HpDの有効成分の検討—ヘマトポルフィリン とプロトポルフィリンの作用の比較—

Photodynamic effects of hematoporphyrin and protoporphyrin

○井戸健一 川本智章* 寺田友彦* 高橋仁志* 堀口正彦*
佐藤治男** 広田紀男*** 横山 武*** 木村 健*

Kenichi Ido*, Chiaki Kawamoto*, Tomohiko Terada*, Hitoshi Takahashi*, Masahiko Horiguchi*, Haruo Sato**, Norio Hirota***, Takeshi Yokoyama***, Ken Kimura*

* 自治医科大学消化器内科 ** 佐藤薬学研究所

*** 自治医科大学病理

*Department of Gastroenterology, Jichi Medical School **Sato Pharmaceutical Research Institute ***Department of Pathology, Jichi Medical School

ABSTRACT

Photodynamic effects of hematoporphyrin derivative (HpD), hematoporphyrin (Hp) and protoporphyrin (Pp) on cultured rat hepatocellular carcinoma cells (JTC-16), human hepatocellular carcinoma (HCC-1) and gastric cancer (GCA-1) serially transplanted in nude mice were studied, under the influence of a dye laser irradiation.

The cell degeneration was observed most strongly in Pp, HpD and then Hp in order. The tumor degeneration of HCC-1 was observed most strongly in Hp and then HpD in order. On the other hand, the tumor degeneration of GCA-1 was observed most strongly in HpD and then Hp in order. Photodynamic effect of Pp was not observed in both GCA-1 and HCC-1.

Therefore, it is suggested that Pp had the most powerful photodynamic effect on the cultured cells, but not on human cancer. This phenomenon would indicate that Pp has no affinity with the cancer tissue.

I 緒 言

Hematoporphyrin 誘導体 (HpD) の有効成分を検討するために、まず Hematoporphyrin (Hp)、Protoporphyrin (Pp) の分離と同定を行い、次に各々のポルフィリンの光化学作用の強さを培養細胞を用いて比較し、さらにヒト消化器癌移植ヌードマウスを用いてポルフィリンの代謝と光化学作用の差異について比較検討を行った。

II 実験材料

1. Hp 及び Pp

Hp は市販の Hp 塩酸塩から Hp をノタノール中でメチルエステルとした後、カラムクロマト及び薄層クロマトにより分離し、IR、元素分析、MASS 及び 400MHz の NMR によりその構造解析を行った。Pp も同様の構造解析を行い、各々のメチルエステルから、それぞれのナトリウム塩に誘導したものを使用した。Hematoporphyrin 誘導体

(HpD)はOncology Reserch & Developmentのもの (Fig 1) を使用した。

H p及びP pの生体組織からの抽出法と高速液体クロマトグラフによる分析法は本論文集に共同研究者の佐藤が詳述するので省略する。

2.株化ラット肝癌細胞

DAB誘発ラット腹水肝癌 (CAH-7974) 由来株化培養細胞 (JTC-16) を使用した。

3.ヌードマウス移植ヒト消化器癌

我々の教室で樹立したヌードマウス可移植性ヒト肝細胞癌 (HCC-1) 及びヒト胃癌 (GCA-1) を使用した。HCC-1はEdmonds II ~ III型の組織像 (Fig 2) を示し、AFP産生株である。一方GCA-1は中等度分化型腺癌の組織像 (Fig 3) を示し、CEAおよびAFPを産生している。各々継代5代より12代目の10ないし15mmの腫瘍径になったものを実験に使用した。

III 実験方法

1.培養細胞に於る実験

ラット肝癌細胞 (JTC-16) を2%仔牛血清添加、フェノールレッド不含DM-170培地に於て培養し、対数増殖期中期にHpD、H pあるいはP pを混和し、使用した。ポルフィリンは各々2.5、15、25、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各濃度で培地に添加、37℃で24時間培養した後、5 mW/cm^2 のエネルギーで、1分間及び3分間のレーザー照射をした。レーザーは630nmのアルゴン・色素レーザー (Lexel Model 700 L) を使用した。なお、対照としてポルフィリン添加のみの群とレーザー照射のみの群を設けた。培養細胞へのポルフィリンとレーザーの光化学作用は、レーザー照射24時間後にその形態学的変化より判定した。細胞の形態学的変化は、以下のごとく4段階に分類した (Fig 4)。

(-)：不変。細胞は壁着伸展。球状のものは分裂期にある。

(+)：胞体顆粒が増加。胞体表面が粗となる。

(++)：細胞突起が消失し、細胞表面がスムーズとなる。

(+++): 細胞はほとんどが浮遊し、ゴースト化している。一部は胞体が壁面に付着したまま死に至りさらには細胞質が細片化する。

2.ヌードマウス移植ヒト消化器癌に於る実験

ヌードマウス腹腔内に10あるいは50 mg/kg のHpD、H pあるいはP pを投与後、72時間目に630nm、280 mW/cm^2 のレーザー照射を10分間 (168 $\text{joules}/\text{cm}^2$) 行った。対照として630nm、280 mW/cm^2 のレーザー照射のみの群と、10あるいは50 mg/kg のポルフィリン投与のみの群を設けた (

Table 1)。レーザー照射は、ヌードマウスの照射予定部以外の部位をガムテープで角型スタンド台に固定し、クオートファイバーの先端硬性部をレトリクト挟で固定して行った。効果判定はレーザー照射72時間後に断頭して得られた腫瘍部の組織所見に基づいて4段階に分類した (Fig 5)。即ち癌組織が全く壊死変化を示さなかった場合を(-)、腫瘍の高さの半分未満の壊死を(+)、腫瘍の高さの半分以上の壊死を(++)、腫瘍の最も深部まで壊死がみられる場合を(+++)とした。

3.光化学治療による温度上昇

培養細胞での実験では、HpDを添加した後のレーザー照射時に針電極を培養液中に挿入して温度測定を行った。一方、担癌ヌードマウスの実験では、10 mg/kg のHpDを投与して、72時間目にレーザー照射を行い、レーザー照射野の皮膚直下と5mmの深さの2点で経時的温度変化を測定した。測定はいずれの場合もBailey Instruments INC Model BAT-8を使用した。

IV 結 果

1.培養細胞に対する光化学作用

1) HpD

濃度 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、レーザー照射3分間 (0.9 J/cm^2) の場合の変化は(-~+)であった。濃度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、レーザー照射3分間では細胞は(+)より(++)まで変性、破壊された。

2. Hematoporphyrin

レーザー照射3分間の場合、2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度

では(+)と軽度の変性がみられるにすぎなかった。しかし $25\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では(+)以上の細胞の変性破壊がみられた。

3) Protoporphyrin

濃度 $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、レーザー照射3分間の場合、細胞は(+)に変性、破壊された。濃度 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では、いずれの照射時間においても(+)より(++)とすべてに強い変化がみられた。

各ポルフィリンの濃度が $5\mu\text{g}/\text{ml}$ で整理し、比較するとTable 2の結果が得られた。

レーザー単独照射の細胞に対する影響をみるために、ポルフィリンを添加せずにレーザー単独で照射した場合、 $5\text{mw}/\text{cm}^2$ 、3分間の照射($0.9\text{J}/\text{cm}^2$)では細胞に変化がみられなかった。

ポルフィリン単独の細胞に対する影響を調べたところ、HpDは $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で細胞に(+~-)の変性と破壊がみられた。HpはHpDと同様に $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で(+)の変化が認められたが、その程度はHpDよりも軽度であった。Ppの細胞に対する影響は最も弱く、濃度が $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であってもごく軽度(+)の変性がみられるにすぎなかった。

ポルフィリンとレーザー照射による熱発生の有無を調べるために本実験で使用した最高濃度の各ポルフィリンと $5\text{mw}/\text{cm}^2$ 、3分間のレーザー照射で、TD-15ガラスフラスコ内の培養液の温度を連続して測定したところ、いかなるポルフィリンにおいても温度上昇は全く認められなかった。

2.ヌードマウス移植ヒト消化器癌に対する光化学作用

1) ヒト肝細胞癌(HCC-1)

胃癌の場合と同様にポルフィリン濃度 $50\text{mg}/\text{kg}$ を投与した後にレーザー照射を $280\text{mw}/\text{cm}^2$ 、10分間行った時の各ポルフィリンに於る腫瘍の壊死の強さはHp、HpDの順であり、Ppでは全く壊死が認められなかった。即ちHpでは腫瘍細胞全体の完全な壊死(++)がみられ、HpDでも腫瘍径の高さの半分をはるかに超える壊死(++)が認められた(Table 3)。

レーザー単独照射による影響をみるために、ポ

ルフィリンを投与せずに $280\text{mw}/\text{cm}^2$ 、10分のレーザー照射を行ったところ、表面から 1mm 位のわずかな変性壊死を認めた。

ポルフィリン単独の腫瘍に対する影響を調べるために、レーザー照射を行わずにポルフィリンを $50\text{mg}/\text{kg}$ 投与したところ、いかなるポルフィリンの場合にも腫瘍細胞の壊死は認めなかった。

ポルフィリンとレーザー照射による熱発生の有無を調べるために $10\text{mg}/\text{kg}$ のHpDを投与後 $280\text{mw}/\text{cm}^2$ のレーザー照射を行い腫瘍の表面(皮膚直下)と深さ 5mm の部分の温度を連続して測定したところ、照射開始後数分間は直線的に温度が上昇するものの、その後は上昇が鈍くなる傾向であった。照射開始10分後の 5mm の深さの温度は照射前より 3.7°C の上昇を示し、皮膚直下では 7.9°C の上昇を示していた(Fig 6)。

2) ヒト胃癌(GCA-1)

ポルフィリン $5\text{mg}/\text{kg}$ を投与した後にレーザー照射を $280\text{mw}/\text{cm}^2$ 、10分間($168\cdot\text{J}/\text{cm}^2$)行った時の各ポルフィリンに於る腫瘍の壊死の強さはHpD Hpの順であり、Ppはほとんど壊死が認められなかった。即ちHpDでは腫瘍径の半分の高さを超える(++)の強い変化がみられ、Hpでは(+)の腫瘍径の半分未満の高さの壊死が認められた。一方、Ppでは4匹のうち1匹に軽度の壊死(+)を認めたものの、他の3匹には全く変性壊死が認められなかった(Table 4)。

レーザー単独照射の腫瘍に対する影響をみるためにポルフィリンを投与せずに $280\text{mw}/\text{cm}^2$ 、10分の照射を行ったところ腫瘍細胞の変性壊死はみられなかった。

ポルフィリン単独の腫瘍に対する影響を調べるために、レーザー照射を行わずにポルフィリンを $50\text{mg}/\text{kg}$ 投与したところ、いかなるポルフィリンの場合にも腫瘍細胞の壊死は認められなかった。

V 考 察

現在光化学治療に使用されているHpDは種々のポルフィリンが含まれているため、その成分の中

で果してどれが光感受性物質として有効であるかについては明確でない。さらに、単一のポルフィリンが光化学治療の光感受性物質として十分な光化学作用と、いわゆる腫瘍親和性を有するならば薬剤としてはHpDよりも理想的なものとなる。このような考えにもとづいて我々は光化学治療の基礎的検討を行うために、HpD、HpDの主たる成分であるH pおよびP pとレーザーの株化培養肝癌細胞あるいはヌードマウス移植ヒト消化器癌に対する光化学作用の効果の比較を行った。

まず培養細胞を用いた実験では、今回の実験条件では培養液の温度上昇が全く認められなかったことからレーザーとポルフィリンの組合せによる温熱作用は無視できると判断された。それゆえにレーザー単独あるいは、一定濃度以下のポルフィリンでは全く細胞変性がみられず、両者の組合せによって明らかな細胞変性が認められた今回の実験結果は、光化学反応に由来する現象と思われた。今回の様な形態学的判定法による培養細胞を用いた研究は光化学治療の基礎的モデルとして最も単純な系であり、光感受性物質のスクリーニングに有用であると思われた。

今回の実験で得られた光化学作用を各ポルフィリンの濃度が5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で整理し、比較検討することにより、H p、HpD、P pの順に光化学作用が増強することが確認された。P pがHpDと同等以上の効果がみられることは、HeLa細胞を使用した ^{51}Cr release法によって榎村等も報告しているが、H pについては報告がみられないようである。ちなみに市販のH pは数種のポルフィリンが混入するものであり、注意を要する。いずれにせよP pはそれ自体の細胞傷害性が低いにもかかわらず光化学作用はHpDやH pよりも強かったという肝癌培養細胞による実験結果に基づいて、次ぎにヌードマウス移植ヒト消化器癌に対して光化学治療を行った。

ヌードマウス移植肝癌及び胃癌では、今回の実験条件で若干の温度上昇を認めたものの、レーザー単独照射で肝癌に極く弱い壊死をみただけで、胃癌で全く壊死を認めず、さらにいかなるポルフ

ィリンの単独投与群でも二種の癌ともに同様に全く壊死を認めなかった。それゆえレーザーとポルフィリンの組合せによって認められた今回の腫瘍の壊死効果は光化学反応に由来する現象と思われた。まず、注目すべき結果は培養細胞では最も光化学作用の強かったP pがほとんど全く肝癌及び胃癌に対して抗腫瘍効果の認められなかったことである。これはP pの腫瘍親和性が全く認められないことを示唆する結果であり、HPLCによる分析でも矛盾しない結果が得られた。一方、榎村等はヌードマウスに移植したAlexander Cellに2 mgのP pを局注し、48時間後にレーザー照射を行ってHpDよりも強い抗腫瘍効果を得ている。しかし、彼等は2 mgの大量のP pを局注して穿刺照射を行っている点が我々の実験係とは大きく異なる。そのために我々の今回の結果と全く反対の結果が得られたものとも推測された。

次にH pの光化学作用が胃癌ではHpDより若干劣るものの肝癌では明らかにHpDよりも強かった。これは癌種によってH pの代謝が異なり、腫瘍親和性の程度が異なるためと推測されたが、今回の実験が一律にH p投与後72時間後に行なわれたため、個々の癌の種々の時間に於る光化学治療の実験と、癌組織のポルフィリン分析の結果が得られない限りは詳細は不明と言わざるをえない。いずれにせよ、H pがある種の癌に対してHpDより有効であった事実から、H pの光感受性物質としての臨床応用も十分に可能性があるものと思われた。

ヒト消化器癌移植ヌードマウスの実験係は、元の癌性質を受けついでいると言われている点、さらにどの個体も全く同じ性質の癌である点などから臨床応用前の動物実験としては最適と考えられた。

Ⅵ 結 語

株化培養肝癌細胞およびヌードマウス移植ヒト肝癌及び胃癌に対するH pあるいはP pの光化学作用を調べた結果。P pは培養細胞には強い光化

学作用を認めたものの、移植ヒト癌にはほとんど光化学作用を認めなかった。

文 献

- 1) 井戸建一 他：日消誌. 80:1661, 1983.
- 2) 川本智章 他：日消誌. 80:240, 1983.
- 3) 樫村博正 他：日本レーザー医学会誌. 3:469, 1982.
- 4) 樫村博正 他：日本レーザー医学会誌. 4:93, 1984.

Figure 3 GCA-1

Schematic Illustration of the Cell Structure after Laser Irradiation

Figure 4

Table 1

Diagrammatic representation of experimental designs for the study of photodynamic therapy of human gastrointestinal cancer serially transplanted in nude mice GCA-1 and HCC-1

	porphyrin i.p. 10 or 50 mg/kg	laser 168 J/cm ² 630 nm, 280 mW/cm ²	sacrifice
Photochemical effect			
	no porphyrin	laser 168 J/cm ²	sacrifice
Effect of laser			
	porphyrin i.p.	No laser	sacrifice
Effect of porphyrin	0	72 hours	144 hours

HPLC of Hematoporphyrin Derivative (PHOTOFIN 250ng)

Figure 1

Figure 2 HCC-1

Schematic Illustration of Tumor Degeneration after Photodynamic Therapy

Figure 5

Table 2

Effect of Porphyrins and Laser Irradiation on JTC-16

5 μ g/ml 630nm 5mW/cm ²	HpD	Hp	Pp
1 minute	±	±	+
3 minutes	+	±	++
no irradiation	—	—	—

HpD : Hematoporphyrin Derivative

Pp : Protoporphyrin

Hp : Hematoporphyrin

Table 3

Effect of photodynamic therapy of human hepatocellular carcinoma(HCC-1) serially transplanted in nude mice

HpD	++ (11/12)	++ (9/10)		
Hp	+++ (10/10)	+++ (8/8)	+++ (7/7)	+++ (6/6)
Pp	— (0/12)	— (0/8)	— (0/7)	

porphyrin : 50 mg/kg

laser : 630 nm, 168 joules/cm²

(depth of infiltration / tumor height (mm))

Figure 6

Table 4

Effect of photodynamic therapy of human gastric cancer(GCA-1) serially transplanted in nude mice

HpD	++ (7/13)	+++ (6/6)		
Hp	+	+	+	+
Pp	+	—	—	—

porphyrin : 50 mg/kg

laser : 630 nm, 168 joules/cm²

(depth of infiltration / tumor height (mm))