

光増感反応の経カテーテル的心房性不整脈治療  
への応用に関する研究

2011 年度

伊藤 亜莉沙

# 主論文要旨

主論文題目：

光増感反応の経カテーテル的心房性不整脈治療への応用に関する研究

(内容の要旨)

本研究の目的は、心房性不整脈に対する新しい非薬物療法として光増感反応を利用した経カテーテル的治療を提案し、治療機構を明らかにする基礎的実験をもとに、本手法に適した光増感反応条件を探索し、大型動物を用いた実験実証を通して理工学的観点からその実現可能性を検討することである。

現行の非薬物療法である高周波カテーテルアブレーションでは、熱的な副作用が問題である。そこで本研究では、光線力学的治療 (Photodynamic therapy; PDT) として現在癌治療に臨床応用されている光化学反応における活性酸素の生成反応 (光増感反応) に注目し、その活性酸素による殺細胞機構を心筋組織の電気伝導ブロックの達成に応用することを提案した。本研究では、励起光に対する吸収係数が高く水溶性の光感受性物質であるタラポルフィンナトリウム (Talaporfin sodium) を採用し、その Q 帯励起光源として発振中心波長 663 ~ 670 nm の半導体レーザー光を用いた。in vitro 細胞実験で、タラポルフィンナトリウムの接触時間を 15 min とし、光感受性物質が細胞外に分布している状態で光増感反応を行うと、イオンチャネルおよび細胞膜の酸化障害による即時的な心筋細胞の電気伝導性消失および細胞壊死が得られることがわかった。この細胞外に光感受性物質が分布する状態を心筋組織内で得るため、in vivo 実験では投薬後から照射までのインターバル時間を数十 min 程度とした。豚心壁を対象に in vivo で心外膜側からレーザー光を照射し、短時間インターバルの光増感反応を行ったところ、厚さ 1 ~ 5 mm の心筋組織に対して即時的な電気伝導性消失および慢性組の貫壁性な組織癒痕化が得られた。この実験結果から吸収された光子数に対する光増感反応の心筋組織障害閾値を推定すると  $7.0 \times 10^{17} \sim 1.5 \times 10^{19}$  photons/cm<sup>3</sup> であり、細胞実験結果から推定した光増感反応の障害閾値 ( $6.2 \times 10^{19}$  photons/cm<sup>3</sup>) よりも低かった。光増感反応中の心筋組織表面温度は 48°C 以下、持続時間は 1 min 以内で熱作用による組織障害閾値以下であることから、得られた電気伝導性消失および組織変性は光増感反応で発生した活性酸素の酸化障害によるものと考えられる。試作したレーザーカテーテルを用いて臨床と同様な運用環境にて in vivo で経カテーテル的に短時間インターバルの光増感反応を行い、総合的な運用評価を行った。タラポルフィンナトリウム 2.5 ~ 7.5 mg/kg を豚に静脈内投与 15 min 後にカテーテル先端から心筋組織に対してレーザー光を接触照射し、一点あたり放射照射量 1 kJ/cm<sup>2</sup> にて光増感反応を行い、電気生理学的検査により電気伝導ブロックを実証した。このように経カテーテル的な運用下において、短時間インターバルの光増感反

応により厚さ 1 ~ 4 mm の心筋組織に対して即時的な貫壁性の電気伝導ブロックが得られることがわかった。以上本研究では、細胞実験および動物実験を通してタラポルフィンナトリウムを用いた短時間インターバルの光増感反応を本提案手法に適用することを考案し、経カテーテル的な運用下でこの光増感反応による心筋電気伝導ブロックを実証し、心房性不整脈治療への適用可能性を示した。

## SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

### Title

The application of photosensitization reaction to atrial arrhythmia therapy with catheter intervention

### Abstract

The author proposed and designed the application of photosensitization reaction to atrial arrhythmia therapy with catheter intervention, through cell level study and *in vivo* animal study to examine the therapeutic mechanism/condition, and animal study under *in vivo* catheterization to demonstrate the feasibility of the proposed method. To solve the issue of thermal complications in the current radiofrequency catheter ablation, the author proposed the use of a photochemical process mediated cytotoxicity utilized in photosensitization reaction to establish myocardial electrical conduction block. The hydrophilic Talaporfin sodium with high photo-absorption coefficient was employed with a CW diode laser ( $\lambda = 663\text{-}670\text{ nm}$ ) to excite the Q band of the photosensitizer. In the *in vitro* study, the author revealed that the damage of ion channel and cell membrane induced by the photosensitization reaction with extracellularly distributed photosensitizer caused acute electrophysiological cell damage and eventually cell necrosis. The short drug-light interval was adopted for this application to achieve the extracellular photosensitizer distribution *in vivo*. Acute electrical conduction block and chronic tissue scarring, as a result of the short drug-light interval photosensitization reaction, were demonstrated by epicardial laser irradiation to 1-5 mm thick porcine myocardium. The measured tissue temperature during the laser irradiation was up to 48°C within 1 min, which is under the threshold load for thermal injury. To demonstrate the feasibility of this application, the interventional experiments in pigs were conducted using a newly developed laser catheter. About 15 min after the photosensitizer injection of 2.5-7.5 mg/kg, the laser light was irradiated to the myocardium point by point through the laser catheter with the radiant exposure of 1 kJ/cm<sup>2</sup>/point. Acute transmural electrical conduction block in 1-4 mm thick myocardium was determined electrophysiologically. The author concludes that this demonstrated short drug-light interval photosensitization reaction with Talaporfin sodium designed for catheter intervention may be an applicable method for arrhythmia therapy.

## 目次

第1章 序論	1
1.1 緒言	1
1.2 本研究の目的と背景	1
1.3 本論文の構成	3
1.4 結言	4
参考文献	5
図表	9
第2章 心房性不整脈に対するカテーテルアブレーション治療	10
2.1 緒言	10
2.2 心臓の電気的活動	10
2.2.1 心臓の刺激伝導システム	10
2.2.2 活動電位とイオンチャネル	11
2.3 心房性不整脈とその発生機序	12
2.3.1 不整脈の発生機序	12
2.3.2 心房細動	13
2.3.3 心房粗動	14
2.4 心房性不整脈に対する高周波カテーテルアブレーション治療	15
2.4.1 心筋電気伝導ブロックの原理	15
2.4.2 治療時に必要な電気生理学的検査	19
2.4.3 治療の課題：熱的副作用	20
2.4.4 カテーテルアブレーション技術の発展	21
2.5 結言	23
参考文献	25
図表	33
第3章 光増感反応による癌治療 (光線力学的治療)	47
3.1 緒言	47
3.2 光増感反応の基礎	47
3.2.1 光増感反応の原理	47
3.2.2 光線力学的治療の発展の経緯	48
3.2.3 臨床で使用されている光感受性物質	49
3.3 光線力学的治療による悪性腫瘍の選択的治療	50
3.3.1 光線力学的治療の運用	51
3.3.2 光感受性物質の腫瘍組織集積性	51
3.3.3 光線力学的治療の抗腫瘍効果	52
3.3.3.1 直接的な殺細胞作用	52
3.3.3.1.1 光感受性物質の細胞内集積	52
3.3.3.1.2 アポトーシス	53
3.3.3.1.3 ネクローシス	53
3.3.3.2 腫瘍血管障害	53
3.3.4 光線力学的治療の課題	54
3.4 結言	55

参考文献	56
図表	60
<b>第4章 光増感反応による心房性不整脈治療の提案</b>	<b>69</b>
4.1 緒言	69
4.2 効果・運用に求められる性能	69
4.3 心房性不整脈治療の構想	71
4.3.1 光感受性物質の選択	71
4.3.2 運用方法の探索	72
4.4 結言	73
参考文献	74
図表	76
<b>第5章 光増感反応による即時的な心筋電気伝導ブロック (<i>in vitro</i> 細胞実験)</b>	<b>80</b>
5.1 緒言	80
5.2 心筋細胞に対する殺細胞効果の測定	80
5.2.1 実験方法	80
5.2.2 実験結果	81
5.3 光感受性物質の心筋細胞内分布の観察	81
5.3.1 実験方法	82
5.3.2 実験結果	82
5.4 電気生理学的な細胞応答と光感受性物質の細胞内分布の関係調査	83
5.4.1 共焦点顕微システムの構築	83
5.4.2 蛍光 $\text{Ca}^{2+}$ 指示薬の選定	84
5.4.3 実験方法	85
5.4.4 実験結果	85
5.5 考察	86
5.6 結言	91
参考文献	92
図表	96
<b>第6章 大型動物を用いた開胸下における光増感反応による即時的かつ永続的な心筋電気伝導ブロック (<i>in vivo</i> 実験)</b>	<b>115</b>
6.1 緒言	115
6.2 心筋組織の光学定数の測定	115
6.2.1 実験方法	115
6.2.2 実験結果	116
6.3 光感受性物質の薬物動態調査	116
6.3.1 実験方法	116
6.3.2 実験結果	117
6.4 即時的な心筋電気伝導ブロックの作成 (電気生理学的評価)	117
6.4.1 実験方法	117
6.4.2 実験結果	120
6.5 永続的な心筋電気伝導ブロックの作成 (組織病理学的評価)	120
6.5.1 実験方法	120
6.5.2 実験結果	121
6.6 考察	122
6.7 結言	126

参考文献	128
図表	130
<b>第7章 インターベンション下における統合運用評価: レーザカテーテルを用いた光増感反応による心筋電気伝導ブロック (<i>in vivo</i> 実験)</b>	<b>142</b>
7.1 緒言	142
7.2 右房解剖学的峡部を対象とした経カテーテル的光増感反応	142
7.2.1 レーザカテーテルの試作	142
7.2.2 実験動物の準備	143
7.2.3 電気伝導ブロックの電気生理学的検査手法	144
7.2.4 光増感反応の実験手法	145
7.2.5 実験結果	146
7.3 光増感反応の作用深度の推定	148
7.4 考察	150
7.5 結言	154
参考文献	156
図表	158
<b>第8章 結論</b>	<b>177</b>
8.1 各章の総括と章間の関連	177
8.2 本提案手法と現行手法との比較	178
8.3 今後の展望と課題	181
8.4 本論文の総括	186
参考文献	187
図表	191
<b>付録</b>	<b>195</b>
A クベルカムンク法	195
B 用語および略語説明	197
B.1 光照射および光計測に関する用語および記号説明	197
B.1.1 用語説明	197
B.1.2 記号説明	198
B.2 心房性不整脈に関する略語説明	198
参考文献	199
図表	200
<b>著者論文目録</b>	<b>201</b>
謝辞	

## 図表の目次

図 1-1	本論文の構成
図 2-1	心臓の刺激伝導系と各部位における活動電位波形
図 2-2	心筋細胞の活動電位と各イオンの流入
図 2-3	心房細動の発生機序
図 2-4	通常型心房粗動の発生機序
図 2-5	摘出心筋組織に対し高周波通電を行った際の組織断面写真
図 2-6	高周波カテーテルアブレーションによる心房細動治療の手順
表 2-1	健常者の肺静脈および左心房壁の各部位における組織厚み
図 2-7	Carto システムによる 3 次元心内電位マッピング
図 2-8	Ensite システムによる 3 次元心内電位マッピング
表 2-2	高周波カテーテルアブレーションによる主な副作用とその発生率
図 2-9	高周波カテーテルアブレーションによる心房細動治療の課題と、それに対して近年行われている対策
図 2-10	近年開発された多機能アブレーションカテーテル
図 2-11	肺静脈隔離専用開発されたバルーンアブレーションカテーテル
図 2-12	カテーテル操作の自動化を目的に開発されたナビゲーションシステムとロボット制御システム
図 3-1	光感受性物質と酸素の光増感反応におけるエネルギーダイアグラム
表 3-1	臨床で使用されている光線力学的治療薬
表 3-2	光感受性物質の特性
図 3-2	光感受性物質の化学構造
図 3-3	光線力学的治療の手順および作用機序
表 3-3	光線力学的治療の治療条件
表 3-4	光感受性物質の細胞内集積部位
図 3-4	健常組織と腫瘍組織の血管構築の違い
図 3-5	光線力学的治療による腫瘍血管の閉塞
表 4-1	光増感反応を経カテーテル的心房性不整脈治療に応用する際に求められる性能
図 4-1	血漿中タラポルフィンナトリウム濃度の時間変化
図 4-2	タラポルフィンナトリウムの吸収スペクトル
表 4-2	レーザカテーテルに内装した光ファイバーの仕様
図 4-3	光増感反応による経カテーテル的心房性不整脈治療の運用構想
図 5-1	使用したレーザ光の発振スペクトル
図 5-2	タラポルフィンナトリウムを用いた光増感反応による心筋細胞の殺細胞効果
図 5-3	ポルフィマーナトリウムを用いた光増感反応による心筋細胞の殺細胞効果
図 5-4	光感受性物質の吸収スペクトルおよび蛍光指示薬 LysoTracker Green の吸収・蛍光スペクトル
図 5-5	光感受性物質の吸収スペクトルおよび蛍光指示薬 Rhodamine 123 の吸収・蛍光スペクトル



図 5-6	各接触時間におけるタラポルフィンナトリウムの心筋細胞内分布
図 5-7	各接触時間におけるポルフィマーナトリウムの心筋細胞内分布
図 5-8	光増感反応中の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度計測用に構築した共焦点蛍光顕微システム
図 5-9	光感受性物質の吸収スペクトルおよび $\text{Ca}^{2+}$ 蛍光指示薬 Fluo-4 の吸収・蛍光スペクトル
表 5-1	光感受性物質の接触条件と細胞内分布の対応関係
図 5-10	コントロール条件における心筋細胞内 Fluo-4 平均蛍光輝度の経時変化
図 5-11	短時間接触条件の光増感反応を行った際の心筋細胞内 Fluo-4 蛍光輝度の経時変化
図 5-12	短時間接触条件のタラポルフィンナトリウムを用いた光増感反応前後の心筋細胞の明視野顕微画像
図 5-13	長時間接触条件の光増感反応を行った際の心筋細胞内 Fluo-4 蛍光輝度の経時変化
表 5-2	各接触条件においてタラポルフィンナトリウムあるいはポルフィマーナトリウムを用いた光増感反応を行った際の $\text{Ca}^{2+}$ 振動の消失時間と細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の平均変化率
図 5-14	細胞膜近傍における $\text{Ca}^{2+}$ 濃度勾配の説明図
表 5-3	光増感反応により細胞膜に発生した孔生成数の計算で用いたパラメータ値
図 5-15	光増感反応により細胞膜に発生した細孔の見積り数
図 5-16	光感受性物質の接触条件が短時間接触条件あるいは長時間接触条件における光増感反応に対する電気生理学的細胞応答の関係
図 6-1	タラポルフィンナトリウム投与後の豚血漿中濃度の時間変化
図 6-2	左心耳に対して光増感反応を行った際の電気生理学的評価
図 6-3	赤色半導体レーザー光の発振スペクトルとタラポルフィンナトリウムの吸収・蛍光スペクトル
図 6-4	左心耳に対して光増感反応を行った際のレーザー光照射後に双極電極 B で記録した興奮伝播波形
表 6-1	左心耳に対して光増感反応を行った際の各光照射直後の刺激用双極電極 A で発生した電気パルスが測定用双極電極 B に到達するまでの時間 $t_{AB}$
図 6-5	光増感反応後に摘出した左心耳の写真
図 6-6	右心室組織に対して光増感反応を行った際のレーザー光照射後に双極電極 B で記録した興奮伝播波形
表 6-2	右心室組織に対して光増感反応を行った際の各光照射直後の刺激用双極電極 A で発生した電気パルスが測定用双極電極 B に到達するまでの時間 $t_{AB}$
図 6-7	開胸下で右心室に対して高周波カテーテルアブレーションを行った際の通電部位の写真
図 6-8	光増感反応の 2 週間後に摘出し、ホルマリン固定した左心耳の写真
図 6-9	左心耳に対して放射照度 $3.5 \text{ W/cm}^2$ 、放射照射量 $50 \text{ J/cm}^2$ にて光増感反応を行った際の光照射部位の Azan 染色標本および HE 染色標本の顕微画像
図 6-10	左心耳に対して放射照度 $3.5 \text{ W/cm}^2$ 、放射照射量 $100 \text{ J/cm}^2$ にて光増感反応を行った際の光照射部位の Azan 染色標本および HE 染色標本の顕微画像
図 7-1	試作したレーザーカテーテル
図 7-2	試作したレーザーカテーテルの内部構造
表 7-1	レーザーカテーテルに内装した光ファイバーの仕様
図 7-3	右房内腔における多電極カテーテルおよびレーザーカテーテルの配置
図 7-4	解剖学的峽部に対する心筋電気伝導ブロックの電気生理学的検査方法 (デ

	イファレンシャルペーシング法)
図 7-5	使用した試作レーザカテーテル
表 7-2	カテーテルアブレーション施行条件のまとめ
図 7-6	1 例目の光増感反応前における三尖弁輪周囲の興奮伝播波形
図 7-7	1 例目の光増感反応後における三尖弁輪周囲の興奮伝播波形
図 7-8	2 例目の光増感反応前後における三尖弁輪周囲の興奮伝播波形
図 7-9	経カテーテル的増感反応後の光照射部位の写真
図 7-10	3 例目の光増感反応前後における三尖弁輪周囲の興奮伝播波形
図 7-11	経カテーテル的に心内腔側から心筋組織に対して赤色レーザ光を照射して増感反応を行った際の作用深度を計算するためのモデル
表 7-3	増感反応による作用深度を計算する際に使用したパラメータ値
図 7-12	推定した増感反応による作用深度と血液層の厚み $\Delta$ の関係
図 7-13	推定した増感反応による作用深度と血漿中の光感受性物質濃度との関係
図 7-14	推定した増感反応による作用深度と光照射時間の関係
図 7-15	解剖学的狭窄部を対象とした場合の経カテーテル的増感反応と高周波カテーテルアブレーションのカテーテル操作の違い
図 7-16	右房後壁に対する線状ブロックラインの追加
表 8-1	本提案手法である経カテーテル的増感反応と各種カテーテルアブレーション治療の特徴比較
表 8-2	増感反応を利用した経カテーテル的治療の特徴と予想される利点
図 8-1	心内組織表面が平滑でなく 1 mm 程度の凸凹が存在する部位に対するカテーテルアブレーション
図 8-2	高周波カテーテルアブレーションと経カテーテル的増感反応による心筋電気伝導ブロックラインの作成方法の違い
図 A-1	クベルカムンク法

## 第 1 章 序論

### 1.1 緒言

本研究の目的は、心房性不整脈に対する新しい非薬物療法として光増感反応を利用した経カテーテル的治療を提案し、治療機構および治療条件を明らかにする基礎的実験から臨床を見据えた大型動物実験までを行い、これらを通して理工学的観点からその実現可能性を検討することにある。

現行の心房性不整脈に対する非薬物療法である高周波カテーテルアブレーション\*では、熱的作用による組織壊死を利用していることから熱的な副作用が問題になっている。本研究では、光線力学的治療 (Photodynamic therapy; PDT) として癌治療に臨床応用されている光化学反応による活性酸素の生成過程 (以下、光増感反応) に注目し、その活性酸素による殺細胞機構を心筋組織の電気伝導ブロックに応用することを提案した。健全な組織に対して光増感反応を適用した例は著者が知る限り報告されておらず、経カテーテル的治療に適した光増感反応条件を決定する必要がある。また、それに応じて治療機構を解明する基礎的な研究を行い、臨床応用を見据えた治療条件の決定を行う必要がある。

本研究では、心筋組織に対する光増感反応を行うため、排泄性の高い水溶性薬剤であり、活性酸素産生効率が高いタラポルフィンナトリウム (Talaporfin sodium、Laserphyrin®、NPe6) を採用した。細胞実験において光増感反応による即時的な心筋電気伝導性消失の原理を明らかにし、光増感反応条件の検討を行った。大型動物実験において光増感反応による心筋組織の電気伝導ブロックを確認し、さらに臨床と同様な運用環境にて経カテーテル的に光増感反応を行い、総合的な運用評価を行った。この結果、光増感反応を利用した経カテーテル的心房性不整脈治療を提案するに至った。

### 1.2 本研究の目的と背景

本研究では心房性不整脈の中で最も患者数の多い心房細動を主な対象としている。心房細動は不整脈全体の約 1/3 を占める疾患であり [1]、人口の高年齢化に伴い有病者数は年々増加傾向にある [2,3]。患者数は日本では約 72 万人 [4,5]、米国では約 230 万人と報告されており [2,6]、2050 年には 2 倍以上に増加すると予想されている [2]。心房細動の患者は脳梗塞発症の危険性が健常者の 3 ~ 5 倍高く [7]、脳梗塞の予防のために早期の根治が望まれている。心房性不整脈に対する第一選択治療は抗不整脈剤を用いた保存的な薬物療法であ

---

\* 不整脈分野では、カテーテルアブレーション (経皮的カテーテル心筋焼灼術) は熱凝固作用による心筋組織壊死という意味で使用されている用語である。工学では、アブレーションは凝縮、蒸発、および気化などの相変化を伴う過程を記述する用語であるが、本文内で使用しているカテーテルアブレーションは上記の熱凝固壊死を示す。

るが [6]、根治が望める高周波カテーテルアブレーションによる非薬物療法が近年急速に普及している。1998 年に Haissaguerre らにより、心房細動の発生機序として肺静脈の左心房への接合部近傍で発生した異常興奮が心房細動の発生および維持に関与していることが明らかになった [9]。また、高周波カテーテルアブレーションによって肺静脈と左心房を電氣的に隔離する (肺静脈隔離術) ことで心房細動の根治ができることがわかった [10]。高周波カテーテルアブレーションでは経カテーテル的に異常興奮の伝播経路あるいはその発生部位に対して高周波通電を行い、ジュール熱によって心筋組織の凝固壊死を起こして異常興奮の電氣的隔離を行う。この高周波カテーテルアブレーション治療は、発作性心房細動において有効性が示されており、第一選択治療である薬物療法と比較して良好な成績が得られている [11]。一方、重篤な熱的副作用が 4~6%発生するため [12-14]、より安全な治療法の開発が待望されている。心房細動はそれ自体が致死性の疾患ではなく薬物療法による保存的な治療が可能のため、高周波カテーテルアブレーション治療の副作用発生率は比較的低いにも関わらず、より安全性の高い手法が求められる。近年、過度な温度上昇を防ぎ、熱的な副作用を抑制するため、カテーテル先端に冷却機能を備えた高周波アブレーションカテーテル (Irrigation catheter) [15,16]、レーザ光の吸収による熱発生を利用したレーザアブレーション<sup>†</sup> (Laser ablation) [17,18]、凍結融解壊死を利用したクライオアブレーション<sup>‡</sup> (Cryo ablation) [19,20] などが開発されている。しかし、いずれも組織温度の制御が困難であり、確立した治療法となっていない。

著者は、光線力学的治療として従来癌治療に臨床応用されている光増感反応で発生した活性酸素による殺細胞機構を心筋電気伝導ブロックに応用し、新しい心房性不整脈治療法を提案している。光線力学的治療は光感受性物質 (Photosensitizer) の腫瘍組織集積性を利用し、悪性腫瘍の選択的治療として臨床応用されているが [21-23]、その殺細胞機構はその他の用途に応用することもできる。光増感反応は、光、光感受性物質、および酸素の 3 要素の光化学反応によって活性酸素を発生する一連の反応過程であり、発生した活性酸素はその酸化作用により生体分子を障害して細胞死を起こす [24,25]。一般に光増感反応では比較的低い投入エネルギーで殺細胞効果を得るのに必要な活性酸素を産生することができるため、熱発生が小さい [26-28]。光増感反応の殺細胞機構を利用した心筋電気伝導ブロックによって、現行の高周波カテーテルアブレーション治療で問題となっている重篤な熱的副作用を大幅に抑制できると考えられる。健常な心筋組織を対象に電気伝導ブロックが得られる光増感反応条件を検討する必要がある。著者は、後述する 2 つの理由から光感受性物質の投与後早期に光照射を開始する短時間インターバルの光増感反応を提案している。従来の悪性腫瘍に対する光線力学的治療では、健常組織と腫瘍組織における光感受性物質の排

<sup>†</sup> 不整脈分野では、アブレーションという用語を心筋組織壊死という意味で使用する。ここでは熱凝固壊死を指す。

<sup>‡</sup> 同上。ここでは凍結融解壊死を指す。

排泄速度の違いから生じる光感受性物質の相対的な腫瘍組織集積性を利用している。そのため、光感受性物質の投与後から数時間経過し、健常組織から光感受性物質が排出された状態において腫瘍組織に対して光照射を行う [21,22]。一方、著者の対象としている健常な心筋組織は周囲臓器との排泄速度の差はないので光感受性物質の集積性はない。そこで、投与後早期に光照射を行う短時間インターバルの光増感反応を採用した。短時間インターバルの場合、対象組織における光感受性物質濃度が高い状態で光照射を行えるため、光感受性物質投与量の抑制、それに伴う遮光入院期間の短縮が期待できる。短時間インターバルを提案するもう一つの理由として即時的効果の必要性が挙げられる。心房性不整脈治療では電気伝導ブロックを確認しながら施術するため、即時的な治療効果が必要である。光線力学的治療では、一般に細胞内小器官の障害によってアポトーシスを誘導し緩やかな細胞死を起こす。光増感反応により即時的な治療効果を得るためには、細胞膜障害により積極的に細胞破壊を起こすような反応条件を探索する必要がある。投薬後数十 min という短時間インターバルの場合には光感受性物質は細胞内に取り込まれず、主に組織間質液中に分布すると考えられる。このような状態において光増感反応を行うと、細胞破壊によって即時的に電気伝導ブロックが得られると予想した。

本研究では光増感反応による心房性不整脈治療に用いる光感受性物質として光線力学的治療薬であるタラポルフィンナトリウムを採用した。タラポルフィンナトリウムは水溶性であり、生体内においてその Q 帯は 664 nm に吸収ピークをもち [29]、励起光に対する吸収係数が高い光感受性物質である。標準的な光線力学的治療薬であるポルフィマーナトリウム (Porfimer sodium、Photofrin®) と比較して、タラポルフィンナトリウムは体内からの排泄が速い。現行の早期肺癌治療に対する投与条件において皮膚の光過敏性は 1 週間程度で消失し、光線力学的治療の課題の一つである遮光入院期間が短い。経カテーテル的に心内腔において心筋組織内に分布するタラポルフィンナトリウムによる光増感反応を行うため、著者は発振中心波長 663 nm の赤色レーザー光を伝送するカテーテル (以下、レーザーカテーテル) を試作した。

### 1.3 本論文の構成

本論文は 8 章から構成される。図 1-1 に本論文の構成を示す。

本章では光増感反応による心房性不整脈の非薬物療法を提案するに至った背景を記述した。

第 2 章では、心房性不整脈 (主に心房細動) の病態およびその治療法を述べ、現行の高周波カテーテルアブレーション治療の課題を述べた。

第 3 章では、光増感反応を利用した癌治療 (光線力学的治療) において、内部エネルギー機構および抗腫瘍効果に関して述べた。

第 4 章では、光増感反応の経カテーテル的心房性不整脈治療への応用を提案した。心房

性不整脈治療に光増感反応を応用する上で必要となる性能に関して述べ、適切な光増感反応条件を考案した。

第 5 章では、光増感反応により即時的な心筋電気伝導性消失が得られる条件を決定するため、*in vitro* 細胞実験において光増感反応に対する電気生理学的な細胞応答を調査した。

第 6 章では、第 5 章を参考に光増感反応条件を設定し、大型動物において光増感反応による即時のおよび永続的な心筋電気伝導ブロックを実証するため、開胸下の豚心筋組織に対して光増感反応を行い、*in vivo* 実験にて急性期の電気生理学的評価および慢性期の組織病理学的な評価を行った。

第 7 章では、試作したレーザカテーテルを用いて臨床と同様な運用環境にて統合評価を行った。具体的には、豚心筋組織に対してインターベンション下で経カテーテル的に光増感反応を起こし、電気生理学的検査を行った。また、光増感反応の作用深度を計算し、実験結果と比較した。

第 8 章では、第 5 章から第 7 章で得られた知見について総括し、今後の開発展開と課題に関して述べた。

## 1.4 結言

本章では、光増感反応を利用した経カテーテル的心房性不整脈治療を提案するに至った背景を述べ、本論文全体の構成をまとめた。

## 参考文献

- [1] D. Bialy, M. H. Lehmann, D. N. Schumacher, R. T. Steinman, and M. D. Meissner, “Hospitalization for arrhythmias in the United States: Importance of atrial fibrillation,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 19, pp. 41A (Abstract), 1992.
- [2] A. S. Go, E. M. Hylek, K. A. Phillips, Y. Chang, L. E. Henault, J. V. Selby, and D. E. Singer, “Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: National implications for rhythm management and stroke prevention: The anticoagulation and risk factors in atrial fibrillation (ATRIA) study,” *JAMA*, vol. 285, pp. 2370–2375, 2001.
- [3] Y. Miyasaka, M. E. Barnes, B. J. Gersh, S. S. Cha, K. R. Bailey, W. P. Abhayaratna, J. B. Seward, and T. S. M. Tsang, “Secular trends in incidence of atrial fibrillation in olmsted county, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence,” *Circulation*, vol. 114, pp. 119–125, 2006.
- [4] 小川聡, 相澤義房, 新博次, 井上博, 奥村謙, 鎌倉史郎, 熊谷浩一郎, 是恒之宏, 杉薫, 三田村秀雄, 矢坂正弘, 山下武志, 大江透, 児玉逸雄, 比江嶋一昌, 矢野捷介, “心房細動治療 (薬物) ガイドライン (2008年改訂版),” *Jpn Circ J*, vol. 72 (Suppl. IV), pp. 1581–1638, 2008.
- [5] H. Inoue, A. Fujiki, H. Origasa, S. Ogawa, K. Okumura, I. Kubota, Y. Aizawa, T. Yamashita, H. Atarashi, M. Horie, T. Ohe, Y. Doi, A. Shimizu, A. Chishaki, T. Saikawa, K. Yano, A. Kitabatake, H. Mitamura, I. Kodama, and S. Kamakura, “Prevalence of atrial fibrillation in the general population of Japan: An analysis based on periodic health examination,” *Int J Cardiol*, vol. 137, pp. 102–107, 2009.
- [6] V. Fuster, L. E. Ryden, D. S. Cannom, H. J. Crijns, A. B. Curtis, K. A. Ellenbogen, J. L. Halperin, J. Y. Le Heuzey, G. N. Kay, J. E. Lowe, S. B. Olsson, E. N. Prystowsky, J. L. Tamargo, S. Wann, S. C. Jr. Smith, A. K. Jacobs, C. D. Adams, J. L. Anderson, E. M. Antman, S. A. Hunt, R. Nishimura, J. P. Ornato, R. L. Page, B. Riegel, S. G. Priori, J. J. Blanc, A. Budaj, A. J. Camm, V. Dean, J. W. Deckers, C. Despres, K. Dickstein, J. Lekakis, K. McGregor, M. Metra, J. Morais, A. Osterspey, and J. L. Zamorano, “ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines and the European Society of Cardiology Committee for practice guidelines,” *Circulation*, vol. 114, pp. e257–e354, 2006.
- [7] V. L. Roger, A. S. Go, D. M. Lloyd-Jones, R. J. Adams, J. D. Berry, T. M. Brown, M. R. Carnethon, S. Dai, G. de Simone, E. S. Ford, C. S. Fox, H. J. Fullerton, C. Gillespie, K. J. Greenlund, S. M. Hailpern, J. A. Heit, P. M. Ho, V. J. Howard, B. M. Kissela, S. J. Kittner, D.

- T. Lackland, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, D. M. Makuc, G. M. Marcus, A. Marelli, D. B. Matchar, M. M. McDermott, J. B. Meigs, C. S. Moy, D. Mozaffarian, M. E. Mussolino, G. Nichol, N. P. Paynter, W. D. Rosamond, P. D. Sorlie, R. S. Stafford, T. N. Turan, M. B. Turner, N. D. Wong, and J. Wylie-Rosett, “Heart disease and stroke statistics: 2011 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee,” *Circulation*, vol. 123, pp. e18–e209, 2011.
- [8] 笠貫宏, 相澤義房, 大江透, 大西哲, 奥村謙, 加藤貴雄, 新田隆, 松本万夫, 三崎拓郎, 山口巖, 石川利之, 岩亨, 梅村純, 栗田隆志, 庄田守男, 住友直方, 中里祐二, 中村好秀, 庭野慎一, 平尾見三, 松田直樹, 児玉逸雄, 田中茂夫, 早川弘一, 平岡昌和, 三井利夫, “不整脈の非薬物治療ガイドライン (2006年改訂版),” *Jpn Circ J*, vol. 65 (Supp. IV), pp. 1127–1160, 2001.
- [9] M. Haïssaguerre, P. Jaïs, D. C. Shah, A. Takahashi, M. Hocini, G. Quiniou, S. Garrigue, A. LeMouroux, P. LeMetayer, and J. Clementy, “Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins,” *N Engl J Med*, vol. 339, pp. 659–666, 1998.
- [10] M. Haïssaguerre, D. C. Shah, P. Jaïs, M. Hocini, T. Yamane, I. Deisenhofer, M. Chauvin, S. Garrigue, and J. Clementy, “Electrophysiological breakthroughs from the left atrium to the pulmonary veins,” *Circulation*, vol. 102, pp. 2463–2465, 2000.
- [11] A. J. Camm, P. Kirchhof, G. Y. H. Lip, U. Schotten, I. Savelieva, S. Ernst, I. C. Van Gelder, N. Al-Attar, G. Hindricks, B. Prendergast, H. Heidbuchel, O. Alfieri, A. Angelini, D. Atar, P. Colonna, R. De Caterina, J. De Sutter, A. Goette, B. Gorenek, M. Heldal, S. H. Hohloser, P. Kolh, J. Y. Le Heuzey, P. Ponikowski, and F. H. Rutten, “Guidelines for the management of atrial fibrillation: The task force for the management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC),” *Eur Heart J*, vol. 31, pp. 2369–2429, 2010.
- [12] R. Cappato, H. Calkins, S. A. Chen, W. Davies, Y. Iesaka, J. Kalman, Y. H. Kim, G. Klein, D. Packer, and A. Skanes, “Worldwide survey on the methods, efficacy, and safety of catheter ablation for human atrial fibrillation,” *Circulation*, vol. 111, pp. 1100–1105, 2005.
- [13] R. Cappato, H. Calkins, S. A. Chen, W. Davies, Y. Iesaka, J. Kalman, Y. H. Kim, G. Klein, A. Natale, D. Packer, A. Skanes, F. Ambrogi, and E. Biganzoli, “Updated worldwide survey on the methods, efficacy, and safety of catheter ablation for human atrial fibrillation.” *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 3, pp. 32–38, 2010.
- [14] N. Dagres, G. Hindricks, H. Kottkamp, P. Sommer, T. Gaspar, K. Bode, A. Arya, D. Husser, L. S. Rallidis, D. T. Kremastinos, and C. Piorkowski, “Complications of atrial fibrillation ablation in a high-volume center in 1,000 procedures: Still cause for concern?” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 20, pp. 1014–1019, 2009.



- [15] K. Yokoyama, H. Nakagawa, F. H. Wittkampf, J. V. Pitha, R. Lazzara, and W. M. Jackman, "Comparison of electrode cooling between internal and open irrigation in radiofrequency ablation lesion depth and incidence of thrombus and steam pop," *Circulation*, vol. 113, pp. 11–19, 2006.
- [16] F. H. M. Wittkampf and H. Nakagawa, "RF Catheter Ablation: Lessons on Lesions," *Pacing Clin Electrophysiol*, vol. 29, pp. 1285–1297, 2006.
- [17] S. Themistoclakis, O. M. Wazni, W. Saliba, R. A. Schweikert, A. Bonso, A. Rossillo, M. Gordon, J. Melsky, A. Raviele, and A. Natale, "Endoscopic fiberoptic assessment of balloon occlusion of the pulmonary vein ostium in humans: Comparison with phased-array intracardiac echocardiography," *Heart Rhythm*, vol. 3, pp. 44–49, 2006.
- [18] V. Y. Reddy, C. Houghtaling, J. Fallon, G. Fischer, N. Farr, J. Clarke, J. McIntyre, E. Sinofsky, J. N. Ruskin, and D. Keane, "Use of a diode laser balloon ablation catheter to generate circumferential pulmonary venous lesions in an open-thoracotomy canine model," *Pacing Clin Electrophysiol*, vol. 27, pp. 52–57, 2004.
- [19] K. R. J. Chun, B. Schmidt, A. Metzner, R. Tilz, T. Zerm, I. Koster, A. Furnkranz, B. Koektuerk, M. Konstantinidou, M. Antz, F. Ouyang, and K. H. Kuck, "The 'single big cryoballoon' technique for acute pulmonary vein isolation in patients with paroxysmal atrial fibrillation: A prospective observational single centre study," *Eur Heart J*, vol. 30, pp. 699–709, 2009.
- [20] P. Khairy, P. Chauvet, J. Lehmann, J. Lambert, L. Macle, J. F. Tanguay, M. G. Sirois, D. Santoianni, and M. Dubuc, "Lower incidence of thrombus formation with cryoenergy versus radiofrequency catheter ablation," *Circulation*, vol. 107, pp. 2045–2050, 2003.
- [21] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, and Q. Peng, "Photodynamic therapy," *J Natl Cancer Inst*, vol. 90, pp. 889–905, 1998.
- [22] T. J. Dougherty, "Photodynamic therapy," *Photochem Photobiol*, vol. 58, pp. 895–900, 1993.
- [23] J. V. Moore, C. M. L. West, and C. Whitehurst, "The biology of photodynamic therapy," *Phys Med Biol*, vol. 42, pp. 913–935, 1997.
- [24] N. L. Oleinick, R. L. Morris, and I. Belichenko, "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why, and how," *Photochem Photobiol Sci*, vol. 1, pp. 1–21, 2002.
- [25] E. Buytaert, M. Dewaele, and P. Agostinis, "Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1776, pp. 86–107, 2007.
- [26] B. C. Wilson and M. S. Patterson, "The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy," *Phys Med Biol*, vol. 53, pp. R61–R109, 2008.

- [27] C. J. Corner and A. Ferrario, "Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model," *Cancer Res*, vol. 50, pp. 3985–3990, 1990.
- [28] A. Johansson, T. Johansson, M. S. Thompson, S. Svanberg, S. Andersson-Engels, N. Bendsoe, and K. Svanberg, "In vivo measurement of parameters of dosimetric importance during interstitial photodynamic therapy of thick skin tumors," *J Biomed Opt*, vol. 11, pp. 034029, 2006.
- [29] 伊藤亮一, 後田修, "注射用レザフィリン®100 mgの物理的・化学的性質および安定性," *化学療法の領域*, vol. 20, pp. 137–140, 2004.

図表

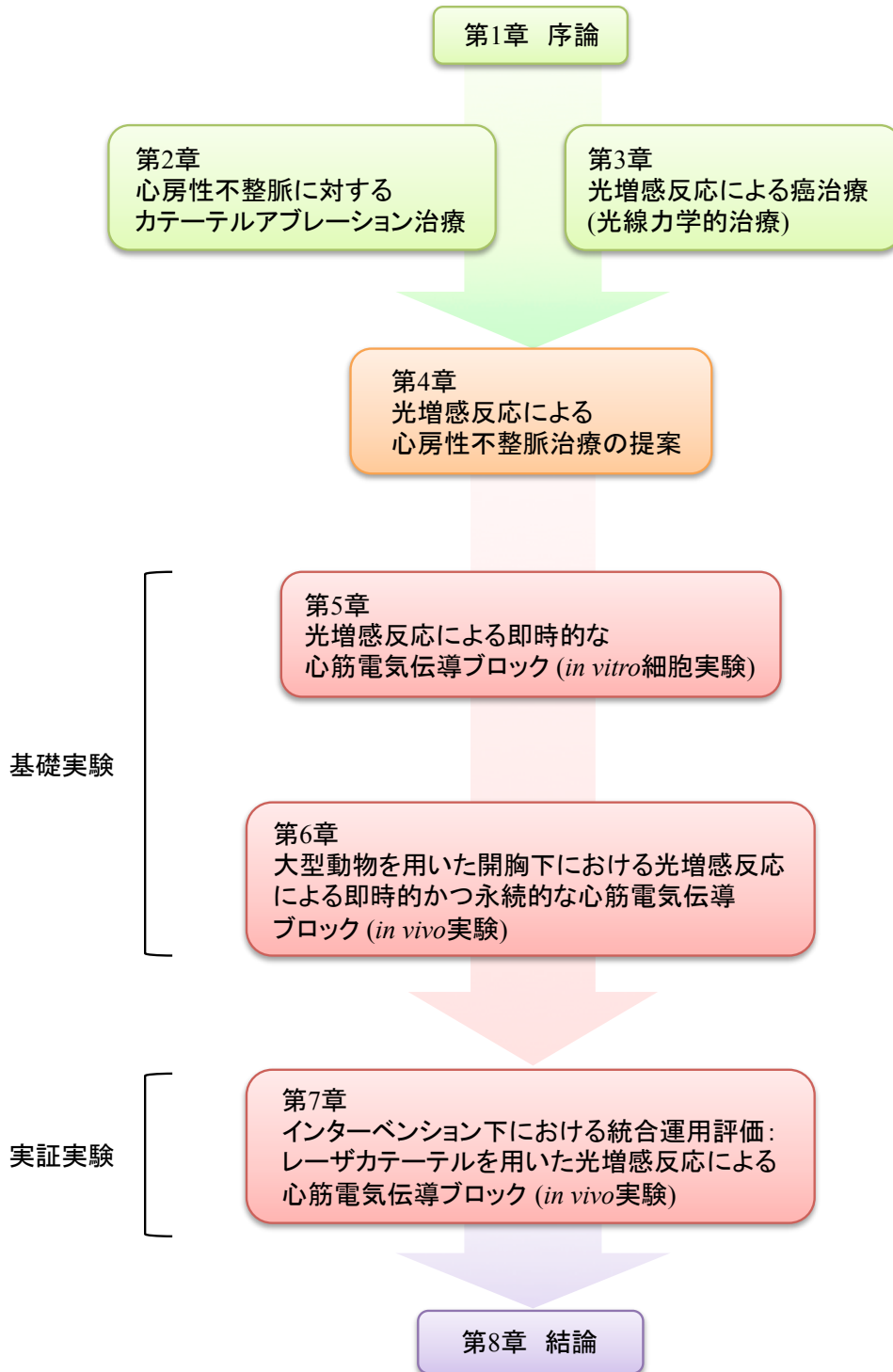


図 1-1 本論文の構成

## 第2章 心房性不整脈に対するカテーテルアブレーション治療

### 2.1 緒言

不整脈は心臓の電氣的活動の異常により生じ、心電図波形やその成因によって分類される。心房で発生する不整脈は心房性不整脈と呼ばれ、異常興奮拍数によって心房期外収縮、心房頻拍、心房粗動、心房細動に分類される。心房性不整脈の発生および維持のメカニズムを理解するためには心筋のイオンチャンネルと活動電位、正常な心臓の機能を把握する必要がある。本章では、正常な心臓の電氣的活動について述べ、さらに心房性不整脈の発生機序および心房細動と心房粗動の疫学や病態について述べる。また、心房性不整脈に対する現行の非薬物療法である高周波カテーテルアブレーション治療に関して述べ、その課題および近年のカテーテルアブレーション関連技術について記述する。

### 2.2 心臓の電氣的活動

心臓は約 100～400 億個の心筋細胞とそれらの細胞をつなぐ間質細胞や細胞外基質で構成される。解剖学的に心臓は隔壁により左右に分けられ、さらに弁膜により心房と心室に分けられる。心房と心室が交互に収縮および弛緩を行うことで血液を全身に送り出すポンプとして機能する。この心臓の規則的な拍動（収縮および弛緩）を担っているのが心筋の電氣的活動である。

#### 2.2.1 心臓の刺激伝導システム

心房内で発生した電気興奮（活動電位）は心房から心室へと伝播する。心臓には心房筋や心室筋細胞とは異なり潜在的に自動能を有する特殊心筋が存在し、その特殊心筋から心臓全体に電気興奮が伝播される。この電気興奮の伝播経路は心臓の刺激伝導系と呼ばれており、図 2-1 に示すように洞房結節、心房内結節間伝導路、房室結節、ヒス束、左・右脚、プルキンエ線維から構成される [1]。洞房結節 (Sinoatrial node; SA node) は上大静脈と右心房の間に存在し、活動電位を発生して心臓のペースメーカーとして心拍数を決定する。洞房結節より発生した興奮は心房内結節間伝導路を通過して心房全体に広がる。心房を回った興奮は右心房下方の冠状静脈洞開口部に存在する房室結節 (Atrio-ventricular node; AV node) を介して心室へ伝播する。心房と心室間の境界は線維組織により絶縁されているため、房室結節は心房と心室間の電気興奮を伝播する唯一の経路である。房室結節の興奮伝導速度は心房筋 (0.5～1 m/s) や心室筋 (1～5 m/s) に比べて著しく遅く (0.05～0.1 m/s) [2]、その長さは 5～7 mm で幅は 2～5 mm あり [3]、心房と心室の収縮の開始に 0.1～0.2 s の時間的な遅延を生み出す。房室結節を伝播した電気興奮はヒス束を通り、左・右脚により左右に分かれて心尖部へ伝わり、プルキンエ線維から左・右心室内腔に向かって拡がる。

心臓の電氣的活動は心電図 (Electrocardiogram; ECG) の計測によって把握することができる。心電図の種類には体表面に設置した電極により誘導される体表面心電図と、ヒス束心電図のように心内腔で得られる心内心電図 (2.4.2 参照) がある。ここでは体表面心電図について述べる。心電図の誘導には一般に標準 12 誘導という方法があり、12 方向から三次元的に心臓の電氣的情報を得る。右手、左手、および左足に電極を取り付けた双極肢誘導 (I、II、III の 3 誘導) と単極肢誘導 ( $aV_R$ 、 $aV_L$ 、 $aV_F$  の 3 誘導) 及び単極胸部誘導 ( $V_{1-6}$  の 6 誘導) がある。右足に基準となる電極を設置し、2 点間の電位差を差動増幅器によって増幅して記録する。心電図の波形は図 2-1 に示すように心房の脱分極過程を表す P 波、心室の脱分極過程を表す QRS 波、心室の再分極過程を表す T 波より構成される。第 I 誘導の心電図波形に注目して考えると、脱分極が洞房結節から始まり心房に広がる過程で心電図の正の振れ (P 波) が観察される。房室結節で遅延した電気パルスはヒス束を伝わり左・右脚へ至り心室中隔へ伝わり、小さい負の振れ (Q 波) が観察される。心室が収縮する時点では大きな正の振れ (R 波) が観察される。心室全体が脱分極すると電氣的活動は消失するが、続いて再分極が心外膜側から心内膜側へと進行するため T 波が生じる。P-Q 間隔は洞房結節より興奮が心室に到達するまでの時間を表す。このように心電図波形は心臓電気現象を反映しており、心電図計測によって房室間の刺激伝導状態や不整脈の診断などができる。

### 2.2.2 活動電位とイオンチャネル

心筋細胞は細胞内外のイオン濃度勾配とイオンに対する選択的透過性により細胞膜を隔てて電位差を保っており、細胞外を基準とした細胞内の電位は膜電位と呼ばれる。静止時の膜電位は静止膜電位と呼ばれ、心室筋では $-85 \sim -90 \text{ mV}$ 、心房筋では $-75 \sim -80 \text{ mV}$ である [4]。心筋細胞の膜電位は興奮により静止膜電位から $+20 \text{ mV}$  付近まで急速に変化し、速やかに元の静止膜電位レベルに戻る。このような一連の膜電位の変化を活動電位といい、この活動電位が伝播することで心臓全体が興奮する。活動電位の形成には細胞のイオン透過性を調節するイオンチャネルが重要な役割を果たしている。イオンチャネルは膜貫通性蛋白によって構成され、親水性の孔構造を通してイオンを輸送する。心筋細胞のイオンチャネルの多くは電位依存性であり、膜電位の変化によってその開閉が決定される。図 2-2 に活動電位とイオン流入の関係を示す。膜電位が静止膜電位から正の向きに変化することを脱分極と呼び、活動電位波形では第 0 相に一致する。膜電位が正電位になることをオーバーシュートと呼び (第 1 相)、活動電位はその後  $0 \text{ mV}$  付近のプラトー相 (第 2 相) に維持された後に、再び元の静止膜電位に戻り (第 3 相)、この過程を再分極という。脱分極は膜のある特定イオンに対する透過性が一過性に上昇するために生じる。 $\text{Na}^+$ チャネルが活性化される閾値は $-60 \text{ mV}$  であり、膜電位が $-60 \text{ mV}$  を超えると  $\text{Na}^+$ チャネルが急速に活性化され、細胞内に  $\text{Na}^+$  が流入して膜電位は一気に上昇し、 $0 \text{ mV}$  を超えてオーバーシュートに達する [4]。 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルは $-40 \text{ mV}$  付近で活性化され、内向き電流を流す [4]。 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルはゆ

つくりと活性化し、不活性化も遅いためプラトー相を形成する。 $K^+$ チャネルは脱分極への電位変化で緩やかに活性化され、外向きの電流を流して再分極を促進する。心筋組織内の興奮伝播は隣り合う細胞間で活動電位が伝わることにより、脱分極のきっかけは隣の細胞から与えられる。心筋細胞間の境界板には細胞間接合体であるギャップ結合 (Gap junction) が存在する。ギャップ結合は細胞膜脂質二重層に組み込まれた蛋白が多数集まった集合体からなる。隣接する2つの細胞膜の蛋白同士が融合して中心部直径1~2 nmの細胞間チャネルが形成され、細胞を電氣的に連結している [4]。このギャップ結合を通して興奮細胞から隣接する静止細胞へ陽イオンが移動することにより、活動電位が伝わる。心室筋や心房筋ではギャップ結合が筋細胞両端にある境界板付近に高密度で存在する。その結果、心筋線維の走行に沿った伝導の方が線維を横切る方向の伝導よりも3~4倍速い [5]。

心臓の収縮には細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度が大きく関わっており、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の増減により心筋細胞は収縮および弛緩を繰り返している。膜電位の脱分極に伴い流入した  $Ca^{2+}$ は筋小胞体 (Sarcoplasmic Reticulum; SR) の  $Ca^{2+}$ 放出チャネルを開口させ、筋小胞体に貯蔵されている  $Ca^{2+}$ の細胞質内へ向けた放出を促す。筋小胞体から放出された  $Ca^{2+}$ は収縮蛋白 (筋原線維) のアクチン線維上に存在するトロポニンに結合する。収縮蛋白内の  $Ca^{2+}$ 濃度が一定レベル以上になると収縮蛋白は構造を変化させて心筋収縮を起こす。収縮後の  $Ca^{2+}$ は筋小胞体に再び貯蔵されるか、細胞膜上の  $Na^+-Ca^{2+}$ ポンプにより細胞外へ排出される。このような心筋における膜電位の電氣的変位から収縮に至る一連の過程を興奮収縮連関 (Excitation-contraction coupling; EC coupling) と呼ぶ [5]。心筋細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度は静止状態においては10~100 nMと低濃度に維持されているが、収縮時には約100 msの間に100倍の1~10  $\mu M$ に達する [6]。このような一過性の細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の上昇は  $Ca^{2+}$ トランジェント ( $Ca^{2+}$  transient) と呼ばれ、興奮収縮連関に伴う細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の周期的な増減は  $Ca^{2+}$ 振動 ( $Ca^{2+}$  oscillation) と呼ばれる。

## 2.3 心房性不整脈とその発生機序

不整脈は心臓の規則的な電氣的活動が乱れる疾患であり、頻脈と徐脈がある。発生部位および脈拍数によって分類され、心房で発生した異常興奮により起こされる不整脈は心房性不整脈という。不規則に拍動する場合を心房期外収縮と呼び、それ以外の頻脈性の場合には異常興奮頻度 (拍数) によって分類される。拍数が230拍/分以内の場合は心房頻拍、240~340拍/分の場合は心房粗動、350拍/分以上の場合は心房細動と呼ばれる [7]。本部では、心房性不整脈の中で頻繁に起こる心房細動および心房粗動に関して述べる。

### 2.3.1 不整脈の発生機序

一般に心房細動や心房粗動などの頻脈性不整脈の発生機序は以下の3つに分けられる [4]。

- i) 興奮旋回 (リエントリー、Reentry)

ii) 異常自動能 (Abnormal automaticity)

iii) 撃発活動 (Triggered activity)

多くの持続性の不整脈の機序は異常興奮旋回によるものであり、解剖学的あるいは機能的に形成された興奮回路を異常興奮が回り続けることによる。異常旋回が生じる条件は、異常興奮回路の形成、不均一な興奮伝導特性による緩徐伝導部位の存在、および一方向性伝導ブロックの形成である。解剖学的基盤をもとに生じた興奮旋回による不整脈の典型的な例が通常型心房粗動であり、三尖弁輪周囲を興奮回路とする不整脈である (2.3.3 参照)。一方、機能的基盤をもとに生じた興奮旋回形成では、伝導速度の不均一性が增大することによって局所的な興奮旋回が生じ、一拍ごとにその旋回経路が変化する。心房細動の維持にはこのような機能的興奮旋回が関わっていると考えられる (2.3.2 参照)。異常自動能とは、心臓の規則的な電気的活動を担う洞房結節以外の心筋細胞が自動能を示すことを言う。洞房結節より下位の自動能をもつ刺激伝導系に属する細胞が自動能を示す場合と、本来自動能を持たない細胞の静止膜電位が何らかの原因で浅くなり緩徐脱分極を示す場合がある。このような異常自動能発生により規則的な心拍動が遮られると不整脈になる。撃発活動はイオンチャンネルの異常もしくは障害により、先行する活動電位が引き金となって起こる異常な電気的活動であり、早期後脱分極と遅延後脱分極がある。早期後脱分極では、先行する活動電位の持続時間が延長し、再分極時に膜電位が浅い状態にとどまり不安定になると、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の活動電位を発生する。遅延後脱分極は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が異常に増加した場合に起こり、先行する活動電位の再分極直後に筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出によって一過性の脱分極が起こる。

### 2.3.2 心房細動

心房細動 (Atrial fibrillation; AFib) は空間的および時間的に変動する複数の興奮旋回によって、心房が局所的に 350~600 拍/分の高頻度で不規則に興奮する疾患である [7]。心室興奮周期だけでなく心房興奮周期も不規則になることが特徴である。心房細動ではその不規則な心房興奮のため有効な心房収縮が得られず、心拍出量が減少して血行動態が悪化し、心不全を起こす可能性がある。また、心房内の内圧が高まるため心房が拡大し、心房の収縮と弛緩が弱くなり、心房内で血流量が低下して血液のよどみを生じる。特に左心耳内の血液のよどみにより血栓が形成されやすく、脳梗塞などの血栓塞栓症の危険性を高める。心房細動患者は年間に約 5%で脳梗塞を発症する危険性があり、特に 80 歳代の脳梗塞発症者のうち 23.5%は心房細動に起因すると報告されている [8,9]。心房細動に合併した脳梗塞は重篤な場合が多く、永続的な障害を引き起こす可能性があるため、高リスク患者は持続的な抗凝固療法が必要になる。

心房細動は特に高齢者に多い疾患であり、その有病率は年齢と相関がある。年齢別の有病率は 40~50 歳代で 0.5%以下であるが、60 歳を超えると急激に増加し、80 歳代では 5~15%

になる [9-11]。罹患者数は米国では約 230 万人 [9,11]、ヨーロッパでは約 600 万人 [10]、日本では約 72 万人と報告されている [12]。心房細動の有病率は人口全体の 1~2%と予想され [10]、人口の高年齢化に伴って年々増加傾向にあり、2050 年には現在の 2.5 倍以上になると見込まれている [9,11]。今後高齢社会を迎える各国では患者数の増加は必至であり、脳梗塞や心不全の重大な危険因子である心房細動の治療および管理が課題となっている。

心房細動は進行性疾患である。初期は症状の発現期間が短期的で頻度も少ないが、進行するにつれて一回の持続期間が長くなり頻繁に起こるようになる。心房細動はその頻拍の持続時間によって 4 つに分かれる [12]。症状が発現してから 7 日以内に自然停止する場合は発作性心房細動 (Paroxysmal AFib) と呼ばれる。長時間自然停止しない場合は持続時間および治療方針によって分類される。7 日以上継続し薬物療法あるいは電気的除細動により停止できる場合は持続性心房細動 (Persistent AFib)、1~3 年ほど持続する場合は長時間持続性心房細動 (Long-lasting AFib)、さらに心房細動が持続して洞調律の回復が困難な場合は永続性心房細動 (Permanent AFib) と呼ばれている。これらの分類は薬物および非薬物療法の有効性を予測する指標として用いられ、心房細動が進行すると伴に治療効果は減少することが報告されている [12]。心房細動が進行するにつれて、電気的および構造的な心房リモデリングが起こり [9,12,13]、心房細動の持続時間が長くなるほど心房細動基質が進展するという悪循環に陥る。年間で約 5%が発作性心房細動から持続性もしくは永続性心房細動に進行している [14]。

心房細動の発作機序は 1998 年に Haissaguerre らによって明らかにされた [15]。心房細動発作の 90%以上が肺静脈内で発生した異常興奮が起源であり、その多くの症例で複数の起源が同一もしくは異なる肺静脈内に存在する [15-17]。これらの異常興奮が心房内に伝播して複数の局所的な興奮旋回を形成することで心房細動が維持される。心房細動の成立には肺静脈近傍で発生する異常興奮と興奮旋回の維持を担う心房細動基質が関与している (図 2-3(a)) [18]。図 2-3(b)、(c) に示すように、肺静脈入口部では心房筋が左房から肺静脈に迷入しており [19]、その境界領域では心筋細胞、血管平滑筋細胞、内皮細胞、および線維芽細胞などが混在している。迷入部位の心筋組織は心筋細胞の配列に不等方性があり、線維化が認められ、興奮旋回の原因になる [19]。迷入部位に存在する心筋細胞は電気生理学的特徴が洞結節細胞に類似しており、その約 40%は膜電位が浅く、異所性自動能をきたして期外収縮を起こしやすい [20]。心房期外収縮の発生頻度は肺静脈の中でも左上肺静脈が最も多く、次いで右上肺静脈、左下肺静脈、右下肺静脈となる [15]。上肺静脈起源の期外収縮が多いのは、上肺静脈では下肺静脈よりも心房筋の迷入が深いことと関連している [19]。

### 2.3.3 心房粗動

心房粗動 (Atrial Flutter; AFI) は心房内興奮旋回性 (マクロリエントリー性) 頻拍であり、心房細動と同様に 60 歳以上に多い疾患である。その発病率は 50 歳未満では 10 万人に 5 人



程度、80歳未満では10万人に600人程度である [21]。心房細動とは異なり心房粗動の場合は心房内興奮が比較的規則的であり、心電図上は心房拍数が240～340拍/分である [7]。心房粗動は動悸、呼吸困難、胸痛、心不全、および血圧低下などをきたす疾患であり、心室細動を誘発する危険性がある。心房粗動は、右房あるいは左房の解剖学的な構造物や瘢痕組織を障害物としてその周囲に異常興奮旋回を形成する 경우가多く、三尖弁輪周囲を興奮旋回路とする通常型心房粗動と、それ以外の興奮旋回路をとる非通常型心房粗動に分けられる。通常型心房粗動の発生頻度は心房粗動全体の約9割を占める [21]。

通常型心房粗動は発作性心房細動などの一過性の心房性不整脈から移行することが多く、単独で心房粗動が発生することは稀である [22]。心房細動中に生じた興奮が右房の中で徐々に心房粗動の回路を機能的に形成し、最終的に心房粗動が発生するとされている。通常型心房粗動の興奮は、図2-4に示すように分界稜 (Crista terminalis; CT) と三尖弁輪 (Tricuspid annulus; TA) 間の右房自由壁の楕状筋を横断するように伝播し、三尖弁輪と下大静脈 (Inferior vena cava; IVC) によって電気的に隔離された解剖学的峡部 (Cavo-tricuspid isthmus; CTI) を通り抜け、三尖弁輪とユースタキオ稜 (Eustachian ridge; ER) の間の中隔峡部を通り、心房中隔を経て旋回経路を形成する [23]。分界稜は、前上大静脈開口部と右心耳の境界から下大静脈に向かって縦に走行する筋肉束である。電気生理学的特性が他部位とは異なり、縦方向の伝導性は良いが横方向の伝導性は不良なため機能的伝導ブロックを生じる。ユースタキオ稜も分界稜と同様の電気生理学的特性を持ち、機能的障壁として働く。このように通常型心房粗動の興奮旋回路は三尖弁輪、分界稜、下大静脈、およびユースタキオ稜を機能的あるいは解剖学的障壁として成立している。通常型心房粗動は興奮旋回路をいずれかの部位で遮断することで根治可能である。実際には高周波カテーテルアブレーション (2.4.1 参照) によって三尖弁輪と下大静脈間の解剖学的峡部に対して線状電気伝導ブロックを作成し、異常旋回路を遮断する治療が行われている。

## 2.4 心房性不整脈に対する高周波カテーテルアブレーション治療

本部では心房細動に対する高周波カテーテルアブレーション治療に関して述べる。高周波カテーテルアブレーションは近年の心房細動の発生機序の解明とカテーテルアブレーション関連技術の発達により急速に普及している。心房粗動は心房細動から合併することが多く、その治療運用に関しては心房細動の一部として考えられることができる。

### 2.4.1 心筋電気伝導ブロックの原理

高周波カテーテルアブレーションは経カテーテル的に心臓まで電極を挿入し、心筋組織に対して高周波通電を行い、電気伝導ブロックを作成することによって異常興奮発生あるいはその興奮伝播経路を遮断するための手法である。高周波アブレーションカテーテルの先端電極を心筋組織に接触させた状態で患者背面に設置した対極板に向かって高周波通電

を行うと、ジュール熱による心筋組織の熱凝固壊死によって電気伝導ブロックが得られる。基本的に高周波カテーテルアブレーションの熱凝固作用の原理は単極の電気メスと同様である。カテーテル先端電極から生体に対して 500～1000 kHz の高周波交流通電を行うと、電極先端の心筋組織に接した領域において電流密度が高まり心筋組織表面近傍でジュール熱が発生する。心筋組織を均質な媒体と仮定すると組織内の電流密度は電極先端からの距離の 2 乗に反比例して減衰するため、単位体積あたりに発生する熱量は電極先端からの距離の 4 乗に反比例して減少する [24,25]。高周波通電によるジュール熱の発生領域はカテーテル先端電極に近接した心筋組織表層の 1～1.5 mm 程度である [26]。発生した熱量の一部は血流によって失われ、それ以外は熱伝導によって深層組織温度を高める。心房組織の厚みは部位によって異なるが 1～4 mm 程度であるため [27]、熱伝導によって心筋深部まで熱が到達するには時間を要し、1 min 間程度の通電を行う必要がある [4]。高周波通電部位の心筋組織は熱凝固壊死となり、即時的に電気伝導性が消失する。数週間後には線維性の結合組織に置換され電氣的に絶縁体となり、高周波通電部位は永続的に電気伝導性を消失する。心筋組織温度と心筋電気伝導性消失および心筋組織壊死の関係は Haines ら、Simmers ら、および Wood らによって研究されている [28-32]。心筋温度が 50～55℃で一過性に心筋電気伝導性が消失し、60℃ 以上持続時間 30 s 間程度で熱凝固壊死により不可逆的な組織変性が起こり、永続的に電気伝導性が消失すると報告されている [31,32]。高周波通電条件と心筋組織温度分布および心筋組織障害領域の関係は Wittkampf らや Wood らによって調査されている [32-35]。図 2-5 に摘出心筋組織に対し高周波通電を行った際の組織断面写真を示す [32]。先端電極長さ 8 mm の高周波アブレーションカテーテルを用いて、臨床に近い通電条件 (出力 20 W、通電時間 1 min 程度) で通電を行った場合、深さ約 6 mm、直径約 10 mm の熱凝固壊死層が得られる。高周波通電による心筋組織の熱障害領域はカテーテル先端と組織の接触面の温度だけでなく、電極と組織間の接触面積、カテーテルの組織に対する接触圧、周囲の熱環境に依存する [4]。

心房細動に対する治療では、術前検査と高周波カテーテルアブレーション治療の 2 段階を経て治療が行われる。術前検査において経食道心エコー下で左心房内の血栓の有無を確認し、心臓の 3 次元 X 線コンピュータ断層撮影 (Computer tomography; CT) 画像あるいは磁気共鳴画像 (Magnetic resonance imaging; MRI) を取得して左心房および肺静脈の位置関係や解剖学的な形状を把握する。図 2-6 に一般的な高周波カテーテルアブレーション治療の手順の概要を示し、以下に詳細を述べる [36]。

- i) 局所麻酔下で鼠蹊部より大腿静脈に高周波アブレーションカテーテルを挿入し、X 線透視下でカテーテルの位置を確認しながら、右心房内腔へカテーテル先端を導入する。
- ii) 右心房から心房中隔の卵円窩を穿刺して左心房へ通じる孔を開ける (経心房中隔穿刺法、Brockenbrough 法)。

- iii) 左心房にカテーテル先端が入ったら、造影撮影により左心房内腔の構造を確認し、カテーテル先端電極において各位置の電位情報を取得し、高周波通電部位を決定する。
- iv) 高周波通電を開始し肺静脈と左房間の電氣的隔離を行う。一般に心房細動治療の通電は設定温度 50～65°C\*、出力 30～50 W、通電時間 30～60 s で行う。
- v) 術中にカテーテルの先端電極にて通電部位の心内電位消失を確認する。
- vi) 電気生理学的検査によって電気伝導ブロックを診断する。

心房細動の根治のために心房内のどの部位に対して高周波通電を行うかは患者ごとに異なり、そのカテーテルアブレーション治療戦略 (Ablation strategy) は確立していない。心房細動に対して高周波カテーテルアブレーション治療が行われ始めた当初は、異常興奮の発生起源に対して局所的に高周波通電を行う手法 (Focal ablation) が行われていた [15]。局所心房細動であれば最早期興奮部位に対する局所高周波通電で根治できるが、心房細動発作の起源は複数の場合もあり、術中に自然発作が得られない場合には起源同定が困難であった。その後、肺静脈で発生した異常興奮の心房への進入を防ぐため、肺静脈入口部に多極リング状カテーテルを留置し、肺静脈全周の電位計測によって左房と肺静脈間の電氣的接合部位を選択的に通電する電気生理学的アプローチ (Segmental ostial ablation) が取られるようになった [16,17]。肺静脈深部に対する高周波通電では肺静脈狭窄を起こす危険性が高い (肺静脈狭窄発生率 5%程度) ことが問題となった [10,37]。これに対して、電気解剖学的マッピング (2.4.3 参照) を用いて、肺静脈入口部全周を連続的に通電して肺静脈と左房を電氣的に隔離する肺静脈隔離術 (Circumferential pulmonary vein isolation) が提唱された [38,39]。肺静脈隔離術によって肺静脈入口部に発生した異常興奮由来の発作性心房細動に対してはほぼ根治できるということが臨床的に確かめられた [17]。一方、亜急性期の心房細動再発率が高く再治療を要することが多く、また術時間および透視時間が長いことが課題であった [40]。近年では、肺静脈の巣状興奮を対象とした心房細動発生要因だけでなく、心房の拡大・変性に伴う心房筋の基質を対象として心房細動維持の要因を考慮し、同側上下の肺静脈2本をまとめて隔離する広範囲肺静脈隔離術 (Extensive encircling pulmonary vein isolation) が多く行われている [41]。再発原因として解剖学的にカテーテルのアプローチが困難な部位や上下肺静脈間の分岐部 (Carina 領域) における伝導再開があるが [42,43]、同側上下肺静脈をまとめて隔離することで肺静脈開口部起源だけでなく左房後壁起源の異常興奮を除去することができる。この手法により心房細動根治率は改善し、術時間および透視時間が短縮した。持続性心房細動に対しては心房のリモデリングが進んでおり、肺静脈隔離だけでは治療効果が低く、心房細動の維持を担う基質 (上肺静脈間の左房天蓋部、左下肺静脈と僧帽弁間の解剖学的峽部など) を標的に線状の電気伝導ブロックラインを追加し

---

\* カテーテル先端電極付近のカテーテル内測温点の温度である。一般に心筋組織内温度より低い [34,44]。

たり [45,46]、分裂電位 (Complex fractionated atrial electrogram; CFAE) を対象として電位指標の高周波通電を追加する場合もある [47]。CFAE は心房細動の持続中に心房内で記録される特殊な心房電位であり、局所的に 120 ms 以下の短い周期をもつことが特徴である。この CFAE を標的とするカテーテルアブレーション法は 2004 年に Nadamance らによって考案された [47]。このように肺静脈隔離に加えて線状通電を段階的に追加する (Stepwise ablation) ことで近年では持続性の心房細動に対しても 80%以上の心房細動停止に成功している [48,49]。基礎心疾患があり左房肥大が進んでいる心房細動に対しては依然として再発率が高く、術時間や透視時間が長いなどの問題が残されている。また、個々の患者によって通電部位が異なるので、電気的解剖学的マッピング下で患者ごとに最適な通電部位を検討し決定する必要がある。高周波カテーテルアブレーションの対象部位となる肺静脈入口部や左房後壁の組織厚みは部位および心房細動の進行によって異なる。表 2-1 に健常者の肺静脈入口部および左房後壁の組織厚みをまとめる [27]。心房細動患者の場合は左房の肥大に伴い左房壁の組織厚みが健常者と比較して 2 割程度薄くなる [50]。一般に高周波カテーテルアブレーション治療においては組織厚み 1~4 mm の心筋壁に対して貫壁性の組織壊死を起こす条件を設定している。組織厚みに応じて高周波通電の施行条件を調節し、治療深度を制御する必要がある。

近年心房細動に対する高周波カテーテルアブレーション治療は成功率と安全性の向上に伴い多くの施設で行われるようになったが、心房細動に対する治療は基本的に薬物療法が主体である。薬物療法には心拍数の調節を目的とするレートコントロールと、洞調律の維持を目的としたリズムコントロールがあり、いずれも症状の軽減、心不全の予防、脳梗塞の予防を目的とした治療である。薬物療法は身体への負担が少ないという利点がある一方、長期間の内服や薬剤の副作用が患者への負担となる。また、薬物療法は保存的治療であり完治は期待できず、心房細動が完全に抑制できる確率は 50%程度である。特に持続性心房細動に対する薬物療法は多くの場合無効である。一方、高周波カテーテルアブレーション治療は心房細動の発作原因に直接作用する治療であり、根治を目指した治療と言える。心房細動に対する薬物療法と高周波カテーテルアブレーション治療の比較試験は近年盛んに行われており、洞調律の回復および Quality of Life (QOL) の改善の面で高周波カテーテルアブレーション群が優れているとの報告がある [51,52]。これを受けて、2010 年に開催された欧州心臓学会 (European Society of Cardiology; ESC) では、独自に作成した新しい心房細動治療ガイドラインが発表され [10]、心疾患の伴わない発作性心房細動でなおかつ抗不整脈薬治療の拒否例に対し、高周波カテーテルアブレーションは第一選択治療として位置づけられた。このように、高周波カテーテルアブレーションに関する臨床試験の成績が蓄積されるに伴い、心房細動治療における位置付けがこれまで以上に明確化されつつある。

#### 2.4.2 治療時に必要な電気生理学的検査

心房細動起源の同定、高周波通電部位の決定および電気伝導ブロックの確認には心臓電気生理学的検査 (Electrophysiological study; EPS) によって記録される心内心電図が用いられる。マッピング用カテーテルやアブレーション用カテーテルの電極対で計測された電位は増幅器でフィルタリングおよび増幅された後、多チャンネル記録装置によって記録される。記録した電位波形は画面上にリアルタイムで表示され、医師は各部位の電位波形から電気生理学的情報を収集する。高周波カテーテルアブレーション治療では、どの部位に対して高周波通電を行って電気伝導ブロックラインを作成するか解析しながら進めている。心房細動に対する電気生理学的検査は肺静脈入口部に挿入した円周状に複数の電極をもつ多極リング状電極カテーテル (Lasso®カテーテル、リング径 20~30 mm) を用いた肺静脈マッピングが多用される。近年では解剖学的に線状の電気伝導ブロックラインを作成する手法が主流であり、この多極カテーテルを用いた肺静脈マッピングに加えて、左房の解剖学的情報と電気生理学的情報を一画面上に表示し、それをガイドに通電を行う 3 次元電気解剖学的マッピングシステム下でのカテーテルアブレーション治療が行われている。電気解剖学的マッピングシステムを用いることで、術中に心房内の解剖学的構造および隣接する臓器との位置関係を把握しながら通電部位を決定することができる。

代表的な電気解剖学的マッピングシステムには Biosense Webster 社の Carto システム (Carto® system) や St. Jude Medical 社の Ensite システム (Ensite® system) がある。両者とも 3 次元 CT 画像上の特定の位置における心腔内電気現象を表示できる装置であり、心臓内興奮伝播を視覚的に捉えることができるのが特徴である。Carto システムでは 3 カ所に配置した位置測定用パッドから周波数の異なる 3 種類の交流磁場を発生し、カテーテル先端に内蔵された磁気センサーで磁場強度を測定することで、心内腔におけるカテーテルの位置を把握する [53,54]。心内膜面に接触した際のカテーテル先端の 1 心拍分の電位情報と位置情報を数十点取得することで、図 2-7 に示すような 3 次元的心内の興奮伝播様式を画面上に表示する [54]。マッピング画像に CT 画像や MRI 画像などの解剖学的情報を重ね合わせることで、通電部位を正確に把握することができる [55]。このような電気解剖学的マッピングシステムの併用により不整脈の起源や伝導ブロック、緩徐伝導部位を把握することができる。また、心腔内の解剖学的構造や血管の位置が視覚的に確認でき、解剖学的なアプローチをとる高周波通電を行う場合や解剖学的に特徴のある部位に対しての高周波通電を行う際に特に有効である。磁気センサーが内蔵された専用の高周波アブレーションカテーテルおよび多電極カテーテルが必要である。日本では 2007 年 10 月に Carto® XP が厚生労働省により承認を得て以来、多くの施設で使用されている。Ensite システムは Carto システムとは原理的に異なり、非接触で心内興奮伝播を測定する [53,54,56]。あらかじめ取得した心内膜面の 3 次元イメージ上に仮想単極電位を作る。図 2-8 に示すように、心内腔に設置したバルーン状の多電極アレイカテーテル上の 64 電極にて、心内膜面の遠隔電位とバルーン

と心内膜面との距離を記録し、心内膜上の各点における電位情報を逆算する [54,56,57]。Ensite システムでは 1 心拍ごとの心内膜面全域の動的解析ができるため、電気伝導ブロックの確認を瞬時に行うことができ、電気伝導ブロックラインの隙間 (伝導ギャップ) を特定する際に利用されている。Ensite システム 3000S は 2009 年 5 月に厚生労働省の承認を得ている。このような 3 次元電気解剖学的マッピングシステムの導入によって解剖学的アプローチを用いた高周波カテーテルアブレーションが容易となり、術成功率が向上した [41]。さらに、透視時間も短縮し、術者や患者に対する放射線被爆量の軽減につながっている。

### 2.4.3 治療の課題：熱的副作用

心房細動根治率は心房細動の進行度、高周波通電部位、設備、および術者によって大きく異なり、60～90%と報告されている [58-60]。発作性心房細動に対する心房細動根治率は 80～90%と良好な成績が得られている [10,60]。単回の高周波カテーテルアブレーション治療では慢性期において 25～40%の症例で心房細動再発を認める場合があり、再発率を減らすための対策が必要である [58]。高周波カテーテルアブレーション治療の最大の課題は重篤な合併症の発生であり、これが患者適応を限定する理由の一つとなっている。表 2-2 に高周波カテーテルアブレーションに伴う主な合併症 (心タンポナーデ、脳梗塞、左房-食道瘻、横隔膜神経麻痺、肺静脈狭窄など) とその発生率を示す [58-60]。1995～2002 年に行われた国際的調査では合併症発生率は全体で 5.9%であり [59]、その後 2003～2006 年に行われた調査では合併症発生率は全体で 4.54%である [60]。高周波アブレーションカテーテル技術の発達に伴い合併症発生率は減少しつつあるが、重篤な合併症の発生は未だ大きな課題である。心タンポナーデは最も頻度の高い合併症であり、なおかつ高周波カテーテルアブレーションによる死亡の原因となっている。心タンポナーデの原因としては、機械的に高周波アブレーションカテーテルで心壁を押し破る場合と、高周波通電中に心筋組織内部で局所的に温度が上昇して組織内水蒸気爆発 (pop) が生じ、心壁に貫通性の亀裂が発生する場合がある。その結果、心臓と心膜の間に血液が充満して拍出量が低下する。高周波カテーテルアブレーションでは組織の電気抵抗を基準として治療条件を定めているが、組織抵抗は均一ではないため電流密度にばらつきを生じて組織内水蒸気爆発が生じる。組織表面温度は血流による熱輸送で低下するため、組織表面から深さ 1 mm 程度で組織内温度が最大値をとる [44]。術中にカテーテル先端に内蔵されている温度センサーにより組織温度を間接的に測定しているものの、実際の組織内最大温度はカテーテルの温度センサーで測定した温度より 10°C 以上高い [34,44]。脳梗塞はカテーテルシース内での血栓形成や、高周波通電時にカテーテル先端電極の発熱により炭化物や凝血塊が発生することなどが原因であり [34]、脳に到達した血塊が脳梗塞を起こす。対策としては、術前のワルファリン投与、術中のヘパリン投与および術時間の短縮がある。食道障害や横隔膜神経麻痺は左房後壁に対する高周波通電の際に熱伝導により周囲組織の温度が上昇することが原因である [61]。左房

後壁は平均2～3 mmと薄く1 mm以下の部位もあり、左房と食道間距離は3～10 mmである [62]。左房と食道前壁が接している部位での左房後壁に対する高周波通電では、食道温度が45℃以上に上昇することがあり、食道障害の危険がある [63]。対策として食道温度上昇を術中にモニタリングして食道障害を防いだり、食道近傍の心筋組織に対する高周波通電では出力を下げたり通電時間を短縮する手法がとられている。肺静脈狭窄・閉塞は肺静脈内での高周波通電が原因とされている。近年では肺静脈周囲を広範囲に通電する手法が普及しており、肺静脈狭窄・閉塞の発生率が大幅に減少した。心房細動はそれ自体が致死性の疾患ではなく薬物療法による保存的な治療が可能であるため、高周波カテーテルアブレーション治療の合併症発生率は全体で4～6%と比較的低いにも関わらず、より安全性の高い手法が求められている。

#### 2.4.4 カテーテルアブレーション技術の発展

現状の高周波カテーテルアブレーションにおける課題として、熱発生に伴う合併症の低減、再発率の抑制、術時間および透視時間の短縮、術式の標準化および簡易化がある。図2-9にこれらの課題とそれに対する対策をまとめる。近年の高周波アブレーションカテーテル関連技術の発展は大きくわけて3つに分かれる。

- i) 安全性を高めるため従来の高周波アブレーションカテーテルを改良して種々の機能を加えた多機能カテーテルの開発
- ii) 術時間の短縮および操作の簡易化を目指し、一括肺静脈隔離の専用カテーテルの開発
- iii) 術者による技術の差異を減らすためカテーテル操作の自動化を目指す開発

従来の高周波アブレーションカテーテルに冷却機能あるいは先端接触圧センサーを付加したカテーテルの開発が近年欧米を中心に行われている。従来の高周波アブレーションカテーテルは電極表面で血液が熱凝固を起こしたり、組織温度が100℃を超えて組織内水蒸気爆発が起きる場合がある。このような過剰な温度上昇を避けて安全な通電を行うため、カテーテル先端電極温度が一定温度（通常は50～65℃に設定）を超えないよう出力の自動調整機能がある。ただし、正確な組織測温が行われていないため制御性能が低いという課題があった。冷却機能付き高周波アブレーションカテーテル（イリゲーションカテーテル、Irrigation catheter）は先端電極表面を強制的に生理食塩水で冷却することによって、高周波通電中のカテーテル先端電極表面における血液凝固物の付着を防ぐことができる [26]。従来の高周波アブレーションカテーテルと比較して脳梗塞などの合併症発生率が低下し、良好な治療成績が報告されている [35]。今後は冷却機能を搭載したカテーテルが主流となる見込みである。図2-10(a)に臨床使用されている冷却機能付き高周波アブレーションカテーテルを示す [64,65]。開放灌流式の冷却機能付き高周波アブレーションカテーテルは、Biosense Webster社のThermoCool®が2009年2月に心房細動治療用のカテーテルとして初

めて米食品医薬品局 (U.S. Food and Drug Administration; FDA) に承認され、日本でも同年7月に厚生労働省の承認を得ている。カテーテル先端電極表面の過度な温度上昇は冷却機能により抑制されるが、組織内部の温度予測が困難であり心筋深部において突然組織内水蒸気爆発を起こして心筋に亀裂が走る可能性がある。また、高周波通電中に流量 17 ~ 30 mL/min で灌流を行うため、数時間に及ぶ治療の場合には全体で 1 L 以上の生理食塩水を体内に放出することになる [66]。その結果、呼吸困難、血圧の上昇、浮腫の発生、体内のイオンバランスの変化などから心不全を起こす場合がある。近年種々の冷却機能付きアブレーションカテーテルが開発されており、灌流量を抑えてより均一にカテーテル先端電極を冷却する対策が取られている。接触圧センサーとはカテーテルを心筋組織に接触させた (押し付けた) 際にカテーテル先端にどの程度の負荷荷重 (Contact force (g)) がかかるか定量的に測定する機能である。Nakagawa らによりカテーテルの心筋組織に対する接触圧と治療領域および合併症の発生率に相関があることが報告されている [67,66]。カテーテル接触圧が過剰な場合には高周波通電中に血栓形成や組織内水蒸気爆発の発生頻度が高く、カテーテルと組織の密着が不十分な場合には十分な熱凝固層が得られない [67]。接触圧センサーを備えた数種の高周波アブレーションカテーテルが欧米で製品化されている。図 2-10(b) に代表的な例として臨床使用されている Endosense 社の接触圧センサー付き高周波アブレーションカテーテル Tacti Cath®を示す [67,69]。Tacti Cath®はカテーテルを組織に押し当てた際のカテーテル先端の歪みをカテーテル先端に内蔵した光ファイバーで光学的に検知することで接触圧を定量的に表示する。副作用が生じずに安全に高周波通電を行うことができる接触圧条件は種々の接触センサー付きカテーテルで調査されており、太さ 7 Fr 程度の高周波アブレーションカテーテルを使用した場合の最適な付加荷重は 10 ~ 30 g と報告されている [67,68,70]。このように高周波カテーテルアブレーション治療をより安全に行うための機能を付加したカテーテルが次々と開発されている。

肺静脈隔離専用のバルーンアブレーションカテーテルは、肺静脈入口部にバルーンを挿入し、バルーンに接した部分に対して円周状に一括で電気伝導ブロックラインを作成することを目的とした肺静脈隔離に特化したカテーテルである。図 2-11 に示すように、熱的凝固作用を利用しない唯一の手法として組織の凍結融解壊死を利用した Medtronic 社のクライオアブレーションカテーテル (Cryoballoon Ablation Catheter, Arctic Front®)、レーザー光エネルギーの熱的作用を利用した CardioFocus 社のレーザーアブレーションカテーテル (Endoscopically guided laser ablation catheter) がある [71,72]。クライオアブレーションでは、カテーテル先端のバルーン内に窒素ガスを導入することでバルーン温度を $-60^{\circ}\text{C}$ 程度まで冷却し、肺静脈と左房間の心筋組織を直接冷凍し、肺静脈の電氣的隔離を行う [73]。一過性の電気伝導ブロックが得られるという利点がある一方、バルーン自体が凍結して固くなるため解剖学的に複雑な構造をとる肺静脈入口部に隙間なくはめ込むことが難しく、一回で肺静脈全周に凍結融解壊死領域を作成するのは困難な場合が多い。レーザーアブレーション



ンはレーザー光エネルギーの熱的作用を利用している。カテーテル先端のバルーン内に内視鏡が設置されており、バルーンが組織に接触していることを内視鏡ガイド下に目視で確認しながらレーザー光照射を行い、組織の熱凝固壊死によって電気伝導ブロックを達成する。バルーンは柔らかいため肺静脈入口部の形状に合わせてはめ込むことができるが、全周接触が得られず一括照射ではなく30°ずつ光照射を行っている [74]。バルーン型式のアブレーションカテーテルは肺静脈全周を一括で電氣的隔離を行うことを目的として開発されたが、実際には一回の施行で円周状に電気伝導ブロックラインを作成することは困難であり、高周波カテーテルアブレーションと比較して術時間および副作用の抑制には至っていないのが現状である。

カテーテル操作の自動化は術者による技術面の差異を減らし、術式の簡易化および術時間の短縮を目的として開発された。心房細動に対するカテーテル通電治療では左房の解剖学的な複雑性から、術者の技術または経験が手術時間の短縮および安全性の向上に大きく関わっている。また、難易度の高い症例に対しては手術時間が3~5 hrに及び、術者および患者の放射線被爆が問題となっている。そこで、図 2-12 に示すような磁気ナビゲーションシステム (Magnetic navigation system) やロボット制御システム (Robotic control system) など、コンピュータによりカテーテルを自由自在に遠隔操作する手法が開発されている [69,75]。近年注目されている Stereotaxis 社の磁気ナビゲーションシステム (Niobe® magnetic navigation system) は Carto システムとの併用ができ、遠隔で磁場を操作することにより3つの磁気センサーを内蔵した高周波アブレーションカテーテルを心内腔で自由自在に動かすことができる。X線透視下でのカテーテル操作に頼らずに、3次元の電気解剖学的マッピング表示をもとにカテーテルを操作するため、症例にもよるが、術中の放射線被爆時間を1 min以内に抑えることができると報告されている [69,76]。ただし、カテーテル室に磁場発生装置を設置するため手術室がカテーテルアブレーション専用室となり、このような大型装置を導入できる施設は限られている。

## 2.5 結言

本章では、心房性不整脈に対する現行の非薬物療法である高周波カテーテルアブレーション治療に関して述べ、現行手法の課題および近年のカテーテルアブレーション関連技術に関して述べた。心房性不整脈に対する治療目的は、主に生命予後の改善、QOLの改善、心機能の改善、血栓塞栓症の予防である。薬物療法による保存的な治療に対して高周波カテーテルアブレーション治療を行う利点は、根治的な治療が期待できるという点にある。それ自体は非致死性の心房性不整脈に対する治療において、高周波カテーテルアブレーション治療に起因する重篤な熱的副作用の発生は重大な問題である。通常型心房粗動では、高周波カテーテルアブレーション治療による根治率が95%以上であり [77]、その術式も確立しているため熱的副作用は特に問題とされていないが、その熱的副作用の発生機序は心

房細動治療の場合と同様である。心房細動に対する高周波カテーテルアブレーション治療は患者によって治療方針が異なり、根治率は60～90%であり、再発率は25～40%と高く、熱発生に伴う重篤な副作用発生が問題であり、確立した治療法は未だ存在しない(2.4.3 参照)。心房細動において、患者数が人口の高齢化に伴い増大傾向にあること、および現行の高周波カテーテルアブレーション治療の根治率が低く副作用発生率が高いことを考えると、今後は心房性不整脈の中でも特に心房細動に対するより有効かつ安全な治療法の開発が期待される。

## 参考文献

- [1] J. T. Hansen and B. M. Koeppen, ネット解剖生理学アトラス, 相磯貞和, 渡辺修一訳, 東京: 南江堂, 2006, pp. 66–87.
- [2] G. Y. H. Lip and J. Dodtfredsen, 不整脈テキスト—発生機序からみた治療のすべて, 小川聡, 和泉徹監訳, 東京: 西村書店, 2008, pp. 2–42.
- [3] 井川修, 臨床心臓構造学—不整脈診療に役立つ心臓解剖, 東京: 医学書院, 2011, pp. 127–141.
- [4] 土谷健, 高橋尚彦, 不整脈プロフェッショナル, 東京: 南江堂, 2010, pp. 36–48.
- [5] 山下武志, 心筋細胞の電気生理学—イオンチャネルから、心電図、不整脈へ, 東京: メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2002, pp. 3–18.
- [6] D. M. Bers, *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001, pp. 39–62.
- [7] 山口巖, 相澤義房, 井上博, 石川利之, 大江透, 小川聡, 奥村謙, 笠貫宏, 加藤貴雄, 鎌倉史郎, 小坂井嘉夫, 小林洋一, 杉薫, 高柳寛, 中里祐二, 渡辺一郎, 家坂義人, 岩佐篤, 大西哲, 久賀圭祐, 熊谷浩一郎, 小林義典, 里見和浩, 庄田守男, 住友直方, 副島京子, 高月誠司, 丹野郁, 池主雅臣, 永瀬聡, 平井真理, 藤木明, 安田正之, 杉本恒明, 早川弘一, 比江嶋一昌, 三崎拓郎, 矢野捷介, “臨床心臓電気生理検査に関するガイドライン,” *Jpn Circ J*, vol. 70 (Suppl. IV), pp. 1391–1462, 2006.
- [8] P. A. Wolf, R. D. Abbott, and W. B. Kannel, “Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: The framingham study,” *Stroke*, vol. 22, pp. 983–988, 1991.
- [9] V. Fuster, L. E. Ryden, D. S. Cannom, H. J. Crijns, A. B. Curtis, K. A. Ellenbogen, J. L. Halperin, J. Y. Le Heuzey, G. N. Kay, J. E. Lowe, S. B. Olsson, E. N. Prystowsky, J. L. Tamargo, S. Wann, S. C. Jr. Smith, A. K. Jacobs, C. D. Adams, J. L. Anderson, E. M. Antman, S. A. Hunt, R. Nishimura, J. P. Ornato, R. L. Page, B. Riegel, S. G. Priori, J. J. Blanc, A. Budaj, A. J. Camm, V. Dean, J. W. Deckers, C. Despres, K. Dickstein, J. Lekakis, K. McGregor, M. Metra, J. Morais, A. Osterspey, and J. L. Zamorano, “ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines and the European Society of Cardiology Committee for practice guidelines,” *Circulation*, vol. 114, pp. e257–e354, 2006.
- [10] A. J. Camm, P. Kirchhof, G. Y. H. Lip, U. Schotten, I. Savelieva, S. Ernst, I. C. Van Gelder, N. Al-Attar, G. Hindricks, B. Prendergast, H. Heidbuchel, O. Alfieri, A. Angelini, D. Atar, P. Colonna, R. De Caterina, J. De Sutter, A. Goette, B. Gorenek, M. Heldal, S. H. Hohloser, P. Kolh, J. Y. Le Heuzey, P. Ponikowski, and F. H. Rutten “Guidelines for the management of

- atrial fibrillation: The task force for the management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC),” *Eur Heart J*, vol. 31, pp. 2369–2429, 2010.
- [11] S. Go, E. M. Hylek, K. A. Phillips, Y. Chang, L. E. Henault, J. V. Selby, and D. E. Singer, “Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: National implications for rhythm management and stroke prevention: The anticoagulation and risk factors in atrial fibrillation (ATRIA) study,” *JAMA*, vol. 285, pp. 2370–2375, 2001.
- [12] 小川聡, 相澤義房, 新博次, 井上博, 奥村謙, 鎌倉史郎, 熊谷浩一郎, 是恒之宏, 杉薫, 三田村秀雄, 矢坂正弘, 山下武志, 大江透, 児玉逸雄, 比江嶋一昌, 矢野捷介, “心房細動治療 (薬物) ガイドライン (2008年改訂版),” *Jpn Circ J*, vol. 72 (Suppl. IV), pp. 1581–1638, 2008.
- [13] M. Allessie, J. Ausma, and U. Schotten, “Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation,” *Cardiovasc Res*, vol. 54, pp. 230–246, 2002.
- [14] T. Kato, T. Yamashita, K. Sagara, and H. Inuma, “Progressive nature of paroxysmal atrial fibrillation – observation from a 14-year follow-up study,” *Jpn Circ J*, vol. 68, pp. 568–572, 2004.
- [15] M. Haïssaguerre, P. Jaïs, D. C. Shah, A. Takahashi, M. Hocini, G. Quiniou, S. Garrigue, A. LeMouroux, P. LeMetayer, and J. Clémenty, “Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins,” *N Engl J Med*, vol. 339, pp. 659–666, 1998.
- [16] M. Haïssaguerre, D. C. Shah, P. Jaïs, M. Hocini, T. Yamane, I. Deisenhofer, M. Chauvin, S. Garrigue, and J. Clémenty, “Electrophysiological breakthroughs from the left atrium to the pulmonary veins,” *Circulation*, vol. 102, pp. 2463–2465, 2000.
- [17] H. Oral, B. P. Knight, M. Özaydın, A. Chugh, S. W. K. Lai, C. Scharf, S. Hassan, R. Greenstein, J. D. Han, F. Pelosi, Jr, S. A. Strickberger, and F. Morady, “Segmental ostial ablation to isolate the pulmonary veins during atrial fibrillation,” *Circulation*, vol. 106, pp. 1256–1262, 2002.
- [18] J. Dewire and H. Calkins, “State-of-the-art and emerging technologies for atrial fibrillation ablation,” *Nat Rev Cardiol*, vol. 7, pp. 129–138, 2010.
- [19] T. Saito, K. Waki, and A.E. Becker, “Left atrial myocardial extension onto pulmonary veins in humans; anatomic observations relevant for atrial arrhythmias,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 11, pp. 888–894, 2000.
- [20] 倉知嘉久, 心筋細胞イオンチャネル心臓のリズムと興奮の分子メカニズム, 東京: 文光堂, 2000, pp. 14–16, 68–144.
- [21] J. S. Steinberg and S. Mittal, 不整脈治療の *The Basic*—臨床に役立つ電気生理学, 山下武志, 野上昭彦, 高橋良英訳, 東京: メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2010, pp. 65–72.
- [22] V. L. Roger, A. S. Go, D. M. Lloyd-Jones, R. J. Adams, J. D. Berry, T. M. Brown, M. R.

- Carnethon, S. Dai, G. de Simone, E. S. Ford, C. S. Fox, H. J. Fullerton, C. Gillespie, K. J. Greenlund, S. M. Hailpern, J. A. Heit, P. M. Ho, V. J. Howard, B. M. Kissela, S. J. Kittner, D. T. Lackland, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, D. M. Makuc, G. M. Marcus, A. Marelli, D. B. Matchar, M. M. McDermott, J. B. Meigs, C. S. Moy, D. Mozaffarian, M. E. Mussolino, G. Nichol, N. P. Paynter, W. D. Rosamond, P. D. Sorlie, R. S. Stafford, T. N. Turan, M. B. Turner, N. D. Wong, and J. Wylie-Rosett, “Heart disease and stroke statistics: 2011 update: A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee,” *Circulation*, vol. 123, pp. e18– e209, 2011.
- [23] A. S. Gami, W. D. Edwards, N. Lachman, P. A. Friedman, D. Talreja, T. M. Munger, S. C. Hammill, D. L. Packer, and S. J. Asirvatham, “Electrophysiological anatomy of typical atrial flutter: The posterior boundary and causes for difficulty with ablation,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 21, pp. 144–149, 2010.
- [24] D. E. Haines, “The biophysics of radiofrequency catheter ablation in the heart: The importance of temperature monitoring,” *Pacing Clin Electrophysiol*, vol. 16 (Part II), pp. 586–591, 1993.
- [25] D. E. Haines and D. D. Watson, “Tissue heating during radiofrequency catheter ablation: A thermodynamic model and observations in isolated perfused and superfused canine right ventricular free wall,” *Pacing Clin Electrophysiol*, vol. 12, pp. 962–976, 1989.
- [26] F. H. M. Wittkampf and H. Nakagawa, “RF catheter ablation: Lessons on lesions,” *Pacing Clin Electrophysiol*, vol. 29, pp. 1285–1297, 2006.
- [27] S. Y. Ho, D. Sanchez-Quintana, J. A. Cabrera, and R. H. Anderson, “Anatomy of the left atrium: Implications for radiofrequency ablation of atrial fibrillation,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 10, pp. 1525–1533, 1999.
- [28] D. E. Haines, D. D. Watson, and A. F. Verow, “Electrode radius predicts lesion radius during radiofrequency energy heating,” *Circ Res*, vol. 67, pp. 124–129, 1990.
- [29] I. D. McRury, J. G. Whayne, and D. E. Haines, “Temperature measurement as a determinant of tissue heating during radiofrequency catheter ablation: An examination of electrode thermistor positioning for measurement accuracy,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 6, pp. 268–278, 1995.
- [30] T. A. Simmers, J. M. T. De Bakker, F. H. M. Wittkampf, and R. N. W. Hauer, “Effects of heating on impulse propagation in superfused canine myocardium,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 25, pp. 1457–1464, 1995.
- [31] T. A. Simmers, J. M. T. De Bakker, F. H. M. Wittkampf, and R. N. W. Hauer, “Effects of heating with radiofrequency power on myocardial impulse conduction: Is radiofrequency ablation exclusively thermally mediated?” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 7, pp. 243–247, 1996.

- [32] M. Wood, S. Goldberg, M. Lau, A. Goel, D. Alexander, F. Han, and S. Feinstein, “Direct measurement of the lethal isotherm for radiofrequency ablation of myocardial tissue,” *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 4, pp. 373–378, 2011.
- [33] H Nakagawa, F. H.M. Wittkampf, W. S. Yamanashi, J. V. Pitha, S. Imai, B. Campbell, M. Arruda, R. Lazzara, and W. M. Jackman, “Inverse relationship between electrode size and lesion size during radiofrequency ablation with active electrode cooling,” *Circulation*, vol. 98, pp. 458–465, 1998.
- [34] K. Matsudaira, H. Nakagawa, F. H.M. Wittkampf, W. S. Yamanashi, S. Imai, J. V. Pitha, R. Lazzara, and W. M. Jackman, “High incidence of thrombus formation without impedance rise during radiofrequency ablation using electrode temperature control,” *Pacing Clin Electrophysiol*, vol. 26, pp. 1227–1237, 2003.
- [35] K. Yokoyama, H. Nakagawa, F. H. M. Wittkampf, J. V. Pitha, R. Lazzara, and W. M. Jackman, “Comparison of electrode cooling between internal and open irrigation in radiofrequency ablation lesion depth and incidence of thrombus and steam pop,” *Circulation*, vol. 113, pp. 11–19, 2006.
- [36] Heart Rhythm society ホームページ; <http://www.hrsonline.org/PatientInfo/> (2011/11/17).
- [37] E. B. Saad, A. Rossillo, C. P. Saad, D. O. Martin, M. Bhargava, D. Erciyes, D. Bash, M. Williams-Andrews, S. Beheiry, N. F. Marrouche, J. Adams, E. Pisano, R. Fanelli, D. Potenza, A. Raviele, A. Bonso, S. Themistoclakis, J. Brachmann, W. I. Saliba, R. A. Schweikert, and A. Natale, “Pulmonary vein stenosis after radiofrequency ablation of atrial fibrillation: Functional characterization, evolution, and influence of the ablation strategy,” *Circulation*, vol. 108, pp. 3102–3107, 2003.
- [38] C. Pappone, S. Rosanio, G. Oreto, M. Tocchi, F. Gugliotta, G. Vicedomini, A. Salvati, C. Dicandia, P. Mazzone, V. Santinelli, S. Gulletta, and S. Chierchia, “Circumferential radiofrequency ablation of pulmonary vein ostia: A new anatomic approach for curing atrial fibrillation,” *Circulation*, vol. 102, pp. 2619–2628, 2000.
- [39] T. Arentz, R. Weber, G. Bürkle, C. Herrera, T. Blum, J. Stockinger, J. Minners, F. J. Neumann, and D. Kalusche, “Small or large isolation areas around the pulmonary veins for the treatment of atrial fibrillation?” *Circulation*, vol. 115, pp. 3057–3063, 2007.
- [40] H. Oral, B. P. Knight, M. Ozaydin, H. Tada, A. Chugh, S. Hassan, C. Scharf, S. W. K. Lai, R. Greenstein, F. Pelosi, Jr, S. A. Strickberger, and F. Morady, “Clinical significance of early recurrences of atrial fibrillation after pulmonary vein isolation,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 40, pp. 100–104, 2002.
- [41] H. Oral, C. Scharf, A. Chugh, B. Hall, P Cheung, E. Good, S. Veerareddy, F. Pelosi, Jr., and F. Morady, “Catheter ablation for paroxysmal atrial fibrillation: Segmental pulmonary vein ostial

- ablation versus left atrial ablation,” *Circulation*, vol. 108, pp. 2355–2360, 2003.
- [42] E. Valles, R. Fan, J. F. Roux, C. F. Liu, J. D. Harding, S. Dhruvakumar, M. D. Hutchinson, M. Riley, R. Bala, F. C. Garcia, D. Lin, S. Dixit, D. J. Callans, E. P. Gerstenfeld, and F. E. Marchlinski, “Localization of atrial fibrillation triggers in patients undergoing pulmonary vein isolation,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 52, pp. 1413–20, 2008.
- [43] F. Ouyang, M. Antz, S. Ernst, H. Hachiya, H. Mavrakis, F. T. Deger, A. Schaumann, J. Chun, P. Falk, D. Hennig, X. Liu, D. Bänsch, and K. H. Kuck, “Recovered pulmonary vein conduction as a dominant factor for recurrent atrial tachyarrhythmias after complete circular isolation of the pulmonary veins,” *Circulation*, vol. 111, pp. 127–135, 2005.
- [44] S. Tungjitkusolmun, E. J. Woo, H. Cao, J. Z. Tsai, V. R. Vorperian, and J. G. Webster, “Thermal-electrical finite element modelling for radio frequency cardiac ablation: Effects of changes in myocardial properties,” *Med Biol Eng Comput*, vol. 38, pp. 562–568, 2000.
- [45] P. Jaïs, M. Hocini, L. F. Hsu, P. Sanders, C. Scavee, R. Weerasooriya, L. Macle, F. Raybaud, S. Garrigue, D. C. Shah, P. L. Metayer, J. Clémenty, and M. Haïssaguerre, “Technique and results of linear ablation at the mitral isthmus,” *Circulation*, vol. 110, pp. 2996–3002, 2004.
- [46] M. Hocini, P. Jaïs, P. Sanders, Y. Takahashi, M. Rotter, T. Rostock, L. F. Hsu, F. Sacher, S. Reuter, J. Clémenty, and M. Haïssaguerre, “Techniques, evaluation, and consequences of linear block at the left atrial roof in paroxysmal atrial fibrillation: A prospective randomized study,” *Circulation*, vol. 112, pp. 3688–3696, 2005.
- [47] K. Nademanee, J. McKenzie, E. Kosar, M. Schwab, B. Sunsaneewitayakul, T. Vasavakul, C. Khunnawat, and T. Ngarmukos, “A new approach for catheter ablation of atrial fibrillation: Mapping of the electrophysiologic substrate,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 43, pp. 2044–53, 2004.
- [48] M. D. O’Neill, K. T. Lim, P. Jaïs, M. Hocini, Y. Takahashi, A. Jonsson, F. Sacher, P. Sanders, S. Kodali, L. Arantes, S. Matsuo, S. Knecht, T. Rostock, M. Rotter, J. Clémenty, and M. Haïssaguerre, “Ablation strategies in chronic atrial fibrillation,” in *Catheter ablation of atrial fibrillation*, E. Aliot, M. Haïssaguerre, and W. M. Jackman, Ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2008, ch. 12.
- [49] A. Takahashi, “Catheter ablation is established as a treatment option for atrial fibrillation – Is catheter ablation established as a treatment option of atrial fibrillation?” *Jpn Circ J*, vol. 74, pp. 1972–1977, 2010.
- [50] P. G. Platonov, V. Ivanov, S. Y. Ho, and L. Mitrofanova, “Left atrial posterior wall thickness in patients with and without atrial fibrillation,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 19, pp. 689–692, 2008.
- [51] O. M. Wazni, N. F. Marrouche, D. O. Martin, A. Verma, M. Bhargava, W. Saliba, D. Bash, R. Schweikert, J. Brachmann, J. Gunther, K. Gutleben, E. Pisano, D. Potenza, R. Fanelli, A.

- Rabiele, S. Themistoclakis, A. Rossillo, A. Bonso, and A. Natale, “Radiofrequency ablation vs antiarrhythmic drugs as first-line treatment of symptomatic atrial fibrillation,” *JAMA*, vol. 293, pp. 2634–2640, 2005.
- [52] I. Nault, S. Miyazaki, A. Forclaz, M. Wright, A. Jadidi, P. Jaïs, M. Hocini, and M. Haïssaguerre, “Drugs vs. ablation for the treatment of atrial fibrillation: The evidence supporting catheter ablation,” *Eur Heart J*, vol. 31, pp. 1046–1054, 2010.
- [53] R. Juneja, “Radiofrequency ablation for cardiac tachyarrhythmias: Principles and utility of 3D mapping systems,” *Curr Sci*, vol. 97, pp. 416–424, 2009.
- [54] D. Bhakta and J. M. Miller, “Principles of electroanatomic mapping,” *Indian Pacing Electrophysiol J*, vol. 8, pp. 32–50, 2008.
- [55] J. Dong, T. Dickfeld, D. Dalal, A. Cheema, C. R. Vasamreddy, C. A. Henrikson, J. E. Marine, H. R. Halperin, R. D. Berger, J. A. C. Lima, D. A. Bluemke, and H. Calkins, “Initial experience in the use of integrated electroanatomic mapping with three-dimensional MR/CT images to guide catheter ablation of atrial fibrillation,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 17, pp. 459–466, 2006.
- [56] R. J. Schilling, N. S. Peters, and D. W. Davies, “Simultaneous endocardial mapping in the human left ventricle using a noncontact catheter,” *Circulation*, vol. 98, pp. 887–898, 1998.
- [57] A. Katsivas, P. Ioannidis, C. Vassilopoulos, A. Giotopoulou, and A. G. Manolis, “Electroanatomical mapping and ablation of upper loop reentry atrial flutter,” *Hellenic J Cardiol*, vol. 46, pp. 74–78, 2005.
- [58] H. Calkins, M. R. Reynolds, P. Spector, M. Sondhi, Y. Xu, A. Martin, C. J. Williams, and I. Sledge, “Treatment of atrial fibrillation with antiarrhythmic drugs or radiofrequency ablation,” *Circ Arrhythmia Electrophysiol*, vol. 2, pp. 349–361, 2009.
- [59] R. Cappato, H. Calkins, S. A. Chen, W. Davies, Y. Iesaka, J. Kalman, Y. H. Kim, G. Klein, A. Natale, D. Packer, and A. Skanes, “Worldwide survey on the methods, efficacy, and safety of catheter ablation for human atrial fibrillation,” *Circulation*, vol. 111, pp. 1100–1105, 2005.
- [60] R. Cappato, H. Calkins, S. A. Chen, W. Davies, Y. Iesaka, J. Kalman, Y. H. Kim, G. Klein, A. Natale, D. Packer, A. Skanes, F. Ambrogi, and E. Biganzoli, “Updated worldwide survey on the methods, efficacy, and safety of catheter ablation for human atrial fibrillation,” *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 3, pp. 32–38, 2010.
- [61] P. G. Macedo, S. Kapa, J. A. Mears, A. Fratianni, and S. J. Asirvatham, “Correlative anatomy for the electrophysiologist: Ablation for atrial fibrillation. Part II: Regional anatomy of the atria and relevance to damage of adjacent structures during AF ablation,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 21, pp. 829–836, 2010.
- [62] D. Sánchez-Quintana, J. A. Cabrera, V. Climent, J. Farré, M. C. Mendonça, and S. Y. Ho,



- “Anatomic relations between the esophagus and left atrium and relevance for ablation of atrial fibrillation,” *Circulation*, vol. 112, pp. 1400–1405, 2005.
- [63] T. Kuwahara, A. Takahashi, A. Kobori, S. Miyazaki, Y. Takahashi, A. Takei, T. Nozato, H. Hikita, A. Sato, and K. Aonuma, “Safe and effective ablation of atrial fibrillation: Importance of esophageal temperature monitoring to avoid periesophageal nerve injury as a complication of pulmonary vein isolation,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 20, pp. 1–6, 2009.
- [64] Biosense Webster 社ホームページ, 製品紹介; <http://www.biosensewebster.com/products/> (2011/9/28)
- [65] St. Jude Medical 社ホームページ, 製品紹介; <http://www.sjm.com/corporate/products.aspx> (2011/9/28)
- [66] W. Stevenson, “Irrigated RF ablation: Power titration and fluid management for optimal safety and efficacy,” *Biosense Webster*, 0605002.5, 2005.
- [67] K. Yokoyama, H. Nakagawa, D. C. Shah, H. Lambert, G. Leo, N. Aeby, A. Ikeda, J. V. Pitha, T. Sharma, R. Lazzara, and W. M. Jackman, “Novel contact force sensor incorporated in irrigated radiofrequency ablation catheter predicts lesion size and incidence of steam pop and thrombus,” *Circ Arrhythmia Electrophysiol*, vol. 1, pp. 354–362, 2008.
- [68] Y. Okumura, S. B. Johnson, T. J. Bunch, B. D. Henz, C.J. O’Brien, and D. L. Packer, “A systematic analysis of in vivo contact forces on virtual catheter tip/tissue surface contact during cardiac mapping and intervention,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 19, pp. 632–640, 2008.
- [69] J. D. Burkhardt and A. Natale, “New technologies in atrial fibrillation ablation,” *Circulation*, vol. 120, pp. 1533–1541, 2009.
- [70] L. D. Biase, A. Natale, C. Barrett, C. Tan, C. S. Elayi, C. K. Ching, P. Wang, A. Al-Ahmad, M. Arruda, J. D. Burkhardt, B. J. Wisnoskey, P. Chowdhury, S. D. Marco, L. Armaganijan, K. N. Litwak, R. A. Schweikert, and J. E. Cummings, “Relationship between catheter forces, lesion characteristics, “popping,” and char formation,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 20, pp. 436–440, 2009.
- [71] D. A. Cesario, A. Mahajan, and K. Shivkumar, “Lesion-forming technologies for catheter ablation of atrial fibrillation,” *Heart Rhythm*, vol.4, pp. S44–S50, 2007.
- [72] V. Y. Reddy, P. Neuzil, A. d’Avila, M. Laragy, Z. J. Malchano, S. Kralovec, S. J. Kim, and J. N. Ruskin, “Balloon catheter ablation to treat paroxysmal atrial fibrillation: What is the level of pulmonary venous isolation?” *Heart Rhythm*, vol. 5, pp. 353–360, 2008.
- [73] Y. V. Belle, P. Janse, M. J. Rivero-Ayerza, A. S. Thornton, E. R. Jessurun, D. Theuns, and L. Jordaens, “Pulmonary vein isolation using an occluding cryoballoon for circumferential ablation: Feasibility, complications, and short-term outcome,” *Eur Heart J*, vol. 28, pp. 2231–2237, 2007.

- [74] S. R. Dukkupati, P. Neuzil, J. Skoda, J. Petru, A. D'Avila, S. K. Doshi, and V. Y. Reddy, "Visual balloon-guided point-by-point ablation: Reliable, reproducible, and persistent pulmonary vein isolation," *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 3, pp. 266–273, 2010.
- [75] P. Kanagaratnam, M. Koa-Wing, D. T. Wallace, A. S. Goldenberg, N. S. Peters, and D. W. Davies, "Experience of robotic catheter ablation in humans using a novel remotely steerable catheter sheath," *J Interv Card Electrophysiol*, vol. 21, pp. 19–26, 2008.
- [76] A. Aryana, A. D'Avila, E. K. Heist, T. Mela, J. P. Singh, J. N. Ruskin, and V. Y. Reddy, "Remote magnetic navigation to guide endocardial and epicardial catheter mapping of scar-related ventricular tachycardia," *Circulation*, vol. 115, pp. 1191–1200, 2007.
- [77] P. Spector, M. R. Reynolds, H. Calkins, M. Sondhi, Y. Xu, A. Martin, C. J. Williams, and I. Sledge, "Meta-analysis of ablation of atrial flutter and supraventricular tachycardia," *Am J Cardiol*, vol. 104, pp. 671–677, 2009.

図表

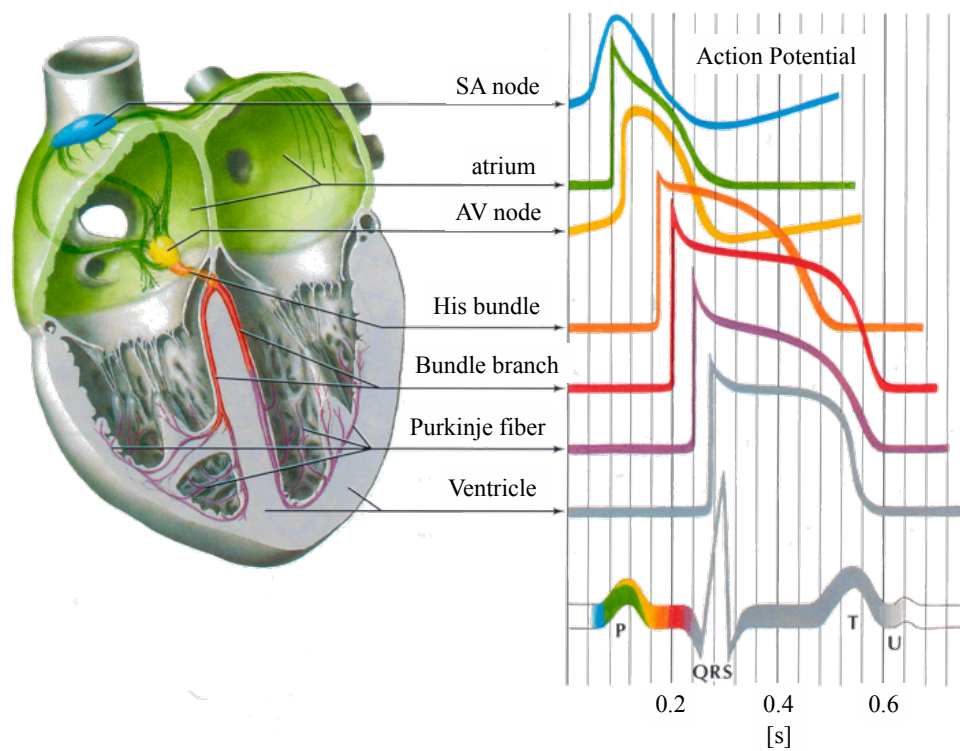


図 2-1 心臓の刺激伝導系と各部位における活動電位波形 (文献[1]より引用、一部  
 改変)

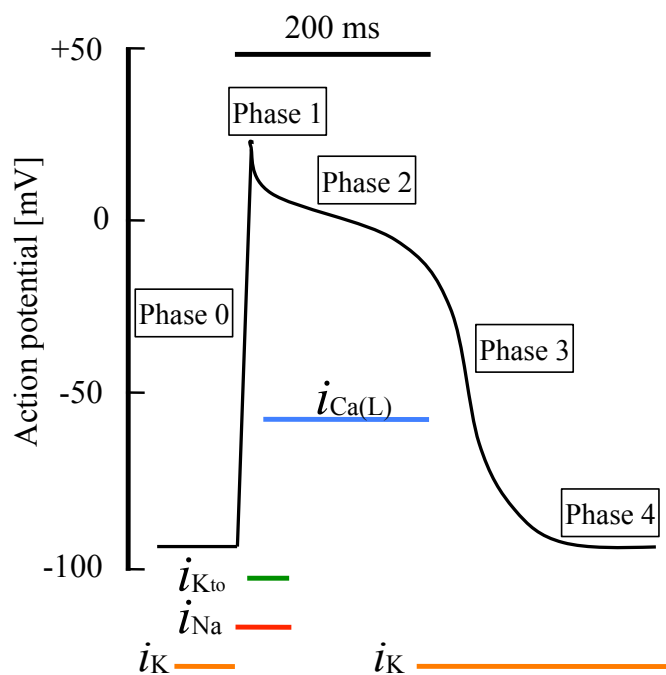


図 2-2 心筋細胞の活動電位と各イオンの流入

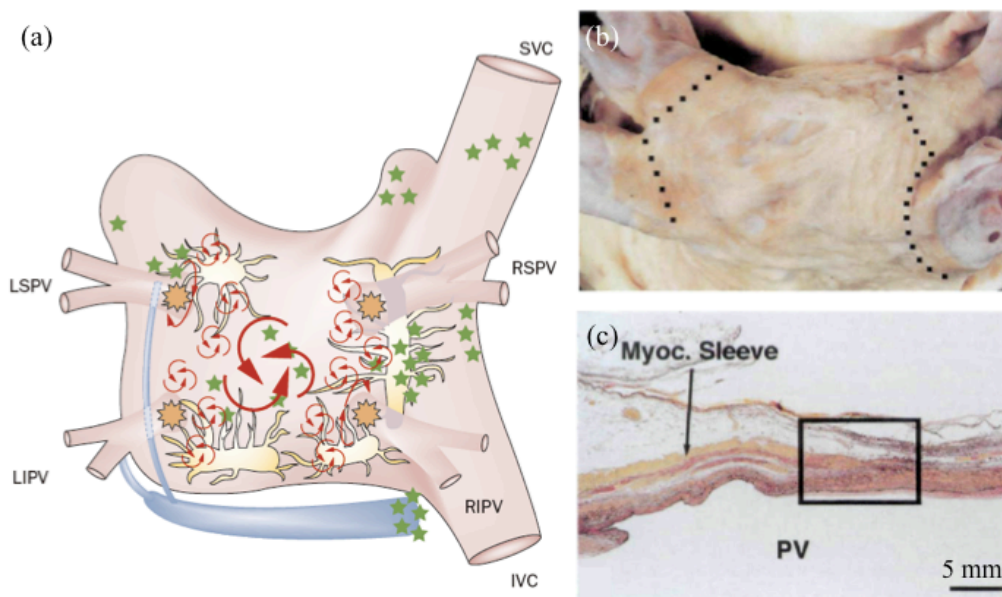


図 2-3 心房細動の発生機序 (文献[18,19]より引用)

(a) 心房細動の発作原因となる肺静脈入口部で発生する異常興奮、および左房内の異常興奮旋回を維持する心房細動基質

LSPV: 左上肺静脈、LIPV: 左下肺静脈、RSPV: 右上肺静脈、RIPV: 右下肺静脈、SVC: 上大静脈、IVC: 下大静脈

(b) 肺静脈の左房への接合部の拡大写真

図中の黒点線は肺静脈と左房の境界を示す。

(c) 左房から肺静脈への心房筋の迷入部位における顕微標本の強拡大画像

PV: 肺静脈、Myoc. Sleeve: 心筋迷入

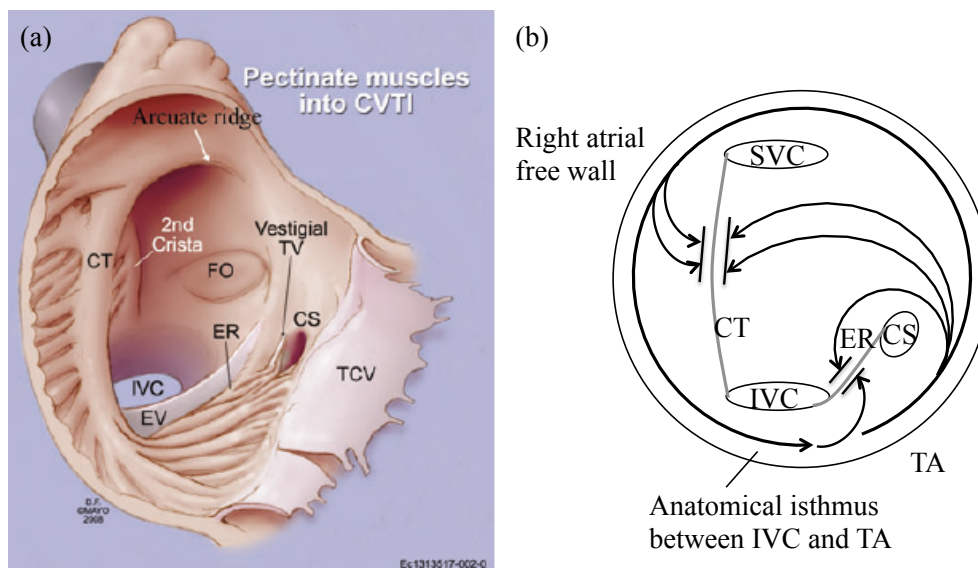


図2-4 通常型心房粗動の発生機序 (文献[23]より引用)

(a) 右房における下大静脈と三尖弁輪間の解剖学的峡部

IVC: 下大静脈、ER: ユースタキオ稜、EV: ユースタキオ弁、CS: 冠状静脈洞、TCV: 三尖弁、FO: 卵円窩、CT: 分界稜

(b) 通常型心房粗動における興奮旋回の伝播経路の模式図

興奮回路は三尖弁輪、分界稜、下大静脈、ユースタキオ稜を機能的あるいは解剖学的障壁として成立している。

SVC: 上大静脈、IVC: 下大静脈、ER: ユースタキオ稜、CS: 冠状静脈洞、TA: 三尖弁輪、CT: 分界稜

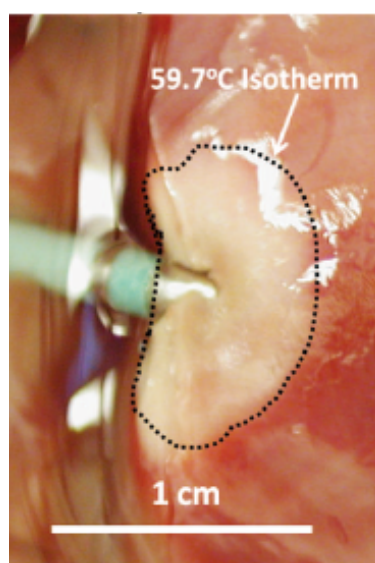


図 2-5 摘出心筋組織に対し高周波通電を行った際の組織断面写真 (文献[32]より引用)

先端電極長さ 8 mm の高周波アブレーションカテーテルを用いて、出力 20 W、通電時間 1 min 程度で高周波通電を行った場合

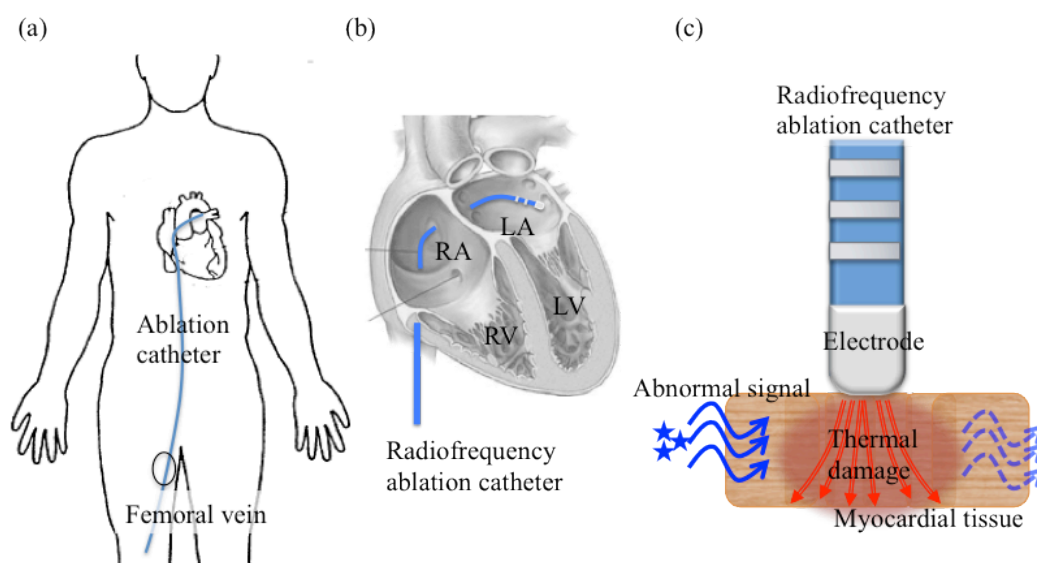


図 2-6 高周波カテーテルアブレーションによる心房細動治療の手順 (文献[36]より引用、一部改変)

(a) 鼠蹊部より大腿静脈に高周波アブレーションカテーテルを挿入する。

(b) 右心房から心房中隔の卵円窩を穿刺して左心房へ通じる孔を開け、左心房にカテーテル先端を挿入する。高周波通電部位を決定する。

RA: 右心房、LA: 左心房、RV: 右心室、LV: 左心室

(c) 心筋組織に対して高周波通電を行い、肺静脈と左房間の電氣的隔離を行う。



表 2-1 健常者の肺静脈および左心房壁の各部位における組織厚み (文献[27]より引用)

(a) 肺静脈入口部における組織厚み

<b>The thickness of Pulmonary vein orifices in normal hearts</b>				
	Left superior	Left inferior	Right superior	Right inferior
<b>Average [mm]</b>	3.7 ± 0.6	2.5 ± 0.3	3.5 ± 0.5	2.7 ± 0.4
	(2.9 ~ 4.5)	(2 ~ 3.4)	(2.7 ~ 4.3)	(2.5 ~ 3.5)

(b) 左心房壁における組織厚み

<b>The thickness of left atrial wall in normal hearts</b>					
	Anterior	Posterior	Superior	Lateral	Vestibule
<b>Average [mm]</b>	3.3 ± 1.2	4.1 ± 0.7	4.5 ± 0.6	3.9 ± 0.7	2.3 ± 0.7
	(1.5 ~ 4.8)	(2.5 ~ 5.3)	(3.5 ~ 6.5)	(2.5 ~ 4.9)	(1.2 ~ 3.3)

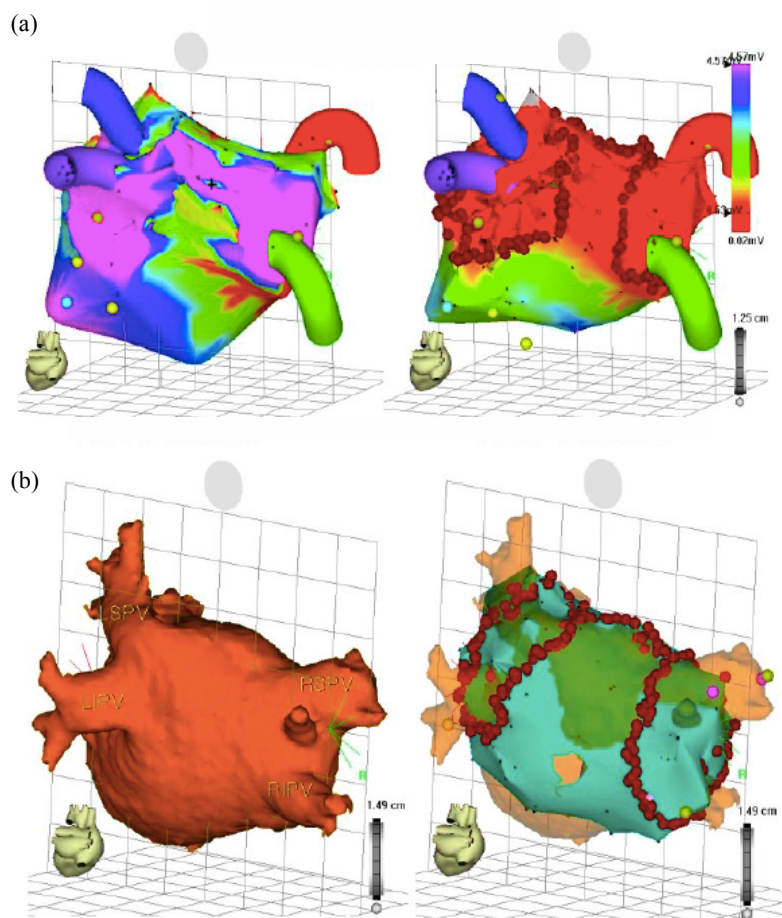


図 2-7 Carto システムによる 3 次元心内電位マッピング (文献[54]より引用)  
 (a) 高周波カテーテルアブレーションによる電気伝導ブロックライン作成前 (左)、  
 および作成後 (右) における左房後側から見た左房の 3 次元心内電位マッピング画  
 像

同側上下の肺静脈を囲むように円周状に一点ずつ高周波カテーテルアブレーションを行うと、電気伝導ブロックラインが作成された円周内部での心内電位が小さくなり、肺静脈と左房が電氣的に隔離されたことがわかる。疑似カラーにて電位の高低を示し、図中の赤点は高周波通電部位を示す。

(b) 左房の 3 次元 CT 画像 (左) と電位マッピング画像を重ね合わせた画像 (右)  
 CT 画像と電位マッピング画像を重ね合わせることで、解剖学的な位置関係を把握しながら高周波通電を行う。

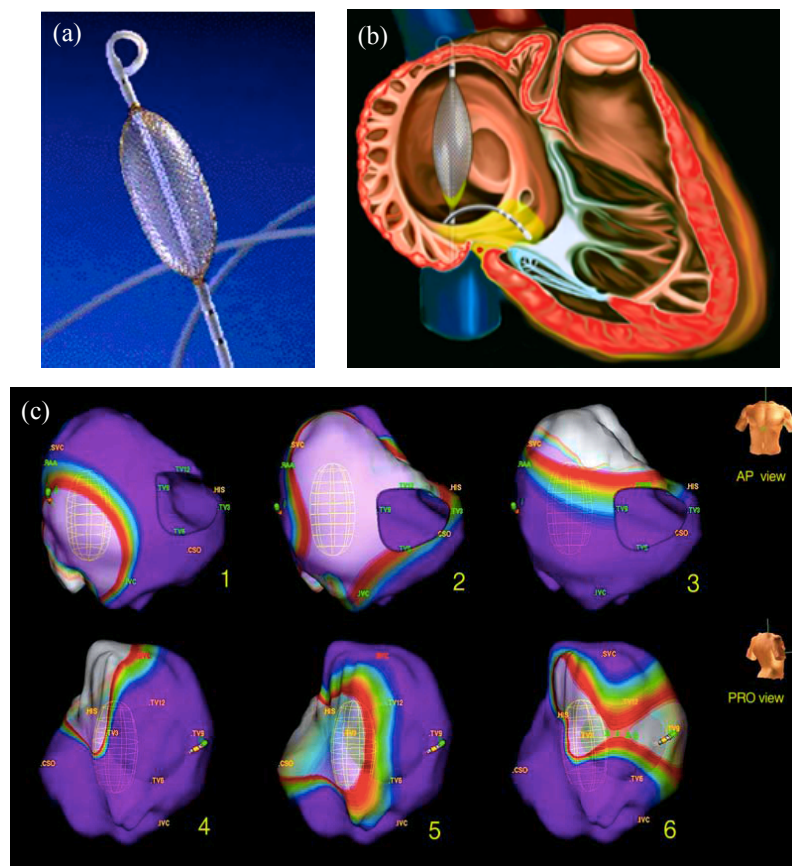


図 2-8 Ensite システムによる 3 次元心内電位マッピング (文献[54,57]より引用)

(a) バルーン状の多電極アレイカテーテル

バルーン上に 64 電極が設置されている。

(b) 右房内腔に多電極アレイカテーテルを留置している様子

(c) 右房内腔に多電極アレイカテーテルを留置して取得したリアルタイム電位マッピング画像

1 心拍ごとの興奮伝播の様子をリアルタイムに表示することができる。疑似カラーにて心内電位の高低を示す。

表 2-2 高周波カテーテルアブレーションによる主な副作用とその発生率 (文献 [58-60]より引用)

	<b>Cardiac tamponade</b>	<b>Stroke</b>	<b>Atrio-esophageal fistula</b>	<b>Diaphragmatic paralysis</b>	<b>PV stenosis / occlusion</b>	<b>Death</b>	<b>Total</b>
H. Calkins, et al., Electronic search of EMBASE and MEDLINE (1990 ~ 2007) [49]	0.8%	0.3%	0.0%	–	1.6%	0.7%	4.9%
R. Cappato, et al., Worldwide survey 181 centers (1995 ~ 2002) [50]	1.22%	0.28%	–	0.11%	<2%	0.05%	5.9%
R. Cappato, et al., Worldwide survey 20825 procedures at 182 centers (2003 ~ 2006) [51]	1.31%	0.23%	0.04%	0.17%	0.29%	0.15%	4.54%

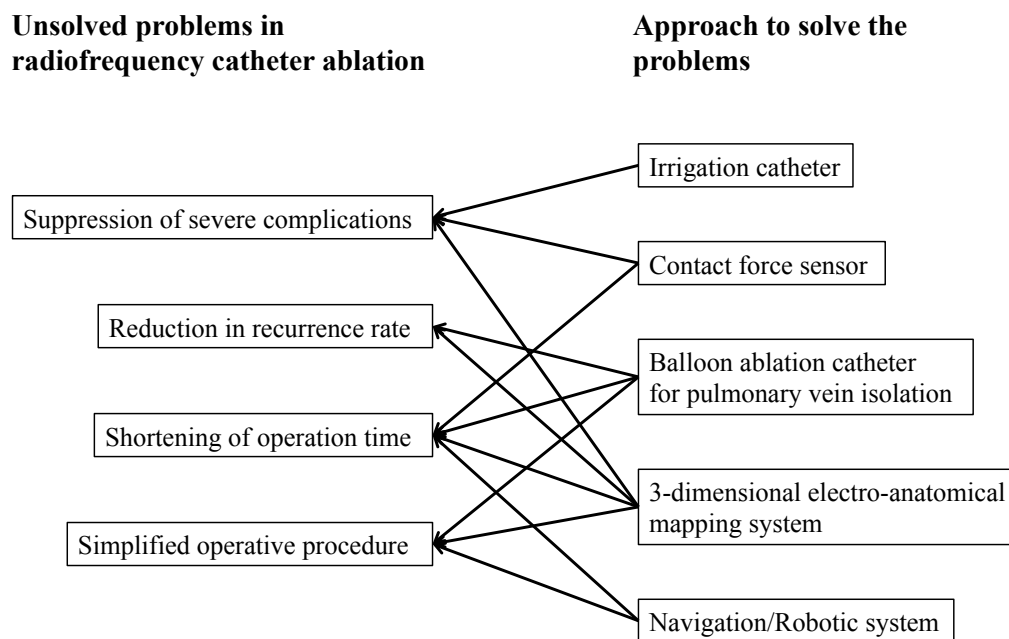


図 2-9 高周波カテーテルアブレーションによる心房細動治療の課題と、それに対して近年行われている対策

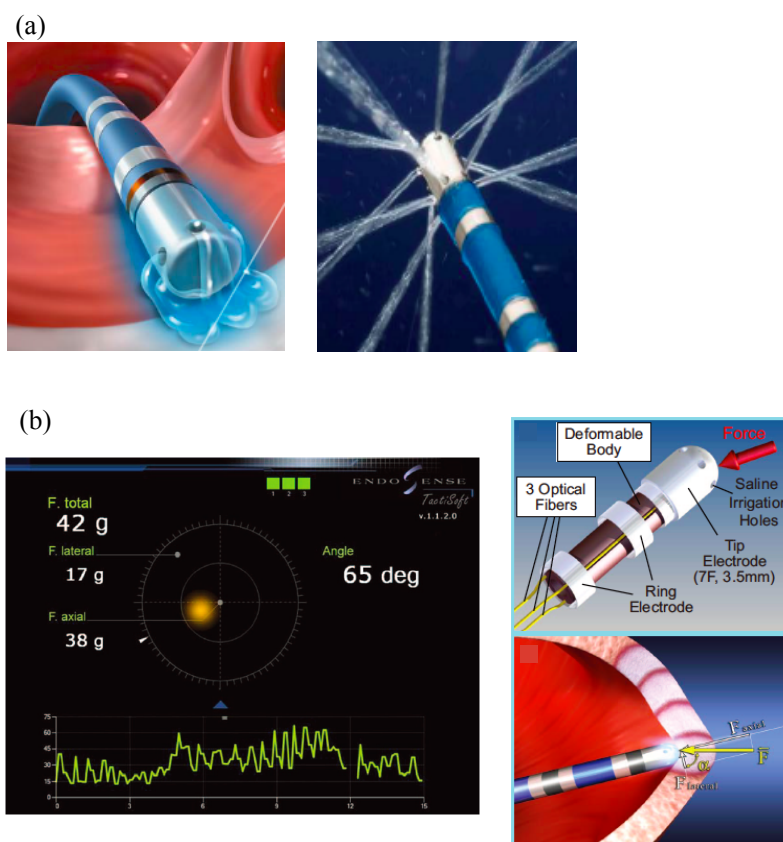


図 2-10 近年開発された多機能アブレーションカテーテル (文献[64,65,67,69]より引用)

(a) 冷却機能を搭載した高周波アブレーションカテーテル

左図: Biosense Webster 社の ThermoCool®、右図: St. Jude Medical 社の Cool Path Duo®

(b) 接触圧センサーを搭載した Endosense 社の高周波アブレーションカテーテル Tacti Cath®

左図: 付加荷重およびカテーテルの組織に対する接触角度の表示、右図: カテーテル内部構造の概要およびカテーテルの組織接触状態

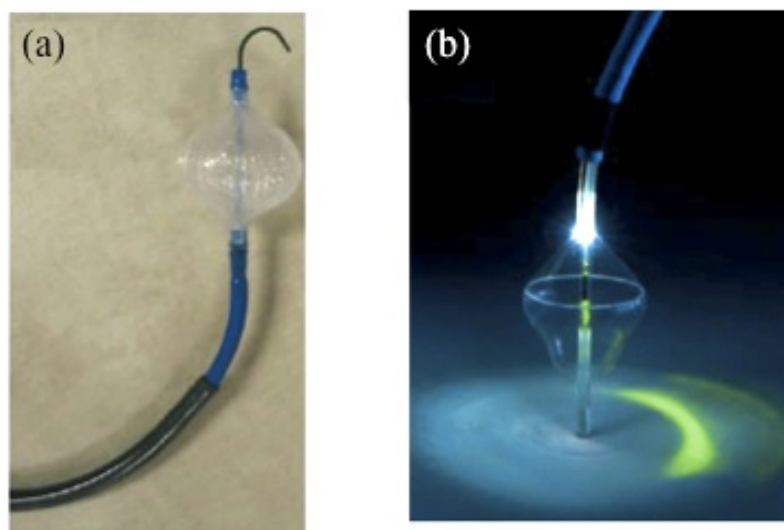


図 2-11 肺静脈隔離専用開発されたバルーンアブレーションカテーテル (文献 [71,72]より引用)

(a) 組織の凍結融解壊死を利用した Medtronic 社のクライオアブレーションカテーテル Arctic Front®

(b) レーザ光エネルギーの熱的作用を利用した CardioFocus 社のレーザアブレーションカテーテル

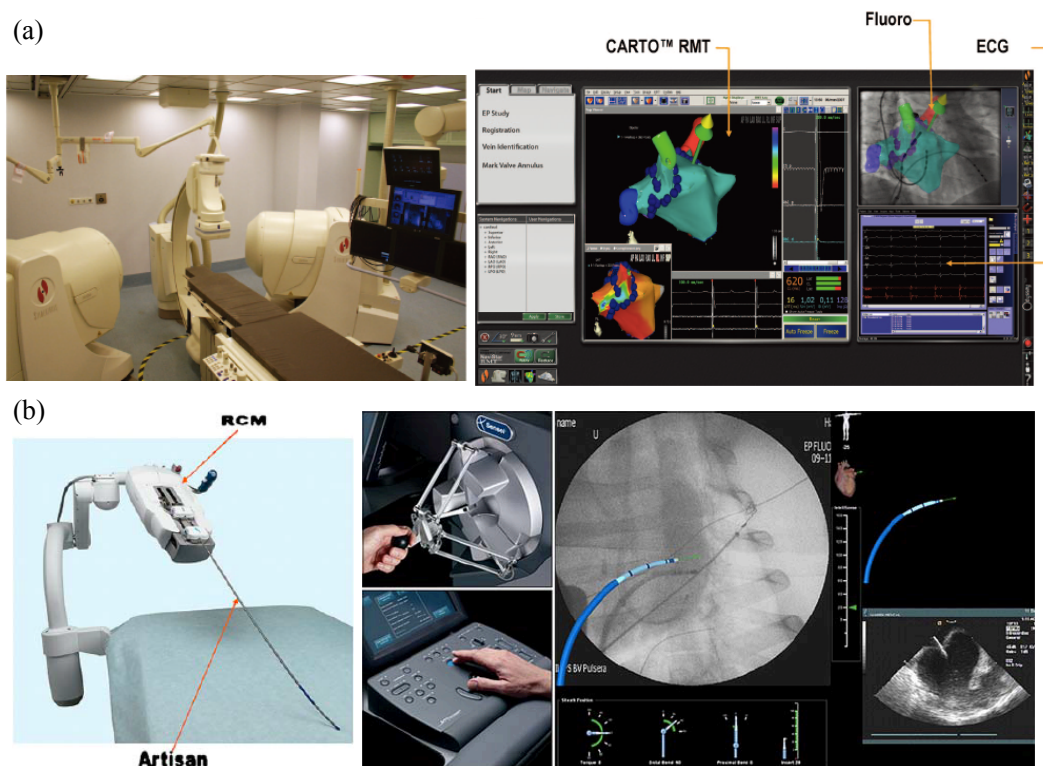


図 2-12 カテーテル操作の自動化を目的に開発されたナビゲーションシステムとロボット制御システム (文献[69,75]より引用)

(a) Stereotaxis 社の磁気ナビゲーションシステム

磁場を制御することで磁気センサーを内蔵したカテーテルを心内腔において遠隔操作する。

(b) Hansen Medical 社のロボット制御システム

カテーテル操作部を専用の装置に固定し、ロボット操縦によってカテーテルを遠隔操作する。



## 第3章 光増感反応による癌治療 (光線力学的治療)

### 3.1 緒言

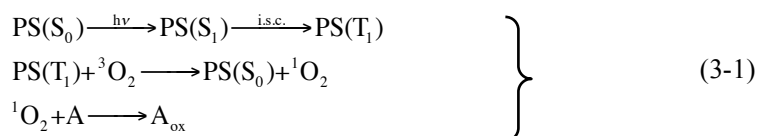
光増感反応は、光感受性物質、光、および酸素の光化学反応で活性酸素を発生する過程であり、発熱がほとんどない。活性酸素による殺細胞効果を利用して、種々の用途に応用できる。特に光感受性物質の腫瘍組織集積性を利用し、悪性腫瘍に対する選択的治療 (光線力学的治療、Photodynamic therapy; PDT) として臨床応用されている。本章では、光線力学的治療の発展の経緯、光増感反応の基本原理に関して述べ、次いで悪性腫瘍に対する光線力学的治療に関して述べる。

### 3.2 光増感反応の基礎

光増感反応の基礎として、光感受性物質、光、および酸素の光化学反応における内部エネルギー機構、光感受性物質が光線力学的治療に臨床応用されるまでの経緯、臨床で使用されている光感受性物質に関して述べる。

#### 3.2.1 光増感反応の原理

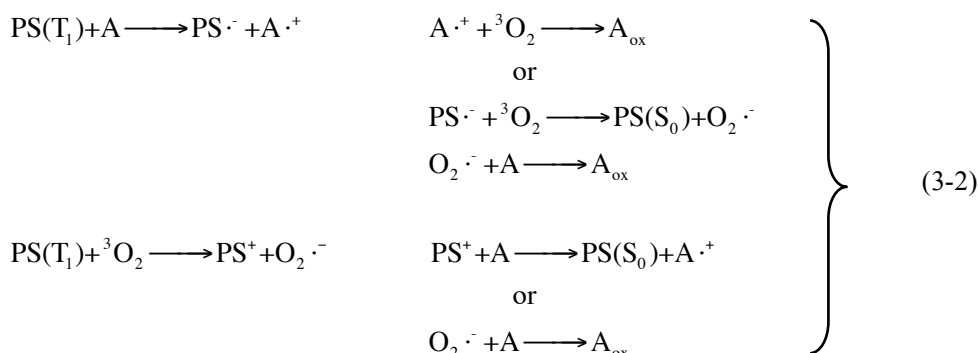
光増感反応の殺細胞効果は、光を吸収して励起状態となった光感受性物質 (Photosensitizer; PS) が酸素と反応して得られる活性酸素 (主に、一重項酸素) の強い酸化作用によるものである [1,2]。図 3-1 に光感受性物質と酸素の光化学反応におけるエネルギーダイアグラムを示す。基底状態の光感受性物質  $PS(S_0)$  はその吸収ピーク波長域に発振波長を持つ光で励起すると励起状態、主に励起一重項状態  $PS(S_1)$  に遷移する。その一部は蛍光を発して元の基底状態に戻るが、大部分は項間交差によりエネルギーの低い励起三重項状態  $PS(T_1)$  に非放射的に移行する。一般に光感受性物質の励起一重項状態の寿命は  $10^{-9} \sim 10^{-8}$  s であり、励起三重項状態の寿命はその  $10^3$  倍以上長いため、励起一重項状態から直接基底状態に戻らず、励起三重項状態を経て光化学反応が進行する [3,4]。励起三重項状態の寿命が長いのは、励起三重項状態から基底状態の遷移にはスピン反転が必要であり、低い確率でしか起こらないことに起因する。励起三重項状態の光感受性物質が基底状態に遷移する際に、基底三重項状態の組織内溶存酸素  $^3O_2$  へエネルギーを移譲すると一重項酸素  $^1O_2$  が生成される。この一重項酸素が周囲の生体分子と反応して酸化障害を起こす。式 (3-1) に光増感反応における一重項酸素発生の反応式を示す。ここでは生体分子を A と表記する。



この一連の過程は Type II 反応と呼ばれる [5]。一重項酸素は活性酸素の一種であり、強い

酸化作用により脂質、蛋白質、および核酸などを含む生体分子と反応し、細胞の変性・壊死を起こす。細胞内で発生した一重項酸素の寿命は短く、その半減期は 10~320 ns であり、拡散距離は 10~55 nm である [6,7]。一般に細胞の直径は 10~30 μm、ミトコンドリアの直径は 500 nm 程度、細胞膜の厚さは 10 nm 程度であるため、一重項酸素による酸化障害の影響範囲は光感受性物質近傍に限定される [6,8]。このように、発生した一重項酸素による殺細胞効果の範囲はレーザー光が照射された部分に限られるため、局所的な治療が実現する。光増感反応における一重項酸素の産生効率(量子収率)は光感受性物質の種類によって異なり、光感受性物質の光エネルギー吸収特性(モル吸光係数  $\epsilon$ ) と、吸収した光子数に対する一重項酸素の生成数を示す量子収率(一重項酸素生成量子収率  $\Phi_{\Delta}$ ) に依存する [4,8]。

一方、光増感反応の反応過程には、一重項酸素発生が伴わずに生体分子障害を起こす反応経路がある。三重項励起状態の光感受性物質  $PS(T_1)$  は直接周囲の生体分子 A や酸素と一電子酸化還元反応を起こし、フリーラジカル(中間生成物)を生成する。この中間生成物は組織内溶存酸素と反応してフリーラジカル(連鎖反応)を起こし、種々の活性酸素を産生して組織を酸化障害する。この一連の過程は Type I 反応と呼ばれ [5]、以下の反応式 (3-2) で表される。



Type I 反応は Type II 反応に比べるとその細胞障害過程が複雑である。光感受性物質の多くは光励起によってより単純な過程である Type II 反応を起こして効率的に一重項酸素を発生し、Type II 反応を基点とする酸化作用による細胞障害が支配的であると考えられる [10,11]。ただし、生体内では光感受性物質はそのほとんどが蛋白質と結合状態で存在しているため [12]、実際の Type I あるいは Type II 反応の割合は明確でない。

### 3.2.2 光線力学的治療の発展の経緯

1900年代の初頭に、アクリジン色素などのある種の化学物質と光を組み合わせることで、殺細胞効果が得られることが明らかになり、この作用は光線力学的作用(Photodynamic action)、あるいは光増感作用(Photosensitization reaction)と呼ばれた [13,14]。その後、種々の色素が光感受性物質として報告され、ある種のポルフィリン(Porphyrin)系化合物において強い光増感作用と悪性腫瘍への親和性が明らかになり、光感受性物質の可視光励起によ

る光線力学的治療への研究が始まった [13]。ヒトを対象とした研究は、1913年に Meyer-Betz が自分の手に対してヘマトポルフィリン (Hematoporphyrin) を使用した光増感反応を試みたのが初めである [13]。1955年には Schwartz らが光感受性物質ヘマトポルフィリン誘導体 (Hematoporphyrin derivative; HPD) の合成に成功した [15]。1960年代には Lipson らによって種々の悪性腫瘍に対するヘマトポルフィリン誘導体の特異的な腫瘍組織集積性が確認され、それ以来悪性腫瘍の治療を目的とした光線力学的治療に関する基礎研究が数多く行われた [16-18]。1975年には Dougherty らがマウスに作成した乳癌に対してヘマトポルフィリン誘導体と赤色光を用いた光線力学的治療を行って抗腫瘍効果を確認、その後臨床応用を目指した研究が始まった [19]。臨床報告は、1975年以降に Dougherty らおよび Kelly らがヘマトポルフィリン誘導体を用いて種々の悪性腫瘍に対して抗腫瘍効果を確認したのが始まりである [20,21]。日本では、1980年に早田らによって中心型肺癌に対する気管支鏡下での光線力学的治療が行われ、早期肺癌治療における光線力学的治療の有効性が示された [22]。これ以後、我が国において光線力学的治療の基礎的および臨床的研究が盛んに行われるようになった [23]。光線力学的治療は、1993年にヘマトポルフィリン誘導体を精製してより光感受性を高めたポルフィマーナトリウム (Porfimer sodium、Photofrin®) とレーザ光を組み合わせた癌治療法としてカナダで認可され、その後日本やアメリカ、ヨーロッパで認可され、世界各国で広く臨床使用されている。

### 3.2.3 臨床で使用されている光感受性物質

悪性腫瘍に対する光線力学的治療では、以下の特性をもつ光感受性物質が用いられる。

- i) 化学的に安定な構造をもち、暗所において生体毒性を示さない。
- ii) 腫瘍組織集積性があり、かつ健常組織から速やかに代謝・排泄される。
- iii) 組織透過性の高い長波長領域 600~900 nm に一重項の吸収帯 (Q 帯) を持つ。

短波長側は治療深度より、長波長側は反応効率より決まる。600 nm 以下では水およびヘモグロビンなど生体物質による吸収が顕著になるため、有効な治療深度が得られなくなる。900 nm 以上では Type II 反応が起こりにくくなり、一重項酸素産生効率が著しく下がる。

- iv) 励起一重項状態から励起三重項状態への項間交差が効率的に起こる。

上記の条件を満たす光線力学的治療用の光感受性物質として最初に認可され、世界で最も普及しているのがポルフィマーナトリウムであるが、いくつか問題がある。同物質を用いた光線力学的治療では、体内からの薬剤排泄速度が遅いため、治療後 1 ヶ月間程度の遮光生活が必要である。Q 帯の波長 630 nm における生体の光侵達長は 1~3 mm 程度であるため、深部の治療ができない [24, 25]。励起光の吸収係数が低く、混合物であり成分組成が一定でない。近年では光感受性物質としてより優れた特性をもつ新しい光線力学的治療薬が開発されている。臨床で用いられている光感受性物質を表 3-1 に [26]、各光感受性物質の特性

を表3-2にまとめる [26-30]。図3-2にそれぞれの光感受性物質の化学構造式を示す [31-35]。

光感受性物質はその構造によっていくつかの種類に分けることができる。ポルフィマーナトリウムに代表されるポルフィリン系化合物は、4つのピロールがメチン基 ( $—CH=$ ) で結合した環状化合物で、ヘモグロビンの基本骨格となる構造体である。ポルフィリン系の化合物は  $\pi$  電子の非局在化に伴い可視光領域に吸収を持つ。ポルフィマーナトリウムの場合は、400 nm 付近に強い吸収帯 (Soret 帯) および、500 ~ 630 nm に数個の比較的小さな吸収帯 (Q 帯) を有する。組織透過性を重視し、光線力学的治療に用いる励起波長は Q 帯の中で最も弱い吸収ピーク波長である 630 nm を採用している。5-アミノレブリン酸 (5-Aminolevulinic acid; 5-ALA) はそれ自体は光感受性物質ではなく、ヘム合成経路におけるポルフィリンの前駆物質である。細胞内で代謝されてプロトポルフィリン IX (Protoporphyrin IX) になり、光増感作用を示す。ポルフィリン系化合物より長波長で励起する光感受性物質として、ポルフィリンのピロール環 2 重結合の一つを還元したクロリン (Chlorin) 系化合物、二つの向かい合う還元ピロールを有するバクテリオクロリン (Bacteriochlorin) 系化合物、および合成ポルフィリンとしてフタロシアニン (Phthalocyanine) 系化合物などが開発された。クロリン系化合物は 640 ~ 700 nm に Q 帯をもち、励起光の吸収係数が高いことが特徴である。その中でもタラポルフィンナトリウムは、660 nm 帯にモル吸光係数  $\epsilon = 4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  の強い吸収を示す [29]。この物質はポルフィマーナトリウムと比較して腫瘍組織集積性が高く、水溶性であり、健常組織からの排泄が速いため遮光期間を1ヶ月から1週間程度に短縮することができる [24]。

我が国では、光線力学的治療用の光感受性物質が3種類認可されている。1994年10月にヘマトポルフィリン誘導体の精製物質であるポルフィマーナトリウム (Porfimer sodium、Photofrin®) が早期肺癌、表在型食道癌、表在型早期胃癌、子宮頸部初期癌、および子宮頸部異形成に対する治療薬として厚生労働省から承認された [31]。2003年10月にクロリン系の光感受性物質であるタラポルフィンナトリウム (Talaporfin sodium、Laserphyrin®) が早期肺癌の治療薬として認可された [35]。また、同時期にベンゾポルフィリン誘導体であるベルテポルフィン (Verteporfin、Visudyne®) が血管新生を伴う非腫瘍病変である加齢性黄斑変性症の治療薬として認可された [33]。

### 3.3 光線力学的治療による悪性腫瘍の選択的治療

光線力学的治療は光感受性物質の腫瘍組織に対する特異的集積性を利用して、光増感反応により発生した活性酸素の殺細胞効果を応用し、悪性腫瘍に対する選択的治療として臨床応用されている。本部では、光線力学的治療の運用および光線力学的治療の抗腫瘍効果に関して述べる。

### 3.3.1 光線力学的治療の運用

光線力学的治療では、光感受性物質の投与および腫瘍組織への光照射という 2 段階の過程で治療を行う。図 3-3 に光線力学的治療の治療手順および作用機序を示す [36]。表 3-3 に臨床で使用されている光感受性物質を用いた光線力学的治療における一般的な治療条件を示す [24]。静脈内に投与した光感受性物質は一旦全身に分布するが、腫瘍組織からの排泄速度が遅いという性質をもつため、時間経過とともに健常組織に比べて腫瘍組織に高濃度で分布する (3.4.2 参照) [2]。光線力学的治療では、健常組織と腫瘍組織における光感受性物質の濃度コントラストが最大となるタイミングを捉え、腫瘍部位まで光ファイバーでレーザー光を伝送して腫瘍組織に対して光照射を行う。腫瘍組織内で光エネルギーを吸収した光感受性物質は、組織内の溶存酸素を活性化して活性酸素を生成する。発生した活性酸素の酸化作用によって腫瘍細胞は死滅し、腫瘍組織を選択的に治療することができる。このように、光感受性物質の腫瘍組織集積性と適切な部位への照射によって選択的に腫瘍組織に障害を与えることができる。

光線力学的治療は、早期癌に対する根治治療と進行癌に対する姑息治療に分けられる。我が国では光線力学的治療は早期癌の根治治療として早期肺癌、早期食道癌、早期胃癌、および早期子宮頸部癌に対して保険適応されている。欧米では進行癌に対する治療として確立されつつあり、進行性食道癌や進行性肺癌による食道あるいは気道狭窄の改善を目指した姑息治療が行われている。このような進行癌に対する治療は、患者の Quality of Life (以下、QOL) の改善と維持を目的としており、生存期間の延長には直接つながらない。光線力学的治療は皮膚、脳、呼吸器、消化器、および泌尿器などの各種臓器腫瘍が主な治療対象であったが、近年では光線力学的治療の原理解明が進み、動脈硬化、子宮内膜症、歯周病、関節リウマチ、骨関節炎、感染症、自己免疫疾患などの悪性腫瘍以外の疾患への応用も試みられている [9,13]。本研究はこの適用拡大の一つと見ることができる。

### 3.3.2 光感受性物質の腫瘍組織集積性

光線力学的治療の悪性腫瘍に対する選択的治療は、光感受性物質の特異的な腫瘍組織集積性と光照射領域の限定という 2 つの要素から成立している。光感受性物質が腫瘍組織集積性を示す理由は光感受性物質の生化学的特徴と、腫瘍組織と健常組織の生理機能の違いがあげられる。光感受性物質は低比重リポ蛋白 (Low density lipoprotein; LDL) やアルブミン、高比重リポ蛋白 (High density lipoprotein; HDL) などの血中蛋白質に高い親和性を示し、このような蛋白質などに結合した状態においても殺細胞効果を示すことが知られている [12,26]。一般に疎水性の光感受性物質は、主に低比重リポ蛋白に結合して血液・組織中に存在する [12,32]。腫瘍組織においては、その増殖を維持するために腫瘍細胞や腫瘍血管内皮細胞の低比重リポ蛋白受容体活性が亢進している。そのため、低比重リポ蛋白と結合した光感受性物質は腫瘍細胞内に能動的に取り込まれ、腫瘍組織内の光感受性物質濃度が増加

する [32]。親水性の光感受性物質は、主にアルブミンや高比重リポ蛋白に対する親和性が高い。このような蛋白質に結合した光感受性物質は、腫瘍内に浸潤した腫瘍関連マクロファージ (tumor associated macrophage; TAM) の貪食作用によって取り込まれ、腫瘍内の光感受性物質濃度増加を起こす [32]。

腫瘍組織の新生血管には数百 nm 程度の孔が多数存在し、物質の血管透過性が亢進している。そのため、分子量の大きい粒子でも取り込まれやすいという特徴がある。また、腫瘍組織はリンパ系が未発達のため、一旦取り込まれた物質は組織内に滞留しやすい。このような過程で物質が腫瘍組織に分布することを EPR 効果 (Enhanced permeability and retention effect) といい、この効果によって健常組織と比較して腫瘍内組織において光感受性物質が蓄積されやすいと考えられる [37]。このようにして、腫瘍組織には健常組織の数倍の濃度の光感受性物質が分布する [2]。ポルフィマーナトリウムの場合は腫瘍組織において健常組織の2~3倍の濃度コントラストがあり、タラポルフィンナトリウムの場合は6~10倍の濃度コントラストが形成されると報告されている [2,38]。

### 3.3.3 光線力学的治療の抗腫瘍効果

光線力学的治療による抗腫瘍効果の主な機序として以下に示す2つが考えられる。

- i) 一重項酸素発生による直接的な殺細胞作用
- ii) 血管内皮細胞障害に伴う血管閉塞による間接的な殺細胞作用

本部では上記二つの抗腫瘍作用の機序に関して説明する。

#### 3.3.3.1 直接的な殺細胞作用

光増感反応によって細胞死に至る経路は、能動的細胞死のアポトーシスと受動的細胞死のネクローシスに分類される。どのような経路で細胞死が起こるかは、光増感反応条件 (光感受性物質濃度、レーザ光の放射照射量など) および、光感受性物質の細胞内分布に依存する [9]。光増感反応で生じた一重項酸素の寿命は短いことから、一重項酸素による酸化作用の直接的な影響範囲は光感受性物質の結合部位から数十nm程度の範囲内に限られる (3.2.2 参照)。そのため、細胞内における光感受性物質の集積部位が光増感反応による細胞死経路に大きく関わっている。

##### 3.3.3.1.1 光感受性物質の細胞内集積

光感受性物質はその物理化学的性質 (化学的構造とその大きさ、水溶性あるいは脂溶性、単量体あるいは重合体) によって細胞内のどの部位に集積しやすいかが異なる [39]。表3-4に各光感受性物質の細胞内集積部位をまとめる [27,40]。光感受性物質の細胞内集積部位としては細胞膜 (Cell membrane)、ライソソーム (Lysosome)、ミトコンドリア (Mitochondria)、小胞体 (Endoplasmic reticulum; ER)、ゴルジ体 (Golgi apparatus) などがある。ポルフィマー

ナトリウムなどの脂溶性を示す光感受性物質は、細胞膜あるいは細胞内に取り込まれると細胞内小器官（主にミトコンドリア）の脂質膜に分布する。一方、タラポルフィンナトリウムなどの水溶性の光感受性物質は、細胞膜に対する透過性がないため、貪食作用（Endocytosis）で細胞内に取り込まれ、主にライソソームに集積する。光感受性物質の細胞内集積部位によって光増感反応による細胞死経路が異なり、一般に細胞内小器官（主にミトコンドリア）の障害の場合にはアポトーシスを誘導し、細胞膜破壊の場合にはネクローシスが起こる [39]。

#### 3.3.3.1.2 アポトーシス

アポトーシスは増殖制御機構でプログラムされた能動的細胞死であり、光増感反応による細胞応答として最も一般的な細胞死経路である [41]。光増感反応によるアポトーシスには種々の経路があり、光増感反応の障害部位すなわち光感受性物質の集積部位に依存する [41]。アポトーシスの制御において中心的な役割を果たしているのがミトコンドリアである。ミトコンドリアの障害によって誘導されるアポトーシスは比較的早い経路で細胞死を起こすと報告されている [26,41]。光増感反応によりミトコンドリアが障害されると、ミトコンドリアの膜透過性亢進とシトクロムc (Cytochrome c) やアポトーシス誘導因子が細胞質へ漏出し、ミトコンドリアの膜電位が低下する。このような現象はミトコンドリア膜透過性遷移孔の形成によるものと考えられている。細胞質に遊離されたシトクロムc はカスパーゼ9 (Caspase 9) と呼ばれる蛋白質分解酵素群を活性化する。活性化したカスパーゼ9は、クロマチンの凝集や核の断片化といったアポトーシスに特有な細胞形態変化や生化学的変化を起こす。また、光増感反応によって抗アポトーシス蛋白であるBcl-2が障害され、細胞のアポトーシス抑制機能が低下し、シトクロムc の漏出を経てアポトーシスが生じることとも報告されている [41]。

#### 3.3.3.1.3 ネクローシス

ネクローシスは外傷などの外的環境要因による受動的細胞死である。ネクローシスは細胞膜の破壊や細胞小器官の破壊により生じる。細胞全体および細胞小器官の膨化が見られ、最終的には細胞膜が破裂する。親油性の高い光感受性物質は細胞膜に集積することが報告されており [39]、光増感反応によって脂質膜の過酸化など膜蛋白の障害を起こす。その結果、細胞外からのイオン流入などにより急激に細胞が膨化し、細胞のネクローシスにつながると考えられている [40,41]。

#### 3.3.3.2 腫瘍血管障害

光感受性物質は腫瘍細胞だけでなく新生血管内皮にも高濃度で分布する。光線力学的治療により新生血管内皮細胞が損傷を受けると、血小板の付着、凝集および脱顆粒が起こり、

血栓が形成される。その結果、酸素や栄養を腫瘍に送る細動脈の閉塞や血管周辺の浮腫形成により、腫瘍組織の低酸素状態を生じ、腫瘍壊死を起こして抗腫瘍効果が得られる [43]。このように光線力学的治療による抗腫瘍効果の機序には直接的な殺細胞効果の他に、血管障害が関与している。光線力学的治療による腫瘍血管障害は種々の光感受性物質で報告されている [44,47]。特にタラポルフィンナトリウムの場合は、抗腫瘍効果には腫瘍組織内の光感受性物質濃度より血漿中濃度が強く関わっていることが知られており、腫瘍血管障害による細胞壊死の方が直接的な細胞死より支配的であると報告されている [48,49]。このような新生血管への光感受性物質の集積性を積極的に利用した手法に、血管を標的とする光線力学的治療 (Vascular-Targeting PDT) がある。光感受性物質投与後15 min程度の腫瘍血管中の光感受性物質濃度が高い状態で光照射を行い、血管内皮を障害して抗腫瘍効果を得る。このような血管標的の光線力学的治療用の光感受性物質としてバクテリオクロロフィル誘導体のTookad® (Pd-bacteriopheophorbide、WST09) があり、前立腺癌などを対象として欧米で臨床研究が行われている [50]。

### 3.3.4 光線力学的治療の課題

光線力学的治療は腫瘍を選択的に治療することができ、生体に対する負担が少ないので、他の治療法との併用も容易で応用範囲が広いが、広く普及するには至っていない。その理由として以下の3つをあげ、それぞれに関して述べる。

- i) 治療効果の判定
- ii) 光過敏症
- iii) 治療の不均一

悪性腫瘍に対する根治治療は切除術が一般的である。病変部位の切除および病理検査を繰り返し行いながら腫瘍切除を進める。病理検査結果から切除部位および追加切除の必要性を判断することができ、診断と治療を兼ねた治療法である。光線力学的治療の場合には局所のおよび選択的治療であり、生体に負担を与えずに治療を行えるという利点がある一方、術中・術直後の診断はできない。治療効果の判断は術後数ヶ月間の経過追観察によるみ行われる。数ヶ月後の検査結果から光線力学的治療の追加または他療法の適用を判断する。このように、光線力学的治療では治療効果の判定に時間を要する。

光過敏症は光線力学的治療の最大の課題である。光感受性物質の投与後から皮膚光過敏性が消失するまでの期間は日光を避けて入院する必要がある。この遮光生活は術後の患者の負担となり、光線力学的治療普及の妨げとなっている。光線力学的治療は侵襲性がなく局所かつ選択的治療であるため臓器機能の温存ができ、切除術に比べて患者のQOLを改善することができる治療法であるにも関わらず、長期遮光入院によってこのQOLの高さが抑制されている。このように光過敏症が長期間に及ぶ理由には、光感受性物質の投与量が多いことがあげられる。光線力学的治療では、光感受性物質の全身投与後、数時間経過し



て健常組織内の光感受性物質濃度が下がった状態で腫瘍組織に対して光照射を行うため、このタイミングで有効濃度を確保する初期投与量を設定する。タラポルフィンナトリウムなどの排泄性および腫瘍組織集積性の高い光感受性物質が開発されたことで、遮光入院期間はポルフィマーナトリウムの場合の半分の2週間程度となり改善の兆しがあるが、それでもなお術後の遮光入院は課題である。

腫瘍に対する光線力学的治療の課題として治療の不均一がある。これは、腫瘍組織における血管構築の不完全性による。図3-4に健常血管と腫瘍血管の違いを示す[51]。健常血管は細動脈、毛細血管、および細静脈から構成され、大中小の秩序ある規則的かつ機能的な構造をしているため血行動態が安定している。一方、腫瘍血管は血管径がまばらで不均一かつ複雑な構造をとり、血管壁細胞の欠如を伴う[52]。このような状態ではところどころに血流の停滞がみられ、光感受性物質は腫瘍組織内に均一に分布しない可能性がある。さらに、腫瘍組織に対して光照射を行い十分な活性酸素産生量を得ようとする、図3-5に示すように光照射中に腫瘍血管が閉塞し[53]、光感受性物質や酸素の供給が途絶えて治療が不均一になる。そのため、血流を維持するために放射照度を下げ、単位時間あたりの活性酸素発生量の少ない弱い条件にて長時間光を照射して光線力学的治療を行うのが一般的である[1,54]。この場合、細胞死の機序は主にアポトーシスであり、細胞内小器官の障害が蓄積されることで緩やかに細胞死を起こす[55]。このように腫瘍組織を対象とした光線力学的治療では、放射照度を上げた強い条件にて光照射を行い短時間で細胞死を得ようすると、上記の理由から治療が不均一になるため弱い条件にせざるを得ない。一方、健常組織内の血管は血行動態が安定しており、強い条件にて光照射を行った場合でも、均一な治療効果が得られる可能性がある(4.1参照)。

### 3.4 結言

本章では、悪性腫瘍に対する光線力学的治療の治療原理、および臨床で使用されている光感受性物質に関して解説し、光線力学的治療における課題点をまとめた。光線力学的治療は局所的かつ選択的な優れた治療である一方、光過敏症や治療不均一などの問題がある。

## 参考文献

- [1] B. C. Wilson and M. S. Patterson, "The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy," *Phys Med Biol*, vol. 53, pp. R61–R109, 2008.
- [2] J. V. Moore, C. M. L. West, and C. Whitehurst, "The biology of photodynamic therapy," *Phys Med Biol*, vol. 42, pp. 913–935, 1997.
- [3] T. Takemura, S. Nakajima, and I. Sakata, "Critical importance of the triplet lifetime of photosensitizer in photodynamic therapy of tumor," *Photochem Photobiol*, vol. 50, pp. 339–344, 1989.
- [4] M. C. DeRosa and R. J. Crutchley, "Photosensitized singlet oxygen and its applications," *Coord Chem Rev*, vol. 233, pp. 351–371, 2002.
- [5] C. S. Foote, "Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems," *Science*, vol. 162, pp. 963–970, 1968.
- [6] R. W. Redmond and I. E. Kochevar, "Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen," *Photochem Photobiol*, vol. 82, pp. 1178–1186, 2006.
- [7] J. S. Dysart and M. S. Patterson, "Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro," *Phys Med Biol*, vol. 50, pp. 2597–2616, 2005.
- [8] J. Moan, K. Berg, E. Kvam, A. Western, Z. Malik, A. Ruck, H. Schneckenburger, "Intracellular localization of photosensitizers," *Ciba Found Symp*, vol. 146, pp. 95–107, discussion 107–111, 1989.
- [9] J. Moan and Q. Peng, "An outline of the history of PDT," in *Photodynamic therapy*, T. Patrice, Ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003, ch. 1.
- [10] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, and Q. Peng, "Photodynamic Therapy: Review," *J Natl Cancer Inst*, vol. 90, pp. 889–902, 1998.
- [11] K. R. Weishaupt, C. J. Gomer, and T. J. Dougherty, "Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor," *Cancer Res*, vol. 36, pp. 2326–2329, 1976.
- [12] J. C. Maziere, P. Morliere, and R. Santus, "New trends in photobiology (invited review)—The role of the low density liprotein receptor pathway in delivery of lipophilic photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours," *J Photochem Photobiol B*, vol. 8, pp. 351–360, 1991.
- [13] D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura, and R. K. Jain, "Photodynamic therapy for cancer," *Nat Rev Cancer*, vol. 3, pp. 380–388, 2003.
- [14] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, and B. W. Handerson, "Photodynamic therapy," *J Natl Cancer*

- Inst*, vol. 90, pp. 889–905, 1998.
- [15] S. Schwartz, K. Abolon, and H. Vermund, “Some relationships of porphyrins, X-rays and tumors,” *Univ Minn Med Bull*, vol. 27, pp. 7–13, 1955.
- [16] R. L. Lipson and E. J. Baldes, “The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative,” *Arch Dermatol*, vol. 82, pp. 508–516, 1960.
- [17] R. L. Lipson, E. J. Baldes, and A. M. Olsen, “The use of an derivative of hematoporphyrin in tumor detection,” *J Natl Cancer Inst*, vol. 26, pp. 1–11, 1961.
- [18] R. L. Lipson, E. J. Baldes, and A. M. Olsen, “Hematoporphyrin derivative: A new aid for endoscopic detection of malignant disease,” *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 42, pp. 623–629, 1961.
- [19] T. J. Dougherty, G. B. Grindey, R. Fiel, K. R. Weishaupt, and D. G. Boyle, “Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light,” *J Natl Cancer Inst*, vol. 55, pp. 115–121, 1975.
- [20] J. F. Kelly and M. E. Snell, “Hematoporphyrin derivative: A possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder,” *J Urol*, vol. 115, pp. 150–151, 1976.
- [21] T. J. Dougherty, J. E. Kaufman, A. Goldfarb, K. R. Weishaupt, D. Boyle, and A. Mittleman, “Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors,” *Cancer Res*, vol. 38, pp. 2628–2635, 1978.
- [22] Y. Hayata, H. Kato, C. Konaka, J. Ono, and N. Takizawa, “Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer,” *Chest*, vol. 81, pp. 269–277, 1982.
- [23] H. Kato, J. Usuda, T. Okunaka, and K. Furukawa, “The history of the study of photodynamic therapy (PDT) and photodynamic diagnosis (PDD) in the department of surgery, Tokyo medical university,” *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 1, pp. 107–110, 2004.
- [24] P. G. Valzavara-Pinton, M. Venturini, and R. Sala, “Photodynamic therapy: Update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology,” *J Eur Acad Dermatol Venereol*, vol. 21, pp. 293–302, 2007.
- [25] L. O. Svaasand and C. J. Gomer, “Optics of tissue,” *Int Soc Opt Eng*, vol. IS5, pp. 114–132, 1989.
- [26] A. C. E. Moor, B. Ortel, and T. Hasan, “Mechanisms of photodynamic therapy,” in *Photodynamic therapy*, T. Patrice, Ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003, ch. 2.
- [27] A. E. O’Connor, W. M. Gallagher, and A. T. Byrne, “Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy,” *Photochem Photobiol*, vol. 85, pp. 1053–1074, 2009.
- [28] R. W. Redmond and J. N. Gamlin, “A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules,” *Photochem Photobiol*, vol. 70, pp. 391–475, 1999.

- [29] C. Hadjur, N. Lange, J. Revstein, P. Monnier, H. van den Bergh, and G. Wagnieres, "Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta (tetrahydroxyphenyl) chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC," *J Photochem Photobiol B*, vol. 45, pp. 170–178, 1998.
- [30] J. D. Spikes and J. C. Bommer, "Photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): A candidate for the photodynamic therapy of tumors," *J Photochem Photobiol B*, vol. 17, pp. 135–143, 1993.
- [31] ワイス株式会社, 武田薬品工業株式会社, フォトフリン®静注用 75 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2008年6月改訂 (新様式第7版)
- [32] J. Osterloh and M. G. H. Vicente, "Mechanisms of porphyrinoid localization in tumors," *J Porphyr Phthalocyanines*, vol. 6, pp. 305–324, 2002.
- [33] ノバルティスファーマ株式会社, ビスダイン®静注用 15 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2007年11月 (新様式第4版)
- [34] R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, X. H. Hu, C. J. H. Childs, and C. H. Sibata, "Photosensitizers in clinical PDT," *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 1, pp. 27–42, 2004.
- [35] 明治製菓株式会社, 注射用レザフィリン®100 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2007年4月 (改訂第2版).
- [36] 明治製菓, 注射用レザフィリン®100mg, 総合製品情報概要, 2005年1月改訂版.
- [37] A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, "Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction," *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 2, pp. 91–106, 2005.
- [38] K. Aizawa, T. Okunaka, T. Ohtani, and I. Kawabe, "Localisation of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in mouse tissues," *Photochem Photobiol*, vol. 46, pp. 789–93, 1987.
- [39] D. Kessel, M. Castelli, and J. Reiners Jr, "What are the targets of photodynamic therapy?" *Proc SPIE*, vol. 4612, pp. 122–127, 2002.
- [40] E. Buytaert, M. Dewaele, and P. Agostinis, "Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1776, pp. 86–107, 2007.
- [41] N. L. Olenick, R. L. Morris, and I. Belichenko, "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why, and how," *Photochem Photobiol Sci*, vol. 1, pp. 1–21, 2002.
- [42] R. D. Almeida, B. J. Manadas, A. P. Carvalho, and C. B. Duarte, "Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1704, pp. 59–86, 2004.
- [43] H. van den Bergh and J. P. Ballini, "Principles of PDT," in *PDT of Ocular Diseases*, E. S. Gragoudas, J. W. Miller, and L. Zografos, Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,

- 2004, pp. 11–42.
- [44] C. He, P. Agharkar, and B. Chen, “Intravital microscopic analysis of vascular perfusion and macromolecule extravasation after photodynamic vascular targeting therapy,” *Pharm Res*, vol. 25, pp. 1873–1880, 2008.
- [45] V. H. Fingar, T. J. Wieman, S. A. Wiehle, and P. B. Cerrito, “The role of microvascular damage in photodynamic therapy: The effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion,” *Cancer Res*, vol. 52, pp. 4914–4921, 1992.
- [46] F. A. M. Silva and E. L. Newman, “Time-dependent photodynamic damage to blood vessels correlation with serum photosensitizer levels,” *Photochem Photobiol*, vol. 61, pp. 414–416, 1995.
- [47] P. Cramers, M. Ruevekamp, H. Oppelaar, O. Dalesio, P. Baas, and F. A. Stewart, “Foscan® uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy,” *Br J Cancer*, vol. 88, pp. 283–290, 2003.
- [48] C. J. Gomer and A. Ferrario, “Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model,” *Cancer Res*, vol. 50, pp. 3985–3990, 1990.
- [49] S. Mitra and T. H. Foster, “In vivo confocal fluorescence imaging of the intratumor distribution of the photosensitizer mono-L-aspartylchlorin-e6,” *Neoplasia*, vol. 10, pp. 429–438, 2008.
- [50] F. Borle, A. Radu, C. Fontollet, H. van den Bergh, P. Monnier, and G. Wagnieres, “Selectivity of the photosensitizer Tookad® for photodynamic therapy evaluated in the syrian golden hamster cheek pouch tumour model,” *Br J Cancer*, vol. 89, pp. 2320–2326, 2003.
- [51] R. K. Jain, L. L. Munn, and D. Fukumura, “Dissecting tumor pathophysiology using intravital microscopy,” *Nat Rev Cancer*, vol. 2, pp. 266–276, 2002.
- [52] G. M. Tozer, C. Kanthou, and B. C. Baguley, “Disrupting tumor blood vessels,” *Nat Rev Cancer*, vol. 5, pp. 423–435, 2005.
- [53] T. Nagao, M. Takahashim K. Matsuzaki, and H. Minamitani, “Application of bioimaging techniques to mechanistic studies on photodynamic therapy,” *Bioimages*, vol. 11, pp. 53–60, 2003.
- [54] S. K. Bisland, L. Lilge, A. Lin, R. Rusnov, and B. C. Wilson, “Metronomic photodynamic therapy as a new paradigm for photodynamic therapy: Rationale and preclinical evaluation of technical feasibility for treating malignant brain tumors,” *Photochem Photobiol*, vol. 80, pp. 22–30, 2004.
- [55] L. Lilge, M. Portnoy, and B. C. Wilson, “Apoptosis induced in vivo by photodynamic therapy in normal brain and intracranial tumour tissue,” *Br J Cancer*, vol. 83, pp. 1110–1117, 2000.

図表

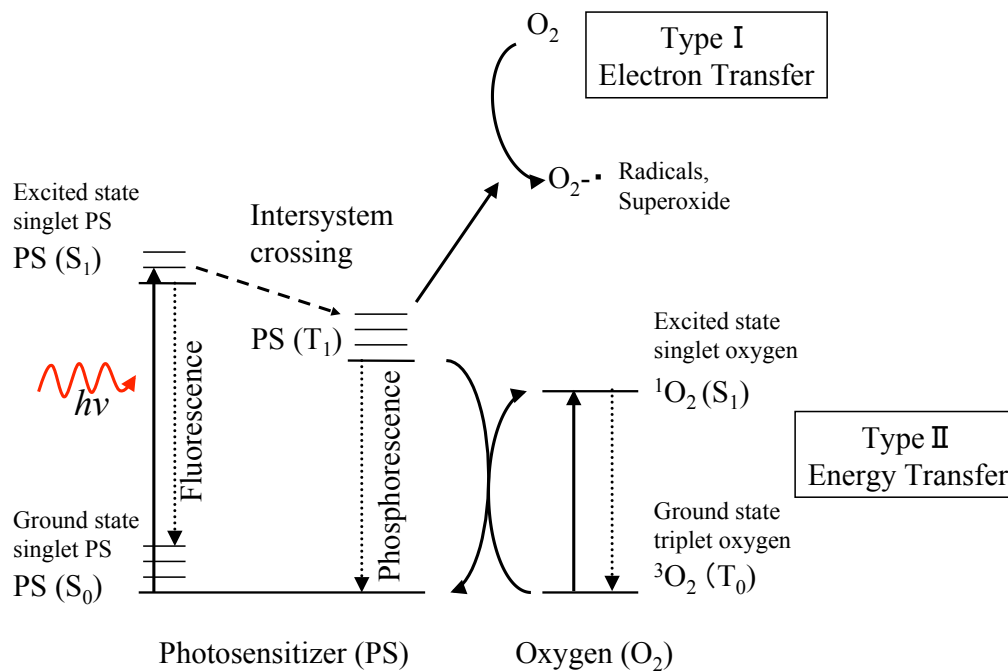


図 3-1 光感受性物質と酸素の光増感反応におけるエネルギーダイアグラム

表 3-1 臨床で使用されている光線力学的治療薬 (文献[26]より引用)

Substance	Trade Mark	Cancer type	Approved status
Porfimer sodium, Hematoporphyrin derivative (HPD)	Photofrin	Lung, Esophagus, Bile duct, Bladder, Brain, Ovarian	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1993 approved in Canada for recurrent superficial papillary bladder cancer</li> <li>• 1994 approved in Japan for superficial esophageal and gastric cancer, early stage lung and cervical cancer and cervical dysplasia</li> <li>• 1995 approved in USA for palliation of esophageal cancer</li> <li>• 1998 approved in USA for late stage lung cancer</li> </ul>
5-aminolevulinic Acid (ALA)	Levulan	Skin, Bladder, Brain, Esophagus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1999 approved in USA for actinic keratoses</li> </ul>
Vertiporfin, Benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD-MA)	Visudyne	Ophthalmic, Pancreatic, Skin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2000 approved in USA for age-related macular degeneration (AMD)</li> <li>• 2003 approved in Japan for AMD</li> </ul>
Temoporfin, Meso-tetra-hydroxyphenyl- chlorine (mTHPC)	Foscan	Head and neck, Esophagus, Lung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2001 approved in EU for palliative treatment of neck and head cancers</li> </ul>
Talaporfin sodium, Mono-L-Aspartyl chlorin e6 (NPe6)	Laserphyrin	Liver, Brain	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2003 approved in Japan for lung cancer</li> <li>• Phase III clinical trial in USA for hepatocellular carcinoma and colorectal cancer metastatic to the liver</li> <li>• Phase I and II clinical trials in USA for benign prostatic hyperplasia</li> </ul>

表 3-2 光感受性物質の特性 (文献[26-30]より引用)

Substance	Structure	Molecular weight	Absorption peak [nm]	Molecular absorption coefficient [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]	Quantum yield of $^1O_2$ generation
Porfimer sodium	Porphyrin	1231.28 ~ 4883.3	633	$1 \sim 2 \times 10^3$ [26,27]	0.25 (in PBS) [28]
5-aminolevulinic Acid (ALA)	Porphyrin precursor	167.59	635	$3 \sim 5 \times 10^3$ [26,27]	0.54 (in PBS) [28]
Vertiporfin	Chlorin	718.79	690	$3.4 \times 10^4$ [26]	0.79 (in PB) [28]
Temoporfin	Chlorin	680.75	652	$2 \sim 3 \times 10^4$ [26,27]	0.3 (in EtOH) [29]
Talaporfin sodium	Chlorin	799.69	664	$4 \times 10^4$ [26]	0.77 (in $D_2O$ ) [30]



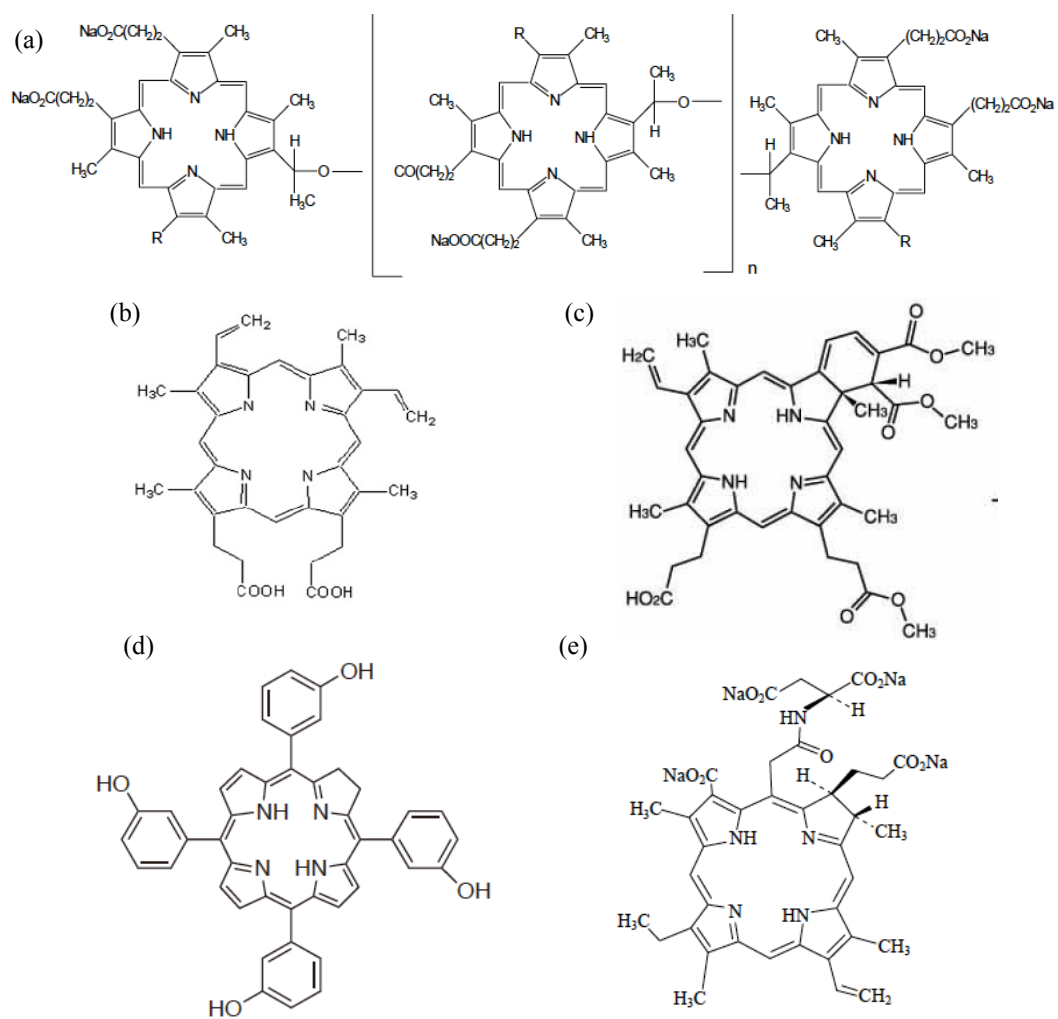


図 3-2 光感受性物質の化学構造 (文献[31-35]より引用)

(a) ポルフィマーナトリウム、(b) プロトポルフィリン IX、(c) ベルテポルフィン、  
(d) テモポルフィン、(e) タラポルフィンナトリウム

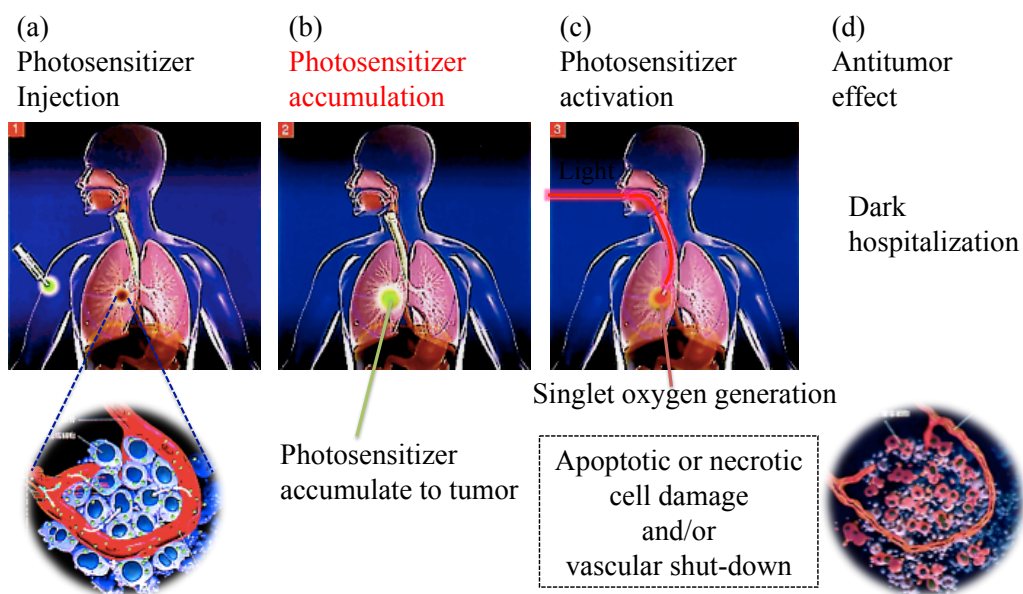


図 3-3 光線力学的治療の手順および作用機序 (文献[36]より引用、一部改変)

- (a) 光感受性物質の静脈投与
- (b) 光感受性物質の腫瘍組織集積
- (c) 腫瘍組織への光照射
- (d) 抗腫瘍効果

表 3-3 光線力学的治療の治療条件 (文献[24]より引用)

Substance	Injection dose [mg/kg]	Commonly employed drug-light interval [hr]	Radiant exposure [J/cm <sup>2</sup> ]	Duration of photosensitization
Porfimer sodium	2.0 ~ 3.0 (i.v.)*	24 ~ 72	50 ~ 200	4 ~ 6 weeks
5-Aminolevulinic Acid (5-ALA)	0.5 ~ 10 (oral)**	4 ~ 6	50 ~ 200	1 ~ 2 days
Verteporfin	0.15 ~ 0.5 (i.v.)*	0.25 ~ 2.5	50 ~ 200	4 ~ 7 days
Temoporfin	0.1 ~ 0.3 (i.v.)*	24 ~ 96	8 ~ 12	< 6 weeks
Talaporfin sodium	0.5 ~ 3.5 (i.v.)*	2 ~ 6	25 ~ 100	3 ~ 14 days

\*i.v.: intravenous injection

\*\*oral: oral injection

表 3-4 光感受性物質の細胞内集積部位 (文献[27,40]より引用)

<b>Substance</b>	<b>Water solubility</b>	<b>Subcellular localization</b>	<b>Primary mechanism of photodynamic action</b>
Porfimer sodium	hydrophobic hydrophobic	Golgi apparatus, Plasma membrane, Mitochondria	Vascular damage and ischemic tumor cell necrosis
5-Aminolevulinic Acid (5-ALA)	hydrophilic	Mitochondria, Cytosol, Cytosolic membrane	Direct tumor cytotoxicity
Verteporfin	hydrophobic	Mitochondria	Vascular damage
Temoporfin	hydrophobic	Endoplasmic reticulum, Mitochondria	Vascular damage and direct tumor cytotoxicity
Talaporfin sodium	hydrophilic	Lysosome, Endosome	Vascular damage and direct tumor cytotoxicity

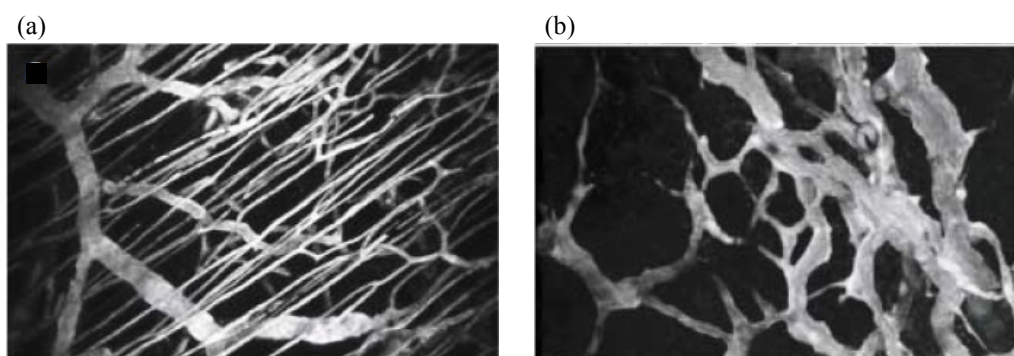


図 3-4 健全組織と腫瘍組織の血管構築の違い (文献[51]より引用)

(a) 健全組織の血管構築

(b) 腫瘍組織の血管構築

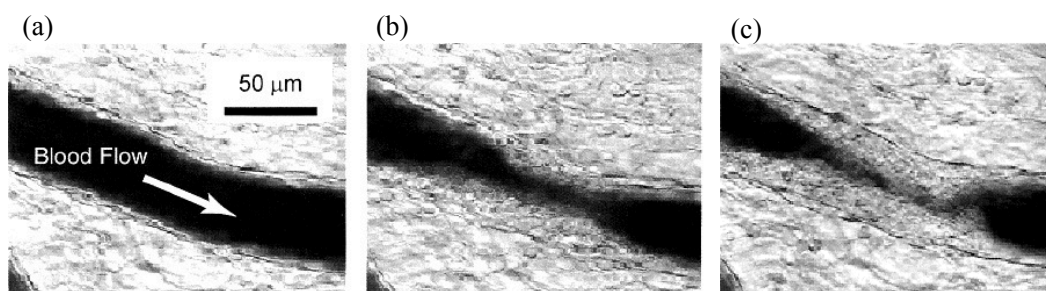


図 3-5 光線力学的治療による腫瘍血管の閉塞 (文献[53]より引用)

- (a) 光線力学的治療前の腫瘍血管
- (b) 光照射開始 3 min 後の腫瘍血管
- (c) 光照射開始 5 min 後の腫瘍血管

## 第4章 光増感反応による心房性不整脈治療の提案

### 4.1 緒言

光増感反応は光感受性物質の特異的な腫瘍組織集積性を利用して悪性腫瘍の治療として用いられているが、その殺細胞効果は健常組織に利用することができる。我々はこの光増感反応の殺細胞機構を心筋組織の電気伝導ブロックに利用し、心房性不整脈治療に応用することを提案している（以下、本提案手法と呼ぶ）。心房性不整脈、特に心房細動に対する現行の高周波カテーテルアブレーション治療は熱的作用を利用しており、熱発生に伴う副作用が問題となっている（2.4.3 参照）。光増感反応により発生した活性酸素の酸化作用を利用することで、熱発生をほとんど伴わずに心筋電気伝導ブロックを達成できる可能性がある。

悪性腫瘍に対する光線力学的治療では、光増感反応による均一な治療が困難な場合がある（3.3.4 参照）。腫瘍組織では無秩序に血管が構築されており、健常血管のように組織全体に酸素や光感受性物質が運搬されず、光増感反応が組織内で均一に起こらない。また、腫瘍血管が容易に光増感反応による障害を受けて血流閉止を起こす。このように腫瘍組織に対する光増感反応は光感受性物質や酸素の供給が不安定であり、弱い光増感反応により緩やかな細胞障害を起こして治療効果を得るのが一般的である。一方、健常組織に対する光増感反応の場合、血管走行は規則的であり、血流が速いため容易に血管閉塞を起こさない。光増感反応中に光感受性物質や酸素が血流によって供給されるため、安定した治療効果が得られると考えられる。このように健常組織に対する光増感反応は、光増感反応の3要素のうち光感受性物質と酸素の安定供給という面で適切な対象部位と考えられる。

本章では、光増感反応を心房性不整脈治療に応用する上で効果および運用の面で求められる性能および治療構想に関して説明する。

### 4.2 効果・運用に求められる性能

心房性不整脈に対する経カテーテル的治療に光増感反応を応用する際に、効果および運用方法の面で現行の標準方法である高周波カテーテルアブレーション治療をしのぐ性能が必要である。表4-1に本提案手法に求められる性能をまとめる。効果の面では、以下の3点が重要である。

- i) 熱的障害を与えずに心筋電気伝導ブロックが得られること。
- ii) 即時的（数十 s 以内に）かつ永続的な心筋電気伝導ブロックが得られること。
- iii) 組織厚み 1 ~ 4 mm の心筋組織に対して貫壁性の心筋電気伝導ブロックが得られること。

ここで、i) は、現行手法に対して本提案手法を心房性不整脈治療に応用する最大の利点で

ある。悪性腫瘍に対する光線力学的治療では光照射中の組織温度上昇は最大5°C程度であり [1]、現行の高周波カテーテルアブレーションにおける通電時の温度上昇の約 1/6 倍である (2.4.1 参照)。光増感反応を利用した経カテーテル的治療では、現行手法の問題点である熱発生に伴う副作用の抑制が見込める。ii) の即時的かつ永続的な心筋電気伝導ブロックは、手術中に対象部位の電気伝導性消失を判断する上で重要となる要件である。高周波カテーテルアブレーション治療では、電位マッピングガイド下に高周波通電を行い、電気伝導ブロック達成を診断しながら治療を進める。このため、高周波通電中に即時的な心筋組織の電気伝導性消失を得る必要がある。これに対し、現行の光線力学的治療では穏やかな効能を特徴としており、光増感反応による即時的な効果を発揮するための検討が必要である。また、光増感反応部位の再伝導による不整脈再発を防ぐため、術中に確認した電気伝導ブロックが術後も持続し、慢性期において組織癒痕化が得られ、永続的な電気伝導ブロックとなる必要がある。iii) の貫壁性の心筋電気伝ブロックを達成するには対象部位の治療深度の制御が重要である。異常興奮の伝播経路を電氣的に遮断するためには、心房組織厚み全層に組織障害を与えて貫壁性の電気伝導ブロックを作成する必要がある。心房組織の厚みは部位によって異なるが1~4 mm である (2.4.1 参照)。治療部位に隣接する臓器への障害を避けるため、ミリメートル単位での治療深度制御が必要である。

運用方法の面においては、以下の4点において現行の高周波カテーテルアブレーション治療と同程度の性能が必要である。

- i) カテーテルの操作性
- ii) 一点あたりに要する作用時間
- iii) 術時間
- iv) 入院期間

本提案手法で使用されるカテーテルにおいても、高周波アブレーションカテーテルと同程度の操作性が必要である。手元の操作ハンドルにてカテーテル先端を自由に屈曲することができ、所望の部位にカテーテル先端を導入することができるようにする必要がある。高周波カテーテルアブレーションでは、一点あたりに要する通電時間は30~60 s であり (2.4.1 参照)、本提案手法においても光照射時間を1 min 以内とすることが望ましい。現行の高周波カテーテルアブレーション治療では高周波通電および電氣的マッピングに要する全体の術時間は3~4 hr であり、患者や術者の負担となる。また、このような長時間の治療はカテーテル施術場所を占有するなど医療機関側への負担もあり、術時間をなるべく減らす必要がある。本提案手法において一点あたりの光照射時間を短縮できれば、全体の術時間を現行手法より抑制できる。入院期間は高周波カテーテルアブレーション治療と同程度の5日間程度にする必要がある [1,2]。高周波カテーテルアブレーション治療の症例数の多い施設では合併症の発生率は低く [3,4]、入院期間は3日間程度のことがある。光増感反応による経カテーテル的治療の場合には皮膚の光過敏性が十分消失することを確認してから退院と



なるため、入院期間は光感受性物質の体内からの排泄に依存する。このため排泄性の高い光感受性物質を使用する必要がある。

### 4.3 心房性不整脈治療の構想

本提案手法を実現するには適切な光感受性物質を選定するとともに、光増感反応条件を探索する必要がある。本部では、光感受性物質を選択し、心腔内にレーザ光を伝送するために試作したカテーテルに関して述べる。さらに、光増感反応による経カテーテル的心房性不整脈治療、ここでは心房細動治療の運用方法に関して記述する。

#### 4.3.1 光感受性物質の選択

心房性不整脈治療に光増感反応を応用するため、臨床で光線力学的治療薬として使用されている光感受性物質の中から以下の条件を満たす光感受性物質を選択した。

- i) 排泄速度が速く、遮光入院期間を5日程度に短縮できる。
- ii) 光感受性物質の励起光に対する吸収係数が高い。
- iii) 光増感反応の一重項酸素産生効率が高い。

上記の3点から、我々は本提案手法において使用する光感受性物質としてタラポルフィンナトリウムを選定した(3.2.3参照)。タラポルフィンナトリウムは水溶性の光感受性物質であり、血液中で主にアルブミンに結合して体内を循環し、大部分が早期に胆汁に排泄されるので体内からの排泄が速いという特徴を持つ[5-7]。図4-1にヒトに対してタラポルフィンナトリウムを体表面あたり $40\text{ mg/m}^2$ (約 $1\text{ mg/kg}$ に相当)で静脈内に単回投与した際の血漿中タラポルフィンナトリウム濃度の時間変化を示す[5]。一般に光感受性物質の消失曲線は2相性を示すことから、血漿中濃度の時間推移は2つの指数項の和で表現でき、2コンパートメントモデルでモデル化できる[5-7]。投与直後の血漿中の光感受性物質濃度が比較的速やかに低下している部分は $\alpha$ 相と呼ばれ、その次の緩やかな速度で低下する部分は $\beta$ 相と呼ばれる。タラポルフィンナトリウムでは、 $\alpha$ 相の半減期は $14.6\text{ hr}$ 、 $\beta$ 相の半減期は $138\text{ hr}$ と報告されている[5,7]。ポルフィマーナトリウムでは、 $\alpha$ 相の半減期は $7.7\text{ hr}$ 、 $\beta$ 相の半減期は $250\text{ hr}$ であり、遮光入院期間は1ヶ月程度である[8]。このようにタラポルフィンナトリウムは $\alpha$ 相では比較的ゆっくりと減衰し、 $\beta$ 相では他の光感受性物質より半減期が短いために全体として早期に体内から排泄される。血漿中タラポルフィンナトリウム濃度の皮膚光過敏性の閾値は約 $3\text{ }\mu\text{g/mL}$ と報告されている[9]。投与量 $40\text{ mg/m}^2$ にてタラポルフィンナトリウムを静脈内投与した際、投薬後から皮膚光過敏性が消失するまでの期間は1週間程度と報告されている[5,9]。本提案手法において現行の癌治療における投与条件( $40\text{ mg/m}^2$ )より投与量を抑制できれば、遮光入院期間を1週間以内に短縮することが可能になる。ii)とiii)にあげた光感受性物質の特性に関しては3.2.3において記述した。タラポルフィンナトリウムは図4-2に示すように生体内で $664\text{ nm}$ にQ帯の吸収ピークを持ち、同波長

においてモル吸光係数は  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、一重項酸素産生の量子収率は 0.77 であり、他の光感受性物質と比較して効率の高い光感受性物質である (3.2.3 参照)。タラポルフィンナトリウムの励起光源として、本研究では波長 660 ~ 670 nm で連続発振の半導体レーザ光源を使用した。光照射による組織温度上昇の抑制という観点からはピコ秒程度の短パルス発振レーザ光の方が望ましいが、タラポルフィンナトリウムはナノ秒レベルの励起光に対しても吸収飽和を起こす物質であり [10]、光増感反応による活性酸素産生効率の面から連続発振レーザ光を採用した。

#### 4.3.2 運用方法の探索

光増感反応の対象は健全な心筋組織であり、目的は心房性不整脈治療であるから、この対象目的に適した光増感反応条件を探索する必要がある。本提案手法では、光感受性物質投与後速やかにレーザ光を照射する短時間インターバルの光増感反応を提案する。従来の悪性腫瘍に対する光線力学的治療は、光感受性物質の腫瘍組織集積性を利用している。すなわち、投薬後数 hr 経過して健全組織から光感受性物質が排泄され、腫瘍組織と健全組織の濃度コントラストが最大となるタイミングで光照射を行う。一方、健全組織では光感受性物質の特異的集積性はなく、光感受性物質濃度は投薬後に時間とともに指数関数的に減衰する [5,11]。したがって、健全組織を対象とする場合には光感受性物質の排泄により濃度コントラストが形成されるまで待つ必要はなく、対象部位において光増感反応で効能を示す光感受性物質濃度が得られれば良い。投薬から光照射までのインターバル時間が短い短時間インターバルの光増感反応を行えば、従来の光線力学的治療と比べて光感受性物質の投与量を抑制でき、それに伴い遮光入院期間を短縮することができる。

光増感反応を心房性不整脈治療に応用する上で重要な即時的な心筋電気伝導ブロックを得るために (4.2 参照)、短時間インターバルの採用は有効である。悪性腫瘍に対する光増感反応では、光感受性物質が細胞内に取り込まれた状態で光増感反応を起こす。このとき、殺細胞機構は細胞内小器官の障害に伴うアポトーシスによるものである。アポトーシスは緩やかな細胞死過程 (光増感反応から約 3 hr 以内) であり [9]、即時的な効果はない。即時的効果が必要な本提案手法では、細胞膜障害によるネクローシスを利用する。光感受性物質が細胞膜に分布している状態で光増感反応を起こすと細胞膜が障害され、ネクローシスに至るとの報告がある [12,13]。細胞外に光感受性物質が分布している状態で光増感反応を行うことで、細胞外で発生した活性酸素により細胞膜を障害し、細胞内のイオンバランスを崩し、即時的な電気伝導性消失が得られると考えられる。生体における光感受性物質の細胞内外分布は投薬から光照射までのインターバル時間に依存する。タラポルフィンナトリウムは投与後 20 min 程度で主に血液中および間質液中に分布し [14,15]、その後徐々に細胞内に取り込まれて数 hr 後には細胞内小器官に集積する [16,17]。したがって、インターバル時間が短い場合には光感受性物質は細胞外に分布しており、この状態で光増感反応を行

うと細胞膜障害によって即時的な電気伝導性消失が得られると考えられる。以上の理由から本提案手法では短時間インターバルの光増感反応を採用した。

図 4-3 に光増感反応を利用した心房細動に対する経カテーテル的治療の具体的な運用構想を示す。タラポルフィンナトリウムは静脈内単回投与する。レーザー光の伝送が可能なカテーテル (以下、レーザーカテーテルと呼ぶ) (7.2.1 参照) を鼠蹊部より大腿静脈に挿入し、レーザーカテーテル先端の光学ウィンドウを心房内対象部位に設置する。投薬数十 min 後からレーザーカテーテルを通して波長 660 ~ 670 nm 帯のタラポルフィンナトリウム励起用赤色レーザー光を心筋組織に対して照射する。光照射中にレーザーカテーテル先端電極にて心内電位を測定し、光照射部位周辺の心筋組織の電気伝導性消失を確認する。レーザーカテーテル先端を移動して電気伝導ブロックラインを作成し、別の電極カテーテルを用いた心内心電図計測による電気生理学的検査で電気伝導ブロックを診断する。電気伝導ブロック達成が確認できたら施術終了とし、タラポルフィンナトリウムが数日後に体内から排出され皮膚光過敏性が消失したら退院する。このように、術中の一連のカテーテル操作は現行の高周波カテーテルアブレーションとほぼ同じであるが、事前に光感受性物質を投与すること、皮膚光過敏性の消失まで遮光入院する点が異なる。

#### 4.4 結言

本章では、光増感反応で発生した活性酸素による殺細胞機構を心筋組織の電気伝導ブロックに応用し、現行の高周波カテーテルアブレーション治療と比較して熱発生小さい心房性不整脈に対する経カテーテル的治療を提案した。また、光増感反応による経カテーテル的心房性不整脈治療を実現するために必要な治療上の性能に関してまとめ、本治療法のデザインを行った。経カテーテル的治療に適した光増感反応条件を探索し、治療機構に関する基礎的な研究を行い、臨床応用を見据えた治療条件の決定を行う必要がある。

## 参考文献

- [1] R. Weerasooriya, P. Jais, J. Y. Le Heuzey, C. Scave, K. J. Choi, L. Macle, F. Raybaud, M. Hocini, D. C. Shah, T. Lavergne, J. Clementy, and M. Haissaguerre, "Cost analysis of catheter ablation for paroxysmal atrial fibrillation," *Pacing Clin Electrophysiol*, vol. 26, pp. 292–294, 2003.
- [2] R. Weerasooriya, P. Khairy, J. Litalien, L. Macle, M. Hocini, F. Sacher, N. Lellouche, S. Knecht, M. Wright, I. Nault, S. Miyazaki, C. Scavee, J. Clementy, M. Haissaguerre, and P. Jais, "Catheter ablation for atrial fibrillation. Are results maintained at 5 years of follow-up?" *J Am Coll Cardiol*, vol. 57, pp. 160–166, 2011.
- [3] R. Cappato, H. Calkins, S. A. Chen, W. Davies, Y. Iesaka, J. Kalman, Y. H. Kim, G. Klein, D. Packer, and A. Skanes, "Worldwide survey on the methods, efficacy, and safety of catheter ablation for human atrial fibrillation," *Circulation*, vol. 111, pp. 1100–1105, 2005.
- [4] A. Takahashi, "Catheter ablation is established as a treatment option for atrial fibrillation – Is catheter ablation established as a treatment option of atrial fibrillation? (Pro) –," *Jpn Circ J*, vol. 74, pp. 1972–1977, 2010.
- [5] 明治製菓株式会社, 注射用レザフィリン®100 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2007年4月 (改訂第2版)
- [6] D. Kessel, "Pharmacokinetics of N-aspartyl chlorin e6 in cancer patients," *J Photochem Photobiol B*, vol. 39, pp. 81–83, 1997.
- [7] 齊藤光一, 芝崎茂樹, 黒沢亨, "タラポルフィンナトリウムの薬理作用と体内動態," *化学療法の領域*, vol. 20, pp. 131–137, 2004.
- [8] ワイス株式会社, 武田薬品工業株式会社, フォトフリン®静注用 75 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2008年6月改訂 (新様式第7版)
- [9] E. Bromley, B. Briggs, L. Keltner, and S. S. Wang, "Characterization of cutaneous photosensitivity in healthy volunteers receiving talaporfin sodium," *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, vol. 27, pp. 85–89, 2011.
- [10] S. Ohmori and T. Arai, "In vitro behavior of Porfimer sodium and Talaporfin sodium with high intensity pulsed irradiation," *Lasers Med Sci*, vol. 21, pp. 213–223, 2006.
- [11] C. J. Gomer and A. Ferrario, "Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model," *Cancer Res*, vol. 50, pp. 3985–3990, 1990.
- [12] N. L. Olenick, R. L. Morris, and I. Belichenko, "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why, and how," *Photochem Photobiol Sci*, vol. 1, pp. 1–21, 2002.

- [13] E. Buytaert, M. Dewaele, and P. Agostinis, “Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1776, pp. 86–107, 2007.
- [14] S. Mitra and T. H. Foster, “In vivo confocal fluorescence imaging of the intratumor distribution of the photosensitizer mono-L-aspartylchlorin-e6,” *Neoplasia*, vol. 10, pp. 429–438, 2008.
- [15] B. Pegaz, E. Debeve, F. Borle, J. P. Ballini, G. Wagnieres, S. Spaniol, V. Albrecht, D. Scheglmann, N. E. Nifantiev, H. van den Bergh, and Y. N. Konan, “Preclinical evaluation of a novel water-soluble chlorin e6 derivative (BLC 1010) as photosensitizer for the closure of the neovessels,” *Photochem Photobiol*, vol. 81, pp. 1505–1510, 2005.
- [16] W. G. Roberts, F. Y. Shiau, J. S. Nelson, K. M. Smith, and M. W. Berns, “In vitro characterization of monoaspartyl chlorin e6 and diaspartyl chlorin e6 for photodynamic therapy,” *J Natl Cancer Inst*, vol. 80, pp. 330–336, 1988.
- [17] J. A. Caruso, P. A. Mathieu, and J. J. Reiners Jr, “Sphingomyelins suppress the targeted disruption of lysosomes/endosomes by the photosensitizer NPe6 during photodynamic therapy,” *Biochem J*, vol. 392, pp. 325–334, 2005.

## 図表

表4-1 光増感反応を経カテーテル的心房性不整脈治療に応用する際に求められる性能

<b>Performance</b>	<b>photosensitization reaction with catheter intervention</b>
<b>Therapeutic effect</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪Electrical conduction block without heat generation</li> <li>▪Acute (within several ten seconds) and permanent electrical conduction block</li> <li>▪Transmural electrical conduction block with 1 ~ 5 mm thick myocardium</li> </ul>
<b>Operation procedure</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪Ablation time: &lt; 1 min</li> <li>▪Total operation time: 3 ~ 4 hr</li> <li>▪Hospitalization period: 3 ~ 5 days</li> </ul>

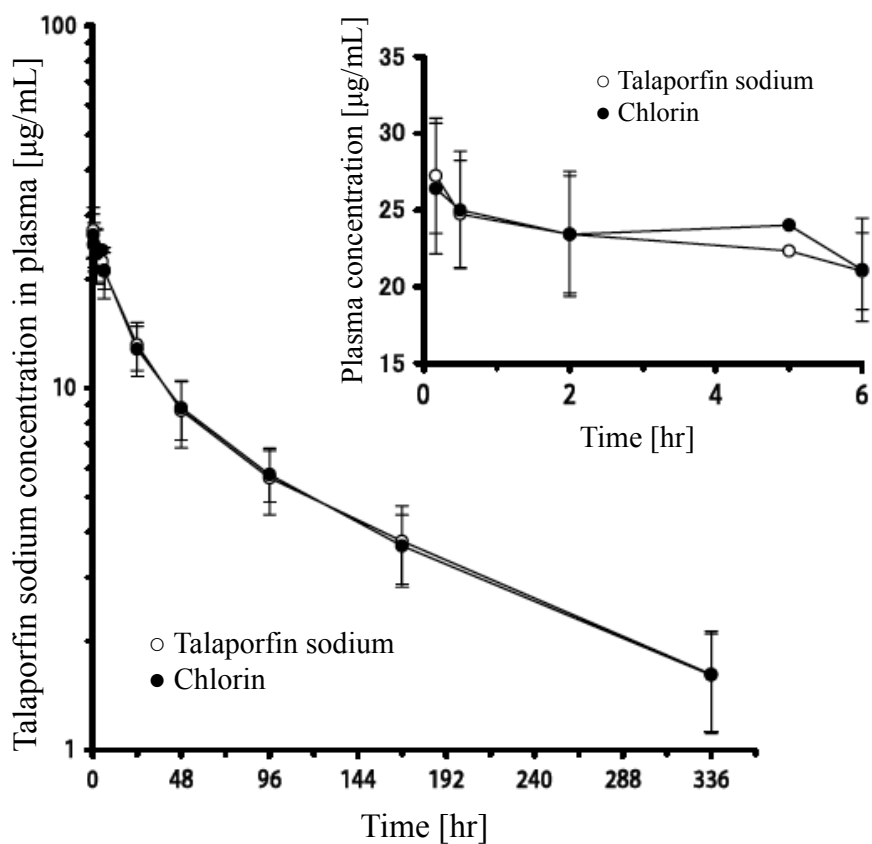


図 4-1 血漿中タラポルフィンナトリウム濃度の時間変化 (文献[3]より引用、一部改変)

ヒトに対してタラポルフィンナトリウムを体表面あたり  $40 \text{ mg/m}^2$  (約  $1 \text{ mg/kg}$  に相当) で静脈内単回投与した際の血漿中タラポルフィンナトリウム濃度 (白円形)、総クロリン濃度 (黒円形) の時間変化を示す。また、右上の挿入図は投薬後 0~6 hr の血漿中濃度の時間変化を拡大した図である。

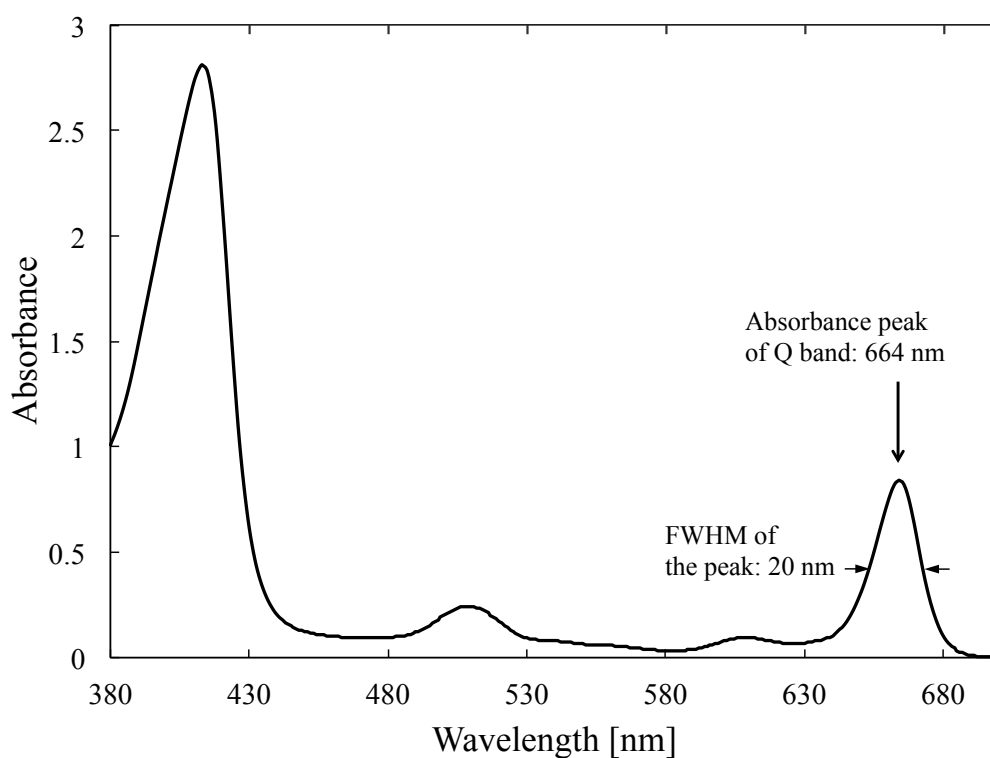


図 4-2 タラポルフィンナトリウムの吸収スペクトル

タラポルフィンナトリウムを 10%ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) を含む培養液 (Minimal Essential Media; MEM) に溶解して 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の溶液の光路長 1 cm における波長範囲 380 ~ 700 nm の吸収スペクトルを測定した (6.3.1 参照)。Q 帯の吸収ピーク波長は 664 nm であり、吸収ピークの半値全副 (Full width at half maximum) は 20 nm である (3.2.3 参照)。



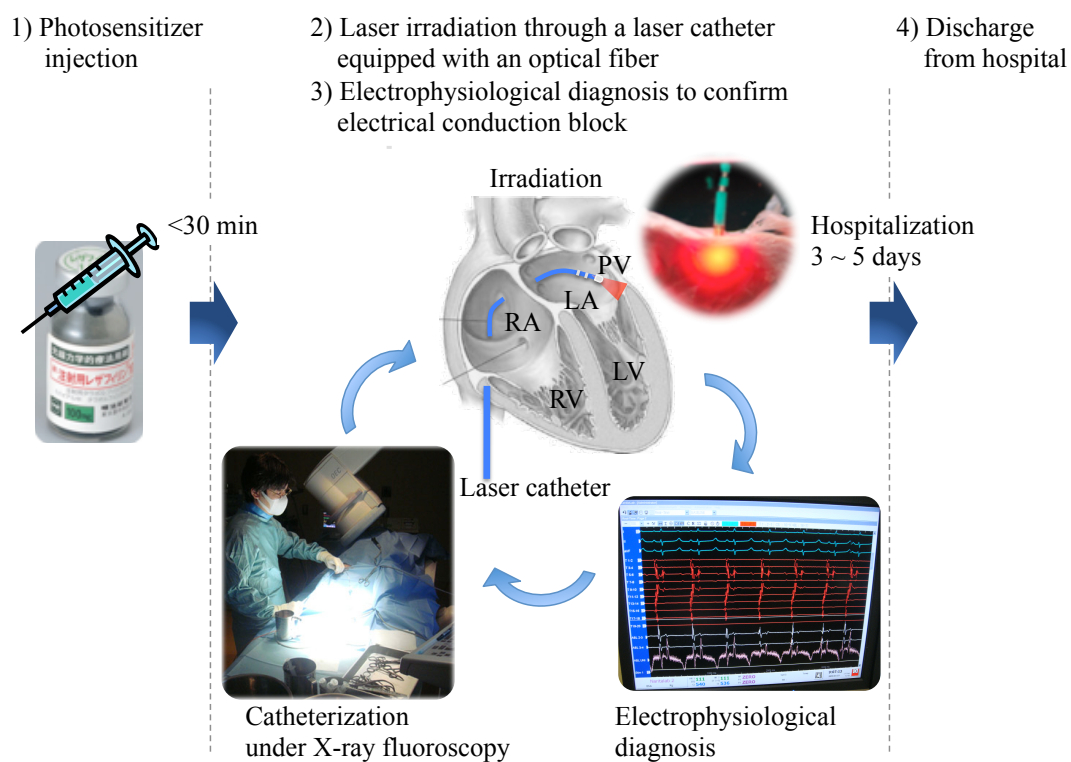


図 4-3 光増感反応による経カテーテル的心房性不整脈治療の運用構想

## 第 5 章 光増感反応による即時的な心筋電気伝導ブロック (*in vitro* 細胞実験)

### 5.1 緒言

本章では、細胞レベルにおいて光増感反応により即時的な心筋細胞の電気伝導消失が得られる光増感反応条件を探索し、その機序を明らかにすることを目的として光増感反応による心筋細胞の電気生理学的な細胞応答を調査した。光感受性物質として本提案手法で選定した水溶性のタラポルフィンナトリウムの他に、光線力学的治療において標準的な光感受性物質である両媒性のポルフィマーナトリウムを使用し、両光感受性物質の光増感反応による電気生理学的な細胞応答を比較した。

### 5.2 心筋細胞に対する殺細胞効果の測定

心筋細胞に対する光増感反応において、光増感反応のパラメータ (光感受性物質濃度、レーザー光の放射照射量) と殺細胞効果の関係を調査した。*in vitro*細胞実験においてタラポルフィンナトリウムあるいはポルフィマーナトリウムを用いた光増感反応を行い、水溶性テトラゾリウム塩 (Water-soluble tetrazolium-8; WST-8) を用いた殺細胞アッセイにより死細胞率を測定した。この手法は*in vitro*細胞毒性試験の定量評価に一般に用いられている。水溶性テトラゾリウム塩が細胞内脱水素酵素により還元されると水溶性のホルマザンが産生されることを利用し、このホルマザン産生量を吸光度測定によって求めることで生細胞率を測定する。

#### 5.2.1 実験方法

生後 1~4 日の新生仔 SD ラット心筋細胞 (株式会社プライマリーセル, 北海道) をコラーゲンコートした 96 ウェルプレート (底の直径 8 mmΦ) に細胞密度約  $2 \times 10^4$  cells/well となるように播種し、培養液 A (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (D-MEM/F-12) に 10% Fetal Bovine Serum (FBS)、100 unit/mL Penicillin、および 100 μg/mL Streptomycin (Invitrogen Corp., CA, USA) を加えたもの) を添加して 37°C、5% CO<sub>2</sub> のもと 6~7 日間インキュベータで培養した。培養中は毎日培地を交換した。培養心筋細胞に濃度 10~50 μg/mL に調整したタラポルフィンナトリウムあるいはポルフィマーナトリウムを含む培養液 A を加え、30 min 間遮光下で培養した。ウェルプレートの下からタラポルフィンナトリウムの励起光源として発振中心波長 670 nm の半導体レーザー光 (Optical Fuel, ソニー株式会社, 東京)、あるいはポルフィマーナトリウムの励起光源として発振中心波長 635 nm の半導体レーザー光 (HPD 5215; Intense, Ltd., NJ, USA) を照射した。図 5-1 に各レーザー装置の発振

スペクトルを示す。光照射条件は放射照度  $150 \text{ mW/cm}^2$  とし、照射時間を変化させて放射照射量を  $1 \sim 10 \text{ J/cm}^2$  の範囲で変化させた。以後、レーザー光の放射照度の表示は、付録 B.1.1 に示すように放射束をビーム断面積で除した平均値を示し、放射照射量は放射照度の時間積分値を示す。光照射後、光感受性物質が入っていない培養液に交換し、各ウェルに培養液体積の 1/10 に相当する  $10 \mu\text{l}$  の水溶性テトラゾリウム塩 (Cell Counting Kit-8; 株式会社同仁化学研究所, 熊本) を加え、インキュベータで 2 hr 培養した。その後、各ウェルにおいて生成した水溶性ホルマザンの  $450 \text{ nm}$  における吸光度をマイクロプレートリーダー (Sunrise™; Tecan Group, Ltd., Mannedorf, Switzerland) を用いて測定した。光増感反応を行っていないウェルの死細胞率を 0%、顕微鏡観察で底面全体に細胞死の所見\*を示したウェル (光増感反応条件が光感受性物質接触濃度  $50 \mu\text{g/mL}$ 、放射照射量  $10 \text{ J/cm}^2$  の場合) の死細胞率を 100% として規格化し、各ウェルにおいて得られた吸光度から死細胞率を算出した。

### 5.2.2 実験結果

図 5-2、図 5-3 にタラポルフィンナトリウムあるいはポルフィマーナトリウムを用いて心筋細胞に光増感反応を起こした際の、死細胞率の放射照射量依存性を示す。どちらの光感受性物質を使用した場合においても、薬剤濃度および放射照射量が増すにつれて死細胞率は増加した。死細胞率が 50%以上では明視野顕微鏡観察下で細胞端に風船状突起物 (ブレブ; Bleb) の形成や細胞の収縮など顕著な細胞形態の変化が見られた。タラポルフィンナトリウムを用いた光増感反応において、光感受性物質濃度が  $20 \mu\text{g/mL}$  以下の場合に死細胞率が負の値となった。これは少量の一重項酸素による酸化障害で恒常性維持のために細胞活動が活性化したためと考えられる。これ以後の細胞実験では、両光感受性物質において放射照射量の増加に伴い単調な死細胞率の増加が見られ、かつ、放射照射量  $10 \text{ J/cm}^2$  において死細胞率が 50%以上となる条件として、光感受性物質濃度を  $30 \mu\text{g/mL}$  とした。

### 5.3 光感受性物質の心筋細胞内分布の観察

心筋細胞における光感受性物質の細胞内集積部位と接触時間の関係を調査するため、ラット心筋細胞を用いて光感受性物質の細胞内分布を顕微鏡下で観察した。光感受性物質としてはポルフィマーナトリウムとタラポルフィンナトリウムを使用した。

光感受性物質の細胞内集積部位を特定するため、蛍光指示薬を用いて細胞内小器官を標識した。種々の癌細胞において、タラポルフィンナトリウムは細胞内ではライソソームに [1,2]、ポルフィマーナトリウムは主にミトコンドリアに集積することが知られている [3,4]。タラポルフィンナトリウムの場合はライソソームを標識するための蛍光指示薬として LysoTracker® Green (Molecular Probes, Inc., OR, USA)、ポルフィマーナトリウムの場合はミ

\* 細胞端に風船状突起物 (ブレブ) の形成や細胞の収縮などの顕著な細胞形態の変化を示す状態を細胞死と判定した。

トコンドリアを標識するための蛍光指示薬として Rhodamine® 123 (Molecular Probes, Inc., OR, USA) を用いて二重染色を行い、蛍光顕微画像の輝度分布を比較することで光感受性物質の細胞内集積部位を特定した。細胞内小器官を標識する蛍光指示薬の選定の際には、図 5-4、図 5-5 に示すように、光感受性物質と蛍光指示薬の吸収および蛍光スペクトルが重複しないように注意した。

### 5.3.1 実験方法

生後 1~4 日の新生仔 SD ラット心筋細胞 (株式会社プライマリーセル, 北海道) を底直径 35 mm $\Phi$  のペトリディッシュの底に置いた丸形カバーガラス (直径 15 mm $\Phi$ ) に播種し、培養液 A (5.2.1 に記載) を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の下 3~4 日間インキュベータで培養した。あらかじめタラポルフィンナトリウムあるいはポルフィマーナトリウムを培養液 B (Minimal Essential Media (MEM) に 10% FBS、100 unit/mL Penicillin、および 100  $\mu$ g/mL Streptomycin (all from Invitrogen Corp., CA, USA) を加えたもの) に溶解して、30  $\mu$ g/mL のタラポルフィンナトリウムあるいはポルフィマーナトリウム溶液を調整し、培養心筋細胞に光感受性物質を一定時間 (15 min から 3 hr) 遮光下において接触させた。光感受性物質接触後、心筋細胞を培養液 B を用いて洗い、1  $\mu$ M LysoTracker Green (培養液 B に含有) あるいは 1  $\mu$ g/ml Rhodamine 123 (Medium B に含有) を室温で 30 min 間接触させた。光感受性物質の接触時間が蛍光指示薬の接触時間より短い場合には、手順を逆にして蛍光指示薬接触後に光感受性物質の接触を行った。その後、培地を培養液 B に交換し、正立型微分干渉顕微鏡 (BX51WI-FL-IRDIC; オリンパス株式会社, 東京) のサンプルステージに細胞が入ったディッシュを載せた。タラポルフィンナトリウムおよびポルフィマーナトリウムは 100 W 水銀ランプからバンドパスフィルターを用いて 400 $\pm$ 10 nm の波長域の光を取り出して励起し、600 nm のロングパスフィルターを用いてタラポルフィンナトリウムの場合は 670 nm 帯の蛍光を、ポルフィマーナトリウムの場合は 630 nm 帯の蛍光を取得した。また、LysoTracker Green および Rhodamine 123 は水銀ランプからバンドパスフィルターを用いて 470~495 nm の波長域の光を取り出して励起し、波長 510~550 nm の蛍光を取得した。蛍光画像は微分干渉顕微鏡に取り付けた近赤外光用のモノクロ冷却 CCD カメラ (Rolera-XR; Q-imaging, Inc., Burnaby, Canada) により撮影した。また得られた画像の輝度解析にはフリーソフト ImageJ 1.41 (National Institute of Health, MD, USA) を用いた。

### 5.3.2 実験結果

図 5-6 にタラポルフィンナトリウムの接触時間 15、30、60 min の場合の同一心筋細胞における明視野画像、タラポルフィンナトリウムの蛍光画像、LysoTracker Green の蛍光画像、およびタラポルフィンナトリウムと LysoTracker Green の蛍光輝度分布の重ね合わせ画像を示す。図 5-6(b) のタラポルフィンナトリウムの蛍光画像から接触時間 15 min の場合にはほ

とんど細胞内に蛍光が見られないことから、タラポルフィンナトリウムは15 min以内の接触時間ではほとんど細胞内に取り込まれていなかった。30 min間の接触を行った場合はタラポルフィンナトリウムの蛍光は細胞内の特定部位に点状に分布した(図5-6(f))。この輝度分布はLysoTracker Greenの蛍光輝度分布(図5-6(g))と類似していることから、タラポルフィンナトリウムは30 minの接触時間では既にライソソームに集積し始めていた。さらに接触時間を増やして45 min間の接触を行うとタラポルフィンナトリウムの蛍光画像とLysoTracker Greenの蛍光画像の輝度分布がほぼ一致した(図5-6(j)、(k))。以上より、タラポルフィンナトリウムは接触開始から30 min程度で細胞内に取り込まれ始め、1 hr程度経過すると取り込まれたタラポルフィンナトリウムはライソソームに集積することがわかった。

図5-7にポルフィマーナトリウムの接触時間0.5、2、3 hrの場合の同一心筋細胞における明視野画像、ポルフィマーナトリウムの蛍光画像、Rhodamine 123の蛍光画像、およびポルフィマーナトリウムとRhodamine 123の蛍光輝度分布の重ね合わせ画像を示す。図5-7(b)のポルフィマーナトリウムの蛍光画像から接触時間30 minの場合には細胞全体に蛍光が分布していたことから、ポルフィマーナトリウムは細胞膜あるいは細胞質全体に分布していた。2 hrの接触を行った場合ではポルフィマーナトリウムの蛍光は細胞核近傍に拡散して分布しており(図5-7(f))、細胞内小器官に取り込まれ始めた。3 hr以上接触を続けると、図5-7(j)に示すように細胞内において局所的な輝度分布が観察された。この輝度分布は図5-7(k)に示すRhodamine 123の輝度分布に類似していることからポルフィマーナトリウムは長時間接触条件の場合にはミトコンドリアに集積していた。ただし、ポルフィマーナトリウムは細胞核周囲に分布しており、ミトコンドリア以外にも他の細胞小器官に分布している可能性がある。以上より、ポルフィマーナトリウムでは接触後数時間は主に細胞膜に分布しており、2 hr以上経過すると徐々に細胞内に取り込まれ、細胞内に取り込まれるとミトコンドリアなどの細胞小器官に集積することがわかった。

#### 5.4 電気生理学的な細胞応答と光感受性物質の細胞内分布の関係調査

本部では光増感反応により即時的な電気伝導ブロックが得られる条件を探索するため、光感受性物質の接触時間による細胞内外の光感受性物質分布の違いを考慮し、光増感反応に対する即時的な心筋細胞の電気生理学的応答を*in vitro*細胞実験にて調査した。その際に、電気生理学的な細胞応答として細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化に注目した。 $\text{Ca}^{2+}$ は心筋細胞の電気的活動において重要な役割を果たしており(2.2.2参照)、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動態の観察によって細胞の活動電位などの電気生理学的な応答だけでなく、細胞の収縮および弛緩といった機械的な応答を予測することができる。

##### 5.4.1 共焦点顕微システムの構築

光増感反応中のリアルタイムな細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度計測を行うため、ニポウ式共焦点ユニッ

ト (CSU-X1; 横河電機株式会社, 東京) を用い、図 5-8 に示すように高感度な蛍光画像撮影を高速で行うことのできる蛍光顕微システムを構築した。近赤外光 (775 nm) 用の正立型微分干渉顕微鏡 (BX51WI-FL-IRDIC; オリンパス株式会社, 東京) にニポウ式共焦点ユニットと電子増幅 CCD カメラ (DU897; Andor Technology, Plc., Belfast, UK)、発振中心波長 488 nm の Ar レーザ (800BL; National laser Co., UT, USA) を組み合わせた。倍率 40 倍、開口数 0.8 の水浸対物レンズ (LUMPlanFL40×W; オリンパス株式会社, 東京) を用いて蛍光顕微観察を行った。近赤外光用のモノクロ冷却 CCD カメラ (Rolera-XR; Q-imaging, Inc., Burnaby, Canada) で明視野画像を観察した。

#### 5.4.2 蛍光 $\text{Ca}^{2+}$ 指示薬の選定

蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬は  $\text{Ca}^{2+}$  高親和性キレート試薬であるビス 2 アミノフェニルエチレングリコール四酢酸 (1,2-bis(2-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid; BAPTA) を基本構造とし、 $\text{Ca}^{2+}$  と結合することにより蛍光特性が変化する [5]。本実験を行うにあたり、以下の点に注意して蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬を選定した。

- i) 使用する光感受性物質の吸収・蛍光スペクトルと用いる蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬の蛍光・吸収スペクトルが重ならない。特に、蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬の励起光照射による光増感反応が細胞の電気生理学的機能にほとんど影響を与えない。
- ii)  $\text{Ca}^{2+}$  との結合解離の速度定数が数 ms 以下であり、興奮収縮に伴う細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を十分に観測することができる。
- iii) 数 min 間の計測中において蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬の退色がほぼ無視できる。

上記の 3 条件を満たす蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬として Fluo-4 AM (Molecular Probes Inc., OR USA) を選定した。Fluo-4 AM は Fluo-4 のアセトキシメチルエステル体 (Acetoxymethyl ester; AM) である。図 5-9 にタラポルフィンナトリウムおよびポルフィマーナトリウムの吸収スペクトルと、Fluo-4 の吸収・蛍光スペクトルを示す。Fluo-4 は  $\text{Ca}^{2+}$  と結合すると蛍光強度が増すという特性を持ち、490 nm 付近に吸収ピークを持つ [6,7]。絶対量の算出は難しいが、簡便に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の相対変化の観測を行え、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態の研究ツールとして普及している [8]。Fluo-4 は水溶性の試薬であるため、細胞導入の際にはカルボキシル基にアセトキシメチル基をエステル結合して脂溶性のアセトキシメチルエステル体とすることで細胞膜透過性を示す。このアセトキシメチルエステル体は無蛍光 (微弱蛍光) 性を示し、遊離  $\text{Ca}^{2+}$  イオンとの結合能力はないが、一旦細胞内に取り込まれると内因性エステラーゼ活性により加水分解されて脱エステル化され Fluo-4 となり、細胞外に漏れ出すことなく細胞内に滞留する。単離直後の心筋細胞では培養 3 日以上経過すると内因性エステラーゼ活性が低下するため、培養 1~2 日目で測定を行う [9]。

### 5.4.3 実験方法

生後 1 ~ 4 日の新生仔 SD ラット心筋細胞 (株式会社プライマリーセル, 北海道) を 5.3.1 と同様に丸形カバーガラスに播種し、2 日間インキュベータで培養した。あらかじめ 50  $\mu\text{g}$  Fluo-4 AM を 50  $\mu\text{L}$  ジメチルスルホキシド (Dimethyl Sulfoxide) (和光純薬工業株式会社, 大阪) に溶解して 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の溶液とし、その内 7.5  $\mu\text{L}$  を 1.5 mL 培養液 B (6.3.1 に記載) に溶解して最終濃度 5  $\mu\text{M}$  の Fluo-4 AM 溶液を調整した。細胞内光感受性物質分布の観察で得られた各光感受性物質の細胞内取り込み時間を参考にし (5.3.2 参照)、光感受性物質の細胞内あるいは細胞外分布が得られるように光感受性物質の接触条件を、短時間接触条件 (細胞外分布: 光感受性物質が細胞内にほとんど取り込まれておらず細胞外に高濃度で分布している状態) と長時間接触条件 (細胞内分布: 細胞内小器官に光感受性物質が集積している状態) の 2 条件で行った。表 5-1 に光感受性物質の接触条件とその時の細胞内外分布状態の対応関係を示す。また、各条件における光感受性物質および Fluo-4 AM の接触条件を以下に示す。短時間接触条件の場合は、培養心筋細胞に 5  $\mu\text{M}$  の Fluo-4 AM を室温で 20 min 接触し、その後、30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のタラポルフィンナトリウム溶液あるいはポルフィマーナトリウム溶液を 15 min 接触した。また、長時間接触条件の場合は、培養心筋細胞に 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のタラポルフィンナトリウム溶液を 1 hr あるいは 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のポルフィマーナトリウム溶液を 3 hr、37°C、5%  $\text{CO}_2$  のもとインキュベータで培養した。その後、5  $\mu\text{M}$  Fluo-4 AM 溶液に交換し、室温で 20 min 接触させた。観察前に培地を培養液 B ( $\text{Ca}^{2+}$ 濃度: 2.2 mM) に交換し細胞外に光感受性物質が存在しない状態とした。各試薬の接触後、細胞が入ったディッシュを顕微鏡のサンプルステージにのせ、規則的に拍動している数個の心筋細胞を明視野観察により選んだ。タラポルフィンナトリウムの場合は水銀ランプから波長域 655 $\pm$ 25 nm の赤色光 (焦点面における放射照度 103  $\text{mW}/\text{cm}^2$ )、ポルフィマーナトリウムの場合は波長域 625 $\pm$ 25 nm の赤色光 (焦点面における放射照度 117  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) を取り出して励起光源とし、光増感反応を起こした。Fluo-4 は発振中心波長 488 nm の Ar レーザで励起し、共焦点ユニットを通して 500 ~ 540 nm 帯の蛍光を電子増幅 CCD カメラで取得した。フレームレート 200 ms/frame にて 110 s 間蛍光画像の連続撮影を行い、輝度解析には画像ソフト iQ Core (Andor technology, Plc., Belfast, UK) を用いた。細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を細胞内の平均 Fluo-4 蛍光輝度変化より評価した。また、Fluo-4 蛍光輝度は測定開始から最初の蛍光輝度増減の下限値で規格化して表示した。

### 5.4.4 実験結果

図 5-10 にタラポルフィンナトリウムを短時間接触条件 (15 min) で接触し、赤色光照射を行わないコントロール状態における心筋細胞内の Fluo-4 蛍光輝度の経時変化を示す。心筋細胞の興奮収縮に伴う一過性の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇 ( $\text{Ca}^{2+}$ トランジェント) に伴い、Fluo-4 蛍光輝度が細胞内全体にわたってほぼ同時に均一に上昇して減少する周期的変化が

みられた。すなわち、興奮収縮に連動した正常な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の周期的変化 ( $\text{Ca}^{2+}$  振動) が観察できた。110 s 間の連続的な蛍光画像撮影において心筋細胞の Fluo-4 蛍光はほぼ一定周期の輝度変化を示し、測定時間内で蛍光退色はなかった。また、上述のコントロール条件においてポルフィマーナトリウムを用いた計測を行ったところ、タラポルフィンナトリウムと同様に正常な  $\text{Ca}^{2+}$  振動に伴う Fluo-4 蛍光輝度の周期的変化が得られた。以上より、Fluo-4 励起用の 488 nm のレーザー光照射による光増感反応に伴う Fluo-4 の蛍光退色は、110 s 間の測定時間ではほぼ無視できると考えた。

短時間接触条件にてタラポルフィンナトリウムあるいはポルフィマーナトリウムを用いた光増感反応を起こした際の代表的な Fluo-4 蛍光輝度の時間変化を図 5-11(a)、(b) に示す。どちらの光感受性物質においても光増感反応中の Fluo-4 蛍光輝度は特徴的な動的変化を示した。赤色光照射開始前ではコントロール状態と同様に  $\text{Ca}^{2+}$  振動に伴う Fluo-4 蛍光輝度の周期的な増減が見られた。光照射開始とともに Fluo-4 蛍光輝度の周期的変化の増減幅が減少し始め、ポルフィマーナトリウムの場合は数 s 間で、タラポルフィンナトリウムの場合は数十 s 間で Fluo-4 蛍光輝度の周期的増減が消失した。このとき、顕微鏡観察において細胞形態および細胞核の形状変化はみられなかった。さらに光照射を続けると Fluo-4 蛍光輝度が緩やかに増加し、光照射前の周期変動における上限値を超えてそのまま増加し続けた。図 5-12 に短時間接触条件においてタラポルフィンナトリウムを用いて光増感反応を起こした際の光照射前および光照射 5 min 後の心筋細胞の明視野顕微鏡画像を示す。光増感反応後に顕微鏡観察上は細胞核の障害などは見られないものの、ブレブ形成が見られた。また、このような顕著な細胞形態の変化はポルフィマーナトリウムを用いた光増感反応においても確認された。

長時間接触条件にてタラポルフィンナトリウムあるいはポルフィマーナトリウムを用いた光増感反応を行った際の代表的な Fluo-4 蛍光輝度の時間変化を図 5-13(a)、(b) に示す。タラポルフィンナトリウムとポルフィマーナトリウムでは光増感反応中の Fluo-4 蛍光輝度の時間的変化が異なった。タラポルフィンナトリウムでは、光照射直後において  $\text{Ca}^{2+}$  振動に伴う Fluo-4 蛍光輝度の周期的な増減にほとんど変化はなく、光照射中もそのまま継続した。一方、ポルフィマーナトリウムでは短時間接触条件と同様に即時的な Fluo-4 蛍光輝度の動的変化が得られた。光照射開始から数 s 後には  $\text{Ca}^{2+}$  振動に伴う Fluo-4 蛍光輝度の周期的変化が消失し、光照射を続けるにつれて Fluo-4 蛍光輝度の上昇が見られた。

## 5.5 考察

本章では *in vitro* 細胞実験において、光感受性物質接触時間による心筋細胞内光感受性物質分布の違いを調査した。また、異なる光感受性物質分布を示す 2 種類の接触条件において光増感反応を起こして細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態の変化を観察した。光感受性物質の接触時間を変化すると、短時間接触条件の場合と長時間接触条件の場合では異なる細胞応答が得られる



ことが報告されている [10-12]。これは光感受性物質の細胞内集積部位が *in vitro* の場合には接触時間によって異なるためであると考えられる [11,12]。また、細胞内への光感受性物質の取り込み速度や取り込まれる部位は光感受性物質の種類によって異なる (3.3.3.1.1 参照)。したがって、タラポルフィンナトリウムとポルフィマーナトリウムを用いた光増感反応では光感受性物質の細胞内外分布の違いにより、異なる細胞応答が得られると考えられる。

短時間接触条件の光増感反応を行った際に、Fluo-4 蛍光輝度の時間変化はタラポルフィンナトリウムとポルフィマーナトリウムで同様な傾向が見られた (5.4.4 参照)。光増感反応中の Fluo-4 蛍光輝度の動的変化を時間的に 2 つの様式 (第 1 相、第 2 相) に分けて考察する。第 1 相は即時的な細胞応答であり、光照射開始直後に起こる Fluo-4 蛍光輝度の周期的変化の消失が起こる。また、第 2 相は第 1 相に引き続いて Fluo-4 蛍光輝度の緩やかな増加が起こる。第 1 相の即時的応答は光照射開始前から数十 s 以内に起こった。短時間接触条件の場合には光感受性物質は主に細胞外に分布しているため、光増感反応により細胞外で発生した活性酸素が細胞外側から細胞に障害を与え、イオンチャネルや細胞膜が障害されたと考えられる。このような障害によって細胞内イオンバランスが崩れて膜電位が上昇し、電位依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンチャネルが  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を一時的に抑止するため、細胞内外の  $\text{Ca}^{2+}$  の流入出が停止したと考えられる。この結果、 $\text{Ca}^{2+}$  振動が消失し、Fluo-4 蛍光輝度の増減幅が減少したと考えられる。第 2 相では、光増感反応が進行して細胞膜やイオンチャネルの障害が蓄積された結果、細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  排出機能を超える量の  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞外から流入し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇したと考えられる。光増感反応後に観察されたブレブの形成から、細胞外液の細胞内への流入は明らかであり、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が過剰状態であることが示唆される。このブレブは、細胞内において  $\text{Ca}^{2+}$  の貯蔵部位である筋小胞体などの細胞内小器官の膨化によるものと考えられる [13]。一般に、このようなブレブの膨化が進行するとネクローシスが起こる [13]。光増感反応による細胞膜障害に伴う細胞内イオン動態の変化は種々の細胞を用いて研究されている。Valenzeno や Tarr らによってパッチクランプ法により光増感反応中の細胞膜電流が調査され [14-16]、Stark らによってシングルチャネル記録により光増感反応中の各イオンチャネルの応答が調査されている [17-20]。光増感反応によるイオンチャネルおよび細胞膜の障害は種々あるが、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、および  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの不活性化、膜電位の上昇、細胞膜のリーク電流の増加、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加などが報告されている [14-20]。これらの機能的な細胞障害の原因は、細胞膜近傍で発生した活性酸素によりチャネル蛋白のアミノ酸が酸化されたり、細胞膜の脂質不飽和部に連鎖的な脂質過酸化反応が起きてチャネル蛋白の脂質環境が変化することでイオンチャネルの機能的変化を生じたり、細胞膜の酸化障害により脂質二重層に細孔 (ポア) が生じる可能性が考えられる [16,18,21-23]。

第 1 相および第 2 相の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答はタラポルフィンナトリウムとポルフィマーナトリウムで多少の違いが見られた。そこで、各相において光増感反応による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答を比較するため、第 1 相では  $\text{Ca}^{2+}$  振動の消失時間、第 2 相では細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の平均変化

率に注目した。Ca<sup>2+</sup>振動の消失時間は、光照射開始から Fluo-4 蛍光輝度の増減幅が光照射前の 1/e 倍に減少するまでの時間と定義した。この Ca<sup>2+</sup>振動の消失時間はイオンチャネル障害や細胞膜障害に伴う細胞の電気生理学的な機能障害の程度を表していると考えた。表 5-2 に各接触時間において、タラポルフィンナトリウムあるいはポルフィマーナトリウムを用いた光増感反応の Ca<sup>2+</sup>振動の消失時間を示す。細胞による差はあるものの、短時間接触条件においてはタラポルフィンナトリウムでは 14±6 s (N = 8) であり、ポルフィマーナトリウムでは 9.9 s (N = 2) であった。長時間接触条件においてはタラポルフィンナトリウムでは Ca<sup>2+</sup>振動の消失が見られなかったため対象から外したが、ポルフィマーナトリウムでは 6.8 s (N = 2) であり、短時間接触条件と比較して Ca<sup>2+</sup>振動の消失時間が短くなった。次に、第 2 相における細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の平均変化率を各条件において求める。細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の平均変化率は第 1 相後に細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇し始めてから 20 s 間の平均変化率と定義した。この細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の平均変化率は細胞膜障害の程度を表す一つの指標になると考え、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の平均変化率を求めるため、以下の関係式を用いて Fluo-4 蛍光輝度から細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を算出した [24]。

$$[Ca^{2+}]_{in} = K_d \frac{F - F_{min}}{F_{Max} - F} \quad (5-1)$$

$K_d$  はイオン解離定数であり、Fluo-4 の場合には  $K_d = 345$  nM と報告されている [10]。F は Fluo-4 の蛍光輝度を示し、 $F_{min}$  は全ての Fluo-4 が Ca<sup>2+</sup>に結合していない場合の蛍光輝度、 $F_{Max}$  は全ての Fluo-4 が Ca<sup>2+</sup>に結合した場合の蛍光輝度である。ここで上式 (5-1) から Ca<sup>2+</sup>濃度を算出するため、以下の 2 つの仮定を行った。 $F_{min}$  はほぼ無視できると考え、 $F_{min} = 0$  とした。また、Ca<sup>2+</sup>振動における細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の最小値を 100 nM とした [25]。以上の仮定から式 (5-1) を用いて Fluo-4 蛍光輝度から細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を算出し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の平均変化率を求めた。一般に Fluo-4 は Ca<sup>2+</sup>振動の濃度範囲内において細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の相対的变化を調査する際に使用されており、その Ca<sup>2+</sup>振動の濃度範囲外では Fluo-4 蛍光輝度と細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の相関関係が成り立たない。本実験条件では全てのサンプルにおいて細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇し始めてから 20 s 程度において、Ca<sup>2+</sup>振動の範囲内の Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が観測された。このため、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の平均変化率を求める際にその算出範囲を細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇してから 20 s 間とした。表 5-2 に各接触条件においてタラポルフィンナトリウムあるいはポルフィマーナトリウムを用いて光増感反応を起こした際の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の平均変化率を示す。Ca<sup>2+</sup>濃度の平均変化率はタラポルフィンナトリウムを用いた短時間接触条件の光増感反応の場合が 18±7 nM/s (N = 8) であり、ポルフィマーナトリウムを用いた短時間あるいは長時間接触条件の光増感反応の場合がそれぞれ 33 nM/s (N = 2)、83 nM/s (N = 2) と求められた。また、どの条件においても細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度はほぼ一定に上昇した。前述したようにこのような光増感反応による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は種々の原因が考えられるが [16-19]、ここでは光増感反応によって細胞膜に細孔が形成されたと仮定し [21-23]、そ

の形成細孔数を見積もる。光増感反応の開始から比較的速い段階で細胞膜に細孔が形成され、この孔を通り細胞内外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度勾配によって細胞外から  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇したと考え、光増感反応により細胞膜に形成された孔の個数を細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の平均変化率から見積もる。一般に細胞膜の物質輸送は Fick の第一法則で表され、物質の拡散速度は濃度勾配に比例する [26]。細胞膜を介して濃度勾配が存在する場合、細胞外から細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入は以下の式で表される。

$$\frac{dn_{c_a}^{in}}{dt} = -D_m S_m \frac{dC_m}{dx} \quad (5-2)$$

$n_{c_a}^{in}$  は細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  の数、 $D_m$  は細胞膜近傍の  $\text{Ca}^{2+}$  の拡散係数、 $S_m$  は拡散輸送がおこる細胞膜表面積、 $C_m$  は細胞膜近傍の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を示し、 $x$  は図 5-14 に示すように細胞膜に対して垂直な軸とする。ここで、以下の 3 つの仮定を行う。拡散係数  $D_m$  は細胞膜の厚さ方向によらず一定とし、図 5-14 に示すように細胞膜内の濃度勾配は、 $\frac{dC_m}{dx} = \frac{C_m^{in} - C_m^{out}}{d}$  で表されるとする。 $d$  は細胞膜の厚さである。液層と細胞膜の界面で  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は平衡状態にあり、細胞内外面における膜近傍の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度  $C_m^{in}$ 、 $C_m^{out}$  は、液層の細胞内外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度  $C^{in}$ 、 $C^{out}$  を用いて以下のように表される。

$$\gamma = \frac{C_m^{out}}{C^{out}} = \frac{C_m^{in}}{C^{in}} \quad (5-3)$$

また、液層と膜近傍で  $\text{Ca}^{2+}$  濃度差がないと仮定し、 $\gamma = 1$  とする。これらの仮定をもとに式 (5-2) を変形すると以下のように書き表される。

$$\frac{dC^{in}}{dt} = -\frac{\gamma D_m S_m}{d V_c} (C^{in} - C^{out}) \quad (5-4)$$

$V_c$  は細胞内容積を示し、 $C^{in}$  は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度であり、 $n_{c_a}^{in}/V_c = C^{in}$  で表される。細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $C^{out} = 2.2 \text{ mM}$ ) が細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $C^{in} = 10 \text{ nM} \sim 10 \text{ }\mu\text{M}$ ) より十分に大きいため、式 (5-4) の右辺の括弧内は  $(C^{out} - C^{in}) \approx C^{out}$  と近似する。ここで、光増感反応によって生成された孔数を  $n_p$ 、孔断面積の平均値を  $s_p$  とすると、式 (5-4) は以下のように書き表され、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の時間変化から孔数  $n_p$  を見積もることができる。

$$\frac{dC^{in}}{dt} = \frac{D_m n_p s_p}{d V_c} C^{out} \quad (5-5)$$

図 5-15 に各接触条件にてタラポルフィンナトリウムあるいはポルフィマーナトリウムを用いた光増感反応を起こした際の細胞膜に発生した孔数の推定値を示す。また、表 5-3 に本計算で用いた各パラメータの値を示す [22,27-31]。光増感反応により細胞膜に発生する孔数はポルフィマーナトリウムを用いた短時間あるいは長時間接触条件の場合が 19 個 ( $N = 2$ )、36

個 ( $N=2$ )、タラポルフィンナトリウムを用いた短時間接触条件の場合は  $8 \pm 3$  個 ( $N=8$ ) と求められた。この値の評価は難しいが、孔数は妥当なオーダーであると考えられる。

以上より、ポルフィマーナトリウムとタラポルフィンナトリウムを用いた光増感反応による細胞応答と比較すると、ポルフィマーナトリウムでは  $\text{Ca}^{2+}$  振動の消失時間が短く、細胞膜に形成される孔数も多いことから、より効率的に細胞の電気生理学的障害を起こしていると考えられる。一方、本実験条件において励起光に対する吸収効率を考慮して各光感受性物質の単位時間・単位体積における吸収エネルギーを比較すると、タラポルフィンナトリウムでは  $7.4 \times 10^{-2} \text{ Js}^{-1} \text{ cm}^{-3}$  であり、ポルフィマーナトリウムの場合の  $1.5 \times 10^{-3} \text{ Js}^{-1} \text{ cm}^{-3}$  より 50 倍程度高い (3.2.3 参照)。また、一重項酸素産生の量子収率を比較すると、タラポルフィンナトリウムでは  $\Phi_{\Delta} = 0.77$  であり、ポルフィマーナトリウムの  $\Phi_{\Delta} = 0.25$  と比較して 3 倍以上高い (3.2.3 参照)。このように励起光に対する吸収、一重項酸素の産生効率はタラポルフィンナトリウムの方がポルフィマーナトリウムより高いにも関わらず、本実験ではポルフィマーナトリウムを用いた光増感反応の方が効率的に細胞障害を与えた。この理由は両光感受性物質の細胞内分布の違いによるものと考えられる。光増感反応による細胞障害の程度はその標的となる細胞膜あるいは細胞内小器官と光感受性物質との距離に依存する [32]。光増感反応で発生した一重項酸素の寿命は水中で半減期  $4 \mu\text{s}$  以内 (反応距離  $125 \text{ nm}$  以内) であり [32]、細胞質中では  $10 \sim 320 \text{ ns}$  (反応距離  $10 \sim 55 \text{ nm}$ ) であるため (3.2.2 参照)、発生した一重項酸素は近傍に存在する標的のみに障害を与える。ポルフィマーナトリウムは、短時間接触条件では細胞膜に分布するため、光増感反応で発生した一重項酸素は膜蛋白を障害すると考えられる [6,7]。また、膜蛋白に結合した光感受性物質は Type I 反応を起こし、酸化作用によって脂質膜を障害するとの報告もある [33]。このようにポルフィマーナトリウムでは Type I および Type II 反応による酸化作用によって効率的に細胞膜を障害していると考えられる。長時間接触条件で効率的に障害を引き起こした (表 5-2、図 5-15) 理由としては、短時間接触条件ではほとんどのポルフィマーナトリウムは細胞膜の表面に結合しているのに対し、 $2 \sim 3$  時間接触を続けるとポルフィマーナトリウムが細胞膜の脂質二重層に取り込まれたためと考えられる [34,35]。脂質二重層の間では一重項酸素の寿命は延長し、その半減期は  $13 \sim 35 \mu\text{s}$  になると報告されている [36]。このため、脂質二重層に取り込まれたポルフィマーナトリウムは効率的に細胞膜を障害したと考えられる。一方、タラポルフィンナトリウムは水溶性のためそのまま細胞膜を透過せず、貪食作用で細胞内に取り込まれるため細胞膜には分布しない [37-39]。タラポルフィンナトリウムを用いた短時間接触条件の光増感反応では、細胞外の細胞膜近傍で発生した一重項酸素はその反応距離内 ( $125 \text{ nm}$  以内) で細胞膜に衝突した場合に細胞膜障害を起こすと考えられる。このようにタラポルフィンナトリウムを用いた光増感反応の場合は標的と光感受性物質の距離がポルフィマーナトリウムの場合と比較して長いために、発生した一重項酸素は効率的に細胞障害を起こしていない。それにも関わらず、ポルフィマーナトリウムと同程度の細胞障害が得

られたのは、前述した光感受性物質の吸収係数や一重項酸素発生効率が高いためと考えられる。

光感受性物質の接触条件が短時間接触条件あるいは長時間接触条件における光増感反応に対する電気生理学的細胞応答の関係を図 5-16 にまとめる。短時間接触条件の場合には細胞外に光感受性物質が分布しており、光増感反応を起こすと細胞の外側で発生した活性酸素が細胞膜あるいはイオンチャネルを障害し、即時的な電気生理学的障害を起こす。その後、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が過剰な状態となり、最終的にネクロシスに至る。この光増感反応による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇の原因は種々の可能性が考えられるが (5.5 参照)、光増感反応による細胞膜障害あるいはイオンチャネル障害が蓄積することで細胞外から  $\text{Ca}^{2+}$ が流入すると考えられる。以上より、心筋組織の場合は間質液中に光感受性物質が分布する状態で光増感反応を起こせば、即時的かつ永続的な心筋組織の電気伝導性消失が得られる可能性がある。一方、長時間接触条件の場合には細胞内に光感受性物質が取り込まれ、ある特定の細胞内小器官に集積する。この状態で光増感反応を起こすと細胞内小器官が障害され、アポトーシスを誘導して緩やかに細胞死に至る [10]。

## 5.6 結言

本章では、心筋組織に対して光増感反応により即時的な心筋電気伝導ブロックを起こす光増感反応条件を探索するため、細胞レベルで光増感反応により即時的な心筋細胞の電気伝導性消失が得られる条件を探索した。光感受性物質の接触時間を変化させて同物質の細胞内外分布を変化させ、光増感反応中の心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を測定することで電気生理学的な細胞応答を調査した。短時間接触条件、すなわち細胞外に光感受性物質が分布している状態で光増感反応を起こすと、細胞外で発生した活性酸素によってイオンチャネルおよび細胞膜が障害し、照射から数 s 程度で電気生理学的障害が起き、引き続き細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が過剰になりネクロシスに至ることがわかった。生体の場合には、光感受性物質の分布を決めるのは光感受性物質の投与後から照射までのインターバル時間であり、短時間インターバルを適用することで間質液中に光感受性物質が分布する状態となり、この状態で光増感反応を起こすことで、即時的な心筋電気伝導ブロックが得られると予想された。

## 参考文献

- [1] W. G. Roberts, F. Y. Shiau, J. S. Nelson, K. M. Smith, and M. W. Berns, "In vitro characterization of monoaspartyl chlorin e6 and diaspartyl chlorin e6 for photodynamic therapy," *J Natl Cancer Inst*, vol. 80, pp. 330–336, 1988.
- [2] J. A. Caruso, P. A. Mathieu, and J. J. Reiners Jr, "Sphingomyelins suppress the targeted disruption of lysosomes/endosomes by the photosensitizer NPe6 during photodynamic therapy," *Biochem J*, vol. 392, pp. 325–334, 2005.
- [3] B. C. Wilson, M. Olivo, and G. Singh, "Subcellular localization of Photofrin® and aminolevulinic acid and photodynamic cross-resistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to Photofrin-mediated photodynamic therapy," *Photochem Photobiol*, vol. 65, pp. 166–176, 1997.
- [4] Y. J. Hsieh, C. C. Wu, C. J. Chang, and J. S. Yu, "Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: When plasma membranes are the main targets," *J Cell Physiol*, vol. 194, pp. 363–375, 2003.
- [5] A. Takahashi, P. Camacho, J. D. Lechleiter, and B. Herman, "Measurement of intracellular calcium," *Physiol Rev*, vol. 79, pp. 1089–1125, 1999.
- [6] H. Seguchi, M. Ritter, M. Shizukushi, H. Ishida, G. Chokoh, H. Nakazawa, K. W. Spitzer, and W. H. Barry, "Propagation of  $Ca^{2+}$  release in cardiac myocytes: Role of mitochondria," *Cell Calcium*, vol. 38, pp. 1–9, 2005.
- [7] K. R. Gee, K. A. Brown, W. N. U. Chen, J. Bishop-Stewart, D. Gray, and I. Johnson, "Chemical and physiological characterization of fluo-4  $Ca^{2+}$  indicator dyes," *Cell Calcium*, vol. 27, pp. 97–106, 2000.
- [8] D. Thomas, S. C. Tovey, T. J. Collins, M. D. Bootman, M. J. Berridge, and P. Lipp, "A comparison of fluorescent  $Ca^{2+}$  indicator properties and their use in measuring elementary and global  $Ca^{2+}$  signals," *Cell Calcium*, vol. 28, pp. 213–223, 2000.
- [9] 三好俊一郎, "心臓分野での光計測のトラブルシューティング," *Jpn J Electrophysiol*, vol. 29, pp. 226–230, 2009.
- [10] N. L. Olenick, R. L. Morris, and I. Belichenko, "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why, and how," *Photochem Photobiol Sci*, vol. 1, pp. 1–21, 2002.
- [11] M. Dellinger, "Apoptosis or necrosis following Photofrin® photosensitization: Influence of the incubation protocol," *Photochem Photobiol*, vol. 64, pp. 182–187, 1996.
- [12] I. J. MacDonald, J. Morgan, D. A. Bellnier, G. M. Paszkiewicz, J. E. Whitaker, D. J. Litchfield,

- and T. J. Dougherty, "Subcellular localization patterns and their relationship to photodynamic activity of pyropheophorbide-a derivatives," *Photochem Photobiol*, vol. 70, pp. 789–797, 1999.
- [13] T. Bohle, M. C. Brandt, N. Henn, A. Schmidt, W. Bloch, and D. J. Beuckelmann, "Identification of the cardiac ryanodine receptor channel in membrane blebs of sarcoplasmic reticulum," *FEBS Lett*, vol. 505, 419–425, 2001.
- [14] D. P. Valenzano and M. Tarr, "Membrane photomodification of cardiac myocytes: Potassium and leakage currents," *Photochem Photobiol*, vol. 53, pp. 195–201, 1991.
- [15] M. Tarr and D. P. Valenzano, "Modification of cardiac ionic currents by photosensitizer-generated reactive oxygen," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 23, pp. 639–649, 1991.
- [16] M. Tarr, A. Frolov, and D. P. Valenzano, "Photosensitization-induced calcium overload in cardiac cells: Direct link to membrane permeabilization and calcium influx," *Photochem Photobiol*, vol. 73, pp. 418–424, 2001.
- [17] L. Kunz and G. Stark, "Photofrin II sensitized modifications of ion transport across the plasma membrane of an epithelial cell line: I. Electrical measurements at the whole-cell level," *J Membr Biol*, vol. 166, pp. 179–185, 1998.
- [18] L. Kunz and G. Stark, "Photofrin II sensitized modifications of ion transport across the plasma membrane of an epithelial cell line: II. Analysis at the level of membrane patches," *J Membr Biol*, vol. 166, pp. 187–196, 1998.
- [19] F. Killig, L. Kunz, and G. Stark, "Photomodification of the electrical properties of the plasma membrane: A comparison between 6 different membrane-active photosensitizers," *J Membr Biol*, vol. 181, pp. 41–46, 2001.
- [20] G. Stark, "Functional consequences of oxidative membrane damage," *J Membr Biol*, vol. 205, pp. 1–16, 2005.
- [21] B. Deuticke, U. Henseleit, C. W. M. Haest, K. B. Heller, and T. M. A. R. Dubbelman, "Enhancement of transbilayer mobility of a membrane lipid probe accompanies formation of membrane leaks during photodynamic treatment of erythrocytes," *Biochim Biophys Acta*, vol. 982, 53–61, 1989.
- [22] I. B. Zavodnik, L. B. Zavodnik, and M. J. Bryszewska, "The mechanism of Zn-phthalocyanine photosensitized lysis of human erythrocytes," *J Photochem Photobiol B*, vol. 67, pp. 1–10, 2002.
- [23] E. A. Kotova, A. V. Kuzevanov, A. A. Pashkovskaya, and Y. N. Antonenko, "Selective permeabilization of lipid membranes by photodynamic action via formation of hydrophobic defects or pre-pores," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1808, pp. 2252–2257, 2011.
- [24] A. Minta, J. P. Kao, and R. Y. Tsien, "Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores," *J Biol Chem*, vol. 264, pp. 8171–8178, 1989.

- [25] M. J. Berridge, P. Lipp, and M. D. Bootman, "The versatility and universality of calcium signaling," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 1, pp. 11–21, 2000.
- [26] E. Neumann, S. Kakorin, and K. Toensing, "Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes," *Bioelectrochem Bioenerg*, vol. 48, pp. 3–16, 1999.
- [27] T. Yamamoto, "On the thickness of the unit membrane," *J Cell Biol*, vol. 17, pp. 413–421, 1963.
- [28] R. E. C. Wildman, "Basic tissue preparation for electron microscopy assessment," in *Trace elements in laboratory rodents*, R. R. Watson, Ed. Florida: CRC Press, 1998, ch. 2.
- [29] M. Courtemanche, R. J. Ramirez, and S. Nattel, "Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: Insights from a mathematical model," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 275, pp. H301–H321, 1998.
- [30] R. E. Safford and J. B. Bassingthwaite, "Calcium diffusion in transient and steady states in muscle," *Biophys J*, vol. 20, pp. 113–136, 1977.
- [31] D. M. Bers and A. Peskoff, "Diffusion around a cardiac calcium channel and the role of surface bound calcium," *Biophys J*, vol. 59, pp. 703–721, 1991.
- [32] R. W. Redmond and I. E. Kochevar, "Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen," *Photochem Photobiol*, vol. 82, pp. 1178–1186, 2006.
- [33] M. Athar, H. Mukhtar, and D. R. Bickers, "Differential role of reactive oxygen intermediates in photofrin-I- and photofrin-II-mediated photoenhancement of lipid peroxidation in epidermal microsomal membranes," *J Invest Dermatol*, vol. 90, pp. 652–657, 1998.
- [34] I. Bronshtein, M. Afri, H. Weitman, A. A. Frimer, K. M. Smith, and B. Ehrenberg, "Porphyrin depth in lipid bilayers as determined by iodide and parallax fluorescence quenching methods and its effect on photosensitizing efficiency," *Biophys J*, vol. 87, pp. 1155–1164, 2004.
- [35] A. Lavi, H. Weitman, R. T. Holmes, K. M. Smith, and B. Ehrenberg, "The depth of porphyrin in a membrane and the membrane's physical properties affect the photosensitizing efficiency," *Biophys J*, vol. 82, pp. 2101–2110, 2002.
- [36] B. Ehrenberg, J. L. Anderson, and C. S. Foote, "Kinetics and yield of singlet oxygen photosensitized by hypericin in organic and biological media," *Photochem Photobiol*, vol. 68, pp. 135–140, 1998.
- [37] M. Vermathen, M. Marzorati, P. Vermathen, and P. Bigler, "pH-dependent distribution of chlorin e6 derivatives across phospholipid bilayers probed by NMR spectroscopy," *Langmuir*, vol. 26, pp. 11085–11094, 2010.
- [38] H. Mojzisoava, S. Bonneau, C. Vever-Bizet, and D. Brault, "The pH-dependent distribution of the photosensitizer chlorin e6 among plasma proteins and membranes: A physico-chemical approach," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1768, pp. 366–374, 2007.



- [39] H. Mojziso娃, S. Bonneau, C. Vever-Bizet, and D. Brault, “Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1768, pp. 2748–2756, 2007.

## 図表

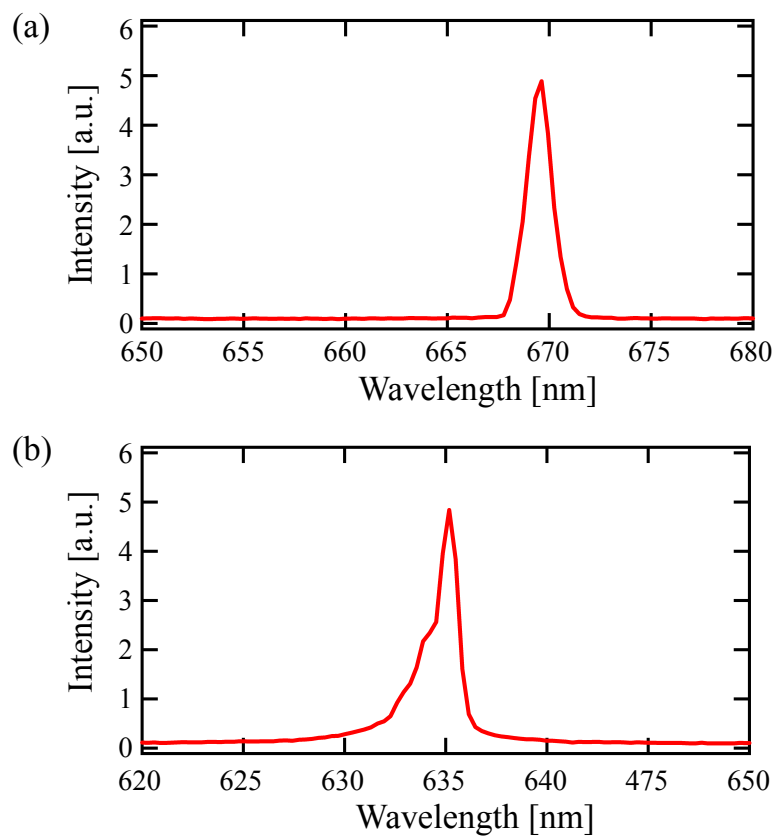


図 5-1 使用したレーザ光の発振スペクトル

(a) タラポルフィンナトリウム励起用の半導体レーザ光の発振スペクトル  
発振ピーク波長は 670 nm であり、発振ピークの半値全幅は 1.5 nm である。

(b) ポルフィマーナトリウム励起用の半導体レーザ光の発振スペクトル  
発振ピーク波長は 635 nm であり、発振ピークの半値全幅は 1.8 nm である。

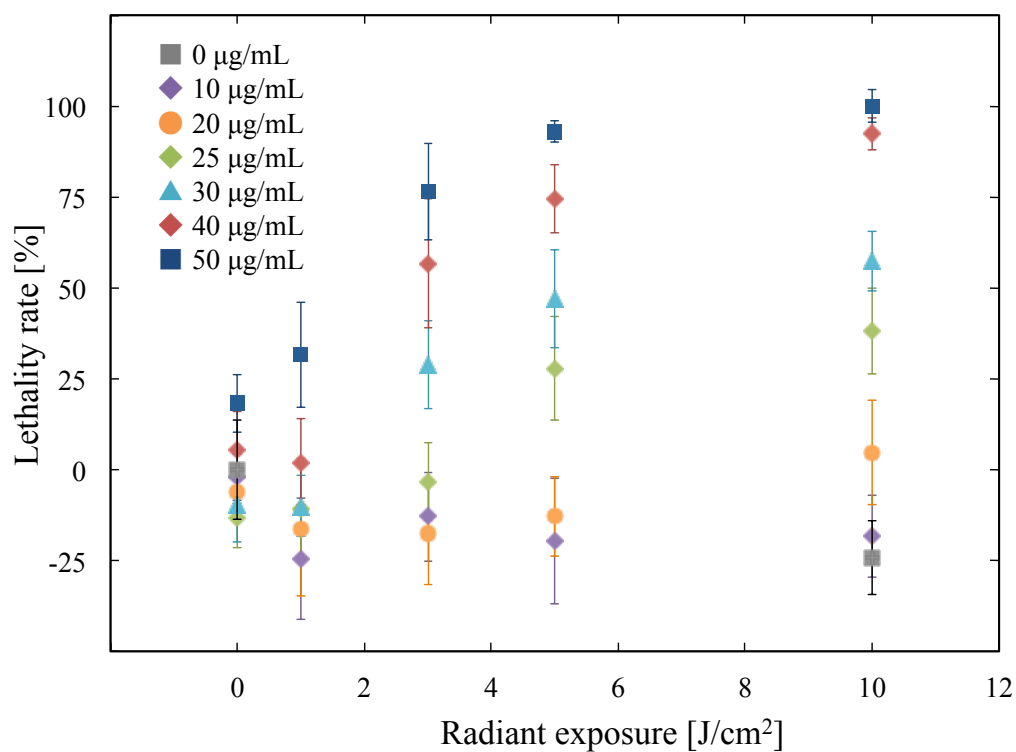


図5-2 タラポルフィンナトリウムを用いた光増感反応による心筋細胞の殺細胞効果

心筋細胞にタラポルフィンナトリウム溶液 (濃度 10 ~ 50 µg/mL) を接触して 30 min 間培養後、発振中心波長 670 nm の半導体レーザー光 (放射照度 150 mW/cm<sup>2</sup>、放射照射量 1 ~ 10 J/cm<sup>2</sup>) を照射して光増感反応を行い、死細胞率を測定した。各条件 N = 8 で行った。

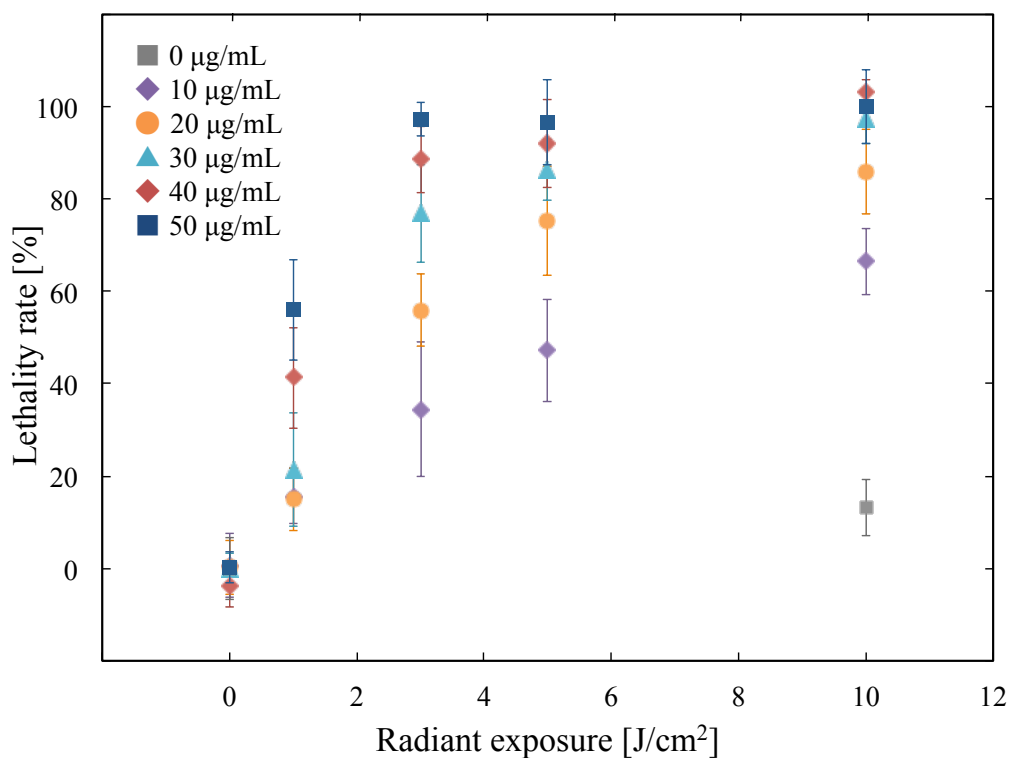


図5-3 ポルフィマーナトリウムを用いた光増感反応による心筋細胞の殺細胞効果  
心筋細胞にポルフィマーナトリウム溶液 (濃度 10 ~ 50  $\mu\text{g/mL}$ ) を接触して 30 min  
間培養後、発振中心波長 635 nm の半導体レーザー光 (放射照度  $150 \text{ mW/cm}^2$ 、放射照  
射量  $1 \sim 10 \text{ J/cm}^2$ ) を照射して光増感反応を行い、死細胞率を測定した。各条件  $N =$   
8 で行った。

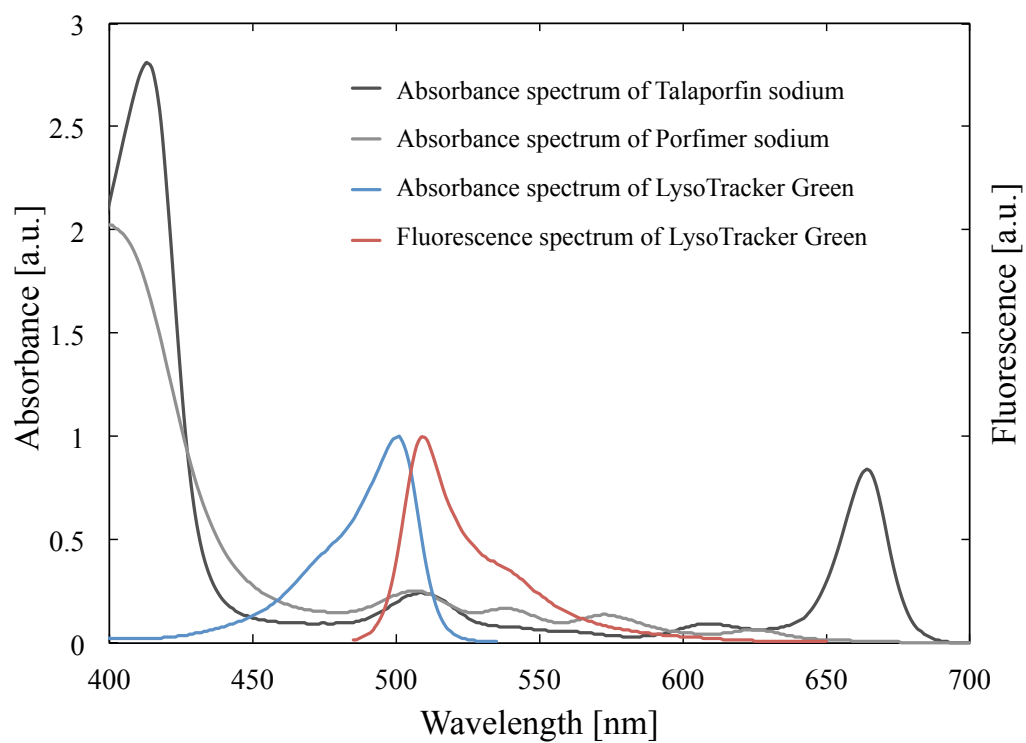


図 5-4 光感受性物質の吸収スペクトルおよび蛍光指示薬 LysoTracker Green の吸収・蛍光スペクトル

光感受性物質タラポルフィンナトリウム (黒線) とポルフィマーナトリウム (灰色線) の吸収スペクトル、およびライソソームを標識する蛍光指示薬 LysoTracker Green の吸収スペクトル (青線) および蛍光スペクトル (赤線) を示す。

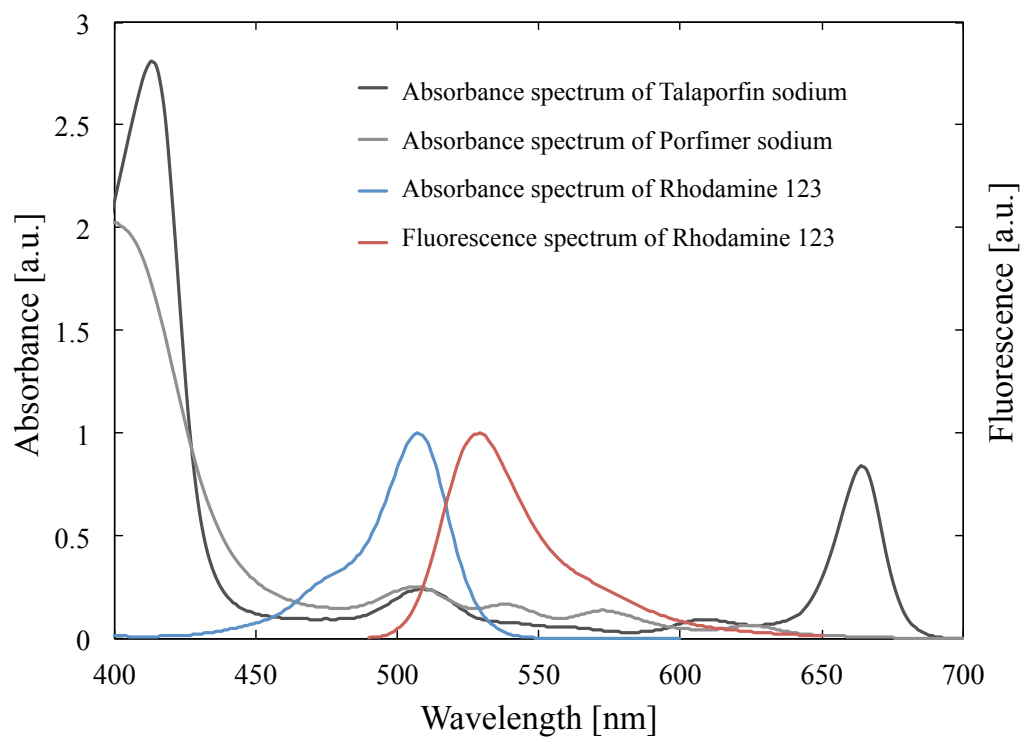


図 5-5 光感受性物質の吸収スペクトルおよび蛍光指示薬 Rhodamine 123 の吸収・蛍光スペクトル

光感受性物質タラポルフィンナトリウム (黒線) とポルフィマーナトリウム (灰色線) の吸収スペクトル、およびミトコンドリアを標識する蛍光指示薬 Rhodamine 123 の吸収スペクトル (青線) および蛍光スペクトル (赤線) を示す。

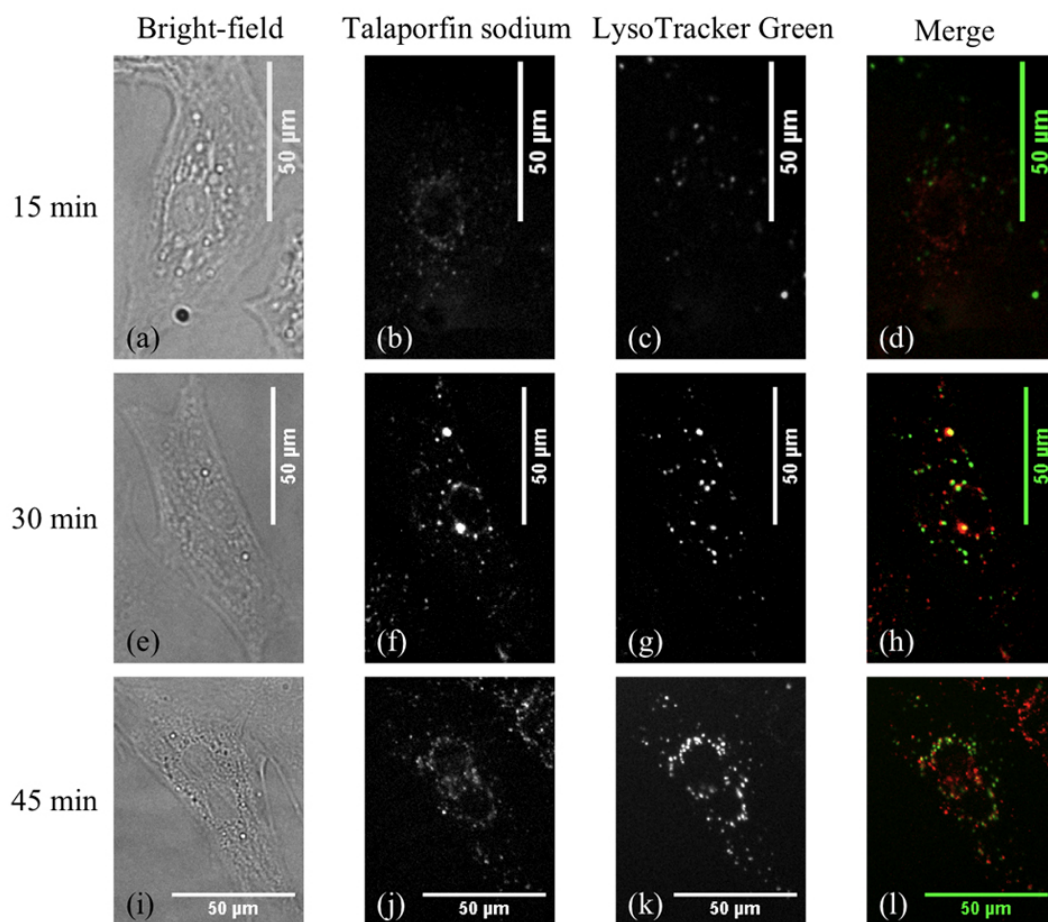


図 5-6 各接触時間におけるタラポルフィンナトリウムの心筋細胞内分布  
 接触時間 15、30、60 min の場合の同一心筋細胞における明視野画像 ((a)、(e)、(i))、  
 タラポルフィンナトリウムの蛍光画像 ((b)、(f)、(j))、LysoTracker Green の蛍光画  
 像 ((c)、(g)、(k))、およびタラポルフィンナトリウムと LysoTracker Green の蛍光輝  
 度分布の重ね合わせ画像 ((d)、(h)、(l)) を示す。

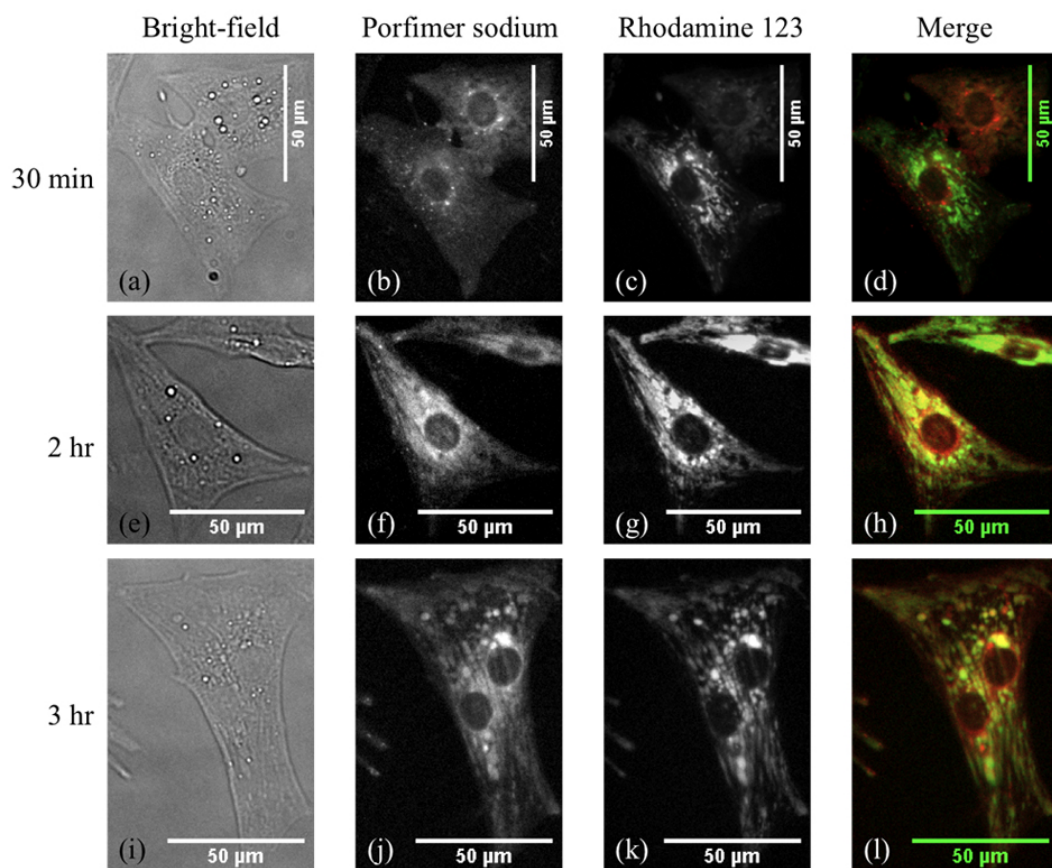


図 5-7 各接触時間におけるポルフィマーナトリウムの心筋細胞内分布  
 接触時間 0.5、2、3 hr の場合の同一心筋細胞における明視野画像 ((a)、(e)、(i))、  
 ポルフィマーナトリウムの蛍光画像 ((b)、(f)、(j))、Rhodamine 123 の蛍光画像 ((c)、  
 (g)、(k))、およびポルフィマーナトリウムと Rhodamine 123 の蛍光輝度分布の重ね  
 合わせ画像 ((d)、(h)、(l)) を示す。



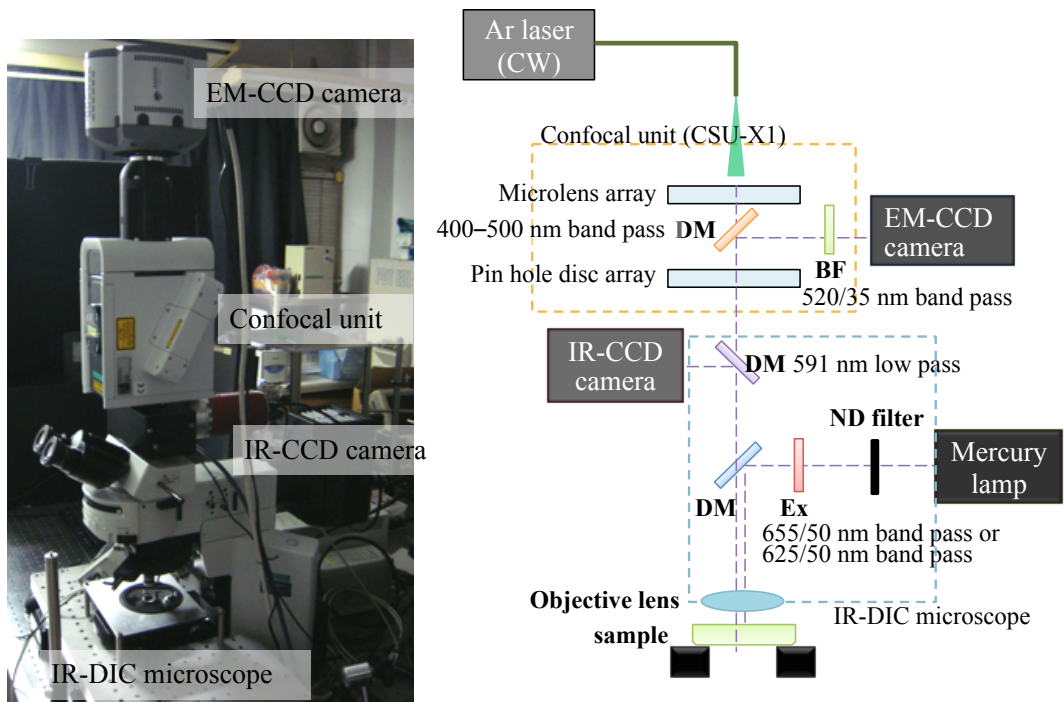


図 5-8 光増感反応中の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度計測用に構築した共焦点蛍光顕微システム

- (a) 構築した共焦点顕微システムの写真
- (b) 共焦点顕微システムの光学系の概要

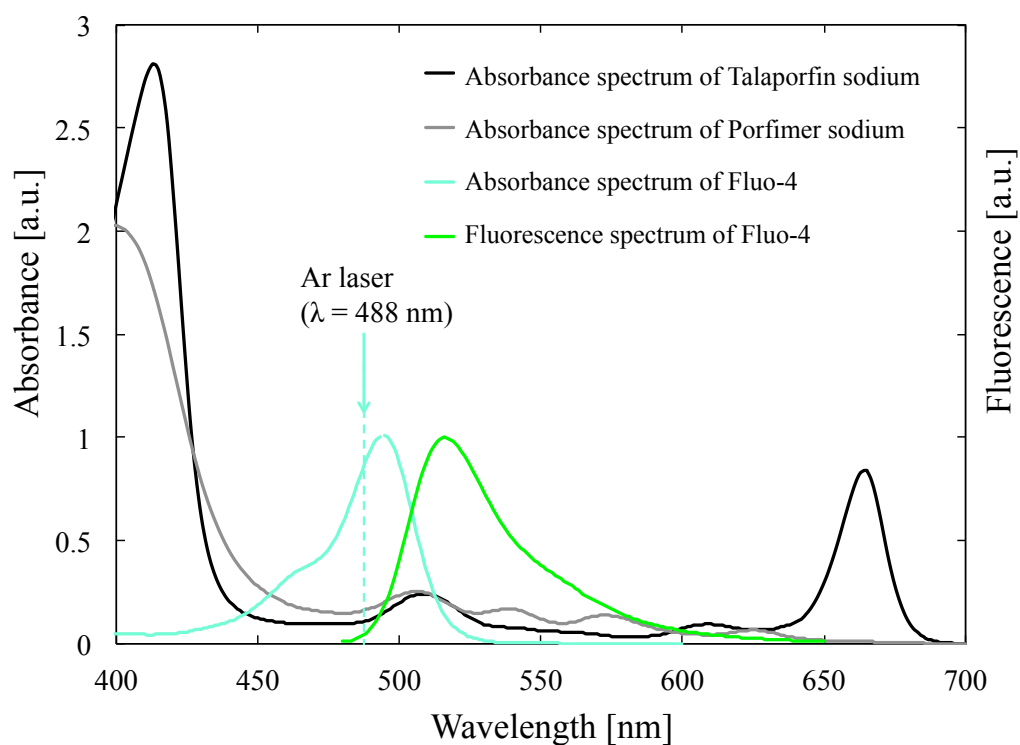


図 5-9 光感受性物質の吸収スペクトルおよび  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬 Fluo-4 の吸収・蛍光スペクトル

光感受性物質タラポルフィンナトリウム (黒線) とポルフィマーナトリウム (灰色線) の吸収スペクトル、および  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬 Fluo-4 の吸収スペクトル (水色線) および蛍光スペクトル (黄緑線) を示す。

表 5-1 光感受性物質の接触条件と細胞内分布の対応関係

	<b>Talaporfin sodium</b>		<b>Porfimer sodium</b>	
	Short interval	Long interval	Short interval	Long interval
<b>Cellular distribution of the photosensitizer</b>	Extracellular distribution	Lysosome localization	Extracellular and cell membrane distribution	Organelle, mainly mitochondria, distribution
<b>Photosensitizer loading time</b>	15 min	1 hr	15 min	3 hr

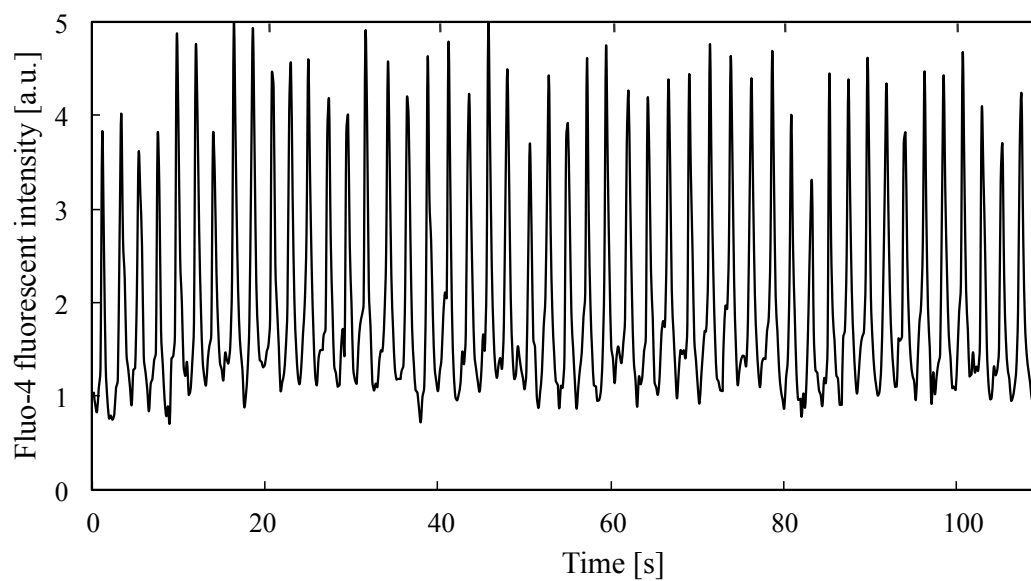


図 5-10 コントロール条件における心筋細胞内 Fluo-4 平均蛍光輝度の経時変化  
タラポルフィンナトリウム (濃度 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を短時間接触条件 (接触時間 15 min)  
で接触し、赤色光照射を行わないコントロール条件における心筋細胞内 Fluo-4 平  
均蛍光輝度の経時的変化

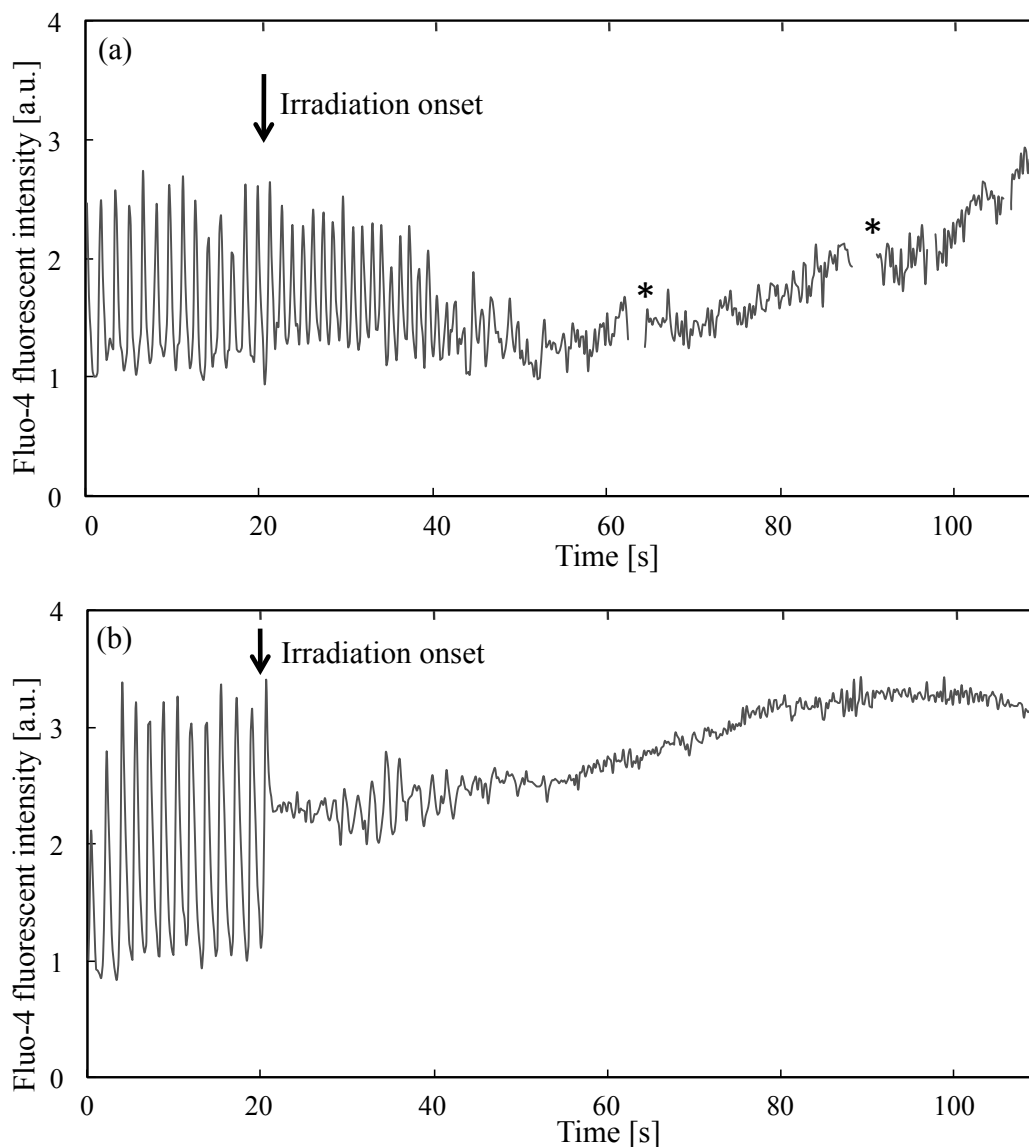


図 5-11 短時間接触条件の光増感反応を行った際の心筋細胞内 Fluo-4 蛍光輝度の経時変化

(a) タラポルフィンナトリウムを用いた光増感反応

タラポルフィンナトリウム (濃度  $30 \mu\text{g/mL}$ ) を短時間接触条件 (接触時間 15 min) で接触し、Fluo-4 蛍光輝度の測定開始 20 s 後から波長域  $655 \pm 25 \text{ nm}$  の赤色光 (放射照度  $103 \text{ mW/cm}^2$ ) を照射し光増感反応を行った。図中の\*印において焦点調整を行った。

(b) ポルフィマーナトリウムを用いた光増感

ポルフィマーナトリウム (濃度  $30 \mu\text{g/mL}$ ) を短時間接触条件 (接触時間 15 min) で接触し、Fluo-4 蛍光輝度の測定開始 20 s 後から波長域  $625 \pm 25 \text{ nm}$  の赤色光 (放射照度  $117 \text{ mW/cm}^2$ ) を照射し光増感反応を行った。

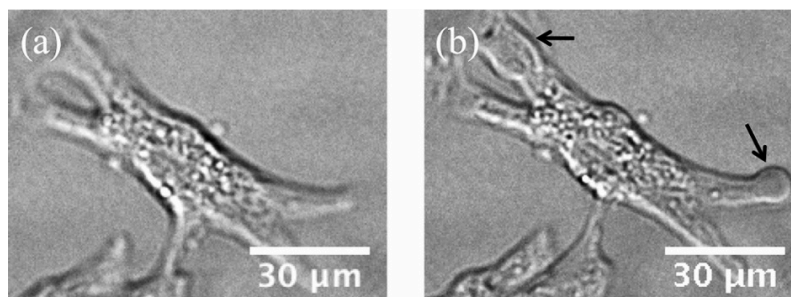


図 5-12 短時間接触条件のタラポルフィンナトリウムを用いた光増感反応前後の心筋細胞の明視野顕微画像

(a) 光増感反応前

(b) 光増感反応 5 min 後

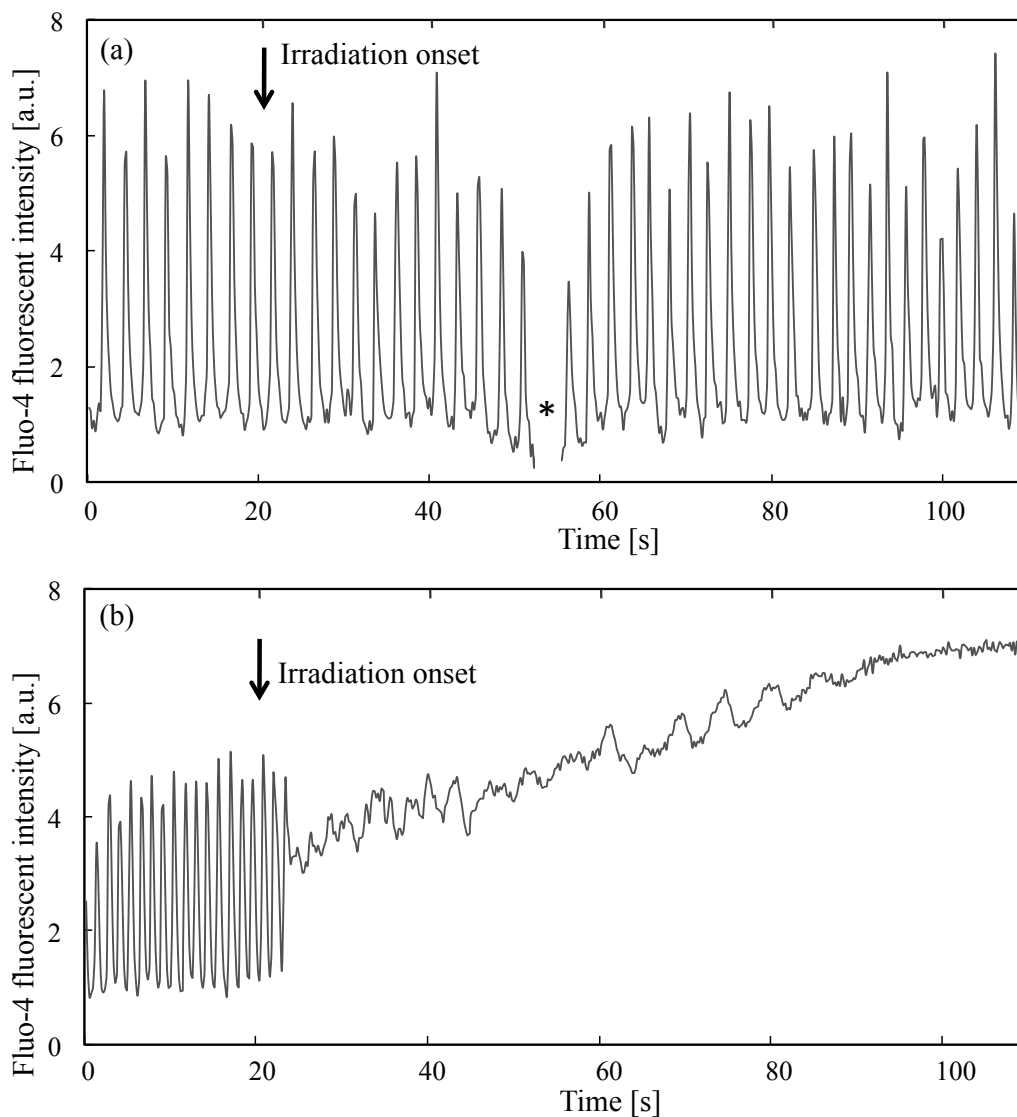


図 5-13 長時間接触条件の光増感反応を行った際の心筋細胞内 Fluo-4 蛍光輝度の経時変化

(a) タラポルフィンナトリウムを用いた光増感反応

タラポルフィンナトリウム (濃度  $30 \mu\text{g/mL}$ ) を長時間接触条件 (接触時間 1 hr) で接触し、Fluo-4 蛍光輝度の測定開始 20 s 後から波長域  $655 \pm 25 \text{ nm}$  の赤色光 (放射照度  $103 \text{ mW/cm}^2$ ) を照射し光増感反応を行った。図中の\*印において焦点調整を行った。

(b) ポルフィマーナトリウムを用いた光増感

ポルフィマーナトリウム (濃度  $30 \mu\text{g/mL}$ ) を長時間接触条件 (接触時間 3 hr) で接触し、Fluo-4 蛍光輝度の測定開始 20 s 後から波長域  $625 \pm 25 \text{ nm}$  の赤色光 (放射照度  $117 \text{ mW/cm}^2$ ) を照射し光増感反応を行った。

表 5-2 各接触条件においてタラポルフィンナトリウムあるいはポルフィマーナトリウムを用いた光増感反応を行った際の  $\text{Ca}^{2+}$  振動の消失時間と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の平均変化率

	<b>Talaporfin sodium</b>		<b>Porfimer sodium</b>	
	Short interval (N=8)	Long interval	Short interval (N=2)	Long interval (N=2)
<b>Decay time of <math>\text{Ca}^{2+}</math> oscillation [s]</b>	14±6	–	9.9	6.8
<b>Average rate of change in intracellular <math>\text{Ca}^{2+}</math> concentration [nM/s]</b>	18±7	–	44	83



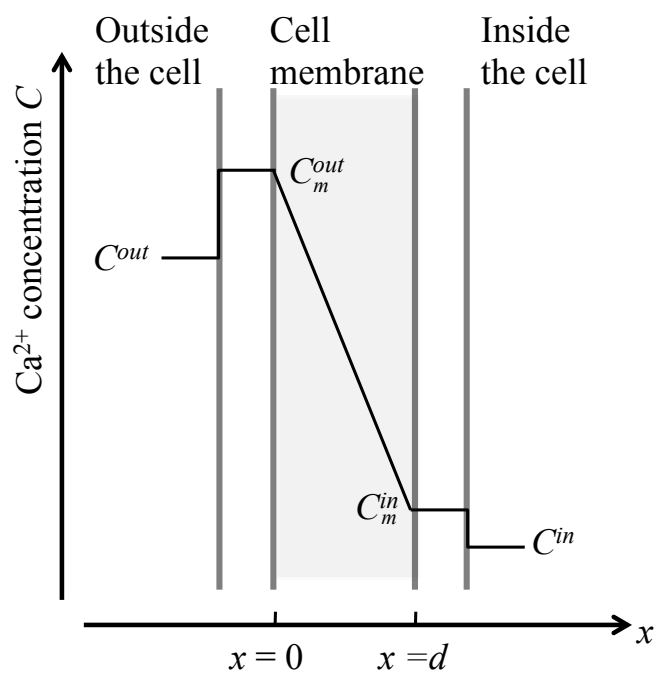


図 5-14 細胞膜近傍における  $\text{Ca}^{2+}$  濃度勾配の説明図

$x$  軸は細胞膜 (膜厚さ  $d$ ) に対して垂直な軸とし、縦軸は  $\text{Ca}^{2+}$  濃度とする。液層と細胞膜の界面で  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は平衡状態にあり、細胞内外の細胞膜近傍における  $\text{Ca}^{2+}$  濃度  $C_m^{\text{in}}$ 、 $C_m^{\text{out}}$  は、細胞内外液層の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度  $C^{\text{in}}$ 、 $C^{\text{out}}$  を用いて  $\gamma = \frac{C_m^{\text{out}}}{C^{\text{out}}} = \frac{C_m^{\text{in}}}{C^{\text{in}}}$  と表される。

表 5-3 光増感反応により細胞膜に発生した孔生成数の計算で用いたパラメータ値  
(文献[22,27-31]より引用)

Parameters	Value
Cell membrane thickness $d$	7.5 nm [27,28]
Extracellular $\text{Ca}^{2+}$ concentration $C^{out}$	2.2 mM
Cellular volume $V_c$	20100 $\mu\text{m}^3$ [29]
Diffusion coefficient of $\text{Ca}^{2+}$ $D_m$	165 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ [30,31]
Pore size $r_p$ $\left( \left( \frac{r_p}{2} \right)^2 \pi = s_p \right)$	1.1 nm [22]

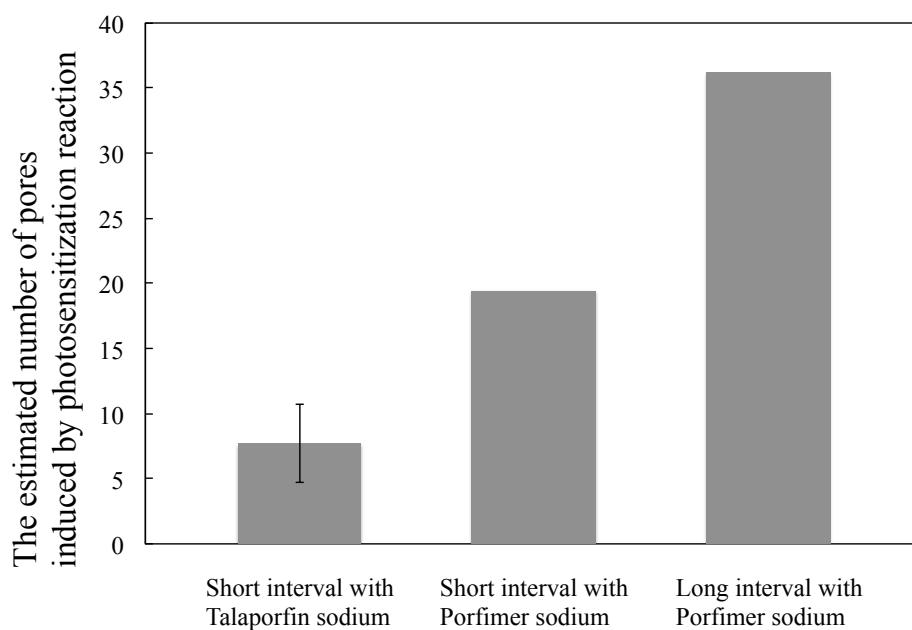


図 5-15 光増感反応により細胞膜に発生した細孔の見積り数

左からタラポルフィンナトリウムを用いた短時間接触条件 (N = 8)、ポルフィマーナトリウムを用いた短時間・長時間接触条件 (いずれも N = 2) において得られた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度増加から式 (5-5) を用いて細胞膜に形成された細孔数を推定した。

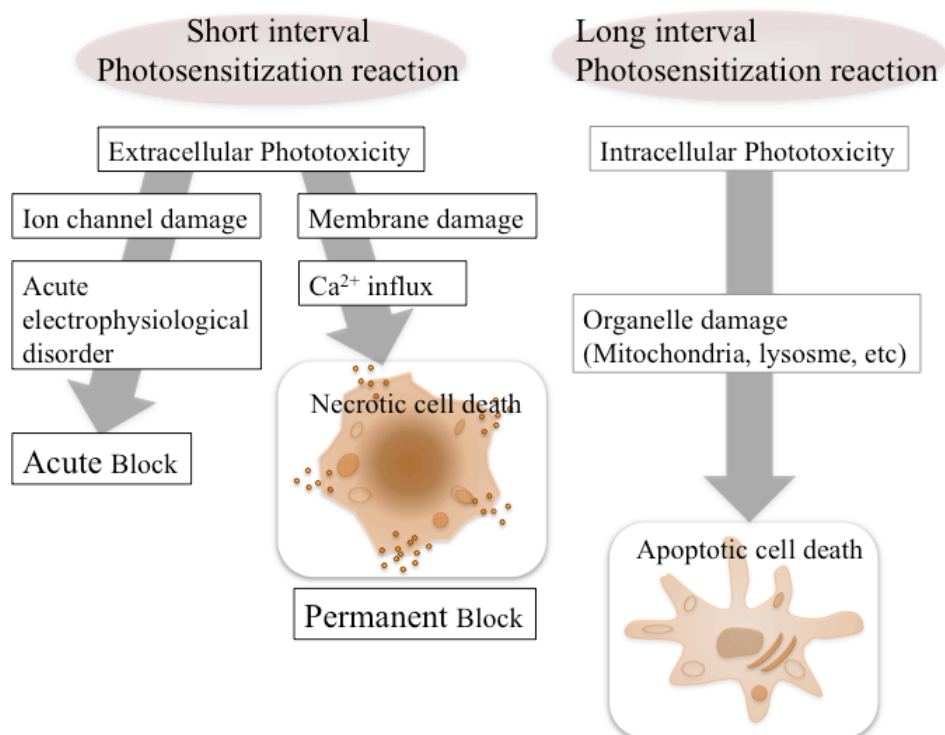


図 5-16 光感受性物質の接触条件が短時間接触条件あるいは長時間接触条件における光増感反応に対する電気生理学的細胞応答の関係

## 第6章 大型動物を用いた開胸下における光増感反応による 即時的かつ永続的な心筋電気伝導ブロック (*in vivo* 実験)

### 6.1 緒言

本章では、第5章の細胞実験で得られた光感受性物質が細胞外に分布する状態の光増感反応による心筋細胞の即時的な電気伝導性消失が、生体組織を対象とした場合にも得られるどうか検証した。5.5よりタラポルフィンナトリウムと比較してポルフィマーナトリウムの方が短時間接触時間の光増感反応でより効率的に心筋細胞の電気伝導性消失を起こしたが、動物実験では実用性の観点から排泄性の高さと一重項酸素の産生効率を重視してタラポルフィンナトリウムを使用した。ヒトと同程度の寸法を持つ豚の心壁を対象とし、タラポルフィンナトリウムを用いて短時間インターバルの光増感反応を行い、即時的かつ永続的な心筋電気伝導ブロックを実証することを目的とした。

### 6.2 心筋組織の光学定数の測定

光感受性物質の励起光である赤色レーザ光の心筋組織内光分布を推定し、*in vivo*動物実験の光照射条件を決めるため、摘出した豚心筋組織の波長663 nmにおける光学定数を求めた。心筋組織の光学定数の算出にはクベルカムンク (Kubelka-Munk) 法を用い [1-3]、測定した反射率と透過率から吸収係数および等価散乱係数を求めた [4,5]。クベルカムンク法は、光源が拡散光であること、媒質中の散乱は等方散乱であること、フレネル反射などの境界面での反射は無視できるなどの仮定のもとに成立しているため適用範囲は限られるものの、生体組織などの散乱体を含む媒質の光学定数を求める簡易な手法として一般に用いられている [1,3,4]。クベルカムンク法に関しては付録Aに詳細を記載した。

#### 6.2.1 実験方法

摘出した食用成豚の心臓 (東京芝浦臓器株式会社, 東京) から心房壁と心室壁を切り出した。心室壁 (組織厚み1~2 cm) は心内膜および心外膜を除去し、外科用メスで厚さ約1 mmに切り出して組織サンプルを作成した。心房壁 (組織厚み1~2 mm) は心内膜および心外膜を除去せずに組織サンプルとした。これらの組織サンプルを厚さ0.2 mmのカバーガラス2枚で挟んだ。組織厚みをノギスで測定後、組織サンプルを積分球を取り付けた紫外可視近赤外分光光度計 (UV-3600; 株式会社島津製作所, 京都) の試料ホルダーに固定した。波長663 nmにおいて心房組織サンプル (N=2) および心室組織サンプル (N=16) それぞれの透過率  $T$  および反射率  $R$  を計測した。得られた透過率および反射率からクベルカムンクの式 (付録A: 式 (A-3)、式 (A-4)) によって吸収および散乱を表すパラメータ  $A_{KM}$  および  $S_{KM}$  を求め、付録Aの式 (A-5) によって光拡散理論において定義された吸収係数  $\mu_a$ 、等価散乱係数  $\mu_s'$

を求めた。次いで、減衰係数  $\mu_{eff}$ 、および光侵達長  $\delta$  を以下の関係式から算出した [4]。

$$\mu_{eff} = \delta^{-1} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s')} \quad (6-1)$$

### 6.2.2 実験結果

豚の心房壁および心室壁における波長663 nmにおける光学定数はそれぞれ以下のように求められた。心房壁の吸収係数は  $\mu_a = 0.26 \text{ mm}^{-1}$ 、等価散乱係数は  $\mu_s' = 0.75 \text{ mm}^{-1}$ 、減衰係数は  $\mu_{eff} = 0.88 \text{ mm}^{-1}$ 、光侵達長は  $\delta = 1.2 \text{ mm}$  であった。心室壁の吸収係数は  $\mu_a = 0.31 \pm 0.06 \text{ mm}^{-1}$ 、等価散乱係数は  $\mu_s' = 0.58 \pm 0.07 \text{ mm}^{-1}$ 、減衰係数は  $\mu_{eff} = 0.93 \pm 0.08 \text{ mm}^{-1}$ 、光侵達長は  $\delta = 1.1 \pm 0.1 \text{ mm}$  であった。得られた吸収係数および等価散乱係数はいずれも以下に示す複数の文献で報告された値の高値と低値の間であった [6,7]。

- i) 吸収係数:  $0.01 \text{ mm}^{-1} < \mu_a < 0.7 \text{ mm}^{-1}$
- ii) 等価散乱係数:  $0.1 \text{ mm}^{-1} < \mu_s' < 1.5 \text{ mm}^{-1}$

心内膜および心外膜の有無など組織サンプルの準備方法が心房壁と心室壁で異なるために多少の違いはあるものの、全体としては心房壁と心室壁で光学定数はほぼ同じであった。心臓の光学特性は部位によらず、組織内の光分布は心房も心室もほぼ同じであることがわかった。

## 6.3 光感受性物質の薬物動態調査

豚におけるタラポルフィンナトリウムの体内動態を調べるため、タラポルフィンナトリウム投与後の豚血漿中タラポルフィンナトリウム濃度の時間変化を測定した。光感受性物質の血漿中濃度は組織内濃度とほぼ比例関係にあり、マウスやラットなどの小型動物においてはタラポルフィンナトリウムの心筋内濃度は血漿中濃度の10 ~ 20%になるとの報告がある [8-10]。血漿中のタラポルフィンナトリウム濃度を把握することで、対象組織中の薬剤濃度の概算が可能である。

### 6.3.1 実験方法

麻酔下でLW種雌豚 (体重約15 kg、月齢1.5 ~ 2.5ヶ月) に対して生理食塩水に溶解したタラポルフィンナトリウム 5、10 mg/kgを約1 min間で静脈内に単回投与した。投与5 ~ 60 min後に採血を行い、血液をエチレンジアミン四酢酸 (Ethylenediamine tetra-acetic acid; EDTA) 入りの採血管 (ベノジェクト®II; テルモ株式会社, 東京) に採取した。採取した血液サンプルを3000 rpmで10 min間、4°Cにて遠心分離し、上澄みの血漿成分を抽出して遮光下において-20°Cで凍結保存した。血漿サンプル内のタラポルフィンナトリウムの波長範囲350 ~ 710

nmにおける吸光度スペクトルを分光光度計 (6.2.1参照) で測定し、タラポルフィンナトリウムのQ帯の吸収ピーク (660 nm近傍) に対してベースライン法を適用し、光感受性物質由来の吸収ピーク面積を算出した。あらかじめ既知の濃度のタラポルフィンナトリウム溶液を用いて測定した吸収ピーク面積と光感受性物質濃度はタラポルフィンナトリウム濃度が5 ~ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で線形関係が得られ、これを検量線とし吸収ピーク面積から光感受性物質濃度に変換した。タラポルフィンナトリウム濃度が50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を超えるときは、血漿サンプルを生理食塩水で2倍に希釈してから吸光度スペクトルを測定した。

### 6.3.2 実験結果

図 6-1 に、タラポルフィンナトリウム 5、10 mg/kg を投与後 5 ~ 60 min における豚血漿中のタラポルフィンナトリウム濃度の測定値および、10 mg/kg 投与時の豚血漿中薬剤濃度の文献値を同一グラフ上に示す [9]。得られた血漿中タラポルフィンナトリウム濃度は時間とともに指数関数的に減少し、文献値と同様な動態を示した [9]。ヒトで報告されているように、静脈内投与後の血漿中タラポルフィンナトリウムの消失曲線は 2 コンパートメントモデルでモデル化することができた (4.3.1 参照)。図 6-1 の測定した豚血漿中のタラポルフィンナトリウムの消失曲線から、 $\alpha$  相および  $\beta$  相の半減期を求めると、 $\alpha$  相の半減期は 7 min、 $\beta$  相の半減期は 77 min となった。ヒトの場合は  $\alpha$  相の半減期は 6 hr、 $\beta$  相の半減期は 138 hr である [10,11]。ヒトと比較すると豚は  $\alpha$  相の半減期がヒトの 1/52 倍程度、 $\beta$  相では 1/108 倍程度と短く、豚ではタラポルフィンナトリウムの代謝が速いことがわかった。

## 6.4 即時的な心筋電気伝導ブロックの作成 (電気生理学的評価)

光増感反応による即時的な貫壁性の心筋電気伝導ブロックを実証するため、開胸下において豚の左心耳あるいは右心室壁に対してタラポルフィンナトリウムを用いた短時間インターバルの光増感反応を起こし、急性期の電気生理学的評価を行った。心筋組織に電気興奮の伝播経路を設定し、この伝播経路を遮断するように光増感反応の光照射ラインを作成した。伝播経路の興奮伝播時間を記録し、その変化から即時的な心筋電気伝導ブロックを評価した。

### 6.4.1 実験方法

本実験は慶應義塾動物実験委員会および理工学部生命倫理委員会の承認を得て、慶應義塾動物実験規定および理工学部生命倫理委員会規定を遵守し行った。実験動物は LW 種雌豚 2 頭 (体重約 15 kg、月齢 1.5 ~ 2 ヶ月) を用いた。豚に塩酸ケタミン注射液 (ケタラール; 第一三共プロファーマ株式会社, 東京) を 2 mg/kg と塩酸キシラジン (セラクター; バイエル薬品株式会社, 東京) を 2 mg/kg 筋肉内注射して鎮静させ、マスクを用いて 5%イソフ

ルラン (フォーレン; アボットジャパン株式会社, 東京) の麻酔ガスを流量 1.5 ~ 2.0 L/min で導入した。気管内挿管後、2.5%イソフルランの麻酔混合ガスを流量 1.5 ~ 2.0 L/min で導入して吸入麻酔に切り替え、全身麻酔状態を維持した。実験中は四肢誘導心電図、動脈圧、およびパルスオキシメーターによる酸素分圧を記録した。大腿部あるいは頸部より採血および持続点滴用の静脈ラインを確保した。左心耳を対象とする場合は左体側肋間直上より、右心室を対象とする場合は正中より深麻酔下において皮膚切開を行い、胸筋および肋間筋を剥離して開胸し、開胸器を用いて視野を確保した。心臓表面を傷つけないよう注意しながら心外膜を切開し、左心耳あるいは右心室が視野に入るように心臓を露出した。臨床において心房細動に対する高周波カテーテルアブレーションの対象部位は肺静脈近傍や左房後壁であるが、豚の場合は解剖学的に心房自由壁と比較して心耳の表面積の割合が多く、開胸した際に心耳が心房自由壁を覆い前面に露出する。このため、本実験では左心耳および右心室を使用した。心耳は楕状筋が発達している部位であり、心内面に凹凸があり組織厚みが不均一であるが、その電気生理学的な特性は心房組織と変わらず [12]、実験対象として問題ないと考えた。

光感受性物質とその投与条件、およびレーザー照射条件を以下のように選定した。5.4.4 の *in vitro* 細胞実験でタラポルフィンナトリウムとポルフィマーナトリウムを用いた短時間接触条件の光増感反応による電気生理学的応答を比較したところ、ポルフィマーナトリウムの方が効率的に心筋細胞の電気伝導性消失を起こした。ただし、ポルフィマーナトリウムは体内からの排泄が遅く遮光期間が約 1 ヶ月に及ぶため、本提案手法に対して実用的でないことから、排泄性および一重項酸素産生効率が優れたタラポルフィンナトリウムを採用した。タラポルフィンナトリウムは豚に対して 10 mg/kg 以内の投与量では薬剤毒性に関する問題が生じないという報告から [10]、10 mg/kg 以内で静脈内投与を行った。また、投薬から照射までのインターバル時間は、この静脈内投与量の場合にタラポルフィンナトリウムの血漿中濃度が 10  $\mu\text{g/mL}$  程度となり、かつ血漿中濃度が緩やかに変化する  $\beta$  相に入るように設定した。血漿中基準濃度の 10  $\mu\text{g/mL}$  は、先行研究のラット摘出心筋組織を用いた *ex vivo* 実験において、電気伝導性消失が得られた灌流液中のタラポルフィンナトリウム濃度 (8  $\mu\text{g/mL}$ ) を参考にして設定した [13]。豚では体内の光感受性物質の代謝が速く (6.3.2 参照)、照射中に薬剤濃度が大幅に変化する  $\alpha$  相で光増感反応の効果が維持できないため、緩やかな薬剤消失となる  $\beta$  相での試験を行った。これらの理由から豚での *in vivo* 実験ではインターバル時間を投与量 10 mg/kg の場合は 30 min、投与量 5 mg/kg の場合は 15 min とした。照射条件は、上述のラット摘出心筋組織を用いた先行研究にて心筋組織の電気伝導ブロックが得られた条件を参考に設定した [13]。この研究では厚さ 1 mm 程度のラット心筋組織で、レーザー光の放射照度 0.6  $\text{W/cm}^2$ 、放射照射量 36  $\text{J/cm}^2$  にて心筋電気伝導ブロックが得られた [13]。先行研究の条件をもとに [13]、6.2.2 で得られた心房組織における励起光の減衰を考慮し ( $\mu_{\text{eff}} = 0.88 \text{ mm}^{-1}$ )、今回対象とした厚さ 1 ~ 3 mm の左心耳に対して電気



伝導ブロックが得られる放射照射量を見積もると、 $36 \sim 210 \text{ J/cm}^2$ となる。以上より、豚の左心耳に対する光増感反応の放射照射条件は、放射照射量  $210 \text{ J/cm}^2$  近傍に設定した。

左心耳 (組織厚み  $1 \sim 3 \text{ mm}$ ) を対象にした場合の実験手順を以下に示す。図 6-2 に示すように、左心耳の表面の 2 カ所に線維走行に対して平行になるようそれぞれ刺激用双極電極 (双極電極 A) および電位測定用双極電極 (双極電極 B) を表層に刺入した。双極電極 A において洞調律より少し速い周期で電気刺激 (パルス幅  $6.3 \text{ ms}$ 、繰り返し周期  $3.0 \text{ Hz}$ 、振幅  $1.5 \text{ V}$ ) を行った。光増感反応前および反応中において、心筋組織内を伝播して双極電極 B にて測定された電気興奮を生体アンプおよびデータ収録システム (PowerLab; AD Instruments, UK) を用いて記録した。大腿静脈ラインより生理食塩水に溶解したタラポルフィンナトリウム  $10 \text{ mg/kg}$  を静脈内に約  $1 \text{ min}$  間で単回投与した。投与  $30 \text{ min}$  後から発振中心波長  $663 \text{ nm}$  の半導体レーザー光 (Optical Fuel; ソニー株式会社, 東京) を照射して光増感反応を起こした。図 6-3 に使用したレーザー光の発振スペクトル、およびタラポルフィンナトリウムの吸収スペクトルを示す。レーザー光は石英光ファイバー (コア径  $1.2 \text{ mm}$ 、開口数  $0.22$ ) で伝送し、心筋組織表面における照射径は  $7 \text{ mm}\Phi$  とした。光ファイバー先端は心筋組織に直接接触しないようスペーサを介して固定し、光ファイバーが心臓の拍動に追従して動くように光ファイバーを軽く押さえた。レーザー光照射条件は、組織表面における放射照度  $5.2 \text{ W/cm}^2$ 、放射照射量  $208 \text{ J/cm}^2$  とした。レーザー光は図 6-2 に示すように双極電極 A と B の間を横断するように一点ずつ、隣り合う照射領域が  $30\%$ 程度重なり合うよう合計 7 点照射し、照射域が長さ約  $35 \text{ mm}$ 、幅約  $7 \text{ mm}$  の帯状領域になるようにした。各光照射後約  $1 \text{ min}$  以内に双極電極 B において興奮伝播を記録し、双極電極 A で発生した電気興奮が双極電極 B に到達するまでの伝播時間  $t_{AB}$  を求めた。光増感反応により貫壁性の電気伝導ブロックラインが生じた場合、この電気伝導ブロックラインに沿って電気刺激は迂回して伝播するため、電気伝導ブロックラインの長さに応じた伝導遅延が得られる。2 つの双極電極間の興奮伝播時間を記録することで光増感反応による心筋電気伝導ブロックに伴う伝導遅延を測定した。

また、右心室自由壁 (組織厚み  $3 \sim 5 \text{ mm}$ ) を対象に同様の実験を行った。右心室自由壁に対して冠状動脈を避けて 2 組の双極電極を配置し、2 つの双極電極間の電気興奮の組織内伝播時間を記録した。タラポルフィンナトリウム  $5 \text{ mg/kg}$  を静脈内投与し、 $15 \text{ min}$  後から発振中心波長  $663 \text{ nm}$  の赤色レーザー光を照射して光増感反応を起こした。レーザー光照射条件は、放射照度は  $2.5 \text{ W/cm}^2$  とし、放射照射量は  $50 \sim 200 \text{ J/cm}^2$  とした。心室表層には冠状動脈が走行しており、光増感反応による血管閉塞性の障害を避けるため、冠状動脈を避けた部位を選んで光照射を行った。円形照射では冠状動脈を避けられないので、マスクを用いて  $8 \text{ mm}\Phi$  の円形ビームを  $8 \times 3 \text{ mm}$  の短形状にした。合計で 4 点の光照射を行い、光照射域が長さ約  $25 \text{ mm}$ 、幅約  $3 \text{ mm}$  の帯状領域になるようにした。左心耳の場合と同様に双極電極 B において興奮伝播を記録した。光照射条件は、1 点目の照射は左心耳を対象とした場合と同じ放射照射量  $200 \text{ J/cm}^2$  としたが、光照射中に照射領域の心筋血行動態が悪化したため、2 点目以

後は放射照度を  $2.5 \text{ W/cm}^2$  で一定とし、放射照射量を 50、あるいは  $100 \text{ J/cm}^2$  とした。

浮腫形成の参照実験として左心室の心外膜側より高周波カテーテルアブレーションを行い、左心室表面の状態を観察した。高周波アブレーションカテーテルは太さ 7 Fr、先端電極長 4 mm の EPT Blazer II (Boston Scientific, Corp., MN, USA) を用い、高周波発生装置 (EPT-1000XP; Boston Scientific, Corp., MN, USA) に接続して使用した。高周波通電条件は、出力 30 W、設定温度  $60^\circ\text{C}$  とした。

#### 6.4.2 実験結果

図 6-4 に左心耳に対して光増感反応を行った際の各レーザ光照射後の双極電極 B で記録した興奮伝播波形を示す。また、各光照射直後の双極電極 A で発生した電気興奮が双極電極 B に到達するまでの時間  $t_{AB}$  を表 6-1 に示した。各光照射直後に  $t_{AB}$  は徐々に延長し、光増感反応に対する心筋組織の即時的な電気伝導性変化が得られた。約 35 mm の光照射ライン完成後に最終的に得られた伝播時間は  $t_{AB} = 90.7 \text{ ms}$  であり、一連の光照射前の初期状態 ( $t_{AB} = 55.2 \text{ ms}$ ) と比較すると 35.5 ms の伝導遅延を生じた。図 6-5 に術後に摘出した左心耳の写真を示す。目視観察では組織の熱凝固変化は見られず、浮腫形成もなかった。

図 6-6 に左心室組織に対して光増感反応を行った際の双極電極 B で記録した各レーザ光照射後の興奮伝播波形を示す。また、各光照射直後の双極電極 A で発生した電気興奮が双極電極 B に到達するまでの時間  $t_{AB}$  を表 6-2 に示した。一回目の放射照射量  $200 \text{ J/cm}^2$  の光照射直後に  $t_{AB}$  は初期状態から 19.5 ms 延長し、光増感反応に対する心筋組織の即時的な電気伝導性変化が得られた。しかし、この後光照射部位の心筋血行動態が悪化したため、2 回目以降では放射照射量を 50、 $100 \text{ J/cm}^2$  と下げた。2 回目以降の光照射後に得られた伝導遅延は一回目の光照射後からあまり変わらなかった。約 25 mm の光照射ライン完成後に最終的に得られた伝導遅延は 23.7 ms であった。

図 6-7 に開胸下で右心室に対して高周波カテーテルアブレーションを行った際の通電部位の写真を示す。通電直後に組織変色が見られ、熱凝固壊死状態になったことがわかり、熱凝固壊死部位の周囲には浮腫層が観察された。

### 6.5 永続的な心筋電気伝導ブロックの作成 (組織病理学的評価)

光増感反応による永続的な貫壁性の心筋電気伝導ブロックを実証するため、開胸下において豚 (体重約 24 kg、N=2) の左心耳に対してタラポルフィンナトリウムを用いた短時間インターバルの光増感反応を起こし、光照射部位の組織病理標本を作成し、組織病理学的により永続的な心筋電気伝導ブロックを評価した。

#### 6.5.1 実験方法

本実験は慶應義塾動物実験委員会の承認を得て、慶應義塾動物実験規定および理工学部

生命倫理委員会規定を遵守し行った。実験動物はLW種雌豚2頭(体重約24kg、月齢2~2.5ヶ月)を用いた。7.4.1と同様に深麻酔下において開胸して、左心耳が観察域に入るように心臓を露出した。生理食塩水に溶解したタラポルフィンナトリウム5mg/kgを静脈内に約1min間で単回投与した。薬剤投与15min後から発振中心波長663nmの赤色レーザー光照射を開始して光増感反応を行った。7.4.1と同様にレーザー光は光ファイバーで伝送し、組織表面における照射径は3mm $\Phi$ とし、光照射条件は放射照度3.5W/cm<sup>2</sup>とした。放射照射量は、6.4の急性実験を参考にして設定した。急性実験で厚さ3~5mmの心室壁に対して放射照射量200J/cm<sup>2</sup>で光照射を行った際に即時的な心筋電気伝導性消失が確認できたことから(6.4.2参照)、組織内の励起光の減衰を考慮して厚さ1~3mmの左心耳に対する光照射は、放射照射量を50、100J/cm<sup>2</sup>と設定した。光照射中に照射部位の心筋組織表面の温度変化を近赤外サーモカメラ(Avio TVS-500; Nippon Avionics, 東京)を用いて測定した。光照射直後に心筋表面の組織変化および浮腫の有無を目視で確認し、その後閉胸して麻酔から覚醒させた。2週間の通常飼育後に犠牲死させ、心臓を摘出してホルマリン固定を行った。光照射部位における組織の癒痕化を観察するためにAzan<sup>\*</sup>染色標本を作成し、同部位の細胞生死判断を行うためにHematoxylin eosin (HE)<sup>†</sup>染色標本を作成した。光照射部位は左心耳の形状から特定した。

### 6.5.2 実験結果

図6-8に施術2週間後の左心耳のマクロ写真を示す。目視では光照射部位の組織変色はなく、熱的障害や出血および浮腫形成は見られなかった。また、光照射部位の心内膜面において血栓の付着はなかった。サーモカメラで測定した光照射中の心筋組織表面の温度上昇は12.8℃であり、心筋温度は最大で47.8℃まで上昇した。図6-9、図6-10に放射照度3.5W/cm<sup>2</sup>、放射照射量50J/cm<sup>2</sup>あるいは100J/cm<sup>2</sup>にて光増感反応を行った際の光照射部位のAzan染色標本およびHE染色標本の顕微鏡画像を示す。図6-9(a)、図6-10(a)のAzan染色標本画像より、光増感反応の影響領域と正常領域は明瞭に区別され、光照射部位近傍の心筋組織は癒痕組織に置き換わり、各光照射条件において光増感反応による貫壁性の組織癒痕化が生じていた。熱凝固所見は見られず、光照射部位と正常組織の境界において組織萎縮などは見られなかった。光増感反応によって放射照射量50J/cm<sup>2</sup>の条件では1.0mmの厚みの組織が貫壁性の癒痕組織に置き換わり、100J/cm<sup>2</sup>の条件では1.3mmの厚みの組織が貫壁性の癒痕組織に置き換わった。光照射領域と非照射領域で組織厚みに変化が見られないことから、癒痕収縮はほぼ無視できると考えられる。このように組織厚み1mm程度の左心耳に対して

\* Azan染色は組織の粗密構造の違いから膠原組織を青紫色に、筋組織を赤色に染め分ける。組織壊死により組織の癒痕化が起きた場合、Azan染色標本から障害部位の特定ができる。

† HE染色は細胞核を青紫色に、その他の細胞質、線維、赤血球などを赤色に染め分ける。核や細胞形態から細胞の生死状態を判断することができる。

光増感反応により貫壁性な組織癒痕化が得られたことから、本光増感反応条件では光増感反応の作用深度が少なくとも 1 mm 以上であることがわかった。HE 染色標本の顕微鏡画像から、光増感反応の作用領域において心筋細胞が壊死していることが確認された (図 6-9(b)、図 6-10(b))。図 6-9(c)、図 6-10(c) の非照射領域と図 6-9(b)、図 6-10(b) の照射領域を比較すると、壊死部の心筋組織は心筋細胞核および心筋の横紋が消失しており、所々に線維芽細胞 (図 6-9(b)、図 6-10(b) 中の黒線矢印) が見られ、膠原線維束が分布していることから線維化組織に置き換わっていることがわかった。

## 6.6 考察

本章では、タラポルフィンナトリウムを用いた短時間インターバルの光増感反応を行い、*in vivo* 実験で即時的かつ永続的な心筋電気伝導ブロックが得られる条件を探索し、大型動物を用いて光増感反応による心筋電気伝導ブロックを実証した。前述したが、本実験では臨床応用を見据え、排泄性が高く一重項酸素産生効率の高いタラポルフィンナトリウムを用いた (6.4.1 参照)。5.4.4 の *in vitro* 細胞実験でタラポルフィンナトリウムとポルフィマーナトリウムを用いて短時間接触条件の光増感反応を行って心筋細胞の電気生理学的応答を調査したところ、タラポルフィンナトリウムとポルフィマーナトリウムで同じようにイオンチャネルや細胞膜の酸化障害による即時的な心筋細胞の電気伝導性消失が得られたが、脂溶性であるポルフィマーナトリウムの方がより効率的に細胞膜障害を起こすことがわかった (5.5 参照)。一方、ポルフィマーナトリウムは体内からの排泄が遅く、遮光期間が 1 ヶ月程度である (3.3.1 参照)。ポルフィマーナトリウムを用いた光増感反応では、現在の高周波カテーテルアブレーション治療の平均入院期間 5 日間の達成は難しい。これに対し、タラポルフィンナトリウムは水溶性であり排泄性が高く、現行の癌治療での遮光期間は 1~2 週間である (3.3.1 参照)。したがって、投薬量を減少できれば入院期間 5 日間の達成も可能である。本研究では実用性の観点からタラポルフィンナトリウムを採用した。

急性期の電気生理学的評価実験において、心筋組織に対して光増感反応による電気伝導ブロックラインを作成し、電気興奮の伝導遅延が得られた。左心耳を対象とした実験では、光増感反応による電気伝導ブロックラインを迂回して電気興奮が双極電極 A から双極電極 B へ最短経路で伝播した場合に、図 6-5 より電気伝導ブロックライン作成前に比べて電気興奮の組織内伝播距離は約 22 mm 増えると予測される。哺乳類動物の心耳における電気伝導速度は 0.4~1.0 m/s と報告されている [14]。伝播距離の増加から予想される伝導遅延は 22~55 ms となる。測定した伝導遅延 35.5 ms は上記の範囲内にあることから、得られた伝導遅延は光増感反応により貫壁性に電気伝導性を失った心筋組織を迂回するように電気興奮の伝播経路が変化したためと考えられる。右心室を対象とした実験では、放射照度  $2.5 \text{ W/cm}^2$ 、放射照射量  $200 \text{ J/cm}^2$  の一回目の光照射後に 19.5 ms の伝導遅延が得られた。ただし、放射照射量を 50、100  $\text{J/cm}^2$  と下げた 2 回目以降の光照射後は、光照射回数に伴う伝導遅延の増

加は見られなかった。したがって、50、100 J/cm<sup>2</sup> の条件では貫壁性の電気伝導性消失が得られなかったと判断できる。1 回目の照射後に電気興奮の組織内伝播距離が約 5 mm 増加したと予想される。哺乳類動物の心室組織における電気伝導速度 0.4~0.8 m/s を用いて [14]、伝播時間の変化を見積もると 6~13 ms となる。測定した伝導遅延は予想される伝導遅延と同程度であることから、光増感反応により貫壁性に心筋組織の電気伝導性消失が得られたと考えられる。このように、厚み 1~3 mm の左心耳および厚み 3~5 mm の右心室に対して、血漿中光感受性物質濃度 10 µg/mL で放射照射量 200 J/cm<sup>2</sup> にて光増感反応を行った際に、貫壁性の即時的な心筋電気伝導ブロックが作成できた。

急性実験で得られた光増感反応による即時的な心筋電気伝導ブロックは、5.4.4 の細胞実験の結果から、光増感反応によってイオンチャネル障害や細胞膜破壊などの障害をうけたためと考えられる。投薬から照射までのインターバル時間が 15~30 min と短い場合、光感受性物質は主に血液中あるいは間質液中に分布していると考えられる [15,16]。この状態で光増感反応を起こすと細胞外側の細胞膜近傍で発生した活性酸素によって細胞膜やイオンチャネルが障害されて即時的に電気生理学的障害を起こし、最終的にネクローシスに至ると考えられる (5.5 参照)。慢性実験では急性実験と同様な条件にて光増感反応を行い、照射部位に組織癒痕化が観察された。一般に、心筋細胞は一旦障害を受けると再生および増殖することはない、癒痕化組織は電気伝導性がないことから [17]、このような組織の癒痕化は永続的な電気伝導性消失を示している。光増感反応による組織癒痕化は本実験条件 (血漿中の光感受性物質濃度 10 µg/mL 程度、放射照度 3.5 W/cm<sup>2</sup>、放射照射量 50~100 J/cm<sup>2</sup>) では全層に及んでいた。心筋組織壁の全層にわたる貫壁性の組織癒痕化は永続的な電気伝導ブロックが得られることを示唆している。本実験では心筋組織の電気伝導ブロックが慢性期において維持されることを電気生理学的に測定していない。一方、開胸下 *in vivo* でラット房室結節に対して光増感反応を行って房室ブロックモデルの作成を行った先行研究の実験において、心電図計測により急性期で得られた光増感反応による房室ブロックが 2 週間後にも継続することを確認した。また、照射部位の組織病理標本から房室結節部位に組織線維化が見られ、得られた効果は慢性期にも持続することが示されている [13]。本急性実験および慢性実験において血漿中タラポルフィンナトリウム濃度および放射照射量はほぼ同じであることから、急性実験で得られた心筋組織の即時的電気伝導ブロックは不可逆的であり、慢性期にもその効果は継続すると予想される。以上より、5.4 の細胞実験で得られた光増感反応による即時的な電気伝導性消失効果および殺細胞効果が生体組織においても同様に得られることがわかった。

次に、生体組織において光増感反応により細胞壊死を起こす光増感反応条件を細胞実験の場合と比較する。光増感反応による組織障害において細胞壊死を起こす直接的因子は活性酸素 (主に一重項酸素) の産生量に相当し、局所でのエネルギー吸収、光感受性物質濃度および酸素濃度に依存する量である。光増感反応の 3 要素のうち即時的に調整できるパラ

メータは組織内の光強度であり、光増感反応による心筋組織障害深度の制御は基本的に光照射条件によって行う。また、心筋組織障害程度は、放射照度よりむしろ放射照射量に依存すると考えられる。光感受性物質および酸素が光増感反応中に心筋組織内に時間的および空間的に均一に分布していると仮定する<sup>‡</sup>。このとき、発生した一重項酸素の半減期は生体内では10~320 nsであり、拡散距離は10~55 nmと短いため(3.2.2参照)、組織レベルで考えるとその作用範囲は局所的である。このため、一重項酸素の組織内の移動はほぼ無視することができ、光増感反応による作用領域は光照射領域によって決まると考えられる。一般に組織障害はある局所領域において単位体積あたりに発生した一重項酸素の産生量がある一定量を超えた場合に生じる[18,19]。組織内で光感受性物質濃度と酸素濃度が一定のもとでは、一重項酸素産生量は局所における光感受性物質のモル吸光係数、組織内光感受性物質濃度、およびフルエンスと線形関係にある[19,20]。組織障害が単位体積あたりに光感受性物質によって吸収されたフォトン数がある閾値を超えた場合に起こると考えると、吸収されたフォトン数に対する光増感反応の組織障害閾値  $T$  (photons/cm<sup>3</sup>) (以下、光増感反応の組織障害閾値と呼ぶ) は以下の関係式で表される[18-20]。

$$T = \frac{1}{\Phi_{\Delta}} \varepsilon C H(d_{th}) \quad (6-2)$$

ここで、 $\Phi_{\Delta}$ は一重項酸素産生の量子効率、 $\varepsilon$ は光感受性物質のモル吸収係数 (mm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>)、 $C$ は光感受性物質の組織内濃度 (M)、 $d_{th}$ は組織の壊死領域と健常領域の境界の位置 (深さ) (mm)、 $H$ は深さ  $d_{th}$ におけるフルエンス (photons/cm<sup>2</sup>) を示し  $H(d_{th}) = H_0 \exp(-\alpha d_{th})$  で表される。 $\alpha$ は心筋組織における光の減衰係数である。光感受性物質のモル吸光係数  $\varepsilon$  と一重項酸素産生の量子収率  $\Phi_{\Delta}$  は、タラポルフィンナトリウムの場合は  $\varepsilon = 4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、 $\Phi_{\Delta} = 0.77$  である(3.2.2参照)。光感受性物質による一重項酸素産生効率の違いおよび励起波長の違いを考慮し、式(6-2)の右辺を一重項酸素産生の量子収率および波長で除し、光増感反応の組織障害閾値の単位を単位体積あたりのフォトン数で表示する。この光増感反応の組織障害閾値  $T$  を本実験条件において見積もる。急性実験では、血漿中の光感受性物質濃度 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $1.2 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ )、放射照度 2.5 W/cm<sup>2</sup>、放射照射量 200 J/cm<sup>2</sup> の光増感反応条件にて厚さ 3~5 mm の右心室に対して貫壁性の電気伝導ブロックが得られた。光感受性物質の組織内濃度を血漿中濃度の1/6倍と仮定し[8]、心室組織の減衰係数を 0.93 mm<sup>-1</sup> とし(6.2.2参照)、深さ 3~5 mm の組織障害深度が得られるとして式(6-2)の右辺を計算すると、 $7.0 \times 10^{17} \sim 4.5 \times 10^{18} \text{ photons/cm}^3$  と求まる。また、慢性実験では、血漿中の光感受性物質濃度 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $1.2 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ )、放射照度 3.5 W/cm<sup>2</sup>、放射照射量 50、100 J/cm<sup>2</sup> の光増感反応条件にて厚さ

<sup>‡</sup> 光照射中は光感受性物質と酸素は光増感反応により消費され続ける一方で、血流によって光感受性物質と酸素は常に供給されて間質液内に拡散する。光感受性物質および酸素の組織内濃度は消費速度と供給速度のバランスによって決まるため、時間的および空間的に濃度一定という仮定は厳密には正確ではない。

1.0、1.3 mm の貫壁性の組織障害が得られた。急性実験の場合と同様に式 (6-2) の右辺を計算すると、 $5.9 \times 10^{18} \sim 1.5 \times 10^{19}$  photons/cm<sup>3</sup> と求まる。ここで、心耳組織の減衰係数は  $0.88 \text{ mm}^{-1}$  とした (6.2.2 参照)。光増感反応中の心筋組織内タラポルフィンナトリウム濃度は、血管から間質中への供給速度、光感受性物質のフォトブリーチング速度に依存し、単位体積あたり光増感反応で消費される光感受性物質の積算量を正確に示すことは困難である。本実験条件では急性および慢性実験において貫壁性の組織障害が得られる条件にて光増感反応を行ったため、測定した組織障害深度は過小であり、実際の光増感反応の組織障害閾値  $T$  は今回計算で求めた値より小さくなると思われる。5.4 の細胞実験において、電気伝導性消失が得られた条件にて前述の方法で光増感反応の障害閾値  $T$  を見積もる。細胞実験で光増感反応による電気伝導性消失が得られた条件は、光感受性物質の接触濃度  $30 \text{ } \mu\text{g/mL}$  ( $2.3 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$ )、放射照度  $103 \text{ mW/cm}^2$ 、放射照射量  $10 \text{ J/cm}^2$  であった (5.4.4 参照)。このとき、励起光に対する吸収効率の違いを考慮して式 (6-2) の右辺を計算すると  $2.9 \times 10^{19}$  photons/cm<sup>3</sup> と求まる。ただし、光感受性物質のフォトブリーチングを考慮していない。以上より、生体組織を対象とした実験では細胞実験の場合と比較して光増感反応の障害閾値は小さく見積もられた。この原因は細胞実験では培養液中の溶存酸素と光感受性物質は限られているのに対して、生体組織では酸素および光感受性物質は血流によって光増感反応中も供給され続け光増感反応が効率的に起きたためであると考えられる。この光増感反応の組織障害閾値  $T$  は主に腫瘍組織を対象に種々の光感受性物質を用いて実験的に調査されており、 $10^{17} \sim 10^{19}$  photons/cm<sup>3</sup> の範囲内と報告されている [19,21,22]。本実験結果から求めた光増感反応の組織障害閾値  $T$  は急性実験の場合には  $7.0 \times 10^{17} \sim 4.5 \times 10^{18}$  photons/cm<sup>3</sup>、慢性実験の場合には  $5.9 \times 10^{18} \sim 1.5 \times 10^{19}$  photons/cm<sup>3</sup> であり、いずれも上記の文献値の範囲内にある。以上より、心筋組織の電気伝導ブロックを達成するための光増感反応の組織障害閾値  $T$  は、本実験から  $7.0 \times 10^{17} \sim 1.5 \times 10^{19}$  photons/cm<sup>3</sup> 範囲内にあり、5.4 の細胞実験から求めた閾値より低いことがわかった。

光照射部位の心筋温度は最大で  $47.8^\circ\text{C}$  であり、光照射時間は 1 min 以内であった。光照射部位の心筋組織に熱凝固壊死や炭化などの熱的障害所見は見られなかった。心筋組織の不可逆的な熱障害 (細胞の電気生理学的障害および熱的組織変性) は  $60^\circ\text{C}$  程度に組織が約 1 min 間維持された場合に起こると報告されている (2.4.1 参照)。したがって、得られた即時的な電気伝導ブロックおよび組織癒痕化は熱的作用によるものではなく、活性酸素の酸化作用によるものと考えられる。また、本実験では開胸下において心外膜側から光照射を行っているため、ほぼ断熱状態であり、温度が上昇しやすい状態であった。本提案手法では最終的にカテーテルインターベンション下で運用し、経カテーテル的に光増感反応を行うことを考えている。経カテーテル的に心内腔側から光照射を行う場合には、血流による冷却効果によって心筋温度上昇はさらに抑制できると考えている。高周波カテーテルアブレーションではカテーテル先端電極の温度設定が  $50 \sim 65^\circ\text{C}$  で通電を行っているが、こ

の温度はカテーテル先端電極内部の温度であり心筋組織内温度より一般に低く (2.4.3 参照)、実際の心筋内温度は 80°C 以上まで到達する場合がある [23,24]。光増感反応を利用した本提案手法において、高周波カテーテルアブレーションと比較して心筋温度上昇が小さいのは、投入パワーが小さいためと考えられる。障害深度が数 mm 程度の障害領域を得るのに必要な投入パワーは、光増感反応の場合は本実験から光入力 が 1 W 以内と考えられるが、高周波カテーテルアブレーションの場合には高周波電流入力が 20 ~ 50 W と報告されている [23]。このように光増感反応と高周波カテーテルアブレーションでは投入パワーに違いがあるのにも関わらず、作用時間は同程度であるため投入エネルギーには大きい差異がある。すなわち、光増感反応では高周波カテーテルアブレーションの投入エネルギーの数%で同様な組織障害を起こすと考えられる。投入エネルギーの効率に関する議論を行うため、光増感反応において組織障害を起こすのに必要な量の一重項酸素を産生するために消費されるエネルギーを見積もる。心筋組織内におけるタラポルフィンナトリウムの波長 663 nm の赤色光の吸収係数は、タラポルフィンナトリウムのモル吸光係数  $4.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  とし (3.2.3 参照)、心筋組織内タラポルフィンナトリウム濃度を血漿中濃度の約 1/6 と仮定すると [8]、 $8.7 \times 10^{-3} \text{ mm}^{-1}$  と求められる。波長 663 nm における心筋組織の吸収係数は  $0.3 \text{ mm}^{-1}$  程度であるため (6.2.2 参照)、組織内のタラポルフィンナトリウムにより吸収されるエネルギーは投入エネルギーの 3%程度である。タラポルフィンナトリウムの一重項酸素産生の量子収率 0.77 とすると (3.2.3 参照)、光増感反応による一重項酸素産生に消費されるエネルギー量は全体の投入エネルギー量の 2%程度と考えられる。一方、熱的作用を利用した高周波カテーテルアブレーションの場合では投入したエネルギーは 100% ほぼ全て組織の温度上昇に使われる。このように、光増感反応における活性酸素の酸化作用を利用した組織障害は高周波カテーテルアブレーションなどの熱的作用を利用する場合と比較して 3 桁以上エネルギー効率の高い手法であると考えられる。以上より、光増感反応では高周波カテーテルアブレーションと比較して投入パワーが小さいために熱発生を伴わずに、低エネルギー量で組織障害を起こすことができると考えられる。

## 6.7 結言

本章では、第 5 章の細胞実験で得られた光増感反応による即時的な心筋細胞の電気伝導性消失が、生体組織レベルにおいても同様に得られるかどうか *in vivo* 動物実験で検証した。ヒトと同じ寸法の組織厚みを持つ豚心筋組織を対象に、開胸下で心外膜側からレーザー光を照射し、タラポルフィンナトリウムを用いた短時間インターバルの光増感反応を行った。急性実験では、血漿中タラポルフィンナトリウム濃度  $10 \mu\text{g/mL}$ 、放射照射量  $200 \text{ J/cm}^2$  において光増感反応を行った結果、厚さ 1 ~ 5 mm の心筋組織に貫壁性の即時的な電気伝導ブロックが得られた。*in vivo* 動物実験において即時的効果が短時間インターバル条件で得られることがわかった。慢性実験では、血漿中タラポルフィンナトリウム濃度  $10 \mu\text{g/mL}$ 、放射照



射量 50、100 J/cm<sup>2</sup>において光増感反応を行った結果、厚さ 1 mm 程度の心筋組織に対して貫壁性の組織癒痕化が得られ、永続的な電気伝導ブロックを生じることがわかった。急性および慢性実験から見積もった吸収されたフォトン数に対する光増感反応の組織障害閾値を推定すると  $7.0 \times 10^{17} \sim 1.5 \times 10^{19}$  photons/cm<sup>3</sup> であり、生体組織では細胞実験における光増感反応の障害閾値 ( $2.9 \times 10^{19}$  photons/cm<sup>3</sup>) よりも低い閾値で心筋組織の電気伝導性消失が得られることがわかった。また、光照射時の組織表面温度は 48°C 以下、持続時間は 1 min 以内で熱作用による組織障害閾値以下であることから、得られた効果は光増感反応で発生した活性酸素の酸化障害によるものであることがわかった。

## 参考文献

- [1] P. Kubelka, “New contributions to the optics of intensely light-scattering materials. Part I,” *J Opt Soc Am*, vol. 38, pp. 448–457, 1948.
- [2] P. Kubelka, “New contributions to the optics of intensely light-scattering materials. Part II: Nonhomogeneous layers,” *J Opt Soc Am*, vol. 44, pp. 330–335, 1954.
- [3] R. R. Anderson and J. A. Parrish, “The Optics of human skin,” *J Invest Dermatol*, vol. 77, pp. 13–19, 1981.
- [4] W. F. Cheong, S. A. Prael, and A. J. Welch, “A review of the optical properties of biological tissues,” *IEEE J Quantum Electron*, vol. 26, pp. 2166–2185, 1990.
- [5] W. M. Star, J. P. A. Marijnissen, and M. J. C. van Gernert, “Light dosimetry in optical phantoms and in tissues: I. Multiple flux and transport theory,” *Phys Med Bioi*, vol. 33, pp. 437–454, 1988.
- [6] J. Swartling, S. Palsson, P. Platonov, S. B. Olsson, and S. Andersson-Engels, “Changes in tissue optical properties due to radio-frequency ablation of myocardium,” *Med Biol Eng Comput*, vol. 41, pp. 403–409, 2003.
- [7] D. Kumar and M. Singh, “Characterization and imaging of compositional variation in tissues,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 50, pp. 1012–1019, 2003.
- [8] C. J. Gomer and A. Ferrario, “Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model,” *Cancer Res*, vol. 50, pp. 3985–3990, 1990.
- [9] K. Kondo, T. Miyoshi, H. Fujino, H. Takizawa, S. Imai, N. Kobayashi, K. Kenzaki, S. Sakiyama, and A. Tangoku, “Photodynamic therapy using a second generation photosensitizer, Talaporfin,” *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 4, pp. 269–274, 2007.
- [10] 明治製菓株式会社, 注射用レザフィリン®100 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2007年4月 (改訂第2版).
- [11] 斉藤光一, 芝崎茂樹, 黒沢亨, “タラポルフィンナトリウムの薬理作用と体内動態,” *化学療法の領域*, vol. 20, pp. 131–137, 2004.
- [12] 井川修, *臨床心臓構造学—不整脈診療に役立つ心臓解剖*, 東京: 医学書院, 2011, pp. 127–141.
- [13] S. Hosokawa, T. Arai, S. Miyoshi, and K. Soejima, “The electric conduction block by PDT: Cardiac muscle cell and tissue study ex vivo,” 11<sup>th</sup> World Congress of the International Photodynamic Association (IPA), 28 Mar. 2007, Shanghai, China.
- [14] M. H. Draper and M. Mya-Tu, “A comparison of the conduction velocity in cardiac tissues of various mammals,” *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, vol. 44, pp. 91–109, 1959.

- [15] S. Mitra and T. H. Foster, "In vivo confocal fluorescence imaging of the intratumor distribution of the photosensitizer mono-L-aspartylchlorin-e6," *Neoplasia*, vol. 10, pp. 429–438, 2008.
- [16] B. Pegaz, E. Debeve, F. Borle, J. P. Ballini, G. Wagnieres, S. Spaniol, V. Albrecht, D. Scheglmann, N. E. Nifantiev, H. van den Bergh, and Y. N. Konan, "Preclinical evaluation of a novel water-soluble chlorin e6 derivative (BLC 1010) as photosensitizer for the closure of the neovessels," *Photochem Photobiol*, vol. 81, pp. 1505–1510, 2005.
- [17] V. Munoz, S. Zlochiver, and J. Jalife, "Fibrosis and fibroblast infiltration: An active structural substrate for altered propagation and spontaneous tachyarrhythmias," in *Cardiac electrophysiology—From cell to bedside*, D. P. Zipes, and J. Jalife, Ed. Philadelphia: Saunders, 2009, ch. 21.
- [18] B. C. Wilson, "Technologies and biophysical techniques for PDT," in *Photodynamic therapy*, T. Patrice, Ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003, ch. 7.
- [19] M. S. Patterson, B. C. Wilson, and R. Graff, "In vivo tests of the concept of photodynamic threshold dose in normal rat liver photosensitized by aluminum chlorosulphonated phthalocyanine," *Photochem Photobiol*, vol. 51, pp. 343–349, 1990.
- [20] L. Lilge, M. Portoy, and B. C. Wilson, "Apoptosis induced in vivo by photodynamic therapy in normal brain and intracranial tumour tissue," *Br J Cancer*, vol. 83, pp. 1110–1117, 2000.
- [21] Q. Chen, M. Chopp, L. Madigan, M. O. Dereski, and F. W. Herzog, "Damage threshold of normal rat brain in photodynamic therapy," *Photochem Photobiol*, vol. 64, pp. 163–167, 1996.
- [22] T. J. Farrell, B. C. Wilson, M. S. Patterson, and M. C. Olivo, "Comparison of the in vivo photodynamic threshold dose for Photofrin, mono- and tetrasulfonated aluminum phthalocyanine using a rat liver model," *Photochem Photobiol*, vol. 68, pp. 394–399, 1998.
- [23] F. H. Wittkampf and H. Nakagawa, "RF catheter ablation: Lessons on lesions," *Pacing Clin Electrophysiol*, vol. 29, pp. 1285–1297, 2006.
- [24] K. Matsudaira, H. Nakagawa, F. H. Wittkampf, W. S. Yamanashi, S. Imai, J. V. Pitha, R. Lazzara, and W. M. Jackman, "High incidence of thrombus formation without impedance rise during radiofrequency ablation using electrode temperature control," *Pacing Clin Electrophysiol*, vol. 26, pp. 1227–1237, 2003.

図表

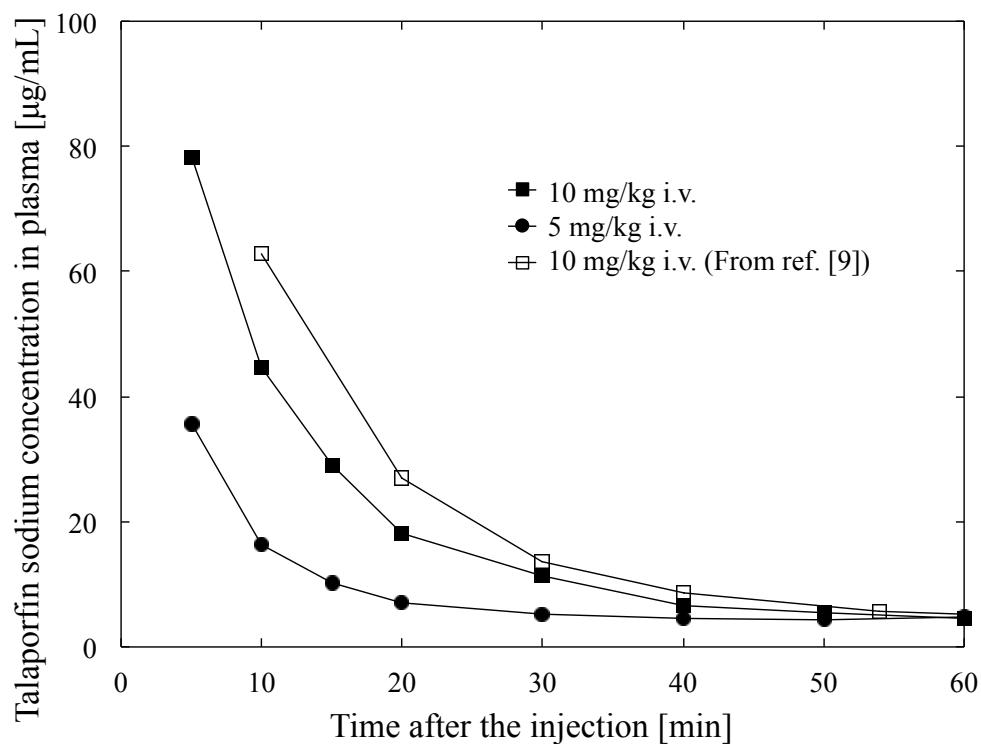


図6-1 タラポルフィンナトリウム投与後の豚血漿中濃度の時間変化 (文献[9]より引用)

タラポルフィンナトリウム 5、10 mg/kg を静脈内に単回投与してから 5～60 min 後の豚血漿中薬剤濃度の測定値、およびタラポルフィンナトリウム 10 mg/kg 投与時の豚血漿中濃度の文献値

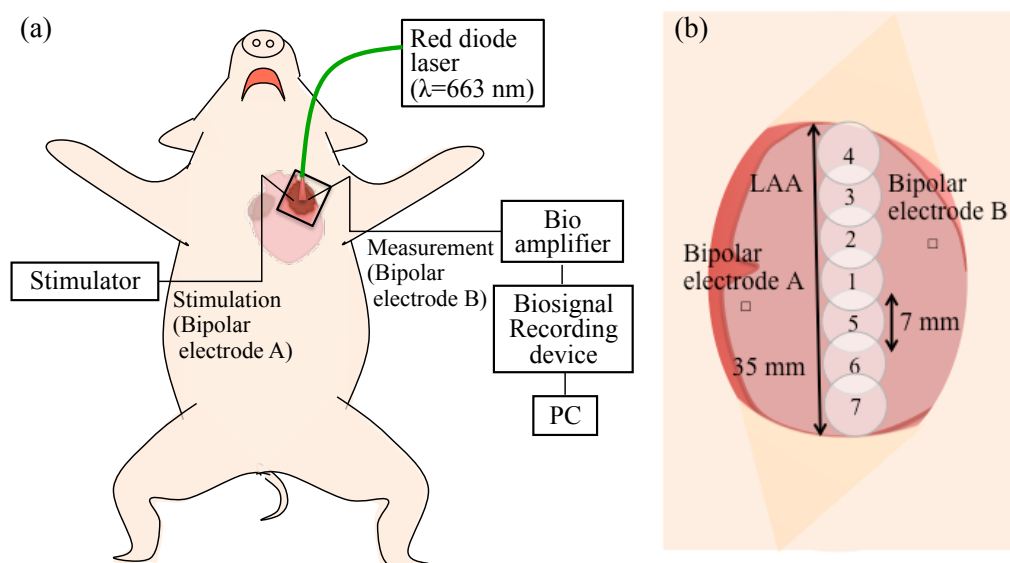


図 6-2 左心耳に対して光増感反応を行った際の電気生理学的評価

(a) 実験系の模式図

左心耳に刺激用および電位測定用の双極電極を刺入し、心筋組織内を伝播して双極電極 B にて測定された電気興奮を生体アンプおよびデータ収録システムを用いて記録した。

(b) 電極および光照射部位の配置レーザー光は双極電極 A と B の間を横断するように一点ずつ、隣り合う照射領域が 30%程度重なり合うよう合計 7 点照射し、光照射域が長さ約 35 mm の帯状領域になるようにした。レーザー光照射条件は、組織表面における放射照度  $5.2 \text{ W/cm}^2$ 、放射照射量  $208 \text{ J/cm}^2$  とした。

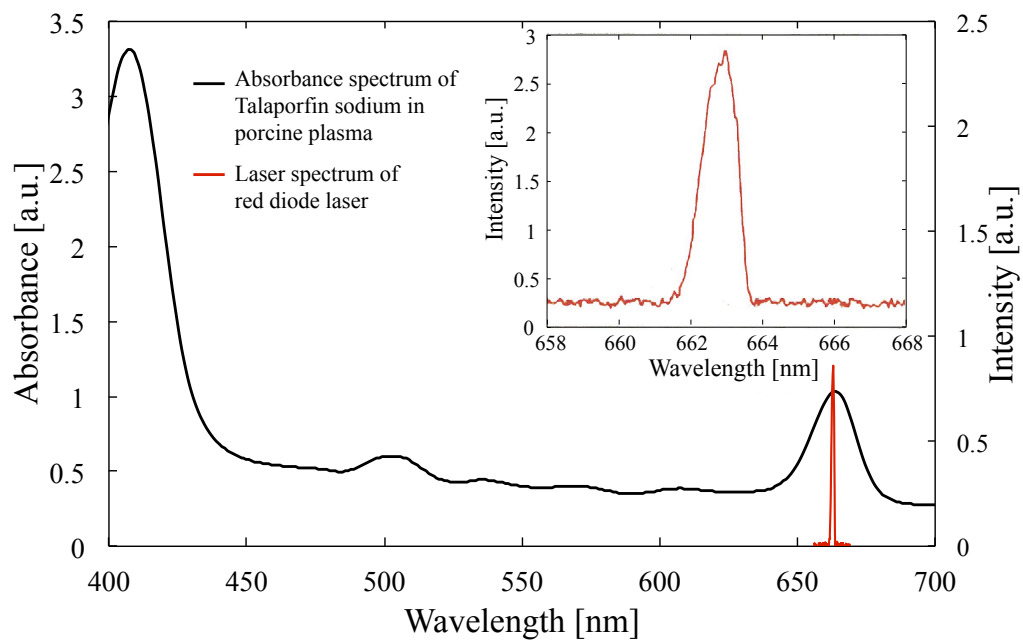


図6-3 赤色半導体レーザ光の発振スペクトルとタラポルフィンナトリウムの吸収スペクトル

使用した赤色半導体レーザ光の発振ピーク波長は 663 nm であり、スペクトル幅は 1.1 nm である。図中右上の挿入図は赤色半導体レーザ光の発振スペクトルを示す。

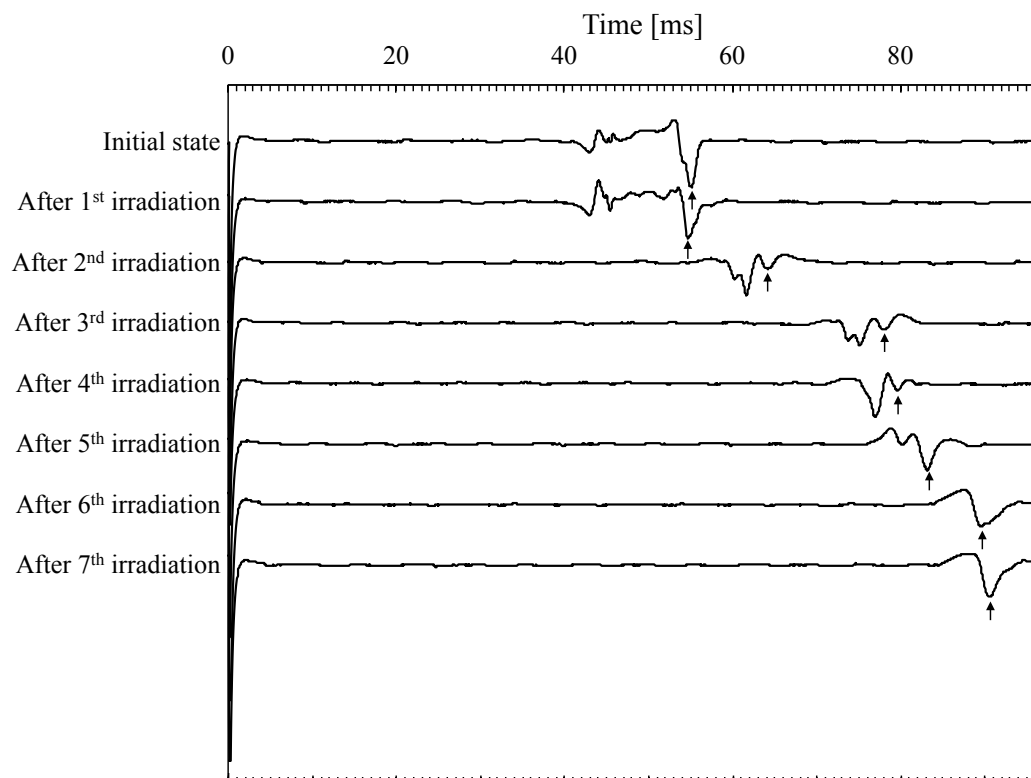


図6-4 左心耳に対して光増感反応を行った際のレーザー光照射後に双極電極Bで記録した興奮伝播波形

図中の矢印は各光照射直後の双極電極Aで発生した電気興奮が双極電極Bに到達するまでの時間 $t_{AB}$ の測定部位を示す。各波形の波高が異なるため、波形ピークが見やすいように各双極電位波形の電位を任意に拡大・縮小した。

表 6-1 左心耳に対して光増感反応を行った際の各光照射直後の刺激用双極電極 A で発生した電気パルスが測定用双極電極 B に到達するまでの時間  $t_{AB}$

Laser irradiation	$t_{AB}$ [ms]	Conduction delay [ms]
Initial	55.2	—
#1	54.8	-0.4
#2	64.2	9.0
#3	78.0	22.8
#4	79.7	24.5
#5	83.3	28.1
#6	89.6	34.4
#7	90.7	35.5



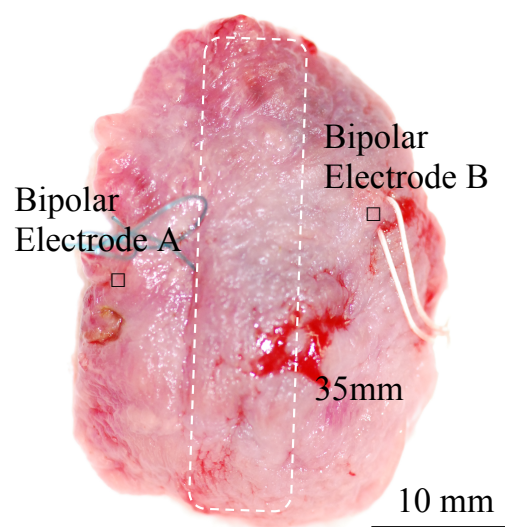


図 6-5 光増感反応後に摘出した左心耳の写真

双極電極 A と双極電極 B の間の白い点線で囲んだ領域が光照射域である。光照射域の長さは約 35 mm であった。

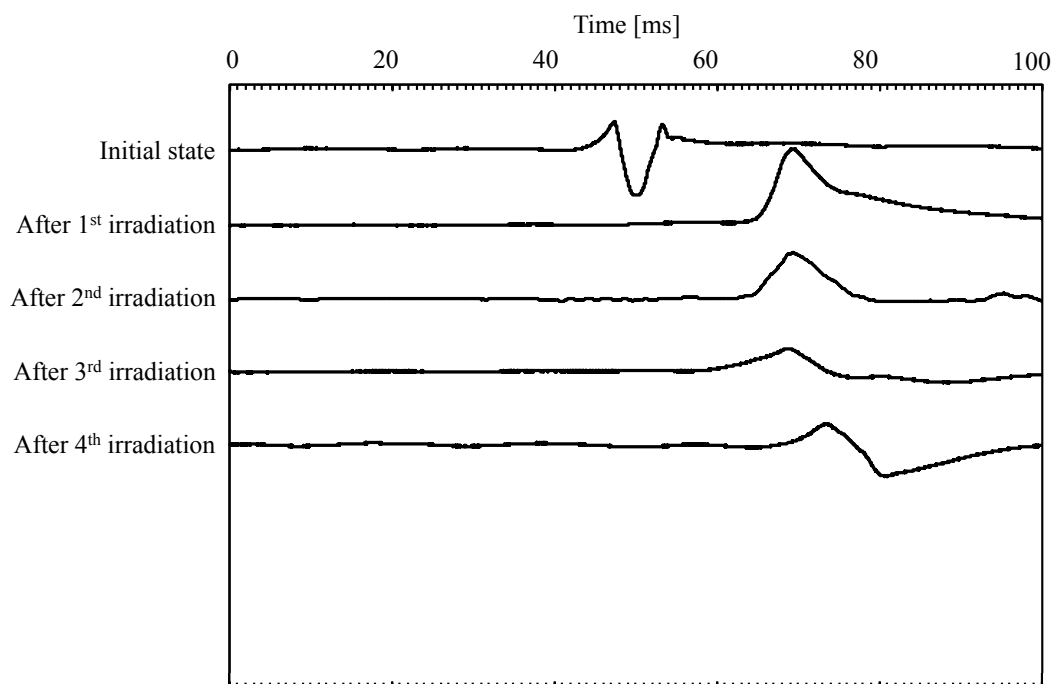


図 6-6 右心室組織に対して光増感反応を行った際のレーザー光照射後に双極電極 B で記録した興奮伝播波形

各波形の波高が異なるため、波形ピークが見やすいように各双極電位波形の電位を任意に拡大・縮小した。

表 6-2 右心室組織に対して光増感反応を行った際の各光照射直後の刺激用双極電極 A で発生した電気パルスが測定用双極電極 B に到達するまでの時間  $t_{AB}$

Laser irradiation	$t_{AB}$ [ms]	Conduction delay [ms]
Initial	49.7	—
#1	69.2	19.5
#2	69.2	19.5
#3	68.8	18.9
#4	73.4	23.7

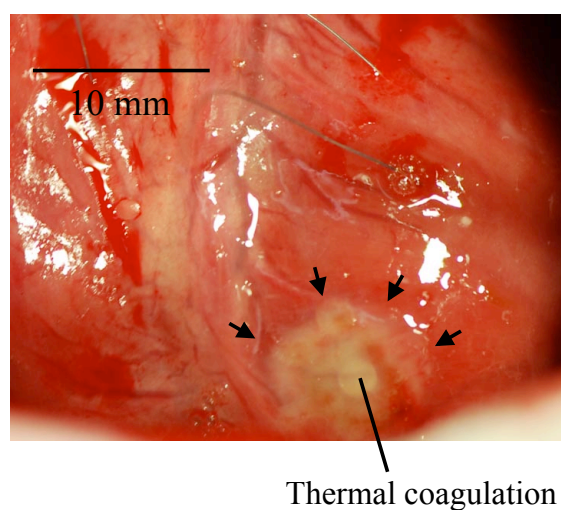


図6-7 開胸下で右心室に対して高周波カテーテルアブレーションを行った際の通電部位の写真

通電部位に組織変色が見られ熱凝固壊死になっている。図中の矢印は熱凝固壊死部位周囲の浮腫形成を示す。

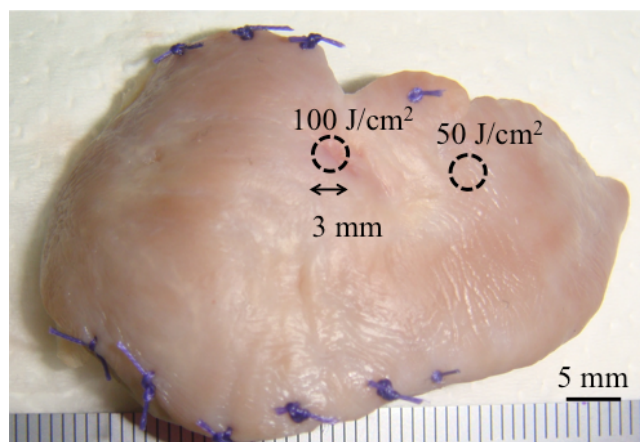


図 6-8 光増感反応の2週間後に摘出し、ホルマリン固定した左心耳の写真  
黒点線で囲んだ領域はそれぞれレーザー光を照射し (放射照度  $3.5 \text{ W/cm}^2$ 、放射照射量 50、 $100 \text{ J/cm}^2$ )、光増感反応を起こした部位を示す。

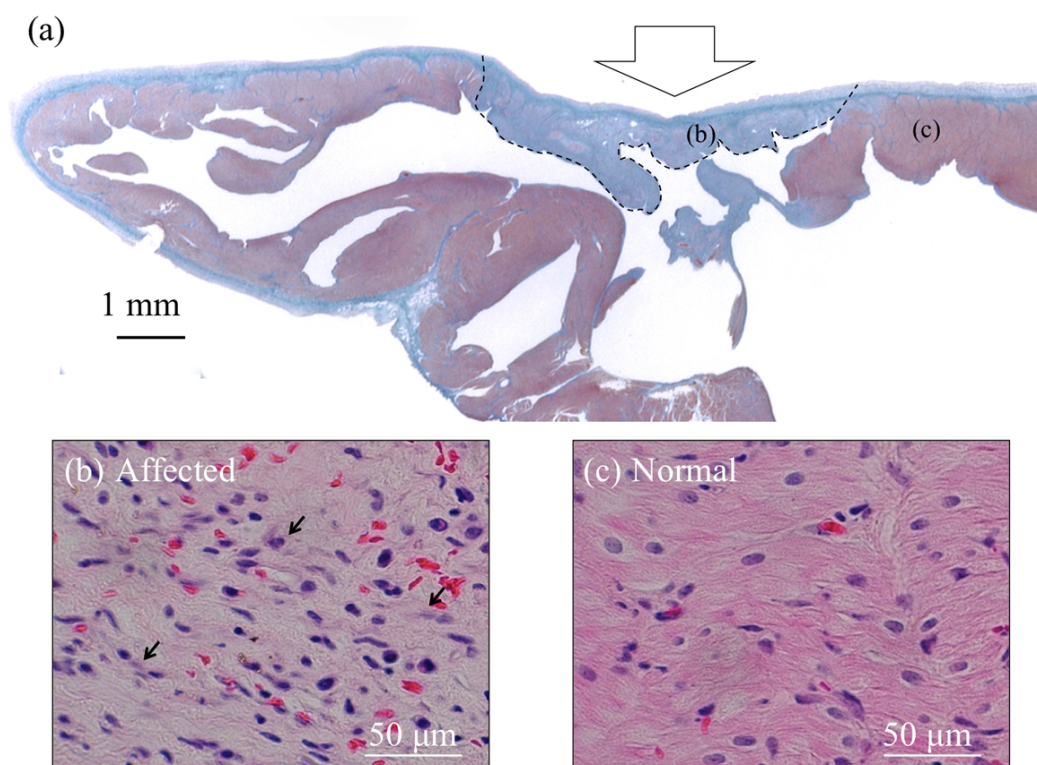


図 6-9 左心耳に対して放射照度  $3.5 \text{ W/cm}^2$ 、放射照射量  $50 \text{ J/cm}^2$  にて光増感反応を行った際の光照射部位の Azan 染色標本および HE 染色標本の顕微画像

(a) 光照射部位の Azan 染色標本の強拡大画像

図中の点線は癒痕化領域と正常領域の境界を示す。矢印の方向から光照射を行った。

(b) (a)の癒痕化領域における HE 染色標本の強拡大画像

(c) (a)の正常領域における HE 染色標本の強拡大画像

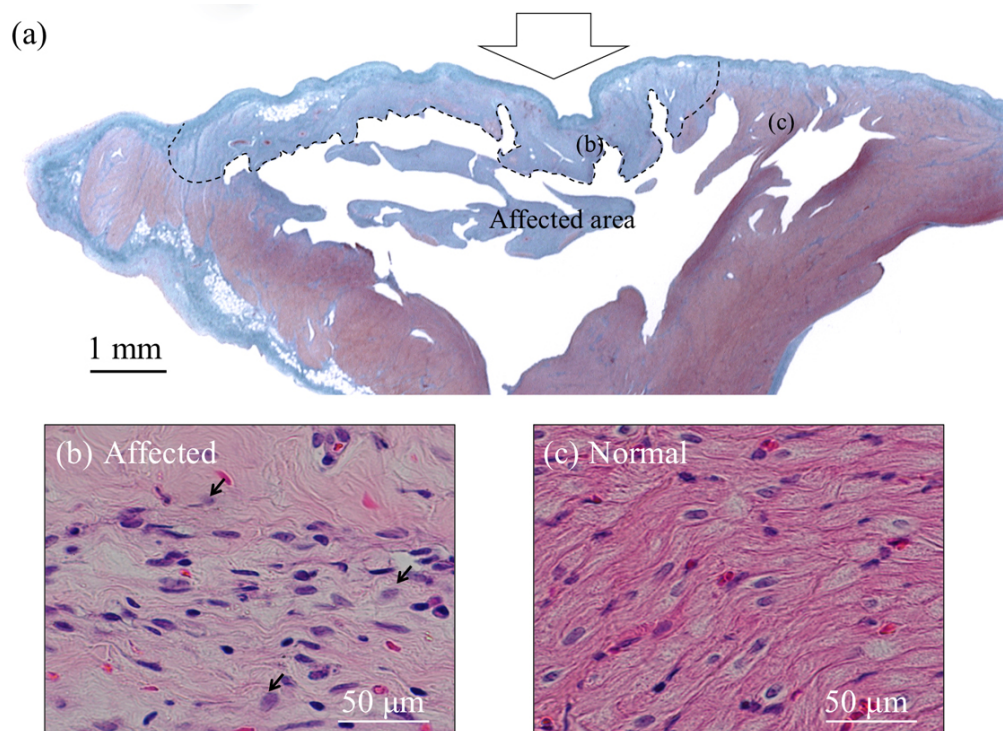


図 6-10 左心耳に対して放射照度  $3.5 \text{ W/cm}^2$ 、放射照射量  $100 \text{ J/cm}^2$  にて光増感反応を行った際の光照射部位の Azan 染色標本および HE 染色標本の顕微画像

(a) 光照射部位の Azan 染色標本の強拡大画像

図中の点線は癒痕化領域と正常領域の境界を示す。矢印の方向から光照射を行った。

(b) (a)の癒痕化領域における HE 染色標本の強拡大画像

(c) (a)の正常領域における HE 染色標本の強拡大画像

## 第7章 インターベンション下における統合運用評価: レーザーカテーテルを用いた光増感反応による心筋電気伝導 ブロック (*in vivo* 実験)

### 7.1 緒言

本章では、試作したレーザーカテーテルを用い、大型動物実験において経カテーテル的にタラポルフィンナトリウムを用いた光増感反応を行い、臨床と同様な運用環境において心筋電気伝導ブロックを実証し、本提案手法の統合的評価を行うことを目的とした。対象は下大静脈 (Inferior vena cava; IVC) と三尖弁輪 (Tricuspid Annulus; TA) 間の解剖学的峽部 (Cavo-tricuspid isthmus; CTI) とし、ヒトとほぼ同じ寸法の心臓を持つ豚を用いて電気生理学的評価を行った。また、心腔内でレーザーカテーテルを接触した状態でレーザー光を照射して光増感反応を行った際の作用深度を算出し、実験結果と比較した。

### 7.2 右房解剖学的峽部を対象とした経カテーテル的光増感反応

豚を用いた大型動物実験において、試作したレーザーカテーテルを用いて赤色レーザー光を心内腔に伝送し、X線透視下で下大静脈と三尖弁輪間の解剖学的峽部に対して経カテーテル的に光増感反応を行い、臨床と同様の運用手技および電気生理学的検査システムにて心筋電気伝導ブロックを作成した。下大静脈と三尖弁輪間の解剖学的峽部は、臨床において通常型心房粗動に対する高周波カテーテルアブレーション治療部位である (2.3.3参照)。通常型心房粗動は三尖弁輪を旋回する興奮旋回性心房内頻拍であり、解剖学的峽部において下大静脈と三尖弁輪を結ぶ線状に高周波カテーテルアブレーションを行い、電気伝導ブロックを作成して治療を行う (2.3.3参照)。本実験ではこの解剖学的峽部を伝導路とする電気興奮伝播経路を設定し、同部位に対して第6章までに検討した条件による光増感反応で電気伝導ブロックラインを作成する。この評価を、三尖弁輪周囲の電氣的マッピングによって行った。豚はヒトと心臓の解剖学的構造が細部では異なるため、カテーテル操作手技および電気伝導ブロックの作成部位は未知である。本実験は慶應義塾大学医学部循環器内科との共同研究により行われた。臨床医師のカテーテル手技の習熟および電気伝導ブロックモデルの実証に重点を置き、光増感反応条件を探索あるいは固定せずに電気伝導ブロックが得られるまで光増感反応を続けた。

#### 7.2.1 レーザカテーテルの試作

著者らは光ファイバーおよび光学ウィンドウを内装し、心内腔にタラポルフィンナトリウムの励起光源である 660 nm 帯の赤色レーザー光を伝送し、心筋組織に対してレーザー光を接



触照射して光増感反応を行うためのレーザカテーテルを試作した。具体的には著者が光学系部分の設計および部材を入手した上で、組み立ては高周波アブレーションカテーテルの製造技術のある会社（メディカルリブ株式会社，長野）に委託し、組み上がったレーザカテーテルの性能検査を著者が行った。図 7-1 に試作したレーザカテーテルの全体の写真および先端部写真を示す。図 7-2 にレーザカテーテル先端部の内部構造の模式図および光学ウィンドウの寸法図面を示す。太さ 7 Fr (2.33 mm $\Phi$ ) のレーザカテーテル内には、レーザ光を伝送する光ファイバー以外にレーザカテーテルを屈曲させるためのテンションワイヤーや電位測定用の電極導線などを挿入する。このため、内装する光ファイバーは、外径がレーザカテーテル内部ルーメンチューブの内径 450  $\mu\text{m}$  より小さくする必要がある。レーザカテーテルを高周波カテーテルアブレーションと同様に屈曲半径 10 ~ 20 mm で屈曲するために許容曲げ半径が 10 ~ 20 mm の光ファイバーを用いる必要がある。また、使用耐熱温度が 100 $^{\circ}\text{C}$  以上の光ファイバーを選んだ。以上より、レーザカテーテルに内装する光ファイバーとして、コア径 200  $\mu\text{m}$  で開口数 0.22 の石英光ファイバー (FG200LCC; ソーラボジヤパン株式会社, 東京)、あるいはコア径 190  $\mu\text{m}$  で開口数 0.35 の石英光ファイバー (GF-180; 住友電気工業株式会社, 東京) を選定した。いずれの光ファイバーも使用耐熱温度は 150 $^{\circ}\text{C}$  である。各光ファイバーの仕様を表 7-1 に示す。図 7-2(b) に示すようにレーザカテーテル先端部には長さ 2.5 mm、直径 2.0 mm、先端曲率半径 1.5 mm の光学ウィンドウ (材質 BK7; 夏目光学株式会社, 長野) を有する。カテーテル先端の屈曲操作は、高周波アブレーションカテーテルと同様に手元の操作ハンドルによって行う。試作したレーザカテーテルは、心房性不整脈治療に用いられている高周波アブレーションカテーテルと同様な操作性および屈曲形状を有する。また、光照射部位周辺の心筋組織における電気伝導性消失を確認するために、図 7-1 に示すようにレーザカテーテル先端部位に合計 4 つの電極を有し、心内電位を測定することができる。試作したレーザカテーテルのレーザ光の伝送方向はカテーテルの長軸に対して平行であるため、光照射の際はレーザカテーテルが心筋組織に対してなるべく垂直に接触するように操作する必要がある。

### 7.2.2 実験動物の準備

本実験は慶應義塾動物実験委員会および理工学部生命倫理委員会の承認を得て、慶應義塾動物実験規定および理工学部生命倫理委員会規定を遵守し行った。実験動物はLW種雌豚 11頭 (体重24 ~ 57 kg、月齢2.5 ~ 4ヶ月) を用いた。麻酔導入および麻酔維持は6.4.1と同様に行った。右大腿部より動脈圧波形記録用ラインおよび、採血と持続点滴用の静脈ラインを確保し、パルスオキシメータ及び、四肢誘導心電図を記録した。

### 7.2.3 電気伝導ブロックの電気生理学的検査手法

三尖弁輪周囲の電気生理学的検査は、太さ6 Frで双極電極間距離が7 mmの操作性のある20極のマッピング用多電極カテーテル (Inquiry™; St. Jude Medical, Inc., CA, USA) を用いて行った。頸静脈を露出して太さ8 Frのシース (スーパーシース; メディキット株式会社, 東京) を挿入した。X線透視ガイド下に多電極カテーテルを頸部より右房内へ導入し、先端部を冠状静脈洞 (Coronary sinus; CS) に挿入し、下大静脈と三尖弁輪間の解剖学的峽部を通り手元側の電極が右房側壁に沿うように留置した。図7-3(a) に代表的な正面X線透視画像 (Anteroposterior fluoroscopic view; AP view) と、右房内腔におけるマッピング用電極カテーテルの配置を示す。また、図7-3(b) は図7-3(a) の電極カテーテルの配置を図示したものである。図7-3(a) に示すように三尖弁輪マッピング用多電極カテーテルの各電極に先端側から番号を付け、多電極カテーテル先端から数えて一番目と二番目の電極よりなる双極電極をTA1-2と表示する。冠状静脈洞入口部近傍に位置する双極電極TA3-4から周期電気刺激を行い、心臓電気生理検査システム (CardioLab®; GE Healthcare, WI, USA) を用いて、三尖弁輪に沿った興奮伝播の様子を記録した。

一般に高周波カテーテルアブレーション治療では解剖学的峽部に対する心筋電気伝導ブロックは、高周波通電部位近傍で電気刺激を行い、電気生理学的検査によって確認することができる。解剖学的峽部の両方向性の電気伝導ブロックは、線状の高周波通電部位の両側の双極電極において電気刺激を行い、解剖学的峽部を越えて反対側へ興奮が伝播しないことをそれぞれ確認することで証明する。実際には高周波通電部位の両側からの電気刺激による電気生理学的検査だけでは、緩徐伝導と完全伝導ブロックの識別が不十分な場合もあり、以下の手法が追加で行われるのが一般的である。貫壁性で両方向性の完全な電気伝導ブロックが形成された場合、線状に高周波通電を行った部位の近傍から電気刺激を行うと、電気刺激部位から始まった興奮が解剖学的障壁を迂回して反対側まで伝播する。図7-4(a) のように線状通電の近傍部位 A で電気刺激を行った場合とやや離れた部位 B で電気刺激を行った場合を考える。このとき反対側の部位 C で測定した興奮シグナルの伝播時間を考えると、部位 A での電気刺激からの伝播時間  $T_A$  は高周波通電部位からやや離れた部位 B での伝播時間  $T_B$  より長くなる。一方、図7-4(b) のように線状通電ライン上に伝導ギャップが存在して緩徐伝導路となっている場合は、電気刺激部位からの興奮は高周波通電部位を通り抜けて反対側へ伝播するため  $T_A$  は  $T_B$  よりも短くなる。このように2ヶ所で電気刺激を行ってその伝播時間を測定し貫壁性の電気伝導ブロックを確認する方法をディファレンシャルペーシング (Differential pacing) 法という [1-3]。両側からの電気刺激およびディファレンシャルペーシングによって完全な両方向性の電気伝導ブロックを確かめることができる。

#### 7.2.4 光増感反応の実験手法

豚10頭に対して、光増感反応による解剖学的峽部の心筋電気伝導ブロック作成を試みた。大腿鼠蹊部皮膚を切開して大腿静脈を露出し、太さ8 Frのロングシース (Fast-Cath SR0; St. Jude Medical, CA, USA) を挿入した。図7-3(a) に示すように大腿静脈よりレーザカテーテルを右房内へ挿入し、先端部を三尖弁輪峽部上に配置した。カテーテル操作は十分な技量と習得が必要であり、一連のカテーテル手技に関しては慶應義塾大学医学部循環器内科の臨床医師が担当した。図7-5(a) に使用したレーザカテーテルの写真、図7-5(b) にレーザカテーテルの光出射端におけるレーザ光ビームパターンを示す。レーザカテーテル出射ビームの断面強度分布はガウス分布に近い分布を示した。レーザカテーテルは内装する光ファイバーの仕様が異なる2種類を用いた (4.3.2参照)。レーザ光出射ビーム径はコア径200  $\mu\text{m}$ 、開口数0.22の石英光ファイバーの使用のときカテーテル先端ウィンドウにおいて1.0 mmで、コア径190  $\mu\text{m}$ 、開口数0.35の石英光ファイバーの使用のとき1.4 mmであった。レーザカテーテルの赤色レーザ光の伝送率は76~85%であった。レーザカテーテルは先端部に4つの電極を持ち、照射部位周辺の心内電位を測定することができる。レーザカテーテルを接続ケーブル用いて心臓電気生理検査システムにつなぎ、隣り合う電極間で測定した心内電位差 (双極電位) を表示した。豚10頭に対して、生理食塩水に溶解したタラポルフィンナトリウム 2.5~7.5 mg/kgを静脈ラインより約1 min間で単回投与した。投薬15 min後から周期電気刺激下に (7.2.2参照)、三尖弁輪と下大静脈間の解剖学的峽部に対して発振中心波長663 nmの赤色レーザ光 (Optical Fuel; ソニー株式会社, 東京) を照射し (6.4.1参照)、光増感反応を開始した。X線透視ガイド下で下大静脈と三尖弁輪を結ぶ線上に対して照射位置を変えながら一点一点照射を行い、電気伝導ブロックラインの作成を試みた。照射条件は、各点において放射照射量1000 J/cm<sup>2</sup>/point程度、照射時間30 s程度で照射を行うことを目標として、レーザカテーテル出射端の放射束を310~920 mW、放射照度を20~60 W/cm<sup>2</sup>の間で変化した。各点での照射はレーザカテーテル先端の双極電位の消失を目安に停止し、照射時間は10~40 sの間であった。照射中はレーザカテーテル先端ウィンドウが心筋組織に対してできるだけ垂直に接触するように操作した。三尖弁輪における興奮伝播方向が反転し、一方向性の電気伝導ブロックが得られるまで照射点を変えながら照射を繰り返し行った。照射部位の両側のマッピング用多電極カテーテルの双極電極から周期電気刺激を行い、さらにディファレンシャルペーシングを行うことで完全な両方向性の電気伝導ブロックを確かめた (7.2.2参照)。その後、犠牲死させて心臓を摘出し、心内膜側の照射部位を目視観察した。

豚1頭に対して従来法の高周波カテーテルアブレーションにより下大静脈と三尖弁輪間の解剖学的峽部に線状通電を行って電気伝導ブロックラインを作成し、本提案手法と比較した。高周波アブレーションカテーテルとしては太さ7 Fr、先端電極長4 mmのEPT Blazer II (Boston Scientific, Corp., MN, USA) を用い、高周波発生装置 (EPT-1000XP; Boston Scientific,

Corp., MN, USA) に接続して使用した。通電条件は、出力30 W、設定温度50°Cとし、高周波通電部位を変えながら、一点ずつカテーテル先端の双極電位が消失するまで10~60 sの通電を行った。経カテーテル的光増感反応の場合と同様に、電気生理学的検査にて解剖学的峡部の電気伝導ブロックを確認するまで高周波通電を繰り返し行った。

### 7.2.5 実験結果

表7-2(a) に経カテーテル的に光増感反応を行った際の実験条件および結果の概要をまとめる。全例において光増感反応中に光照射部近傍の心内電位の消失が確認できた。完全な電気伝導ブロックが得られたのは7例で、一過性の電気伝導ブロックが1例、残りの2例では組織表層の電位消失が確認されたが電気伝導ブロックには至らなかった。下大静脈と三尖弁輪間の解剖学的峡部に対して経カテーテル的に光増感反応を起こし、電気伝導ブロックに成功した代表的な2例 (1例目、2例目)、および組織表層の電位消失が確認された1例 (3例目) に関して述べる。

図7-6に1例目 (表7-2(a) の#1) のマッピング用多電極カテーテルの各点で記録した初期状態 (図7-6(a)) および光増感反応前 (図7-6(b)) の双極電位の時間波形を示す。上から心電図波形 (I、II、aV<sub>F</sub>誘導)、多電極カテーテルの各双極電極で測定した三尖弁輪の電位波形を示す。電極カテーテルの双極電極TA3-4にて周期電気刺激を行った際に、電気興奮は各双極電極で順次計測された。冠状静脈洞入口部 (TA3-4) より解剖学的峡部を通り低位右房側壁に位置するTA11-12へと向かって時計周りに電気興奮が伝播する様子がわかった。光感受性物質投与前後で電気興奮伝播波形に変化はなかった。図7-7に光増感反応後の電気生理学検査で得られた電位波形を示す。TA7-8とTA9-10の間に三尖弁から下大静脈へ向かって線状に光照射を行って光増感反応を行った。光増感反応条件としては、タラポルフィンナトリウム 5 mg/kg投与15 min後からレーザカテーテル出射端の放射束310 mW (放射照度 40 W/cm<sup>2</sup>) にて一点あたりの照射時間40 sとし、解剖学的峡部に対して合計8点の光照射を行った。図7-7(a) より、光増感反応前は周期電気刺激部位から時計周りに伝播していた電気興奮が、7回目の光照射後にはTA7-8からTA9-10の間に電気伝導性が消失し、電気興奮は反時計周りに伝播していることがわかった。これは、下方に向かう電気興奮は光照射部位にて伝播が遮断され、三尖弁輪を上方より反時計周りに旋回した電気興奮は反対方向から回り込んだことを示している。光増感反応前後においてTA3-4で周期電気刺激を行った際のTA9-10までの伝導時間を比較すると、光増感反応前は44 msであるのに対して光増感反応後は102 msとなり、58 ms延長した。次に光照射部位を挟んで反対側のTA9-10から周期電気刺激を行った場合の電位波形変化を図7-7(b) に示す。冠状静脈洞側から周期電気刺激を行った場合とは逆の現象が生じ、三尖弁輪を上方に時計周りに電気興奮が旋回した。図7-7(b)、(c) にTA9-10、TA11-12のそれぞれの双極電極で周期電気刺激を行い、ディファレンシャルペーシングを行った際の電位波形を示す。TA9-10あるいはTA11-12における周期電気刺激からTA5-6までの

伝導時間はそれぞれ81 ms、67 msであり、より光照射部位の近傍で周期電気刺激を行った方が伝導時間は長くなった。このように、両側からの電気刺激による伝播方向の変化、およびディファレンシャルペーシングによって、光照射部位において両方向性の完全な電気伝導ブロックラインが完成したことがわかった。

次に2例目(表7-2(a)の#2)の試験結果を示す。図7-8に心内腔における三尖弁輪マッピング用多電極カテーテルとレーザカテーテルの配置を示す正面X線透視画像、および光増感反応前後においてマッピング用多電極カテーテルの各点で記録した双極電位の時間波形を示す。1例目と同様に、多電極カテーテルのTA3-4にて周期電気刺激を行った際の時計周りの電気興奮伝播が観察された。TA7-8とTA9-10の間で光照射を行い、光増感反応を行った。光増感反応条件としては、タラポルフィンナトリウム 2.5 mg/kg 投与 15 min 後からレーザカテーテル出射端の放射束 310 mW (放射照度 40 W/cm<sup>2</sup>) にて一点あたり照射時間 10、20 s とし、解剖学的峽部に対して合計 19 点の光照射を行った。図7-8(c)より、光増感反応前は周期電気刺激部位から時計周りに伝播していた電気興奮が、19 回目の光照射後には TA7-8 で電気伝導性が消失していることがわかる。光増感反応前後で TA3-4 での周期電気刺激から TA9-10 までの伝導時間を比較すると、光増感反応前は 55 ms であるのに対して光増感反応後は 68 ms となった。光増感反応前後で電気興奮の伝導遅延は 13 ms であり、1 例目と比較して伝導遅延が小さかった。図7-9に施術直後に心臓を摘出してホルマリン固定した際の光照射部位の写真を示す。レーザカテーテルが機械的にこすれた部分に出血斑は認められるが、熱凝固による組織変色や炭化の所見はなく、得られた電気伝導ブロックは熱的作用による組織変性によって起きたものではないと判断できる。光照射部位に浮腫の形成は認められず、光増感反応を起こした部位と非照射部は目視上の変化はなかった。

次に3例目(表7-2(a)の#3)の試験結果を示す。図7-10に光増感反応前後においてマッピング用多電極カテーテルの各点で記録した双極電位の時間波形を示す。1例目と同様に、多電極カテーテルのTA3-4にて周期電気刺激を行った際の時計周りの電気興奮伝播が観察された。TA7-8とTA9-10の間で光照射を行い、光増感反応を行った。光増感反応条件としては、タラポルフィンナトリウム 5 mg/kg 投与 15 min 後からレーザカテーテル出射端の放射束 310 mW (放射照度 40 W/cm<sup>2</sup>) にて一点あたり照射時間 20 s とし、解剖学的峽部に対して合計 17 点の光照射を行った。図7-10(c)より、17 回目の光照射後には TA7-8 および TA9-10 において心内電位波形の振幅が小さくなっていることがわかる。レーザカテーテルの先端電極にて光照射部位の双極電位を測定したところ、光照射部位にてほぼ電位が消失していることがわかった。光増感反応前後で TA3-4 での周期電気刺激から TA9-10 までの伝導時間は変わらずいずれも 54 ms であった。光増感反応により表層組織における電気伝導性は消失したが、組織深部を通過して電気興奮が伝播しており、貫壁性の電気伝導ブロックは得られていないと考えられる。

表7-2(b)に高周波カテーテルアブレーションにより解剖学的峽部に対して電気伝導ブロ

ックを作成した例の通電条件を示す。高周波通電条件は出力3～30 Wにて一点あたりの通電時間10～60 sとし、解剖学的峽部に対して合計35点の通電を行った。光増感反応を利用する本提案手法の場合と比較して出力は10～100倍であった。また、合計の投入エネルギー量は光増感反応の場合には0.1～1 kJ程度であるが、高周波カテーテルアブレーションの場合には約9 kJであった。また、一点あたりの通電時間および、電気伝導ブロック達成までに要した施術時間は本提案手法とほぼ変わらなかった。

### 7.3 光増感反応の作用深度の推定

7.2のインターベンション下での経カテーテル的光増感反応で得られた即時的な電気伝導ブロックが、光増感反応の観点から検討した場合においても妥当であるかどうか調べるため、経カテーテル的に心内腔においてレーザー光を照射して光増感反応を起こした際の作用深度を推定する。

6.6において、光増感反応による組織障害は単位体積あたりに光感受性物質によって吸収されたフォトン数がある閾値を超えた場合に起こり、この吸収されたフォトン数に対する光増感反応の組織障害閾値  $T$  (photons/cm<sup>3</sup>) (以下、光増感反応の組織障害閾値と呼ぶ) は、

$T = \frac{1}{\Phi_{\Delta}} \varepsilon C H_0 \exp(-\alpha d_{th})$  で表されることを述べた (6.5 参照)。6.4 および 6.5 の *in vivo* 急性・

慢性実験から、心筋電気伝導ブロックを起こす光増感反応の組織障害閾値は、腫瘍組織に対する光線力学的治療の場合と同程度の  $10^{17} \sim 10^{19}$  photons/cm<sup>3</sup> の範囲内にあることがわかった。また、ポルフィマーナトリウムではラットの健常組織に対して *in vivo* にて光増感反応を行った場合の組織障害閾値  $T$  は  $1.5 \sim 3.5 \times 10^{18}$  photons/cm<sup>3</sup> と報告されている [4,5]。6.4の急性実験で即時的な心筋電気伝導ブロックが得られた光増感反応条件から計算した光増感反応の組織障害閾値  $T$  ( $7.0 \times 10^{17} \sim 4.5 \times 10^{18}$  photons/cm<sup>3</sup>) は、上記の文献値に近い値を示した。光増感反応の組織障害閾値  $T$  は、光感受性物質による一重項酸素産生効率の違いおよび励起波長の違いを考慮し、一重項酸素産生量子収率および波長で割り、単位体積あたりのフォトン数で表示しているため、光感受性物質の種類によって大きく変動しないと考えられる [4,6]。本研究では光増感反応の組織障害閾値  $T$  を  $T = 1.5 \sim 3.5 \times 10^{18}$  photons/cm<sup>3</sup> と仮定し、タラポルフィンナトリウムを用いた光増感反応を心筋組織に対して行った場合の作用深度を推定する。光増感反応の作用深度は前述の関係式を変形することで、以下のよう

$$d_{th} = \frac{1}{\alpha} \ln \frac{\varepsilon C H_0'}{\Phi_{\Delta} T} \quad (7-1)$$

$\alpha$  は心筋組織の減衰係数であり、 $H_0'$  は心筋組織に入射する光の放射照射量である。タラポルフィンナトリウムのモル吸光係数  $\varepsilon$  と一重項酸素産生の量子収率  $\Phi_{\Delta}$  は  $\varepsilon = 4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、

$\Phi_{\Delta} = 0.77$  である (3.2.2 参照)。光増感反応の作用深度は入射する光の放射照度および組織内の光感受性物質濃度から求めることができる。

経カテーテル的に心内腔側から心筋組織に対して赤色レーザー光を照射して光増感反応を行った際の作用深度を計算するため、図 7-11 に示すようなモデルを考える。インターベンション下の実証実験と同様な光増感反応条件とし (7.2.3 参照)、タラポルフィンナトリウムの投与量 5 mg/kg、レーザーカテーテル出射端の放射束 310 mW (放射照度 40 W/cm<sup>2</sup>)、光照射時間 20 s とした。7.2 の実証実験ではレーザーカテーテル先端の光学ウィンドウが心筋組織に接触した状態で光を照射するようにカテーテル操作を行ったが、解剖学的峽部近傍の心筋組織表面は平滑でなく、心臓は拍動に伴い激しく動くため完全な接触状態を維持するのは難しい。本計算ではレーザーカテーテル先端ウィンドウと心筋組織表面の間に厚さ  $\Delta$  の血液層が存在すると仮定して計算を行った。また、投薬から光照射までのインターバル時間の違いによる血漿中および組織中の光感受性物質濃度の変化を考慮して作用深度を予測した。レーザーカテーテル出射端の放射束が 310 mW の場合に、先端ウィンドウからの出射ビーム中心部の半径 100  $\mu\text{m}$  の領域において算出した放射照度 (以下、ビーム中心における放射照度と呼ぶ) は、約 70 W/cm<sup>2</sup> となる。レーザーカテーテル先端ウィンドウから出射したレーザー光は血液層によって吸収され、心筋組織内に入射する。レーザーカテーテル先端と組織間に存在する血液によるレーザー光の減衰を考慮し、心筋組織に入射する光のビーム中心における放射照射量  $H'_0 = H_0 \exp(-\alpha_{blood} \Delta)$  を求めた。ここで、 $\alpha_{blood}$  は血液層における赤色光の減衰係数とし、 $H_0$  はレーザーカテーテル出射ビーム中心における放射照射量とした。求めた心筋に入射する光のビーム中心における放射照射量と組織内光感受性物質濃度から、式 (7-1) より光増感反応による作用深度を求めた。表 7-3 に本計算で用いたパラメータとして、各インターバル時間における血液および組織中のタラポルフィンナトリウム濃度、および光学定数をまとめた [7,8]。血液層においては、光感受性物質による光吸収を考慮し、血液の吸収係数に血液中のタラポルフィンナトリウムの吸収係数を加えて減衰係数  $\alpha_{blood}$  を求めた。心筋組織内の減衰係数  $\alpha$  は、先行研究で摘出した含血心筋組織に対して波長 663 nm の赤色レーザー光を照射した際の組織内光分布を測定した結果から得られた  $\alpha = 1.6 \text{ mm}^{-1}$  を用いた [9]。また、組織内のタラポルフィンナトリウム濃度は血漿中濃度の 1/6 倍として計算した [10]。心筋組織においてはタラポルフィンナトリウムの濃度は小さく、波長 663 nm においては光感受性物質の吸収係数は心筋組織の減衰係数の 1/100 倍以下となるため、本計算において光感受性物質の光吸収による組織内光減衰は無視できると考えた。

図 7-12 に上述の方法で推定した光増感反応による作用深度と仮定した血液層の厚み  $\Delta$  の関係を示す。レーザーカテーテル出射端の放射束 310 mW (放射照度 40 W/cm<sup>2</sup>)、光照射時間 20 s とした。血漿中タラポルフィンナトリウム濃度が 10  $\mu\text{g/mL}$  (インターバル時間 25 min に相当) および 20  $\mu\text{g/mL}$  (インターバル時間 16 min に相当) においてそれぞれ作用深度を計算した。作用深度はレーザーカテーテルと組織間の血液層の厚み  $\Delta$  が増えるほど減少した。

血漿中の光感受性物質濃度  $20 \mu\text{g/mL}$  では、血液層の厚みが  $\Delta = 8 \mu\text{m}$  の場合に作用深度は  $3.5 \sim 4.0 \text{ mm}$  となり、血液層が  $\Delta = 2 \text{ mm}$  の場合に  $2.7 \sim 3.2 \text{ mm}$  となった。この結果は、レーザカテーテル先端と心筋組織が完全に接触していない状態においても電気伝導ブロックが得られることを示している。また、図 7-13 に光増感反応による作用深度と血漿中の光感受性物質濃度 (インターバル時間) の関係を示す。レーザカテーテル出射端の放射束  $310 \text{ mW}$  (放射照度  $40 \text{ W/cm}^2$ )、血液層の厚みを  $\Delta = 8 \mu\text{m}$  とした。光照射時間  $10 \text{ s}$ 、および  $40 \text{ s}$  においてそれぞれ作用深度を計算した。作用深度は血漿中の光感受性物質濃度が高くなるほど、すなわちインターバル時間が短いほど増加した。光照射時間が  $10 \text{ s}$  では、血漿中の光感受性物質濃度が  $10 \mu\text{g/mL}$  の時に作用深度は  $2.7 \sim 3.2 \text{ mm}$  となり、血漿中の光感受性物質濃度が  $25 \mu\text{g/mL}$  の時に  $3.2 \sim 3.8 \text{ mm}$  となった。7.2 の実証実験で対象とした下大静脈と三尖弁輪間の解剖学的峽部の組織厚みは  $2 \sim 4 \text{ mm}$  であり、推定した作用深度から 7.2 で採用した光増感反応条件にて貫壁性の心筋電気伝導ブロックが得られることが説明できる。図 7-14 に光増感反応による作用深度と光照射時間 (放射照射量) の関係を示す。レーザカテーテル出射端の放射束  $235 \text{ mW}$  (放射照度  $30 \text{ W/cm}^2$ )、および  $80 \text{ mW}$  (放射照度  $10 \text{ W/cm}^2$ ) においてそれぞれ作用深度を計算した。血漿中の光感受性物質濃度を  $10 \mu\text{g/mL}$  とし、血液層の厚みを  $\Delta = 8 \mu\text{m}$  とした。作用深度は放射照射量が大きくなるほど増加した。放射照度が  $30 \text{ W/cm}^2$  では、光照射時間  $10 \text{ s}$  の場合に作用深度は  $2.5 \sim 3.0 \text{ mm}$  となり、光照射時間  $60 \text{ s}$  の場合に  $3.6 \sim 4.1 \text{ mm}$  となった。このように光照射時間を変えて放射照射量を変化させることで、作用深度の調節ができることがわかった。

#### 7.4 考察

インターベンション下において試作したレーザカテーテルを用い、豚の下大静脈と三尖弁輪間の解剖学的峽部に対してタラポルフィンナトリウムによる光増感反応を行った。レーザカテーテルは試作中で本提案手法に適した仕様を模索している段階にある。豚の場合はヒトと比較して心房内腔が狭いため心内腔でレーザカテーテルを自由に操作することができず、豚の解剖学的峽部に対して電気伝導ブロックを作成するためのカテーテル操作手技の確立および光照射部位の決定には試行錯誤を重ねた。右房の解剖学的峽部の電気伝導ブロックモデルはヒトの場合には心房粗動に対する治療法として確立したモデルであるが (2.3.3 参照)、豚ではヒトと同じ部位に電気伝導ブロックラインを作成するだけでは電気生理学的検査にて電気伝導ブロックを確認できない場合があった。このため、光増感反応条件を固定せず、臨床医師らのカテーテル手技の習熟および電気伝導ブロックモデルの実証に重点を置いて実験を行った。また、豚はタラポルフィンナトリウムの排泄速度が速く、術中に血漿中濃度が速やかに減少する (6.3.2 参照)。組織内光感受性物質の濃度減衰を考慮して、光照射条件は実験中に変更した。解剖学的峽部の電気伝導ブロックが得られる電気伝導ブロックラインの作成部位および光増感反応条件を探索しながら、全 10 例の動物実験を



行った。1~5 例目は開口数 0.22 の光ファイバーを内装したレーザカテーテルを使用した。1 例目では解剖学的峽部に対して合計 8 点の光照射で電気伝導ブロックが得られた。解剖学的峽部の電気伝導速度はヒトの場合は 0.4~0.5 m/s であり [11]、ディファレンシャルペーシングによって得られた伝導時間の差 14 ms (7.2.4 参照) から予想される興奮伝播距離の差は 5.6~7.0 mm となる。マッピング用多電極カテーテルの双極電極間距離は 7 mm なので、得られた伝導時間の差は妥当である。2 例目以後は、この 1 例目の光増感反応条件を基準として条件を設定した。2~5 例目でタラポルフィンナトリウムの投与量を下げて光照射時間を短縮し、より弱い光増感反応条件にて、1 例目と同じように電気伝導ブロックが得られるか確かめた。レーザカテーテル先端が解剖学的峽部に対してほぼ垂直に接触した状態で光照射を行えた場合に、この 1 例目より弱い光増感反応条件で心筋電気伝導ブロックが得られた。5 例の実験結果より、完全な電気伝導ブロックの達成には光増感反応条件だけでなく、レーザカテーテル先端ウィンドウの対象部位への接触状態が大きく関与していることがわかった。試作したレーザカテーテルはカテーテル長軸方向にレーザ光が出射するため、光照射の際にはレーザカテーテル先端ウィンドウを対象部位に対してほぼ垂直に接触させる必要がある。心内腔でのカテーテル操作は X 線透視ガイド下に行うが、心筋組織表面に凹凸がある場合やカテーテルの操作困難な部位ではカテーテルの組織に対する接触角度の細かい調整は困難である。図 7-15(a)、(b) に解剖学的峽部を対象とした場合の経カテーテル的光増感反応と高周波カテーテルアブレーションのカテーテル操作の違いを示す。図 7-15(d) に示すように高周波カテーテルアブレーションでは先端電極と組織の接触部位にて高周波電流が流れるため、有効な接触角度に制限はない。一般に高周波カテーテルアブレーションでは、カテーテルの接触角度は 5~90 度の範囲内である [12,13]。一方、レーザカテーテルを用いた解剖学的峽部に対する光増感反応では、図 7-15(a)、(c) に示すように右房内腔でカテーテル先端を屈曲させ、解剖学的峽部に対してカテーテル先端をほぼ垂直に接触させた状態で光照射を行う必要がある。特に三尖弁輪近傍に対して光照射を行う際にはレーザカテーテル先端を 180°以上屈曲させる必要がある。屈曲半径が 20 mm 程度のレーザカテーテルを内腔直径 20~30 mm の狭い右心房内で自由に屈曲させることができず、所望の部位にレーザカテーテル先端を設置することができなかつた。そこで、6 例目以後では心腔内におけるカテーテル操作を行えるように、体重を 25 kg 程度から 50 kg 程度に大きくし、より心腔内空間の広い大型の豚を使用した。また、レーザカテーテル先端の光出射径を拡げ、レーザカテーテルが組織に対して斜めに接触した場合においてもレーザ光が組織に伝達するようにした。具体的にはレーザカテーテルに内装する光ファイバーの開口数を 0.22 から 0.35 に変更することで、カテーテル先端ウィンドウにおける出射径を 1.0 mm から 1.4 mm に拡げた。開口数 0.35 の光ファイバーを内装したレーザカテーテルを使用した場合には、レーザカテーテルが組織に対して斜めに接触している場合においても、ある程度の作用深度が得られる [9]。例えば、レーザカテーテルの組織に対する接触角度が 50 度の場合には、

垂直にカテーテルが接触している状態 (接触角度 90 度) の場合の 70%程度の作用深度になる [9]。6~10 例目では体重が 50 kg 以上の豚を使用し、開口数 0.35 の光ファイバーを内装したレーザカテーテルを用いた。6,7 例目ではタラポルフィンナトリウムの投与量 2.5 mg/kg、レーザカテーテル出射端の放射束 310 mW (放射照度 20 W/cm<sup>2</sup>) で光増感反応を行った。7 例目では一過性の電気伝導ブロックとなった。これは、体重の大きな豚を使用したことで心壁厚みが増し、組織深部まで作用が及ばなかったと考えられる。そこで、8~10 例目ではタラポルフィンナトリウムの投与量を増して、放射照度を増やし、本モデルで確実に電気伝導ブロックを得ることを目的として実験を行った。カテーテル出射端における放射照度が 60 W/cm<sup>2</sup>を超える場合には、レーザカテーテル先端の光学ウィンドウに凝集血液塊が付着している場合があった。これは、心筋組織とカテーテル先端光学ウィンドウの間の血液層によって赤色レーザ光が吸収され、ウィンドウ先端部の温度が上昇することが原因と考えられる [14]。ウィンドウ先端部の温度上昇に伴い、赤血球の凝集および溶血を生じ、この凝集血液塊が赤色光の吸収体となりさらに温度が上昇し、最終的に炭化を生じる可能性がある [14]。放射照度が 40 W/cm<sup>2</sup>以下ではレーザカテーテル先端ウィンドウにおける凝集血液塊の付着は全くなかった。

以上 6~10 例目の実験を通し、本提案手法において解剖学的峽部の電気伝導ブロックを確実に得るためにはレーザカテーテルの屈曲性の向上が必要であるとの結論に至った。本法ではレーザカテーテルを組織に対して垂直に近い状態 (接触角度 40~90 度) で接触させる必要があることから、レーザカテーテル先端部の屈曲性が心筋組織にレーザ光を伝達するために大きく関わる。試作したレーザカテーテルは屈曲半径が約 20 mm であったが、狭い心内腔での操作を考慮すると屈曲半径を 15 mm 以下にする必要がある。ただし、この曲率は本豚モデルでの知見である。また、本実験モデルにおいて電気伝導ブロックラインの作成部位を見直す必要があると考えられた。2, 6, 8 例目では、局所において電気伝導ブロックが得られているものの伝導時間の変化が小さかった。これは、豚心臓に特有な解剖生理学的特徴が原因であると予想している。2 例目において 1 例目より得られた伝導時間変化が小さかった理由として (7.2.4 参照)、1 例目とは異なる興奮伝播経路を通ったためと考えられる。右房には本来ならば分界稜やユースタキオ稜と呼ばれる解剖学的障壁が存在し、これらが機能的伝導ブロックを形成するため興奮は右房後壁を通る旋回経路を形成することができずに三尖弁輪周囲を旋回する (2.3.3 参照)。動物の場合は特に個体によってこの分界稜が下大静脈まで伸びきらずに途絶しており下大静脈入口部の周囲を旋回する経路が形成されたり、分界稜中部で横方向の伝導 (伝導ギャップ) が存在して伝導ギャップを通る旋回路が形成されると考えられる [15]。このように分界稜において横方向の伝導が存在する場合には、通常のディファレンシャルペーシングによる電気生理学的検査だけでは解剖学的峽部における完全な電気伝導ブロックの判断が困難である [16]。本実験で光増感反応前後において伝播方向は変わったにも関わらず伝導時間にあまり差が出なかった理由として、

光増感反応によって右房後壁を通り下大静脈入口部周囲を旋回する興奮伝播経路が形成されたためと考えられる。この結果、解剖学的峽部を通る旋回路と光増感反応後の迂回経路の伝播距離に大きな差がでなかつたと考えられる。このように右房後壁を通る伝播経路を遮断して、解剖学的峽部の電気伝導ブロックを臨床と同様な電気生理学的検査で判断するためには、図 7-16 に示すように右房後壁に対する線状ブロックラインを追加する必要がある [17]。

以上 10 例の動物実験を通して、電気生理学的検査システムを用いて本提案手法の統合的な運用評価を行い、現行の高周波カテーテルアブレーションと同じ運用環境にて同様な効果が得られることがわかった。また、本提案手法は高周波カテーテルアブレーションと比較して低エネルギー量で電気伝導ブロックが達成できた。光増感反応の観点から作用深度を推定した結果、本実験条件にて最大で 4 mm の作用深度が得られることがわかった (7.3 参照)。また、レーザカテーテルが完全に組織に接触していない場合においても、本実験条件のもとでは光増感反応によって 2~4 mm の作用深度が得られる可能性がある。実際の対象部位は心内膜面の平坦な部位だけでなく、心耳近傍などの楕状筋が発達した部位もある。このような部位では、心内組織表面は 1 mm 程度の凸凹が存在するため、カテーテルと組織の間に必然的に血液層が生じる。本提案手法の場合には 2 mm 程度の血液層があったとしても照射時間を調節することによって 2~4 mm の作用深度が得られると考えられる。一方、高周波カテーテルアブレーションでは、このように凹凸のある組織表面に対して高周波通電を行うとカテーテルと組織間の血流により熱伝導が不均一になるため治療深度が不安定になる [18,19]。高周波通電時は有効な接触角度に制限はないものの、治療深度を安定化するためにカテーテル先端電極と組織との密着が必要である。また、カテーテルの組織に対する接触圧によって治療効果や副作用発現率が大きく異なることが報告されている [20,21]。接触圧が不十分な場合には十分に心筋組織温度が上昇しないため、治療域が小さくなる [20]。例えば、カテーテルの心筋組織に対する負荷荷重が 10 g あるいは 40 g において高周波通電を行った場合を比較すると、負荷荷重が 40 g の場合には負荷荷重 10 g の場合の約 1.3~1.5 倍の治療深度となる [20,21]。一方、過剰にカテーテルを組織に押し当てた場合には、接触面において血流によるカテーテル先端電極の熱輸送が抑制され、組織温度が過剰になり、組織内水蒸気爆発や血栓形成の原因となる [21]。負荷荷重が 40 g 以上の場合には高周波アブレーションカテーテル先端部において組織内水蒸気爆発や血栓形成が発生する頻度が高くなることが報告されている [20]。このように、組織内水蒸気爆発や血栓形成の発生率が少ない最適な接触圧条件は 10~30 g とされているが [12,20,21]、心拍動がある中でカテーテルと組織間の接触圧を維持するのは困難である。一方、経カテーテル的光増感反応の場合はレーザカテーテル先端が組織に対して少し浮いた状態で光照射を行った際にもある程度の作用深度が得られるので、高周波カテーテルアブレーションのように接触圧を厳密に考える必要がないと考えられる。ただし、レーザカテーテルの先端電極において光照射

部位周辺の心内電位の消失を確認するためには、先端電極が組織に接触している必要がある。また、光増感反応による血液の障害を最小限にするためには、レーザカテーテル先端の光学ウィンドウと組織間の血液層は薄いことが望ましい。以上のように、本提案手法においてはレーザカテーテルと組織間に血液層が存在している場合においても実用的な光増感反応による作用深度が得られるため、現行の高周波カテーテルアブレーションと比較して接触圧を厳密に最適化する必要がなく、組織表面に凹凸がある部位に対しても作用深度が得られると思われる。

以上より、経カテーテル的増感反応により 1~4 mm の心筋組織に対して電気伝導ブロックを達成するためには、本実験結果から以下に示す増感反応条件が適していることがわかった。

- i) 血漿中タラポルフィンナトリウム濃度: 10~20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (豚の場合タラポルフィンナトリウム投与量 5~7.5 mg/kg、インターバル時間 15 min)
- ii) レーザ光の放射照度: 40  $\text{W}/\text{cm}^2$  以下
- iii) レーザ光の放射照射量: 1  $\text{kJ}/\text{cm}^2/\text{point}$  程度

タラポルフィンナトリウム 2.5~7.5 mg/kg の静脈内単回投与条件で電気伝導ブロックが得られたが、投与量 2.5 mg/kg では電気伝導ブロックを達成するまで平均 85 min 要し、5 mg/kg 以上の場合 (平均 54 min) と比較して長かった (7.2.4 参照)。投与量 2.5 mg/kg では投薬後 15 min で血漿中タラポルフィンナトリウム濃度が 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を下回っており (6.3.2 参照)、図 7-13 より血漿中濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下では推定作用深度が急激に減少することから、貫壁性の電気伝導ブロックを達成するのに投入エネルギーを増す必要がある。したがって、光照射時の血漿中タラポルフィンナトリウム濃度が 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上となる投与量設定が適切であることがわかった。放射照度が 60  $\text{W}/\text{cm}^2$  以上でレーザカテーテル先端ウィンドウにおける凝集血液塊の付着があり、カテーテル先端部の温度上昇の原因になる。このような凝集血液塊の付着が全くなかった 40  $\text{W}/\text{cm}^2$  以下に放射照度を設定する必要がある。放射照射量は、本実験ではレーザカテーテル先端の双極電位の消失を目安に 400~1600  $\text{J}/\text{cm}^2/\text{point}$  の間で変化させており、心筋電気伝導ブロックを達成するためには 1  $\text{kJ}/\text{cm}^2/\text{point}$  程度の放射照射量で光照射を行う必要があることがわかった。

経カテーテル的増感反応ではレーザカテーテルを心筋組織に対して垂直に近い状態 (接触角度 40~90 度) で接触させる必要があることから、レーザカテーテル先端部の屈曲性が重要である。本豚モデルではカテーテル屈曲半径を 15 mm 以下にすると、心内腔でレーザカテーテルを操作して所望の部位に対してほぼ垂直に接触照射できると考えられた。豚の心房内腔はヒトと比べて狭いためこのように屈曲半径を小さくする必要がある。

## 7.5 結言

本章では、試作したレーザカテーテルを用い、*in vivo* 動物実験において下大静脈と三尖弁輪間の解剖学的峽部に対して経カテーテル的に光増感反応を行い、臨床と同様な運用環境において光増感反応による心筋電気伝導ブロックの実証を行った。タラポルフィンナトリウム 2.5~7.5 mg/kg 投与 15 min 後からレーザカテーテル先端における放射照度 20~60 W/cm<sup>2</sup>にて光増感反応を行った場合に解剖学的峽部における電気伝導ブロックを電気生理学的検査で確かめた。なお、カテーテル手技および光増感反応条件は最適化されていない。第6章の実験結果から求めた光増感反応の組織障害閾値を用い、経カテーテル的に光増感反応を起こした際の光増感反応による作用深度を推定した結果、1~4 mm であることがわかった。

## 参考文献

- [1] D. Shah, M. Haïssaguerre, A. Takahashi, P. Jaïs, M. Hocini, and J. Clémenty, “Differential pacing for distinguishing block from persistent conduction through an ablation line,” *Circulation*, vol. 102, pp. 1517–1522, 2000.
- [2] 土谷健, 高橋尚彦, *不整脈プロフェッショナル*, 東京: 南江堂, 2010, pp. 36–48.
- [3] S. Miyazaki, X. Liu, A. Shah, M. Haïssaguerre, and M. Hocini, “Differential pacing for confirming mitral isthmus block: Is the mitral isthmus completely blocked?” *Heart Rhythm*, vol. 8, pp. 145–147, 2011.
- [4] L. Lilge, M. Portoy, and B. C. Wilson, “Apoptosis induced in vivo by photodynamic therapy in normal brain and intracranial tumour tissue,” *Br J Cancer*, vol. 83, pp. 1110–1117, 2000.
- [5] Q. Chen, M. Chopp, L. Madigan, M. O. Dereski, and F. W. Herzog, “Damage threshold of normal rat brain in photodynamic therapy,” *Photochem Photobiol*, vol. 64, pp. 163–167, 1996.
- [6] T. J. Farrell, B. C. Wilson, M. S. Patterson, and M. C. Olivo, “Comparison of the in vivo photodynamic threshold dose for Photofrin, mono- and tetrasulfonated aluminum phthalocyanine using a rat liver model,” *Photochem Photobiol*, vol. 68, pp. 394–399, 1998.
- [7] W. F. Cheong, S. A. Prahl, and A. J. Welch, “A review of the optical properties of biological tissues,” *IEEE J Quantum Electron*, vol. 26, pp. 2166–2185, 1990.
- [8] K. Kondo, T. Miyoshi, H. Fujino, H. Takizawa, S. Imai, N. Kobayashi, K. Kenzaki, S. Sakiyama, and A. Tangoku, “Photodynamic therapy using a second generation photosensitizer, Talaporfin,” *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 4, pp. 269–274, 2007.
- [9] 梶原拓郎, 伊藤亜莉沙, 荒井恒憲, “Photodynamic Therapy による心房細動治療: 心筋接触照射光の組織内強度分布と治療領域推定,” *日本レーザー医学会誌*, vol. 31, pp. 331, 2010.
- [10] C. J. Gomer and A. Ferrario, “Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model,” *Cancer Res*, vol. 50, pp. 3985–3990, 1990.
- [11] G. K. Feld, M. Mollerus, U. Birgersdotter-Green, O. Fujimura, T. D. Bahnson, K. Boyce, and M. Rahme, “Conduction velocity in the tricuspid valve-inferior vena cava isthmus is slower in patients with type 1 atrial flutter compared to those without a history of atrial flutter,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 8, pp. 1338–1348, 1997.
- [12] Y. Okumura, S. B. Johnson, T. J. Bunch, B. D. Henz, C. J. O’Brien, and D. L. Packer, “A systematic analysis of in vivo contact forces on virtual catheter tip/tissue surface contact during cardiac mapping and intervention,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 19, pp. 632–640, 2008.
- [13] S. J. Asirvatham, “Pulmonary vein-related maneuvers: Part I,” *Heart Rhythm*, vol.

- 4, pp. 538–544, 2007.
- [14] M. Takahashi, A. Ito, T. Kajihara, and T. Arai, “Detection of pre-charring optical behavior at a laser catheter-tip in blood: ex vivo and in vivo study,” *Proc SPIE*, vol. 7897, pp. 78970U, 2011.
- [15] T. R. Betts, S. Y. Ho, D. Sanchez-Quintana, P. R. Roberts, R. H. Anderson, and J. M. Morgan, “Three-dimensional mapping of right atrial activation during sinus rhythm and its relationship to endocardial architecture,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 13, pp. 1152–1159, 2002.
- [16] H. Sugimura, I. Watanabe, Y. Okumura, K. Ohkubo, S. Ashino, T. Nakai, Y. Kasamaki, and S. Saito, “Differential pacing for distinguishing slow conduction from complete conduction block of the tricuspid-inferior vena cava isthmus after radiofrequency ablation for atrial flutter—Role of transverse conduction through the crista terminalis,” *J Interv Card Electrophysiol*, vol. 13, pp. 125–134, 2005.
- [17] F. Saremi, L. Pouzand, S. Krishnan, O. Ashikyan, S. V. Gurudevan, J. Narula, K. Kaushal, and A. Raney, “Right atrial cavotricuspid isthmus: Anatomic characterization with multi-detector row CT,” *Radiology*, vol. 247, pp. 658–668, 2008.
- [18] S. J. Asirvatham, “Correlative anatomy and electrophysiology for the interventional electrophysiologist: Right atrial flutter,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 20, pp. 113–122, 2009.
- [19] T. Yamada, Y. Murakami, Y. Yoshida, T. Okada, N. Yoshida, J. Toyama, N. Tsuboi, Y. Inden, M. Hirai, T. Murohara, H. T. McElderry, A. E. Epstein, V. J. Plumb, and G. N. Kay, “Electrophysiologic and electrocardiographic characteristics and radiofrequency catheter ablation of focal atrial tachycardia originating from the left atrial appendage,” *Heart Rhythm*, vol. 4, pp. 1284–1291, 2007.
- [20] K. Yokoyama, H. Nakagawa, D. C. Shah, H. Lambert, G. Leo, N. Aeby, A. Ikeda, J. V. Pitha, T. Sharma, R. Lazzara, and W. M. Jackman, “Novel contact force sensor incorporated in irrigated radiofrequency ablation catheter predicts lesion size and incidence of steam pop and thrombus,” *Circ Arrhythmia Electrophysiol*, vol. 1, pp. 354–362, 2008.
- [21] L. D. Biase, A. Natale, C. Barrett, C. Tan, C. S. Elayi, C. K. Ching, P. Wang, A. Al-Ahmad, M. Arruda, J. D. Burkhardt, B. J. Wisnoskey, P. Chowdhury, S. De Marco, L. Armaganijan, K. N. Litwak, R. A. Schweikert, and J. E. Cummings, “Relationship between catheter forces, lesion characteristics, “popping,” and char formation: Experience with robotic navigation system,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 20, pp. 436–440, 2009.

図表

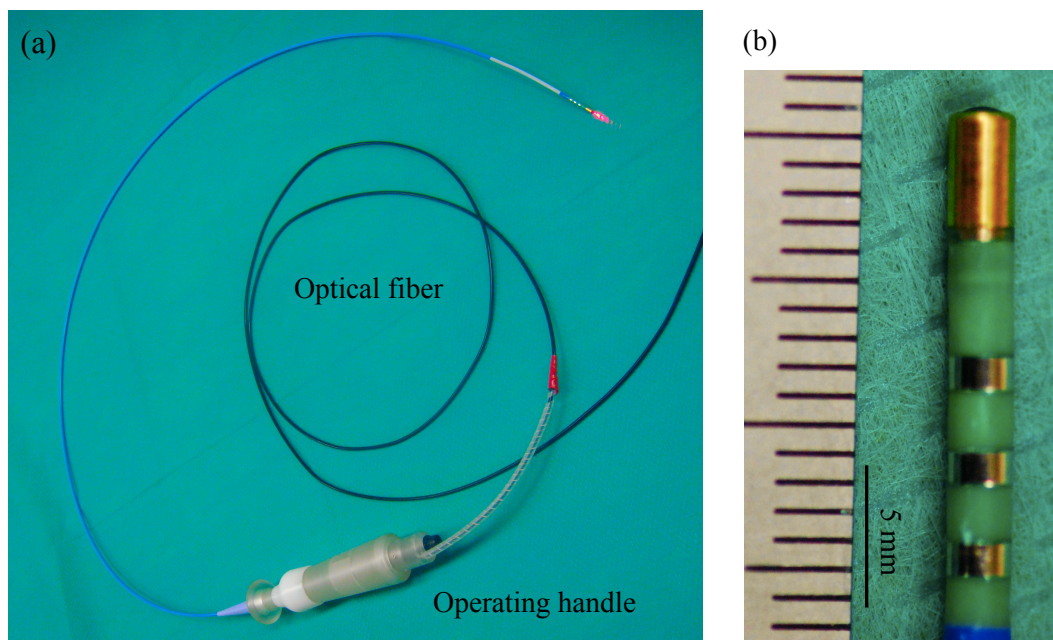


図 7-1 試作したレーザカテーテル

(a) 試作したレーザカテーテルの全体写真

カテーテル先端の屈曲操作は、高周波アブレーションカテーテルと同様に手元の操作ハンドルによって行う。

(b) レーザカテーテル先端部の拡大写真



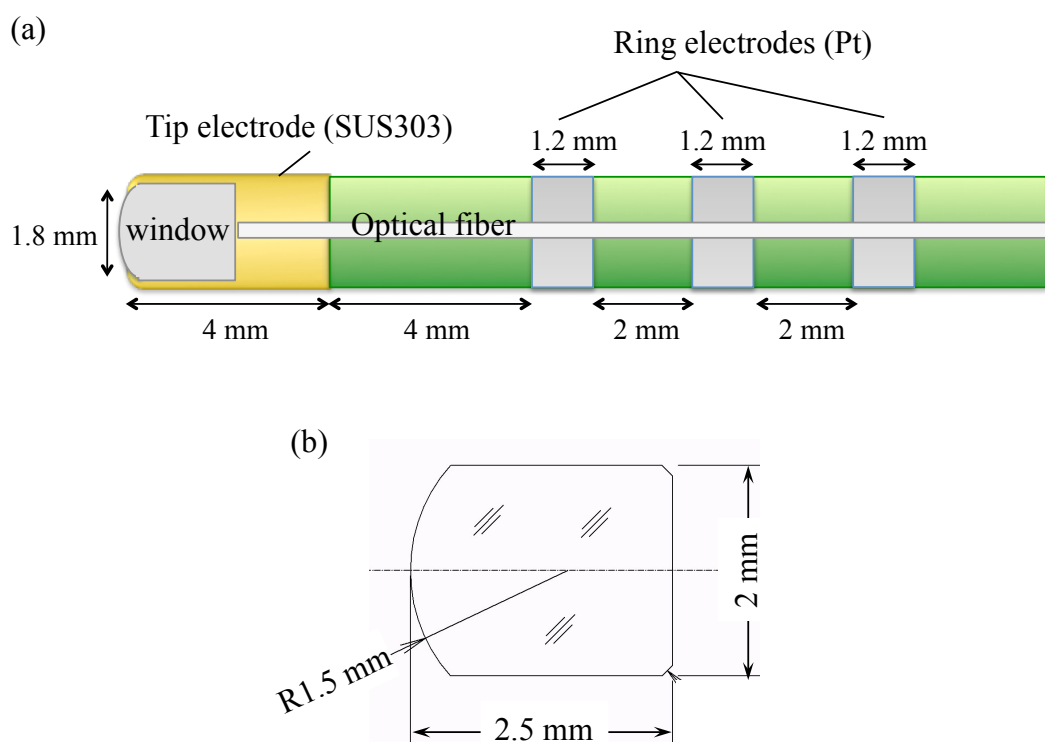


図 7-2 試作したレーザーカテーテルの内部構造

(a) レーザカテーテル先端部の内部構造の模式図

先端電極の材質は SUS303 であり、カテーテル先端の発熱を防ぐため、内部表面を金メッキ加工して赤色光の反射率を高めた。リング電極の材質はプラチナ合金である。

(b) レーザカテーテル先端に内装した光学ウィンドウの模式図

光学ウィンドウは材質 BK7、長さ 2.5 mm、直径 2.0 mm、先端曲率半径 1.5 mm である。

表 7-1 レーザカテーテルに内装した光ファイバの仕様

Optical fiber		Specification							
	Core material	Clad material	Coating material	Core diameter [ $\mu\text{m}$ ]	Cladding diameter [ $\mu\text{m}$ ]	Coating diameter [ $\mu\text{m}$ ]	Numerical aperture	Allowable Bending radius (short term) [mm]	Operating temperature Limit [ $^{\circ}\text{C}$ ]
<b>FG200LCC</b>	Silica	Fluorine-doped silica	Tefzel	200	240	400	0.22	18	150
<b>GF-180</b>	Germanium dioxide-doped silica	Fluorine-doped silica	Urethane acrylate polymer	190	200	240	0.35	10	150

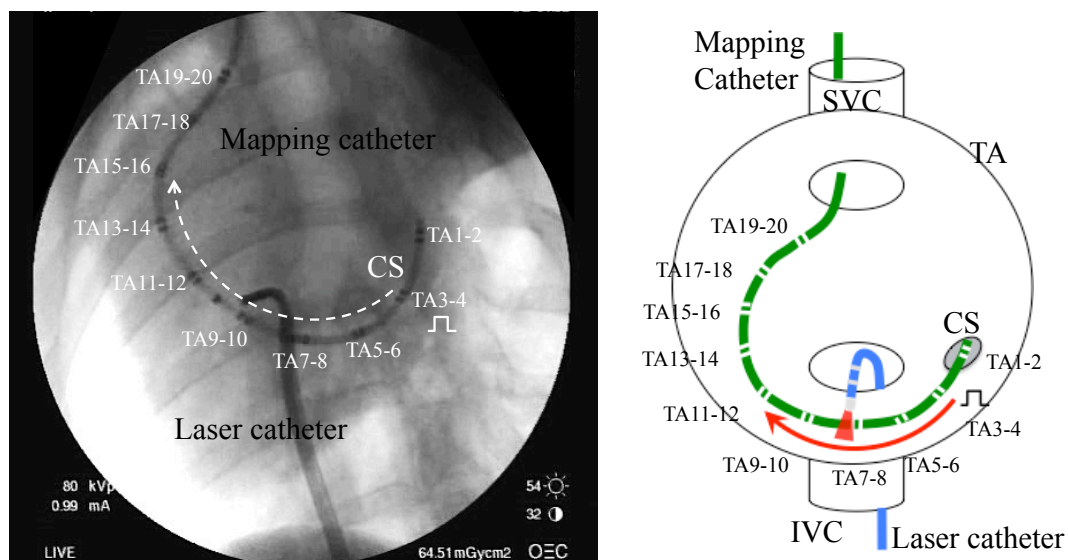


図 7-3 右房内腔における多電極カテーテルおよびレーザーカテーテルの配置

(a) 正面 X 線透視画像

三尖弁輪マッピング用多電極カテーテルの先端部を冠状静脈洞に挿入し、解剖学的峡部を通るように配置した。多電極カテーテル先端から数えて一番目と二番目の電極よりなる双極電極を TA1-2 と表示する。レーザーカテーテルを大腿静脈より右房内へ導入し、解剖学的峡部上に配置した。

TA: 三尖弁輪、CS: 冠状静脈洞

(b) 右房内腔のカテーテル配置の模式図

SVC: 上大静脈、IVC: 下大静脈

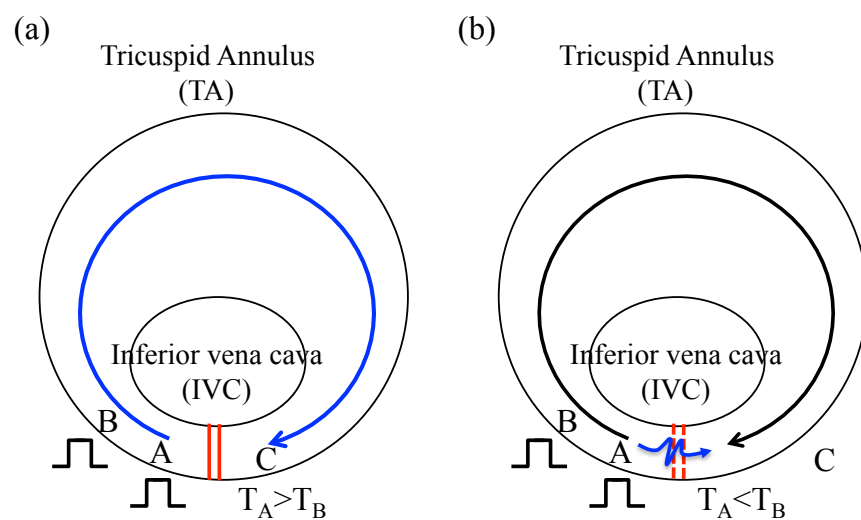


図7-4 解剖学的狭部に対する心筋電気伝導ブロックの電気生理学的検査方法 (ディファレンシャルペーシング法)

(a) 完全な電気伝導ブロックが得られた場合

電気刺激部位から部位Cまでの興奮伝播時間を考えると、部位Aから電気刺激を行った場合の伝播時間 $T_A$ は部位Bから電気刺激を行った場合の伝播時間 $T_B$ より長くなる。赤線は完全伝導ブロックラインを示す。青矢印は電気興奮の伝播経路を示す。

(b) 線状な電気伝導ブロックライン上に伝導ギャップが存在し緩徐伝導路となっている場合電気刺激部位からの興奮は伝導ブロックライン部位を通り抜けて反対側へ伝播するため $T_A$ は $T_B$ よりも短くなる。

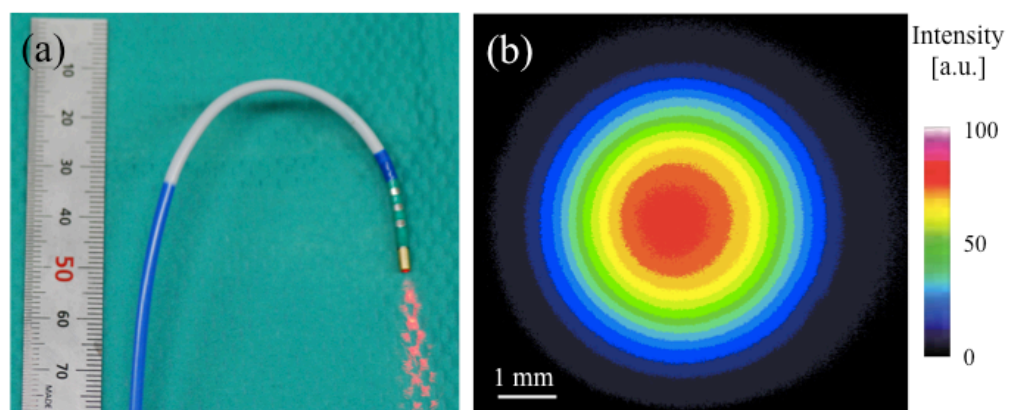


図 7-5 使用した試作レーザーカテーテル

(a) 操作ハンドルでカテーテルを屈曲させた際のレーザーカテーテルの先端部の写真

(b) レーザカテーテルから照射したレーザー光のビームパターン

レーザーカテーテルに内装した光ファイバーはコア径  $200\ \mu\text{m}$ 、開口数 0.22 の石英光ファイバーである (4.3.2 参照)。レーザーカテーテルの光学ウィンドウ先端が受光面から  $7\ \text{mm}$  離れた距離からレーザー光を出射した。

表7-2 カテーテルアブレーション施行条件のまとめ  
 (a) 光増感反応によるカテーテルアブレーションを行った10例の光増感反応条件

Pig	Weight [kg]	PS i.v. [mg/kg]	Output power [mW]	Average Irradiance [W/cm <sup>2</sup> ]	Irradiation time [s/point]	Total irradiation number	Total input energy [J]	Total energy density [kJ/cm <sup>2</sup> ]	Total operation time [min]	Acute effect by electrophysiological study (EPS)
#1	27	5.0	310	40	40	8	101	12.9	50	Conduction block
#2	24	2.5	310	40	10, 20	34	158	20.1	80	Conduction block (short conduction delay)
#3	24	5.0	310	40	20	17	107	13.6	43	Superficial conduction block
#4	27	2.5	310 630	40 80*	20 10, 20	46	364	46.4	98	Conduction block
#5	30	1.5+1.5	360	46 80*	20, 40 20	61	609	77.6	120	Superficial conduction block
#6	50	2.5	310	20	20, 40	24	205	13.3	74	Conduction block (short conduction delay)
#7	56	2.5	310	20	40	28	345	22.4	86	Transient conduction block
#8	52	7.5	920	60*	20, 30, 40	46	1006	65.4	82	Conduction block (short conduction delay)
#9	52	7.4	920	60	20	21	388	25.2	52	Conduction block
#10	54	7.3	920	60*	20	17	314	20.4	43	Conduction block

(b) 高周波カテーテルアブレーションを行った1例の高周波通電条件

Pig	Weight [kg]	Current power [W]	Catheter temperature [°C]	Ablation time [s/point]	Total ablation number	Total input energy [J]	Total operation time [min]	Acute effect by electrophysiological study (EPS)
#11	31	3~30	42~66	10~60	35	8,847	67	Conduction block

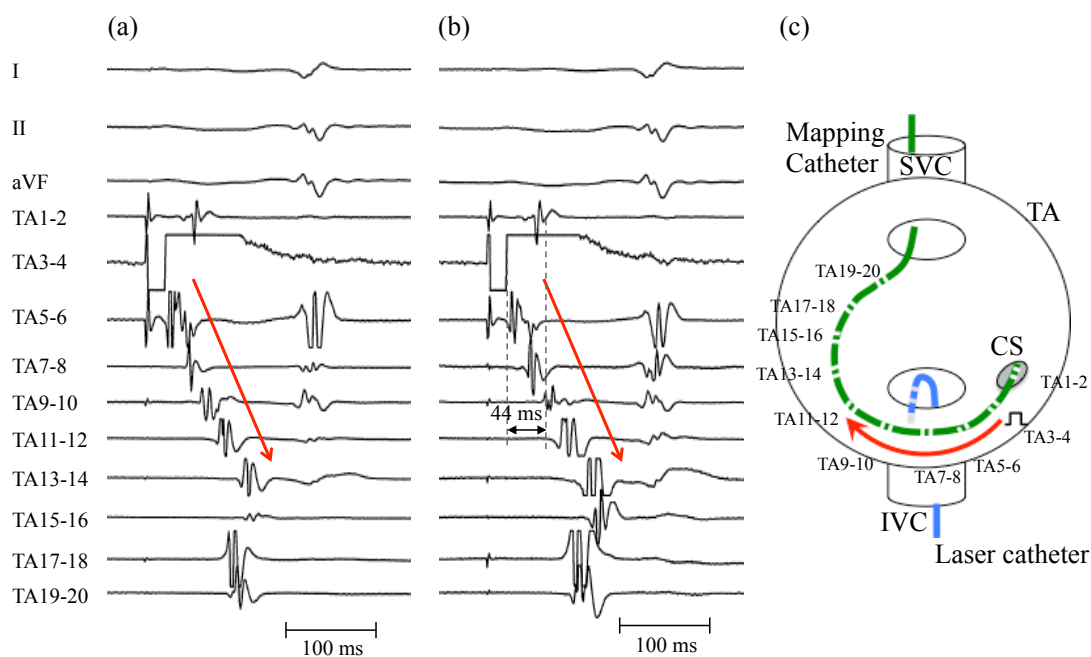


図 7-6 1 例目の光増感反応前における三尖弁輪周囲の興奮伝播波形

(a) 初期状態 (TA3-4 における周期電気刺激)

上から心電図波形 (I, II, aV<sub>F</sub> 誘導)、20 極多電極カテーテルの各双極電極で測定した三尖弁輪周囲の心内電位波形を示す。心内電位の縦軸は基本的に相対値である。TA3-4 の双極電極から周期電気刺激を行った。

(b) 光増感反応前 (TA3-4 における周期電気刺激)

TA3-4 から TA9-10 までの興奮伝播時間は 44 ms であった。

(c) 光増感反応前の興奮伝播の様子

三尖弁輪周囲を時計周りに興奮が伝播している。

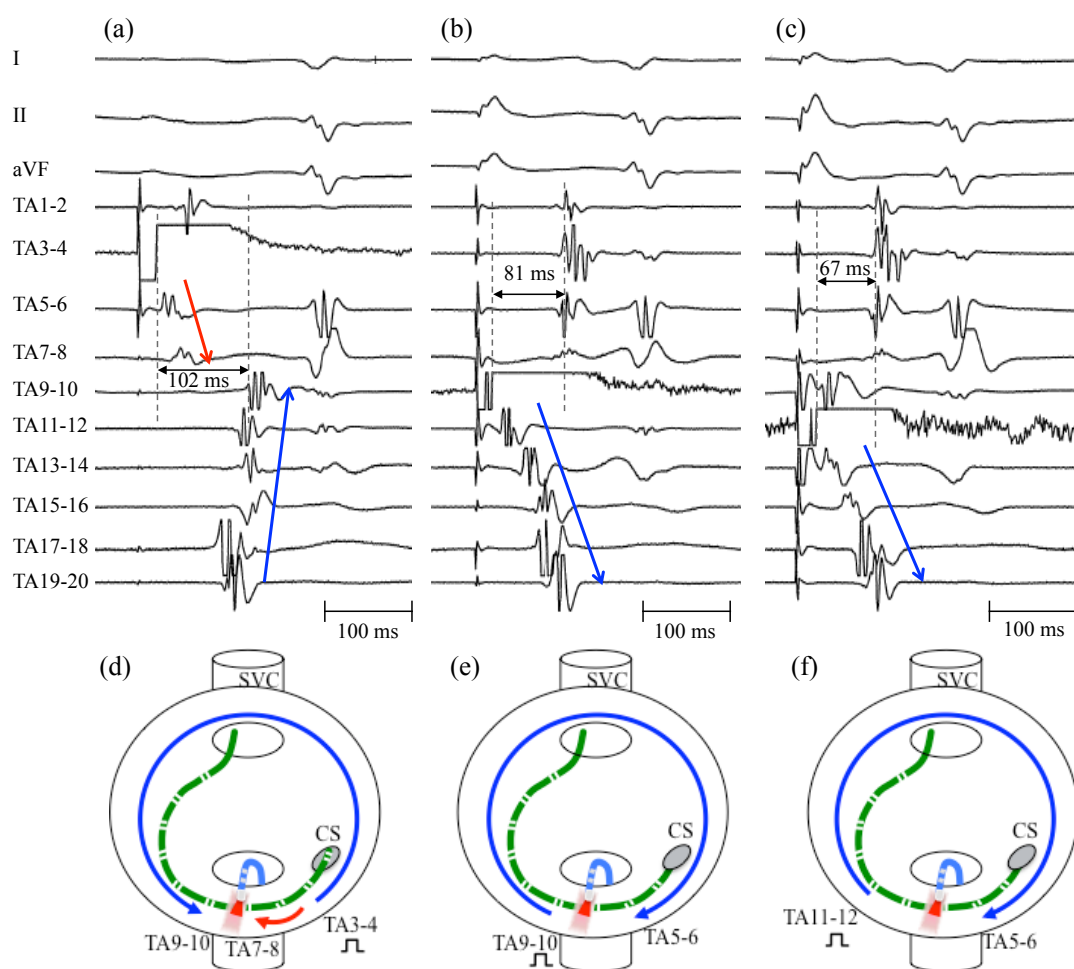


図 7-7 1 例目の光増感反応後における三尖弁輪周囲の興奮伝播波形

(a) TA3-4 における周期電気刺激

上から心電図波形 (I, II, aV<sub>F</sub> 誘導)、20 極多電極カテーテルの各双極電極で測定した三尖弁輪周囲の心内電位波形を示す。心内電位の縦軸は基本的に相対値である。TA3-4 から TA9-10 までの興奮伝播時間は 102 ms であった。(d) に興奮伝播の様子を示す。

(b) TA9-10 における周期電気刺激

TA9-10 から TA5-6 までの興奮伝播時間は 81 ms であった。(e) に興奮伝播の様子を示す。

(c) TA11-12 における周期電気刺激

TA11-12 から TA5-6 までの興奮伝播時間は 67 ms であった。(f) に興奮伝播の様子を示す。



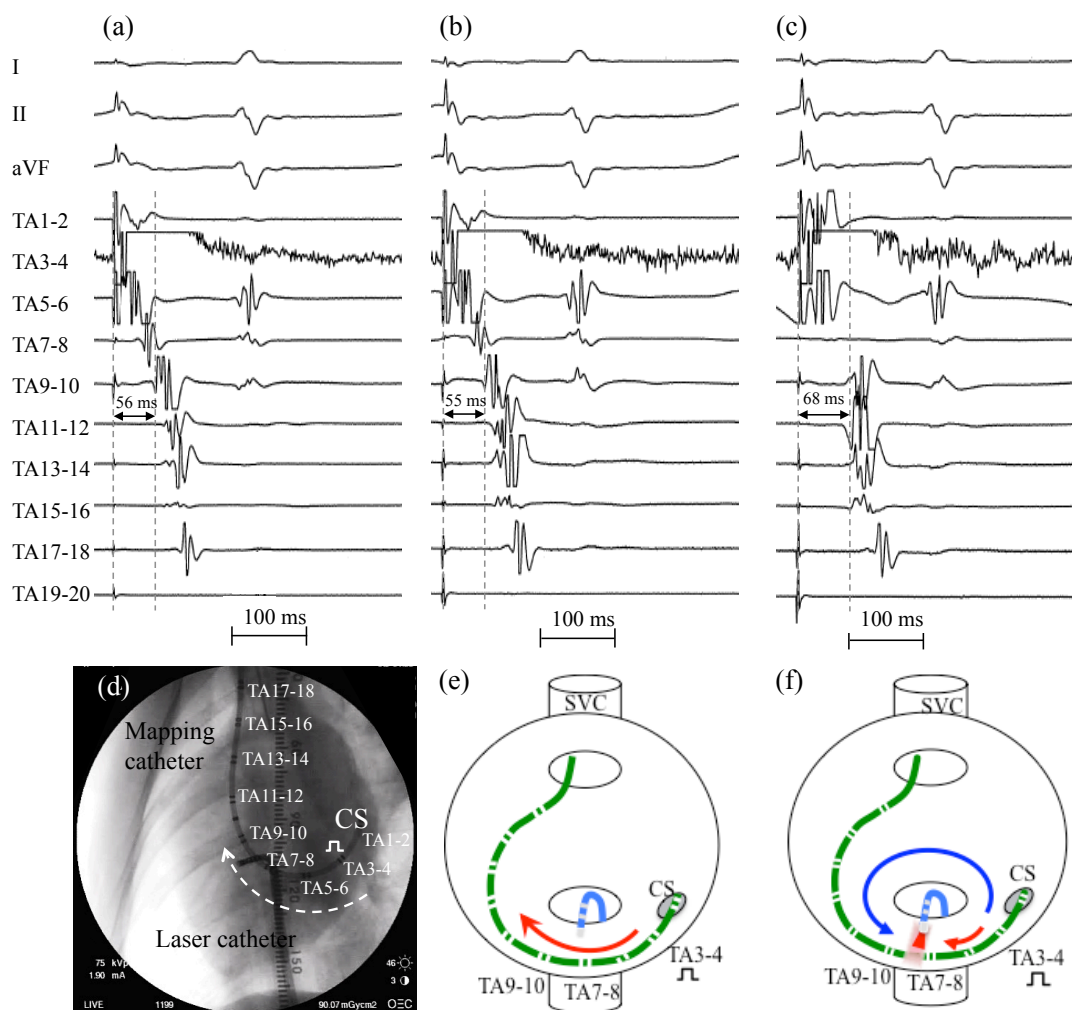


図 7-8 2 例目の光増感反応前後における三尖弁輪周囲の興奮伝播波形

(a) 初期状態 (TA3-4 における周期電気刺激)

上から心電図波形 (I, II, aV<sub>F</sub> 誘導)、20 極多電極カテーテルの各双極電極で測定した三尖弁輪周囲の心内電位波形を示す。心内電位の縦軸は基本的に相対値である。TA3-4 から周期電気刺激を行った。(d) にこのときの正面 X 線透視画像を示す。

(b) 光増感反応前 (TA3-4 における周期電気刺激)

TA3-4 から TA9-10 までの興奮伝播時間は 55 ms であった。(e) に興奮伝播の様子を示す。

(c) 光増感反応後 (TA3-4 における周期電気刺激)

TA3-4 から TA9-10 までの興奮伝播時間は 68 ms であった。(f) に興奮伝播の様子を示す。

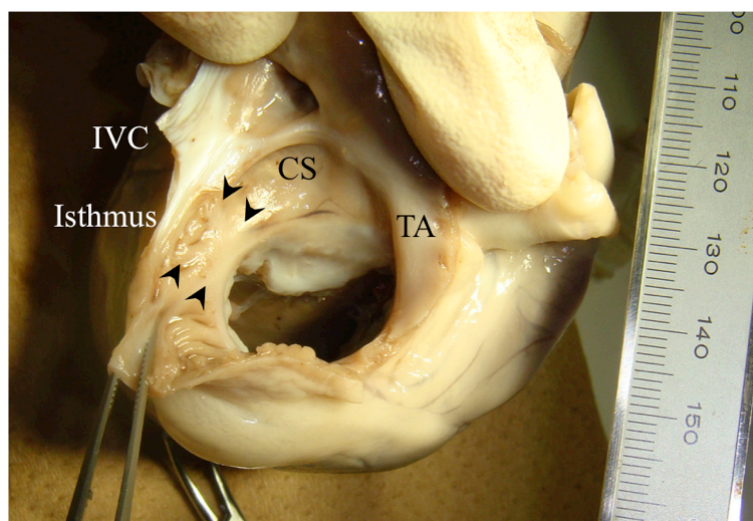


図 7-9 経カテーテル的増感反応後の光照射部位の写真

2 例目 (表 7-2(a) の#1) の術後に心臓を摘出してホルマリン固定した。黒矢印の間で光照射を行った。

IV: 下大静脈、CS: 冠状静脈洞、TA: 三尖弁輪

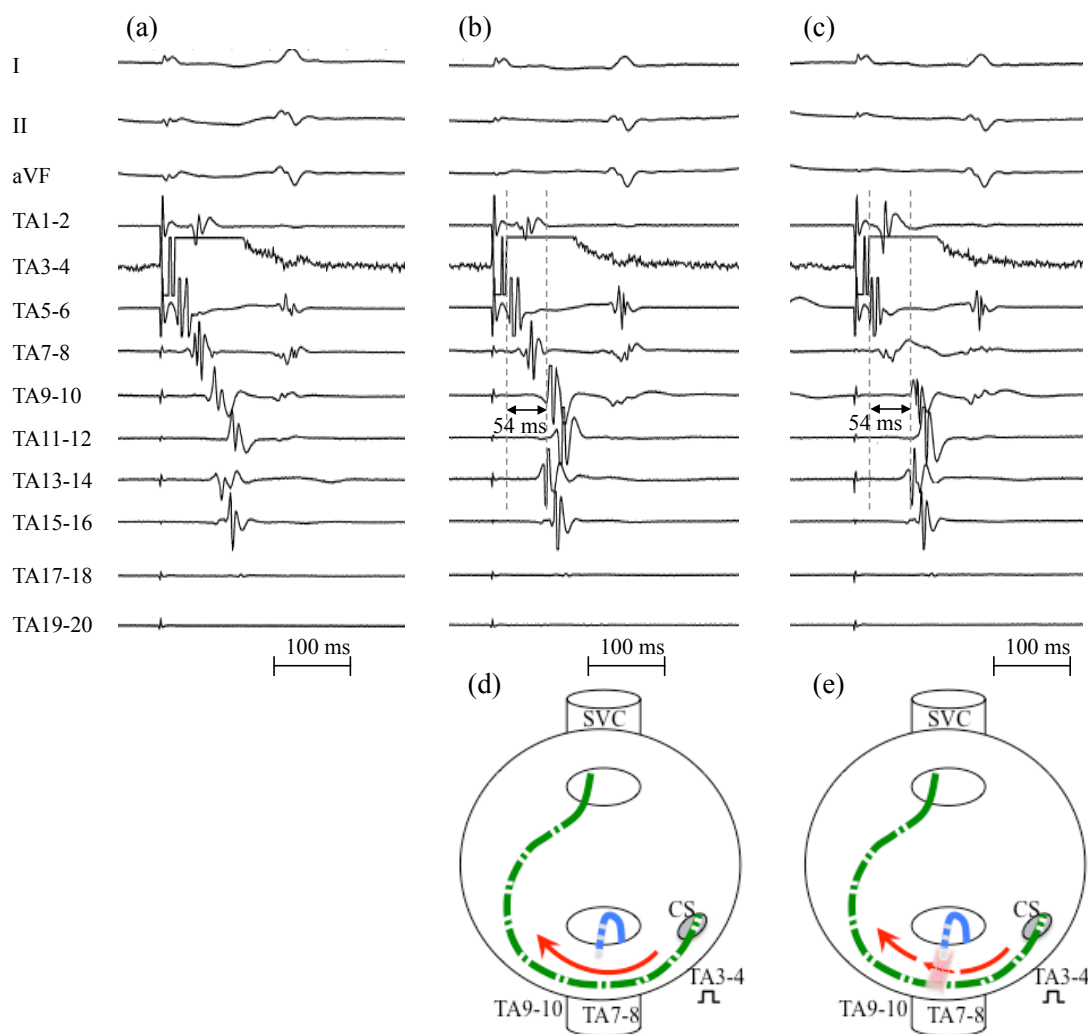


図 7-10 3 例目の光増感反応前後における三尖弁輪周囲の興奮伝播波形

(a) 初期状態 (TA3-4 における周期電気刺激)

上から心電図波形 (I, II, aV<sub>F</sub> 誘導)、20 極多電極カテーテルの各双極電極で測定した三尖弁輪周囲の心内電位波形を示す。心内電位の縦軸は基本的に相対値である。TA3-4 から周期電気刺激を行った。

(b) 光増感反応前 (TA3-4 における周期電気刺激)

TA3-4 から TA9-10 までの興奮伝播時間は 54 ms であった。(d) に興奮伝播の様子を示す。

(c) 光増感反応後 (TA3-4 における周期電気刺激)

TA3-4 から TA9-10 までの興奮伝播時間は 54ms であった。(e) に興奮伝播の様子を示す。

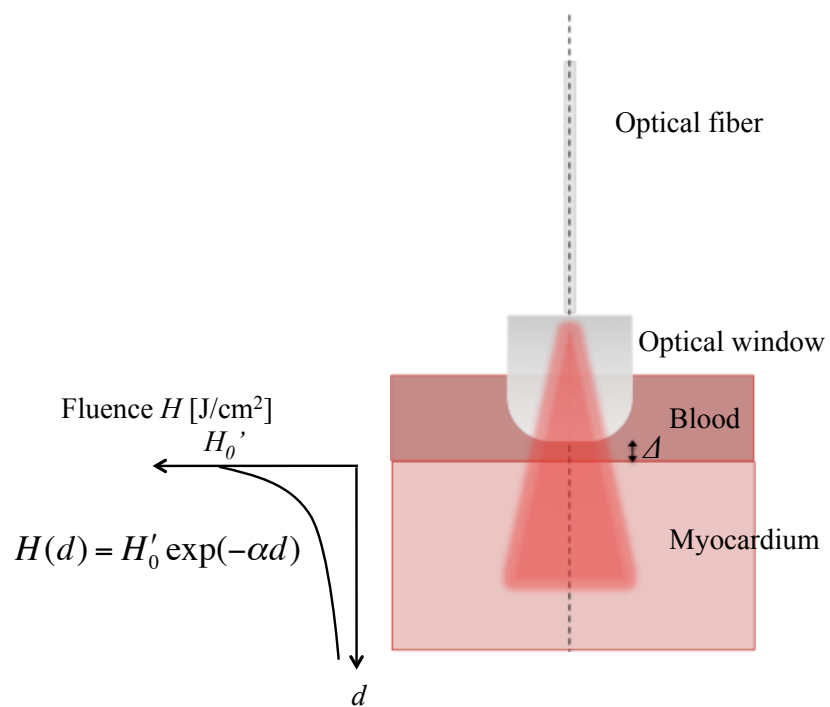


図 7-11 経カテーテル的に心内腔側から心筋組織に対して赤色レーザー光を照射して光増感反応を行った際の作用深度を計算するためのモデル

表 7-3 光増感反応による作用深度を計算する際に使用したパラメータ値

Tissue	Parameters	Drug-light interval				
		13 min	16 min	19 min	25 min	36 min
Blood	Talaporfin sodium concentration in plasma [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	25	20	15	10	5
	Talaporfin sodium concentration in blood [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] *	16	13	10	6	3
	Absorption coefficient of blood [ $\text{mm}^{-1}$ ]	0.21	0.19	0.18	0.16	0.15
	Reduced scattering coefficient of blood [ $\text{mm}^{-1}$ ]	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61
	Effective attenuation coefficient of blood [ $\text{mm}^{-1}$ ]	0.72	0.68	0.65	0.61	0.58
Myocardium	Talaporfin sodium concentration in myocardium [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	4.2	3.3	2.5	1.7	0.83
	Absorption coefficient of Talaporfin sodium in myocardium [ $\text{mm}^{-1}$ ]	0.021	0.017	0.013	0.008	0.004
	Effective attenuation coefficient [ $\text{mm}^{-1}$ ]	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6

\*Calculated by assuming the hematocrit of 0.36

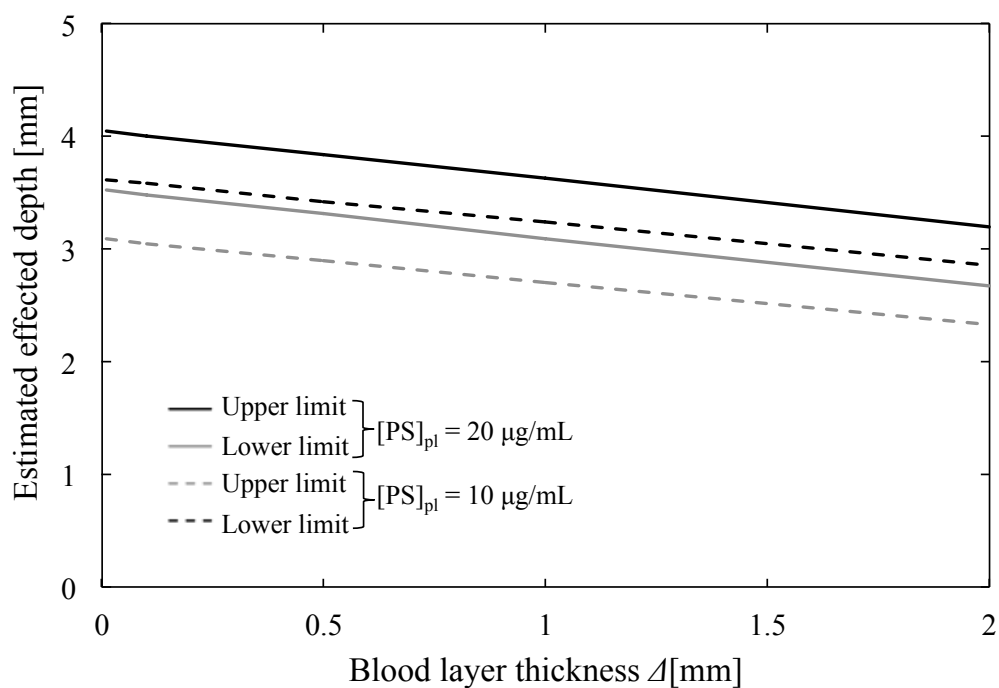


図 7-12 推定した光増感反応による作用深度と血液層の厚み  $\Delta$  の関係

光増感反応の組織障害閾値  $T$  を  $T = 1.5 \sim 3.5 \times 10^{18}$  photons/cm<sup>3</sup> と仮定した。レーザーカテーテル出射端の放射束 310 mW (放射照度 40 W/cm<sup>2</sup>)、光照射時間 20 s とした。血漿中タラポルフィンナトリウム濃度  $[PS]_{pl}$  が 10  $\mu\text{g/mL}$  (インターバル時間 25 min に相当) および 20  $\mu\text{g/mL}$  (インターバル時間 16 min に相当) においてそれぞれ血液層の厚み  $\Delta$  が変化した場合の作用深度を計算した。

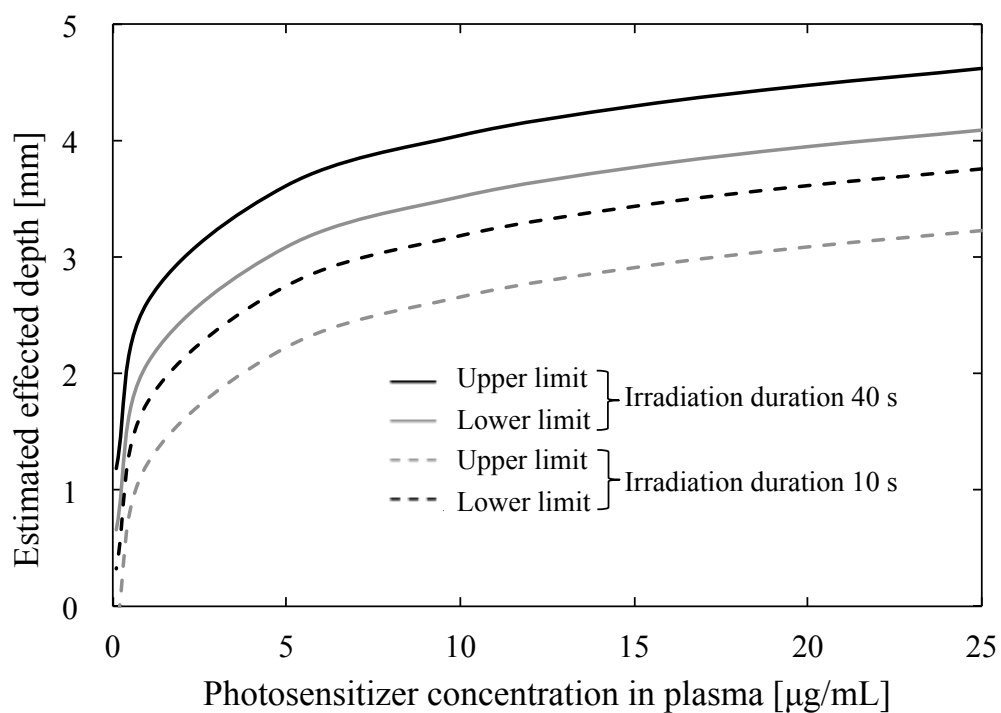


図 7-13 推定した光増感反応による作用深度と血漿中の光感受性物質濃度の関係  
 光増感反応の組織障害閾値  $T$  を  $T = 1.5 \sim 3.5 \times 10^{18}$  photons/cm<sup>3</sup> と仮定した。レーザーカテーテル出射端の放射束 310 mW (放射照度 40 W/cm<sup>2</sup>)、血液層の厚みを  $l = 8$  μm とした。光照射時間 10 s、および 40 s においてそれぞれ血漿中のタラポルフィンナトリウム濃度が増加した際の作用深度を計算した。

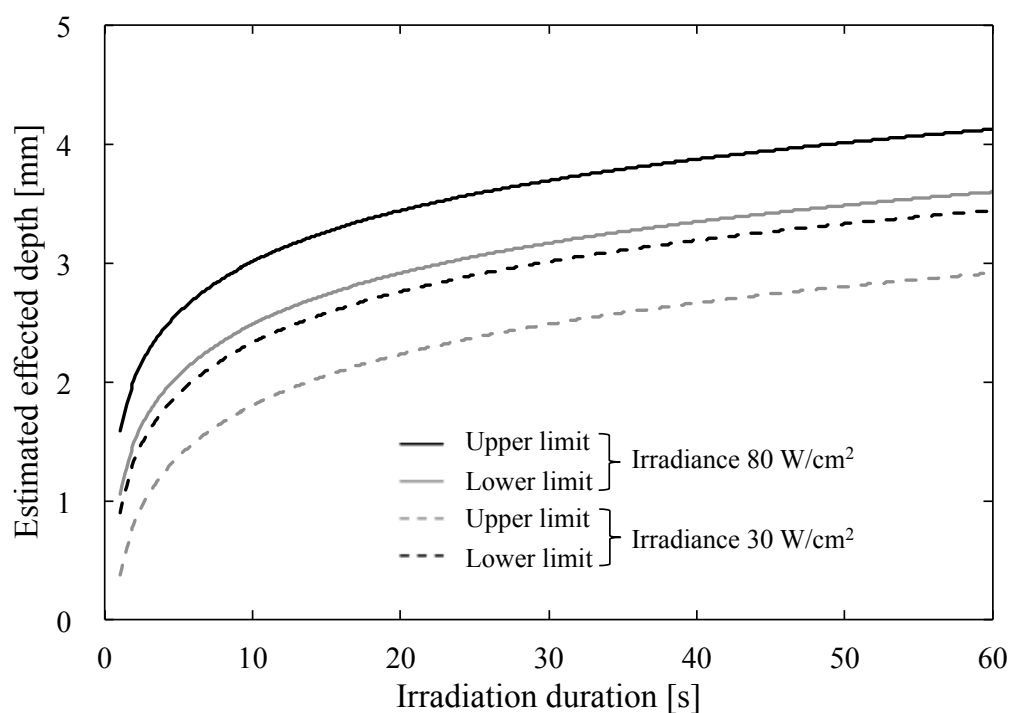


図 7-14 推定した光増感反応による作用深度と光照射時間の関係

光増感反応の組織障害閾値  $T$  を  $T = 1.5 \sim 3.5 \times 10^{18}$  photons/cm<sup>3</sup> と仮定した。血漿中の光感受性物質濃度を 10 µg/mL とし、血液層の厚みを  $\Delta = 8$  µm とした。レーザカテーテル出射端の放射束 235 mW (放射照度 30 W/cm<sup>2</sup>)、および 80 mW (放射照度 10 W/cm<sup>2</sup>) においてそれぞれ光照射時間を変化した際の作用深度を計算した。



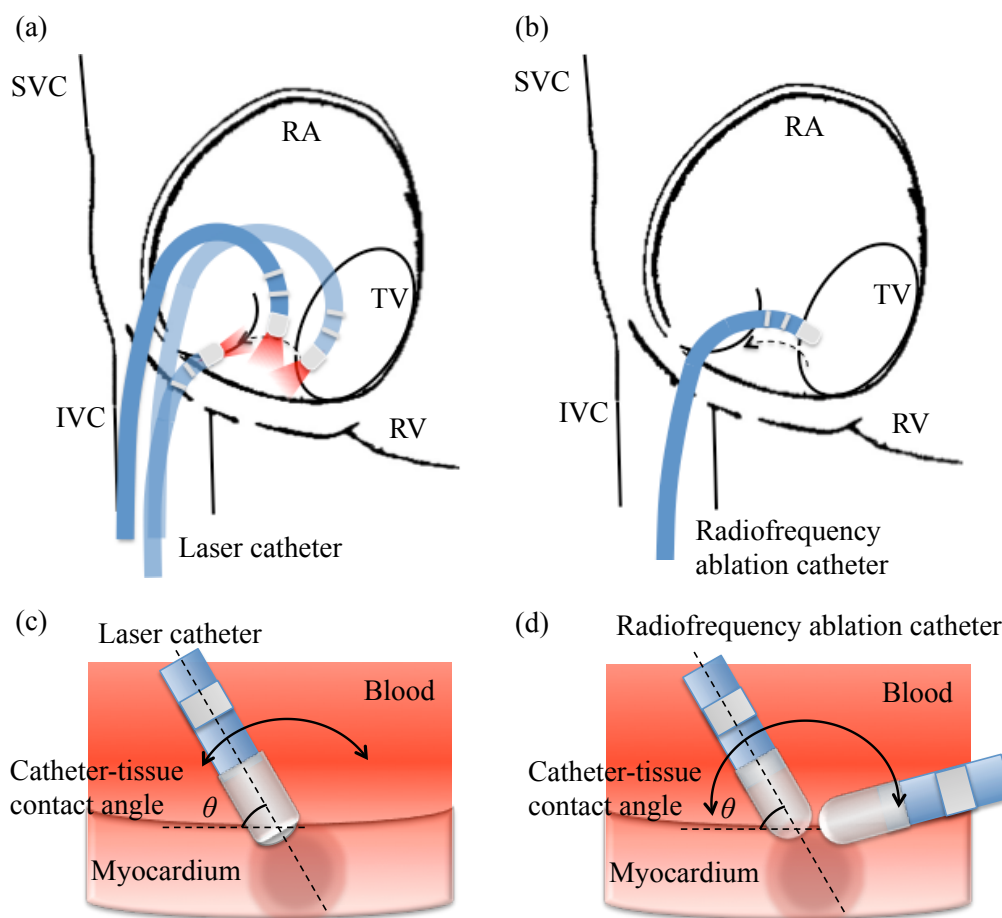


図 7-15 解剖学的狭部を対象とした場合の経カテーテル的増感反応と高周波カテーテルアブレーションのカテーテル操作の違い

(a) 経カテーテル的増感反応のレーザーカテーテル操作

右房内腔でレーザーカテーテル先端を屈曲させ、解剖学的狭部に対してレーザーカテーテル先端をほぼ垂直に接触させた状態で光照射を行う。

(b) 高周波カテーテルアブレーションのカテーテル操作

先端電極と組織の接触部位にて高周波電流が流れるため、接触角度に制限はない。

(c) 経カテーテル的増感反応におけるレーザーカテーテルの心筋に対する接触角度

(d) 高周波カテーテルアブレーションにおけるアブレーションカテーテルの心筋に対する接触角度

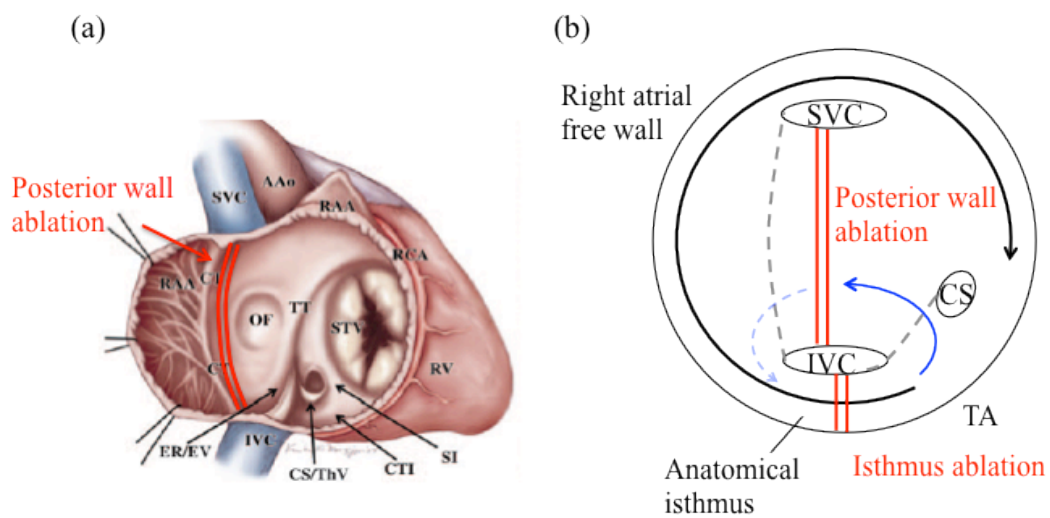


図 7-16 右房後壁に対する線状ブロックラインの追加 (文献[17]より引用、一部改変)

(a) 右房後壁に対する線状ブロックラインの作成部位

(b) 線状ブロックラインによる右房後壁を巡回する興奮伝播経路の遮断

## 第 8 章 結論

### 8.1 各章の総括と章間の関連

本論文では第 1 章において光増感反応を利用した経カテーテル的心房性不整脈治療を提案するに至った背景を述べ、本論文全体の構成をまとめた。第 2 章では、心房性不整脈に対する現行の非薬物療法である高周波カテーテルアブレーションに関して述べ、現行手法の課題および近年のカテーテルアブレーション関連技術に関して述べた。第 3 章では、悪性腫瘍に対する光線力学的治療の治療原理、および光線力学的治療における課題をまとめた。第 4 章では、光増感反応を用いた心房性不整脈に対する経カテーテル的治療を提案した (以下、本提案手法と呼ぶ)。また、光増感反応による経カテーテル的治療を実現するために必要な治療上の性能を検討し、本治療法のデザインを行った。一般に悪性腫瘍に対する光線力学的治療では、細胞内に取り込まれた光感受性物質が光増感反応によって細胞内小器官に酸化障害を与えてアポトーシスを誘導し、緩やかな細胞死を起こす。一方、心房性不整脈に対するカテーテルアブレーション治療では術中に電気伝導ブロックを診断しながら治療を進めるため、即時的な電気伝導ブロック効果が必要である。このように、同じ光増感反応を使う治療法であるが、従来の悪性腫瘍を対象とした場合とは異なり、本提案手法では即時的な効果が得られる条件を探索する必要がある。これに対し、著者は光感受性物質投与後から光照射までのインターバル時間を短縮することによって、光増感反応による即時的な心筋電気伝導ブロックが得られると考え、本提案手法で短時間インターバルの光増感反応を提案した。インターバル時間を短縮することによって細胞外に光感受性物質が分布している状態で光増感反応を起こし、細胞膜障害による即時的な電気伝導性の消失を意図した。第 5 章では、細胞レベルで光増感反応により即時的な心筋細胞の電気伝導性消失が得られる条件を探索した。光感受性物質の接触時間を変化させて同物質の細胞内外の分布を変化させ、光増感反応中の心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を測定することで電気生理学的な細胞応答を調査した。その結果、細胞外に光感受性物質が分布している状態で光増感反応を起こすと、細胞外で発生した活性酸素によってイオンチャネルおよび細胞膜が障害を受け、光照射から数 s 程度で電気生理学的障害が起き、引き続き細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が過剰になりネクローシスに至ることがわかった。このような細胞応答は細胞内に光感受性物質が局在している状態では見られなかった。したがって、細胞外に光感受性物質が分布している状態で光増感反応を行うことで、心筋組織の即時的な電気伝導性消失が得られることが示唆された。第 6 章では、第 5 章の細胞実験で得られた光増感反応による即時的な心筋細胞の電気伝導性消失が、生体組織レベルにおいても同様に得られるかどうか *in vivo* 動物実験で検証した。ヒトと同じ寸法の組織厚みを持つ豚心筋組織を対象に、開胸下で心外膜側から光照射を行って短時間インターバルの光増感反応を行った。急性実験では、血漿中

タラポルフィンナトリウム濃度  $10 \mu\text{g/mL}$ 、放射照射量  $200 \text{ J/cm}^2$  において光増感反応を行い、厚さ  $1 \sim 5 \text{ mm}$  の心筋組織に対して貫壁性の即時的な電気伝導ブロックを得た。慢性実験では、血漿中タラポルフィンナトリウム濃度  $10 \mu\text{g/mL}$ 、放射照射量  $50, 100 \text{ J/cm}^2$  において光増感反応を行い、厚さ  $1 \text{ mm}$  程度の心筋組織に対して貫壁性の組織瘢痕化が得られ、永続的な電気伝導ブロックを生じることがわかった。急性および慢性実験から見積もった吸収された光子数に対する光増感反応の組織障害閾値を推定すると  $7.0 \times 10^{17} \sim 1.5 \times 10^{19} \text{ photons/cm}^3$  であり、生体組織では細胞実験における光増感反応の障害閾値 ( $2.9 \times 10^{19} \text{ photons/cm}^3$ ) よりも低い閾値で心筋組織の電気伝導性消失が得られた。また、光照射時の組織表面温度は  $48^\circ\text{C}$  以下、持続時間は  $1 \text{ min}$  以内で熱作用による組織障害閾値以下であることから、得られた効果は光増感反応で発生した活性酸素の酸化障害によるものであることがわかった。第 7 章では、試作したレーザカテーテルを用い、*in vivo* 動物実験において下大静脈と三尖弁輪間の解剖学的峽部に対して経カテーテル的に光増感反応を行い、臨床と同様な運用環境において心筋電気伝導ブロックの実証を行った。タラポルフィンナトリウム  $2.5 \sim 7.5 \text{ mg/kg}$  を静脈内投与  $15 \text{ min}$  後からレーザカテーテル先端における放射照度  $20 \sim 60 \text{ W/cm}^2$  にて光照射を行い、解剖学的峽部における電気伝導ブロック達成を電気生理学的検査で確かめた。なお、カテーテル手技および光増感反応条件は最適化されていない状況である。第 6 章の実験結果から求めた光増感反応の組織障害閾値を用い、経カテーテル的に光増感反応を起こした際の作用深度を推定した結果、 $1 \sim 4 \text{ mm}$  であることがわかった。

本章では、第 4 章から第 8 章までの内容を総括し、臨床応用されている高周波カテーテルアブレーション、クライオアブレーション、およびレーザアブレーションと比較し、本提案手法の実現可能性を検討する。また、本提案手法を実用化する上で今後の課題を考察する。

## 8.2 本提案手法と現行手法との比較

光増感反応で発生した活性酸素の酸化作用による殺細胞効果を利用し、経カテーテル的に心内腔側でレーザ光を接触照射して光増感反応を行い、厚み  $1 \sim 4 \text{ mm}$  の心筋組織に対して即時的かつ永続的な貫壁性の心筋電気伝導ブロックを確かめた。本部では本提案手法の光増感反応による経カテーテル的手法と臨床応用されている各種のカテーテルアブレーションを比較する。表 8-1 に本提案手法と現行手法の比較表を示す。提案している光増感反応を利用した経カテーテル的手法の特徴を表 8-2 に示し、予想される利点を以下に示す。

- i) 副作用の低減
- ii) 連続的な電気伝導ブロックラインの作成
- iii) 同一部位の複数回照射
- iv) 術時間の短縮

光増感反応を経カテーテル的心房性不整脈治療へ応用する最大の利点は熱発生をほとんど

ど伴わずに心筋電気伝導ブロックが得られる点にある。本提案手法における心筋電気伝導ブロックの機構は従来の熱凝固作用や凍結融解を利用する熱的過程とは異なり、光増感反応で発生した活性酸素の酸化作用を利用する光化学的過程である。本提案手法では、現行手法の高周波カテーテルアブレーションと比較して投入パワーが 1/10 以下と小さく、ほとんど熱発生を伴わずに組織障害を起こすため (6.5 参照)、現行手法で問題となっている熱発生に伴う重篤な副作用 (2.4.3 参照) を抑制できると考えている。具体的には、カテーテル先端あるいは心筋組織内における過剰な温度上昇が原因で生じる血栓形成や組織内水蒸気爆発が生じないと考えられるため、脳梗塞や心タンポナーデなどの副作用の発生率が大幅に抑制できると予想される。短時間インターバルの光増感反応では、光増感反応を使った治療に特異的な副作用である光過敏症を現状より抑制できると考えられる。光過敏症は悪性腫瘍に対する光線力学的治療において、普及を妨げている最大の課題である。施術後の長期間にわたる遮光入院は患者の QOL を低下させる。本提案手法において光感受性物質の投与量を癌治療における投与量 (体表面あたり  $40 \text{ mg/m}^2$ ) より減らすことができれば、遮光期間を現状の 1~2 週間より短縮できると予想される。ヒトの場合はタラポルフィンナトリウム  $40 \text{ mg/m}^2$  投与時の血漿中濃度は比較的緩やかに減衰し (4.4.1 参照)、投与後 4 hr までにおいて血漿中濃度は  $23 \sim 25 \text{ } \mu\text{g/mL}$  である [1-3]。本研究では血漿中タラポルフィンナトリウム濃度が  $10 \text{ } \mu\text{g/mL}$  にて豚心筋組織に対してレーザー照射を行ったところ、電気伝導ブロックが達成できた (6.4 および 6.5 参照)。したがって、タラポルフィンナトリウムの投与量は癌治療における投与量の半量以下に抑制できる見込みがある。光感受性物質の投与量と皮膚光過敏性の消失までの期間はほぼ比例関係にあるため [4]、投薬量が半分に減らせれば遮光期間は 3~7 日に短縮できると考えている。現状の高周波カテーテルアブレーションにおける入院日数は施設により異なるが 3~5 日間であることから (表 8-1)、ほぼ同等の入院期間にできる可能性がある。従来法の高周波カテーテルアブレーションおよびバルーン型のカテーテルアブレーションにおいて隣接臓器障害が重大な問題となっている。熱的作用を利用したカテーテルアブレーションの場合は心壁と周囲臓器の間に存在する空気層が断熱体として機能し、隣接臓器への熱伝導を抑制している。ただし、食道や横隔膜神経など心房壁に近接している隣接臓器に対しては熱伝導により障害が及ぶ。本提案手法においては、隣接臓器にもタラポルフィンナトリウムが分布しており、レーザー光が心房壁を透過して隣接臓器に到達し光増感反応が起きた場合、障害が及ぶ可能性がある。光増感反応の作用深度は主に組織内で吸収される光子数に依存するため組織厚みに応じて照射時間を調節することで、治療深度を制御でき、隣接臓器障害を抑制できると思われる (7.3 参照)。

光増感反応による経カテーテル的治療では心筋組織に対してレーザーカテーテルが非接触な状態で照射を行った場合でも電気伝導ブロックが得られると予想される (7.3 参照)。波長  $660 \text{ nm}$  帯における血液の減衰係数は  $0.6 \text{ mm}^{-1}$  程度と比較的小さいため [5]、レーザーカテ

ーテルと組織の隙間に血液層が存在する場合でも、レーザ光は血液層を透過して組織内に伝達され作用深度が得られる (7.3 参照)。櫛状筋が発達して心内組織表面が平滑でなく 1 mm 程度の凸凹が存在する部位には、カテーテル先端と組織の間に部分的に血液層が生じる。このような部位に対しても経カテーテル的増感反応では、接触照射と効果はほとんど同じで (7.3 参照)、有効である (図 8-1(a))。一方、高周波カテーテルアブレーションでは、図 8-1(b) に示すように凹凸のある心筋組織表面に対して高周波通電を行うとカテーテルと組織間の血液により熱伝導が不均一になり、治療領域が不安定になると思われる (7.4 参照)。また、高周波カテーテルアブレーションの治療領域はカテーテルの心筋組織に対する接触圧に影響されやすい [6,7]。したがって、水蒸気爆発の防止の観点もあり、一点一点接触状態を確認しながら高周波通電条件を設定し、図 8-2(a) に示すように治療域を重複させるように点状に通電を行う。しかし、しばしば治療域が不連続になって、電気伝導ブロックラインに隙間 (伝導ギャップ、あるいは慢性期に伝導性が回復する部位) が生じる場合があり [8,9]、このような伝導ギャップが不整脈再発の原因になると考えられている [8-10]。本提案手法においてもレーザカテーテル先端の双極電位測定により光照射部位の電気伝導性消失をモニタするため、先端電極を組織に接触させる必要がある。また、増感反応による血液障害を抑制するため、レーザカテーテルの光出射ウィンドウはできるだけ組織に接触させて隙間の血液層を薄くする必要がある。しかし、本提案手法において、接触状態を厳密に意識せずに経カテーテル的に増感反応ができれば、図 8-2(b) に示すようにレーザ光を照射したまま連続的にレーザカテーテル先端を移動し、伝導ギャップのない連続的な電気伝導ブロックラインを短時間で得られると思われる。このことは、再発率の低下および術時間の短縮につながると期待される。

従来の高周波カテーテルアブレーションでは、6.4.2 に示したように通電直後に熱凝固壊死層の周囲に浮腫が生じることが知られている [11,12]。浮腫が発生し、心内膜下に組織間液が溜まった状態で高周波通電を続けると、電流密度低下により作用深度が小さくなる [11]。したがって、一度高周波通電を行った部位の近傍に通電が必要な場合は、浮腫が消失するまで待ってから再度通電を行う。増感反応を利用した経カテーテル的治療では、増感反応直後の照射部位に浮腫形成が生じないことが *in vivo* 動物実験でわかった (6.4.2、6.5.2、7.2.4 参照)。仮に浮腫が発生しても、滲出液の赤色光吸収は小さく ( $\mu_a = 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$  程度) 本提案手法に重大な影響はない [13]。増感反応後も組織内の血流が保持されていれば、光感受性物質と酸素が心筋組織に供給されるため、同部位に対して複数回の増感反応を行うことができる。*in vivo* 動物実験において、血漿中のタラポルフィンナトリウム濃度が  $10 \mu\text{g/mL}$  において開胸下で家兎の心室壁に対してレーザ光を放射照度  $10 \text{ W/cm}^2$  で 20 ~ 40 s 間照射して増感反応を起こした場合、心筋組織血流量は照射中に低下するものの照射前の 6 ~ 8 割に保たれた [14]。したがって、本提案手法は施術中の同一部位の複数回照射が可能であると思われる。

試作した光ファイバーを内装したレーザカテーテルは従来用いられている高周波アブレーションカテーテルと同程度の操作性を持ち、高周波カテーテルアブレーションのカテーテル手技をほぼそのまま適用できる。ただし、現状の試作レーザカテーテルではカテーテルを組織にほぼ垂直に設置する必要があり、細かい操作法は同一ではなかった。一点あたりの照射時間は高周波カテーテルアブレーションの通電時間と同程度もしくはそれ以下であった。上述のように連続的にレーザカテーテルを心壁に沿って動かしながら光増感反応を行うことで連続的な電気伝導ブロックラインが得られ、術時間の短縮を期待できる。本提案手法は 4.2 にてあげた経カテーテル的心房性不整脈治療に求められる効果および運用上の性能を満たしていると考えられる。

### 8.3 今後の展望と課題

本部では、光増感反応による経カテーテル的心房性不整脈治療の今後の展望と課題に関して述べる。心房性不整脈の中でも心房細動に対する経カテーテル的治療は、確立した治療法が未だ存在しない。現行の心房細動に対する高周波カテーテルアブレーション治療は、熱発生に伴う重篤な副作用や高い再発率が課題である (2.4.3 参照)。したがって、本研究では主に心房細動治療への適用を目指し、この実現に向けてレーザカテーテル型式、運用方法、および至適条件設定、それぞれの観点で検討を行う。

近年、アブレーションカテーテルは肺静脈隔離専用のバルーン状やリング状のカテーテル、左房後壁や心房中隔を対象とした多電極カテーテルなど、対象部位を特定した種々の方式が開発されている。ただし、このような特定部位に対する電気伝導ブロック作成に特化した方式は、必ずしも術式の簡易化につながっていない。したがって、今回試作したレーザカテーテルは現行手法の高周波アブレーションカテーテルに類似し、多点照射あるいは点移動による線状照射を行う方式を採用している。肺静脈隔離を目的としたバルーン型式のカテーテルは Medtronic 社製のクライオアブレーションと CardioFocus 社製のレーザアブレーションがあるが (2.4.4 参照)、臨床研究を重ねるにつれてバルーン型式の特有の課題が明らかになってきた。カテーテル先端に 20 ~ 30 mm $\Phi$  に拡張できる大型のバルーンを設置しているためカテーテル先端が太くなっている。バルーン拡張のためシャフト部分も 10 ~ 12 Fr (直径 3.3 ~ 4 mm $\Phi$ ) と太くなり (表 8-1)、十分な屈曲曲率や操作性をもたせることが困難である。このため、カテーテル操作に専用の操作性のある長いシースを使用する必要がある。その結果、大腿静脈に通常の 2 倍程度の太さ 14 ~ 15 Fr (直径 4.7 ~ 5 mm $\Phi$ ) のシースを刺入するため (表 8-1)、シース抜去後の同部位の止血に時間を要したり、止血不全で血腫を生じたりする [15]。バルーンを肺静脈入口部に接触させて凍結あるいは光照射を行うため、拡張圧力がかかり心房が変形して食道や横隔膜神経などの隣接臓器と対象部位が密着し、熱伝導により隣接臓器障害の発生頻度が高くなる傾向がある [15-18]。肺静脈入口部に対してバルーンサイズが小さい場合には、バルーンが肺静脈深部へ挿入され、施術後に

肺静脈狭窄を起こしやすい [15]。また、そもそも肺静脈隔離だけで根治できるのは発作性心房細動のみで、持続性の心房細動では肺静脈隔離に加えて後壁や心房細動基質に対する電気伝導ブロックの作成が必要である (2.4.1 参照)。肺静脈専用のアブレーションカテーテルでは、他部位への電気伝導ブロック作成のために別のアブレーションカテーテルを用意する必要がある。このような肺静脈隔離を目的としたバルーン型式の特有な問題を考慮すると、この型式が必ずしも術時間の短縮や術式の簡易化につながっていないと考えられる。今回試作したレーザカテーテルはカテーテル長軸方向にレーザ光を出射する方式を採用しているが、カテーテル先端に光学系を組み込むことで照射パターンを側方あるいは斜方照射に変更することもできる。カテーテルを操作して組織に接触させるとき、屈曲内側あるいは外側で組織に接触させる手技が簡単である。したがって、レーザカテーテルの先端全周にわたって光照射を行えることが望ましい。一方、全周照射を行うと組織に接触していない面で血液に対して光照射を行うことになり、光増感反応による血液障害が生じる心配がある。以上を踏まえると、操作は難しくなるが安全性の面で本研究にて採用した長軸方向への光照射が適切な方式であると考えられる。

本提案手法では現行の高周波カテーテルアブレーション治療と同様に 3 次元の電気解剖学的マッピングシステムを用いたカテーテル手技を採用することになる。最も普及している Carto システム (Carto® system) は、先端に磁気センサーを内装した専用のアブレーションカテーテルと組み合わせて使用する。本提案手法では、Ensite システム (Ensite® system) との併用を考えている。Ensite システムには 2.4.2 で述べた多電極アレイカテーテルを用いた非接触での電位マッピング (アレイモード) の他に、Carto システムと同様に接触電位を測定して電位マッピング (Navx モード) を行うことができる。体表面の 6 カ所 (両側胸部、胸部と背部、後頸部と大腿の内側) に電極パッドを 3 次元座標軸となるようにそれぞれペアで皮膚に貼り付けて心内に電場を作り、その信号をカテーテル先端電極で検知することで心内腔における 3 次元的なカテーテルの位置情報を取得する。このシステムでは先端電極を有するどんなカテーテルでも使用することができ、位置精度は Carto システムと同程度の 1 mm 程度と報告されている [19]。本提案手法では、この Ensite システムを使用することで現行手法と同様なカテーテル操作および照射部位の判断基準にて治療を進めることができる。一般に高周波カテーテルアブレーションではカテーテル先端電極におけるインピーダンス、双極電位、温度をモニタすることで通電管理を行っており、安全性の向上に大いに役立っている。さらに近年ではカテーテルの組織接触圧モニタが行われている [6,7]。本提案手法は、レーザカテーテル内に光ファイバーが内装されており先端での光情報取得が可能であることから、双極電位に加えて組織光学的情報の取得を検討している。光学的治療法であるためインピーダンス測定は不要であり、熱発生がほとんどないことから温度測定の必要もない。具体的には、レーザカテーテルからレーザ光を照射した際の組織からの拡散反射光や光感受性物質由来の蛍光を測定することで、光増感反応の進行程度やレーザカ



テーテルの接触状態を把握することが可能である [20-22]。一般に、光照射を行って光増感反応を起こすと、光感受性物質の蛍光退色により蛍光強度が減衰する [23,24]。この蛍光強度の減衰は活性酸素産生量に相関があり、蛍光強度は組織内の光感受性物質濃度を反映する [25,26]。このため、光感受性物質の蛍光強度をモニタすることで光増感反応の進行程度がわかる [20]。また、レーザ光の戻り光強度を測定することで、血液と組織内の光伝播特性の違いからレーザカテーテルの組織に対する接触性を検知できる可能性がある [21]。さらに、戻り光強度の変化により、レーザカテーテル先端の光学ウィンドウへの凝集血液塊付着を検知することができるため [27]、先端ウィンドウの焦げ付きを未然に防ぎ、安全性を担保するモニタとして使用できると思われる。このようにレーザカテーテルでは組織の電気的情報に加えて光学的情報を取得することができ、新しいモニタシステムの開発と、それらを組み合わせた安全な運用が期待できる。

本提案手法では、薬剤の実用性と安全性を担保するために悪性腫瘍に対する光線力学的治療用に認可を受けた光感受性物質を用いた。励起光の吸収係数が高く、組織浸透性の高く、一重項酸素産生効率が高く、体内からの排泄が速いという観点から、タラポルフィンナトリウムを採用した。一方、心房性不整脈治療を目的とした経カテーテル的光増感反応に最適な光感受性物質の開発はまだ行われていない。光増感反応による経カテーテル的心房性不整脈治療に最適な光感受性物質の条件として以下の 6 つが考えられる

- i) 筋組織、特に心筋組織に集積性をもつ (腫瘍組織への集積性がない)。
- ii) 細胞膜に対して集積性がある。
- iii) 体内からの排泄が速い。
- iv) 励起光の吸収係数が高い。
- v) 一重項酸素の産生効率が高い。
- vi) 心筋組織に対する浸透性が高い波長域に吸収帯を持つ。

タラポルフィンナトリウムは iii)~vi) に適合するが、i) および ii) を満たしていない。ii) の細胞膜集積性と iii) の排泄性の両立は難しい。一般に、脂溶性物質は脂質膜に対する親和性が高く、水溶性物質は膜親和性がない。一方、脂溶性物質は体内に貯留しやすく、水溶性物質は速やかに体内から排泄される。したがって、本研究では iii) の排泄性と v) の一重項酸素の産生効率を主眼に光感受性物質を選んだ。心房性不整脈治療に適した光感受性物質の開発によって、より制御性の高い治療が可能であると考えられる。

以下に本提案手法の課題および今後の対策に関して述べる。臨床と同様な運用環境において光増感反応による心筋電気伝導ブロックの実証を行ったが、臨床医師のカテーテル手技の習熟および *in vivo* での電気伝導ブロックの実証に重点を置いており、*in vivo* での最適な光増感反応条件を探索していない。また、先行研究において弱い光増感反応条件では可逆的な心筋電気伝導ブロックが起こることが報告されている [28]。今後、心房性不整脈治療、特に心房細動治療に適した光増感反応条件および治療深度の制御性に関して詳細な検

討を行う必要がある。光増感反応による組織障害は、組織内光感受性物質濃度、組織内酸素濃度、および単位体積あたりのフォトン数に依存する。組織内酸素濃度は調整が困難であるため、その他の 2 つのパラメータを調整することで治療深度を制御することになる。組織内光感受性物質濃度は投薬量およびインターバル時間によって決まる。タラポルフィンナトリウムの場合、ヒトに対して 1 mg/kg 静脈内単回投与時の血漿中濃度の半減期は 14.6 hr であり、投薬後数 hr 程度はほぼ一定とみなせる (4.3.1 参照)。組織内光感受性物質濃度は血漿中濃度にほぼ比例するため、投薬量によって組織内濃度を調整することができる [1,29]。組織内光感受性物質濃度は心筋全層でほぼ均一と考えられるため、実際の治療深度制御は単位体積あたりのフォトン数の調整によって行うことができる。単位体積あたりのフォトン数は光照射条件、主にレーザカテーテル出射端からの放射照射量に依存する。具体的にはレーザカテーテル出射端における放射照度を一定とし、照射時間を調整することで放射照射量を変化すれば良い。したがって、厚さ 1~4 mm の心房組織に対して貫壁性の電気伝導ブロックが得られる光増感反応の至適条件を探索するにあたり、光感受性物質の投薬量、レーザカテーテル出射端における放射照度、および放射照射量に関する検討が必要である。タラポルフィンナトリウムは早期肺癌治療に対する認可薬であり、ヒトに対して体表面あたり 40 mg/m<sup>2</sup> (1 mg/kg) の投与量において使用実績があるので、それ以下の投与量では薬剤単独の安全性は確保されている。したがって、安全性の面から臨床でのタラポルフィンナトリウムの投与量は 1 mg/kg より少なくすれば新たに安全性を検討する必要はない。一方、運用上遮光期間を短縮するためにも投薬量の低減は重要である。タラポルフィンナトリウムの投与量を減らして心筋組織内濃度が減少すると、それに伴いレーザカテーテル出射端における放射照射量を増す必要がある (7.3 参照)。一点あたりの照射時間を 1 min 以内にするためには放射照度を増やすことになるが、過度に放射照度を増すとレーザカテーテル先端で発熱による熱傷害を起こす心配がある。したがって、光感受性物質の投薬量、放射照度、および放射照射量は単独で至適条件を決定できるパラメータではなく、効果および運用上のバランスを考慮して選定する必要がある。以上より、今後は治療深度に応じた即時かつ永続的な貫壁性の心筋電気伝導ブロックを確実に得られる最適な光増感反応条件範囲を探索し、*in vivo* で安全性および有効性を確かめる必要があると考えられる。

光増感反応による経カテーテル的心房性不整脈治療において考えられうる副作用は、8.2 で述べた光増感反応に特徴的な副作用である光過敏症の他に隣接臓器障害が考えられる。一般に、熱エネルギーや光エネルギーなどの物理的エネルギーを用いた治療ではネクロシスによる急性組織壊死領域の周囲に慢性期にアポトーシスが誘導される。例えば、高周波カテーテルアブレーションでは、急性期に熱凝固壊死領域の周囲に炎症性細胞の浸潤や間質性浮腫の形成が起こり、慢性期にアポトーシスが誘導されることが報告されている [30-32]。そのため、高周波カテーテルアブレーションでは、急性熱凝固壊死領域より慢性期に得られる組織癒着化領域の方が広い [33]。光増感反応を用いる場合でも急性期と慢性

期では組織障害領域に違いが生じると予想される。アポトーシスあるいはネクローシスを生じるために必要な吸収フォトン数に対する光増感反応による組織障害閾値はアポトーシスの方が低く、組織内濃度が一定の場合はネクローシスを生じるフォトン数の約 1/10 のフォトン数でアポトーシスが生じると考えられる [34]。急性期のネクローシスによる組織障害の周囲に慢性期にアポトーシス誘導層が生じるため、光増感反応による組織障害領域は慢性期に拡大すると思われる。この慢性期の組織障害領域の拡大が食道や肺などの隣接臓器に及んだ場合、隣接臓器障害が起こる可能性がある。心房性不整脈治療では術中に即時的に治療効果を診断することから、急性期と慢性期の障害領域に大きな差異がない方がよい。したがって、本提案手法では緩やかな細胞死を起こすアポトーシスの寄与が少ない光増感反応条件を設定する必要がある。この時、光感受性物質の細胞内外分布の変化に注意する必要がある。光感受性物質の細胞内分布は時間とともに変化するため、3 hr 程度に及ぶ術中に光増感反応の作用機序が変化する可能性がある。5.3.2 より、細胞内レベルではタラポルフィンナトリウムは数十 min 経過すると徐々に細胞内に取り込まれ、ライソソームに集積することがわかった。光感受性物質がライソソームに集積している状態で光増感反応を起こすとアポトーシス誘導による細胞死を生じる。したがって、光感受性物質投与から光照射までのインターバル時間が長くなるにつれて、細胞死の機構はネクローシスの他にアポトーシスの寄与が加わると考えられる。このようなインターバル時間に伴う細胞死機構の変化も併せて調査する必要がある。以上より、今後は光増感反応条件を変化させ組織障害深度の制御性を確認して隣接臓器障害がなく貫壁性の電気伝導性消失効果が得られる至適光増感反応条件を探索するとともに、急性期で得られた即時的な組織障害領域が慢性期に大幅に拡大あるいは縮小することなく急性期と慢性期の作用領域が同程度になる条件を調査する必要がある。

本研究では健常な心筋組織を用いており、持続性心房細動に伴う基質的な心筋組織への治療を考慮していない。持続性の心房細動患者の心房は、左房内圧が高まり、左房が肥大化し、それに伴い心房組織間質が線維化し、構造的リモデリングが生じる [35-37]。このような構造的リモデリングが生じた持続性心房細動患者の心房組織では、電気的特性、光学特性、および薬剤動態が健常者や発作性心房細動患者と異なると考えられる。例えば、左房が肥大して間質線維化が起こると心筋電気伝導速度が低下したり、あるいは組織内のコラーゲン含有量が増加すると [36]、散乱体が増加するため心筋の散乱係数が増加する。また、このような間質線維化部位では血管走行の間隔が大きくなり、光増感反応により活性酸素を産生するために必要な酸素や光感受性物質が十分に心筋全体に行き渡らない可能性がある。ただし、わずかでも心筋細胞が存在していれば、そこには酸素が供給されているため、光増感反応を行うことが可能であると考えられる。このように今後は、臨床応用を視野にいれ、基質的变化を伴う心筋組織に対する光増感反応も考慮し、至適条件の探索をする必要がある。

#### 8.4 本論文の総括

心房性不整脈、特に心房細動に対する非薬物療法として光増感反応を利用した経カテーテル的治療を提案し、治療機構および治療条件に関する基礎的研究から臨床を見据えた大型動物実験までを行った。細胞実験において、細胞外に光感受性物質が分布する短時間インターバルの光増感反応により、イオンチャネルや細胞膜の障害を生じて即時的な心筋電気伝導ブロックが得られることがわかった。大型動物を用いた *in vivo* 実験において、短時間インターバルの光増感反応により、即時的および永続的な光増感反応による心筋電気伝導ブロックを実証した。本提案手法では、現行手法の高周波カテーテルアブレーションと比較して投入パワーが 1/10 以下と小さく、ほとんど熱発生を伴わずに組織障害を得られる。また、試作したレーザカテーテルを用い、臨床と同様な運用環境において経カテーテル的に光増感反応を行い、心筋組織の電気伝導ブロックを実証した。現行の高周波カテーテルアブレーションと比較し、光増感反応を利用した経カテーテル的治療は熱発生が小さく、より安全な心房性不整脈治療となる可能性がある。以上より、本論文では、臨床と同様な運用環境にて経カテーテル的な光増感反応により心筋組織の即時的かつ永続的な電気伝導ブロックを実証し、本提案手法の心房性不整脈治療への実現可能性を示した。

## 参考文献

- [1] 明治製菓株式会社, 注射用レザフィリン®100 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2007年4月 (改訂第2版).
- [2] D. Kessel, “Pharmacokinetics of N-aspartyl chlorin e6 in cancer patients,” *J Photochem Photobiol B*, vol. 39, pp. 81–83, 1997.
- [3] 斉藤光一, 芝崎茂樹, 黒沢亨, “タラポルフィンナトリウムの薬理作用と体内動態,” *化学療法の領域*, vol. 20, pp. 131–137, 2004.
- [4] E. Bromley, B. Briggs, L. Keltner, and S. S. Wang, “Characterization of cutaneous photosensitivity in healthy volunteers receiving talaporfin sodium,” *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, vol. 27, pp. 85–89, 2011.
- [5] W. F. Cheong, S. A. Prael, and A. J. Welch, “A review of the optical properties of biological tissues,” *IEEE J Quantum Electron*, vol. 26, pp. 2166–2185, 1990.
- [6] K. Yokoyama, H. Nakagawa, D. C. Shah, H. Lambert, G. Leo, N. Aeby, A. Ikeda, J. V. Pitha, T. Sharma, R. Lazzara, and W. M. Jackman, “Novel contact force Sensor incorporated in irrigated radiofrequency ablation catheter predicts lesion size and incidence of steam pop and thrombus,” *Circ Arrhythmia Electrophysiol*, vol. 1, pp. 354–362, 2008.
- [7] L. D. Biase, A. Natale, C. Barrett, C. Tan, C. S. Elayi, C. K. Ching, P. Wang, A. Al-Ahmad, M. Arruda, J. D. Burkhardt, B. J. Wisnoskey, P. Chowdhury, S. De Marco, L. Armaganijan, K. N. Litwak, R. A. Schweikert, and J. E. Cummings, “Relationship between catheter forces, lesion characteristics, “popping,” and char formation: Experience with robotic navigation system,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 20, pp. 436–440, 2009.
- [8] V. Y. Reddy, E. J. Schmidt, G. Holmvang, and M. Fung, “Arrhythmia recurrence after atrial fibrillation ablation: Can magnetic resonance imaging identify gaps in atrial ablation lines?” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 19, pp. 434–437, 2008.
- [9] H. Hahiya, K. Hirao, A. Takahashi, Y. Nagata, K. Suzuki, S. Maeda, T. Sasaki, M. Kawabaga, M. Isobe, and Y. Iesaka, “Clinical implications of reconnection between the left atrium and isolated pulmonary veins provoked by adenosine triphosphate after extensive encircling pulmonary vein isolation,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 18, pp. 392–398, 2007.
- [10] R. Weerasooriya, P. Khairy, J. Litalien, L. Macle, M. Hocini, F. Sacher, N. Lellouche, S. Knecht, M. Wright, I. Nault, S. Miyazaki, C. Scavee, J. Clementy, M. Haissaguerre, and P. Jais, “Catheter ablation for atrial fibrillation. Are results maintained at 5 years of follow-up?” *J Am Coll Cardiol*, vol. 57, pp. 160–166, 2011.
- [11] G. R. Vergara, S. Vijayakumar, E. G. Kholmovski, J. J. E. Blauer, M. A. Guttman, C. Gloschat, G. Payne, K. Vij, N. W. Akoum, M. Daccarett, C. J. McGann, R. S. MacLeod, and N. F.

- Marrouche, “Real-time magnetic resonance imaging–guided radiofrequency atrial ablation and visualization of lesion formation at 3 Tesla,” *Heart Rhythm*, vol. 8, pp. 295–303, 2011.
- [12] D. Schwartzman, J. F. Ren, W. A. Devine, and D. J. Callans, “Cardiac swelling associated with linear radiofrequency ablation in the atrium,” *J Interv Card Electrophysiol*, vol. 5, pp. 159–166, 2001.
- [13] Q. Peng, A. Juzeniene, J. Chen, L. O Svaasand, T. Warloe, K. E. Giercksky, and J. Moan, “Lasers in medicine,” *Rep Prog Phys*, vol. 71, pp. 056701–28, 2008.
- [14] 末成元, “早期 Photodynamic therapy における組織血流量の変化: 家兔心筋を用いた検討,” 慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻 修士論文, 2010 年度.
- [15] J. G. Andrade, P. Khairy, P. G. Guerra, M. W. Deyell, L. Rivard, L. Macle, B. Thibault, M. Talajic, D. Roy, and M. Dubuc, “Efficacy and safety of cryoballoon ablation for atrial fibrillation: A systematic review of published studies,” *Heart Rhythm*, vol. 8, pp. 1444–1451, 2011.
- [16] Y. Okumura, B. D. Henz, T. J. Bunch, C. Dalegrave, S. B. Johnson, and D. L. Packer, “Distortion of right superior pulmonary vein anatomy by balloon catheters as a contributor to phrenic nerve injury,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 20, pp. 1151–1157, 2009.
- [17] H. Ahmed, P. Neuzil, A. d’Avila, Y. M. Cha, M. Laragy, K. Mares, W. R. Brugge, D. G. Forcione, J. N. Ruskin, D. L. Packer, and V. Y. Reddy, “The esophageal effects of cryoenergy during cryoablation for atrial fibrillation,” *Heart Rhythm*, vol. 6, pp. 962–969, 2009.
- [18] R. Horton, L. D. Biase, V. Reddy, P. Neuzil, P. Mohanty, J. Sanchez, T. Nguyen, S. Mohanty, G. J. Gallinghouse, S. M. Bailey, J. D. Zagrodzky, D. Burkhardt, and A. Natale, “Locating the right phrenic nerve by imaging the right pericardiophrenic artery with computerized tomographic angiography: Implications for balloon-based procedures,” *Heart Rhythm*, vol. 7, pp. 937–941, 2010.
- [19] D. L. Packer, “Three-dimensional mapping in interventional electrophysiology: Techniques and technology,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 16, pp. 1110–1116, 2005.
- [20] 箱守志穂, 山口恭司, 玉村好司, 荒井恒憲, 伊藤亜莉沙, “評価装置及び評価方法,” 国際公開 WO/2011/114653, 公開日 2011 年 9 月 22 日.
- [21] 箱守志穂, 山口恭司, 玉村好司, 荒井恒憲, 伊藤亜莉沙, “判別装置及び判別方法,” 特開 2011-189019, 公開日 2011 年 9 月 29 日.
- [22] 箱守志穂, 山口恭司, 玉村好司, 荒井恒憲, 伊藤亜莉沙, “算出装置及び算出方法,” 特開 2011-189020, 公開日 2011 年 9 月 29 日.
- [23] J. C. Finlay, S. Mitra, M. S. Patterson, and T. H. Foster, “Photobleaching kinetics of Photofrin in vivo and in multicell tumour spheroids indicate two simultaneous bleaching mechanisms,” *Phys Med Biol*, vol. 49, pp. 4837–4836, 2004.

- [24] I. Georgakoudi, M. G. Nichols, and T. H. Foster, “The mechanism of Photofrin photobleaching and its consequences for photodynamic dosimetry,” *Photochem Photobiol*, vol. 65, pp. 135–144, 1997.
- [25] M. J. Niedre, A. J. Secord, M. S. Patterson, and B. C. Wilson, “In vitro tests of the validity of singlet oxygen luminescence measurements as a dose metric in photodynamic therapy,” *Cancer Res*, vol. 63, pp. 7986–7994, 2003.
- [26] M. J. Niedre, C. S. Yu, M. S. Patterson, and B. C. Wilson, “Singlet oxygen luminescence as an in vivo photodynamic therapy dose metric: Validation in normal mouse skin with topical amino-levulinic acid,” *Br J Cancer*, vol. 92, pp. 298–304, 2005.
- [27] M. Takahashi, A. Ito, T. Kajihara, and T. Arai, “Detection of pre-charring optical behavior at a laser catheter-tip in blood: Ex vivo and in vivo study,” *Proc SPIE*, vol. 7897, pp. 78970U, 2011.
- [28] S. Hosokawa, T. Arai, S. Miyoshi, and K. Soejima, “The electric conduction block by PDT: Cardiac muscle cell and tissue study ex vivo,” 11<sup>th</sup> World Congress of the International Photodynamic Association (IPA), 28 March 2007, Shanghai, China.
- [29] C. J. Gomer and A. Ferrario, “Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model,” *Cancer Res*, vol. 50, pp. 3985–3990, 1990.
- [30] A. C. Lardo, E. R. McVeigh, P. Jumrussirikul, R. D. Berger, H. Calkins, J. Lima, and H. R. Halperin, “Visualization and temporal/spatial characterization of cardiac radiofrequency ablation lesions using magnetic resonance imaging,” *Circulation*, vol. 102, pp. 698–705, 2000.
- [31] P. Cabeza, A. H. Madrid, A. Palmeiro, J. M. Rebollo, G. Peña, C. Escobar, M. G. Bueno, C. Correa, A. Chércoles, I. Marín, E. Bernal, J. Peng, S. Nannini, L. Limón, M. Viana, and C. Moro, “Lesions produced by radiofrequency ablation of the cavotricuspid isthmus in an experimental model,” *Rev Esp Cardiol*, vol. 56, pp. 963–70, 2003.
- [32] T. Deneke, K. Khargi, K. M. Muller, B. Lemke, A. Mugge, A. Laczkovics, A. E. Becker, and P. H. Grewe, “Histopathology of intraoperatively induced linear radiofrequency ablation lesions in patients with chronic atrial fibrillation,” *Eur Heart J*, vol. 26, pp. 1797–1803, 2005.
- [33] T. J. Badger, R. Oakes, M. Daccarett, N. S. Burgan, N. Akoum, E. N. Fish, J. J. E. Blauer, S. N. Rao, Y. Adjei-Poku, E. G. Kholmovski, S. Vijayakumar, E. V. R. Di Bella, R. S. Macleod, and N. F. Marrouche, “Temporal left atrial lesion formation after ablation of atrial fibrillation” *Heart Rhythm*, vol. 6, pp. 161–168, 2009.
- [34] L. Lilge, M. Portoy, and B. C. Wilson, “Apoptosis induced in vivo by photodynamic therapy in normal brain and intracranial tumour tissue,” *Br J Cancer*, vol. 83, pp. 1110–1117, 2000.
- [35] J. E. Saffitz, R. B. Schuessler, and K. A. Yamada, “Mechanisms of remodeling of gap

- junction distributions and the development of anatomic substrates of arrhythmias,” *Cardiovasc Res*, vol. 42, pp. 309–317, 1999.
- [36] B. Burstein and S. Nattel, “Atrial fibrosis: Mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 51, pp. 802–809, 2008.
- [37] R. S. Oakes, T. J. Badger, E. G. Kholmovski, N. Akoum, N. S. Burgon, E. N. Fish, J. J. E. Blauer, S. N. Rao, E. V. R. DiBella, N. M. Segerson, M. Daccarett, J. Windfelder, C. J. McGann, D. Parker, R. S. MacLeod, and N. F. Marrouche, “Detection and quantification of left atrial structural remodeling with delayed-enhancement magnetic resonance imaging in patients with atrial fibrillation,” *Circulation*, vol. 119, pp. 1758–1767, 2009.



## 図表

表 8-1 本提案手法である経カテーテル的増感反応と各種カテーテルアブレーション治療の特徴比較 (2.4.4 参照)

心房性不整脈に対する高周波カテーテルアブレーションあるいはその他の近年開発中のカテーテルアブレーション (クライオアブレーション、レーザアブレーション) と本提案手法の経カテーテル的増感反応を比較した。

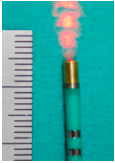
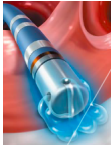

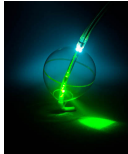
	<b>Photosensitization reaction</b>	<b>Radiofrequency Ablation (irrigation)</b>	<b>Cryo ablation</b>	<b>Endoscopic laser balloon ablation</b>
				
		ThermoCool®, (Biosense Webster)	Arctic Front®, (Medtronic)	Laser Balloon (Cardiofocus)
<b>Therapeutic mechanism</b>	Photo-oxidation reaction with reactive oxygen	Thermal coagulation with joule heating	Tissue freezing with N <sub>2</sub> O	Thermal coagulation with laser energy ( $\lambda = 980 \text{ nm}$ )
<b>Catheter system</b>	Steerable catheter (7 Fr)	Steerable catheter (7.5 Fr)	Non-steerable catheter (shaft size 10.5 Fr) with balloon (fixed size 23, 28 mm) 14 Fr steerable sheath	Non-steerable catheter (shaft size 12 Fr) with compliant balloon (size 20 ~ 30 mm) 15 Fr steerable sheath
<b>Tissue temperature</b>	Non-temperature mediated process	70 ~ 80°C	-49 ~ -54°C	70 ~ 80°C
<b>Therapeutic depth</b>	1 ~ 4 mm (Depending on optical characteristic of tissue)	1 ~ 4 mm (Depending on joule heating and thermal conduction of tissue)	1 ~ 4 mm (Depending on thermal conduction of tissue)	1 ~ 4 mm (Depending on optical characteristic and thermal conduction of tissue)
<b>Ablation pattern</b>	Continuous, or Point by point	Point by point	Circular pattern	Partial circular pattern (30° arc)
<b>Ablation time</b>	< 60 s/point	30 ~ 60 s/point	200 ~ 300 s/circle	20 ~ 30 s/30° of circle
<b>Total operation time</b>	(< 3 hr)	< 4 hr	3-6 hr	3-5 hr
<b>Hospitalization period</b>	(< 7 days)	About 5 days	< 7 days	< 7 days
<b>Complications</b>	No serious complications, Photosensitivity	Cardiac tamponade, Stroke, Esophageal injury, PV stenosis, Phrenic nerve injury	Phrenic nerve injury, PV stenosis, Stroke	Phrenic nerve injury, Cardiac tamponade, Esophageal injury

表 8-2 光増感反応を利用した経カテーテル的治療の特徴と予想される利点

<b>Characteristic</b>	<b>Advantage</b>
Non-temperature mediated cytotoxicity	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Suppression of thermal complications</li><li>▪ Multiple ablation at the same site → Shortening of total operation time</li></ul>
Non-contact ablation	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Continuous block line → Shortening of total operation time</li></ul>

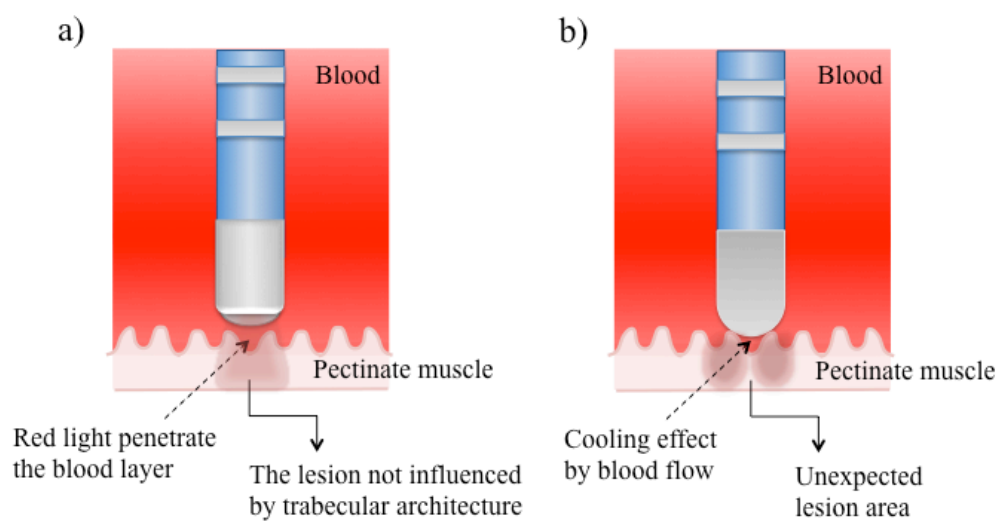


図 8-1 心内組織表面が平滑でなく 1 mm 程度の凸凹が存在する部位に対するカテ  
 テルアブレーション

(a) 経カテーテル的光増感反応

(b) 高周波カテーテルアブレーション

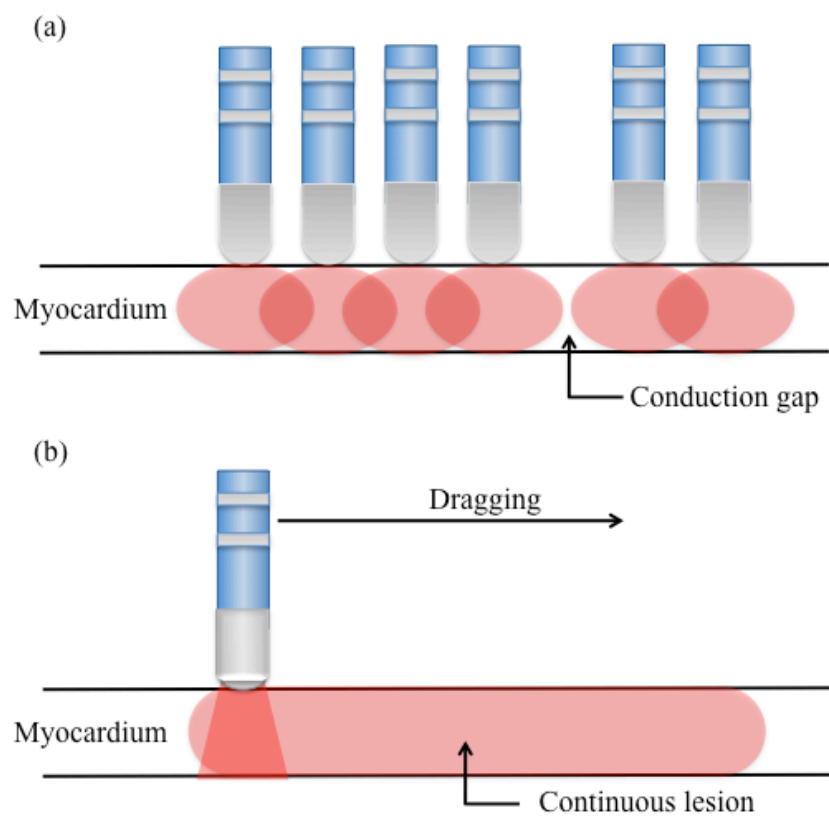


図 8-2 高周波カテーテルアブレーションと経カテーテル的光増感反応による心筋電気伝導ブロックラインの作成方法の違い

(a) 高周波カテーテルアブレーション (点状通電)

(b) 経カテーテル的光増感反応 (連続照射)

## 付録

## A クベルカムンク法

クベルカムンク (Kubelka-Munk) 法は、ある有限の厚さを持つ均一な無限薄板のサンプルに対して均一な拡散光を入射した際に、クベルカムンク法にて独自に定義した散乱・吸収を記述するパラメータ $S_{KM}$ と $A_{KM}$ を用いて、一定方向に進む光束の透過率と反射率を導き出す解析的な解法である [1-3]。図A-1に示すように、厚さ  $t$  の均一な平板サンプルに対して垂直に拡散光が入射した場合を考える。ここで、サンプル内を2方向 ( $\pm z$ 方向) に進む光束を  $F_+ = 2\pi \int_0^1 L(z, \mu) \mu d\mu$ ,  $F_- = -2\pi \int_{-1}^0 L(z, \mu) \mu d\mu$  と定義する [4,5]。  $L(z, \mu)$  は単位体積あたり単位立体角あたりの放射強度を示す。  $\mu$  は  $\mu = \cos\theta$  から得られるパラメータであり、  $\theta$  は光束の進む方向と  $z$  軸のなす角度を示す。この時、単位長さ  $dz$  における光束の流入出はクベルカムンク法における散乱と吸収を表すパラメータ  $S_{KM}$  と  $A_{KM}$  を用い、以下のように記述される [4]。

$$\begin{aligned} dF_+ &= -(A_+ + S_+)F_+ dz + S_- F_- dz \\ dF_- &= (A_- + S_-)F_- dz - S_+ F_+ dz \end{aligned} \quad (\text{A-1})$$

均一な媒質を考えているので、 $S_{\pm}$  と  $A_{\pm}$  は  $L(z, \mu)$  の角度分布に依存せず、前方と後方で同じ値をとると仮定する。ここで、 $F_{\pm}$  が指数関数的依存性を持ち、 $F_{\pm} \propto \exp(\alpha z)$  と表されると仮定する。境界条件として  $F_+(z=0) = F_0$ ,  $F_-(z=t) = 0$  とすると、 $F_{\pm}$  は  $\alpha$  を用いて表すことができる。このとき、反射率  $R = F_-(0) / F_0$  および透過率  $T = F_+(t) / F_0$  は以下の関係式で表される [4]。

$$\begin{aligned} R &= \frac{F_-(0)}{F_0} = \frac{\sinh(S_{KM} y t)}{x \cosh(S_{KM} y t) + y \sinh(S_{KM} y t)} \\ T &= \frac{F_+(t)}{F_0} = \frac{y}{x \cosh(S_{KM} y t) + y \sinh(S_{KM} y t)} \end{aligned} \quad (\text{A-2})$$

従って、クベルカムンク法における散乱と吸収を表すパラメータ  $S_{KM}$  および  $A_{KM}$  は測定したサンプルの拡散透過率  $T$  と拡散反射率  $R$  を用いて以下のように表される [4]。

$$S_{KM} = \frac{1}{y t} \left[ \frac{1 - R(x - y)}{T} \right], \quad A_{KM} = (x - 1) S_{KM} \quad (\text{A-3})$$

ここで、 $x$  と  $y$  は以下に示すパラメータとする。

$$x = \frac{1 + R^2 - T^2}{2R}, \quad y = \sqrt{x^2 - 1} \quad (\text{A-4})$$

クベルカムンク法では2方向の光束のみの記述であり、前方と後方にピークをもつ位相関数を想定しており、吸収と散乱を表すパラメータである  $A_{KM}$  および  $S_{KM}$  は位相関数の近似を行

うことで光拡散理論 (Transport Theory) における吸収係数および散乱係数と関係づけることができる [5]。本研究ではStarらにより最終的に導き出された以下の関係式を用いている [5]。

$$A_{KM} = 2\mu_a, \quad S_{KM} = \frac{1}{4} \left[ 3\mu'_s - \mu_a \right] \quad (\text{A-5})$$

以上より、測定した拡散透過率及び拡散反射率を用いて吸収係数  $\mu_a$ 、および等価散乱係数  $\mu'_s$  を算出することができる。

## B 用語および略語説明

### B.1 光照射および光計測に関する用語および記号説明

#### B.1.1 用語説明

本論文では、レーザー光の光照射条件は以下に定義する Radiant power、Irradiance、および Radiant exposure を用いて表記した。それぞれの定義は文献 [6] を参考にした。光生物学および光化学の分野において光照射および光計測で使用する用語に関して国際照明委員会 (International Commission on Illumination; CIE) の推奨する定義を示す。単位は SI 単位系ではなく慣用表現を用いた。

用語	定義
Radiant power [W]	単位時間に伝播する光エネルギーの量
Irradiance [W/cm <sup>2</sup> ]	ある面に対して単位面積あたり垂直に入射する Radiant power
Radiant exposure [J/cm <sup>2</sup> ]	Irradiance の時間積分値
Fluence rate [W/cm <sup>2</sup> ]	ある球に大円断面積 (球の中心を通る断面の円の面積) あたりに入射する Radiant power
Fluence [J/cm <sup>2</sup> ]	Fluence rate の時間積分値

ここで、Irradiance あるいは Radiant exposure と同じ単位を使用する用語として Fluence rate あるいは Fluence の定義を示したが、これらの用語は生体組織などの散乱体を含む物質中の光動態を記述する際に用いられる用語である。組織内における光化学反応を記述するために組織内吸収光子数を計算する際には Fluence で表記するのが一般的である。これらの用語の日本語表記は文献 [7,8] を参考に、放射束 (Radiant power)、放射照度 (Irradiance)、放射照射量 (Radiant exposure)、フルエンス率 (Fluence rate)、フルエンス (Fluence) と定義した。また、本論文中で光照射条件を設定する際に示した放射照度および放射照射量は放射ビーム断面における平均値を記載した。レーザー光の放射分布はガウシアン分布に近く、放射照射は放射束を放射ビーム断面積で除した平均値を記載し、放射照射量は放射照度を照射時間で乗じた値を記載した。

## B.1.2 記号説明

Symbol	Definition	Unit
$\mu_a$	吸収係数 (Absorption coefficient)	$\text{mm}^{-1}$
$\mu_s$	散乱係数 (Scattering coefficient)	$\text{mm}^{-1}$
$\mu_s'$	等価散乱係数 (Reduced scattering coefficient)	$\text{mm}^{-1}$
$\mu_{eff}$	減衰係数 (Attenuation coefficient)	$\text{mm}^{-1}$
$\delta$	光侵達長 (Penetration depth)	mm
$T$	透過率 (Transmittance)	
$R$	反射率 (Reflectance)	
$E$	モル吸光係数 (Molar absorption coefficient)	$\text{M m}^{-1}$
$\Phi_{\Delta}$	一重項酸素産生収率 (Quantum yield of singlet oxygen generation)	

## B.2 心房性不整脈に関する略語説明

Abbreviation	Definition
A Fib	心房細動 (Atrial fibrillation)
A Fl	心房粗動 (Atrial flutter)
RA	右心房 (Right atrium)
RV	右心室 (Right ventricle)
LA	左心房 (Left atrium)
LV	左心室 (Left ventricle)
PV	肺静脈 (Pulmonary vein)
SVC	上大静脈 (Superior vena cava)
IVC	下大静脈 (Inferior vena cava)
CS	冠状静脈洞 (Coronary sinus)
TV	三尖弁 (Tricuspid valve)
TA	三尖弁輪 (Tricuspid annulus)
ER	ユースタキオ稜 (Eustachian ridge)
CT	分界稜 (Crista terminalis)



## 参考文献

- [1] P. Kubelka, “New contributions to the optics of intensely light-scattering materials. Part I,” *J Opt Soc Am*, vol. 38, pp. 448–457, 1948.
- [2] P. Kubelka, “New contributions to the optics of intensely light-scattering materials. Part II: Nonhomogeneous layers,” *J Opt Soc Am*, vol. 44, pp. 330–335, 1954.
- [3] R. R. Anderson and J. A. Parrish, “The Optics of human skin,” *J Invest Dermatol*, vol. 77, pp. 13–19, 1981.
- [4] W. F. Cheong, S. A. Prahl, and A. J. Welch, “A review of the optical properties of biological tissues,” *IEEE J Quantum Electron*, vol. 26, pp. 2166–2185, 1990.
- [5] W. M. Star, J. P. A. Marijnissen, and M. J. C. van Gernert, “Light dosimetry in optical phantoms and in tissues: I. Multiple flux and transport theory,” *Phys Med Biol*, vol. 33, pp. 437–454, 1988.
- [6] D. H. Sliney, “Radiometric quantities and units used in photobiology and photochemistry: Recommendations of the Commission International de l’Eclairage (International Commission on illumination),” *Photochem Photobiol*, vol. 83, pp. 425–432, 2007.
- [7] S. E. Braslavsky, “Glossary of terms used in photochemistry 3rd Edition (IUPAC recommendations 2006),” *Pure Appl Chem*, vol. 79, pp. 293–465, 2007.
- [8] E. R. Cohen, T. Cvitas, J. G. Frey, B. Holmstrom, K. Kuchitsu, R. Marquardt, I. Mills, F. Pavese, M. Quack, J. Stohner, H. L. Strauss, M. Takami, and A. J. Thor, 物理化学で用いられる量・単位・記号, 日本化学会監修, 産業技術総合研究所計量標準総合センター訳, 東京: 講談社サイエンティフィク, 2007, pp. 41–47.

図表

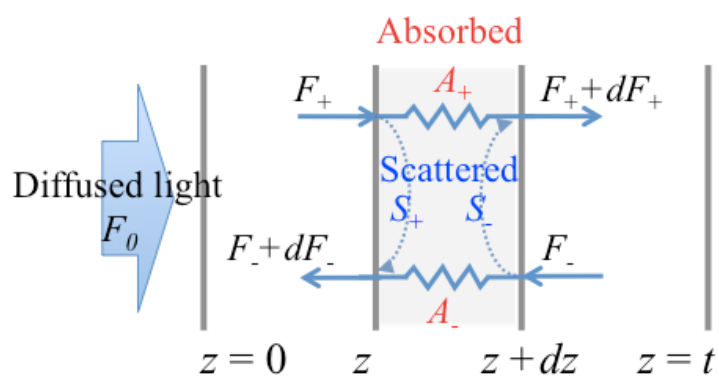


図 A-1 クベルカムンク法

厚さ  $t$  の均一な平板サンプルに対して垂直に拡散光が入射した場合、サンプル内を 2 方向 ( $\pm z$  方向) に光束が伝播すると考える。

## 著者論文目録

## 1 原著論文

## 1.1 本研究に関連する論文

- (1) A. Ito, S. Hosokawa, S. Miyoshi, K. Soejima, S. Ogawa, and T. Arai, “The myocardial electrical blockade induced by photosensitization reaction,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 57, pp. 488–495, 2010.
- (2) A. Ito, T. Kimura, S. Miyoshi, S. Ogawa, and T. Arai, “Photosensitization reaction-induced acute electrophysiological cell response of rat myocardial cells in short loading periods of talaporfin sodium or porfimer sodium,” *Photochem Photobiol*, vol. 87, pp. 199–207, 2010.
- (3) A. Ito, S. Miyoshi, T. Kimura, S. Takatsuki, K. Fukumoto, K. Fukuda, and T. Arai, “Myocardial electrical conduction block induced by photosensitization reaction in exposed porcine hearts in vivo,” *Lasers Surg Med*, vol. 43, pp. 984–990, 2011.

## 1.2 その他の論文

なし

## 1.3 国際会議論文（査読付きの full-length papers）

- (1) A. Ito, S. Hosokawa, S. Miyoshi, K. Soejima, and T. Arai, “The mechanism of PDT-induced electrical blockade: The measurement of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration changes in cardiac myocytes,” *Proc SPIE*, vol. 6854, pp. 68540M-1–5, 2008.
- (2) A. Ito, H. Matsuo, T. Suenari, S. Miyoshi, S. Takatsuki, S. Ogawa, and T. Arai, “The mechanism of PDT-induced electrical blockade: The dependence of time-lapse localization of talaporfin sodium on the cell death phenotypes in rat cardiac myocytes,” *Proc SPIE*, vol. 7164, pp. 716412-1–6, 2009.
- (3) A. Ito, H. Matsuo, T. Suenari, T. Kajihara, T. Kimura, S. Miyoshi, S. Ogawa, and T. Arai, “The new application of photosensitization reaction to atrial fibrillation treatment: Mechanism and demonstration of non-thermal electrical conduction block with porcine heart,” *Proc SPIE*, vol. 7380, pp. 738051-1–8, 2009.
- (4) H. Matsuo, A. Ito, S. Miyoshi, K. Soejima, S. Ogawa, and T. Arai, “Novel non-thermal atrial fibrillation treatment with photosensitization reaction: Possibility of permanent electrical blockade in rat chronic model,” *Proc SPIE*, vol. 7380, pp. 73805D-1–9, 2009.
- (5) A. Ito, H. Matsuo, S. Tsukasa, T. Kajihara, T. Kimura, S. Miyoshi, and T. Arai, “Non-thermal ablation technology for arrhythmia therapy: Acute and chronic electrical conduction block with

- photosensitization reaction,” *Proc SPIE*, vol. 7548, pp. 75483B-1–7, 2010.
- (6) T. Suenari, H. Matsuo, A. Ito, S. Miyoshi, and T. Arai, “Dependence of light fluence on treated depth with photosensitization reaction shortly after photosensitizer injection in rabbit myocardial tissue in vivo,” *Proc SPIE*, vol.7551, pp. 755114-1–7, 2010.
- (7) A. Ito, T. Kajihara, T. Suenari, M. Takahashi, T. Kimura, K. Fukumoto, S. Takatsuki, S. Miyoshi, and T. Arai, “Non-thermal myocardial electrical conduction block by photosensitization reaction with catheterization in IVC-TA isthmus of porcine heart in vivo,” *Proc SPIE*, vol. 7883, pp.78833K-1–6, 2011.
- (8) M. Takahashi, A. Ito, T. Kajihara, and T. Arai, “Detection of pre-charring optical behavior at a laser catheter-tip in blood: Ex vivo and in vivo study,” *Proc SPIE*, vol. 7897, pp. 78970U-1–7, 2011.
- (9) M. Kunio, N. Shimazaki, A. Ito, T. Hayashi, T. Arai, and M. Sakurada, “Basic study of effects on the smooth muscle cells' proliferation with novel short-term thermal angioplasty in vitro and in vivo,” *Proc SPIE*, vol. 7883, pp. 78833L-1–7, 2011.

## 2 学会

### 2.1 国際会議発表

- (1) A. Ito\*, S. Hosokawa, S. Miyoshi, K. Soejima, and T. Arai, “Photosensitization reaction-induced electrical blockade in myocardial tissue,” 30<sup>th</sup> Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (IEEE EMBC 2008), 23 August 2008, Vancouver, Canada.
- (2) A. Ito\*, H. Matsuo, T. Suenari, T. Kimura, S. Miyoshi, S. Ogawa, and T. Arai “Photosensitization reaction-induced electrophysiological response of myocardial cells dependent on subcellular photosensitizer distribution,” World Congress 2009 on Medical Physics and Biomedical Engineering, 10 September 2009, Munich, Germany.
- (3) S. Miyoshi\*, A. Ito, T. Kajihara, M. Ide, H. Suenari, M. Takahashi, T. Kimura, K. Tanimoto, K. Fukumoto, S. Takatsuki, T. Satoh, Y. Futami, S. Ogawa, and T. Arai, “Cavo-tricuspid isthmus ablation by novel photodynamic laser catheter in swine heart in vivo” American College of Cardiology 59<sup>th</sup> Annual Scientific Session, 15 March 2010, Georgia, USA.
- (4) M. Takahashi\*, A. Ito, T. Kajihara, H. Matsuo, and T. Arai, “Basic Study of Charring Detection at the laser catheter-tip using back scattering light measurement during therapeutic laser irradiation in blood,” 32<sup>th</sup> Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (IEEE EMBC 2010), 31 August 2010, Buenos Aires, Argentina.
- (5) M. Kunio\*, N. Shimazaki, A. Ito, T. Hayashi, and T. Arai, “Characteristics of smooth muscle cells shape and proliferation rate in novel short-term thermal angioplasty ex vivo and in vitro,”

32<sup>th</sup> Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (IEEE EMBC 2010), 31 August 2010, Buenos Aires, Argentina.

- (6) A. Ito\*, T. Kajihara, T. Suenari, M. Takahashi, T. Kimura, K. Fukumoto, S. Takatsuki, S. Miyoshi, and T. Arai, “Non-thermal cardiac ablation with photosensitization reaction in right atrial isthmus of porcine heart,” 13<sup>th</sup> International Photodynamic Association, 11 May 2011, Innsbruck, Austria.
- (7) M. Takahashi\*, A. Ito, and T. Arai, “An optical-tip anti-charring system for photodynamic therapy laser irradiation in blood via a catheter,” 13<sup>th</sup> International Photodynamic Association, 11 May 2011, Innsbruck, Austria.

## 2.2 国内学会発表

- (1) 細川俊太郎\*, 伊藤亜莉沙, 荒井恒憲, 三好俊一郎, 副島京子, 小川聡, “PDT を用いた心筋電気伝導ブロックによる心房細動治療,” 第 28 回日本レーザー医学会総会, 2007 年 9 月 14 日, 旭川.
- (2) 伊藤亜莉沙\*, 細川俊太郎, 三好俊一郎, 副島京子, 荒井恒憲, “Photosensitization reaction による心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化,” 第 47 回日本生体医工学会大会, 2008 年 5 月 10 日, 神戸.
- (3) 三好俊一郎\*, 副島京子, 木村雄弘, 小川聡, 荒井恒憲, 細川俊太郎, 伊藤亜莉沙, “Photodynamic therapy を応用した光アブレーション—生体位心での検討,” 第 23 回日本不整脈学会学術大会, 2008 年 6 月 1 日, 横浜.
- (4) 伊藤亜莉沙\*, 細川俊太郎, 三好俊一郎, 副島京子, 荒井恒憲, “心房細動治療に対する PDT の適用,” 第 18 回日本光線力学学会学術講演会, 2008 年 6 月 14 日, 名古屋.
- (5) 伊藤亜莉沙\*, 細川俊太郎, 三好俊一郎, 副島京子, 荒井恒憲, “静脈注射後早期に行う PDT における心筋電気伝導ブロックの原理解明: 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化の測定,” 第 18 回日本光線力学学会学術講演会, 2008 年 6 月 14 日, 名古屋.
- (6) 伊藤亜莉沙\*, 荒井恒憲, 三好俊一郎, 小川聡, “PDT の適用拡大: 新たな不整脈治療,” 第 29 回日本レーザー医学会総会, 2008 年 11 月 15 日, 八王子.
- (7) 伊藤亜莉沙\*, 松尾洋希, 末成元, 三好俊一郎, 高月誠司, 副島京子, 小川聡, 荒井恒憲, “PDT による心筋電気伝導ブロックの原理: 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化,” 第 29 回日本レーザー医学会総会, 2008 年 11 月 15 日, 八王子.
- (8) 松尾洋希\*, 伊藤亜莉沙, 末成元, 荒井恒憲, 三好俊一郎, 高月誠司, 副島京子, 小川聡, “PDT による心筋電気伝導ブロックの心房細動治療への応用,” 第 29 回日本レーザー医学会総会, 2008 年 11 月 15 日, 八王子.
- (9) 梶原拓郎\*, 松尾洋希, 伊藤亜莉沙, 荒井恒憲, “パルス光励起 PDT における腫瘍表面血流動態の経時的モニタリング,” 第 48 回日本生体医工学会大会, 2009 年 4 月 23 日, 船堀.
- (10) 末成元\*, 伊藤亜莉沙, 松尾洋希, 三好俊一郎, 木村雄弘, 小川聡, 荒井恒憲,

- “Photosensitization Reaction による心筋組織の電気伝導遮断機構,” 第 48 回日本生体医工学会大会, 2009 年 4 月 23 日, 船堀.
- (11) 伊藤亜莉沙\*, 松尾洋希, 梶原拓郎, 末成元, 木村雄弘, 三好俊一郎, 荒井恒憲, “Photosensitization reaction による心房細動治療,” 第 19 回日本光線力学学会学術講演会, 2009 年 7 月 4 日, 横浜.
- (12) 箱守志穂, 松尾洋希\*, 伊藤亜莉沙, 荒井恒憲, “パルス光励起 PDT 施行時の深度方向治療効果計算モデル,” 第 19 回日本光線力学学会学術講演会, 2009 年 7 月 4 日, 横浜.
- (13) 末成元\*, 伊藤亜莉沙, 松尾洋希, 三好俊一郎, 木村雄弘, 小川聡, 荒井恒憲, “Photosensitization Reaction による心筋組織の細胞内  $Ca^{2+}$  動態変化: ex vivo 観察,” 第 19 回日本光線力学学会学術講演会, 2009 年 7 月 4 日, 横浜.
- (14) 梶原拓郎\*, 松尾洋希, 伊藤亜莉沙, 荒井恒憲, “高強度パルス光励起 PDT による腫瘍表面血流動態及び血管径の変化,” 第 19 回日本光線力学学会学術講演会, 2009 年 7 月 4 日, 横浜.
- (15) 梶原拓郎\*, 松尾洋希, 伊藤亜莉沙, 荒井恒憲, “高強度パルス光励起 PDT における腫瘍表面の一過性血流閉止機構,” 第 30 回日本レーザー医学会総会, 2009 年 12 月 2 日, 市ヶ谷.
- (16) 伊藤亜莉沙\*, 松尾洋希, 末成元, 梶原拓郎, 高橋芽意, 井手水紀, 木村雄弘, 福本耕太郎, 高月誠司, 三好俊一郎, 荒井恒憲, “ブタ心筋を用いた Photosensitization reaction による心筋電気伝導ブロック,” 第 20 回日本光線力学学会学術講演会, 2010 年 6 月 12 日, 福井.
- (17) 高橋芽意\*, 伊藤亜莉沙, 梶原拓郎, 三好俊一郎, 木村雅弘, 箱守志穂, 山口恭司, 玉村好司, 荒井恒憲, “PDT の血中・接触運用における光学的な安定性,” 第 20 回日本光線力学学会学術講演会, 2010 年 6 月 12 日, 福井.
- (18) 伊藤亜莉沙\*, 松尾洋希, 末成元, 梶原拓郎, 木村雄弘, 三好俊一郎, 荒井恒憲, “Photosensitization Reaction による即時のおよび永続的な心筋電気伝導ブロック,” 第 49 回日本生体医工学会大会, 2010 年 6 月 25 日, 大阪.
- (19) 高橋芽意\*, 伊藤亜莉沙, 梶原拓郎, 松尾洋希, 荒井恒憲, “Charring prevention method at the laser catheter-tip during laser irradiation in blood,” 第 49 回日本生体医工学会大会, 2010 年 6 月 25 日, 大阪.
- (20) 國尾美絵\*, 島崎夏美, 伊藤亜莉沙, 林智章, 伊神優香, 荒井恒憲, “Influences on smooth muscle cells with stretch-fixing by novel short-term thermal angioplasty,” 第 49 回日本生体医工学会大会, 2010 年 6 月 25 日, 大阪.
- (21) 伊藤亜莉沙\*, 梶原拓郎, 末成元, 高橋芽意, 木村雄弘, 福本耕太郎, 高月誠司, 三好俊一郎, 荒井恒憲, “経カテーテル的な Photosensitization reaction によるブタ心筋電気伝導ブロック,” 第 31 回日本レーザー医学会総会, 2010 年 11 月 14 日, 名古屋.
- (22) 梶原拓郎\*, 伊藤亜莉沙, 荒井恒憲, “Photodynamic Therapy による心房細動治療: 心筋接触照射光の組織内強度分布と治療領域推定,” 第 31 回日本レーザー医学会総会, 2010 年

11月14日,名古屋.

- (23) 高橋芽意\*, 伊藤亜莉沙, 梶原拓郎, 荒井恒憲, "経カテーテル的血中レーザ光照射時の安定した光照射," 第31回日本レーザー医学会総会, 2010年11月14日, 名古屋.
- (24) 梶原拓郎, 伊藤亜莉沙\*, 荒井恒憲, "経カテーテル的赤色レーザ光心筋接触照射時の組織内光分布," 第50回日本生体医工学会大会, 2011年5月1日, 東京.
- (25) 高橋芽意\*, 伊藤亜莉沙, 梶原拓郎, 末成元, 木村雄弘, 福本耕太郎, 高月誠司, 三好俊一郎, 荒井恒憲, "ブタ心筋における Photosensitization reaction による電気伝導ブロック," 第50回日本生体医工学会大会, 2011年5月1日, 東京.
- (26) 梶原拓郎, 高橋芽意\*, 伊藤亜莉沙, 荒井恒憲, "血中接触レーザ光照射時の心筋内光強度分布," 第21回日本光線力学学会学術講演会, 2011年7月3日, 大阪.
- (27) 小川恵美悠\*, 伊藤亜莉沙, 荒井恒憲, "早期 PDT による心房細動治療の基礎検討: photosensitization reaction の施行条件と心筋細胞壊死," 第21回日本光線力学学会学術講演会, 2011年7月3日, 大阪.
- (28) 本橋沙彌佳\*, 伊藤亜莉沙, 高橋芽意, 小川恵美悠, 木村雄弘, 福本耕太郎, 高月誠司, 三好俊一郎, 荒井恒憲, "photosensitization reaction による心筋電気伝導ブロック:イヌを用いた in vivo 運用," 第21回日本光線力学学会学術講演会, 2011年7月3日, 大阪.

### 3 特許

- (1) 荒井恒憲, 伊藤亜莉沙, "光化学反応により心筋組織の光線力学的アブレーションを行うカテーテル," 国際公開 WO/2011/105631, 公開日 2011年9月1日.
- (2) 荒井恒憲, 伊藤亜莉沙, 高橋芽意, "レーザカテーテル出射部の血液焦げ付き防止システム," 国際公開 WO/2011/111645, 公開日 2011年9月15日.
- (3) 箱守志穂, 山口恭司, 玉村好司, 荒井恒憲, 伊藤亜莉沙, "評価装置及び評価方法," 国際公開 WO/2011/114653, 公開日 2011年9月22日.
- (4) 箱守志穂, 山口恭司, 玉村好司, 荒井恒憲, 伊藤亜莉沙, "判別装置及び判別方法," 特開 2011-189019, 公開日 2011年9月29日.
- (5) 箱守志穂, 山口恭司, 玉村好司, 荒井恒憲, 伊藤亜莉沙, "算出装置及び算出方法," 特開 2011-189020, 公開日 2011年9月29日.

## 謝辞

本研究は、著者が慶應義塾大学大学院 理工学研究科基礎理工学専攻 後期博士課程在学中に、本塾大学院 基礎理工学専攻教授 荒井恒憲先生の指導のもとに行ったものである。本研究を遂行するにあたり、基礎研究から開発研究まで種々の段階からなる研究に対する考え方や進め方をご教示していただき、また学会、展示会、および企業会議など幅広い経験や知識を身につける機会をご提供していただき、荒井恒憲教授に心より深く感謝申し上げます。

本学位論文をまとめるにあたり、不整脈の専門的な内容に関するご指導とご意見をいただきました本塾医学部名誉教授 小川 聡先生、また理工学的観点から深い視点でご指導とご意見をいただきました本塾大学院理工学研究科総合デザイン工学専攻 小原 實教授、本塾大学院理工学研究科基礎理工学専攻 田中敏幸教授、内山孝憲教授に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行する上で、株式会社アライ・メッドフォトン研究所の二見精彦氏、深田晶子氏には研究開発という側面で様々なご助言をいただき感謝申し上げます。

慶應義塾大学医学部循環器内科の三好俊一郎先生、木村雄弘先生、高月誠司先生、福本耕太郎先生には、動物実験では実験手技などのご指導をいただき、医学的な観点から本研究に関する貴重なご助言をいただき、また機器開発および実験デザイン設定にあたりご意見をいただきまして感謝申し上げます。

本研究実施にあたり大変充実した装置および実験環境を整えてくださった、多数の企業の方々に感謝いたします。

研究グループの仲間として共に研究に関する討論をした修士 2 年の高橋芽意さん、小川恵美悠さん、修士 1 年の本橋沙彌佳さん、学部 4 年の河上裕重さん、中村哲也さん、町田直樹さん、既に社会で活躍中の荒井研究室卒業生の箱守志穂さん、細川俊太郎さん、松尾洋希さん、梶原拓郎さん、末成 元さん、井手水紀さんに感謝いたします。

これまで荒井研究室での研究生活を共に過ごした全ての先輩方、同期の方、後輩に感謝しています。特に、荒井研究室卒業生の島崎夏美博士には 5 年間に渡り研究および研究生活を支えていただき感謝いたします。

荒井恒憲教授秘書の鈴木れいさんには、充実した研究生活を過ごせるよう常日頃から温かいご支援とご配慮をいただき感謝申し上げます。

最後に、研究生活を送るにあたり、いつも温かく見守り、支えてくれた家族に心から感謝しています。

2011年12月20日