

# Comparison of Gold Vapor and Argon-dye Laser Light in terms of Potential Usefulness in Photodynamic Therapy

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7999">http://hdl.handle.net/2297/7999</a>

## 光力学的治療における金蒸気レーザーとアルゴン色素レーザーの有用性の比較に関する実験的研究

金沢大学医学部泌尿器科学講座 (主任：久住治男教授)

山 本 肇

(昭和62年12月22日受付)

ヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivative, HpD) の腫瘍親和性を利用した光力学的治療 (photodynamic therapy, PDT) には一般に連続波を発生するアルゴン色素レーザー (argon-dye laser, ADL, 波長 630 nm) が用いられている。今回本研究では新しいタイプのパルス波を発生する金蒸気レーザー (gold vapor laser, GVL, 波長 628 nm) を導入し、両レーザー光の組織透過性について分光学的に比較検討すると共に実験的移植腫瘍に対する PDT 効果についても比較検討を行った。使用された実験試料は、血行を保った HpD 非含有家兎耳介, HpD 含有・非含有切除家兎肝臓, HpD 含有・非含有ヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 およびヌードマウス移植 KK-47 腫瘍である。透過光強度測定には、パワーメーターによる定常的測定法と、オシロスコープによる経時的観察の2方法を用いた。その結果、家兎耳介を用いた組織透過性実験では、光消散長は出力 10 mW/20 mm<sup>2</sup> では両レーザー間に差は認められなかったが、GVL のみは出力の増強と共に増大し、出力 100 mW/20 mm<sup>2</sup> においては ADL に比し約 3.3 倍大となった。HpD 含有 KK-47 細胞を試料とした laser flash photolysis system の実験では、高密度励起によると考えられる HpD の吸光度の過渡的低下 (transient photobleaching) が認められた。家兎肝切片を用いた two-laser excitation system の実験では、両レーザー併用照射時に GVL 光照射により肝内のヘモグロビン、ミオグロビン、その他の色素に photobleaching が発生したためと考えられる透過光強度の著明な上昇がみられた。実験的移植腫瘍に対する PDT 効果の比較では、温熱効果の認められない出力の GVL (平均出力 150 mW/cm<sup>2</sup>, 9 J/cm<sup>2</sup>/min) では、15 分照射群においては complete response (CR) = 5/6 (CR 所要日数 10.2 日), 30 分照射群においては CR = 6/6 (7.5 日) であり、ADL (出力 300 mW/cm<sup>2</sup>) の 15 分照射群の CR = 2/6 (13.0 日), 30 分照射群の CR = 3/6 (12.0 日) に比し、有意に高い抗腫瘍効果が認められた。以上、本実験の GVL の高い抗腫瘍効果には、高いパルス波のくり返しと高いピーク出力を示す GVL 光の組織内色素の高密度励起を介した組織透過性の増強が大きく関与していると考えられた。

---

**Key words** gold vapor laser, argon-dye laser, hematoporphyrin derivative, photodynamic therapy

---

低エネルギーレーザー光を利用した癌治療法の代表的なものとしては、アクリジンオレンジ、ヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivative, HpD), あるいはビタミン A などの光感受性物質との併用がある。レーザーはこれら色素の励起光源として用いられ、そこに生ずる光力学的反応を治療に応用するものである。最近では、癌組織に蓄積性の良好な光

感受性物質 HpD を投与し、正常組織との間に蓄積量の差の大きい 48~72 時間後に低エネルギー赤色レーザー光アルゴン色素レーザー (Argon-dye laser, ADL, 630 nm) を照射し、発生する一重項酸素の酸化作用を利用した比較的選択性の高い光力学的治療 (photodynamic therapy: PDT) が注目されている<sup>1)</sup>。泌尿器科領域では、1975 年に Kelly ら<sup>2)</sup>が初めて実験

---

Abbreviations: HpD, hematoporphyrin derivative; PDT, photodynamic therapy; GVL, gold vapor laser; ADL, argon-dye laser; CR, complete response; TUR, transurethral resection.

的マウス膀胱腫瘍に対し、HpDの光化学反応を用いた診断と治療の可能性を、400ワットのヨウ化ランプを用いて研究した。その後ADLを用いたこの種の報告はJochamら<sup>3)</sup>(1981)が最初で、家兎膀胱壁内に移植されたBrown-Pearce carcinomaに対し、光量100~1500 mW/sec, 30秒~20分の照射を行い、PDTが臨床的に応用可能なことを示した。また彼ら<sup>3)</sup>は実験的にHpD静注後、移植腫瘍と正常膀胱壁のHpD濃度差は48~72時間に最大となることをも示した。1983年に入り、Tsuchiyaら<sup>4)</sup>は8症例の膀胱腫瘍においてHpD静注後、クリプトンレーザーの青色光照射により腫瘍部にHpD蛍光が発生することを認めた。またHpD 2.5 mg/kg 静注後、48~72時間後に内視鏡を介して直径400  $\mu$ mの石英ファイバーによるADL赤色光(約120 J/cm<sup>2</sup>)照射を行い、8例中6例に腫瘍の完全消失を認めたと報告している。Hisazumiらは1982年以來HpDとADL赤色光を用いたPDTを表在性膀胱腫瘍治療に応用し<sup>5)6)</sup>、同時に培養細胞および動物移植腫瘍を用いてPDTの基礎的研究も行ってきた<sup>7-9)</sup>。しかしADL光を用いたPDTにおける問題点の一つとして、ADL光(波長630 nm)の光量は組織内で深さ5~7 mmで約1/100に減衰し、その組織内有効深達度は約1.5~2 cm以下と小さいことが指摘されている<sup>27)</sup>。従って、その臨床的有用性は、すでに治療法として確立している経尿道的電気切除術(transurethral resection, TUR)を超えるものではなかった<sup>10-12)</sup>。このような理由から、PDTによる癌治療成績の向上を期するための一つの方法として、治療時間の短縮、適応腫瘍容量の拡大を目的として、組織内深達度の高いレーザーの開発が必要であろう。本研究では、連続波を発振するADLと異なり波長628 nmのパルス波を発振する金蒸気レーザー(gold vapor laser, GVL)を導入し、従来のADLと組織透過性について分光学的に比較検討すると共に、さらに両レーザーと

HpDを用いたPDT効果をヌードマウス移植腫瘍につき比較検討し、興味ある結果を得たので報告する。

### 対象および方法

#### I. 使用動物

生後6週齢で体重約20 gのBALB/c 雌性のヌードマウス(nu/nu)と、体重約2.5 kgの日本白色種の雌性家兎をそれぞれ使用した。

#### II. 飼育方法

##### 1. ヌードマウス

本学動物実験施設内の無菌動物飼育室に移動式ビニールアイソレーターCL-1001(日本クレア, 東京)を設置し、その中でspecific pathogen free(S.P.F.)環境下に飼育した。飼育室内では、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気15回/hrに保った。飼料には無菌動物飼育飼料CL-2(日本クレア, 東京)を用い、これに $170^\circ\text{C}$ 、30分間の乾熱滅菌を施し、アイソレーター内に搬入した。床敷は滅菌缶内に密封後、オートクレーブ( $121^\circ\text{C}$ 、2 kg/cm<sup>2</sup>、20分)にて滅菌し、ビニールスリーブでステリーロックに連結後、0.25%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で噴霧消毒し、アイソレーター内に搬入した。そのほかの小実験用具はAnprolene<sup>®</sup>(H. W., Anderson Products, New Jersey)にて24時間滅菌した後、同様に搬入した。

##### 2. 家兎

本学動物施設内の無菌動物飼育室において飼育して、実験に供した。飼料には固形飼育RM3(船橋農場, 船橋市)を用いた。

#### III. 麻酔方法

ヌードマウスに対してはネプタール(Sodium Pentobarbital)(Abbott Laboratories, North Chicago)1 mgを生理食塩水に溶解し、腹腔内に投与した。また、家兎ではソムノベンチル(Sodium Pentobarbital)(Pitman-Moore Inc., Washington)32.4 mg

Table 1. Specifications of gold vapor laser, argon-dye laser and excimer laser

	Gold vapor laser	Argon-dye laser	Excimer laser (XeCl)
Wavelength	628nm	630nm	308nm
Peak power	$5 \times 10^4$ W	1.2W	$5 \times 10^6$ W
Average power	4.5W	1.2W	0.05W
Pulse energy	0.45mJ	—	50mJ
Pulse width	$5 \times 10^{-8}$ sec	—	$10^{-8}$ sec
Repetition rate	10kHz	—	~1 Hz
Type of laser	Pulse	★CW	Pulse

★CW: Continuous waves.

を生理食塩水に溶解し、静脈内に投与した。

IV. 移植培養細胞

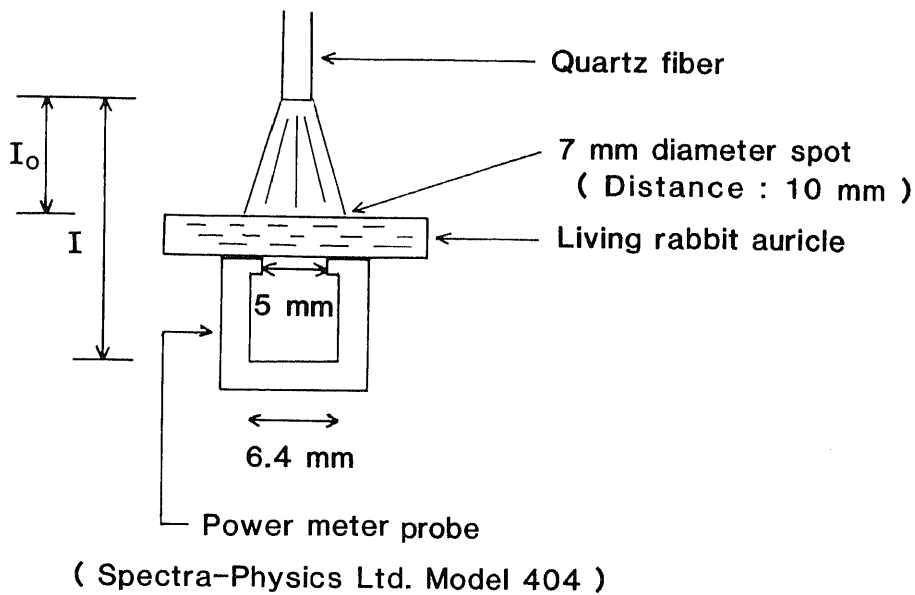
当教室において1977年樹立し、継代培養を行っているヒト膀胱癌由来培養細胞KK-47<sup>13)~16)</sup>の130継代を使用した。KK-47細胞は、20%仔牛血清 (Microbiological Assoc., Maryland) およびカナマイシン 50 μg/ml 含有 HamF12 培地 (日水製薬, 東京) からなる FC-20 培養を用いて閉鎖静置培養を行い、対数増殖期にある細胞を実験に供した。

V. 実験移植腫瘍作成法

対数増殖期にあるヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 を、0.05 ml の FC-20 に 10<sup>7</sup> 個の細胞濃度となるように調整し、ヌードマウス背部皮下に接種した。約2週間後に直径約1~2 cm に発育した腫瘍を切除し、3 mm 角に細切後、新たにヌードマウス背部皮下に再移植した。今回は実験の再現性を図るために、移植5, 6 継代のものを使用した。

VI. 光増感物質

ヘマトポルフィリン誘導体 (HpD.: Photofrin I, 0.5 mg/ml, Oncology Research and Development



$$L = \frac{1}{\delta} \log_e \frac{100}{10} = \frac{1}{0.434 \times \delta}$$

$$\log_e \frac{I_0}{I} = \delta d$$

L : Extinction length

I<sub>0</sub>: Output power

I : Transmitted power

δ : Absorption coefficient

d : Auricle thickness ( 0.7 mm )

Fig.1. Schematic representation of laser transmission study using living rabbit auricle without HpD.

Inc., New York)

#### VII. レーザー装置

GVLには Model Au-10 (Oxford Laser, Oxford), ADLには Model 171-07, 375-03 (Spectra-Physics, Santa Clara) および excimer laserには EMG-50E (Lambda Physik, Göttingen) を用いた。それらの波長, 最大出力などの特性は表1に一括表示した。なお, GVLおよびADL光は球状先端を有する直径  $400\ \mu\text{m}$  の石英ファイバーP-084, (オリンパス光学, 東京)に導入し, 以下の実験には光照射条件を一定にするために, 一本のファイバーを共用して用いた。この場合ファイバー先端出射角はADLでは  $540\ \text{mrad}$  で, GVLでは  $646\ \text{mrad}$  で, 平面先端の場合に比し, 比較的平坦なビームプロフィールをもった大きなスポットが形成された。

#### VIII. 家兎耳介を用いたレーザー組織透過性の比較

HpD 静注を行わず, 自然の血行を有する家兎耳介(厚さ  $0.7\ \text{mm}$ ) に対する光消散長 (extinction length: 入射光強度の90%が吸収される光路層の長さ)を, 図1に示す Lambert の法則<sup>17)</sup>より導き出された公式を用いて両レーザー光の間で比較検討した。ADLは石英ファイバー先端出力  $200\ \text{mW}$ , GVLは平均出力  $200\ \text{mW}$  (ピーク出力  $400\ \text{W}$ , ピークエネルギー  $20\ \mu\text{J}$ )とした。家兎耳介を剃毛し, ソムノペンチ

ル静脈麻酔下に, 受光面の大きさ直径  $5\ \text{mm}$  のパワーメーター Model 404 (Spectra-Physics, Santa Clara) の検出器上に固定した。受光面中心上方よりファイバーを垂直に上下させることにより耳介表面の入射光強度 ( $I_0$ ) を変動させ, その時の透過光強度 ( $I$ ) を測定し, 両レーザー光の光消散長を求めた。

#### IX. 培養細胞を用いた光透過性の検討

実験系は図2のごとくで, サンプルには静置閉鎖培養し対数増殖期にある KK-47 細胞に  $50\ \mu\text{g/ml}$  の HpD を含む FC-20 培養液を加え,  $37^\circ\text{C}$ , 1 時間培養後, 遊離 HpD を洗浄除去し, トリプシン処理後, phosphate buffer solution 溶液に再浮遊させ, この細胞浮遊液  $50 \times 10^4/\text{ml}$  を  $10 \times 5 \times 4\ \text{mm}$  の石英セルに入れて用いた。モニター光には Xe-ランプ, UXL-500D (ウシオ電気, 東京)の光を, 側方より波長  $308\ \text{nm}$  のパルス波を共振する excimer laser を用いた。基底状態の HpD の吸収スペクトルは, 分光光度計 Model 124 (日立, 東京)により測定した。側方より excimer laser 光 1 パルス波を照射した時の HpD の吸光度の過渡的変化を, 単色器 MC-10N (リッソ-応用化学, 東京), 光電子増倍管 R-666 (浜松ホトニクス, 浜松)を通し, オシロスコープ TS-8123 (岩崎通信機, 東京)上に  $\mu\ \text{sec}$  の単位時間で観察した。なお, 対照として, 同一細胞濃度の HpD 非含有細胞においても, 同様の実験を

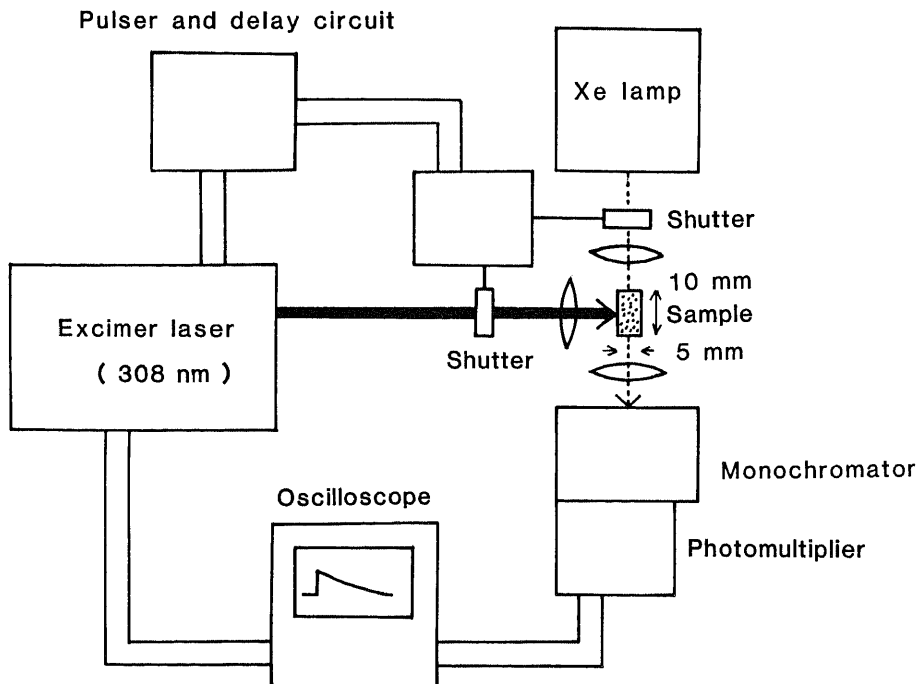


Fig. 2. Schematic representation of laser flash photolysis system.

行った。以上の実験は、いずれも標本を変えて3回づつ実施した。

#### X. GVLの組織深達性の分光学的分析

暗室にてHpD 3 mg/kgを静脈内投与した家兎より48時間後に肝臓を摘出し、大きさ10×10×5 mmの切片を作成し、ADL光（出力700 mW）を検体表面より5 mm、GVL光（平均出力450 mW）を検体側方より5 mmの距離から照射するtwo-laser excitation systemを用いてGVL光の組織深達性を分析した。肝臓へのHpDの取り込みを、850型分光蛍光光度計（日立、東京）にて、同時に測定した。両レーザー光を単独あるいは併用照射し、透過性の過渡的变化は、610 nmのカットオフフィルターおよび光電子増倍管を通し、オシロスコープ上にmsecの単位時間で観察した。なお、HpD非含有肝臓においても、同様の実験を行った。この実験はいずれも標本を変えて50回づつ実施した（図3）。また同実験を定常的にも次のように検討した。パワーメーター検出器上にHpD含有10×10×5 mmの家兎肝切片を固定し、ADL光（出力1 W）を検体表面より5 mm、GVL光（平均出力450 mW）を検体側方より5 mmの距離から単独あるいは併用照射し、透過性の強度をいずれも標本を変えて5回づつ測定した。以上のGVLを用いた実験はすべてシールド室にて実施した。

#### XI. 光力学的抗腫瘍効果の比較

移植腫瘍は移植2週後より指数関数的増殖を呈し、

これらのうちより腫瘍容量が200~300 mm<sup>3</sup>に発育したものを1群6匹として実験に供した。腫瘍の容量はOvejera and Houchens<sup>24)</sup>の方法により、腫瘍短径(a)と長径(b)をノギス(1 mm単位)で測定し、換算腫瘍容量(mm<sup>3</sup>)=a<sup>2</sup>×b/2で求め比較検討した。PDT後18日間毎日腫瘍を計測し、腫瘍増殖曲線を作製した。測定不能に至ったものはcomplete response (CR)とし、その所要日数を記録した。なお、その後も60日間腫瘍の再増殖の有無を観察した。GVLおよびADLの出力は、いずれも温熱治療効果を示さなかったGVLの平均出力150 mW/cm<sup>2</sup>、ADLの出力300 mW/cm<sup>2</sup>を用いた。HpD 10 mg/kgをヌードマウス腹腔内に投与し、48時間後には移植腫瘍より10 mmの距離からレーザー光スポットが腫瘍全体をおおるようにセットし、GVLおよびADLを15分あるいは30分照射した。対照群(無処置)、HpD単独投与群、レーザー単独照射群およびHpDとレーザー併用群の4群について腫瘍増殖曲線、腫瘍消失率および消失平均日数を比較検討した。なお、HpD投与後より全群暗室にて飼育した。

##### 1. 腫瘍増殖曲線

片対数グラフ上に経時的に測定した移植腫瘍容量の平均値と標準偏差値を記入し、腫瘍増殖曲線を作成した。実験終了時(18日目)に各群間で抗腫瘍効果の推計学的検討を行った。

##### 2. 腫瘍消失率

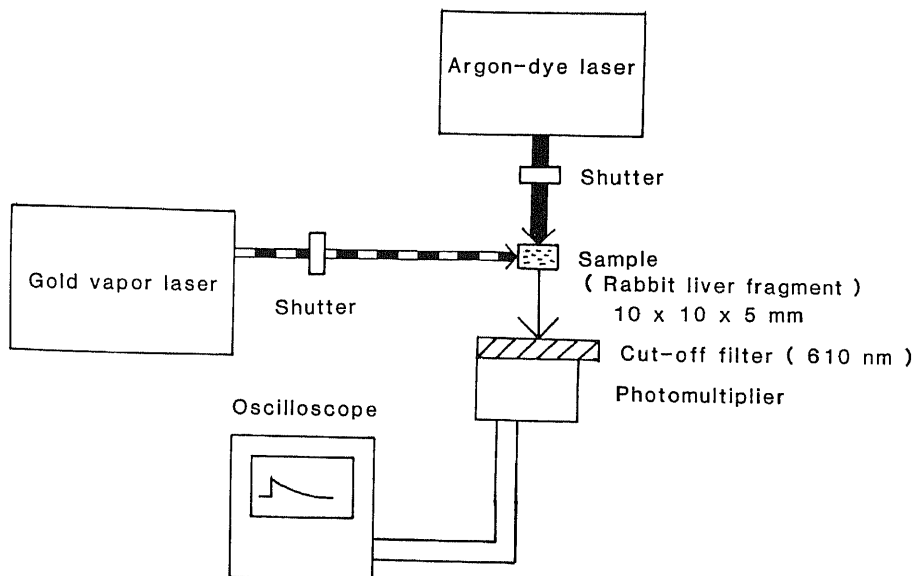


Fig. 3. Schematic representation of laser tissue penetration study using a rabbit liver fragment and two-laser excitation system.

実験終了時におけるCRの有無にて、抗腫瘍効果の推計学的検討を行った。

### 3. 消失平均日数

CRを認めた群間のCR平均日数について抗腫瘍効果の推計学的検討を行った。

## XII. 推計学的検討

抗腫瘍効果の推計学的検討には、一元配置分散分析後Duncanの多重比較による平均値間の差の検定およびFisherの直接確率計算法によるCR率の差の検定を行った。

## 成 績

### I. 家兎耳介を用いた組織透過性の比較

図4に示すごとく、石英ファイバー先端と家兎耳介間の距離を50mmより10mmごとに10mmまで減少させるに従い、耳介表面での入射光強度は両レーザー光ともに約10mW/20mm<sup>2</sup>より約100mW/20mm<sup>2</sup>まで増大した。この範囲においてGVL光の光消散長は、それぞれ1.06±0.02mm, 1.28±0.07mm, 1.74±0.16mm, 2.57±0.06mmおよび2.74±0.14mmと有意に増大し、おおむね100mW/20mm<sup>2</sup>ではGVL

光の光消散長は一定の閾値に達した。一方、ADL光では、それぞれ0.74±0.01mm, 0.77±0.03mm, 0.81±0.02mm, 0.85±0.02mmおよび0.83±0.04mmといずれも約0.8mmと一定で、有意の増大は認められなかった。

### II. 培養細胞を用いた光透過性の検討

図5はHpD含有および非含有KK-47細胞に対し波長400nmXe-ランプ光を照射し、その透過光強度の時間的経過を観察し、さらにexcimer laser光1パルス併用照射した時の光透過性の変化を検討したものである。HpD含有KK-47細胞にXeランプ光照射時の透過率を100%とした場合、excimer laser光1パルス照射により、透過率の増大が過渡的に認められ(図5左)、その回復時間(光強度が1/eになる時間, e=2.718)は240μsecであった。一方、HpD非含表KK-47細胞では、透過率の増大は認められなかった(図5右)。

HpD含有KK-47細胞に対し380~450nmのXe-ランプ光を照射した時の腫瘍細胞の光吸収は基底状態のHpDの吸収スペクトルに一致するものであった(図6上段)。一方、excimer laser併用照射時の腫瘍細胞

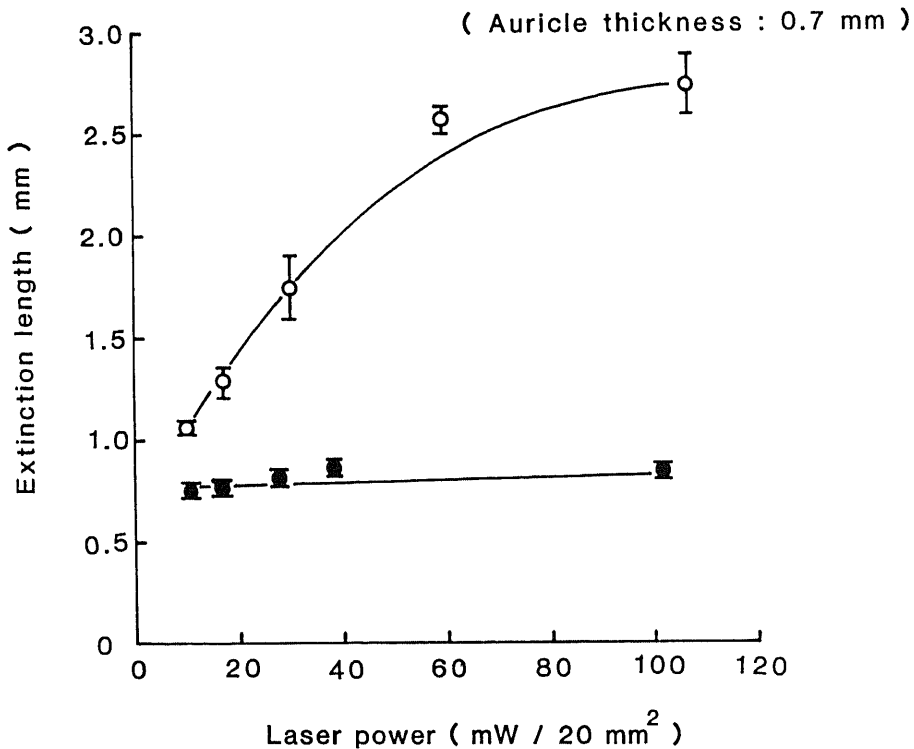


Fig. 4. Tissue penetration of gold vapor laser and argon-dye laser in living rabbit auricles without HpD. (○), gold vapor laser, average power 200 mW; (●), argon-dye laser, output power 200 mW. Mean value±S.E.M. from 5 experiments.

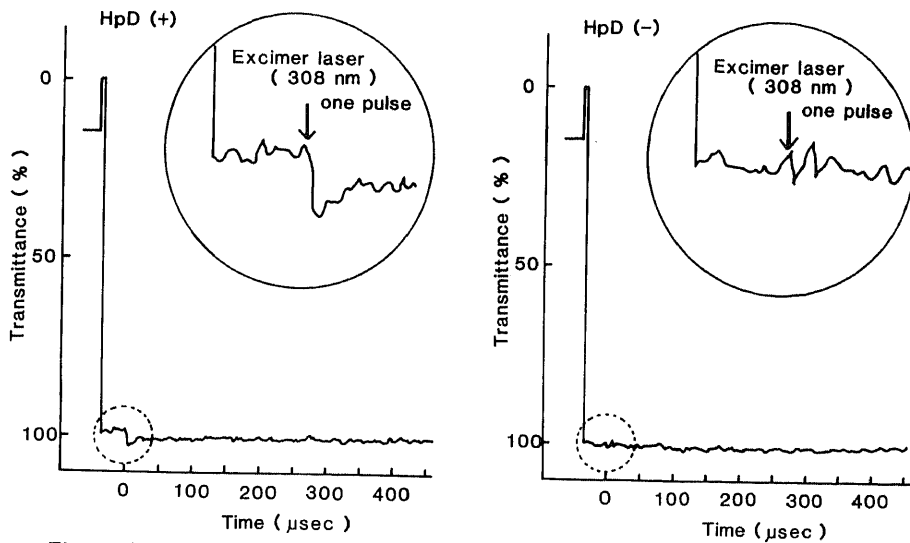


Fig. 5. The oscilloscope trace of transient absorption of KK-47 bladder cancer cells with or without HpD at 400 nm by one-pulse irradiation of excimer laser. HpD concentration, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; HpD exposure time, 1 hr; Cell concentration,  $50 \times 10^4/\text{ml}$ .

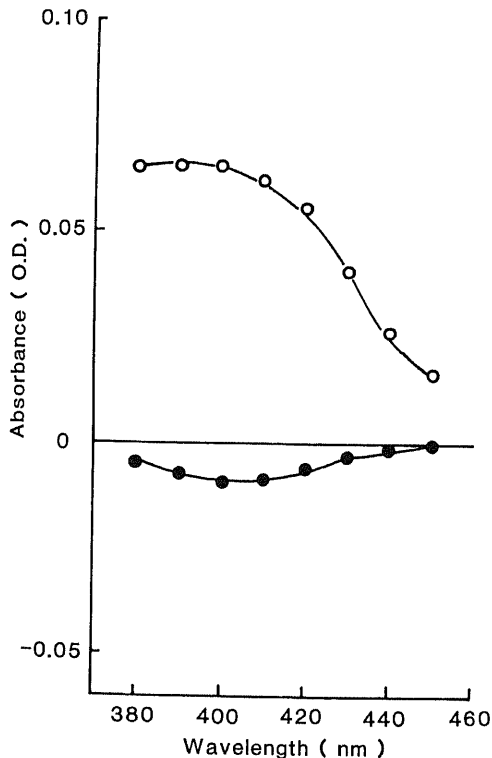


Fig. 6. Transient absorption (●) of HpD-containing KK-47 bladder cancer cells excited by excimer laser and absorption spectrum (○) of ground-state HpD in the cells. HpD concentration, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; HpD exposure time, 1 hr; Cell concentration,  $50 \times 10^4/\text{ml}$ .

の光吸収は図6下段のごとくであり、excimer laserにより細胞内 HpDが励起され、光吸収が低下したことが明らかに示された。HpDの最大吸収波長400 nmでは17%と最も大きな吸収値の低下が認められた(図6)。この現象は、excimer laserの時間当りの高いエネルギーによる HpDの高密度励起、おそらく多光子励起 HpDが発生した結果と考えられた。

### III. GVLの組織深達性の分析

図7 (a)は、HpD含有家兎肝切片に対し、ADL光およびGVL光をそれぞれ単独あるいは併用照射した時の透過光強度の時間的变化を観察したものである。両レーザー光併用照射時の透過光は併用照射開始後40 msecまで漸次増強し、以後閾値に達した。閾値に達した後の透過光強度は、両レーザー光単独照射時の相加値より大であった。一方、HpD非含有家兎肝切片においては、図7 (b)に示すごとく、図7 (a)と同様の所見が観察された。同様の結果は次の実験からも得られた。ADL光上方よりの単独照射では、透過光は  $20 \pm 2.5 \text{ mW}/20 \text{ mm}^2$  を示し、GVL光単独側方照射では  $15 \pm 2.1 \text{ mW}/20 \text{ mm}^2$  を示した。ADL光照射とGVL光側方照射では、 $100 \pm 2.6 \text{ mW}/20 \text{ mm}^2$  と両レーザー光単独照射時の相加値の約3倍に透過光は増加した(表2)。

### IV. 光力学的抗腫瘍効果

図8はGVL平均出力  $150 \text{ mW}/\text{cm}^2$ 、15分 ( $125 \text{ J}/\text{cm}^2$ ) および30分 ( $270 \text{ J}/\text{cm}^2$ ) 照射時の腫瘍増殖曲線である。



HpD 単独投与群およびレーザー単独照射群では、腫瘍増殖曲線には対照群のそれとの間には差は認められなかった。レーザー照射による温熱による腫瘍増殖抑制効果がないものと考えられた。PDT 群の 30 分照射では照射後、平均  $7.5 \pm 1.22$  日 (d) にて 6 匹中 6 匹 (d') に CR が認められ、15 分照射では平均  $10.2 \pm 1.79$

日 (c) にて 6 匹中 5 匹 (c') に CR が認められた。一方、ADL  $300 \text{ mW/cm}^2$ 、15 分および 30 分照射については図 9 のごとく、対照群、HpD 単独投与群およびレーザー単独照射群の間には腫瘍容積の有意差は認められず ( $p < 0.05$ )、PDT 群の 30 分照射では、照射後平均  $12.0 \pm 2.00$  日 (b) にて 6 匹中 3 匹 (b') に、15 分

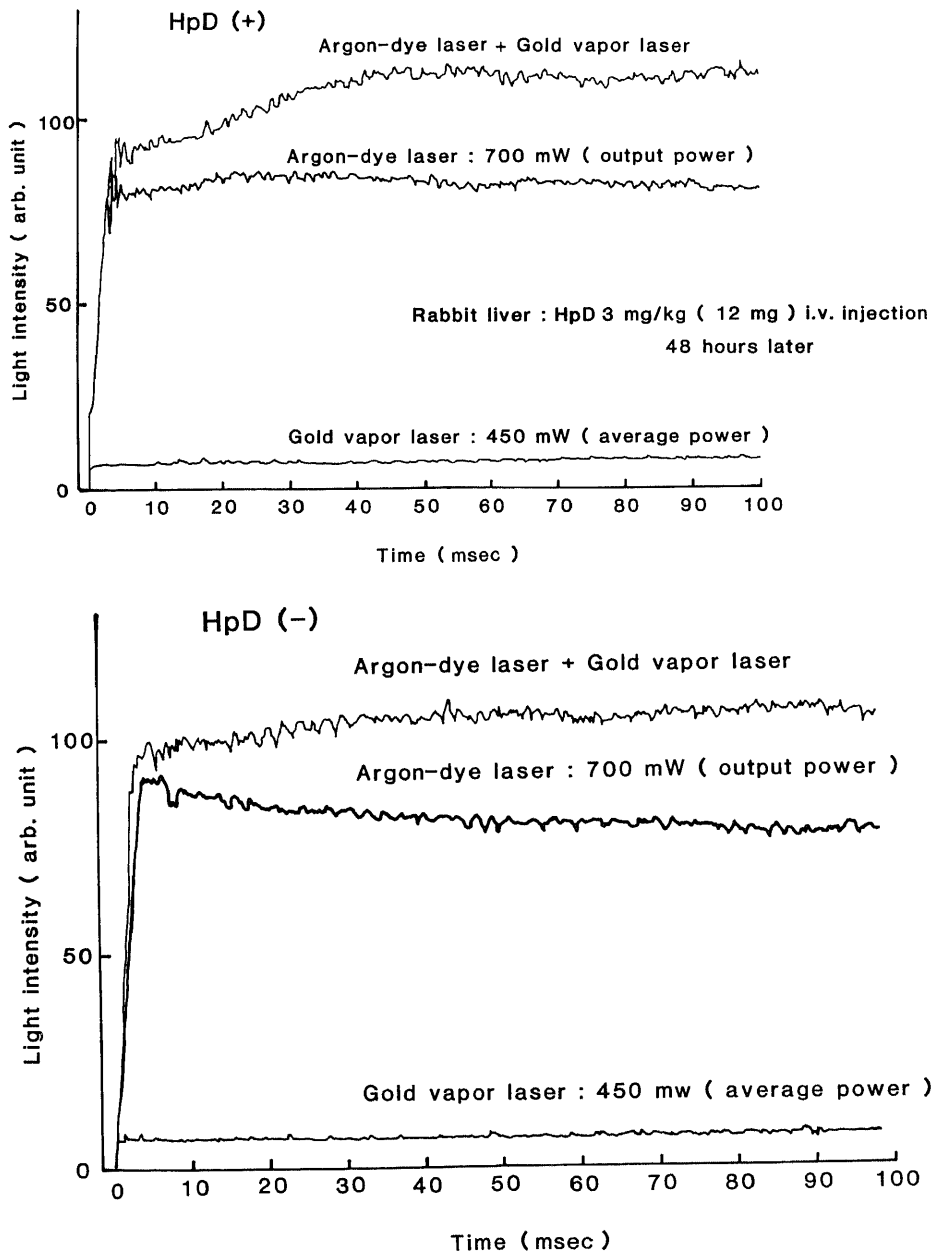


Fig. 7. Alteration of light transmission in a rabbit liver fragment due to a combination of gold vapor laser and argon-dye laser. (a) with HpD, (b) without HpD.

Table 2. Tissue penetration of laser light in a two-laser excitation study using rabbit liver fragments obtained 48 hr after HpD i.v. injection

Lasers	Argon-dye laser	Gold vapor laser	Combination of both lasers
	630nm, output power of 1W	628nm, average power of 450mW	
direction of laser beams	vertical	horizontal	vertical plus horizontal
transmitted light power : Mean $\pm$ SD*(mW)	20 $\pm$ 2.5	15 $\pm$ 2.1	100 $\pm$ 2.6

\*n=5.

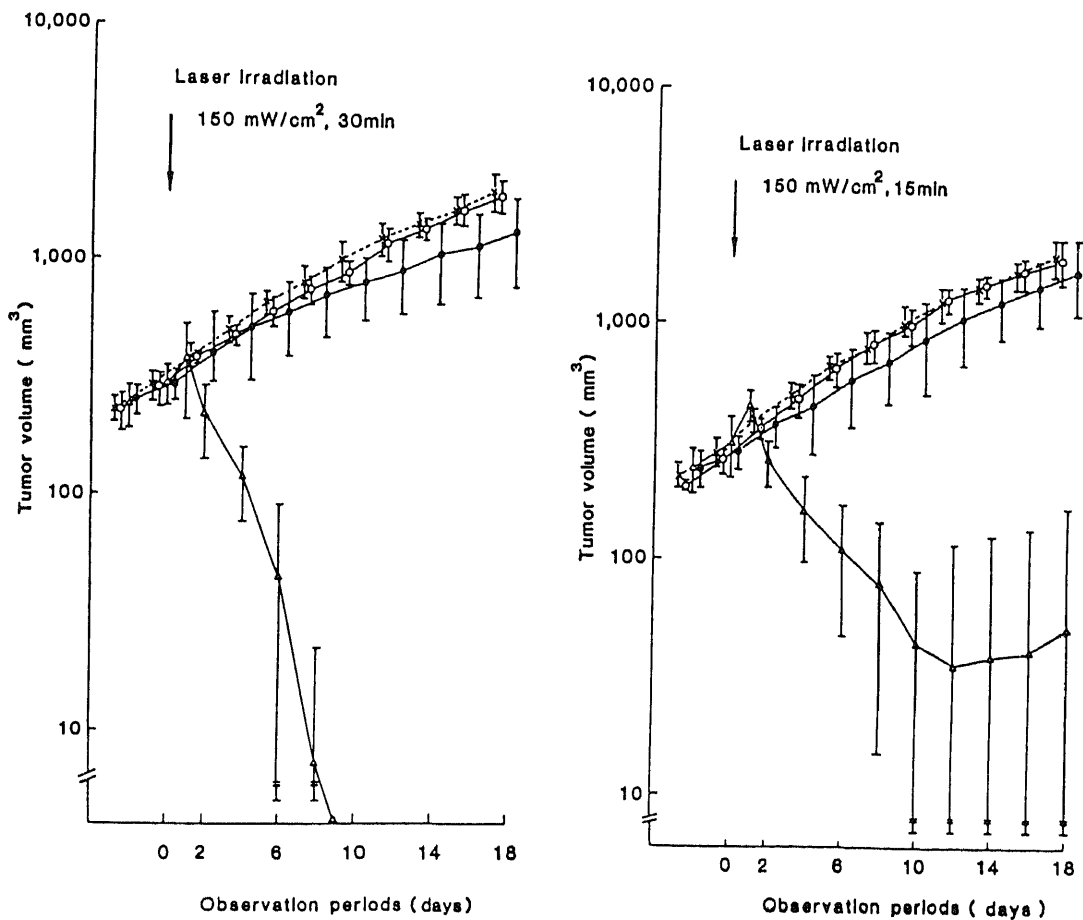


Fig. 8. Photodynamic effect of HpD and gold vapor laser (628 nm) on growth of KK-47 bladder cancer cell transplanted into nude mice. (x), control; (o), HpD; (●), gold vapor laser; (Δ), HpD & gold vapor laser. Mean value  $\pm$  S.E.M. from 6 experiments.

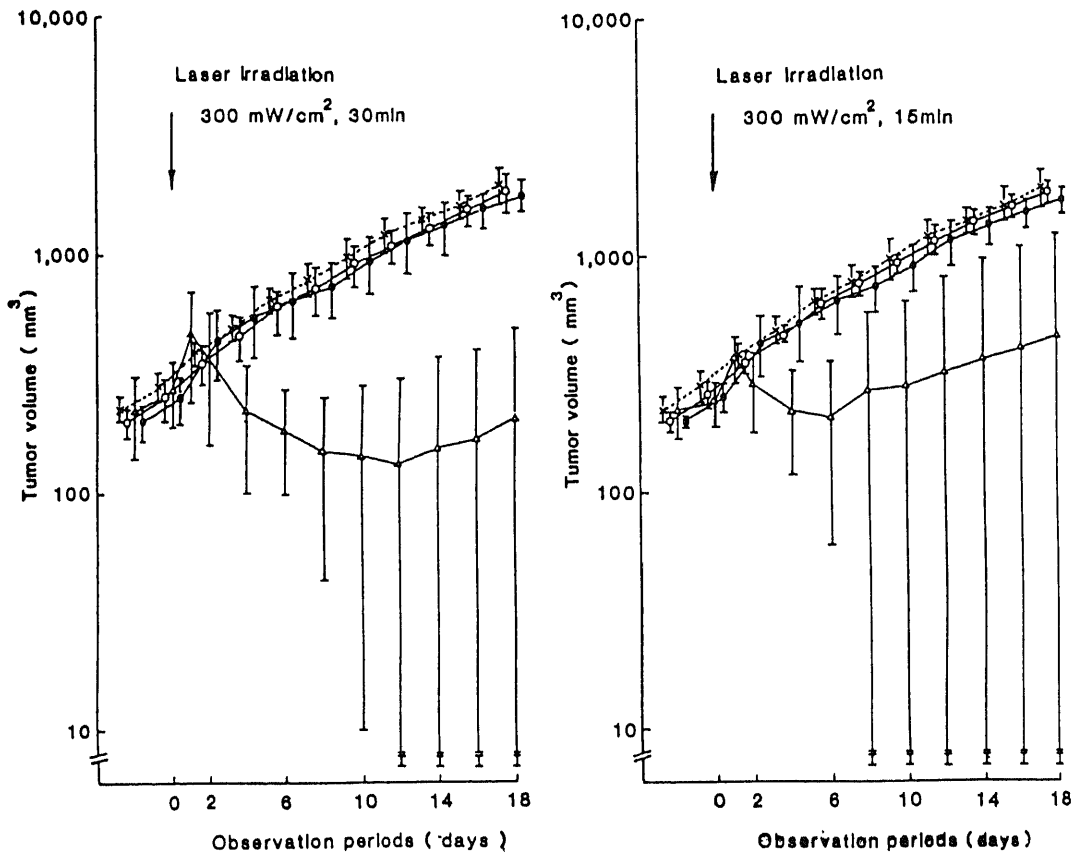


Fig. 9. Photodynamic effect of HpD and argon-dye laser (630 nm) on growth of KK-47 bladder cancer cell transplanted into nude mice. (×), control; (○), HpD; (●), argon-dye laser; (△), HpD & argon-dye laser. Mean value  $\pm$  S.E.M. from 6 experiments.

Table 3. Antitumor effects of PDT using argon-dye laser and gold vapor laser on KK-47 tumors transplanted into nude mice

	Irradiation time (min)	CR ratio at a 18-day follow-up period	Average CR time (days) (Mean $\pm$ SD)
Argon-dye laser			
Output power	15	2/6 (a')	13.0 $\pm$ 1.40 (a)
300mW/cm <sup>2</sup>	30	3/6 (b')	12.0 $\pm$ 2.00 (b)
Gold vapor laser			
Output average power	15	5/6 (c')	10.2 $\pm$ 1.79 (c)
150mW/cm <sup>2</sup>	30	6/6 (d')	7.5 $\pm$ 1.22 (d)

ANOVA (analysis of variance)

followed by Duncan's multiple comparison procedure

(a) vs (d)  $p < 0.05$

(b) vs (d)  $p < 0.05$

(c) vs (d)  $p < 0.05$

Fisher exact probability test

(a') vs (d')  $p < 0.05$

照射では平均  $13.0 \pm 1.40$  日 (a) にて 6 匹中 2 匹 (a') に CR が認められたにすぎなかった。CR 率において a' と d' の間に 5% の危険率で有意差が認められ、また CR 所要日数についても a と d, b と d, c と d の間に 5% の危険率で有意差が認められた (表 3)。

## 考 察

各種レーザーより発振されるレーザー光の波長は発振媒体により異なる。この波長の異なるレーザー光は生体に対しても相異なる作用をおよぼすことはよく知られている。また、レーザー光の各種物質における透過性も波長により大きく左右されるといわれている。すなわちレーザー光の透過性は、同一検体、同一条件下では、個々のレーザー光の波長により決定されるといわれている。Goldman ら<sup>19)</sup>は光の各波長における皮膚の吸収係数と光消散長とを算出し、Nd:YAG レーザー光 ( $1.06 \mu\text{m}$ ) では光消散長は比較的長く、CO<sub>2</sub> レーザー光 ( $10.6 \mu\text{m}$ ) ではきわめて表層で光のほとんどが吸収されてしまうと述べている。生体では含有色素、水などによるレーザー光の吸収が大きい因子となっている。大多和ら<sup>19)</sup>は ADL の赤色光 (630 nm) とアルゴンレーザーの緑色光 (514.5 nm) との組織透過性を比較し、後者は前者に比し、組織 (ヘモグロビン) に大きく吸収され、透過しにくいと述べている。また、同様に米川ら<sup>20)</sup>も、マウス移植腫瘍を用いた実験系で 514.5 nm のアルゴンレーザー光は深さ 3~4 mm で約 1% に、636 nm のレーザー光は深さ 5~7 mm で約 1% に減衰すると述べている。本研究では、レーザー光の発振様式マルチモードパルス波 (GVL) と連続波 (ADL) と異なっているが、628 nm (GVL) と 630 nm (ADL) とほぼ近似した波長の赤色光を用い、両レーザー光の組織透過性の比較、並びに GVL 光の組織深達性について分光学的に検討を行った。さらに両レーザー光と HpD を使用した PDT 効果をヌードマウス移植腫瘍において比較検討した。

現在のところ内外の文献において、GVL を用いた PDT 効果について報告は極めて乏しく、さらに GVL と ADL を用いた PDT 効果の比較についての発表は極めて少ない。Cowled ら<sup>25)</sup>はマウス移植腫瘍を用いて、HpD 50 mg/kg 注射後 24 時間に  $1.0 \sim 2.5 \text{ J/m}^2 \times 10^{-2} \text{ g}$  の光エネルギー量で PDT を行い、50% 再増殖所要日数の比較上 ADL と GVL との間に差は認められなかったと報告しているにすぎない。Cowled ら<sup>25)</sup>の方法は、極めて大量の HpD を使用していること、また用いられた抗腫瘍効果判定法の精度が低いと考えられることや、臨床成績を考える上で実際的でないなど、本研究と同列に比較することができない。また

Mckenzie ら<sup>26)</sup>は、彼らの GVL システムでは、臨床上必要レベルの出力をファイバー先端で発振するには GVL はよい励起光源ではあるが、同一波長、出力では、GVL と ADL では生物学的効果はほぼ同じようであると報告している。本研究においては、時間当たり高いエネルギーを発振する金蒸気レーザーの組織内深達度を分光学的に研究すると共に、移植腫瘍を用いて ADL と GVL とを同じ光量において PDT を行い、CR という臨床上有用なパラメーターを効果判定に用い、PDT 後 60 日間再発を認めないかどうかの経過観察をも含めて検討を行った。本研究で用いた方法はこのような抗腫瘍効果を完全治癒の観点からみた有意義な実験法と考えられよう。

組織透過性の比較にパラメーターとして用いた光消散長は、検体が均質な組成を持つ場合に適切なものである。本実験で用いられた家兎耳介は、正常の血流を有するが、皮膚に色素を欠き、一般的な腫瘍に近いものとして用いられた。両レーザー光の照射は、同一の検体について照射技術を同一条件にして比較検討を行った。本試料ではレーザー光の出力  $100 \text{ mW}/20 \text{ mm}^2$  において、GVL 光は ADL 光の約 3.3 倍大きい光消散長を示すことが判明した (図 4)。

HpD 含有および HpD 非含有培養細胞を用いた laser flash photolysis 実験の比較では、ピーク出力の高い excimer laser 光 1 パルス照射により、HpD に対して回復時間  $240 \mu \text{ sec}$  の光透過の増大が認められた (図 5)。これは excimer laser 照射によって HpD の高密度励起状態が過渡的に発生したものと考えられ、この透過光の増大は伊藤ら<sup>21)22)</sup>がのべている transient photobleaching として表現される。一方、GVL ではくり返し 10 kHz、パルス幅 50 nsec としてパルスエネルギー  $20 \mu \text{ J}$ 、ピーク出力 400 W となり、ADL 200 mW の場合と比較して同じ時間内に集中するエネルギーが 2000 倍大きくなる。光の励起過程を考えるとある特定波長を吸収できる分子には単位面積当りで限界がある。GVL の場合、時間に関して高密度励起となっているのでその波長を吸収できる遷移がおこってしまい、その波長に関しては吸収がおこらない。つまり透明状態となることが考えられる。しかし、時間当たりのエネルギーの低い ADL 照射では励起過程は同じようおこっているが、励起状態からの緩和が次々におこり、再び励起 (吸収) できるようになるので透明状態はおこらないと推定される。また生体では、ヘモグロビン、ミオグロビン、その他の 630 nm に吸収帯をもつ色素が含まれ、GVL 光励起により HpD と同様な photobleaching が起こることが推定され、組織内深達度が増強されるものであろう。さらに我々は GVL 光の組

織透過性に対する効果のみる一方法として、HpD 静注後の家兎肝切片を用い、two-laser excitation 実験を行った。両レーザー併用照射後、40 msec まで透過光は漸次上昇し、以後単独照射時の相加値より大きい閾値に達した (図 7 (a))。この結果は、前述の実験において示唆された透明状態の発現を支持するものと考えられた。また、図 7 (b) で示されるように、HpD 含有の有無にかかわらずほぼ同様な現象が認められた。肝は HpD 親和性の高い臓器であるが<sup>23)</sup>、肝内にはヘモグロビン、ミオグロビン、その他の色素が多く、これらの色素にも高密度励起状態が発生し、その結果同様の透過光の増大が得られたものと推定された。家兎肝切片を用い、両レーザー併用照射時パワーメーターによって測定された透過光の結果 (表 2) も GVL 光照射により肝内に高密度励起状態をきたし、その結果、ADL 光の組織内透過性も亢進したことを示唆するものと考えられた。さらにヌードマウス移植腫瘍に対する PDT 効果の比較で認められた GVL 光の有用性 (図 8) は、組織深達性の実験をも支持するものであろう。以上述べたごとく GVL 光にみられた平均出力 100 mW/20 mm<sup>2</sup> 以上における高い組織深達性は、2 cm 以上の比較的大きな腫瘍にも CR が充分期待されうること示唆するものと考えられた。また、出力に応じて、照射時間を短縮することも可能であり、GVL を用いることにより PDT の臨床的有用性を一段と高めうるものと考えられた。

## 結 論

GVL 光と ADL 光の組織深達性および HpD を利用した光力学的抗腫瘍効果を、KK-47 細胞、家兎耳介、家兎肝臓切片およびヌードマウス移植腫瘍を用いて検討し、以下の成績が得られた。

1. 家兎耳介を用いて GVL 光と ADL 光の組織透過性を光消散長で比較し、約 100 mW/20 mm<sup>2</sup> の入射光強度では GVL 光は ADL 光の約 3.3 倍大きい光消散長を示した。

2. HpD 含有および非含有 KK-47 細胞に対して laser flash photolysis system を用いた実験では、excimer laser 波長 308 nm, 50 mJ の 1 パルス照射により、HpD 含有 KK-47 細胞において、回復時間 240 μ sec に亘り光透過率に増大が認められた。一方、HpD 非含有 KK-47 細胞では、光透過率に増大は認められなかった。

3. 試料として HpD 含有あるいは非含有家兎肝切片に対して ADL と GVL を含む two-laser excitation system を用いた実験では両レーザー併用照射時には、それぞれ GVL 平均出力 450 mW, ADL 出力 1

W 単独照射時の相加値より大きな透過光強度を、またパワーメーターを用いた測定でも、両レーザー併用時には、透過光は単独照射時の相加値の約 3 倍大であった。

4. 実験的移植腫瘍を用いた温熱効果の認められないレーザー出力における光力学的抗腫瘍効果の検討において、GVL 150 mW/cm<sup>2</sup>, 15 分照射群では CR=5/6 (CR 所要日数 10.2±1.79 日), 30 分照射群では CR=6/6 (7.5±1.22 日) および ADL 300 mW/cm<sup>2</sup>, 15 分照射群では CR=2/6 (13.0±1.40 日), 30 分照射群では CR=3/6 (12.0±2.00 日) であった。CR 率および CR 所要日数において、GVL 150 mW/cm<sup>2</sup>, 30 分照射群と ADL 300 mW/cm<sup>2</sup>, 15 分照射群の間に 5% の危険率で有意差が認められた。

5. 以上の分光学的検討および抗腫瘍効果の実験より、連続波の ADL とは異なり、時間当りのエネルギー強度の大きいパルス波を発振する GVL 光照射によって高密度励起状態の発生が示唆された。すなわち、組織内光深達性が ADL に比し大きく、抗腫瘍効果も有意に大きいことが示された。これらの成績は光力学的癌治療効果増強に GVL が有用であることを示唆するものと考えられた。

## 謝 辞

欄筆するに当り終始御懇篤な御指導、御校閲を賜った恩師久住治男教授に深謝致します。本研究の遂行にあたり貴重な御助言ならびに御協力をいただいた金沢大学薬学部薬品物理化学教室、伊藤道也教授ならびに谷本能文助教授に深謝致します。なお、推計学処理につき御指導を賜った本学衛生学教室橋本和夫教授に感謝の意を表します。本論文の要旨は第 73 回日本泌尿器科学会総会および第 44 回日本癌学会総会において発表した。また、本研究は文部省科学研究費補助金一般研究 (A) 課題番号 58440065, および一般研究 (A) 課題番号 60440075, さらに試験研究 (I) 課題番号 61870113 の補助をうけたもので、付記して謝意を表する。

## 文 献

- 1) 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).
- 2) Kelly, J. F., Snell, M. E. & Berenbaum, M. C.: Photodynamic destruction of human bladder carcinoma, *Brit. J. Cancer*, **31**, 237-244 (1975).
- 3) Jocham, D., Staehler, G., Chaussy, C., Hammer, C. & Löhrens, U.: Laserbehandlung von Blasen-tumoren nach Photosensibilisierung mit Hämatoporphyrin Experimentelle Erfahrungen,

Urologe A, suppl., 20, 340-343 (1981).

4) Tsuchiya, A., Obara, N., Miwa, M. Ohi, T., Kato, H. & Hayata, Y.: Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the diagnosis and treatment of bladder cancer. *J. Urol.*, 130, 79-82 (1983).

5) Hisazumi, H., Misaki, T. & Miyoshi, N.: Photoradiation therapy of bladder tumors. *J. Urol.*, 130, 685-687 (1983).

6) Hisazumi, H., Miyoshi, N., Naito, K. & Misaki, T.: Whole bladder wall photoradiation therapy for carcinoma in situ of the bladder: A preliminary report. *J. Urol.*, 131, 884-887 (1984).

7) Hisazumi, H., Ueki, O., Miyoshi, N. Nishino, A. & Nakajima, K.: Photodynamic inactivation of in vitro cultivated human bladder cancer cells (KK-47) treated with hematoporphyrin derivative (HpD) and argon-dye laser light., *Photochem. Photobiol.*, 5, 47-48 (1983).

8) 三崎俊光, 内藤克輔, 久住治男: スードマウス移植腫瘍を用いた photoradiation therapy の基礎的研究. 第 43 回日本学会総会記事, 447 (1984).

9) Miyoshi, N., Hisazumi, H., Ueki, O. & Nakajima, K.: Cellular binding of hematoporphyrin derivative in human bladder cancer cell line: KK-47. *Photochem. Photobiol.*, 39, 359-363 (1984).

10) 久住治男, 上木 修, 熊木 修, 内藤克輔, 三崎俊光: 表在性膀胱腫瘍および上皮癌のヘマトポルフィリン誘導体とレーザー光線による光化学療法. 癌の臨床, 31, 697-703 (1985).

11) 久住治男, 三崎俊光, 山本 肇, 上木 修他: 表在性膀胱腫瘍に対する光化学療法の問題点とその対策. 日本レーザー医学会誌, 5, 133-135 (1985).

12) 久住治男, 内藤克輔, 山本 肇: レーザーを用いた膀胱癌の光線力学的治療. 日本レーザー医学会誌, 6, 23-29 (1985).

13) 内藤克輔, 久住治男, 鹿子木基二, 加藤正博, 中嶋和喜, 塚原健治, 小林徹治, 黒田恭一, 松原藤継: ヒト腎癌および膀胱癌由来培養細胞株 (KH-39, KN-41 および KW-103) の樹立とその性状. 日泌尿会誌, 73, 1019-1031 (1982).

14) 久住治男, 鹿子木基二, 中嶋和喜, 小林徹治, 塚原健治, 内藤克輔, 黒田恭一, 松原藤継: ヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 の生物学的特性について. 日泌尿会誌, 70, 485-494 (1979).

15) 小林徹治: ヒト膀胱癌由来培養細胞 (KK-47,

KW-103) および非悪性移行上皮由来培養細胞 (HCV-29) の電顕的観察. 日泌尿会誌, 73, 294-307 (1982).

16) 田谷 正, 小林徹治, 塚原健治, 打林忠雄, 内藤克輔, 久住治男, 黒田恭一: ヒト悪性腫瘍の組織培養. 日泌尿会誌, 68, 1003-1010 (1977).

17) 桜井靖久, 菊知 真: レーザー光の生体への作用機序. レーザー医学, 基礎と臨床 (渥美和彦編), 27-40 頁, 中山書店, 東京, 1980.

18) Goldman, L. & Rockwell, R. J., Jr.: *Lasers in Medicine*. Gordon & Breach, New York, London & Paris, 1971.

19) 大多和正樹, 会沢勝夫, 加藤治文, 小野寿太郎, 米山一男, 篠原秀樹, 高橋秀暢, 伴野隆久: レーザー光線の組織透過性に関する基礎的研究. 現代の診療, 24, 689-693 (1982).

20) 米川元樹, 佐野文男, 葛西洋一, 西坂 剛, 黒田寛人: レーザー光化学治療における 2, 3 の問題点. 厚生省がん研究「HpD とクリプトン・イオンレーザーによる蛍光診断と HpD とアルゴン・ダイレーザーによる光学的治療」班会議記事, 1-3 (1984).

21) Tanimoto, Y., Udagawa, H., Katsuda, Y. & Itoh, M.: Magnetic field effects on the photolysis of p-benzophenone derivatives in sodium dodecyl sulfate micells. *J. Chem. Phys.*, 87, 3976-3982 (1983).

22) 谷本能文, 高山昌也, 伊藤道也, 三好憲雄, 久住治男: レーザー分光法によるヘマトポルフィリン類の励起状態の研究. 第 25 回光化学討論会, 399-400 (1984).

23) Jan Folkvard, E., Stein, S., Johan, M., & Terje, C.: Tumorlocalizing and photosensitizing properties of the main components of hematoporphyrin derivative, *Cancer Res.*, 44, 482-486 (1984).

24) Ovejera, A. A., Houchens, D. P., & Barker, A. D.: Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice., *Ann. Clin. Lab. Science*, 8, 50-56 (1978).

25) Cowled, P. A., Grace, J. R., Forbes, I. J.: Comparison of the efficacy of pulsed and continuous-wave red laser light in induction of photocytotoxicity by haematoporphyrin derivative, *Photochem. Photobiol.*, 39, 115-117 (1984).

26) McKenzie, A. L. and Carruth, J. A. S.: A comparison of gold-vapor and dye lasers for photodynamic therapy., *Lasers in Med. Sci.*, 1, 117-120 (1986).

27) Dougherty, T. J., Thoma, R. E., Boyle, D. G. & Weishaupt, K. R.: Photoradiation therapy of malignant tumors. In R. Pratesi & C. A. Sacchi

(eds.), Role of the Laser. "Lasers in Photomedicine and Photobiology", 67-75, Springer-Verlag. New York, 1980.

**Comparison of Gold Vapor and Argon-dye Laser Light in terms of Potential Usefulness in Photodynamic Therapy** Hajime Yamamoto, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **96**, 1237—1250 (1987)

**Key words:** gold vapor laser, argon-dye laser, hematoporphyrin derivative, photodynamic therapy

#### Abstract

A pulsed gold vapor laser (GVL, 628 nm) was spectroscopically compared with a continuous wave argon-dye laser (ADL, 630 nm) in terms of tissue penetration and anticancer effects. Using living white rabbit auricles receiving a normal blood supply without hematoporphyrin derivative (HpD), the extinction length (L) of the GVL light was significantly increased with increasing output power from approximately 10 to 100 mW/20 mm<sup>2</sup>, but no increase in L was observed with ADL. At a light intensity of approximately 100 mW/20 mm<sup>2</sup> on the auricle surface, the L of the GVL was 3.3 times larger than that of the ADL. Using KK-47 bladder cancer cells with or without HpD, the high density excitation of intracellular HpD induced by the high peak power of an excimer laser resulted in a transient increase in the transmission rate of Xe-lamp light with a recovery time of 240  $\mu$  sec. However, KK-47 cells without HpD showed no acceleration of the transmission rate. In a two-laser excitation study using the GVL, ADL and liver sections with or without HpD, a remarkable increase in the transmission rate and photobleaching was observed. This increase may be due to the high density excitation of HpD, hemoglobin and other pigments incorporated into the liver which was evoked by high peak power and high repetition rate of GVL light. In a comparative study of photodynamic therapy (PDT) with HpD for the nude mouse tumor, the complete response (CR) rate and number of days needed to achieve CR in the GVL groups (average output power, 150 mW/cm<sup>2</sup>, 9 J/cm<sup>2</sup>/min) were significantly superior to those in the ADL groups (output power, 300 mW/cm<sup>2</sup>). The above spectroscopical study and photodynamic anticancer study strongly suggest the potential usefulness of GVL to increase PDT tumor destruction.