Excimer Dye Laserを用いた 脳腫瘍に対するPDTの実験的検討

村川孝次, 野倉宏晃, 坂井 昇, 山田 弘
岐阜大学脳神経外科

Photodynamic therapy on experimental brain tumor
by Excimer Dye Laser

Takatsugu Murakawa, Hiroaki Nokura, Noboru Sakai,
Hiromu Yamada

Department of Neurosurgery, Gifu University

Abstract

The effect of Excimer Dye Laser (EDL) on photodynamic therapy (PDT) for brain tumor has been evaluated in vitro and in vivo.

Rat brain tumor cells used (C6, T9 and GH-1), were incubated with or without hematoporphyrin derivatives (HpD), and then irradiated using EDL or Argon Dye Laser (ADL). The effect of EDL was correlated with HpD concentration in culture medium and the laser power. Using $10 \mu\text{g/ml}$ HpD concentration, cell killing rates in EDL and ADL were not so different.

In glioma model established by implanting C6 cells in Wistar male rat, PDT was carried out with an optical fiber tip contacting with the tumor surface 48 hours after intravenous administration of HpD. Consequently, EDL showed stronger anti-tumor effects than ADL; mean depth of tumor necrosis induced by EDL was 3.2 mm at 15 joules, 4.3 mm at 30 joules, and 5.9 mm at 60 joules, whereas, that by ADL was 1.6 mm at 60 joules. There were not adverse effects such as cerebral edema and severe hemorrhage in this study.

I. はじめに

光化学治療 Photodynamic therapy (PDT) は腫瘍組織に特異的に集積する光感受性物質に特有の光を照射し、その感受性を利用し選択的に腫瘍組織を破壊しようとする局所療法である。脳腫瘍にも局所補助療法としての応用が研究されており、従来より主として連続光であるArgon-pumped Dye

Laser (ADL) を用いてPDTが施行されてきた。

しかし、光の組織透過性の限界から効果の深達性が十分でないという問題点があり、組織深達度の向上を目指して、レーザー光、光感受性物質、それぞれに新たな研究開発が進められている。

我々はこれまでにADLにて種々の光感受性物質を用いてラット脳腫瘍に対しPDT実験を行い、

その有効性の検討を行ってきた¹⁾²⁾。今回新たにパルス波である浜松ホトニクス社製 Excimer Dye Laser (EDL) L5081³⁾を用いてラット脳腫瘍に対しPDT実験を行う機会を得、比較検討した。

EDLはガス供給機、レーザー本体、操作コンソールよりなる。塩化キセノン (XeCl) Excimer Laserから得られた波長 308nm光がさらに色素ローダミン640を用いて波長を 630nmに変換される。レーザー光は直径400 μ mの optical fiber にて導出し照射した。パルスエネルギー (~6.0mJ), 全照射エネルギー, 照射時間, パルス繰り返し周波数 (30, 40, 60Hz) 等のレーザー照射条件設定が、容易である。

EDLはパルス尖頭値は最高600kwと高出力であり、これはADLの約 1.2×10^6 倍である。EDLのこの出力特性によって局所組織での熱発生が少なく、光深達度の大きい照射を行うことができる。

II. 実験方法

実験腫瘍は、in vitroでは N-methyl-nitrosourea誘発ラットglioma C6, ラットgliosarcoma T9, ラット下垂体腫瘍 GH-1を、RPMI-1640 medium に10% fetal bovin serum を加えた培地で継代培養したものを使用した。

in vivo では、実験動物は5~6週齢のWistar雄性ラットを用い、脳腫瘍はC6細胞 1×10^5 個をハミルトン注射器にてラット右頭頂葉内に刺入移植して作成した。

光感受性物質は伊藤ハム製国産HpDIを使用した。

1) in vitro 実験

HpDを培養液にて希釈し、37°C 5% CO₂気相下暗所にて腫瘍細胞と2時間混合培養した。phosphate buffered saline にて2回洗滌後、マルチウェルプレートに分注した (5×10^5 cells/well)。37°Cの incubator内で波長 630nmのレーザー光を液面より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 (Fig.1)。

2) in vivo 実験

C6移植後20日目に、10mg/kgのHpDをラッ

ト尾静脈から one shot で投与し、暗所にて飼育した。投与後48時間で Halothane麻酔下に開頭を行い、腫瘍を露出し、optical fiber にて導出したレーザー光を定位的に腫瘍表面に接触照射した。レーザー先端出力を 1パルス 1.0mJ, 周波数40Hzとし、腫瘍接触照射のため total dose で表した。照射中は腫瘍表面に生理食塩水を滴下し腫瘍の乾燥を防止した。その後経時的に、diethyl ether深麻酔により屠殺し、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病理組織学的に検討した (Fig.2)。

III. 結果

1) in vitro 実験

HpD 10 μ g/mlでレーザー先端出力を 1パルス 1.0mJ, 周波数40Hz, 平均出力40mW (液面22.5 mW/cm²/sec) および1パルス2.5mJ, 周波数40Hz, 平均出力100mW (液面56mW/cm²/sec) に設定し、比較した。HpD作用単独では2時間までは殺細胞効果を認めなかった。100% cell death には平均出力40mWで50分, 100mWで40分とレーザー強度に相关した (Fig.3)。

Fig. 3 The relationship between drug concentration and laser irradiation time.

Fig. 4 The relationship between laser power and irradiation time.

Fig. 5 The survival cell rate using Excimer Dye Laser versus Argon Dye Laser.

レーザー先端出力を 1パルス 2.5mJ, 周波数40 Hz, 平均出力100mW (液面56mW/cm²/sec) にし, HpD濃度を, 1, 10, 50 µg/mlに設定し比較した。レーザー単独照射では2時間までは殺細胞効果を認めなかった。100% cell death には10 µg/mlで40分, 50 µg/mlで30分と殺細胞効果は薬剤濃度に相関した (Fig. 4)。

HpD 10 µg/mlでEDL 1パルス2.5mJ, 周波数 40Hz, 平均出力 100mWとしたものと, ADLの

出力を同じ100 mWとしたものとを比較した。C6, T9, GH-1ともに有意差は認められなかった (Fig. 5)。

2) in vivo 実験

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を, さらにその周囲に正常脳組織を認めた (Fig. 6)。腫瘍壊死境界部では, 壊死に陥った核濃染された腫瘍細胞の周囲に, 炎症細胞浸潤, 赤血球の血管外漏出を認めた (Fig. 7)。PDT後24時間以内では, 細胞質膨化, 腫瘍血管内の赤血球うっ滞を認めた。

腫瘍表面から腫瘍壊死を認めた最深部までの距離を腫瘍壊死深達度とし, レーザー出力との関係を見た。HpD 10mg/kg投与では, 15Jで 3.2mm, 30Jで 4.3mm, 60Jで 5.9mmまで腫瘍壊死を認め, レーザー強度に相関した腫瘍壊死深達度が認められた (Table.1)。

IV. 考察

PDT効果を向上させるため種々の新しいレーザー光, 光感受性物質が研究開発されている。我々はADLを用いて, HpDI, PhotofrinII, HpD oligomer, PH-1126 等種々の光感受性物質を使用し実験脳腫瘍に対してPDTを行い報告してきた。今回, パルス波のEDLを使用する機会を得てPDTを行いその効果を検討した。in vitro 実験では殺細胞効果はレーザー強度, 薬剤濃度に比例していたが, 平均出力として同量とした場合, ADLと有意差は認めず, 同等であった。一方, in vivo 実験ではHpD 10mg/kg, 平均出力 40 mW, 照射総量 60Jでは腫瘍変性壊死は 5.9mmまでと組織深達度は大きく, 以前施行したADLを用いたPDT実験と比較した場合, 腫瘍細胞がC6とT9の違いはあるが, 有意に強力であると考えられ, EDLの組織透過性の優秀性を確認できた。なお, 腫瘍壊死の中に一部生存した腫瘍細胞を認めたが, これはHpDの腫瘍細胞内への取り込みが均等でないことに起因したと思われる。また, PDT後24時間以内の組織変化からは, PDT効果の腫瘍血管の血流障害による虚血性変化が示唆され, これはADLによる結果と同様であった。EDLによるPDTで, 脳浮腫は同じ仕事量では

Fig.6 Microphotography of the rat brain bearing C6 tumor, 48 hours after PDT with 10mg/kg of HpD and 15 joules of laser. Arrows indicated tumor necrosis.(H.E.stain $\times 2.5$)

Fig.7 Necrotic and inflammatory changes in the border zone affected with EDL were seen. (H.E.stain)

	LASER POWER (J)			
	15	30	60	120
Excimer dye laser (C6) HpD 10 mg/kg	3.2	4.3	5.9	
Argon-pumped dye laser (T9) HpD 10 mg/kg			1.6	1.8
HpO 10 mg/kg		1.6	2.1	5.4

Table.1 The depth of tumor necrosis in PDT (mean:mm).

ADLに比べ強い傾向にあったが、これは腫瘍壊死範囲の広さに起因したものと考えられた。ADLによるPDTでは、深達度を上げるため、薬剤高濃度、レーザー高出力とした場合、腫瘍血管の破綻による大量出血の危険性を有したが、今回、その様な例は認められなかった。

今回 in vivo 実験では 1パルスで 1.0mJで施行し報告したが、2.0mJとした場合40Hzではfiberに接した組織に炭化層を生ずることがあり、1パルス強度と周波数の設定にさらに検討が必要と考えている。

V. 結語

- 1) EDLを用いたPDTを rat brain tumor に対して in vitro, in vivo にて行い、ADLと比較検討した。
- 2) in vitro においてEDLの殺細胞効果は、レーザー強度、薬剤濃度に比例していた。
- 3) in vitro におけるEDLの殺細胞効果は、AD

Lと同等であった。

- 4) in vivo においてEDLの腫瘍壊死深達度はレーザー強度に相関していた。
- 5) in vivo におけるEDLの腫瘍壊死深達度は、ADLの深達度に比し有意に強力であった。
- 6) 脳腫瘍に対するPDTにEDLは有用であることが示唆された。

参考文献

- 1) 三輪嘉明他：悪性脳腫瘍に対するアルゴン励起色素レーザー治療に関する基礎研究。神経外科26, 439-443, 1987.
- 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.
- 3) 平野 達他：パルスレーザーの光線力学的がん治療への応用。第11回日本レーザー医学会大会論文集, 103-106, 1991.