原 著

Photodynamic therapy (PDT) 併用時における Hyperthermia の効果

三好 憲雄, 松本順雄*, 斉藤 等*, 福田 優

福井医科大学・第一病理学講座, *耳鼻咽喉科学教室

The effects of hyperthermia in combination with photodynamic therapy (PDT)

Norio Miyoshi, Nobuo Matsumoto*, Hitoshi Saitoh* and Masaru Fukuda

Department of pathology and *Otorhinopharyngology, Fukui Medical School,

Matsuoka, Yoshida-gun, Fukui 910-11

Abstract

Experimental mouse leukemia L1210 cells were subjected to hyperthermia ($43.0 \pm 0.05^\circ\text{C}$, waterbath) and photodynamic therapy ($50\mu\text{g/ml}$ HpD, $630 \pm 5\text{nm}$ at $0.1\text{mW}/\text{cm}^2$) for varying lengths of time and sequences. The results show that the two modalities interact in a manner which is more cytotoxic than the sum of the individual treatments, and the sequence of treatments is a determining factor in the degree of interaction of the HpD-uptake by the tumor cells. The most cytotoxic effect of photodynamic therapy is seen when the photodynamic therapy is treated after hyperthermia with HpD. When hyperthermia is done after HpD-uptake and photodynamic therapy, additive cytotoxic effect is obtained by analysis of dose-response curves. These data are supported on DNA damage (amount of single strand DNA) and RNA damage with analysing by flow cytometer to which the treated cells are stained with acridine orange (AO). Furthermore, an application to the clinical treatment, namely, the photodynamic therapy after the hyperthermia with HpD injection was able to propose as an useful combination therapy from the obtained finding in vitro experiments.

Key words:

加温療法	Hyperthermia
光力学療法	Photodynamic therapy
併用効果	Combination effect
相乗効果	Synergistic effect
相加効果	Additive effect
ヘマトポルフィリン誘導体	Hematoporphyrin derivative (HpD)
自動細胞分取装置	Flow cytometer
アクリジン・オレンジ	Acridine orange (AO)

1. はじめに

最近、レーザー技術の目覚ましい進歩によって、癌の診断や治療(たとえば、HpD を光増感剤として体内に投与して、レーザー光照射により、腫瘍組織に取込まれた HpD の蛍光検出の診断や、HpD との光化学反応による治療: Photodynamic therapy=PDT)が行われるようになる一方、温熱療法 (Hyperthermia=HT) の臨床応用も盛んに行われるようになってきた。そこで、これら二つの方法を併用して治療効果を上げることが期待できるので、我々は、白血病培養細胞 (L1210) を用いて、HT と PDT の併用による殺細胞効果を経時的に検討した。つまり、HT と PDT の順序の違いによる殺細胞効果の相違や核 DNA と RNA 損傷の経時的変化を明らかにできた。従来より我々は、DNA 損傷の質的変化の定量的解析¹⁾を顕微蛍光測光とフロー・サイトメーターを使って研究してきたので、その基礎的研究の一環として、今回は DNA 損傷の程度と RNA の減少を経時的に調べた。すなわち、RNase 未処理時 [RNase (-)] の赤色と黄緑色の蛍光強度比 (F632/F545) は RNA と単鎖 DNA に相当する量が検知され、RNase 処理時 [RNase (+)] は RNA が失われるため、単鎖 DNA 相当量だけが検知される。また、RNase (-) の F632/F545 値から RNase (+) の値を差引くと、RNA に由来する量が検知できる。さらに、DNA の質的変化の定量的解析に、細胞固定後、塩酸加水分解して AO 染色する方法も開発してきた¹⁾。つまり、細胞核 DNA を塩酸で緩やかに加水分解してゆくと、アデニン、グアニンのプリン塩基が失われ部分的に単鎖になったアプリン酸が生成される。この単鎖 DNA に AO 染色してスタッキング結合してできた赤色蛍光強度比 (F632/F545) を加水分解時間に対してプロットすると Schiff 色素を結合させた Feulgen 反応の加水分解カーブ²⁾の場合と同じく Bateman function; $y(t) = y_0 \cdot k_1 / (k_1 - k_2) \cdot [\exp(-k_1) - \exp(-k_2)]$ ……(1) に computer fitting した。ここで $y(t)$ は加水分解時間 t におけるアプリン酸(単鎖 DNA)の総潜在量を示し、また k_1, k_2 はアプリン酸の生

成と崩壊の rate constant である。(1)式と AO 加水分解カーブからそれぞれのパラメーター y_0 (潜在アプリン酸つまり単鎖 DNA 量の理論的初期濃度を表わす), k_1 ($1/k_1$ は核クロマチンの濃縮度を表わす), k_2 (核 DNA の不安定性を表わす) を computer により求めた。

2. 材料と方法

[細胞] mouse leukemia L1210 cells (RPMI 1640 含 10 % FBS 培養液にて継代した) を PBS 中に 10^6 cells/ml で浮遊したものをを用いた。

[HpD] 最終濃度が $50 \mu\text{g/ml}$ になるように HpD (Photofrin; Photofrin Medical Inc., I.V. Solution; 5 mg/cc; Cheek towaga, New York) を PBS 中に投与したものをを用いた。

[殺細胞効果の判定] 0.5 % Trypan blue (半井化学, Guaranteed Reagent) 0.5 ml をサンプル液 0.5 ml に加えたものを使用した。

[核 DNA 損傷の定量] 70 % EtOH 固定後、RNase (from bovine pancreas, crystallized, Type 1-A : Sigma, USA) 処理 (37°C , 60min) 未処理または 2N-HCl 加水分解を行い、 $10 \mu\text{g/ml}$ のアクリジン・オレンジ (AO ; for microscopy: Merck, F. R. Germany) 染色液に 7°C で 24-48 hr 染色した。AO の赤色蛍光強度 (F632) と黄緑色蛍光強度 (F545) の比 (F632/F545) を経時的にプロットした。

3. 装置と操作

(1) 加温装置には、大洋サービス社製の Jr-80 型の恒温槽を使用した。また、サンプル管内の温度は高精度センサー付パネル温度差計 (宝工業製, D622型) を使用した。

(2) 殺細胞効果の判定には、Trypan blue で青色に染まらなかった細胞数を全細胞数で割った値を位相差顕微鏡 (オリンパス製, IMT型) にて、Survival fraction として求めた。

(3) レーザー光照射には、アルゴン・色素レーザー (Spectra Physics 社製の 171-07型と 375-03型) を金沢大学医学部泌尿器科にて借用して、 630 ± 5

nm, 0.1mW/cm²の条件で照射した。

(4)核 DNA 損傷の解析には、フロー・サイトメーター (昭和電工社製, CS-20型) を使用した。

4. 実験条件と結果

(1) HpD 取込み：最終濃度が50 μ g/ml HpD になるように10⁶cells/mlのL1210培養細胞浮遊液 (PBS) 中に5mg/mlのHpD原液を加えて、37°C (レーザー光照射を先にする場合；Fig. 1のCurve 1) または43°C (加温処理を先にした場合；Fig.1のCurve 2) にて、1時間培養した。培養後

Fig. 1

加温処理による Survival curve. Curve 1: 37°C, + HpD; Curve 2: 43°C, + HpD, ; Curve 3: 43°C, - HpD. L1210細胞.

遠心分離機にて遊離 HpD 分子を洗浄除去した。

(2)加温効果 (HT)：加温処理を先にする場合 (Fig. 1のCurve 2) は、HpD をL1210細胞浮遊液に投与し、恒温槽にて43 $\pm$ 0.05°C (熱電対で実測) に1時間、HpD を取込ませながら加温した。また、HpD 非投与L1210細胞 (Fig.1のCurve 3) やレーザー光照射を先にした場合の細胞 (Fig.3, Curve 1) も43 $\pm$ 0.05°Cに加温し、経時的 (0', 30', 60', 120', 180', 240') に0.5mlをサンプリン

グ後、0.5%トリパン・ブルー (0.5ml) 染色液を加えて survival fraction を算定した (Fig.1, 3)。

Fig.1 は43°Cおよび37°Cにおいて HpDを含むものと含まない時の殺細胞効果の経時的变化を示す。37°C (Curve 1) では殺細胞効果は認められず、43°C (Curve 2, 3) では、HpD が共存した方が殺細胞効果は小さく、HpD のない方が大であった。

(3)レーザー光照射効果 (PDT)：加温処理を先にした細胞 (Fig.1, Curve 2) や、HpD を37°Cで取り込ませ、レーザー光照射を先にする細胞 (Fig. 1, Curve 1) も、塩化ビニル製のサンプル管 (15 ml容器) にて滅菌密封して、回転台上で回転させながらアルゴン-色素レーザー光 (630 $\pm$ 5 nm; 0.1mW/cm²) を照射し、経時的 (0', 1', 3', 5', 10') に0.5mlをサンプリング後、0.5%トリパン・ブルー (0.5ml) 染色液を加えて survival fraction を算定した (Fig.2)。Fig.1において、加温と同時に HpD 取込みを行った Curve 2の細胞 (1時間のみ43°C処理) をレーザー光照射すると、照射時間の増加とともに、顕著な殺細胞効果が認められた (Fig.2, Curve 2)。一方、37°Cで HpD を取込んだ細胞 (Fig.1のCurve 1で1時間作用)

Fig. 2

レーザー光照射による Survival curve. Curve 1: 37°C, 1 hr, + HpD; Curve 2: 43°C, 1 hr, + HpD 作用の L1210細胞.

Fig. 3

レーザー光照射後の加温処理による Survival curve.
L1210細胞.

ではレーザー光照射しても, Fig. 2, Curve 2 に比べて, それ程大きな殺細胞効果は示さなかった (Fig. 2, Curve 1). さらに, レーザー光照射に続いて, Fig. 3 のように, 加温処理を行っても, Fig. 1, Curve 2 と同じ傾きでしか殺細胞効果は得られなかった.

(4)核 DNA 損傷の解析: 加温処理を先にした場合 (Fig. 4) は, 2 時間の加温処理後, 遊離 HpD を遠心洗浄除去後 10% FCS を含む培養液 (RPMI 1640) にて 48 時間培養して, 70% EtOH 水溶液にて固定後, RNase 処理および 2 N-HCl で経時的 (0', 30', 60', 90', 120', 150', 180') に加水分解後 AO 染色した. AO の蛍光強度比 (F_{632}/F_{545}) の値を酸加水分解時間に対し経時的 (0, 1, 2, 3 時間) にプロットした. Fig. 4 の Curve の番号は Fig. 1 の番号に対応している. つまり, 殺細胞効果の大きな Curve 3 は (F_{632}/F_{545}) の値が大きく, その値の変化も大であった. HpD を含む Curve 2 も Control (Curve 1) に比べて, (F_{632}/F_{545}) の値の変化は大であった. (1)式と Fig. 4 の AO 加水分解カーブから, それぞれのパラメ

ーター y_0 (潜在アプリン酸つまり単鎖 DNA 量の理論的初期濃度を表わす), k_1 ($1/k_1$ は核クロマチンの濃縮度を表わす), k_2 (核 DNA の不安定性を表わす) が computer により, Table 1 のように求まる. つまり, Fig. 4 の酸加水分解カーブにおいて赤色の蛍光強度比が大きく, その時間的変化の

Table 1

Fig. 4 の酸加水分解カーブの解析による各パラメーター (y_0 : 単鎖 DNA 量に相当する量, $1/k_1$: クロマチンの濃縮度に相当する値, k_2 : 核 DNA の不安定性を表わす値).

	Y_0	K_1	K_2
Curve 1	1.24	1.28×10^{-2}	1.28×10^{-2}
// 2	1.64	2.01×10^{-2}	2.00×10^{-2}
// 3	3.44	1.94×10^{-2}	1.94×10^{-2}

Fig. 4

Fig. 1 の各サンプル (2 時間作用) の酸加水分解カーブ. 2 N-HCl, 30°C.

大きいカーブは, y_0 や k_1 , k_2 も Curve 1 のコントロールに比べて, 大であった.

一方, 経時的にレーザー光照射したサンプルは照射後 30 分以内に固定し, RNase 未処理と処理を行い, AO 染色した (Fig. 5). また, レーザー光照

射後経時的 (0, 1, 2, 3 時間) に培養した後、固定し、RNase 未処理と処理を行い、AO 染色した (Fig.6). さらに、加温による核 DNA 損傷の解析 (Fig.7) は10分間のレーザー光照射をし、経時的 (0, 1, 2, 3 時間) に加温処理を行った直後に PBS で遠心洗浄後固定し、RNase 未処理と処理を行い、AO 染色した. なお、核 DNA 損傷の解析のフロー・サイトメーターのデータは、AO 色素の蛍光強度比 (F_{632}/F_{545}) の値を経時的にプロットしたものである. 細胞の流すスピードは毎秒200-300個で、1個のサンプルの細胞数は約2万個であった. この様にして得られた Fig. 5と7において、Curve 2' [RNase(+)] は照射時間の増加とともに増大しているが、レーザー光照射を先にした Fig.7, Curve 1' [RNase(+)] では、逆に加温時間の増加とともに減少している. また、Fig.5, Curve 2'' と Fig.7, Curve 1'' は処理時間の経過とともに減少している. Fig.6 はレーザー光照射単独処理 (Curve 1) および加温後にレーザー光照射処理 (Curve 2) を行った後の経時的培

Fig.5

Fig.2の各サンプルの AO 赤色蛍光強度比 (F_{632}/F_{545}) の経時的変化.

Fig.6

Fig.2の各サンプル (10分間照射) 後、経時的に培養した各サンプルの AO 赤色蛍光強度比 (F_{632}/F_{545}) の変化.

Fig.7

Fig.3のサンプルの AO 赤色蛍光強度比 (F_{632}/F_{545}) の経時的変化.

養後の赤色蛍光強度比 F_{632}/F_{545} の変化を示している. 単鎖 DNA の相当量を示す Curve 1' と 2' の飽和値が 0.7 に対して 1.4 と 2 倍になっている.

5. 考 察

以前にも HpD を使用した Photodynamic Therapy (PDT) と Hyperthermia (HT) の併用療法の研究が報告されている。Dougherty 等の研究グループは PDT を先にして HT を後にした併用が効果的であることを *in vitro*, *in vivo* で明らかにしている^{3,4)}。一方、我々は、従来より HpD の取込みについて、詳細に研究してきた^{5,6,7)}。さらに、HpD 取込みに与える温度の効果を検討し、高温程 HpD の取込みが多くなることが明らかになった⁸⁾。この事実から、HpD を取込ませながら HT をやることにより、HpD をより多く取込ませることができるので、その後の PDT の併用効果に期待できると考えた。この予測は的中し、Figs. 1, 2, 3, のごとくである。つまり、同条件 (PDT=10min, HT=1hr) でも HT を先にした場合は Fig. 2, Curve 2 のように survival curve の傾きが明らかに大であり、PDT を先にした場合は Fig. 3, Curve 1 のように Fig. 1, Curve 2 の傾きと同じであった。今後、survival curve の詳細な検討が必要であるが、恐らく HT を先にした方は相乗効果であり、PDT を先にした場合は相加効果と考えられる。これは、細胞膜内への拡散作用と密接に関係し、高温程より多くの HpD 分子が取込まれるので、レーザー光照射時間とともに、加温処理も相まって、ほぼ指数関数的に減少したものと考えられる。また、この併用の組合せは、臨床へ適用可能なものと考えられる。すなわち、HT 中に HpD を静注し、48時間後に PDT を行うのである。HpD を静注後の HpD 分子は30分間内で体内に広がる由、静注と同時に HT を行うと、腫瘍内血流の増大に伴い HpD の取込み量をも増加させ、しかる後、HT による腫瘍血管の崩壊により HpD の蓄積が期待でき、腫瘍血管が蘇生しない早い時期に PDT を行うのが都合が良いと考える。ところが、Dougherty 等の研究グループは PDT を HT の先にした方が治療効果が出るとしているが、HpD の取込み条件のところで我々とは異なる。すなわち、我々の方法のように HT 時には HpD を投与せず、HT の前に HpD を投与して24

時間後に HT と PDT を行っているの、取込みに対する加温効果はなく、HT を行っているうちに腫瘍組織内 HpD の減少が起ったため、PDT を先に行った方が見かけ上殺細胞効果が出たものと考えた。

HpD と PDT による細胞の損傷は、ミトコンドリアが特に変性を受けていることが、言われている^{6,7)}。また、HT によっても核 DNA が直接に変性を受けている事実の報告はない。しかしながら、我々の処理をしてから二次的変性として核 DNA に波及すると考えられるので、今までの手法^{1,2)}を使って、経時的变化を明らかにした。つまり、今までの手法により、微少な核 DNA の質的変性を定量的に解析すると、加温 (43°C, 2 hr, 48 hr incubation) 後は、確かに単鎖 DNA (yo) が加温未処理に比べて2.7倍も大であった。つまり、加温処理によって、48時間後には DNA への質的变化が起っていることが、塩酸加水分解と AO 染色によって明らかになった。さらに、この手法で加温処理との併用による殺細胞の相乗効果を検討すると殺細胞効果が増大するにつれて、単鎖 DNA 量が増大するとともに RNA 量が減少しているのが特徴的である。しかし、相加効果の方は単鎖 DNA 量も減少していることから DNase の減少が考えられる。また、単鎖 DNA 量の増減がそれぞれ相乗効果と相加効果をはっきり特徴付けている。

まとめとして、(1) 43°C の加温と同時に HpD 取込みを行った後、レーザー光照射した方が相乗的殺細胞効果を示し、その逆の併用では、相加効果しか得られなかった。(2) AO 染色によるフロー・サイトメトリー測光結果からも、(1) の事実が核 DNA の損傷 (単鎖 DNA の増加と RNA の減少) の程度より立証された。(3) (1) の事実より臨床への応用、つまり温熱療法中に HpD を投与し、その後レーザー光照射治療する効果的併用を提唱できた。

6. 文 献

- 1) 福田 優, 三好憲雄: 顕微蛍光測光法の細胞学への応用—細胞核 DNA の質的变化の定量的解析—. 生物物理, Vol.25, No.2, 44-48, 1985.
- 2) Miyoshi, N., and Fukuda, M.: Quantitative Detection of DNA Damage in the Neuronal Cells of the Cerebellum and Cerebrum by the Analysis of Feulgen Hydrolysis Curves, *Histochemie*. in press.
- 3) Mang, T.S., and Dougherty, T.J.: Time and Sequence Dependent Influence of in vitro Photodynamic Therapy (PDT) Survival by Hyperthermia, *Photochem. Photobiol.*, 42:533-540, 1985.
- 4) Henderson, B.W., Waldow, S.M., Potter, W.R., and Dougherty, T.J.: Interaction of Photodynamic Therapy and Hyperthermia: Tumor Response and Cell Survival Studies after Treatment of Mice in Vitro, *Can. Res.*, 45:6071-6077, 1985.
- 5) Miyoshi, N., Hisazumi, H., Ueki, O., and Nakajima, K.: Cellular Binding of Hematoporphyrin Derivative in Human Bladder Cancer Cell Lines: KK-47, *Photochem. Photobiol.*, 39:359-363, 1984.
- 6) Miyoshi, N., Hisazumi, H., Nakajima, K., Ueki, O., and Fukuda, M.: The similarity between the fluorescence spectra of hematoporphyrin derivative incorporated by rat bladder cancer tissues and trimethyl ammonium bromide micelle, *Photobiochem. Photobiophys.* 8:115-121, 1984.
- 7) Miyoshi, N., Hisazumi, H., Ueki, O., Nakajima, K., and 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.
- 8) 三好憲雄, 福田 優: ヘマトポルフィリン誘導体 (HpD) の取込みとその温度効果, および加温による殺細胞効果. 日本ハイパーサーミア誌, 第1巻・第4号, 25-31, 1985.