



Title	ニトロイミダザール誘導体KIN-804の放射線増感効果に関する実験的検討
Author(s)	多田, 卓仁
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1995, 55(1), p. 70-75
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/16600
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誘導体 KIN-804 の放射線増感効果に関する実験的検討

多田 卓仁

大阪府立羽曳野病院放射線科

Radiosensitizing Effects of Nitroimidazole Derivative, KIN-804

Takuhiro Tada

KIN-804(2-nitroimidazole-1-methylacetohydroxamate) is a new hypoxic cell radiosensitizer developed in Japan. It showed a high level of radiosensitizing effect in vitro experiments and is expected to have low neurotoxicity because of its hydrophilic side chain. In this paper, the in vivo characteristics of KIN-804 were studied.

Acute toxicity, pharmacokinetics and radiosensitizing effect were studied using C3H/He mice and SCC VII carcinoma. Misonidazole was used as a standard comparison.

LD50/7 was used for the evaluation of acute toxicity. The LD50/7 of KIN-804 and Misonidazole were 3200 mg/kg and 2000 mg/kg, respectively.

Pharmacokinetics were studied using high performance liquid chromatography. The concentration of KIN-804 in the tumor peaked 20 min after administration and reached 62% of the maximum concentration in blood. The concentrations in brain and sciatic nerve were low.

The radiosensitizing effect was evaluated using the growth delay method. The enhancement ratios of KIN-804 were 1.71, 1.50 and 1.22 at doses of 200, 100 and 50 mg/kg, respectively, compared with 1.36 for Misonidazole at a dose of 100 mg/kg.

When irradiation was performed with double fractionation, the enhancement ratio of KIN-804 at a dose of 100 mg/kg decreased to 1.25.

Based on these results, KIN-804 is considered a promising radiosensitizer.

Research Code No. : 600. 4

Key words : Hypoxic cell radiosensitizer,
Nitroimidazole,
Hydroxamic acid, KIN-804

Received Mar. 30, 1994; revision accepted Jul. 27, 1994

Department of Radiology, Osaka-Prefectural Habikino Hospital

はじめに

悪性腫瘍に含まれる低酸素細胞は、その放射線抵抗性のため放射線治療による局所制御を困難なものにする重要な因子である。その対策として低酸素細胞放射線増感剤（以下、増感剤）が考案されたが、代表的薬剤であるMisonidazole（以下MISO）は臨床試験において神経毒性という副作用が発現し、有効性の確認はできなかった¹⁾⁻⁴⁾。

MISOより高い増感効果、より低毒性を目標に、各国で新しい増感剤が合成され検討されている。これらのなかで有力視されたSR-2508は欧米で臨床試験が開始されたが、dose limiting factorはやはり末梢神経障害であったと報告されている⁵⁾⁻⁷⁾。一方RK-28も日本で臨床試験が開始されたが、投与直後に出現する嘔気、嘔吐がdose limiting factorとなり、前期第二相試験の段階で有用性を確認できずに終了している⁸⁾⁻¹⁰⁾。今回検討したKIN-804 (2-nitroimidazole-1-methylacetohydroxamate 以下KIN) は日本で新しく合成された増感剤で、in vitroにおける実験では高い増感効果が報告されている¹¹⁾。さらに脂溶性が低いので神経毒性も低いことが期待される。臨床使用をめざし、in vivoにおける増感効果と毒性を中心に検討した。

材料および方法

KINは慶応大学薬化学研究所の永澤らによって合成されたニトロイミダゾールのヒドロキサム酸側鎖置換体である (Fig. 1)。比較対照薬剤としてMISO（日本ロッッシュより提供）を使用した。薬剤は生理食塩水に溶解し腹腔内投与した。

実験動物として雄C3H/HeJマウス（20-25g、日本クレア）を、実験腫瘍としてマウス皮膚扁平上皮癌由来のSCC VIIを使用した。SCC VII細胞約 10^6 個を8週齢のマウスの除毛した大腿部皮下に移植した。

(1) 急性毒性

薬剤の急性毒性は50%のマウスが7日以内に死亡する薬剤量 (LD50/7) を指標とした。各群10匹の10週齢マ

ウスに対し、種々の用量を投与し7日間の生死を観察した。各用量における死亡率をプロットし、Dose-Mortality curveを作成した。この曲線上で死亡率50%を示す薬剤投与量をLD50/7とした。

(2) 生体内分布

血液、腫瘍、脳、坐骨神経内の薬剤濃度を high performance liquid chromatography (以下 HPLC) を用いて測定した。

マウスに移植した腫瘍が2-3週後に短径約10mmとなった時点で、各群3-5匹のマウスを使用した。薬剤投与量は100mg/kgとし、濃度5mg/mlとなるよう調整し投与した。薬剤投与後経時的に脱血屠殺し、血液、腫瘍、脳、坐骨神経を採取した。脳と坐骨神経はできる限り多く採取し、血液、腫瘍は300-400mg/bodyの範囲で採取した。血液、腫瘍、脳には蒸留水2mlを、坐骨神経は採取量が少ないため5匹分を1試料として蒸留水0.4mlを加えた。腫瘍、脳、坐骨神経は固形であるためホモゲナイズした。その後、血液、腫瘍、脳には5ml、坐骨神経には1mlのアセトニトリルを加えて除蛋白した。3000rpm、15分間の遠心分離施行後、上澄を日本ミリポア工業製のフィルター (SJHV 013NS) を用いて濾過し、HPLCの試料とした。

HPLC装置には島津製作所製 LC-4A を、検出器には島津製作所製 SKD-2AS を使い、325nm の吸光度にて検出した。クロマトグラムのデータ処理には島津製作所製クロマトパック C-R3A を使用した。カラムには Zolbax 製の C-18 ODS column (length 25cm) を用いた。carrier は 66% アセトニトリル水溶液で、流速 0.3ml/min、温度 50℃ の条件で分析した。

各試料は C-R3A を用いて 2 点検量線法 (絶対検量線法) によってピーク面積を算出した。これを 33-100mg/kg に調整した標準試料のピーク面積と比較して濃度を算出した。

(3) 1 回照射における増感効果

Growth delay 法を用いて薬剤の増感率を求めた。腫瘍は移植後 2-3 週に短径が 8-10mm となった時点で使用した。各群 6-10 匹のマウスを使用した。

薬剤投与量は KIN が 50, 100, 200mg/kg, MISO が 100mg/kg とし、調整濃度は KIN で 2.5, 5.0, 10.0 mg/ml saline, MISO で 5.0mg/ml saline とした。薬剤は照射前 30 分に投与した。これは予備実験として KIN 100mg/kg を 20, 30, 40 分前に投与し、20Gy 照射時の growth delay を比較したところ、30 分前投与で最も delay が大きかったことを考慮して薬剤投与のタイミングを決定した。コントロール群に対しては同じタイミングで生理食塩水 0.4 ml を投与した。

照射装置には Siemens 社製 Stabilipan II を使い、管電圧 200kVp、管電流 20mA、フィルター 2mmAl、FSD34cm、線量率 3.7Gy/min で 1 回照射した。マウスは無麻酔で固定し、患側大腿以外は 3mm 厚鉛板で遮蔽し

た。線量は薬剤投与群では 15, 20, 25Gy, コントロール群では 20, 30, 40Gy とした。

照射直前および照射後 2-3 日ごとに腫瘍の長径 (a) と短径 (b) を計測し、次式によって腫瘍面積 (S) を求めた。

$$S = \pi ab / 4$$

非照射群では観察初日から 2-3 日ごとに計測し、同様に面積を求めた。

照射直前あるいは観察開始時に対する面積比 (対数表示) と経過日数から Growth curve を作成した。これらの Growth curve から面積比 3.0 となるのに要する日数を求め、DAY_{3.0} とした。照射群の DAY_{3.0} と非照射群の DAY_{3.0} の差をもって Growth delay (以下 GD) とした。横軸に線量、縦軸に GD をプロットし、最小自乗法によって直線化したものを Dose-Growth delay line とした。これにより Growth delay が 10 日となる線量を求め DOSE₁₀ とし、増感率 (以下 ER) を次式のごとく算出した。

$$ER = DOSE_{10}(\text{control}) / DOSE_{10}(\text{drug})$$

(4) 2 分割照射における増感効果

X線照射を 2 回に分割することによる ER の変化を検討した。

KIN の投与量を 100mg/kg、線量を 10, 15, 20Gy とし、他は 1 回照射の実験と同じ要領で 1 回目の照射を施行した。さらに 48 時間後に同じ薬剤投与量、同じ線量で 2 回目の照射を施行した。一方、コントロール群に対しては 1 回線量を 15, 20, 25Gy とし、48 時間間隔で同じ線量を 2 回照射した。

その後の計測およびデータ処理も 1 回照射の実験と同様の方法で 2 分割における ER を算出した。

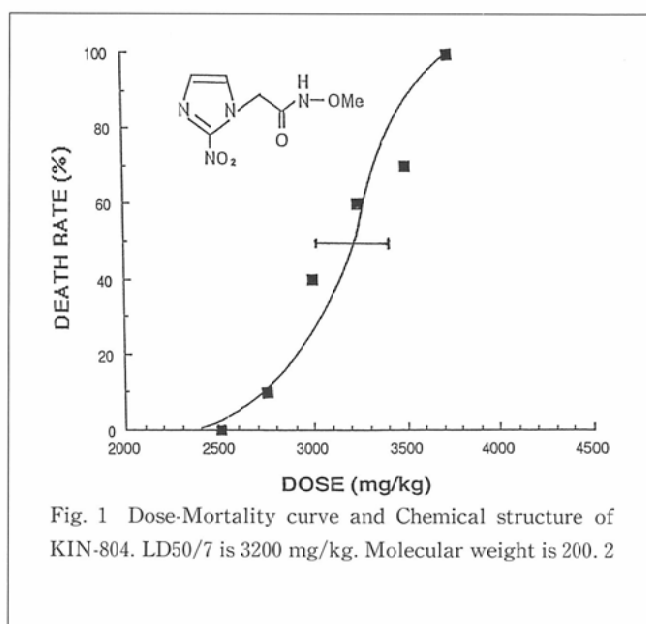


Fig. 1 Dose-Mortality curve and Chemical structure of KIN-804. LD50/7 is 3200 mg/kg. Molecular weight is 200.2

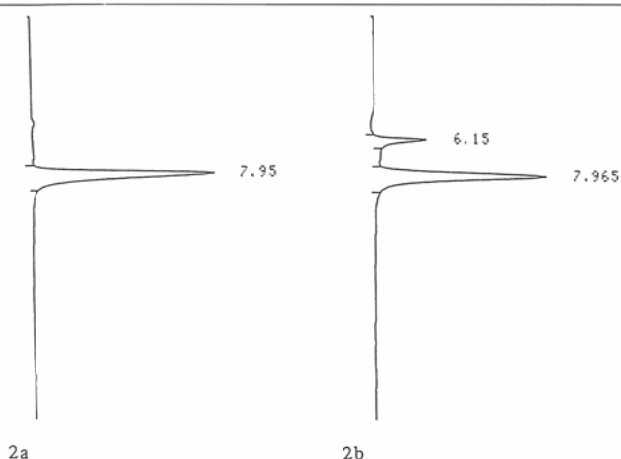


Fig. 2 Chromatograms of KIN-804 in water (2 (A)) and in blood (2 (B)).

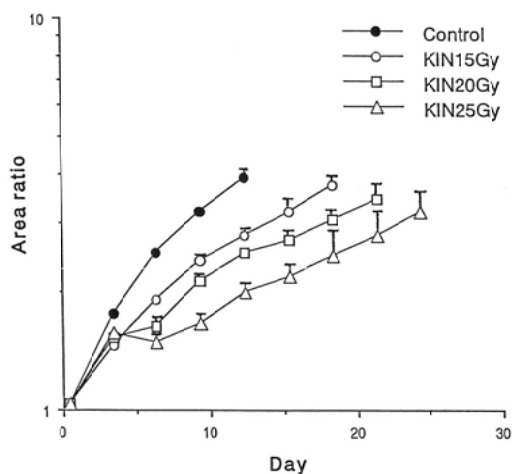


Fig. 4 The growth curves of the tumors. Irradiation was performed with the doses of 15Gy, 20Gy and 25Gy. The administration dose of KIN-804 was 100 mg/kg.

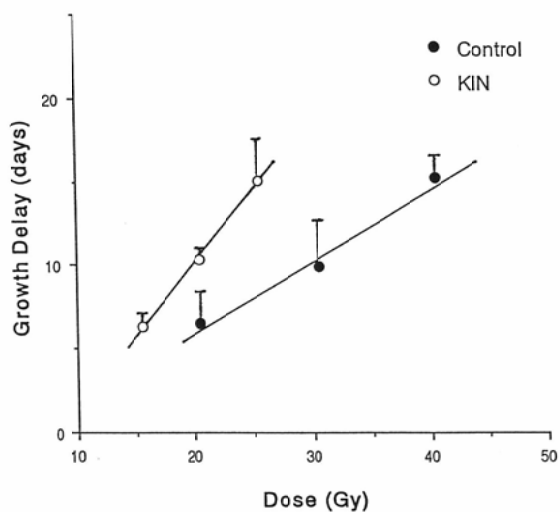


Fig. 5 The dose-growth delay lines. The administration dose of KIN-804 was 100mg/kg.

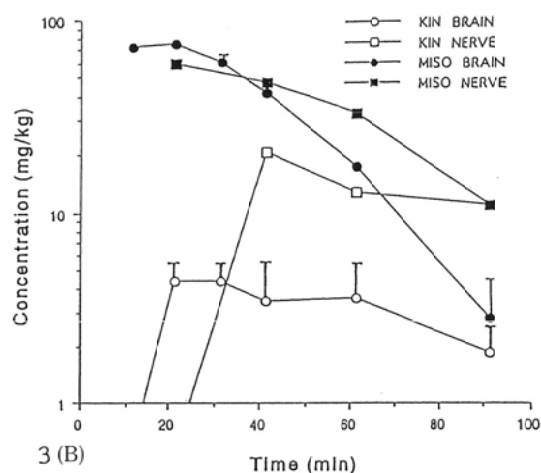
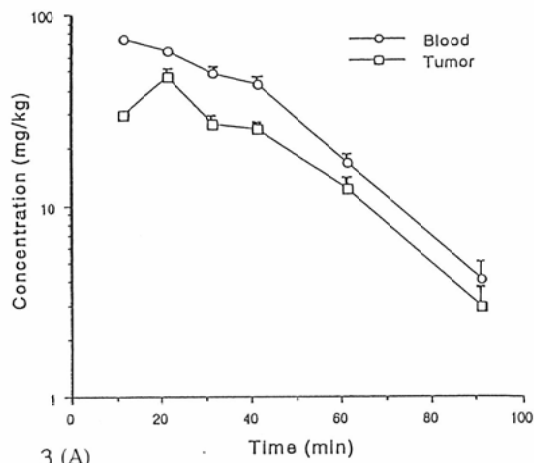


Fig. 3 Pharmacokinetics of KIN-804. Change of the concentration of KIN-804 in the blood and in the tumor tissue according to the time after injection (3 (A)). The concentration of KIN-804 was compared with misonidazole in the brain and in the sciatic nerve (3 (B)).

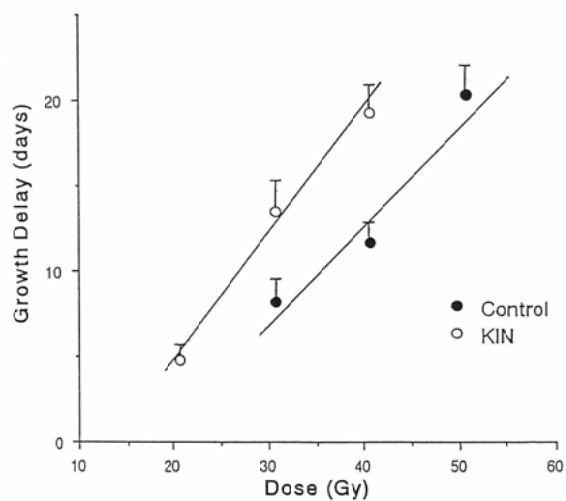


Fig. 6 The dose-growth delay lines in the double fractionation. Irradiation was performed twice with an interval of 48hr.

Table 1 ERs of KIN-804 and misonidazole.

Drug	Dose(mg/kg)	ER
KIN-804	50	1.22
	100	1.50
	200	1.71
KIN-804(2-fx)	100	1.25
misonidazole	100	1.36

Note. The interval in the double fractionation (2-fx) was 48 hours.

結 果

(1) 急性毒性

5000mg/kg BW という大量の KIN を投与すると、直後からマウスの運動量が低下し、次第に呼吸が粗大となった。けいれんや震えなどの神経系の異常所見は見られなかったが、全例が 24 時間以内に死亡した。

各用量における死亡率から作成した Dose-Mortality curve より得た LD₅₀/7 は 3200mg/kg であった (Fig. 1)。

(2) 生体内分布

コントロールとして KIN を生理食塩水に溶解し HPLC にて分析したところ、retention time 7.95min に単一のピークを認めた (Fig. 2(A))。一方、投与後 30 分における血液のクロマトグラムでも同様のピークが認められた (Fig. 2(B))。Fig. 2(B)における 6.1min 付近のピークは、薬剤を投与していないマウスの腫瘍のクロマトグラムにおいても観察されており、組織由来のピークと考えられた。

KIN の体内動態を Fig. 3 に示した。KIN の血中濃度は 10 分後の値から時間とともに低下した。腫瘍内濃度は 20 分後にピークを示し、その値は 44mg/kg であった (Fig. 3(A))。一方脳内濃度はすべての測定点で 6mg/kg 以下であった。これは MISO に比べると非常に低い値であった (Fig. 3(B))。坐骨神経内濃度は 40 分後にピークを示し、その値は 20mg/kg であった。これも MISO に比べると低値であった (Fig. 3(B))。

(3) 1 回照射における増感効果

KIN100mg/kg 投与時の各線量における Growth curve を Fig. 4 に示した。さらに Growth curve から得られた DAY_{3.0} をもとに Dose-Growth delay line を作成した (Fig. 5)。ここから DOSE₁₀ は KIN100mg/kg で 20Gy、コントロールで 30Gy であった。ER は 1.50 と計算された。同様の手順で KIN の他の濃度ならびに MISO の ER を算出したところ KIN50, 200mg/kg, MISO100mg/kg の ER はそれぞれ 1.22, 1.71, 1.36 と計算された (Table 1)。

(4) 2 分割照射における増感効果

1 回照射と同じ要領で 2 分割照射における Dose-Growth delay line を作成した (Fig. 6)。分割照射するとより多くの線量が必要となり、DOSE₁₀ は KIN100mg/kg で 27Gy、コントロールで 36Gy であった。増感率は 1.25 と計算された。

考 察

低酸素細胞の存在は多数の実験腫瘍¹²⁾⁻¹⁴⁾のみならず、人の悪性腫瘍^{15),16)}においても存在が確認されている。これらの細胞では酸素の増感効果がないため、放射線の細胞傷害効果が小さく、したがって低酸素細胞を多く含む腫瘍は放射線治療に対し抵抗性となる¹⁷⁾。酸素は拡散の過程で途中の細胞に消費され、血管から離れた位置 (70 μ m 以上) にある腫瘍細胞には到達しない。これに対し、途中で変化をうけることなく低酸素細胞に到達し、酸素と同様の作用をして放射線による細胞傷害を高める物質があれば、低酸素細胞の放射線抵抗性を軽減できると考えられる¹⁸⁾。このような理論的背景のもとに生まれたのが、低酸素細胞を特異的に増感する低酸素細胞放射線増感剤である。

有力な増感剤候補物質としてニトロイミダゾール系化合物があり、MISO はその代表的な薬剤であったが、その臨床試験は失敗に終わった。しかし、増感効果とイミダゾール環の構造に依存する電子親和性の間に相関関係があること¹⁹⁾、ならびに神経毒性は化合物の側鎖構造によって規定される脂溶性に関係すること²⁰⁾を基本的知見として、より低い神経毒性とより高い増感効果を有する新しい化合物の研究が進められている。永澤らは側鎖にヒドロキサム酸誘導体を用いることにより放射線増感効果が修飾されること²¹⁾を利用し、ニトロイミダゾール環にさまざまなヒドロキサム酸誘導体を側鎖として加えた化合物を合成してきた。その中でも in vitro の実験ですぐれた ER を示したのが KIN-804 である¹¹⁾。

急性毒性に関する実験では KIN の LD₅₀/7 は MISO の 1.6 倍の高値を示し低毒性が期待される。これは SR-2508²²⁾に比べると少し劣るものの、RK-28⁸⁾に比べると優れている。

神経毒性に関係する脂溶性の指標の一つとしてオクタノール・水分配係数 (octanol-water partition coefficient, 以下 P 値) が有用とされている²⁰⁾。pH7.4 の条件下で測定された P 値は KIN が 0.084, MISO が 0.422 で¹¹⁾、KIN は脂溶性が低く、神経毒性は高くないと予想された。今回の生体内分布の実験では脳内濃度はすべての測定点で 6mg/kg 以下であり脳への移行は極めて少なかった。このことは、脂溶性が高く (P 値 0.53⁸⁾) 脳への移行が比較的多い RK-28 の臨床試験で問題となった、投与直後の嘔気、嘔吐^{8),9)}の軽減につながる可能性があると考えられる。また末梢神経内濃度もピーク値が 20mg/kg と MISO の 3 分の 1 程度であり、末梢神経毒性の軽減も期待される。

電子親和性の定量的物性値として一電子還元電位が用いられ、in vitro における増感効果の予測に有用とされている¹⁹⁾。KIN の一電子還元電位は実測で -0.99 eV であり、MISO の -1.04 eV とほぼ同様の値を示した²³⁾。しかし、永澤らが施行した EMT6/KU 単層培養細胞を用いた in vitro の実験において KIN 0.1mM の ER は 2.00 であり

MISO 0.1mM の 1.72 より高い ER を示している¹¹⁾。これは KIN のメチルアセトヒドロキサム酸側鎖がニトロイミダゾール環の増感効果を修飾したためと考えられる。なおこの値は SR-2508 0.1mM の ER1.72 よりも高値であった¹¹⁾。今回の in vivo の実験においても、投与量 100mg/kg の条件下で KIN の ER は 1.50 と MISO の ER である 1.36 を上回っていた。in vivo においても KIN は MISO に比し優れた毒性、効果比を有していると考えられる。

臨床における KIN の許容量は不明であるが、LD50/7 が高く神経系への分布が少ないことから、MISO に比し高値が期待される。KIN の ER は 200mg/kg で 1.71, 100mg/kg では 1.50, 0.50mg/kg では 1.22 という値を示し、これらの範囲では濃度依存性が認められた。したがって薬剤投与量を多くすることが高い増感効果につながると考えられる。

臨床においては分割照射が一般的であり、治療中には repair をはじめとするさまざまな影響が生じる。増感剤の効果も 1 回照射における効果とは異なると考えられる。そこで分割照射が ER に及ぼす影響を知る目的で、2 分割照射の実験を行った。その結果 48 時間間隔の 2 分割照射におけるコントロール群の DOSE₁₀ は 36Gy で 1 回照射の 30Gy より大きかった。2 分割照射における KIN の ER は 1.25 で、1 回照射の 1.50 に比し低値を示した。Hill はさまざまな腫瘍における分割照射に関する過去の報告をもとに、一般に分割照射では増感効果が小さくなると指摘し、その要因として reoxygenation をあげている²⁴⁾。すなわち、分割照射の過程で低酸素細胞が再酸素化することにより増感剤の影響が小さくなるという理論である。一方 Kitakabu らは、SCC VII 腫瘍において 13Gy の 1 回照射後 1 時間以内に急激に reoxygenation が起こり、その後も徐々に進行すると報告している²⁵⁾。今回の 2 分割照射は、同じ SCC VII に対して 48 時間間隔で照射したため、その間に reoxygenation がかなり進んでいると考えられる。コントロール群では 2 分割照射の DOSE₁₀ が一回照射に比し 20% 増加し、一方 KIN 群では DOSE₁₀ が 35% 増加した。これはコントロール群では repair や repopulation の影響が reoxygenation の効果により軽減されていると考えられるが、KIN 群では低酸素細胞の放射線抵抗性が低下していることから reoxygenation の効果は小さく、repair や repopulation の影響が強くなったと考えられる。その結果 ER は低下したが、なお有意な増感効果が認められた。臨床使用の際には、KIN に限らず増感剤一般に言えることであるが、reoxygenation の影響がない術中照射や reoxygenation が起こりにくい腫瘍においての使用が、理論上はより有効と思われる。

SR-2508 は P 値が 0.048 と極めて脂溶性が低く¹¹⁾、低神経毒性が期待されたにもかかわらず臨床試験において末梢神経障害が問題となった。KIN は SR-2508 よりも P 値が少し高く¹¹⁾、末梢神経障害が問題となる可能性はある。しかしながら、in vitro で KIN はより高い ER を示してお

り¹¹⁾、今後 in vivo での ER 比較が必要と思われる。

以上の in vivo における実験成績は、KIN が臨床試験に値する増感剤候補物質であることを示唆すると考えられる。

稿を終えるに当たり、懇切なる御指導を賜った大阪市立大学放射線医学教室小野山靖人教授、ならびに薬剤を提供していただいた慶応大学薬化学研究所永澤秀子先生をはじめ御協力をいただいた皆様に深謝致します。

文 献

- 1) Wasserman TH, Stetz J, Phillips TL: Radiation therapy oncology group clinical trial of misonidazole. *Cancer* 47: 2382-2390, 1981
- 2) 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
- 3) Leibel D, Bauer M, Wasserman TH, et al: Radiotherapy with or without misonidazole for patients with stage IIIB or IVA squamous cell carcinoma of the uterine cervix: Preliminary report of a radiation therapy oncology group randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 13: 541-549, 1987
- 4) Fazekas J, Pajak L, Wasserman TH, et al: Failure of misonidazole-sensitized radiotherapy to impact upon outcome among stage III-IV squamous cancer of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 13: 1155-1160, 1987
- 5) Chassagne D, Charreau I, Sancho-Garnier H, et al: First analysis on tumor regression for the European randomized trial of etanidazole combined with radiotherapy in head and neck carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22: 581-584, 1992
- 6) Coleman CN, Buswell L, Noll L, et al: The efficacy of pharmacokinetic monitoring and dose modification of etanidazole on the incidence of neurotoxicity: Results from a Phase 2 trial of etanidazole and radiation therapy in locally advanced prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22: 565-568, 1992
- 7) Coleman CN, Wasserman TH, Urtasun RC, et al: Final report of the phase 1 trial of the hypoxic cell radiosensitizer SR2508 (etanidazole): Radiation Therapy Oncology Group 83-03. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 18: 389-393, 1990
- 8) Shibamoto Y, Sasai K, Sakaguchi M, et al: Evaluation of a new 2-nitroimidazole nucleoside analogue, RK-28 as a radiosensitizer for clinical use. *Int J Radiat Biol* 59: 105-115, 1991
- 9) Sasai K, Shibamoto Y, Manabe T, et al: Pharmacokinetics of intratumoral RK-28, a new hypoxic radiosensitizer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 24: 959-963, 1992

- 10) Sakamoto S: personal communication.
- 11) Nagasawa H, Bando M, Hori H, et al: Radiosensitizing, toxicological, and pharmacokinetic properties of hydroxamate analogues of nitroimidazoles as bifunctional radiosensitizers/chemical modifiers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22: 561-564, 1992
- 12) Powers WE, Tolmach LJ: A multi-component X-ray survival curve for mouse lymphosarcoma cells irradiated in vivo. *Nature* 197: 710-711, 1963
- 13) Moulder JE, Rockwell S: Hypoxic fraction of solid tumors: experimental techniques, method of analysis, and a survey of existing data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10: 695-712, 1984
- 14) Shibamoto Y, Yukawa Y, Tsutsui K, et al: Variation in the hypoxic fraction among mouse tumors of different types, sizes and sites. *Jpn J Cancer res (GANN)* 77: 908-915, 1986
- 15) Denecamp J, Foeler JF, Dische S: The proportion of hypoxic cells in a human tumor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2: 1227-1228, 1978
- 16) Urtasun RC, Chapman JD, Raleigh JA, et al: Binding of ³H-misonidazole to solid human tumors as a measure of tumor hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12: 1269-1273, 1986
- 17) Gray HL: Radiobiologic basis of oxygen as a modifying factor in radiation therapy. *Am J Roentgenol Rad Therapy and Nuclear Med* 85: 803-815, 1961
- 18) Adams GE, Dische S, Fowler JF, Thomlinson RH: Hypoxic cell sensitizers in radiotherapy. *The Lancet* 24: 186-188, 1976
- 19) Adams GE, Flockhart IR, Slithen CE, et al: Electron-affinic sensitization VII. a correlation between structures, one-electron reduction potentials, and efficiencies of nitroimidazoles as hypoxic cell radiosensitizers. *Radiat Res* 67: 9-20, 1976
- 20) 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
- 21) Mulcahy RT, Wustrow DJ, Kende AS: Preliminary evaluation of isocyanate-generating nitroheterocycles as chemosensitizers, radiosensitizers and hypoxic cell cytotoxic agents. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10: 1609-1613, 1984
- 22) Shibamoto Y, Nishimoto S, Shimokawa K, et al: Characteristics of fluorinated nitroazoles as hypoxic cell radiosensitizers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16: 1045-1048, 1989
- 23) Nishimoto S: personal communication.
- 24) Hill RP: Sensitizers and radiation dose fractionation: results and interpretations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12: 1049-1054, 1986
- 25) Kitakabu Y, Shibamoto Y, Sasai K, et al: Variations of the hypoxic fraction in the SCC VII tumors after single dose and during fractionated radiation therapy: assessment without anesthesia or physical restraint of mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 20: 709-714, 1991