

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590555

研究課題名（和文） ALA 併用光線力学療法での中皮腫診断及び治療効果に関する研究

研究課題名（英文） Effect of Photodynamic Diagnostic System and Photodynamic therapy for Malignant Peritoneal Mesothelioma used both 5-aminolevulinic acid and Talaporphin.

研究代表者

網中 雅仁 (AMINAKA MASAHIRO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：30231997

研究成果の概要（和文）：我が国では新たな石綿の利用が全面禁止されたが、今後は中皮腫患者数の増加が懸念される。しかし、明確な早期中皮腫の診断法や標準治療法は確立されておらず、中皮腫診断法および治療法の開発が急務である。本研究では、5-aminolevulinic acid (ALA) の腫瘍集積性を応用し、ポルフィリン (Por) 代謝物を用いたスクリーニング法と光線診断法 (photodynamic diagnostic system ; PDD) の技術を向上させ、光線力学治療法 (photodynamic therapy ; PDT) の検討する目的で ALA 投与量と中皮腫集積の至適時間、取り込み、Por 代謝物の蛍光強度、中皮腫発症と ALA 投与後の尿中および血液中 Por クリアランス、ALA および Talaporphin sodium 併用投与について F344 ラットによる動物実験を実施した。その結果、ALA 投与量では 100mg/kg を 1 度、2 時間後に 200mg/kg を 1 度の 2 回、初回投与から 6 時間後に ALA 取り込み量が至適投与量・時間であると推定できた。また、中皮腫から ALA 代謝物と推定されるコプロ Por I および III、プロト Por IX が高濃度で検出された。一方、尿中 Por は中皮腫発症によって明らかな違いを見出した。これらの解析を行った結果、中皮腫発症と関連性が高いメソテリン濃度と Por との間に関連性を見出した。また、Talaporphin 併用投与では、中皮腫への取り込みが十分に確認出来ず、PDT 治療には問題のあることが明らかになった。この原因として、ALA と Talaporphin の中皮腫への取り込み時間の違い、ALA による活性酸素の誘導が限定的であったことが推察され、これは腫瘍細胞である中皮腫での至適濃度に時間的な差が生じるためであろうと推察できた。

研究成果の概要（英文）：Asbestos use were forbidden in Japan now. We are anxious about increase in mesothelioma patients load from now on. And diagnostic methods in early stages of mesothelioma and standard treatment methods have not been established yet. Development of diagnostic methods and standard treatment methods are pressing need. In this study, the accumulation nature to cancer cell of 5-aminolevulinic acid (ALA) was used. We progressed photodynamic diagnostic system (PDD) and screening which used porphyrin (Por) metabolite. Furthermore, optimal time of ALA dose and mesothelioma accumulation for purpose which photodynamic therapy (PDT) examines, F344 rats were used about fluorescence intensity of taking in, Por metabolite, and Por clearance in blood and urine by ALA and Talaporphin sodium combined administration. As a result, in ALA dose, it has been presumed 6 hours after first time medication that ALA uptake quantities were 100mg/kg and one more time 200mg/kg optimal given dose about 2hours later. Moreover, ALA metabolites which were coproPor I, III and protoIX was detected from mesothelioma at high concentration. On the other hand, urinary Por were found clear difference by mesothelioma. As results of these analyses, relevance has been suggested between mesothelin and Por concentrations with development of symptoms on mesothelioma. And in Talaporphin combined administration, taking in mesothelioma could not fully check, but it became clear that there were problem in PDT. As this cause, it were guessed that different of taking-in time in ALA and Talaporphin on

mesothelioma cells and generating of active oxygen by ALA were restrictive. This has been imagined to be different times arise to optimal concentrations in mesothelioma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：産業中毒

### 1. 研究開始当初の背景

我が国では 1950 年頃から広く工業製品や住宅建材などに石綿が使用され始めた。石綿消費量はその後も上昇を続け、1960 年代後半には年間 30 万トンを超える一方、1970 年には発がん物質としての規制も始まった。1973 年には我が国で最初の石綿曝露による中皮腫が報告され、石綿による健康障害として肺がん、良性石綿胸水、びまん性胸膜肥厚も認知されるようになった。中でも中皮腫は石綿初回曝露から約 40 年の経過後に胸膜、腹膜、心膜、精巣鞘膜で発症する。その部位は胸膜原発が約 80%、腹膜原発が約 20%であり、その他の部位の中皮腫はまれである。現在、新たな石綿の利用は全面禁止されている。しかし、中皮腫の死亡者数は 2006 年に 1000 人を超え、2010 年には 1209 人にのぼった。今後、消費量の多かった 1970 年代から 90 年代半ばまでに生産に携わった職業性曝露者のみならず、石綿関連工場の周辺に居住する住民での中皮腫発症の増加も懸念される。さらに現在も石綿製品の多くが我々の生活の中に存在し、石綿製品の利用者や石綿除去に携わる作業者の健康問題も懸念される。このような状況で中皮腫の診断および治療には、他の悪性新生物と同様に早期発見・早期治療が重要となる。しかし、早期の中皮腫診断は中皮腫に精通した病理医であっても容易ではなく、中皮腫治療の予後が良好ではない原因の 1 つにも考えられる。また、中皮腫の新たな診断法としては ELISA 法による血清レプチン濃度の測定が試みられており、動物実験においてその有効性が確認され、人への治験も試みられた。しかし、未だに承認には至っていないのが現状である。また、中皮腫治療薬としては、ペトレキセド(アリムタ)とシスプラチン併用療法が承認されているのみである。以上のことから我々は、新たな早

期中皮腫の診断法および治療法の開発が急務であると考え、本研究を実施するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、新たな中皮腫の診断法として 5-aminolevulinic acid(ALA) の腫瘍集積性を用いたポルフィリンクリアランスおよび光線力学診断法(photodynamic diagnostic system ; PDD)、の有用性および向上に加えて、光線力学治療法(photodynamic therapy ; PDT)の有用性について検討することを目的とした。

近年、ALA は画期的な生成方法の確立によって安定的かつ高品質な供給が可能となり、悪性腫瘍の PDD 用薬としての活用が注目されている。ALA は生体物質であり、生体内で代謝されて porphyrinogen となり、紫外線を照射することで励起し、活性酸素を放出して necrosis を誘導し、さらに蛍光物質である porphyrin を産生する。この代謝過程が悪性腫瘍細胞内で顕著に生じることから、悪性腫瘍の診断が可能となる。一方、Talaporfin 投与による PDT では早期の肺がんや胃がん、食道がん、子宮頸がん、皮膚がんの他、眼科領域では Verteporfin 投与による加齢性黄斑変性症の治療にも保険が適用されている。ALA はこれら合成 porphyrin 様物質よりも生体内でのクリアランスが素早く、患者管理が容易であることや ALA がヘム代謝関連物質であるため、副反応の危険性が低いことなどの利点がある。また、ヘム代謝関連物質であるため、各種 porphyrin クリアランスを指標として早期中皮腫の発症を明らかに出来るのではないかと推察した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 中皮腫発症モデルラットの作成

実験的に中皮腫を作成するため、炭化ケイ素 ウィスカ (SiC) を生理食塩水に懸濁し、F344 雄性ラット (1 群 5 匹) の腹腔内へ

5mg/kg 投与した。本研究では SiC 含有生理食塩水を投与後 4,12,16,20,25,30 週が経過したラットの腹腔内へ投与して中皮腫発症モデルの作成を試みた。

#### (2)中皮腫発症モデルの確認

各投与ラットの尿中 Por や 8hydroxy2-deoxyguanosine(8-OHdG)、血漿中メソテリン、バイオピリンを測定した。さらに中皮腫発症を HE および Masson's trichrome 染色、8-OHdG 染色等の病理学的手法で確認した。

#### (3)中皮腫発症モデルにおける PDD 実験

ALA を用いた PDD の至適条件を明らかにするため、(2)で中皮腫発症が確認された 4,5,6 ヶ月経過したモデルラットを 2 群に分け、1 群には ALA 含有生理食塩水を経口投与、もう一方の群は positive control として生理食塩水を経口投与した。ALA 投与量は 100mg/kg と 200mg/kg、投与回数と間隔は代謝時間を考慮して 1~3 回、投与間隔は 1 時間ごとに設定した。

初回投与から 4、6、8 時間後に解剖し、ALA の中皮腫細胞への取り込みに適した時間を調べた。

#### (4) 中皮腫発症モデルラットにおけるバイオロジカルモニタリングの検討

中皮腫発症の指標となり得る可能性を検討するため、(3)に用いたラットの尿中 Por クリアランスを HPLC 蛍光検出法で、血漿中メソテリンおよび尿中 8-OHdG を ELISA 法で測定した。また、中皮腫細胞内での ALA 集積性と代謝を明らかにする目的で中皮腫における Por 濃度変化を HPLC 蛍光検出法で、至適な蛍光強度の検索には蛍光分析器を用いて調べた。

#### (5) 中皮腫発症モデルラットにおける PDT の検討

(3)の研究によって得られた至適条件を基にして、中皮腫発症モデルラット 1 群 5 匹に ALA および Talapofin を併用投与し、中皮腫での集積性の有無について検討を行った。Talapofin は生理食塩水で溶解し、10mg/kg を尾静脈 から投与した。投与後に(3)と同じ条件で解剖を行い、中皮腫細胞内のポルフィリン関連代謝物の変化と蛍光強度を調べた。

#### (6)実験データの解析

得られた実験データは SPSS Statistics 18 を用いて統計解析を実施した。

#### (7)動物実験の管理規定

動物実験の実施にあたって、担当者は聖マリアンナ医科大学動物実験規定に基づく教育訓練を修了し、大学院実験動物管理施設動物実験委員会へ動物計画書を提出して承認を受けた上で動物実験を実施した。

## 4. 研究成果

### (1)中皮腫発症モデルにおける PDD

ポルフィリン様物質の取り込みは、悪性腫瘍によって異なることが既に明らかになっている。特に ALA を用いた中皮腫細胞への PDD はこれまでに検討されておらず、新たな課題であった。本研究の成果から、ALA 投与量は 100mg/kg を 1 度、2 時間後に 200mg/kg を 1 度の合計 2 回の投与を実施し、初回投与から 6 時間後における ALA の腫瘍取り込み量が至適な投与量・時間であることが推定できた。また、中皮腫細胞からは取り込まれた ALA 代謝物と推定される coproPor I および III、protoPor IX が高濃度で検出され、ALA 投与による PDD の有用性を確認することができた (図 1、2)。

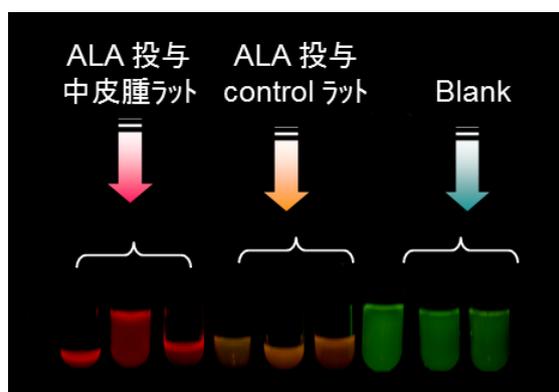


図 1 中皮腫発症ラット及び ALA 投与ラット、生理食塩水投与ラット尿の 405nm 蛍光

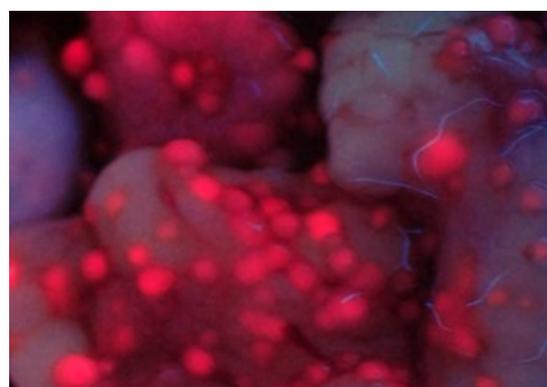


図 2 中皮腫発症モデルラットにおける PDD

### (2)中皮腫発症モデルラットにおけるバイオロジカルモニタリングの検討

PDD 実験に並行して中皮腫発症の指標として尿中 Por の有用性を明らかにするため、各種の尿中 Por 濃度を調べた。尿中に排出された Por は中皮腫発症ラットと positive control ラットで明らかな違いを見出すことができた。これら結果の解析を行った結果、有意な相関は得るには至らなかった。しかし、中皮腫発症と関連性の高い mesothelin 濃度

と Por との間に関連性が示唆される傾向を見出すことができた。また、中皮腫発症モデルの尿中 Po は 16 週で uroPor および coproPor III 濃度に有意差は認められなかったが、20,25 週では uroPor および coproPor III 濃度、ProtoPor 濃度で有意な上昇を認めた

(図 3 \*\*: $p<0.01$ , \*\*\*: $p<0.001$ 、図 4 \*: $p<0.05$ , \*\*: $p<0.001$ 、)。

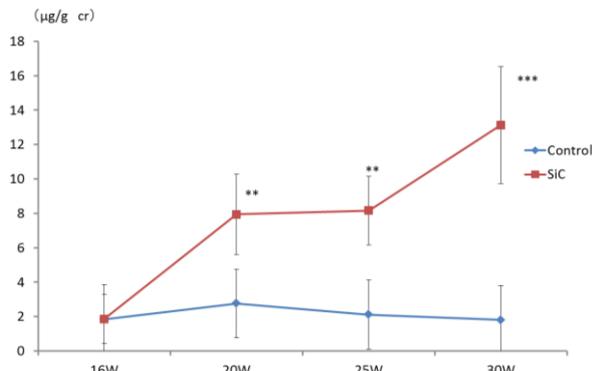


図 3 中皮腫発症モデルラットの尿中 uroPor 濃度変化

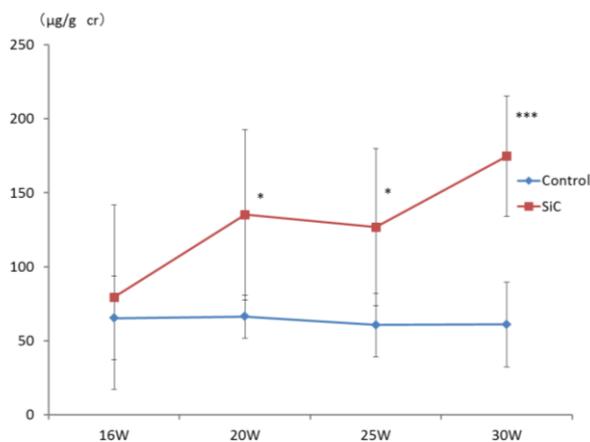


図 4 中皮腫発症モデルラットの尿中 coproPor III 濃度変化

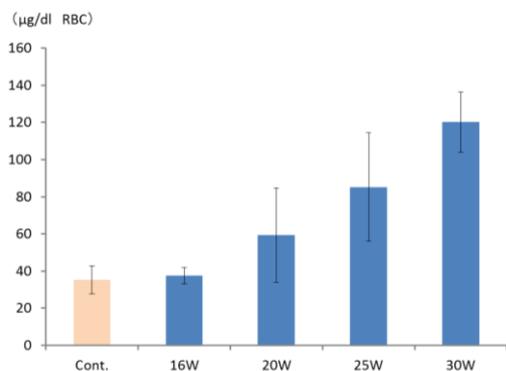


図 5 中皮腫発症モデルラットの尿中 prptoPor 濃度変化

また、中皮腫発症モデルラットの 8-OHdG 濃度は対照群に比較して 16,20 週では有意差は認められず、25 および 30 週で有意な上昇を認めた ( $P<0.05$ )。中皮腫発症モデルラットでは、中皮腫の進行に伴って酸化ストレスは上昇し、ポルフィリン濃度も上昇を認め、中皮腫発症マーカーの 1 つとしてポルフィリン濃度測定の実用性が期待された。

### (3)中皮腫発症モデルラットにおける PDT の検討

ALA が腫瘍内で励起し、発生する活性酸素だけでは PDT をおこなうことは困難であることが明らかになっている。そこで、本研究では ALA および PDT 治療薬として承認されている Talapofin の併用投与による有用性の検討を試みた。その結果、ALA による至適条件下では中皮腫細胞への Talapofin の取り込みを確認することが出来ず、PDT 治療への応用には問題のあることが確認された。この原因として、ALA と Talapofin の中皮腫への取り込み時間の違い、ALA による活性酸素の誘導が限定的であったことが推察され、とくに腫瘍細胞である中皮腫細胞内での至適濃度に時間的な差が生じるためであろうと考えられた。

最近の報告によれば、ALA と鉄の混合剤が正常細胞のエネルギー産生を活性化することでがんの進行に伴う衰弱を抑制するのではないかとする研究が明らかにされており、中皮腫組織での影響を検討する必要があるのではないかと考える。

### 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 3 件)

① 戸田枝里子、高田礼子、網中雅仁、戸谷忠雄、山下喜世次、神山宣彦、山内博。ラット気管内一回投与によるクリスタイルとアモサイトとその焼成品の酸化ストレスに関する研究、臨床環境医学、(査読有)、Vol.20、No.2、2012、131-140

② Takata A, Yamauchi H, Toya T, Miyamoto-Kohno S, Iwatatu Y, Teranaka I, Aminaka M, Yamashita K, Kohyama N. Effectiveness of serum megakaryocyte potentiating factor in evaluating the effects of chrysotile and its heated products on respiratory organs. Toxicology and pharmacology, (Peer-Reviewed Journal), Vol.252, No.2, 2011, 123-129

③ Sakai Y, Aminaka M, Takata A, Kudou K, Yamauchi H, Aizawa K, Sakagami H. Oxidative stress in mature rat testis and developmental changes. Development

Growth and Differentiation, (Peer-Reviewed Journal), Vol.52, No.7, 2010, 657-663

〔学会発表〕(計 9 件)

①高田礼子、網中雅仁、山内 博、アモサイト無害化処理材料のラット気管内投与による慢性呼吸器影響、2012 年 10 月 24 日、山口 (サンルート山口)

②網中雅仁、高田礼子、山内 博、アモサイト無害化処理材料のラット気管内投与による酸化的 DNA 損傷から見た慢性影響、2012 年 10 月 24 日、山口 (サンルート山口)

③高田礼子、高野 (宮本) 清子、網中雅仁、江尻直美、山下喜世次、神山宣彦、山内 博、ラット気管支肺胞洗浄液を用いたアモサイト焼成無害化処理材料の急性呼吸器影響評価、第 85 回日本産業衛生学会総会、2012 年 6 月 1 日、愛知 (名古屋国際会議場)

④網中雅仁、高田礼子、山内 博、中皮腫発症ラットにおける酸化ストレスとポルフィリン濃度との関連性、第 85 回日本産業衛生学会総会、2012 年 5 月 31 日、愛知 (名古屋国際会議場)

⑤江尻直美、戸田枝里子、高田礼子、高野 (宮本) 清子、網中雅仁、山下喜世次、神山宣彦、山内 博、第 82 回日本衛生学会総会、2012 年 3 月 25 日、京都 (京都大学吉田キャンパス)

⑥高田礼子、高野 (宮本) 清子、網中雅仁、山下喜世次、神山宣彦、山内 博、第 59 回日本職業・災害医学会学術大会、2011 年 11 月 12 日、東京 (六本木アカデミーヒルズ)

⑦戸田枝里子、江尻直美、高野 (宮本) 清子、高田礼子、網中雅仁、山下喜世次、神山宣彦、山内 博、アモサイト焼成無害化処理材料のラット腹腔内投与における酸化ストレス評価、第 84 回日本産業衛生学会総会、2011 年 5 月 19 日、東京 (都立産業貿易センター)

⑧網中雅仁、高田礼子、山内 博、ラットにおける腹膜中皮腫の発症と酸化ストレスおよびポルフィリンの動態、第 84 回日本産業衛生学会総会、2011 年 5 月 19 日、東京 (シーサイドホテル芝 弥生)

⑨網中雅仁、高田礼子、戸谷忠雄、山内 博、ラットを用いた腹膜中皮腫でのポルフィリン集積性とクリアランスに関する研究、第 83 回日本産業衛生学会総会、2010 年 5 月 28 日、福井県 (フェニックスプラザ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

網中 雅仁 (AMINAKA MASAHIRO)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師  
研究者番号：30231997

(2) 研究分担者

高田礼子 (TAKATA AYAKO)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30321897  
山内 博 (YAMAUCHI HIROSHI)  
北里大学・医療衛生学部・教授  
研究者番号：90081661

(3) 連携研究者 なし  
( )

研究者番号：