

実験的扁平上皮癌における光力学的療法 とマイクロ波温熱療法の併用効果

福井医科大学耳鼻咽喉科学教室（主任：斎藤 等教授）

松 本 順 雄，斎 藤 等

福井医科大学第一病理学教室（主任：福田 優教授）

三 好 憲 雄，中 西 和 夫，福 田 優

COMBINATION EFFECT OF PHOTODYNAMIC THERAPY AND MICROWAVE HYPERTHERMIA ON EXPERIMENTAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN VIVO

NOBUO MATSUMOTO, M.D. and HITOSHI SAITO, M.D.

Department of Otolaryngology, Fukui Medical School, Fukui

NORIO MIYOSHI, Ph.D., KAZUO NAKANISHI, M.D. and MASARU FUKUDA, M.D.

Department of the 1st Pathology, Fukui Medical School, Fukui

We investigated the time course of Hematoporphyrin oligomer (HpO) uptake to squamous cell carcinoma (SCC) transplanted into C3H mice after intraperitoneal (i.p.)-injection by measuring its fluorescence intensity. The fluorescence intensity was maximum at 83 hr after the i.p.-injection.

The tumors once disappeared by the single application of photodynamic therapy (PDT) or microwave hyperthermia at 83 hr after HpO i.p.-injection. However, all the tumors treated with these single modalities recurred within 4 weeks after the treatments. Therefore, we investigated the therapeutic effect of microwave hyperthermia in combination with PDT at 83 hr after HpO i.p.-injection. As the results, the combination effect was the strongest when high-dose therapy was used as the first choice of therapy, irrespective of the orders of the treatments and no tumor regrowth occurred over 45 days after tumor disappearance.

Key words: 扁平上皮癌，ヘマトポルフィリンオリゴマー
光力学的療法，マイクロ波温熱療法，併用療法

A 92—2079—94330

はじめに

近年，悪性腫瘍に対してヘマトポルフィリン誘導体 (HpD) とアルゴン色素レーザーシステムを使用した光力学的治療が発達してきた。しかし，その治療の適用は，表在性の腫瘍に限られている。Harris ら¹⁾は，頭頸部癌に対する光力学的治療の最初の臨床経験を1986年に報告しており，6例中4例の腫瘍において完

全消失を見ており，残り2例についても相当の治療効果を挙げている。

一方，深部に存在する悪性腫瘍に対する治療法として，マイクロ波あるいはラジオ波温熱療法が研究されてきている。また，HpDのマイクロ波作用に対する増感効果が中島ら²⁾や竜田ら³⁾によって，in vitro と in vivo の系において，それぞれ報告されてきた。以前，

われわれも、悪性腫瘍治療法の基礎的研究として、マイクロ波の温熱効果と、HpDのマイクロ波作用に対する増感効果を *in vitro* の系で報告した⁴⁾⁵⁾。

また、われわれは、他の HpD に比べて安定な化合物であり、しかも、C3H マウスに移植した扁平上皮癌 (SCC) 組織に効率よく取り込まれる新しいヘマトポルフィリンオリゴマー (HpO) を報告している⁶⁾。

他方、培養細胞系において、光力学的治療と温熱療法の併用相乗的殺細胞効果が見られることが、Christensen ら⁷⁾ や Mang ら⁸⁾ によって示唆されてきているが、実際に実験腫瘍を用いた *in vivo* の研究報告はない。

今回の研究では、C3H マウスの移植扁平上皮癌による、HpO 取込みの時間的推移と、光力学的治療とマイクロ波温熱療法の併用において最も効果的な条件を検討した。

実験方法

1. 材料

(1) 腫瘍

C3H/He マウスの前肢腋窩部に自然に発生した扁平上皮癌⁹⁾¹⁰⁾、同マウス背部に多代にわたって継代移植した腫瘍 (生着率100%) を移植後1カ月目に摘出した。中心壊死部分を、70%エタノール綿で除去し、清潔な操作下で腫瘍辺縁部を約 $3 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$ に細切して、10%FBS を含む RPMI-1640 培養液に浮遊させ、生後約8-9週齢の C3H/He マウスの背部皮下左右に1片ずつ切開刺入した。移植後約2週目 (11-17日)、腫瘍の大きさが約 $100-200 \text{ mm}^3$ になった時点で、ネブタール麻酔下に光力学的療法あるいはマイクロ波照射を行った。

(2) HpO

ヘマトポルフィリンオリゴマー (HpO, 分子量 3000, 2.5mg/ml 生理食塩水; 日本生化学工業^株, 東京) を $50 \mu\text{g/g.b.w.}$ の濃度で、担癌 C3H/He マウスに対し腹腔内注射した。

2. 蛍光測定技術

HpO を腹腔内あるいは腫瘍内注射後種々の時間 (0, 24, 48, 72, 83, 96, 168時間) に、マウスを屠殺し、腫瘍直上の皮膚を除外し、腫瘍組織を摘出した。摘出した腫瘍は約 $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ に細切し、直ちにあらかじめアセトン・ドライアイス溶液で冷却されたイソペンタン溶液中で急冷した。さらにコンパウンド (BRIGHT CRYO-M-BED, ブライト器具^株, Huntin-

gdom, Cambridgeshire, PE 18, England) で覆い、クライオスタット (ブライツ・クライオスタットモデル, OTF/AS-60, Huntingdom, Cambridgeshire, PE 18, England) 中で -15°C まで冷却した。5 μm の凍結切片を作成して、腫瘍組織内に取り込まれた HpO の蛍光強度を、蛍光強度計 (850型, 日立^株, 東京) を用いて反射法により決定した⁶⁾。腫瘍直上の皮膚組織は非凍結標本のまま、皮膚裏面の蛍光強度を同様に測定した。

3. 光力学的治療

アルゴン色素レーザー (630 $\pm$ 5nm, 171-07型と375-03型, スペクトロ・フィジックス^株, Mountain view, CA, U.S.A.) を用い、ファイバー先端のパワー測定 (50, 100, 200, 300mW/cm²) を行い、腫瘍までの距離を3cm, 腫瘍におけるスポットの大きさを直径8mmにして照射した。移植後約2週目の腫瘍に対し、腹腔内注射後83時間目に、0, 17.9, 35.8, 71.6, 107.4J/cm² の線量で照射を行った (14匹)。

4. マイクロ波温熱療法

マイクロタイザー (2450MHz, MT-30 型, ミナト医学^株, 大阪) を使って、直径2cmの円形のプローブを腫瘍の頂点に密着させて照射した。移植後約2週目の腫瘍に対し、腹腔内注射後83時間目に、43 $\pm$ 0.5 $^\circ\text{C}$ で30, 60, 90分と照射時間を変えて照射を行った (15匹)。

5. 光力学的治療とマイクロ波温熱療法の併用療法

HpO を腹腔内注射後83時間目に、以下の方法で、光力学的治療とマイクロ波温熱療法の併用療法を行った (各群6匹)。

(1) マイクロ波温熱療法 (照射時間60分) 施行後、1時間以内に光力学的治療 (レーザー光の線量 35.8J/cm²) を施行した。

(2) 光力学的治療 (35.8J/cm²) 施行後、1時間以内にマイクロ波温熱療法 (60分) を施行した。

(3) マイクロ波温熱療法 (30分) 施行後、1時間以内に光力学的治療 (71.6J/cm²) を施行した。

(4) 光力学的治療 (71.6J/cm²) 施行後、1時間以内にマイクロ波温熱療法 (30分) を施行した。

6. 温度測定

光力学的治療あるいはマイクロ波温熱療法の間、高精度センサー付パネル温度差計 (デギパネル D620 型, 宝サーミスター器具^株, 横浜) を使って、腫瘍底部中央の温度と体温 (こう門入口部より2cm奥の腸内温度) の計測を行った。マイクロ波照射中、腫瘍内の温度を43 $\pm$ 0.5 $^\circ\text{C}$ に上げるまでに要する時間は、10分以内

になるようにした。体温は 40°C 以下に保った。光力学的治療施行中、全例において腫瘍内温度は 39°C 以上には上昇しなかった。

7. 単独および併用療法で行った腫瘍反応の評価

(1) 腫瘍の growth curve を作成するために、照射前後を通じて1日1回、ノギスで腫瘍の体積を測定した。

(2) 照射前、および照射後の肉眼的変化を写真に記録した。

(3) 照射直前、および照射後種々の時間に、マウスを殺し、腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍は、10%緩衝ホルマリンに固定し、パラフィンに包埋し、 $5\mu\text{m}$ のパラフィン切片を作成して、ヘマトキシリン・エオジン(H.E.)で染色した。

8. 併用療法による腫瘍体積減少率の算定

(1) growth curve において、腫瘍の体積の減少率を、腫瘍が照射開始時の大きさの75, 50, 25, 0%になるのに要する日数の逆数で表した。

(2) 4処置群間の差異有意差を、Wilcoxon-Mann-Whitney test(非対二標本順位検定)¹¹⁾を使って、それぞれの腫瘍の減少率に対し解析した。

実験結果

1. 蛍光

凍結切片中では、HpOの特異的赤色蛍光は、腫瘍組

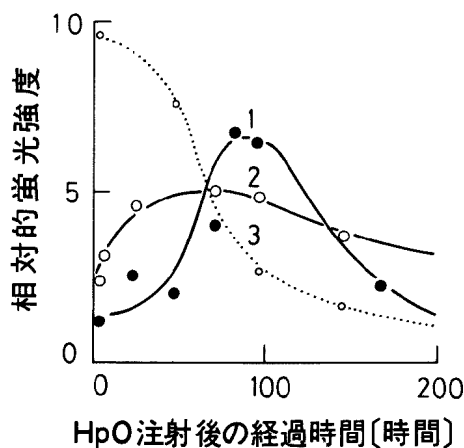


図1 HpOの蛍光強度の比較
注射後種々の時間に腫瘍組織と皮膚に取り込まれた HpO の相対的蛍光強度 (カーブ1は腹腔内注射後の腫瘍内の強度を示す。カーブ2, 3はそれぞれ、腫瘍内注射後の皮膚内、腫瘍内の強度を示す。)

織の周囲に形成された線維性被膜と腫瘍組織中の結合組織細胞、毛細血管、炎症細胞、特にこれらの細胞の細胞質に陽性に観察された。

腫瘍および腫瘍直上の皮膚に取り込まれた HpO の蛍光スペクトルを反射法により測定して図1のスペクトルを得た。すなわち、腹腔内注射により腫瘍組織に取り込まれた HpO の相対的蛍光強度 (カーブ1) は、注射後83時間目に最も強かった。他方、腫瘍内注射により腫瘍組織に取り込まれた HpO の相対的蛍光強度 (カーブ3) は注射後急速に減少した。また、腫瘍内注射により皮膚に取り込まれた HpO の相対的蛍光強度 (カーブ2) は、注射後次第に強くなり注射後83時間目近傍でピークに達し、その後は緩やかに減少した。この結果から、HpO 腹腔内投与後83時間目において以後の実験を行った。

2. 光力学的治療単独

(1) Dose-response

種々の線量で、5腫瘍(5匹)に対し光力学的治療を施行し図2の growth curve を得た。この図で、 $17.9\text{J}/\text{cm}^2$ の線量で照射した腫瘍(カーブ1)では、腫

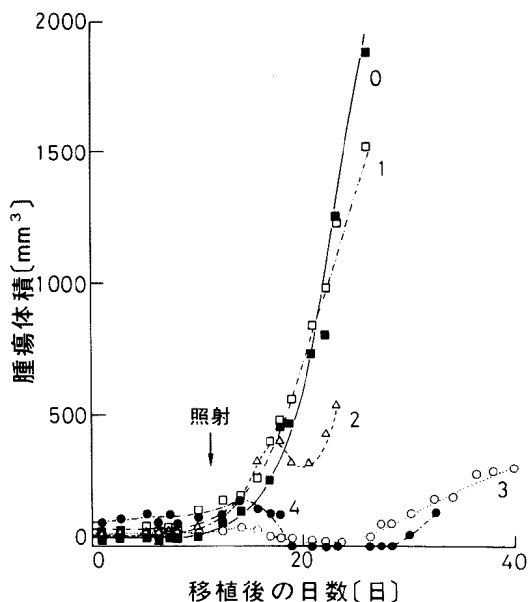


図2 光力学的治療の dose-response
HpOを腹腔内注射後83時間目にアルゴン色素レーザーからの光(波長 $630\pm 5\text{nm}$)を使って、0(カーブ0)、 17.9 (カーブ1)、 35.8 (カーブ2)、 71.6 (カーブ3)、 107.4 (カーブ4) J/cm^2 の線量で、腫瘍に対し、光力学的治療を施行した。

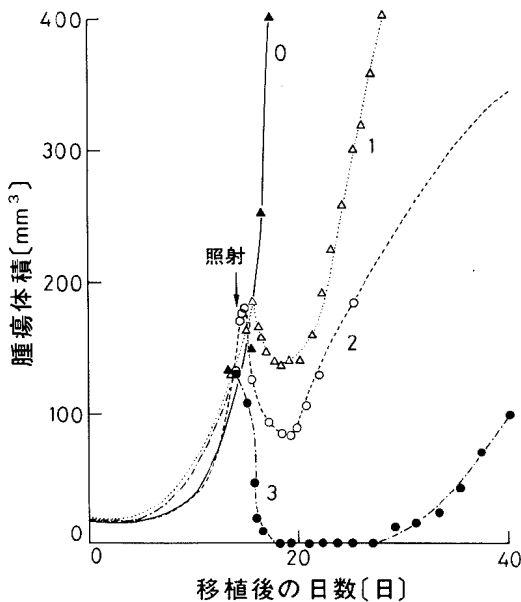


図3 マイクロ波温熱療法の dose-response
HpO を腹腔内注射後83時間目にマイクロ
タイザー(2450 MHz)を使って、 $43 \pm 0.5^\circ\text{C}$
で、種々の時間〔0 (カーブ0), 30 (カー
ブ1), 60 (カーブ2), 90 (カーブ3) 分
間〕, 腫瘍に対し, マイクロ波を照射した。

瘍の生長速度はコントロール (カーブ0) の生長速度とほとんど同じであった。35.8 J/cm² あるいは 71.6 J/cm² の線量で照射した腫瘍 (カーブ2, 3) では, 腫瘍はいったん退縮したが消失しなかった。これに対し, 107.4 J/cm² の線量で照射した腫瘍 (カーブ4) では, 腫瘍 (1個) は照射後8日目に消失したが, 腫瘍消失後9日目には再発した。

(2) 腫瘍の再発

腫瘍消失後の腫瘍の再発の有無を調べるために, HpO を腹腔内注射後83時間目に, 107.4 J/cm² の線量で, 9腫瘍 (9匹) に対し, 光学的治療を施行した。結果として, 照射した腫瘍はすべて消失した (照射後平均4.22日目) が, 全例において, 腫瘍消失後4週間以内に腫瘍の再発をみた。

(3) 腫瘍の肉眼的および組織学的変化

照射後, 腫瘍表面は黒化し痂皮を形成した。組織学的には, 照射直後よりうっ血と出血が強く, 腫瘍内血管の損傷が見られた。そして, 肉眼的に腫瘍が消失したかに見えても, 組織学的には腫瘍細胞は常に残存していた。

3. マイクロ波温熱療法単独

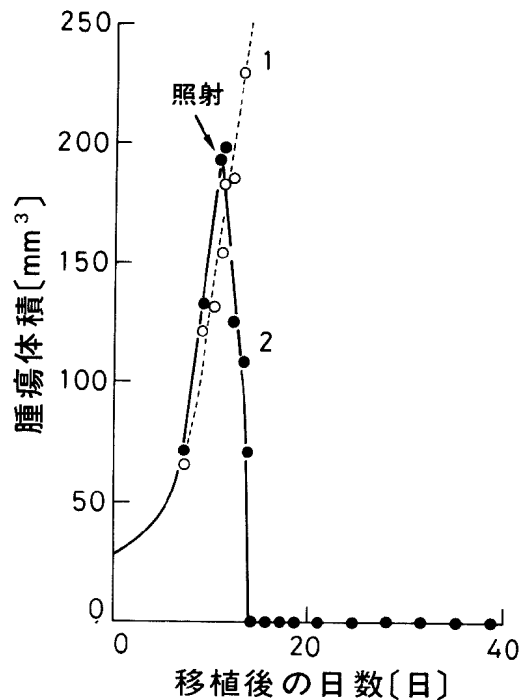


図4 high-dose のマイクロ波温熱療法を行い,
次いで low-dose の光学的治療を行った
場合の growth curve

HpO を腹腔内注射後83時間目に, high-dose のマイクロ波温熱療法 (3.21 W, $43 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 60分) を行い, その直後に low-dose の PDT (35.8 J/cm²) を行った。カーブ1はコントロールの腫瘍を示し, カーブ2は照射した腫瘍を示す。

(1) Dose-response

HpO を腹腔内注射後83時間目に, 3群 (各2匹) に対し, 種々の時間, マイクロ波温熱療法を施行した。図3に示したように, コントロール (カーブ0) は急速に生長したのに対し, 30分間あるいは60分間照射した群 (カーブ1, 2) において, 腫瘍はいったん退縮したが消失しなかった。これに対し, 90分間照射した群 (カーブ3) では, 腫瘍 (2個) は照射後平均5日目に消失したが, 腫瘍消失後平均11日目には再発した。

(2) 腫瘍の再発

腫瘍消失後の腫瘍の再発の有無を調べるために, HpO を腹腔内注射後83時間目に, 90分間, 9腫瘍に対し, マイクロ波温熱療法を施行した。結果として, 照射した腫瘍はすべて消失した (照射後平均4.02日目) が, 全例において, 腫瘍消失後4週間以内に腫瘍の再発をみた。

(3) 腫瘍の肉眼的および組織学的変化

光力学的療法の場合とほぼ同じであった。

4. 光力学的治療とマイクロ波温熱療法の併用療法

光力学的治療単独あるいはマイクロ波温熱療法単独の dose-response の結果 (図 2, 3) から, それぞれの単独療法において腫瘍をいったんは消失させる条件が得られた。すなわち, 光力学的治療においては 107.4 J/cm^2 の線量であり, マイクロ波温熱療法においては 90 分照射である。しかし, これらの条件でも腫瘍は再発した。それ故, 完全な腫瘍の絶滅を成し遂げるために, 光力学的治療とマイクロ波温熱療法の併用を試みた。この併用療法においては, 照射方法による効果の差をより明確にするためと, 生体の負担を軽減するために, 図 2, 3 で得た growth curve から, それぞれの単独療法において腫瘍が消失しない条件を用いた。すなわち, high-dose の治療の条件として, 光力学的治療においては 71.6 J/cm^2 の線量を, マイクロ波温熱療法においては 60 分照射を用い, また, low-dose の治療の条件としては, 光力学的治療として 35.8 J/cm^2 の線量を, マイクロ波温熱療法として 30 分照射を適用した。それぞれ異なる療法の high-dose の条件と low-dose の条件を組み合わせる実験を行った。

(1) 先に high-dose の治療を行い, 次いで low-dose の治療を行った場合 (併用第 1, 4 群)

マイクロ波温熱療法 (60 分) を行い, 次いで光力学的治療 (35.8 J/cm^2) を行った場合 (第 1 群) の照射した腫瘍 (カーブ 2) とコントロールの腫瘍 (カーブ 1)

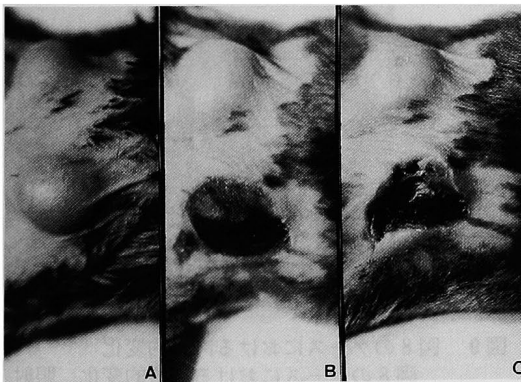


図 5 図 4 のケースにおける肉眼的変化

図 4 のケースにおける肉眼的変化。照射前 (A) において, 下の腫瘍は照射した腫瘍で, 上の腫瘍はコントロールである。(B), (C) はそれぞれ, 照射後第 2 日目, 第 3 日目を示す。

の代表的な growth curve を, 図 4 に示す。コントロールの腫瘍は, 照射後急速に生長した。これに対し, 照射した腫瘍は, 照射後急速に退縮し, 照射後 5 日目には消失した。第 1 群 (high-dose のマイクロ波温熱療法を行い, 次いで low-dose の光力学的治療を行った群) と, 第 4 群 (high-dose の光力学的治療を行い, 次いで low-dose のマイクロ波治療を行った群) では, 照射した腫瘍はすべて消失し, 腫瘍消失後 45 日以上経過しても再発しなかった。

図 5 に, これらの腫瘍の肉眼的変化を示す。丸い皮下腫瘍 (A) が, 照射後 2 日目には退縮してかつ表面が黒化し (B), 照射後 5 日目には消失している (C)。

組織学的には, 照射前 (図 6) は, 腫瘍組織はほぼ完全に viable な腫瘍組織で充満しており, 自然な壊死領域は見られなかった。照射直後の所見では, 腫瘍組織はかなりうっ血し部分的な出血が見られたが, 腫瘍細胞は依然として viable であり, 上皮も正常であった。照射後 1 日目になると, 上皮は潰瘍を形成し, 腫

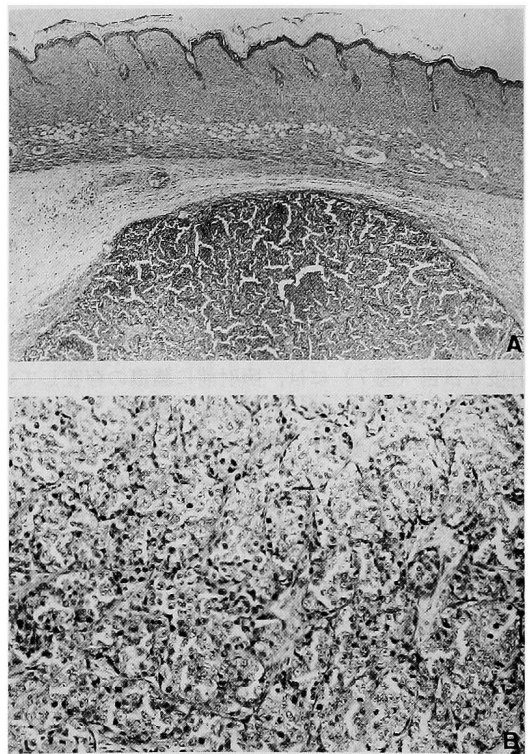


図 6 照射前の腫瘍の顕微鏡写真

照射前の腫瘍の顕微鏡写真を示す。(A) は低倍率写真 (10 倍) を示し, (B) は高倍率写真 (50 倍) を示す。

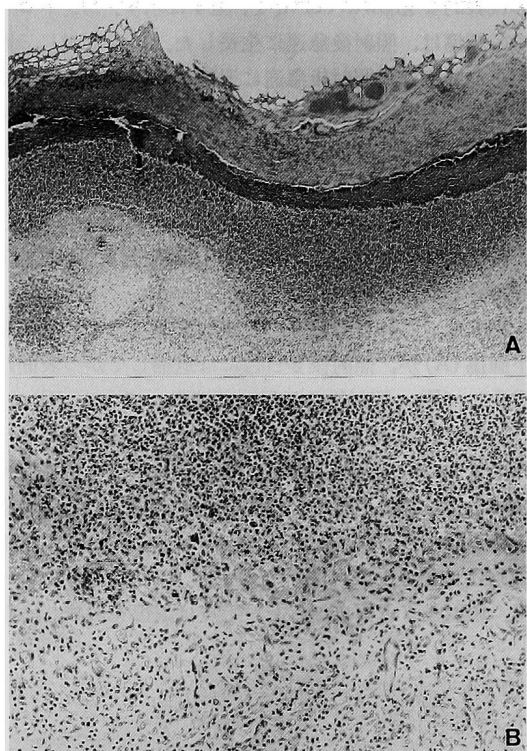


図7 図4の方法の照射を行ってから5日目の腫瘍の顕微鏡写真

図4の方法の照射を行ってから5日目の腫瘍の顕微鏡写真。(A)は低倍率写真(16倍)を示し、(B)は高倍率写真(50倍)を示す。

瘍組織の出血は顕著になり、腫瘍細胞は viable なものと壊死を起こしているものが混在していた。そして照射後5日目(図7)には、照射前に腫瘍の存在していた領域は、好中球を伴った炎症性の浸出物(高倍率写真(B)の上方の領域)で覆われた肉芽組織(Bの下方の領域)から成っており、腫瘍細胞の残存は見られなかった。照射後45日目も組織学的に tumor-free であった。

(2) 先に low-dose の治療を行い、次いで high-dose の治療を行った場合(併用第2, 3群)

光学的治療(35.8 J/cm^2)を行い、次いでマイクロ波温熱療法(60分)を行った場合(第2群)の照射した腫瘍(カーブ2)とコントロールの腫瘍(カーブ1)の代表的な growth curve を、図8に示す。照射した腫瘍は照射後7日目にはいったん消失したが、照射後12日目には再発した。第2群(low-dose の光学的治療を行い、次いで high-dose のマイクロ波温熱療法を行

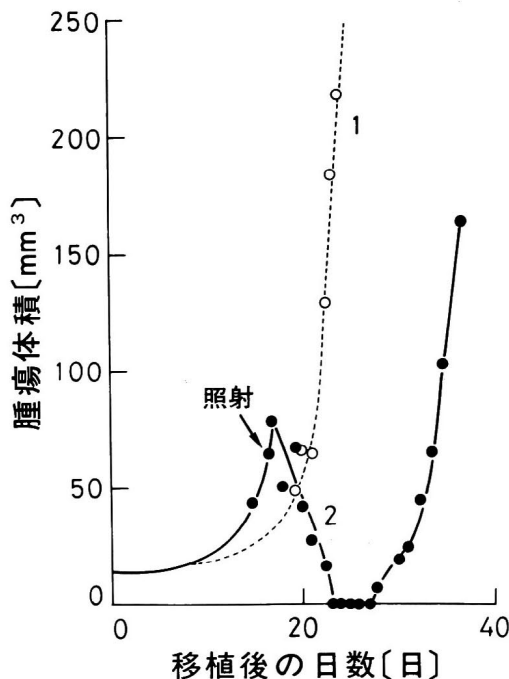


図8 low-dose の光学的治療を行い、次いで high-dose のマイクロ波温熱療法を行った場合の growth curve

HpO を腹腔内注射後83時間目に、low-dose の光学的治療(35.8 J/cm^2)を行い、その直後に high-dose のマイクロ波温熱療法(3.54 W , $43 \pm 0.5^\circ \text{C}$, 60分)を行った。カーブ1はコントロールの腫瘍を示し、カーブ2は照射した腫瘍を示す。

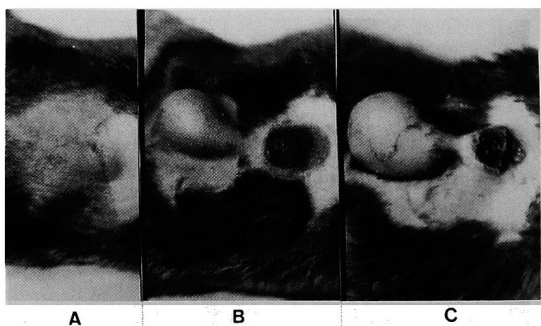


図9 図8のケースにおける肉眼的変化

図8のケースにおける肉眼的変化。照射前(A)において、右の腫瘍は照射した腫瘍で、左の腫瘍はコントロールである。(B)、(C)はそれぞれ、照射後第7日目、第12日目を示す。

った群)と、第3群(low-dose のマイクロ波温熱療法を行い、次いで high-dose の光学的治療を行った

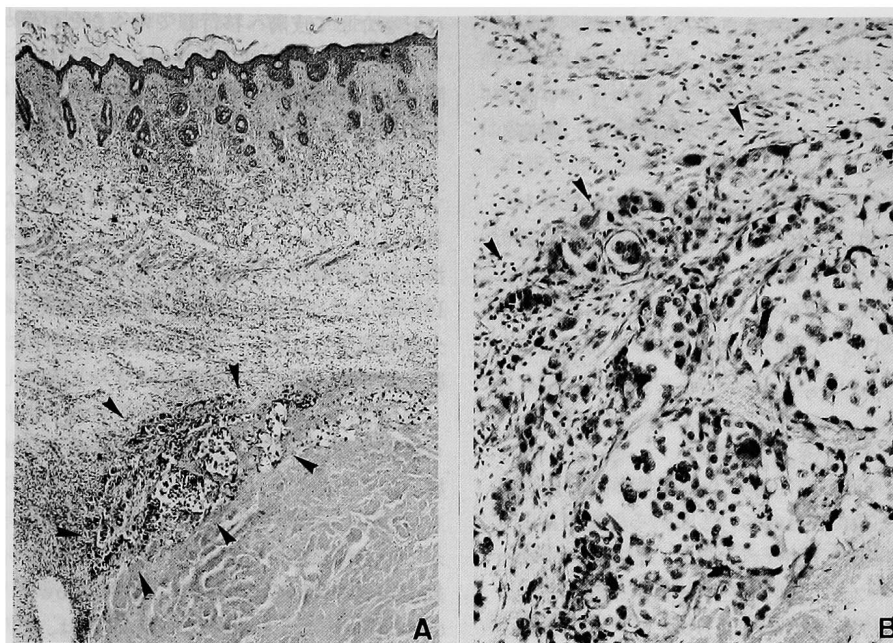


図10 図8の方法の照射を行ってから11日目の腫瘍の顕微鏡写真

図8の方法の照射を行ってから11日目の腫瘍の顕微鏡写真。(A)は低倍率写真(13.2倍)を示し、(B)は高倍率写真(50倍)を示す。◀は残存している腫瘍細胞。

表1 併用療法における抗腫瘍効果の比較

それぞれの併用療法における抗腫瘍効果の平均値を、腫瘍の大きさが照射開始時の大きさの75, 50, 25, 0%に減少するのに要する時間の逆数によって求めた。数が大きいほど抗腫瘍効果が大であることを示す。

腫瘍 体積	マイクロ波 (60分)	レーザー光 (35.8 J/cm ²)	マイクロ波 (30分)	レーザー光 (71.6 J/cm ²)
	↓ レーザー光 (35.8 J/cm ²)	↓ マイクロ波 (60分)	↓ レーザー光 (71.6 J/cm ²)	↓ マイクロ波 (30分)
75%	1.149	0.213	0.223	5.717
50%	0.754	0.161	0.141	1.490
25%	0.597	0.125	0.125	0.652
0%	0.466	0.103	0.114	0.344

[1/日]

群)では、照射した腫瘍はすべていったん消失したが、皆、照射後4週間以内に再発した。

図9に、これらの腫瘍の肉眼的変化を示す。丸い皮下腫瘍(A)が、照射後7日目に消失した(B)が、照射後12日目には再発した(C)。

肉眼的に腫瘍があたかも消失したかにみえた、照射後11日目の組織学的所見を図10に示すが、腫瘍細胞は残存していた(◀)。

(3) 腫瘍反応の評価とデータ解析

growth curve (図4, 8) から、腫瘍体積の縮小率

を、腫瘍が照射開始時の大きさの75, 50, 25, 0%になるのに要する日数の逆数で表し、各群における平均値を表1に示す。光力学的治療であれ、マイクロ波であれ、先に high-dose の治療を行った群では、腫瘍の体積が急速に減少した。

そして4つの処置群間の縮小率の差異の有意差も、Wilcoxon-Mann-Whitney test (順位和検定) で解析した。腫瘍の大きさを75, 50, 25, 0%に減少させる抗腫瘍効果は、第1群あるいは第4群が、第2群あるいは第3群に対し、1%有意水準において有意差があった。

考 察

HpD はあらゆる正常組織よりも悪性腫瘍に高率に蓄積されると一般に言われているが、その動態およびメカニズムの詳細は不明な点が多い。1979年、Gomer ら¹²⁾ は、担癌マウスに腹腔内注射後種々の時間における、腫瘍組織に局在する [¹⁴C] HpD と [³H] HpD の総量は、皮膚や筋肉組織より多かったが、肝、腎、脾より少ないと報告している。

Gomer ら¹²⁾ はまた、腹腔内注射後の、腫瘍を含むすべての組織内の [¹⁴C] HpD と [³H] HpD の蓄積量は、腹腔内投与後3—4時間でピークが得られ、続く44あるいは45時間の間、一定であるが、その後両アイソトープ量は減少したと報告している。これに反し、今回の実験では、腹腔内注射により腫瘍組織に取り込まれた HpO の相対的蛍光強度は、注射後次第に上昇して83時間目にピークがあった。彼らの実験と今回の実験における最も大きな違いは使用した光増感剤の分子量にあると考えられる。すなわち、今回使用した HpO の分子量(3000)は、Gomer らが使用した Photofrin I の分子量(1000以下)の3倍以上である。HpO はその大きな分子量のために、Photofrin I に比べて、腫瘍組織への取込み、腫瘍組織内での蓄積、腫瘍組織からの排泄に、より多くの時間を要する可能性がある。

過去の分光学的研究¹³⁾ より、腫瘍内注射においても、腹腔内注射の場合と同じように注射後83時間目では、注射後初期の頃に比べ、HpO 分子は腫瘍内で会合体を形成し、安定化していると考えられる。さらに、図1に示すように、HpO を腫瘍内注射後、腫瘍内の蛍光強度(カーブ3)が急速に減少していくのに対し、皮膚の蛍光強度(カーブ2)は次第に上昇し、83時間目付近でピークに達する。このことから、腫瘍内注射後83時間目に近づくにつれて、腫瘍内の HpO が血管

などを介して皮膚へ移行していくことがうかがえる。すなわち、HpO を腫瘍内注射した場合は、注射後83時間目には、HpO 分子は腫瘍内で安定しているが、量は少ないと考えられる。

併用療法を行う前に、光力学的治療単独、あるいはマイクロ波温熱療法単独の治療効果を調べた結果、両者において dose-response が見られ、腫瘍をいったん消失させる条件、すなわち、光力学的治療においては107.4J/cm²の線量、マイクロ波温熱療法においては90分照射が得られた。しかし、これらの条件においては、腫瘍消失後4週間以内に腫瘍はすべて再発した。

併用療法においては、光力学的治療であれ、マイクロ波温熱療法であれ、先に high-dose の治療を行った場合に、治療効果は最も高く、照射後45日以上(あるものは1年以上)経過しても、腫瘍の再発は起こらなかった。移植癌に対する光力学的治療とマイクロ波温熱療法の併用効果については Waldow ら¹⁴⁾ と Henderson ら¹⁵⁾ による報告がある。彼らは、光力学的治療を先に行った場合に最も併用効果が強く、マイクロ波温熱療法を先に行った場合には効果が弱いと報告した。彼らの実験においては、光力学的治療の線量は135J/cm²であり、マイクロ波温熱療法の照射時間は30分であった。135J/cm²の線量での光力学的療法は、今回の実験では high-dose の条件に相当し、30分間のマイクロ波温熱療法は、low-dose の条件に相当する。従って、彼らの実験は、今回の実験の第3群と第4群に相当し、今回の実験結果と一致する。

次に何故、先に high-dose の治療を行った方が効果的かということに関しては、以下の考察が可能であろう。

まず第一に、腫瘍細胞の温熱あるいは光力学的作用に対する耐性の存在が考えられる。古来、熱耐性の存在が提唱されて久しいが^{16)~20)}、近年 step down heating すなわち high-dose の温熱療法を行い、次いで low-dose の温熱療法を行う場合は、熱耐性が減少する^{21)~23)} が、step up heating すなわち low-dose の温熱療法を行い、次いで high-dose の温熱療法を行う場合は、大きな熱耐性が存在する²¹⁾²⁴⁾ と報告されている。今回の実験における、high-dose の治療を行い、次いで low-dose の治療を行う方法は、step down heating に相当し、また、low-dose の治療を行い、次いで high-dose の治療を行う方法は、step up heating に相当するとすれば、温熱と光力学的作用の間にも耐性が存在し、治療内容にかかわらず、high-dose の後の耐性

は小さく、low-doseの後の耐性は大きい可能性がある。

第二に、DNA 損傷に対する腫瘍細胞の修復(repair)能力が考えられる。low-doseの治療を行い、次いでhigh-doseの治療を行う場合は、最初のlow-doseの治療の不十分な効果が修復作用を引き起こし易くする可能性がある。

第三に、low-doseのマイクロ波温熱療法によるHpDの腫瘍内局在の変化の可能性が考えられる。腫瘍組織に取り込まれたHpD分子の一部は、弱い温熱治療効果よりも、マイクロ波温熱療法の温熱作用によって、血管を介して腫瘍外へ遊離するかもしれない。またlow-doseの光力学的治療により、腫瘍内HpDが失活する可能性も考えられる。

一方、光力学的治療とマイクロ波温熱療法のメカニズムは、以下の点において類似していると思われる。

まず第一に、両者とも照射時に活性酸素を発生させる可能性があることである。従来、光力学的治療に関しては、赤色光(波長630nm)によって腫瘍内のHpDが励起され、その時に発生する一重項酸素によって腫瘍細胞が酸化されるといわれている²⁵⁾²⁶⁾。他方、中島ら²⁾や竜田ら³⁾、そして、われわれ⁵⁾は、HpDを含む腫瘍細胞がマイクロ波によって照射された時に、光力学的療法と同様に活性酸素を発生させる可能性があることを報告してきた。

第二は、両者の照射後の組織学的所見の類似である。この二者の各々、あるいは併用において、照射後の組織学的変化は、腫瘍組織内のうっ血、出血が主であり、両者は血管系の損傷が初期段階として起こるものと推測される。

結 語

C3H マウスに移植した扁平上皮癌に対し、最近開発された新しいヘマトポルフィリン誘導体の一つであるヘマトポルフィリンオリゴマー(HpO)を投与して実験を行った結果、以下の結論を得た。

1) HpO 腹腔内投与後の腫瘍内取込み量の時間的推移を調べたところ、腫瘍組織内HpOの相対的蛍光強度は投与後83時間目に最大であった。

2) HpO 腹腔内投与後83時間目に施行した光力学的治療(PDT)あるいはマイクロ波温熱療法の単独処置により、腫瘍は肉眼的にいったん消失したが、処置後4週間以内に再発を見た。

3) そこで、この再発を防ぐために、HpOを腹腔内

投与後83時間目にPDTとマイクロ波温熱療法の併用療法を施行した結果、どちらの治療法にせよ、先にhigh-doseの治療を行った場合に限り、その併用効果は最も強く、腫瘍消失後45日以上経過後でも肉眼的かつ組織学的に腫瘍の再発は見られなかった。

4) これら単独治療後の病理組織学的検討の結果、いずれの治療においても、照射直後より腫瘍組織内にうっ血や出血が見られた。

参 考 文 献

- 1) Harris DM, Hill JH, Werkhaven JA et al: Porphyrin fluorescence and photosensitization in head and neck cancer. Arch Otolaryngol Head and Neck Surg 112: 1194-1199, 1986.
- 2) 中島 進, 森本典雄, 林 秀雄, 垣内美弘, 進藤善雄 他: microwave 波による superoxide の発生と癌細胞破壊効果. 医学のあゆみ 122: 256-260, 1982.
- 3) 竜田正晴, 飯石浩康, 山村倫子, 山本玲子, 奥田 茂: マイクロ波の抗腫瘍効果に関する実験的検討, 竹本忠良, 平塚秀雄 監修, 西坂 剛, 江崎昌俊 企画編集: 内視鏡的マイクロ波治療法—基礎と臨床—, アイオニクス蔵書, 東京, 1985, 105-113頁.
- 4) 松本順雄, 三好憲雄, 斎藤 等, 福田 優: ヘマトポルフィリン誘導体(HpD)とマイクロ波照射によるL1210とCML培養細胞の殺細胞効果. 日本ハイパーサーミア誌 3: 325-331, 1987.
- 5) Miyoshi N, Matsumoto N, Fukuda M et al: The effect of hyperthermia on murine leukemia cells in combination with photodynamic therapy. Int J Hyperthermia 4: 203-209, 1988.
- 6) Miyoshi N, Matsumoto N, Fukuda M et al: Spectroscopic study of haematoporphyrin oligomers in tumor tissue. Lasers in Medical Science 3: 185-193, 1988.
- 7) Christensen T, Sandquist T, Moan J: Retention and photodynamic effects of hematoporphyrin derivative in cells after prolonged cultivation in the presence of porphyrin. Cancer Letter 48: 35-43, 1983.
- 8) Mang TS, Dougherty TJ: Time and sequence dependent influence of in vitro photodynamic therapy (PDT) survival by hyperthermia. Photochem Photobiol 42: 533-540, 1985.
- 9) 上田恵一, 大瀬千年, 小森 泰, 外松茂太郎, 中安 清 他: 実験皮膚腫瘍に関する研究—³H-TdR 標識法による光顕, 電顕 Autoradiogram と核DNA量. 日皮会誌 91: 13-24, 1981.

- 10) 上田恵一, 丸尾 充, 若林俊治, 小森 泰, 小森万智生: 実験皮膚腫瘍における腫瘍細胞の増殖と分化. 日皮会誌 91: 1380-1387, 1981.
 - 11) Snedecor GW, Cochran WG: Statistical Methods. The Iowa State Univ. Pr., Ames, Iowa, 1988, pp 144-145, 475-476.
 - 12) Gomer CJ, Dougherty TJ: Determination of [^3H] - and [^{14}C] Hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissue. Cancer Res 39: 146-151, 1979.
 - 13) Miyoshi N, Hisazumi H, Nakajima K et al: The similarity between the fluorescence spectra of hematoporphyrin derivative incorporated by rat bladder cancer tissue and trimethyl ammonium bromide micelles. Photobiochem Photobiophys 8: 115-121, 1984.
 - 14) Waldow SM, Henderson BW, Dougherty TJ: Enhanced tumor control following sequential treatments of photodynamic therapy (PDT) and localized microwave hyperthermia in vivo. Lasers in Surgery and Medicine 4: 79-85, 1984.
 - 15) Henderson BW, Waldow SM, Dougherty TJ et al: Interaction of photodynamic therapy and hyperthermia: Tumor response and cell survival studies after treatment of mice in vivo. Cancer Res 45: 6071-6077, 1985.
 - 16) Gerner EW, Schneider MJ: Induced thermal resistance in HeLa cells. Nature 256: 500-502, 1975.
 - 17) Gerner EW, Boone R, Connor WG et al: A transient thermotolerant survival response produced by single thermal doses in HeLa cells. Cancer Res 36: 1035-1040, 1976.
 - 18) Nielsen OS, Overgaard J: Hyperthermic radiosensitization of thermotolerant tumor cells in vitro. Int J Radiat Biol 35: 171-176, 1979.
 - 19) Henle KJ, Bitner AF, Dethlefsen LA: Induction of thermotolerance by multiple heat fractions in Chinese hamster ovary cells. Cancer Res 39: 2486-2491, 1979.
 - 20) Henle KJ, Dethlefsen LA: Heat fractionation and thermotolerance: A review. Cancer Res 38: 1843-1851, 1978.
 - 21) Miyakoshi J, Ikebuchi M, Kano E et al: Combined effects of X-irradiation and hyperthermia (42°C and 44°C) on Chinese hamster V-79 cells in vitro. Radiat Res 79: 77-88, 1979.
 - 22) Henle KJ, Leeper DB: The modification of radiation damage in CHO cells by hyperthermia at 40°C and 45°C. Radiat Res 70: 415-424, 1977.
 - 23) Henle KJ: Sensitization to hyperthermia below 43°C induced in Chinese hamster ovary cells by step-down heating. J Natl Cancer Inst 64: 1479-1483, 1980.
 - 24) Miyakoshi J, Kano E, Heki S: Cellular responses to hyperthermia and radiation in Chinese hamster cells. In T. Sugahara (ed) Modification of radiosensitivity in cancer treatment. Academic Press, Tokyo, 1984, pp 335-350.
 - 25) Welshaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ: Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photodestruction of a murine tumor. Cancer Res 36: 2326-2329, 1976.
 - 26) Tatsuta M, Yamamoto R, Yamamura H et al: Photodynamic effects of exposure to hematoporphyrin derivatives and dye-laser radiation on human gastric adenocarcinoma cells. J Natl Cancer Inst 73: 59-67, 1984.
-
- 稿を終えるに臨み、本研究の趣旨に賛同され、蛍光強度計、アルゴン色素レーザーの使用を許可して下さった金沢大学泌尿器科学教室久住治男教授および教室各位に深謝致します。
- 本研究の一部は、第2回日韓耳鼻咽喉科頭頸部外科学会ならびに第5回国際ハイパーサーミア学会において発表した。
-

(原稿受付 1989年7月24日急載)

別刷請求先 〒910-11 福井県吉田郡松岡町下合月23-3
福井医科大学耳鼻咽喉科学教室 松本順雄