

Studies on Photodynamic Therapy with Polyhematoporphyrin Ethers/Esters Combined with Excimer Dye Laser

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8534

ポリヘマトポルフィリン エーテル/エステルと エキシマ・ダイ・レーザーを用いた 光力学的癌治療に関する基礎的検討

金沢大学医学部泌尿器科学講座 (主任代理: 大川光央助教授)

森 下 裕 志

ポリヘマトポルフィリン エーテル/エステル (polyhematoporphyrin ethers/esters, PHE) とエキシマ・ダイ・レーザー (excimer dye laser, EDL) を用いて、マウス実験腫瘍およびヌードマウス可移植性ヒト腫瘍に対して光力学的癌治療 (photodynamic therapy, PDT) を行い、その抗腫瘍効果を検討した。さらに、ヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 に対する PDT の殺細胞効果および PDT の殺細胞機序についても検討した。PDT の至適条件を設定する目的で、PHE の投与量、PHE 投与後のレーザー光の照射時期、照射エネルギー量を変化させて、サルコーマ180細胞を移植した ICR マウスに対して PDT を施行したところ、25mg/kg の PHE 投与48時間後に、50J/cm²の照射エネルギー量でレーザー光の照射を行う条件が、最も良好であると結論された。この治療条件下に、ヒト線維肉腫 HT-1080、ヒト膀胱癌 KK-47 移植腫瘍に対して PDT を施行した結果、腫瘍非特異的に優れた抗腫瘍効果が得られ、かつ重篤な副作用は認められなかった。また、PDT 施行時の腫瘍局所内温度上昇は軽度で、温熱効果は認められなかった。KK-47 細胞に対する殺細胞効果の検討では、殺細胞効果は照射エネルギー量よりも PHE の濃度に依存的に上昇した。10μg/ml の PHE を投与し、5J/cm²のレーザー光を照射した KK-47 細胞の DNA 電気泳動では、ラダー状の DNA の断片化が認められ、この断片化は経時的に増強した。以上の結果より、PHE と EDL を用いた PDT は浸潤性膀胱癌患者に対しても臨床応用できる治療法であると考えられた。また、その殺細胞機序へのアポトーシスの関与が示唆された。

Key words polyhematoporphyrin ethers/esters, excimer dye laser, photodynamic therapy, apoptosis

腫瘍組織に特異的に集積し、光エネルギーにより励起され、殺細胞効果を示す光感受性物質と、レーザー光を用いた光力学的癌治療 (photodynamic therapy, PDT) は、早期の肺癌、食道癌、胃癌、子宮頸癌および表在性膀胱癌などに対して、組織型にかかわらず臨床的に高い奏効率が得られている¹⁾²⁾。しかし、この治療法を組織深達度の高い有効な治療法として臨床応用するためには、より新しい光感受性物質の研究、組織透過性の優れたレーザー光照射装置の開発、さらに光感受性物質の副作用である皮膚光線過敏症の制御など、今後に残された課題も多い。今回、腫瘍組織への親和性が高いポルフィリン化合物であるポリヘマトポルフィリン エーテル/エステル (polyhematoporphyrin ethers/esters, PHE) と波長 630±5nm のパルスレーザー光を発振するエキシマ・ダイ・レーザー (excimer dye laser, EDL) を用い、マウス実験腫瘍およびヌードマウス可移植性ヒト腫瘍に対する PDT の抗腫瘍効果を検討した。さらに、ヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 を用いた PDT の殺細胞効果の評価を行うとともに、その殺細胞機序に関しても検討した。

材料および方法

1. マウス実験腫瘍およびヌードマウス可移植性ヒト腫瘍に対する PDT の検討

1. 実験動物

5週齢雌性の ICR マウス、BDF₁ マウスおよび CD-1 (ICR) ヌードマウス [CD-1nu/nu] を用いた。ICR マウスは日本クレア (東京) より、BDF₁ マウスおよび CD-1 ヌードマウスは日本チャールズリバー (厚木) より購入した。マウスは無病原体飼育条件下 (specific pathogen-free, SPF)、皮膚光線過敏症を避けるために、飼育室内の照明を20ルクス以下に調整して飼育した。

2. 腫瘍細胞

マウス肉腫サルコーマ180細胞は、ICR マウスの腹腔内で継代維持した。実験に際しては、ICR マウスの腹腔内より腫瘍細胞を無菌的に採取後、細胞浮遊液を作製し、ICR マウスの右鼠蹊部皮下に 5×10⁶ 個/0.05ml の腫瘍細胞を移植し、固形腫瘍を作製した。

平成5年12月17日受付, 平成6年1月25日受理

Abbreviations: ADL, argon dye laser; AlPcCl, chloroaluminum phthalocyanine; EDL, excimer dye laser; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FBS, fetal bovine serum; HpD, hematoporphyrin derivative; IR, inhibition ratio; MTT, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide; OD₅₄₀, optical density at

マウス Lewis 肺癌細胞は、C57BL/6 マウスの皮下で継代維持した。腫瘍を摘出後細切して、BDF₁ マウスの皮下にトロッカー針を用いて移植し、固形腫瘍を作製した。

ヒト線維肉腫由来培養細胞 HT-1080 細胞とヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 細胞は、10% (v/v) 非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (GIBCO, Grand Island, USA) と抗生物質 (ペニシリン G 100U/ml, ストレプトマイシン 100μg/ml) を含有した RPMI-1640 培地 (ニプロ, 大阪) 中で継代維持した。CD-1 ノードマウスの右鼠蹊部皮下に HT-1080 細胞または KK-47 細胞を 3×10^6 個/0.1ml 移植し、固形腫瘍を作製した。

3. 使用薬剤

PHE (Photofrin II, 日本レダリー, 東京) は、5% 注射用ブドウ糖液に溶解し、マウスの尾静脈より各種濃度の PHE を体重 10g につき 0.1ml 静脈内投与した。

4. レーザー光照射装置

レーザー光照射装置は EDL (PDT-EDL-1, 浜松ホトニクス, 浜松) を使用した。光源から直径 400μm のクォーツファイバーを通して、波長 630 ± 5 nm, パルス幅 8nsec のパルスレーザー光を発振数 40 または 80Hz で誘導し、腫瘍への照射面の直径を 15mm に設定した。マウスをペントバルビタールにて麻酔後、移植された皮下腫瘍に対して垂直方向にレーザー光照射を行った。腫瘍周辺部は、皮膚光線過敏症を避けるためにアルミホイルで遮蔽した。

5. PHE の至適投与量の設定

PHE の至適投与量を決定する目的で、PHE 投与後のレーザー光照射時期と照射エネルギー量を一定にして以下の実験を行った。ICR マウスにサルコーマ180細胞を移植 7 日後、腫瘍径が 5~8mm になった時点で、PHE を 1, 5, 25mg/kg の投与量で静脈内投与した。PHE 投与48時間後にレーザー出力 4mJ/パルス、照射エネルギー量 100J/cm² の条件で、移植部に形成された固形腫瘍に対してレーザー光照射を行った。一群 6 匹を用い、効果判定は、PHE 投与35日後の固形腫瘍の完全消失の有無で行った。

6. 至適照射エネルギー量の設定

至適照射エネルギー量を決定する目的で、PHE の投与量と PHE 投与後のレーザー光照射時期を一定にして以下の実験を行った。PHE の投与量は、5. の実験結果 (結果は成績の項で示す) に基づき、25mg/kg とした。ICR マウスにサルコーマ180細胞を皮下移植後、腫瘍径が 5~8mm になった時点で、PHE を 25mg/kg の投与量で静脈内投与した。PHE 投与48時間後に、レーザー出力 4mJ/パルス、照射エネルギー量を 50 および 100J/cm² として、固形腫瘍に対してレーザー光照射を行った。一群 6 匹を用い、PHE 投与直後より経日的に固形腫瘍の長径と短径を計測し、以下の近似式より腫瘍容積を算出して、腫瘍増殖曲線を作成した。効果判定は Battelle Columbus 法³⁾ に従い行った。

$$V (\text{mm}^3) = (L \times W^2) \times 1/2$$

V, 腫瘍容積; L, 腫瘍の長径; W, 腫瘍の短径。

7. レーザー光の至適照射時期の設定

レーザー光の至適照射時期を決定する目的で、PHE の投与量、照射エネルギー量を一定にして以下の実験を行った。5. および 6. の実験結果 (結果は成績の項で示す) に基づき、PHE 25mg/kg、照射エネルギー量 50J/cm² を用いた。ICR マウスにサルコーマ180細胞を皮下移植後、腫瘍径が 5~8mm になった時点で、PHE を 25mg/kg の投与量で静脈内投与した。PHE 投与24, 48, 72時間後に、レーザー出力 4mJ/パルス、照射エネルギー量 50J/cm² の条件で、固形腫瘍に対してレーザー光照射を行った。一群 6 匹を用い、PHE 投与直後より経日的に固形腫瘍の長径と短径を計測し、前項 6. で示した近似式を用いて腫瘍容積を算出し、腫瘍増殖曲線を作成した。効果判定は、Battelle Columbus 法³⁾ に従い行った。

8. マウス Lewis 肺癌固形腫瘍に対する PDT の効果

マウス Lewis 肺癌については、PDT の抗腫瘍効果の検討に加えて、安全性についても検討した。BDF₁ マウスに細切したマウス Lewis 肺癌腫瘍を移植 7 日後、腫瘍径が 5~8mm になった時点で、PHE を 25mg/kg または 50mg/kg の投与量で静脈内投与した。PHE 投与48時間後に、レーザー出力 4mJ/パルス、照射エネルギー量 100J/cm² の条件で、固形腫瘍に対してレーザー光照射を行った。25mg/kg 投与群は一群 6 匹、50mg/kg 投与群は一群 8 匹として、PHE の効果と安全性を検討した。PHE 投与直後より経日的に固形腫瘍の長径と短径を計測し、6. で示した近似式を用いて腫瘍容積を算出し、腫瘍増殖曲線を作成した。効果判定は、6. と同様に行った。

9. ノードマウス可移植性ヒト腫瘍に対する PDT の効果

ノードマウス可移植性腫瘍であるヒト線維肉腫 HT-1080 およびヒト膀胱癌 KK-47 に対する PDT の抗腫瘍効果について検討した。サルコーマ180固形腫瘍を用いた 5., 6., 7. の実験結果 (結果は成績の項で示す) に基づき、PDT を行った。すなわち、CD-1 ノードマウスの皮下に移植した腫瘍径が 5~8mm になった時点で、PHE を 25mg/kg の投与量で静脈内投与した。PHE 投与48時間後に、レーザー出力 4mJ/パルス、照射エネルギー量 50J/cm² の条件で、固形腫瘍に対してレーザー光照射を行った。一群 6 匹を用い、PHE 投与直後より経日的に固形腫瘍の長径と短径を計測し、効果判定は 6. と同様に行った。

10. 腫瘍局所加温の影響に関する検討

PDT による腫瘍局所への温熱効果の有無について検討した。ICR マウスにサルコーマ180細胞を移植 7 日後、腫瘍径が 5~8mm になった時点で、PHE を 25mg/kg の投与量で静脈内投与した。PHE 投与48時間後に 4mJ/パルスのレーザー出力で、固形腫瘍に対してレーザー光照射を行った。レーザー光照射の際に、固形腫瘍内にサーミスタープローブを穿刺して、経時的に温度測定を行った。

11. 病理組織学的検討

PHE と EDL を用いた PDT の至適条件下における腫瘍組織の経時的な組織像の変化について検討した。

サルコーマ180細胞を ICR マウスに移植後、腫瘍径が 5~8mm になった時点で、PHE を 25mg/kg の投与量で静脈内投与した。PHE 投与48時間後にレーザー出力 4mJ/パルス、照射エネルギー量 50J/cm² の条件で、固形腫瘍に対してレーザー光照射を行った。PDT 施行後、経日的に腫瘍組織を摘出し、

10%ホルマリンにて固定後、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い光学顕微鏡下で観察した。

II. KK-47 細胞を用いた試験管内 (*in vitro*) での PDT の検討

1. KK-47 細胞を用いた PDT の殺細胞効果の検討

PDT の殺細胞機序を明らかにする目的で、まず試験管内における PDT の殺細胞効果について検討した。生細胞数の判定は、Carmichael ら⁴⁾の方法に準じ、生細胞の脱水素酵素の還元能を指標とする 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 法を用いた。

KK-47 細胞を 180 μ l の 10% FBS 加 RPMI-1640 中に 4.5×10^3 個浮遊するように調整し、96マイクロウェルプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) の各ウェルに 180 μ l ずつ分注した。最終濃度が 0–20 μ g/ml になるように調整した PHE を各々 20 μ l 分注し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で 24時間培養した。PHE を含む 10% FBS 加 RPMI-1640 を吸引除去後、200 μ l の 10% FBS 加 RPMI-1640 を新たに分注し、レーザー出力 4mJ/パルス、照射エネルギー量 0–40J/cm² の条件で、レーザー光照射を行った。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で 24時間培養後、0.15M リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4) (phosphate-buffered saline, PBS) (和光純薬、大阪) にて 2mg/ml に溶解した MTT (Sigma, St. Louis, USA) を 25 μ l 各ウェルに加え、さらに 4時間培養した。培地を吸引除去後、ジメチルスルフォキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) (和光純薬) を 200 μ l 各ウェルに加え、生成した MTT-フォルマゼンを溶解した。各試料はマイクロプレート用分光高度計 (ImmunoReader NJ-2000, 日本インターメッド、東京) を用いて、波長 540nm における吸光度 (optical density at 540nm, OD₅₄₀) を測定した。

効果判定は、測定した吸光度の結果に基づき、次式より算出した増殖抑制率 (inhibition ratio, IR) にて評価した。

$$IR (\%) = (1 - T/C) \times 100$$

T, PDT 施行群の平均 OD₅₄₀ 値; C, 対照群の平均 OD₅₄₀ 値。

2. DNA 電気泳動による検討

PDT による DNA の断片化誘発作用を、試験管内で PDT を行った細胞の DNA 電気泳動により検討した。

Agarwal ら⁵⁾は、増殖抑制率が90%になる条件下の PDT において、DNA の断片化が見られたと報告している。II. の1.での検討結果より、PHE 濃度を 10 μ g/ml、照射エネルギー量を 5J/cm² とした場合に、増殖抑制率が93.3%であったことから、この治療条件下に PDT を施行後、処理細胞の DNA 電気泳動を行った。

KK-47 細胞を 3ml の 10% FBS 加 RPMI-1640 中に 2×10^6 個浮遊するように調整し、35mm ペトリディッシュに 3ml 分注した。最終濃度が 10 μ g/ml になるように調整した PHE を 30 μ l ずつ、それぞれのディッシュに加え、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の条件下で 24時間培養した。PHE を含む 10% FBS 加 RPMI-1640 を吸引除去後、3ml の 10% FBS 加 RPMI-1640 を新たにに加え、5J/cm² の照射エネルギー量で、レーザー光照射を行った。レーザー光照射直後、6、12、24時間後に培養細胞をトリプシン処理にてペトリディッシュから剥離し、剥離細胞を含んだ培養液を 800回転で 5分間遠心した。DNA の抽出は、Echhardt⁶⁾の方法

に準じて以下のごとく施行した。すなわち、上清を吸引除去後、ペレット状になった細胞に 10mg/ml RNA 分解酵素 (RNase) (Sigma), 15% フィコール 70 (Ficoll 70) (Sigma), および 0.01% ブロモフェノールブルー (bromophenol blue) (和光純薬) を含んだ 89mM Tris-ホウ酸緩衝液 (pH8.0)–2.5mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) (Tris-borate-EDTA, TBE) 溶液を 50 μ l 加えた。10サンプルブラグキャスター (日本バイオラッド、東京) の各ウェルに、1.25mg/ml のプロテイナーゼ K (proteinase K) (和光純薬)、10% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate), および TBE 溶液を含んだ 0.8% 低融点アガロースゲル (low melting temperature agarose gel) (FMC BioProducts, Rockland, USA) を 50 μ l 分注後、剥離細胞を含んだ TBE 溶液を 50 μ l 加え、50 $^{\circ}$ C で 4時間加温し、除蛋白および RNA の分解を行った。各サンプルを 2% アガロースゲル (agarose gel) (宝酒造、京都) にて、20V 1時間、さらに 90V 3時間の電気泳動を行った後、100ml Tris-EDTA (TE) 緩衝液 (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0) 中でゲルを一晩洗浄した。0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイド (ethidium bromide) を含む蒸留水でゲルを30分間染色後、紫外線照射器 UV トランスイルミネーター (フナコシ薬品、東京) 上でゲルをポラロイドカメラを用いて撮影した。

III. 統計学的検討

成績は平均値±標準誤差または平均値で示した。多群間の平均値の差の検定には、一元配置分散分析後、Duncan の多重比較法を用い、危険率が 5% 以下である場合を有意とした。

成 績

I. サルコーマ180固形腫瘍を用いたPDTの至適条件の検討

1. PHE の至適投与量

PHE 1mg/kg 投与群および 5mg/kg 投与群では、いずれも腫瘍の完全消失が認められたマウスはなかった。一方、PHE 25mg/kg 投与群では、6匹中2匹に腫瘍の完全消失が認められたことより、25mg/kg を PHE の至適投与量とした。

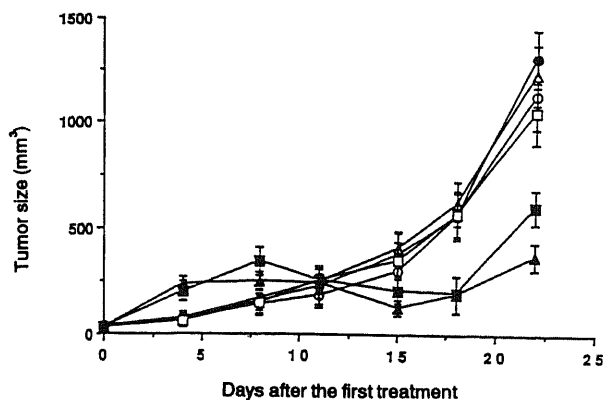


Fig. 1. Photodynamic effect of polyhematoporphyrin ethers/esters (PHE) and the excimer dye laser (EDL) on growth of Sarcoma 180 cells transplanted into ICR mice. ICR mice bearing Sarcoma 180 tumor were treated with PHE at a dose of 25 mg/kg and EDL at different light doses. ○, control; ●, PHE 25 mg/kg alone; △, EDL 50 J/cm² alone; □, EDL 100 J/cm² alone; ▲, PHE 25 mg/kg and EDL 50 J/cm²; ■, PHE 25 mg/kg and EDL 100 J/cm². Each value represents the mean±SE (n=6).

2. 至適照射エネルギー量

至適照射エネルギー量の検討では、 $50\text{J}/\text{cm}^2$ 群と $100\text{J}/\text{cm}^2$ 群との間に、明らかな抗腫瘍効果の差は認められなかった(図1)。照射面の直径を15mmとした場合、80Hzの発振数で $50\text{J}/\text{cm}^2$ の照射に要する時間は4分40秒で、 $100\text{J}/\text{cm}^2$ の照射に要する時間は9分20秒であることから、麻酔の覚醒の影響や照射時間を考えて $50\text{J}/\text{cm}^2$ を至適照射エネルギー量とした。

3. レーザー光の至適照射時期

PDTによる抗腫瘍効果は、照射時期にかかわらず、ほぼ同程度であったが、48時間後にレーザー光を照射した群において、比較的強い抗腫瘍効果が認められた(図2)。このため、PHEの投与後48時間を、レーザー光照射の至適時期とした。

以上より、 $25\text{mg}/\text{kg}$ のPHEを静脈内投与48時間後に、レー

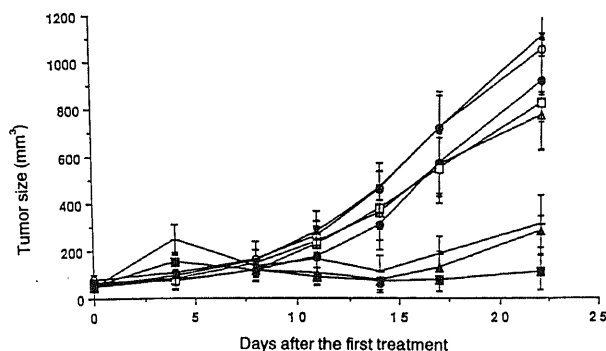


Fig. 2. Photodynamic effect of PHE and EDL on Sarcoma 180 cells transplanted into ICR mice. ICR mice bearing Sarcoma 180 tumor were treated with EDL at different timings of photoirradiation after the administration of PHE. ○, control; ●, PHE $25\text{mg}/\text{kg}$ alone; △, EDL $50\text{J}/\text{cm}^2$ alone 24 hr after the administration of PHE; □, EDL $50\text{J}/\text{cm}^2$ alone 48 hr after the administration of PHE; ×, EDL $50\text{J}/\text{cm}^2$ alone 72 hr after the administration of PHE; ▲, PHE $25\text{mg}/\text{kg}$ and EDL $50\text{J}/\text{cm}^2$ 24 hr after the administration of PHE; ■, PHE $25\text{mg}/\text{kg}$ and EDL $50\text{J}/\text{cm}^2$ 48 hr after the administration of PHE; +, PHE $25\text{mg}/\text{kg}$ and EDL $50\text{J}/\text{cm}^2$ 72 hr after the administration of PHE. Each value represents the mean $\pm$ SE ($n=6$).

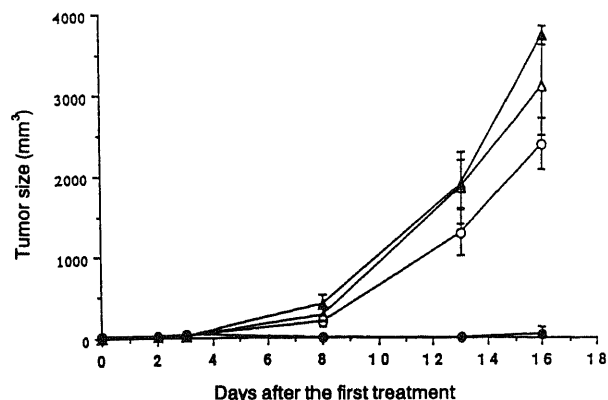


Fig. 3. Photodynamic effect of PHE and EDL on growth of murine Lewis lung carcinoma cells transplanted into BDF₁ mice. ○, control; ▲, PHE $25\text{mg}/\text{kg}$ alone; △, EDL $100\text{J}/\text{cm}^2$ alone; ●, PHE $25\text{mg}/\text{kg}$ and EDL $100\text{J}/\text{cm}^2$. Each value represents the mean $\pm$ SE ($n=6$).

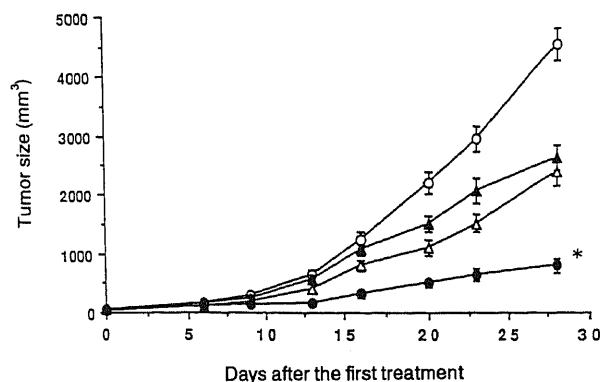


Fig. 4. Photodynamic effect of PHE and EDL on growth of HT-1080 fibrosarcoma cells transplanted into nude mice. ○, control; ▲, PHE $25\text{mg}/\text{kg}$ alone; △, EDL $50\text{J}/\text{cm}^2$ alone; ●, PHE $25\text{mg}/\text{kg}$ and EDL $50\text{J}/\text{cm}^2$. Each value represents the mean $\pm$ SE ($n=6$). *, $P<0.05$ vs. control by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison.

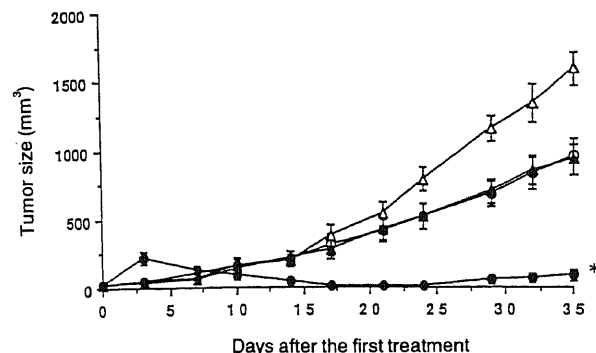


Fig. 5. Photodynamic effect of PHE and EDL on growth of KK-47 bladder cancer cells transplanted into nude mice. ○, control; ▲, PHE $25\text{mg}/\text{kg}$ alone; △, EDL $50\text{J}/\text{cm}^2$ alone; ●, PHE $25\text{mg}/\text{kg}$ and EDL $50\text{J}/\text{cm}^2$. Each value represents the mean $\pm$ SE ($n=6$). *, $P<0.05$ vs. control by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison.

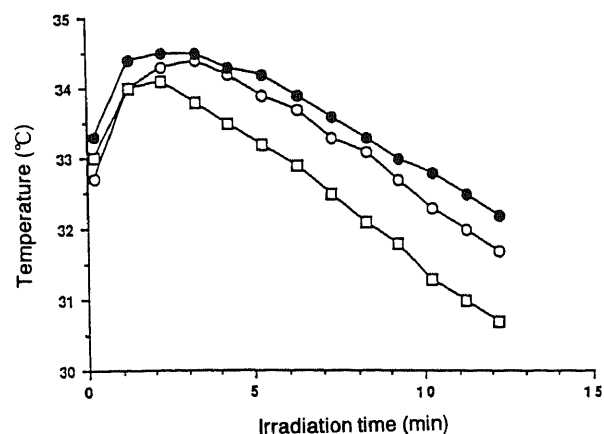


Fig. 6. Changes in the intratumor temperature of Sarcoma 180 tumor during photoirradiation. ICR mice bearing Sarcoma 180 tumor were treated with EDL at a power density of 160mW or 320mW after the administration of PHE at a dose of $25\text{mg}/\text{kg}$. ○, EDL (320mW) alone; ●, PHE $25\text{mg}/\text{kg}$ and EDL (320mW); □, PHE $25\text{mg}/\text{kg}$ and EDL (160mW).

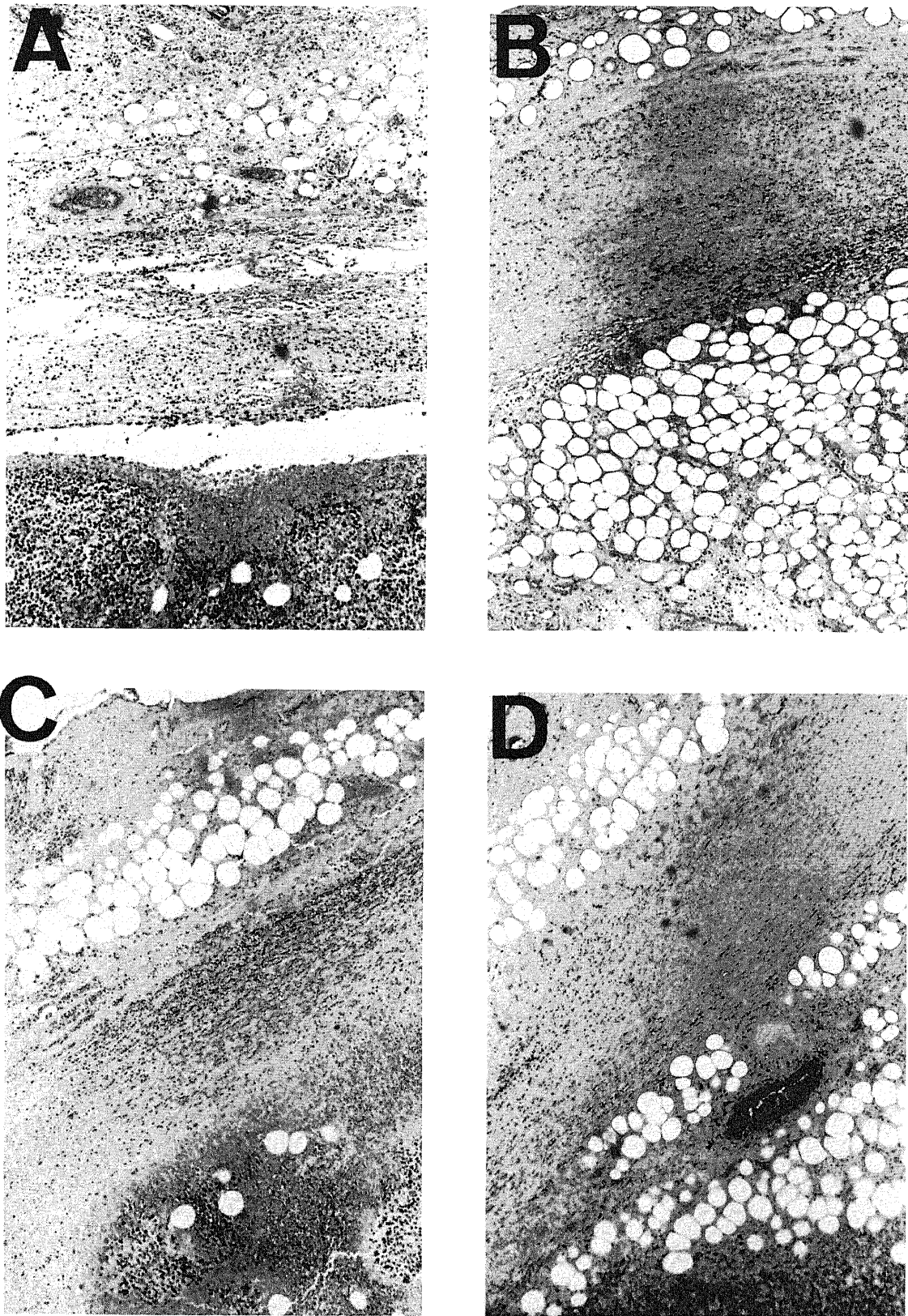


Fig. 7. Histological photomicrographs of Sarcoma 180 in ICR mice treated with PDT. ICR mice bearing Sarcoma 180 tumor were treated with EDL at a total light dose of 50 J/cm^2 48 hr after the administration of PHE at a dose of 25 mg/kg . Tumors were excised on day 1 (A, $\times 40$), day 2 (B, $\times 40$), day 3 (C, $\times 40$) and day 7 (D, $\times 40$) after PDT.

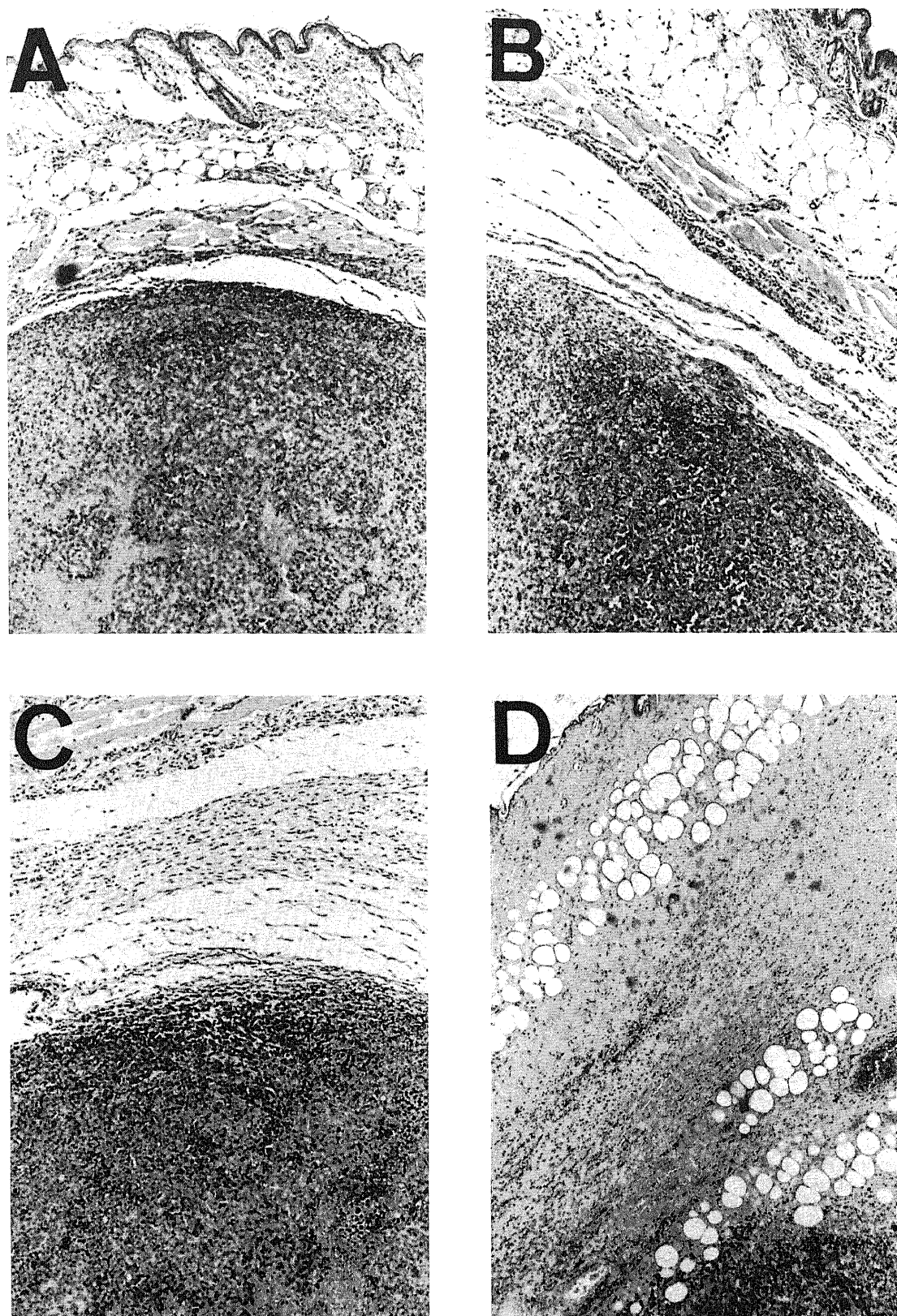


Fig. 8. Histological photomicrographs of Sarcoma 180 in ICR mice untreated, and treated with PHE alone, laser irradiation alone and PDT. Tumors were excised on day 7 after the treatment. A, untreated control ($\times 40$); B, PHE alone ($\times 40$); C, laser irradiation alone ($\times 40$); D, PDT ($\times 40$).

レーザー出力 4mJ/パルス, 照射エネルギー量 50J/cm² でのレーザー光照射を, 以下の実験条件として用いた。

Ⅱ. マウス Lewis 肺癌固形腫瘍に対する PDT の効果

マウス Lewis 肺癌は, PHE 25mg/kg 投与群と 50mg/kg 投与群に分け, レーザー出力 4mJ/パルス, 照射エネルギー量 100J/cm² の条件で PDT を施行した。図 3 に対照群, PHE 25mg/kg 単独投与群, レーザー光単独照射群, および PDT 施行群 (PHE 25mg/kg+EDL 100J/cm²) の腫瘍増殖曲線を示す。PHE 単独投与群およびレーザー光単独照射群では抗腫瘍効果は認められなかったが, PDT 施行群で強い相乗効果が認められ, 6 例中 5 例に腫瘍の消失が認められた。残りの 1 例は腫瘍縮小後に再増殖した。PHE 50mg/kg 投与群では, 8 例中 4 例が PDT 施行 5 日後に死亡した。残りの 4 例は生存し, 全例腫瘍の消失が認められた。

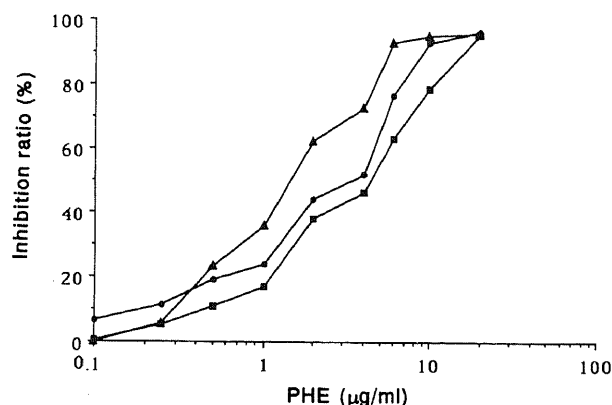


Fig. 9. Photodynamic cell killing effect of PHE and EDL on KK-47 cells. The cells were incubated with graded doses of PHE for 24 hr and exposed to EDL at different total light doses. ■, EDL 2.5 J/cm²; ●, EDL 5 J/cm²; ▲, EDL 10 J/cm². Inhibition ratio (IR) was calculated by the following formula: $IR (\%) = (1 - T/C) \times 100$, where C was the mean OD₅₄₀ value of the control group and T was that of the treated group.

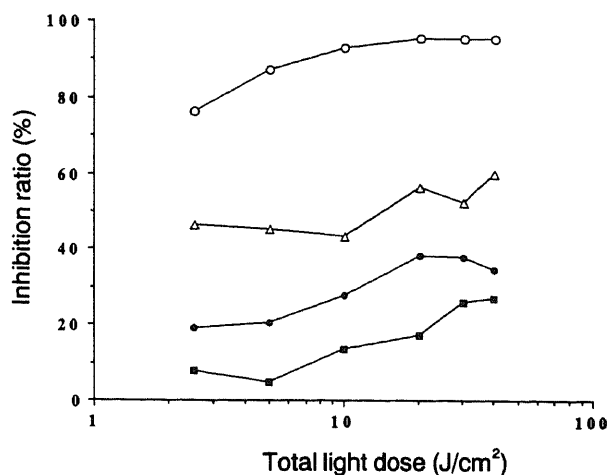


Fig. 10. Photodynamic cell killing effect of PHE and EDL on KK-47 cells. The cells were incubated at different doses of PHE and exposed to graded doses of EDL. ■, PHE 0.3 μg/ml; ●, PHE 1.0 μg/ml; △, PHE 3.0 μg/ml; ○, PHE 10 μg/ml. Inhibition ratio (IR) was calculated by the following formula: $IR (\%) = (1 - T/C) \times 100$, where C was the mean OD₅₄₀ value of the control group and T was that of the treated group.

Ⅲ. ノドマウス可移植性ヒト腫瘍に対する PDT の効果

1. HT-1080 固形腫瘍に対する PDT の効果

PDT 施行 28 日後で, PHE 単独投与群およびレーザー光単独照射群では, 対照群に比し, それぞれ 42%, 47% の腫瘍増殖抑制率が得られた。これに対し, PDT 施行群では, 83% の腫瘍増殖抑制率が得られた (図 4)。

2. KK-47 固形腫瘍に対する PDT の効果

PHE 単独投与群およびレーザー光単独照射群では, 対照群と同様の腫瘍増殖を示したが, PDT 施行群では, PDT 施行後 35 日目で 78% の腫瘍増殖抑制率が得られた (図 5)。

Ⅳ. 腫瘍局所加温の影響について

サルコーマ 180 固形腫瘍を用いたレーザー光照射による腫瘍内温度変化の検討では, 腫瘍内温度はレーザー光照射と同時に上昇し, 照射後 2 分でプラトー状態となり, その後は徐々に低下した (図 6)。しかしながら, 温熱効果が期待できる 43℃ 以上の温度上昇は認められなかった。

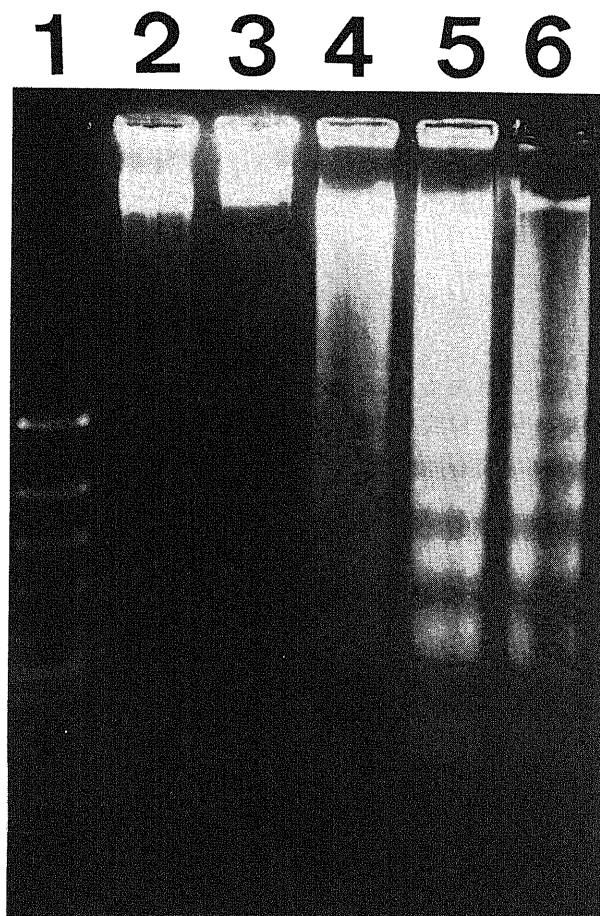


Fig. 11. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from KK-47 bladder cancer cells treated with EDL at a total light dose of 5 J/cm² after incubation with PHE 10 μg/ml for 24 hr. Lane 1, ΦX174/Hinc II digest; lane 2, DNA extracted from untreated cells; lane 3, DNA extracted from cells just after PDT; lane 4, DNA extracted from cells 6 hr after PDT; lane 5, DNA extracted from cells 12 hr after PDT; lane 6, DNA extracted from cells 24 hr after PDT.

V. 病理組織学的検討

PDT 施行後 1 日目から、皮下組織の変性壊死および腫瘍組織への好中球やリンパ球の浸潤が認められ、2 日目には腫瘍組織の壊死像が出現した。7 日目には広範な腫瘍組織の壊死像が認められた (図 7)。一方、PHE 単独投与群およびレーザー光単独照射群では、処置後 7 日目においても、腫瘍組織には全く変化は認められなかった (図 8)。

VI. KK-47 細胞に対する PDT の効果

PHE 濃度に依存して、増殖抑制率の上昇が認められた (図 9)。これに対し、照射エネルギー量を増加しても、増殖抑制率の有意の上昇は認められなかった (図 10)。

VII. PDT による DNA の断片化の誘発

図 11 に、PDT 施行後の KK-47 細胞の DNA について電気泳動を行った結果を示す。レーザー光照射 6 時間後から DNA の断片化を示すラダー (ladder) パターンが認められるようになり、12 時間後、24 時間後にはラダーパターンはさらに顕著となった。

考 察

PDT とは、腫瘍親和性の高い光感受性物質を予め投与後、腫瘍部に光照射を行い光力学的反応を発生させることにより腫瘍組織の選択的破壊をはかるものである。1960 年、Lipson ら⁷⁾は、ヘマトポルフィリン塩酸塩を氷酢酸と濃硫酸で処理して、さらに腫瘍親和性が高くかつ毒性の少ないヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivative, HpD) を合成し、PDT を行った。従来 HpD の励起光として、水銀アーク灯、キセノンアーク灯などが用いられてきたが⁸⁾、HpD を高効率に励起できるアルゴン・ダイ・レーザー (argon dye laser, ADL) が用いられるようになった。上皮内癌 (carcinoma in situ, CIS) を主体とした難治性表在性膀胱癌に対しても、HpD と ADL を用いた PDT が有効な治療法であることが次第に明らかとなった⁹⁾。しかし、HpD は皮膚における残留性が比較的高く、3~4 週間の長期にわたり皮膚光線過敏症発生の可能性があり、ADL は腫瘍深部にまで到達できないという欠点を有している。そのため、今回、HpD に代わるより新しい光感受性物質である PHE と、EDL を用いた PDT の有用性について検討した。PHE は、HpD に比べ、生体内有効成分であるヘマトポルフィリンのエーテルおよびエステル結合による多量体を 80% 以上含有している。腫瘍を皮下移植したマウスを用いた実験では、PHE の腫瘍内濃度は投与 24~48 時間後にピーク値を示し、正常皮膚との濃度比は、3.7 倍になると報告されている¹⁰⁾。HpD の腫瘍内/皮膚濃度比が 2.2~2.8 倍であるのに比べ¹¹⁾、PHE は極めて腫瘍集積性の高い物質であり、皮膚光線過敏症の発生も最小限に抑制されるものと考えられている。EDL は、連続波を発振する ADL と比べ、高出力、高頻度のパルス波を発振する。Okunaka ら¹²⁾は、マウスの皮下移植腫瘍に対して、HpD と ADL を用いた PDT、および HpD と EDL を用いた PDT を施行し、両者の PDT 効果を腫瘍表面からの壊死領域の深さで比較している。その結果、照射エネルギー量を 50 J/cm² と設定した場合、ADL で 4 mm、EDL で 15 mm の腫瘍内深達が得られ、明らかに EDL により優れた組織深達性が得られたと報告している。今回、著者はより腫瘍集積性に優れた PHE と、より組織深達性に優れた EDL を用いて、サルコーマ 180 固形腫瘍、マウス Lewis 肺癌固形腫瘍、ヌードマウス可移植性ヒト腫

瘍 HT-1080 および KK-47 移植腫瘍に対して PDT を施行した。その結果、いずれの組織型の移植腫瘍においても高い抗腫瘍効果が認められ、かつ重篤な副作用も認められなかった。また、マウス Lewis 肺癌固形腫瘍に対する PDT の結果、PHE 50 mg/kg 投与群において、8 例中 4 例 (50%) が PDT 施行 5 日後に死亡しており、副作用の軽減という点から PHE の過剰投与は不必要であると考えられた。さらに、サルコーマ 180 固形腫瘍を用いて病理組織学検討を行った結果、PDT 施行後 2 日で既に腫瘍組織の壊死が出現し、PDT 施行後 7 日には広範な腫瘍壊死像が認められた。以上の結果から、至適条件下で PDT を施行することにより、癌腫または腫瘍の種類に関係なく、いずれも高い抗腫瘍効果が得られ、かつ重篤な副作用が認められなかったことより、集学的癌治療の一つとして、PHE と EDL を用いた PDT は極めて有用と考えられた。EDL と同じく、パルス波を発振する金蒸気レーザー (gold vapor laser) では、レーザー光照射による腫瘍の局所的温熱上昇を伴い、光力学的抗腫瘍効果に温熱効果が加味されている可能性が指摘されている¹³⁾。今回、サルコーマ 180 固形腫瘍を用いた腫瘍局所の加温状態を調べた結果、温熱効果が得られる 43℃ 以上の温度上昇は認められず、EDL を用いた PDT においては、温熱効果の付加的増強は認められず、抗腫瘍効果は純粋に光力学的反応に基づくものであることが明らかとなった。

ヒト膀胱癌細胞 KK-47 を用いた試験管内における実験より、PDT による殺細胞効果は、用いた照射エネルギー量よりも PHE 濃度に依存して増強が認められた。しかし、上述のごとく過剰の PHE 投与により実験動物の死亡率が上昇しており、臨床的に応用する際には至適濃度の設定が極めて重要であると考えられる。光力学的反応のメカニズムとして、タイプ I とタイプ II の二経路が関与していると考えられている。すなわち、通常腫瘍内に集積した基底状態の光感受性物質に光照射を行うと、励起一重項状態の光感受性物質が発生する。励起一重項状態はエネルギー的には不安定であり、一部は蛍光を発して基底状態に戻るが、大部分は無輻射遷移によって、より安定な励起三重項状態に項間交差する。タイプ I では、励起三重項状態から他の分子への電子移動、または水素引き抜きが生じて、色素分子や基質のラジカルが形成され、色素分子のラジカルが酸素と反応することによって、過酸化物 (peroxide)、ヒドロキシラジカル (hydroxyl radical) さらにスーパーオキシドアニオン (superoxide anion) が生成される^{14)~17)}。タイプ II では、励起三重項状態の光感受性物質から基底状態の酸素分子にエネルギー移動が生じ、酸化力の非常に強い一重項酸素 (singlet oxygen) が生成される¹⁸⁾。PDT による細胞破壊は、現在のところ主に光力学的反応のタイプ II によって生成される一重項酸素によるものと考えられている¹⁴⁾。PDT による細胞内標的器官としてはこれまでミトコンドリア、細胞膜、ライソゾームなどが考えられてきているが¹⁹⁾、殺細胞効果に直接的に関与する細胞内標的器官は、未だ確定されていない。試験管内における PDT の研究では、各実験系における細胞と光感受性物質との接触時間の差により、障害が生じる細胞内器官が異なっており、HpD との接触時間が 1 時間以下の実験系では、細胞膜の障害が第一に起こるのに対して、臨床での治療条件に類似する長時間接触の実験系では、細胞質内小器官の障害が起こると報告されている²⁰⁾。近年、PDT による殺細胞機序へのアポトーシス (apoptosis) の関与が注目されるようになり、1991 年、Agarwal ら²¹⁾は L5178Y マウ

スリンパ腫細胞に対して、光感受性物質としてクロロアルミニウムフタロサイアニン (chloroaluminum phthalocyanine, AlPcCl) を用いて PDT を施行し、アポトーシスが認められたことを報告している。アポトーシスは、1972年 Kerr ら²¹⁾により命名された細胞死の形態の一つで、壊死とは異なる能動的細胞死である。形態学的には核膜周囲へのクロマチンの凝集や、核および細胞質の濃縮、断片化が認められ、生化学的には180-200塩基単位 (オリゴヌクレオソーム単位) の DNA の断片化が認められる^{22,23)}。Agarwal ら⁵⁾は、L5178Y マウスリンパ腫細胞を15時間 AlPcCl と共に培養後除去し、光照射を行いその結果を報告している。この実験系では、DNA の断片化現象は、光照射30分後よりすでに出現し、時間の経過と共にその作用は増強している。今回、ヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 を24時間、PHE と共に培養後、PHE を除去し、EDL を用いてレーザー光照射を行った。その結果、レーザー光照射6時間後より DNA の断片化現象が出現し、時間の経過と共に断片化の増強が認められた。今回観察された PDT による DNA の断片化は、時間の経過とともに進行することから、DNA に対する直接的な光化学作用による障害の結果ではなく、エンドヌクレアーゼが関与する酵素反応によるアポトーシス様反応であると考えられる。Agarwal ら⁵⁾の実験と同じく、PHE を臨床での条件に類似する長時間 (24時間) 接触させたことより、生体での PDT による細胞死にもアポトーシスが関与しているものと推察された。今回の検討により、PHE と EDL を用いた PDT は腫瘍非特異的な抗腫瘍効果を示し、かつ至適照射条件下で重篤な副作用が認められなかったことから、浸潤性膀胱癌患者にも臨床応用できる可能性が示唆された。また、PDT の殺細胞機序へのアポトーシスの関与が示唆された。

結 論

PHE と EDL を用いた PDT の有用性について、マウス実験腫瘍およびヌードマウス可移植性ヒト腫瘍を用いて検討した。また、培養細胞を用いた殺細胞機序についても検討し、以下の結果が得られた。

1. 至適照射条件下での PDT では、いずれの腫瘍型の移植腫瘍においても腫瘍非特異的に高い抗腫瘍効果が得られた。
2. 至適照射条件下での PDT では、重篤な副作用は認められなかった。
3. PHE と EDL を用いた PDT では、温熱効果を期待できる43℃以上の温度上昇は得られず、ハイパーサーミアによる抗腫瘍効果増強の関与はみられなかった。
4. 培養細胞を用いた殺細胞効果の検討では、照射エネルギー量よりもむしろ PHE の濃度に依存して殺細胞効果の増強が認められた。
5. PDT 施行後に行った培養細胞の DNA 電気泳動にて、6時間後に DNA の断片化現象が認められ、この断片化現象が経時的に増強したことから、その殺細胞機序にアポトーシスが関与していることが示唆された。
6. PHE と EDL を用いた PDT は、浸潤性膀胱癌患者に対しても臨床応用できる治療法と考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部泌尿器科学教室大川光央助教授ならびに金沢大学がん研究所化学療法部

佐々木琢磨教授に深甚なる謝意を表します。本研究開始にあたり御指導戴きました本学泌尿器科学教室久住治男名誉教授に深く感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、直接御指導、御協力戴きました本学がん研究所化学療法部田中基裕助教授に心より深謝いたします。さらに、御助言と御協力を頂きました本学泌尿器科学教室打林忠雄講師ならびにがん研究所化学療法部遠藤良夫先生に感謝いたします。併せて多大なる御協力を賜りました本学泌尿器科学講座諸兄、ならびにがん研究所化学療法部の皆様に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の一部は、第2回国際光化学治療学会日本支部例会 (1992年、旭川)、第81回日本泌尿器科学会総会 (1993年、京都) において発表した。

文 献

- 1) Dougherty, T. J.: Photosensitization of malignant tumors. *Sem. Surg. Oncol.*, 2, 24-37 (1986).
- 2) Kato, H., Horai, T., Furuse, K., Fukuoka, M., Suzuki, S., Hiki, Y., Ito, Y., Mimura, S., Tenjin, Y., Hisazumi, H. & Hayata, Y.: Photodynamic therapy for cancers: A clinical trial of porfimer sodium in Japan. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84, 1209-1214 (1993).
- 3) Ovejera, A. A., Houchens, D. P. & Barker, A. D.: Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. *Ann. Clin. Labor. Sci.*, 8, 50-56 (1978).
- 4) Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. & Mitchell, J. B.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, 47, 936-942 (1987).
- 5) Agarwal, M. L., Clay, M. E., Harvey, E. J., Evans, H. H., Antunez, A. R. & Oleinick, N. L.: Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res.*, 51, 5993-5996 (1991).
- 6) Eckhardt, T.: A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*, 1, 584-588 (1978).
- 7) Lipson, R. L., Baldes, E. J. & Olsen, A. M.: The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J. Natl. Cancer Inst.*, 26, 1-8 (1961).
- 8) Kelly, J. F., Snell, M. E. & Berenbaum, M. C.: Photodynamic destruction of human bladder carcinoma. *Br. J. Cancer*, 31, 237-244 (1975).
- 9) 久住治男, 打林忠雄, 平田昭夫: 表在性膀胱癌に対する光力学的治療. *Biotherapy*, 5, 560-567 (1991).
- 10) Fingar, V. H. & Henderson, B. W.: Drug and light dose dependence of photodynamic therapy: A study of tumor and normal tissue response. *Photochem. Photobiol.*, 46, 837-841 (1987).
- 11) 久住治男, 平田昭夫, 打林忠雄, 内藤克輔, 三好憲雄: 光力学的治療 (Photodynamic Therapy) における新しい光感受性物質; フタロサイアニンについて. *癌と化学療法*, 17, 1120-1126 (1990).
- 12) Okunaka, T., Kato, H., Konaka, C., Sakai, H., Kawabe, H. & Aizawa, K.: A comparison between argon-dye and excimer-dye laser for photodynamic effect in transplanted mouse tumor. *Jpn. J. Cancer Res.*, 83, 226-231 (1992).
- 13) 久住治男, 山本 肇, 越田 潔, 中嶋和喜, 内藤克輔, 三

崎俊光, 谷本能文, 伊藤道也: 光力学的癌治療における金蒸気レーザーの有用性に関する実験的研究. 日本ハイパーサーミア誌, 2, 82-95 (1986).

14) Weishaupt, K. R., Gomer, C. J. & Dougherty, T. J.: Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer Res.*, 36, 2326-2329 (1976).

15) Buettner, G. R. & Need, M. J.: Hydrogen peroxide and hydroxyl free radical production by hematoporphyrin derivative, ascorbate and light. *Cancer Lett.*, 25, 297-304 (1985).

16) Hariharan, P. V., Courtney, J. & Eleczko, S.: Production of hydroxyl radicals in cell systems exposed to haematoporphyrin and red light. *Int. J. Radiat. Biol.*, 37, 691-694 (1980).

17) Van Steveninck, J., Tijssen, K., Boegheim, J. P. J., Van Der Zee, J. & Dubbelman, T. M. A. R.: Photodynamic generation of hydroxyl radicals by hematoporphyrin derivative and light. *Photochem. Photobiol.*, 44, 711-716 (1986).

18) Foote, C. S.: Mechanisms of photooxygenation. *In* D.

R. Doiron & C. J. Gomer (eds.), *Porphyrin Localization and Treatment of Tumors*, p3-18, Alan R. Liss, Inc., New York, 1984.

19) Hilf, R., Murant, R. S., Narayanan, U. & Gibson, S. L.: Relationship of mitochondrial function of cellular adenosine triphosphate levels to hematoporphyrin derivative-induced photosensitization in R3230AC mammary tumors. *Cancer Res.*, 46, 211-217 (1986).

20) Kessel, D.: Photosensitization with derivatives of hematoporphyrin. *Int. J. Radiat. Biol.*, 49, 901-907 (1986).

21) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R.: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239-257 (1972).

22) Wyllie, A. H.: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284, 555-556 (1980).

23) Waring, P., Kos, F. J. & Mullbacher, A.: Apoptosis or programmed cell death. *Med. Res. Rev.*, 11, 219-236 (1991).

Studies on Photodynamic Therapy with Polyhematoporphyrin Ethers/Esters Combined with Excimer Dye Laser
Hiroshi Morishita, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., 103, 310—319 (1994)

Key words polyhematoporphyrin ethers/esters, excimer dye laser, photodynamic therapy, apoptosis

Abstract

This study was carried out to assess the antitumor effect of photodynamic therapy (PDT) using a combination of polyhematoporphyrin ethers/esters (PHE) and the excimer dye laser (EDL) on transplanted murine tumors and human tumors transplanted into nude mice. The cytotoxic effect of PDT on KK-47 cells derived from human bladder transitional cell carcinoma *in vitro* and the mechanism of PDT-induced cell death were also examined. To determine the best conditions for PDT, ICR mice bearing the Sarcoma 180 solid type were treated with PDT using PHE at different doses (1.5 and 25 mg/kg), and the EDL at different timings of photoirradiation after the administration of PHE (24, 48 and 72 hr) and total light doses (50 and 100 J/cm²). High antitumor effects were obtained when mice were treated with the EDL at a total light dose of 50 J/cm² 48 hr after the administration of PHE at a dose of 25 mg/kg. Under these conditions, an equivalent antitumor effect was obtained in transplanted human fibrosarcoma HT-1080 and transplanted human bladder transitional cell carcinoma KK-47. No side effects were seen. No thermal effects induced by photoirradiation were observed, although tumor temperature during photoirradiation showed a slight temperature rise. The cytotoxic effect of PDT on KK-47 cells *in vitro* depends on the concentration of PHE rather than on the laser intensity. Additionally, DNA extracted from KK-47 cells, which were treated by 10 μ g/ml of PHE and 5 J/cm² of laser, was observed as a ladder of DNA fragments by agarose gel electrophoresis. There was increased fragmentation of DNA with time. These findings suggest that PDT with PHE and EDL can be expected to be clinically applicable in the treatment of malignant tumors including invasive growth, and that PDT-induced cell death partly results from apoptosis.