

高コレステロールウサギを用いたtalaporfin sodiumによる 光線力学的治療の血管内膜肥厚抑制効果の検討

中井 宏昌¹ 長江 恒幸¹ 内村 智生¹
石丸 新¹ 斎藤 喬士² 會沢 勝夫³

要 旨：高コレステロールウサギを用いて血管形成術後の内膜肥厚に対する光線力学的療法 (photodynamic therapy: PDT) の効果について検討した。動脈硬化腹部大動脈を未治療部位 (non treatment: NT群), 血管形成術部位 (angioplasty: AP群), 血管形成術 + PDT部位 (PDT群) に分けて比較したところ, 治療14日後での内膜中膜比はNT群, AP群のいずれよりもPDT群において有意に低値を示した。PDT治療によるプラークの縮小および新生内膜抑制を認めた。
(J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 255-261)

Key words: photodynamic therapy, atherosclerosis, restenosis, intimal hyperplasia, talaporfin sodium (LS11/NPe6)

はじめに

動脈硬化は虚血性心疾患, 慢性閉塞性動脈硬化症, 頸動脈狭窄症などの原因といわれている。これら動脈硬化性疾患に対する治療法として, 外科的バイパス術に加えて経カテーテル的血管内治療が盛んに行われている。虚血性心疾患について経皮的冠動脈形成術 (percutaneous transluminal coronary angioplasty: PTCA) が広く臨床応用されるようになってから20年あまり経過したが¹⁾, 特に最近の治療法の進歩には目覚ましいものがあり, アテレクトミー, ステント, ロータブレーターなどの新しいデバイスが次々と導入され, その適応病変が多枝病変にも拡大されてきている。しかし, これら血管内治療後に起きる再狭窄の問題はバルーン拡張後で約20~30%, ステント挿入後でも約10~20%と依然重要な合併症となっている²⁾。再狭窄の抑制法として, これまでさまざまな治療法が検討されてきているが, 特に最近では遺伝子治療, 放射線治療や薬剤放出性ステント (drug eluting stent: DES) の有用性が報告されている³⁻⁵⁾。

循環器領域での光線力学的療法 (photodynamic therapy: PDT) の研究は1983年にSpearsら⁶⁾が, ウサギの血管粥状硬化部位に一致して光感受性物質ヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivative: HpD) が集積することを報告したことに始まる。その後1992年にOrtuら⁷⁾により新生内膜肥厚抑制効果が*in vivo*で報告され, 以来多くの実験的および臨床的報告がみられるようになった⁸⁻¹⁰⁾。

今回, われわれは励起効率の高い第2世代の光感受性物質talaporfin sodium (LS11/NPe6) を使用し, 高コレステロールウサギに対し, バルーン血管形成術に血管内PDTを併用した治療を行い, PDTによる動脈硬化プラークへの影響, 新生内膜肥厚の抑制効果を検討した。

対象と方法

(1) 光感受性物質の分光特性

Talaporfin sodium (LS11/NPe6) (明治製菓, 東京, 日本) は, クロリン骨格にアスパラギン酸を付加したクロリン系の光感受性物質である。リン酸緩衝液中ではSoret帯 (400nm) とQ帯 (502, 600, 654nm) の各波長に吸収ピークを認める。さらにこのピークは, 生体組織中では約10nm長波長側へシフトし, 654nmの吸収ピーク

¹東京医科大学外科学第2講座

²杏林大学医学部生物学

³東京医科大学生理学第2講座

2004年8月30日受付 2005年1月29日受理

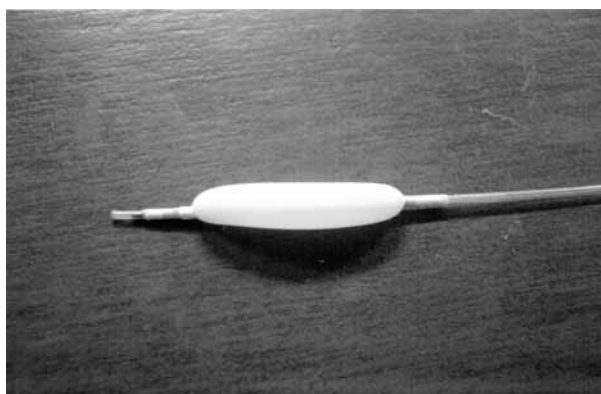


Figure 1 Laser Balloon Light Diffuser (BLD) (Medlight SA Switzerland). The balloon is 20 mm in length, and is capable of expanding to 4 mm in diameter (compared with 1.2 mm in deflation) with maximal illumination homogeneity.

は664nmとなる。この吸収帯で励起すると波長672nmの talaporfin sodium 特有の蛍光を観測できる¹¹⁾。

(2) 高コレステロールウサギの作成

雄性 New Zealand white rabbit (体重2.5 ~ 3.0kg) を19羽使用した。東京医科大学 動脈実験施設倫理規定にのっとり、塩酸ケタミン(ケタラール50[®]) 30mg/kg とキシラジン塩酸塩(セラクター[®]) 10mg/kg の筋肉内注射による麻酔下に、右大腿動脈を露出し、同部位から2Fr. Fogarty バルーンカテーテル(Baxter Healthcare, CA, USA) を腎動脈レベル腹部大動脈まで挿入し、腸骨動脈分岐までの約15cm に至る腹部大動脈でバルーンを拡張させたまま3回繰り返し通過させることで血管内膜に傷害を与えた¹²⁾。その後、1% コレステロール食を8週間摂取させて高コレステロールウサギを作成した。水分は自由に摂取させた。

(3) 蛍光画像による talaporfin sodium 集積状態の観察

作成した高コレステロールウサギの左大腿動脈に5Fr. イントロデューサー(テルモ, 東京, 日本) を留置した。Talaporfin sodium (5mg/kg) 静脈内投与直後に、イントロデューサーよりバルーン長40mm, 拡張径4mm のPTA(percutaneous transluminal angioplasty: 経皮経管的血管形成術)バルーンカテーテル(SymmetryTM PTA catheter, Boston Scientific, MA, USA) を挿入し腎動脈下の腹部大動脈に10気圧, 10分間の加圧を行った。30分, 1時間, 3時間, 6時間後にペントバルビタール過剰投与により犠牲死させ、治療血管を摘出し、O.C.T. compound 4583 (Miles, Elkhart, IN, USA) にて凍結保存し

た(-70°C)。Cryosta (Cryostat microtome 1850, Leica, Nussloch, Germany) にて血管横断面 6μm 切片を作成し PDT の至適時間を見いだすために talaporfin sodium の集積状態について蛍光顕微鏡 (OMS-600, トプコン, 東京, 日本) を用いて観察した。励起光源として UV フィルターを導入し, 500nm 以下の蛍光波長を gelatin filter (Kodak, Rochester, NY, USA) によりカットし 672nm にスペクトルピークを持つ talaporfin sodium 特有の蛍光を撮影した。

(4) 血管内 PDT

高コレステロールウサギの左大腿動脈を麻酔下に露出し 5Fr. イントロデューサーを挿入。Talaporfin sodium (5mg/kg) の経静脈的投与直後にシースから PTA バルーンを腹部大動脈に挿入し, 10気圧, 10分のバルーン拡張を施行した。Talaporfin sodium の動脈硬化モデルに対する至適時間である投与3時間後に血管内レーザー照射用カテーテル(Laser balloon light diffuser (BLD) (Medlight S.A. Switzerland) を挿入し, PDT (laser power density 50mW/cm², energy density 50J/cm²) を行った。この BLD の先端バルーン部(長さ20mm, 直径4mm) は標的治療血管の位置に挿入し, バルーンを拡張させ血流を排除することで全周性に均等なパワー密度のレーザー照射を行うことができる(Fig. 1)。PDT に使用した半導体レーザー光源(松下産業機器, 大阪, 日本) は talaporfin sodium の吸収最長波長と一致する波長664nm に調整した。比較する群として動脈硬化腹部大動脈の中枢側よりバルーン血管拡張, PDT とともに施行していない動脈硬化のみの部位 (NT 群: non treatment), バルーン血管拡張のみを施行した部位 (AP 群: angioplasty),

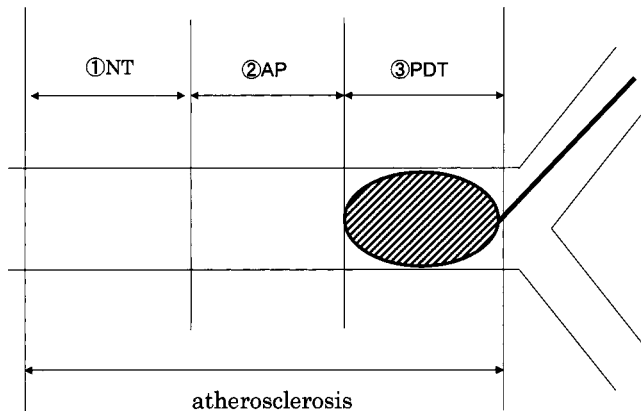


Figure 2 The *in vivo* experiment to study the rabbits' abdominal aorta.

NT: First, scratches in the rabbits' abdominal aorta were created by pulling a balloon catheter back and forth in the aorta. Second, the rabbits were fed on an atherogenic diet containing 1.0% cholesterol for 8 weeks.

AP: PTA catheter (4mm in diameter, 4cm in length) was inflated at 10 atm for 10 minutes in the atherosclerotic abdominal aorta.

PDT: The inner abdominal aorta was irradiated with laser light through BLD at 3 hours after injection of talaporfin sodium. PDT was performed with 664 nm at 50J/cm² (50mW/cm²).

バルーン血管拡張とPDTを施行した部位 (PDT群) の3カ所を同一個体で作成した (Fig. 2)。これはすべて開腹直視下で腹部大動脈をバルーン拡張し、PTAバルーン長とBLDバルーン長の中枢側先端部位の腹部大動脈近傍組織のところにおおの3-0絹糸を縫合して目印をつけた。そして、再び1%コレステロール食を継続し、PDT施行3日後 (n=7) と14日後 (n=8) に生存期間を分け、ペントバルビタール過剰投与により犠牲死させ、前回開腹実験のときにつけていた目印を目標にして、PDT施行部位を含む腹部大動脈を10%ホルマリンで灌流固定した。各群をパラフィン埋没施行後、3 μ mスライスの動脈横断切片を約600 μ m間隔ごとに10標本を作成した。各標本に対してH&E染色および抗平滑筋 α 1-actin抗体 (Dako, Carpinteria, CA, USA)、抗マクロファージ抗体RAM11 (Dako, Carpinteria, CA, USA) とLSABキット (Dako, Carpinteria, CA, USA) を用いた免疫組織染色を行った。形態学的分析には顕微鏡に接続したvideomicrometer-60 system (Olympus Optical, 東京, 日本) を使用し、各群におけるPDT治療後3日後と14日後の内膜面積、中膜面積、内膜肥厚度 (内膜面積/中膜面積比; I/M比)、中膜細胞密度を測定した。測定は各治療部位の中央の3スライスを平均して行った。3群間でこれらと比較することにより動脈硬化病変における血管形成術後出現する内膜肥厚に対するPDT効果を検討した。

(5) 統計学的解析

数値はすべて平均 \pm 標準偏差 (mean \pm SD) で示し、統計処理はone-way ANOVA, Bonferroni test (StatView-J 5.0 for Windows) を用い、危険率0.05未満をもって有意

差ありと判定した。

結 果

(1) 蛍光画像によるtalaporfin sodiumの集積状況

作成された動脈硬化部位の血管の横断面の蛍光画像について、集積したtalaporfin sodiumから発する波長672nmの赤い蛍光がプラーク部位に選択的に認められ、中膜には認められなかった (Fig. 3)。一方、動脈硬化部位にバルーン血管拡張を加えた血管の横断面の蛍光画像について、プラークに加え拡張された中膜にもプラーク内と同様にtalaporfin sodiumが投与3時間後に最も集積しているのが確認された (Fig. 3)。

(2) 病理所見

Fogartyバルーンによる引き抜き傷害直後より1%コレステロール食を8週間摂取させたモデルには著しい内膜プラークの形成が認められた。PDT群ではAP群と比較して治療3日後ですでに内膜プラークが縮小し、中膜の平滑筋細胞の減少または消失が認められた (Fig. 4)。同群間の治療14日後においても3日後と同様にPDT部位において内膜形成の抑制、中膜のacellular、またはhypocellular layerな部位が認められ、免疫染色組織所見では、PDT部位で中膜平滑筋細胞の著明な減少とマクロファージの肥厚内膜での減少が認められた (Fig. 5)。

(3) 形態学的検討

PDT治療をしてから3日後の内膜面積は、NT群、AP群、PDT群でおおの3.27 \pm 1.21, 3.35 \pm 1.14,

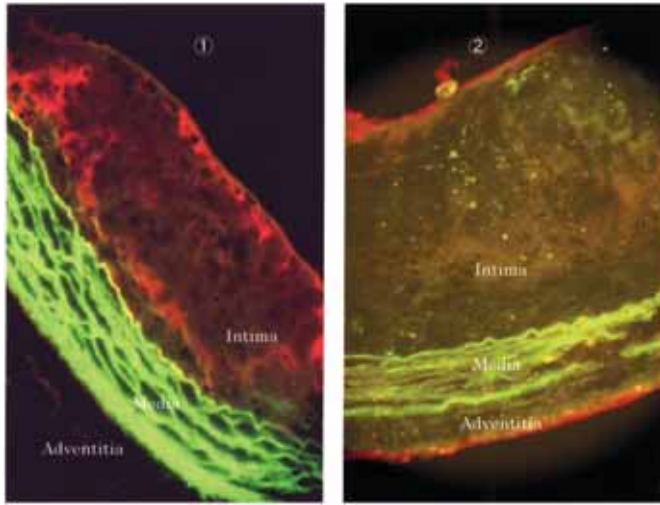


Figure 3 Fluorescence micrograph images of the rabbit's abdominal aorta at 3 hours after talaporfin sodium injection and the balloon injury in the hyper-cholesterolemic rabbit model.

No angioplasty performed: The red fluorescence is evident in the atherosclerotic plaque while the talaporfin sodium accumulation is not in the media.

Angioplasty performed: The red fluorescence from talaporfin sodium was observed selectively in both the dilated media and the atherosclerotic plaque.

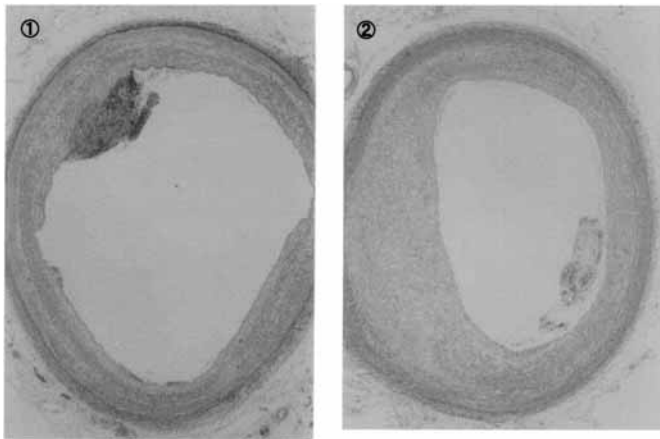


Figure 4 Pathological findings at 3 days after PDT (HEMATOXYLIN-EOSIN STAIN).

PDT
AP
The development of intimal hyperplasia was inhibited remarkably in the PDT area.

1.38±0.27mm²(NT vs PDT; p<0.01, AP vs PDT; p<0.01)であった。治療14日後では、おのおの3.16±0.42, 4.57±0.51, 2.04±0.34mm²(NT vs PDT; p<0.01, AP vs PDT; p<0.01)となりPDT後の内膜面積はNTおよびAPより有意に小さい傾向がみられた。中膜面積では3日後でNT群, AP群, PDT群でおのおの1.11±0.13, 1.07±0.31, 1.15±0.48mm², 14日後では, 0.93±0.13, 1.03±0.23, 0.90±0.23mm²となり各部位間での有意差は認められなかった。I/M比では3日後でNT群, AP群, PDT群でおのおの2.49±0.43, 3.65±2.23, 1.41±0.65(NT vs PDT; p<0.05, AP vs PDT; p<0.01)となり, 14日後では, おのおの3.45±0.64, 4.70±1.45, 2.38±0.57(NT vs PDT; p<0.05, AP vs PDT; p<0.001)と

なりPDT群で有意に減少していた。中膜細胞数密度は3日後でおのおの4,865±2,586, 3,175±1,279, 304±161/mm²(NT vs PDT; p<0.001, AP vs PDT; p<0.01), 14日後では, 4,408±1,449, 4,591±1,823, 976±323/mm²(NT vs PDT; p<0.01, AP vs PDT; p<0.001)となりPDT群で他に比べて有意に減少していた(Fig. 6)。

考 察

今回使用したtalaporfin sodiumはクロリン環の側鎖にアスパラギン酸を結合した第2世代光感受性物質で水溶性であり, 従来の光感受性物質であるHpDと異なり, ヘモグロビンや生体組織などの光吸収帯域による影響が少ない1650nmよりも長波長側の664nmに吸収帯

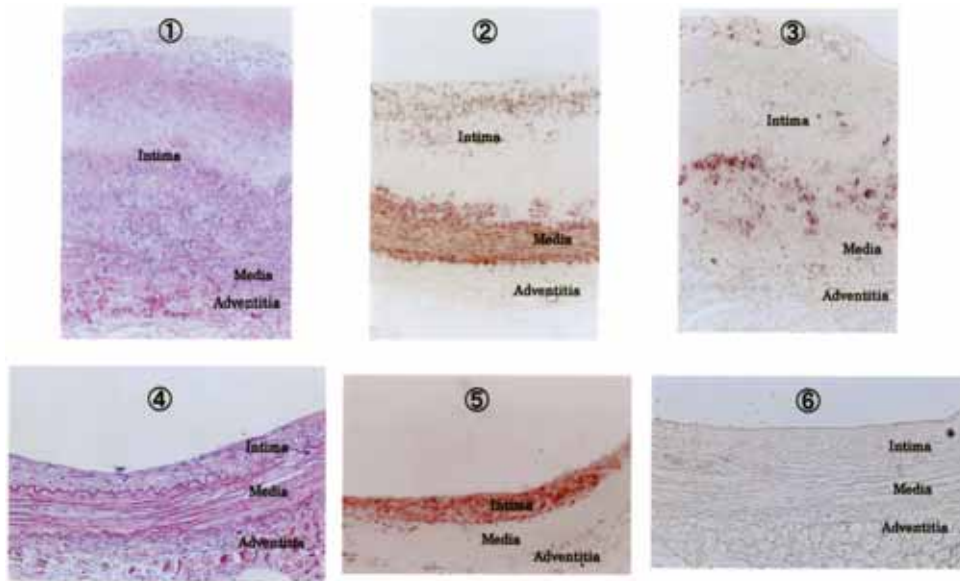


Figure 5 Pathological findings at 14 days after PDT (AP group: ~, PDT group: ~).
 < HEMATOXYLIN-EOSIN STAIN >
 The development of intimal hyperplasia was observed in the AP group (). The number of SMCs in the media was decreased in the PDT group ().
 < α -ACTIN IMMUNOSTAINING >
 In the intima and the media of the AP group, SMCs accumulation was observed (). In the PDT group, SMCs accumulation was significantly limited in the media ().
 < RAM 11 IMMUNOSTAINING >
 Although RAM 11 positive macrophages were observed in the intima in the AP group (), they were significantly suppressed in the intima of the PDT group ().

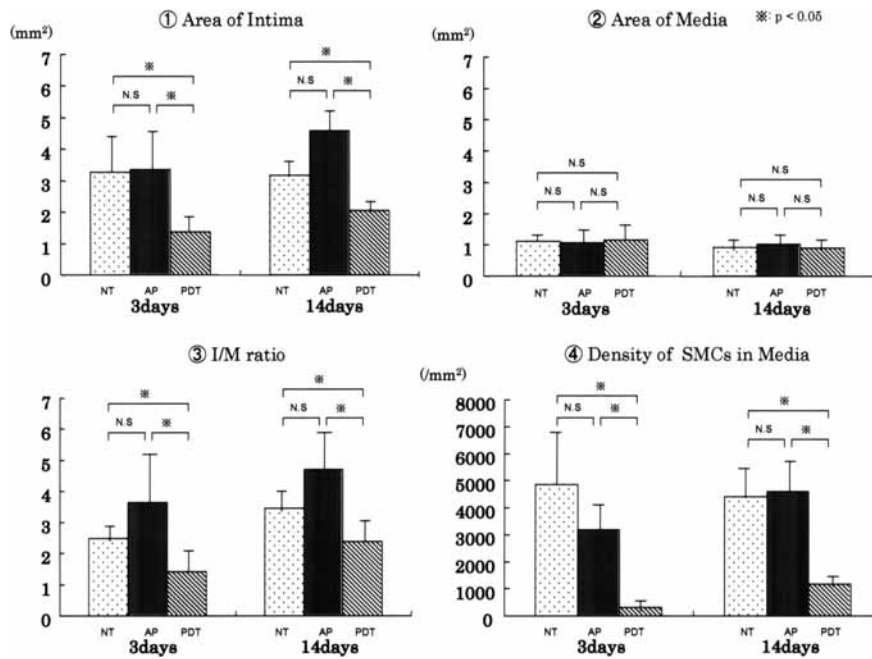


Figure 6
 The area of intima was limited in the PDT group.
 The area of media created no difference among 3 groups.
 I/M ratio on the PDT group was significantly decreased compared to the NT and the AP groups.
 The number of SMCs on the PDT group was decreased compared to the NT and the AP groups.

を有しており励起効率が高い。また、HpDは組織からのクリアランス速度が遅いため副作用として光線過敏症が問題となるが、talaporfin sodiumは正常組織からの排泄がHpDと比べて速いため光線過敏症が発現しにくい利点を有する。これらの特性から血管系へのPDTの応用において有用な光感受性物質と考えられる¹²⁾。

血管形成術によるバルーン拡張は、加圧操作に伴い手技上避けられない血管壁への傷害を生じさせる。そのため形成術後の組織修復反応の結果起こるリコイル、新生内膜肥厚や収縮性リモデリングにより引き起こされる再狭窄はいまだ解決されない高率に起こり得る重要な合併症である。中でも中心的役割を担う新生内膜肥厚はおもに平滑筋細胞の内膜への移動と増殖および細胞外マトリックスの過剰合成沈着により起こる。この過程は血小板付着、単球やマクロファージなど炎症性細胞の浸潤に始まり、これらより分泌されるPDGF(platelet derived growth factor:血小板由来成長因子)、bFGF(basic fibroblast growth factor:塩基性線維芽細胞成長因子)などの成長因子やIL-1(interleukin-1)やIL- α (interleukin-6)などのサイトカインほか多くの因子が関わり、静止状態の収縮型平滑筋細胞が活性化され増殖能を有する合成型にフェノタイプ変換を起こすことによる¹³⁻¹⁶⁾。また、細胞外マトリックスの収縮性リモデリングも再狭窄の重要な因子で、これに関連してTGF- β (transforming growth factor- β)の重要性などが報告されている¹⁷⁾。

Ortuら⁷⁾は、HpDを用いたPDTによる中膜平滑筋細胞消失が動脈傷害後の内膜肥厚抑制に有用であることを実験的に報告した。Nagaeら¹⁸⁾は実験的に血管外からのtalaporfin sodium-PDTにより照射側の血管中膜平滑筋細胞の消失と内膜肥厚の抑制を認め、一方照射反対側では効果が減弱していることを示した。また、ラットを使用した治療後6カ月の検討でPDT後の血管壁への炎症細胞の浸潤が抑制されることが報告されている。

本研究で、talaporfin sodiumは動脈硬化プラークに選択的に集積しPTAバルーンによる血管拡張を行った部位では内膜プラークに加えて中膜にもtalaporfin sodiumが集積することを示した。これは、血管拡張という動脈傷害が加わることにより、内膜の剥離、動脈硬化層の破壊、中膜の過伸展による弾性線維の傷害が生じ、talaporfin sodiumは中膜まで分布されると考えられる。また、プラークに対するtalaporfin sodium-PDTとバル-

ーン拡張による血管形成術の併用治療により治療14日後でのプラーク面積と中膜細胞数密度の減少を認めた。

動脈硬化プラークに対するPDTに関しては、Tangら¹⁹⁾は、ウサギの腹部大動脈に誘発させた粥状硬化巣に第1世代光感受性物質であるphotofrin IIを用いたPDTを行い、プラークの厚さが0.74mmから0.51mmに減少したことを報告し、Hayaseら²⁰⁾は第2世代光感受性物質Antrinを使用しPDT後2週間での内膜肥厚部位のマクロファージの著明な減少消失を報告している。今回のわれわれの検討ではバルーン血管拡張単独と比較してPDT治療部位での中膜平滑筋細胞とマクロファージの著明な減少とプラーク面積の減少、I/M比の減少が認められPDTによるプラーク治療および再狭窄抑制の有用性が示された。しかし、治療14日後までの検討であるため、今後、長期モデルでの検討が必要と思われる。

結 論

高コレステロールウサギを使用した血管内PDT併用血管形成術の有効性について検討した。PDT併用による新生内膜形成の抑制、内膜プラークでのマクロファージの消失およびプラークの縮小効果、中膜平滑筋細胞の消失が認められ、動脈硬化に対する血管内PDTの臨床応用の有用性が示唆された。

文 献

- 1) Grüntzig A: Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. (letter) *Lancet*, 1978, **311**: 263.
- 2) Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F et al: A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*, 1994, **331**: 489-495.
- 3) Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC et al: *Ex-vivo* gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomized, controlled trial. *Lancet*, 1999, **354**: 1493-1498.
- 4) Lemos PA, Saia F, Ligthart JM et al: Coronary restenosis after sirolimus-eluting stent implantation: morphological description and mechanistic analysis from a consecutive series of cases. *Circulation*, 2003, **108**: 257-260.
- 5) Teirstein PS, Massullo V, Jani S et al: Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med*, 1997, **336**: 1697-1703.
- 6) Spears JR, Serur J, Shropshire D et al: Fluorescence of experimental atheromatous plaques with hematoporphyrin

- derivative. *J Clin Invest*, 1983, **71**: 395–399.
- 7)Ortu P, LaMuraglia GM, Roberts WG et al: Photodynamic therapy of arteries. A novel approach for treatment of experimental intimal hyperplasia. *Circulation*, 1992, **85**: 1189–1196.
- 8)LaMuraglia GM, ChandraSekar NR, Flotte TJ et al: Photodynamic therapy inhibition of experimental intimal hyperplasia: acute and chronic effects. *J Vasc Surg*, 1994, **19**: 321–329; discussion 329–331.
- 9)Eton D, Colburn MD, Shim V et al: Inhibition of intimal hyperplasia by photodynamic therapy using photofrin. *J Surg Res*, 1992, **53**: 558–562.
- 10)Nyamekye I, Anglin S, McEwan J et al: Photodynamic therapy of normal and balloon-injured rat carotid arteries using 5-amino-levulinic acid. *Circulation*, 1995, **91**: 417–425.
- 11)Aizawa K, Okunaka T, Ohtani T et al: Localization of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in mouse tissues. *Photochem Photobiol*, 1987, **46**: 789–793.
- 12)内村智生, 會沢勝夫, 長江恒幸 他: 血管形成術後にみられる血管組織内への光感受性物質 Mono-L-aspartyl chlorine 6 集積の検討. *日本レーザー医学会誌*, 2000, **21**: 1–8.
- 13)Ross R: Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340**: 115–126.
- 14)Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801–809.
- 15)Takagi M, Ueda M, Becker AE et al: The Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit is a suitable experimental model to study differences in tissue response between intimal and medical injury after balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 3611–3619.
- 16)LaMuraglia GM, Adili F, Karp SJ et al: Photodynamic therapy inactivates extracellular matrix-basic fibroblast growth factor: insights to its effect on the vascular wall. *J Vasc Surg*, 1997, **26**: 294–301.
- 17)Status van Eps RG, Adili F, Watkins MT et al: Photodynamic therapy of extracellular matrix stimulates endothelial cell growth by inactivation of matrix-associated transforming growth factor- β . *Lab Invest*, 1997, **76**: 257–266.
- 18)Nagae T, Aizawa K, Uchimura N et al: Endovascular photodynamic therapy using mono-L-aspartyl-chlorin e6 to inhibit intimal hyperplasia in balloon-injured rabbit arteries. *Lasers Surg Med*, 2001, **28**: 381–388.
- 19)Tang G, Hyman S, Schneider JH Jr. et al: Application of photodynamic therapy to the treatment of atherosclerotic plaques. *Neurosurgery*, 1993, **32**: 438–443.
- 20)Hayase M, Woodbum KW, Perlroth J et al: Photoangioplasty with local motexafin lutetium delivery reduces macrophages in a rabbit post-balloon injury model. *Cardiovasc Res*, 2001, **49**: 449–455.

Inhibition of Intimal Hyperplasia by Photodynamic Therapy Using Talaporfin Sodium in the Hypercholesterolemic Rabbit Model

Hiromasa Nakai,¹ Tsuneyuki Nagae,¹ Norio Uchimura,¹
Shin Ishimaru,¹ Takashi Saito,² and Katsuo Aizawa³

¹Department of Surgery, Tokyo Medical University, Tokyo, Japan

²Department of Medicine and Gerontology, Kyorin University, Tokyo, Japan

³Department of Physiology, Tokyo Medical University, Tokyo, Japan

Key words: photodynamic therapy, atherosclerosis, restenosis, intimal hyperplasia, talaporfin sodium (LS11/NPe6)

Intimal hyperplasia leading to restenosis is a major complication of arterial revascularization. Photodynamic therapy reportedly inhibits the development of intimal hyperplasia. In this study, we examined the arterial accumulation and the effect of a possible second generation photosensitizer, talaporfin sodium (LS11/NPe6) in the rabbit atherosclerotic model. LS11 was administered selectively to the atherosclerotic plaque and dilated media. A substantial depletion in smooth muscle cells and macrophages, a reduction in plaque, and inhibition of intimal hyperplasia were observed at 14 days after endovascular PDT. This combined therapy may offer a new approach to inhibiting intimal hyperplasia, in addition to treating atherosclerotic plaque. (J Jpn Coll Angiol, 2005, **45**: 255–261)