

Fundamental Study on Photodynamic Therapy against Human Gastric Cancer Using Q switch Pulsed Nd-YAG Laser and Pheophorbide-A

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8263

胃癌に対する Pheophorbide-A を用いた Nd-YAG レーザー光化学的治療に関する基礎的研究

金沢大学がん研究所外科部 (主任: 磨伊正義教授)

出口 康

(平成3年2月12日受付)

Q スイッチパルス Nd-YAG レーザーと、光感受性物質であるフェオフォルバイド A (pheophorbide-A, Ph-A) を用いた新たな光化学的治療 (photodynamic therapy, PDT) の効果について、ヒト胃癌を対象に、培養細胞株およびヌードマウス移植株を用いて基礎的実験を行なった。本研究で使用した培養細胞株は、KATOIII, KKLS, NKPS の3株で、それぞれ1) Ph-A 単独投与群、2) レーザー単独照射群、3) Ph-A+レーザー (PDT) 群の3群に分け、殺細胞効果を臭化テトラゾリウム比色法 (MTT アッセイ法) にて測定し、その有用性を検討した。その結果、PDT 群は Ph-A 単独群、レーザー単独群に比して相乗的に高い殺細胞効果が得られ、Ph-A 濃度の増加にしたがって増強された。また、異なる3株いずれについても同様の殺細胞効果が得られた。ヌードマウスを用いた検討では、ヒト胃癌移植株 OSS を用い、まず Ph-A の腹腔内投与および腫瘍内投与についてのヌードマウス体内薬物動態について検討したところ、腹腔内投与では腫瘍内投与に比し Ph-A の腫瘍集積性が低く、肝臓、腎臓より高濃度の集積がみられた。一方、腫瘍内投与における肝臓への集積は、腹腔内投与に比べ低く、このため腫瘍内投与についてのみ、光化学的効果を培養細胞実験と同様な治療群を設定して検討した。効果判定は、治療後継時的腫瘍径の計測および、7日後、21日後に摘出した腫瘍に対する組織学的な検討から行なった。その結果、Ph-A 単独群、レーザー単独群でほとんど腫瘍の増殖抑制がみられなかったのに対し、PDT 群では対照群に比して有意の増殖抑制効果を示した。また Ph-A 単独群、レーザー単独群に比べても腫瘍の増大傾向は抑えられ、組織学的にも腫瘍の壊死が広範囲に及んでいた。以上の成績より、Ph-A と Nd-YAG レーザーを用いた光化学治療で、培養細胞株、ヌードマウスのいずれの実験系においても胃癌に対する抗腫瘍効果がみとめられ、胃癌に対する光化学的治療の有用性が示唆された。

Key words Gastric cancer, Nd-YAG laser, Nude mouse, Photodynamic therapy, Q switch

1961年 Lipson ら¹⁾によりヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivative, HpD) が紹介されて以来、光感受性物質とレーザー光を用いた光化学的治療 (photodynamic therapy, PDT) は、各科領域において臨床応用が試みられてきた。なかでも、HpD はアルゴン色素 (argon dye) レーザーとの組み合わせにより、多数の臨床応用がなされ、かなりの抗腫瘍効果

が確認されている²⁾。しかしながら HpD の問題点として、その生物学的半減期が非常に長く、治療の際に長期にわたって遮光の必要があることや、腫瘍への集積性は必ずしも高くなく、光過敏症などの合併症の発生頻度が高いことが挙げられる。さらに argon dye レーザーは、赤色光で波長が 630nm と短く、組織透過性が低いことから、深部へ発育進展する腫瘍に対しての

Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HpD, hematoporphyrin derivative; HPLC, high performance liquid chromatography; I.P., intraperitoneal; I.T., intratumoral; MTT, 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-tetra-

十分な効果が期待できないなどの問題点が指摘されている。このため、将来の光化学的治療では、より腫瘍選択性が高く、抗腫瘍効果に優れた光感受性物質と、これを励起しうるより組織透過性に優れた光源の発見が今後の課題とされている。

一方フェオフォルバイド A (pheophorbide-A, Ph-A) はクロロフィル-A から Mg とフィチル基がとれることにより生成される物質で (図 1), 植物をはじめ自然界に広く存在している²⁰⁾が、古くから光線過敏症を起こす原因物質の一つであることがしばしば報告⁹⁻¹³⁾され、新たな光感受性物質としての可能性が期待されていた。また Nd-YAG レーザーはその強い熱凝固作用により癌治療に利用されてきた¹⁴⁾。この Nd-YAG レーザーは波長が 1064nm と長いので、この波長で励起しうる光感受性物質は知られていなかったが、1985年益子ら¹⁵⁾が、Nd-YAG レーザーに Q スイッチを付けることにより高い尖頭出力 (peak power) を持つパルス波を発生させ、二光子吸収のメカニズムで Ph-A を励起、光化学作用を発現しうることを初めて報告した。以来各種の腫瘍に対する Ph-A と Nd-YAG レーザーを用いた光化学的効果が検討¹⁶⁻¹⁹⁾されているが、その抗腫瘍効果に関する報告は散見されるに過ぎず、なかでも胃癌に対する光化学的治療についての検討は少ない。そこで今回著者は、胃癌培養細胞株およびヌードマウス移植ヒト胃癌株を用

いて、Ph-A と Nd-YAG レーザーによる光化学的効果について検討を行なったので報告する。

対象および方法

I. 使用胃癌細胞株

1. 培養細胞株

実験に用いた培養細胞株は、KATOIII および教室で樹立した²⁰⁾ヒト胃癌細胞株 KKLS, NKPS の 3 細胞株である。これら細胞株の維持は RPMI-1640 (日本、東京) 培地と 10% ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum, FBS, GIBCO Laboratories, Grand Island, USA) よりなる培養液に抗生剤としてカナマイシン (明治製薬, 東京) 10mg/dl, ペントシリン (三共, 東京) 10mg/dl, ファンギゾン (Flow Laboratories, McLean, USA) 10ng/dl を加えた培養液 (RF10) および培養フラスコ Falcon 3024 (Becton Dickinson, Oxnard, USA) を用い 37°C, 湿潤, 7%CO₂ の開放系において行なった。また継代は、0.02% エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, 和光純薬, 東京) と 0.25% トリプシン (Difco Laboratories, Detroit, USA) を用いて細胞浮遊液を作成し、1:4 または 1:8 の希釈で 4~5 日に 1 回行なった。

2. ヌードマウス移植株

実験に使用したヌードマウス移植株は、教室で樹立したヌードマウス皮下移植ヒト胃癌細胞株である

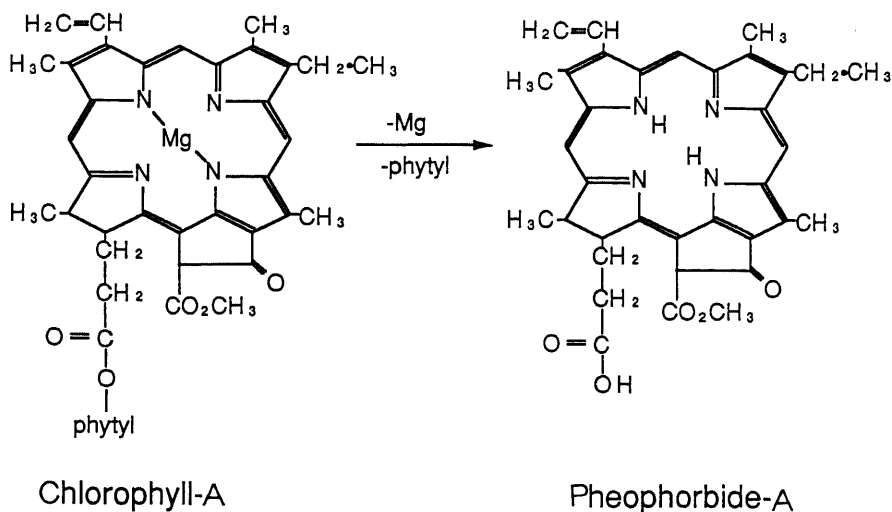


Fig.1. Chemical structure of Pheophorbide-A (Ph-A). Ph-A is formed by eliminating Mg and phytyl from chlorophyll A.

zolium bromide; PBS, phosphate buffer saline PDT, photodynamic therapy; Ph-A, pheophorbide-A

OSS を用いた。ヌードマウスは三共ラボサービス(富山)より購入した4~6週齢の雌のヌードマウスを用い、特定の無菌環境下(specific pathogen free)で飼育した。飼育ケージはエチレンオキシドガス滅菌を施し、床敷および飼料は放射線滅菌されたものを用いた。腫瘍は手術の際、原発巣から採取し直ちに滅菌シャーレに入れ、ペントシリン 100 μ g/ml を含有する生理的食塩水約 20ml にて3回洗浄した。その後約 5mm 角に細切した腫瘍切片をヌードマウス背部皮下に移植、継代した。腫瘍の組織型は中分化型腺癌であった。今回、10ないし12継代した移植腫瘍で腫瘍径がほぼ 1.5cm になったものを実験に供した。

II. フェオフォルバイド-A (Ph-A) 溶液の作成

Ph-A (ヤクルト, 東京) 3mg をジメチルスルホキシド(dimethyl sulfoxide, DMSO, SIGMA Chemical Company, ST. Louis, USA) 0.2ml に溶解し, 50mM NaOH 水溶液 0.2ml を加えて pH を調整し, さらに精製水 1.6ml, 10% リン酸緩衝液(phosphate buffer saline, PBS) 3.0ml にて希釈し, 1mM の溶液を作成した。これを異物濾過フィルター(マイレックス GV, 孔径 0.22 μ m, 日本 Millipore 社, 東京)にて濾過した後, さらに培養液である RF-10 を用いて必要とする濃度に希釈して実験に供した。ヌードマウスを用いた光化学的効果の検討では, 溶解する Ph-A の量を 5mg とし, 濃度を 1mg/ml に設定した。

III. レーザー発振装置および周辺機器

レーザーは Nd-YAG レーザー発振装置 CL-50 (SLT ジャパン, 東京) および温度モニターとして SLT レーザーフィードバックシステム, Q スイッチとして SLT YAG-PDT ドライバを用いた。レーザー発振装置から発振されたレーザー光は SLT コンタクトレーザー用ファイバー(口径 2.2mm, 透過率 85%)を用いて導光した。照射部分の径がいずれも 1cm になるように, ファイバー先端から照射部位までの距離はほぼ 12cm 離れた。

IV. 検討項目

1. ヒト胃癌培養細胞株を用いた検討

1) 培養細胞株における光化学効果

まず治療群として, 以下の処置群を設定した。すなわち, 1. 対照群, 2. Ph-A 単独投与群, 3. レーザー単独照射群, 4. Ph-A + レーザー (PDT) 群の 4 群である。

種々の濃度に希釈した Ph-A 溶液と細胞浮遊液を 1:1 で混合し, 37°C, 7%CO₂ の条件下で 1 時間接触させた。両者の混合の際は, 浮遊細胞である KATO-III ではポリスチレンチューブ (Falcon 2027, Becton

Dickinson) を, KKLS, NKPS では, チューブ内への細胞の貼りつきを防ぐためポリプロピレンチューブ (Falcon 2005, Becton Dickinson) を用いた。接触の後, PBS にて 2 回洗浄を行なった。ついで 1ml の PBS を加えて細胞を浮遊させ, acoustic Q スイッチによりパルス変換された Nd-YAG レーザーを, 平均出力 3.5w400Hz で 10 分間照射した。照射は 37°C の恒温槽内に細胞浮遊液を入れたチューブを浸しながら行ない, レーザーによる温熱効果を除いた。レーザー照射後 PBS を吸引, 前述の培養液を用い, 組織培養ディッシュ (Falcon 3001, Becton Dickinson) 上で細胞数を 5 万/ml に調整した。この細胞浮遊液を 200 μ l ずつ 96 穴マイクロプレート (Nunc, Kamstrup, Denmark) に撒き込み, 3 日間培養した。

2) 殺細胞率の測定

殺細胞率の測定は臭化テトラゾリウム比色法 (MTT アッセイ法) を用いて行なった²⁹⁾。すなわち 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, SIGMA Chemical Company) を PBS にて溶解, 2mg/ml の溶液を作成した。これをマイクロプレートに 25 μ l/well の割合で加え, 37°C 7% CO₂ の条件下で 4 時間静置した。2000rpm, 5 分間の遠心の後上清を吸引し, DMSO を 0.2ml ずつ加え, 細胞内に生成されたフォルマザン (formazan) を溶出した。マイクロプレートを 10 分間振盪し色調が均一となった後, 分光光度計 EAR 340 (ラボサイエンス, 東京) を用い励起波長 540nm, 測定波長 630nm で吸光度を測定した。対照群における吸光度を 100% としたときの, 各処置群の吸光度の割合をその Ph-A 濃度における細胞生存率とし, その補数を殺細胞率とした。

2. ヌードマウス移植腫瘍を用いた検討

1) 担癌ヌードマウスにおける Ph-A の体内薬物動態

Ph-A の体内動態では投与方法として, 腹腔内投与と腫瘍内投与について検討した。マウス 1 匹当たりの重量が約 20g であることから, 腹腔内投与では 10mg/kg, 腫瘍内投与では 200 μ g/個体の Ph-A 溶液を投与, 1 時間, 3 時間, 6 時間, 12 時間後に, エーテル麻酔下に 25G 針にて心臓を穿孔し血液を採取した。その後, 腫瘍, 肝臓, 腎臓を摘出, 皮膚組織を採取した。皮膚組織を採取する際には注射部位からの Ph-A の漏れの影響を除くため, 腹腔内投与群では背部から, 腫瘍内投与群では腹部から採取した。各臓器の重量を測定し, 重量の 6 倍量のメタノールを加えた後, ウルトラディスペルサー LK-22 (木村科学, 東京) を用

いてホモジナイズし、Ph-A を抽出した。3000rpm, 10分間の遠心分離を行ない上清を採取した。これを(株)ヤクト本社中央研究所において、一定量を減圧乾燥した後メタノールに溶解し、高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography, HPLC) により各臓器に含まれる Ph-A 濃度とその時間的変動を測定した。分析条件として、カラムは TSK gel 80TM (4.6mm×10cm, 東ソ(株), 東京) を、溶媒はメタノール, 酢酸, H₂O を 92:3:80 の割合で用い、流速は 1.2ml/min とし、UV 415nm で検出した。

2) ヌードマウスにおける光化学的効果

治療群として、培養細胞での検討と同様の設定を行った。すなわち、1. 対照群, 2. Ph-A 単独投与群, 3. レーザー単独照射群, 4. Ph-A +レーザー (PDT) 群の 4 群である。

Ph-A は腫瘍内投与とし、先程と同様 200 μ g/個体を投与した。投与 2 時間後にパルス変換されレーザーを平均出力 2w, 400Hz で 5 分間照射した。照射の際はレーザーの温熱による殺細胞効果を抑えるため、図 2 に示すごとく照射の際腫瘍内部に温度センサーを刺入し局所温度をモニターする一方、腫瘍上方に塩化ビニル製ウォーターパック (water pack) を静置し、内部に恒温槽で 30°C に温度設定した水を循環させ、これを通してレーザーを照射することにより温度の上昇を抑えた。照射前および照射後 3 日毎に腫瘍の長径及び短径をノギスを用いて計測、次に示す計算式により推定

腫瘍重量を算出しその変化を継続的に観察した。

$$\text{推定腫瘍重量 (g)} = \text{長径 (cm)} \times \text{短径 (cm)}^2 / 2$$

さらに、照射 7 日後および 21 日後にマウスを屠殺、腫瘍を摘出し組織標本を作製、組織学的にその効果を検討した。

V. 統計処理

実験は、それぞれ同一条件下で 3 回施行 (triplicate) し、数値は平均値±標準誤差で表わした。統計学的検討は一元または二元配置分散分析の後、Scheffé または Dunnett の多重比較法を用いて行ない、 $p < 0.05$ をもって有意とした。

成 績

I. 培養細胞株における光化学効果

それぞれの細胞株について MTT アッセイ法により測定した、対照群の細胞生存率を 100% としたときの各濃度における殺細胞率の変化を図 3-5 に示す。

KATOIII では (図 3) レーザー単独群における殺細胞率は 10.86% であった。Ph-A 単独群における殺細胞率は、Ph-A 濃度 10 μ M で 5.15%, 20 μ M で 6.06% と、低い値を示した。Ph-A 濃度の増加にしたがって

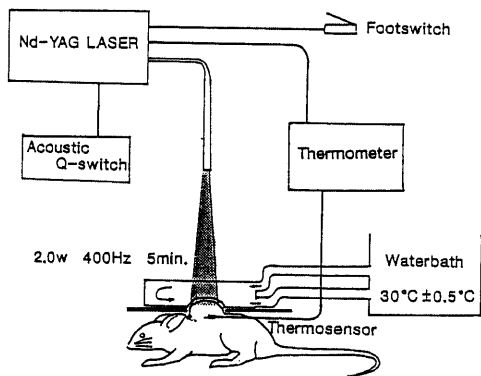


Fig. 2. Scheme of laser irradiation. A thermosensor was inserted into the tumor, and the temperature was monitored by computer during the PDT. A water pack made of vinyl chloride was also placed on the tumor and 30°C water circulated through the pack in order to protect the tumor from the heat produced by the laser irradiation.

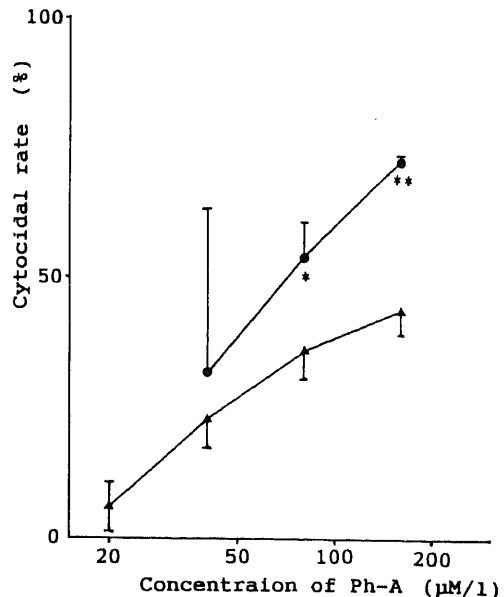


Fig. 3. Relation between cytotoxic rate and Ph-A concentration in KATO III. ▲, Ph-A only; ●, Ph-A and laser (PDT). All values are given as mean±standard error. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by two-way analysis of variance with Scheffé's multiple comparison.

殺細胞率は上昇したがその傾きは小さく、 $80\mu\text{M}$ の濃度では36.20%、 $160\mu\text{M}$ で43.84%と、半分以上が生存していた。これに対し PDT 群では、 $40\mu\text{M}$ の濃度でも殺細胞率が31.58%と、高い傾向を示した。Ph-A 濃度の増加に伴う殺細胞率の上昇も急峻で、 $80\mu\text{M}$ の濃度では53.96%、 $160\mu\text{M}$ で72.37%であり、Ph-A 単独群に比べ有意に高い値を示した ($p < 0.025$)。この殺細胞効果は、Ph-A 単独、レーザー単独による殺細胞率の加算以上の殺細胞率を示し、相乗的効果であった。

NKPS では (図4) レーザー単独群における殺細胞率は12.36%であった。Ph-A 単独群では、KATOIII に比べさらに殺細胞率は低く、 $80\mu\text{M}$ の濃度においても18.43%と、80%以上の細胞の生存をみた。これに対し PDT 群では、 $40\mu\text{M}$ で38.18%、 $80\mu\text{M}$ で51.21%、 $160\mu\text{M}$ で68.36%と、有意に高い殺細胞効果を示した ($p < 0.005$)。

最後に、KKLS については (図5)、レーザー単独群における殺細胞率が36.51%と、他の2株に対してやや高い値を示した。Ph-A 単独群では、 $80\mu\text{M}$ の濃度において22.81%と、やはり80%近い細胞の生存をみていたが、 $160\mu\text{M}$ で殺細胞率は急激に増加し、

59.71%を示した。PDT 群における殺細胞率は、 $40\mu\text{M}$ の濃度においてすでに79.47%と有意に高かった ($p < 0.005$)。殺細胞率は Ph-A 濃度の増加に伴ってさらに上昇し、 $80\mu\text{M}$ で88.84%となったが、 $160\mu\text{M}$ では90.26%と、殺細胞効果はほぼ飽和状態となった。

以上より、3株いずれについても PDT 群は Ph-A 単独群に比し相乗的な殺細胞効果の増強をみとめた。

II. ヌードマウス体内における Ph-A の薬物動態

腹腔内投与、腫瘍内投与の両群について、各臓器別の Ph-A 濃度の時間的推移を示す (表1, 2)。腹腔内投与の場合、腫瘍内の Ph-A 濃度は6時間で最大となったものの、その値は低かった。もっとも高い集積をみたのは肝臓であり、投与1時間で $3.92\mu\text{g/g}$ を示した。以後濃度は次第に減少を示したが、12時間経過した時点でも $0.948\mu\text{g/g}$ と、腫瘍内濃度の $0.164\mu\text{g/g}$ よりも高かった。また、腎臓においても比較的高い集積をみとめた。さらに皮膚への集積も投与6時間後までは腫瘍より高い組織内濃度を示しており、全身投与における腫瘍集積性は必ずしも高くなかった。

一方、腫瘍内投与においては、肝臓への集積は腹腔内投与における肝臓への集積に比べ、1時間値で $1.08\mu\text{g/g}$ と、低い値を示した。また、腫瘍では、投与3

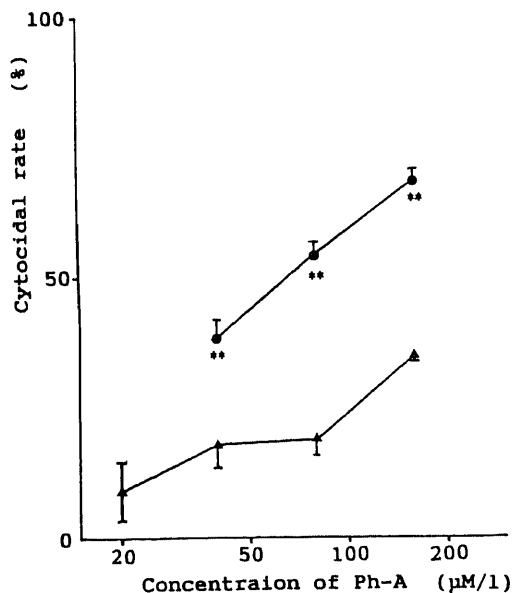


Fig. 4. Relation between cytotoxic rate and Ph-A concentration in NKPS. \blacktriangle , Ph-A only; \bullet , Ph-A and laser (PDT). All values are given as mean \pm standard error. $**p < 0.01$ by two-way analysis of variance with Scheffé's multiple comparison.

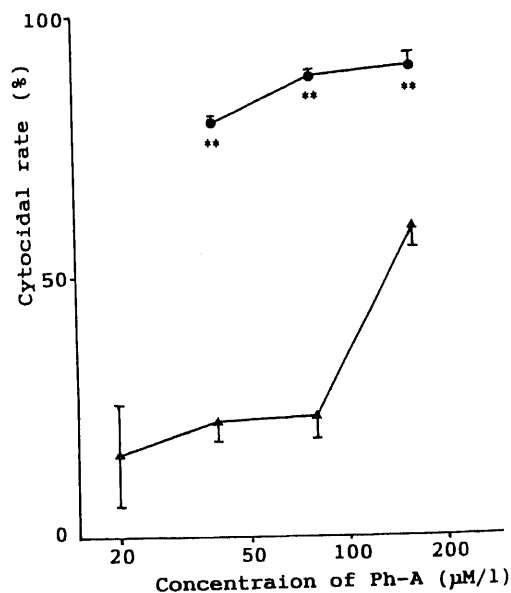


Fig. 5. Relation between cytotoxic rate and Ph-A concentration in KKLS. \blacktriangle , Ph-A only; \bullet , Ph-A and laser (PDT). All values are given as mean \pm standard error. $**p < 0.01$ by two-way analysis of variance with Scheffé's multiple comparison.

時間後よりすでに Ph-A の濃度は低下をはじめ、腫瘍内からの Ph-A の排泄がみられたが、その半減期は他臓器と比べ差をみとめなかった。腎臓の Ph-A 濃度の変化は腹腔内投与の場合と同程度で差はなかったが、腹腔内投与群の方は投与12時間を経過しても Ph-A 濃度はあまり減少せず、やや排泄が遅延する傾向がみられた。

全血中の Ph-A 濃度は腹腔内投与、腫瘍内投与の両群ともほぼ同様に推移しており、投与12時間で両群とも $0.1\mu\text{g/g}$ 以下に低下した。

III. ヌードマウスにおける光化学的効果

各群について、処置前の腫瘍推定重量を100としたときの、継続的腫瘍重量比の推移を示す(図6)。対照群では、21日間で約415まで重量の増大をみた。Ph-A 単独群、レーザー単独群においても処置後時間の経過とともに腫瘍重量は増大し、それぞれ約379、401となった。対照群との間に、有意差はみとめられなかった。これに対し、PDT 群では21日後では約268と、対照群に比して有意の増殖抑制効果がみられた ($p < 0.05$)。また、Ph-A 単独群、レーザー単独群と比較しても増殖は抑制される傾向にあったが、有意差はみとめられなかった。

処置7日後に摘出した腫瘍における組織標本では、Ph-A 単独群、レーザー単独群のいずれにも中心部に軽度の腫瘍壊死がみられたが、その範囲はほぼ同程度

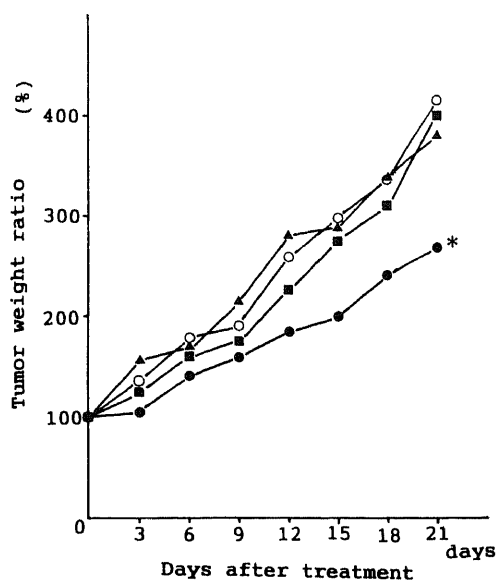


Fig. 6. Photodynamic effect of Ph-A and Nd-YAG laser on tumor growth in each group. ●, treated by PDT; ■, laser only; ▲, Ph-A only; ○, not treated (control) (n=3). All values were revealed by tumor weight ratio (pretreatment: 100). * $p < 0.05$ by one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison with the control (one sided).

Table 1. Pharmacodynamics in I.P. injection of Ph-A (10 mg/kg body weight) determined by high performance liquid chromatography

hr	Tumor	Liver	Kidney	Skin	Blood
1	0.068 ± 0.056	3.916 ± 2.298	0.868 ± 0.293	1.268 ± 0.364	0.296 ± 0.062
3	0.102 ± 0.066	2.532 ± 0.840	1.638 ± 0.846	0.564 ± 0.132	0.216 ± 0.144
6	0.276 ± 0.125	3.076 ± 1.247	0.508 ± 0.242	0.34 ± 0.137	0.14 ± 0.051
12	0.164 ± 0.014	0.948 ± 0.318	0.768 ± 0.141	0.176 ± 0.021	0.072 ± 0.030

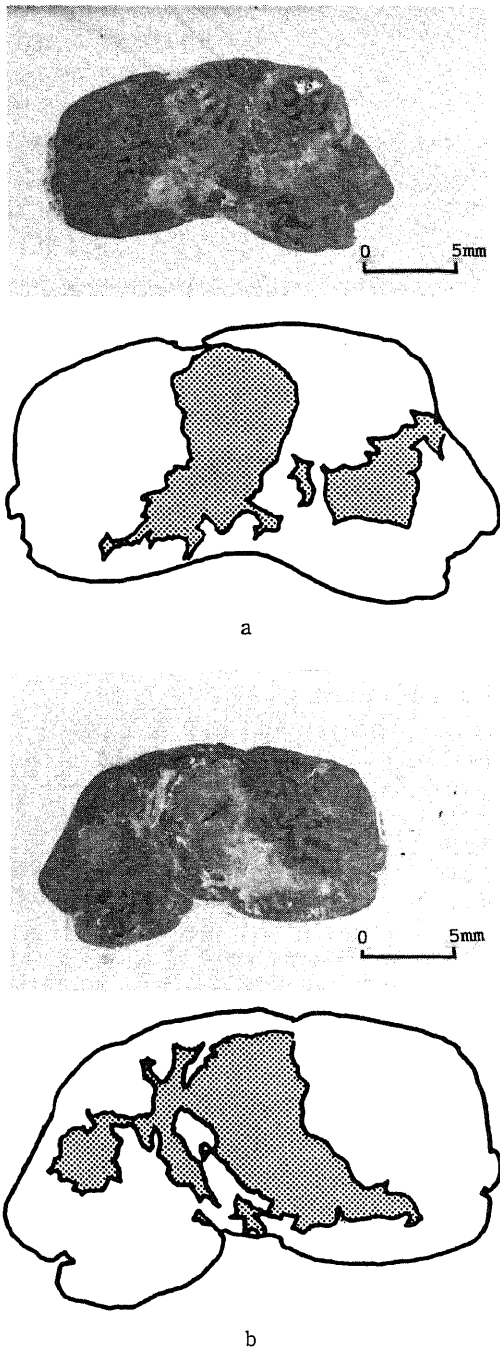
All values are expressed as micrograms per gram tissue or blood and given as mean ± standard error. (n=3)

Table 2. Pharmacodynamics in I.T. injection of Ph-A (200 μg /body) determined by high performance liquid chromatography

hr	Tumor	Liver	Kidney	Skin	Blood
1	27.34 ± 7.690	1.084 ± 0.317	0.564 ± 0.305	0.34 ± 0.049	0.34 ± 0.210
3	24.38 ± 10.78	0.736 ± 0.158	0.584 ± 0.191	0.468 ± 0.245	0.2 ± 0.092
6	17.63 ± 6.276	0.452 ± 0.049	0.408 ± 0.111	0.464 ± 0.324	0.148 ± 0.064
12	9.696 ± 2.043	0.384 ± 0.153	0.196 ± 0.098	0.432 ± 0.300	0.088 ± 0.017

All values are expressed as micrograms per gram tissue or blood and given as mean ± standard error. (n=3)

であり、明らかな差はみとめられなかった。また、対照群における腫瘍においても、ほぼ同程度の範囲の中心壊死をみとめた。生存している癌層部分では、腫瘍細胞は、ごくわずかに腺腔形成をみとめる中分化型腺癌で、原発巣における組織所見によく類似していた(図7)。



一方、PDT 施行群では、7日後の腫瘍における組織標本で、腫瘍のほぼ全域にわたる壊死がみとめられ(図8 a)、Ph-A 単独群、レーザー単独群に比べ明らかに壊死範囲に差をみとめた。腫瘍細胞は腫瘍辺縁にごくわずかに残るに過ぎなかった(図8 b)。

また、処置後21日目における腫瘍の摘出標本でも、対照群、Ph-A 単独群、レーザー単独群の腫瘍壊死範囲は同程度であったが、PDT 群における壊死範囲はこれらに比べ、広い傾向を示した。

考 察

光化学的治療では、より腫瘍選択性が高く、抗腫瘍効果に優れた光感受性物質と、これを励起しうるより組織透過性に優れた光源の発見が課題とされている。本研究に用いた光感受性物質 Ph-A はクロロフィル-A から Mg とフィチル基がとれることにより生成される³⁰⁾が、pH の低下によって Mg は容易に外れること、またフィチル基を切る水解酵素であるクロロフィラーゼは、広く植物に分布していることから身近な存在であった。この Ph-A が、光線過敏症を起こす原因物質としてかなり以前から注目されていた。Clare⁹⁾は家畜にしばしば見られる日光過敏症の原因が、Ph-A およびその誘導体であるピロフェオフォルバイド-A であることを初めて明らかにした。また、我が国においては1899年竹中⁹⁾が、北海道奥尻島のアワビとりの漁師に、また古賀⁷⁾は長崎県壱岐島で、やはりアワビとりの漁師に光線過敏症らしい症状がみら

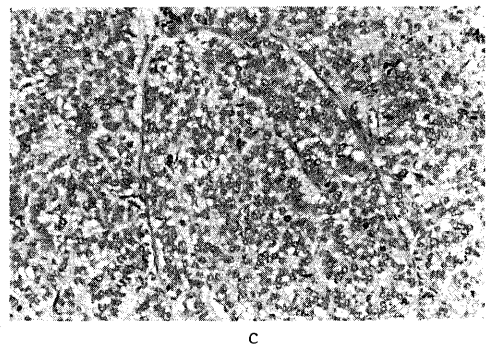


Fig. 7. Microphotographs of longitudinal sections of the tumors and their schemes in the 'Ph-A only' (a) and 'laser only' (b) groups. Both groups showed almost the same area of necrosis in the center of the tumor (the area on the dot screen indicates the necrotic lesion). Histologically, the tumor consisted of a moderately differentiated adenocarcinoma (c). (H.E. stain. a, b, $\times 4$; c, $\times 100$)

れたことを報告しており、その後 Hashimoto²⁰⁰、Tsutsumi ら¹⁰は、アワビのきもである中腸腺に初めて原因物質としてピロフェオフォルバイド-A を見いだした。また山田ら¹¹は野沢菜漬、タカ菜漬などの塩蔵菜漬中に光化学作用物質を見だし、それがピロフェオフォルバイド-A であることを確かめている。1977年には、東京を中心に、ある種のクロレラ錠を大

量服用した人に、光線過敏症が発生し、その原因物質が Ph-A であることが明らかになった^{12,13}。

Ph-A は、670nm 付近を最大吸収波長とし、780nm の蛍光を発する¹⁵が、これを用いた光化学的治療の可能性については前田ら²⁰が、HpD に比べて Ph-A は3.5倍の光学的皮膚壊死作用を持つことやラット実験皮膚癌に対し Ph-A を静注後、プロジェクター用ハロゲンランプの使用により励起し強い抗腫瘍効果を得たと報告している。また、加藤ら²¹が、培養細胞に対し Ph-A を作用させ、白色光で励起することにより細胞膜の透過性の亢進と、ミトコンドリアの膨化、形態破壊をみたことを報告している。

一方 Nd-YAG レーザーは、もっぱらその強い熱凝固作用により癌治療に利用されてきた¹⁴。Nd-YAG レーザーは、波長が1064nm と長く組織透過性に優れていること、石英ファイバーによるレーザー光の導光が可能であることから、特に胃癌をはじめとする消化器悪性腫瘍に対する内視鏡的治療に用いられている²²⁻²⁵。その方法として接触および非接触照射法による癌組織の蒸散凝固、あるいは高拡散マイクロロッドを装着し、熱作用によるレーザー温熱療法などがある。ただこの波長で励起しうる光感受性物質は知られていなかったため、光化学的治療には応用されていなかった。しかし、1985年益子ら¹⁶が、Nd-YAG レーザーに Q スイッチを付けることにより高い尖頭出力 (peak power) を持つパルス波を発生させ、二光子吸収のメカニズムで Ph-A を励起、光化学作用を発現しうることを初めて報告し、両者の組み合わせによる光化学的治療が可能となった。以来、各種の腫瘍により Ph-A と Nd-YAG レーザーを用いた光化学的效果について検討がなされている¹⁶⁻¹⁹が、消化器癌、特に胃癌に対する検討は少ないのが現状である。そこで今回著者は、培養細胞株およびヌードマウス移植腫瘍株を用いて、胃癌に対する Ph-A および Nd-YAG レーザーによる光化学的治療が可能かを検討することを試みた。

培養細胞での検討においては門脇ら¹⁶により胃癌培養細胞株である Hs746T に対する光化学的效果が報告され、100 μ g/ml の濃度において50%を超える殺細胞効果をもとめている。今回の検討でも殺細胞率が Ph-A 単独投与群では 80 μ M で 20~40%、レーザー単独群で約10~37.5%であった一方、PDT 群では 80 μ M の時 50~80%、160 μ M の時70%から94%に達した。すなわち PDT 群においては Ph-A およびレーザー照射の併用による相乗的な殺細胞効果の増強がみられておりレーザー照射を行わない Ph-A 単独群に

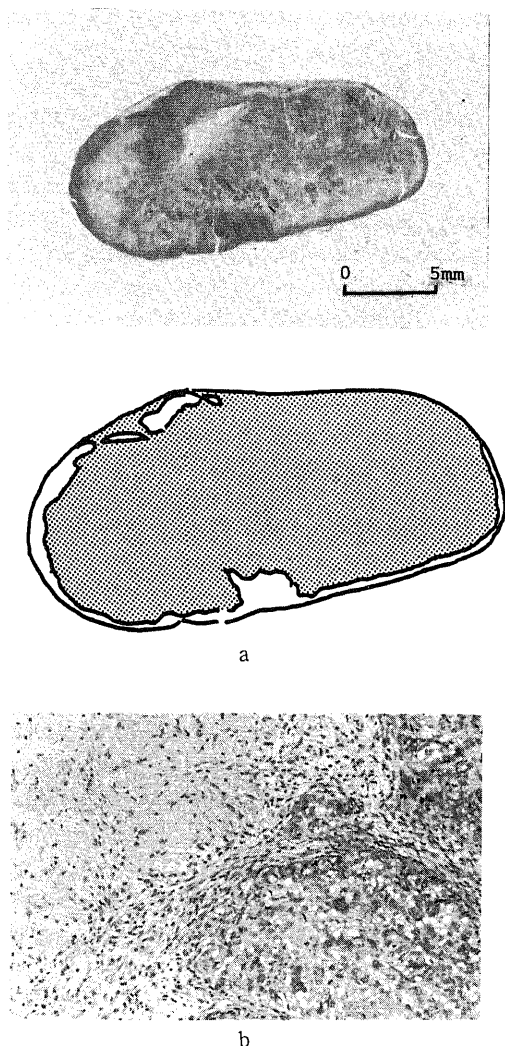


Fig. 8. Microphotograph of a tumor and its scheme in the 'PDT' group. Most of the transplanted tumor was replaced by necrotic tissue (a, b) 7 days after treatment (the area on the dot screen indicates the necrotic lesion). Some fibroblasts are seen adjacent to the residual tumor. (H.E. stain. a, $\times 4$; b, $\times 100$)

比べ 160 μ M で 50~80% の殺細胞効果の増強がみとめられ、光化学的治療の有用性が確認された。また、著者の検討では、異なる 3 種類の胃癌株について同様の検討を試みているが、いずれの腫瘍細胞株においてもほぼ同様の効果が得られたことから細胞間に感受性の差はほとんどないと考えられた。この点は、抗癌剤では一般的に癌細胞が同一の抗癌剤に対して、等しく感受性を示すことはみとめられないばかりか、同一の腫瘍であっても原発巣と、転移巣では抗癌剤に対する感受性が異なっており、いわゆる癌の heterogeneity として癌治療を困難にしている²⁹⁾ことを考慮すると、光化学的療法の注目すべき特徴と考えられた。

今回、培養細胞株での検討において効果判定に用いた MTT アッセイは、生細胞のミトコンドリア内に存在する脱水素酵素により生成される formazan を測定することにより、生細胞数とその代謝活性 (viability) を定量するものであり、1983年 Mosmann²⁹⁾により初めて報告されて以来細胞株を用いた実験でその有用性が報告されている²⁹⁾³⁰⁾。培養細胞を用いた光化学的効果の検討において、これまでは照射直後のトリパンブルー染色による殺細胞効果の判定が主に用いられてきた¹⁸⁾が、Ph-A の光化学作用による細胞破壊が細胞膜およびミトコンドリアに起こるとされている点で、MTT アッセイによる効果判定は有効であると考えられた。また、Ph-A と Nd-YAG レーザーによる光化学反応ではレーザー照射中ないし直後よりも、レーザー照射18時間までの長時間にわたって癌細胞の死滅が起こるとする報告もあり³¹⁾、照射3日後に判定を行なうことにより、継時的に起こる癌の細胞死を十分に評価することができることから、MTT アッセイは適切な判定法と考えられた。

生体内反応系を用いた Ph-A 薬物動態に関する検討では、前田ら²⁹⁾は Ph-A の静注によるラット実験皮膚癌への集積を検討し、Ph-A の腫瘍集積性が HpD のそれと比べて劣る可能性を指摘した。一方、木村ら³²⁾は、Ph-A 0.5mg を DMSO 0.05ml に溶解後、静注にてマウス乳癌移植株 FM3A に投与を行い、正常組織に比べて腫瘍への移行は遅れるものの集積性はあったと報告した。また中村、西脇ら^{33)~35)}は、NZW 家兎移植 VX-2 肝癌に対しリピオドール (lipiodol) および PBS に溶解した Ph-A を胃十二指腸動脈内と、尾静脈内への全身投与を行なって体内動態を検討したところ、動脈内投与では、リピオドール溶解 Ph-A、PBS 溶解 Ph-A のいずれも明らかな腫瘍への集積がみられた反面、静脈内投与では、腫瘍集積性に乏しかったと報告している。さらに、門脇ら³⁶⁾はイヌに Ph-A を静

注し、体内動態について検討し、Ph-A は主に肝臓に集積し、腎臓内の Ph-A は低い値で推移したと報告した。今回の検討では Ph-A が DMSO に可溶性であること、pH の低下により Ph-A が析出してしまふことから、DMSO に溶解後、NaOH にて pH を調整し、さらに PBS にて希釈する方法を試みた。Ph-A の溶解方法、対象とした腫瘍に相違はあるものの、ヌードマウスの腹腔内に投与した Ph-A は腫瘍よりも肝臓、腎臓に高い集積をみた。したがって、全身投与における Ph-A の腫瘍集積性はそれほど高くはなく、抗腫瘍効果を期待するために Ph-A の局所投与の必要性が示唆された。

Ph-A の腫瘍集積性について、評価が一定しない理由として、Ph-A の溶解方法が、各施設によってまったく異なることが考えられる。Ph-A は、その化学構造ゆえ、水に難溶性であることから、適当な溶解方法が確立されていないため、いまだ試行錯誤の状態である。藤島ら¹⁷⁾はアルブミンを溶媒として用い、また門脇ら¹⁹⁾³⁰⁾は DMSO、PBS に加えプロピレングリコール (propylene glycol) を溶解補助剤として用いているが、溶解法と Ph-A の体内動態との関連について言及した報告はほとんどみられない。しかし、種々の溶解法が試みられている点や、腫瘍集積性に対し結論が得られていない点を考慮すると、Ph-A の溶解方法により、その体内動態に影響が及ぶことは十分考えられる。この点に関しては、更に検討が加えられ、より適切な溶解方法や、投与経路により高い腫瘍集積性をあげることが期待される。すでに、この問題点を解決すべく、Ph-A の誘導体の合成と、その薬理作用について検討が行われつつある。河部ら³⁷⁾、石原ら³⁸⁾は Ph-A にアミンを結合させた誘導体である PH-1126 (浜理薬品工業㈱、大阪) を用いて分光学的な検討、および抗腫瘍効果について検討し、静脈内投与、経口投与において明らかな腫瘍集積性と、光化学反応による抗腫瘍効果が得られたと報告している。また、市岡ら³⁹⁾は、Sarcoma 180 担癌マウスに対し Ph-A と 10-Hydroxypheophorbide を投与して、マウスにおける体内動態を検討し、10-Hydroxypheophorbide が正常組織からの排泄、光力学的活性に優れていたと報告している。

生体内での光化学的効果における検討では、腫瘍内に十分量の Ph-A が存在すればその光化学的効果は組織のかなり広範に及ぶとされている⁴⁰⁾。継時的に腫瘍径を計測して腫瘍の増殖抑制効果をみた検討では、対照群に比して Ph-A 単独群、レーザー単独群の増大傾向はほとんど変化がなかったが、PDT 群においては

対照群に比べ有意の増殖抑制効果がみとめられ、また他の2群に比べても増殖は抑えられる傾向にあった。しかしながら、PDT群においても組織所見でわずかながら腫瘍細胞の遺残がみとめられたことから、腫瘍の遺残を防ぎ、十分な抗腫瘍効果を得るためには、PDTを繰り返し施行する必要があると考えられた。

PDT施行例の7日後の組織所見で、PDT施行例ではほぼ腫瘍全体に壊死が見られ、腫瘍細胞はレーザー照射部位外の表面にごくわずかに残るに過ぎなかった。レーザー照射群では、対照群に比べ壊死範囲は広いものの、レーザーが照射された部位に比較的限局してみられた。山下ら⁴⁰⁾は、ヌードマウス移植ヒト肝細胞癌を用いた検討で、PDT施行48時間後に腫瘍を摘出して腫瘍壊死面積を測定し、最大12mm×8mmに及ぶ腫瘍の壊死があったと報告している。著者の検討においても、PDT群の腫瘍の壊死範囲は明らかにPh-A単独群、レーザー単独群のそれよりも広範囲であり、腫瘍の壊死が光化学反応により引き起こされたものであることが考えられた。また、その効果は表面より1.0cm程度の深さまで及んでおり、PDTによる組織深達性が良好であることが示唆された。

しかしながら、Nd-YAGレーザーは、本来腫瘍の蒸散凝固、ないし温熱効果を得ることを目的として用いるため、照射部位の温度の上昇は不可避である。このため、PDT施行による癌組織の壊死が、光化学効果によるものか確認するためには癌巢の温度上昇を抑える必要がある。今回ヌードマウスを用いた検討において、腫瘍に対する影響が、温熱効果によるものか、光化学効果によるものかの識別を容易にする目的で、照射面を含むマウス体表面に透明塩化ビニルで作成したウォーターパックを密着させ、体表面の温度の上昇を抑えることが可能となった。照射中の温度はほぼ31~35°Cまでで一定していたことから、この腫瘍の壊死は光化学効果によるものといえる。

藤島ら¹⁷⁾は、QスイッチNd-YAGレーザーが通常用いられる連続波に比べ、レーザー光の組織内分布が均一で、組織深達性にも優れるとし、山下ら⁴⁰⁾は、連続波とQスイッチパルス波を使用したNd-YAGレーザー温熱治療の検討で、Qスイッチパルス波群の腫瘍壊死範囲が広い傾向にあったと報告している。換言すれば、光化学的治療における光源として、QスイッチNd-YAGレーザーは有用であると考えられ、今後は光感受性物質であるPh-Aについて、さらに検討が必要である。すなわち、前述したPh-Aの腫瘍親和性の問題である。Ph-Aの誘導体の合成のみならず、難水溶性であるPh-Aに対し、腫瘍内濃度を選択的に上昇

させるためのよりすぐれた溶解方法および投与経路の検討は、臨床応用への実現に向け必要不可欠な点と考えられる。また、今回の検討では、Ph-A投与からレーザー照射までの間隔を2時間とし、さらに温熱効果の除去を容易にするため、レーザー照射時間は5時間にとどめたが、より高い光化学的効果をあげるための、光感受性物質投与とレーザー照射の間隔、およびレーザーの照射時間などについても検討の余地が残されている。今後のPDTの臨床応用のためにも上述した問題点を解決するならば、本法は癌集学的治療の一環として新しい展開が期待される。

結 論

QスイッチパルスNd-YAGレーザーと、フェオフォルバイドA (Pheophorbide-A, Ph-A)を用いた新たな光化学的治療に関し、ヒト胃癌株を対象に培養細胞株3株と、ヌードマウス移植株を用いてこれらにおける光化学的効果および、ヌードマウス体内でのPh-A薬物動態について検討した。

1. 培養細胞株を用いた光化学的効果に関する検討において、PDT群ではPh-A単独群、レーザー単独群に比して相乗的に高い殺細胞効果が得られ、Ph-A濃度の増加にしたがって増強された。また、異なる3株いずれについても、同様の殺細胞効果が得られた。

2. ヌードマウス移植株を用いた、マウス体内でのPh-Aの薬物動態に関する検討において、腹腔内投与ではPh-Aの腫瘍集積性は低く、肝臓、腎臓に対しより高濃度の集積がみられた。腫瘍内投与における肝臓への集積は、腹腔内投与に比べ、低い傾向にあった。また、腫瘍からの排泌は、いずれの投与方法においても他臓器と同様の排泌速度を示した。

3. ヌードマウス移植株を用いた光化学的効果の検討において、PDT群は、対照群に比して有意の腫瘍の増殖抑制効果のみとめた。またPh-A単独群、レーザー単独群に比べても腫瘍の増大傾向は抑えられ、組織学的にも腫瘍の壊死が広範に及んでいた。

以上より、Ph-AとNd-YAGレーザーを用いた光化学治療で、培養細胞、ヌードマウスのいずれの実験系においても胃癌に対する抗腫瘍効果が確認された。しかしながら、Ph-Aは腹腔内投与において腫瘍への集積性が低く、十分な腫瘍内濃度を得るためにはPh-Aの局所投与が必要と考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師磨伊正義教授に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導い

ただいた荻野知己助教授に深謝致します。さらに、御協力をいただいた当外科学教室の諸先生方、(株)ヤクルト本社中央研究所主任研究員、渡辺常一氏に心から感謝致します。

なお、本論文の一部は第35回日本消化器外科学会総会(津, 1990), 第49回日本癌学会総会(札幌, 1990), 第28回日本癌治療学会総会(東京, 1990), 第11回日本レーザー医学会大会(金沢, 1990), および The 9th World Congress of Gastroenterology (Sydney, 1990) にて発表した。

文 献

- 1) Lipson, R. L., Baldes, E. J. & Gray, M. J.: Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. *Cancer*, **20**, 2255-2257 (1967).
- 2) Dougherty, T. J., Kaufman, J. E., Goldfarb, A., Weishaupt, K. R., Boyle, D. & Mittleman, A.: Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.*, **38**, 2628-2635 (1978).
- 3) 木村修一: 4. フェオホーパイドー自然界における起源とその光力学作用。医のあゆみ, **112**, 878-885 (1980).
- 4) 木村修一: 2. フェオホーパイド。蛋・核・酵, **33**, 2803-2810 (1988).
- 5) Clare, N. T.: Photosensitization in animals, *Adv. Vet. Sci.*, **2**, 182-211 (1955).
- 6) 竹中成憲, 沢田玄弘, 吉岡峰雄: 毒鮑(どくあわび)に就て。東京医事新誌, **1114**, 1359-1365 (1899).
- 7) 古賀俊英: 鮑腑(あわびのつわた)中毒症に就て。東京医事新誌, **1179**, 1977 (1900).
- 8) Hashimoto, Y., Naito, K. & Tsutsumi, J.: Photosensitization of animals by the viscera of abalones. *HALOTIS DESCUS HANNAI*. 日本産会誌, **26**, 1216-1221 (1960).
- 9) Hashimoto, Y. & Tsutsumi, J.: Isolation of photodynamic agent from the liver of abalone, *HALOTIS DISCUS HANNAI*. 日本産会誌, **27**, 859-866 (1961).
- 10) Tsutsumi, J. & Hashimoto, Y.: Isolation of Pyroropheophorbide a as a photodynamic pigment from the liver of abalone, *HALOTIS DISCUS HANNAI*. *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 467-470 (1964).
- 11) 山田幸二, 中村延生蔵: 塩蔵漬菜中の光力学的物質について。栄と食料, **25**, 466-471 (1972).
- 12) 駒井善明, 大貫憲一, 山岸 弘, 白鳥憲行: クロレラ錠喫食者に発生した光線過敏症皮膚炎について。食衛研, **28**, 747-752 (1978).
- 13) 天野立爾, 池 慶子, 内山 充: クロレラ中のクロロフィル分解物に関する化学的試験。食衛研, **28**, 739-745 (1978).
- 14) 中島正治: レーザーによる癌治療。医のあゆみ, **124**, 346-351 (1983).
- 15) 益子信郎, 佐藤俊一, 稲葉文男, 田口喜雄, 葛西森夫, 木村修一: Nd-YAG レーザー光照射によるフェオフォーパイド a の光化学効果の基礎的研究。日レーザー医学会誌, **6(3)**, 113-116 (1986).
- 16) 村田方身, 藤目 真, 北川龍一: フェオフォルパイド a と Nd-YAG レーザーによるマウス膀胱癌の光化学療法。日レーザー医学会誌, **8(3)**, 55-56 (1987).
- 17) 藤島一郎, 堺 常雄, 田中篤太郎, 山本貴道, 杉山憲嗣, 龍 浩志, 植村研一, 大工園則雄: Nd-YAG Laser (acoustic Q switch) と Pheophorbide-A を用いた Photodynamic Therapy (PDT)。日レーザー医学会誌, **8(3)**, 57-58 (1987).
- 18) 恒川 洋, 伊奈研次, 杉原 真, 堀田素子, 間宮均人, 渡辺喜則, 森瀬公友, 大工園則雄, 西垣郁雄, 小嶋仲夫, 八木國夫: Nd-YAG レーザー光線力学的治療法に関する基礎的研究。日レーザー医学会誌, **9(3)**, 121-124 (1988).
- 19) 門脇 徹, 中沢慶彦, 森田雅範, 西岡隆見, 高橋佳伸, 宮田 彰, 北島裕慎, 松本浩利, 山崎一明, 西森 功, 佐野修一, 壽美貴守, 鍵山惣一, 田村 智, 坂本芳也, 中田博文, 岡崎和一, 山本泰朗, 山本泰猛: Pheophorbide-A による胃癌培養細胞に対する Nd-YAG Laser-PDT の基礎的検討。日レーザー医学会誌, **10(3)**, 249-252 (1989).
- 20) 沢口 潔, 浅井 透, 董 新舒, 田中敦子, 伊藤透, 出口 康, 大井章史, 荻野知己, 磨伊正義: ヒト胃癌株 (KKLS) の樹立とその性状。HUMAN CELL, **2** (Suppl.), 87-88 (1989).
- 21) 沢口 潔, 田中敦子, 浅井 透, 表 和彦, 出口康, 大井章史, 荻野知己, 磨伊正義, 伊川和美: ヒト胃癌株 (NKPS) の樹立とその性状。HUMAN CELL, **3** (Suppl.), 56 (1989).
- 22) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983).
- 23) 前田直徳, 市川一彦, 小林泰介, 水野信行: 1. ラット実験皮膚癌に対するフェオフォーパイド a 光照射療法。Photomed. Photobiol., **6(2)**, 7-11 (1984).
- 24) 加藤武久, 榊原 茂, 三枝寛子, 水野信行: 16. 培養細胞に対するフェオフォーパイド a 光毒性反応

の超微形態および組織化学的变化—特にその初期像について. *Photomed. Photobiol.*, **5(2)**, 49-50 (1983).

25) 青木 純, 鈴木荘太郎, 鳴海裕之, 椎名泰文, 長谷部哲理, 原沢 茂, 三輪 剛: 早期胃癌に対する内視鏡的 Nd-YAG laser 接触治療法の限界と可能性. *消内視鏡の進歩*, **32**, 57-62 (1988).

26) 鈴木荘太郎, 青木 純, 三輪 剛: レーザーを用いたハイパーサーミアの試み Nd-YAG レーザーによる内視鏡的局所温熱療法. *消化器科*, **4**, 363-370 (1986).

27) Tajiri, H., Oguro, Y., Egawa, S. & Sugimura, T.: Local hyperthermia using a low powered Nd-YAG laser for pancreatic and gastric carcinoma. *北海道医誌*, **63**, 889-896 (1988).

28) 太田孝仁: 大腸癌における原発巣と転移巣の生物学的差異に関する実験的研究. *十全医会誌*, **99**, 385-394 (1990).

29) 内藤克輔, 越田 潔, 浅利豊紀, 小橋一功, 打林忠雄, 久住治男: *In vitro* 抗癌剤感受性試験における Tetrazolium Bromide の応用に関する基礎的検討. *癌と化療*, **14**, PART. I, 1933-1935 (1987).

30) 川井 章, 伊藤士郎, 尾崎敏文, 井上 一, 田辺剛造, 佐藤二郎: 人骨軟部腫瘍を用いた MTT-hybrid assay の検討. *HUMAN CELL*, **2**, 283-289 (1989).

31) 村田方身, 藤目 真, 北川龍一: フェオフォルバイド a を使った光化学治療における経時的細胞死について. 第11回日本レーザー医学会大会抄録集, **73** (1990).

32) 木村修一, 岩井邦久: 光増感化学反応を用いた癌治療. *KARKINOS*, **3**, 195-204 (1990).

33) 中村 達, 西脇由朗, 坂口周吉, 仲里正孝, 今野光夫, 太田和義, 山下 豊: Lipiodol-PPa を用いた肝腫瘍に対する光化学治療の基礎的研究. *医のあゆみ*,

142, 115-116 (1987).

34) 西脇由朗, 中村 達, 鈴木昌八, 坂口周吉, 仲里正孝, 今野光夫, 山下 豊, 太田和義: 肝癌の光力学的治療に関する基礎的研究. *日レーザー医学会誌*, **8(3)**, 53-54 (1987).

35) Nishiwaki, Y., Nakamura, S. & Sakaguchi, S.: New method of photosensitizer accumulation for photodynamic therapy in an experimental liver tumor. *Lasers Surg. Med.*, **9**, 254-263 (1989).

36) 門脇 徹, 中澤慶彦, 森田雅範, 坂本芳也, 鍵山惣一, 西岡隆見, 松本浩利, 山崎一明, 高橋佳伸, 西森 功, 田村 智, 中田博文, 岡崎和一, 山本泰朗, 山本泰猛: 光感受性色素 Pheophorbide-a 静注時のイヌ臓器内分布の検討. *日レーザー医学会誌*, **9(3)**, 327-330 (1988).

37) 河部博文, 会沢勝夫, 古川欣也, 山本秀樹, 玉地義弘, 加藤治文, 早田義博: 新光感受性物質の抗腫瘍効果. *日レーザー医学会誌*, **10(3)**, 245-247 (1989).

38) 石原聖也, 三好憲雄, 松本順雄, 新井達郎, 徳丸克己, 市村厚一, 小林孝嘉, 唐沢三智人, 沢田道一, 中西和夫, 久住治男, 福田 優: フェオフォルバイド誘導体 Hamari-1126 の分光学的検討. *日レーザー医学会誌*, **10(3)**, 241-244 (1989).

39) 市岡 稔, 小山陸子, 細谷英雄, 遠藤 寛: 担癌マウスに投与した光増感剤, Pheophorbide a および 10-hydroxypheophorbide a の臓器内分布. *日レーザー医学会誌*, **10(1)**, 15-18 (1989).

40) 山下幸孝, 森安史典, 玉田 尚, 川崎俊彦, 小野成樹, 木村 達, 梶村幸三, 染田 仁, 濱戸教行, 内野治人, 酒井正彦: 肝細胞癌に対する光線力学的治療の基礎的検討—光感受性物質局所投与方法—. *日癌治療会誌*, **25**, 770-775 (1990).

Fundamental Study on Photodynamic Therapy against Human Gastric Cancer Using Q-switch Pulsed Nd-YAG Laser and Pheophorbide-A Yasushi Deguchi, Department of Surgery, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 921 - J. Juzen Med. Soc., **100**, 296 - 308 (1991)

Key words Gastric cancer, Nd-YAG laser, Nude mouse, Pheophorbide-A, Photodynamic therapy

Abstract

A pulsed Nd-YAG laser with Pheophorbide-A (Ph-A) was used as a new method of photodynamic therapy (PDT) for human gastric cancer. *In vitro* and *in vivo* experimental studies were performed to evaluate the anti-tumor effect of PDT using a pulsed Nd-YAG laser in combination with pheophorbide-A (Ph-A). The *in vitro* study was designed to study the effect of PDT on three gastric cancer cell lines; KATO III, KKLS, NKPS, each of which was divided into three treatment groups; 1) 'Ph-A only', 2) 'laser only', and 3) 'Ph-A and laser (PDT)'. The cytocidal effect was judged by tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay three days after treatment. The 'PDT' group showed synergistic cytocidal effects as compared with the 'Ph-A only' and 'laser only' groups in the *in vitro* study, and the effect of PDT correlated with the concentration of Ph-A. A similar effect was obtained in each of the three different cell lines. In the *in vivo* study, a human gastric cancer transplanted subcutaneously into the backs of nude mice (BALB/c-nu) was used, and the differences in pharmacodynamics between intraperitoneal (I. P.) and intratumoral (I. T.) Ph-A injection examined. With I. P. administration, Ph-A accumulation within the tumor tissue was less than that achieved with I. T. injection, although higher drug concentrations were found in the liver and kidney. Ph-A showed less accumulation in the liver after I. T. injection as compared to I. P. injection. Accordingly, the *in vivo* experiment designed to study the anti-tumor effects of PDT was performed with Ph-A injected I. T. The nude mice were divided into four treatment groups; 1) control, 2) 'Ph-A only', 3) 'laser only', and 4) 'Ph-A and laser (PDT)'. The anti-tumor effects were judged by measuring the size of the tumors every three days after treatment. On the 7th and 21st days after PDT treatment the tumors were enucleated and examined histologically. The 'PDT' group showed a significant anti-tumor effect as compared with the 'Ph-A only' and 'laser only' groups. In the 'PDT' group, large portions of the tumors were seen to be necrotic. These results suggest that PDT using Ph-A exerts a synergistic anti-tumor effect against gastric cancer cells both *in vitro* and *in vivo*, and that PDT may be of value in the treatment of gastric cancer.