総 説

Photodynamic Therapyにおけるレーザー光源
: パルス波レーザー光の細胞・組織傷害効果について

宮本 裕一, 西坂 剛

北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科

〒923-1292 石川県能美郡辰口町旭台1-1

TEL 0761-51-1682 FAX 0761-51-1685

Excitation sources in photodynamic therapy
: Photodynamic effects of the pulsed lasers in PDT

Yuuichi MIYAMOTO and Tsuyoshi NISHISAKA

Graduate School of Materials Science, Japan Advanced Institute of
Science and Technology, Ishikawa, 923-1292, JAPAN

要 旨

Photodynamic therapy (PDT) は、レーザー光による感光色素の励起に基づく光化学反応を利用した悪性腫瘍の治療法である。従来、励起光源にはアルゴンイオンレーザー励起色素レーザーなどの連続波レーザーが用いられてきたが、近年、いくつかのパルス波レーザーが利用されるようになった。パルス波レーザー光励起PDTの治療効果は、繰り返し周波数、パルス幅そしてパルスエネルギーなどのパラメータによって大きく異なる。本稿では、各種のパルス波レーザー光励起PDTの細胞傷害効果、およびその治療効果への関与が考えられる諸因子を概説する。

キーワード : Photodynamic therapy, パルス波レーザー, PDT効果

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is a treatment for malignant tumors employing the interaction of a photosensitizer with laser light in the presence of molecular oxygen. A continuous wave laser, usually an argon laser-pumped dye laser, has normally been used as the excitation light source in PDT. Recently, some pulsed lasers have become available. The effectiveness of PDT using a pulsed laser varies greatly with the operating conditions, for instance, repetition rate, pulse width and pulse energy. This review describes mainly the cytotoxic efficacy when using a variety of pulsed lasers,

(平成12年1月27日受理, 平成12年3月16日掲載決定)

(Received January 27th 2000, Accepted March 16th 2000)

and some factors that would contribute significantly to their therapeutic effects.

Key words : Photodynamic therapy (PDT), Pulsed laser, PDT effects

1. はじめに

Photodynamic Therapy (PDT) はレーザーを用いた癌治療法の一つであり、身体に対して侵襲の少ない早期癌の根治的療法として確立されている¹⁾.

PDTは癌患者にあらかじめ腫瘍親和性の感光色素(光増感剤)を投与し、病巣部に色素が蓄積したのを見はからいレーザー光の照射によって色素を励起し、光化学反応を介して癌を死滅させる方法である²⁾. PDTで得られる抗腫瘍効果は感光色素の励起に基づくものであり、より高い治療効果を求めるためには色素の開発はもちろん、適切な励起光源の選択も重要である.

PDTの励起光源として用いられるレーザーは、アルゴンイオンレーザー励起色素レーザー(ADL)をはじめとする連続波が主流であったが、近年多くのパルス波レーザーの治療効果も検討され、実際に導入されるようになった³⁻⁴⁾. パルス波レーザーには平均出力が同じであっても、繰り返し周波数やパルス幅などのパラメータの組み合わせによって多様な照射モードがある. つまりパルス波レーザー光励起PDTの施行にあたっては、波長、平均パワー密度、総照射量など従来連続波でも検討の対象とされてきたパラメータに加え、パルス幅や繰り返し周波数、さらにはピークパワー密度なども考慮する必要がある. 現在までにパルス波レーザー光励起PDTの治療効果に関する研究は、連続波レーザーとの比較を中心に数多くなされてきた. これらの研究に用いられたパルス波レーザーの照射条件は報告ごとに異なり、その治療効果や細胞傷害効果に対する評価も同様である(表1). すなわち連続波レーザーにはないパルス波レーザー特有の前記パラメータがPDTの治療効果に大きく影響することを示す結果となっている. 本稿では、これまでに得られているパルス波

レーザー光励起PDTに関する代表的な知見を整理し、概説するとともに、パルス波レーザー光励起PDTに期待される効果などについても言及する.

2. 金蒸気レーザー (GVL) のPDT効果

GVLはレーザー光の発振までに時間を要するなど管理維持に問題があるため現在ではあまり用いられることはない⁵⁾. しかし、連続波レーザー光励起PDTとの治療効果の比較が最も行われているパルス波レーザーである. これらのレーザーは繰り返し周波数が数kHz~数十kHz、パルス幅が数ns~数十nsであり、ピークパワー密度は数百W/cm²程度である.

久住ら⁶⁾は金蒸気レーザーを用いたPDTはADLを用いたものよりも治療効果が高いことを報告した. そして、①ヘマトポルフィリン誘導体(HpD)含有のKK-47細胞に1パルス照射することにより過渡的に光の透過率が上昇し、その回復時間が240 μ sであったこと、②GVLの光消散長がADLのそれよりも有意に大きいこと、③治療効果の増大には感光色素の過渡的なPhoto-bleachingが関与していることなどを指摘した. また、彼らは金蒸気レーザー光照射によるハイパーサーミックな細胞傷害機構の存在も示している.

一方、LaPlantら⁷⁾は積分球を用いてGVLとADLの光の組織深達性を兎腎筋組織を対象とし比較した. 彼らは両者の光の組織深達性に有意な差は認められなかったとし、GVL使用によるPDTの治療効果の増大には、これらのメカニズムは関与しないと結論づけている.

PDTの細胞傷害効果および治療効果については、Cowledら⁸⁾がRaji細胞とマウス固形腫瘍を、McCaughanら⁹⁾が腫瘍由来気管閉塞モデルを対

表1 各種パルス波レーザー光励起PDTの治療効果

Investigator	Pulse width	Repetition rate	Average power density(/cm ²)	Pulse energy	Peak power density(/cm ²)	Total light dose(/cm ²)	Wave length (nm)	Sensitizer	Objects	PDT effects
Cowled et al. (1984)(8)	50ns	10-14kHz	510mW	36-51μJ	720W	1-2.5J	627.8	HpD	mouse tumor culture cells	pulse=CW
Bellnier et al. (1984)(16)	1.6μs	4Hz	400mW	100mJ	62.5kW	125J	632	HpD	mouse tumor	pulse<CW
Hisazumi et al. (1986)(9)	50ns	7-10kHz	300mW	30-42μJ	600-840W	270-540J	627.8	HpD	mouse tumor	pulse>CW
Ben-Hur et al. (1987)(20)	9ns	4.5kHz	15mW	3.3μJ	370W	1-6J	680	AIPCS	culture cells	pulse<CW
Barr et al. (1989)(17)	2μs	5Hz	127mW	25.4mJ	12.7kW	64J	675	A3IPCS	rat colon	pulse<CW
Ferrario et al. (1991)(14)	470ns	25kHz	75mW	3.0μJ	6.38W	50-400J	630	Photofrin®	mouse tumor	pulse=CW
Okunaka et al. (1992)(10)	10ns	30Hz	200mW	6mJ	600kW	50J	630	HpD	mouse tumor	pulse>CW
Raush et al. (1993)(12)	20ns	30Hz	90mW	3.0mJ	150kW	150J	630	Photosan 3	mouse tumor	pulse>CW
Panjehpour et al. (1993)(15)	450ns	25kHz	400mW	16μJ	35.6W	300J	630	Photofrin®	canine esophagus	pulse=CW

象にそれぞれGVLとADLの比較を行ったが、いずれも有意な差は認められないと報告した。

3. エキシマレーザー励起色素レーザー (EDL) のPDT効果

EDLは現在わが国においてPDTの励起光源として認可されているパルス波レーザーであり、繰り返し周波数は数十Hz、パルス幅は数ns～数十ns、ピークパワー密度は数百kW/cm²からMWオーダーにも及ぶ。

奥仲ら¹⁰⁾はEDLとADLの腫瘍壊死深達度の比較をマウス固形腫瘍を用いて行い、EDLを用いたPDTはADLを用いたものよりも3倍～4倍の壊死深達度を持つことを明らかにした。村川ら¹¹⁾はEDLを用いたPDTをラット脳腫瘍に対してin vivoおよびin vitroにて行い、ADLと比較検討した。その結果、in vivoではレーザー強度に依存して腫瘍壊死深達度の上昇が見られたが、in vitroではEDLの有意性は認められなかった。Rauschら¹²⁾はヌードマウスに移植したヒト上皮癌細胞にEDLおよびADLによるPDTを行い、

それらのCR (complete remission : 完全寛解) 率を比較した。彼らはEDLはADLよりも高いCR率を得たと報告している。臨床的にも多くの研究者らがEDLの有効性を実証している。三村ら¹³⁾は胃癌に対してPDTを行い、mおよびsm癌ともにEDLのCR率がADLのそれよりも有意に高いことを示している。

4. KTPレーザー® のPDT効果

主として1990年代初頭にKTPレーザー®の有効性の検討が行われた。本レーザーはパルス幅が数百ns、繰り返し周波数が数十kHz以上であり、ピークパワー密度は比較的低い(数W/cm²程度)。

Ferrarioら¹⁴⁾はマウス移植腫瘍およびV-79線維芽細胞に対してADLとKTPレーザー®光励起色素レーザーによるPDTを行い、それぞれの効果を比較した結果、両者間における腫瘍の治癒率および細胞生存率に大きな違いは見られないことを示している。さらに彼らは感光色素(Photofrin®)の不可逆的なPhotobleachingの割合を比較するため、血清含有のPBS (phosphate-

buffered saline : リン酸緩衝液) に色素を添加した試料に対し各レーザー光を照射, その後の吸光度 (波長400nm) を測定した. その結果, ADL との間に有意な差は認められず, 本照射モードは Photobleaching 動態にはほとんど影響を与えないことが示唆された.

また, これと類似した条件での組織学的評価が Panjehpour ら¹⁵⁾ によってなされている. 彼らは犬食道組織 (Photofrin® 含有) を対象に ADL と KTP レーザー® 光励起色素レーザーによる PDT をそれぞれ行った結果, これらの効果は同等であったと報告している. また本レーザーのピークパワーでは, 感光色素の飽和は考えにくいとも述べている.

5. フラッシュランプ励起色素レーザー

フラッシュランプ励起色素レーザーは繰り返し周波数が数 Hz, 1 パルスあたりのエネルギーが数 m~数十 mJ であり, PDT に用いられる他のパルス波レーザーと比較してパルス幅は数 μ s オーダーと長い.

Bellnier ら¹⁶⁾ は, マウス移植腫瘍 (HpD 含) に対する PDT 効果を ADL とフラッシュランプ励起色素レーザーと比較している. 彼らはここで, パルス波レーザー光励起 PDT が連続波レーザーよりも効果的ではないことを報告している. また彼らは, パルス波レーザー光照射中の腫瘍内温度が 50°C 程度にまで上昇したという実験結果から, 熱的なダメージが正常および腫瘍組織に及んでいるとしている.

Barr ら¹⁷⁾ は, 感光色素にアルミニウムフタロシアニン (AlSPc) を用い, ラット大腸組織における壊死深達度を ADL および銅蒸気レーザー励起色素レーザー (波長 675 nm に調整) と比較している. 彼らの結果によれば, ADL と銅蒸気レーザー励起色素レーザーの壊死深達度には大きな差は見られなかったが, フラッシュランプ励起色素レーザーの群では前二者よりも格段に劣る結果となり, 組織に全くダメージを与えなかったという. 彼らはこの理由の一つとして AlSPc が

レーザーパルスのわずかな光により, 過渡的に Photobleach されてしまい, パルスエネルギーが有効に用いられなかったことをあげ, とくに AlSPc に効率的に吸収される 675 nm の波長では, より顕著にこのような現象が生じたのではないかと考察している.

6. パルス波レーザー光励起 PDT の組織・細胞傷害機構

6.1 熱による組織・細胞傷害効果

熱的な細胞傷害効果が期待できるのは繰り返し周波数の高いレーザーもしくはパルス幅の広いレーザーであると考えられる. すなわち, 1 パルス照射で与えられる熱エネルギーを次のパルスが照射されるまでに, 対象となる組織が緩和できるかどうかということである. PDT はもともと感光色素の吸収効率がよい波長を選択し照射していることから, 感光色素が含まれる組織に光を照射した場合, 色素を含まない組織に比べ, 熱の発生効率が高い. もっともこれは感光色素の無輻射遷移の割合, すなわち吸収した光が熱に変換される効率に依存するものであり, 使用する感光色素によっても効果が変わってくるものと考えられる. 熱的な細胞傷害作用の存在が示唆されるパルス波レーザー光励起 PDT は, GVL とフラッシュランプレーザーを励起光源とし, HpD を用いたものが知られている^{6, 16)}.

一方, PDT 効果が連続波レーザーより優れるとされる EDL 励起の PDT では熱的な傷害効果は認められていない. Rausch ら¹²⁾ の PDT 条件では照射中における腫瘍組織内の温度上昇は 3°C 程度であり, 熱的な細胞傷害効果は関与していないとしている. このことは, EDL の有するパルス照射間隔 (繰り返し周波数) およびパルス幅が腫瘍組織内の熱緩和に十分であることを示唆している. しかしながら, 過渡的な温度上昇は否定できず, これが細胞傷害に与える影響は明らかになっていない.

6.2 細胞傷害因子の生成効率

現在, パルス波レーザー光励起 PDT の細胞傷

図1 Q-スイッチNd:YAGレーザー第二高調波励起PDTによる細胞破壊
 (細胞: マウス肝癌由来MH134, 感光色素: Ga-C₁₀P (ATX-70))
 (a)走査電子顕微鏡像, (b)透過電子顕微鏡像 Bar = 5 μ m
 文献24)より許可を得て転載

害因子は十分解明されていないが、いくつかの知見が得られている。Karrerら¹⁸⁾はアミノレブリン酸 (ALA) を用いた実験系に一重項酸素のクエンチャーであるアジ化ナトリウムを添加することで、フラッシュランプ励起色素レーザー励起PDTにおける支配的な傷害因子が一重項酸素であることを明らかにしている。パルス波レーザー光励起PDTの数値解析的な手法による傷害効果の推定は、Sterenborgら¹⁹⁾によって行われている。彼らはパルス幅が短くなるほど酸素の消耗度が低下すること、ピークパワー密度が40kW/cm²以上になるとそのPDT効果が連続波レーザーを用いたときよりも低下することなどを主張している。これはin vitroで行われたいくつかの実験結果とも合致するものとなっている^{20, 21)}。この理論によれば、EDLを用いたPDTの光化学的な傷害効果は、ADL励起のPDTよりも劣るものとなる。しかし、本理論は①線形な吸収のみを考慮していること、②傷害機構をType II 反応 (一重項酸素による細胞傷害) に限っていること、③ Photobleaching を考慮していないこと、④酸素濃度は一定としていることなど、実際の状態を反映しているとは言い難い。最近Avelineら²²⁾は

EDLの仕様と比較的近いNd:YAGの第二・三高調波を用い、感光色素の三重項状態のself-quenching作用によるラジカル種の発生を報告している。

6.3 応力波 (衝撃波) による組織傷害効果

EDLのようなピークパワーの高いパルス波レーザー光を生体組織に照射すると、照射部位を発生源として応力波 (衝撃波) が生じる²³⁾。PDTは感光色素を用い、その吸収波長に合ったレーザー光を照射するため、レーザー光の吸収が高く、過渡的な断熱膨張による応力波の発生は通常より高くなることが予想される。こうしたことから、この応力波による治療効果の増大の可能性は多くの研究者らによって指摘されてきた^{3, 13)}。しかしながら、PDTのレーザー光照射において誘起される応力波は実測されておらず、またそれが細胞を傷害することが可能かどうかの検討はほとんど行われていないのが現状である。こうした中、我々はin vitroにおいてピークパワーの高いパルス波レーザーと連続波レーザーによるPDTの比較を行い、形態学的に検討を行った結果、応力波による細胞傷害機構の存在を示唆する細胞を観察した (図1)²⁴⁾。また平野ら²⁵⁾はEDL照射

(光子) による組織の圧力発生を報告している。

このような応力波の効果は、細胞・組織傷害のみに現れるわけではない。興味深い例として、Doukasら²⁶⁾はパルス波レーザー光誘起応力波によって細胞の膜透過性が上昇することを報告している。こうした現象を考慮すれば、パルス波レーザー光励起のPDTには感光色素の細胞内分布を変化させる作用があるのかもしれない。

6. 4 励起光の組織深達性の上昇

前述したようにピークパワーが低く、繰り返し周波数の高い金蒸気レーザーなどでは連続波レーザーと比較して組織深達にほとんど違いは見られないといった報告が多い。一方、EDLなどのピークパワーが高いレーザーは、実際に壊死深達度が上昇するという事実から、光の組織深達度を増大させる作用を有するものと考えられている。竹村ら²⁷⁾はin vivoのPDTにおいて壊死の最大深達度が連続波レーザーを用いるよりもパルス波レーザーを用いた方が相当に大きいことを光の深達度との関係によって理論的に証明している。Pattersonら²⁸⁾も、組織中の感光色素のPhotobleachingが光の組織深達度の増大に寄与することを理論的に示している。

7. まとめ

PDTの治療効果が感光色素の励起による光化学的な細胞傷害機構のみに基づくものであれば、励起光源としてのレーザーは、照射光を無駄なく感光色素の励起にのみ用いるものが望ましい。

金蒸気レーザーやKTPレーザー®などのPDT効果は連続波レーザー光励起PDTのそれと同等であるとする結果が多く、これらのレーザーの有する照射モードは感光色素の励起や細胞傷害因子の生成の増大に、ほとんど関与しないものと考えられる。

フラッシュランプ励起レーザーのPDT効果は、連続波レーザーよりも劣るものとなっている。すなわち、この照射モードは光化学反応の誘起に対して効率的に作用しないものと考えられる。また照射による温度上昇などが認められてはいるものの、治療効果に多大な影響を及ぼすものではなく、

重畳する効果もそれほど期待できないものと考えられる。

EDLに代表されるパルス波レーザー (ピークパワー: 数百kW以上, パルス幅: 数十ns以下, 繰り返し周波数: 数十Hz以下) は、数値解析において光化学反応に基づくPDT効果が連続波レーザー光励起PDTよりも低下することが示されている。また光の組織深達性がほとんど問題にならないin vitroの系における実験結果は、これを支持するものとなっている。しかしながら、in vivoで行われた過去の実験事実や臨床報告は、このパルス波レーザーの治療効果の増大を認めている。この増大した治療効果への関与が示唆されるいくつかの機構は、他のパルス波レーザーでは現れにくいものと考えられ、極論すれば、このパルス波レーザー特有のもの、すなわち、EDLなどのピークパワーが高く、パルス幅の短いパルス波レーザーの治療効果は、単純な光化学反応のみではなく、本稿で示してきた各種効果の相乗によって得られているものと考えられる。これらの詳細の解明が期待される。

参考文献

- 1) 奥仲哲弥, 加藤治文: 光線力学的治療法による癌治療 レーザー研究 24: 860-865, 1996.
- 2) 西坂 剛: ヘマトポルフィリン誘導体を利用したがんの光化学治療 化学と工業 41: 311-318, 1988.
- 3) Yamamoto, H., Kato, H., Okunaka, T., Eckhauser, M. L. et al.: Photodynamic therapy with the excimer dye laser in the treatment of respiratory tract malignancies, Lasers Life Sci., 4: 125-133, 1991.
- 4) 西坂 剛: Photodynamic therapy - 基礎的研究の現状 医学のあゆみ 173: 887-890, 1995.
- 5) 加藤治文: 光線力学治療法の治療法 過去・現在・未来 癌と化学療法 23: 8-15, 1996.
- 6) 久住治男, 山本肇, 越田潔 他: 光力学的癌治療における金蒸気レーザーの有用性に関する実験的研究 日本ハイパーサーミア誌 2: 142-155, 1986.
- 7) LaPlant, M., Parker, J., Stewart, B. Waner, M. et al.: Comparison of the optical transmission properties of pulsed and continuous wave light in biological tissue, Lasers Surg. Med., 7: 336-338, 1987.

- 8) Cowled, P. A., Grace, J. R. and Forbes, I. J.: Comparison of the efficacy of pulsed and continuous-wave red laser light in induction of photocytotoxicity by haematoporphyrin derivative, *Photochem. Photobiol.*, 39 : 115-117, 1984.
- 9) McCaughan, J. S., Barabash, R. D., Hatch, D. R. and McMahon, D. C.: Gold vapor laser versus tunable argon-dye laser for endobronchial photodynamic therapy, *Lasers Surg. Med.*, 19 : 347-350, 1996.
- 10) Okunaka, T., Kato, H., Konaka, C., Sakai, H. et al.: A comparison between argon-dye and excimer-dye laser for photodynamic effect in transplanted mouse tumor, *Jpn. J. Cancer Res.*, 83 : 226-231, 1992.
- 11) 村川孝次, 野倉宏晃, 坂井 昇, 他: Excimer Dye Laserを用いた脳腫瘍に対するPDTの実験的検討 第13回日本レーザー医学会大会論文集, 463-466, 1992.
- 12) Rausch, P. C., Rolfs, F., Winkler, M. R. et al.: Pulsed versus continuous wave excitation mechanisms in photodynamic therapy of differently graded squamous cell carcinomas in tumor-implanted nude mice, *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 250 : 82-87, 1993.
- 13) Mimura, S., Narahara, H., Otani, T., Okuda, S.: Photodynamic therapy for early gastric cancer : its application for wider lesions, *SPIE* 2371, 522-525, 1995.
- 14) Ferrario, A., Rucker, N., Ryter, S. W., Doiron, D. R. et al.: Direct comparison of in-vitro and in-vivo photofrin-II mediated photosensitization using a pulsed KTP pumped dye laser and a continuous wave argon ion pumped dye laser, *Lasers Surg. Med.*, 11 : 404-410, 1991.
- 15) Panjehpour, M., Overholt, B. F., DeNovo, R. C., Petersen, M. G. et al.: Comparative study between pulsed and continuous wave lasers for Photofrin photodynamic therapy, *Lasers Surg. Med.*, 13 : 296-304, 1993.
- 16) Bellnier, D. A., Lin, C. W., Parrish, J. A. and Mock, P. C.: Hematoporphyrin derivative and pulse laser photoradiation, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 170:533-540, 1984.
- 17) Barr, H., Boulos, P. B., MacRobert, A. J., Tralau, C. J. et al.: Comparison of lasers for photodynamic therapy with a phthalocyanine photosensitizer, *Lasers Med. Science*, 4 : 7-12, 1989.
- 18) Karrer, S., Baumler, W., Ables, C. et al.: Long-pulse dye laser for photodynamic therapy : investigations in vitro and in vivo, *Lasers Surg. Med.*, 25 : 51-59, 1999.
- 19) Sterenborg, M. J. C. M. and Gemert, M. J. C.: Photodynamic therapy with pulsed light sources : a theoretical analysis, *Phys. Med. Biol.*, 41 : 835-849, 1996.
- 20) Ben-Hur, E., Newman, H. C., Crane, S. W. and Rosenthal, I.: Pulsed versus continuous-wave 680nm laser light in photosensitization by chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate, *Proc. SPIE*, 847 : 154-157, 1987.
- 21) Miyamoto, Y., Umebayashi, Y., Nishisaka, T.: Comparison of : phototoxicity mechanism between pulsed and continuous wave irradiation in photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.*, 53 : 53-59, 2000.
- 22) Aveline, B. M., R. M. Sattler, R. M., Redmond, R. W.: Environmental effects on cellular photosensitization : correlation of phototoxicity mechanism with transient absorption spectroscopy measurements, *Photochem. Photobiol.*, 68 : 51-62, 1998.
- 23) Cleary, S. F.: Laser pulses and the generation of acoustic transients in biological material, *Lasers Applications in Medicine and Biology* 3 (Edited by M. L. Wolbarsht) pp. 175-219, Plenum Press, New York, 1977.
- 24) Miyamoto, Y., Umebayashi, Y., Nishisaka, T.: Morphological changes of MH134 cells after the pulsed and the continuous wave laser irradiation in photodynamic therapy, pp31-36, *Recent Progress of photodynamic therapy*, Proc. 7th Annual Conf. of JCIPA, IONICS Pub., Tokyo, 1997.
- 25) 平野 達, 袴田欣也, 鈴木健司, 他: パルスレーザーの光特性, 第6回国際光化学治療学会日本支部例会抄録集, 31-32, 1996.
- 26) Doukas, A. G., Flotte, T. J., Physical characteristics and biological effects of laser-induced stress waves, *Ultrasound in Med. & Biol.* 22 : 151-164, 1996.
- 27) Takemura, T., Umeuchi, S., Nakajima, S. et al.: Mechanism of photodynamic therapy (PDT) : Investigation of sensitizer dose and light dose rate effects, *SPIE* 2371, 351-354, 1995.
- 28) Patterson M. S., Wilson B. C.: A theoretical study of the influence of sensitizer photobleaching

ching on depth of necrosis in photodynamic
therapy, SPIE 2133, 208-219, 1994.