

In vitro Studies of Combined Effects of Adriamycin and HpD Photodynamic Therapy

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/2297/8239

光力学的療法に対するアドリアマイシン併用の 有用性に関する実験的研究

金沢大学医学部泌尿器科学講座 (主任: 久住治男教授)

新 田 政 博

(平成2年12月14日受付)

抗癌剤と光力学的療法との併用療法の基礎的研究として、KK-47膀胱癌由来培養細胞の試験管内におけるアドリアマイシン (adriamycin, ADM) の取り込みと殺細胞効果に対する光増感剤 (hematoporphyrin derivative, HpD) を用いた光力学的療法の併用効果を検討した。KK-47培養細胞浮遊液 5 ml (500 cells/ml) に、100 μ g/ml 濃度の HpD と 0.5 μ g/ml 濃度の ADM をそれぞれ、30分間接触処理した。ADM と HpD の投与順位の差、つまり、(1)ADM 30分間持続処理 4 時間後に HpD を投与、(2)HpD 30分間持続処理 4 時間後に ADM を投与、(3)ADM と HpD の 30分間同時持続処理投与、での細胞内 HpD 濃度の変化を HpD の蛍光強度から外挿して行った。その結果、HpD の細胞内取り込みは、投与順序(2)<(1)<(3)の順に高くなり、(1)と(2)では投与 ADM 濃度の増大と共に HpD 取り込みは減少した。次に、ADM と HpD の投与順位の違いによる ADM の殺細胞効果をコロニー形成法により検討した。その結果、ADM の殺細胞効果は(2)<(1)<(3)の順で HpD により抑制された。さらに、両薬剤併用時のレーザー照射による光力学的殺細胞効果につき検討した。その結果、ADM の低濃度域において、630nm アルゴン色素レーザー照射時の(1)群、488.0および514.5nm アルゴンレーザー照射時の(1)および(3)群において ADM 単独群および HpD 単独群に比し、相乗的殺細胞効果の増大が認められた。すなわち、ADM と HpD の投与順位の違いにより両者の細胞内濃度の間に変動が認められ、このことが抗癌剤とレーザー照射による光力学的治療との併用効果に関与してくるものと考えられた。従って、ADM 取り込み後に HpD を投与し、照射を行うことにより ADM と光力学的療法との最も良好な併用効果が得られるものと考えられた。

Key words adriamycin, hematoporphyrin derivative, chemotherapy, photodynamic therapy, argon-dye laser

最近、光力学的療法 (photodynamic therapy, PDT) が癌治療法の一つとして注目され、臨床各科において研究が行われている¹⁾²⁾。しかし光力学的療法は癌の局所療法であり、悪性腫瘍を全身疾患としてみた場合、抗癌化学療法などの全身療法との併用が考慮されるべきである。アドリアマイシン (adriamycin, ADM) による抗癌化学療法とヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivative, HpD) による PDT の併用効果は ADM と HpD の投与方法、投与順序つまりこれら両者の薬剤の細胞内取り込みによっ

て影響されることが予測される。しかしながら、現在までのところ、この併用効果における両薬剤の投与順序と細胞内取り込みとの関係はほとんど検討されていない。従来より、我々は HpD および ADM の細胞内取り込みについて報告してきた³⁻⁶⁾。そこで今回、ADM と HpD の併用時の投与順序と細胞内取り込みの関係を明らかにした上で、アルゴンレーザーおよび色素レーザー照射によるヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47⁷⁻⁹⁾ に対する殺細胞効果を検討し、抗癌化学療法と光力学的療法との併用効果の臨床応用への基礎研

Abbreviations: ADM, adriamycin; HpD, hematoporphyrin derivative; PDT, photodynamic therapy

究を行ったので報告する。

材料および方法

I. 材 料

HpD すなわち (Photofrin II) は Photofrin Medical Inc., (Raritan, NJ, USA: 濃度は 2.5mg/ml, 主成分 dihematoporphyrin ethers を 75mg/30ml 含有) の製品を使用した。また アドリアマイシン (ADM) は (協和発酵 (株), 東京) から供給されたものを使用した。培養細胞 KK-47 は当教室にてヒト膀胱癌患者より摘出した腫瘍組織を培養樹立した移行上皮癌細胞株である⁷⁻⁹⁾。

II. 方 法

1. 培養細胞および培養方法

KK-47細胞は20%牛胎児血清 (Micro biological Associates, MD, USA) と抗生物質として kanamycin sulfate 50 μ g/ml を含有した80% Ham F-12培地 (日水製薬 (株), 東京) からなる FC-20培養液を用い, 37°Cにて閉鎖培養したものを実験に供した。

2. 培養細胞 KK-47細胞における ADM の取り込み

KK-47培養細胞に20 μ g/ml の ADM を30分間接触処理した後, 蛍光顕微鏡写真撮影と蛍光スペクトル測定を行った。測定には, 蛍光顕微分光システム IMT2-SRF 型 (オリンパス (株), 東京) を用いた。励起光として Green-band のバンドパスフィルターを併

用した高圧水銀ランプを用いた (540nm)。

3. KK-47細胞における ADM 共存下での HpD の取り込み

KK-47細胞浮遊液 5 ml (10^4 cells/ml) に, 100 μ g/ml 濃度の HpD と 0.5 μ g/ml 濃度の ADM を, 以下の順序で持続接触処理した。(1)ADM 30分間持続処理 4 時間後に HpD を 30分間持続処理, (2)HpD 30分間持続処理 4 時間後に ADM を 30分間持続処理, (3) ADM と HpD の同時30分間持続処理, を行った。37°C, 5%炭酸ガス培養器中で30分間の培養後, 1,500rpm で3分間遠心後, FC-20にて2回洗浄し, 培養液 5 ml に再浮遊させ, 細胞内 HpD の蛍光強度を蛍光分光光度計日立850 (日立 (株), 東京) にて測定した。

4. KK-47細胞に対する ADM 単独および HpD 併用 ADM の殺細胞効果

KK-47細胞浮遊液 (500 cells/ml) を 5 ml ずつフタ付きポリエチレン製短試験管 (Corning, Co., Calif., USA) に分注し, 各種濃度の ADM を加え37°Cで30分間処理後, 1,500rpm で3分間遠心する。ついで 5 ml の FC-20培養液に再浮遊させ, 組織培養平板60×15mm (Falcon, Calif., USA) を用いて, 植え込み細胞数500 cells/dish として, 5%CO₂, 37°Cにて14日間静置培養を行いコロニー形成法¹⁰⁾¹¹⁾により細胞生残率を求めた。ついで, 100 μ g/ml 濃度の HpD を 37°Cで30分間取り込ませ, 両薬剤の取り込み順序を変えて

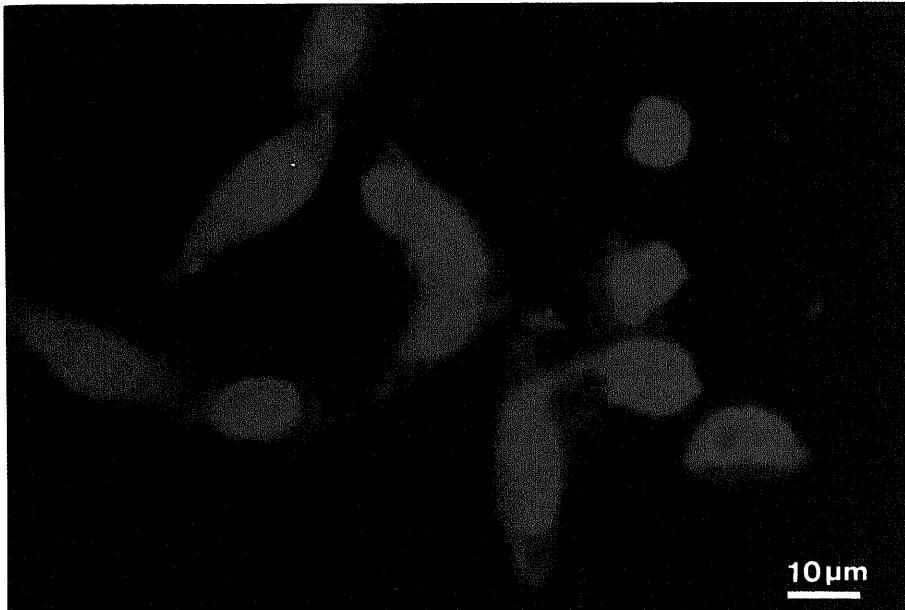


Fig. 1. Fluorescence photomicrograph showing ADM-containing KK-47 cells.

HpD 共存下における ADM の処理を行い、その併用殺細胞効果についても同様にコロニー形成法により細胞生残率を算出した。

5. KK-47細胞に対する HpD を用いた PDT の殺細胞効果

500 cells/ml 濃度の KK-47細胞浮遊液 5 ml に100 μ g/ml 濃度の HpD を37°C, 30分間処理後、遠心洗浄を行う。ついで、回転式試料固定枠上で45mW/cm²のアルゴン (Model 170-07型), (Spectra Physics Inc., Calif., USA) および15mW/cm²のアルゴン色素レーザー (Model 375-03), (Spectra Physics Inc.) を用いてそれぞれ30秒 (1.35 J/cm²), 60秒 (2.7 J/cm²), 90秒 (4.05 J/cm²), 120秒 (5.4 J/cm²) 照射を行った。照射後、500cells/dish の植え込み濃度として、2週間炭酸ガス培養を行い、コロニー形成法により細胞生残率を求めた。

6. KK-47細胞に対する ADM の抗腫瘍効果、ADM および HpD 併用による光力学的殺細胞効果
500cells/ml 濃度の KK-細胞浮遊液5ml に100 μ g/ml 濃度の HpD および0.5 μ g/ml 濃度の ADM を処理順序を変えてそれぞれ37°Cで30分間取り込ませる。遠心洗浄後、上記と同様のレーザー光強度および照射時間にて照射を行った。500cells/dish の植え込み濃度で、2週間炭酸ガス培養後、コロニー形成法により細胞生残率を算出した。

成 績

I. 蛍光顕微鏡による細胞内 ADM 局在の観察
20 μ g/ml 濃度の ADM を20分間取り込ませた

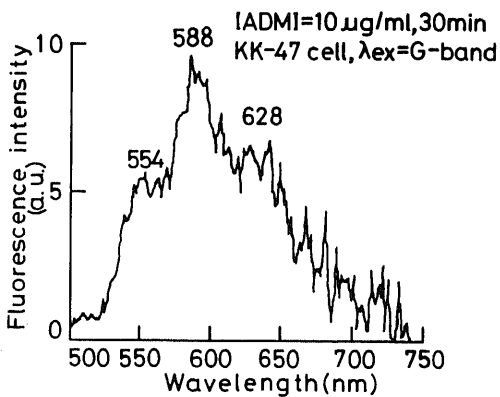


Fig. 2. Fluorescence spectra of ADM incorporated into KK-47 cells at each excitation wavelength. The cells were exposed to 10 μ g/ml ADM for 30 min at 37°C. a. u.=arbitrary unit.

KK-47細胞を蛍光顕微鏡下に観察すると図1に示すごとく ADM の赤色蛍光は主として核を中心に分布しており、細胞質内においても軽度の ADM 蛍光が観察された。

II. 細胞内 ADM の蛍光発光スペクトル

蛍光顕微鏡下に緑色の波長で励起した際の細胞内 ADM の蛍光発光スペクトルを測定した結果、588nm をピークとし554および628nm に shoulder を有する蛍光発光スペクトルが観察された (図2)。

III. KK-47細胞による ADM 共存下での HpD の取り込み

KK-47細胞に対する ADM, HpD 両薬剤の投与順序の違い、つまり (1群) ADM 30分間持続処理 4時間後に HpD を30分間持続処理、(2群) HpD 30分間持続処理 4時間後に ADM を30分間持続処理、(3群) ADM と HpD を30分間同時持続処理、において

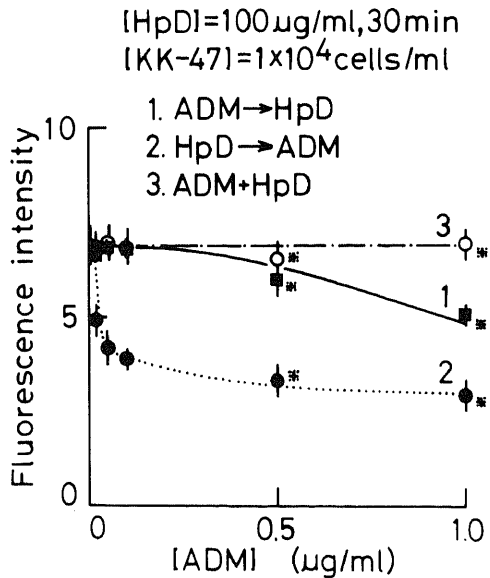


Fig. 3. Fluorescence intensity of intracellular HpD. The cells were treated with three types of combination of ADM and HpD, (1) ADM followed by HpD treatment (ADM \rightarrow Hpd), (2) HPD followed by ADM treatment (HpD \rightarrow ADM), (3) Simultaneous treatment with ADM and HpD (ADM+HpD) The cells were exposed to 100 μ g/ml HpD and 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 μ g/ml ADM for 30 min at 37°C. The HpD uptake was large in order of 3>1>2. Statistical significance of differences of the three groups is represented by * ($p<0.005$) using Student's t test. Mean value from 3 experiments \pm S.E.M.

HpD の細胞内濃度を検討した (図 3). 横軸の ADM 濃度に対し, HpD の蛍光強度を縦軸に作図した. ADM 濃度が 0.02, 0.05, 0.1, 0.5 および 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の場合の細胞内 HpD の蛍光強度は 1 群ではそれぞれ 6.71, 6.92, 6.78, 6.0, 5.06, 2 群ではそれぞれ 4.88, 4.15, 3.88, 3.25, 2.87, 3 群ではそれぞれ 6.80, 6.92, 6.80, 6.51, 6.90 であった. この結果, (3 群) > (1 群) > (2 群) の順で HpD の細胞内濃度は低くなり, 3 群の間で統計学的有意差が認められた ($p < 0.005$). (1 群) と (2 群) では投与 ADM 濃度の増大とともに HpD 取り込みは減少した. 特に (2 群) では ADM の低濃度域より HpD 取り込みの減少が認められた. ADM 共存下での細胞内 HpD 濃度抑制が最も大であった (2 群) の場合において, HpD の蛍光発光スペクトルを図 4 に示す. この条件においては投与 ADM 濃度が上昇するに従い HpD の蛍光強度の低下, すなわち細胞内濃度の低下が認められた.

IV. ADM 単独および ADM, HpD 併用時の殺細胞効果

ADM の抗腫瘍効果におよぼす HpD の作用を検討するために, 各種濃度の ADM 単独処理時の細胞生存率を横軸にプロットし, ADM 単独処理時の細胞生存率と 100 $\mu\text{g/ml}$ の HpD を併用投与した際の細胞生存

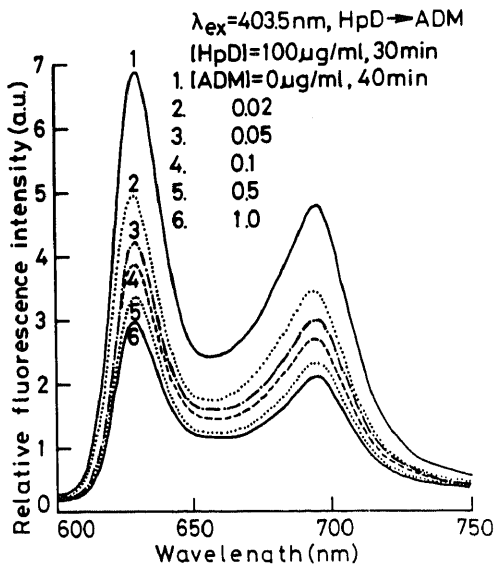


Fig. 4. Fluorescence spectra of intracellular HpD treated with (2) HpD followed by ADM treatment (HpD-->ADM) at each excitation wavelength. The cells were exposed to 100 $\mu\text{g/ml}$ HpD and 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ADM for 30 min at 37°C. λ_{ex} = excitation wavelength.

率を縦軸に作図した (図 5). ADM 単独による細胞生存率が 99.0, 94.9, 76.1, 6.4 および 0.2% の場合の ADM, HpD 各併用群における細胞生存率は 1 群ではそれぞれ 100, 86.3, 64.0, 9.1, 1.1%, 2 群ではそれぞれ 89.8, 78.2, 52.0, 11.9, 0.6%, 3 群ではそれぞれ 108.0, 85.9, 88.2, 23.4, 6.9% であった. この結果, ADM 濃度 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上においては, 細胞生存率が 1 : 1 に対応する対照群の細胞生存率曲線の傾きに比していずれの併用群においても細胞生存率曲線 {カーブ(1), (2), (3)群} の傾きは有意に小であった ($p < 0.01$). さらに細胞内 HpD 取り込みが最も大であった (3 群) の傾きは最小であった. このことから HpD は ADM の抗腫瘍効果を減弱させることが示唆された.

V. ADM 単独の抗腫瘍効果と, ADM および HpD 併用 PDT による殺細胞効果

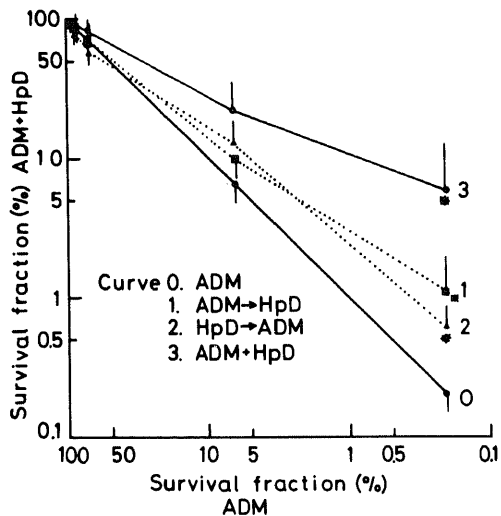


Fig. 5. Survival curves of KK-47 cells treated with (0) ADM alone, (1) ADM followed by HpD treatment (ADM-->HpD), (2) HpD followed by ADM treatment (HpD-->ADM), (3) Simultaneous treatment with ADM and HpD (ADM+HpD), in the dark. The cells were exposed to 100 $\mu\text{g/ml}$ HpD and 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ADM for 30 min at 37°C. Each surviving fractions of ADM treatment of 100, 94.9, 76.1, 6.4, and 0.2% corresponds to 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, and 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ADM concentration, respectively. The degree of cytotoxicity was high in order of 2 > 1 > 3. Statistical significance of differences of the three groups is represented by * ($p < 0.01$) using Student's t test. Mean value from 3 experiments \pm S.E.M.

アルゴンおよびアルゴン色素レーザーを用いて光照射を加え、HpD と ADM の光増感作用による併用光力学的殺細胞効果について検討した(図6, 7). アルゴン色素レーザー光照射時間が30, 60, 90, 120秒の場合の ADM, HpD 各併用群における細胞生存率は0群ではそれぞれ95.1, 87.3, 91.5, 78.7%, 1群ではそれぞれ57.7, 31.8, 27.1, 14.3%, 2群ではそれぞれ77.6, 73.1, 86.7, 78.2%, 3群ではそれぞれ79.5, 70.7, 71.2, 65.3%であった. この結果, アルゴン色素レーザー-630nm 赤色光を照射した場合には(1群)において, 図6の対照群細胞生存率曲線すなわちADM 単独群および HpD 単独群に比し, 細胞生存率曲線の傾きの増加を伴う殺細胞効果の増加が認められ, 90秒以上の照射時間においては(1群)>(3群)>(2群)の順であり, この3群間に統計学的有意差が認められた($p < 0.005$) (図6). ADM 単独群および HpD 単独群の併用による併用殺細胞効果を検討するに際し, 先ず, 両者の細胞生存率の積を求め併用効果

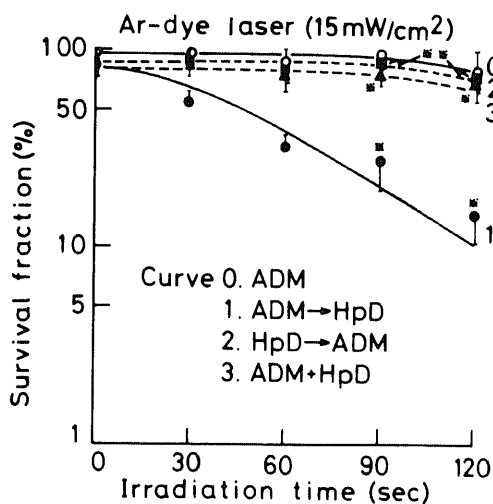


Fig. 6. Survival curves of KK-47 cells after treatments with HpD, ADM, and photoirradiation using an argon-dye laser light (630 ± 5 nm). (0) ADM alone, (1) ADM followed by HpD treatment (ADM \rightarrow HpD), (2) HpD followed by ADM treatment (HpD \rightarrow ADM), (3) Simultaneous treatment with ADM and HpD (ADM+HpD). The cells were exposed to $100 \mu\text{g/ml}$ HpD and $0.5 \mu\text{g/ml}$ ADM for 30 min at 37°C . The degree of cytotoxicity was high in order of $1 > 3 > 2$. Statistical significance of differences of the three groups is represented by * ($p < 0.005$) using Student's t test. Mean value from 3 experiments \pm S.E.M.

がこの値であれば相加効果, この値以上ならば相乗効果で, この値以下なら相殺効果とされる¹⁰⁾. 従って図8で示すごとく, ADM 単独群および HpD 単独群の細胞生存率曲線をそれぞれ0群, O'群とし, 両者の細胞生存率の積をO''として算出すると(1群)においては相乗効果が認められた. 一方アルゴンイオンレーザー光照射時間が30, 60, 90および120秒の場合の ADM, HpD 各併用群における細胞生存率は0群ではそれぞれ81.6, 63.1, 42.4, 40.0%, 1群ではそれぞれ46.5, 44.6, 21.5, 3.5%, 2群ではそれぞれ91.5, 81.6, 85.1, 79.8%, 3群ではそれぞれ30.8, 22.4, 16.6, 6.0%であった(図7). この結果, アルゴンイオンレーザー光を照射した場合には図9で示すごとく(1群)のみならず(3群)においてもADM 単独群および HpD 単独群に比し, 著明な殺細胞効果の増大が認められ, その併用効果は上記の基準に従えば相乗的と考えられ, (1群)=(3群)>(2群)の順で併用効果が

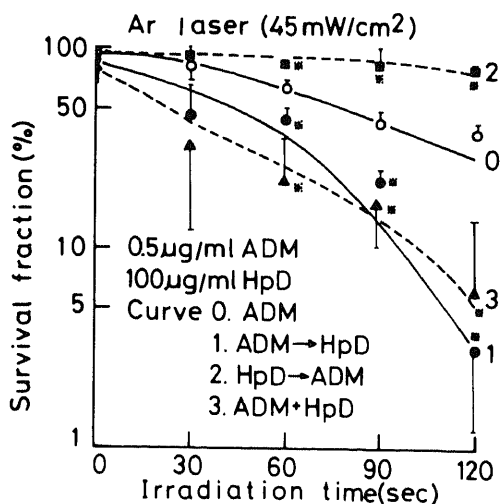


Fig. 7. Survival curves of KK-47 cells after treatments with HpD, ADM, and photoirradiation using an argon laser light (488.0 and 514.5nm). (0) ADM alone, (1) ADM followed by HpD treatment (ADM \rightarrow HpD), (2) HpD followed by ADM treatment (HpD \rightarrow ADM), (3) Simultaneous treatment with ADM and HpD (ADM+HpD). The cells were exposed to $100 \mu\text{g/ml}$ HpD and $0.5 \mu\text{g/ml}$ ADM for 30 min at 37°C . The degree of cytotoxicity was high in order of $1 = 3 > 2$. Statistical significance of differences from the three groups is represented by * ($p < 0.005$) using Student's t test. Mean value from 3 experiments \pm S.E.M.

得られた。この3群の間には統計学的有意差が認められた ($p < 0.01$)。またアルゴンイオンレーザー光照射においては ADM 単独群においても図9の対照群細胞生存率曲線に示されるように ADM の光増感作用による殺細胞効果が確認できた。

考 察

近年、光学的治療 (PDT) は悪性腫瘍治療に応用されつつあり我々¹⁰⁻¹⁶⁾も1982年以来表在性膀胱癌に対し PDT を行ってきた。従来、PDT では2 cm 以上の膀胱腫瘍に完全寛解を得ることは困難であるとされており、またそれ以下の腫瘍でもしばしば腫瘍の再増殖を認める¹⁷⁾。今回、我々は抗癌化学療法剤との併用治療における PDT の有用性を期待してその併用効果を検討した。この研究の目的は抗腫瘍性抗生物質である ADM を抗癌化学療法剤として用いるだけでなく、光増感剤として従来より用いられている HpD に併用することにより光学的治療の効果増強を目指す点にあると考えられる。ADM と PDT の併用について

Dougherty¹⁸⁾は ADM と PDT との併用治療を受けた皮膚腫瘍患者においては PDT 単独治療時に比し、正常部位の皮膚を含めて強い皮膚反応が認められたと報告している。一方、Cowledら¹⁹⁾は Lewis 肺癌細胞及び Raji 細胞を用いて25 μ g/ml 濃度の HpD 及び20-200 μ g/ml 濃度の ADM を同時処理後白熱電球による600-650nm の光照射を行い、クロム遊離試験法 (Chromium releasing assay 法) により検討した結果試験管内においては ADM と PDT の併用効果は不良であると報告している。我々は抗癌化学療法剤と光学的治療の効果的な併用療法を考える上で併用時の両薬剤の細胞内濃度を正確に測定することが重要と考え、検討を進めた。今回の実験から、図3、4に示すように投与 ADM 濃度に依存して細胞内 HpD 濃度が減少することが明らかとなった。すなわち、Cowledらが用いた ADM 濃度20-200 μ g/ml という比較的高濃度域の条件では、細胞内への HpD の取り込みが抑制される可能性も考えられ、試験管内において両者の

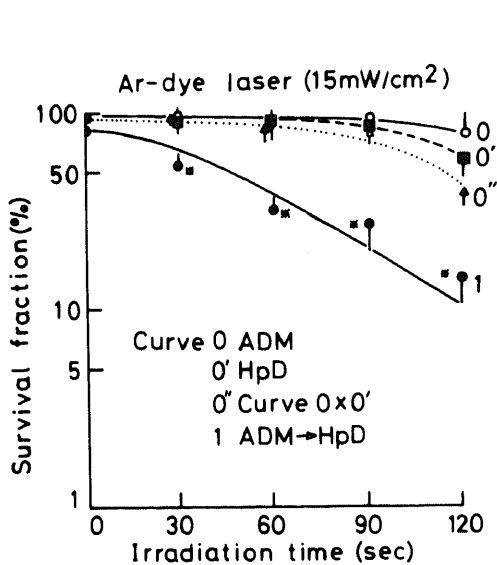


Fig. 8. Survival curves of KK-47 cells after treatments with HpD, ADM, and photoirradiation using an argon-dye laser light (630 ± 5 nm). (0) ADM alone, (0') HpD alone, (0'') Curve 0x0', (1) ADM followed by HpD treatment (ADM \rightarrow HpD). The cells were exposed to 100 μ g/ml HpD and 0.5 μ g/ml ADM for 30 min at 37°C. The degree of cytotoxicity was high in order of $1 > 3 > 2$. Statistical significance of differences from the three groups is represented by * ($p < 0.005$) using Student's t test. Mean value from 3 experiments \pm S.E.M.

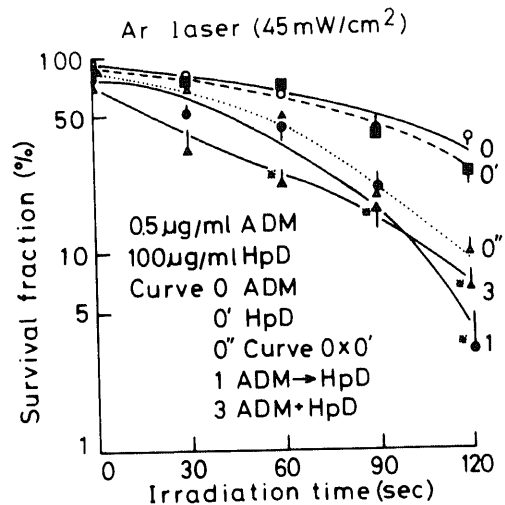


Fig. 9. Survival curves of KK-47 cells after treatments with HpD, ADM, and photoirradiation using an argon laser light (488.0 and 514.5 nm). (0) ADM alone, (0') HpD alone, (0'') Curve 0x0', (1) ADM followed by HpD treatment (ADM \rightarrow HpD), (3) Simultaneous treatment with ADM and HpD (ADM+HpD). The cells were exposed to 100 μ g/ml HpD and 0.5 μ g/ml ADM for 30 min at 37°C. The combined cytotoxicities in the case of (1) and (3) exceeded an additive cytotoxic effect (0x0'). 0x0'; the additive effect on cell killing between group 0 and 0' is expected as the product of the individual surviving fractions. Mean value from 3 experiments \pm S.E.M.

併用効果を期待する為には、今回我々が用いた比較的低 ADM 濃度域の濃度条件が有用であることが示唆された。また両薬剤の投与順序の差による細胞内 HpD 濃度の変化を検討した結果、(3群)>(1群)>(2群)の順となり HpD の光増感作用もそれと同じ順序で期待されるものと推定された。しかし、一方において、HpD 光増感が最も期待し得る(3群)では、図5に示すように、ADM の抗腫瘍効果の最も強い抑制が認められた。すなわち、蛍光強度による細胞内 HpD の濃度測定結果から、HpD による光増感作用が期待される順位に従って ADM の抗腫瘍効果に対する抑制作用が予測された。すなわち、HpD の細胞内取り込みと ADM の抗腫瘍効果に対する抑制作用の両者が組み合わさって、ADM および HpD 併用による PDT 効果が決定されるものと考えられた。本研究においては、光を照射しない両薬剤単独の相互作用を検討すると共に、レーザー照射を行った場合の、HpD の PDT, ADM の PDT および ADM の抗腫瘍効果の併用殺細胞効果を検討した。その結果、アルゴン色素レーザー照射時における(1群)およびアルゴンレーザー照射時における(1群)および(3群)において ADM 単独群および HpD 単独群に比し相乗的殺細胞効果の増大が認められた。さらに、今回の実験において、アルゴンレーザー照射により ADM 単独群においても照射量依存性の光力学的殺細胞効果が認められた。すなわち、HpD-光増感による PDT と ADM の抗腫瘍効果に加え、それ自身蛍光性を有する ADM が光増感剤としてアルゴンレーザー光により光励起され、光力学的効果が生ずることが示唆された。今回の実験から試験管内における HpD-PDT, ADM 抗腫瘍化学療法および ADM-PDT の併用療法の有用性が示唆された。なお、これらの群の中では特に(1群)が最も有効であった。以上の結果から、今後さらに有用な併用方法が確立されるよう試験管内および生体内における研究を進める努力がなされる必要があると思われる。

結 論

ADM と HpD を用いた PDT の試験管内における KK-47膀胱癌由来培養細胞に対する併用効果を、(1群) ADM 30分間持続処理4時間後に HpD を投与、(2群) HpD 30分間持続処理4時間後に ADM を投与、(3群) ADM と HpD の30分間持続処理投与の3群につき検討し、以下の成績を得た。

1. 細胞内 ADM の赤色蛍光は主として核を中心に分布しており、細胞質内においても軽度の ADM 蛍光

を認めた。

2. 細胞内 ADM の蛍光発光スペクトルを測定した結果、588nm をピークとし554および628nm にそれぞれ肩を有する蛍光発光スペクトルを認めた。

3. 投与 ADM 濃度が上昇するに従い、(3群)>(1群)>(2群)の順で HpD の細胞内取り込みは抑制された。

4. 照射前においては HpD は ADM の殺細胞効果を抑制した。

5. 低濃度域の ADM および HpD を光増感剤とした PDT と ADM 単独の抗腫瘍効果には良好な併用殺細胞効果を認めた。

6. アルゴン色素レーザー照射時の(1群)、アルゴンレーザー照射時の(1群)および(3群)において両者の併用効果は相乗的と考えられた。

7. アルゴンレーザー照射においては ADM 単独群においても ADM の光増感作用による殺細胞効果を認めた。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導と御校閲を頂いた恩師久住治男教授に深謝いたします。また実験にあたり終始御指導と御助言を賜った福井医科大学第一病理学教室三好憲雄博士に厚く感謝します。さらに実験に際し、御指導を仰いだ中嶋和喜講師、及び論文作製にあたり御援助を賜った打林忠雄講師、ならびに本研究に御協力いただいた当教員各位、土田貴夫文部技官、田中耕一文部技官に心から感謝します。本論文の要旨は第10回および11回光医学、光生物学会、第26回日本癌治療学会総会、および第10回日本レーザー医学会大会において発表した。また、本研究は昭和61.62年度文部省科学研究研究費補助金一般研究(A)課題番号60440075、および昭和63年度一般研究(A)課題番号63440060の補助を受けたもので、付記して謝意を表する。

文 献

- 1) 久住治男, 上木 修, 熊木 修, 内藤克輔, 三崎俊光: 表在性膀胱腫瘍および上皮内癌のヘマトポリン誘導体とレーザー光線による光化学療法. 癌の臨床, 31, 697-703 (1985).
- 2) 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).
- 3) Miyoshi, N., Hisazumi, H., Ueki, O., Nakajima, K. & Fukuda, M.: Photodynamic inactivation of cultivated human bladder cancer cells (KK-47) sensitized by hematoporphyrin derivative and argon-dye laser light. *Photobio-*

chem. Photobiophys., 9, 241-252 (1985).

4) 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).

5) 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).

6) Naito, K., He, Q., Scog, S., Tribukait, B., Andersson, L. & Hisazumi, H.: Effects of adriamycin and hyperthermia on cellular uptake of [³H] thymidine and its significance for the incorporation into DNA. Int. J. Hyperthermia, 5, 329-340 (1989).

7) 久住治男, 西東康夫, 加藤正博, 中嶋和喜, 小林徹治, 塚原健治, 打林忠雄, 三崎俊光: ヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 の凝固・線溶活性について. 日泌尿会誌, 69, 1328-1333 (1978).

8) 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, 485-495 (1978).

9) 打林忠雄: ヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47, KW-103 および Hela 細胞における各種抗癌剤の殺細胞効果について. 日泌尿会誌, 74, 1606-1620 (1983).

10) Puck, T. T. & Marcus, P. I.: A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors.

Proc. Nat. Acad. Sci., 41, 432-437 (1955).

11) Elkind, M. M. & Sutton, H.: Radiation response of mammalian cells grown in culture. I. Repair of X-ray damage in surviving chinese hamster cells. Radiat. Res., 13, 556-593 (1960).

12) 宮本忠昭, 寺島東洋三: 放射線と化学療法の併用. 癌・放射線療法, 第1版, 55-69頁, 篠原出版, 東京, 1987.

13) Valeriote, F. & Lin, H. S.: Synergistic interaction of anticancer agents: A cellular perspective. Cancer Chemother. Rep., 59, 895-900 (1975).

14) Hisazumi, H., Misaki, T. & Miyoshi, N.: Photoradiation therapy for bladder tumors. J. Urol., 130, 685-687 (1983).

15) Hisazumi, H., Miyoshi, N., Naito, K. & Misaki, T.: Whole bladder wall photoradiation therapy for carcinoma in situ of the bladder: A preliminary report. J. Urol., 131, 884-887 (1984).

16) 久住治男, 内藤克輔, 三崎俊光, 山本 肇: Gold vapor laser を用いた photodynamic therapy の基礎的研究. 日本レーザー医学会誌, 5, 59-62 (1985).

17) 久住治男, 三崎俊光: 表在性膀胱腫瘍に対する光力学的治療. 手術, 40, 1275-1285 (1986).

18) Dougherty, T. J.: Photoradiation therapy. Urology, 23 (Suppl.), 61-64 (1984).

19) Cowled, P. A., Mackenzie, L. & Forbes, I. J.: Pharmacological modulation of photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative and light. Cancer Res., 47, 971-974 (1987).

***In vitro* Studies of Combined Effects of Adriamycin and HpD Photodynamic Therapy**

Masahiro Nitta, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 – J. Juzen Med. Soc., **99**, 1135 – 1143 (1990)

Key words adriamycin, hematoporphyrin derivative, chemotherapy, photodynamic therapy, argon-dye laser

Abstract

The cellular uptake of adriamycin (ADM) and a hematoporphyrin derivative (HpD) was investigated using a fluorescence spectrophotometer and KK-47 bladder cancer cells *in vitro*. The fluorescence of the cells incorporating ADM was seen in the nucleus and cytoplasm and the emission peak was seen at 588 nm with 2 shoulders at 554 and 628 nm. Three types of combination of ADM and HpD; (1) ADM followed by HpD treatment (ADM→HpD), (2) HpD followed by ADM treatment (HpD→ADM), and (3) simultaneous treatment with ADM and HpD (ADM+HpD), were studied in terms of cellular uptake and phototoxicity. The HpD uptake was large in the order of (3)>(1)>(2). The HpD uptake decreased with the increasing of the ADM uptake in the case of (1) and (2). Thus, the cytotoxicity of ADM was thought to be inhibited by cellularly incorporated HpD, in the order of (3)>(1)>(2). When the cells treated with the 3 combination procedures were irradiated, the degree of cytotoxicity was high in the order of (1)>(3)>(2) with an argon-dye laser (630±5 nm), or (1)=(3)>(2) with an argon laser (488.0 and 514.5 nm). The combined cytotoxicities in the case of (1) with an argon-dye laser irradiation and in the case of (1) or (3) with an argon laser irradiation, exceeded the cytotoxic levels of ADM or HpD treatment alone. These results indicate that ADM treatment, followed by HpD and photodynamic therapy may be the most effective combination therapy for bladder cancer *in vitro*.