



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1682号
学位記番号	第1199号
氏名	益田 秀之
授与年月日	平成 31年 3月 25日
学位論文の題名	Dual wavelength 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy using a novel flexible light-emitting diode unit (新たなフレキシブルLEDユニットを用いた複数波長による5-アミノレブリン酸光線力学療法) J Dermatol Sci. (in press)
論文審査担当者	主査： 山崎 小百合 副査： 芝本 雄太, 森田 明理

論文内容の要旨

【目的】

光線力学療法 (PDT) は、日光角化症、基底細胞癌、ボーエン病、ニキビ等の各種皮膚疾患に対する非侵襲的治療として期待されている。本治療には光増感剤および可視光が用いられるが、皮膚科領域においては、光増感剤として 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) およびメチルアミノレブリン酸が使用されている。これら光増感剤は、それ自体では吸光特性を示さないが、標的細胞に取り込まれプロトポルフィリン IX (PpIX) 等のポルフィリン類に代謝されることで、410nm、510nm、545nm、580nm、630nm の 5 つのピーク波長を有する吸光スペクトルを示す。一般的に皮膚科の PDT においては、635nm 周辺の赤色と 400nm 周辺の青色が利用されている。635nm は生体への深達性は高いものの、吸光係数が低いため治療に長い時間を要す。一方、410nm は吸光係数は最も高いものの、生体への深達性が最も低いため深在性の疾患には適していない。これまで、赤色と青色のみが使用されてきたが、他のピーク波長を含めた複数の波長を組み合わせることで PDT 効率の向上が期待される。発光ダイオード (LED) は、比較的自由に波長を選択できることから、複数波長用照射光源に適している。また、対象疾患は顔面や頭部などの曲面に頻発するが、均一な照射を行うためにフレキシブル性を有し患部へ貼りつけられる形状が望ましい。そこで我々は、複数波長照射が可能なフレキシブル型 LED を用い PDT の効率向上に向けた研究を行った。

【方法】

HaCaT 細胞に 5-ALA (1 mM) を添加し 5%CO₂、37°C にて 4 時間培養した。その後、5-ALA を除去、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に置換し、プレート型 LED を用い 405 nm、505 nm、545 nm、570 nm、635 nm の単一波長照射もしくは複数波長のシーケンシャル照射を行いフローサイトメーターにて活性酸素を測定した。また、照射後 5%CO₂、37°C にて 18 時間培養し、XTT アッセイにて細胞生存率を測定した。次に、ヌードマウス (CAnN.Cg-Foxn1nu) の側腹部に COLO679 細胞 (2 × 10⁶ 個) を接種し、13 日後に腫瘍の長径が 5 ~ 7mm に拡大していることを確認した。5-ALA (250 mg/kg) を腫瘍へ直接投与し、4 時間後にフレキシブル型 LED および比較対照としてプレート型 LED を用い 405 nm、635 nm、405 nm + 505 nm にて 50J/cm² 照射した。その後 21 日間、ノギスを用い腫瘍の長径、短径を測定した。照射前後での腫瘍体積の比を相対腫瘍体積と定義し評価した。

【結果と考察】

HaCaT 細胞を用いた単一波長照射における照射量—生存率曲線は、PpIX の吸光係数に概ね対応していた。複数波長照射における相乗効果を評価するために、基準線 (相乗効果がない場合に、照射量—生存率曲線と一致する線) を定義した。405 nm + 505 nm、405 nm + 545 nm および 505 nm + 545 nm の組合せにおいて、照射量—生存率曲線は基準線を大きく下回っており、405 nm + 505 nm において最も大きな相乗効果が確認された。また、活性酸素のレベルも 405 nm + 505 nm において、対照および 405 nm 単一照射に比べ有意に高かった。

マウスを用いた PDT においては、全ての照射群において、相対腫瘍体積が対照群に比べ縮小していた。405 nm + 545 nm 照射群においては、照射 15 日後まで腫瘍が消失していた。照射 21 日後の相対腫瘍体積はそれぞれ、13.0 (405 nm, プレート型)、13.0 (405 nm, フレキシブル型)、3.8 (405 nm + 505 nm, プレート型)、0.3 (405 nm + 505 nm, フレキシブル型)、18.5 (635 nm, プレート型)、10.9 (635 nm, フレキシブル型) であった。これらの結果より、複数波長照射による PDT は、治療効果を向上させるための効率的な方法であることが示唆された。また、フレキシブル型 LED は曲面を有する疾患部に対し、均一な照射手段として期待される。

論文審査の結果の要旨

【研究目的】 光線力学療法 (PDT) は、日光角化症、基底細胞癌、ボーエン病等の各種皮膚疾患に対する非侵襲的治療として期待されている。皮膚科領域においては、光増感剤として 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) およびメチルアミノレブリン酸が使用されている。光増感剤は、プロトポルフィリン IX (PpIX) 等のポルフィリン類に代謝されることで、410nm、510nm、545nm、580nm、630nm の 5 つのピーク波長を有する吸光スペクトルを示す。皮膚科の PDT においては、赤色と青色のみが使用されてきたが、他のピーク波長を含めた複数の波長を組み合わせることで PDT 効率の向上が期待される。また、対象疾患は顔面や頭部などの曲面に頻発するが、均一な照射を行うためにフレキシブル性を有し患部へ貼りつけられる形状が望ましい。そこで、複数波長照射が可能なフレキシブル型 LED を用い PDT の効率向上に向けた研究を行った。

【方法】 HaCaT 細胞に 5-ALA (1 mM) を添加し 5%CO₂、37°C にて 4 時間培養した。その後、5-ALA を除去 PBS に置換し、単一波長照射もしくは複数波長のシーケンシャル照射を行いフローサイトメーターにて活性酸素を測定した。また、照射後 5%CO₂、37°C にて 18 時間培養し、XTT アッセイにて細胞生存率を測定した。次に、ヌードマウスに COL0679 細胞を接種し、腫瘍の長径が 5~7mm に拡大していることを確認した。5-ALA (250 mg/kg) を腫瘍へ直接投与し、4 時間後にフレキシブル型 LED およびプレート型 LED を用い 405 nm、635 nm、405 nm + 505 nm にて 50J/cm² 照射した。その後 21 日間、腫瘍長径、短径を測定した。照射前後での腫瘍体積の比を相対腫瘍体積と定義し評価した。

【結果と考察】 HaCaT 細胞を用いた単一波長照射における照射量-生存率曲線は、PpIX の吸光係数に概ね対応していた。複数波長照射における相乗効果を評価するために、基準線 (相乗効果がない場合に、照射量-生存率曲線と一致する線) を定義した。405 nm + 505 nm、405 nm + 545 nm および 505 nm + 545 nm の組合せにおいて、照射量-生存率曲線は基準線を大きく下回っており、405 nm + 505 nm において最も大きな相乗効果が確認された。また、活性酸素のレベルも 405 nm + 505 nm において、対照および 405 nm 単一照射に比べ有意に高かった。マウスを用いた PDT においては、全ての照射群において、相対腫瘍体積が対照群に比べ縮小しており、405 nm + 505 nm、フレキシブル型で最も縮小していた。これらの結果より、複数波長照射による PDT は、治療効果を向上させるための効率的な方法であることが示唆された。また、フレキシブル型 LED は曲面を有する疾患部に対し、均一な照射手段として期待される。

【審査内容】 約 15 分の論文内容のプレゼンテーション後、初めに主査の山崎教授から、フレキシブル型 LED の構造上の特徴、本研究成果の皮膚癌以外への応用の可能性、動物実験における光照射方法等に関して 7 項目の質問がなされた。次に、第一副査の芝本教授から、活性酸素の細胞死誘導機序、生存率曲線の解釈、光免疫療法との違い等についての 10 項目の質問があった。最後に森田教授から、光線療法の実用疾患、今後の光線療法の応用展開、PDT と放射線治療の使い分けに関して 3 項目の質問がなされた。これらの 質問に対して 申請者からはおむね適切な回答が得られたことから、学位論文の主旨を十分理解しているとともに専門領域 (皮膚科学) の知識を有すると判断された。本研究は複数波長を用いた新たな PDT に関するもので、今後の皮膚癌治療を考える上で有意義な知見を得たと考えられる。よって本論文の著者には博士 (医学) の学位を授与するに値すると判断した。

論文審査担当者 主査 山崎 小百合 副査 芝本 雄太、森田 明理