脳腫瘍に対する光線力学的治療の実験的検討
—新しい光増感剤(PH-1126)の有用性について—

Photodynamic therapy using a new
photosensitizer, PH-1126

野倉宏晃, 村川孝次, 坂井 昇, 山田 弘, 會沢勝夫*

Hiroaki Nokura, Takatsugu Murakawa, Noboru Sakai,
Hiromu Yamada and Katsuo Aizawa*

岐阜大学脳神経外科
東京医科大学生理学*

Department of Neurosurgery, Gifu University
Department of Physiology, Tokyo Medical College*

The effect of photodynamic therapy(PDT) using argon-pumped dye laser on new photosensitizer, PH-1126 (amine in the d-ring of pheophorbide, Hamari Chemical Co. Ltd. Osaka) on T9 glioma, was investigated.

T9 cells, in vitro, were incubated independently with HpD and PH-1126, and irradiated. Using $1\mu\text{g/ml}$ of PH-1126, 100% cell death needed for 34J/cm^2 . PDT with PH-1126 was more favorable than that with HpD in tumoricidal effect.

Rat brain tumor, in vivo, was established by implanting T9 cells in Fischer 344 male rat. PDT was carried out 24hours after administration of 10mg/kg PH-1126 with craniotomy, in which the tip of an optical fiber was contact with the tumor surface. Histologically, the depth of tumor necrosis was 3.7mm at 30joules, 5.3mm at 60joules, and 6.4mm at 120joules.

It is suggested that PH-1126 is one of useful photosensitizers for treatment of brain tumors.

I. はじめに

悪性脳腫瘍は局所再発を繰り返し平均生存期間は、2年以内であることが多い。それゆえ徹底的な局所療法が望まれている。光線力学的治療(PDT)は悪性組織に特異的に集積する光増感剤に適した光を照射し、その感受性を利用し選択的に悪性組織を破壊する局所療法である。最近、脳腫瘍にも応用されているが、従来のHematoporphyrin derivatives (HpD)より優れた光増感剤の開発が望まれる。最近開発されたHpDより長波長側に吸収帯を持つフェオフォルバイド誘導体¹⁾(PH-1126)(Fig. 1, 2)はラット脳腫瘍(T9)に集積し、正常脳実質には認められないことがわれわれの実験結果から判明した。今回われわれは、PH-1126を用いたPDT実験をrat脳腫瘍に行いその有効性の検討を行った。

II. 方法および結果

実験腫瘍はN-methylnitrosourea誘発 rat gliosarcoma T9で、RPMI-1640 mediumに16% fetal bovin serumを加えた培地で継代培養した。

実験動物は5-6週齢のFischer 344雄ratを用い、脳腫瘍はT9細胞 5×10^5 個をハミルトン注射器にてrat右頭頂葉内に刺入移植して作成した²⁾。

Laser systemはArgon laserがCoherent社製Inova 90でDye laserが同社製CR 599で色素DCMを用いて波長を630と650nmに変換して使用した。laser光は直径400 μ のoptical fiberにて導出し照射した。出力はfiber先端で測定した。

PH-1126*はpolyethylene glycolにて溶解し、生理食塩水を加え振盪混和して使用した。

1) in vitro 実験

PH-1126を培養液にて希釈し、37℃ 5% CO₂ 気相下暗所にてT9細胞と2時間混合培養した。RPMI mediumにて2回洗浄後、マルチウエルプレートに分注した。room air 37℃のincubator内で波長650nmのlaser光を液面より5cm上から照射し、経時的にトリパンブルーによるdye exclusion methodにて殺細胞効果を検討し、% cell viabilityで表した。HpDも同様に630nmでPDTを行った(Fig. 3)。

Vanox蛍光顕微鏡を用い400nm励起, cut filter 600nmでの培養細胞の観察では、細胞は核を除い

Fig. 1. Structure of PH-1126

Fig. 2. Absorption spectra of photosensitizers

Fig. 3.

※ PH-1126: 浜理薬品工業株式会社提供

た均一な蛍光を発しており、培養腫瘍細胞がPH-1126を取り込んでいると考えられた(Fig. 4)。

PH-1126 $1\mu\text{g/ml}$ でレーザー先端出力を50 mW(液面: $28\text{mW}/\text{cm}^2/\text{sec}$), 100 mW($56\text{mW}/\text{cm}^2/\text{sec}$), 200 mW($112\text{mW}/\text{cm}^2/\text{sec}$)にした結果である。PH-1126 単独では殺細胞効果を2時間までは認めなかった。100% cell deathには50 mWで30分, 100 mWで10分, 200 mWで5分であり, $30\text{J}/\text{cm}^2$ では腫瘍細胞は死滅した(Fig. 5)。

レーザー出力を200 mW(液面: $112\text{mW}/\text{cm}^2/\text{sec}$)にし, PH-1126を0.1, 1, $10\mu\text{g/ml}$ にした結果である。殺細胞効果は薬剤濃度に相関しており, 100% cell deathには $0.1\mu\text{g/ml}$ で20分($136\text{J}/\text{cm}^2$), $1\mu\text{g/ml}$ で5分($34\text{J}/\text{cm}^2$), $10\mu\text{g/ml}$ で1分($7\text{J}/\text{cm}^2$)であった。腫瘍細胞の変化は細胞壁の破壊を思わせる細胞の膨化を示した。HpDとの比較では, $10\mu\text{g/ml}$ 濃度で200 mW照射では100% cell deathはHpDでは90分($630\text{J}/\text{cm}^2$), PH-1126は1分($7\text{J}/\text{cm}^2$)と強力な殺細胞効果を認めた(Fig. 6)。

2) in vivo 実験

T9移植後9日に, 2, 5, 10mg/kg のPH-1126をrat尾静脈からone shotで投与し, 暗所にて飼育した。投与後24時間で 25mg/kg のpentobarbital麻酔下に開頭し, corticotomyを行い腫瘍を露出し, optical fiberにて導出したレーザー光を腫瘍表面に接触照射した。照射中は腫瘍表面に生理食塩水を滴下し腫瘍の乾燥と温度上昇を防止した。その後48時間でpentobarbital大量投与により屠殺し, 10%ホルマリン固定後, H. E. 染色を行い腫瘍に対する効果を組織学的に検討した。

PDTによりレーザー照射に一致した腫瘍壊死を認めた。壊死周囲には影響を受けなかった腫瘍が認められ, 腫瘍周囲の正常部脳には変化がなかった(Fig. 7)。PDTによる腫瘍の変化は核濃染・細胞質の変性であり, 腫瘍血管の拡張・血栓形成を腫瘍壊死部に認めた(Fig. 8)。また, 壊死周囲に小細胞浸潤を認めた。腫瘍出血は認めなかった。PDT後24時間以内に屠殺したものでは腫瘍の血管拡張を認めたが腫瘍細胞の変性は認めず, PH-1126のPDT効果には腫瘍の血管障害も関与していると考えられた。また, レーザー単独, 薬剤単独では腫瘍変性を認めなかった。

Fig. 4. Fluorescence photomicrograph of T9 cells for 2 hours of incubation time.

Fig. 5. The survival cell rate in the relationship between laser power and irradiation time.

Fig. 6. The survival cell rate in the relationship between drug concentration and laser irradiation time.

腫瘍壊死を認めた最深部から腫瘍表面までの距離を腫瘍壊死深達度とし、PH-1126 投与量とレーザー出力との関係をみた。レーザー出力は腫瘍接触照射のため total dose で表した。10mg/kg 投与では 15 J で 3.5mm, 30 J で 3.7mm, 60 J で 5.3mm, 120 J で 6.4mm まで腫瘍壊死を認め、レーザー出力 60 joules では 2mg/kg で 3.2mm, 5mg/kg で 3.7mm, 10mg/kg で 5.3mm と薬剤投与量・レーザー強度に相関した腫瘍壊死を認めた (Fig. 9)。

Ⅲ. 考 察

photosensitizer は PDT 効果を決定する重要な因子である。従来使用されていた HpD は組織深達性の良い 600 nm 以上の光では励起が充分でなく、種々の新しい photosensitizer が研究開発されている。今回、われわれが用いた PH-1126 は 650nm 付近に HpD より大きな吸収帯を持ち、HpD の 630 nm 光より組織深達性が良好であるため、その効果が期待できる。in vitro 実験では殺細胞効果は薬剤濃度とレーザー強度に比例していた。HpD を用いた PDT より優れた殺細胞効果を示した。以前のわれわれが行った HpD を用いた PDT での腫瘍壊死深達度は 10mg/kg, 200mW 10 分で 3mm 程度であり、PH-1126 では約 6mm であることより、PH-1126 は HpD より有用であることが示唆された。PH-1126 を用いた PDT の腫瘍に対する効果は直接作用のほかに、24 時間以内の腫瘍は腫瘍血管の拡張のみを認め、腫瘍細胞の変化を認めず、腫瘍血管の破綻による出血を認めないことより腫瘍血管性梗塞による腫瘍の虚血変化も示唆された。今回の実験は腫瘍を冷却し、PDT のみの効果をみたもので、今後は温熱効果を加えより効果的な PDT の検討も必要と思われる。

Ⅳ. 結 語

- 1) PH-1126 を用いた PDT を rat glioma T9 に対して in vitro, in vivo にて行った。
- 2) in vitro において殺細胞効果は、薬剤濃度・レーザー強度に比例していた。
- 3) in vitro における殺細胞効果は HpD より強力であった。
- 4) in vivo において腫瘍壊死深達度は薬剤投与量・レーザー強度に依存していた。
- 5) 脳腫瘍に対する PDT に PH-1126 は有用であることが示唆された。

Fig. 7.

Fig. 8. Microphotography of the rat brain bearing T9 tumor. 48 hours after PDT with 10mg/kg of PH-1126 and 60 joules of laser; H.E. stain.

Depth of Tumor Necrosis (mm) (N=3)

PH-1126 (mg/kg)	LASER POWER (J)			
	15	30	60	120
2	2.9	3.2	3.2	5.0
5	3.4	3.0	3.7	5.2
10	3.5	3.7	5.3	6.4

Fig. 9 The depth of tumor necrosis in animal treated.

文 献

- 1) 會沢勝夫他：新しい光感受性物質、PH-1126 の組織集積性と抗腫瘍効果。日本レーザー医学会誌 9(3)：339-342, 1988
- 2) 野倉宏晃他：ラット脳腫瘍に対する PDT の深達度の検討。日本レーザー医学会誌 9(3)：295-297, 1988