

平成21年 5月25日現在

研究種目:基盤研究 (C)

研究期間: 2006 ~ 2008

課題番号: 18591915

研究課題名(和文)インドシアニングリーンとフェムト秒レーザーによる光線力学療法の開発

研究課題名(英文)Development of Photodynamic therapy with Indocyanine green and femto second pulse laser

研究代表者

大路 正人 (OHJI MASAHITO)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90252650

研究成果の概要:

加齢黄斑変性に対する新たな光線力学療法の開発を目的とした。インドシアニンググリーン(ICG)とフェムト秒パルスレーザーを組み合わせた光線力学療法(ICG-PDT)の効果を検討した。ラット脈絡膜新生血管(Choroidal neovascularization; CNV)モデルにおいて、ICG-PDTは効果的に新生血管を閉塞させることができた。in vitroの実験ではICG-PDTでは活性酸素種の発生を確認できただけでなく、VEGF発現を抑制することができ、従来のPDTよりも、より安全に効果的に治療を行うことができる可能性がある。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 外科系臨床医学・眼科学

キーワード: 光線力学療法、ICG、フェムト秒レーザー、新生血管

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性や強度近視に伴う脈絡膜新生血管は欧米先進国では社会的失明原因の第一位であり、わが国においても、社会の高齢化と生活様式の欧米化に伴い、急激に増加してき

ている。それに対する治療法として、2004年にベルテポルフィンを光感受性物質として用いた光線力学的療法がわが国においても認可され、現在では加齢黄斑変性に伴う脈絡

膜新生血管に対する治療法の第一選択となっている。しかしながら、ベルテポルフィンを用いた光線力学的療法は平均視力が維持されるものの視力改善が得られる症例は少ない、繰り返しの治療が必要である、光線過敏症を防御するために数日間光を避ける必要がある、光感受性物質であるベルテポルフィンが高額である、などのさまざまな問題点がある。肝機能測定や眼科の造影検査に用いられているインドシアニングリーンは、広く臨床応用されており、その安全性は確立されている。われわれは、この薬剤がベルテポルフィンに代わる光感受性物質として光線力学療法に用いることができる可能性があると考えている。海外において、インドシアニンググリーンと半導体レーザーの組み合わせの治療は動物実験などの基礎実験を行うことなく臨床検討が開始されている。しかしながら、半導体レーザーは連続波であり、熱発生の可能性が極めて高く、その照射による治療は、光線力学的療法ではなく、dye-enhanced thermal therapyの可能性もある。後者の影響を考えると、病巣である脈絡膜新生血管を治療するだけでなく、病巣周囲の健常組織障害の危険性が高い。

そこで我々は、フェムト秒レーザーの一種であるチタンサファイアレーザーに着目した。フェムト秒レーザーは熱発生の可能性がほとんどなく、それとインドシアニンググリーンを組み合わせることにより光線力学療法が可能であれば、病巣周囲の健常組織障害の危険性が少なく、より良い視力改善やより少ない治療回数を達成できる可能性がある。また、それだけではなく、光線過敏性反応の危険性がなく、安価であり、加齢黄斑変性の治療を大きく変える可能性を秘めていると思われる。

2. 研究の目的

インドシアニンググリーンとフェムト秒レーザーを用いた光線力学療法の可能性と安全性を検討することを目的とする

(1) フェムト秒レーザーと ICG による PDT の新生血管閉塞効果の検討

光感受性物質にインドシアニンググリーン (Indocyanine green; ICG)、光源にフェムト秒パルスレーザーを用いて、新しい加齢性黄斑変性の光線力学治療について検討した。

(2) フェムト秒レーザーと ICG による PDT における ROS 発生の評価

一般的な光線力学治療 (Photodynamic Therapy; PDT) は活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) による殺細胞効果が治療の原理と考えられているが、その作用機序については不明な点が多い。また、本研究はフェムト秒パルスレーザーを用いるため、一般的な連続発振レーザーを用いた PDT とは作用機序が異なる可能性がある。そこで、ICG を用いた光線力学治療における ROS 発生量に関して、超短パルスレーザーと連続発振レーザーの比較検討を行った。

(3) フェムト秒レーザーと ICG による PDT における VEGF 発現の評価

近年、レーザー照射により様々な増殖因子の分泌が促進・抑制されることが報告されている。本研究では、波長 800 nm 帯のレーザーと脈絡膜組織との相互作用において、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) の発現について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ラット脈絡膜新生血管 (Choroidal neovascularization; CNV) モデルを作製し、スリットランプ観察下で CNV 部位に波長 800 nm、パルス幅 110 fs のフェムト秒パルスレーザーを照射した。

(2) 活性酸素検出用蛍光試薬 Aminophen1 Fluorescein (APF) は、ROS と反応し、強蛍光性のフルオレセインに変化する試薬である。レーザー照射前後の APF の蛍光強度を調べることで、ROS 量を検出することができる。APF 水溶液 (5 μM) と ICG 水溶液 (0、10、30、50 μM) を 1:1 で混合させ、照射前後のフルオレセイン (励起波長 490 nm、蛍光波長 515 nm) の蛍光強度より、ROS 量を求めた。光源には波長 800 nm、繰り返し周波数 1 kHz、パルス幅 110 fs のフェムト秒パルスレーザーおよび、波長 808 nm の連続発振レーザーを用いた。照射平均パワーは 10、30、50 mW/well、照射時間は 10–180 s、照射面積は ϕ 6 mm で実験を行った。

(3) 96 ウェルプレートに播種したサル由来脈絡膜血管内皮細胞 RF/6A (1×10^6 cells/mL、100 μL) に ICG 水溶液 (0、10、30、50 μM) を添加し、15 分間、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 にてインキュベートした。光源には波長 800 nm、繰り返し周波数 1 kHz、パルス幅 110 fs のフェムト秒パルスレーザーおよび、波長 808 nm の連続発振レーザーを用い、ICG が添加された RF/6A に対してレーザー照射を行った。照射平均パワーは 10、30、50 mW/well、照射時間は 10–180 s、照射面積は ϕ 6 mm で実験を行った。照射 1 日後に上清を回収し、酵素抗原抗体反応にて上清中の VEGF の発現を測定した。

4. 研究成果

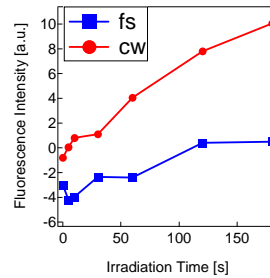
(1) 平均パワー 9 mW のときに未治療群と比べて有意な新生血管閉塞効果を確認することができた。

(2) 照射平均パワーが 10 mW/well の場合、連続発振レーザーの方が ROS 発生量は多かった。照射平均パワー密度が 30 および 50

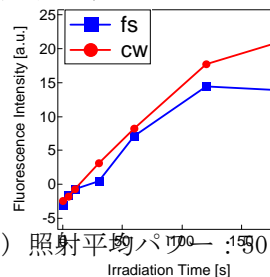
mW/well の場合、ROS 発生量はフェムト秒パルスレーザーと連続発振レーザーで差はみられなかった。また、照射平均パワーが大きい方が ROS 発生量が多いことが分かった。

図 ICG 濃度 50 μM におけるレーザー照射時間と ROS 発生量の関係

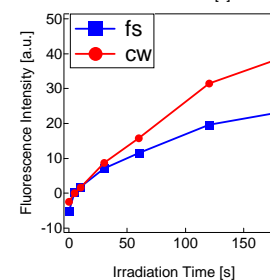
(a) 照射平均パワー : 10 mW/well



(b) 照射平均パワー : 30 mW/well



(c) 照射平均パワー : 50 mW/well

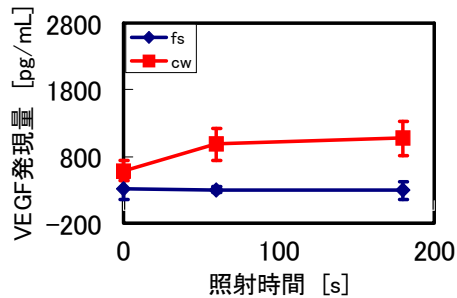


(3) レーザー照射条件の違いにより VEGF の発現量に違いが認められた。照射平均パワーが 10 および 30 mW/well の場合、フェムト秒パルスレーザーと連続発振レーザーで VEGF 発現量に関する差は観られなかった。照射平均パワーが 50 mW/well の場合、連続発振レーザーと比較してフェムト秒パルスレーザーは VEGF 発現量が小さかった。

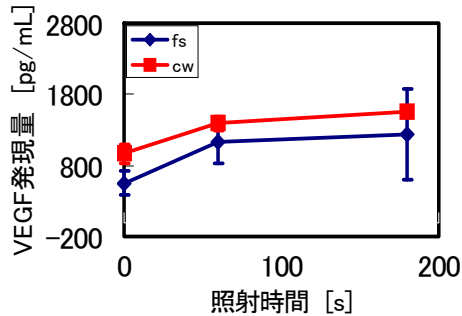
図 : 照射平均パワー 50 mW/well におけるレーザー照射時間と VEGF 発生現量の関係. ICG 濃度 : (a) 0 μM 、(b) 10 μM 、(c) 30 μM 、

(d) 50 μ M.

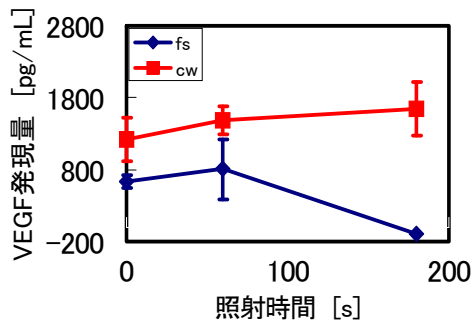
(a)



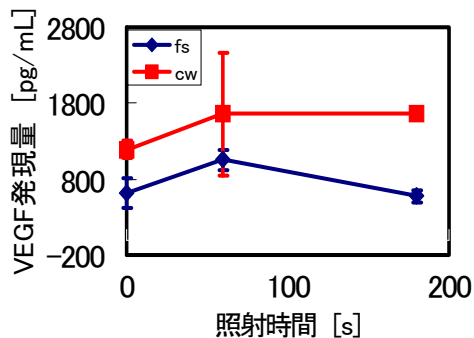
(b)



(c)



(d)



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Iwamoto Y, Awazu K, Suzuki S, Oshima T, Sawa M, Sakaguchi H, Tano Y, Ohji M. The new methods of treatment for age-related macular degeneration using ultra-short pulsed laser. Proc of SPIE Vol 6435 64350U1-U7, 2007 (査読あり)
- ② 岩本由美子、鈴木幸子、栗津邦男、大島鉄朗、坂口裕和、沢美喜、田野保雄、大路正人：フェムト秒レーザーによるICG-PDTの基礎的検討(2), Jpn Pharmacol Ther (薬理と治療), Vol. 34 Suppl. 2, S-107-S-112, 2006. (査読あり)

[学会発表] (計4件)

- ① 岩本由美子、酒井真理、富岡穰、櫛引俊宏、鈴木幸子、大島鉄朗、坂口裕和、沢美喜、大路正人、田野保雄、栗津邦男：脈絡膜血管内皮細胞を用いた超短パルスレーザー励起インドシアニンググリーンによる光線力学治療の検討、第17回日本光線力学学会学術講演会(2007.6.16-17、鬼怒川ホテルニュー岡部、栃木県日光市)
- ② Y. Iwamoto, S. Suzuki, T. Oshima, H. Sakaguchi, M. Sawa, M. Ohji, Y. Tano, K. Awazu: The new method of treatment for age-related macular degeneration using the ultra-short pulsed laser, SPIE Photonics West BiOS2007 (2007.1.20-25, San Jose Convention Center, San Jose, CA, USA)

- ③ 岩本由美子、鈴木幸子、粟津邦男、大島鉄朗、坂口裕和、沢美喜、田野保雄、大路正人：フェムト秒レーザーによる ICG-PDT の基礎的検討 (2)、第 14 回肝病態生理研究会 (2006. 5. 24、京都宝ヶ池プリンスホテル、京都府京都市)
- ④ 岩本由美子、鈴木幸子、大島鉄朗、坂口裕和、沢美喜、大路正人、田野保雄、粟津邦男：加齢性黄斑変性に対する新規治療法の開発、第 16 回日本光線力学学会学術講演会 (2006. 05. 13、東京医科大学病院、東京都新宿区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大路 正人 (OHJI MASAHITO)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：9 0 2 5 2 6 5 0

(2) 研究分担者

村木 早苗 (MURAKI SANAE)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号：9 0 3 3 5 1 7 5
坂口 裕和 (SAKAGUTI HIROKAZU)
大阪大学・医学部・助教
研究者番号：8 0 3 7 9 1 7 2
粟津 邦男 (AWAZU KUNIO)
大阪大学・工学研究科・教授
研究者番号：3 0 3 2 4 8 1 7
田野 保雄 (TANO YASUO)
大阪大学・医学部・教授
研究者番号：8 0 0 9 3 4 3 3

(3) 連携研究者

なし