん患者のスクリーニングや、治療効果判定や再発評価など経過観察を行う場合は、血液や尿サンプルを用いて簡便に行うことが可能な合成バイオマーカーに優位性がある。そのため、利用用途に応じて使い分けこ

とで、両者の利点を最大限活用可能となる。

結論

2013年の最初の報告以降⁽²⁰⁾、およそ10年で、合成バイオマーカー研究は非常に進展を遂げた。まだ萌芽期の研究であるため、ヒトへの応用はまだなされていないものの、様々多様な分子解析へ適用可能にする本方法論の潜在性は非常に高い。本総説においては、がん関連分子との間の化学反応を利用する方法論に焦点を当て概説したが、現在、遺伝子操作技術を活用した方法論も飛躍的な進展を遂げている⁽³⁹⁾。今後、合成バイオマーカーを用いた診断手法が、内因性バイオマーカーによる疾病診断の代替、もしくは補完する方法論として、さらに進展していくことを期待したい。

References

1. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J. Clin.* 2020; 70: 7–30.
2. The National Lung Screening Trial Research Team. Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365: 395–409.
3. Zhao Y. R., Xie X., de Koning H. J., Mali W. P., Vliegenthart R., Oudkerk M. NELSON lung cancer screening study. *Cancer Imaging.* 2011; 11 Spec No A(1A):S79–84.
4. Siu A. L., U.S. Preventive Services Task Force. Screening for breast cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann. Intern. Med.* 2016; 164: 279–296.
5. US Preventive Services Task Force. Screening for colorectal cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *JAMA.* 2016; 315: 2564–2575.
6. US Preventive Services Task Force. Screening for cervical cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *JAMA.* 2018; 320: 674–

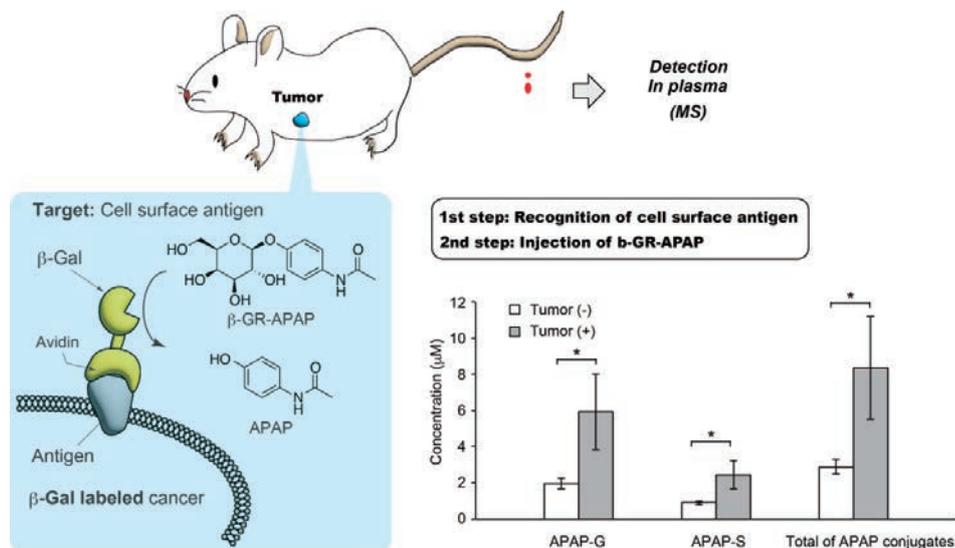


図3. β -ガラクトシダーゼ応答性アセトアミノフェン (β -GR-APAP) を用いたがん抗原情報をコードした合成バイオマーカーの概略図。抗原認識に基づく β -ガラクトシダーゼ標識を利用することで、がん部位選択的に酵素反応を進行させ、アセトアミノフェン量を増幅させる。60分後の各アセトアミノフェン、及びその抱合体濃度を記載。

- 686.
7. Moyer V. A., U.S. Preventive Services Task Force. Screening for lung cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann. Intern. Med.* 2014; 160: 330–338.
 8. Pinsky P. F., Prorok P. C., Kramer B. S. Prostate cancer screening - A perspective on the current state of the evidence. *N. Engl. J. Med.* 2017; 376:1285–1289.
 9. Cohen J. D., Li L., Wang Y. *et al.* Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science.* 2018; 359: 926-930.
 10. Au S. H., Edd J., Haber D.A., Maheswaran S., Stott S. L., Toner M. Clusters of Circulating Tumor Cells: a Biophysical and Technological Perspective. *Curr. Opin. Biomed. Eng.* 2017; 3: 13–19.
 11. Bettgowda C., Sausen M., Leary R.J. *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* 2014; 6: 224ra24.
 12. Maheswaran S, Sequist L. V., Nagrath S. *et al.* Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359: 366–377.
 13. Dawson S. J., Tsui D. W., Murtaza M. *et al.* Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368: 1199–1209.
 14. Lennon A. M., Buchanan A. H., Kinde I. *et al.* Feasibility of blood testing combined with PET-CT to screen for cancer and guide intervention. *Science.* 2020; 369: eabb9601.
 15. De Rubis G, Rajeev Krishnan S, Bebawy M. Liquid biopsies in cancer diagnosis, monitoring, and prognosis. *Trends Pharmacol. Sci.* 2019; 40: 172–186.
 16. Sokoll L. J., Sanda M. G., Feng Z. *et al.* A prospective, multicenter, National Cancer Institute Early Detection Research Network study of [-2]proPSA: improving prostate cancer detection and correlating with cancer aggressiveness. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19:1193–1200.
 17. Karlsen M. A., Sandhu N., Høgdall C. *et al.* Evaluation of HE4, CA125, risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) and risk of malignancy index (RMI) as diagnostic tools of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* 2012; 127:379–383.
 18. Wagner C. C., Langer O. Approaches using molecular imaging technology — use of PET in clinical microdose studies. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2011; 63: 539–546.
 19. Condeelis J., Weissleder R. In vivo imaging in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010; 2:a003848.
 20. Kwong G., von Maltzahn G., Murugappan G. *et al.* Mass-encoded synthetic biomarkers for multiplexed urinary monitoring of disease. *Nat. Biotechnol.*, 2013; 31: 63–70.
 21. Chan L. W., Anahar M. N., Ong TH., Hern K. E., Kunx R. R., Bhatia S. N. Engineering synthetic breath biomarkers for respiratory disease. *Nat. Nanotechnol.* 2020; 15: 792–800.
 22. Mac Q. D., Sivakumar A. Phuengkham H. R. *et al.* Urinary detection of early responses to checkpoint blockade and of resistance to it via protease-cleaved antibody-conjugated sensors. *Nat. Biomed. Eng.* 2022; 6: 310–324.
 23. Amini A. P., Kirkpatrick J. D., Wang C. S. *et al.* Multiscale profiling of protease activity in cancer. *Nat. Commun.* 2022; 13, 5745.
 24. Kirkpatrick J. D., Warren A. D., Soleimany A. P. *et al.* Urinary detection of lung cancer in mice via noninvasive pulmonary protease profiling. *Sci. Transl. Med.* 2020; 12: eaaw0262.
 25. Dudani J. S., Ibrahim M. Kirkpatrick J., Warren A. D., Bhatia S. N. Classification of prostate cancer using a protease activity nanosensor library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2018; 118:8954–8959.
 26. Warren A. D., Gaylord S. T., Ngan K. C. *et al.* Disease detection by ultrasensitive quantification of microdosed synthetic urinary biomarkers. *J. Am. Chem. Soc.* 2014; 136:13709-13714.
 27. Dudani J. S., Jain P. K., Kwong G. A., Stevens K. R., Bhatia S. N. Photoactivated spatiotemporally-responsive nanosensors of in vivo protease activity. *ACS Nano.* 2015; 9: 11708–11717.
 28. Mac Q. D., Mathews D. V., Kahla J. A. *et al.* Non-invasive early detection of acute transplant rejection via nanosensors of granzyme B activity. *Nat Biomed Eng.* 2019; 3:281–291.
 29. Kwon E., Dudani J. Bhatia, S. N. Ultrasensitive tumour-penetrating nanosensors of protease activity. *Nat Biomed Eng* 2017; 1, 0054.
 30. Dudani J.S., Buss C.G., Akana R.T.K., Kwon, G.A., Bhatia S.N. Sustained-Release Synthetic Biomarkers for Monitoring Thrombosis and Inflammation Using Point-of-Care Compatible Readouts. *Adv. Funct. Mater.*, 2016; 26: 2919-2928.
 31. Warren A. D., Kwong G. A., Wood D. K., Lin K. Y., Bhatia S. N. Point-of-care diagnostics for noncommunicable diseases using synthetic urinary biomarkers and paper microfluidics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2014; 111:3671–3676.
 32. Hao L., Zhao R.T., Welch N.L. *et al.* CRISPR-Cas-amplified urinary biomarkers for multiplexed and portable cancer diagnostics. *Nat. Nanotechnol.* 2023; 18: 798–807.
 33. Lin K. Y., Kwong G. A., Warren A. D., Wood D. K., Bhatia S. N. Nanoparticles that sense thrombin activity as synthetic urinary biomarkers of hrombosis. *ACS Nano* 2015; 7: 9001–9009.
 34. Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144: 646–674.
 35. Nishihara T., Kuno S., Nonaka H. *et al.* Beta-galactosidase-responsive synthetic biomarker for targeted tumor detection. *Chem. Commun.* 2018; 54: 11745–11748.
 36. Nishihara T., Inoue J. Tabata S. *et al.* Synthetic

- biomarker design by using analyte-responsive acetaminophen. *ChemBioChem* 2017; 18: 910–913.
37. Ishizawa T., Fukushima N., Shibahara J. *et al.* Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer* 2009; 115:2491–2504.
 38. Ishizawa T., Masuda K., Urano Y. *et al.* Mechanistic background and clinical applications of indocyanine green fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2014 21:440–448.
 39. Kwong G. A., Ghosh S., Gamboa L., Patriotis C., Srivastava S., Bhatia. S. N. Synthetic biomarkers: a twenty-first century path to early cancer detection. *Nat Rev Cancer* 2021; 21: 655–668.

Fluorescence Lifetime Measurement and Its Applications Using Time-Correlated Single-Photon Counting

Yoshinobu Nishimura*

Faculty of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8571, Japan

*Corresponding author

Tel: (+)81-29-853-4215

Fax: (+)81-29-853-6503

E-mail: nishimura@chem.tsukuba.ac.jp

ABSTRACT

The details of the fluorescence lifetime measurement using the single-photon counting method are described, including light sources, photodetectors, electronic devices, apparatus placement, and measurement conditions. The validity of the assembled equipment was examined by measuring the lifetime of cryptocyanine as the reference compound. To demonstrate the potential for improved time resolution, hot-band fluorescence measurements of free-base porphyrins were performed, showing that phenomena with relaxation times of a few picoseconds could be observed.

Key words: Time-correlated single photon counting method; Fluorescence decay curve; Free-base porphyrin; Time-resolved fluorescence spectrum; Hot-band emission

INTRODUCTION

Fluorescence lifetime measurement is a powerful tool for investigating the kinetics of phenomena in the excited singlet state. In kinetic analysis, the relevant rate constants are often estimated using lifetime analysis. However, the uptake of dye molecules by proteins has a non-uniform distribution, making kinetic analysis difficult, as in homogeneous solution systems. When only a single fluorescent species is present, an identical fluorescence decay curve is obtained at any wavelength at which the fluorescence is observed. However, when multiple fluorescence signals are present, the fluorescence decay curves differ depending on the observed wavelength^[1-9]. Even when only one type of fluorescent molecule is present, the interaction of a specific site of a protein with the molecule in a solution containing the protein causes differences in the fluorescence state of the molecule, resulting in changes in the fluorescence wavelength and the deactivation time constant. By contrast, in homogeneous solutions, when one type of molecule is present, a fluorescence decay curve that can be expressed as an exponential function of one component is observed under dilute conditions. However, in heterogeneous solutions, the fluorescence decay curve varies depending on the observed wavelength; in many cases, the fluorescence decay curve is analyzed using a multicomponent exponential function, such as global analysis^[10-12]. This method analyzes a series of fluorescence decay curves measured in a wavelength region where multiple emission species overlap, simultaneously rather than individually. It also provides the fluorescence spectra for each emission species with different lifetimes. Fluorescence lifetime

imaging is a useful technique in such cases^[13-18]. This technique is useful for visualizing the lifetime components at each observation position in biological samples, where the fluorescence lifetime varies depending on the location. However, it is difficult to assign meaning to individual time constants when analyzing with a multi-component exponential function. This is because it is not possible to assume a simple reaction scheme such as that of a homogeneous dispersion system.

It is noteworthy that the time-correlated single photon counting (TCSPC) method has an advantage over other methods in determining time constants with a high degree of accuracy. Another method that does not discuss the kinetic aspect is the qualitative use of time-resolved fluorescence spectra. For the time-resolved fluorescence spectra, when using TCSPC, the fluorescence decay curve is first measured at the same integration time while scanning the range of the fluorescence spectra at equally spaced wavelengths. The fluorescence curves are then arranged by the observed wavelength, and the curve connected in the time direction is the decay curve, whereas the curve connected in the wavelength direction can be regarded as the fluorescence spectrum at an elapsed time after excitation. This fluorescence spectrum is known as time-resolved fluorescence spectrum. The time interval of the fluorescence spectrum depends on the time interval of each point that constitutes the fluorescence decay curve. The time-resolved fluorescence spectrum can often be separated into its constituent fluorescent species, making it possible to identify the fluorescence spectrum of the emitting species involved in the fluorescent species that is not identified in the fluorescence decay curve.

Consequently, time-resolved fluorescence spectra of benzene solutions of free-base porphyrins were measured to see how much time-resolved fluorescence spectra could be measured. Successful observation of hot-band fluorescence emitted from a higher vibrational level rather than the lowest vibration level of the excited state was achieved using an assembled TCSPC system.

EXPERIMENTAL

A detailed description of the equipment was provided since the TCSPC apparatus used in the previous studies was reassembled^[19–28]. The description was divided according to the devices constituting the equipment.

Apparatus

Light sources

In recent years, mode-locked Ti:Sa laser systems equipped with pulse selectors have become popular light sources for fluorescence measurement. However, flash lamps are also currently available for generating light pulses in the 560–700 nm range, where the Ti:Sa laser may not provide sufficient power and stability. A typical Ti:Sa laser offers a wide excitation wavelength range of 700–1000 nm, producing < 100 fs pulse widths. It serves as a stable oscillator, which is essential for successful TCSPC measurements, in comparison with a typical dye-laser system.

Without pulse picking, the average output power can reach 1 W if a 10 W class laser is used to pump the Ti:Sa laser. After pulse picking, the repetition rate decreases to a few MHz, and the average power reduces to 20–30 mW, which is sufficient for TCSPC measurements. This implies that additional amplifier systems are not necessary. However, it is important to note that the time resolution in TCSPC can be affected by laser fluctuations such as the line noise generated from the power supply and surrounding electronics. Therefore, the use of a simple configuration for the light source is significant. The repetition rate of the pulse train depends on the lifetime of the target sample and processing electronics.

The available wavelength region depends on the lasing region of the Ti:Sa laser. In some cases, second-harmonic generation (SHG) is used to extend the available wavelength region by producing half the fundamental wavelength. The conversion efficiency of SHG mainly relies on the type of crystal used and the peak power of the fundamental laser. If the Ti:Sa laser provides a 1 W output, third harmonic generation (THG) can also be utilized as an excitation source. However, the conversion efficiency of THG is approximately 10% of the fundamental value, which is lower than that of the SHG. Consequently, the output power after pulse picking is less than 1 mW. Nevertheless, this power level is sufficient for conducting TCSPC measurements, provided that long-term laser stability can be achieved during decay measurements. This stability can be attained in a well-air conditioned room.

If a wavelength range from 500 to 700 nm is needed to excite a sample, an alternative to a flash lamp could be an

optical parametric oscillator (OPO). OPO, in combination with a Ti:Sa laser, can generate infrared femtosecond pulses ranging from 1.1 to 2.0 μm . By utilizing nonlinear crystals, the OPO enables second harmonic generation (SHG) and third harmonic generation (THG) to provide excitation wavelengths that cannot be generated by the Ti:Sa laser alone. However, a drawback of the OPO is that laser alignment becomes more challenging compared to that of the Ti:Sa laser, as the fundamental pulse of the OPO is in the infrared region. This means that an infrared viewer is essential for aligning the mirrors.

Recently, laser diodes (LD) have gained popularity as excitation sources due to their ease of handling. Moreover, for TCSPC measurements, it is sufficient to use LD to excite the samples and generate single-photon events. While LD can produce excitation pulses ranging from 375 to 1550 nm, the available wavelengths are discrete, and there is a lack of options in the 500 nm region. Despite the inconvenience of the limited wavelengths for sample excitation, LD remain an attractive choice as an excitation source.

Photodetectors

Photomultiplier tubes (PMT) play a crucial role in determining the time resolution in TCSPC, in addition to the pulse width of the excitation source and time jitter in electronics. The statistical dispersion of the transit time spread (TTS) of photoelectrons can affect the width of the instrument response function (IRF) in single-photon counting measurements. Conventional PMT often exhibits low time resolution due to multiple amplification stages in the electron dynodes, which are necessary to amplify the photoelectrons generated at the photocathode by incident photons. The fastest time resolution achieved with a conventional PMT, such as R928, was reported to be less than 300 ps under specific conditions^[29]. However, the use of conventional PMT for TCSPC is not recommended, despite their ease of handling and cost-effectiveness. Specific PMT designed for TCSPC applications, including a microchannel plate photomultiplier (MCP-PMT) with a time resolution of approximately 20 ps, are commercially available^[30,31].

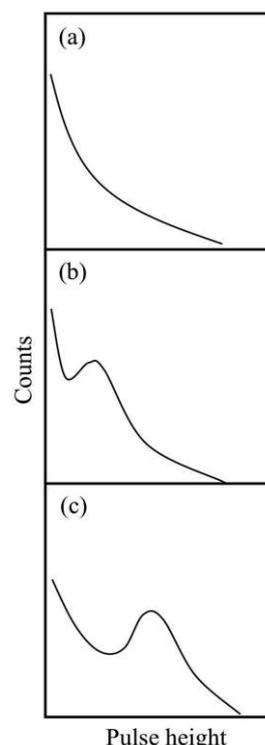


Fig. 1. Dependence of pulse height distribution on the voltage applied to the MCP-PMT.

The spectral sensitivity of a PMT depends on the photocathode material, which generates photoelectrons upon irradiation, based on the photoelectric effect. Typically, alkali metals with low work functions are used as the photocathodes. The PMT performance depends on the radiant sensitivities of multialkali (MA), infrared-enhanced multialkali (EMA), and Ag-O-Cs (S-1) as a function of the irradiation wavelength. The radiant sensitivity is calculated by dividing the photocurrent from the photocathode by the incident photon energy. MA has a sensitivity range of 200–800 nm and is widely used as a photocathode material in PMT for spectrofluorometers. Through specific activation, MA can be transformed into EMA, which extends the spectral sensitivity to 930 nm. The S-1 photocathode is frequently employed for detecting photons beyond 800 nm despite its low sensitivity and considerable dark current. Cooling the photocathode using a Peltier device allows for effective reduction of the dark current, enabling the detection of a substantial number of photons emitted from a sample even if it exhibits very weak emission. This is because the red-sensitive PMT emits thermionic electrons from the photocathode.

The spectral sensitivity of PMT is also influenced by the window material used. PMT with MgF₂ windows can operate down to 110 nm, although the use of MgF₂ is challenging because of its deliquescent properties. Quartz is a commonly used window material with a spectral sensitivity that extends to approximately 160 nm. Notably, molecular oxygen is absorbed in the UV region, leading to ozone formation. UV and borosilicate glasses are the most popular window materials, and they do not encounter any issues when detecting emissions in the visible region.

To achieve a single-photon operation, it is necessary to adjust the voltage applied to PMT. When the applied voltage is low, no peak is observed in the pulse height distribution, as shown in Fig. 1a. As the applied voltage increases, the pulse-height distribution begins to exhibit a peak, as shown in Fig. 1b, and eventually reaches a distinct peak at the optimal voltage, as shown in Fig. 1c. Optimizing the instrument response function (IRF) allows us to determine the optimal voltage for driving MCP-PMT. It is important to note that a high emission intensity can damage the photocathode of MCP-PMT, leading to a decrease in sensitivity and unusual IRF. It is generally advisable to set the voltage below 3 kV to achieve the optimal output, although the exact value may vary depending on the individual cases.

Electronic devices

TCSPC measurements involve the use of multiple electronic devices to process signals from PMT, which detects emissions from fluorescent molecules. Fig. 2 depicts a block diagram of a TCSPC apparatus, consisting of a photomultiplier (PMT), PIN photodiode (PINPD), preamplifier (AMP), constant fraction discriminator (CFD), time-to-amplitude converter (TAC), analog-to-digital converter (ADC), and multichannel analyzer (MCA). The arrows indicate the direction of flow of the

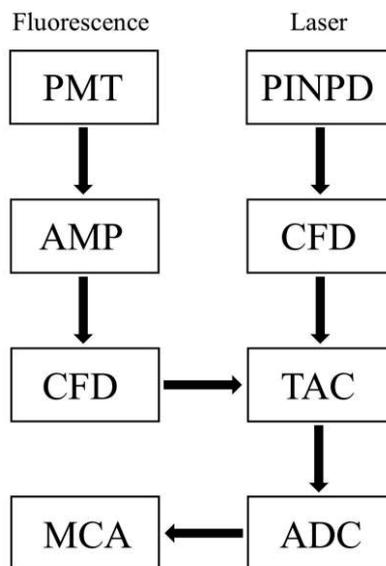


Fig. 2. Block diagram of TCSPC measurements: PMT (photomultiplier tube), PINPD (PIN photodiode), AMP (preamplifier), CFD (constant fraction discriminator), TAC (time-to-amplitude converter), ADC (analog-to-digital converter), and MCA (multichannel analyzer).

electrical signals. AMP is necessary to amplify the output of PMT because its amplitude may be insufficient to drive the CFD.

Because there are various combinations of PMT and AMP, it is important to place an appropriate attenuator (up to several GHz) between them to avoid saturating the output of AMP. To determine a suitable attenuator, it is convenient to have attenuators with 6 dB, 14 dB, and 20 dB settings, which correspond to multiplier factors of 1/2, 1/5, and 1/10, respectively. Trying different attenuators allows us to determine the appropriate attenuator by examining the instrument response function (IRF), which is explained later. If the shape of the IRF is distorted, another attenuator is recommended.

The output of the AMP primarily consists of the emission signals and dark noise. Since the emission signals also exhibit a broad distribution of pulse heights, it is necessary to distinguish the desired signals from the AMP output. To achieve this, the discriminator level should be sufficiently high such that the counting rate of single photons decreases to 2/3 of the maximum count rate obtained at the minimum discriminator level. The excitation intensity should be adjusted such that the maximum count rate is less than 1/100 of the repetition rate of the pulsed laser to avoid distortions caused by pulse pile-up. If the dark count rate resulting from the dark current of the PMT is not negligible (e.g., several hundred counts per second), the maximum count rate needs to consider the dark count rate by subtracting it from the measured maximum count rate.

To optimize the IRF and minimize its full width at half maximum (FWHM), there are several tuning points within each apparatus. One such point is the zero-cross setting of

the CFD. In general, the zero-cross level is highly sensitive to the FWHM of the IRF because it determines the timing of the output pulse from CFD. A delay line is utilized to introduce a signal delay between the CFD output and TAC input. It is commercially available as a pre-calibrated NIM module. The delay accuracy is calibrated within a range of ± 100 ps, making it suitable for calibrating the time resolution of the MCA when combined with the TAC in a manufactured system.

TAC plays a crucial role in TCSPC, as it determines the time difference between the start and stop signals from the CFD output by utilizing capacitor charging. TAC features input connectors that accept start and stop signals along with some control lines. When the START pulse is received from the corresponding CFD output, the capacitor begins to charge and stops charging upon receiving the STOP pulse. The time difference between the START and STOP signals is directly proportional to the voltage across the charged capacitor. However, in some cases, the linearity of this relationship is not guaranteed, and should be checked before measuring the FWHM of the IRF. This helps identify the available channels in the MCA. To prepare for a subsequent START signal, the capacitor must discharge, resulting in a 'dead time' of approximately 100 ns.

In general, START and STOP signals are typically associated with the outputs of PINPD and AMP, respectively, which is referred to as the 'Normal setting'. The probability of detecting a PINPD signal resulting from the repetition of a laser pulse is lower than that of an AMP signal. In the 'Normal setting', AMP serves as the START signal and PINPD as the STOP signal, which allows TAC to start charging. However, there is an alternative configuration known as the 'Reverse setting', where AMP becomes the STOP signal and PINPD becomes the START signal. This setting is useful to avoid time loss caused by the 'dead time' of the system.

It is important to note that the 'Reverse setting' may not be applicable if the time constant of the emission decay is greater than the laser repetition rate. This is due to the non-negligible overlap of the prolonged decay components from the excitation caused by the previous laser pulse. Therefore, accurately determining the repetition rate of the laser pulse using a pulse picker is crucial for achieving efficient measurement of fluorescence decay. In certain applications, TAC can be controlled using an additional INHIBIT signal. This feature allows the measurement of differential decay in the presence and absence of an applied electric field^[32].

Until high-performance personal computers (PC) became popular, a multichannel analyzer (MCA) was commonly used as a stand-alone device. However, in recent years, MCA have been implemented using PC extension boards or external boxes that are controlled by a real-time program. This advancement allows for advantageous control of the MCA, along with other peripheral devices, such as motor driver, photon counter, and sample changer units. Integration of these components into a PC-based

system provides flexibility and ease of operation.

Apparatus Placement

Fig. 3 depicts the present setup for fluorescence lifetime measurements using the time-correlated single-photon counting method. A polarizer is employed to set the polarization angle of the excitation beam to 35.25° to avoid emission photoselection. The beam is then focused onto the sample cuvette using a convex lens. The light emitted from the sample is monitored at a right angle to the excitation beam to prevent detection of the excitation source. A pair of convex lenses is utilized to collect the emission and match the F value of the monochromator. A depolarizer is necessary to eliminate the polarization property of the monochromator. The desired monitor wavelength is selected using a monochromator and detected using a PMT. The output signal from the PMT is amplified by AMP and processed by CFD to discriminate the emission signals from dark noise. The START signal generated by CFD is fed into the TAC input. If a laser diode (LD) is employed as the laser source, the STOP signal in the "Reverse setting" is generated by the LD driver. In the case of a conventional pulse laser, such as a Ti:Sa laser, the STOP signal is generated by monitoring a portion of the pulse split from the excitation pulse using a low-reflection mirror. If second harmonic generation (SHG) or third harmonic generation (THG) is used to excite the sample, the fundamental pulse is suitable as the STOP signal, which should be processed by CFD.

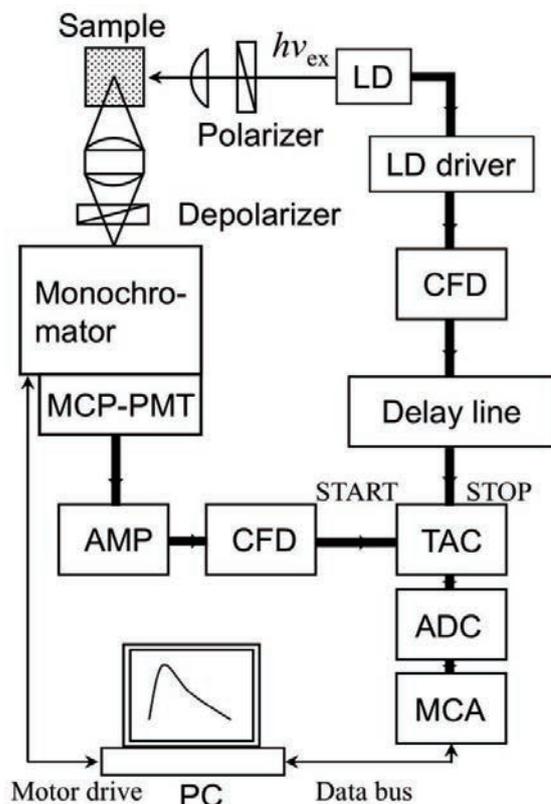


Fig. 3. The present setup for measuring fluorescence decay, including a laser diode and optics for collecting emission from a sample.

Measurement Conditions

When starting fluorescence decay measurements, please take note of the following points,

1. It was ensured that the laser pulse remained stable throughout the decay measurement. In some cases, it may be necessary to wait a few hours to achieve a stable laser pulse.
2. Check if the absorbance at the excitation wavelength is less than 0.3. This is important to ensure homogeneous excitation of the sample in a 1 cm × 1 cm cuvette.
3. The polarization of the excitation pulse is verified. If you plan to measure anisotropic decay, make sure to use a polarizer on both the excitation and emission sides.
4. Check whether the photon counting rate from the sample, relative to the repetition rate of the excitation pulse, is less than 0.01. If it exceeds 0.01, the obtained decay curve may be distorted due to pulse pile-up effects caused by multiphoton events.

Materials and Instrumentation

Cryptocyanine and H₂P were purchased from Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., and purified three times with ethanol. Fluorescence decay measurement was performed using an LDH-P-C-405 diode laser (PicoQuant) with a PDL 800-B power control unit (PicoQuant) at a repetition rate of 2.5 MHz. The temporal profiles of the fluorescence decays were detected via an R3809U microchannel plate photomultiplier (Hamamatsu) equipped with a TCSPC computer board module (SPC630, Becker and Hickl GmbH).

RESULTS AND DISCUSSION

Measurement of IRF

Rayleigh scattering at the excitation wavelength was measured using a sonicated vesicle solution, instead of the sample solution (Fig. 4). This scattering decay can serve as IRF, which can be used to analyze the fluorescence decay curve through deconvolution. A Delay Generator was used to adjust the position of the decay signal on the MCA.

If the peak channel of the IRF fluctuates on MCA, it is important to check the stability of the laser. In some cases, the fluctuation may have been caused by airflow from an air conditioner. To mitigate this, consider covering both the laser and detection instruments to block the airflow. Finally, the fluorescence decay curves were processed using a computer. To measure time-resolved spectra, the monochromator was controlled using a stepping motor driven by a personal computer. Accumulate photon signals at specific wavelengths for a defined period of time and then reconstruct the time-resolved spectra on the computer.

Measurement of Fluorescence Decay

Once the components of the measurement system have been assembled, it is important to verify the accuracy of the measured fluorescence decay. A common approach

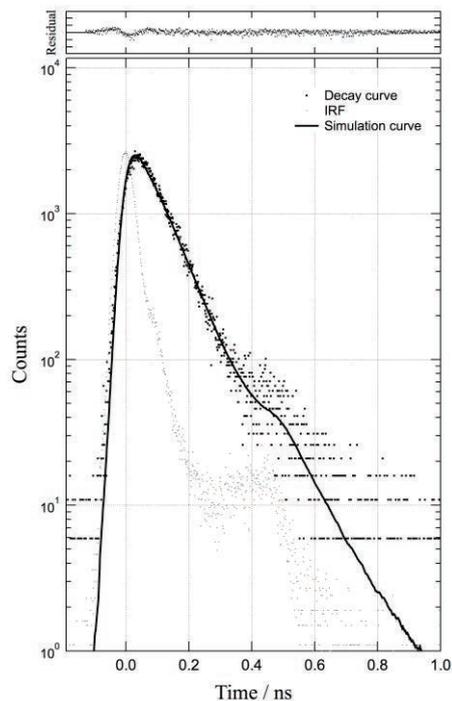


Fig. 4. The fluorescence decay of cryptocyanine in ethanol was monitored at 728 nm with excitation at 410 nm. In the plot, small dots represent the instrument response function (IRF), while large dots represent the fluorescence decay. The solid line represents the simulated curve obtained through a least-squares fit, which yields a lifetime of 75 ps. The upper plot shows the weighted residuals calculated from the fitting data.

is to compare the obtained lifetime with previously reported values to ensure consistency. Fig. 4 depicts the fluorescence decay of cryptocyanine in ethanol. The resulting lifetime was determined to be 75 ps, which agreed with the reported value of 75 ps^[33]. Furthermore, this observation highlights that a minimum of 2000 peak counts is necessary for a reliable lifetime analysis. If the peak counts are insufficient due to a very low quantum yield, caution must be exercised when interpreting the calculated lifetimes. Several studies using the current apparatus have been published^[34–47].

Fluorescence decay measurement of H₂P

The excited state generated by photoexcitation is not the lowest vibrational state, but a higher vibrational state, followed by vibrational relaxation to the most stable excited state. Photochemical reactions usually occur in the lowest excited state. This is because higher vibrational states relax within a few picoseconds (ps), which is too fast for normal photochemical reactions to proceed^[48–54]. Relaxation from higher vibrational states results in hot-band emission during the excitation relaxation process of H₂P. The absorption spectrum showed a Soret band with a large molar absorption coefficient of approximately 400 nm and a Q band from 480 to 650 nm. Furthermore, the Q band is split into the Q_x and Q_y bands, with Q_y having a higher energy. When the Soret band is excited, internal

conversion to the Q_y band occurs within 100 fs, followed by a high vibrational state in the Q_x band. The vibrational relaxation time of this high vibrational state has been reported to be 1.5 ps^[55].

When measured with an instrument with femtosecond (fs) -time resolution, such as the fluorescence up-conversion method, these processes can be observed and the time constant can be determined. However, up-conversion is a technically challenging method that measures the sum frequency of the emitted fluorescence and the probe laser. Due to the use of optical delay, it can be used to determine the fluorescence lifetime in the femtosecond region. Meanwhile, the TCSPC method does not have fs-time resolution, but ps-time resolution, making it difficult to determine the time constant^[30,31,56]. However, because the time resolution of TCSPC is limited to a few picoseconds, fluorescence from a higher vibrational state, or hot-band fluorescence, may be observed in the time-resolved fluorescence spectrum immediately after excitation. In addition, this fluorescence relaxation is expected to be strongly influenced by interaction with the medium.

Time-resolved spectra

The time-resolved fluorescence spectrum of a benzene solution of H_2P was measured at an excitation wavelength of 410 nm using the assembled TCSPC. This was prepared by reconstructing the fluorescence decay curves measured every 2 nm from 550 to 770 nm. The time-resolved fluorescence spectra are shown in Fig. 5. The number on the far right represents the time elapsed after excitation. The reason for some negative times is that the peak of IRF is time zero. Because the IRF has a time width, the time before the peak was represented as a negative time. The negative time is the time region where fluorescence emission occurs along with photoexcitation.

A weak fluorescence signal was observed in the spectra from 590 to 630 nm immediately after excitation within 35 ps. Judging from the observed fluorescence wavelength and time region based on previously published literature, this fluorescence can be attributed to hot-band fluorescence. In other words, although the signal was very weak, the present TCSPC apparatus could observe the fluorescence emission process with a time constant of a few picoseconds. However, this was not sufficient to determine the time constant. This indicates that the time-resolved fluorescence spectrum, which can be measured using TCSPC, has potential as a measurement technique. Thus, TCSPC has the advantage of being a compact instrument; however, it also has the aspect of a spectrometer with high temporal resolution. For example, it is possible to explore the morphology of porphyrin derivatives in proteins in which emissive species are distributed inhomogeneously.

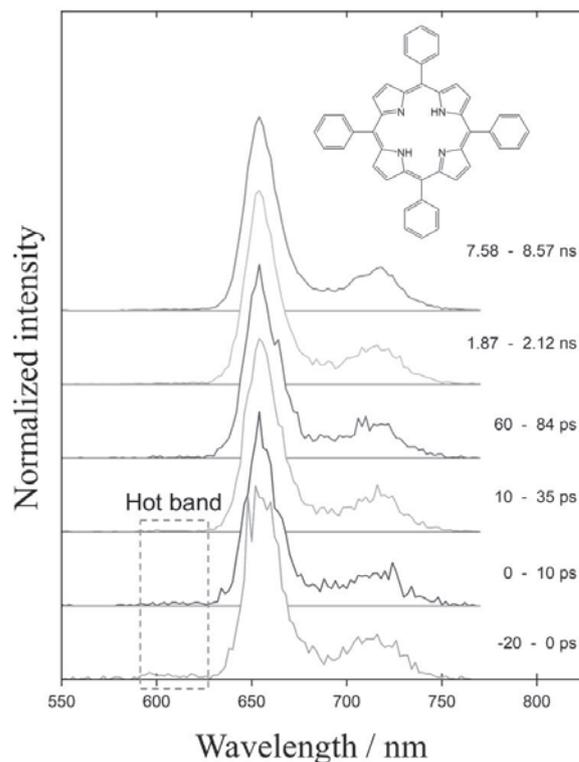


Fig. 5. Time-resolved fluorescence spectra of H_2P in benzene on excitation at 410 nm under Ar.

References

1. Das PK, Chaudhuri A, Saha S, Samanta A. First simultaneous estimates of the water pool core size and the interfacial thickness of a cationic water-in-oil microemulsion by combined use of chemical trapping and time-resolved fluorescence quenching. *Langmuir*, 1999;15:4765–4772.
2. Lang J, Mascolo G, Zana R, Luisi PL. Structure and dynamics of cetyltrimethylammonium bromide water-in-oil microemulsions. *J Phys Chem*, 1990;94:3069–3074.
3. Bismuto E, Sirangelo I, Irace G. Fluorescence lifetime distribution of 1,8-anilino-naphthalenesulfonate (ANS) in reversed micelles detected by frequency domain fluorometry. *Biophys Chem*, 1992;44:83–90.
4. Matzinger S, Hussey DM, Fayer MD. Fluorescent probe solubilization in the headgroup and core regions of micelles: Fluorescence lifetime and orientational relaxation measurements. *J Phys Chem B*, 1998;102:7216–7224.
5. Prazeres TJV, Fedorov A, Martinho JMG. Dynamics of oligonucleotides adsorbed on thermosensitive core-shell latex particles. *J Phys Chem B*, 2004;108:9032–9041.
6. Chatterjee A, Maity B, Seth D. Photophysics of 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid in cationic micelles: Effect of chain length and head group of the surfactants and urea. *RSC Adv*, 2014;4:34026–34036.

7. Maiti NC, Krishna MMG, Britto PJ, Periasamy N. Fluorescence dynamics of dye probes in micelles. *J Phys Chem B*, 1997;101:11051–11060.
8. Horng ML, Gardecki JA, Maroncelli M. Rotational dynamics of coumarin 153: Time-dependent friction, dielectric friction, and other nonhydrodynamic effects. *J Phys Chem A*, 1997;101:1030–1047.
9. Krishna MMG, Das R, Periasamy N, Nityananda R. Translational diffusion of fluorescent probes on a sphere: Monte Carlo simulations, theory, and fluorescence anisotropy experiment. *J Chem Phys*, 2000;112:8502–8514.
10. Pelet S, Previte MJ, Laiho LH, So PT. A fast global fitting algorithm for fluorescence lifetime imaging microscopy based on image segmentation. *Biophys J*, 2004;87:2807–2817.
11. Grecco HE, Roda-Navarro P, Verveer PJ. Global analysis of time correlated single photon counting FRET-FLIM data. *Opt Express*, 2009;17:6493–6508.
12. Barber PR, Ameer-Beg SM, Gilbey J, Carlin LM, Keppler M, Ng TC, et al. Multiphoton time-domain fluorescence lifetime imaging microscopy: Practical application to protein-protein interactions using global analysis. *J R Soc Interface*, 2009;6:93–105.
13. Becker W. Fluorescence lifetime imaging - techniques and applications. *J Microsc*, 2012;247:119–136.
14. Becker W, Bergmann A, Hausteiner E, Petrusek Z, Schwille P, Biskup C, et al. Fluorescence lifetime images and correlation spectra obtained by multidimensional time-correlated single photon counting. *Microsc Res Tech*, 2006;69:186–195.
15. Suhling K, French PMW, Phillips D. Time-resolved fluorescence microscopy. *Photochem Photobiol Sci*, 2005;4:13–22.
16. Berezin MY, Achilefu S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem Rev*, 2010;110:2641–2684.
17. Tadrous PJ. Methods for imaging the structure and function of living tissues and cells: 2. Fluorescence lifetime imaging. *J Pathol*, 2000;191:229–234.
18. Chen Y, Periasamy A. Characterization of Two-photon Excitation Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy for Protein Localization. *Microsc Res Tech*, 2004;63:72–80.
19. Imahori H, Yamada H, Nishimura Y, Yamazaki I, Sakata Y. Vectorial Multistep Electron Transfer at the Gold Electrodes Modified with Self-Assembled Monolayers of Ferrocene - Porphyrin - Fullerene Triads. *J Phys Chem B*, 2000;104:2099–2108.
20. Imahori H, Arimura M, Hanada T, Nishimura Y, Yamazaki I, Sakata Y, et al. Photoactive three-dimensional monolayers: Porphyrin - Alkanethiolate-stabilized gold clusters. *J Am Chem Soc*, 2001;123:335–336.
21. Imahori H, Norieda H, Yamada H, Nishimura Y, Yamazaki I, Sakata Y, et al. Light-harvesting and photocurrent generation by gold electrodes modified with mixed self-assembled monolayers of boron-dipyrin and ferrocene-porphyrin-fullerene triad. *J Am Chem Soc*, 2001;123:100–110.
22. Imahori H, Kashiwagi Y, Endo Y, Hanada T, Nishimura Y, Yamazaki I, et al. Structure and Photophysical Properties of Porphyrin-Modified Metal Nanoclusters with Different Chain Lengths. *Langmuir*, 2004;20:73–81.
23. Yamada H, Imahori H, Nishimura Y, Yamazaki I, Ahn TK, Kim SK, et al. Photovoltaic properties of self-assembled monolayers of porphyrins and porphyrin-fullerene dyads on ITO and gold surfaces. *J Am Chem Soc*, 2003;125:9129–9139.
24. Imahori H, Norieda H, Nishimura Y, Yamazaki I, Higuchi K, Kato N, et al. Chain length effect on the structure and photoelectrochemical properties of self-assembled monolayers of porphyrins on gold electrodes. *J Phys Chem B*, 2000;104:1253–1260.
25. Nakano A, Osuka A, Yamazaki I, Yamazaki T, Nishimura Y. Windmill-like porphyrin arrays as potent light-harvesting antenna complexes. *Angew Chem Int Ed*, 1998;37:3023–3027.
26. Osuka A, Nakajima S, Maruyama K, Mataga N, Asahi T, Yamazaki I, et al. 1,2-Phenylene-Bridged Diporphyrin Linked with Porphyrin Monomer and Pyromellitimide as a Model for a Photosynthetic Reaction Center: Synthesis and Photoinduced Charge Separation. *J Am Chem Soc*, 1993;115:4577–4589.
27. Osuka A, Tanabe N, Kawabata S, Yamazaki I, Nishimura Y. Synthesis and Intramolecular Electron- and Energy-Transfer Reactions of Polyene- or Polyene-Bridged Diporphyrins. *J Org Chem*, 1995;60:7177–7185.
28. Osuka A, Marumo S, Mataga N, Taniguchi S, Okada T, Yamazaki I, et al. A stepwise electron-transfer relay mimicking the primary charge separation in bacterial photosynthetic reaction center. *J Am Chem Soc*, 1996;118:155–168.
29. Kinoshita S, Kushida T. High-performance, time-correlated single photon counting apparatus using a side-on type photomultiplier. *Rev Sci Instrum*, 1982;53:469–472.
30. Yamazaki I, Tamai N, Kume H, Tsuchiya H, Oba K. Microchannel-plate photomultiplier applicability to the time-correlated photon-counting method. *Rev Sci Instrum*, 1985;56:1187–1194.
31. Boens N, Tamai N, Yamazaki I, Yamazaki T. Picosecond single photon timing measurements with a proximity type microchannel plate photomultiplier and global analysis with reference convolution. *Photochem Photobiol*, 1990;52:911–917.
32. Nishimura Y, Yamazaki I, Yamamoto M, Ohta N. Measurements of the electric-field-induced change in fluorescence decay profile of methylene-linked carbazole and terephthalic acid methyl ester in a PMMA polymer film. *Chem Phys Lett*, 1999;307:8–14.

33. Sundström V, Gillbro T. Viscosity dependent radiationless relaxation rate of cyanine dyes. A picosecond laser spectroscopy study. *Chem Phys*, 1981;61:257–269.
34. Nishimura Y, Kamada M, Ikegami M, Nagahata R, Arai T. The relaxation dynamics of the excited state of stilbene dendrimers substituted with phenylacetylene groups. *J Photochem Photobiol A Chem*, 2006;178:150–155.
35. Ohshiro I, Ikegami M, Shinohara Y, Nishimura Y, Arai T. Photochemical behavior of an anthracene-urea derivative interacting with anions. *Bull Chem Soc Jpn*, 2007;80:747–751.
36. Nishida M, Momotake A, Shinohara Y, Nishimura Y, Arai T. Synthesis and photophysical properties of water-soluble dendrimers bearing a phthalocyanine core. *J Porphyr Phthalocyanines*, 2007;11:448–454.
37. Ikeda S, Nishimura Y, Arai T. Kinetics of hydrogen bonding between anthracene urea derivatives and anions in the excited state. *J Phys Chem A*, 2011;115:8227–8233.
38. Choi SJ, Kuwabara J, Nishimura Y, Arai T, Kanbara T. Two-step changes in luminescence color of Pt(II) complex bearing an amide moiety by mechano- and vapochromism. *Chem Lett*, 2012;41:65–67.
39. Hirakawa K, Hirano T, Nishimura Y, Arai T, Nosaka Y. Dynamics of singlet oxygen generation by DNA-binding photosensitizers. *J Phys Chem B*, 2012;116:3037–3044.
40. Sakai R, Nagai A, Tago Y, Sato SI, Nishimura Y, Arai T, et al. Fluorescence turn-on sensing of anions based on disassembly process of urea-functionalized poly(phenylenebutadiynylene) aggregates. *Macromolecules*, 2012;45:4122–4127.
41. Hirakawa K, Fukunaga N, Nishimura Y, Arai T, Okazaki S. Photosensitized protein damage by dimethoxyphosphorus(V) tetraphenylporphyrin. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013;23:2704–2707.
42. Hirakawa K, Nishimura Y, Arai T, Okazaki S. Singlet oxygen generating activity of an electron donor connecting porphyrin photosensitizer can be controlled by DNA. *J Phys Chem B*, 2013;117:13490–13496.
43. Yamamura M, Albrecht M, Albrecht M, Nishimura Y, Arai T, Nabeshima T. Red/near-infrared luminescence tuning of group-14 element complexes of dipyrrins based on a central atom. *Inorg Chem*, 2014;53:1355–1360.
44. Hirakawa K, Umemoto H, Kikuchi R, Yamaguchi H, Nishimura Y, Arai T, et al. Determination of Singlet Oxygen and Electron Transfer Mediated Mechanisms of Photosensitized Protein Damage by Phosphorus(V) porphyrins. *Chem Res Toxicol*, 2015;28:262–267.
45. Kuwabara J, Yamaguchi K, Yamawaki K, Yasuda T, Nishimura Y, Kanbara T. Modulation of the Emission Mode of a Pt(II) Complex via Intermolecular Interactions. *Inorg Chem*, 2017;56:8726–8729.
46. Matsumoto H, Nishimura Y, Arai T. Excited-state intermolecular proton transfer dependent on the substitution pattern of anthracene-diurea compounds involved in fluorescent ON1-OFF-ON2 response by the addition of acetate ions. *Org Biomol Chem*, 2017;15:6575–6583.
47. Togasaki K, Arai T, Nishimura Y. Effect of Moderate Hydrogen Bonding on Tautomer Formation via Excited-State Intermolecular Proton-Transfer Reactions in an Aromatic Urea Compound with a Steric Base. *J Phys Chem A*, 2020;124:6617–6628.
48. Ferrante C, Pontecorvo E, Cerullo G, Vos MH, Scopigno T. Direct observation of subpicosecond vibrational dynamics in photoexcited myoglobin. *Nat Chem*, 2016;8:1137–1143.
49. Mizutani Y, Kitagawa T. Ultrafast dynamics of myoglobin probed by time-resolved resonance raman spectroscopy. *Chemical Records*, 2001;1:258–275.
50. Dietze DR, Mathies RA. Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy. *ChemPhysChem*, 2016;17:1224–1251.
51. Batignani G, Ferrante C, Scopigno T. Accessing Excited State Molecular Vibrations by Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy. *J Phys Chem Lett*, 2020;11:7805–7813.
52. Ferrante C, Batignani G, Pontecorvo E, Montemiglio LC, Vos MH, Scopigno T. Ultrafast Dynamics and Vibrational Relaxation in Six-Coordinate Heme Proteins Revealed by Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 2020;142:2285–2292.
53. Nakano A, Yasuda Y, Yamazaki T, Akimoto S, Yamazaki I, Miyasaka H, et al. Intramolecular energy transfer in S1- and S2-states of porphyrin trimers. *J Phys Chem A*, 2001;105:4822–4833.
54. Cho HS, Song NW, Kim YH, Jeoung SC, Hahn S, Kim D, et al. Ultrafast energy relaxation dynamics of directly linked porphyrin arrays. *J Phys Chem A*, 2000;104:3287–3298.
55. Akimoto S, Yamazaki T, Yamazaki I, Osuka A. Excitation relaxation of zinc and free-base porphyrin probed by femtosecond fluorescence spectroscopy. *Chem Phys Lett*, 1999;309:177–182.
56. Kinoshita S, Kushida T. Picosecond Fluorescence Spectroscopy by Time-Correlated Single-Photon Counting. *Instrum Sci Technol*, 1985;14:503–524.

光老化 -メカニズム、治療、予防-

川田 暁

近畿大学名誉教授

要約

皮膚の老化は内因性老化と外因性老化に分けられる。外因性老化のうち慢性の紫外線曝露によって生じるものを「光老化」という。光老化ではシミ・シワが増え、皮膚がたるむ。真皮では日光弾性線維症が特徴的である。これはエラスチンの合成が亢進し、そこにエラフィンの結合、糖化、ラセミ化が起こり、好中球エラスターゼに対して抵抗性となる。また膠原線維と細胞外基質の破壊が慢性に繰り返され変性する。

光老化の諸症状を改善する治療方法は多岐にわたる。これらの治療方法は「皮膚の若返り」(rejuvenation)治療ともいえる。抗シワ化粧品などの外用剤、光治療、注射療法、外科的治療、ケミカルピーリングなどが用いられる。光治療には可視光レーザー、広域赤外線、フラクショナルレーザー、IPL (intense pulsed light) などがある。患者の病態を正確に診断し、それに合った適切な治療方法を選択する。

光老化の予防としては、サンスクリーン剤を含む日常的な光防御を若年から継続することが重要である。光防御としては衣服などの物理的防御に加えて、サンスクリーン剤を使用する。

Key Words: 光老化、日光弾性線維症、抗シワ化粧品、光治療、サンスクリーン剤

1. はじめに

筆者は1979年に東京医科歯科大の皮膚科に入局しその後防衛医大、帝京大市原病院を経て、近畿大で定年を迎えた。東京医科歯科大、防衛医大、帝京大市原病院では光老化の基礎と予防を中心に研究をしてきた。近畿大では光老化の治療の臨床研究に従事した。すなわち4つの大学を通じて、光老化の基礎、治療、予防をトータルで研究することが出来たと言える。このような時に日本光医学・光生物学会の機関誌である本誌に光老化の総説を執筆する機会を賜り、きわめて感慨深く光榮に思う。

本稿では、光老化についてメカニズム・治療・予防を歴史的側面も含めて解説したい。

2. 光老化とは

老化 (aging) は、内因性老化 (intrinsic aging) と外因性老化 (extrinsic aging) に分けられる。通常の老化は内因性老化に相当し、光老化は外因性老化の代表的なものである。

内因性老化は chronological aging ともいい、遺伝的にプログラムされた老化である¹⁾。一方外因性老化は内因性老化に、紫外線 (UV) による障害 (光老化 photoaging)、環境汚染、気候、喫煙などの外的要因が

加わったものである¹⁾。「光老化」は19世紀に premature aging と言われたのに始まる。1983年に Fitzpatrick が皮膚 (derma) と太陽の神 (Helios) から dermatoheliosis という言葉を造った。1986年には Kligman & Kligman が photoaging と定義し、以後は photoaging (光老化) という言葉が一般的になった。

3. 光老化の臨床症状²⁾と病理組織学的所見

1) 臨床症状 (表1)

臨床的には色が黄色調および褐色調 (sallowiness) となり、種々の色素斑 (mottled pigmentation & solar lentigines) が増加する。さらに表面が粗糙 (dry and rough skin) で、血管拡張 (telangiectasia) を伴い、光沢を失い (loss of skin tone)、厚く硬い皮膚となり (leathery texture)、弾力性を失いたるみ (laxity)、シワが増加しかつ深くなる (coarse and fine wrinkles) (図1)。脂漏性角化症などの種々の良性腫瘍、日光角化症などの前癌病変、有棘細胞癌や基底細胞癌などの皮膚癌を合併する。

2) 光老化の病理組織学的所見 (表1)

病理組織学的には真皮内に変性した弾性線維が増加し均一な染色性を示す (図2)。これを日光弾性線

表1 光老化皮膚の臨床症状と病理組織学的所見

臨床症状	病理組織学的所見
黄色調～褐色調となる	表皮
種々の色素斑が増える	表皮肥厚
表面が粗糙となる	メラノサイトの数や異型性の増加
血管拡張がみられる	表皮メラニン量の増加
光沢を失う	真皮
厚く硬い皮膚となる	日光弾性線維症
弾力性を失いたるむ	エラスチンの増加
シワが増え深くなる	フィブリリン増加
脂漏性角化症が増える	パーシカンの増加
日光角化症が増える	コラーゲンの変性と減少
有棘細胞癌や基底細胞癌が増える	細胞外基質の変性と減少



図1 光老化の臨床像 (87歳女性の顔面) (文献1) より引用

維症 (solar elastosis) といひ、この変化は光老化に特徴的とされている。日光弾性線維症では、エラスチン (elastin)、フィブリリン (fibrillin)、バーシカン (versican) などからなる異常な弾性線維の組織が蓄積している。その他日光弾性線維症では、弾性線維の中心のエラスチンの core を構成しているトロポエラスチン (tropoelastin)、弾性線維に強く結合している2つの complement inhibitor である decay-accelerating factor や serum amyloid P が増加する。

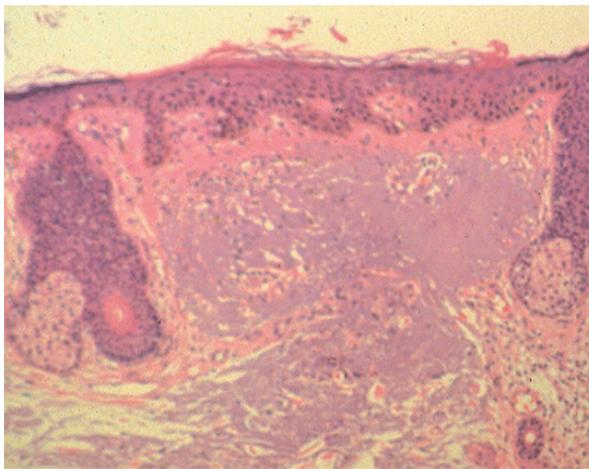


図2 光老化の病理組織像 (75歳男性の頬部、H・E染色 X100)

真皮の膠原線維や細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) の変性や減少が認められる。またプロコラーゲン I、III の変性と減少も認められる。真皮間質成分である proteoglycans や glycosaminoglycans (GAG) は増加する。ヒアルロン酸やデルマトン硫酸は減少している。

表皮では、表皮肥厚がみられる。メラノサイトの数や異型性の増加、表皮メラニン量の増加がみられる。

4. 光老化のメカニズム

1) 日光弾性線維症

日光弾性線維症ではエラスチンとフィブリリンの mRNA の強い増加がみられる。したがってエラスチ

ン蛋白の合成が促進している。これは、human elastin promoter の下流に chloramphenicol acetyl transferase receptor gene をつないで transgenic mouse を作製した研究によって裏付けられている³⁾。すなわち UVB によって *in vivo* と *in vitro* で、UVA によって *in vivo* でそれぞれ elastin の promoter 活性が上昇することによって確認された。

2) 好中球エラスターゼとエラフィン^{4,5)}

好中球エラスターゼはコラーゲン (collagen)、エラスチン、ECM の分解作用があり、かつ matrix metalloproteinase (MMP) の活性を上昇させる。

エラフィンは好中球エラスターゼの阻害剤である。好中球のみならず角化細胞でも産生され transglutaminase (TGase) の基質ともなる。日光弾性線維症ではエラスチン+エラフィンが陽性となる。TGase 下ではエラスチン+エラフィン反応物ができ、これはエラスターゼ消化に抵抗性である。また線維芽細胞に IL-1 β 存在下で UVA 照射するとエラフィンを発現する。したがって日光弾性線維症に対しては好中球エラスターゼが正常のエラスチンに対してよりも作用しにくいいため、分解しにくいと考えられる (図3)。

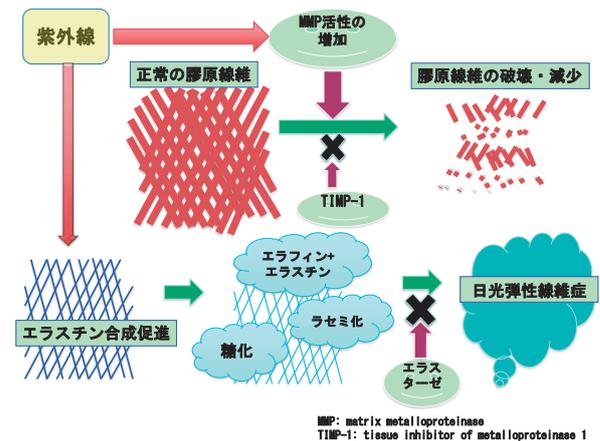


図3 光老化における膠原線維の変化と日光弾性線維症のメカニズム

3) 糖化

糖化 (glycation) とは蛋白・脂質・核酸に糖 (グルコース) が非酵素的に付加する反応で、メイラード (Maillard) 反応ともいう。糖化によって生じたものを advanced glycosylation endproduct (AGE) という。AGE の1つにカルボキシメチルリジン (CML) がある。Mizutari ら⁶⁾ は日光弾力線維症のエラスチンに CML が沈着していたことを報告した。Yoshinaga ら⁷⁾ はエラスチンの CML 化について詳細に検討した。まず α -elastin は ribose で CML 化され UV 照射で CML 化が充進し、その結果エラスターゼによる消化に抵抗性となった。次に α -elastin は CML 化されると、より低温で自己集合が始まり、液滴が巨大化した。最後に CML 化した α -elastin からシートを作成すると、太く異常な線維が形成された。シート作成後に CML 化すると線維が歪曲した。これらに張力を付加すると、いずれも CML 化した方がより弱い力で、かつ短い状態で線維が断裂した。すなわちエラスチンの CML 化によって、消化抵抗性と

り、自己集合が亢進し、形態異常を生じたことを明らかにした。

4) ラセミ化⁵⁾

種々の組織（眼、皮膚、脳、歯、骨、動脈壁）では年齢に伴ってラセミ化したD-アスパラギン酸 (D-β-Asp) が増加する。高齢者の顔面皮膚（光老化）の真皮でD-β-Aspが増加している。またヒト真皮のD-β-Aspはエラスチンに含まれる。ヒトにUVBまたはUVAを1回照射すると真皮にD-β-Aspが増加する。高齢者の顔面皮膚（光老化）の真皮にD-β-AspとCMLがエラスチンに一致して増加している。以上からラセミ化が日光弾性線維症の構造変化や分解の低下につながると考えられている（図3）。

5) 膠原線維の変化

膠原線維の変化については、UVの反復照射によってその変性が繰り返され、修復が不完全なため膠原線維の変性や減少がみられる。このメカニズムとして（図3）⁸⁾、まずUV照射によって、角化細胞や線維芽細胞の細胞質内で活性酸素が発生し、核内でMAP kinaseのシグナル伝達が活性化する。転写因子のAP-1の活性化、転写因子のc-Junの活性化、レチノイン酸受容体の抑制が起こる。さらにDNAの障害、NF-κBの活性化、TGF-βの抑制が起こる。その結果、MMPsの活性化、膠原線維（I型コラーゲン）とECMの破壊、炎症性サイトカインの産生が起こると考えられている⁹⁾。またMMP-1産生においては活性酸素以外にもIL-6、IL-1β、macrophage migration factor (MIF) が関与している¹⁰⁾。さらに好中球エラスターゼが活性化し、コラーゲンを分解しシワの形成に働く。

5. 光老化の治療

前述した光老化の症状を改善する治療方法としては、抗シワ化粧品などの外用剤、レーザーを含む光治療、ボトックスやフィラーの注射、外科的治療、ケミカルピーリング、など多岐にわたる¹¹⁾。特に光治療によるものを「光による皮膚の若返り」(photorejuvenation)という。

本稿では抗シワ化粧品とレーザーを含む光治療を中心に解説する。

1) 抗シワ化粧品

眼周囲の浅いシワには化粧品の外用で十分効果がある。抗シワ化粧品の有効成分としては、トレチノインやレチノールなどの細胞調節物質と、ナイアシナマイドやビタミンCなどの抗酸化剤に大別される¹¹⁾。2016年に医薬部外品の新規効能として「シワを改善する」が承認された¹²⁾。それを受け2017年以降に好中球エラスターゼの阻害剤 (NEI-L1[®])、レチノール、ナイアシナマイドを配合した製品が上梓された。

A. トレチノイン (all-trans-retinoic acid)

トレチノインはビタミンA誘導体の1つで、アメリカでは尋常性痤瘡の治療薬として使用されていた。Kligmanらは1986年に高齢者の光老化皮膚にトレチノインを外用し、組織学的に萎縮表皮の肥厚、異型細胞の消失、メラニンの分散の均一化、膠原線維や血管の新生などを認めた。その後組織学的所見のみならず、光老化

皮膚の臨床症状に対する効果も明らかにされた。その作用機序として、トレチノインがc-jun蛋白を破壊し、その結果MMPの活性を抑制し、膠原線維の変性を抑制すると考えられている。本邦ではトレチノインクリームを使用した患者の90%以上に、紅斑、局所の腫脹、皮膚の乾燥、軽度の落屑などの皮膚症状がみられた。本剤は本邦では認可されていないため、使用できない。

B. レチノール

レチノールは多くの抗シワ化粧品や抗光老化化粧品に配合されている。化粧品中にはパルミチン酸レチノールなどのレチノールの誘導体が使用されている。作用機序はトレチノインとほぼ同様であり、表皮のターンオーバーを促進して正常化する。その結果角質が剥離しやすくなる。したがって角質の異常による浅いシワや角質に沈着したメラニンによるくすみなどに有効である。

また線維芽細胞のエラスチン蛋白合成促進やエラスチン線維の合成促進、ヒト皮膚でのトロポエラスチンのmRNA発現の促進がみられたという¹³⁾。

我々はレチノール含有化粧品の目尻のシワに対する有効性をハーフサイド試験で検討した¹⁴⁾。医師の判定では33%に中等度改善以上の効果がみられた。副作用として23%に灼熱感と発赤が一時的にみられたが、全例が8週間の試験を終了できた。

C. ナイアシナマイド

ビタミンB₃とも呼ばれ、抗酸化作用に加えて、線維芽細胞のコラーゲン増生を刺激し、グルコサミノグリカンの産生を正常化する。皮表脂質の改善による保湿作用や、メラノソームの伝達阻害による色素減少作用もある。ビタミンCと異なり刺激性が少なく、多くの化粧品に配合されている。

我々はナイアシナマイド含有化粧品の目尻のシワに対する有効性を、基剤を対照とした二重盲検試験で検討した¹⁵⁾。医師の判定では60%に中等度改善以上の効果がみられた。副作用として1例のみに灼熱感と発赤が一時的にみられたが、全例が8週間の試験を終了できた。

2) 光治療

可視光レーザー（ロングパルス532nmレーザー、色素レーザー、1064nmNd:YAGレーザー）、広域赤外線、フラクショナルレーザー、IPL (intense pulsed light) などが有効である。本稿ではフラクショナルレーザーとIPLについて解説する。

A. フラクショナルレーザー (fractional laser) (以下FL)^{16, 17)}

a. FLのメカニズム

FLはレーザー光をきわめて小さいスポットサイズに分割して、多数の光を一度に照射する。FL照射後には皮膚表面に点状のスポットがみられる。組織学的にはスポットの部分が柱状に、表皮・真皮が壊死している。レーザー光のスポットサイズは通常5-20mm程度であるが、FLでは100-1000μmに分割されている。

壊死と壊死の間は正常のままである。壊死部分のみで組織の再生がおり、治癒が早い。治療後に通常の日常生活に復帰するまでの時間をダウンタイムという。従来のレーザー治療と比べてダウンタイムがないか少

ない。また副作用が少ない、患者の QOL が高い、などの利点がある。

b. FL 治療の適応

FL の波長は 1440 nm 以上のものが多い。FL は組織内の水に吸収され、タンパク質特異性がない。すなわち表皮・真皮の全ての組織が熱エネルギーによって変性し、再上皮化や真皮のリモデリングが生じる。その結果、特に光老化皮膚の日光黒子・シワ・質感が同時に改善する。

副作用としては、紅斑の遷延化・びらん・紫斑・炎症後色素沈着・瘢痕・単純ヘルペス感染症などがある。

B. IPL (intense pulsed light)^{18, 19)}

a. IPL とは

IPL はフラッシュランプを光源とし、非干渉性、非レーザー性の広域可視光である¹⁸⁾。単色光でエネルギーがきわめて強いレーザーと異なり、IPL は広域可視光で出力が比較的弱い。したがって 1) 多くの疾患や病態に対応できる、2) 非侵襲的である、3) 痛みが少ない、4) 水疱や痂皮形成が少なく照射直後から通常の生活が可能である (ダウンタイムがない)、という長所がある。一方、1) 臨床効果はレーザーより劣る、2) 複数回数の照射が必要である、という短所ももっている。

b. IPL のメカニズム

IPL はメラニン、ヘモグロビン、コラーゲン (水) の吸収波長をカバーしている。したがって IPL はこれらの蛋白質 (chromophore) に吸収され、そこで生じた光エネルギーによって様々な熱反応を引き起こす。IPL は光温熱効果によってメラニンやメラニンを含む細胞を破壊し、その結果マイクロクラストを形成し、それが脱落して皮膚の改善を示す²⁰⁾。動物やヒト皮膚に IPL を照射するとコラーゲン I、III の組織学的な増加、プロコラーゲン I、III の mRNA の増加がみられる。したがって IPL がコラーゲンに吸収され、コラーゲンのリモデリングが起こると考えられている。

c. IPL の適応

メラニンを標的とした疾患では、日光黒子・雀卵斑²¹⁾に、ヘモグロビンでは毛細血管拡張・ポートワイン母斑・酒さに、コラーゲンでは肥厚性瘢痕・ケロイド・開大毛孔などに有効である。さらにクスマ・質感・浅いシワなど光老化の種々の症状にも有効である。副作用はレーザーよりも比較的軽度であるが、発赤や炎症後色素沈着が時にみられる。

6. 光老化の予防

1) 光老化皮膚の作用波長

Bissett ら²²⁾ は、UVB (290-300 nm) 照射によってマウスのシワが深くかつ多くなり、膠原線維の変化や GAG の増加、日光弾性線維症が引き起こされると報告している。Wulf ら²³⁾ は 292、300、307、317、336 nm の 5 つの波長の反復照射によって、マウスに日光弾性線維症が出現することから、UVB と UVA の両者が作用波長であるとしている。Kligman & Sayre²⁴⁾ はマウスの日光弾性線維症の作用波長は UVA と UVB の両者であるが、より UVB のほうが有効であり、紅斑の作用波長に類似するとしている。これらの報告から、真皮の弾性線維や膠原線維の変化及び表皮変化などの作用波

長は、UVB と UVA の両者ということになる。

2) サンスクリーン剤は光老化皮膚の予防に有効か?

Kligman ら²⁵⁾ によれば Skh マウスに UVB を 6 MED 量、1 週間に 3 回、30 週間照射し、その後 15 週間経過観察したところ、日光弾性線維症、中性及び酸性ムコ多糖、メラニン沈着などの真皮変化が改善した。また SPF 15 のサンスクリーン剤を使用することによってこれらの組織学的変化を防ぐことができたという。その後広域サンスクリーン剤 (UVB にも UVA にも有効) がマウスの真皮の変化を予防することができたという報告が多数された。人の皮膚については、Phillips ら²⁶⁾ が UVA+B の 2 MED 量を 4 日間連続照射する際に、SPF15 のサンスクリーン剤を外用すると、サンバーン細胞・炎症の程度・lysozyme の染色程度の増加と、Langerhans 細胞の数の減少を防ぐことができたという。

3) 光老化の予防とサンスクリーン剤

これらの事から光老化の予防に対してサンスクリーン剤を含めた遮光が提唱されている²⁷⁻²⁹⁾。米国では「SPF15 以上の広域サンスクリーン剤の使用は、適切な他の防御方法を併用すれば皮膚癌や光老化のリスクを減らせる」という効能表現が可能である。2006 年日本化粧品学会の化粧品機能評価法検討委員会は「サンスクリーン製品の新規効能表現に関するガイドライン」を作成した³⁰⁾。その中で SPF が 15 以上で PA が + 以上のサンスクリーン剤に、「日常的に使用することで、長期間の紫外線曝露によって生じるシワやしみ (光老化) を抑える」という新規の効能表現を表記できると提唱した³⁰⁾。表 2 に筆者が考える光老化皮膚の予防に適するサンスクリーン剤の条件を示した。

表 2 光老化予防のためのサンスクリーン剤の条件 (私見)

UVB と UVA 有効な広域サンスクリーン剤である
SPF が 15 以上、PA が + 以上
吸収剤が少ないか含有しない
感作能が低い
塗り心地が良い
白うきしない

4) 「光老化」啓発プロジェクト

2016 年に光老化とサンスクリーン剤の認知度の向上を目的として、「光老化」啓発プロジェクト委員会が設立され、「光老化」啓発プロジェクトがスタートした。学会発表、市民公開講座、マスメディアへの紹介など、多彩な活動をしている³¹⁾。このプロジェクトの一環として、2017 年に日本化粧品学会みらい検討委員会 (宮地良樹委員長) は研究者や臨床医向けに、「皮膚の光老化とその予防に関するコンセンサスステートメント」を発行した³²⁾。同委員会は同時に一般の人々に向けて「紫外線によるシミ・シワ (光老化: ひかりろうか) を防ぐために知っておくべきこと」というコンセンサスステートメントも発行した。本プロジェクトの継続によって光老化が一般の人々に啓発されていくと思われる。

7. おわりに

以上に述べたように光老化においては、そのメカニ

ズムと予防に対する研究が1980年代頃から先行した。治療においては光治療が1990~2000年代頃からめざましい進歩を遂げてきた。いずれの分野でもさらなる発展を期待したい。

文献

- 1) 川田 暁. 皮膚の加齢要因 (1) : 紫外線による光老化. *Geriatr Med*, 2016; 54: 961-963.
- 2) 川田 暁. 紫外線の功罪-ビタミンD₃合成と光老化-. *日皮会誌*, 2020; 130: 2031-2034.
- 3) Bernstein EF, Brown DB, Urbach F, et al. Ultraviolet radiation activates the human elastin promoter in transgenic mice: a novel *in vivo* and *in vivo* model of cutaneous photoaging. *J Invest Dermatol*, 1995; 105: 269-273.
- 4) 多島新吾. 光老化と皮膚変化. *アンチエイジング医学*, 2009; 5: 238-242.
- 5) 多島新吾. AGEsと皮膚疾患. *アンチエイジング医学*, 2012; 8: 35-41.
- 6) Mizutari K, Ono T, Ikeda K, Kayashima K, Horiuchi S. Photo-enhanced modification of human skin elastin in actinic elastosis by N ϵ -(carboxymethyl) lysine, one of the glycoxidation products of the Maillard reaction. *J Invest Dermatol*, 1997; 108: 797-802.
- 7) Yoshinaga E, Kawada A, Ono K, et al. N ϵ -(carboxymethyl) lysine modification of elastin alters its biological properties: implications for the accumulation of abnormal elastic fibers in actinic elastosis. *J Invest Dermatol*, 2012; 132: 315-323.
- 8) Fisher GJ, Voorhees JJ. Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 1998; 3: 61-68.
- 9) Poon F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2015; 31: 65-74.
- 10) 清水忠道. 真皮の光老化の分子メカニズム. *医学のあゆみ*, 2014; 248: 587-591
- 11) 川田 暁. 化粧品による治療. *MB Derma*, 2012; 192: 1-5.
- 12) 川島 眞. 新規効能「シワを改善する」を取得した医薬部外品が登場するまでの経緯. *先端医療と健康美容*, 2017; 4: 2-6.
- 13) Weihermann AC, Lorencini M, Brohem CA, de Carvalho CM. Elastin structure and its involvement in skin photoaging. *Int J Cosmetic Sci*, 2017; 39: 241-247.
- 14) Kawada A, Konishi N, Momma T, Oiso N, Kawara S. Evaluation of anti-wrinkle effects of a novel cosmetic containing retinol using the guideline of the Japan Cosmetic Industry Association. *J Dermatol*, 2009; 36: 583-586.
- 15) Kawada A, Konishi N, Oiso N, Kawara S, Date A. An evaluation of anti-wrinkle effects of a novel cosmetic containing niacinamide. *J Dermatol*, 2008; 35: 637-642.
- 16) 川田 暁. フラクショナルレーザーの応用. 宮地良樹編. *WHAT'S NEW in 皮膚科学 2012-2013*. 東京: メディカルレビュー社, 2012: 134-135.
- 17) 川田 暁. レーザー等を用いたアンチエイジング治療. 五十嵐敦之編. 1冊でわかる最新皮膚科治療. 東京: 文光堂, 2013: 271-274.
- 18) 川田 暁. レーザーを含む光治療の最近のトピックス. *日皮会誌*, 2008; 118: 2197-2201.
- 19) Kawada A. Intense pulsed light therapy for Asian skin. In: Fodor L, Ullman Y, editors. *Aesthetic applications of intense pulsed light*. Switzerland: Springer, 2020: 145-155.
- 20) Kawada A, Asai M, Kameyama H, et al: Videomicroscopic and histopathological investigation of intense pulsed light therapy for solar lentiginous. *J Dermatol Sci*, 2002; 29: 91-96.
- 21) Kawada A, Shiraishi H, Asai M, et al. Clinical improvement of solar lentiginous and ephelides with an intense pulsed light source. *Dermatol Surg*, 2002; 28: 504-508.
- 22) Bissett DL, Hannon DP, Orr TV. Wavelength dependence of histological, physical, and visible changes in chronically UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem Photobiol*, 1989; 50: 763-769.
- 23) Wulf HC, Poulsen T, Davies RE, Urbach F. Narrow-band UV radiation and induction of dermal elastosis and skin cancer. *Photodermatol*, 1989; 6: 44-51.
- 24) Kligman LH, Sayre RM. An action spectrum for ultraviolet induced elastosis in hairless mice: quantification of elastosis by image analysis. *Photochem Photobiol*, 1991; 53: 237-242.
- 25) Kligman LH, Akin FJ, Kligman AM. Prevention of ultraviolet damage to the dermis of hairless mice by sunscreens. *J Invest Dermatol*, 1982; 78: 181-189.
- 26) Phillips TJ, Bhawan J, Yaar M, Bello Y, Lopiccolo D, Nash JF. Effect of daily versus intermittent sunscreen application on solar simulated UV radiation-induced skin response in humans. *J Am Acad Dermatol*, 2000; 43: 610-618.
- 27) 川田 暁. サンスクリーン. *皮膚臨床*, 2002; 44: 1249-1255.
- 28) 川田 暁, 佐藤吉昭. 光防御とサンスクリーン剤. 佐藤吉昭監修, 市橋正光, 堀尾 武編. *光線過敏症 改訂3版*. 東京: 金原出版, 2002: 263-282.
- 29) 川田 暁. 紫外線と皮膚. 宮地良樹, 長沼雅子編. *化粧品・外用薬研究者のための皮膚科学*. 東京: 文光堂, 2005: 45-48.
- 30) 日本化粧品学会化粧品機能評価法検討委員会. サンスクリーン製品の新規効能表現に関するガイドライン. *化粧品誌*, 2006; 30: 338-344.
- 31) 川島 眞, 川田 暁, 錦織千佳子, 森田明理, 宮地良樹. 「光老化」啓発プロジェクトについて. *臨床皮*, 2016; 70: 173-175.
- 32) みらい検討委員会. 皮膚の光老化とその予防に関するコンセンサスステートメント. *化粧品誌*, 2017; 41: 240-243.

Photochemical protein damaging activity of tetrakis(*p*-allyloxyphenyl) porphyrin P(V) complexes

テトラキス(*p*-アリルオキシフェニル)ポルフィリンP(V)錯体が示す光化学的タンパク質損傷作用

Kazuho Fukaya¹, Shigetoshi Okazaki², Hideki Kawai¹, and Kazutaka Hirakawa^{1,3,4*}

¹ Applied Chemistry and Biochemical Engineering Course, Department of Engineering, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, Johoku 3-5-1, Chuo-ku, Hamamatsu, Shizuoka 432-8561, Japan

² Preeminent Medical Photonics Education and Research Center, Hamamatsu University School of Medicine, Handayama 1-20-1, Chuo-ku, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, Japan

³ Department of Optoelectronics and Nanostructure Science, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, Johoku 3-5-1, Chuo-ku, Hamamatsu, Shizuoka 432-8561, Japan

⁴ Cooperate Major in Medical Photonics, Shizuoka University, Johoku 3-5-1, Chuo-ku, Hamamatsu, Shizuoka 432-8561, Japan

*Corresponding author:

Prof. Dr. Kazutaka Hirakawa

Applied Chemistry and Biochemical Engineering Course, Department of Engineering, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, Johoku 3-5-1, Chuo-ku, Hamamatsu, Shizuoka 432-8561, Japan

Tel: (+)81-53-478-1287

Fax: (+)81-53-478-1287

E-mail: hirakawa.kazutaka@shizuoka.ac.jp

Abstract

Porphyrins are macrocyclic pigment molecules that are abundant in nature and play many important roles, including photosynthesis and photomedicine. It is an aromatic compound with 18 pi-electrons, consisting of four pyrrole rings bonded together. Porphyrin has been used as the agent of photodynamic therapy (PDT), which is a less invasive cancer treatment. The important mechanism of PDT is an oxidation of biomacromolecules through singlet oxygen production. P(V)porphyrin has another effective damaging mechanism, which is the direct electron transfer from biomacromolecules to the photoexcited P(V)porphyrin. In this study, to evaluate the effect of the ligands on the photosensitizer activity, P(V) porphyrins with different alkoxy ligands (EGP and PGP) were synthesized. The optical and electrochemical properties of EGP were almost the same as those of PGP. However, the protein photodamaging activity of PGP was larger than that of EGP. The difference in photodamaging activity may be attributed to differences in association with protein, because the binding constant between protein and PGP was larger than that of EGP. This result could be explained by the assumption that the relatively long carbon chain of the axial ligand of PGP increases the hydrophobicity and enhances the interaction between PGP and protein.

Keywords: P(V)porphyrin; Axial ligand; Photodynamic therapy; Electron transfer; Protein photodamage

1. 緒言

光増感剤とは、光を吸収して他の物質に対してエネルギー移動や電子移動を引き起こし、その物質への直接的な光照射なしに化学反応を誘発する物質である⁽¹⁾。ポルフィリンは、光増感剤としてがん治療、人工光合成など多岐にわたる分野で応用されている⁽²⁾。光線力学的療法 (Photodynamic Therapy, PDT) は、一般に光増感剤を静脈注射によって投与し、光の照射により細胞障害性をもつ一重項酸素 (¹O₂) を生成させてがん細胞をアポトーシスやネクローシスへと誘導する治療法である。PDTにおける照射光は可視光を用いており、内視鏡による光照射を用いるため切開の必要が無く、低侵襲性かつ腫瘍組織に選択的な治療法である^(3,4)。光増感剤の腫瘍組織損傷機構は、主に酸化力の高い活性酸

素の一種である ¹O₂ を生成させることによる ¹O₂ 生成損傷機構が知られている⁽³⁾。しかし、腫瘍組織は、急速な細胞増殖に血管新生が追いつかず血管形成が不完全な場合等、正常組織と比べて低酸素状態となる⁽⁵⁻⁷⁾。ポルフィリン環の中心にリン原子を導入した P(V) ポルフィリンは、比較的長波長の可視光を利用した光誘起電子移動により酸素を介さない生体分子の酸化損傷が可能であることが報告されている^(8,9)。

本研究では、P(V) ポルフィリン光増感剤の軸配位子が PDT に関わる光化学的物性におよぼす効果を検討した。**Figure 1** に示すように、P(V) ポルフィリンの軸配位子として 2 個の炭素をもつ bis(2-hydroxyethoxy) P(V) tetrakis(4-allyloxyphenyl)porphyrin (EGP) と 3 個の炭素をもつ bis(3-hydroxypropoxy) P(V) tetrakis(4-

allyloxyphenyl)porphyrin (PGP) を合成した。これらポルフィリンの光化学的および電気化学的物性および光増感反応によるタンパク質損傷作用を評価した。

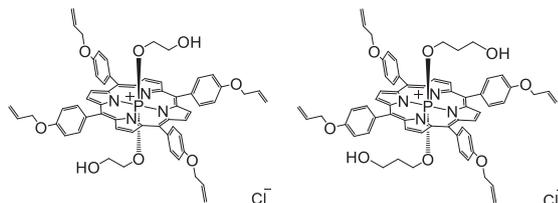


Figure 1 Structures of EGP (left) and PGP (right).

2. 実験方法

2.1. 試薬

エタノールおよびアセトニトリル、ヘキサフルオロリン酸テトラブチルアンモニウムは、富士フィルム和光純薬株式会社から、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.6) は、ナカライテスク株式会社からそれぞれ購入した。ヒト血清アルブミン (HSA) は Sigma-Aldrich 株式会社から購入した。

2.2. 測定

NMR は AvanceIII HD400 (Bruker)、質量分析は microTOF (Bruker)、吸収スペクトルは UV-1900i 紫外可視分光光度計 (株式会社島津製作所)、蛍光スペクトルは F-4500 蛍光分光光度計 (株式会社日立製作所) を用いてそれぞれ測定した。光増感剤の酸化還元電位は、Potentiostat/Galvanostat (HA-301、北斗電工株式会社)、Function generator (DF1906、NF 株式会社)、Midi Loger (GL900-4、GRAPHTEC 株式会社) を用いて測定した。溶媒には、アセトニトリル、電解質にはヘキサフルオロリン酸テトラブチルアンモニウムを用いた。参照電極として飽和カロメル電極 (SCE)、作用極および対極には白金電極を用いた。

2.3. 合成

定法⁽¹⁰⁾ に基づき Bis(chloro)P(V)tetrakis(4-allyloxyphenyl)porphyrin (Cl P(V)TallyPP) を合成した。Cl P(V)TallyPP 100 mg を脱水ピリジンと脱水エチレングリコール (いずれも富士フィルム和光純薬株式会社製) の混合溶媒に溶かし、15 時間加熱還流した。生成物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (メタノール: クロロホルム = 1:4) で精製した。最終的に EGP を収率 84% で得た。また Cl P(V)TallyPP 133 mg と脱水ピリジンと脱水 1,3-プロパンジオール (富士フィルム和光純薬株式会社) の混合溶媒に溶かし、20 時間加熱還流した。なお生成物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (メタノール: クロロホルム = 1:5) で精製した。最終的に PGP を収率 99% で得た。NMR および質量分析の結果を以下に示す。

EGP: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.99 (d, *J*_{P-H} = 3.3 Hz, 8H, βH), 7.91 (d, *J*_{H-H} = 8.0 Hz, 8H, *o*-phenyl-H), 7.27 (d, *J*_{H-H} = 8.0 Hz, 8H, *m*-phenyl-H), 6.23 ~ 6.12 (m, 4H, CH₂=CHCH₂O-), 5.55 (d, *J*_{H-H} = 17.4 Hz 4H, CH₂=CHCH₂O-), 5.40 (d, *J*_{H-H} = 10.8 Hz 4H, CH₂=CHCH₂O-), 4.75 (d, *J*_{H-H} = 5.6 Hz, 8H, CH₂=CHCH₂O-), 0.74 (t, *J*_{H-H} = 5.6 Hz, 4H, P-OCH₂CH₂OH), -2.19 ~ -2.25

(m, 4H, P-OCH₂CH₂OH), ³¹P NMR (CDCl₃, 161 MHz): δ -180.8; ESI-HR TOF-MS calcd. for C₆₀H₅₄N₄O₈P⁺ [M⁺]: 989.3674, found: 989.3875.

PGP: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.01 (d, *J*_{P-H} = 3.2 Hz, 8H, βH), 7.88 (d, *J*_{H-H} = 8.7 Hz, 8H, *o*-phenyl-H), 7.28 (d, *J*_{H-H} = 8.7 Hz, 8H, *m*-phenyl-H), 6.21 ~ 6.12 (m, 4H, CH₂=CHCH₂O-), 5.55 (d, *J*_{H-H} = 16.8 Hz 4H, CH₂=CHCH₂O-), 5.39 (d, *J*_{H-H} = 10.4 Hz 4H, CH₂=CHCH₂O-), 4.75 (d, *J*_{H-H} = 5.2 Hz, 8H, CH₂=CHCH₂O-), 1.45 (t, *J*_{H-H} = 4.0 Hz, 4H, P-OCH₂CH₂CH₂OH), -1.25 ~ -1.31 (m, 4 H, P-OCH₂CH₂CH₂OH), -2.27 ~ -2.33 (m, 4H, P-OCH₂CH₂CH₂OH), ³¹P NMR (CDCl₃, 161 MHz): δ-180.6; ESI-HR TOF-MS calcd. for C₆₂H₅₈N₄O₈P⁺ [M⁺]: 1017.3987, found: 1017.4080.

3. 結果および考察

3.1. P(V) ポルフィリンの光化学的物性

各化合物の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルをエタノールまたはリン酸緩衝液 (pH 7.6, 10 mM, 1% エタノール) 中で測定した。ポルフィリンには、波長 400–450 nm 付近に第二励起一重項 (S₂) 状態への電子遷移に帰属される Soret 帯と波長 500–700 nm 付近に第一励起一重項 (S₁) 状態への電子遷移に帰属される Q 帯と呼ばれる特徴的な吸収波長域が知られている⁽¹¹⁾。吸収スペクトル測定の結果、Soret 帯 (EGP: 445 nm, PGP: 447 nm, エタノール中) および Q 帯 (EGP: 568, 614 nm, PGP: 568, 614 nm, エタノール中) における各ピーク波長の違いは、どちらの化合物においても、ほとんど見られなかった。モル吸光係数は、エタノール溶液中では、両化合物に大きな差が見られなかったが、リン酸緩衝液中 (pH 7.6, 10 mM, 1% エタノール) では PGP が EGP の 2 倍に近い値を示した。さらに、リン酸緩衝液中において、EGP の Soret 帯に顕著なブロード化が観察された。これらの結果は、EGP の会合体形成を示唆している。軸配位子の炭素数が少ない EGP の方が、分子間でスタックしやすいと考えられる。

蛍光スペクトル測定ではエタノールおよびリン酸緩衝液 (pH 7.6, 1% エタノール) 中において、最大蛍光波長における違いはあまり観測されなかった。エタノール溶液中における蛍光量子収率は、EGP では 0.059、PGP では 0.064 であり、PGP の方が EGP よりもわずかに大きかった。一方、エタノール溶液中での蛍光寿命は、PGP (1.82 ns) の方が EGP (2.13 ns) よりもわずかに短かった。

3.2 P(V) ポルフィリンの酸化還元電位

アセトニトリル中における EGP および PGP の還元電位 (*E*_{red}) は、それぞれ -0.61 V、-0.59 V (vs. SCE) であった。化合物の酸化電位 (*E*_{ox}) は、以下の式 [1] および [2] により計算した。トリプトファン (Trp) の酸化電位 *E*_{ox} = 0.65 V (アセトニトリル中)⁽⁸⁾ を用い、タンパク質のトリプトファンからポルフィリンへの光誘起電子移動におけるギブスエネルギー変化 (Δ*G*) を次の式 [3] で算出した。生体内の環境とアセトニトリル中では、ポルフィリンおよびタンパク質の状態は異なるが、タンパク質との結合でポルフィリンの凝集が解かれ、アセトニトリルのような有機溶媒中に近い状態に

なることが考えられる。

$$E_{0-0} = \frac{hc}{\lambda} \quad [1]$$

ここで、 h [J·s] はプランク定数、 c [m/s] は光速、 λ [nm] はポルフィリンのQ帯における長波長側の極大波長と極大蛍光波長の平均値である。

$$E_{ox} = E_{red} + E_{0-0} \quad [2]$$

$$\Delta G = (E'_{ox} - E_{red}) - E_{0-0} \quad [3]$$

それぞれの測定と計算の結果をエネルギー準位図として **Figure 2** に示す。

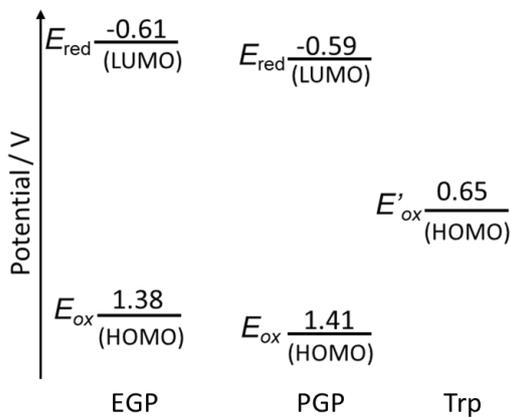


Figure 2 Energy level diagram of EGP, PGP and tryptophan vs. SCE.

両化合物の酸化還元電位には大きな違いは観測されなかったが、いずれの化合物も酸素を介さない酸化損傷機構であるタンパクからの光誘起電子移動が可能であることが ΔG の計算結果から、熱力学的に示された (EGP: -0.73 eV, PGP: -0.76 eV)。両化合物は、低酸素環境下でも PDT 活性を維持できる可能性が示唆された。

3.3 P(V) ポルフィリンとタンパク質との相互作用

タンパク質との相互作用を評価するために、水溶性タンパク質である HSA⁽¹²⁾ をモデルに用いた。本研究では、がん細胞内でターゲットになるタンパク質がポルフィリンの光増感反応で損傷を受ける程度を HSA のトリプトファン残基の光酸化を指標に解析した。ポルフィリンが HSA と結合することによって吸収スペクトルが変化することが先行研究⁽¹³⁾ から分かっており、その吸収スペクトルの変化から結合定数の算出が可能である。ポルフィリンと HSA が 1:1 の結合を形成したと仮定したときのポルフィリンと HSA の結合定数 (K_b , M^{-1}) を式 [4] で算出した。サンプル溶液は、濃度 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20 μM の HSA と 5 μM P(V) ポルフィリンを 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.6, 1% エタノール) に溶解させて調製した。結合定数は、下記の式 [4] で表される。HSA との相互作用による P(V) ポルフィリンの吸収スペクトル変化を **Figure 3** に示す。

$$K_b = \frac{[\text{Por} - \text{HSA}]}{[\text{Por}][\text{HSA}]} \quad [4]$$

ここで、[Por-HSA] は、ポルフィリン-HSA 複合体の濃度、[Por] は、未結合状態のポルフィリン濃度、[HSA] は、ポルフィリンを結合していない HSA の濃度である。

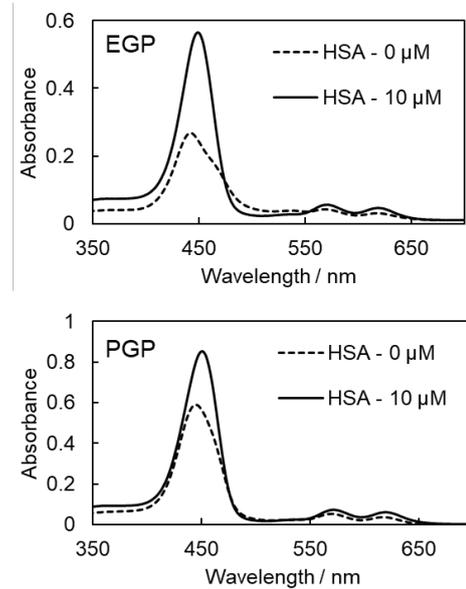


Figure 3 Absorption spectra of EGP (top) and PGP (bottom) with or without 10 μM HSA in a 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.6, 1% ethanol).

両化合物ともに吸収スペクトルは、HSA 添加により、わずかな長波長シフトと濃色効果が観測された。これは、HSA との相互作用により P(V) ポルフィリンの会合が解かれたことで説明できる。結合定数は、EGP で $1.9 \times 10^6 M^{-1}$ 、PGP で $2.7 \times 10^6 M^{-1}$ と解析された。この違いは、軸配位子の炭素数増加に伴う疎水性の上昇によって、HSA の疎水ポケット⁽¹⁴⁾ に PGP が結合しやすいことが考えられる。また、円偏光二色性スペクトル測定では、HSA 存在下において P(V) ポルフィリンの Soret 帯の波長域にわずかな負のコットン効果を観測した。このことは、P(V) ポルフィリンが HSA の表面付近に結合したとき、キラリティーを有する場合があります、部分的に規則性をもって結合していることを示唆している。

EGP および PGP の蛍光強度 (励起波長: 550 nm) は、HSA との相互作用により、いずれも約 2 倍に上昇した。この結果は、HSA との相互作用により、P(V) ポルフィリンの会合が解かれ、濃度消光が解消されたことで説明できる。HSA (10 μM) と相互作用した P(V) ポルフィリンの蛍光寿命は 3 成分で解析され、HSA 非存在下に比べて長寿命成分が増加した。多成分化は P(V) ポルフィリンの会合状態、HSA への結合の様式による多成分化を示しており、長寿命化は HSA との結合によって脱会合した P(V) ポルフィリンの割合の増加が原因だと考えられる。また、短寿命成分は、HSA からの電子移動による消光の寄与を示唆している。

P(V) ポルフィリンとタンパク質との結合様式を推定するために蛍光共鳴エネルギー移動法によってHSAのトリプトファンからの距離を算出した。蛍光分子（エネルギードナー）がその蛍光と同じ波長域に吸収帯を有する分子（エネルギーアクセプター）に近接すると分子間でFörster機構^(15, 16)によるエネルギー移動が起こり、その励起状態の寿命が短縮する。エネルギードナーの蛍光寿命をエネルギーアクセプター存在下と非存在下で測定し、その比から中心間距離を次の式[5]によって算出できる。蛍光寿命はHSA濃度10 μM、ポルフィリン濃度5 μM、リン酸緩衝液（pH 7.6）で測定した。

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \left(\frac{R_0}{R}\right)^6 + 1 \quad [5]$$

ここで、 τ_0 は、ポルフィリン非存在下におけるトリプトファンの蛍光寿命、 τ は、ポルフィリン存在下におけるトリプトファンの蛍光寿命、 R_0 は、エネルギー移動の臨界距離、 R [Å] は、トリプトファン-ポルフィリンの中心間距離である。 R_0 は、Förster機構の理論式⁽¹⁵⁾に基づき、トリプトファンの蛍光スペクトルと蛍光量子収率、P(V)ポルフィリンの吸収スペクトルから計算した。各P(V)ポルフィリンにおける R_0 は、EGPでは27.7 Å、PGPでは28.8 Åであった。P(V)ポルフィリンの存在下と非存在下におけるトリプトファンの蛍光寿命を測定したところ、トリプトファンの蛍光寿命は、それぞれ3成分で解析された（EGP: $\tau_1 = 0.11$ ns, 5%, $\tau_2 = 1.01$ ns, 40%, $\tau_3 = 3.23$ ns, 55%, PGP: $\tau_1 = 0.12$ ns, 7%, $\tau_2 = 0.99$ ns, 43%, $\tau_3 = 3.13$ ns, 50%）。そこで、それぞれの蛍光寿命を用いて、式[5]からP(V)ポルフィリンとトリプトファンの中心間距離を算出したところ、EGPでは27.2–57.6 Å、PGPでは28.1–69.8 Åと見積もられた。HSAの直径が80–110 Å⁽¹⁷⁾であるため、両化合物ともに大部分は、HSAの表面付近に結合していることが示唆された。

3.4. タンパク質の光損傷作用

HSA中のトリプトファンをターゲットにして、P(V)ポルフィリンへの光照射による光損傷を評価した。HSAの光酸化損傷の程度は、トリプトファンの自家蛍光強度の減少から評価した。また、 $^1\text{O}_2$ 消去剤のアジ化ナトリウムの添加効果の解析から、光誘起電子移動による損傷量を式[6]のように算出した⁽¹³⁾。

$$[\text{Damaged HSA}] = \frac{F_0 - F}{F_0} [\text{HSA}]_0 \quad [6]$$

ここで、[Damaged HSA] は、HSA損傷量（酸化されたトリプトファン数）、 F_0 は、初期蛍光強度、 F は、光照射後の蛍光強度である。式[6]によって求めた損傷量から算出した初期の光酸化損傷速度とポルフィリンの吸収光子数、照射面積から式[7]を用いて全タンパク質損傷量子収率 (Φ_d) を算出した。

$$\Phi_d = \frac{\nu}{NA} \quad [7]$$

ここで、 ν は、初期の酸化損傷速度 [nM min⁻¹]、 N は、ポルフィリンに吸収された光子数 [nM cm⁻² min⁻¹]、 A は、サンプルの照射断面積 [cm²] である。式[7]により算出した Φ_d 、 $^1\text{O}_2$ 生成による損傷量子収率 ($\Phi_d\Delta$)、光誘起電子移動による損傷量子収率 ($\Phi_d(\text{ET})$) の関係は次の式[8]で表される。

$$\Phi_d = \Phi_d(\Delta) + \Phi_d(\text{ET}) \quad [8]$$

なお、 $\Phi_d(\text{ET})$ は、アジ化ナトリウムの添加により $^1\text{O}_2$ を消去したときに観測された損傷量子収率である⁽¹³⁾。Table 1に各機構におけるタンパク質損傷量子収率を示す。

Table 1 Protein photodamaging quantum yields by EGP and PGP

Compound	Φ_d	$\Phi_d(\text{ET})$	$\Phi_d\Delta$
EGP	8.4×10^{-4}	2.1×10^{-4}	6.3×10^{-4}
PGP	1.1×10^{-3}	3.1×10^{-4}	7.9×10^{-4}

PGPはEGPと比べ、全タンパク質損傷量子収率および $^1\text{O}_2$ 生成による損傷量子収率、光誘起電子移動による損傷量子収率の全てにおいて大きな値が観測された。主な要因として、PGPのHSAとの大きな結合定数が考えられる。 $^1\text{O}_2$ 生成量子収率は、HSA存在下で僅かにPGPの方が大きな値（EGP: 0.08, PGP: 0.10）を示した。酸化還元電位においても、EGPとPGPで大きな差はなかった。従って、タンパク質損傷能の違いは軸配位子の炭素数の増加に伴ったタンパク質との結合促進によることが示唆された。

タンパク質との相互作用において、両化合物ともにタンパク質との結合を確認した。HSAとの結合について、両化合物ともにHSAの表面付近に結合し、わずかな規則性をもった結合が示唆された。HSAとの結合定数では、炭素数の大きいPGPでEGPの約1.4倍の結果を観測した。これは炭素数増加に伴う疎水性の増大によって、HSAの疎水ポケットへの結合が促進されたことに起因すると考えられる。タンパク質光損傷作用については、PGPが全ての機構でタンパク質損傷量子収率において大きな数値を示した。これは各機構の損傷の割合には大きな違いが無く、主に結合定数の大きさに起因していると推測した。軸配位子の炭素鎖のわずかな違いでタンパク質との相互作用と光損傷作用に大きな差が生じる場所が確認された。

総括

本研究では、光線力学的療法において酸素を介さない生体組織損傷機構で高い効率を有すると期待されるP(V)ポルフィリンを用い、軸配位子の炭素鎖の違いによるタンパク質損傷活性を評価した。Cl P(V)TallyPPを原料にP(V)ポルフィリンの軸配位子として2個の炭素をもつEGPと3個の炭素をもつPGPを合成した。両化合物における光化学的および電気化学的物性には、大きな違いは観測されなかった。酸化還元電位の値から、両化合物ともに生体分子への酸化損傷が可能であることを確認した。タンパク質損傷活性において、PGPが高い結合能によってEGPに比べて高い光損傷能を示した。本研究において、P(V)ポルフィリン軸配位子の

一炭素分の長さの違いが、タンパク質光損傷能に影響をおよぼすことが観測された。今後、P(V) ポルフィリンの軸配位子に着目した光増感剤の分子設計が期待できる。

謝辞

円偏光二色性スペクトル測定でお世話になりました筑波大学数理物質系化学域の百武篤也准教授、本間詩織氏、鳥越果林氏、核磁気共鳴分光法および質量分析測定をして頂きました静岡大学技術部の早川敏弘技術専門職員に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- (1) 長村利彦, 川井秀記. 光化学 基礎から応用まで. 講談社, 2014年, 5章, 4節.
- (2) Dev R, Kim Y, Koo J, Kim K. Porphyrin boxes, *Acc. Chem. Res.* 2018;11:2730–2738.
- (3) Liang Y, Wang J, Zhang H, Yin P, Li T, Li Q, Li Q, Liu Y, Liu HB. A highly sensitive magnetic nano-fluorescent probe for singlet oxygen detection and screening of natural photosensitizers, *Hai-Bo Liu, Sens Actuators B Chem*, 2022;369:132346.
- (4) Overchuk M, Weersink R, Wilson B, Zheng G. Photodynamic and photothermal therapies: synergy opportunities for nanomedicine, *ACS Nano*, 2023;17:7979–8003.
- (5) Fatima H, Jin Z, Shao Z, Chen X. Recent advances in ZnO-based photosensitizers: Synthesis, modification, and applications in photodynamic cancer therapy, *J Colloid Interface Sci*, 2022;621:440–463.
- (6) Tojo T, Nishida K, Kondo T, Yuasa M. Evaluation of the correlation between functional porphyrin positions and trans-membrane permeation in cancer cells, *The 141st Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan (Hiroshima)*. 2021.
- (7) 大村健二. がん細胞の代謝と栄養, *日本静脈経腸栄養学会雑誌*, 2015;30:907-910.
- (8) Hirakawa K, Fukunaga N, Nishimura Y, Arai T, Okazaki S. Photosensitized protein damage by dimethoxyphosphorus(V) tetraphenyl-porphyrin. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23:2704–2707.
- (9) 新田雅之, 岡田芳和, 光でがん細胞をたたく-光線力学療法(PDT)を用いた悪性腫瘍の治療-. *Isotope News*. 2013.
- (10) Adler A. A simplified Synthesis for meso-tetraphenylporphyrin. *J Org Chem*, 1967;32: 476.
- (11) Beyene B, Yibeltal A, Ayana M. Colorimetric and fluorescent on-off detection of Cu²⁺, Sn²⁺ and Zn²⁺ by a water-soluble porphyrin: Electronic absorption and emission study. *Res Chem.* 2020;2:100058.
- (12) Merlino A. Metallo drug binding to serum albumin: Lessons from biophysical and structural studies. *Coord Chem Rev*, 2023; 480:215026.
- (13) Yamaoka S, Okazaki S, Hirakawa K. Activity control of pH-responsive photosensitizer bis(6-quinolinoxy) P(V)tetrakis(4-chloro-phenyl)porphyrin through intramolecular electron transfer, *Chem Phys Lett*, 2022;788: 139285.
- (14) Schmidt MM, Townson SA, Andreucci AJ, King BM, Schirmer EB, Murillo AJ, Dombrowski C, Tisdale AW, Lowden PA, Masci AL, Kovalchin JT, Erbe DV, Wittrup KD, Furfine ES, Barnes TM. Crystal structure of an HSA/FcRn complex reveals recycling by competitive mimicry of HSA ligands at a pH-dependent hydrophobic interface. *Struct*, 2013;21:1966–1978.
- (15) Förster Th. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann Physik*, 1948;437:55–75.
- (16) Wan Q, Mouton S, Veenhof L, Boersma A. A FRET-based method for monitoring structural transitions in protein self-organization. *Cell Rep Methods*, 2022;5:100184.
- (17) Ehrenshaft M, Deterding L, Mason R. Tripping up Trp: Modification of protein tryptophan residues by reactive oxygen species modes of detection and biological consequences. *Free Radic Biol Med*, 2015;89:220–228.

Author Guidelines

Submission of manuscripts

Editor-in-Chief requests authors to submit manuscripts via e-mail <dts211@gmail.com>. Manuscripts must be submitted as Microsoft Word or compatible software (doc or docx files). Figures should be prepared as high resolution (>300 dpi) JPEG files. Only black and white figures are available. Word limit for summary must be 250 words. Authors for whom English is not a mother tongue may submit their manuscript to professional English Editing Service. The work to be submitted has not been published before, is not considered for publication elsewhere. The manuscript for submission must be carefully written and approved fully by all authors. Color artwork is free for submission.

Editor-in-Chief

Daisuke Tsuruta, MD, PhD
Department of Dermatology
Graduate School of Medicine, Osaka Metropolitan University
1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku,
Osaka 545-8585, Japan

Manuscript types

Photomedicine and Photobiology accepts original articles, review articles, and letters to the editor. Color figures are normally not applicable for the submission.

Original articles are investigative studies in fields such as photomedicine, photobiology, and photochemistry. It should not exceed 3500 words (10,000 characters in Japanese), including 250 words (750 characters in Japanese) abstract, Figure legends (excluding references), and a maximum of 4 figures/ tables.

Review articles are for authors essentially invited by Editors. However, suggestions from readers are welcome. It should not exceed 5000 words (15,000 characters in Japanese), including 250 words (750 characters in Japanese) abstracts, figure legends (excluding references), and maximum of 5 figures/tables

Letters to the Editor are for brief reports. Word count limits for this category are 1500 words (4,000 characters in Japanese), including legends (excluding references) with 2 figures or tables. Reference should not exceed 10 in number. Abstract is not required for this category.

Manuscript arrangement

The manuscript should be written in either English or Japanese. Double spaced typing and minimal margin of 25 mm are required. Each manuscript requires following: 1) Title page, 2) Abstract and 3-5 key words, 3) Text, 4) acknowledgements, 5) References, 6) Tables/Figures with separate legends. Please number each page. Structured abstract, including Background, Methods, Results and Conclusions, is requested. The abstract should be written in English even if the manuscript was written in Japanese.

References

Number references consecutively in the order appeared in the text. Identify references by Arabic numerals in parentheses. Ex) (1). List all authors when 6 or less. When 7 or more authors exist, list only the first 3 and add "et al." Journal titles should be properly abbreviated according to Index Medicus style. Examples of references are as follows:

1. Rahmani F, Razaee N. Therapeutic targeting of Toll-like receptors: a review of Toll-like receptors and their signaling pathways in psoriasis. *Expert Rev Clin Immunol*, 2016;12:1289-1298.
2. Frain-Bell W. The photodermatoses. In: Rook A, ed. *Recent advances in dermatology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1973: 101-133.

Conflict of Interest

Please disclose all conflict of interests. These include financial, personal, political, intellectual or religious interests.

Offprints

PDF offprint will be provided for authors. If additional printed offprints are required, the authors can order them via e-mail <dts211@gmail.com>.

「Photomedicine and Photobiology」投稿規定

1. 筆頭著者は日本光医学光生物学会員とし、共著者は原則として日本光医学光生物学会員に限る。
2. 投稿内容は original article (原著), review article (総説), letter to the editor (短報) を主とし、和文または英文で他誌に掲載されていないものとする。投稿原稿は和文と英文のいずれも可とする。
3. 投稿原稿の執筆要綱は下記のとおりとする。
原著 (英文 3,500 語, 和文 10,000 字):
医学, 薬学, 生物学, 化学, 物理学などの分野における光に関連した研究論文。
本文, 要約, 図の説明を含む (参考文献は除く)。図・表は 4 点以内。
総説 (英文 5,000 語, 和文 15,000 字):
原則, 編集者からの依頼原稿であるが購読者からの推薦も歓迎する。
本文, 要約, 図の説明を含む (参考文献は除く)。図・表は 5 点以内。
短報 (英文 1,500 語, 和文 4,000 字):
臨床症例報告や速報的研究。
本文, 図の説明を含む。参考文献は 10 編以内。要約は不要。図・表は 2 点以内。
要約は英語で 250 字以内とする。
図・表が制限を超える場合については, 編集委員会で調整する。
4. 原稿は英文あるいは和文で Microsoft Word かそれと互換性のあるソフトウェア (doc or docx file) で作成し, メールで dts211@gmail.com へ提出する。
5. 原稿には 1) タイトルページ, 2) 要約と key words (3-5 個), 3) 本文, 4) 謝辞, 5) 参考文献, 6) 図・表の説明を記載し, 頁番号をつける。
6. 要約は和文, 英文に関わらず英語 (250 語) で, 背景, 方法, 結果, 結論と構造化して記載する。
7. 図は高解像度 (300 dpi 以上) で JPEG ファイルで作成し必ず説明を付ける。図は白黒のみとする。
8. 文献は本文に用いられたもののみをあげる。引用番号は本文の引用順とし, 本文中の引用箇所にアラビア数字を入れた括弧を記載する。例 (1)。
9. 文献は, 下記の形式に従って記載する。著者は 6 名以下の場合には全員を, 7 名以上の場合には最初の 3 名を記載し, 「他」または et al. を付ける。雑誌名は Index Medicus に従い適切に略記する。
(例) Rahmani F, Razaee N. Therapeutic targeting of Toll-like receptors: a review of Toll-like receptors and their signaling pathways in psoriasis. *Expert Rev Clin Immunol*, 2016;12:1289-1298.

Frain-Bell W. The photodermatoses. In: Rook A, ed. *Recent advances in dermatology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1973: 101-133.
10. 利益相反に関してはすべて記載する。
11. 著者には PDF のオフプリントを提供します。印刷版が必要な場合はメールでご注文ください。

Photomedicine and Photobiology

編集長 鶴田 大輔

〒 545-8585 大阪府阿倍野区旭町 1-4-3

大阪公立大学院医学研究科皮膚病態学

E-mail : dts211@gmail.com

笑顔につながる 明日を、共に。



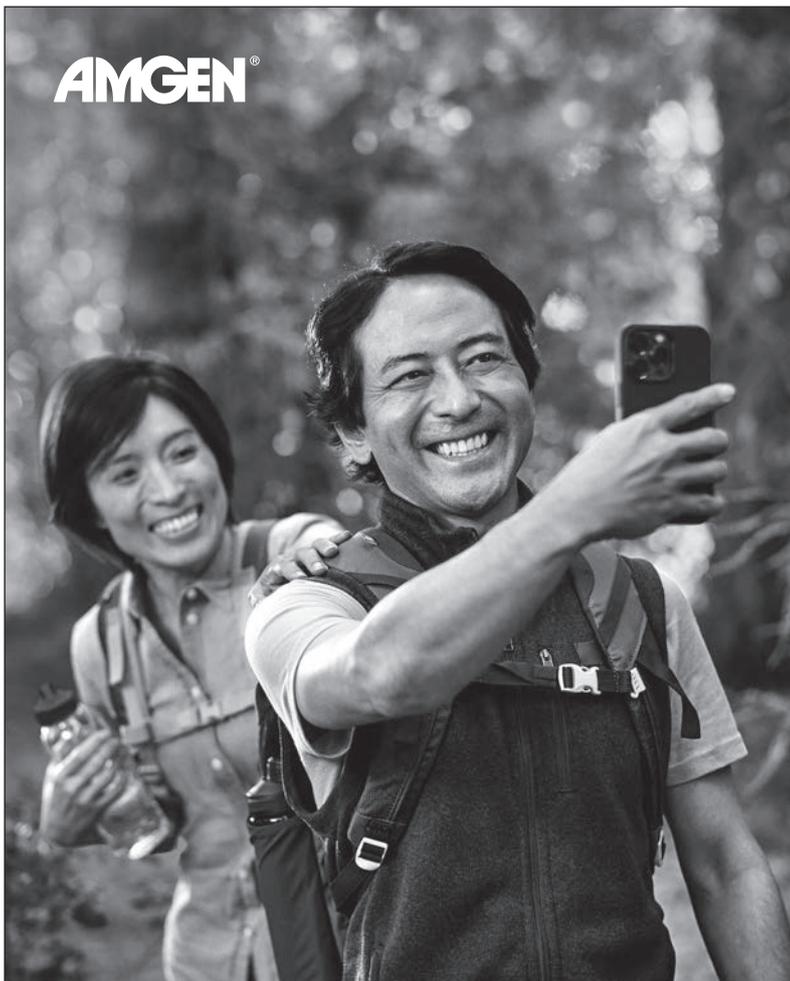
米国に本社を置く、グローバルな研究開発型のバイオ医薬品企業アッヴィ。
私たちが目指すのは、この社会の誰もがその人らしく笑顔ある日々を過ごせること。
そのために、多様な社員が想いをひとつに、
新しい医薬品や治療法を生み出すことに挑み続けます。
そして、医療分野にとどまることなく、同じ想いを持つ人々と共に、
社会課題の解決に向けて取り組んでいきます。

abbvie

アッヴィ合同会社

〒108-0023 東京都港区芝浦三丁目1番21号
msb Tamachi 田町ステーションタワーS
<https://www.abbvie.co.jp/>

AMGEN®



PDE4阻害剤

薬価基準収載

オテズラ錠 10mg
20mg
30mg

Otezla® Tablets

アプレミラスト錠

劇薬 処方箋医薬品・注意—医師等の処方箋により使用すること

「効能又は効果」、「用法及び用量」、「禁忌」を含む注意事項等情報等については、電子添文をご参照ください。

製造販売元

アムジェン株式会社

東京都港区赤坂九丁目7番1号

【文献請求先及び問い合わせ先】
メディカルインフォメーションセンター
0120-790-549

OTZ206013RX2
2022年5月作成



hbc
human health care

患者様の想いを見つめて、
薬は生まれる。

顕微鏡を覗く日も、薬をお届けする日も、見つめています。
病気とたたかう人の、言葉にできない痛みや不安。生きることへの希望。
私たちは、医師のように普段からお会いすることはできませんが、
そのぶん、患者様の想いにまっすぐ向き合っていたいと思います。
治療を続けるその人を、勇気づける存在であるために。
病気を見つめるだけでなく、想いを見つめて、薬は生まれる。
「ヒューマン・ヘルスケア」。それが、私たちの原点です。

ヒューマン・ヘルスケア企業 エーザイ



AFUTUREFREEOFLF
Eisai Alliance

エーザイはWHOのリンパ系フィラリア病制圧活動を支援しています。

Kracie

twice or three times a day 選べるやさしさ

Product Code	Product Name	Weight
KB-19	小青竜湯	3.0g
KB-23	当帰芍薬散料	3.0g
KB-24	加味逍遙散料	3.0g
KB-25	桂枝茯苓丸料	3.0g
KB-41	補中益気湯	3.75g
KB-62	防風通聖散料	3.75g
KB-108	人參養栄湯	3.75g
EK-19	小青竜湯	2.0g
EK-23	当帰芍薬散料	2.0g
EK-24	加味逍遙散料	2.0g
EK-25	桂枝茯苓丸料	2.0g
EK-41	補中益気湯	2.5g
EK-62	防風通聖散料	2.5g
EK-108	人參養栄湯	2.5g

スティックで、健やかな暮らしへ

クラシエ 薬品株式会社

【資料請求先】 〒108-8080 東京都港区海岸3-20-20

医療用医薬品ウェブサイト 「漢・方・優・美」 <http://www.kampoyubi.jp>

■各製品の「効能・効果」、「用法・用量」、「使用上の注意」等については製品添付文書をご参照ください。

生薬には、
個性がある。

漢方製剤にとって「良質」とは何か。その答えのひとつが「均質」である、とツムラは考えます。自然由来がゆえに、ひとつひとつに個性がある生薬。漢方製剤にとって、その成分のばらつきを抑え、一定に保つことが「良質」である。そう考える私たちは、栽培から製造にいたるすべてのプロセスで、自然由来の成分のばらつきを抑える技術を追求。これからもあるべき「ツムラ品質」を進化させ続けます。現代を生きる人々の健やかな毎日のために。自然と健康を科学する、漢方のツムラです。

良質。均質。ツムラ品質。



株式会社ツムラ <https://www.tsumura.co.jp/> 資料請求・お問合せは、お客様相談窓口まで。

医療関係者の皆様 tel.0120-329-970 患者様・一般のお客様 tel.0120-329-930 受付時間 9:00~17:30(土・日・祝日は除く)

2021年4月制作 (審)



ヒト型抗ヒトIL-4/13受容体モノクローナル抗体

デュピクセント®

DUPIXENT® デュピルマブ(遺伝子組換え)製剤

生物由来製品、劇薬、処方箋医薬品(注意-医師等の処方箋により使用すること)

薬価基準収載

皮下注300mgペン

皮下注300mgシリンジ

皮下注200mgシリンジ

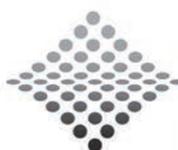
「効能又は効果、用法及び用量、警告・禁忌を含む注意事項等情報」等については電子添文をご参照ください。

MAT-JP-2307267-1.0
2023年11月作成

製造販売元: **サノフィ株式会社**

〒163-1488
東京都新宿区西新宿三丁目20番2号

販売提携: **リジェネロン・ジャパン株式会社**



ヤヌスキナーゼ(JAK)阻害剤 薬価基準収載

サイバインコ錠

50mg
100mg
200mg

CIBINQO Tablets

アプロシチニブ錠

劇薬 処方箋医薬品^注 注)注意-医師等の処方箋により使用すること



JAK3/TECファミリーキナーゼ阻害剤 薬価基準収載

リットフーロ®カプセル50mg



Litfulo® capsules

リトレスチニブトシル酸塩カプセル

劇薬、処方箋医薬品^注 注)注意-医師等の処方箋により使用すること

●効能又は効果、用法及び用量、警告・禁忌を含む注意事項等情報等については、電子添文をご参照ください。

製造販売

ファイザー株式会社

〒151-8589 東京都渋谷区代々木3-22-7

文献請求先及び製品の問い合わせ先:
製品情報センター 学術情報ダイヤル 0120-664-467
<https://pfizerpro.jp/>

販売情報提供活動に関するご意見:
0120-407-947
<https://www.pfizer.co.jp/pfizer/contact/index.html>

CIB720001A
2024年2月作成



TYK2阻害剤 薬価基準収載

ソーティクツ[®]錠 6mg

劇薬 処方箋医薬品 注意—医師等の処方箋により使用すること

一般名：デュークラバシチニブ SOTYKTU[®]

「効能又は効果」、「用法及び用量」、「警告・禁忌を含む注意事項等情報」等の詳細は、
電子化された添付文書をご参照ください。

製造販売元

 プリストル・マイヤーズ スクイブ 株式会社

〒100-0004 東京都千代田区大手町1-2-1

文献請求先及び問い合わせ先 メディカル情報グループ TEL:0120-093-507

販売情報提供活動に関するお問い合わせ窓口 TEL:0120-487-200

2023年11月作成
1787-JP-230076129

maruho NOVARTIS



ヒト型抗ヒトIL-17Aモノクローナル抗体製剤

生物由来製品 劇薬 処方箋医薬品^{注)}

薬価基準収載

コセンティクス[®] 皮下注 150mg ペン
皮下注 300mg ペン
皮下注 75mg シリンジ

Cosentyx[®] セクキヌマブ (遺伝子組換え) 注射剤 注) 注意-医師等の処方箋により使用すること
secukinumab

●効能又は効果、用法及び用量、警告・禁忌を含む注意事項等情報等については電子添文をご参照ください。

販売

maruho

[文献請求先及び問い合わせ先]

マルホ株式会社

大阪市北区中津1-5-22 〒531-0071

(ホームページアドレス)

<https://www.maruho.co.jp/>

本製品に関するお問い合わせ

TEL: 0120-12-2834

販売情報提供活動に関するご意見

TEL: 0120-12-3821

受付時間: 9:30~17:30

(土・日・休日および当社休業日を除く)

製造販売 (輸入)

[文献請求先及び問い合わせ先]

ノバルティス ファーマ株式会社

東京都港区虎ノ門1-23-1 〒105-6333

ノバルティスダイレクト

TEL: 0120-003-293

販売情報提供活動に関するご意見

TEL: 0120-907-026

受付時間: 月~金 9:00~17:30

(祝日および当社休業日を除く)

(2022.08作成)



ヤンセンが目指すのは、 病が過去のものになる未来を作ることです。

世界のすべてが、私たちの研究室。

病と懸命に闘う患者さんのために、高い科学技術、独創的な知性、
世界中の力を合わせ、新しい可能性を切り拓く。

すべては、私たちの解決策を待つ、ひとつの命のために。複雑な課題にこそ挑んでいく。
新しい薬を創るだけでなく、それを最適な方法で提供する。

革新的な薬や治療法を、届ける。世界中に、私たちを待つ人がいる限り。

誰もが健やかに、いきいきと暮らす社会。

そんな「当たり前」の願いのために、自ら変化し、努力を続けます。

ヤンセンファーマ株式会社 www.janssen.com/japan www.facebook.com/JanssenJapan



協和キリン株式会社

たった一度の
いのちと
歩く。

私たちの志

ここにいる責任と幸福。

私たちの志は、いつもおかげが人のいのちが救われ、病と懸命に闘う患者さんのために、高い科学技術、独創的な知性、世界中の力を合わせ、新しい可能性を切り拓く。

すべては、私たちの解決策を待つ、ひとつの命のために。複雑な課題にこそ挑んでいく。新しい薬を創るだけでなく、それを最適な方法で提供する。

革新的な薬や治療法を、届ける。世界中に、私たちを待つ人がいる限り。

誰もが健やかに、いきいきと暮らす社会。

そんな「当たり前」の願いのために、自ら変化し、努力を続けます。

ヤンセンファーマ株式会社 www.janssen.com/japan www.facebook.com/JanssenJapan

KYOWA KIRIN

私たちの志 検索



Inspired by patients.
Driven by science.



効能効果
追加

ヒト化抗ヒトIL-17A / IL-17Fモノクローナル抗体製剤 薬価基準収載
(ビメキズマブ(遺伝子組換え)製剤)

ズビンゼレックス® 皮下注160mg
オートインジェクター・シリンジ

生物由来製品、劇薬、処方箋医薬品(注意—医師等の処方箋により使用すること)

Bimzelx®

「効能又は効果」「用法及び用量」「警告・禁忌を含む注意事項等情報」等につきましては、電子化された添付文書をご参照ください。

製造販売元

ユーシービージャパン株式会社
東京都新宿区西新宿8丁目17番1号

文献請求先及び
問い合わせ先

ユーシービーケアーズ コンタクトセンター

TEL:0120-093-189

受付時間 9:00~17:30(土日・祝日・会社休日を除く)

JP-P-BK-PsA-2300007
2023年12月作成

トータルヘルスケア企業として、
これからも、さまざまな人生のそばに。

Pharmaceuticals Nutraceuticals

大塚製薬は、“Otsuka-people creating new products for better health worldwide”の企業理念のもと、疾病の診断から治療までを担う医療関連事業と、日々の健康の維持・増進をサポートするニュートラシューティカルズ関連事業からなる両輪事業の強みを活かして、さまざまな社会課題や健康課題に取り組んでまいります。



人と動物の健康の向上 - 私たちの目標



イノベーションによる
価値

ベーリンガーインゲルハイムは、
研究開発主導型のバイオ製薬企業の
リーディングカンパニーとして、
アンメットメディカルニーズの
高い分野において、イノベーションによる
価値の創出に日々取り組んでいます。
1885年の創立以来、
ベーリンガーインゲルハイムは、
株式を公開しない独立した企業形態により
長期的視野を維持しています。

日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社

本社 / 〒141-6017 東京都品川区大崎2-1-1 ThinkPark Tower
<https://www.boehringer-ingenelheim.com/jp/>



選択肢をつくる。 希望をつくる。

なんでも選べるこの時代に、
まだ選択肢が足りない世界があります。
そこでは、たったひとつの選択肢が生まれることが、
たくさんの希望につながります。
だから、田辺三菱製薬はつくります。

病と向き合うすべての人に、希望ある選択肢を。

この国でいちばん長く培ってきた
薬づくりの力を生かして、
さまざまな分野で、挑みつづけていきます。
そこに待っている人がいるかぎり。



 田辺三菱製薬

<https://www.mt-pharma.co.jp/>

 MITSUBISHI
CHEMICAL
GROUP



Lilly

世界中の人々の
より豊かな人生のため、
革新的医薬品に
思いやりを込めて

日本イーライリリーは製薬会社として、
人々がより長く、より健康で、充実した生活を実現できるよう、
がん、糖尿病、筋骨格系疾患、中枢神経系疾患、自己免疫疾患、
成長障害、疼痛などの領域で、日本の医療に貢献しています。

日本イーライリリー株式会社

〒651-0086 神戸市中央区磯上通 5-1-28
www.lilly.co.jp