

# Photodynamic Treatment with Intratumor Injection of Hematoporphyrin Derivative

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/2297/8145">http://hdl.handle.net/2297/8145</a>

## ヘマトポルフィリン誘導体腫瘍内直接注入法による 光学的治療の検討

金沢大学医学部泌尿器科学講座 (主任: 久住治男教授)

天 野 俊 康

(平成1年10月2日受付)

光感受性物質であるヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivative, HpD) と 630nm に最大ピークを有するアルゴン・色素レーザー光による光学的治療 (photodynamic therapy, PDT) は、新しい癌治療法の一つとして確立されつつある。しかしながら、HpD を全身投与した場合の組織内分布、体内動態に関して、腫瘍内のみならず、肝、脾、腎などの正常組織や炎症、過形成組織への集積も認められ、腫瘍親和性に関して一定の見解は得られていない。そこで、より高い抗腫瘍効果および副作用の一つである皮膚における光過敏症を軽減する目的で HpD を腫瘍内へ直接注入して、HpD の腫瘍および正常組織内での濃度を測定し、さらに PDT による抗腫瘍効果につき従来の HpD 腹腔内投与方法と比較検討した。マウス移植膀胱腫瘍 (MBT-2) に対し、腹腔内 (20mg/kg b. w.) または腫瘍内 (0.4 mg/cm<sup>3</sup> tumor) に HpD を投与し、3, 24, 48, 96および168時間後に、腫瘍および正常組織を採取し、<sup>3</sup>H-HpD によるシンチレーションカウンティングまたは HpD に特有の蛍光強度を利用して HpD 濃度を算定した。次いで、腹腔内では 10-50mg/kg b. w., 腫瘍内では 0.2-1.0mg/cm<sup>3</sup> tumor の HpD を投与し24時間後に 12.5-300J/cm<sup>2</sup> の照射を行った。照射24時間後に腫瘍を摘出し、酸素処理にて単離浮遊細胞を、0.4%トリパンブルーで非染色細胞数を数え、1g あたりの生細胞数を算出し腫瘍生存率を求めた。その結果、まず HpD 濃度の検討では、HpD 投与後 3-96時間において、腫瘍内注入群では、腹腔内投与群に比べ 3-15倍高濃度の HpD が腫瘍内に認められ、一方正常組織では 1/10-1/1.3の低濃度の HpD が検出されたのみであった。腫瘍内と皮膚との HpD 濃度比は、腫瘍内直接注入法で高く、6-95倍に達した。腫瘍生細胞数よりみた PDT の抗腫瘍効果の検討では、いずれの投与方法においても HpD の投与量および光照射量に比例して抗腫瘍効果の増大が認められ、腫瘍内投与 1mg/cm<sup>3</sup> tumor は、腹腔内投与 40mg/kg b. w. に相当する抗腫瘍効果を示した。これは腹腔内投与方法での抗腫瘍効果は HpD の濃度測定の結果から期待されたよりも低いものであり、HpD の全身投与と腫瘍内直接投与とはそれぞれ異なった PDT による殺細胞機序を検討する必要性を示唆する。また、同程度の殺細胞効果を得るための HpD 量を腹腔内および腫瘍内に投与したのち皮膚に含まれる HpD 濃度を測定したところ、腫瘍内投与の場合に低いことを見出した。このことは、皮膚の光過敏症を軽減するという点から腫瘍内直接投与方法は有用であると考えられる。

**Key words** hematoporphyrin derivative, photodynamic therapy, intratumor direct injection, 組織内濃度, 殺細胞効果

1961年 Lipson ら<sup>1)</sup>により紹介され光感受性物質であるヘマトポルフィリン誘導体 (Hematoporphyrin derivatives, HpD) は腫瘍親和性を有する光感受性物質として知られ、レーザー光線との併用による悪性腫

瘍の光学的治療 (Photodynamic therapy, PDT) として各科領域において臨床的検討がなされている<sup>2-6)</sup>。しかしながら近年の HpD 体内動態や組織内分布に関する検討において、HpD の蓄積が必ずしも腫

Abbreviations: HpD, hematoporphyrin derivative; IP, intraperitoneal injection; IT, intratumor injection; PDT, photodynamic therapy

瘍内のみ特異的に認められるのではないという結果が得られている。Gomer ら<sup>7)</sup>は、<sup>3</sup>H および <sup>14</sup>C-HpD を投与した後、マウス移植腫瘍内から抽出された HpD 濃量は、肝、脾、腎など臓器における濃度よりも低く、筋肉、皮膚とも有意差がなかったと報告している。また、炎症や過形成組織への良好な HpD の集積が認められた報告<sup>8)</sup>も散見され、HpD の腫瘍親和性、体内動態に関しては一定の見解が得られていないのが現状である。一方、組織内 HpD 測定法自体に関してもいくつかの問題点が指摘されている。現在 HpD の定量法として、主に <sup>3</sup>H または <sup>14</sup>C-HpD を用いたラジオアイソトープ法<sup>9)</sup>、HpD に特有な吸光度を用いた分光学的方法や蛍光を用いた蛍光強度法<sup>10)</sup>などの方法が使用されているが、いずれの方法も種々の問題を含んでいる。ラジオアイソトープ法では、組織内での HpD の代謝によるラジオアイソトープ測定値の変動、また蛍光強度法では、HpD に特有とされている赤色蛍光は、その分子形態が単量体の時には強く二重体や多量体では減弱するから<sup>11,12)</sup>、種々の形態が混在していると考えられる組織内 HpD をその蛍光強度から定量することが困難視される。さらに分光学的測定法では、生体内に存在するヘモグロビンや組織の蛍光、また吸光性なども HpD 定量法の信頼性を低下させる一因としてあげられる。したがって、測定にはいくつかの異なった方法を併用し検討してみる必要がある。近年局所療法としての PDT の適応基準も各臓器において、次第に明確化されつつある。われわれもこれまで表在性膀胱移行上皮癌に対する PDT の効果を検討し、低浸潤度癌、特に上皮内癌が、最適との考えに至っている<sup>5,13)</sup>。しかしながら腫瘍や周囲組織内の HpD 濃度やその体内動態が明らかにされていない現状では、時に抗腫瘍効果が不確実であったり、HpD の副作用である光過敏症が発現するなどいくつかの臨床上的問題が生じている。これらの問題解決のため HpD 投与量や投与方法、照射方法などの再検討、新しいレーザーや光感受性物質の開発など多くの検討すべき問題が残されている。高い抗腫瘍効果を期待し、一方癌周囲正常組織の低い光力学的反応と皮膚の光過敏症防止を得るために、HpD の腫瘍内局所投与も一方法と考えられるが、いまだ詳細な検討はなされていない。以上の理由より、今回 N-(4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl)formamide (FANFT) 誘発マウス膀胱腫瘍株を C3H マウス背部に移植し、まず <sup>3</sup>H-HpD を用いた方法と腫瘍より抽出された HpD の蛍光強度測定による二種の定量法を用いて、HpD の腫瘍内濃度および体内動態に関し比較検討を行った。さらに腫瘍内

HpD 局所投与における抗腫瘍効果を全身投与のそれと比較し、臨床応用への可能性につき検討を行った。

## 材料および方法

### I. ヘマトポルフィリン誘導体 (HpD)

HpD (Photofrin I, Oncology research & Development Inc. Cheektowaga, NY USA) は、5mg HpD/ml の濃度に調節されたものを使用した。トリチウム標識 HpD (<sup>3</sup>H-HpD) は、Gomer and Dougherty の方法<sup>7)</sup>に従って作製されたもの (1.7mCi/mg: New England Nuclear Co. Boston, MA USA) を上記 HpD にて溶解し、specific activity 23 $\mu$  Ci/mg HpD として使用した。

HpD および <sup>3</sup>H-HpD の両者は、リバース薄層クロマトグラフィー (65%メタノール:35% 3mM リン酸テトラブチルアンモニウム, pH 3.5溶液) 中にて Whatman KC18 Plates 上に展開<sup>14)</sup>にて同一であることが確認された。

### II. 腫瘍モデル

N-(4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl) formamide (FANFT) にて誘発されたマウス膀胱腫瘍 (MBT-2)<sup>15)</sup>を雌性 C3H マウス背部皮下にて継代した。この腫瘍を無菌的に摘出、細切し約 1mm 角として、雌性 C3H マウス背部皮下に移植したものを実験に用いた。腫瘍の長径 (d<sub>1</sub>)、短径 (d<sub>2</sub>) および高さ (d<sub>3</sub>) を計測し、腫瘍体積 (V) を楕円体近似式  $V = 4/3 \pi (d_1/2) (d_2/2) (d_3/2) = \pi / 6 d_1 d_2 d_3$  として求めた。移植 2 ないし 3 週間後に、腫瘍体積が約 1cm<sup>3</sup> に発育したものを以下の実験に供した。

### III. <sup>3</sup>H-HpD による HpD の組織内濃度の測定

MBT-2 を背部皮下に移植されたマウスを、<sup>3</sup>H-HpD 投与方法別に、腹腔内投与 (IP 群) および腫瘍内投与 (IT 群) の 2 群とした。実験時のマウス体重は約 20g で、腫瘍は 1cm<sup>3</sup> であることから、マウスあたりの HpD 量を一定にするため、IP 群には 20mg/kg body weight, IT 群には 0.4mg/cm<sup>3</sup> tumor volume の <sup>3</sup>H-HpD を 25G および 30G 針を用いて投与した。

IP 群および IT 群ともに <sup>3</sup>H-HpD 投与後、3、24、48、96時間後および 7 日後にエーテル麻酔下に 22G 針にて心臓穿刺を行い全血採取後、腫瘍、肝、脾、腎、膀胱、筋肉および皮膚組織を採取した。腫瘍組織は、中心部と周辺部にほぼ二等分した。各摘出臓器 (70~200mg, 膀胱は 10~50mg) および全血液 (0.1~0.3 ml) を組織溶解液 (Soluen 350, Packard Instrument Co. Downers Grove, IL USA, 100mg wet tissue per ml) にて 60°C 恒温槽内で一夜静置し、

溶解させた。室温にて冷却後、30%過酸化水素で30分間脱色、100 $\mu$ l 氷酢酸で中和した。シンチレーション溶液(Dimilin, Packard Inst. Co.) 15ml を加え、Beckman Liquid Scintillation Systems LS 3801 (Beckman Inst. Inc. Irvine, CA USA)にてカウント(cpm; counts per minute)を求めた。既知量の $^3\text{H}$ -HpD と、種々の重量の HpD 非投与マウスからの各臓器とを混ぜ、上記の方法にて同様に cpm を求め、これより counting efficiency (cpm/dpm; disintegrations per minute)を算出し、臓器別の重量との標準曲線を作成した。この標準曲線を用い、各検体から得られた cpm 値を dpm に換算し、用いた $^3\text{H}$ -HpD の specific activity から HpD 濃度 ( $\mu\text{g}$  HpD/g wet tissue)を算出した。

#### IV. 蛍光強度による HpD の組織内濃度の測定

非放射性 HpD (5mg/ml)を前述した $^3\text{H}$ -HpD による方法と同様に、マウス腹腔内および腫瘍内に直接投与した後、採血および各臓器を摘出した。Gomerら<sup>10)</sup>の方法に準じて摘除された各組織を一夜(約16時間)凍結乾燥、乳鉢にて粉末状に破砕し、その20mg(膀胱は5-15mg)に1%硫酸ドデシルナトリウム含有過塩素酸:メタノール(1:1, V/V)溶解液7mlを加え、ホモジネートした後、4000rpm、10分間遠心した。上澄液を回収し、沈渣に対してはさらに同様の操作を行い、得られた上澄液を1回目のものと混合し、蛍光強度測定用の検体とした。蛍光強度測定は、Fluorescence Spectrophotometer MPF-44E (Perkin-Elmer, Wellesly, MA USA)を用いて波長405nmにて励起し、この抽出液中で HpD の最大蛍光ピークを示す600nmにて蛍光強度を計測した。この測定値より無処置マウスから得られた各組織の背景蛍光を差し引き、以下に述べる標準曲線を用いて HpD 濃度 ( $\mu\text{g}$  HpD/g dry tissue)に換算した。標準曲線は、無処置のマウスから得られた各組織をホモジネートし、既知濃度の HpD と37°Cにて1時間インキュベートしたものを、同様に抽出し蛍光を測定することにより各臓器別に作成した。なお、2回の抽出操作が行われた沈渣を上記溶解液を加え蛍光分光を行ったが、これらの検体からは、HpD 特有の蛍光は得られなかった。

#### V. HpD とアルゴン色素レーザー光照射による PDT

前述した MBT-2 を C3H マウス背部皮下に移植約2ないし3週間後、腫瘍体積が約1cm<sup>3</sup>のマウスを用い以下の実験を行った。脱毛剤(Neet<sup>®</sup>, Whitehall Laboratories Inc. NY, NY USA)にて背部の毛を除

毛した。HpD を腹腔内(IP)または腫瘍内(IT)投与の2群とし、IP群には5, 10, 20, 35および50mg/kg, IT群には0.1, 0.2, 0.4, 0.7および1.0mg/cm<sup>3</sup>濃度をそれぞれ投与した。HpD 投与24時間後に3.6%抱水クロラール(0.1ml/10g b. w.)にて麻酔し、アルゴン色素レーザー光を腫瘍に対して照射した。アルゴンイオンレーザー(Model 164-09, Spectra Physics, Mountain View, CA USA)およびカイトンレッド(Extion Chemical Co. Dayton, OH USA)を用いた色素レーザー(Model 599-OEM dye laser, Coherent Inc. Palo Alto, CA USA)から構成されるアルゴン色素レーザー(波長622-642nm)装置より200nmのクォーツファイバーを用いて、波長622-642nmの赤色レーザー光を誘導した。ファイバー先端の光強度をパワーメーター(210 powermeter, Coherent, Palo Alto, CA USA)にて測定した後、照射野の直径を1.2-2.0cm、腫瘍表面に対して直角に照射できるように固定した。腫瘍以外の部位は黒色ゴム性のシートにて覆い保護した。光強度は温熱効果の生じない150-250mW/cm<sup>2</sup>とし、照射時間を調節することにより12.5, 25, 50, 75, 100, 150, 200および300J/cm<sup>2</sup>光エネルギー量での光腫瘍効果を検討した。

照射24時間後、腫瘍を一塊に摘出し重量を測定しメス刃にて細切した。Collagenase (2mg/ml, type 1A; Sigma, St. Louis, MO USA), DNase (0.4mg/ml, type IV; Sigma) および hyaluronidase (10unit/ml, type VI-S; Sigma)を含むDulbecco's phosphate-buffered saline (pH; 7.2) 15mlを加え1時間緩徐に振蕩し、さらに数回22G針を装着したディスポーザブル注射シリンジを用いてポンピングを行い、単離浮遊細胞を得た。この浮遊液に0.4%トリパンブルーを加え染色を行い、非青染細胞数を算出して、腫瘍重量あたりの生存細胞数を求め、PDTによる殺細胞効果を検討した。

#### VI. 腫瘍生細胞数算定による殺細胞効果の検討

前述の方法により得られた生細胞数と HpD 投与量および光エネルギー照射量との関係を検討した。さらにIT群とIP群とを比較検討するために、同程度の殺細胞効果を得るのに必要な光照射量(J/cm<sup>2</sup>)と HpD の投与量(IT群ではmg HpD/cm<sup>3</sup> tumor; IP群ではmg HpD/kg b. w.)との積を求めて、それを光-HpD量指数(L.H; light-HpD dose index)と定め、両群間で比較検討した。

### 成 績

#### I. $^3\text{H}$ -HpD の組織内濃度

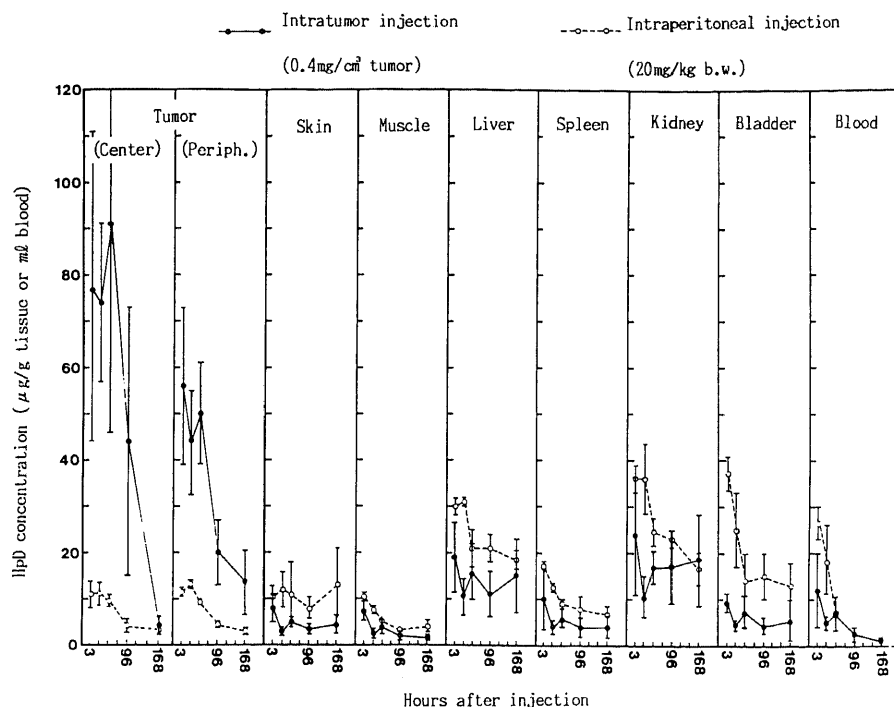


Fig. 1. Tumor and tissue levels of hematoporphyrin derivatives, determined by radioactivity counting. HpD concentration in the tumors was much higher for IT injection ( $0.4\text{mg}/\text{cm}^3$  tumor, ●—●) than for IP injection ( $20\text{mg}/\text{kg}$  b. w., ○—○) from three to 96 hours after HpD administrations. When HpD was administered by IP injection, HpD levels in the liver, kidney, spleen and bladder tissues were higher than that in the tumor. However, when HpD was administered directly into the tumor, HpD levels in tumor were the highest among all of the tissues examined from three to 96 hours after the injection. All values are micrograms per gram tissue or milliliter blood and given as mean  $\pm$  standard error.

Table 1. Tumor and tissue levels of hematoporphyrin derivatives, determined by radioactivity counting after IP injection ( $20\text{mg}/\text{kg}$  b. w.).

hr.	Tumor center	Tumor periphery	Skin	Muscle	Liver	Spleen	Kidney	Bladder	Whole blood
3	$11.1 \pm 3.0$ (n=3)	$11.7 \pm 1.2$ (n=3)	$10.2 \pm 2.8$ (n=3)	$10.5 \pm 0.8$ (n=3)	$30.2 \pm 1.8$ (n=3)	$17.0 \pm 0.7$ (n=3)	$36.2 \pm 2.9$ (n=3)	$37.4 \pm 4.0$ (n=3)	$26.5 \pm 3.2$ (n=3)
24	$11.6 \pm 2.5$ (n=3)	$13.2 \pm 1.4$ (n=3)	$12.0 \pm 4.1$ (n=3)	$7.5 \pm 0.9$ (n=3)	$31.0 \pm 1.0$ (n=3)	$12.4 \pm 0.9$ (n=3)	$35.7 \pm 7.7$ (n=3)	$25.1 \pm 8.0$ (n=3)	$18.1 \pm 8.8$ (n=3)
48	$9.8 \pm 1.5$ (n=3)	$9.1 \pm 0.5$ (n=3)	$10.9 \pm 6.8$ (n=3)	$5.2 \pm 0.8$ (n=3)	$20.8 \pm 3.6$ (n=3)	$9.1 \pm 1.0$ (n=3)	$24.4 \pm 2.9$ (n=3)	$14.2 \pm 5.8$ (n=3)	$6.7 \pm 0.6$ (n=3)
96	$4.2 \pm 1.7$ (n=3)	$4.5 \pm 0.7$ (n=3)	$7.7 \pm 2.4$ (n=3)	$3.2 \pm 0.8$ (n=3)	$20.8 \pm 2.6$ (n=3)	$7.8 \pm 2.6$ (n=3)	$23.2 \pm 2.5$ (n=3)	$15.3 \pm 4.7$ (n=3)	$3.0 \pm 0.8$ (n=3)
168	$3.7 \pm 0.7$ (n=3)	$2.9 \pm 0.6$ (n=3)	$13.2 \pm 7.7$ (n=3)	$3.9 \pm 2.3$ (n=3)	$18.4 \pm 2.5$ (n=3)	$6.3 \pm 2.4$ (n=3)	$16.6 \pm 3.4$ (n=3)	$12.9 \pm 5.0$ (n=3)	$1.0 \pm 0.2$ (n=3)

All values are micrograms per gram tissue or milliliter blood and are given as mean  $\pm$  standard error.

Table 2. Tumor and tissue levels of hematoporphyrin derivatives, determined by radioactivity counting after IT injection (0.4mg/cm<sup>2</sup> tumor).

hr.	Tumor center	Tumor periphery	Skin	Muscle	Liver	Spleen	Kidney	Bladder	Whole blood
3	77.1±33.1 (n=4)	56.1±17.3 (n=4)	8.1±2.9 (n=4)	7.4±1.9 (n=4)	19.1±7.5 (n=4)	10.0±6.6 (n=4)	23.7±12.8 (n=4)	9.5±1.9 (n=4)	12.1±7.9 (n=4)
24	74.1±16.6 (n=5)	43.6±10.5 (n=5)	2.8±0.8 (n=5)	2.5±0.9 (n=5)	10.4±4.1 (n=5)	3.9±1.4 (n=5)	10.5±4.6 (n=5)	4.6±1.3 (n=5)	4.8±1.5 (n=5)
48	91.0±44.4 (n=5)	50.0±11.0 (n=5)	5.1±1.1 (n=5)	3.9±1.5 (n=5)	16.2±5.8 (n=5)	6.2±1.8 (n=5)	16.7±3.5 (n=5)	7.5±3.6 (n=5)	7.0±3.8 (n=5)
96	43.6±28.9 (n=5)	20.3±7.0 (n=5)	3.5±0.9 (n=5)	2.0±1.0 (n=5)	11.2±5.0 (n=5)	4.2±2.2 (n=5)	17.2±8.1 (n=5)	4.2±2.2 (n=5)	2.6±1.6 (n=5)
168	4.0±1.8 (n=3)	13.7±7.1 (n=4)	4.4±1.9 (n=4)	1.6±0.4 (n=4)	15.2±8.3 (n=4)	4.3±2.7 (n=4)	18.5±10.4 (n=4)	5.6±4.2 (n=4)	1.2±0.4 (n=4)

All value are micrograms per gram tissue or milliliter blood and are given as mean ± standard error.

Table 3. Ratio of tumor and skin hematoporphyrin derivatives concentrations between intratumor (0.4mg/cm<sup>2</sup> tumor) and intraperitoneal (20mg/kg b.w.) injected mice, determined by radioactivity counting.

hr.	Tumor center	Tumor periphery	Skin
3	6.95	4.79	0.79
24	6.39	3.30	0.23
48	9.29	5.49	0.47
96	10.4	4.51	0.45

IP 群においては、腫瘍中心部および周辺部の組織内 HpD 濃度は、3 時間投与にてそれぞれ 11.1±3.0 および 11.7±1.2 μg/ml、24 時間で 11.6±2.5 および 13.2±1.4 μg/ml であったが、以後漸減し、168 時間後で 3.7±0.7 および 2.9±0.6 μg/ml であった。しかしながら、これら腫瘍内 HpD 濃度は皮膚、筋、脾内のそれと比較して、大きな差は認められず、肝、腎、膀胱および全血中に比し有意 (p<0.05) の低値を示した (図 1 および表 1)。

一方、IT 投与群においては、腫瘍内組織濃度は中心部および周辺部組織いずれも他の正常臓器内濃度に比較して、高値を示し、前者においては 48 時間、後者においては 3 時間でそれぞれ 91.0±44.4 および 56.1±17.3 μg/ml と最高濃度を示し、以後漸減した。他の正常臓器および全血中においてはいずれも IP 投与における組織内濃度よりもさらに低値を示し、その経時的変動も不明瞭であった (図 1 および表 2)。

IT 投与により得られた HpD 濃度と IP 投与におけるそれとの比を腫瘍中心部、腫瘍周辺部および皮膚において検討すると、腫瘍中心部および周辺部ともに IT 群に有意に高く、腫瘍中心部で HpD 投与 3、24 時間後で 6.4-7.0 倍、48 時間 9.3 倍、96 時間後 10.4 倍まで達した。腫瘍周辺部では、3 時間で 4.8 倍から 96 時間 4.5 倍と比の変動は軽度であった。一方、皮膚組織においては IT 投与における HpD 濃度は IP 投与のそれに比べて常に低く、3 時間後で 0.79 倍、24 時間後 0.23 倍、48 時間後 0.47 倍および 96 時間後 0.45 倍であった (表 3)。

腫瘍組織内と皮膚組織の HpD 濃度の比を IT 群、IP 群それぞれに比較すると、IT 群では腫瘍中心部および周辺部とも HpD 投与 24 時間でそれぞれ 26.5 倍、15.6 倍と最高値を示し、以後漸減したが、96 時間後においてもそれぞれ 12.5、5.80 倍と腫瘍内における HpD 濃度は皮膚組織内のそれに比較し、高値を示した。一方、IP 群においては腫瘍と皮膚組織内の HpD 濃度はほぼ同じで、時間の経過による変動も軽微であった (表 4)。

## II. 蛍光強度測定による組織内 HpD 濃度

蛍光強度測定法による腫瘍および正常組織内 HpD 濃度の経時的推移は IP 投与および IT 投与いずれにおいても <sup>3</sup>H-HpD の成績とほぼ同様であった。すなわち、IP 群においては、腫瘍中心および周辺部の HpD 濃度は 24 時間後でそれぞれ 42.5±14.3 および 52.5±18.5 μg/ml と最高値を示し、以後漸減したが、その値は皮膚および筋組織内 HpD 濃度を僅かに上回る程度であり、肝、脾、腎および膀胱に比較して有意 (p<0.05) の低値を示した。全血中の HpD 濃度は、

赤血球による光の消尽 (quenching) の影響により測定不能であった (図2 および表5)。

IT 群においては、腫瘍中心部で48時間後  $437.1 \pm 261.0 \mu\text{g/ml}$ 、周辺部で3時間後  $382.4 \pm 88.9 \mu\text{g/ml}$

と最高濃度に達し以後漸減した。正常臓器ではいずれも組織内濃度は低くかつ経時的変動も不明瞭であった (図2 および表6)。

IT 投与と IP 投与による腫瘍および皮膚組織の

Table 4. Ratio between tumor and skin hematoporphyrin derivatives levels in intratumor ( $0.4\text{mg/cm}^3$  tumor) and intraperitoneal ( $20\text{mg/kg}$  b.w.) injected mice, determined by radioactivity counting.

hr.	Tumor center			Tumor periphery		
	① IT	② IP	①/②	③ IT	④ IP	③/④
3	9.52	1.09	8.73	6.93	1.15	6.03
24	26.5	0.97	27.3	15.6	1.10	14.2
48	17.8	0.90	19.8	9.80	0.83	11.8
96	12.5	0.55	22.7	5.80	0.58	10.0

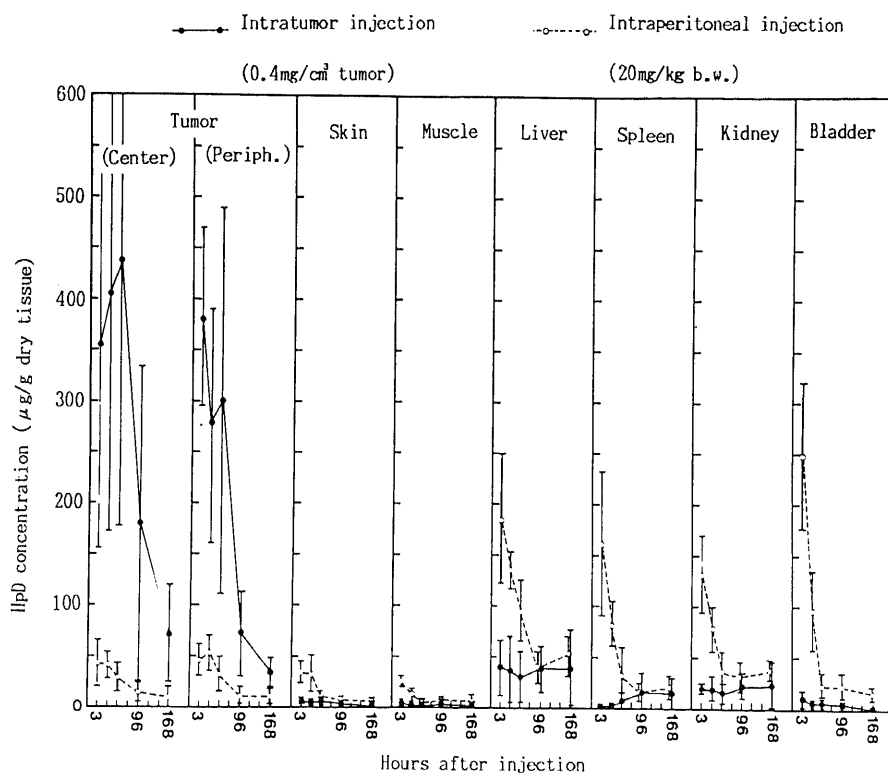


Fig. 2. Tumor and tissue levels of hematoporphyrin derivatives, determined by the fluorometric assay. HpD concentration in the tumors were much higher for IT injection ( $0.4\text{mg/cm}^3$  tumor, ●—●) than for IP injection ( $20\text{mg/kg}$  b. w., ○---○) from three to 96 hours after HpD administrations. All values are micrograms per gram tissue or milliliter blood and given as mean  $\pm$  standard error. Both radioactivity counting and fluorometric assay methods of HpD quantitation yielded similar, although not identical, patterns of HpD distribution among various tissues.

Table 5. Tumor and tissue levels of hematoporphyrin derivatives, determined by flouometric assay after IP injection (20mg/kg b.w.).

hr.	Tumor center	Tumor periphery	Skin	Muscle	Liver	Spleen	Kidney	Bladder
3	42.3±24.0 (n=4)	46.3±16.0 (n=5)	33.7±10.3 (n=4)	26.0±5.8 (n=5)	184.2±64.9 (n=7)	160.9±72.4 (n=7)	131.4±38.0 (n=7)	247.5±72.2 (n=3)
24	42.5±14.3 (n=5)	52.5±18.5 (n=5)	33.4±17.9 (n=4)	12.5±5.9 (n=4)	134.3±19.3 (n=5)	81.0±22.8 (n=4)	77.7±22.9 (n=5)	96.3±39.8 (n=3)
48	28.9±14.1 (n=6)	32.7±19.9 (n=6)	9.5±7.1 (n=3)	4.5±3.7 (n=4)	93.0±32.3 (n=6)	32.2±27.6 (n=4)	36.4±15.7 (n=6)	22.6±14.0 (n=3)
96	13.7±10.0 (n=6)	10.7±7.1 (n=6)	6.3±3.3 (n=3)	4.7±3.8 (n=4)	39.4±16.3 (n=6)	13.1±11.1 (n=4)	33.3±13.4 (n=6)	21.8±14.6 (n=3)
168	10.9±9.4 (n=5)	10.5±9.6 (n=5)	4.9±3.8 (n=4)	4.8±6.3 (n=4)	51.4±19.4 (n=6)	21.9±15.4 (n=6)	37.3±9.8 (n=6)	14.9±7.0 (n=3)

All values are micrograms per gram tissue and are given as mean ± standard error.

Table 6. Tumor and tissue levels of hematoporphyrin derivatives, determined by flouometric assay after IT injection (0.4mg/cm<sup>3</sup> tumor).

hr.	Tumor center	Tumor periphery	Skin	Muscle	Liver	Spleen	Kidney	Bladder
3	353.7±195.6 (n=4)	382.4±88.9 (n=4)	3.8±4.6 (n=5)	4.4±1.6 (n=3)	39.2±27.5 (n=5)	0.6±1.4 (n=5)	19.5±5.1 (n=5)	11.4±7.8 (n=5)
24	404.7±234.7 (n=5)	277.0±114.7 (n=5)	3.4±1.8 (n=5)	2.0±4.2 (n=5)	36.5±35.7 (n=6)	1.6±3.2 (n=5)	18.6±14.4 (n=6)	4.4±4.1 (n=6)
48	437.1±261.0 (n=7)	299.2±190.1 (n=7)	5.5±7.3 (n=5)	0.8±1.0 (n=7)	28.8±28.7 (n=8)	6.5±10.1 (n=6)	15.3±10.7 (n=8)	4.8±4.9 (n=5)
96	179.8±153.9 (n=5)	72.2±41.6 (n=7)	2.4±1.1 (n=4)	3.2±5.8 (n=5)	37.9±23.5 (n=8)	14.0±20.7 (n=5)	22.9±13.5 (n=8)	5.1±2.6 (n=3)
168	71.7±47.7 (n=5)	33.5±13.1 (n=6)	0.0±0.0 (n=3)	0.0±0.0 (n=3)	38.4±40.2 (n=6)	13.5±18.2 (n=6)	24.2±25.3 (n=6)	0.9±1.3 (n=3)

All values are micrograms per gram tissue and are given as mean ± standard error.

Table 7. Ratio of tumor and skin hematoporphyrin derivatives concentrations between intratumor (0.4mg/cm<sup>3</sup> tumor) and intraperitoneal (20mg/kg b.w.) injected mice, determined by flouometric assay.

hr.	Tumor center	Tumor periphery	Skin
3	8.26	8.26	0.11
24	9.52	5.28	0.10
48	15.1	9.15	0.58
96	13.1	6.75	0.38

HpD 濃度比は、腫瘍部において IT 群に有意 ( $p < 0.01$ ) の高値が認められ、その値は <sup>3</sup>H-HpD による測定値に比較してさらに増加したが、皮膚組織においては <sup>3</sup>H-HpD による測定値とほぼ近似し、IP 投与時の HpD 濃度以下であった (表 7)。

腫瘍部と皮膚組織との濃度比においても、IT 投与により腫瘍組織内 HpD 濃度は皮膚組織のそれと比較し、著明な高値を示し腫瘍中心部で24時間120.4倍、周辺部で3時間100.6倍と <sup>3</sup>H-HpD による測定値をさらに上回った。一方、IP 投与においては、腫瘍と皮膚との濃度比は <sup>3</sup>H-HpD による測定値のそれとほぼ同じ値をとり、時間的経過による明らかな変動も認められなかった (表 8)。



Ⅲ. 光力学的殺細胞効果

1. 照射エネルギー量と殺細胞効果

前述した組織内 HpD 濃度測定で用いた IT (0.4 mg/cm<sup>3</sup> tumor) および IP (20mg/kg b. w.) 投与における照射エネルギーの殺細胞効果に及ぼす影響を検討した。HpD 非投与マウスにおいては光照射100, 200 および 300J/cm<sup>2</sup>のいずれの光照射においても殺細胞効果が認められなかったが, 0.4mg HpD/cm<sup>3</sup> tumor

(IT) あるいは, 20mg HpD/kg b. w. (IP) を投与された2群においては明らかに照射エネルギー量依存性な殺細胞効果の増強が認められた。また 150J/cm<sup>2</sup>までの照射においては投与方法の違いによる推計学的有意差は認められなかったが, 200および300J/cm<sup>2</sup>の照射では腹腔内投与において有意 (p<0.05) に高い殺細胞効果が得られ, IT 0.4mg HpD/cm<sup>3</sup> tumor 群はプラトーの状態となった。しかしながら, 20mg HpD/kg

Table 8. Ratio between tumor and skin hematoporphyrin derivatives levels in intratumor (0.4mg/cm<sup>3</sup> tumor) and intraperitoneal (20mg/kg b.w.) injected mice, determined by flourometric assay.

hr.	Tumor center			Tumor periphery		
	① IT	② IP	①/②	③ IT	④ IP	③/④
3	93.1	1.27	73.3	100.6	1.37	73.4
24	120.4	1.27	94.8	82.4	1.57	52.5
48	79.8	3.04	26.3	54.6	3.44	15.9
96	75.5	2.17	34.8	30.3	1.70	17.8

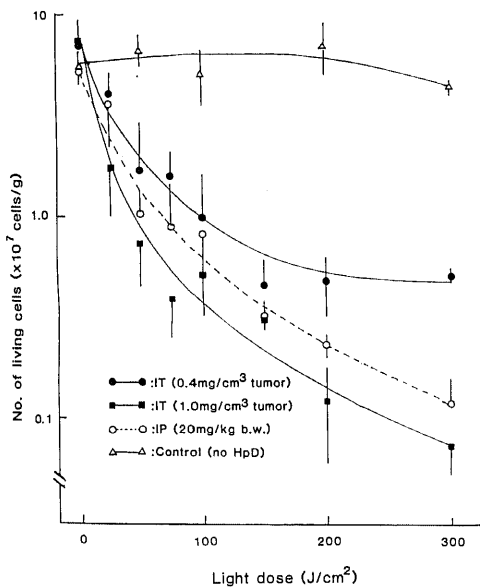


Fig. 3. Relation between cell survival and light dose. No cell killing effects were observed in the control group (no HpD,  $\Delta$ ). The numbers of living cells were decreasing with the light dose in IT (0.4mg/cm<sup>3</sup> tumor,  $\bullet$ ), IP (20mg/kg b. w.,  $\circ$ ) and IT (1.0mg/cm<sup>3</sup> tumor,  $\blacksquare$ ) groups. The cell killing effect was the highest in IT (1.0mg/cm<sup>3</sup> tumor,  $\blacksquare$ ) followed by IP (20mg/kg b. w.,  $\circ$ ) and IT (0.4mg/cm<sup>3</sup> tumor,  $\bullet$ ).

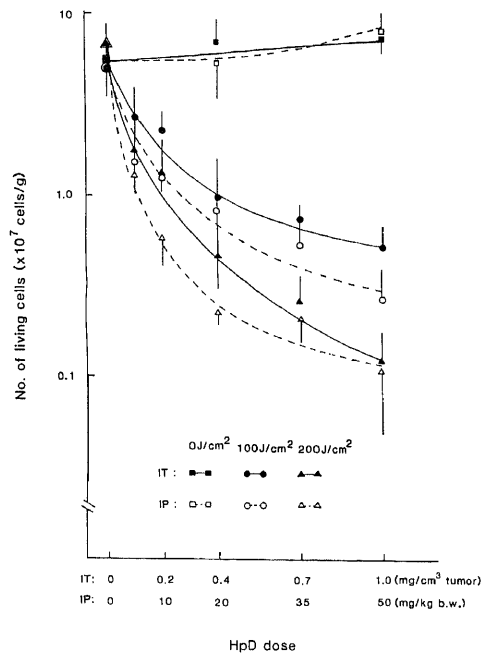


Fig. 4. Relation between cell survival and hematoporphyrin derivatives dose. No cell killing effects were observed either in IT (0J/cm<sup>2</sup>,  $\blacksquare$ ) or IP (0J/cm<sup>2</sup>,  $\square$ ) group. The numbers of living cells were with the HpD dose. The cell killing effect was the highest in IP (200J/cm<sup>2</sup>,  $\Delta$ ) followed by IT (200J/cm<sup>2</sup>,  $\blacktriangle$ ), IP (100J/cm<sup>2</sup>,  $\circ$ ) and the lowest in IT (100J/cm<sup>2</sup>,  $\bullet$ ).

b. w. (IP) において、 $300\text{J}/\text{cm}^2$  を越えるとマウス自体が24時間以内に死亡した。また、IT にて  $1.0\text{mg}/\text{cm}^3$  tumor とすると、 $20\text{mg HpD}/\text{kg b. w. (IP)}$  より若干よい殺細胞効果が得られた (図3)。

## 2. 投与 HpD 濃度と殺細胞効果

HpD のみ投与されたラットにおいては、投与方法、投与量に関係なく殺細胞効果は認められなかった。

HpD 投与群では、いずれも HpD 投与量依存性に殺細胞効果は増大するが、IP では  $20\text{mg HpD}/\text{kg b. w.}$  以上になると徐々に殺細胞効果は横ばいとなった。IT  $200\text{J}/\text{cm}^2$  照射群では、 $1.0\text{mg HpD}/\text{cm}^3$  tumor 以上の投与量で殺細胞効果の増強も期待できたが、実際に多量の HpD を投与すると、腫瘍以外にも HpD の漏出が認められ、PDT には不適當であった (図4)。

## 3. 光-HpD 量指数 (図5)

以上の結果より IT 群より IP 群とを比較した場合、腫瘍内の HpD 濃度と、殺細胞効果とは平行関係にはなく、殺細胞効果よりみた両群間の比較検討が必

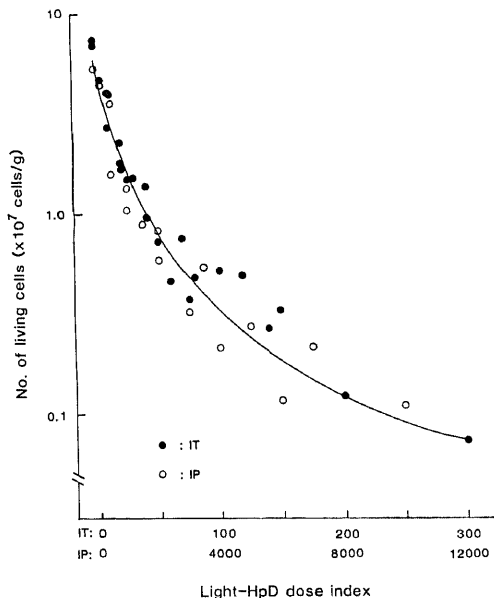


Fig. 5. Relation between cell survival and light-HpD dose index. When the light-HpD dose index. (light dose  $\times$  HpD dose) were calculated to make IT (100) coincide IP (4000) on the horizontal axis, numbers of living cells after PDT were similar between the IT (●) and IP (○) groups. According to these data, the cell killing effect in IT ( $1\text{mg}/\text{cm}^3$  tumor) is considered to correspond with that in IP ( $40\text{mg}/\text{kg b. w.}$ ) at the same light dose laser exposure.

要となる。そこで、PDT の殺細胞効果に影響を及ぼす、照射量 ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ) と HpD の投与量 (IT 群では  $\text{mg HpD}/\text{cm}^3$  tumor; IP 群では  $\text{mg HpD}/\text{kg b. w.}$ ) との積を両群にてそれぞれで求めて、それを光-HpD 量指数 ( $I_{LH}$ ; light-HpD dose index) と定めた。  $I_{LH}$  と殺細胞効果 (生細胞数) との関係プロットし、横軸上の IT の  $I_{LH}100$  に対し、IP の  $I_{LH}4000$  とを対応させると、図5に示すごとく両群は良好な相関を示し、ほぼ  $I_{LH}(\text{IP}) = I_{LH}(\text{IT}) \times 40$  の関係が得られた。これは、同じエネルギー量で照射をした場合、 $0.5\text{mg}/\text{cm}^3$  tumor の HpD の IT 投与は、 $20\text{mg}/\text{kg b. w.}$  の HpD の IP 投与に匹敵する殺細胞効果を有するものと考えられる。

## 考 察

HpD は、従来より全身投与することにより、その腫瘍親和性を利用して悪性腫瘍の診断や治療に用いられてきた<sup>29-31</sup>。HpD をその特有の蛍光から観察すると、家兎移植膀胱腫瘍と正常膀胱粘膜との HpD 蛍光強度に差を認め<sup>30</sup>、さらに膀胱腫瘍摘出標本の検討より dysplasia や carcinoma in site (CIS) からも HpD の蛍光が認められている<sup>31</sup>。しかしながら、HpD に特有の蛍光強度はその分子形態によって異なり、単量体では強く、二量体或多量体では弱いといわれている<sup>10,12</sup>。光学的治療に際しては、いわゆる HpD の活性成分と考えられる多量体の蛍光強度は弱く<sup>17</sup>、生体内での HpD の蛍光強度のみで HpD 濃度および治療効果を推測することには、問題があるものと考えられる。したがって、HpD の生体内での定量には、各組織からの抽出物から放射性同位元素<sup>7</sup>や、蛍光強度<sup>10</sup>を用いて、単位組織重量あたりの HpD 量を計測してきた。最近 Mang ら<sup>18</sup>は、マウス移植細胞において、活性成分よりなる Photofrin II (DHE) 投与後、腫瘍における生体内 (in vivo) の蛍光強度を He-Ne レーザーを用いた fluorescence photometry にて測定し、腫瘍抽出物からの蛍光強度と比較して、比例関係にあることを示した。これは、in vivo における新しい正確なポルフィリンの測定法の一つとして注目されるが、各臓器からの抽出液を用いた HpD の定量の結果によると、HpD 全身投与の場合、HpD は肝、腎、脾などに多く含まれ、腫瘍内の HpD 濃度は皮膚を含めた他の正常組織に比べ必ずしも有意に高いとは限らない。今回の IP 群の結果においても、<sup>3</sup>H-HpD および蛍光強度による計測にてほぼ同様の傾向が認められ、これらの抽出物による測定法の妥当性が示されたものと考えられる。

$^3\text{H}$ -HpD 法と蛍光強度法とを比較すると、wet tissue と dry tissue あたりの量という差はあるものの、全体的な傾向としては、ほぼ一致しており、いずれの方法も HpD の組織内濃度測定として適当であると考えられた。しかしながら、全血液を試料として用いた場合、蛍光強度法においては、ヘモグロビンによる光の消尽 (quenching) が強く特有の HpD の蛍光が得られず、HpD の全血液中の HpD の定量はできなかったため、 $^3\text{H}$ -HpD 法による測定のみ施行した。

また HpD は、その腫瘍への集積の際、クリアランスが悪く、腫瘍内に長く留まることが一つの特徴とされている<sup>19)</sup>。この点については、最近開発されている各種の光感受性物質においても、その腫瘍親和性という点で重要となっている<sup>20)</sup>。

しかしながら、HpD の全身投与 (IP 群) した場合、蛍光強度法からは HpD 投与後48時間で腫瘍中心部で3.0倍、周辺部では3.4倍皮膚より高い HpD が検出され HpD がやや腫瘍への親和性が長く続くことも示唆されたが、 $^3\text{H}$ -HpD 法ではこの傾向は認められず、今回の実験からは HpD が正常組織に比べて腫瘍内に長く留まるとはいえず、その腫瘍親和性という点につき、疑問が残った。

Kostron らは、ラットの脳腫瘍 (glioma) に対し HpD の腫瘍内注入およびレーザー照射にて、HpD の有意に高い腫瘍内濃度および抗腫瘍効果を認めたと報告している<sup>9)</sup>。脳腫瘍では、HpD 全身投与でも血液脳関門 (blood-brain barrier) のため、脳腫瘍部には HpD の集積がわずかにしか認められないが、正常脳にはさらにそれよりも HpD の移行は少なく、そのために正常部に比して腫瘍部に高濃度の HpD が認められる。さらに HpD の腫瘍内直接注入法により、正常部と腫瘍部との比はさらに大となりより有効な殺細胞効果が認められる。一方、皮膚における HpD 濃度が直接法では有意に低いため、PDT における副作用の一つである皮膚の光過敏症に対してもその予防が期待できるものと考えられた<sup>9)</sup>。マウス背部皮下に移植された膀胱腫瘍と脳腫瘍では、その周囲の環境に差があることも予想されたが、直接注入法では全身投与法に比べやはり腫瘍内での高い HpD 濃度と、皮膚をはじめすべての正常組織において低い濃度の HpD が検出されたのみであった。この  $^3\text{H}$ -HpD 法あるいは蛍光強度法いずれにおいても、組織内での分子形態までは同定できない。どの程度の活性成分が含まれているのかは不明であるが、少なくとも総量としての HpD の濃度分布に関しては、HpD 直接注入法は満足できる方法であると考えられた。

また、皮膚への HpD の集積を低下させ、腫瘍部により高い HpD を取り込ませると同じ目的で、選択的に  $^3\text{H}$ -HpD の動脈内投与を施行し、その組織内濃度を測定した報告もあるが<sup>21)</sup>、腫瘍内および他の正常組織での HpD 濃度は、静脈内投与の場合と同じであり、必ずしも有用な方法とは考えにくい。

HpD を腹腔または腫瘍内に投与し、24時間後にレーザー照射を施行したが、HpD の濃度分布の検討から、IP 20mg/kg b. w.、または IT 0.4mg/cm<sup>3</sup> tumor の HpD を投与した場合、この時点で IP 群と比較して IT 群では  $^3\text{H}$ -HpD 法では3.3~6.4倍、蛍光強度法では5.3~9.5倍の HpD が腫瘍部から検出された。ところが、IT 0.4mg/cm<sup>3</sup> tumor、IT 1.0mg/cm<sup>3</sup> tumor、IP 20mg/kg b. w. の3群を比較すると、IT 0.4mg/cm<sup>3</sup> tumor 群は、HpD の含有量において3.3~9.5倍多量にあるにもかかわらず、抗腫瘍効果は IP 20mg/kg b. w. 群の方が優れていた。IT 群の投与量を1.0mg/cm<sup>3</sup> tumor としたところで IP 20mg/kg b. w. 群よりも若干よい結果が得られた。

また IT 0.4mg/cm<sup>3</sup> tumor 群では、照射エネルギーが150J/cm<sup>2</sup>を越えると、殺細胞効果は横ばいとなり、それ以上の効果は期待できなかった。IP 20mg/kg b. w. 群は、300J/cm<sup>2</sup>の時点でもまだプラトー状態に至らず、それ以上のレーザー照射にてさらに抗腫瘍効果も期待できた。しかし、IP 群では腫瘍部以外の光遮蔽が不十分であると、正常部の HpD とも反応が起こったためか、照射24時間以内に死亡する例が急増し、これ以上の照射は不可能と考えられた。

さらに、HpD の投与量と殺細胞効果との関係を見ると、それぞれ HpD 投与量の増加に伴い抗腫瘍効果も増強していくが、IT 100J/cm<sup>2</sup>、IP 100J/cm<sup>2</sup>、IP 200J/cm<sup>2</sup>の3群は IT では0.4mg/cm<sup>3</sup> tumor、IP では20mg/kg b. w. 以上に増加しても、効果的な殺細胞効果は得られなかった。一方、IT 200J/cm<sup>2</sup>群では、さらに HpD の投与量を増加することにより殺細胞効果を増強できる可能性も考えられるが、実際に多量の HpD を IT 投与した場合、腫瘍以外にも HpD の漏出が認められ、PDT には不相当であった。以上より、HpD の投与量にも限界があるものと考えられた。

Fingar ら<sup>22)</sup>は、PDT の際の DHE 投与量と、光照射量との積 (drug/light product) を求め、tumor clonogenicity assay を用いて、コントロール群に対する clonogenicity が drug/light product によく一致することを示した。今回の検討では、IT および IP 両群にて HpD 投与量と光照射量の積 (光·HpD 量指数) をそれぞれ求めた。PDT 24時間後の 1g あたりの

生細胞数に対して IT 群, IP 群のそれぞれの光-HpD 量指数とを比較して図5のごとくの結果が得られた. IT の光-HpD 量指数100に対し IP の光-HpD 量指数4000を対比させることにより, 両群の結果はほぼ一定の曲線にて表現されることが示された. すなわち, IT 群の光-HpD 量指数 (ITL.H) と IP 群の光-HpD 量指数 (IPL.H) は,  $ITL.H \times 40 = IPL.H$  として近似した. たとえば, 同じ光量 (J/cm) を照射した場合, 直接注入法での 0.5mg HpD/cm<sup>3</sup> tumor 投与は, 腹腔内投与法の 20mg HpD/kg b. w. にほぼ等しい効果になることが示唆された.

先に示しごとく, HpD の腫瘍内濃度と, PDT による殺細胞効果とは, IT 群と IP 群と比較した場合, 両者は一致せず, IP 群の方が HpD の腫瘍内濃度と比べてみると IT 群より相対的にすぐれた PDT 効果を示した. すなわち, IT 0.4mg/cm<sup>3</sup> tumor と IP 20mg/kg b. w. とを比較すると, IT 0.4mg/cm<sup>3</sup> tumor 群の方が約3~15倍の HpD 量が検出されたにもかかわらず, 抗腫瘍効果のうえでは IT 0.5mg/cm<sup>3</sup> tumor と IP 20mg/kg b. w. とがほぼ等しく, HpD の腫瘍内濃度とその抗腫瘍効果に IT と IP では明らかに差が認められた. すなわち, IT 群では, HpD 含有量が多いにもかかわらず抗腫瘍効果として有効に作動しないものと推察された. 今回の実験系では, その理由を明らかにするには説明ができなかったが, その原因について考察を試みると, まず① IT 群では腫瘍内の HpD 分布が不均一であり, また低酸素状態のため, 部分的に殺細胞効果が低い. ② IP 群では血管系を介して腫瘍部に HpD が運ばれ, 腫瘍を栄養する血管の内皮細胞にも HpD が取り込まれ, そこで光学的殺細胞作用が起こることにより血管壁に損傷が生じる. その結果, 腫瘍組織は血流障害に陥り抗腫瘍効果が増強されるのに対し<sup>29)~29)</sup>, IT 群では血管系の障害がほとんどなく, 一重項酸素による腫瘍細胞に対する殺細胞効果に対する殺細胞効果のみ生じ<sup>29)</sup>, 両群間の抗腫瘍効果に差が出てくる. ③ IP 群では, 血中を循環する間に, 蛋白質との結合や, HpD の単量体, 二量体あるいは多量体などの形成により殺細胞効果に差が生じる, などが考えられよう. しかしながら, 現時点ではこれらの仮説はまだ証明されておらず, 今後種々の方法にて検討を重ねていく必要があるものと考えられた.

以上より IT は, その抗腫瘍効果に関しては, HpD の腫瘍内濃度に比し良好とはいえない. しかしながら, IT と IP とはほぼ同程度の抗腫瘍効果を示す HpD 投与量 (例えば, IT 0.5mg/cm<sup>3</sup> tumor と IP 20mg/kg b. w.) において, 皮膚組織での HpD 濃度

は, IT 群が IP 群よりも低く皮膚光過敏症を軽減するものと考えられる. したがって, HpD の腫瘍内直接注入法は, PDT の抗腫瘍効果を損なうことなくその副作用である光過敏症を軽減する方法として有用であると考えられた.

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を頂いた恩師久住治男教授ならびに三崎俊光博士および膀胱腫瘍研究班の諸兄, 教室員各位らの御厚意に深く感謝いたします. また本研究に関し, 御指導と御助言を賜った Professor George R. Prout, Jr., Urological Service, Massachusetts General Hospital and Department of Surgery, Harvard Medical School, and Dr. Chi-Wei Lin, Urology Research Laboratory, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, U.S.A. に厚く感謝いたします.

## 文 献

- 1) Lipson, R. L., Baldes, E. J. & Olsen, A. M.: The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J. Natl. Cancer Inst.*, **26**, 1-9 (1961).
- 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) Kelly, J. F., Snell, M. E. & Berenbaum, M. C.: Photodynamic destruction of human bladder carcinoma. *Brit. J. Cancer*, **31**, 237-244 (1975).
- 4) Benson, R. C., Kinsey, J. H., Cortese, D. A., Farrow, G. M. & Utz, D. C.: Treatment of transitional cell carcinoma of the bladder with hematoporphyrin derivative phototherapy. *J. Urol.*, **130**, 1090-1095 (1983).
- 5) Hisazumi, H., Misaki, T. & Miyoshi, N.: Photoradiation therapy of bladder tumors. *J. Urol.*, **130**, 685-687 (1983).
- 6) Dougherty, T. J., Laurence, 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).
- 7) 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).
- 8) Selman, S. H., Goldblatt, P. J., Klaunig, J.

- E., Keck, R. W. & Kreimer-Birnbaum, M.: Localization of hematoporphyrin derivative in injured bladder mucosa. An experimental study. *J. Urol.*, **133**, 1104-1107 (1985).
- 9) Kostron, H., Bellnier, D. A., Lin, C-W., Swartz, M. R. & Martuza, R. L.: Distribution, retention, and phototoxicity of hematoporphyrin derivative in a rat glioma. *J. Neurosurg.*, **64**, 768-774 (1986).
- 10) Gomer, C. J., Jester, J. V., Razum, N. J., Szirth, B. C. & Murphree, A. L.: Photodynamic therapy intraocular tumors examination of hematoporphyrin derivative distribution and long-term damage in rabbit ocular tissues. *Cancer Res.*, **45**, 3718-3725 (1985).
- 11) Moan, J. & Sommer, S.: Uptake of the components of hematoporphyrin derivative by cells and tumors. *Cancer Lett.*, **21**, 167-174 (1983).
- 12) Margalit, R., Shaklai, N. & Cohn, S.: Fluorimetric studies on the dimerization equilibrium of protoporphyrin IX and its haemato derivative. *Biochem. J.*, **209**, 547-552 (1983).
- 13) 三崎俊光, 久住治男, 上木 修, 熊木 修, 越田 潔, 中嶋和喜, 打林忠雄, 三好憲雄: BBN 誘発ラット膀胱腫瘍におけるヘマトポルフィリン誘導体の組織内局所とアルゴン・色素レーザー照射併用による光照射併用による光力学的抗腫瘍効果の検討. *日泌尿会誌*, **78**, 572-578 (1987).
- 14) Kessel, D.: Components of hematoporphyrin derivatives and their tumor-localizing capacity. *Cancer Res.*, **42**, 1703-1706 (1982).
- 15) Soloway, M. S.: Intravesical and systemic chemotherapy of murine bladder cancer. *Cancer Res.*, **37**, 2918-2929 (1977).
- 16) Jocham, D., Staehler, G., Chaussy, C., Hammer, C. & Lohrs, U.: Laserbehandlung von Blasentumoren nach Photosensibilisierung mit Hamatoporphyrin-Derivat. *Urologe A*, **20**, 340-343 (1981).
- 17) Kessel, D. & Cheng, M. L.: On the preparation and properties of dihematoporphyrin ether, the tumor-localizing component of HPD. *Photochem. Photobiol.*, **41**, 277-282 (1985).
- 18) Mang, T. S., Dougherty, T. J., Potter, W. R., Boyle, D. G., Somer, S. & Moan, J.: Photobleaching of porphyrins used in photodynamic therapy and implication for therapy. *Photochem. photobiol.*, **45**, 501-506 (1987).
- 19) Sanderson, D. R., Fontana, R. S., Lipson, R. L. & Baldes, E. J.: Hematoporphyrin as a diagnostic tool. *Cancer*, **30**, 1368-1372 (1972).
- 20) Tralau, C. J., MacRobert, A. J., Coleridge-Smith, P. D., Barr, H. & Bown, S. G.: Photodynamic therapy with phthalocyanine sensitisation: quantitative studies in a transplantable rat fibrosarcoma. *Br. J. Cancer*, **55**, 389-395 (1987).
- 21) Elmer, E. B., Wood, W. C., Cohn, A. M. & Bamberg, M.: Effect of route of administration on the selectivity of hematoporphyrin derivative for tumor tissue. *J. Surg. Oncol.*, **34**, 113-119 (1987).
- 22) Fingar, V. H., Potter, W. R. & Henderson, B. W.: Drug and light dose dependence of photodynamic therapy: A study of tumor cell clonogenicity and histologic changes. *Photochem. Photobiol.*, **45**, 643-650 (1987).
- 23) Selman, S. H., Kreimer-Birnbaum, M., Klauning, J. E., Goldblatt, P. J., Keck, R. W. & Britton, S. L.: Blood flow in transplantable bladder tumors treated with hematoporphyrin derivative and light. *Cancer Res.*, **44**, 1924-1927 (1984).
- 24) Henderson, B. W., Waldow, S. M., Mang, T. S., Potter, W. R., Malone, P. B. & Dougherty, T. J.: Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumors following photodynamic therapy. *Cancer Res.*, **45**, 572-576 (1985).
- 25) Selman, S. H., Milligan, A. J., Kreimer-Birnbaum, M., Keck, R. W., Goldblatt, P. J. & Britton, S. L.: Hematoporphyrin derivative photochemotherapy of experimental bladder tumors. *J. Urol.*, **133**, 330-333 (1985).
- 26) Dougherty, T. J., Gomer, C. J. & Weishaupt, K. R.: Energetics and efficiency of photoinactivation of murine tumor cell containing hematoporphyrin. *Cancer Res.*, **36**, 2330-2333 (1976).

**Photodynamic Treatment with Intratumor Injection of Hematoporphyrin Derivative** Toshiyasu Amano, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 98, 980—992 (1989)

**Key words** hematoporphyrin derivative, photodynamic therapy, intratumor direct injection, HpD concentration in tissue, cell killing effect

#### Abstract

Photodynamic therapy (PDT) with a hematoporphyrin derivative (HpD) as a photosensitizer is a promising new cancer treatment. However, the presence of HpD has been reported not only in the tumor tissue but also in the liver, spleen, kidney, inflammatory tissue, hyperplastic tissue and elsewhere after HpD systemic administration. To examine the possibility of increasing tumor destruction and reducing the skin photosensitivity, HpD concentrations in tissues and PDT tumor destruction were studied using subcutaneously transplanted mouse bladder tumors (MBT-2) after intratumor HpD injection (I.T.). The concentrations in the tumor and various normal tissues were determined by the liquid scintillation counting method using  $^3\text{H}$ -HpD and by the specific HpD fluorescence method in tissue extractions at 3, 24, 48, 96 and 168 hours after I.T. HpD injection ( $0.4\text{mg}/\text{cm}^3$  tumor). These data were compared with those obtained after intraperitoneal HpD injection (I.P.;  $20\text{mg}/\text{kg}$  b.w.). The results obtained indicated that 3 to 96 hrs after administration, the concentrations in the tumor were approximately 3 to 15 times higher by the I.T. than the I.P. administration, while those in the skin and other tissues were 1.3 to 10 times lower. Consequently, the ratio of HpD levels in the tumor to those in the skin were 6 to 95 times higher for I.T. than I.P. injection. Then, the cell killing effect by PDT was determined in I.T. and I.P. groups. When tumors reached approximately  $1\text{cm}^3$  in size, the animals were injected with HpD either I.T. ( $0.2$ – $1.0\text{mg}/\text{cm}^3$ ) or I.P. ( $10$ – $50\text{mg}/\text{kg}$  b.w.). Each of the tumors was irradiated with argon-dye laser light (wave length  $630\text{nm}$ ,  $12.5$ – $300\text{J}/\text{cm}^2$ ) 24 hours after injection. The tumors were removed en bloc and dissociated with an enzyme cocktail 24 hours after irradiation, and then the number of living cells was counted using the trypan blue method. The results obtained indicated that the cell killing effect has increased with increasing laser light intensity or HpD dose in each of the groups. The data in the group of HpD  $0.5\text{mg}/\text{cm}^3$  (I.T.) were almost similar to those of the group of HpD  $20\text{mg}/\text{kg}$  (I.P.). Though the effect in the group of I.T. was much less than that of the previous HpD distribution study, I.T. may be proved to be a method to reduce skin photosensitivity.