光線力学と温熱合併療法の基礎的研究

松本順雄^{1,4}、三好憲雄²、斎藤 等¹、石原聖也³、久住治男⁵、福田 優²

福井医大耳鼻咽喉科¹、同第一病理²、浜理薬品³

三国病院耳鼻咽喉科⁴、金沢大学医学部泌尿器科⁵

A Basic Study of Combination Effect of Photodynamic Therapy
and Microwave Hyperthermia

Nobuo Matsumoto^{1,4}, Norio Miyoshi², Hitoshi Saito¹,
Masaya Ishihara³, Haruo Hisazumi⁵, Masaru Fukuda²

¹Dept. of Otolaryngol., Fukui Med. Sch.

²Dept. of Pathol., Fukui Med. Sch.

³Dept. of Development, Hamari Chemical Co.

⁴Dept. of Otolaryngol., Mikuni Hosp.

⁵Dept. of Urolog., Faculty of Med., Kanazawa Univ.

We investigated the time course of hematoporphyrin oligomer uptake in squamous cell carcinoma transplanted into C3H mice after intraperitoneal injection by measuring its fluorescence intensity. The intensity peaked 83 hours after the injection. The tumors disappeared after an average of 4.40 days with a single application of photodynamic therapy or microwave hyperthermia 83 hours after hematoporphyrin oligomer injection. However, all the tumors treated with these single modalities regrew within 4 weeks after the treatments. Therefore, we investigated the therapeutic effect of microwave hyperthermia in combination with photodynamic therapy. As a result, the combination effect was strongest when high-dose therapy was used as the first choice, irrespective of the order of the treatments, and no tumor regrowth occurred for 45 days.

Moreover, we applied above-mentioned single and combined modalities to the same carcinoma 48 hours after PH-1126 intravenous injection. The same tendency was observed in the combined condition. However, the antitumor effects were stronger in the single modalities than in the combined modalities, although the tumor regrowth occurred after its disappearance.

はじめに

頭頸部領域の悪性腫瘍は機能と形態上、重要な臓器に発生するので、それらを保持しながら根治するのが理想である。そこで頭頸部領域に多い表在性の扁平上皮癌(実験癌)において、光力学的療法(PDT)とマイクロ波温熱療法の併用を試みた。その理由として、以下のことが挙げられる。(1) PDTのみでは組織深達性に問題がある。(2) in vitroの系でマイクロ波とヘマトポルフィリン誘導体(HpD)との増感効

果が確認されている¹⁾。光増感剤として、HpDのなかでも安定な化合物で、C3Hマウス背部移植扁平上皮癌組織に効率よく取り込まれるヘマトポルフィリンオリゴマー(HpO)²⁾と、HpDの630nmより長い吸収波長(647.1nm)を持つフェオフォルバイド誘導体のPH-1126を用いた。

実験方法

1. 腫瘍: C3H/Heマウス継代移植扁平上皮癌組織を約3x3x3mm³に細切後、1片を約9週令のマウス背部皮下中央に切開刺入した。

2. Hp0投与群の実験^{3), 4)}**(1) 蛍光測定法**

Hp0を腹腔内投与後、経時的にマウスを屠殺し、摘出した腫瘍を細切した(約2x2x2mm³)。直ちに急冷後コンパウンドで覆い、-15℃まで冷却した。凍結切片(5μm)を作成して、腫瘍組織内のHp0の蛍光強度を蛍光分光光度計(850型、日立製)を用いて反射法により測定した。

(11) 光力学的治療

アルゴン色素レーザー(630±5nm, 171-07型と375-03型、スペクトロ・フィジックス社製)を(1) Hp0を腹腔内投与後83時間目に0, 17.9, 35.8, 71.6, 107.4J/cm²の線量で照射した(14匹)。(2) Hp0を腹腔内投与後0, 6, 24, 48, 72, 83, 96, 168時間目に107.4J/cm²の線量で照射した(各17, 17, 18, 22, 22, 19, 16, 11匹; コントロールとしてHp0非投与群10匹使用)

(111) マイクロ波温熱療法

マイクロタイザー(2450MHz, MT-30型、ミナト医科学)を43±0.5℃で(1) Hp0を腹腔内投与後83時間目に0, 30, 60, 90分間照射した(15匹)。

(2) Hp0を腹腔内投与後0, 6, 24, 48, 72, 83, 96, 168時間目に43±0.5℃で90分間照射した(各20, 10, 20, 10, 20, 28, 10, 20匹; コントロールとしてHp0非投与群10匹使用)

(111) 光力学的治療とマイクロ波温熱療法の併用療法

Hp0を腹腔内投与後83時間目に、以下の方法で行った(腫瘍体積減少率の算定に各群8匹、生存日数の検討に下記の順に2, 5, 11, 3匹使用)。

- (1) マイクロ波温熱療法(60分照射)施行後1時間以内に光力学的治療(35.8J/cm²)施行
- (2) 光力学的治療(35.8J/cm²)施行後1時間以内にマイクロ波温熱療法(60分照射)施行
- (3) マイクロ波温熱療法(30分照射)施行後1時間以内に光力学的治療(71.6J/cm²)施行
- (4) 光力学的治療(71.6J/cm²)施行後1時間以内にマイクロ波温熱療法(30分照射)施行
- (V) 単独および併用療法で行った腫瘍反応の評価と抗腫瘍効果の判定

(1) 腫瘍のgrowth curveを作成するために、照射前後を通じて1日1回、ノギスで腫瘍の体積を測定した。

(2) 照射前後の肉眼的変化を写真に記録した。

(3) 照射前後経時的にマウスを屠殺し、腫瘍を摘出し、ホルマリン固定、パラフィン包埋、切片(5μm)作成後、H.E.染色した。

(4) 腫瘍体積減少率の算定: growth curveにおいて、腫瘍が照射開始時の大きさの75, 50, 25, 0%になるのに要する日数で表した。単独療法においてはマイクロ波単独療法(43℃, 90分照射)においてHp0非投与の群とHp0投与後83時間目照射群について、併用療法においては施行した4処置群について、差異有意差をWilcoxon-Mann-Whitney testを使って、それぞれの腫瘍の減少率に対し解析した。

(5) 生存日数の比較: Hp0を腹腔内投与後経時的に各単独療法を施行した場合と、Hp0を腹腔

内投与後83時間目に併用療法を施行した場合において、治療後の生存日数をKaplan-Meier法により検討し、差異有意差を一般化ワイルコクソン検定により、各二群間について解析した。

3. PH-1126投与群の実験¹⁾**(1) 光力学的治療**

クリプトン・イオン・レーザー(647.1nm)をPH-1126を尾静脈内投与後48時間目に0, 50, 100, 150J/cm²の線量で照射した(18匹使用)。

(11) マイクロ波温熱療法

マイクロタイザー(2450MHz, MT-30型)をPH-1126を尾静脈内投与後48時間目に43±0.5℃で0, 30, 60, 90分照射した(11匹使用)。

(111) 光力学的治療とマイクロ波温熱療法の併用療法: PH-1126を尾静脈内投与後48時間目に、以下の方法で行った(各群3匹)

- (1) マイクロ波温熱療法(60分)施行後1時間以内に光力学的治療(50J/cm²)施行
- (2) 光力学的治療(50J/cm²)施行後1時間以内にマイクロ波温熱療法(60分)施行
- (3) マイクロ波温熱療法(30分)施行後1時間以内に光力学的治療(100J/cm²)施行
- (4) 光力学的治療(100J/cm²)施行後1時間以内にマイクロ波温熱療法(30分)施行

(111) 単独および併用療法で行った抗腫瘍効果の判定: Hp0投与群の実験と同様に腫瘍体積減少率の算定を行った。

実験結果と考察**1. Hp0投与群の実験^{3), 4)}****(1) 蛍光**

凍結切片中では、Hp0の特異的赤色蛍光は、腫瘍組織の周囲に形成された線維性被膜と腫瘍組織中の結合組織細胞、毛細血管、炎症細胞、特にこれらの細胞の細胞質に陽性に観察された。

腹腔内注射により腫瘍組織に取り込まれたHp0の相対的蛍光強度は注射後経時的に増加し、83時間目に最も強く、以後減少した。

この結果をもとに、光力学的治療単独あるいはマイクロ波温熱療法単独において、Hp0腹腔内注射後83時間目の抗腫瘍効果が最大であることを確認するとともに、Hp0腹腔内注射後83時間目の抗腫瘍効果を詳しく検討した。

(11) 光力学的治療単独

(1) Dose-response: 種々の線量で、5腫瘍(5匹)に光力学的治療を施行しgrowth curveを得た。17.9J/cm²の線量で照射した腫瘍とコントロールの腫瘍は生長速度がほぼ同じであった。35.8J/cm²あるいは71.6J/cm²の線量で照射した腫瘍では、腫瘍はいったん退縮したが消失しなかった。一方、107.4J/cm²の線量で照射した腫瘍では、腫瘍(1個)は照射後8日目に消失したが、腫瘍消失後9日目には再発した。

(2) 腫瘍の再発: Hp0を腹腔内注射後83時間目に107.4J/cm²の線量で9腫瘍(9匹)に光力学的治療を施行すると、照射した腫瘍は全て消失した(うち8匹の腫瘍体積減少率の平均を表1に示す)が、全て腫瘍消失後4週間以内に再発した。

(3) Hp0を腹腔内注射後経時的にレーザー照射

した群の生存日数の比較: Hp0非投与群(コントロール)はHp0非投与照射群に対し1%有意水準において有意差があった。Hp0投与後83時間目近傍(72, 83, 96時間目)は1%有意水準において、Hp0投与後168時間目照射群は5%有意水準において、Hp0非投与照射群に対して有意差があったが、コントロールに対しては有意差がなかった。

(4) 腫瘍の肉眼的および組織学的変化: 照射後、腫瘍表面は黒化し、痂皮を形成した。組織学的には、照射直後よりうっ血と出血が強く、腫瘍内血管の損傷が見られた。そして、肉眼的に腫瘍が消失したかに見えても、組織学的には腫瘍細胞は常に残存していた。

(III) マイクロ波温熱療法単独

(1) Dose-response: Hp0を腹腔内注射後83時間目に3群に種々の時間、マイクロ波温熱療法を施行した。コントロールは急速に増大したのに対し、30分間あるいは60分間照射した群では腫瘍(各2個)はいったん退縮したが消失しなかった。これに対し、90分間照射した群では腫瘍(2個)は照射後平均5日目に消失したが、腫瘍消失後平均11日目には再発した。

(2) 腫瘍の再発: Hp0を腹腔内注射後83時間目に90分間、9腫瘍にマイクロ波温熱療法を施行すると、照射した腫瘍は全て消失(うち6匹の腫瘍体積減少率を表1に示す)したが、全て腫瘍消失後4週間以内に再発した。なお、表1より、Hp0とマイクロ波の増感効果が証明された。

(3) Hp0を腹腔内注射後経時的にマイクロ波温熱療法を施行した群の生存日数の比較: Hp0非投与群(コントロール)はHp0非投与照射群に対し1%有意水準において有意差があった。Hp0投与後48, 72, 83, 96時間目照射群は1%有意水準において、Hp0投与後24時間目照射群は5%有意水準において、Hp0非投与照射群に対し有意差があった。更にHp0投与後83時間目照射群はHp0投与後6, 24, 48, 72, 96, 168時間目照射群に対し1%有意水準において有意差があった。

(4) 腫瘍の肉眼的および組織学的変化: 光力学的療法の場合とほぼ同じであった。

(IV) 光力学的治療とマイクロ波温熱療法の併用療法

光力学的治療単独あるいはマイクロ波温熱療法単独のdose-responseの結果から、それぞれの単独療法において腫瘍をいったんは消失させる条件が得られた。すなわち、光力学的療法においては107.4 J/cm²の線量であり、マイクロ波温熱療法においては90分照射である。しかし、これらの条件でも腫瘍は再発した。それ故、完全な腫瘍の絶滅を成しとげるために、両者の併用を試みた。この併用療法においては、照射方法による効果の差をより明確にするためと、生体の負担を軽減するために、あえて、それぞれの単独療法で腫瘍が消失しない条件を用いた。

すなわち、

光力学的治療	温熱療法
high-doseの条件	71.6 J/cm ² 60分照射
low-doseの条件	35.8 J/cm ² 30分照射

を適用した。それぞれ異なる療法のhigh-doseの条件とlow-doseの条件を組み合わせる実験を行った。

第1群(high-doseのマイクロ波温熱療法を行い、次いでlow-doseの光力学的治療を行った群)と、第4群(high-doseの光力学的治療を行い、次いでlow-doseのマイクロ波温熱療法を行った群)では、照射した腫瘍は全て消失し、腫瘍消失後45日以上経過しても消失しなかった。組織学的にも、照射前は、腫瘍組織はほぼ完全にviableな腫瘍組織で充満していたが、照射後1日目になると腫瘍組織の出血が顕著になった。照射後5日目には、照射前の腫瘍組織は、好中球を伴った炎症性の浸出物で覆われた肉芽組織に置き代わり、腫瘍細胞の残存は見られなかった。照射後45日目も組織学的にtumor-freeであった。

これに対し、第2群(low-doseの光力学的治療を行い、次いでhigh-doseのマイクロ波温熱療法を行った群)と第3群(low-doseのマイクロ波温熱療法を行い、次いでhigh-doseの光力学的治療を行った群)では、照射した腫瘍は全ていったん消失したが、照射後4週間以内に再発した。肉眼的にあたかも腫瘍が消失したかに見えた時点で腫瘍を摘出すると、組織学的には腫瘍細胞が残存していた。

growth curveから腫瘍体積の縮小率を、腫瘍が照射開始時の大きさの75, 50, 25, 0%になる日数で表し、各群における平均値を求めると表2を得た。どちらの治療法にせよ、先にhigh-doseの治療を行った群で、腫瘍の体積が急速に減少した。そして、腫瘍の大きさを75, 50, 25, 0%に減少させる抗腫瘍効果は、第1群あるいは第4群が、第2群あるいは第3群に対し、1%有意水準において有意差があった。

治療後の生存日数の検討では、第1群と第4群はHp0非投与群(コントロール)に対し、5%有意水準において有意差があり、光力学的治療単独(107.4 J/cm²)あるいはマイクロ波温熱療法単独(90分照射)より効果が大きいことが解った。

2. PH-1126投与群の実験

過去のPH-1126の取り込み実験⁵⁾では、腹腔内投与では、腫瘍の取り込み量自体は他の正常臓器と比較してどの時間帯においてもそれほど高くなく、腫瘍に選択的に取り込まれないが、尾静脈内投与においては、腫瘍選択性がかなり高まり、投与後36時間目に取り込みが最大となることが解っている。しかし、尾静脈内投与後36時間目に光力学的治療(50 J/cm²)を行うと、照射後24時間以内にショック死する例が見られた。そこで、早い時間では腫瘍組織より取り込みの多い肝臓、腎臓、脾臓の取り込みが腫瘍組織とはほぼ同じレベルまで低下する48時間目に各単独療法あるいは併用療法を施行した。

(1) 光力学的治療単独(Dose-responseと腫瘍の再発): PH-1126を静脈内注射後48時間目に3群に光力学的治療を施行した。非照射群(5匹)

の腫瘍は急速に増大したが、50J/cm²あるいは100J/cm²の線量で照射した腫瘍(各群3匹)は照射後いったん退縮したが消失しなかった。150J/cm²の線量で照射した腫瘍(7匹)は平均1.70日目に消失した(表3)が、腫瘍消失後12日目(1匹)、27日目(1匹)には再発していた。

(I) マイクロ波温熱療法単独(Dose-responseと腫瘍の再発): PH-1126を静脈内注射後48時間目に3群(各2匹)にマイクロ波温熱療法を施行した。非照射群の腫瘍(5匹)は急速に増大したのに対し、30分間あるいは60分間照射した群では腫瘍はいったん退縮したが消失しなかった。一方、90分間照射群では腫瘍は照射後平均2.25日目に消失した(表3)が、腫瘍消失後38日目に再発した(内1匹)。

(II) 光学的治療とマイクロ波温熱療法の併用療法(PH-1126尾静脈内投与後48時間目)

光学的治療単独あるいはマイクロ波温熱療法単独のdose-responseの結果から、HpO投与群と同じようにhigh-dose, low-doseの条件を決定し、両者の併用を4群に分けて施行した(各群3匹)。そしてgrowth curveから腫瘍体積の縮小率を、腫瘍が照射開始時の大きさの75, 50, 25, 0%になる日数で表し、各群における平均値を求めると表4を得た。HpO投与群と同様、どちらの治療法にせよ、先にhigh-doseの治療を行った群の方が腫瘍の体積の減少速度は速かった。しかし、PH-1126投与群の場合は、光学的治療単独(150J/cm²)あるいはマイクロ波温熱療法単独(90分照射)の方が、併用群に比べ、腫瘍の退縮速度が速かった(表3と表4)。

先にlow-doseの治療を行った方がなぜに効かないのかを、次のように考えている。

- 1) 熱と光学的作用における耐性の可能性
- 2) DNA損傷に対するrepairの可能性
- 3) low-doseのマイクロ波の温熱作用による腫瘍内の光増感剤の局在部位の変化の可能性
- 4) low-doseの光学的治療後に腫瘍内の光増感剤が失活する可能性

腫瘍 体積	光増感剤 非投与マイクロ波 (43℃, 90分)照射群 (9匹)	HpO投与後 83時間目マイクロ波 (43℃, 90分)照射群 (6匹)	HpO投与後83時間目 アルゴン色素レーザー 照射群 (8匹)
75%	8.13 (2匹)	2.22	2.39
50%	17.25 (1匹)	2.88	2.91
25%	—	3.52	3.52
0%	—	4.36	4.44

(日)

—はその体積(%)に腫瘍が達しないことを示す

** p < 0.01 (Wilcoxon-Mann-Whitney test)

HpO(50 μg/g.b.w.)腹腔内投与後83時間目に施行した単独療法における抗腫瘍効果

表1

腫瘍 体積	マイクロ波 (60分) 743J色素レーザー (35.8 J/cm ²)	743J色素レーザー (35.8 J/cm ²) ↓ マイクロ波 (60分)	マイクロ波 (30分) 743J色素レーザー (71.6 J/cm ²)	743J色素レーザー (71.6 J/cm ²) ↓ マイクロ波 (30分)
75%	0.87	4.69	4.48	0.17
50%	1.33	6.21	7.09	0.67
25%	1.68	8.00	8.00	1.53
0%	2.15	9.71	8.77	2.91

(日)

** p < 0.01 (Wilcoxon-Mann-Whitney test)

HpO(50 μg/g.b.w.)腹腔内投与後83時間目に施行した併用療法における抗腫瘍効果の比較

表2

腫瘍 体積	光増感剤 非投与マイクロ波 (43℃, 90分)照射群 (9匹)	PH-1126投与後 48時間目マイクロ波 (43℃, 90分)照射群 (2匹)	PH-1126投与後 48時間目 Kr-イオンレーザー (150 J/cm ²)照射群 (7匹)
75%	8.13 (2匹)	1.22	0.57
50%	17.25 (1匹)	1.66	0.91
25%	—	1.94	1.14
0%	—	2.25	1.70

(日)

—はその体積(%)に腫瘍が達しないことを示す

PH-1126(20 μg/g.b.w.)尾静脈内投与後48時間目に施行した単独療法における抗腫瘍効果

表3

腫瘍 体積	マイクロ波 (60分) Kr-イオンレーザー (50 J/cm ²)	Kr-イオンレーザー (50 J/cm ²) ↓ マイクロ波 (60分)	マイクロ波 (30分) Kr-イオンレーザー (100 J/cm ²)	Kr-イオンレーザー (100 J/cm ²) ↓ マイクロ波 (30分)
75%	2.00	2.33	4.63	1.17
50%	2.73	6.00	5.81 (1匹)	1.98
25%	5.50	11.54	—	5.79
0%	8.83	21.17	—	7.58

(日)

—はその体積(%)に腫瘍が達しないことを示す

PH-1126(20 μg/g.b.w.)尾静脈内投与後48時間目に施行した併用療法における抗腫瘍効果の比較

表4

参考文献

- 1) 松本他: 日本hyperthermia誌3:325-331, 1987
- 2) N.Miyoshi et al., Lasers in Medical Science 3: 185-193, 1988
- 3) 松本他: 日耳鼻92:2079-2088, 1989
- 4) N.Matsumoto et al., Arch Otolaryngol Head and Neck Surg 116: 824-829, 1990
- 5) 石原他: 第11回日本レーザー医学会大会論文集:183-186, 1990