



Title	光線力学効果に基づく光線力学治療の照射計画法の開発
Author(s)	富岡, 穂
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/85395">https://doi.org/10.18910/85395</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 博士学位論文

光線力学効果に基づく光線力学治療の照射計画法の開発

富 岡 穂

2021 年 6 月

大阪大学大学院工学研究科 環境エネルギー工学専攻  
量子エネルギー工学講座 量子ビーム応用工学領域（栗津研究室）  
博士後期課程 1 年 28H20814

主査：栗津邦男 教授（量子ビーム応用工学領域）

副査：村田勲 教授（量子反応工学領域）

副査：間久直 准教授（量子ビーム応用工学領域）

## 要旨

本研究の目的は、光線力学療法（以下「PDT」という）のメカニズムに基づいた治療計画手法を開発することである。PDTにより発生する活性酸素種（以下「ROS」という）の直接的作用およびROSに拠らない免疫効果を細胞レベルでの実験により、治療結果に影響を与えるパラメータを明らかにし、治療計画や治療進行モニタリングに寄与するパラメータを提案した。さらに、それらパラメータのうち腫瘍組織中のレーザーエネルギーの評価に有効な生体組織光学（tissue optics）に基づいた光分布シミュレーションをROSによる治療効果を定量的に評価するための手法として提案した。細胞レベルでの評価により得られた結果を臨床の治療計画まで一気通貫した橋渡し研究は未だかつて存在しない。

本研究では、光線力学効果によってもたらされるROSによる直接的な治療効果に寄与するパラメータを細胞レベルで探索し（第2章）、続いて、PDTの治療機序の1つとして考えられている免疫効果を確認するために腫瘍抗原による免疫細胞のサイトカイン分泌を調べ（第3章）、最後に組織レベルでの光分布シミュレーションの可能性を検討し（第4章）、PDTのメカニズムに基づいたレーザー照射計画法の確立に向けた検討を行った。

第1章では、研究の背景、目的および本論文の構成について述べた。PDTの普及を加速するためには、個別症例に対するレーザー照射計画の手法の標準化は欠かせない。また、PDTの普及の壁となっている限定的な適応から新しい癌種への適応拡大に向けて、これらレーザー照射計画の手法の標準化は欠かせない。

第2章では、PDTのメカニズム、すなわち腫瘍細胞への光感受性薬剤（以下「PS」という）の取り込み、PSと光の反応による溶存酸素の消費、PSの光退色、ROSの発生およびROSによる殺細胞効果について、培養細胞を用いたin Vitroの実験系において確認し、ROSによる殺細胞効果のメカニズムと最適化するための条件として、組織中の溶存酸素濃度と照射されるレーザーエネルギー量が最も重要であることを確認した。

第3章では、PDTの治療機序の1つとして考えられている抗腫瘍免疫に関する検討を行った。PDT由来の腫瘍抗原が免疫細胞からのサイトカイン分泌を誘導することを確認し、ROSによる直接的な殺細胞効果が及ばない範囲においても抗腫瘍免疫による抗腫瘍効果が発揮される可能性が見いだされた。一方で、ROSによる直接的な殺細胞効果に比較して免疫効果は、抗腫瘍効果としては限定的と言わざるを得ないことを考察した。

第2章および第3章において、臨床PDTにおいても治療対象となる腫瘍組織のうち、十分なROSの発生が見込まれる範囲をあらかじめ照射計画において明らかにすることの重要性が明らかになったことを受け、第4章では、組織内光分布に基づいたPDT治療効果の評価に向けて、計算機シミュレーションの利用を提案した。末梢性肺癌を対象として、異なる光照射プローブによる光分布をモンテカルロ法により求め、計算機シミュレーションに基づくPDT治療効果評価の可能性を示した。

第5章では、第2章から第4章までの研究を総括し、今後の展望として臨床PDTの術前治療計画における計算機シミュレーションと術中の治療進行モニタリングの重要性について論述した。

## 目次

1. 序論 .....	1
1.1 がん治療.....	1
1.2 光線力学治療.....	1
1.3 光線力学効果の殺細胞効果に関するパラメータ .....	2
1.4 光線力学効果における細胞生物学的反応と細胞間ネットワークによる免疫反応...3	3
1.5 光照射条件が PDT 治療効果へ与える影響 .....	3
1.6 本論文の目的.....	4
1.7 本論文の構成.....	5
2. PDT の殺細胞効果に影響する因子に関する <i>in Vitro</i> 評価.....	6
2.1 緒言 .....	6
2.2 材料と方法 .....	7
2.2.1 材料.....	7
2.2.2 方法.....	7
2.2.2.1 溶存酸素の測定 .....	7
2.2.2.2 光退色特性の観察.....	7
2.2.2.3 活性酸素種の測定.....	8
2.2.2.4 細胞内へのタラポルフィンナトリウムの取り込み量の測定 .....	8
2.2.2.5 PDT の有効性評価と PDT 後の培養液中の VEGF 濃度測定 .....	9
2.2.2.6 統計解析 .....	9
2.3 結果 .....	10
2.3.1 溶存酸素の測定.....	10
2.3.2 光退色特性の観察 .....	11
2.3.3 活性酸素種の測定 .....	12
2.3.4 タラポルフィンナトリウムの細胞内の取り込み量の測定 .....	13
2.3.5 PDT の有効性評価と PDT 後の培養液中の VEGF 濃度測定 .....	14
2.4 小括 .....	16
3. PDT による免疫細胞からのサイトカイン分泌の誘導 .....	18
3.1 緒言 .....	18
3.2 材料と方法 .....	19
3.2.1 材料.....	19
3.2.2 方法.....	19
3.2.2.1 がん細胞に対する PDT.....	19
3.2.2.2 PDT 由来のがん抗原の作成.....	19

3.2.2.3	樹状細胞由来のサイトカインの測定 .....	19
3.2.2.4	統計解析 .....	20
3.3	結果 .....	20
3.4	小括 .....	22
4.	PDT における組織内光分布に関する検討 .....	24
4.1	緒言 .....	24
4.2	対象と方法 .....	26
4.2.1	対象 .....	26
4.2.2	方法 .....	30
4.2.2.1	数値末梢肺癌モデルの構築 .....	30
4.2.2.2	光伝搬シミュレーション .....	30
4.3	結果 .....	31
4.4	小括 .....	36
5.	結論 .....	38
5.1	総括 .....	38
5.2	臨床 PDT の術前治療計画における計算機シミュレーションと術中の治療進行モニタリングの重要性 .....	39
引用文献	.....	43
業績一覧	.....	52
謝辞	.....	54

## 1. 序論

### 1.1 がん治療

悪性新生物（以下「がん」という）は、1981 年以来 2021 年現在、本邦の死因の第 1 位であり、死亡数および死亡率（人口 10 万人対）が減少に転じたことはない [1]。2021 年 2 月 10 日の報告によると、男性の 65.5%、女性の 50.2% が生涯でがんに罹患し、男性の 26.7%、女性の 17.8% ががんが原因で死亡する [2]。現在、がん治療は手術（外科的または内視鏡下での切除）、化学療法、放射線療法の 3 つが主な治療法として検討され、いずれか 1 つの治療法を選択するのではなくこれらを組み合わせて行う集学的治療が一般的である [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10]。各癌種の標準的な治療方針は、診療ガイドラインにて詳細に定められている [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10]。近年、がんが完治しさえすればよいという旧来の視点から、患者の負担を最小限に抑える点が考慮されるよう発展している。手術は、再発を防ぐためにできるだけ広範囲を切除する拡大手術から可能な限り切除範囲を小さくする縮小手術が重視され、薬物療法では、重い副作用が発現しやすい従来の化学療法薬（抗がん剤）に加え、がん細胞の増殖を抑制可能な特定の標的分子に狙いを定めた分子標的薬が開発され、多くの分子標的薬が臨床に導入されている [11] [12] [13] [14] [15]。放射線治療においては、呼吸の影響で動く臓器（肺、肝臓など）のがんに対し正常組織への照射（有害事象を誘発）を最小限に抑えつつがんのみに正確に放射線を当てる技術（Intensity Modulated Radiation Therapy; IMRT）[16] や、3 次元画像を用いて照射の正確性を高めて、正常組織に当たる放射線を抑制する方法（Image-guided radiotherapy; IGRT）[17] などが開発され、臨床導入されている [18]。緩和治療の領域でも、有効な鎮痛薬、医療用麻薬の開発が進み、これら薬剤の早期利用により治療効果の向上が示されている。また、がんによる心理的な苦痛の治療を目的とする精神腫瘍学（サイコオンコロジー）や、がん患者の社会復帰に向けたリハビリテーションの分野も進展している [19]。がんを効果的に治療するとともに、患者の身体的および心理的な負担も最小限にし、QOL に配慮した低侵襲な治療が求められる。

### 1.2 光線力学治療

がんに対する手術、化学療法および放射線療法以外の低侵襲な治療の 1 つとして、光線力学療法（Photodynamic Therapy; PDT、以下「PDT」という）が臨床導入されている [20] [21]。正常組織と比較して腫瘍組織に選択的に蓄積する光感受性薬物と、光感受性薬物の吸収スペクトルのピーク波長のレーザー光を組み合わせて効果を得る治療である。PDT によるがん治療は、光感受性薬物を静脈注射し、光感受性薬物が全身に分布した後、正常細胞とがん細胞の光感受性薬物の代謝時間の違いを利用し、より多くの光感受性薬物ががん細胞に遺残するタイミングで腫瘍組織に対してレーザー光を照射することで発生する活性酸

素種 (Reactive Oxygen Species; ROS、以下「ROS」という) によるがん細胞に対する直接的および間接的な効果 (以下「光線力学効果」という) を利用している [22]。がん細胞に対する光線力学効果による直接的な殺細胞効果と、がん組織に酸素や栄養を供給している血管を構成する細胞に対する光線力学効果によって壊死させることで血管を遮断し、腫瘍組織への酸素や栄養の供給を遮断する間接的な効果によってがんを死滅させると言われている。また PDT の 3 つ目の治療メカニズムとして、光線力学効果に因らない炎症反応惹起に起因する抗腫瘍免疫反応が知られている [22]。

PDT は、本邦においては、一般名「タラポルフィンナトリウム」と「PDT 半導体レーザ」の組み合わせで製造販売承認されている [23] [24]。現在、タラポルフィンナトリウム（販売名：注射用レザフィリン®100mg）を用いた PDT が医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（以下「医薬品医療機器法」という）における製造販売承認を受けている対象疾患は「早期肺癌（病期 0 期又は I 期）」、「原発性悪性脳腫瘍（摘出手術を施行する場合に限る）」および「化学放射線療法又は放射線療法後の局所遺残再発食道癌」である [23] [24] [25] [26]。いずれの適応疾患も診療ガイドラインに掲載される治療であり臨床現場では一定の地位を確立しているものの [3] [9] [10]、PDT の作用メカニズムに基づいた治療効果の評価が不十分なことから治療計画のための手法が標準化されておらず、広く普及している治療とは言い難い状況にある。

### 1.3 光線力学効果の殺細胞効果に関するパラメータ

第 1.2 節に前述のとおり、PDT の光線力学効果は ROS の発生に起因している。PDT における ROS 発生の機序は、主に 2 つある。光感受性物質が光エネルギーを受け取ることで電子スピントン変換を受けて三重項状態となり、プロトン移動や電子移動によって基質と直接反応してラジカルやラジカルイオンを生成し、周囲に存在する溶存酸素と共に酸素化生成物を生成する (Type I 反応)。また、溶存酸素濃度が高い場合には、励起された光感受性物質のエネルギーが直接酸素に移動して、光線力学効果で最も細胞毒性の高い一重項酸素が生成される (Type II 反応) [27]。Type I 反応でも光線力学効果による不可逆的な光感受性物質の分解が起こるが [28]、Type II 反応で生成する一重項酸素は拡散性が高く、基質との反応速度定数が大きいため、Type I 反応よりも Type II 反応の方が光線力学効果が効率的な場合が多い [29]。毒性の高い一重項酸素や酸素ラジカルは、細胞成分と反応して細胞死を引き起こすため、酸素は PDT の有効性を左右する重要なパラメータである。しかし、PDT の治療対象組織では、治療中の酸素消費 [30] [31] [32] や、治療による腫瘍血管系の破壊 [33] [34] によって局所的に低酸素状態になり、治療中に絶えず溶存酸素が豊富な状態が継続することは難しいと考えられる。低酸素は、転写因子である hypoxia inducible factor-1a(HIF-1a) を安定化させることで血管新生を促し [35]、その結果、vascular endothelial growth factor(VEGF) の産生と分泌が増加する [36]。VEGF の誘導は、腫瘍の生存と再生に

寄与すると考えられており、PDT がその抗腫瘍効果を十分に発揮できない要因となりうる。PDT 中のレーザー照射エネルギー量と酸素消費の関係の解析は、PDT の作用機序の定量的な理解に必要といえる。

#### 1.4 光線力学効果における細胞生物学的反応と細胞間ネットワークによる免疫反応

第 1.3 節に前述のとおり、ROS の作用に起因する直接的な殺細胞効果には溶存酸素が欠かせない。一方で固形がんは無秩序な血管形成によって特に腫瘍の深部は低酸素状態にあると言われている。また、PDT によって治療対象組織では治療進行中に低酸素状態に陥りやすく、PDT の抗腫瘍効果を下げ、腫瘍が遺残する結果となる。そこで、PDT の効果を補完する間接的な効果が免疫の賦活化だと言われている。PDT は ROS の発生に伴う酸化ストレスにより腫瘍細胞に対してアポトーシスやネクローシスなどの様々な細胞死のメカニズムを局所的に引き起こす。すなわち、直接的に腫瘍細胞に対して殺細胞効果をもたらすだけではなく、他のがん治療にはない特徴的な酸化ストレスによる細胞死のメカニズムによって、細胞はホメオスタシスの回復を目的とした適応ストレス応答（サイトカインの放出など）を引き起こし、腫瘍微小環境の炎症反応が起こることで全身の免疫応答を活性化することが報告されている。がんに対する免疫反応は、次の 7 つのステップで構成される。すなわち、1 がん細胞からのがん抗原の放出、2 樹状細胞によるがん抗原の捕獲と提示、3 樹状細胞による T 細胞のプライミングと活性化、4 T 細胞の腫瘍への遊走、5 T 細胞の腫瘍への浸潤、6 T 細胞によるがん細胞の認識、7 T 細胞によるがん細胞の殺傷の 7 つのステップである。このうち 1 から 3 に関与する抗原提示細胞である樹状細胞(Dendritic Cell; DC、以下「DC」という)が高効率に抗原提示し、T 細胞を活性化できることが、がん免疫獲得に必要な条件といえる。PDT は、抗腫瘍免疫の誘導に必要な腫瘍抗原と、DC の活性化の両方に有利な環境を腫瘍部位に作り出す可能性が指摘されている [37]。PDT 由来の腫瘍抗原によって誘導される免疫細胞による免疫反応が惹起される現象の解明は、PDT による直接的な抗腫瘍作用に加えて PDT による抗腫瘍免疫の効果を最大化することにつながる。

#### 1.5 光照射条件が PDT 治療効果へ与える影響

PDT によるがん治療は、第 1.3 節、第 1.4 節において述べたように、腫瘍組織内の光感受性薬剤への光照射によって生じる活性酸素生成によって誘導される直接的作用および間接的作用、ならびに免疫的抗腫瘍作用を基にしている。活性酸素の生成は、薬剤や酸素濃度とともに光照射エネルギー量に依存する。PDT の光照射は生体組織に対して行うため、生体組織内の光分布が治療効果に影響する。生体組織中へレーザー光照射した際の光伝搬は、モンテカルロ法に基づく計算機シミュレーションによって確度良く計算できる [38]。これまでに、レーザー治療効果の比較評価への計算機シミュレーションの応用が提案されてい

る [39] [40] [41]。PDT の治療効果評価に対しても光伝搬シミュレーションが活用されており、PDT 作用機序の解析や光照射条件の最適化が検討されている [42] [43]。医療機器の評価においては、米国医薬品食品局(FDA)は、2016 年 9 月に Reporting of Computational Modeling Studies in Medical Device Submissions をまとめ、医療機器の申請を支援するための計算機シミュレーション使用における正式なガイダンスを示している [44]。本邦においては、2019 年 3 月に PDT 用照射装置に特化して *in silico* 評価の活用に関する基本的な考え方を示すことを目的とした「PDT 機器開発ガイドライン 2019 (手引き)」が策定され [45]、医療機器製造販売承認を取得した PDT 半導体レーザの評価にも計算機シミュレーションが利用されている [46] [47]。また、直近では、2021 年 3 月に PMDA 科学委員会より「コンピュータシミュレーションを活用した医療機器ソフトウェアの審査の考え方に関する専門部会 報告書」が公開され [48]、数値シミュレーションの医療機器開発への適用の仕方、すなわち、1) 数値シミュレーションを医療機器（医療機器プログラムを含む）の主要な機能実現に用いる場合、2) 数値シミュレーションを医療機器の評価に用いる場合、に大別して論じられている。これら FDA や PMDA の直近の動向は、計算機シミュレーションがプログラム医療機器の主たる機能としても、また、従来のハードウェア医療機器の評価手法としても重要性が増していることを裏付けている。生体組織内の光伝搬シミュレーションは、生体組織スケールにおいて PDT 治療効果を定量的に評価することにつながる。

## 1.6 本論文の目的

細胞レベルで分子生物学的な見地から PDT を理解することは、PDT の作用機序に基づく治療条件の探索や、治療前の治療計画、治療中の治療進行モニタリング手法の検討に欠かせない。また、PDT では種々の抗腫瘍効果の組み合わせにより治療効果が得られ、その根本は光照射による活性酸素種の生成にある。そのため、PDT の治療効果の予測および評価には生体組織内の光分布の評価が有効となる。これら背景を踏まえて本論文では、PDT の直接的作用および免疫作用を細胞レベルで実験的に評価して治療効果に与える治療パラメータを明らかにし、治療計画や治療進行モニタリングに寄与するパラメータを提案するとともに、治療計画に有効と考える生体組織光学 (tissue optics) に基づいた光分布により治療効果を定量的に評価するための手法を確立することを目的とする。生体組織光学に基づくレーザー照射計画の標準化および臨床応用により、PDT 施行前に治療シミュレーションを実行したり、照射計画を立案したりすることが可能となり、より適格な患者選択やより有効かつ安全な PDT の実現に資すると考える。現在本邦で適応のある疾患に対する PDT の成績向上により、PDT の臨床現場での位置づけを向上させることによって、新たな適応の追加が実現すれば、必ずしも十分ではない現状のがん治療に対し新しい選択肢を増やし、現状の標準治療では治療法がないがん患者に対して新しい標準治療の提供が可能となる。

## 1.7 本論文の構成

本論文では、細胞レベルでの PDT に寄与するパラメータを探索し、続いて、PDT によってもたらされる腫瘍抗原による免疫細胞のサイトカイン分泌の有無を調べ、最後に組織レベルでの光分布シミュレーションの可能性を検討し、PDT の原理に基づいた照射計画法の立案に向けた検討を行う。

第 2 章では、PDT の原理（腫瘍細胞へのレザフィリンの取り込み、溶存酸素の消費、レザフィリンの光退色、活性酸素種の発生、殺細胞効果）について培養細胞を用いた *in Vitro* の実験系において確認し、PDT の原理と PDT を最適化するための条件や、治療前の治療計画、治療中の治療進行モニタリングにおいて、いずれのパラメータが重要な要素を確認する。

第 3 章では、PDT による直接的な抗腫瘍効果に加えて抗腫瘍免疫への関与に関する検討を行う。PDT 由来の抗原が免疫細胞からのサイトカイン分泌を誘導することを確認することで、抗腫瘍免疫の活性化につながる抗腫瘍免疫に有利な環境を腫瘍部位を作り出していくことを明らかにし、臨床 PDT の最適化の条件の探索、すなわち臨床 PDT の抗腫瘍免疫の観点から考慮すべき点の有無を明らかにする。

第 4 章では、組織内光分布に基づいた PDT 治療効果の評価に向けて、数値シミュレーションの利用を提案する。末梢性肺癌を対象として、異なる光照射プローブによる光分布をモンテカルロ法により求める。数値シミュレーションに基づく PDT 治療効果評価の可能性を示す。

第 5 章では、研究を総括し、PDT の治療成績の向上と普及に向けた PDT の術前治療計画における計算機シミュレーションの重要性について論述する。

## 2. PDT の殺細胞効果に影響する因子に関する *in Vitro* 評価

### 2.1 緒言

光線力学治療（以下「PDT」という）の効果を高めるためには、そのメカニズムを明らかにすることが重要であるため、光線力学効果による酸素消費と光増感剤の分解（光退色）に関する研究が盛んに行われている [28] [49] [50] [51] [52] [53] [54]。Type I 反応でも光線力学効果による不可逆的な光感受性物質の分解が起こるが [28]、一重項酸素は拡散性が高く、基質との反応速度定数が大きいため、Type I よりも Type II の反応の方が光線力学効果が効率的な場合が多い [29]。

光線力学効果により発生する活性酸素種（reactive oxygen species; ROS、以下「ROS」という）の中でも、毒性の高い一重項酸素や酸素ラジカルは、細胞成分と反応して細胞死を引き起こすため、溶存酸素は PDT の効果を左右する重要なパラメータである。しかし、PDT には局所的な低酸素がつきものである。これは、治療中の酸素消費に直接起因するもの [30] [31] [32] と、効果的な治療の結果として腫瘍血管系が破壊されることによって腫瘍への酸素供給が途絶え、間接的に引き起こされるもの [33] [34] がある。低酸素は、転写因子である hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )を安定化させ [35]、その結果、vascular endothelial growth factor(VEGF)の産生と分泌が増加することで血管新生を促す [36]。VEGF の誘導は、腫瘍の生存と再生に寄与すると考えられており、したがって、VEGF の分泌促進は PDT がその抗腫瘍効果を十分に発揮できない要因となりうる [55] [56]。

PDT 後、VEGF の分泌量の増加 [57] [58] と血管新生反応が *in vivo* の実験で報告されている [59] [60]。また、マウス乳癌の皮下移植モデルに対するフォトフリンを用いた PDT 後に HIF-1 $\alpha$ が増加すると、cyclooxygenase-2(COX-2)と VEGF が増加するという報告もある [58] [61]。したがって、PDT 中の酸素消費の挙動をより深く理解することは、PDT において考慮すべき要素を明らかにし、レーザーの照射方法の改善や新たな治療概念の構築に役立ち、PDT を受けた患者の長期生存率を向上させる可能性がある。

本章では、PDT 中の酸素消費量、ROS の産生、光退色、および PDT 後の光細胞毒性と培養がん細胞からの VEGF 分泌を測定し、それらの関係から PDT の効率化に寄与する因子を検討する。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 材料

光感受性薬剤には本邦で医薬品製造販売承認を取得しているタラポルフィンナトリウム (mono-l-aspartyl chlorin e6, Laserphyrin®, Meiji Seika ファルマ株式会社より提供) を用いた。タラポルフィンナトリウムは、クロリン構造の D 環にアスパラギン酸がアミド結合した化合物であり、波長 664 nm に光吸収のピークを有する。レーザー照射装置は、波長  $664 \pm 1\text{nm}$  の連続波半導体レーザー (UM1000/medical, JENOPTIK unique-mode GmbH, Germany) を用いた。レーザーの照射は、培養プレートの底面に取り付けたファイバーを介して行った。レーザーの照射位置は自動ステージ (シグマ光機株式会社) を用いて自動調整した。がん細胞としてはマウス Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞株を用いた。

### 2.2.2 方法

#### 2.2.2.1 溶存酸素の測定

タラポルフィンナトリウムを含む培養液中の酸素消費量は、クラーク型酸素微小電極 (PO2-150D) を用いて、レーザー照射中に連続的に測定した。タラポルフィンナトリウム (0.5, 1, 5, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を含む培地を黒色で底が透明な 96 ウェルの Microtest™ Optilux™ Plate (BD Bioscience Inc., CA, USA) に入れ、各ウェルの底面から  $60\text{ mW}/\text{cm}^2$  のパワー密度で 0, 30, 60, 90, 120 秒間照射した。照射中に電極の先端を培地中に入れ、溶存酸素濃度を連続的に測定した。各測定の前には、培地を静置し大気に暴露し、測定中は自動ステージに備え付けられたサーモコントローラーを用いてウェル内の温度を  $37^\circ\text{C}$  に制御した。

#### 2.2.2.2 光退色特性の観察

レーザー照射時のタラポルフィンナトリウムの光退色特性を調べるために、培養液に溶解したタラポルフィンナトリウム (0.5, 1, 5, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を黒色で底が透明な 96 ウェルの Microtest™ Optilux™ Plate に入れ、各ウェルの底面から  $60\text{ mW}/\text{cm}^2$  のパワー密度で 0, 30, 60, 90, 120 秒間照射し、残存したタラポルフィンナトリウムの濃度を測定した。レーザー照射後、タラポルフィンナトリウムの蛍光を、マルチモードマイクロプレートリーダー (SpectraMax M5®; Molecular Devices Co. Ltd., CA, USA) を用いて定量測定した。蛍光強度の測定は励起波長は  $405\text{ nm}$ 、蛍光波長は  $672\text{ nm}$  で行った。タラポルフィンナトリウムの濃度の検量には、レザフィリンの既知濃度のサンプル溶液を用いて、蛍光強度と濃度の検量線を事前に取得し用いた。

#### 2.2.2.3 活性酸素種の測定

2-[6-(4'-Amino)phenoxy-3*H*-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid (APF; Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo, Japan)を蛍光プローブとして用い、タラポルフィンナトリウム溶液中のヒドロキシルラジカルやペルオキシダーゼの反応性中間体などの活性酸素を検出した<sup>30</sup>。APFは弱い蛍光しか発しないが、活性酸素との反応により、選択的かつ用量依存的に強い蛍光を発する化合物であるフルオレセインに変化する。0.5, 1, 5, 10 µg/mL のタラポルフィンナトリウムを含む培養液に APF (5 mM) を溶解し、黒色で底が透明な 96 ウェルの Microtest™ Optilux™ Plate に入れ、各ウェルの底面から 60 mW/cm<sup>2</sup> のパワー密度で 0, 30, 60, 90, 120 秒間照射し、レーザー照射後にフルオレセインの蛍光を測定した。レーザー照射後のフルオレセイン濃度は、マルチモードマイクロプレートリーダー SpectraMax M5 を用いて、励起波長 490nm、蛍光波長 515nm で定量測定した。光学フィルターを用いることで、タラポルフィンナトリウムの蛍光を除去して、APF 由来のフルオレセインの蛍光を測定した。

#### 2.2.2.4 細胞内へのタラポルフィンナトリウムの取り込み量の測定

タラポルフィンナトリウムの細胞への取り込み量の測定は、先行研究 [62]と同様に測定した。黒色で底が透明な 96 ウェルの Microtest™ Optilux™ Plate を用いてマウス Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞を 1 ウェルあたり 1×10<sup>4</sup> cells の密度で播種し、100 µL の Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich Inc., MO, USA) で静置培養した。24 時間の培養後、細胞がプレートに付着していることを確認したうえで培地を除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS, pH7.4, Sigma-Aldrich Inc.) で 3 回洗浄した。その後、各ウェルにタラポルフィンナトリウム (0.5, 1, 5, 10 µg/mL) を含む DMEM (胎児性仔牛血清 (FCS) フリーの DMEM) 100 mL ずつ添加した。タラポルフィンナトリウムを含む培地を添加した 2 時間後に上清を除去し PBS で 3 回よく洗浄し、細胞外のタラポルフィンナトリウムを可能な限り除去し後、0.05 % ドデシル硫酸ナトリウム溶液 100 µL を用いて 37 °C で 20 分間細胞を溶解し、Hoechst 33258 溶液(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 100 µL を加えた。室温で 5 分間静置した後、マルチモードマイクロプレートリーダー SpectraMax M5 を用いて、励起波長 405 nm、蛍光波長 672 nm で各ウェル内のタラポルフィンナトリウムの蛍光強度を定量測定した。その後、Hoechst 33258 溶液を用いた細胞の DNA 量の蛍光によって定量測定し各ウェル内の細胞数を計測した。Hoechst 33258 とタラポルフィンナトリウムの間の蛍光干渉は、光学フィルターを用いて分離した。DNA 濃度と細胞数の間の検量線は、異なる既知の細胞濃度の細胞懸濁液を用いてあらかじめ作成した。各ウェル内に含まれるタラポルフィンナトリウムの量を各ウェル内の細胞数で除して、細胞中のタラポルフィンナトリウム量の平均値を算出した。

#### 2.2.2.5 PDT の有効性評価と PDT 後の培養液中の VEGF 濃度測定

LLC 細胞を黒色で底が透明な 96 ウエルの Microtest<sup>TM</sup> Optilux<sup>TM</sup> Plate に播種し、24 時間の培養後、細胞がプレートに付着していることを確認したうえで培地を除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS, pH7.4, Sigma-Aldrich Inc.) で 3 回洗浄した。その後、各ウェルにタラポルフィンナトリウム (0.5, 1, 5, 10 µg/mL) を含む FCS フリーの DMEM100 µL ずつ添加した。タラポルフィンナトリウムを含む培地を添加した 2 時間後に、上清を除去し、PBS で 3 回よく洗浄し、細胞外のタラポルフィンナトリウムを可能な限り除去した後、タラポルフィンナトリウムを含まない FCS フリーDMEM を添加した細胞に、レーザー照射 (照射パワー密度 60 mW/cm<sup>2</sup>) を 0, 30, 60, 90, 120, 180 秒行った。レーザー照射後、培養液を FCS 入りの培地に変更し、細胞を 24 時間培養した後、細胞数のカウントと VEGF 濃度の測定を行った。細胞数の測定には、水溶性テトラゾリウム化合物をベースにした Cell Counting Reagent SF キット (Nacalai Tesque, Japan) を用いた。吸光度と細胞数の検量線は、細胞密度の異なる細胞を用いてあらかじめ作成した。分泌された VEGF の測定には、mouse VEGF Quantikine ELISA kit (R&D Systems, MN, USA) を使用した。

#### 2.2.2.6 統計解析

本章のすべての測定値は、3 回の独立した実験の平均±SD として報告する。統計解析には、Student's t 検定を用いた。p<0.05 で有意に異なる値と判定した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 溶存酸素の測定

PDT 中の酸素消費量を確認するため、レーザー照射中の培地中の溶存酸素濃度の経時変化を測定した (Fig.2.1)。溶存酸素濃度は、レーザー照射中に時間とともに減少し、培地中のタラポルフィンナトリウムの初期濃度が  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  および  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  の場合には劇的に減少し、120 秒のレーザー照射終了時には 80 %以上の酸素が消費されていた。一方、タラポルフィンナトリウムの初期濃度が  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  および  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  の場合、溶存酸素濃度の減少は 20 %未満であった。

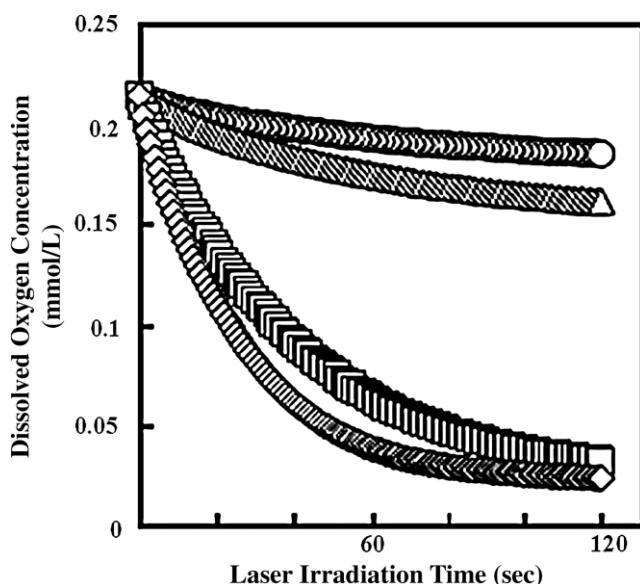


Fig.2.1 Time courses for  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  (○),  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  (△),  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  (□), or  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  (◊) of talaporfin sodium showing changes in dissolved oxygen concentration in the culture medium during laser irradiation.

### 2.3.2 光退色特性の観察

レーザー照射時間とタラポルフィンナトリウムの濃度の関係を Fig.2.2 に示す。光退色は、レーザー照射の直前と直後の光感受性物質の蛍光強度の差として定義される。この測定は、レーザー照射後の光線力学反応の後に蛍光を測定しているため、不可逆的な光退色を反映している。レーザー照射により、培地中のタラポルフィンナトリウムの初期濃度が  $0.5 \mu\text{g/mL}$  または  $1 \mu\text{g/mL}$  の場合には、蛍光は短時間で減少した。培地中のタラポルフィンナトリウムの初期濃度が  $5 \mu\text{g/mL}$  または  $10 \mu\text{g/mL}$  の場合、レーザー照射 120 秒後に蛍光の減少は確認できたもののタラポルフィンナトリウムは残存していた。

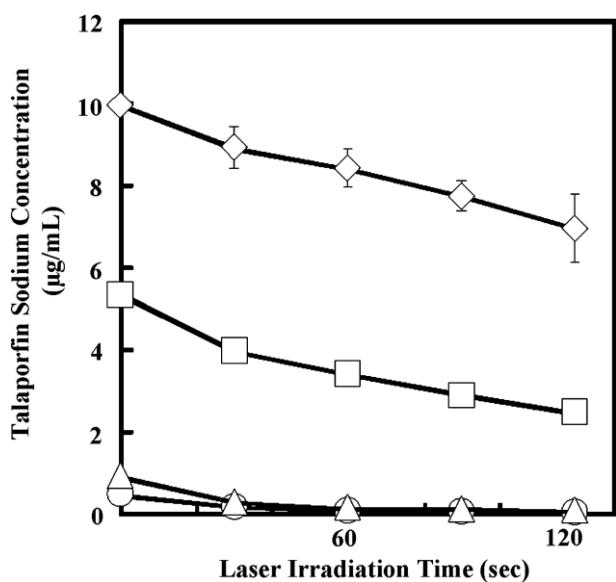


Fig.2.2 Photobleaching of photosensitizer resulting from laser irradiation. Photodynamic therapy (PDT) using laser irradiation induced a significant degradation of fluorescence when the initial concentration of talaporfin sodium in the medium was  $0.5 \mu\text{g/mL}$  (○) or  $1 \mu\text{g/mL}$  (△). In contrast, when the initial concentration of talaporfin sodium in the medium was  $5 \mu\text{g/mL}$  (□) or  $10 \mu\text{g/mL}$  (◇), fluorescence was only slightly decreased after laser irradiation for 120 sec.

### 2.3.3 活性酸素種の測定

活性酸素の発生を定量化するため、APF 由来のフルオレセインの蛍光強度を測定した。レーザー照射後、高濃度のタラポルフィンナトリウム（5 または  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）の存在下では、低濃度（0.5 または  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）の存在下での活性酸素の発生と比較して、活性酸素の発生が高く、活性酸素の発生量はレーザーの照射時間依存的に増加した（Fig.2.3）。

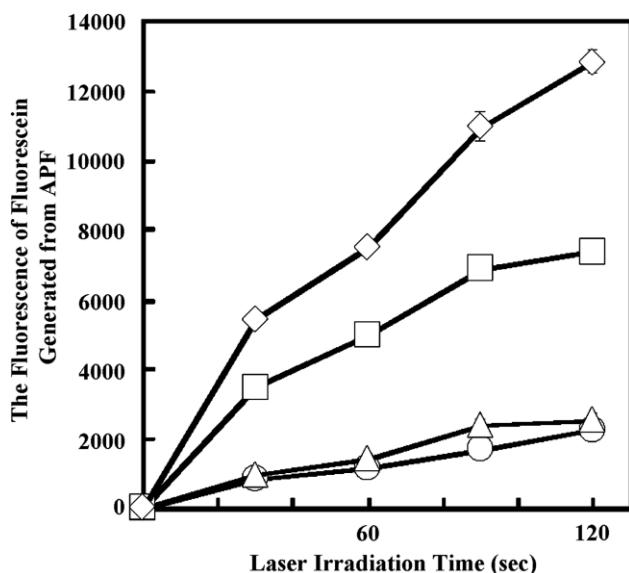


Fig.2.3 Laser irradiation induced increased reactive oxygen species (ROS) generation at higher concentrations of talaporfin sodium,  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  (□) or  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  (◇), compared with lower concentrations,  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  (○) or  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  (△). APF, 2-[6-(40-amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid.

### 2.3.4 タラポルフィンナトリウムの細胞内の取り込み量の測定

培養液中のタラポルフィンナトリウムの初期濃度(投与濃度)と細胞内への取り込み量の関係を Fig.2.4 に示す。タラポルフィンナトリウムの細胞内取り込み量は、用量依存的に増加した。

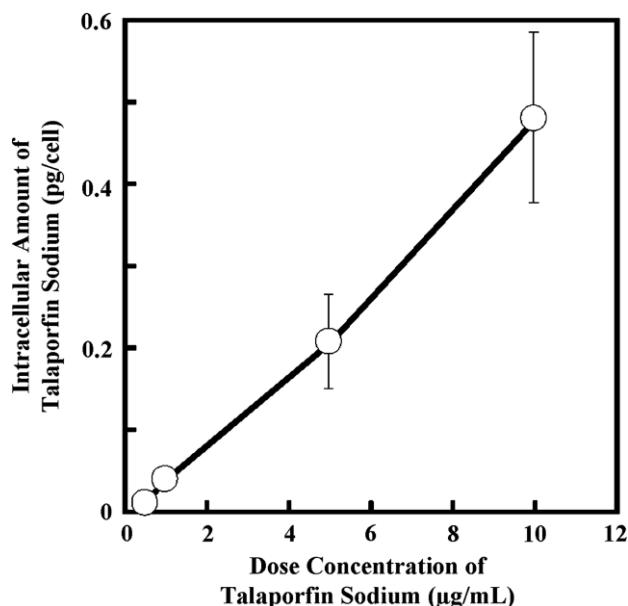


Fig.2.4 The intracellular uptake of talaporfin sodium by mouse Lewis lung carcinoma (LLC). Graph shows the amount of intracellular talaporfin sodium that was taken up by LLC after 2 h of culture in FCS-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 0.5, 1, 5, and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of talaporfin sodium (dose concentration). All the value was  $p<0.001$  in Student t test compared to the other data point.

### 2.3.5 PDT の有効性評価と PDT 後の培養液中の VEGF 濃度測定

PDT の細胞毒性効果をタラポルフィンナトリウムの濃度ごとに評価した (Fig.2.5)。タラポルフィンナトリウムの濃度が 5 または  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  の場合、PDT による殺細胞効果はレーザー照射時間に依存して増大した。しかし、タラポルフィンナトリウムの濃度が  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  および  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  の場合、PDT による殺細胞効果は確認できず、非照射群と比較して生存率に有意な違いは確認できなかった。

次に、PDT の 24 時間後に細胞培養液中に放出された VEGF の量をタラポルフィンナトリウムの濃度ごとに定量評価した (Fig.2.6)。タラポルフィンナトリウムを  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  または  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  添加した場合、PDT により生存する細胞数が減少したことによって培養液中の VEGF の濃度も減少した。PDT によって、細胞からの VEGF の分泌が増えることはなかった。

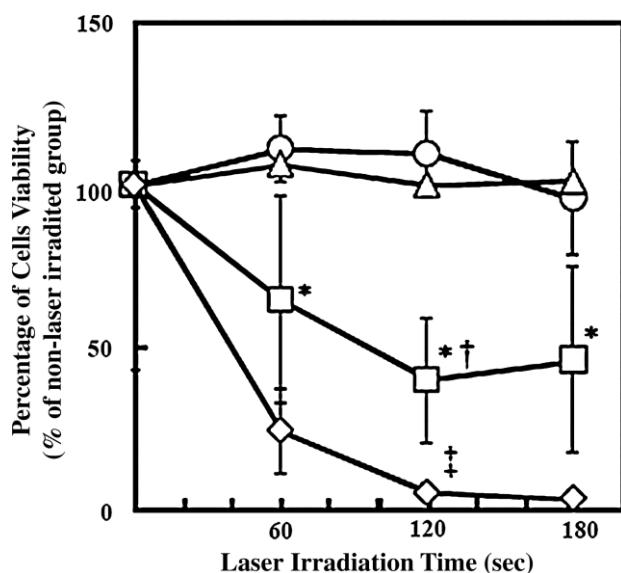


Fig.2.5 The cytotoxic effects of PDT at different talaporfin sodium concentrations. When the concentration of talaporfin sodium was  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  (□) or  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  (◇), the phototoxicity of PDT was proportional to the duration of laser irradiation. However, when the concentration of talaporfin sodium was  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  (○) or  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  (△), the phototoxicity was markedly lower.  
\* $p < 0.001$  (vs 1 and  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  in same irradiation time, respectively); † $p < 0.05$  (vs.  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 60 sec); ++ $p < 0.001$  (vs.  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 60 sec).

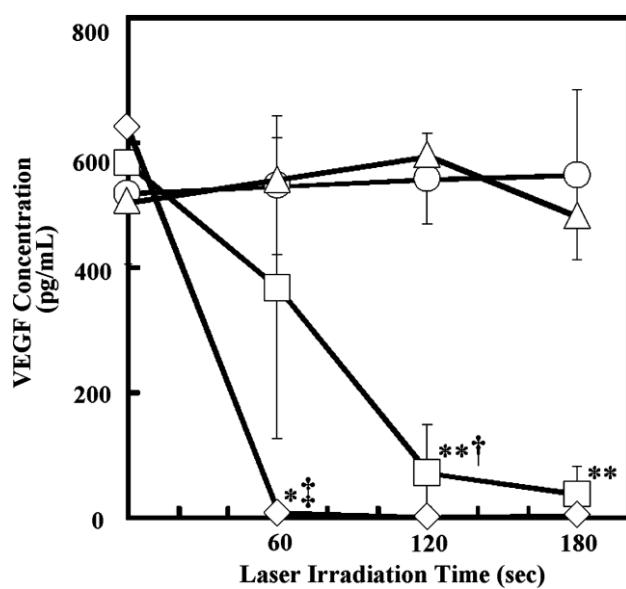


Fig.2.6 The amount of vascular endothelial growth factor (VEGF) released into the cell culture medium was quantified 24 h after PDT for each talaporfin sodium concentration. Since PDT decreased the number of cells, the concentrations of VEGF in the culture media also decreased when 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (□) or 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (◇) of talaporfin sodium was added. \* $p<0.05$  (vs. 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 60 sec); \*\* $p<0.001$  (vs. 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in same irradiation time); † $p<0.05$  (vs. 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 60 sec); ++ $p<0.001$  (vs. 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0 sec).

## 2.4 小括

PDT の治療の根幹は ROS であるため、その発生に必要な溶存酸素が減少すると PDT の効果が低下する [62] [63]が、この過程における酸素消費の詳細な動態はこれまで不明であった。本章では、PDT 中の酸素消費とその細胞生存率への影響を調べた。その結果、タラポルフィンナトリウムの投与濃度が高いと、タラポルフィンナトリウムの細胞内濃度 (Fig.2.4)、酸素消費量 (Fig.2.1)、活性酸素の生成量 (Fig.2.3)、殺細胞効果 (Fig.2.5) が高くなることがわかった。このように、PDT の殺細胞効果は酸素消費量とともに高まることが分かった。本章の結果は、これまでの PDT の研究における活性酸素の生成量が多いほど細胞死が増加するというモデルを改めて検証するものであるが、同時に酸素消費量の総量が細胞毒性の本質的な要因であることも示唆している。また、酸素が十分に供給されている培養細胞を用いた環境下では、タラポルフィンナトリウムの投与濃度と細胞に照射されるレーザーエネルギーの総量も ROS の発生と殺細胞効果につながる重要な要素であることを示した。

以上から、本章の研究結果から以下の 3 つが PDT の効果を司る要素であると結論できる。すなわち、1.タラポルフィンナトリウムの投与濃度、2.溶存酸素濃度、3.レーザーエネルギーの 3 つである。このうち、タラポルフィンナトリウムの投与濃度については、臨床 PDT を考慮した場合、医薬品の毒性評価の観点から投与量を引き上げることはできず、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律に基づくタラポルフィンナトリウムの製造販売承認において用法・用量は患者の単位表面積あたり一定量しか投与できない現状から、症例ごとに変えることが難しいため、本論文における検討の対象外とする。

PDT の治療の根幹をなす ROS の発生と殺細胞効果に加え、酸素消費と光退色に着目した本章の研究からは、溶存酸素は PDT の効果を左右する重要なパラメータであることを明らかにしたが、PDT 自体が血管障害や光線力学効果による酸素消費により治療組織の低酸素化を引き起こす可能性がある [64] [65]。低酸素状態になると HIF-1 $\alpha$ が安定化し [32]、これが VEGF を活性化することが明らかになっている [33]が、本章の研究では生存した癌細胞からの VEGF の分泌量の有意な増加は確認できなかった。HIF-1 $\alpha$ は酸素のホメオスタシスを回復させ、解糖、赤血球生成、血管新生、アポトーシス抑制などの細胞生存プロセスを促進する [66] [55] [56]。これまでの研究では、PDT による低酸素状態が血管新生促進因子の発現に及ぼす影響と、PDT の効果との関連性に焦点が当てられてきた [35] [67]。これらの結果からも、活性酸素や一重項酸素の生成をサポートするだけでなく、新生血管形成を抑制するためにも、PDT 中に充実した酸素環境を維持することで、PDT の効率が向上する可能性を示している。治療の進行をモニタリングする手法として、PDT 施行中の酸素モニタリングや光退色モニタリングが大きな可能性を持つことを示している。しかしながら、現状技術的なハードルや医療機器化の障壁の高さから PDT 施行中の酸素モニタリング

や光退色モニタリングを行うための医療機器開発は行われておらず、今後の課題といえる。本章に続く、第3章では低酸素下の腫瘍組織においてROSによる直接的な殺細胞効果が得られない場合の免疫効果に関して検討する。

### 3. PDT による免疫細胞からのサイトカイン分泌の誘導

#### 3.1 緒言

第2章では光線力学作用による活性酸素種（以下「ROS」という）の発生と ROS による直接的な殺細胞効果に寄与する要素について培養細胞を用いた *in Vitro* の実験系により分子生物学的な見地から評価した。その結果、ROS による殺細胞効果を高効率に起こすためには腫瘍組織の溶存酸素濃度を高く保つことが重要であることが分かった。一方で、一般的に腫瘍組織は正常組織と比較して無秩序な血管形成によって低酸素状態にあるといわれており [68]、個々の症例における腫瘍組織内の酸素状態の理解は光線力学治療（以下「PDT」という）の治療計画に欠かせない要素と言えるものの、現状腫瘍組織中の酸素状態を定量的に評価しモニタリングする手法は確立していない。よって PDT の対象の腫瘍組織内が低酸素状態で PDT が施行されていることも想定され、その場合、腫瘍全体に対しては ROS による直接的な殺細胞効果が有効に働くこととなる。そこで、ROS による直接的な殺細胞効果以外の PDT がもたらす効果として、従来から報告のある免疫効果について [22]、PDT によって傷害された腫瘍細胞が免疫細胞への抗原提示に有効な腫瘍抗原となりうるか否かについて、培養細胞を用いた *in Vitro* の実験系において検討を行う。

本章の研究で用いる樹状細胞(Dendritic Cell; DC、以下「DC」という)は最も強力な抗原提示細胞である。腫瘍由来のペプチド、タンパク質、遺伝子、ライセートなどで賦活化した DC や、腫瘍細胞と融合させた DC は、がん治療用ワクチンとして研究されている [69] [70] [71] [72] [73] [74] [75] [76] [77]。これらの方法は複雑でコストがかかるが、進行がんの患者を対象とした臨床試験では有望な結果が得られている。これらの臨床試験では、DC 由来のワクチンは忍容性が高く、腫瘍特異的な T 細胞応答を誘導し、転移性腫瘍の体積を縮小させることができることが示されている。一方で、このアプローチによる全体的な治療効果は限定的と言わざるを得ず、その効果を更に高めるか、他の治療法と組み合わせる必要がある。DC を用いた免疫療法と組み合わせる治療法の候補としては、抗がん剤治療のような全身的な治療や、放射線治療、ラジオ波焼灼療法、PDT のような局所的な治療を併用する方法が考えられる。

PDT による腫瘍の傷害は、光線力学効果によって発生する ROS による直接的な殺細胞効果に加えて、局所的な炎症反応の誘発にも起因する [78]。非臨床的な研究では、PDT が腫瘍細胞のアポトーシスおよびネクローシスを誘発するだけでなく、サイトカインの放出を通じて腫瘍微小環境を変化させることができることが示されている。PDT は、その特徴的な腫瘍傷害メカニズムに基づいて、抗腫瘍免疫の誘導に必要な腫瘍抗原の提供と DC の活性化の両方に有利な環境を腫瘍部位に作り出す可能性があるといわれている [37]。

本章では、PDT 由来の腫瘍抗原により DC から発現するサイトカインを網羅的に調べ、PDT で確認されている免疫反応に対する効果への関与の有無を調べる。

### 3.2 材料と方法

#### 3.2.1 材料

光感受性薬剤、レーザー照射装置、は、第2章と同様に本邦で医薬品製造販売承認を取得しているタラポルフィンナトリウム (mono-L-aspartyl chlorin e6, Laserphyrin®, Meiji Seika ファルマ株式会社より提供) と波長  $664 \pm 1\text{nm}$  の連続波半導体レーザー (UM1000/medical, JENOPTIK unique-mode GmbH, Germany) をそれぞれ用いた。レーザーの照射は、培養プレートの底面に取り付けたファイバーを介して行った。レーザーの照射位置は自動ステージ (シグマ光機株式会社) を用いて自動調整した。がん細胞として株化されたマウス Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞を用いた。

#### 3.2.2 方法

##### 3.2.2.1 がん細胞に対する PDT

培養がん細胞に対する PDT は先行研究と同様に、以下のように行った [62]。がん細胞の培養には、黒色で底が透明な 96 ウェルの Microtest™ Optilux™ Plate (BD bioscience Inc., CA) を用いて、10%のウシ胎児血清 (FCS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich Inc., MO) で培養した。初期の細胞密度は  $1 \times 10^4 \text{ cells/well}$  で播種した。24 時間後、細胞がプレートに付着していることを確認したうえで培地を除去し、培養液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.4, Sigma 社) で 3 回洗浄した。FCS フリー DMEM に溶解したタラポルフィンナトリウム (Mono-L-aspartyl chlorin e6, Laserphyrin®, Meiji Seika ファルマ株式会社より提供) を各ウェルに添加した ( $50 \mu\text{g/mL}$ )。2 時間後、上澄み液を除去し、PBS で 3 回、細胞を十分に洗浄した。FCS フリー DMEM を加え、致死量 (LD100) に相当する量のレーザー照射 (波長: 664nm、パワー密度:  $60\text{mW/cm}^2$ 、照射時間: 30 sec) を行った。レーザー照射後すぐに、培養液を FCS 入りの成長培地に交換し、再び培養環境に戻した。

##### 3.2.2.2 PDT 由来のがん抗原の作成

がん細胞への PDT の 24 時間後、細胞と上清を回収し、遠心分離により細胞の残骸を除去し、PDT 由来のライセートとした。並行して、LLC 細胞 (FCS フリー DMEM) を液体窒素による瞬間的な凍結と  $37^\circ\text{C}$  の水浴中による融解を 3 回繰り返した後、遠心分離して細胞の残骸を除去し、凍結融解ライセートとした。LLC 細胞の静止培養液 (FCS フリー DMEM) をコントロールとして使用した。

##### 3.2.2.3 樹状細胞由来のサイトカインの測定

JAWSII マウス樹状細胞株は、リボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオシド、4mM の L-グルタミンおよび 1mM ピルビン酸ナトリウムを含む最小必須培地 (MEM)  $\alpha$  に、10%

FCS および 5ng/mL のマウスリコンビナント GM-CSF を加えた完全増殖培地で培養した。JAWSII 細胞を 96 ウェルマイクロプレートに  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、一晩培養し、培養液を PDT 由来のライセートまたは凍結融解ライセート ( $100 \mu\text{L}/\text{well}$ ) に交換した。培養液を各ライセートに交換して 24 時間後、上清を回収し ELISA アッセイに供した。上清中の IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、マクロファージ炎症性タンパク質 (MIP) 1 $\alpha$ 、トランスフォーミング成長因子 (TGF)  $\beta$ 、腫瘍壞死因子 (TNF)  $\alpha$ 、血管内皮成長因子 (VEGF) のレベルは、Quantikine ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いて各サンプルから定量測定した。

### 3.2.2.4 統計解析

すべての測定値は、コントロール (LLC の培養液) に対する相対比として、平均値±標準偏差 ( $n=6-12$ ) で表した。統計的有意性 ( $P$  値 $<0.01$  と定義) は、Student's t-検定 (両側検定) を用いて評価した。

## 3.3 結果

PDT は、宿主の抗腫瘍免疫反応を増強することが示されている[13]。この増強が少なくとも一部は腫瘍細胞に対する PDT による効果の結果であるかどうかを確認するために、本章では *in vitro* の PDT で生成した腫瘍細胞のライセートの免疫原性について試験した。PDT で生成した腫瘍細胞ライセートを DC の培養液に加え、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、MIP-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、および VEGF のレベルを測定した。実験に先立ち、Proteome Profiler™ Array kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いてアレイテストを行い、実験群と陰性対照群の間で差があると思われるサイトカインや成長因子を網羅解析している。PDT で生成した腫瘍細胞ライセートを添加した DC 培養上清では、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 が最も顕著に増加し、TNF- $\alpha$  は減少していた (Fig.3.1 A)。これらのサイトカインは、腫瘍細胞のライセートからは検出されなかったので、DC から分泌されたものと判断できる。他のサイトカインの濃度は、ELISA の検出限界以下であった IL-2 と IL-12 を除いて、コントロール細胞の濃度と比較して変化していなかった。並行して、凍結解凍して生成した腫瘍細胞ライセートで処理した DC 培養の上清中のサイトカインレベルも調べた (Fig.3.1 B)。これらの実験では、上清に分泌されたサイトカインおよび成長因子のレベルは、凍結解凍で生成した腫瘍細胞ライセートを添加しても変化しなかった。

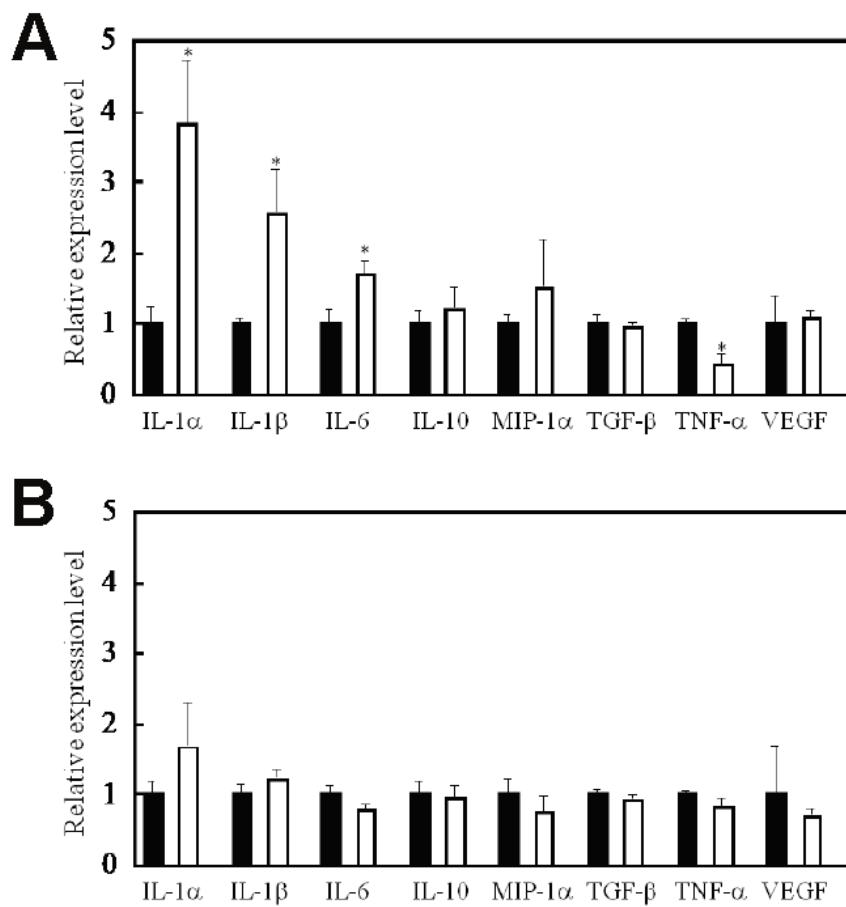


Fig.3.1. PDT-generated cell lysates activate DCs. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 were most markedly increased and TNF- $\alpha$  was decreased following the addition of PDT-generated lysates to DC cultures (A). In contrast, cytokine levels did not change after addition of freeze/thaw-generated tumor cell lysates to DC cultures (B). IL-2 and IL-12 secretion levels were below the detection limit of ELISA. \*, p<0.01: significant difference between the addition of PDT-generated lysates and addition of stationary culture media from LLC cells.

### 3.4 小括

IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  は、IL-6 の誘導因子として認識されており、マウスの抗腫瘍反応を誘導するために IL-6 と相乗的に作用するため、並行して調べた [79] [80]。Kick らが先に述べた *in vitro* での PDT 後の細胞からの IL-6 の分泌促進を確認した [81]。さらに、Kick らが示唆したように、IL-6 の変化には TNF- $\alpha$  の同様の変化が先行せず、また伴わないことから、PDT による IL-6 誘導に TNF- $\alpha$  は関与していないと考えられる。PDT は *in vitro* でマウス腹膜マクロファージに TNF- $\alpha$  を誘導し [82]、Anderson ら [83] による研究では、フタロシアニン由来の光増感剤を用いた PDT により *in vitro* でケラチノサイトに TNF- $\alpha$  のアップレギュレーションが見られた。本章の研究で観察された TNF- $\alpha$  レベルの低下は、先行研究と異なる結果である。TNF- $\alpha$  遺伝子の制御領域に対立遺伝子の違いがあることが示されているため、使用した DC に関連している可能性がある [84]。

DC による IL-6 の産生が PDT 由来の抗腫瘍反応に関与しているかどうかは、まだ不明であるものの、IL-6 によって局所的な抗腫瘍免疫が高まる報告は複数存在しており、腫瘍内に IL-6 を注入したり、腫瘍細胞に IL-6 遺伝子を導入したりすると、実験的なマウスの腫瘍モデルにおいて、腫瘍の免疫原性を高め、腫瘍の成長を抑制することができる [80] [85] [86]。このように、PDT は DC による IL-6 産生を促進することで、局所的な抗腫瘍免疫を高めることが可能性を秘めている。

Gollnick ら [87] は、PDT で生成した腫瘍細胞溶解液をワクチンとして投与すると、その後の腫瘍播種に対する防御、脾臓における抗癌活性の誘導、IFN を分泌する脾臓細胞の数の増加などにより、腫瘍特異的な免疫応答が誘発されることを報告した。これらの研究は、PDT が少なくとも一部の腫瘍細胞の固有の免疫原性を高めることができることを示している。PDT で生成された腫瘍細胞ライセート中で免疫細胞を「活性化」している因子については、いくつかの有望な候補があるものの、明らかにはなっていない。PDT で生成された腫瘍細胞ライセートが有効な抗腫瘍ワクチンであるという発見は、潜在的に幅広い臨床的意味を持っている。PDT による根治的な治療が可能な腫瘍の大きさや深さであれば PDT の適応となりうるもの、全ての腫瘍が PDT の適応となることは現実的ではない。一方で、PDT 単独での治療が難しい大きさや深さの腫瘍であっても PDT の免疫効果に期待して PDT を施行することは検討され得ると考える。一方で PDT 由来の抗原による抗腫瘍免疫のみでがんを根治させ得るほど強力に免疫原性を高めることは確認されていない。よって、PDT の免疫効果を最大限生かす方法としては、手術や化学療法など、宿主の抗腫瘍免疫反応を増強しない他のがん治療法と併用して、PDT を体内でワクチンを生成するアジュvant 的治療法として使用することも考えられる。最も考えうる組み合わせとしては、例えば、手術と PDT のコンビネーション治療によって、手術の治療成績に上乗せの効果を期待することも可能と考える。実際に、本邦で適応を取得している「原発性悪性脳腫瘍（摘出手術を施行する場合に限る）」は、PDT によって従来の手術成績に対する大幅な上乗せ効果が報告

されており [88] [89]、上乗せ効果の一部が免疫効果によるものか否かは不明であるものの、手術と PDT のコンビネーション治療の好例といえる。

## 4. PDT における組織内光分布に関する検討

### 4.1 緒言

第 2 章では光線力学作用により発生する活性酸素種（以下本章において「ROS」という）の発生と ROS による直接的な殺細胞効果に寄与する要素について分子生物学的な見地から培養細胞を用いた *in Vitro* の実験系により評価した。その結果、ROS による殺細胞効果を高効率に起こすためには腫瘍組織の溶存酸素濃度を高く保つことと十分なエネルギー量のレーザーを照射することが重要であることが分かった。一方で、一般的に腫瘍組織は正常組織と比較して無秩序な血管形成によって部分的に低酸素状態にあるといわれており [68]、腫瘍組織内の酸素状態の理解は治療計画においても重要となるが、未だその手法は確立していない。そのため光線力学治療（以下本章において「PDT」という）の適応症であるにも関わらず PDT で十分な治療効果が得られていない症例は、対象となる組織の低酸素によって十分な直接的な作用が得られていない可能性があるが、第 3 章において検討した PDT の免疫効果が ROS による直接的な抗腫瘍効果を補完している可能性について論述した。次に、第 2 章における検討の結果、PDT の効果を司る要素の 1 つとして特定したレーザーエネルギーについて検討する。具体的には、腫瘍組織内の光伝搬を予測することが可能であるか本章で検討し、臨床 PDT における照射計画立案の標準的な手法として計算機による腫瘍組織内の光伝搬シミュレーションの実装について検討する。

PDT では、薬剤の存在下にレーザー光を照射することにより抗腫瘍効果を得る。すなわち、レーザー光の照射方法が PDT 治療効果に直接的に影響する。しかしながら、PDT におけるレーザーの照射方法の違いの評価や照射性能の異なるプローブの性能の比較評価は、生体組織のような吸収散乱体中の光分布を実測することが困難であることから、定性的議論にとどまっている [90]。今後、PDT のさらなる発展に向けて、PDT の治療対象に応じた治療計画時の照射方法の検討や適切な新規光照射プローブの設計において、組織内光分布を評価する安定した再現性のある手法の確立が必要となる。

生体組織中へレーザー光照射した際の光伝搬は、モンテカルロ法に基づく計算機シミュレーションによって確度良く計算できる [38]。これまでに、レーザー治療効果の比較評価への計算機シミュレーションの応用が提案されている [39] [40] [41]。PDT の治療効果評価に対しても光伝搬シミュレーションが活用されており、PDT 作用機序の解析や光照射条件の最適化が検討されている [42] [43]。医療機器の評価においては、近年、米国医薬品食品局（Food and Drug Administration; FDA）は、2016 年 9 月に Reporting of Computational Modeling Studies in Medical Device Submissions をまとめ、医療機器の申請を支持する非臨床試験としての計算機シミュレーションの使用における正式なガイダンスを示している [44]。本邦においては、2019 年 3 月に PDT 用照射装置に特化して *in silico* 評価の活用に関する基本的な考え方を示すことを目的とした「PDT 機器開発ガイドライン 2019（手引き）」が策定された [45]。さらに、2021 年 3 月には PMDA 科学委員会より「コンピュータ

シミュレーションを活用した医療機器ソフトウェアの審査の考え方に関する専門部会 報告書」が公開され、数値シミュレーションの医療機器開発への適用の仕方、すなわち、1) 数値シミュレーションを医療機器（医療機器プログラムを含む）の主要な機能実現に用いる場合、2) 数値シミュレーションを医療機器の評価に用いる場合、に大別して論じられている [48]。これら FDA や PMDA の直近の動向は、計算機シミュレーションがプログラム医療機器の主たる機能としても、また、従来のハードウェア医療機器の評価手法としても重要性が増していることを裏付けている。実際に、既に医療機器製造販売承認を取得した PDT 半導体レーザの評価にも計算機シミュレーションが利用されている [46] [47]。現在、治験が進行中の PDT の新たな適応に対する PDT 光照射プローブの光照射性能の評価においても、光伝搬シミュレーションの活用が期待できる。本章では、PDT の新たな適応として 2021 年 5 月現在医師主導治験が進行中の末梢型肺癌に対する PDT [91]への使用を想定して開発検討段階にあるレーザー照射プローブ（直射プローブ [92]と側射プローブ）を取り上げ、計算機シミュレーションを元にした非臨床試験を実施し、実際のヒト生体組織の光学定数を用いた生体組織内の光伝搬シミュレーションの実行可能性について検証する。

## 4.2 対象と方法

### 4.2.1 対象

本研究では、開発検討段階の直射プローブ [92]と側射プローブを対象とした (Fig.4.1)。直射プローブでは、ファイバーコアからレーザー光が一様に射出されると仮定した。ファイバーコア径は 0.43 mm、ビーム拡がり角は実測値から  $17.4^\circ$  と設定した。側射プローブは、外径 1 mm、射出領域長 11 mm の円柱表面から一様になるようにレーザー光が射出されると仮定した。同一光源での光照射性能を比較するため、直射プローブ、側射プローブとともに 1 回の光照射あたり、射出光の全パワー 150 mW、照射時間 667 s と同じ値に設定した。光波長は 664 nm とした。腫瘍形状は気管支中心に中心を置く球形と仮定した (Fig.4.1)。腫瘍サイズの違いによる各プローブによる光照射特性を評価するために、直径 10, 20 mm の腫瘍サイズを対象とした。臨床条件を想定して直径 10 mm の腫瘍に対しては 1 回照射、直径 20 mm の腫瘍に対しては 2 回照射とした。光照射プローブはガイドシースによって気管支内腔に配置して光照射を行うと仮定した (Fig.4.1)。気管支は直径 2 mm とし、空気層と仮定した。照射プローブと腫瘍位置の関係を Fig.4.2、および、Fig.4.3 にまとめる。直射プローブでは、直径 10 mm 腫瘍に対して腫瘍手前 5 mm から照射 (Fig.4.2(a))、直径 20 mm 腫瘍に対して腫瘍中心手前 5 mm から照射後に腫瘍手前 5 mm から照射 (Fig.4.2(b)) を評価した。側射プローブでは、直径 10 mm の腫瘍に対してプローブの拡散領域中心と腫瘍中心を合わせて照射 (Fig.4.3(a))、直径 20 mm の腫瘍に対して腫瘍中心後方と手前にプローブ領域が重ならないよう 2 回照射 (Fig.4.3(b))、直径 20 mm の腫瘍に対して腫瘍中心後方と手前にプローブ領域を 1 mm 重ねて 2 回照射 (Fig.4.3(c)) を評価した。

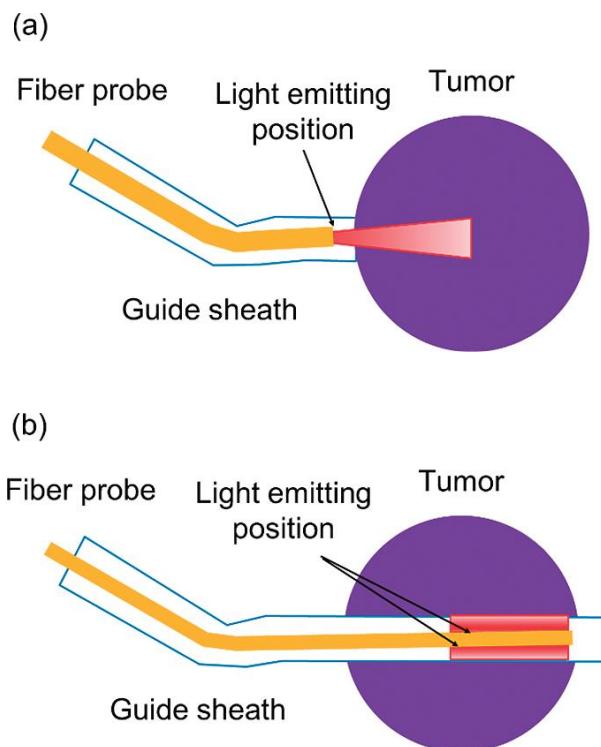


Fig.4.1 Schematic illustration of irradiation with (a) a direct transmission light irradiation probe and (b) a diffused light irradiation probe in PDT for peripheral lung cancer.

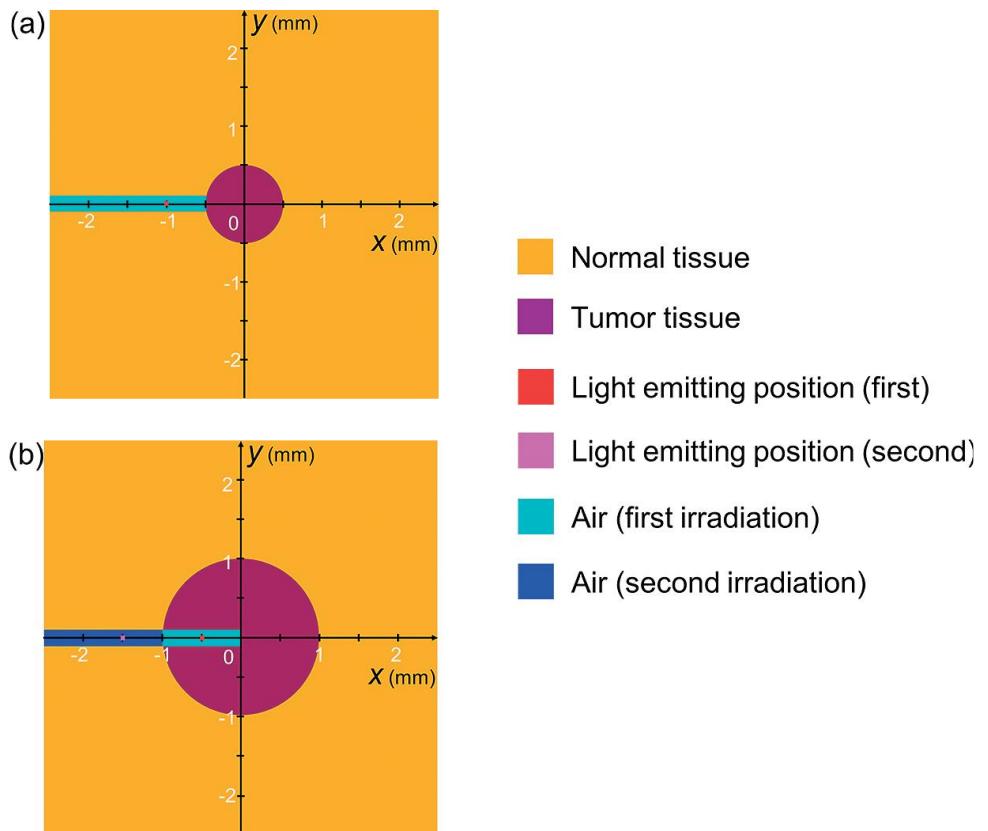


Fig.4.2 Irradiation conditions with a direct transmission light irradiation probe for (a) 10-mm and (b) 20-mm diameter of tumor tissue ( $xy$  plane ( $z = 0$  mm)).

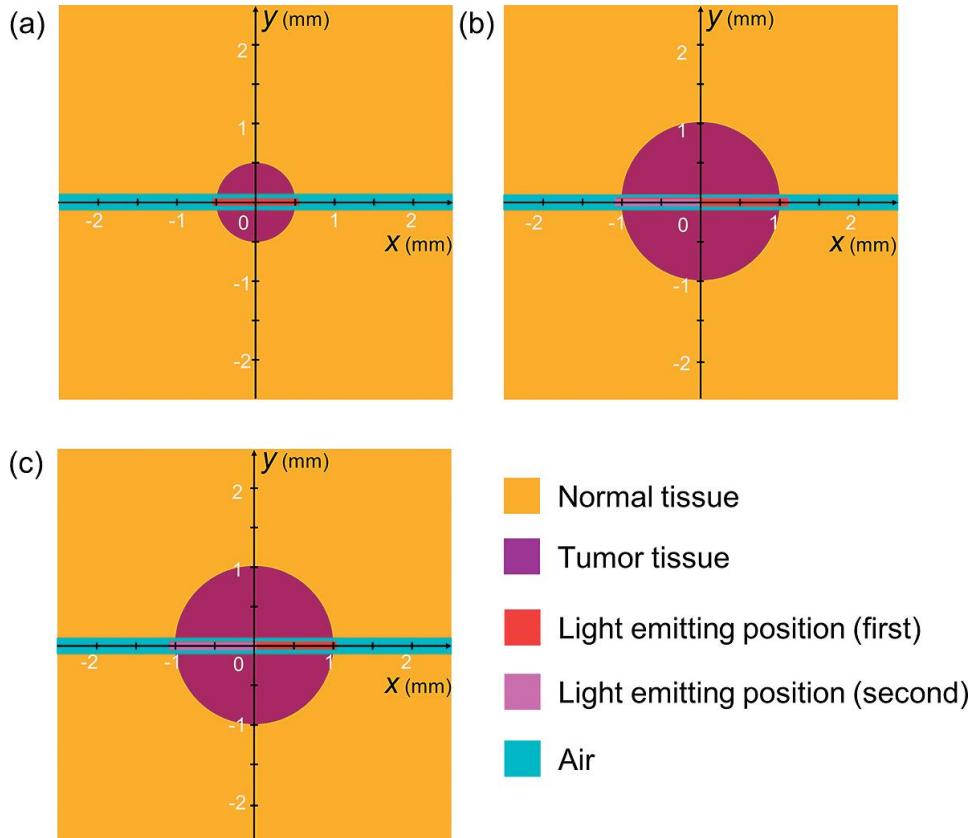


Fig.4.3 Irradiation conditions with a diffused light irradiation probe for (a) 10-mm and (b, c) 20-mm diameter of tumor tissue (xy plane ( $z = 0$  cm)). For 10 mm tumor, the center of light emitting area is positioned at the center of the tumor tissue (a). For 20 mm diameter tumor, the light emitting area is positioned at  $(x, y, z) = (-0.505 \text{ cm}, 0 \text{ cm}, 0 \text{ cm})$  and  $(0.505 \text{ cm}, 0 \text{ cm}, 0 \text{ cm})$  not to be overlapped (b) and the light emitting area is positioned at  $(x, y, z) = (-0.5 \text{ cm}, 0 \text{ cm}, 0 \text{ cm})$  and  $(0.5 \text{ cm}, 0 \text{ cm}, 0 \text{ cm})$  to be overlapped by 1 mm at the center of the tumor (c).

#### 4.2.2 方法

##### 4.2.2.1 数値末梢肺癌モデルの構築

光伝搬を計算するために、Fig.4.2、4.3 に示す構造にて肺末梢部を模擬した 3 次元モデルをそれぞれ構築した。計算領域を  $50 \times 50 \times 50$  mm、ボクセルサイズを  $0.1 \times 0.1 \times 0.1$  mm とした。構築した 3 次元モデルは各部位に対応する光学特性値を割り当てた。光照射時のガイドシース内は空気と仮定した。空気層の光学特性値は吸収係数  $1 \times 10^{-5}$  mm $^{-1}$ 、換算散乱係数  $0.1$  mm $^{-1}$  とした。正常組織と腫瘍組織の光学特性値は文献 [93] [94; 95] を参考に算出した値を用いた。換算散乱係数  $\mu'_s(\lambda)$  は次式で表現できる。

$$\mu'_s(\lambda) = a \times \lambda^{-b} [\text{mm}^{-1}] \quad \lambda \text{ in nm}$$

$a$ 、 $b$  は組織ごと固有の定数であり、文献 21)より肺組織における定数は  $a = 68.4$  mm $^{-1}$ 、 $b = 0.53$  (no units) である。以上より、 $\mu'_s(664) = 2.2$  [mm $^{-1}$ ] と算出した。吸収係数は、 $\mu_a(\lambda)$  は、還元ヘモグロビン吸収係数  $\mu_{a\text{Hb}}(\lambda)$ 、酸化ヘモグロビン吸収係数  $\mu_{a\text{HbO}_2}(\lambda)$ 、水吸収係数  $\mu_{a\text{W}}(\lambda)$  を用いて次式で表現できる。

$$\mu_a(\lambda) = S_B \left( x \times \mu_{a\text{Hb}}(\lambda) + (1 - x) \mu_{a\text{HbO}_2}(\lambda) \right) + S_W \mu_{a\text{W}}(\lambda) [\text{mm}^{-1}] \quad \lambda \text{ in nm}$$

ここで  $x, S_B, S_W$  は組織ごとに求められるスケーリング因子であり、肺組織における定数は  $x = 0.85, S_B = 0.15, S_W = 0.85$  である [93]。 $\mu_{a\text{Hb}}(664) = 1.63$  [mm $^{-1}$ ] 24)、 $\mu_{a\text{HbO}_2}(664) = 0.165$  [mm $^{-1}$ ] 24)、 $\mu_{a\text{W}}(664) = 0.000144$  [mm $^{-1}$ ] 25) を用いて、 $\mu_a(664) = 0.21$  [mm $^{-1}$ ] と求めた。

##### 4.2.2.2 光伝搬シミュレーション

モンテカルロ法に基づく吸収散乱体中の光伝播計算手法により、各条件におけるトータルフルエンスの空間分

布を求めた。S. L. Jacques らにより開発されたシミュレーションコード [96] を元に、対象とする直射プローブと側射プローブを再現するように光源初期値を設定して計算した。空間グリッドサイズを  $100 \mu\text{m}$  とし、射出光子数は  $1.2 \times 10^7$  とした。モンテカルロ法に基づく吸収散乱体中の光伝播計算手法は、過去に PDT 用のレーザー照射装置（医療機器の一般的な名称「PDT 半導体レーザ」）の製造販売承認審査においても根拠資料として採用されており、レーザー照射装置の医療機器としての評価にシミュレーションを適用する際に用いられている [46] [47]。

### 4.3 結果

Fig.4.4 に直射プローブ照射時の条件 1、2 におけるトータルフルエンスの空間分布の中心断面を示す。直射プローブ照射により、10 mm 径腫瘍に対して  $1 \text{ J/cm}^2$  以上の領域にてカバーされるのに対して (Fig.4.4(a))、20 mm 径腫瘍に対しては二回照射した場合においても  $1 \text{ J/cm}^2$  以下になる領域があった (Fig.4.4(b))。

Fig.4.5 に側射プローブ照射時の条件 3、4、5 におけるトータルフルエンスの空間分布の中心断面を示す。側射プローブ照射により、10mm 径腫瘍に対して  $1\text{J/cm}^2$  以上の領域にてカバーされるのに対して (Fig.4.5(a))、20mm 径腫瘍に対しては二回照射した場合においても  $1 \text{ J/cm}^2$  以下になる領域があった (Fig.4.5(b)、Fig.4.5(c))。Fig.4.5(b) と Fig.4.5(c) を比較するとトータルフルエンス分布に大きな差はなく、照射位置の微量の重なりの変化は光照射領域には影響しないことが分かる。

腫瘍サイズが同じ場合、Fig.4.4(a) と Fig.4.5(a)、Fig.4.4(b) と Fig.4.5(b) を比較すると、側射プローブ照射時は直射プローブによる照射領域をカバーすることがわかる。また、Fig.4.5(b) と Fig.4.5(c) を比較すると、複数回照射による重なりによる組織内のトータルフルエンスの空間分布の変化は小さい。Fig.4.6、4.7 に腫瘍サイズが 10 mm と 20 mm の両方の場合の直射と側射プローブ照射時における腫瘍領域内のエネルギーフルエンスと体積の関係を示す。腫瘍サイズが 10 mm と 20 mm の両方の場合において、直射プローブ照射時の方が最大エネルギー密度は大きいが、早期肺癌に対して定められている [23; 24] 照射エネルギー密度  $100 \text{ J/cm}^2$  となる体積は側射プローブの方が大きい。

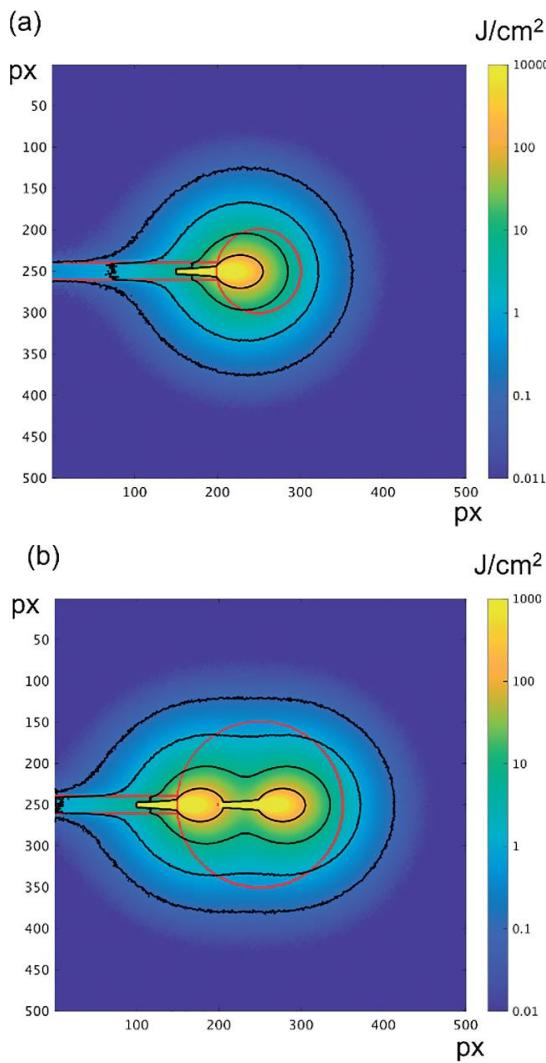


Fig.4.4 Spatial distribution of total fluence by irradiation with a direct transmission light irradiation probe. A tumor diameter is (a) 10 mm and (b) 20 mm. Red line indicates the border of each section shown in Fig.4.2. Black line indicates the point at 100, 10, 1, 0.1  $\text{J}/\text{cm}^2$  from the side closer to the irradiation end.

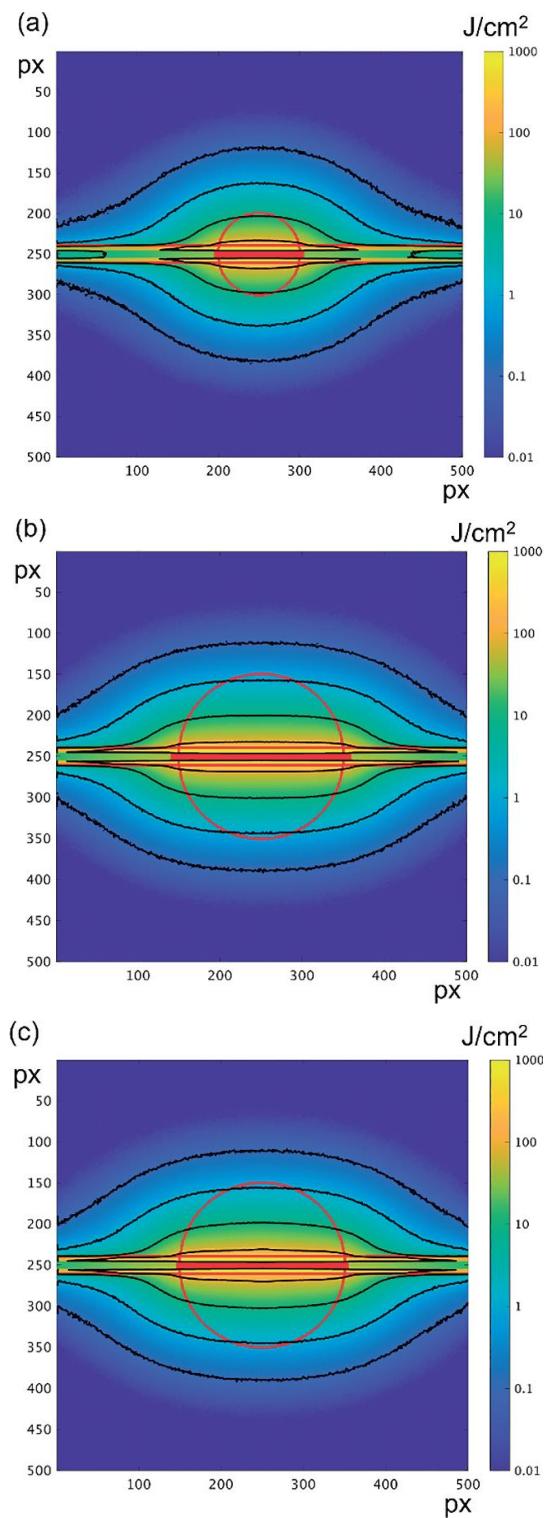


Fig.4.5 Spatial distribution of total energy fluence by irradiation with a diffused light irradiation probe. A tumor diameter is (a) 10 mm and (b, c) 20 mm. Red line indicates the border of each section shown in Fig.4.3. Black line indicates the point at 100, 10, 1, 0.1 J/cm<sup>2</sup> from the side closer to the irradiation end.

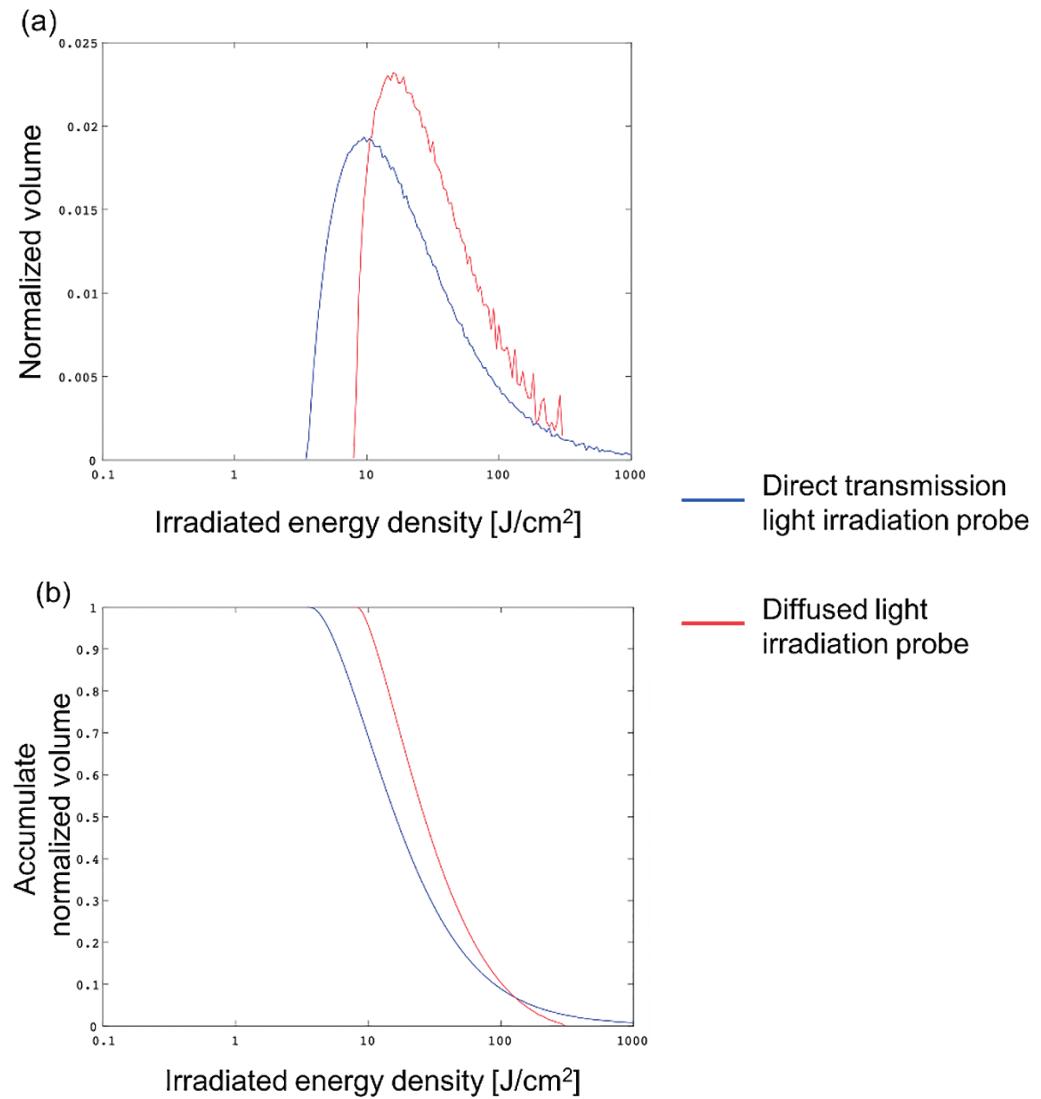


Fig.4.6 Relationship of total energy fluence with (a) volume ratio and (b) cumulative volume ratio in the tumor tissue for the 10 mm diameter of tumor. Blue line shows the result of irradiation by a direct transmission light irradiation probe. Red line shows the results of irradiation by a diffused light irradiation probe.

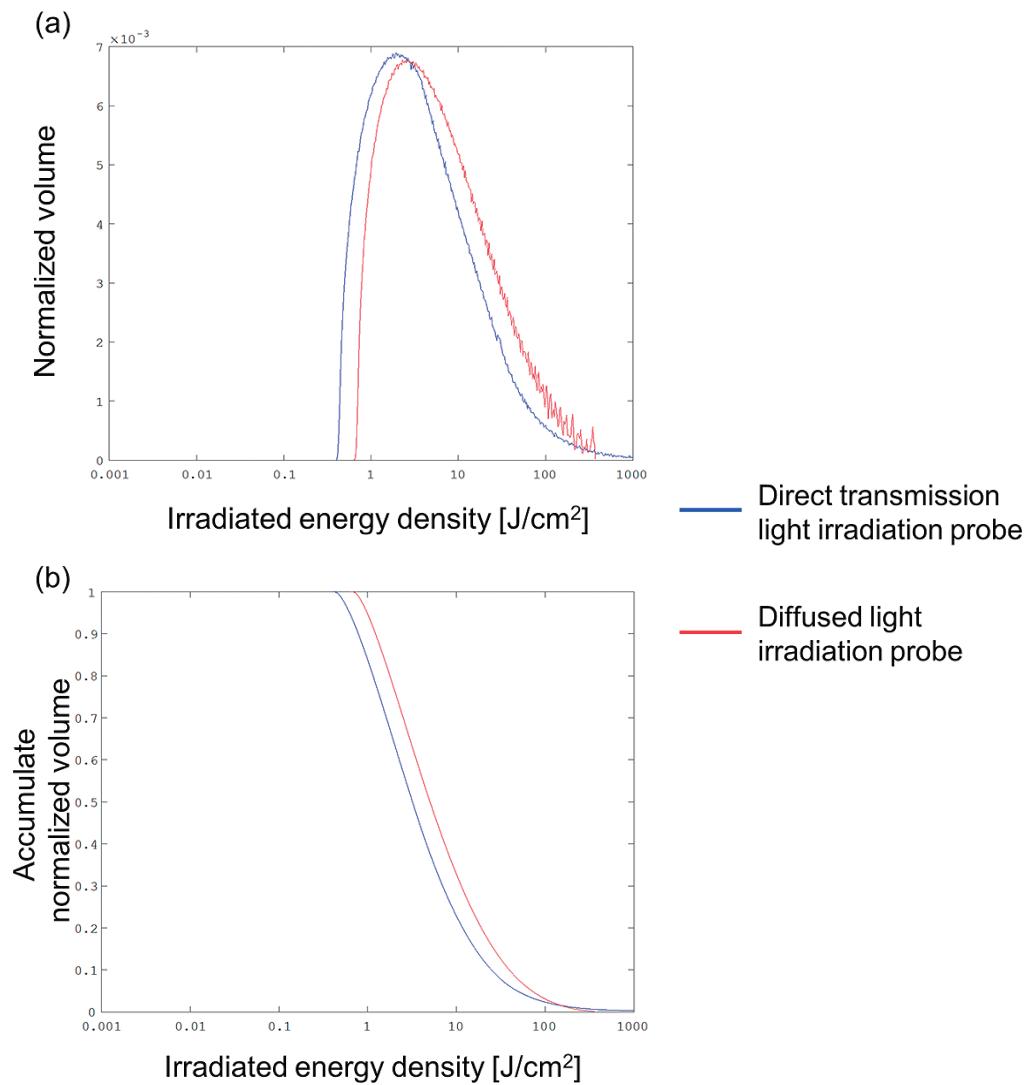


Fig.4.7 Relationship of total energy fluence with (a) volume ratio and (b) cumulative volume ratio in the tumor tissue for the 20 mm diameter of tumor. Blue line shows the result of irradiation by a direct transmission light irradiation probe. Red line shows the results of irradiation by a diffused light irradiation probe.

#### 4.4 小括

光伝搬シミュレーションによる腫瘍領域内のエネルギーフルエンスと体積割合の解析 (Fig.4.6、Fig.4.7) から、本章の研究で対象としたプローブのうち、側射プローブによる照射の方が大きな腫瘍体積を光照射可能であることが明らかとなった。同量の光感受性薬剤が蓄積している腫瘍に対しては、側射プローブを用いた PDT の方が効率的に腫瘍細胞死を誘導できるといえる。これまでに、管腔臓器に対する PDT において、本章の研究で対象とした側射プローブと同様のファイバー側面方向への光照射を行う照射プローブの開発、基礎研究が進められている [90]。肺末梢領域などの狭い領域においてファイバー軸垂直方向への照射が効率的と考えられてきているが、生体組織光学見地からの根拠は不明確であった。本章では、気管支の周囲に腫瘍組織が発現した末梢肺癌に対する PDT を想定し、各プローブの光照射性能をヒト生体組織内で比較するシミュレーション試験を実施した。その結果、ターゲットとなる腫瘍組織の形状と位置によっては、アプローチするプローブの種類を変えることで治療可能な腫瘍組織の範囲が異なることを示した。すなわち、今回のシミュレーション試験において取り上げたような単純な形状の腫瘍であっても、側射プローブでは十分な治療効果が得られ、直射プローブでは治療効果が不十分となる可能性が示唆され、臨床 PDT においても個々の症例における診断画像を用いた術前の照射計画を計算機シミュレーションにより行うことの重要性を支持する結果と理解できる。

本章では、事前に予測することが困難な個々の症例における腫瘍組織内の光感受性薬剤の濃度や溶存酸素濃度などの光照射以外の条件やその応答は同様と仮定し、ROS の発生量や治療効果の強度をトータルフルエンス分布により比較評価した。ただし実際には、PDT の治療効果は光と光感受性薬剤との相互作用と溶存酸素の消費によるにより得られる [97]。また、正常組織への光感受性薬剤の残留もあり、安全性を評価するうえでは正常組織への ROS の作用による損傷も少なからず考慮する必要がある。特に脳のような不可逆的は反応によって代替する機能が他にはない領域を損傷することで患者の QOL の低下に直結するような有害事象を引き起こす組織については、より強い配慮が必要となる。

本章の研究において、腫瘍の中心に気管支が通るように発現している末梢肺癌に対する PDT において、直射プローブと比較して、側射プローブがより効率的に腫瘍組織へ光照射が可能であることを明らかにした。本研究における検討のように、単純な腫瘍形状かつ単純な照射方法におけるシミュレーションをあらかじめ行い、標準的な照射方法を定めておくことは PDT の有効性および安全性を最大化するために有益と考える。一方で、必ずしも単純な腫瘍の形状や照射方法ばかりではない臨床現場において、今後 PDT を普及させ、標準的な治療法としての地位を確立していくためには、患者の臨床画像情報に基づき、照射方法の適切性を施術前に確認できる治療計画プログラムの開発が望まれる。

また、本章の研究で取り上げた開発検討段階にある新規 PDT 用レーザー照射プローブの計算機シミュレーションを用いた非臨床試験では、組織スケールの光伝搬は照射プローブの新規開発において、従来プローブとの比較を計算機シミュレーションで行うことにより

定量比較が可能であることが分かった。また、過去に医療機器製造販売承認を取得した PDT 半導体レーザにおいて評価資料として採用されていた計算機シミュレーションが利用した非臨床試験 [46] [47] のように、新しく開発される医療機器の評価における計算機シミュレーションの利用する例は増加している。今後も、医療機器開発の場面における PDT の治療対象に応じた適切なファイバー設計や、臨床現場における治療計画の際の照射方法の検討において、光伝搬シミュレーションの積極的な活用が期待される。医療機器の規制当局としても、医療機器の評価に計算機シミュレーションを取り入れることを受容する動きがある。米国 FDA は、2016 年 9 月に Reporting of Computational Modeling Studies in Medical Device Submissions をまとめ、医療機器の申請を支持する非臨床試験としての計算機シミュレーションの使用における正式なガイダンスを示している [44]。本邦においては、2019 年 3 月に PDT 用照射装置に特化して *in silico* 評価の活用に関する基本的な考え方を示すことを目的とした「PDT 機器開発ガイドライン 2019 (手引き)」が策定された [45]。さらに、2021 年 3 月には PMDA 科学委員会より「コンピュータシミュレーションを活用した医療機器ソフトウェアの審査の考え方に関する専門部会 報告書」が公開され、数値シミュレーションを医療機器の評価に用いる手法に対する考え方が示されている [48]。これら FDA や PMDA の直近の動向は、計算機シミュレーションが従来のハードウェア医療機器の評価手法としても重要性が増していることを裏付けている。

## 5. 結論

### 5.1 総括

本研究の目的は、生体組織光学に基づいた光伝搬シミュレーションを光線力学治療（以下「PDT」という）の術前の治療計画や PDT の新規レーザー照射デバイスの評価への応用可能性について検討することである。PDT の原理を細胞スケール、細胞間スケールで検討した結果を踏まえた組織スケールでの組織内の光伝搬に関する検討により、臨床 PDT における治療計画手法および新規レーザー照射デバイス開発のための非臨床評価法につながる手法を実証した。第 2 章では、培養がん細胞を用いた *in Vitro* の実験系において、光感受性薬物の投与量と細胞内への取り込み量が投与する光感受性薬物の濃度依存的に増加することを確認した後、光感受性薬物とレーザーの反応による活性酸素種（reactive oxygen species; ROS、以下「ROS」という）の発生とそれに伴う溶存酸素および光感受性薬物の消費ならびに殺細胞効果をそれぞれ定量的に評価し、いずれも照射エネルギー依存的に増加することを確認した。また併せて、PDT 後にがん細胞から分泌される血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor; VEGF）についても定量的に評価した結果、殺細胞効果と同様の傾向を示した。従来から PDT の原理として説明されてきた ROS の発生と殺細胞効果との関係を実証すると共に、ROS の発生に伴う溶存酸素の消費および光感受性薬物の分解についても実証できた。この結果から、殺細胞効果には ROS の発生量が直接的に関与していることや溶存酸素の消費量や ROS の発生に伴う光感受性薬物の分解が殺細胞効果を評価するパラメータとなり得ること、また、を明らかにした。これらのことから、治療対象の腫瘍組織中の溶存酸素濃度が十分であるか治療前に確認することと、術前および術中に組織中の酸素濃度を上げることが治療効果を向上させる可能性や、治療中に治療が効果的に進行していることのモニタリング手法として、組織中の酸素濃度のモニタリングや光感受性薬物の蛍光モニタリングの可能性が示唆された。

第 3 章では、培養細胞を用いた *in Vitro* の実験系において、PDT 後のがん細胞の上清を加えた樹上細胞から分泌されるサイトカインを測定した結果、PDT 由来の腫瘍抗原にのみ樹状細胞から分泌されるサイトカインの変化として、インターロイキン（interleukin、以下「IL」という）-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の増加が確認された。IL-1 $\alpha$  および IL-1 $\beta$  は炎症性サイトカインであり、これらの増加は樹状細胞が何らかの免疫応答を起こしていることが示唆された。また、制御性 T 細胞の活性を抑え免疫を賦活化する IL-6 の増加も何らかの免疫応答を起こしていることが示唆される。

第 4 章では、末梢肺癌に対する PDT におけるレーザー照射を想定し、直射プローブと側射プローブの違いや、側射プローブの照射範囲よりも大きい腫瘍に対するに対する照射におけるプローブの位置の違いによる、組織内光分布の違いを計算機シミュレーションにより検討し、組織内光分布の計算機シミュレーションを臨床 PDT における術前

治療計画や新規レーザー照射デバイス開発のための非臨床評価法へ応用可能性について検討した。その結果、末梢肺癌の PDT を想定した検討においては、直射プローブと側射プローブでは照射効率に明らかな違いがあり、末梢肺癌に対しては側射プローブのほうが高効率にレーザー照射が可能であることが定量的に示された。また、腫瘍が比較的大きく複数回に分けて分割照射する必要がある場合には、側射プローブを用いた照射において、レーザー照射範囲を重ねる幅の違いによる照射エネルギー密度の分布の違いは軽微であることが分かった。これらの結果から、組織内光伝搬シミュレーションの臨床 PDT への応用の可能性として、比較的形状が単純な腫瘍に対する照射計画はあらかじめテンプレートとして用意しておくことで、簡便に応用可能であり、一方で、複雑な腫瘍の形状に対して PDT の照射計画を立てようとする場合には、3 次元的な腫瘍の形状と組織内光分布を重ねて腫瘍組織全体に対して十分なエネルギー密度のレーザー光が照射される照射計画を立案することによって、より治療の品質管理が可能になると考える。

## 5.2 臨床 PDT の術前治療計画における計算機シミュレーションと術中の治療進行モニタリングの重要性

医療機器と医薬品の大きな違いは、「使用方法」である。医薬品の投与方法が「飲む」「打つ」「貼る」の 3 つしかなく、製造販売承認されている適応疾患、用法・用量を遵守して使用する限りにおいて、患者にもたらされる有効性と安全性は安定している。対照的に、医療機器は使用する医師の使用方法や技量によって、患者にもたらされる有効性および安全性が大きく左右される。例にもれず、PDT も術者の技量によってその結果（有効性および安全性）が大きく異なるといわれている。1.序論において述べたとおり、PDT の普及を阻む一つの要因として、腫瘍の存在範囲に対するレーザーの照射計画を立てる方法が標準化されていないために、PDT に熟練した特定の医師にしか扱えない難しい手技となっている点がある。PDT は対象組織に薬剤が存在していることとレーザー光が腫瘍組織内に十分なエネルギー量で照射されていることで成立する。癌を対象とし根治を目的とする場合には、当然のことながら腫瘍組織への適切な照射により組織深部も含めた腫瘍組織全体へ必要十分なエネルギーを与え、治療対象となる腫瘍組織を漏れなく死滅させることが求められる。そのため、視認可能な範囲だけではなく、腫瘍を 3 次元的に捉えた上で腫瘍の体積全体に対し十分なエネルギー量でレーザー光照射することは極めて重要である。

レーザー光の生体組織内での挙動（生体組織内の光伝搬）は、生体組織光学の研究において長年積み上げた知見から研究的には予測可能であることは、第 4 章で示したとおりである。一方、PDT を施行する医師は、皆が生体組織光学に精通しているわけではなく、現在臨床現場で行われている PDT は必ずしも組織内の光伝搬を考慮した腫瘍組織に対する照射エネルギー量を定量的に計画するような照射計画は行われていない

[98] [99] [100]。医療機器であるレーザー照射装置（一般的名称：PDT 半導体レーザ）の薬事承認の内容としても、個々の症例の腫瘍組織の深さを考慮することなく一義的に照射エネルギー密度を定めている [24] [25]ため、腫瘍組織全体に対して治療に必要十分なエネルギー量が照射され個々の症例において治療対象と定めた組織が完全に死滅し得る治療ができているか、改めて顧みられるべきと考える。パブリケーションバイアスがあり、PDT の施行症例において治療が不十分で局所再発を来す症例がどの程度あるのか、詳細な検討を行えるデータは現時点では存在しないものの、PDT を積極的に導入する施設における成績 [89] [101]や治験成績からは一定数の局所再発が確認されており、これら局所再発のうち一部は適切な照射エネルギーが照射できていないことに起因することが考えられる。

現状の本邦の医薬品および医療機器の製造販売承認の法制度の中では、製造販売業者が承認取得時に定められたレーザー照射エネルギー量から増減した照射を推奨することは許容されないものの、臨床現場において医師が医師の裁量権の範囲において患者に最適な治療を施すことは許容されている。臨床 PDT において、医師の裁量権の範囲における判断のエビデンスとして個々の症例に応じて照射計画を立案し得るツールが必要だと考える。電離放射線を用いる治療用の医療機器である X 線治療装置（一般的名称：線形加速器システム）、粒子線治療装置（一般的名称：粒子線治療装置）、BNCT 用の中性子照射装置（一般的名称：ホウ素中性子捕捉療法用中性子照射装置）は、全て治療計画プログラムが医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（以下「医薬品医療機器法」という）の製造販売承認又は製造販売認証が必要な医療機器とされており、臨床現場においても治療と一体不可分である治療計画の立案において欠かせないツールとなっている（一般的名称：放射線治療計画プログラム、ホウ素中性子補足療法用治療計画プログラム）。特に PDT と治療原理が類似している BNCT においても治療計画プログラムが医療機器として医薬品医療機器法の下に製造販売承認を得ていることは、PDT における治療計画のためのツールの必要性を示唆する強い根拠と考える。基本的には腫瘍に対して直接的または鏡視下に視認可能な範囲への光照射を行う PDT は、放射線治療（腫瘍の周囲に位置する正常組織への影響を避けられず、医療機器から照射される電離放射線そのもので組織への傷害をもたらす）のように厳密な照射計画は必要ないと考えられるものの、本学位論文でも繰り返し述べているとおり 3 次元的な腫瘍の範囲に対して十分なエネルギー量のレーザー光が照射されるようなレーザー照射計画が本来必要であり、腫瘍の 3 次元的な範囲を考慮したレーザー照射計画を支援するための術前の治療計画ツールの提供は PDT が普及するためには欠かせない要素と考える。

医師の裁量権の範囲で患者に最適な治療を施すという点について、臨床 PDT でどのような最適化が可能であるか検討してみると、第 2 章において、がん細胞は培地中のタラポルフィンナトリウムの濃度依存的に細胞内にもタラポルフィンナトリウムを取り

込むことが明らかとなったものの、現状、医薬品医療機器法の下の医薬品製造販売承認の中でタラポルフィンナトリウムの用量（患者の単位体表面積あたりの用量）は一義的に定められいるため、また、タラポルフィンナトリウムの副作用である光線過敏症にも配慮する必要があるために、タラポルフィンナトリウムの用量を上げることは許容されない。タラポルフィンナトリウムの用量が一定である場合には、レーザー照射エネルギー量に依存して殺細胞効果が変化することを第2章において明らかにした。さらに、第4章の研究では、患者のCTやMRIなどの医用画像から、適切な腫瘍の3Dモデルが構築できれば計算機シミュレーションが可能となり、組織内の深部においても照射エネルギー量の算出および照射方法の違いによる比較が可能となることを示した。前述のとおり医療機器であるレーザー照射装置（一般的名称：PDT 半導体レーザ）の医療機器製造販売承認においても、1回の照射における照射エネルギー密度は一義的に定められているものの、個々の症例における腫瘍の大きさによって複数回照射することについては制限されていない。そのため、第4章の研究結果を臨床PDTへ応用させることは可能と考える。第4章の研究は、組織内光伝搬の計算機シミュレーションの可能性に関する基礎的な検討のために、敢えて単純な実験系における検討を行ったため、第4章における検討のみで臨床現場におけるPDTの治療計画に計算機シミュレーションを導入することの必要性を論じるには限界があるものの、これを臨床現場における個々の症例の腫瘍における検討に当てはめることにより、複雑な形状を有する腫瘍組織内の光伝搬を検討する際に計算機シミュレーションが有用であることは言うまでもない。また、本研究や臨床PDTの治療計画に計算機シミュレーションが応用されることをきっかけに、個々の症例や個々の病変に応じて、1回の照射における照射エネルギー密度を変更可能とする新たな規制の在り方についても今後検討されていくことを期待する。

今後、本研究の先にある臨床PDTへの応用においてシミュレーションの中に加えていくことを検討すべき要素としては、PDTの治療効果を発揮するために重要な要素であることが本学位論文の第2章の結果からも明らかとなった組織の酸素状態である。現在の臨床現場においては、臨牞性必要な状況がないことと、技術的な限界もあるために組織の微小環境の血管の走行までは可視化することは行われてはいないものの、今後血管の走行の詳細な可視化が可能なツールが開発された際には、患者個々の腫瘍組織の酸素状態も考慮した個別化治療計画を検討することでより精密な治療計画が行えると考える。

最後に、術前の照射計画に加え、治療中に治療の進行をモニタリングできる可能性について考察する。第2章の結果から、レーザー照射中に治療が適切に進行している際には、腫瘍組織中の溶存酸素の消費とレザフィリンの退色が同時に起こることを明らかにした。レーザー照射と同時に又は間欠的に治療対象の腫瘍組織中の溶存酸素やタラポルフィンナトリウムの退色の状態をモニタリングすることで治療の進行状況をモニタリングできる可能性があると考える。治療の進行状況を適切にモニタリングすることは、

即ち、術前に計画したとおりに治療が完了していることの確認、あるいは、遺残の可能性、追加治療の必要性を確認することであり、治療の進行状況をモニタリングする技術の臨床実装は臨床 PDT の治療成績向上に貢献することは間違いないと確信する。

## 引用文献

1. 厚生労働省. 死因順位（第5位まで）別にみた死亡数・死亡率（人口10万対）の年次推移. 2021.
2. 国立研究開発法人国立がん研究センター. 最新がん統計. 2021.
3. 日本肺癌学会. 肺癌診療ガイドライン 2020年版. 2020.
4. 日本胃癌学会. 胃癌治療ガイドライン 医師用 第5版. 2018.
5. 大腸がん研究会. 大腸がん治療ガイドライン 医師用 2019年版. 2019.
6. 日本乳癌学会. 乳癌診療ガイドライン 2018年版（追補2019）. 2019.
7. 日本肝臓学会. 肝癌診療ガイドライン 2017年版.
8. 日本脾臓学会. 脾癌診療ガイドライン 2019年版. 2019.
9. 日本食道学会. 食道がん診療ガイドライン 2017年版. 2017.
10. 日本脳腫瘍学会. 脳腫瘍診療ガイドライン 2019年版 成人脳腫瘍編 改訂2版. 2019.
11. Michelle M Kim, Yoshie Umemura, Denise Leung. Bevacizumab and Glioblastoma: Past, Present, and Future Directions. Cancer J., 2018. 24(4):180-186.
12. Hidetoshi Hayashi and Kazuhiko Nakagawa. Combination therapy with PD-1 or PD-L1 inhibitors for cancer. 2020. 25(5):818-830.
13. Michael A Postow, Margaret K Callahan and Jedd D Wolchok. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. J. Clin. Oncol., 2015. 33(17):1974-82.
14. Smyth ECJ, Fitzgerald RC, Lordick F, Shah MA, Lagergren P, Cunningham D. Lagergren. Oesophageal cancer. Nat Rev Dis Primers, 2017. ページ: 3:17048.
15. Van Cutsem EX, Topal B, Haustermans K, Prenen H. Sogaert. Gastric cancer. Lancet, 2016. 388(10060):2654-2664.
16. T.Bortfeld. IMRT: a review and preview. Phys Med Biol., 2006. 51(13):R363-79.
17. Verellen DRidder M, Tournel K, Duchateau M, Reynders T, Gevaert T, Linthout N, Storme G. De. An overview of volumetric imaging technologies and their quality assurance for IGRT. Acta Oncol., 2008. 47(7):1271-8.
18. Baskar RKA, Yeo R, Yeoh KW. Lee. Cancer and radiation therapy: current advances and

future directions. Int J Med Sci., 2012. 9(3):193-9.

19. **Saga YM, Iwata Y, Ogawa A, Enokido**. Transitions in palliative care: conceptual diversification and the integration of palliative care into standard oncology care. Chin Clin Oncol., 2018. 7(3):32.
20. **SchuitmakerBaas, P., Van Leengoed, H.L., Van der Meulen, F.W., Star, W.M., and Van Zandwijk, N.J.J..** Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. J. Photochem. Photobiol., 1996. B 34, 3–12.
21. **LighthdaleHeier, S.K., Marcon, N.E., et al.C.J..** Photodynamic therapy with porfimer sodium versus thermal ablation therapy with Nd:YAG laser for palliation of esophageal cancer: a multicenter randomized trial. Gastrointest. Endosc., 1995. 42, 507–512.
22. **Ana P. CastanoMroz, Michael R. HamblinPawel.** Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. Nat. Rev. Cancer. 2006 July ; 6(7): 535–545., 2006.
23. **Meiji Seika ファルマ株式会社.** 添付文書「注射用レザフィリン®100 mg／注射用タラポルフィンナトリウム」第9版. 2019.
24. **Meiji Seika ファルマ株式会社.** 添付文書「PD レーザ」第15版. 2017.
25. **Meiji Seika ファルマ株式会社.** 添付文書「PD レーザ BT」第5版. 2016.
26. **Meiji Seika ファルマ株式会社.** 添付文書「EC-PDT プローブ」第6版. 2017.
27. **FooteC.S.** Definition of type I and type II photosensitized oxidation. Photochem. Photobiol., 1991. 54, 659.
28. **Georgakoudi, I. and Foster, T.H..** Singlet oxygenversus nonsinglet oxygen-mediated mechanisms of sensitizer photobleaching and their effects on photodynamic dosimetry. Photochem. Photobiol., 1998. 67, 612–625.
29. **Ochsner M.** Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. J. Photochem. Photobiol. B., 1997. 39(1):1-18.
30. **Sitnik, T.M., Hampton, J.A., Henderson, B.W.** Reduction of tumour oxygenation during and after photodynamic therapy *in vivo*: effects of fluence rate. Br. J. Cancer, 1998. 77, 1386–1394.
31. **Henderson, B.W., Busch, T.M., Vaughan, L.A., et al.** Photofrin photodynamic therapy can significantly deplete or preserve oxygenation in human basal cell carcinomas during treatment, depending on fluence rate. Cancer Res., 2000. 60, 525–529.

32. Chen, Q., Huang, Z., Chen, H., Shapiro, H., Beckers, J., and Hetzel, F.W. Improvement of tumor response by manipulation of tumor oxygenation during photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 2002. 76, 197–203.
33. Engbrecht, B.W., Menon, C., Kachur, A.V., Hahn, S.M. and Fraker, D.L. Photofrin-mediated photodynamic therapy induces vascular occlusion and apoptosis in a human sarcoma xenograft model. *Cancer Res.*, 1999. 59, 4334–4342.
34. Fingar, V.H., Kik, P.K., Haydon, P.S., et al. Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (BPD). *Br. J. Cancer*, 1999. 79, 1702–1708.
35. Semenza, G.L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2001. 13, 167–171.
36. Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell Biol.*, 1996. 16, 4604–4613.
37. Engleman EG, Brody J, and Soares L. Using signaling pathways to overcome immune tolerance to tumors. *Sci STKE*, 2004. pe28.
38. Wang L-H, Jacques SL, and Zheng LQ. MCML—Monte Carlo modeling of photon transport in multi-layered tissues. *Comput. Methods Programs Biomed.*, 1995. 47: 131-146.
39. 西村隆宏, 下条 裕, 粟津邦男. レーザー治療における計算機援用レギュラトリーサイエンス. *日レ医誌*, 2020. 41: 37-43.
40. Shimojo Y, Nishimura T, Hazama H, Ito N, Awazu K. Picosecond laser-induced photothermal skin damage. *Laser Therapy*, 2020. 29: 61-72.
41. 西村 隆宏, 下条 裕, 間 久直, 粟津邦男. 热損傷シミュレーションに基づく皮膚良性色素疾患治療用ナノ秒パルスレーザー装置の計算機臨床試験方法. *日レ医誌*, 2020. 40: 301-308.
42. Honda N, Ishii K, Terada T, Nanjo T, Awazu K. Determination of the tumor tissue optical properties during and after photodynamic therapy using inverse Monte Carlo method and double integrating sphere between 350 and 1000 nm. *J Biomed Optics*, 2011. 16: 058003.
43. Izumoto A, Nishimura T, Hazama H, Ikeda N, Kajimoto Y, Awazu K. Singlet oxygen model evaluation of interstitial photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid for malignant brain tumor. *J Biomed Opt.*, 2019. 25: 063803.

44. **U.S. Food and Drug Administration.** Reporting of Computational Modeling Studies in Medical Device Submissions. Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff. 2016.
45. 経済産業省, 国立研究開発法人日本医療研究開発機構. PDT 機器開発ガイドライン 2019 (手引き) . 2019.
46. 独立行政法人医薬品医療機器総合機構. 審査報告書「PD レーザ BT」. 2013.
47. 独立行政法人医薬品医療機器総合機構. 審査報告書「PD レーザ」「EC-PDT プローブ」. 2015.
48. PMDA科学委員会. コンピュータシミュレーションを活用した医療機器ソフトウェアの審査の考え方に関する専門部会 報告書. 2021.
49. Moor, A.C., Lagerberg, J. W., Tijssen, K., et al. In vitro fluence rate effects in photodynamic reactions with AIPcS4 as sensitizer. Photochem. Photobiol., 1997. 66, 860–865.
50. Georgakoudi, I., Nichols, M.G., and Foster, T.H. The mechanism of Photofrin photobleaching and its consequences for photodynamic dosimetry. Photochem. Photobiol. 65, 135–144.
51. Iinuma, S., Schomacker, K.T., Wagnieres, G., et al. In vivo fluence rate and fractionation effects on tumor response and photobleaching: photodynamic therapy with two photosensitizers in an orthotopic rat tumor model. Cancer Res., 1999. 59, 6164–6170.
52. Edrei, R., and Kimel, S. Oxygen depletion during in vitro photodynamic therapy: structure-activity relationships of sulfonated aluminum phthalocyanines. 出版地不明 : J. Photochem. Photobiol. B:. ページ: 50, 197–203.
53. Finlay, J.C., Mitra, S., and Foster, T.H. In vivo mTHPC photobleaching in normal rat skin exhibits unique irradiance-dependent features. Photochem. Photobiol., 2002. 75, 282–288.
54. Dysart, J.S., Patterson, M.S., Farrell, T.J., and Singh, G. Relationship between mTHPC fluorescence photobleaching and cell viability during in vitro photodynamic treatment of DP16 cells. Photochem. Photobiol., 2002. 75, 289–295.
55. Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. The hypoxia-inducible factor and tumor progression along angiogenic pathway. Int. Rev. Cytol., 2005. 242, 157–213.
56. Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., et al. Role of HIF-1a in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumor angiogenesis. Nature, 1998. 394, 485–490.

57. Deininger, M.H., Weinschenk, T., Morgalla, M.H., Meyermann, R., Schluesener, H.J. Release of regulators of angiogenesis following hypocrellin-A and -B photodynamic therapy of human brain tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002. 298, 520–530.
58. Ferrario, A., Von Tiehl, K.F., Rucker, N., Schwarz, M.A., Gill, P.S., and Gomer, C.J. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res.*, 2000. 60, 4066–4069.
59. Jiang, F., Zhang, Z.G., Katakowski, M., et al. Angiogenesis induced by photodynamic therapy in normal rat brains. *Photochem. Photobiol.*, 2004. 79, 494–498.
60. Schmidt-Erfurth, U., Schlotzer-Schrehard, U., Cursiefen, C., Michels, S., Beckendorf, A., and Naumann, G.O. Influence of photodynamic therapy on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor 3, and pigment epithelium-derived factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2003. 44, 4473–4480.
61. Ferrario, A., Von Tiehl, K., Wong, S., Luna, M., and Gomer, C.J. Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment enhances photodynamic therapy-mediated tumor response. *Cancer Res.*, 2002. 62, 3956–3961.
62. Kushibiki, T., Sakai, M., and Awazu, K. Differential effects of photodynamic therapy on morphologically distinct tumor cells derived from a single precursor cell. *Cancer Lett.*, 2008. 268, 244–251.
63. Foster, T.H., Murant, R.S., Bryant, R.G., Knox, R.S., Gibson, S.L., and Hilf, R. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. *Radiation Res.*, 1991. 126, 296–303.
64. Moan, J., Pettersen, E.O., and Christensen, T. The mechanism of photodynamic inactivation of human cells in vitro in the presence of haematoporphyrin. *Br. J. Cancer*, 1979. 39, 398–407.
65. Peng, Q., Moan, J., and Nesland, J.M. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. *Ultrastruct. Pathol.*, 1996. 20, 109–129.
66. Peng, Q., and Nesland, J.M. Effects of photodynamic therapy on tumor stroma. *Ultrastruct. Pathol.*, 2004. 28, 333–340.
67. Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M., and Wang, G.L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor-1. *J. Biol. Chem.*, 1994. 269,

23757–23763.

68. Höckel M, and Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.*, 2001. 93(4):266-76.
69. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, and Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen pulsed dendritic cells. *Nat. Med.*, 1996. 2: 52-58.
70. Steinman RM, and Pope M Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J Clin Invest*, 2002. 109: 1519-1526.
71. Banchereau J, and Palucka K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005. 5: 296-306.
72. Fields RC, Shimizu K, and Mule JJ. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998. 95: 9482-9487.
73. Song W, Kong HL, Carpenter H, Torii H, Granstein R, Rafii S, Moore MA, and Crystal RG. Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity. *J Exp Med*, 1997. 186: 1247-1256.
74. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, and Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med*, 1996. 184: 465-472.
75. Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, and Falo LD, Jr. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med*, 1996. 2: 1122-1128.
76. Gong J, Chen D, Kashiwaba M, and Kufe D. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med*, 1997. 3: 558-561.
77. Figdor CG, DeVries JM, Lesterhuis WJ, and Melief CJM. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med*, 2004. 10: 475-480.
78. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, and Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*, 1998. 90: 889-905.
79. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*, 1989. 74: 1-10.
80. Mule JJ, Custer MC, Travis WD, and Rosenberg SA. Cellular mechanisms of the antitumor activity of recombinant IL-6 in mice. *J Immunol*, 1992. 148: 2622-2629.

81. Kick G, Messer G, Goetz A, Plewig G, and Kind P. Photodynamic therapy induces expression of interleukin 6 by activation of AP-1 but not NF- $\kappa$ B DNA binding. *Cancer Res*, 1995. 55: 2373-2379.
82. Evans S, Matthews W, Perry R, Fraker D, Norton J, and Pass HI. Effect of photodynamic therapy on tumor necrosis factor production by murine macrophages. *J Natl Cancer Inst*, 1990. ページ: 82: 34-39.
83. Anderson C, Hrabovsky S, McKinley Y, Tubesing K, Tang H, Dunbar R, Mukhtar H, and Elmets CA. Phthalocyanine photodynamic therapy: disparate effects of pharmacologic inhibitors on cutaneous photosensitivity and on tumor regression. *Photochem Photobiol*, 1997. 65: 895-901.
84. Vincek V, Kurimoto I, Medema JP, Prieto E, and Streilein JW. Tumor necrosis factor a polymorphism correlates with deleterious effects of ultraviolet B light on cutaneous immunity. *Cancer Res*, 1993. 53: 728-732.
85. Mullen CA, Coale MM, Levy AT, Stetler-Stevenson WG, Liofta LA, Brandt S, and Blaese RM. Fibrosarcoma cells transduced with the IL-6 gene exhibit reduced tumorigenicity, increased immunogenicity, and decreased metastatic potential. *Cancer Res*, 1992. 52: 6020-6024.
86. Dougherty GJ, Thacker JD, Lavey RS, Belldegrun A, and McBride WH. Inhibitory effect of locally produced and exogenous interleukin-6 on tumor growth in vivo. *Cancer Immunol Immunother*, 1994. 38: 339-345.
87. Gollnick SO, Vaughan L, and Henderson BW. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. *Cancer Res*, 2002. 62: 1604-1608.
88. Yoshihiro Muragaki, Jiro Akimoto, Takashi Maruyama, Hiroshi Iseki, Soko Ikuta, Masayuki Nitta, Katsuya Maebayashi, Taiichi Saito, Yoshikazu Okada, Sadao Kaneko, Akira Matsumura, Toshihiko Kuroiwa, Katsuyuki Karasawa, Yoichi Nakazato, and Takamasa Kayama. Phase II clinical study on intraoperative photodynamic therapy with talaporfin sodium and semiconductor laser in patients with malignant brain tumors. *J Neurosurg.*, 2013. ページ: 119(4):845-52.
89. Masayuki NittaMuragaki, Takashi Maruyama, Hiroshi Iseki, Takashi Komori, Soko Ikuta, Taiichi Saito, Takayuki Yasuda, Junji Hosono, Saori Okamoto, Shunichi Koriyama, Takakazu KawamataYoshihiro. Role of photodynamic therapy using talaporfin sodium and a semiconductor laser in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Neurosurg.*, 2018. 7;1-

8.

90. 小川恵美悠, 荒井 恒憲, 白田 実男, 大谷 圭志, 前原 幸夫, 今井 健太郎, 工藤 勇人, 小野 祥太郎, 池田徳彦. プラスチック光ファイバーを用いた細径拡散光照射プローブによる光線力学的治療. 日レ医誌. , 2020. 41: 25-29.
91. 白田実男. 末梢型肺癌患者に対する ME2906 及び PNL6405PLC を用いた光線力学的療法に関する無治療群対照比較試験 (jRCT2031200040) . Japan Registry of Clinical Trial.
92. Usuda J, Inoue T, Tsuchida T, Ohtani K, Maehara S, Ikeda N, Ohsaki Y, Sasaki T, and Oka K. Clinical trial of photodynamic therapy for peripheral-type lung cancers using a new laser device in a pilot study. Photodiagnosis Photodyn Ther., 2020. 16: 1007-1013.
93. Alexandrakis G, Rannou FR, Chatzioannou AF. Tomographic bioluminescence imaging by use of a combined optical-PET(OPET) system: a computer simulation feasibility study. Phys. Med Biol., 2005. 50: 4225-4241.
94. Prahl S. Optical Absorption of Hemoglobin. (オンライン) (引用日: 2021年1月15日.) <https://omlc.org/spectra/hemoglobin/>.
95. Bricaud A, Babin M, Morel A, and Claustre H. Variability in the Variability in the chlorophyll-specific absorption coefficients of natural phytoplankton: analysis and parameterization. J Geophys Res Oceans, 1995. 100: 13321-13332.
96. Jacques SL, and Li T. Monte Carlo simulations of light transport in 3D heterogenous tissues (mcxyz.c) Version July 22, 2019. (オンライン) (引用日: 2021年1月15日.) <http://omlc.org/software/mc/mcxyz/index.html>.
97. Dolmans DE, Fukumura D, and Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. Nat Rev Cancer, 2003. 3(5):380-7.
98. 早期肺癌を対象とした PDT 施行の安全ガイドライン. 日本レーザー医学会.
99. 原発性悪性脳腫瘍に対する光線力学的療法の安全ガイドライン委員会. 原発性悪性脳腫瘍患者に対する光線力学的療法施行の安全ガイドライン 第1版. 2014.
100. 日本レーザー医学会 ガイドライン委員会, 日本光線力学学会 ガイドライン委員会. 化学放射線療法又は放射線療法後の局所遺残再発食道癌患者に対する光線力学的療法施行の安全ガイドライン 第1.1版. 局所遺残再発食道がんワーキンググループ, 2015.
101. Tomonori Yano, Hiroi Kasai, Takahiro Horimatsu, Kenichi Yoshimura, Satoshi Teramukai, Satoshi Morita, Harue Tada, Yoshinobu Yamamoto, Hiromi Kataoka, Naomi Kakushima, Ryu

**Ishihara, Hajime Isomoto, and Manabu Muto.** A multicenter phase II study of salvage photodynamic therapy using talaporfin sodium (ME2906) and a diode laser (PNL6405EPG) for local failure after chemoradiotherapy or radiotherapy for esophageal cancer. *Oncotarget.*, 2017. 28;8(13):22135-22144.

## 業績一覧

### 査読付き原著論文

1. Yutaka Tomioka, Toshihiro Kushibiki, and Kunio Awazu. Evaluation of Oxygen Consumption of Culture Medium and In Vitro Photodynamic Effect of Talaporfin Sodium in Lung Tumor Cells. *Photomedicine and Laser Surgery* 28(3):385–390, 2010.
2. Toshihiro Kushibiki, Takako Tajiri, Yutaka Tomioka, Kunio Awazu. Photodynamic therapy induces interleukin secretion from dendritic cells. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 3(2):110-114, 2010.
3. 富岡 穣, 守 順大, 西村 隆宏, 白田 実男, 粟津 邦男. 光伝搬シミュレーションに基づく末梢型肺癌に対する光線力学治療用プローブの比較評価. 日本レーザー医学会誌, J-STAGE 早期公開(in press).

### 国内学会発表（査読なし）筆頭のみ

1. 富岡穣, 坂本隆, 石井克典, 櫛引俊宏, 粟津邦男：癌細胞のレザフィリン取り込み量の違いによる光線力学的治療効果の検討. レーザー学会学術講演会第 27 回年次大会 (2007.1.17-18 宮崎県宮崎市)
2. 富岡穣, 坂本隆, 岩本由美子, 石井克典, 櫛引俊宏, 粟津邦男：細胞内低酸素誘導を指標とした光線力学治療. 第 17 回日本光線力学学会 (2007.6.16-17, 栃木県日光市)
3. 富岡穣, 櫛引俊宏, 粟津邦男：光線力学治療後の樹状細胞の免疫応答. 第 18 回日本光線力学学会 (2008.6.14-15, 愛知県名古屋市)
4. 富岡穣, 櫛引俊宏, 粟津邦男：波長 405 nm レーザー照射によるラット肥満細胞のヒスタミン分泌促進効果. 第 29 回日本レーザー医学会総会 (2008.11.15-16, 東京都八王子市)

### 国内学会発表（招待）筆頭のみ

1. 富岡穣：レーザー医療機器の製造販売承認申請. シンポジウム II 実用化を見据えた研究・開発 -PDT の発展に向けて-, 第 33 回日本レーザー医学会総会 (2012.11.10-11, 大阪府吹田市)
2. 富岡穣, 金田悠拓, 市川雄大, 岡本吉弘, 鈴木由香：レーザ医療機器の承認審査における課題と PMDA の取組み. 主題演題 I 「正しいレーザー治療のあり方」, 第 36 回日本レーザー医学会総会 (2015.10.24-25, 栃木県宇都宮市)
3. 富岡穣, 鈴木由香：光線力学的治療の適応拡大に対する医療機器審査の論点. 産官学合同シンポジウム 1 「PDT 適応拡大の必要性」, 第 37 回日本レーザー医学会総会 (2016.10.21-22, 北海道旭川市)
4. 富岡穣：GCP を適用する臨床試験の留意点. 特別企画シンポジウム 3 「革新的なレーザ

ー機器を開発するために：臨床試験のあり方を考える」，第 38 回日本レーザー医学会総会（2017.11.10-11，神奈川県横浜市）

5. 富岡穰：医療機器開発拠点としての国立がん研究センター東病院の取組み。パネルディスカッション 2 「日本の医療機器開発を成功に導く人材とその育成方法～様々な立場からの提言」，第 29 回コンピュータ外科学会大会（2020.11.22-23，オンライン）

#### 国際会議発表（招待）筆頭のみ

1. Yutaka Tomioka: Review of Medical Device Applications Using STED. Session4 STED, 2011 APEC Harmonization Center Workshop on Medical Devices “Implementation of GHTF Documents”(July 4-5, 2011, Seoul, Korea)

#### 表彰

1. レーザー学会第 27 回年次大会 優秀論文発表賞（2007.5）

## 謝辞

本研究は、大阪大学大学院工学研究科環境エネルギー工学専攻量子エネルギー工学講座量子ビーム応用工学領域において、栗津邦男教授の下で行われました。小生は、本研究に着手した博士前期課程から光線力学治療（PDT）をテーマに研究を続け、博士前期課程修了後に入職した独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）在職中も、PDTに用いる医療機器の承認審査に携わり、さらに現職の国立研究開発法人国立がん研究センターにおいても、PDTに関する共同研究を推進する立場で職務に邁進しております。PMDA在職中は、厚生労働省や日本レーザー医学会、日本医用レーザー協会とも連携して本邦のレーザー医療機器の承認審査を抜本的に見直す取り組みを主導し、その間も栗津邦男教授と故 石井克典助教には常に多くのご助言およびご指導をいただきました。これら PDTに対する小生の取組みの集大成として、博士後期課程へ入学し博士論文としてまとめるすることを勧めいただき、こうして本学位論文をまとめるに至りましたことは、栗津邦男教授のご指導なくしては成し得なかつたことであることは間違いない、深甚なる感謝の意を表します。本学位論文の完成は栗津研究室の間久直准教授と西村隆宏助教の献身的な支援がなくして成し得なかつたことを明記させていただくと共に、心から感謝申し上げます。さらに、副査の村田勲教授には、客観的な視点から本研究を見直すきっかけを与えていただき、また、ご自身のホウ素中性子捕捉療法の研究のご経験からも多くのご示唆に富むご助言を賜りましたこと、心より感謝申し上げます。村田教授のご助言により、本研究によって得られた知見が実臨床においてどう応用されていくか具体性が増したことにより、本研究により得られた知見の臨床応用へ道筋も具体性が増したと考えます。重ねて感謝申し上げます。

本研究の第2章および第3章の実験（培養細胞を用いた実験）については、防衛医科大学校医用工学講座 櫛引俊宏准教授（小生が博士前期課程在学中は大阪大学大学院工学研究科環境エネルギー工学専攻量子エネルギー工学講座量子ビーム応用工学領域（栗津研究室）特任講師）にご指導をいただきながら進めたものです。櫛引准教授に心より感謝申し上げます。また、博士前期課程在学当時栗津研究室に在籍していたスタッフの皆様、学生諸氏は、同じ環境で大事な時間を過ごした仲間であり、小生の心の支えがありました。この機を借りて感謝の意を表します。さらに、これらの研究を進めるにあたり、光感受性薬剤タラポルフィンナトリウムを供与していただきました Meiji Seika ファルマ株式会社、レーザー光源を貸与していただきました住友電気工業株式会社には深く感謝申し上げます。

本研究の第3章の実験（計算機シミュレーション）については、日本医科大学大学院 外科学（呼吸器外科学）白田実男教授、栗津研究室の西村隆宏助教および守顕大氏（博士前期課程）、Meiji Seika ファルマ株式会社の協力によって実施されたものであり、関係各位にはこの機を借りて筆舌に尽くしがたい感謝の気持ちをお伝えしたいと思います。

最後に、本研究を進めている間や本学位論文を執筆している間、小生に対する深い理解と献身的な援助、そして深い愛により小生を支えてくれた家族の存在は忘れてはいません。心より感謝しています。