

博士(医学) 劉 杰

論文題目

Differentiation of tumor sensitivity to photo dynamic therapy and early evaluation of treatment effect by nuclear medicine technique

(核医学的技術による光線力学的療法に対する腫瘍の感受性の鑑別と治療効果の早期判定)

論文の内容の要旨

[はじめに]

光線力学的療法(Photo Dynamic Therapy, PDT)は、光感受性物質を投与し、腫瘍へレーザー光線を照射することによる腫瘍選択的で低侵襲な腫瘍治療法である。PDT による腫瘍細胞の生化学的応答は短時間内に起こるが、治療早期の PDT 効果を *in vivo* で評価する判定法はなく、現在のところ経時的な観察によって評価されている。そこで本研究では、PDT 治療後早期の腫瘍細胞の反応について、核医学的手法による判定法の構築を目的として、現在核医学検査において腫瘍の診断や治療効果判定に使用されている ^{18}F -FDG (^{18}F -fluorodeoxyglucose) および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -methoxyisobutylisonitrile)を用いて腫瘍の PDT 感受性の鑑別と共に評価可能かどうか、*in vitro* 実験系において基礎的に検討を行うこととした。

[材料ならびに方法]

腫瘍細胞株: 5種類(ヒト上皮様細胞癌由来細胞株 A431、ヒト前立腺癌(脳転移)由来細胞株 DU145、ヒト肺腺癌由来細胞株 H1650、ヒト大腸癌由来細胞株 LS180、ヒト卵巣漿液性嚢胞腺癌由来細胞株 SHIN3)を用いた。培養腫瘍細胞に Photofrin (PF; Wyeth Japan, Tokyo)を各種濃度 (50 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM) になるように添加して 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 条件下で 24 時間培養した。PF 無添加の培地を対照として用いた。培養後、それぞれの腫瘍細胞をトリプシン-EDTA で処理し、冷却した PBS で 3 回洗浄した後、細胞濃度が 5×10^6 個/ml となるよう調整した。

PDT レーザー照射および一重項酸素の測定: 1.5 ml の腫瘍細胞懸濁液に、630 nm のレーザー光 (30 Hz, 40 mW, 24 J/cm^2) を 10 分間照射した。これに伴い発生する一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) 発生量を、近赤外光電子増倍管により 1270 nm にて測定した。 $^1\text{O}_2$ 発生量は、細胞のタンパク重量 (mg) 当たりの 10 分間の総カウント数で評価した。また、照射直後の細胞懸濁液について① ^{18}F -FDG および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI の取込率評価、②MTT アッセイ、③TB アッセイ、④ローリー法によるタンパク質定量を行った。

^{18}F -FDG および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI 取込率評価: PDT レーザー照射直後に、37 KBq の ^{18}F -FDG および 37 KBq の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI を各細胞懸濁液 (500 μl) に加え 37 $^\circ\text{C}$ にて培養した。培養後、細胞と上清をそれぞれ遠心分離法により集め、各放射能を NaI ウェル型ガンマカウンタで測定した。タンパク質濃度はローリー法により求めた。 ^{18}F -FDG および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI の取込率は、初回添加量に対する細胞への放射能集積量の比率をタンパク質 1 mg 当たりに標準化して求めた。

^{18}F -FDG および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI 取込低下率、MTT 低下率、TB 低下率を、対照群でのそれぞれの

取込率あるいは測定値を 100%として求めた。

PF 細胞内濃度: 腫瘍細胞株を 24 時間 10 μM PF を含む培地中で培養した。培養後、細胞は冷却 PBS で洗浄し、UV 検出器を用いて 410 nm で PF の吸光度を測定した。PF 細胞内濃度は、既知濃度の PF 溶液から作成した検量線を用いて計算し、タンパク質 1 mg 当りに換算した。

[結果]

^{18}F -FDG 取込低下率と $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI 取込低下率は、添加 PF 濃度に依存して大きくなることが確認された。さらに、 ^{18}F -FDG 低下率は $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI 低下率より常に高い値を示した。同様に、MTT 低下率および TB 低下率も、PF 濃度に依存して高い値を示し、すべての PF 濃度において、MTT 低下率は TB 低下率より高い傾向にあった。

^{18}F -FDG 低下率は、MTT 低下率と指数関数的な相関を示し ($R^2=0.650$, $P<0.01$)、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI 低下率と MTT 低下率の関係は直線的な相関性を示した ($R^2=0.719$, $P<0.01$)。

1 μM PF 濃度条件下では、PDT レーザー照射をしない群における ^{18}F -FDG 取込率と PDT レーザー照射後の MTT 低下率の関係は直線的によく相関した ($R^2=0.800$, $P<0.05$)。一方、この場合の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI 取込率および MTT 低下率には、相関性が認められなかった。PDT レーザー照射により発生した $^1\text{O}_2$ 量や腫瘍細胞への PF 取込量については、MTT 低下率との関連性は認められなかった。

[考察]

PDT 後早期における $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI 取込低下率の変化は、主として PDT 直後に惹起されるミトコンドリア機能変化に伴うミトコンドリア膜電位変化を示し、また、 ^{18}F -FDG 取込低下率の変化は主に細胞膜機能障害の結果と考えられる。本研究で検討したような PDT 後早期での ^{18}F -FDG の取込率変化は、PDT 効果を過大評価する可能性があるものの、MTT 低下率と $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI 取込低下率が直線的な相関関係を示したことより、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI の取込率変化が PDT 処理後早期において治療効果を反映することが示唆された。また、MTT 低下率が TB 低下率より高い結果を示したことから、本研究で用いた PF はミトコンドリアが PF-PDT 障害の主な標的となるものと考えられた。

一方、PDT 前の腫瘍細胞への ^{18}F -FDG 取込量が高いほど、PDT 効果が直線的に相関して高くなることから、PDT 前に ^{18}F -FDG-PET 検査を施行することで PDT 効果を予測できる可能性が示された。

[結論]

申請者は、PDT による早期治療効果判定が $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI 低下率によって評価できる可能性を示した。さらに、異なる腫瘍に対する PDT 効果が、PDT 前の ^{18}F -FDG-PET 検査によって予測できるものと考えられた。今後、 ^{18}F -FDG-PET および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI-SPECT による PDT 効果の評価に向けた *in vivo* 研究への展開が期待される。

論文審査の結果の要旨

悪性腫瘍の光線力学的療法 (PDT) において、効果予測および治療後の早期効果判定のための

確立した方法はない。申請者は培養細胞株を用い、PDT前後の ^{18}F -fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG)および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -methoxyisobutylisonitrile ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI)の細胞への取り込みと治療効果の関係を検討した。5種類のヒト腫瘍細胞を用い、培地にporfimer sodiumを添加し、レーザー照射を行った直後に ^{18}F -FDGあるいは $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBIを加え取り込み量を測定した。さらに一重項酸素発生量、細胞内のporfimer sodium濃度を測定し、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)アッセイ、トリパンブルーアッセイで細胞生存率を評価した。Porfimer sodium添加量の増加とともに生存率が低下し、 ^{18}F -FDG、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBIのいずれも細胞への取り込みが抑制された。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBIの取り込み低下とMTTアッセイの結果がほぼ直線関係を示したのに対し、MTTアッセイで一定の生存率を示す細胞でも ^{18}F -FDGの取り込みがほぼ完全に抑制され、 ^{18}F -FDGは治療効果を過大評価する傾向があると考えられた。一方、PDT治療前の取り込みの検討では ^{18}F -FDGの取り込みが高い細胞株ほど治療効果が高かったが、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBIではそうならなかった。すなわち、治療効果予測には ^{18}F -FDGが、早期効果判定には $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBIが良いと考えられた。一重項酸素発生量、細胞内porfimer sodium濃度と治療効果は必ずしも相関しなかった。審査委員会では、申請者の研究がPDT治療効果予測には一重項酸素発生量、細胞内porfimer sodium濃度の測定では不十分で核医学的手法が効果予測、早期効果判定に有効である可能性を示した優れた研究であると評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 阪原 晴海
副査 金山 尚裕 副査 蓑島 伸生