



|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Porphyrin Derivatives Mediated Sonodynamic Therapy on Malignant Glioma in Vitro                 |
| Author(s)           | 遠藤, 将吾                                                                                          |
| Description         | 配架番号 : 2134                                                                                     |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                           |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第11652号                                                                                        |
| Issue Date          | 2015-03-25                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k11652">https://doi.org/10.14943/doctoral.k11652</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/59717">https://hdl.handle.net/2115/59717</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | Shogo_Endo.pdf                                                                                  |



# 学 位 論 文

## **Porphyrin Derivatives Mediated Sonodynamic Therapy on Malignant Glioma in Vitro**

(悪性神経膠腫細胞株に対するポルフィリン  
誘導体を用いた音響力学療法)

2015 年 3 月

北海道大学

遠藤 将吾



# 学 位 論 文

## **Porphyrin Derivatives Mediated Sonodynamic Therapy on Malignant Glioma in Vitro**

(悪性神経膠腫細胞株に対するポルフィリン  
誘導体を用いた音響力学療法)

2015 年 3 月

北海道大学

遠藤 将吾

## 目 次

|                           |      |
|---------------------------|------|
| 発表論文目録および学会発表目録 . . . . . | 1 頁  |
| 緒言 . . . . .              | 2 頁  |
| 略語表 . . . . .             | 5 頁  |
| 実験方法 . . . . .            | 6 頁  |
| 実験結果 . . . . .            | 17 頁 |
| 考察 . . . . .              | 47 頁 |
| 総括および結論 . . . . .         | 51 頁 |
| 謝辞 . . . . .              | 53 頁 |
| 引用文献 . . . . .            | 54 頁 |

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Shogo Endo, Nobuki Kudo, Shigeru Yamaguchi, Koki Sumiyoshi, Hiroaki Motegi, Hiroyuki Kobayashi, Shunsuke Terasaka, Kiyohiro Houkin  
Porphyrin Derivatives Mediated Sonodynamic Therapy on Malignant Glioma in Vitro  
Ultrasound in Medicine & Biology (現在投稿中)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Shogo ENDO, Nobuki KUDO, Shigeru YAMAGUCHI, Hiroyuki KOBAYASHI, Shunsuke TERASAKA, Kiyohiro HOUKIN  
Porphyrin Derivatives Mediated Sonodynamic Therapy on Malignant Glioma Cells in Vitro  
2nd International ALA and Porphyrin Symposium (IAPS2),  
16/November/2014, Tokyo

## 緒言

神経膠腫は本邦の原発性脳腫瘍の約19.5 %を占め、髄膜腫に次いで有病率が高い疾患群である<sup>1</sup>。取り分け悪性神経膠腫の代表である膠芽腫は手術摘出と放射線照射、化学療法を組み合わせで治療されるが、その2年生存率はわずか33.9 %と全癌種の中で最も予後不良である<sup>2,3</sup>。また近年、悪性神経膠腫に対する補助療法として分子標的薬や腫瘍ワクチン、また新規放射線照射デバイスの開発などが試みられているものの、現時点で満足できる治療成績は得られていない。

本腫瘍は初期治療として神経機能を温存しつつ最大限の摘出が求められる一方、特に言語野や運動野などに浸潤する腫瘍に対しては全摘出を断念せざるを得ない場合が多い。また標準治療後もその90 %が原発巣の2cm以内に局所再発する<sup>4</sup>ことから、局所再発を如何に予防するかが本疾患制御の最大の課題と言える。ここで我々は、既存の治療戦略では本疾患の克服は極めて困難と考え、手術摘出、放射線療法、化学療法に次ぐ第4の治療方法として、有効かつ安全な局所補助療法の開発を目的として本研究を開始した。

まず我々が着目したのが光線力学療法 (photodynamic therapy: PDT) である。これは外的に光感受性物質を取り込ませた標的腫瘍細胞に対して低エネルギーのレーザー光を照射することで光感受性物質が励起され、これが再び基底状態に戻る際に発生する活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) が標的腫瘍細胞に酸化的損傷を引き起こしてアポトーシスを誘導するといった治療方法である。我々もこれまで悪性神経膠腫に対するPDTに関して、いくつかの基礎研究を行い報告してきた<sup>5,6</sup>。本邦では2013年9月に原発性悪性脳腫瘍に対して光感受性物質であるレザフィリン<sup>®</sup> (Talaporfin sodium: TS) と半導体レーザーの組み合わせによるPDTが保険承認された<sup>7</sup>。

悪性腫瘍細胞では正常細胞に比べて内因性の光感受性物質であるプロトポルフィンIX (protoporphyrin IX: PpIX) の代謝活性が低下していることから、外的にPpIXの前駆物質 (後述) を投与することで、腫瘍細胞内に正常細胞と比較してより多くのPpIXが蓄積される。このためPDTは腫瘍選択性が高く、周囲正常組織への影響が少ないことが利点である。しかしレーザー光は組織深達度が低いため皮膚癌や膀胱癌などの表在性の腫瘍では有効である一方で脳腫瘍に対しては開頭後に残存腫瘍を視認し、これに直接レーザー光を照射するといった比較的侵襲が高い実施方法に局限されている。

その欠点を補うべく近年、注目されているのが音響力学療法 (sonodynamic therapy: SDT) である。前述のTSやPpIXを含むポルフィリン誘導体はレーザー光と同様、超音波照射によっても励起してROSを発生することは既に知られており (音響感受性)<sup>8</sup>、レーザー光に比して超音波は圧倒的に組織深達度に優れていることから、SDTでは深部の腫瘍に対して腫瘍選択的な治療が可能である。実際これまでに悪性神経膠腫をはじめ多癌腫に対して多数の基礎研究が行われており、有望な治療方法として期待されている<sup>9</sup>。

超音波が生体に与える作用は主に2つに分類され、一方は音響エネルギーの吸収による生体組織の温度上昇作用 (『熱的作用』) で、他方は超音波音場内で溶存微小気泡が振動することによって膨張と圧縮を繰り返した結果、これが崩壊するという一連の過程 (キャビテーション) を経てフリーラジカルや放射圧 (マイクロストリーミング) が発生する機械的作用 (『非熱的作用』) である。前立腺癌などの固形癌に対する超音波治療は広義には高密度焦点式超音波療法 (High Intensity Focused Ultrasound: HIFU) を代表とする一種の温熱療法で前者を基本原理とするが、病変が機能野と近接することが多い脳腫瘍の治療では組織温度の上昇は非常に大きな問題である。このためSDTが音響感受性物質の励起によって産生されたROSによる細胞障害、すなわち『非熱的作用』を利用する点は見逃せない (図1)。以上よりSDTでは理論上、標的腫瘍細胞に対して選択的かつ安全な局所補助療法が可能である。

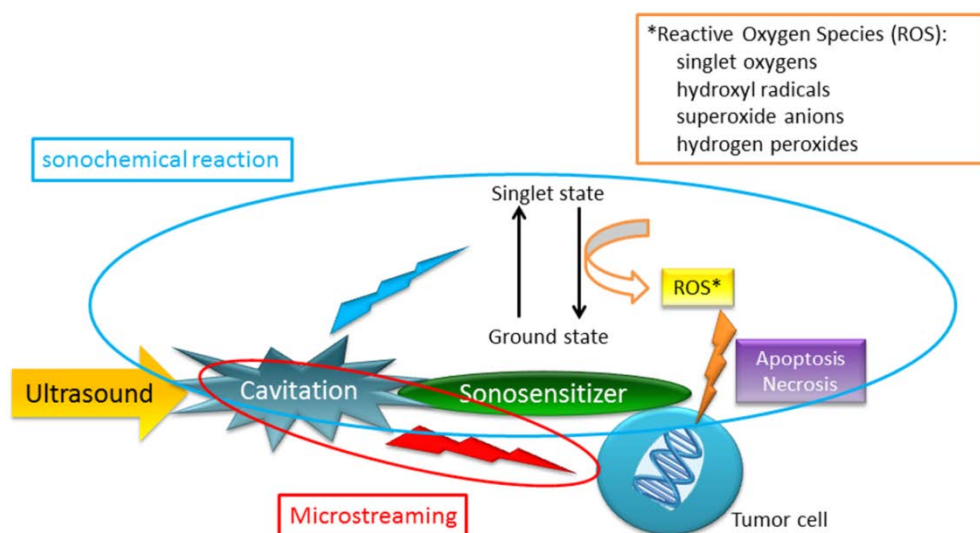


図1 超音波の非熱的作用

腫瘍細胞内に取り込まれた音響感受性物質が超音波照射によって励起され、これが再び基底状態に戻る際に活性酸素が発生する。これにより腫瘍細胞にアポトーシスやネクローシスが誘導される。

音響感受性物質は天然のアミノ酸の一つでヘムの前駆物質であるアミノレブリン酸 (5-Aminolevulinic acid hydrochloride: ALA) に着目した。ALA自体に音響感受性物質としての作用はないが、その経口投与後に腫瘍細胞のミトコンドリアに取り込まれて代謝されることで、音響感受性を有するPpIXが生成される。腫瘍細胞に蓄積したPpIXはある一定波長のレーザー光を照射することで赤色蛍光を発することから、この発光を指標に腫瘍摘出度の判定が可能であり、ALAは悪性神経膠腫に対する術中蛍光診断薬のアラベル<sup>®</sup>として既に広く臨床応用されている<sup>10</sup>。本剤は極めて安全性が高く、かつ血中半減期が短いことから反復での使用が可能な点もSDTでの使用においては有利である。

既にALAもしくは外因性PpIXを用いたSDT (ALA-SDT, PpIX-SDT) は、多癌腫において有望な報告が散見される<sup>11-15</sup>。しかし一方で、神経膠腫においてはこれまで他のポルフィリン誘導体を用いたSDTの報告はあるものの、ALA-SDTに関しては渉猟し得た限りin vivoの報告が2編あるのみで<sup>16,17</sup>、in vitroでの報告はない。以上より本研究はラット神経膠腫細胞株C6およびヒト膠芽腫細胞株U87MGを用いて、悪性神経膠腫に対するALA-SDTおよびPpIX-SDTのin vitroでの抗腫瘍効果を評価することを目的とした。

また前述のようにTSもALA同様、既に悪性神経膠腫に対するPDT薬として臨床応用されており、本薬剤を用いたSDT (TS-SDT) の報告も散見される<sup>18,19</sup>。しかしながらTS-SDTに関しても、ALA-SDT同様に悪性神経膠腫細胞株に対してはin vitroにおいて既存の報告がない。よって本研究ではTS-SDTの抗腫瘍効果も併せて評価した。

## 略語表

|        |                                            |
|--------|--------------------------------------------|
| ABCG2  | ATP-binding cassette sub-family G member 2 |
| ALA    | 5-aminolevulinic acid                      |
| ANOVA  | analysis of variance                       |
| CCK-8  | cell counting kit-8                        |
| DMEM   | Dulbecco's modified eagle medium           |
| DMSO   | dimethyl sulfoxide                         |
| EthD-1 | Ethidium homodimer                         |
| FBS    | fetal bovine serum                         |
| HIFU   | high intensity focused ultrasound          |
| MALA   | 5-amino-4-oxo hexanoic acid                |
| MRI    | magnetic resonance imaging                 |
| PBS    | phosphate-buffered saline                  |
| PDT    | photodynamic therapy                       |
| PET    | positron emission tomography               |
| PFS    | progression free survival                  |
| PI     | Propidium iodide                           |
| PpIX   | protoporphyrin IX                          |
| ROS    | reactive oxygen species                    |
| SDT    | sonodynamic therapy                        |
| TS     | talaporfin sodium                          |
| WHO    | world health organization                  |

## 実験方法

### 【培養細胞株】

ラット神経膠腫細胞株C6、ヒト膠芽腫細胞株U87MG (ATCC<sup>®</sup>; the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) を10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Life Technologies, Minato, Tokyo, Japan)、penicillin G 100 U/mlとstreptomycin 100 µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (以降、FBSとpenicillin G、streptomycin無添加のDMEMとの混同を避けるため、FBSとpenicillin G、streptomycinを含むDMEMをDMEM (+) と表記する) 内で単層培養した。インキュベーターでの培養環境は温度37 °C、相対湿度100 %、酸素濃度95 %、二酸化炭素濃度5 %とした (以降、特に断りのない場合、培養条件は上記とする)。

### 【超音波照射装置】

超音波照射装置は本学情報科学研究科・人間情報工学研究室と共同で開発した (図2)。

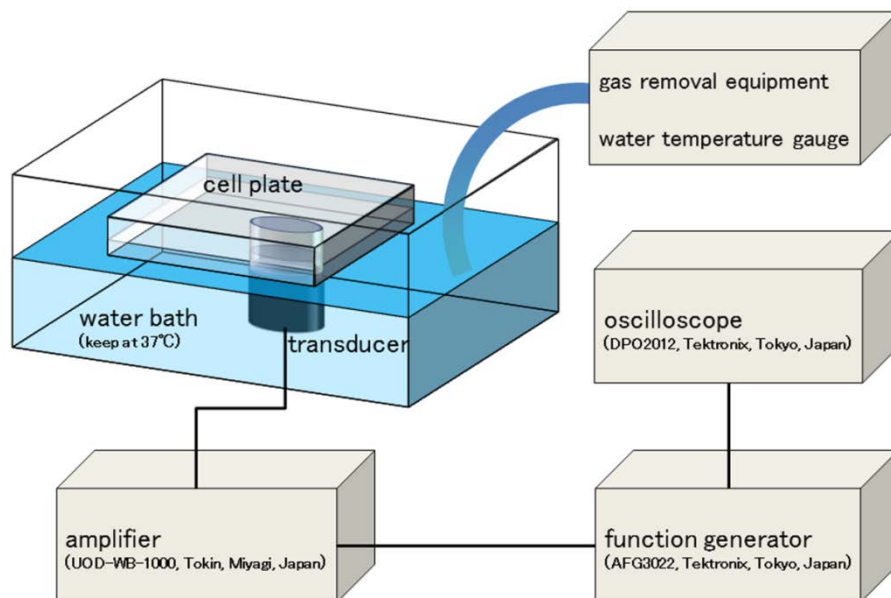


図2 超音波照射装置

ファンクションジェネレータ (AFG3022: Tektronix, Minato, Tokyo, Japan) で生成してアンプ (UOD-WB-1000: Tokin, Sendai, Miyagi, Japan) を用いて増

幅した交流電圧信号を水槽内に留置した超音波振動子を用いて、6ウェルプレート底に照射した。全ての超音波照射実験で6ウェルプレート (MULTIWELL 6 well: BD FALCON<sup>®</sup>, Bedford, MA, USA) を用いた。プレートの各ウェルと同径 (35 mm) の平面円形の超音波振動子を水槽 (0.4×0.2×0.1 m<sup>3</sup>) 内に留置して、プレート底 (プレート底面厚は1.62 mm) を超音波振動子の表面から5 mmの位置に設置した。気泡は超音波を減衰させるため水槽内の水は脱気して用いた。またウェル内の液面やウェル側壁からの定在波の影響を少なくするため、超音波振動子とプレート底を平行になるように設置した。照射強度はmembrane型ハイドロホン (MHB-500, Onda, Sunnyvale, CA, USA) を用いて測定した。水槽内の水温を37 °Cに維持して超音波照射の際に発生する熱を可能な限り排除することで、本装置を用いて生じる事象が非熱的作用によるものとした。なお自然光によるPDT効果を避けるため、超音波照射中も含めて音響感受性物質を扱う全ての実験は可能な限り遮光して暗室で実施した。

#### 《予備実験① 各ウェル内の至適溶液量の検討》

前述のように超音波はウェル内の液面や側壁によって複雑な定在波を形成する。このため各ウェル内の溶液量 (液面高) の違いによる定在波の影響を、ヨウ素デンプン反応を利用してフリーラジカルの発生量を定性的に観察することで、超音波照射実験に最適な各ウェル内の溶液量を検討した。

ヨウ素デンプン反応とは、0.3 g/Lのヨウ化カリウム、0.01 Mのデンプン、0.1 Mのクロラール、1 Mの塩化ナトリウムを含む溶液 (以降、ヨウ素デンプン溶液) 中でフリーラジカルの二次反応物であるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が発生すると、I<sup>-</sup>が酸化してI<sub>2</sub>となりそれがデンプンと呈色反応を示して無色透明なヨウ素デンプン溶液が紫色に変化することを利用した方法である。555 nmの測定波長の吸光度を測定してヨウ素デンプン溶液の透過光の減衰を見ることで、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の発生量を間接的に知ることができる<sup>20</sup>。

各ウェル内に腫瘍細胞を播種せず適当量のヨウ素デンプン溶液のみを添加して0.8 W/cm<sup>2</sup>の照射強度で120秒間までの超音波強照射を行った (n=10)。

各ウェル内のラジカル発生量と超音波照射時間に正の相関が得られた (図3)。

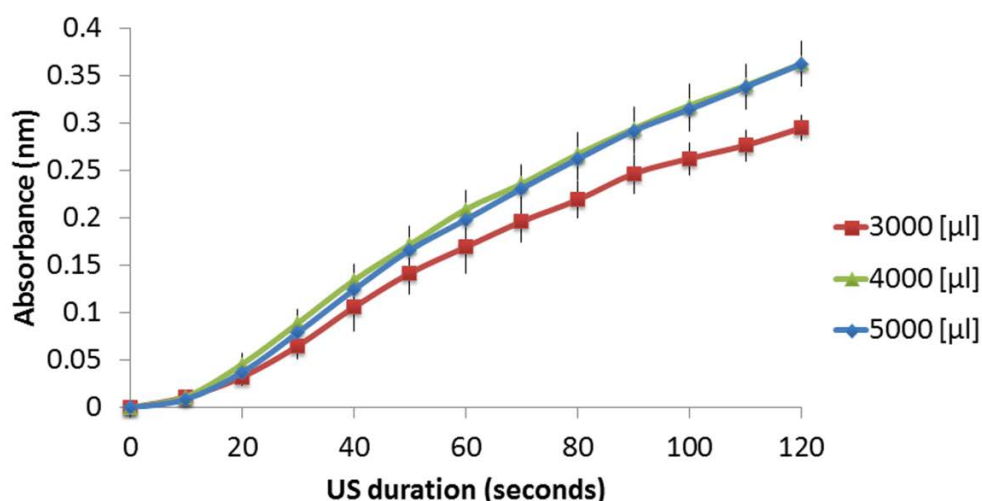


図3 ヨウ素デンプン反応によるフリーラジカル発生量の定性

各超音波照射時間 (0-120 秒) におけるヨウ素デンプン溶液の吸光度 (測定波長 555 nm) を測定した。いずれのウェル内の溶液量 (3000~5000  $\mu$  L) においても前 2 者に正の相関が得られたが、5000  $\mu$  L のみ吸光度すなわち  $H_2O_2$  の発生量が低下していた。中央値±標準偏差で表記。一元配置分散分析法 (one-way analysis of variance: ANOVA) を用いて、 $P < 0.05$  を統計学的有意差ありと判定した。

3000  $\mu$  L の溶液量で 4000 および 5000  $\mu$  L と比較してラジカルの発生量が少なかったが、これは前者では液面高が 2.95 mm と低いため (後者では各々 3.93 mm と 4.91 mm)、定在波のみではなく超音波照射によって生じる液面の波立ちによる反射波の影響を受け易かったためと推測された。

以上より、以降の超音波照射実験では 6 ウェルプレートの各ウェル内に、4 mL の溶液量を用いることで統一した。

#### 《予備実験② 至適播種細胞濃度の検討》

次に各ウェル内に播種する至適細胞濃度を検討するため、無治療の C6 細胞株の成長曲線を作成した。

70-80 % confluence となった 5 継代以上の各接着単層細胞を phosphate-buffered saline (PBS: Nacalai tesque, Nakagyo, Kyoto, Japan) で一度洗浄後、0.05 % trypsin (with 0.53mM ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) で剥離して、96 ウェルプレート (MICROTEST 96: BD FALCON®, Bedford, MA, USA) の各ウェル内に DMEM (+) で適当濃度に希釈した細胞懸濁液を 100  $\mu$  L ずつ播種した (n=8)。これを 24 時間培養した後、Cell Counting Kit-8

(CCK-8: Dojindo Molecular Technologies, Inc., kamimashiki, Kumamoto, Japan) を用いて細胞増殖を評価した。各ウェル内に10  $\mu$  LのCCK-8試薬を添加し、インキュベーター内で4時間の呈色反応を行った後、プレートリーダー (SUNRISE microplate reader: TECAN, Kawasaki, Kanagawa, Japan) で450 nmの吸光度を測定した。

図4に示すようなシグモイド曲線が得られた。本実験では治療による抗腫瘍効果の判定が目的であるため、播種細胞濃度を指数増殖期にある  $2.5 \times 10^5$  cells/mL程度に設定した。

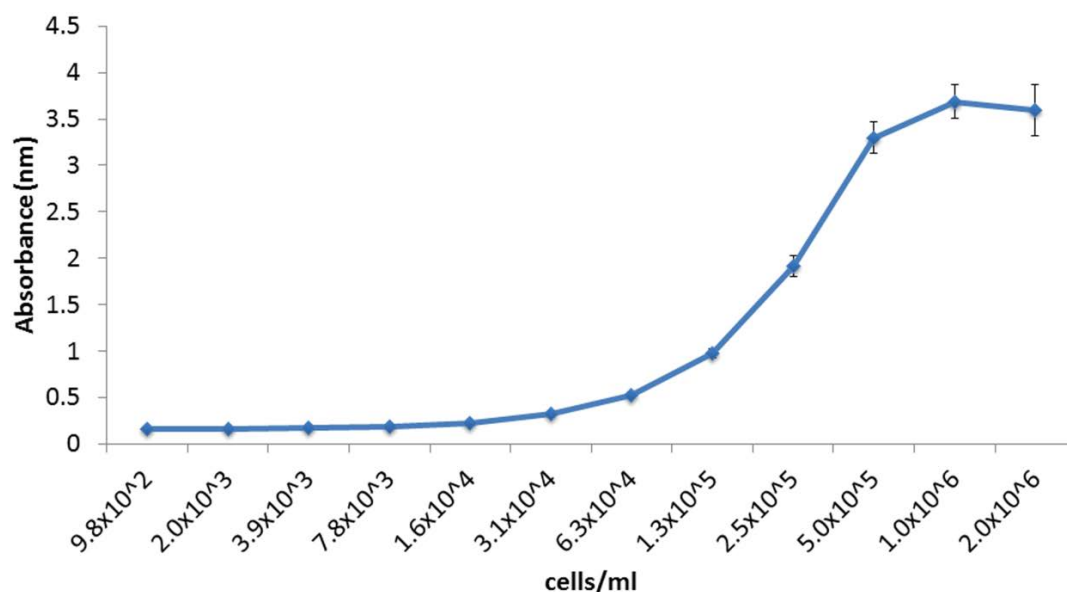


図4 C6細胞株の成長曲線

各播種細胞濃度 ( $9.8 \times 10^2$ - $2.0 \times 10^6$  cells/mL) において、CCK-8アッセイ後 (4時間の呈色反応後) の450 nmの吸光度を測定した (n=8)。中央値±標準偏差で表記。

#### 【音響感受性物質の調整】

- ① 5 -Aminolevulinic acid hydrochloride (ALA: COSMO BIO Co., Ltd, Koto, Tokyo, Japan)

4  $^{\circ}$ Cの冷暗所で保存した ALA を使用直前に、フェノールレッド不含の DMEM (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA) で希釈して ALA 溶液を調整した。共培養条件は下記、予備実験③の結果を参考に決定した。

② Protoporphyrin IX (PpIX: Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA)

DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA) で 0.005g/mL に希釈して-20℃の冷暗所で保存した PpIX を上記同様、使用直前にフェノールレッド不含の DMEM で希釈して PpIX 溶液を調整後、下記条件で共培養した。

③ Talaporfin sodium (TS: Meiji seika Ltd., Chuo, Tokyo, Japan)

ALA 同様に 4℃の冷暗所で保存した TS を使用直前にフェノールレッド不含の DMEM で希釈して TS 溶液を調整後、下記条件で共培養した。

《予備実験③ 音響感受性物質による細胞毒性の判定》

細胞株に対する各音響感受性物質の細胞毒性を評価し、各音響感受性物質との共培養条件を検討した。細胞毒性試験に用いる細胞株は各細胞株を代表して C6 細胞株を選択した。

① ALA

96ウェルプレートの各ウェル内に $1.0 \times 10^5$  cells/mLのC6細胞株を100  $\mu$  L 播種した (n=5)。これを24時間培養した後、フェノールレッド不含のDMEM 1mLで各ウェルを一度洗浄して、各ウェルの培地を100-500  $\mu$  g/mLのALA 溶液100  $\mu$  Lに置換した。これを1-4時間共培養し、CCK-8を用いて腫瘍生存率を算出した。

腫瘍生存率 (%) は [(音響感受性物質共培養群の吸光度－音響感受性物質溶液の吸光度)／(音響感受性物質非共培養群の吸光度－フェノールレッド不含のDMEMの吸光度)×100] の公式を用いて算出した。

図5より以降の実験ではALAの共培養条件を200  $\mu$  g/mLのALA濃度、4時間の共培養時間で統一した。

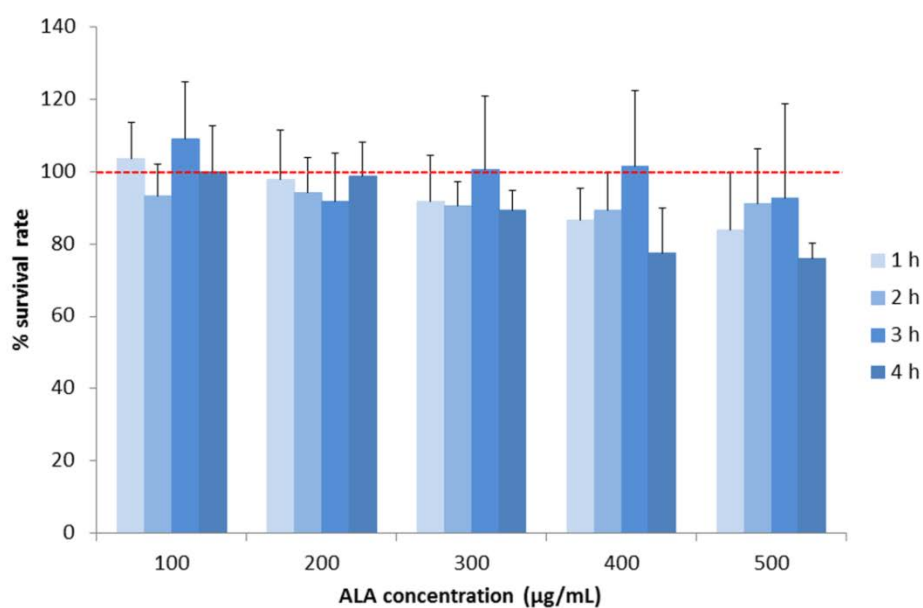


図5 ALAの細胞毒性の評価

各ALA濃度 (100-500  $\mu$ g/mL) および各共培養時間 (1-4時間) におけるC6細胞株の腫瘍生存率を算出した。腫瘍生存率 (%) は [(音響感受性物質共培養群の吸光度－音響感受性物質溶液の吸光度)／(音響感受性物質非共培養群の吸光度－フェノールレッド不含のDMEMの吸光度)×100] で算出した。中央値±標準偏差で表記。

## ② PpIX

上記と同様の方法でPpIXの細胞毒性を評価した。

C6細胞株と0.5-2.5  $\mu$ g/mLのPpIX濃度で1-4時間の共培養を行った。

図6より以降の実験ではPpIXとの共培養条件を1  $\mu$ g/mLのPpIX濃度、4時間の共培養時間で統一した。

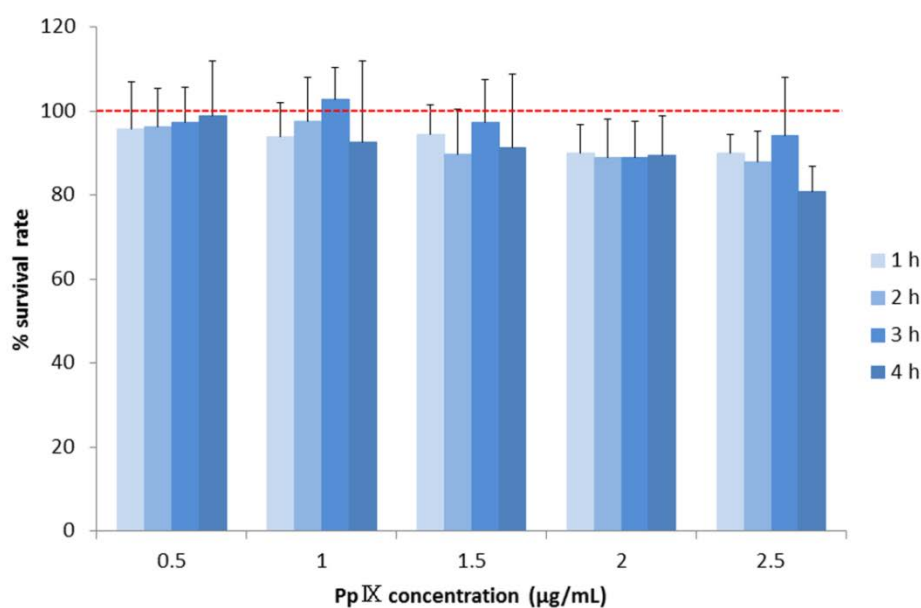


図6 PpIXの細胞毒性の評価

各PpIX濃度 (0.5-2.5  $\mu$ g/mL) および各共培養時間 (1-4時間) におけるC6細胞株の腫瘍生存率を算出した。腫瘍生存率 (%) は [(音響感受性物質共培養群の吸光度－音響感受性物質溶液の吸光度)／(音響感受性物質非共培養群の吸光度－フェノールレッド不含のDMEMの吸光度)×100] で算出した。中央値±標準偏差で表記。

### ③ TS

上記と同様の方法でTSの細胞毒性を評価した。

C6細胞株と10-50  $\mu$ g/mLのTS濃度で1-4時間の共培養を行った。

図7より以降の実験ではTSとの共培養条件を30  $\mu$ g/mLのTS濃度、4時間の共培養時間で統一した。

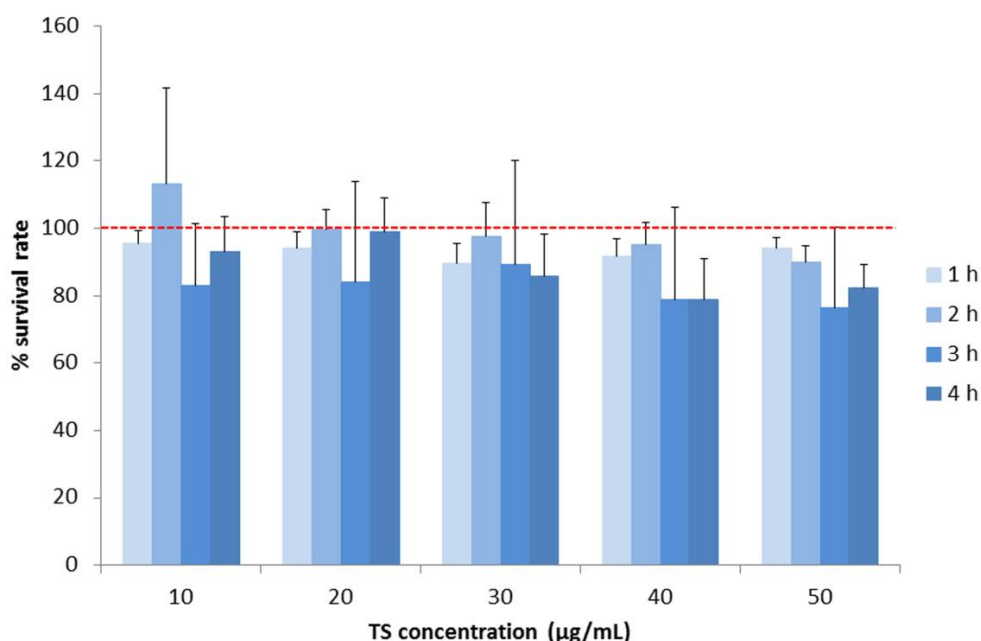


図7 TSの細胞毒性の評価

各TS濃度 (10-50  $\mu$ g/mL) および各共培養時間 (1-4時間) におけるC6細胞株の腫瘍生存率を算出した。腫瘍生存率 (%) は [(音響感受性物質共培養群の吸光度－音響感受性物質溶液の吸光度)／(音響感受性物質非共培養群の吸光度－フェノールレッド不含のDMEMの吸光度)×100] で算出した。中央値±標準偏差で表記。

#### 【細胞内音響感受性物質の局在の観察】

各音響感受性物質と共培養後、細胞内に蓄積した音響感受性物質を蛍光顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000: KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて観察した。その際にHoechst33342 (bis Benzimide H 33342 trihydrochloride: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) での核染色も同時に行うことで蓄積した音響感受性物質の局在をより明瞭化した。励起フィルター、蛍光フィルターは各々545/25、605/70 nmを選択した。

4ウェルカルチャースライド (Collagen type1 cellware 4-well culture slide: BD Biosciences, Bedford, MA, USA) の各ウェル内に $6.0 \times 10^4$  cells/wellのC6細胞株を播種して、これを24時間培養した。その後、フェノールレッド不含のDMEM 1mLで各ウェルを一度洗浄して、上記条件で各音響感受性物質と共培養した。培地内の音響感受性物質を除去してバックグラウンドの蛍光を落とすため共培養後に各ウェルをPBSで一度洗浄後に、1 mLのPBSとHoechst33342を0.2  $\mu$ L添加し、室温で30分間の呈色反応を行った後に蛍光顕

微鏡で観察して記録した。

#### 【細胞内音響感受性物質量の半定量化】

各細胞内に蓄積した音響感受性物質の蓄積量を、その蛍光強度をフローサイトメーター (Attune<sup>®</sup> Acoustic Focusing Cytometer: Life Technologies Japan, Minato, Tokyo, Japan) で解析することで半定量化して、細胞株の違いによる細胞内音響感受性物質量を比較した。

6ウェルプレートの各ウェル内に $4.0 \times 10^5$  cells/wellの各細胞株を播種して、これを24時間培養した。その後、フェノールレッド不含のDMEM 1mLで各ウェルを一度洗浄して、上記条件で各音響感受性物質と共培養した。共培養後の各ウェルをPBSで一度洗浄して、0.05 % trypsinを用いて細胞を回収した後にPBSで適当量に懸濁した。これらを488 nmのアルゴンイオンレーザーで細胞内音響感受性物質を励起して、その蛍光強度を690/50 nmのフィルターを用いて解析した。

#### 【SDTプロトコール】

6ウェルプレートの各ウェル内に $2.5 \times 10^5$  cells/mLの細胞懸濁液1mL ( $2.5 \times 10^5$  cells/well) を播種して、これを24時間培養した後、各ウェルをフェノールレッド不含のDMEM 1mLで一度洗浄した。音響感受性物質単独群ならびにSDT群では各ウェルの培地を上記濃度に調整した各音響感受性物質溶液4 mLに置換し、上記の時間で培養を行った。一方、コントロール群ならびに超音波照射単独群では、同様にフェノールレッド不含のDMEM 1mLで各ウェルを一度洗浄した後、各ウェル内の培地を音響感受性物質溶液の代わりに不含のDMEM 4 mLに置換し、上記と同じ時間で培養を行った。

超音波照射条件はResonant frequency 1.0 MHz、Duty ratio 50 %、 $I_{\text{sata}}$  0.08-0.8 W/cm<sup>2</sup>、照射時間10-210秒に設定した。

#### 【抗腫瘍効果判定】

##### I. 腫瘍生存率の算出

超音波照射終了後、24時間の培養を行い、CCK-8を用いて各治療群の腫瘍生存率を算出した。腫瘍生存率 (%) は [治療群の吸光度 / コントロール群の吸光度  $\times 100$ ] の公式を用いて算出した。

## II. 生細胞/死細胞の評価

同様に超音波照射から24時間の培養後にCalcein AM/Ethidium homodimer (EthD-1) costaining kit (Live/Dead Viability/Cytotoxicity Assay Kit: Life Technologies, Minato, Tokyo, Japan) を用いて生細胞/死細胞を評価した。-20 °Cで保存した2 mMのEthD-1ストック溶液20 µLをPBS10 mLで希釈した後、4 mMのCalcein AMストック溶液5 µLを混和しワーキング溶液を調整した。各ウェルをPBSで一度洗浄した後、1 mLのPBSと本溶液100 µLを添加して、室温で30分間の呈色反応を行った。蛍光顕微鏡 (IX71 + U-LH100HGAPO: OLYMPUS, Shinjuku, Tokyo, Japan) で観察して、デジタルカラーカメラ (VB-6010: KEYENCE, Higashi-yodogawa, Osaka, Japan) で記録した。

## III. ALA-SDTによる細胞障害機序の評価

Annexin V-FLUOS Staining Kit (Roche Applied Science, Minato, Tokyo, Japan) と Propidium iodide (PI: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) の二重染色後にフローサイトメーターを用いて、ALA-SDTによる細胞障害機序を評価した。培地内のALAの存在によるアーチファクトを可能な限り減ずるため、音波照射の直前に6ウェルプレートの各ウェルをフェノールレッド不含のDMEM 1mLで一度洗浄して、培地をフェノールレッド不含のDMEM 4 mLに置換した後に超音波照射を行い、治療6時間後に解析した。治療後の各ウェルをPBSで一度洗浄して、0.05 % trypsinを用いて細胞を回収した後にPBSで適当量に懸濁した。その際、超音波照射によってプレート底面から細胞が剥離して培地内に浮遊することを考慮して、それら浮遊細胞も同時に回収して検体とした。-20°Cで保存した20 µLのフルオレセイン標識Annexin V試薬をインキュベーションバッファー (10 mM HEPES、pH 7.4、140 mM NaCl、5 mM CaCl<sub>2</sub>) 1 mLで希釈した後、50 µg/mLのヨウ化プロピジウムストック溶液20 µLを混和した。回収した細胞懸濁液 1 mLに本溶液100 µLを添加して、室温で15分間の呈色反応を行った。これらを488 nmのアルゴンイオンレーザーで励起して、Annexin V-FLUOSとPIの蛍光強度を各々530/30 nm、574/26 nmのフィルターを用いて解析した。解析結果はAnnexin-V-/PI-の細胞群を生細胞、Annexin-V+/PI-の細胞群を早期アポトーシス細胞、Annexin-V+/PI+の細胞群を後期アポトーシス細胞、Annexin-V-/PI+の細胞群をネクローシス細胞と評価した。

#### 【統計学的解析】

超音波照射実験は各群3ウェルに対して実施した。データは全てStatcel 3 software (OMS publishing Inc, Tokorozawa, Saitama, Japan) を用いて統計学的解析を行った。結果は中央値±標準偏差で表記した。2群の比較は一元配置分散分析法 (one-way analysis of variance: ANOVA) を用いて、 $P < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

## 実験結果

### 【細胞内音響感受性物質の局在の観察】

本実験で用いた音響感受性物質との共培養条件下において、C6細胞内に蓄積した各音響感受性物質の蛍光を蛍光顕微鏡を用いて確認した。

ALAおよびPpIXとの共培養細胞においては細胞縁（細胞膜）を中心にPpIXの蛍光が認められた（図8, 9）のに対して、TSとの共培養細胞に関しては細胞質内にびまん性の蛍光を認めた（図10）。

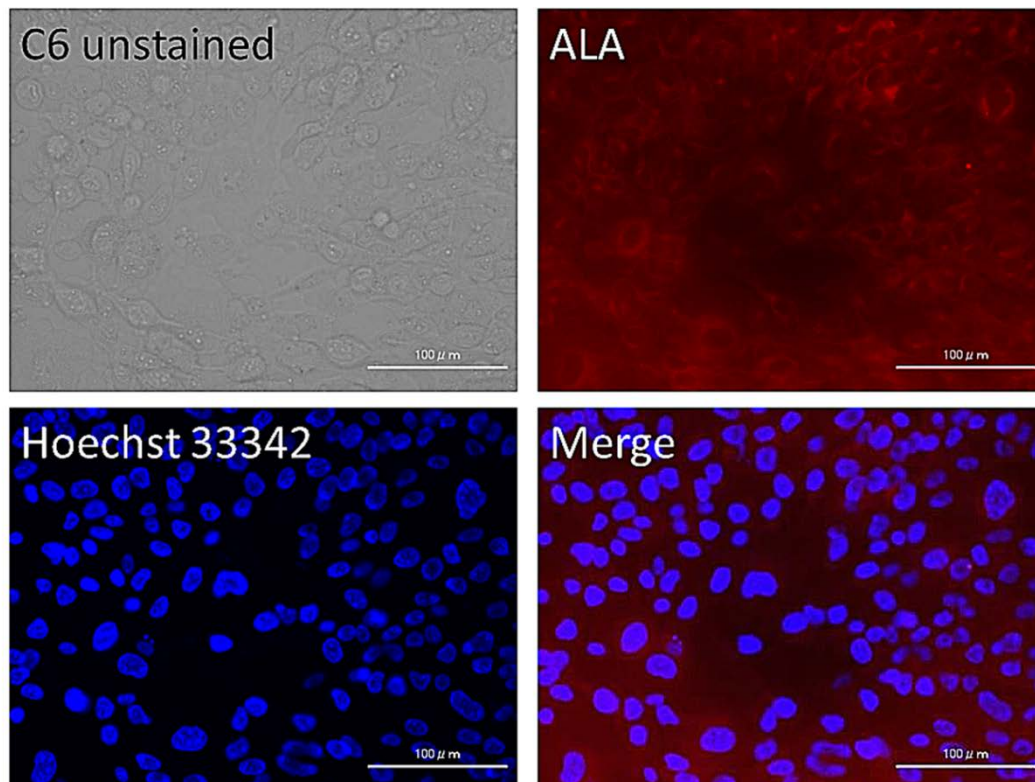


図8 ALA 200  $\mu$ g/mL と 4 時間共培養後の C6 細胞株内の PpIX 蛍光の観察  
左上: 未染色、右上: ALA由来PpIX蛍光 (蛍光フィルター605/70 nm)、左下: Hoechst蛍光 (蛍光フィルター545/25 nm)、右下: 右上と左下の合成像。

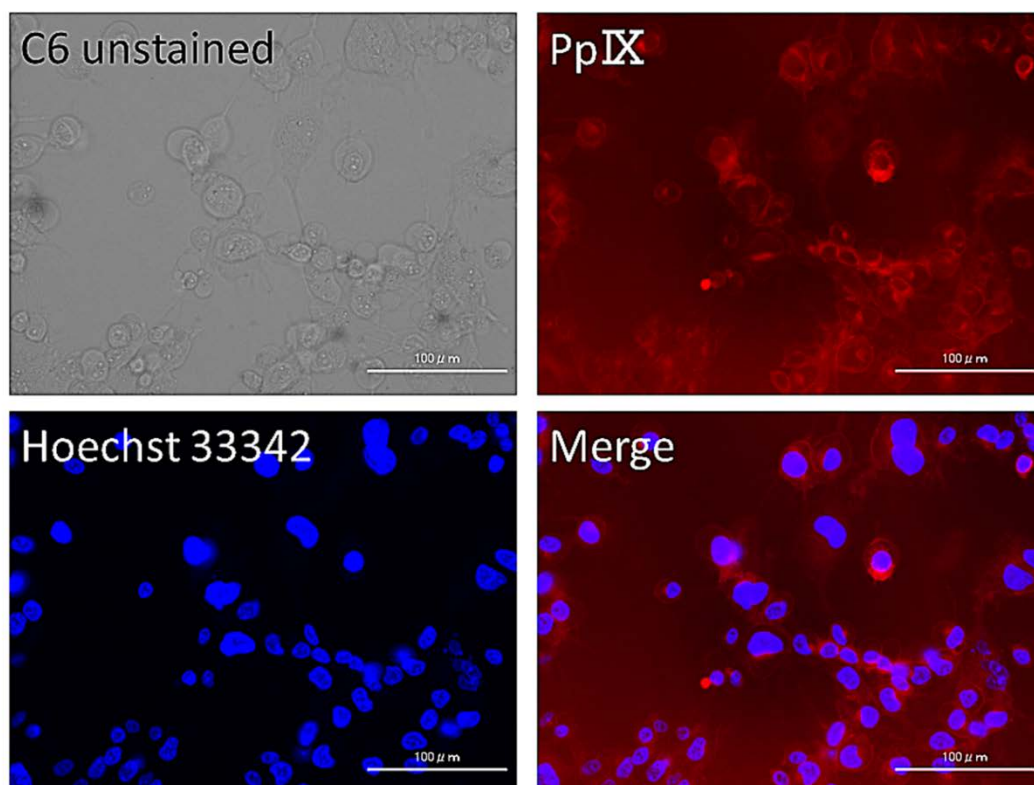


図9 PpIX 1.0  $\mu$ g/mL と4時間共培養後のC6細胞株内のPpIX蛍光の観察

左上: 未染色、右上: 外因性PpIX蛍光 (蛍光フィルター605/70 nm)、左下: Hoechst蛍光 (蛍光フィルター545/25 nm)、右下: 右上と左下の合成像。

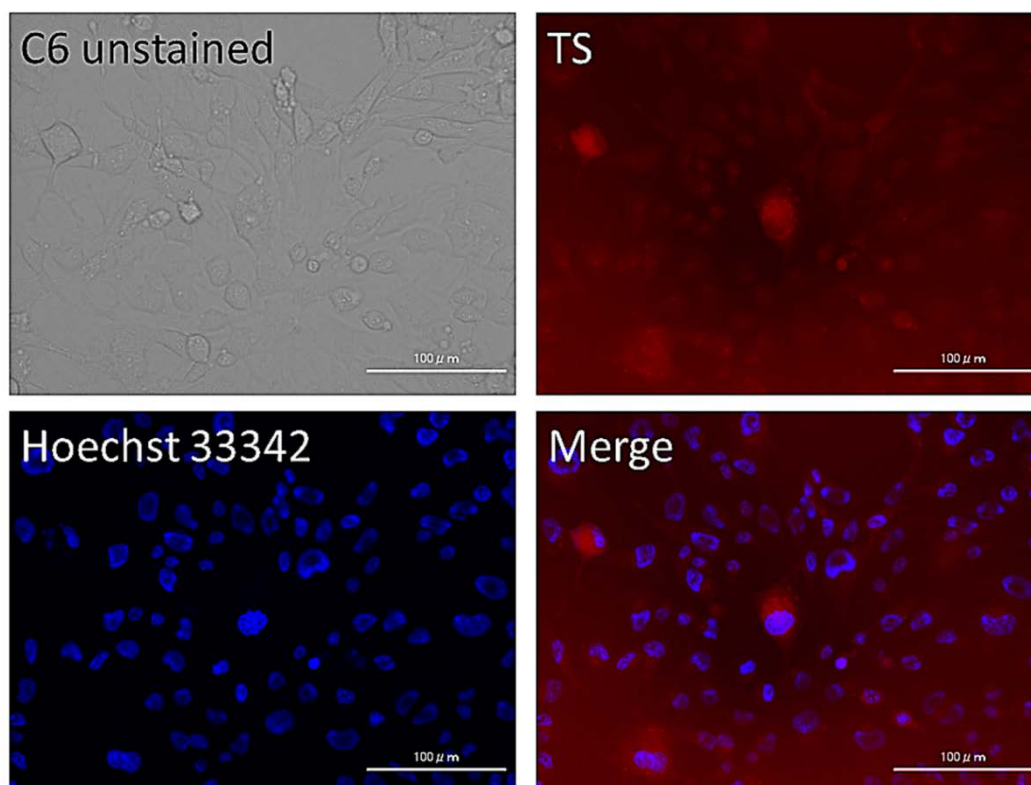


図 10 TS 30  $\mu$ g/mL と 4 時間共培養後の C6 細胞株内の TS 蛍光の観察  
 左上: 未染色、右上: TS 蛍光 (蛍光フィルター 605/70 nm)、左下: Hoechst  
 蛍光 (蛍光フィルター 545/25 nm)、右下: 右上と左下の合成像。

#### 【細胞内音響感受性物質量の半定量化】

音響感受性物質との非共培養群と比較して、共培養群において相対的な細胞内音響感受性物質の蛍光強度の上昇を認めた。

C6 細胞株、U87MG 細胞株ともに各音響感受性物質の蛍光強度は ALA < PpIX < TS の順であった (図 11)。

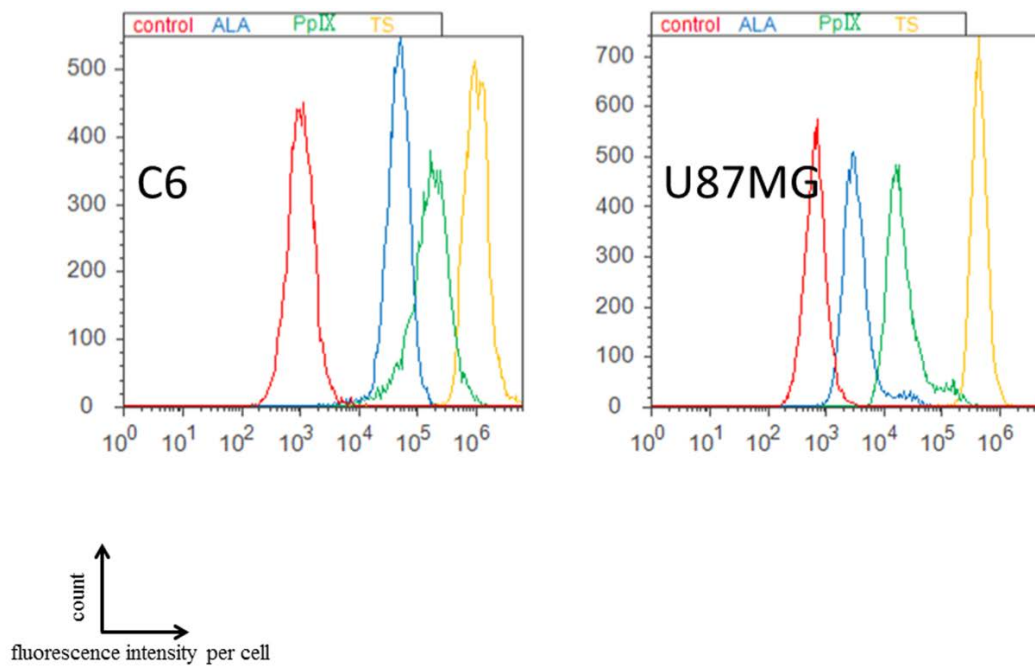


図 11 各音響感受性物質と共培養後の C6 細胞株、U87MG 細胞株の相対的な細胞内音響感受性物質の蛍光強度の解析

左: C6 細胞株、右: U87MG 細胞株

赤: 未染色、青: ALA、緑: PpIX、黄: TS

励起波長: 488 nm、測定波長 690/50 nm

一方、同じ音響感受性物質との共培養条件で各細胞株を比較したところ、C6 細胞株と比較して U87MG 細胞株で各細胞内音響感受性物質の蛍光強度はいずれも低かった (図 12)。

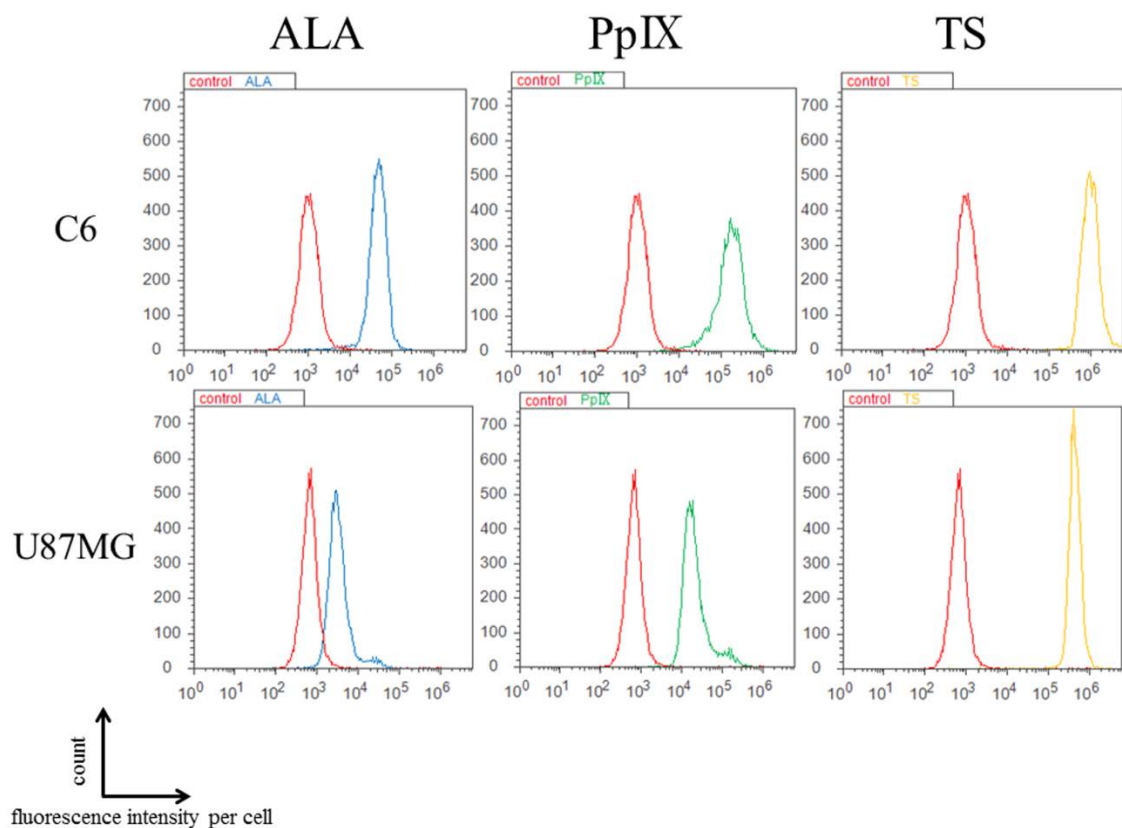


図 12 各音響感受性物質と共培養後の C6 細胞株、U87 細胞株の相対的な細胞内音響感受性物質の蛍光強度の比較

左上: ALA との共培養 (200  $\mu$ g/mL、4 時間の共培養条件) 後の C6 細胞株内の ALA 由来 PpIX の蛍光強度 (励起波長: 488 nm、測定波長 690/50 nm)、左下: ALA との共培養 (同上) 後の U87MG 細胞株内の ALA 由来 PpIX の蛍光強度 (同上)、中上:PpIX との共培養 (1.0  $\mu$ g/mL、4 時間の共培養条件) 後の C6 細胞株内の外因性 PpIX の蛍光強度 (同上)、中下: PpIX との共培養 (同上) 後の U87MG 細胞株内の外因性 PpIX の蛍光強度 (同上)、右上: TS との共培養 (30  $\mu$ g/mL、4 時間の共培養条件) 後の C6 細胞株内の TS の蛍光強度 (同上)、右下: TS との共培養 (30  $\mu$ g/mL、4 時間の共培養条件) 後の U87MG 細胞株内の TS の蛍光強度 (同上)

赤: 未染色、青: ALA、緑: PpIX、黄: TS

## 【抗腫瘍効果判定】

### I. 腫瘍生存率の算出

#### I a. C6 細胞株

##### ① ALA-SDT

i) 照射強度:  $0.8 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 0-60 秒間

上記条件で超音波照射を開始した。

【結果】ALA 群と非 ALA 群ともに照射時間に相関して生存率の低下が見られたものの、両群間で生存率に有意差は得られなかった (図 13)。

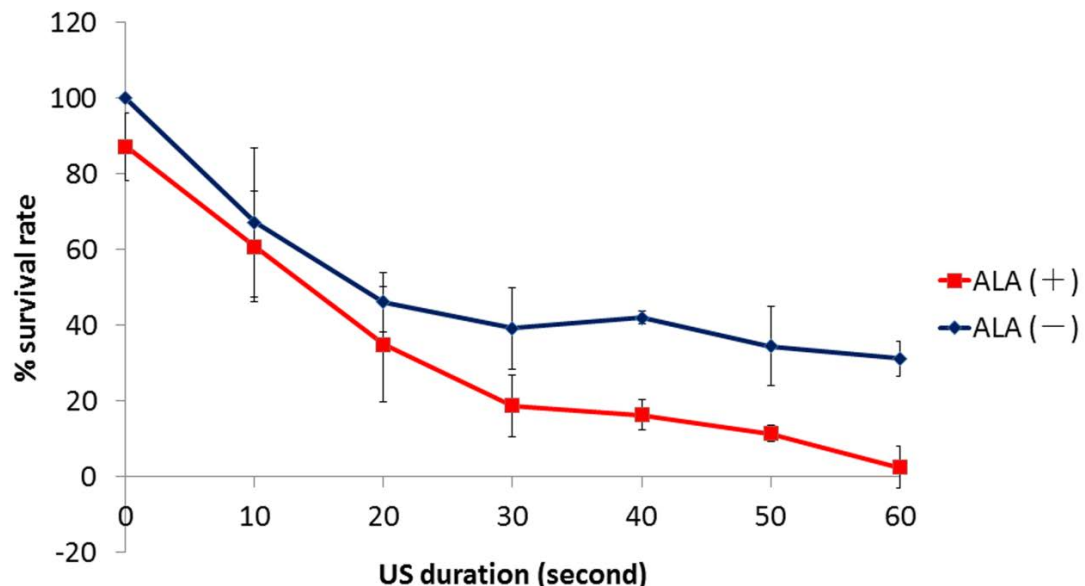


図 13 C6 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.8 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 0-60 秒間)

中央値±標準偏差で表記。

【考察】照射強度が強すぎて ALA の音響感受性物質としての効果が打ち消されてしまったため、もしくは照射時間が短すぎて適切な抗腫瘍効果を観察できなかったためと考えられた。

ii) 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 0-120 秒間

照射強度を  $0.16 \text{ W/cm}^2$  に下げて、かつ照射時間も 0-120 秒間に延長した。

【結果】上記と同様、ALA 群と非 ALA 群で生存率に有意差は得られなかった (図 14)。

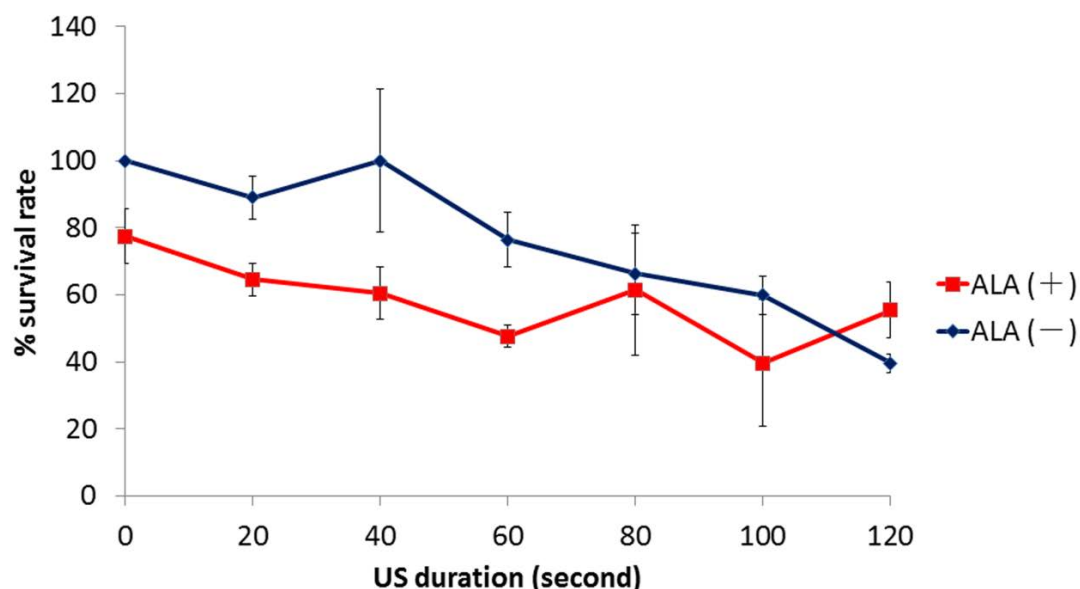


図 14 C6 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 0-120 秒間)

中央値±標準偏差で表記。

【考察】上記とは逆に超音波照射強度が低すぎたため、抗腫瘍効果を得るのに十分な量の ROS の産生が得られなかったためと考えられた。また 120 秒間までの照射でも両群の生存率に明らかな開きが出なかったため、以降の超音波照射実験は再度 60 秒間までの照射時間に設定した。

### iii) 照射強度: $0.48 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 0-60 秒間

超音波照射強度を前 2 回の間中値である  $0.48 \text{ W/cm}^2$  に設定した。

【結果】これまでと同様、ALA 群と非 ALA 群で生存率に有意差は得られなかった (図 15)。

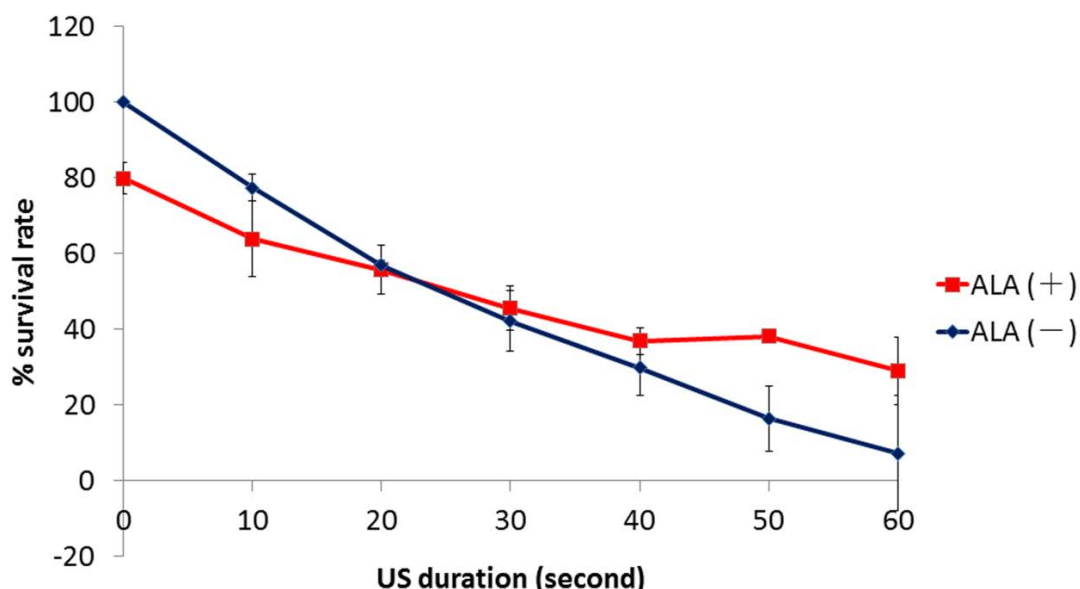


図 15 C6 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.48 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 0-60 秒間)

中央値±標準偏差で表記。

【考察】前 3 回の超音波照射実験では超音波照射強度および照射時間に相関して抗腫瘍効果が得られていたことから、照射自体は適切に行われているものと判断して、抗腫瘍効果判定のタイミングを検討した。

iv) 照射強度:  $0.16\text{-}0.48 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 0-60 秒間、抗腫瘍効果判定: 超音波照射 24-72 時間後

前述のように、これまでの超音波照射実験では超音波照射から 24 時間後に抗腫瘍効果の判定を行ってきたが、CCK-8 では一般的に浮遊細胞による発色は接着細胞よりも弱いため、浮遊細胞に対しては長時間のインキュベーションとより多くの細胞が必要であり、<sup>21</sup> これまでの実験では、超音波照射後に物理的にプレート底面から剥がれた細胞が多数いたことによって、偽陰性 (本来は腫瘍細胞の viability が保たれていたにも係わらず、上記アッセイの特性上、死細胞と判定していた) を見ていた可能性が考えられた。

このため超音波照射直後の接着細胞の剥がれによる抗腫瘍効果判定への影響を考慮して、超音波照射から各々 24-72 時間後に抗腫瘍効果判定を行った。

さらに照射強度は照射単独群において抗腫瘍効果を認めず、SDT 群のみで抗腫瘍効果を認める条件が理想的であることから、以降の照射強度は  $0.48 \text{ W/cm}^2$  以下に条件を絞った。

【結果】いずれの抗腫瘍効果判定のタイミングにおいても、これまでと同様、ALA 群と非 ALA 群で生存率に有意差は得られなかった (図 16-18)。

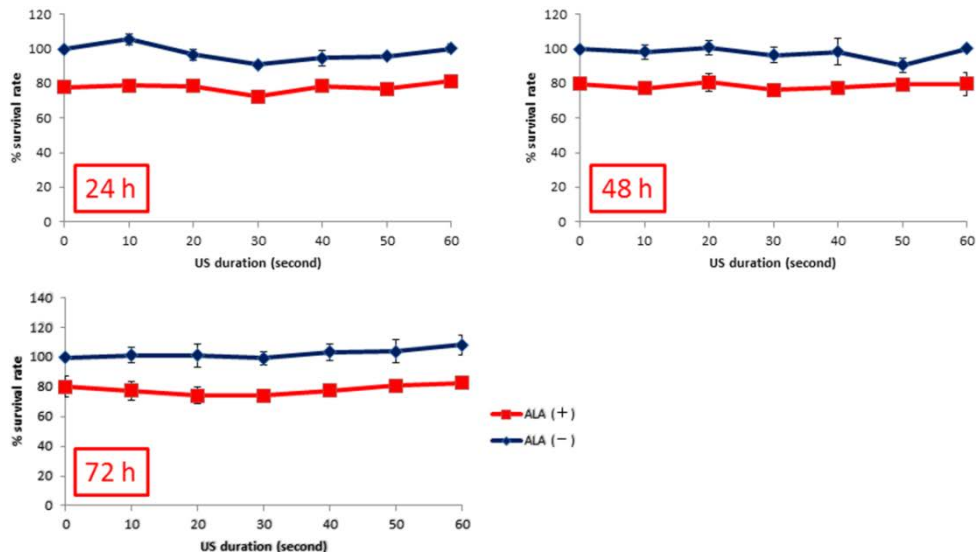


図 16 C6 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 0-60 秒間、抗腫瘍効果判定: 超音波照射 24-72 時間後)

左上: 超音波照射 24 時間後に抗腫瘍効果判定、右上: 超音波照射 48 時間後に抗腫瘍効果判定、左下: 超音波照射 72 時間後に抗腫瘍効果判定  
中央値±標準偏差で表記。

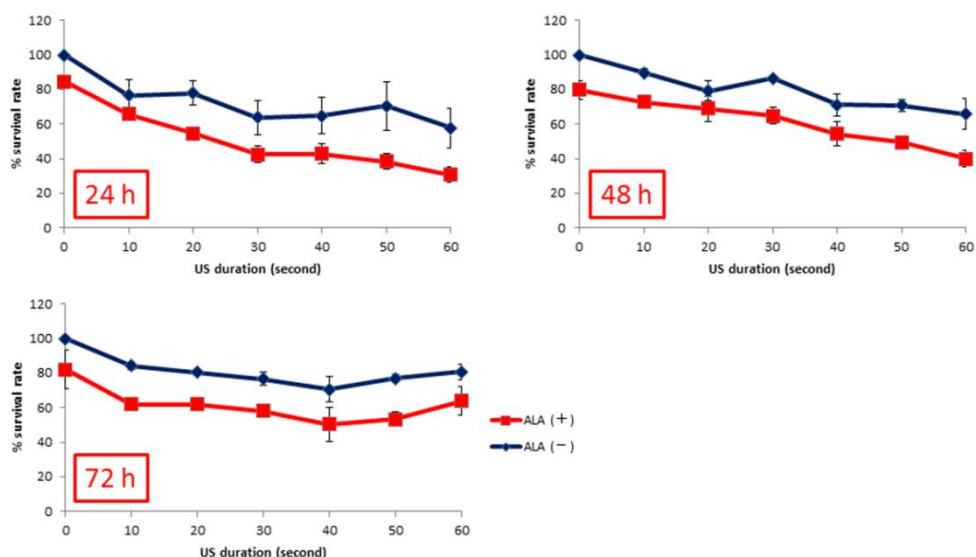


図 17 C6 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.32 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 0-60 秒間、抗腫瘍効果判定: 超音波照射 24-72 時間後)

左上: 超音波照射 24 時間後に抗腫瘍効果判定、右上: 超音波照射 48 時間後に抗腫瘍効果判定、左下: 超音波照射 72 時間後に抗腫瘍効果判定  
中央値±標準偏差で表記。

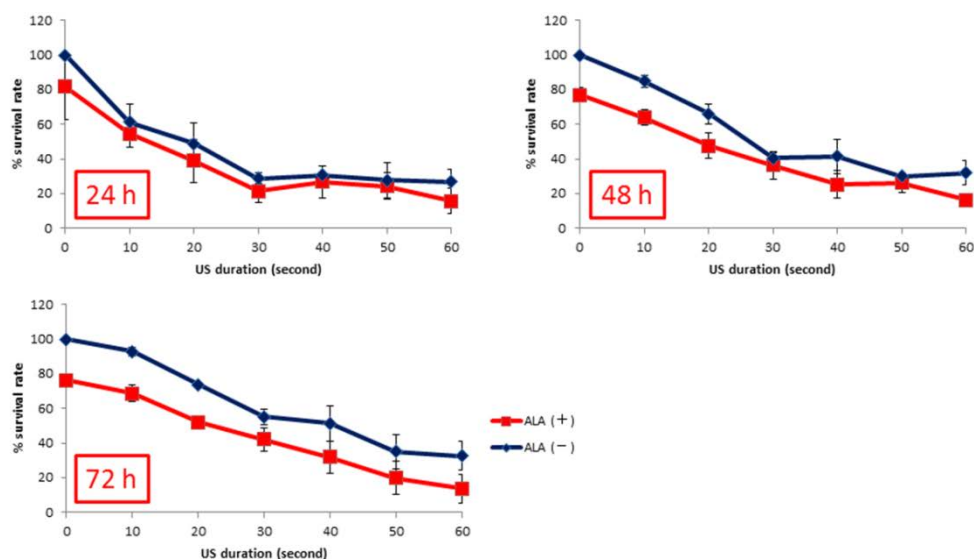


図 18 C6 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.48 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 0-60 秒間、抗腫瘍効果判定: 超音波照射 24-72 時間後)

左上: 超音波照射 24 時間後に抗腫瘍効果判定、右上: 超音波照射 48 時間後に抗腫瘍効果判定、左下: 超音波照射 72 時間後に抗腫瘍効果判定  
中央値±標準偏差で表記。

【考察】以上より抗腫瘍効果判定は超音波照射 24 時間後で十分と判断し、以降の実験では再び超音波照射 24 時間後に抗腫瘍効果判定を行った。

ここで抗腫瘍効果判定のアッセイ自体を見直すこととした。

CCK-8 は試薬が生細胞中の脱水素酵素によって還元され、この溶液の吸光度を測定することで生細胞数を測定するアッセイであるが、細胞を添加していない ALA 溶液のみに CCK-8 試薬を加えたところ呈色反応が生じたことから ALA 自体が還元剤として作用していた (誤発色) ことが判明した。このため ALA 溶液と DMEM を比較する実験系においては、各溶液の吸光度に乖離があること

から抗腫瘍効果判定に CCK8 を用いることは不適であると考えられた。このため抗腫瘍効果判定の方法自体を見直して変更した。

具体的には、超音波照射から 24 時間後に Calcein AM/Ethidium homodimer costaining kit を用いた蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡で直接生細胞数と死細胞数をカウントすることで腫瘍生存率を算出した。その際に全細胞数をカウントするため Hoechst33342 との二重染色も行った。各ウェルを PBS で一度洗浄した後、1 mL の PBS と Hoechst33342 を 0.2  $\mu$ L 添加して、室温で 30 分間の呈色反応を行った。

#### 《新たな腫瘍生存率の算出方法》

1) まず 6 ウェルプレートの各ウェルで任意の 5 点の全細胞数 (Hoechst33342 陽性細胞数) と死細胞数 (EthD-1 陽性細胞数) をカウントした (n=3)。

2) 次に超音波照射によってプレートの底面から剥がれて、超音波照射 24 時間後も再接着しなかった細胞を死細胞と仮定して、仮定死細胞数を下記の公式を用いて算出した。

[仮定死細胞数 = 無治療群の Hoechst33342 陽性細胞数 - 治療群の Hoechst33342 陽性細胞数]

3) 下記の公式を用いて、各群において補正死細胞数を算出した。

[補正死細胞数 = 実測死細胞数 (EthD-1 陽性細胞数) + 仮定死細胞数]

4) 最後に下記の公式を用いて腫瘍生存率を算出した。

[腫瘍生存率 (%) =  $100 - \frac{\text{補正死細胞数}}{\text{無治療群の Hoechst33342 陽性細胞数}} \times 100$ ]

#### vi) 0.16 W/cm<sup>2</sup>、照射時間: 0-120 秒間

上記公式によって腫瘍生存率を算出した場合、[仮定死細胞数 = 無治療群の Hoechst33342 陽性細胞数 - 治療群の Hoechst33342 陽性細胞数]であるため、超音波照射によるプレート底面からの細胞の剥がれは間接的に死細胞数の上昇に繋がることから、剥がれの程度は大きな問題である。このため抗腫瘍効果判定を変更したことに伴い、まずは各ウェル当たりの適当な播種細胞数の再検討を行った。各細胞数で播種した各ウェルに対して上記超音波照射条件

で超音波照射を行い、細胞の剥離程度を Hoechst33342 陽性細胞数で評価した (n=10)。

【結果】照射時間に応じて播種細胞数の少ない群の剥がれが顕著な傾向が得られた (図 19, 20)。

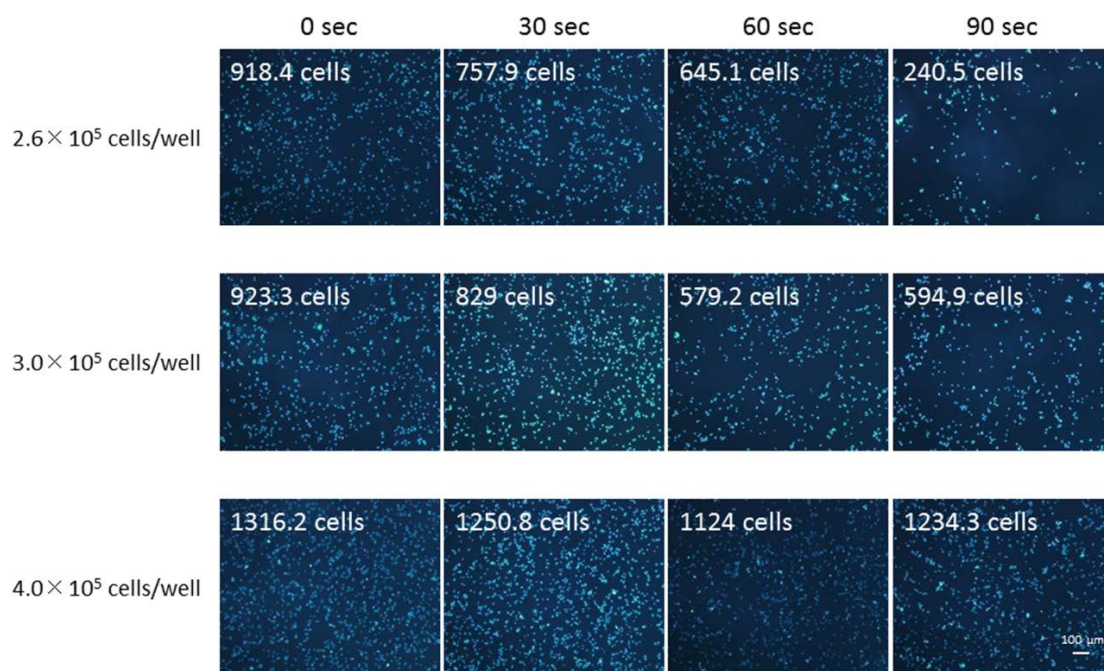


図 19 超音波照射後 ( $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 0-90 秒間) の細胞の剥離程度を播種細胞数毎に Hoechst33342 陽性細胞数で評価

上段: 播種細胞数  $2.6 \times 10^5$  cells/well、中段:  $3.0 \times 10^5$  cells/well、下段:  $4.0 \times 10^5$  cells/well

左から、超音波照射時間 0 秒間、30 秒間、60 秒間、90 秒間。

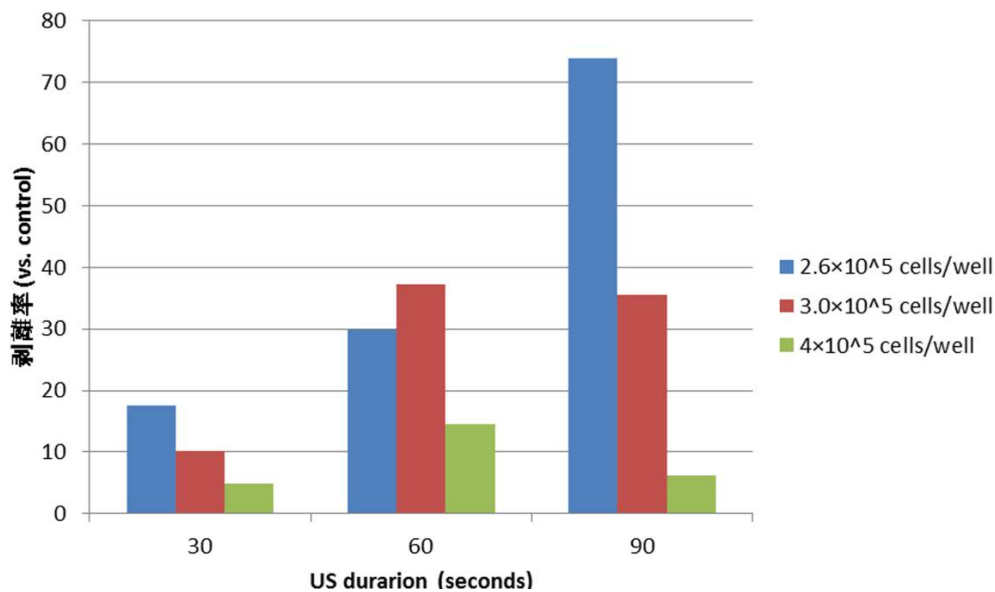


図 20 超音波照射後 (0.16 W/cm<sup>2</sup>、照射時間: 0-90 秒間) の播種細胞数毎の細胞剥離率

各播種細胞数 (青:  $2.6 \times 10^5$  cells/well、赤:  $3.0 \times 10^5$  cells/well、緑:  $4.0 \times 10^5$  cells/well) における超音波照射後のプレート底面からの細胞剥離率 (非照射群と比較)。

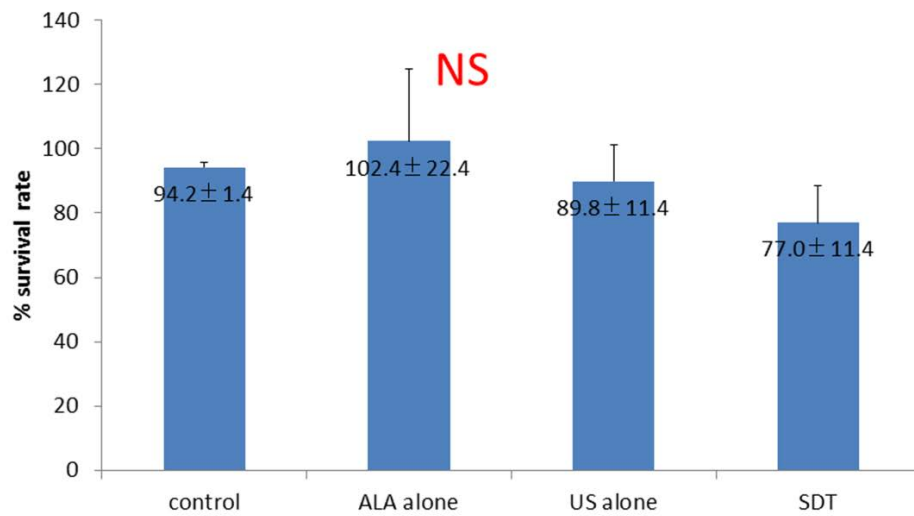
左から、超音波照射時間 0 秒間、30 秒間、60 秒間、90 秒間。

【考察】これは播種細胞数が多い群では少ない群と比較して細胞間の距離が近く細胞間接着が強固となったためと考えられた。よって以降の実験では超音波照射による細胞の剥がれが少なく、かつ顕微鏡視野で細胞数のカウントが比較的しやすい細胞数を得るため、播種細胞数を  $3.0 \times 10^5$  cells/well に設定した。

vii) 照射強度: 0.08 W/cm<sup>2</sup>、照射時間: 30 秒間

次に超音波照射単独群では抗腫瘍効果が得られず、SDT 群で抗腫瘍効果が得られる超音波照射条件を検索するため、まずは照射時間を 30 秒間に固定して、低照射強度の超音波照射から開始した。

【結果】いずれの群間においても腫瘍生存率に統計学的有意差は得られなかった。特に超音波照射単独群と比較して SDT 群で腫瘍生存率の低下が見られたものの、統計学的有意差は得られなかった (図 21, 22)。



NS: Not Significant

By one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test

図 21 C6 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度: 0.08 W/cm<sup>2</sup>、照射時間: 30 秒間)

左から、コントロール群、ALA 単独群、超音波照射単独群、SDT 群  
中央値 ± 標準偏差で表記。

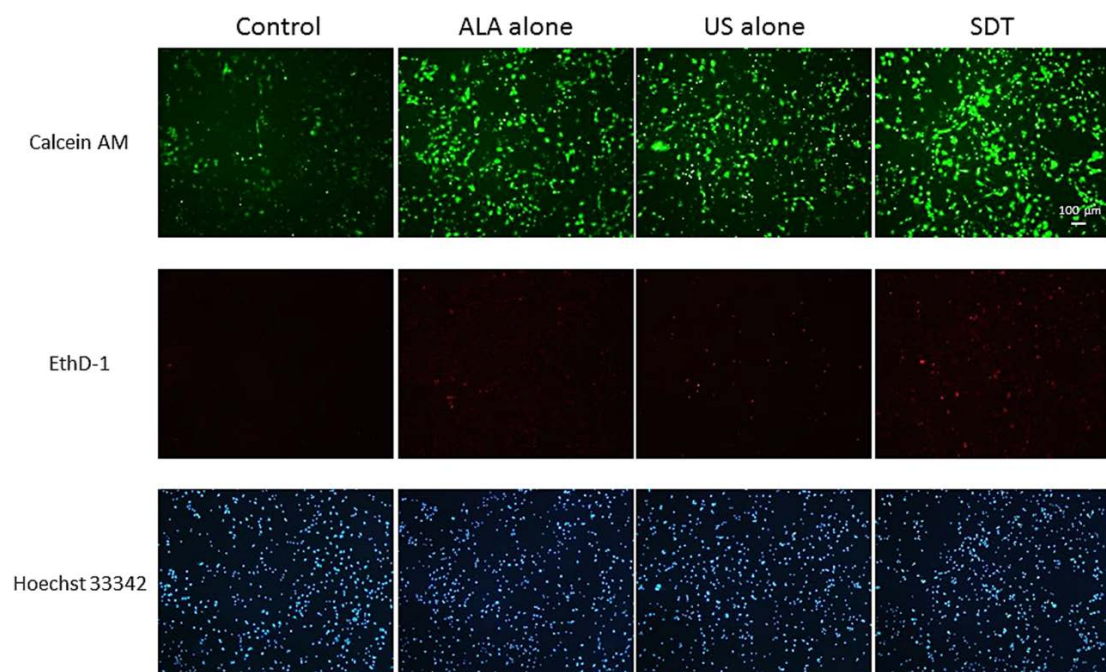


図 22 C6 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度: 0.08 W/cm<sup>2</sup>、照射時間: 30 秒間) 治療 24 時間後の各群の蛍光写真

上段: Calcein AM、中段: EthD-1、下段: Hoechst33342

左から、コントロール群、ALA 単独群、超音波照射単独群、SDT 群

【考察】 $0.08 \text{ W/cm}^2$  では照射強度が低く抗腫瘍効果を得るのに十分な ROS の産生が得られなかったためと考えられ、超音波照射条件を徐々に強めることとした。

viii) 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 30 秒間

【結果】ALA 単独群および照射単独群と SDT 群の腫瘍生存率に統計学的有意差が得られた (図 23, 24)。

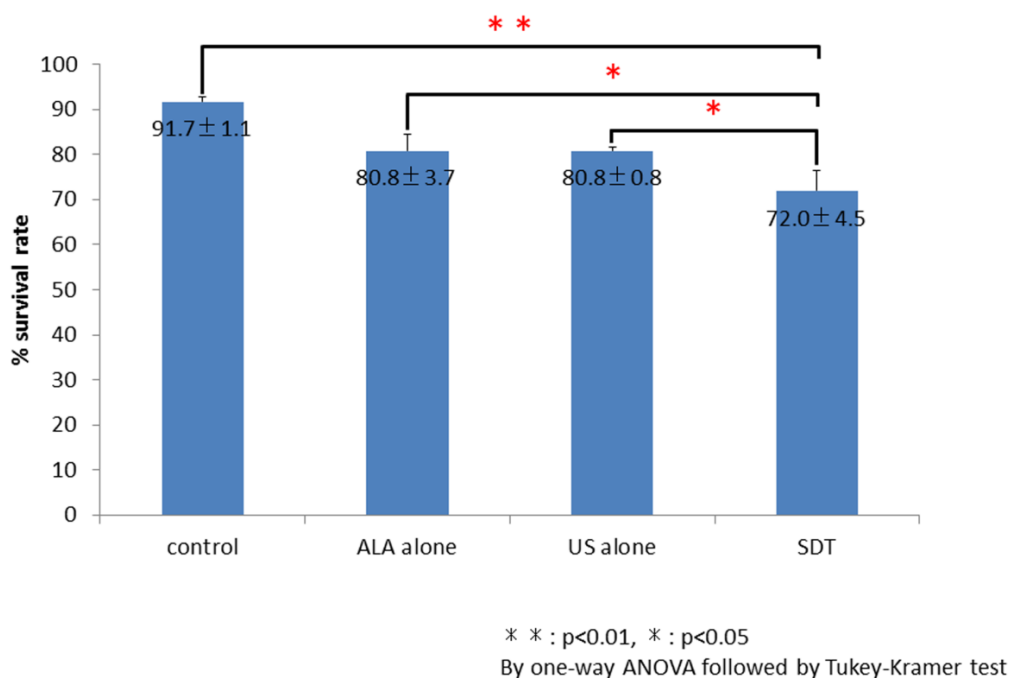


図 23 C6 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 30 秒間)

左から、コントロール群、ALA 単独群、超音波照射単独群、SDT 群  
中央値 ± 標準偏差で表記。

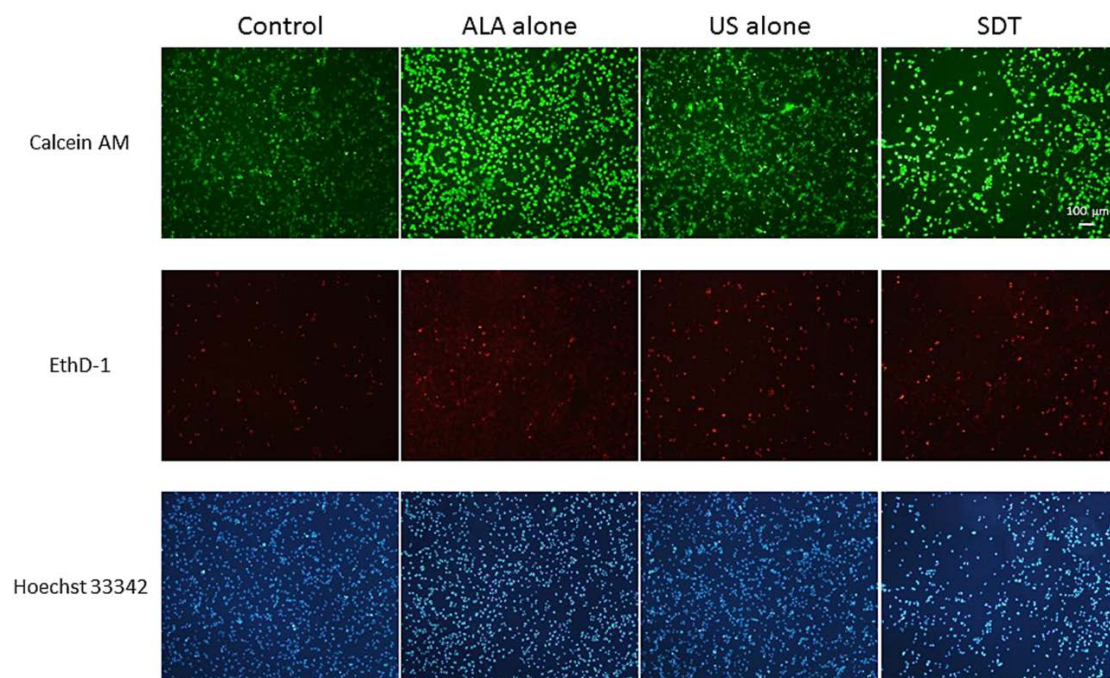


図 24 C6 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 30 秒間) 治療 24 時間後の各群の蛍光写真  
上段: Calcein AM、中段: EthD-1、下段: Hoechst33342  
左から、コントロール群、ALA 単独群、超音波照射単独群、SDT 群

【考察】SDT 群と他群の腫瘍生存率の開きを期待して照射強度は  $0.16 \text{ W/cm}^2$  に固定して照射時間を延ばすこととした。

ix) 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 60 秒間

【結果】照射単独群と SDT 群の腫瘍生存率に統計学的有意差が得られ、上記と比較して SDT 群の腫瘍生存率のさらなる低下を認めた (図 25, 26)。

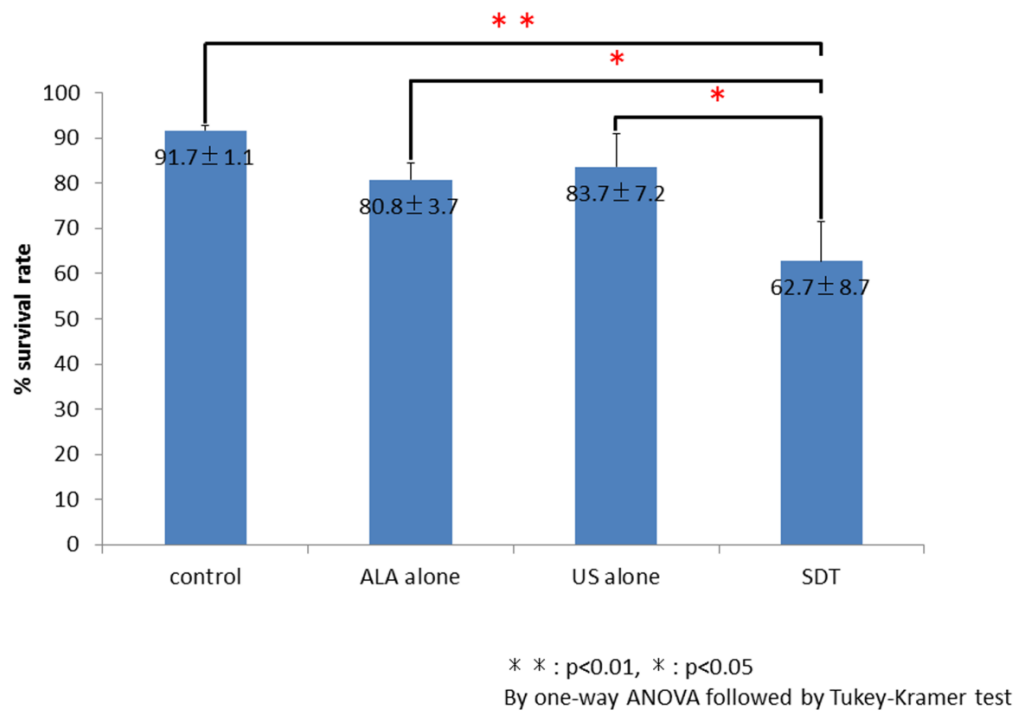


図 25 C6 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 60 秒間)

左から、コントロール群、ALA 単独群、超音波照射単独群、SDT 群  
中央値 ± 標準偏差で表記。

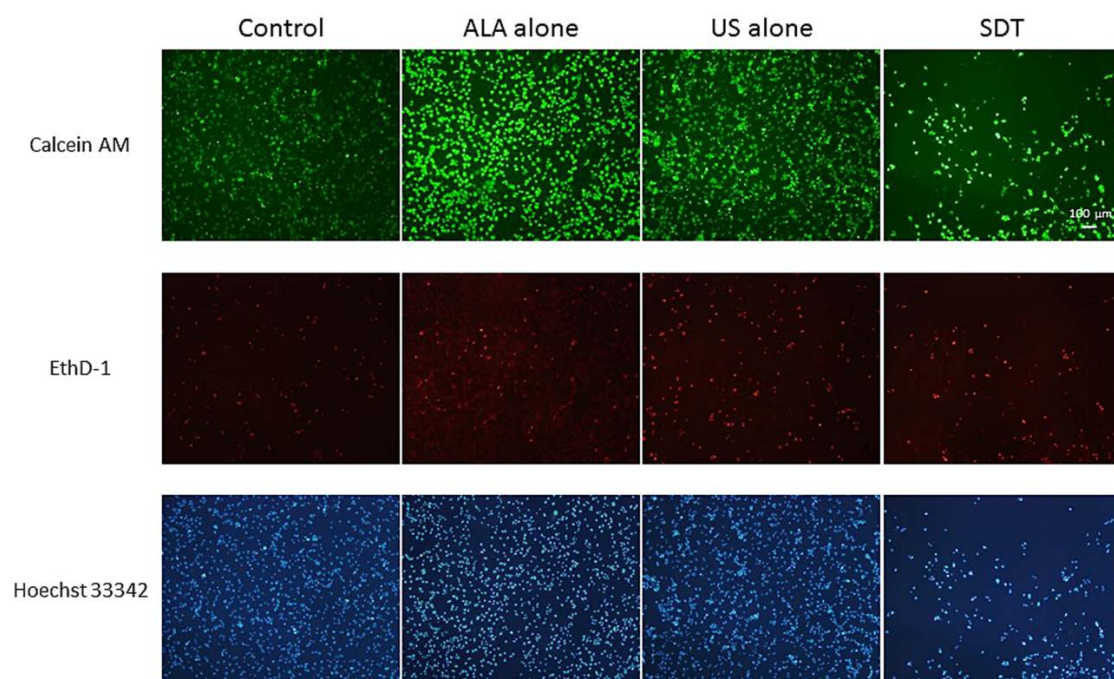


図 26 C6 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 60 秒間) 治療 24 時間後の各群の蛍光写真

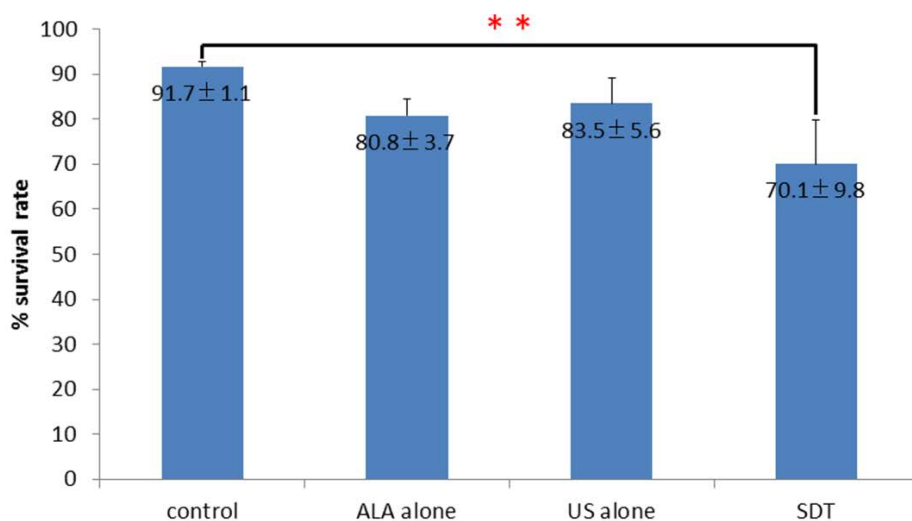
上段: Calcein AM、中段: EthD-1、下段: Hoechst33342

左から、コントロール群、ALA 単独群、超音波照射単独群、SDT 群

【考察】 さらに照射時間を延ばすこととした。

x) 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 90 秒間

【結果】 超音波照射単独群と比較して SDT 群で腫瘍生存率の低下は見られたものの、予想に反して統計学的有意差が得られるほどではなかった (図 27, 28)。



\*\* :  $p < 0.01$

By one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test

図 27 C6 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 90 秒間)

左から、コントロール群、ALA 単独群、超音波照射単独群、SDT 群

中央値 ± 標準偏差で表記。

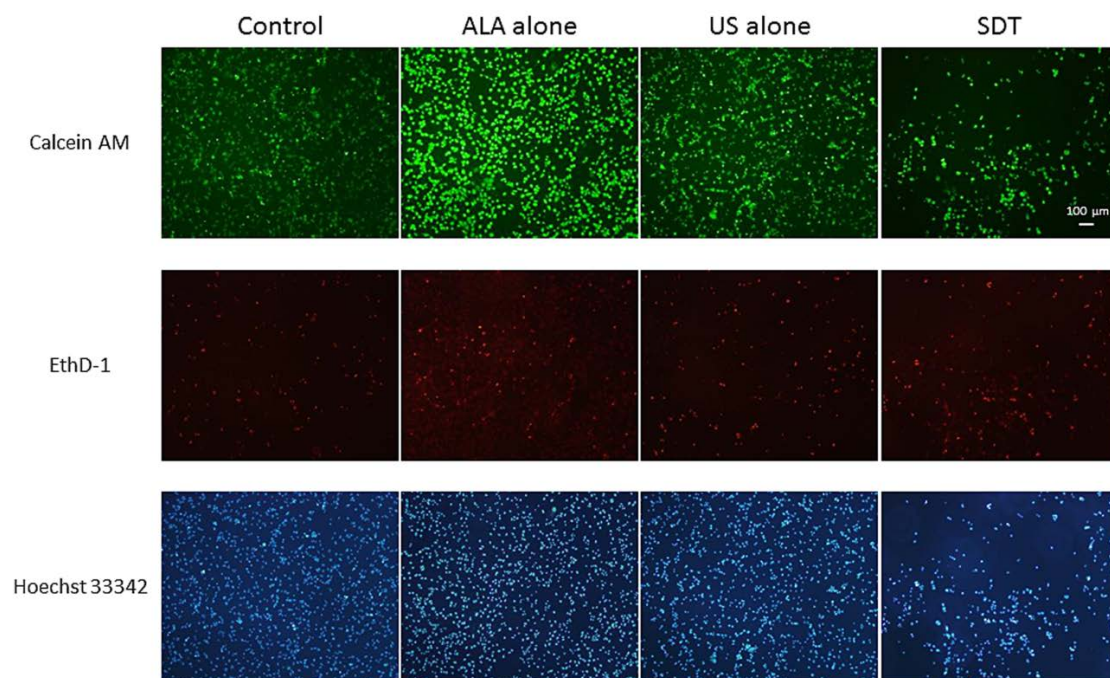
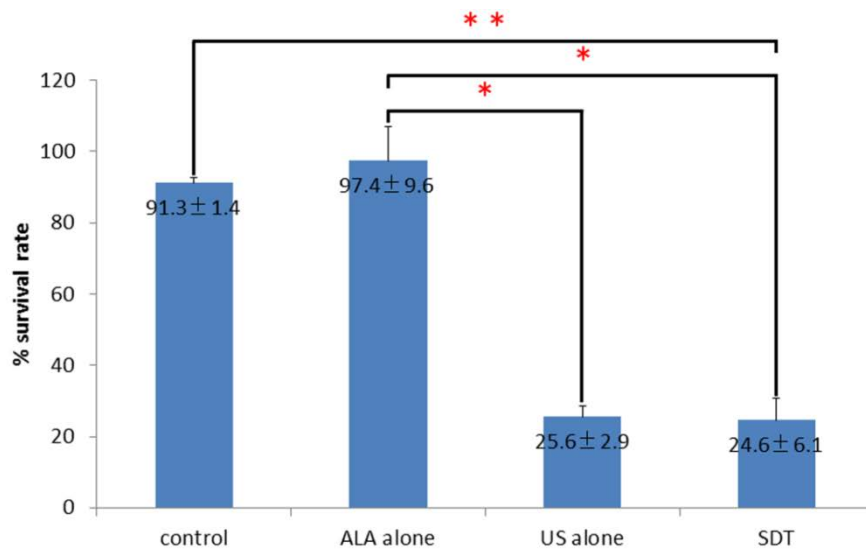


図 28 C6 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 90 秒間) 治療 24 時間後の各群の蛍光写真  
上段: Calcein AM、中段: EthD-1、下段: Hoechst33342  
左から、コントロール群、ALA 単独群、超音波照射単独群、SDT 群

【考察】さらに超音波照射強度を高くして、より適当な超音波照射条件を検索するため、照射強度を強めた。

xi) 照射強度:  $0.24 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 30 秒間

【結果】照射単独群で腫瘍生存率が 25 %程度まで低下し、さらに照射単独群と SDT 群で腫瘍生存率に統計学的有意差は得られなかった (図 29, 30)。



\*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$

By one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test

図 29 C6 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.24 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 30 秒間)

左から、コントロール群、ALA 単独群、超音波照射単独群、SDT 群  
中央値 ± 標準偏差で表記。

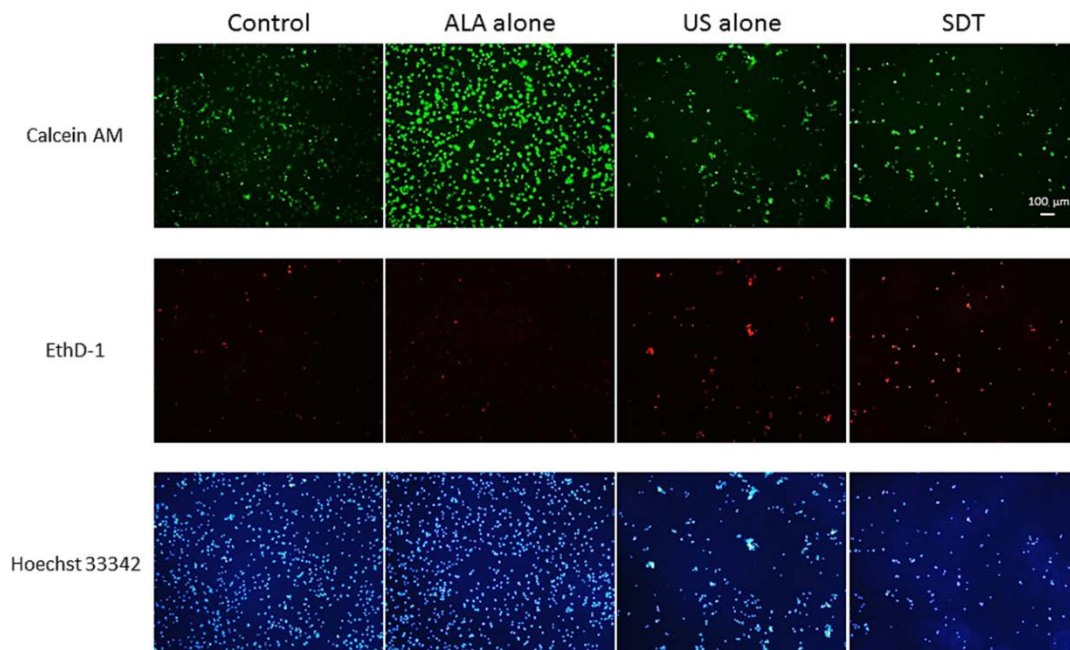


図 30 C6 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.24 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 30 秒間) 治療 24 時間後の各群の蛍光写真

上段: Calcein AM、中段: EthD-1、下段: Hoechst33342

左から、コントロール群、ALA 単独群、超音波照射単独群、SDT 群

【考察】上記条件では照射強度が強すぎたと考えられたため、以降の実験では腫瘍生存率に統計学的有意差が得られた照射強度  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間 60 秒間に超音波照射条件を固定した。

## ② PpIX-SDT

前述の ALA-SDT での超音波照射条件を踏襲して、C6 細胞株に対する PpIX-SDT を実施した。

【結果】ALA-SDT と同様に、他群と比較して SDT 群で有意な腫瘍生存率の低下を認めた (図 31, 32)。

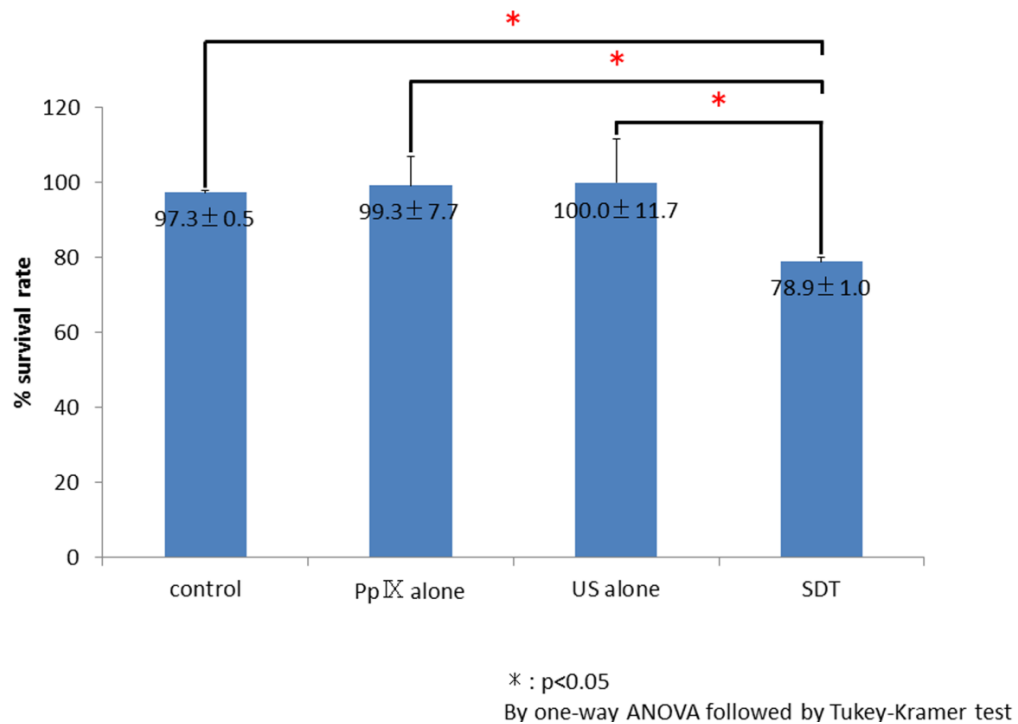


図 31 C6 細胞株に対する PpIX-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 60 秒間)

左から、コントロール群、PpIX 単独群、超音波照射単独群、SDT 群  
中央値 ± 標準偏差で表記。

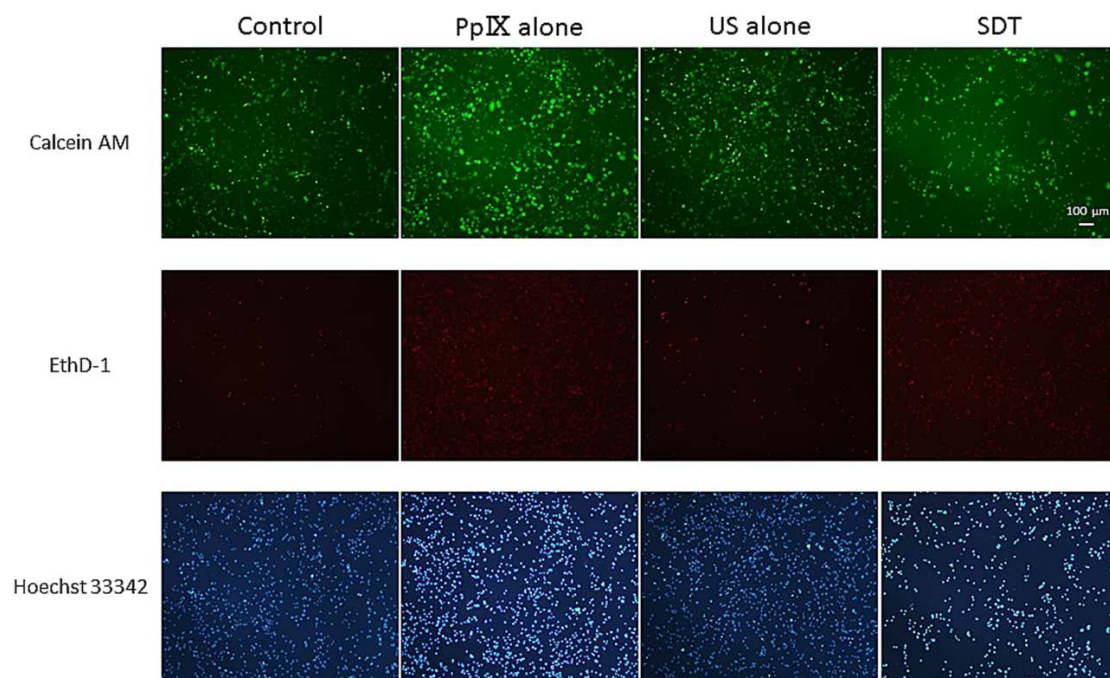


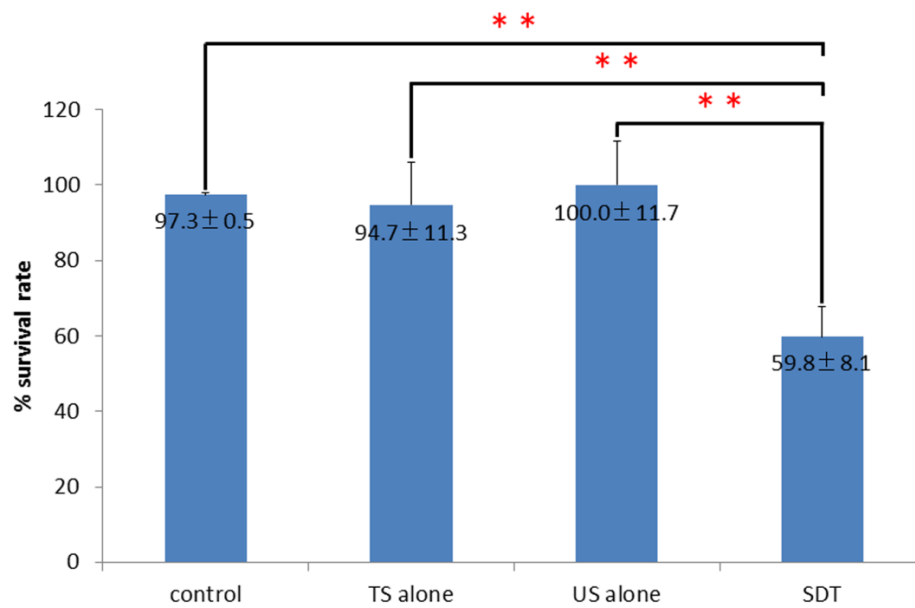
図 32 C6 細胞株に対する PpIX-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 60 秒間) 治療 24 時間後の各群の蛍光写真  
上段: Calcein AM、中段: EthD-1、下段: Hoechst33342  
左から、コントロール群、PpIX 単独群、超音波照射単独群、SDT 群

【考察】本実験での条件下において PpIX-SDT に関しても ALA-SDT とほぼ同様の抗腫瘍効果が得られた。

### ③ TS-SDT

同様に C6 細胞株に対する TS-SDT を実施した。

【結果】前 2 者と同様、他群と比較して SDT 群で有意な腫瘍生存率の低下を認めた (図 33, 34)。



\* \* :  $p < 0.01$

By one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test

図 33 C6 細胞株に対する TS-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 60 秒間)

左から、コントロール群、TS 単独群、超音波照射単独群、SDT 群  
中央値 ± 標準偏差で表記。

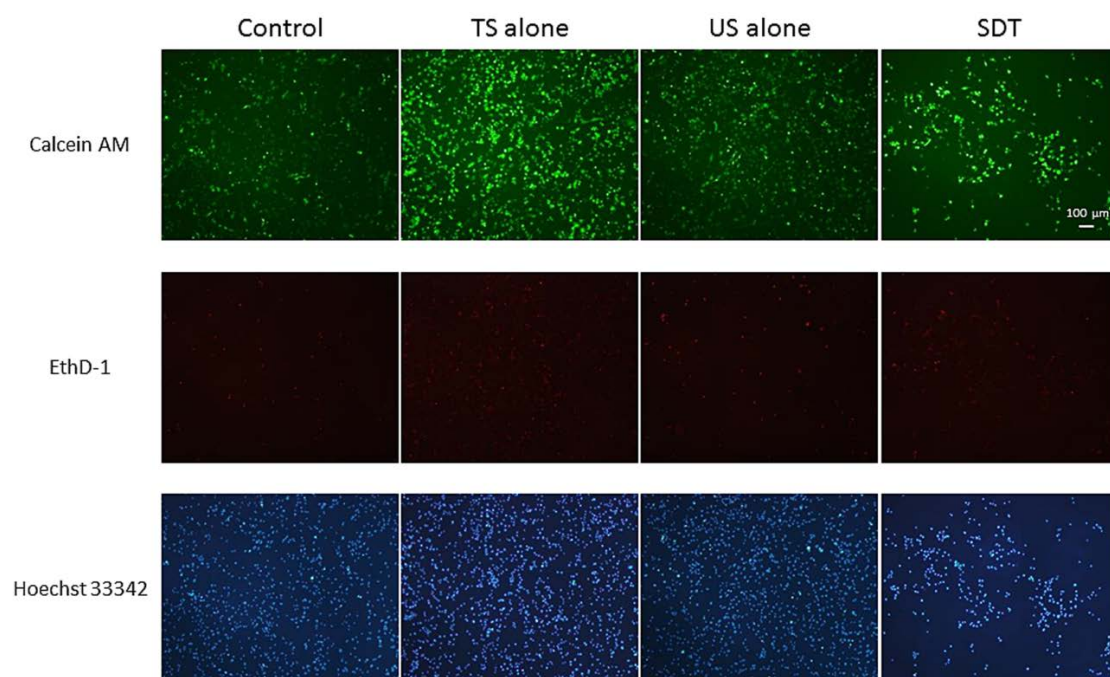


図 34 C6 細胞株に対する TS-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 60 秒間) 治療 24 時間後の各群の蛍光写真

上段: Calcein AM、中段: EthD-1、下段: Hoechst33342

左から、コントロール群、TS 単独群、超音波照射単独群、SDT 群

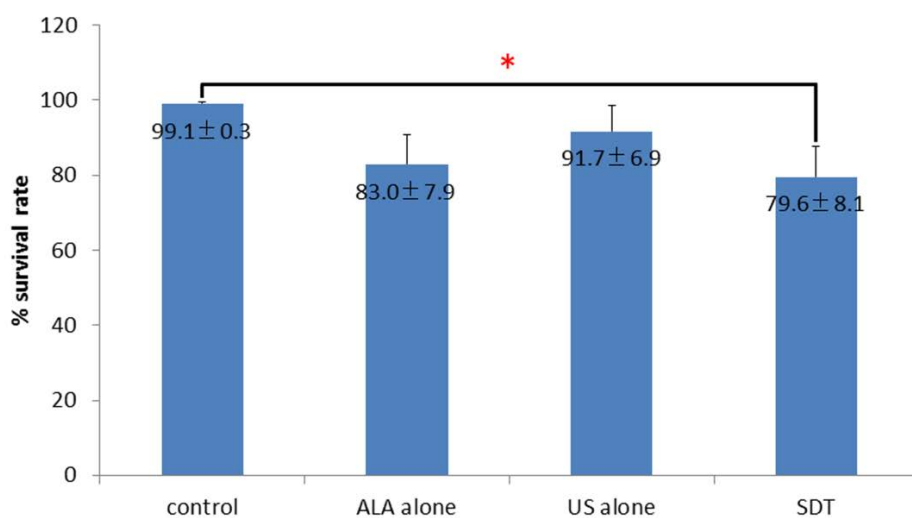
【考察】前 2 者と比較すると、本実験条件下においては SDT 群の腫瘍生存率の低下が最も低かった。

## I b. U87MG 細胞株

### ① ALA-SDT

同様に U87MG 細胞株に対する ALA-SDT を実施した。

【結果】コントロール群と SDT 群の腫瘍生存率に統計学的有意差が得られたものの、他の群間では腫瘍生存率に統計学的有意差が得られなかった (図 35, 36)。



\* :  $p < 0.05$

By one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test

図 35 U87MG 細胞株に対する ALA-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 60 秒間)

左から、コントロール群、ALA 単独群、超音波照射単独群、SDT 群  
中央値 ± 標準偏差で表記。

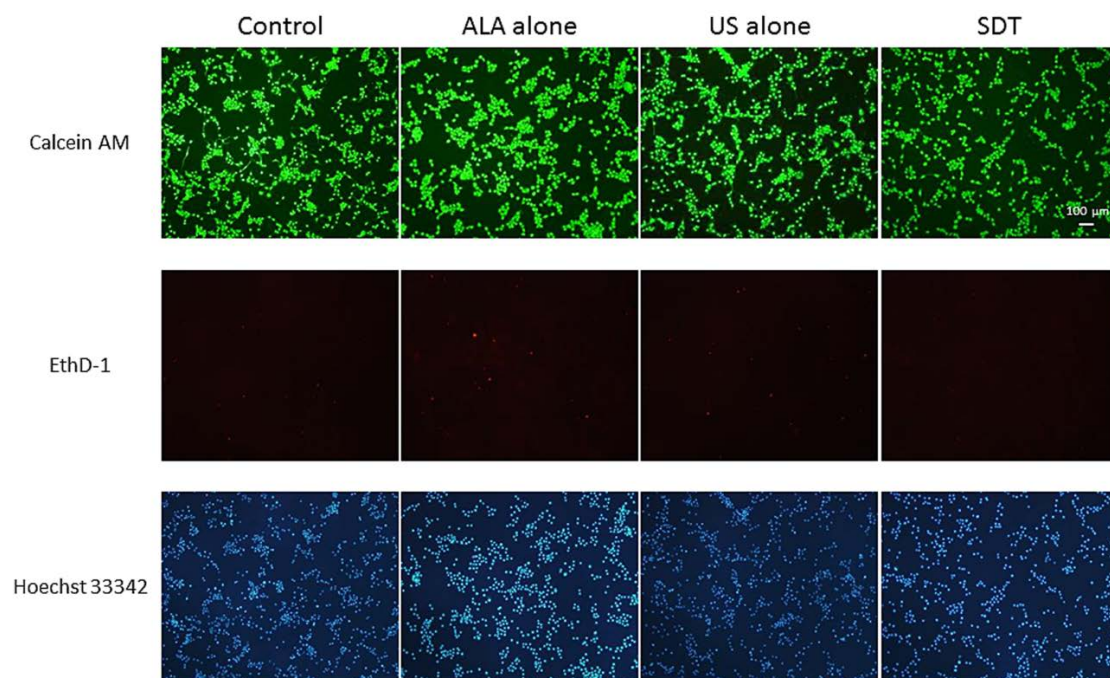


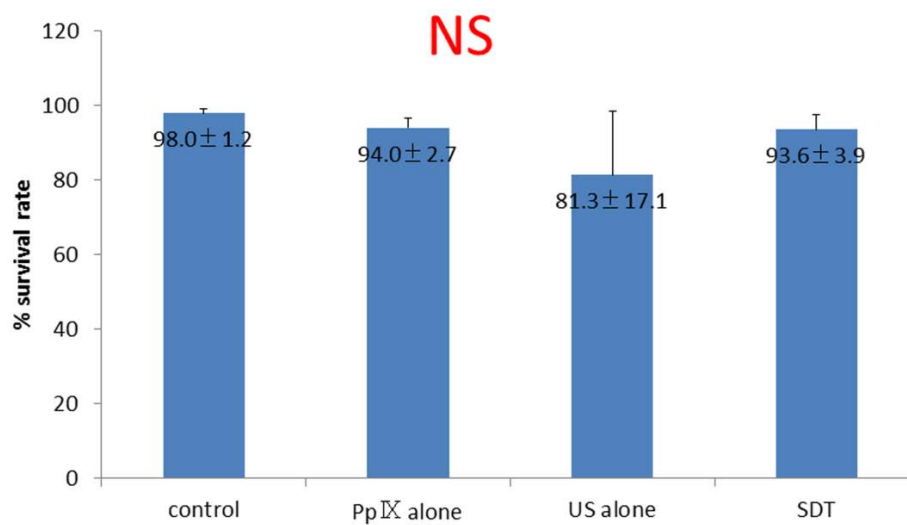
図36 U87MG細胞株に対するALA-SDTの抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 60秒間) 治療24時間後の各群の蛍光写真  
上段: Calcein AM、中段: EthD-1、下段: Hoechst33342  
左から、コントロール群、ALA 単独群、超音波照射単独群、SDT 群

【考察】超音波照射条件ならびにALAとの共培養条件は一定であるにも関わらず、C6細胞株とU87MG細胞株の各細胞株間での抗腫瘍効果の違いに関して、何らかの因子の関与が示唆された。詳細な考察は次項に譲る。

## ② PpIX-SDT

同様に U87MG 細胞株に対する PpIX-SDT を実施した。

【結果】いずれの群間においても統計学的有意差は得られなかった (図 37, 38)。



NS: Not Significant

By one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test

図 37 U87MG 細胞株に対する PpIX-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度: 0.16 W/cm<sup>2</sup>、照射時間: 60 秒間)

左から、コントロール群、PpIX 単独群、超音波照射単独群、SDT 群  
中央値 ± 標準偏差で表記。

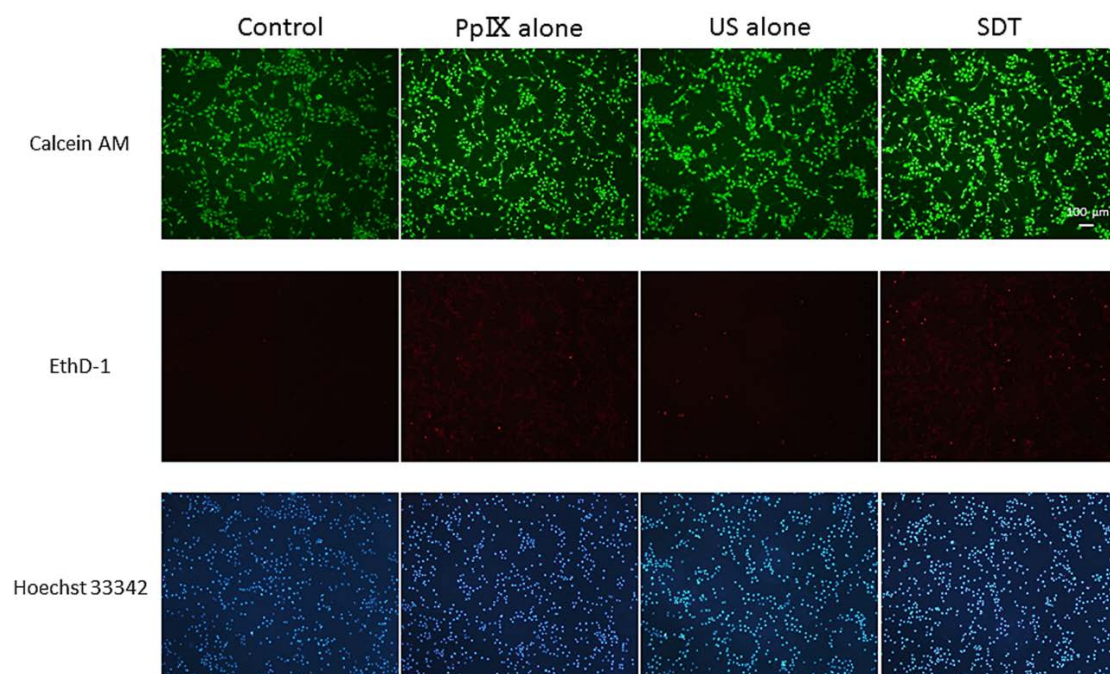


図 38 U87MG 細胞株に対する PpIX-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度: 0.16 W/cm<sup>2</sup>、照射時間: 60 秒間) 治療 24 時間後の各群の蛍光写真  
上段: Calcein AM、中段: EthD-1、下段: Hoechst33342

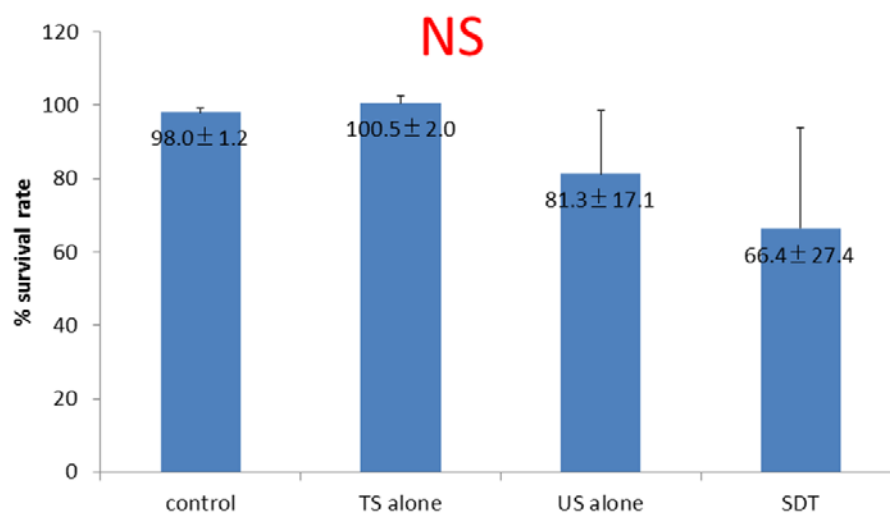
左から、コントロール群、PpIX 単独群、超音波照射単独群、SDT 群

【考察】 上記と同様。

### ③ TS-SDT

同様に U87MG 細胞株に対する TS-SDT を実施した。

【結果】 上記と同様、いずれの群間においても統計学的有意差は得られなかった (図 39, 40)。



NS: Not Significant

By one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test

図 39 U87MG 細胞株に対する TS-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 60 秒間)

左から、コントロール群、TS 単独群、超音波照射単独群、SDT 群  
中央値 ± 標準偏差で表記。

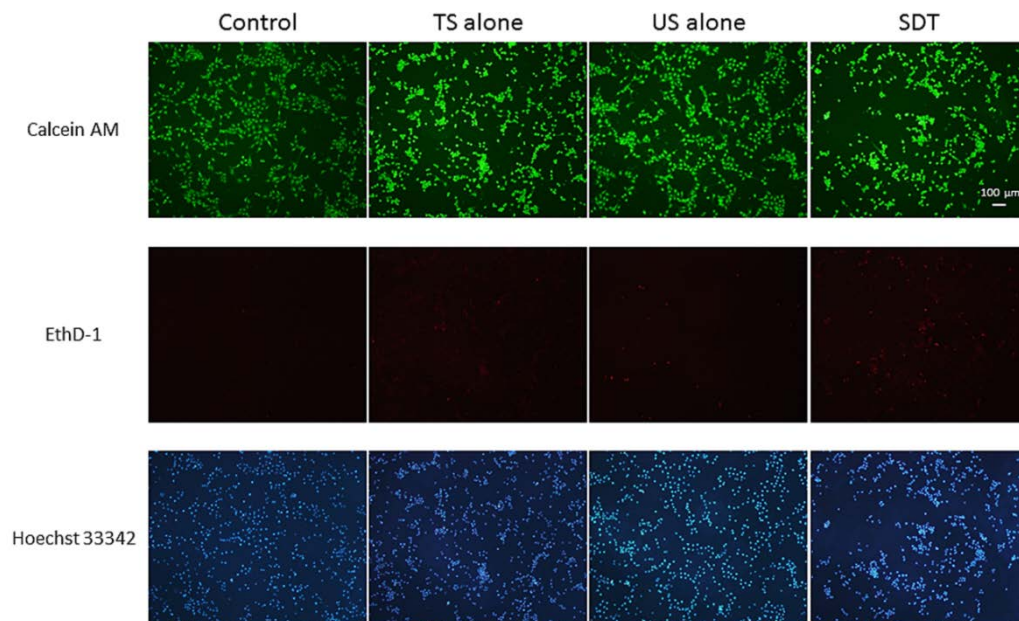


図 40 U87MG 細胞株に対する TS-SDT の抗腫瘍効果 (超音波照射条件: 照射強度:  $0.16 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間: 60 秒間) 治療 24 時間後の各群の蛍光写真

【考察】 上記と同様。

上段: Calcein AM、中段: EthD-1、下段: Hoechst33342

左から、コントロール群、TS 単独群、超音波照射単独群、SDT 群

## II. 生細胞/死細胞の評価

Calcein AM/Ethidium homodimer costaining kitを用いた生細胞/死細胞の評価は上述の如く抗腫瘍効果の腫瘍生存率に代替したため、本項の記載は前項に譲り割愛する。

## III. ALA-SDTによる細胞障害機序の評価

### IIIa. C6細胞株

【結果】 C6細胞株に対するALA-SDTにおいてコントロール群と比較して超音波照射単独群とSDT群で早期および後期アポトーシス細胞の割合が高かった (コントロール群 v.s. 超音波照射単独群 v.s. SDT群: 早期アポトーシス細胞の割合  $5.1 \% \text{ v.s. } 14.2 \% \text{ v.s. } 20.4 \%$ 、後期アポトーシスの割合  $2.8 \% \text{ v.s. } 6.6 \% \text{ v.s. } 7.6 \%$ )。SDT群においては超音波照射単独群と比較しても早期および後期アポトーシスの割合がともに高かった (図41)。

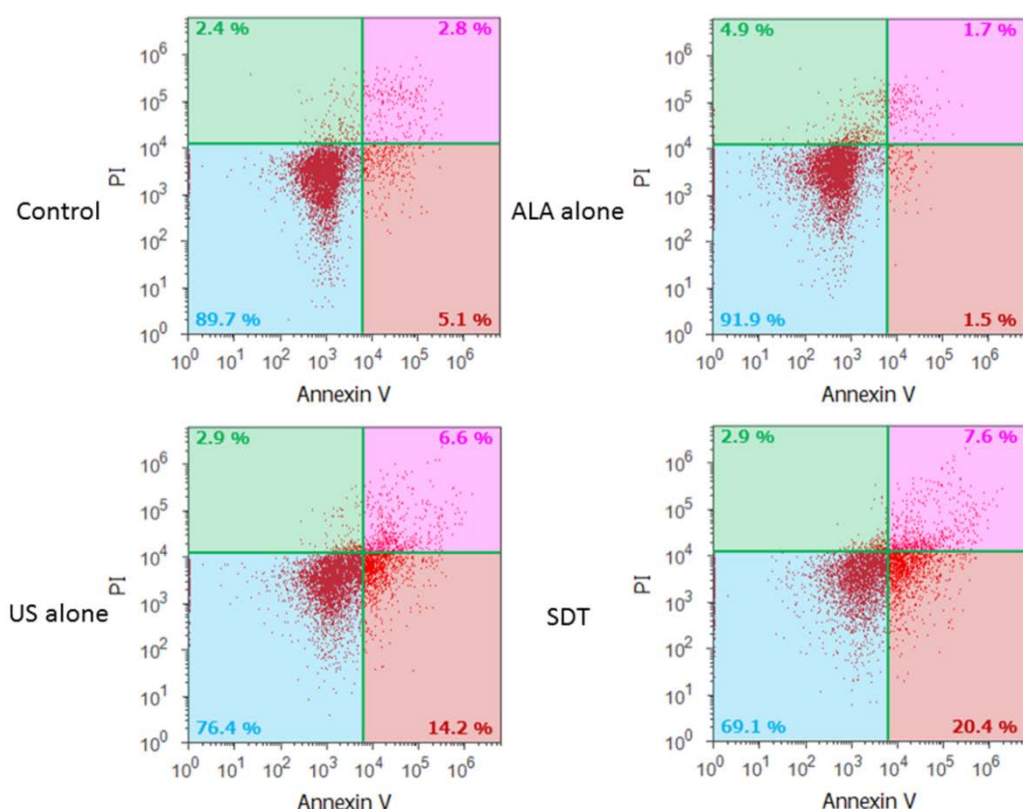


図41 C6細胞株に対するALA-SDTの細胞機序の評価 (超音波照射条件: 照射強度: 0.16 W/cm<sup>2</sup>、照射時間: 60秒間)

左上: コントロール群、右上: ALA単独群、左下: 超音波照射単独群、右下: SDT群

各図の解析結果はAnnexin-V/PI-の細胞群 (左下) を生細胞、Annexin-V+/PI-の細胞群 (右下) を早期アポトーシス細胞、Annexin-V+/PI+の細胞群 (右上) を後期アポトーシス細胞、Annexin-V-/PI+ (左上) の細胞群をネクローシス細胞と評価した。

【考察】C6細胞株に対するALA-SDTの主な細胞障害機序はアポトーシスであることが示唆された。またC6細胞株に関しては本実験で用いた超音波照射条件下では超音波照射単独のみでアポトーシスが誘導されることが確認された。またALAの投与によってアポトーシス細胞がさらに増加しており、これは前述のALA-SDT群における腫瘍生存率の低下とも矛盾はなかった。

### III b. U87MG細胞株

【結果】U87MG細胞株に対するALA-SDTにおいてコントロール群と比較して超音波照射単独群とSDT群で主に後期アポトーシス細胞の割合が高かった (コントロール群 v.s. 超音波照射単独群 v.s. SDT群: 2.6 % v.s. 10.8 % v.s. 8.0 %)。一方、後期アポトーシスの割合は群間で明らかな違いは認めなかった (同様に3.4 % v.s. 4.5 % v.s. 4.3 %)(図42)。

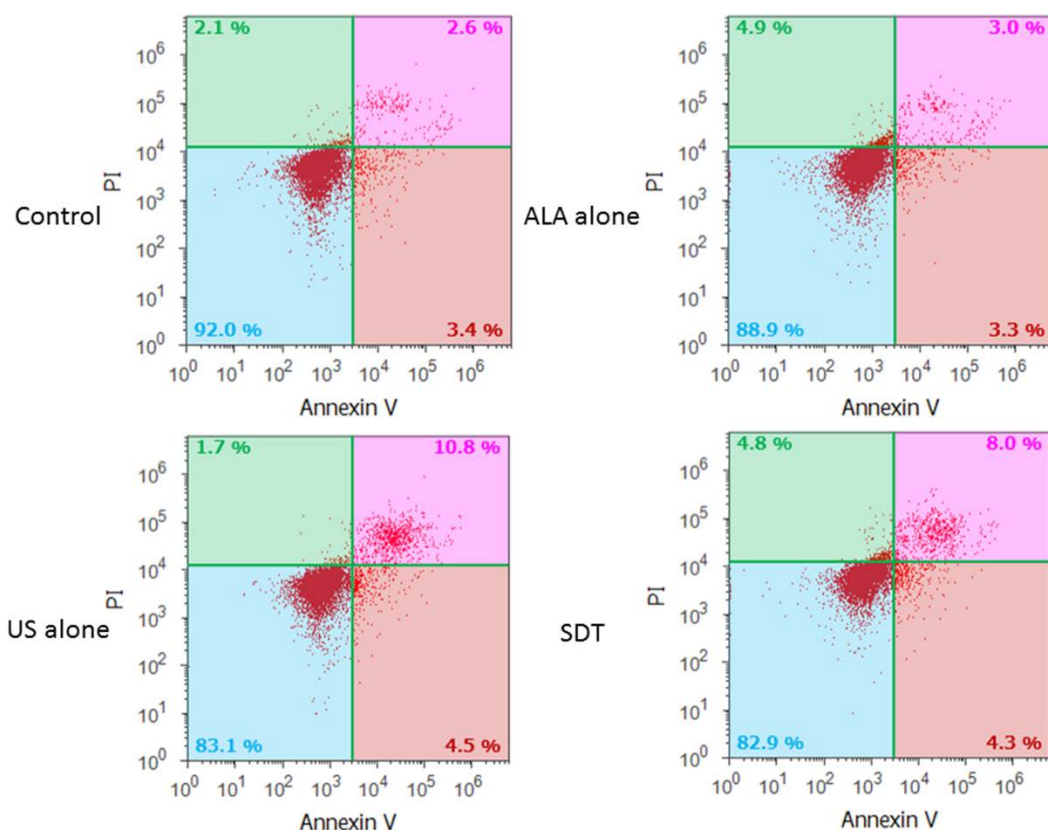


図42 U87MG細胞株に対するALA-SDTの細胞機序の評価 (超音波照射条件: 照射強度: 0.16 W/cm<sup>2</sup>、照射時間: 60秒間)

左上: コントロール群、右上: ALA単独群、左下: 超音波照射単独群、右下: SDT群

各図の解析結果はAnnexin-V-/PI-の細胞群 (左下) を生細胞、Annexin-V+/PI-の細胞群 (右下) を早期アポトーシス細胞、Annexin-V+/PI+の細胞群 (右上) を後期アポトーシス細胞、Annexin-V-/PI+ (左上) の細胞群をネクロシス細胞と評価した。

【考察】前述のC6細胞株と異なり、U87MG細胞株においては本実験条件下では超音波照射単独の主な細胞障害機序が後期アポトーシスであることが確認された。また超音波照射単独群とSDT群でアポトーシス細胞の割合に大きな違いはなく、前述の腫瘍生存率の結果と矛盾はなかった。

## 考察

ラット神経膠腫細胞株C6を対象としたALA-SDTの抗腫瘍効果の検証において、腫瘍生存率の低下が確認され、その細胞障害機序はアポトーシスが主体であることが立証された。本実験系においては照射強度 $0.2 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間60秒間の超音波照射条件で最大の抗腫瘍効果が得られた。またC6細胞株に対するPpIX-SDT、TS-SDTも同様の結果であった。

この結果を受けて、ヒト膠芽腫細胞株U87MGに対しても同様に上記超音波照射条件下に各音響感受性物質を用いたSDTを実施したが、ALA-SDTでのコントロール群との比較を除いて、いずれの音響感受性物質を用いたSDT群での腫瘍生存率に統計学的有意差が得られなかった (図43)。

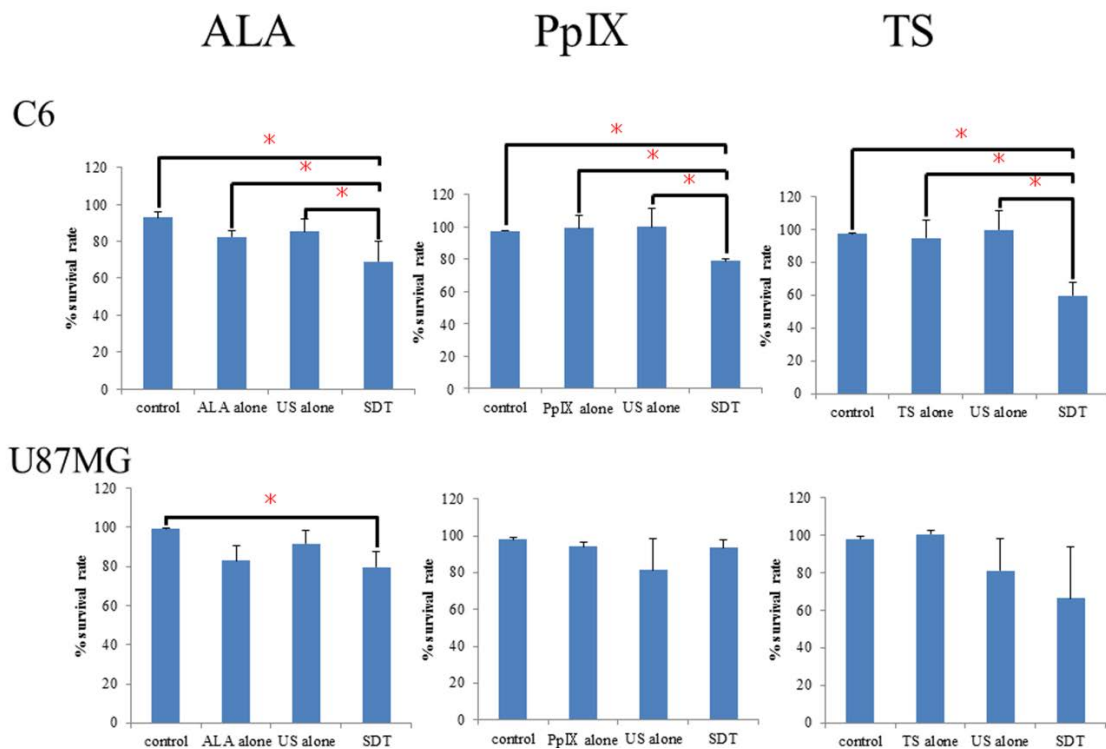


図43 C6細胞株とU87MG細胞株に対するALA-SDT、PpIX-SDT、TS-SDTの抗腫瘍効果の比較

上段: C6細胞株、下段: U87MG細胞株

左から、ALA-SDT、PpIX-SDT、TS-SDT

各図において、左から、コントロール群、ALA 単独群、超音波照射単独群、SDT 群

中央値±標準偏差で表記。

各細胞株と各音響感受性物質を共培養（各音響感受性物質濃度：ALA 200 µg/mL、PpIX 1.0 µg/mL、TS 30 µg/mL、共培養時間：各4時間）を行った後、細胞内の音響感受性物質の相対的な蛍光強度をフローサイトメーターを用いて解析したところ、C6細胞株と比較してU87MG細胞株ではコントロール群と比較して各音響感受性物質の相対的な蛍光強度が明らかに低下していた（図12）。以上より細胞内に蓄積した各音響感受性物質がSDTによる抗腫瘍効果に関与していることが示唆された。実際にポルフィリン誘導体の細胞内からの排泄を調整するATP-binding cassette sub-family G member 2 (ABCG2) トランスポーターの働きを阻害することで、細胞内の音響感受性物質の濃度を高めてSDTによる抗腫瘍効果を増強させる試みは既になされている<sup>22</sup>。

さらに悪性神経膠腫は組織学的特性が不均一であることが知られており、実臨床においてもWorld Health Organization (WHO) グレードが同一の腫瘍においても術中蛍光診断での腫瘍蛍光の程度が検体によって異なることはよく経験する。今後、腫瘍細胞の根絶と神経機能の維持という相反する課題を克服するためには、より効率的に音響感受性物質を腫瘍細胞内に蓄積させる必要があり、さらなる検討が必要と考えられる。

SDTの抗腫瘍効果は超音波照射強度や超音波照射時間をはじめ、音響感受性物質の濃度やその共培養時間、さらには細胞内の音響感受性物質の局在など多種の要素が密接に関与することが知られている。

前述のようにALA由来の内因性PpIXは主にミトコンドリアで代謝される。このため一般的に内因性PpIXはミトコンドリアに集積される一方、外的に取り込まれた外因性PpIXは細胞膜に集積されとの報告がある<sup>13</sup>。またTSは主にリソソームに集積することが報告されている<sup>7</sup>。しかしながら本実験での共培養条件下ではC6細胞株に蓄積した内因性PpIXと外因性PpIXはともに細胞縁（細胞膜）に（図8, 9）、またTSは細胞質内にびまん性に集積（図10）しており、各音響感受性物質との共培養条件や用いる細胞株の違いによっても細胞内の音響感受性物質の局在は異なっていた。このため最適な治療条件を検索することは非常に困難であることが想定された。

近年、本態性振戦や Parkinson 病、神経因性疼痛など機能脳神経外科領域において、いくつかの国際共同試験により MRI ガイド下収束超音波照射装置 (ExAblate<sup>®</sup> Neuro; InSightec, Haifa, Israel) が導入されている。本機器は超音波の『熱的作用』を利用した定位的な組織凝固をその基本原理としており、深部脳刺激療法に代わる新たな低侵襲治療方法として注目されている<sup>23</sup>。

Magnetic resonance imaging (MRI) を用いて経頭蓋的に照射部位を任意に設定でき、かつ組織温度を MRI thermography を用いてリアルタイムに測定可能である。また全身麻酔が不要であるため、臨床的あるいは画像的治療効果が直ちにフィードバックされる。さらには放射線を利用しないため繰り返しの実施が可能である点も優れている。

最近、深部の再発悪性神経膠腫を対象として本機器を用いた第1相試験が行われ、その安全性が示された。しかしながら実際には腫瘍の局所制御が得られるほどの腫瘍ボリュームの縮小に関しては、周囲正常脳組織へ影響を考慮した場合、本機器が『熱的作用』を用いている点で懐疑的であり、更なる技術的な改良が必要であることは疑いようがない。ここで我々は充実性腫瘍に対してより低侵襲な局所治療を達成するため本機器を『非熱的作用』つまり SDT に応用できる可能性について考えた。

超音波照射によって生じるイナーシャルキャビテーションと呼ばれる細胞膜の破壊を引き起こすずり応力の発生には閾値が存在し、その閾値以下とされる  $0.3 \text{ W/cm}^2$  以下の低強度の超音波照射単独で腫瘍細胞のアポトーシスが誘導されることは知られており<sup>24</sup>、Zhang らは C6 細胞株において底強度超音波照射によって誘導されるアポトーシスは caspase-3、Bcl-2、survivin を介したものであると示した<sup>25</sup>。本研究においても  $0.16 \text{ W/cm}^2$  (60 秒間) という低強度の超音波照射単独治療によって悪性神経膠腫細胞株のアポトーシスを誘導することを確認した。また ALA、PpIX および TS によって、そのアポトーシス誘導が増強されることが立証されたことから、本機器の超音波照射出力を周囲正常脳組織への影響が少ない低強度に設定することによって、本機器を『非熱的作用』に応用することは技術的には十分可能と確信している。

神経膠腫は正常脳に浸潤性に広がり、組織性状や活動性が不均一であることが知られている。MRIは形態学的情報を表すには有用であるが浸潤の程度や活動性を精確に捉えることはできず、術前MRIの造影領域のみの摘出を目的とした手術には限界がある。このため近年はpositron emission tomography (PET)、特にアミノ酸トレーサーである<sup>11</sup>CメチオニンPETが腫瘍浸潤の程度や代謝を如実に表すとして、我々も臨床での有用性を示してきた<sup>26</sup>。

他方、ALAを用いた術中蛍光診断によって腫瘍摘出度が向上し、悪性神経膠腫の無増悪生存期間 (progression free survival: PFS) に寄与したとの欧州での大規模臨床試験の結果<sup>10</sup>は、ALAが組織の浸潤や活動性に応じて腫瘍細胞に取り込みがあることを示唆しており、ALAがメチオニンよりもさら

に治療に特化したPET用アミノ酸トレーサーとなり得ると考えられる。最近、ALAの誘導体であるMALA (5-amino-4-oxo hexanoic acid) に放射性同位元素<sup>11</sup>Cを付加し、高度の放射化学的純度を有する<sup>11</sup>C-MALAが自動合成できることが報告されており<sup>27</sup>、本研究の結果と併せてALAを治療と治療計画の設定、さらには治療効果予測と多岐に渡って応用できる可能性が示唆される。

## 総括および結論

### ① 本研究全体から得られた新知見

- ・本研究は悪性神経膠腫細胞株（C6 細胞株、U87MG 細胞株）に対する ALA-SDT、PpIX-SDT、TS-SDT に関する *in vitro* での初めての報告である。

- ・C6 細胞株を対象とした各 SDT 群で、未治療群、各音響感受性物質単独群、超音波照射単独群と比較していずれも統計学的に有意な腫瘍生存率の低下が確認された。他方、U87MG 細胞株に関しては同一の実験条件ながら、いずれも統計学的に有意な抗腫瘍効果は得られなかった。

- ・フローサイトメトリーを用いた細胞内音響感受性物質量の半定量的解析の結果、同一の共培養条件下にも係わらず両細胞株間で各細胞内音響感受性物質の相対的蛍光強度、つまり細胞内への音響感受性物質の蓄積量に違いが認められた。いずれの音響感受性物質においても C6 細胞株と比較して U87MG 細胞株で相対的蛍光強度が低下していた。

- ・以上より各音響感受性物質の細胞内の取り込み量が各 SDT による抗腫瘍効果と相関していることが示唆された。

### ② 新知見の意義

- ・現時点で悪性神経膠腫に対する期待できる補助療法はない。SDT は深部の標的組織に対して選択的に、周囲正常組織に影響を与えることなく治療可能な治療手段であり、これまでに悪性神経膠腫細胞株に対する ALA-SDT、PpIX-SDT、TS-SDT の *in vitro* での報告はないことから、本研究の結果は ALA-SDT、PpIX-SDT、TS-SDT の悪性神経膠腫に対する新規補助療法としての有用性が示唆されるものであった。

- ・本邦における悪性神経膠腫の治療戦略として、ALA は術中蛍光診断薬として、また TS は PDT 薬として既に臨床応用されている薬剤である。よって SDT の音響感受性物質としてこれらの薬剤を応用することは临床上

も問題なく実現可能と考えられる。本実験結果を受けて、安全で確実な超音波照射機器および超音波照射条件が整えさえすれば、悪性神経膠腫に対するALA-SDTならびにTS-SDTを臨床にフィードバックすることは実現可能なものと考えられ、本研究は極めて臨床的価値は高いものと言える。経頭蓋超音波収束照射装置が臨床に導入されたことを受けて、SDTはさらに現実味のある治療方法に近づいた可能性が高い。

- ③ 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか
  - ・悪性神経膠腫を対象としたALA-SDT、PpIX-SDT、TS-SDTのin vivoでの抗腫瘍効果の検討（追試含む）。
  - ・ABCG2 トランスポーター阻害剤を併用するなど、細胞内音響感受性物質の取り込み量を増やすことで各SDTの抗腫瘍効果が増強するかの検証。
- ④ 今後の課題
  - ・超音波照射条件や音響感受性物質との共培養条件など、より最適な治療条件の検索は必須であると考えられる。

## 謝辞

本研究は独立行政法人日本学術振興会科研費 26670632 の助成を受けたものです。また本実験を遂行するにあたって多大なる技術的支援を賜りました北海道大学 大学院情報科学研究科 人間情報工学研究室の関根大輝様ならびに同学 大学院医学研究科 脳神経外科の四戸由美子様、長島理香様に深謝します。最後になりますが、研究を通じて活発な議論にお付き合い頂き、終始適切な助言を賜った同科の先生方にも併せて感謝の意を表します。

## 引用文献

- 1 Nakamura, H., Makino, K., Yano, S., Kuratsu, J. & Kumamoto Brain Tumor Research, G. Epidemiological study of primary intracranial tumors: a regional survey in Kumamoto prefecture in southern Japan--20-year study. *Int. J. Clin. Oncol.* **16**, 314-321
- 2 Chinot, O. L. *et al.* Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *The New England journal of medicine* **370**, 709-722
- 3 Gilbert, M. R. *et al.* A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *The New England journal of medicine* **370**, 699-708
- 4 Wilson, C. B. Glioblastoma: the past, the present, and the future. *Clinical neurosurgery* **38**, 32-48 (1992).
- 5 Kamoshima, Y., Terasaka, S., Kuroda, S. & Iwasaki, Y. Morphological and histological changes of glioma cells immediately after 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy. *Neurol. Res.* **33**, 739-746,
- 6 Yamaguchi, S. *et al.* Novel photodynamic therapy using water-dispersed TiO<sub>2</sub>-polyethylene glycol compound: evaluation of antitumor effect on glioma cells and spheroids in vitro. *Photochem. Photobiol.* **86**, 964-971,
- 7 Muragaki, Y. *et al.* Phase II clinical study on intraoperative photodynamic therapy with talaporfin sodium and semiconductor laser in patients with malignant brain tumors. *Journal of neurosurgery* **119**, 845-852,
- 8 Rosenthal, I., Sostaric, J. Z. & Riesz, P. Sonodynamic therapy--a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **11**, 349-363
- 9 Chen, H. *et al.* Recent progress in development of new sonosensitizers for sonodynamic cancer therapy. *Drug discovery today* **19**, 502-509,
- 10 Stummer, W. *et al.* Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* **7**, 392-401,
- 11 Lv, Y. *et al.* Low-intensity ultrasound combined with 5-aminolevulinic acid administration in the treatment of human tongue squamous carcinoma. *Cell*

- Physiol. Biochem.* **30**, 321-333
- 12 Song, W., Cui, H., Zhang, R., Zheng, J. & Cao, W. Apoptosis of SAS cells induced by sonodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid sonosensitizer. *Anticancer research* **31**, 39-45 (2011).
  - 13 Wang, X., Wang, P., Tong, W. & Liu, Q. Comparison of pharmacokinetics, intracellular localizations and sonodynamic efficacy of endogenous and exogenous protoporphyrin IX in sarcoma 180 cells. *Ultrasonics* **50**, 803-810
  - 14 Li, Y. *et al.* Apoptosis induced by sonodynamic treatment by protoporphyrin IX on MDA-MB-231 cells. *Ultrasonics* **52**, 490-496
  - 15 Su, X., Li, Y., Wang, P., Wang, X. & Liu, Q. Protoporphyrin IX-mediated sonodynamic action induces apoptosis of K562 cells. *Ultrasonics* **54**, 275-284
  - 16 Ohmura, T. *et al.* Sonodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid and focused ultrasound for deep-seated intracranial glioma in rat. *Anticancer research* **31**, 2527-2533 (2011).
  - 17 Jeong, E. J. *et al.* Sonodynamically induced antitumor effects of 5-aminolevulinic acid and fractionated ultrasound irradiation in an orthotopic rat glioma model. *Ultrasound in medicine & biology* **38**, 2143-2150
  - 18 Yumita, N., Han, Q. S., Kitazumi, I. & Umemura, S. Sonodynamically-induced apoptosis, necrosis, and active oxygen generation by mono-l-aspartyl chlorin e6. *Cancer science* **99**, 166-172
  - 19 Yumita, N. *et al.* Sonodynamically-induced antitumor effect of mono-l-aspartyl chlorin e6 (NPe6). *Anticancer research* **31**, 501-506 (2011).
  - 20 Kondo, T. & Yoshii, G. Effect of intensity of 1.2 MHz ultrasound on change in DNA synthesis of irradiated mouse L cells. *Ultrasound in medicine & biology* **11**, 113-119 (1985).
  - 21 Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., Ohkura, Y. & Ueno, K. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta* **44**, 1299-1305 (1997).
  - 22 Xu, Z. Y. *et al.* The ABCG2 transporter is a key molecular determinant of the efficacy of sonodynamic therapy with Photofrin in glioma stem-like cells. *Ultrasonics* **53**, 232-238

- 23 Lipsman, N. *et al.* MR-guided focused ultrasound thalamotomy for essential tremor: a proof-of-concept study. *Lancet Neurol.* **12**, 462-468
- 24 Tachibana, K., Feril, L. B., Jr. & Ikeda-Dantsuji, Y. Sonodynamic therapy. *Ultrasonics* **48**, 253-259
- 25 Zhang, Z. *et al.* Low frequency and intensity ultrasound induces apoptosis of brain glioma in rats mediated by caspase-3, Bcl-2, and survivin. *Brain Res.* **1473**, 25-34
- 26 Yamaguchi, S. *et al.* Detection of histological anaplasia in gliomas with oligodendroglial components using positron emission tomography with (18)F-FDG and (11)C-methionine: report of two cases. *Journal of neuro-oncology* **101**, 335-341
- 27 Suzuki, C. *et al.* Synthesis and in vitro cellular uptake of 11C-labeled 5-aminolevulinic acid derivative to estimate the induced cellular accumulation of protoporphyrin IX. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 4567-4570