



## Photodynamic therapy using talaporfin sodium for synovial membrane from rheumatoid arthritis patients and collagen-induced arthritis rats

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鳥養, 栄治 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/795">http://hdl.handle.net/10271/795</a>

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 533号	学位授与年月日	平成21年 3月18日
氏 名	鳥 養 栄 治		
論文題目	Photodynamic therapy using talaporfin sodium for synovial membrane from rheumatoid arthritis patients and collagen-induced arthritis rats (関節リウマチ患者の関節滑膜およびコラーゲン関節炎ラットに対するタラポルフィンナトリウムを用いた光線力学療法)		

博士(医学) 鳥 養 栄 治

## 論文題目

Photodynamic therapy using talaporfin sodium for synovial membrane from rheumatoid arthritis patients and collagen-induced arthritis rats

(関節リウマチ患者の関節滑膜及びコラーゲン関節炎ラットに対するタラポルフィンナトリウムを用いた光線力学療法)

## 論文内容の要旨

### [背景と目的]

関節リウマチ(以下 RA)は高度に増生した滑膜とそれによる骨・軟骨破壊を特徴とする慢性炎症性疾患である。RA に対する治療は薬物療法が主体であるが、治療に抵抗する滑膜炎は外科的滑膜切除術の適応となる。光線力学療法(以下 PDT)は、光感受性物質を投与した後、レーザー光を照射して光化学反応を引き起こさせ、それにより光感受性物質に親和性のある組織を選択的に変性壊死させる治療法で、今日、各医療分野でその技術が応用されている。今回、RA に対する外科的滑膜切除術に変わる新たな方法として、タラポルフィンナトリウムを用いた PDT の効果を検討した。

### [材料と方法]

はじめに、ヒト RA 滑膜について検討した。*in vitro* の実験系では、RA 患者の膝関節滑膜を手術時に採取し、3 – 5 代継代培養した滑膜細胞を実験対象とした。RA 培養細胞にタラポルフィンナトリウムを 25  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で添加し、細胞内取り込み部位を確認した。次に、タラポルフィンナトリウムを 0 – 100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で添加し、4 時間経過後、664 nm のダイオードレーザー光を 0 – 20  $\text{J/cm}^2$  の照射量で照射し、PDT を行い、24 時間後、細胞障害度を 3 – (4,5-dimethylthiazol-2-yl) – 5 – (3-carboxymethoxyphenyl) – 2 – (4-sulphophenyl) – 2H – tetrazolium, inner salt (MTT)アッセイで測定した。*in vivo* の実験系では、手術中に採取し径 8 mm 大とした RA 滑膜を 8 – 10 週齢雄の severe combined immunodeficiency (SCID) マウスの背部に移植し、4 週間経過後、生着を確認し実験対象とした。移植部にタラポルフィンナトリウムを 0 – 1.0  $\text{mg/ml}$  の濃度で 0.3 ml 局注し、4 時間遮光後、0 – 50  $\text{J/cm}$  の照射量で組織内レーザー光照射し PDT を行い、PDT 24 時間後に RA 滑膜組織を HE 染色し傷害組織量を計測した。

続いて、RA の動物モデルであるコラーゲン関節炎(CIA)ラットで PDT の効果を検討した。体重 250 – 300 g の雄レイスラットの尾部に II 型コラーゲンとフロイントコンプリートアジュバントの混合エマルジョンを 2 回皮下注射し、関節炎を発症させた。CIA ラットの膝関節内にタラポルフィンナトリウムを 1.0  $\text{mg/ml}$  の濃度で 0.3 ml 投与し、0 – 48 時間遮光後に滑膜、軟骨、関節周囲筋組織、関節周囲皮膚組織を採取し、タラポルフィンナトリウムの取り込み量を計測した。次に CIA ラットの膝、足関節内にタラポルフィンナトリウムを 0 – 1.0  $\text{mg/ml}$  の濃度で注入後遮光し、4 時間後に 0 – 50  $\text{J/cm}$  の照射量で関節内レーザー光照射し PDT を行った。PDT 24 時間後に膝関節を HE 染色にて病理像を評価し、膝関節傷害滑膜量を計測した。また、PDT 56 日後に足関節を HE 染色、サフラニン O 染色し病理像を評価し、残存軟骨量を計測し、さらに単純 X 線像にて骨破壊を評価した。

### [結果]

RA 滑膜の検討では、*in vitro* の実験系でタラポルフィンナトリウムはライソゾームに取り込まれた。*in vitro*、*in vivo* の PDT でタラポルフィンナトリウム濃度、照射エネルギー量依存性に RA 滑膜細胞の組織

障害度が増加した。CIA ラットでは、タラポルフィンナトリウム取り込み量は軟骨、筋、皮膚に比し関節滑膜に有意に多く、投与 4 時間後に最大となった。病理像の評価では、一定のタラポルフィンナトリウム濃度、照射エネルギー量までは、タラポルフィンナトリウム濃度、照射量依存性に照射 24 時間後の滑膜傷害効果と 56 日後の骨・軟骨破壊抑制効果が得られたが、それ以上の濃度、照射量では骨・軟骨破壊が進行した。56 日後の単純 X 線像の評価でも同様の結果であった。

#### [考察]

RA は高度に増生した滑膜とそれによる骨・軟骨破壊を特徴とする慢性炎症性疾患であり、関節滑膜は RA の重要な治療標的とされている。タラポルフィンナトリウムは RA 滑膜のライソゾームに取り込まれ、RA 滑膜に対する PDT は、タラポルフィンナトリウム濃度依存性、レーザー照射量依存性に組織破壊効果を示した。また、CIA ラットに対する PDT では、一定値の範囲内でタラポルフィンナトリウム濃度、レーザー照射量依存性に膝関節滑膜への PDT 効果と足関節の骨・軟骨破壊抑制効果が得られた。以上より、ヒト RA 滑膜に対するタラポルフィンナトリウムを用いた PDT は有効であり、骨・軟骨破壊の進行を抑制する可能性が推測された。しかし、過度のタラポルフィンナトリウム濃度、レーザー照射量による PDT では逆に骨・軟骨破壊が進行しており、適切な条件で PDT を施行することが重要と考えられた。今回、タラポルフィンナトリウム取り込み量は軟骨、筋、皮膚に比し関節滑膜に有意に多かった。光線感受性物質は、静脈内投与では筋組織、皮膚組織に比較的良好に取り込まれることが知られているが、関節内投与では、筋、皮膚組織にほとんど取り込まれなかった。これは関節包による遮蔽効果によるものであり、静脈内投与ではしばしば問題となる光線過敏性の軽減に理想的な投与方法と考えた。タラポルフィンナトリウムの関節内投与では、関節滑膜へのタラポルフィンナトリウムの取り込み量は投与 4 時間後に最大となり、関節内投与による PDT は投与 4 時間後に行うことが最も有効と推測された。

#### [結論]

RA の新しい滑膜除去法として、タラポルフィンナトリウムを用いた PDT は有用な方法となりえることが推測された。

### 論文審査の結果の要旨

申請者らは関節リウマチ(以下 RA)の光線力学療法(以下 PDT)について基礎的検討を行った。RA は難治性の関節の慢性炎症性疾患で原因不明の自己免疫疾患である。RA に対する治療は抗炎症薬やステロイドなどの薬物療法が主体であるが、治療に抵抗する滑膜炎では外科的滑膜切除術の適応となる。しかし、滑膜切除術は侵襲的であり、奏効率は必ずしも高くない。申請者らは予備的研究から RA の滑膜細胞に光感受性物質が取り込まれることを見出した。これらの事実から RA に対して PDT が有効か否か培養実験及び動物実験で検討した。光感受性物質は現在肺癌で臨床応用されている光感受性物質タラポルフィンナトリウムを用いた。

申請者らは以下の方法で実験を行った。培養実験では、RA 患者の膝関節滑膜を手術時に採取し、3 - 5 代継代培養した滑膜細胞を使用した。培養細胞にタラポルフィンナトリウムの取り込みを確認した。次にタラポルフィンナトリウムを各種濃度(0 - 100  $\mu\text{g/ml}$ )で添加し4時間経過後、664 nm のダイオードレーザー光を(0 - 20  $\text{J/cm}^2$ )の照射量で照射しPDTを行った。細胞傷害度をMTT法により測定した。動物実

験は 2 つ行っている。両実験とも注目すべき点は従来の PDT とは異なり局所投与(関節内投与)を用いている点である。最初の実験は手術中に採取し RA 滑膜を 8-10 週齢雄の SCID マウスの背部に移植し、その後移植部にタラポルフィンナトリウムを局所投与し PDT を行った。24 時間後に RA 滑膜の組織解析を行い、PDT 効果を観察した。第 2 の動物実験としてコラーゲン関節炎ラットに局所の PDT を行い有効性について研究を行った。コラーゲン関節炎ラットの膝、足関節内に各種濃度のタラポルフィンナトリウムを局所投与後、PDT を行い 24 時間後の膝関節の病理像及び膝関節傷害滑膜量を計測した。また PDT 56 日後の足関節を単純 X 線像等により滑膜の再生効果を評価した。

申請者らは以下の結果を得た。

- 1) 培養細胞を用いた実験では RA の滑膜細胞ではタラポルフィンナトリウムはライソゾームに取り込まれた。
- 2) RA の滑膜組織を移植したマウスに PDT を行った実験では、タラポルフィンナトリウム濃度、照射エネルギー量依存性に PDT 効果が増加した。
- 3) コラーゲン関節炎ラットの実験では、タラポルフィンナトリウム取り込み量は他の組織に比較し関節滑膜に有意に多く、投与 4 時間後に最大となった。病理像の評価では、0.3 mg/ml のタラポルフィンナトリウム濃度、30J/cm<sup>2</sup> の照射エネルギー量までは濃度、照射量依存性に PDT 効果が得られた。また長期的な滑膜の再生においても 0.3 mg/ml のタラポルフィンナトリウム濃度、30J/cm<sup>2</sup> の照射エネルギー量までは濃度、照射量依存性に再生効果が観察された。

以上の結果から申請者らは RA の新規治療法として関節局所の PDT という可能性を示した。本研究は本学が力を入れている光医学を大きく発展させる内容であり、また近い将来臨床応用に結びつくものである点を高く評価した。

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) RA 滑膜細胞の培養条件について
- 2) 用いたコントロール細胞について
- 3) ダイオードレーザーの発生機構について
- 4) RA 滑膜のマウスへの生着率について
- 5) タラポルフィンナトリウム濃度、照射時間の設定について
- 6) タラポルフィンナトリウムがライソゾームに取り込まれる機序について
- 7) PDT 効果の判定法について
- 8) コラーゲン関節炎ラットの発症機序について
- 9) PDT の局所投与と静脈投与の効果の差異について
- 10) コラーゲン関節炎ラットにおいて PDT による滑膜の再生機序について

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 金山 尚裕

副査 橋本 賢二

小川 法良