

ヒト膀胱癌由来培養細胞 (KK-47) による光増感剤の 取り込み形態とその細胞の光力学的不活性化

金沢大学医学部泌尿器科学講座 (主任: 久住治男教授)

南 後 修

(平成5年1月26日受付)

ヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivative, HpD) の吸収, 蛍光スペクトルおよび蛍光寿命を含む分光特性をヒト膀胱癌由来培養細胞 (KK-47) 浮遊液中で検定した。HpD を含む培養液で30分間取りこませた後, 細胞を培養液で洗浄したサンプルを用いた。その結果, 遊離 HpD 洗浄後の培養時間の増大とともに HpD 会合体は増加した。また HpD を取り込んだ KK-47 細胞にアルゴン-色素レーザー光 (波長 $630 \pm 5 \text{ nm}$) を照射し, HpD の取り込み様式とレーザー光による細胞の光力学的不活性化の関係をコロニー形成法で求めた。その結果, 細胞の不活性化は取り込み時の細胞外 HpD 濃度の増加と, 遊離 HpD 洗浄後の培養時間の増大に伴い助長された。遊離 HpD 洗浄直後における HpD 分子の緩やかな結合状態に比較して, 培養時間の増大に伴う細胞内での HpD 会合体の安定化が光力学的治療効果の増大に大きく寄与していることが明らかとなった。

Key words photosensitizers, absorption spectra, fluorescence spectra, fluorescence lifetime, aggregation

近年のレーザー技術の急速な進展に伴い, 臨床医学においてもレーザーはその応用の場を広げつつある。なかでも光増感剤投与後のレーザー照射による光力学的治療 (photodynamic therapy, PDT) が各診療科で試みられ, 良好な成績が得られている。しかしながら今後さらに治療効果を向上させるには新たな光増感剤, とくに光増感効率に優れた薬剤の開発が求められている。そのための基礎的研究として, 癌細胞内における光増感剤の分子形態¹⁰⁾が殺細胞効果に及ぼす影響についての検討は重要な意味を持つと考えられる。

そこで今回, 臨床応用試験薬として試用されている光増感剤とヒト膀胱癌由来培養細胞 (KK-47) を使用して以下のような検討を行った。すなわち癌細胞内における光増感剤の分子状態, とりわけ単量体・会合体のいずれの状態をとって細胞内へ取り込まれ, その後変化してゆくのか, その変遷を分光学的検討により明らかにした上で, 光増感剤分子の分子形態の違いによる光増感効率の相違を殺細胞率で検討したので報告する。

ヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivative, HpD) は Lipson ら³⁾により癌の診断に, および Kelly ら⁴⁾により膀胱癌の診断・治療に導入され, Dougherty と彼の共同研究者⁵⁻⁹⁾により他の悪性腫瘍の治療に拡大された。HpD は, その優れた腫瘍内保持能によりポルフィリンの赤色蛍光発光を用いた悪性腫瘍の局在と検出に利用され, また光励起された HpD 分子の有効な殺細胞効果により悪性腫瘍の治療にも使用されている。この治療効果は, 悪性腫瘍組織の方が正常組織に比べて HpD 分子をより多く蓄積する点と, $630 \pm 5 \text{ nm}$ の赤色光照射により生成する励起一重項酸素またはラジカル種の活性酸素が癌細胞を光酸化することによるものである。悪性腫瘍組織

における HpD 分子の取り込みのメカニズムやその分子の細胞内局在部位については, いまだ十分には明らかにされていない。Kessel⁹⁾はネズミの白血病由来培養細胞 L1210 内において, HpD 分子の疎水性構成成分が細胞内に徐々に蓄積すると報告している。Bonnett ら¹⁰⁾は高速液体クロマトグラフィーにより, HpD は複数の成分の混合物であることを明らかにした。Moan ら¹¹⁾は, 光力学的治療において最も有効な HpD の成分は疎水性の物質であると報告している。それ以外にはどの構成物質が腫瘍組織内にどのような分子形態で取り込まれているのか, いまだ明らかにされていないのが現状である。彼らの報告の重要な点のひとつに, 最も有効な HpD の成分は一つのポルフィリン環, 二つのカルボニル基と疎水性基を所有している, とする点があげられる。それぞれの成分単体の光活性にはほとんど大きな違いはないと考えられる。これらの成分が経時的にどのような推移により腫瘍組織あるいは癌細胞内に取り込まれ, 蓄積するのかを解明することは重要であると考えられる。そこで今回は, 光増感剤分子の分子形態の変化が吸収スペクトルあるいは蛍光スペクトル変化に反映されることを利用し, 細胞内における光増感剤分子の分子形態の変化を明らかにする目的で細胞内の光増感色素の分光特性を測定した。

材料および方法

I. 材 料

HpD は Roswell Park 記念研究所 (Buffalo, NY, USA) の T. Dougherty 博士より供与された臨床試験薬を使用した。ハム F-12 培養液 (日水製薬, 東京) は, 吸収スペクトル・蛍光スペクトル・蛍光寿命測定の際に, KK-47 細胞の培養に使用した。

Abbreviations: CMC, critical micelle concentration; CTAB, cetyl trimethyl ammonium bromide; HpD, hematoporphyrin derivative; PBS, phosphate-buffered saline; PDT, photodynamic therapy

イーグル MEM (日水製薬) はレーザー照射による殺細胞効果の検定の際に, KK-47 細胞の培養に使用した. RPMI 1640 培養液 (和光純薬, 大阪) はエーリッヒ腹水癌細胞の培養に使用した. リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) は Dulbecco¹³⁾ の A 液, すなわち塩化ナトリウム 8.0g, 塩化カリウム 0.2g, リン酸 2 ナトリウム無水 1.15g, リン酸 1 カリウム 0.2g を蒸留水 200ml に溶解させたものを用いた.

II. 方法

1. 培養細胞および培養方法

KK-47 細胞系は当教室においてヒト膀胱癌組織から樹立した移行上皮癌細胞株である¹³⁾. 分光学的測定に際しての KK-47 細胞の取り扱いには Miyoshi¹⁴⁾ の方法を用いた. すなわち 10^5 cells/ml 濃度の KK-47 細胞浮遊液 5ml に $200\mu\text{g/ml}$ の HpD を加えて暗所にて 37°C , 3 時間培養し細胞内に HpD を取り込ませた. ついでハム F-12 培養液で 2 回洗浄し遊離 HpD を除去したものを用いた.

エーリッヒ腹水癌細胞は dd 株マウスの腹腔内において増殖させ, RPMI 1640 培養液内にて 37°C , CO_2 ガス培養器で培養を行った.

2. 分光学的測定方法

1) 吸収および蛍光スペクトル測定

HpD の吸収スペクトルは二波長分光光度計 UV-190 型 (島津, 京都) を使用し測定した. 蛍光スペクトルは蛍光分光光度計 850 型 (日立, 東京) を使用して, ローダミン B 溶液でスペクトルを補正した. 蛍光発光スペクトルの励起波長はそれぞれ,

コンピュータにより最大蛍光強度の励起波長を検索して, PBS では 398nm , 界面活性剤 (cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB) ミセル溶液では $400\text{-}403\text{nm}$, KK-47 細胞浮遊液では 408nm とした.

2) 蛍光寿命測定

NAES-400 型蛍光寿命測定装置を用いて蛍光減衰曲線を測定し, 最少自乗反復コンポリューション法によりコンピュータ解析を行い蛍光寿命を算出した.

3. レーザー照射条件

培養皿一枚につき KK-47 細胞 300 個を 10% のウシ血清を含むイーグル MEM 培養液の中, 37°C で 48 時間培養した. その細胞の付着率は 61.9% であった. 血清を含まないイーグル MEM 培養液に種々の濃度の HpD 分子を加え, その溶液で 37°C , 30 分間 KK-47 を培養した. 遊離 HpD を洗浄後, 37°C , 5% の CO_2 ガス培養器で 0, 2, 4 と 6 時間培養した. それぞれの培養皿を 10% のウシ血清を含む培養液で洗浄し, そしてアルゴン色素レーザー光 (波長 $635\pm 5\text{nm}$) で照射し, 細胞を剥すことなく 2 週間培養した. その殺細胞効果はコロニー形成法により検定した. レーザーはアルゴンレーザー 171-07 型 (Spectra Physics, CA, 米国) で色素レーザー 375-03 型 (Spectra Physics) を励起発振した光を使用した.

成 績

1. HpD の吸収スペクトルの比較

異なる溶媒中における HpD の吸収スペクトルを測定し, 比

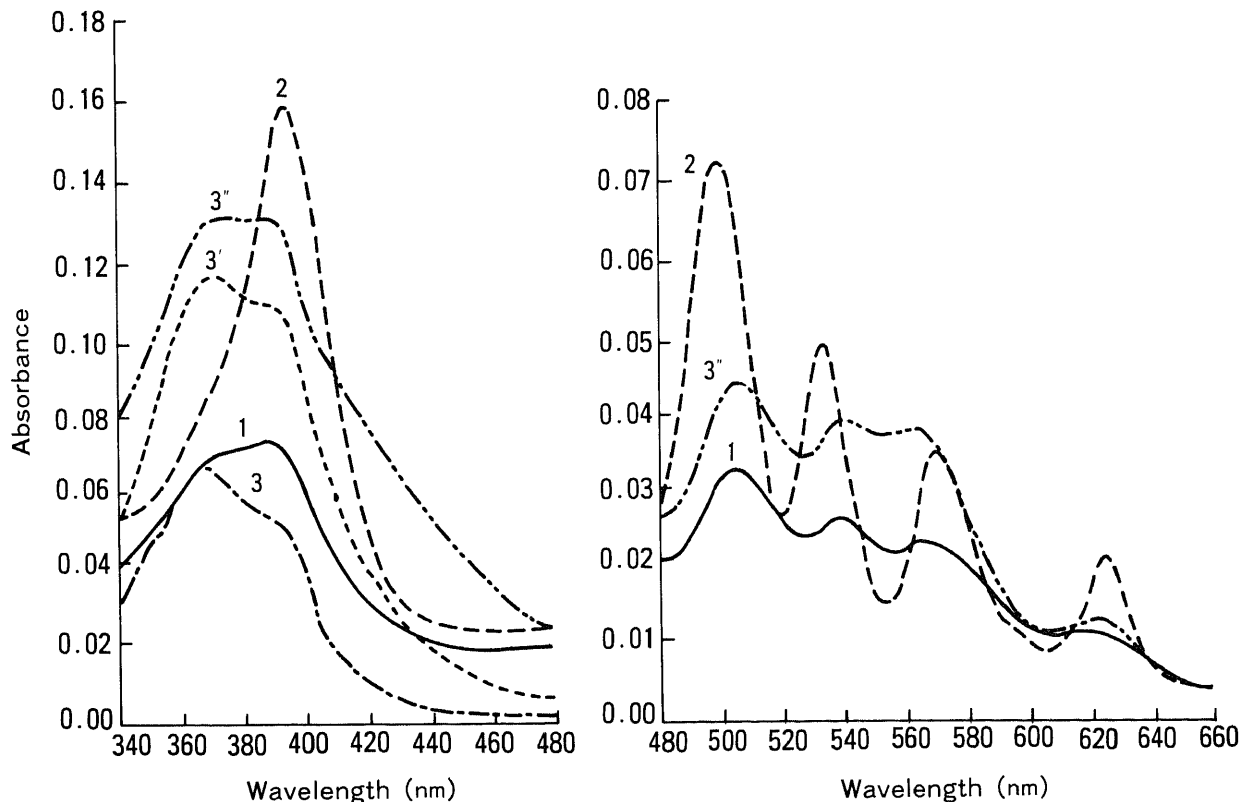


Fig. 1. Absorption spectra of HpD dissolved in various solutions. Curve 1, PBS; curve 2, 10 mM CTAB; curve 3, 10^5 KK-47 cells/ml in PBS; curve 3', 10^4 KK-47 cells/ml in PBS; curve 3'', 10^6 KK-47 cells/ml in PBS. Concentration of HpD in curves 1 and 2 was $6\mu\text{g/ml}$. The KK-47 cells were exposed to $200\mu\text{g/ml}$ HpD for 3 hr, then washed with serum-free Eagle's MEM medium to remove the free-HpD. Thereafter, the cells were incubated for 6 hr.

較を行った(図1). 曲線1は6 μ g/mlのHpDをPBS水溶液に, 曲線2は同濃度のHpDを10mMのCTAB水溶液に溶解させた場合の吸収スペクトルを示すが, 曲線2の402nmにおける吸光度が曲線1に比較して増大した. またPBS水溶液中においては曲線1に示されるとおり370nmにショルダーが認められた. 一方, 可視領域では曲線2における短波長側の2つの吸収極大は, 曲線1に比してさらに短波長側に移動していた.

曲線3, 3'および3''は, KK-47細胞浮遊液における吸収スペクトルを示す. 含まれる細胞数はそれぞれ10⁵, 10⁴, および10³個/mlである. 浮遊細胞内におけるKK-47細胞数が増大するにつれて1細胞あたりのHpD分子の量は減少して, 370nmの吸光度は少々減少するものの370nmのショルダーはいずれにも認められた.

II. HpDの蛍光発光スペクトル

図2における曲線はそれぞれPBS, 0.1mM, 1.0mM, 10mMのCTABミセル溶液中およびKK-47細胞浮遊液中におけるHpD分子の蛍光発光スペクトルである. KK-47細胞内におけるHpD分子の発光極大は634nmと694nmに存在し, それらはPBS水溶液中での発光スペクトル(曲線1)と比較した場合, 約20nmも短波長側に移動していた. また細胞浮遊液中において, 曲線5で示されるごとく670nmに新しく蛍光発光帯が出現した. そこで670nmにおける発光帯を帰属させるために, CTABの濃度を変えて蛍光スペクトルも測定した. 図2の曲線2, 3においては, 670nmに蛍光発光ピークあるいは

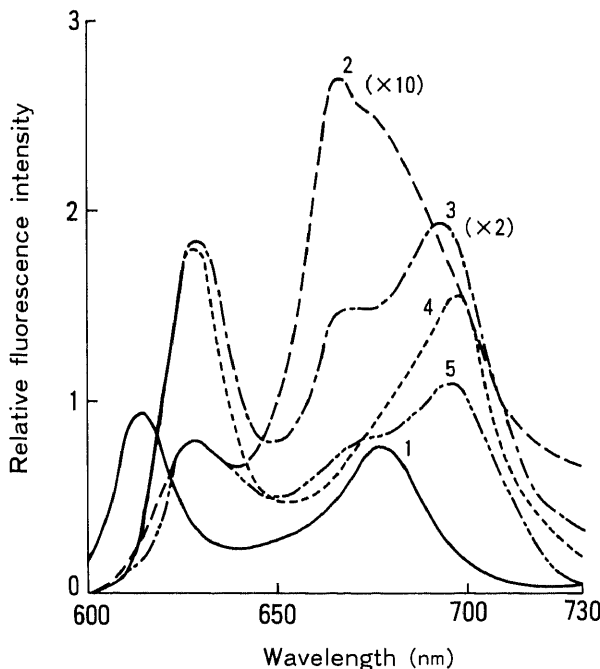


Fig. 2. Fluorescence spectra of HpD dissolved in various solutions. Curve 1, PBS; curve 2, 0.1 mM CTAB; curve 3, 1.0 mM CTAB; curve 4, 10 mM CTAB; curve 5, 10⁵ KK-47 cells/ml suspended in PBS. Concentration of HpD in curves 1, 2, 3, and 4 was 6 μ g/ml. The KK-47 cells were exposed to the same conditions as those in Fig. 1. The excitation wavelength used in various solutions is described in Materials and Methods. The value of curve 2 is described twofold. The value of curve 3 is described tenfold.

ショルダーが出現している. それに対して曲線4においては670nmの発光ピークあるいはショルダーは消失し, 水溶液中の短波長帯における蛍光強度は曲線1で1.24となっている. CTABミセル溶液中の, 長波長側における発光強度に対する短波長側(630nm)における発光強度の比は, CTAB濃度が増すにつれて減少した. 670nmにおけるショルダーは曲線3に示されるごとく, 1.0mM CTABミセル溶液中においても認められた. しかし10mM CTABミセル溶液中では, HpD会合体が正常ミセルの結合効果により単量化するためショルダーは消失していた.

1.0mM CTABミセル溶液中におけるHpDの発光スペクトルパターンが, 遊離HpDを洗浄し除去した後の, 細胞に取りこまれたHpD発光スペクトルパターンによく一致していた. したがって, KK-47細胞内に取りこまれたHpD分子は会合体として存在しているものと考えられた. 10mM CTAB中では短波長側ピークの蛍光強度が大で長波長側ピークの蛍光強度に比べて1.17倍大であった. 一方前期ミセル領域である1.0および0.1mM CTABではその比率はそれぞれ0.95および0.30であった. さらにKK-47ヒト膀胱癌由来浮遊細胞溶液では, その比は0.73であった. 以上より1mM CTAB溶液と生体中の分子環境は類似しているものと推察された.

曲線1と曲線4とを比較した場合, 短波長側と長波長側のピークの値に大きな変化は見られないが曲線4は12nm長波長側に移動している. これはHpD分子の静電的結合により影響をうけているものと考えられる.

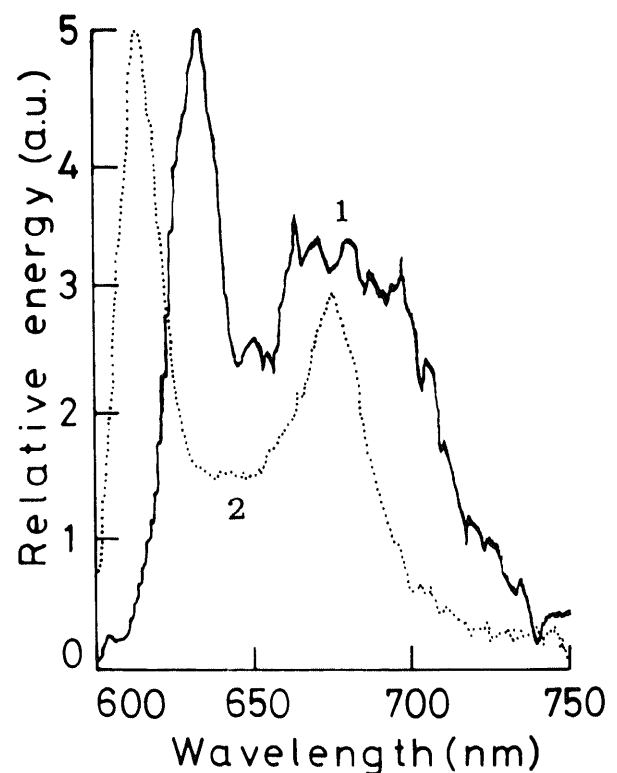


Fig. 3. Fluorescence emission spectra of HpD. Curve 1, Ehrlich ascites tumor cell; curve 2, free-HpD. The incubation time was 3 hr, the incubation temperature was 37 $^{\circ}$ C, and the concentration of HpD was 50 μ g/ml. The excitation wavelength was 405 nm.

Ⅲ. HpD の細胞内・外における発光スペクトルパターン

図3の実線は、エルリッヒの腹水癌細胞を 50 μ g/ml の HpD 培養液中にて37 $^{\circ}$ C, 3時間培養し, 細胞内に取りこませた HpD の蛍光顕微鏡により計測した発光スペクトルパターンを示す. また点線は細胞外水溶液中における HpD の蛍光発光パターンを示す.

水溶液中における短波長側での発光ピークは 612nm であったが, 細胞内における発光ピークは 632nm であった. すなわちここでも HpD が細胞内に取りこまれると, 図2と同様に 612nm における発光ピークは長波長側にシフトし, また蛍光強度は減少した.

Ⅳ. HpD の蛍光減衰曲線

図4のように, PBS 水溶液と0.1M CTAB ミセル水溶液中における蛍光減衰曲線は, 単一指数関数的減衰を示した. HpD 分子のカルボキシル基(陰イオン)は CTAB のアンモニウム基(陽イオン)と結合しやすく, また水溶液中の HpD の二量体はミセルの結合力により単量化する事実が知られている. しかしながら KK-47 細胞に取りこまれた HpD の蛍光減衰曲線は曲線3のように二相性の曲線であった. PBS とミセル水溶液中での蛍光寿命はそれぞれ 16.2ns と 17.9ns であった. また KK-47 細胞における短寿命は 2.4ns, 長寿命成分は 15.2ns であった.

Ⅴ. 培養時間に対する HpD の蛍光寿命および短寿命成分比の変化

図5は細胞に HpD をいったん30分取りこませた後, 遊離の HpD を洗い流した後の培養時間に対する蛍光寿命の変化および短寿命成分の割合の変化を示している.

PBS (曲線1)と CTAB ミセル水溶液(曲線2)における経時の変化は認められなかった. 曲線3^fと3^sはそれぞれ蛍光寿命の

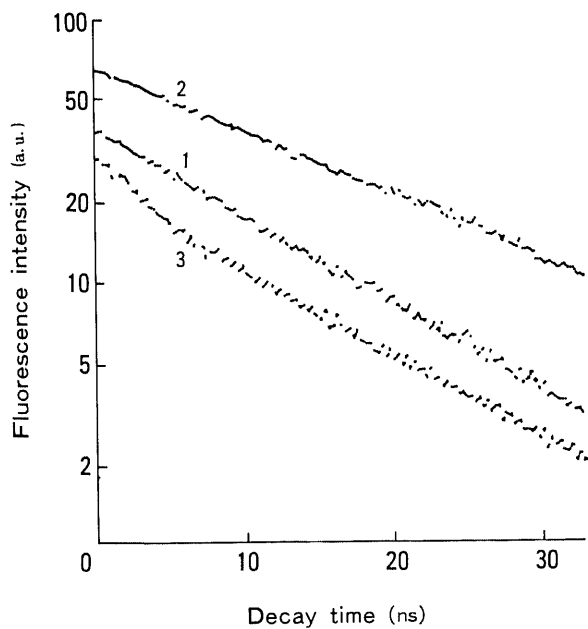


Fig. 4. Fluorescence decay curve of HpD in two solutions at room temperature. Curve 1, aqueous solution (pH 7.2); curve 2, 0.1 M CTAB micellar solution; curve 3, 10⁸ KK-47 cells/ml suspended in Ham's F-12 medium. The decay measurement was carried out 6 hr after washing free-HpD with serum-free Ham's F-12 medium. Concentration of HpD: curves 1 and 2, 0.6 μ g/ml; curve 3, 12 pg/cell.

短寿命と長寿命を表している. どちらの寿命成分とも最初4時間までは緩やかな増加を示し, それ以降は平衡に達し寿命の変化はなかった. 曲線3^fは3^fと3^sの和に対する3^fの比, すなわち短寿命成分の割合を表している. 4時間の培養時間内で, その割合は約20%の増加を示した. それ以降の培養時間に対しては変動がなかった. 短寿命成分(3^f)が会合体によるものであることを考えれば, この増加は培養時間が経過するにつれて, HpD 分子が細胞膜を透過するにしたがって会合体形成が進行することを意味するものと考えられた.

Ⅵ. 培養時間に対する光毒性の変化

遊離 HpD を洗い流したあとの種々の培養時間における単量体と会合体の HpD の光増感効率を比較するために, HpD を取りこんだ培養細胞にアルゴン色素レーザー(波長 635 \pm 5nm)を照射し, その光毒性をコロニー形成法により判定した.

図6に示されているとおり, これらの細胞の生存曲線の特徴は, ショルダーの部分と指数関数的曲線部分を有することである. 遊離 HpD を除去した直後は図6のAのように, 細胞に対

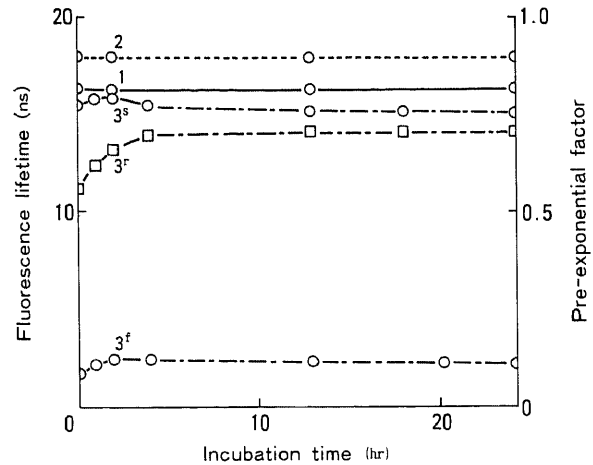


Fig. 5. Changes in fluorescence lifetime of HpD with increasing incubation time in two solutions and KK-47 cell suspension at 37 $^{\circ}$ C. Curve 1, aqueous solution, 0.6 μ g/ml HpD; curve 2, 0.1 M CTAB micellar solution, 0.6 μ g/ml HpD; curves 3^f, 3^s, and 3^s, 10⁸ KK-47 cells/ml suspended in Ham's F12 medium, 12 pg/cell HpD; curve 3^f, fast-decaying component; curve 3^s, slow-decaying component; curve 3^f, pre-exponential factor.

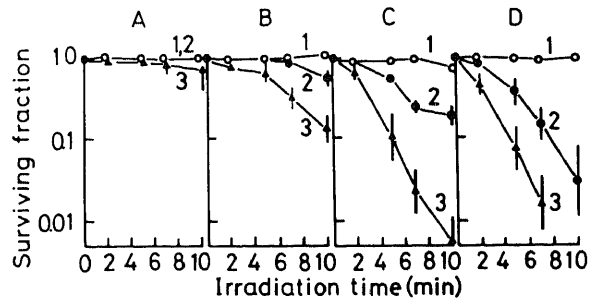


Fig. 6. Survival curves of KK-47 cells irradiated with an argon-dye laser light (wavelength 635 \pm 5 nm). Concentrations of HpD in curves 1, 2 and 3 were 0, 20 and 40 μ g/ml, respectively. The laser irradiations in A, B, C and D were at 0, 2, 4 and 6 hr incubation after the free-HpD washing.

する HpD の光毒性はどの濃度においてもごくわずかであった。しかしながら KK-47 細胞の光不活性の程度は、HpD 濃度の増大、および遊離 HpD 分子を洗浄し除去した後の培養時間の経過につれて増大した。大きな光毒性は、4 時間以上で観察された。

考 察

PDT の治療効果を向上させるためには、光増感効率に優れた新たな薬剤の開発が求められる。そのための基礎的研究として、癌細胞内における光増感剤の分子形態¹⁰⁾が殺細胞効果に及ぼす影響についての検討は重要な意味を持つと考えられる。

HpD は、その優れた腫瘍内保持能によりポルフィリンの赤色蛍光発光を用いての悪性腫瘍の局在と検出に利用され、また光励起された HpD 分子の有効な殺細胞効果により悪性腫瘍の治療にも使用されている。この治療効果は、悪性腫瘍組織の方が正常組織に比べて HpD 分子をより多く蓄積する点と、630±5nm の赤色光照射により生成する励起一重項酸素またはラジカル種の活性酸素が癌細胞を光酸化することによるものである。

悪性腫瘍組織における HpD 分子の取り込みのメカニズムやその分子の細胞内局在部位に関する報告は少ない。Kessel⁹⁾はネズミの白血病由来培養細胞 L1210 内において、HpD 分子の疎水性構成成分が細胞内に徐々に蓄積すると報告している。Bonnett ら¹⁰⁾は高速液体クロマトグラフィーにより、HpD は複数の成分の混合物であることを明らかにした。Moan ら¹¹⁾は、光学的治療において最も有効な HpD の成分は疎水性の物質であると報告している。それ以外にはどの構成物質が腫瘍組織内にどのような分子形態で取り込まれているのか、いまだ明らかにされていないのが現状である。

そこで今回、臨床応用試験薬として試用されている光増感剤とヒト膀胱癌由来培養細胞 (KK-47) を使用して以下のような検討を行った。すなわち光増感剤の分子形態の変化が吸収スペクトルあるいは蛍光スペクトル変化に反映されることを利用し、細胞内における光増感剤分子の分子形態の変化を明らかにする目的で細胞内の光増感剤色素の分光特性を測定し、分子形態の違いによる光増感効率の相違を殺細胞率で検討した。

われわれはヒト膀胱癌由来培養細胞 (KK-47) を用いて、HpD 分子の細胞内取り込みと結合に関して分光学的に検討し、有機溶媒中および CTAB ミセル溶液中における HpD 分子の分光特性と比較しながら検討し報告した¹⁰⁾。遊離細胞内 HpD の極大蛍光発光波長は PBS 溶液内に比べて長波長側に移動し広いスペクトルを示した。PBS 中および CTAB ミセル溶液中における蛍光偏光度は混合後の時間経過には影響を受けなかったが、遊離細胞液中においては遊離 HpD の洗浄直後から HpD の蛍光偏光度は急激に増大し、また 2 時間後以降は減少を示した。これらの結果からは、HpD 単量体分子と会合体分子は最初は細胞膜外に弱く結合し、その後徐々に会合状態で細胞内の安定結合状態に移行していくものと示唆された¹⁰⁾。以上述べた知見は図 1 で示すような吸収スペクトル変化からも支持された。すなわち曲線 1 は 6μg/ml の HpD を PBS 水溶液に、曲線 2 は同濃度の HpD を 10mM の CTAB 水溶液に溶解させた場合の吸収スペクトルを示すが、曲線 2 の 402nm における吸光度が曲線 1 に比較して増大した。また PBS 水溶液中においては曲線 1 に示されるとおり 370nm にショルダーが認められ

た。307nm と 402nm の吸収極大がそれぞれ、水溶液中における HpD 分子の会合体と単量体由来する事実より¹⁰⁾、PBS 中における会合体は CTAB 水溶液中では単量化され、CTAB ミセルと静電的に結合しているものと考えられた。さらに浮遊細胞内では、KK-47 細胞数が増大するにつれて 1 細胞あたりの HpD 分子の量は減少して、370nm の吸光度は少々減少するものの、HpD 分子会合体は細胞内に存在していることが示された。

図 2 は PBS, 0.1mM, 1.0mM, 10mM の CTAB ミセル溶液中および KK-47 細胞浮遊液中における HpD 分子の蛍光発光スペクトルを示している。KK-47 細胞内における HpD 分子の発光極大は 634nm と 694nm に存在し、それらは PBS 水溶液中での発光スペクトル (曲線 1) と比較した場合、約 20nm も短波長側に移動していた。また細胞浮遊液中において、曲線 5 で示されるごとく 670nm に新しく蛍光発光帯が出現した。そこで 670nm における発光帯を帰属させるために、CTAB の濃度を変えて蛍光スペクトルも測定した。HpD 分子の 2 つのカルボキシル基は CTAB ミセルのカチオン性のアンモニウムイオンと容易に結合することが予測され⁹⁾、HpD 分子のポルフィリン環はミセル内部の疎水性の環境に取り込まれていることが考えられる。CTAB ミセルのミセル臨界濃度 (critical micelle concentration, CMC) は 25℃における電気伝導率法による測定値が 0.9mM で¹⁰⁾、CMC 以下もしくはその近辺の濃度域は前期ミセル領域と呼ばれている。図 2 の曲線 2, 3 で示されるごとく前期ミセル領域では 670nm に蛍光発光ピークあるいはショルダーが出現している。それに対して正常ミセル領域では、曲線 4 で示されるごとく 670nm にみられた新しい発光ピークあるいはショルダーは消失し、水溶液中の短波長帯における蛍光強度は曲線 1 で 1.24 となっている。CTAB ミセル溶液中の、長波長側における発光強度に対する短波長側 (630nm) における発光強度の比は、CTAB 濃度が増すにつれて減少した。670nm におけるショルダーは曲線 3 に示されるごとく、1.0mM CTAB ミセル溶液中においても認められた。しかし 10mM CTAB ミセル溶液中では、HpD 会合体が正常ミセルの結合効果により単量化するためショルダーは消失していた。一方 CMC 以下もしくはその近辺の濃度域、すなわち前期ミセル領域では、HpD 分子は 5 ないし 10 個の CTAB 分子と結合しているものと考えられる¹⁰⁾。前期ミセル領域内であるところの 1.0mM CTAB ミセル溶液中における HpD の発光スペクトルパターンが、遊離 HpD を洗浄し除去した後の、細胞に取りこまれた HpD 発光スペクトルパターンによく一致していた。したがって、KK-47 細胞内に取りこまれた HpD 分子は会合体として存在しているものと考えられた。10mM CTAB 中では短波長側ピークの蛍光強度が大で長波長側ピークの蛍光強度に比べて 1.17 倍大であった。一方前期ミセル領域である 1.0 および 0.1mM CTAB ではその比率はそれぞれ 0.95 および 0.30 であった。さらに KK-47 ヒト膀胱癌由来浮遊細胞溶液では、その比は 0.73 であった。以上より 1mM CTAB 溶液と生体中の分子環境は類似しているものと推察された。

図 2 の曲線 1 と曲線 4 とを比較した場合、短波長側と長波長側のピークの値に大きな変化は見られないが曲線 4 は 12nm 長波長側に移動している。これは HpD 分子の静電的結合により影響を受けているものと考えられる。

図 3 に示されるとおり、水溶液中における短波長側での発光

ピークは 612nm であったが、細胞内における発光ピークは 632nm であった。すなわちここでも HpD が細胞内に取りこまれると、図 2 と同様に 612nm における発光ピークは長波長側に移動し、また蛍光強度は減少した。

図 4 のように、PBS 水溶液と 0.1M CTAB ミセル水溶液における蛍光減衰曲線は単一指数関数的減衰を示した。HpD 分子のカルボキシル基 (陰イオン) は CTAB のアンモニウム基 (陽イオン) と結合しやすく、また水溶液中の HpD の二量体はミセルの結合力により単量化する事実が知られている。しかしながら KK-47 細胞に取りこまれた HpD の蛍光減衰曲線は曲線 3 のように二相性の曲線であった。PBS とミセル水溶液中での蛍光寿命はそれぞれ 16.2ns と 17.9ns であった。また KK-47 細胞における短寿命は 2.4ns、長寿命成分は 15.2ns であった。Anderoni ら¹⁸⁾ は pH7.4 PBS 中における蛍光寿命が 4.1ns と 16.5ns であり、短寿命成分が HpD の二量体由来であり、長寿命成分が単量体由来であることを報告している。さらに彼らは HpD の濃度が増加するにつれて、短寿命成分の割合が増大していることも報告している。図 4 における曲線 1 と 2 において、短寿命成分が欠如しているのは HpD 濃度が 0.6mM と低濃度であったためと考えられる。したがって細胞中における短寿命成分は会合体由来と考えられた。また細胞中における蛍光強度が曲線 1 と 2 に比較して減少しているのは会合体形成のためであると思われた。

図 5 に示されるとおり PBS (曲線 1) と CTAB ミセル水溶液 (曲線 2) における、蛍光寿命の培養時間に対する変化は認められなかった。曲線 3' と 3'' はそれぞれ蛍光寿命の短寿命と長寿命を表している。どちらの寿命成分とも最初 4 時間までは緩やかな増加を示し、それ以降は平衡に達し寿命の変化はなかった。曲線 3' と 3'' の和に対する 3' の比、すなわち短寿命成分の割合を表している。4 時間の培養時間内で、その割合は約 20% の増加を示し、それ以降の培養時間に対しては変動がなかった。短寿命成分 (3') が会合体によるものであることを考えれば、この増加は培養時間が経過するにつれて、HpD 分子が細胞膜を透過するにしたがって会合体形成が進行することを意味するものと考えられた。この短寿命成分の割合は、Anderoni ら¹⁸⁾ が報告している 14% (PBS) よりもはるかに大きかった。このことより、HpD 分子は細胞内に取りこまれるにしたがってほとんど会合体に変化していることが示唆された。

遊離 HpD を洗い流したあとの種々の培養時間における単量体と会合体の HpD の光増感効率を比較するために、HpD を取りこんだ培養細胞にアルゴン色素レーザー (635±5nm) を照射し、その光毒性を図 6 のようにコロニー形成法により判定した。単量体 HpD は、遊離 HpD 分子を洗い流した直後には弱く細胞膜に結合しており、徐々に細胞膜を通過して会合体を形成するものと考えられている。また 2 ないし 4 時間かけて緩徐に細胞内のミトコンドリアに安定結合していくものと思われる¹⁹⁾。図 6 に示されているとおり、これらの細胞の生存曲線の特徴は、ショルダーの部分と指数関数的曲線部分を有することである。遊離 HpD を除去した直後は図 6 の A のように、細胞に対する HpD の光毒性はどの濃度においてもごくわずかであった。しかしながら KK-47 細胞の光不活性の程度は、HpD 濃度の増大、および遊離 HpD 分子を洗浄し除去した後の培養時間の経過につれて増大した。大きな光毒性は、HpD がミトコンドリアあるいは核膜に安定結合する時間帯であるところの 4

時間以上¹⁹⁾ で現れた。したがって、HpD の会合体が細胞の光不活性化に大きく寄与していると考えられた。

以上をまとめると、細胞の光不活性化は細胞の HpD の取りこみ状態に依存していた。また細胞の光不活性化は細胞外 HpD 濃度の増大と、遊離 HpD を除去した後の培養時間が経過するにしたがって増大した。Grossweiner¹⁹⁾ らも述べているように、HpD の会合体は単量体に比べてラジカル種の活性酸素をより生成しやすくと考えられる。その理由としては単量体状態よりも、HpD 会合体の 3 重項状態の方が、より容易に電子の移動が行われるからである。光増感反応によって生じた活性酸素のメカニズムは今後の論文で報告する予定である。

結 論

HpD の吸収、蛍光スペクトルおよび蛍光寿命を含む分光特性をヒト膀胱癌由来培養細胞 (KK-47) 浮遊液中で検定し、以下の結果を得た。

1. 吸収スペクトルパターンにおいて会合体由来の 370nm のショルダーが認められたことから、細胞内における HpD 分子会合体の存在が示された。
2. 蛍光スペクトルパターンにおいて、PBS 水溶液中および CTAB ミセル溶液中ではみられなかった 670nm のピークが出現した。前期ミセル領域内であるところの、1.0mM CTAB ミセル溶液中での発光スペクトルパターンとの類似性からも、細胞内に取りこまれた HpD 分子は会合体として存在しているものと考えられた。
3. 発光スペクトルパターンにおける短波長側ピークと長波長側ピークの蛍光強度比の近似性から考えて、1.0mM CTAB 溶液と生体中の分子環境は類似していた。
4. 大きな光毒性は、HpD がミトコンドリアあるいは核膜に安定結合する時間帯に認められた。ゆえに HpD の分子形態と光不活性化との関係に着目した場合、HpD の会合体が細胞の光不活性化に大きく寄与していた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました恩師久住治男教授および当教室腫瘍研究班の諸兄、教室員各位に深く感謝の意を表します。また本研究に関し、ご指導を賜った福井医科大学第一病理学教室助手・本学医学部非常勤講師である三好憲雄博士に深く感謝いたします。なお本論文の一部は第13回日本光医学・光生物学会において発表された。

文 献

- 1) 石田武之: 各種光感受性物質の蛍光特性を中心とした分光学的検索。日本レーザー医学会誌, 13, 3-15 (1992).
- 2) Ishida, T., Miyoshi, N., Nango, O., Uchibayashi, T., Naito, K. & Hisazumi, H.: A study of fluorescence properties of several photosensitizers. *Photomed. Photobiol.*, 13, 135-137 (1991).
- 3) Lipson, R. L., Baldes, E. J. & Olsen, A. M.: The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J. Natl. Cancer Inst.*, 26, 1-11 (1961).
- 4) Kelly, J. F. & Snell, M. E.: Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, 115, 150-151 (1976).
- 5) Dougherty, T. J., Grindey, G. B., Fiel, R., Weishaupt,

- K. R. & Boyle, D. G.: Photoradiation therapy. II. cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**, 115-121 (1975).
- 6) Chang, C. T. & Dougherty, T. J.: Photoradiation therapy: kinetics and thermodynamics of porphyrin uptake and loss in normal and malignant cells in culture. *Radiat. Res.*, **74**, 498 (1978).
- 7) Dougherty, T. J., Kaufman, J. E., Goldfarb, A., Weishaupt, K. R., Boyle, D., & Mittleman, A.: Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.*, **38**, 2628-2635 (1978).
- 8) Dougherty, T. J., Lawrence, G., Kaufman, J. H., Boyle, D., Weishaupt, K. R. & Goldfarb, A.: Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **62**, 231-237 (1979).
- 9) Kessel, D.: Transport and binding of hematoporphyrin derivative and related porphyrins by murine leukemia L1210 cells. *Cancer Res.*, **41**, 1318-1323 (1981).
- 10) Bonnett, R., Charalambides, A. A., Jones, K., Magnus, I. A. & Ridge, R. J.: The direct determination of porphyrin carboxylic acids. *Biochem. J.*, **173**, 693-696 (1978).
- 11) Moan, J., McGhie, J. B. & Christensen, T.: Hematoporphyrin derivative: photosensitizing efficiency and cellular uptake of its components. *Photobiochem. Photobiophys.*, **4**, 337-345 (1982).
- 12) Dulbecco, R., & Vogt, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.*, **99**, 167-182 (1954).
- 13) 久住治男, 鹿子木基二, 中嶋和喜, 小林徹治, 塚原健治, 内藤克輔, 黒田恭一, 松原藤継: ヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 の生物学的特性について. *日泌尿会誌*, **70**, 485-494 (1979).
- 14) Miyoshi, N., Hisazumi, H., Ueki, O. & Nakajima, K.: Cellular binding of hematoporphyrin derivative in human bladder cancer cell lines: KK-47. *Photochem. Photobiol.*, **39**, 359-363 (1984).
- 15) Hisazumi, H., Miyoshi, N., Ueki, O., Nishino, A. & Nakajima, K.: Cellular uptake of hematoporphyrin derivative in KK-47 bladder cancer cells. *Urol. Res.*, **12**, 143-146 (1984).
- 16) 北原文雄, 玉井康勝, 早野茂夫, 原 一郎: 界面活性剤. 第1版, 69-83 頁, 講談社, 東京, 1989.
- 17) Miyoshi, N., Hisazumi, H., Nakajima, K., Ueki, O., & Fukuda, M.: The similarity between the fluorescence spectra of hematoporphyrin derivative incorporated by rat bladder cancer tissues and trimethyl ammonium bromide micelles. *Photobiochem. Photobiophys.*, **8**, 115-121 (1984).
- 18) Anderoni, A., Cubeddu, R., Silvestri, S. D., Laporta, P., Jori, G. & Reddi, E.: Hematoporphyrin derivative: experimental evidence for aggregated species. *Chem. Phys. Lett.*, **88**, 33-36 (1982).
- 19) Grossweiner, L. I., Patel, A. S. & Grossweiner, J. B.: Type I and II mechanisms in the photosensitized lysis of phosphatidylcholine liposomes by hematoporphyrin. *Photochem. Photobiol.*, **36**, 159-167 (1982).

Cellular Uptake of Photosensitizers and Photodynamic Inactivation of KK-47 Cultivated Human Bladder Cancer Cells Osamu Nango, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. Juzen Med Soc.*, **102**, 172—178 (1993)

Key words photosensitizers, absorption spectra, fluorescence spectra, fluorescence lifetime, aggregation

Abstract

The spectroscopic properties including absorption spectra, fluorescence spectra and fluorescence lifetime of hematoporphyrin derivative (HpD) were measured in a KK-47 bladder cancer cell suspension. After washing out free-HpD, HpD aggregates continued to increase the longer the incubation time. The KK-47 cells incorporating HpD were photoirradiated by an argon-dye laser light (630±5 nm). The relationship between the mode of cellular HpD uptake and photodynamic cellular inactivation by the laser light was studied using a clonogenic assay system. Cellular photoinactivation increased with the increasing concentration of the external HpD and the longer the incubation time after washing out free-HpD. These findings indicate that the photodynamic action of cells where HpD aggregate is stabilized with incubation after washing out free-HpD, is significantly stronger than that of the cells to which HpD is bound weakly immediately after washing out free-HpD.