実験腫瘍による Acridine Orange と Argon Laser を用いた Photodynamic therapy

東京大学医学部医用電子研究施設臨床部門

本 村 喜代二・中 島 正 治

渥 美 和 彦・

熊本大学医学部整形外科教授

北 川 敏 夫

Photo-Dynamic Therapy of Experimental Tumors Using Acridine-Orange and Argon-Laser

by

K. Motomura, M. Nakajima, and K. Atsumi

Institute of Medical Electronics, Faculty of Medicine,
University of Tokyo

T. Kitagawa

Department of Orthopedic Surgery, Faculty of Medicine,
University of Kumamoto

We use Donryu rats (100 g) transplanted Walker's Carcino-sarcoma subcutaneously as experimental tumors.

When tumor attained 2 cm of its maximal diameter, we injected 3 mg Acridine orange intraperitoneally.

After 48^{hr}, Argon-Laser was irradiated (5w, 250 sec, C. W) on this tumor, and still more on second day from irradiation, we made tumor cells separatedly and stained them by Feulgen method.

We measured DNA-content distribution with MMSP-RF, Absorption spectrum with MMSP-TU, and emission spectrum with MMSP-RFF.

Still more we checked transtimidal change of intratumor temperature during Argon-Laser irradiation with Thermography & Thermister.

As to DNA content distribution, there was no discrepancy between control group (administrated nothing or Acridine-Orange only) and photodynamic therapy group (Acridine-Orange + Argon Laser).

As to emission spectrum of intracellular Acridine-Orange, orthochromatic cell has maximal emission peak at 515 nm, but metachromatic cell has at 535 nm or more longer wave shift.

As to emission spectrum of Feulgen stained cells, normal DNA has maximal peak at 610 nm, but Acridine-Orange administrated & photodynamic therapy group have maximal peak at 620 nm or more longer wave length.

Shift to longer wave length can be seen also in heat-degenerated DNA.

During photodynamic therapy, the highest temperature retained less than 40°C.

Adding to these results, photodynamic-therapied Rats could survive more longer than any other therapied rats significantly.

And we could observe perfect disappearance of transplanted tumors in some rats.

From these observations, we think Photodynamic-Therapy is one of the useful anticancer-therapy.

最近国内に於けるレーザー (Laser) は、医学・工学分野を中心に急速に普及している。Laser とは、Light Amplification of Stimulated Emission of Radiation の頭文字をとったもので、レーザー光の誘導理論は、1917年、アインシュタインにより確立された。レーザー光の特徴は、単色性・干渉性・指向性・集束性・パルス性・高出力性・高輝度性と表現されるが、現在、レーザーの種類も極めて多岐に及び、医学領域では、種々の利点から CO₂ Laser, YAG Laser, Ruby Laser, Argon-Laser が普及している。一部のレーザー光は、Optics Fiber により光を誘導し、無侵襲外科治療の分野でも応用されている。

今回我々は、当教室に導入された種々のレーザーのうち Argon Laser を用いて特に、その抗腫瘍効果の点から基礎実験を行ったので、その結果を報告する。

実験目的

Argon laser と Photosensitizing-Agents の組み合わせによる Photodynamic Therapy³⁾ の抗腫瘍効果について、特に DNA を中心に、検討する。

方 法

実験動物としては、岐阜・熊本両大学整形外科より供与された Donryu-Rats の皮下に、移植された Walker's carcino-sarcoma を使用した。Photosensitizer としては、文献上の検討から Acridine Orange (A. O.) を使用した。使用レーザーは、米国 S. P. 社製の Argon laser (Ar) を使用した。エネルギー強度は、基礎実験の結果から 5 W, 250 Sec と統一した。レーザー光は、ファイバーにより、腫瘍直上 15 cm から Defocussing して照射した。A. O. は、腫瘍の最大径 2 cm の時点で、3 mg を腹腔内に注入し、48^{hr} 後に Ar を上記条件にて皮膚の上から、または皮膚を除去して露出後照射した。更に48^{hr} 後に、一部の実験では、腫瘍細胞を採取し、Feulgen 染色して DNA 量分を Olympass-MMSP にて計測し、更にその染色細胞の Absorbance Spectrum を MMSP-HF-TU、及び Emission Spectrum を、MMSP-HE-RFF にて計測した。照射中の腫瘍内の温度変化を知るために、サーモグラフィー及びサーミスタ温度計にて経時的に計測した。

結 果

(1) Photodynamic therapy の延命効果について
無治療群、A. O. 単独投与群、Ar 単独照射群の平均生存日数は、各々 14.34 ± 1.21 , 15.21 ± 2.42 , 14.38 ± 1.89 であり、各群に有意差は、認めなかった。しかし Photodynamic therapy (A. O.+Ar) 群では、照射後死亡する迄の平均日数だけでも、 28.21 ± 3.26 日で、既に4カ月以上生存し、腫瘍が完全消滅したものも観察された。故に Photodynamic therapy は抗腫瘍効果があるものと判断された。

(2) DNA 分布について

無処置群、A. O. 単独投与群、A. O.+Ar 群において、特に量的分布差は、認めなかった。(Ploidy の減少化や、Hyperploid Cell の抑制傾向等) しいて言う、A. O. 投与群では、2C, 4C等の Orthoploidy に、DNA 分布が集中している結果が得られた。(合成期の細胞、即ち Growth Fraction の低下を示す。) これは A. O. の本来有する抗腫瘍効果の故かどうかは断定できなかった。各群の特徴的 DNA 分布を Fig. 1 に示す。

(3) 蛍光波長について

細胞内に取り込まれた A. O. は、その Emission

Fig. 1 Distribution of DNA contents of Cells

Fig. 2 Emission Spectrum of Intracellular Acridine Orange

Fig. 3 Absorption Spectrum of Various Dyes

Spectrum を調べると 510~520 nm にピークを作る。これはリンパ球・肝細胞・皮膚細胞においても同じである。たゞ、一部の腫瘍細胞においては、オレンジ蛍光の他に、グリーン¹⁸⁾を発するものも含まれており、これらでは、535 nm にピークを有していた。(Fig. 2-a & b) Feulgen 染色した細胞の Absorbance Spectrum をみるといづれも、575 nm に吸収ピークを認めた。Feulgen 染色に使用される Pararose Anilin, Basic Fuchsin は、その Absorbance Spectrum のピークを 520 nm に有し Pararose Anilin に Formalin を滴下して発色させたものは 535 nm にピークを有する Absorbance Spectrum が得られた (Fig. 3). Emission Spectrum を調べると、正常リンパ球を Feulgen 染色した場合は 610 nm に Emission Peak を有し (Fig. 4-a), A. O. を投与した場合、及び A. O.+Ar 群の細胞を Feulgen 染色した場合の Emission Spectrum は、615~620 nm にピークを有しやや長波長側へのシフトをおこす事が判った (Fig. 4-b)。

それで我々は、リンパ球を故意に 80°C にて加熱してその DNA の変性をおこしめさせて、Feulgen 染色を行った後に Emission Spectrum を計測した。結果は、未加熱群に対して加熱変性群ではピークが 610~630 nm の間に 2 峰性をもって出現したり Bimodal Pattern)、巾広い Plateau を形成する所見が得られた。(Fig. 4-c) 一方、照射中の腫瘍内温度変化をみると、サーモグラフィ及びサーミスタ温度計による温度変化は、いづれも Fig. 5 に示された如く、上昇しても 40°C 以下である事が判った。対照として A. O. を与えずに Ar のみを照射した群の温度変化をみたが、浅・中・深層とも上昇温度は、4°C 以下で Photodynamic therapy 時の様な温度の急上昇を示す変化はなかった。腫瘍を露出せずに、皮膚の上から Photodynamic therapy (Unexposed

Fig. 4 Emission Spectrum of Feulgen stained Cells

Photodynamic therapy) を行なうと Fig. 5-a の如く、最初の温度は 1~2°C 下降し、ついで徐々にしか上昇しないが、腫瘍を露出してから Exposed Photodynamic therapy を行なうと、Fig. 5-b の如く浅・中層は、直後より上昇ははじめ、1 分あたりで加速的に上昇し最終的には 8°C 位の上昇を示した。この結果は Ar のエネルギーが、かなり皮膚によって吸収される事を示しており、腫瘍に対する直接開創照射の有効性を示しているものと解釈できる。(エネルギーの吸収性及び到達性の観点から。)

考 察

Laser と素色 Photosensitizer を組み合わせた腫瘍治療¹⁴⁾が、現在活発に行なわれており、その中で

Fig. 5 Change of the Intratumor Temperature during Photodynamic therapy

も特に Ruby Laser, Melanin 色素を応用した Malignant Melanoma⁷⁾ の治療では、すでに臨床上の実用段階に、はいっている。Photodynamic therapy に使用されている色素には Acridine Orange¹⁵⁾¹⁶⁾ の他に Janus Green, Hematoporphyrin, Methylene Blue が挙げられているが、Vital stain の点からは Acridine Orange と Hematoporphyrin が最も有力と考えられている。これら色素の他に Indomethasine と Dexamethasone も細胞内にて蛍光を発する事が報告されており今後、併用療法薬剤として使えるかどうか、検討中である。

また制癌剤の Actinomycin-D も、文献的には、A. O. と DNA に対する結合親和性 (Affinity) が、類似していると報告されており興味深い。現在我々は、有色制癌剤として Adriamycin, その他 Mitomycin 等による Photodynamic therapy を検討中である。今回使用した A. O. は、比較的高濃度に腫瘍細胞に、とり込まれる事が判っており、かつ A. O

の Absorbance Spectrum が Ar の波長成分と一致している点も、本治療の重要なポイントと考えられる。

そもそも、A. O. の細胞に対する相互作用¹⁷⁾ に関しては、多くの事実が報告されているが、要旨としては、A. O. は、細胞の Lysosome²⁾ に取り込まれ、また DNA に結合する時は Active Extended Euchromatin¹⁾ に結合する事が知られている。この Euchromatin は、DNA の合成を regulate する方向に作用するので A. O. のみでも、抗腫瘍効果⁹⁾¹⁵⁾ が期待されるとされている。(我々の実験では A. O. のみにての抗腫瘍効果は顕著でなかったが DNA-distribution⁴⁾ における結果は、それを示唆していた。)

DNA-content distribution⁴⁾ にて、各群間の分布差を認めなかったのは、治療から細胞の染色時間までが 48hr と短かったために、量的変化をおこすに十分な Cell cycle time を経過していなかったか、または、量的変化よりも質的变化が先行したためと考えた。

その観点で我々は、Feulgen 染色後の DNA 蛍光波長のスペクトラムを計測し、Photodynamic therapy を行った群の Emission-Spectrum が長波長側へシフトする結果を得た。更に DNA を加熱変性した場合も、長波長側へのシフトや 2 峰性のピーク形成、Plateau 形成が確認され Photodynamic therapy により DNA に何らかの熱変性機序に近い質的变化を生ずる事を推察させた。

波長の長波長側へのシフトに関しては文献上も散見されるにすぎないが、その中の記述によると、シフト (Shift)²⁾ がおこるのは、DNA の Double helix structure が Single strand に変る場合²⁾、及び DNA そのものに Fragmentation がおこる場合²⁾、更には、DNA 量が正常の密度以上に存在する場合²⁾ が報告されている。

本法は、DNA の質的变化を数字でとらえる事のできる有効な手段となるか、今後の研究を更に進める予定である。

Photodynamic therapy の作用機序の一面を知るために、腫瘍内温度変化を計測したが、照射中の腫瘍内温度変化は¹²⁾¹³⁾、DNA 変性をおこすに十分な温度には達せず 40°C 以下の事実をふまえ、抗腫瘍効果の因子として、熱効果を一義的には考え難いと結論し

た。

文献上も Photodynamic therapy の作用機序要因として、熱効果 (Heat effect) の他に Active Biradicals¹⁰⁾ や Trioxan¹⁰⁾, Toxic components¹¹⁾ の形成等が報告されているが、極めて興味深い分野である。

レーザーと腫瘍治療効果に関係する因子^{5) 8) 13)} としては、(1) レーザーの種類とエネルギー、(2) 腫瘍の性質、(3) Vascularity (4) エネルギーの吸収度、(5) Thermalcapacity & conductivity (Thermal gradient effect) (6) Reflections between various tissue-interfaces が挙げられる。

レーザーの有する種々の利点、たとえば高エネルギーを利用しての硬組織の切除、止血効果を利用しての肝切除、及び血管腫の除去、集束性を利用しての脳外科、耳鼻科での Microsurgery への応用、色素を利用しての腫瘍治療や、形成、美容外科での色素斑の治療等、応用範囲は、極めて広いと考えられる。

整形外科領域でも、腫瘍治療を始め、骨の切断や、無菌的関節外科手術への応用、おおいに今後が期待される分野であると考ええる。

総 括

1. Acridine Orange と Argon Laser を用いた Photodynamic therapy において、顕著な抗腫瘍効果が得られた。

2. Photodynamic therapy に於いて、腫瘍細胞の DNA の量的分布よりも、蛍光染色後の Emission Spectrum における長波長側へのシフト等、質的面での変性を示す所見を得た。

3. Photodynamic therapy における熱効果は、その作用機序として、第一義的な因子とは考がえ難いと判断した。

4. A. O. 等の色素の他に、有색性制癌剤にも Ar と相乗効果を有すると期待されるものがあり、現在検討中である。

References

- 1) Allison, A. C.: Uptake of Dyes & Drugs by Living Cells in Culture. Life Science, 3: 1407-1414, 1964.
- 2) Bradley, D. F.: Aggregation of an Acridine-Orange on Native & Denatured DNA Nature, 184: 1920, 1959.

- 3) Diamond, I.: Photodynamic therapy of Malignant tumors. The Lancet, Des, 2: 1175-1177, 1972.
- 4) Ehlers, S.: Zur Frage der kanzerogenen Wirkung von Rubinlaserstrahlen. Med, Klini, 68: 1229-1238, 1973.
- 5) Fine, S. & Klein, E.: Interaction of Laser radiation with Biologic systems. Fed. Proc, 24 (1): s35-47, 1965.
- 6) Frenster, J. H.: Electron Microscopic Localization of Acridine Orange Binding DNA within Human Leukemic Bone Marrow Cells. Cancer Res, 31: 1128-1132, 1971.
- 7) Helsper, J. T.: The Biological Effects of Laser Energy on Human Melanoma. Cancer, 17: 1299-1304, 1964.
- 8) Klein, E.: Interaction of LASER radiation with Biologic systems. (Experimental tumors) Fed. Proc, 24: s150-154, 1965.
- 9) Lewis, M. R.: In vivo staining and retardation of Tumors in mice by Acridine. Amer. J. Med. Scie, 215: 282-295, 1948.
- 10) Marshall, P. M.: The Laser Photochemistry of Quinones Under Aerobic Conditions. Annals. N. Y. Academy of Scie, 201-215, 1977.
- 11) May, J. F.: Intercellular Transfers of Toxic Components after Laser Irradiation. J. Nat. Cancer Inst, 46: 3, 655-663, 1971.
- 12) McGuff, P. E.: The Laser Treatment of Experimental Malignant Tumors. The Canadian Med. Assoc, 91: 21, 1089-1095, 1964.
- 13) McGuff, P. E.: Effects of Laser radiation on Tumor transplants. Fed. Proc, 24: s150-154, 1965.
- 14) Paul, J. S.: Laser induced changes in DNA synthesis & Embryonic development in Sea Urchins. Cell Res, 60: 166-174, 1970.
- 15) Thomas, T. J.: Activated Dyes as Anti-cancer Agents. J. Nat. Cancer Inst, 52: 1333-1336, 1974.
- 16) Tomson, S. H.: Tumor destruction due to Acridine Orange Photoactivation by Argon Laser. Annals N. Y. Academy of Scie, 191-200, 1977.
- 17) Tomson, S. H.: Photodestruction of Mouse Epithelial Tumors after Oral Acridine Orange & Argon Laser. Cancer Res, 34: 3124-3127, 1974.

- 18) Wolf, M. K.: Growth, Fluorescence and Metachromasy of Cells Cultured in the Presence of Acridine Orange. J. Histochem. Cytochem., 9: 22-29, 1961.

質 問 国立福岡中央病院 西川 耕平

- ① アクリジン・オレンジが Tumor cells に選択的にとり込まれる理由？
② 治療開始期の Tumor の大きさは？

解 答

- ① アクリジンオレンジは投与量が少いと interc-

alation され多量に与えると hindering すると考えられている。従って Tumor cell に選択的にとり込まれるとは考えていないがその部分のみをレーザで励起して特異効果を与えることにより、Tumor のみをたたこうと意図したものである。

② 論文上は 2 cm としてあるが 2 cm では一部壊死に陥る為現在は 1.5 cm におとしてやっている。増殖能力を十分に発揮させる点においては 1 cm でも十分と考えている。