光化学治療の分子化学的解析

Molecular Analysis of PRT

○藤村 寛 有山重美 大谷達夫 大下芳人 岡崎幸紀

竹本忠良

○Hiroshi Fujimura, Shigemi Ariyama, Tatuoto Otani,

Hideto Oshita, Yukinori Okazaki, Tadayoshi Takemoto

山口大学医学部第一内科

First department of Internal medicine, Yamaguchi University. school
of medicine.

ABSTRACT

Characteristic ESR spectrum is detected only after PRT. This ESR spectrum was considered triplet signal which is peculiar to R_2NO radical. We regarded this ESR spectrum as a product of HpD after PRT. We believe the strength of ESR spectrum is correlative with the volume of HpD which is absorbed into cells.

Based on this opinion, we measured the ESR spectrum after PRT with patient and animals. In the result, we conclude that the second day after HpD injection is most optimum condition for PRT.

はじめに

最近、胃癌に対する新しい治療法として、hematoporphyrin derivative (HpD) による photoradiation therapy (PRT) が注目されている。しかし、本法の最適条件の設定などには多くの問題点が残されています。そこでわれわれの研究グループは電子スピン共鳴法 electron spin resonance (ESR) の手法を導入し、光化学効果 photoradiation effect の解析を分子化学的に行った。その

経時的变化を癌部、非癌部において、患者や動物実験により観察し、先に述べた問題点の検討を行ってみた。

器具および使用薬剤

本研究に使用したのは Spectra Physics 社製 Model 770 型 Argon laser 発振器、門田製作所製 laser 用内視鏡装置、西坂らの開発した round tip 型 quartz fiber, Oncology Research 製 HpD、日

本電子製 ESR spectrometer, JES-ME-1X、石英製 ESR 用試料管、液体窒素、画像解析用コンピュータシステムなどである。

方 法

- 1) Wister 系雄性ラットに HpD を胃内、腹腔内に投与し、12, 24, 36, 48 時間後に胃粘膜に Argon laser を照射し組織を採取する。
(HpD 5.0mg/kg, Argon laser 500mW, 20min)
- 2) ビーグル犬に HpD を静脈内投与し、その 12, 24, 48, 72, 168 時間後に Argon laser を照射し直視下生検により組織を採取する。
(HpD 2.5mg/kg, Argon dye laser 200mW, 20min)
- 3) 胃癌患者を対象に photoradiation therapy (PRT) の前後で直視下生検により組織を採取する。
(HpD 2.5mg/kg, Argon laser 500mW, 20min)
- 4) 1)~3) の各々の組織を採取後直ちに冷却した生食で洗浄し、石英製の試料管につめて溶封する。
- 5) ジュワーびんに液体窒素を満し、中心に試料管を挿入し凍結した後に ESR spectrometer で測定を行う。

結果と考察

ヒトにおける photoradiation therapy 後の ERS スペクトルでは、3300 Gauss 付近に 3 本の ESR

Fig. 1 光化学治療後の ESR スペクトル

シグナルが認められた。ESR シグナルをコンピュータにより解析してみた (Fig. 1)。これらのシグナルはそれぞれ、g 値が 1.9998, 2.0099, 2.0201 の位置に等強度でしかも 15.1 Gauss の等間隔な 3 本のシグナルであった。このスペクトルの信号強度は内部標準物質 Mn^{2+} のそれよりやや弱く、HpD 溶液にみられたシグナルとはまったく異なるものであった。

ESR 強度

Fig. 2 laser 照射時間による ESR の変化

Fig. 3 N 核による超微細構造

Argon laser の照射時間を変えてみると、Fig.2 のように ESR スペクトルの信号強度も変化しており、照射前では特異的なシグナルはまったく検出されなかった。照射後20分までは急速に信号の強度が増加することが観察された。このシグナルも温度変化や時間経過に対してはきわめて安定なものであった。

このようにして得られた3本線(triplet)の等間隔、等強度のシグナルについて、われわれは R_2 NO・ラジカルと考えた。Fig.3にみられるように ^{14}N 核のスピ量子数は1であるから、各電子スピンの準位は3となり、電子スピンMsの準位は ^{14}N 核の核スピンとの相互作用により3つの準位に分裂し、選択律により3本の等間隔、等強度の ^{14}N 核の超微細構造 hyperfine structure ; hfs が観察されると考えられる。このような ESR スペクトルの出現する理由としては、PRTによりボルフィリン骨格が oxidation により切断され、 $R_2\text{NO}$ ラジカルが発生すると推測される。

そこでラットとビーグル犬を用いた実験を行った。正常ラットを用いて、HpD 5.0mg/kg を胃内投与、腹腔内投与したのちの ESR 信号強度を Fig.4 に示す。この表より投与後、12時間から36時間までに HpD がすみやかに排泄されることがわかる。次に、ENNG を用いて発癌させたビーグル犬の癌部、

非癌部の PRT 後の ESR 信号強度を Fig.5 に示す。正常部では、ラットと同様に48時間までに HpD がすみやかに排泄されています。また、正常部と癌部を比較してみると、投与後12時間、24時間では有意差は認めないが、48時間以後では癌部で高値を示し、有意差がみられる。ビーグル犬における PRT 後の ESR 信号強度比をグラフ (Fig.6) に示す。黒丸が癌部、白丸が正常部をあらわしている。このグラフより HpD 投与後2日目(48時間)が正常部と癌部の HpD 含有量の差が最大となり、PRT における Argon レーザーの照射効率がもっとも良いと考えた。

ラットにおけるPRT後のESR信号強度 ($\Delta\text{HpD}/\text{Mn}$)

	コントロール	12時間	24時間	36時間	48時間
胃内投与	(-)	2.10±0.24 *1	0.63±0.19 *2	0.19±0.02 *3	0.10±0.02 *4
腹腔内投与	(-)	0.25±0.02 *5	0.19±0.03 *6	0.10±0.02 *7	0.09±0.01 *8

*1 - *2	p<0.01	*7 - *8	n.s.
*2 - *3	p<0.05	*1 - *5	p<0.001
*3 - *4	p<0.01	*2 - *6	p<0.05
*5 - *6	p<0.05	*3 - *7	p<0.01
*6 - *7	p<0.05	*4 - *8	n.s.

Fig. 4

ビーグル犬におけるPRT後のESR信号強度 ($\Delta\text{HpD}/\text{Mn}$)

	コントロール	12時間	24時間	48時間	72時間	168時間
正 常	(-)	0.08±0.02 *1	0.10±0.02 *2	0.04±0.01 *3	0.02±0.04 *4	(-)
癌	(-)	0.08±0.04 *5	0.09±0.01 *6	0.09±0.02 *7	0.06±0.05 *8	0.03±0.01 *9

*1 - *2	p<0.05	*5 - *6	n.s.	*1 - *5	n.s.
*2 - *3	p<0.01	*6 - *7	n.s.	*2 - *6	n.s.
*3 - *4	n.s.	*7 - *8	n.s.	*3 - *7	p<0.05
		*8 - *9	p<0.01	*4 - *8	p<0.01

Fig. 5

ESRを用いたビーグル犬におけるレーザー照射後のHpD/Mn比の変化

Fig. 6

結 論

Argon レーザー照射の効率がもっとも良いと考えた。

- 1) Argon laserを用いた photoradiation therapy (PRT)の解析を行うため、ラットの胃粘膜、イヌ、ヒトの胃癌についてESRスペクトルの測定を行った。
- 2) HpD投与前のコントロール群では、ラット、イヌ、ヒトいずれも特異的なスペクトルは検出されず、PRT後にのみtriplet シグナルが検出された。
- 3) このtripletシグナルはポルフィリン 環の開裂によって生じたR NO・ラジカルと考えられ、また、信号強度 Δ HpD/MnはPRTの効果を表わしていると思われた。
- 4) ラットの実験では、 Δ HpD/Mnは12時間から36時間にかけて急激に減少を示し、正常胃粘膜ではHpDはすみやかに排泄されと考えられた。
- 5) ビーグル犬を用いた実験では、癌部は正常部に比較してHpDの排泄は遅延しており、1日目までは統計的に有意差はないが2日目以降では有意差が認められた。
- 6) 今回の実験では種特異性は多少みられるがHpD投与後2日目が正常部と癌部の粘膜内のHpD含有量の差が最大となり、PRTにおける