

- 6) 近藤雅雄：ポルフィリン症の生化学的診断、日皮会誌 107(1)：1-8、1997.
- 7) 近藤雅雄：ポルフィリン代謝異常症の生化学的診断、ポルフィリン 5(2,3)：103-111、1996.
- 8) 近藤雅雄：先天性ポルフィリン症の現状と課題、ポルフィリン 10(3,4)：83-85、2001.
- 9) 近藤雅雄、梶原正宏：高速液体クロマトグラフィーによるポルフィリン体測定の実用臨床診断への応用、LC-family 22(2)：5-10、1987.
- 10) 石塚昌宏、上田康信、宇津木聡、小倉俊一郎、近藤雅雄、大倉一郎：5-アミノレブリン酸(ALA)投与後のポルフィリン測定による癌診断の可能性—ポルフィリン測定方法の確立、—第35回ポルフィリン研究会、2008.
- 11) 近藤雅雄：ヘム生合成関連物質の測定意義、ポルフィリン 12(2)：73-88、2003.
- 12) 近藤雅雄：ポルフィリン・ポルフィリン前駆体の測定、特集ポルフィリン症、日本臨床 53(6)：45-58、1995.
- 13) 近藤雅雄：ポルフィリンの検査法、検査と技術 22：411-418、1994.
- 14) 近藤雅雄、広沢実一：高速液体クロマトグラフィーによる赤血球ポルフィリンの高感度迅速測定法、臨床化学 17：36-39、1988.
- 15) 坂井公、竹内幸子、荒木高明ほか：HPLCによる血中プロトポルフィリン測定法の検討標準液調製の協定と4施設での血液試料の測定結果の比較、産業医学 34：236-242、1992.
- 16) 近藤雅雄：糞便ポルフィリンの測定と臨床的意義、ポルフィリン 2：85-91、1993.
- 17) 近藤雅雄、網中雅仁、田中利明、中村磐男、工藤吉郎：血漿ポルフィリンの測定と臨床的意義、ポルフィリン 5(4)：349-355、1996.
- 18) 近藤雅雄、矢野雄三：晩発性皮膚ポルフィリン症、先天代謝異常症候群—遺伝子解析の進歩と成果(下巻)、別冊日本臨床、領域別症候群シリーズNo.19. p.145、日本臨床社、1998.
- 19) Kondo M, Shimizu Y: The effect of ethanol, estrogen, and hexachlorobenzene on the activities of hepatic δ -aminolevulinate synthase, δ -aminolevulinate dehydratase and uroporphyrinogen decarboxylase in male rats. Arch Toxicol 59:141-145, 1986.
- 20) 近藤雅雄、堀江裕、平田健治、古山和道、柘植光代、藤田博美、佐々茂、浦田郡平：晩発性皮膚ポルフィリン症の臨床および生化学的解析、ポルフィリン 13(3,4)：93-94、2004.
- 21) 近藤雅雄：晩発性皮膚ポルフィリン症のC型肝炎の合併症例の生化学的解析、消化器科 39(6)：681-690、2004.
- 22) 近藤雅雄：鉛中毒によるポルフィリン症、血液症候群—その他の血液疾患を含めて、別冊日本臨床、領域別症候群シリーズ No.20. p.487-490、日本臨床社、1998.
- 23) Watson CJ, Schwartz S: Simple test for urinary porphobilinogen. Proc Soc Exp Bio Med 47:393-394、1941.
- 24) 近藤雅雄：マイクロプレート蛍光法を用いた新しい尿中ポルフィリンの測定法、医学のあゆみ 156：491-492、1991.
- 25) 近藤雅雄、井上克司：遺伝性ポルフィリン症の簡易診断機器の試作開発研究、遺伝性ポルフィリン症の全国疫学調査ならびに診断・治療法の開発に関する研究、平成21年度研究成果報告集厚生労働科学研究費補助金、難治性疾患克服研究事業、研究成果報告書、p.55-56、2010.

Study on Draft Criteria for Biochemical Diagnosis of Porphyria

Masao Kondo¹⁾, Masahito Aminaka²⁾ and Masahiro Ishizuka³⁾

1)Department of Human Science, Tokyo City

University, 2)Department of Preventive Medicine, ST. Marrianna Medical University School of Medicine. 3) SBI ALA promo CO.LTD

Key words: Porphyria, Biochemical diagnosis, Criteria

Porphyrias are a clinically diverse group of diseases due to inherited deficiencies of enzymes in the porphyrin metabolic pathways and are classified into eight types. However diagnostic criteria and testing methods for diagnosis has not yet been established.

Currently, the diagnosis of porphyria is

suspected from clinical symptoms, porphyrin related compounds were measured after a special inspection is to determine common diagnosis, it takes more than a week.

In this study, the measured values from a variety of porphyrin-related substance in the blood, urine, and feces obtained from patients with porphyria, a draft summary of the diagnostic criteria. The purpose of early diagnosis of this disease, developing a biochemical diagnostic system using high performance liquid chromatography method summarizes the differential diagnosis.

特集 光線過敏症—最新の研究から遮光対策まで—

総説 5 Part2. 光線過敏症の今

J Visual Dermatol 10:459-461,2011

遺伝性皮膚ポルフィリン症の遺伝子診断

中野 創

Key words: 遺伝性皮膚ポルフィリン症, 骨髄性プロトポルフィリン症, 遺伝子診断

はじめに

遺伝性ポルフィリン症のうち皮膚症状を呈するものは6病型に分類されるが(表1), それぞれの原因遺伝子が明らかになっており, 遺伝子診断が可能である(弘前大学皮膚科ホームページ: http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~derma/ja/g_home.html). 遺伝子診断の主たる目的は確かな遺伝カウンセリングを行うことであるが, 一方皮膚ポルフィリン症においては臨床診断のみでは必ずしも病型を決定できない症例が少なからず存在するので, 確定診断を得るためには原因遺伝子の同定が必須である. 筆者は東京慈恵会医科大学 上出良一 教授, 近畿大学 川田 暁 教授, 同 川原 繁 准教授とともに厚生労働省遺伝性ポルフィリン症研究班で分子遺伝学的解析を行ってきた. 本項ではこれまでの知見をもとに, 遺伝性皮膚ポルフィリン症の主な病型について, 遺伝子診断の現状を概説する.

骨髄性プロトポルフィリン症 (erythropoietic protoporphyria : EPP)

EPPは, 遺伝性を示す皮膚ポルフィリン症のなかではもっとも報告数が多い病型である. プロトポルフィリンに鉄イオンをキレートさせ, ヘムを形成する酵素フェロケラターゼ (FECH) をコードする *FECH* 遺伝子の変異により発症し, 遺伝形式は常染色体優性遺伝である.

数%に重度の肝障害を合併し, 予後を左右する.

本症は原因遺伝子が同定される以前から, 不完全優性遺伝性疾患として知られていた. それは, 家系分析から, 明らかに変異を有すると考えられるが発病しない個体, すなわち無症候性キャリアの存在が認められたからである. こうした遺伝様式は, 「浸透率が100%未満の優性遺伝」ともいうことができる. 浸透率は, 「遺伝子変異を有する個体のうち, 発症している個体の割合」と定義されるが, ヨーロッパの白人 EPP 症例では, 変異を有すると考えられる個体の大部分は発症せず, 浸透率は10%程度とされてきた. この浸透率の低さについて, 現在ではその理由を分子遺伝学的に説明できるようになった. *FECH* 遺伝子の一方のアリルに, 酵素活性を著しく低下させるような変異が存在し, かつ, もう一方のアリルのイントロン3に遺伝子多型 IVS3-48C が存在するとスプライシング異常をおこす頻度が高まり, 結果として早期停止コドンを生じるため, ナンセンス変異依存性 mRNA 分解機構によって *FECH* mRNA 量が低下することが判明している¹⁾ (図1).

このことは同時に変異の対側のアリルの IVS3-48C が発症を規定しているともいうことができる(図2). *FECH* 遺伝子変異と IVS3-48T/C 遺伝子多型との関係を調べた報告によると, 大部分の症例が IVS3-48C によって EPP の発症が規定されており, われわれの研究

表1 遺伝性皮膚ポルフィリン症の病型と原因遺伝子

病型	原因遺伝子産物	遺伝形式
骨髄性プロトポルフィリン症	フェロケラターゼ	常優*
異型ポルフィリン症	プロトポルフィリノーゲン酸化酵素	常優
遺伝性コプロポルフィリン症	コプロポルフィリノーゲン酸化酵素	常優
晩発性皮膚ポルフィリン症***	ウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素	常優
肝性骨髄性ポルフィリン症	ウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素	常劣**
先天性骨髄性ポルフィリン症	ウロポルフィリノーゲン合成酵素	常劣

*常優: 常染色体優性遺伝, **常劣: 常染色体劣性遺伝, ***臨床的に大部分は後天性

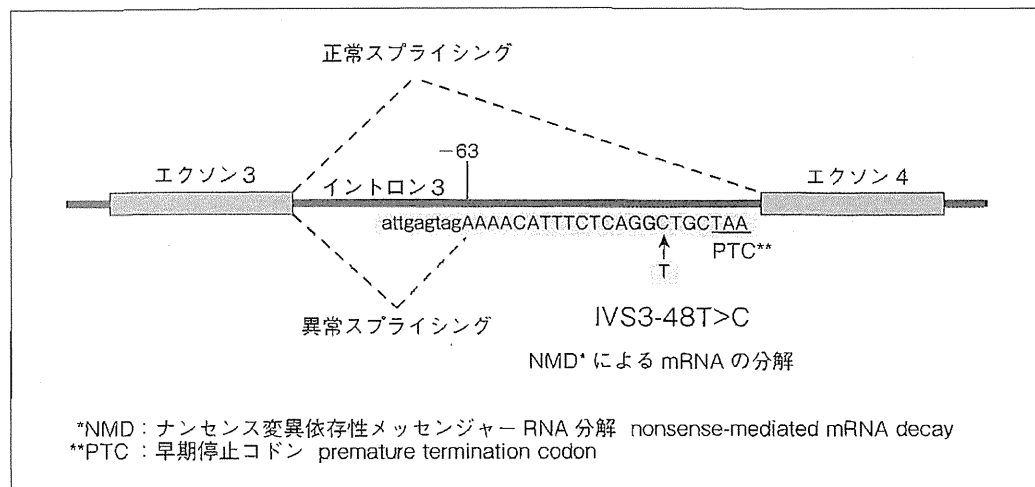


図1 IVS3-48C 遺伝子多型とスプライシング異常

班の解析結果もそれを支持していた²⁾。したがって、EPP 家系において、発端者の *FECH* 遺伝子変異が同定されれば、IVS3-48T/C の遺伝子型をあわせて調べることによって、その同胞のうち臨床的に無症状の個体が無症候性キャリアであるかそうでないかが決定できる。IVS3-48C 遺伝子多型の頻度には人種差があり、欧米人に比べ日本人では IVS3-48C のアリル頻度が4倍高い³⁾。したがって、本邦では EPP の浸透率が欧米より高いと推定される⁴⁾。

EPP における遺伝子診断のもっとも重要な臨床的意義は、潜在的 EPP 罹患児を発見できることにある。EPP は通常、出生後すぐには発症せず幼児期になって光線過敏を示すようになる。そのため、罹患児と知らずに多量の日光に曝露されると重度の光線過敏症状のみならず、血中に大量に放出されたプロトポルフィリンによる急性肝不全で死に至る危険性がある。したがって、EPP と診断された家系では遺伝子診断を行い、とくに光線過敏をいまだ呈さない幼児について、発症する可能性の有無を明らかにしておくことが必要である。

EPP の遺伝子診断で問題となる点はさらに二つある。一つは肝障害の合併に特異的な *FECH* 遺伝子変異がいまだ不明な点である。停止コドンが生じるような変異のように *FECH* の活性を著しく低下させるような変異では、ミスセンス変異に比べて肝障害をひきおこす可能性が高いことが示唆されているが、一方ではミスセンス変異であっても肝障害を生じた家系が報告されている⁵⁾。また、同じミスセンス変異でも肝障害を合併しない場合もあり、特定の変異から肝障害の合併を推定することは

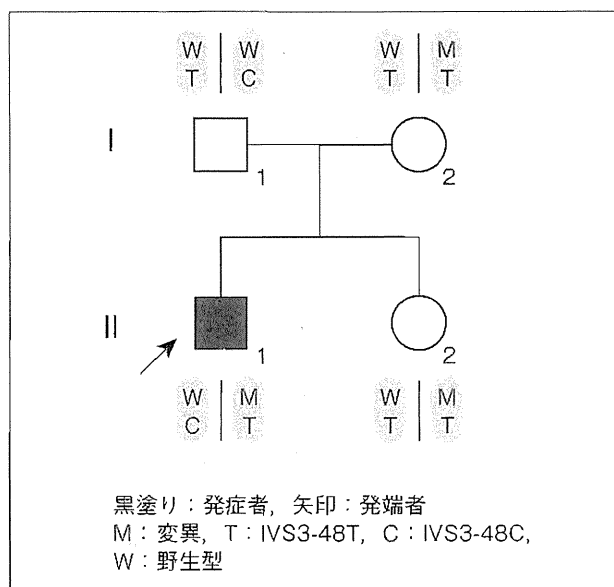


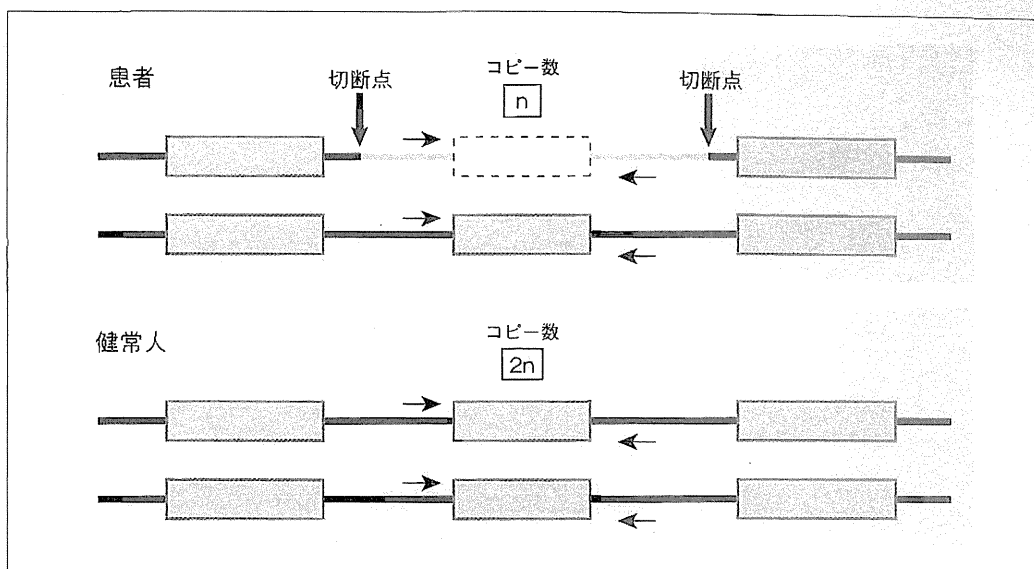
図2 IVS3-48C で発症が規定される EPP 家系
II-1 は *FECH* 遺伝子の一方のアリルに変異 M を有し、他方のアリルに遺伝子多型 C を有するので発症している。同じ変異 M を有する I-2 と II-2 は、他方のアリルの遺伝子多型が T であるので発症しない。

むずかしい。

もう一つの問題は、通常の PCR とシーケンスの組み合わせでは変異が検出できない EPP 症例が一定の割合で存在する点である。このような症例は、ヨーロッパからの報告では6家系に1つの割合でみられると報告されている⁶⁾。こうした症例ではゲノム DNA レベルでのエクソン単位での欠失が生じていることが明らかになっている(図3)。われわれの検索でも MLPA 法を用いたエクソンの定量的解析により、ゲノムレベルでのエ

図3 ゲノム DNA レベルでのエクソン欠失

患者 *FECH* 遺伝子の一方のアリルがイントロン内の切断点でエクソンおよびその近傍のイントロン部分を欠失している場合、通常の PCR では他方の健全なアリルが増幅されるので、シーケンスをしても一見欠失がないかのように判断される。定量的 PCR などを行えば、健康人のエクソンコピー数が $2n$ であるのに対して患者では n となり、欠失が判明する。



クソン欠失を同定しえた症例が存在した(未発表)。したがって、臨床診断で EPP が強く示唆されながらも *FECH* 変異が同定できない症例では、ゲノムレベルでの定量的解析を行う必要がある。

■ 異型ポルフィリン症 (variegate porphyria : VP)

VP は EPP に次いで報告が多い遺伝性皮膚ポルフィリン症である。常染色体性優性遺伝であり、プロトポルフィリノーゲン酸化酵素をコードする *PPOX* 遺伝子の変異により発症する。本症は病名が示すとおり、臨床症状が非定形的であり、急性間歇性ポルフィリン症と晩発性皮膚ポルフィリン症 (porphyria cutanea tarda : PCT) との混合型と理解されている。VP は青壮年期から光線過敏を生じるようになるが、光線過敏がごく軽微で自覚されない場合もあるため、遺伝子変異検索によって初めて診断が確定する症例も稀ではない。また、われわれの研究班では EPP や PCT など他のポルフィリン症を想定して検索を進めるうちに、*PPOX* 遺伝子の変異が明らかとなって VP と診断しえた症例を 3 例経験したため(未発表)、本病型においても遺伝子診断はきわめて有用であるといえる。

■ 遺伝性コプロポルフィリン症 (hereditary coproporphria : HCP)

HCP はコプロポルフィリノーゲン酸化酵素をコードする *CPOX* 遺伝子の変異で発症する、常染色体性優性遺伝のポルフィリン症である。過去の報告数は非常に少ないが、やはり他のポルフィリン症との鑑別の過程で遺

伝子診断によって確定診断された症例が存在するので、今後報告が増加すると考えられる。

■ 先天性骨髄性ポルフィリン症 (congenital erythropoietic porphyria : CEP)

CEP はウロポルフィリノーゲン合成酵素をコードする *UROS* 遺伝子の変異により発症する、常染色体劣性遺伝の非常に稀なポルフィリン症である。本症は出生後間もなく発症するので臨床診断はむずかしくないと思われるが、軽症例も存在し、その場合は遺伝子変異検索が診断の決め手となる。

■ おわりに

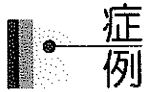
本邦における遺伝性皮膚ポルフィリン症の遺伝子診断はいまだ十分なされていないとはいえず、今後も解析例数を増やして臨床的に有益な情報がもたらされるよう引き続き努力したい。

文献

- 1) Gouya L et al: Nat Genet 30: 27, 2002
- 2) Gouya L et al: Am J Hum Genet 73: 2, 2006
- 3) Nakano H et al: J Invest Dermatol 126: 2717, 2006
- 4) 中野 創: 日皮会誌 119: 1225, 2009
- 5) Chen FP et al: Cell Mol Biol 48: 83, 2002
- 6) Whatley SD et al: J Invest Dermatol 127: 2790, 2007

中野 創 Nakano, Hajime

弘前大学大学院医学研究科 皮膚科学講座
〒036-8562 弘前市在府町 5
E-mail : hnakano@cc.hirosaki-u.ac.jp



フェロケラターゼ遺伝子解析により診断した 骨髄性プロトポルフィリン症

古市 恵* 牧野 輝彦* 松永 憲治*
中野 創** 澤村 大輔** 清水 忠道*

要 約

9歳, 男児。7歳頃より日光曝露後に顔, 手背などに紅斑, 腫脹を繰り返していた。赤血球中プロトポルフィリン高値, 光溶血現象陽性, 蛍光赤血球陽性。肝障害はなし。前腕の皮膚生検で基底膜と真皮上層血管にPAS染色陽性物質が沈着していた。フェロケラターゼ遺伝子解析でc.286C>Tのナンセンス変異とIVS3-48Cの遺伝子多型が同定され, 骨髄性プロトポルフィリン症と診断した。家系内の遺伝子解析で無症状の7歳の妹にも同様の変異が同定され, 赤血球中プロトポルフィリン高値であった。妹は無症状でありながら遺伝子検索により患児と判明し, 両症例とも日光曝露回避など予防的対策を速やかに講ずることが可能であった。

キーワード: 骨髄性プロトポルフィリン症, フェロケラターゼ遺伝子, 赤血球中プロトポルフィリン, 光線過敏

I. はじめに

ポルフィリン症はヘムを合成する代謝経路に関する酵素群のいずれかの活性が低下し, ポルフィリン中間代謝物が蓄積するために生じる代謝異常症である。骨髄性プロトポルフィリン症(erythropoietic protoporphyria, 以下EPP)はヘム合成経路の最後の酵素であるフェロケラターゼ(ferrochelatase, 以下FECH)の活性低下が原因で起こる。今回我々はEPPの男児の遺伝子解析によりFECH遺伝子に変異を同定し, さらにその家族の遺伝子解析を行うことにより, 無症状の妹にも同様の変異を見出しEPPと診断しえたため, 文献的考察を加えて報告する。

II. 症 例

患 者 9歳, 男児

主 訴 光線過敏症の疑い

家族歴 父に光線過敏症の疑い。母, 妹(7歳), 弟(5歳)に光線過敏なし。

既往歴 特記事項なし。

現病歴 乳幼児期には皮膚症状はなかった。7歳頃から山や海などに出かけた後, 顔や手背などの露光部に紅斑, 腫脹が出現するようになった。光線過敏症が疑われ精査加療のため当科を受診した。

現 症 頬部と手背, 前腕に淡い紅斑を認める。頬部には小癬痕がみられた(図1-a, b)。

* Megumi FURUICHI, Teruhiko MAKINO, Kenji MATSUNAGA & Tadamichi SHIMIZU, 富山大学大学院医学薬学研究部, 皮膚科学教室(主任: 清水忠道教授)

** Hajime NAKANO & Daisuke SAWAMURA, 弘前大学, 皮膚科学教室(主任: 澤村大輔教授)
別刷請求先 古市 恵: 富山大学大学院医学薬学研究部皮膚科(〒930-0194 富山市杉谷 2630)

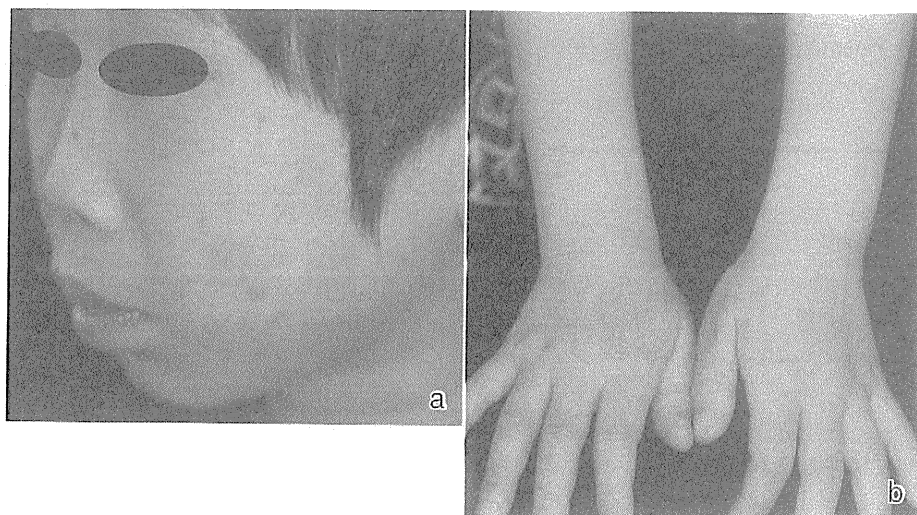


図1 臨床像

- a : 頬に淡い紅斑と小瘢痕がみられる。
b : 手背, 前腕に淡い紅斑を認める。

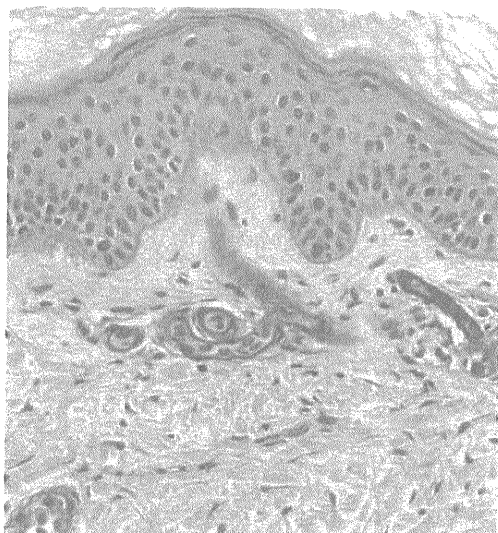


図2 病理組織像 (PAS 染色) : 基底膜と真皮上層血管にジアスターゼ抵抗性 PAS 染色陽性物質が沈着していた。

臨床検査所見 WBC 6730/mm³, RBC 454×10⁴/mm³, Hb 12.0 g/dl ↓, Ht 35.7%, Plt 24.1×10⁴/mm³, GOT 26 IU/l, GPT 18 IU/l, LDH 203 IU/l, ALP 706 IU/l, γ -GTP 12 IU/l。光溶血現象陽性, 蛍光赤血球陽性。赤血球中プロトポルフィリン 1796 μ g/dl ↑↑ (正常 30~86), 血中コプロポル

フィリン 5 μ g/dl ↑ (正常 1 以下), 血中ウロポルフィリン 1 μ g/d/RBC 以下, 尿中コプロポルフィリン 107 μ g/g · CRE, 尿中ウロポルフィリン 24 μ g/g · CRE, 便中プロトポルフィリン 1454 (正常 1500 以下)。光溶血現象および蛍光赤血球陽性。

光線過敏性試験 UVB 照射による最少紅斑量は正常範囲であった。また UVA, 可視光の照射でも紅斑は誘発されなかった。

病理組織学的所見 前腕の紅斑: 基底膜と真皮上層血管の肥厚がみられ, 同部位にジアスターゼ抵抗性 PAS 染色陽性物質が沈着していた (図 2)。

遺伝子解析 両親の同意のもと遺伝子解析を行ったところ, *FECH* 遺伝子に c.286C>T, p.R96X のナンセンス変異が同定された (図 3-a)。これは過去に報告されている変異と一致した¹⁾。さらにもう一方のアリルには IVS3-48C の遺伝子多型も認めた。家族の遺伝子解析で妹に患児と同様の遺伝子変異と遺伝子多型が同定された (図 3-b)。

診断と経過 以上の結果より EPP と診断した。また, 遺伝子変異が同定された患児の妹は現在無症状であるが, 採血検査で軽度の貧血と赤血球中プロトポルフィリンの著明な上昇 (4316 μ g/dl) を認め EPP と診断した。両者とも肝機能異常はみ

(a) Heterozygous c.286C>T, p.R96X

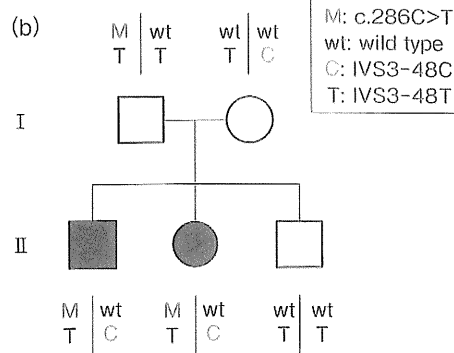
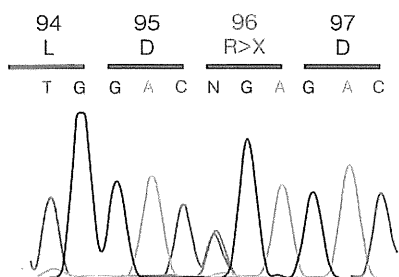


図3 遺伝子解析結果

- a : c. 286C>T, p. R96X のナンセンス変異が同定された。
b : 家系内の遺伝子解析で妹に患児と同様の遺伝子変異と遺伝子多型が同定された。

られていないが、遮光を徹底し、予防的にウルソデオキシコール酸内服、βカロテン内服を行っている。

Ⅲ. 考 案

EPP は先天性のポルフィリン症のなかでは最も多い病型である。ヘムを合成する代謝経路の最終段階において、プロトポルフィリンⅨ (PPIX) に鉄をキレートさせ、ヘムを形成する酵素である FECH の活性が低下することにより PPIX が骨髄造血系や皮膚などに蓄積するために生じる。日光曝露の機会が増える小児期以降に発症し、露光部に紅斑、小水疱、小瘢痕、皮膚肥厚などの皮膚症状を呈する。皮膚症状のみの場合には生命予後は良好であるが、重度の肝障害が併発し予後不良となることもある。

EPP は FECH をコードする *FECH* 遺伝子の異常により引き起こされる遺伝性疾患である。本遺伝子は第 18 番染色体の長腕 18q21.3 に局在し、11 のエクソンからなる。本邦ではこれまで自験例を含め 18 家系の遺伝子変異の報告があり²⁾その多くがミスセンス変異である³⁾。

本症は同じ遺伝子変異を有しながらも発症しない無症候性キャリアが存在することが知られており、これまで不完全な常染色体優性遺伝とされていたが、1996 年 Gouya ら⁴⁾が提唱した“low expression allele theory”によりその分子遺伝学的メカニズムが明らかとなった。この low expression

allele theory とは *FECH* 遺伝子の変異に加え、遺伝子変異を持たないアレルにおいても、何らかの原因により遺伝子発現が低下した場合に EPP が発症するというものである。この原因として *FECH* 遺伝子のイントロン 3 の遺伝子多型である IVS3-48T>C の存在が報告された⁵⁾。この遺伝子多型が存在すると、スプライシング異常を起して早期停止コドンを生じる頻度が高まり、その結果 FECH 量が低下する。また、この IVS3-48T>C の生じる頻度は人種間で異なり、白人で 11.3%であるのに対して、日本人では 43.3%⁶⁾から 45.2%⁷⁾と 4 倍以上高い。自験例では患児とその妹は父親由来の *FECH* 遺伝子変異 c.286C>T と母親由来の遺伝子多型 IVS3-48C を持つため EPP が発症したと考えられる。

EPP の予後に最も影響を与える因子として肝障害がある。EPP 全体の 5~10%に合併がみられ、致死率は 1%である⁸⁾。平林ら⁹⁾は 1990 年以降の EPP 患者 23 例を集計し、肝障害についての詳細な検討を行っている。それによると、幼少時の赤血球中プロトポルフィリン値と肝障害の合併との相関は比較的少なく、むしろ繰り返される日光曝露により加齢とともに肝障害が出現する傾向がみられる。したがって、早期からの遮光が重要であるとしている。また、ナンセンス変異やエクソン欠失など酵素活性がほとんど失われる変異を有する症例では肝障害の合併頻度が高く¹⁰⁾、注意が必要とも述べられている。自験例では兄妹とも肝臓

能異常はないものの、ナンセンス変異を有しており、遮光の徹底が必要と思われた。最後に、自験例の妹のように無症状の EPP であった場合、遺伝子解析による診断が早期からの遮光など予防的対策を講ずるうえで非常に有用であると考えられた。
(2010年8月25日受理)

文 献

1) Di Pierro E et al : Hum Genet, **114** : 608, 2004

- 2) Nakano H et al : Photomedicine and Photobiology, **31** : 1-2, 2009
- 3) 中野 創 : 日皮会誌, **119** : 1225-1230, 2009
- 4) Gouya L et al : Am J Hum Genet, **58** : 292-299, 1996
- 5) Gouya L et al : Nat Genet, **30** : 27-28, 2002
- 6) Gouya L et al : Am J Hum Genet, **78** : 2-14, 2006
- 7) Nakano H et al : J Invest Dermatol, **126** : 2717-2719, 2006
- 8) Todd DJ : Br J Dermatol, **131** : 751-766, 1994
- 9) 平林 香ほか : 西日本皮膚, **65** : 446-450, 2003
- 10) Schneider-Yin X et al : Eur J Pediatr, **159** : 719-725, 2000

症
例

遺伝子解析により診断した異型ポルフィリン症の1例

舩岡恵律子* 尾藤 利憲* 岡 昌宏* 中野 創** 錦織千佳子*

要 約

44歳，女性。30歳頃からの顔面，手指背など露光部の水疱を主訴に1999年5月に当科を受診。けいれん，腹痛発作等の合併はなく家族に類似症状はなかった。血中プロトポルフィリンが上昇し，皮膚以外に目立つ症状はなく骨髄性プロトポルフィリン症と診断され，遮光と対症療法で症状は安定していた。2009年12月の皮疹増悪時に，尿中コプロポルフィリン・ウロポルフィリンの上昇や発症年齢が遅いことから異型ポルフィリン症が疑われた。遺伝子検査でプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子に未報告の変異を認め，診断に至った。皮膚症状を主とするポルフィリン症の診断は困難なことがあり，遺伝子検査が有用であった。

キーワード：異型ポルフィリン症，プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子，骨髄性プロトポルフィリン症

I. はじめに

ポルフィリン症は，ヘム合成経路に関わる酵素の異常によりポルフィリン体およびその中間代謝産物が生体内に蓄積して発症する代謝異常症である。ヘムはヘモグロビン，ミオグロビンなどの構成成分として生体の重要な機能に利用されている。最近報告されたX連鎖性プロトポルフィリン症¹⁾も含めると，ポルフィリン症は障害される酵素の部位により8責任遺伝子，9病型に分類され，このうち7病型で皮膚症状が生じる。

異型ポルフィリン症 (variegate porphyria, 以下VP) はヘム合成経路7番目の酵素であるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protoporphyrinogen oxidase, 以下PPOX) の活性低下の結果生じる。ポルフィリン症の中では比較的まれで，本邦

では2002年までに54例(男女比10:44)が報告されている²⁾。今回，露光部の皮膚症状に軽度の神経症状を伴って発症し診断に苦慮したが，最終的にPPOX遺伝子変異の同定により診断したVPを経験したので報告する。

II. 症 例

患 者 44歳，女性 (2009年12月時)

初 診 1999年5月

家族歴 父に喉頭癌，胃癌，大腸癌。母に乳癌，胃痛。

既往歴 アレルギー性鼻炎，子宮筋腫

生活歴 アルコールは機会飲酒程度

現病歴 30歳頃から顔面に紅斑，手指背に水疱が生じるようになった。爪の脱落，手指の感覚低下，しびれ感も出現し，精査加療目的で33歳時

* Eriko MASUOKA, Toshinori BITO, Masahiro OKA & Chikako NISHIGORI, 神戸大学大学院医学研究科内科系講座，皮膚科学分野 (主任：錦織千佳子教授)

** Hajime NAKANO, 弘前大学，皮膚科学教室，准教授

別刷請求先 舩岡恵律子：神戸大学大学院医学研究科内科系講座皮膚科学分野 (〒650-0017 神戸市中央区楠町7-5-1)

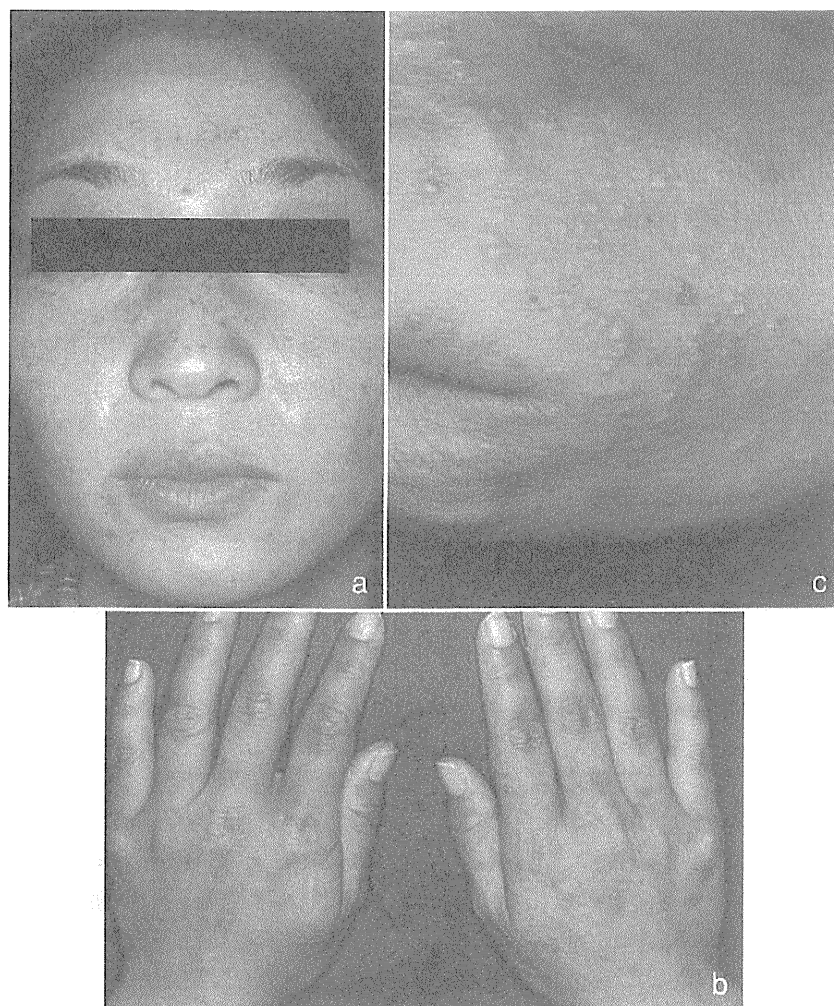


図1 初診時臨床像 (1999年5月)

- a : 前額部, 鼻背, 頬部にびまん性に紅斑と多数の半米粒大までの淡褐色もしくは褐色斑をみる。
b, c : 両手背に瘢痕を混じて粟粒大程の小水疱が多発。

に当科を受診した。脱力感, 痙攣, 腹痛発作ではなく, 家族に類似症状はなかった。赤血球中プロトポルフィリン (protoporphyrin, 以下 PP) が陽性であったことより骨髄性プロトポルフィリン症 (erythropoietic protoporphyria, 以下 EPP) と診断され, 遮光とステロイド軟膏外用で症状は安定し, 近医で経過観察されていた。2009年12月 (44歳) に子宮頸部前癌病変で婦人科を受診した際に皮疹が増悪し, 再び精査加療目的で当科を受診した。発症年齢や初診時の尿中コプロポルフィリン (coproporphyrin, 以下 CP) およびウロポル

フィリン (uroporphyrin, 以下 UP) の上昇, 赤血球中 PP 値の上昇が症状に比して軽度であるなど EPP に合致しない点があるため, 再度ポルフィリン体検査を実施するとともに, 遺伝子解析を行った。

現 症

1) 1999年5月: 前額部から鼻背, 頬部にびまん性の紅斑を認め, 多数の小褐色斑を伴っていた (図1-a)。両手背には小水疱と, 点状・線状の瘢痕が散在していた (図1-b, c)。

2) 2009年12月: 鼻背に小豆大までの血疱が



図2 再診時臨床像 (2009年12月): 手指関節部は肥厚し、皮膚萎縮も認める。指尖部背側には小びらんをみる。

散在し、前額部、頬部にはびまん性の青褐色の色素沈着をみる (巻頭クリニカラー1図, 173頁参照)。手指の皮膚に萎縮と小びらんをみる (図2)。

初診時病理組織学的所見 手指の水疱部: 基底膜部に裂隙形成を認める (図3-a)。PAS染色では水疱蓋にPAS陽性の基底膜を認め、真皮浅層の血管壁にもPAS陽性物質が軽度沈着する (図3-b)。

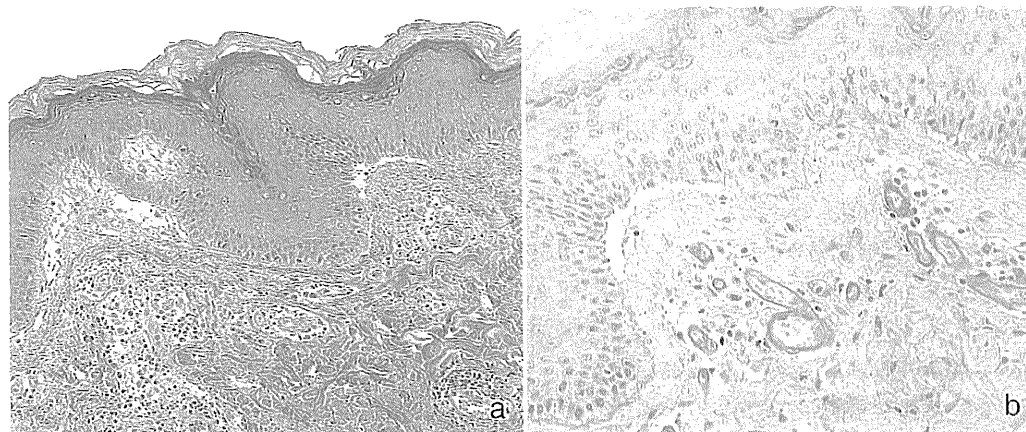


図3 初診時病理組織像 (手指水疱部)

a: HE染色; 基底膜部に裂隙を形成し、真皮浅層の血管周囲には炎症細胞が軽度浸潤する。
b: PAS染色; 真皮浅層の血管周囲にPAS陽性物質が沈着する。

初診時血液生化学検査 白血球の軽度上昇 (10400/mm³) 以外は、肝機能も含め明らかな異常はない。

初診時光線照射試験 UVA: 16.5 J/cm²で紅斑反応を呈する。UVB: 124mJ/cm²まで照射するも紅斑反応はなし。

ポルフィリン体検査

1) 1999年5月: 赤血球中 PP 99 μg/dl RBC (基準値 30~86), 尿中 CP 313 μg/gcr (8~168), UP 50 μg/gcr (2~25)

2) 2009年12月: 赤血球中 PP 130 μg/dl RBC,

3) 2010年5月: 糞便中 PP 13040 μg/24h (基準値 <1500 μg/24h), UPI 63 μg/24h (<120), UPIII 9 μg/24h (<50), 5カルボキシシロI 32 μg/24h (<20), 5カルボキシシロIII 35 μg/24h (<20), CP I 717 μg/24h (<500), CPIII 312 μg/24h (<400), イソコプロポルフィリン (isoCP) 1794 μg/24h (<200) (図4)

遺伝子検査 PPOX遺伝子にヘテロ変異 (exon6c 557_558delGT) を認める (図5)。フェロケラターゼ遺伝子には調べた限りにおいて変異はない。

経過 VPと診断し、遮光の継続、禁忌薬などの注意を喚起した。2010年6月、当院婦人科で子宮全摘手術を行う際、ポルフィリン症で安全と考えられているドロペリドールなどの薬物³⁾を用いて全身麻酔下に管理された。しかし、無影灯曝露

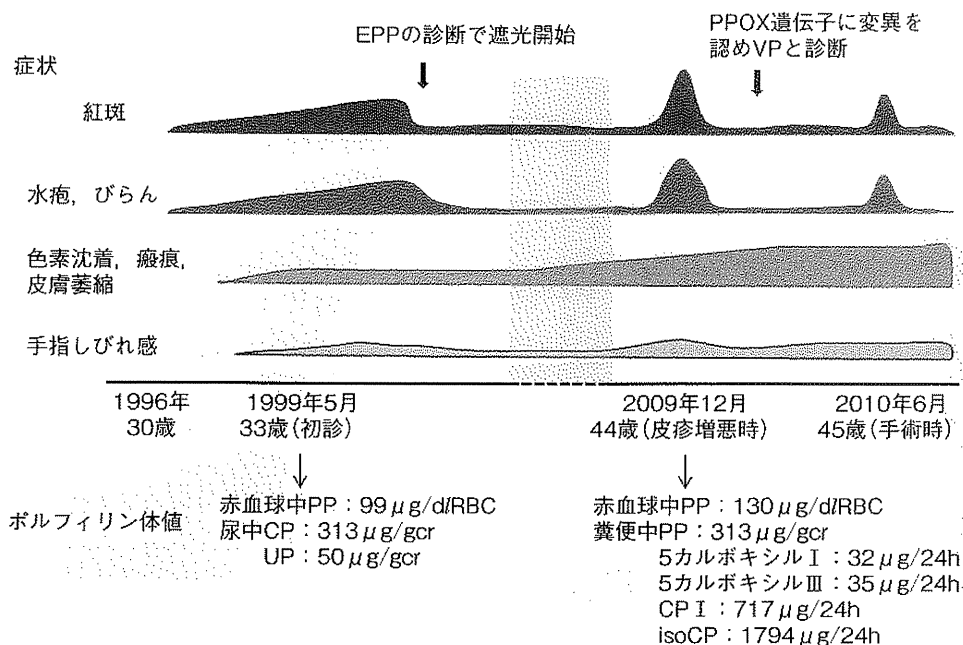


図4 経過とポルフィリン体検査所見

部である下腹部に一致して紅斑, びらんが生じた。皮疹は, 術後 13 日目には上皮化し, 色素沈着のみとなった (図 6)。

III. 考 察

VP は, 光線過敏を主体とする皮膚症状と急性の腹痛, 嘔吐, 下痢などの腹部症状や脱力発作, 知覚異常, 高血圧, けいれん, 精神症状などを併せ持つことが特徴である。急性症状は遺伝子異常による酵素異常に加え, 妊娠や飲酒, 手術侵襲, 飢餓, あるいはバルビタール等, 肝における主なヘム蛋白である CYP450 合成を誘発する薬剤使用などの誘因が加わり初めて発症する⁴⁾。症例により各症状の発現程度は異なり, 多彩な臨床像を示す。常染色体優性遺伝形式をとるが, その発症には後天的な要因も強く関与し無症候性キャリアの存在が知られている。多くはヘテロ接合体であり, 思春期から中年に発症する。

一方, EPP はヘム合成経路最終段階に関わるフェロケラターゼの異常により生じる常染色体優性遺伝性疾患である。日光曝露による浮腫性紅斑, 腫脹, 灼熱感などの急性反応を主体とする光線過敏症状の頻度が最も高いが, 貧血や肝障害を伴う

こともある。

VP の皮膚症状は小水疱やびらん, 癬痕, 脆弱化などが主であるが, これらは他の皮膚型ポルフィリン症でもみられ, 紅斑などの急性反応を呈する場合は EPP との鑑別は困難で, 生化学所見が診断上重要になる。VP は尿中 CP, 糞便中 PP・CP の上昇が特徴で, 急性症状出現時にはさらに尿中 UP, δ-アミノレブリン酸, ポルフォビリノーゲンも上昇することが多い⁵⁾。EPP では赤血球中 PP の上昇, 糞便中 PP の上昇を特徴とする³⁾。通常 VP では赤血球中 PP は上昇しないことが定説だが³⁾, 本例は赤血球中 PP が軽度上昇していた。それゆえ, 当初 EPP と診断されたが, EPP は思春期以前の発症が多く, 本例は成人以降の発症である点, 尿中 CP, UP の上昇, 軽度だが神経症状を認めた点が診断を見直すきっかけとなった。

ポルフィリン症の多くは臨床症状とともに生化学所見にも多様性があり, 病型診断に難渋することが少なくない。患者の協力が得られ, 状況が許すなら, 積極的な遺伝子解析をすべきと考える。VP の責任遺伝子である PPOX 遺伝子は染色体 1q22 に位置し, 1995 年に初めてクローニングさ

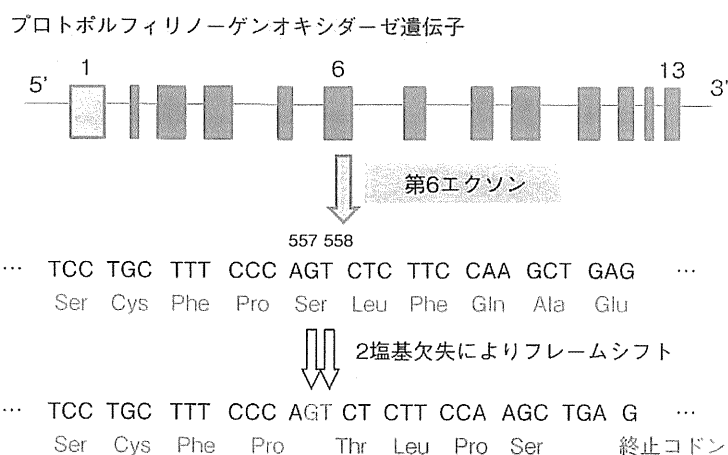


図5 本症例のPPOX遺伝子変異：エクソン6の557-558番目において2塩基欠失によりフレームシフトを生じる結果、その下流で終止コドンが生じている。

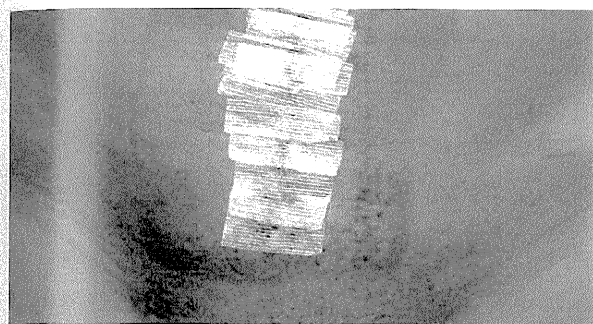


図6 無影灯曝露部位に生じた皮膚疹：発症後13日経過しているが、下腹部に境界明瞭な色素沈着とびらんの上皮化を認める。

れて以来⁶⁾、塩基の欠失や挿入など変異の種類、また変異の部位ともに多種の遺伝子変異が報告されており、これまでにThe Human Gene Mutation Database⁷⁾に報告された変異はおよそ150にのぼる。本例では第6エクソンに2塩基欠失によるフレームシフトと終止コドンが生じており、酵素活性に障害をもたらしていると推測される。この変異は過去に報告がなく、臨床症状との相関を検討する上でも貴重な症例と考えられる。ただし、Whatleyら⁸⁾は100人のVP患者を遺伝子変異型の種類により3群に分け、各々、皮膚症状のみ、急性症状のみ、両症状を有する群の3病型群に分類した結果、遺伝子変異型と臨床症状には相関性

がないと結論している。またRossettiら⁹⁾も、同じ遺伝子変異を持つ患者でも症状が異なることより、上記の説を支持している。しかし、いずれの報告も変異部位や、後天的要因を含めて十分に検討されておらず、遺伝子変異と臨床症状については、今後も症例を蓄積し検討すべき課題と考える。

ポルフィリン体は400nm付近の最大吸収波長と550~600nmにも小さな吸収波長を有する¹⁰⁾。そのため皮膚症状の予防にはサンスクリーン剤のみでは不十分で、物理的遮光が不可欠となる。本例では、約3時間の無影灯照射により皮膚疹が誘発された。EPP患者でも肝移植手術後にII度熱傷を生じた報告がある¹¹⁾¹²⁾。ポルフィリン体の主な吸収波長をカットする黄色フィルターの使用も試みられており¹³⁾、今後、ポルフィリン症患者の長時間手術には導入すべきであろう。

(2010年12月20日受理)

文献

- 1) Whatley SD et al: Am J Hum Genet, 83: 408-414, 2008
- 2) Kondo M et al: Int J Hematol, 79: 448-456, 2004
- 3) 矢野雄三, 近藤雅雄: 別冊日臨 領域別症候群 19: 123-135, 1998
- 4) 村上博和ほか: 日臨, 53: 1491-1497, 1995
- 5) Sassa S: Br J Haematol, 135: 281-292, 2006
- 6) Taketani S et al: Genomics, 29: 698-703, 1995
- 7) <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

- 8) Whatley SD et al : Am J Hum Genet, 65 : 984-994, 1999
9) Rossetti MV et al : BMC Med Genet, 9 : 54, 2008
10) 野中薫雄ほか : 日臨, 53 : 1449-1455, 1995
11) Herbert A et al : Gastroenterology, 100 : 1753-1757, 1991
12) Shehade SA et al : Clin Exp Dermatol, 16 : 185-187, 1991
13) Meerman L et al : Transplantation, 57 : 155-158, 1994

小児科

編集 福永 慶隆・河野 陽一・中西 敏雄・岡部 信彦・高橋 孝雄

4月増刊号
Vol.51 No.5
2010

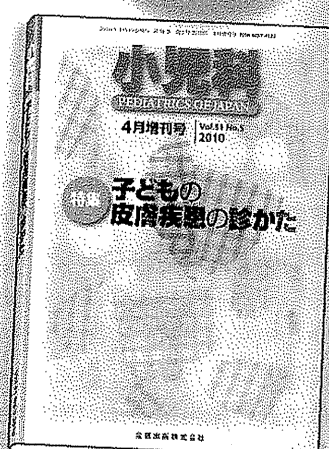
日常診療に役立つ、実践的テキスト!!
オールカラーでビジュアルに解説!!

特集 子どもの皮膚疾患の診かた

小児科診療において皮膚所見から得られる情報は非常に重要であり、小児科医が児を診察する時に、全身所見として皮膚の状態を見落とさないようにすることは診察の基本である。本書では、まず「I. 皮膚の基本」で小児科医が知らなくてはならない皮膚の生理的構造や機能、そして診断、治療法の基本をまとめ、「II. 小児皮膚疾患」で特徴的な皮膚病変部の写真と簡明な解説を執筆者にお願いした。「III. 検査法」、「IV. 知っておくと役立つ関連情報」も子どもの皮膚疾患を理解するのに大いに役立つ内容になっている。

読者対象 小児科医、皮膚科医 B5判 210頁 オールカラー 定価 7,350円(本体 7,000円+税5%) 2010・5

金原出版 〒113-8687 東京都文京区湯島2-31-14 TEL03-3811-7184(営業部直通) FAX03-3813-0288
振替 00130-1-191269 ホームページ <http://www.kanehara-shuppan.co.jp/>



Quinolone compounds enhance δ -aminolevulinic acid-induced accumulation of protoporphyrin IX and photosensitivity of tumour cells

Received September 10, 2010; accepted October 13, 2010; published online October 19, 2010

Yoshiko Ohgari¹, Yoshinobu Miyata¹,
Tuan Thanh Chau¹, Sakihito Kitajima¹,
Yasushi Adachi² and Shigeru Taketani^{1,3,*}

¹Department of Biotechnology Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585; ²1st Department of Pathology, Kansai Medical University, Moriguchi, Osaka 570-8506; and ³Department of Biotechnology, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585, Japan

*Shigeru Taketani, Insect Biomedical Center, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585, Japan. Tel: +81 75 724 7789, Fax: +81 75 724 7789, email: taketani@kit.ac.jp

Exogenous δ -aminolevulinic acid (ALA)-induced photodynamic therapy (PDT) has been used in the treatment of cancer. To obtain a high efficacy of ALA-PDT, we have screened various chemicals affecting ALA-induced accumulation of protoporphyrin in cancerous cells. When HeLa cells were treated with quinolone chemicals including enoxacin, ciprofloxacin or norfloxacin, the ALA-induced photodamage accompanied by the accumulation of protoporphyrin was stronger than that with ALA alone. Thus, quinolone compounds such as enoxacin, ciprofloxacin and norfloxacin enhanced ALA-induced photodamage. The increased ALA-induced photodamage in enoxacin-treated HeLa cells was decreased by haemin or ferric-nitritoltriacetate (Fe-NTA), suggesting that an increase in iron supply cancels the accumulation of protoporphyrin. On the other hand, the treatment of the cells with ALA plus an inhibitor of haem oxygenase, Sn-protoporphyrin, led to an increase in the photodamage and the accumulation of protoporphyrin compared with those upon treatment with ALA alone, indicating that the cessation of recycling of iron from haem augments the accumulation. The use of quinolones plus Sn-protoporphyrin strongly enhances ALA-induced photodamage. To examine the mechanisms involved in the increased accumulation of protoporphyrin, we incubated ferric chloride with an equivalent amount of quinolones. Iron–quinolone complexes with visible colours with a maximum at 450 nm were formed. The levels of iron-metabolizing proteins in enoxacin- or ciprofloxacin-treated cells changed, indicating that quinolones decrease iron utilization for haem biosynthesis. Hence, we now propose that the use of quinolones in combination with ALA may be an extremely effective approach for the treatment modalities for PDT of various tumour tissues in clinical practice.

Keywords: δ -aminolevulinic acid (ALA)/ciprofloxacin/enoxacin/PDT/photodamage/protoporphyrin/quinolones.

Abbreviations: ALA, δ -aminolevulinic acid; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FCS, fetal calf serum; Fe-NTA, ferric-nitritoltriacetate; HO, haem oxygenase; MTT, 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; PDT, photodynamic therapy; PVDF, poly(vinylidene difluoride); SDS-PAGE, sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis.

Photodynamic therapy (PDT) for cancer patients is widely used to treat non-melanoma skin tumours and preneoplastic skin lesions. PDT involves the activation of photosensitizer, which causes the release of singlet oxygen and other reactive oxygen species upon exposure to light, resulting in photodamage and subsequent tissue destruction (1). PDT is performed with ALA, which is converted to the active photosensitizer protoporphyrin IX within cells (2). In tumour cells, via the haem biosynthesis pathway, protoporphyrin is synthesized from a large amount of exogenous ALA and accumulates in a specific manner. The application of ALA following PDT treatment has been used in the treatment of skin diseases and has advantages over systemic administration in that the entire body does not face sensitization. ALA-induced PDT has been successfully applied in various medical fields including urology, gastroenterology and dermatology (3, 4). Although there are reports that ALA-induced PDT can also be used as a fluorescence detection marker for the photodiagnosis of tumours (5, 6), the mechanisms involved in the specific accumulation of protoporphyrin in cancerous tissues have not been clearly demonstrated. We previously reported that protoporphyrin accumulates owing to the limited capacity for ferrochelatase reaction (7, 8) where the enzyme catalyses the insertion of ferrous ions into protoporphyrin IX to form protohaem. Additionally, we also reported the increase in the uptake of ALA by cancerous cells (7).

The death rate from non-melanoma skin cancer is reduced compared with that from other kinds of malignancies, but both mortality and incidence are rising in tropical regions and owing to the thinner ozone layer (9). Nonmelanoma skin cancer is classified into two general groups. One is basal cell carcinoma and the

other is squamous cell carcinoma (10). Although many studies on PDT carried out over the past decade show efficiency in treating non-melanoma skin cancer and preneoplastic skin lesion, the results of ALA-PDT in the treatment of them appear to be inadequate (11). Since ALA-PDT alone seems to be relatively insufficient for the treatment of non-melanoma skin cancer and preneoplastic skin lesion, advanced treatment options are required to significantly improve the therapeutic effectiveness of ALA-PDT.

Quinolone chemicals are widely used as synthetic anti-bacterial agents to treat respiratory tract infection (12). They have a broad anti-bacterial spectrum of activity against Gram-positive and -negative bacteria. Anti-bacterial activities of quinolones are involved in their inhibitory activities against DNA gyrase and topoisomerase IV (13, 14). Both enzymes are members of the type II topoisomerase family that regulates bacterial DNA topology by passing a DNA double helix through another. In addition, the quinolones are used not only as anti-bacterial agents but also as an option for chemotherapy (15). During a study on enhancement of the phototoxic effect of ALA-induced photodamage, we tried to improve the sensitivity of ALA-PDT in cancerous cells by screening the increase in the accumulation of protoporphyrin, using many kinds of additional agents. We here report that quinolone agents including enoxacin and ciprofloxacin can enhance the accumulation of protoporphyrin as well as the photodamage in ALA-treated cancerous cells, and the importance of the recycling of iron from haem in cancerous cells upon ALA-induced photodamage is also shown.

Materials and Methods

Materials

Protoporphyrin IX and Sn-protoporphyrin were purchased from Frontier Scientific Co. (Logan, UT, USA). Enoxacin and lomefloxacin were products of Tokyo Kasei Chemicals (Tokyo, Japan) and Merck Biosciences (Darmstadt, Germany), respectively. Norfloxacin, and ciprofloxacin were from WAKO Chemicals (Tokyo). The antibodies for ferrochelatase and actin used were as previously described (7, 16). Anti-transferrin receptor-1 and ferritin were products of Santa Cruz Co. (Santa Cruz, CA, USA) and DAKO Ltd. (Glostrup, Denmark), respectively. All other chemicals used were of analytical grade.

Cell cultures

Human epithelial cervical cancer HeLa and epidermoid carcinoma A431 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 7% foetal calf serum (FCS) and antibiotics. The cells (1×10^5) in a 1.5-cm-diameter dish were then incubated in the absence or presence of ALA (0.5–1 mM) for 16 h before being exposed to light. Treatment of cells with quinolones was performed for 16–24 h, followed by the addition of ALA to the cell culture (7, 8).

Exposure of the cells to light

The cells were incubated with a specific concentration of ALA for 8–16 h, and 1.0 ml of fresh drug-free medium was then added. Irradiation with visible light was carried out under sterile conditions, using a fluorescence lamp, in a CO₂ incubator. The light was filtered through a glass plate to omit UV light and applied from the bottom of the plate to achieve uniform delivery to the entire plate. The increase of the temperature was confirmed to be <2°C by using a thermo-couple device during exposure to light. The power was calibrated with a power metre, and the period of irradiation was

adjusted to obtain fluences of 0.54 J/cm². Cell viability was measured by trypan-blue exclusion after trypsinization. The cell activity was also examined by 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. Each experiment was carried out in triplicate or quadruplicate. Controls were as follows: (i) cells exposed to ALA but not exposed to light (dark cytotoxicity), (ii) cells untreated with ALA but exposed to light and (iii) cells exposed to neither ALA nor light. Cell viability (cell survival) was expressed as a percentage of control cells. Porphyrins were extracted from the cells with 96% ethanol containing 0.5 M HCl (7). The amount of protoporphyrin was determined by fluorescence spectrophotometry, as previously described (7, 17).

Immunoblotting

The lysates from HeLa cells were subjected to sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electroblotted onto poly(vinylidene difluoride) (PVDF) membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Immunoblotting was carried out with antibodies for ferrochelatase, ferritin and transferrin receptor-1 as the primary antibodies (8).

Absorption spectra

Ferric chloride (100 μM) was incubated with quinolones (100 μM). Absorption spectra of iron-quinolone complexes were measured using a JASCO V-530 spectrophotometer (Tokyo).

Statistics

Two-sample *t*-tests were used to compare the amount of protoporphyrin and photosensitivity between treated and untreated controls. Comparison of data from different treatment groups was conducted using 1-way analysis of variance (ANOVA). Analysis was performed using Microsoft Excel 2003 software.

Results

Quinolones enhances ALA-induced photodamage

We (7, 8) have previously shown that the ALA-induced accumulation of protoporphyrin is inversely related to the level of ferrochelatase. To obtain a high efficacy of ALA-PDT, the various chemicals affecting the ALA-induced accumulation of protoporphyrin were screened using HeLa cells. The fluorescence pattern with ethanol extracts of the cells treated with 1 mM ALA for 16 h showed a maximum peak at 637 nm with excitation at 400 nm, which was consistent with that of standard protoporphyrin. First, effects of quinolone chemicals, including enoxacin and ciprofloxacin, on the ALA-induced accumulation of protoporphyrin were examined. As shown in Fig. 1A, enoxacin, ciprofloxacin and norfloxacin increased the accumulation of protoporphyrin by incubation of HeLa cells with ALA, in a dose-dependent manner. In the absence of ALA, no accumulation of protoporphyrin in enoxacin- or ciprofloxacin-treated cells was observed. When pre-incubation of cells with enoxacin was carried out, the accumulation increased by 1.4- and 1.9-fold with 16 and 24 h incubation, respectively (Fig. 1B). The pre-treatment with ciprofloxacin, norfloxacin or lomefloxacin was also effective for the accumulation. The growth of cells did not change by the treatment with 100 μM quinolone compounds for 48 h (data not shown). When a concentration of >200 μM these quinolones was used, the accumulation of protoporphyrin gradually declined due to cytotoxicity. To evaluate the effect of enoxacin on ALA-induced photosensitivity of HeLa cells, they were treated with 1 mM ALA for 16 h and then exposed to visible light. The viability of the cells pre-treated with ALA plus 50 and 100 μM

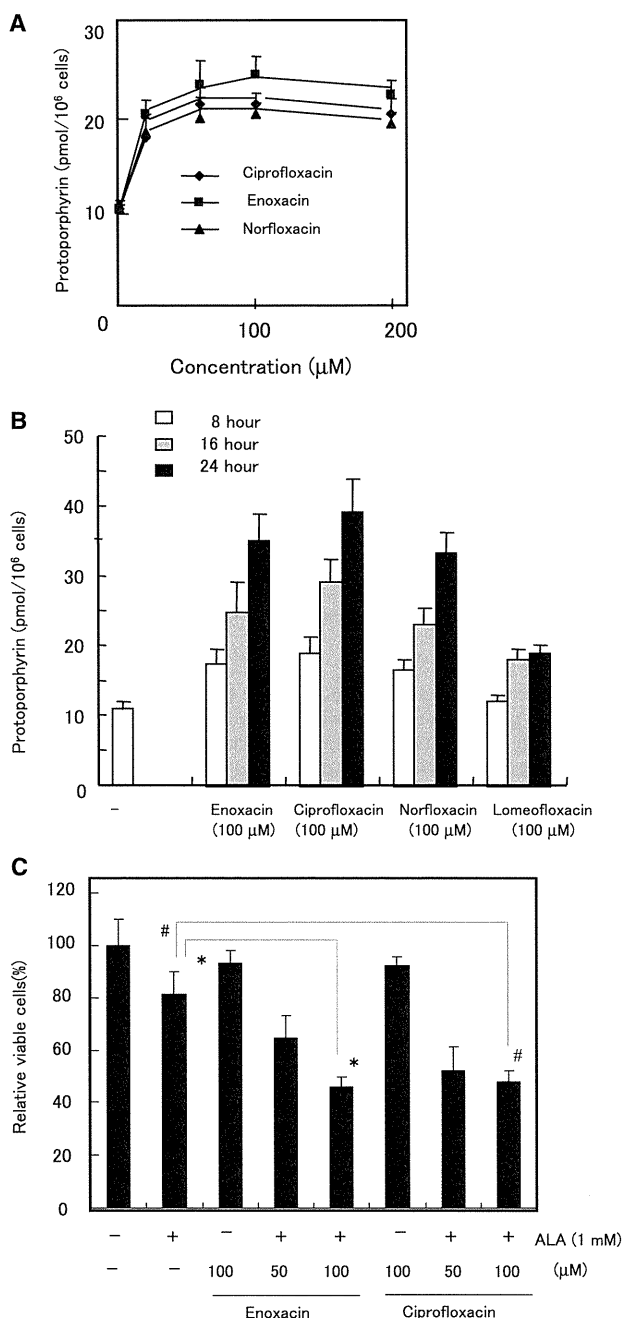


Fig. 1 The increase by quinolone compounds of the accumulation of protoporphyrin and photosensitivity in ALA-treated HeLa cells. (A) Effect of quinolones on the ALA-induced accumulation of protoporphyrin. HeLa cells were incubated with 1 mM ALA plus the indicated concentration of enoxacin, ciprofloxacin or norfloxacin for 16 h. Porphyrin was extracted from the cells and measured using a fluorospectrophotometer. (B) Effect of pre-treatment. HeLa cells were pre-treated with quinolone compounds (100 μM) for the indicated period, and changed to a fresh medium with 1 mM ALA, followed by incubation for 16 h. The concentration of protoporphyrin was determined. (C) Effect of quinolones on ALA-induced photodamage. The cells pre-treated with the indicated concentration of enoxacin or ciprofloxacin for 24 h were incubated without or with 1 mM ALA for 16 h, and then exposed to visible light. Light dose = $0.54 \text{ J}/\text{cm}^2$. After trypsinization, the living cells were counted. More than 500 living cells without any treatment were counted. The data are expressed as the average \pm SEM for three to four experiments. Two-sample *t*-test was carried out: * $P < 0.005$ and # $P < 0.005$ versus ALA alone.

enoxacin decreased to 62 and 43%, respectively, which were significantly different compared with that with ALA alone (78%) (Fig. 1C). Ciprofloxacin was also effective for the photodamage. When the cells treated with enoxacin or ciprofloxacin alone were exposed to light, virtually no cell death was observed. No cell death of ALA-treated cells was also observed without exposure to light. In separate experiments, when A431 cells were pre-treated with 100 μM enoxacin, ciprofloxacin or norfloxacin for 24 h, the ALA-induced photodamage was stronger than that with ALA alone (Fig. 2A). In parallel, the ALA-induced accumulation of protoporphyrin in quinolone-treated cells was higher than that in control cells (Fig. 2B). Thus, quinolone compounds such as enoxacin, ciprofloxacin and norfloxacin facilitate ALA-induced photodamage.

The inhibitory effect of haemin and Fe-NTA on ALA-PDT

Figure 3A shows the decrease of the ALA-induced accumulation of protoporphyrin in haemin-treated HeLa cells, suggesting that iron from haem can be reused as the substrate of the ferrochelatase reaction. The addition of Fe-NTA also led to a decrease of the

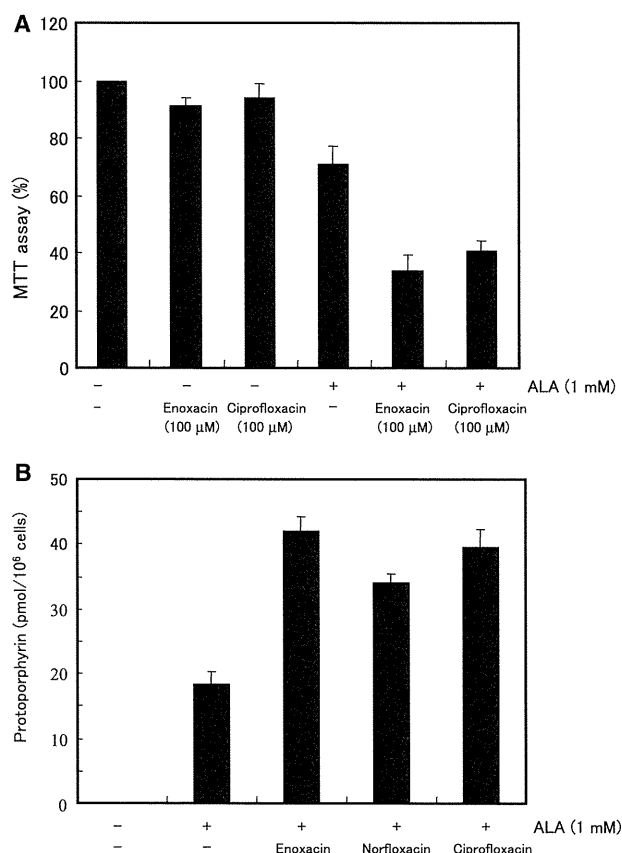


Fig. 2 The increase by enoxacin, norfloxacin or ciprofloxacin of the accumulation of protoporphyrin and photodamage in ALA-treated A431 cells. (A) Treatment of A431 cells with indicated quinolone chemicals (100 μM), in combination with 1 mM ALA. The cells as above were irradiated, and survival of the cells was analysed by the MTT assay. The data are expressed as the average \pm SEM for at least three independent experiments. (B) The concentration of protoporphyrin in the cells was determined, similar to those shown in the legend of Fig. 1.

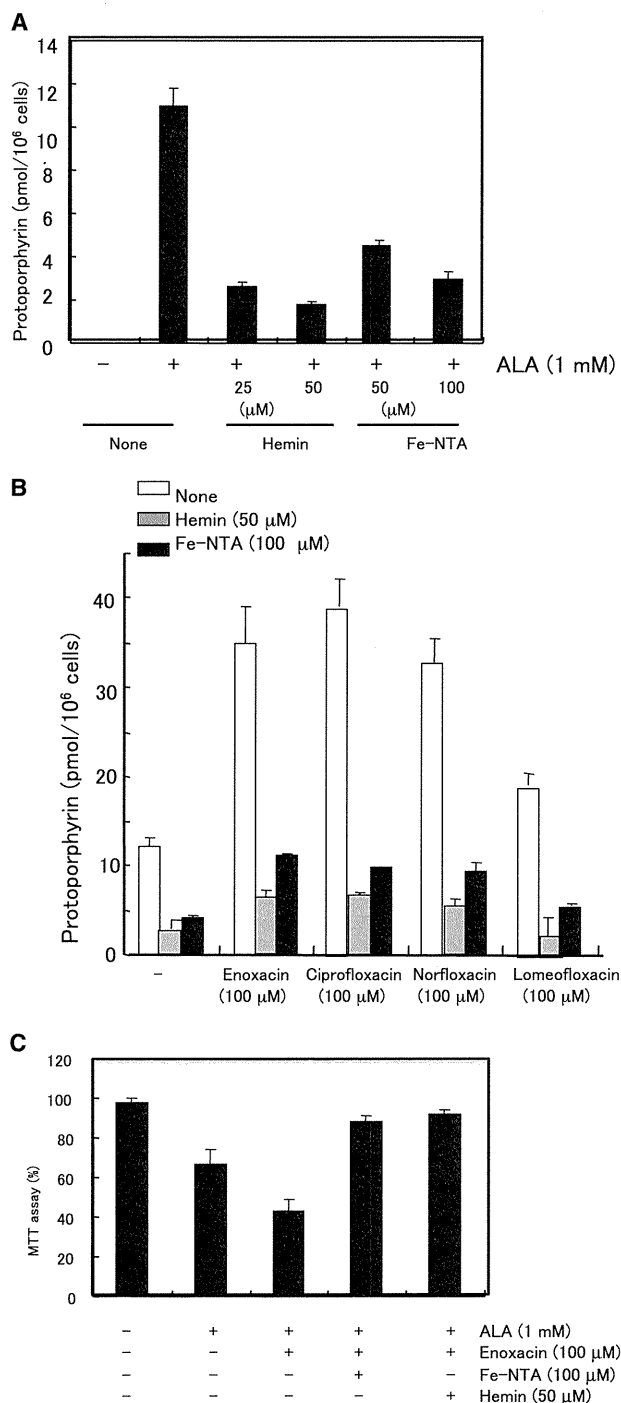


Fig. 3 Effect of haemin and Fe-NTA on ALA-induced accumulation of protoporphyrin and photodamage. (A) The inhibitory effect of haemin and Fe-NTA on the ALA-induced accumulation of protoporphyrin. HeLa cells were incubated with 1 mM ALA plus the indicated concentration of haemin and Fe-NTA for 16 h. Porphyrin was extracted from the cells and measured using a fluorospectrophotometer. (B) Effect of haemin and Fe-NTA on the quinolone-dependent increased accumulation of protoporphyrin. HeLa cells were pre-treated with the indicated concentration of quinolones for 24 h, and then incubated with 1 mM ALA, in combination with haemin or Fe-NTA for 16 h. The accumulated protoporphyrin was measured. (C) Effect of haemin, Fe-NTA and enoxacin on ALA-induced photodamage. The cells pre-treated with enoxacin plus haemin or Fe-NTA as above were irradiated, and survival of the cells was analysed by the MTT assay.

accumulation of protoporphyrin. These results suggest that iron supply for the ferrochelatase reaction is limited in cancerous cells. Then, we examined the effect of haemin or Fe-NTA on the increased accumulation of protoporphyrin by quinolones. As shown in Fig. 3B, enoxacin-, ciprofloxacin-, norfloxacin and lomefloxacin-dependent increases in the accumulation of protoporphyrin were cancelled by the treatment with haemin or Fe-NTA. To evaluate the inhibitory effect of haemin on photosensitivity, the cells treated with enoxacin and haemin were exposed to light. The ALA-induced photodamage in enoxacin-pre-treated HeLa cells was decreased by 50 μM haemin (Fig. 3C). Fe-NTA (100 μM) also reduced the rate of cell death.

Synergistic effect of Sn-protoporphyrin and quinolones on ALA-induced photodamage

We next examined the effect of Sn-protoporphyrin, an inhibitor of haem oxygenase (HO), on ALA-induced accumulation of protoporphyrin. The accumulation was markedly increased in 20 μM Sn-protoporphyrin-treated A431 cells, while the increase was cancelled by co-incubation with 100 μM Fe-NTA and 20 μM Sn-protoporphyrin (Fig. 4A). The addition of 50 μM haemin or 50 μg/ml myoglobin diminished the accumulation in Sn-protoporphyrin-treated cells (Fig. 4A). These results indicated that degradation of haem by HO and subsequent utilization of the released iron for the ferrochelatase reaction contributes to the reduction of the accumulation of protoporphyrin. The photodamage was then evaluated using Sn-protoporphyrin-treated cells. As shown in Fig. 4B, the cell death of Sn-protoporphyrin- and ALA-treated cells was severer than that of ALA-treated cells. Treatment with haemin or Fe-NTA in combination with Sn-protoporphyrin resulted in less photosensitivity. Conversely, pre-treatment of A431 with enoxacin or ciprofloxacin, followed by the treatment with Sn-protoporphyrin and ALA for 16 h led to a marked increase in the photodamage and accumulation of protoporphyrin, as compared with those upon pre-treatment with quinolones alone or treatment with Sn-protoporphyrin alone (Fig. 4C and D). Thus, the use of quinolones plus Sn-protoporphyrin strongly enhances ALA-induced photodamage.

Iron-chelating activity of quinolones

We finally examined the mechanisms involved in the increase in the ALA-induced accumulation of protoporphyrin by quinolones. Figure 5A shows absorption spectra of the iron-quinolone complexes formed by incubation of ferric chloride with an equivalent amount of enoxacin, ciprofloxacin and norfloxacin. Iron-quinolone complexes with visible colours with a maximum at 450 nm were formed, indicating that quinolones function as iron-chelators (18). Therefore, to examine changes of cellular metabolism upon quinolone treatments, the levels of iron-metabolizing proteins in enoxacin- or ciprofloxacin-treated cells were analysed by immunoblotting. The level of transferrin receptor-1 in enoxacin- or ciprofloxacin-treated HeLa cells increased compared with that of untreated cells, while ferritin in quinolone-treated cells slightly

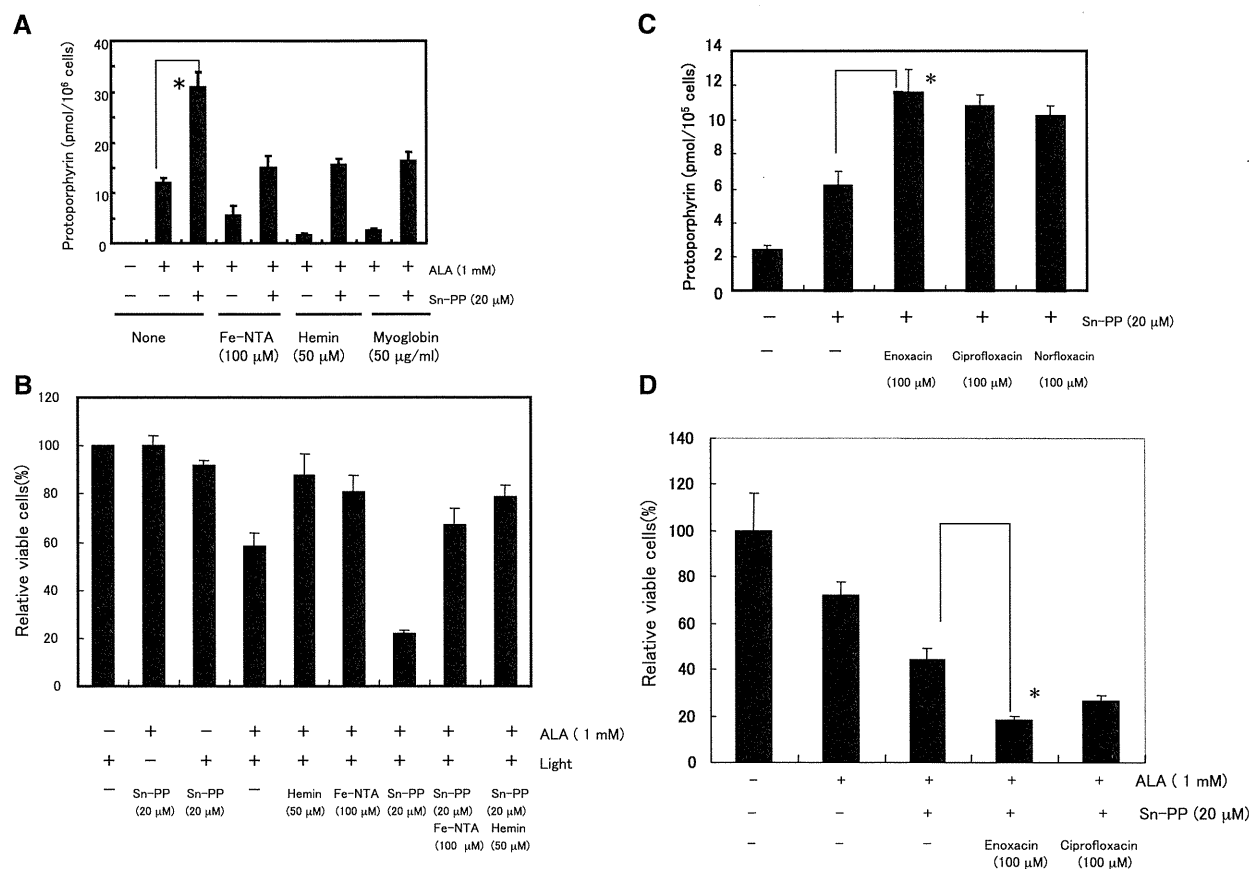


Fig. 4 Effect of Sn-protoporphyrin and quinolone chemicals on ALA-induced accumulation of protoporphyrin and photodamage. (A) Effect of Sn-protoporphyrin on the accumulation of protoporphyrin. A431 cells were incubated with 1 mM ALA in the absence or presence of 20 μM Sn-protoporphyrin (Sn-PP) for 16 h. The indicated cells were simultaneously incubated without or with Fe-NTA, haemin or myoglobin. The concentration of protoporphyrin in the cells was determined. The data are expressed as the average \pm SEM for at least three independent experiments. * $P < 0.01$. (B) The photosensitivity of the cells. The cells treated as above were exposed to light and the living cells were determined by counting living cells, using trypane blue. More than 500 living cells were counted in control. (C) Effect of quinolones and Sn-protoporphyrin on the accumulation of protoporphyrin. A431 cells were pre-treated with 100 μM enoxacin, 100 μM ciprofloxacin or 100 μM norfloxacin for 24 h, and were incubated with 1 mM ALA in the absence or presence of 20 μM Sn-protoporphyrin (Sn-PP) for 16 h. Protoporphyrin in the cells was examined. The data are expressed as the average \pm SEM for three to four independent experiments. * $P < 0.005$. (D) The photosensitivity of the cells. The living cells upon exposure to light were measured by the trypane-blue exclusion method. * $P < 0.01$.

decreased (Fig. 5B). Since the expression of these proteins changes in a manner dependent on the intracellular level of iron (19), quinolones decrease iron utilization in cells. In contrast, virtually no change in the level of ferrochelatase in enoxacin-treated cells was observed although the expression of ferrochelatase was low by the treatment with iron-chelators (20), indicating that iron chelation with enoxacin or ciprofloxacin was weak.

Discussion

Since cancer development and progression are highly complex, it is evident that often no single therapeutic modality can be curative. Understanding the cellular and molecular events contributing to PDT-induced apoptosis and recovery from cell death leads to the development of more sophisticated approaches to drug design and therapy. A new molecular-based therapeutics including multiple regimens is more likely to eradicate malignant tissues. The present study first demonstrated that anti-bacterial drugs, quinolones, could enhance the ALA-induced photosensitivity of

two kinds of human cancer cells. The effect of quinolones was also seen with colon cancer Colo201 and breast cancer MCF-7 cells. Results based on chemical extraction of porphyrin from cells confirmed the increased production of protoporphyrin upon treatment with quinolones including enoxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and lomefloxacin, followed by incubation with ALA. In the absence of exogenously added ALA, neither photodamage nor the accumulation of protoporphyrin was observed even with quinolone-treated cells. The concentration of quinolones up to 100 μM used in this study neither affected cell growth nor showed cytotoxicity. Thus, the treatment of tumour cells with quinolones can enhance efficacy of ALA-induced photodamage.

We (7) previously reported that desferrioxamine, an iron-chelator, markedly enhanced ALA-induced photosensitivity *in vitro*. Quinolones act as chelating agents with metal ions such as calcium and magnesium (21, 22). We showed the formation of enoxacin-, norfloxacin- and ciprofloxacin-iron complexes by determining absorption spectra (Fig. 5A), indicating that chelation of iron with quinolones occurred. This