The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | ミソニダゾールとSR-2508の実験動物腫瘍に対する放射線増感効果に関する研究 |
| Author(s) | 小野, 公二; 高橋, 正治; 浜中, 大三郎 他 |
| Citation | 日本医学放射線学会雑誌. 1983, 43(2), p. 370-376 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/16093 |
| rights | |
| Note | |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

# ミソニダゾールとSR-2508の実験動物腫瘍に対する放射線増感効果に関する研究

京都大学医学部放射線医学教室
小野　公二　　高橋　正治　　浜中大三郎
平岡　真寛　　西台　武弘　　阿部　光幸

（昭和57年2月18日受付）
（昭和57年5月24日最終原稿受付）

# Studies in Radiosensitizing Effects of Misonidazole and SR-2508 on Experimental Animal Tumors

Koji Ono, Masaji Takahashi, Daisaburo Hamanaka, Masahiro Hiraoka
Takehiro Nishidai and Mistusyuki Abe
Department of Radiology, Faculty of Medicine, Kyoto University

*Research Code No.: 407*
*Key Words: Radiosensitizer, Misoniazole, SR-2508*

Radiosensitizing efficacy of SR-2508, a new 2-nitroimidazole, which is less neurotoxic than misonidazole was studied using the spontaneous mammary carcinoma of C3H/He mice. The tumor growth delay assay showed that radiosensitizing effects of SR-2508 and misonidazole reached the maximum when radiation was given 30 and 60 minutes after an i.v. injection of SR-2508 and misonidazole respectively. Thereafter radiosensitizing efficacy of both drugs decreased gradually and no significant difference in the sensitizing effects was observed between the two drugs.

Studies on their radiosensitizing effects as a function of the drug dose showed no significant difference in their efficacy at any dose levels. However, at the equitoxic dose level, the radiosensitizing effect of SR-2508 was greater than misonidazole in the dose range of more than 1,000 rad. Under acutely hypoxic conditions induced by clamping the tumor bearing thigh, the same degree of SERs was observed both in the dose range of less than and more than 1,000 rad.

SR-2508 is expected to be the promising hypoxic cell sensitizer in clinical use.

## 緒　言

腫瘍組織に存在する放射線抵抗性の低酸素性細胞は放射線治療の成否に影響すると言われている．過去，低酸素性細胞の問題を解決するために高圧酸素吸入下照射，95% $O_2$と5% $CO_2$の混合ガス吸入下照射などが行われたが満足すべき結果を得るに至っていない[1)2)]．酸素が腫瘍組織内の低酸素性細胞領域へ浸透していく過程で消費されることが失敗の原因と考えられている．高LET放射線はOERが小さく強力な手段であるが，一般に大型加速器を必要とする点で，いかなる施設でも利用できるというものではない．酸素と異なり腫瘍組織中で消費されず，低酸素性細胞に充分浸透し，放射線生物学的に酸素と同様の作用を有する化学物質があれば低酸素性細胞克服の有力な手段となり得る．

低酸素性細胞の選択的増感作用と電子親和性の関連が明らかになって以来[3)4)]，いくつかの低酸素性細胞増感剤が出現した[5)~11)]．現在，これらのなかで培養細胞および実験動物腫瘍系での放射線増感効果が確認され[12)~19)]，臨床応用可能なものにミソニダゾールがあり[20)~23)]，我国でも二重盲検法によ

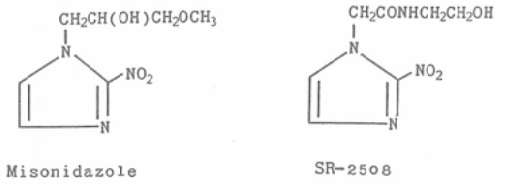


Fig. 1　Chemical structures of misonidazole (MIS) and SR-2508.

る臨床効果の検討が進行中である．しかしミソニダゾールは副作用としての神経毒性を有し[24)~29)]，投与量に限界がある．毒性は組織内の薬剤濃度と接触時間の積に深く関係している[24)30)]．最近，スタンフォード大学のBrownら[31)]により開発されたSR-2508はミソニダゾールの側鎖を修飾し，神経組織への薬剤の移行を低下させ，かつ腎よりの排泄を早めた結果，神経毒性の低減に成功した新しい低酸素性細胞増感剤である．

本研究ではSR-2508とミソニダゾールの放射線増感効果について実験動物腫瘍を用いて比較検討した．

## 研究方法

1．低酸素性細胞増感剤

SR-2508とミソニダゾールの構造式をFig. 1に示す．SR-2508はミソニダゾールの側鎖を$CH_2CHOHCH_2OCH_3$から$CH_2CONHCH_2CH_2OH$に変え，脂溶性を低下させている．両者のoctanol：水における分配係数はミソニダゾール0.43，SR-2508 0.046である[31)]．また電子親和性の指標となる一電子還元電位はミソニダゾール：−389mV，SR-2508：−388mVであり[31)]，等しい増感作用が期待される．両者を生理食塩水に溶解し，SR-2508の腹腔よりの吸収が悪い点を考慮して実験に際してはマウス尾静脈より投与した．

2．実験動物および腫瘍系

実験には京大医学部動物センターにて繁殖させたC3H/Heの約7週齢マウスを用いた．腫瘍系は同系マウス自然発生乳癌を用いた．凍結保存した第二世代腫瘍をマウスの背部皮下に移植し，増殖させた第三世代乳癌を摘出し，細切した後5％仔牛血清を含むHanks氏液と混合し20分間静置し，上澄をSwinny filterにて濾過し，1,500rpmで10分間遠沈した．生じた沈渣を同様のHanks氏液にて希釈し，単離腫瘍細胞濃度を約$2\times10^6$細胞/5 $\mu l$とした．この単離細胞浮遊液5 $\mu l$をマウスの右大腿皮下に移植した．腫瘍が約20日後，平均腫瘍径9.5mm，平均腫瘍容積で450$\mu l$に達した時実験に供した．

3．照射法，血流遮断処置

島津製BT 32型ベータトロンにて発生させた32MeVの電子線を用い，腫瘍局所以外は鉛にて遮蔽，腫瘍局所を含む右大腿部のみを照射した．照射線量率は毎分1,500radであった．通常の照射条件下ではマウスの麻酔は施行しなかった．

血流遮断下照射実験に際しては，照射5分前から，照射器具に装着したバネ式クリップでマウス右そ径部を圧迫し，照射終了まで血流遮断を続行した．この実験に際しては照射10分前にネンブタール1 mgをマウス腹腔内に投与し麻酔した．

4．増感率の判定

放射線照射後，毎日ほぼ同時刻にノギスにて腫瘍直径を計測し，一度縮小した腫瘍が，再増殖により照射時の容積にもどるまでの時間，即ちTumor Growth Delay Timeを求めた．次に等しいGrowth Delay Timeを得るに要する線量を対照群，増感剤併用群について求め，両者の比から増感率を算出した．腫瘍容積Vは縦，横，高さの三方向の腫瘍直径を各々a, b, cとして，次式$V=a\cdot b\cdot c\cdot\pi/6$にて求めた．

## 結　果

1．照射後の腫瘍容積の変化

Fig. 2に非照射群，放射線照射単独群，ミソニダゾール併用群，SR-2508併用群の照射後の腫瘍容積の経日的変化を示す．非照射群は2.5日の体積倍加時間で増殖している．2,000radの照射を受けた腫瘍は翌日より腫瘍容積の減小が認められ，しかる後に再増殖し，照射時容積を回復する．

2．薬剤投与・照射間隔と増感効果

Fig. 3にSR-2508，ミソニダゾールの各々0.5 mM/kg投与後，15分，30分，60分，90分に2,000 rad照射した際の平均のGrowth Delay Timeを示す．各群のマウスは5匹とした．SR-2508は30分後に，ミソニダゾールは60分後にGrowth Delay

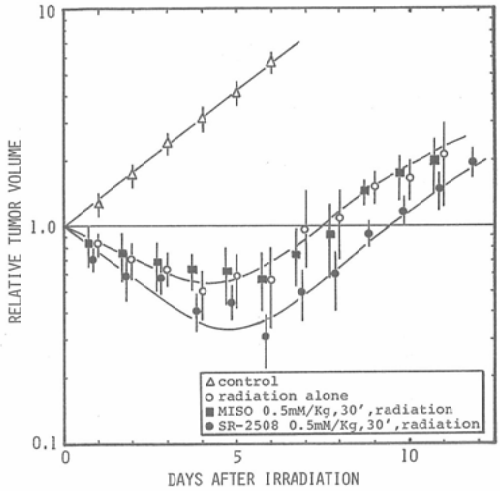


Fig. 2 The growth curves for C3H/He mouse mammary tumors either untreated (control) or irradiated with 2,000 rad. Vertical lines represent standard deviation.

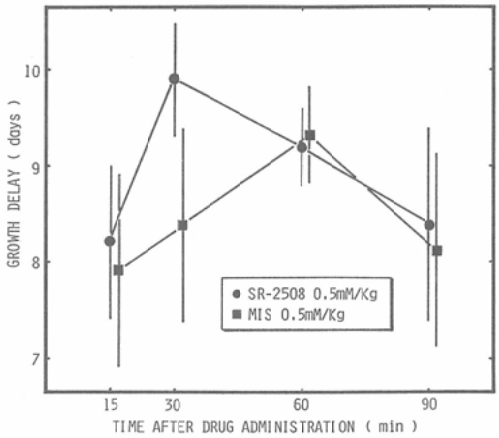


Fig. 3 The growth delay time of C3H/He mouse mammary tumors as a function of irradiation time after MIS and SR-2508 administration. A single dose of 2,000 rad was given to the tumors. Vertical lines represent standard deviation.

Time が最大となり各々9.7±0.7日，9.3±0.7日となった．SR-2508投与群では投与15分後に既に増感効果が認められた．60分および90分後の照射では両群の Growth Delay Time の延長は同程度であった．

3．投与量と増感効果

投与量と増感効果の関係を Fig. 4 に示す．SR-

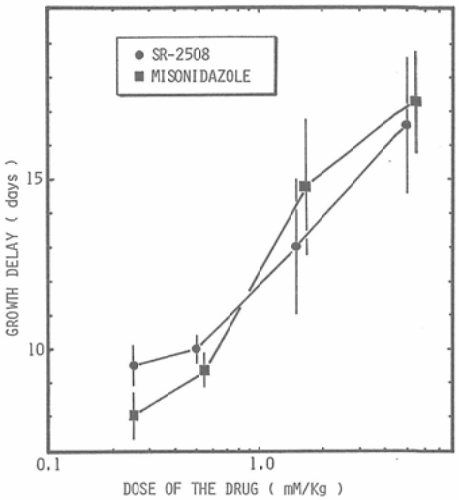


Fig. 4 The growth delay time of C3H/He mouse mammary tumors as a function of drug doses. A single dose of 2,000 rad was given to the tumors 30 and 60 minutes after administration of SR-2508 and MIS respectively.

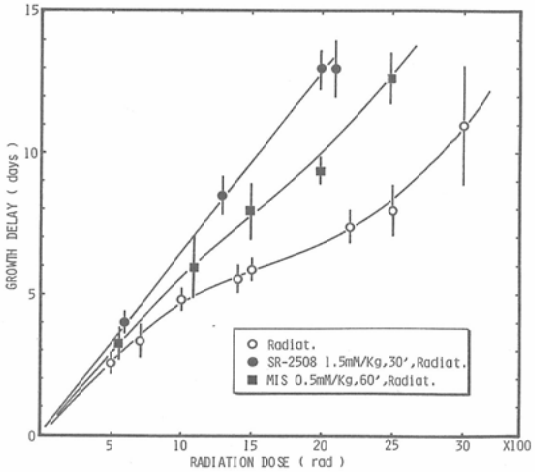


Fig. 5 The growth delay time of C3H/He mouse mammary tumors as a function of radiation doses. 1.5 mM/kg of SR-2508 were given i.v. 30 minutes before irradiation, 0.5 mM/kg of MIS were given i.v. 60 minutes before irradiation. Vertical lines represent standard deviation.

2508とミソニダゾールそれぞれ0.25mM/kg，0.5 mM/kg，1.5mM/kg，5 mM/kg を投与し，SR-2508投与群では全例30分後に，ミソニダゾール投与群では0.5mM/kg 以上のものは60分後に，0.25

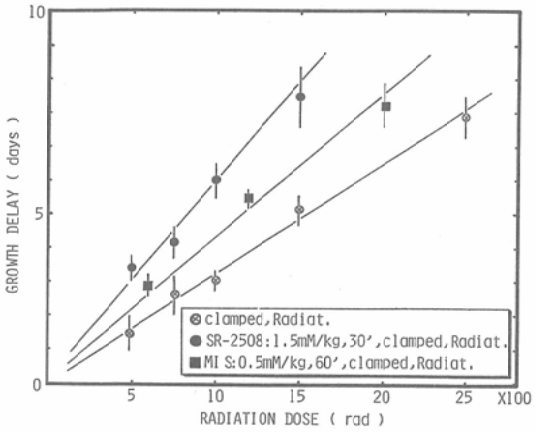


Fig. 6　The growth delay time of C3H/He mouse mammary tumors as a function of radiation doses under acutely hypoxic conditions produced by clamping the tumor bearing thigh.

mM/kg 投与群は薬剤の生体内での動態を考慮して30分後に2,000rad 照射した．両者の Growth Delay Time の変化をみると，SR-2508の0.25 mM/kg 投与群の Growth Delay Time が同量のミソニダゾール投与群より長くなっている以外両者の増感効果は等しかった．

4．照射線量と増感効果

放射線照射量と Growth Delay Time の関係を Fig. 5 に示す．放射線量を段階的に変え，放射線単独群，SR-2508，1.5mM/kg 投与群，これと等しい毒性[32]のミソニダゾール0.5mM/kg 投与群の3群の Tumor Growth Delay Time を比較検討した．放射線単独群は1,000rad付近で屈折する二相性の曲線となり，薬剤併用時には1,000rad 以下の領域では Growth Delay Time の延長はみられなかった．1,000rad 以上の高線量域では薬剤併用群で有意な延長がみられ，$SER_{10}$（Growth Delay Time 10日を得るに要する線量比から求めた増感率）はミソニダゾールの0.5mM/kg 投与群で1.4，SR-2508，1.5mM/kg 投与群で1.8となった．

5．血流遮断下照射

低線量域での低酸素性細胞に対する放射線増感効果を検討するため，腫瘍血流の遮断下に放射線照射を行なった．Fig. 6 に示すごとく，放射線単独群の線量効果曲線は二相性から一相性へと変化し，2,500rad までの間では効果は線量に対して直線となった．SR-2508，ミソニダゾールの併用群では1,000rad 以下の低線量域でも放射線単独群に比し Growth Delay Time の延長が得られた．$SER_8$は各々1.8，1.3であった．

## 考　案

SR-2508はミソニダゾールと同様の2-nitro-imidazole 化合物である．in vitro での実験結果は両者の一電子還元電位が示す如く等しい増感率を示している．しかし側鎖の修飾に基づく octanol：水における分配係数の変化は薬物動態上，著しい相違を惹起した．神経組織は脂質に富むため，薬剤の脂溶性の低下は神経組織への浸透の低下，薬剤濃度を低下させることとなった．又腎より排泄を早める結果，神経組織との接触時間も短くなり神経毒性の低減に成功したのである[32]．White ら[33]は犬を用いた実験で，SR-2508，ミソニダゾールの各々，0.5mM/kg 静脈投与時の腫瘍内濃度，血中濃度を高速液体クロマトグラフィーで測定し，SR-2508では15分後に，ミソニダゾールでは60分後に最高濃度に達したと報告している．我々のマウスを用いた実験結果でも同様の傾向がみとめられ，SR-2508で30分後，ミソニダゾールで60分後に増感効果が最高になった．高速液体クロマトグラフィーで定量した腫瘍内最高濃度の時期はより早いところに存在するが，この時間差は薬剤が有効に作用する低酸素性細胞領域まで浸透し，低酸素性細胞内で最高濃度になる時間と，腫瘍内平均濃度が最高になる時間の差と考えることができる．Brown ら[32]は両薬剤の腫瘍内動態の相違を次の様に考えている．脂溶性の高いミソニダゾールは膜の透過性が良く，薬剤はまず毛細血管近傍の細胞群に入り，これらの細胞内の薬剤濃度が高くなってから隣の細胞に浸透するというように段階的に低酸素細胞領域へ向って浸透してゆく．一方 SR-2508では脂溶性が低いため，毛細血管から出た薬剤は細胞間隙を通り，腫瘍内に早期に，均等に分布する．しかる後に膜を通過して低酸素細胞内へ入る．結果的には低酸素性細胞内濃度は SR-2508の方が早く最高に達すると考えら

れている．我々の実験では90分後の増感効果はSR-2508とミソニダゾールで差がみられなかった．Brown ら[32]も両薬剤1.0mM/kg 投与後の増感効果減少の時間的変化に差がないと報告しており，SR-2508の低酸素性細胞からの clearance は，腫瘍内の酸素供給の良好な細胞領域からのそれとは異なり，かなりゆるやかと考えられる．

Tumor Growth Delay Time で求めた増感率はミソニダゾール0.5mM/kg, SR-2508, 1.5mM/kg 投与で各々，1.4と1.8であり従来の報告と大差なかった．1,000rad 以下の低線量域では薬剤併用群に Growth Delay Time の延長を認めないことから，通常の放射線治療における小線量多分割照射への応用を疑問視する考えがある．しかしこの1,000rad 以下の線量域での Delay Time は主に活発に増殖している酸素に富む細胞群の致死に基づくものであり，同時に生じている低酸素性細胞に対する致死効果はかくされていると考えられる．血流遮断処置下の照射では酸素に富む細胞群の効果を反映すると考えられる第一相が消失し，一相性の線量効果曲線になったが，これはこの処置が急性低酸素性細胞をつくり出すのに適切な処置であったことを示している．そして SR-2508またはミソニダゾール併用照射群では1,000rad 以下の低線量域においても高線量域と同様の増感率が得られた．SR-2508は低毒性で薬量の増量が可能であるので，小線量多分割照射でも充分な増感効果を得ることが可能と考えられる．

マウスを用いた急性毒性，および慢性神経毒性に関する実験と，犬の自然発生腫瘍を用いた等モル量投与時の腫瘍内濃度の実験から同等の神経毒性を示す SR-2508の腫瘍内最低濃度はミソニダゾールの7.5倍量と考えられている[33]．我国におけるミソニダゾールの第一相臨床試験成積から推定すると，1.0g/m²週2回投与は比較的安全な量である．その血中濃度は平均0.2mM である[34]ので，今回の実験で得られた SR-2508, 1.5mM/kg 投与の増感率が1.8という値は臨床上大変有望である．分割照射により生じる reoxygenation とそれに基づく増感効果の減殺は更に検討せねばならない．

## 結　論

1. SR-2508の静脈内投与時に増感効果が最大になる時間はミソニダゾールよりも早く，0.5 mM/kg 投与では SR-2508で30分，ミソニダゾールで60分であった．しかし増感効果減少の時間的変化には差を認めなかった．

2. SR-2508とミソニダゾールの等モル量投与はほぼ等しい増感効果を示した．

3. 等しい毒性量である SR-2508, 1.5mM/kg とミソニダゾール0.5mM/kg 投与時の増感率は，1,000rad 以上の高線量域では各々1.8, 1.4であった．1,000rad 以下では Growth Delay Time の延長が認められなかった．

4. 腫瘍血流遮断下照射実験では1,000rad 以下の低線量域でも増感効果が認められ，SR-2508, 1.5mM/kg，ミソニダゾール，0.5mM/kg の増感率は各々1.8，1.3であった．

我国での第一相臨床試験成積から推定すると，低毒性の SR-2508で1.5mM の腫瘍内濃度を得ることは充分可能と考えられ，臨床効果が大いに期待される．

本研究を行なうにあたり，ミソニダゾールは日本ロッシュ社より，又 SR-2508はスタンフォード大学 Brown 教授の御厚意によって NCI より提供を受けた．

C3H/He マウスの供給に御尽力いただいた京大医学部実験動物センター鈴鹿　守氏に深謝致します．

なお本研究は，文部省癌特別研究助成金（研究課題番号56010065）および厚生省がん研究助成金（研究課題番号55-5）により行なわれた．

## 文　献

1) Glassburn, J.R., Brady, L.W. and Plenk, H.P. Hyperbaric oxygen in radiation therapy. Cancer, 39 : 751—765, 1977
2) Abe, M., Yabumoto, E., Nishidai, T. and Takahashi, M.: Trials of new forms of radiotherapy for locally advanced bronchogenic carcinoma. irradiation under 95% $O_2$ plus 5% $CO_2$ inhalation, uneven fractionation irradiation and intraoperative irradiation. Strahlentherapie, 153 : 149—158, 1977
3) Adams, G.E. and Dewey, D.L.: Hydrated electrons and radiobiological sensitization. Biochem. Biophys. Res. Commun., 12 : 473—477, 1963
4) Adams, G.E. and Cooke, M.S.: Electron

affinic sensitization 1 : A structural basis for chemical radiosensitizers in bacteria. Int. J. Radiat. Biol., 15 : 457—471, 1969

5) Adams, G.E., Asquith, J.C., Dewey, D.L., Foster, J.L., Michael, B.D. and Willson, R.L. : Part II paranitroacetophenone. A radiosensitizer of anoxic bacterial and mammalian cells. Int. J. Radiat. Biol., 19 : 575—585, 1971

6) Chapman, J.D., Webb, R.G. and Borsa, J. : Radiosensitization of mammalian cells by p-nitroacetophenone. I. characterization in asynchronous and synchronous populations. Int. J. Radiat. Biol., 19 : 561—574, 1971

7) Sheldon, P.W. and Smith, A.M. : Modest radiosensitization of solid tumors in C3H mice by the hypoxic cell radiosensitizer NDPP. Brit. J. Cancer, 31 : 81—88, 1975

8) Chapman, J.D., Reuvers, A.P., Borsa, J., Petkau, A. and McCalla, D.R. : Nitrofurans as radiosensitizers of hypoxic mammalian cells. Cancer Res., 32 : 2616—2624, 1972

9) Foster, J.L. and Willson, R.L. : Radiosensitization of anoxic cells by metronidazole. Brit. J. Radiol., 46 : 234—235, 1973

10) Asquith, J.C., Foster, J.L. and Willson, R.L. : Metronidazole (Flagyl.). A radiosensitizer of hypoxic cells. Brit. J. Radiol., 47 : 474—481, 1974

11) Begg, A.C., Sheldon, O.W. and Foster, J.L. : Demonstration of radiosensitization of hypoxic cells in solid tumors by metronidazole. Brit. J. Radiol., 47 : 399—404, 1974

12) Asquith, J.C., Watts, M.E., Patel, K., Smithen, C.E. and Adams, G.E. : Electron affinic sensitization V. Radiosensitization of hypoxic bacteria and mammalian cells in vitro by some nitroimidazoles and nitropyrazoles. Radiat. Res., 60 : 108—118, 1974

13) Moore, B.A., Palcic, B. and Skarsgard, L.D. : Radiosensitizing and toxic effects of the 2-nitroimidazole Ro-07-0582 in hypoxic mammalian cells Radiat. Res., 67 : 459—473, 1976

14) 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

15) Sheldon, P.W., Foster, J.L. and Fowler, J.F. : Radiosensitization of C3H mouse mammary tumours by a 2-nitroimidazole drug. Brit. J. Cancer, 30 : 560—565, 1974

16) Brown, J.M. : Selective radiosensitization of the hypoxic cells of mouse tumors with the nitro imidazoles metronidazole and Ro-7-0582. Radiat. Res., 64 : 633—647, 1975

17) Stone, H.B. and Withers, H.R. : Enhancement of the radioresponse of a murine tumor by a misonidazole. Brit. J. Radiol., 48 : 411—412, 1977

18) Sheldon, P.W. and Hill, S.A. : Hypoxic cell radiosensitizers and local control by X-ray of a tansplanted tumor in mice. Brit. J. Cancer, 35 : 795—808, 1977

19) Ono, K., Nakajima, T., Hiraoka, M., Matsumiya, A. and Onoyama, Y. : Radiosensitizing effect of misonidazole on mammary carcinoma of mouse tumor. Kawaski Med. J., 4 : 183—191, 1978

20) Foster, J.L., Flockhart, I.R., Dische, S., Gray, A., Smith, I.L. and Smithen, C.E. : Serum concentration measurements in man of the radiosensitizer Ro-07-0582 ; some preliminary results. Brit. J. Cancer, 31 : 679—683, 1975

21) Gray, A.J., Dische, S., Adams, G.E., Flockhart, I.R. and Foster, J.L. : Clinical testing of the radiosensitizer' Ro-07-0582. I. Dose tolerance, serum and tumor concentrations. Clin. Radiol., 27 : 151—157, 1976

22) Dische, S., Gray, A.J. and Zanelli, G.D. : Clinical testing of the radiosensitizer Ro-07-0582 II. Radiosensitization of normal and hypoxic skin. Clin. Radiol., 27 : 159—166, 1976

23) Thomlinson, R.H., Dische, S., Gray, A.J. and Errington, L.M. : Clinical testing of the radiosensitizer Ro-07-0582 III. Response of tumor. Clin. Radiol., 27 : 167—174, 1976

24) Dische, S., Saunders, M.I., Lee, M.E., Adams, G. E. and Flockhart, I.R. : Clinical testing of the radiosensitizer Ro-07-0582. Experience with multiple doses. Brit. J. Cancer, 35 : 567—579, 1977

25) Saunder, M.I., Dische, S., Anderson, P. and Flockhart, I.R. : The neurotoxicity of misonidazole and its relationship to dose, half-life and concentration in the serum. Brit. J. Cancer, 37 : Suppl. III, 268—270, 1978

26) Urtasun, R.C., Band, P., Chapman, J.D., Rabin, H.R., Willson, A.F. and Fryer, C.G. : Clinical phase I stuidy of the hypoxic cell radiosensitizer Ro-07—0582, 2-nitroimidazole derivative. Radiology, 122 : 801—804, 1977

27) Wasserman, T.H., Phillips, T.L., Johnson, R.J., Gomer, C.J., Lawrence, G.A., Sadee, W., Marques, R.A., Levin, V.A. and Raalte, G. : Initial united states clinical and pharmacologic

evaluation of misonidazole (Ro-07-0582), an hypoxic cell radiosensitizer. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 5 : 775—786, 1979

28) Kogelnik, H.H., Meyer, H.J., Jentzsch, K., Szepsi, T., Karcher, K.H., Maida, E., Mamoli, B., Wessely, P. and Zaunbauer, F.: Further clinical experiences of a phase I study with the hypoxic cell radiosensitizer misonidazole. Brit. J. Cancer, 37 : Suppl, III 281—285, 1978

29) Phillips, T.L., Wasserman, T.H., Johnson, R.J., Gomer, C.J., Lawrence, G.A., Levine, M.C., Sadee, W., Penta, J.S. and Rubin, D.J.: The hypoxic cell sensitizer programme in the united states. Brit. J. Cancer, 37 : Suppl. III, 276—280, 1978

30) Mellet, L.B.: The constancy of the product of concentration and time. In antineoplastic and immuno-suppressive agents, Sartorelli, A.C. and Johns, D.G. (Eds.). Berlin, Springer Verlag, . 330—340, 1975

31) Brown, J.M. and Workman, P.: Partition coefficient as a guide to the development of radiosensitizers which are less toxic than misonidazole. Radiat. Res., 82 : 171—190, 1980

32) Brown, J.M., Yu, N.N., Brown, D.M. and Lee, W.W.: 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

33) White, R.A., Workman, P. and Brown, J.M.: The pharmacokinetics, tumor and neural tissue penetrating properties in the dog of SR-2508 and SR-2555-Hydrophilic radisensitizer potentially less toxic than misonidazole. Radiat. Res., 84 : 542—561, 1980

34) 小野山靖人，中島俊文，梅川智三郎，中島秀行，谷口脩治，山下　彰：Hypoxic cell sensitizer の臨床的応用．癌の臨床，27(12)：1461—1466, 1981