光感受性物質ドキシサイクリンを用いた家兎動脈硬化への光線力学的療法の研究

妹尾和克, 大熊恒郎, 佐藤 成, 金田寛之, 杵淵忠司, 大江 大
蔡 景襄, 石山智敏, 黒川良望, 澤井高志*, 田口喜雄, 森 昌造

東北大学医学部第二外科, 第一病理*

A study of Photodynamic Therapy with Photosensitive Substance,
Doxycycline, in Arteriosclerosis Rabbits

K. Senoo, T. Ohkuma, A. Sato, H. Kaneda, T. Kinefuti, D. Oe, K. Sai,
T. Isiyama, R. Kurokawa, T. Sawai*, Y. Taguchi, S. Mori

The 2nd Department of Surgery and The 1st Department of Pathology*,
Tohoku University School of Medicine

In our previous experiments, we administered photosensitive antibiotics of tetracycline type to determine their intensity of the fluorescence in arteriosclerotic lesions. Among these, doxycycline (DOXY) showed the highest intensity of fluorescence. During the post-treatment period, 4-12 hours later, DOXY accumulated only in the hypertrophic intima. Irrespective of DOXY administration, the laser therapy in the output lower than 66 J/cm^2 had no direct effects including thermal effect on the vessels of arteriosclerotic lesions. On the basis of our experience thus far, the present experiment was performed.

DOXY (35 mg/kg) was administered to arteriosclerosis rabbits. Their abdominal aortae were dissected. Five hours after DOXY administration, Nd:YAG laser (the third high-frequency, 355 nm) was applied in the output of 24 J/cm^2 . A group of arteriosclerosis rabbits which received no DOXY administration was used as a control. The sites where photodynamic therapy (PDT) was applied were observed 0.5, 1, 3, 7 and 42 days later. In the control group, laser therapy had no effects on the hypertrophic intima throughout the observation period. In PDT group, the hypertrophic intima consisting of mast cells showed the cellular changes 0.5 day later. The imbalanced intracellular concentration and constricted cells were recognized on the first day. The cells which lost their nuclei started to melt and left only fibrous components around them on the third day. Past of the lesions showed morphological changes including the increased density and atrophy on the 7th day. On the 42nd day, although the fibrous components and atrophy were still observed on the hypertrophic intima, the lesions were reduced. Leukocytes, erythrocytes and new mast cells were not concerned in the process of the changes due to PDT.

癌の光線力学的療法および診断には、近年さまざまな光感受性物質を用いた数多くの報告がなされ臨床応用されている。また PDT は動脈硬化症の補助的治療としても注目されており、我々はドキシサイクリン (DOXY) を用いた兎の初期動脈硬化病変に対する PDT を検討した。

【対象・方法】

2 kg の日本白色家兎にバルーンカテーテルを用いて腹部大動脈に内膜損傷部位を作成し、1% コレステロール食を2ヶ月間投与後、さらに普通食を1ヶ月間投与して動脈硬化モデルを作成した。PDTの方法として DOXY 35 mg/kg 静注

し、ペントバルビタール麻酔後腹部大動脈を切開し、血管内腔側よりDOXY投与5時間後にレーザー照射を行った。レーザーは、Nd:YGAレーザー第3高調波(355nm)を使用した。照射条件は出力50mw直径4mmで60秒間照射であり24 J/cm²とした。観察期間は12時間・1日・3日・1週間・6週間・3ヶ月とし、対照群はDOXYを投与せずレーザー照射のみを行った群とした(図1)。なお術後に血小板凝集抑制剤等の薬剤は使用しなかった。

【結果】

対照群の症例はレーザーによる病理学的変化は見られなかった。

DOXY投与後PDTを行った結果では、12時間後、24時間後の変化は同様であった。偏平な内皮細胞は収縮し円形に変形した状態で基底膜に付着していた。その下層の泡沫細胞は、細胞が収縮している状態や、細胞群が浮き立っている状態のものが存在していた(図2)。更に状態が進行すると、内皮細胞は完全に消失し、泡沫細胞も収縮したり、周囲より遊離した状態で若干残存し、大部分の泡沫細胞が消失し空胞化していた(図3)。これは泡沫細胞が死滅消失したか、又は死滅しかかった細胞が周囲より遊離し血流により流された場合などが考えられる。またこれらの標本において白血球の侵入や血栓等の付着は存在していなかった。

次に線維性内膜肥厚部位の変化を提示する。24時間後においては、偏平な平滑筋細胞は細胞全体が収縮しているものや、細胞核のみ残存している状態になっており、線維性構築物質との間に間隙が存在していた。線維性構築物質の構造変化はこの時点では認められなかった(図4)。

3日目では血管内腔面に存在した泡沫細胞による内膜肥厚部位は完全に消失していた。線維性内膜肥厚部位は線維成分のみ残存しており、細胞成分が完全に消失していた。消失した部分は空胞化しているが、細胞周囲にあったコラーゲンや弾性線維による線維成分の骨格構造の変化はなかった(図5)。1週間後では線維性内膜肥厚部位の構築が崩壊し疎に凝集しており(図6)、これによって内膜肥厚部位の軽度の退縮をもたらしていた。また内皮細胞がこの時点で再生されていた。6週間後では、コラーゲンや弾性線維による線維成分の凝集が更に高密度化されており、内膜の退縮が更に進行していた(図7)。なお、血管内腔表面には動脈を切開した部位より発生した若干の内膜肥厚が被っていた。3ヶ月後には線維性内膜肥厚部位の線維成分の凝集が完全に退縮・消失しており(図8)、我々のPDTの実験条件では3ヶ月後に家兎動脈硬化病変が消失していた。またこの線維性肥厚の退縮の変化においても炎症細胞などの侵入は一切認められなかった。

【考案】

テトラサイクリン(TC)は抗生物質として使用されているが光感受性物質としても有名であり、動脈硬化巣に集積する報告がなされている。しかし現在TCは臨床において使用されおらず、この誘導体が使用されている。TC系誘導体も光感受性物質の性格・動脈硬化巣への集積性も兼ね備えており、これらの吸収波長は約360nmで励起波長としてのNd:YAG(355nm)は有用と思われる。さらにTC系抗生物質5種類のなかで動脈硬化病巣に一番特異的に集積する物質としてDOXYが報告されている¹⁾。

PDT後	12時間	1日	3日	1週間	6週間	3ヶ月
DOXY +	n=3	n=3	n=4	n=2	n=5	n=3
DOXY -			n=3	n=2	n=2	n=1

図 1. PDT動脈硬化家兔症例数

図 2. PDT 12時間後 内皮細胞・泡沫細胞

図 3. PDT 1日後 内皮細胞・泡沫細胞

図 4. PDT 1日後 平滑筋細胞・線維性肥厚部

図 5. PDT 3日後 線維性内膜肥厚部

図 6. PDT 1週間後 線維性内膜肥厚部

図 7. PDT 6週間後 線維性内膜肥厚部

図 8. PDT 3ヶ月後 内膜肥厚部位消失

このDOXYの動脈硬化病巣への集積に関する時間的経過の報告もあり、DOXY静注後3-12時間後が正常部に対し有意に集積していたとの報告であった²⁾。我々のDOXY濃度の検討でも4-12時間後が集積性が有意にあり、内皮細胞>泡沫細胞による内膜肥厚部>線維性内膜肥厚部>中膜の順であった。

照射出力に関しては、正常血管において

$$\text{蒸散深度} = -70.1 + 0.533 \times \text{照射出力} \quad n = 225$$

$$(\mu\text{m}/\text{sec}) \quad (\text{J}/\text{cm}^2)$$

の関係があった。動脈硬化病巣に対して低出力において60秒照射した場合 ($n = 101$)、85 J/cm²以上において熱変性・空胞形成などの変化が存在した。また低出力においてはDOXY投与の有無に関係はなかった。これらの条件を踏まえて、今回DOXYによる家兎のPDTの実験を行った。

HpDによる動脈硬化に対してのPDTは、いくつか報告されている。in vitroにおいてヒト動脈硬化平滑筋細胞は4時間後より細胞骨格を構成するフィラメントが変化しそれに伴って細胞形態も変化し最後は融解していく報告があった³⁾。これは今回の我々のin vivoにおいても24時間以内に同様の細胞変化を来していた。家兎に対してのHpDによるPDTでは、6週間後の内膜肥厚部位がコントロールと比較して一番減少していた報告⁴⁾もあったが、我々のような詳細な病理学的検討が記載されていなかった。

最後に、DOXYによる家兎動脈硬化病変に対しPDTを行い、有用であったことを詳細な病理学的検討で行った。今後DOXY濃度・レーザー照射出力に関してのそれぞれの検討が必要であるが、DOXYは臨床において抗性物質として

現在使用されており、PTLAの補助手段として、今後十分な可能性があると思われた。

参考文献

- 1) 妹尾和克他：Nd：YAGレーザー蛍光分光によるテトラサイクリン系抗性物質の蛍光特性および家兎動脈硬化への吸着・放出の検討。第12回日本レーザー医学会大会論文集 321-324, 1992.
- 2) 藤森 清他：動脈硬化病変に対する光線力学的療法の研究；Tetracycline 誘導体。第11回日本レーザー医学会大会論文集 321-324, 1991.
- 3) Peter C. D et al：Responses of cultured smooth muscle cells from human nonatherosclerotic arteries and primary stenosing lesions after photoradiation：Implications for photodynamic therapy of vascular stenosis. J Am Coll Cardiol 15：1545-50, 1990.
- 4) Victoria N et al：Hematoporphyrin uptake in atherosclerotic plaque：therapeutic potential. Neurosurgery 23：307-312, 1988.