

# Studies of Hematoporphyrin Derivative Uptake in Nude Mice Bearing the KK-47 Bladder Tumor

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8207">http://hdl.handle.net/2297/8207</a>

## KK-47 膀胱癌移植ヌードマウスにおけるヘマトポルフィリン 誘導体取り込みに関する研究

金沢大学医学部泌尿器科学講座 (主任: 久住治男教授)

平 田 昭 夫

(平成2年7月5日受付)

光感受性物質, ヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivative, HpD) とレーザー光照射による悪性腫瘍の光線力学的治療は HpD の腫瘍親和性にに基づいている. HpD は hematoporphyrin (Hp), hydroxyethylvinyldeuteroporphyrin (Hvd), protoporphyrin (Pp) およびポルフィリン乏量体の混合物であると言われている. そこで今回 HpD 中のどのポルフィリン成分が HpD の腫瘍親和性に関与しているかを高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) を用いて検討した. ヒト移行上皮癌由来培養細胞 KK-47 をマウス (BALB/c, nu/nu) 背部皮下に移植後, HpD 25mg/kg 投与し, 12~96時間後の腫瘍, 肝, 脾, 腎, 肺および腫瘍周囲筋肉組織のポルフィリンを酢酸エチル, 塩酸等の溶媒により抽出し, HPLC を用いてそれらの分析および分離を行った. ついで HPLC で分離されたポルフィリンの蛍光励起および発光スペクトルの測定を行った. HPLC による分析にて HpD 中には8種類のポルフィリンが認められ, Hp, Hvd の2つの異性体, Pp のほかにも4種類のポルフィリン (F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>7</sub>, F<sub>8</sub>) が分画された. 腫瘍親和性の比較において, HpD 投与48時間後には Hp に比較し Hvd で1.22倍, F<sub>4</sub> で2.92倍, F<sub>5</sub> で3.00倍, Pp で2.34倍, F<sub>7</sub> で4.15倍, F<sub>8</sub> で5.55倍の高い腫瘍親和性が認められた. また HpD 投与後の筋肉組織に対する腫瘍組織内の各ポルフィリンの濃度比は経時的に, Hp, Hvd, Pp は1~3倍であるのに対し F<sub>4</sub> と F<sub>5</sub> は4~6倍, さらに F<sub>7</sub> と F<sub>8</sub> は6~11倍と F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>7</sub>, F<sub>8</sub> の高い腫瘍親和性, および, 比は, 投与後時間とともに大きくなることより, 腫瘍に残留する傾向が認められた. また HpD 投与後に腫瘍組織より抽出された Hp, Hvd, Pp の蛍光発光スペクトルは波長 630nm と 695nm にピークを持つ二峰性であるのに対し, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>7</sub>, F<sub>8</sub> では二つのピークの他に 650nm にもピークが認められ, 三峰性を示し, この特徴的なスペクトルより F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>7</sub>, F<sub>8</sub> はポルフィリン乏量体と推察された. HpD 中のポルフィリンではポルフィリン乏量体の腫瘍組織親和性が高く, 腫瘍周囲組織との比較による腫瘍集積性についてもポルフィリン乏量体が重要な役割を果たしていると考えられた.

**Key words** hematoporphyrin derivative (HpD), high performance liquid chromatography, tumor localizing HpD components, tissue HpD uptake, HpD fluorescence spectrum

光感受性物質の一つであるヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivative, HpD) を用いたレーザー光照射による癌の局在診断, および光力学的治療 (photodynamic therapy, PDT) は膀胱癌をはじめ

め各種ヒト悪性腫瘍に応用されている<sup>1-3)</sup>. HpD は1961年 Lipson ら<sup>4)</sup> により hematoporphyrin dihydrochloride (HDh) から合成されて以来, その内容成分の同定がなされてきた. HpD にはポルフィリンの

Abbreviations: HDh, hematoporphyrin dihydrochloride; HDL, high density lipoprotein; Hp, hematoporphyrin; HpD, hematoporphyrin derivative; HPLC, high performance liquid chromatography; Hvd, hydroxyethyl-vinyl-deuteroporphyrin; LDL, low density

単量体である hematoporphyrin (Hp), hydroxyethyl-vinyl-deuteroporphyrin (Hvd), protoporphyrin (Pp) の他にポルフィリンの二量体, 乏量体, および, 会合体が含まれているといわれ, HpD の腫瘍親和性および PDT 殺細胞効果がいずれのポルフィリン成分によるものかについて多くの議論がなされている<sup>5,6)</sup>. しかし, これまで HpD 中の各ポルフィリンの分離および同定を明確に行う有効な手段がなかったが, 最近, 各ポルフィリンの分離に高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) が用いられるようになった.

今回著者は HPLC を用いて, HpD の構成成分の同定, 特に腫瘍組織に親和性の高い成分の同定および分離を行ない, その成分の蛍光分光学的特性を明らかにした. さらに, この腫瘍親和性の高いポルフィリンの腫瘍組織内における経時的動態を検討し, 正常組織である肝, 脾, 腎, 肺, および腫瘍周囲の筋肉組織におけるポルフィリン取り込み動態と比較検討を行った.

#### 材料および方法

##### I. 使用薬剤

HpD (Photofrin I, Oncology Research and Development Inc., N. Y., U. S. A.), Hp および Pp (Sigma Chemical Co., St. Louis, U. S. A.), さらに, Hvd (浜理薬品, 大阪) を使用した.

##### II. 実験動物および移植腫瘍細胞とその実験方法

実験動物としては生後 6 週齢, 雌性ヌードマウス (BALB/c, nu/nu) を使用し, 移植腫瘍細胞は, 当教室で樹立したヒト膀胱移行上皮癌由来培養株 KK-47 細胞である. 10%胎児牛血清を含む Ham F12 培養溶液中で維持されているが, その生細胞  $1 \times 10^7$  個/0.2ml の浮遊液を作成しマウス背部皮下に接種した. 約 2 週間後に直径約 1cm に発育した腫瘍を切除し, 3mm 角

に細切し新たなヌードマウス背部に再移植した. 約 2 週間後指数関数的増殖を示し, 腫瘍直径 1cm 前後のものを一群 5 匹として使用した. HpD は生理的食塩水に溶解し 25mg/kg をマウス腹腔内に投与し, 投与後 12, 24, 48, 72 および 96 時間後にマウスを屠殺し, 腫瘍, 肝, 脾, 腎, 肺および腫瘍周囲筋肉組織を摘出した.

##### III. 腫瘍および各臓器よりのポルフィリン誘導体の抽出

Evensen らの方法に準じて行った<sup>12)</sup>. この方法は, 表 1 に記したように, 各組織より湿重量 200mg を切除後これを細切し, 0.15M の酢酸 5ml を加えてホモジネートした. これに酢酸エチルと酢酸 (3:1) の混合液 50ml を加え,  $-18^{\circ}\text{C}$  にて 1 時間静置した. ついでガラスフィルターにて濾過後, 飽和酢酸ナトリウム水溶液 25ml を加え, 有機層を分離した. この有機層に 1.5M の塩酸 30ml を加え攪拌し, 塩酸層を分離除去した後, 無水酢酸ナトリウムにより pH 3.0~3.5 に調整した. そして, エチルエーテル 10ml にて抽出を行い, エーテル層を分離採取した. このエーテルを減圧除去後, 残留物を HPLC の移動層 1ml に溶解し, HPLC の測定資料とした. サンプルは HPLC 分析の直前に 0.45  $\mu\text{m}$  のミリポアフィルターで濾過を行った.

##### IV. HPLC の測定方法

HPLC は高速液体クロマトグラフ LC-5A 型 (島津製作所, 京都), カラムは Zorbax ODS (4.6mm  $\times$  25 cm) (DuPont Co., Wilmington, France) を使用した. 移動層は 10% 酢酸緩衝液となるように調整した 50% テトラヒドロフラン水溶液を使用し, 0.7ml/min の流速で実施した. 検出は 400nm 励起の, 630nm の蛍光強度を分光蛍光光度計 PF-500 型 (島津製作所, 京都) にて, 400nm の吸光度を spectrophotometric detector SPD-2A (島津製作所, 京都) にて測定を行なった. どちらも HPLC の移動層および流速は同条件で行なった. 標準コントロールとして 10  $\mu\text{g/ml}$  の HpD を毎回 10  $\mu\text{l}$  流してピークの保持時間を確認した.

##### V. HPLC により分離されたポルフィリンの蛍光スペクトル

HpD 投与 48 時間後に腫瘍より抽出されたポルフィリンの HPLC のクロマトグラムの各ピークに対応するフラクションを分離し, その蛍光スペクトルを分光蛍光光度計 850 型 (日立製作所, 東京) にて測定した.

Table 1. Extraction Method of Porphyrins from Tissue Samples

1. Resect the tissue 0.1~0.2 g in weight
2. Homogenize in 0.15 N acetic acid
3. Add ethylacetate : acetic acid (3:1)
4. Store at  $-18^{\circ}\text{C}$  for 1 hr
5. Filter through a glass filter
6. Add a saturated solution of sodium acetate
7. Extract the organic phase with 1.5 N hydrochloride
8. Adjust to pH 3-3.5 with sodium acetate
9. Extract the porphyrins by ether

lipoprotein; PDT, photodynamic therapy; Pp, protoporphyrin; TLC, thin layer chromatography

## 成 績

## I. HpD および HpD 投与48時間後に腫瘍組織より抽出し得たポルフィリンの HPLC クロマトグラム, およびクロマトグラム上でのポルフィリンの面積比

50%テトラヒドロフラン-酢酸緩衝液に溶解した HpD の HPLC クロマトグラムは, 蛍光強度を測定すると, 図1の実線に示すごとくであった. HpD 溶液をカラムに注入してから保持時間(1)6分50秒, (2)9分25秒, (3)9分45秒, (4)11分40秒, (5)13分5秒, (6)15分52秒, (7)16分50秒および(8)17分52秒にそれぞれピークが認められた. これらのピークをそれぞれ図のように  $F_1, F_2, F_3, F_4, F_5, F_6, F_7$  および  $F_8$  とした. また吸光度測定では図2のごとくで, 蛍光強度測定の場合と同様のピークが認められた. それぞれの標準物質の保持時間を比較することにより,  $F_1$  は Hp,  $F_2$  は 4-hydroxyethyl-2-vinyl-deuteroporphyrin,  $F_3$  は 2-hydroxyethyl-4-vinyl-deuteroporphyrin,  $F_6$  は Pp と同定された. 図1の破線で示したクロマトグラムは, HpD を腫瘍移植マウスに投与48時間後, 腫瘍から抽出したポルフィリンの HPLC クロマトグラムの1例である. 図1ではスペクトルパターンが比較できるように  $F_1$  (Hp) のピークの高さを等しくして示した. 表1に

示した抽出操作により HpD に化学的変化が起こるかどうかの検討として, 無処理の腫瘍および各組織を用い, これに HpD を添加し同じ抽出操作を行ったが, 図1の実線で示したごとくクロマトグラム上の変化は認められなかった. このことより表1における抽出操作では HpD 中のポルフィリンは化学的変化を受けないものと考えられた. また, この時の HpD の回収率は75~80%であった. 図1の実線と破線の蛍光強度を比較すると, 破線の方が高いピークとなるフラクションは  $F_4, F_5, F_6$  (Pp),  $F_7$  そして  $F_8$  で, これらフラクションの保持時間はいずれも11分以上の成分であった. それぞれのフラクションを面積比で比較してみると, 表2のごとくである. HpD のクロマトグラムにおいての全体に占める面積比率は, Hp ( $F_1$ ) は約29%, Hvd ( $F_2+F_3$ ) は約33%であった. それに比較して, HpD 投与48時間後に移植腫瘍に取り込まれたポルフィリンでは Hp ( $F_1$ ) の全体に占める面積比率は約16%, Hvd ( $F_2+F_3$ ) は約21%と減少しており, Hp, Hvd 以外のポルフィリン ( $F_4, F_5, F_6, F_7, F_8$ ) の腫瘍内取り込みの高いことが示唆された.

## II. HpD 投与48時間後に腫瘍組織に取り込まれたポルフィリンの相対的親和性について

腫瘍組織内において HpD 投与48時間後にどのポルフィリンが親和性が高いかを HPLC にて検討した.

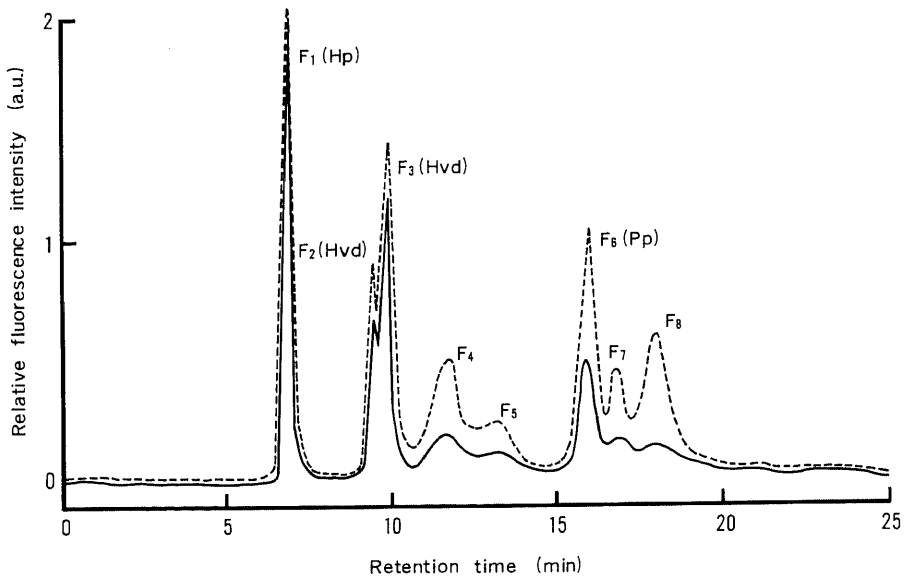


Fig. 1. HPLC chromatogram. The solid line shows HPLC chromatogram of HpD dissolved in tetrahydrofuran acetate buffer, and the dotted line that of porphyrins extracted from the tumor at 48 hr after HpD injection. The excitation and observation wavelengths were 400 and 630 nm, respectively.

HpD 投与後に Hp の腫瘍内取り込み比を 1 としたときの、他のポルフィリンの取り込み比を求めた。つまり HpD のクロマトグラムより、n 番目のフラクションのピークの面積 (S) を SFn, Hp のフラクションピークの面積を SHp とした。同様にして、腫瘍組織内から抽出したポルフィリンのクロマトグラムより、n 番目のフラクションピークの面積を SFn', Hp のフラクションピークの面積を SHp' とし、図 3 の縦軸に相当する値、式  $\{(SFn'/SHp')/(SFn/SHp)\}$  を求めると、図 3 の棒グラフが得られ、Hp を基準としてポルフィリン類の相対的親和性を示している。F<sub>2</sub> と F<sub>3</sub> は Hvd の異性体であり、またピークが重なるため併せて表示した。F<sub>23</sub>(Hvd) は 1.22, F<sub>4</sub> は 2.92, F<sub>5</sub> は 3.02, F<sub>6</sub>(Pp) は 1.84, F<sub>7</sub> は 3.94, F<sub>8</sub> は 4.29 となり、Hp に比較し F<sub>4</sub>~F<sub>8</sub> の腫瘍組織への高い親和性が認められた。

### III. 腫瘍組織による取り込みポルフィリンの経時的、相対的濃度変化

HpD 投与後経時的に得られた腫瘍組織抽出液の HPLC 各フラクションの蛍光強度変化を、個々のピークの面積から求めた (表 3)。定量化を期すために、用いられた腫瘍組織の単位湿重量 (10<sup>-5</sup> g) 当たりの蛍光強度で表わした。しかしながら、各々のポルフィリンの蛍光発光能 (量子収率) が異なるために、フラクション間での相対的蛍光強度比はフラクション間の濃度比には必ずしも一致しない。しかし個々のフラクション

の経時的濃度変化を見ることは可能である。表 3 のごとく腫瘍組織内に取り込まれた個々のポルフィリンは、投与 24~72 時間後に最大濃度を示した。残留性の検討では F<sub>6</sub>(Pp) が他のフラクションに比較し残留傾向が大で、投与 96 時間後に投与 48 時間値の約 90% の濃度を示した。それに比較して他のフラクションでは 42%~64% であった。

### IV. 各臓器による取り込みポルフィリンの経時的、相対的濃度変化

HpD 投与後の肝、脾、腎、肺および腫瘍周囲筋肉組織による取り込みポルフィリンの経時的動態を HPLC を用いて求めた。すなわち各組織の単位湿重量

Table 2. Ratio of each of the fraction areas of HpD and tumor extract porphyrins at 48 hr after HpD intraperitoneal injection

fraction	time (min)	HpD	tumor extracts
F <sub>1</sub> (Hp)	6.83	0.292 (1.000)	0.162 (1.000)
F <sub>2</sub> (Hvd)	9.42	0.090 (0.308)	0.058 (0.358)
F <sub>3</sub> (Hvd)	9.75	0.244 (0.836)	0.153 (0.944)
F <sub>4</sub>	11.67	0.094 (0.322)	0.135 (0.833)
F <sub>5</sub>	13.09	0.035 (0.120)	0.054 (0.333)
F <sub>6</sub> (Pp)	15.87	0.144 (0.493)	0.169 (1.043)
F <sub>7</sub>	16.83	0.050 (0.171)	0.110 (0.679)
F <sub>8</sub>	17.98	0.051 (0.175)	0.159 (0.981)
total		1.000	1.000

F<sub>1</sub> (Hp), F<sub>2</sub> (Hvd), F<sub>3</sub> (Hvd), F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub> (Pp), F<sub>7</sub>, F<sub>8</sub> are the names of fractions. Numbers in parenthesis are the relative values to F<sub>1</sub> (Hp).

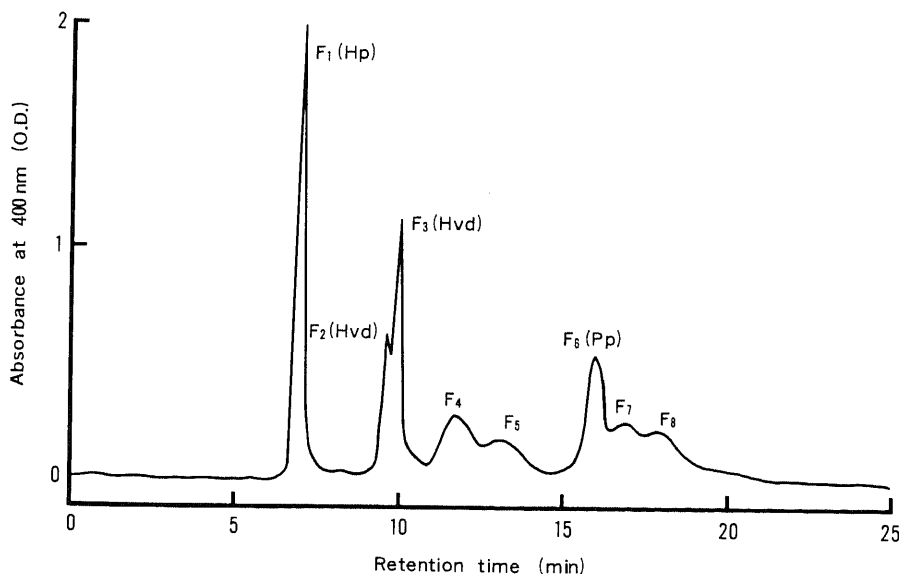


Fig. 2. HPLC chromatogram of HpD in tetrahydrofuran acetate buffer. Absorbance at 400 nm was monitored.

( $10^{-5}$ g) あたりの取り込みポルフィリンの蛍光強度で検討した. 表4は肝, 表5は脾, 表6は腎, 表7は肺, および表8は筋肉組織における値である. 表3の腫瘍における値と比較すると, HpD投与48時間後に

において, HpD中のどのポルフィリンも筋肉組織より腫瘍組織に高い濃度が認められたものの, 肝および脾よりは低濃度であった. 腎および肺と腫瘍組織との比較では, 腫瘍組織により高い濃度が認められたもの

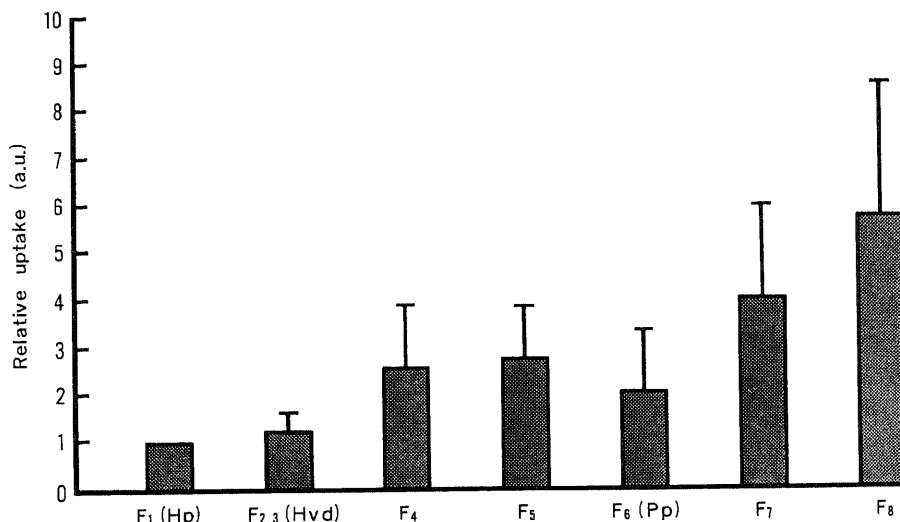


Fig. 3. Uptake ratios of F<sub>2,3</sub>(Hvd), F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub>(Pp), F<sub>7</sub> and F<sub>8</sub> porphyrins to Hp concentration in the tumor at 48 hr after HpD injection. Bars represent standard error.

Table 3. Tumor levels of each of the porphyrin fractions after HpD injection

hr.	F <sub>1</sub> (Hp)	F <sub>2,3</sub> (Hvd)	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub> (Pp)	F <sub>7</sub>	F <sub>8</sub>
12	20.2±2.3	22.4±3.5	17.3±2.4	6.5±1.4	12.6±4.3	7.3±1.1	10.6±2.2
24	20.8±2.4	24.3±4.8	17.3±1.5	7.7±1.5	18.5±2.4	13.8±2.3	15.5±2.4
48	21.6±3.0	29.2±3.8	19.9±2.4	7.6±0.7	22.5±4.6	15.1±2.8	20.6±2.3
72	20.8±2.4	19.0±5.8	15.1±3.4	4.8±1.7	24.4±4.0	13.5±0.8	16.1±1.8
96	13.9±4.8	12.2±2.7	9.2±2.0	3.2±0.7	20.2±5.4	8.2±0.7	9.2±1.1

All values are fluorescence intensities per  $10^{-5}$  g tissue and are given as mean±standard error of five determinations.

Table 4. Liver levels of each of the porphyrin fractions after HpD injection

hr.	F <sub>1</sub> (Hp)	F <sub>2,3</sub> (Hvd)	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub> (Pp)	F <sub>7</sub>	F <sub>8</sub>
12	357.6±39.6	290.7±38.3	202.5±24.7	94.0±11.2	83.5±5.6	37.0±9.8	74.8±13.0
24	211.5±44.8	213.4±33.0	179.3±25.4	79.3±15.6	159.2±18.5	33.9±4.2	71.8±14.0
48	151.0±17.2	171.3±13.8	120.2±15.7	55.1±5.8	162.4±21.9	28.0±4.2	37.5±8.7
72	150.0±21.0	158.1±16.9	111.5±11.6	73.4±9.0	132.2±20.1	22.0±4.6	30.8±8.8
96	137.5±25.5	133.5±18.7	63.2±6.7	40.8±6.7	134.5±24.9	15.6±6.8	21.2±6.6

All values are fluorescence intensities per  $10^{-5}$  g tissue and are given as mean±standard error of five determinations.

Table 5. Spleen levels of each of the porphyrin fractions after HpD injection

hr.	F <sub>1</sub> (Hp)	F <sub>2,3</sub> (Hvd)	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub> (Pp)	F <sub>7</sub>	F <sub>8</sub>
12	103.2±14.5	104.4±17.0	37.4±6.4	26.3±3.4	77.4± 9.5	9.8±1.1	26.1±1.8
24	101.1±16.1	101.7±13.8	37.4±4.6	29.2±5.9	89.5±10.7	13.1±1.9	25.6±3.7
48	113.3±18.8	104.3±18.0	24.9±5.3	17.4±2.5	100.3± 5.3	9.2±1.2	19.4±4.5
72	72.2±10.0	61.4± 4.0	16.5±1.6	7.2±1.4	57.4± 8.4	3.4±1.4	5.6±2.0
96	60.2± 9.9	50.4± 8.7	6.7±3.7	3.6±0.7	53.2± 9.9	1.4±0.6	1.3±0.7

All values are fluorescence intensities per 10<sup>-5</sup> g tissue and are given as mean±standard error of five determinations.

Table 6. Kidney levels of each of the porphyrin fractions after HpD injection

hr.	F <sub>1</sub> (Hp)	F <sub>2,3</sub> (Hvd)	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub> (Pp)	F <sub>7</sub>	F <sub>8</sub>
12	69.8±5.4	75.8±9.5	20.3±3.5	16.2±1.8	63.8±7.9	13.7±1.8	16.1±1.7
24	77.5±5.9	70.7±6.7	19.7±4.2	12.8±1.8	75.2±8.7	13.0±2.0	7.3±1.3
48	72.3±7.4	72.5±8.5	14.1±4.3	7.9±1.3	60.2±6.8	5.0±1.8	7.5±1.1
72	54.0±6.2	46.1±5.2	4.5±1.1	3.2±0.9	52.9±6.9	4.0±1.1	6.1±1.9
96	33.0±5.6	33.1±4.9	4.3±1.3	1.8±0.2	32.2±5.9	2.1±0.9	3.3±1.3

All values are fluorescence intensities per 10<sup>-5</sup> g tissue and are given as mean±standard error of five determinations.

Table 7. Lung levels of each of the porphyrin fractions after HpD injection

hr.	F <sub>1</sub> (Hp)	F <sub>2,3</sub> (Hvd)	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub> (Pp)	F <sub>7</sub>	F <sub>8</sub>
12	29.5±4.1	26.9±3.4	5.0±0.6	3.9±0.5	19.7±3.0	3.5±0.7	5.3±0.5
24	31.3±3.3	30.3±2.0	5.6±0.9	4.2±1.1	36.3±2.6	2.4±0.7	6.3±1.5
48	31.9±2.9	33.7±3.2	4.8±0.7	3.4±0.7	33.1±3.5	1.8±0.4	3.4±0.6
72	21.6±2.1	23.1±3.2	3.9±1.1	1.7±0.4	25.3±3.9	1.3±0.7	2.9±0.6
96	14.5±1.0	14.4±2.3	2.5±0.4	1.7±0.4	21.6±2.7	1.5±0.5	1.9±0.3

All values are fluorescence intensities per 10<sup>-5</sup> g tissue and are given as mean±standard error of five determinations.

Table 8. Muscle levels of each of the porphyrin fractions after HpD injection

hr.	F <sub>1</sub> (Hp)	F <sub>2,3</sub> (Hvd)	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub> (Pp)	F <sub>7</sub>	F <sub>8</sub>
12	12.9±1.8	13.0±1.6	2.8±0.5	1.6±0.7	9.6±0.5	1.1±0.2	1.5±0.6
24	12.2±1.3	13.6±1.1	2.7±0.3	2.2±0.5	9.9±1.1	1.5±0.4	2.7±0.5
48	11.1±1.3	12.0±1.1	3.4±0.6	2.6±0.6	10.4±1.1	1.9±0.4	2.3±0.4
72	9.7±0.7	10.9±1.1	3.3±0.7	1.1±0.3	10.2±1.4	2.0±0.5	1.8±0.4
96	8.0±1.9	6.8±1.4	1.6±0.5	1.0±0.2	7.8±0.7	1.0±0.3	0.9±0.3

All values are fluorescence intensities per 10<sup>-5</sup> g tissue and are given as mean±standard error of five determinations.

と、腎あるいは肺により高値を示すものに分かれた。検討したすべての時間においてどのポルフィリンも他臓器に比較し、より腫瘍組織に多く取り込まれたものは認められなかった。つまり HpD 内に含まれるポルフィリンには特異的に腫瘍親和性の顕著なものは認められなかった。

#### V. 腫瘍組織および各臓器による取り込みポルフィリンの相対的、経時的な親和性について

図 2 では HpD 投与48時間後、腫瘍内に取り込まれたポルフィリンの Hp に対する相対的親和性を検討し

たが、さらに各臓器に取り込まれたポルフィリンの親和性を、Hp のそれと比較検討した。図 2 と同様に、HpD の HPLC の結果より、n 番目のフラクションのピークの面積を SFn, Hp のフラクションピークの面積を SHp とした。同様にして、各臓器よりの抽出液についても n 番目のフラクションピークの面積を SFn', Hp のフラクションピークの面積を SHp' として、図 4 ~ 図 9 の縦軸に相当する値、式  $\{ (SFn'/SHp') / (SFn/SHp) \}$  を求めた。図 4 は F<sub>23</sub>(Hvd), 図 5 は F<sub>4</sub>, 図 6 は F<sub>5</sub>, 図 7 は F<sub>6</sub>(Pp), 図 8 は F<sub>7</sub>, およ

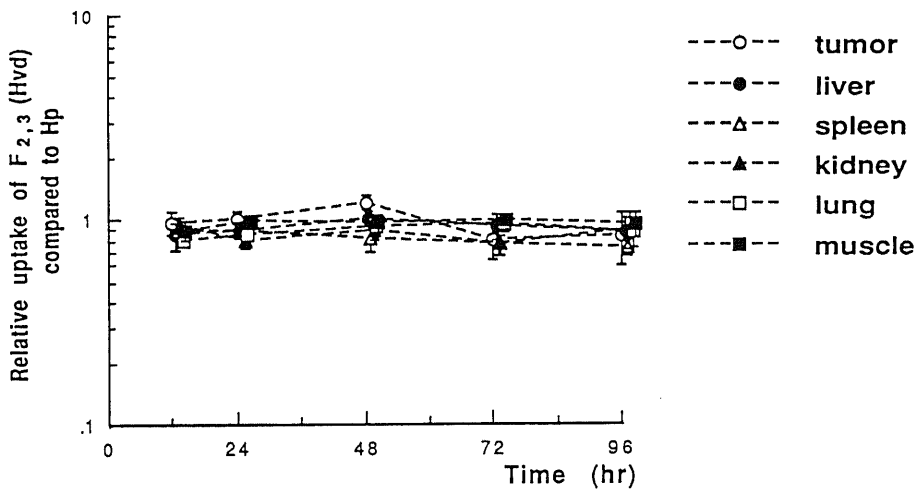


Fig. 4. Uptake ratios of F<sub>23</sub>(Hvd) compared to Hp in the various tissues with increasing intervals after HpD injection. Each point represents mean  $\pm$  standard error.

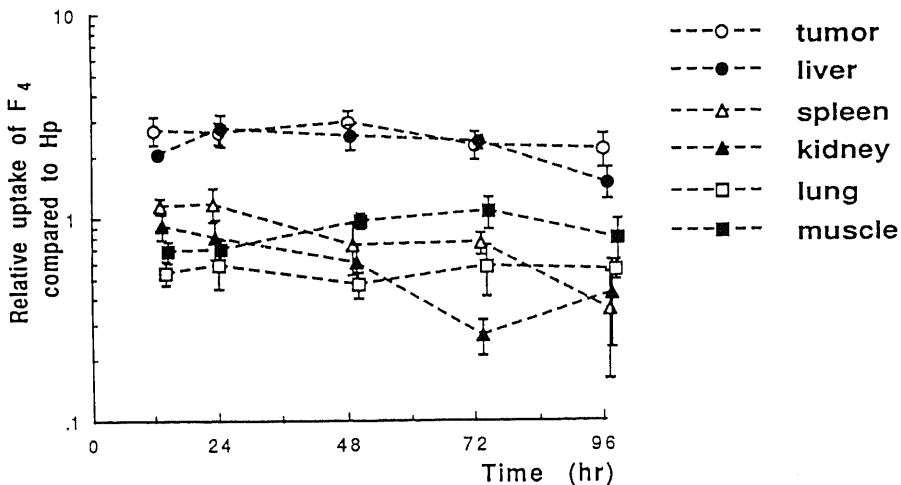


Fig. 5. Uptake ratios of F<sub>4</sub> compared to Hp in the various tissues with increasing intervals after HpD injection. Each point represents mean  $\pm$  standard error.



び図9はF<sub>5</sub>の腫瘍組織、各臓器におけるHpに比しての相対的親和性の経時的推移である。図4のHvdについては、腫瘍組織および各臓器でHpと比して1前後であり、また経時変化は少なく、腫瘍および各臓器でHpとHvdの親和性に差がみられなかった。図5に示すごとく腫瘍組織および肝ではHpとF<sub>4</sub>の比は2~3であるのに対し、脾、腎、肺および筋肉組織ではこの比が1以下であり、Hpに比較しF<sub>4</sub>は腫瘍組織および肝で親和性は高かった。図6では図5と同様

に腫瘍組織および肝でF<sub>5</sub>の親和性が高い結果であり、それ以外の臓器では脾で投与12および24時間において2~3倍の高い親和性があるものの、それ以外の時間および他臓器ではHpより親和性は認められなかった。図7はPpのHpに対する親和性の比を示す。HpD投与48時間後でPpはHpに比し腫瘍組織および各臓器で約2倍の高い親和性を示し、時間とともに比が大きくなる傾向が認められた。しかし腫瘍組織および他臓器ではこれらの親和性に差は認められなかつ

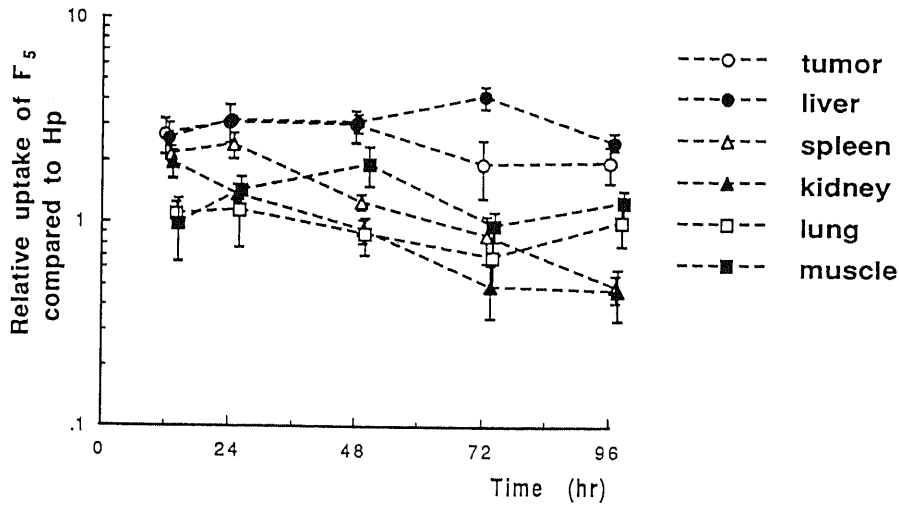


Fig. 6. Uptake ratios of F<sub>5</sub> compared to Hp in the various tissues with increasing intervals after HpD injection. Each point represents mean  $\pm$  standard error.

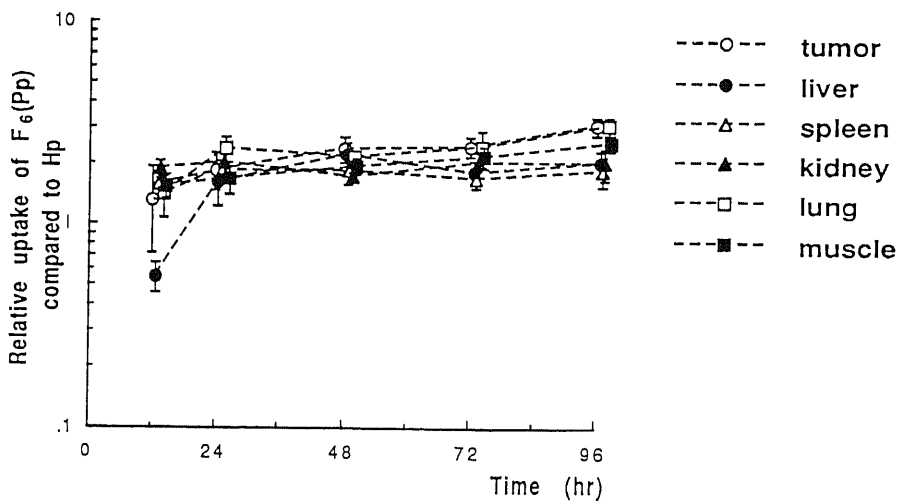


Fig. 7. Uptake ratios of F<sub>6</sub>(Pp) compared to Hp in the various tissues with increasing intervals after HpD injection. Each point represents mean  $\pm$  standard error.

た. 図8および図9では腫瘍組織において Hp に比し  $F_7$  は3~4倍,  $F_8$  は3~6倍親和性が高い結果であったが, 他臓器では比は1以下であり経時的にも減少する傾向にあり,  $F_7$  および  $F_8$  は比較的早く低下する傾向が認められた.

#### VI. 腫瘍組織および周囲筋肉組織内取り込みポルフィリン類濃度の経時的比較

HpD 投与後の腫瘍組織および筋肉組織の抽出液を HPLC にて処理し, 各フラクションにおける単位湿重

量当りの蛍光強度を用いてポルフィリンの濃度比を算定した(図10). 腫瘍組織の筋肉組織に対する濃度比では Hp と Hvd は約2であり, 経時的な変化は認められなかった. それに対し Pp については12, 24, 48, 72および96時間後における比はそれぞれ1.34, 1.91, 2.16, 2.40および2.64と時間とともに大きくなり, Pp は筋肉組織に比較し腫瘍組織に残留する傾向が大きいと考えられた. また  $F_7$  および  $F_8$  では比が4~7,  $F_8$  では3~5と筋肉組織に比し腫瘍組織に高濃度

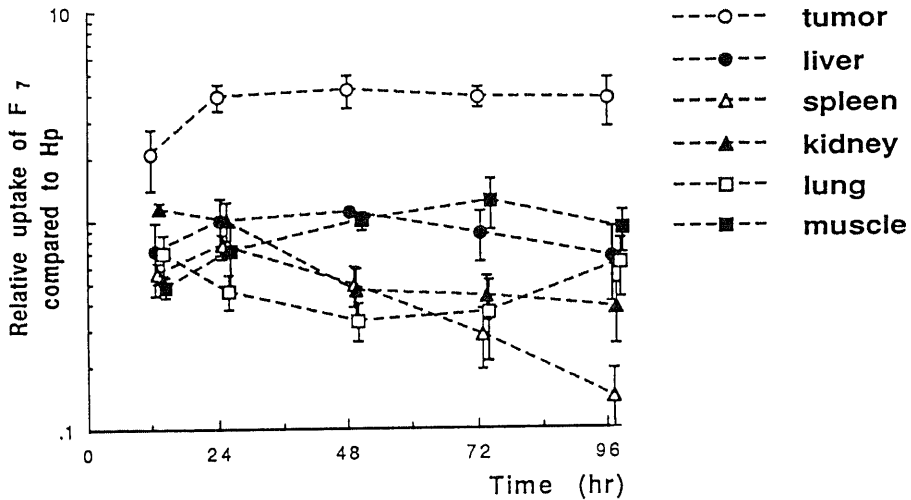


Fig. 8. Uptake ratios of  $F_7$  compared to Hp in the various tissues with increasing intervals after HpD injection. Each point represents mean  $\pm$  standard error.

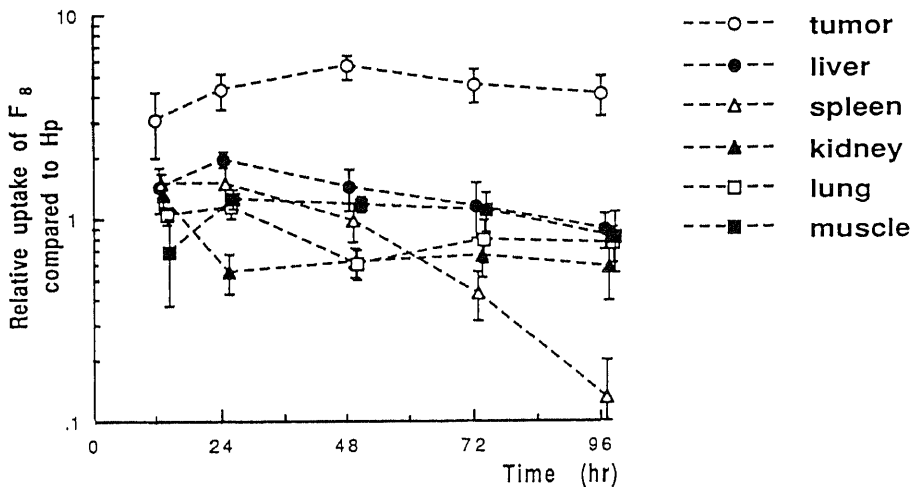


Fig. 9. Uptake ratios of  $F_8$  compared to Hp in the various tissues with increasing intervals after HpD injection. Each point represents mean  $\pm$  standard error.

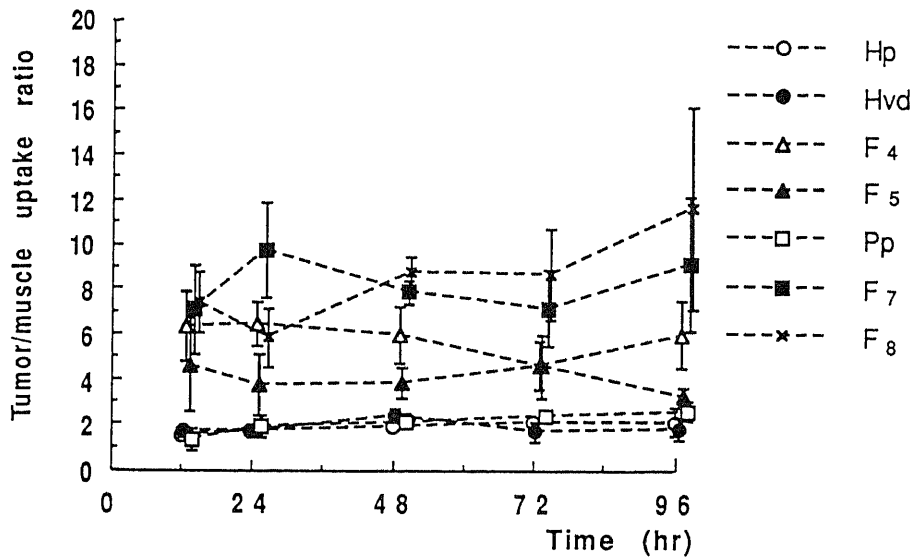


Fig.10. Concentration ratios of each of the fractions in the tumor as compared to the muscle with increasing intervals after HpD injection. Each point represents mean  $\pm$  standard error.

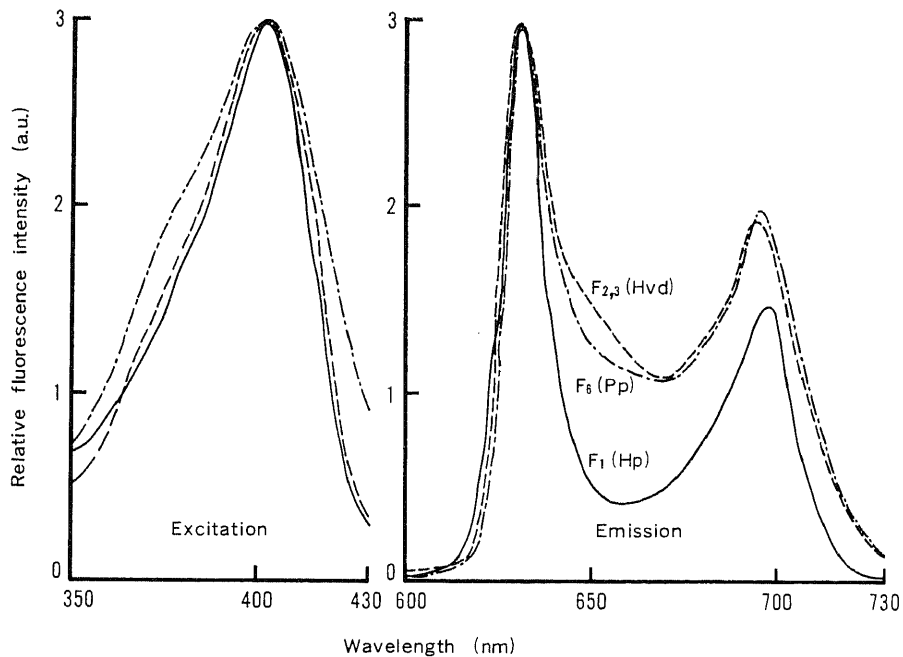


Fig.11. The fluorescence spectra of F<sub>1</sub>(Hp), F<sub>2,3</sub>(Hvd) and F<sub>6</sub>(Pp) in tetrahydrofuran acetate buffer solution. (—), F<sub>1</sub>(Hp); (·····), F<sub>2,3</sub>(Hvd); (---), F<sub>6</sub>(Pp). The excitation and observation wavelengths were 400 and 630 nm, respectively.

に認められたが、時間的推移については比がさらに大きくなるような傾向は認められなかった。また  $F_7$  および  $F_8$  では比がおのおの 7~10, および 5~11 と大きな値であり筋肉組織に比較し腫瘍組織親和性が高いと考えられた。

#### VII. HpD 投与後、腫瘍組織より抽出し得たポルフィリン類の HPLC により分離された各フラクションの蛍光分光学的特徴

HpD 投与48時間後の腫瘍組織抽出液の HPLC におけるポルフィリンの各フラクションにつき蛍光発光スペクトルを測定すると、図11、12に示すごとくである。図11は  $F_1$ (Hp),  $F_{2,3}$ (Hvd) および  $F_4$ (Pp) の蛍光励起スペクトルと蛍光発光スペクトルである。 $F_2$  と  $F_3$  はいずれも Hvd の異性体であるが、今回用いた HPLC では分離不能のため  $F_2$  と  $F_3$  を混合したスペクトルで示した。励起スペクトルでは3つの分離された成分はいずれも 402nm に励起極大を、発光スペクトルでは 630nm と 695nm に二峰性のピークが認められた。図12はこれら Hp, Hvd および Pp 以外のフラクション ( $F_4, F_5, F_7, F_8$ ) の蛍光スペクトルである。励起スペクトルは Hp, Hvd および Pp と同様、402nm にピークが認められた。一方、発光スペクトルでは 628nm と 695nm に二峰性のピークの他に、650nm に

新たなピークが認められた。その蛍光強度は  $F_4, F_5, F_7$  および  $F_8$  の順に増大を示した。この 650nm にみられたピークは HPLC により分離してはじめて、ピークとして新しく検出することができた。

#### 考 察

HpD は1961年 Lipson ら<sup>4</sup>が以下のようにして作成したものである。すなわち最初に HDh を 19:1 の氷酢酸、濃硫酸混合液に加えた後、3%酢酸ナトリウム水溶液中で中和した。そこで生じた沈殿物を分離乾燥し、水酸化ナトリウム水溶液に溶解した後、塩酸を加え溶液の pH を 7.4 に調整したものである。HDh のアセチル化により、hematoporphyrin acetate の他に、いくつかのポルフィリン化合物が生じる。それにアルカリ処理が加えられ、加水分解が生じるため、種々のポルフィリンが形成されることになる。そのため HpD 中には Hp, Hvd および Pp のほかに少量体および会合状態のポルフィリンが含まれることになる。

従来 HpD 中のポルフィリンの分離は困難であったが、最近 HPLC あるいは薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography, TLC) を用いて HpD 内のポルフィリンの同定およびその成分の体内の経時的变化つまり体内動態が明らかにされてきた。その結果

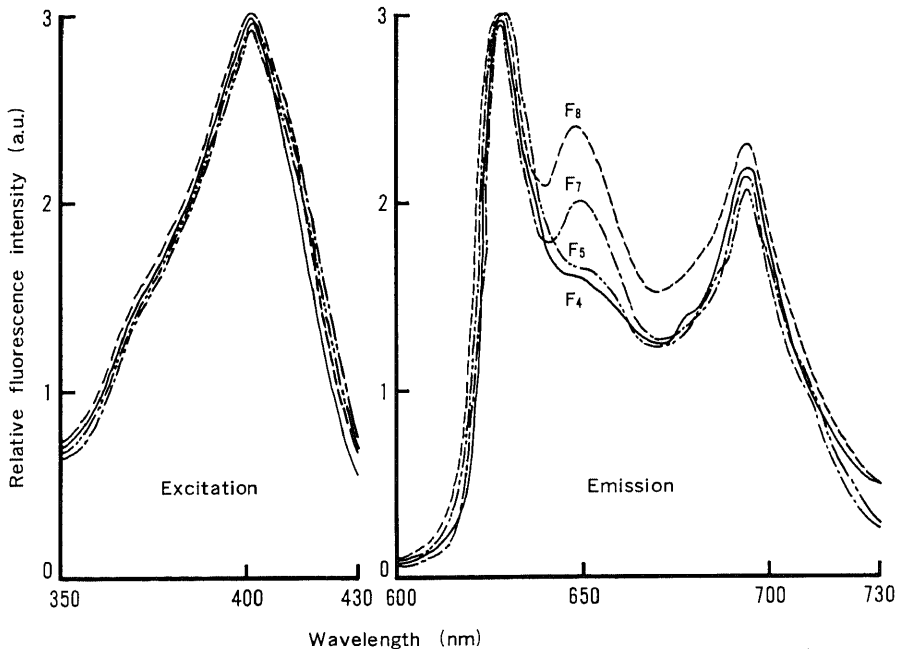


Fig.12. The fluorescence spectra of  $F_4, F_5, F_7$  and  $F_8$  in tetrahydrofuran acetate buffer solution. (—),  $F_4$ ; (---),  $F_5$ ; (- - -),  $F_7$ ; (- · - ·),  $F_8$ . The excitation and observation wavelengths were 400 and 630 nm, respectively.

HpD が Hp, Hvd, Pp 等の各種ポルフィリンの混合物であることを Bonnett ら<sup>7</sup> が HPLC の分析により, Kessel<sup>8</sup> は TLC の分析により明らかにしている. さらに Moan ら<sup>9</sup> は HpD を HPLC により, ①単量体成分, ②乏量体成分, ③会合体状態である成分の3つに分離しているが, 会合体状態のポルフィリンについて, 以下のように述べている. 彼らの HPLC の移動層であるメタノール水溶液では, Hp, Hvd および Pp は単量体状態であり, 会合体状態とはなりにくい. しかし乏量体はメタノール水溶液中では会合体状態となりやすいため, 会合体状態のポルフィリンについては, その構成分子形態は乏量体でないかと推察している. 一般に HpD は生理的食塩中あるいは各種溶液中では会合体状態となりやすい性質がある<sup>10</sup>. そこで今回 HpD 中のポルフィリンをできるだけ分離するため, 著者は HPLC の移動層にテトラヒドロフラン水溶液を用いた. その溶液中では生理的食塩水でみられる会合体状態のポルフィリンは解離し, 単量体あるいは乏量体といった構成分子形態となる<sup>11</sup>. また会合体状態のポルフィリンの蛍光発光能が低いことより, ポルフィリンの分離, 測定に蛍光を利用することは適当でないといわれる. そのため著者は蛍光光度計とは別に, 吸光光度計を用いて HPLC の測定を行った. その結果は図2で示すように分離できたポルフィリンのピークは図1の実線のクロマトグラムと同じ急峻なピークであり, 会合体状態のポルフィリンが示す幅広いピークは認められなかった. これらのことよりテトラヒドロフラン水溶液中では HpD は今回検出されたピーク以外のポルフィリンは含まれておらず, 生理的食塩水あるいはメタノール水溶液中で見られる会合体状態のポルフィリンは解離しているものと推察された.

HpD が各種ポルフィリンの混合物であることが明らかにされて以来, 選択的に腫瘍内に取り込まれる HpD 中のポルフィリン類の検討が行われてきた. Evensen ら<sup>12</sup> は Lewis 肺癌を B6D2 マウスに移植した腫瘍を用いて検討を行っている. それによると HpD を HPLC にて Hp, Hvd およびそれ以外のポルフィリンに分離した後, <sup>3</sup>H でラベルし, 経静脈的に移植腫瘍マウスに投与し腫瘍親和性について検討を行い, 投与24時間後において Hp および Hvd の腫瘍親和性は低いものの, Hp, Hvd 以外の HpD 中のポルフィリン成分は, 全体として HpD 自体に比較し2倍以上の高い腫瘍親和性を認めている. また Dougherty ら<sup>13</sup> は HpD 静注3日後の患者の粘液肉腫よりポルフィリンを抽出し HPLC により分析を行なっている

が, それによると HpD 中には Hp および Hvd はそれぞれ20%および30%含まれているのに対し, 肉腫内に集積したポルフィリン中には4.3%および1.6%しか含まれていず, Hp および Hvd の腫瘍親和性は低く, Hp および Hvd に比較して HpD 中のそれ以外のポルフィリン (疎水性ポルフィリン, 著者の HPLC での分離では F<sub>4</sub>~F<sub>6</sub>に相当する) の親和性の高いことを述べている. Evensen あるいは Dougherty らの HpD 投与後の移植腫瘍および人の癌組織よりのポルフィリン抽出およびその HPLC による検討では, Hp および Hvd とそれ以外のポルフィリンの3つに分離し腫瘍親和性を検討している. それに対し, 本実験では HpD を8つに分類し, それぞれの腫瘍組織親和性の比較を行なった. 腫瘍組織内のポルフィリンの成分比が, HpD における成分比に比較して, どのような変化を示すかを明らかにした. すなわち, HPLC の保持時間が11分以上のフラクション (F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, Pp, F<sub>6</sub>, F<sub>7</sub>) の成分に関してみると, HpD における成分比と HpD 投与48時間後の腫瘍内取り込みポルフィリン類の成分比を比較すると, Hp の約2~6倍も腫瘍組織内に取り込まれていることになり, 高い親和性が認められた. とくに F<sub>7</sub>には4.15倍, F<sub>6</sub>には5.55倍の高い親和性が認められた.

HpD の腫瘍組織親和性については, HpD を腫瘍移植マウスに投与し, 青色光を照射することにより, 腫瘍にはポルフィリン特有の赤色の蛍光発光を認めるのに対し, 周囲正常組織には蛍光発光が認められないことから, HpD は腫瘍にのみ選択的に集積すると唱えられた<sup>9</sup>. しかし Gomer ら<sup>14</sup> は, [<sup>14</sup>C] HpD および [<sup>3</sup>H] HpD を用いたマウス移植腫瘍の検討から HpD は投与24, 48, 72時間後において腫瘍には周囲筋肉組織よりも高濃度に認められるものの, 肝, 脾, 腎よりは低濃度であり, HpD は全身投与後, 腫瘍に選択的親和性を有するものではないと述べている. 著者の結果でも表3~表8で示すように HpD 投与12, 24, 48, 72および96時間後のいずれの時間においても, HpD 中のいかなるポルフィリン類も腫瘍組織において最も高濃度となることはなく, 全身的なポルフィリン分布の観点からは, 腫瘍に特異的かつ選択的取り込みを示すポルフィリンは存在しないと言える.

HpD 投与後の体内分布にはどのような因子が関与するか明確にされていないが, 最近それぞれの組織の低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) レセプターの関与が重要な因子として注目されている. 増殖速度の速い組織ほど細胞膜合成のためコレステロールを必要としている. またそのコレステロールはおも

に血中の LDL を細胞内に取り込み合成されることより、腫瘍組織においては網内系組織と同様に高い LDL レセプターの存在が報告されている<sup>15)</sup>。また Kessel<sup>16)</sup>は HpD を Lewis 肺癌を移植したマウスに投与し、血漿中のいかなる成分と結合するかを HPLC を用いた検討から報告している。それによると HpD 中のポルフィリンは投与30分後には、おもに血漿中のアルブミン、高比重リポ蛋白 (high density lipoprotein, HDL) および LDL に結合する。その中でアルブミンに結合するものは約20%のポルフィリンであり、その結合したポルフィリンは主として Hp および Hvd である。それに対し LDL に主として疎水性ポルフィリン (F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>7</sub>, F<sub>8</sub>) が結合し、投与48時間後には血漿中よりほとんど消失するのに対し、HDL に結合したポルフィリン (組成の比率は HpD 中のポルフィリン比率に類似) は投与48時間後も血漿中よりの消失は少ないと報告している。このことより組織に主として取り込まれるポルフィリンは LDL に結合した疎水性ポルフィリンではないかと推察している。また投与48時後の各組織内濃度は、その組織の LDL のレセプターの数と比較的に相関すると述べている。また Barel ら<sup>17)</sup>は Hp を HDL あるいは LDL に結合させてから移植腫瘍マウスに投与し、24時間後の Hp の組織分布を求めているが、それによると腫瘍組織親和性を示すものは、主として LDL に結合した Hp である。それに対し、肝あるいは肺に比較的に親和性の高いものは HDL に結合した Hp と述べている。Kessel や Barel らの結果より考えると、腫瘍組織に取り込まれる HpD 中のポルフィリン類については主として LDL に結合した疎水性ポルフィリンであり、肝などの網内系組織には HDL および LDL、どちらかと言うと HDL に結合したポルフィリンが取り込まれ易く、HpD 中の各ポルフィリン比率に比較的に類似して取り込まれるのではないかと推察される。著者の結果でも腫瘍組織に取り込まれるポルフィリンについては図1のように F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>7</sub> および F<sub>8</sub> の疎水性ポルフィリンが比較的多く取り込まれた結果であった。また、図4～図9の結果から腫瘍においては脾、腎、肺あるいは筋肉組織に比較し、F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>7</sub> ならびに F<sub>8</sub> の Hp に対する取り込みが比較的良好なことより、HpD 投与後のポルフィリンの全身分布には LDL が大きな役割を果たしているのかも知れない。

HpD 中のポルフィリン類では、腫瘍組織に特異的親和性を示すものはないという結果を得たが、HpD を用いた癌の蛍光発光による局在診断および PDT を行なう場合に重要なことは、周囲組織に比較し腫瘍組

織に高濃度にポルフィリンが集積することである。図10では腫瘍組織の周囲正常筋肉組織に対しての各ポルフィリン濃度比を投与後の時間と共に示した。腫瘍組織においては筋肉組織に比し HpD 投与12時間後に Hp は1.58倍、Hvd は1.72倍、Pp は1.34倍であったのに対し、F<sub>4</sub> は6.40倍、F<sub>5</sub> は4.68倍、F<sub>7</sub> は7.11倍、F<sub>8</sub> は7.51倍と HpD 投与後の早い時間において F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>7</sub> および F<sub>8</sub> の腫瘍親和性の良好なことが示された。また経時的にみて、HpD 投与96時間においても筋肉組織に比し F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>7</sub> および F<sub>8</sub> の成分の高比率が維持され、腫瘍組織においては F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>7</sub> および F<sub>8</sub> の残留傾向の大きいことが示唆された。HpD の腫瘍組織への取り込みが大きいことについては、①先程述べたように LDL の関与、②腫瘍内マクロファージによる疎水性ポルフィリンの選択的取り込み<sup>12)</sup>等の説のほかには③腫瘍血管の正常血管との相異も挙げられる。腫瘍血管においては、正常血管に比較して血管透過性が高く、正常血管では透過しにくい高分子化合物が腫瘍血管では血管外へ漏出するといわれる。また腫瘍組織ではリンパ系が未発達なため、腫瘍組織の血管外へ漏出した高分子化合物が長く腫瘍組織内に留まるといわれる<sup>18)</sup>。HpD は全身投与後に、血中では先程述べたようにアルブミン、HDL あるいは LDL に結合し、高分子塊のポルフィリンとなる他に、担体に結合しない疎水性ポルフィリンは、分子間力で結合した会合体状態で循環するといわれている。会合体状態のポルフィリンについては平均分子量は20,000以上との報告もあり<sup>19)</sup>、高分子塊であるために腫瘍組織に親和性が増し、腫瘍組織内での、残留性が高まる可能性も示唆される。

腫瘍組織に取り込まれたポルフィリンは、腫瘍細胞内へ拡散あるいはピノサイトーシスにより取り込まれると考えられるが、培養細胞で HpD 中のいかなるポルフィリンに親和性が認められるかについては Moan ら<sup>9)</sup>はヒト子宮頸部上皮内癌由来培養細胞株 NHIK 3025 を用いて、Dougherty ら<sup>13)</sup>はマウスの放射線誘発癌組織肉腫腫瘍細胞株を用いて、HPLC により検討を行なっている。それらによると腫瘍細胞に親和性の高いポルフィリン成分については、HpD 中の疎水性成分で蛍光発光能の強い成分 (著者の HPLC での F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>7</sub>, F<sub>8</sub>) を挙げている。これらのことより腫瘍組織には周囲正常組織に比較し疎水性ポルフィリンが集積しやすいが、腫瘍細胞内には、腫瘍組織に集積したポルフィリンの中でも疎水性ポルフィリンが選択的に取り込まれるのではないかと考えられる。疎水性ポルフィリン (F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>7</sub>, F<sub>8</sub>) の蛍光スペクトルの特徴を検

討する目的で、腫瘍より抽出した各フラクションの蛍光励起スペクトルおよび蛍光発光スペクトルの測定を行なったが、図12のように 650nm に特徴的ピークが確認された。この特徴的な3峰性の蛍光発光ピークをもつポルフィリンについては Miyoshi ら<sup>20</sup>が乏量体のポルフィリンと報告しており、F<sub>4</sub>、F<sub>5</sub>、F<sub>7</sub>および F<sub>8</sub>はポルフィリン乏量体と推察された。また、F<sub>4</sub>、F<sub>5</sub>、F<sub>7</sub>および F<sub>8</sub>は Moan ら<sup>9</sup>、および Dougherty ら<sup>19</sup>の HPLC での HpD の分析と比較してもポルフィリンの乏量体と考えられた。HpD 中のポルフィリンの分子形態による蛍光スペクトルの相異について Miyoshi ら<sup>20</sup>が、ポルフィリンの単量体である Hp は 630nm および 695nm の二峰性の特徴を有すること、また会合状態のポルフィリンについては 630nm と 695nm の二峰性の特徴の他に 675nm にショルダーまたはピークが認められると報告している。

今回の検討より、HpD 中のポルフィリンで、腫瘍親和性の良好なものは疎水性傾向の大きいものであり、血中では各種担体と結合しやすい性質あるいは巨大な分子塊を形成しやすいポルフィリンであったことを明らかにした。現在腫瘍親和性をさらに高める目的で、①高分子ポルフィリンを合成し投与方法<sup>20</sup>、②HpD にポリエチレングリコールを結合して投与方法、③HpD をリポソームに包埋して投与方法等を考案し検討中であり、ある程度の腫瘍親和性向上の結果が得られている。

今後ポルフィリン類の腫瘍親和性の特徴を参考に、腫瘍集積性を高める方法あるいは腫瘍親和性の高いポルフィリン化合物の合成が期待される。

## 結 論

HPLC を用いて HpD 中に含まれるポルフィリンの分離および同定を行なった。また、ヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 を背部皮下に移植したヌードマウスを用いて、HpD 投与後の腫瘍、肝、脾、腎、肺および筋肉組織におけるポルフィリンの経時的取り込みを HPLC を用いて検討し、以下の結果を得た。

1. HPLC による分析により HpD 中には F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、F<sub>3</sub>、F<sub>4</sub>、F<sub>5</sub>、F<sub>6</sub>、F<sub>7</sub>および F<sub>8</sub>に分離される8種類のポルフィリンが含まれており、標準物質との比較により F<sub>1</sub>は Hp、F<sub>2</sub>および F<sub>3</sub>は Hvd の異性体、F<sub>4</sub>は Pp と同定された。

2. HpD 投与48時間後では、腫瘍組織内に取り込まれた各ポルフィリンの濃度の比較より、Hp に比し、Hvd は1.22倍、F<sub>4</sub>は2.92倍、F<sub>5</sub>は3.00倍、Pp は2.34倍、F<sub>7</sub>は4.15倍、および F<sub>8</sub>は5.55倍の腫瘍親和性

が認められた。

3. 腫瘍組織内における各ポルフィリンの残留性の検討として、HpD 投与48時間後に対する投与96時間後の比率では Hp は64%、Hvd は42%、F<sub>4</sub>は46%、F<sub>5</sub>は42%、Pp は90%、F<sub>7</sub>は54%、および F<sub>8</sub>は45%となり、Pp が最も残留傾向が大であった。

4. HpD 投与後の腫瘍、肝、脾、腎、肺および筋肉組織中の各ポルフィリンの濃度の比較では、投与12、24、48、72および96時間のいずれの時間において、腫瘍組織において最も高濃度となるものは認められず、選択的腫瘍親和性を示すポルフィリンは存在しなかった。

5. HpD 投与後の腫瘍および各臓器での Hp に対する各ポルフィリンの経時的取り込みの比較では、Hp と Hvd の間には差が認められなかった。Pp については、腫瘍および各臓器で Hp に比較し約2倍の親和性が認められ、時間とともに Hp に比較し残留する傾向も認められたが、腫瘍と各臓器間では Hp と Pp の取り込み比には差が認められなかった。脾、腎、肺、および筋肉組織においては、F<sub>4</sub>と F<sub>5</sub>の取り込みはいずれも Hp に比し差が認められないものの、腫瘍と肝では Hp より2~3倍親和性が高く、経時的親和性も大であった。F<sub>7</sub>および F<sub>8</sub>では腫瘍のみが Hp に比し3~6倍高い親和性を示し、経時的にも高い親和性が認められた。一方、他臓器では Hp と F<sub>7</sub>および F<sub>8</sub>の間には差が認められず、経時的に Hp よりすみやかに低下する傾向にあった。

6. HpD 投与後、筋肉組織に対し腫瘍組織に含有される各ポルフィリン濃度の経時的比較では、Hp および Hvd はいずれも約2倍腫瘍組織に高濃度で経時的変化は筋肉組織と比較して少なかった。一方 Pp も約2倍腫瘍組織に高濃度であるものの、時間とともに筋肉組織に比較し腫瘍組織の濃度は高く持続する傾向が認められた。また F<sub>4</sub>および F<sub>5</sub>は腫瘍組織で4~6倍と高濃度で、かつ経時的に変化が少なかった。一方 F<sub>7</sub>および F<sub>8</sub>では6~11倍腫瘍組織に高濃度で、かつ時間とともに値が大きくなり、腫瘍組織に対して高い親和性を有する成分と考えられた。

7. HpD 投与後腫瘍組織より抽出および分離し得た各ポルフィリンの蛍光励起スペクトル、および蛍光発光スペクトルの測定では、蛍光励起スペクトルに特徴的な違いはみられないものの、蛍光発光スペクトルでは Hp、Hvd および Pp は 630nm と 695nm にピークを持つ二峰性であるのに対し、F<sub>4</sub>、F<sub>5</sub>、F<sub>7</sub>および F<sub>8</sub>は 630nm と 695nm の他に 650nm に新しいピークが認められた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜っ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わします。また本論文の校正に際し、ご指導を賜った福井医科大学第一病理学教室助手である三好憲雄博士に厚く感謝します。本論文の一部は The 1st International Congress of CAPDT および第75回日本泌尿器科学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) Profio, A. E., Balchum, O. J. & Carstens, F.: Digital background subtraction for fluorescence imaging. *Med. Phys.*, **13**, 717-721 (1986).
- 2) Hisazumi, H., Misaki, T. & Miyoshi, N.: Photoradiation therapy of bladder tumors. *J. Urol.*, **130**, 685-687 (1983).
- 3) 久住治男, 内藤克輔: 表在性膀胱癌の光力学的治療. *泌尿器外科*, **1**, 829-834 (1988).
- 4) Lipson, R. L., Baldes, E. J. & Olsen, A. M.: The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J. Nat. Cancer Inst.*, **26**, 1-11 (1961).
- 5) Moan, J., McGhie, J. B. & Christensen, T.: Hematoporphyrin derivative: photosensitizing efficiency and cellular uptake of its components. *Photobiochem. Photobiophys.*, **4**, 337-345 (1982).
- 6) Nelson, J. S. & Berns, W.: Biological studies on the main fractions of hematoporphyrin derivative. *Cancer Res.*, **47**, 1027-1030 (1987).
- 7) Bonnett, R., Ridge, R. J. & Scourides, P. A.: On the nature of hematoporphyrin derivative. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 3135-3140 (1981).
- 8) Kessel, D.: Components of Hematoporphyrin derivatives and their tumor-localizing capacity. *Cancer Res.*, **42**, 1703-1706 (1982).
- 9) Moan, J. & Sommer, S.: Uptake of the components of hematoporphyrin derivative by cells and tumors. *Cancer Lett.*, **21**, 167-174 (1983).
- 10) 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).
- 11) Dougherty, T. J.: Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem. Photobiol.*, **45**, 879-889 (1987).
- 12) Evensen, J. F., Sommer, S., Moan, J. & Christensen, T.: Tumor-localizing and photosensitizing properties of the main components of hematoporphyrin derivative. *Cancer Res.*, **44**, 482-486 (1984).
- 13) Dougherty, T.J. & Mang T. S.: Characterization of intra-tumoral porphyrin following injection of hematoporphyrin derivative of its purified component. *Photochem. Photobiol.*, **46**, 67-70 (1987).
- 14) Gomer, C. J. & Dougherty, T. J.: Determination of [<sup>3</sup>H]- and [<sup>14</sup>C] hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissue. *Cancer Res.*, **39**, 146-151 (1979).
- 15) Brown, M. S., Kovanen, P. T. & Goldstein, J. L.: Evolution of the LDL receptor concept-from cultured animal cells to intact animals. *Proc. N. Y. Acad. Sci.*, **348**, 48-68 (1980).
- 16) Kessel, D.: Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization. *Cancer Lett.*, **33**, 183-188 (1986).
- 17) Barel, A., Jori G., Perin, A., Romandini, P., Pagnan, A. & Biffanti S.: Role of high-, low-, and very low-density lipoproteins in the transport and tumor-delivery of hematoporphyrin in vivo. *Cancer Lett.*, **32**, 145-150 (1986).
- 18) Matsumura Y. & Maeda H.: A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent Smancs. *Cancer Res.*, **46**, 6387-6392 (1986).
- 19) Swincer, A. G., Ward, A. D. & Howlett, G. J.: The molecular weight of hematoporphyrin derivative, its gel column fractions and some of its components in aqueous solution. *Photochem. Photobiol.*, **41**, 47-50 (1985).
- 20) Miyoshi, N., Hirata, A., Kunimi, K., Sakurai, K., Sakamoto, K., Matsumoto, N., Hisazumi, H. & Fukuda, M.: Spectroscopic study of hematoporphyrin oligomers in tumour tissue. *Lasers Med. Sci.*, **3**, 185-193 (1988).



**Studies of Hematoporphyrin Derivative Uptake in Nude Mice Bearing the KK-47 Bladder Tumor** Akio Hirata Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. Jusen Med. Soc., 99, 618-633 (1990)

**Key words** hematoporphyrin derivative (HpD), high performance liquid chromatography, tumor localizing HpD components, tissue HpD uptake, HpD fluorescence spectrum

#### Abstract

Photodynamic therapy, now undergoing clinical trials for the treatment of human neoplasms, is based on the cellular binding and retention of photosensitizing compounds. The photosensitizer hematoporphyrin derivative (HpD) has been said to be a mixture of hematoporphyrin (Hp), hydroxyethylvinyldeuteroporphyrin (Hvd), protoporphyrin (Pp) and porphyrin oligomers in physiologic saline. In the present study, the tumor and organ (liver, spleen, kidney, lung and muscle) affinities of the porphyrins contained in HpD investigated, using nude mice bearing the KK-47 bladder tumor, with high performance liquid chromatography (HPLC). Tissue samples were obtained at various intervals ranging from 12 to 96 hr after a single i. p. injection of 25 mg/kg b. w. HpD to study the pharmacokinetics. Extraction of the porphyrins from the tissues was performed with ethyl acetate and hydrochloric acid, and the extracts were fractionated by means of HPLC. The amount of each of the fractionated porphyrins was estimated using a fluorescence spectrophotometer. HPLC study demonstrated the presence of Hp, two isomers of Hvd, Pp, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>7</sub>, and F<sub>8</sub> porphyrins in HpD. Spectroscopic study of the fractionated porphyrins demonstrated marked tumor affinity and retention of hydrophobic porphyrins such as F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, Pp, F<sub>7</sub> and F<sub>8</sub> as compared to Hp over an increasing passage of time. Although the concentrations of Hp, Hvd and Pp in the tumor extracts were 1 to 3-fold higher than those in the muscle extracts, those of F<sub>4</sub> and F<sub>5</sub> in the tumor extracts were persistently 4 to 6-fold higher than those in the muscle extracts during the observation period. Particularly, in the case of F<sub>7</sub> and F<sub>8</sub>, they were 6 to 11-fold higher. The fluorescence spectral patterns of Hp, Hvd and Pp showed two emission peaks at wavelengths of 630 and 695 nm, while those of F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>7</sub>, and F<sub>8</sub>, showed a new emission peak at a wavelength of 650 nm in addition to the two peaks. The appearance of the new emission peak was presumed to be due to the presence of the porphyrin oligomers. These results suggested that the preferential retention of HpD in the tumor may be due to hydrophobic porphyrins, particularly porphyrin oligomers.