

[研究助成 (A)]

光学的相互作用を活用した悪性腫瘍の診断・治療法に関する研究

Diagnosis and treatment of malignant tumor by light-tissue interactions

2181018



研究代表者

防衛医科大学校
防衛医学研究センター

助教 角井 泰之

[研究の目的]

悪性腫瘍は長らく我が国における死因1位の疾患であり、高効率・低副作用の治療の実現が現代医学の重要課題の一つである。光線力学治療(Photodynamic therapy, PDT)は、光と薬剤(光感受性薬剤)との光化学反応により生じる一重項酸素の強力な酸化力を利用し、腫瘍細胞を直接的に破壊する、または腫瘍に酸素や栄養を供給する血管を障害して抗腫瘍効果を得る方法である(図1)。光照射部でのみ効果が得られること、そして光感受性薬剤自体の毒性は低いことなどから、一般の抗癌剤治療や放射線治療に比べ生体に対する侵襲が小さく、国内では早期肺癌や胃癌、脳腫瘍などの様々な悪性腫瘍を対象に臨床応用されている。しかし上記の原理より、治療効果を得るには光照射時に腫瘍に光感受性薬剤が十分に分布していることが必要条件であるが、同薬剤の腫瘍への輸送効率は必ずしも高くはなく、このことがPDTの治療効果を制限する要因の一つとなっている。

そこで我々は、光感受性薬剤を腫瘍へ能動的に輸送するためにフォトメカニカル波(Photo-mechanical wave, PMW)を利用することを着想した。PMWは、光吸収体に一定閾値以上の高エネルギー短パルスレーザーを照射することで光学的絶縁破壊により生じるプラズマの体積膨張に伴い発生する圧力波のことである。その

圧力特性(ピーク圧力や力積など)は照射レーザーのパラメータにより高精度に制御可能で、生体に対し低侵襲的に適用することができる。我々の先行研究において、PMWを適用した組織で血管壁の透過性が一過的に亢進し、血中に投与した薬剤が血管外の組織に輸送されることが明らかになった。本研究ではPMWの作用を利用し、悪性腫瘍への光感受性薬剤の輸送量を増大させられないか、そしてその結果PDTによる抗腫瘍効果を向上できないか検討を行った。またその過程では、上記PDTの治療機序の一つである腫瘍血管障害を観察するためにレーザースペックル法(散乱光のスペックルパターン変化を利用した血流のイメージング法)を導入し、光と生体との多彩な相互作用を活用したこれら診断・治療法の有効性を検証した。なお、本研究で実施した動物実験は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認の下に実施した。

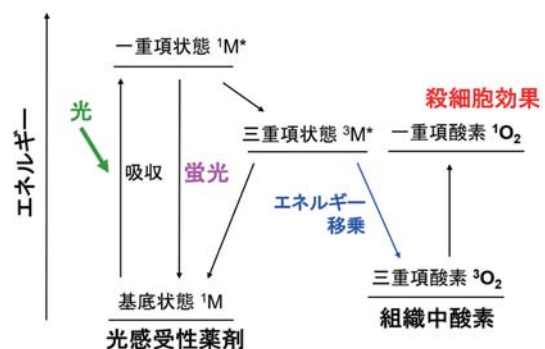


図1 PDTの原理

[研究の内容, 成果]

(1) PMW の発生

黒色天然ゴム（光吸収層）と PET（透明層）の 2 層構造から成るターゲットに対し、Q スイッチルビーレーザー（波長 694 nm, パルス幅 20 ns）を照射し、PMW を発生させた（図 2a）。レーザー照射により吸収層でプラズマが発生し、その膨張を透明層により閉じ込めることで PMW の圧力を高める構造である。レーザーの照射条件について予備検討を行った結果、PMW による組織損傷が生じないフルエンス 0.8 J/cm^2 、スポット径 6 mm の条件を後述の動物実験で採用することにした。同条件で発生させた PMW の圧力波形をハイドロフォン（応答周波数 0.2-10 MHz, 素子径 1 mm）で取得した結果、ピーク圧力 50 MPa, 力積 $16 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ であった（図 2b）。

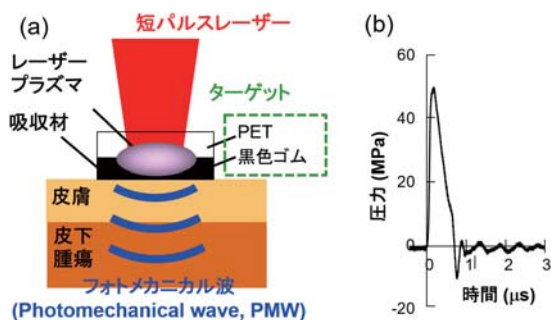


図 2 (a) PMW の発生・適用方法。(b) フルエンス 0.8 J/cm^2 、スポット径 6 mm のレーザー照射で発生した PMW の時間波形。

(2) 薬剤輸送の検討

ヌードマウスの皮下にヒト頭頸部扁平上皮癌細胞を移植した悪性腫瘍モデルを用いた。臨床用の光感受性薬剤であるタラポルフィンナトリウム（Talaporfin sodium, TS）を静脈投与後、皮下腫瘍直上の体表に上記ターゲットを設置し、レーザーを照射して PMW を適用した（図 2a）。薬剤投与 5 時間後に摘出した腫瘍の凍結標本を蛍光顕微鏡で観察し（励起 405 nm, 吸収 670 nm）、TS の分布を評価した。その結果、PMW

適用個体（TS 投与後に PMW 適用）の腫瘍中の TS に由来する蛍光強度は、PMW 非適用個体（TS 投与のみ）と比較して、統計学的に有意に高かった（図 3）。すなわち、PMW 適用により腫瘍への輸送薬剤量を増やせることが実証された。

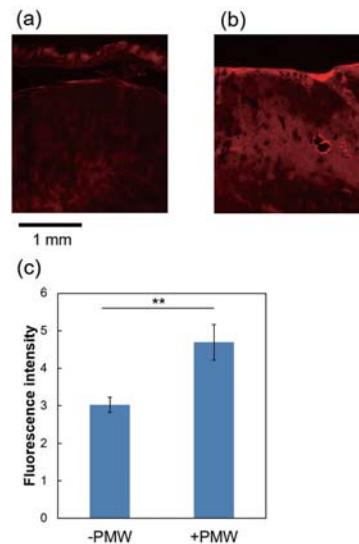


図 3 (a) PMW 非適用個体と (b) PMW 適用個体の腫瘍中の TS 分布を示す蛍光断面画像。(c) PMW 適用有無での蛍光強度の比較。

(3) 治療効果の検討

上記悪性腫瘍モデルを、生理食塩水のみを投与した偽治療群（Sham 群）、TS 投与後に PMW を適用した群（TS+PMW 群）、TS 投与後に PDT を適用した群（PDT 群）、TS 投与後に PMW を適用してから PDT を適用した群（PMW+PDT 群）の 4 群に分けた。薬剤投与および PMW 適用は、上記の薬剤輸送の検討と同様に行った。PDT は、薬剤投与 5 時間後に TS の吸収ピークである波長 665 nm の半導体レーザーを腫瘍部中心に照射して行った（スポット径 6 mm, 照度 75 mW/cm^2 , 照射時間 667 秒）。治療効果の評価として、7 日後に各個体の腫瘍径（長径, 短径, 厚さ）を測定し、腫瘍体積を算出した。また治療機序を考察するために、レーザースペックル法により治療前後の腫瘍部の血流をイメージするとともに、治療 2 日後に一部の個体から摘出した腫瘍の増殖

能を Ki-67 免疫染色により評価した。

治療 7 日後の各群の平均腫瘍体積を図 4 に示す。PMW+PDT 群の腫瘍は PDT 群 (PMW 非適用) に比べ小さく、Sham 群と TS+PMW 群に対しては有意差が認められた。この結果から、PDT または PMW の単独適用では治療効果が限定的である場合においても、両者を組み合わせることで有意な治療効果が得られうることを示された。PMW 適用により腫瘍への輸送薬剤量が増大したことで、その後の PDT による抗腫瘍効果が向上したと考えられる。

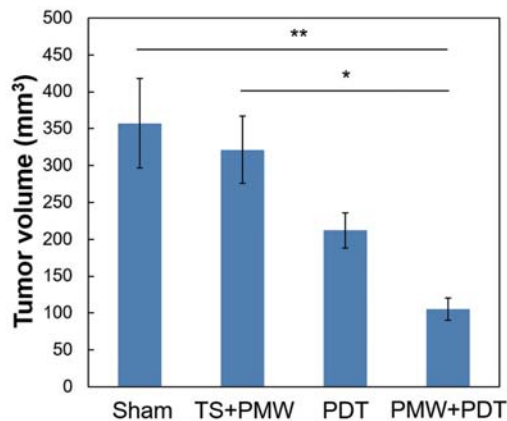


図 4 治療 7 日後の腫瘍体積の比較

続いて、治療前後の腫瘍部とその周辺部の血流を可視化したレーザースペckル画像を図 5 に示す。Sham 群と TS+PMW 群では血流の時間変化はほとんどなく (図 5a, b)、薬剤投与と PMW 適用では腫瘍血管への影響は見られなかった。一方、PDT 群と PMW+PDT 群ではともに腫瘍部の血流が治療後に著しく低下した (図 5c, d)。これは PDT による血管障害 (血流遮断) の発生を捉えた結果と考えられる。ただし、両群間で血流の低下量に有意差は認められなかった。一方、両群の腫瘍を治療 2 日後に摘出し、Ki-67 免疫染色を行った結果を図 6 に示す。PDT 群では茶褐色の陽性細胞 (増殖能のある腫瘍細胞) が多数残存していたのに対し (図 6a)、PMW+PDT 群ではほとんどの細胞が壊死または増殖能を失っていた (図 6b)。以上の結果から、PMW 適用は上記の PDT の

治療機序のうち、腫瘍血管への障害よりも腫瘍細胞への殺細胞効果の向上に寄与したと考えられる。さらにこのことから、PMW 適用による TS の輸送機序について以下のように考察される。血中の TS が PMW 適用により血管外の腫瘍へ移動した経路としては、腫瘍血管の壁を構成する内皮細胞内、または同細胞同士の間を 2 つの候補が考えられる。しかしもし TS が内皮細胞内を通ったのであれば、同細胞内にも多くの TS が集積し、PDT による血管障害は増強されたはずである。しかし今回、PDT による血流低下量は PMW 適用の有無で差はなかったため (図 5c, d)、TS は内皮細胞内ではなく、同細胞同士の間を通り腫瘍に輸送されたと考えられる。

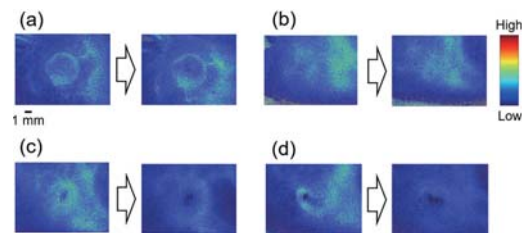


図 5 (a) Sham 群, (b) TS+PMW 群, (c) PDT 群, (d) PMW+PDT 群の治療前後のレーザースペckル画像。腫瘍部とその周辺部の血流を可視化した。

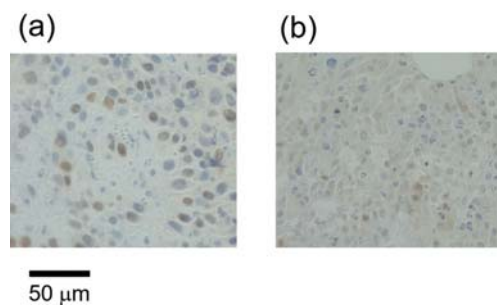


図 6 (a) PDT 群と (b) PMW+PDT 群の腫瘍の Ki-67 免疫染色画像。茶褐色の細胞が陽性である。

[今後の研究の方向, 課題]

PMW を用いた薬剤輸送法を悪性腫瘍に対する PDT に応用することにより、その治療効果を向上できることが示されたが、現状では

PMW の伝搬減衰により、適用深度は数 mm に限られている。そのため、PMW の集束やコリメーションによる深部適用を目指す予定である。また本研究で用いた光学的診断・治療法はすべてコンパクトなシステムで実現可能であり、さらに複数の技術を組み合わせて使用することも容易である。今後、各技術のさらなる性能向上とともに、それらの統合型システムの開発にも取り組みたい。

[成果の発表, 論文等]

1. Y. Koshi, Y. Tsunoi, A. Tomiyama, S. Kawauchi, K. Mori, S. Sato, I. Nishidate: Enhanced therapeutic

effect of an antitumor agent on malignant glioma in rats by photomechanical wave-based transvascular drug delivery, Proc. SPIE, 10711, pp.10711111/1-3, 2018.

2. Y. Tsunoi, K. Yoshimi, R. Watanabe, N. Kumai, M. Terakawa, S. Sato: Quality improvement of acoustic-resolution photoacoustic imaging of skin vasculature based on practical synthetic-aperture focusing and bandpass filtering, Jpn. J. Appl. Phys., 57, 12, pp.127001/1-6, 2018.
3. Y. Tsunoi, K. Araki, E. Ozeki, I. Hara, A. Shiotani, M. Terakawa, S. Sato: Photoacoustic diagnosis of pharmacokinetics and vascular shutdown effects in photodynamic treatment with indocyanine green-lactosome for a subcutaneous tumor in mice, Photodiagn. Photodyn. Ther., 26, pp.436-441, 2019.