



Selective accumulation of ALA-induced PpIX and photodynamic effect in chemically induced hepatocellular carcinoma

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松永, 真美子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/272

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	医博論第 397号	学位授与年月日	平成16年 3月10日
氏 名	松 永 真美子		
論文題目	Selective accumulation of ALA-induced PpIX and photodynamic effect in chemically induced hepatocellular carcinoma (化学発癌による肝細胞癌へのALA誘導 PpIXの選択的集積生とその光線力学的効果)		

博士(医学) 松 永 真美子

論文題目

Selective accumulation of ALA-induced PpIX and photodynamic effect in chemically induced hepato cellular carcinoma

(化学発癌による肝細胞癌へのALA誘導PpIXの選択的集積性とその光線力学的効果)

論文の内容の要旨

[はじめに]

肝細胞癌(HCC)は治療抵抗性の悪性疾患であり、肝予備能を考慮した、より腫瘍選択性の高い診断法、および治療法の確立が望まれる。光線力学的治療(PDT)は、予め患者に投与した光感受性物質が腫瘍部に選択的に集積する時間にレーザー光を腫瘍部に照射し腫瘍破壊を導く治療法である。肝臓は、光感受性物質が取り込まれやすく腫瘍選択性の出にくい臓器であり、PDTの施行は困難と考えられていた。しかし近年、δアミノレブリン酸(ALA)の肝腫瘍への応用が報告され、ALA-PDTの移植肝癌への有効性が示された。ALAはヘム合成系におけるプロトポルフィリンIX(PpIX)の前駆体であり、外因性ALAの投与により細胞内へのPpIXの集積を誘導し、このPpIXが有効な光感受性物質として働く。本研究では、PDTがHCCに应用可能か否かを、移植癌ではなく化学発癌によるHCC in situを用いて、ALA投与後のPpIXの集積性とPDT効果を評価することにより、検討した。

[材料ならびに方法]

肝癌モデルは、5週齢のFisher系雄性ラットにジエチルニトロソアミン100ppm水溶液を11週間自由に飲水させた後、2週間水道水で飼育し作成した。モデルの肝臓には、同一個体に直径5-15mmの腫瘍が多発し、病理組織学的に、変異肝細胞巣(FAH)、過形成結節(HN)、異型結節(AN)、HCCに分類される病変が混在した。正常肝組織はほとんど認められず、非腫瘍部の組織像は主にFAHとHN、腫瘍部は主にANとHCCであった。肝癌モデルにALA 500mg/kgを静注し、1、3、6時間後、およびALAを投与せずに肝臓を摘出した(各群それぞれn=4~5)。腫瘍部、非腫瘍部の組織抽出液を作成し、分光光度計を用いて波長410nmで励起し、蛍光強度を測定した。この測定系を用い、ALA非投与の肝抽出液に既知濃度のPpIX Naを加えて作成した検量線において、蛍光強度とPpIX量は比例関係を示した。さらに、形態的検索のため、ALA 500mg/kg静注3時間後のHCCと非腫瘍部を含む肝臓を用いて、蛍光写真と蛍光顕微鏡写真を撮影した。最後に、同モデルの5-9mmの4個の腫瘍に対し、ALA静注3時間後に開腹下でPDTを行った。エキシマダイレーザー(4mJ/pulse、40Hz、630nm)で腫瘍の表面より30Jを照射し、24時間後の病理所見により治療効果を評価した。

[結果]

ALA投与後抽出液では、635nmにピークを有するPpIXによる蛍光スペクトルを得た。HCCと非腫瘍部において、この蛍光強度を比較した。ALA投与後、1時間でHCC16ヶ所、非腫瘍部15ヶ所、3時間でHCC10ヶ所、非腫瘍部19ヶ所、6時間でHCC 8ヶ所、非腫瘍部13ヶ所を測定した。蛍光強度は、1時間のHCCが 56.6 ± 9.7 (平均 $\pm$ 標準誤差)、非腫瘍部が 19.5 ± 3.6 、3時間のHCCが 279.3 ± 67.1 、非腫瘍部が 202.0 ± 35.3 、6時間のHCCが 166.6 ± 37.7 、非腫瘍部が 129.9 ± 32.3 であり、1時間で有意差を認めた。次に、同

一個体におけるHCCの非腫瘍部に対する蛍光強度の比を検討した。比の平均はすべての時間で1より大きく、1時間と3時間で有意差を認めた。蛍光写真と蛍光顕微鏡写真では、HCCにPpIXによる赤色の蛍光を認めた。ALA-PDTにおいては、最深8mmまで腫瘍を選択的に壊死させることが可能であった。

〔考察〕

PpIX濃度は、HCC、非腫瘍部ともにALA投与3時間後にピークに達し、すべての時間においてHCCが非腫瘍部より高いという結果が得られ、ALA取り込みがHCCで非腫瘍部より速いことが示された。1時間以外で有意差が認められなかった理由はばらつきのためであるが、これは各個体の腫瘍の径や数によるALA取り込み量の相違や、中性に近い溶液中のALAの不安定さによると考えられた。次に、実際の光線力学的診断(PDD)およびPDTでは、同一個体の肝臓で組織型の相違によるPpIX集積性の差が重要と考え、一個体におけるHCCの非腫瘍部に対する比を求め検討した。その結果、同一個体においてはすべての時間において、HCCに、より高濃度にPpIXが集積している事実が示された。以上より、HCCのPDDとPDTは、PpIXが高濃度でかつ選択的に集積するALA投与3時間後に行うべきであると考えた。蛍光写真においてHCCを描出できており、これはALA投与後の蛍光診断が臨床応用されうることを示唆している。ALA-PDTにおいて大きな抗腫瘍効果が得られた理由には、ALAの全身投与により組織の深部まで均一にPpIXが分布したことが考えられる。

〔結論〕

ALAによるPDDやPDTがHCCの診断治療に応用できる可能性が示唆された。今後の研究によって、より安全で効果的な治療法となることが期待される。

論文審査の結果の要旨

〔はじめに〕

肝細胞癌(HCC)は治療に抵抗性を持つ悪性腫瘍である。経カテーテル動脈塞栓術、経皮的エタノール注入療法、経皮経肝的マイクロ波凝固療法などの治療が行われているが、その効果は不十分である。光線力学療法(PDT)はHCCには有効ではないとされてきたが、 δ -アミノレブリン酸(ALA)によるALA-PDTが移植肝癌に対して有効であると報告された。そこで申請者らは化学発癌によるHCCへのALA誘導PpIXの選択的集積性とそのPDT効果について検討した。

〔材料ならびに方法〕

HCCモデルは5週齢のFisher系雄ラットにジエチルニトロソアミン100ppmを11週間与え、その後2週間水道水を与えた。HCCモデルの肝臓には直径5-15mmの腫瘍が多発しており、ほとんど正常組織はみられなかった。その腫瘍は病理組織学的に非腫瘍性病変部は変異肝細胞巣(FAH)、過形成結節(HN)、腫瘍性病変部は異型結節(AN)、HCCが混在していた。エーテル麻酔下でラット尾静脈よりALAを500mg/kg投与し、投与後1時間をグループ1(5匹)、投与後3時間をグループ2(5匹)、投与後6時間をグループ3(4匹)、ALA非投与はグループ4(4匹)とした。

全グループのラットを屠殺後、腫瘍性病変と非腫瘍性病変を摘出し、病理組織用に一部残しホモジネート後、3,000回転5分間で遠心分離し、上澄み液を410nmで励起、蛍光分光光度計でPpIXの蛍光強度を測

定した。PDTはALAを500mg/kg静脈注射し、3時間後に開腹下で腫瘍表面から3-4mm離し、レーザー出力は4mj/pulse、160mWとし、各腫瘍あたりに平均30J、187秒照射した。照射24時間後にラットを屠殺し、その効果を病理組織学的に検討した。

〔結果〕

1. 蛍光強度

組織の最高蛍光強度は、HCCおよび非腫瘍性病変ともに635nmであった。ALA非投与の組織では、このピークは認められなかった。

2. PpIXの組織集積性の解析

HCCおよび非腫瘍性病変のPpIXの蛍光強度はALA投与1時間後有意差($P<0.01$)があった。どの時間帯においても、同一個体ではHCCの方が非腫瘍性病変よりも蛍光強度が強く、投与後1時間と3時間に有意差をもって蛍光強度が増していた。

3. 蛍光像

ALA投与3時間後の蛍光写真、肉眼および蛍光顕微鏡において青色光を当てたHCC部にオレンジ色の蛍光を認めた。

4. 光線力学療法の効果

PDTは腫瘍あたり30Jのレーザーを照射すると、HCCは完全に壊死し、周囲の非腫瘍性病変にはほとんど障害はなかった。

〔考察〕

PDTは近年様々な腫瘍での有効性が報告されているが、未だHCCでは効果が確立されていない。PpIXの蓄積はHCC、非腫瘍性病変でもALA投与3時間後にピークに達し、すべての時間でHCCの方が非腫瘍性病変よりも多く蓄積していた。その結果をもとに、HCCに対するPDDとPDTをALA投与後3時間で行い良好な成果を得た。PDTでは深度8mmまでの選択的なHCCの壊死をみた。さらなる研究によりALA-PDTがHCCに対し、より安全で効果的な治療となることが期待される。

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) ヘムの合成経路は、腫瘍によって違いがあるか
- 2) cell lineにより酵素活性が異なるが、ヒトの腫瘍では違いがあるか
- 3) 移植肝癌はどの様にして作ったのか
- 4) 移植部と転移部でporphyrinの集積性に違いがあるか
- 5) ALAをpH5.0～6.5に調整した理由は
- 6) 肉眼的に腫瘍と非腫瘍は区別がつくか
- 7) 肉眼的にHCCが白いのはなぜか
- 8) 前癌病変とは、何をさすのか
- 9) 1、3、6 時間に濃度を測定した理由は
- 10) ALAは肝以外に分布することはないか
- 11) PDT後24時間で組織を見ているが、経時的に観察するとどうなるのか
- 12) レーザー光の照射効果は、腫瘍内で変化があるか

13) PDTの欠点はregrowthであるが、その可能性を評価できないか

14) 壊死組織の定量的評価法は

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、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	橋 本 賢 二	
	副査	今 野 弘 之	副査 三 浦 克 敏