

細胞外光増感反応による心筋細胞の障害

2015 年度

小川 恵美悠

主 論 文 要 旨

報告番号	㊦ 乙 第	号	氏 名	小川 恵美悠
主 論 文 題 目 :				
細胞外光増感反応による心筋細胞の障害				
(内容の要旨)				
<p>本研究の目的は、光増感反応による頻脈性不整脈の電気伝導遮断治療すなわち光線力学アブレーションの実用化のため、心筋細胞を用いた <i>in vitro</i> 基礎実験により細胞外光増感反応による心筋細胞の障害を明らかにし、治療に有効な条件を推定することにある。著者は細胞外光増感反応による細胞膜障害により心筋の即時的な電気伝導遮断を、また細胞壊死によって永続的な遮断を行う熱的副作用を抑制できる治療を提案している。臨床における光増感反応条件を検討するため、即時的な電気伝導遮断に対応する (i) 数十 s から数 min の急性期の細胞電気生理学的障害、永続的な電気伝導遮断に対応する (ii) 亜急性期の細胞壊死、および (iii) アポトーシスなどの遅発性細胞死、の3つについて <i>in vitro</i> で実験を行った。</p> <p>数十 s から数 min の即時的な障害の応答を心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度計測によって明らかにした。細胞壊死発生までの時間は、タラポルフィンナトリウム濃度と放射照度が高くなるにつれて短くなったことから、細胞壊死発生までの時間は一重項酸素産生速度に依存することが示唆された。放射照度 30-290 mW/cm^2、タラポルフィンナトリウム濃度 10-30 $\mu g/ml$ の範囲では、光照射開始から 200-500 s で細胞壊死が発生した。96 ウェルプレート <i>in vitro</i> 実験系における光増感反応の進行を、蛍光および酸素分圧経時計測と分光測定によって明らかにした。この系では酸素供給が律速段階となり、放射照度 0.29 W/cm^2 では液面からの拡散によって反応が継続することを明らかにした。この実験系を用いて光増感反応から 2 h 後における心筋細胞の死細胞率をタラポルフィンナトリウム濃度 0-40 $\mu g/ml$、放射照射量 0-40 J/cm^2 の範囲で計測したところ、タラポルフィンナトリウム濃度が約 15 $\mu g/ml$ に細胞壊死発生の閾値があり、タラポルフィンナトリウム濃度と放射照射量が大いほど高い死細胞率が得られることが分かった。アルブミンとタラポルフィンナトリウムの結合率はアルブミン濃度に比例して高くなった。殺細胞効果は結合率とは比例関係になく、モル濃度比 0.3-1.2 を境にし、それより大きいと急激に殺細胞効果が減少した。溶液温度を 17°C から 37°C に上昇させることで、血清タンパクとタラポルフィンナトリウムの結合率が低下し、殺細胞効果が有意に上昇した。静脈注射後心筋細胞内にタラポルフィンナトリウムが蓄積することによる遅発性細胞死を評価するため、タラポルフィンナトリウムの心筋細胞への蓄積量と光増感反応 24 h 後の死細胞率を測定した。この結果蓄積量は、接触時間 60 min まで急激に増加し 120 min 以降飽和傾向が見られた。接触時間が 30 min 以上の条件で 24 h 後の死細胞率は 2 h 後と比較して有意に上昇した。</p> <p>以上の結果より、臨床における有効な治療条件を推定すると以下となった。(i) 1 か所 200-500 s の照射による電気伝導遮断は一括型アブレーションの運用に適合すると思われた。(ii)-a 細胞外光増感反応によって心筋細胞壊死が得られる 15 $\mu g/ml$ のタラポルフィンナトリウム濃度は、現状の認可投与量で達成できると推定された。(ii)-b アルブミン濃度比の大きい血液中では光増感反応の影響は小さく、心筋細胞周囲の間質液中では大きいと考えられた。(ii)-c インターベンション治療では温度変化による影響が問題とならないが、外科的な治療の場合は組織温度低下に注意する必要があると思われた。心筋細胞内へのタラポルフィンナトリウム蓄積量が 0.17 $\mu g/ml$ 以下であれば遅発性の治療域拡大が生じないと思われた。以上本研究では、光線力学アブレーション実用化のため細胞外光増感反応による心筋細胞の障害を明らかにし、治療に有効な光増感反応条件に関して論じた。</p>				

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Fundamental science and Technology	Student Identification Number	SURNAME, First name OGAWA, Emiyu
Title Damage of myocardial cell by extracellular photosensitization reaction		
Abstract The author studied the damage of myocardial cell by extracellular photosensitization reaction and prospected useful operational condition for electrical conduction block of tachyarrhythmia treatment, that is, photodynamic ablation. The immediate and permanent myocardium electrical conduction block by membrane damage and necrosis caused by extracellular photosensitization reaction has been proposed as tachyarrhythmia treatment to reduce thermal complications. To study the photosensitization reaction conditions which realize the immediate and permanent electrical conduction block, the author studied (i) acute electrophysiological damage of myocardial cell with range of several tens of seconds to several minutes; corresponding to immediate electrical conduction block capability, (ii) sub-acute myocardial cell death, and (iii) late myocardial cell death; corresponding to permanent electrical conduction block capability. Clinical photodynamic ablation conditions were discussed with the results of these studies <i>in vitro</i> . The immediate electrophysiological cell damage with range of several tens of seconds to several min was studied measuring intracellular Ca^{2+} concentration. The time for necrosis to occur was found to be 200-500 s. The author pointed out that the necrosis occurrence time depends on the singlet oxygen production rate, since the time decreased as the talaporfin sodium concentration and irradiance increasing in the following condition ranges; irradiance of 30-290 mW/cm ² , radiant exposure of 10-40 J/cm ² , and talaporfin sodium concentration of 10-30 µg/ml. The photosensitization reaction progress in a cell experimental system using 96 well plate was studied by fluorescence and dissolved oxygen measurements. The rate-controlling factor of photosensitization reaction was oxygen and the reaction continuity in this system was confirmed with 0.29 W/cm ² in irradiance. The sub-acute cell lethality of 2 h after the photosensitization reaction was measured with various talaporfin sodium concentration of 0-40 µg/ml and radiant exposure of 0-40 J/cm ² . The cell lethality increased with the concentration of talaporfin sodium, and the increase of radiant exposure. The photocytotoxicity threshold was found in 15 µg/ml in talaporfin sodium concentration. The sub-acute cell lethality 2 h after the photosensitization reaction increased as the temperature increased, and decreased drastically with the molar density ratio of albumin to talaporfin sodium increasing from 0.3-1.2. The talaporfin sodium uptake change and late cell lethality of 24 h after the photosensitization reaction was measured. The intracellular talaporfin sodium concentration was markedly increased from 0-60 min in incubation time with talaporfin sodium. The cell lethality was increased from 2 to 24 h in the time after the photosensitization reaction over 30 min in contact duration. From these results, the author obtained the following operational condition: (i) Electrical conduction block within 200-500 s might be conforming to a fixed mount type ablation. (ii)-a Talaporfin sodium concentration of 15 µg/ml is feasible under present clinical dose. (ii)-b Effect of photosensitization reaction would be small in blood that contains high albumin concentration, large in interstitial space that contains low albumin concentration. (iii) The therapeutic lesion extent would not occur under 0.17 µg/ml in intracellular talaporfin sodium concentration.		