近紫外部レーザー照射による3T3細胞および

SV3T3細胞への影響

Effects of near UV laser irradiation
on 3T3 cells and SV3T3 cells

中田博幸、神川喜代男

Hiroyuki Nakata and Kiyoo Kamikawa

大阪府立成人病センター 脳神経外科

The lethal effect of near UV laser irradiation on 3T3 cells and SV3T3 cells were investigated by testing the growth rates and the colony formation efficiencies. The survival curves of these cells treated with near UV laser exhibited an initial shoulder at low dose followed by exponential response at the higher dose, and there was little difference on the lethal effect between these two cell lines.

This lethal effect was remarkably enhanced when the cells treated with vitamin A. Compared the survival rates of two cell lines in the presence of vitamin A, SV3T3 cells were more sensitive to near UV laser than 3T3 cells. These survival curves were showed the same pattern as those of cells treated with near UV laser only, but the quasithreshold dose and the mean lethal dose were very low.

1. はじめに

レーザーを使用した癌治療としては、CO₂ レーザーやYAG レーザーなどのように熱効果による細胞破壊による方法と、photodynamic 作用を利用した photoradiation therapy にレーザーを使用する方法が行なわれている。後者は癌の選択的破壊を目的として行なわれており、現在は hematoporphyrin derivatives を用いた可視領域の波長のレーザーによる方法がおもである。著者らはそれとは異なり、近紫外領域のレーザーを用いた photoradiation therapy による癌の選択的破壊の研究をすすめてきた。今回は近紫外部レーザー照射の細胞に及ぼす影響が、正常細胞と癌細胞とでどのような相違があるかを比較検討した。正常細胞として 3T3 細胞を、また癌細胞としては Simian virus により癌化した SV3T3 細胞を用いた。それぞれの細胞に窒素ガスレーザーを照射し、おもに致死効果を指標として比較した。また照射に際し、光増感剤としてのビタミン A の効果についても検討した。

2. 材料と方法

レーザーは Moletron 社の窒素ガスレーザー(波長 337nm, パルス巾 10ns)を用い、細胞は株として確立したマウス繊維芽細胞由来の 3T3 細胞と、3T3 細胞を Simian virus により癌化させた SV3T3 細胞を使った。また光増感剤としてビタミン A (retinyl palmitate 最大吸収波長 325nm) を使用した。細胞はあらかじめ 10% 牛血清加 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) にて 10% CO₂ 下 37°C 静置培養したものを用いた。

増殖度により細胞の生存率を求める実験では、培養細胞をトリプシンで処理し、phosphate buffer solution (PBS) に浮遊させた細胞浮遊液にレーザーを照射した。細胞濃度は 1.5×10^6 cells/ml とした。照射時のレーザーの条件はパルス頻度を 40Hz とした。そのエネルギー密度は 35mW/cm² であった。細胞浮遊液 1ml を石英セルに入れ、レーザーを照射した。照射後 6cm Petri dish に各々 2×10^5 個細胞を分注し、10% 牛血清加 DMEM を加えて静置培養した。所定の時間培養した後、各々の細胞数を数えることにより増殖度を求め、それより生存率を得た。

コロニー形成能より生存率を求める実験では、細胞を 6cm Petri dish に各々 150 個植え込み、その Petri dish に照射する方法を採用した。その場合にはレンズにより照射範囲を拡大して照射した。その照射エネルギー密度は 7mW/cm² であった。まず細胞を dish に植え込み、細胞を付着させるため 2 時間静置培養した。照射直前に培養液を除去、PBS にて洗浄し、乾燥を防ぐため少量の PBS を加えてレーザーを照射した。ビタミン添加実験では、ビタミン A を 10^{-4} M 含んだ PBS を用いて同様の操作を行なった。照射後 10% 牛血清加 DMEM を加えて静置培養した。培養後 2 週間して培養液を除去し、Giemsa 染色を施し、コロニー数を算定して細胞生存率を求めた。

細胞外へのカリウム漏出については、細胞浮遊液のカリウム濃度を測定することにした。すなわち細胞を生理食塩水で 3 回洗浄し、生理食塩水に浮遊させて細胞浮遊液とし、細胞濃度を 1.2×10^6 cells/ml に調整した。この細胞浮遊液 1ml に、増殖度測定と同様の条件のレーザーを照射した。カリウム濃度の測定には、K⁺ selective electrode を用い、照射前、照射直後および照射後 30 分の値を測定した。

3. 実験結果

Fig. 1 はレーザー照射した 3T3 細胞と SV3T3 細胞の増殖度より求めた生存率曲線である。生存率曲線はともに肩をもつ直線を示す。3T3 細胞と SV3T3 細胞を比較すると、低エネルギー照射において SV3T3 細胞の生存細胞数が少ない傾向を示すが全体的には著明な差は認めない。Table 1 にこの生存率曲線の D₀ (平均致死線量)、D_q (閾値)、D₃₇ (37% 線量) の値を示す。

次にレーザーを照射した細胞、ならびにレーザー照射時にビタミン A 処理した細胞について、コロニー形成能より求めた生存率曲線を Fig. 2 に示す。レーザー照射時に、光増感剤としてビタミン A を使用した場合、レーザー照射単独に比較して 3T3 細胞、SV3T3 細胞ともに著明な致死効果の増強を認めた。またその生存率曲線は、レーザー照射単独の生存率曲線 (Fig. 1) と比較して、肩が

Table 1. survival curve parameters derived from Fig.1.

	D_0	D_q	D_{37}
3T3 cell	0.9	1.0	1.9
SV3T3 cell	0.7	1.2	1.9

($J/M^2 \times 10^5$)

Table 2. survival curve parameters derived from Fig.2.

	D_0	D_q	D_{37}
3T3 cell	4.2	0.4	4.6
SV3T3 cell	2.8	0.6	3.4

($J/M^2 \times 10^4$)

Table 3. concentration of potassium in the cell suspension of irradiated 3T3 cells

	befor radiation	after radiation	30 min.
control	4.1	8.0	16.5
radiation	4.6	9.0	15.5

($\times 10^5 M$)

Fig. 1
survival curves of 3T3 and SV3T3
cells irradiated by N₂ laser

survival curves of 3T3 and SV3T3
cells treated by vitamine A and
laser radiation

小さくて傾むきが大きい直線となる。ビタミンA使用時の生存率曲線を、3T3細胞とSV3T3細胞とで比較すると、SV3T3細胞の方がより致死効果大きい。すなわちレーザーに対して感受性が高かった。ビタミンA使用時の生存率曲線の D_0 , D_{01} , D_{37} の値をTable 2に示す。

レーザー照射を16分間行なった細胞浮游液のカリウム濃度の変化をTable 3に示す。レーザー照射によりカリウム濃度が上昇、すなわち細胞外へのカリウムの漏出がみられるが、レーザーを照射しない細胞浮游液にも同程度の漏出が見られる。このカリウム漏出は、他の原因によるものでレーザー照射は関係しないと考えられる。

4. 考 察

近紫外線による生物作用としては、おもに細菌を用いて研究されており、核酸の損傷や^{7) 23)}増殖の遅れ¹⁹⁾などが知られている。また細胞致死の原因は核酸であるという考えが一般的である。^{20) 24)}動物細胞を使い近紫外線の致死効果を調べたものとしては、DunpureとTyrrellの報告がある²⁾。彼らは近紫外線(365 nm)の致死効果は遠紫外線(254 nm)に比較し約1万倍もの感受性の差があること、またその致死効果が酸素の存在に強く影響されることを示している。これは近紫外線の致死効果がphotodynamic作用によることを示唆している。またDanpureらの実験では、近紫外線照射により90%の致死効果を与えるために 4×10^5 J/cm²のエネルギーを要している。この値を著者がえた 3.2×10^5 J/cm²という値と比較した場合、波長の違いを考慮すればほぼ同程度の致死効果である。すなわちレーザーと従来の光源とでは、致死効果において差がみられないと考えられる。このことは遠紫外線において、レーザーと従来の光源とに生物作用に差がみられないとのRoundらの報告^{16) 21)}と一致する。

近紫外線が正常細胞を癌化させるとの報告は数多くみられるが、^{8) 24)}近紫外線による致死効果を正常細胞と癌細胞とで比較検討した報告はあまりみられない。正常細胞と癌細胞の致死効果にほとんど差がみられないという結果は、近紫外線レーザー照射単独では癌細胞の機能的破壊が期待できないことを示している。しかしこの結果は、Simian virus

により癌化した細胞を使用していること、また一種類の細胞での比較であることより早急に結論づけることはできない。腫瘍の種類によっては、近紫外線レーザーに高感受性をもつ可能性が考えられ、今後の課題として残っている。また低エネルギー照射においては、癌細胞の方が感受性が高いことは、実験の誤差である可能性を否定できないが、注目すべき事実であると考ええる。

photodynamic作用を用いて悪性腫瘍を治療しようとする試みは古くより行なわれており、1903年にJesionek¹⁰⁾らの報告がみられる。また1970年代にはDongherty⁴⁾やDiamond³⁾が、hematoporphyrinを光増感剤として用いた悪性腫瘍に対するphotoradiation therapyを報告しており、1974年にはTomsonらがargon laserとacridine orangeを使ったphotoradiation therapyを報告している。²²⁾その後も数多くの報告がみられ⁵⁾現在においては臨床において実際に応用されるようになった。^{6) 12)}これらはおもにhematoporphyrin derivativesを光増感剤とし、可視領域のレーザーを使用している。可視領域のレーザーは多少とも熱効果をもつため、大きな腫瘍を治療しようとして照射エネルギーを大きくした場合、熱効果がphotodynamic作用をうわまわり、機能的破壊ができないという欠点がある。¹¹⁾そのため著者らは熱効果がより少ないと考えられる近紫外線レーザーをphotoradiation therapyに応用することを研究し、そして増感物質としてはビタミンA (retinyl palmitate)を使用してきた。^{17) 18)}

ビタミンAおよびその同族体は、それ自体抗癌作用をもつことが知られている。^{1) 14)}しかしその抗癌作用は細胞の種類や、ビタミンAの構造式の違いによりかなり異なることが報告されている。¹³⁾3T3細胞に対しては、ビタミンAによる増殖抑制作用はほとんど認められないとの報告があり、¹⁵⁾これは著者らの結果とも一致する。

しかしビタミンAが近紫外線レーザーの致死効果を増強することは、すでに著者らが報告している。^{17) 18)}今回の実験においては、3T3細胞だけでなくSV3T3細胞に対しても致死効果の増強が確認された。3T3細胞とSV3T3細胞で、ビタミン

A存在下における窒素ガスレーザーの致死効果を比較すると、SV3T3細胞が感受性が高いという結果をえた。これはレーザー単独での低エネルギー照射時には、SV3T3細胞が高感受性を示す傾向にあることと何らかの関係があることを示唆している。しかしこの実験でえられた致死効果の差では、臨床的に癌細胞のみを破壊するには不十分であると思われる。今後は癌細胞に特異的にとりこまれる新しい増感物質の開発が必要であると思われる。

近紫外レーザーの致死効果の機序については、核酸の損傷や膜の損傷などが考えられる。著者らは、致死効果が膜損傷による可能性を検討するために、窒素ガスレーザー照射後の細胞からのカリウム漏出を調べた。その結果、レーザー照射された細胞のカリウム漏出は、レーザー照射をうけない細胞と比較して差を認めなかった。これは少なくとも、レーザー照射によりカリウム漏出をおこすような細胞膜損傷が、早期にはみられないことを示している。しかし近紫外線による膜損傷が存在するという報告があり、⁹⁾今後致死効果の機序を含め検討しなければならない問題である。

5. 参考文献

- 1) Bollag, W.; Therapy of chemically skin tumors of mice with vitamin A palmitate and vitamin A acid. *Experienta*, 27:90, 1971.
- 2) Danpure, H.J., Tyrrell, R. M.; Oxygen dependence of near UV (365 nm) lethality and the interaction of near UV and X-rays in two mammalian cell lines. *Photochem. Photobiol.*, 23:171-177, 1976.
- 3) Diamond, I., McDonach, A.F., Wilson, C.B., et al.; Photodynamic therapy of malignant tumors. *Lancet*, 2:1175-1177, 1972.
- 4) Dougherty, T.J.; Activated dyes as antitumor agent. *J. Natl. Cancer Inst.*, 52:1333-1336, 1974.
- 5) Dougherty, T.J., Grindey, G.B., Fiel, R., Wershaupt, K.R., Boyle, D.B.; Photoactivation therapy II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl. Cancer Inst.*, 55:115-119, 1975.
- 6) Dougherty, T.J., Lawrence, G., Kaufman, J.H., Boyle, D., Wershaupt, K.R., Goldfarb, A.; Photoradiation therapy in the treatment of recurrent breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 62:231-237, 1979.
- 7) Eisenstark, A., Ruff, D.; Repair in phage and bacteria inactivated by light from fluorescent and photo lamp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38:244-248, 1970.
- 8) Freeman, R.G.; Data on the action spectrum for ultraviolet carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 55:1119-1121, 1975.
- 9) 伊藤敦, 伊藤隆: 近紫外放射線照射による細胞膜損傷。 *Photomed. Photobiol.*, 3: 65-66, 1981.
- 10) Jesionek, A., Tappeiner, V. H.; Zur Behandlung der Hautcarcinome mit Fluorescierenden Stoffen. *Muench Med. Wochschr.*, 47:2042-2044, 1903.
- 11) Kamikawa, K., Hayakawa, T., Ikeda, T., Kuroda, R., Murui, H., Ushio, Y.; Argon laser treatment of brain tumor sensitized with acridine orange. *Osaka Med. J.*, 26:61-67, 1975.
- 12) Laws, E.R., Cortese, D.A., Kinsey, J.H., Eagan, R.T., Anderson, R.E.; Photoradiation therapy in the treatment of malignant brain tumors: A phase I (feasibility) study. *Neurosurg.*,

- 9:672-678, 1981.
- 13) Lotan, R., Nicholson, G.L.; Inhibitory effects of retinoic acid or retinyl acetate on the growth of untransformed, transformed, and tumor cells in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.*, 59:1717-1722, 1977.
 - 14) Lotan, R.; Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 605:33-91, 1980.
 - 15) Lotan, R., Neumann, G., Lotan, D.; Relationships among retinoid structure, inhibition of growth, and cellular retinoic acid-binding protein in cultured S91 melanoma cells. *Cancer Res.*, 40:1097-1102, 1980.
 - 16) Okigaki, T., Rounds, D.E.; The morphological and cytogenetic effects of laser power at 2650 Å on Chinese Hamster cells in vitro. *Radiat. Res.*, 50:85-93, 1972.
 - 17) 大西俊輝、神川喜代男：紫外レーザーによる抗腫瘍効果。第三回医用レーザー研究会論文集。pp 119-124, 1979.
 - 18) 中田博幸、大西俊輝、神川喜代男：近紫外レーザーの培養細胞への影響。日本レーザー医学会誌。1:231-236, 1980.
 - 19) Ramabhadran, T.V., Jagger, J.; Evidence against DNA as the target for 334 nm-induced growth delay in *Escherichia coli*. *Photochem. Photobiol.*, 21:227-233, 1975.
 - 20) Setlow, R.B., Carrier, W. L.; Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. *J. Mol. Biol.*, 17:237-254, 1975.
 - 21) Stroud, A.N., Rounds, D.E., Creter, S., Kadi, S.S.E.; Reproductive integrity of cells after ultraviolet laser irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 19:157-165, 1971.
 - 22) Tomson, S.H., Emmett, E.A., Fox, S.H.; Photodestruction of mouse epithelial tumor after oral acridine orange and argon laser. *Cancer Res.*, 34:3124-3127, 1974.
 - 23) Tyrrell, R.M., Ley, R.D., Webb, R.B.; Induction of single-strand breaks (alkali-labile bounds) in bacterial phage DNA by near UV (365 nm) radiation. *Photochem. Photobiol.*, 20:395-398, 1974.
 - 24) Webb, R.B.; Lethal and mutagenic effects of near UV radiation. *Photochem. Photobiol. Res.*, 2:169-261, 1977.
- (本研究は、昭和55年度ならびに昭和56年度大阪対ガン協会研究助成奨励金の援助によって行われた。)