



| | |
|--------------|---|
| Title | マウス腫瘍に対するmisonidazole, vidarabineおよびACNU併用による放射線効果の増強 |
| Author(s) | 朝倉, 英男; 秋田, 雄三; 小坂, 昇他 |
| Citation | 日本医学放射線学会雑誌. 1987, 47(1), p. 74-81 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/15222 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

マウス腫瘍に対する misonidazole, vidarabine および ACNU併用による放射線効果の増強

虎の門病院放射線科

朝倉 英男 秋田 雄三 小坂 昇

東京大学医学部放射線基礎医学教室

馬嶋秀行 鈴木紀夫

（昭和61年10月15日受付特別掲載）

（昭和61年11月11日最終原稿受付）

Enhancement of Radiation Response of SqII Mouse Tumors by Combined Treatment with Misonidazole, Vidarabine, and ACNU

Hideo Asakura, Yuzo Akita and Noboru Kosaka

Department of Radiotherapy, Toranomon Hospital

Hideyuki Majima and Norio Suzuki

Department of Radiation Oncology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

Research Code No. : 407.9

Key Words : Misonidazole, Vidarabine, Nitrosourea, Radiosensitization, Tumor growth time

It is well known that misonidazole (Miso.) is a hypoxic cell sensitizer, vidarabine (Ara-A) is a PLD repair inhibitor, and ACNU is an anticancer drug derivative of nitrosourea. The effect of combined use of these drugs and radiation was studied.

SqII tumor, an anaplastic squamous cell carcinoma was transplanted to the right thighs of WHT male mice. At 9 days after transplantation, the tumors of about 600 mm³ were treated by several protocols. After the treatment, tumor growth curves were drawn and the time required to reach twice the initial volume of the treatment was determined. The results were as follows. The combination of 3 agents, Miso., Ara-A, and radiation was the most effective, followed by that of Miso., ACNU, and radiatin, which was better than another combination of Miso. and radiation. The effect of Ara-A, ACNU and radiation was inferior to Miso. and radiation.

The effect of Miso., Ara-A and ACNU was further inferior to radiation alone. The combination of 4 agents, Miso., Ara-A, ACNU and radiation was effective in the same degree or slightly inferior to Miso., Ara-A and radiation. On the other hand, effect of combined treatment with drugs and radiation without Miso. was not so remarkable on this mouse tumor, in other words, Miso. played the most important role among these 3 drugs.

This study showed that the combination of Miso., Ara-A and radiation was the most effective among these tested and may be useful for the clinical control of cancer. Furthermore, this combination did not include anticancer drugs which cause bone marrow suppression and intestinal disorders.

はじめに

misonidazole(以下 Miso.と略す)は低酸素性細胞増感剤として開発され¹⁾²⁾、マウス腫瘍では放射線と併用して有効との多くの報告³⁾⁴⁾がある。また、Miso.は制がん剤特にアルキル化剤やニトロソウレア系薬剤の腫瘍効果を増強する⁵⁾⁶⁾ともいわれる。一方、vidarabine(以下 Ara-A と略す)は抗ウイルス剤として開発され⁷⁾動物実験⁸⁾でも臨床⁹⁾でも帯状疱疹に有効で現在臨床で広く使用されている。さらに Iliakis¹⁰⁾によれば Ehrlich 腹水腫瘍細胞を用いた実験で Ara-A は PLD 回復阻害作用があることが報告されている。

放射線抵抗性といわれる腫瘍では低酸素性細胞が多い¹¹⁾とか、PLD 回復が大きい¹²⁾¹³⁾とか指摘されていることから、今回われわれは両因子に有効な Miso.と Ara-A とを放射線照射と併用することで腫瘍に対してより増強効果が得られることを期待して以下の実験を試みた。

実験材料および方法

1. 動物一腫瘍系

実験には10～12週齢 WHT-マウスの雄を用いた。腫瘍は Sq-II 腫瘍(高井：学位論文)を用いたが、この腫瘍の組織学的診断は未分化扁平上皮がんである。この腫瘍細胞の 1×10^6 個をマウス右大腿部に筋注移植した。

2. 放射線照射条件

放射線は X 線を用いた。X 線照射は 200KVp, 20mA, 焦点一腫瘍中心間距離 35cm, フィルターは Cu 1.0mm+Al 1.0mm で線量率約 0.86Gy/分の条件で行った。移植後 9 日目に腫瘍が約 600 mm³(約 10.5mm ϕ , $\pi/6 \cdot A \cdot B \cdot C$ で計算した—A・B・C は 3 方向の直径)に到達した時点で実験に供した。腫瘍に対する X 線照射は 6 回をアクリル板上に麻酔のうえ固定し、マウス右大腿腫瘍部を照射した。なお、この照射部位以外の身体は厚さ 5 mm の鉛板で覆った。用いた線量は 15Gy で 1 回のみの照射を行った。

マウスに対する麻酔は nembutal(50mg/kg)を腹腔内投与した。なお、この麻酔は照射しない対照群にも行い、放射線照射に際しては照射前 10 分に投与した。

3. 薬剤とその使用量

薬剤はすべて腹腔内に投与した。Miso.は 200 mg/kg を照射前 30 分に、ACNU(商品名はニドラン)は 10mg/kg を照射直前または直後に、Ara-A(商品名はアラセナ A)は 30mg/kg を照射直前または直後にそれぞれ投与した。なお、これらの投与量は臨床における投与量の約 6 倍の量に相当する。

4. 実験結果の分析法

実験結果は腫瘍の成長曲線を作り判定した。すなわち、実験処理日の腫瘍体積を 1 とし、その後の腫瘍の増大、縮小を相対比で記録し成長曲線を作成した。そして腫瘍体積が 2 倍になるまでの日数で表わした時間を算出して、換言すれば tumor growth time(以下 TGT × 2 と略す)を指標として薬剤や照射の効果を検討した。

有意差検定は、F 検定で有意差のない場合は t 検定法で、F 検定で有意差のある場合は Cochran-Cox 法で行った¹⁴⁾。有意差はすべて有意水準 5 % で判定した。

5. 実験群

対照群、薬剤処理群 2 群(Ara-A 群と Miso.+ Ara-A+ACNU 群)と照射単独群を設け、放射線と薬剤との併用は次の 8 つの実験群を設けた。

Ara-A → XRT (X 線照射)

Miso. → XRT

Miso. → Ara-A → XRT

Miso. → XRT → Ara-A

Miso. → ACNU → XRT

Miso. → XRT → ACNU

Miso. → XRT → ACNU+Ara-A

XRT → ACNU+Ara-A

以上 12 の実験群に用いた匹数は 1 群 6 ～ 9 匹である。実験は 3 回行った。

実験結果

各群の腫瘍成長曲線は Fig. 1, 2, 3 に示すごとくである。縦軸には実験処理日の腫瘍体積を 1 とした時の相対的な腫瘍体積比を示し、横軸には実験処理後の日数を示してある。われわれが結果の分析に用いた腫瘍体積 2 倍値は、縦軸の 2 の位置であり、TGT × 2 はその点の日数を表わす。

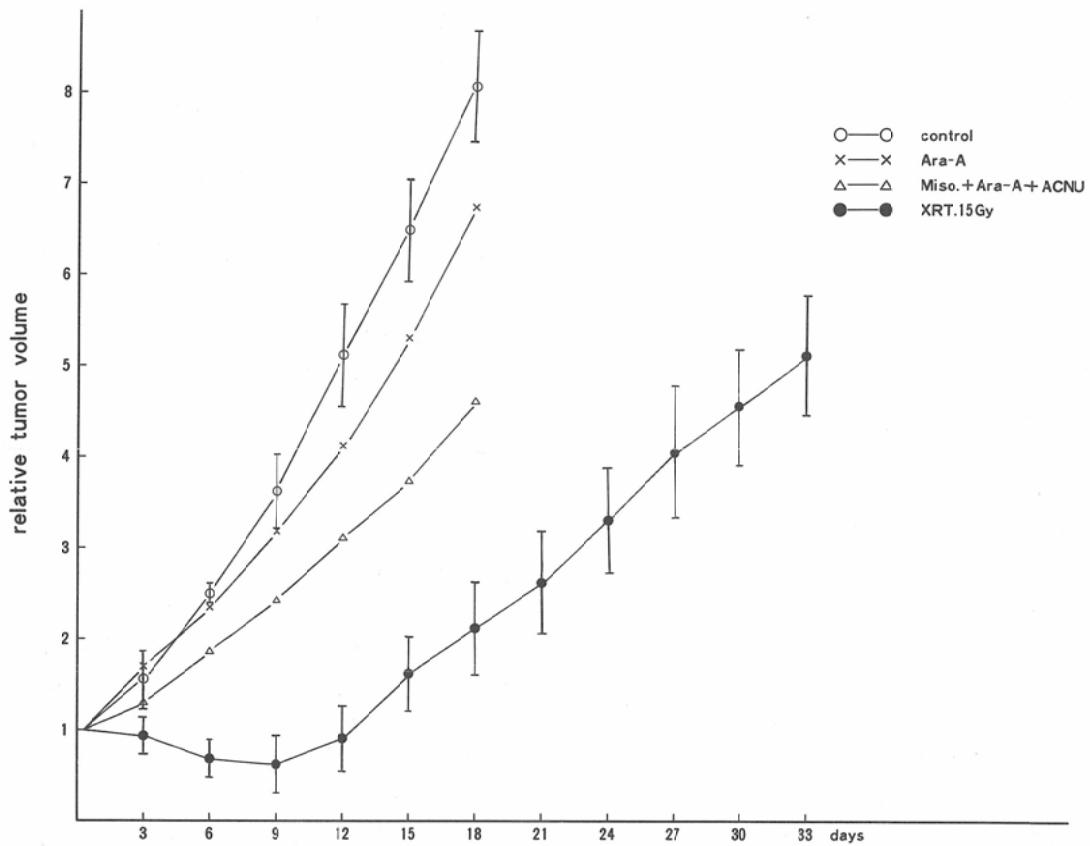


Fig. 1 Tumor growth curve

The ordinate is the relative volume of tumor. The Scale, 1 is the initial volume at the beginning of treatment. Two means the volume twice the initial volume. The abscissa is the day after treatment. This shows the tumor growth curves of control, Ara-A only, Miso. + Ara-A + ACNU, and X-irradiation alone. Bar shows $\pm 1 \times$ standard deviation.

Fig. 1 は対照群, Ara-A 単独群, Miso.+Ara-A+ACNU 群, それに照射単独群の 4 群の腫瘍成長曲線である。Ara-A 単独群は対照群とはほとんど差がなく, Miso.+Ara-A+ACNU 群は対照群より僅かに腫瘍成長の抑制がみられる。これは ACNU の制がん効果のためと考えられる。15Gy の照射単独はかなりの成長抑制を示し, 照射後約 2 週間は腫瘍が縮小した状態である。TGT × 2 は Table 1 に示すごとく、対照群と Ara-A 単独群では有意差はなく、対照群と Miso.+Ara-A+ACNU 群および対照群と照射単独群との間には有意差が認められた。

Fig. 2 には対照群、照射単独群、Ara-A → XRT

群、XRT → ACNU + Ara-A 群および Miso. → XRT 群の 5 群が示されている。Ara-A → XRT 群は照射単独群とほぼ同様である。XRT → ACNU + Ara-A 群は照射単独群よりやや抑制がみられる。Miso. → XRT 群は照射単独群より一段とつよい抑制がみられ、照射後約 3 週後まで腫瘍は縮小した状態である。Table 1 の TGT × 2 も成長曲線と同様で、照射単独群と Ara-A → XRT 群および XRT → ACNU + Ara-A 群との間には有意差はないが、Miso. → XRT 群との間でだけ有意差が認められた。

Fig. 3 には対照群、照射単独群、Miso. → ACNU → XRT 群、Miso. → Ara-A → XRT 群、および

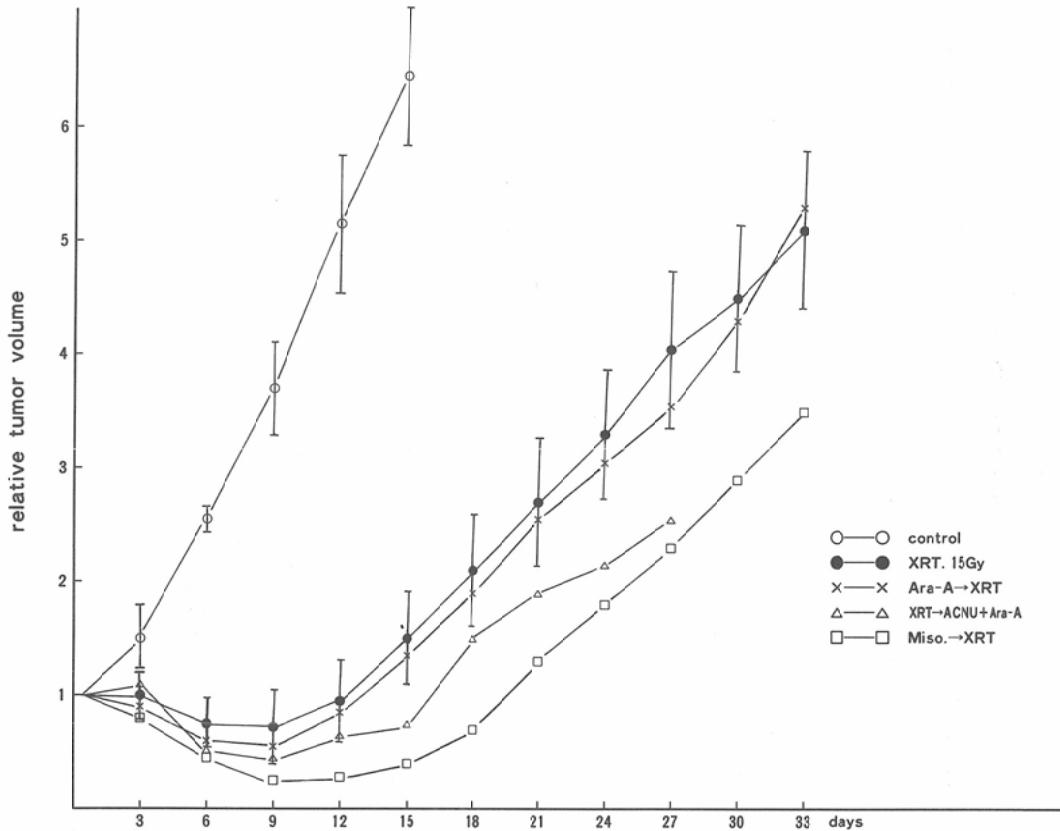


Fig. 2 Tumor growth curve

The ordinate and the abscissa are the same as Fig. 1. This shows the tumor growth curves of control, irradiation alone, Ara-A → irradiation, irradiation → ACNU+Ara-A, and Miso. → irradiation.

Miso. → XRT → ACNU+Ara-A 群の 5 群が示されている。Fig. 3 の場合、縦軸の目盛が Fig. 1 および Fig. 2 より拡大されている。この図から照射単独群とくらべ他の 3 群は同程度に成長抑制がつよいことが知られる。また、照射後約 3.5 週まで腫瘍は縮小した状態である。Table 1 の TGT × 2 では照射単独群と他の 3 群との間には有意差が認められた。Miso. → Ara-A → XRT 群と Miso. → XRT → ACNU+Ara-A 群との間に有意差はなかったが、前者と Miso. → ACNU → XRT 群との間には有意差が認められた。Fig. 3 ではこの両群の曲線は差があまりないようにみえるが、TGT × 2 で有意差があるということは Miso. → ACNU → XRT 群は腫瘍抑制が解除され増大しはじめると増大速度が Miso. → Ara-A → XRT 群より速いのではないかと考えられる。

私達の最初の期待に反して、Miso. → XRT → ACNU+Ara-A 群の TGT × 2 は最大とならず、むしろ Miso. → Ara-A → XRT 群の方が有意差はないが TGT × 2 が最大となる結果を得た。3 者併用群では XRT → ACNU+Ara-A 群の効果が一番よわく、Miso. → ACNU → XRT 群が中間で、Miso. → Ara-A → XRT 群が一番つよかった。

図にはなく、Table 1 にのみ示されているが、薬剤と照射の投与順序を変えると効果が異なるかどうかも検討した。Miso. → ACNU → XRT 群と Miso. → XRT → ACNU 群とでは ACNU を照射前に投与するか照射後に投与するかの違いだけだが、照射前に投与した方が TGT × 2 が僅かに延長するとの結果を得た。ただし、両群間で有意差は

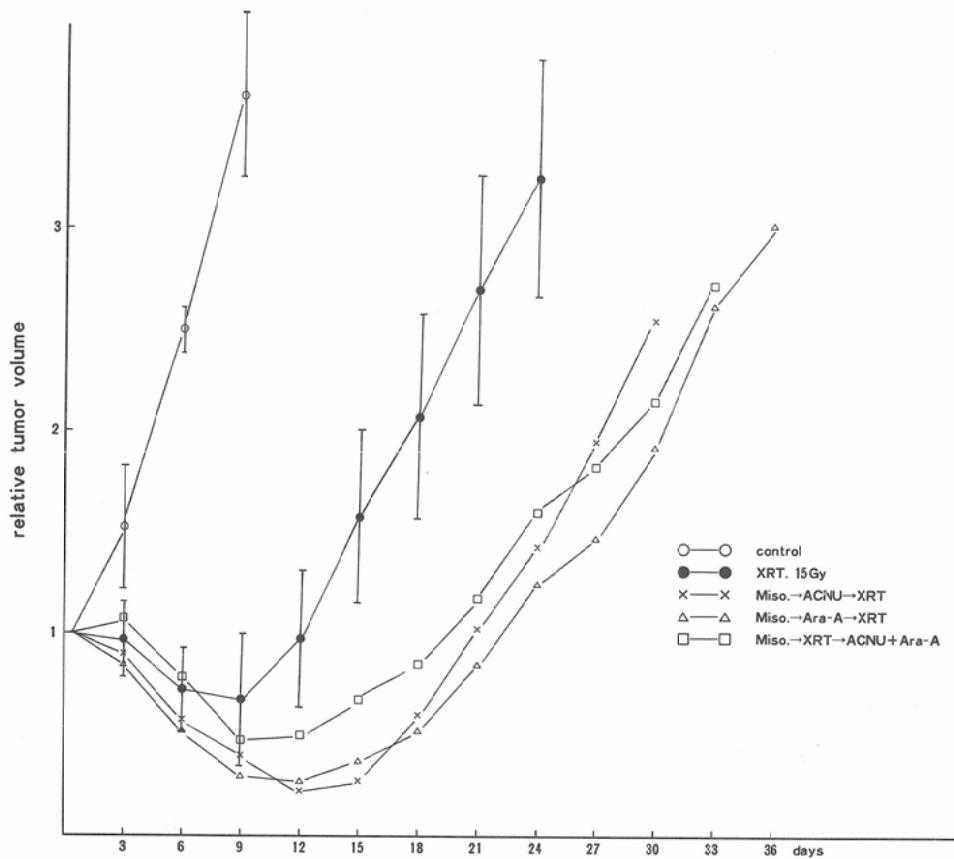


Fig. 3 Tumor growth curve

The scale of the ordinate is magnified compared to Figs. 1 and 2. This shows the tumor growth curves of control, irradiation alone, Miso.→ ACNU → irradiation, Miso.→ Ara-A → irradiation, and Miso.→ irradiation → ACNU + Ara-A.

認められなかった。また、Miso.→ Ara-A → XRT 群と Miso.→ XRT → Ara-A 群との 2 群比較でも照射前にAra-Aを投与する方が僅かにTGT×2が延長した。しかし、この両群間にも有意差はなかった。

Table 1 のTGT×2で、Miso.→XRT群とMiso.→ ACNU → XRT 群との間では有意差が認められなかつたが、Miso.→ XRT 群と Miso.→ Ara-A → XRT 群との間では有意差が認められ、Miso.と照射にさらにAra-Aを加えることは有効である。

考 察

Miso.は低酸素性細胞増感剤であるとともに化学増感の作用も有している。Ara-Aも抗ウイルス剤、PLD回復阻害剤であるとともに化学増感作用

があるといわれる¹⁵⁾。Siemannらはマウス腫瘍での実験でMiso.とCCNUと照射がMiso.と照射より有効と報告¹⁶⁾しており、私達もMiso.とACNUと照射の併用を臨床で検討¹⁷⁾、これらの併用是有用との結果を得ている。今回はMiso.とACNUにさらにPLD回復阻害剤であり化学増感も行なうAra-Aを加えて照射すれば、一段と有効性をますだらうと考え本実験を実施した。結果は期待に反し、Miso.→ XRT → ACNU+Ara-A群はMiso.→ ACNU → XRT群、あるいはMiso.→ Ara-A → XRT群より有効との結果は得られなかつた。この理由はまだよく判らない。4者併用群は実験後3～4週でマウスが死亡することがあり、副作用が出たのかも知れない。観察期間がもっと長期にな

Table 1 Tumor growth time

This shows the tumor growth times of all evaluated groups. Numerals show the mean values of 6 or 9 mice and 1×standard deviation.

| group | time(days) to get to 2 times of initial volume | compared with control | compared with XRT only |
|----------------------|---|--------------------------|---------------------------|
| Control | 4.23 ± 0.63* | — | sig. |
| Ara-A only | 4.73 ± 0.92 | n.s.** | sig. |
| Miso.+Ara-A+ACNU | 6.74 ± 0.39 | sig.*** | sig. |
| XRT only (15Gy) | 18.19 ± 2.77 | sig. | — |
| Ara-A→XRT | 18.0 ± 1.71 | sig. | n.s. |
| Miso.→XRT | 25.14 ± 1.82 | sig. | sig. |
| XRT→ACNU+Ara-A | 21.25 ± 3.42 | sig. | n.s. |
| Miso.→ACNU→XRT | 27.38 ± 0.98 | sig. | sig. |
| Miso.→XRT→ACNU | 25.59 ± 2.59 | sig. | sig. |
| Miso.→Ara-A→XRT | 30.07 ± 1.62 | sig. | sig. |
| Miso.→XRT→Ara-A | 29.85 ± 5.06 | sig. | sig. |
| Miso.→XRT→ACNU+Ara-A | 27.24 ± 4.16 | sig. | sig. |

* mean value ± 1×S.D.

** n.s.→not significant

*** sig.→significant($p < 0.05$)

れば Miso.→Ara-A→XRT 群より有効との結果が出るかも知れない。Fig. 3をよくみるとその傾向があるようにも思われる。Miso.→Ara-A→XRT 群が Miso.→ACNU→XRT 群より有効だったことは興味深く、前者の組合せでは制がん剤が入ってないので、悪心・嘔吐や骨髓抑制作用が出現しないだろうから臨床での利用が大いに期待される。

つぎに、薬剤の投与期間について考察する。Miso.の投与はマウスでは照射前30分、人体で照射前4~6時間が最適とされている。今回は Ara-A と ACNU について検討した。両者とも照射前10分以内と照射後10分以内との2つを比較した。結果は照射前に投与した方が照射後に投与するより TGT×2が延長したが両者で有意差は認められてない。Ara-A については生体内代謝が速いとの報告¹⁸⁾があり、Ara-A 投与と照射との間隔が1時間もあくことはよくないと思われる。ACNU は

Siemann らの報告¹⁶⁾ (ACNU でなく CCNU を使用している)によれば照射後6時間ぐらいまでに投与すれば有効といわれる。これら薬剤は照射前から照射中にかけて投与するのが良いと思われる。

今回はこれらの増感剤併用照射の正常組織への影響を検討しなかったので確言はできないが、ACNU のような制がん剤は当然、骨髓抑制などの副作用がある。Miso. や Ara-A は本実験のごとき投与量では、しかもただ1回だけの投与ではあまり副作用がないと思われる。

PLD 回復阻害剤としては Ara-A の他に、抗ウイルス薬として開発された Aciclovir、その他同様の作用のあるものが報告¹⁹⁾されている。これらの放射線効果を増強させる薬剤を利用することで、人間のがんに対する放射線治療が一層有効になるだろうと当然期待されるし、これに関する総説¹⁸⁾²⁰⁾もみられる。系統は異なるが低酸素性細胞増感剤として有効な Miso. は約20年前に開発され、すでに記したごとく in vitro, in vivo ですばらしい増感効果を、すなわち、正常組織に対しては放射線の効果を増強することなく、腫瘍にのみ増感効果を表わし²¹⁾、臨床での効果が大いに期待されたが、phase III の臨床研究ではそれほど有効ではないとの結果²²⁾²³⁾となった。このため、わが国では現在 Miso. を臨床で使用することができない。しかし、本実験でも Ara-A と照射また ACNU と照射ではあまり効果がつよくないが、これらに Miso. を加えることで効果が著明となってくる。一方、Miso. は副作用がつよく臨床では使えないともいわれるが、使用法によっては¹⁷⁾²⁴⁾ Miso. の副作用を表わすことなく有効性のみを示すことができる。これほど動物実験で多くの有効な利点を持つ薬剤を臨床で使用できないことは残念であり、より一層の基礎実験を積み重ね、より有効な臨床的使用法を検討すべきと思う。Miso. とともにがんの放射線治療での現在の問題点である細胞の PLD 回復の阻害に寄与すると云われる Ara-A をはじめとする多くの PLD 回復阻害剤がさかんに利用されて、今後のがんの放射線治療に大きい役割をはたすことを期待する。

まとめ

1. マウスの大腿に移植した Sq-II 腫瘍(未分化扁平上皮がん)の TGT×2を指標として、Miso., Ara-A および ACNU 併用による放射線効果の増強を検討した。4者中2者併用では Miso.と照射が一番有効である。3者併用では Miso.と Ara-A と照射が一番有効で、ついで Miso.と ACNU と照射、照射と ACNU と Ara-A の順で、薬剤だけの組合せ、Miso.と Ara-A と ACNU は照射単独の効果より劣る。4者併用 Miso.と照射と ACNU と Ara-A は期待に反し、Miso.と Ara-A と照射の3者併用(本実験では TGT×2が最長)と同等あるいはそれ以下の効果しか示さなかった。

2. 以上の実験結果から低酸素性細胞増感剤である Miso.と PLD 回復阻害剤である Ara-A とを臨床でのがんの放射線治療に併用することは有用と考える。

3. 本併用実験でも Miso.の存在役割は大きく、動物実験でこれほど有効な薬剤が臨床で使用できないのは惜しまれる。副作用の起きない使用法での使用許可は得られないのだろうか?

謝辞 持田製薬株式会社から Ara-A (アラセナ A) のご提供を頂き本研究を実施しました。同会社に心からの感謝を申し上げます。また、本研究の完成に何かとご助力を頂いた京都大学放射線生物研究センター岡田重文教授と持田製薬株式会社洲之内毅は氏に、また動物実験の手伝いをして頂いた東大病院ラジオアイソトープ室相原敬氏に厚くお礼申し上げます。

文献

- 1) Adams, G.E. and Dewey, D.L.: Hydrated electrons and radiobiological sensitization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 12: 473-477, 1963
- 2) Adams, G.E., Dische, S., Fowler, J.F. and Thominson, R.H.: Hypoxic cell sensitizers in radiotherapy. *Lancet*, I: 186-188, 1976
- 3) Denekamp, J. and Harris, S.R.: Tests of two electron affinic radiosensitizers in vivo using regrowth of an experimental carcinoma. *Radiat. Res.*, 61: 191-203, 1975
- 4) Sheldon, P.W. and Hill, S.A.: Hypoxic cell radiosensitizers and local control by X-ray of a transplanted tumour in mice. *Brit. J. Cancer*, 35: 795-808, 1972
- 5) Clement, J.J., Gorman, M.S., Wodinsky, L., Catane, R. and Johnson, R.K.: Enhancement of antitumour activity of alkylating agents by the radiation sensitizer misonidazole. *Cancer Res.*, 40: 4165-4172, 1980
- 6) Siemann, D.W.: Response of murine tumours to combinations of CCNU with misonidazole and other radiation sensitizers. *Brit. J. Cancer*, 45: 272-281, 1982
- 7) Miller, F.A., Dixon, G.J., Ehrlich, J., Sloan, B.J. and McLean, I.W.: Antiviral activity of 9-β-D-arabinofuranosyl adenine. I. Cell culture studies. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 1968, 136-147, 1969.
- 8) Sidwell, R.W., Fixon, G.J., Shabel, F.M. and Kampp, D.H.: Antiviral activity of 9-β-D-arabinofuranosyl adenine. II. Activity against herpes simplex keratitis in hamsters. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 1968, 148-171, 1969.
- 9) Whitley, R.J., Soong, S.J., Hirshe, M.S., Karchmer, A.W., Dolin, R., Galasso, G., Dunnick, J.K., Alford, C.A. the NIAID Collaborative Antiviral Study Group: Herpes simplex encephalitis: Vidarabine therapy and diagnostic problems. *N. Engl. J. of Med.*, 304: 313-318, 1981.
- 10) Iliakis, G.: Effects of β-arabinofuranosyl adenine on the growth and repair of potentially lethal damage in ehrlich ascites tumor cells. *Radiat. Res.*, 83: 537-552, 1980
- 11) Gray, L.H.: Oxygenation in radiotherapy. I. Radiobiological considerations. *Brit. J. Radiol.*, 30: 403-406, 1957.
- 12) Little, J.B., Hahn, G.M., Frindel, E. and Tubiana, M.: Repair of potentially lethal radiation damage in vitro and in vivo. *Radiology*, 106: 689-694, 1973
- 13) Weichselbaum, R.R., Schmit, A. and Little, J. B.: Cellular repair factors influencing radio-curability of human malignant tumors. *Brit. J. Cancer*, 45: 10-16, 1982
- 14) 富永祐民: 治療効果判定のための実用統計学。生命表法の解説, 136-143, 1982, 蟹書房, 東京
- 15) Nakatsugawa, S. and Sugahara, T.: Effects of inhibitors of radiation-induced potentially lethal damage repair on chemotherapy in murine tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 8: 1555-1559, 1982
- 16) Siemann, D.W., Hill, S.A. and Sutherland, R. M.: Enhanced tumor responses through therapies combining CCNU, MISO and radiation. (In) *Chemical Modifiers of Cancer Treatment*, held at Banff, Canada. 1983, No. 5-8

- 17) 朝倉英男, 丸橋 晃, 間島寧興, 金沢敦子 : Misonidazole と ACNU(ニドラン)併用による放射線治療: 主として肺癌について. 日本医学会誌, 43 : 1295—1306, 1983
- 18) 田中敬正 : 薬物による癌放射線治療効果の増強 : とくに放射線増感剤を中心に. 医学のあゆみ, 131 : 284—289, 1984
- 19) 寒川光治, 赤木 清, 吉井義一, 田中敬正 : 核酸類似物質の放射線増感効果. 日本医学会誌, (印刷中), 1986)
- 20) 菅原 努 : 放射線増感研究とがん治療. 癌と化学療法, 12 : 405—411, 1985
- 21) 田中紀元, 坂崎富夫, 長谷川隆, 岡部春海, 山下正人, 村上晃一, 竹内 博 : 実験動物腫瘍に対する放射線と Misonidazole の併用効果. 癌の臨床, 27 : 1453—1456, 1981
- 22) Dische, S. : The clinical use of hyperbaric and chemical hypoxic cell sensitizers. (In) Steel GG, Adams GE, Peckham MJ ed : The biological basis of radiotherapy. 225—237, 1983, Elsevier, Oxford
- 23) 入江五郎, 桜井智康, 菊池雄三, 亘野 勉, 池田道雄, 望月幸夫, 鎌田力三郎, 金田浩一, 御厨修一, 砂倉瑞良, 松井謙吾, 田中利彦, 森田皓三, 蔡本栄三, 阿部光幸, 小野山靖人, 横山 敬, 伊藤祐治 : 食道癌に対する放射線増感剤 Misonidazole の二重盲検法による放射線増感効果の分析. 日癌治, 19 : 2085—2092, 1984
- 24) 朝倉英男 : ミソニダゾール, 多剤制がん剤, ビダラビン併用の放射線治療. 放治システム研究, Suppl. 3 : 171—174, 1986