

肝腫瘍に対する光化学療法 of 基礎的検討

東邦大学外科学第3講座
柁原 宏 久

肝腫瘍に対する光化学療法の基礎的実験として日本白色家兎を用い VX2腫瘍モデル群を作成したのち、このモデル群に光感受性物質 PH-1126を3mg/kg 投与し、投与後48時間における肝組織内の集積性を、内視鏡蛍光分光装置と手術用顕微鏡による肉眼的観察の2つの方法で確認した。また、PH-1126投与後48時間目における80J/cm²のクリプトンレーザーを用いた光化学療法の治療効果を、① PH-1126非投与・辺縁穿刺3点照射群を対照群として、②表面照射群、③中心部穿刺1点照射群、④辺縁穿刺3点照射群に分類し施行、抗腫瘍効果として、(1) 腫瘍の増殖抑制効果、(2) 壊死率の2点より検討し、いずれも辺縁穿刺3点照射群の治療成績は他群と比較し有意差を認めた。同様に、延命効果に関しても辺縁穿刺3点照射群は有意な生存期間の延長をみた。これらの結果から、PH-1126を用いた光化学療法は、肝腫瘍に対する新しい集学的治療法の1つとして有用な方法であることを確認した。

Key words: photodynamic therapy, PH-1126, VX2-tumor

1. 緒 言

近年の外科治療、化学・免疫療法、放射線療法、温熱療法の進歩とこれら各治療の効果的な組み合わせにより、悪性腫瘍に対する治療成績は次第に向上しつつある。諸家により様々な新しい診断法や治療法が報告されてきているが、なかでも腫瘍細胞に特異的に集積する光感受性物質と低出力レーザーを用い、正常組織に影響の少ない光化学診断 (photodynamic diagnosis: 以下、PDD と略記)¹⁾²⁾・光化学治療 (photodynamic therapy: 以下、PDT と略記)^{3)~10)}が、悪性腫瘍に対する新しい診断・治療法として注目されている。現在、世界中で種々の癌・悪性腫瘍に対して PDT が施行され、その症例数は3,000人を超えたものと推測される⁶⁾。しかし、従来行われてきた光感受性色素である光感受性色素:ヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivatives: 以下、HpD と略記)⁷⁾による PDT は、皮膚および肝臓に長時間集積するという性格から、肺癌・膀胱癌などおもに表在性組織の癌治療を対象に行われ、肝癌に対しては適応外であった。今回我々は日本白色家兎 VX2肝腫瘍モデルを作製し、新しく開発されたクロロフィル誘導体の光感受性色素-*desoxo-9-hydroxy-pheophorbide-N*, *N*-dimethylaminoethylester (以下、PH-1126 と略記: 浜

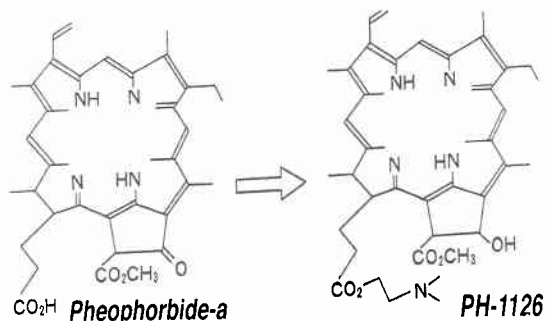
理薬品) と低出力のクリプトンレーザーを用い、深部組織腫瘍である肝腫瘍に対する全く新しい治療法の1つとして PDT を施行し、十分な実験的治療効果を確認した。

2. 材料および方法

(1) 光感受性物質: PH-1126

今回実験で使用した PH-1126は、クロロフィルのフェオフォルバイド a より誘導される新しい光感受性色素で、従来 PDT に使用されてきた HpD とは基本環構造を異にし、フェオフォルバイド環の D リング17位の炭素の位置にアミンをエステル結合させたものである (Fig. 1)。今回の実験では、この PH-1126を3mg/kg 静脈内に投与し、その48時間後に PDT を施行した。

Fig. 1 Structure of PH-1126



<1995年2月8日受理>別刷請求先: 柁原 宏久
〒153 目黒区大橋 2-17-6 東邦大学大橋病院第3外科

(2) 実験動物および実験腫瘍

実験動物としては、体重2,400g~2,600gの成熟雄性日本白色家兎（以下、家兎と略記）84羽を用いた。飼育条件に関しては、20°Cに保たれた恒温室の金属ケージに1羽ずつ収容し、固型肥料と水を自由に与えた。実験に供出する際には、環境の変動による個体差を考慮し、収容後1か月以上経過したものを使用した。実験腫瘍としては、教室で3週間ごとに継代移植されている移植率ほぼ100%の、野兎ウイルス由来 papiloma より作製された VX2腫瘍株を用いた。

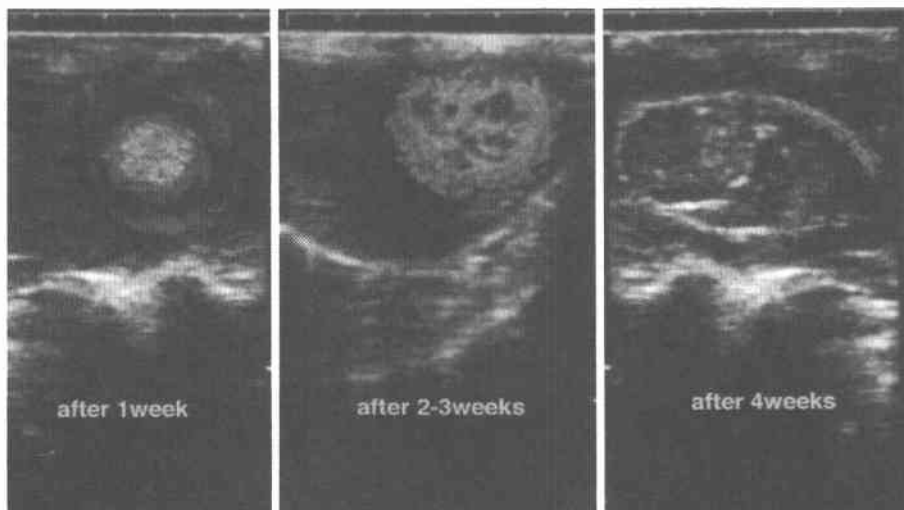
(3) VX2肝腫瘍モデル作成方法

家兎大腿部に継代移植後3~4週目に VX2腫瘍を無菌的に摘出し、移植用 VX2腫瘍細胞浮遊液を作製した^{11)~13)}。まず、VX2腫瘍組織の灰白色の腫瘍実質部分を約1cm³大の組織塊に分割して4°Cの HANKS 液内に浮遊させた後、この腫瘍片を眼科用剪刀を用い、壊死組織を除去・洗浄した後に、さらに滅菌ビーカー内でミンチ状になるまで細片化した。これを滅菌ガーゼにて濾過し、この濾過液を毎分200回転で5分間遠沈し

たのち上澄を除去し、この沈殿した腫瘍細胞に再度 HANKS 液を加え細胞数が $10^5 \sim 10^7$ 個/mlになるよう調整した。家兎にネプタール0.6mg/kgで静脈麻酔を行い、上腹部を剃毛消毒後に約3cmの上腹部正中切開にて開腹し、肝左葉の肝実質内深部に27G針付ツベルクリン注射器を用い、肝表面が膨隆してくるよう細胞浮遊液を0.3ml注入した。注入後は穿刺部よりの細胞浮遊液の漏出を防ぐ目的で、直ちにガーゼにて穿刺部を約3分間圧迫した後、腹壁を2層に縫合・閉鎖した。肝腫瘍の検索には、腹部超音波診断装置（横河メディカル社製 RT-2000, 5MHz リニアプローブ）を用い、体外的に季肋部および右側腹部より腹部超音波検査（以下、USと略記）を施行、肝腫瘍の内部性状・最大径を経時的に観察した。肝臓に移植された VX2 は、1週間目ではほぼ1cm、2週間目で1.5cm、4週間目で約4cmと、腫瘍径の経時的増大が認められた。1.5cm以下の移植腫瘍はいずれもほとんど壊死像が認められないのに対して、2cmを超えたものでは腫瘍中心部に腫瘍の増大乏血に伴う壊死巣が認められたため、腫瘍

Fig. 2 Preparation of Tumor model

For the preparation of the liver tumor model, we used the VX2 tumor of rabbits, which is a big animal possible to external search by ultrasonography. Under intravenous anesthesia, they were operated upon, and VX2 tumor cells were transplanted into the deep portion of the left liver lobe. The liver tumor was scanned with ultrasonograph. Although the tumor diameter was increased as about 1.0cm at 1week, 1.5cm at 2weeks and 4.0cm at 4weeks, necrosis was observed in center larger than 1.0cm, so the tumor, in which the spontaneous necrosis was hardly observed, about 0.7~1.0cm (meas 0.84±0.08cm) in diameter was used in the experiment.



の自然壊死が認められない移植手術後平均7日目の腫瘍最大直径0.7~1.0cm程度(平均 0.84 ± 0.08 cm)の充実性腫瘍を実験に供した。また腫瘍存在部位は注入移植した肝左葉に限局し、肝表面に腫瘍の露出がなく肝内転移の認められないもののみを選択して使用した(Fig. 2)。

(4) PH-1126の組織内集積性および分布状態に関する観察方法

作成した肝腫瘍モデルに対し、PH-1126:3mg/kgを左耳介静脈より静脈内投与した。その48時間後にネブタール麻酔下で犠牲屠殺し、肝臓を摘出後、超音波診断装置にて腫瘍最大割面部を含む矢状断面を確認し、肝腫瘍を2分割した。分割切離面における肝腫瘍の性状には、肉眼的に差のないことを確認後、以下に述べる内視鏡蛍光分光装置を用いた組織内集積状態観察用と、手術用顕微鏡を使用した肉眼的蛍光分布観察用に使用した。

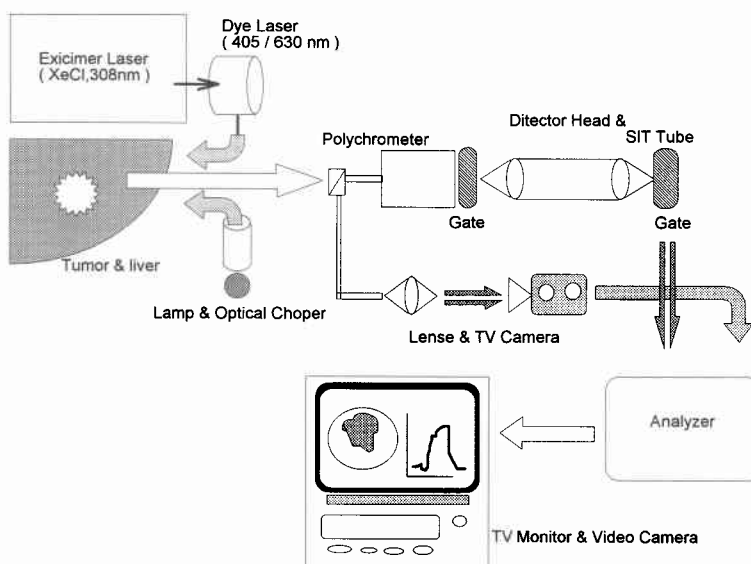
a) 光感受性物質 PH-1126の組織集積状態の観測

今回の蛍光スペクトル測定による PH-1126の組織内集積状態の観測には、エキシマ色素レーザー内視鏡蛍光分光装置を使用した¹⁴⁾(Fig. 3)。同装置は、内視鏡照明ファイバー、画像転送ファイバー、励起レーザー導入ファイバー、蛍光転送ファイバーを含む内視鏡部分と、光感受性物質励起用のエキシマ色素レーザーおよび内視鏡画像蛍光スペクトル解析装置(浜松ホトニ

クス)より構成される。

PH-1126を励起するために、XeCl ガスを用いてエキシマレーザーを波長308nm, パルス幅10nsec, 出力0.1 mJ/パルス, 繰り返し3.75Hz のパルスレーザーとして発振させた。このレーザーを、ジフェニルスチルベン色素(DPS)の 10^{-3} mol/l ジオキサン溶液を用いて波長405nm に変換した。これを、内視鏡鉗子孔内に挿入してある直径300 μ m の石英ファイバーに導入し照射した。また、明瞭な組織画像を得るために、キセノンランプによる白色光を照明用ファイバーに導入し、組織に光が均一に当たるよう調整した。励起された PH-1126より発生する蛍光は、蛍光転送ファイバーによって分光器のスリットまで導入され、ポリクロメーターを通して分光され、その蛍光スペクトルはゲート付き光増感装置により増感された後に解析処理され、モニター上に記録された。蛍光スペクトルを観測している時には組織照明のための白色光はチョッパーによって遮断しておき、光増感装置が強い光によって損傷しないようにした。蛍光スペクトル測光が行われていない時には光増感装置のゲートを閉じ、同時に白色光のチョッパーを開き組織を照明し、その組織像を画像転送ファイバーを通してテレビカメラにより受光した。このようにして交互に得られた光感受性物質の蛍光スペクトルとそのスペクトル発生部位の内視鏡画像を同一モニター上に合成して同時に観察できるようにし

Fig. 3 Endoscopic spectrophotometer



た。なお、蛍光強度は蛍光スペクトルの波形を積分した値として計測し、腫瘍および正常各組織内に集積している PH-1126 の状態を検討した (n=6)。

b) 手術顕微鏡を用いた PH-1126 の蛍光画像の観察
手術顕微鏡 (TOPCON-OMS-600) を改造して手術顕微鏡蛍光画像観測装置を組み立てた。顕微鏡の照明光源を水銀キセノン光源 (SUNCURE 202-PS ASAHI GLASSCOMP) に変換し、バンドパスフィルターを挿入し、波長405nm の光感受性物質の励起光だけを管腔ファイバーに導入して手術顕微鏡蛍光装置の励起光源とし、直径0.4cm の範囲の組織に照射できるようにした。この励起光は光路中に挿入したカットフィルター (波長600nm 以下を取り除く) により除き照射範囲内から発した蛍光のみを蓄積型 ICC カメラ (CI-11 VISITEC Co. Ltd) にて観測し、画像化してビデオ録画撮りを行いながら観察した (n=6)。

(5) 治療用レーザー

治療用レーザー照射装置として、クリプトンレーザー¹⁾ (東芝社製) を使用した。投与エネルギー量は、純粋な PDT の効果を判定する目的で、レーザー照射による生体の熱変性を起こさないごく低出力の波長647nm・先端出力170~180mW¹⁹⁾ に調整した上で、照射時間を増減させて各腫瘍当たり80J/cm² に設定した。レーザー光の誘導には、直径400 μ m の石英ファイバーチップを用い、以下に述べる2種類の先端形状のもの

を使用した。1つは先端形状が直角断面を成すファイバーチップで、導出されたレーザー光の拡散が発生せず前方のみ照射可能であり、肝表面非接触照射に用いた。他方は先端形状が球状で、導光ファイバー部を除く全方向に均一のレーザー照射ができ、かつ組織内穿刺が可能なファイバーチップ (モリテック社製) を、組織内照射に使用した。

(6) 各実験群の設定

a) 対照群の設定：対照群には治療群の照射法に基づき、非接触1点表面照射群・腫瘍中心部穿刺1点照射群・腫瘍辺縁部3点穿刺照射の各群を設定し、おのの PH-1126 を投与せずにレーザー照射を行った (n=6)。

b) 治療群の設定：PH-1126 を投与した治療群は I 群 (非接触1点表面照射群)・II 群 (腫瘍中心部穿刺1点照射群)・III 群 (腫瘍辺縁部3点穿刺照射群) の3群を設定し、それぞれ比較検討した (Fig. 4)。

いずれの群に対しても、実際のレーザー照射は、PH-1126 投与後48時間目に US をもちいて腫瘍の性状・肝内占居部位を確認した後に、ネブタール麻酔下に再開腹し、直視下で各腫瘍に対しクリプトンレーザーを照射した。

(7) 治療効果判定

PDT に基づく治療効果判定は、下記の方法で局所効果と延命効果に関して行った。

Fig. 4 Classification of Laser irradiation method

Control: Rabbit treated by intratumoral three-point irradiation without PH-1126
Group 1: non-contact surface irradiation method. (used with fiber of the forward irradiation type)
Group 2: intratumoral one-point irradiation method.
Group 3: intratumoral three-point irradiation method. (Omnidirectional fiber was used in Group 2.3)

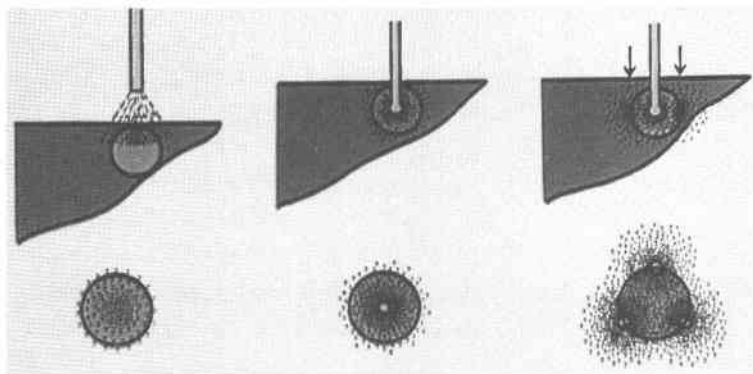
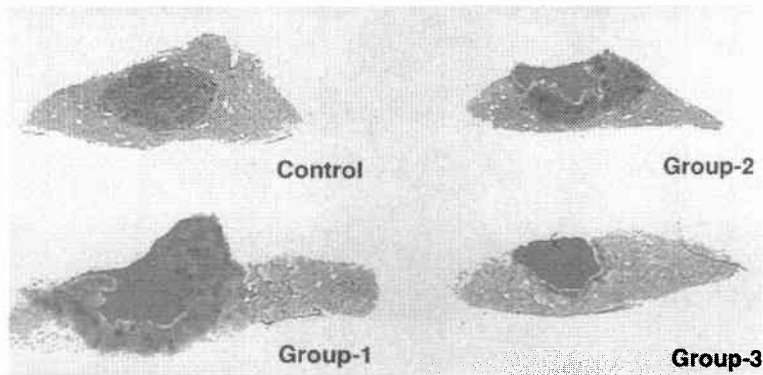


Fig. 5 Histological findings after therapeutic Laser irradiation (H.E. stained specimen)



a) 局所効果

各群を、レーザー照射1週間後に15ml ネプタール静脈麻酔下に犠牲屠殺し、肝臓を摘出し Tissue-Tek II (三共株式会社製) 中に O.C.T. Compound (Lab-Tek Products 社製) と共に埋没、 -80°C で迅速凍結した。これを、Microtome Cryostat (Bright 社製) にて $5\mu\text{m}$ 厚の切片にし、Hematoxylin-Eosin 染色(以下、H.E. 染色と略記)を行い、1検体に付き各4枚の標本を作製し、癌細胞の分布状態を定量的に計測・比較検討した。標本の計測には、カラー画像解析システム SP-500 (オリンパス社製) を用い、各組織間の H.E. 染色濃度差を利用して、コンピューター画像解析処理し面積として求め、以下の2項目で評価した (Fig. 5)。

1) 腫瘍面積：腫瘍最大割面部を含む標本切片より、含まれる腫瘍の面積を比較し、対照群と各治療群間における腫瘍増殖抑制効果を検討した ($n=6$)。

2) 壊死率：腫瘍全体の面積と壊死組織の面積より、腫瘍面積に対する壊死組織の面積比率を壊死率と定義し比較検討した。以上の2項目より、PDTによる局所の殺細胞作用による治療効果の差を、統計学的に有意差を求め検討した。今回の統計学的手法には、一元配置分散分析法¹⁶⁾を用い、Bartlett の F 検定にて実験モデル各群より得られた結果の分布に関し評価し分布の正規性を確認した後に、Tukey の多重比較検定にて危険率5%未満を有意の差とし、比較検討した ($n=6$)。

b) 延命効果

PDTに基づく治療効果のひとつの指標として、治療用レーザー照射後の生存日数を観察し、Kaplan-Meier 法に基づき生存曲線を作製し、各群間における50%生存期間を generalized Wilcoxon 法より算出し、5%

未満を有意の差として統計学的に比較検討した ($n=6$)。なお照射後の飼育条件に関しては、治療前と同様に 20°C に保たれた恒温室の金属ケージに1羽ずつ収容し、固型肥料と水を自由に与えた。

3. 結果

(1) PH-1126の組織内集積性および分布状態

a) 組織内集積性

エキシマ色素レーザー経内視鏡的蛍光分光装置を使用した。正常肝組織と腫瘍組織との吸光度の肉眼的な比較では、腫瘍近接部および腫瘍中心部に PH-1126 の高い集積を確認した。また、腫瘍組織内部において、腫瘍辺縁部と中心部の吸光度に若干の差が示唆された。各組織に含有される PH-1126 の蛍光強度は、正常肝組織の平均が 6.38 ± 0.53 、腫瘍辺縁付近で 67.75 ± 4.31 、腫瘍中心部で 113.56 ± 6.16 であった。これは正常肝組織の蛍光強度を1とすると、肝表面腫瘍近接部付近で正常肝組織に比較して10.62倍の集積を、また腫瘍中心部で約17.82倍の集積に匹敵する高い集積性を確認した (Fig. 6)。

b) 手術用顕微鏡下蛍光写真による検討

水銀キセノン励起光照射下における手術用顕微鏡を用いた各観察所見において、PH-1126投与後48時間目の観察では、腫瘍中心の壊死部分を除いた腫瘍全域に、PH-1126に特有の明るいオレンジ色を基調とした強い蛍光が、明瞭に認められた。これに対し、正常肝組織では蛍光発色は非常に微弱で、肝組織の元来発する自家蛍光である緑色部分すら散見されるほどであり、腫瘍組織と正常肝組織との各組織間における組織内集積量の明らかな差を認めた (Fig. 7)。

Fig. 6 Distributions between normal liver and tumor by Endoscopic spectrophotometer

These shows the absorption of the normal liver and tumor tissues at 48 hours after administration by the fluorescent spectrums originated after excitation with irradiated by the excimer laser at the 405nm wavelength, which was determined among 630nm and 720nm by the endoscopic fluoroscopy. As shown in the left photo (a), when the absorption in the normal liver tissue was defined as one, the corresponding quantity for the tumor was 10.61 in a part exposed in the surface area (b), and 17.82 in the central part of the tumor (c).

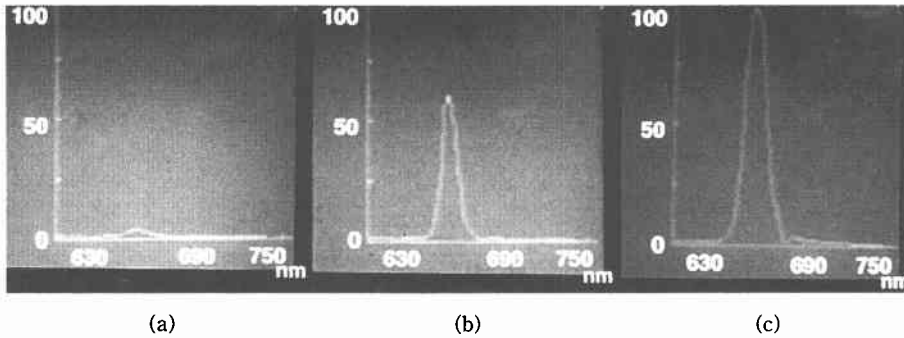


Fig. 7 Uptakes of PH-1126 among normal liver and tumor by Microscopic spectrophotometer

It shows the absorption of the normal liver and tumor tissues at 48hours after administration PH-1126, originated after excitation with irradiated by the Hg-Xe light at the 405nm wavelength.

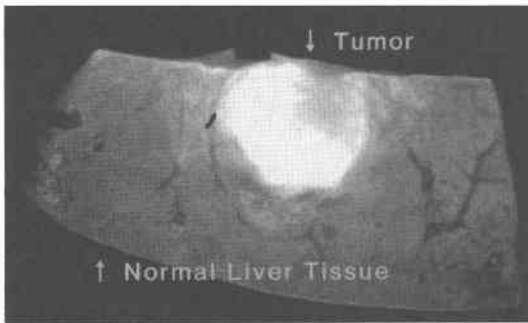
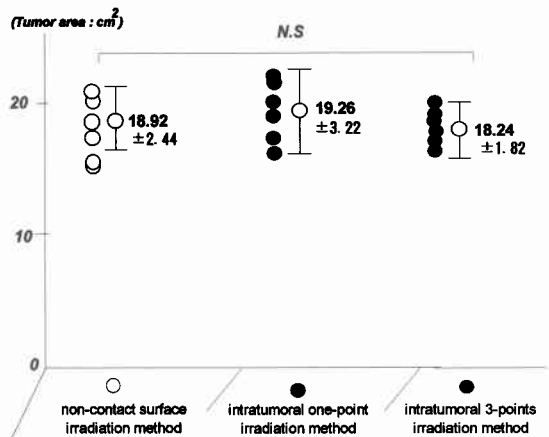


Fig. 8 Comparison of tumor area among three types of irradiation methods



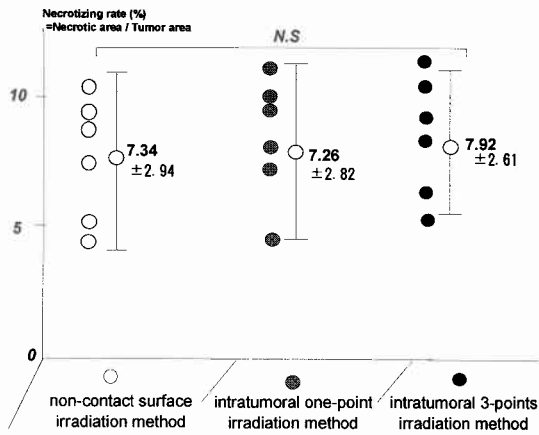
(2) 対照群

a) 腫瘍面積：PH-1126を投与せずにレーザー照射のみ行った非接触1点表面照射群・腫瘍中心部穿刺1点照射群・腫瘍辺縁部3点穿刺照射群の腫瘍面積は、 $18.92 \pm 2.44 \text{cm}^2 \cdot 19.26 \pm 3.22 \text{cm}^2 \cdot 18.24 \pm 1.82 \text{cm}^2$ であり、照射群のレーザー照射1週後の腫瘍面積には有意差を認めなかった (Fig. 8).

b) 壊死率：画像解析処理に基づく平均壊死率は、

非接触1点表面照射群で $7.34 \pm 2.94\%$ 、腫瘍中心部穿刺1点照射群で 7.26 ± 2.82 、腫瘍辺縁部3点穿刺照射群では $7.92 \pm 2.61\%$ と、いずれの群間にも有意差は確認できなかった (Fig. 9)。以上の対照群に関する基礎的検討より、治療用レーザー照射の方法の違いによっては、局所効果に有意差は生じないものと判断して、以下の治療群との効果判定には、PH-1126を投与せずに腫瘍辺縁部に3点の穿刺照射を行った群を対照群として設定し、各治療群と比較検討した。

Fig. 9 Comparison of necrotizing rate among three types of irradiation methods



(3) PDT の治療効果

a) 局所効果

1. 腫瘍面積の比較検討

計測された腫瘍面積を各群間で比較検討した。①対照群においては、治療用レーザー照射部位に該当すると思われる肝表面に肉眼的変化を全く認めなかった。画像解析システムを用い処理した計測結果では、その腫瘍面積は18.24±1.82cm²であった。②I群における腫瘍面積の解析結果は14.34±6.40cm²であり、肉眼的にも著変を認めなかった。③II群では、刺入部を中心として肉眼的に壊死巣部分の拡大を認めるものの、腫瘍辺縁部には腫瘍残存部分を認め、腫瘍全体の面積は対照群と差を認めなかった。同様にH.E.染色標本においても著明な壊死部分の拡大を認めるものの、全体の腫瘍面積に関しては差を認めなかった。画像解析処理の結果において、その腫瘍面積は13.29±4.51cm²であった。④III群では、他群に比較し肉眼的にもH.E.染色標本においても明らかに最大腫瘍径は小さく、同様に画像解析処理結果において、腫瘍部全体の面積は8.33±2.17cm²であった (Fig. 10)。

2. 壊死率の比較検討

① 対照群の肉眼的所見またH.E.染色標本では、自然壊死と思われる部分の拡大を認めるのみで、画像解析処理に基づく計測ではその平均壊死率は7.92±2.61%であった。②I群における肉眼的所見では、照射部位と思われる肝表面に壊死性変化をほとんど認めなかった。また、H.E.染色標本では、ファイバーチップに最も近い部分の肝表面にのみごくわずかにくさび

Fig. 10 Histological findings about antitumoral effect of PDT

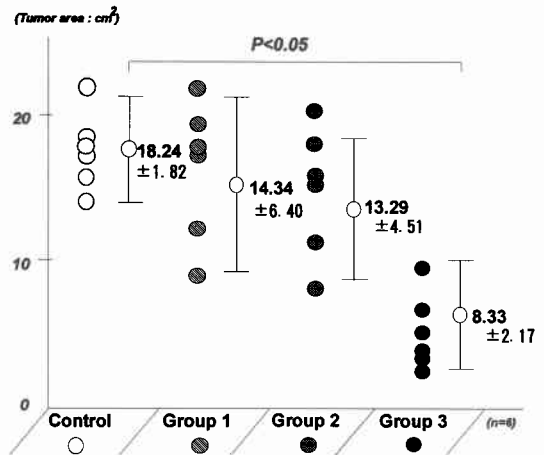
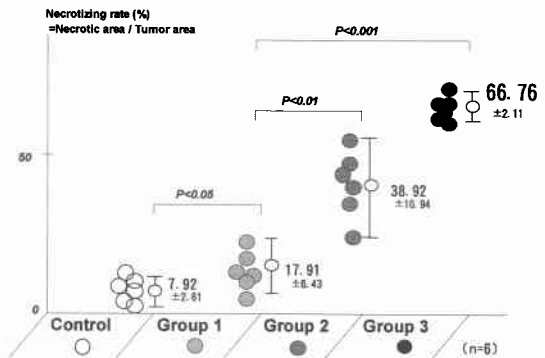


Fig. 11 Antitumoral effect of PDT-necrotizing rate among control and others

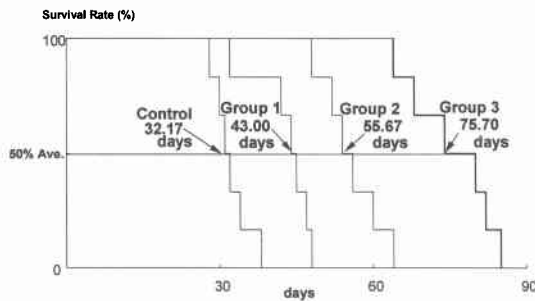


状の壊死性変化を確認した。画像解析処理結果では、その平均壊死率は17.91±6.43%であった。③II群では、腫瘍辺縁部には厚い帯状の腫瘍細胞残存を認めるものの、穿刺部を中心壊死部分の拡大を認め、画像解析処理結果よりの平均壊死率は38.92±10.94%であった。④腫瘍増殖抑制効果の示唆されたIII群では、肉眼的観察およびH.E.染色標本において明らかな壊死部分の広範化を確認し、画像解析処理の結果では平均壊死率66.76±2.11%と、優れた値を確認した (Fig. 11)。

b) 延命効果

レーザー照射後の生存日数の検討では、50%生存期間は、対照群：32.17日、I群：43.00日、II群：55.67日、III群：75.70日と、III群において有意に延長してい

Fig. 12 Comparison of survival rate among control and others



た (Fig. 12).

4. 考 察

教室では、良性疾患に対して接触型レーザーを用いた胆管結石の治療¹⁷⁾¹⁸⁾をはじめ、食道癌、肺癌、胆道癌・膵臓癌など、悪性疾患に対する手術・治療分野に幅広くレーザーを応用している。これら一連の高出力レーザーによる直接的な細胞破壊・蒸散作用を利用した方法とは別に、人体に対し侵襲の少ないごく低出力のレーザーを利用し、選択的に目的部分—特に悪性腫瘍のみを標的とし診断・治療を行う標的治療の1つとして、基礎・臨床医学の各分野でPDD・PDTが注目されている^{2)~8)}。PDD・PDTでは、光感受性物質が特定波長の光線に暴露されると、光エネルギーを吸収し、エネルギーの高揚した励起状態に転位する。その後基底状態に遷移する際のエネルギー放出が蛍光として確認され、一方では他の物質、すなわち一重項酸素や活性酸素 superoxide を産生する¹⁾。PDTにおける治療効果は、この活性酸素の局所細胞障害作用や、周囲癌組織の変性・壊死を引き起こす性質を利用している。当初、この治療効果は局所の温熱作用¹⁵⁾やレーザー照射による直接細胞障害の関与が指摘されたが、その後基礎的分野で研究が進み光線力学的反応以外の要素は否定されている^{19)~21)}。PDTの治療効果は、使用する光感受性物質と治療用レーザー照射方法の組み合わせにより変化する。現在、主に表在性腫瘍に対して、臨床に用いられている光感受性色素：HpDの腫瘍組織内局在は、ミトコンドリアに強く観察され¹⁾²²⁾²³⁾、そのSoret帯は405nmにあり、Q帯は530・628nmに観察される。今回実験に使用したPH-1126は、400.4nmにSoret帯を、500.4・596.8・652.4nmにQ帯を有し、PDTの際に要求される最長波長ピークは、HpDの628nmに対し24.4nm以上長波長域に存在し、より高い組

織透過性が期待できる⁹⁾¹⁰⁾²⁴⁾。また、この波長域はヘモグロビンの吸収波長である400~630nmを外れるため、ヘモグロビンの光吸収による減弱も発生せず、周囲血流の豊富な深部腫瘍である肝腫瘍のPDTに使用した場合に、より一層の治療効果が期待できる¹⁾¹⁰⁾。以上より、今回の実験で使用したPH-1126は、現在のところ研究中所であるその細胞内局在や殺細胞効果の詳細な発現機序など、完全に解明されない部分は残るものの、肝腫瘍のPDTに用いる光感受性物質として最適なものの1つである。治療用レーザー照射時間は、正常肝組織に比較して、腫瘍組織に高濃度のPH-1126の残存が期待でき、その組織内濃度差より高い治療効果の期待できるPH-1126投与後48時間に設定した¹⁰⁾。今回は、同時刻における各組織内濃度勾配の再確認を、内視鏡蛍光分光装置と、手術用顕微鏡を用いて行った。内視鏡蛍光分光装置による観察では、正常肝組織に比較し、腫瘍中心部・辺縁部でPH-1126の高い集積を確認した。今回の検討で、腫瘍組織内部、特に辺縁部と中心部の吸光度に若干の差が確認されたが、これは局在部位におけるPH-1126の組織内含有量の差を表すというよりも、肝表面部の色調がVX2腫瘍固有の性格とされる線維増生により白色調が強くなり、蛍光強度測定の際に、励起光が反射され測定値が低下するという若干の光学的影響が関与したものと考えている。手術用顕微鏡を用いて撮影された蛍光写真による検討でも、内視鏡蛍光分光装置による組織内集積性の検討より得られた結果と近似していた。以上の検討より、本実験における治療用レーザー照射時間の正当性を再確認した。以上の方法は、正常肝組織および腫瘍部分の全体が、簡便にかつ直視下に同一視野内で観察されることが、従来までの蛍光観察法にない特徴であった。治療効果に関する検討は、その局所の治療効果と、治療による生命予後の影響を確認する延命効果の2点より行った。

局所効果の検討では、腫瘍面積の比較検討より治療による増殖抑制効果と壊死率の2種類の指標を設定し、おのおの統計学的手法に基づき比較検討した。対照群においては、治療用レーザー照射部位に肉眼的変化を全く認めず、組織学的所見においても、腫瘍中心部において腫瘍の発育増大に伴うと思われる壊死部分の拡大を認めるのみで、同部の壊死率は最も低く、50%生存期間も最短であった。この結果は、治療用レーザー照射のみでは殺細胞効果が発生せず、PDTによる抗腫瘍効果が全く起こらないことを示唆した。I群におけ

腫瘍面積は、照射部位に若干の肉眼的・組織学的変化を認めたが、全体の腫瘍面積としては増大傾向を示し、統計学的検討では増殖抑制効果は確認できなかった。H.E. 標本では、ファイバーチップに最も近い部分の肝表面にのみごくわずかにくさび状の壊死性変化を確認したが、その効果はごく表層にのみ限局しており深部には何らかの変化も来していなかった。平均壊死率では、対照群と比較し若干の統計学的有意差を確認したが、50%生存期間の検討では、対照群との間に有意差はなかった。この照射法では、照射レーザー光が表面に限局し、腫瘍全域に到達しないため、組織内に含有されている PH-1126 の励起が不十分で、殺細胞効果による治療効果を期待できないことが示唆された。II 群では、腫瘍中心の刺入部を中心として肉眼的に壊死巣部分の拡大を認め、H.E. 染色標本においても著明な壊死部分の拡大を確認し、平均壊死率の検討では、対照群・I 群と比較し明らかに統計学的有意差を認め、PDT により壊死部分は確実に広範化していることを確認した。また、50%生存期間は、対照群、I 群と比較し有意な延長を認めた。しかし、同時に腫瘍全体の面積としては若干の増殖傾向を示し、画像解析処理の結果において腫瘍面積は、対照群・I 群と比較し統計学的に有意差を認めなかった。

以上の検討より、中心部穿刺照射群では、穿刺部周辺では壊死性変化による若干の治療効果が期待でき、延命効果には結びつくものの、穿刺部より距離のある腫瘍辺縁部には厚い帯状の腫瘍細胞残存を認め、PDT の効果発現が穿刺部周辺に限局する傾向が示唆された。これは、照射レーザー光が腫瘍外側・辺縁部分には到達しないため PH-1126 の励起が不十分で、全体の腫瘍細胞を十分に減少させるには至らず、満足すべき結果に結びつかなかったものと考えられた。III 群では、他群に比較し肉眼的にも H.E. 染色標本においても明らかに最大腫瘍径・腫瘍面積は小さく、画像解析処理結果において対照群・I 群・II 群のいずれに対しても、統計学的に明らかに腫瘍増殖抑制効果を確認した。壊死部分も広範化しており、特に腫瘍辺縁の 3 点の穿刺部周辺においては、場所により残存腫瘍細胞を確認しえないほどの効果を認めた。その平均壊死率は、変化の認められなかった対照群・I 群に対してはもちろん、若干の壊死率上昇の認められた II 群に比較しても、明らかな壊死率の向上を確認した。50%生存期間は、設定された各群間で最長であり、統計学的にも対照群・I 群・II 群に対し明らかに有意差を認め、増殖抑制効

果と壊死率の 2 点より検討された局所の治療効果が、延命効果に密接に結びついていることが示唆された。

これらの結果より、腫瘍の増殖を抑制するには腫瘍辺縁部に 3 点の穿刺照射を行い、腫瘍組織内に含有される PH-1126 をより効果的に、かつ十分に励起させることが、優れた腫瘍面積の増大抑制効果・壊死率の向上、ひいては生存期間の延長を生むことが確認された。また、使用ファイバーチップの面より検討すると、前方照射型ファイバーチップを使用しレーザー照射を行った対照群・I 群に対し、全方向照射型ファイバーチップを使用した II 群・III 群では、その治療効果に関し明らかな有意差を確認した。深部組織腫瘍である肝腫瘍の PDT に際しては、十分な光感受性色素の励起が治療効果に強く影響するものと思われ、穿刺照射型ファイバーチップの使用が有用であった。

今回の一連の実験結果より、肝腫瘍に対する集学的治療方法の 1 つとして、PDT も今後積極的に検討される方法であることが示唆される。今後さらに新しい治療用レーザーおよび光感受性物質の組み合わせにより、治療効果の向上が期待できるものと考えている。

稿を終えるに臨み、終始御丁寧な御指導・御校閲を賜りました恩師炭山嘉伸教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究に当たり御指導ならびに使用器材などの使用を御快諾下さいました東京医科大学第 2 生理学教室曾沢勝夫教授に、謹んで深謝の意を表します。直接この研究に対し御協力、御教示いただきました鈴木 茂非常勤講師・桜井貞夫博士をはじめとする外科学第 3 講座の教室員各位に深く感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第 43 回日本消化器外科学会総会および第 93 回日本外科学会総会において発表した。

文 献

- 1) 曾沢勝夫：Hematoporphyrin 誘導体を用いたレーザー光化学反応の癌診断、治療の基礎。日レーザー医学会誌 5：3-12, 1985
- 2) 加藤治文, 小中千守, 大友伸也ほか：レーザー光線による光線力学的診断・治療法の外科応用。日外会誌 89：988-991, 1986
- 3) Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A et al: Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 38: 2628-2635, 1978
- 4) Diamond I, Granelli S, McDonagh AF et al: Photodynamic therapy of malignant tumors. *Lancet* 2: 1175-1177, 1972
- 5) 三村征四郎, 一居 誠, 今西 清ほか：食道癌ならびに胃癌に対する HpD 光線力学的治療の適応と限界。癌と化療 15: 1440-1444, 1988
- 6) 小林正美, 小宮山真：DNA の光切断とがんの化学療法。化学 47: 54-55, 1992

- 7) 森田 豊, 松井亮好, 安藤貴志ほか: N2 dye laser を励起光源とした Photodynamic therapy. Gastroenterol Endosc 29: 920-925, 1987
- 8) 奥島憲彦, 井手博子, 鈴木 茂ほか: 食道癌の Photodynamic Therapy. 日気管食道会報 40: 118-121, 1989
- 9) 西宮克明, 河部博文, 山田隆一ほか: 新しい光感受性物質, PH-1126 の組織集積性と抗腫瘍効果. 日レーザー医学会誌 9: 339-342, 1988
- 10) 桜井秀樹, 曾沢勝夫: 肝癌に対する光力学治療の基礎的研究 (兎実験肝腫瘍および光感受性物質 PH-1126 の分布). 東京医大誌 48: 786-794, 1990
- 11) 桜井貞夫: 肝癌におけるホルモン療法の基礎的検討—Medroxyprogesterone acetate の補助療法としての有用性について. 東邦医学会誌 39: 70-81, 1992
- 12) Nakamura K, Tashiro S, Hiraoka T et al: Studies on anticancer treatment with an oily anticancer drug injected into ligated feeding hepatic artery for liver cancer. Cancer 52: 2193-2200, 1983
- 13) 多田康之, 多淵芳樹, 斎藤洋一: VX2 癌による高頻度肝転移・肝再発家兎胃癌モデルの確立. 日外会誌 93: 818-826, 1992
- 14) Okunaka T, Kato T, Konaka C et al: A comparison between aron-dye and excimer-dye laser for photodynamic effect in transplanted mouse tumor. Jpn J Cancer Res 83: 226-231, 1992
- 15) 三輪嘉明, 坂井 昇, 山田 弘: Photodynamic therapy における温熱効果に関する再検討. 日レーザー医学会誌 7: 25-27, 1987
- 16) 緒方正名, 大橋紘一, 菊池 進ほか: 3.3分散分析. ベーシック・プログラムによる医学統計手法. 第1版. 第2刷. 同文書院, 東京, 1989, p55-70
- 17) 鈴木 茂: 経皮経肝胆道鏡による胆管結石の治療, 特に Laser および Stone Disintegrater の基礎と臨床について. 東邦医学会誌 33: 319-329, 1986
- 18) 炭山嘉伸, 桜井貞夫, 鈴木 茂ほか: 経皮経肝胆道鏡による切石および吻合部拡張術を施行した胆管空腸吻合部狭窄の1治験例. 胆と膵 9: 1257-1261, 1988
- 19) 西宮克明, 会沢勝夫, 奥仲哲弥ほか: 光化学治療のレーザー光線照射による腫瘍温度変化. 日レーザー医学会誌 7: 23-24, 1987
- 20) 王 正澤: Photodynamic therapy による腫瘍細胞の形態学的変化. 東京医大誌 46: 279-185, 1988
- 21) 河手典彦, 野口正之, 酒井治正ほか: 光線力学的療法による細胞変化. 日レーザー医学会誌 6: 307-310, 1986
- 22) 田口喜雄, 桑原悦美, 佐藤俊一ほか: 光線力学的療法的作用機序に関する研究. 病態生理 7: 493-496, 1988
- 23) Bellnier DA, Doughety TJ: Membranelysis in chinese hamster ovary cells treated with hematoporphyrin derivertive plus light. Photochem Photobiol 36: 43-47, 1982
- 24) 河部博文, 曾沢勝夫, 古川欣也ほか: 新光感受性物質の抗腫瘍効果. 日レーザー医学会誌 10: 245-247, 1989

A Basic Study of Photodynamic Therapy of Experimental Hepatoma with PH-1126

Hirohisa Kajiwara

Third Department of Surgery, Toho University

After VX2 hepatoma models were prepared using Japanese white rabbits, we carried out fundamental studies on the photodynamic therapy with PH-1126, a photosensitizer, and krypton laser in the treatment of hepatoma; namely, accumulation of PH-1126 in livers of these models was measured 48 hours after administration at a dosage of 3 mg/kg, using 2 methods, endoscopic photometer and macroscopic observation with a surgical microscope. More, we also determined the therapeutic effects of the photodynamic therapy with a krypton laser at 80 J/cm² 48 hours after administration of PH-1126. The tumor models were as follows: Control: rabbit hepatoma treated by intratumoral three-point irradiation without PH-1126. Group 1: non-contact surface irradiation method (used with fiber of the forward irradiation type). Group 2: intratumoral one-point irradiation method. Group 3: intratumoral three-point irradiation method. (Omnidirectional fiber was used in Groups 2 and 3) Anti-tumor effects were examined as to (1) inhibitory effect on tumor growth and (2) necrotizing rate. It was found that use of the 3-point irradiation method gave significantly better therapeutic results compared with the other three methods. The survival time was also significantly prolonged in the 3-point irradiation group. From these results, it was confirmed that the photodynamic therapy with PH-1126 is useful as a new multidisciplinary therapy for hepatoma.

Reprint requests: Hirohisa Kajiwara Third Department of Surgery, Toho University, School of Medicine

2-17-6 Ohashi Meguro-ku, Tokyo, 153 JAPAN