

Photodynamic Damages in Bp8 Ascites Tumor Cells with 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	http://hdl.handle.net/2297/7947

ヘマトポルフィリン誘導体を用いた光線力学的療法における細胞障害

金沢大学医学部泌尿器科学講座 (主任：久住治男教授)

上 木 修

(昭和62年3月9日受付)

ヘマトポルフィリン誘導体 (HpD) と光照射による光線力学的療法 (PDT) の細胞レベルでの障害を明らかにする目的にて、Bp 8 マウス腹水肉腫細胞を用い、その HpD 取り込み、および PDT の効果を分光学的および生化学的に *in vitro* にて検討した。細胞結合 HpD の蛍光発光強度 (λ_{ex} 402 nm, λ_{em} 632 nm) により測定した細胞内 HpD 濃度は HpD 処理時間の延長に伴い、HpD 処理時間 30 分までは急激な上昇が認められ、その後 120 分までは緩徐な上昇が認められた。また、HpD 濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までは HpD 濃度の上昇に伴う細胞内 HpD 濃度の急激な上昇が認められ、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では、細胞内 HpD 濃度の上昇は緩徐となった。30 分間 HpD 処理し、遊離 HpD 洗浄後培養を 4 時間まで継続しても、細胞内 HpD 濃度に変化は認められなかった。Bp 8 細胞を 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の HpD を含む Ham's F10 培養液中で 30 分間培養後、遊離 HpD を洗浄除去し、培養を継続した。洗浄直後、2、3 および 4 時間後に 10% 仔牛血清を含む Ham's F10 培養液中で光照射 (570-640 nm, 22 mW/cm², 3 分間) を行い、さらに同培養液中で 6 時間培養を継続し、2 時間ごとに、0.1% Lissamine Green B を用いた dye exclusion 法により生残細胞数を、Percoll density gradient centrifugation により細胞比重の変化も観察した。また PDT 後における細胞の ³H-thymidine, ³H-uridine, ¹⁴C-leucine 取り込みを測定し、DNA, RNA および蛋白合成の変化を検討した。HpD 処理直後に光照射を行うと、細胞膜障害を示唆する高比重細胞数の減少および細胞生残率の減少が認められた。一方、蛋白合成は阻害されたが、DNA および RNA 合成には変化は認められなかった。HpD 処理から光照射までの時間が延長するにしたがって、細胞膜障害を示唆する値に減少が認められたが、依然として、蛋白合成阻害は認められ、さらに DNA 合成阻害も認められた。以上の PDT による細胞膜障害や蛋白および DNA 合成への影響の経時的変化は、HpD 細胞内局在あるいは HpD の分子形態の経時的変化を示唆するものであり、臨床的に最大の PDT の効果を得るタイミングを推察する上で重要な所見であると考えられた。

Key words hematoporphyrin derivative, photodynamic cell killing effect, DNA-, RNA- and Protein-syntheses

アクリジン色素を取り込んだ微生物が光照射により不活化されることが 1900 年に発見され、この作用は photodynamic action (光線力学的作用) または photosensitization (光増感作用) と呼ばれた^{1,2)}。その後、種々の色素が光増感物質 (photosensitizer) として報告され、ある種のポルフィリン³⁾⁻⁶⁾の強い光増感作用と悪性腫瘍を含めた発育の早い細胞や組織への高い親和性が報告され、それに対し可視光線照射をおこなう

光線力学的療法 (photodynamic therapy, PDT) の報告が次第に散見されるようになった⁷⁾⁻¹³⁾。その後 Lipson ら¹⁴⁾により紹介されたヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivative, HpD) は、正常組織より悪性腫瘍組織に長時間とどまる性質がさらに大きいので、HpD 特有の蛍光を利用した腫瘍の検出、および PDT など臨床応用の可能性が強く示唆された¹⁵⁾。当教室においても、1982 年より HpD 投与後

Abbreviations: HpD, hematoporphyrin derivative; PCA, perchloric acid; PDT, photodynamic therapy.

アルゴン色素レーザー赤色光 (波長 630 nm) 照射による PDT を膀胱腫瘍に応用し, その基礎的研究と共に臨床成績について報告してきた^{16)~19)}.

PDT の殺細胞機序として, 光エネルギーを吸収した HpD からもたらされる励起一重項酸素の強い酸化作用が重要視されているが²⁰⁾²¹⁾, その作用機序にはなお不明な点が多い. PDT の標的器官としては, 主に *in vitro* の実験系から細胞膜²²⁾²³⁾, 核^{24)~29)}, ミトコンドリア^{30)~33)}, ライソゾーム³⁴⁾などが考えられているが, HpD 処理時間ならびに HpD 処理から照射までの時間などの実験条件の差により効果が異なっているようである. 三好ら³⁵⁾³⁶⁾は, 膀胱癌由来培養細胞を用いて, 細胞結合 HpD の分光学的特性が経時的に変化すること, さらに HpD 処理後長時間培養した後の照射により高い殺細胞効果が認められることを報告している. その他にも細胞培養時間の延長とともに HpD の細胞内局在や結合様式が変化すると報告も散見される³⁷⁾³⁸⁾. つまり, このような HpD の細胞内局在や結合様式の経時変化が, PDT における標的器官の違いや殺細胞効果の経時変化に関与していると考えられる.

著者は, これまでに示唆された HpD の細胞内局在や結合様式の経時変化についてさらに検討を加えると共に, PDT の殺細胞効果発現について, マウス腹水肉腫細胞を用いて生化学的に検討したので報告する.

材料および方法

I. 細胞培養

実験には Bp 8 マウス腹水肉腫細胞を用いた. 3 か月令雄 NMRI マウスの腹腔内へ 3×10^7 個の細胞を移植し, 7-10 日ごとに passage を行った. 細胞移植後 4 日目に, マウスを頸椎脱臼にて屠殺し細胞を採取した. Tris-NaCl-EDTA buffer (Tris 0.1 mol/l, NaCl 0.07 mol/l, EDTA 0.005 mol/l, pH 7.5, Tris buffer) で 2 回洗浄後, Bürker 血球計算盤にて細胞数を算定し実験に用いた.

培養液として Ham's F10 (Flow Laboratory, U.K.) に L-glutamine (146.2 mg/l) および PEST (penicillin, streptomycin, 100 IE/ml) を加えたもの (FC-0), および 10% 仔牛血清を含む FC-0 (FC-10) を用いた. また, 光感作物質として HpD (Photofrin I, Oncology Research and Development Inc., New York) を用いた. 以下 HpD を用いたすべての実験は遮光した試験管内で行った.

II. HpD 濃度および HpD 処理時間の検討

FC-0 を用いて 5.0×10^6 cells/ml の細胞浮遊液を作

成し, 直径 10 mm のガラスチューブに 2 ml あて分注した. 最終濃度が 10, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/ml}$ となるように HpD を加え, 37°C で種々の時間 (30, 60, 90, 120 分) 培養した後, 細胞を 5.0 ml の Tris buffer にて 2 回洗浄し 2.0 ml の FC-0 で再び細胞浮遊液を作製した. HpD の細胞内濃度は LS-5 Luminescence Spectrometer (Perkin-Elmer Ltd., U.K.) を用いた HpD の蛍光発光強度の測定 ($\lambda_{\text{ex}} 402 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 632 \text{ nm}$) により求めた. Bp 8 細胞に結合した HpD は 632 nm に蛍光発光ピークを有しており, 同じく 632 nm に発光ピークを有する 5% 牛血清アルブミン水溶液中 HpD の蛍光発光強度より標準曲線を作成し, HpD の相対的細胞内濃度を求めた.

2. HpD 処理後の培養時間による細胞内 HpD 濃度の変化

FC-0 を用いた 5.0×10^6 cells/ml の細胞浮遊液 2.0 ml に, 最終濃度が 10, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/ml}$ となるように HpD を加え, 37°C で 30 分間培養した後, 細胞を 5.0 ml の Tris buffer にて 2 回洗浄し 2.0 ml の FC-0 にて再び細胞浮遊液を作製した. その後 4 時間まで 37°C で培養を続け, HpD 処理直後, 2 時間後および 4 時間後に細胞内 HpD 濃度を前述のごとく蛍光発光強度より求めた.

III. HpD の DNA synthesis rate に及ぼす効果

FC-0 を用いた 5.0×10^6 cells/ml の細胞浮遊液 2.0 ml に, 最終濃度が 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ になるように HpD を加え, 37°C で 30 分間培養した. 遊離 HpD を 5.0 ml の Tris buffer にて 2 回洗浄除去後, ³H-thymidine (New England Nuclear, USA, 比放射能 20.0 Ci/mmol) を 1 $\mu\text{Ci/ml}$ となるよう 2.0 ml の細胞浮遊液に加え, さらに 37°C で 30 分間培養を続けた. 5, 10, 20, および 30 分後に, 5.0 ml の氷冷 Tris buffer を加え, ³H-thymidine の細胞内取り込みを停止させた. さらに 5.0 ml の氷冷 Tris buffer にて細胞を 2 回洗浄後, 細胞沈渣に 0.2 M 過塩素酸

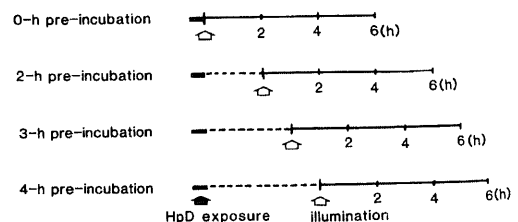


Fig. 1. Experimental schedule of the 0-h, 2-h, 3-h and 4-h pre-incubation groups. --- pre-incubation in serum-free Ham's F10 medium; — incubation after illumination in Ham's F10 medium supplemented with 10% new born bovine serum.

(perchloric acid, PCA) を 2.0 ml 加え、4°C で 15 分間作用させた。さらに 2.0 ml の 0.2 M PCA にて 1 回洗浄した (4°C, 3,000 rpm, 5 分間遠心)。上清および洗浄液を保存し、PCA 可溶性分画 (PCA soluble fraction) とした。細胞沈渣は 1.0 ml の 0.5 M NaOH にて溶解し PCA 不溶性分画 (PCA insoluble fraction) とした。両分画への ^3H -thymidine の取り込みを、SCINTILLATOR 299™ (PACKARD, USA) をシンチレーター溶液として用い、TRI-CARB® 300 C Liquid Scintillation System (PACKARD, USA) にて測定した。すべての値は dpm/cell で算出された。HpD 処理をせず同様の操作を行ったものを対照群とし、各 HpD 濃度および各処理時間の ^3H -thymidine の取り込みを対照群の ^3H -thymidine 30 分処理における取り込みに対する百分率で表した。

IV. dye exclusion 法による PDT 殺細胞効果の検討

1. HpD 濃度および照射時間の検討

FC-0 を用いた 5.0×10^6 cells/ml の細胞浮遊液 2.0 ml に HpD を 2 または 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加え、37°C で 30 分間培養した。細胞を 5.0 ml の Tris buffer にて 2 回洗浄後、2.0 ml の FC-10 にて細胞浮遊液を作製し、37°C で照射を行った。照射には、75 W high pressure Xenon lamp を光源とし、フィルター (No.40-7300-3, No.40-7302-9, No.40-7312-8, Carl Zeiss, West Germany) の使用により得られた 570–640 nm の光を使用した。光強度は細胞浮遊液表面で 22 mW/cm² であった。照射後 6 時間まで密封試験管内 37°C で培養を続け、照射直後、2, 4 および 6 時間後に 0.1% Lissamine Green B を用いた dye exclusion 法により生残細胞数を算定し、HpD を加えなかった対照群との比率から細胞生残率を算定した。

2. pre-incubation time の殺細胞効果に及ぼす影響

HpD 処理から照射までの時間 (pre-incubation time) の差による殺細胞効果の変化を検討するため、以下のような実験を行った。FC-0 を用いた 5.0×10^6 cells/ml の細胞浮遊液 2.0 ml に HpD を 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加え、30 分間培養した。5.0 ml の Tris buffer にて細胞を 2 回洗浄後、再び 2.0 ml の FC-0 にて細胞浮遊液を作製し、さらに 4 時間まで密封試験管内 37°C で培養した。HpD 処理直後、2, 3 および 4 時間後に培養液を FC-10 に交換し、IV-1. で述べた条件で照射を行った (それぞれ 0-h pre-incubation 群, 2-h pre-incubation 群, 3-h pre-incubation 群および 4-h pre-incubation 群とする。図 1)。照射後 6 時間ま

で、密封試験管内 37°C で培養を続け、照射直後、2, 4 および 6 時間後に dye exclusion 法により生残細胞数を算定し、HpD を加えなかった対照群との比率から細胞生残率を算定した。

V. 細胞比重分画法による細胞比重の検討

FC-0 を用いた 5.0×10^6 cells/ml の細胞浮遊液 2.0 ml に HpD を 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加え、37°C で 30 分間培養した。5.0 ml の Tris buffer にて細胞を 2 回洗浄後、2.0 ml の FC-0 にて再び細胞浮遊液を作製し、さらに 4 時間まで密封試験管内 37°C で培養した。HpD 処理直後および 4 時間後に培養液を FC-10 に交換し、IV-1. で述べた条件で照射を行った (0-h pre-incubation 群および 4-h pre-incubation 群)。照射後 6 時間まで、密封試験管内 37°C で培養を続けた。照射直後、2, 4 および 6 時間後に、 12×10^6 細胞を 10 ml の Percoll 溶液に混じよく攪拌した後、JA-20 Beckman rotor head を用い、15,000 rpm にて、4°C, 15 分間遠心した。Percoll 溶液は以下のごとく調整した。Percoll stock solution (Pharmacia, Sweden, No. 170891-0) に 1.5 M NaCl を 9 : 1 の比で混合した。この溶液と等張液 (0.9% NaCl) を 4 : 6 の比で混合した溶液に、細胞の凝集を防ぐ目的で sodium methyl cellulose を 0.2% となるように加え実験に用いた。また、Skog ら³⁹⁾の方法により gradient を 0.5 ml ずつの 20 分画に分画し、gradient 内細胞分布および比重分布についても検討した。HpD を加えず同様の操作を行った細胞を対照群とした。なお、低比重細胞は、コロニー形成法によると non-viable cell に相当すると報告されている³⁹⁾。

VI. PDT の DNA, RNA および蛋白合成への影響

V. に述べたと同様の方法で HpD 処理および照射を行い 0-h pre-incubation 群および 4-h pre-incubation 群について以下のごとく放射性前駆物質を用い DNA, RNA および蛋白合成への影響についてそれぞれ検討した。照射直後および 2, 4, 6 時間後に、1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^3H -thymidine, 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^3H -uridine (New England Nuclear, USA, 比放射能 20.0 Ci/mmol) または 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^{14}C -leucine (New England Nuclear, USA, 比放射能 54.2–55.0 mCi/mmol) を 30 分間それぞれ作用させた。III. で述べた方法に準じ、 ^3H -thymidine, ^3H -uridine あるいは ^{14}C -leucine の PCA 可溶性分画および PCA 不溶性分画への取り込みを測定した。HpD を作用させず同様の操作を行った細胞を対照群として、各放射性前駆物質の取り込みを対照群の百分率で表した。

VII. 推計学的処理

実験結果の推計学的処理は Student's t-test および

Scheffe 多重比較法によって行った。

成 績

I. HpD の細胞内取り込み

1. HpD 濃度および HpD 処理時間 (図 2 および 3)

HpD 濃度が 10 $\mu\text{g/ml}$ および 50 $\mu\text{g/ml}$ における HpD 細胞内濃度は処理時間 30 分までは急激に上昇し、それぞれ 1.2 pg/ml および 3.3 pg/ml であった。

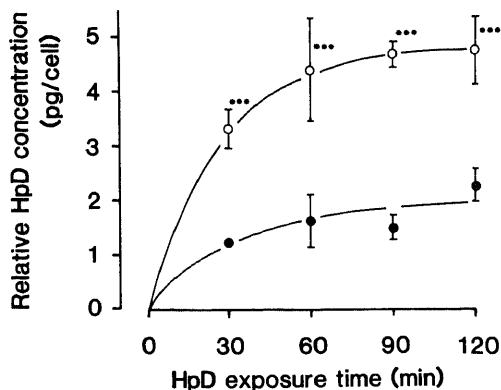


Fig. 2. Relative intracellular HpD concentration vs. various HpD exposure times. The cells were exposed to 10 (\bullet) and 50 (\circ) $\mu\text{g/ml}$ HpD for various times at 37°C. Mean value from 3 experiments \pm S.E.M. *** $p < 0.001$ vs. 10 $\mu\text{g/ml}$ by Student's t-test.

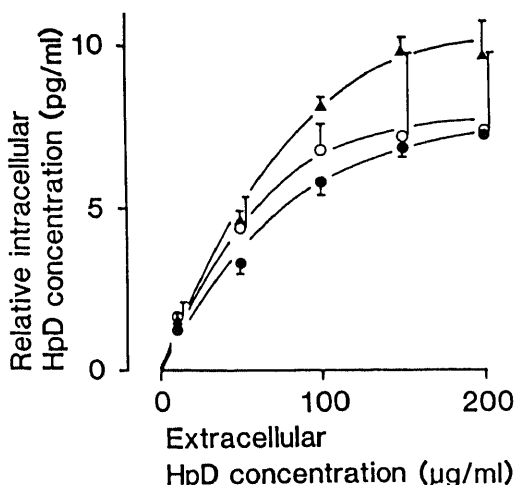


Fig. 3. Relative intracellular HpD concentration vs. various extracellular HpD concentrations. The cells were exposed to various HpD concentrations for 30 (\bullet), 60 (\circ) and 90 (\blacktriangle) min at 37°C. Mean value from 3 experiments \pm S.E.M.

その後 10 $\mu\text{g/ml}$ 群では 60 分処理で 1.6 pg/ml, 90 分処理で 1.5 pg/ml, 120 分処理で 2.3 pg/ml, また 50 $\mu\text{g/ml}$ 群では 60 分処理で 4.4 pg/ml, 90 分処理で 4.6 pg/ml, 120 分処理で 4.7 pg/ml と 120 分までは緩徐な上昇が認められた (図 2)。また, HpD 濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ 群では, すべての処理時間において細胞内 HpD 濃度は 10 $\mu\text{g/ml}$ 群に比し有意に高かった ($p < 0.001$)。また, HpD 濃度が 100 $\mu\text{g/ml}$ までは HpD 濃度の上昇に伴い, 細胞内 HpD 濃度は 30 分処理群で 5.8 pg/ml, 60 分処理群で 6.7 pg/ml, 90 分処理群で 8.0 pg/ml と急激な上昇が認められたが, 150 $\mu\text{g/ml}$ ではそれぞれ 6.8, 7.2, 9.7 pg/ml, 200 $\mu\text{g/ml}$ ではそれぞれ 7.1, 7.2, 9.5 pg/ml と, HpD 濃度を上昇させても, 細胞内 HpD 濃度の上昇は緩徐であった (図 3)。また, すべての HpD 濃度において 30 分処理群と 60 分処理群, および 60 分処理群と 90 分処理群の間にはそれぞれ細胞内 HpD 濃度に有意差は認められなかった。以上より, HpD の細胞内取り込みには, HpD 処理時間 30 分, HpD 濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ 以下が適当と考えられた。

2. HpD 処理後の培養時間による細胞内 HpD 濃度の変化 (図 4)

HpD 処理直後から培養 4 時間後までは, 10 $\mu\text{g/ml}$ から 200 $\mu\text{g/ml}$ の HpD 濃度において, 細胞内 HpD 濃度に有意差は認められなかった。すなわち, HpD 処理を行い遊離 HpD 洗浄後培養時間を 4 時間まで継続しても細胞内 HpD 濃度に変化は認められなかった。

II. HpD の DNA synthesis rate に及ぼす効果 (図 5 および 図 6)

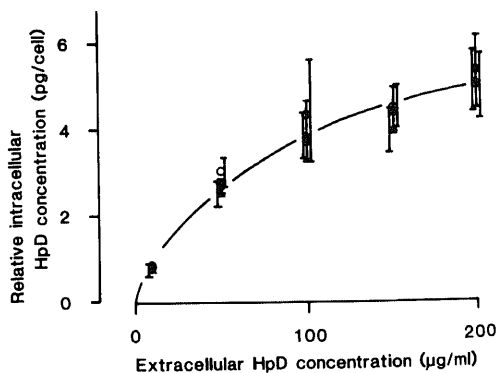


Fig. 4. Relative intracellular HpD concentration vs. various extracellular HpD concentrations. Relative intracellular HpD concentrations immediately (\bullet), 2 (\circ) and 4 h (\blacktriangle) after 30-min HpD exposure at various extracellular HpD concentrations at 37°C. Mean value from 3 experiments \pm S.E.M.

PCA 不溶性分画への ^3H -thymidine の取り込みは、10 から 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の HpD 濃度においては対照群と同様に、 ^3H -thymidine 処理 5 分以降時間の延長に伴い 30 分までは直線的に増加した (図 5)。また、HpD 濃度の上昇に伴う ^3H -thymidine 取り込みの減少が認められ、30 分処理においてそれぞれ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群で 99.3%、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群で 73.4% および 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群で 19.7% を示した。特に 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群では、10 分処理で 4.8%、20 分処理で 16.6%、30 分処理で 19.7% と対照群の 26.8%、67.9%、100.0% に比し有意の低下を示した ($p < 0.001$)。

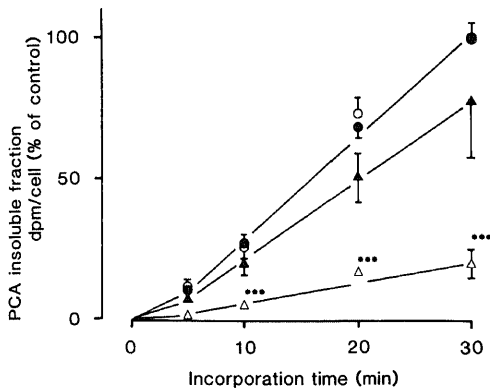


Fig. 5. Time-course of ^3H -thymidine activity in the PCA insoluble fraction. The cells were exposed to 10 (○), 25 (▲) and 50 (△) $\mu\text{g}/\text{ml}$ HpD and not exposed to HpD (●) at 37°C. Mean value from 3 experiments \pm S.E.M. *** $p < 0.001$ vs. control (●) by Student's t-test.

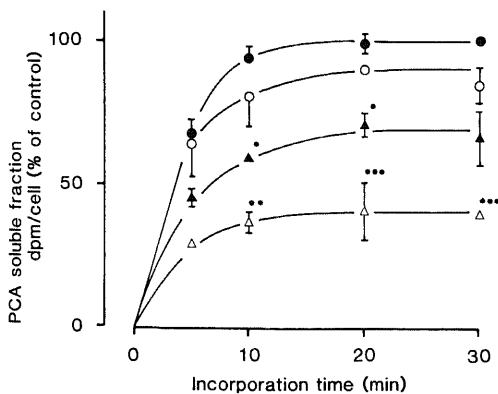


Fig. 6. Time-course of ^3H -thymidine activity in the PCA soluble fraction. The cells were exposed to 10 (○), 25 (▲) and 50 (△) $\mu\text{g}/\text{ml}$ HpD and not exposed to HpD (●) at 37°C. Mean value from 3 experiments \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control (●) by Student's t-test.

PCA 可溶性分画への ^3H -thymidine の取り込みは、対照群において 5 分処理で 67.8%、10 分処理で 93.8%、20 分処理で 98.9%、30 分処理で 100.0% と、5 分までは急激に増加し、10 分以降 plateau に達した (図 6)。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の HpD 濃度においても対照群と同様、5 分処理までは急激に増加し、10 分以降 plateau に達した。また、HpD の上昇に伴い ^3H -thymidine の PCA 可溶性分画への取り込みはしだいに減少し、10 分処理において 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群で 69.1% ($p < 0.05$)、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群で 36.5% ($p < 0.01$)、20 分処理において 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群で 70.6% ($p < 0.05$)、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群で 40.4% ($p < 0.001$)、30 分処理において 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群で 33.6% ($p < 0.001$) と、HpD 濃度 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では対照群に比し有意の低下が認められた。

以上より、HpD 濃度 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では HpD 処理のみにて ^3H -thymidine の細胞内取り込みに抑制が認められ、以下の殺細胞効果の検討、DNA、RNA および蛋白合成への PDT の障害の実験では 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の低濃度 HpD を使用した。

III. dye exclusion 法による PDT の殺細胞効果の検討

1. HpD 濃度および光照射時間の検討 (図 7 および 8)

HpD 濃度 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にて 30 分間処理した直後に 5 分間までの光照射を行うと、照射時間の延長に伴う生残細胞数の減少と、光照射後の培養時間の経過に伴う生残細胞数の減少が認められた (図 7)。HpD 濃度 2 および 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理における 3 分間光照射後の経時的生残細

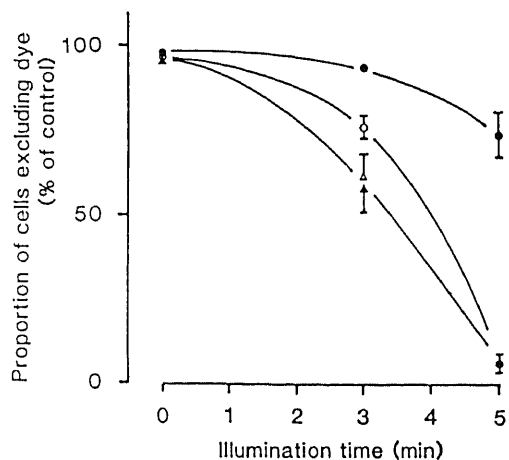


Fig. 7. Proportion of the cells excluding dye. The cells were illuminated for various times at 37°C immediately (●), 2 (○), 4 (▲) and 6 (△) h after 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HpD exposure. Mean value from 3 experiments \pm S.E.M.

胞数の変化を図8に示すが、 $2\mu\text{g/ml}$ 群において照射直後で95.0%、2時間後で80.4%、4時間後で59.6%、6時間後で64.0%と、また $3\mu\text{g/ml}$ 群でもそれぞれ98.0、69.6、40.4、26.2%と、光照射後の培養時間の経過に伴う生残細胞数の減少が認められた。

^3H -thymidine、 ^3H -uridineや ^{14}C -leucineなどの放射性前駆物質を用いた実験では、いわゆるdead cellsの存在が放射性前駆物質の取り込みや測定に影響を与えると考えられたので、光照射後6時間培養後も50%以上の細胞生残率が認められたHpD $2\mu\text{g/ml}$ 、光照射3分間でそれぞれの放射性前駆物質の取り込みの実験を行った。

2. pre-incubation timeの殺細胞効果に及ぼす影響(図9)

それぞれのpre-incubation群において、細胞生残率は光照射後の培養時間とともに減少した(図9)。一方、0-, 2-, 4-および6-h pre-incubation群における光照射後6時間の細胞生残率はそれぞれ26.2、52.2、55.6および75.1%であり、pre-incubation timeの延長とともに、細胞生残率の上昇が認められた。生残細胞率は、2-h pre-incubation群では光照射後6時間で、3-h pre-incubation群では光照射後4時間より、また4-h pre-incubation群では光照射後2時間より0-h pre-incubation群に比し有意差が認められた($p < 0.01$)。すなわち、HpD処理から光照射までの培養時間を延長させるにしたがい、dye exclusion法に基づく光線力学的殺細胞効果に減少が認められた。

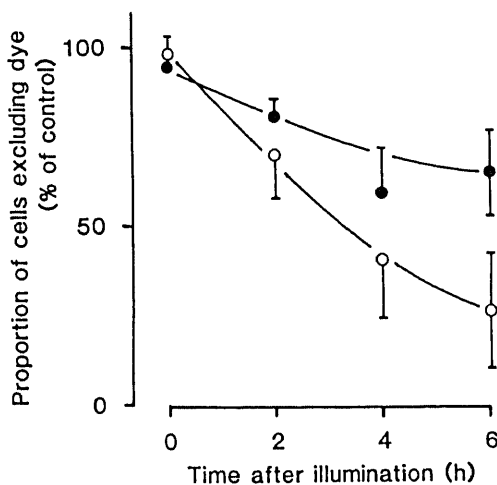


Fig. 8. Time-course of proportion of the cells excluding dye. The cells were incubated for 6 h after exposure to 2 (●) and 3 (○) $\mu\text{g/ml}$ HpD followed by a 3-min illumination. Mean value from 3 experiments \pm S.E.M.

IV. 細胞比重への PDT の影響 (図10および11)

density marker beadsのdensity gradient内分布を図10上段に示したが、gradient内の比重分布は直線的ではなかった。非照射群においては少なくともfraction I-IIIの3つの分画が肉眼的に観察されたが、図10下段に示すように、約70%の細胞が高比重を示すfraction IIIに分画された。照射群では、高比重細胞(fraction III)が約10%に減少し、低比重細胞(fraction I, II)が増加した。図11は0-hおよび4-h pre-incubation群におけるfraction III(高比重分画)に分画された細胞数の経時的変化を示すが、0-h pre-incubation群では、光照射直後より高比重細胞は8.5%と著明に低下したが、光照射後6時間培養を続けると高比重細胞数は33.7%と増加した。この高比重細胞数の低下は光照射直後から6時間まで対照群に比し有意であった($p < 0.001$)。4-h pre-incubation群では

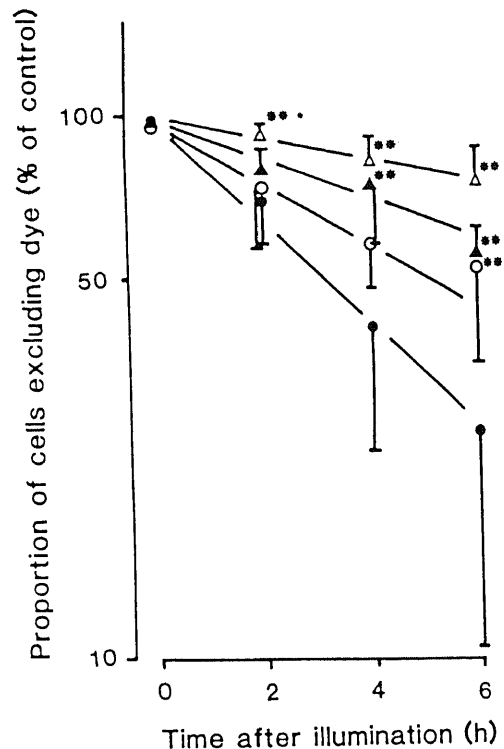


Fig. 9. Time-course of proportion of the cells excluding dye in the 0-h pre-incubation group (●), 2-h pre-incubation group (○), 3-h pre-incubation group (▲) and 4-h pre-incubation group (△). Mean value from 3 experiments \pm S.E.M. ** $p < 0.01$ vs. 0-h pre-incubation group by ANOVA followed by Scheffe's multiple comparison procedure.

光照射直後には 85.0%, 2 時間後には 86.8% と有意な高比重細胞の減少が認められたが ($p < 0.05$), 光照射後 4 時間より対照群の値にまで復した。

V. DNA, RNA および蛋白合成への PDT の影響 (図 12, 13 および 14)

1. DNA 合成への影響 (図 12)

0-h pre-incubation 群では, PCA 可溶性および不溶性分画への ^3H -thymidine の取り込みは対照群に比し有意差は認められなかった。4-h pre-incubation 群では, PCA 可溶性分画への取り込みは光照射後 6 時間までは変化は認められなかった。PCA 不溶性分画への取り込みは光照射直後には変化は認められなかったが, 光照射後 2 時間にて対照群の 59.3% と対照群に比し有意の低下が認められた ($p < 0.05$)。その抑制は 4 時間および 6 時間において, それぞれ対照群の 73.1% および 69.7% であったが, 対照群に比し有意差は認められなかった。不溶性分画/可溶性分画比 (insoluble/soluble fraction ratio) は光照射後 2 時間で対照群の 64.0% と有意の低下 ($p < 0.05$) が認められた。その後経時的に軽度の上昇が認められ, 6 時間後には対照群

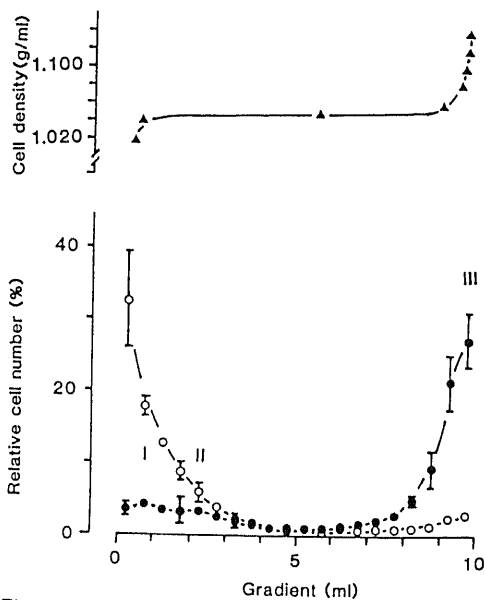


Fig. 10. Relationship between the density distribution and the cell distribution in a Percoll gradient. Density in a gradient (▲) was determined by density marker beads (upper part). Density distribution of the cells in a Percoll gradient (lower part) exposed (○) and not exposed (●) to light. The HpD-exposed cells were from the 0-h pre-incubation group at 2 h after illumination. Mean value from 3 experiments \pm S.E.M.

の 77.2% となり, 両者間に有意差は認められなくなった。

2. RNA 合成への影響

0-h pre-incubation 群では, PCA 不溶性分画への ^3H -uridine の取り込みは光照射直後から 4 時間まで対照群の約 80% に低下したが, 有意差は認められず, 6 時間後には対照群の値にまで復した。また, PCA 可溶性分画への取り込みも, 光照射直後対照群の 75.1% に低下したが, やはり対照群に比し有意差は認められず, 4 時間後には対照群の値にまで復した。一方, 4-h pre-incubation 群では, PCA 可溶性および不溶性の両分画への取り込みは光照射 6 時間まで対照群と同等であった。

3. 蛋白合成への影響 (図 14)

0-h および 4-h pre-incubation 両群ともに, PCA 不溶性分画への ^{14}C -leucine の取り込みは光照射直後には, それぞれ対照群の 71.3% および 71.0% に, さらに 2 時間後には 50.4% ($p < 0.01$) および 50.5% ($p < 0.01$) に, 6 時間後においてもそれぞれ 62.3% ($p < 0.05$) および 54.1% ($p < 0.01$) に抑制され, 対照群に比し有意の低下が認められた。PCA 可溶性分画への取り込みは, 0-h pre-incubation 群では光照射後 6 時間までは対照群の値に保たれ, また, 4-h pre-incubation 群では光照射後 2 および 4 時間には, それぞれ対照群の 122.9% および 117.4% と軽度上昇が認められたが,

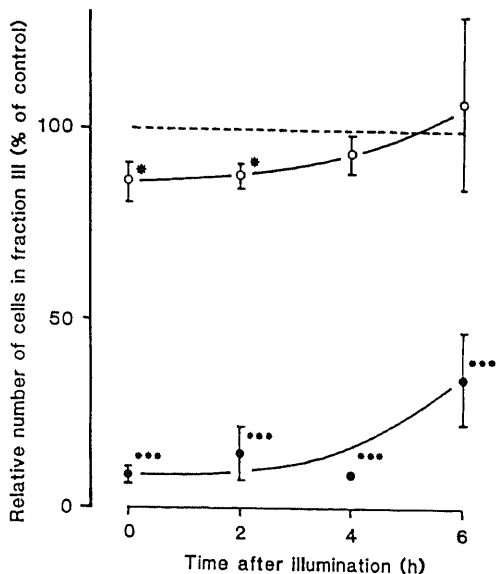


Fig. 11. Time-course of proportion of the cells showing high density. (●), 0-h pre-incubation group; (○), 4-h pre-incubation group. Mean value from 4 experiments \pm S.E.M. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control by Student's t-test.

対照群に比し有意差は認められなかった。

考 察

HpD と光照射による光殺細胞効果は HpD の光吸収スペクトルと直接関係しており、また、この場合発生する光化学反応は可視光線すなわち低エネルギー光子により成立すると考えられている。よって細胞内の HpD 局在、その時の HpD の結合様式や分子形態は光殺細胞効果を発現する上で極めて重要な因子である。

この論文では細胞レベルでの HpD の取り込みと光殺細胞効果の発現過程を主として分光学的に、また生物学的に検討したものである。

久住ら⁴⁰⁾は細胞に結合した HpD の分光学的特性の経時変化および蛍光顕微鏡所見から、HpD 分子は初め細胞膜に弱く結合した後、時間の経過に伴って細胞質内で安定結合することが示唆されると述べている。この結論より考えると、我々の dye exclusion 法による判定で 0-h pre-incubation 群において強い光殺細胞効果が認められたのは、HpD が主として細胞膜に分布

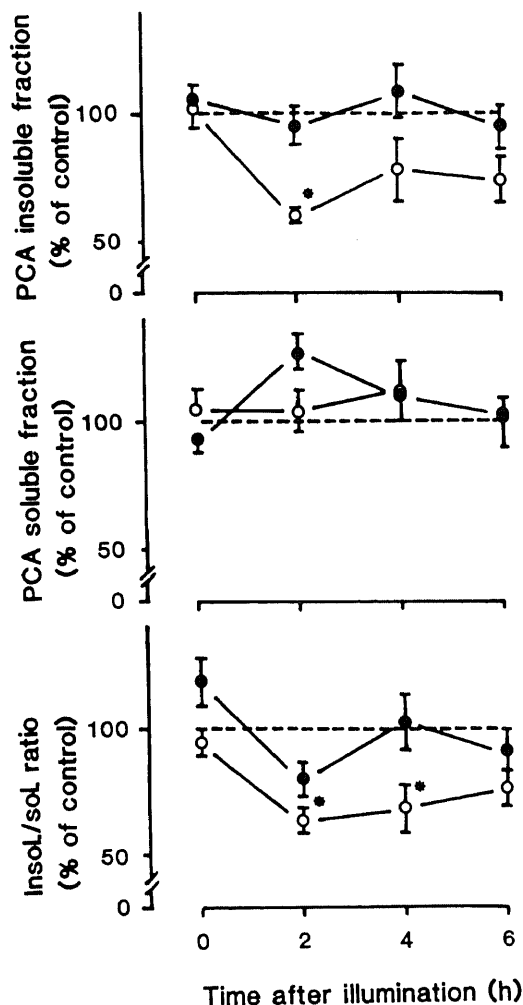


Fig. 12. Time-course of ^3H -thymidine activity incorporated into the PCA insoluble (upper part) and soluble (middle part) fractions, and the insoluble/soluble fraction ratio (lower part). (●), 0-h pre-incubation group; (○), 4-h pre-incubation group. Mean value from 4 experiments \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs. control by Student's t-test.

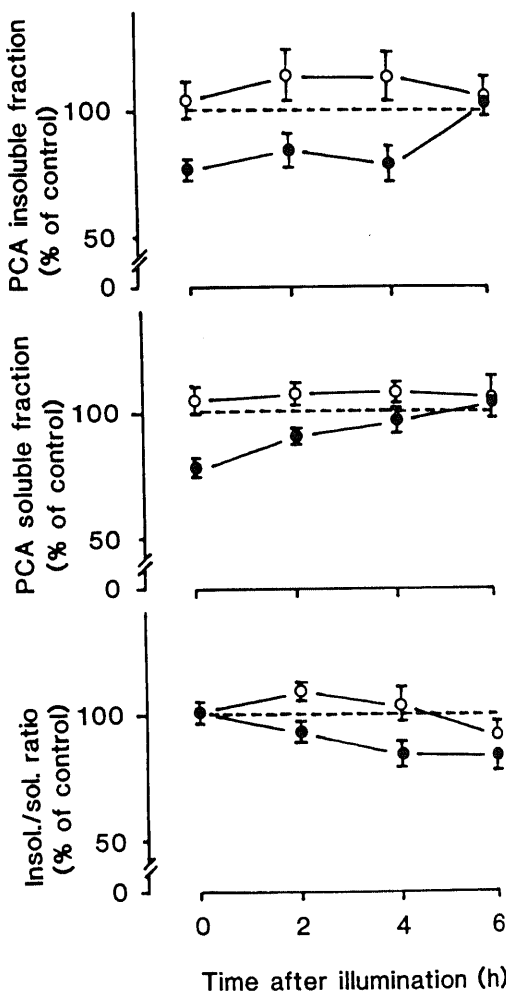


Fig. 13. Time-course of ^3H -uridine activity incorporated into the PCA insoluble (upper part) and soluble (middle part) fractions, and the insoluble/soluble fraction ratio (lower part). (●), 0-h pre-incubation group; (○), 4-h pre-incubation group. Mean value from 4 experiments \pm S.E.M.

しているためと考えられた。

PDT による殺細胞効果に関しては、著者の用いた実験系では HpD 処理から照射までの時間が延長するにしたがい dye exclusion 法により評価した Bp 8 腹水肉腫細胞への光殺細胞効果の減少が認められた。この結果は、当教室において先に行ったヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 に対する HpD の光線力学的作用をコロニー形成法により判定した結果³⁶⁾と逆の成績であった。コロニー形成法はいわゆる“reproductive death”を反映することが知られている⁴¹⁾。一方、dye exclusion 法は、細胞膜の色素の選択的透過性の変化

に基づく評価方法である⁴²⁾。Warters ら⁴²⁾は放射線照射あるいは温熱処理によりすべての細胞が不活化された場合でも、トリパン青による dye exclusion 法では 90-100%の生存率を示すことを報告しており、dye exclusion 法は“immediate cell death”および“membrane function”は反映するものの、“reproductive potential”の評価には限られた価値しかない結論している。また、King ら⁴³⁾は dye exclusion 法は細胞障害のおそい段階しか反映しないと述べている。つまり、実験に用いられた細胞株が異なっていることのほか、殺細胞効果の評価方法が dye exclusion 法とコロニー形成法と異なったことが、今回の結果と先に行った膀胱癌由来培養細胞を用いた実験結果において成績が異なった重要な一因と考えられた。また、Kessel³⁸⁾は長時間培養により、HpD の疎水性成分が細胞に集積し、この HpD 成分は容易には洗浄されず、50% impairment of cycloleucine transport により検討した光線力学的作用の膜輸送障害効果が比較的低いことを報告しており、HpD 処理から照射までの時間が延長するにしたがい殺細胞効果の低下が認められた今回の著者の結果に一致した。

HpD 処理直後の照射 (0-h pre-incubation 群) による細胞比重大の低下は、PDT による膜透過性の急激な変化による可能性が高いと考えられた。0-h pre-incubation 群において、照射後 6 時間で細胞比重が軽度上昇したことは、この PDT 膜障害はある程度回復する可能性を有するものと考えられた。このことは、4-h pre-incubation 群でも認められ、照射直後に軽度認められた細胞比重大の低下は、照射 4 時間後より対照群の値に復している。0-h および 4-h pre-incubation 両群における細胞比重の変化の差は、dye exclusion 法の結果と同様、4-h pre-incubation 群より 0-h pre-incubation 群において、膜障害が大きいことを示唆するものと考えられた。このことは Moan ら²⁹⁾の α -aminoisobutyric acid uptake と $^{51}\text{Cr O}_4$ release により検討した光線力学的作用の膜輸送障害についての報告と一致するものであった。

アイソトープを用いた macromolecule 合成の測定を困難にさせる一つの要因として、障害された細胞の存在があげられる。本報では結果は示さなかったが、dye exclusion 法で“dead cell”と判定された細胞でも、PCA 不溶性分画への細胞あたりの ^3H -thymidine の取り込みは、“viable cell”のそれとほぼ同等であったが、PCA 可溶性分画への取り込みは認められなかった。つまり、取り込みを測定しようとする細胞集団の細胞生残率が低いと、細胞あたりの ^3H -thymidine の取り込みを計算する際困難を生じた。この困難を解消

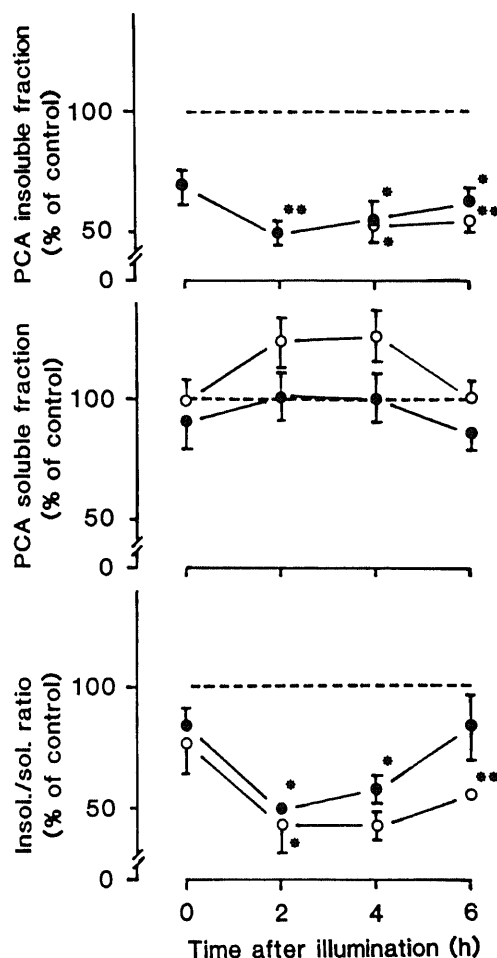


Fig. 14. Time-course of ^{14}C -leucine activity incorporated into the PCA insoluble (upper part) and soluble (middle part) fractions, and the insoluble/soluble fraction ratio (lower part). (●), 0-h pre-incubation group; (○), 4-h pre-incubation group. Mean value from 4 experiments \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control by Student's t-test.

するため、膜障害の強い 0-h pre-incubation 群では Percoll による細胞比重分画法を用いて dye exclusion 法で少なくとも 80%以上の生残細胞率を示す細胞集団を取りだし、取り込みを測定するようにした。

アイソトープを用いた実験のもう一つの問題点として、膜輸送能の変化が macromolecule 合成への影響として現れることがあげられる。つまり、放射性前駆物質の細胞内取り込みが障害されれば当然 macromolecule そのものへの取り込みも減少する。逆に macromolecule 合成阻害が高度の場合、放射性前駆物質の細胞内取り込みに影響を与えることもある。一般に、PCA 可溶性分画では、それぞれの放射性前駆物質の細胞内プールへの取り込みが測定され、膜機能を反映するものと考えられ、一方、PCA 不溶性分画では macromolecule への前駆物質の取り込みが測定され、macromolecule 合成そのものを反映するものと考えられている。今回の実験では Percoll による細胞比重分画法を用い、細胞比重が高い細胞、つまり膜機能が対照群とほぼ同等と考えられた細胞を取りだし、その ^3H -thymidine, ^3H -uridine および ^{14}C -leucine の取り込みを測定したので、各放射性前駆物質の PCA 可溶性分画への取り込みは対照群に比し有意差が認められなかった。その結果、先に述べたアイソトープを用いた実験におけるもう一つの問題を除外できたものと考えられる。

今回検討した DNA 合成, RNA 合成および蛋白合成の 3 つの parameter のうち、0-h および 4-h pre-incubation 群において、蛋白合成障害が光線力学的反応によって最も鋭敏に発現した。一般的に、蛋白合成は以下に述べる様々な段階で進行することが知られている⁴⁴⁾。1) DNA の複製, 2) DNA から RNA への転写, 3) RNA の processing, 4) RNA の核から細胞質への移動, 5) mRNA のリボゾームへの付着と蛋白合成の開始, 6) mRNA の安定化, 7) 蛋白の最終的な形態への処理。0-h pre-incubation 群において、DNA 合成は影響を受けず、RNA 合成は蛋白合成阻害よりおそく、軽度抑制されるのみであることより、PDT は少なくとも前述の 1), 2) の段階には影響を与えないことが示唆された。ribosomal RNA 量や ribosome maturation が蛋白合成阻害剤である cycloheximide により影響を受けることが報告されており⁴⁵⁾、今回認められた RNA 合成阻害はおそらく蛋白合成阻害による 2 次的変化と考えられた。

dye exclusion 法および細胞比重分画法の結果より、膜機能の障害が 0-h pre-incubation 群における光線力学的作用の重要な部分であると考えられた。しかし、細胞比重が対照群と同程度の細胞についての ^{14}C -

leucine の取り込みについて検討し、細胞への取り込みは影響を受けなかったにもかかわらず、蛋白合成阻害が発現したことより、この蛋白合成阻害は膜障害に伴った 2 次的なものではないと考えられ、0-h pre-incubation 群において PDT は膜障害とは別に蛋白合成阻害も発現することが示唆された。

0-h pre-incubation 群では DNA 合成に変化は認められなかったが、4-h pre-incubation 群では明らかな抑制が認められた。今回の実験からは、この 4-h pre-incubation 群における DNA 合成阻害が、蛋白合成阻害による 2 次的変化なのか、核そのものへの直接的な効果なのかは不明であった。これまで HpD 細胞内局在が経時的に変化し、その変化により PDT の標的器官が変化することが示唆されてきた³⁶⁾³⁸⁾⁴⁶⁾。今回の実験における 4-h pre-incubation 群での DNA 合成阻害の発現は、このような HpD 細胞内局在の経時的変化が関与している可能性が高いと考えられた。

今回の実験では HpD 処理直後の光照射により、著明な細胞膜障害と蛋白合成阻害が認められた。また、HpD 処理から光照射までの時間が延長するにしたがい、細胞膜障害を示唆する所見は減少したが、蛋白合成阻害は同様に認められ、DNA 合成阻害も認められるようになった。これらの光線力学的作用の経時的変化は、HpD の細胞内局在さらには HpD の分子形態や結合様式の経時的変化を示唆するものと考えられた。また、臨床的に HpD 投与と光照射との間隔は 48-72 時間となっているが、著者の研究結果は臨床的 PDT に関連深いものと考えられた。

結 論

マウス腹水肉腫細胞 (Bp8) を用い、HpD による PDT 効果を *in vitro* で検討し、以下の結果を得た。

1. 細胞結合 HpD の蛍光発光強度により測定した細胞内 HpD 濃度は処理時間の延長に伴い、30 分までは急激な上昇が認められ、その後 120 分までは緩徐な上昇を示した。

2. 細胞内 HpD 濃度は、用いられた HpD 濃度の上昇に依存したが、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では、その上昇は緩徐であった。

3. 30 分間 HpD 処理を行い、遊離 HpD 洗浄後培養を 4 時間まで継続しても、細胞内 HpD 濃度に変化は認められなかった。

4. PCA 不溶性分画への ^3H -thymidine の取り込みは、すべての HpD 濃度において、対照群と同様 ^3H -thymidine 処理時間 30 分までは直線的に増加した。また、HpD 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、 ^3H -thymidine の取り込みは対照群に比し有意の低下を示した。

5. PCA 可溶性分画への ^3H -thymidine の取り込みは、すべての HpD 濃度において、対照群と同様 ^3H -thymidine 処理時間 5 分までは急激な増加を示し、10 分以降 plateau となった。また、 ^3H -thymidine 30 分処理における取り込みは HpD 濃度の上昇に伴い徐々に減少し、HpD 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下では対照群に比し有意の低下を示した。

6. 照射時間を延長するに伴い細胞生残率は減少を示した。また、照射後経時的に細胞生残率の減少が認められた。

7. HpD 処理から照射までの時間 (pre-incubation time) の延長に伴い、細胞生残率の上昇が認められた。

8. HpD 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理直後に照射を行うと、照射直後より高比重細胞数が著明に低下したが、HpD 処理 4 時間後に照射を行うと、対照群と同様高比重を示す細胞が大部分を占めた。

9. HpD 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理直後に照射を行っても、PCA 不溶性および可溶性分画への ^3H -thymidine の取り込みは対照群に比し有意差は認められなかった。HpD 処理 4 時間後に照射を行うと、PCA 可溶性分画への取り込みは照射 6 時間後までは対照群に比し有意差が認められなかった。PCA 不溶性分画への取り込みは、照射 2 時間後に対照群の 59.3% に抑制され、4 および 6 時間後においてもそれぞれ 73.1% および 69.7% と抑制された。

10. HpD 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理直後に照射を行うと、PCA 不溶性分画への ^3H -uridine の取り込みは照射直後から 4 時間までは対照群の約 80% に低下したが、6 時間後には対照群の値にまで復した。また、PCA 可溶性分画への取り込みも照射直後対照群の 75.1% に低下したが、4 時間後には対照群の値にまで復した。一方、HpD 処理 4 時間後に照射を行っても、PCA 不溶性および可溶性分画への ^3H -uridine の取り込みは照射 6 時間後まで対照群の値と差は認められなかった。

11. HpD 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理直後に照射を行っても、4 時間後に照射を行っても、PCA 可溶性分画への ^{14}C -leucine の取り込みには対照群に比し有意の低下は認めなかったが、PCA 不溶性分画への取り込みは照射直後には対照群の約 70% に、さらに 2 時間後には約 50% に抑制された。

12. HpD 処理直後の照射により、著明な細胞膜障害と蛋白合成阻害が認められた。また、HpD 処理から照射までの時間が延長するにしたがって、細胞膜障害を示唆する値に減少が認められたが、HpD 処理 4 時間後に照射を行うと蛋白合成阻害は認められ、さら

に DNA 合成阻害も認められた。これらの光線力学的効果の経時変化は、HpD の細胞内局在あるいは HpD 結合様式や分子形態の経時変化を示唆するもので、臨床的に最大の PDT 効果を得るタイミングを推察する上で重要な所見と考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を頂いた恩師久住治男教授および膀胱腫瘍研究班の諸兄、教室員各位らの御厚意に感謝します。また本研究に関し、御指導と御助言を賜った Professor B. Tribukait and Dr. S. Skog, Department of Medical Radiation Biology, Karolinska Institute, Sweden, and Professor L. Andersson, Department of Urology, Karolinska Hospital, Sweden ならびに推計学的処理について御指導いただいた本学衛生学橋本和夫教授に厚く感謝します。本論文の要旨は、The 1st International Congress of CAPDT および第 45 回日本癌学会総会において発表した。また、この研究の一部は、the Japan-Sweden Cooperative Research Foundation, the Stockholm Cancer Society, 文部省科学研究費補助金一般研究 (A) 課題番号 60440075 および厚生省がん研究助成金 (56-5, 59-3) の援助を受けたもので附記して謝意を表します。

文 献

- 1) Raab, O.: Über die Wirkung Fluorescirender Stoffe auf Insusorien. Z. Biol., 39, 524-546 (1900).
- 2) Moan, J., Pettersen, E. O. & Christensen, T.: The mechanism of photodynamic inactivation of human cells *in vitro* in the presence of hematoporphyrin. Br. J. Cancer, 39, 398-407 (1979).
- 3) Berns, M. W., Dahlman, A., Johnson, F. M., Burns, R., Sperling, D., Gultinan, M., Siemens, A., Walter, R., Wright, W., Hammer-Wilson, M. & Wile, A.: *In vitro* cellular effects of hematoporphyrin derivative. Cancer Res., 42, 2325-2329 (1982).
- 4) Figge, F. H. J., Weiland, G. S. & Manganiello, L. O. J.: Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 68, 640-641 (1948).
- 5) Kessel, D.: Effects of photoactivated porphyrins at the cell surface of leukemia L1210 cells. Biochem., 16, 3443-3449 (1977).
- 6) Kessel, D. & Kohn, K. I.: Transport and binding of mesoporphyrin IX by leukemia L1210 cells. Cancer Res., 40, 303-307 (1980).
- 7) Dougherty, T. J.: Activated dyes as anti-

- tumor agents. *J. Natl. Cancer Inst.*, **52**, 1333-1336 (1974).
- 8) **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).
- 9) **Dogherty, 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).
- 10) **Dougherty, T. J.** : Photoradiation therapy for cutaneous and subcutaneous malignancies. *J. Invest. Dermatol.*, **77**, 122-124 (1981).
- 11) **Hayata, Y., Kato, H., Konaka, C., Ono, J. & Takizawa, N.** : Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer. *Chest*, **81**, 269-277 (1982).
- 12) **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).
- 13) **Ward, B. G., Forbes, I. J., Cowled, P. A., McEvoy, M. M. & Cox, L. W.** : The treatment of vaginal recurrences of gynecologic malignancy with phototherapy following hematoporphyrin derivative pretreatment. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **356-357** (1982).
- 14) **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).
- 15) **Sanderson, D. R., Fontana, R. S., Lipson, R. L. & Baldes, E. J.** : Hematoporphyrin as a diagnostic tool. A preliminary report of new techniques. *Cancer*, **30**, 1368-1372 (1972).
- 16) **Hisazumi, H., Misaki, T. & Miyoshi, N.** : Photoradiation therapy of bladder tumors. *J. Urol.*, **130**, 685-687 (1983).
- 17) **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).
- 18) **Hisazumi, H., Miyoshi, N. & Misaki, T.** : A trial manufacture of a motor-driven laser light scattering optic for whole bladder wall irradiation. *In Porphyrin Localization and Treatment of Tumors*, p.239-247, Alan R. Liss, Inc., 1984.
- 19) **Misaki, T., Hisazumi, H. & Miyoshi, N.** : Photoradiation therapy of bladder tumors. *In Porphyrin Localization and Treatment of Tumors*, p.785-794, Alan R. Liss, Inc., 1984.
- 20) **Dougherty, T. J., Gomer, C. J. & Weishaupt, K. R.** : Energetics and efficiency of photo-inactivation of murine tumor cells containing hematoporphyrin. *Cancer Res.*, **36**, 2330-2333 (1976).
- 21) **Weishaupt, K. R., Gomer, C. J. & Dougherty, T. J.** : Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer Res.*, **36**, 2326-2329 (1976).
- 22) **Bellinier, D. A. & Dougherty, T. J.** : Membrane lysis in Chinese hamster ovary cells treated with hematoporphyrin derivative plus light. *Photochem. Photobiol.*, **36**, 43-47 (1982).
- 23) **Girotti, A. W.** : Photodynamic action of protoporphyrin IX on human erythrocytes : Cross-linking of membrane proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 1367-1374 (1976).
- 24) **Evensen, J. F. & Moan, J.** : Photodynamic action and chromosomal damage : A comparison of haematoporphyrin derivative (HpD) and light with X-irradiation. *Br. J. Cancer*, **45**, 456-465 (1982).
- 25) **Fiel, R. J., Datta-Gupta, N., Mark, E. H. & Howard, J. C.** : Induction of DNA damage by porphyrin photosensitizers. *Cancer Res.*, **41**, 3543-3545 (1981).
- 26) **Gomer, C. J., Rucker, N., Banerjee, A. & Benedict, W. F.** : Comparison of mutagenicity and induction of sister chromatid exchange in Chinese hamster cells exposed to hematoporphyrin derivative photoradiation, ionizing radiation, or ultraviolet radiation. *Cancer Res.*, **43**, 2622-2627 (1983).
- 27) **Gutter, B., Speck, W. T. & Rosenkranz, H. S.** : The photodynamic modification of DNA by hematoporphyrin. *Biochem. Biophys. Acta*, **475**, 307-314 (1977).
- 28) **Moan, J. & Christensen, T.** : Photodynamic effects on human cells exposed to light in the presence of hematoporphyrin. Localization of the active dye. *Cancer Lett.*, **11**, 209-214 (1981).
- 29) **Moan, J., McGhie, J. & Jacobsen, P. B.** : Photodynamic effects on cells *in vitro* exposed to hematoporphyrin derivative and light. *Photochem. Photobiol.*, **37**, 599-604 (1983).
- 30) **Coppola, A., Viggiani, E., Salzarulo, L. & Rasile, G.** : Ultrastructural changes in lymphoma

- cells treated with hematoporphyrin and light. *Am. J. Pathol.*, **99**, 175-192 (1980).
- 31) **Gibson, S. L. & Hilf, R.** : Photosensitization of mitochondrial cytochrome c oxidase by hematoporphyrin derivative and related porphyrins *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.*, **43**, 4191-4197 (1983).
- 32) **Hilf, R., Smail, D. B., Murant, R. S., Leakey, P. B. & Gibson, S. L.** : Hematoporphyrin derivative-induced photosensitivity of mitochondrial succinate dehydrogenase and selected cytosolic enzymes of R3230AC mammary adenocarcinomas of rats. *Cancer Res.*, **44**, 1483-1488 (1984).
- 33) **Salet, C., Moreno, G. & Vinzens, F.** : Photodynamic effects induced by furocoumarins on a membrane system. Comparison with hematoporphyrin. *Photochem. Photobiol.*, **36**, 291-296 (1982).
- 34) **Christensen, T., Volden, G., Moan, J. & Sandquist T.** : Release of lysosomal enzymes and lactate dehydrogenase due to hematoporphyrin derivative and light irradiation of NHIK 3025 cells *in vitro*. *Ann. Clin. Res.*, **14**, 46-52 (1982).
- 35) **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).
- 36) **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. *Photobiochem. Photobiophys.*, **9**, 241-252 (1985).
- 37) **Henderson, B. W., Bellnier, D. A., Ziring, B. & Dougherty, T. J.** : Aspects of the cellular uptake and retention of hematoporphyrin derivative and their correlation with the biological response to PRT *in vitro*. In D. Kessel & T. J. Dougherty (eds.), *Porphyrin photosensitization (Advanced Experimental Medicine and Biology, Vol.160)*, p.129-138, Plenum Press, New York and London, 1983.
- 38) **Kessel, D.** : Transport and binding of hematoporphyrin derivative and related porphyrins by murine leukemia L1210 cells. *Cancer Res.*, **41**, 1318-1323 (1981).
- 39) **Skog, S. & Tribukait, B.** : Irradiation induced cell death as related to cell cycle. *Acta Radiol. Oncol.*, **24**, 87-93 (1985).
- 40) **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).
- 41) **Okada, S.** : *Radiation Biochemistry, Vol.1*, p. 190-307, Academic Press, New York and London, 1970.
- 42) **Warters, R. L. & Hofer, K. G.** : The *in vivo* reproductive potential of density separated cells. *Exp. Cell Rec.*, **87**, 143-151 (1974).
- 43) **King, D. W., Paulson, S. R., Puckett, N. L. & Krebs, A. T.** : Cell death: IV. The effect of injury on the entrance of vital dye in Ehrlich tumor cells. *Am. J. Pathol.*, **35**, 1067-1079 (1959).
- 44) **Lodish, H. F.** : Translation control of protein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.*, **903**, 39-72 (1976).
- 45) **Warner, J. R., Girard, M., Latham, H. & Darnell, J. E.** : Ribosome formation in Hela cells in the absence of protein synthesis. *J. Mol. Biol.*, **19**, 373-382 (1966).
- 46) **Moan, J., Christensen, T. & Jacobsen, P. B.** : Photodynamic effects on cells *in vitro* labelled with hematoporphyrin derivative. *Photobiochem. Photobiophys.*, **7**, 349-358 (1984).

Photodynamic Damages in Bp 8 Ascites Tumor Cells with Hematoporphyrin Derivative Osamu Ueki, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **96**, 483—496 (1987)

Key words: hematoporphyrin derivative, photodynamic cell killing effect, DNA-, RNA- and protein syntheses

Abstract

Using Bp 8 tumor cells *in vitro*, cellular uptake of hematoporphyrin derivative (HpD) and photodynamic effects have been spectroscopically and biochemically investigated to elucidate photodynamic reactions in connection with possible changes in molecular form and distribution of cell-bound HpD following incubation. The uptake was assessed by fluorescence intensity (λ_{ex} 402 nm, λ_{em} 632 nm) of cell-bound HpD. The uptake increased with increasing HpD exposure time rapidly until 30 min and slowly from 30 to 120 min. Intracellular HpD concentrations increased with increasing extracellular HpD concentrations markedly up to 100 $\mu\text{g/ml}$ and slightly from 150 to 200 $\mu\text{g/ml}$. No appreciable changes in intracellular HpD concentration was observed for 4-h incubation in Ham's F10 medium after 30-min HpD exposure at several extracellular HpD concentrations. The cells were cultivated in the medium containing 2 $\mu\text{g/ml}$ HpD for 30 min, and immediately after cell washing or after further incubation in the medium without HpD for 2, 3 and 4 h, the cells were exposed to 570-640 nm light at an intensity of 22 mW/cm² for 3 min. Studies were performed to determine the proportional rate of cells excluding dye, cell density and macromolecule syntheses as assessed by ³H-thymidine, ³H-uridine and ¹⁴C-leucine incorporation. Illumination immediately after HpD exposure resulted in a decrease in the proportional rate and a remarkable shift from high to low cell density, indicating membrane damage. Protein synthesis was severely reduced while DNA and RNA syntheses were unaffected. With increasing intervals between HpD exposure and illumination, no significant signs of membrane damage were observed, while protein synthesis remained depressed and DNA synthesis was also reduced. These time-course changes in the photodynamic effect indicated changes in intracellular HpD binding loci and/or cell-bound HpD molecular form. These results were thought to be important when considering the optimal photoradiation point after HpD administration in order to obtain the maximum photodynamic effect clinically.