

氏 名	木 村 誠 吾
(ふりがな)	(きむら せいご)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 号
学位審査年月日	平成30年7月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Assessment of safety of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in rat brain (ラット脳における 5-アミノレブリン酸を用いた光線力学療法的安全性評価)
論文審査委員	(主) 教授 荒 若 繁 樹 教授 鳴 海 善 文 教授 近 藤 洋 一

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《諸 言》

光線力学療法 (ALA-photodynamic therapy; ALA-PDT) は光線力学的診断 (photodynamic diagnosis; PDD) を応用した治療方法で、悪性神経膠腫や髄膜腫などの脳腫瘍に対して考案されている。第二世代の光増感剤である 5-アミノレブリン酸 (aminolevulinic acid; ALA) は、2013 年に悪性神経膠腫において術中診断薬として保険承認されている。経口投与された ALA は、細胞内のヘム合成系経路により protoporphyrin IX (PpIX) に代謝され、細胞内に蓄積される。ALA-PDT は、蓄積された PpIX が 635nm の励起光の照射による物理化学反応によって細胞傷害を引き起こすことを利用した治療法であるが、悪性神経膠腫に対する報告はほとんどない。ALA は肝臓を含む様々な器官においても PpIX に代謝され、ABCG2 などのトランスポーターによって細胞内から血中に放出される。高線量の励起光照射を行った場合、血液中に存在する PpIX により正常血管内皮細胞

を損傷する可能性があり、血液脳関門(blood brain barrier; BBB)の破壊をもたらし、脳浮腫および脳傷害を引き起こす可能性が指摘されている。

#### 《目 的》

高用量の ALA 投与後の励起光照射が、BBB 損傷を惹起し、それによって脳細胞障害や脳浮腫が起こる可能性を検討する。

#### 《方 法》

開頭時の穿孔による振動や摩擦熱による BBB 損傷を防ぐため、Fischer rat に対して非開頭下に励起光を照射することで、脳に到達する励起光が約 50%減衰することを確認し「非頭蓋開頭光照射モデル」を作成した。

Fischer rat に麻酔を行った後、0, 30, 60, 90, 120, 160, 200 及び 240mg/kg の ALA 溶解液を腹腔内投与し、投与 4 時間後より照射を行った。手順は、rat 頭部を定位固定枠で固定し、正中線から右側 3.5mm の部を中心に皮膚切開後、右頭蓋骨上に開窓(7mm×7mm)したゴムシールドを置き、頭蓋骨上 3cm の距離から 0(control), 100 及び 400J/cm<sup>2</sup> の励起光 (635nm) を照射した。神経学的重症度は、modified neurological severity score で評価した。光照射の 48 時間後に 2%エバンスブルー1ml を陰茎静脈経由で注入した。エバンスブルーの注射の 30 分後に rat を 10%ホルマリンで灌流固定した。各々の脳を取り出し、脳内のエバンスブルー染色を肉眼的に確認し、各脳を 2mm スライスで 6 つに切断した。各スライス上でエバンスブルーによって染色された領域を追跡した。それぞれのスライドにおける面積を測定し、各スライスの面積から容積を算出した。正中線から 3.5mm 外側の皮質厚を、照射側大脳半球と非照射側大脳半球との間で比較した。組織学的所見は H.E. 染色、Kluver-Barrera 染色、および TUNEL 染色によって評価した。

#### 《統 計》

統計分析は、Excel 2007 ソフトウェア(Microsoft、Redmond、WA、USA)を用いて行っ

た。統計学的有意差をスチューデントの t 検定に従って解析した。P 値<0.05 を有意と見なした。

## 《結 果》

### ●神経学的評価

100 J/cm<sup>2</sup> の励起光照射処置を行った群では、240mg/kg の ALA 投与を行った場合に 200mg/kg 以下のものと比較して神経学的症状が有意に悪化した。400 J/cm<sup>2</sup> の励起光照射処置を行った群では、120mg/kg 以上の ALA 投与を行った場合に神経学的症状が有意に悪化した。

### ●BBB 破壊の評価

エバンスブルーの漏出は、ALA 90mg/kg 以上を投与した群において 100J/cm<sup>2</sup> 以上の励起光照射処置を行った場合に観察された。また、ALA 200mg/kg 以上を投与した群において、160mg/kg 以下のものと比較して 400J/cm<sup>2</sup> の励起光照射で処置した場合に、エバンスブルーで染色された脳容積が有意に増加した。

### ●大脳皮質損傷の評価

照射された側の皮質厚は、ALA 240mg/kg を投与した群において 400J/cm<sup>2</sup> の励起光を照射処置した場合に非照射側と比較して有意に厚かった。

### ●組織学的所見

ALA 240mg/kg を投与した群において 400J/cm<sup>2</sup> の励起光照射で処置した rat では、微小血栓および微小出血を伴った脳浮腫が明らかであった。ニューロンおよび軸索は顕著に損傷し、ALA 200mg/kg 以上を投与した群において、400J/cm<sup>2</sup> で励起光照射を行った rat では、非照射側と比較してニューロン数が有意に低かった。

### ●大脳皮質における TUNEL 染色

照射された大脳半球は、ALA 240mg/kg を投与した群において 400J/cm<sup>2</sup> の励起光照射で処置した rat において非照射側と比較して TUNEL 陽性細胞数が有意に増加していた。

## 《考 察》

我々の実験結果から、ALA 濃度および励起光強度を増加させることによって、細胞損傷が起こるよりも前に、神経学的症状から始まる有害作用が認められることが示唆された。

ALA 投与下に強度な励起光照射を行った場合、血液中に存在する PpIX により活性酸素が生じることで正常血管内皮細胞が傷害されると考えられており、損傷した血管内皮細胞は BBB の破綻や微小血栓形成を引き起こし脳組織損傷が起こると考えられる。また我々の研究で観察された TUNEL 陽性細胞数の増加は、BBB の破綻により細胞内から漏出した PpIX の組織内への移行と励起光照射がアポトーシスを誘導することを示唆した。

有害作用を回避するためには、ALA 濃度および励起光強度を慎重に決定する必要があると考えた。

## 《結 論》

今回、ALA-PDT の安全閾値を調べることによって、ALA 濃度および励起光強度が BBB の破綻および正常脳組織の損傷を引き起こす重要な要因であることが示唆された。これら rat における正常脳に対する ALA 濃度および励起光強度の安全閾値の評価は、将来の悪性脳腫瘍に対する ALA-PDT の開発に寄与すると思われる。

## 論文審査結果の要旨

光線力学的診断(photodynamic diagnosis; PDD)は、悪性神経膠腫や髄膜腫などの脳腫瘍に対する手術中に使用される診断手段である。第二世代の光増感剤である 5-アミノレブリン酸(aminolevulinic acid; ALA)は、2013 年には悪性神経膠腫において術中診断薬として保険承認がなされている。経口投与された ALA は細胞内のヘム合成系経路により protoporphyrin IX(PpIX)に代謝され、細胞内に蓄積される。ALA を用いた光線力学療法(ALA-photodynamic therapy; ALA-PDT)は、蓄積された PpIX が 635nm の励起光の照射による物理化学反応によって細胞傷害を引き起こすことを利用した治療法である。ALA は肝臓を含む様々な器官においても PpIX に代謝され、細胞内から血中に放出されるため、高線量の励起光照射を行った場合、血液中に存在する PpIX により正常血管内皮細胞を損傷する可能性があり、頭蓋内病変に対する診断や治療においては血液脳関門(blood brain barrier; BBB)の破壊をもたらし、脳浮腫および脳傷害を引き起こす可能性が指摘されている。申請者は rat を用いた非頭蓋開頭光照射モデルを開発し、高用量の ALA 投与後の励起光照射が、BBB 損傷を惹起し、脳組織障害や脳浮腫を引き起こす可能性を検討した。実験結果から、ALA 濃度および励起光強度を増加させることによって細胞損傷が生じるが、それよりも低濃度の ALA 投与及び低い強度の励起光照射により神経学的症状から始まる有害作用が認められることが示された。副作用を予防するためには、ALA 投与量および光照射線量を慎重に考慮する必要があることを示唆した。申請者による rat 正常脳における ALA 投与量および励起光強度の安全閾値の評価は、悪性脳腫瘍に対する ALA-PDT の開発において重要な意味を持つものと判断する。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 21: 367-374, 2018