

# 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

学位論文 博士 (工学)

細胞外光増感反応による心筋細胞の障害

2015 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

小川 恵美悠

# 主論文要旨

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)

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 *in vitro* 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 *in vitro* で実験を行った。

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  $30-290 \text{ mW/cm}^2$ 、タラポルフィンナトリウム濃度  $10-30 \text{ }\mu\text{g/ml}$  の範囲では、光照射開始から  $200-500 \text{ s}$  で細胞壊死が発生した。96 ウェルプレート *in vitro* 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  $0.29 \text{ W/cm}^2$  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  $0-40 \text{ }\mu\text{g/ml}$ 、放射照射量  $0-40 \text{ J/cm}^2$  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  $15 \text{ }\mu\text{g/ml}$  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き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  $17^\circ\text{C}$  から  $37^\circ\text{C}$  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。

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  $200-500 \text{ s}$  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  $15 \mu\text{g/ml}$  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  $0.17 \mu\text{g/ml}$  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。

## SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

### 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 *in vitro*.

The immediate electrophysiological cell damage with range of several tens of seconds to several min was studied measuring intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , radiant exposure of 10-40  $\text{J}/\text{cm}^2$ , and talaporfin sodium concentration of 10-30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . 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  $\text{W}/\text{cm}^2$  in irradiance. The sub-acute cell lethality of 2 h after the photosensitization reaction was measured with various talaporfin sodium concentration of 0-40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and radiant exposure of 0-40  $\text{J}/\text{cm}^2$ . The cell lethality increased with the concentration of talaporfin sodium, and the increase of radiant exposure. The photocytotoxicity threshold was found in 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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  $\mu\text{g/ml}$  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  $\mu\text{g/ml}$  in intracellular talaporfin sodium concentration.

# 目次

第1章 序論	1
1.1 緒言	1
1.2 本研究の目的と背景	1
1.3 本論文の構成	3
1.4 結言	4
参考文献	5
図表	9
第2章 心房性頻脈性不整脈に対する電気伝導遮断治療	11
2.1 緒言	11
2.2 心臓の拍動メカニズムと頻脈性不整脈	11
2.2.1 心筋細胞の構造と活動電位	11
2.2.2 心臓の構造と刺激伝導	12
2.2.3 心房性頻脈性不整脈	13
2.3 心房細動の病態と治療法	13
2.3.1 心房細動の病態と疫学	13
2.3.2 心房細動の治療法	14
2.4 カテーテルアブレーション	14
2.4.1 カテーテルアブレーションの原理と運用	15
2.4.2 高周波カテーテルアブレーションの課題	16
2.4.3 新しいカテーテルアブレーション	16
2.4 結言	18
参考文献	19
図表	26
第3章 光増感反応による治療	35
3.1 緒言	35
3.2 光増感反応	35
3.2.1 光増感反応の原理	35
3.2.2 光感受性薬剤	36
3.2.3 光増感反応による細胞障害	37
3.3 細胞内光増感反応を用いた光線力学的治療の適用と運用法	38
3.3.1 細胞内光増感反応による悪性腫瘍に対する光線力学的治療の運用法	38
3.3.2 細胞内光増感反応による光線力学的治療の課題	39
3.4 細胞外光増感反応	40
3.4.1 細胞外光増感反応による感染症に対する光線力学的治療	40

3.4.2 細胞外光増感反応による頻脈性不整脈に対する光線力学アブレーション	41
3.5 結言	41
参考文献	42
図表	45
<b>第4章 細胞外光増感反応による光線力学アブレーション</b>	<b>53</b>
4.1 緒言	53
4.2 細胞外光増感反応による頻脈性不整脈の電気伝導遮断治療の提案	53
4.3 細胞外光増感反応による光線力学アブレーションの原理と運用構想	54
4.4 細胞外光増感反応による光線力学アブレーション開発研究	55
4.4.1 細胞外光増感反応による生体反応	55
4.4.2 デバイスの開発	56
4.5 細胞外光増感反応による心筋細胞の障害：本研究の対象	57
4.6 結言	58
参考文献	59
図表	61
<b>第5章 細胞外光増感反応による心筋細胞の即時的応答</b>	<b>75</b>
5.1 緒言	75
5.2 心筋細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の経時的計測	75
5.2.1 実験方法	75
5.2.1.1 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化測定用プローブ物質	75
5.2.1.2 共焦点レーザー顕微システム	76
5.2.1.3 細胞外光増感反応中の心筋細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の経時的計測方法	77
5.2.2 実験結果	78
5.3 細胞内および細胞外光増感反応による即時的障害	78
5.3.1 実験方法	78
5.3.2 実験結果	78
5.4 細胞外光増感反応による心筋細胞の即時的細胞障害発生割合	80
5.4.1 実験方法	80
5.4.2 実験結果	80
5.5 細胞外光増感反応による心筋細胞の障害が生じるまでの時間	80
5.5.1 実験方法	80
5.5.2 実験結果	80
5.6 考察	81
5.6.1 細胞内光増感反応および細胞外光増感反応による即時的心筋細胞障害の比較	81
5.6.2 電気伝導性回復の可能性	82
5.6.3 細胞死発生発生までの時間の一重項酸素産生速度依存性	82
5.7 結言	82
参考文献	84



図表	85
<b>第6章 <i>in vitro</i> 実験系における光増感反応の進行と殺細胞効果</b>	<b>103</b>
6.1 緒言	103
6.2 光増感反応中のタラポルフィンナトリウム溶液温度	103
6.2.1 実験方法	103
6.2.1.1 96 ウェルプレートを用いた光増感反応実験系	103
6.2.1.2 光増感反応中のタラポルフィンナトリウム溶液温度計測	104
6.2.2 実験結果および考察	104
6.3 光増感反応中のタラポルフィンナトリウム蛍光	105
6.3.1 実験方法	105
6.3.2 実験結果	105
6.4 光増感反応による酸素およびタラポルフィンナトリウム消費	106
6.4.1 実験方法	106
6.4.1.1 光増感反応中酸素分圧測定系	106
6.4.1.2 酸素分圧計測	106
6.4.2 実験結果	107
6.5 心筋細胞における細胞外光増感反応の殺細胞効果	107
6.5.1 実験方法	107
6.5.2 実験結果	108
6.6 考察	109
6.6.1 <i>in vitro</i> 実験系における酸素環境と光増感反応進行	109
6.6.2 光増感反応の第一段階における考察	110
6.6.3 生体内酸素分圧による光増感反応進行の比較	111
6.6.4 放射照度による光増感反応効率の変化	112
6.6.5 殺細胞効果閾値	113
6.7 結言	114
参考文献	115
図表	117
<b>第7章 アルブミン濃度及び温度が殺細胞効果へ与える影響</b>	<b>137</b>
7.1 緒言	137
7.2 タラポルフィンナトリウムのアルブミン結合率	137
7.2.1 実験方法	137
7.2.2 実験結果	138
7.3 殺細胞効果のアルブミン結合率依存性	138
7.3.1 実験方法	138
7.3.2 実験結果	139
7.4 温度変化に伴う血清タンパク結合率	139
7.4.1 実験方法	139

7.4.2 実験結果	140
7.5 温度変化に伴う殺細胞効果への影響	140
7.5.1 実験方法	140
7.5.2 実験結果	141
7.6 考察	141
7.6.1 実験に使用したアルブミン濃度	141
7.6.2 結合率変化に伴う殺細胞効果と タラポルフィンナトリウムに吸収されたエネルギー	141
7.6.3 殺細胞効果に対する タラポルフィンナトリウムとアルブミンのモル濃度比依存性	142
7.6.4 温度上昇に伴った結合率低下による殺細胞効果変化	142
7.7 結言	143
参考文献	144
図表	145
<b>第8章 心筋細胞へのタラポルフィンナトリウム蓄積量と遅発性殺細胞効果</b>	<b>155</b>
8.1 緒言	155
8.2 接触時間に伴う心筋細胞へのタラポルフィンナトリウム蓄積量	155
8.2.1 実験方法	155
8.2.2 実験結果	156
8.3 接触時間に伴う遅発性心筋細胞障害	156
8.3.1 実験方法	156
8.3.2 実験結果	157
8.4 接触時間変化による細胞死機構への影響	157
8.4.1 実験方法	158
8.4.2 実験結果	158
8.5 考察	158
8.5.1 タラポルフィンナトリウムの心筋細胞への蓄積特性	158
8.5.2 タラポルフィンナトリウム接触時間の変化に伴う殺細胞効果への影響	158
8.5.3 光増感反応による細胞毒性閾値の比較	159
8.6 結言	159
参考文献	160
図表	161
<b>第9章 細胞外光増感反応による心筋細胞障害に関する総括的検討</b>	<b>169</b>
9.1 緒言	169
9.2 細胞外光増感反応による有効な心筋組織電気伝導遮断を達成する条件	169
9.2.1 <i>in vitro</i> 実験系における反応進行を考慮した定量評価	169
9.2.2 細胞壊死が発生するまでの時間と壊死の発生率	170
9.2.3 永続的な電気伝導遮断が達成可能な光増感反応条件の検討	170

9.2.4 即時的な電気生理学的障害発生の結果を用いた治療運用への拡張	171
9.3 細胞外光増感反応による心筋組織電気伝導遮断の安全性	172
9.3.1 タラポルフィンナトリウムの血清蛋白結合による細胞外光増感反応の効果	172
9.3.2 タラポルフィンナトリウム蓄積量による遅発性細胞障害領域拡大	173
9.4 本研究の limitation	174
9.5 検討の総括	174
9.6 結言	174
参考文献	175
図表	176
第 10 章 結論	<b>179</b>
付録	<b>181</b>
A 用語および略語説明	181
A.1 光照射および光計測に関する用語および記号説明	181
A.1.1 用語説明	181
A.1.2 記号説明	181
A.2 心房性頻脈性不整脈に関する略語説明	182
参考文献	183
著者論文目録	<b>185</b>
謝辞	

## 図表の目次

図 1-1	本論文の構成
表 2-1	各イオンの細胞内および細胞外濃度
図 2-1	心筋細胞の活動電位
図 2-2	心筋細胞の構造とイオンの流れ
図 2-3	心臓の電気伝導系
表 2-2	心房性頻脈性不整脈の分類、原因、日本での不整脈全体に占める出現頻度
表 2-3	心室性頻脈性不整脈の分類、原因、日本での不整脈全体に占める出現頻度
図 2-4	肺静脈隔離術に用いられる電気伝導遮断線
表 2-4	新しいアブレーションカテーテルの諸元
図 3-1	光増感反応のエネルギー機構
図 3-2	種々のポルフィリン化合物構造
図 3-3	ポルフィリンの化学構造
図 3-4	タラポルフィンナトリウムの化学構造
図 3-5	ベルテポルフィリンの化学構造
図 3-6	タラポルフィンナトリウムを $40 \text{ mg/m}^2$ 投与した後のヒト血漿中濃度変化
図 3-7	細胞内光増感反応および細胞外光増感反応とその適用
表 3-1	種々の癌に対するポルフィマーナトリウムを用いた光線力学的治療におけるレーザー照射条件
図 4-1	光増感反応を治療原理とする電気伝導遮断の構想
図 4-2	想定している治療のプロトコルとその原理
図 4-3	ラット心筋細胞におけるタラポルフィンナトリウム取り込みの顕微観察
図 4-4	細胞外光増感反応中における心筋細胞障害
図 4-5	<i>ex vivo</i> ラット心筋組織を用いた急性電気伝導遮断の実証実験配置
図 4-6	電気生理学的診断および組織標本観察による即時のおよび永続的電気伝導遮断効果の実証
図 4-7	<i>in vivo</i> カテーテルインターベンション下における電気伝導遮断効果の実証
図 4-8	レーザー試作装置写真
図 4-9	直射型レーザーカテーテルの先端内部構造
図 4-10	直射型レーザーカテーテル先端からの光照射の状態と強度分布
図 4-11	拡散型カテーテル先端からの光照射の状態およびカテーテルチューブの周囲方向への実測および計算による光強度分布
表 4-1	臨床応用に求められる条件

- 図 4-12 *in vivo* 治療状態を *in vitro* で再現する場合の対応関係
- 図 4-13 本論文で使用している *in vitro* 実験系を用いた細胞外光増感反応による心筋細胞への障害研究
- 図 5-1 Fluo-4 AM の細胞内透過のメカニズム
- 表 5-1  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬の種類と諸元
- 図 5-2 Fluo-4 AM の化学分子式
- 図 5-3 タラポルフィンナトリウムの吸収スペクトル、Fluo-4 AM の吸収および蛍光スペクトル、タラポルフィンナトリウムおよび Fluo-4 AM の励起光波長
- 図 5-4 共焦点顕微鏡を用いた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度計測実験系の光路模式図
- 図 5-5 光ファイバー間の空間伝送およびシャッターを用いた照射時間操作のための光学系
- 図 5-6 使用した 40 倍対物レンズ焦点面における励起光ビームの概形
- 図 5-7 光増感反応をおこしていない場合の心筋細胞の Fluo-4 AM 連続蛍光画像
- 図 5-8 細胞内平均蛍光輝度変化の相対値
- 図 5-9 細胞内光増感反応・細胞外光増感反応の前および光照射開始から約 10 min 後における心筋細胞の形態観察
- 図 5-10 代表的な細胞外光増感反応前後の Fluo-4 AM 蛍光画像
- 図 5-11 細胞内光増感反応および細胞外光増感反応の前、反応中、反応後の蛍光画像解析によって得られた細胞内 Fluo-4 AM 蛍光輝度
- 図 5-12 ブレブおよび壊死発生細胞数の発生割合
- 図 5-13 各放射照射量における光照射開始からブレブ発生までに要した時間のタラポルフィンナトリウム濃度依存性
- 図 5-14 各放射照射量における光照射開始から細胞壊死発生までに要した時間のタラポルフィンナトリウム濃度依存性
- 図 5-15 光照射開始から細胞壊死発生までに要した時間の放射照度依存性
- 図 5-16 細胞外光増感反応による心筋細胞壊死発生タイミングと死細胞率結果の模式図
- 図 6-1 赤色半導体レーザーの発振スペクトル
- 図 6-2 レーザのファイバー端における出射光強度分布
- 図 6-3 ウェル照射光学系の配置
- 図 6-4 構築した光照射台における光強度分布
- 図 6-5 異なる放射照度における光増感反応中のタラポルフィンナトリウム溶液温度変化
- 図 6-6 細胞外光増感反応中におけるタラポルフィンナトリウム蛍光の経時計測系
- 図 6-7 タラポルフィンナトリウム蛍光計測集光系の配置
- 図 6-8 タラポルフィンナトリウム蛍光の計測に用いた各フィルターと 4 枚のフィルターを合わせたフィルターセットの波長特性
- 図 6-9 光増感反応中のタラポルフィンナトリウム蛍光強度減衰

- 図 6-10 細胞外光増感反応中の酸素分圧および溶液温度測定系
- 図 6-11 酸素電極出力電圧値の温度依存性
- 図 6-12 タラポルフィンナトリウム溶液濃度変化させたときの、光照射中および照射停止後 30 s までの酸素分圧経時変化
- 図 6-13 酸素分圧とタラポルフィンナトリウム溶液吸光度ピークの変化
- 図 6-14 光増感反応前後における心筋細胞の形態変化
- 図 6-15 放射照度  $0.29 \text{ W/cm}^2$  のときの死細胞率のタラポルフィンナトリウム濃度依存性
- 図 6-16 異なる放射照度における死細胞率のタラポルフィンナトリウム濃度依存性
- 図 6-17 異なる放射照度における死細胞率のタラポルフィンナトリウム濃度依存性
- 図 6-18 タラポルフィンナトリウム濃度と反応速度の変曲点となる放射照射量の関係
- 図 6-19 光増感反応による酸素、光、タラポルフィンナトリウムの消費バランス概要
- 表 6-1 異なる放射照射量における死細胞率 50%となるタラポルフィンナトリウム濃度および一重項酸素産生閾値
- 
- 図 7-1 アルブミン濃度を  $0\text{-}20 \text{ mg/ml}$  に変化させたときのタラポルフィンナトリウム吸収スペクトル
- 図 7-2 タラポルフィンナトリウムとアルブミンの結合率
- 図 7-3 アルブミン濃度を変化させたときの細胞外光増感反応前後における心筋細胞形態観察結果
- 図 7-4 各アルブミン濃度における細胞外光増感反応 2 h 後の死細胞率の薬剤濃度依存性
- 図 7-5 細胞外光増感反応 2 h 後における死細胞率のアルブミン濃度依存性
- 図 7-6 タラポルフィンナトリウムとヒト血清アルブミン、高比重リポ蛋白、低比重リポ蛋白それぞれの混合溶液中の温度ごとの結合率
- 図 7-7 タラポルフィンナトリウムと高比重リポ蛋白、低比重リポ蛋白それぞれの混合溶液中の遊離薬剤割合の温度依存性
- 図 7-8  $17^\circ\text{C}$  と  $37^\circ\text{C}$  下の光増感反応における、死細胞率のタラポルフィンナトリウム濃度依存性
- 図 7-9  $40 \text{ J/cm}^2$  の光照射を行ったときのウェルに吸収される光エネルギー：アルブミン濃度の影響
- 
- 図 8-1 接触時間に伴う心筋細胞内タラポルフィンナトリウム濃度変化
- 図 8-2 心筋細胞内タラポルフィンナトリウム蓄積にともなう細胞死機構の予想図
- 図 8-3 本章の実験方法とそれらにおける薬剤分布場所、細胞内光増感反応および細胞外光増感反応の用語対応
- 図 8-4 タラポルフィンナトリウム接触時間を変化させたときの、光増感反応直後および 24 h 後の心筋細胞形態

- 図 8-5 放射照射量  $20 \text{ J/cm}^2$  での細胞内・細胞外光増感反応から 2 h 後および 24 h 後における死細胞率のタラポルフィンナトリウム接触時間依存性
- 図 8-6 細胞外光増感反応 24 h 後における死細胞率の放射照射量依存性
- 図 8-7 光増感反応前後の心筋細胞核の形態変化
- 図 9-1 アルブミンと溶液温度による治療効果変化の模式図
- 表 9-1 臨床応用における要求、本研究を通じて明らかになった知見、および総括的な検討による提案





## 第 1 章 序論

### 1.1 緒言

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 *in vitro* 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。電気伝導遮断による不整脈治療では、術中に電気生理学的な検査を治療判定として行うという特徴がある [1]。臨床において即時のおよび永続的な電気伝導遮断が得られ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 *in vitro* で実験を行う。

光線力学アブレーションは、癌治療に応用されてきた光増感反応により産生する一重項酸素を頻脈性不整脈の心筋電気伝導遮断に応用する開発中の治療法である [2-5]。光感受性薬剤投与後早期に経カテーテル的に対象心筋に光を照射し、間質中において細胞外光増感反応を起こす構想である。細胞外光増感反応によって生じた一重項酸素の酸化作用によりイオンチャネル障害や細胞膜障害を起こし、即時的な電気伝導遮断効果と細胞壊死による永続的な電気伝導遮断効果の両方を実現可能と考えられる [4]。腫瘍組織への光感受性薬剤集積性を用いた従来の光線力学的治療では、細胞内に取り込まれた光感受性薬剤による細胞内光増感反応を用いているのに対し、この治療は心筋組織間質中に分布する光感受性薬剤による細胞外光増感反応を利用している [5]。著者は治療の安全性と有効性を確実なものにするために、光感受性薬剤の投与条件や光照射条件などのパラメーター、治療効果に影響を及ぼす可能性のある反応周囲環境要素について検討する。

### 1.2 本研究の目的と背景

頻脈性不整脈の中で最も多い心房細動の患者数は日本国内で約 72 万人、米国内で約 230 万人にのぼる [6-9]。高齢化に伴い、年々患者数は増加傾向にある [8]。心房細動は致死性の疾患ではないが、左心耳における血栓の発生により脳梗塞の原因となることが知られている。このため心房細動の患者では脳梗塞の発症リスクが健常者の 3-5 倍高い [10]。心房細動の第一選択治療は、リズムコントロール薬物による維持治療である。心房細動の主因が左心房の肺静脈入口部からの異常興奮であることが明らかになったことにより、高周波カテーテルアブレーションによる電気伝導遮断が積極的に行われている [11, 12]。薬物療法との比較で治療の優位性が報告されたことから、近年急速に普及している [13]。カテーテル先端電極から心筋組織に高周波通電し、発生するジュール熱で心筋組織を熱凝固壊死させる。点状焼灼型では直径約 2 mm の電極に 30-50 W の通電を 20-60 s 行い、これをつなげ

て熱凝固壊死を線状に起こすことで異常興奮発生部位を電氣的に隔離し、異常興奮が他の部位に伝導するのを遮断する [14]。しかし高周波カテーテルアブレーションでは、組織内温度が電流密度および組織熱伝導によって決まるため、(i) 水蒸気爆発による心筋損傷、(ii) 食道障害や横隔神経障害などの周囲組織損傷、(iii) 血栓形成、といった重篤な副作用が全体の約 3%に生じる [15, 16]。維持治療が第一選択治療である疾患に対して、上記のような副作用が生じることが問題となっている。過剰な心筋組織温度上昇を防ぐために種々の新しい装置が開発されているが、新規開発のアブレーターでも副作用の抑制が十分達成されているとは言い難い。灌流機能の付いたカテーテル (以下、イリゲーションカテーテルと呼ぶ) では血栓形成や水蒸気爆発の発生率は約半分になったものの、副作用が十分に抑制できていない [17]。凍結融解療法を利用したクライオアブレーターでは治療深度制御が不安定であるため横隔神経障害が生じる確率が増加している [18]。

光増感反応では光、光感受性薬剤、酸素による光化学反応により一重項酸素を産生する [19, 20]。この酸化作用によって生体組織を障害し、治療に用いられている。光線力学的治療は光感受性薬剤の集積性を用い、低侵襲な悪性腫瘍の選択的治療として普及している [21]。腫瘍組織と健常組織の細胞内における光感受性薬剤の排泄速度差によって、薬剤投与後数 h 経過すると、これらの組織の間に 3-10 倍の薬剤濃度のコントラストが形成される [22, 23]。これが光線力学的治療における腫瘍選択性の原理となっている。腫瘍細胞内では光感受性薬剤はミトコンドリアやライソゾームに高濃度で分布する [24, 25]。この状態で光感受性薬剤を励起すると、溶存酸素との光増感反応により一重項酸素が産生され、その酸化によって主にアポトーシスにより穏やかな細胞死が起こり、その結果固形腫瘍が数日から数週間のうちに縮小する [26, 27]。このような治療選択性により肺換気能を損なわない早期肺癌治療や、女性の妊孕性を損なわない子宮頸癌治療が可能となる [28]。一方、血管透過性を調整した光感受性薬剤を用いることで、加齢黄斑変性症の新生血管治療に応用されている例もある [29]。光感受性薬剤は青色領域に Soret 帯と呼ばれる大きな吸収帯があるため、皮膚残留薬剤と日光による光増感反応で、日光過敏症が生じる。ポルフィマーナトリウムでは 1 ヶ月、タラポルフィンナトリウムでは 2 週間の遮光が必要であり、患者の quality of life の低下や、入院医療費の増加につながって、光線力学的治療の有用性を大きく損ねている。一重項酸素産生効率の高い新世代の光感受性薬剤を用いた光線力学的治療では、酸素の消費速度が速くなる。このため組織内における酸素供給源である血流が治療中に保持されることが、治療に必要である。腫瘍組織の血管は断面が大きく不揃いで、血管内皮が未成熟であるため、血流閉止が生じやすい [30]。血流量が低下し酸素が十分に供給されないと、治療が不均一に生じてしまう [31]。

著者らは、光増感反応を応用した熱発生が少ない電気伝導遮断治療、すなわち光線力学アブレーションを提案している [2-5]。光線力学的治療の原理である光増感反応は、高いエネルギー効率で一重項酸素を産生できるので、熱発生がほとんどない [32]。従来の腫瘍組

織を対象とした光線力学的治療では強い治療条件で治療の不均一性が問題になっていたが [31]、血流速が速く血管が閉止しにくい健全組織を対象とする本法の場合は、より強い治療条件の施行が可能である。本治療法では光感受性薬剤として第二世代のタラポルフィンナトリウムを用い、レーザカテーテル先端から波長 660 nm 帯の赤色連続光を対象部位に照射し治療を行う構想である。タラポルフィンナトリウムは Q 帯の吸収が生理食塩水中でモル吸光係数:  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  と大きく、三重項寿命:  $10^{-4} - 10^{-1} \text{ s}$  と長いため一重項酸素産生効率が低い。また水溶性なので投与後速やかに間質中に分布し、排泄の半減期が 14.6 h と短い。遮光期間も 2 週間と短いことが特徴である [33]。本研究の治療構想ではタラポルフィンナトリウムの集積性を利用せず、投与後早期に光照射を行う。タラポルフィンナトリウムは血中や組織間質中では、血清蛋白とほぼ全量が結合し、特にアルブミンと 65-70% 結合している [33]。間質液に分布後、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ始め、数 h 経過すると完全に細胞内に移行する [4, 23]。光線力学アブレーションの原理はイオンチャネル障害および膜障害による即時的な電気伝導遮断と、それに続く壊死による永続的な電気伝導遮断であると報告されている [4]。本研究では前述のように即時のおよび永続的な電気伝導遮断条件を *in vitro* で検討するため、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 つについて種々の光増感反応条件について明らかにする。永続的な電気伝導遮断を達成する亜急性期細胞壊死調査では、心筋細胞壊死を定量的に評価する方法として死細胞率測定を採用し、種々のタラポルフィンナトリウム濃度と光照射条件における死細胞率測定から、障害の得られる条件を明らかにする。さらに、細胞外光増感反応の障害効率に影響を与えられられるタラポルフィンナトリウムと血清蛋白の結合率変化、およびそれによる心筋細胞への影響を明らかにする。アポトーシスなどの遅発性殺細胞効果の調査では、細胞内へのタラポルフィンナトリウム蓄積量とそれに伴う細胞死機構の変化を明らかにする。総合討論では、(i) 数十 s から数 min の急性期の細胞電気生理学的障害の調査から、治療応用時における治療効果判定時期および運用方法の検討、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発生の調査から、治療応用時における運用条件の検討、(iii) アポトーシスなどの遅発性細胞死の調査から、治療応用時における慢性期治療領域拡大に関する検討、などを行う。

以上要するに著者は、光線力学アブレーションによる安全かつ有効な頻脈性不整脈治療実用化のために、心筋細胞外の光増感反応による細胞障害を *in vitro* 実験によって明らかにする。

### 1.3 本論文の構成

本論文は 10 章から構成される。図 1-1 に本論文の構成を示す。

本章では細胞外光増感反応による心筋細胞の障害を検討する本研究の背景を述べた。

第 2 章では、心房性頻脈性不整脈の病態と、現行の治療法であるカテーテルアブレーションについて述べた。

第 3 章では、光線力学的治療とそのメカニズムである光増感反応について述べた。

第 4 章では、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提案と治療メカニズムおよび運用について説明した。光線力学アブレーションの応用に必要な基礎検討について述べ、本研究で検討した細胞外光増感反応による心筋細胞障害の研究目的を示した。

第 5 章では、光増感反応中の心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を測定することで即時的な心筋細胞応答と細胞障害メカニズムについて調査し、即時的および永続的な電気伝導遮断を実現するための光増感反応条件について検討を行った。

第 6 章では、心筋細胞に対して光増感反応を起こすための実験系を構築し、光増感反応中のタラポルフィンナトリウム蛍光、酸素分圧、溶液吸光度を測定し、構築した実験系における光増感反応の進行を明らかにした。放射照度、放射照射量、タラポルフィンナトリウム濃度を変化させて死細胞率を測定し、心筋細胞に対する光増感反応の殺細胞効果について検討を行った。

第 7 章では、タラポルフィンナトリウムが生体内で結合するアルブミンの濃度と、溶液温度を変化させて死細胞率を測定し、タラポルフィンナトリウムの結合状態による細胞外光増感反応の殺細胞効果について検討を行った。

第 8 章では、心筋細胞へのタラポルフィンナトリウムの蓄積量の時間変化を調査し、タラポルフィンナトリウム接触時間を変化させて光増感反応 2 h 後および 24 h 後の死細胞率を測定し、タラポルフィンナトリウムの蓄積量に伴う光増感反応による遅発性の殺細胞効果について検討を行った。

第 9 章では、第 5 章から第 8 章で得られた知見に関して総括的な検討を加え、光増感反応による心房の頻脈性不整脈治療の臨床における治療条件について論じた。

第 10 章では、第 5 章から第 8 章の検討および第 9 章の総括的な検討から、本研究を総括した。

## 1.4 結言

本章では、光増感反応による頻脈性不整脈治療の基礎的検討の背景と目的を述べ、本論文全体の構成をまとめた。

## 参考文献

- [1] 奥村謙, 相澤義房, 相原直彦, 青沼和隆, 沖重薫, 熊谷浩一郎, 庄田守男, 住友直方, 高橋淳, 内藤滋人, 中村好秀, 野上昭彦, 平尾見三, 松本万夫, 村川裕二, 山根禎一, “カテーテルアブレーションの適応と手技に関するガイドライン,” *Circ J*, vol. 76, pp. 3–67, 2012.
- [2] A. Ito, S. Hosokawa, S. Miyoshi, K. Soejima, S. Ogawa, and T. Arai, “The myocardial electrical blockade induced by photosensitization reaction,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 57, pp. 488–495, 2010.
- [3] A. Ito, S. Miyoshi, T. Kimura, S. Takatsuki, K. Fukumoto, K. Fukuda, and T. Arai, “Myocardial electrical conduction block induced by photosensitization reaction in exposed porcine hearts *in vivo*,” *Lasers Surg Med*, vol. 43, pp. 984–990, 2011.
- [4] A. Ito, T. Kimura, S. Miyoshi, S. Ogawa, and T. Arai, “Photosensitization reaction-induced acute electrophysiological cell response of rat myocardial cells in short loading periods of talaporfin sodium or porfimer sodium,” *Photochem Photobiol*, vol. 87, pp. 199–207, 2011.
- [5] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, K. Fukumoto, M. Takahashi, E. Ogawa, A. Ito, T. Arai, S. Ogawa, and K. Fukuda, “Nonthermal cardiac catheter ablation using photodynamic therapy,” *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 6, pp. 1025–1031, 2003.
- [6] H. Inoue, A. Fujiki, H. Origasa, S. Ogawa, K. Okumura, I. Kubota, Y. Aizawa, T. Yamashita, H. Atarashi, M. Horie, T. Ohe, Y. Doi, A. Shimizu, A. Chishaki, T. Saikawa, K. Yano, A. Kitabatake, H. Mitamura, I. Kodama, and S. Kamakura, “Prevalence of atrial fibrillation in the general population of Japan: An analysis based on periodic health examination,” *Int J Cardiol*, vol. 137, pp. 102–107, 2009.
- [7] 小川聡, 相澤義房, 新博次, 井上博, 奥村謙, 鎌倉史郎, 熊谷浩一郎, 是恒之宏, 杉薫, 三田村秀雄, 矢坂正弘, 山下武志, 大江透, 児玉逸雄, 比江嶋一昌, 矢野捷介, “心房細動治療 (薬物) ガイドライン (2008 年改訂版),” *Jpn Circ J*, vol. 72 (Suppl. IV), pp. 1581–1638, 2008.
- [8] A.S. Go, E.M. Hylek, K.A. Phillips, Y.C. Chang, L.E. Henault, J.V. Selby, and D.E. Singer, “Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults. National implications for rhythm management and stroke prevention: the anticoagulation and risk factors in atrial fibrillation (ATRIA) study,” *JAMA*, vol. 285, pp. 2370–2375, 2001.
- [9] V. Fuster, L. E. Ryden, D. S. Cannom, H. J. Crijns, A. B. Curtis, K. A. Ellenbogen, J. L. Halperin, J. Y. Le Heuzey, G. N. Kay, J. E. Lowe, S. B. Olsson, E. N. Prystowsky, J. L. Tamargo, S. Wann, S. C. Jr. Smith, A. K. Jacobs, C. D. Adams, J. L. Anderson, E. M. Antman, S. A. Hunt, R. Nishimura, J. P. Ornato, R. L. Page, B. Riegel, S. G. Priori, J. J. Blanc, A. Budaj, A. J. Camm, V. Dean, J. W. Deckers, C. Despres, K. Dickstein, J. Lekakis, K. McGregor, M.

- Metra, J. Morais, A. Osterspey, and J. L. Zamorano, “ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines and the European Society of Cardiology Committee for practice guidelines,” *Circ*, vol. 114, pp. e257– e354, 2006.
- [10] V. L. Roger, A. S. Go, D. M. Lloyd-Jones, R. J. Adams, J. D. Berry, T. M. Brown, M. R. Carnethon, S. Dai, G. de Simone, E. S. Ford, C. S. Fox, H. J. Fullerton, C. Gillespie, K. J. Greenlund, S. M. Hailpern, J. A. Heit, P. M. Ho, V. J. Howard, B. M. Kissela, S. J. Kittner, D. T. Lackland, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, D. M. Makuc, G. M. Marcus, A. Marelli, D. B. Matchar, M. M. McDermott, J. B. Meigs, C. S. Moy, D. Mozaffarian, M. E. Mussolino, G. Nichol, N. P. Paynter, W. D. Rosamond, P. D. Sorlie, R. S. Stafford, T. N. Turan, M. B. Turner, N. D. Wong, and J. Wylie-Rosett, “Heart disease and stroke statistics: 2011 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee,” *Circ*, vol. 123, pp. e18– e209, 2011.
- [11] M. Haïssaguerre, P. Jaïs, D. C. Shah, A. Takahashi, M. Hocini, G. Quiniou, S. Garrigue, A. LeMouroux, P. LeMetayer, and J. Clementy, “Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins,” *N Engl J Med*, vol. 339, pp. 659–666, 1998.
- [12] M. Haïssaguerre, D. C. Shah, P. Jaïs, M. Hocini, T. Yamane, I. Deisenhofer, M. Chauvin, S. Garrigue, and J. Clementy, “Electrophysiological breakthroughs from the left atrium to the pulmonary veins,” *Circ*, vol. 102, pp. 2463– 2465, 2000.
- [13] A. J. Camm, P. Kirchhof, G. Y. H. Lip, U. Schotten, I. Savelieva, S. Ernst, I. C. Van Gelder, N. Al-Attar, G. Hindricks, B. Prendergast, H. Heidbuchel, O. Alfieri, A. Angelini, D. Atar, P. Colonna, R. De Caterina, J. De Sutter, A. Goette, B. Gorenek, M. Heldal, S. H. Hohloser, P. Kolh, J. Y. Le Heuzey, P. Ponikowski, and F. H. Rutten, “Guidelines for the management of atrial fibrillation: The task force for the management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC),” *Eur Heart J*, vol. 31, pp. 2369–2429, 2010.
- [14] S. Nath, J. P. DiMarco, and D. E. Haines, “Basic aspects of radiofrequency catheter ablation,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 5, pp. 863–876, 1994.
- [15] H. Calkins, J. Brugada, D. L. Packer, R. Cappato, S. A. Chen, H. J. Crijns, R. J. Damiano Jr., D. W. Davies, D. E. Haines, M. Haissaguerre, Y. Iesaka, W. Jackman, P. Jais, H. Kottkamp, K. H. Kuck, B. D. Lindsay, F. E. Marchlinski, P. M. McCarthy, J. L. Mont, F. Morady, K. Nademanee, A. Natale, C. Pappone, E. Prystowsky, A. Raviele, J. N. Ruskin, and R. J. Shemin, “HRS/EHRA/ECAS Expert Consensus Statement on Catheter and Surgical Ablation of Atrial Fibrillation: Recommendations for Personnel, Policy, Procedures and Follow-Up: a report of the Heart Rhythm Society (HRS) Task Force on Catheter and Surgical Ablation of Atrial Fibrillation developed in partnership with the European Heart Rhythm Association (EHRA) and

- the European Cardiac Arrhythmia Society (ECAS); in collaboration with the American College of Cardiology (ACC), American Heart Association (AHA), and the Society of Thoracic Surgeons (STS). Endorsed and approved by the governing bodies of the American College of Cardiology, the American Heart Association, the European Cardiac Arrhythmia Society, the European Heart Rhythm Association, the Society of Thoracic Surgeons, and the Heart Rhythm Society,” *Europace*, vol. 9, pp. 335–379, 2007.
- [16] H. Hoyt, A. Bhonsale, K. Chilukuri, F. Alhumaid, M. Needleman, D. Edwards, A. Govil, S. Nazarian, A. Cheng, C. A. Henrikson, S. Sinha, J. E. Marine, R. Berger, H. Calkins, and D. D. Spragg, “Complications arising from catheter ablation of atrial fibrillation: Temporal trends and predictors,” *Heart Rhythm*, vol. 8, pp. 1869–1874, 2011.
- [17] K. Yokoyama, H. Nakagawa, F. H. Wittkamp, J. V. Pitha, R. Lazzara, and W. M. Jackman, “Comparison of electrode cooling between internal and open irrigation in radiofrequency ablation lesion depth and incidence of thrombus and steam pop,” *Circ*, vol. 113, pp. 11–19, 2006.
- [18] D. L. Packer, R. C. Kowal, K. R. Wheelan, J. M. Irwin, J. Champagne, P. G. Guerra, M. Dubuc, V. Reddy, L. Nelson, R. G. Holcomb, J. W. Lehmann, J. N. Ruskin, “Cryoballoon ablation of pulmonary veins for paroxysmal atrial fibrillation: First results of the North American Arctic Front (STOP AF) pivotal trial,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 61, pp. 1713–1723, 2013.
- [19] H. van den Bergh, and J. P. Ballini, *PDT in ocular disease*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004, pp. 11–42.
- [20] C. H. Sibata, V. C. Colussi, N. L. Oleinick, and T. J. Kinsella, “Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment,” *Braz J Med Biol Res*, vol. 33, pp. 869–880, 2000.
- [21] H. Kato, J. Usuda, T. Okunaka, and K. Furukawa, “The history of the study of photodynamic therapy (PDT) and photodynamic diagnosis (PDD) in the department of surgery, Tokyo medical university,” *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 1, pp. 107–110, 2004.
- [22] J. V. Moore, C. M. L. West, and C. Whitehurst, “The biology of photodynamic therapy,” *Phys Med Biol*, vol. 42, pp. 913–935, 1997.
- [23] K. Aizawa, T. Okunaka, T. Ohtani, and I. Kawabe, “Localisation of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in mouse tissues,” *Photochem Photobiol*, vol. 46, pp. 789–93, 1987.
- [24] A. E. O’Connor, W. M. Gallagher, and A. T. Byrne, “Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy,” *Photochem Photobiol*, vol. 85, pp. 1053–1074, 2009.
- [25] E. Buytaert, M. Dewaele, and P. Agostinis, “Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1776, pp. 86–107, 2007.

- [26] H.R. Kim, Y. Luo, G. Li, and D. Kessel, “Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after bcl-2 transfection,” *Cancer Res*, vol. 59, pp. 3429–3432, 1999.
- [27] N. L. Olenick, R. L. Morris, and I. Belichenko, “The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why, and how,” *Photochem Photobiol Sci*, vol. 1, pp. 1–21, 2002.
- [28] ファイザー株式会社, フォトフリン® 静注用 75 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2013 年 1 月改訂 (改訂第 10 版).
- [29] ノバルティスファーマ株式会社, ビスダイン® 静注用 15 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2013 年 5 月改訂 (新様式第 6 版).
- [30] G. M. Tozer, C. Kanthou, and B. C. Baguley, “Disrupting tumor blood vessels,” *Nat Rev Cancer*, vol. 5, pp. 423–435, 2005.
- [31] T. Nagao, M. Takahashi, K. Matsuzaki, and H. Minamitani, “Application of bioimaging techniques to mechanistic studies on photodynamic therapy,” *Bioimages*, vol. 11, pp. 53–60, 2003.
- [32] K. R. Weishaupt, C. J. Gomer, and T. J. Dougherty, “Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor,” *Cancer Res*, vol. 36, pp. 2326–2329, 1976.
- [33] Meiji Seika ファルマ株式会社, 注射用レザフィリン® 100 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2013 年 12 月改訂 (改訂第 6 版).



図表

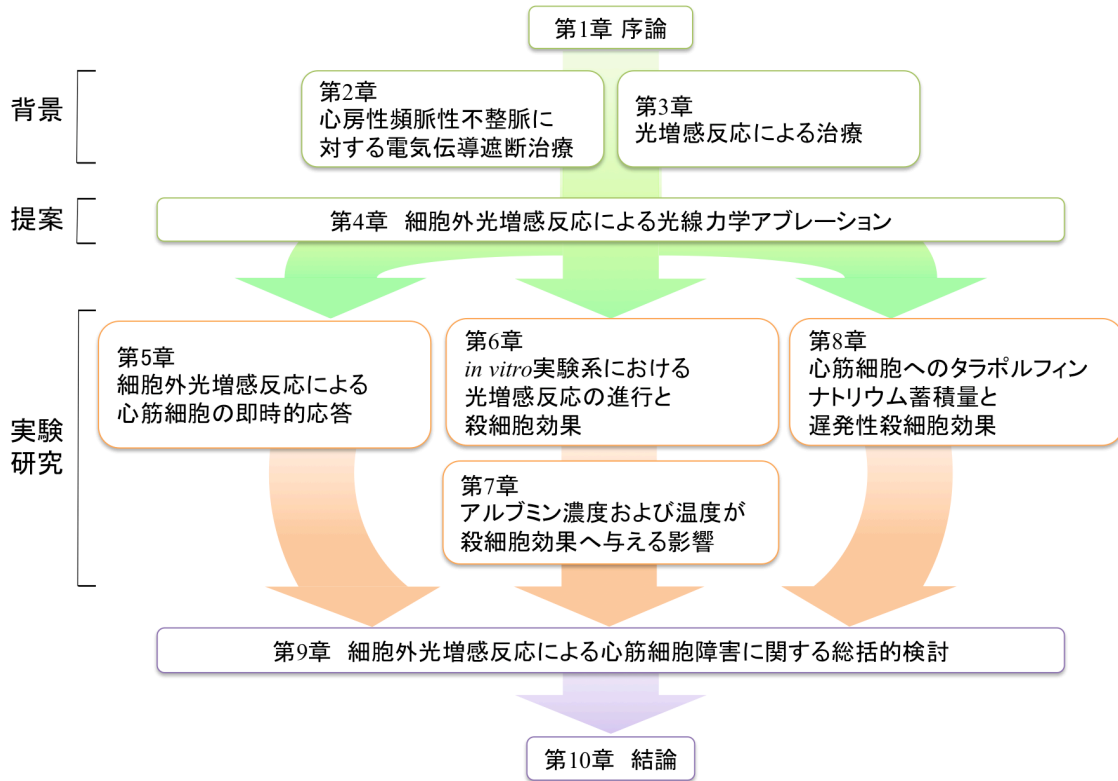


図 1-1 本論文の構成



## 第 2 章 心房性頻脈性不整脈に対する電気伝導遮断治療

### 2.1 緒言

心臓は簡単な神経系と心筋の電気伝導性によって心房、心室がそれぞれ一体となって収縮を繰り返し、肺循環で酸素を取り入れ、大循環によって生体組織に酸素化血液を循環させる機能を持つ。本章では、心臓と心筋細胞の基本的な構造と、拍動メカニズムの基本である刺激伝導と活動電位について説明する。心房を起源とした頻脈性の不整脈について、その病態と疫学について述べる。さらに現行治療法の中で非薬物的根治療法として普及している高周波カテーテルアブレーションに関して、その原理と現状の課題について説明する。

### 2.2 心臓の拍動メカニズムと頻脈性不整脈

心筋細胞の構造と電気伝導の原理を述べる。心臓の構造と刺激伝導による拍動の原理、電気伝導異常によって生じる頻脈性不整脈について説明する。

#### 2.2.1 心筋細胞の構造と活動電位

細胞のイオン濃度組成は、細胞膜で隔たれた細胞内外で表 2-1 に示すように異なる [1]。イオン濃度組成の差によって細胞内は負に帯電しており、この細胞内外の電位の差を膜電位と呼ぶ。膜電位変化の起きていない定常状態での細胞の膜電位を静止膜電位と呼ぶ。心筋細胞の静止膜電位は心臓の部位により少しずつ異なり、心室筋では $-85$  から $-90$  mV、心房筋では $-75$  から $-80$  mV となり、心臓のペースメーカーである刺激伝導系の起点の洞房結節や右心房にある心房と心室をつなぐ房室結節では、 $K^+$ チャネルが少ないため静止膜電位が他の部位よりも高く、 $-44$  から $-65$  mV である [2-3]。電荷を持つイオンは細胞膜の脂質二重層を通常透過することができないが、心筋細胞膜には 19 種類以上のイオンチャネルが存在する [1]。イオンチャネルとは膜貫通蛋白質のひとつで、選択的にイオンを透過することができる親水性の細孔構造を持っている。代表的なイオンチャネルにカリウムチャネル、ナトリウムチャネル、カルシウムチャネルなどがある。イオンチャネルは、開閉の制御機構により電位依存性チャネルや温度依存性チャネルに分類される。活動電位は、外部からの刺激などによって静止膜電位が変化して起こる。心筋細胞の活動電位は、図 2-1 に図示したように第 0 相から第 4 相で構成されている [3]。第 0 相では電位依存性  $Na^+$ チャネルが開閉して急激に  $Na^+$ が流入し、膜電位は $+30$  mV まで上昇し、この状態を脱分極と呼ぶ。脱分極によって膜電位が正になるオーバーシュートが生じ、電位依存性  $Na^+$ チャネルはすぐに閉じる。第 1 相では電位依存性  $K^+$ チャネルが開閉して、 $K^+$ が細胞外に流出することで膜電位は低下する。続く第 2 相では L 型電位依存性  $Ca^{2+}$ チャネルが開閉して  $Ca^{2+}$ が細胞内に流

入し、プラトー相とも呼ばれる緩やかな膜電位の低下が生じる。心筋細胞は、L 型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの活性化および不活性化が遅いため、プラトー相が約 200 ms と、骨格筋細胞の 2–4 ms と比較して長いことが特徴である。第 3 相では、N 型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが不活性化し、 $\text{K}^+$  チャンネル群が開口することで、 $\text{K}^+$  が細胞外へと流出し、再分極する。再分極すると  $\text{K}^+$  チャンネルはゆっくりと閉鎖し、第 4 相では十分に低下した膜電位を平衡電位に収束させるように、細胞に内向きの方向に電流を通しやすい内向きの整流  $\text{K}^+$  チャンネルを介して  $\text{K}^+$  が流入し、再度静止膜電位に落ち着く [3]。

心筋細胞の構造を図 2-2 に示した [4]。心筋細胞は細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化に伴って心筋細胞の収縮および弛緩が起こる [5]。活動電位によって心筋細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルから  $\text{Ca}^{2+}$  が流入すると、筋小胞体に貯留されていた  $\text{Ca}^{2+}$  が放出され、細胞内での遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が急激に上昇する。定常状態では細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が 2 mM であるのに対し、心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は 0.1  $\mu\text{M}$  と低く維持されているが、収縮時では約 100 ms の間に 1–10  $\mu\text{M}$  に上昇する [5]。筋小胞体から放出された  $\text{Ca}^{2+}$  が、アクチンフィラメント上のトロポニンに結合し、筋原線維が構造変化することで心筋の収縮が起こる。収縮が起こった後、心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  は再度筋原線維から放出され細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  となり、一部は再び筋小胞体に戻り、一部は細胞外へ放出される。この膜電位の変化によって起こる収縮の過程を興奮収縮連関と呼ぶ [6]。心筋細胞で起こる興奮収縮連関の伝搬は、発生した心筋細胞の脱分極による活動電位が隣接する細胞に脱分極のきっかけを与え次々に伝搬することで生じる。心筋細胞は、細胞間が約 2 nm に隣接する場合に、ギャップジャンクションと呼ばれる細胞間を結ぶ特殊なチャンネルを形成する [2]。ギャップジャンクションは細胞膜の蛋白質コネキシンの集合体から構成されるチャンネルで、イオンや小分子が透過することのできる細胞間のトンネル状のチャンネルである。ひとつの細胞に活動電位が生じると隣接する細胞間で電位差が生じるため、ギャップジャンクションを通じて速やかに電流が流れ、その電流によって次の活動電位が引き起こされる。ギャップジャンクションを介した電流は、 $\text{K}^+$  の透過性で比較すると細胞膜の約 5000 倍であるため [2]、こちらが優位であり、より速い活動電位の伝搬が生じる。心筋組織の刺激伝導系に沿ってギャップジャンクションが発達しており、活動電位の伝搬が速やかに心臓全体に広がることで心臓の拍動が生じる。

### 2.2.2 心臓の構造と刺激伝導

心臓は全身に血液を循環させるポンプの役割を果たす臓器である。心臓は動脈へ血液を送り出すポンプである心室と、補助ポンプである心房に分かれている。安静時には 5 L/min、運動時には 25 L/min の血液を送り出し [7]、1 分間で全血液が体内を一巡する。心臓の左心室から大動脈を経て送り出された血液は体循環で全身を循環し、上下大静脈を通過して右心房に戻る。右心房に入った血液は右心室から肺動脈へ送り出されて肺循環を経て左心房に戻り、再度左心室から全身へ送り出される。このポンプの役割は、心房と心室が交互に収

縮することで生じる心室内圧の上昇によって起こる。

心室と心房に交互に起こる周期的な収縮は、心筋細胞の脱分極が刺激伝導系を伝わることで生じる。心臓の刺激伝導系を図 2-3 に示した [8]。刺激伝導系の起点である洞房結節は静止膜電位が上昇した細胞群から成り、周期的に脱分極を生じる。この脱分極が心房内を伝わり、心房の収縮が起こる。心房内を伝わった脱分極は右心房にある房室結節に伝わる。心房と心室の同時収縮を防ぐために、心房と心室の間は繊維輪によって隔たれており、房室結節のみが心房と心室の間の興奮伝搬経路となる。房室結節では活動電位の伝搬が遅いため、心房の収縮のあとに心室の収縮が起こるようになっている。房室結節の脱分極はヒス束に伝わり、心室壁を右脚と左脚に分かれてプルキンエ線維に伝えられ、心室筋収縮が起こる。この洞房結節からプルキンエ線維までの伝導系を刺激伝導系と呼び、発達したギャップジャンクションによる速い伝搬が起こっている。

### 2.2.3 心房性頻脈性不整脈

心臓の心拍は、安静時に 60-70 回/min 程度の規則正しい洞調律がある。この洞調律が乱れた状態を不整脈と呼び、心拍数が通常よりも少なくなり、脈拍数が 50 回/min 未満になる状態を徐脈性不整脈と呼ぶ。心拍数が通常よりも多くなり、脈拍数が 100 回/min 以上になる状態を頻脈性不整脈と言ひ、原因となる異常興奮の発生場所によって心房性と心室性に分類される。頻脈性不整脈の分類、原因、および日本での不整脈全体に占める出現頻度を表 2-2 および表 2-3 に示した [9, 10]。心拍の頻度から、100-230 回/min の場合を心房頻拍、240-340 回/min の場合を心房粗動、350 回/min 以上の場合を心房細動と分類する [9, 10]。頻脈性不整脈の原因には、心筋の電気興奮旋回、異常自動能、撃発活動がある [9]。頻脈性不整脈の中で最も症例数の多い疾患は心房細動であり、頻脈性不整脈の半数以上を占める [11]。

## 2.3 心房細動の病態と治療法

### 2.3.1 心房細動の病態と疫学

心房細動の罹患者数は米国で約 230 万人、日本で約 72 万人と報告されている [12-15]。心房細動は高齢者に多い疾患で [14]、年齢が高くなるほど患者数が増加することが報告されている [16]。人口の高齢化が進む現在、更なる罹患者数の増加が予想される。

心房細動とは心房に生じる頻脈性不整脈で進行性であり、発作の発現期間と頻度は進行するにつれて重症化する。発作症状が 7 日以内に自然に停止する場合を発作性心房細動、7 日以上停止しないが薬物療法や電氣的除細動によって停止できる場合を持続性心房細動、処置による洞調律の回復ができない場合を永続性心房細動と分類する [17]。心房細動によって生じる不規則な心臓収縮は心拍出量の減少につながり、高齢者や既に心疾患のある場合では血行動態不良による心不全や、心疾患がない場合でも頻脈誘発性心筋症を起こすり

スクがある [17]。また心房内の血流動態の悪化は血栓形成の原因となり、特に左心耳血栓は脳梗塞発生の危険因子になっている [18]。心房細動の患者のうち年間約 5%が脳梗塞を発症し、80代における脳梗塞発症の 23.5%は心房細動に起因すると報告されている [15, 19]。

心房細動は、主に心筋虚血に起因する静止膜電位の上昇による自動能発生により生じ、他の原因として左心房の機械的負荷による心筋組織変性、自律神経活動による異常興奮発生、心筋細胞のイオンチャネルの変化などの要因も考えられる [20, 21]。1998年に心房細動発作の 90%以上が肺静脈入口部で発生した異常興奮由来であることが報告された [22-24]。発生した異常興奮が心房内に伝搬しトリガーとなることで、興奮旋回を形成し、持続的な頻脈が生じる。異常興奮の発生が多く生じる肺静脈入口部は、心筋細胞以外に血管平滑筋細胞、内皮細胞、線維芽細胞が混在していて配向が不等方なため、線維化による興奮旋回が生じやすい [25]。また肺静脈入口部の心筋細胞は静止膜電位が高く洞房結節の心筋細胞と類似であり、自動能を起こしやすい特徴を持つ [22]。

### 2.3.2 心房細動の治療法

薬物療法には、心房細動を停止するリズムコントロール、心房細動の心拍数を適切に管理するレートコントロール、再発予防、重要な合併症である血栓塞栓症の予防、の主に 4種類が挙げられる。リズムコントロールは抗不整脈剤により細胞のイオンの流入を遮断することで洞調律を維持する方法である。しかし再発率が高く、副作用も重篤であり、投与時は脳梗塞リスクに応じた抗凝固療法を継続する必要がある [26]。レートコントロールは房室結節の伝導を抑制することで心室の心拍数を下げる治療である。リズムコントロールと比較して副作用のリスクが低く、広く用いられているが、心房細動の症状を抑えることができても動悸や拍出量は改善されない可能性がある [27]。これらの薬物療法は、侵襲がなく外来通院で治療を受けることができ、患者への負担が少ないという利点があるが、疾患の完治は難しく薬剤を長期服用しなくてはならないという欠点がある。

心房細動発作に対し、外科手術や植え込み型除細動器、カテーテルアブレーションなどの非薬物療法がある [17]。1950年代にペースメーカーが開発され、1960年代からは外科手術が行われるようになった [17]。1980年代には第一世代植込み型除細動器や高周波カテーテルアブレーションが誕生した [17]。現在、Maze手術と呼ばれる外科アブレーションは、侵襲性が高く、他の疾患の外科手術の際に付随的に行われる他は、単独で行われることはほとんどない。心房細動の発生機序が明らかになったことから、カテーテルアブレーションによる治療が近年急速に普及した [22-24]。

## 2.4 カテーテルアブレーション

近年普及している代表的な心房細動の非薬物療法として、高周波カテーテルアブレーションがある。高周波カテーテルアブレーションの基本は、肺静脈からの異常興奮を、左心

房筋に伝搬しないように電氣的に隔離する肺静脈隔離術である [24]。このほか左心房後壁起源、上大静脈起源に対応した遮断法もある [28]。初めての高周波カテーテルアブレーションは、直流通電による房室接合部の電気伝導遮断や副伝導路の電気伝導遮断に用いられた [29]。しかし、心タンポナーデ、神経障害、血栓生成などの重篤な副作用が発生した [30, 31]。日本では高周波カテーテルアブレーションが 1994 年に保険償還された後、急速に普及した [32]。本部では高周波カテーテルアブレーションの原理と運用、近年開発されているデバイス、現状のアブレーション治療の課題を述べる。

#### 2.4.1 カテーテルアブレーションの原理と運用

高周波カテーテルアブレーションでは、カテーテル先端を組織に接触した状態で、先端電極から患者の背部に設置した対極板に 500–1000 kHz の高周波通電を行う。通電電流密度の 2 乗に比例したジュール熱発生による組織温度上昇によって熱凝固壊死を発生させる [33]。先端電極温度を 50–65°C に保ちながら約 1 min 通電する。ただし電極温度は組織温度を示すものではない。高周波通電によって、心筋組織は蛋白質変性による熱凝固壊死を生じ、即時的に電気伝導性が障害される。数週間経過すると、壊死組織は線維性の組織に置換されて電気絶縁体となり、永続的な電気伝導遮断が完成する。組織温度を正確に計測するのは難しいが、組織表面温度  $50 \pm 8^\circ\text{C}$  で一過性の電気伝導遮断、組織表面温度  $62 \pm 15^\circ\text{C}$  で永続的な電気伝導遮断効果が達成されると報告されている [34]。この電氣的な隔離による治療は心房細動だけでなく、他の頻脈性不整脈治療としても臨床応用されている。心房細動における肺静脈隔離術では、局所麻酔下で大腿静脈からアブレーションカテーテルと電気生理学的検査用の電極カテーテルを挿入し、ブロックンブロー法によって右心房の中隔にある卵円窩に穿刺することで、アブレーションカテーテルを左心房へ挿入する [35]。アブレーション部位に高周波通電による熱凝固壊死によって電気伝導遮断線を作成し、電気生理学的検査によって電気伝導遮断を確認する。

初期のカテーテルアブレーションでは、電位マッピングによって異常興奮発生部位を特定し、その部位の焼灼を行う focal ablation が行われていたが、術中に発作が生じなければ部位の特定が難しいことや、診断に時間を要し術時間が長時間になることから、異常興奮部位および異常興奮が発生する肺静脈を特定せず、4 本の肺静脈を全て電氣的に隔離する肺静脈隔離術が主流となった [23]。図 2-4 に主な遮断性を示す [36]。さらに、肺静脈隔離術後の医原性不整脈すなわち通常型心房粗動や、左心房の心房粗動を予め防止する遮断線を肺静脈隔離時に作成する場合もあり [37]、術式は未だ確立されていない。高周波カテーテルアブレーションでは、点状の焼灼を複数回隣接して行うことで線状の遮断線を作成する point-to-point テクニックと呼ばれる方法が用いられてきた。このとき、焼灼部位は X 線透視と高周波アブレーションカテーテル先端の電極による心内電位計測により決定される。より簡便に電気伝導遮断線の決定や、電気伝導遮断の確認を行うために、心内電位興奮部

位や伝搬経路を表示することが可能な電気生理学モニターとして、三次元マッピングシステム (electroanatomical mapping system) が近年用いられている [38, 39]。三次元マッピングシステムは、CT や MRI によって取得される解剖学的構造に電気生理学的な電位情報を重ねて表示することで、電位とその興奮伝搬を三次元画像として表示することができる。代表的な三次元マッピングシステムとして、CARTO<sup>®</sup>システム、EnSite<sup>™</sup> Array<sup>™</sup>システム、EnSite<sup>™</sup> NavX<sup>™</sup>システムがある [41-43]。X線透視のみを用いる場合と比較して、三次元マッピングシステムの使用により遮断線作成は容易に施行できるようになった。

#### 2.4.2 高周波カテーテルアブレーションの課題

現在発作性心房細動に対する高周波カテーテルアブレーションの成功率は、術後6ヶ月の慢性期において80-90%であり [26]、実用に耐える治療法であるが、未だに熱発生に伴う重篤な合併症が課題である [43]。カテーテル操作によって心筋組織に強い力が加わることや、熱発生による組織の突沸によって心筋組織に亀裂が生じ、心臓と心膜の間に血液が漏出して生じる心タンポナーデ (1.22%) や、肺静脈内の焼灼によって生じる肺静脈狭窄 (1.6%) および閉塞 (0.2%)、左心房後壁からの熱伝導によって熱損傷領域が心筋以外の他の臓器におよぶことで生じる食道障害 (1%) や横隔神経麻痺 (0.11%)、熱によって発生した血栓が脳血管を塞栓することで生じる脳梗塞 (1.2%) などが発生する [44]。副作用発生率の合計は5%程度で、他のインターベンション治療に比べて高くはないが、薬剤による持続維持治療も可能な疾患の治療副作用としては問題である [44]。運用面では、X線透視のみを用いる場合と比較して、三次元マッピングシステムの使用により遮断線作成は容易に施行できるようになったものの、それでも point-to-point テクニックによる遮断線の作成は操作が難しく術者の技術を必要とし、そのため長時間の術時間を要する [45]。また、1回通電した部位に浮腫が発生するため、2回目以降の通電効果が著しく減少するという問題がある [46]。

#### 2.4.3 新しいカテーテルアブレーション

高周波カテーテルアブレーションの熱発生に伴う合併症の抑制や、手技の簡便化、術時間の短縮などを目的とした、第二世代のアブレーションカテーテルが近年開発されている。表2-4に第二世代の主なアブレーションカテーテルの諸元を示す。冷却機能付き高周波アブレーションカテーテルは表2-4上段に示すように、カテーテル先端から生理食塩水を流すことで先端電極の過剰な温度上昇や、血液凝固物の付着を防ぐものである [47, 48]。このデバイスでは表面温度の上昇は抑制できたが、過剰な温度上昇による組織内部での水蒸気発生は解決できなかった [47]。長時間にわたる治療で生理食塩水の注入量が1-1.5L以上になると、心不全などの合併症を引き起こす恐れがある [49]。近年、主なアブレーション部位である肺静脈隔離をより簡便に短時間で達成することを目的とした一括焼灼型のカテー



テルが開発されている。その形状としてバルーン型あるいは環状型のカテーテル形状が採用されている。バルーン型カテーテルには、クライオバルーン、レーザバルーン、高周波加熱ホットバルーンが挙げられる [50-52]。凍結融解壊死を利用したクライオバルーンカテーテルを表 2-4 下段に示した [53]。Medtronic 社が開発した Arctic Front Advance™ は 2 重バルーン構造のカテーテルを肺静脈入口部に設置し、バルーン内部に亜酸化窒素ガスを灌流することでバルーンを-40 から-60℃に冷却し、熱伝導によって冷却することで間質液と細胞内基質および細胞膜の凍結障害と、冷却後の融解による血管拡張、浮腫・血栓形成、出血による組織障害の複合作用で細胞壊死を起こすものである [50]。1ヶ所あたり 3 min の冷却を 2 回行い、心筋組織を凍結および融解させて壊死させる [54, 55]。発作性心房細動に対して 2010 年までに 35000 例以上の臨床試験を実施し、通常のイリゲーションカテーテルと作用および副作用は同程度であると報告されている [54, 55]。単回のアブレーションから 12 ヶ月後の肺静脈隔離成功率は 81.3-90.3%であり、通常のイリゲーションカテーテルよりも高いと報告されている [54, 55]。従来の Point-to-point デバイスでは複数の点状アブレーションによって遮断線を作成していたのに対し、バルーンによって一括で遮断線を作成できることから、操作の簡便性が向上している。レーザ光照射による熱的作用を利用したレーザアブレーションカテーテルを表 2-4 下段に示した [56]。CardioFocus 社が開発した HeartLight® は水で満たされたコンプライアントなバルーン内に内視鏡が設置されており、内視鏡視野で肺静脈入口部への接触を確認できる。熱源として波長 980 nm のレーザ光を照射し、心筋組織の光吸収による発熱および熱伝導によって高周波カテーテルアブレーションと同じように心筋組織の熱凝固壊死を起こして肺静脈隔離を行う [57, 58]。内視鏡下操作によって術時間は若干長くなるが、副作用は高周波カテーテルアブレーションと同じ程度である [59]。発作性心房細動に対する治療成績は、単回のアブレーション直後における肺静脈隔離成功率が 98.9%、アブレーション 12 ヶ月後における心房細動再発率が 29%と、通常のイリゲーションカテーテルを用いた高周波アブレーションと同等である [58]。従来の高周波通電と熱伝導を用いた高周波ホットバルーンカテーテルを表 2-4 下段に示した [59]。東レ社が開発した高周波加熱ホットバルーンは、高周波通電用コイル電極と温度センサーを設置したバルーン内に電解質溶液を充填し、高周波通電によりバルーン表面を 60-65℃に加熱し、心筋組織への熱伝導によって心筋の熱凝固壊死を起こして肺静脈隔離を行う [59]。体積の大きいバルーン内部を均一温度にするための振動攪拌機構を有している [59]。これらのバルーンを用いた電気伝導遮断デバイスは、肺静脈隔離を簡便に短時間で行うことを目的としているが、現状では術時間の大幅な短縮には至っておらず、施術中に肺静脈の血流閉止を伴うという問題点がある。

一方血流を閉止する必要のない環状型カテーテルの代表的なものとして、Medtronic 社が開発した Pulmonary Vein Ablation Catheter® GOLD (PVAC® GOLD) と、Biosense Webster 社が開発した nMARQ™ がある [60, 61]。この 2 つの環状カテーテルを表 2-4 中段に示した [62,

63]。1回あたりの焼灼時間は10–20 minである [60, 61]。PVAC<sup>®</sup> GOLDは直径25 mmの環状構造に9極の金電極があり、単極および双極の通電切り換えによって治療深度制御ができる [60]。心房細動治療に対し、アブレーションから6ヶ月後の治療成功率が83%と報告されている [60]。冷却機構が無く、電極温度上昇によって血栓形成や気体塞栓の副作用が報告されている [60]。nMARQ<sup>™</sup>は20–35 mmの範囲で直径可変できる環状構造に、生理食塩水還流付の電極を10極有する [61]。PVACと比べてイリゲーション機能を有しているため、血栓形成は少ないが、生理食塩水の注入量が30–60 ml/minで、1症例で平均1.6 Lと過大である。そのため、心臓への負担が懸念される [61]。

## 2.5 結言

本章では心臓の基本的な構造と拍動原理について説明した。心房の頻脈性不整脈の中でも最も患者数の多い心房細動について、その病態と疫学について述べ、現在用いられる治療法とその課題について説明した。

## 参考文献

- [1] 倉知嘉久, 心筋細胞イオンチャンネル—心臓のリズムと興奮の分子メカニズム, 東京: 文光堂, 2010, pp. 14–144.
- [2] 土谷健, 高橋尚彦, 不整脈プロフェッショナル, 東京: 南江堂, 2010, pp. 36–48.
- [3] 大谷修, 堀尾嘉幸, 人体の正常構造と機能, 東京: 日本医事新報社, 2000, p 28.
- [4] B. C. Knollmann, D. M. Roden, “A genetic framework for improving arrhythmia therapy,” *Nature*, vol. 451, pp. 929–936, 2008.
- [5] 山下武志, 心筋細胞の電気生理学—イオンチャンネルから、心電図、不整脈へ, 東京: メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2002, pp. 3–18.
- [6] D. M. Bers, *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001, pp. 39–62.
- [7] 大谷修, 堀尾嘉幸, 人体の正常構造と機能, 東京: 日本医事新報社, 2000, p 2.
- [8] J. T. Hansen and B. M. Koeppen, ネット解剖生理学アトラス, 相磯貞和, 渡辺修一訳, 東京: 南江堂, 2006, pp. 66–87.
- [9] G. Y. H. Lip and J. Dodtfredsen, 不整脈テキスト—発生機序からみた治療のすべて, 小川聡, 和泉徹監訳, 東京: 西村書店, 2008, pp. 2–42.
- [10] 山口巖, 相澤義房, 井上博, 石川利之, 大江透, 小川聡, 奥村謙, 笠貫宏, 加藤貴雄, 鎌倉史郎, 小坂井嘉夫, 小林洋一, 杉薫, 高柳寛, 中里祐二, 渡辺一郎, 家坂義人, 岩佐篤, 大西哲, 久賀圭祐, 熊谷浩一郎, 小林義典, 里見和浩, 庄田守男, 住友直方, 副島京子, 高月誠司, 丹野郁, 池主雅臣, 永瀬聡, 平井真理, 藤木明, 安田正之, 杉本恒明, 早川弘一, 比江嶋一昌, 三崎拓郎, 矢野捷介, “臨床心臓電気生理検査に関するガイドライン,” *Jpn Circ J*, vol. 70 (Suppl. IV), pp. 1391–1462, 2006.
- [11] Hindrics: Interventional Electrophysiological Chances, challenges and visions, in St. Jude Medical 2011 Investor Conference, 2011.
- [12] 小川聡, 相澤義房, 新博次, 井上博, 奥村謙, 鎌倉史郎, 熊谷浩一郎, 是恒之宏, 杉薫, 三田村秀雄, 矢坂正弘, 山下武志, 大江透, 児玉逸雄, 比江嶋一昌, 矢野捷介, “心房細動治療 (薬物) ガイドライン (2008年改訂版),” *Jpn Circ J*, vol. 72 (Suppl. IV), pp. 1581–1638, 2008.
- [13] H. Inoue, A. Fujiki, H. Origasa, S. Ogawa, K. Okumura, I. Kubota, Y. Aizawa, T. Yamashita, H. Atarashi, M. Horie, T. Ohe, Y. Doi, A. Shimizu, A. Chishaki, T. Saikawa, K. Yano, A. Kitabatake, H. Mitamura, I. Kodama, and S. Kamakura, “Prevalence of atrial fibrillation in the general population of Japan: An analysis based on periodic health examination,” *Int J Cardiol*, vol. 137, pp. 102–107, 2009.
- [14] A. S. Go, E. M. Hylek, K. A. Phillips, Y. Chang, L. E. Henault, J. V. Selby, and D. E. Singer,

- “Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: National implications for rhythm management and stroke prevention: The anticoagulation and risk factors in atrial fibrillation (ATRIA) study,” *JAMA*, vol. 285, pp. 2370–2375, 2001.
- [15] V. Fuster, L. E. Ryden, D. S. Cannom, H. J. Crijns, A. B. Curtis, K. A. Ellenbogen, J. L. Halperin, J. Y. Le Heuzey, G. N. Kay, J. E. Lowe, S. B. Olsson, E. N. Prystowsky, J. L. Tamargo, S. Wann, S. C. Jr. Smith, A. K. Jacobs, C. D. Adams, J. L. Anderson, E. M. Antman, S. A. Hunt, R. Nishimura, J. P. Ornato, R. L. Page, B. Riegel, S. G. Priori, J. J. Blanc, A. Budaj, A. J. Camm, V. Dean, J. W. Deckers, C. Despres, K. Dickstein, J. Lekakis, K. McGregor, M. Metra, J. Morais, A. Osterspey, and J. L. Zamorano, “ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines and the European Society of Cardiology Committee for practice guidelines,” *Circulation*, vol. 114, pp. e257–e354, 2006.
- [16] W. M. Feinberg, J. L. Blackshear, A. Laupacis, R. Kronmal, and R. G. Hart, “Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation,” *Arch Intern Med*, vol. 155, pp. 469–473, 1995.
- [17] 笠貫宏, 相澤義房, 大江透, 大西哲, 奥村謙, 加藤貴雄, 新田隆, 松本万夫, 三崎拓郎, 山口巖, 石川利之, 岩亨, 梅村純, 栗田隆志, 庄田守男, 住友直方, 中里祐二, 中村好秀, 庭野慎一, 平尾見三, 松田直樹, 児玉逸雄, 田中茂夫, 早川弘一, 平岡昌和, 三井利夫, “不整脈の非薬物治療ガイドライン (2006年改訂版),” *Jpn Circ J*, vol. 65 (Supp. IV), pp. 1127–1160, 2001.
- [18] V. L. Roger, A. S. Go, D. M. Lloyd-Jones, R. J. Adams, J. D. Berry, T. M. Brown, M. R. Carnethon, S. Dai, G. de Simone, E. S. Ford, C. S. Fox, H. J. Fullerton, C. Gillespie, K. J. Greenlund, S. M. Hailpern, J. A. Heit, P. M. Ho, V. J. Howard, B. M. Kissela, S. J. Kittner, D. T. Lackland, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, D. M. Makuc, G. M. Marcus, A. Marelli, D. B. Matchar, M. M. McDermott, J. B. Meigs, C. S. Moy, D. Mozaffarian, M. E. Mussolino, G. Nichol, N. P. Paynter, W. D. Rosamond, P. D. Sorlie, R. S. Stafford, T. N. Turan, M. B. Turner, N. D. Wong, and J. Wylie-Rosett, “Heart disease and stroke statistics: 2011 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee,” *Circulation*, vol. 123, pp. e18–e209, 2011.
- [19] P. A. Wolf, R. D. Abbott, and W. B. Kannel, “Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: The framingham study,” *Stroke*, vol. 22, pp. 983–988, 1991.
- [20] T. Yamashita, Y. Murakawa, N. Hayami, E. Fukui, Y. Kasaoka, M. Inoue, and M. Omata, “Short-term effects of rapid pacing on mRNA level of voltage-dependent K(+) channels in rat atrium: electrical remodeling in paroxysmal atrial tachycardia,” *Circulation*, vol. 101, pp.

- 2007–14, 2000.
- [21] R. H. Falk and P. J. Podrid, *Atrial Fibrillation: Mechanisms and Management*, Raven Press, 1992, pp. 109–25.
- [22] M. Haïssaguerre, P. Jaïs, D. C. Shah, A. Takahashi, M. Hocini, G. Quiniou, S. Garrigue, A. LeMouroux, P. LeMetayer, and J. Clementy, “Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins,” *N Engl J Med*, vol. 339, pp. 659–666, 1998.
- [23] M. Haïssaguerre, D. C. Shah, P. Jaïs, M. Hocini, T. Yamane, I. Deisenhofer, M. Chauvin, S. Garrigue, and J. Clementy, “Electrophysiological breakthroughs from the left atrium to the pulmonary veins,” *Circulation*, vol. 102, pp. 2463–2465, 2000.
- [24] H. Oral, B. P. Knight, M. Özaydin, A. Chugh, S. W. K. Lai, C. Scharf, S. Hassan, R. Greenstein, J. D. Han, F. Pelosi, Jr, S. A. Strickberger, and F. Morady, “Segmental ostial ablation to isolate the pulmonary veins during atrial fibrillation,” *Circulation*, vol. 106, pp. 1256–1262, 2002.
- [25] Y. Miyasaka, M. E. Barnes, B. J. Gersh, S. S. Cha, K. R. Bailey, W. P. Abhayaratna, J. B. Seward, and T. S. M. Tsang, “Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence,” *Circulation*, vol. 114, pp. 119–125, 2006.
- [26] 小川聡, 相澤義房, 新博次, 井上博, 奥村謙, 鎌倉史郎, 熊谷浩一郎, 是恒之宏, 杉薫, 三田村秀雄, 矢坂正弘, 山下武志, “循環器病の診断と治療に関するガイドライン (2006–2007年度合同研究班報告), 心房細動治療 (薬物) ガイドライン (2008年改訂版),” *Circ J*, vol. 72, pp. 1581–1638, 2008.
- [27] 奥村謙, *不整脈こう診る・こう考える ガイドライン/ガイダンス*, 東京: 日本医事新報社, 2011, pp. 24–49.
- [28] M. Arruda, H. Mlcochova, S. K. Prasad, F. Kilicaslan, W. Saliba, D. Patel, T. Fahmy, L. S. Morales, R. Schweikert, D. Martin, D. Burkhardt, J. Cummings, M. Bhargava, T. Dresing, O. Wazni, M. Kanj, and A. Natale, "Electrical isolation of the superior vena cava: an adjunctive strategy to pulmonary vein antrum isolation improving the outcome of AF ablation," *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 18, pp. 1261–1266, 2007.
- [29] M. M. Scheinman, F. Morady, D. S. Hess, and R. Gonzalez, “Catheter-induced ablation of the atrioventricular junction to control refractory supraventricular arrhythmias,” *JAMA*, vol. 248, pp. 851–855, 1982.
- [30] M. M. Scheinman, T. E. Bell, and the executive committee of the percutaneous cardiac mapping and ablation registry, “Catheter ablation of the atrioventricular junction: a report of the percutaneous mapping and ablation registry,” *Circulation*, vol. 70, pp. 1024–1029, 1984.
- [31] F. Morady, M. M. Scheinman, L. A. Di Carlo, J. C. Davis, J. M. Herre, J. C. Griffin, S. A.

- Winston, M. Buttler, C. B. Hantler, J. A. Wahr, W. H. Kou, and S. D. Nelson, "Catheter ablation of ventricular tachycardia with intracardiac shocks: results in 33 patients," *Circulation*, vol. 75, pp. 1037–1049, 1987.
- [32] 奥村謙, 相澤義房, 相原直彦, 青沼和隆, 沖重薫, 熊谷浩一郎, 庄田守男, 住友直方, 高橋淳, 内藤滋人, 中村好秀, 野上昭彦, 平尾見三, 松本万夫, 村川裕二, 山根禎一, "カテーターアブレーションの適応と手技に関するガイドライン," *Circ J* 2012, pp. 3–67, 2012.
- [33] S. Nath, J. P. DiMarco, and D. E. Haines, "Basic aspects of radiofrequency catheter ablation," *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 5, pp. 863–876, 1994.
- [34] J. J. Langberg, H. Calkins, R. El-Atassi, M. Borganelli, A. Leon, S. J. Kalbfleisch, and F. Morady, "Temperature monitoring during radiofrequency catheter ablation of accessory pathways," *Circulation*, vol. 86, pp. 1569–1474, 1992.
- [35] T. Arita, S. Kubota, K. Okamoto, F. Kuma, K. Nakasuga, H. Koga, H. Ito, T. Maruyama, Y. Kaji, and M. Harada, "Bezold-Jarisch-like reflex during Brockenbrough's procedure for radiofrequency catheter ablation of focal left atrial fibrillation: report of two cases." *J Interv Card Electrophysiol*, vol.8 pp. 195–202, 2003.
- [36] 青沼和隆, 松崎益徳, *不整脈を診る・治す-非薬物療法のすべて-*, 東京: 文光堂, 2009, pp. 176–292.
- [37] F. G. Cosio, M. López-Gil, A. Goicolea, F. Arribas, and J. L. Barroso, "Radiofrequency ablation of the inferior vena cava-tricuspid valve isthmus in common atrial flutter," *Am J Cardiol*, vol. 71, pp. 705–709, 1993.
- [38] 井上博, 奥村謙, *EPS 臨床心臓電気生理検査*, 東京; 医学書院, pp.28–44, 2007.
- [39] L. Gepstein, G. Hayam, and S. A. Ben-Haim, "A novel method for nonfluoroscopic catheter-based electroanatomical mapping of the heart *in vitro* and *in vivo* accuracy results," *Circulation*, vol. 95, pp. 1611–1622, 1997.
- [40] Biosense Webster 社 ホーム ページ, 製品紹介 (CARTO system), <https://www.biosensewebster.com/products/carto-3.aspx> (2015/4/24)
- [41] St. Jude Medical 社 ホーム ページ, 製品紹介 (EnSite Array catheter), <http://www.sjm.co.jp/medical/af/af12.html> (2015/4/24)
- [42] St. Jude Medical 社 ホーム ページ, 製品紹介 (EnSite NavX catheter), <http://professional.sjm.com/products/ep/mapping-visualization/> (2015/4/24)
- [43] H. Calkins, J. Brugada, D. L. Packer, R. Cappato, S. A. Chen, H. J. Crijns, R. J. Damiano Jr., D. W. Davies, D. E. Haines, M. Haissaguerre, Y. Iesaka, W. Jackman, P. Jais, H. Kottkamp, K. H. Kuck, B. D. Lindsay, F. E. Marchlinski, P. M. McCarthy, J. L. Mont, F. Morady, K. Nademanee, A. Natale, C. Pappone, E. Prystowsky, A. Raviele, J. N. Ruskin, and R. J. Shemin, "HRS/EHRA/ECAS Expert Consensus Statement on Catheter and Surgical Ablation of Atrial

- Fibrillation: Recommendations for Personnel, Policy, Procedures and Follow-Up: a report of the Heart Rhythm Society (HRS) Task Force on Catheter and Surgical Ablation of Atrial Fibrillation developed in partnership with the European Heart Rhythm Association (EHRA) and the European Cardiac Arrhythmia Society (ECAS); in collaboration with the American College of Cardiology (ACC), American Heart Association (AHA), and the Society of Thoracic Surgeons (STS). Endorsed and approved by the governing bodies of the American College of Cardiology, the American Heart Association, the European Cardiac Arrhythmia Society, the European Heart Rhythm Association, the Society of Thoracic Surgeons, and the Heart Rhythm Society,” *Europace*, vol. 9, pp. 335–379, 2007.
- [44] H. Hoyt, A. Bhonsale, K. Chilukuri, F. Alhumaid, M. Needleman, D. Edwards, A. Govil, S. Nazarian, A. Cheng, C. A. Henrikson, S. Sinha, J. E. Marine, R. Berger, H. Calkins, and D. D. Spragg, “Complications arising from catheter ablation of atrial fibrillation: Temporal trends and predictors,” *Heart Rhythm*, vol. 8, pp. 1869–1874, 2011.
- [45] H. Oral, B. P. Knight, M. Ozaydm, H. Tada, A. Chugh, S. Hassan, C. Scharf, S. W. K. Lai, R. Greenstein, F. Pelosi, Jr, S. A. Strickberger, and F. Morady, “Clinical significance of early recurrences of atrial fibrillation after pulmonary vein isolation,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 40, pp. 100–104, 2002.
- [46] T. Okada, T. Yamada, Y. Murakami, N. Yoshida, Y. Ninomiya, T. Shimizu, J. Toyama, Y. Yoshida, T. Ito, N. Tsuboi, T. Kondo, Y. Inden, M. Hirai, and T. Murohara, “Prevalence and severity of left atrial edema detected by electron beam tomography early after pulmonary vein ablation,” *J Am Coll Cardiol*, vol.49, pp. 1436– 1442, 2007.
- [47] L. Macle, P. Jaïs, R. Weerasooriya, M. Hocini, D. C. Shah, K. Choi, C. Scavée, F. Raybaud, J. Clementy, and M. Haïssaguerre, “Irrigated-tip catheter ablation of pulmonary veins for treatment of atrial fibrillation,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 13, pp. 1067–1073, 2002.
- [48] Biosense Webster 社 ホーム ページ , 製品 紹介 (ThermocoolSF catheter), <http://www.biosensewebster.com/thermocoolsf.php> (2014/6/25)
- [49] W. Stevenson, “Irrigated RF ablation: Power titration and fluid management for optimal safety and efficacy,” *Biosense Webster*, 0605002.5, 2005.
- [50] G. B. Chierchia, A. Sorgente, A. Sarkozy, C. Asmundis, and P. Brugada, “The use of cryoballoon ablation in atrial fibrillation: simplifying pulmonary vein isolation?,” *J Atr Fibrillation*, vol. 3, pp. 33–43, 2010.
- [51] S. R. Dukkipati, K. Kuck, P. Neuzil, I. Woollett, J. Kautzner, H. T. McElderry, B. Schmidt, E. P. Gerstenfeld, S. K. Doshi, R. Horton, A. Metzger, A. d’Avila, J. N. Ruskin, A. Natale, and V. Y. Reddy, “Pulmonary vein isolation using a visually–guided laser balloon catheter: the first 200-patient multicenter clinical experience,” *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 6, pp. 467–472,

- 2013.
- [52] H. Sohara, S. Satake, H. Takeda, Y. Yamaguchi, H. Toyama, K. Kumagai, T. Kuwahara, A. Takahashi, and T. Ohe, “Radiofrequency hot balloon catheter ablation for the treatment of atrial fibrillation: A3-center study in Japan,” *J Arrhythm*, vol. 29, pp. 20–27, 2013.
- [53] Medtronic 社ホームページ, 製品紹介 (Arctic Front catheter), <http://www.cryocath.com/> (2014/7/1).
- [54] P. Kojodjojo, M. D. O’Neil, P. B. Lim, L. M. Lawes, Z. I. Whinnett, T. V. Salukhe, N. W. Linton, D. Lefroy, A. Mason, I. Wright, N. S. Peters, P. Kanagaratnam, and D. W. Davies, “Pulmonary venous isolation by antral ablation with a large cryoballoon for treatment of paroxysmal and persistent atrial fibrillation: medium-term outcomes and non-randomised comparison with pulmonary venous isolation by radiofrequency ablation,” *Heart*, vol. 96, pp. 1379–1384, 2010.
- [55] A. V. Sarabanda, T. J. Bunch, S. B. Johnson, S. Mahapatra, M. A. Milton, L. R. Leite, G. K. Bruce, and D. L. Packer, “Efficacy and safety of circumferential pulmonary vein isolation using a novel cryothermal balloon ablation system,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 46, pp. 1902–1912, 2005.
- [56] Cardio focus 社ホームページ, 製品紹介 (Heart light), <http://cardiofocus.com/> (2014/7/1).
- [57] V. Y. Reddy, P. Neuzil, S. Themistoclakis, S. B. Danik, A. Bonso, A. Rossillo, A. Raciele, R. Schweikert, S. Ernst, K. Kuck, and A. Natale, “Visually-guided balloon catheter ablation of atrial fibrillation. Experimental feasibility and first-in-human multicenter clinical outcome,” *Circulation*, vol. 120, pp. 12–20, 2009.
- [58] S. R. Dukkupati, P. Neuzil, J. Skoda, J. Petru, A. d’Avila, S. K. Doshi, and V. Y. Reddy, “Visual balloon-guided point-by-point ablation: reliable, reproducible, and persistent pulmonary vein isolation,” *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 3, pp. 266–273, 2010.
- [59] K. Tanaka, S. Satake, S. Saito, S. Takahashi, T. Hiroe, Y. Miyashita, S. Tanaa, M. Tanaka, and Y. Watanabe, “A new radiofrequency thermal balloon catheter for pulmonary vein isolation,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 38, pp. 2079–2086, 2001.
- [60] L. V. A. Boersma, M. C. E. F. Wijffels, H. Oral, E. F. D. Wever, and F. Morady, “Pulmonary vein isolation by duty-cycled bipolar and unipolar radiofrequency energy with a multielectrode ablation catheter,” *Heart Rhythm*, vol. 5, pp. 1635–1642, 2008.
- [61] R. Rosso, A. Halkin, Y. Michowitz, B. Belhassen, A. Glick, and S. Viskin, “Radiofrequency ablation of paroxysmal atrial fibrillation with the new irrigated multipolar nMARQ ablation catheter: Verification of intracardiac signals with a second circular mapping catheter,” *Heart Rhythm*, vol. 11, pp. 559–565, 2014.
- [62] Medtronic 社ホームページ, 製品紹介 (PVAC catheter), <http://www.cryocath.com/> (2014/7/1).



[63] Biosense Webster 社 ホーム ページ , 製 品 紹 介 (nMARQ catheter),  
<http://www.biosensewebster.com/nmarqgen.php> (2014/6/25)

## 図表

表 2-1 各イオンの細胞内および細胞外濃度

	<b>Intracellular</b>	<b>Extracellular</b>
Na <sup>+</sup>	10 mM	140 mM
K <sup>+</sup>	140 mM	4 mM
Ca <sup>2+</sup>	0.1 μM	2 mM
Cl <sup>-</sup>	30 mM	140 mM

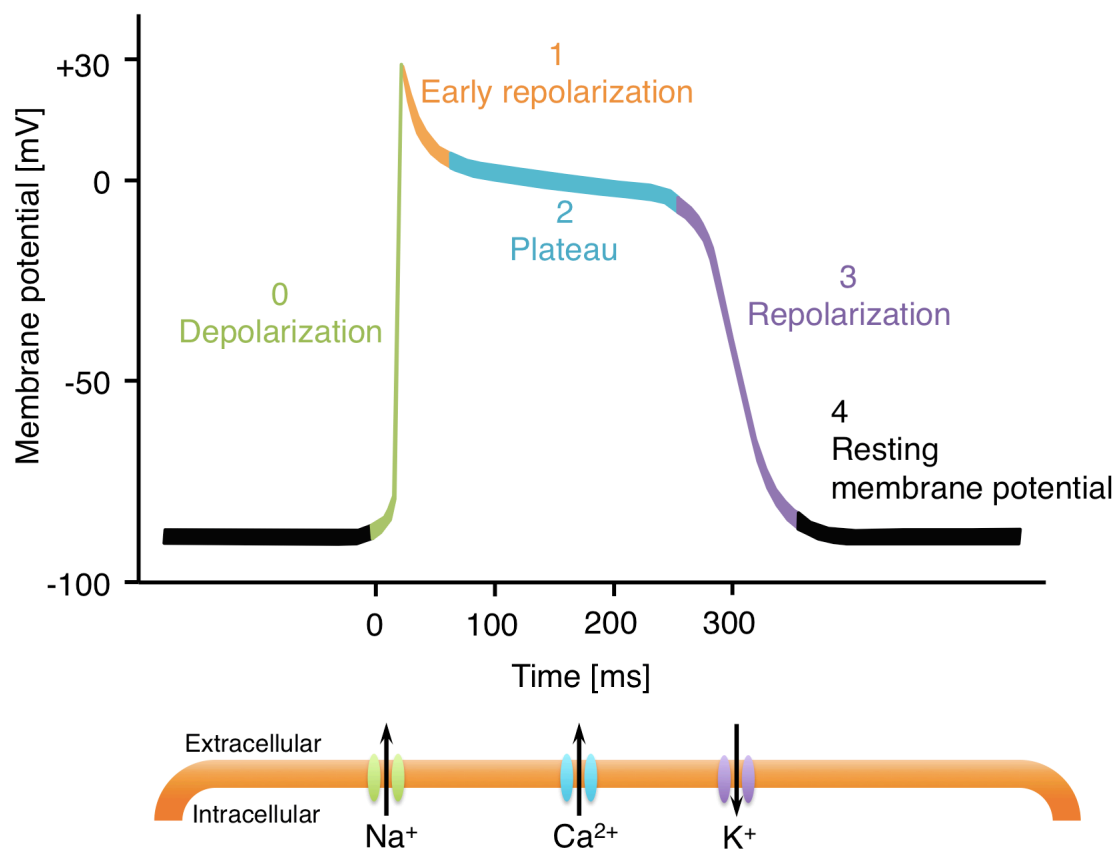


図 2-1 心筋細胞の活動電位

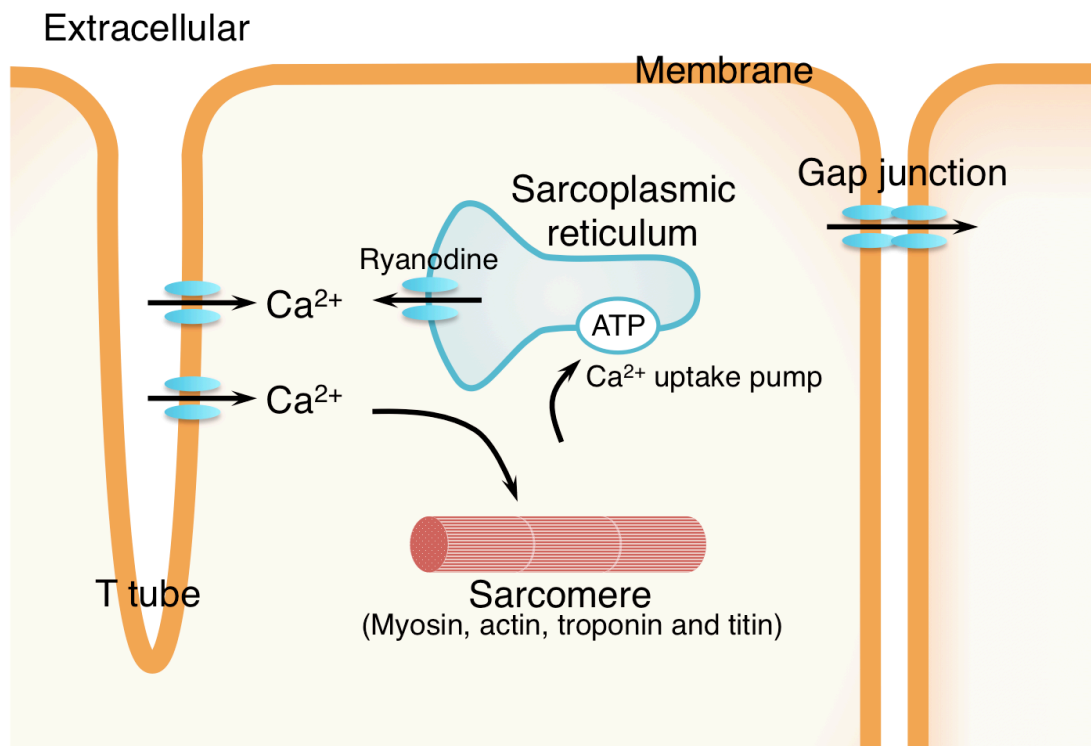


図 2-2 心筋細胞の構造とイオンの流れ

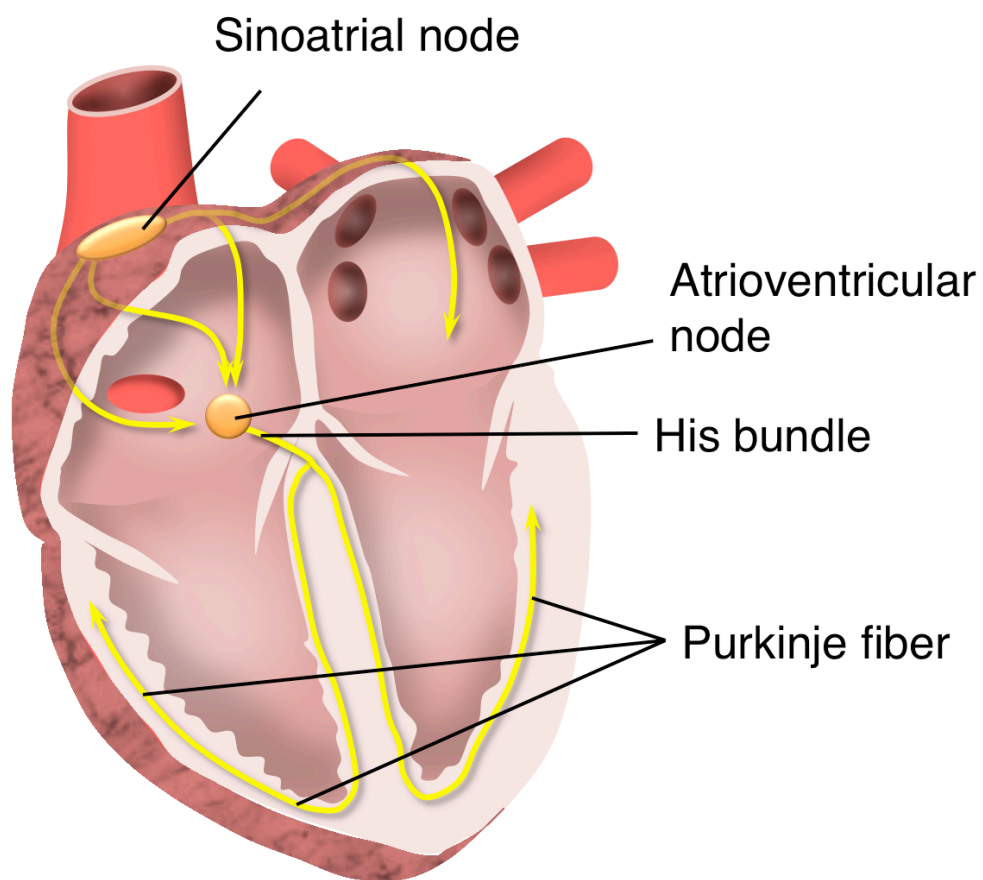


図 2-3 心臓の電気伝導系

表 2-2 心房性頻脈性不整脈の分類、原因、日本での不整脈全体に占める出現頻度

<b>Atrial tachyarrhythmia</b>	<b>Pulse rate [pulse/min]</b>	<b>Origin</b>	<b>Incidence ratio in arrhythmia [%]</b>
Premature atrial contraction			4.8
Supraventricular tachycardia	<230		
–WPW syndrome		Kent bundle	0.3
–Atrioventricular nodal reentrant tachycardia		Around atrioventricular node	0.2
Atrial flutter			0.9
–Type I	240 – 340	Right atrium, cavotricuspid isthmus	
–Type II	340 – 440	Right atrial upper loop, right atrial free wall, left atrium	
Atrial fibrillation	>350	Left atrium, pulmonary vein	6.7

表 2-3 心室性頻脈性不整脈の分類、原因、日本での不整脈全体に占める出現頻度

<b>Ventricular tachyarrhythmia</b>	<b>Pulse rate [pulse/min]</b>	<b>Origin</b>	<b>Incidence ratio in arrhythmia [%]</b>
Premature ventricular contraction		Left ventricle	8.7
Ventricular tachycardia	>100	Left ventricle	0.3
Ventricular fibrillation	>300	Left ventricle	

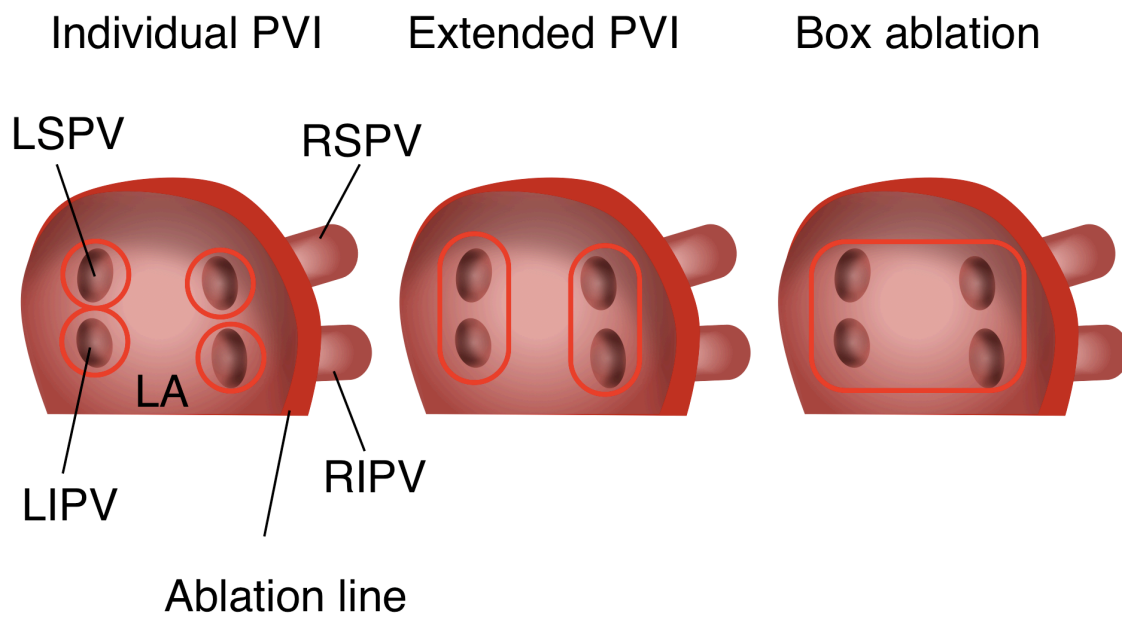


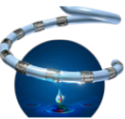





図 2-4 肺静脈隔離術に用いられる電気伝導遮断線



表 2-4 新しいアブレーションカテーテルの諸元

Catheter type	Name	Shape	Mechanism	Irrigation	Diameter	Input power
Irrigation catheter	ThermoCool® Biosense Webster		Radio-frequency	Irrigation	7.5 Fr	<30 W
Ring catheter	PVAC® Medtronic		Radio-frequency	-	-	<10 W /electrode
	nMARQ® Biosense Webster		Radio-frequency	Irrigation	8.5 Fr	<25 W /electrode
Balloon catheter	Arctic Front® Medtronic		Cryoablation	-	10.5 Fr	-
	Hotballoon Toray-Satake		Hotballoon	-	12 Fr	<12 W
	HeartLight® Cardiofocus		Laser	-	13 Fr	<150 W



## 第3章 光増感反応による治療

### 3.1 緒言

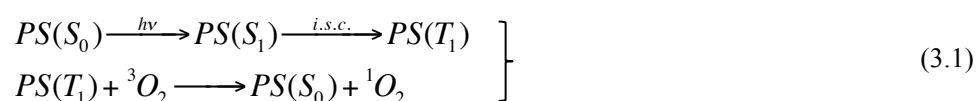
光線力学的治療は、光増感反応によって産生される一重項酸素の酸化作用を利用した治療法であり、悪性腫瘍の選択的治療などに臨床応用されている。本章では、光増感反応の原理と主な光感受性薬剤について説明し、光増感反応を用いた種々の治療について述べる。

### 3.2 光増感反応

光線力学的治療の原理である光増感反応における、内部エネルギー機構について述べ、臨床応用されている光感受性薬剤について説明する。

#### 3.2.1 光増感反応の原理

光増感反応は、光と酸素と光感受性薬剤による光化学反応である。光増感反応のエネルギー機構を図 3-1 に示した [1]。基底状態 ( $S_0$ ) にある光感受性薬剤が励起光を吸収して励起状態 ( $S_1$ ) に遷移し、一部は蛍光を發して基底状態に戻る。励起された光感受性薬剤の大部分が、項間交差によって励起三重項状態 ( $T_1$ ) に移行する。この状態からのエネルギー経路は 3 種類存在する。励起三重項状態の光感受性薬剤周囲に存在する基底状態の酸素分子  $^3O_2$  ( $T_0$ ) にエネルギー移乗することで、酸素が一重項状態 ( $S_1$ ) に遷移し一重項酸素  $^1O_2$  となる。この反応を Type II 反応と呼ぶ [2]。光感受性薬剤の励起一重項状態の寿命は液中で  $10^{-9}$ – $10^{-8}$  s であるのに対して、三重項状態の寿命は  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  s と長いので、酸素との反応が高効率で進行する [3, 4]。上述の Type II 反応以外にリン光を發して基底状態に戻る経路、およびラジカルまたはラジカルイオンと酸素の反応による Type I 反応がある [2, 5]。Type I 反応を起こすためには、光感受性薬剤の移動度に励起三重項状態の光感受性薬剤の寿命を乗じた約 10 Å の範囲内に、生体内基質と励起三重項状態の光感受性薬剤が存在する必要がある。一方、同時に励起三重項状態の光感受性薬剤寿命範囲内に溶存酸素が衝突すると Type II 反応が生じる [6, 7]。生体内で Type I 反応と Type II 反応のどちらが支配的になるかは、反応環境や物質によって左右される。一般的に励起三重項寿命が長く、酸素の多い状況では Type II 反応が支配的になる [6, 7]。Type II 反応の光増感反応による一重項酸素産生の反応式を以下に示す。



発生した一重項酸素は、その酸化力によって脂質や蛋白質などで構成される生体分子と反応し、細胞の変性や壊死を起こす。一重項酸素の半減期は 10–320 ns と短く、液中での拡散

距離 10–55 nm に対応するので [8, 9]、光増感反応による影響範囲は光感受性薬剤の分布する部位に限定される [8, 10]。一重項酸素による障害の効果は光の放射照射量、光感受性薬剤の吸収特性、吸収した光子数に対する一重項酸素生成量子収率  $\Phi_{\Delta}$  によって決定される [5, 11]。一重項酸素の生成によって、光感受性薬剤自体が酸化されて構造が変化し、光感受性薬剤の蛍光が減衰する。産生された一重項酸素の間接的な計測方法としてこの光感受性薬剤蛍光の減衰変化が用いられている [12, 13]。

### 3.2.2 光感受性薬剤

光感受性薬剤は、ヘモグロビンや葉緑素などの基本骨格となるポルフィリン関連化合物の誘導体である。図 3-2 にポルフィリン化合物の化学構造を示す [14]。ポルフィリン化合物は蛋白質に対する高い親和性を有している。ポルフィリン化合物は周囲に水分が多い環境では親水基を外側にした形態、周囲に油脂が多い環境では親油基を外側にした形態をとる、いわゆるスタッキング現象と呼ばれる性質により両媒性を示す [14]。このため血中では低比重リポ蛋白質 (Low Density Lipoprotein; LDL) と強い親和性を持つ [14]。腫瘍細胞は LDL レセプター活性が健常細胞と比べて高いため、ポルフィリンと結合した低比重リポタンパクを能動的に細胞内に取り込む。腫瘍組織にはリンパ組織が未発達で組織からの排泄能力が小さいという特徴があるため、ポルフィリンは腫瘍組織で高濃度に存在しやすい [15]。これが一般に集積性と言われている現象である。この集積性を利用し、光増感反応は悪性腫瘍に対する選択的治療方法に応用されてきた。光感受性薬剤に求められる特徴として、(i) 生体組織における光侵達長が長い近赤外波長域 (600–800 nm) の吸収が大きいこと、(ii) 一重項酸素生成量子収率  $\Phi_{\Delta}$  が大きいこと、(iii) 光照射を行わないときの光感受性薬剤単体での毒性が低いこと、(iv) 生体からの排泄が速いこと、が挙げられる [16]。本節では、多くの光感受性薬剤の中で、日本で臨床適用されている代表的な薬剤の特性や適用疾患について述べる。

第一世代光感受性薬剤であるポルフィマーナトリウム (フォトフリン®、分子量: 1,231.28–4,883.3) (ファイザー株式会社, USA) は、日本国内で 1994 年に早期肺癌治療薬として認可を受けた [17]。図 3-3 にポルフィマーナトリウムの化学分子式を示す。波長 635 nm に吸収ピークを有し、モル吸収係数は  $1\text{--}2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  である [18]。ポルフィマーナトリウムの光感受性薬剤としての課題は、(i) 励起波長での生体光侵達長が 1–3 mm と治療深度が浅いこと [5, 16, 19]、(ii) 光吸収効率が低いこと [17]、(iii) 生体における代謝が遅く光線過敏症の発症リスクが 4–6 週間の長期におよぶこと [5, 16, 19]、(iv) 重合数 60 以上の化合物であり化学的に不安定であること [5, 16]、であった。

第二世代光感受性薬剤では第一世代光感受性薬剤よりも、吸収帯波長が長波長側になり、励起効率が高く、排泄も速く改善されている [14]。生体内に存在する主な吸収体は水、メラニン、およびヘモグロビンである [1]。これらの吸収が小さい 650–850 nm は生体の分光

学的窓と呼ばれる [1]。第二世代光感受性薬剤では、第一世代光感受性薬剤のポルフィマーナトリウムの励起波長 630 nm から、この分光学的窓に入るよう長波長化することで、生体組織への侵達性が高くなり、より深部への治療が可能となった。健常組織からの薬剤排泄が速くなったことから、光線力学的治療の問題である皮膚光過敏症を防ぐための遮光期間を短縮することができる。臨床適用されている代表的な第二世代光感受性薬剤は、早期肺癌治療および原発性悪性脳腫瘍治療に使われるタラポルフィンナトリウム（レザフィリン®、別名: mono-L-aspartyl chlorin e6, NPe6, LS11, 分子量: 799.69）(Meiji seika ファルマ株式会社, 日本) と、加齢黄斑変性症治療に使われるベルテポルフィリン（ビスダイン®, 別名: BPD-MA, 分子量: 718.79）(ノバルティスファーマ株式会社, 日本) である。タラポルフィンナトリウムは植物クロロフィル由来のクロリン環骨格にアスパラギン酸をアミド結合させた化合物である [20]。図 3-4 にタラポルフィンナトリウムの化学構造を示す [20]。速い排泄は水溶性によって達成されている。タラポルフィンナトリウムは生体内でアルブミンと結合しているために、大部分が胆汁として排泄され、排泄速度がポルフィマーナトリウムと比較して速い。一方、親水性および親油性の塩基を有するため、細胞膜への受動輸送が行われやすく、細胞内への移行が速いという特徴がある [5, 21]。Q 帯吸収ピークは波長 664 nm に、Soret 帯吸収ピークは波長 404 nm にある (図 5-3 参照) [5, 22]。Q 帯吸収ピークにおけるモル吸収係数は  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  とポルフィマーナトリウムより 20–40 倍高い [18, 20]。ベルテポルフィリンは BPD-MA (benzoporphyrin derivative monoacid) の 2 つの異性体である BPD-MA<sub>C</sub> と BPD-MA<sub>D</sub> を等量ずつ含んだリポゾーム製剤である。血管外への漏出を防止するように大きい薬剤形態となっている。図 3-5 に化学分子式を示す [23]。Q 帯吸収ピークを波長 690 nm に有し、そのモル吸収係数は  $3.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  である [5, 16, 24]。

静脈注射されたタラポルフィンナトリウムは、血中で大部分がアルブミンと結合して運搬されて分布する。静脈注射後の時間に伴い、胆汁や尿として血液中からの排泄が起きる。図 3-6 にタラポルフィンナトリウムを  $40 \text{ mg/m}^2$  投与した後のヒト血漿中濃度変化を示す [20]。各臓器を箱 (コンパートメント) として考える代表的な薬物動態の解析モデルでは、体循環コンパートメントから末梢コンパートメントへ移行する分布相と、排泄によって消失する消失相に分けて解析を行う。タラポルフィンナトリウムの分布相半減期は  $14.6 \pm 2.96 \text{ h}$ 、消失相半減期は  $138 \pm 21.4 \text{ h}$ 、全身クリアランスは  $19.0 \pm 3.8 \text{ ml/hr/m}^2$  と報告されている [20]。血液中のタラポルフィンナトリウムは次第に血管壁を通過して組織間質液中に分布し、徐々に組織細胞中および血管壁の細胞に取り込まれ始める。

### 3.2.3 光増感反応による細胞障害

光増感反応産生物である一重項酸素の影響範囲は限局され、光感受性薬剤が分布する部分だけで酸化作用すなわち障害効果が起こる (3.2.1 節参照)。光感受性薬剤の分布する部位によって、光感受性薬剤を細胞内光増感反応と細胞外光増感反応に大別した。図 3-7 に細胞

内光増感反応および細胞外光増感反応の概要を示す。悪性腫瘍に対する光線力学的治療に代表されるように、腫瘍細胞への集積性利用した治療では光感受性薬剤投与後から治療までの時間を設け、細胞が光感受性薬剤に長時間接触することで細胞内に光感受性薬剤を取り込ませる。取り込まれた光感受性薬剤に励起光を照射することで細胞内で光増感反応が起きる。一方、細胞と光感受性薬剤の接触時間を短く設定すると、光感受性薬剤が細胞外に高濃度で分布する。細胞外に分布する光感受性薬剤に励起光を照射することで細胞外で光増感反応が起きる。

細胞内光増感反応によって細胞内小器官に障害を受けた場合、遺伝子によって制御された能動的な細胞死であるアポトーシスが引き起こされることが知られている [25, 26]。アポトーシスは、細胞内の障害を受けた部位によってアポトーシスに至る経路が異なり、数時間から数日を要する [25, 26]。ポルフィマーナトリウムが集積するミトコンドリアの障害では、ミトコンドリアから漏出したシトクロムcが、アポトーシス誘導因子であるカスパーゼ9を活性化し、クロマチンの凝集や核の断片化といったアポトーシスに特有な細胞形態変化や生化学的变化を起こす。タラポルフィンナトリウムが集積するライソソームの障害では、障害の程度により誘導される細胞死の機構が異なる [27]。ライソソームが低い障害により部分的に破壊された場合、カテプシン等のライソソーム由来のプロテアーゼによりカスパーゼファミリーやBcl-2ファミリー等細胞内因子を活性化し、ミトコンドリア等を経由しアポトーシスが誘導される [27]。ライソソームが高い障害により完全に破壊されるとネクローシスを生じる。

細胞外光増感反応によって細胞膜に障害を受けた場合、細胞膜やイオンチャネルに即時的な障害を受け、これにより細胞内に $\text{Ca}^{2+}$ が流入する [28]。流入した $\text{Ca}^{2+}$ によって細胞が膨化し、細胞壊死に至る [28]。数時間から数日を要するアポトーシスと比較して、細胞外光増感反応によって生じる $\text{Ca}^{2+}$ の流入や細胞壊死といった細胞障害効果は、数十 sから数十 minと速く生じる [28]。細胞外光増感反応による細胞障害については3.4部で詳述する。

### 3.3 細胞内光増感反応を用いた光線力学的治療の適用と運用法

悪性腫瘍に対する光線力学的治療は、光感受性薬剤の腫瘍集積性を利用した細胞内光増感反応の応用であり、低侵襲な選択的治療として臨床応用されている。光線力学的治療の治療プロトコルと特徴について述べ、光線力学的治療の課題を説明する。

#### 3.3.1 細胞内光増感反応による悪性腫瘍に対する光線力学的治療の運用法

現在認可されている悪性腫瘍の治療法には、ポルフィマーナトリウムとタラポルフィンナトリウムを用いた治療がある。ポルフィマーナトリウムは、肺癌、子宮頸癌、食道癌、および胃癌治療に適用されており、肺癌症例が最も多い。適応範囲は外科手術など他の根治療法が不可能な場合に限られている。機能温存が必要であり且つ内視鏡的に病巣全容が

観察できる早期肺癌、機能温存が必要な子宮頸部初期癌および表在型食道癌、表在型早期胃癌に使用しても良い [17]。ポルフィマーナトリウムを 2 mg/kg で静脈注射し、投与後 48–72 h で光照射を行う。ポルフィマーナトリウムは健常組織では肝臓や腎臓を除いて 24 h 以内にほとんど排泄されているが、腫瘍組織には健常組織の 3–10 倍の濃度でポルフィマーナトリウムが存在している状態となるため、腫瘍組織のみを選択的に治療することができる [29]。Q 帯吸収ピークのある波長 630 nm で励起し、光増感反応を起こす。励起光源は 1994 年にエキシマダイレーザ PDT EDL-1 (浜松ホトニクス株式会社, 日本) が厚生労働省の認可を受け、1998 年にエキシマダイレーザ PDT EDL-2 (浜松ホトニクス株式会社, 日本) と Nd:YAG レーザの第二高調波光源 (YAG-OPO レーザ 1000, 石川島システムテクノロジー株式会社, 日本) が認可を受けた。これらの励起光源はレーザ装置が大型で消費電力が大きいため、設置条件に制限がある。表 3-1 に種々の癌に対する光線力学的治療におけるレーザ照射条件を示す [14]。対象とする疾患により異なるが、標準的には照射条件は 4 mJ/pulse、繰返し周波数 20–40 Hz である。皮膚に残留するポルフィマーナトリウムと環境光による光増感反応によって光線過敏症を生じる可能性がある。そのため、治療後 1 ヶ月間は直射日光および集中光を避け、照度 100–300 lx の薄暗い室内で過ごす必要がある [17]。これを厳密に運用するために遮光入院が必要であると考えられる医師も多い。

タラポルフィンナトリウムを用いた早期肺癌治療および原発性悪性脳腫瘍では、タラポルフィンナトリウムを 40 mg/m<sup>2</sup> 静脈注射し、投与後 4–6 h で光照射を行う。2003 年に日本国内で、発振中心波長 664 nm の PDT 用半導体レーザ (Panalas 6405, 松下産業機器株式会社, 日本) が励起光源として認可を受けている。放射照度を 150 mW/cm<sup>2</sup> で 100 J/cm<sup>2</sup> 照射する。そのため照度 500 lx 以下の室内で過ごす遮光期間は、治療後 2 週間とポルフィマーナトリウムの 1 ヶ月と比較して短い [20]。

### 3.3.2 細胞内光増感反応による光線力学的治療の課題

光線力学的治療では、血管閉塞による治療効果の不均一性と、皮膚日光過敏症を防ぐための遮光入院の 2 つが主な課題となっている。健常組織血管および腫瘍組織血管の状態を比較すると、腫瘍組織の血管は健常血管と比較して不均一な分布や太さを持つ [30]。健常血管では動脈網と静脈網が規則的に配置されており血流速が速く安定しているのに対し、腫瘍組織では血管の配向が屈曲して不均一で、血流速も遅く局所的に停滞したり、逆流している。また腫瘍血管では血管内皮が未成熟であるため、光増感反応により容易に血栓が形成され血管閉塞によって組織血流量が低下する [31, 32]。血流量が不均一になることで酸素供給が不足する部位が発生し、治療効果にも不均一が生じるという問題がある。

光感受性薬剤は可視青色領域に Soret 帯と呼ばれる大きな吸収があるため、投与後一定時間を過ぎて皮膚での光感受性薬剤濃度が一定以下になるまでは、皮膚に日光過敏症を生じる。そのため、その間日光等の光に当たらないように遮光期間が設けられており、これを

厳密に運用するためには入院が必要になる (3.3.1 節参照)。このことは、患者の quality of life の低下だけでなく、入院医療費の増加につながり、光線力学的治療の普及を妨げる要因の一つとなっている。一方で、皮膚残留薬剤を蛍光計測によって測定することで、退院時期判断の支援を行うことが検討されている [33]。光感受性薬剤の排泄は個人による差が大きいため、指定された遮光期間内であっても、皮膚残留薬剤が十分少ないと判断されれば、遮光入院期間を短縮することが期待されている。さらに現在複数開発が進められている第三世代光感受性薬剤では、例えば腫瘍組織に集積した場合のみ光増感反応を起こす光学的特徴を有する薬剤など、選択性や排泄性などを改善に向けて研究が進められている [34]。

### 3.4 細胞外光増感反応

光増感反応の治療応用として、光感受性薬剤の集積性を利用せず、細胞の外側に光感受性薬剤が存在する状態で光照射を行う細胞外光増感反応がある。治療の選択性は光感受性薬剤の集積ではなく、光照射によって与えられる。細胞外光増感反応を用いた、感染症に対する光線力学的治療と頻脈性不整脈に対する光線力学アブレーションの治療プロトコルと特徴について述べる。

#### 3.4.1 細胞外光増感反応による感染症に対する光線力学的治療

感染症に対する光線力学的治療 (抗菌PDT, antimicrobial-PDT) は、細菌だけでなく真菌やウイルスに対しても効果があることから、幅広い病原体に対する新しい治療法として期待され、研究が進められている [35, 36]。通常の抗生剤とは異なる一重項酸素の酸化障害を作用機序としているため、薬剤を用いた治療において問題であった薬剤耐性菌に対しても治療効果が得られるというメリットがある [37]。細菌、真菌、ウイルス、を対象とした治療法として、ウイルス性乳頭腫症、にきび治療、歯周病治療に対して臨床試験が進められている [35, 36]。使用されている代表的な光感受性薬剤は、ポルフィリン、フタロシアニン、フェノチアジンである。フェノチアジンは、自然界にカチオン性、単純な三環平面構造を有している。カチオン性の光感受性薬剤は微生物細胞に対して殺細胞効果が有意に高いことが知られている [37]。最も広く使用される化合物は、メチレンブルー (methylene blue)、トルイジンブルー (toluidine blue) である。溶液中の最大吸収波長はメチレンブルーが656 nm、トルイジンブルーが625 nmである。メチレンブルーを用いた抗菌PDTの研究として、メチレンブルーを濃度450–500  $\mu\text{g/ml}$ で口腔投与し、投与10 min後に、拡散長1 cmの拡散光照射ファイバーから275 J/cmの光照射を行うことで、カンジダ・アルビカンスを根絶できると報告されている [37]。光感受性薬剤が細胞膜や外膜に分布した状態で光照射を行う細胞外光増感反応によって、細菌、真菌、ウイルスの不活性化や壊死を起こす原理である [35, 36]。



### 3.4.2 細胞外光増感反応による頻脈性不整脈に対する光線力学アブレーション

頻脈性不整脈に対する光線力学アブレーションでは、一重項酸素の酸化による心筋組織壊死を、頻脈性不整脈治療における電気伝導遮断線の作成に応用している [28, 38–40]。代謝の早いタラポルフィンナトリウムを光感受性薬剤として用いる。光感受性薬剤の集積性を持たない健常な心筋組織を対象とするため、光感受性薬剤投与後 15–30 min から光照射を開始する。光感受性薬剤が心筋間質中に分布した状態で光照射を行う細胞外光増感反応によって、イオンチャネル障害を含んだ細胞膜障害とそれに続く細胞壊死を起こし、即時かつ永続的な心筋電気伝導遮断を実現する [28]。頻脈性不整脈に対する光線力学アブレーションの詳細は4章にまとめた。

### 3.5 結言

本章では、光増感反応の原理とその治療応用について述べた。臨床応用されている光線力学的治療について、悪性腫瘍治療の治療プロトコル、用いられている光感受性薬剤、治療の課題について説明した。悪性腫瘍治療と異なり、光感受性薬剤の集積性をしない細胞外光増感反応について、代表的な感染症に対する光線力学的治療と頻脈性不整脈に対する光線力学アブレーションについて述べた。

## 参考文献

- [1] 小原實, 荒井恒憲, 緑川克実, *レーザ応用工学*, コロナ社, 1993, pp. 189–192.
- [2] C. H. Sibata, V. C. Colussi, N. L. Oleinick, and T. J. Kinsella, “Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment,” *Braz J Med Biol Res*, vol. 33, pp. 869–880, 2000.
- [3] T. Takemura, S. Nakajima, and I. Sakata, “Critical importance of the triplet lifetime of photosensitizer in photodynamic therapy of tumor,” *Photochem Photobiol*, vol. 50, pp. 339–344, 1989.
- [4] M. C. DeRosa and R. J. Crutchley, “Photosensitized singlet oxygen and its applications,” *Coord Chem Rev*, vol. 233, pp. 351–371, 2002.
- [5] H. van den Bergh, and J. P. Ballini, *PDT in ocular disease*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004, pp. 11–42.
- [6] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, and Q. Peng, “Photodynamic Therapy: Review,” *J Natl Cancer Inst*, vol. 90, pp. 889–902, 1998.
- [7] K. R. Weishaupt, C. J. Gomer, and T. J. Dougherty, “Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor,” *Cancer Res*, vol. 36, pp. 2326–2329, 1976.
- [8] R. W. Redmond and I. E. Kochevar, “Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen,” *Photochem Photobiol*, vol. 82, pp. 1178–1186, 2006.
- [9] J. S. Dysart and M. S. Patterson, “Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro,” *Phys Med Biol*, vol. 50, pp. 2597–2616, 2005.
- [10] J. Moan, K. Berg, E. Kvam, A. Western, Z. Malik, A. Ruck, and H. Schneckenburger, “Intracellular localization of photosensitizers,” *Ciba Found Symp*, vol. 146, pp. 95–107, discussion 107–111, 1989.
- [11] M. Ochsner, “Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours,” *Photochem Photobiol B: Biol*, vol. 39, pp. 1–18, 1998.
- [12] B. C. Wilson, M. S. Patterson, and L. Lilge, “Review article Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a new paradigm,” *Laser Med Sci*, vol. 12, pp. 182–199, 1997.
- [13] R. Bonnett and G. Martinez, “Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy,” *Tetrahedron*, vol. 57, pp. 9513–9547, 2001.
- [14] 中島 進, 竹村 健, 阪田 功, *PDT ハンドブック*, 東京: 医学書院, 2002, pp. 1–10.
- [15] A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, “Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction,” *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 2, pp. 91–106, 2005.

- [16] R. Allison and C. H. Sibata, "Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review," *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 7, pp. 61–75, 2010.
- [17] ファイザー株式会社, フォトフリン® 静注用 75 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2013年1月改訂 (改訂第10版).
- [18] A. E. O'Connor, W. M. Gallagher, and A. T. Byrne, "Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy," *Photochem Photobiol*, vol. 85, pp. 1053–1074, 2009.
- [19] P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. C. Wilson, and J. Golab, "Photodynamic therapy of cancer: an update," *CA Cancer J Clin*, vol. 61, pp. 250–281, 2011.
- [20] Meiji Seika ファルマ株式会社, 注射用レザフィリン® 100 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2013年12月改訂 (改訂第6版).
- [21] D. Kessel, "Determinants of photosensitization by mono-L-aspartyl chlorin e6," *Photochem Photobiol*, vol. 49, pp. 447–452, 1989.
- [22] J. D. Spikes and J. C. Bommer, "Photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): A candidate for the photodynamic therapy of tumors," *J Photochem Photobiol B*, vol. 17, pp. 135–143, 1993.
- [23] ノバルティスファーマ株式会社, ビスダイン® 静注用 15 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2013年5月改訂 (新様式第6版).
- [24] R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, X. H. Hu, C. J. H. Childs, and C. H. Sibata, "Photosensitizers in clinical PDT," *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 1, pp. 27–42, 2004.
- [25] P. Mroz, A. Yaroslavsky, G. B. Kharkwal, and M. R. Hamblin, "Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer," *Cancers*, vol. 3, pp. 2516–2539, 2011.
- [26] N. L. Oleinick, R. L. Morris and I. Balichenko, "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how," *Photochem Photobiol Sci*, vol. 1, pp. 1–21, 2002.
- [27] J. J. Reiners Jr, J. A. Caruso, P. Mathieu, B. Chelladurai, X-M Yin, and D. Kessel, "Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage," *Cell death and differentiation*, vol. 9, pp. 934–944, 2002.
- [28] A. Ito, T. Kimura, S. Miyoshi, S. Ogawa, and T. Arai, "Photosensitization reaction-induced acute electrophysiological cell response of rat myocardial cells in short loading periods of talaporfin sodium or porfimer sodium," *Photochem Photobiol*, vol. 87, pp. 199–207, 2011.
- [29] J. V. Moore, C. M. L. West, and C. Whitehurst, "The biology of photodynamic therapy," *Phys Med Biol*, vol. 42, pp. 913–935, 1997.

- [30] R. K. Jain, L. L. Munn, and D. Fukumura, “Dissecting tumor pathophysiology using intravital microscopy,” *Nat Rev Cancer*, vol. 2, pp. 266–276, 2002.
- [31] G. M. Tozer, C. Kanthou, and B. C. Baguley, “Disrupting tumor blood vessels,” *Nat Rev Cancer*, vol. 5, pp. 423–435, 2005.
- [32] T. Nagao, M. Takahashi, K. Matsuzaki, and H. Minamitani, “Application of bioimaging techniques to mechanistic studies on photodynamic therapy,” *Bioimages*, vol. 11, pp. 53–60, 2003.
- [33] M. Takahashi and T. Arai, “Fluorescence sensing system by Soret-band LED light excitation for estimating relative talaporfin sodium concentration in skin,” *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, vol. 11, pp. 586–594, 2014.
- [34] J. G. Moser, *Photodynamic Tumor Therapy: 2nd and 3rd Generation Photosensitizers*, London: Gordon and Breach, 1998, pp. 3–34.
- [35] M. Wainwright, “Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT),” *J Antimicrob Chemother*, vol. 42, pp. 13–28, 1998.
- [36] M. R. Hamblin and T. Hasan, “Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?,” *Photochem Photobiol Sci*, vol. 3, pp. 436–450, 2004.
- [37] M. C. Teichert, J. W. Jones, M. N. Usacheva, and M. A. Biel, “Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model.” *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, vol. 93, pp. 155–160, 2002.
- [38] A. Ito, S. Hosokawa, S. Miyoshi, K. Soejima, S. Ogawa, and T. Arai, “The myocardial electrical blockade induced by photosensitization reaction,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 57, pp. 488–495, 2010.
- [39] A. Ito, S. Miyoshi, T. Kimura, S. Takatsuki, K. Fukumoto, K. Fukuda, and T. Arai, “Myocardial electrical conduction block induced by photosensitization reaction in exposed porcine hearts *in vivo*,” *Lasers Surg Med*, vol. 43, pp. 984–990, 2011.
- [40] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, K. Fukumoto, M. Takahashi, E. Ogawa, A. Ito, T. Arai, S. Ogawa, and K. Fukuda, “Nonthermal cardiac catheter ablation using photodynamic therapy,” *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 6, pp. 1025–1031, 2003.

図表

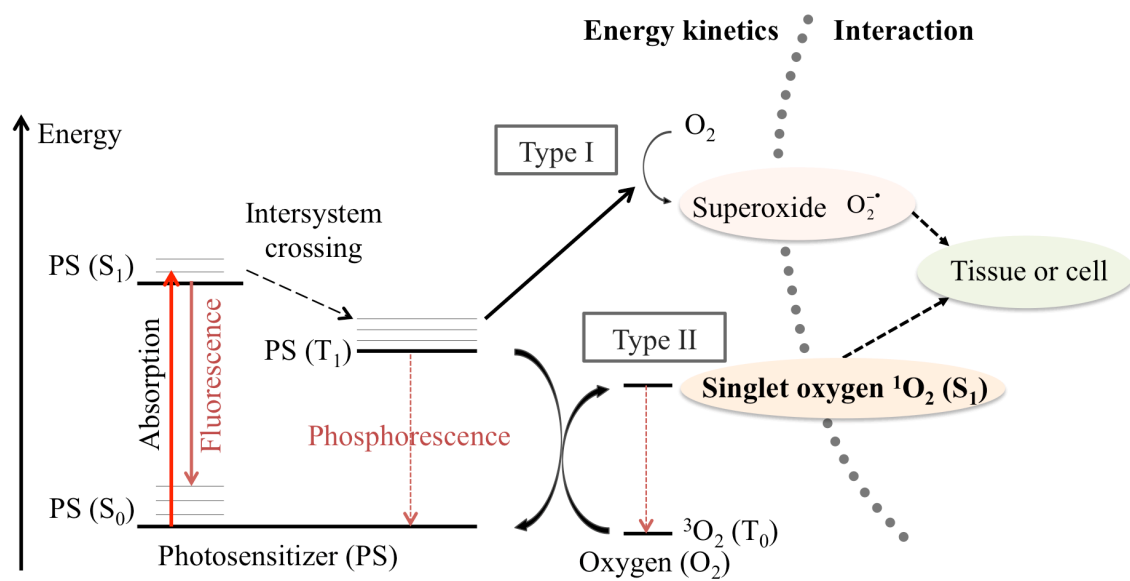


図 3-1 光増感反応のエネルギー機構

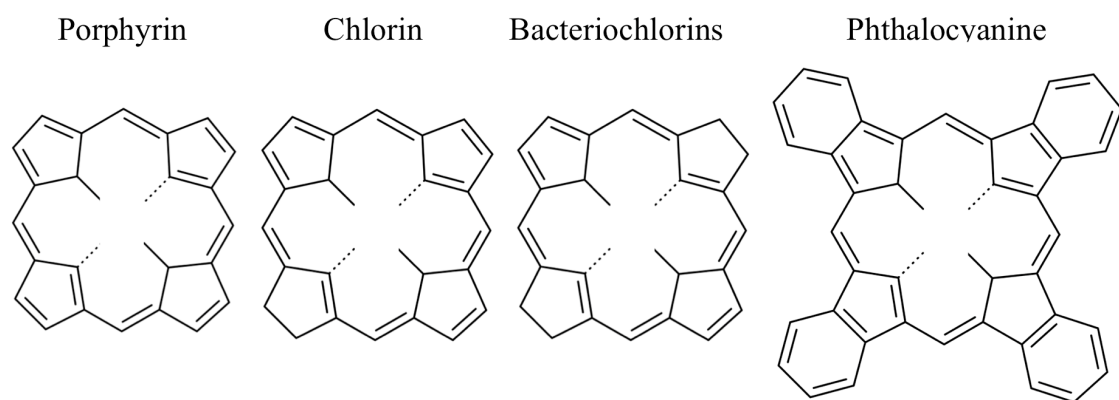


図 3-2 種々のポルフィリン化合物構造

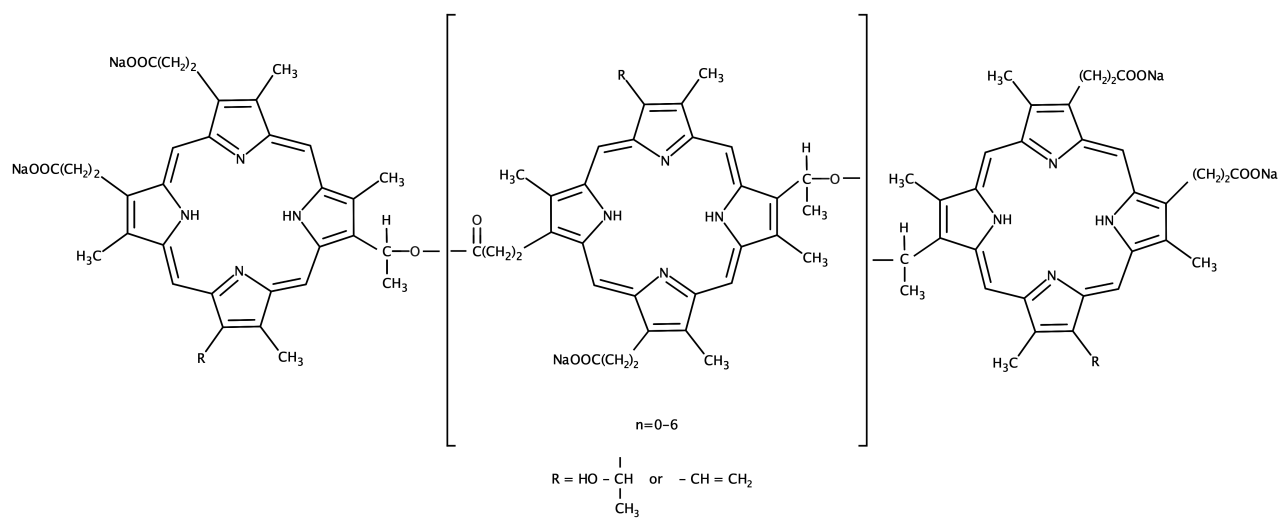


図 3-3 ポルフィリンの化学構造

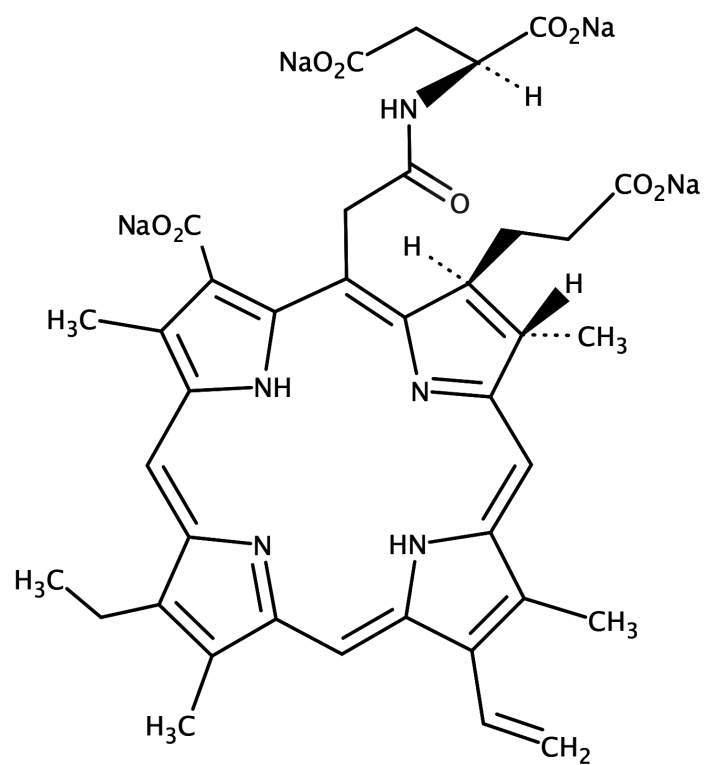


図 3-4 タラポルフィンナトリウムの化学構造



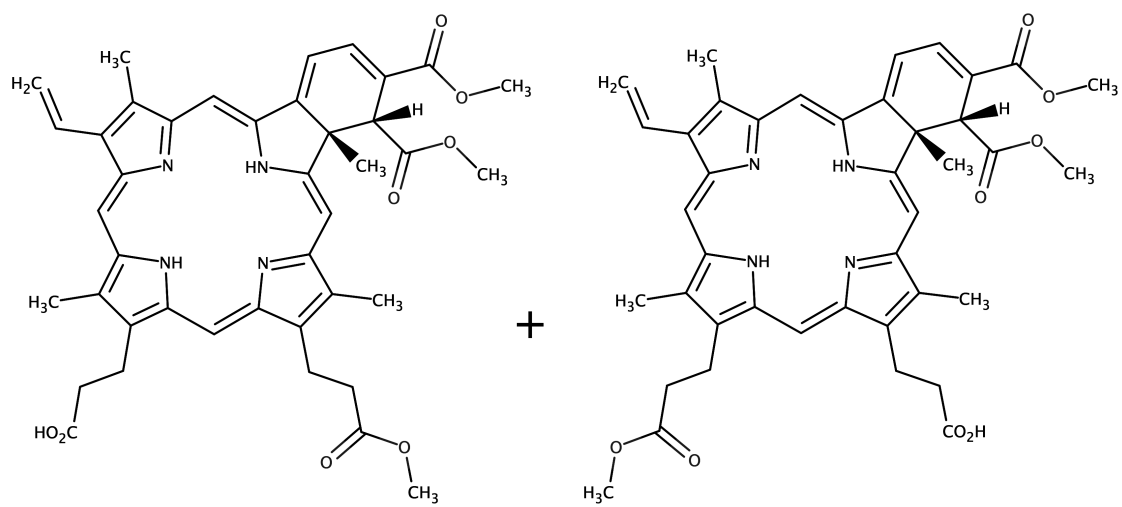


図 3-5 バルテポルフィリンの化学構造

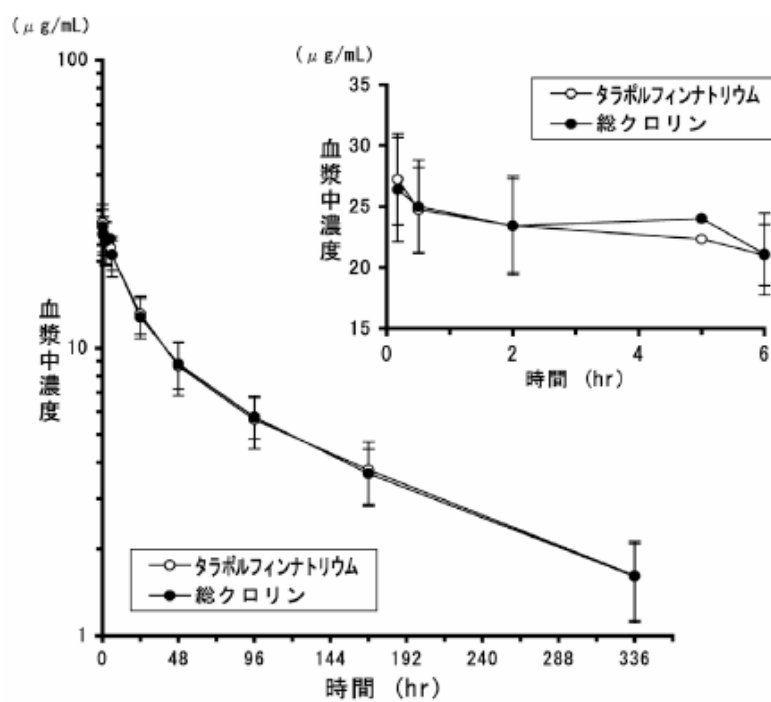


図 3-6 タラポルフィンナトリウムを  $40 \text{ mg/m}^2$  投与した後のヒト血漿中濃度変化 (文献 [20] より引用)

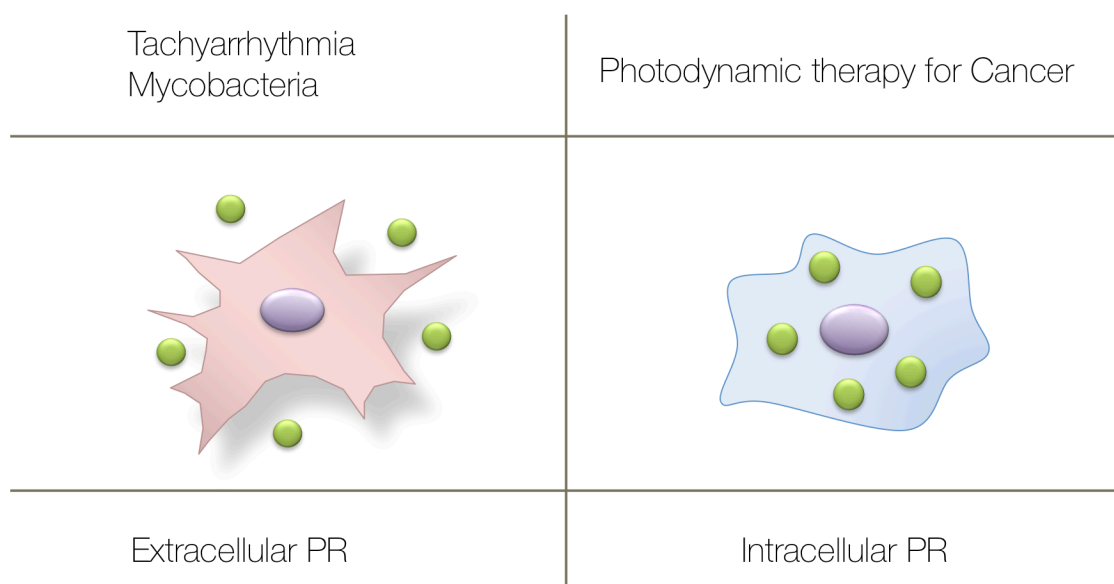


図 3-7 細胞内光増感反応および細胞外光増感反応とその適用

表 3-1 種々の癌に対するポルフィマーナトリウムを用いた光線力学的治療におけるレーザ照射条件

<b>Disease</b>	<b>Fiber diameter [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>Tip output [mJ/pulse]</b>	<b>Pulse frequency [Hz]</b>	<b>Radiant exposure [J/cm<sup>2</sup>]</b>
Early lung cancer	400	2-4	30-40	100-500
Superficial esophageal cancer	400	4	40	60-150
Early superficial gastric cancer	400	4	20-40	60-200
Cervical cancer early and dysplasia	400, 800	4-8	40	100

## 第4章 細胞外光増感反応による光線力学アブレーション

### 4.1 緒言

本章では、著者らが提案する光増感反応を用いた光線力学アブレーションについて説明する。また現行の高周波カテーテルアブレーションの課題である熱発生を抑制できる細胞外光増感反応による心筋電気伝導遮断の原理、臨床治療の構想、開発の現状を述べる。著者らが本研究で取り組む研究、すなわち光線力学アブレーションによる治療の安全性と有効性を確実なものにするための、光感受性薬剤の投与条件や光照射条件などのパラメータ、治療効果に影響をおよぼす可能性のある反応周囲環境要素に関する調査の必要性を説明する。

### 4.2 細胞外光増感反応による頻脈性不整脈の電気伝導遮断治療の提案

本研究では従来癌に対する治療として用いられてきた光線力学的治療の原理である光増感反応を、頻脈性不整脈の電気伝導遮断治療に応用することを構想している。図 4-1 に光増感反応を用いた電気伝導遮断の構想を示す。心房性頻脈性不整脈治療の根治療法として用いられる高周波カテーテルアブレーションは、過剰な熱発生による重篤な副作用が課題でとなっている (2.4.2 節参照)。光増感反応産生物の酸化作用による組織障害を、頻脈性不整脈の電気伝導遮断に応用することで、熱発生の少ない電気伝導遮断が可能となり、現行の頻脈性不整脈治療の熱的な副作用を根本的に解決できると考えられる。

光線力学的治療は腫瘍組織と健常組織の光感受性薬剤排泄速度の差により薬剤投与後生じる光感受性薬剤濃度のコントラストを用い、光感受性薬剤投与から数 h のインターバルを設定することで選択的に癌を治療する (3.3.1 節参照)。腫瘍細胞内に取り込まれた光感受性薬剤により光増感反応を起し、細胞内の障害によりアポトーシスを誘導する。一方、本研究で対象とする健常心筋組織に対して、光感受性薬剤の集積性はない。そのため本法では、インターバルを設けずに光感受性薬剤静注後早期に光照射を行うことで、細胞外で光増感反応を起こすデザインとした。腫瘍組織の血管は断面が大きく不揃いで、血管内皮が未成熟であるため、悪性腫瘍に対する光線力学的治療では血流閉止が起こりやすく、治療が不均一に生じる問題があった。一方健常組織を対象とする本法では健常血管の構造および血流速が安定しているため、血管閉塞が生じにくく均一で安定した治療効果が期待される。健常心筋組織を対象とした本法では、排泄性が高く反応効率の高いタラポルフィンナトリウムを採用した。タラポルフィンナトリウム (Meiji Seika ファルマ株式会社, 東京, 日本) は高排泄性や長波長励起を目指して開発された第二世代の光感受性薬剤で、植物クロロフィル由来のクロールン環にアスパラギン酸をアミド結合させた化合物である (図 3-5 参照)。生体内に投与されたタラポルフィンナトリウムは血中で主に血清アルブミンと結合し

て体内を循環する。水溶性の物質で胆汁排泄による高い排泄性が特徴である [1, 2]。タラポルフィンナトリウムの吸収は生体内でアルブミンと結合することで長波長にシフトし、Q 帯吸収ピークは波長 664 nm である。この Q 帯のモル吸光係数は  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  と大きい [3]。この大きい吸収および長い三重項寿命により、他の光感受性薬剤と比較して一重項酸素産生効率が低い [4]。三重項状態のエネルギーレベルより計算された一重項酸素産生の量子収率は 0.77 である [5]。タラポルフィンナトリウムは心筋細胞において接触から 15 min 以内では細胞内よりも細胞外が高濃度であり、徐々に細胞内にエンドサイトーシスによって取り込まれ、数 h 経過すると細胞内のライソソームに高濃度で分布する [6]。

### 4.3 細胞外光増感反応による光線力学アブレーションの原理と運用構想

細胞外光増感反応による光線力学アブレーションの原理と運用構想に関して述べる。本法は現行の高周波カテーテルアブレーション治療とほぼ同じ術手技で行う予定である。光感受性薬剤を投与して、レーザカテーテルの先端から赤色光を放射して光感受性薬剤の励起を行う。図 4-2 に想定している治療のプロトコルとその細胞レベルの作用原理を示す。想定している治療プロトコルを以下に示す。

#### 1. カテーテル挿入

現行のアブレーション治療と同じように、局所麻酔後に大腿静脈からレーザ装置に接続されたレーザカテーテルと電気生理学的検査用の電極カテーテルを血管シースを通して下大静脈に挿入し、X 線透視下で心臓内腔に到達させる。

#### 2. 光感受性薬剤の投与

タラポルフィンナトリウムを静脈注射投与する。心筋組織に均一に分布した時点で光照射を開始する。

#### 3. 光照射部位の決定

あらかじめ電気生理学的検査の上診断および計画された遮断線に、X 線透視あるいは 3 次元マッピングシステムの併用によってカテーテルの位置決めを行う。

#### 4. 光照射

計画した遮断線にレーザカテーテルを接触させながら光照射をし、光増感反応を起こす。光照射は point-to-point テクニック (2.4.1 節参照) あるいは据付型の一括照射 (2.4.3 節参照) で行うことを考えている。Point-to-point テクニックを用いた点状照射の場合、照射部位の 1 点当たりの照射時間は  $<60 \text{ s/point}$ 、放射照度:  $<10 \text{ W/cm}^2$ 、スポット径:  $1.4 \text{ mm}\Phi$  を想定している。心筋細胞外に高濃度で分布した光感受性薬剤によって細胞外で一重項酸素が産生する。

#### 5. 即時的な電気伝導遮断の確認

心筋細胞外で発生した一重項酸素によって、心筋細胞のイオンチャネル障害や膜障害が生じ、即時的に電気伝導性が失われる (4.4.1 節参照)。その後心筋細胞壊死によって治療部位

の永続的な電気伝導遮断が達成される。カテーテル先端電位と電気生理学的検査用の電極カテーテルの電位を測定し、先端電極電位の消失や電気伝導パターンの変化で電気伝導遮断を確認する。

#### 4.4 細胞外光増感反応による光線力学アブレーション開発研究

著者らは細胞外光増感反応による頻脈性不整脈治療の開発を目指し、基礎検討からデバイスを開発を進めてきた。これまでの研究と開発の現状について述べる。

##### 4.4.1 細胞外光増感反応による生体反応

細胞外光増感反応による心筋組織の電気伝導遮断について、電気伝導遮断の原理解明および実証が進められてきた。

ラット心筋細胞を用いた *in vitro* 実験で細胞外光増感反応による心筋の電気伝導遮断の原理が Ito らによって報告されている [6]。図 4-3 にタラポルフィンナトリウム的心筋細胞への取り込みを蛍光顕微鏡で調査した結果を示す。心筋細胞でも癌細胞のようにタラポルフィンナトリウムがライソゾームに取り込まれていた。細胞の電気生理学的障害を評価する方法として細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を測定することで心筋細胞の電気生理学的障害の評価が報告されている [6]。図 4-4 に細胞外光増感反応中における  $\text{Ca}^{2+}$  濃度と形態観察を示す。光感受性薬剤が細胞外に高濃度で分布する接触時間 15 min 以内に光照射をすると、図 4-4(A) に示すように拍動が停止し細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が単調増加し、光照射後細胞には図 4-4(B) に示すようにブレブが観察された。光照射から 2 h 後において細胞壊死が確認された [6]。これらの結果から、細胞外光増感反応によって、心筋細胞イオンチャネル障害や膜障害による即時的な電気伝導遮断と、壊死による永続的な電気伝導遮断の両方が実現可能であることが明らかになった。

摘出ラット心筋組織を用いた細胞外光増感反応中の *ex vivo* 電気生理学的測定実験で、急性電気伝導遮断が Ito らによって実証されている [7]。具体的には、タラポルフィンナトリウムを 2 mg/kg 静脈投与して 1 h 後に摘出したラット右心室壁を用い、図 4-5 に示したような実験配置で電気刺激を与え、心筋伝播電位を計測した。一方の測定電極を電気刺激から隔離するように線状に細胞外光増感反応を起こした。この測定電極の電位は、細胞外光増感反応後に消失し、反応による急性の電気伝導遮断が実証された。ラットの房室結節を用いた *in vivo* 実験で、細胞外光増感反応による慢性電気伝導遮断が Ito らによって実証されている [7, 8]。細胞外光増感反応によって *in vivo* で房室結節遮断を作成し、心電図によって急性期と 2 週間後の電気伝導遮断を実証した。図 4-6 に急性の心電図および 2 週間後の Azan 染色標本を示す。染色標本において組織の瘢痕化が確認された。この組織像により心筋細胞壊死による永続的な電気伝導遮断が生じることが確認された。ブタを用いた *in vivo* 実験で、細胞外光増感反応による電気伝導遮断がカテーテルインターベンション下で実証され

ている [9, 10]。カテーテルは 4.4.2 節の直射型カテーテルを用いている。ブタの三尖弁輪間解剖学的峽部に電気伝導遮断を達成した。この焼灼部位は、臨床における心房粗動の焼灼部位に相当する。図 4-7 に示したように、多電極カテーテルによる電位計測によって、光増感反応の前後で三尖弁輪周囲の伝導方向が逆転し、光照射部位近傍の心筋の電位が消失、遮断が達成されていることが分かった。このように、光線力学アブレーションについて基礎的な原理は解明されてきたが、有効・安全に臨床使用できる光増感反応条件の検討は十分ではない。

#### 4.4.2 デバイスの開発

本治療では、光増感反応の励起光源としてタラポルフィンナトリウムの Q 帯吸収に中心発振波長を有する半導体レーザを用いる。レーザカテーテルには、従来の高周波カテーテルアブレーションと同じ手技で (2.4 部参照) アブレーションが可能な直射型レーザカテーテルと、環状ないしは線状一括アブレーションが可能な拡散型レーザカテーテルを開発している [11, 12]。図 4-8 に開発したレーザ装置を示す。

初めに開発された直射型レーザカテーテルは、カテーテル内に細径で柔軟な光ファイバー (石英ガラス, コア径: 200  $\mu\text{m}$ , N.A.: 0.37) (WF200/220P37, Ceram Optec, USA) を設置し、レーザ装置からカテーテル先端に励起光を伝送する。図 4-9 にカテーテル先端の内部構造を示す [11]。カテーテル外径は 7 Fr (2.33 mm $\Phi$ ) で、現行の高周波カテーテルと同じように、プルワイヤー方式でカテーテル先端部の曲がり角度を調節することができる。先端電極と複数のリング状電極によって、治療中の組織バイポーラ電位を計測可能である。図 4-10 に直射型レーザカテーテル先端からの光照射の状態および光強度分布を示す [13]。光強度分布はガウシアン分布類似である [13]。カテーテルから励起光を照射すると、組織からの拡散反射光と蛍光が光ファイバーを通して先端からレーザ装置側に戻る。この戻り光の光感受性薬剤蛍光の時間変化により、治療の状態を知ることができる [14]。戻り光の拡散反射光の時間変化によって、先端窓での血液の焦げ付きを事前に検知することも可能である [15]。光感受性薬剤投与直後は血中薬剤濃度が組織中薬剤濃度よりも高いため、戻り光に含まれる蛍光強度を測定することで、カテーテルの心筋組織への接触を光学的に判定することができる [16]。

拡散型カテーテルでは、環状型に成形したカテーテル内に柔軟なプラスチック光ファイバーを設置し、レーザ装置からカテーテル先端に光を伝送する。プラスチック光ファイバーの先端側部はブラスト加工された光拡散体である。光拡散体長は最大 120 mm まで任意の長さに製作できる。図 4-11 に拡散型カテーテル先端からの光照射の状態およびカテーテルチューブの周囲方向への実測および計算による光強度分布を示す [17]。



#### 4.5 細胞外光増感反応による心筋細胞の障害：本研究の対象

頻脈性不整脈の電気伝導遮断治療には、数十 s から数 min の即時的応答を示す電気伝導遮断と、永続的な電気伝導遮断の両方が必要であるという特徴がある (2.4.1 節参照)。光線力学アブレーションは、現行の光線力学的治療と異なり、細胞外光増感反応を作用原理としている (3.4.2 節参照)。電気伝導遮断を一重項酸素の酸化作用によって行うことで、現行の高周波アブレーションにおける熱的副作用の根本的な解決が期待される。この新しい治療を実現するにあたり、細胞外光増感反応による心筋細胞の障害効果を明らかにする必要がある。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つの障害作用について明らかにする必要がある。

表 4-1 に臨床応用に求められる条件を示す。臨床応用において求められる治療深度、所要時間、電気生理学的応答を満足する光増感反応条件を探索する必要がある。図 4-12 に *in vivo* 治療状態を *in vitro* で再現する場合の対応関係を示す。(i) タラポルフィンナトリウムがどのように細胞に到達するのか、(ii) どのような光増感反応が起こるのか、(iii) その作用結果として急性および遅発性の生体相互作用がどのように起こるのか、の3点についてそれぞれ *in vitro* と *in vivo* の対応を示した。*in vivo* ではタラポルフィンナトリウムが静注投与後の経過時間に伴って、血中から心筋組織間質中に分布した後、心筋細胞に取り込まれる。*in vitro* 系では、この光感受性薬剤の蓄積量を光感受性薬剤接触時間によって変化させる。パラメーターの対応としては、*in vivo* での静注後経過時間と *in vitro* での薬剤と心筋細胞の接触時間が対応する。光増感反応については、*in vivo* 心筋組織中での光増感反応を心筋細胞を用いた *in vitro* 系で再現する。パラメーターとしては、タラポルフィンナトリウム濃度、放射照度、および照射時間によって変化させた放射照射量がある。*in vivo* においてはこの他に、対象組織の血清蛋白濃度、酸素分圧、組織温度、および血流速、の反応周囲環境要素が反応に影響をおよぼす。これらの *in vivo* 環境は *in vitro* 系では溶液の血清蛋白濃度、酸素分圧、溶液温度に対応する。急性および遅発性の生体相互作用の作用結果は、*in vivo* における細胞外光増感反応による即時的かつ永続的な心筋組織の電気伝導遮断、*in vitro* 系の電気生理学的障害とそれに続く細胞死に対応する。

図 4-13 に本研究で検討する細胞外光増感反応による心筋細胞への障害を示す。細胞外光増感反応による光線力学アブレーションを安全かつ有効に運用するための *in vitro* 基礎実験として、細胞外光増感反応の進行や各パラメーターの影響、心筋細胞に対する光感受性薬剤の蓄積量変化、および光増感反応による心筋細胞への障害効果、の3点について検討する必要がある。細胞外光増感反応の進行については、使用した *in vitro* 実験系における酸素環境に着目し *in vivo* への拡張解釈を可能とする基礎的な調査を行う必要がある。光増感反応のパラメーターとして、光、光感受性薬剤、アルブミン、および溶液温度を変化させて心筋細胞への障害効果を検討した。心筋細胞に対する光感受性薬剤の蓄積量については、

臨床応用においてタラポルフィンナトリウム静脈注射後に術時間が経過すると、光感受性薬剤は心筋細胞内へと取り込まれる。このような状態の心筋細胞では細胞内光増感反応によってアポトーシスなどの遅発性細胞死障害が生じる可能性があるため (3.2.3 節参照)、心筋細胞に対する光感受性薬剤の蓄積量変化を綿密に調査する必要がある。光増感反応による心筋細胞への障害効果について、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つについて種々の光増感反応条件において明らかにする必要がある。

#### 4.6 結言

本章では著者らが提案する光増感反応を応用した光線力学アブレーションの構想と原理について述べた。先行研究を総括し、開発の現状や今までに明らかになった細胞外光増感反応の生体相互作用を説明した上で、光線力学アブレーションによる治療を安全かつ有効なものにするために必要な基礎的な検討についてまとめた。

## 参考文献

- [1] Meiji Seika ファルマ株式会社, 注射用レザフィリン® 100 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2013年12月改訂 (改訂第6版).
- [2] D. Kessel, "Pharmacokinetics of N-aspartyl chlorin e6 in cancer patients," *J Photochem Photobiol B*, vol. 39, pp. 81–83, 1997.
- [3] J. D. Spikes and J. C. Bommer "Photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors," *J Photochem Photobiol B Biol*, vol. 17, pp. 135–143, 1993.
- [4] M. C. DeRosa and R. J. Crutchley, "Photosensitized singlet oxygen and its applications," *Coord Chem Rev*, vol. 233, pp. 351–371, 2002.
- [5] C. Hadjur, N. Lange, J. Revstein, P. Monnier, H. van den Bergh, and G. Wagnieres, "Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta (tetrahydroxyphenyl) chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC," *J Photochem Photobiol B*, vol. 45, pp. 170–178, 1998.
- [6] A. Ito, T. Kimura, S. Miyoshi, S. Ogawa, and T. Arai, "Photosensitization Reaction-Induced Acute Electrophysiological Cell Response of Rat Myocardial Cells in Short Loading Periods of Talaporfin Sodium or Porfimer Sodium," *Photochem Photobiol*, vol. 87, pp. 199–207, 2011.
- [7] A. Ito, S. Hosokawa, S. Miyoshi, K. Soejima, S. Ogawa, and T. Arai, "The myocardial electrical blockade induced by photosensitization reaction," *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 57, pp. 488–495, 2010.
- [8] H. Matsuo, A. Ito, S. Miyoshi, K. Soejima, S. Ogawa, and T. Arai, "Novel non-thermal atrial fibrillation treatment with photosensitization reaction: Possibility of permanent electrical blockade in rat chronic model," *Proc SPIE*, vol. 7380, pp. 73805D, 2009.
- [9] A. Ito, S. Miyoshi, T. Kimura, S. Takatsuki, K. Fukumoto, K. Fukuda, and T. Arai, "Myocardial electrical conduction block induced by photosensitization reaction in exposed porcine hearts *in vivo*," *Lasers Surg Med*, vol. 43, pp. 984–990, 2011.
- [10] A. Ito, T. Kajihara, M. Takahashi, T. Kimura, K. Fukumoto, S. Takatsuki, S. Miyoshi, and T. Arai, "Non-thermal myocardial electrical conduction block by photosensitization reaction with catheterization in right atrium isthmus of porcine heart *in vivo*," *Proc SPIE*, vol. 7883, pp. 78833K, 2010.
- [11] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, K. Fukumoto, M. Takahashi, E. Ogawa, A. Ito, T. Arai, S. Ogawa, and K. Fukuda, "Nonthermal cardiac catheter ablation using photodynamic therapy," *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 6, pp. 1025–1031, 2003.
- [12] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, M. Takahashi, E. Ogawa, K. Nakajima, S. Kashimura, Y.

- Katsumata, T. Nishiyama, N. Nishiyama, Y. Tanimoto, Y. Aizawa, T. Arai, and K. Fukuda, “Electrical superior vena cava isolation using photodynamic therapy in a canine model,” *Europace*. 2015 Mar 29. pii: euv016.
- [13] 伊藤亜莉沙, 光増感反応の経カテーテル的心房性不整脈治療への応用に関する研究, 博士学位論文, 慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻, 2011.
- [14] M. Takahashi, A. Ito, T. Kimura, S. Takatsuki, K. Fukuda, and T. Arai, “Myocardial necrosis depth prediction during extracellular photosensitization reaction of talaporfin sodium by defined index using fluorescence measurement,” *Lasers Med Sci*, vol. 29, pp. 1173–1181, 2013.
- [15] M. Takahashi, A. Ito, S. Miyoshi, T. Kimura, S. Takatsuki, K. Fukuda, and T. Arai, “Study of blood charring precursor states using backscattering at 663 nm from blood and optical window boundary,” *Lasers Surg Med*, vol. 44, pp. 508–513, 2012.
- [16] 箱守志穂, 山口恭司, 玉村好司, 荒井恒憲, 伊藤亜莉沙, “判別装置及び判別方法,” 特開 2011–189019, 公開日 2011 年 9 月 29 日.
- [17] R. Matsuzaki and T. Arai, “Estimation of light distribution in myocardium by emission from 4-lumen tube with an optical diffuser for photosensitization based cardiac ablation,” *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, submitted, 2015.

図表

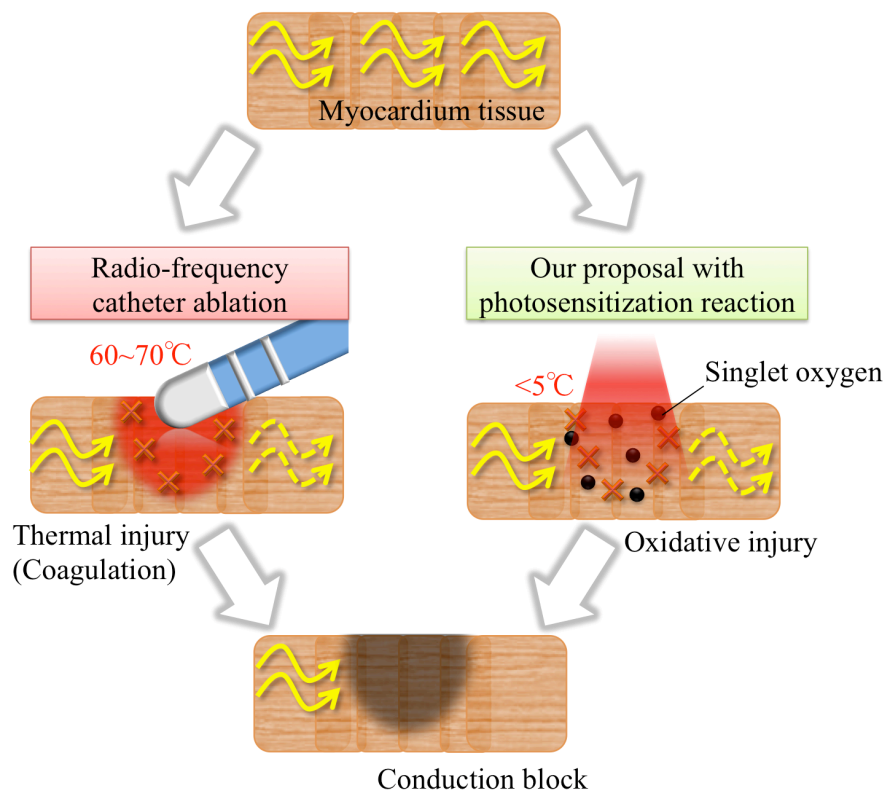


図 4-1 光増感反応を治療原理とする電気伝導遮断の構想

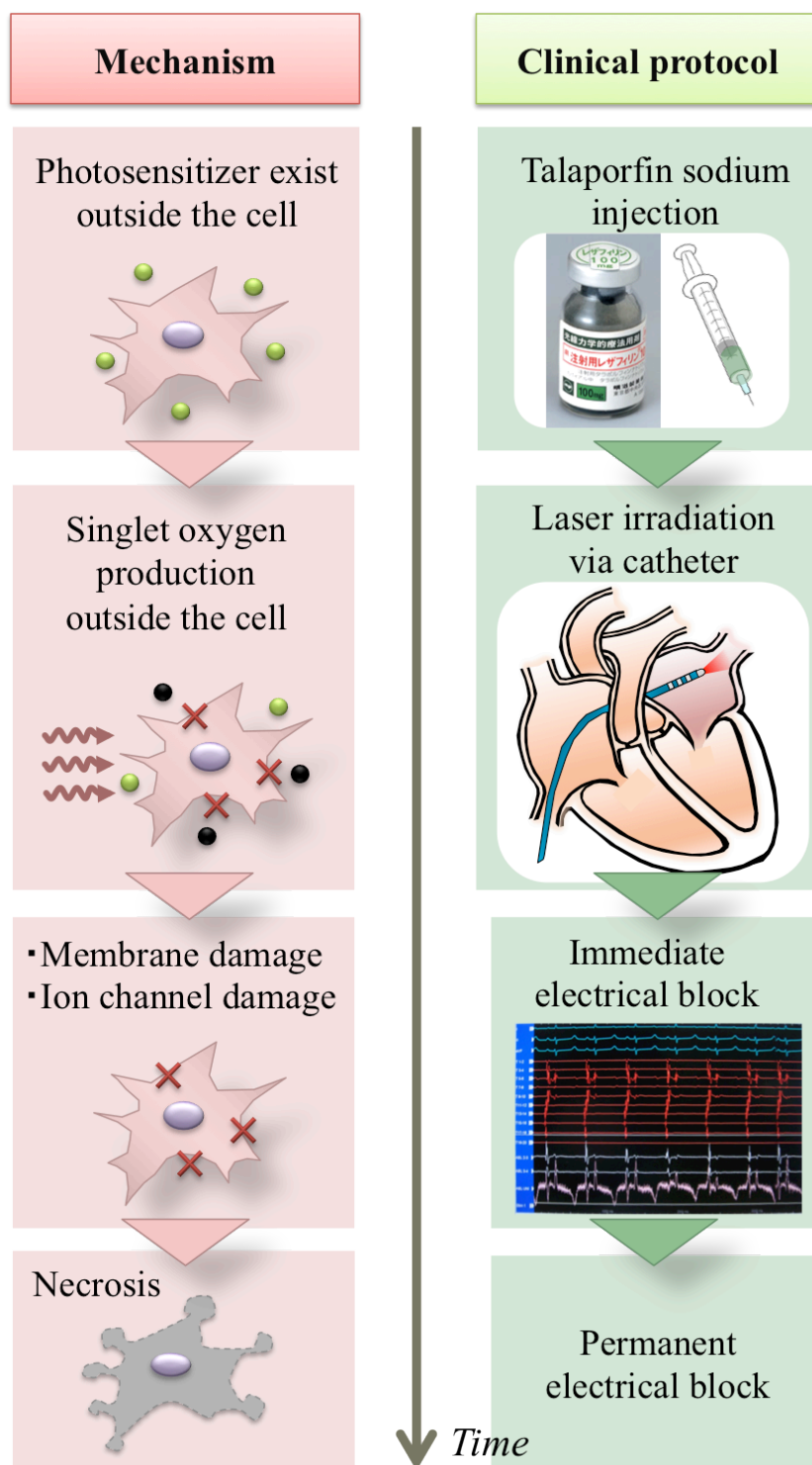


図 4-2 想定している治療のプロトコルとその原理

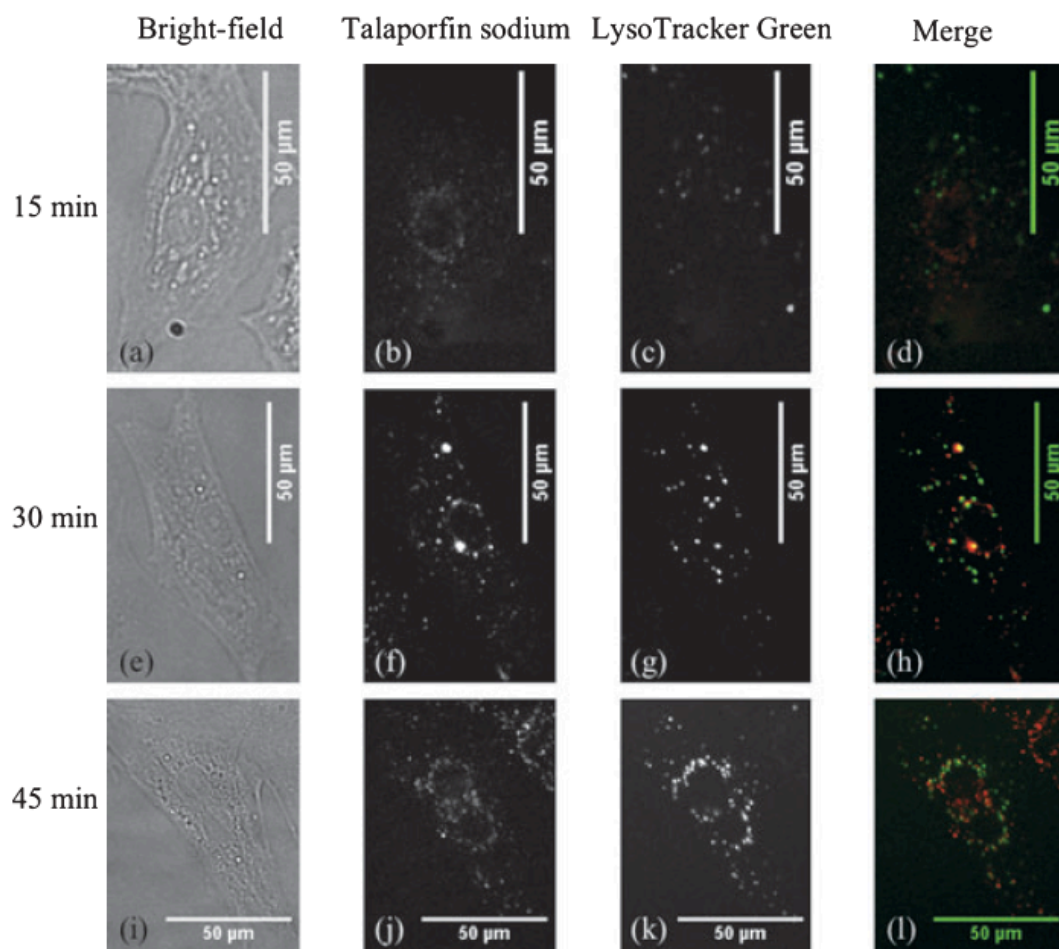
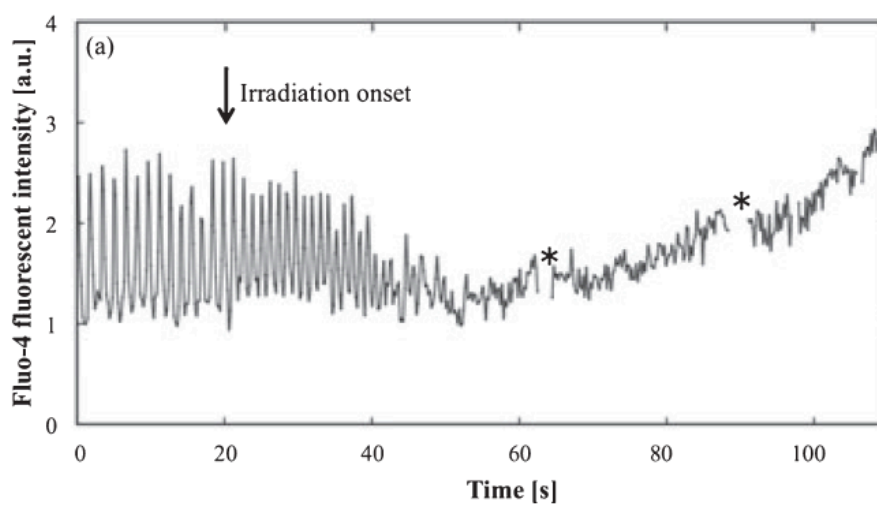


図 4-3 ラット心筋細胞におけるタラポルフィンナトリウム取り込みの顕微観察  
(文献 [6] より引用)

(A)



(B)

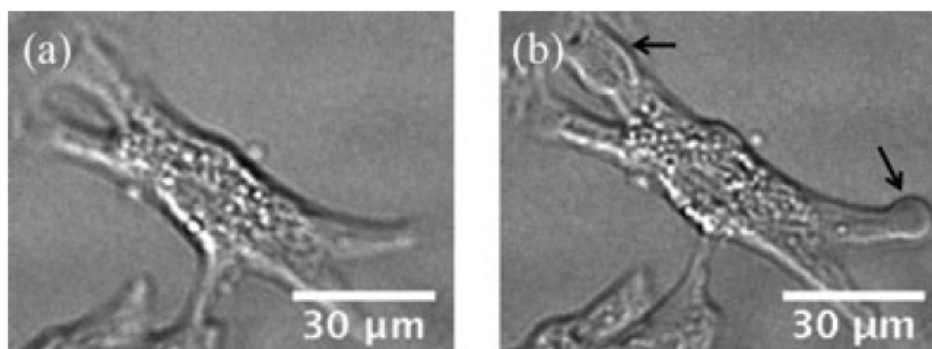


図 4-4 細胞外光増感反応中における心筋細胞障害 (文献 [6] より引用)

(A) 細胞外光増感反応中における心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化

(B) 細胞外光増感反応による心筋細胞のブレブ発生

(a) 光増感反応前

(b) 光増感反応後



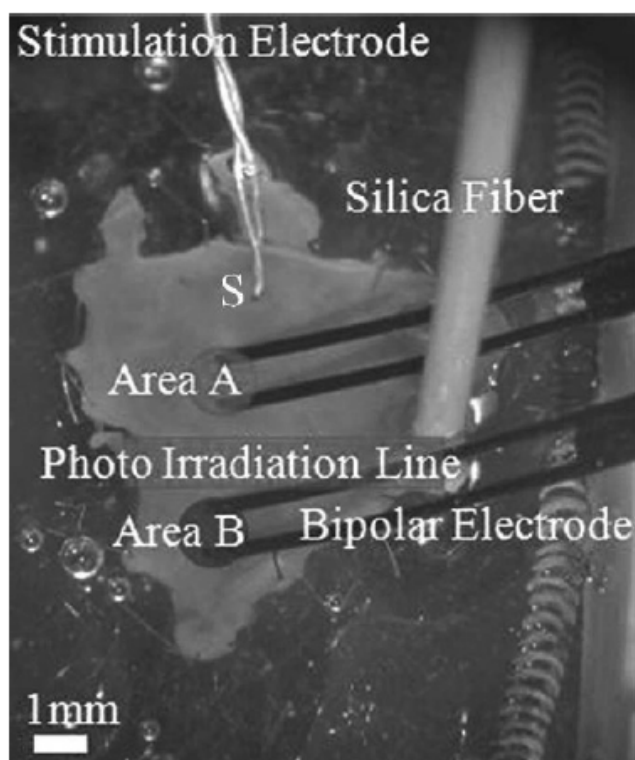


図 4-5 *ex vivo* ラット心筋組織を用いた急性電気伝導遮断の実証実験配置  
(文献 [7] より引用)

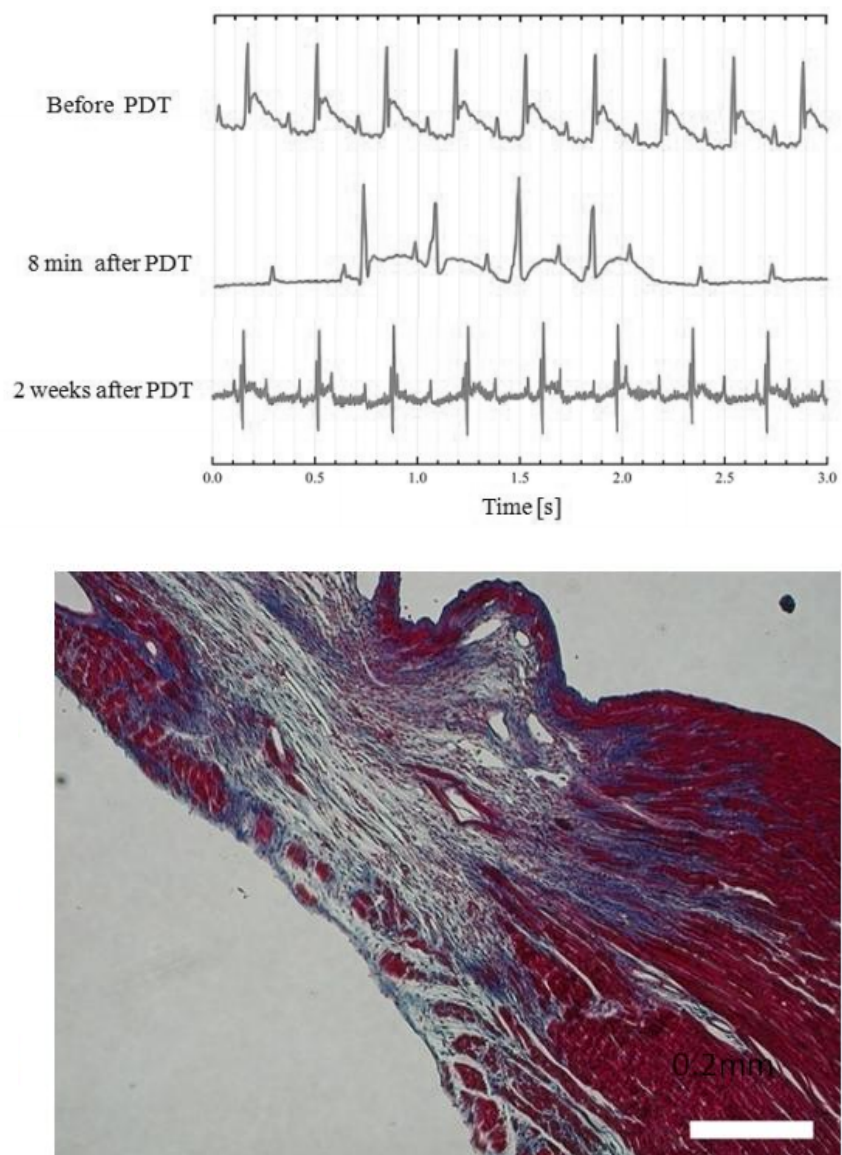


図 4-6 電気生理学的診断および組織標本観察による即時のおよび永続的電気伝導遮断効果の実証 (文献 [8] より引用)

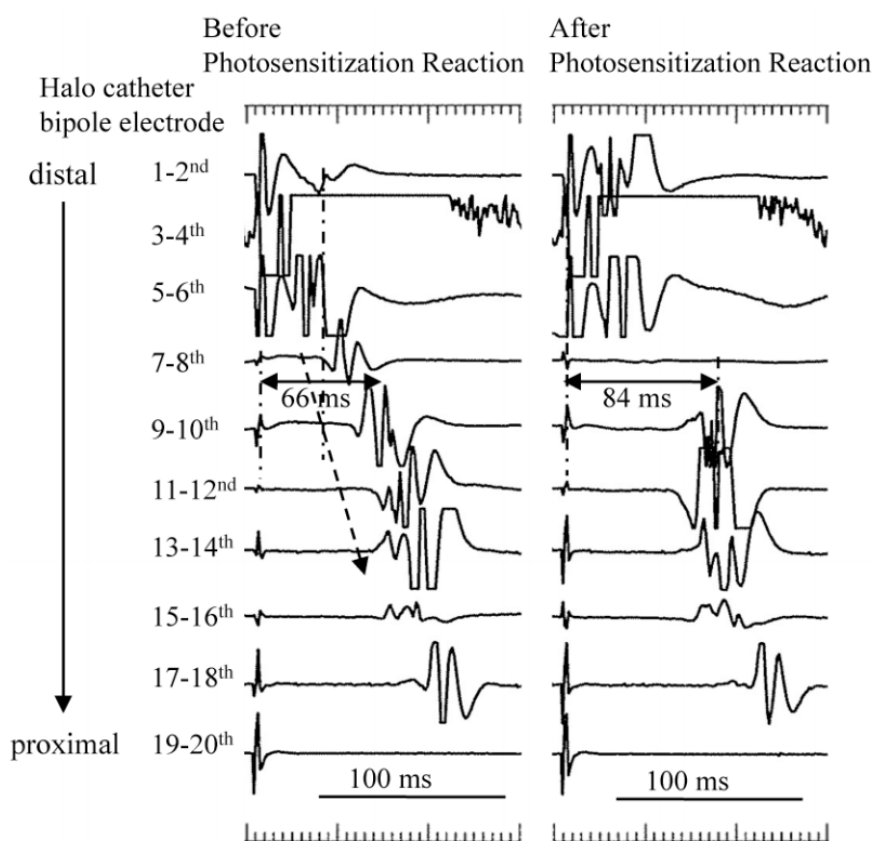
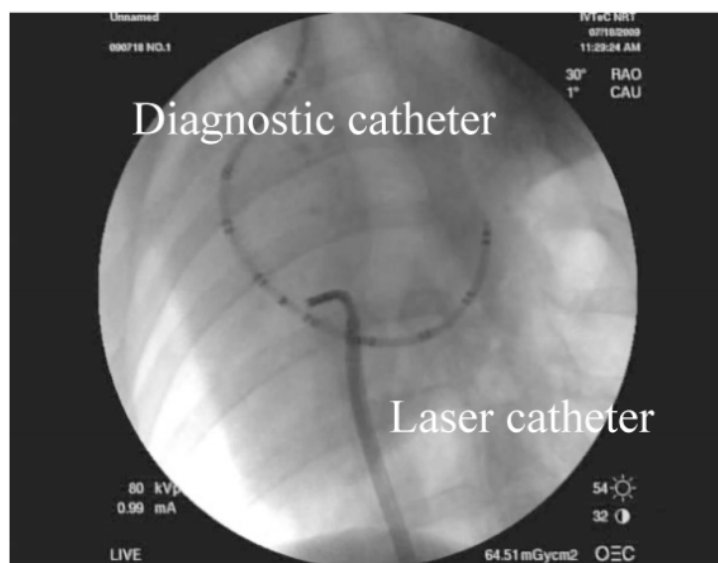


図 4-7 *in vivo* カテーテルインターベンション下における電気伝導遮断効果の実証  
(文献 [10] より引用)

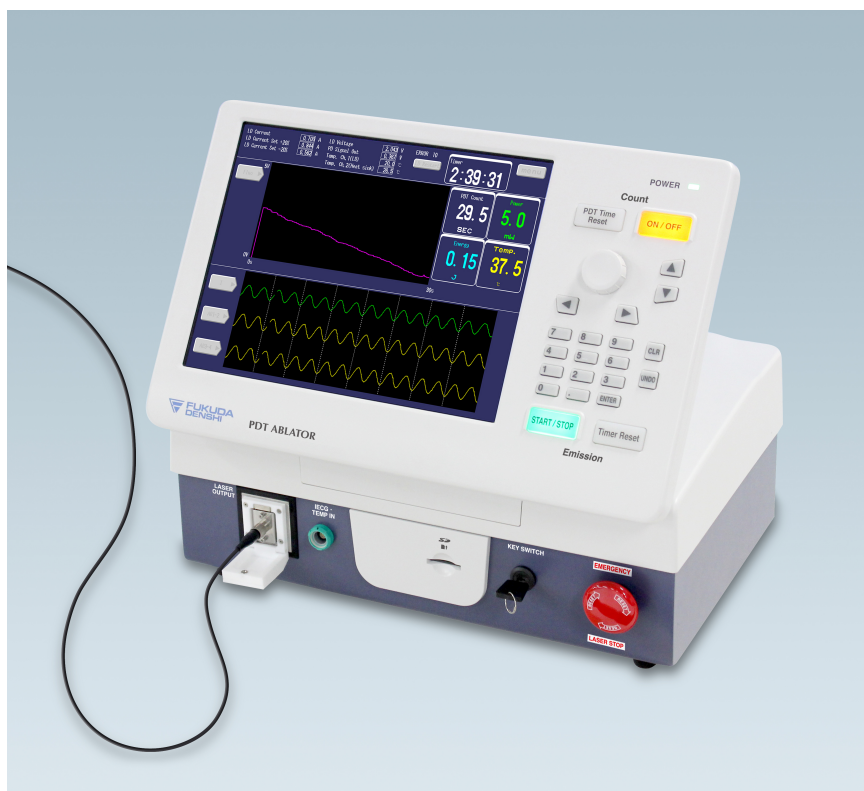


図 4-8 レーザ試作装置写真 (アライ・メッドフォトン研究所 (株) 提供)

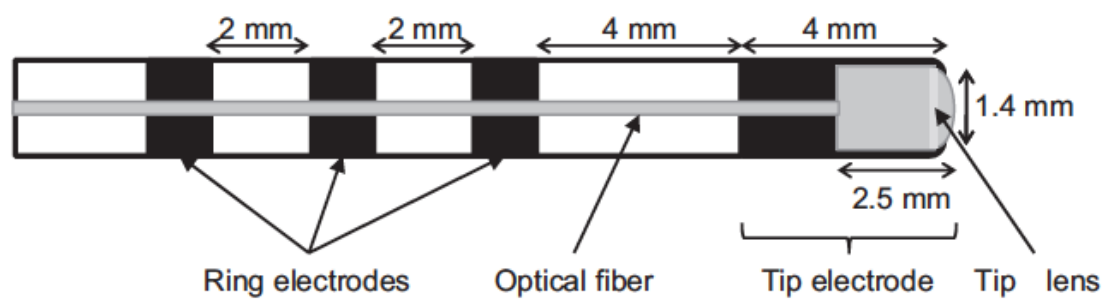


図 4-9 直射型レーザーカテーテルの先端内部構造 (文献 [11] より引用)

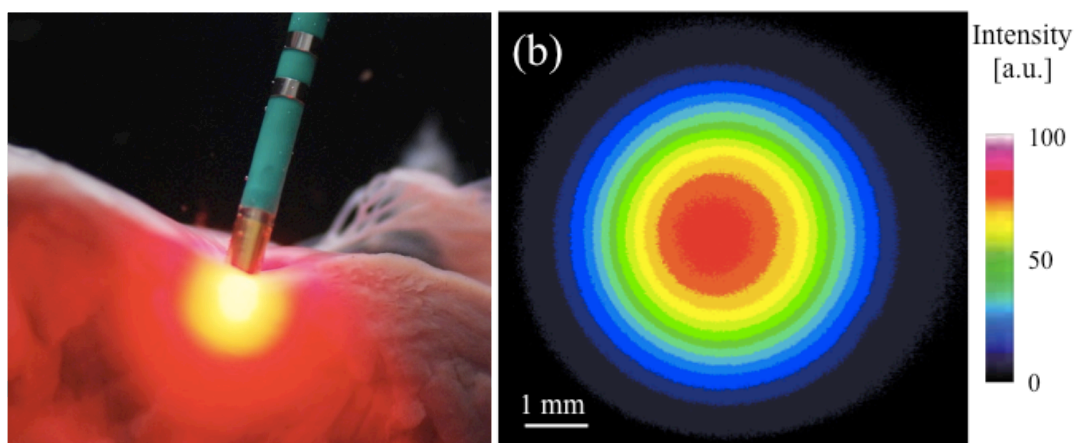


図 4-10 直射型レーザーカテーテル先端からの光照射の状態と強度分布  
(文献 [13]より引用)

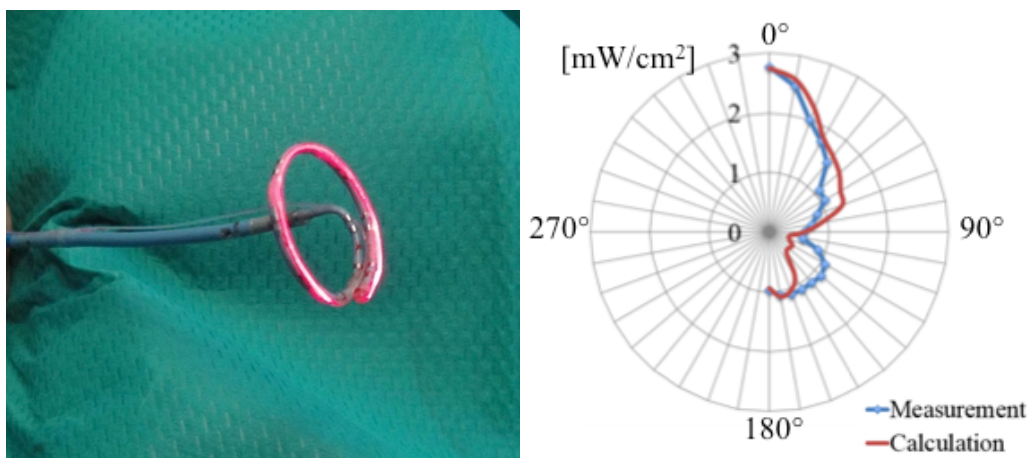


図 4-11 拡散型カテーテル先端からの光照射の状態およびカテーテルチューブの周囲方向への実測および計算による光強度分布 (文献 [17] より引用)

表 4-1 臨床応用に求められる条件

<b>Performance</b>	<b>Clinical requirement</b>
Depth	<4 mm depth in atrial ablation
Duration	Point-to-point device: <1 min/point
	Ring or balloon device: 10–20 min
Judgment	Electrophysiological diagnosis



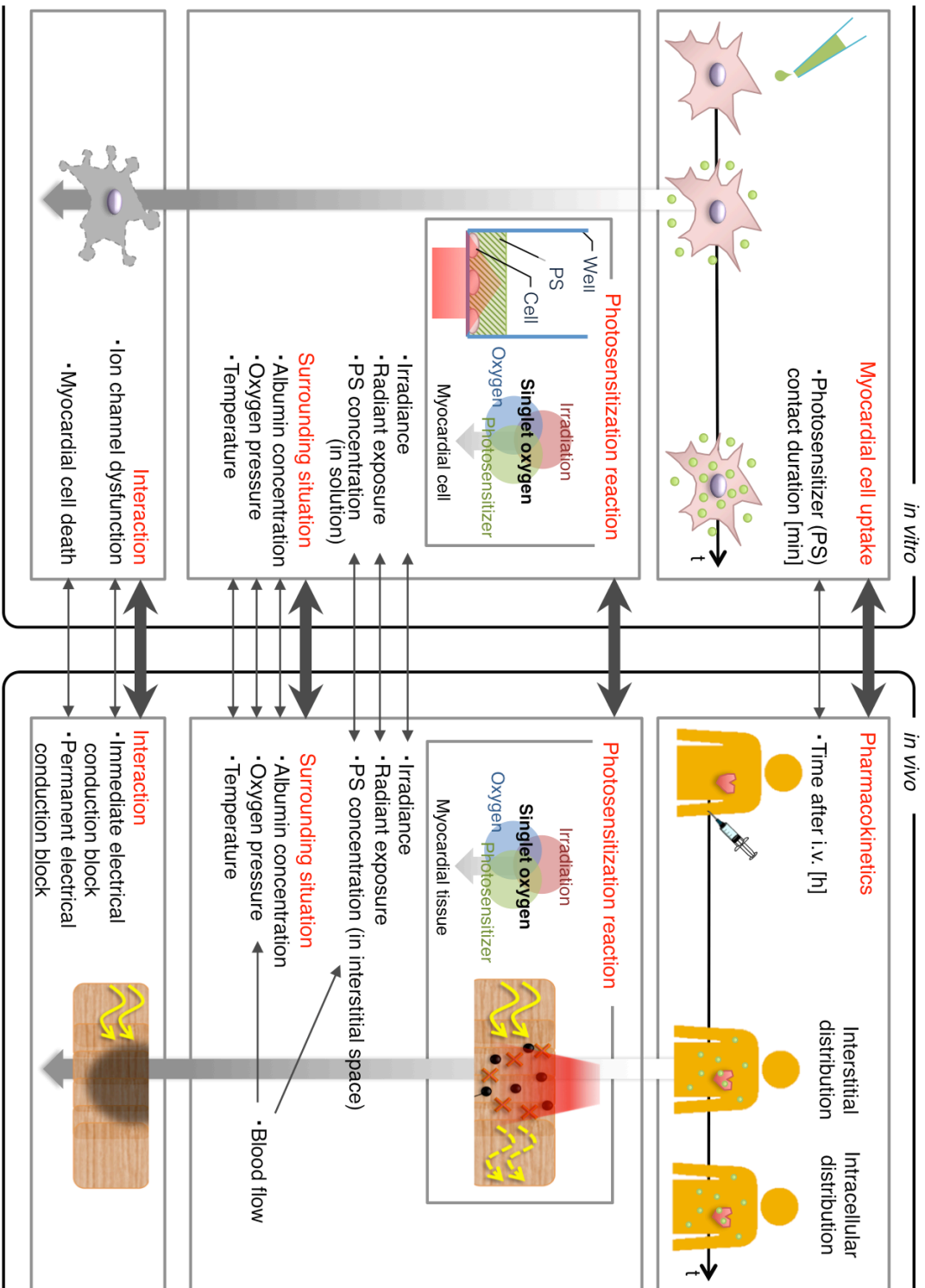


図4-12 *in vivo*治療状態を*in vitro*で再現する場合の対応関係  
太矢印に作用の対応を、細矢印箇条書きにパラメーターの対応を示す

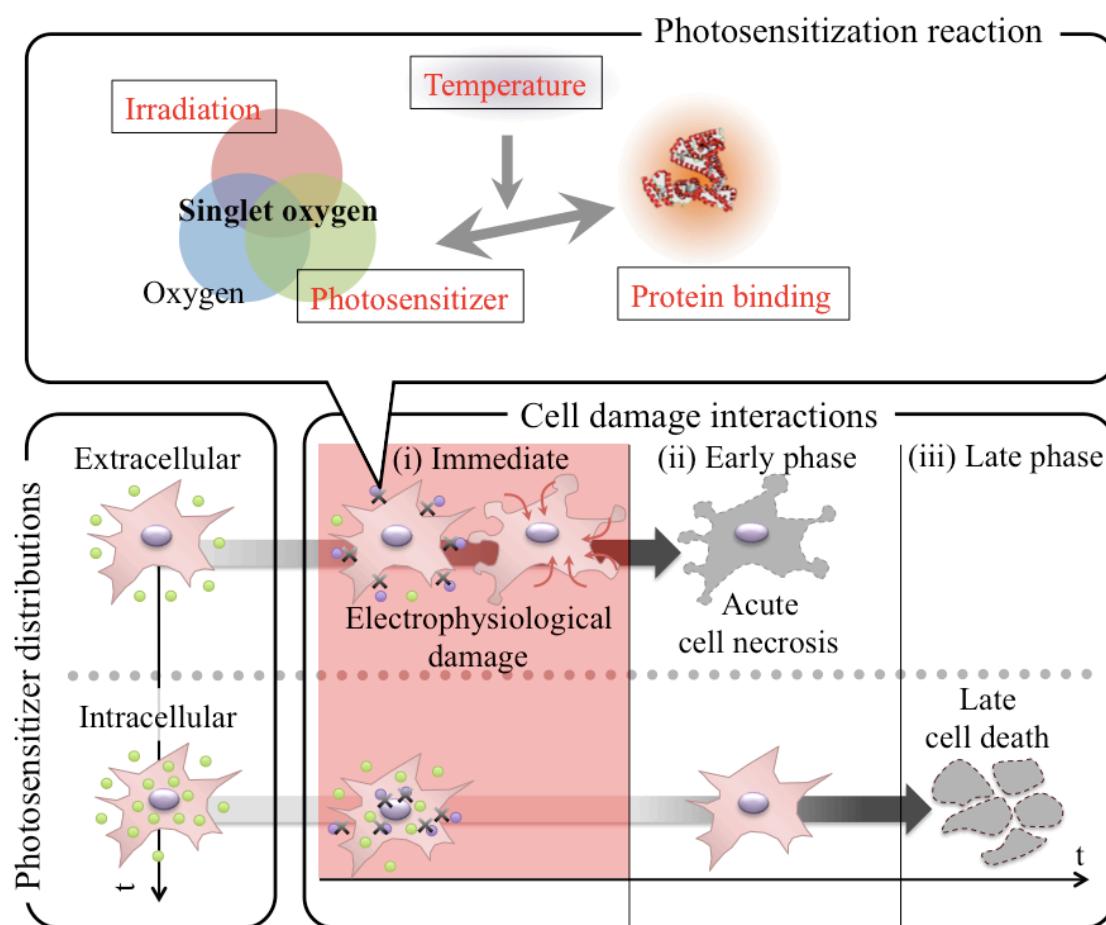


図4-13 本論文で使用している *in vitro* 実験系を用いた細胞外光増感反応による心筋細胞への障害研究

赤字は変化させたパラメーターを示す。

## 第 5 章 細胞外光増感反応による心筋細胞の即時的応答

### 5.1 緒言

頻脈性不整脈治療では術中に電気伝導遮断を確認しながら治療を行うため、即時的な電気伝導遮断性能が必要となる。本章では、細胞外光増感反応により生じる心筋細胞の即時的な障害を経時的に測定するため、光増感反応開始から 10 min 以内の心筋細胞の電気生理学的な障害を、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度測定によって明らかにした。 $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬 Fluo-4 AM と、ニポウ式共焦点レーザー顕微鏡を使用し、高感度画像を高速で取り込んで蛍光強度の変化から心筋細胞の拍動や障害を調査した。即時的な細胞障害が発生するまでの時間を、タラポルフインナトリウム濃度、放射照度、放射照射量を変化させて測定した。

### 5.2 心筋細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の経時的計測

光増感反応中の心筋細胞における電気生理学的障害効果を経時的に評価するため、光増感反応と同時に共焦点顕微鏡を用いた計測を行える実験系を構築し、心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度計測を行った。

#### 5.2.1 実験方法

##### 5.2.1.1 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化測定用プローブ物質

心筋の活動調査として電気的にも機械的にも重要である  $\text{Ca}^{2+}$  動態を測定する方法が一般に用いられている。細胞のイメージングには、電位計測、イオン標識、酵素標識、細胞内小器官の染色に用いられる、種々の指示薬が開発されてきた。イオンプローブの中でも  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬は、筋収縮、代謝調節、生理活性物質の分泌現象の研究に用いられている [1]。 $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬は、 $\text{Ca}^{2+}$  高親和性キレート剤 BAPTA (1,2-bis(2-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) の分子構造に蛍光発色団を組み込んだ構造を基本としている。この試薬は安息香酸部位である BAPTA に電子が多い状態であると蛍光を呈さないが、BAPTA が  $\text{Ca}^{2+}$  と結びつくことで電子の多い状態が解消されると蛍光を呈する。脂溶性で無蛍光のアセトキシメチルエステル体 (acetoxymethyl, AM) を合成することで細胞の脂質二重層膜を透過できる AM 誘導体の状態にしてある。AM 誘導体の状態では遊離イオンとの結合能が無いが、細胞内に取り込まれ細胞内のエステラーゼによって AM 基が外れると遊離イオンとの結合能が生じる。細胞内に取り込まれて脱エステル化すると水溶性となるため、細胞膜を再度透過することはできない。そのため BAPTA AM 誘導体が細胞内に留まり、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を観察することができる。

図 5-1 に代表的な  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬の一つである Fluo-4 AM の構造との細胞内透過の原理を示す。1980 年に最初の  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬が作られた後、複数の改良型が開発されてきた [1]。

表 5-1 に  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬の種類と諸元を示す [1]。  $\text{Ca}^{2+}$  と結合すると蛍光強度が変化する Fluo-4 や Fluo-3、蛍光波長が変化する Fura-2 や Indo-1 に大別できる。蛍光強度が変化する指示薬は測定が簡便である。蛍光波長が変化する指示薬はレシオメトリー (短波長と長波長での蛍光強度比) を用いることで  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の絶対値算出ができる。Fluo-4 は、アルゴンイオンレーザー (波長: 488 nm) による励起が可能で、Fluo-3 と比較して蛍光効率が約 2 倍高いため、指示薬濃度および励起光強度を抑制することができ、細胞への負担が軽い。また励起光による退色が Indo-1 などと比べて少ないため、経時的な観察に適している。結合解離速度定数は数 ms であり、心筋細胞の拍動を捉えることができる。図 5-2 に Fluo-4 AM の化学構造式を示す [2]。図 5-3 にタラポルフィンナトリウムの吸収スペクトルと Fluo-4 の吸収および蛍光スペクトルを示す [2]。Fluo-4 AM はタラポルフィンナトリウムの光増感反応に用いる波長 660 nm 帯にはほとんど吸収が無く、波長 488 nm の Fluo-4 AM 励起光はタラポルフィンナトリウムへの光吸収が小さい。すなわち Fluo-4 AM を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  濃度計測では光増感反応が生じないことが分かる。本研究では、Fluo-4 AM (Molecular Probes, USA) を用いて、心筋細胞に光増感反応を起こしたときの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を経時計測し、即時的に生じる細胞障害を評価する。

### 5.2.1.2 共焦点レーザー顕微鏡システム

Fluo-4 AM の蛍光画像を高感度かつ高速に取得し、経時的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を観察するために、共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた。共焦点顕微鏡では検出器と光源に 2 つのピンホールを設置し、干渉性が高い単色光のレーザーを用いる。この光学配置により、高分解能な蛍光画像が取得できる。共焦点顕微鏡の光軸方向空間分解能が高いことを活かし、細胞の重なりなどがある培養心筋細胞群の中から 1 つの心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  のみを計測することができる。本研究では励起レーザー光走査の方法としてニポウ式を採用している。ニポウ式スキャナでは複数のピンホールを有するニポウディスクを回転させることで、平面画像を高速取得できる。ディスクが 30 度回転すると 1 枚の画像を取得することができ、数十 ms/frame の高速連続撮像計測できる [3, 4]。

本研究では、近赤外用正立型微分干渉顕微鏡 (BX51WI-FL-IRDIC, オリンパス, 日本) にニポウ式共焦点ユニット (CSU-X1, 横河電機, 日本) とアルゴンイオンレーザー (波長: 488 nm) (800BL, National laser, USA) を設置した共焦点レーザー顕微鏡システムを使用し、水浸対物レンズ (N.A.: 0.8, 焦点距離: 3.3 mm) (LUMPlanFL40×W, オリンパス, 日本) を通して観察を行った。蛍光顕微観察には電子増幅 CCD カメラ (512×512 pixels, 冷却温度:  $-70^{\circ}\text{C}$ ) (DU897, Andor Technology, UK) を用いた [5]。明視野観察には近赤外用モノクロ冷却 CCD カメラ (Rolera-XR, Qimaging, Canada) (695×520 pixels, 冷却温度:  $-25^{\circ}\text{C}$ ) を用いた [6]。

共焦点レーザー顕微鏡下で光増感反応を起こすため、共焦点顕微鏡に半導体レーザー光を導入した。図 5-4 に共焦点顕微鏡を用いた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度計測実験系の光路の概略を示す。

波長 660 nm 帯の半導体レーザー (Optical Fuel, ソニー, 日本) による連続励起光は、ソレノイドシャッター (SSH-S, シグマ光機, 日本) によって照射時間を変化させた。図 5-5 に光学シャッターを介した光ファイバー結合系を示す。焦点での励起光強度分布を、ビームプロファイラ (LaserCam-HR II, Coherent, USA) を用いて測定した。図 5-6 に 40 倍対物レンズ焦点面における励起光強度分布を示す。スポット面積は  $5.1 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$  であった。対物レンズから出射された光ビームのパワーを実験毎にレーザーパワーメーター (LaserCheck<sup>TM</sup>, Coherent, USA) で測定し、スポット面積から放射照度を算出した。放射照度は  $30\text{--}290 \text{ mW/cm}^2$  で実験を行った。光照射中の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化は、Fluo-4 AM の蛍光経時計測によって測定した。蛍光観察には波長 400–500 nm を透過し、波長 500–750 nm を反射するダイクロイックミラーおよび波長 520 nm のバンドパスフィルターを用いた [7, 8]。設置位置は図 5-4 に示す。

### 5.2.1.3 細胞外光増感反応中の心筋細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の経時的計測方法

直径 35 mm のペトリディッシュの底に直径 15 mm のカバーガラスを敷き、1–4 日齢の新生仔ラットの心室から採取した浮遊心筋細胞 (心筋細胞培養キット T-2, コスモバイオ, 日本) を溶液細胞濃度が  $2.0 \times 10^5 \text{ cells/ml}$  となるように調整して、ディッシュに 2.7 ml ずつ分注した<sup>1</sup>。細胞培養培地 Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (Invitrogen, USA) に 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) (Invitrogen) と 100 unit/ml Penicillin、100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin (Invitrogen) を加えた培地 (以下培養用培地と呼ぶ) を用いて 2–3 日間、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  に設定されたインキュベーター内で培養した。培養中は 1 日おきに培地を交換した。実験は培養開始日から 2–3 日目に行った。この理由は、単離された細胞内の内因性エステラーゼ活性が培養から 3 日以上経過すると低下するため、また心筋細胞の拍動は培養から 2 日目以降に生じるためである。

$\text{Ca}^{2+}$  観察の実験用培地として、Minimal Essential Media (MEM) (Invitrogen, USA) に 10% FBS と 100 unit/ml Penicillin, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin を加えたものを用意した (以下実験用培地と呼ぶ)。この実験用培地での  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は 2.2 mM となる。脂溶性である  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬 Fluo-4 AM (Molecular Probes, USA) 50  $\mu\text{g}$  を実験用培地に溶解するため、50  $\mu\text{l}$  の Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (試薬特級, 和光純薬工業, 大阪, 日本) にあらかじめ溶解し、濃度 1  $\mu\text{g/ml}$  の Fluo-4 AM 溶液 50  $\mu\text{l}$  とした。この溶液 7.5  $\mu\text{l}$  を実験用培地 1.5 ml で溶解し、濃度を 5  $\mu\text{M}$  の Fluo-4 AM 溶液とした。培養した心筋細胞を Fluo-4 AM 溶液に室温で 20 min 間接触させた後に、2.7 ml の培地に入れ替えた。正立顕微鏡 (BX51WI-FL-IRDIC, オリンパス, 日本) と、水浸対物レンズ (LUMPlanFL40 $\times$ W, オリンパス, 日本) を組み合わせて明視野観察により規則的に拍動している心筋細胞を選択した。Fluo-4 AM の蛍光画像を 400 ms 毎に取得した。

<sup>1</sup> この状態で、第 6 章の 96 ウェルプレートを用いた実験の細胞密度および液厚と同じになっている。

画像解析ソフト iQ Core (PacStar, USA) を用い、約 10 min 間の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を解析した。

### 5.2.2 実験結果

図 5-7 に光増感反応を起こしていない場合の心筋細胞の Fluo-4 AM 蛍光画像を示す。図中で  $t=0$  s から  $t=3.2$  s にかけて輝度が上昇し、再度  $t=4.0$  s から  $t=7.2$  s にかけて同じ周期で輝度が上昇している。すなわち、心筋細胞の拍動に伴い細胞内蛍光輝度が周期的に変化した。画像輝度解析ソフトにより、細胞内における平均蛍光輝度の相対値を算出した。図 5-8 に周期的な拍動を繰り返す健全な心筋細胞内平均蛍光輝度変化を示す。図 5-8(a) に 600 s 間の心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  変化を示す。心筋細胞の電気生理学的機能が 600 s 間保たれていることがわかる。図 5-8(b) に図 5-8(a) と同じ細胞の 50 s 間の心筋細胞の拍動を拡大して示す。顕微観察において目視で確認したように、心筋細胞は約 5 s に 1 度の周期で拍動しており、400 ms 毎の輝度観察によって、拍動に伴う心筋細胞内 Fluo-4 AM 蛍光輝度変化が観察できた。但しピークが急峻なため、ピーク部分は十分に測定できていない。

## 5.3 細胞内および細胞外光増感反応による即時的障害

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の経時的観察によって、心筋細胞外光増感反応中の即時的な障害効果について明らかにした。細胞内光増感反応と細胞外光増感反応をタラポルフィンナトリウムの接触時間によって変化させて、光増感反応中の心筋細胞の障害を調査した。

### 5.3.1 実験方法

5.2.1.3 項で述べた実験用培地を溶媒とし、タラポルフィンナトリウムを濃度 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように溶解した。タラポルフィンナトリウム濃度は臨床における早期肺癌治療、悪性脳腫瘍治療の投与量 (40  $\text{mg}/\text{m}^2$ ) を静脈注射後の血中濃度を参考に設定した (図 3-6 参照)。培養したラット心筋細胞にタラポルフィンナトリウム溶液 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を 120 min 接触させてタラポルフィンナトリウムを取り込ませ、細胞内光増感反応群とした。タラポルフィンナトリウムに接触させていない心筋細胞を細胞外光増感反応群とした。準備した両細胞群に 5.2.1.3 項と同じ手順で Fluo-4 AM 溶液を 20 min 接触させた。細胞外光増感反応群では Fluo-4 AM を取り除いてタラポルフィンナトリウム溶液 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を 2.7 ml 加えた。細胞内光増感反応群には Fluo-4 AM を取り除いて培地を 2.7 ml 加えた。5.2.1.3 項と同じ方法で Fluo-4 AM 蛍光画像を取得した。光増感反応用の励起光を放射照度 0.29  $\text{W}/\text{cm}^2$  (選定理由は 6.6.4 節参照)、放射照射量を 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  で照射した。光増感反応前、光増感反応中、光増感反応後の約 10 min 間の蛍光画像を取得した。5.2.1.3 項と同じ方法で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を解析した。

### 5.3.2 実験結果

図 5-9 に細胞内光増感反応・細胞外光増感反応の前および光照射開始から約 10 min 後にける心筋細胞の形態観察結果を示す。細胞外光増感反応においては、図 5-9(d)に示すように細胞末端が膨化するブレブの発生や壊死してウェル底面から剥離した細胞が観察された。細胞外光増感反応では球状のブレブが多数発生し、図 5-9(d)中の細矢印に示すブレブの発生や、太矢印に示す凝集が起こったのに対して、細胞内光増感反応では図 5-9(b)に示すように細胞の形状に大きな変化が見られなかった。図 5-10 に細胞外光増感反応前後の Fluo-4 AM 蛍光画像を示す。図 5-10 の上 2 段に示すように、光照射開始前は周期的な拍動に伴って細胞内 Fluo-4 AM 蛍光輝度が増加している。図中の  $t=0$  s から  $t=137$  s に相当する光照射中に、細胞内 Fluo-4 AM 蛍光輝度が上昇し、それと同時に細胞の末端が膨化しブレブが発生した。光照射後  $t=239$  s に見られるように、細胞内基質が周囲に拡散し細胞内 Fluo-4 AM 蛍光輝度が低下した。図 5-11 に細胞内光増感反応および細胞外光増感反応における反応前、反応中、反応後の蛍光画像解析によって得られた代表的な細胞内 Fluo-4 AM 蛍光輝度変化を示す。細胞内光増感反応および細胞外光増感反応のいずれの場合も、図 5-11(a), (b), (c)の横軸 0 s 以前に示すように光増感反応前に拍動に伴った周期的な変化が見られた。図 5-11(a)に示す細胞外光増感反応の場合、光照射前は拍動に伴って周期的な蛍光輝度の変化が見られたが、光照射開始から約 2 s で拍動が停止した。光照射直後 40-100 s の間で細胞内 Fluo-4 AM 蛍光輝度が上昇し、その後減少し始めた。このとき、光照射から約 100 s で細胞膜が膨化し始め、ブレブが発生した。光照射開始から約 200 s 後以降、輝度下降が続き、光照射開始から約 510 s で輝度が初期値 1 よりも低くなった。これは細胞壊死の発生により細胞内基質が周囲へ拡散したためと考えられる。蛍光観察後に行った形態観察によって光増感反応から約 610 s 後において細胞壊死の発生を確認したことから、細胞壊死は 610 s より以前に生じていたことがわかる。細胞壊死の発生に伴い細胞内基質が周囲に拡散し、細胞内 Fluo-4 AM 蛍光輝度が初期値を下回ったと考えられることから、細胞壊死の発生タイミングを細胞内 Fluo-4 AM 蛍光輝度減少が初期値を下回った時点とすることは妥当であるとされる。よって、本研究では蛍光輝度最大値より後の下降状態において、蛍光輝度が初期値を下回ったときを細胞壊死発生の時点と定義した。図 5-11(b)に示す細胞内光増感反応の場合、 $\text{Ca}^{2+}$ の変動の周期性が乱れ、振幅も小さくなるなどの影響が見られたが、10 min 間の観察の間周期的な変動が停止しなかった。図 5-11(c)に示す細胞外光増感反応の例では、タラポルフィンナトリウム濃度  $10 \mu\text{g/ml}$ 、放射照射量  $10 \text{ J/cm}^2$  の弱い障害により、壊死が生じた例と異なる変化が得られた。図 5-11(c)と図 5-11(a)と比較すると細胞外光増感反応によって細胞内 Fluo-4 AM 蛍光輝度が上昇するが、(i) ピークの後の蛍光輝度減衰が 5-15(c)の方が穏やかであること、(ii) 図 5-11(c)の 550 s 付近に見られるように再度周期的な蛍光輝度変化が見られること、(iii) 細胞内 Fluo-4 AM 蛍光輝度が初期値を下回らないこと、の 3 つの違いが見られた。

## 5.4 細胞外光増感反応による心筋細胞の即時的細胞障害発生割合

5.3.2 節において、細胞外光増感反応によって即時的にブレブの発生や細胞壊死が生じていることがわかった。観察を行った約 10 min の間に生じたブレブや心筋細胞壊死の発生について、その発生率をタラポルフィンナトリウム濃度と放射照射量を変化させて調査した。

### 5.4.1 実験方法

5.2.1.3 項と同じ方法で光増感反応前、光増感反応中、光増感反応後の約 10 min 間の蛍光画像を取得し、解析により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を測定した。タラポルフィンナトリウム濃度を 10–30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と変化させた。光増感反応用の励起光を放射照度 0.29  $\text{W}/\text{cm}^2$  (選定理由は 6.6.4 節参照) で照射した。放射照射量を 10–40  $\text{J}/\text{cm}^2$  とするように、照射時間を変化させた。タラポルフィンナトリウム濃度および放射照射量を変化させて、同じ条件の心筋細胞 23 個について、ブレブの発生および 5.3.2 節で定義した細胞壊死発生判定法を用いて、発生割合を求めた。

### 5.4.2 実験結果

図 5-12 にブレブおよび壊死発生細胞数の発生割合を示す (1 プロットは細胞 23 個における平均値,  $N=1$ )。いずれの放射照射量においても、タラポルフィンナトリウム濃度が高くなるほど高いブレブ発生率、壊死発生率が得られた。ほとんどの光増感反応条件で、ブレブ発生率は壊死発生率より高かった。

## 5.5 細胞外光増感反応による心筋細胞の障害が生じるまでの時間

頻脈性不整脈治療の電気伝導遮断治療では、電気生理学検査によって電気伝導遮断の発生を判断する。そのため、細胞外光増感反応による電気伝導遮断発生までに要する時間を明らかにする必要がある。細胞内 Flu-4 AM 蛍光輝度計測により、心筋細胞の壊死発生までの時間をタラポルフィンナトリウム濃度、放射照度、放射照射量を変化させて調査した。

### 5.5.1 実験方法

5.4.1 節と同じ方法で細胞外光増感反応中の心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を観察した。タラポルフィンナトリウム濃度は 10–30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  とした。放射照度 30–290  $\text{mW}/\text{cm}^2$  を用いて、それぞれの放射照度で照射時間の変化によって放射照射量を 10–40  $\text{J}/\text{cm}^2$  と変化させた。5.2.1.3 項と同じ方法で蛍光画像を取得し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を解析した。5.3.2 節で述べた定義に従い、各光増感反応条件について、細胞壊死発生までの時間を解析した。

### 5.5.2 実験結果

図 5-13 に各放射照射量における光照射開始からブレブ発生までに要した時間のタラポル



フィンナトリウム濃度依存性を示す。プロットが重畳する部分は、横方向にプロットをずらして表示した。タラポルフィンナトリウム濃度が 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  のとき、ブレブ発生までの時間は放射照射量による有意差が見られなかったが、薬剤濃度 10, 30  $\mu\text{g/ml}$  の間に有意差 ( $P=0.0002$ , t 検定,  $N=10-20$ ) があつた。

図 5-14 に各放射照射量における光照射開始から細胞壊死発生までに要した時間のタラポルフィンナトリウム濃度依存性を示す。プロットが重畳する部分は、横方向にプロットをずらして表示した。細胞壊死発生までの時間の平均値は 209–452 s の範囲にあつた。タラポルフィンナトリウム濃度が高くなるほど細胞壊死発生までの時間は短くなった。放射照射量による細胞壊死発生までの時間の有意差はなかった。図 5-14 より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 10, 30  $\mu\text{g/ml}$  の間に有意差 ( $P<0.013$ , t 検定,  $N=2-18$ ) があり、タラポルフィンナトリウム濃度が高いほど細胞壊死発生までの時間は短かかつた。最短は 30  $\mu\text{g/ml}$  のときで、平均 209 s だつた。図 5-15 に光照射開始から細胞壊死発生までに要した時間の放射照射量依存性を示す。放射照射量が高くなるほど細胞壊死発生までの時間が短くなった。放射照射量照度 30  $\text{mW/cm}^2$  と 120  $\text{mW/cm}^2$  の間および、30  $\text{mW/cm}^2$  と 290  $\text{mW/cm}^2$  の間に有意差が認められた ( $P<0.0002$ , t 検定,  $N=18-27$ )。

## 5.6 考察

### 5.6.1 細胞内光増感反応および細胞外光増感反応による即時的な心筋細胞障害の比較

細胞内光増感反応と細胞外光増感反応による心筋細胞障害の即時的な障害について比較するため、光増感反応接触時間を変化させて検討を行った (5.3.2 節参照)。心筋細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇には (i) 心筋細胞外からの流入と (ii) 心筋細胞内にある筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出が考えられる。図 5-11(b) に示した細胞内光増感反応の場合にも、振幅が小さくなっていること、図 5-11(a) および (c) において光照射開始直後における  $\text{Ca}^{2+}$  のわずかな減少が見られることから、筋小胞体に障害が生じている可能性が予想される。拍動の予備実験において、カフェインを用いて心筋細胞内の筋小胞体中  $\text{Ca}^{2+}$  をあらかじめ放出させた状態での心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度より、細胞外光増感反応による心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が高くなったことから、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇は筋小胞体からの放出のみではなく、細胞外からの流入があることが考えられる。実験的に確かめられてはいないが、筋小胞体からの放出も計測した  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に寄与していると思われる。図 5-11(a) に示すような反応は、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入によってブレブが発生し、細胞が膨化して壊死が発生したと考えられる [9]。細胞壊死が発生するまでに要する時間は  $\text{Ca}^{2+}$  の流入速度に依存的であると考えられる [9]。細胞外光増感反応開始に伴って心筋細胞の拍動が停止し、細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入が始まるまでは数十 s を要し、さらに、 $\text{Ca}^{2+}$  は数十 s に渡り心筋細胞に流入する。 $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇後の平坦なピークは条件や細胞によって差が大きい、概ね 200–300 s 間続く。その後 100–500 s 間かけて細胞内基質が周囲に拡散する。以上のようなタイムスケールで細胞壊死が生じるため、細胞壊死発生まで

に数 min 以上の時間を要すると考えられる。

### 5.6.2 電気伝導性回復の可能性

図 5-12 に示したようにいずれの放射照射量においても、ほとんどの光増感反応条件で、ブレブ発生率は壊死発生率より高かった。このことよりブレブが発生した一部の細胞はブレブを生じても壊死に至らないものと考えられる。細胞膜が障害を受けブレブが発生しても、細胞膜の修復能によってブレブ部分を切り離し細胞が生存することが報告されている [10]。細胞膜やイオンチャンネルに障害を生じた心筋細胞が、拍動を停止し一時的に電気生理学的障害を生じたとしても、その後細胞壊死には至らず場合によっては電気伝導性を再び取り戻す可能性が考えられる。

### 5.6.3 細胞死発生までの時間の一重項酸素産生速度依存性

図 5-13 に示すように、薬剤濃度 10-30  $\mu\text{g/ml}$  の範囲内ではブレブが発生した細胞数に差が見られなかったことから、ブレブの発生細胞数が減る又はブレブ発生までの時間が長くなる条件は、更に低いタラポルフィンナトリウム濃度の時であると予想される。図 5-14 に示すように、細胞壊死発生までの時間は放射照射量に依存しないことがわかった。レーザーと生体の相互作用では一般に治療のエネルギー効率一定を仮定すると、治療効果が放射照射量に比例することが知られている [11]。一般的にタラポルフィンナトリウムを用いた光増感反応では一重項酸素が主な障害効果をもたらす物質である (3.2.1 節参照)。一重項酸素の産生速度は放射照度、タラポルフィンナトリウム濃度、酸素濃度によって決定される。本章で用いた実験系では酸素枯渇が生じていないと考えられるため<sup>2</sup>、一重項酸素の産生速度は放射照度とタラポルフィンナトリウム濃度によって決定されることが考えられる。図 5-14 および図 5-15 に示すように、細胞壊死発生までの時間は放射照度とタラポルフィンナトリウム濃度依存的に変化したことから、細胞壊死発生までの時間は一重項酸素の産生速度によって決定されていると考えられる。図 5-16 に心細胞外光増感反応による心筋細胞壊死発生タイミングと死細胞率結果を模式的にまとめた。図 5-16 の上段に示すように、あるタラポルフィンナトリウム濃度あるいは放射照度を固定し、光照射時間を変化させることで放射照射量を変化させても、細胞壊死が発生するまでの時間は変化しない。図の上段から下段にタラポルフィンナトリウム濃度あるいは放射照度を低下させることで一重項酸素の産生速度を低下させると、細胞壊死が発生するまでの時間が長くなる。

## 5.7 結言

本章では、細胞外光増感反応により生じる心筋細胞の即時的な障害を経時的に測定する

---

<sup>2</sup> 6.6.1 節参照

ため、光増感反応開始から 10 min 以内の心筋細胞の電気生理学的な障害を、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度測定によって明らかにした。タラポルフィンナトリウムが細胞外に存在する場合、光照射開始約 2 s で拍動は停止し、 $\text{Ca}^{2+}$  が細胞内に流入してブレブが形成された。 $\text{Ca}^{2+}$  流入の原因は細胞膜やイオンチャネルの障害によると考えられる。ブレブが発生した細胞の一部は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低下し細胞壊死が生じた。ブレブ発生率は細胞壊死発生率よりも高く、ブレブが発生した一部の細胞はブレブを生じても壊死に至らないものとする。ブレブが発生した細胞の一部が細胞壊死に至ることが分かった。細胞壊死発生までの時間は放射照射量が 30–290  $\text{mW}/\text{cm}^2$ 、タラポルフィンナトリウム濃度が 10–30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲において、200–500 s の間で生じた。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および放射照度依存性を示し、薬剤濃度と放射照度が高いほど細胞壊死発生までの時間は短く、薬剤濃度 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、放射照度 0.29  $\text{W}/\text{cm}^2$ 、放射照射量 40  $\text{J}/\text{cm}^2$  の場合で最も短い平均 209 s であった。細胞壊死発生までの時間は一重項酸素の産生速度によって決定されることが示唆された。本章の実験系の光増感反応環境については、6.6.4 節を参照されたい。

## 参考文献

- [1] A. Takahashi, P. Camacho, J.D. Lechleiter, and B. Herman, “Measurement of Intracellular Calcium,” *Physiol Rev*, vol. 79, pp. 1089–1125, 1999.
- [2] Molecular porobes 社ホームページ;  
<http://www.lifetechnologies.com/jp/ja/home/brands/molecular-probes.html> (2015/3/25).
- [3] 高田邦昭, *初めてでもできる共焦点顕微鏡活用プロトコール*, 羊土社, 2004, pp. 13–38.
- [4] T. Tanaami, S. Otsuki, N. Tomosada, Y. Kosugi, M. Shimizu, and H. Ishida, “High-speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with a microlens and Nipkow disks,” *Appl opt*, vol. 41, pp. 4704–4708, 2002.
- [5] 電子増倍型 CCD カメラ DU-897 カタログ, Andor Technology, 2008.
- [6] 近赤外光用 CCD カメラ Rolera-XR カタログ, Qimaging, 2005.
- [7] Omega Optical 社ホームページ; <http://www.omegafilters.com/> (2015/03/01).
- [8] Chroma Technology 社ホームページ; <http://www.chroma.com/> (2015/03/01).
- [9] A. Ito, T. Kimura, S. Miyoshi, S. Ogawa, and T. Arai, “Photosensitization reaction-induced acute electrophysiological cell response of rat myocardial cells in short loading periods of talaporfin sodium or porfimer sodium,” *Photochem Photobiol*, vol. 87, pp. 199–207, 2011
- [10] D. Keefe, L. Shi, S. Feske, R. Massol, F. Navarro, T. Kirchhausen, and J. Lieberman, “Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis,” *Immunity*, vol.23, pp. 249–262, 2005.
- [11] Vo-Dinh T, *Biomedical Photonics Handbook*. Florida: CRC Press, Chap 3, 2003, pp 11–13.

図表

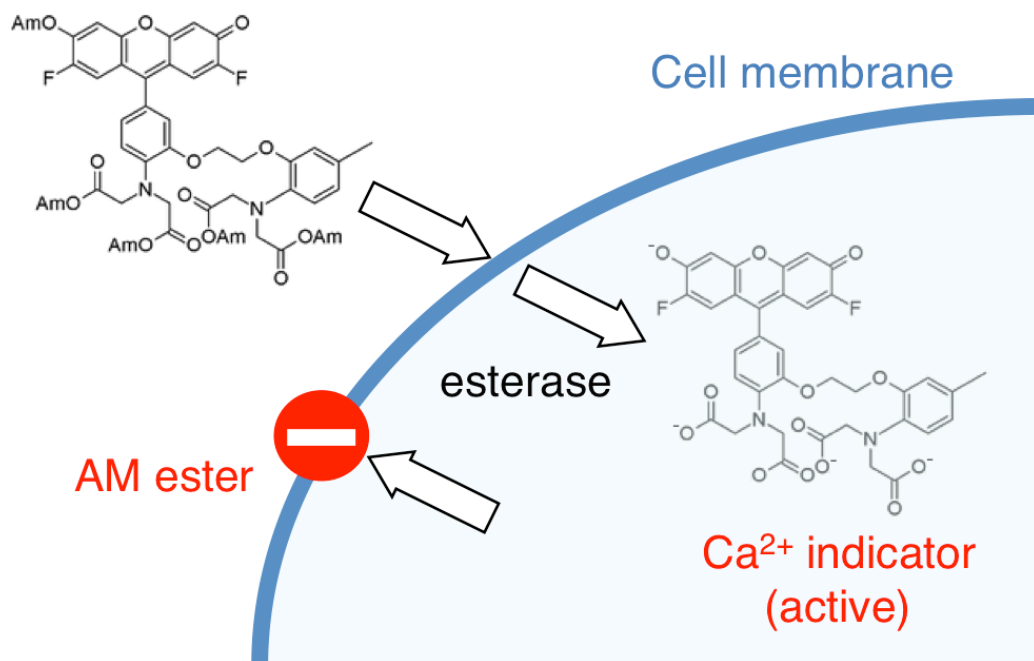


図 5-1 Fluo-4 AM の細胞内透過のメカニズム

表 5-1  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬の種類と諸元

Indicator	Absorption wavelength [nm]		Emission wavelength [nm]	
	$\text{Ca}^{2+}$ free	$\text{Ca}^{2+}$ bound	$\text{Ca}^{2+}$ free	$\text{Ca}^{2+}$ bound
Quin 2	353	333	495	495
Indo 1	346	330	475	401
Fura 2	363	335	512	505
Benzothiaza-1	368	325	470	470
Fluo 3	503	506	526	526
Fluo 4	491	494	None	516
Fluo 5N	491	494	None	516
Calcium green-1	506	506	531	531

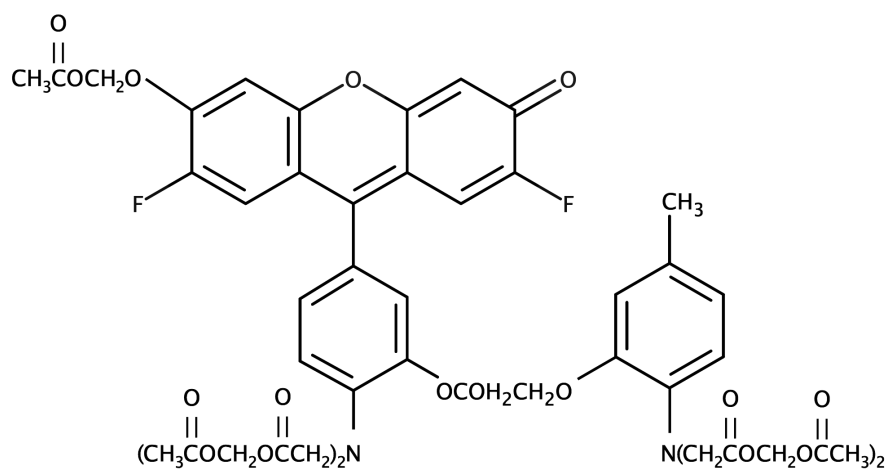


図 5-2 Fluo-4 AM の化学分子式

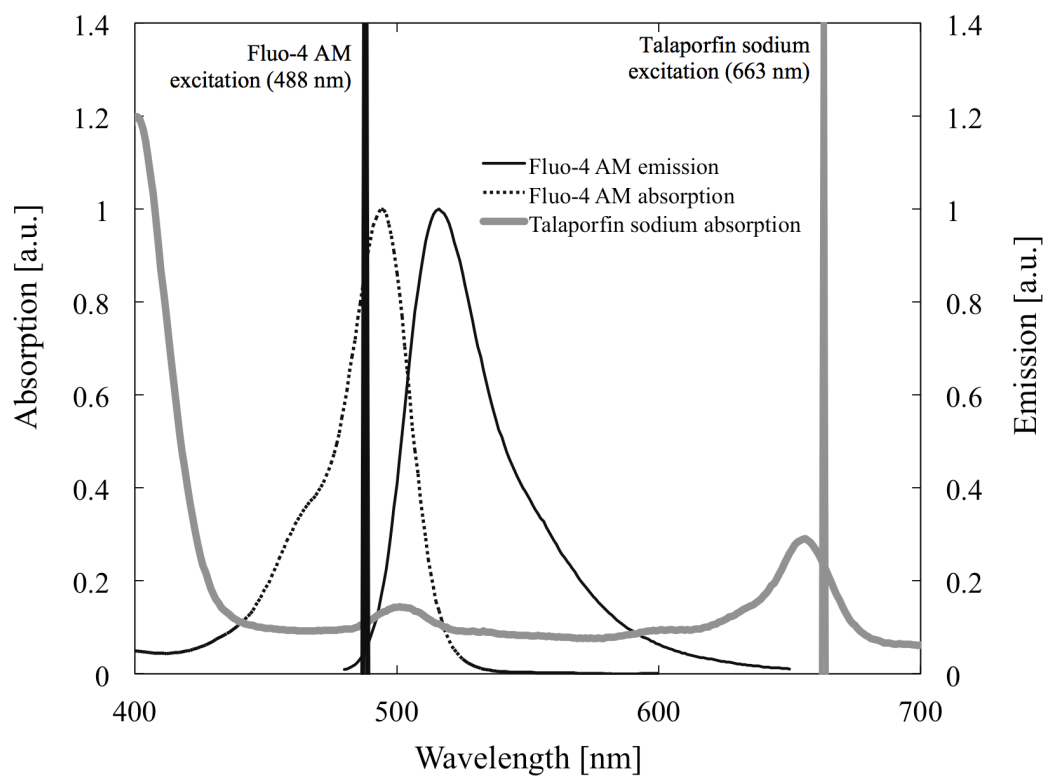


図 5-3 タラポルフィンナトリウムの吸収スペクトル、Fluo-4 AM の吸収および蛍光スペクトル、タラポルフィンナトリウムおよび Fluo-4 AM の励起光波長



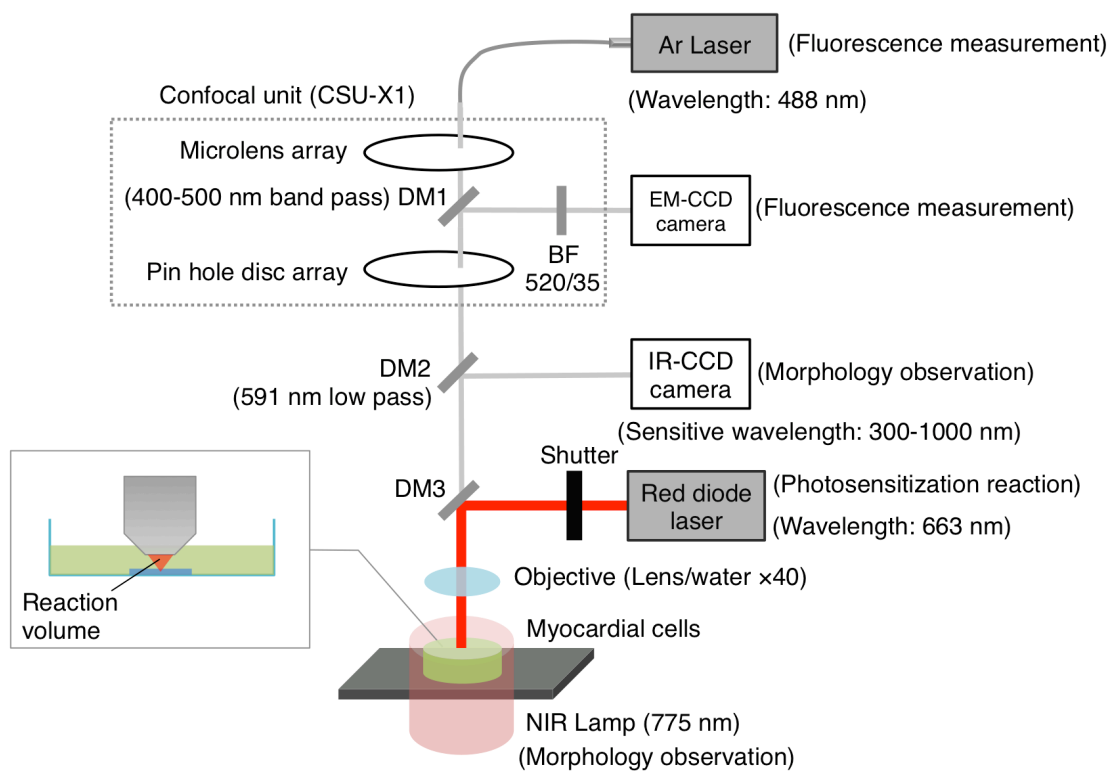


図 5-4 共焦点顕微鏡を用いた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度計測実験系の光路模式図

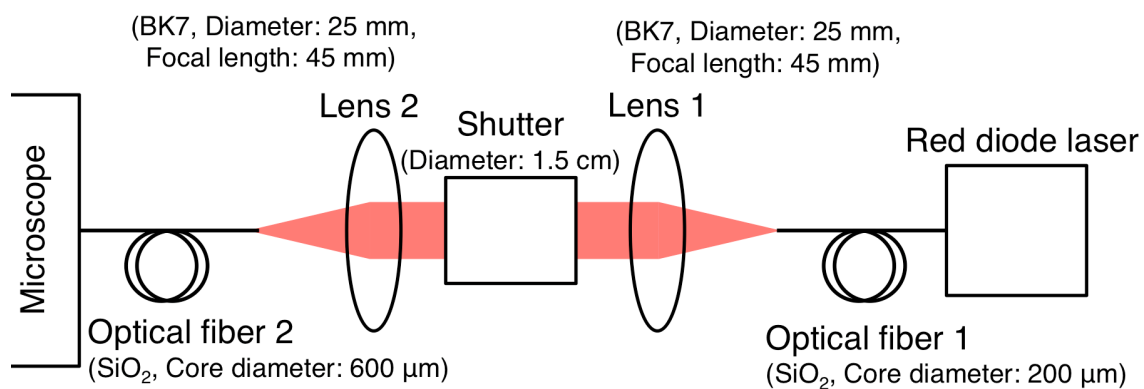


図 5-5 光ファイバー間の空間伝送およびシャッターを用いた照射時間操作のための光学系

レーザに接続された光ファイバー (石英, コア径: 200 μm) (Ceram Optec, USA) から射出したレーザ光はシャッターを介して再度光ファイバー (石英, コア径: 600 μm) (ST600I, 三菱電線工業, 日本) に集光し、ダイオードレーザポートから顕微鏡内光学系を介して細胞のあるタラポルフィンナトリウム溶液に照射した。

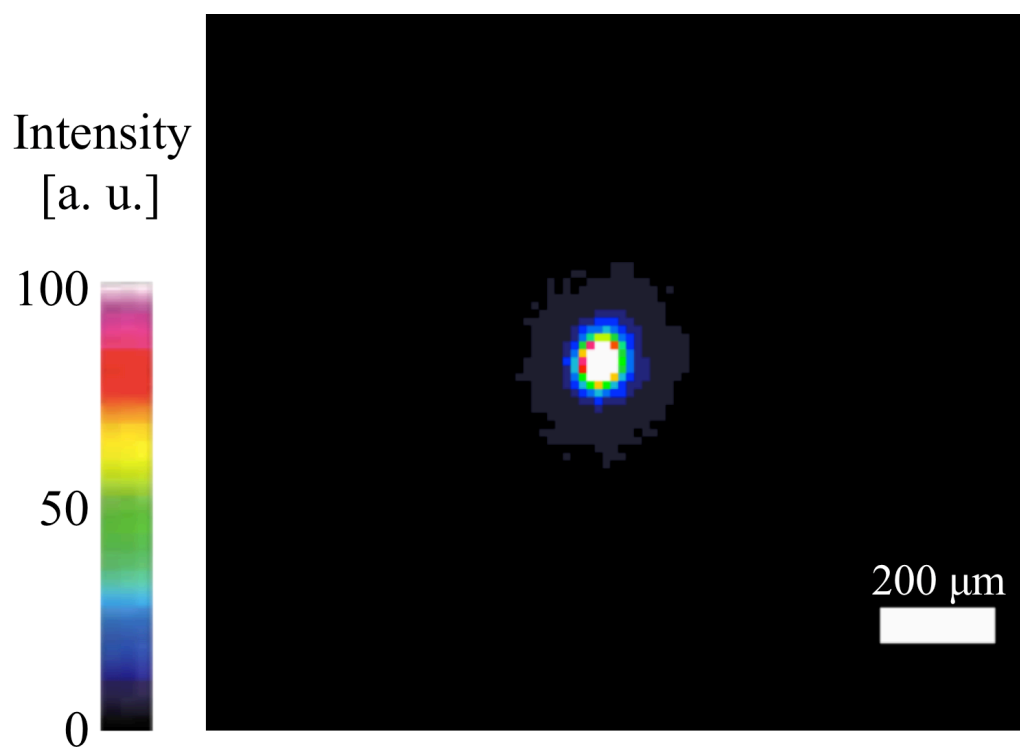


図 5-6 使用した 40 倍対物レンズ焦点面における励起光ビームの概形

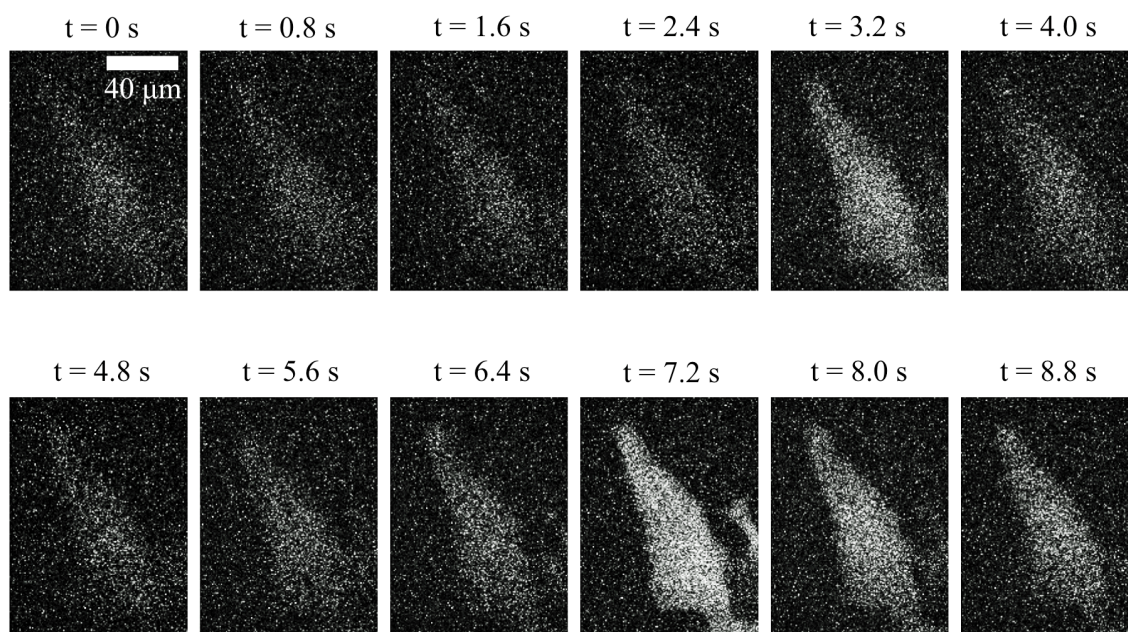


図 5-7 光増感反応をおこしていない場合の心筋細胞の Fluo-4 AM 連続蛍光画像  
(0.8 s 間隔, タラポルフィンナトリウム濃度: 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 放射照射量: 0  $\text{J}/\text{cm}^2$ )

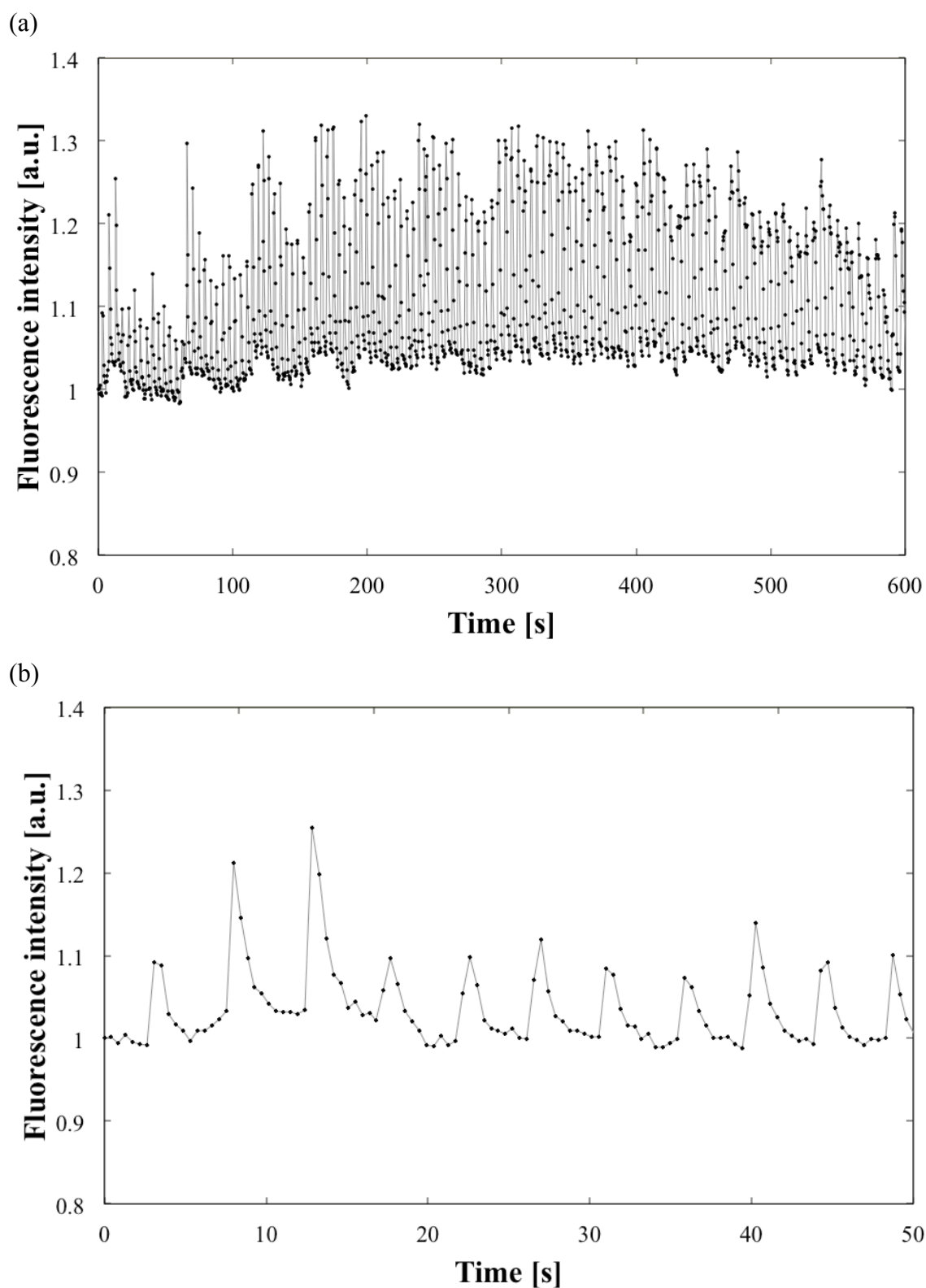


図 5-8 細胞内平均蛍光輝度変化の相対値  
(タラポルフィンナトリウム濃度:  $0 \mu\text{g/ml}$ , 放射照射量:  $0 \text{ J/cm}^2$ )

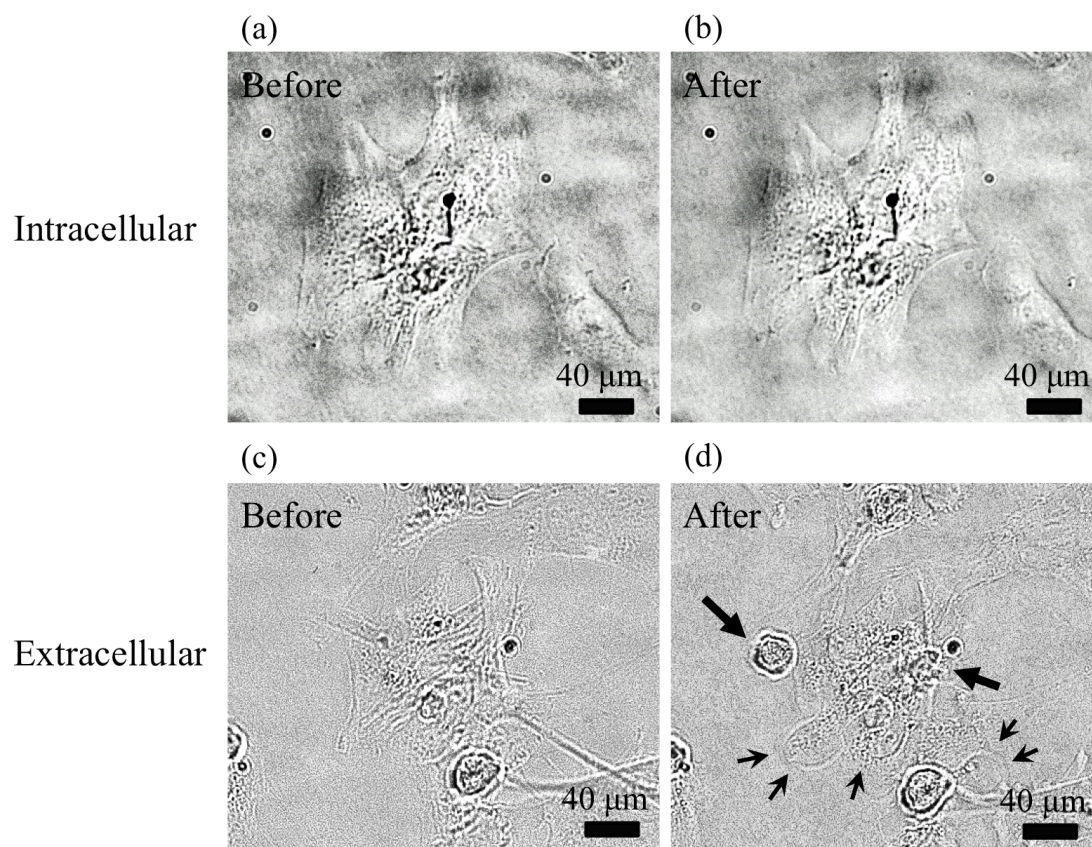


図 5-9 細胞内光増感反応・細胞外光増感反応の前および光照射開始から約 10 min 後における心筋細胞の形態観察

- (a) 細胞内光増感反応前の心筋細胞
- (b) 細胞内光増感反応後の心筋細胞
- (c) 細胞外光増感反応前の心筋細胞
- (d) 細胞外光増感反応後の心筋細胞

細矢印はブレブの発生を示す。太矢印は剥離した細胞を示す。

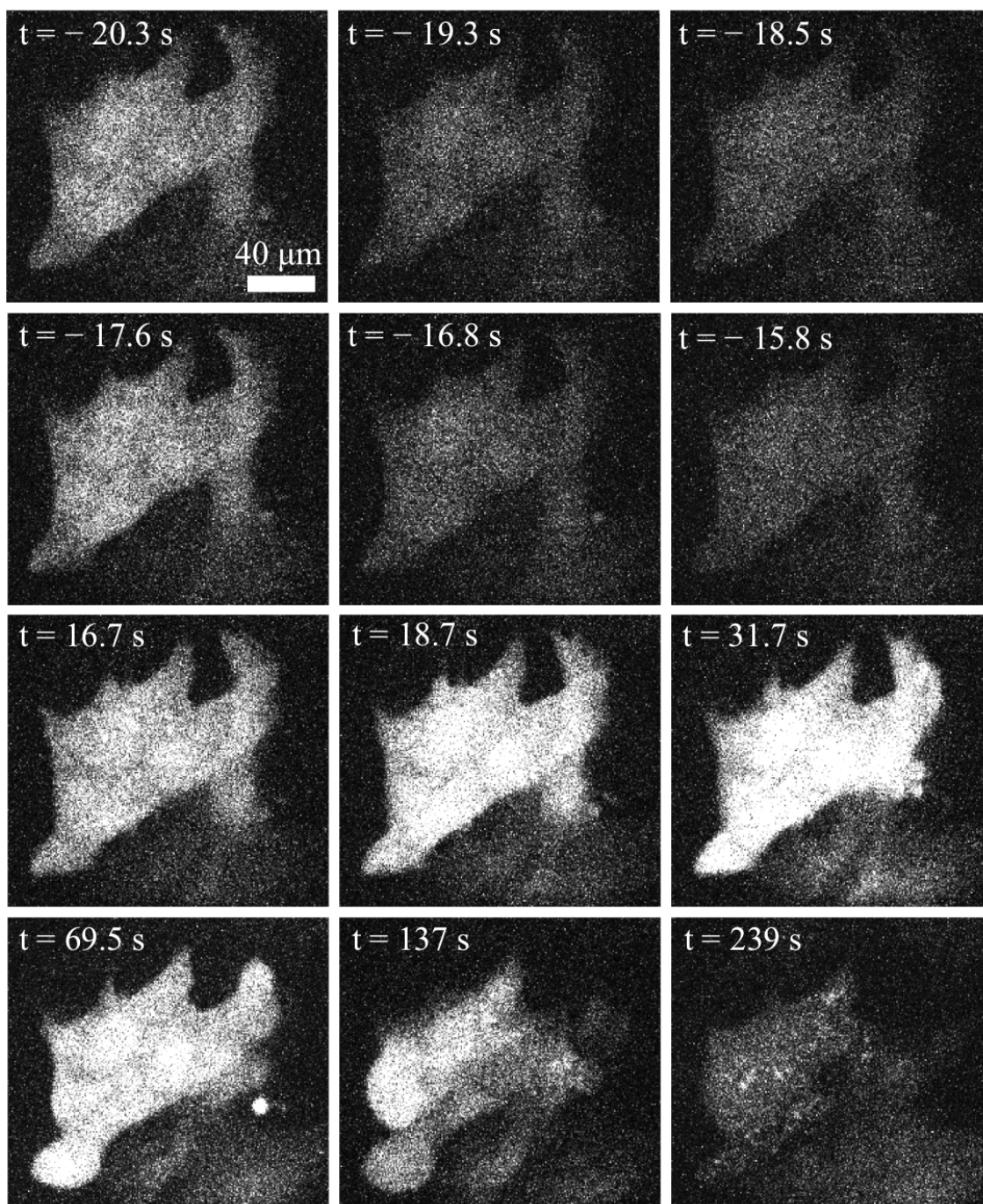


図 5-10 代表的な細胞外光増感反応前後の Fluo-4 AM 蛍光画像  
(光照射開始時:  $t = 0$  s)

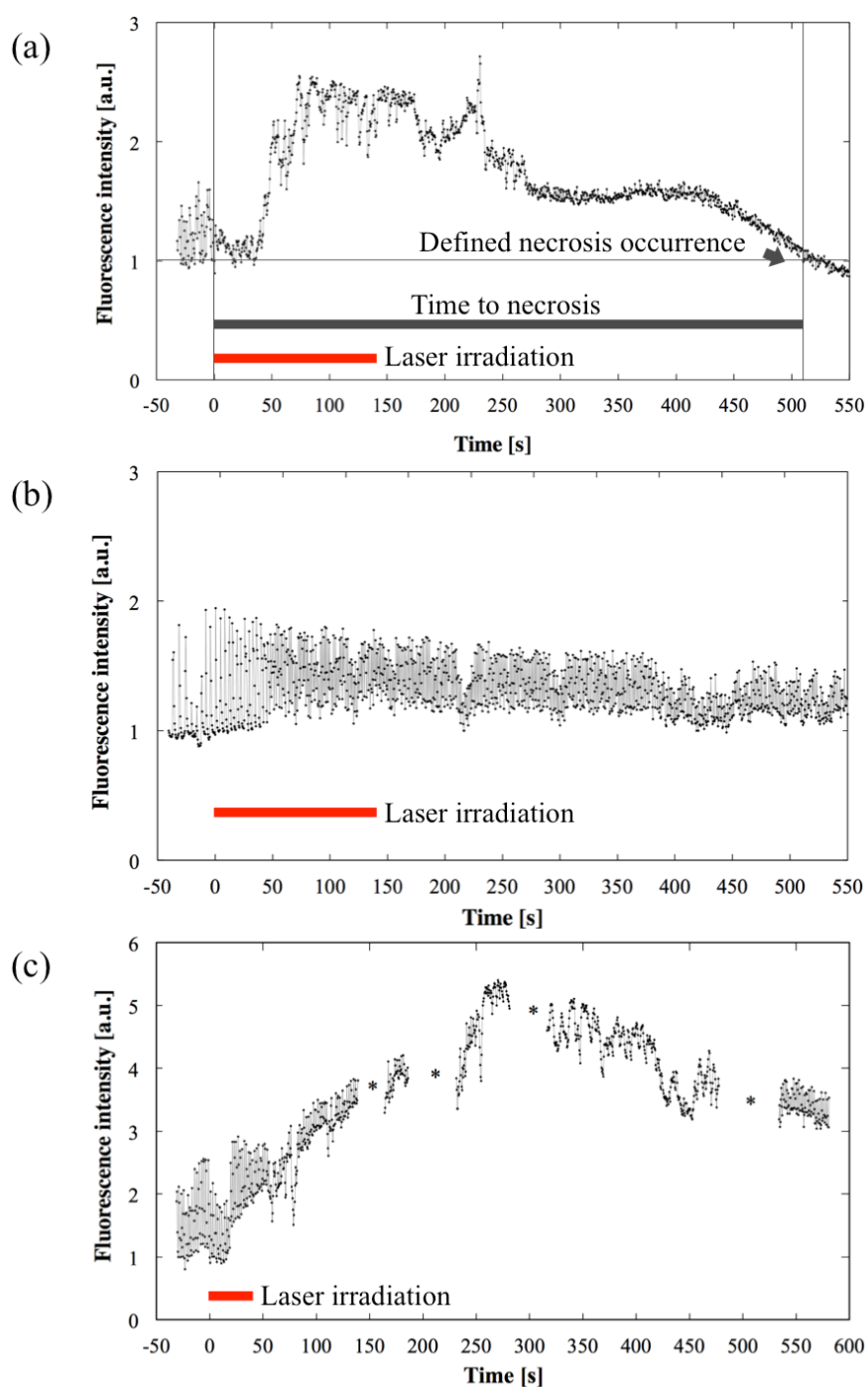


図 5-11 細胞内光増感反応および細胞外光増感反応の前、反応中、反応後の  
 蛍光画像解析によって得られた細胞内 Fluo-4 AM 蛍光輝度

(a) 強い細胞外光増感反応の場合 (接触時間 <math>< 15 \text{ min}</math>,

(b) 細胞内光増感反応の場合 (接触時間:

(c) 弱い細胞外光増感反応の場合 (接触時間 <math>< 15 \text{ min}</math>,



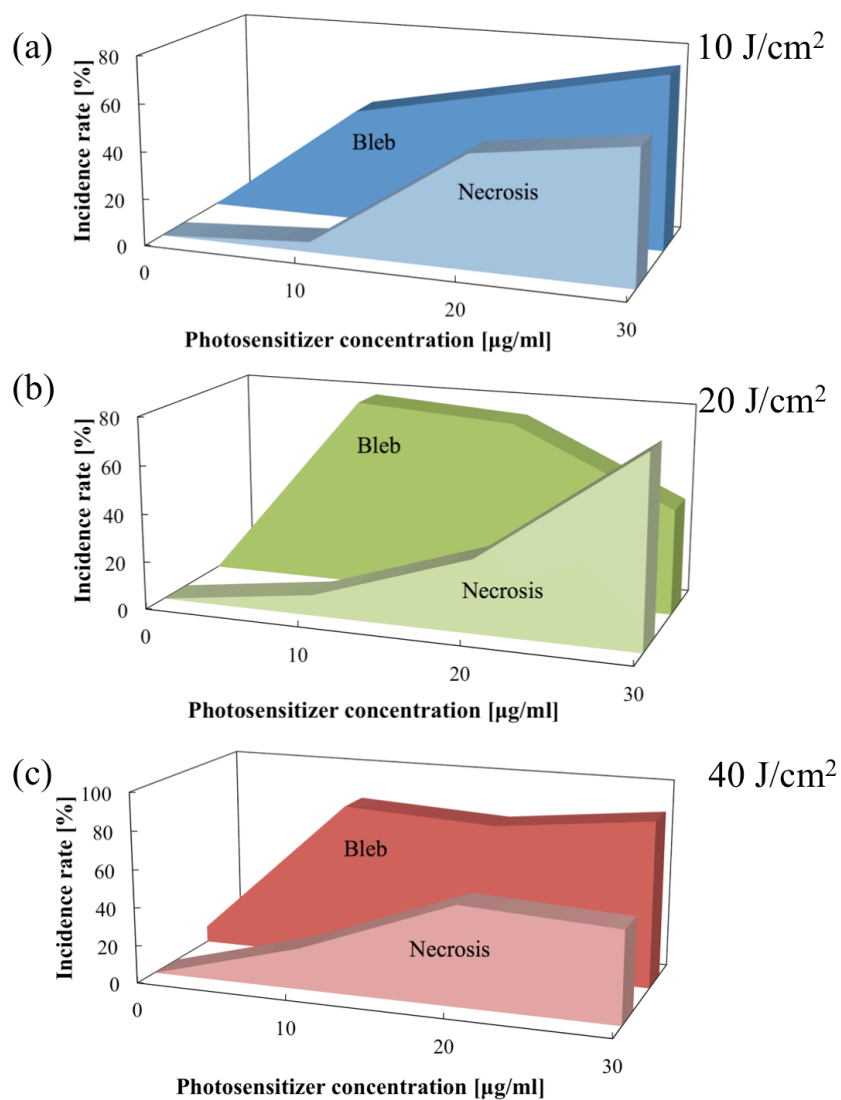


図 5-12 ブレブおよび壊死発生細胞数の発生割合 (N=1)

- (a) 放射照射量 10 J/cm<sup>2</sup>
- (b) 放射照射量 20 J/cm<sup>2</sup>
- (c) 放射照射量 40 J/cm<sup>2</sup>

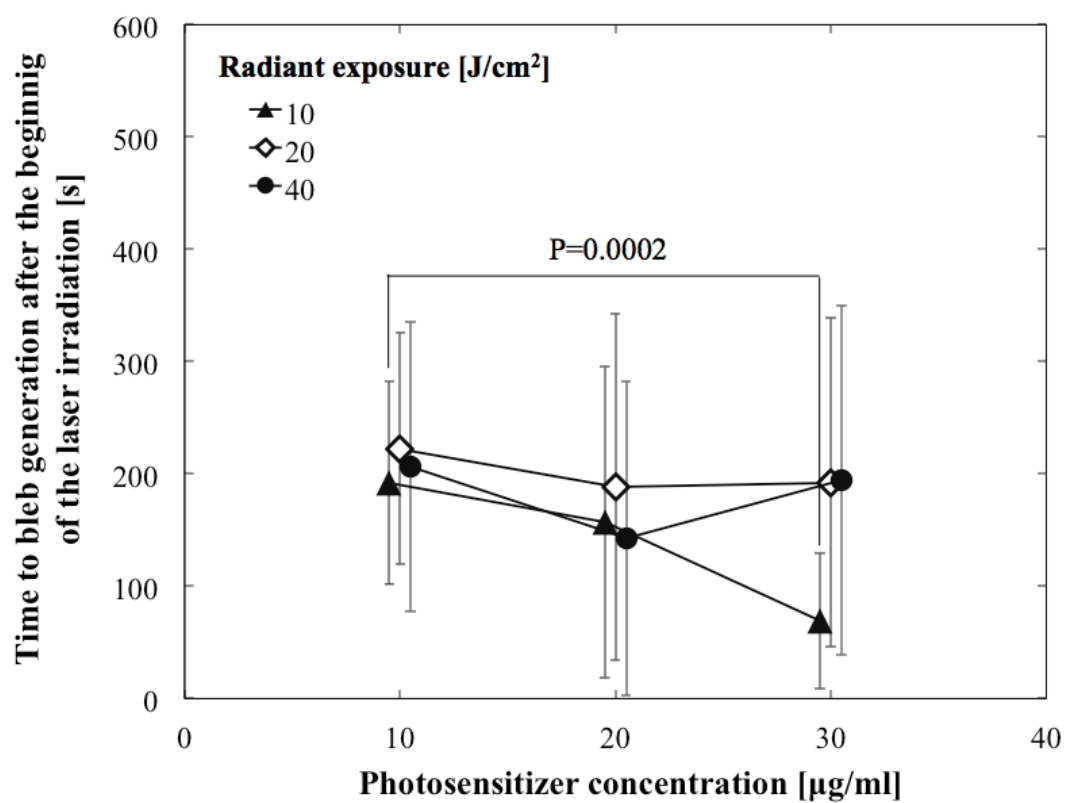


図 5-13 各放射照射量における光照射開始からブレブ発生までに要した時間のタラポルフィンナトリウム濃度依存性

(放射照度: 0.29 W/cm<sup>2</sup>, N=10-20,

プロットが重畳する部分は横方向にプロットをずらして表示)

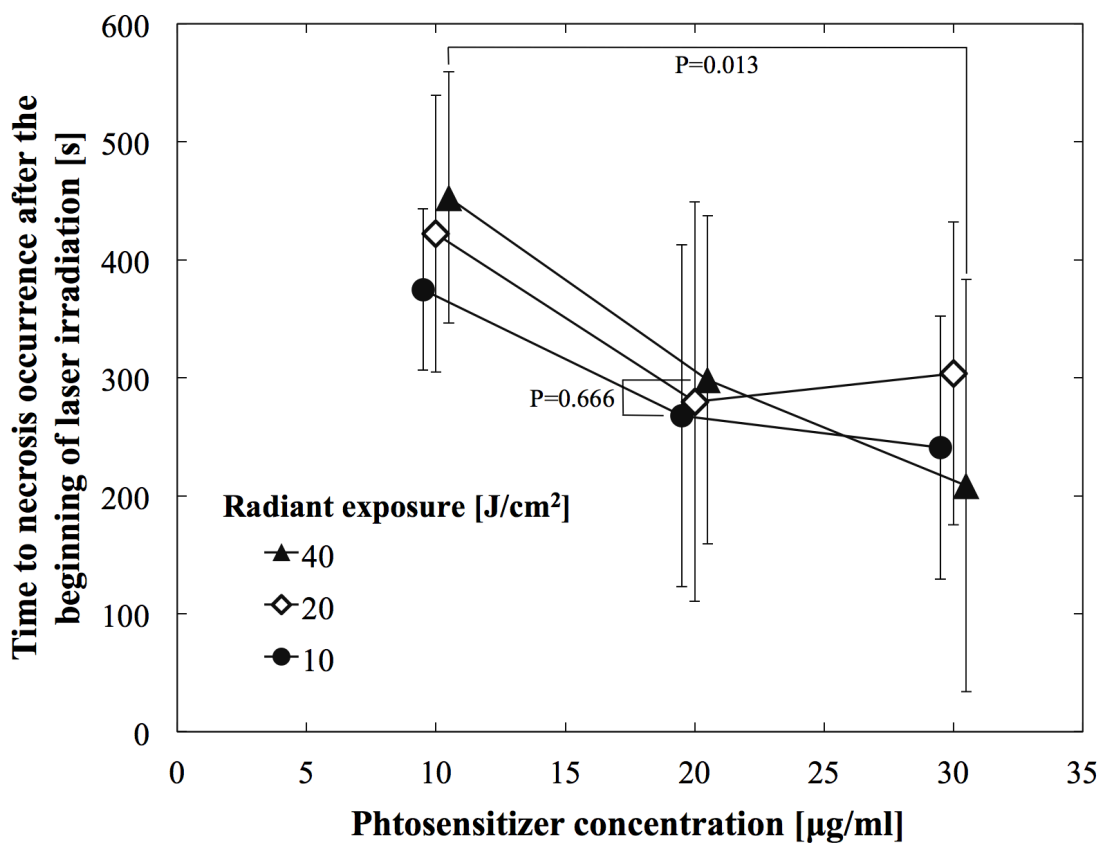


図 5-14 各放射照射量における光照射開始から細胞壊死発生までに要した時間のタラポルフィンナトリウム濃度依存性

(放射照度: 0.29 W/cm<sup>2</sup>, N=2-18, t 検定による p 値を表示,  
 プロットが重畳する部分は横方向にプロットをずらして表示)

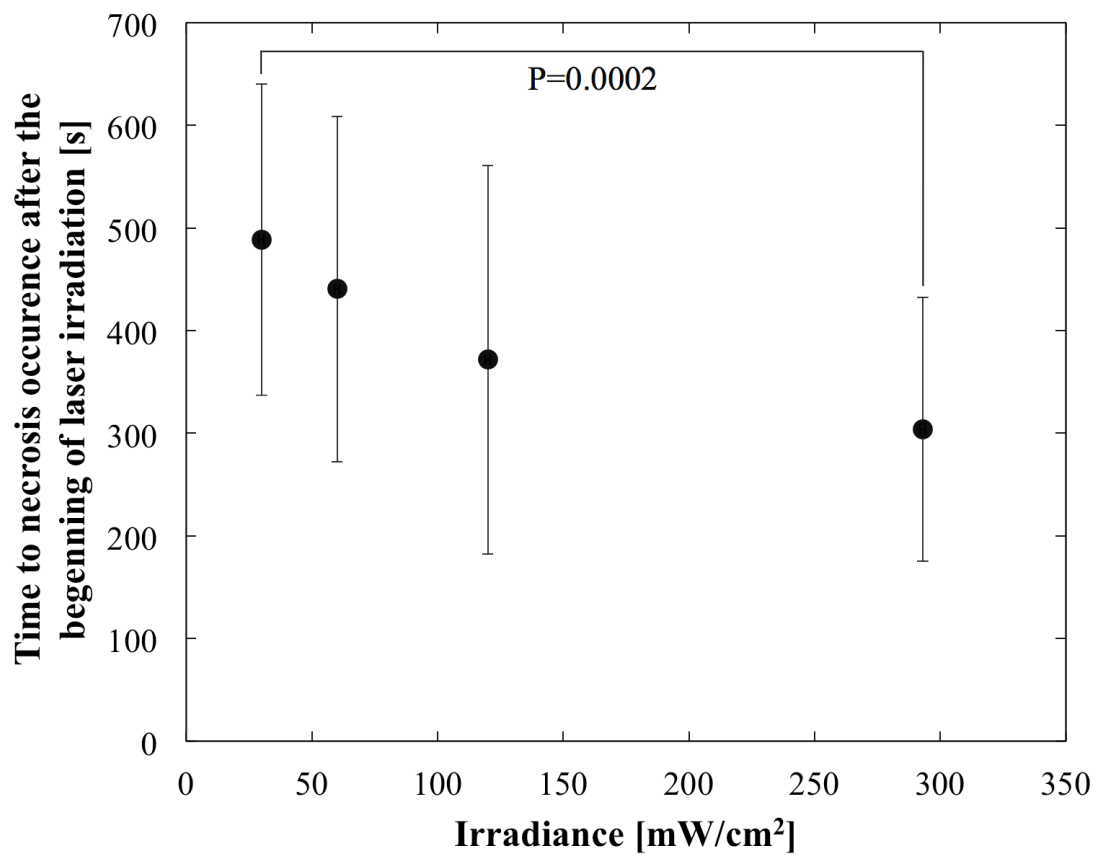


図 5-15 光照射開始から細胞壊死発生までに要した時間の放射照度依存性  
(放射照射量: 20 J/cm<sup>2</sup>, タラポルフィンナトリウム濃度: 30 μg/ml, N=18-27,  
t 検定による p 値を表示)

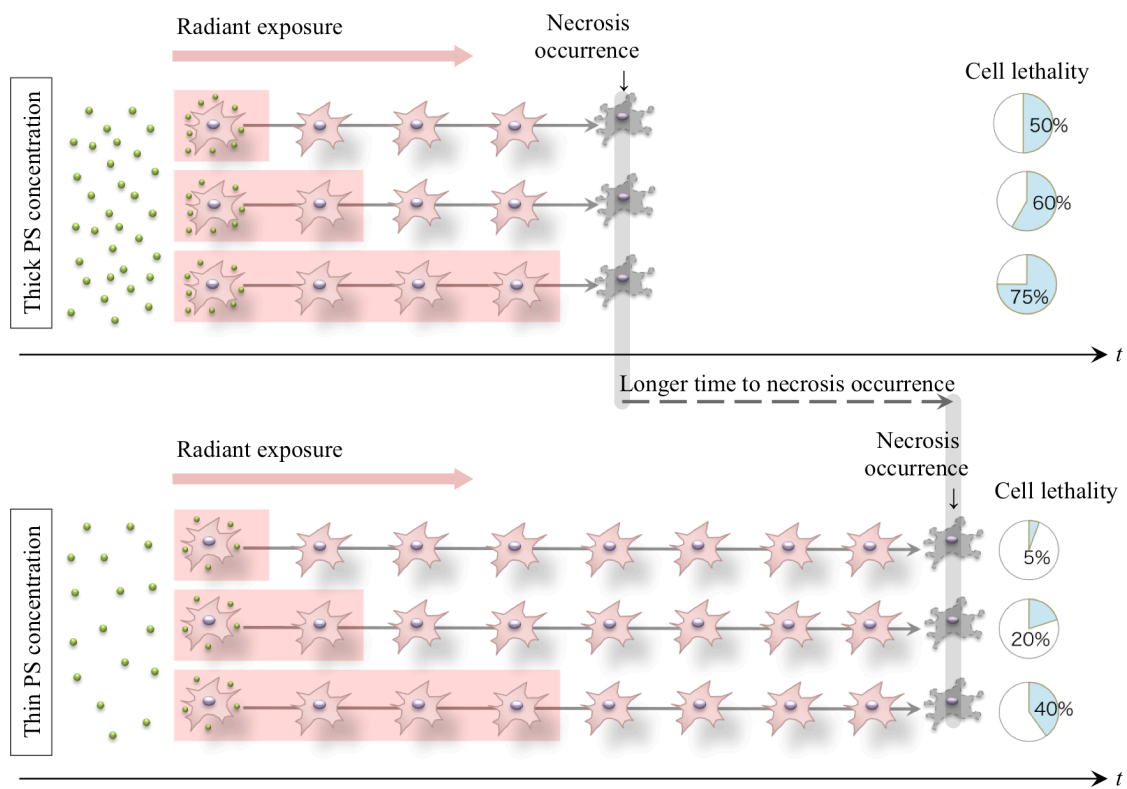


図 5-16 細胞外光増感反応による心筋細胞壊死発生タイミングと死細胞率結果の模式図



## 第 6 章 *in vitro* 実験系における光増感反応の進行と殺細胞効果

### 6.1 緒言

アブレーションによる心房細動治療では、細胞壊死による永続的な電気伝導遮断が必要である。心筋細胞を用いた *in vitro* 実験系を用い、永続的な電気伝導遮断を実現できる細胞壊死発生に必要な光増感反応条件を明らかにする。光線力学的治療における細胞内光増感反応を模擬するため、光線力学的治療の *in vitro* 基礎実験では一般に、細胞内に光感受性薬剤を取り込ませウェル内の溶液を培地に交換した上で光照射を行う。一方我々の提案する光線力学アブレーションでは、患者に光感受性薬剤投与後早期、すなわち光感受性薬剤が細胞外に高濃度で分布した状態で光照射を行う構想である。この状態を模擬するため、*in vitro* 基礎実験ではウェル内に光感受性薬剤溶液を注入した直後に光照射を行い、細胞外光増感反応を起こす。ウェル内に含まれる光感受性薬剤の分子数は前述の光増感反応と比べて多くなり、ウェル内の光増感反応進行が異なると予想される。よって、細胞外光増感反応の *in vitro* 実験系における反応進行を明らかにする必要がある。本章では 96 ウェルプレートを用いた *in vitro* 細胞実験系における、細胞外光増感反応の進行を明らかにする。タラポルフィンナトリウムを入れたウェル内で細胞外光増感反応を起こしたときの、溶液温度、タラポルフィンナトリウム蛍光、酸素分圧、タラポルフィンナトリウム吸光度を測定することで、細胞実験における光増感反応の進行を定量的に評価する。汎用的に細胞実験に用いられる実用的な実験系を工夫して使用することで、*in vivo* の治療効果を推定することを狙った。この *in vitro* 実験系を用い、細胞外光増感反応による心筋細胞への殺細胞効果を調査する。ラット心筋細胞に対しタラポルフィンナトリウムを用いて、放射照度、放射照射量、タラポルフィンナトリウム濃度を変化させながら細胞外光増感反応を起こし、2 h 後の死細胞率を測定する。

### 6.2 光増感反応中のタラポルフィンナトリウム溶液温度

タラポルフィンナトリウム溶液を入れたウェル内で光増感反応を起こすとき、タラポルフィンナトリウム溶液やウェル側面に光が吸収され発熱して、溶液温度が上昇することが予想される。ウェル内光増感反応による心筋細胞への影響調査の実験を行うにあたって、温度上昇による影響を事前に検討する必要がある。そこで、光増感反応中の溶液温度を測定する。

#### 6.2.1 実験方法

##### 6.2.1.1 96 ウェルプレートを用いた光増感反応実験系

本研究を通してタラポルフィンナトリウムを光感受性薬剤として使用し、タラポルフィ

ンナトリウムの Q 帯吸収ピーク 660 nm 帯に中心波長をもつ半導体レーザー (Optical Fuel, ソニー株式会社, 日本) を励起光源として用いた。図 6-1 にレーザーの発振スペクトルを示す。レーザー光は石英ガラス光ファイバー (コア径: 200  $\mu\text{m}$ , N.A.: 0.37,) (WF200/220P37, Ceram Optec, USA) で伝送した。図 6-2 にビームプロファイラ (LaserCam-HR II, Coherent, USA) によって測定した光ファイバー端における出射光強度分布を示す。ガウシアンよりも平坦な強度分布であった。図 6-3 にウェル照射光学系の配置を示す。光ファイバー端より出射したレーザー光は、非球面レンズ (直径: 50 mm, 焦点距離: 39 mm) (AGL-50-39P, シグマ光機, 日本) を用いて平行光にしたのち、アパーチャー (直径: 8 mm) によって、ビーム中心部を切り出した。ウェル 1 つずつに光照射を行うためウェルの外径 8 mm と同じ直径の孔からウェル底面に光照射可能な照射台を作成した。図 6-4 に光照射台における照射光強度をビームプロファイラで測定した結果を示す。照射孔全体での光パワーをレーザーパワーメータ (PS19Q, Coherent, USA) で測定し、ウェル底面での放射照度を求めた。

### 6.2.1.2 光増感反応中のタラポルフィンナトリウム溶液温度計測

5.2.1.3 項と同じ細胞培養用培地にタラポルフィンナトリウムを 40  $\mu\text{g/ml}$  となるように溶解した。ウェル相互が遮光状態に保てる黒色 96 ウェルプレート (NCO3904, Corning, USA) を用いた。さらに、光照射による近接のウェルへの影響を低減するように、ウェル間隔を一つ空けて使用し、1 枚のプレートあたり 24 ウェルを使用した。各ウェルに作成したタラポルフィンナトリウム溶液を 0.1 ml ずつ入れて照射台の上に乗せて各ウェルに光照射をして光増感反応を起こした。タラポルフィンナトリウムを含まない培地を参照用とした。放射照度は 0.12–0.66  $\text{W/cm}^2$  と変化させた。T 型熱電対をウェル内の溶液の底面付近に設置し、デジタルペンレコーダー (DL750, 横河電機, 日本) の温度/高精度電圧絶縁モジュール (701265, 横河電機, 日本) を用い、放射照射量 40  $\text{J/cm}^2$  まで光照射を行ったときの、光照射中のタラポルフィンナトリウム溶液温度を経時的に測定した。照射時間は、0.12  $\text{W/cm}^2$  のとき 333 s、0.29  $\text{W/cm}^2$  のとき 137 s、0.47  $\text{W/cm}^2$  のとき 85 s、0.66  $\text{W/cm}^2$  のとき 60 s であった。

### 6.2.2 実験結果および考察

図 6-5(a)に参照用のウェル、図 6-5(b)にタラポルフィンナトリウム溶液の入ったウェルでの溶液温度変化を示す (N=1)。図 6-5(a)のように参照用ウェルでは 40  $\text{J/cm}^2$  の光照射後、放射照度の変化に伴い 5.2–10.3 $^{\circ}\text{C}$  温度上昇した。図 6-5(b)のようにタラポルフィンナトリウム溶液では 40  $\text{J/cm}^2$  の光照射後、放射照度の変化に伴い 5.4–15.6 $^{\circ}\text{C}$  温度上昇した。参照群における放射照度 0.47  $\text{W/cm}^2$  の結果は測定精度に問題がある可能性がある。温度上昇は放射照度が高いほど大きくなり、最大放射照度である 0.66  $\text{W/cm}^2$  のときに最大となり、初期溶液温度 22.9 $^{\circ}\text{C}$  から 38.5 $^{\circ}\text{C}$  まで上昇した。レーザーによる光熱作用では、42–45 $^{\circ}\text{C}$  では蛋白質の構造変化や水素結合の解離による収縮など、45–50 $^{\circ}\text{C}$  では酵素や膜の不活性、50–60 $^{\circ}\text{C}$  では凝



固や蛋白質の変性が生じる [1, 2]。本実験では、溶液の温度上昇は見られたものの、最も吸収が大きくなる濃度 40  $\mu\text{g/ml}$  タラポルフィンナトリウム溶液に放射照度 0.66  $\text{W/cm}^2$  で光照射を行った場合でも 40°C 以下であった。このことよりレーザー照射による温度上昇で細胞毒性は生じず、光増感反応後に得られる細胞毒性は光増感反応によるものであると考えられる。

### 6.3 光増感反応中のタラポルフィンナトリウム蛍光

光感受性薬剤蛍光強度は、光増感反応による最終産生物である一重項酸素が光感受性薬剤を酸化するため減衰する。光感受性薬剤蛍光の減衰と一重項酸素の産生量の間には相関があるため、光感受性薬剤蛍光の減衰によって光増感反応の進行を間接的に測定できる [3, 4]。生体組織と異なり、酸素供給が液面からの拡散輸送のみであるウェル内で、細胞外光増感反応がどのように生じるのかを調査する。本部では、ウェル内における細胞外光増感反応中のタラポルフィンナトリウム蛍光強度を経時計測することで、光増感反応の進行について検討する。

#### 6.3.1 実験方法

図 6-6 に細胞外光増感反応中のタラポルフィンナトリウム蛍光経時計測系を示す。光増感反応を施行する 96 ウェルプレートの上部に球面平凸レンズ (材質: BK7, 直径: 30 mm, 焦点距離: 35 mm) (SLB-30-35P, シグマ光機, 日本) と PIN フォトダイオード (受光面: 1 mm 平方) (DET210, Thorlabs, USA) を設置した。ウェル底面の中央部約 1 mm から発生した N. A. 0.37 に拡がる光線がフォトダイオード受光面内に入るようにした。図 6-7 にタラポルフィンナトリウム蛍光計測集光系の配置を示す。面積の小さいフォトダイオードの受光面に対し、タラポルフィンナトリウム蛍光は集光され、平行な励起光は拡散する。このように、励起光とタラポルフィンナトリウム蛍光の空間的な分離を図った。波長的な分離を行うために、ノッチフィルター (日東光器, 日本) 1 枚と、710 nm ロングパスフィルター (直径: 25 mm) を 3 枚用いた。図 6-8 にタラポルフィンナトリウム蛍光の計測に用いた各フィルターと 4 枚のフィルターを合わせたフィルターセットの波長特性を分光光度計 (7.2.1 節参照) (UV-3600, 島津製作所, 日本) で測定した結果を示す。タラポルフィンナトリウム濃度を 10-30  $\mu\text{g/ml}$  と変化させた溶液を 0.1 ml それぞれのウェルに注入した。放射照度 0.29  $\text{W/cm}^2$  (選定理由は 6.6.4 節参照) で放射照射量 40  $\text{J/cm}^2$  になるまで光照射を行い、PIN フォトダイオードにより、光増感反応中のタラポルフィンナトリウム蛍光を経時的に測定した。

#### 6.3.2 実験結果

図 6-9 に光増感反応中のタラポルフィンナトリウム蛍光強度減衰を示す (N=1)。光照射開始時のタラポルフィンナトリウム蛍光強度で正規化した。光照射中、タラポルフィンナ

トリウム蛍光は単調に減少し、溶存酸素枯渇によって光増感反応が停止することではなく、光照射中連続的に反応が続くことが分かった。あるタラポルフィンナトリウム濃度のプロットに着目すると、光照射開始後にタラポルフィンナトリウム蛍光は最初急激に減衰するが、後に緩やかな減衰に変化する。両者の傾きの比は約 11 であった。傾きが変曲する点は、今回用いたタラポルフィンナトリウム濃度の範囲では  $0.4\text{--}1.3\text{ J/cm}^2$  の間に存在し、タラポルフィンナトリウム濃度が高いほど小さい放射照射量で変曲点があった。

## 6.4 光増感反応による酸素およびタラポルフィンナトリウム消費

6.3 部においてウェル内の細胞外光増感反応では反応速度の異なる 2 つの段階があることが分かった。この詳細を明らかにするために、光増感反応による酸素とタラポルフィンナトリウムの消費を、酸素分圧測定およびタラポルフィンナトリウム溶液吸光度測定によって明らかにした。

### 6.4.1 実験方法

#### 6.4.1.1 光増感反応中酸素分圧測定系

図 6-10 に光増感反応中の溶液温度と酸素分圧を測定する実験系を示す。酸素電極と熱電対をウェル底面付近に設置した。酸素分圧測定はテフロン膜で表面が被膜されたクラーク型酸素電極 (POE-10N, バイオリサーチセンター, 日本) と酸素分圧モニター (PO2-100, バイオリサーチセンター, 日本) を用いた。プラチナの酸素電極の側面はポリウレタンとエポキシでコートされ外径は  $200\text{ }\mu\text{m}$  であり、先端部は酸素透過膜を有する [5]。酸素分圧測定はポーログラフイーの原理を用い、ファラデー電流値から酸素分圧値を求めるものである [5]。直径  $100\text{ }\mu\text{m}$  の不感電極と直径  $200\text{ }\mu\text{m}$  の酸素電極にそれぞれ正と負の電圧を印可することで以下のような酸化還元反応が生じる。



酸素電極表面における溶存酸素のファラデー電流を測定し、その値を酸素分圧に変換する。上記の酸化還元反応は、溶液温度による影響を大きく受ける。室温 ( $26.4^\circ\text{C}$ ) において十分に放置した生理食塩水でキャリブレーションを行い、出力電圧  $500\text{ mV}$  を酸素分圧  $155\text{ mmHg}$  に対応させた。図 6-11 に測定した酸素電極出力電圧値の温度依存性を示す ( $N=1$ )。6.2 部に示したように光増感反応中はタラポルフィンナトリウム溶液の温度上昇が生じるため、図 6-11 の校正直線を用いて、キャリブレーションを行い室温での酸素分圧に変換した。

#### 6.4.1.2 酸素分圧計測

96 ウェルプレートにタラポルフィンナトリウム溶液を  $0.1\text{ ml}$  注入し、電極の先端をウェル底面直上になるように設置した。タラポルフィンナトリウムの濃度を  $5\text{--}40\text{ }\mu\text{g/ml}$  と変化させたときの酸素分圧を経時的に測定することで、光増感反応による酸素消費と液面から

の拡散による酸素供給を調査した。放射照度は  $0.12, 0.29 \text{ W/cm}^2$  の 2 種類を用いた。光照射を 30 s 行い、その照射中および照射後の溶液温度と酸素分圧を経時的に計測した。測定した温度を図 6-11 の校正直線に代入して、室温での酸素分圧に変換した。酸素消費が急速に進行する光照射開始直後の光増感反応進行について明らかにするため、光増感反応後の溶液吸光度を測定した。タラポルフィンナトリウム溶液濃度は  $20 \mu\text{g/ml}$  を用いた。放射照度を  $0.29 \text{ W/cm}^2$  (選定理由は 6.6.4 節参照) として、 $0.5\text{--}1.0 \text{ J/cm}^2$  の光照射をした後、ウェル内のタラポルフィンナトリウム溶液を光路長 1 cm のディスポ分光セルに移した。D-MEM/F12 を加え 13 倍に薄めてピペッティングによりよく混合し、溶液量を 1.4 ml とした。波長 450–800 nm における吸光度を分光光度計 (UV-3600, 株式会社島津製作所, 日本) を用いて計測した。計測した吸光度スペクトルのピークを光照射前のタラポルフィンナトリウム溶液吸光度ピークにより正規化した。

#### 6.4.2 実験結果

図 6-12 にタラポルフィンナトリウム溶液濃度を変化させたときの、光照射中および光照射停止後 30 s までの酸素分圧経時変化を示す ( $N=1$ )。光照射開始から 3–10 s で酸素分圧は 2 s 間で 100 mHg 以上急激に減少する。その後光照射が続く間、酸素分圧は放射照射量が  $10 \text{ J/cm}^2$  から  $40 \text{ J/cm}^2$  の間での変化は初期値の 3% の減少であった。図 6-9 に示したタラポルフィンナトリウム蛍光減衰と図 6-12 の酸素分圧減衰を比較すると、タラポルフィンナトリウム蛍光減衰は明確な 2 段階の異なる傾きがあったが、酸素分圧減衰はなだらかに減少速度が変化していることが分かる。光照射を停止した後、酸素分圧は緩やかに上昇した。この上昇は液面から酸素電極が設置されたウェル底面付近へ酸素が拡散輸送によって到達することを反映していると考えられる。この酸素の拡散輸送速度にはタラポルフィンナトリウム濃度や放射照度に対する依存性は見られなかった。図 6-13 に光照射前の値で正規化した、酸素分圧とタラポルフィンナトリウム溶液吸光度ピークの変化を示す。酸素分圧の減少と比較して、タラポルフィンナトリウムの減少は緩やかで、2 割程度しか減少しなかった。このことより、ウェル内での細胞外光増感反応においてタラポルフィンナトリウムは十分に存在しており、反応速度に影響を与える要素は酸素供給であることが確かめられた。

### 6.5 心筋細胞における細胞外光増感反応の殺細胞効果

6.4 部までに細胞外光増感反応の *in vitro* 実験系における反応の進行を明らかにした。この *in vitro* 実験系を用いて、細胞外光増感反応による殺細胞効果を調査するため、光増感反応を起こした後の死細胞率を測定した。

#### 6.5.1 実験方法

細胞毒性を試験する方法として一般的に用いられる水溶性テトラゾリウム塩化合物

(2-[2-methoxy-4-nitrophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2,4-disulfophenyl]-2H-tetrazolium, Water soluble Tetrazolium Salts) アッセイ (以下 WST アッセイと呼ぶ) を採用した。WST アッセイは生細胞の酵素活性を測定する比色定量法であり、ミトコンドリア内の脱水素酵素によって還元されたホルマザン色素を分光により計測し、培養細胞の生存率や増殖率、試薬や毒物の細胞毒性評価に用いられる [6,7]。本研究では WST アッセイキットである Cell Counting Kit-8 (株式会社同仁化学研究所, 日本) を用いて死細胞率の算出を行った。WST-8 ホルマザンは 450 nm 付近に吸収スペクトルを有するため、計測には 450 nm における吸光度測定を用いた。

5.2.1.3 項と同じ心筋細胞をコラーゲンコートされた黒色 96 ウェルプレート (Corning, USA) に播種した。細胞密度は 5.2.1.3 項と同じ  $2.0 \times 10^5$  cells/ml となるように調製し、各ウェルに 0.1 ml ずつ注入した<sup>1</sup>。6.2.1.2 項に示すようにプレート内のウェルを間隔を空けて使用した。5.2.1.3 項と同じ細胞培養用培地および同じ条件で 6-7 日間培養した。ウェルに入れた当初浮遊していた細胞は、培養 1 日目からウェル底面に接着し始める。培養開始から 2-3 日経過すると、心筋細胞は自動能を示し、少しずつ細胞同士が近づき細胞塊を形成した。6 日目にはウェル底面でコンフルエントな状態になり、全体的に拍動した。この培養経過より、培養期間を 6-7 日間とした。

タラポルフィンナトリウム濃度が 5-40  $\mu\text{g/ml}$  となるように細胞培養用培地に溶解した。細胞を培養したウェルに、調製したタラポルフィンナトリウム溶液を 0.1 ml ずつ注入し、図 6-3 に示す光照射系を用いて光増感反応を起こした。放射照度を 0.12-0.66  $\text{W/cm}^2$ 、放射照射量を 1.2-40  $\text{J/cm}^2$  と変化させた。細胞外での光増感反応による心筋細胞へ与える影響を調査するため、タラポルフィンナトリウム注入から 15 min 以内に光照射を行った。光増感反応を起こしたウェル内の細胞を顕微鏡 (IX70, オリンパス株式会社, 日本) で観察した。ウェル内のタラポルフィンナトリウム溶液を吸引して培養用培地 0.1 ml と WST-8 溶液 10  $\mu\text{l}$  を遮光下で注入し、インキュベーターで 2 h 培養した。各ウェルの波長 450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Sunrise™, Tecan Group Ltd., Switzerland) で測定した。光増感反応を起こしていない生細胞が含まれるウェルでの吸光度を死細胞率 0%、タラポルフィンナトリウム濃度 30  $\mu\text{g/ml}$ 、放射照射量 40  $\text{J/cm}^2$  の条件で光増感反応を起こし、顕微鏡観察でウェル全域に細胞死が発生することが確認されたウェルでの吸光度を死細胞率 100% と定義した。測定したい光増感反応を起こしたそれぞれのウェルにおいて、この定義によってそれぞれ死細胞率を算出した。

## 6.5.2 実験結果

図 6-14 に光増感反応前後における心筋細胞の形態変化を示す。光増感反応前の図 6-14(a)

<sup>1</sup> この状態で、第 5 章のペトリディッシュを用いた実験の細胞密度および液厚と同じになっている。

および図 6-14(b)はウェル底面にコンフルエントに接着している心筋細胞が観察されるが、図 6-14(c)および図 6-14(d)に見られるように、光増感反応が強くなるにつれ、ブレブの発生やウェル底面からの剥離が見られた。図 6-15(a)に放射照度  $0.29 \text{ W/cm}^2$  における死細胞率のタラポルフィンナトリウム濃度依存性を示す。プロットが重畳する部分は、横方向にプロットをずらして表示した。放射照射量  $10\text{--}40 \text{ J/cm}^2$  において、 $10 \mu\text{g/ml}$  と  $15 \mu\text{g/ml}$  の間には有意な差が見られタラポルフィンナトリウム濃度  $15 \mu\text{g/ml}$  付近が細胞壊死発生の閾値と考えられる ( $P=0.0005$ ,  $t$  検定,  $N=6$ )。細胞毒性効果が生じ始めると考えられる  $10 \mu\text{g/ml}$  と  $15 \mu\text{g/ml}$  の間の濃度条件 ( $11.5, 13 \mu\text{g/ml}$ ) を追加した結果を図 6-15(b)に示した。 $15 \mu\text{g/ml}$  以上では死細胞率はタラポルフィンナトリウム濃度と放射照射量に比例して死細胞率が高くなった。タラポルフィンナトリウム濃度が上記の閾値以下では死細胞率がいずれの場合でも 20%を下回り、明確な殺細胞効果が得られなかった。以上より、放射照度  $0.29 \text{ W/cm}^2$  および放射照射量  $10\text{--}40 \text{ J/cm}^2$  の条件において、細胞外の光増感反応による心筋細胞への殺細胞効果はタラポルフィンナトリウム濃度依存的で、 $15 \mu\text{g/ml}$  付近に細胞壊死発生閾値があることが分かった。

図 6-16(a)–(c)に、放射照度  $0.12, 0.47$ , および  $0.66 \text{ W/cm}^2$  における死細胞率のタラポルフィンナトリウム濃度依存性を示す ( $N=6$ )。プロットが重畳する部分は、横方向にプロットをずらして表示した。放射照度  $0.12 \text{ W/cm}^2$  の場合は図 6-15 に示した放射照度  $0.29 \text{ W/cm}^2$  の場合と類似し、タラポルフィンナトリウム濃度依存的に死細胞率が上昇している。一方で放射照度  $0.47$  および  $0.66 \text{ W/cm}^2$  の場合では全体的に死細胞率が低かった。同じ放射照射量におけるそれぞれの放射照度でのタラポルフィンナトリウム濃度依存性を比較するため、図 6-17 に放射照射量  $20 \text{ J/cm}^2$  について異なる放射照射量照度における死細胞率のタラポルフィンナトリウム濃度依存性を示す (図 6-15, 図 6-16 の再掲)。プロットが重畳する部分は、横方向にプロットをずらして表示した。放射照度が  $0.12$  および  $0.29 \text{ W/cm}^2$  の場合は、タラポルフィンナトリウム濃度に比例して死細胞率が上昇しているが、 $0.47$  および  $0.66 \text{ W/cm}^2$  の場合では殺細胞効果は得られなかった。薬剤濃度  $30 \mu\text{g/ml}$  のとき、この二つの群の間に有意な差が見られた ( $P=0.00003$ ,  $t$  検定,  $N=6$ )。また、放射照度  $0.12$  および  $0.29 \text{ W/cm}^2$  の間、 $0.47$  および  $0.66 \text{ W/cm}^2$  の間には有意な差はなかった。

## 6.6 考察

### 6.6.1 *in vitro* 実験系における酸素環境と光増感反応進行

図 6-9 における反応の第一段階では溶存酸素を消費して急激に反応が進行し、それに続く反応の第二段階では酸素分圧の低下に伴って液面から酸素が底面へ拡散輸送されることで緩やかな酸素供給が続き反応が連続的に進行しているものと考えられる。タラポルフィンナトリウム濃度が高いほど反応速度の変曲点が低い放射照射量となるのは、タラポルフィンナトリウム濃度が高いほど、同じ放射照度でも単位時間あたりに消費する酸素が多く

なり、溶存酸素をより短い照射時間で消費するためだと考えられる。図 6-9 における変曲点に注目し、その点の放射照射量とタラポルフィンナトリウム濃度の関係を図 6-18 に示す。タラポルフィンナトリウム濃度 10–20  $\mu\text{g/ml}$  の範囲で図 6-18 のように線形性を示す。タラポルフィンナトリウム濃度が 30  $\mu\text{g/ml}$  のプロットは 10–20  $\mu\text{g/ml}$  の線形部の外挿より高いところにあった。20–30  $\mu\text{g/ml}$  以上では、タラポルフィンナトリウム濃度を高くしても単位時間あたりに消費する酸素の分子数が多くなならない。すなわち一重項酸素産生速度が上がらないことを意味している。タラポルフィンナトリウム濃度を増やしても一重項酸素産生速度が上がらないということは、それ以外の酸素分圧あるいは光強度が光増感反応の律速段階になっていると推測される。

図 6-9 において、タラポルフィンナトリウム濃度が 30  $\mu\text{g/ml}$  の場合に放射照射量 20  $\text{J/cm}^2$  付近から、タラポルフィンナトリウム蛍光減衰速度が増加した。一見すると光増感反応の反応速度が速くなったと解釈されるが、タラポルフィンナトリウム濃度、放射照度、酸素分圧は変化していないため、反応速度が変化することは考えにくい。この観測された傾きの変化は、光増感反応による酸化新生物の生成によって、タラポルフィンナトリウム蛍光が吸収された影響と思われる。図 6-9 に示したタラポルフィンナトリウム蛍光減衰と図 6-12 に示した酸素分圧の減衰を比較すると、タラポルフィンナトリウム蛍光減衰は明確な 2 段階の異なる傾きがあったが、酸素分圧減衰はなだらかに減少速度が変化することが分かる。タラポルフィンナトリウム蛍光減衰は反応の総量を表すのに対して、酸素分圧減衰は反応による消費と拡散による供給のバランスを表しているために、厳密な変化の一致は見られないものと考えられる。

### 6.6.2 光増感反応の第一段階における考察

反応速度の速い反応の第一段階では、酸素、光感受性薬剤、および光、すべての要素が十分に存在する。この状態でそれぞれの要素が消費されるバランスをについて考察する。図 6-9 におけるタラポルフィンナトリウム濃度 20  $\mu\text{g/ml}$  のときの変曲点よりも左側の放射照射量 0.5  $\text{J/cm}^2$  をこの第一段階に分類される放射照射量と考えた。放射照射量 0.5  $\text{J/cm}^2$  の光照射を行う間の酸素分圧および溶液吸光度ピークの減衰を図 6-13 より求めると、酸素分圧は初期値の 0.34 倍、溶液吸光度ピークは初期値の 0.81 倍であった。酸素分圧の初期濃度は大気と平衡の 220  $\mu\text{M}$  であるから、図 6-13 の放射照射量 0.5  $\text{J/cm}^2$  では約 75  $\mu\text{M}$  の酸素濃度になる。よって、液面からの拡散輸送による酸素供給を無視すると、放射照度 0.5  $\text{J/cm}^2$  の光照射によって、 $1.5 \times 10^{-8}$  mol の酸素が消費されたことがわかる。タラポルフィンナトリウム濃度 20  $\mu\text{g/ml}$  は初期値の 25  $\mu\text{M}$  から 20  $\mu\text{M}$  に減少し、放射照射量 0.5  $\text{J/cm}^2$  の光照射によって  $4.8 \times 10^{-10}$  mol のタラポルフィンナトリウムが消費されると計算できる。次に光の吸収を計算する。Lambert Beer 則により励起透過光  $I$  は入射光  $I_0$ 、吸収係数  $\mu_a$ 、光路長  $d$  とすると以下の式に表される。

$$\frac{I}{I_0} = \exp(-\mu_a \cdot d) \quad (6.2)$$

3.2.2 節に述べたモル吸収係数を代入すると、厚み 2.8 mm のタラポルフィンナトリウム溶液に吸収されたエネルギーは  $3.9 \times 10^{-2}$  J となる。それぞれ分子数に換算すると、 $1.3 \times 10^{17}$  の光子が吸収され、 $9.0 \times 10^{15}$  の酸素分子が消費され、 $2.9 \times 10^{14}$  のタラポルフィンナトリウム分子が退色する。図 6-19 にこの結果の総括を示す。448 個の光子がタラポルフィンナトリウムに吸収され、31 個の酸素分子が消費されて一重項酸素を産生し、その結果 1 つのタラポルフィンナトリウム分子が酸化され退色する。

この消費バランスで進行する光増感反応におけるエネルギー効率について考える。波長 660 nm 帯の光子 448 個が吸収され、消費された 31 個の酸素分子が全て一重項酸素に励起されると仮定して、一重項酸素が発生する反応の効率は、光子 1 個が持つエネルギー  $E$  は、プランク定数  $h$ 、振動数  $\nu$ 、光速度  $c$ 、波長  $\lambda$  を用いて

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (6.3)$$

と表せる。一重項酸素は波長 1270 nm の光子相当のエネルギーを有するから、波長 660 nm 帯の光子が吸収され、消費された酸素分子が全て一重項酸素に励起されると仮定した際、産生された一重項酸素による酸化のエネルギー効率は

$$\begin{aligned} (\text{産生された一重項酸素による酸化のエネルギー効率}) &= \frac{\text{Output}}{\text{Input}} \\ &= \frac{E_{1270} \times 31}{E_{663} \times 448} = \frac{h \frac{c}{1270} \times 31}{h \frac{c}{660} \times 448} = 3.6\% \end{aligned} \quad (6.4)$$

より約 3.6%であった。このような系に吸収されたエネルギーに対する一重項酸素による酸化のエネルギー効率という観点での反応収率に関する報告は他に無い。0.77 の量子収率よりも得られたエネルギー効率が低い理由を考察する。量子収率では産生された一重項酸素のうち、三重項状態に戻る場合でも一重項酸素産生として数えられる一方、算出したエネルギー効率では産生された一重項酸素のうち生体物質あるいは蛋白質を酸化することで三重項状態に戻らず、酸素が消費された分を数えている。吸収されたエネルギーのうち 3.6%、つまり 0.77 の効率で産生された一重項酸素を分母に考えると、そのうち約 4.7%の一重項酸素が生体物質あるいは蛋白質を酸化して消費され、残りが三重項状態に戻ると推定できる。

### 6.6.3 生体内酸素分圧による光増感反応進行の比較

本研究に用いた 96 ウェルプレート実験系における光増感反応の進行を、対象とする心筋組織内で予想される光増感反応の進行と比較検討する。タラポルフィンナトリウム蛍光は反応の第一段階で急激に減衰し、反応の第二段階では第一段階の約 1/11 の速度で減衰した。

本章の実験では、光増感反応中に溶液中酸素分圧が初期酸素分圧 155 mmHg から反応の第一段階で急激に低下し、反応の第二段階では約 40 mmHg でほぼ変化はなかった。このことから、96 ウェルプレートにおける光増感反応は溶存酸素を消費しながら急激に反応が進んだ後、液面からの拡散によって酸素が供給され反応が継続されることが分かった。液面からの拡散によって光増感反応が進行する反応の第二段階では、光増感反応による酸素消費と拡散による酸素供給が平衡し、そのときのウェル底面付近の酸素分圧は 20–40 mmHg であった。頻脈性不整脈治療で対象とする心筋組織は、40 mmHg またはそれ以下の酸素分圧を有すると考えられる [8]。また、血中に含まれる酸素の大部分がヘモグロビンと結合した状態で存在し、生体内で酸素消費が生じると、ヘモグロビンが酸素と解離して酸素分圧が一定に保たれるように機能する [9]。さらに、筋組織にはヘモグロビンと同じように酸素と結合するミオグロビンが存在し、筋組織内の緊急時の酸素貯蔵機能を果たす [10]。よって、心筋組織における酸素分圧は光増感反応による速い酸素消費下においても、十分な予備能を持っているので分圧を保つことができると予想される。以上より、本実験で使用した 96 ウェルプレート細胞実験系における反応速度の緩やかな反応の第二段階では、生体内とほぼ同程度の速度で光増感反応が進行していると思われる。

#### 6.6.4 放射照度による光増感反応効率の変化

放射照度による殺細胞効果の違いについて考察する。6.4 部で 96 ウェルプレートにおける光増感反応は酸素が律速段階となることが分かった。この *in vitro* 系では溶存酸素を消費しながらの急激な反応に続き、液面から拡散によって酸素が供給されることで、緩徐で連続的な光増感反応が起こる。液面で大気と平衡を保つように溶解された酸素分子は、拡散によってウェル底面へ向かって輸送されるため、その分布は指数関数的に底面へ向かって減少する。一方で、連続して照射される励起光によってウェル全体で光増感反応は継続して起こる。上述のような状態であるから、放射照度が高くなるとウェル内単位体積当たりに消費される酸素量が増え、ウェル底面の酸素分圧は減少する。ラット心筋細胞は培養から 6–7 日経過すると、全てウェル底面に接着している。そのため高放射照度では細胞周囲の酸素分圧が低下する。放射照度 0.47 および 0.66 W/cm<sup>2</sup> ではウェル底面での酸素分圧が十分でなかったために、殺細胞効果が低かったと考えられる (図 6-17)。よって、本研究では酸素枯渇を防ぐため、放射照度 0.29 W/cm<sup>2</sup> を採用した。

第 5 章では 35 mmΦ のペトリディッシュを用い、細胞外光増感反応による心筋細胞への即時的な応答を調査した。96 ウェルプレートのウェル内径は 6.7 mm であるのに対し、顕微鏡下の実験系に適用するため 35 mmΦ のペトリディッシュを用いた。溶液厚みはウェルプレートおよびペトリディッシュのいずれも 2.8 mm と揃えた。溶液体積はペトリディッシュでは 2.7×10<sup>3</sup> mm<sup>3</sup> であるのに対し、ウェルプレートでは 1.0×10<sup>2</sup> mm<sup>3</sup> であった。また、溶液中の光照射体積はペトリディッシュでは 5.1×10<sup>3</sup> mm<sup>3</sup> に対してウェルプレートでは 1.0×10<sup>2</sup>



mm<sup>3</sup>であった。すなわち、タラポルフィンナトリウム溶液体積に占める光増感反応領域体積はペトリディッシュでは 1.2%であるのに対してウェルプレートでは 100%であった。光増感反応領域において約 70%の大気圧下溶存酸素が 0.5 J/cm<sup>2</sup>の光照射で消費されることから、ペトリディッシュを用いた実験系では 98.8%の非照射体積からの拡散による酸素供給によって酸素枯渇が生じていなかったと考えられる。

### 6.6.5 殺細胞効果閾値

図 6-15 に示したように放射照度 0.29 W/cm<sup>2</sup>、放射照射量 0-40 J/cm<sup>2</sup>の条件において、細胞外光増感反応による心筋細胞壊死はタラポルフィンナトリウム濃度 15 µg/ml 付近を境に生じることが分かった。同じタラポルフィンナトリウムを用いた細胞内光増感反応の場合と比較すると、白血病細胞株 P388 を用いた細胞内光増感反応による 24 h 後の細胞毒性は、放射照射量 20 J/cm<sup>2</sup>の場合に、タラポルフィンナトリウム濃度閾値が 10 µg/ml と 20 µg/ml の間に存在すると報告されている [11]。細胞外光増感反応による細胞壊死と、細胞内光増感反応によるアポトーシスは、原理は全く異なるが有効なタラポルフィンナトリウム濃度はほぼ同じ程度であることが分かった。実験に用いた酸素枯渇が生じない放射照度 0.29 W/cm<sup>2</sup>は、細胞外光増感反応による感染症治療の *in vitro* 検討の代表的な例における放射照度 40-150 mW/cm<sup>2</sup>と比較して 2-7 倍高いが同オーダーであると言える [12]。

一重項酸素による細胞壊死発生には、一定の一重項酸素産生量を要し、その閾値を超える一重項酸素の産生が起きると細胞壊死が発生する [13]。測定した死細胞率をもとに、一重項酸素の細胞壊死発生閾値を考察する。酸素とタラポルフィンナトリウムが十分に存在する場合、一重項酸素の産生量は吸収された光エネルギーと比例するため [14]、単位体積当たりに吸収された光と細胞毒性を生む一重項酸素産生量の閾値  $A$  (mol/L) を算出するため、以下の式を用いた[15]。

$$A = \Phi \varepsilon C_{th} D \frac{\lambda}{hc} \frac{1000}{N_A} \quad (6.5)$$

ここで、 $\Phi$  は一重項酸素産生の量子効率、 $\varepsilon$  はタラポルフィンナトリウムのモル吸収係数 (mm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>)、 $C_{th}$  はタラポルフィンナトリウム濃度 (M) で表される。本実験で得られた死細胞率の最大値が 100%であったため、その半分の 50%の壊死を発生させる閾値について 1.2-40 J/cm<sup>2</sup>の各放射照射量  $D$  において、3.2.2 節で述べたタラポルフィンナトリウムのモル吸光係数および量子収率を代入して検討した。死細胞率 50%を上回った放射照射量 5-40 J/cm<sup>2</sup>に対して、死細胞率 50%となるタラポルフィンナトリウム濃度をグラフから読み取り、式 (6.5) を用いて細胞毒性を生む一重項酸素産生量の閾値を算出し表 6-1 に示した。死細胞率 50%となる一重項酸素産生量の閾値は 4.3-17×10<sup>-2</sup> M であった。他の光感受性薬剤であるポルフィマーナトリウムを用いた例では、腫瘍細胞に対して取り込まれた光感受性薬剤によるアポトーシス発生の一重項酸素産生量の閾値は、1.2×10<sup>-3</sup> および 1.7×10<sup>-3</sup> M と報告されてい

る [16, 17]。本実験で求めた結果は、報告例よりも 25-100 倍大きな値であった。従来法の光感受性薬剤が細胞内集積している場合は、光感受性薬剤が細胞内小器官付近に存在するため、一重項酸素の障害効率が高いと言える。一方提案する方法では、光感受性薬剤が細胞外の間質中や血中に存在するため、上記のような細胞毒性を生む一重項酸素産生量の閾値が高いと考えられる。

## 6.7 結言

本章では 96 ウェルプレートを用いた *in vitro* 細胞実験系における、細胞外光増感反応の進行について調査し、ラット心筋細胞に対する光増感反応の殺細胞効果について、放射照度、放射照射量、タラポルフィンナトリウム濃度を幅広く変化させた調査を行った。用いた 96 ウェルプレート *in vitro* 系および光増感反応条件において、酸素が反応の律速段階であり、溶存酸素を消費し急速に反応が進行する段階と液面からの酸素拡散によって緩やかに反応が進行する 2 つの反応速度の異なる段階があることが分かった。2 つ目の段階では酸素分圧が 20-40 mmHg に保たれることから、この状態が対象とする心筋組織内とほぼ同じであると解釈できる。酸素不足による殺細胞効果の低下が生じない放射照度  $0.29 \text{ W/cm}^2$  でさらに調査した結果、タラポルフィンナトリウム濃度  $15 \mu\text{g/ml}$  付近に細胞壊死発生の閾値があり、閾値以上ではタラポルフィンナトリウム濃度と放射照射量に比例して死細胞率が上昇した。

## 参考文献

- [1] Q. Peng, A. Juzeniene, J. Chen, L. O. Svaasand, T. Warloe, K.-E. Gierckky, and J. Moan, "Lasers in medicine," *Rep Prog Phys*, vol. 71, pp. 056701 1–28, 2008.
- [2] T. N. Glenn, S. Rastegar, and S. L. Jacques, "Finite element analysis of temperature controlled coagulation in laser irradiated tissue," *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 43, pp. 79–87, 1996.
- [3] J. D. Spikes, and J. C. Bommer, "Photobleaching of mono-l-aspartyl chlorin e6 (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors," *Photochem Photobiol*, vol. 58, pp. 346–350, 1993.
- [4] J. S. Dysart, G. Singh, and M. S. Patterson, "Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mTHPC photodynamic therapy of MLL cells," *Photochem Photobiol*, vol. 81, pp. 196–205, 2005.
- [5] バイオリサーチセンター株式会社ホームページ;  
[http://www.brck.co.jp/product/sp091\\_brc\\_oxygenmonitor.html/](http://www.brck.co.jp/product/sp091_brc_oxygenmonitor.html/) (2015/3/1).
- [6] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *J Immunol methods*, vol. 65, pp. 55–63, 1983.
- [7] 株式会社同仁化学研究所, Cell Counting Kit-8 Technical Manual, 2011.
- [8] 本間研一, *小生理学*, 東京: 南山堂, 1999, pp. 100–104.
- [9] 貴邑富久子, 根来英雄, *シンプル生理学*, 東京: 南江堂, 1999, pp. 259.
- [10] 中谷昭, "マウス骨格筋・心筋ミオグロビン含量及び酵素活性について," *Bull Nara Univ Educ*, vol. 40, pp. 29–34, 1991.
- [11] I. Sheyhedin, K. Aizawa, M. Araake, H. Kumasaka, T. Okunaka, and H. Kato, "The effects of serum on cellular uptake and phototoxicity of mono-l-aspartyl chlorin e6 (npe6) *in vitro*," *Photochem. Photobiol.*, vol. 68, pp. 110–114, 1998.
- [12] M. Wainwright, "Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)," *J Antimicrob Chemother*, vol. 42, pp. 13–28, 1998.
- [13] B. C. Wilson, "Technologies and biophysical techniques for PDT," in *Photodynamic therapy*, T. Patrice, Ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003, ch. 7.
- [14] M. S. Patterson, B. C. Wilson, and R. Graff, "*In vivo* tests of the concept of photodynamic threshold dose in normal rat liver photosensitized by aluminum chlorosulphonated phthalocyanine," *Photochem Photobiol*, vol. 51, pp. 343–349, 1990.
- [15] L. Lilge, M. Portoy, and B. C. Wilson, "Apoptosis induced *in vivo* by photodynamic therapy in normal brain and intracranial tumour tissue," *Br J Cancer*, vol. 83, pp. 1110–1117, 2000.
- [16] T. J. Farrell, B. C. Wilson, M. S. Patterson, and M. C. Olivo, "Comparison of the *in vivo* photodynamic threshold dose for photofrin, mono- and tetrasulfonated aluminum

- phthalocyanine using a rat liver model,” *Photochem Photobiol*, vol. 68, pp. 394–399, 1998.
- [17] I. Georgakoudil, M. G. Nichols, and T. H. Foster, “The mechanism of photofrin® photobleaching and its consequences for photodynamic dosimetry,” *Photochem Photobiol*, vol. 65, pp. 135–144, 1997.

図表

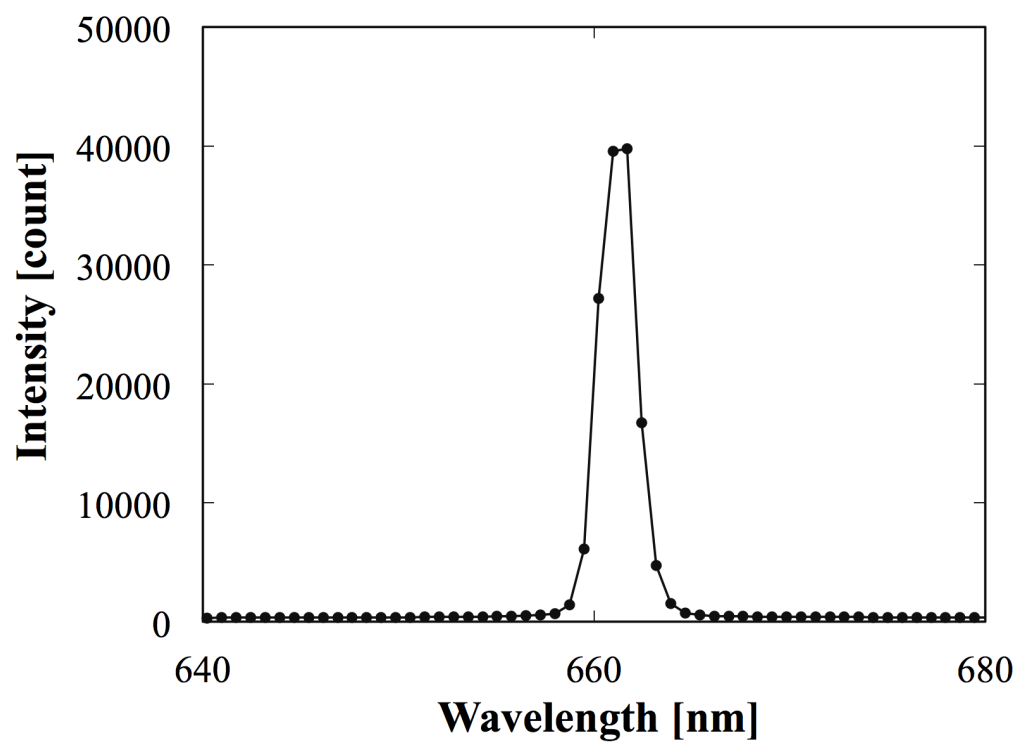


図 6-1 赤色半導体レーザの発振スペクトル (中心波長: 663 nm)

(Optical Fuel, ソニー株式会社, 日本).

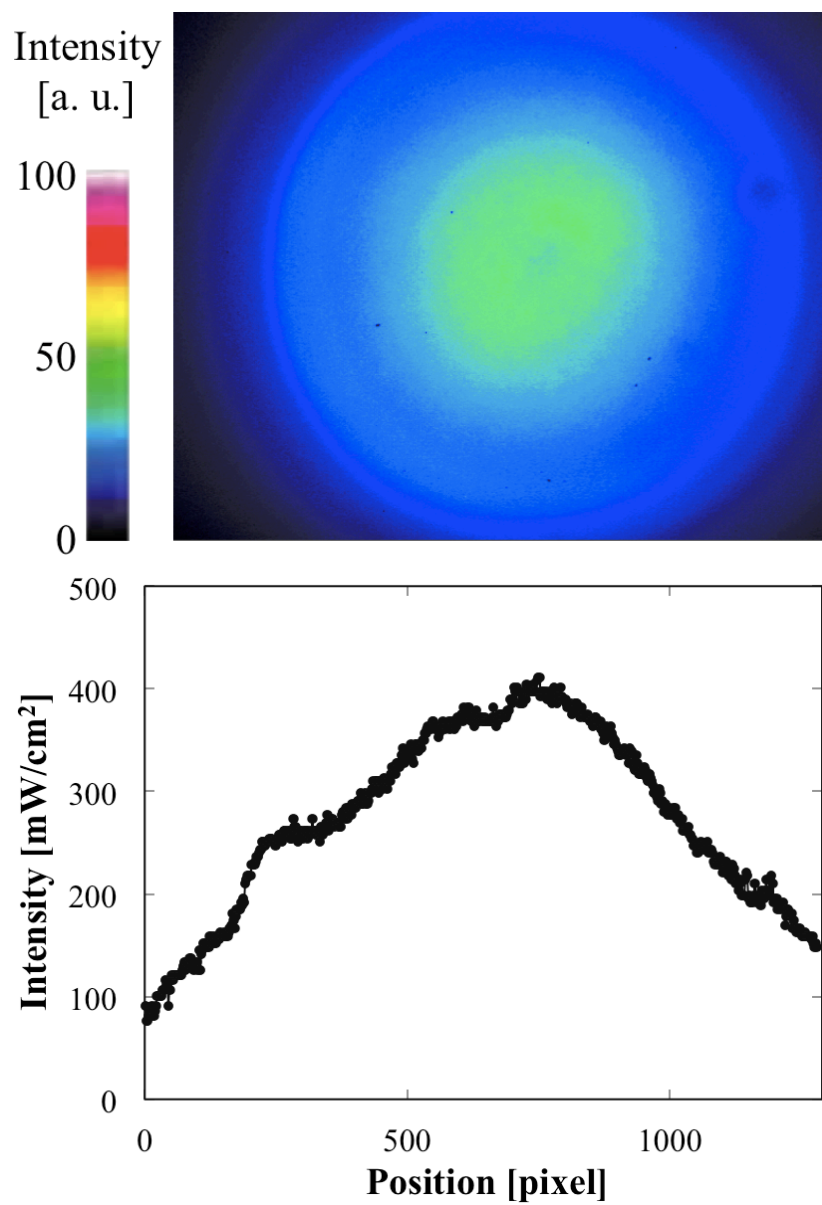


図 6-2 レーザのファイバー端における出射光強度分布  
(1 pixel = 6.7  $\mu\text{m}$ , 1280 $\times$ 1024 pixels)

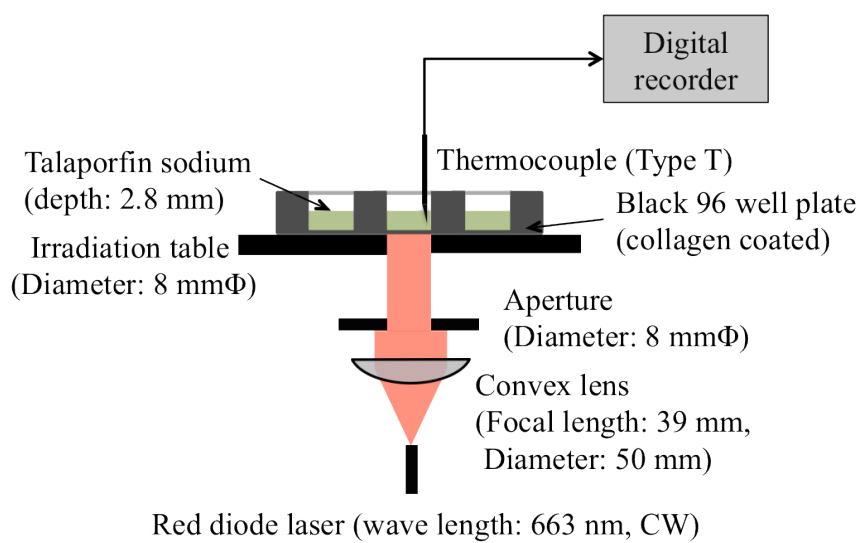


図 6-3 ウェル照射光学系の配置

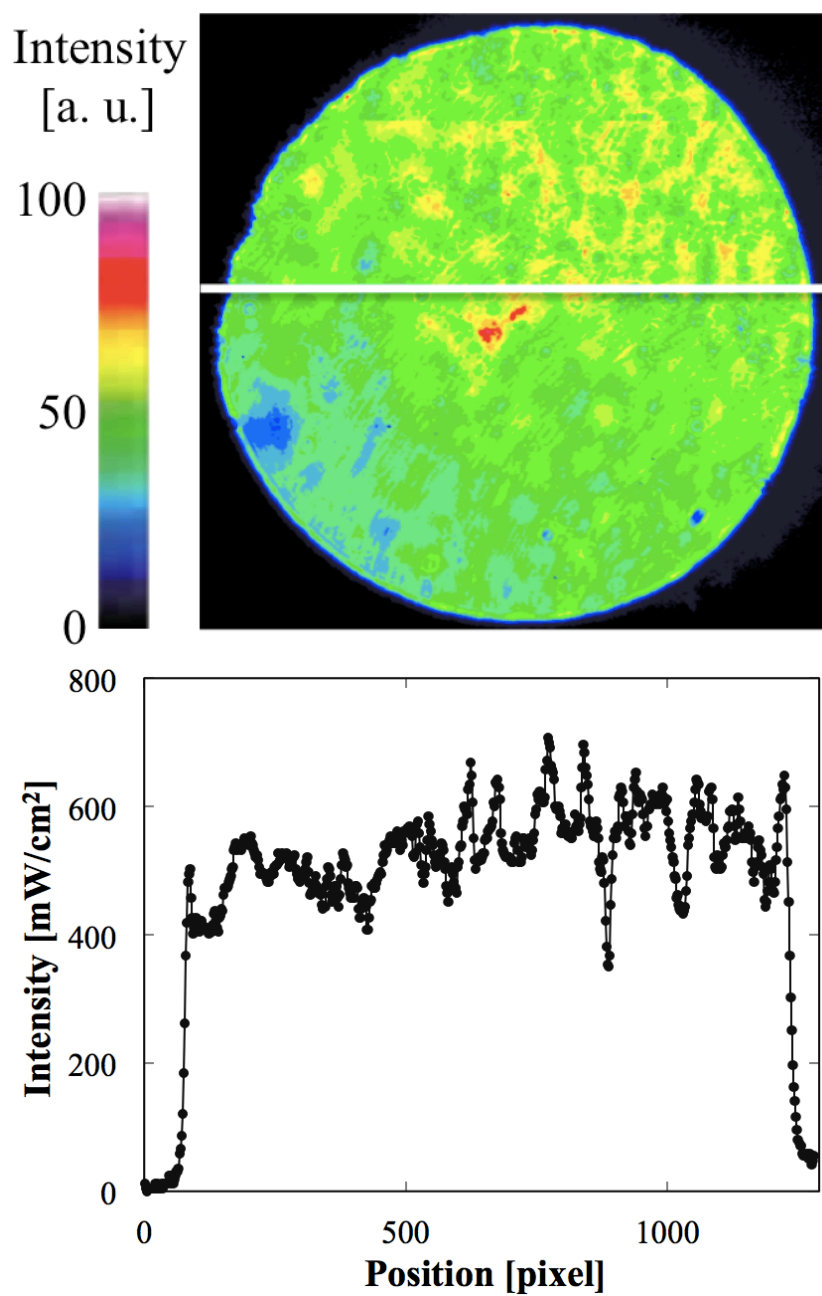


図 6-4 構築した光照射台における光強度分布 (1 pixel = 6.7  $\mu\text{m}$ , 1280 $\times$ 1024 pixels)



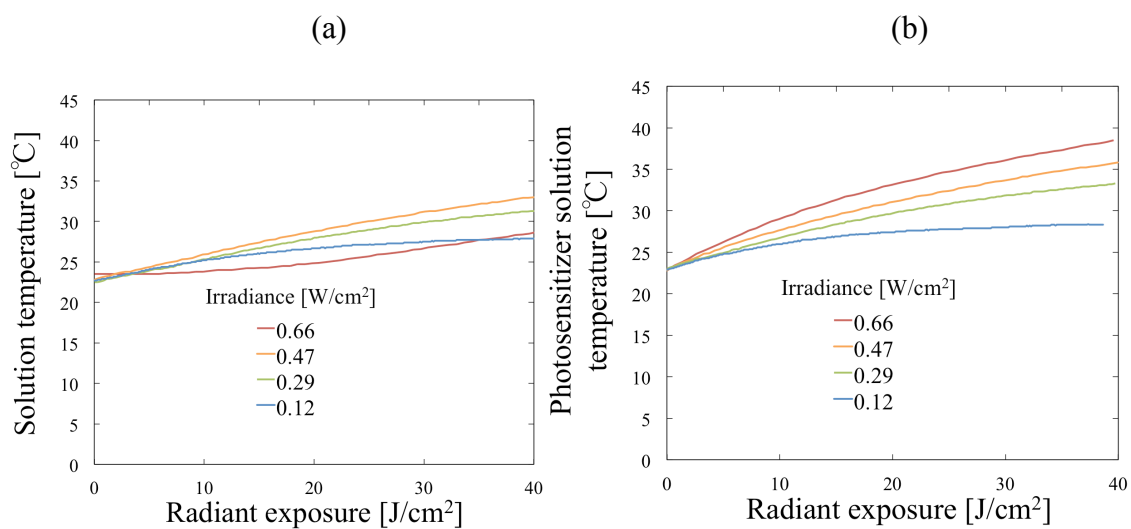


図 6-5 異なる放射照度における光増感反応中のタラポルフィンナトリウム溶液温度変化

(a) タラポルフィンナトリウム濃度: 0 µg/ml

(b) タラポルフィンナトリウム濃度: 40 µg/ml

照射時間は、0.12 W/cm<sup>2</sup> のとき 333 s、0.29 W/cm<sup>2</sup> のとき 137 s、

0.47 W/cm<sup>2</sup> のとき 85 s、0.66 W/cm<sup>2</sup> のとき 60 s であった。

参照群における放射照度 0.47 W/cm<sup>2</sup> の結果は測定精度に問題がある可能性がある。

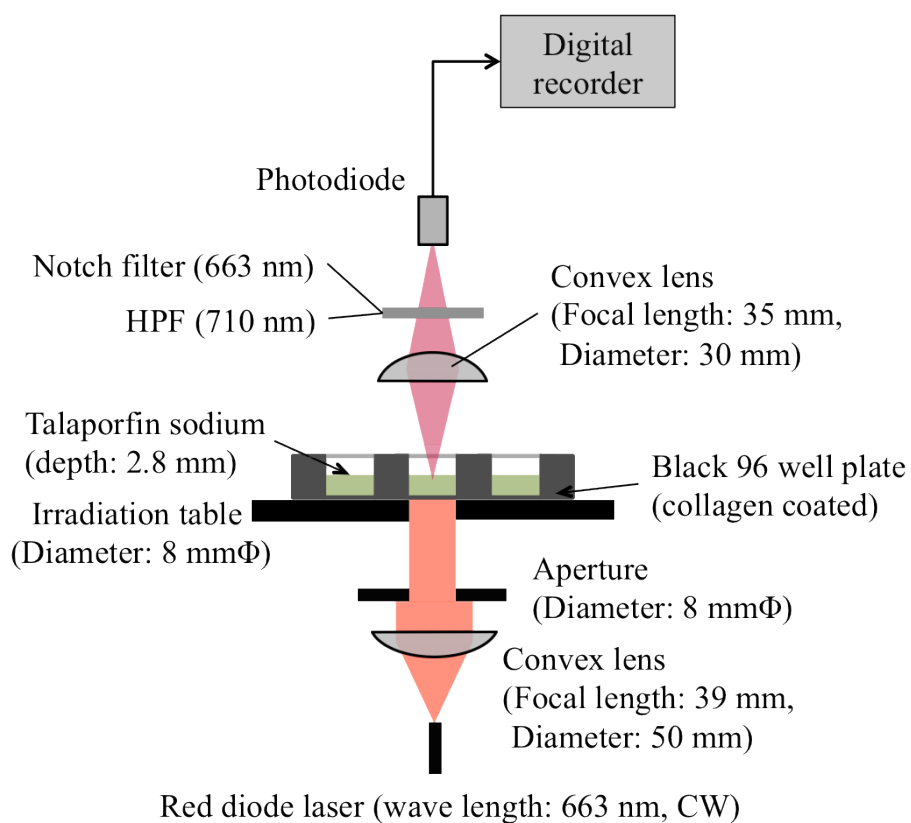


図 6-6 細胞外光増感反応中におけるタラポルフィンナトリウム蛍光の経時計測系

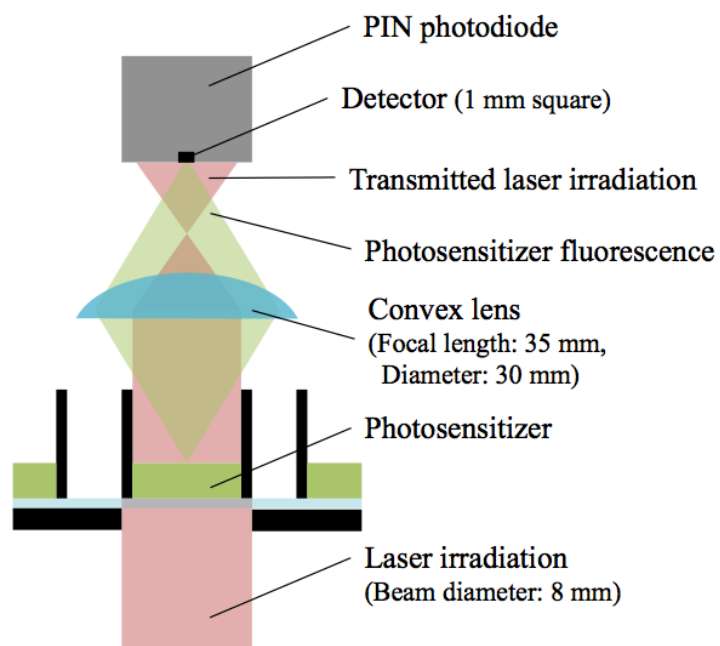


図 6-7 タラポルフィンナトリウム蛍光計測集光系の配置

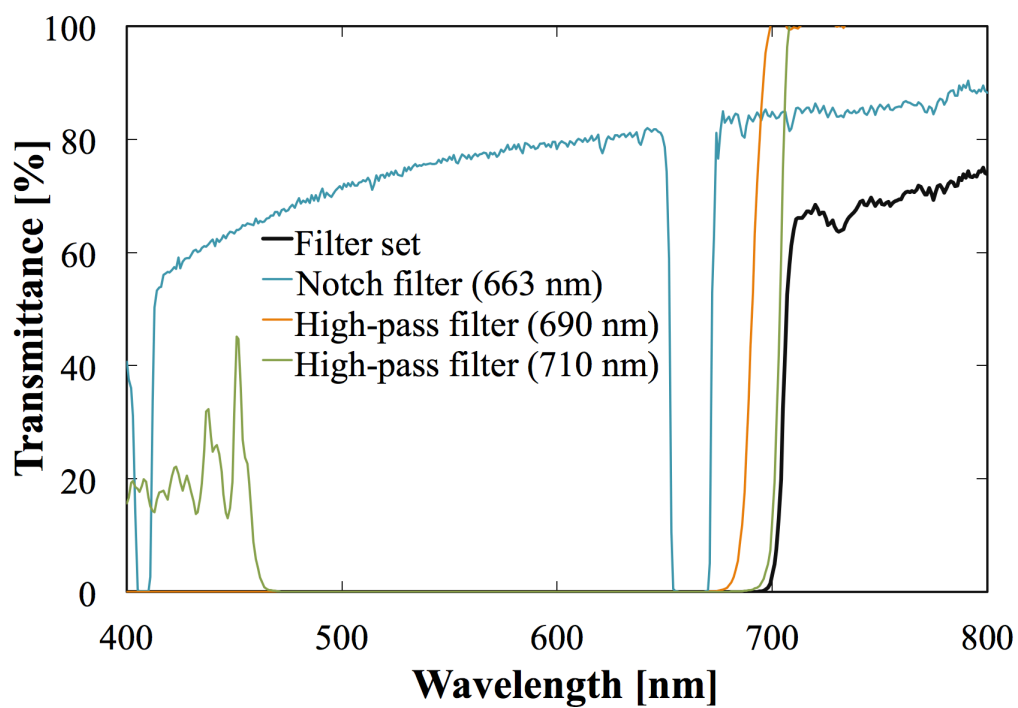


図 6-8 タラポルフィンナトリウム蛍光の計測に用いた各フィルターと  
4枚のフィルターを合わせたフィルターセットの波長特性

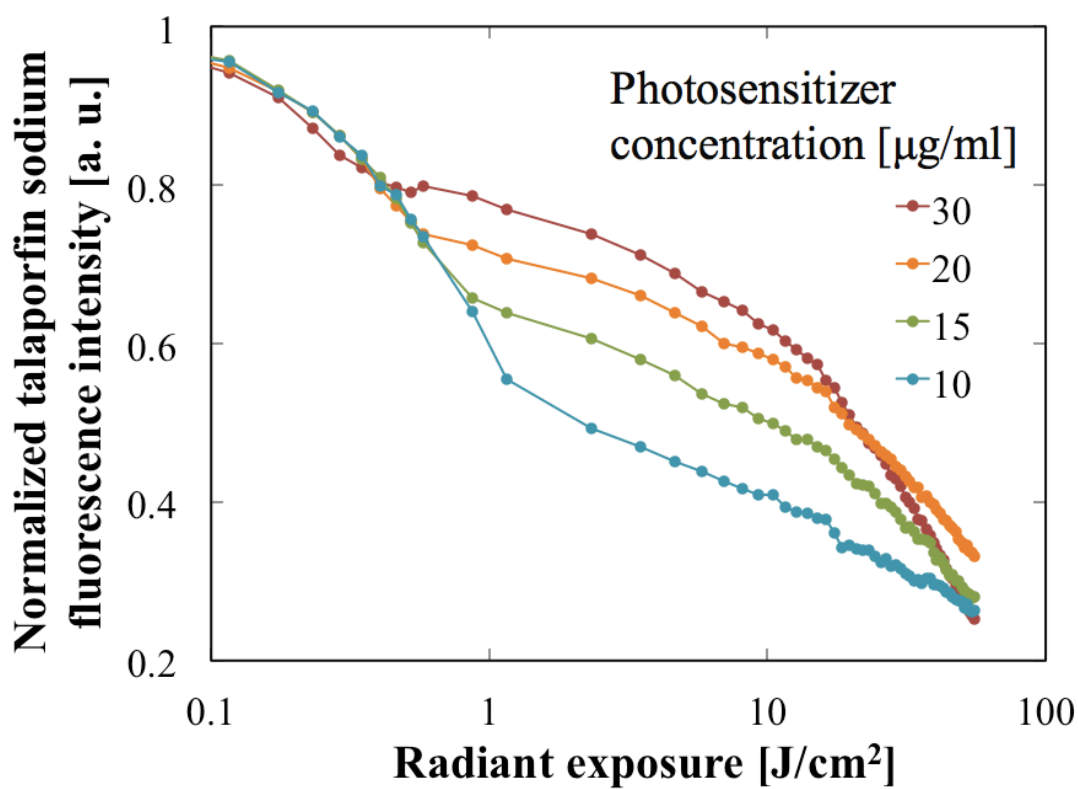


図 6-9 光増感反応中のタラポルフィンナトリウム蛍光強度減衰  
(放射照射量照度: 0.29 W/cm<sup>2</sup>).

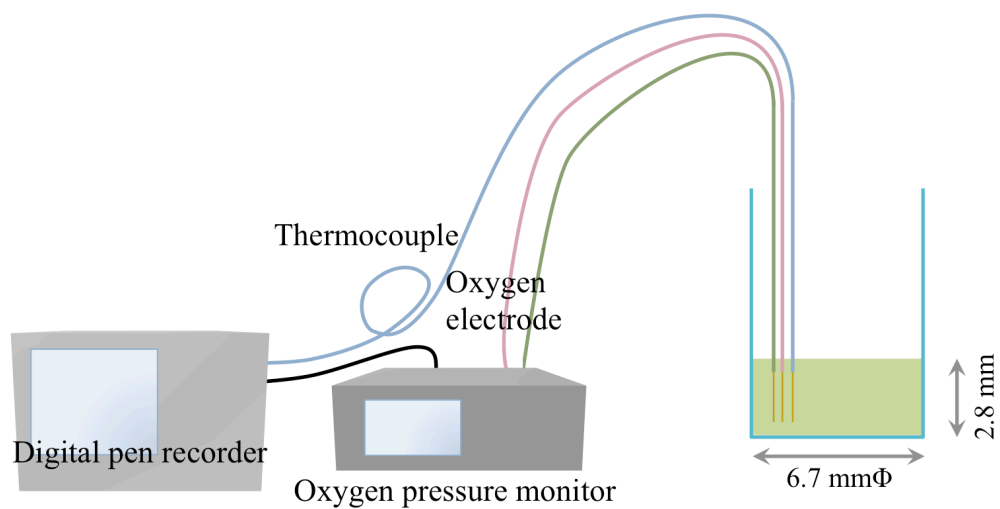


図 6-10 細胞外光増感反応中の酸素分圧および溶液温度測定系  
(酸素電極および熱電対は底面直上に設置)

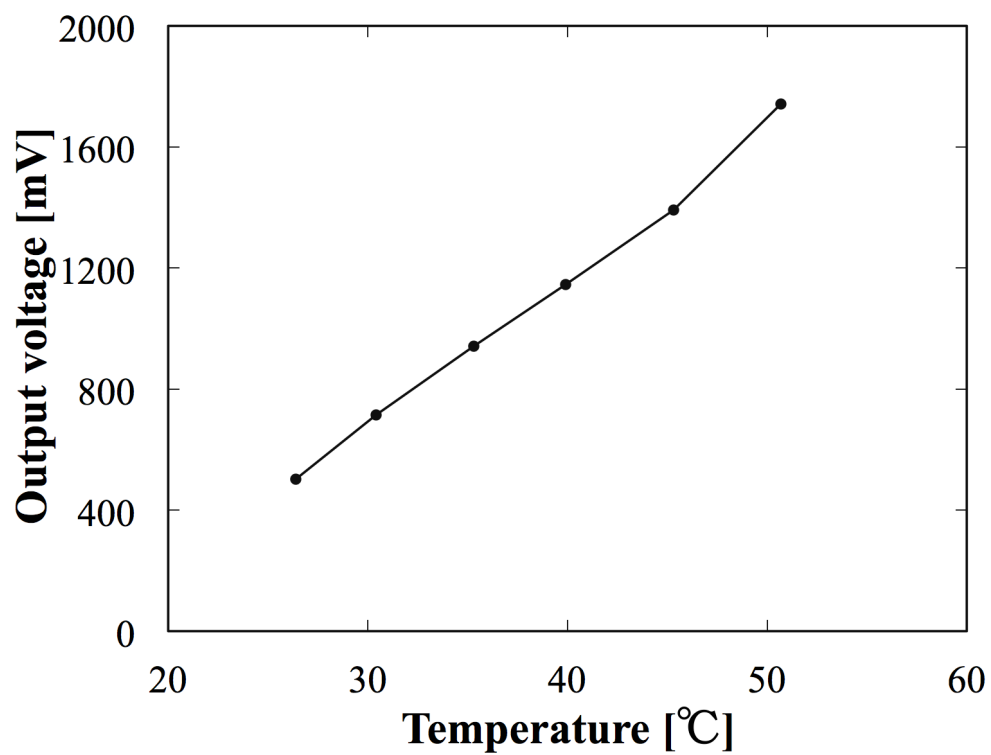


図 6-11 酸素電極出力電圧値の温度依存性 (酸素分圧: 155 mmHg)

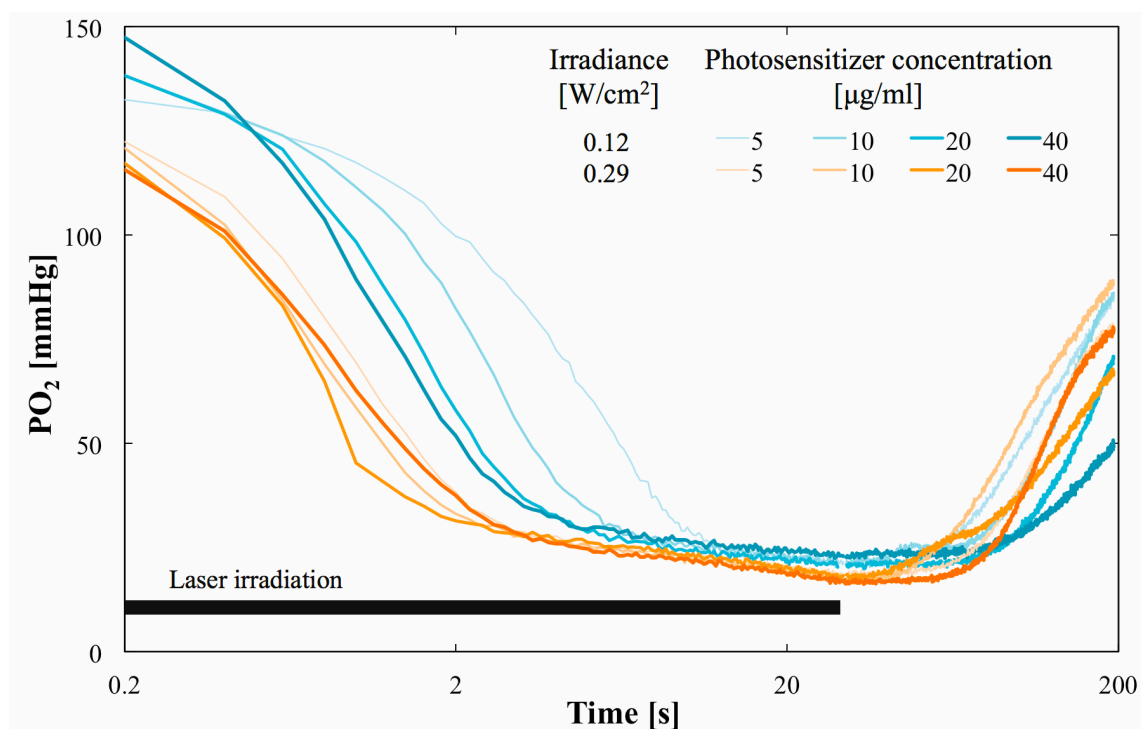
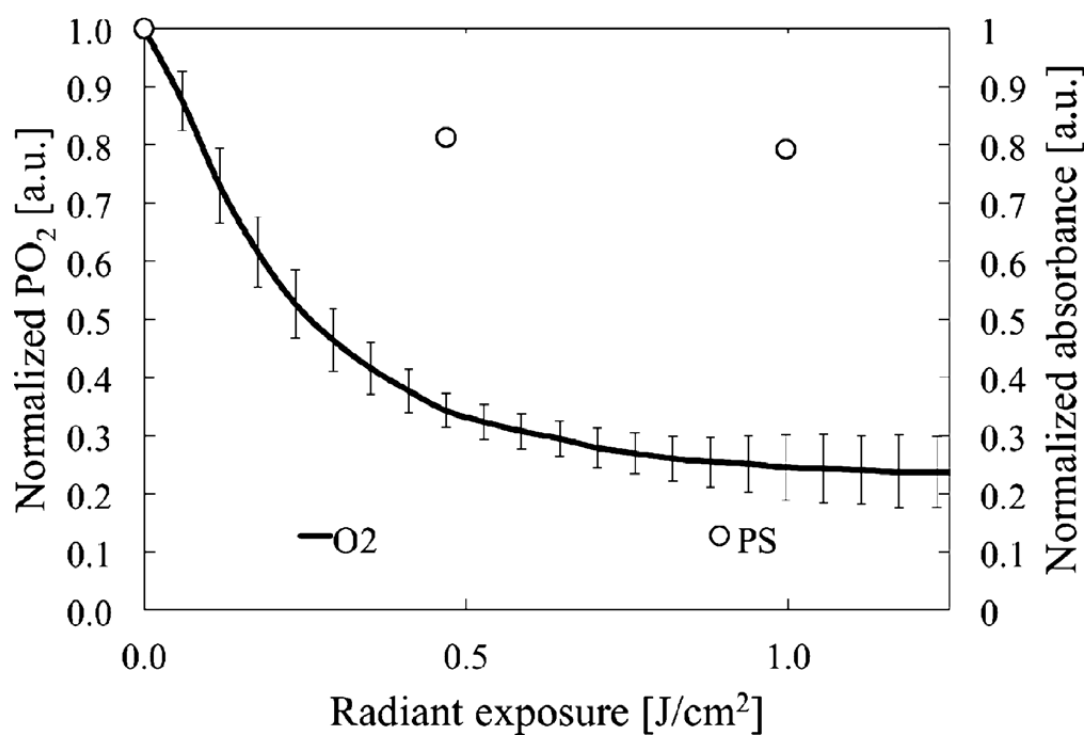


図 6-12 タラポルフィンナトリウム溶液濃度変化させたときの、光照射中および光照射停止後 30 s までの酸素分圧経時変化





(Irradiance:  $0.29 \text{ W}/\text{cm}^2$ ).

図 6-13 酸素分圧とタラポルフィンナトリウム溶液吸光度ピークの変化

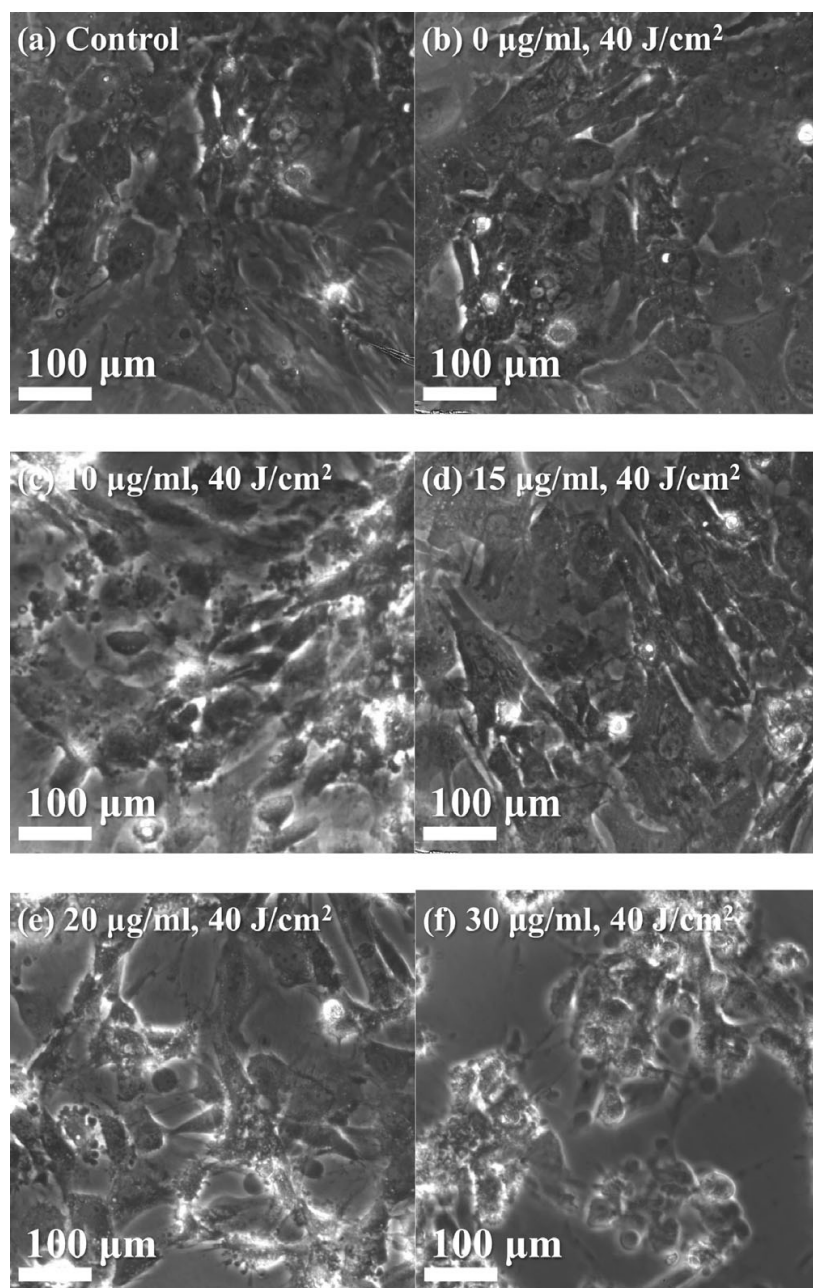


図 6-14 光増感反応前後における心筋細胞の形態変化

- (a) タラポルフィンナトリウムなし、光照射なし
- (b) タラポルフィンナトリウムなし、放射照射量 40 J/cm<sup>2</sup>
- (c) 光増感反応後、タラポルフィンナトリウム 10 μg/ml、放射照射量 40 J/cm<sup>2</sup>
- (d) 光増感反応後、タラポルフィンナトリウム 15 μg/ml、放射照射量 40 J/cm<sup>2</sup>
- (e) 光増感反応後、タラポルフィンナトリウム 20 μg/ml、放射照射量 40 J/cm<sup>2</sup>
- (f) 光増感反応後、タラポルフィンナトリウム 40 μg/ml、放射照射量 40 J/cm<sup>2</sup>

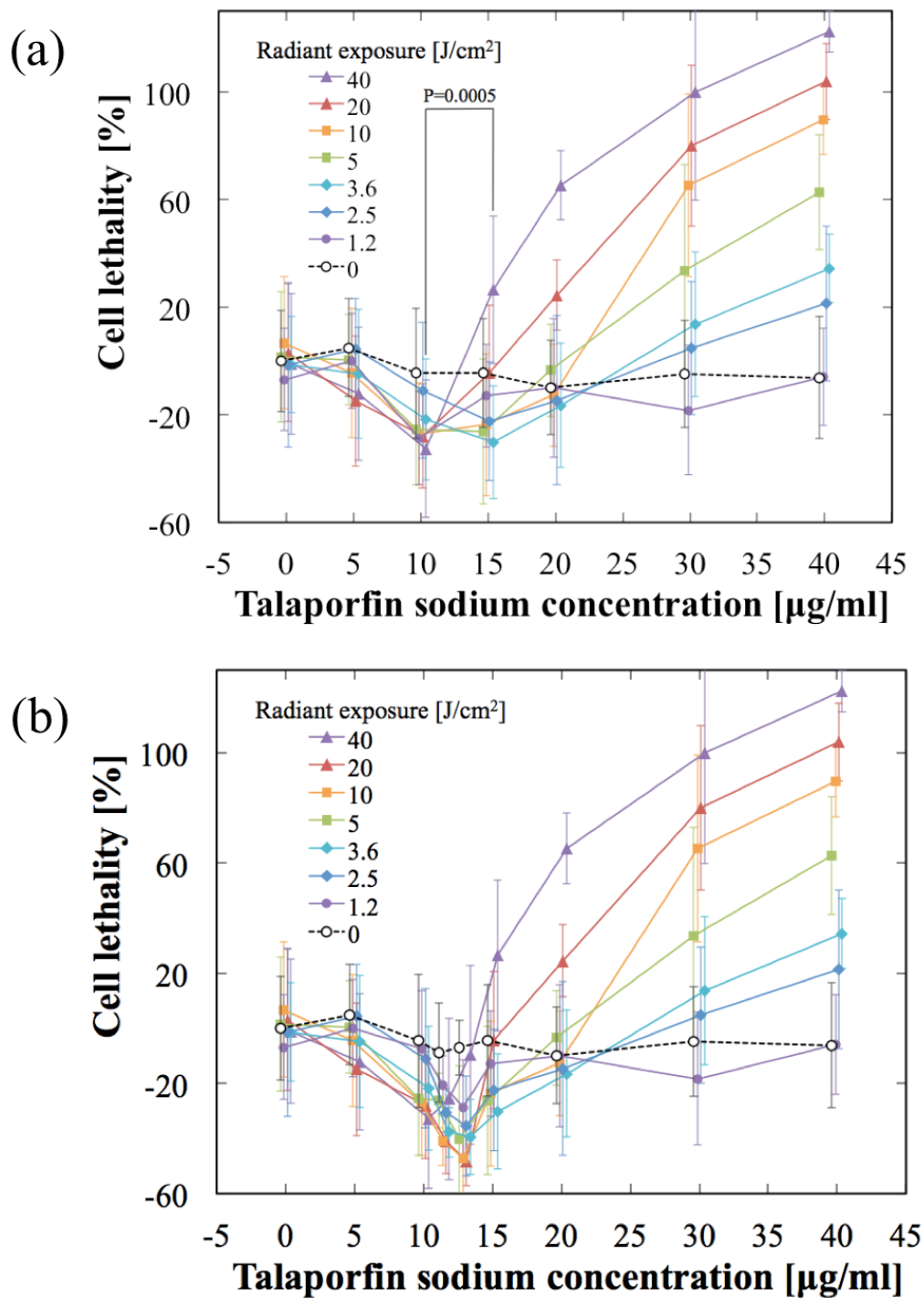


図 6-15 放射照度  $0.29 \text{ W/cm}^2$  のときの死細胞率のタラポルフィンナトリウム濃度依存性 (放射照度:  $0.29 \text{ W/cm}^2$ ,  $N=6$ ,  $t$  検定による  $p$  値を表示, プロットが重畳する部分は横方向にプロットをずらして表示)

図 6-15(a)において  $10 \mu\text{g/ml}$  と  $15 \mu\text{g/ml}$  の間には有意な差 ( $P=0.0005$ ) が見られた。細胞毒性効果が生じ始めると考えられる  $10 \mu\text{g/ml}$  と  $15 \mu\text{g/ml}$  の間の濃度条件 ( $11.5, 13 \mu\text{g/ml}$ ) を追加した結果を図 6-15(b)に示す。

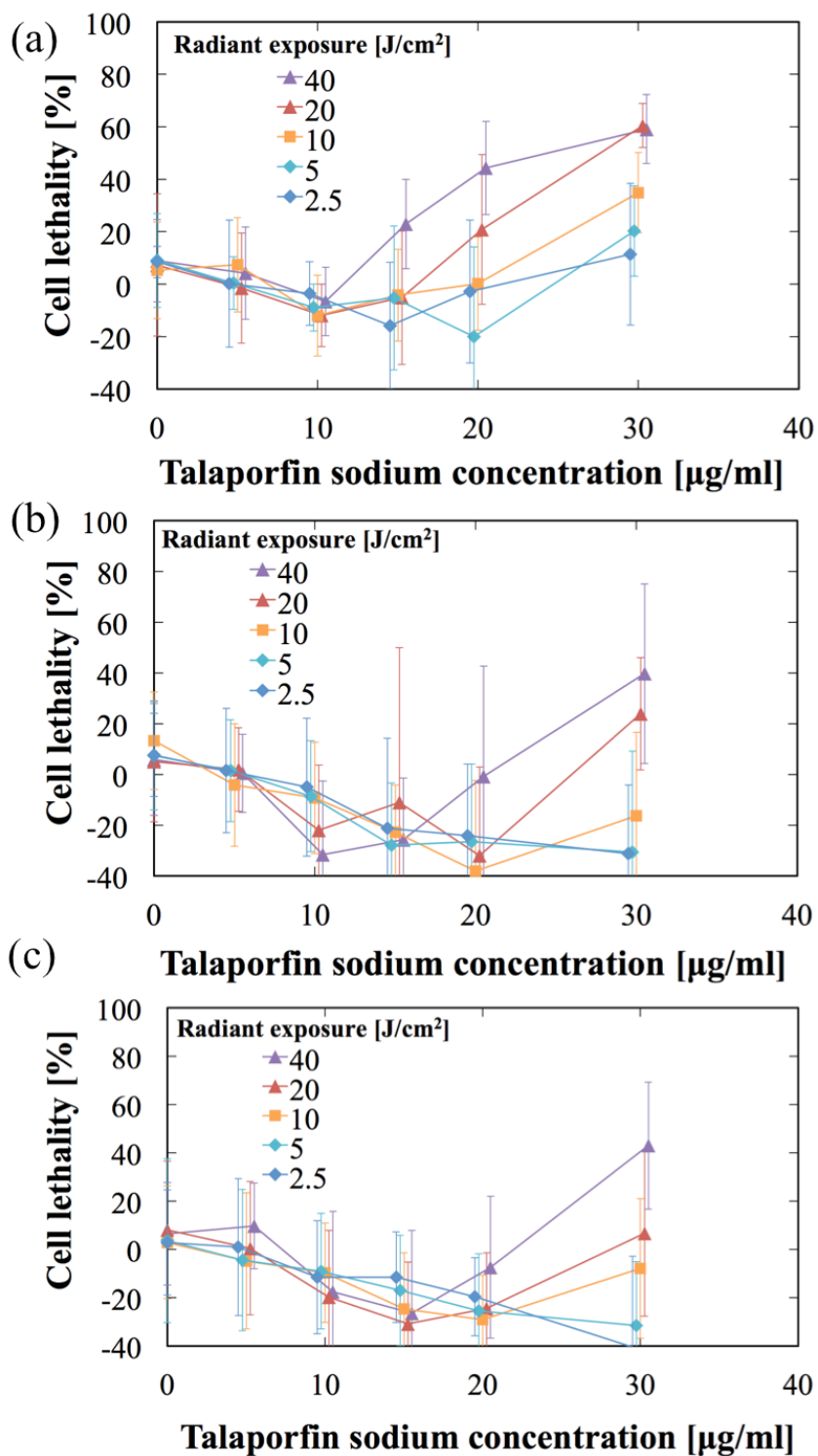


図 6-16 異なる放射照度における死細胞率のタラポルフィンナトリウム濃度依存性 (N=6, プロットが重疊する部分は横方向にプロットをずらして表示)

- (a) 放射照度 0.12 W/cm<sup>2</sup>
- (b) 放射照度 0.47 W/cm<sup>2</sup>
- (c) 放射照度 0.66 W/cm<sup>2</sup>

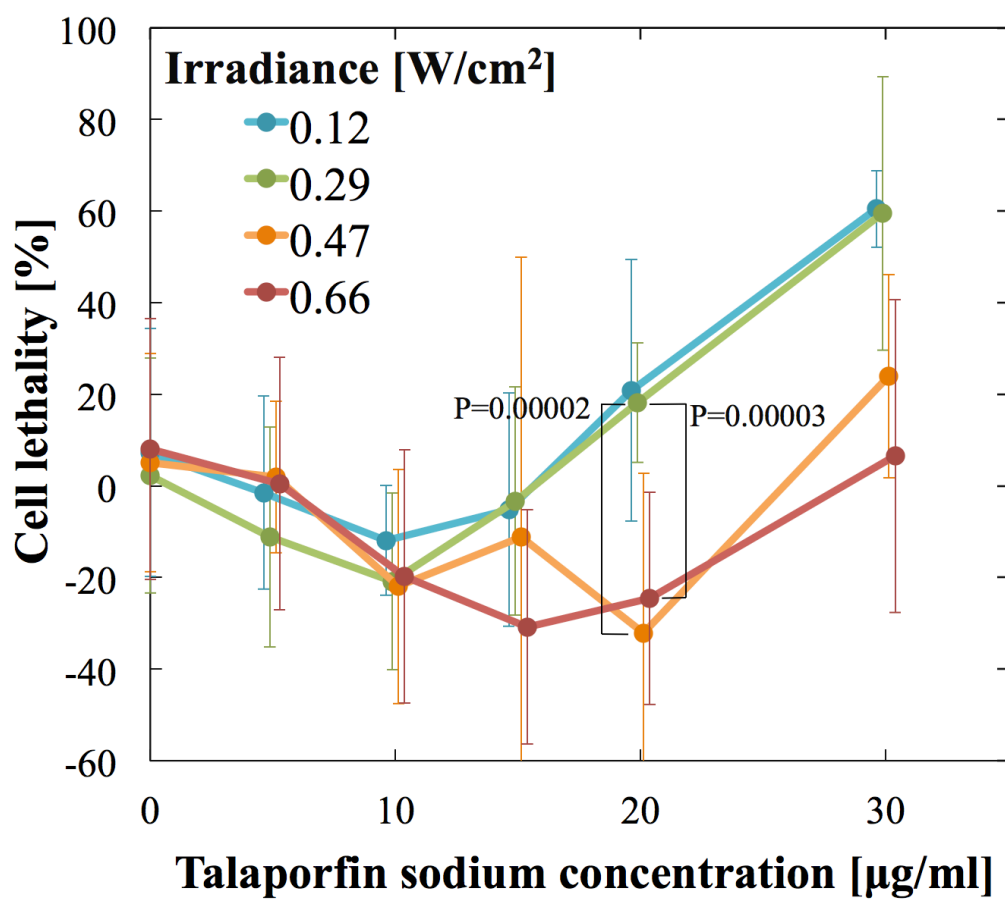


図 6-17 異なる放射照度における死細胞率のタラポルフィンナトリウム濃度依存性 (放射照射量: 20 J/cm<sup>2</sup>, t 検定による p 値を表示, プロットが重畳する部分は横方向にプロットをずらして表示)

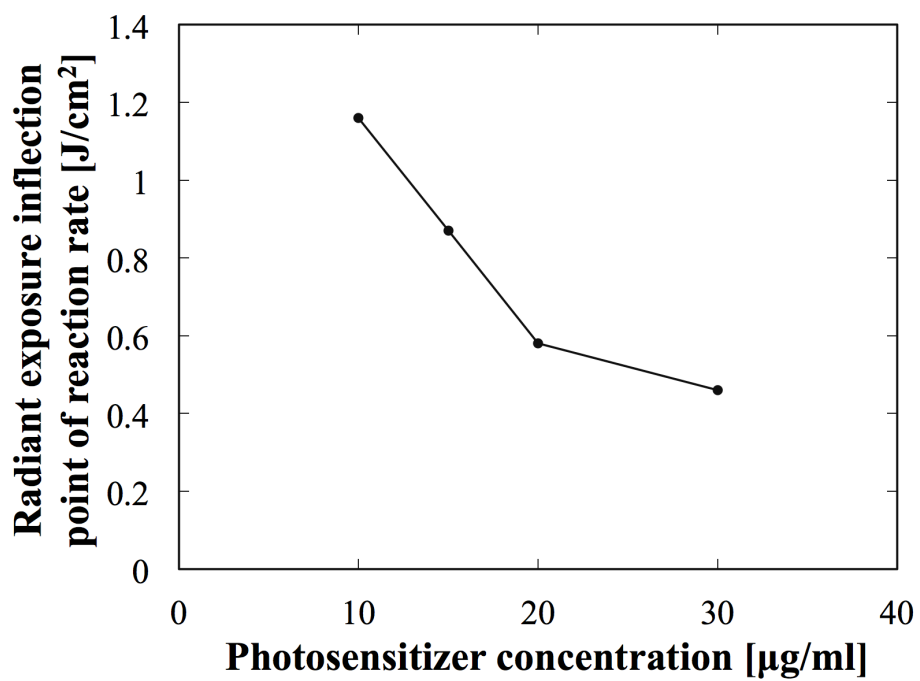


図 6-18 タラポルフィンナトリウム濃度と反応速度の変曲点となる放射照射量の関係 (放射照射量照度: 0.29 W/cm<sup>2</sup>)

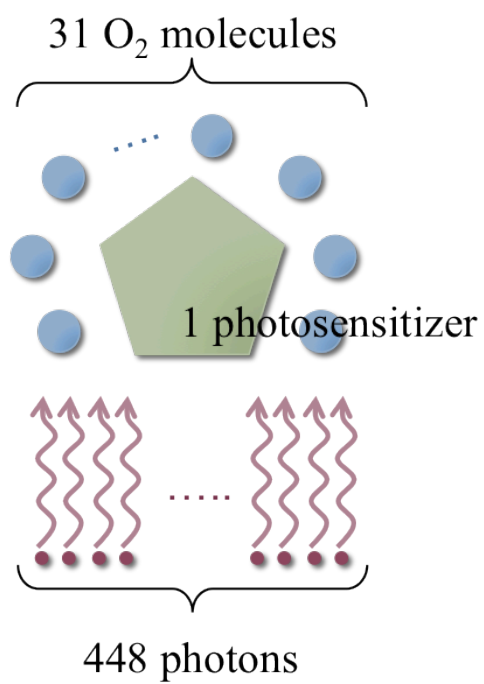


図 6-19 光増感反応による酸素、光、タラポルフィンナトリウムの消費バランス概要

表 6-1 異なる放射照射量における死細胞率 50%となるタラポルフィンナトリウム濃度および一重項酸素産生閾値 (放射照射量照度:  $0.29 \text{ W/cm}^2$ ).

<b>Radiant exposure [J/cm<sup>2</sup>]</b>	<b>Photosensitizer concentration threshold of 50% in cell lethality [μg/ml]</b>	<b>Singlet oxygen threshold [M]</b>
40	20	$1.7 \times 10^{-1}$
20	28	$1.2 \times 10^{-1}$
10	32	$6.8 \times 10^{-2}$
5	40	$4.3 \times 10^{-2}$



## 第7章 アルブミン濃度および温度が殺細胞効果へ与える影響

### 7.1 緒言

タラポルフィンナトリウムは、血中で主にアルブミンと結合する。*in vitro*における光線力学的治療の基礎実験において、アルブミン濃度が高くなるほど癌細胞への薬剤取り込み量が減少し、殺細胞効果が低下することが報告されている [1]。また、タラポルフィンナトリウムがアルブミンと結合した状態で光増感反応を起こすと、産生された一重項酸素がアルブミンの酸化に消費される。これらのことから、タラポルフィンナトリウムを用いた細胞外光増感反応治療では、アルブミンとの結合率によって治療効果が変化することが予想される。そこで本章ではアルブミン濃度によって光増感反応による心筋細胞の殺細胞効果がどのような影響を受けるのかを明らかにする。アルブミンとタラポルフィンナトリウムの結合率は周囲温度による影響を受けると考えられる。対象とする心筋において、励起レーザ光による発熱で組織温度が上昇する。また外科的手術を想定すると心筋の外気露出によって心筋表面温度が低下する。すなわち、温度変化に伴うアルブミンとタラポルフィンナトリウムの結合率変化と、それに伴う殺細胞効果を明らかにする必要がある。タラポルフィンナトリウムの Q 帯吸収ピークはアルブミン結合によって長波長シフトすることが報告されている [1]。本章では、アルブミン濃度変化および温度変化によるアルブミンとタラポルフィンナトリウムの結合率を吸光スペクトル計測によって調査し、結合率変化による殺細胞効果への影響を明らかにした。

### 7.2 タラポルフィンナトリウムのアルブミン結合率

本部ではアルブミン濃度変化によるタラポルフィンナトリウムのアルブミン結合率を、吸光スペクトル計測によって明らかにする。

#### 7.2.1 実験方法

ウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin; BSA) (010-23382, 和光純薬工業, 大阪, 日本) を生理食塩水に溶解し、濃度を 0-20 mg/ml に変化させたものを薬剤溶解の溶媒として用いた。タラポルフィンナトリウム (分子量: 799.69; Meiji Seika Pharma Co. Ltd., Tokyo, Japan) を暗室環境下で上記の溶液に溶解し、薬剤濃度を 24  $\mu\text{g/ml}$  とした。タラポルフィンナトリウム単体は波長 650 nm 付近に Q 帯吸収ピークを持ち、血清蛋白結合を生じるとピークが長波長側に移動する [1, 2] ことから、吸収スペクトルピークシフトからタラポルフィンナトリウムとの結合を調査することができる。吸光スペクトル計測には、回折格子紫外可視近赤外分光光度計 (UV-3600, 島津製作所, 日本) を用いた [3]。計測した透過光から式 (7-1) に示す Lambert-Beer 則に基づき吸光度を算出した [3]。 $A$  は吸光度、 $I_0$  は入射光強度、

$I$ は測定光強度、 $\epsilon$ はモル吸光係数 [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]、 $c$ は溶液濃度 [ $M$ ]、 $l$ は光路長 [ $cm$ ]である。

$$A = \log_{10} I_0 / I = \epsilon c l \quad (7-1)$$

紫外可視領域の波長精度は $\pm 0.2$  nm、波長再現性は $\pm 0.08$  nmである [3]。電子冷熱式恒温セルホルダ (TCC-240A, SHIMADZU) を用い、溶液温度を一定にした状態で計測を行った [4]。使用温度範囲において直線性が高い K 型熱電対を用いて溶液温度を計測した [5]。

光路長 1 cm のセルを用い、分光光度計の参照側に生理食塩水を入れたセルを、タラポルフィンナトリウム濃度 24  $\mu g/ml$  およびアルブミンの濃度 0–20 mg/ml の混合溶液を 1.4 ml 入れたセルを試料側に設置した。分光光度計に電子冷熱式恒温セルホルダを設置し、37.6°C (設定温度 40°C) において混合溶液の透過吸収スペクトルを波長範囲 550–700 nm、サンプリング幅 0.1 nm で測定した (N=8)。この結果に式 (7-2) を用い血清蛋白結合率を算出した。

$$\text{血清蛋白結合率 (\%)} = 100 \times (C-A) / (B-A) \quad (7-2)$$

A: 血清蛋白無添加の吸収ピーク波長 [nm] (血清蛋白結合率 0%と仮定)

B: 吸収ピークシフト飽和時の吸収ピーク波長 [nm] (血清蛋白結合率 100%と仮定)

C: 各アルブミン濃度での吸収ピーク波長 [nm]

## 7.2.2 実験結果

図 7-1 にアルブミン濃度を 0–20 mg/ml と変化させたときのタラポルフィンナトリウム吸収スペクトルの代表例を示す (N=1)。タラポルフィンナトリウムの Q 帯吸収ピーク波長は、アルブミン濃度の増加に伴い、最大  $13.0 \pm 0.65$  nm 長波長側にシフトした (N=3)。ピーク波長シフトはアルブミン濃度が 0–5 mg/ml で生じ、それ以上では変化は見られなかった。吸収ピークの大きさは、アルブミン濃度が 0 mg/ml の場合と比較して、5 mg/ml の場合に Q 帯の吸収ピークは約 1.9 倍大きくなった。図 7-2 に式 (7-2) を用いて算出した結合率を、アルブミン濃度 0.1–5 mg/ml の対数横軸として示す (タラポルフィンナトリウム濃度: 24  $\mu g/ml$ , N=3)。アルブミン濃度が 1 mg/ml 以下では、アルブミン濃度の増加に伴って、結合率が線形的に増加した。アルブミン濃度が 2.1–5 mg/ml の範囲では、結合率変化は飽和傾向を示した。

## 7.3 殺細胞効果のアルブミン結合率依存性

タラポルフィンナトリウムとアルブミンの結合が光増感反応の殺細胞効果に与える影響を定量的に調査するため、アルブミン濃度を変化させた場合の殺細胞効果を WST アッセイで測定した。

### 7.3.1 実験方法

ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum; FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を 5.2.1.3 項と同じ

細胞培養用培地に混合し、アルブミン濃度を 0-15 mg/ml と変化させた。5.3.1 節と同じ方法でタラポルフィンナトリウム濃度が 0-40  $\mu\text{g/ml}$  となるように細胞培養用培地に溶解した。6.5.1 節と同じようにラット心筋細胞を 96 ウェルプレートに培養した。6.2.1.1 項と同じレーザ装置および光照射系を用いた。放射照度は酸素枯渇が生じない  $0.29 \text{ W/cm}^2$  を用いた (選定理由は 6.6.4 節参照)。調製したタラポルフィンナトリウム溶液を 0.1 ml ずつ細胞培養したウェルに加えた。溶液厚みは 2.8 mm である。薬剤溶液を加えて 15 分以内に培養細胞に光照射を行い、細胞外光増感反応を起こした。放射照度  $0.29 \text{ W/cm}^2$  一定で照射時間を 0-137 s と変化させることで、放射照射量を 0-40  $\text{J/cm}^2$  と変化させた。6.5.1 節と同じように細胞の形態観察を光照射前後に顕微鏡下で行った。6.5.1 節と同じ方法および死細胞率定義で WST をアッセイにより細胞外光増感反応 2 h 後の死細胞率を測定した。

### 7.3.2 実験結果

図 7-3 に光増感反応前後の心筋細胞の顕微観察画像を示す。図 7-3(a), (b), (c)の右列に示した光増感反応後の顕微観察画像を相互に比較すると、細胞形状よりアルブミン濃度が増加するほど細胞への障害が減少している所見が得られた。障害を受けた細胞は図 7-3(a)右列に示すように細胞膜に複数のブレブを生じ、さらに障害が進むとウェル底面から剥離した。図 7-4 にアルブミン濃度 0.17, 0.65 mg/ml の場合の、死細胞率の薬剤濃度依存性を示す (N=6)。いずれのアルブミン濃度においても薬剤濃度が高いほど、放射照射量が高くなるほど高い死細胞率を示すが、アルブミン濃度によって薬剤濃度依存性が異なっていた。図 7-5 にタラポルフィンナトリウム濃度 20  $\mu\text{g/ml}$  の場合の細胞外光増感反応 2 h 後における死細胞率のアルブミン濃度依存性を示す (一部図 7-4 の再掲)。死細胞率はアルブミン濃度が高くなるほど低下する傾向が見られた。アルブミン濃度が 0.17-0.65 mg/ml では 80%以上の高い死細胞率が得られるのに対し、0.65 mg/ml 以上のアルブミン濃度では、アルブミン濃度増加に対して死細胞率が単調かつ大幅に低下した ( $P=2 \times 10^{-8}$ , t 検定, N=6)。

## 7.4 温度変化に伴う血清タンパク結合率

心筋組織に光増感反応励起用の赤色光を照射すると、組織や血液の吸収による発熱が生じることが予想される。薬剤とタンパクの結合率は温度により変化するので、温度変化に伴う血清タンパクとタラポルフィンナトリウムの結合率変化を明らかにし、光照射に伴う光増感反応の効率について検討する。

### 7.4.1 実験方法

生理食塩水にヒト血清アルブミン、高比重リポ蛋白 (High Density Lipoprotein; HDL)、低比重リポ蛋白 (Low Density Lipoprotein; LDL) を溶解し、それぞれの濃度を 0-20 mg/ml, 0-0.04 mg/ml, 0-0.14 mg/ml と変化させた。調製した血清タンパク溶液にタラポルフィンナトリ

ウム濃度 20  $\mu\text{g/ml}$  となるように溶解した。調製した溶液を限外濾過容器 (CENTRIFREE, Merck Millipore, USA) に 1 ml 入れた。 $-9^{\circ}\text{C}$  から  $40^{\circ}\text{C}$  までの温度コントロールが可能な遠心分離機 (テーブルトップ冷却遠心機 2800, KUBOTA, 日本) を用い、3000 rpm で  $17-37^{\circ}\text{C}$  の設定温度環境下で 10 分間遠心分離を行った。抽出した濾液 1.6 ml をプラスチック製のセミマイクロ分光用セル (光路長 10 mm) (1940, アズワン株式会社, 日本) に入れ、溶液の吸収スペクトルを計測した。紫外可視近赤外分光光度計 (UV3600, 島津製作所, 日本) に電子冷熱式恒温セルホルダ (CPS-240A, 島津製作所, 日本) を設置して、 $17-37^{\circ}\text{C}$  の設定温度環境下にて吸光度を測定した。測定波長はタラポルフィンナトリウムの Q 帯吸光ピーク波長を含む波長 645 nm から 665 nm までの範囲である。7.2.1 節の式 (7-2) で定義した結合率を算出した。

#### 7.4.2 実験結果

図 7-6 に  $17-37^{\circ}\text{C}$  におけるタラポルフィンナトリウムとヒト血清アルブミン、高比重リポ蛋白、低比重リポ蛋白それぞれの混合溶液中のタラポルフィンナトリウムと蛋白質の結合率を示す (N=3)。図 7-6(a) に示すヒト血清アルブミン濃度が 2.1 mg/ml の混合溶液では、タラポルフィンナトリウムとの結合率はいずれの温度でもほぼ 100% であり、温度依存性はなかった。ヒト血清アルブミン濃度 0.5 mg/ml の場合にも、タラポルフィンナトリウムとの結合率に温度依存性はなかった。すなわち、タラポルフィンナトリウムとヒト血清アルブミンの結合は、 $17-37^{\circ}\text{C}$  の温度変化では解離しないことが分かった。これに対して図 7-6(b) に示す高比重リポ蛋白濃度 0.04 mg/ml の場合および図 7-6(c) に示す低比重リポ蛋白濃度 0.14 mg/ml の場合において、溶液温度によって結合率に変化が生じた。図 7-7 にタラポルフィンナトリウムと高比重リポ蛋白、低比重リポ蛋白それぞれの混合溶液中の結合率の温度依存性を示す (図 7-6(b),(c) の再掲)。タラポルフィンナトリウムと高比重リポ蛋白、低比重リポ蛋白それぞれの混合溶液中の結合率は温度が高いほど低くなった。間質液の推定濃度で高比重リポ蛋白を混合した溶液 (0.04 mg/ml) では  $17^{\circ}\text{C}$  から  $37^{\circ}\text{C}$  の加温により結合率は 6.3% 減少し (P=0.02, t 検定, N=3)、低比重リポ蛋白を混合した溶液 (0.14 mg/ml) では 12.8% 減少した (P=0.12, t 検定, N=3)。

#### 7.5 温度変化に伴う殺細胞効果への影響

7.4 部で温度変化に伴い、高比重リポ蛋白および低比重リポ蛋白とタラポルフィンナトリウムの結合率が減少することが分かった。温度上昇による結合率低下に伴い、光増感反応による殺細胞効果の効率が向上することが予想される。動物血清を用い、温度上昇に伴う殺細胞効果変化を WST アッセイによって明らかにする。

### 7.5.1 実験方法

5.3.1 節と同じ細胞培養用培地にタラポルフィンナトリウム濃度 0–30  $\mu\text{g/ml}$  となるように溶解した。6.5.1 節と同じようにラット心筋細胞を 96 ウェルプレートに培養した。7.3.1 節と同じレーザー装置および光照射系を用いた。内蔵ヒーター・ペルチェ素子により環境温度を調整できる温調ユニット (Blast、日本) 内にウェルプレートを設置した。温調ユニット内で 17, 37°C に調整したウェルプレートにおいて、ウェル内の培地を吸引し、予め溶液温度を同一にしたタラポルフィンナトリウム溶液を 0.1 ml ずつウェルに加えた。7.3.1 節と同じ条件で光照射を行った後、6.5.1 節と同じ方法および死細胞率定義で WST をアッセイにより細胞外光増感反応 2 h 後の死細胞率を測定した。

### 7.5.2 実験結果

図 7-8 に 17°C と 37°C 下の光増感反応における、死細胞率のタラポルフィンナトリウム濃度依存性を示す。図 7-8(a)–(d) に、放射照射量が 5, 10, 20, 40  $\text{J/cm}^2$  の場合をそれぞれ示す。図 7-8(a) および図 7-8(b) に示したように、放射照射量が 5  $\text{J/cm}^2$  および 10  $\text{J/cm}^2$  の場合では、17°C と 37°C の間で死細胞率に有意な差はみられなかった。図 7-8(c) および図 7-8(d) に示したように、放射照射量が 20  $\text{J/cm}^2$  および 40  $\text{J/cm}^2$  の場合では、タラポルフィンナトリウム濃度が 20  $\mu\text{g/ml}$  において死細胞率が 17°C のときと比べて 37°C の場合の方が有意に高くなった ( $P=0.046, 0.0065, t$  検定,  $N=6$ )。いずれの放射照射量の場合でも、図 6-15 に類似してタラポルフィンナトリウム濃度が高くなるほど死細胞率が高くなる傾向がみられた。

## 7.6 考察

### 7.6.1 実験に使用したアルブミン濃度

3.2 部で述べたように、タラポルフィンナトリウムは生体内で血清アルブミンと 99% 以上結合している。細胞毒性を示すのはアルブミンと結合していない遊離したタラポルフィンナトリウムであるため、アルブミンの濃度が低下すると、殺細胞効果が高くなる。生体内のアルブミン濃度は血中アルブミン濃度 36–42  $\text{mg/ml}$  と報告されている [6]。本法で対象とする心筋組織間質中のアルブミン濃度の報告はない。グルコースの経皮的な計測の研究によれば、皮膚間質中には血中の約 3 分の 1 の濃度で蛋白質が存在する [7]。よってこの結果より推測すると、間質中は約 13–16  $\text{mg/ml}$  のアルブミン濃度であると思われることから、アルブミン濃度を 0–15  $\text{mg/ml}$  と変化させて殺細胞率を調査した。

### 7.6.2 結合率変化に伴う殺細胞効果とタラポルフィンナトリウムに吸収されたエネルギー

タラポルフィンナトリウム溶液に吸収された励起光を各アルブミン濃度において算出した。7.3.2 節で得られた各アルブミン濃度におけるタラポルフィンナトリウム溶液の吸収ス

ペクトルと励起光として用いたレーザの発振スペクトル (図 6-1) の積分値を算出した。この積分値はタラポルフィンナトリウムに吸収されたエネルギーに対応する。アルブミン濃度が 0 mg/ml のときの値が報告されたタラポルフィンナトリウムのモル吸光係数  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  となるように正規化し [8]、それぞれのアルブミン濃度におけるタラポルフィンナトリウム溶液の吸収係数において、 $40 \text{ J/cm}^2$  の放射照射量で光照射を行った場合の吸収されたエネルギーを計算した。図 7-9 に  $40 \text{ J/cm}^2$  の光照射を行ったときのウェルに吸収される光エネルギーに対するアルブミン濃度の影響を示す (N=1)。吸収エネルギーはアルブミン濃度を 0–20 mg/ml の範囲で変化させた場合、 $4.23 \pm 0.19 \text{ J/ウェル}$  とほぼ一定であった。このことから、7.3.2 節で得られたアルブミン濃度変化に伴う殺細胞効果の変化は、吸収スペクトルピークシフトに伴う吸収エネルギー変化によるものではないと考えられる。すなわちタラポルフィンナトリウムがアルブミンと結合することにより、産生された一重項酸素がアルブミンの酸化に消費されることによって生じる効率低下が支配的な要因になっていると思われる [9]。

### 7.6.3 殺細胞効果に対するタラポルフィンナトリウムとアルブミンのモル濃度比依存性

図 7-2 によると濃度  $24 \text{ } \mu\text{g/ml}$  のタラポルフィンナトリウムにおいて、アルブミン濃度増加に対するタラポルフィンナトリウムとアルブミンの結合率の減少は、アルブミン濃度が 0.1 mg/ml と 1 mg/ml の間で顕著にみられた。一方で図 7-5 を見ると光増感反応による死細胞率の上昇はアルブミン濃度が 0.65 mg/ml と 2.1 mg/ml の間で顕著にみられた。図 7-2 および図 7-5 を比較すると、アルブミン濃度が 0.17 mg/ml と 0.65 mg/ml の間では、結合率が約 40% 上昇しているにもかかわらず殺細胞効果には有意な変化が見られなかった。アルブミン濃度 0.17 mg/ml はモル濃度比 0.3 に、同じく 0.65 mg/ml は 1.2 に対応する。すなわち、7.6.2 節で述べたようにアルブミン濃度 0.1–20 mg/ml の範囲で計算した吸収エネルギーは  $4.23 \pm 0.19 \text{ J/ウェル}$  とほぼ変化しないが、アルブミンとタラポルフィンナトリウムのモル濃度比が 0.3–1.2 の間に光増感反応による殺細胞効果の大きな変化があることが分かった。タラポルフィンナトリウム濃度  $20 \text{ } \mu\text{g/ml}$  においてアルブミン濃度が 0.65 mg/ml を超える場合、あるいはタラポルフィンナトリウムとアルブミンのモル濃度比が 0.3–1.2 を超える場合に、光増感反応による殺細胞効果は、顕著に減少することが明らかになった。

### 7.6.4 温度上昇に伴った結合率低下による殺細胞効果変化

7.4.2 節で述べたように、アルブミン濃度が 2.1 mg/ml において、 $17^\circ\text{C}$  から  $37^\circ\text{C}$  への温度上昇における結合率の変化には有意な差が見られなかった。血中の濃度に相当する高比重リポ蛋白  $0.04 \text{ mg/ml}$  および低比重リポ蛋白  $0.14 \text{ mg/ml}$  におけるタラポルフィンナトリウムとの結合率の平均値は、7.4.2 節で述べたように、 $17^\circ\text{C}$  から  $37^\circ\text{C}$  の温度上昇によって、それ

ぞれ 6.3%および 12.8%減少した。7.5.2 節の図 7-8 に示したように、6.3%の高比重リボ蛋白との結合率減少および 12.8%の低比重リボ蛋白との結合率減少によって、20%-30%の殺細胞効果の上昇が生じることが明らかになった。

## 7.7 結言

本章では、アルブミン濃度変化および温度変化によるアルブミンとタラポルフィンナトリウムの結合率を吸光スペクトル計測によって調査し、結合率変化による殺細胞効果への影響を明らかにした。温度上昇に伴うタラポルフィンナトリウムの血清蛋白との結合率変化および殺細胞効果効率の変化を明らかにした。

## 参考文献

- [1] I. Sheyhedin, K. Aizawa, M. Araale, H. Kumasawa, T. Okunaka, and H. Kato, “The effect of serum on cellular uptake and phototoxicity of mono-L-aspartyl chlorine e6 (NPe6) *in vitro*,” *Photochem Photobiol*, vol. 68, pp. 110–114, 1998.
- [2] 会沢勝夫, 安中ゆかり, 広沢英子, 勝目卓郎, 大谷卓三, 河部博文, 斎藤喬士, 大畑進, 加藤治文, 早田義博, “Mono-L-aspartyl chlorine (NPe6) の分光特性と腫瘍集積性,” *杏林医会誌*, vol. 18, pp. 77–84, 1987.
- [3] 島津製作所株式会社, *紫外・可視・近赤外分光光度計 UV-3600 製品説明書*, pp. 4–20.
- [4] 島津製作所株式会社, “電子冷熱式恒温セルホルダ TCC-240A,” *紫外可視分光光度計付属品ハンドブック*, p. 11.
- [5] 炭竈貞夫, *熱センサ入門—原理・構造と使い方*, 1st edit, 東京: 啓学出版, 1984, pp. 7–122.
- [6] 岡田隆夫, *集中講義生理学: カラーイラストで学ぶ*, 東京都: メジカルビュー社, 2008, p. 82.
- [7] 萱嶋信介, 荒井恒憲, 菊地真, 永田直一, 高谷治, 宮本重幸, 篠原志緒, 伊藤成史, 栗山敏秀, “経皮的吸引浸出液取得法と ISFET 型バイオセンサを用いた無侵襲連続血糖値測定システム,” *電子情報通信学会技術研究報告*, vol. 89, No. 9, pp. 73–79, 1989.
- [8] C. Hadjur, N. Lange, J. Revstein, P. Monnier, H. van den Bergh, and G. Wagnieres, “Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta (tetrahydroxyphenyl) chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC,” *J Photochem Photobiol B*, vol. 45, pp. 170–178, 1998.
- [9] M. Kurotsu, E. Ogawa, and T. Arai, “Evaluation of Human and Bovine Serum Albumin on Oxidation Characteristics by Photosensitization Reaction Under Complete Binding of Talaporfin Sodium to Albumin,” *Photodiagnosis Photodyn Ther*, submitted, 2014.



図表

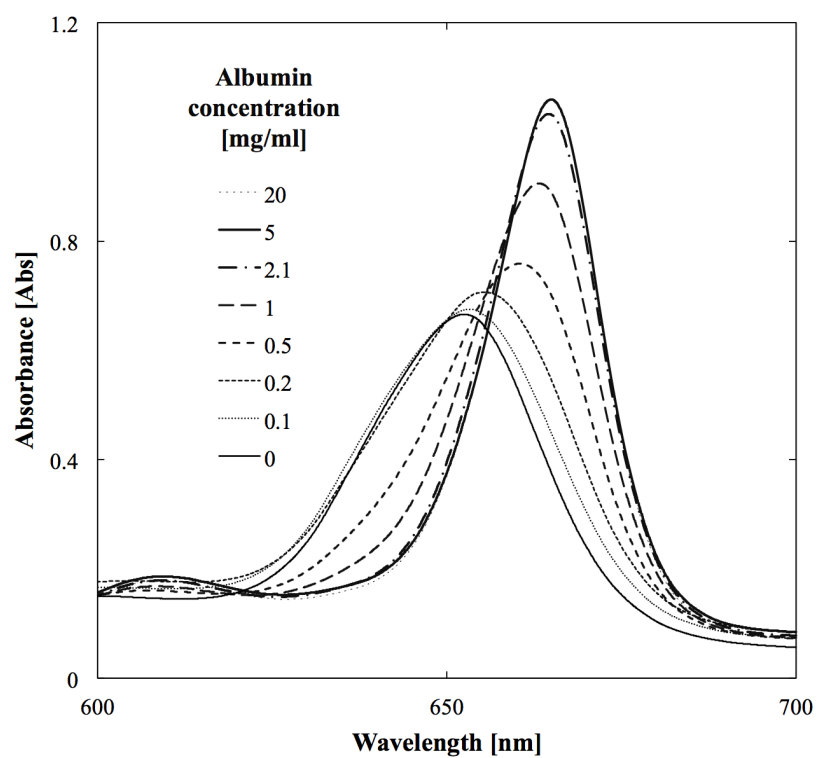


図 7-1 アルブミン濃度を 0-20 mg/ml に変化させたときのタラポルフィンナトリウム吸収スペクトル

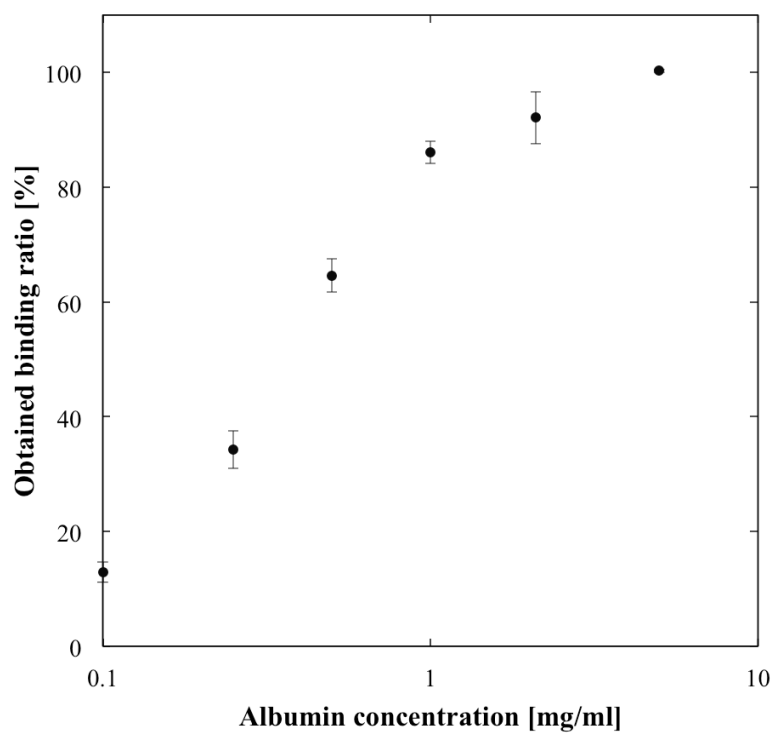


図7-2 タラポルフィンナトリウムとアルブミンの結合率  
(タラポルフィンナトリウム濃度：24  $\mu\text{g/ml}$ , N=3,  
算出は式(7-2)に示す方法による。)

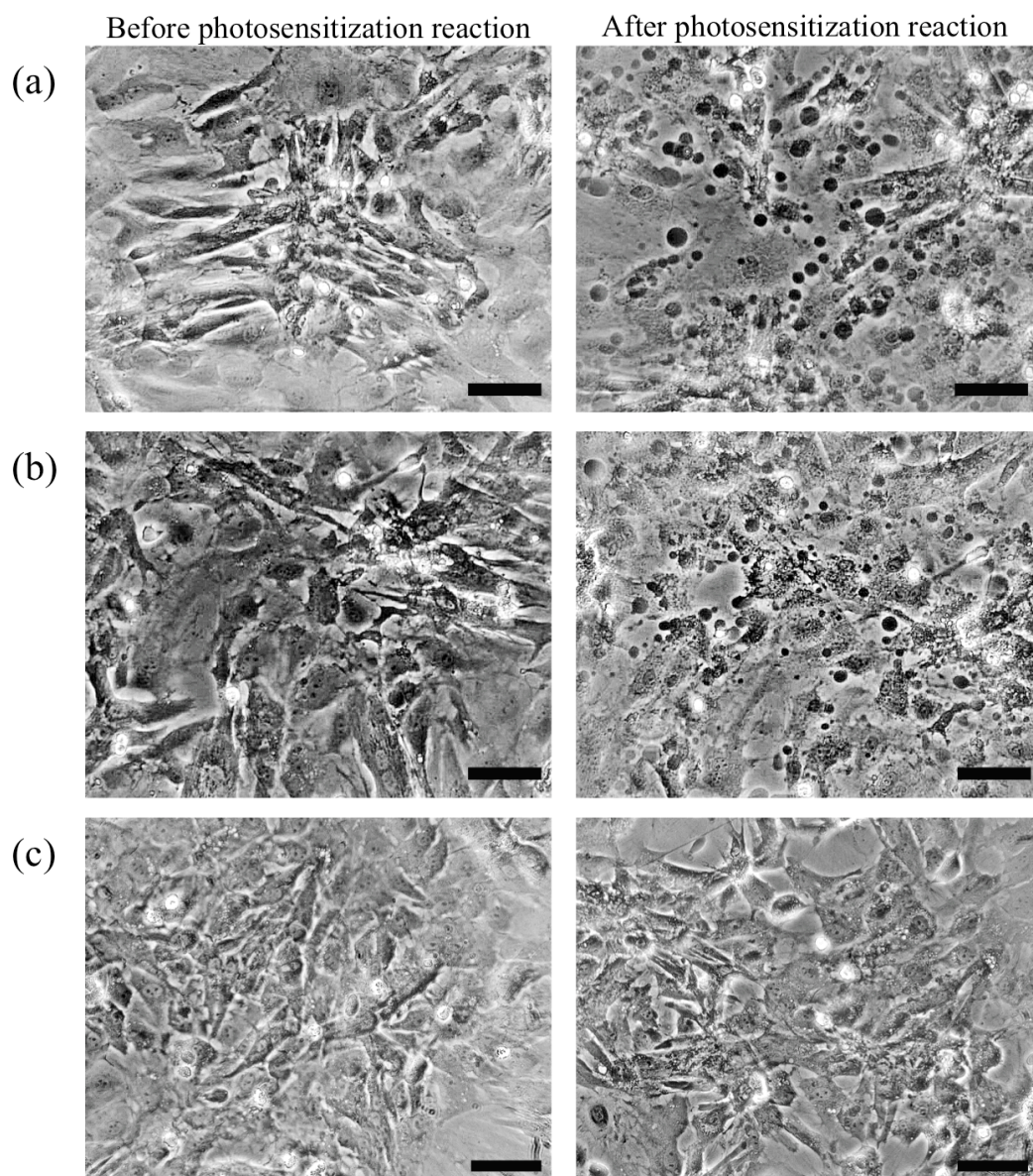


図 7-3 アルブミン濃度を変化させたときの細胞外光増感反応前後における心筋細胞形態観察結果

(a) アルブミン濃度 0.17 mg/ml

(b) アルブミン濃度 0.65 mg/ml

(c) アルブミン濃度 2.1 mg/ml

スケールバー: 100  $\mu$ m

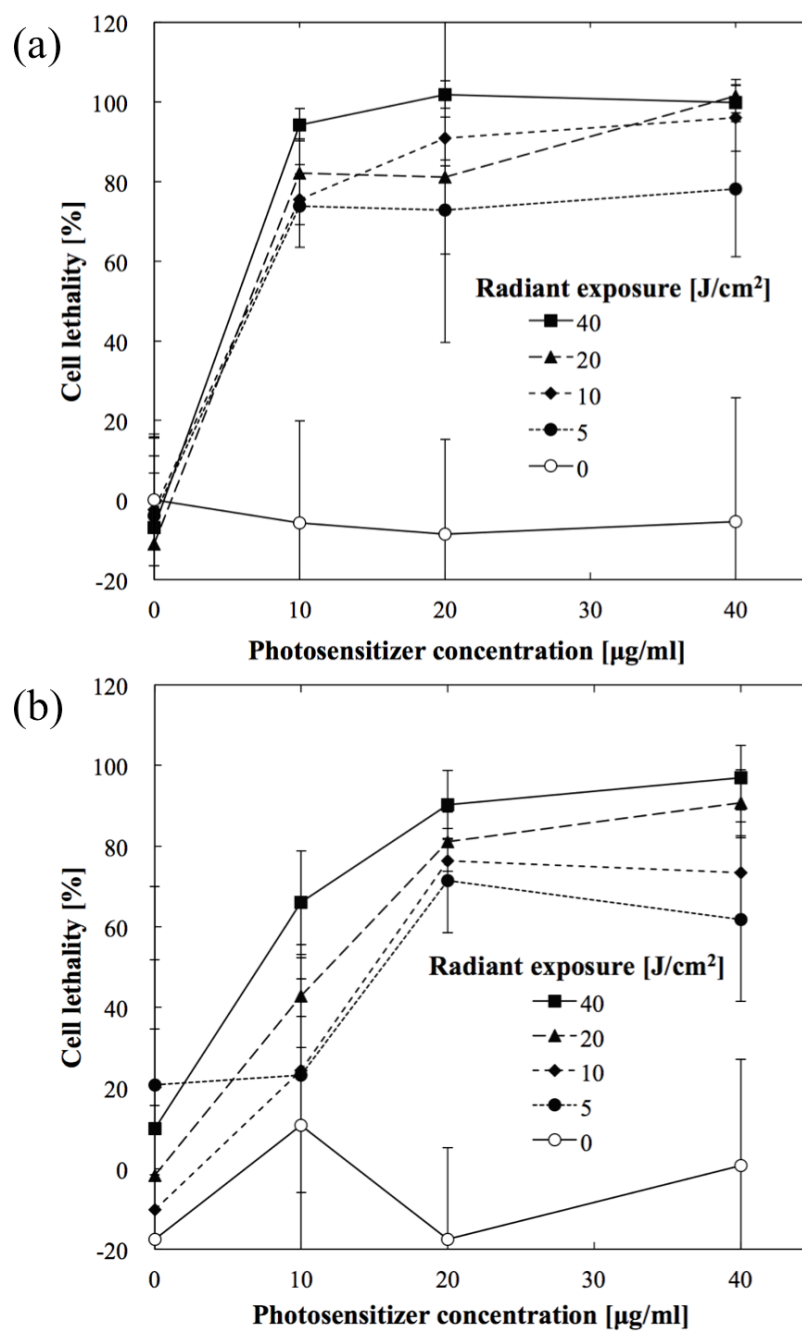


図 7-4 各アルブミン濃度における細胞外光増感反応 2 h 後の死細胞率の薬剤濃度依存性 (N=6)

(a) アルブミン濃度 0.17 mg/ml

(b) アルブミン濃度 0.65 mg/ml

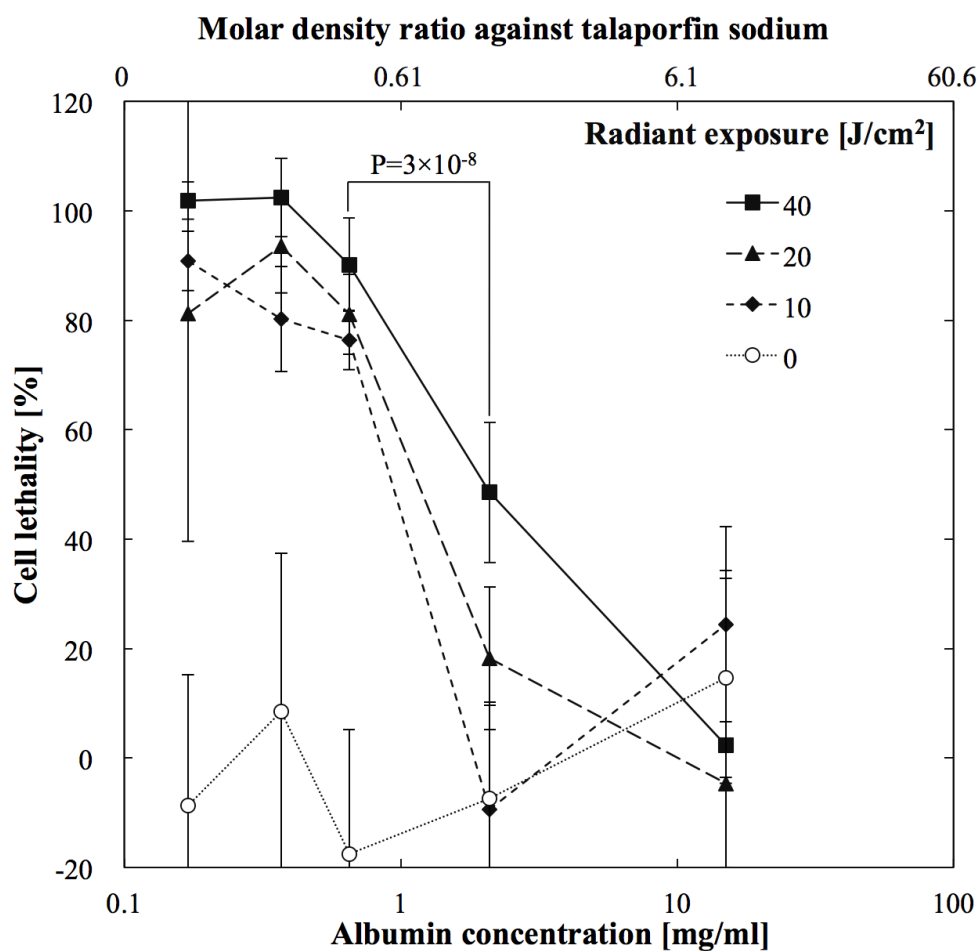


図 7-5 細胞外光増感反応 2 h 後における死細胞率のアルブミン濃度依存性  
(タラポルフィンナトリウム濃度: 20  $\mu\text{g/ml}$ , N=6, t 検定による p 値を表示)

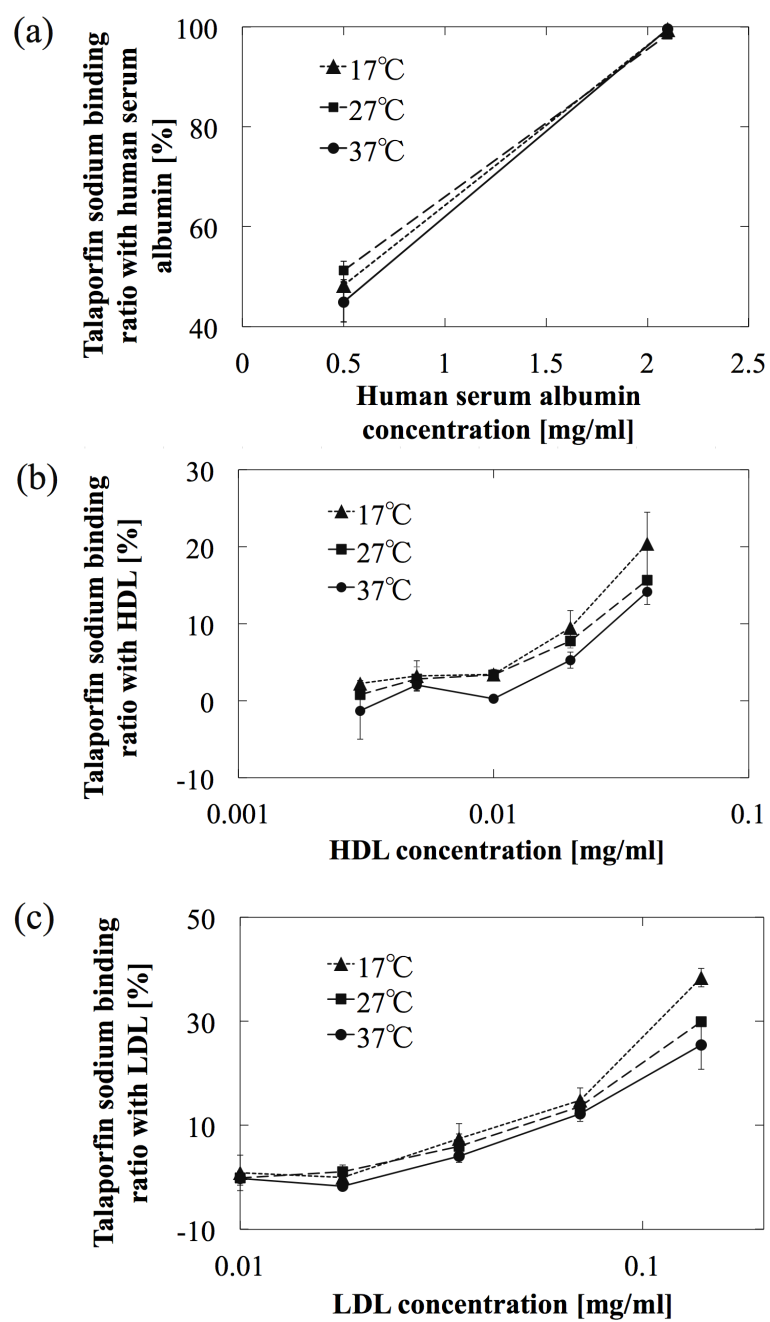


図7-6 タラポルフィンナトリウムとヒト血清アルブミン、高比重リポ蛋白、低比重リポ蛋白それぞれの混合溶液中の温度ごとの結合率 (N=3)

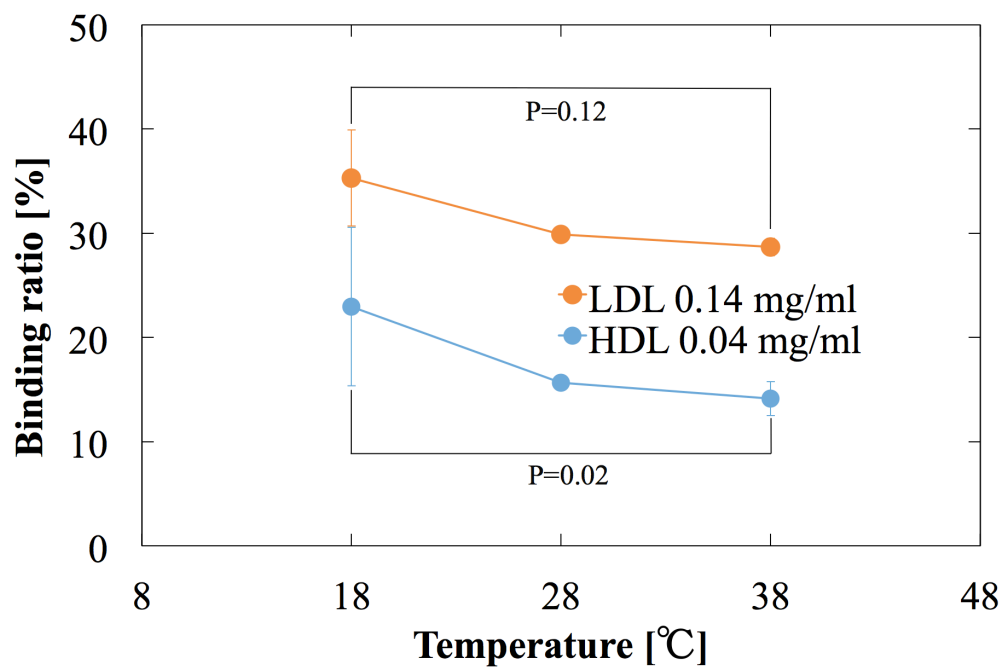


図7-7 タラポルフィンナトリウムと高比重リポ蛋白、低比重リポ蛋白それぞれの混合溶液中の遊離薬剂割合の温度依存性 (N=3, t 検定による p 値を表示)

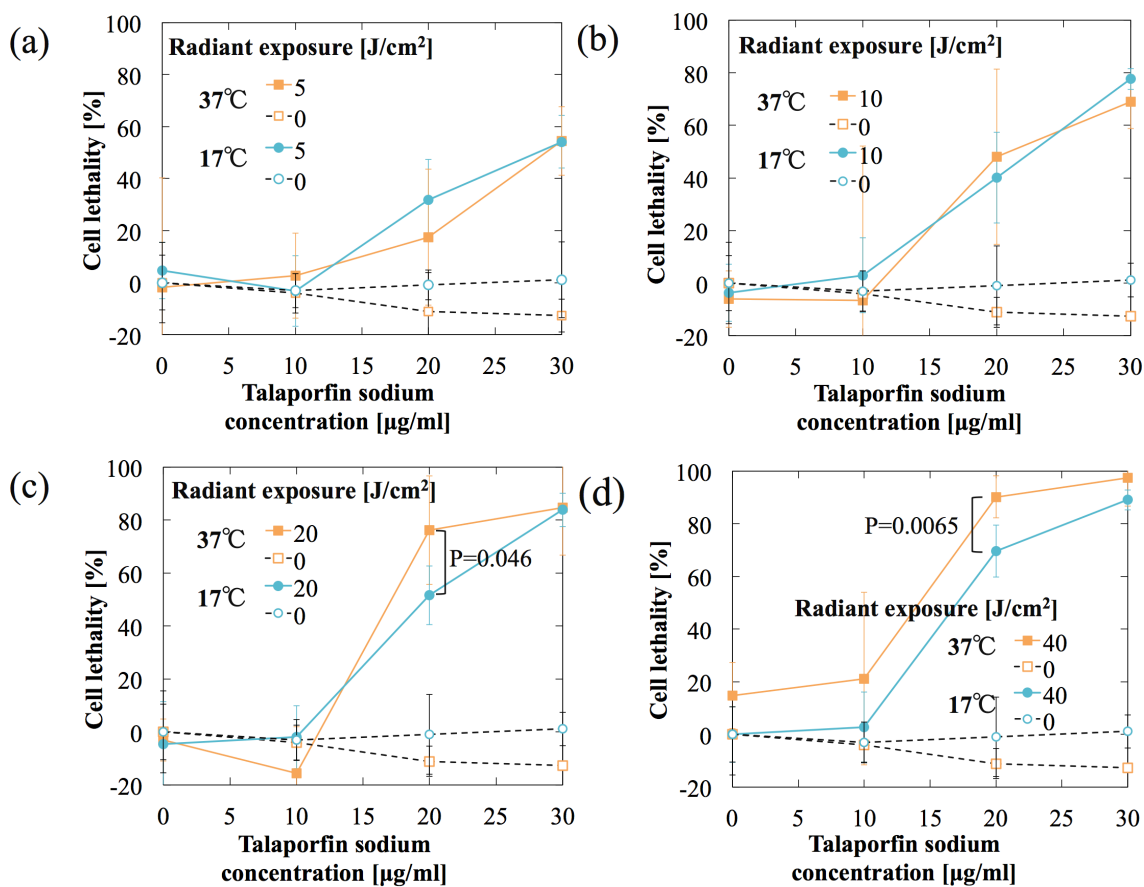


図 7-8 17°Cと 37°C下の光増感反応における、死細胞率のタラポルフィンナトリウム濃度依存性 (アルブミン濃度: 2.1 mg/ml, N=6, t 検定による p 値を表示)

- (a) 放射照射量 5 J/cm<sup>2</sup>
- (b) 放射照射量 10 J/cm<sup>2</sup>
- (c) 放射照射量 20 J/cm<sup>2</sup>
- (d) 放射照射量 40 J/cm<sup>2</sup>



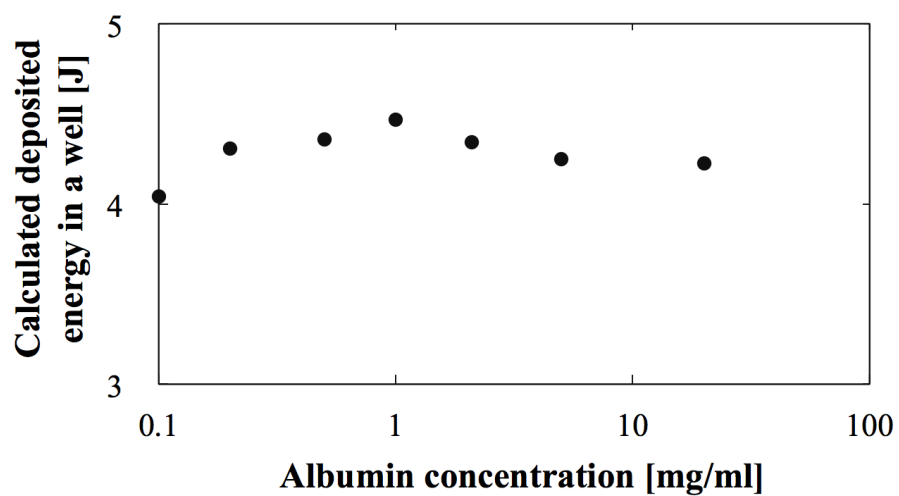


図 7-9  $40 \text{ J/cm}^2$  の光照射を行ったときのウェルに吸収される光エネルギー：  
アルブミン濃度の影響 (N=1)



## 第 8 章 心筋細胞へのタラポルフィンナトリウム蓄積量と遅発性殺細胞効果

### 8.1 緒言

タラポルフィンナトリウムは接触時間が増えるにつれて心筋細胞に取り込まれるため、光増感反応による障害を受ける部位が変化し、殺細胞効果や細胞死機構に影響をおよぼす。本章ではタラポルフィンナトリウムの心筋細胞内蓄積量が殺細胞効果におよぼす影響について検討するために、タラポルフィンナトリウム薬剤蛍光強度測定により心筋細胞におけるタラポルフィンナトリウム蓄積量の接触時間依存性を調査する。心筋に対する細胞外光増感反応においてタラポルフィンナトリウム接触時間の増加が殺細胞効果や細胞死機構におよぼす影響を *in vitro* 細胞実験により検討する。タラポルフィンナトリウムが細胞外、細胞内・外、および細胞内に分布する状態を模擬して光増感反応起こし、2 h 後および 24 h 後の死細胞率を調査する。

### 8.2 接触時間に伴う心筋細胞へのタラポルフィンナトリウム蓄積量

心筋細胞内に蓄積されたタラポルフィンナトリウム濃度の経時変化を計測する。蛍光プレートリーダーを用い、ウェル内の薬剤由来蛍光強度を測定する。

#### 8.2.1 実験方法

6.5.1 節と同じようにラット心筋細胞を 96 ウェルプレートに培養した。5.2.1.3 項と同じ細胞培養用培地を用い、タラポルフィンナトリウム濃度 20  $\mu\text{g/ml}$  となるように溶解した。培養したラット心筋細胞にタラポルフィンナトリウム溶液 0.1 ml を接触させた。心筋細胞とタラポルフィンナトリウム溶液の接触時間は十分に細胞内に蓄積される時間 6 h を上限にして [1]、5–360 min とした。薬剤接触後にウェル内を細胞培養用培地で 5 回洗浄し、細胞培養用培地 0.1 ml をウェルに注入し、ウェル内の蛍光強度 (Ex. 405 $\pm$ 20 nm, Em. 720 $\pm$ 40 nm) を蛍光吸光プレートリーダー (Infinite F200 Pro, TECAN, スイス) にて測定した。励起用バンドパスフィルタ (400 $\pm$ 20 nm) を用いてタラポルフィンナトリウムの Soret 帯で励起を行い、蛍光測定用バンドパスフィルタ (720 $\pm$ 40 nm) によりウェル底面から発生するタラポルフィンナトリウムの蛍光成分を測定した。ウェル内蛍光強度の測定値から細胞内に移行したタラポルフィンナトリウム濃度を算出するため、タラポルフィンナトリウム濃度と蛍光強度の検量線を作成した。予備実験で蛍光強度を上記プレートリーダーの出力カウント、タラポルフィンナトリウム濃度を 0.001–0.1  $\mu\text{g/ml}$  とするときの出力カウントと濃度の検量線を得た。検量線を用いて心筋細胞内に蓄積されたタラポルフィンナトリウム濃度の経時変化を測定した。

### 8.2.2 実験結果

図 8-1 に接触時間に伴う心筋細胞内タラポルフィンナトリウム濃度変化を示す。心筋細胞内タラポルフィンナトリウム濃度は接触時間の増加に伴って単調増加した。特に、接触時間 60 min までは接触時間の増加に伴い急激に心筋細胞内タラポルフィンナトリウム濃度が増加し、その後接触時間 360 min までなだらかな増加が続いた。接触時間 120 min 以降心筋細胞内蓄積量が飽和する傾向が見られた。第 4 章で提案した光線力学アブレーションにおける想定最大治療時間である 180 min の接触では、短時間の接触時間 15 min の場合に比べ約 3.9 倍多くのタラポルフィンナトリウムが細胞内に蓄積することがわかった。心筋細胞に対する細胞外光増感反応においては接触時間 15 min に比べ 30 min 以上の条件では 1.6 倍以上のタラポルフィンナトリウムが細胞内に蓄積する

### 8.3 接触時間に伴う遅発性心筋細胞障害

接触時間に伴ってタラポルフィンナトリウムが心筋細胞内へ蓄積し、心筋細胞内においても光増感反応が発生する。図 8-2 に心筋細胞内タラポルフィンナトリウム蓄積に伴う細胞死機構の予想図を示す。心筋細胞内において光増感反応が生じることで、細胞壊死よりも緩徐に生じるアポトーシスなどの遅発性細胞死が生じる可能性がある。臨床においては、このような遅発性の細胞死発生によって、治療深度が拡大する可能性がある。この慢性期における治療領域拡大の可能性について検討するため、タラポルフィンナトリウムとの接触時間を変化させ、光増感反応から 2 h 後の亜急性期死細胞率、24 h 後の遅発性死細胞率を WST アッセイにより測定した。

#### 8.3.1 実験方法

図 8-3 に本章の実験方法とそれらにおける薬剤分布場所、細胞内光増感反応および細胞外光増感反応の用語対応を示す。本研究では *in vitro* 細胞実験において、細胞の外にタラポルフィンナトリウムがある状態の光増感反応を、細胞内蓄積量に関わらず細胞外光増感反応と呼ぶ。一方、心筋細胞をタラポルフィンナトリウムに接触させた後に細胞の外側を洗浄し、細胞内だけにタラポルフィンナトリウムが存在する状態としたときの光増感反応を細胞内光増感反応と呼ぶ。6.5.1 節と同じ方法で培養したラット心筋細胞を、濃度 20  $\mu\text{g/ml}$  のタラポルフィンナトリウム溶液と接触させ、接触時間を 15 min から 180 min まで変化させた。接触後に培養用培地で洗浄したものを細胞内光増感反応群とし、洗浄を行わずタラポルフィンナトリウム溶液が細胞周囲に存在するものを細胞外光増感反応群とした。6.2.1.1 項と同じ光照射系を用いて赤色半導体レーザーをウェル底面に照射した。放射照度は 0.29  $\text{W/cm}^2$  (選定理由は 6.6.4 節参照) とし、放射照射量は 0–20  $\text{J/cm}^2$  を使った。6.5.1 節と同じく光照射前後に顕微鏡下形態観察を行った。6.5.1 節と同じ方法および死細胞率定義で WST アッセイにより細胞外光増感反応 2 h 後および 24 h 後の死細胞率を測定した。

### 8.3.2 実験結果

図 8-4 に細胞外光増感反応において接触時間により細胞内蓄積量を変化させた場合の光増感反応後の心筋細胞の顕微観察画像を示す。タラポルフィンナトリウム接触時間が 15 min の場合には、図 8-4(a), (b)において上段の左右を比較すると、心筋細胞の形状は光増感反応直後と 24 h 後でほとんど変化していない。タラポルフィンナトリウム接触時間が 120 min の場合には、図 8-4(a), (b)において下段の左右を比較すると、いずれの放射照射量においても光増感反応直後から 24 h 後にかけて細胞形状に障害変化が生じていた。図 8-5 に放射照射量  $20 \text{ J/cm}^2$  での細胞内・細胞外光増感反応による 2 h 後および 24 h 後における死細胞率のタラポルフィンナトリウム接触時間依存性を示す。タラポルフィンナトリウム接触時間が 15 min から 30 min に増加するとき、光増感反応 2 h 後の死細胞率は約 20%有意に上昇し ( $P=0.004$ , t 検定,  $N=6$ )、光増感反応 24 h 後の死細胞率は約 60%有意に上昇した ( $P=0.000004$ , t 検定,  $N=6$ )。光増感反応 2 h 後 24 h 後いずれの場合もタラポルフィンナトリウム接触時間 30 min から 180 min の間に死細胞率変化は見られなかった。タラポルフィンナトリウム接触時間 30 min から 180 min の間で、光増感反応 24 h 後の死細胞率は光増感反応 2 h 後の死細胞率に比べて約 20%高くなった (接触時間 60 min の場合に  $P=0.0009$ , t 検定,  $N=6$ )。図 8-5 中に三角形でタラポルフィンナトリウムを 15 min および 60 min 接触した後に培地で洗浄した細胞内光増感反応による死細胞率をプロットした。接触時間 60 min における細胞内光増感反応による死細胞率は、細胞外光増感反応に比べて低かった。接触時間 15 min の場合と比較すると、60 min の場合細胞内光増感反応による死細胞率は約 30%高くなった。これは細胞内光増感反応による遅発性障害効果が生じたためと考えられる。

図 8-6 に接触時間を 5-180 min と変化させたときの光増感反応 24 h 後における死細胞率の放射照射量依存性を示す。プロットが重畳する部分は、横方向にプロットをずらして表示した。死細胞率は放射照射量が増加するにつれて上昇した。放射照射量  $20 \text{ J/cm}^2$  において、タラポルフィンナトリウム接触時間による死細胞率変化に有意な差は見られなかった。放射照射量  $10 \text{ J/cm}^2$  において、タラポルフィンナトリウム接触時間 15 min の場合に、他の接触時間と比較して死細胞率が有意に低くなった ( $P=0.000004$ , t 検定,  $N=6$ )。放射照射量  $5 \text{ J/cm}^2$  において、タラポルフィンナトリウム接触時間 180 min の場合に、他の接触時間と比較して死細胞率が有意に高くなった ( $P=0.00056$ , t 検定,  $N=6$ )。

## 8.4 接触時間変化による細胞死機構への影響

8.3.2 節において細胞外光増感反応後 2 h 後から 24 h 後にかけて死細胞率が上昇する知見が得られた。これはアポトーシスなどの遅発性の細胞死が発生したためと考えられる。アポトーシスによる死滅過程の特徴的変化の一つである核クロマチンの凝集や断片化の発生を確認するため、心筋細胞核の染色による核の形態観察を行う。

#### 8.4.1 実験方法

本研究ではアポトーシス判定方法として、Hoechst 33342 (Cell stain®- Hoechst 33342 solution, 同仁化学) 染色による核の形態観察を用いた [2]。アポトーシス発生細胞で、クロマチンが凝集することで、生細胞と比べて強い青色蛍光が認められ、アポトーシス特有の形態変化を捉えることができる。濃度 20  $\mu\text{g/ml}$  のタラポルフィンナトリウムに心筋細胞を 15 min および 60 min 接触させ、8.3.1 節と同じ方法で光増感反応を起こした。放射照射量を 20  $\text{J/cm}^2$  とし、光照射から 2-24 h 後において、5  $\mu\text{g/ml}$  の Hoechst 33342 溶液に 37°C で 5 min 間接触させ [3-6]、蛍光顕微鏡 (対物レンズ倍率 20 倍) (IX70; Olympus, Tokyo, Japan) 下で観察を行った。

#### 8.4.2 実験結果

図 8-7 に光増感反応前後の心筋細胞核の形態変化を示す。図 8-11(b) にタラポルフィンナトリウムと 60 min 接触したのちに放射照射量 20  $\text{J/cm}^2$  の光照射を行ったときの、光増感反応 24 h 後の心筋細胞核の状態を示す。図 8-7(b) に矢印で示すように、一部の細胞に核クロマチンの凝集や断片化が見られた。

### 8.5 考察

#### 8.5.1 タラポルフィンナトリウムの心筋細胞への蓄積特性

浮遊心筋細胞の顕微観察で計測した心筋細胞の直径  $12.5 \pm 2.2 \mu\text{m}$  より、浮遊心筋細胞を球体と仮定すると、細胞の体積は  $1.02 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  と見積もられる。20  $\mu\text{g/ml}$  のタラポルフィンナトリウム溶液に 6 h 接触させた場合の単一心筋細胞あたりに蓄積されたタラポルフィンナトリウム質量は図 8-1 と細胞体積より  $0.5 \times 10^{-3} \text{ pg/cell}$  と求められる。タラポルフィンナトリウムを用いた細胞蓄積量の報告では、食道扁平上皮癌細胞株 KYSE70 に対して 10  $\mu\text{g/ml}$  のタラポルフィンナトリウムを接触させた場合で 1  $\text{pg/cell}$ 、白血病細胞株 P388 に対して 10  $\mu\text{g/ml}$  のタラポルフィンナトリウムを接触させた場合で  $2.0 \times 10^{-3} \text{ pg/cell}$  の蓄積量があると報告されている [7]。得られた心筋細胞へのタラポルフィンナトリウムの蓄積量の見積もりは、これらの報告例の数分の一である。白血病細胞株における蓄積量は、接触時間 24 h まで単調に増加し続け、飽和傾向は見られないのに対して [7]、図 8-1 のように心筋細胞では接触時間に伴う蓄積量が 120 min 付近から飽和傾向を示す特徴を持つ。図 8-1 に見られるような蓄積の飽和傾向は心筋細胞特有のものと思われる。これらのことから、心筋細胞は癌細胞と異なりタラポルフィンナトリウムの排泄速度が大きいと推測される。

#### 8.5.2 タラポルフィンナトリウム接触時間の変化に伴う殺細胞効果への影響

図 8-6 に示すように、遅発性細胞死が顕著に観察されたのは、放射照射量が 5  $\text{J/cm}^2$  および 10  $\text{J/cm}^2$  のときであった (8.3.2 節参照)。図 8-1 より、遅発性細胞死が生じたときの細胞

内タラポルフィンナトリウム濃度は、放射照射量  $5 \text{ J/cm}^2$  のとき  $0.41\text{--}0.47 \text{ }\mu\text{g/ml}$  の間より高いとき、放射照射量  $10 \text{ J/cm}^2$  のとき  $0.17\text{--}0.22 \text{ }\mu\text{g/ml}$  の間より高いときであった。以上より、用いた光増感反応条件下では、心筋細胞内タラポルフィンナトリウム濃度が  $0.17 \text{ }\mu\text{g/ml}$  以下であれば、光増感反応後に遅発性細胞死が生じないことが分かった。不整脈治療では慢性期の治療領域拡大は好ましい性質ではないため、遅発性細胞死が発生しない光増感反応条件の探索は重要である。

### 8.5.3 光増感反応による細胞毒性閾値の比較

白血病細胞株 P388 を用いた細胞内光増感反応による 24 h 後の細胞毒性は、放射照射量  $20 \text{ J/cm}^2$  の場合に、タラポルフィンナトリウム濃度閾値が  $10 \text{ }\mu\text{g/ml}$  と  $20 \text{ }\mu\text{g/ml}$  の間に存在すると報告がある [7]。このときの細胞内タラポルフィンナトリウム量は  $5\text{--}11 \text{ }\mu\text{g}/10^9 \text{ cells}$  であった [7]。心筋細胞体積を 8.5.1 節のように  $1 \times 10^3 \text{ }\mu\text{m}^3$  とし、上記報告例を当て填めると、細胞内タラポルフィンナトリウム濃度閾値は  $5\text{--}11 \text{ }\mu\text{g/ml}$  と換算できる。一方、8.5.2 節の知見である心筋細胞内タラポルフィンナトリウム濃度が  $0.17 \text{ }\mu\text{g/ml}$  より高いときに遅発性細胞死が生ずる可能性があることと比較すると、心筋細胞における細胞障害を与える細胞内タラポルフィンナトリウム濃度閾値の方が 1 桁以上低い。このことから、癌細胞と比較して心筋細胞は細胞内光増感反応による障害に対する耐性が弱い可能性が示唆される。

## 8.6 結言

ラット心筋細胞に対して接触時間を変化させてタラポルフィンナトリウムの細胞内蓄積量を調査した。薬剤蛍光強度測定の結果では、心筋細胞内タラポルフィンナトリウム濃度は接触時間の増加に伴って単調増加した。特に、接触時間 60 min までは接触時間の増加に伴い急激に心筋細胞内タラポルフィンナトリウム濃度が増加し、その後接触時間 360 min までなだらかに増加した。接触時間 120 min 以降心筋細胞内蓄積量が飽和する傾向が得られた。4.2 部で提案した治療法における想定最大治療時間である 180 min の薬剤接触では、接触時間 15 min の場合に比べ約 3.9 倍のタラポルフィンナトリウムが細胞内に蓄積することが分かった。心筋細胞に対する細胞外光増感反応においては接触時間 15 min に比べ 30 min 以上の条件では 1.6 倍以上のタラポルフィンナトリウムが細胞内に蓄積することで、細胞内障害によりアポトーシスを誘導し 24 h 後において殺細胞効果が上昇した。用いた光増感反応条件では、心筋細胞内タラポルフィンナトリウム濃度が  $0.17 \text{ }\mu\text{g/ml}$  以下であれば、光増感反応後遅発性細胞死が生じないことが分かった。

## 参考文献

- [1] K. Aizawa, T. Okunaka, T. Ohtani, and I. Kawabe, “Localisation of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in mouse tissues,” *Photochem Photobiol*, vol. 46, pp. 789–93, 1987.
- [2] 同仁化学株式会社, -Cell stain®- Hoechst 33342, 2015 年 4 月改訂.
- [3] A. Heng, Y. Cao, H. Liu, W. Zhang, Y. Liu, T. Shi, G. Jia, and X. Wang, “DIDS Attenuates Staurosporine-induced Cardiomyocyte Apoptosis by PI3K/Akt Signaling Pathway: Activation of eNOS/NO and Inhibition of Bax Translocation,” *Cell Physiol Biochem*, vol. 22, pp. 177–186, 2008.
- [4] Y. Xiao, J. He, D. Raymond, and L. Zhang, “Cocaine Induces Apoptosis in Fetal Myocardial Cells through a Mitochondria-Dependent Pathway,” *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 292, pp. 8–14, 2000.
- [5] I. Furre, S. Shahzidi, Z. Luksiene, M. Møller, E. Borgen, J. Morgan, and K. Stachowska, “Targeting PBR by Hexaminolevulinate-Mediated Photodynamic Therapy Induces Apoptosis through Translocation of Apoptosis-Inducing Factor in Human Leukemia Cells,” *Cancer Res*, vol. 65, pp. 11051–11060, 2005.
- [6] S. Levrard, C. Bouchiche, B. Pesse, P. Pacher, F. Feihl, B. Waeber, and L. Liaudet, “Peroxynitrite is a major trigger of cardiomyocyte apoptosis *in vitro* and *in vivo*,” *Free Radic Biol Med*, vol. 41, pp. 886–895, 2006.
- [7] L. Sheyhedin, K. Aizawa, M. Araake, H. Kumasaka, T. Okunaka, and H. Kato, “The Effects of Serum on Cellular Uptake and Phototoxicity of Mono-L-Aspartyl Chlorin e6 (NPe6) In Vitro,” *Photochem Photobiol*, vol. 68, pp. 110–114, 1998.



図表

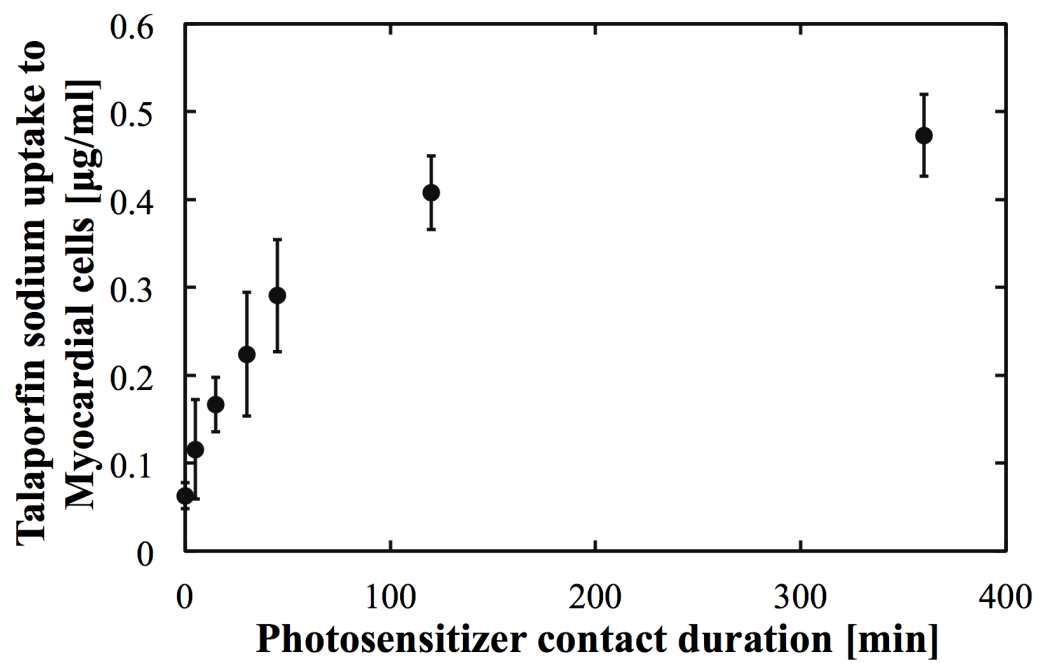


図 8-1 接触時間に伴う心筋細胞内タラポルフィンナトリウム濃度変化

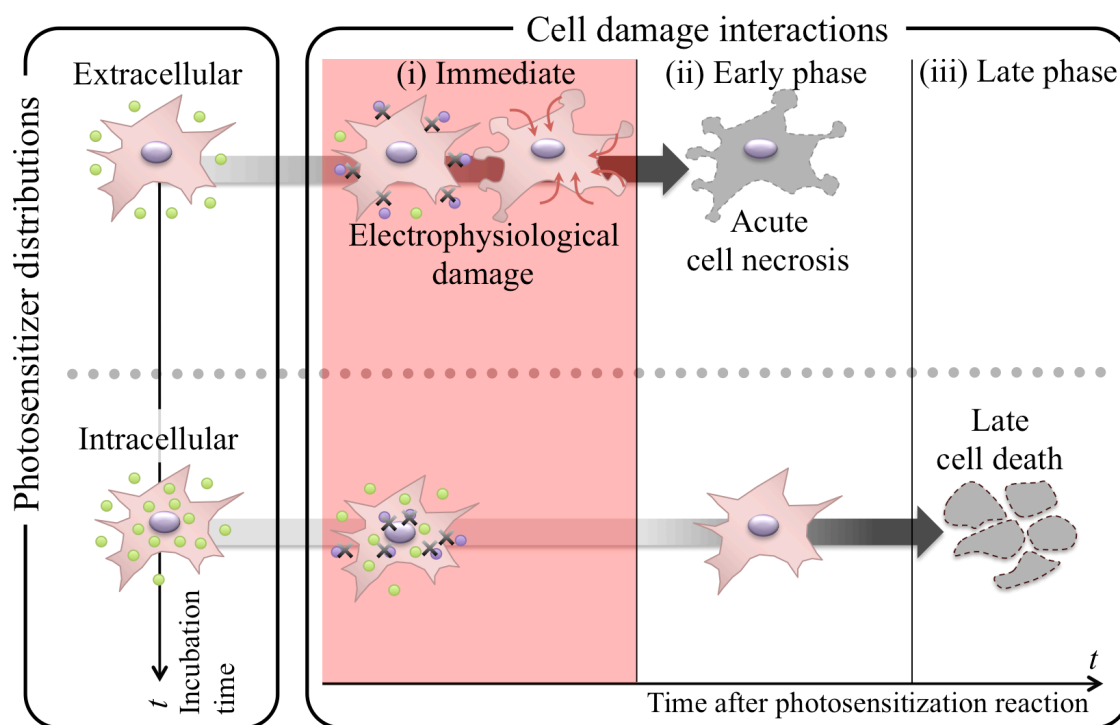


図 8-2 心筋細胞内タラポルフィンナトリウム蓄積に伴う細胞死機構の予想図

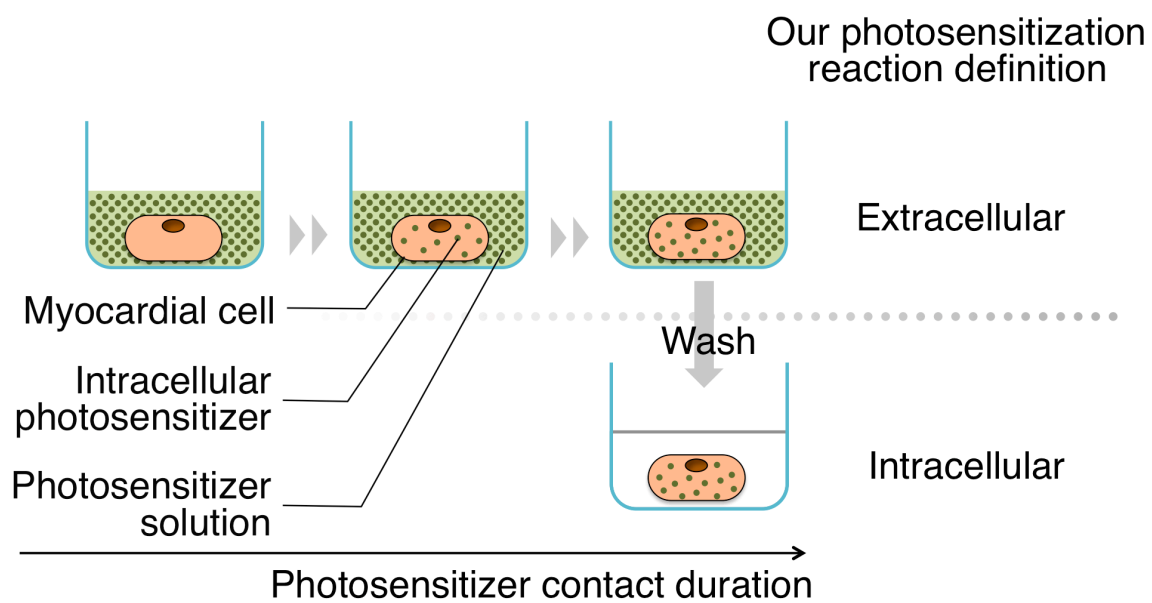


図 8-3 本章の実験方法とそれらにおける薬剤分布場所、細胞内光増感反応および細胞外光増感反応の用語対応

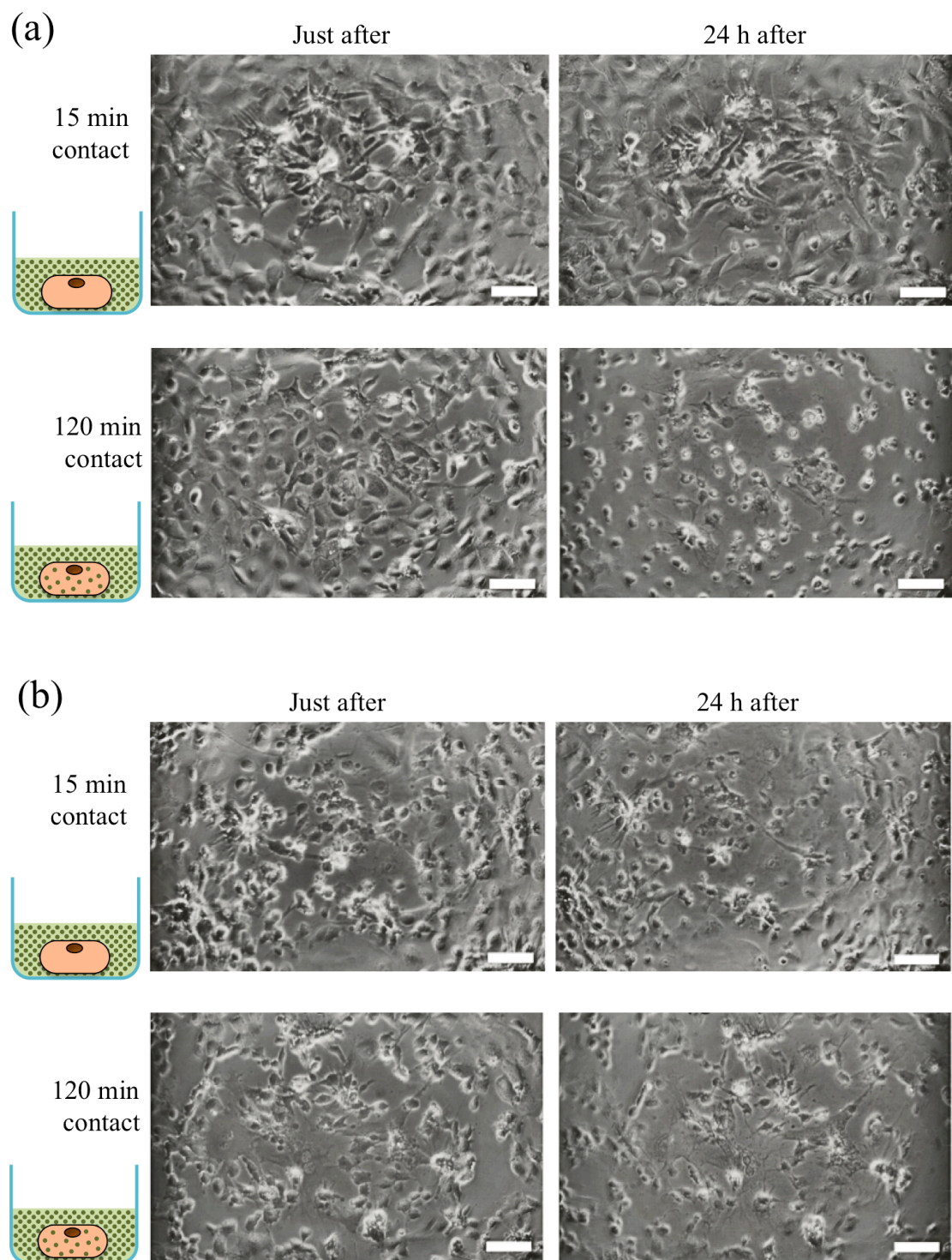


図 8-4 タラポルフィンナトリウム接触時間を変化させたときの、光増感反応直後および 24 h 後の心筋細胞形態

(a) 放射照射量:  $10 \text{ J/cm}^2$

(b) 放射照射量:  $20 \text{ J/cm}^2$

スケールバー:  $100 \mu\text{m}$

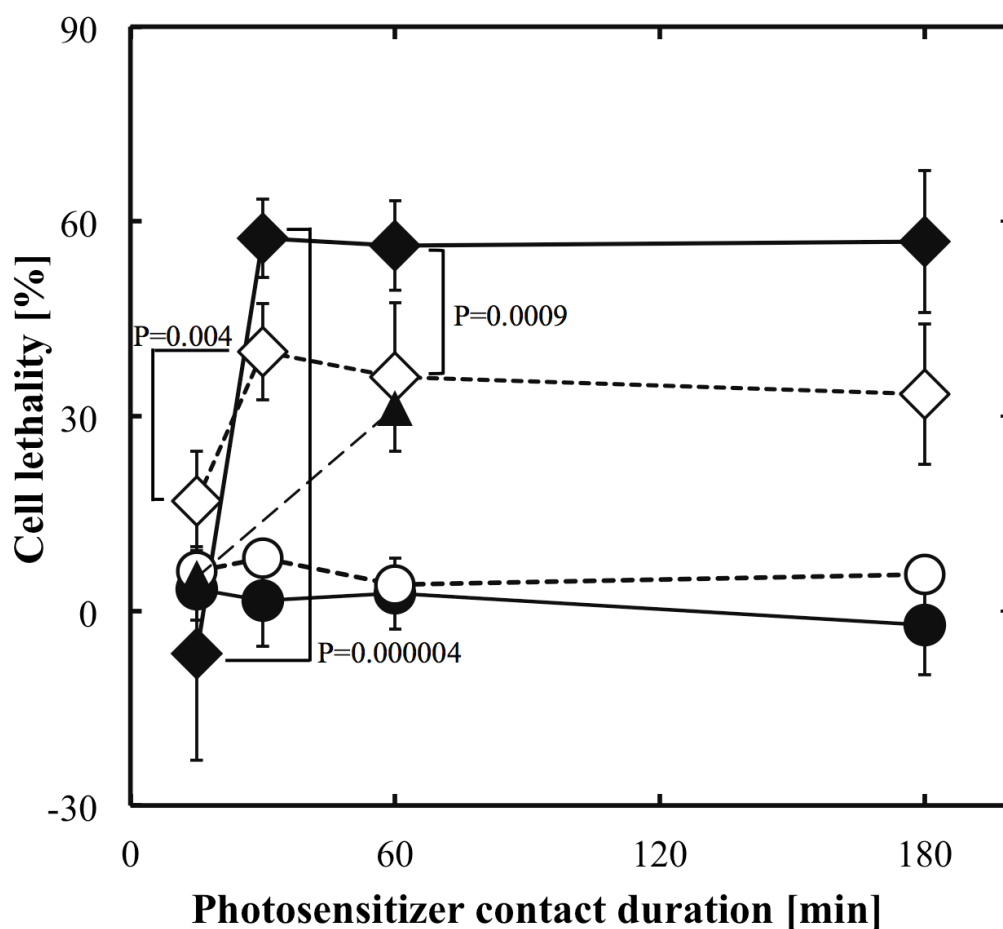


図 8-5 放射照射量  $20 \text{ J/cm}^2$ での細胞内・細胞外光増感反応から 2 h 後および 24 h 後における死細胞率のタラポルフィンナトリウム接触時間依存性

(N=6, t 検定による p 値を表示)

- : 無照射参照群 (タラポルフィンナトリウム接触 2 h 後)
- : 無照射参照群 (タラポルフィンナトリウム接触 24 h 後)
- ◇ : 細胞外光増感反応、放射照射量  $20 \text{ J/cm}^2$  (反応 2 h 後)
- ◆ : 細胞外光増感反応、放射照射量  $20 \text{ J/cm}^2$  (反応 24 h 後)
- ▲ : 細胞内光増感反応、放射照射量  $20 \text{ J/cm}^2$  (反応 24 h 後)

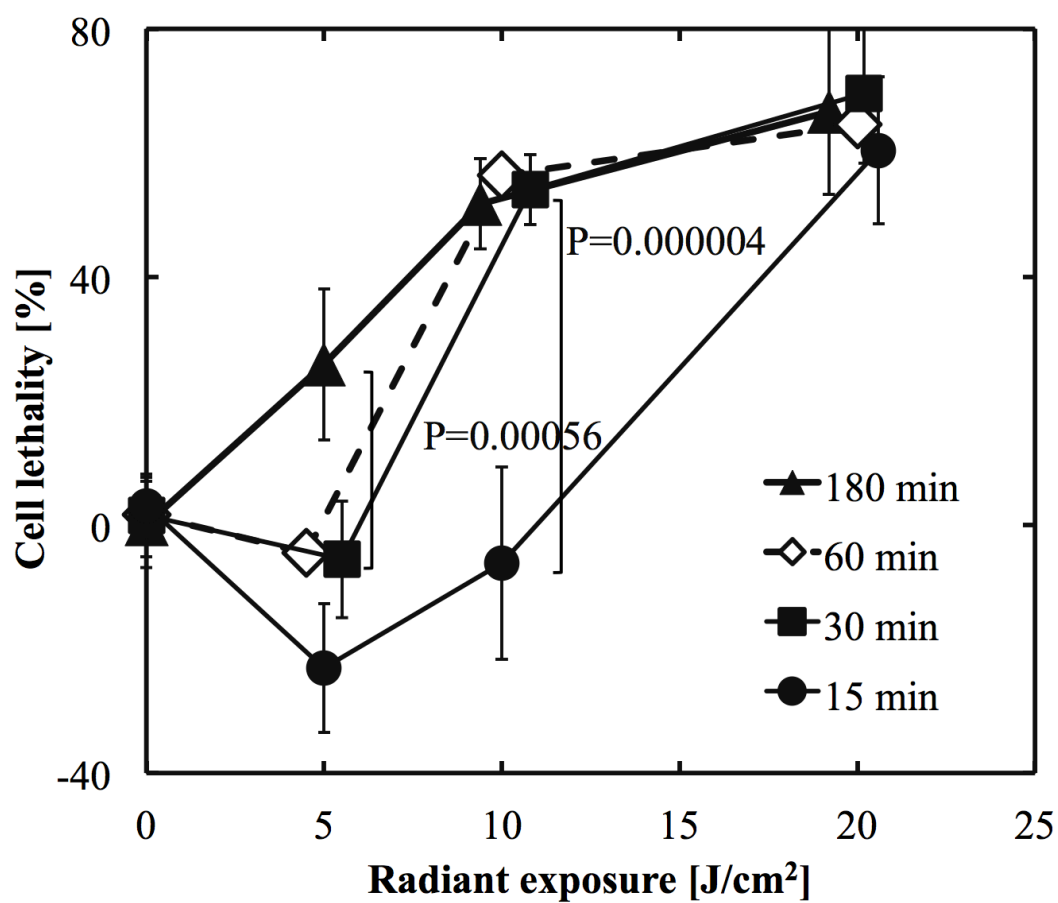


図 8-6 細胞外光増感反応 24 h 後における死細胞率の放射照射量依存性 (N=6, t 検定による p 値を表示, プロットが重畳する部分は横方向にプロットをずらして表示)

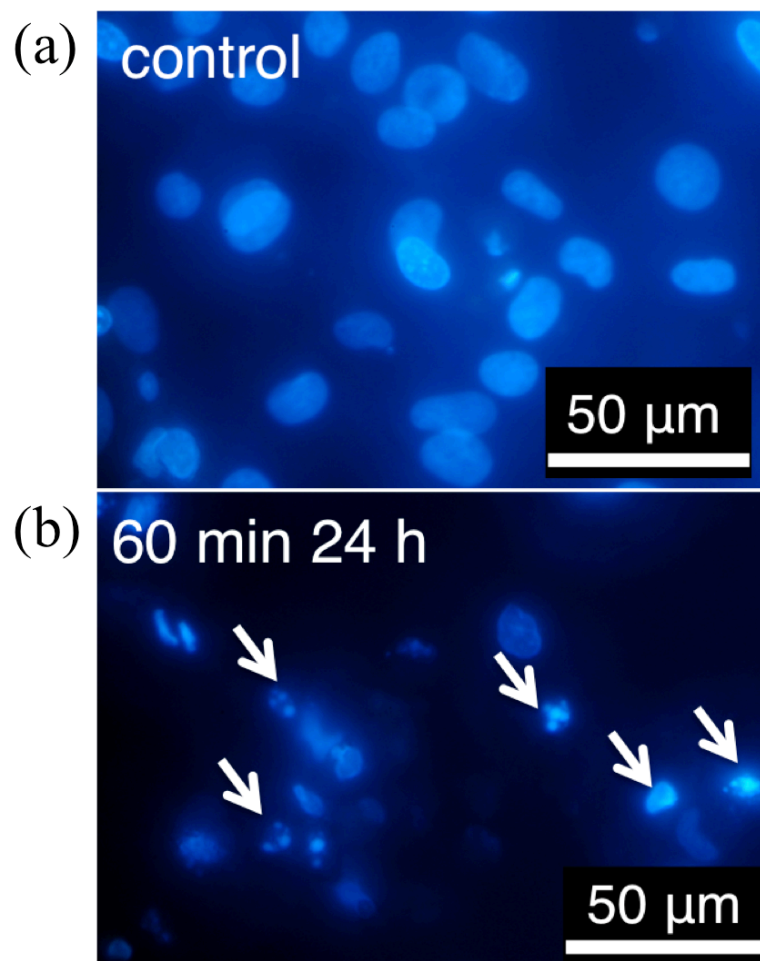


図 8-7 光増感反応前後の心筋細胞核の形態変化

(a) 光増感反応前

(b) 光増感反応 24 h 後

(タラポルフィンナトリウム接触時間 60 min、放射照射量  $20 \text{ J/cm}^2$ )

矢印：核クロマチンの凝集や断片化を生じた心筋細胞核





## 第9章 細胞外光増感反応による心筋細胞障害に関する総括的検討

### 9.1 緒言

著者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 *in vitro* 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特性を明らかにすることで、治療に有効な条件を推定することを目的とし、心筋細胞を用いた基礎実験を行った。本章では、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、本研究を通じて明らかになった実験結果の科学的な新規性や、治療運用における実験結果の拡張議論について総括的に検討する。タラポルフィンナトリウムの投与条件や光照射条件などのパラメーター、治療効果に影響をおよぼす可能性のある反応周囲環境要素について、治療の安全性と有効性を確実なものにする適切な臨床応用条件を検討する。(i) 急性期の細胞電気生理学的障害に対応するのは9.2.2節および9.2.4節、(ii) 亜急性期の細胞壊死に対応するのは9.2.2節、9.2.3節、および9.3.1節、(iii) アポトーシスなどの遅発性細胞死に対応するのは9.3.2節である。

### 9.2 細胞外光増感反応による有効な心筋組織電気伝導遮断を達成する条件

#### 9.2.1 *in vitro* 実験系における反応進行を考慮した定量評価

第6章では、96 ウェルプレートを用いた *in vitro* 実験系における反応速度について調査した。タラポルフィンナトリウムがウェル中に豊富に存在する本研究の実験条件では、溶存酸素の消費が急激に起こるため酸素が光増感反応の律速段階となっていた (6.4.2節参照)。溶存酸素を消費しながら急激に生じる反応の第一段階と、液面からの拡散によって緩やかに続く反応の第二段階では、タラポルフィンナトリウム蛍光強度の減衰速度から、約11倍反応速度が異なることが分かった (6.3.2節参照)。反応の第二段階では、対象とする心筋組織内酸素分圧と同オーダーの酸素分圧環境であるため反応速度は *in vivo* と同程度であると解釈できる (6.6.3節参照)。一方、反応の第一段階では大気と平衡状態にある155 mmHgを初期状態として反応が起こるため、生体内よりも急速な光増感反応が生じると考えられる。本研究では酸素枯渇が生じない放射照度  $0.29 \text{ W/cm}^2$  を採用し、放射照度一定にして照射時間を変化させることで、放射照度と照射時間の積である放射照射量を変化させて調査を行った (6.6.4節参照)。生体内の反応速度はほぼ反応の第二段階に等しいと考えられるから (6.6.3節参照)、反応の第一段階の速い反応を第二段階の遅い反応に置き換えるように換算する。反応の第一段階では第二段階の約11倍の速度で光増感反応が進行していることから、

第一段階の効率を第二段階と同じとして、見かけの放射照射量を第二段階の放射照射量の11倍と表現する。例えば、全体で放射照射量  $20 \text{ J/cm}^2$  の光照射のうち、はじめの  $1 \text{ J/cm}^2$  分の反応の第一段階を第二段階の効率で  $11 \text{ J/cm}^2$  分とし、第二段階の  $19 \text{ J/cm}^2$  分を加え、第二段階の効率で  $30 \text{ J/cm}^2$  の光照射をしたときの反応と換算する。すなわち、*in vitro* の放射照射量  $20 \text{ J/cm}^2$  分の反応は、生体内では  $30 \text{ J/cm}^2$  分の放射照射量が必要であることが分かる。このように、光増感反応の進行が明らかになっている *in vitro* 実験系を用いることで、細胞実験の結果を心筋組織への治療効果推定に拡張することができる。

### 9.2.2 細胞壊死が発生するまでの時間と壊死の発生率

細胞外光増感反応による心筋細胞壊死発生に関して、壊死が発生するまでの時間 (第5章参照) および壊死の発生率 (第6章参照) を明らかにした。タラポルフィンナトリウム濃度と放射照度が高くなるほど壊死が発生するまでの時間は短くなり、放射照射量依存性は見られなかった (5.5.2 節参照)。酸素枯渇のない条件下において、タラポルフィンナトリウム濃度と放射照射量が高くなるほど壊死の発生率は高くなり、放射照度依存性は見られなかった (6.5.2 節参照)。以上の二つの結果から、壊死が発生するためにはある一定の一重項酸素産生総量が必要であることが予想される。タラポルフィンナトリウム濃度一定の条件で考えると、放射照射量によって一重項酸素産生総量が変化することで壊死の発生確率が変化し、一定の必要一重項酸素総量に達するまでの時間は、単位時間当たりの一重項酸素産生量、すなわち放射照度によって変化することが予想される。

### 9.2.3 永続的な電気伝導遮断が達成可能な光増感反応条件の検討

細胞外光増感反応による心筋細胞の殺細胞効果について、放射照度、放射照射量、およびタラポルフィンナトリウム濃度の依存性を明らかにした。使用した 96 ウェルの *in vitro* 実験系において酸素枯渇が生じない放射照度  $0.29 \text{ W/cm}^2$  の条件では、死細胞率はタラポルフィンナトリウム濃度と放射照射量に依存的に変化することが分かった (6.5.2 節参照)。特に、タラポルフィンナトリウム濃度が  $15 \text{ } \mu\text{g/ml}$  以下の条件では本実験で行ったいずれの光照射条件においても殺細胞効果が得られず、細胞外光増感反応による心筋細胞壊死には、タラポルフィンナトリウム濃度に閾値があることが明らかになった (6.5.2 節参照)。タラポルフィンナトリウムを  $40 \text{ mg/m}^2$  静脈注射した 2 h 後に光線力学アブレーションを施行することを想定すると、術中の平均的な血漿中タラポルフィンナトリウム濃度は約  $25 \text{ } \mu\text{g/ml}$  である (図 3-7 参照)。すなわち現行の光線力学的治療に用いられているタラポルフィンナトリウム投与量を用いることで、有効な治療効果を得ることができると考えられる。タラポルフィンナトリウム濃度  $25 \text{ } \mu\text{g/ml}$  では、放射照射量  $20, 40 \text{ J/cm}^2$  のときにそれぞれ死細胞率が約 40, 85% となる (図 6-18 参照)。例えば心筋組織を深さ  $2 \text{ mm}$ 、実効的な減衰係数  $\mu_{\text{eff}}$  を  $1.0 \text{ mm}^{-1}$  とし [1]、心筋組織表面放射照度  $300 \text{ mW/cm}^2$  の光照射を考える。タラポルフィン

ナトリウム濃度は 30  $\mu\text{g/ml}$  のとき心筋組織表面における放射照度 300  $\text{mW/cm}^2$  では約 2 min の光照射で 50%の死細胞率を得ることができると考えられる。深さ 2 mm では放射照度が約 40  $\text{mW/cm}^2$  となり、50%の死細胞率を得るには約 13 min の光照射が必要であると考えられる。このように細胞外光増感反応を用いた光線力学アブレーションでは、現行の光線力学的治療におけるタラポルフィンナトリウム投与条件で有効な治療が実現可能であり、基礎検討結果から治療条件の検討が可能である。実際に *in vivo* の作用検討も報告されている [2, 3]。 *In vivo* では組織レベルでの作用機構が存在するため、必ずしも *in vitro* における死細胞率が 100%の条件が組織壊死を示すものではない。*in vivo* と *in vitro* の結果を比較するときの調整パラメーターが必要になると思われる。

#### 9.2.4 即時的な電気生理学的障害発生の結果を用いた治療運用への拡張

細胞外光増感反応によって、心筋細胞は膜障害やイオンチャネル障害を生じ、拍動が停止し細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  が流入して細胞が膨化することで、即時的な電気生理学的障害を生じる。続いて細胞壊死による永続的な電気伝導遮断が生じる (5.3.2 節参照)。図 5-15(c) に示したように、一度細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇してブレブが発生する場合でも、細胞壊死に至るような急激な輝度の低下とは異なり緩やかに減少しながら再度拍動し始める例が観察された。図 5-16 に示したように、ブレブ発生率は細胞壊死率より高く、ブレブが発生した細胞が必ずしも壊死を起こすとは限らないことが分かった (5.4.2 節参照)。細胞膜やイオンチャネルに障害を生じた心筋細胞が、拍動を停止し一時的に電気生理学的障害を生じたとしても、その後細胞壊死には至らず場合によっては電気伝導性を再び取り戻す可能性が考えられた (5.6.2 節参照)。このような心筋細胞に生じる一過性の電気生理学的障害は、この方法を臨床に適応した場合に電気生理学的判断の有効性に影響をおよぼすものと考えられる。電気生理学的に治療のエンドポイントを決定すると、その後に電気伝導性が戻る恐れがある。すなわち現行法の高周波カテーテルアブレーションでは電気伝導遮断を治療のエンドポイントとしているが、光線力学アブレーションでは、光増感反応総量を以って治療のエンドポイントとする必要がある。このような治療運用法は Cryoballoon と同じであり、Cryoballoon の場合では、一箇所の電気伝導遮断に 3 min の冷却および融解を 2 回ずつ行っている (2.4.3 節参照)。光線力学アブレーションにおいては治療の総量を規定するため、一括固定照射が point-to-point 型の照射よりも適していると考えられる。

*in vitro* 実験において、細胞外光増感反応による心筋細胞壊死が発生するまでの時間を明らかにした (5.5 部参照)。本研究で用いた放射照度 30–290  $\text{mW/cm}^2$ 、タラポルフィンナトリウム濃度 10–30  $\mu\text{g/ml}$  の条件では、細胞壊死が発生するまでの時間は 200–500 s であり、放射照度とタラポルフィンナトリウム濃度によって決まることが分かった。本研究で求められた細胞壊死発生までの時間は、放射照度 290  $\text{mW/cm}^2$  のとき、20 および 30  $\mu\text{g/ml}$  でそれぞれ平均 282 および 259 s であった。心筋組織に照射された励起光の放射照度は心筋組織深

度にもなって減少する。放射照度が低くなるほど細胞壊死発生までの時間が長くなるという結果から、心筋組織厚みに応じて貫壁性の心筋組織壊死を得るまでの時間が変化することを考慮する必要がある。点状に光照射を行う point-to-point テクニックは、現状の高周波アブレーションで1箇所の焼灼が最大1 min であるが、細胞外光増感反応による電気伝導遮断治療をこの方式とすると治療時間が過大になるため適用できないと考えられる。現行の頻脈性不整脈に対する電気伝導遮断治療に用いられるカテーテルアブレーションの中でも、バルーン型や環状型のカテーテルによる環状一括焼灼型のカテーテルでは、一箇所あたりの焼灼所要時間は10–20 min である (2.4.3 節参照)。光線力学アブレーションにおいて環状の一括照射型カテーテルを用いることを想定すると、光照射中に心筋組織壊死による永続的な電気伝導遮断を起し、治療とその診断を行える性能を十分に有していることが分かった (5.5.2 節参照)。例えば心筋組織を厚み 2 mm、実効的な減衰係数  $\mu_{\text{eff}}$  を  $1.0 \text{ mm}^{-1}$  とし [1]、心筋組織表面放射照度  $300 \text{ mW/cm}^2$  の光照射を考える。心筋組織表面における放射照度  $300 \text{ mW/cm}^2$  では約 5 min で細胞壊死が生じる。深さ 2 mm では放射照度が約  $40 \text{ mW/cm}^2$  となり、約 8 min で細胞壊死が生じると考えられる。

### 9.3 細胞外光増感反応による心筋組織電気伝導遮断の安全性

#### 9.3.1 タラポルフィンナトリウムの血清蛋白結合による細胞外光増感反応の効果

第7章では細胞外光増感反応による障害効果について、血清蛋白結合による影響を調査した (7.3 節参照)。温度変化による血清蛋白結合率への影響とそれに伴った殺細胞効果への影響は、 $17^\circ\text{C}$  から  $37^\circ\text{C}$  への温度上昇によって死細胞率で 20–30% 程度であることが明らかになった (7.5.2 節参照)。光線アブレーションにおける心筋組織に対する赤色レーザー照射によって、心筋組織や血液に吸収された光による温度上昇が生じる可能性がある。想定している運用の放射照度は、カテーテル先端で数百  $\text{mW/cm}^2$  である。心筋組織内の温度上昇は、断熱仮定下で厚み 1 mm、面積  $1 \text{ cm}^2$  の領域において、組織の吸収係数、比熱、比重をそれぞれ  $0.12 \text{ mm}^{-1}$ 、4.2、1.0、心筋組織表面での放射照射量照度を  $300 \text{ mW/cm}^2$  と仮定すると、 $8.0 \times 10^{-2} \text{ }^\circ\text{C/s}$  と見積もることができる。よって、光線力学アブレーションで想定している組織温度上昇では治療効果に与える影響を無視できることが分かった (7.6.4 節参照)。外科的アブレーションや外科手術においては、開胸により組織表面の温度が約  $30^\circ\text{C}$  程度まで低下することが予想される [4]。これらの状況では、光増感反応効率が低下しないようにするため、対象とする組織温度を保持することが必要だと考えられる。

アルブミンとタラポルフィンナトリウムの間のモル濃度比が 0.3–1.2 を境にアルブミンが増えるほど殺細胞効果が急激に減少することが明らかになった。図 9-1 にアルブミンと溶液温度による治療効果変化の模式図を示す。肝硬変などに伴う低アルブミン血症などでは、血中のアルブミン濃度が  $35 \text{ mg/ml}$  を下回る [5]。このような血中アルブミン濃度の低下に伴い、間質中でもアルブミン濃度が低下することが予想される。タラポルフィンナトリウ

ム濃度は投与後の時間変化に伴って変化し、その変化は個人の代謝能などにより差が生じる。治療効果を大きく左右するアルブミンとタラポルフィンナトリウムのモル濃度比は、タラポルフィンナトリウムの吸収ピーク波長シフトで測定できる。カテーテル運用下において吸収ピーク波長の解析から正確なアルブミンとタラポルフィンナトリウムのモル濃度比を算出し、濃度比に伴った細胞障害効率による補正を行うことで安全で安定した治療が実現可能であると考えられる。

一方で、血中のアルブミン濃度は40–50 mg/mlで、血管内で生じる光増感反応はその障害効率が低くなるため、血管内皮障害が生じる可能性は低いと考えられる。内皮細胞が障害されないことによって、(i) 高周波カテーテルアブレーションにおいて問題であった浮腫発生が生じないこと (2.4.2 節参照) [6]、(ii) 血栓形成による血管閉塞が生じないこと、の2つが利点となる。大型動物を用いたカテーテルインターベンション実験における急性期および慢性期の病理標本から、血管が開存していることが確かめられている [6, 7]。血管が開存していることで壊死を生じた心筋組織にマクロファージが到達しやすいため、繊維化までの時間も短く遮断治療の完成が速やかに達成されると予想できる。通常の悪性腫瘍に対する光線力学的治療は安定まで1–2ヶ月を要するが [8]、光線力学アブレーションでは治療後に状態が安定するまでの期間、すなわちフォローアップ期間を高周波アブレーションより短縮できる可能性が高い。

### 9.3.2 タラポルフィンナトリウム蓄積量による遅発性細胞障害領域拡大

第8章では心筋細胞へのタラポルフィンナトリウム蓄積量と、それに伴う亜急性および遅発性細胞死障害について明らかにした。心筋細胞へのタラポルフィンナトリウムの蓄積量は接触時間の増加に伴って単調増加した (8.2.2 節参照)。特に蓄積されたタラポルフィンナトリウムの増加が急激であったのは接触時間60 min以下であり、120 min以降は増加がなだらかになり、飽和傾向を示した。このタラポルフィンナトリウム蓄積に伴う、遅発性細胞死発生の条件が明らかになった。10 J/cm<sup>2</sup>の光照射の場合には接触時間30 min以上で発性細胞死が生じた。細胞内のタラポルフィンナトリウム濃度に換算すると、0.17 µg/ml以下では遅発性細胞死が生じないことが分かった (8.5.2 節参照)。本論文における実験では、ウェル内に培養した心筋細胞をタラポルフィンナトリウムに接触させ始めた時点をも0 minとして接触時間を計測している。臨床応用を想定すると、タラポルフィンナトリウムは静脈注射後血中に高濃度で分布し連続的に排泄されつつ血液中を循環する。循環しているタラポルフィンナトリウムは徐々に血液から血管壁を介して間質液中へと移行し、さらに細胞内に蓄積する。このように臨床では細胞外のタラポルフィンナトリウム濃度は今回行った *in vitro* 実験と異なり、細胞周囲の濃度零から徐々に上昇すると考えられる。*in vivo* における間質液中タラポルフィンナトリウム濃度推移については、報告例がなく、本研究でも計測を実施していない。与えられた細胞外タラポルフィンナトリウム濃度において実験により

得られた心筋細胞への蓄積特性、および遅発性細胞死発生に対する細胞内タラポルフィンナトリウム濃度閾値が明らかになったことから、ヒトの間質中タラポルフィンナトリウム濃度の時間変化が明らかになれば、遅発性細胞死による障害領域拡大を正確に検討することができると思われる。

#### 9.4 本研究の limitation

(i) 実験に用いたのは健常なラット心筋細胞のみであり、ヒト心筋細胞あるいは、心房細動の心房筋細胞では結果が異なる可能性がある。(ii) 実験に用いたアルブミンは主にウシ胎児血清であり、動物種によってアルブミンの結合サイトなどに差異があるため、ヒトアルブミンと結合した場合は結果が異なる可能性がある。(iii) *in vitro* 実験系と *in vivo* 組織中の反応環境を比較すると、酸素供給速度や周囲のタラポルフィンナトリウム総量などが異なる可能性がある。

#### 9.5 検討の総括

表 9-1 に臨床応用における要求と本研究を通じて明らかになった知見、および総括的な検討の結果導かれた提案をまとめた。(i) 本研究で対象とした細胞外光増感反応は、即時的な電気伝導遮断に対応する急性期の細胞電気生理学的障害の観点において、頻脈性不整脈への治療応用性があることが分かった。(ii)-a 永続的な電気伝導遮断に対応する亜急性期の細胞壊死について、タラポルフィンナトリウム濃度の観点から現状の投与量における治療の有効性が分かった。(ii)-b アルブミン濃度の高い血管中では光増感反応による障害効率が低いため、血管が保護される可能性が分かった。(ii)-c 温度変化による観点からは光線力学アブレーションの照射による温度変化が治療へ与える影響は無視できることが分かった。(iii) アポトーシスなどの遅発性細胞死について、心筋細胞内への蓄積量が  $0.17 \mu\text{g/ml}$  以下であれば治療域の拡大が生じないことが分かった。

#### 9.6 結言

光増感反応の進行を調査した *in vitro* 実験系において、ラット心筋細胞に対する細胞外光増感反応による即時的電気生理学的障害、亜急性細胞死障害、遅発性細胞死障害を調査から、光線力学アブレーションにおける治療の有効性と安全性に関して総括的に検討した。頻脈性不整脈に対する光線力学アブレーションを実現するにあたって有効かつ安全な治療効果を得られる光増感反応条件について明らかにした。

## 参考文献

- [1] A. Ito, S. Miyoshi, T. Kimura, S. Takatsuki, K. Fukumoto, K. Fukuda, and T. Arai, "Myocardial electrical conduction block induced by photosensitization reaction in exposed porcine hearts *in vivo*," *Lasers Surg Med*, vol. 43, pp. 984–990, 2011.
- [2] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, M. Takahashi, E. Ogawa, Y. Katsumata, T. Nishiyama, Y. Tanimoto, Y. Aizawa, T. Arai, and K. Fukuda, "Optimal conditions for cardiac catheter ablation using photodynamic therapy," *Europace*, p. euu335, 2015.
- [3] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, M. Takahashi, E. Ogawa, K. Nakajima, S. Kashimura, Y. Katsumata, T. Nishiyama, N. Nishiyama, Y. Tanimoto, Y. Aizawa, T. Arai, and K. Fukuda, "Electrical superior vena cava isolation using photodynamic therapy in a canine model," *Europace*, p. euv016, 2015.
- [4] Molnar GW and Read RC, "Studies during open-heart surgery on the special characteristics of rectal temperature," *J Applied Physiology*, vol. 36(3), pp. 333–336, 1974.
- [5] J. Y. Yeun, R. A. Levine, V. Mantadilok, and G. A. Kaysen, "C-reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 35, pp. 469–476, 2000.
- [6] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, K. Fukumoto, M. Takahashi, E. Ogawa, A. Ito, T. Arai, S. Ogawa, and K. Fukuda, "Nonthermal cardiac catheter ablation using photodynamic therapy," *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 6, pp. 1025–1031, 2003.
- [7] M. Takahashi, A. Ito, T. Kimura, S. Takatsuki, K. Fukuda, and T. Arai, "Myocardial necrosis depth prediction during extracellular photosensitization reaction of talaporfin sodium by defined index using fluorescence measurement," *Lasers Med Sci*, vol. 29, pp. 1173–1181, 2013.
- [8] T. Sitnik, J. Hampton, and B. Henderson, "Reduction of tumour oxygenation during and after photodynamic therapy *in vivo*: effects of fluence rate," *British journal of cancer*, vol. 77, p. 1386, 1998.

図表

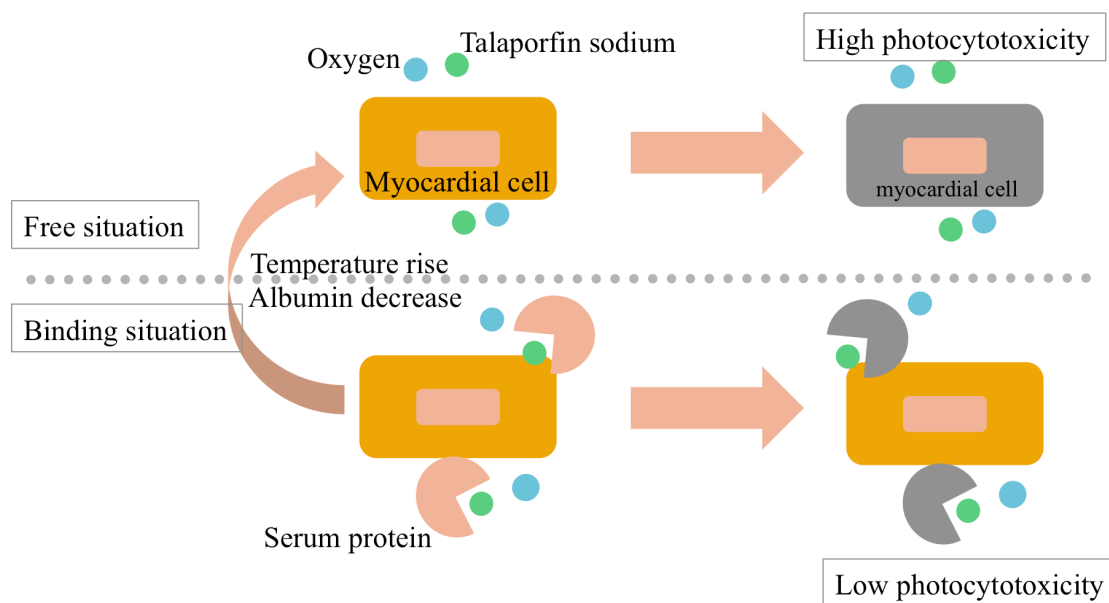


図 9-1 アルブミンと溶液温度による治療効果変化の模式図



表 9-1 臨床応用における要求、本研究を通じて明らかになった知見、および総括的な検討による提案

Factor	Clinical requirement	In vivo situation	Finding	Suggestion
<b>(i) Immediate response</b>				
Photosensitizer concentration	• 10-20 min/ablation to realize judgment by electrophysiological diagnosis	-	• Immediate cell death occurrence of 300-500 s (30 µg/ml, 30-290 mW/cm <sup>2</sup> )	• Applicable for arrhythmia ablation
Albumin concentration	-	• 25-30 µg/ml 0-6 h after i. v. (40 mg/m <sup>2</sup> )	• Photocytotoxicity over 15 µg/ml in photosensitizer concentration (10-40 J/cm <sup>2</sup> )	• Effective as treatment performance
Temperature	-	• 40-50 mg/ml in blood • Not reported in myocardium interstitial space	• Drastic change in photocytotoxicity between 0.65-15 mg/ml in albumin concentration	• Vessel protection by photocytotoxicity efficiency decrease with high albumin concentration in blood
Late cell death caused by uptake	-	• Negligible temperature rise in photodynamic ablation	• About 30% cell lethality increasing with temperature rise of 20°C	• Negligible in photodynamic ablation
<b>(iii) Late cell death</b>				
Irradiation	-	• Not investigated pharmacokinetics in interstitial space	• No late cell death under 0.17 µg/ml in intracellular photosensitizer concentration	-
All	-	• Controllable	• Linear dependence on radiant exposure over 15 µg/ml in photosensitizer concentration	• Controllable treatment by laser irradiation



## 第 10 章 結論

本論文では、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 *in vitro* 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した。第 2 章では心臓の拍動原理および代表的な心房性頻脈性不整脈である心房細動の病態と、現行の治療法であるカテーテルアブレーションについてその歴史、近年の開発動向、課題を述べた。第 3 章では光増感反応の基礎的な原理と、治療応用されている細胞内光増感反応による光線力学的治療、細胞外光増感反応を用いた治療についてまとめた。第 4 章では、細胞外光増感反応を応用した光線力学アブレーションによる頻脈性不整脈治療の提案と、治療原理、運用構想、開発の現状について説明した。新しい原理を用いた治療法を実現するにあたって、安全かつ有効な運用のために必要な基礎的検討をまとめた。細胞外光増感反応では光感受性薬剤が心筋組織間質液中あるいは血中に分布した状態で光照射を行うことで、即時的かつ永続的な電気伝導遮断を行う。安全性と有効性を評価するために、著者は術中にあたる即時的な電気生理学的障害、永続的な治療効果にあたる亜急性期細胞死障害、慢性期の障害領域拡大にあたる遅発性細胞死障害の研究に取り組んだ。第 5 章では即時的な電気生理学的障害について明らかにした。ブレイブが発生した細胞の一部が細胞壊死に至ることが分かった。細胞外光増感反応によって生じる心筋細胞壊死の発生は、放射照射量が  $30\text{-}290\text{ mW/cm}^2$ 、タラポルフィンナトリウム濃度が  $10\text{-}30\text{ }\mu\text{g/ml}$  の範囲において、 $200\text{-}500\text{ s}$  の間で生じ、一重項酸素産生速度に依存することが明らかになった。細胞壊死発生までの時間は一重項酸素の産生速度によって決定されることが示唆された。第 6 章では亜急性細胞死障害の生じる光増感反応条件を明らかにするため、タラポルフィンナトリウム濃度、放射照度、および放射照射量を幅広く変化させて死細胞率を測定した。放射照射量  $10\text{-}40\text{ J/cm}^2$  において光感受性薬剤濃度が約  $15\text{ }\mu\text{g/ml}$  以上の条件で有効な細胞障害効果を得られることを明らかにした。*in vitro* 実験を行う実験系における結果から定量的に *in vivo* 運用条件を考察するために、96 ウェルプレートを用いた *in vitro* 実験系における光増感反応の進行を明らかにした。96 ウェルプレートを用いた *in vitro* 実験系においては、酸素が律速段階となっており、液面からの拡散による供給によって光増感反応が連続的に起こり、酸素分圧が生体内とほぼ同程度であった。これらの実験結果より臨床条件を検討することができる。第 7 章では、細胞外光増感反応による心筋細胞障害効果に影響をおよぼすと考えられる血清蛋白結合について調査を行った。血中や組織間質中には光感受性薬剤と高い結合率を示す血清蛋白が多く存在するため、結合率によって光増感反応による障害効果の効率が大きく変化する可能性がある。吸収分光による結合率のアルブミン濃度依存性と、それに伴った殺細胞効果を死細胞率測定によって明らかにし、タラポルフィンナトリウムに対するアルブミンのモル濃度比が  $0.3\text{-}1.2$  を境にして、アルブミン濃度が上昇すると殺細胞効果が大幅に減少することが明

らかになった。第 8 章では、慢性期における障害領域拡大にあたる遅発性細胞死障害の発生と、その原因となる心筋細胞内へのタラポルフィンナトリウム蓄積量について明らかにした。心筋細胞内へのタラポルフィンナトリウム蓄積量は接触開始から約 60 min 後まで急激に上昇し、その後飽和傾向になった。光増感反応 2 h 後から 24 h 後にかけて上昇した死細胞率から遅発性細胞死障害の発生について検討したところ、放射照射量  $10 \text{ J/cm}^2$  の条件において、タラポルフィンナトリウムとの接触時間が 15 min と 30 min の間で死細胞率変化があることが明らかになった。このことから、細胞内タラポルフィンナトリウム濃度が  $0.17 \mu\text{g/ml}$  以下の条件においては、遅発性細胞死障害による慢性期の障害領域拡大の危険性が無いことが分かった。第 9 章では細胞外光増感反応による光線力学アブレーションの実現に向けて第 5 章から第 8 章で得られた知見により、安全かつ有効な治療運用条件について考察を行った。(i) 本研究で対象とした細胞外光増感反応は、即時的な電気伝導遮断に対応する急性期の細胞電気生理学的障害の観点において、頻脈性不整脈への治療応用性があることが分かった。(ii)-a 永続的な電気伝導遮断に対応する亜急性期の細胞壊死について、タラポルフィンナトリウム濃度の観点から現状の臨床投与量 ( $40 \text{ mg/m}^2$ ) における治療の有効性が示唆された。(ii)-b アルブミン濃度の高い血管中では光増感反応による障害効率が低いため、血管が保護される可能性が分かった。(ii)-c 温度変化による観点からは光線力学アブレーションの光照射による温度変化が治療へ与える影響は無視できると思われた。(iii) アポトーシスなどの遅発性細胞死について、心筋細胞内へのタラポルフィンナトリウム蓄積量が  $0.17 \mu\text{g/ml}$  以下であれば治療域の拡大が生じないことが示唆された。

以上要するに本研究で明らかにした細胞外光増感反応による心筋細胞の障害効果に関する知見により臨床応用の運用条件を検討することができ、新しい治療法を実現するために有用であると考えられる。

## 付録

### A 用語および略語説明

#### A.1 光照射および光計測に関する用語および記号説明

##### A.1.1 用語説明

本論文では、光照射条件は以下に定義する Irradiance および Radiant exposure を用いて表記した。光生物学および光化学の分野における光照射および光計測に関する用語について、国際照明委員会 (International Commission on Illumination; CIE) の推奨する定義を示す [1]。これらの日本語表記は文献 [2, 3] を参考に、放射照度 (Irradiance)、放射照射量 (Radiant exposure)、と定義した。単位は SI 単位系ではなく慣用表現を用いた。本論文中において放射照度および放射照射量は、放射ビーム断面における平均値を記載した。

用語	定義
放射照度 [ $\text{W}/\text{cm}^2$ ]	ある面に対して単位面積あたり垂直に入射する、単位時間に伝播する光エネルギーの量
放射照射量 [ $\text{J}/\text{cm}^2$ ]	放射照度の時間積分値

##### A.1.2 記号説明

Symbol	Definition	Unit
$\mu_a$	吸収係数 (Absorption coefficient)	$\text{mm}^{-1}$
$\mu_s$	散乱係数 (Scattering coefficient)	$\text{mm}^{-1}$
$\mu_s'$	等価散乱係数 (Reduced scattering coefficient)	$\text{mm}^{-1}$
$\mu_{eff}$	減衰係数 (Attenuation coefficient)	$\text{mm}^{-1}$
$T$	透過率 (Transmittance)	%
$E$	モル吸光係数 (Molar absorption coefficient)	$\text{M m}^{-1}$
$\Phi_\Delta$	一重項酸素産生収率 (Quantum yield of singlet oxygen generation)	-

## A.2 心房性頻脈性不整脈に関する略語説明

<b>Abbreviation</b>	<b>Definition</b>
A Fib	心房細動 (Atrial fibrillation)
A Fl	心房粗動 (Atrial flutter)
RA	右心房 (Right atrium)
RV	右心室 (Right ventricle)
LA	左心房 (Left atrium)
LV	左心室 (Left ventricle)
PV	肺静脈 (Pulmonary vein)
LSPV	左上肺静脈 (Pulmonary vein)
LIPV	左下肺静脈 (Pulmonary vein)
RSPV	右上肺静脈 (Pulmonary vein)
RIPV	右下肺静脈 (Pulmonary vein)
SVC	上大静脈 (Superior vena cava)
IVC	下大静脈 (Inferior vena cava)
CS	冠状静脈洞 (Coronary sinus)
TV	三尖弁 (Tricuspid valve)
TA	三尖弁輪 (Tricuspid annulus)

## 参考文献

- [1] D. H. Sliney, “Radiometric quantities and units used in photobiology and photochemistry: Recommendations of the Commission International de l’Eclairage (International Commission on illumination),” *Photochem Photobiol*, vol. 83, pp. 425–432, 2007.
- [2] S. E. Braslavsky, “Glossary of terms used in photochemistry 3rd Edition (IUPAC recommendations 2006),” *Pure Appl Chem*, vol. 79, pp. 293–465, 2007.
- [3] E. R. Cohen, T. Cvitas, J. G. Frey, B. Holmstrom, K. Kuchitsu, R. Marquardt, I. Mills, F. Pavese, M. Quack, J. Stohner, H. L. Strauss, M. Takami, and A. J. Thor, 物理化学で用いられる量・単位・記号, 日本化学会監修, 産業技術総合研究所計量標準総合センター訳, 東京: 講談社サイエンティフィク, 2007, pp. 41–47.





## 著者論文目録

## 1 原著論文

## 1.1 本研究に関連する論文

- (1) E. Ogawa, A. Ito, and T. Arai, “Detailed *in vitro* study of the photosensitization reaction of extracellular talaporfin sodium in rat myocardial cells” *Lasers Surg Med*, vol. 45, pp. 660–667, 2013.
- (2) E. Ogawa, S. Motohashi, and T. Arai, “Effects of albumin binding on photocytotoxicity of extracellular photosensitization reaction using talaporfin sodium to rat myocardial cells,” *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 12, pp. 252–257, 2015.
- (3) E. Ogawa, N. Machida, A. Ito, and T. Arai, “Comparison of myocardial cell lethality 2 hours and 24 hours after extracellular talaporfin sodium-induced photosensitization reaction” *Photodiagnosis Photodyn Ther*, accepted for publication on 19 June 2015.

## 1.2 その他の論文

- (1) T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, M. Takahashi, E. Ogawa, Y. Katsumata, T. Nishiyama, Y. Tanimoto, Y. Aizawa, T. Arai, and K. Fukuda, “Optimal conditions for cardiac catheter ablation using photodynamic therapy,” DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/europace/euu335>, *Europace*, accepted 17 October 2014.
- (2) T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, M. Takahashi, E. Ogawa, K. Nakajima, S. Kashimura, Y. Katsumata, T. Nishiyama, N. Nishiyama, Y. Tanimoto, Y. Aizawa, T. Arai, and K. Fukuda, “Electrical superior vena cava isolation using photodynamic therapy in a canine model,” DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/europace/euv016>, *Europace*, accepted 22 January 2015.

## 1.3 国際会議論文（査読付きの full-length papers）

- (1) E. Ogawa, M. Takahashi, and T. Arai, “Study of photosensitization reaction progress in a 96 well plate with photosensitizer rich condition using Talaporfin sodium,” *Proc SPIE*, vol. 8579, pp. 85790D-1–6, 2013.
- (2) M. Takahashi, E. Ogawa, S. Motohashi, T. Nakamura, H. Kawakami, N. Machida, A. Ito, T. Kimura, S. Takatsuki, K. Fukumoto, S. Miyoshi, K. Fukuda, and T. Arai, “Electrophysiological and histological effects on canine right atrium by photosensitization reaction under catheterization *in vivo*,” *Proc SPIE*, vol. 8565, pp. 85654A-1–6, 2013.
- (3) E. Ogawa, M. Takahashi, A. Ito, and T. Arai, “Extracellular photosensitization reaction progress and effect on myocardial cell necrosis for arrhythmia treatment application,” *Proc OSA-SPIE*,

- vol. 8803, pp. 88030K-1-4, 2013.
- (4) H. Kawakami, E. Ogawa, M. Takahashi, A. Ito, and T. Arai, “Detection of singlet oxygen luminescence generated in photosensitization reaction excited by CW laser *in vitro*,” *Proc OSA-SPIE*, vol.8798, pp. 879815-1-4, 2013.
  - (5) E. Ogawa, M. Takahashi, A. Ito, and T. Arai, “Immediate response of  $Ca^{2+}$  concentration in myocardial cells against oxidation stress by extracellular photosensitization reaction using Talaporfin sodium for the arrhythmia treatment application,” *Proc SPIE*, vol. 8941, pp. 89410U-1-7, 2014.
  - (6) M. Takahashi, E. Ogawa, T. Nakamura, H. Kawakami, N. Machida, M. Yajima, M. Kurotsu, A. Ito, T. Kimura, and T. Arai, “Prediction of myocardial damage depth induced by extracellular photosensitization reaction using fluorescence measurement *in vivo*,” *Proc. SPIE*, vol. 8926, pp. 89262X-1-7, 2014.
  - (7) M. Kurotsu, T. Nakamura, M. Takahashi, E. Ogawa, and T. Arai, “Comparison of human serum and bovine serum albumins on oxidation dynamics induced by talaporfin sodium photosensitization reaction with albumin rich conditions: solution experiments,” *Proc. SPIE*, vol. 8941, pp. 89410F-1-6, 2014.
  - (8) M. Yajima, H. Kawakami, E. Ogawa, M. Takahashi, and T. Arai, “Photosensitization reaction along depth of a culture well with high concentration of talaporfin sodium for extra-cellular photodynamic therapy study,” *Proc. SPIE*, vol. 8941, pp. 89410V-1-6, 2014.
  - (9) M. Shinozuka, N. Shimazaki, E. Ogawa, N. Machida, and T. Arai, “Acute cell death rate of vascular smooth muscle cells during or after short heating up to 20 s ranging 50 to 60° C as a basic study of thermal angioplasty,” *Proc. SPIE*, vol. 8941, pp. 89410L-1-6, 2014.
  - (10) E. Ogawa, A. Ito, and T. Arai, “Immediate response and cytotoxicity effect on myocardial cells by extracellular photosensitization reaction varying irradiance” *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, vol. 2014, pp. 5316-5319, 2014.
  - (11) M. Kurotsu, E. Ogawa, and T. Arai “Conduction block in novel cardiomyocyte electrical conduction line by photosensitization reaction” *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, vol. 2014, pp. 4787-4790, 2014.
  - (12) E. Ogawa, S. Motohashi, and T. Arai “Cytotoxicity change with albumin binding of talaporfin sodium in extracellular photosensitization reaction on cardiomyocyte” *Proc SPIE*, vol. 9321, pp. 93210I-1-4, 2015.
  - (13) M. Kurotsu, E. Ogawa, and T. Arai “Time response of electrical conduction block in novel cardiomyocyte wire by extra-cellular photosensitization reaction at various irradiances” *Proc SPIE*, pp. 93210N-1-5, 2015.

## 2 学会

### 2.1 国際会議発表

- (1) E. Ogawa, M. Takahashi, and T. Arai, “Study of photosensitization reaction progress in a 96 well plate with photosensitizer rich condition using Talaporfin sodium,” *SPIE BiOS2013* (San Francisco, USA, 2013.2.4).
- (2) M. Takahashi, E. Ogawa, S. Motohashi, T. Nakamura, H. Kawakami, N. Machida, A. Ito, T. Kimura, S. Takatsuki, K. Fukumoto, S. Miyoshi, K. Fukuda, and T. Arai, “Electrophysiological and histological effects on canine right atrium by photosensitization reaction under catheterization *in vivo*,” *SPIE BiOS2013* (San Francisco, USA, 2013.2.2).
- (3) E. Ogawa, M. Takahashi, A. Ito, and T. Arai, “Extracellular photosensitization reaction progress and effect on myocardial cell necrosis for arrhythmia treatment application,” *European Conference on Biomedical Optics (ECBO 2013)* (Munich, Germany, 2013.5.15).
- (4) M. Takahashi, E. Ogawa, A. Ito, and T. Arai, “Estimation of photosensitization-induced myocardial damage depth by a talaporfin sodium fluorescence measurement via a laser catheter,” *European Conference on Biomedical Optics (ECBO 2013)* (Munich, Germany, 2013.5.15).
- (5) H. Kawakami, E. Ogawa, M. Takahashi, A. Ito, and T. Arai, "Detection of singlet oxygen luminescence generated in photosensitization reaction excited by CW laser *in vitro*," *European Conference on Biomedical Optics (ECBO 2013)* (Munich, Germany, 2013.5.15).
- (6) E. Ogawa, M. Takahashi, A. Ito, and T. Arai, “Myocardial cell necrosis and reaction progress of extracellular photosensitization reaction *in vitro*,” The 14th world congress of the International Photodynamic Association (IPA 2013) (Seoul, the Republic of Korea, 2013. 5.28–31)
- (7) M. Takahashi, E. Ogawa, A. Ito, T. Kimura, S. Takatsuki, K. Fukumoto, S. Miyoshi, K. Fukuda, and T. Arai, “Electrophysiological effect on canine myocardium after photosensitization reaction *in vivo*,” *The 14th world congress of the International Photodynamic Association (IPA 2013)* (Seoul, the Republic of Korea, 2013. 5.28–31).
- (8) M. Takahashi, E. Ogawa, A. Ito, T. Kimura, S. Takatsuki, K. Fukumoto, S. Miyoshi, K. Fukuda, and T. Arai, “Electrophysiological effect on canine myocardium after photosensitization reaction *in vivo*,” The 14th world congress of the International Photodynamic Association (IPA 2013) (Seoul, the Republic of Korea, 2013. 5.28–31)
- (9) E. Ogawa, M. Takahashi, A. Ito, and T. Arai, “Immediate response of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in myocardial cells against oxidation stress by extracellular photosensitization reaction using Talaporfin sodium for the arrhythmia treatment application,” *SPIE BiOS 2014* (San Francisco, USA, 2014.2.4).
- (10) M. Takahashi, E. Ogawa, T. Nakamura, H. Kawakami, N. Machida, M. Yajima, M. Kurotsu, A.

- Ito, T. Kimura, and T. Arai, "Prediction of myocardial damage depth induced by extracellular photosensitization reaction using fluorescence measurement *in vivo*," *SPIE BiOS 2014* (San Francisco, USA, 2014.2.1).
- (11) M. Kurotsu, T. Nakamura, M. Takahashi, E. Ogawa, and T. Arai, "Comparison of human serum and bovine serum albumins on oxidation dynamics induced by talaporfin sodium photosensitization reaction with albumin rich conditions: solution experiments," *SPIE BiOS 2014* (San Francisco, USA, 2014.2.3).
- (12) M. Yajima, H. Kawakami, E. Ogawa, M. Takahashi, and T. Arai, "Photosensitization reaction along depth of a culture well with high concentration of talaporfin sodium for extra-cellular photodynamic therapy study," *SPIE BiOS 2014* (San Francisco, USA, 2014.2.4).
- (13) M. Shinozuka, N. Shimazaki, E. Ogawa, N. Machida, and T. Arai, "Acute cell death rate of vascular smooth muscle cells during or after short heating up to 20 s ranging 50 to 60° C as a basic study of thermal angioplasty," *SPIE BiOS 2014* (San Francisco, USA, 2014.2.4).
- (14) E. Ogawa, A. Ito, and T. Arai, "Immediate response and cytotoxicity effect on myocardial cells by extracellular photosensitization reaction varying irradiance" *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2014 36th Annual International Conference of the IEEE*, (Chicago, USA, 2014.8.29).
- (15) M. Kurotsu, E. Ogawa, and T. Arai "Conduction block in novel cardiomyocyte electrical conduction line by photosensitization reaction" *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2014 36th Annual International Conference of the IEEE*, (Chicago, USA, 2014.8.29).
- (16) E. Ogawa, S. Motohashi, and T. Arai "Cytotoxicity change with albumin binding of talaporfin sodium in extracellular photosensitization reaction on cardiomyocyte" *SPIE BiOS 2015* (San Francisco, USA, 2015.2.10).
- (17) M. Kurotsu, E. Ogawa, and T. Arai "Time response of electrical conduction block in novel cardiomyocyte wire by extra-cellular photosensitization reaction at various irradiances" *SPIE BiOS 2015* (San Francisco, USA, 2015.2.10).
- (18) E. Ogawa and T. Arai "Parameter study of myocardial cell damage with photosensitization reaction under extracellular talaporfin sodium existence" The 15th world congress of the International Photodynamic Association (IPA 2015) (Rio de Janeiro, Brazil, 2015. 5.25)
- (19) M. Kurotsu, E. Ogawa, and T. Arai "Conduction block recovery by photosensitization reaction under extracellular talaporfin sodium existence in a cardiomyocyte electrical conduction wire" The 15th world congress of the International Photodynamic Association (IPA 2015) (Rio de Janeiro, Brazil, 2015. 5.25)
- (20) R. Hamada, R. Matsuzaki, H. Takenoya, M. Kurotsu, E. Ogawa, and T. Arai "Acute phase injury of vascular endothelial cells under extra-cellular talaporfin sodium existence: *in vitro*

Study” The 15th world congress of the International Photodynamic Association (IPA 2015) (Rio de Janeiro, Brazil, 2015. 5.24)

## 2.2 国内学会発表

- (1) 小川恵美悠, 高橋芽意, 荒井恒憲, “96 well plate を使用した *in vitro* 実験系における Talaporfin sodium 溶液の光増感反応,” 第 33 回日本レーザー医学会 (大阪, 2012.11.11).
- (2) 高橋芽意, 小川恵美悠, 伊藤亜莉沙, 荒井恒憲, “経カテーテル的血中レーザ照射に伴う血液の経時的光学特性変化による焦げ付き事前検知,” 第 33 回日本レーザー医学会 (大阪, 2012.11.11).
- (3) 河上裕重, 本橋沙彌佳, 小川恵美悠, 高橋芽意, 伊藤亜莉沙, 荒井恒憲, “薬剤静注早期に対応する *in vitro* 系における連続光励起光増感反応の一重項酸素発光計測,” 第 33 回日本レーザー医学会 (大阪, 2012.11.11).
- (4) 中村哲也, 河上裕重, 本橋沙彌佳, 小川恵美悠, 高橋芽意, 伊藤亜莉沙, 荒井恒憲, “線維化心筋組織の反射偏光測定,” 第 33 回日本レーザー医学会 (大阪, 2012.11.11).
- (5) 小川恵美悠, 高橋芽意, 伊藤亜莉沙, 木村雄弘, 三好俊一郎, 福本耕太郎, 高月誠司, 福田恵一, 荒井恒憲, “Talaporfin sodium を用いた 細胞外光増感反応: 心筋細胞の急性応答,” 第 23 回日本光線力学学会 (旭川, 2013.6.8).
- (6) 木村雄弘, 高橋芽意, 小川恵美悠, 伊藤亜莉沙, 福本耕太郎, 三好俊一郎, 高月誠司, 福田恵一, 荒井恒憲, “PDT による心臓カテーテルアブレーション: 不整脈治療への適応拡大” 第 23 回日本光線力学学会 (旭川, 2013.6.7).
- (7) 町田直樹, 小川恵美悠, 高橋芽意, 木村雄弘, 福本耕太郎, 三好俊一郎, 高月誠司, 福田恵一, 荒井恒憲, “光増感反応による心筋組織障害深度: 殺細胞率に及ぼす薬剤接触時間の影響,” 第 23 回日本光線力学学会 (旭川, 2013.6.7).
- (8) 黒津真璃子, 中村哲也, 高橋芽意, 小川恵美悠, 木村雄弘, 福本耕太郎, 三好俊一郎, 高月誠司, 福田恵一, 荒井恒憲, “Talaporfin sodium を用いた細胞外光増感反応: 反応進行に与える albumin/Talaporfin sodium 濃度比の影響,” 第 23 回日本光線力学学会 (旭川, 2013.6.8).
- (9) 矢島正大, 河上裕重, 小川恵美悠, 高橋芽意, 木村雄弘, 福本耕太郎, 三好俊一郎, 高月誠司, 福田恵一, 荒井恒憲, “Talaporfin sodium を用いた細胞外光増感反応: *in vitro* 実験系における反応中の酸素動態,” 第 23 回日本光線力学学会 (旭川, 2013.6.8).
- (10) 小川恵美悠, 高橋芽意, 伊藤亜莉沙, 荒井恒憲, “細胞外光増感反応による心筋細胞の即時的障害” 第 34 回日本レーザー医学会 (東京, 2013.11.10).
- (11) 高橋芽意, 小川恵美悠, 伊藤亜莉沙, 木村雄弘, 荒井恒憲, “Talaporfin sodium を用いた細胞外光増感反応: 経カテーテル的測定による心筋ネクロシス深度の推定,” 第 34 回日本レーザー医学会 (東京, 2013.11.10).
- (12) 町田直樹, 矢島正大, 小川恵美悠, 高橋芽意, 荒井恒憲, “Talaporfin Sodium の接触時間が

- 光増感反応による心筋細胞死に及ぼす影響: *in vitro* の検討,” 第 34 回日本レーザー医学会 (東京, 2013.11.10).
- (13) 矢島正大, 河上裕重, 小川恵美悠, 高橋芽意, 荒井恒憲, “Talaporfin sodium を用いた細胞外光増感反応: 細胞培養 Well 中の反応進行分布,” 第 34 回日本レーザー医学会 (東京, 2013.11.9).
- (14) 黒津真璃子, 中村哲也, 高橋芽意, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “Talaporfin sodium を用いた細胞外光増感反応の蛍光進行モニタに対するアルブミン種の影響: *in vitro* 実験,” 第 34 回日本レーザー医学会 (東京, 2013.11.10).
- (15) 篠塚真智子, 島崎夏美, 小川恵美悠, 町田直樹, 荒井恒憲, “レーザを熱源とした短時間加温型血管形成術: 血管平滑筋細胞死と新生内膜増殖抑制の関係” 第 34 回日本レーザー医学会 (東京, 2013.11.9).
- (16) 小川恵美悠, 荒井恒憲, “細胞外光増感反応を用いた即時的な心筋細胞電気生理学的機能障害の放射照度及び薬剤濃度依存性,” 第 53 回日本生体医工学会大会 (仙台, 2014.6.24).
- (17) 黒津真璃子, 町田直樹, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “*In vitro* 心筋電気伝導系の構築,” 第 53 回日本生体医工学会大会 (仙台, 2014.6.24).
- (18) 安元啓人, 荒井恒憲, 小川恵美悠, 日比拓麻, “近赤外分光による動脈硬化病変のコレステロール計測,” 第 53 回日本生体医工学会大会 (仙台, 2014.6.26).
- (19) 日比拓麻, 安元啓人, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “心筋光学モデルを用いたトリグリセリド脂質の近赤外分光測定,” 第 53 回日本生体医工学会大会 (仙台, 2014.6.26).
- (20) 松崎亮太, 矢島正大, 小川恵美悠, 高橋芽意, 荒井恒憲, “photodynamic ablation catheter からの心筋内光強度分布の実測とそれに基づく Monte-Carlo モデルの調整,” 第 53 回日本生体医工学会大会 (仙台, 2014.6.24).
- (21) 竹ノ谷洋海, 黒津真璃子, 町田直樹, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “遊離光感受性薬剤による細胞外光増感反応治療の効率化に関する基礎検討,” 第 53 回日本生体医工学会大会 (仙台, 2014.6.26).
- (22) 小川恵美悠, 荒井恒憲, “細胞外光増感反応による心筋細胞壊死の即時・急性効果の放射照度依存性,” 第 24 回日本光線力学学会 (浜松, 2014.6.28).
- (23) 黒津真璃子, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “光増感反応による電気伝導遮断を評価可能な *in vitro* 心筋電気伝導路の構築,” 第 24 回日本光線力学学会 (浜松, 2014.6.28).
- (24) 松崎亮太, 矢島正大, 小川恵美悠, 高橋芽意, 荒井恒憲, “心筋内光増感反応治療の基礎検討: 拡散光デバイスを用いた心筋内光強度分布の実測と Monte-Carlo モデルの調整,” 第 24 回日本光線力学学会 (浜松, 2014.6.28).
- (25) 松崎 亮太, 矢島 正大, 小川 恵美悠, 高橋 芽意, 荒井 恒憲, “上大静脈での PD アブレーションにおける心筋内光強度分布の Monte-Carlo 計算モデルを用いた治療領域推定,” 第 35 回日本レーザー医学会 (東京, 2014.11.29).

- (26) 小川恵美悠, 竹ノ谷洋海, 荒井恒憲, “血清蛋白結合が細胞外光増感反応による心筋細胞障害効果に与える影響,” 第 25 回日本光線力学学会 (東京, 2015.7.11).
- (27) 土井万理香, 黒津真璃子, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “細胞外光増感反応による心筋細胞の電気伝導遮断効果: 細胞外電位計測を用いた検討,” 第 25 回日本光線力学学会 (東京, 2015.7.11).
- (28) 浜田梨沙, 松崎亮太, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “talaporfin sodium を用いた細胞外光増感反応による急性・亜急性期の血管内皮細胞障害: *in vitro* での検討,” 第 25 回日本光線力学学会 (東京, 2015.7.11).

### 3 特許

- (1) 荒井恒憲, 伊藤亜莉沙, 小川恵美悠, “医療用具及び医療用具用の光放射プローブ取付キット,” 特願 2013-155867 (2015.1.29, 公開).
- (2) 荒井恒憲、渡部恵美子、小川恵美悠, “カテーテル,” 特願 2015-111296 (2015.6.1, 出願)





## 謝辞

本研究は、著者が慶應義塾大学大学院 理工学研究科基礎理工学専攻 後期博士課程在学中に、同大学理工学部荒井恒憲教授の指導のもとに行ったものである。

本研究を行うにあたり、多くのご指導とご支援を賜りました荒井恒憲教授に心より感謝申し上げます。医工連携・産学連携の一端に携わらせていただき、多くの知見と経験を得ることができました。これまでの5年間、いつも温かいご指導を頂き本当にありがとうございました。

本学位論文をまとめるにあたり、副査としてご指導いただきました内山孝憲先生、塚田孝祐先生、戸嶋一敦先生、小川聡先生、臼田実男先生に深く感謝申し上げます。

慶應義塾大学医学部循環器内科の木村雄弘先生、高月誠二先生、三好俊一郎先生には、実験や医学的観点での研究討論に際して、多くのご指導とご支援を賜りました。感謝申し上げます。

株式会社アライ・メッドフォトン研究所の皆様には、多くの学びの機会を提供いただきました。感謝申し上げます。

同じ研究グループとして研究に関する討論を行い、多くの場面で支えてくださった、竹ノ谷洋海さん、松崎亮太さん、土井万理香さん、浜田梨沙さん、森永謙二郎さん、片桐涉さん、また既に社会でご活躍中の荒井研究室卒業生の伊藤亜莉沙さん、高橋芽意さん、本橋沙彌佳さん、河上裕重さん、中村哲也さん、町田直樹さん、黒津真璃子さん、矢島正大さん、に感謝いたします。これまで荒井研究室での研究生生活をともに過ごした全ての先輩方、同期の方、後輩に感謝しています。ありがとうございました。

荒井恒憲教授秘書の鈴木れいさんには、常日頃から温かいご支援とご配慮をいただき、研究生生活を支えていただきました。心より感謝申し上げます。

最後に、5年間の研究生生活を送るにあたり、いつもそばで支えてくれた家族に心から感謝しています。