

第二世代光感受性物質 mono-L-aspartyl chlorin e6 を 用いた光化学療法の可能性

森 圭介¹⁾, 太田 昌孝¹⁾, 佐野 朱美¹⁾, 米谷 新¹⁾
 藺田 勝²⁾, 金田 明³⁾, 佐藤 吉和⁴⁾

¹⁾埼玉医科大学眼科学教室, ²⁾埼玉医科大学第一生化学教室

³⁾松下産業機器, ⁴⁾明治製菓株式会社

要 約

組織代謝が迅速な新しい光感受性物質 mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) と, その最大吸光波長 664 nm を発振する半導体レーザーによる光化学療法の可能性につき基礎実験を行った。活性酸素の発生を検出するため, NPe6 溶液にレーザー照射し, その直後に電子スピン共鳴法 (ESR) で測定した。その結果, O_2^- , $\cdot OH$, 1O_2 それぞれの波形が検出された。また, O_2^- の消去剤である superoxide dismutase を加えるとこれらの波形は消失した。次に, この NPe6 から発生した活性酸素による血管内皮障害および, それに伴う血管閉塞の有無を家兎眼底で組織学的に検索した。脈絡毛細管板を主体として血管内皮

細胞の壊死・血管閉塞ならびに網膜色素上皮細胞の壊死が観察されたが, 過剰量投与においても網膜感覚上皮はほぼ正常構造を保持していた。NPe6 による光化学療法では, 各種活性酸素が能率よく発生し, 血管内皮細胞の障害による血管閉塞が可能であることが示唆された。(日眼会誌 101: 134-140, 1997)

キーワード: Mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6), 664 nm 半導体レーザー, 光化学療法, 活性酸素種

Potential of Photodynamic Therapy with a Second-generation Sensitizer: Mono-L-Aspartyl Chlorin e6

Keisuke Mori¹⁾, Masataka Ohta¹⁾, Akemi Sano¹⁾,
 Shin Yoneya¹⁾, Masaru Sonoda²⁾, Akira Kaneda³⁾
 and Yoshikazu Sato⁴⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Saitama Medical School

²⁾First Department of Biochemistry, Saitama Medical School

³⁾Matsushita Industrial Equipment Co., Ltd., ⁴⁾Meiji Seika Kaisha, Ltd.

Abstract

We evaluated the potential for photodynamic therapy of a new photosensitizer, mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6), whose tissue uptake and clearance are rapid. Firstly, NPe6 solution was exposed to a diode laser at 664 nm that fits the maximum absorption of NPe6. Immediately after laser exposure, the solution was subjected to electron spin resonance (ESR) to detect generation of activated oxygen species. With ESR, O_2^- , $\cdot OH$, and 1O_2 were detected in the NPe6 solution. O_2^- and $\cdot OH$ disappeared when superoxide dismutase was added to the solution. Next, the fundi of pigmented rabbits were irradiated with the diode laser after administration of NPe6. Histopathologically, there was necrosis of endothelial cells and vascular occlusion

in the choroid, especially in the choriocapillaris. Retinal pigment epithelial cells were also injured. In contrast, the sensory retina was undamaged even after use of a large amount of dye. This new combination of NPe6 and diode laser at 664 nm enables us to occlude choroidal vessels efficiently by generating various activated oxygen species. Thus, photodynamic therapy with NPe6 is potentially useful in treating retinochoroidal involvement. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 134-140, 1997)

Key words: Mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6), Diode laser at 664 nm, Photodynamic therapy, Activated oxygen species

別刷請求先: 350-04 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 38 埼玉医科大学眼科学教室 森 圭介
 (平成 8 年 7 月 2 日受付, 平成 8 年 9 月 6 日改訂受理)

Reprint requests to: Keisuke Mori M.D. Department of Ophthalmology, Saitama Medical School, 38 Morohongo, Moroyama-machi, Iruma-gun, Saitama-ken 350-04, Japan

(Received July 2, 1996 and accepted in revised form September 6, 1996)

I 緒 言

光化学療法(PDT)は、レーザーの臨床応用を広げる新しい治療法として期待されている¹⁾。従来の熱凝固効果を期待したレーザー治療では、病変部位だけでなく、光路およびその周囲にある組織が熱エネルギーの伝達により障害を受けるといった問題があった。一方、PDTによれば、あらかじめ投与された光感受性物質の集積した部位のみを選択的に障害し得る²⁾³⁾という利点があり、眼科的には眼内腫瘍⁴⁾だけでなく、新生血管を伴う血管病変の治療、特に中心窩下の脈絡膜新生血管の選択的閉塞に応用可能であることが示唆されている⁵⁾⁶⁾。この治療の光源として、光感受性物質の最大吸光波長を共振するレーザー光を使用することにより、より効率の良い治療が可能となる。

PDTとしては、既に第一世代の光感受性物質であるヘマトポルフィン誘導体(HPD)の臨床応用¹⁾が悪性腫瘍に対して試みられている。一方、励起光の組織透過性の点では600~800 nmが望ましいとされているが、この波長域でのHPDの光子吸収量は弱く、励起効率の悪いことがその欠点として指摘されている⁷⁾。また、HPDの他の問題点として、体内での代謝が遅く、光線過敏症などの全身合併症の発生が遷延することが指摘されている⁸⁾。そのためにHPDを用いたPDTは広く臨床応用されるには至らなかった。

近年になり、いわゆる第二世代の光感受性物質が登場したが、その一つとしてmono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6)が挙げられる⁹⁾。このNPe6はHPDに比し、代謝されるスピードが10倍以上に速いという優れた特性があり、投与後10時間には血漿中の濃度が投与量の1/100以下となる¹⁰⁾¹¹⁾。そのため、光線過敏症による全身合併症の可能性は低く¹¹⁾¹²⁾、臨床応用しやすい物質といえることができる。また、NPe6の可視光域での最大吸光波長は664 nmである¹²⁾ため、HPDに比べ組織透過性に優れ励起効率は向上する。また、NPe6は水溶性であり、血中のアルブミンやリポ蛋白と結合しやすく¹⁰⁾、血液柵のある脳や感覚網膜には拡散しにくいこと、また、細胞内への移動は貪食や細胞吸水などの能動輸送を受けること¹³⁾がその特性として挙げられている。これらの特性から、NPe6は感覚網膜を障害せずに、脈絡膜新生血管を選択的に治療し得ることが期待される。

我々は、NPe6の最大吸光波長の664 nmのレーザー光を光源とするレーザー治療装置を新たに開発し、より効率の良い、安全なPDTの可能性を検討する目的で*in vitro*および*in vivo*の実験を行った。その結果、NPe6の有用性および近い将来の臨床応用の可能性について検討したので報告する。

II 実験方法

1. 光感受性物質および励起光源装置

光感受性物質として、mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6)を使用した(図1)。NPe6は暗緑色の粉末で、使用直前まで5°Cの冷暗所に保管した。励起光源として、NPe6の光子吸収量が最大となる664 nmの半導体レーザー・システムを試作した。このシステムは、レーザー発振装置とその眼科用デリバリー・システムから構成されている。以下の*in vitro*の実験ではレーザー発振装置のファイバー・オプティクスから照射されるレーザー光を、*in vivo*の実験ではデリバリー・システムから照射される光量を光パワー・メータ(Optical Power Meter AQ-2101®, 安藤電気)で計測し、それぞれの照射強度とした。エイミング光として、633 nmのヘリウムネオン・レーザーを搭載し、その照明強度はNPe6を励起させないよう80 μ Wと低く設定した。

2. 活性酸素種の検出(*in vitro*の実験)

活性酸素種の発生を検出するため、電子スピン共鳴法(ESR)を用いた。フリーラジカルは常磁性であるためESRで検出可能だが、ラジカルの寿命は短いことや酸素ラジカルに軌道角運動量が存在してスピン-格子緩和が速いことなどから直接測定できない場合が多い¹⁴⁾。そのため、トラップ剤でラジカル反応を捕らえた上でESRで測定した。トラップ剤にはスーパーオキシドとOHラジカルを捕捉するため5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO)を、一重項酸素の捕捉のため2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone hydrochloride(TMP)を用いた。NPe6を蒸留水に暗所氷上で溶解させ、濃度500 μ g/mlの溶液を作成した。そのうち180 μ lを分取し、40 μ lのDMPOまたは20 μ lのTMPと混和した。この混和液

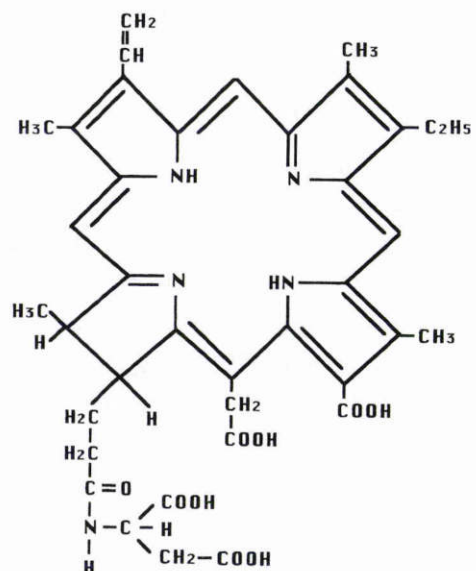


図1 Mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6)の構造。
分子量：711

を ESR 測定用扁平セルに注入し、セルの扁平な面の垂直方向から 664 nm の半導体レーザーを照射した。照射エネルギーは 50 mW/cm^2 で、照射時間は 9 秒間とした。その直後に ESR として、X-band spectrometer (FE-1-X®, JEOL) を用いて活性酸素種の検出を行った。また、これらの混和液に O_2^- の消去剤である superoxide dismutase (SOD, Sigma) を $400 \mu\text{g/ml}$ で $20 \mu\text{l}$ 加え、同様な条件でレーザー照射し、ESR で測定した。以上の *in vitro* の実験は室温下、暗室内で行った。

3. *In vivo* の実験

次に、*in vivo* の実験として、体重 2.0~3.0 kg の正常有色家兎 4 匹 7 眼の眼底に NPe6 を用いた PDT を行った。25, 50, 100 mg/kg の NPe6 を静注し、静注後 5 分以内に試作した 664 nm の半導体レーザーで眼底後極部に照射した。照射部位はあらかじめアルゴンレーザー (920 Argon/Dye®, Coherent) でマーキングした間隙とした。照射エネルギーは、3.6 もしくは 5.9 mW、照射時間は 1 もしくは 10 秒、照射径は $1,000 \mu\text{m}$ とした。照射直後、1 週間後、1 か月後に蛍光眼底撮影を施行した。全例、NPe6 投与後も通常の蛍光灯の下約 30 lux で飼育し、照射後 2 時間もしくは 1 週で眼球摘出の上、組織学的に検索した。2.5% グルタルアルデヒドで前固定した後、1% 四酸化オスミウムリン酸緩衝液で 90 分間本固定した。その後、エタノール系列で脱水し、エポン 812 に包埋した。標本を $0.8 \mu\text{m}$ で薄切後、トルイジンブルーで染色し、光学顕微鏡 (Optiphot 2®, Nikon) で観察した。また、1 匹 2 眼では NPe6 を 100 mg/kg 投与後レーザーを照射せず、他の例と同様に蛍光眼底撮影と組織学的検索を行った。

なお、すべての家兎は、The ARVO Resolution on the Use of Animals in Research に従って取り扱った。実験は塩酸ケタミン (ケタラル 50®) とキシラジン塩酸塩 (セラクター®) 2 : 1 混合液の筋注による全身麻酔下で行った。散瞳にはミドリン P® (参天) を用いた。

III 結 果

1. *In vitro* の実験

ESR の実験では、TMP をトラップ剤とした場合、照射直後から中央に 3 本のピークを持つ、一重項酸素に基づく ESR スペクトルが得られた。また、両端の 2 本のシグナルは Mn^{2+} によるマーキングであるが、この Mn^{2+} のシグナルに対する一重項酸素のシグナル比は 2.3 であった (図 2)。DMPO をトラップ剤として用いた場合、照射直後にはスーパーオキシド、照射後 90 秒では OH ラジカルアダクトの ESR スペクトルが検出された。また、 Mn^{2+} とのシグナル比は、スーパーオキシドでは 0.68、OH ラジカルでは 0.32 であった (図 3)。一方、SOD を混和した場合、これらのスペクトルは消失し、中央に SOD 由来の Cu^{2+} のシグナルのみ検出された (図 4)。

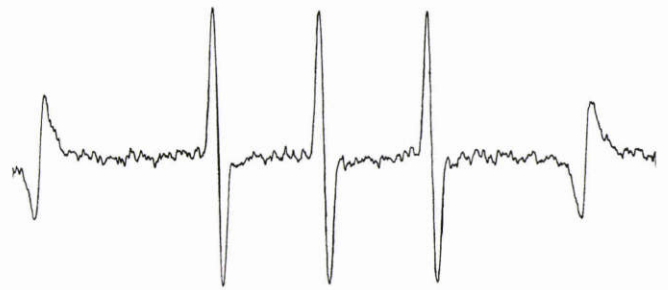


図 2 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone hydrochloride (TMP) をトラップ剤とした場合の電子スピン共鳴法 (ESR) スペクトル。

照射直後から 3 本のピークを持つ一重項酸素に基づく ESR スペクトルが検出。 Mn^{2+} とのシグナル比は 2.3。測定条件：Magnetic field : $334.0 \pm 5.0 \text{ mT}$, Power : 1 mW, Time constant : 0.03, Frequency modulation : 100kHz, Modulation : 0.1mT, Amplitude : $1.6 \times 1,000$, Sweep time : 20 sec., Temperature : room temperature.



図 3 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) をトラップ剤とした場合の ESR スペクトル。

測定条件は、Power : 1 mW (上), 6 mW (下) 以外は図 2 と同様。照射直後 (上) にはスーパーオキシド、照射後 90 秒 (下) を経過すると OH ラジカルアダクトの ESR スペクトルが検出。 Mn^{2+} とのシグナル比は、スーパーオキシドでは 0.68、OH ラジカルでは 0.32。



図 4 Superoxide dismutase (SOD) を混和した場合の ESR スペクトル。

測定条件：図 2 と同一。中央に SOD 由来の Cu^{2+} のシグナルのみ検出。

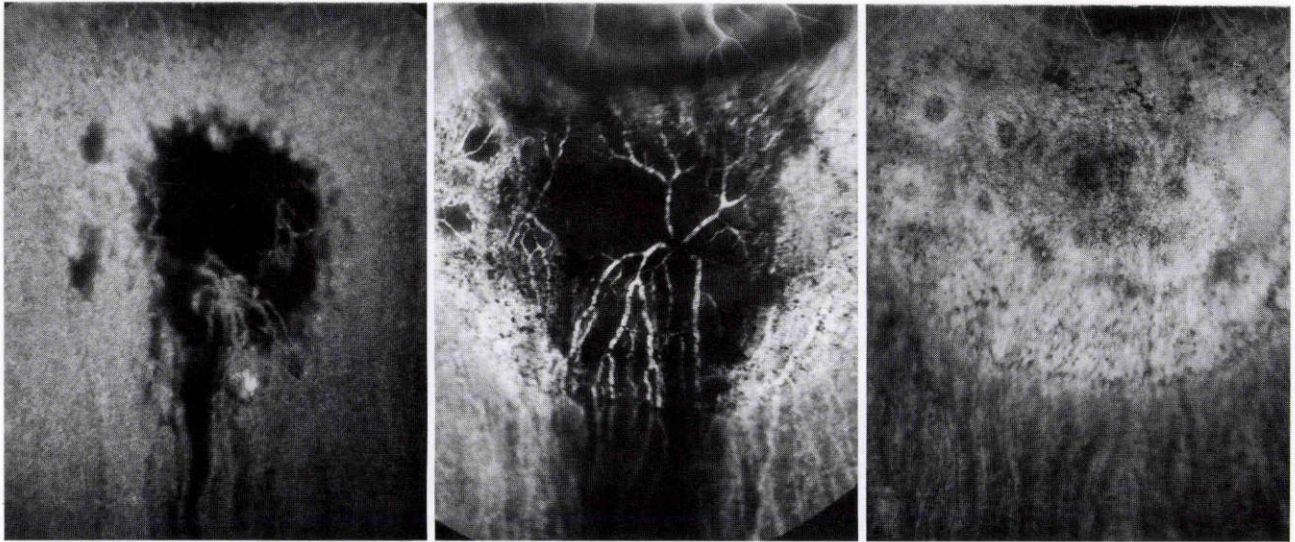


図5 Mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6)投与例(25 mg/kg)のフルオレセイン蛍光造影。

左：664 nm 半導体レーザー照射後2時間，フルオレセイン静注後10秒。中央：照射後1週，フルオレセイン静注後9秒。右：照射後1週，フルオレセイン静注後6分10秒。レーザー照射後2時間で，既に脈絡膜血管の閉塞が開始。照射1週後では血管閉塞の範囲は非照射部にも拡大して観察され，静注後期では顆粒状蛍光あり。

2. *In vivo*の実験

正常家兎眼にNPe6を用いた場合のフルオレセイン蛍光眼底造影所見を図5, 6に示す。25 mg/kg投与した場合には，レーザー照射後2時間で，既に脈絡膜血管の閉塞が起こっていた。1週後の血管閉塞の範囲は，アルゴンレーザーによるマーキングを越えて非照射部にも拡大して観察され，それに伴い，後期相では網膜色素上皮の障害を示す顆粒状蛍光がみられた(図5)。50 mg/kg投与例では，脈絡膜血管の閉塞の程度，範囲とも拡大しており，静注後期まで持続していた。100 mg/kgではさらに障害の程度は増強し，眼底後極部全体に及ぶ網脈絡膜血管が閉塞していた(図6)。

組織学的には，25 mg/kg投与例の照射後2時間で，既に脈絡毛細管板の内皮細胞は膨化・変性し，管腔の閉塞が観察された。網膜色素上皮細胞も膨化壊死に陥っていた。一方，網膜感覚上皮では，一部視細胞の脱落と考えられる内外節の網膜下腔への移動とそれに連続する視細胞核の濃縮があったが，全体的にはその構造は保持されていた(図7上)。25 mg/kg投与例の照射後1週でも，脈絡毛細管板の閉塞は持続し，再開通はみられなかった。一方，内外節は消失し，外顆粒層の核数は減少していた(図7下)。一方，100 mg/kg投与後レーザーを照射せず，通常の蛍光灯の下約30 luxで1週間飼育した例では，極量を投与したのにもかかわらず，網脈絡膜ともほぼ正常構造を保っていた(図8)。また，全実験経過を通じて，光線過敏症などの全身合併症はみられなかった。

IV 考 按

眼科領域でのPDTの応用は，HPD^{4)~6)}やローズ・ベン

ガル¹⁵⁾など，主に第一世代の光感受性物質について報告されている。HPDは，緒言の項で記したように，PDTに適した波長域での励起効率が悪い⁷⁾。加えて，体内での代謝が遅く全身合併症が遷延するため⁸⁾，広く臨床応用されるには至らなかった。ローズ・ベンガルにおいても血管閉塞の効率が悪いことが指摘されており，十分な効果を得るには，临床上の安全域の27倍もの量を投与する必要があるとされている¹⁶⁾。これらのことから，全身合併症が少なく，長波長域にその最大吸光波長を有し，より効率よく標的組織を障害し得る第二世代の光感受性物質が開発された。その代表的なものとして，chloro-aluminum sulfonated phthalocyanine¹⁷⁾，benzoporphyrin derivative monoacid ring A¹⁶⁾，NPe6などが挙げられる。このうち，殺細胞作用の主体とされている一重項酸素¹⁸⁾¹⁹⁾を最も効率よく発生し，かつ，体内での代謝が最も速いものがNPe6である¹⁹⁾。

このNPe6を眼科臨床で応用するため，我々は664 nm半導体レーザーとその眼科用デリバリーシステムを試作した。今回，実験を開始するにあたり，このレーザーでNPe6を効率よく励起することが可能か，また，どのような活性酸素種がどの程度発生し得るかをESRを用いて検討した。一般に，光感受性物質が光子エネルギーを吸収すると，二つの経路からフリーラジカルが発生する¹⁹⁾。一つはtype I反応と呼ばれ，まずスーパーオキシドが発生し，次いで過酸化水素，OHラジカルが発生する¹⁹⁾。本実験でDMPOを用いた場合に，経時的に得られた2種類のESRスペクトルは，この過程を表しているものと考えられた。もう一つはtype II反応と呼ばれ，一重項酸素が発生する過程を指す¹⁹⁾が，今回TMPを用い

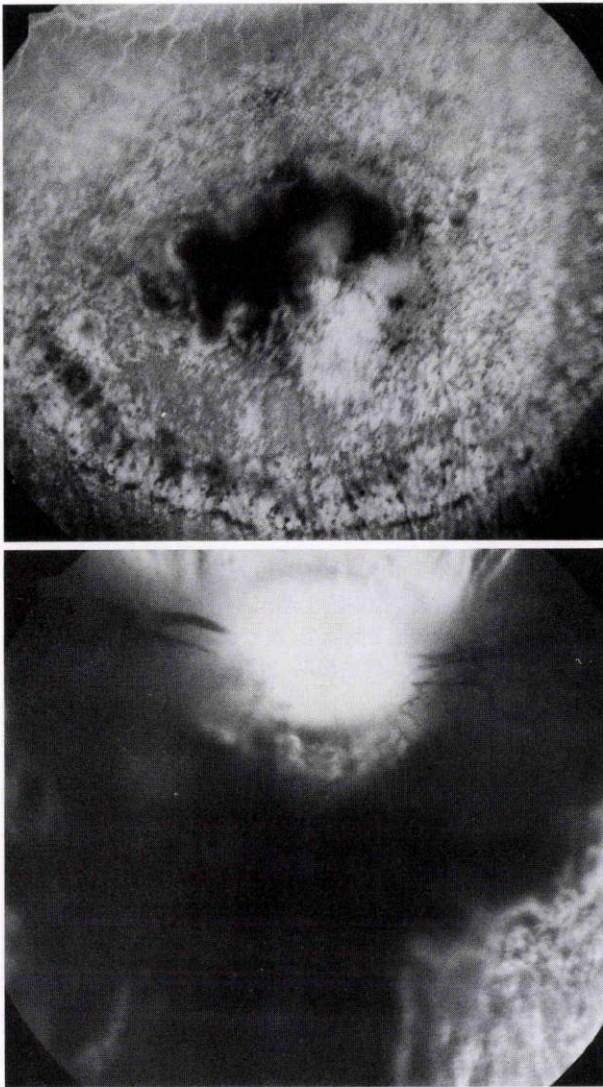


図6 NPe6投与(50, 100 mg/kg)後1週のフルオレセイン蛍光造影。

上: 50 mg/kg 投与レーザー照射後1週・フルオレセイン静注後5分46秒。下: 100 mg/kg 投与レーザー照射後1週・フルオレセイン静注後34秒。50 mg/kg 投与例では、脈絡膜血管の閉塞の程度範囲とも拡大。100 mg/kg では眼底後極部全体に及ぶ脈絡膜血管が閉塞。

た場合に得られたESRスペクトルにより、この反応の存在が確認された²⁰⁾。したがって、NPe6の励起による光増感反応はtype I, type IIとも合わせ持っていたことが本実験から証明された。また、それぞれのMn²⁺とのシグナル比は一重項酸素、スーパーオキシド、OHラジカルの順に、2.3, 0.68, 0.32であった。本実験と同じ濃度のHPDを用いた報告²¹⁾では、Mn²⁺とのシグナル比は、一重項酸素・スーパーオキシドともに1.0と報告されている。この報告²¹⁾では、二光子吸収・波長などの点で励起効率は良いが、組織透過性が悪いため、臨床応用では通常用いられていないパルス型二倍波YAGレーザーで本実験の80倍もの長時間照射している。また、特に殺細胞作用

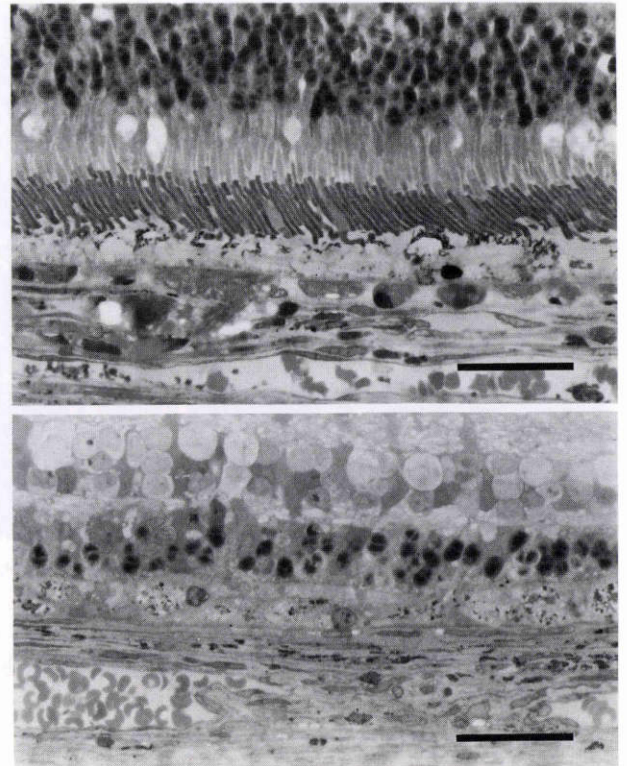


図7 25 mg/kg 投与例の光学顕微鏡所見。

上: 照射後2時間。下: 照射後1週。照射後2時間で、既に脈絡毛細管板の内皮細胞は膨化・変性し、管腔の閉塞が観察。網膜感覚上皮では全体的にはその構造は保持。照射後1週でも、脈絡膜毛細管板の閉塞は持続し、再開通はない。バーは25 μm

の主体とされる一重項酸素¹⁸⁾¹⁹⁾においてはNPe6でより効率よく発生していた。以上のことから、NPe6は今回試作した664 nm半導体レーザー励起により、HPDに比べても優れた励起効率および殺細胞作用を持っていることが示唆された。

一方、活性酸素種の寿命は短く、0.1 μm以上は組織内で移動しないことが明らかにされている¹⁹⁾。したがって、今回PDT後に観察された脈絡膜の組織学的変化は、ほとんどがその場で発生した活性酸素種に由来すること、また、血流にのった活性酸素種がレーザーの照射域を越えて広がり、周囲組織を障害する可能性はないことが推定される。これに対し、*in vivo*の実験では、蛍光眼底造影で示されたように、脈絡膜血管の閉塞や網膜色素上皮の障害を示す顆粒状蛍光は、レーザー非照射部にも拡大して観察された。また、この障害域は、NPe6の投与濃度が高くなるほど拡大していたことから、レーザーの散乱光のような微量な光でも、NPe6が高濃度であるほど、周囲組織を障害し得る量の活性酸素が発生した可能性が考えられる。また、障害された範囲がコンタクトレンズで観察しやすい範囲と一致していることから、細隙灯顕微鏡の照明光によっても励起されていた可能性も推定される。いずれにしろ、今回の投与量の設定は過剰量であり、適切

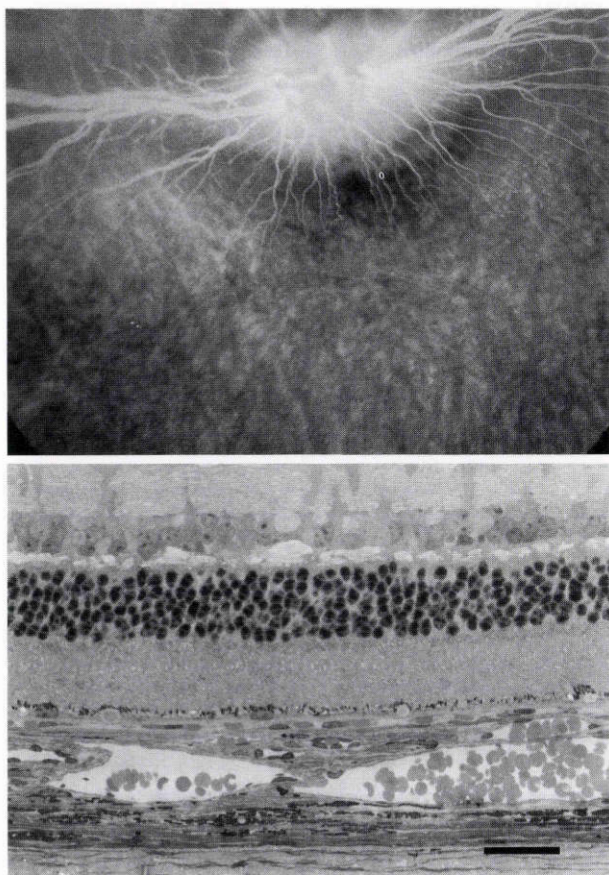


図8 100 mg/kg 投与後1週・レーザー非照射例。
上：蛍光眼底造影。フルオレセイン静注後6分20秒。
下：光学顕微鏡。極量を投与したのにもかかわらず、網脈絡膜ともほぼ正常構造を維持。バーは25 μm

なNPe6の投与量の検討、さらには、細隙灯顕微鏡の照明光の改良が今後の課題と考えられた。また、今回設定したレーザーの照射強度は、0.46、もしくは0.75 W/cm²で、照射時間は1もしくは10秒としたが、この条件でのレーザー光そのものによる網膜障害の有無も問題となる。Hamら²²⁾によるサル眼を用いた検討では、赤色光(633 nm)で網膜障害を起こす閾値は、照射時間1秒では30 W/cm²、16秒では15 W/cm²とされている。また、我々の以前の有色家兎を用いた検討²³⁾では、本実験と同程度の照射強度では網膜障害を起こすには1時間の照射が必要であった。以上の事実から、今回のレーザー光の照射エネルギーは障害閾値の数十分の1以下と推算され、レーザー光のみでは網膜障害を起こし得ないと考えられた。したがって、本実験で観察された色素上皮ならびに脈絡膜の障害は、NPe6がレーザー光で励起されることにより発生した活性酸素種によるものと推定された。

一方、過剰量のNPe6を投与したのにも関わらず、本実験の組織所見では、障害の部位は脈絡膜毛細管板の内皮細胞・網膜色素上皮細胞に限局され、網膜感覚上皮にはほとんど形態変化がみられなかった。これらの障害部位は、透過性の面から推定されるNPe6の存在部位に一致

しており、障害部位の選択性は高いことが本実験から証明された。加えて、照射直後には脈絡毛細管板の内皮細胞の障害がみられ、照射後1週にもその閉塞が持続していたことから、活性酸素による内皮細胞の障害がその作用機序であることが推定された。一方、100 mg/kgという極量を投与した場合でも、通常の蛍光灯の下では、網脈絡膜はほぼ正常構造を示しており、光線過敏症などの全身合併症も観察されなかった。これらの事実は、NPe6は安全な光感受性物質であること、また、その作用は従来の熱作用によるレーザー光凝固とは、全く異なった方法であることを示すものであり、今後適切な投与量や照射強度、照射時期を決定することにより脈絡膜新生血管を代表とする各種血管病変の選択的治療に有用である可能性が示唆された。

本論文の要旨は、第99回日本眼科学会総会および4th International Symposium on Ocular Circulation and Neovascularizationにおいて森が報告した。

文 献

- 1) Dougherty TJ, Kaufmann J, Goldfarb A, Weishaup K, Boyle D, Mittleman A: Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 38: 2628—2635, 1978.
- 2) Manyak MJ, Russo A, Smith PD, Glatstein E: Photodynamic therapy. *J Clin Oncol* 6: 380—391, 1988.
- 3) Roberts WG, Hasan T: Role of neovasculture and vascular permeability on the tumor retention of photodynamic agents. *Cancer Res* 52: 924—930, 1992.
- 4) Ohnishi Y, Yamana Y, Minei M: Phtoradiation therapy using argon laser and a hematoporphyrin derivative for retinoblastoma. A preliminary report. *Jpn J Ophthalmol* 30: 409—419, 1986.
- 5) Thomas EL, Langhofer M: Closure of experimental subretinal neovascular vessels with di-hematoporphrin ether augmented argon green laser photocoagulation. *Photochem Photobiol* 46: 881—886, 1987.
- 6) Packer AJ, Tse DT, Gu X-Q, Hayreh SS: Hematoporphyrin photoradiation therapy for iris neovascularization. *Arch Ophthalmol* 102: 1193—1197, 1984.
- 7) 藺田 勝, 坂岸良克: 光増感反応による活性酸素. *生化学* 60: 21—26, 1988.
- 8) Dougherty TJ: Photoradiation therapy (PRT) of malignant tumors. *CRC Crit Rev* 2: 83—116, 1984.
- 9) Bommer JC, Sveja ZJ, Petryka BF: The relationship between the structure of a tetrapyrrole and the selective fluorescence in tumors. In: Jori G, et al (Eds): *Photodynamic therapy of tumors and other disease*. Libreria Progretto, Padova, 204—206, 1985.
- 10) Kessel D, Allen R: Determinants of localization by second-generation PDT sensitizers. In: Spinelli

- P, et al (Eds): Photodynamic therapy and biomedical lasers. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 526—530, 1992.
- 11) **Gomer CJ, Ferrario A**: Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model. *Cancer Res* 50: 3985—3990, 1990.
 - 12) **Nelson JS, Roberts WG, Berns MW**: *In vivo* studies on the utilization of mono-L-aspartyl chlorin (NPe6) for photodynamic therapy. *Cancer Res* 47: 4681—4685, 1987.
 - 13) **Roberts WG, Shiau F-Y, Nelson JS, Smith KM, Berns MW**: *In vitro* characterization of monoaspartyl chlorin e6 and diaspartyl chlorin e6 for photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 80: 330—336, 1988.
 - 14) **池上雄作**: 活性酸素ラジカルのESR. 活性酸素・フリーラジカル 2: 491—497, 1991.
 - 15) **Miller H, Miller B**: Photodynamic therapy of subretinal neovascularization in the monkey eye. *Arch Ophthalmol* 111: 5855—5860, 1993.
 - 16) **Miller JW, Walsh AW, Kramer M, Hasan T, Michaud N, Flotte TJ, et al**: Photodynamic therapy of experimental choroidal neovascularization using lipoprotein-delivered benzoporphyrin. *Arch Ophthalmol* 113: 810—818, 1995.
 - 17) **Panagopoulos JA, Svitra PD, Puliafito CA, Gragoudas ES**: Photodynamic therapy for experimental intraocular melanoma using chloroaluminum sulfonated phthalocyanine. *Arch Ophthalmol* 107: 886—890, 1989.
 - 18) **Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ**: Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res* 36: 2326—2329, 1976.
 - 19) **Grossweiner LI**: The science of phototherapy. CRC Press, Boca Raton, 27—49, 150—151, 1994.
 - 20) **Lion Y, Delmelle M, Vorst A**: New method of detecting singlet oxygen production. *Nature* 263: 442—443, 1976.
 - 21) **石原聖也, 三好憲雄, 岡本博明, 新井達郎, 徳丸克己, 市村厚一, 他**: 光励起による種々の光増感剤からの活性酸素検出. 第13回磁気共鳴医学会講演集: 57—59, 1991.
 - 22) **Ham WT, Mueller HA**: Retinal sensitivity to damage from short wavelength light. *Nature* 260: 153—155, 1976.
 - 23) **森 圭介, 米谷 新, 飯田知弘, 林 直樹, 阿部友厚**: 手術用顕微鏡の短波長光と長波長光による網膜障害. *日眼会誌* 96: 1112—1119, 1992.