



Sufficient PpIX production for PDT even with short contact time of topically applied 5-ALA in rabbit tongues

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大浦, 健宏 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/370

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 501号	学位授与年月日	平成20年 3月17日
氏 名	大 浦 健 宏		
論文題目	<p>Sufficient PpIX production for PDT even with short contact time of topically applied 5-ALA in rabbit tongues (ウサギ舌における局所塗布 5-ALA の短時間接触による PDT に十分な PpIX の生産)</p>		

博士(医学) 大 浦 健 宏

論文題目

Sufficient PpIX production for PDT even with short contact time of topically applied 5-ALA in rabbit tongues
(ウサギ舌における局所塗布5-ALAの短時間接触によるPDTに十分なPpIXの生産)

論文の内容の要旨

[はじめに]

5-アミノレブリン酸(以下ALA)を用いた光線力学療法(以下PDT)は、フォトフリンなどの光増感剤などに比べ、遮光期間がほとんど不要で、その投与法により対象とする病変に応じた選択自由度が高い薬剤と考えられる。

口腔粘膜疾患は、体表の表在性疾患であることからALA局所投与の良い適用であり、軟膏剤として口腔白板症に臨床応用し有効性が報告されている。そこでわれわれも、前癌病変であり、病変が粘膜表層に限られる白板症がALA-PDTの良い適用と考え、ALA局所投与によるPDTの臨床応用を行った。しかし、ALAを口腔病変に局所塗布する際、唾液や舌の動き等によって薬剤が洗い流されることが投与時の問題点であり、ALA塩酸塩の酸味はこれを増悪すると推測されている。数時間、軟膏薬剤を口腔内病変に接触させ、唾液で洗い流されずに保持させるのは困難で、薬剤の接触時間を短くすることができれば患者のストレスを大幅に軽減でき、ALA局所投与PDTの適用を広げることができると思われる。

局所塗布されたALAがどれだけの間、病変表面に洗い流されずに、維持されていればよいのか、口腔病変部に対するALAの至適接触時間を検討するため、兎の舌粘膜に対してALA軟膏を局所塗布し、その接触時間、protoporphyrin IX (PpIX) の産生量さらにPDTの効果について解析し評価した。

[材料ならびに方法]

実験動物には固形飼料と水で飼育した体重約3 kgの雄性日本白色家兎を用いた。

使用した光増感剤はALAで、ALA100 mgに、320 μ lの蒸留水と80 mgのカルボキシメチルセルロースを加え、20% (W/W%) 軟膏を作成した。

投与法は、実験動物に全身麻酔を施し、20%ALA軟膏50 mgを兎の舌背部約10×10 mmの範囲に塗布して一定時間保持したのち、生理食塩水20 mlとスポンジブラシで塗布した軟膏をすべて洗い流した。軟膏を洗い流す処置を加えたのは、生体の唾液や舌の動きによって軟膏が洗い流されるのを模擬するためである。

1. 組織検体のPpIX量測定: ALA軟膏を一定時間接触させ(接触時間: 5, 10, 30, 240分)、ALA軟膏接触開始から240分後に組織を摘出して、組織内のPpIXを測定した。630 nm近傍のピーク値をPpIXの蛍光強度とした。
2. 舌表面のPpIX量測定: 上述とは別の実験動物に対して、ALA軟膏を一定時間接触させ(接触時間: 1, 5, 10, 30, 240分)、ALA軟膏接触開始から240分後に舌表面のPpIX量を測定した。630 nm近傍のピーク値をPpIXの蛍光強度とした。
3. PpIXの組織局在の評価: ALA軟膏を一定時間接触させ(接触時間: 10, 240分)、ALA軟膏接触開始から240分後に実験動物を犠牲死させ検体を採取し、採取した舌はクライオスタットで20 μ m厚の連続切片を作製した。隣接する切片のうち1枚を蛍光顕微鏡で観察し、もう1枚にHE染色を施して光学顕微鏡で

観察することでPpIXの蓄積の有無とその局在を調べた。

4. PDTの効果: ALA軟膏投与後に光照射を行い、PDT効果を評価した。上述とは別の実験動物にALA軟膏を一定時間接触させ(接触時間: 10, 240分)、ALA軟膏接触開始から240分後にPDTを行った。照射用光源として、発振波長635 nmの半導体レーザーを使用した。照射3日後に実験動物を犠牲死させ検体を採取し5 μ mの切片標本を作製し、HE染色を施して光学顕微鏡で観察した。

[結果]

1. 組織検体のPpIX量測定: 接触時間が5分という短時間でも、PpIXが産生されていることが分かった。接触時間240分におけるPpIX量を100%とすると、接触時間10分ですでに73 %に達していた。
2. 舌表面のPpIX量測定: ALA接触時間10分で最大値を呈した。
3. PpIXの組織局在の評価: 基底層から浅層にかけて、特に基底層でPpIX由来の蛍光を認めた。それより深部の組織では蛍光がほとんど見られなかった。
4. PDTの効果: 10分塗布と240分塗布による明らかな差異は認められなかった。両群ともにALA軟膏塗布部ではレーザー照射直後から軽度の浮腫が見られ、照射3日目には照射部周辺部位の発赤と照射部の一部粘膜上皮欠損が見られた。HE染色では舌表面から基底層にかけて、炎症細胞浸潤を伴い、粘膜上皮の一部欠損を認めた。

[考察および結論]

今回の実験では、ALA軟膏の接触時間が10分と短くても舌表層においてPpIXの産生が十分に行われることを示している。

ALA局所塗布後のPpIX蓄積量の時間的推移に関する報告では、PpIX蓄積量がピークに達する2～4時間後まで薬剤を停滞保持させるよう工夫し、光照射が行われているが、薬剤の停滞時間とPpIX蓄積量に関する研究はない。本実験では、舌組織ならびに舌表面のPpIX蛍光測定により、ALA局所接触時間10分程度で、接触時間240分の場合と同程度のPpIX量が産生されることが分かった。口腔粘膜には皮膚とは違いバリアとなる角化層がないために組織内へのALAの浸透が早期に行われ、残りの薬剤が機械的に洗い流された後も、組織内に残留したALAが代謝を受けPpIXが産生されたものと推測した。本結果は、口腔粘膜の病変部にALAを塗布した後、長時間に渡って唾液の流出を防ぐ努力をしなくても治療効果が期待できることを示唆し、臨床上非常に有益であると考えられる。

ヒト口腔内の前癌病変や癌に対するALA-PDTの効果の及ぶ範囲は、病変の表層部から0.1～1.3 mmであると報告されている。本実験の結果では、ALA局所投与により主に基底層(厚さ0.5～0.8 mm)にPpIXが産生されることが分かった。これは基底層より表層の粘膜上皮が病変の主座である白板症には、ALA局所塗布PDTが良い治療適用であることを示している。基底層にPpIX産生量が多いのは、薬剤の組織浸透性に起因すると考えられるが、基底細胞の活発な代謝活性が関与している可能性もある。治療に必要な組織内のPpIX絶対量はまだ明確になっていないが、本結果により、ALA局所塗布PDTが口腔内白板症治療の新しい手法としておおいに期待できることが分かった。

論文審査の結果の要旨

5-アミノレブリン酸(ALA)を用いた光線力学療法(PDT)は、フォトフリンなどの光増感剤などに比べ遮

光期間がほとんど不要で、病変に応じた治療ができると期待される。特に前癌病変であり病変が粘膜表層に限られる白板症がALA-PDTの良い適応と考えられる。申請者は、局所塗布されたALAがどれだけの間、病変表面に洗い流されずに維持されていればいいのか、口腔病変部に対するALAの至適接触時間を検討するため、家兎の舌粘膜に対してALA軟膏を局所塗布し、その接触時間、protoporphyrin IX (PpIX)の産生量さらにPDTの効果について解析し評価した。

[方法および結果]

ALA100 mgに、320 μ lの蒸留水と80 mgにカルボキシメチルセルロースを加え、20% (W/W%)軟膏を作成した。投与法は、実験動物(体重約3 kgの雄性日本白色家兎)に全身麻酔を施し、20%ALA軟膏50 mgを家兎の舌背部約10×10 mmの範囲に塗布して一定時間保持した。生理食塩液20 mlとスポンジブラシで塗布した軟膏をすべて洗い流した後、舌組織と舌表面のPpIX量を測定し局在を調べ、またPDTの効果についても解析した。

1. 組織検体のPpIX量測定：ALA軟膏を一定時間接触させ(接触時間：5, 10, 30, 240分)、ALA軟膏接触開始から240分後に組織を摘出して、組織内のPpIXを測定した。630 nm近傍のピーク値をPpIXの蛍光強度とした。接触時間が5分という短時間でも、PpIXが産生されており、接触時間240分におけるPpIX量を100%とすると、接触時間10分ですでに70%強に達していた。
2. 舌表面のPpIX量測定：ALA軟膏を一定時間接触させ(接触時間：1, 5, 10, 30, 240分)、ALA軟膏接触開始から240分後に舌表面のPpIX量を測定した。630 nm近傍のピーク値をPpIXの蛍光強度とした。ALA接触時間10分で最大値を呈した。
3. PpIXの組織局在の評価：ALA軟膏を一定時間接触させ(接触時間：10, 240分)、ALA軟膏接触開始から240分後に実験動物を犠牲死させ検体を採取し、クライオスタットで20 μ m厚の連続切片を作製した。隣接する切片で蛍光顕微鏡とHE染色を施して光学顕微鏡で観察し、PpIXの蓄積の有無とその局在を調べた。基底層から浅層にかけて、特に基底層でPpIX由来の蛍光を認めたが、それより深部の組織では蛍光がほとんど見られなかった。
4. PDTの効果：ALA軟膏を一定時間接触させ(接触時間：10, 240分)、ALA軟膏接触開始から240分後にレーザー照射を行った。照射用光源として、発振波長635 nmの半導体レーザーを使用した。照射3日後に実験動物を犠牲死させ検体を採取し5 μ mの切片標本作製し、HE染色を施して光学顕微鏡で観察した。10分塗布と240分塗布による明らかな差異は認められなかった。両群ともにALA軟膏塗布部ではレーザー照射直後から軽度の浮腫が見られ、照射3日目には照射部周辺部位の発赤と照射部の一部粘膜上皮欠損が見られた。HE染色では舌表面から基底層にかけて、炎症細胞浸潤を伴い、粘膜上皮の一部欠損を認めた。

本実験では、舌組織ならびに舌表面のPpIX蛍光測定により、ALA局所接触時間10分程度で、接触時間240分の場合と同程度のPpIX量が主に基底層(厚さ0.5～0.8 mm)に産生されるのを明らかにした。ALAを使用したPDTにおいても同部の病理学的変化や脱落を示した。これらから、基底層より表層の粘膜上皮が病変の主座である白板症には、ALA局所塗布PDTが良い治療方法であることが示唆された。

審査委員会では、従来のPDTの短所であった遮光期間を短縮させるALAの臨床適応可能な投与法および有効性を基礎実験で裏づけ、新しい臨床応用への道を開いた点を高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) ALAの体内での存在意義について

- 2) PpIXの濃度を調節するFerrochelataseの組織特異性について
- 3) mild dysplasia、moderately dysplasia、severe dysplasiaの病理学的所見の差について
- 4) 舌表面の場所による角化層の差とALAの吸収の差について
- 5) PpIXの舌表面濃度が240分で低下する理由について
- 6) レーザー照射3日後に組織を切除した根拠について
- 7) PDT後に組織に浸潤する炎症細胞の種類について
- 8) 全身麻酔の時間を統一しなかった理由について
- 9) コントロールの家兎の条件について
- 10) レーザー照射の回数について
- 11) 白板症モデル動物で行ったか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	峯	田	周	幸	
	副査	難	波	宏	樹	副査 山 本 清 二