

論文内容の要旨

論文提出者氏名 日野 仁嗣

論文題目

5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes of different wavelengths in a mouse model of peritoneally disseminated gastric cancer

論文内容の要旨

光線力学的治療(photodynamic therapy: PDT)とは、生体内への光感受性物質の投与と、それらの吸収スペクトルに応じた特定波長の光を照射することから成る治療法である。この光照射によって、細胞内では活性酸素(reactive oxygen species: ROS)が産生され、細胞死が誘導される。5-アミノレブリン酸(5-aminolevulinic acid: 5-ALA)は天然アミノ酸の一種であり、それ自体に光感受性はないが、癌細胞内で光感受性物質である protoporphyrin IX (PpIX)に代謝され蓄積される。この性質を利用し、5-ALAを用いた PDT (ALA-PDT)は種々の悪性腫瘍に応用されてきた。一方、ALA-PDTにおいては、赤色光源が頻用されてきたが、PpIXの吸収スペクトルには5つのピークがあり、どの様な波長がALA-PDTにおいて最も適切であるかは不明であった。本研究では、胃癌腹膜播種に対する発光ダイオード(light-emitting diode: LED)光源を用いたALA-PDTの有用性についての検討を行った。また、異なる波長のLED光源(バイオレット:ピーク波長410 nm、緑色:ピーク波長525 nm、赤色:ピーク波長635 nm)を使用、比較することで、照射光源の至適波長についても同時に検討した。

まず、培養胃癌細胞株に対するALA-PDTの効果について検討した。胃癌細胞株 MKN-45を1.0 mMの5-ALAで3時間処理した後、各々のLEDで3.0 J/cm²で照射を行い、ROS産生量を評価した。結果、ROS産生量はバイオレット>緑色>赤色LEDの順であった。また、胃癌細胞株(EGFP発現 MKN-45、MKN-74、NUGC-4)に対して上記同様にALA-PDTを行い、その殺細胞効果をWST assayで評価した。結果、いずれの細胞株においてもALA-PDTの殺細胞効果はバイオレット>緑色>赤色LEDの順であった。

続いて、BALB/c nude mouseを用い、EGFP発現 MKN-45を腹腔内注射し胃癌腹膜播種モデルを作成した。移植1週後に5-ALA 250 mg/kgを腹腔内投与し、5時間後に開腹した。大網上に実体顕微鏡下に白色光で観察可能な約1 mmの腹膜播種結節を認めた。これらの結節はEGFP蛍光陽性であり、さらに同部位に一致して、PpIX由来の赤色蛍光も認めた。この胃癌腹膜播種モデルに対してALA-PDTを行った。5-ALA 250mg/kgを腹腔内投与し、5時間後に開腹し、大網上の腹膜播種結節に対して各々のLEDで4.5 J/cm²で照射を行った。48時間後、標的となった腹膜播種結節を切除し、HE染色を行った。それぞれの播種結節における壊死組織の範囲で、グレードA:壊死組織

が1/3未満、グレードB:壊死組織が1/3以上2/3未満、グレードC:壊死組織が2/3以上、と分類し、ALA-PDTの効果判定を行った。結果、各LEDにおける抗腫瘍効果は、バイオレットと緑色LEDが同等であり、これらはそれぞれ赤色LEDよりも有意に高かった。

本結果より、LEDを用いたALA-PDTは胃癌腹膜播種治療に対して有効な治療法となる可能性が示された。PDTにおいて最大の効果を得るためには、光感受性物質に対する適切な波長を有する照射光源を用いることが重要である。PpIXの吸収スペクトルは410 nm、510 nm、545 nm、580 nm、635 nm付近に5つのピークをもち、410 nmのピークは635 nmのピークの約30倍である。一般に、PDTの効果は癌細胞内に蓄積した光感受性物質に吸収された光子数に相関するといわれ、本研究においても、培養細胞ではROS産生量、殺細胞効果ともにバイオレットLEDが最大、赤色LEDが最小であった。また、この結果から、培養細胞では、ROS産生量がPDTの効果の規定する決定的な因子であると考えられた。一方、生体モデルにおいては、別のPDT効果規定因子が加わる。照射光の組織深達度は最も重要な因子の一つであり、一般に、照射光の波長が長くなる程、その組織深達度も増加し、生体内でのPDTではより高い効果が期待される。よって、最終的な生体内でのALA-PDTの効果は、各々の照射光源におけるROS産生量、組織深達度といったPDT効果規定因子の力関係によって決定されると考えられる。本研究では、胃癌腹膜播種モデルにおいて、バイオレットと緑色LEDが同等の抗腫瘍効果を示し、これらは赤色LEDよりも強力であった。このことから、胃癌腹膜播種治療には、赤色よりも、バイオレットや緑色の照射光の方が適していると考えられた。これは、赤色LEDは他のLEDと比較し、ROS産生量が少なく、さらに、治療対象となった腹膜播種は約1mm程度と、照射光の組織深達度が大きな問題とならないことが一因と考えられた。

結論として、LEDを用いたALA-PDTは胃癌腹膜播種に対して有効な治療法となり得ると考えられた。ALA-PDTの臨床応用に向けては、生体内で最も有効な波長をもつ照射光源を選択することが重要であると考えられた。