

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591956

研究課題名(和文)がん播種性転移に対する蛍光診断と光力学的治療に関する研究

研究課題名(英文)Studies on photo dynamic diagnosis and photo dynamic treatment for cancer peritoneal metastases.

研究代表者

片山 寛次(KATAYAMA, Kanji)

福井大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30204431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス腹膜播種モデルに、腫瘍に集積して蛍光を発する5-ALAを腹腔内投与し、光励起にて播種を発光させて転移部位を明らかにした。切除困難な播種には光線力学療法を試みた。培養細胞では波長630nmの赤色光照射で細胞死を確認した。複雑な腹腔内全体を照射することは困難で、腹腔内に希釈した脂肪乳剤を注入し光を乱反射させて腹腔内全般にPDTを行った。培養細胞における脂肪乳剤添加培地での間接照射実験では光照射でがん細胞の増殖抑制が認められた。今後、脂肪乳剤の油滴のサイズを調整することと、腹腔内に複数のLED光源を光ファイバーで導入することでより効率的に腹腔内全体の治療が可能になるものと推測される。

研究成果の概要(英文)：We administered 5-ALA intraperitoneally a mouse peritoneal dissemination model, and emitted fluorescence of the tumor. We emitted tumor could detect the metastatic site. We tried photo dynamics therapy also. We found cell death by radiation wavelength 630nm with cultured cell. To irradiate whole peritoneum we injected fat emulsion into peritoneum, and light reflect diffusely and performed PDT. The growth suppression of cancer cell was seen by light radiation with the fat emulsion addition culture media. Treatment effect will improve if we regulate the size of the oil droplet of the fat emulsion and transducing plural LED light source with optical fiber in a peritoneal cavity.

研究分野：消化器外科学・腹膜播種治療・がん温熱療法・化学療法・がん集学的治療・臨床栄養学・緩和医療・在宅医療

キーワード：光線力学的治療 腹膜転移 ALA

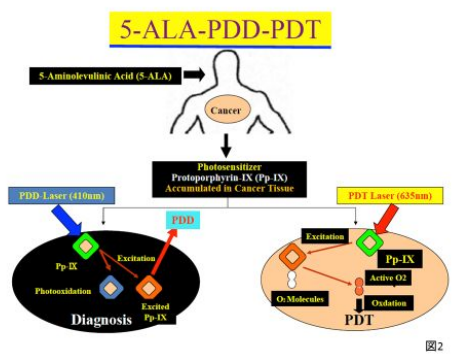
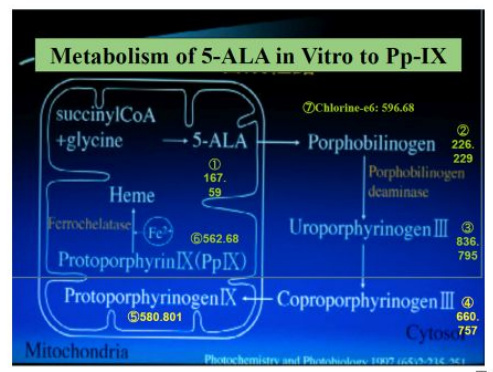
1. 研究開始当初の背景

現在最も治療が困難である癌の腹膜播種性転移に対する治療効果を改善する目的で研究を行った。従来、腹膜転移に対しては可及的な腹膜切除と腹腔内温熱化学療法 (HIPEC) が行われてきた。しかし、腸管などを大量に切除することによる臓器欠損障害が QOL を著しく損ない、ある程度以上の深さをもった播種巣は治療できない。腹腔内の病巣が小さくても見逃さず切除するために、発見しやすくすること、また、浸襲の小さな腹腔鏡下に治療できる事が望ましい。また、切除困難な部位はレーザー高照度による PDT も可能である。腫瘍細胞や腫瘍組織内の新生血管の内皮細胞内に取り込まれた光感受性物質は、レーザー光が照射されることにより、活性酸素を発生させ、この活性酸素により、腫瘍組織が傷害を受けて消退することを期待する。PDT は、ALA の光線力学的反応を利用した治療法であり、それ自身毒性が低い光感受性物質と低出力のレーザー光を使用するため、生体への負担が少ないのが特徴である。既に、脳外科領域や皮膚科領域では、ALA 1gr を経口摂取した上で半導体レーザーで励起して局所診断を行っている。従って、本研究は動物実験の上で、臨床応用が可能である可能性が高く、腹膜転移症例に対する重要な治療法になるものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では 5- Amino Levulinic Acid (ALA) を、従来の経口投与だけではなく、腹腔内投与して播種巣に取り込ませ、光励起により播種巣を蛍光させることで、腹腔内の病巣が小さくても見逃さず切除できる、また、必要かつ十分な切除が行える可能性について実験的研究を行う。また、散布性びまん性に広がった病変に置いては、光高照度による光線力学療法 (PDT) を、浸襲の小さな腹腔鏡下に、複雑な構造を持つ腹膜全体の腹膜播種巣を

治療できる技術を確立するべく研究した。複雑な構造の腹腔内全体を光治療するためには腹腔内全体に光を行き渡らせる必要がある。複数の光源を光ファイバーで導入することは可能であるが、それでも隅々まで光を行き渡らせることは困難である。そのために脂肪乳剤を腹腔内に注入し、光線の乱反射にて腹膜漿膜の隅々にまで光を導くことを研究した。(図1, 図2)



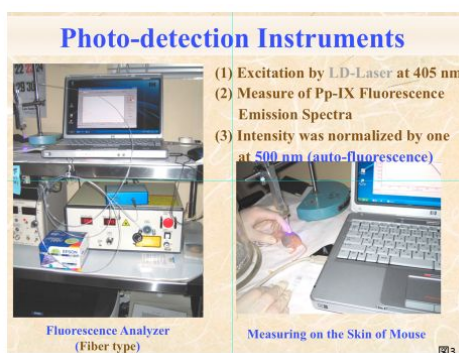
3. 研究の方法

腹膜播種性転移に対し、腫瘍集積性があり代謝を経て蛍光物質である Protoporphyrin (Pp) に変化する ALA を腹腔内投与して播種巣に取り込ませ、光励起により播種巣内の Pp を蛍光させることで腹膜転移の部位を明らかにする。

(1)まず、ALA の正常腹膜に対する障害の有無についてマウスの腹腔に高濃度で投与し病理組織学的に腹腔漿膜の変化を調べた。実際の投与濃度の 10 倍である、10mM/L をマウス腹腔が十分ふくれるまで注入した。注入後 7 日間経過を観察した。その後屠殺し、腹

膜と腸管漿膜の変化を病理組織学的に観察した。

(2)ヌードマウス，ヌードラットにMK-45P 胃癌腹膜転移培養細胞を腹腔内投与することで腹膜播種モデルを作成，ALAの腹腔内投与にて405nmのレーザー光にて励起し，その局在をフィルター下に赤色光にて検索した。(図3)



(3)腫瘍内のALA取り込みを405nmのレーザー光にて励起し腹腔内投与後経時的に開腹したマウスで測定した。

(4)各濃度の脂肪乳剤(イントラリポース10%溶液を生理食塩水で希釈して作成)(0.5, 2.0%)をマウス，ラットの腹腔内に腹腔が膨隆するまで注入，それらの状態を観察した。また，1週間空けて2回の注入を繰り返した後，屠殺し腹膜を病理組織学的に観察した。

(5)腹腔内脂肪乳剤における乱反射を利用するにあたり，至適濃度を得るべく試験管，培養フラスコを用いて波長630nmの赤色レーザーの乱反射率と照射エネルギーを照度計Ophir starlite エネルギーメーターを用いて測定した。(図4)



(6)In vitro 系として，MK45P 細胞を培養している培養フラスコに培地に脂肪乳剤を追加して波長630nmの赤色レーザーを培地内に細胞から10mm離れて水平に照射。フラスコの底面でのレーザーエネルギー照度を測定した。

(7)MK45P 細胞を培養している75cm²培養フラスコに培地に脂肪乳剤を追加して満たし，フラスコの底部中央から長軸上に中央波長405nmの青色レーザー，630nmの赤色レーザーを培地内に細胞から10mm離れて水平に60秒照射，その後24時間通常の培地で培養した後生細胞量をMTTアッセイで測定した。

(8)実際の腹膜播種動物モデルの腹膜に穴を開け，波長630nmの赤色レーザーを照射し，腫瘍の増大の程度をMTTアッセイにて比較した。(MTT-Cell Proliferation Kit 1: Roche)

4. 研究成果 結果：

(1)ALAの正常腹膜に対する障害の有無について，2匹のマウスの腹腔にpH7.0に調整したALAを10nM/Lの高濃度で投与した。マウス腹腔内の投与量は3.5mlと4.0mlであった。注入2日目からの状態，摂食量も7日間変わらなかった。病理組織学的に腹膜腔漿膜，腸管漿膜の変化を調べたが，未処理コントロールと全く変わり無く，ALA腹腔内投与の安全性には問題が無いものと考えられた。

(2)ヌードマウスでは移植後ほぼ3週間で，腹膜播種モデルが作成できた。ヌードラットでは安定した生着モデルはできず，盲腸漿膜下移植モデルで6匹中2匹に腹水が出現，超音波検査では腹膜転移が作成されたと考えられた。

イソプロレン麻酔下に開腹し，405nmのレーザー光にて励起し，その局在をフィルター下に赤色光にて検索したところ，600nm以下をカットするフィルターを使うことでその

局在を認めることが出来た。(図5,6)

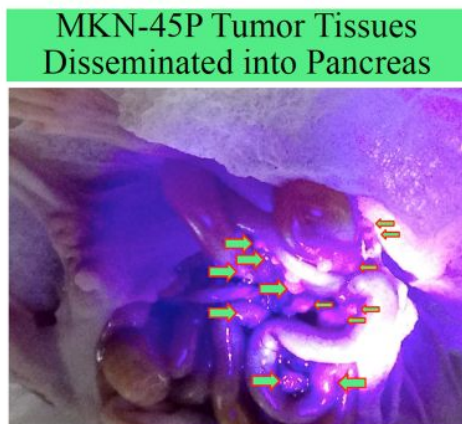


図5

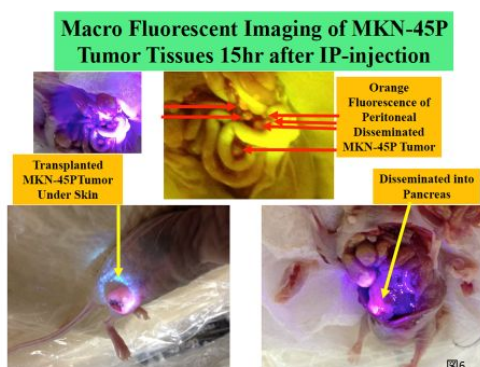


図6

(3) 開腹したマウス腫瘍内の ALA 取り込みを 405nm のレーザー光にて励起し励起光を測定した結果, 十分な励起光を観察した。(図7)

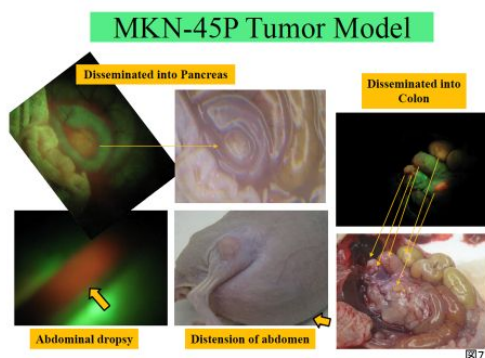


図7

(4) 脂肪乳剤溶液を生理食塩水で希釈して作成, 4匹のマウスに2匹ずつ0.5, 2.0%をマウスの腹腔内に腹腔が膨隆するまで注入, 約4mlが注入できた。それらの状態を1週間観察したが, 経口摂取も十分であり, 観察した。また, 1週間空けて2回目の注入を行い7日後に屠殺し腹膜を病理組織学的に観察

したところ, 壁側腹膜, 腸管の漿膜いずれも無処置コントロールマウスと変わらなかった。従って, 静脈投与用の脂肪乳剤はマウスの腹腔内に投与しても正常漿膜には影響を与えないことが明らかとなった。

(5) 腹腔内に脂肪乳剤を投与し乱反射を利用するにあたり, 人口の模擬腹腔として試験管, 培養フラスコを用いて波長 630nm の赤色レーザーの乱反射率と照射エネルギーを測定した。至適濃度を得るべく各種の濃度(0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5%各濃度)で実験を行ったところ, 波長 405, 630nm のどちらのレーザー光でも, 0.2%の溶液でもっとも大きな側面反射光を得た。波長 630nm のレーザー光エネルギー, 11mWatt/cm² 40J/sec/cm² の分散光は, 0.44J/sec/cm² であった。波長 405nm のレーザー光エネルギー, 24 mWatt/cm² 90J/sec/cm² の分散光は, 1.02J/sec/cm² であった。ちなみに, 同時に行った波長 630nm の LCD 光エネルギー, 4 mWatt/cm² 11J/sec/cm² の分散光は, 0.24J/sec/cm² と出力の割には高値であった。

(6) In vitro 系として, MK45P 細胞を培養している培養フラスコに培地に 0.2%脂肪乳剤を追加して波長 405, 630nm のレーザー光を培地内に細胞から 10mm 離れて水平に照射。フラスコの底面でのレーザーエネルギー照度の測定値を測定したところ, 腫瘍細胞の増殖程度によってばらつきが大きかったが, 波長 405nm のレーザー光エネルギー, 11mWatt/cm² 40J/sec/cm² の分散光は, 平均 0.23J/sec/cm² であった。波長 405nm のレーザー光エネルギー, 24 mWatt/cm² 90J/sec/cm² の分散光は, 0.39J/sec/cm² であった。ちなみに, 同時に行った波長 630nm の LCD 光エネルギー, 4 mWatt/cm² 11J/sec/cm² の分散光は, 0.18J/sec/cm² であった。(図8)

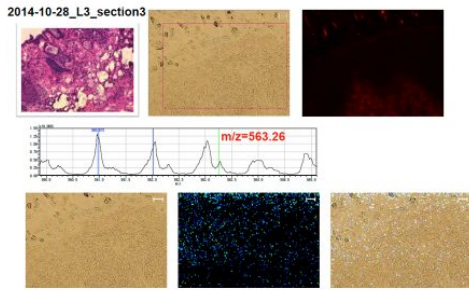


図8

(7) MK45P 細胞を培養している培養フラスコに培地に脂肪乳剤を追加して波長 405, 630nm のレーザーを培地内に細胞から 10mm 離れて水平に 60 秒照射, その後 24 時間通常の培地で培養した後の MTT アッセイでは, 照射しないコントロールに比較してそれぞれ平均して 68%, 74% の増殖抑制が観察された。(図 9)

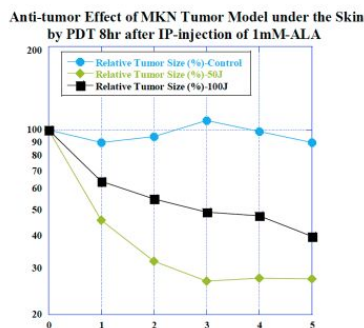


図9

(8) ノードマウスの腹膜に穴を開け, 波長 405, 630nm のレーザー光を照射し, 腫瘍の増殖抑制の程度を比較したが, 検体が小さく, モデル数も 4 例ずつと少なかったため治療効果を得るには至らなかった。感想としては照射群で腹水貯留までの期間, 生存は延長したと考えられたが, 治癒に至ったモデルはなかった。

結語: 腹腔内のがん播種巣に ALA の直接投与は, 腫瘍内の ALA 濃度安全に低容量で十分投与できた。

複雑な腹腔内の広い範囲で転移巣を見つけ, また治療するためには, ALA による PDD, PDT が有用である。腹腔内への生理的で安全な脂肪乳剤希釈液の投与は安全であり, 腹腔全般

に対する PDT の施行には有用と考えられる。

今後はより大きな動物の播種モデルの作成と, より効率的な光の導入法の開発が必要である。今回は実験にレーザー装置を用いたが, より安価な LCD でも同様な効果が得られることが解ったので, 腹腔内に多数の LED 光源を入れる, または光ファイバーの束を腹腔内に拡散して導入し, 脂肪乳剤の添加とともに腹腔内全体の照射を図る事が可能と考えられる。また, 投与脂肪乳剤の直径は変えることができるので, 光の波長に応じた粒子径を選ぶことでより効率的な光拡散が得られる可能性がある。今後の課題である。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 4 件)

三好憲雄, 石塚昌宏², 井上克司, 他. ALA エステル誘導体のマクロファージ PDT 刺激後の共存白血病細胞の治療効果。

第 4 回ポルフィリン ALA 学会年会. 平成 26 年 4 月 26 日。

N. Miyoshi, and Kanji Katayama. Nanoparticle aggregation with 5-ALA and sonodynamic therapy (SDT) of cancer 1st International ALA and Porphyrin Symposium (IAPS-1). King Hamad Univ. Hosp., Kingdom of Bahrain, 28th Oct., 2013

Norio Miyoshi, Kyo Kume, Kanji Katayama et al.

Combination Therapy and New Nano-Drug Development for PDT. The 14th World Congress of the International Photodynamic Association. 2013 年 5 月 31 日. 韓国ソウル

三好憲雄, 片山寛次. 質量顕微鏡による腫瘍内蛍光物質の特定と局在. 第 2 回ポルフィリン-ALA 学会. 平成 24 年 4 月 28 日。

於：東京工業大学。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 寛次

(K A T A Y A M A , K a n j i)

福井大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：3 0 2 0 4 4 3 1

(2) 研究分担者

村上 真

(M U R A K A M I , M a k o t o)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：0 0 3 3 4 8 2 1

三好 憲雄

(M I Y O S H I , N o r i o)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：4 0 2 0 9 9 6 1