



Title	陽子線とHypoxic cell sensitizer併用における生物効果
Author(s)	馬嶋, 秀行; 安藤, 興一; 小池, 幸子 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1982, 42(4), p. 398-405
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/15166">https://hdl.handle.net/11094/15166</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 陽子線と Hypoxic cell sensitizer併用における生物効果

日本大学歯学部放射線科

馬嶋秀行

放射線医学総合研究所臨床研究部

安藤興一 小池幸子 古川重夫

放射線医学総合研究所物理研究部

平岡武 河内清光 金井達明

(昭和56年6月23日受付)

(昭和56年8月27日最終原稿受付)

### Biological Studies of Proton Irradiation Under Combination with a Hypoxic Cell Sensitizer

Hideyuki Majima<sup>1</sup>, Koichi Ando<sup>2</sup>, Sachiko Koike<sup>2</sup>, Shigeo Furukawa<sup>2</sup>, Takeshi Hiraoka<sup>3</sup>,  
Kiyomitsu Kawachi<sup>3</sup> and Tatsuaki Kanai<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Radiology, School of Dentistry, Nihon University, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Division of Clinical Research, National Institute of Radiological Sciences, Chiba, Japan

<sup>3</sup>Division of Physics, National Institute of Radiological Sciences, Chiba, Japan

---

Research Code No.: 407

---

Key Words: Proton, Hypoxic cell sensitizer, Early skin reaction, TGD time, TGF

---

Combination usage of proton irradiation with misonidazole was explored in order to obtain sensitizer enhancement ratio (SER) and therapeutic gain factor (TGF). Skin reaction in C3H mice was enhanced by administration of 1.0 mg/g misonidazole prior to single irradiation of proton beam with spread-out Bragg peak. The SER was 1.0 at dose 10 Gy and the enhancement by the drug was clearly observed at doses over 30 Gy. Magnitude of the enhancement ( $1.37 \pm 0.13$ ) was slightly higher than that after 200 kVp X-ray irradiation ( $1.33 \pm 0.15$ ). A transplanted squamous cell carcinoma in syngeneic mice responded excellently to the sensitizer. SER of  $1.64 \pm 0.19$  was obtained after proton doses ranging from 10 to 50 Gy, a value being slightly lower than that after X-ray ( $1.73 \pm 0.23$ ). Therapeutic gain factors obtained in our system were therefore 1.19 after 70 MeV proton beam and 1.29 after 200 kVp X-ray.

### 1. 緒言

放射線治療において、hypoxic cell の存在が重要な因子であることは、Grayにより1953年に初めて指摘され<sup>1)</sup>、以来、この hypoxic cell の致死率を上昇させるべく、reoxygenation を考慮した分割照射法、あるいは hyperbaric oxygen 療法、

また、中性子線、重粒子線などの高 LET 放射線療法、そして hypoxic cell sensitizer 併用法など、種々の方法が開発され、治療率向上の努力がなされている。

一方、放射線治療における治療線量の最大限度は正常組織が耐えうる線量である。正常組織に対

する照射線量は少ないほど好ましい。荷電粒子線は、 Bragg peak を持つ放射線であり、 そのすぐれた線量分布により、 正常組織に対する照射線量を軽減できる特徴を持つ。中でも陽子線はそれら荷電粒子線中最も良い線量分布を示す放射線である<sup>2)</sup>。 すなわち、 陽子線は、 最も腫瘍に限局して線量を集中でき、 かつ、 周囲の正常組織に対する線量を、 最も軽減できる放射線である。しかしながら、 その RBE は、 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  線を対照として1.0ないし1.2<sup>3-5)</sup> また、 X線を対照として0.8ないし1.0<sup>7-8)</sup> と、 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  線あるいはX線と比較して大きな違いを示していない。また、 OER も2.5前後<sup>9)</sup> と、 ほぼX線と等しい効果を示している。 すなわち、 中性子線、 重粒子線あるいは  $\pi$ -中間子線などの高 LET 放射線に比較し、 陽子線の hypoxic cell に対する致死効果は低いと思われる。

筆者らは、 最も良好な線量分布を有する陽子線と hypoxic cell sensitizer との併用が有効な治療法であるという想定のもとに、 両者併用の効果を検討した。

## 2. 材料及び方法

材料及び方法については、 すでに別に詳しく述べた<sup>8)</sup>ので、 簡単に述べると次の通りである。

実験動物—腫瘍系： 実験動物には、 放射線医学総合研究所（以下放医研）にて specific pathogen free の状態で育てられた C3H/HeMs Nrs ICR マウス12ないし14週齢の雄を用いた。 一つの実験点に対して6ないし8匹のマウスを用い、 一つの照射方法に40ないし60匹のマウスを用いた。 腫瘍はこの系のマウスに自然発生した扁平上皮癌細胞 (NRS1)<sup>9)10)</sup> の第7世代が実験に供された。 照射5日前に NRS1 の単細胞浮遊液を作製し、  $1.2 \times 10^5$  個の細胞をマウス右側下肢皮下に移植した。

照射方法： 照射は、 X線、 陽子線ともネンブタール麻酔下 ( $0.06\text{mg/g.b.w}$ ) にて行なった。

陽子線は、 放医研サイクロトロンより得られた 70MeV 陽子線を用いた。 陽子線照射の線量率は毎分 90Gy であり、 25mm のレンジモデュレーターを使用し、  $1\text{cm} \times 1\text{cm}$  の正方形 spot beam scanning method にて照射した。 照射野は  $3\text{cm} \times$

$18\text{cm}$  で、 6ないし8匹同時に照射した。 照射は、 マウス照射方向手前に  $15\text{mm}$  のルサイトをおき、  $25\text{cm}$  幅に広げた spread out Bragg peak (SOBP) の中央位置にて行なった。

X線は、 200kVp, 20mA, 0.5mm Al+0.5mm Cu, FSD 30cm であり、 線量率は、 每分2.4Gy であった。 腫瘍を移植した下肢部のみを  $2.5\text{cm}$  幅のドーナツ型照射野で6ないし8匹同時に照射した。

Misonidazole 水溶液の作製及び投与法： Misonidazole は日本ロッシュより提供されたものである。 照射当日、 Misonidazole を約  $37^\circ\text{C}$  に温められた滅菌済みの生理食塩水に搅拌しながら溶解し、  $10\text{mg/ml}$  Misonidazole 溶液を作製した。  $1\text{mg/g.b.w}$  の Misonidazole を照射開始前25分から50分以内に腹腔内投与した。

早期皮膚反応判定法： 除毛剤にてマウス下肢を脱毛し、 7日後、 右側下肢のみ照射した。 判定方法は、 相沢の方法<sup>11)</sup>によった。 觀察は、 照射後6日目から1日間隔にて35日目まで1人が行ない、 各グループの全マウスの皮膚反応スコアの平均値を Mean skin reaction とし、 算定した。

腫瘍増殖判定法： 照射は、 腫瘍移植後5日後に行なわれた。 腫瘍の計測は、 照射後6日目から1日間隔で200日まで1人が行なった。 腫瘍の大きさは、 縦、 横、 高さ、 各々 Amm, Bmm, Cmm を計測し、  $a \times b \times c \times \frac{\pi}{6}$  で腫瘍体積を算定した。

腫瘍体積が  $900\text{mm}^3$  (平均直径  $12\text{mm}$ ) になるまでの日数、 すなわち Tumor Growth (TG) time をコンピューターにより計算し求めた。 また対照として照射していない腫瘍の TG time を求め、 照射グループ腫瘍の TG time との差を得、 これを Tumor Growth delay (TGD) time とした。

SER 及び TGF 算定法： X線及び陽子線の Misonidazole 併用における増感比、 Sensitizer Enhancement Ratio (SER) は次式に従って算出された。

$$\text{SER (X)} = \frac{\text{dose x-ray without drug}}{\text{dose x-ray with drug}}$$

$$\text{SER (P)} = \frac{\text{dose Proton without drug}}{\text{dose Proton with drug}}$$

この式より得られた皮膚からの SER と、腫瘍からの SER との比から、治療効果改善比、Therapeutic Gain Factor (TGF) を次式のごとく算定した。

$$TGF = \frac{\text{SER from TGD time}}{\text{SER from mean skin reaction}}$$

### 3. 結 果

i) 皮膚反応について Misonidazole 併用照射後に観察した早期皮膚反応は Fig. 1 の線量効果関係曲線を示した。20Gy 以下では Misonidazole 併用群と照射単独群との間に差が認められなかつた。しかし、陽子線、X線とも 30Gy 以上で強い皮膚反応がおこり、薬剤による増感効果が明きらかとなつた。

次に皮膚反応の経日変化を Fig. 2 に示した。陽子線、X線単独照射では、どちらも同様な曲線を示しているが、全体的にやや陽子線の方が低いスコアを示している。一方、Misonidazole 併用における曲線では、30Gy までは同様の傾向を示しているが、40Gy 以上の線量ではX線に比較

し、陽子線の方が、皮膚反応スコアー下降の程度が小さく、すなわち治癒が遅れていた。この治療遅滞が Fig. 1 の陽子線40Gy 以上で大きな mean skin reaction の値をもたらした。

#### ii) 腫瘍について

次に、TGD time に及ぼす Misonidazole の増感効果を調べた。Fig. 3a と 3b は、それぞれ陽子線及びX線を用いた場合である。Misonidazole 併用により陽子線及びX線いずれの場合にも 20Gy 以上の線量域にて延長が認められた。すなわち、照射単独群では 20ないし 30Gy の線量域に break point があり、Oxic-hypoxic cell fraction の二相性を示していたが、Misonidazole 併用群には、こうした二相性は認められなかつた。また、陽子線40及び50Gy で8個中4個及び6個中6個の腫瘍が、X線でも同様に40Gy で5個中4個、50Gy で7個中7個の腫瘍が消失し、以後再発を示さなかつた(200日間)。照射単独群では、このような腫瘍消失は認められなかつた。Misonidazole 併用10Gy 以下では、しかし、こうした増感

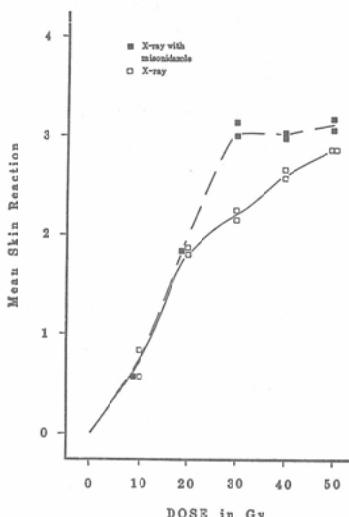
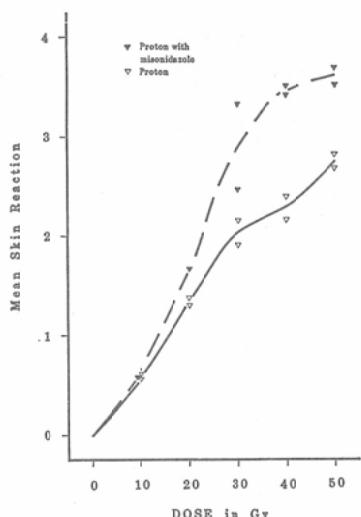


Fig. 1 Mean skin reaction of the hind limb (average from those among the 6th to 35th day after irradiation) as a function of radiation dose. Open ( $\blacktriangledown$ ) and solid ( $\blacktriangledown$ ) triangles indicate proton and proton with misonidazole, respectively (a). Open ( $\square$ ) and solid ( $\blacksquare$ ) squares indicate x-ray and x-ray with misonidazole, respectively (b). S.E.M., omitted from this figure, are less than 4% of the individual scores.

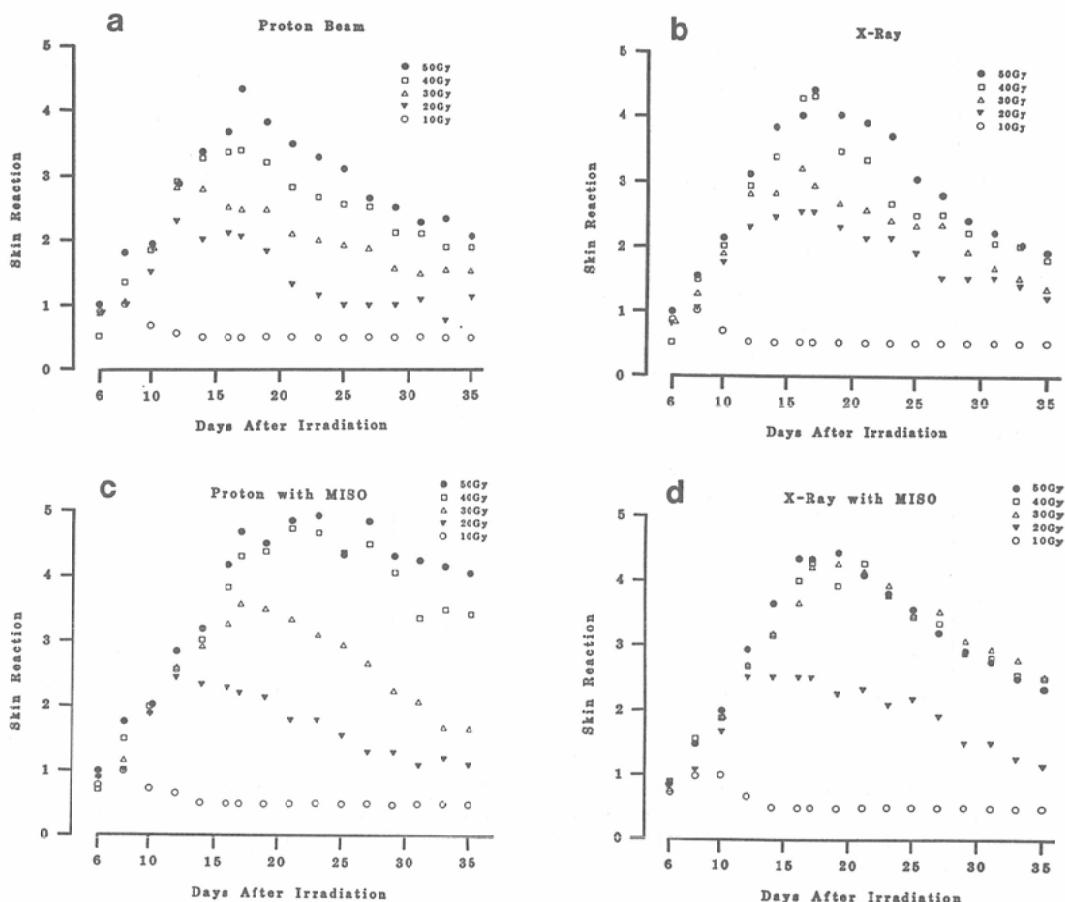


Fig. 2 Time course of skin reaction. Note that skin reaction remained high in groups received 40 and 50 Gy of proton beam with misonidazole (c).

効果は認められなかった。

### iii) SER 及び TGF

皮膚及び腫瘍から得られた陽子線あるいはX線のSERよりTGFを算出し、まとめたものをTable 1に示した。SERは陽子線、X線とも皮膚及び腫瘍で、10Gy以下では1.0であり、20Gy以上で増感作用を示した。全ての線量におけるSER値を平均してみると、陽子線のSERは、腫瘍で1.64、皮膚で1.37となり、一方、X線でのSERは、腫瘍では1.73、皮膚で1.33となり、この結果よりTGFは、陽子線で1.19、X線で1.29となつた。

Misonidazole併用療法のTGFを、皮膚反応と

TGD timeとの関係で示したものがFig. 4である。

### 4. 考 察

我々の結果では、陽子線、X線とも30Gy以上でMisonidazoleを併用した皮膚反応で増感作用が認められた(Fig. 1)。Brownらは、すでにMisonidazoleを併用し、皮膚のX線増感効果を調べ、30Gy以上でやはり増感作用が現われたことを報告している<sup>12)</sup>。また、Stoneらは、マウス皮膚にmetronidazoleを投与し、X線に対する効果が増加したことを報告している<sup>13)</sup>。すなわち、30Gy以上では、皮膚内のhypoxic cellsに対して増感作用があらわれることが、我々の実験及び

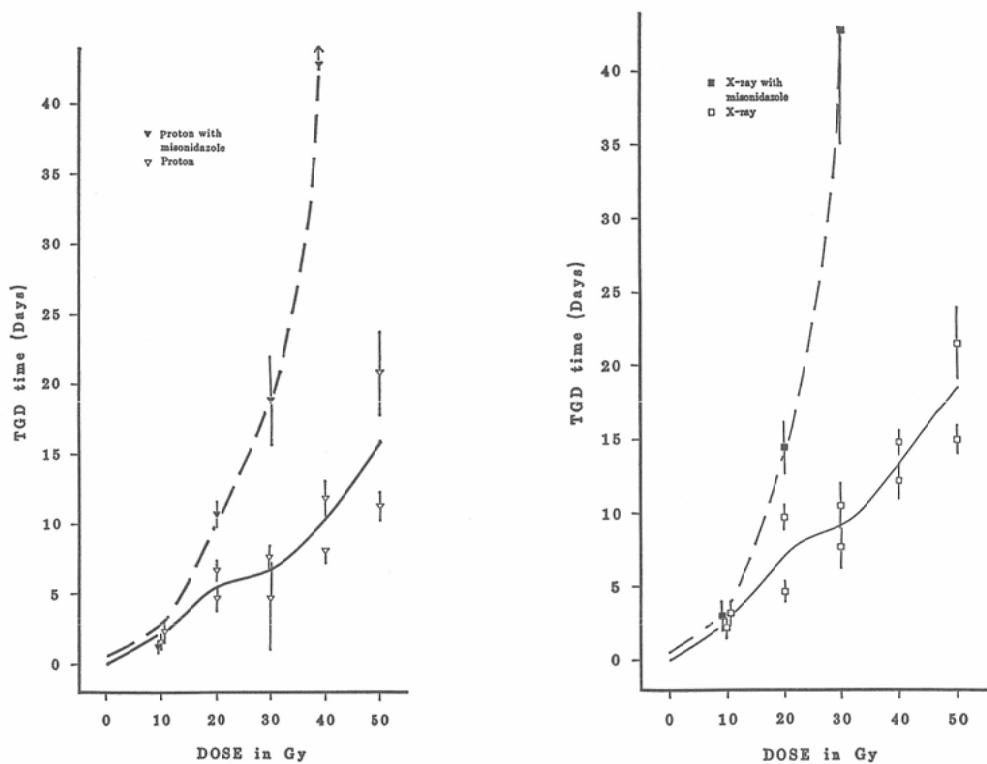


Fig. 3 Tumor growth delay (TGD) time of NR-S1 tumors as a function of radiation dose. Open ( $\nabla$ ) and solid ( $\blacktriangledown$ ) triangles indicate proton and proton with misonidazole respectively (a), and open ( $\square$ ) and solid ( $\blacksquare$ ) squares indicate x-ray with misonidazole, respectively (b). Bars indicate S.E.M., Note that break points disappear in misonidazole groups.

Table 1 SER and TGF of misonidazole (1.0mg/g.b.w.) after proton and x-ray irradiation.

SER at given dose level

	TGD time		Skin Reaction		TGF
X-ray	XwithMISO	SER	XwithMISO	SER	/
10.0Gy	10.0Gy	1.00	10.0Gy	1.00	1.00
20.0Gy	14.0Gy	1.43	20.0Gy	1.00	1.43
30.0Gy	16.5Gy	1.82	22.5Gy	1.33	1.37
40.0Gy	18.0Gy	2.22	26.0Gy	1.54	1.44
50.0Gy	23.0Gy	2.17	28.0Gy	1.79	1.22
Mean	/	1.73	/	1.33	1.29
S.E. (n)	/	0.23 (5)	/	0.15 (5)	0.08 (5)
Proton	PwithMISO	SER	PwithMISO	SER	TGF
10.0Gy	10.0Gy	1.00	10.0Gy	1.00	1.00
20.0Gy	14.0Gy	1.43	16.0Gy	1.25	1.14
30.0Gy	15.5Gy	1.94	23.0Gy	1.30	1.48
40.0Gy	20.0Gy	2.00	25.0Gy	1.60	1.25
50.0Gy	27.0Gy	1.85	29.0Gy	1.72	1.08
Mean	/	1.64	/	1.37	1.19
S.E. (n)	/	0.19 (5)	/	0.13 (5)	0.08 (5)

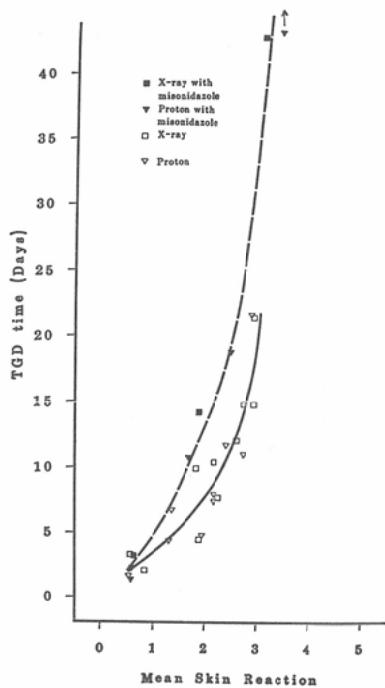


Fig. 4 TGD time of NR-S1 tumors as a function of mean skin reaction after x-ray and proton beam. The dotted line indicates groups which are irradiated with misonidazole.

Brown らの報告により示されている。

皮膚内に hypoxic cell が存在するという報告は、1965年、Van den Brenk ら<sup>14)</sup>、Fowler ら<sup>15)</sup>、及び1967年、Withers ら<sup>16)</sup>が、hyperbaric oxygen を併用したX線、あるいは電子線療法の結果で示し、また1970年、Hill ら<sup>17)</sup>、及び1971年、Field ら<sup>18)</sup>は中性子線を照射した実験より、皮膚の hypoxic cell を推定している。さらに、Emery ら<sup>19)</sup>は、1970年、マウスの皮膚  $1\text{mm}^2$  のうち1個の細胞は、hypoxic cell であろうと述べている。

皮膚における Misonidazole 併用効果では、陽子線とX線を比較し、30Gy 以上で陽子線の方が高い効果を示している (Fig. 1 & 2)。皮膚反応の治癒遅滞がいかなる理由に基づくものかについては、明瞭ではないが一つの可能性として陽子線の Oxygen enhancement ratio (O.E.R.) が、X 線のそれより大きい事が考えられる。その場合、皮膚及び皮膚の血管内皮細胞の増感度が問題とな

るが、この点に関する検討は今後に残された問題であろう。今回の実験に我々は除毛剤を用いている。増田<sup>19)</sup>は照射直前に除毛剤を用いると皮膚反応が強くなると報告している。我々は除毛剤塗布から照射までの間隔を充分とっている (7日間) ので、除毛剤の影響はほとんど無視できると思われる。また陽子線とX線の照射は同一時期に行なっているので除毛剤の影響は両群間に差はない。

腫瘍に対する Misonidazole 併用の効果は、極めて大きかった。10Gy 以下で増感効果が認められなかつたが、これは Oxic cell fraction の致死効果が主になっている線量域であるためと思われる。事実、より大線量域では、break point が消失し、線量効果関係曲線は一相性を示すようになった。Denekamp は、4種の in vivo 肿瘍について調べた結果、hypoxic の状態 (clamped) の腫瘍に Misonidazole を併用すると、2.0～2.2の SER が求められたことを報告している<sup>20)</sup>。また、同じく、Denekamp は、14種類の腫瘍を aerobic の状態で照射した結果、我々の結果と同じく break point が消失し、1.1～2.2の SER を得、この値はすなわち総合的に hypoxic の状態の腫瘍で得られた SER よりも低い数値を得ている。我々の実験で得られた SER は1.0から2.2の値を得、これらの結果と良く合致している。

陽子線とX線の SER において、大きな差異は認められなかつたが、これは、陽子線の効果が、 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  線、あるいはX線と比較し、同じくらいであることと<sup>3)～8)</sup>合わせて考えると、容易に理解できうる。

TGF は、小線量域 (10Gy) で小さく (1.00)、線量が増加するにつれ、TGF も大きくなり (20～40Gy)、50Gy では、小さくなる傾向を示している。これは、腫瘍と皮膚では放射線抵抗性である hypoxic cell fraction の程度が異なり、Misonidazole の効果が発現したす線量が異なるため、このような推移を示したものと考えられる。すなわち、50Gy における TGF の減少は、皮膚に対する SER の上昇と、腫瘍の、すでに 40Gy で最高値 (2.0前後) まで達した SER との関係により

導かれたものであると考えられる。

陽子線と Misonidazole 併用では、X線よりわずかに低い TGF が得られているが、線量分布を考慮すれば、臨床的に、より大きな TGF が得られることは、容易に推測できる。しかしながら、我々の結果より、10Gy 以下で SER が1.0であった事を考えると、より大きな線量で、Misonidazole 併用陽子線治療が行なわれるべきであると思われる。

### 5. 結論

i) 陽子線と Misonidazole の併用によりマウス皮膚反応は 30Gy 以上で増感された。増感の程度は X線と同等かそれ以上のものであった。

ii) マウス in vivo 腫瘍 NR-S1 の陽子線照射における Misonidazole 併用増感効果は、10Gy から 30Gy までは X線における増感効果と同じ程度に発現し、高線量 (40Gy, 50Gy) では X線の方がやや大きい効果を示した。

iii) Misonidazole の投与を行なった場合の TGF は、陽子線で 1.19, X線では 1.29 が得られた。

稿を終えるにあたり、御指導、御助言、ならびに御協力をいただいた、放射線医学総合研究所、生理病理研究部、大原弘博士、臨床研究部、恒元博博士、ならびに、日本大学歯学部、西連寺永康教授、安藤正一教授に深謝いたします。

本論文の要旨は、第39回日本医学放射線学会 (1980) および、2nd Rome International Symposium Biological Bases and Clinical Implications of tumor Radioresistance (1980) において発表した。

### 文 献

- Gray, L.H., Conger, A.D., Ebert, M., Hornsey, S. and Scott, O.C.A.: The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. Brit. J. Radiol., 26: 638—648, 1953
- Raju, M.R., Almols, H.L. and Dicello, J.F.: A heavy particle comparative study. Part I. Depth dose distributions. Brit. J. Radiol., 51: 699—703, 1978
- Robertson, J.B., Williams, J.R., Schmidt, R.A., Little, J.B., Flynn, D.F. and Suit, H.D.: Radiobiological studies of a high-energy modulated proton beam utilizing cultured mammalian cells. Cancer, 35: 1664—1677, 1975
- Hall, E.J., Kellerer, A.M., Rossi, H.H. and Lam, Y.P.: The relative biological effectiveness of 160 MeV protons-II. Biological data and their interpretation in terms of microdosimetry. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 4: 1009—1013, 1978
- Tepper, J., Verhey, L., Goitein, M., Suit, H.D. and Koehler, A.M.: In vivo determinations of RBE in a high energy modulated proton beam using normal tissue reactions and fractionated dose schedules. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2: 1115—1122, 1977
- Urano, M., Goitein, M., Verhey, L., Mendiondo, O., Suit, H.D. and Koehler, A.: Relative biological effectiveness of a high energy modulated proton beam using a spontaneous murine tumor in vivo. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 6: 1187—1193, 1980
- Raju, M.R., Amols, H.I., Bain, E., Carpenter, B.A., Cox, R.A. and Robertson, J.B.: A heavy particle comparative study. Part III: OER and RBE. Brit. J. Radiol., 51: 712—719, 1978
- 馬鷲秀行, 安藤興一, 小池幸子, 古川重夫, 平岡武, 河内清兄, 金井達明: 放医研陽子線の腫瘍及び皮膚に対する効果. 日本医放会誌, 投稿中.
- Urano, M., Nesumi, N., Ando, K., Koike, S. and Ohnuma, N.: Repair of potentially lethal radiation damage in acute and chronically hypoxic tumor cells in vivo. Radiology, 118: 447—451, 1976
- Urano, M. and Koike, S.: Comparison of the effects of neutron and or photon irradiation on spontaneous squamous-cell carcinoma in mice. Radiology, 134: 219—225, 1980
- 相沢 恒: C3H/He マウスの皮膚に及ぼす速中性子線およびX線の1回照射, 2分割照射の影響. 日本医放会誌, 33: 602—616, 1973
- Brown, J.M.: Selective radiosensitization of the hypoxic cells of mouse tumors with the Nitroimidazoles Metronidazole and Ro 7-0582. Radiation Research, 64: 633—647, 1975
- Stone, H.B. and Withers, H.R.: Tumor and normal tissue response to Metronidazole and Irradiation in mice. Radiology, 113: 441—444, 1974
- van den Brenk, H.A.S., Kerr, R.C., Richter, W. and Papworth, M.P.: Enhancement of radiosensitivity of skin of patients by high pressure oxygen. Brit. J. Radiol., 38: 857—

- 864, 1965
- 15) Fowler, J.F., Kragt, K., Ellis, R.E., Lindop, P.J. and Berry, R.J.: The effect of divided doses of 15 MeV electrons on the skin response of mice. *Int. J. Rad. Biol.*, 9: 241—252, 1965
  - 16) Withers, H.R.: The effect of oxygen and anaesthesia on radiosensitivity in vivo of epithelial cells of mouse skin. *Br. J. Radiol.*, 40: 335—343, 1967
  - 17) Hill, R.P., Cheshire, P.J., Lindop, P.J. and Field, S.B.: A comparison of the response of tumour and normal tissue in the mouse exposed to single doses of fast neutrons or electrons. *Br. J. Radiol.*, 43: 894—897, 1970
  - 18) Field, S.B. and Hornsey, S.: RBE values for cyclotron neutrons for effects on normal tissues and tumours as a function of dose and dose fractionation. *Europ. J. Cancer*, 7: 161—169, 1971
  - 19) Emery, E.W., Denekamp, J. and Ball, M.M.: Survival of mouse skin epithelial cells following single and divided dose of x-rays. *Radiation Research*, 41: 450—466, 1970
  - 20) 増田康治:  $\gamma$ 線照射されたマウスの急性皮膚反応. 1. 剃毛の影響. *日医放*, 39: 878—883, 1979
  - 21) Denekamp, J., Hirst, D.G., Stewart, F.A. and Terry, N.H.A.: Is tumour radiosensitization by misonidazole a general phenomenon? *Br. J. Cancer*, 41: 1—9, 1980