

次世代の PDT を目指して

—新しい光感受性物質 Na-Pheophorbide a (Na-Phde a) を用いた培養肺癌細胞に対する基礎的検討—

井上秀範¹⁾、高橋 渉¹⁾、吉井新平¹⁾、喜納五月¹⁾、横須賀哲哉¹⁾、松原寛知¹⁾、保坂 茂¹⁾、鈴木章司¹⁾、大沢宏¹⁾、明石興彦¹⁾、多田祐輔¹⁾、西川 祐²⁾、秋山満知子²⁾、仲里正孝²⁾、小林正美²⁾
 山梨医科大学 第2外科¹⁾、筑波大学 物質工学²⁾

【目的】Pheophorbide a の Na 塩 (Na-Phde a) を新しく調整したため、これを用いて腫瘍内局所注射を前提とした *in vitro* の実験を行った。【方法】対象に用いた光感受性物質は Na-Phde a を用い、細胞株はヒト培養癌細胞 (RERF-LC-AI) を使用した。実験 1 : 各種濃度の Na-Phde a を用いて作用時間に対する培養癌細胞 1 個あたりの細胞内 Phde a 濃度曲線を作成した。実験 2 : 細胞内に Na-Phde a が取り込まれた状態を蛍光顕微鏡観察で確認した。【結果】実験 1 : 0.04mg/ml 以上の濃度で 4 時間以上作用させれば細胞内最高濃度が約 1.4 pg/cell に達した。実験 2 : 蛍光顕微鏡観察では 1 時間程度より細胞内に取り込まれることが観察された。【結語】Na-Phde a を癌細胞内に取り込ませ PDT が可能であることが *in vitro* のレベルにて示唆された。

Key words : Photodynamic Therapy, Na-Pheophorbide a

はじめに

近年、悪性腫瘍の治療に光感受性物質を用いた光線力学療法 (Photodynamic Therapy : 以下 PDT) の研究や開発が行われ有効性が認められたことを受けて¹⁾、1996年4月より、ヘマトポルフィリン系光感受性腫瘍親和性物質フォトフリン (フォトフリン[®] : 日本ワイスレダリー[株]) の全身投与¹⁾とエキシマダイレーザ—癌治療装置 (PDT-EDL1 : 浜松ホトニクス[株]) の組み合わせ²⁾が保険適応となった。新しい治療法として PDT が注目されてから 15 年経過したが、フォトフリン[®] 静注に伴う日光過敏症防止目的のために長期

の暗室内生活が強いられるため期待されたほど症例数は増えていないのが現状である。

我々は Na-Phde a は局所注入においても殺細胞効果が高いこと³⁾に注目し、『光感受性物質の腫瘍内直接注射による PDT が有効であれば、光感受性物質の投与量を少なくでき、副作用である日光過敏症を抑えることができる』と考え、新しい光感受性物質 Na-Phde a を用いて、今後の PDT 実験の基礎データを取るべく培養癌細胞を用いた細胞内 Phde a 濃度を測定する基礎的実験を行った。

図1：Na-Pheophorbide aの構造式

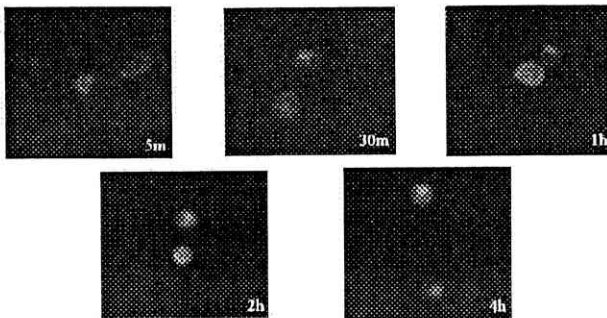
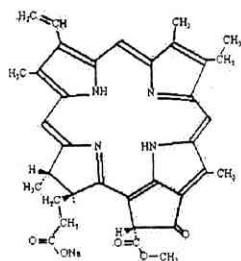


図2：Pheophorbide aの吸光度曲線

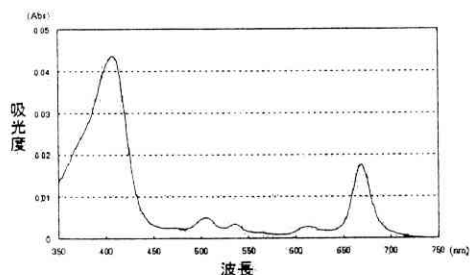
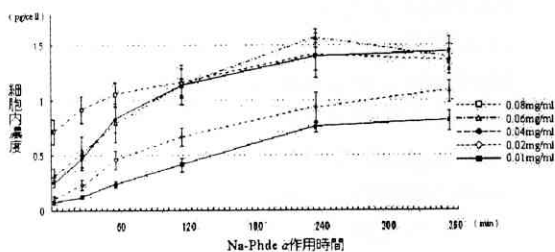


図3：細胞内 Phde a 濃度曲線



実験材料および実験方法

(A) 実験材料

a：光感受性物質

構造式および吸光度曲線を図1・2に示した。培養癌細胞に作用させるNa-Phde aの調製法は、リン酸バッファー(Phosphate-Buffered Salines：以下PBS)を用い0.22μmの無菌フェルターを通過させ調整したものを用いた。

b：細胞株

ヒト肺扁平上皮癌細胞株であるRERF-LC-AIを10%FBS添加MEM培地

図4：蛍光顕微鏡観察

0.04mg/ml Phde aを5分・30分・1時間・2時間・4時間作用させ観察した。培養癌細胞は1時間程度で強い蛍光を発していた。

(Gibco)で培養し、すべて10継代以内の細胞を使用した。

(B) 実験方法

実験1：経時的細胞内Phde a濃度曲線を作成するため、培養癌細胞RERF-LC-AIを25cm²の組織培養用フラスコに播種し、インキュベートを行った。48時間後、Na-Phde a濃度が0.01、0.02、0.04、0.06、0.08mg/mlになるように調製し、それぞれ5分、30分、1時間、2時間、4時間、6時間、培養癌細胞に作用させた。作用終了後は直ちにPBSで細胞表面を洗浄しメタノールにてPhde aを抽出後、分光光度計(V-560：日本分光[株])にてそれぞれの色素量を測定し、培養癌細胞1個あたりの細胞内Phde a濃度を算出し、細胞内Phde a濃度曲線を作成した。なお、各作用濃度および作用時間における検体数は15検体以上で、全体で555検体に対して行った。

実験2：Na-Phde aの培養癌細胞内への取り込みをみるため、カバーガラス上に培養癌細胞RERF-LC-AIを生着させ、0.04 mg/ml Na-Phde aを5分、30分、1時間、2時間、4時間作用させた。作用終了後は直ちにPBSで細胞表面を洗浄し、細胞

胞が生着したカバーガラスを蛍光顕微鏡（落差蛍光顕微鏡 BHS-RFK: オリンパス [株]、励起条件[V 励起]）で観察を行った。

結果

実験 1 : 各種 Na-Phde a 濃度および時間に対する細胞内 Phde a 濃度曲線を示す (図 3)。Phde a の腫瘍細胞内濃度は 0.04mg/ml 以上の濃度であれば 4 時間以上作用させることでほぼピークに達しプラトーとなり、細胞内最高濃度が約 1.4 pg/cell に達した。

実験 2 : 培養癌細胞 (RERF-LC-AI) に Na-Phde a を作用させたときの蛍光顕微鏡写真 (図 4) を示す。同時に施行した位相差顕微鏡の所見と重ね合わせると、Na-Phde a は 1 時間程度より培養癌細胞内に強い蛍光が観察され、細胞内に取り込まれることが観察された。

考察

近年癌に対する新しい治療法として光力学療法 (PDT) が確立した¹⁾²⁾⁴⁾。歴史的な背景として、1979 年 Dougherty ら⁵⁾は HpD と光源にレーザー光を用いる組み合わせで、その有用性を証明し以後盛んに研究された。

現在までに開発された光感受性物質はいろいろあるが、Lipson が開発した HpD がもっとも使用されている⁶⁾。日本でも 1996 年 4 月より HpD のオリゴマータイプのヘマトポルフィリン系光感受性腫瘍親和性物質 (フォトフリン®: 日本ワイズレダリー [株]) の使用が保険適応となった。しかしながら現在臨床で施行されている PDT は長期の暗室内での生活を余儀なくされるため、期待されたほど症例数は増えていないのが現状である。

今回我々の注目した Phde a は 400nm 付近に Soret band と可視光領域の Q 吸収帯が認められる (図 2)。さらに文献的には、体内の正常組織からの代謝が非常に早い

ため副作用が少ないことや⁷⁾、殺細胞効果は静注および局注にても非常に高いこと³⁾、そのうえ可視光照射レベルで高い DNA の切断能力があること⁸⁾などが報告されている。PDT を行なうためにはレーザー照射する波長が非常に大切になってくるが、実際照射することとなる Q 吸収帯の比較では、Phde a は HpD よりもさらに長波長側の 667nm になり、しかも吸光度係数が非常に大きい。このことは現在保険適用となっているフォトフリン®と 630nm のエキシマダイレーザーの組み合わせよりもさらに組織透過性の高いより長波長のレーザーが利用可能で、しかも現在使用されているものよりもさらに低出力のレーザーで PDT ができると予想できる。

われわれは、『もし局所注射で PDT が可能であれば、投与量を減らせることができ副作用の発現が少なくなる』と考へ今回の基礎的実験をおこなった。まず Na-Phde a を用いて培養癌細胞への取り込み濃度に関する実験を施行したが、Na-Phde a が 0.04mg/ml 以上の濃度で 4 時間以上作用させれば、培養癌細胞内濃度は 1.4pg/cell でプラトーに達した。つぎに実際に細胞内に Na-Phde a が取り込まれているか確認するため蛍光顕微鏡にて観察を行ったが、培養癌細胞に 1 時間程度作用させることで、Phde a の蛍光が強く観察された。この結果、Na-Phde a は局所投与による方法でも十分に培養癌細胞内に取り込まれた状態で PDT を施行することが可能であることが示唆された。

今後、in vitro および in vivo にて実験を重ねていくことで、我々の目的どおり Na-Phde a の局所投与による PDT が可能であれば、次世代の PDT を担う光感受性物質として重要な役割を果たしていくと考えられるため、当科で引き続き実験を行なっていきたい。

結語

Na-Phde a は培養癌細胞 (RERF-LC-AI) に直接作用させる方法でも細胞内に良好に取り込まれ、しかも 0.04mg/ml 以上の濃度で 4 時間作用させることで、培養癌細胞内濃度は 1.4pg/ml 付近でプラトーに達した。

文献

- 1) Furuse K, Fukuoka M, Kato H, Horai T, Kubota K, Kodama N, Kusunoki Y, Takifuji N, Okunaka T, Konaka C, Wada H, Hayata Y : A prospective phase II study on photodynamic therapy with photofrin II for centrally located early stage lung cancer. *J Clin Oncol* 11 : 1852-1857, 1993.
- 2) 平野 達、鈴木健司 : PDT 用エキシマダイレーザー. *日本レーザー医学会誌* 16 : 29-35, 1995.
- 3) 山下幸孝、森安史典、玉田 尚、川崎俊彦、小野成樹、木村 達、梶村幸三、染田 仁、濱戸教之、内野治人 : 光感受性物質フェオフォーバイド a を用いた光線力学治療の基礎的検討. *日癌治会誌* 25 : 1123-1128, 1990.
- 4) 加藤治文、河手典彦、高橋秀暢、奥仲哲弥、小中千守 : 肺・気管支癌の光化学治療. *治療学* 26 : 482-487, 1992.
- 5) Dougherty TJ, Lawrence G, Kaufman JH, Boyle D, Weishaupt KR, Goldfarb A : Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 62 : 231-237, 1979.
- 6) Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM : The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *Journal of the National Cancer Institute* 26 : 1-11, 1961.
- 7) 市岡 稔、小山隆子、細谷英雄、遠藤寛 : 担癌マウスに投与した光増感剤, pheophorbide a および 10-hydroxypheophorbide a の臓器内分布. *日本レーザー医学会誌* 10 : 15-18, 1989.
- 8) 小林正美、仲里正孝、大工園則雄、小宮山真 : 光増感色素フェオフォーバイド a による DNA の光切断. *日本レーザー医学会誌* 13 : 37-41, 1992.