特集／腹腔鏡下のMinimally invasive surgery におけるレーザーの応用

胃癌および腹腔内リンパ節転移に対する W/O/W PHE Emulsion局所投与による 光化学治療の基礎的検討 An Experimental Study of a Modified PDT for Gastric Cancer and Lymph Node Metastases

永井 祐吾, 谷村 弘, 白井 康嗣, 椿原 秀明, 寺下 史朗

和歌山県立医科大学第2外科

〒640 和歌山県和歌山市7番丁27番地

TEL 0734-31-2151 FAX 0734-26-8278

Yugo NAGAI, Hiroshi TANIMURA, Kosuke SHIRAI,
Hideaki TSUBAKIHARA and Shiroh TERASHITA

Second department of surgery, Wakayama medical college

27, 7 Bancho, wakayama, 640 JAPAN.

要 旨

光化学療法に伴う光線過敏症を軽減させ、腹部外科領域への応用を可能とするため、光感受性物質(PHE)をw/o/w型エマルジョン化して、腫瘍周囲に局所投与の後、YAG-OPOLレーザーを照射する方法を考案し、その実験結果を紹介した。

W/o/w型PHEエマルジョンを、PHEとして通常の1/4量を腫瘍周辺に局所投与することで、血液および腹腔内臓器のPHE濃度を高めることなく、投与1時間後より24時間までの長期間にわたり、高い腫瘍内濃度が維持できた。

また、w/o/w型PHEエマルジョンを局所投与24時間後、腫瘍にYAG-OPOLレーザー照射することにより、著しい腫瘍破壊効果を認めた。

以上より、w/o/w型PHEエマルジョンの局所投与により、光線過敏症の少ない光化学療法も可能であることが実験的に証明でき、今後、腹部外科領域での有用性が示唆された。

キーワード：光化学治療、光感受性物質、エマルジョン、胃癌、リンパ節転移

Abstract

The experimental study was conducted to determine the effectiveness of the modified PDT with preceding local injection of w/o/w PHE emulsion combined with YAG-OPOL laser irradiation 24 hours after, as a treatment for gastric cancer and lymph node metastases. The aim of the modification was to reduce the photo-hypersensitivity of skin or intraabdominal organs.

We observed the effectiveness of the PDT with local injection of w/o/w PHE emulsion as following. The locally injected PHE emulsion, which is only 1/4 of general dose, successfully maintained the PHE level high in the tumor without increasing its level in the blood or intraabdominal cavity from 1 up to 24 hours after the injection.

We also recognized that another major advantage of the modified PDT, which included YAG-OPO laser irradiation to the tumor at 24 hours after the injection, was its significantly destructive effect on the tumor.

Thus it is concluded that our modified PDT seems to reduce the photo-hypersensitivity and is expected to be an alternative treatment for intraabdominal tumor and lymph node metastases.

Key words : Photodynamic therapy, Photosensitizer, Emulsion, Gastric Cancer, Lymph node metastases

1. はじめに

消化器内視鏡技術の進歩により、比較的早期に発見される消化器癌が増えるとともに、食道表在癌や早期胃癌に対し内視鏡的治療が積極的に施行されるようになった。その結果、食道癌では m_2 までの粘膜内癌、胃癌では粘膜内癌に対する、Endoscopic mucosal resection (EMR)を中心とした内視鏡的治療の成績は、外科手術に勝るとも劣らず、低侵襲性とQOLを考慮すれば、これらの癌病巣に対する第1選択の治療法としての地位を確保した¹⁾。

しかし、EMRを施行した場合、必ずしも局所病巣の完全切除とはならず、実際には局所の遺残病巣に対し、レーザー照射²⁾やマイクロ波凝固³⁾を行って局所の根治性を確保しているのが現状である。

光化学治療 (Photodynamic therapy, PDT) は、YAGレーザーやマイクロ波と同様に組織破壊法であるため、病巣が回収できない欠点があるとはいえ、食道表在癌や早期胃癌に対しては良好な成績が報告されている¹⁾。また、癌病巣のみを特異的に破壊できるPDTの特性に注目すると、むしろEMRの適応からはずれた病巣を安全確実に破壊する治療法として、期待度が大きい。

しかし、一方で光感受性物質の副作用である光線過敏症を防止するため、患者はPDT後の一定期間を暗室で過ごさねばならないという問題点を有する。

PDTを腹部外科領域に応用する一つの方法として、PDTを開腹手術中あるいは腹腔鏡下に行った場合、手術室の無影灯の光や腹腔鏡のライトガイドによる腹腔内諸臓器に光線障害が起こる可能性があり、これを軽減する必要がある。

われわれは、抗癌剤エピルピシン (EPI) をw/o/w型エマルジョン化し、内視鏡的に腫瘍近傍に局所投与することで、腫瘍のみならず転移リンパ節にもEPIが高濃度に移行することをすでに確認し⁴⁾、臨床応用しているが、このw/o/w型エマルジョンの組織滞留性とリンパ移行性を光化学治療にも応用すれば、光過敏症を軽減でき、合理的な光化学治療が可能であろうと考えた。

ここでは、主にpolyhematoporphyrin ether/ester (PHE) のw/o/w型エマルジョン局所投与後の腫瘍内集積性と滞留性について基礎的検討を行うとともに、光感受性物質の励起エネルギーとして、アルゴンレーザーよりも組織透過性に優れたYAG-OPOレーザー照射による腫瘍破壊効果を実験的に検討した結果を紹介する。

2. 対象と方法

1) w/o/w型PHEエマルジョンの作成

光感受性物質はPHE (フォトフリン® 日本レダリー) を用いた。

w/o/w型PHEエマルジョンの作成は松本らの二段階乳化法にて行った^{6) 7)}。

乳化剤は、親油性乳化剤としてテトラグリセリル・縮合リシノレート (TGCR) を、親水性乳化剤として、デカグリセリル・モノオレート (DGMO) を使用した。

一次乳化として、PHE水溶液を30% TGCRを含有するオリーブ油中に極く少量ずつ分散させ、w/o型エマルジョンとした。

二次乳化として、このw/o型エマルジョンを2% グルコース液と混合させ、w/o/w型エマルジョンとした。

これを超音波細胞破碎器 (Powersonic model 50) を

図1 w/o/w型PHEエマルションの作成法

図2 w/o/w型PHEエマルションの安定性

図3 腫瘍内へのエマルションの集積

これを超音波細胞破碎器(Powersonic model 50)を用い、50Wにて15分間、超音波処理し、小胞粒子を細分化した(図1)。作成したw/o/w型PHEエマルションを位相差顕微鏡で観察し、マスターサイザー(Malvern社)で粒子径を測定した。

2) 実験動物および実験腫瘍

実験動物は雄性日本白色家兔(以下ウサギ、日本動物より購入)、体重2,400~2,600g、を用いた。実験腫瘍

はVX2腫瘍を用いた。

ウサギの大腿部に継代移植したVX2腫瘍細胞を $10^5 \sim 10^7$ 個移植し、腫瘍の大きさが10~15mmになった時点で、本実験に供した。

3) w/o/w型PHEエマルション局所投与後の腫瘍内集積の確認と腫瘍内および血中・諸臓器内PHE濃度の測定

ウサギの大腿部に移植したVX2腫瘍が10~15mmになった時点で、作成したw/o/w型PHEエマルション(PHE濃度として0.5mg/ml)を腫瘍から1cm離れた腫瘍周囲4点に、26G針にて腫瘍中心方向に向かって刺入し、注入した。

局注後、1時間、6時間後にネブタール麻酔下に腫瘍を摘出し、腫瘍内へのエマルションの集積を光学顕微鏡を用い、SudanⅢ染色にて確認した。

また、HPLC法にて腫瘍および血中PHE濃度を測定した。

対象は、臨床投与量であるPHE 2mg/mlの静脈内投与とした。

4) w/o/w型PHEエマルション局所投与後のYAG-OPO Laser照射による腫瘍破壊効果の検討

w/o/w型PHEエマルション(PHEとして0.5mg/ml)を前記の方法で局所投与し、その1時間後に、YAG-OPOレーザーを100J/cm²の条件で腫瘍全体を照射し、7日後に摘出、光学顕微鏡で観察し、w/o/w型PHEエマルション局所投与後に腫瘍破壊効果を無処置群を比較した。

3. 結果

1) w/o/w型PHEエマルションの安定性

作成したw/o/w型PHEエマルションはミルクコーヒ様の液体で、位相差顕微鏡による観察では、粒子はほぼ均一で、平均粒子径 $2.7 \pm 1.3 \mu\text{m}$ であった。

常温保存下では、作成後50日間は肉眼的に分離を認め

ず、位相差顕微鏡による観察でも粒子の状態に変化は起こらないことを確認した(図2)。

遠心負荷(2,000rpm, 15分)をかけた後の状態でも、肉眼的には分離を認めなかった。

2) w/o/w型PHEエマルション局所投与後の腫瘍内集積性とPHE濃度

図3にw/o/w型PHEエマルション局所投与後、1時間の腫瘍部の光顕像を示す。SudanⅢ染色で腫瘍組織内にオレンジ色に染まった脂肪滴が多数集積している。

腫瘍内濃度は、静脈内投与群では1時間後はまだ検出限界以下であったが、6時間後に $13.8 \pm 3.1 \mu\text{g/g}$ となり、24時間後に $7.8 \pm 1.7 \mu\text{g/g}$ であった。これに対しエマルション局所投与後では、静注の1/4量であるにもかかわらず、1時間後にすでに $12.8 \pm 4.1 \mu\text{g/g}$ に達し、6時間後も $11.4 \pm 2.8 \mu\text{g/g}$ となり、24時間後でも $8.7 \pm 2.1 \mu\text{g/g}$ と高濃度が持続した(図4)。

一方、PHEの血中濃度は、静脈内投与では1時間後に $13.7 \pm 2.5 \mu\text{g/ml}$ 、6時間後に $7.6 \pm 2.5 \mu\text{g/ml}$ 、24時間後には $2.7 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ と漸減したが、エマルションの局所投与では、1時間、6時間、24時間後いずれの時間帯でもすべてが検出限界以下であった(図5)。

また、静脈内投与群では肝・胃・小腸など腹腔内臓器においても、6時間後に高値を示したが、エマルションの局所投与後では、1時間、6時間、24時間後のいずれの時間帯でもすべて検出限界以下であった(図6)。

3) PHEエマルション局所投与後のYAG-OPOレーザー照射による腫瘍破壊効果

PHEエマルション局所投与1時間後にYAG-OPOレーザー照射7日後に腫瘍を摘出して、エマルション局所投与は行ってもYAG-OPOレーザー照射しなかった群と比較すると、後者ではほとんど変化を認めなかったが、YAG-OPOレーザー照射群では、組織学的に

図4 PHEの腫瘍内濃度

図5 PHEの血中濃度

(2 mg/kg, 全身投与, n = 5)

図6 腹腔臓器内PHE濃度

図7 YAG-OPOLレーザー照射前後の比較

著しい核の濃縮、破片化、融解、壊死像などが見られた(図7)。

4. 考察

PDTは1979年にDoughertyらにより、乳癌の皮膚転移の治療に応用されたのが最初で⁸⁾、わが国でも1980年に早田らが肺癌の治療にアルゴンダイレーザーによるPDTを初めて行い⁹⁾、有効性を立証している。

最近では、早期胃癌や食道表在癌の内視鏡治療として広く普及しているが、その開発の歴史は、より腫瘍選択性に優れた新しい光感受性物質の発見と、組織深達性に優れたレーザーの開発にあったといっても過言ではない。

しかしながら、光感受性物質の副作用である光線過敏症の問題はいまだ解決されず、PDTを施行された患者は、薬剤投与後の一定期間を暗室で過ごすことを余儀なくされている。それゆえ、PDTを内視鏡下ではなく、手術中に行うことは現段階では困難であり、何らかの剤

型の変更、あるいは投与方法の変更が必要である。

共同研究者の1人である寺下は1933年、抗癌剤であるEPIをw/o/w型エマルジョン化し、ヒト胃癌の腫瘍近傍に局注し、腫瘍のみならず転移リンパ節にもEPIが高濃度に移行することを確認している。

われわれは、この技術を発展させて、光感受性物質であるPHEをw/o/w型エマルジョンとして局注することにより、臨床投与量の約1/4のPHE量で、6時間後に静脈投与とほぼ同等の腫瘍内PHE濃度を得ることができた。

W/o/w型エマルジョンの特性として、1) 徐放性であり安定性もよい、2) 外水相が水であるため粘稠度が低く局所に適している、3) 作成が容易である、4) リンパ指向性が高いことが挙げられる。

低投与量で、より高濃度の腫瘍内濃度を得る目的のみならば、PHE水溶液の局注も考えられるが、山野ら¹⁰⁾がヌードマウスに移植したMKN-45腫瘍に行ったヘマトポルフィリン誘導体水溶液の局注と全身投与の比較実験では、局注群はレーザー照射後の腫瘍壊死が不均一であったと報告している。水溶液局注後の腫瘍内濃度を定量し、全身投与と比較した報告はなく、今後の課題であるといえよう。

今回の実験では検討できなかったが、PHEをw/o/w型エマルジョン化したもう一つの理由は、そのリンパ指向性の高いことに期待していることにある。転移リンパ節へのw/o/w型PHEエマルジョンの移行が確認できれば、PDTの適応が拡大できる可能性がある。

消化器外科の領域では、一部の早期癌を除いて、大部分の消化器癌は外科的切除が根治療法となるが、いわゆ

るStage IVの進行癌に対しては外科手術はほとんど無効で、放射線療法や免疫・化学療法^{11) 12) 13)}といった治療を駆使した集学的治療に委ねてはいるが、その治療成績も決して満足できるものには至っていない。

そこで、外科手術時に残存が予想される癌病巣に対し、術中に光化学療法を併用することにより、根治性を高めることを考えた。

今回の検討で、PHEをw/o/w型エマルジョン化して腫瘍周囲に局注することにより、腹腔内臓器への移行は、静脈内投与に比し極めて少なかったことが確認でき、開腹あるいは腹腔鏡下に光線に曝される周囲臓器の障害の危険性は、まずないと考えられた。

また、転移リンパ節においても、約2週間という長期間にわたり、エピルビシンが高濃度に滞留していたという、EPIエマルジョンによる経験と、PHEなど光感受性物質自体が腫瘍集積性の高い物質であることを考えあわせても、今後の検討で、PHEをw/o/w型エマルジョン化することにより、転移リンパ節に強く集積することが示唆される。

このことから、内視鏡下に原発巣周囲にw/o/w型PHEエマルジョンを局注して、1～24時間後に腹腔鏡下手術の一環としてYAG-OPOレーザーを照射する腹腔内転移巣のPDTが大いに期待できる。

また、われわれは光感受性物質とマイクロ波による抗腫瘍効果の存在することを実験的に確認している¹⁴⁾。表在性の腹膜転移や肝十二指腸間膜のリンパ節転移はYAG-OPOレーザーによるPDTを行い、肝腫瘍など実質深部に存在する固形腫瘍や癌性腹水に対してはマイクロ波とPHEエマルジョン併用によるマイクロ波力学的治療(Microwave dynamic therapy, MDT)を外科手術あるいは腹腔鏡下手術に応用して、進行消化器癌の手術成績の向上を図ることを今後の課題としたい。

5. 結語

PHEをw/o/w型エマルジョン化し、腫瘍周囲に局所投与することで、現在臨床応用されている静脈内投与量の1/4のPHE量で、血中および腹腔内臓器あるいは皮膚のPHE濃度を上昇させることなく、腫瘍内に高濃度にPHEを集積させることができた。

W/o/w型PHEエマルジョン局所投与1時間後にYAG-OPOレーザーを照射することにより著しい腫瘍破壊効果が確認できた。

以上より、w/o/w型PHEエマルジョンの局所投与による光化学療法も可能であることが実験的に証明できた。

本研究の一部は、文部省科学研究補助金(一般研究C

課題番号06671222)によった。

文 献

- 1) 多田正弘, 菊田幹夫; 消化器癌は内視鏡でどこまで治せるか. *Gastroenterol Endosc* 1992; 34: 1164-1169.
- 2) 嶋尾 仁, 比企能樹; 内視鏡的粘膜切除で不完全切除となった例に対するレーザー照射の効果と評価方法に対する検討. *胃と腸* 1993; 28: 1427-1432.
- 3) 永井祐吾. 早期胃癌に対する内視鏡的マイクロ波凝固療法の局所根治性に関する研究. *Gastroenterol Endosc* 1987; 29: 2453-2165.
- 4) 三村征四郎, 檜原啓之, 上原宏之, 他; 胃癌の光線力学的治療. *癌と化学療法* 1996; 23: 41-45.
- 5) 寺下史朗; 早期胃癌に対する内視鏡治療の補助化学療法に関する基礎的臨床的研究. *Gastroenterol Endosc* 1993; 35: 1793-1806.
- 6) 松本幸雄; w/o/w型エマルジョンについて. *油化学* 1986; 35: 667-672.
- 7) Ueda k, Matsumoto S.; Effect of proteins on the zeta potential of dispersed vesicular globules in w/o/w emulsions. *Bull Chem Soc Jpn* 1991; 64: 3163-3165.
- 8) Dougherty T. J., Lawrence G., Kaufman J. K., Boyle d., Weishaup K. R. et al.; Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1979; 62: 231-237.
- 9) Hayata, Y., et al.; Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer. *Chest.* 1982; 81: 269-277.
- 10) 山野三紀, 岡村毅と志, 佐藤信司, 他; 光化学療法の実験的検討—HpD局注投与と全身投与の比較. *日本レーザー医学会誌.* 1987; 8: 47-48.
- 11) 山上裕機, 谷村 弘, 角田卓也, 他; 胃癌に対するSDI法による抗癌剤感受性試験の改良. *医学のあゆみ* 1991; 158(3):173-174.
- 12) 岩橋 誠, 谷村 弘, 山上裕機, 他; 癌性腹膜炎を伴う胃癌に対する養子免疫療法を中心とした集学的治療. *日本癌治療学会誌* 1990; 25: 1558-1564.
- 13) Yamaue H., Tanimura H., et al.; Clinical and immunological evaluation of intraoperative radiation therapy for patients with unresectable pancreatic cancer. *J. Surg. oncol.* 1992; 49: 10-15.

- 14) 永井祐吾；胃癌手術後の腹腔内残存胃癌病巣に対するマイクロ波力学的治療の開発に関する研究，平成7年度科学研究補助金（一般研究C）研究成果報告書（課題番号06671222）1996.