顎・口腔領域培養細胞に対するヘマトポルフィリン 誘導体と光照射の影響

虎谷 茂昭・諸山 隆正・宮内 忍・高田 和彰

Influence of hematoporphyrin derivative and photoradiation against culture cells derived from oral and maxillofacial region

Shigeaki TORATANI・Takamasa MOROYAMA・Shinobu MIYAUCHI
Kazuaki TAKADA

Abstract: The influence of hematoporphyrin derivative (HpD) and photoradiation on eight culture cells of oral cavity and jaw in origin was studied.

HpD activated by photoradiation showed a cytotoxic effect on not only culture cells derived from squamous cell carcinoma but also cultured fibroblast.

Key words: hematoporphyrin derivative, photoradiation, culture cell of oral and maxillofacial region

緒 言

光照射による光感受性色素の殺細胞作用は、1900年 Raab による原生動物へのアクリジン応用により明らかにされた¹⁾。また、光感受性色素には腫瘍親和性があることから1960年 Lipson らは、ヘマトポルフィリン誘導体 (HpD と略す) を用いて、動物組織内での腫瘍の局在診断を試みた²⁾。

一方、臨床において、1978年 Dougherty らは乳癌等の悪性腫瘍治療に HpD 投与と光照射を試みており³⁾、現在は肺癌、胃癌、膀胱腫瘍の診断治療に HpD とアルゴン・ダイ・レーザー等を併用しての試験研究がなされている⁴⁻⁶⁾。

われわれは、顎・口腔領域悪性腫瘍治療への本法の応用を計画しているが、今回悪性腫瘍治療の至適条件を見出す試みの一つとして、培養細胞を用い、殺細胞作用に関する検索を行い、興味ある知見を得たので問題点を含めて報告する。

材料および方法

1. 細胞培養

顎・口腔由来悪性腫瘍培養細胞は、株細胞として Ueda-1⁷⁾、細胞系として、Ueda-1 をヌードマウスに移植し形成された腫瘍を再び培養系に移した N-Ueda 細胞と、頬粘膜癌由来 Nakata-1 細胞、舌癌由来 Yoshida-1 細胞である。線維芽細胞は、6か月男児の口唇由来 HO-1-1 細胞をはじめ、HO-1-2 細胞、HO-1-3 細胞、HO-1-4 細胞の4種類である (表1)。

培養は Dulbecco's Modified Eagle Medium と Ham F12 Medium (日本製薬) を等量混和した培養液 (DME/F12 と略す) に、ペニシリン 90 µg/ml、重炭酸ナトリウム 1.5 mg/ml、10% 牛胎児血清 (M.A. Bioproduct, USA) をそれぞれ加えて CO₂ インキュベーター内で行った⁷⁾。

2. HpD

hematoporphyrin dihydrochloride (Sigma, USA) を Lipson²⁾、Dougherty³⁾ の方法に準じて調整した HpD (Sigma HpD と略す) と、photofrin II (Photofrin medical Inc., USA) の2種類を用いた。

3. 光照射

光源として 1,000 ワットスライドプロジェクター、Hi-Lux (理科学精器) を用いた。プロジェクター先端から標的細胞まで 15 cm の照射距離をもって光照射を行

広島大学歯学部第1口腔外科学教室
(主任: 高田和彰教授)
The First Department of Oral and Maxillofacial
Surgery, Hiroshima University School of Dentistry
(Chief: Prof. Kazuaki Takada)
受付日: 昭和60年9月25日

表 1 顎・口腔由来培養細胞

1. 悪性腫瘍細胞

株細胞

Ueda-1 (口底扁平上皮癌由来, 95-104 継代)

細胞系

N-Ueda (Ueda-1 のヌードマウス経由, 48-53 継代)

Nakata-1 (頬粘膜扁平上皮癌由来, 16-22 継代)

Yoshida-1 (舌扁平上皮癌由来, 13-18 継代)

2. 線維芽細胞

HO-1-1 (口唇由来, 3-7 継代)

HO-1-2 (頬粘膜由来, 7-14 継代)

HO-1-3 (歯肉由来, 4-8 継代)

HO-1-4 (歯肉由来, 2-5 継代)

表 2 HpD 投与および光照射の実験法

った。

4. 培養細胞に対する HpD の影響

1) 口底癌由来株細胞 Ueda-1 に対する影響

Ueda-1 細胞を 24 well プラスチックプレート (Corning, USA) に 2×10^4 個/ml/well の割合で接種し、表 2 のスケジュールで実験を行った。前培養 24, 48, 72 時間後に、HpD を 0.01 $\mu\text{g/ml}$ から 50 $\mu\text{g/ml}$ まで 7 段階濃度で投与し、さらに 24, 48, 72 時間培養した後光照射を 1, 5, 30 分間行った。24 時間後生細胞数を算出した。

2) 顎・口腔領域由来培養細胞に対する影響

表 1 に記載の細胞を Ueda-1 細胞と同様の条件で 24 well プラスチックプレートに接種した。48 時間後に photofrin II を投与し、24 時間培養後光照射を行い、さらに 24 時間培養した後、生細胞数を算出した。

5. 生細胞数測定

生細胞数は核数を計測することで求めた⁹⁾。すなわち、おのおのの well 上清を吸引除去後、0.3% アクチナーゼ E (科研製薬) 150 μl と DME/F12 medium 100 μl を添加し 37°C インキュベーター内で 30 分間インキュベートした。次に Isoton II (コールターサイエンティフィックジャパン) 10 ml と Zap-Oglobin (コールターサイエンティフィックジャパン) 3 滴 (約 100 μl) を加えて混和し、生細胞の核数計測を Coulter Counter (Coulter Electronics, Eng.) で行った。HpD 投与から生細胞数計測までの各操作は室温 25°C の暗室で行った。CO₂ インキュベーター内での培養は上部をアルミニウム箔で被い遮光した。

6. 形態観察

HpD 作用と光照射による細胞形態の変化の観察を倒立型位相差顕微鏡 TMD (日本光学工業) にて行った。

7. 生存率

細胞生存率は HpD や光照射処理群の細胞数を未処理コントロール群の生細胞数で除し、その百分率で示した。また、各値は 2 well を 1 群としてその平均を算出した値である。細胞の場合、実験を 2 回以上行いその平均値を算出した。

結 果

1. HpD 単独による Ueda-1 細胞への影響

1) Sigma HpD

前培養 48 時間後、Sigma HpD を 48 時間作用させた場合 10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度まではコントロール値域で、50 $\mu\text{g/ml}$ 濃度では 77% 生存率 (実験 2 回の平均) であった。

2) Photofrin II

photofrin II を作用させた場合、10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度まではコントロール値域であった。50 $\mu\text{g/ml}$ 濃度では、24, 48, 72 時間前培養、48 時間 photofrin 作用でそれぞれ 71%, 72%, 91% の生存率であった。24, 48 時間前培養、72 時間 photofrin 作用でそれぞれ 44%, 48% の生存率であった。前培養 24 時間、photofrin 作用時間 96 時間の場合、39% の生存率であった (図 1)。

写真 1 は、48 時間前培養後 photofrin II 50 $\mu\text{g/ml}$ 濃度を 48 時間作用させたときの Ueda-1 細胞である。細胞質の空胞化が認められたが、死細胞はほとんど認められなかった。

2. HpD と光照射による Ueda-1 細胞への影響

1) Sigma HpD

図 2 は、前培養 48 時間後に Sigma HpD を 24 時間作用させた後、光照射を行ったときの生存曲線を示す。照射時間を 1 分、5 分、30 分間と増やすにしたがい生存率の低下はより低濃度の Sigma HpD で起こった。

同様の傾向は photofrin II 投与においても認められ

図 1 HpD (photofrin II) 単独作用での Ueda-1 細胞生存曲線

左 右

写真 1 HpD (photofrin II) 単独投与による Ueda-1 細胞
48 時間前培養後 photofrin II 50 µg/ml を 48 時間作用させた (左) 対照 (右).

た。
写真 2 は、48 時間前培養後 Sigma HpD 50 µg/ml, 1 µg/ml を 24 時間作用させ、光照射をそれぞれ 1 分、

30 分間行ったときの Ueda-1 細胞である。ほぼ全細胞において、膨化や細胞変性が認められた。
2) 50% 生存率

図 2 HpD (Sigma HpD) と光照射による Ueda-1 細胞生存曲線
前培養 48 時間後に HpD を 24 時間作用させスライドプロジェクターによる光照射を行った。

左

右

写真 2 HpD (Sigma HpD) と光照射による Ueda-1 細胞

48 時間前培養後 Sigma HpD 50 µg/ml を 24 時間作用させ光照射を 1 分間行った (左), 48 時間前培養後 Sigma HpD 1 µg/ml を 24 時間作用させ光照射を 30 分間行った (右)。

表 3 Ueda-1 細胞50%生存率の HpD 濃度

前培養時間 (時間)	HpD作用時間 (時間)	光照射時間 (分)		
		1	5	30
HpD (Sigma) 48 Photofrin II 24	24	5.83	1.25	($\mu\text{g/ml}$) 0.52
	24	4.67	1.43	0.32
	48	4.43	1.33	0.15
	72	5.20	1.11	0.17
48	24	6.92	1.19	0.22
	48	2.35	0.72	0.10
72	24	11.09	3.93	0.35
	48	8.80	4.01	0.12

表 4 顎・口腔由来培養細胞50%生存率の Photofrin II 濃度

	光照射時間 (分)		
	1	5	30
悪性腫瘍			($\mu\text{g/ml}$)
N-Ueda	7.90	1.80	0.18
Nakata-1	2.20	0.55	0.11
Yoshida-1	3.49	1.34	0.27
線維芽細胞			
HO-1-1	7.42	1.40	0.22
HO-1-2	6.50	1.45	0.21
HO-1-3	8.20	1.65	0.20
HO-1-4	3.01	1.55	0.21

表3は Ueda-1 細胞50%生存率の HpD 濃度を示す。Sigma HpD と photofrin II は、30分間光照射を除きほぼ同じ値を得た。すなわち、1分間光照射で4~6 $\mu\text{g/ml}$ 、5分間光照射で約1.25 $\mu\text{g/ml}$ であった。photofrin II は、前培養時間よりも作用時間において、生存率により影響を及ぼす傾向にあった。すなわち、24、48、72時間と作用時間を増やすにしたがい50%生存率を与える photofrin II の濃度は低下した。

3. 顎・口腔領域由来細胞50%生存率の photofrin II 濃度

Ueda-1 細胞において指數的細胞増殖期である48時間前培養で、かつ50%生存率がほぼ中間値である24時間 photofrin II 作用の条件下にて他の顎・口腔領域培養細胞の検索を行った。

1) 悪性腫瘍由来培養細胞

N-Ueda 細胞での1分、5分、30分間光照射による値は、それぞれ7.90 $\mu\text{g/ml}$ 、1.80 $\mu\text{g/ml}$ 、0.18 $\mu\text{g/ml}$ と、ほぼ Ueda-1 細胞と同じであった。舌癌由来の Yoshida-

1 細胞でも、1分間光照射での値は3.49 $\mu\text{g/ml}$ と低い濃度であったが、5分、30分間光照射では、Ueda-1 細胞とほぼ同等の値であった。頬粘膜由来の Nakata-1 細胞ではいずれの光照射時間においても悪性腫瘍中最も低い値を示した(表4)。

2) 培養線維芽細胞

4種類のいずれの細胞とも、1分間光照射を除いてはほぼ同じ値を示した。すなわち、1分間光照射で3~8 $\mu\text{g/ml}$ 、5分間光照射で1.5 $\mu\text{g/ml}$ 前後、30分間光照射で0.2 $\mu\text{g/ml}$ であった(表4)。

考 察

臨床において試験研究がなされている photofrin II は Dougherty らによりヘマトポルフィリン誘導体から作製されたもので、Bis-1-[8-(1-hydroxyethyl) deuteroporphyrin 3-yl] ethyl ether が主成分である⁹⁾。現在 HpD と他の薬剤、たとえば抗腫瘍剤や、モノクローナル抗体¹⁰⁾との結合物¹¹⁾の使用を計画しており、今回の培養細胞を用いた実験では条件設定のため、photofrin II に加えて、ヘマトポルフィリンを酢酸等で自家調製した Sigma HpD を使用した。

HpD 単独での培養株細胞 Ueda-1 への影響は、細胞数計測と光顕レベルでの観察において、50 $\mu\text{g/ml}$ 濃度で細胞増殖抑制がみられた。HpD は光照射により活性化され、三重項酸素($^3\text{O}_2$)を一重項酸素($^1\text{O}_2$)に変換する。この一重項酸素の酸化力により細胞障害がみられるといわれている¹²⁾。本実験は暗室内(照度1~5ルクス)で行ったが、遮光下の HpD で細胞増殖抑制などの細胞障害がみられたことは、今後、高濃度 HpD による活性酸素発生の有無のより詳細な検討が必要と思われる。

HpD と光照射の併用において、Ueda-1 細胞への影響は殺細胞作用として、Sigma HpD よりも photofrin II の方がやや強く見られた。また、殺細胞作用は、HpD 濃度と光照射時間に比例して増加し、最大殺細胞効果は48時間前培養48時間 photofrin II において得られた。

前培養時間、HpD 作用時間、および光照射時間の条件を一定にした場合、他の3種の悪性腫瘍細胞への殺細胞作用は Ueda-1 細胞とほぼ同様であった。ところが、線維芽細胞においても用いた4種類とも、悪性腫瘍細胞と同等の殺細胞作用効果がみられた。

生体内へポルフィリン類を投与した場合、腫瘍組織への蓄積は一般組織よりも多いといわれている¹³⁾。Gomer らは、アイソトープラベルしたヘマトポルフィリンによる *in vivo* 検索により、投与から48時間までの腫瘍内への移行は、肝臓、腎臓、脾臓よりも明らかに低いが、皮膚、筋肉、血中よりも有意に高いことを証明している¹⁴⁾。培養細胞を用いた実験ではおのおのの細胞へ HpD が作用する条件は一定である。本結果は、培養下では正常細

胞内へも HpD が悪性腫瘍細胞と同等に移行することを間接的に示していると思われる。したがって本法を臨床に応用する場合は、HpD の腫瘍組織内高濃度化を計るため、局所動脈内投与を試みたり、光照射の範囲の正確な設定などの配慮が必要と思われる。

結 語

HpD と光照射による悪性腫瘍の診断・治療を顎・口腔領域悪性腫瘍に応用すべく、8種類の培養細胞を用いた基礎的検索を行い、以下の結果を得た。

1. HpD 単独使用において $10 \mu\text{g/ml}$ 濃度以下では細胞障害はみられなかった。
2. 口底癌由来株細胞 Ueda-1 への HpD と光照射の併用において、殺細胞効果は、HpD 濃度と光照射時間に比例してみられた。最大の殺細胞作用は48時間前培養、48時間 HpD 作用において得られた。
3. HpD と光照射の併用による殺細胞作用は、悪性腫瘍のみでなく線維芽細胞においても同等にみられた。

本論文の要旨は、第30回日本口腔外科学会総会（1985年9月、東京）において発表した。また、本研究の一部は、昭和59年度文部省科学研究費（課題番号59480392）の援助を受けて行った。

引 用 文 献

- 1) Raab, O.: Über die Wirkung Fluorescirender Stoffe auf Infusorier. *Z Biol* 39: 524-546 1900.
- 2) Lipson, R.L., Baldes, E.J., et al.: The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J Natl Cancer Inst* 26: 1-11 1960.
- 3) Dougherty, T.J., Kaufman, J.E., et al.: Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 38: 2628-2635 1978.

- 4) 早田義博, 加藤治文: レーザーと癌治療, 癌と化学療法 10: 1387-1394 1983.
- 5) 加藤治文, 小中千守, 他: レーザー治療: 光線力学的療法, 癌の臨床 31: 690-696 1985.
- 6) 久住治男, 上木 修, 他: 表在性膀胱腫瘍および上皮内癌のヘマトポルフィリン誘導体とレーザー光線による光化学療法, 癌の臨床 31: 697-703 1985.
- 7) 宮内 忍, 諸山隆正, 他: ヒト口底癌由来細胞株(Ueda-1)の樹立, 日口外誌 31: 1347-1351 1985.
- 8) 岩本真知子: コールターカウンターによる細胞障害性反応の測定, 生化学 54: 1193-1196 1982.
- 9) Dougherty, T.J., Potter, W.T., et al.: Porphyrins in Tumor Phototherapy. Ed, by Andreoni, A., et al., Plenum Press, New York and London, 1983, p 23-35.
- 10) 明見能成, 諸山隆正, 他: ヒト口底癌由来株細胞 Ueda-1 に対するモノクローナル抗体, 日口外誌 31: 2556-2560 1985.
- 11) Mew, D., Wat, C., et al.: Photoimmunotherapy: Treatment of animal tumors with tumor-specific monoclonal antibody-hematoporphyrin conjugates. *J Immunol* 130: 1473-1477 1983.
- 12) Weishaupt, K.R., Gomer, C.J., et al.: Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of murine tumor. *Cancer Res* 36: 2326-2329 1976.
- 13) Winckelman, J. and Rasmussen-Taxdal, D.: Quantitative determination of porphyrin uptake by tumor tissue following parenteral administration, *Bull Johns Hopkin Hosp* 107: 228-233 1960.
- 14) Gomer, C.J. and Dougherty, T.J.: Determination of [^3H]-and [^{14}C] hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissue. *Cancer Res* 39: 146-151 1979.