

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08782

研究課題名（和文）胃癌腹膜播種に対するパルスレーザーを用いた新規光線療法の開発

研究課題名（英文）Development of new photo dynamic therapy for peritoneal dissemination of gastric cancer

研究代表者

白下 英史（Shiroshita, Hidefumi）

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：50596955

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腹膜播種病変の治療を内視鏡にて治療可能なパルスレーザー光線療法の実用化を目指し、近赤外超短パルスレーザー光線照射による胃癌腹膜播種病変に対する殺細胞効果の向上を図るための光源開発を行った。
まず、超短パルスレーザーを用いて、胃癌細胞株に対して、レーザー照射を行ったところ、殺細胞効果を認め、光子励起によるALA-PDT/PDDの原理を実証した。
さらに、顕微鏡とジョイントした小型ファイバレーザーシステムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、光子励起によるALA/PDDの効果が確認でき、また顕微鏡とジョイントした小型ファイバレーザーシステムを構築したことで、腹膜播種という広範囲かつ深部ですべてを肉眼的に同定することが難しい病変に対して抗癌剤治療よりも直接的に治療を行える治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a light source to improve the cell-killing effect of near-infrared ultrashort pulsed laser irradiation on gastric cancer peritoneal seeding lesions, aiming at the practical application of pulsed laser phototherapy that can treat peritoneal seeding lesions by endoscopy.

First, the principle of ALA-PDT/PDD by photon excitation was demonstrated by performing laser irradiation of gastric cancer cell lines using an ultrashort pulsed laser, which showed a cell-killing effect. Furthermore, a compact fiber laser system jointed with a microscope was constructed.

研究分野：消化器外科

キーワード：光線治療 パルスレーザー 腹膜播種

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍などの病変部に光線を照射する光線力学療法 (photodynamic therapy: PDT) は、腫瘍組織に対する低侵襲治療の一種であり、腫瘍細胞へ特異的な集積性を持つ光感受性物質を励起することで実現できる。日本では、5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を用いた光線力学診断 (photodynamic diagnosis: PDD) が、脳腫瘍 (2013 年)、膀胱癌 (2017 年) に薬事承認されているが、5-ALA を用いた PDT に関しては未認可である。5-ALA はヘムの前駆体であり、腫瘍細胞では光感受性物質であるプロトポルフィリン (Pp) がヘムに代謝されずに蓄積することが報告されている。ALA-PDT が普及しない理由の 1 つに、使用する波長によっては散乱減衰が大きく、組織深達度が小さくなり細胞毒性が低いことが考えられる。本研究では、近赤外光を用いて 2 つの光子が同時に分子に吸収され励起を起こす 2 光子励起現象に着目し、2 光子励起を利用した ALA-PDT の確立を目的として、*in vitro* における検証を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、腹膜播種病変の治療を内視鏡にて治療可能なパルスレーザー光線療法の実用化を目指し、近赤外超短パルスレーザー光線照射による胃癌腹膜播種病変に対する治療効果、すなわち殺細胞効果の向上を図るための光源開発を行う。近赤外光の“生体透過性”という特性を活かし、特に腹膜播種という広範囲かつ深部ですべてを肉眼的に同定することが難しい病変に対して抗癌剤治療よりも直接的に治療を行える手法の開発を目的とし、腫瘍外科領域における新しい治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 高パルスエネルギー光源を用いた ALA-PDT による殺細胞効果の評価

ヒト胃癌細胞株を用いて *in vitro* における 5-ALA の蛍光観察 (ALA-PDD) と照射量ごとの抗腫瘍効果 (殺細胞効果) の確認を行う。従来の可視光 (635 nm) 照射実験をコントロールとして、2 光子励起においては吸収波長の 2 倍の波長を照射する。5-ALA の代謝生成物であるプロトポルフィリン (Pp) がもつ吸収帯を 2 光子励起できる近赤外超短パルスレーザーを利用して、光子励起による ALA-PDT/PDD に最適な光源の仕様を策定すると同時に *in vitro* での蛍光観察と抗腫瘍効果を検証する。

(2) 独自開発した小型近赤外超短パルスファイバレーザーの改良および最適化

近赤外超短パルスレーザーの高いコストや設置スペース、可搬性を考慮し小型ファイバレーザーシステムおよび評価実験装置を構築する。現在のパルスレーザーの仕様値は波長 1040 nm・ピコ秒発振・平均出力 100 mW である。市販のパルスレーザーと比較すると小型で安価である一方、パルス幅や平均出力において、ALA-PDT/PDD には最適化されておらず、(1) の実験結果を踏まえての改良を行う。具体的には、ピコ秒パルスフェムト秒パルスへと圧縮し、安定的なパルス発振と十分な平均出力が得られるように群速度分散補正およびアンプによる増幅を行う予定である。そして改良後には、蛍光観察と抗腫瘍効果をパルスレーザー光照射と従来の赤色レーザー照射とで比較確認する (図 1)。

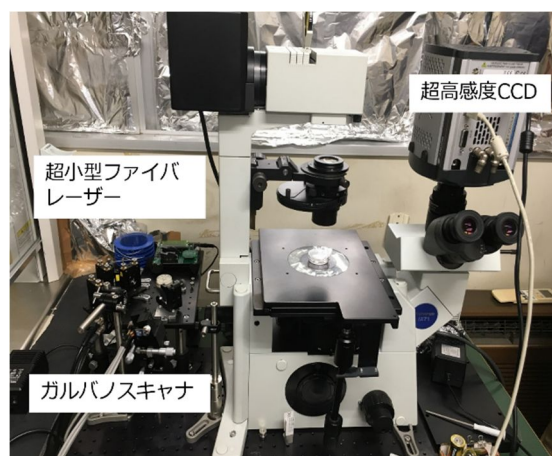


図 1 *in vitro* 評価のための超短パルスレーザー照射装置

4. 研究成果

(1) 超短パルスレーザー (繰り返し周波数 80M Hz, 800 nm, 1040 nm) を用いて、胃癌細胞株 NUGC-4, MKN74 に対して、5-ALA を 4 時間インキュベートして 20 分間照射したところ、Pp の 2 光子蛍光シグナルを確認することができた。さらに、2 画像と照射 2 時間後において Calcein 投与による生細胞蛍光を観察したところ、レーザー照射部位においては殺細胞効果を認めた (図 2)。以上より、光子励起による ALA-PDT/PDD の原理実証に成功した。

(2) 顕微鏡とジョイントした小型ファイバーレーザーシステムを構築した。(1)の結果では、Ppの2光子蛍光は非常に顕著であったが、レーザー照射の経過ごとにPp蛍光の褪色が確認された。高エネルギー光が活性酸素種を産生する前に蛍光色素分子を破壊している可能性が示唆されたため、実用化に向けて平均出力やパルス幅、繰返し周波数、対物レンズ倍率等の各パラメータの検討段階に移行した。さらに、レーザー光をより広範囲照射する拡散能を有するデバイスの試作機が完成し、in vitroでの光源パラメータの最適化実験およびin vivo評価系の構築を実施中である。

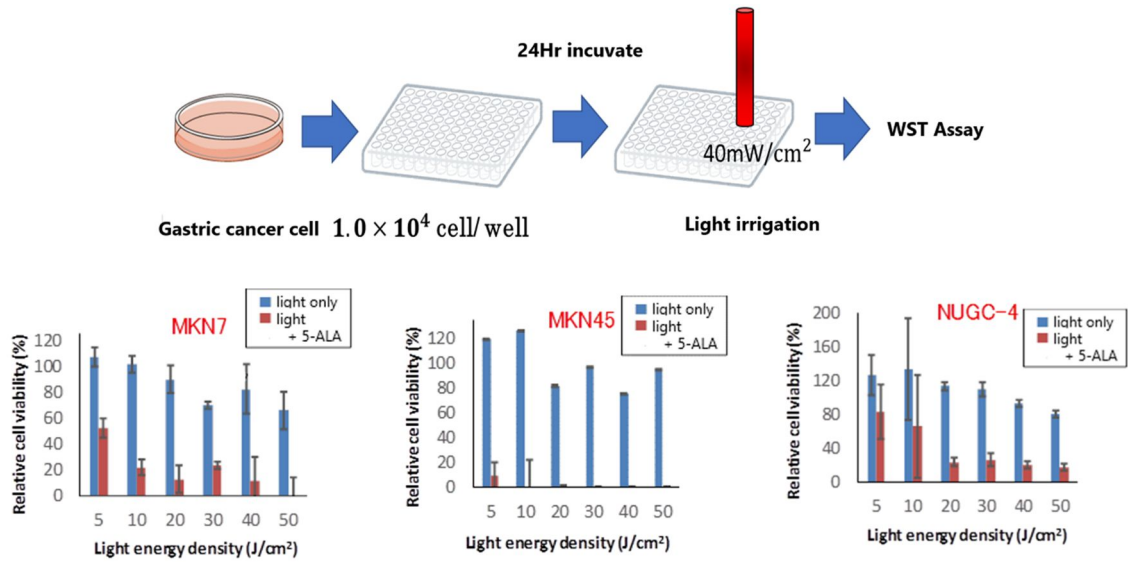


図2 既存の光源を用いた5-ALA-PDTの抗腫瘍効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 屋敷翔紀, 小川雄大, 白下英史, 猪股雅史, 片桐崇史, 大嶋佑介
2. 発表標題 近赤外超短パルスレーザーを用いた光線力学療法における2光子励起の検討
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第44回年次大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	衛藤 剛 (ETOH Tsuyoshi) (00404369)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	白坂 美哲 (SHIRASAKA Yoshinori) (40837746)	大分大学・医学部・客員研究員 (17501)	
研究分担者	大嶋 佑介 (OSHIMA Yusuke) (10586639)	富山大学・学術研究部工学系・准教授 (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------