Mono-L-aspartyl Chlorin e6(NPe6)とレーザーによる抗腫瘍効果 におけるNPe6投与量とPhotodynamic Therapy (PDT) 施行開始時間に関する検討

齊藤光一^{1, 2}、黒岩ゆかり^{1, 2}、倉田 靖²、勝海東一郎¹、
畔高政行²、會沢勝夫¹
東京医科大学生理¹、明治製菓・薬総研²

Effects of NPe6 dose and interval time on tumor therapeutic effects of PDT using
NPe6 and diode laser.

Kouichi Saito, Yukari Kuroiwa, Yasushi Kurata, Toichiro Katsumi,
Masaaki Azetaka and Katsuo Aizawa

Depts of Physiology, Tokyo Medical College
Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd.

Tumor therapeutic effects of PDT using NPe6 as a photosensitizer and diode laser as the light source on BALB/c mice bearing Meth-A fibrosarcoma were examined. The more dose and the shorter interval time, the better cure rates were obtained. To elucidate whether the cure rates correlate to the NPe6 concentration in plasma or in tumor, NPe6 levels were measured by HPLC analysis. In conditions with plasma or tumor NPe6 concentration of nearly 0, PDT was performed and cure rates were obtained. As the results, difference of cure rates seemed to depend on the NPe6 concentration in plasma rather than in tumor. Therefore tumor therapeutic effects using NPe6 can be anticipated by the plasma NPe6 concentration at the time of PDT treatment.

1. 緒言

NPe6はクロリン骨格にアスパラギン酸を付加した光感受性物質である。この物質は従来のヘマトポルフィリン誘導体に比べ高波長側に吸収帯をもち、励起効率も高い等の優れた特徴を有している。これまでに

も、NPe6とレーザーを用いたPDTの効果について報告がなされてきた¹⁾。今回我々はレーザー照射条件を一定にして、NPe6の投与量とPDT施行開始時間を変えた時の治療効果の変動について検討した。更に、

その時の治療効果に差をもたらす要因について、NPe6の血漿中濃度と腫瘍内濃度という観点から検討を加えた。

2. 方法

PDT: 5週齢雄性のBALB/cマウスの右大腿部皮下に 1×10^6 個のMeth-A fibro-sarcoma細胞を移植し、腫瘍径約1.0cmとなった担瘤マウスを使用した。この担瘤マウスにNPe6を静脈内投与し、各群のPDT施行開始時間に腫瘍及びその周辺部を剃毛した状態でレーザーを照射した。レーザーは波長664 nmの半導体レーザーを用い、照射径1.4cm、出力100 mW/cm²で総照射量100 J/cm²となるよう照射した。このPDTの7日後にマウスをエーテル麻酔下で屠殺し、腫瘍部位を摘出してH-E染色標本を作製し、腫瘍の残存がみられないものを治癒と判定した。

NPe6の血漿及び腫瘍内濃度の測定: マウスの血漿及び腫瘍を採取後、Fig. 1に示す方法でHPLC用サンプルを調製した。HPLCにおける検出は、蛍光法(励起波長405nm、蛍光波長660nm)により行った。

3. 結果

1) NPe6投与量とPDT施行開始時間の検討

NPe6投与量とPDT施行開始時間を変えてPDTを行った時の治癒率をTable 1に示した。治癒率は投与量とPDT施行開始時間の早さに依存しており、投与量の減少やPDT施行開始時間を遅らせることにより治療効果が落ちた。また、NPe6 5mg/kg投与2時間後にPDTを施行した群

Fig.1 Sample preparation for HPLC analysis

Table 1 Percent cure following PDT

NPe6 Dose (mg/kg)	Interval time (hr)			
	1	2	4	6
0.625	—	0	—	—
1.25	—	0	0	0
2.5	83	18	0	0
5	100	83	9	0

At least 8 tumor bearing mice per group were used for the PDT experiments.

と4時間後に施行した群の治癒率に大きな差がみられた。

2) NPe6 5mg/kg投与2、4時間後の血漿及び腫瘍内NPe6濃度

NPe6投与後の血漿中濃度は、2時間で2.33 µg/ml、4時間で0.49 µg/mlであり、4時間後には2時間後の約1/5に減少した。一方、腫瘍内濃度は2時間、4時間でそれぞれ1.18 µg/g、0.99 µg/gと僅かに減

Fig.2 Plasma and tumor NPe6 concentration

The results are shown as the means of 5 mice, and the bars correspond to the standard deviations. *, Significantly different from the 5mg/kg 2hr group at $p < 0.05$.

少しだけであった (Fig. 2)。

3) 治療効果の差の要因についての検討

治療率の高かった5mg/kg投与2時間後と腫瘍内濃度が等しく血漿中濃度が低い条件と、その逆の血漿中濃度が等しく腫瘍内濃度が低い条件をみつけ、その時の治療効果を検討した。20mg/kg投与24時間後(condition I)において、腫瘍内濃度が5mg/kg投与2時間後とほぼ等しく、血漿中濃度は検出限界以下となった。また、0.5mg/kg投与した時、投与直後からレーザーを照射したとして照射が終了する時間である0.28時間(1000秒)後(condition II)では、血漿中濃度は5mg/kg投与2時間後とほぼ等しく、腫瘍内濃度は約1/10と有意に低くなった (Fig. 3)。それぞれの条件でPDTを実施したときの担癌マウスの治療率は、condition I では25%、condition II では90%であった (Fig. 4)。

4. 考察

レーザー照射条件が一定の時、PDTに

Fig.3 Plasma and tumor NPe6 concentration

The results are shown as the means of 5 mice, and the bars correspond to the standard deviations. *, Significantly different from the 5mg/kg 2hr group at $p < 0.05$.

Fig.4 Percent cure following PDT

At least 8 tumor bearing mice pergroup were used for the PDT experiment.

よる治療率はNPe6投与量とPDT施行開始時間の早さに依存して高くなった (Table 1)。この時、治療率の高い条件と低い条件の間には、NPe6の体内分布(濃度)に差があることが考えられる。PDTの抗腫瘍作用は腫瘍細胞を直接障害するものの他に、血管系を障害して抗腫瘍効果を示すことも報告されている²⁾。Gomerら³⁾は

^{14}C ラベルされたNPe6を用い、マウスにおけるNPe6の体内分布を経時的に測定し、血漿中からの早い減衰と、腫瘍内濃度が数時間のレベルではほとんど変化しないこと、また、抗腫瘍効果が血漿中濃度に依存していることを示唆する報告をしている。今回我々は、HPLCによるNPe6の測定に基づき、血漿中濃度と腫瘍内濃度をコントロールした条件での治癒率の検討をおこなったが、その結果は彼等の結果を支持するものであった。すなわち、5 mg/kg 2時間と血漿中濃度が等しい群は治癒率もほぼ等しく、腫瘍内濃度が等しくても血漿中濃度が低ければ、治癒率は著しく低下した。このことは、少なくともレーザー照射が一定条件の時にはNPe6の血漿中濃度と治癒率が相関し、血漿中濃度から治療効果を予測できる可能性を示唆するものである。

しかしながら、我々は、PDT後の腫瘍において、3時間という短い時間で腫瘍細胞に変性壊死がみられることを観察している(データは示していない)。このことは、PDTの作用により癌細胞が直接障害された可能性が高いことを推察させる。また、今回のcondition Iの条件においても治癒した個体がみられ、更に治癒に至らなかった個体においても、明らかな腫瘍の退縮が観察された。これらのことから、実際の治療においては、治癒率は血漿中濃度との相関が高いものの、腫瘍内のNPe6も抗腫瘍効果の発現において重要であると考えられる。

5. 結語

(1)NPe6とレーザーを用いたPDTによる担癌マウスの治癒率は、NPe6投与量が多くまたPDT施行開始時間が早いほど高かった。

(2)治癒率に大きな差のみられた5 mg/kg 2時間後と4時間後にHPLCを用いてNPe6の血漿及び腫瘍内濃度を測定したところ、血漿中濃度は4時間後には2時間後の約1/5に減少したが、腫瘍内濃度は僅かに減少したのみであった。

(3)本実験におけるPDTによる治癒率はNPe6の血漿中濃度に相関しており、血漿中濃度に基づき治療効果が予測できる可能性が示唆された。

6. 文献

- 1) T.Katsumi, T.Okunaka, Y.Kuroiwa, H.Yamamoto, T.Hiyoshi, Y.Ii, A.Kaneda, T.Yuuzu, N.Kawate, C.Konaka, K.Aizawa and H.Kato, Photodynamic therapy using a diode laser with NPe6 for implanted fibrosarcoma, Proceedings of the 14th Congress of the Japan Society for Laser Medicine, 14: 347-350, 1993.
- 2) Harvey I. Pass, Photodynamic Therapy in Oncology: Mechanisms and Clinical Use (REVIEW), J. Natl. Cancer Inst., 85: 443-456, 1993.
- 3) A.Ferrario, D.Kessel and C.J.Gomer, Metabolic Properties and Photosensitizing Responsiveness of Mono-L-aspartyl Chlorin e_6 in a Mouse Tumor Model, Cancer Res., 52: 2890-2893, 1992.