

Title	実験腫瘍への放射線作用のin vivo処理in vitro解析 YM-08310及びRo-07-0582による修飾
Author(s)	江部, 和勇
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1987, 47(2), p. 307-317
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/16387">https://hdl.handle.net/11094/16387</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

# 実験腫瘍への放射線作用の *in vivo* 処理 *in vitro* 解析 YM-08310及び Ro-07-0582による修飾

山口大学医学部放射線医学教室（主任：中西 敬教授）

江 部 和 勇

（昭和61年5月28日受付）

（昭和61年9月4日最終原稿受付）

## Responses to Radiation of Ehrlich Ascites Tumor Cells in the Presence of YM-08310 (=WR-2721) and/or Ro-07-0582 (*In vivo*, *In vitro* Assay)

Kazuyu Ebe

Department of Radiology, Yamaguchi University School of Medicine  
(Director: Prof. Takashi Nakanishi)

---

Research Code No. : 402.3

---

Key Words : YM-08310 (=WR-2721), Ro-07-0582, *In vivo*  
treatment, *In vitro* analysis

---

The responses to radiation of Ehrlich ascites tumor cells were studied by *in vivo*, *in vitro* assay. The solid tumor was irradiated in air-breathing mice and dead mice. A soft agar colony assay was used to determine the survival rate of tumor cells after irradiation. The dose response curve showed a terminal slope. It was calculated that 12.7% of the tumor cells were the severely hypoxic cell variety. The response was enhanced with the administration of hypoxic radiosensitizer Ro-07-0582 (1 g/kg). The ER was calculated to be 2.3. The radioprotector YM-08310 (=WR-2721) (250 mg/kg) showed a DMF of 1.2—1.7 in air-breathing mice but no protection in dead mice. When both Ro-07-0582 and YM-08310 were present during irradiation, the dose response curves were shown to be intermediate to the curves of Ro-07-0582 and YM-08310 in air-breathing mice and also close to the curves of Ro-07-0582 in dead mice. We confirmed that YM-08310 is more efficient in aerobic conditions than hypoxic conditions.

### 1. はじめに

放射線にて、腫瘍を治療する際の問題はいかにして腫瘍細胞に多くの障害を与えて、さらにそれとは反対に、いかにして周辺の正常組織を放射線から防護するかということである。現在まで、放射線防護作用物質として数多くの化合物が開発されてきたが、なかでも、YM-08310 (=WR2721) は、正常組織を放射線より防護するが、腫瘍組織は防護しないという、いわゆる differential protection を示す防護剤として注目され

ている<sup>1)2)</sup>。

一方、Ro-07-0582は、hypoxic cell に対してのみ増感効果がみられることが知られている<sup>3)</sup>。腫瘍内には、多くの hypoxic cell が存在するので、正常組織よりも腫瘍をより増感する (differential sensitization) と考えられる。

したがって、YM-08310と Ro-07-0582を併用すれば、正常組織はYM-08310によって防護され、腫瘍はRo-07-0582によって増感されるので、therapeutic ratio を上昇させることができると考え

られる。担癌マウスに、in vivo にて薬剤及び放射線の処理を行ない in vitro にて、colony formation assay を行ない in vivo 処理、in vitro 解析を用いることにより放射線の腫瘍に対する効果を直接細胞の生存率から判別でき、あわせて放射線の効果に対する両薬剤の修飾作用を、in vivo 及び in vitro のそれぞれから検討したのでその結果をのべる。

## 2. 材料及び方法

### 1) 実験動物及び腫瘍細胞系

細胞は当教室でクローン化した in vivo 及び in vitro の両系で増殖可能な、Ehrlich Ascites Tumor Cells (EATC) を使用した。in vitro の培養では、培養液は、Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に10% calf serum, penicillin (100Unit/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml)を加えて使用し、3~4日毎に継代した。実験動物は、ICR系マウス(雄、6週齢)を用い、実験室にて飼育、固形飼料と水道水を自由に与えた。EATCのマウスへの生着率を向上させるため、免疫抑制剤である cyclophosphamide (100mg/kg マウス体重)を、マウス腹腔内に投与した。1日後に、in vitro で継代培養して、exponentially に growing している EATC $10^6$ 個/マウスを左足に移植した。移植3~4週後に1cm<sup>3</sup>程に増殖した腫瘍を実験に使用した。腫瘍体積は、 $V=a \times b \times c \times \pi/6$ (a, b, cは、腫瘍の縦、横、幅)として求めた。

### 2) 放射線照射

深部治療用X線発生装置(島津社製)を用い、使用条件は、200kVp, 20mA, 線量率0.91Gy/min, 0.5mm Cu+1.0mm Al filter, H.V.L. 1.50mm Cuで、FSD=50cmである。

In vivo 処理、aerobic condition とは、マウスが正常空気を常圧下で室温で呼吸している状態であり、hypoxic condition とは、マウスを頸骨々折法にて屠殺して5分後の低酸素状態を示す。これらの状態でマウスに全身照射を行なった。

In vitro 処理、aerobic condition とは、試験管に EATC の細胞浮遊液2ml (2.0 $\times 10^6$ 個/ml)を入れ、正常空気、常圧、室温下にて、X線照射を行なった場合の状態である。

Hypoxic condition とは、ガラス製試験管に EATC の細胞浮遊液2ml (2.0 $\times 10^6$ 個/ml)を入れて、95%N<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>の混合ガスを1時間(1L/min)流して得られた低酸素状態をさす。

なお、Ro-07-0582及びYM-08310の使用に際しては、枝付き試験管を用いて、hypoxic condition になってから、これらの薬剤と細胞を混じた。

### 3) 使用薬剤

低酸素細胞増感剤として、Ro-07-0582(Ro.)(日本ロシュ)、化学名、1-(2-nitro-1-imidazolyl)-3-methoxyl-2-propanol、一般名、Misonidazole を用いた。In vivo 処理では生理食塩水に溶解後、1g/kg(マウス体重)を照射前にマウス腹腔内に投与した。また、in vitro 処理では、培養液で溶解し5mMの濃度で使用した。室温で細胞に作用させ、10分後にX線照射を行なった。

放射線防護剤として、YM-08310とYM-08310SH $\cdot 2$ HClを用いた。YM-08310(YM.)(山之内製薬)は、化学名、S-2-(3-aminopropyl-amino)ethylphosphorothioic acid monohydrate、一般名、Amifostineである。これは、WR-2721に水1分子が結合したものである。In vivo 処理では、生理食塩水で溶解し、250mg/kg(マウス体重)を、X線照射前にマウスの腹腔内に投与した。

YM-08310SH $\cdot 2$ HCl(YM.SH $\cdot 2$ HCl)(山之内製薬)は、化学名、S-2-(3-aminopropyl-amino)ethan thiol dihydrochlorideである。これは、WR-1065 $\cdot 2$ HClと同じである。今回は、in vitro の実験のみで使用した。培養液にて溶解後、BTBを使用し、0.1N NaOHにて、pH 7.0とした。5mMの濃度で、室温にて10分間細胞と作用させた後、放射線照射をおこなった。

### 4) In vitro 解析

In vivo 処理 in vitro 解析では、X線照射後直ちにマウスを頸骨々折法にて屠殺し、腫瘍を切除する。取り出した腫瘍を70%エタノールにて1分間消毒し、メスにて切りぎみsingle cell suspensionを作る。遠沈操作(1,000rpm 5min)を1回行ない、0.17%トリパンブルー液にて生存細胞を数えて軟寒天培地の上層に植える。

軟寒天培地は、二層よりなり、下層は、0.5%寒

天, 10% Calf serum. DMEM, 1ml とし, 上層は, 0.3%寒天, 10% Calf serum. DMEM, 1ml で, 上層に細胞を播種した. 直径3.5cm の dish (Falcon) 3枚に植えた. CO<sub>2</sub>インキュベーター(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)で10日間培養した後, 50個以上の細胞よりなるコロニーを数えて生存率を求めた.

In vitro 処理 in vitro 解析では, X線照射後直ちに細胞数を数えて軟寒天培地のの上層に植えた. なお, 薬剤を使用した場合は, 遠沈操作(1,000rpm 5min)を3回行ない細胞を洗滌した後, 培地に植えた. その後同様に培養し, コロニー数を数えて生存率を求めた. In vivo 処理 in vitro 解析における Plating Efficiency (P.E.)は,  $0.23 \pm 0.018$  (M $\pm$ SE) (n=22), in vitro 処理 in vitro 解析では P.E.= $0.39 \pm 0.024$  (n=32) となった.

同一の実験を3回以上行ない, 回帰直線 ( $y = a + bx \pm se$ ) を求めた. 各直線間の傾きの差の検定は, 回帰係数の Student's test を行なった. なお, グラフ上に示す各ポイントは, 3枚の dish の平均のコロニー数より得られた生存率である.

### 3. 結 果

#### 1) 固形腫瘍内の hypoxic cell fraction

Fig. 1 に, in vivo 処理 in vitro 解析における X線に対する dose response curve を示す. Aerobic condition では, 曲線は二相性で, 10Gy 以上の高線量域では直線の傾きが緩かとなる (曲線の tail). Hypoxic condition における, この曲線の直線部分の傾きと, aerobic condition での tail の傾きとの間には有意差はない. 従って, この曲線の tail は, 腫瘍内 (体積約1cm<sup>3</sup>) の severely hypoxic cell の放射線感受性を示すと考えられる. そこで, hypoxic cell fraction を求めた<sup>4)~6)</sup>. 両直線の y 切片の差から得られた hypoxic cell fraction は, 12.7%である. さらに, 小さい腫瘍 (体積約0.1cm<sup>3</sup>) の放射線感受性を示す. この場合, 高線量域での傾きの緩やかな直線部位は, 認められなかったが, 低線量域では, グラフは一致した.

#### 2) Oxygen Enhancement Ratio (OER)

Fig. 2 に培養液中で増殖中の細胞に X線照射した場合の dose response curve (in vitro 処理 in vitro 解析) を示す.

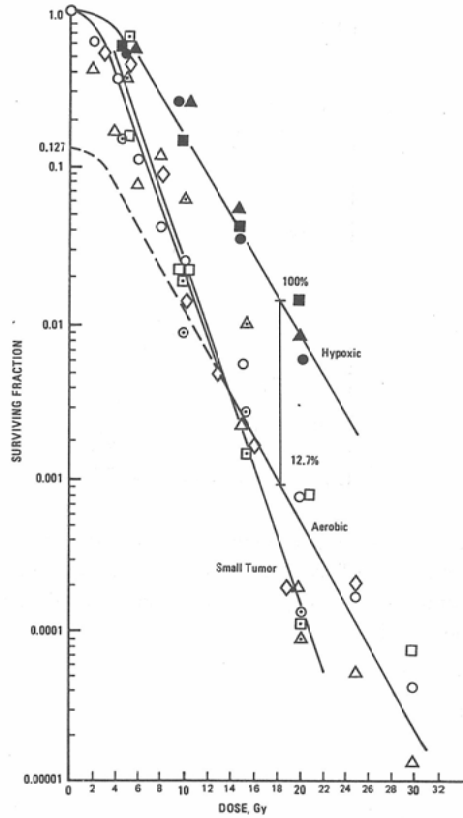


Fig. 1 Dose response curves for EATC solid tumors (1cm<sup>3</sup>) in aerobic conditions (open symbols) and in hypoxic conditions (closed symbols). 12.7% of tumor cells were the severely hypoxic cell population. Dose response curve for small tumor (0.1cm<sup>3</sup>) doesn't have the terminal slope in aerobic conditions.

グラフより得られた次の値, Do (hypoxic)=2.56Gy, Do (aerobic)=0.99Gy を次式に代入する.  $OER = Do(\text{hypoxic}) / Do(\text{aerobic}) = 2.6$  となる.

#### 3) 実験腫瘍での Ro. の効果 (in vivo 処理 in vitro 解析)

1g/kg (body weight) をマウス腹腔内に投与し1時間後に X線照射した. Fig. 3 にその結果を示す. Aerobic condition で, Do=1.34Gy, コントロールの tail の Do=3.12Gy と比較して, Enhancement Ratio (ER)= $3.12 / 1.34 = 2.3$  を得た. Hypoxic condition では, Do=1.33Gy, コントロールの Do=3.57Gy と比較して, ER= $3.57 /$

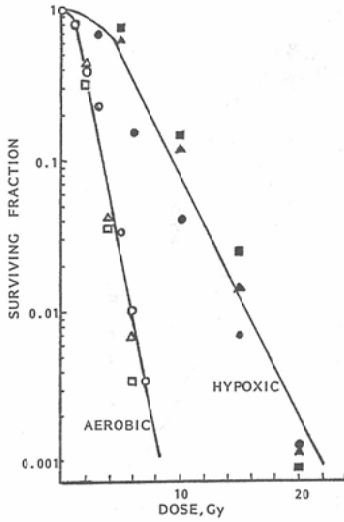


Fig. 2 Dose response curves for in vitro irradiation of EAT cells in aerobic conditions (open symbols), and hypoxic conditions (closed symbols). OER=2.6

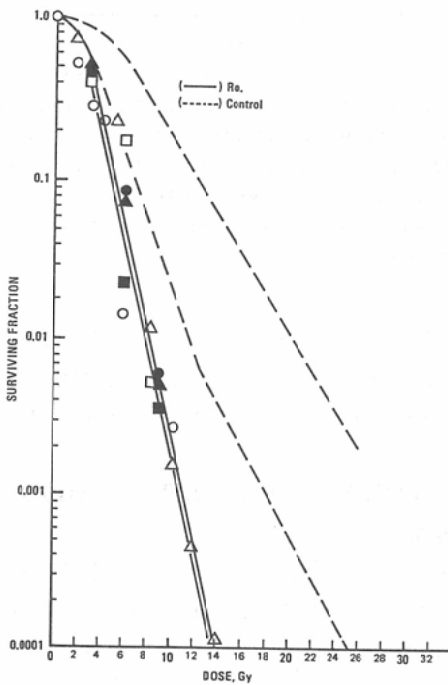


Fig. 3 Dose response curves for EATC solid tumors treated 1 hour before irradiation with 1g/kg of Ro-07-0582. In aerobic (open symbols), in hypoxic (closed symbols). ER=2.7

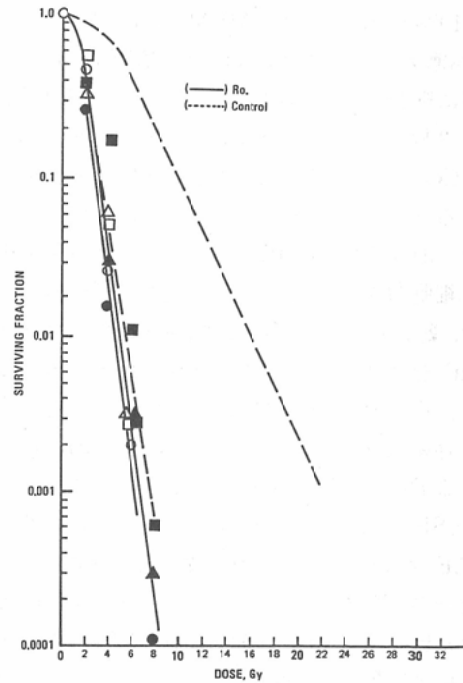


Fig. 4 Dose response curves for in vitro irradiation of EAT cells pretreated with 5mM of Ro-07-0582. In aerobic (open symbols), in hypoxic (closed symbols). ER=3.0

1.33=2.7となる。

また、Ro.を投与し、aerobic及びhypoxic conditionで得られた両曲線は一致した。

4) 培養細胞での Ro. の効果 (in vitro 処理 in vitro 解析)

5mM, 10min 作用させた後 X線照射を行なった。

Fig. 4 にその結果を示す。Aerobic conditionで、 $D_{01} = 0.83\text{Gy}$ 、コントロールの  $D_{01} = 0.99\text{Gy}$  より、 $ER = 0.99/0.83 = 1.2$ となる。Hypoxic conditionで、 $D_{01} = 0.86\text{Gy}$ 、コントロールの  $D_{01} = 2.56\text{Gy}$  より、 $ER = 2.56/0.86 = 3.0$ となる。

5) 実験腫瘍での Y.M. の効果 (in vivo 処理 in vitro 解析)

250mg/kg (body weight) をマウスに投与後、1時間後に X線照射を行なった。

Fig. 5 にその結果を示す。Aerobic conditionで、生存率が37%となる線量と比較すると、 $LD_{37} = 4.62\text{Gy}$ 、コントロールの  $LD_{37} = 3.95\text{Gy}$ と

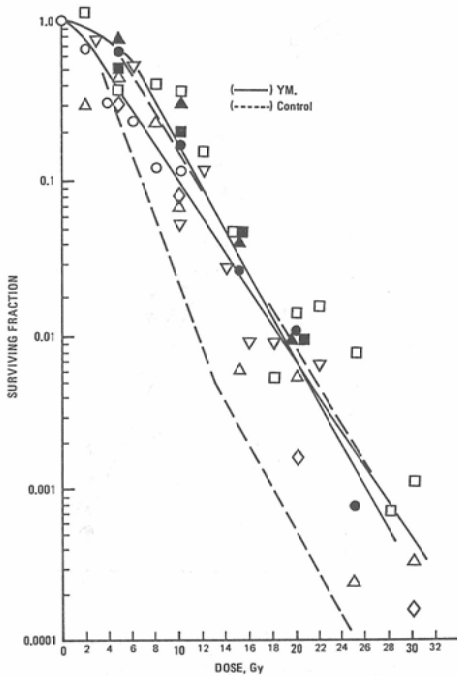


Fig. 5 Dose response curve for EATC solid tumors treated 1 hour before irradiation with 250 mg/kg of YM-08310. In aerobic (open symbols) DMF=1.2-1.7, in hypoxic (closed symbols).

なり、Dose Modifying Factor (DMF)=4.62/3.95=1.2となる。また37%以下の生存率でDMFを求めると1.2-1.7となる。

なお、この直線の傾きとコントロールのtailの傾きの間に有意差はなく、このことから、腫瘍内のseverely hypoxic cellに対して、高線量域では、防護効果は認められないことになるが、低線量域については不詳である。

また、腫瘍をhypoxic conditionにした場合、コントロールと比較して、防護効果はみられない。

以上よりYMは、severely hypoxic cellを防護しない。

6) YMの投与量と防護効果の関係 (in vivo 処理 in vitro 解析)

Fig. 6 に投与量と防護効果の関係を示す。マウス腹腔内に50, 100, 250, 500mg/kg (body weight) 投与し、1時間後に10Gy照射した。その結果50 mg/kg 以上で防護効果がみられた (p<0.1)。また、YM投与単独では、各投与量における生存率

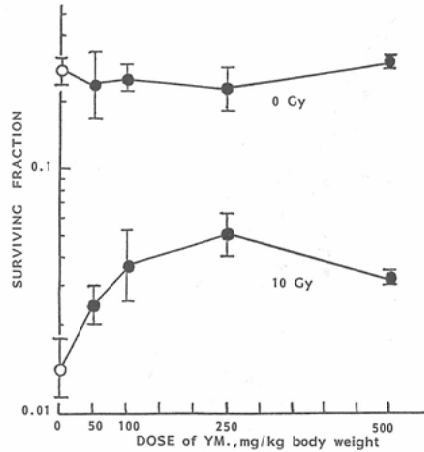


Fig. 6 The effect of dose of YM-08310. It was injected to tumor-bearing mice 1 hour before 10 Gy of exposure in aerobic conditions. Data points represent the mean±SE. (○); without YM-08310 (●); with YM-08310.

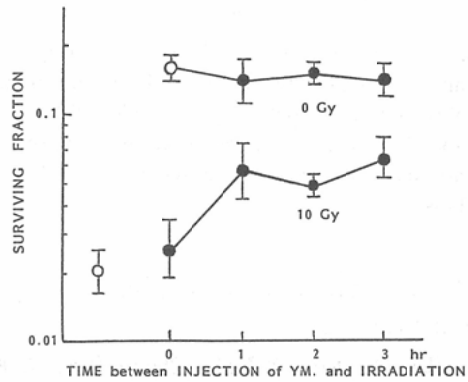


Fig. 7 The effect of time of pretreatment with 250 mg/kg of YM-08310 in EATC tumors exposed to 10 Gy in aerobic conditions. Data points represent the mean±SE. (○); without YM-08310 (●); with YM-08310

に変化はなく、毒性はみられなかった。

7) YMの投与と照射までの時間 (in vivo 処理 in vitro 解析)

方法は、250mg/kg (body weight) をマウスの腹腔内に投与し、各時間経過後にX線を10Gy照射し、その防護効果を比較した。

Fig. 7にその効果を示す。照射の直前投与では効果はみられないが、1時間以上たてば、防護効果がみられる (p<0.05)。また、YM投与単独で

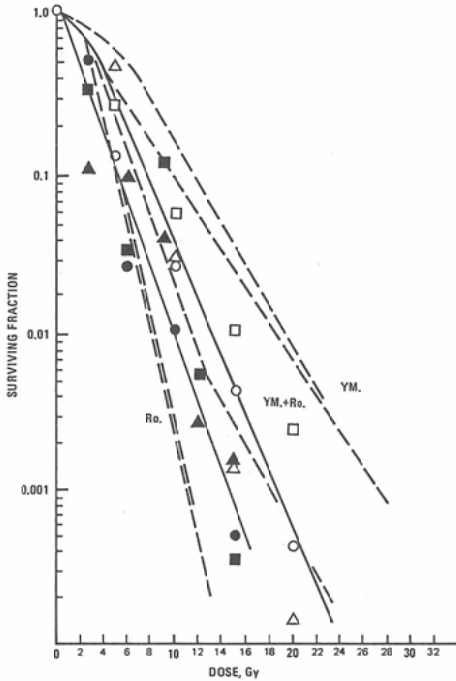


Fig. 8 Combined effects of YM-08310 (250mg/kg) and Ro-07-0582 (1g/kg) in EATC solid tumors. YM-08310 and Ro-07-0582 were injected 2 hours and 1 hour before irradiation respectively. In aerobic (open symbols), in hypoxic (closed symbols).

は、投与後各時間における生存率を比較した結果、毒性はみられなかった。

8) Ro. (1g/kg) と YM. (250mg/kg) の併用効果 (in vivo 処理 in vitro 解析)

YM.は2時間前に、Ro.は1時間前に、それぞれマウスの腹腔内に所要量を投与し、X線照射した。

Fig. 8にその結果を示す。Aerobic conditionで  $D_0=2.38\text{Gy}$  となる。Hypoxic conditionで、 $D_0=2.07\text{Gy}$  となる。

YM.は in vitro では、in vivo でみられる程の効果は示さない。その理由は、生体内にて脱リン酸化を受けて、YM. SH (WR-1065) となり、防護効果を示すとされる<sup>7-10)</sup>。

そこで、YM. SH · 2HCl を使用して、in vitro 処理 in vitro 解析を行なった。

9) YM. SH · 2HCl (5mM) の効果 (in vitro 処理 in vitro 解析)

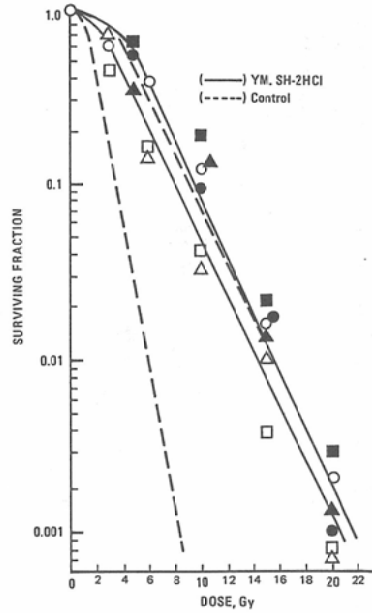


Fig. 9 Dose response curves for in vitro irradiation of EAT cells pretreated with 5mM of YM-08320 SH · 2HCl. In aerobic (open symbols), in hypoxic (closed symbols).

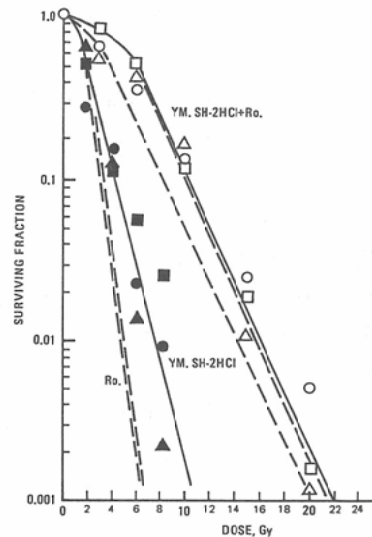


Fig. 10 Combined effects of YM-08310 SH · 2HCl (5mM) and Ro-07-0582 (5mM) in vitro irradiation. In aerobic (open symbols), in hypoxic (closed symbols).

Fig. 9にその結果を示す。Aerobic conditionで  $D_0=2.70\text{Gy}$  となる。コントロールの  $D_0=0.99\text{Gy}$  と比較して、 $DMF=2.70/0.99=2.7$  とな

る。

Hypoxic condition で  $D_0=2.56\text{Gy}$  である。コントロールの  $D_0=2.56\text{Gy}$  と比較して、 $\text{DMF}=\frac{2.56}{2.56}=1.0$  となる。防護効果は、みられなかった。

#### 10) Ro. (5mM) と YM. SH · 2HCL (5mM) の併用効果 (in vitro 処理 in vitro 解析)

Fig. 10にその結果を示す。Aerobic condition で、 $D_0=2.62\text{Gy}$  となる。

YM. SH · 2HCL 単独と同程度の防護効果がみられ、Ro.の増感効果は、みられなかった。Hypoxic condition で、 $D_0=1.45\text{Gy}$  となる。Ro.による増感効果が主に認められた。

#### 4. 考 察

放射線増感効果を有する因子の一つに酸素がある。

また、ある種の薬剤を投与することによっても、生体の放射線に対する感受性を変化させることができる。ここでは、低酸素細胞増感剤として、Ro.を放射線防護剤として、YM.及びこの薬剤の free SH form である YM. SH · 2HCL の三種類の薬剤をもちいた。

YM.は、in vivo 投与にてはじめて著明な防護効果を示すといわれており<sup>7)~10)</sup>、in vitro 実験では、YM. SH · 2HCL を使用した。

これらの薬剤の効果を、酸素の影響を含めて、考察した。

YM.は、正常組織を防護するが、腫瘍は防護しないという、いわゆる differential protection を示す放射線防護剤であり、今日まで多くの研究がなされてきた<sup>12)</sup>。

YM.は、生体内で脱リン酸化され free SH form となって防護効果を示す。主な防護機序としては、二つある<sup>11)12)</sup>。一つは、free SH form が酸化され、disulfide となる際に、溶液中の酸素を消費し、hypoxia をもたらすという事と、もう一つは、free SH form が、放射線照射によって生成されたラジカルに対して、水素原子を与えることによってラジカルを消去するという事である。そして、放射線防護効果に関して酸素濃度が重要な意味をもつ事が報告されている<sup>7)12)13)</sup>。

Differential protection をもたらす機構については、腫瘍細胞では、YM.に対する barrier があるため<sup>14)15)</sup>と考えられているが、一方では腫瘍も防護される<sup>16)</sup>と主張する報告もある。

著者は、EATC 固形腫瘍を用いて、YM.の防護効果を調べ、aerobic condition にて  $\text{DMF}=1.2-1.7$  を得た。また、hypoxic cell に対する防護効果はみられなかった。これは、Utley らによる EMT6 腫瘍による報告<sup>17)18)</sup> とほぼ一致した。次に free SH form である YM. SH · 2HCL を用いて、その防護効果を in vitro で調べた。その結果、aerobic condition では  $\text{DMF} (\text{Do} (\text{YM.})/\text{Do} (\text{control}))=2.7$  を得たが、hypoxic condition では防護効果はみられなかった。以上より YM.に関して in vivo 処理 in vitro 解析と in vitro 処理 in vitro 解析の一致がみられた。そこで、YM.は、 $\text{O}_2$  存在下で著明な防護効果を示すが、hypoxic cell は防護しないと考えられる。従って、腫瘍に対する防護効果を考える場合、その腫瘍内に aerobic cell の割合が多ければ多いほど防護効果が大きくなると考えられる。

YM.の投与量については、50mg/kg 以上で防護効果がみられた。なお、Yuhas らによれば、250 mg/kg までは、直線的な防護効果の増大がみられている。

投与してから X 線照射までの時間については、一時間以上経過すれば防護効果がみられた。Yuhas らは、投与後の各組織における濃度を測定し、腫瘍への経時的移行が他の組織に比べてゆっくりしていることを報告している<sup>19)</sup>。

現在まで、培養細胞を使用して in vitro で、YM.の正常細胞と腫瘍細胞における防護効果の差を明らかにした報告はない<sup>20)</sup>。Yuhas らは切り出した組織を使った実験で、正常組織と腫瘍組織への集積の差を、YM.に対する細胞膜の性質の差とした<sup>14)15)</sup>。また、オートラジオグラフィにて YM.の体内分布が組織別に調べられているが、いずれも腫瘍組織にはあまり集積が認められてない。それで、防護効果も小さいと考えられるが<sup>21)22)</sup>、しかし、腎臓や肺には、集積が多いにもかかわらず、防護効果は小さい<sup>23)</sup>。このことから、摂取量のみで



防護効果の差を説明できない。

こうして、正常組織と腫瘍組織との防護効果の差、及び各正常組織間での防護効果の差についての明解な説明はない。

著者の結果から、YM.の防護効果に関して、各組織への分布の問題や脱リン酸化の問題はもちろんのこととして、腫瘍を含めて各組織における酸素濃度の問題が防護効果に大きく関係していると考えられる。

Ro-07-0582は、低酸素細胞のみを増感する薬剤であり<sup>3)</sup>、その作用能力は酸素効果にほぼ等しいため、酸素疑似物質と考えられている。Adamsらは、nitroimidazol系のいろいろな化合物を調べ、それらの化合物の増感効果は、その電子親和性と関連しており<sup>24)</sup>、またその電子親和性は、one-electron reduction potentialとして示すことができることを報告している<sup>25)</sup>。

著者は、in vivo 処理 in vitro 解析で、ER=2.7、in vitro 処理 in vitro 解析で、ER=3.0を得た。

著者と同様な、in vivo 処理 in vitro 解析を用いた報告では、マウス B16 メラノーマで、ER=2.0<sup>26)</sup>、マウス EMT6腫瘍で、ER=2.2<sup>27)</sup>、ヒト膀胱癌で、ER=1.8<sup>28)</sup>、ヒトメラノーマで、ER=2.45<sup>29)</sup>があり、いずれも良好な増感効果が観察されている。

In vivo にて、マウス<sup>30)</sup>及びヒト<sup>31)</sup>で体内分布が調べられ、腫瘍内へ充分取り込まれるが、中枢神経にも取り込まれ副作用をもたらすことが報告されている。

Ro.は、hypoxic conditionの細胞内で代謝され、その代謝物質が増感効果及び毒性に関与すると考えられている。そして、細胞内の non-protein thiols (NPSH)を減少させる事が増感機構の一つと考えられている<sup>32)33)</sup>。

現在まで臨床トライアルが行われたが、神経毒性のため<sup>35)</sup>に臨床での使用は否定的であるが、この薬剤の増感機構を研究する事は、将来、新しい増感剤の開発に繋がると考えられる。

YM. SH $\cdot$ 2HCl と Ro.を併用した場合 (in vitro 処理 in vitro 解析)、aerobic conditionでは、主に YM. SH $\cdot$ 2HCl の防護効果がみられ、hypoxic

conditionでは、主に、Ro.の増感効果がみられた。この結果は、Yuharsらのcystein と Ro.の併用効果の結果<sup>36)37)</sup>と一致した。

しかし、in vivo 処理 in vitro 解析 (aerobic condition)では、防護効果か増感効果のどちらか一方が優位というのではなく、放射線単独による感受性と同じ程度の感受性が得られた。Fig. 1 から、計算された hypoxic fraction は12.7%であり、これは、Kallmanによる報告<sup>6)</sup> (severely hypoxic cell 15—25%)とほぼ一致した。固形腫瘍内の細胞について、87.3%は十分に酸素に富む細胞集団であり、残りの12.7%は極めて酸素の乏しい細胞集団であると仮定すれば、両薬剤を併用した場合には、in vitro 処理 in vitro 解析の結果を適用すれば、主に防護効果がみられると推測されるが、この推測があてはまらないのは、87.3%を占める細胞集団の中には、充分酸素に富むものから低酸素状態の細胞まで、酸素レベルの異なるものが同時に存在しているためと考えられる。そして、87.3%を占める細胞集団の平均の酸素レベルは、in vitro の aerobic condition に比較して低酸素状態であり、そのためにある程度の Ro.の増感効果が出現し、推測されたほどの防護効果がみられないと考えられる。

一方、Ro.とYM.の併用効果については、Purdieは、human kidney cellを用いて (in vitro 処理 in vitro 解析)、hypoxic conditionで防護効果が主に認められる事を報告している<sup>38)</sup>。Kochら<sup>39)</sup>及びAntokuら<sup>40)</sup>は、Ro.とcysteamine (MEA)の併用にて (in vitro 処理 in vitro 解析)、hypoxic conditionで、MEAの防護効果が増強される事を示した。Chapmanら<sup>41)</sup>は、MEAは、Ro.と細胞内高分子物質の結合を、hypoxic conditionにて、blockする事を認めている。

Alexander and Charlesbyは<sup>42)</sup>、放射線によって生成されたラジカルに対して、酸素はこのラジカルと反応する事によって損傷を固定し、一方、SH剤は水素原子を供与する事によって損傷を修復するという仮説を提唱した。

Howard-Flandersは<sup>43)</sup>、SH剤の一つであるcysteamine (MEA)とO<sub>2</sub>が競合する事を示した。

細胞内の NPSH を減少させる作用のある薬剤 (N-ethylmaleimide, diamide, buthionine-S, R-sulfoximine, diethyl maleate) を投与すると、増感効果が得られるから、細胞内に存在する glutathion (GSH) をはじめとする NPSH が存在し、放射線によってもたらされた傷の修復に関与すると考えられている<sup>44)</sup>。

NPSH は  $O_2$  と競合し<sup>45)</sup>、Ro. の増感効果とも関連すると考えられている<sup>44)46)47)</sup>。また MEA は、NPSH を上昇させる事が報告されている<sup>48)49)</sup>。

したがって、実験固形腫瘍では、内因性増感剤として  $O_2$ 、内因性防護剤として NPSH があり、さらに本実験では、外因性増感剤として Ro.、外因性防護剤として YM. を使用した訳であって、これらの互いの相互関係をさらに解明することは、細胞に対する放射線の作用機序を解明することができ腫瘍の放射線治療での防護剤、増感剤を使用する上で重要な手がかりになると考えられる。

## 5. 結 語

Ehrlich 腹水癌細胞 (EATC) の固形腫瘍と培養細胞を使用し、YM., YM. SH $\cdot$ 2HCl 及び Ro. の放射線の効果修飾を生存率から検討した。

1) EATC 固形腫瘍 (体積約  $1\text{cm}^3$ ) の severely hypoxic cell fraction は 12.7% である。

2) Ro. (1g/kg, in vivo 処理 in vitro 解析, aerobic condition) では、ER=2.3 を得た。

3) YM. (250mg/kg, in vivo 処理 in vitro 解析, aerobic condition) では、生存率 37% 以下で DMF を求めて、DMF=1.2—1.7 を得た。

4) YM. は  $O_2$  存在下で防護効果を認めた。

5) Ro. と YM. の併用では、aerobic condition では、主に YM. の防護効果が認められ、hypoxic condition では、主に Ro. の増感効果が認められた。

以上の結果から若干の考察を加えた。

稿を終えるにあたり、御指導、校閲を賜った恩師中西敬教授ならびに川崎祥二博士につつしんで感謝の意を表します。また、本研究に際し、御協力いただいた教室員の皆様に深謝致します。

## 文 献

1) Yuhas, J.M. and Storer, J.B.: Chemoprotec-

tion against three modes of radiation death in the mouse. *Int. J. Radiat. Biol.*, 15: 233—237, 1969

2) Yuhas, J.M. and Storer, J.B.: Differential chemoprotection of normal and malignant tissues. *J. Nat. Cancer Inst.*, 42: 331—335, 1969

3) Hall, E.J. and Roizin-Towle, L.: Hypoxic sensitizers: Radiobiological studies at the cellular level. *Radiology*, 177: 453—457, 1975.

4) Powers, W.E. and Tolmach, L.J.: A multi-component X-ray survival curve for mouse lymphosarcoma cells irradiated in vivo. *Nature*, 197: 710—711, 1963

5) Van Putten, L.M. and Kallman, R.F.: Oxygenation status of a transplantable tumor during fractionated radiation therapy. *J. Nat. Cancer Inst.*, 40: 441—451, 1968

6) Kallman, R.F.: The phenomenon of reoxygenation and its implications for fractionated radiotherapy. *Radiology*, 105: 135—142, 1972

7) Harris, J.W. and Phillips, T.L.: Radiobiological and biochemical studies of thiophosphate radioprotective compounds related to cysteamine. *Radiat. Res.*, 46: 362—379, 1971

8) Vos, O., Budke, L. and Grant, G.A.: In vitro evaluation of some latent radioprotective compounds. *Int. J. Radiat. Biol.*, 30: 433—448, 1976

9) Purdie, J.W.: A comparative study of the radioprotective effects of cysteamine. WR-2721 and WR-1065 in cultured human cells. *Radiat. Res.*, 77: 303—311, 1979

10) Mori, T., Watanabe, M., Horikawa, M., Nikaïdo, P., Kimura, H., Aoyama, T. and Sugahara, T.: WR-2721, its derivatives and their radioprotective effects on mammalian cells in culture. *Int. J. Radiat. Biol.*, 44: 41—53, 1983

11) Purdie, J.W. and Inhaber, E.R.: Interaction of cultured mammalian cells with WR-2721 and its thiol, WR-1065: Implication for mechanisms of radioprotection. *Int. J. Radiat. Biol.*, 43: 517—527, 1983

12) Durand, R.E.: Radioprotection by WR-2721 in vitro at low oxygen tensions: Implication for its mechanisms of action. *Br. J. Cancer*, 47: 387—392, 1983

13) Denekamp, J., Michael, B.D., Rojas, A. and Stewart, F.A.: Thiol radioprotection in vivo: The critical role of tissue oxygen concentration. *Br. J. Radiol.*, 54: 1112—1113, 1981

14) Yuhas, J.M.: Protective drugs in cancer therapy: Optimal clinical testing and future directions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 8: 513

- 517, 1982
- 15) Yuhas, J.M., Davis, M.E., Glover, D., Brown, D. Q. and Ritter, M.: Circumvention of the tumor membrane barrier to WR-2721 absorption by reduction of drug hydrophilicity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 8: 519—522, 1982
  - 16) Denekamp, J., Stewart, F.A. and Rojas, A.: Is the outlook grey for WR-2721 as a clinical radioprotector?. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 9: 1247—1249, 1983
  - 17) Phillips, T.L., Kane, L. and Utley, J.F.: Radioprotection of tumor and normal tissues by thiophosphate compounds. *Cancer*, 32: 528—535, 1973
  - 18) Utley, J.F., Phillips, T.L., Kane, L.J., Wharam, M.D. and Wara, W.M.: Differential radioprotection of euoxic and hypoxic mouse mammary tumors by a thiophosphate compound. *Radiology*, 110: 213—216, 1974
  - 19) Yuhas, J.M.: Active versus passive absorption kinetics as the basis for selective protection of normal tissues by *s*-2-(3-aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid. *Cancer Res.*, 40: 1519—1524, 1980
  - 20) Ritter, M.A., Brown, D.Q., Glover, D.J. and Yuhas, J.M.: In vitro studies on the absorption of WR-2721 by tumors and normal tissues. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 8: 523—526, 1982
  - 21) Utley, J.F., Marlowe, C. and Waddell, W.J.: Distribution of <sup>35</sup>S-labeled WR-2721 in normal and malignant tissues of the mouse. *Radiat. Res.*, 68: 284—291, 1976
  - 22) 田中敬正, 赤木 清, 長谷川武夫, 中沢 緑, 播磨敬三, 村田貴史, 沢田 敏: YH-08310 (WR-2721)の放射線防護効果に関する研究. その1. マウスの正常組織及び腫瘍に及ぼす防護効果について. *日本医放会誌*, 43: 700—709, 1983.
  - 23) Yuhas, J.M., Spellman, J.M. and Culo, F.: The role of WR-2721 in radiotherapy and/or chemotherapy. *Cancer Clin. Trials*, 3: 211—216, 1980
  - 24) Adams, G.E. and Dewey, D.L.: Hydroated electrons and radiobiological sensitisation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 12: 473—477, 1963
  - 25) Adams, G.E., Flockhart, I.R., Smithen, C.E., Stratford, I.J., Wardman, P. and Watts, M.E.: Electron-affinic sensitisation. VII. A correlation between structures, one-electron reduction potentials, and efficiencies of nitromidazoles as hypoxic cell radiosensitizers. *Radiat. Res.*, 67: 9—20, 1976
  - 26) Stanley, J.A., Peckham, M.J. and Steel, G.G.: Influence of tumor size on radiosensitization by misonidazole. *Br. J. Cancer*, 37(Suppl. III): 220—224, 1978
  - 27) Rockwell, S.: Cytotoxic and radiosensitizing effects of hypoxic cell sensitizers in EMT6 mouse mammary tumor cells in vivo and in vitro. *Br. J. Cancer*, 37(Suppl. III): 212—215, 1978
  - 28) Courtenay, V.D., Smith, I.E. and Steel, G.G.: The effect of misonidazole on the radiation response of clonogenic human pancreatic carcinoma cells. *Br. J. Cancer* 37(Suppl. III): 225—227, 1978
  - 29) Rofstad, E.K.: Radiation response of the cells of a human malignant melanoma xenograft. Effect of hypoxic cell radiosensitizers. *Radiat. Res.*, 87: 670—683, 1981
  - 30) Pedersen, J.E., Smith, M.R., Bugden, R.D. and Peckham, M.J.: Distribution and tumor cytotoxicity of the radiosensitizer misonidazole (Ro-07-0582) in C57 mice. *Br. J. Cancer*, 39: 429—433, 1979
  - 31) Ash, D.V., Smith, M.R. and Bugden, R.D.: Distribution of misonidazole in human tumors and normal tissues. *Br. J. Cancer*, 39: 503—509, 1979
  - 32) Wong, T.W., Whitmore, G.F. and Gulyas, S.: Studies on the toxicity and radiosensitizing ability of misonidazole under conditions of prolonged incubation. *Radiat. Res.*, 75: 541—555, 1978
  - 33) Michaels, H.B., Peterson, E.C., Ling, C.C. and Epp, E.R.: Combined effects of misonidazole radiosensitization and hypoxic cell toxicity in mammalian cells. *Radiat. Res.*, 88: 354—368, 1981
  - 34) Biaglow, J.E. and Vernes, M.E.: Mechanism of misonidazole-linked cytotoxicity and altered radiation response: Role of cellular thiols. *Br. J. Radiol.*, 54: 1006—1008, 1981
  - 35) Saunders, 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. *Br. J. Cancer*, 37(Suppl. III): 268—270, 1978
  - 36) Yuhas, J.M., Yurconic, M., Kligerman, M.M., West, G. and Peterson, D.F.: Combined use of radioprotective and radiosensitizing drugs in experimental radiotherapy. *Radiat. Res.*, 70: 433—443, 1977

- 37) Yuhas, J.M. and Li, A.P.: In vitro studies on the radioresistance of oxic and hypoxic cells in the presence of both radioprotective and radiosensitizing drugs. *Radiat. Res.*, 75: 563—572, 1978
- 38) Purdie, J.W.: Dephosphorylation of WR-2721 to WR-1065 in vitro and effect of WR-1065 and misonidazole in combination in irradiated cells. (In) Brady ed: *Radiation sensitizers' their use in the clinical management of cancer.* 330—333, 1980, Masson
- 39) Koch, C.J. and Howell, R.L.: Combined radiation-protective and radiation-sensitizing agents. II. Radiosensitivity of hypoxic or aerobic Chinese hamster fibroblasts in the presence of cysteamine and misonidazole: Implications for the "oxygen effect" (with appendix on calculation of dose-modifying factors). *Radiat. Res.*, 87: 265—283, 1981
- 40) Antoku, S. and Hoshi, M.: Combined effects of radiosensitizers and radioprotectors on cultured mammalian cells to Co-60  $\gamma$ -rays. *J. Radiat. Res.*, 25: 305—313, 1984
- 41) Chapman, J.D., Baer, K. and Lee, J.: Characteristics of the metabolism-induced binding of misonidazole to hypoxic mammalian cells. *Cancer Res.*, 43: 1523—1528, 1983
- 42) Alexander, P. and Charlesby, A.: Physico-chemical methods of protection against ionizing radiations. (In) Bacq, M., Alexander, P., eds: *Radiobiology Symposium.* 49—60, 1954, Butterworths, London
- 43) Howard-Flanders, P.: Effect of oxygen on the radiosensitivity of bacteriophage in the presence of sulphhydryl compounds. *Nature*, 186: 485—487, 1960
- 44) Biaglow, J.E., Varnes, M.E., Clark, E.P. and Epp, E.R.: The role of thiols in cellular response to radiation and drugs. *Radiat. Res.*, 95: 437—455, 1983
- 45) Cullen, B.M., Michalowski, A., Walker, H.C. and Revesz, L.: Correlation between the radiobiological oxygen constant, K, and the nonprotein sulphhydryl content of mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 38: 525—535, 1980
- 46) Edgren, M., Larsson, A., Nilsson, K., Revesz, L. and Scott, O.C.A.: Lack of oxygen effect in glutathione-deficient human cells in culture. *Int. J. Radiat. Biol.*, 37: 299—306, 1980
- 47) Malaise, E.: Reduced oxygen enhancement of the radiosensitivity of glutathione-deficient fibroblasts. *Radiat. Res.*, 95: 486—494, 1983
- 48) Sorbo, B.: The effect of radioprotective agents on tissue nonprotein sulphhydryl and disulfide levels. *Arch. Biochem. Biophys.*, 98: 342—344, 1962
- 49) Modig, H.G. and Revesz, L.: Non-protein sulphhydryl and glutathione content of Ehrlich ascites tumor cells after treatment with the radioprotectors AET, cysteamine and glutathione. *Int. J. Radiat. Biol.*, 13: 469—477, 1967