

Title	低酸素細胞増感剤RK-27の動物正常組織およびEhrlich腫瘍に対する放射線増感効果
Author(s)	黄田, 保光
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1988, 48(4), p. 497-508
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/16883
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

低酸素細胞増感剤 RK-27の動物正常組織および Ehrlich 腫瘍に対する放射線増感効果

京都府立医科大学放射線医学教室（主任：村上晃一教授）

黄 田 保 光

（昭和62年3月25日受付）

（昭和62年9月9日最終原稿受付）

Radiosensitization Effect of New Hypoxic Cell Radiosensitizer RK-27 on Normal Tissue and Ehrlich Tumor of Experimental Animals

Yasumitsu Kohda

Department of Radiology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Research Code No. : 407

Key Words : Hypoxic cell radiosensitizer, RK-27, Ehrlich
tumor, Enhancement ratio

The toxicity and radiosensitizing effect of new hypoxic cell radiosensitizer RK-27 were evaluated in vivo.

The LD50/30 value in ICR mice was 1.21 mg/g.b.wt.

Whole body irradiation of ICR mice with or without RK-27 pretreatment was undertaken to determine radiosensitizing effect on normal tissue. The LD50/30, indicating bone marrow death was 6.75 Gy for irradiation alone while 6.93 Gy for irradiation with RK-27.

The radiosensitizing effect of RK-27 on hypoxic tumor cells was studied using Ehrlich ascites tumor cells implanted subcutaneously in the thigh of ICR mice and locally irradiated under hypoxic condition. The result was analyzed using the TCD50/90 method.

Enhancement ratios of RK-27 on hypoxic Ehrlich tumor cells were 1.42, 1.51, 1.58 and 2.10 for the doses of 0.2, 0.3, 0.4 and 0.6 mg/g.b.wt., respectively.

はじめに

腫瘍の放射線感受性は、腫瘍内の酸素分圧に大きく影響される¹⁾。多くの腫瘍でその増殖が栄養血管の発育を上まわる為、乏血部分が生じ低酸素分圧領域（以下低酸素領域）ができる²⁾。この低酸素分圧腫瘍細胞（以下低酸素腫瘍細胞）は、正常酸素分圧細胞（以下正酸素細胞）に比べて放射線感受性が1/2～1/3になる事が知られている³⁾。幾つかの動物腫瘍では、20%前後の低酸素細胞の存在が報告されており⁴⁾⁵⁾、人癌においても同等以上

の低酸素細胞の存在が推測されている⁶⁾。

一方、正常組織の大部分は正酸素細胞で構成されており、従ってこの低酸素細胞の放射線感受性を改善することが、正常組織を温存しながら腫瘍の局所治癒を計る放射線治療の目的とその成績向上のための課題となっている⁶⁾。

このため、過去様々な試みがなされている。低酸素細胞の酸素分圧を上昇させるために高圧酸素療法や高酸素分圧ガス(95%O₂+5%CO₂)吸入下放射線療法が行なわれたが、治療成績は多少改善

したもののその実施が困難でかつ分割照射回数に制限があるなどの問題があり、一般に広く利用されなかった⁷⁾⁸⁾。この低酸素状態を改善する試みは、人工血液を使って酸素運搬能を上げる方法や⁹⁾、放射線照射後生残低酸素組織の再酸素化現象を最大限に利用するための分割照射法の再検討という形で続けられている^{10)~12)}。また、酸素効果の少ない速中性子線、重粒子線、 π 中間子などの高 LET 放射線療法や¹³⁾低酸素細胞がむしろ高感受性を示す温熱療法の研究も行なわれている⁵⁾¹⁴⁾。このほか酸素と同様の放射線増感効果を期待して、酸素類似物質の開発とその放射線との併用効果の研究も行なわれるようになった¹⁵⁾。酸素類似物質の探求の過程で、それらの化学物質の持つ電子親和性と放射線増感効果が関連することがわかり、電子親和性を指標とした低酸素細胞放射線増感剤の開発が続いている。開発された薬剤のうち栄養血管から離れた低酸素領域に到達できるだけの代謝安定性を持ち、培養細胞、実験動物腫瘍の両者に効果のあったのが 2-Nitroimidazole 化合物の Misonidazole である^{16)~20)}。Misonidazole については世界各国で臨床試験が行なわれたが、統計的に有意な治療成績の向上は見られなかった²⁰⁾。その原因の一つとして神経毒性による総投与量の制限という問題点が残された^{20)~24)}。現在では、Misonidazole の欠点を克服する薬剤の開発や増感剤と他剤或いは他療法との併用等が今後の課題となっている¹⁴⁾。この報告では、新低酸素細胞放射線増感剤として開発された RK-27 について、実験動物に対する毒性、正常組織に対する放射線との併用効果、実験固形腫瘍に対する放射線増感効果を検討した。

実験材料及び方法

実験動物—腫瘍系

実験動物：実験には千葉県船橋農場より購入した生後 8 週齢の ICR 系マウスを用いた。毒性の検討には雄マウスを、放射線増感効果の検討には雌マウスを用いた。これらの動物は 6 週齢で購入し、我々の教室の空気調節を行った小動物飼育室で水道水と市販の固形餌料を自由に与え飼育したのち実験に使用した。

実験腫瘍：Ehrlich 腹水腫瘍細胞を使用した。これは、我々の教室で単一細胞を生後 24 時間以内の ICR/JCL マウス腹腔内に移植し、それより採取した腫瘍細胞を以後 ICR/JCL マウスに継代移植を続け、宿主—腫瘍細胞関係の確立した腫瘍細胞株である。まず一定数の細胞を ICR 系雌マウスの腹腔内に移植し、対数増殖期にある²⁵⁾、4 日目の腫瘍細胞を含む腹水を採取し、これを 5% 非活性化仔牛血清を含むハンクス氏液で希釈し細胞浮遊液を作成した。この作業は氷冷中で行った。これらの細胞を Trypan blue で染色し生細胞数を血球計算盤で計数し一定細胞数 (5×10^5 Viable cell/5 μ l) をマウス右大腿皮下に移植し 48 時間後の固形腫瘍を実験に使用した。照射時の腫瘍の大きさは皮膚表面上からノギスを用いて計測し、直径約 1 mm であった。

薬剤及び投与方法

低酸素腫瘍細胞放射線増感剤として坂口により開発、合成され、提供された RK-27 を用いた。化学構造式を Fig. 1 に示す。化学名は 1-((4-Hydroxy Butoxy) Methyl) 2-Nitroimidazole で Misonidazole と同じ 2-Nitroimidazole 系の薬剤である。側鎖部分が鎖状の糖構造となっており、Imidazole 環が Purine 核の主構成要素であるので、2-nitroimidazole 環を塩基と見なすと全体を核酸(ヌクレオシド)誘導體と解する事が出来る。RK-27 は宮本の報告²⁶⁾した一連の RK 化合物中の RK-28 とは、RK-28 に含まれる側鎖部分の不飽和結合が RK-27 に含まれない点で異なっている。薬剤は必要な濃度まで生理食塩水で希釈して用いた。薬剤単独の毒性の実験には 0.15~1.5 mg/g.b.wt の間で 9 段階の薬剤量により試みた。その他の実験では必要薬剤量を X 線照射 30 分前にマウス腹腔内に投与した。

X 線照射法

X 線発生装置は東芝製 KXC-18 型深部治療装置を用い、管電圧 180 kVp、管電流 25 mA で実験対象によって filter および線源—被照射動物間距離を変えて照射した。すなわち、正常組織に対する薬剤と放射線との併用効果の実験では 0.3 mm Cu + 0.5 mm Al の filter を使用し(半価層 0.7 mm Cu)、

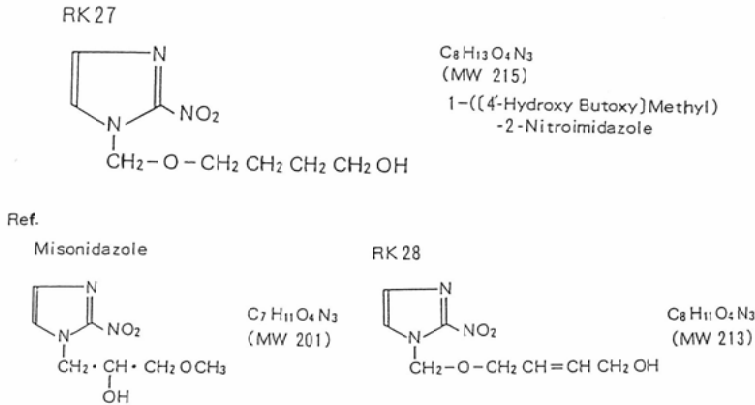


Fig. 1 Chemical structure of RK-27, RK-28 and Misonidazole

線源—動物間距離55cm, 95.6cGy/minの線量率で全身照射した。この際、マウスは12個の個室が放射状に並んだプラスチック製ケースに各室1匹ずつ無麻酔下に収容し、均等な照射条件を得るため照射中は毎分15~20回転させた。このケースの線源側のプラスチックの厚さは3mmである。

次に腫瘍に対する薬剤と放射線との併用効果の実験には2mm Alのfilterを使用し(半価層8mm Al), 線源—腫瘍中心間距離10cm, 775.4cGy/minの線量率で照射した。この照射のためにまずマウスを固定する金属性の容器を作成した。この容器は6cm×18.5cm大で1.5mm厚の2枚の真鍮製の板をマウスが入るように2.5cmの間隙を開けて平行に組合せたもので、2枚の真鍮板のいずれも中央に2.5cm×3.5cm大の穴が開けてあり、腫瘍を移植した右大腿をこの穴に露出させて固定し、さらに線源側の真鍮板の上へ中央に2.5cm×3.5cmの穴のあいた5mm厚の鉛板を穴が合致するように置くことにより正常部分は遮蔽され腫瘍とその周囲のみが穴を通して上下どちらの方向からも照射されるようになっている。

実際の照射にあたってはマウス2匹を1組とし、ネプタール(0.06mg/g.b.wt)麻酔下で前述のように固定し、必要照射時間の半分の時間経過時点で金属性容器の天地を逆にし、腫瘍内の線量分布が均等になるようにした。照射は正酸素条件下と急性低酸素条件下の二群にわけて行なった。ここでいう正酸素条件とは、マウスに麻酔以外の

処置をせず室温空気呼吸下で腫瘍が通常の血流状態にある場合をいい、急性低酸素条件とは、真鍮製容器に付属した金属製締めでマウス右大腿根部を圧迫し3分間血流を遮断することにより得られた低酸素の状態である。この方法で田中らは酸素効果比(O.E.R.)3.1を報告しており¹⁸⁾、放射線生物学的にはほぼ完全な低酸素化を達成できると考えられる。なお、線量測定にはVictoreen Condensor R-meter, Probe No. 156を用い、得られたR値に気圧、気温の補正因子を乗じ、さらに吸収線量補正值0.96を乗じて実効吸収線量とした。

腫瘍体積の計測

照射による腫瘍体積の変化を知るために照射後30日目までは毎日、それ以後は6日おきにその計測を行った。すなわち、腫瘍の長径a, 短径b, 及び厚さcをノギスで計測し腫瘍を回転楕円体と仮定し、次式により体積Vを算出した。

$$V = \pi/6 \cdot a \cdot b \cdot c$$

実験分析法

薬剤単独による毒性の実験には9段階に設定した薬剤量の各々に9匹のマウスを使用し、LD50/30日法で、正常組織に対する薬剤と放射線との併用効果の実験には14段階に設定した照射線量の各々に10~15匹づつのマウスを使用し同じくLD50/30日法で分析した。固形腫瘍に対する薬剤と放射線との併用効果の実験には一つの薬剤量に対し9段階の照射線量を設定し各々の線量に9匹のマウスを使用し、TCD50/90日法で分析した。

Table 1 LD50/5days and LD50/30days values for ICR male mouse after irradiation combined with or without RK-27(0.4mg/g. b. wt)
LD50/5 and LD50/30 values combined with radiation with RK-27

ICR male mouse (8 weeks age)		
RK-27 0.4 mg/g. b. wt	LD50/5 (S.D.)Gy	LD50/30 (S.D.)Gy
-	12.77±0.47	6.75±0.71
+	14.21±1.36	6.93±0.85

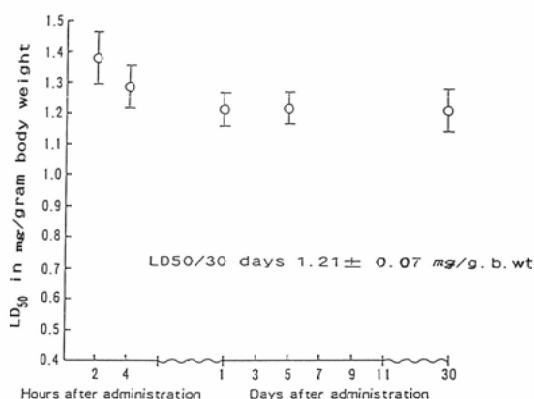


Fig. 2 Changes of the LD 50 values after intraperitoneal administration of RK-27 in ICR male mouse

Changes of the LD 50 after RK-27 administration

実験結果

(1) 薬剤単独投与による30日間半数致死線量 (LD 50/30日値)

薬剤をICR系雄マウス腹腔内に投与後、24時間までは時間単位で、以後30日目までは1日1回同一時刻に生死を観察し、得られた値からLD 50/30日値を算出した。Fig. 2に投与後の経過時間に伴うLD 50値の推移を示した。投与24時間後からは殆ど変動が無くLD 50/30日値は 1.21 ± 0.07 mg (5.63×10^{-7} mol)/g.b.wtであった。この値は田中らにより報告¹⁸⁾されているMisonidazoleのLD 50/30日値2.0mg (9.95×10^{-7} mol)/g.b.wtより低く、RK-27の方が毒性が高いといえる。

(2) 薬剤を投与した場合の放射線照射によるLD 50/30日値 (正常組織に対する薬剤と放射線の併用効果)

薬剤投与量は薬剤単独投与によるLD 50/30日

値の約1/3量に相当する0.4mg/g.b.wtとした。この投与量で死亡したマウスはなかった。薬剤投与群と非投与群に分けて全身照射し、照射後毎日同一時刻に生死を観察し、LD 50/5日値とLD 50/30日値を算出し、Table 1に示した。腸管死を反映すると考えられるLD 50/5日値は薬剤非投与群で1,277cGy、薬剤投与群で1,421cGy、骨髄死を反映すると考えられるLD 50/30日値はそれぞれ675cGy、693cGyで両者共に有意差は認められなかった。マウス正常組織に対してRK-27は放射線感受性を増感していないと考えられる。

(3) Ehrlich 腫瘍細胞移植後48時間後の固形腫瘍に対する放射線と薬剤の併用効果

Fig. 3に示すように6つの実験群を設定した。すなわち、Control群として放射線照射(-)、阻血(-)でRK-27投与(-)と同(+)²⁾の2群、正酸素条件下で照射(+)²⁾RK-27投与(-)と同(+)²⁾の2群、及び急性低酸素条件下で照射(+)²⁾、RK-27(-)と同(+)²⁾の2群、合計6実験群である。RK-27投与量は、正酸素条件下の実験には0.2mg/g.b.wtと0.4mg/g.b.wtの2段階を、急性低酸素条件下の実験には0.2mg、0.3mg、0.4mg及び0.6mg/g.b.wtの4段階を設定した。

① 薬剤投与の放射線非照射群腫瘍増殖に及ぼす効果

RK-27 0.4mg/g.b.wt投与群と同非投与群の当初の腫瘍体積を1とし、Relative tumor volumeを対数値で現したTumor Growth curveをFig. 4に示す。両者に差は認められず、RK-27は薬剤単独では正酸素条件下の腫瘍に対し増殖抑制効果を示さなかった。

② 正酸素条件下薬剤投与の腫瘍増殖における

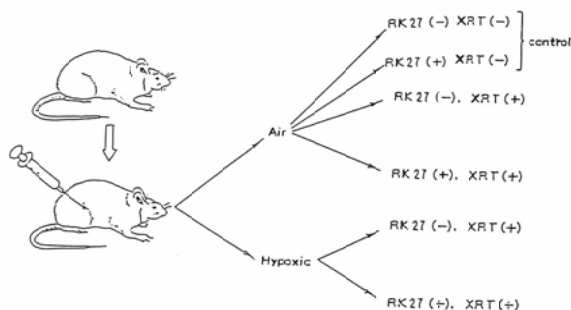


Fig. 3 Scheme of experimental procedures. Ehrlich ascites tumor cells were transplanted subcutaneously to the right thigh of ICR female mice under Nembutal induced anesthesia. The mice were divided into two batches. One batch was assigned to one of 2 RK-27 dose groups (0.2, 0.4 mg/g.b.wt) and then irradiated locally with 180 Kvp Xrays (H.V.L. 8mm Al) at a rate of 775.4 cGy/min under aerobic condition. The other batch were assigned to one of 4 RK-27 dose groups (0.2, 0.3, 0.4, 0.6mg/g.b.wt) and then irradiated locally with the same method under hypoxic condition.

放射線増感効果

RK-27を0.4mg/g.b.wt投与後、正酸素条件下で500, 750または1,500cGy照射した群と放射線単独で500, 800または1,500cGy照射した群のTumor growth curveをFig. 5に示した。800cGy照射群までは両者に差が認められないが、1,500cGyでは薬剤併用群でGrowth delayの傾向が見られた。Table 2にRK-27 0.2mg/g.b.wtおよび0.4mg/g.b.wt投与群のTCD 50/90日、すなわち照射後90日目に50%のマウスで腫瘍を局所的にコントロールするのに必要な線量を示した。RK-27 0.2mg/g.b.wt投与群ではTCD 50/90日は1,255cGy、同非投与群では1,454cGyであり、0.4mg/g.b.wt投与群ではTCD 50/90日は薬剤投与群1,082cGy、同非投与群1,390cGyであった。Enhancement Ratio (以下E.R.) 即ち薬剤非投与群のTCD 50/90日を薬剤投与群の同値で除した値は、0.2mg/g.b.wt投与群では1.16、0.4mg/g.b.wt投与群では1.28となった。RK-27が正酸素条件下の腫瘍に対し若干の増感効果を示すという結果を得た。

③ 急性低酸素条件下薬剤投与の腫瘍増殖にお

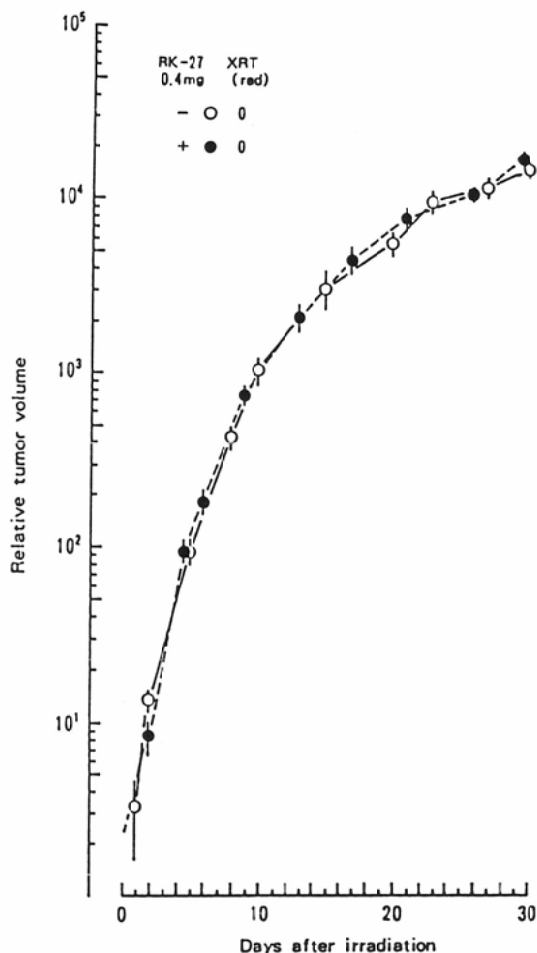


Fig. 4 The effect of RK-27 (0.4mg/g.b.wt) on the growth curves for ICR mouse-Ehrlich tumor Growth Curves (48hr Ehrlich tumor) under Aerobic condition

Table 2 TCD50/90days values for ICR female mouse-Ehrlich tumor after irradiation combined with or without RK-27 under aerobic condition

Condition	TCD 50/90days		E.R.
	RK-27	TCD 50/90 value(Gy)	
Aerobic	0	14.54±1.89	1.16
	0.2mg	12.55±1.28	
Aerobic	0	13.90±1.92	1.28
	0.4mg	10.82±1.20	

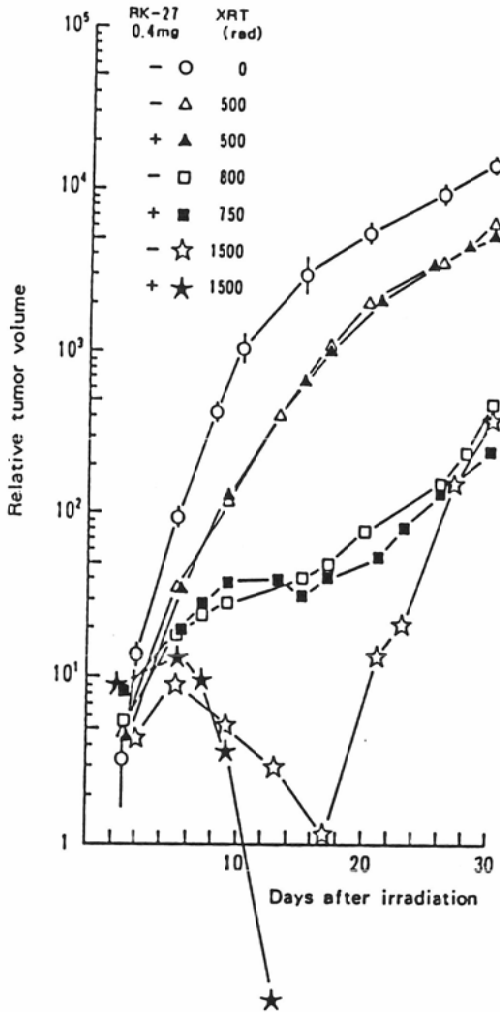


Fig. 5 Tumor growth curves for ICR mouse-Ehrlich tumor after irradiation combined with or without RK-27, 0.4mg/g.b.wt under aerobic condition
Tumor Growth Curves (48hr Ehrlich tumor) under Hypoxic condition

ける放射線増感効果

RK-27を0.4mg/g.b.wt投与後、急性低酸素条件下で1,100または1,550cGy照射した群と急性低酸素条件下で薬剤非投与で1,100または1,550cGy照射した群の Tumor growth curve を Fig. 6 に示す。薬剤投与群では1,550cGy照射群に growth delay が認められた。Table 3 に0.2mg, 0.3mg, 0.4mg, または0.6mg/g.b.wt投与各群の TCD 50/90日を示した。これらの E.R. はそれぞれ1.42,

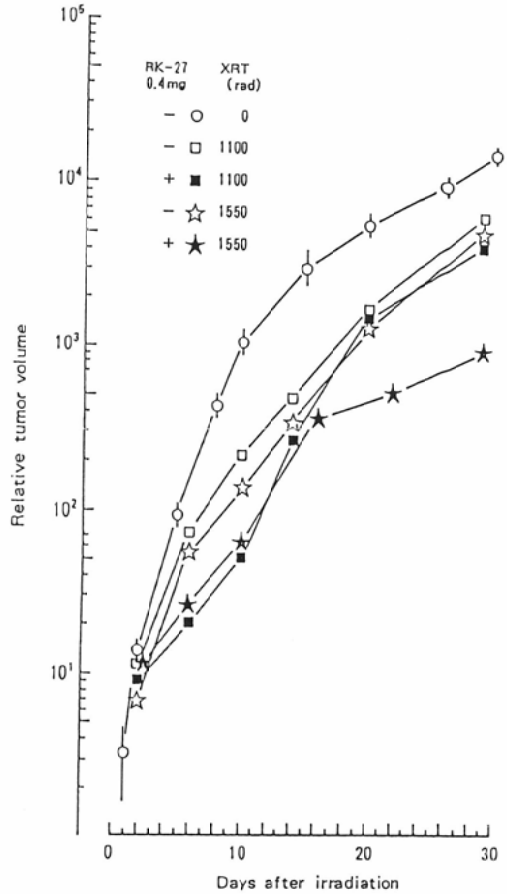


Fig. 6 Tumor growth curves for ICR female mouse-Ehrlich tumor after irradiation combined with or without RK-27, 0.4mg/g.b.wt under hypoxic condition

1.51, 1.58及び2.10であり、薬剤投与量の増加と E.R. の上昇に相関傾向が見られた。

考 案

臨床応用が期待された Misonidazole が十分な成果を上げられなかったことに対し、様々な問題点が提起された。それらを要約すると投与する薬剤に関する問題点と薬剤を投与される側の腫瘍に関する問題点に大別される。即ち、増感効果を期待できる投与薬剤量では毒性とくに神経毒性が発現し、この神経毒性の発現には総投与量に関与し、薬剤の一回投与量も総投与量も制限されるという点と^{21)~23)}、実験腫瘍では確かめられている低酸素細胞が放射線治療の対象となった人癌におい

Table 3 TCD50/90days values for ICR female mouse-Ehrlich tumor after irradiation combined with or without RK-27 under hypoxic condition

TCD 50/90days			
ICR female mouse (8weeks)			
48hrs Ehrlich tumor			
Hypoxic condition			
RK-27 i.p.			
Condition	RK-27	TCD 50/90 value(Gy)	E.R.
Hypoxic	0	25.61±2.36	1.42
	0.2mg	18.05±2.00	
Hypoxic	0	25.60±1.40	1.51
	0.3mg	16.91±1.09	
Hypoxic	0	27.27±3.05	1.58
	0.4mg	17.24±1.90	
Hypoxic	0	25.60±1.40	2.10
	0.6mg	12.18±1.11	

てどの位の割合で存在し、それが小線量多分割照射で行われる臨床の放射線治療期間中にどのように変化していくかという点である。人癌において放射線低感受性の低酸素腫瘍細胞が放射線治療効果にどの程度関与しているかが未だ充分には解明されていない事が重要であると言える²⁰⁾。このうち神経毒性の問題に関しては、その後の研究で Misonidazole が中枢神経系へ移行する事や末梢神経の形態学的変化を来すことが確認されており²³⁾、Misonidazole 以降の低酸素細胞放射線増感剤の開発には、(1) 増感作用をより高める、(2) 毒性を下げる、あるいは、(3) Misonidazole の効果を補う薬剤を併用するという方向が考えられた。RK-27は神経毒性の軽減という点に留意して合成された薬剤である。一般に Nitroimidazole 系薬剤の放射線増感作用は、Nitro 基の位置やその数も含め、Imidazole 環が関与し、神経毒性とそれに関連する薬剤分子の脂溶性は側鎖部分が関与している事が知られている²⁷⁾²⁸⁾。RK-27は Misonidazole の側鎖置換体として、増感作用を示すと考えられる Imidazole 環を残し側鎖部分に改良が加えられている。すなわち側鎖末端に水酸基を付けて水溶性を高め、エーテル結合を入れて脂溶性を確保している。しかし、側鎖に二重結合が無い

ので同じ RK-series の化合物 RK-28よりも脂溶性は低いと考えられる。側鎖部分を鎖状の糖構造と考え環構造を塩基とみなすと薬剤全体を核酸(ヌクレオシド)誘導体と解する事が出来る。一般にこのような核酸誘導体(nucleoside analogue)の形の化合物は血液脳関門を通過しにくいと言われ、側鎖部分が糖構造でなく従って nucleoside analogue の形とならない Misonidazole よりも神経毒性を軽減できるのではないかと考えられている。側鎖の持つ脂溶性は神経毒性と関連していると考えられ、脂溶性を低下させる方向で薬剤の開発改良が進められてはいるが²⁰⁾²⁸⁾²⁹⁾、同時にこの側鎖が腫瘍組織への薬剤の浸透性にも関与しており、Adams³⁰⁾も低酸素細胞放射線増感剤の持つべき条件の一つとして、腫瘍組織への到達に必要な脂溶性を持つべきことをあげており、薬剤開発の際の問題点となっている。脂溶性の基準となる分配係数(Octanol/Water Partition coefficient)でみると Misonidazole は0.43²⁸⁾、RK-27は0.35³¹⁾、RK-27の方が低い値となっている。

一方、電子親和性低酸素細胞増感剤の放射線増感効果は、酸素類似作用に基づくと考えられている。放射線照射時の酸素分子の作用機序には未だ解明されていない点もあるが、酸素分子は照射によって生じる水の分解産物と共同で標的である DNA 分子に損傷を起こしたり、照射による電離から生じる電子と DNA 分子の再結合や細胞内 SH 基と DNA 分子の結合を妨げる事によってその修復を阻害すると考えられている。電子親和性低酸素細胞増感剤の放射線増感機構は、電子を受け取る事による DNA 分子の修復阻害とされており、この点が酸素類似と考えられているのである¹⁵⁾³²⁾³³⁾。実際、酸素自体が強力な電子親和性物質であり、これまで開発された薬剤の電子親和性と放射線増感効果とは良く相関し、電子親和性が高くなると増感効果も大きくなる傾向があることが知られている¹⁵⁾。この電子親和性の指標としてよく使われるのは E1/7 (one electron reduction potential, 一電子還元単位)と E1/2 (half wave potential, 半波電位)であるが、RK-27については E1/2値が報告されておりそれは-270mV であ

る³⁴⁾。一方、Misonidazole の E1/2値は -272mV と報告されており³⁵⁾、両者はほぼ同じ値である。前述のように RK-27 の分配係数は Misonidazole の分配係数より低い値であり、これらの事からは、RK-27 は Misonidazole と同程度の電子親和性を持ち、脂溶性はやや低い薬剤であると考えられる。

RK-27 の低酸素腫瘍細胞に対する増感効果の検討は、Ehrlich 腹水細胞移植後48時間の小固形腫瘍を用いて行った。Table 3 に示すように急性低酸素条件下で放射線単独群、RK-27併用群を TCD 50/90日によって比較するとその E.R. は、 0.2mg/g.b.wt 投与時には1.42、 0.3mg/g.b.wt 投与時には1.51、 0.4mg/g.b.wt 投与時には1.58及び 0.6mg/g.b.wt 投与時には2.10であり、投与量依存性の増感効果が証明された。この結果を同じ実験腫瘍～動物系で得られた田中らの Misonidazole に関する実験結果と比較検討する。一般に薬剤の投与量を制限する理由は、主にその薬剤の持つ毒性のためであり、それ故、毒性の等しい薬剤投与量で増感効果を比較すべきだと思われる。そこで、両薬剤の投与量を LD 50/30日に対する割合が同一になるように設定した²⁶⁾²⁸⁾。この報告での実験結果は、マウス正常組織に対する RK-27 の毒性は LD 50/30日で 1.21mg/g.b.wt であり、その約50%の 0.6mg/g.b.wt 投与時の増感効果を Misonidazole の LD 50/30日 2.1mg/g.b.wt の約49%にあたる 1mg/g.b.wt 投与時の増感効果と比較した。Table 4 に示すとおり、E.R. は RK-27 で、2.1、Misonidazole で2.49であり、Misonidazole の方が増感効果が勝れているという結果を得た。in vivo における RK-27 の低酸素細胞に対する増感効果の報告はこの報告が始めてであるが、in vitro における増感効果の報告はすでに幾つかある。V-79 cell を使った母里らの実験では RK-27 1mM 投与群の E.R. は2.5、同じく Misonidazole 1mM 投与群の E.R. 2.0の結果を得ており³⁶⁾、安徳らは chinese hamster V-79B130H cell を用い 1mM 投与群で E.R. は1.56を、またマウス白血病 L5178Y cell を用い E.R. 1.70を得、同濃度の Misonidazole 投与群よりも増感効果がわずかに大きいと報告している³⁷⁾。従って低酸素腫瘍細胞に対する

Table 4 Comparison of the efficiency between RK-27 and Misonidazole

Drug	Dose (% of LD50/30days)	Enhancement Ratio
RK-27	0.6mg(50%)	2.10
Misonidazole	1 mg(48%)	2.49

RK-27 の放射線増感効果は in vitro においても Misonidazole と同濃度の投与量にして初めて Misonidazole と同等以上になると考えられる。RK-27 の低酸素細胞に対する放射線増感効果は正常組織に対する毒性を考慮すると Misonidazole を上回るものではないことが明らかとなった。また、Ehrlich 腫瘍以外では田中らが NF Sarcoma の8mm 径腫瘍を用いた実験で TRT 50法による分析を行い 0.3mg 投与群の E.R. は1.31と報告しており³⁸⁾、RK-27 は Ehrlich 腫瘍だけでなく他の実験腫瘍についてもその放射線増感効果が証明されている。

低酸素腫瘍細胞放射線増感剤となる薬剤は、正常組織の大部分を占める正酸素細胞に対し、増感作用を示さないことが望ましい。マウス正常組織に対する RK-27 の併用効果の実験結果は Table 1 に示すとおりである。この実験では薬剤 0.4mg/g.b.wt 投与30分後に全身照射を行っているが、胃腸管死を反映する LD 50/5日も骨髄死を反映する LD 50/30日も薬剤投与群と非投与群との間で有意差を示していない。ほとんど全ての細胞が正酸素細胞で構成されている正常組織、特に胃腸管と骨髄に対し RK-27 は放射線と併用しても増感効果を示さないと解される。このことは田中らが Misonidazole で得た結果と同じである¹⁸⁾。一方、正酸素条件下の腫瘍に対する RK 27 の作用は Table 2 に示す様に 0.2 または 0.4mg/g.b.wt のいずれの薬剤投与量に於いても E.R. は1.16または1.28の E.R. が得られている。同じ実験腫瘍～動物系を使った Misonidazole の実験では正酸素条件下の腫瘍に対する E.R. は1で増感効果を示していない¹⁸⁾。しかし正酸素条件下の腫瘍に対しては、RK-27 が低酸素条件下だけでなく正酸素条件下でも増感効果を示すという結果が得られた。電子親

和性放射線増感剤の中には、正酸素条件下の腫瘍細胞にも増感効果を示したとする報告もあるが³⁹⁾、通常は正酸素条件下では放射線増感効果は認められないとされており、V-79 cell を用いた母里らの *in vitro* の実験でも正酸素条件下では RK-27 に増感効果が認められなかったと報告している³⁶⁾。正酸素条件下の腫瘍に対しても RK-27 の増感効果が示された事に関しては次のように考察する事が出来よう。即ちこれまでの同じ実験方法を用いた Misonidazole や RK-28 の実験では、実験時の O.E.R. が 2.5~3 の間を示し¹⁸⁾²⁶⁾、従って阻血しなければ照射時の腫瘍の大部分が正酸素細胞で構成されると推定されるのに対し、この報告における実験では Table 2, Table 3 から計算される O.E.R. は 0.2mg/g.b.wt 投与時 1.76, 0.4mg/g.b.wt 投与時 1.96 と低下している事である。ただしここで“O.E.R. (酸素効果比)”の定義は腫瘍を完全に阻血した状態で照射した実験結果から得られた TCD 50/90日を腫瘍を阻血しない状態で照射した実験結果から得られた TCD 50/90日で除した値であり *in vitro* の実験で行われる酸素化の状態と無酸素化の状態を比較した値と異なり、その無酸素化の程度に生体内であるが故の不完全さが在るのかもしれない。従ってここで使う“O.E.R.”は照射時の腫瘍内に存在する低酸素細胞の数によって変動することになる。つまり正酸素条件下の実験でも照射時に低酸素細胞が含まれるとそのときの TCD 50/90日は正酸素細胞だけが腫瘍を構成する場合の TCD 50/90日に比べて大きくなる筈であり、この値を分母とする“O.E.R.”は低下することになる。逆にこの報告における正酸素条件下の実験結果の様に、“O.E.R.”が低下している事は照射時の腫瘍にすでに低酸素細胞が存在している可能性を示唆しており、この低酸素細胞に対して RK-27 が増感効果を示し、1 を越える E.R. になったとも考えられるからである。正酸素条件下と急性低酸素条件下の腫瘍に対する実験結果から、RK-27 は少なくとも低酸素条件下でより強い放射線増感効果を示したと言える。ただ低酸素細胞増感剤の作用機構は、未だ充分には解明されていない部分もあり、SH 基の減少の様な腫瘍細胞

の置かれた環境の変化に伴い Misonidazole が酸素以上の増感効果を示すという報告など⁴⁰⁾、必ずしも酸素類似効果で説明できない部分もあり⁴¹⁾、正酸素条件下の腫瘍に対する作用に関しては今後さらに検討が必要と考える。この様に実験腫瘍内の低酸素細胞の存在の有無やその割合を知ることは薬剤の増感効果を *in vivo* の実験と比較検討する場合に“O.E.R.”の変動を避けて実験結果の再現性を高める意味からも必要な事柄であるように考えられる。またこのことは、Misonidazole の臨床治験で人癌において低酸素腫瘍細胞が放射線治療効果にどのように関与しているかをもっと解明する必要があると指摘されている様に²⁰⁾、放射線増感剤の臨床応用に際してもまた重要と思われる。放射線増感剤投与に際して、対象となる腫瘍内に低酸素細胞がどの位の割合いで存在し、その割合が照射によりどのように変化するのを知ることが薬剤の投与量、投与時期或いはその間隔の決定に必要と思われるからである⁴¹⁾。最近、このような観点から Misonidazole に対し hypoxic cell marker としての役割の再認識、再検討がなされている。これらの研究の多くは、放射性同位元素で Misonidazole をラベルすることにより行われており、Urtasun らは¹⁴C でラベルした Misonidazole が人癌由来の細胞に *in vitro* で集積し、酸素分圧が低いほどよく集積することを証明している。そしてつぎに³H でラベルした Misonidazole の集積の程度を調べることにより、腫瘍内の低酸素細胞の割合を計算できるとし、小細胞性未分化型肺癌は 10%、melanoma には 6% の低酸素細胞が存在するとしている⁴²⁾。また Franko らは Misonidazole の imidazole 環を¹⁴C で側鎖を³H でラベルし腫瘍への集積は両者とも同程度だが正常組織へは³H の方がよく集まることから hypoxic cell marker として Misonidazole 系化合物を使う場合、imidazole 環をラベルする方がすぐれていると述べている⁴³⁾。また hypoxic cell marker として薬剤を検討する場合のモデルとして、Rassey らは実験動物に人為的に作った脳梗塞状態が有効であると報告している⁴⁴⁾。RK-27 の体内分布に関する報告は未だみあたら

ないが、同じ RK-series 化合物である RK-28 については腫瘍からは緩慢に排泄され、血中から Misonidazole よりも早く排泄されるようだと言われ²⁶⁾されており、RK-28 が低酸素腫瘍細胞に対し選択的毒性を持つとの報告もある³⁰⁾。RK-27 は化学構造式上は、RK-28 よりも腫瘍組織からは遅く、正常組織からは早く排泄されると推定されており⁴⁵⁾、Misonidazole の側鎖置換体として低酸素細胞に特異的に結合、代謝されることが考えられ、今後 Hypoxic cell marker として発展していく可能性もあると思われる。

この報告では ICR マウス—Ehrlich 腫瘍系を用いて、Misonidazole 以降に新しく低酸素腫瘍細胞放射線増感剤候補物質として開発された RK-27 の *in vivo* における放射線増感効果を検討し、低酸素腫瘍細胞に対する放射線増感効果を証明した。*in vivo* における放射線増感効果の証明はこの報告が初めてである。その放射線増感効果は Misonidazole の増感効果を上回るものではなかった。大きな増感効果比を持つことは低酸素腫瘍細胞増感剤にとって望ましいことではあるが、増感効果比が低くてもそのみで薬剤として臨床応用から除外されるわけではない。増感効果比が低い値であっても蓄積性がなく反復投与が可能であり臨床で使われる小線量分割照射との併用で確実な増感効果があげられるならば照射線量を減らす事ができるわけで、皮膚粘膜反応や骨髄抑制など腫瘍治療線量を照射した際に起こしうる望ましくない副次的反応を軽減でき、治療効果比を高められるからである⁶⁾。この様に放射線増感剤としての薬剤の有効性は Misonidazole の研究を通じて明らかになった神経毒性や分割照射時の増感効果などの検討も含めて総合的に判断されるべきものである。RK-27 に就いても、今後、他の実験腫瘍における有効性の検討などを行えば低酸素腫瘍細胞増感剤に共通のこれらの課題も解明されていくものと考えられる。

結 語

新低酸素腫瘍細胞放射線増感剤候補物質 RK-27 の毒性、正常組織に対する放射線増感効果、低酸素腫瘍細胞に対する放射線増感効果について

ICR マウス—Ehrlich 腹水腫瘍細胞を用いて実験を行い以下の結果を得た。

(1) 薬剤単独の LD 50/30 日値は、 1.21 ± 0.07 mg/g.b.wt であった。

(2) 正常組織に対する放射線増感効果は認められなかった。

(3) 低酸素腫瘍細胞に対し放射線増感効果を認めた。増感効果比は、薬剤投与量依存性の傾向を示した。E.R. は 0.2mg/g.b.wt 投与群で 1.42、0.3 mg/g.b.wt 投与群で 1.51、0.4mg/g.b.wt 投与群で 1.58 及び 0.6mg/g.b.wt 投与群で 2.10 であった。

稿を終るに臨み、御指導御校閲を賜った京都府立医科大学放射線医学教室村上晃一教授及び、本研究の遂行に際して、終始変らぬ御助言御指導御協力をいただいた同田中紀元講師に深甚なる謝意を表明します。薬剤と薬理学的情報の提供をしていただきましたポーラ株式会社坂口正一博士と、実験に協力していただいた教室員諸兄姉に感謝します。

本研究は昭和 58, 59, 60 年度文部省科学研究費がん特別研究 I 小野山班 (#580/0064, 590/0066 及び 600/0065) の一部資金援助によって遂行された。ここに記して謝意を表明する。

文 献

- 1) Gray LH, Conger AD, Ebert M, et al: Concentration of oxygen dissolved in tissue at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Brit J Radiol* 26: 638—648, 1953
- 2) Thomlinson RH, Gray LH: The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Brit J Cancer* 9: 539—545, 1955
- 3) Gray LH: Radiologic basis of oxygen as a modifying factor in radiation therapy. *Am J Roentgenol* 85(5): 803—815
- 4) 坂本澄彦: 癌放射線治療法と腫瘍放射線生物学の役割, 癌の臨床, 25: 1225, 1979
- 5) Hall EJ 著, 浦野宗保 訳: 放射線科医のための放射線生物学, 218, 篠原出版, 1980
- 6) 増田康治: 放射線生物学の放射線治療への寄与, 放射線科, 4: 316—323, 1984
- 7) Glassburn JR, Brady LW: Hyperbaric oxygen in radiotherapy. *Cancer* 39: 751—765, 1977
- 8) 阿部光幸, 小野山靖人, 他: 肺癌放射線治療成績の改善に関する研究, 日医放, 37(4): 325—334, 1977
- 9) 伊藤要子, 綾川良雄, 宮田伸樹: 人工血液 (FOB 20%) による Ehrlich 腫瘍マウスの酸素効果によ

- る放射線増感, 癌と化学療法, 11: 864—872, 1984
- 10) 村上晃一: 特別発言, 癌の臨床, 23(7): 626—628, 1977
 - 11) Tanaka N, Tanabe C, Okumura Y, et al: Post-irradiation kinetics of the C3H/He mouse mammary carcinoma as regards tumor volume regrowth time and cell loss. *Strahlentherapie* 155: 58—62, 1979
 - 12) 田邊親男: 移植腫瘍の放射線照射後の動態—Reoxygenationの関与について—, 京府医大誌, 88(3): 343—356, 1979
 - 13) 村上晃一: 高LET治療の現状, 臨床ME, 6(6): 1982
 - 14) Yamashita M: Radiosensitizing effect of combined radiotherapy, hyperthermia and misonidazole on C3H mouse FM3A tumor. *Nippon Acta Radiologica* 44(9): 1181—1188, 1984
 - 15) Adams GE: Chemical radiosensitization of hypoxic cells. *Br Med Bull* 29(1): 48—53, 1973
 - 16) Hall EJ, Dph, Roizin-Towle LMS: Hypoxic sensitizers: Radiobiological studies at the cellular level. *Radiol* 117: 453—457, 1975
 - 17) Chapman JD, Urtasun RC: The application in radiation therapy of substances which modify cellular radiation response. *Cancer* 40: 484—488, 1977
 - 18) 田中紀元, 他: 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—1460, 1981
 - 19) Ono K, Nakajima T, et al: Radiosensitizing effect of misonidazole on mammary carcinoma of C3H mice. *Kawasaki Med J* 4(3): 183—191, 1978
 - 20) 小野山靖人, 中島俊文, 田中正博: 放射線増感剤について—低酸素性細胞増感剤を中心に—, 癌と化学療法, 13(4): 894—903, 1986
 - 21) Urtasun RC, Band P, Chapman JD, et al: Clinical phase I study of the hypoxic cell radiosensitizer Ro-07-0582, A2-nitroimidazole derivative. *Radiol* 122: 801—804, 1977
 - 22) Sauners MI, Dische S, Anderson P, et al: 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
 - 23) Urtasun RC, Chapman JD, et al: Peripheral neuropathy related to misonidazole: Incidence and pathology. *Br J Cancer* 37(Suppl III): 271—275, 1978
 - 24) Wasserman TH, Phillips TL, et al: Initial United States clinical and pharmacologic evaluation of misonidazole (Ro-07-0582), an hypoxic cell radiosensitizer. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 5: 775—786, 1979
 - 25) Tanaka N: Radiosensitivity of Ehrlich tumor cells in different growth phases and its enhancement by iodoacetamide. *J Radiat Res* 14: 236—247, 1973
 - 26) 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(8): 1142—1191, 1985
 - 27) Mulcahy RT, Wustrow DJ, Hark RR, et al: Radiosensitization by acetohydroxamic acid derivatives of 3-nitroprazole. *Radiat Res* 105: 296—306, 1986
 - 28) Brown JM, Yu NY, Brown DM, et al: A2-nitroimidazole amide which should be superior to misonidazole as a radiosensitizer for clinical use. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 7: 695—703, 1981
 - 29) Nori D, Kim JH, Chu F: Radiosensitizers and protectors. *Cancer Invest* 2(4): 321—330, 1984
 - 30) Adams GE: Hypoxic cell sensitizers for radiotherapy. *Cancer Comprehensive Treatise* 6: 181—233, 1977
 - 31) 坂口正一: Personal communication
 - 32) Adams GE, Dewey DL: Hydrated electrons and radiobiological sensitization. *Biochem Biophys Res Comm* 12: 473—477, 1963
 - 33) 安徳重敏: 放射線に対する化学防護および化学増感の機構, 放射線生物研究, 12(4): 27—46, 1977
 - 34) Mori T, et al: in press
 - 35) Knox RJ, Knight RC, Edwards DI: Interaction of nitroimidazole drugs with DNA in vitro: Structure-activity relationships. *Br J Cancer* 44: 741—745, 1981
 - 36) 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年度実験報告書
 - 37) 安徳重敏: 培養細胞における増感剤のスクリーニング; 文部省科学研究費がん特別研究I, 昭和59年度報告書
 - 38) 田中紀元: Hypoxic cell radiosensitizer (RKおよびMO)の実験, 動物正常組織として腫瘍に対する放射線との併用効果: 文部省科学研究費がん特別研究I, 昭和60年度研究報告書
 - 39) 田中紀元, 西口弘恭, 田辺親男, 他: 腫瘍細胞に対するElectron affinic sensitizerの放射線増感効果, 癌の臨床, 24(11): 927—932, 1978
 - 40) Koch CJ, Stobbe CC, Bump EA: The effect on the Km for the radiosensitization at 0°C of thiol depletion by diethylmalate pretreatment: Quantitative differences found using the radia-

- tion sensitizing agent misonidazole or oxegen. Radit Res 98 : 141—153, 1984
- 41) Franko AJ: Misonidazole and other hypoxic markers: Metabolism and applicatons. Int J Radiation Oncology Biol Physc 12 : 1195—1202, 1986
- 42) Urtasun RC, Chapman JD, Raleigh JA, et al: Binding of ³H-Misonidazole to solid human tumors as a measure of tumor hypoxia. Int J Radiation Oncol Biol Phys 12 : 1263—1267, 1986
- 43) Franko AJ, Garrecht BM: Misonidazole retention by normal tissues: A distinction between label on the ring and side chain. Int J Radiation Oncology Biol Phys 12 : 1259—1262, 1986
- 44) Rassey JS, Hoffman JM, Spence AM, et al: Hypoxia mediated bindings of misonidazole in non malignant tissue. Int J Radiation Oncology Biol Phys 12 : 1255—1258, 1986
- 45) 坂口正一 : Personal communication
-