

転移性脊椎腫瘍に対する局所治療  
としての光線力学療法の可能性

2 0 1 1

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

船 山 徹

# 目次

## 第1章 研究の背景

- 1-1 転移性脊椎腫瘍の疫学的特徴 . . . . . p. 1
- 1-2 乳癌骨転移の特徴 . . . . . p. 1
- 1-3 転移性脊椎腫瘍に対する外科治療の問題点と望まれる治療法 . . . p. 2
- 1-4 光線力学療法 of 原理と組み合わせ . . . . . p. 3

## 第2章 研究の仮説と目的

- 2-1 仮説 . . . . . p. 5
- 2-2 目的 . . . . . p. 5

## 第3章 材料と方法

- 3-1 材料
  - 3-1-1 細胞株 . . . . . p. 6
  - 3-1-2 実験動物 . . . . . p. 6
  - 3-1-3 使用機器と材料 . . . . . p. 7

## 3-2 方法

### 3-2-1 *in vitro*による細胞増殖抑制効果の検討（実験1）

- 1) 乳癌細胞に対する光線力学療法・・・ p. 7
- 2) WST-1アッセイによる生細胞数の定量化・・・ p. 8
- 3) 統計学的解析による細胞増殖抑制効果の判定・・・ p. 9

### 3-2-2 *in vivo*による治療効果の検討

- 1) 脊椎転移乳癌ラットの作成・・・ p. 9
- 2) 近赤外レーザーによる椎体照射の安全性試験（実験2）・・・ p. 10
- 3) 近赤外レーザー照射単独による治療効果の検討（実験3）・・・ p. 11
- 4) 光線力学療法による治療効果の検討（実験4）・・・ p. 12
- 5) ラットの下肢運動機能評価と定義・・・ p. 13
- 6) 治療効果を判定するための検討項目と統計学的解析・・・ p. 13
- 7) 脊椎標本の病理組織学的観察・・・ p. 14

## 第4章 結果

### 4-1 *in vitro*による細胞増殖抑制効果（実験1）・・・ p. 15

### 4-2 *in vivo*による治療効果

#### 4-2-1 近赤外レーザーによる椎体照射の安全性試験結果（実験2）・・・ p. 15

4-2-2	近赤外レーザー照射単独による治療効果（実験3）	
1)	下肢運動機能の推移	p. 16
2)	観察期間	p. 17
3)	病理組織学的所見	p. 17
4-2-3	光線力学療法による治療効果（実験4）	
1)	下肢運動機能の推移	p. 18
2)	観察期間	p. 18
3)	病理組織学的所見	p. 19
4-2-4	実験3および実験4のまとめ	p. 19

## 第5章 考察

5-1	本研究の新規性	p. 21
5-2	各実験結果のまとめ	p. 21
5-3	<i>in vitro</i> 実験に関して	p. 22
5-4	<i>in vivo</i> 実験に関して	
5-4-1	脊椎転移癌動物モデルの選択と治療のタイミング	p. 23
5-4-2	動物モデル作成から治療までの下肢運動機能に関して	p. 24
5-4-3	脊椎転移乳癌ラットに対する局所治療法の比較	p. 25

5-4-4	近赤外レーザー照射単独とPDTの治療効果の違い	p. 26
5-4-5	インドシアニングリーンの投与方法と治療効果	p. 26
5-5	転移性脊椎腫瘍に対するPDT応用の可能性	p. 27
5-6	本研究の限界	p. 27
5-7	今後の展望	p. 29
第6章	結論	p. 31
第7章	図表	p. 32
謝辞		p. 49
学会発表		p. 50
引用文献		p. 52
参考論文		p. 60

# 第1章 研究の背景

## 1-1 転移性脊椎腫瘍の疫学的特徴

骨は肺や肝臓に次ぐ癌転移の好発部位である。我が国における詳細な疫学データはないが、本邦における骨転移癌患者は約15～25万人と推定されている[1]。癌の骨転移は進行すると激しい疼痛や病的骨折、高カルシウム血症などの併発が問題となる。脊椎は骨転移の約40%を占める好発部位であり[2]、硬膜外への腫瘍進展による脊髄圧迫を原因とする四肢麻痺が脊椎転移癌患者の5%～20%に発生し[2-5]、患者の生活の質（QOL）を低下させ生命予後を悪化させる[6]。

## 1-2 乳癌骨転移の特徴

我が国における乳癌の5年生存率は87.7%と高く[7]、近年罹患率が年々上昇しているが[8]死亡率の上昇は比較的ゆるやかであり[9]長期の生命予後が望める癌である（図1）。一方乳癌で死亡した患者の69%に骨転移が認められた[10]という報告がある他、骨転移がある乳癌患者の46%に1年以内に骨折や四肢麻痺を始めとする骨関連事象が発生していた[11]という報告もある。脊椎転移の原発部位は乳癌が最も多いとされており[12, 13]、脊椎転移を始めとする骨転移が乳癌患者のQOL低下の原因として多くを占めていると言える。

### 1-3 転移性脊椎腫瘍に対する外科治療の問題点と望まれる治療法

近年転移性脊椎腫瘍に対する有効な外科的治療法として椎体全摘術（図2）が開発され[14-16]、症例によってはQOLの改善が見込めるようになった[17, 18]。しかしこれは依然として侵襲が大きい治療法であるため手術適応となる症例が極めて少なく、実際には一時的な症状緩和のための手術が適応となることが多い。また外科手術の際、脊椎は大血管や脊髄・馬尾神経など切除不可能な重要組織が隣接するという解剖学的特徴から辺縁合併切除が困難であることが多い。そのため残存腫瘍からの再発がしばしば問題となる[3, 19]。再発後の治療は放射線治療などに限られてしまう[3]。

一方転移性脊椎腫瘍による癌性疼痛に対する低侵襲な外科治療として近年経皮的椎体形成術[20]や経皮的ラジオ波焼灼術[21]およびこれらを組み合わせた経皮的治療法[22, 23]が開発され臨床応用されている（図3）。

より多くの転移性脊椎腫瘍患者のQOLを維持するために臨床現場ではより低侵襲で効果的な治療法の開発が望まれている。しかし転移性脊椎腫瘍における神経圧迫による四肢麻痺に対する低侵襲で有効な治療法は未だ確立されていない。

#### 1-4 光線力学療法の原理と組み合わせ

光線力学的治療 (photodynamic therapy: PDT) とは、光感受性物質とレーザー照射を組み合わせた侵襲の少ない治療法である。そのメカニズムは、光感受性物質が特定の波長の光の暴露により光エネルギーを吸収し基底状態から励起状態に転位し、再び基底状態に戻る際に一重項酸素やフリーラジカルなどの活性酸素が発生し細胞のアポトーシスを誘導して壊死させることとされている [24]。正常組織に大きな傷害を与えることがなく低エネルギーで病変部を選択的に治療することができ、細いプローベを利用したレーザー照射により悪性腫瘍を始めとして様々な病変の治療に応用されており [25]、我が国においては早期肺癌、早期食道癌、胃癌、早期子宮頸癌および加齢黄斑変性に対して保険適用されている。これらの治療には光感受性物質として腫瘍親和性のあるポルフィリン関連化合物が用いられ、対応する光として一般に600 nm付近の赤色光線が組み合わせて用いられている。また、原発性骨軟部腫瘍に対するアクリジンオレンジと青色励起光を組み合わせた光線力学療法が一部施設で臨床応用されている [26, 27]。

一方シアニン系色素として肝機能検査 [28]、心機能検査 [29] および眼底検査 [30] において臨床使用されているインドシアニングリーン (ICG) は810 nm付近の近赤外光に最大吸光特性があることが知られており [31]、PDTへの応用を目指

した研究が様々な領域で行われている[32-38]。前述したPDTのメカニズムにより一重項酸素が産生される[39]ことに加えてICGは近赤外光により分解され、その分解産物がさらに細胞活性を低下させる[40]ことも報告されている（図4）。またICGは投与後の遮光が不要であり光感受性物質として現在主流であるポルフィリン関連化合物と比較して患者管理の必要性が少なく、今後臨床への応用が期待されている。しかしICGは全身投与後早期に肝臓で代謝され[31]、腫瘍選択性はないとされている。

## 第2章 研究の仮説と目的

### 2-1 仮説

転移性脊椎腫瘍に対するこれまでの外科治療法では微少転移巣を含めた完全切除および摘出は困難であり、局所の微少残存腫瘍を殺傷できる効果的な追加局所治療法があればより患者のQOLと予後の改善が期待できるのではないかと考え、その一つとしてPDTの可能性を考えた。光感受性物質には古くから臨床応用され安全性が担保されているICGを用い近赤外レーザー照射を組み合わせることで、転移性脊椎腫瘍の局所治療を行い運動機能の維持が可能になるとの仮説を立てた。なおICGには腫瘍選択性がないことからICGの投与方法の違いにより治療効果に差が出るのではないかと考えた。

### 2-1 目的

本研究の目的は、①ICG と近赤外レーザー光を利用した光線力学療法が乳癌細胞の細胞増殖に与える影響を検討すること、および②脊椎転移乳癌モデル動物に対する光線力学療法が下肢運動機能の維持に有効かを検討することであり、転移性脊椎腫瘍に対する新しい局所治療法の可能性を明らかにすることである。

## 第3章 材料と方法

本研究における動物実験は筑波大学動物実験取扱規程に従い、筑波大学動物実験委員会の承認を得て行った。

### 3-1 材料

#### 3-1-1 細胞株

細胞株はラット乳癌細胞である CRL-1666 (American Type Cell Culture より入手) を用いた。細胞培養は Dulbecco's modified Eagle's medium (SIGMA-ALDRICH, Tokyo, Japan) に 10% fetal bovine serum (以下すべて GIBCO, invitrogen Japan K.K. より入手)、80.5 pg/ml streptomycin、80.5 U/ml penicillin を添加した培養液を使用し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の環境下で行った (図 5)。実験には増殖期の細胞を用いた。

#### 3-1-2 実験動物

実験動物は Fischer 344 ラット (オリエンタルバイオより入手) の雌を合計 56 匹使用した。筑波大学生命科学動物資源センター内で飼育および管理した。動物実験における麻酔はペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル、共

立製薬 東京) 32.5 mg/kg 体重を腹腔内投与し全身麻酔とした。実験終了時には同 130.0 mg/kg 体重を腹腔内投与し安楽死させた。

### 3-1-3 使用機器と材料

近赤外レーザー装置は外科手術などで臨床使用されている医用半導体レーザー (UDL-15、オリンパス 東京) を用いた。レーザーの波長は 810 nm±20 nm、最大出力は 15 W である。実験においては先端径 600 μm で直射タイプのレーザープローベ (DM-6065、オリンパス 東京) を用いた (図 6)。なお PDT における光感受性物質である ICG はジアグノグリーン (25mg/V、第一三共 東京) を用いた。

## 3-2 方法

### 3-2-1 *in vitro* による細胞増殖抑制効果の検討 (実験 1)

#### 1) 乳癌細胞に対する光線力学療法

96 ウェルプレート (IWAKI 東京) 計 18 枚を用い、培養した細胞をプレートの左上 16 ウェルに、1 ウェルにつき  $2.0 \times 10^4$  個 (培養液 100 μl) ずつ播種した。以下の 4 群に分類した (図 7)。

- ・ **control 群** (4 枚) : 24 時間毎に通常の培養液 100  $\mu$ l で培地交換した。
- ・ **laser 群** (5 枚) : 通常の培養液で 24 時間培養後、phosphate-buffered saline (PBS) 100  $\mu$ l でリンスし、照射を行った。照射後通常の培養液 100  $\mu$ l を添加して培養を継続、以後 24 時間毎に control 群と同様に培地交換した。
- ・ **ICC 群** (4 枚) : 64.5  $\mu$ M ICG を混合した培養液で 24 時間培養後、control 群と同様に培地交換した。
- ・ **PDT 群** (5 枚) : 64.5  $\mu$ M ICG を混合した培養液で 24 時間培養後、PBS100  $\mu$ l でリンスし、照射を行った。照射後通常の培養液 100  $\mu$ l を添加して培養を継続、以後 24 時間毎に control 群と同様に培地交換した。

プローベは 16 ウェルが同時に照射できるように上方にセットし、プレートの蓋を除いて照射を行った (図 8)。照射出力は 10 W、連続照射モードで 30 秒間 (合計エネルギー 18.8 J/cm<sup>2</sup>) 照射を行い、設定時間後自動的にオフとなるようにセットした。

## 2) WST-1 アッセイによる生細胞数の定量化

治療後の生細胞数は WST-1 アッセイ (Roche Diagnostics Japan 東京) により評価した。WST-1 はテトラゾリウム塩の 1 つで生細胞のミトコンドリア内に取

り込まれると代謝されて赤色から暗赤色に変化する。この発色溶液の吸光度を測定することで生細胞数を定量評価することが可能である。WST-1 は MTT や MTS といった細胞活性試験に用いられる他の試薬と異なり前処理が不要なため簡便に測定できる利点があり、得られた吸光度は生細胞数と強い正の相関があるとされる [41]。治療後 0、24、48、72 時間 (laser 群および PDT 群は 96 時間後まで) 培養し培地交換を行った後に各群のプレートに 1 ウェルにつき  $10\mu\text{l}$  の WST-1 をそれぞれ添加した。さらに 1 時間培養し、発色した溶液の吸光度をマイクロプレートリーダー (MTP-300、コロナ電器 ひたちなか) を用いて測定した (測定波長 450 nm、対照波長 610 nm)。

### 3) 統計学的解析による細胞増殖抑制効果の判定

各群各時間の平均吸光度 ( $n = 16$ ) を算出し、分散分析法 (ANOVA) ののち多重比較 (Tukey-Kramer法) を行った (使用ソフト: Statcel ver. 2)。有意水準は  $p < 0.01$  とした。

#### 3-2-2 *in vivo*による治療効果の検討

##### 1) 脊椎転移乳癌ラットの作成

脊椎転移乳癌ラットは Mantha ら [42] が提唱したラット乳癌腫瘍片を腰椎椎体

に直接移植して作成するモデル（図9）を選択した。まず *in vitro* 実験でも用いた CRL-1666 細胞を培養し、増殖期となった細胞  $1 \times 10^6$  個を浮遊液（0.1 ml）としてドナーラットの乳腺近傍の皮下に移植して皮下腫瘍塊を得た。約 1 cm 大となった皮下腫瘍（移植後約9日から10日目）を摘出し、マイクロ手術用器械（攝子や鉗）を用いて移植用に約1 mm × 1 mm × 1 mm 大の腫瘍片とした（図10）。続いてモデルを作成する Fischer 344 ラットを腹部正中切開で開腹して腸管をよけ、腰椎前方に存在する大動脈と大静脈の血管束を同定し、大動脈分岐部直上で腰椎前面の左側を鈍的に剥離して第6腰椎椎体を確認した。ラットの椎体は前方凸の形態をしており、左側面に正中から約1 mm の部位に18ゲージ針を用いて骨孔（直径1 mm、深さ1.5 mm）を作製し、事前に調整しておいた腫瘍片を1個骨孔内に移植した。最後に腫瘍片の骨孔外への脱出を防ぐため移植後骨孔をハイドロキシアパタイト製ビーズ（直径1.7 mm）でシールし[43]、ナイロン糸で閉腹した（図11）。

## 2) 近赤外レーザーによる椎体照射の安全性試験（実験2）

実験3および4における近赤外レーザーの照射エネルギーを決定するにあたり、予備実験として照射による医原性下肢麻痺の発生の有無に焦点をあてた安全性試験を行った。13匹の正常ラット（7週齢、雌）を用い、脊椎転移乳癌ラットモ

デルを作成する際の手技と同様にL6椎体左側面に骨孔を作成し、プローベを骨孔に接した状態で照射を行い、以下の4群に分類した。

- ・ **control** (1匹) : 骨孔作成のみ
- ・ **5J 群** (4匹) : 出力0.5 W、10秒間 (合計エネルギー5 J)
- ・ **10J 群** (4匹) : 出力1W、10秒間 (合計エネルギー10J)
- ・ **20J 群** (4匹) : 出力2W、10秒間 (合計エネルギー20J)

なお照射は連続モードで行い、10 秒後に自動的にオフとなるようにセットした。照射翌日から医原性下肢麻痺の有無を観察し、3 日後に安楽死させ後述する方法で病理組織を観察した。

### 3) 近赤外レーザー照射単独による治療効果の検討 (実験3)

17匹のラット (5週齢) を用い前述の方法で脊椎転移乳癌ラットを作成した。7日後に再開腹し、骨孔をシールしていたハイドロキシアパタイトビーズを除去した後以下の2群に分類して治療を行った。なお、実験2の結果をもとにレーザー照射条件は出力1W、10秒間 (合計エネルギー10J) を用いた。

- ・ **control群 (C群 7匹)** : 骨孔にプローベをあてるのみ (無治療)
- ・ **laser照射群 (L群 10匹)** : 骨孔にプローベをあて出力1 W、10秒間 (合計エネルギー10 J) の照射 (図12)

なお照射は連続モードで行い、10秒後に自動的にオフとなるようにセットした。治療後ナイロン糸で閉腹した。

#### 4) 光線力学療法による治療効果の検討（実験4）

26匹のラット（9週齢）を用い前述の方法で脊椎転移乳癌ラットを作成した。7日後に再開腹し、骨孔をシールしていたハイドロキシアパタイトビーズを除去した後以下の3群に分類して治療を行った。

- ・ **control群**（7匹）：骨孔にプローベをあてるのみ（無治療）
- ・ **PDT-L群**（9匹）：25 mg/mlのICG水溶液5  $\mu$  lをハミルトンマイクロシリンジを用いて椎体内に形成された転移巣に局所投与し、直後に骨孔にプローベをあて出力1W、10秒間（合計エネルギー10J）照射（)
- ・ **PDT-V群**（10匹）：25 mg/mlのICG水溶液0.2 mlを尾静脈より全身投与し、3分後に骨孔にプローベをあてPDT-L群と同様に照射

照射は連続モードで行い、10秒後に自動的にオフとなるようにセットした。治療後ナイロン糸で閉腹した。なお、ICGの濃度および投与量に関しては事前に正常ラットにPDT-L群およびPDT-V群と同じ濃度および投与量で局所投与および全身投与を行い、医原性合併症が起きないことを確認した。

## 5) ラットの下肢運動機能評価と定義

脊椎転移乳癌ラットはモデル作成後約10日目から急速に下肢麻痺が進行していくという特徴がある[42]。本研究ではラットの下肢運動機能をBassoらが提唱した21点満点のBBB (Basso-Beattie-Bresnahan) スケール[44]を用いて評価した(図13)。モデル作成翌日よりラットの歩容を1日1回毎日観察してスコアリングを行った。評価は各ラットを飼育ケージからプラスチック箱 (57 cm × 38 cm × 30 cm) 内に移して約4分間自由に動き回れるようにし、2名の整形外科医が別々に行った。「実験終了」をBBBスケールが3点となった日もしくは観察時死亡していた日と設定し、「実験開始」(モデル作成) から実験終了までの日数を「観察期間」と定義した(図13)。

## 6) 治療効果を判定するための検討項目と統計学的解析

### ・ 下肢運動機能の推移

各群の平均BBBスコアを算出し、Wilcoxon signed-rank testにより比較検討(使用ソフト: Statcel ver. 2)を行った。有意水準は  $p < 0.05$ とした。

### ・ 観察期間

各群の平均観察期間を算出し、Log-rank testにより比較検討(使用ソフト: 同)を行った。有意水準は  $p < 0.05$ とした。

## 7) 脊椎標本の病理組織学的観察

動物実験終了時にラットを前述の方法で安楽死させて腰椎を摘出し、10%ホルマリンにて固定し脱灰後Hematoxylin and Eosin (H&E)染色を行った。続いて光学顕微鏡 (BX51、オリンパス 東京) を用いて第6腰椎水平断 (横断面) の病理組織学的観察を行った。

## 第4章 結果

### 4-1 *in vitro*による細胞増殖抑制効果（実験1）

図 14 にラット乳癌細胞に対する PDT 後の吸光度の推移を示す。治療直後（0 時間）における PDT 群の平均吸光度（ $0.10 \pm 0.08$ ）は、control 群の平均吸光度（ $0.82 \pm 0.32$ ）と比較し約 1/8 であった。また治療後 24, 48, および 72 時間の各時間において PDT 群は control 群と比較し統計学的有意に低値であった。同様にすべての時間において laser 群は control 群と比較し統計学的に低値であった。PDT 群は 24 時間後以降 96 時間後まで継続して laser 群よりも統計学的有意に低値であるのに対して、laser 群は時間とともに抑制効果が減弱する傾向であった。なお、PDT 群間における比較では 24 時間後から 96 時間後において統計学的有意差は認めず低値が持続した。一方 control 群と ICG 群との比較では 24 時間後をのぞき 0, 48, および 72 時間後において統計学的有意差は認めなかった。

### 4-2 *in vivo*による治療効果

#### 4-2-1 近赤外レーザーによる椎体照射の安全性試験結果（実験 2）

コントロール、5J 群、および 10J 群では医原性下肢麻痺の出現はなかった

(BBB スケール：すべて 21 点) が、20J 群では 4 匹中 2 匹において医原性下肢麻痺が出現した (BBB スケール：19 点)。図 15 に各群の代表的な病理組織学的所見を示す。5J 群および 10J 群ではレーザー照射による組織変性の範囲が椎体内にとどまっていた。10J 群では椎体の大部分に組織変性が及んでいたが、椎体後壁付近や横突起付近では正常骨髄細胞が観察された。正常組織との境界線部分を拡大すると骨細胞の核の消失や骨髄細胞の核の変形がみられた。20J では椎体後壁を超えて脊柱管内に存在する神経組織まで変性がおよんでいた。正常神経組織との境界線部分を拡大すると細胞間隔が疎になり核の変形がみられた。これらの結果から今後本研究で用いるラットの腰椎に対する近赤外レーザーによる椎体照射の安全なエネルギーは最大 10J であると判断し、以後の実験 3 および 4 におけるエネルギー設定を出力 1W、10 秒間 (合計エネルギー 10J) とした。

#### 4-2-2 近赤外レーザー照射単独による治療効果 (実験 3)

##### 1) 下肢運動機能の推移

図 16 に各群の下肢運動機能の推移を示す。モデル作成後一過性に下肢麻痺が出現したが 6 日後までにすべて回復し、7 日目の治療時にはすべてのラットにおいて BBB スコアは 21 点であった。C 群 (control 群) ではモデル作成後 11 日目

降急激に平均 BBB スコアの低下がみられたが、L 群 (laser 照射群) では平均 BBB スコアの低下はなだらかに進行した。統計学的解析では L 群の平均 BBB スコアは C 群と比較しモデル作成後 15 日目以降有意に高かった。

## 2) 観察期間

表 1 に全ラットの観察期間を示し、図 17 に観察期間の Kaplan-Meier 曲線を示す。平均観察期間は C 群で  $14.0 \pm 2.6$  日であったのに対し L 群では  $17.9 \pm 4.1$  日であった。C 群では 11 日目以降 17 日目までの間にすべてのラットが観察終了となり、L 群では 12 日目以降 24 日目までの間に観察終了となったが観察期間に統計学的有意差はなかった ( $p = 0.07$ )。

## 3) 病理組織学的所見

図 18 に各群の代表的な観察終了時の病理組織学的所見を示す。両群とも観察終了時には脊柱管内に増殖した腫瘍が神経組織を強く圧迫していた。C 群において椎体は骨梁構造が破壊され、椎体内組織は腫瘍細胞に置換されていた。L 群においてはレーザー照射により椎体内は組織変性していたが、腫瘍細胞が少なからず観察された。腫瘍細胞は後壁付近および横突起付近により多く観察され、後壁を破壊して脊柱管内へ増殖していた。

#### 4-2-3 光線力学療法による治療効果（実験 4）

##### 1) 下肢運動機能の推移

図 19 に各群の下肢運動機能の推移を示す。モデル作成後 6 日目まで下肢麻痺出現はなかった。7 日目（治療前）の観察時に BBB スコアが 19 点になったラットが各群 1 匹ずついた。したがって、治療前の平均 BBB スコアは control 群で 20.7 点、PDT-L 群で 20.8 点、PDT-V 群で 20.8 点であった（統計学的有意差なし）。モデル作成後 10 日目以降 control 群では急激に BBB スコアの低下がみられたが、PDT を行った両群ではモデル作成後 13 日目（治療後 6 日目）までは平均 BBB スコアが 18.0 以上を維持していた。統計学的解析では PDT-L 群および PDT-V 群の平均 BBB スコアは control 群と比較しモデル作成後それぞれ 13 日目以降、11 日目以降有意に高かった。

##### 2) 観察期間

表 2 に全ラットの観察期間を示し、図 20 に観察期間の Kaplan-Meier 曲線を示す。平均観察期間は control 群で  $13.6 \pm 1.8$  日であったのに対し PDT-L 群および PDT-V 群ではそれぞれ  $18.6 \pm 1.9$  日および  $18.9 \pm 2.7$  日であった。control 群ではモデル作成後 10 日目から 16 日目までの間にすべてのラットが観察終了

となったのに対し、PDT 両群ともモデル作成後 14 日目から 22 日目までに観察終了となり、PDT 両群で control 群と比較して統計学的有意差を認めた。なお、平均 BBB スコアおよび観察期間に関し PDT 両群間における統計学的有意差はなかった。全 26 匹のラットのうち control 群の 1 匹のみ下肢麻痺が出現しなかったが椎体外への腫瘍進展による癌性腹水により死亡した。

### 3) 病理組織学的所見

図 21 に PDT 両群の代表的な観察終了時の病理組織学的所見を示す。ここで control 群は実験 3 の C 群と同じと考え省略した。PDT 両群とも観察終了時には脊柱管内に増殖した腫瘍が神経組織を強く圧迫していた。両群とも椎体は大部分組織変性しており椎体内組織に腫瘍細胞はほとんど観察されなかった。後壁付近および横突起付近のみにわずかに観察された腫瘍細胞が脊柱管内へと増殖していた。

#### 4-2-4 実験 3 および 4 のまとめ

表 3 に実験 3 および実験 4 の結果のまとめを示した。実験 3 では近赤外レーザー照射単独により下肢運動機能の温存効果が短期間であるが認められたが、観察期間の延長効果はなかった。それに対し実験 4 では実験 3 と照射エネルギー

は同じであるが ICG を投与して光線力学療法を行うことにより、ICG の投与経路によらず下肢運動機能の温存効果と観察期間の延長効果が認められた。

## 第5章 考察

### 5-1 本研究の新規性

転移性脊椎腫瘍に対するPDTの研究は、海外の研究施設において本研究とは異なるラットの乳癌脊椎転移モデルを用いて行われている[45]。これまで発表された論文によると、光感受性物質であるポルフィリン関連化合物を全身投与するためレーザー照射の影響が転移巣に加えて脊髄までおよび、治療による医原性下肢麻痺の発生を防ぎ得ていない[46]。治療効率と副作用低減の両立に向けて光感受性物質の選択や濃度・投与量、レーザーの出力の組み合わせの調整など解決すべき課題が多いのが現状である[47]。転移性脊椎腫瘍に対する下肢運動機能低下に着目した光線力学療法の研究は渉猟しうる限りこれまで行われていない。したがって転移性脊椎腫瘍に対する局所治療としての光線力学療法の可能性を検証した研究は本研究が初めてである。

### 5-2 各実験結果のまとめ

実験1の結果より、ラット乳癌細胞に対する近赤外光照射 ( $18.8 \text{ J/cm}^2$ ) では、照射単独でも直後から細胞増殖抑制効果はあるが、ICG と組み合わせた PDT を行うことでより高い細胞増殖抑制効果があることが分かった。さらに PDT では少

なくとも 96 時間にわたり細胞増殖抑制効果が持続されることも分かった。なお、ICG のみでは 24 時間後を除き細胞増殖に影響を与えないことも分かった。

実験 2 の結果より、本実験系における椎体照射の安全な照射エネルギーは出力 1W、10 秒間（合計エネルギー 10 J）であることが分かったが、同時にレーザーはプローブ先端から放射状に照射されるため、椎体内でも後壁付近や横突起付近は照射範囲外となり正常骨髄細胞が残存することが分かった。

実験 3 の結果より、脊椎転移乳癌ラットに対する近赤外レーザー照射単独ではコントロール群と比較して有意な下肢運動機能温存効果は限定的であり、観察期間の有意な延長効果はなかった。病理組織学的所見から 10 J の照射エネルギーのみでは椎体内の腫瘍細胞は十分に殺傷されないと考えられた。

実験 4 の結果より、脊椎転移乳癌ラットに対する ICG と近赤外レーザー照射による PDT ではコントロール群と比較して ICG の局所投与ならびに経静脈的投与によらず比較的長期にわたり有意な下肢運動機能温存効果が認められ、さらに観察期間の有意な延長効果も認められた。

### 5-3 *in vitro* 実験に関して

これまで近赤外光照射による細胞毒性に関して *in vitro* における報告があり、近赤外光照射単独でも高エネルギーを照射することにより活性酸素が産生され

細胞活性が低下することが言われている[48, 49]。本研究における実験 1 でラット乳癌細胞に対する近赤外レーザー照射単独でも細胞増殖抑制効果が認められた。一方 ICG と近赤外光を組み合わせた PDT では光線力学反応により一重項酸素やフリーラジカルなどの活性酸素が産生され細胞毒性を持つこと[24]に加えてさらに ICG は近赤外光により分解され、その分解産物が細胞活性を低下させること[40]により本研究においてラット乳癌細胞に対する PDT により高く、そして長時間持続する細胞増殖抑制効果が得られたものと考えられた。

#### 5-4 *in vivo* 実験に関して

##### 5-4-1 脊椎転移癌動物モデルの選択と治療のタイミング

本研究には脊椎転移乳癌ラットを選択した。脊椎転移乳癌ラットは腫瘍を脊椎内へ実験的に直接移植して得られる単発の脊椎転移癌モデルであるため局所治療の検討に適しており様々な研究が行われている[43, 50-55]。本モデルは同種の腫瘍細胞を移植するため腫瘍の生着率が非常に高く再現性がよい。本研究においてもコントロール群では腫瘍移植後 7 日目以降に下肢麻痺が出現しはじめ、10 日前後から急激に下肢麻痺が進行し、平均約 14 日で下肢運動機能が消失した。腫瘍の進展形式は移植した椎体が腫瘍細胞に置換され、椎体後壁を破壊して脊柱管内へ進展して神経組織を圧迫するため、ヒトの脊椎転移癌の病態を

よく反映していると考えられる。本研究では過去の報告[53-55]と同様にモデル作成後 7 日目を治療日に設定して実験を行った。モデル作成後 7 日目の病理組織学的所見を観察すると、椎体内組織は腫瘍細胞により置換され、一部椎体後壁を穿破して腫瘍が脊柱管内へ増殖し始めていた (図 22)。実際には脊柱管内への腫瘍増殖の有無や程度には多少差があると考えられるが、本研究における治療のタイミングはヒトにおける脊椎転移癌に対する外科治療のタイミングをよく反映していると考えられた。

#### 5-4-2 動物モデル作成から治療までの下肢運動機能に関して

実験 3 ではモデル作成後 C 群および L 群ともに一過性に下肢麻痺が出現し、6 日目までにすべて回復した。同じ動物モデルを用いた過去の報告でも同様の一過性下肢麻痺がみられており [52, 53]、手術操作に起因した技術的なものであったと考察されている。同じグループから後に報告された研究ではこの麻痺はみられておらず [54, 55]、考察はされていないが何らかの改善があったと思われる。我々の研究においても実験 3 ではモデル作成時の術野確保のため腰筋を過度に圧迫したことにより一過性に下肢麻痺が出現したと考えられ、やはり手術操作に起因した技術的な問題であったと考えられる。それを踏まえ実験 4 では愛護的な手術操作を行うことでモデル作成後の一過性下肢麻痺を回避できた。

### 5-4-3 脊椎転移乳癌ラットに対する局所治療法の比較

Bagley ら[53]はモデル作成後 7 日目から 5 日間の放射線治療（合計 20 Gy）を行ったところコントロール群と比較し下肢運動機能温存効果があり、平均観察期間は 18 日であったと述べている。また、同じく Bagley ら[52]はモデル作成後 6 日目に再開腹しパクリタキセル含有ジェルを局所投与したところ同様に平均観察期間は 18 日であったと述べている。Gok ら[54]はモデル作成後 7 日目に再開腹し椎体内腫瘍搔爬術を行うと平均観察期間は 19 日に達し、術後 5 日間の放射線治療（合計 20 Gy）を追加すると平均観察期間は 22 日に達したと報告している。さらに同じく Gok ら[55]はモデル作成後 7 日目に前述の椎体内腫瘍搔爬術、放射線治療に加えてパクリタキセル含有ジェルを局所投与するとモデル作成後 21 日目まで下肢運動機能低下はなく、平均観察期間は 26 日に達したと報告している。モデル作成後の治療のタイミングに若干の違いはあるものの、本研究の結果から PDT は放射線治療や手術治療や抗癌剤局所投与などの治療単独と遜色ない治療効果があることが言える。さらに PDT とこれらの治療法を追加したり組み合わせたりすることでより高い治療効果を得ることができると可能性が示唆された。

#### 5-4-4 近赤外レーザー照射単独と PDT の治療効果の違い

実験 3 および実験 4 ではコントロール群と治療群における治療のタイミングは同じとした。実験 2 より本実験系における近赤外レーザー照射エネルギーは最大 10 J (1W、10 秒間) であり、この照射エネルギーを単独で用いた実験 3 では下肢運動機能温存効果は認められたが期間は限定的であり観察期間の延長効果は得られなかった。しかし実験 4 では照射エネルギーは同じでも ICG を投与して PDT を行うことでより長い期間下肢運動機能温存効果があり、観察期間の延長効果も認められた。病理組織学的所見から近赤外レーザー照射のみでは椎体内の腫瘍細胞は存在していたが、PDT では照射範囲内の腫瘍細胞は見られなかった。これらは *in vitro* 実験 (実験 1) の結果を反映しているものと考えられた。

#### 5-4-5 インドシアニンググリーンの投与方法と治療効果

ICG は肝代謝試薬であり [31] 腫瘍選択性はないとされる。ICG は静脈投与されるとまず全身にくまなくひろがり続いて早期に肝臓への集積が始まるとされ、ラットにおいては全身投与後 5 分で血中濃度が 1/10 に減少すると報告されている [56]。我々は実験 4 において ICG を尾静脈より投与後 3 分後にレーザー照射を行った。これは ICG を尾静脈から投与してからレーザー照射を再現性よく行

うためにかかる技術的な時間を考慮して設定した。したがって PDT-L 群の方が転移巣における ICG の量が多く治療効果が高いことが予想された。しかし実際には ICG を転移巣へ局所投与しても尾静脈から全身投与しても PDT の治療効果に明らかな違いは見出せなかった。なお、下肢運動機能において control 群と比較した平均 BBB スコアの統計学的有意差が PDT-L 群では 13 日目以降、PDT-V 群では 11 日目以降と差異がみられたが、これは各個体における BBB スコアのばらつきがみられたためと考えられた。

#### 5-5 転移性脊椎腫瘍に対する PDT 応用の可能性

本研究で示した通り半導体レーザーは細いプローブを使って治療を行うことができる。さらに照射範囲内の腫瘍細胞をレーザー照射により直接損傷できることに加えて PDT を行うことで更に効果的に殺傷できる。したがって外科手術で残存した腫瘍を安全に追加切除したり微小な転移巣に対して内視鏡などを使用し経椎弓根的にアプローチして治療を行ったりするなど応用の可能性が十分にあると考えられる。

#### 5-6 本研究の限界

①本研究では実験 1 でラット乳癌細胞に対する PDT は近赤外レーザー照射単独

と比較して顕著な細胞増殖抑制効果があったため、実験 4 では近赤外レーザー照射単独群を含めなかった。実験 3 と実験 4 を比較すると PDT を行うことでコントロール群と比較した下肢機能温存期間が長く、観察期間も長くなった。しかし *in vitro* と *in vivo* では ICG の投与方法や治療効果の評価方法は異なる。そのため単純に *in vitro* の結果を *in vivo* に置き換えることは困難であり、純粹な PDT の効果を把握するためにも PDT と近赤外レーザー照射単独治療を同一実験系で検証する必要があると考えられた。

②本研究では実験 2 において医原性下肢麻痺の有無と病理組織学的所見から安全なレーザー照射エネルギーを決定したが、照射による熱上昇の評価を行っていない。ヒトにおける近赤外光（波長 835 nm）の深達度は組織によって差があるが約 2~4 mm とされている[57]。照射エネルギー（出力×時間）が大きくなると、実際には照射範囲よりも広い範囲で組織への影響がおよぶ可能性があり今後の研究においては熱センサーなどを用いて熱上昇による影響を考慮する必要があると考えられた。

③本研究では病理組織学的評価を観察終了時のみ行った。しかし PDT による下肢機能温存効果が脊柱管内への腫瘍増殖を遅らせたことによることを病理組織学的に証明するためには治療後の病理組織所見を経時的に観察し、椎体内残存腫瘍細胞数や脊柱管内へ増殖した腫瘍のサイズなどを定量化する必要があると

考えられた。

④本研究では PDT による椎体の力学的強度変化の評価を行っていない。二足歩行であるヒトでは脊椎に頭尾方向の荷重がかかるため治療後の力学的強度の維持が課題である。正常ラットに対する PDT により椎体の力学的強度が上昇したという報告[58, 59]もあり、今後臨床応用を検討する際には椎体の力学的強度変化の評価が必要であると考えられた。

⑤本研究における実験 4 では ICG の局所濃度を計測していない。本来光線力学反応は原則的にレーザー照射範囲内で効果が発揮される。治療効果が ICG の局所濃度や投与量に依存しているのかを検討するためには ICG の局所濃度の計測は今後必須であると考えられた。

⑥本研究では観察期間を原則的に BBB スケールの点数（3 点をエンドポイント）を用いて定義した。したがって「観察期間」は「生存期間」とは異なる。本動物モデルを用いた研究の限界と考えられた。

## 5-7 今後の展望

近年ヒト肺癌細胞やヒト乳癌細胞をヌードマウスやヌードラットの椎体に直接移植して作成する転移性脊椎腫瘍の動物モデルが報告されている[60, 61]。転移性脊椎腫瘍に対する PDT が臨床応用可能かを検討するためには今後ヒトの

癌細胞を用いた動物モデルによる検証が必要であると考えます。

また、転移性脊椎腫瘍に対する PDT の臨床応用を安全に行うためには、光感受性物質である ICG を腫瘍組織に選択的に集積させ、腫瘍細胞のみを効果的に殺傷させることが重要である。本来 ICG は単体では腫瘍選択性を持たないが、高分子ミセルなどのナノ粒子に担持させることで腫瘍組織に選択的に集積させ、腫瘍の分子イメージングが可能になってきている[62-64]。さらに最近、近赤外光を可視化できるフィルターを装着した手術用カメラや手術用顕微鏡が開発され[65]、ICG を利用した術中リアルタイム近赤外イメージングが冠血管再建前後の血流評価[66]、脊髄動静脈奇形治療前後の血流評価[67, 68]、脊髄腫瘍の局在評価[8, 69]や乳癌のセンチネルリンパ節マッピング[70]などにおいて注目されている。ICG が最大吸光特性を持つ近赤外光は可視光線と比べ水やヘモグロビンによる吸収が少なく、生体イメージングに有利であるといわれる。これまで ICG 含有ナノ粒子[63]を利用した脊椎転移乳癌ラット[42]に対する近赤外蛍光イメージングに成功しており[71]、本研究で得られた PDT の知見をもとにこれらを組み合わせて応用すれば、ICG と近赤外光を利用した術中リアルタイムイメージング (=診断) と PDT (=治療) を同時に行う治療システム (特許出願中「光線力学治療システム」) の構築が可能であり、今後臨床応用に向け取り組んでいきたいと考えている。

## 第6章 結論

インドシアニングリーンと近赤外レーザー照射を組み合わせた光線力学療法がラット乳癌細胞および脊椎転移乳癌ラットに与える効果を検討した。ラット乳癌細胞の増殖は光線力学療法直後より抑制され長時間にわたり効果が持続した。さらに脊椎転移乳癌ラットに対する光線力学療法により有意な下肢運動機能温存効果と観察期間の延長効果がインドシアニンググリーンの投与経路によらず認められた。本研究の結果よりインドシアニンググリーンと近赤外レーザー照射を組み合わせた光線力学療法は、脊椎転移癌患者の QOL 改善に対する効果的な局所治療法の一つとなる可能性が示唆された。

## 第7章 図表

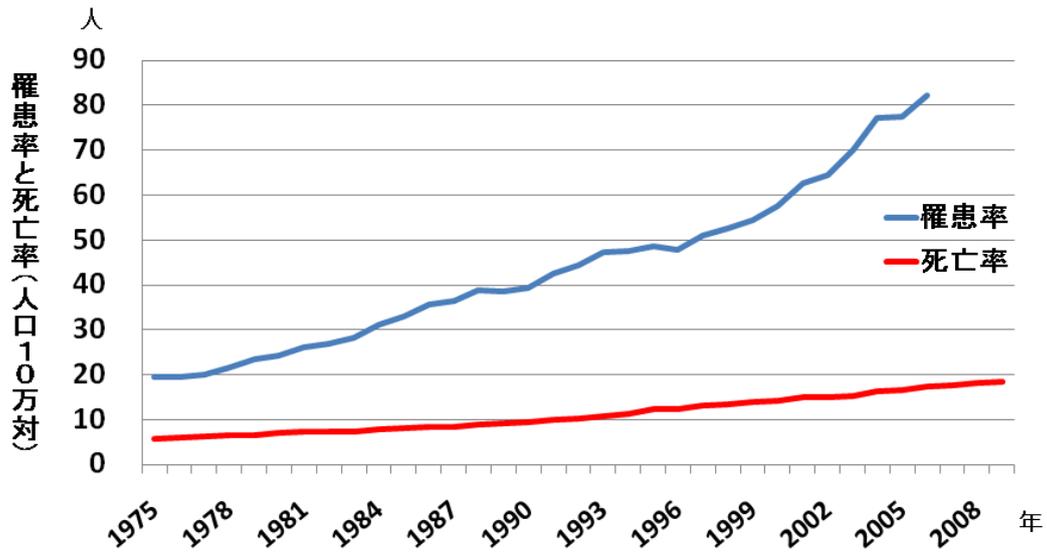


図1. 我が国における乳癌の罹患率と死亡率の推移 (文献[8, 9]より作成)

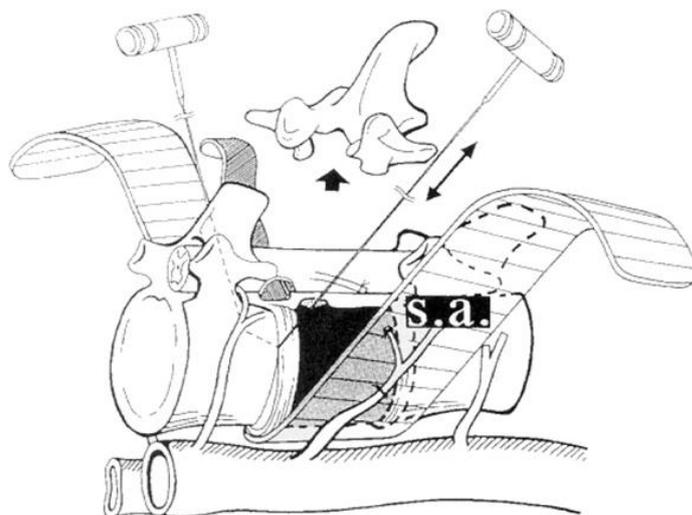


図 2. 転移性脊椎腫瘍に対する椎体全摘術（文献[14]より転載）

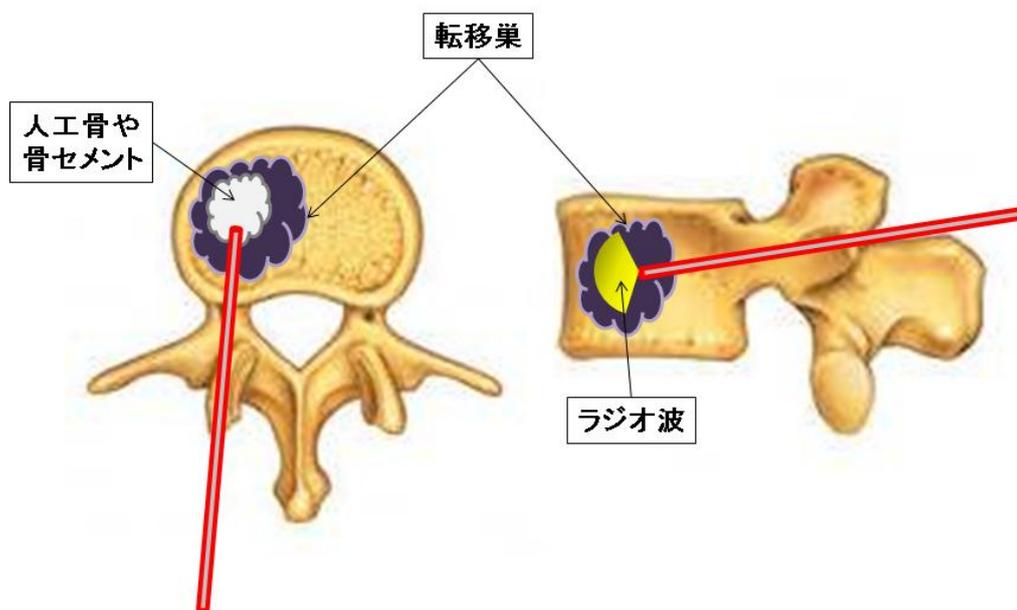


図 3. 転移性脊椎腫瘍による癌性疼痛に対する経皮的治療法のイメージ

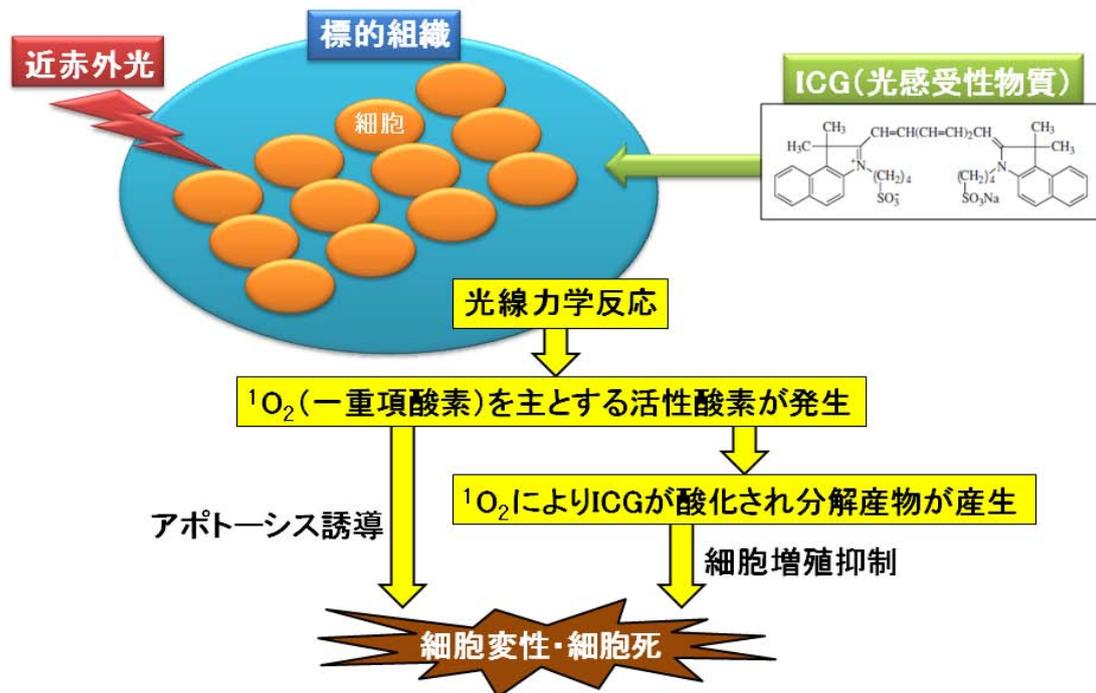


図 4. ICG を利用した PDT のメカニズム (文献[24, 40]より一部改変)

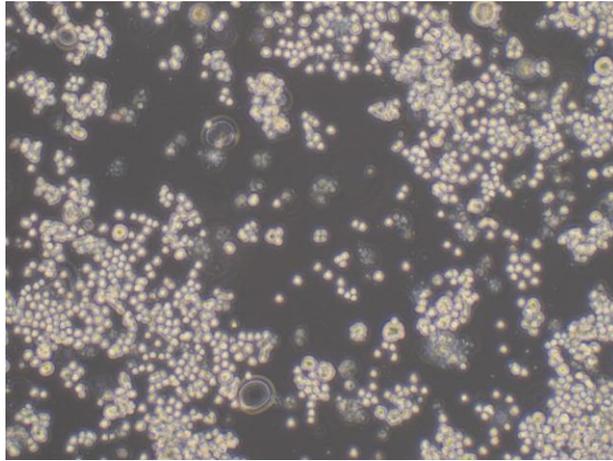


図 5. CRL-1666 細胞（位相差顕微鏡にて観察 40 倍）

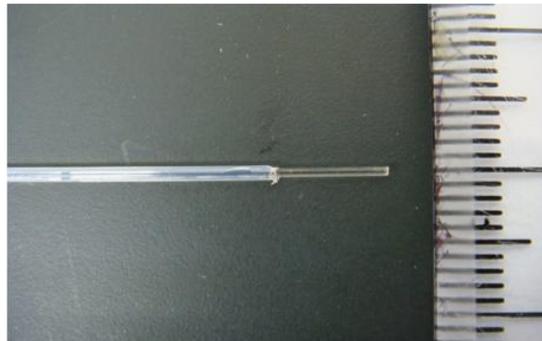


図 6. 使用機器

上段：医用半導体レーザー（UDL-15、オリンパス）

（出典 オリンパス社ホームページ）

下段：レーザープローベ（DM-6065、オリンパス）

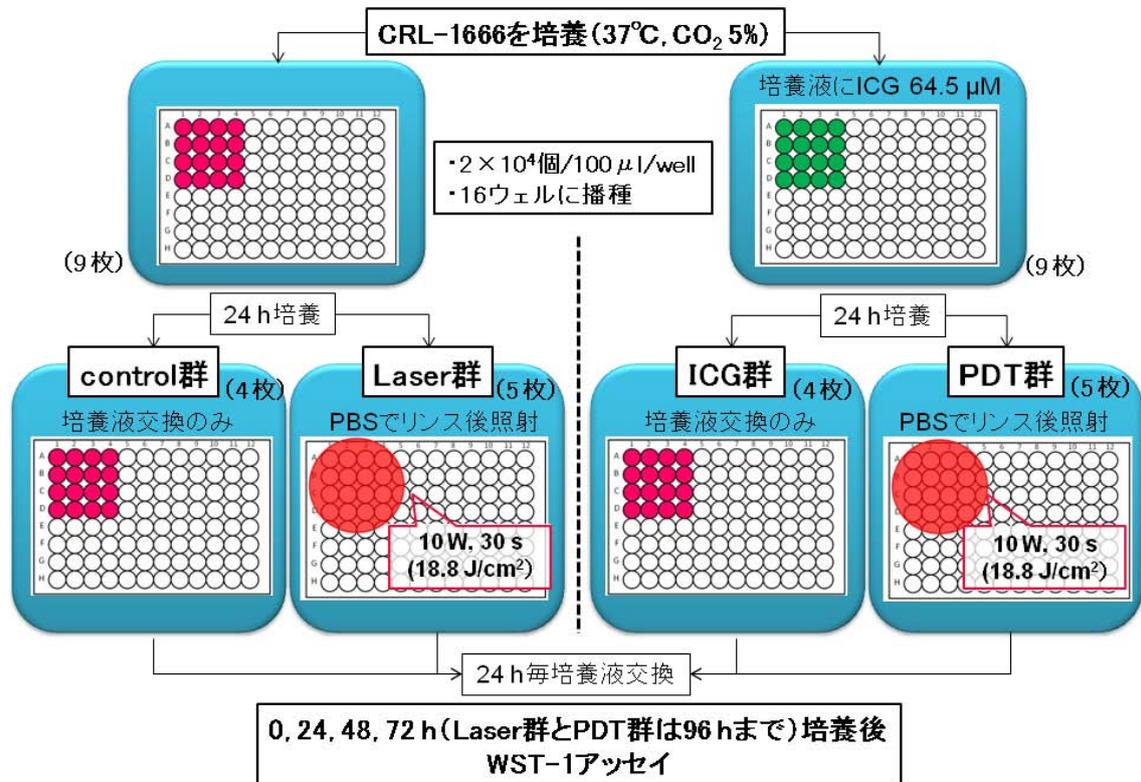


図 7. 実験 1 プロトコール

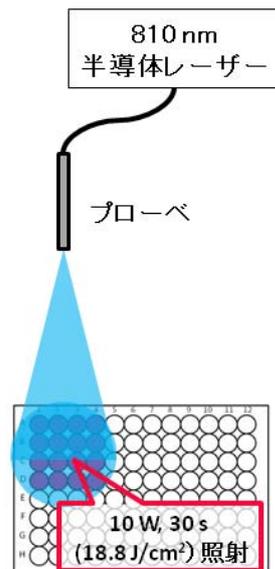


図 8. 実験 1 照射方法

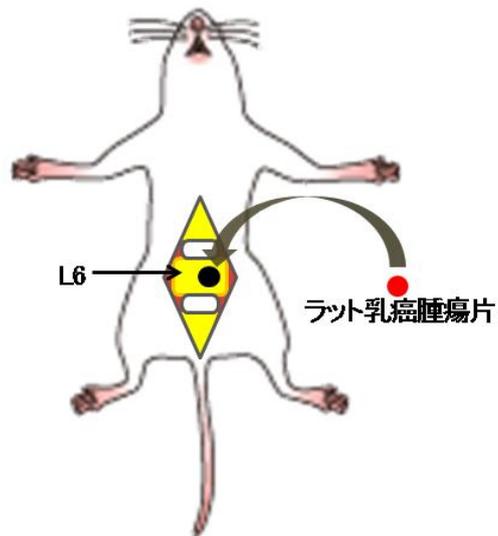


図 9. 脊椎転移乳癌ラットシエーマ

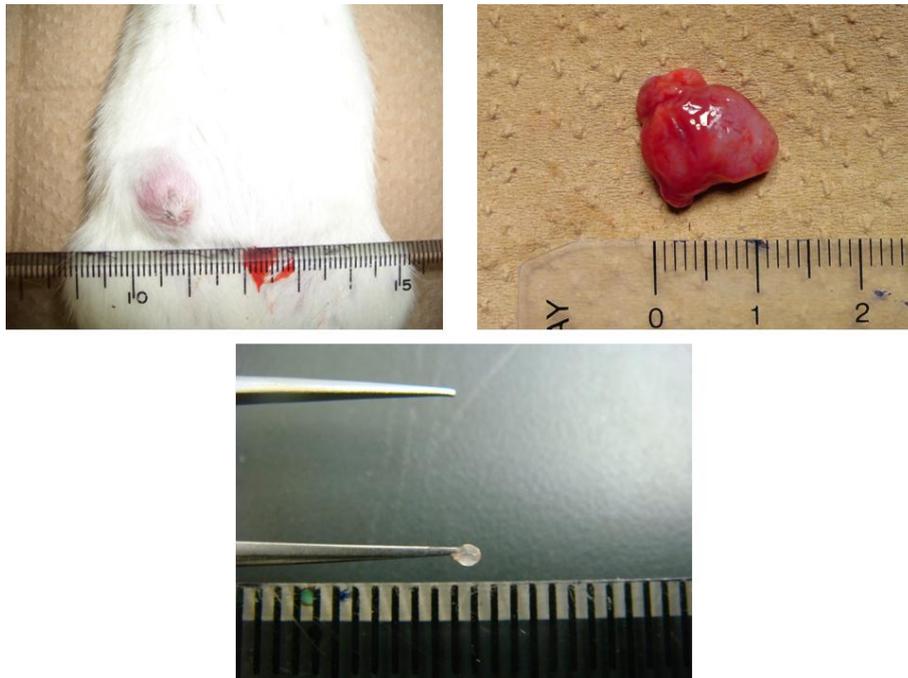


図 10. ラット乳癌移植片の作成

上段左：ドナーラットに作成した皮下腫瘍、上段右：摘出した皮下腫瘍

下段：約 1 mm × 1 mm × 1 mm 大のラット乳癌腫瘍片

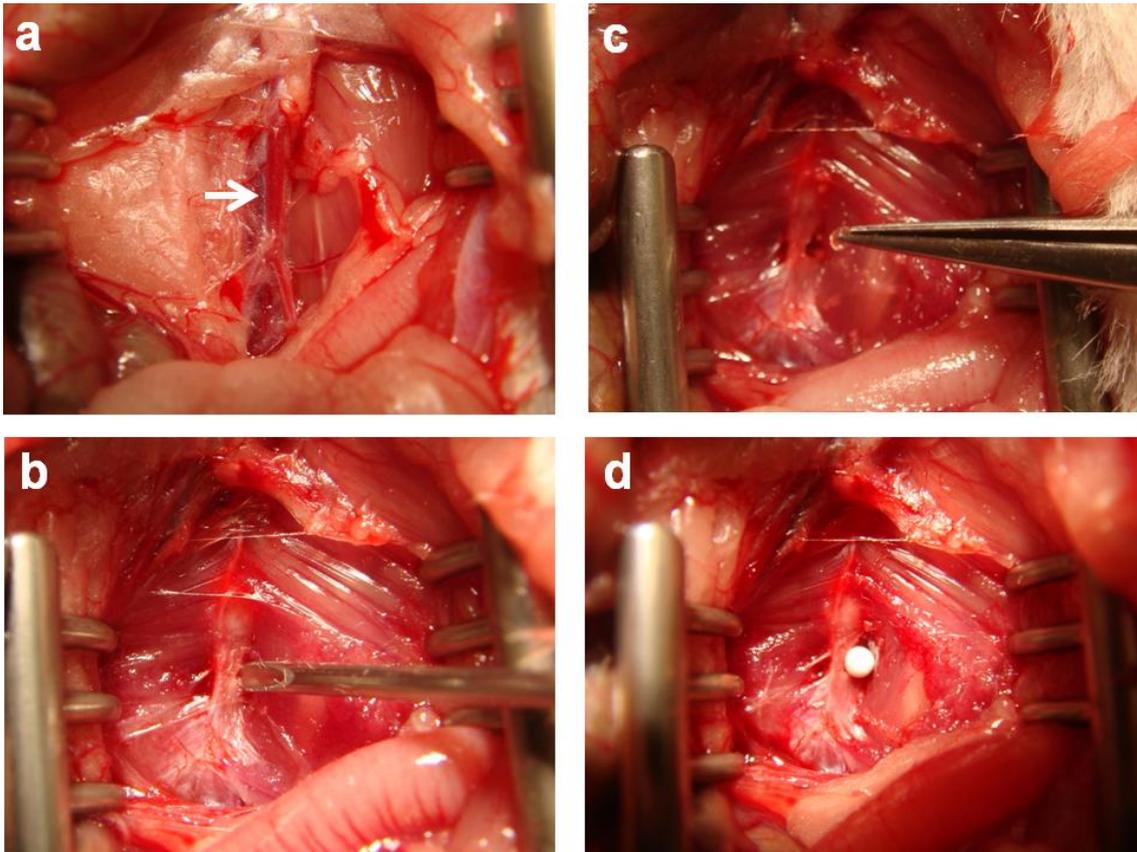


図 11. 脊椎転移乳癌ラットの作成

- a. 腹部大動脈（白矢印）を同定
- b. 第6腰椎椎体の左側面に骨孔作成
- c. ラット乳癌腫瘍片を骨孔内に移植
- d. ハイドロキシアパタイト製ビーズで骨孔をシール

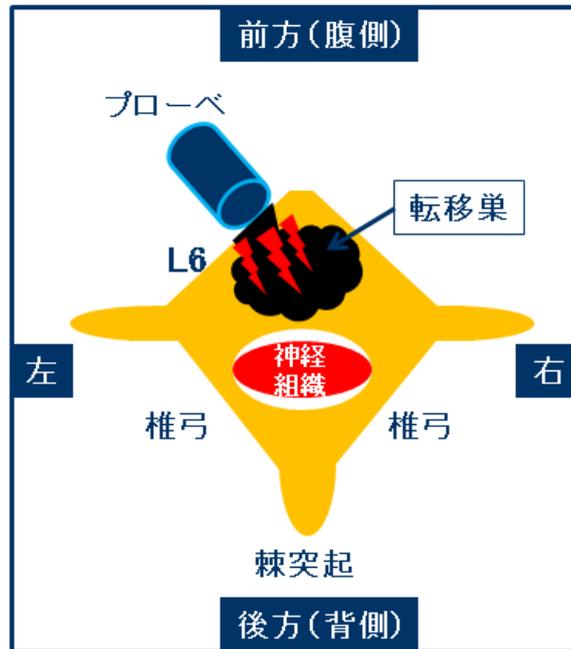


図 12. 実験 3, 4 照射方法

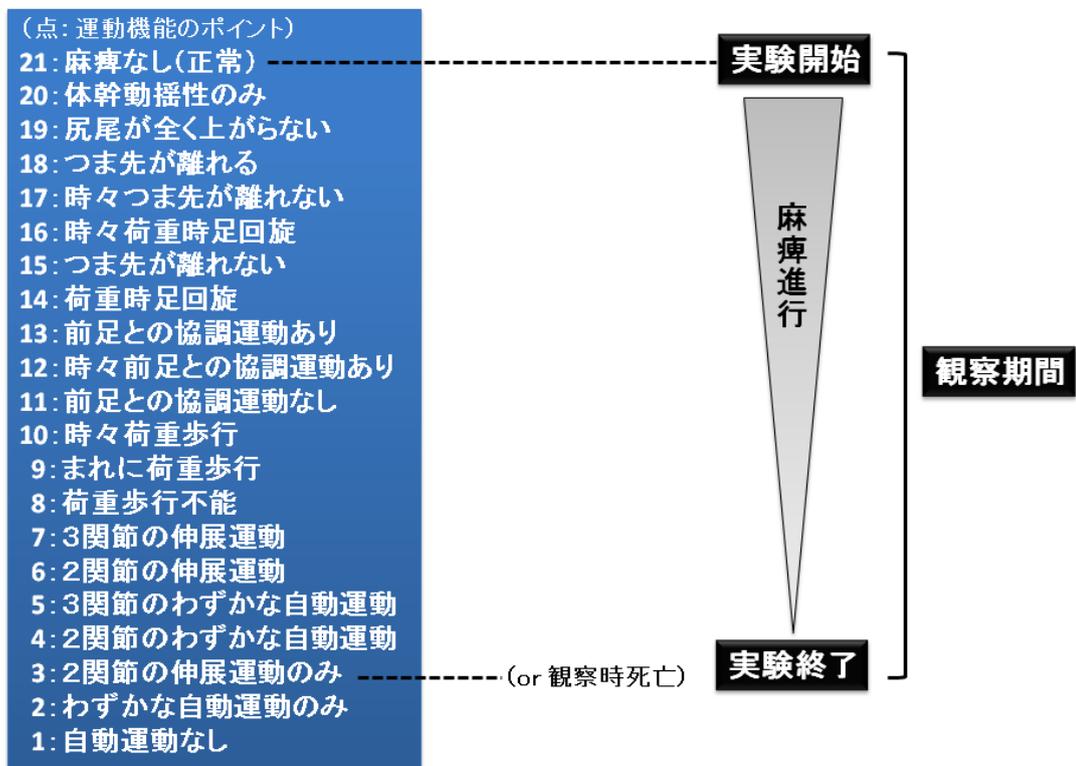


図 13. BBB スケールにおける運動機能のポイント (文献[45]より作成) と定義

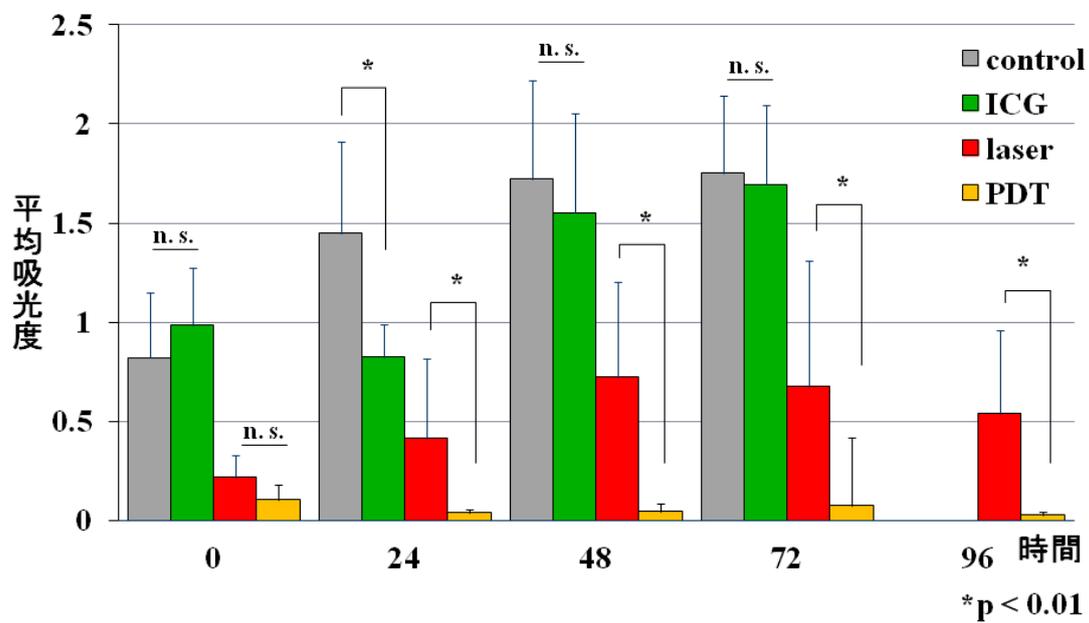


図 14. ラット乳癌細胞に対する PDT 後の吸光度の推移 (実験 1)

(平均吸光度 ± 標準偏差, n=16, n. s. = not significant)

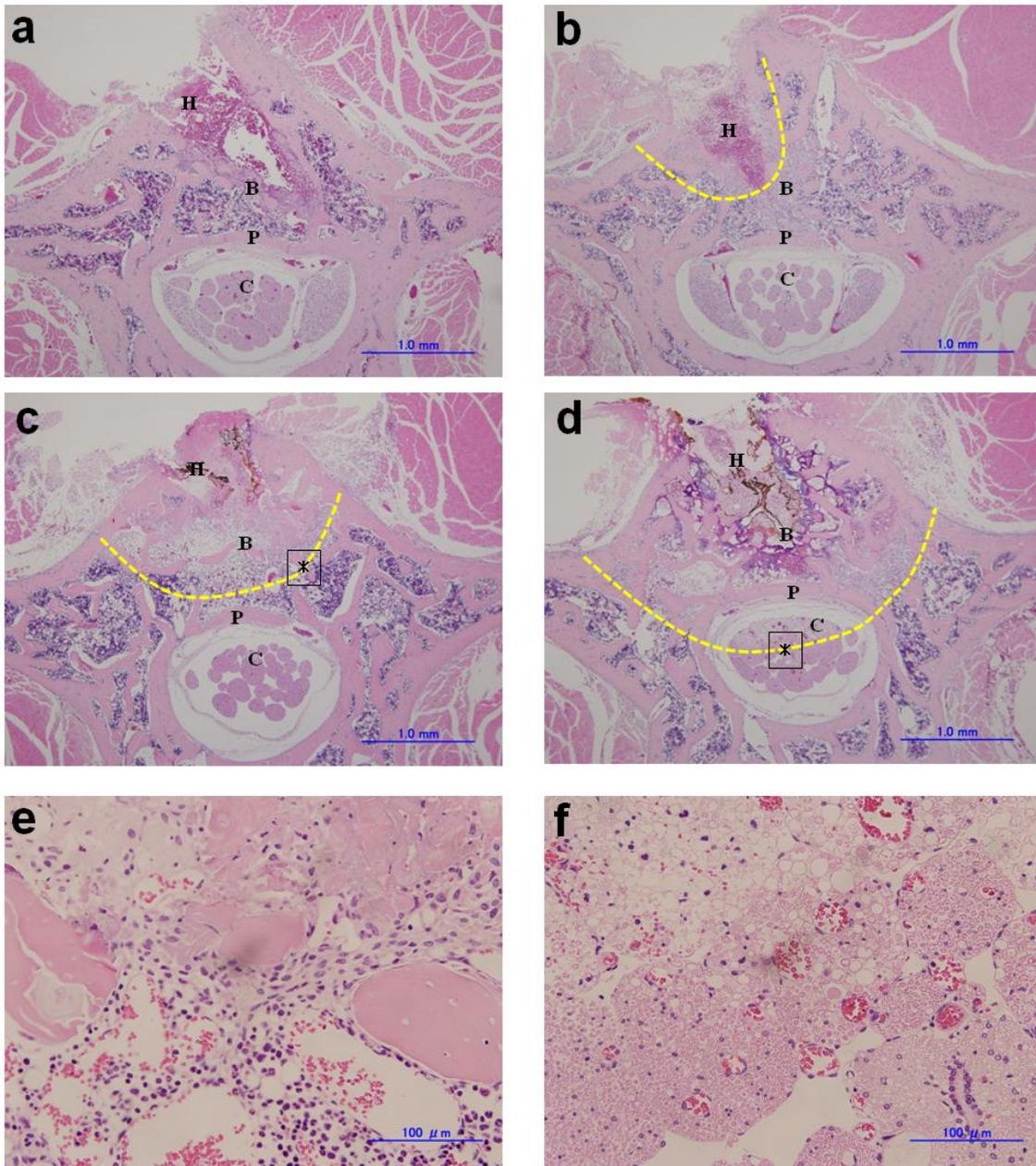


図 15. 正常ラット腰椎に対する近赤外レーザー照射後の病理組織像（実験 2）

**a**, control    **b**, 5J 群    **c**, 10J 群    **d**, 20J 群

**e**, 10J 群(**c**)\*部分強拡大    **f**, 20J 群(**d**)\*部分強拡大

**H**, 骨孔    **B**, 椎体    **P**, 椎体後壁    **C**, 神経組織

\*黄色点線はレーザー照射による変性組織と正常組織の境界線

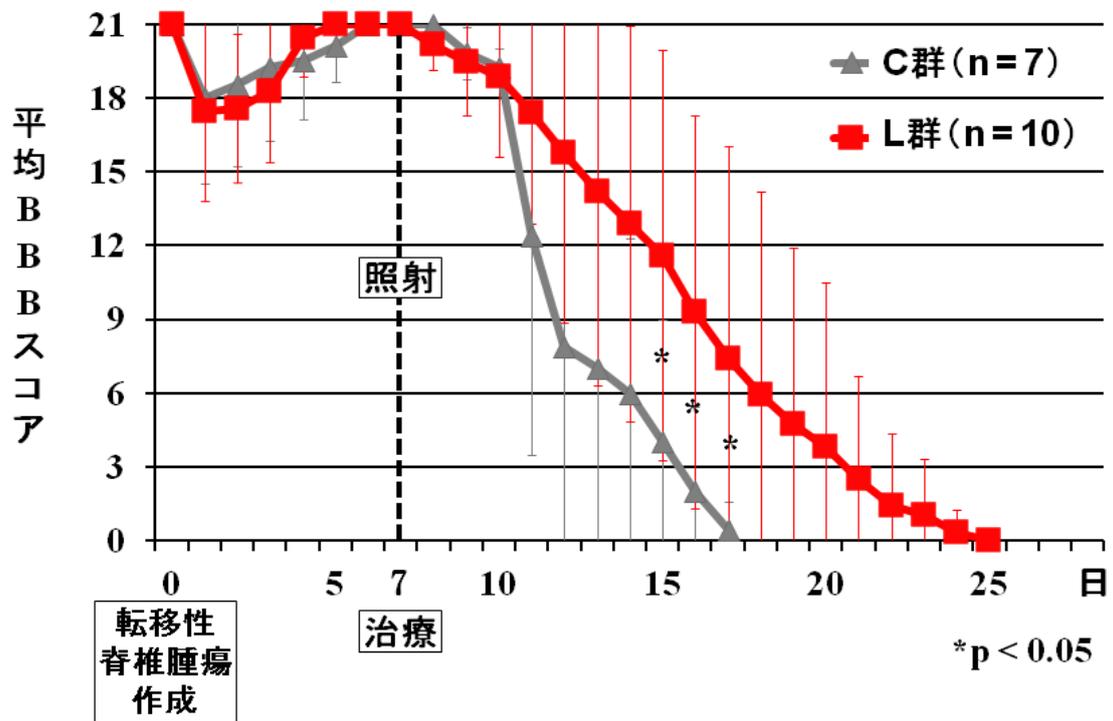


図 16. 下肢運動機能の推移（実験 3）

（平均 BBB スコア ± 標準偏差）

表 1. 全ラットの観察期間（実験 3）

C群	ラット	rat 1	rat 2	rat 3	rat 4	rat 5	rat 6	rat 7	平均±標準偏差			
	観察期間 (日)		15	15	17	17	11	12	11	14±2.6		
L群	ラット	rat 8	rat 9	rat 10	rat 11	rat 12	rat 13	rat 14	rat 15	rat 16	rat 17	平均±標準偏差
	観察期間 (日)		23	17	13	12	15	17	22	19	24	17

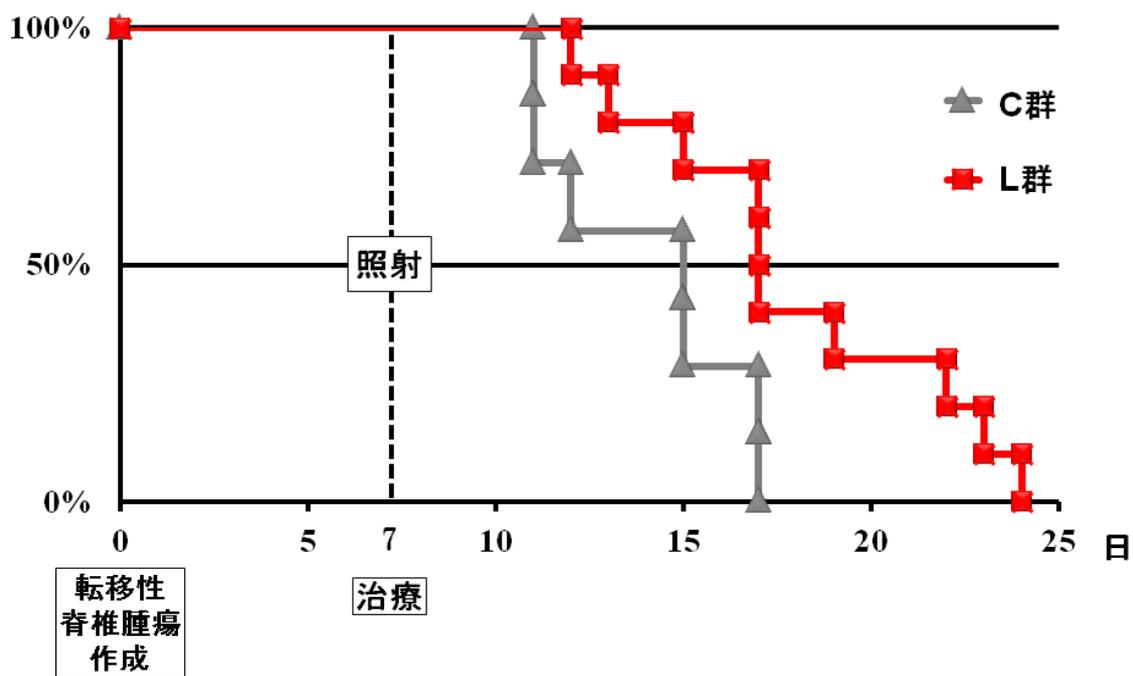


図 17. 観察期間の Kaplan-Meier 曲線（実験 3）

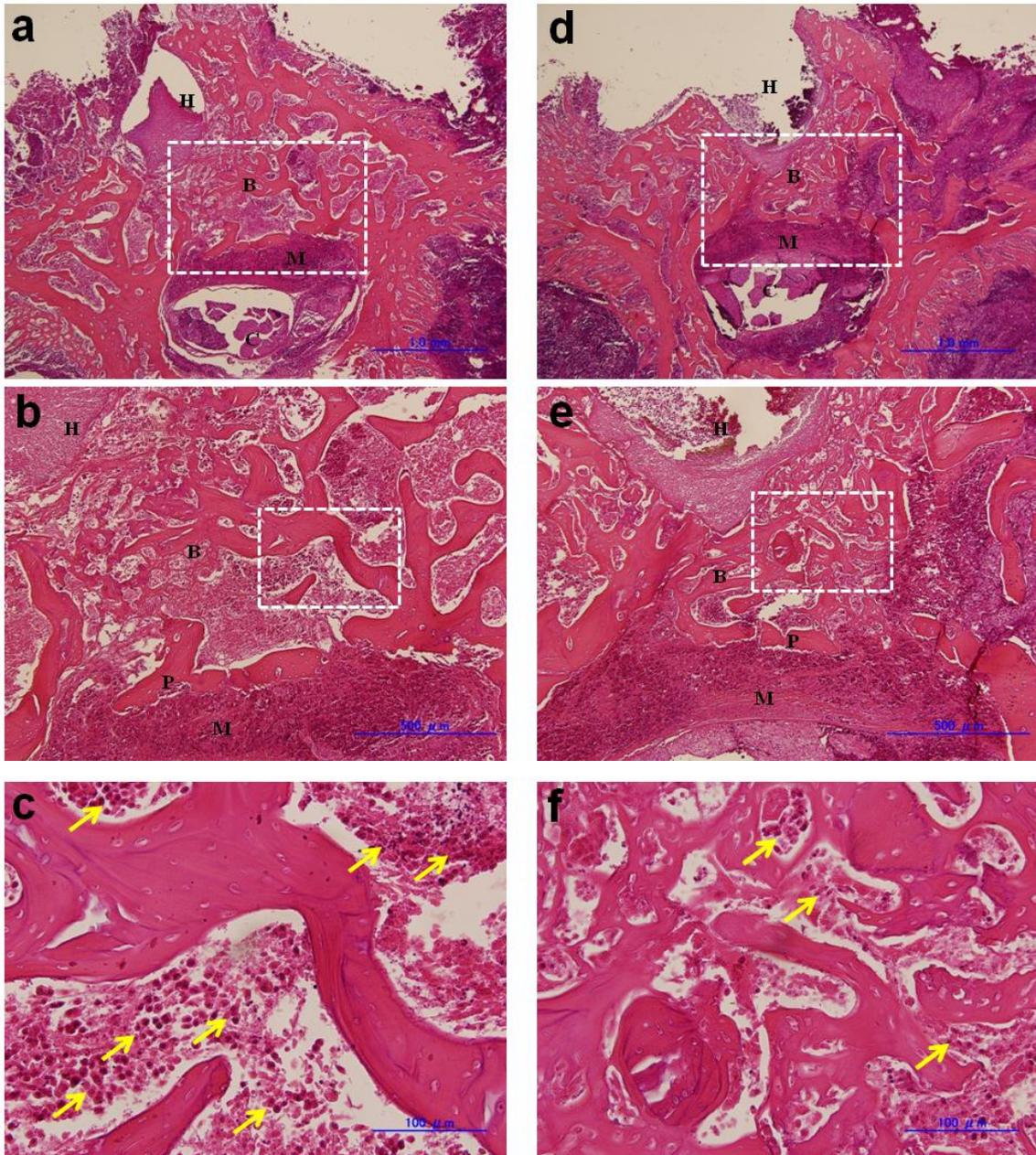


図 18. 実験 3 終了時の病理組織像

**a, b, c**; C 群    **d, e, f**; L 群

(白点線で囲った部分を順に強拡大した)

**H**, 骨孔    **B**, 椎体    **M**, 硬膜外転移巣    **P**, 椎体後壁    **C**, 神経組織

\*黄色矢印;椎体内に観察された腫瘍細胞

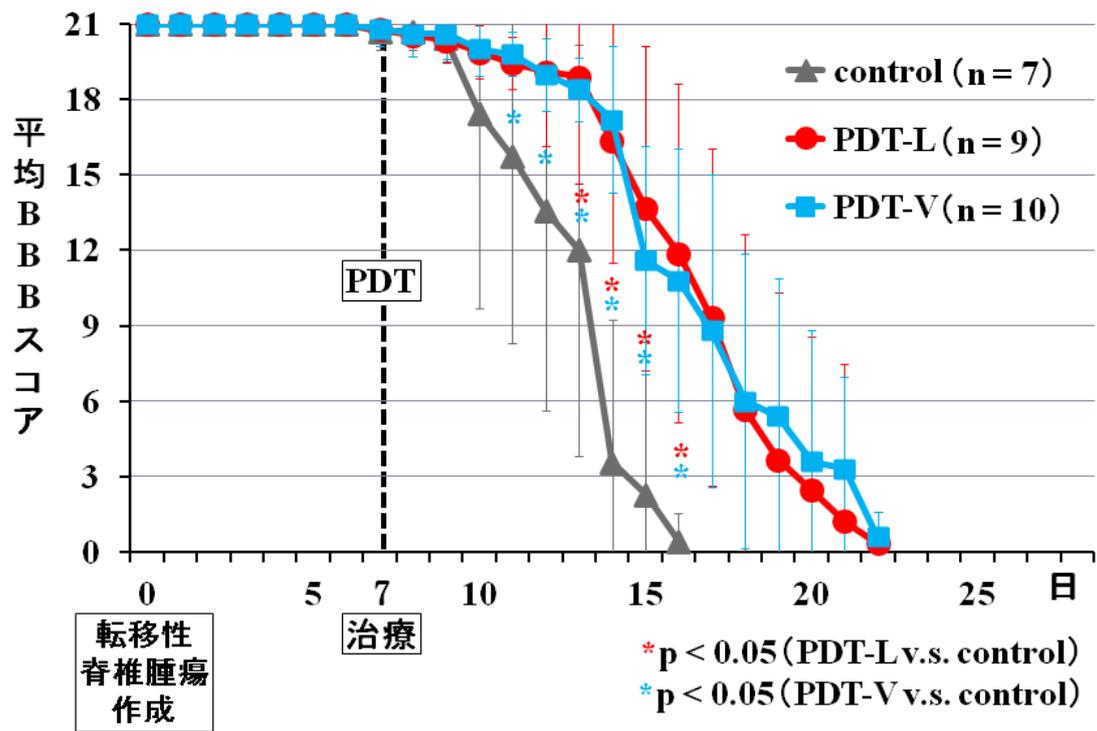


図 19. 下肢運動機能の推移 (実験 4)

(平均 BBB スコア ± 標準偏差)

表 2. 全ラットの観察期間（実験 4）

control	ラット	rat 1	rat 2	rat 3	rat 4	rat 5	rat 6	rat 7	平均±標準偏差			
	観察期間 (日)	16	14	14	13	14	10	14	13.6±1.8			
PDT-L	ラット	rat 8	rat 9	rat 10	rat 11	rat 12	rat 13	rat 14	rat 15	rat 16	平均±標準偏差	
	観察期間 (日)	17	17	20	16	18	19	22	20	18	18.6±1.9	
PDT-V	ラット	rat 17	rat 18	rat 19	rat 20	rat 21	rat 22	rat 23	rat 24	rat 25	rat 26	平均±標準偏差
	観察期間 (日)	19	15	18	22	15	19	22	17	20	22	18.9±2.7

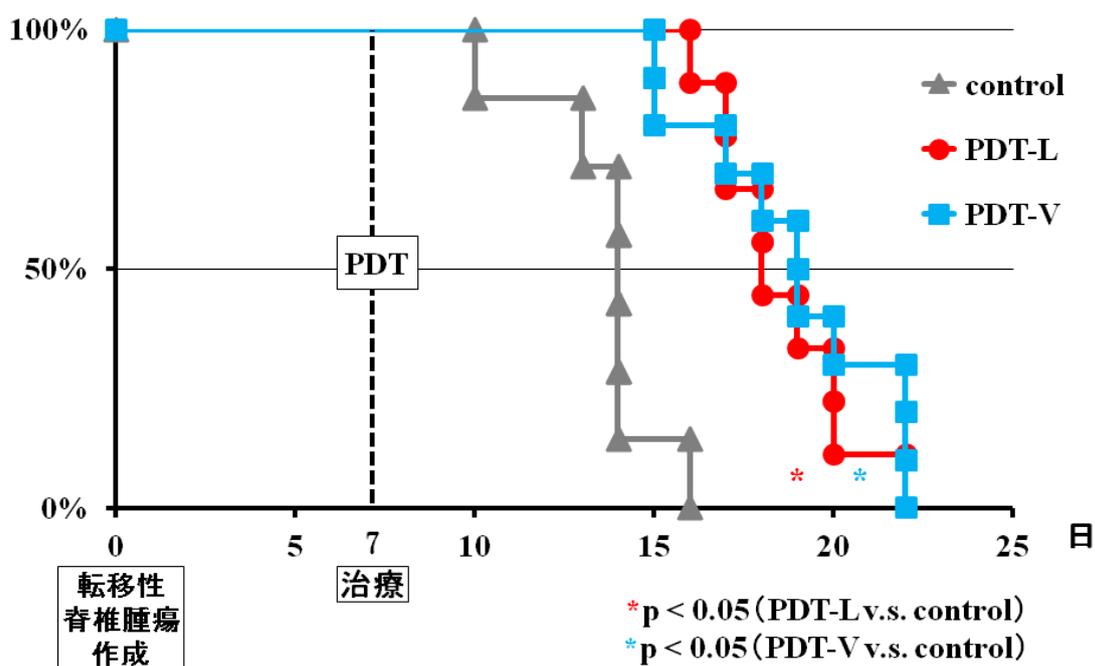


図 20. 観察期間の Kaplan-Meier 曲線（実験 4）

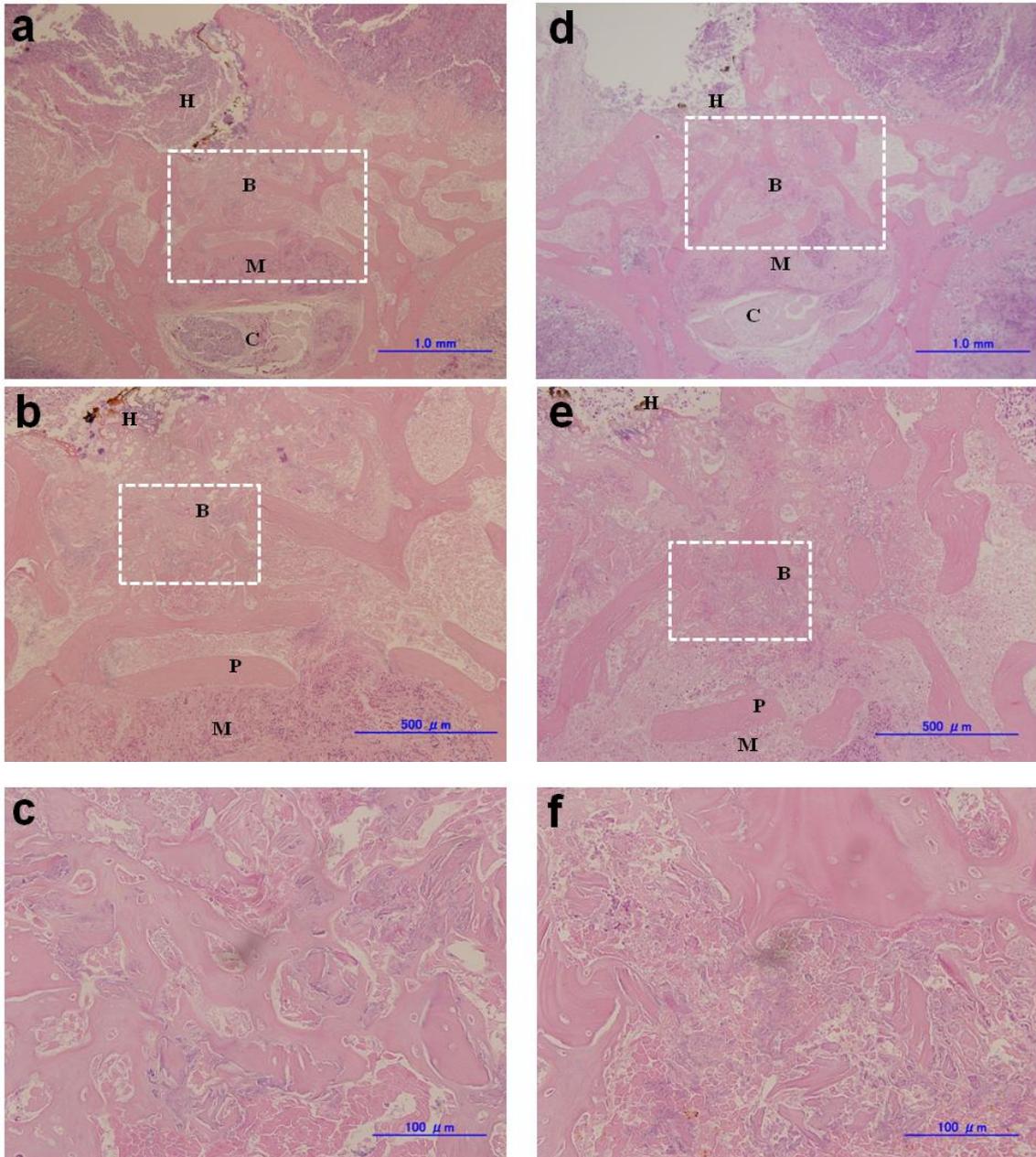


図 21. 実験 4 終了時の病理組織像

**a, b, c**; PDT-L 群    **d, e, f**; PDT-V 群

(白点線で囲った部分を順に強拡大した)

**H**, 骨孔    **B**, 椎体    **M**, 硬膜外転移巣    **P**, 椎体後壁    **C**, 神経組織

表 3. 実験 3 および実験 4 の結果まとめ

	治療群	ICG投与	照射エネルギー	下肢運動機能の温存効果	観察期間の延長効果
実験3	C群	—	—	—	—
	L群	なし	10 J	あり	なし
実験4	control群	—	—	—	—
	PDT-L群	局所	10 J	あり	あり
	PDT-V群	全身	10 J	あり	あり

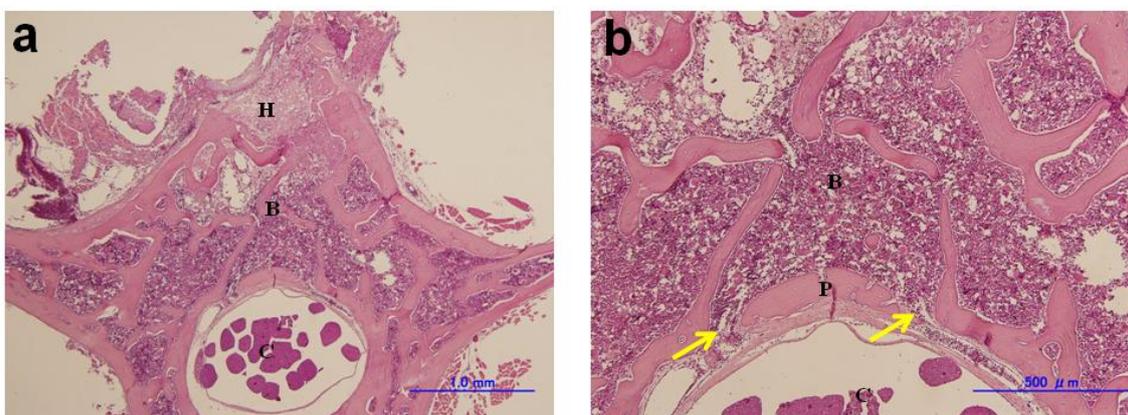


図 22. モデル作成後 7 日目の病理組織像

**a**; 弱拡大 **b**; 強拡大

**H**, 骨孔 **B**, 椎体 **P**, 椎体後壁 **C**, 神経組織

\*黄色矢印; 椎体後壁を穿破した腫瘍

## 謝辞

本研究の進行と論文作成にあたり、すべての過程においてご指導とご検閲を賜りました坂根正孝博士（筑波大学臨床医学系整形外科准教授ならびに次世代医療研究開発・教育統合センター准教授）に心から感謝いたします。

また、本研究における実験の技術指導をして頂いた安部哲哉博士（つくばセントラル病院整形外科）および実験助手をして頂いた小林美穂子殿（筑波大学次世代医療研究開発・教育統合センター技術職員）に厚く御礼申し上げます。

そしてなにより4年間の研究を支えて下さいました落合直之教授（筑波大学臨床医学系整形外科教授ならびに次世代医療研究開発・教育統合センター長）に厚く御礼申し上げます。

## 学会発表

1. 第30回日本レーザー医学会総会（東京）2009年12月  
半導体レーザーによる転移性脊椎腫瘍に対する低侵襲治療の検討  
船山 徹、坂根正孝、安部哲哉、落合直之
2. 第9回TXテクノロジー・ショーケース in つくば（つくば）2010年1月  
半導体レーザーによる脊椎転移モデルに対する治療効果の検討  
船山 徹、坂根正孝
3. 第20回日本光線力学学会（福井）2010年6月  
脊椎転移乳癌ラットに対するインドシアニングリーンを用いた光線力学療法  
船山 徹、坂根正孝、安部哲哉、落合直之
4. 第13回癌と骨病変研究会（東京）2010年11月  
乳癌脊椎転移ラットに対する ICG 含有ナノ粒子を用いた光線力学療法  
坂根正孝、船山 徹、落合直之、安部哲哉
5. 第57回 Orthopaedic Research Society（ロングビーチ アメリカ）2011年1月  
Photodynamic Therapy with Indocyanine Green Delays Paralysis in a Rat Model of Metastatic Spinal Cancer  
T. Funayama, M. Sakane, T. Abe, N. Ochiai
6. 第40回日本脊椎脊髄病学会（東京）2011年4月  
脊椎転移乳癌ラットに対するインドシアニンググリーン含有高分子ミセルを用いた腫瘍選択的な光線力学療法による下肢運動機能温存効果  
船山 徹、坂根正孝、安部哲哉、落合直之
7. 第13回 World Congress of the International Photodynamic Association（インスブルック オーストリア）2011年5月  
Photo-toxic Effects of Near-infrared Light Irradiation with Indocyanine Green on Rat Mammary Adenocarcinoma Cells  
T. Funayama, M. Sakane, T. Abe, N. Ochiai

8. 第 21 回日本光線力学学会 (大阪) 2011 年 7 月  
ラット乳癌細胞に対するインドシアニンググリーンと近赤外光照射による光線力学療法 of 細胞増殖抑制効果  
船山 徹、坂根正孝、塚西敏則、小関英一、落合直之
9. 第 44 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (京都) 2011 年 7 月  
転移性脊椎腫瘍に対するインドシアニンググリーンと近赤外光を用いた光線力学療法による細胞増殖抑制効果と運動機能温存効果  
船山 徹、坂根正孝、安部哲哉、落合直之
10. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 (前橋) 2011 年 10 月  
転移性脊椎腫瘍に対するインドシアニンググリーン含有ナノ粒子を用いた近赤外蛍光イメージング  
船山 徹、坂根正孝、安部哲哉、小関英一、落合直之
11. 第 2 回 Leading Graduate Schools International Conference (つくば)  
2011 年 11 月  
Intraoperative near-infrared fluorescence imaging for spinal metastasis using a novel indocyanine green-loaded nanocarrier  
T. Funayama, M. Sakane, T. Tsukanishi, N. Ochiai

## 引用論文

- [1] 内田淳正, "骨転移一序文," *骨・関節・靭帯*, vol. 17, p. 315, 2004.
- [2] P. Klimo, Jr. and M. H. Schmidt, "Surgical management of spinal metastases," *Oncologist*, vol. 9, pp. 188-96, 2004.
- [3] J. S. Cole and R. A. Patchell, "Metastatic epidural spinal cord compression," *Lancet Neurol*, vol. 7, pp. 459-66, May 2008.
- [4] H. Oka, T. Kondoh, A. Seichi, T. Hozumi, and K. Nakamura, "Incidence and prognostic factors of Japanese breast cancer patients with bone metastasis," *J Orthop Sci*, vol. 11, pp. 13-9, Jan 2006.
- [5] N. A. Quraishi, Z. L. Gokaslan, and S. Boriani, "The surgical management of metastatic epidural compression of the spinal cord," *J Bone Joint Surg Br*, vol. 92, pp. 1054-60, Aug 2010.
- [6] J. L. Abrahm, M. B. Banffy, and M. B. Harris, "Spinal cord compression in patients with advanced metastatic cancer: "all I care about is walking and living my life"," *JAMA*, vol. 299, pp. 937-46, Feb 27 2008.
- [7] "全国がん罹患モニタリング集計 2000-2002 年生存率報告," 独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センター, 2011.
- [8] G. A. Schubert, M. Barth, and C. Thome, "The Use of Indocyanine Green Videography for Intraoperative Localization of Intradural Spinal Tumors," *Spine*, vol. [Epub ahead of print], Feb 26 2010.
- [9] "人口動態統計によるがん死亡データ (1958年～2009年) " 国立がん研究センターがん対策情報センター.
- [10] R. E. Coleman and R. D. Rubens, "The clinical course of bone metastases from breast cancer," *Br J Cancer*, vol. 55, pp. 61-6, Jan 1987.
- [11] A. O. Jensen, J. B. Jacobsen, M. Norgaard, M. Yong, J. P. Fryzek, and H. T. Sorensen, "Incidence of bone metastases and skeletal-related events in breast cancer patients: a population-based cohort study in Denmark," *BMC Cancer*, vol. 11, p. 29, 2011.
- [12] P. Bohm and J. Huber, "The surgical treatment of bony metastases of the spine and limbs," *J Bone Joint Surg Br*, vol. 84, pp. 521-9, May 2002.
- [13] J. Schaberg and B. J. Gainor, "A profile of metastatic carcinoma of the

- spine," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 10, pp. 19-20, Jan-Feb 1985.
- [14] K. Tomita, N. Kawahara, H. Baba, H. Tsuchiya, T. Fujita, and Y. Toribatake, "Total en bloc spondylectomy. A new surgical technique for primary malignant vertebral tumors," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 22, pp. 324-33, Feb 1 1997.
- [15] K. Tomita, N. Kawahara, H. Murakami, and S. Demura, "Total en bloc spondylectomy for spinal tumors: improvement of the technique and its associated basic background," *J Orthop Sci*, vol. 11, pp. 3-12, Jan 2006.
- [16] K. Tomita, Y. Toribatake, N. Kawahara, H. Ohnari, and H. Kose, "Total en bloc spondylectomy and circumspinal decompression for solitary spinal metastasis," *Paraplegia*, vol. 32, pp. 36-46, Jan 1994.
- [17] A. Ibrahim, A. Crockard, P. Antonietti, S. Boriani, C. Bunger, A. Gasbarrini, A. Grejs, J. Harms, N. Kawahara, C. Mazel, R. Melcher, and K. Tomita, "Does spinal surgery improve the quality of life for those with extradural (spinal) osseous metastases? An international multicenter prospective observational study of 223 patients. Invited submission from the Joint Section Meeting on Disorders of the Spine and Peripheral Nerves, March 2007," *J Neurosurg Spine*, vol. 8, pp. 271-8, Mar 2008.
- [18] R. A. Patchell, P. A. Tibbs, W. F. Regine, R. Payne, S. Saris, R. J. Kryscio, M. Mohiuddin, and B. Young, "Direct decompressive surgical resection in the treatment of spinal cord compression caused by metastatic cancer: a randomised trial," *Lancet*, vol. 366, pp. 643-8, Aug 20-26 2005.
- [19] H. Sakaura, N. Hosono, Y. Mukai, T. Ishii, K. Yonenobu, and H. Yoshikawa, "Outcome of total en bloc spondylectomy for solitary metastasis of the thoracolumbar spine," *J Spinal Disord Tech*, vol. 17, pp. 297-300, Aug 2004.
- [20] J. D. Barr, M. S. Barr, T. J. Lemley, and R. M. McCann, "Percutaneous vertebroplasty for pain relief and spinal stabilization," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 25, pp. 923-8, Apr 15 2000.
- [21] L. Thanos, S. Mylona, P. Galani, D. Tzavoulis, V. Kalioras, S. Tanteles, and M. Pomoni, "Radiofrequency ablation of osseous metastases for the palliation of pain," *Skeletal radiology*, vol. 37, pp. 189-94, Mar 2008.

- [22] J. S. Jang and S. H. Lee, "Efficacy of percutaneous vertebroplasty combined with radiotherapy in osteolytic metastatic spinal tumors," *J Neurosurg Spine*, vol. 2, pp. 243-8, Mar 2005.
- [23] A. Sandri, G. Carbognin, D. Regis, D. Gaspari, C. Calciolari, V. Girardi, G. Mansueto, and P. Bartolozzi, "Combined radiofrequency and kyphoplasty in painful osteolytic metastases to vertebral bodies," *Radiol Med*, vol. 115, pp. 261-71, Mar 2010.
- [24] D. E. Dolmans, D. Fukumura, and R. K. Jain, "Photodynamic therapy for cancer," *Nat Rev Cancer*, vol. 3, pp. 380-7, May 2003.
- [25] S. B. Brown, E. A. Brown, and I. Walker, "The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment," *Lancet Oncol*, vol. 5, pp. 497-508, Aug 2004.
- [26] K. Kusuzaki, H. Murata, T. Matsubara, S. Miyazaki, A. Okamura, M. Seto, A. Matsumine, H. Hosoi, T. Sugimoto, and A. Uchida, "Clinical trial of photodynamic therapy using acridine orange with/without low dose radiation as new limb salvage modality in musculoskeletal sarcomas," *Anticancer Res*, vol. 25, pp. 1225-35, Mar-Apr 2005.
- [27] T. Nakamura, K. Kusuzaki, T. Matsubara, A. Matsumine, H. Murata, and A. Uchida, "A new limb salvage surgery in cases of high-grade soft tissue sarcoma using photodynamic surgery, followed by photo- and radiodynamic therapy with acridine orange," *Journal of surgical oncology*, vol. 97, pp. 523-8, May 1 2008.
- [28] J. Caesar, S. Shaldon, L. Chiandussi, L. Guevara, and S. Sherlock, "The use of indocyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function," *Clin Sci*, vol. 21, pp. 43-57, Aug 1961.
- [29] J. M. Maarek, D. P. Holschneider, and E. H. Rubinstein, "Fluorescence dilution technique for measurement of cardiac output and circulating blood volume in healthy human subjects," *Anesthesiology*, vol. 106, pp. 491-8, Mar 2007.
- [30] J. S. Slakter, L. A. Yannuzzi, D. R. Guyer, J. A. Sorenson, and D. A. Orlock, "Indocyanine-green angiography," *Curr Opin Ophthalmol*, vol. 6, pp. 25-32, Jun 1995.
- [31] G. R. Cherrick, S. W. Stein, C. M. Leevy, and C. S. Davidson, "Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction," *J Clin Invest*, vol. 39, pp. 592-600, Apr

- 1960.
- [32] C. Abels, S. Fickweiler, P. Weiderer, W. Baumler, F. Hofstadter, M. Landthaler, and R. M. Szeimies, "Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photooxidation," *Arch Dermatol Res*, vol. 292, pp. 404-11, Aug 2000.
  - [33] W. Baumler, C. Abels, S. Karrer, T. Weiss, H. Messmann, M. Landthaler, and R. M. Szeimies, "Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light," *Br J Cancer*, vol. 80, pp. 360-3, May 1999.
  - [34] O. Bozkulak, R. F. Yamaci, O. Tabakoglu, and M. Gulsoy, "Photo-toxic effects of 809-nm diode laser and indocyanine green on MDA-MB231 breast cancer cells," *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 6, pp. 117-21, Jun 2009.
  - [35] B. J. Kim, H. G. Lee, S. M. Woo, J. I. Youn, and D. H. Suh, "Pilot study on photodynamic therapy for acne using indocyanine green and diode laser," *J Dermatol*, vol. 36, pp. 17-21, Jan 2009.
  - [36] T. Noritomi, Y. Yamashita, T. Kodama, K. Mikami, T. Hashimoto, T. Konno, T. Maekawa, and T. Shirakusa, "Application of dye-enhanced laser ablation for liver resection. Production of protein sealant on the cut surface of the liver by enhanced thermal energy of low power diode laser," *Eur Surg Res*, vol. 37, pp. 153-8, May-Jun 2005.
  - [37] M. Sato, M. Ishihara, T. Arai, T. Asazuma, T. Kikuchi, T. Hayashi, T. Yamada, M. Kikuchi, and K. Fujikawa, "Use of a new ICG-dye-enhanced diode laser for percutaneous laser disc decompression," *Lasers Surg Med*, vol. 29, pp. 282-7, 2001.
  - [38] K. Skrivanova, J. Skorpikova, J. Svihalek, V. Mornstein, and R. Janisch, "Photochemical properties of a potential photosensitiser indocyanine green in vitro," *J Photochem Photobiol B*, vol. 85, pp. 150-4, Nov 1 2006.
  - [39] T. Hirano, E. Kohno, Y. Gohto, and A. Obana, "Singlet oxygen generation due to ICG irradiation," *Photomedicine and Photobiology*, vol. 28, pp. 15-6, 2006.
  - [40] E. Engel, R. Schraml, T. Maisch, K. Kobuch, B. Konig, R. M. Szeimies, J. Hillenkamp, W. Baumler, and R. Vasold, "Light-induced decomposition of indocyanine green," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 49, pp. 1777-83, May 2008.

- [41] M. Ishiyama, M. Shiga, K. Sasamoto, M. Mizuguchi, and P. He, "A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye," *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 41, pp. 1118-1122, 1993.
- [42] A. Mantha, F. G. Legnani, C. A. Bagley, G. L. Gallia, I. Garonzik, G. Pradilla, E. Amundson, B. M. Tyler, H. Brem, and Z. L. Gokaslan, "A novel rat model for the study of intraosseous metastatic spine cancer," *J Neurosurg Spine*, vol. 2, pp. 303-7, Mar 2005.
- [43] T. Abe, M. Sakane, T. Ikoma, M. Kobayashi, S. Nakamura, and N. Ochiai, "Intraosseous delivery of paclitaxel-loaded hydroxyapatitealginate composite beads delaying paralysis caused by metastatic spine cancer in rats," *J Neurosurg Spine*, vol. 9, pp. 502-10, Nov 2008.
- [44] D. M. Basso, M. S. Beattie, and J. C. Bresnahan, "A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats," *J Neurotrauma*, vol. 12, pp. 1-21, Feb 1995.
- [45] S. Burch, S. K. Bisland, A. Bogaards, A. J. Yee, C. M. Whyne, J. A. Finkelstein, and B. C. Wilson, "Photodynamic therapy for the treatment of vertebral metastases in a rat model of human breast carcinoma," *J Orthop Res*, vol. 23, pp. 995-1003, Sep 2005.
- [46] M. K. Akens, A. J. Yee, B. C. Wilson, S. Burch, C. L. Johnson, L. Lilge, and S. K. Bisland, "Photodynamic therapy of vertebral metastases: evaluating tumor-to-neural tissue uptake of BPD-MA and ALA-PpIX in a murine model of metastatic human breast carcinoma," *Photochem Photobiol*, vol. 83, pp. 1034-9, Sep-Oct 2007.
- [47] M. K. Akens, M. R. Hardisty, B. C. Wilson, J. Schwock, C. M. Whyne, S. Burch, and A. J. Yee, "Defining the therapeutic window of vertebral photodynamic therapy in a murine pre-clinical model of breast cancer metastasis using the photosensitizer BPD-MA (Verteporfin)," *Breast Cancer Res Treat*, vol. 119, pp. 325-33, Jan 2010.
- [48] T. Karu, "Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells," *J Photochem Photobiol B*, vol. 49, pp. 1-17, Mar 1999.
- [49] R. Lavi, A. Shainberg, V. Shneyvays, E. Hochauser, A. Isaac, T. Zinman, H. Friedmann, and R. Lubart, "Detailed analysis of reactive oxygen species induced by visible light in various cell types," *Lasers in surgery and medicine*, vol. 42, pp. 473-80, Aug 2010.

- [50] T. Abe, M. Sakane, T. Ikoma, M. Kobayashi, and N. Ochiai, "Therapeutic effects of paclitaxel-loaded hydroxyapatite-alginate beads: *in vitro* and *in vivo* studies," *Key Engineering Materials*, vol. 396-398, pp. 551-4, 2009.
- [51] T. Abe, M. Sakane, T. Ikoma, T. Tonegawa, T. Yoshioka, J. Tanaka, and N. Ochiai, "Novel local treatment with paclitaxel-loaded hydroxyapatite-alginate gels for spinal bone metastases," *Key Engineering Materials*, vol. 330-332, pp. 1343-6, 2007.
- [52] C. A. Bagley, M. J. Bookland, J. A. Pindrik, T. Ozmen, Z. L. Gokaslan, and T. F. Witham, "Local delivery of oncogel delays paresis in rat metastatic spinal tumor model," *J Neurosurg Spine*, vol. 7, pp. 194-8, Aug 2007.
- [53] C. A. Bagley, M. J. Bookland, J. A. Pindrik, T. Ozmen, Z. L. Gokaslan, J. P. Wolinsky, and T. F. Witham, "Fractionated, single-port radiotherapy delays paresis in a metastatic spinal tumor model in rats," *J Neurosurg Spine*, vol. 7, pp. 323-7, Sep 2007.
- [54] B. Gok, M. McGirt, D. M. Sciubba, S. Ayhan, A. Bydon, T. F. Witham, J. P. Wolinsky, and Z. L. Gokaslan, "Surgical resection plus adjuvant radiotherapy is superior to surgery or radiotherapy alone in the prevention of neurological decline in a rat metastatic spinal tumor model," *Neurosurgery*, vol. 63, pp. 346-51; discussion 351, Aug 2008.
- [55] B. Gok, M. J. McGirt, D. M. Sciubba, G. Garces-Ambrossi, C. Nelson, J. Noggle, A. Bydon, T. F. Witham, J. P. Wolinsky, and Z. L. Gokaslan, "Adjuvant treatment with locally delivered OncoGel delays the onset of paresis after surgical resection of experimental spinal column metastasis," *Neurosurgery*, vol. 65, pp. 193-9; discussion 199-200, Jul 2009.
- [56] B. F. Scharschmidt, J. G. Waggoner, and P. D. Berk, "Hepatic organic anion uptake in the rat," *J Clin Invest*, vol. 56, pp. 1280-92, Nov 1975.
- [57] S. Stolik, J. A. Delgado, A. Perez, and L. Anasagasti, "Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human "ex vivo" tissues," *J Photochem Photobiol B*, vol. 57, pp. 90-3, Sep 2000.
- [58] E. Won, M. K. Akens, M. R. Hardisty, S. Burch, S. K. Bisland, A. J. Yee, B. C. Wilson, and C. M. Whyne, "Effects of photodynamic therapy on the structural integrity of vertebral bone," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 35, pp. 272-7, Feb 1 2010.

- [59] E. Won, L. Wise-Milestone, M. K. Akens, S. Burch, A. J. Yee, B. C. Wilson, and C. M. Whyne, "Beyond bisphosphonates: photodynamic therapy structurally augments metastatically involved vertebrae and destroys tumor tissue," *Breast Cancer Res Treat*, vol. 124, pp. 111-9, Nov 2010.
- [60] H. Liang, S. Y. Ma, K. Mohammad, T. A. Guise, G. Balian, and F. H. Shen, "The reaction of bone to tumor growth from human breast cancer cells in a rat spine single metastasis model," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 36, pp. 497-504, Apr 1 2011.
- [61] C. E. Tatsui, F. F. Lang, J. Gumin, D. Suki, N. Shinojima, and L. D. Rhines, "An orthotopic murine model of human spinal metastasis: histological and functional correlations," *J Neurosurg Spine*, vol. 10, pp. 501-12, Jun 2009.
- [62] T. H. Kim, Y. Chen, C. W. Mount, W. R. Gombotz, X. Li, and S. H. Pun, "Evaluation of temperature-sensitive, indocyanine green-encapsulating micelles for noninvasive near-infrared tumor imaging," *Pharmaceutical research*, vol. 27, pp. 1900-13, Sep 2010.
- [63] A. Makino, S. Kizaka-Kondoh, R. Yamahara, I. Hara, T. Kanzaki, E. Ozeki, M. Hiraoka, and S. Kimura, "Near-infrared fluorescence tumor imaging using nanocarrier composed of poly(L-lactic acid)-block-poly(sarcosine) amphiphilic polydepsipeptide," *Biomaterials*, vol. 30, pp. 5156-60, Oct 2009.
- [64] X. Zheng, D. Xing, F. Zhou, B. Wu, and W. R. Chen, "Indocyanine green-containing nanostructure as near infrared dual-functional targeting probes for optical imaging and photothermal therapy," *Molecular pharmaceutics*, vol. 8, pp. 447-56, Apr 4 2011.
- [65] M. V. Marshall, J. C. Rasmussen, I.-C. Tan, M. B. Aldrich, K. E. Adams, X. Wang, C. E. Fife, E. A. Maus, L. A. Smith, and E. M. Sevick-Muraca, "Near-infrared fluorescence imaging in humans with indocyanine green: a review and update," *The Open Surgical Oncology Journal*, vol. 2, pp. 12-25, 2010.
- [66] T. Handa, R. G. Katare, H. Nishimori, S. Wariishi, T. Fukutomi, M. Yamamoto, S. Sasaguri, and T. Sato, "New device for intraoperative graft assessment: HyperEye charge-coupled device camera system," *General thoracic and cardiovascular surgery*, vol. 58, pp. 68-77, Feb 2010.

- [67] G. P. Colby, A. L. Coon, D. M. Sciubba, A. Bydon, P. Gailloud, and R. J. Tamargo, "Intraoperative indocyanine green angiography for obliteration of a spinal dural arteriovenous fistula," *Journal of neurosurgery. Spine*, vol. 11, pp. 705-9, Dec 2009.
- [68] J. K. Oh, H. C. Shin, T. Y. Kim, G. H. Choi, G. Y. Ji, S. Yi, Y. Ha, K. N. Kim, and D. H. Yoon, "Intraoperative Indocyanine Green Video-Angiography: Spinal Dural Arteriovenous Fistula," *Spine*, vol. [Epub ahead of print], Feb 17 2011.
- [69] G. A. Schubert, K. Schmieder, M. Seiz-Rosenhagen, and C. Thome, "ICG Videography Facilitates Interpretation of Vascular Supply and Anatomical Landmarks in Intramedullary Spinal Lesions: Two Case Reports," *Spine*, vol. 36, pp. E811-3, May 20 2011.
- [70] B. E. Schaafsma, J. S. Mieog, M. Hutteman, J. R. van der Vorst, P. J. Kuppen, C. W. Lowik, J. V. Frangioni, C. J. van de Velde, and A. L. Vahrmeijer, "The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery," *Journal of surgical oncology*, pp. 1-9, Apr 14 2011.
- [71] T. Funayama, M. Sakane, T. Abe, I. Hara, E. Ozeki, and N. Ochiai, "Intraoperative Near-infrared Fluorescence Imaging with Novel Indocyanine Green-Loaded Nanocarrier for Spinal Metastasis: A Preliminary Rat Case Study," *Open Biomed Eng J.* [in press] 2012.

## 参 考 論 文

**Photodynamic therapy with indocyanine green injection and near-infrared light irradiation has phototoxic effects and delays paralysis in spinal metastasis.**

**Funayama Toru, M.D., Sakane Masataka, M.D., Ph.D.,**

**Abe Tetsuya, M.D., Ph.D., Ochiai Naoyuki, M.D., Ph.D.**

**Photomedicine and Laser Surgery 2012 Jan; 30(1): 47-53.**