



Title	ニトロイミダゾール系低酸素細胞放射線増感剤に関する実験的研究
Author(s)	田中, 正博; 福田, 晴行; 中島, 俊文 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1988, 48(10), p. 1249-1260
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/15600">https://hdl.handle.net/11094/15600</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

ニトロイミダゾール系低酸素細胞放射線  
増感剤に関する実験的研究

大阪市立大学医学部放射線医学教室

田中 正博 福田 晴行 中島 俊文

杉本 清 小野山靖人

慶応義塾大学医学部

堀 均 稲山 誠 一

(昭和63年3月3日受付)

(昭和63年4月25日最終原稿受付)

Radiosensitizing Effect of the Nitroimidazole Derivatives  
RK28 and DNIE on Murine Tumors

Masahiro Tanaka, Haruyuki Fukuda, Toshifumi Nakajima,  
Kiyoshi Sugimoto and Yasuto Onoyama

Department of Radiology, Osaka City University, Medical School

Hitoshi Hori and Seiichi Inayama

Faculty of Medicine, Keio University

---

Research Code No. : 408

---

Key Words : Hypoxic cell, Radiosensitizer, RK28, DNIE,  
In vivo assay

---

The toxicity and radiosensitizing effect of 1-(4'-hydroxy-2'-butenoxy)-methyl-2-nitroimidazole (RK28) and 2,4-dinitroimidazole-1-ethanol (DNIE) were examined *in vivo* in male C3H/He mice bearing transplantable FM3A tumors derived from murine breast cancer. The pharmacokinetics of these compounds in mice and rabbits was also examined with a reversed-phase high-pressure liquid chromatography (HPLC).

Tumor cells were transplanted to the footpad of the mice and a single irradiation was done without anesthesia. The enhancement ratio (ER) of the compounds was calculated in terms of the ratio of the single dose of radiation needed to delay the growth of the tumor by 20 days with or without sensitizer.

The LD50 of RK28 and DNIE given by intraperitoneal injection was 830 and 300 mg/kg, respectively. The ER of RK28 was 1.74 with 1/2 of the LD50 and 1.37 with 1/4 of the LD50. That of DNIE was 1.52, 1.18, and 1.00 with 5/6, 1/2, and 1/4 of the LD50. In the same system the ER with 1/2 of the LD50 of misonidazole was 1.41.

After RK28 was injected into the peritoneal cavity, its concentrations in the plasma and the brain decreased more quickly than those of misonidazole given in the same way. If sensitizer must be administered every day to fit the daily schedule of radiation therapy, the total amount of drugs will not be small. As adverse effects are assumed to depend on concentration and biological half-life, the pharmacokinetics of RK28 suggests that it may be less neurotoxic than misonidazole. The ER of RK28 is as satisfactory as that of misonidazole, so RK28 may be useful as a new hypoxic cell radiosensitizer.

clinically in the near future.

After DNIE was injected into the peritoneal cavity, it was rapidly metabolized and unidentified metabolites were detected by HPLC. DNIE was less effective than misonidazole at the same toxicity level and its toxicity was a problem that needs to be solved before further investigation.

### はじめに

悪性腫瘍に対する放射線治療の局所制御率は、診断や治療技術の進歩にともない向上してきたが、部位や組織型によっては必ずしも十分とは言えない。放射線抵抗性の原因の一つに低酸素状態の細胞の存在が考えられている<sup>1)2)</sup>。腫瘍内の毛細血管から離れた部位に低酸素状態の細胞（以下低酸素細胞と略す）が存在し、酸素が充分供給された細胞よりX線、γ線等低LET放射線に対して2～3倍抵抗性で難治や再発の原因となる<sup>3)</sup>。

低酸素細胞に対する放射線治療効果を向上させるため、種々の試みが従来より行われている。中性子線、重イオン、 $\pi$ 中間子等の酸素効果の少ない高LET放射線の使用<sup>4)5)</sup>、低LET放射線を使う場合には高圧酸素療法の併用<sup>6)7)</sup>、分割方法の改善<sup>8)9)</sup>、温熱療法の併用<sup>10)11)</sup>等である。しかし最も容易かつ安価に実施できる手段として、低LET放射線と低酸素細胞を選択的に放射線増感する薬剤（低酸素細胞放射線増感剤、以下増感剤と略す）の併用療法が挙げられる<sup>12)</sup>。低酸素細胞の放射線感受性を高める薬剤はこれまでも多数合成されている。そのうちmisonidazole（以下MISOと略す）については臨床第3相試験まで実施されたが、主としてその神経毒性のため投与可能量が限られ、臨床的有用性を確認するにいたらなかった。MISOの経験を踏まえて、多数の増感剤候補物質が合成されているが、なお臨床的に満足できる薬剤はない。さらに毒性・効果比の良い増感剤の開発が望まれている。

今回、日本で合成され *in vitro* で優れた増感効果を示したニトロイミダゾール系の薬剤について、マウスにおける急性毒性、移植腫瘍に対する増感効果および生体内濃度についてMISOと比較検討した。

### 材料と方法

増感剤としてはRK28 (1-[(4'-hydroxy-2'-bute-

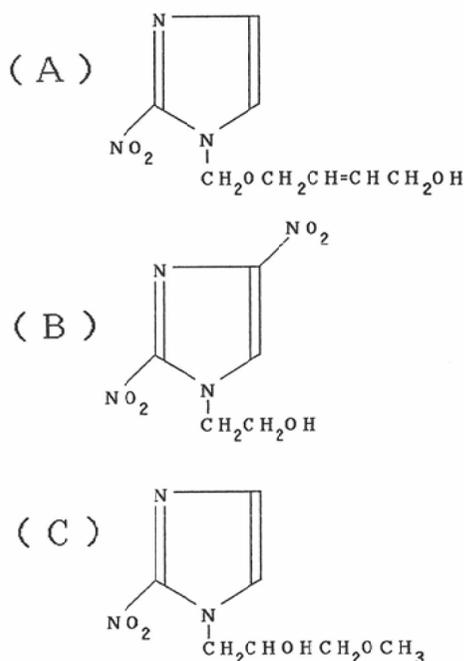


Fig. 1 Structural formulae of RK28 (A), DNIE (B), and misonidazole (C).

noxy)methyl]-2-nitroimidazole, 分子量213.0; 科薬・坂口より提供), DNIE(2, 4-dinitroimidazole-1-ethanol, 分子量170.2; 慶大・稲山より提供) および MISO(1-(2-nitro-1-imidazolyl)-3-methoxy-2-propanol, 分子量201.2; 日本ロッシュより提供)を使用した (Fig. 1).

### 1. 急性毒性の検定

急性毒性は50%のマウスが30日以内に死亡する薬剤量（以下LD50と略す）を指標とした。

実験動物には6～7週齢、体重18～20gの雄C3H/Heマウス（日本クレア）を使用した。投与量が約1mlになるように実験開始直前に増感剤を生理食塩水に溶解した。投与量を種々に変化させながらマウス腹腔内に投与し、30日間生死を観察した。投与量ごとの死亡率を正規確率紙にプロットし、最小自乗法でdose-mortality curveを一次回

帰し LD50値を算出した。数値計算および統計学的処理には Hewlett Packard 社の 16bit パーソナル・コンピュータ HP9816 と同社の Statistical Library (polynomial analysis) を用いた。

## 2. 増感効果の評価

### 実験動物—腫瘍系

6～7週齢の雄の C3H/He マウス (日本クレア) の右後肢足背部に、マウス乳癌由来の FM3A 細胞<sup>13)14)</sup> (長崎大・奥村より提供) を  $10^6 \sim 10^7$  個移植する。約 2 週後、腫瘍直径が 5～6mm となった時点で実験に使用した。

### X 線照射および薬剤投与方法

投与量が約 1ml になるように実験開始直前に増感剤を生理食塩水に溶解し、LD50 値の 1/4 量および 1/2 量を腹腔内に投与した。DNIE については投与後 20 分に、RK28 と MISO については 40 分に、10Gy から 40Gy まで適当な間隔で X 線を 1 回照射した。照射時にはマウスをビニールハウス中にいれ、腫瘍の血流を妨げないように、細いチューブで右足首を緩く固定した。腫瘍部以外は 4mm 厚の鉛板で遮蔽し、全身への被曝を避けた。また上記操作および X 線照射は無麻酔下に行った。X 線発生装置は Stabilipan II (シーメンス、西独) を使用した。焦点皮膚間距離 34cm、線量率 3.7Gy/min、電圧 200 KVp、2mm 厚アルミニウムフィルタ、Roentgen-rad 変換係数には 0.95 を用いた。

### 増感効果の評価方法

実験直前の腫瘍の 3 方向の長さ (a, b, c) をノギスで計測し、腫瘍体積 (以下  $V_0$  と略す) は、

$$V_0 = \frac{\pi \times a \times b \times c}{6}$$

とした。

以後 2～3 日おきに同様の方法で腫瘍体積を求め、 $V_0$  で除して比体積 (以下 RV と略す) を求める。対照群 (生理食塩水のみ)、照射単独群 (生理食塩水と照射のみ) および増感剤投与群 (増感剤と照射併用) について、RV を縦軸に、照射後の日数を横軸にとり、最小自乗法を用いて 3 次関数で近似させて growth curve を得た。対照群と照射単独群および増感剤投与群の growth curve の横

軸方向の距離の差 (同一 RV に到達するまでに要する日数の差) を RV が 2.0～5.0 のときに 0.5 おきに求め、平均値を growth delay (以下 GD と略す) とした。各照射線量ごとの GD の常用対数を縦軸に、照射線量を横軸にとり、最小自乗法で dose-response curve の一次回帰直線を得た。20 日間の GD を得るのに必要な X 線線量を照射単独群および増感剤投与群についてそれぞれ  $D_c$ ,  $D_s$  とした。

増感率 (Enhancement Ratio 以下 ER と略す) は

$$ER = \frac{D_c}{D_s}$$

とした。

以上の計算処理には第 1 項と同じコンピュータおよびプログラムを使用した。

## 3. 生体内濃度および代謝の検討

### 実験動物

雄の C3H/He マウス (日本クレア) と雄の日本白色兔 (日本生物材料) を用いた。

### 試料作成

マウスの腹腔内に LD50 値の 1/2 量の RK28, DNIE および MISO を投与し、経時的に脱血屠殺した。腫瘍、脳のホモジネートおよび血清を 4ml のアセトニトリルで除蛋白し、遠心分離後上澄を濾過し (SJHV 013NS 日本ミリポア工業)、高速液体クロマトグラフィ (high performance liquid chromatography 以下 HPLC と略す) の試料とした。さらに DNIE に関しては、家兔に 350mg 静注後、大腿動脈より経時的に採血し、マウス血清と同じ処理をした上で測定した。

### HPLC 装置

使用した HPLC 装置は LC-4A, C-R3A (島津製作所) および C18 ODS column (Zolbax, USA) である。分析条件は移動相に 5～40% のアセトニトリル—水系を用い、流量 1.0 または 0.5 ml/min とした。分析に用いた波長はニトロ基の紫外線吸収波長の 325nm を採用した。恒温槽を用いてカラムの温度を 50℃ に保った。試料注入量は 10  $\mu$ l である。

Table 1 Mortality of mice after i.p. injection of RK28

dose(mg/kg)							
2000	1000	900	800	700	600	500	250
6/6	7/9	5/6	0/6	0/6	0/6	1/6	1/6

Table 2 Mortality of mice after i.p. injection of DNIE

dose(mg/kg)					
1000	500	250	100	50	25
6/6	6/6	9/34	0/41	0/6	0/6

## 結 果

### 1. 急性毒性

RK28; 2,000mg/kg 投与時, マウスはすべて死亡し, 1,000mg/kg では9匹中7匹, 900mg/kg では6匹中5匹が死亡した. 800, 700, 600mg/kg の投与ではマウスは死亡しなかった. 500, 250mg/kg 投与時には各群6匹中1匹のマウスが死亡した (Table 1). 腹腔内投与後もマウスは比較的小となし, 起立, 跳躍などの異常運動はあまり認められなかった. 死亡時期は1日後から6日後までややバラツキが認められた. LD50は830mg/kg であった.

DNIE; 1,000mg および500mg/kg 投与したマウスは各群6匹中6匹とも死亡した. 250mg/kg 投与したマウスは34匹中9匹が死亡した. 100, 50, 25mg/kg の投与量では死亡したマウスはいなかった (Table 2). また死亡する時期については500mg/kg 以上投与したマウスでは1~2時間以内に死亡することが多く, 250mg/kg 投与したときには24時間以内に死亡することが多かった. LD50は300mg/kg であった.

### 2. 増感効果

RK28; RK28投与時の growth curve の一例を Fig. 2 に示す. LD50の1/2量を投与し, 20Gy, 10Gy 照射したときのGDはそれぞれ14.1, 5.3日となった. 30Gy 以上では観察期間中に腫瘍体積が2倍に達せずGDを日数で表すことができず, 25GyでのGDは22.3日であった. 1/4量を投与し, 30Gy, 20Gy 照射したときには24.1日, 7.9日

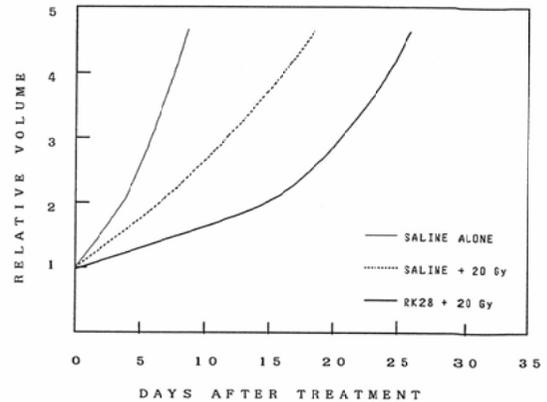


Fig. 2 Relative volume of the FM3A tumor as a function of days after irradiation. Groups: mice injected with saline, mice injected with saline 40 min before the start of irradiation with a dose of 20 Gy, and mice injected with 1/2 of the LD50 of RK28 40 min before such irradiation.

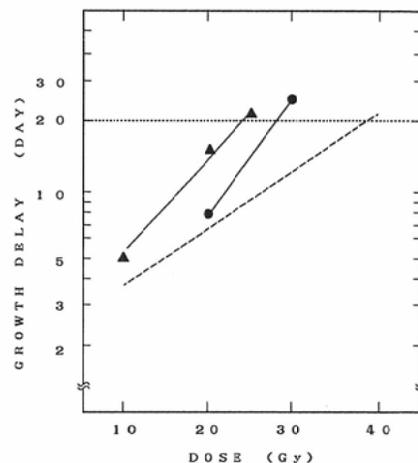


Fig. 3 Growth delay of the FM3A tumor as a function of the radiation dose for mice treated with RK28. The mice received 1/2 ( $\blacktriangle$ ) or 1/4 ( $\bullet$ ) of the LD50 of RK28. The broken line is for mice injected with saline.

であり, 40Gyでは腫瘍体積が2倍にならなかった (Table 3). 照射単独群のGDは40, 30, 20, 10Gyの照射で各々25.7, 9.3, 6.4, 5.3日であった. 以上より20日のGDを得るのに必要なX線線量はLD50の1/2量投与時22.3Gy, 1/4量投与時28.3Gy, 照射単独群で38.8Gyとなり, 従って

Table 3 Growth delay in days

compounds	dose <sup>a</sup>	10 Gy	20 Gy	25 Gy	30 Gy	40 Gy
RK28	1/2	5.3	14.1	22.3	NE	NE
	1/4		7.9		24.1	NE
DNIE	5/6	3.3	13.5		34.7	NE
	1/2	2.7	6.5		17.1	NE
	1/4	2.6	2.8		13.2	23.0
MISO	1/2	6.1	12.4		30.1	NE
Control		5.3	6.4		9.3	25.7

a : ratio to the dose of LD50 of the sensitizer.  
 NE : relative volume did not reach twice of the initial volume.

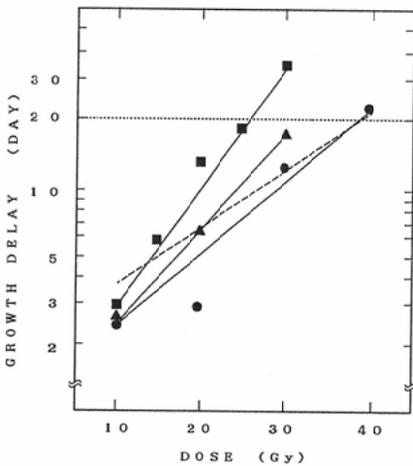


Fig. 4 Growth delay of the FM3A tumor as a function of the radiation dose for mice treated with DNIE. The mice received 5/6 (■), 1/2 (▲), or 1/4 (●) of the LD50 of DNIE. The broken line is for mice injected with saline.

Table 4 Enhancement Ratios of Hypoxic Cell Radiosensitizers

Compound	Dose(ratio to LD50)		
	1/4	1/2	5/6
RK28	1.37	1.74	
DNIE	1.00	1.18	1.52
MISO		1.41	

ERは1/2量投与時1.74, 1/4量投与時1.37となった (Fig. 3, Table 4).

DNIE ; LD50の5/6量を投与し, 30Gy, 20Gy, 10Gy 照射したときのGDはそれぞれ34.7, 13.5,

Table 5 Physico-chemical characteristics of the compounds

Compound	Electron affinity <sup>a</sup>	Partition coefficient octanol : water	LD50 (mg/kg)
RK28	-0.97	0.53	830
DNIE	-0.72	0.51	300
MISO	-1.05	0.43	2,000

a ;  $E_{1/2}^{red} (S/S^-)/V$  vs  $Ag/Ag^+$

3.3日, 1/2量を投与し, 30Gy, 20Gy, 10Gy 照射したときには17.1, 6.5, 2.7日, 1/4量を照射し, 40Gy, 30Gy, 20Gy, 10Gy 投与したときに23.0, 13.2, 2.8, 2.6日であった。5/6量, 1/2量投与時に40Gy 照射すると腫瘍体積が2倍にならなかった。また薬剤量にかかわらず10Gy 照射したとき及びLD50の1/4量投与し20Gy 照射したときのように少量, 少線量では照射単独群よりもGDが小さい傾向がみられた (Table 3)。以上より20日のGDを得るのに必要なX線線量はLD50の5/6, 1/2, 1/4量投与時23.5Gy, 31.8Gy, 38, 8Gyとなる。従ってERはLD50の5/6量投与時1.52, 1/2量投与時1.18, 1/4量投与時1.00となった (Fig. 4, Table 4)。

MISO ; LD50の1/2量を投与し, 30Gy, 20Gy, 10Gy 照射したときのGDはそれぞれ30.1, 12.4, 6.1日となった。40Gy 照射したときには腫瘍体積が2倍にならなかった (Table 3)。従って20日のGDを得るのに必要なX線線量は27.5Gyとなり, ERは1.41となった (Fig. 5, Table 4)。

### 3. 生体内分布および代謝の検討

RK28 ; 腹腔内投与40分後の血清の chromatogram を Fig. 6 に示す。control と同一の retention time のピークが認められ, 生体内でも比較的安定と考えられた。腹腔内投与10分後の血液, 腫瘍, 脳内濃度は292, 166, 181 $\mu$ g/g, 20分後には177, 111, 159 $\mu$ g/g, 40分後には115, 73, 114 $\mu$ g/g となった (Fig. 7)。

DNIE ; マウス腹腔内投与30分後にはDNIEは検出できなくなり, retention time の異なる新しいピークが検出できた (Fig. 8)。この代謝産物の紫外線吸収値をもとにした血液, 腫瘍, 脳内の相

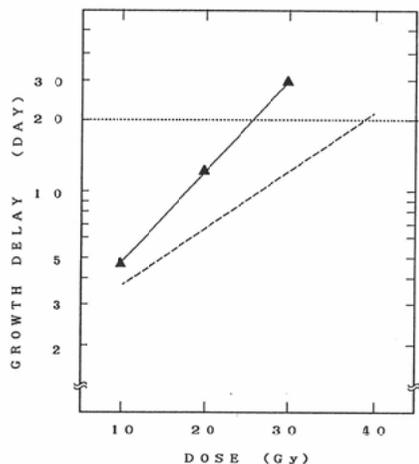


Fig. 5 Growth delay of the FM3A tumor as a function of the radiation dose for mice treated with misonidazole. The mice received 1/2 of the LD50 ( $\blacktriangle$ ) of misonidazole. The broken line is for mice injected with saline.

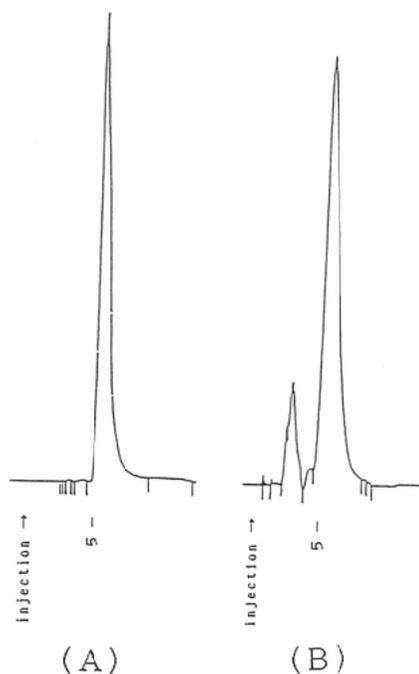


Fig. 6 Chromatogram of reversed-phase HPLC of RK28. Column, C18 ODS; carrier, 20% acetonitrile in water; detection, 325 nm. RK28 alone (A) and plasma obtained from mice 20 min after the intraperitoneal injection of 1/2 of the LD50 of RK28 (430 mg/kg) (B). RK28 was almost completely stable in vivo.

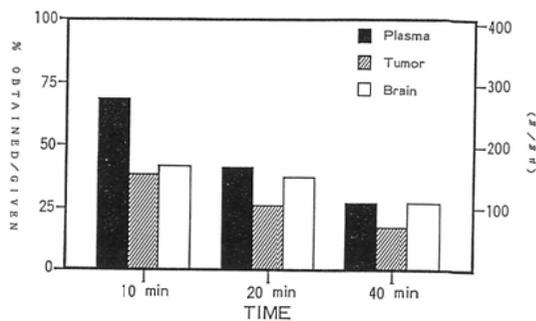


Fig. 7 Distribution of RK28 in C3H/He mice bearing FM3A tumors as a function of time after the intraperitoneal injection of 1/2 of the LD50 of RK28. Each point is a mean of the data from six mice.

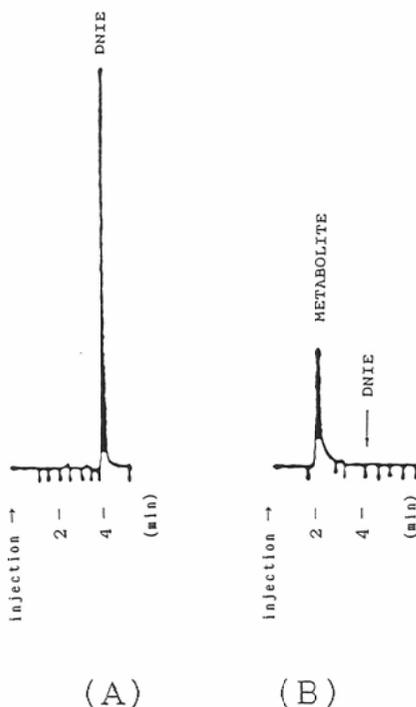


Fig. 8 Chromatogram of reversed-phase HPLC of DNIE. Column, C18 ODS; carrier, 20% acetonitrile in water; detection, 325nm. DNIE alone (A) and plasma obtained from mice 30 min after the intraperitoneal injection of 100mg/kg of DNIE (B). DNIE was rapidly metabolized in vivo. The original peak of DNIE disappeared and a new peak at a shorter retention time appeared.

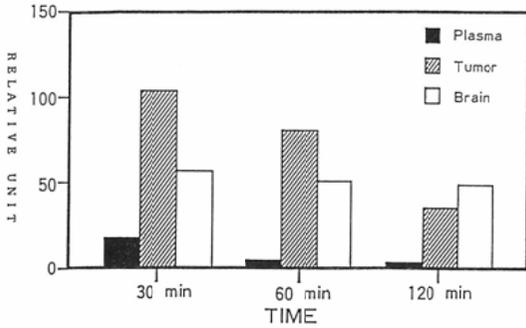


Fig. 9 Distribution of metabolites of DNIE in C3 H/He mice bearing FM3A tumors as a function of time after the intraperitoneal injection of 1/2 of 1/2 of the LD50 of DNIE. Each point is a mean of the data from six mice.

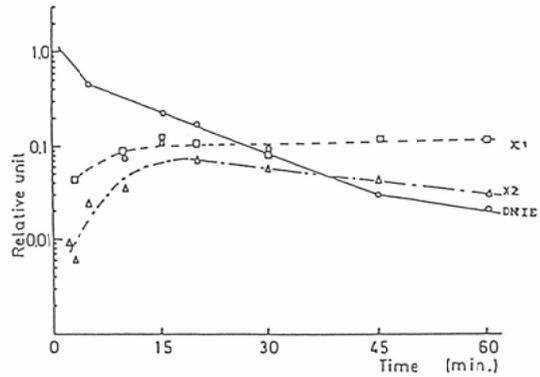


Fig. 11 Concentrations of DNIE and its metabolites X1 and X2 over time in the plasma of a Japanese white rabbit after an intravenous injection of 350 mg.

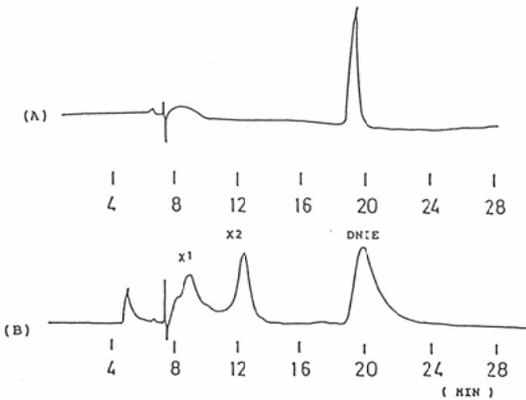


Fig. 10 Chromatogram of reversed-phase HPLC of DNIE. Column, C18 ODS; carrier, 20% acetonitrile in water; detection, 325 nm. DNIE alone (A) and plasma obtained from rabbit 20 min after the intravenous injection at 350 mg of DNIE (B). Metabolites X1 and X2 were found.

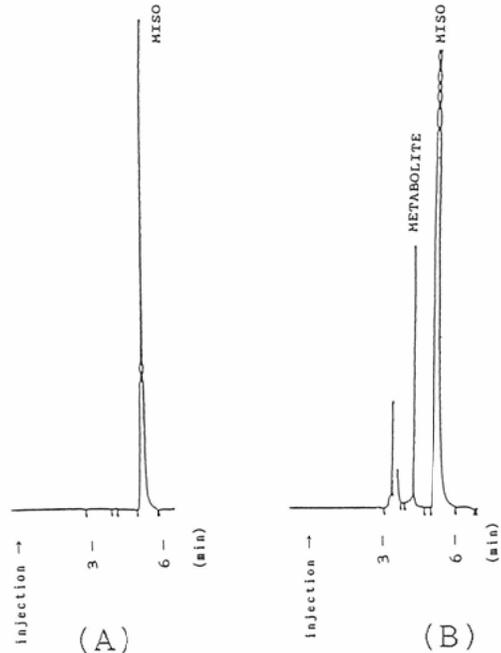


Fig. 12 Chromatogram of reversed-phase HPLC of misonidazole. Column, C18 ODS; carrier, 20% acetonitrile in water; detection, 325 nm. Misonidazole alone (A) and plasma obtained from mice 30 min after the intraperitoneal injection of 1/2 of the LD50 of misonidazole (1,000mg/kg) (B). A small amount of a metabolite was detected.

対濃度を Fig.9 に示す。さらに代謝産物を分離、検出するために HPLC の溶媒の流速を遅くすると、代謝産物は 2 個のピーク X1, X2 に分離できた (Fig. 10)。家兎動脈血中の濃度の経時的变化を Fig. 11 に示す。横軸は投与後の時間 (分)、縦軸は相対濃度の常用対数をあらわしている。DNIE は速やかに減少していくが、代謝産物 X1, X2 がかわりに上昇した。X1 は 60 分後まではほぼ同一濃度を保っており、X2 は 20 分後に最高濃度に達し以後漸減した。

MISO; 腹腔内投与 40 分後の血清の chromatogram を Fig. 12 に示す。少量の代謝産物の peak

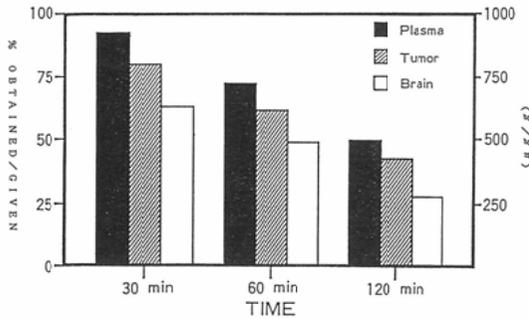


Fig. 13 Distribution of misonidazole in C3H/He mice bearing FM3A tumors as a function of time after the intraperitoneal injection of 1/2 of the LD50. Each point is a mean of the data from six mice.

が認められるが、生体内ではほぼ安定していると考えられた。腹腔内投与30分後の血液、腫瘍、脳内濃度は923, 795, 630 $\mu\text{g/g}$ , 60分後には717, 615, 491 $\mu\text{g/g}$ , 120分後には492, 425, 280 $\mu\text{g/g}$ となった (Fig 13)。

#### 考 察

放射線の酸素効果の機序についてまだ充分には解明されていないが、この問題に関し以下の如き仮説が提唱されている。すなわち電離放射線の照射によって $10^{-6}$ 秒程度の寿命の遊離基が形成され、電子親和性の高い酸素はこの遊離基と反応し、非可逆的な変化をきたし、放射線の効果を増強すると考えられている<sup>3)</sup>。腫瘍は自律的に増殖するため血管新生が不十分で、毛細血管から遠い部では栄養ならびに酸素の供給不足のため壊死がおこる。壊死巣と正酸素状態の腫瘍細胞との境界に存在する低酸素状態の腫瘍細胞の放射線抵抗性が放射線による腫瘍の局所制御失敗の重要な原因の一つと考えられている<sup>1)</sup>。

酸素のように腫瘍細胞によって代謝されずに、毛細血管から遠位にある腫瘍細胞まで到達でき、かつ酸素と同様に電子親和性の高い化合物が存在すれば、酸素でなくても酸素類似の増感効果をあらわすといわれている<sup>15)</sup>。

以上の仮説をもとにして低酸素細胞に対する放射線治療効果を向上させるために低酸素細胞放射線増感剤の使用が試みられてきた。細菌や培養細

胞を用いた実験から増感効果の強さと電子親和性との間には相関関係が見いだされ、新しい増感剤を合成するときの目安になっている<sup>16)</sup>。特に芳香族ニトロ化合物およびヘテロ環ニトロ化合物は低酸素状態の培養細胞に対して強い増感効果を示した。ニトロイミダゾール系化合物は毒性、安定性、水溶性等薬剤に必要な性質を満たしており有力な増感剤と考えられるようになった。トリコモナスの治療薬として既に臨床使用されていた5-ニトロイミダゾール化合物である metronidazole (Flagyl)を始めて、多くの薬剤が試みられてきた<sup>17)18)</sup>。in vitro および動物実験レベルで優れた効果を示した MISO が注目され、第一世代の増感剤として世界的規模で臨床第3相試験が行われた。しかし、主に神経毒性のために十分な薬剤量を投与できず、残念ながら有用性を確立するにはいたらなかった<sup>19)~25)</sup>。

MISOにおける経験を基礎として、増感効果が同程度であればより毒性(特に神経毒性)が低い薬剤、毒性が同程度であればより増感効果の高い薬剤の開発が進められている。MISO および類似化合物の薬化学的検討からニトロイミダゾール系薬剤の神経毒性は主として側鎖構造によって規定される脂溶性、体内滞留時間に関係し、増感効果はイミダゾール環の構造によって規定される電子親和性に支配されるといわれている<sup>26)</sup>。脂溶性に関してはオクタノール・水分配係数 (octanol: water partition coefficient 以下 P と略す) が一つの指標となっている。MISO (P=0.43) よりも脂溶性の少ない desmethyl misonidazole (P=0.13) が臨床試験の対象となったが、本剤ではやはり神経毒性が認められた<sup>27)28)</sup>。更に分配係数の小さい化合物として2-ニトロイミダゾールアミドの SR-2508 (1-[N-(2-hydroxyethyl)acetamidyl]-2-nitroimidazole, P=0.046) が合成された。本剤は生体内からの排泄も速やかで、実験腫瘍レベルで良好な成績が示されている<sup>29)</sup>。第1相臨床試験で安全性が確かめられ、現在アメリカで第3相臨床試験が行われつつある<sup>30)31)</sup>。

本邦においても、類似のポリシーに沿って多くのニトロイミダゾール系増感剤候補物質が合成さ

れたが、その多くは水溶性、安定性、毒性の面で *in vitro* では有効でも *in vivo* では無効であった。

今回 *in vivo* 検定を行った2つの化合物および MISO の電子親和性、オクタノール・水分配係数、LD50は Table 5のごとくである。このうち RK28 は坂口が nucleoside が脳血液関門を通過し難いことに着目して側鎖を環状5炭糖とした RA-263 の近縁化合物として開発した化合物である<sup>32)</sup>。また DNIE はニトロ基を2個にすることにより、電子親和性を高め、増感活性を強めることを目的として稲山らが合成した<sup>33)</sup>。

RK28は *in vitro* の検定では MISO の約20%の濃度で同程度の増感効果を示すことが知られている<sup>34)</sup>。本剤は電子親和性では MISO とほぼ同程度ないしやや高いが、マウスの LD50は MISO の約40%であった。オクタノール・水分配係数でみると脂溶性は高い。また HPLC による脳内濃度も RA-263では腫瘍内濃度の20%以下であったと報告されているが<sup>35)</sup>、RK28はむしろ脳内濃度の方がやや高値であった。しかし生体よりの排泄速度は MISO に比較して著しく早く (Fig. 7, 13)、かつ投与量が約40%であることもあって、腹腔内投与後40分の脳内濃度は絶対値で MISO の20%以下 (LD50を基準とした相対値で50%以下)であった。さらに月曜から金曜まで5日間連日照射する現在の標準的な放射線治療スケジュールに増感剤を併用するとすれば、体内から速やかに排泄される性質は反復投与に適していると考えられた。また坂口らの Rotarod 法による神経毒性試験では400 mg/kg および700mg/kg の1回投与では異常を認めず、連日400mg/kg の4週間投与時には29% (2/7) に抑制例が認められたが4週間の回復期間終了後は正常に回復したと報告している<sup>37)</sup>。従って今回投与した薬剤量では神経毒性は認めないと考えられた。他方増感効果でみると LD50の1/2量で ER1.74、1/4量で1.37と MISO のLD50の1/2量での ER1.41を越え、臨床に使用できる可能性が高く有望であると考えられた。

次に毒性が従来からの薬剤と同程度でも増感効果が十分に強力であれば、投与量は少なくすむ、最終的には低毒性であるような薬剤も考えられ

る。DNIEはこの様な考えのもとに合成され、一つのイミダゾール環に2個のニトロ基を結合し、電子親和性が高く強力な増感効果が予想された。*in vitro* の増感効果・細胞毒性比で考えると MISO よりも約10倍優れており、実験動物レベルでの検定が待たれていた<sup>38)</sup>。今回の *in vivo* の検定では LD50の1/2量での ERは1.18と MISO より低く、LD50の5/6量でようやく MISO のレベルであり、毒性・効果比の面で直ちに実用化は困難と考えられた。DNIE の代謝産物である X1, X2は DNIE のヒドロキシアミン誘導体と考えられており<sup>39)</sup>、それ自体の増感効果について当該化合物を合成して検定することも必要と思われた。いずれにせよ DNIE は生体内投与後速やかに代謝される。したがって生体内でも安定であるか、あるいは代謝された後強力な増感活性を発揮するように側鎖を変えることができれば有望な放射線増感剤になる可能性がある<sup>40)</sup>。また DNIE の薬理作用が一回投与量や一回照射線量を変化させることにより放射線増感効果や防護作用を示すという報告がある<sup>41)42)</sup>。我々のデータでも DNIE の濃度に関係なく10Gy 照射した時と LD50の1/4量投与時の20Gy 照射時には GDの短縮が認められ、放射線防護的に作用している。生物学的バラツキの可能性もあり、防護的效果の機序についても不明の点が多いが、放射線増感剤を開発していく上で非常に興味深い現象であると思われた。

増感剤の効果の優劣を判定する基準として、現在 ER が一般的に用いられており、マウスに MISO を1mg/g 投与したときの ERは1.7~2.0程度という報告が多い<sup>43)44)</sup>。今回比較のために行った MISO のLD50の1/2量投与時の ERは1.41であり、他の報告よりも少し低い傾向が認められた。原因として、使用する実験動物—腫瘍系、照射法、ER の評価法等が異なっていることが考えられる。例えば使用する腫瘍の種類、大きさが異なると、その中に含まれる低酸素細胞の比率が異なる。全身麻酔を併用すると血圧は低下し、腫瘍の血流の低下のために一時的に低酸素細胞が増加する。さらに麻酔による低体温の影響や、麻酔薬そのものに放射線防護作用があるという報告も

ある<sup>45)~47)</sup>。この様に腫瘍中に含まれる低酸素細胞分画の比率の変化などにより、同じ増感剤投与でも見かけ上 ER は変動することになる。従って増感剤の研究、開発を進めていく上で、基準となる検定システムが確立していない今の段階では ER の絶対値のみで薬剤の優劣を比較することには問題があると思われる。in vitro の系では oxygen enhancement ratio (OER) との比で比較することも容易であるが、in vivo の系では困難である。そこでマウス実験腫瘍レベルで優れた効果を示すことが明らかな MISO を基準にして、同じ検定系の MISO の ER よりも優れているか否かを決定することが有用であると考えられる。

#### まとめ

ニトロイミダゾール系低酸素細胞放射線増感剤のうち RK28 と DNIE について急性毒性、低酸素細胞に対する放射線増感効果、体内濃度について C3H/He マウスおよび FM3A 移植腫瘍を用いて実験を行い、MISO と比較し以下の結果を得た。

1. RK28, DNIE とともに in vivo でも増感効果を示し、電子親和性を指標とした増感剤開発の妥当性を確認した。増感活性の指標として、MISO の増感率と比較することが望ましいと考えられた。

2. RK28 の LD50 は 830mg/kg であり、増感率は LD50 の 1/2 量、1/4 量投与時に 1.74, 1.37 であった。同じ実験系での MISO の増感率は LD50 の 1/2 量投与時に 1.41 であった。生体内でも比較的安定で、排泄は速やかであった。腹腔内投与 40 分後の脳内濃度は MISO の 20% 以下であり、低い神経毒性が予想された。MISO よりも毒性・効果比が優れており、臨床的に使用できる可能性が高い。

3. DNIE の LD50 は 300mg/kg であり、増感率は LD50 の 5/6, 1/2, 1/4 量投与時に 1.52, 1.18, 1.00 であった。生体内では速やかに代謝され、また毒性・効果比も MISO に及ばず、このままでは臨床応用は不可能であり、改良の余地があることが示された。

この研究は文部省科学研究費補助金がん特 1 の援助によることを付記する。

#### 文 献

- 1) Thomlinson RH, Gray LH: The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Brit J Cancer* 9: 539-549, 1955
- 2) Kallman RF: The phenomenon of reoxygenation and its implications for fractionated radiotherapy. *Radiology* 105: 135-142, 1972
- 3) Gray HL: Radiobiologic basis of oxygen as a modifying factor in radiation therapy. *Am J Roentgenol Rad Therapy Nuclear Med* 85: 803-815, 1961
- 4) Montour JL, Wilson JD, Rogers CG, et al: Biological characterization of a high energy neutron beam for radiation therapy. *Cancer* 34: 54-64, 1974
- 5) D'Angio GJ, Aceto H, Nisce LZ, et al: Preliminary clinical observations after extended Bragg peak helium ion irradiation. *Cancer* 34: 6-11, 1974
- 6) Brenk VD: Hyperbaric oxygen in radiation therapy. An investigation of dose-effect relationships in tumor response and tissue damage. *Am J Roentgenol Rad Therapy Nuclear Med* 102: 8-26, 1968
- 7) Henk JM: Late results of a trial of hyperbaric oxygen and radiotherapy in head and neck cancer: A rationale for hypoxic cell sensitizers? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12: 1339-1341, 1986
- 8) 高橋正治, 筒井一成: 放射線治療における 1 日多分割照射法について, *日本放医会誌*, 42: 951-961, 1986
- 9) Weissberg JB, Son YH, Percarpio B, et al: Randomized trial of conventional versus high fractional dose radiation therapy in the treatment of advanced head neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8: 179-185, 1982
- 10) Coley WB: The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 105: 487-511, 1893
- 11) 中島俊文: ハイパーサーミアの臨床応用に関する研究. *日本ハイパーサーミア誌*, 2: 215-229, 1986
- 12) 小野山靖人, 中島俊文, 田中正博: 放射線増感剤について—低酸素性細胞放射線増感剤を中心に—, *癌と化学療法*, 13: 894-903, 1986
- 13) 斎藤武郎: C3H マウス乳癌の腹水型転換—マウス腹水乳癌 FM3A の樹立, *福島医学雑誌*, 12: 335-352, 1962
- 14) Okumura Y: Nutritional depletion of the established stationary phase during growth of

- mouse mammary carcinoma cells in suspension culture. *Gann* 69 : 389—393, 1978
- 15) 小野山靖人 : Hypoxic cell sensitizer, 癌の集学的治療 (放医研編), p298—318, 1980
  - 16) Adams GE, Flockhart IR, Smithen CE, et al : Electron-affinic sensitization VII. A correlation between structures, one-electron reduction potentials, and efficiencies of nitroimidazoles as hypoxic cell radiosensitizers. *Rad Res* 67 : 9—20, 1976
  - 17) Adams GE : Chemical radiosensitization of hypoxic cells. *Br Med Bull* 29 : 48—53, 1973
  - 18) Asquith JC, Foster JL, Willson RL, et al : Metronidazole ("Flagyl"). A radiosensitizer of hypoxic cells. *Br J Radiol* 47 : 474—481, 1974
  - 19) Hall EJ, Roizin-Towle L : Hypoxic sensitizers: Radiobiological studies at the cellular level. *Radiology* 117 : 453—457, 1975
  - 20) Urtasun RC, Band P, Chapman JD, et al : Clinical phase I study of the hypoxic cell radiosensitizer Ro-07-0582, a 2-nitroimidazole derivative. *Radiology* 122 : 82, a 2-nitroimidazole derivative. *Radiology* 122 : 801—804, 1977
  - 21) Wasserman TH, Stetz J, Phillips TL : Radiatin therapy oncology group clinical trials with misonidazole. *Cancer* 47 : 2382—2390, 1981
  - 22) Medical Research Council: The Medical Research Council trial of misonidazole in carcinoma of the uterine cervix: A report from the MRC working party on misonidazole for cancer of the cervix. *Brit J Radiol* 57 : 491—499, 1984
  - 23) Bauer M, Leibel S, Wasserman T, et al : Effect of misonidazole dose on survival in patients with stage IIIB-IVA squamous cell carcinoma of the uterine cervix: An RTOG randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12 : 1101—1103, 1986
  - 24) Onoyama Y, Nakajima T : Clinical evaluation of misonidazole and future prospects of hypoxic cell radiosensitizer. *Proceedings of the 1st Japan-China bilateral symposium on radiosensitization*. p7—17, 1985
  - 25) Dische S : Role of hypoxic cells and local failures of irradiation. *Plenary Session Proceedings. XVI. International Congress of Radiology*, P165—170, 1985
  - 26) Brown JM, Workman P : Partition coefficient as a guide to the development of radiosensitizers which are less toxic than misonidazole. *Radiat Res* 82 : 171—190, 1980
  - 27) Dische S, Saunders MI, Stratford MRL : Neurotoxicity with desmethylmisonidazole *Br J Radiol* 54 : 156—157, 1981
  - 28) Coleman CN, Wasserman TH, Phillips TL, et al : Initial pharmacology and toxicology of intravenous desmethylnisonidazole. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8 : 371—375, 1982
  - 29) Brown JM, Yu NY, Brown DM, et al : SR-2508: A 2-nitroimidazole amide which should be superior to misonidazole as a radiosensitizer for clinical use. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 7 : 695—703, 1981
  - 30) Coleman CN, Wasserman TH, Urtasun RC, et al : Phase I trial of the hypoxic cell radiosensitizer SR-2508: The results of the five to six week drug schedule. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12 : 1105—1108, 1986
  - 31) Adams GE, Stratford IJ : Hypoxic-mediated nitro-heterocyclic drugs in the radio- and chemotherapy of cancer, An overview. *Biochem Pharmac* 35 : 71—76, 1986
  - 32) Sakaguchi M, Larroquette CA, Agrawal KC : Potential radiosensitizing agents. 6.2-nitroimidazole nucleosides: Arabinofuranosyl and hexopyranosyl analogues. *J Med Chem* 26 : 20—24, 1983
  - 33) Shibata C, Hori H, Inayama S, et al : Radiosensitizing effect of 2,4-dinitroimidazole-1-ethanol and its cytotoxicity in HeLa S3 cells. *Strahlentherapie* 157 : 481—485, 1981
  - 34) 母里知之 : 低酸素細胞増感剤の実験的研究. 文部省科学研究費がん特別研究 I, 小野山班, 昭和58年度研究報告書, p42—47, 1983
  - 35) Agrawal KC, Rupp WD, Rockwell S : Radiosensitization, pharmacokinetics, and toxicity of a 2-nitroimidazole nucleoside (RA-263). *Radiat Res* 105 : 227—239, 1986
  - 36) 宮本裕二 : 新低酸素細胞増感剤 RK-28 の動物正常組織および Ehrlich 腫瘍に対する放射線増感効果について, 日本医放会誌, 45 : 1151, 1985
  - 37) 坂口正一 : Personal communication.
  - 38) Inayama S, Hori H, Ohsaka T, et al : An approach to the design and synthesis of mercaptoimidazole derivatives containing oxidized sulfur based on electron affinity sensitization. *Gann* 72 : 156—159, 1981
  - 39) 稲山誠一 : 増感剤の薬化学的分子設計と合成. 文部省科学研究費がん特別研究 I, 小野山班, 昭和60年度研究報告書, p26—34, 1985
  - 40) 田中正博, 中島俊文, 福田晴行, 他 : 低酸素性細胞放射線増感剤 Dinitroimidazole 誘導体のマウス腫瘍に対する効果, 日本医放会誌, 46 : 1442

- 1443, 1986
- 41) 芝本雄太, 小野公二, 高橋正治, 他: 放射線増感剤の大量投与時にみられたマウス腫瘍の放射線防護現象, 日本医放会誌, 46: 725—727, 1986
- 42) 柴田徹一, 伊東久夫, 堀 均, 他: 放射線増感効果を有する DNIE のマウス腫瘍に対する放射線防護現象—II. 日本癌学会総会記事第45回総会, p570, 1986
- 43) McNally NJ, Denekamp J, Sheldon P, et al: Radiosensitization by misonidazole (Ro 07-0582), The importance of timing and tumor concentration of sensitizer. *Rad Res* 73: 568—580, 1978
- 44) Sheldon PW, Hill SA: Hypoxic cell radiosensitizers and local control by X-ray of a transplanted tumour in mice. *Br j Cancer* 35: 795—808, 1977
- 45) Sheldon PW, Chu AM: The effect of anesthetics on the radiosensitivity of a murine tumor. *Rad Res* 79: 568—578, 1979
- 46) Johnson R, Fowler JF, Zanelli GD: Changes in mouse blood pressure, tumor blood flow, and core and tumor temperatures following nembutal or urethane anesthesia. *Radiol* 118: 697—703, 1976
- 47) Zanelli GD, Lucas PB, Fowler JF: The effect of anaesthetics on blood perfusion in transplanted mouse tumours. *Br J Cancer* 32: 380—390, 1975
-