



Title	実験動物腫瘍におけるミソニダゾール(MISO)の放射線増感効果におよぼすdiethyl maleate(DEM)の効果に関する研究
Author(s)	小野, 公二; 高橋, 正治; 西台, 武弘 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1984, 44(3), p. 517-522
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/17800
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

実験動物腫瘍におけるミソニダゾール (MISO) の
放射線増感効果におよぼす
diethyl maleate (DEM) の効果に関する研究

京都大学医学部放射線医学教室 (主任：阿部光幸教授)

小野 公二 高橋 正治 西台 武弘
百々 義廣 阿部 光幸

(昭和58年 6 月 3 日受付)

(昭和58年 7 月19日最終原稿受付)

The Effect of Diethyl Maleate (DEM) on the Radiosensitization
by Misonidazole (MISO) in Experimental Animal Tumors

Koji Ono, Masaji Takahashi, Takehiro Nishidai, Yoshihiro Dodo and
Mitsuyuki Abe

Department of Radiology, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director. Prof. Mitsuyuki Abe)

Research Code No. : 407

Key Words : Radiosensitizer, Misonidazole, Diethyl maleate,
Glutathione

The radiosensitization of diethyl maleate (DEM) in combination with or without misonidazole (MISO) were studied in C3H/He mouse mammary tumors. The radiation effects were evaluated by tumor growth delay time assay.

The enhancement ratio of 2.06 was obtained when 760 mg/kg of DEM and 0.5 mmole/kg of MISO were administered in combination with radiation. Since the enhancement ratios of DEM and MISO were 1.18 and 1.44 respectively, synergistic effect was obtained by combined treatment of these two drugs.

Further studies showed that the synergistic effects at DEM of 760 mm/kg were observed in the dose range of MISO of less than 1.5 mmole/kg. In contrast, when the MISO doses were more than 1.5 mmole/kg, the combined effects were lower than those of the additive effects of tow drugs.

The radiosensitizing effects of DEM alone, were observed in the dose range of more than 600 mg/kg. In the presence of MISO, the synergistic effects were observed in the dose range of DEM of more than 400 mg/kg at MISO of 0.5 mmole/kg or DEM of over 200 mg/kg at MISO of 1.5 mmole/kg, respectively.

緒 言

細胞の放射線感受性を支配する因子の一つに NPSH (non-protein SH), 主にグルタチオン (GSH) が挙げられている^{1)~6)}. GSH は水の放射線分解により生じた酸化ラジカルと反応し, これを除去する Radical Scavenger としての作用

と⁷⁾⁸⁾, これらの酸化ラジカルが標的分子と反応して生成した障害標的分子を水素供与によって修復する作用⁹⁾¹⁰⁾の両者を有し, 細胞内では防護物質として作用していると考えられている. 特に酸素が標的分子の障害を固定するよう作用するため, 低酸素条件下では, GSH の修復作用が, 細胞の放射

線抵抗性の大きな理由の一つと考えられている。

ところで低酸素性細胞を選択的に増感する親電子性の増感剤ミソニダゾールは、低酸素条件下で培養細胞と長時間接触させると、細胞内のNPSHの濃度を著明に低下させる作用を有しており、低酸素下長時間培養により非常に大きな増感率を示すことが報告されている¹¹⁾。さらに培養細胞を用いた実験で、細胞内NPSHを低下させる物質とミソニダゾールを同時併用すると、ミソニダゾールの放射線増感効果が著しく増強されることも報告されている¹²⁾¹³⁾。

我々は今回、NPSHと特異的に反応し、その細胞内濃度を低下させる薬剤diethyl maleate (DEM)を用い、ミソニダゾールの放射線増感効果におけるNPSH役割を実験動物腫瘍で検討したので報告する。

研究方法

1. ミソニダゾールとDEM

低酸素性細胞増感剤ミソニダゾールは生理食塩水に溶解し、100mM溶液とした。マウスへの投与は腹腔内注入にて行なった。DEMはビーナッツ油に溶解し、100mg/mlの濃度に調製した上でミソニダゾール同様、マウス腹腔内に投与した。DEM、ミソニダゾールの投与と放射線照射の間隔は、Bumpら¹⁴⁾の実験を参考にして、ミソニダゾール単独では照射30分前に、DEM単独では照射90分前に投与し、両者併用の場合は、DEM投与60分後にミソニダゾールを投与し、さらに30分後に放射線照射をした。

2. 実験動物および腫瘍系

実験には京大医学部実験動物センターにて繁殖させたC3H/Heマウスの約7週齢のものをを用いた。腫瘍系は同系マウスに自然発生した乳癌を移植継代した第4代乳癌である。第3代乳癌の単離細胞浮遊液5mm³、腫瘍細胞2×10⁵ヶを右大腿皮下に移植すると、約3週後に平均腫瘍径10mm、平均腫瘍容積で520mm³の第4代腫瘍となる。この時、実験に供した。なお使用したマウスの数は1群7匹とした。

3. 照射法と効果の判定

照射にはリニアックからの10MV X線を用い

た。10MV X線のビルドアップを考慮して、2.5cm厚のアクリル樹脂板上にマウス右大腿部を固定し、下方一門にて腫瘍を含む右大腿部を照射した。照射線量率は毎分500radである。効果の判定は、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、等しいGrowth Delay Timeを得るに要する線量の比から増感率を算出した。なお腫瘍容積は腫瘍の直角3方向の直径をa, b, cとして、次式 $V = a \cdot b \cdot c \pi / 6$ にて求めた。

結果

1. 照射後の腫瘍容積の変化

Fig. 1に放射線単独(500rad, 1,700rad)およびDEMとミソニダゾール併用時(600rad, 1,500rad)の照射後の腫瘍容積の変化を示す。照射翌日より平均腫瘍容積は減少しはじめ、照射線量に応じて、一定時間の後再増殖により照射時腫瘍容積を回復する。放射線単独1,700rad照射後の腫瘍容積の変化は、DEMとミソニダゾールの併用による600radの照射後の腫瘍容積の変化と等しく、両者併用による増感率の大きいことを示している。

2. ミソニダゾール、DEMの放射線増感効果

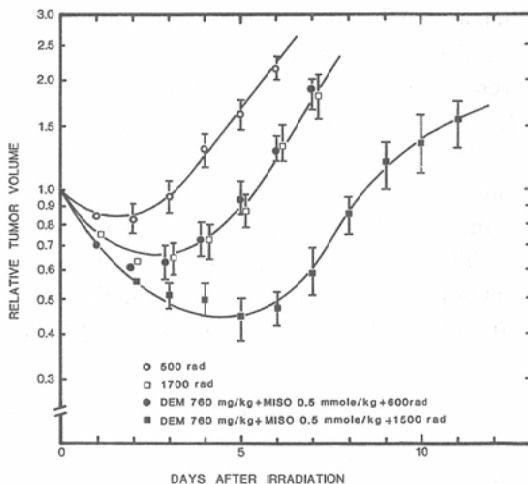


Fig. 1 The growth curves for C3H/He mouse mammary tumors after irradiation combined with or without DEM and MISO. Vertical lines represent standard deviations.

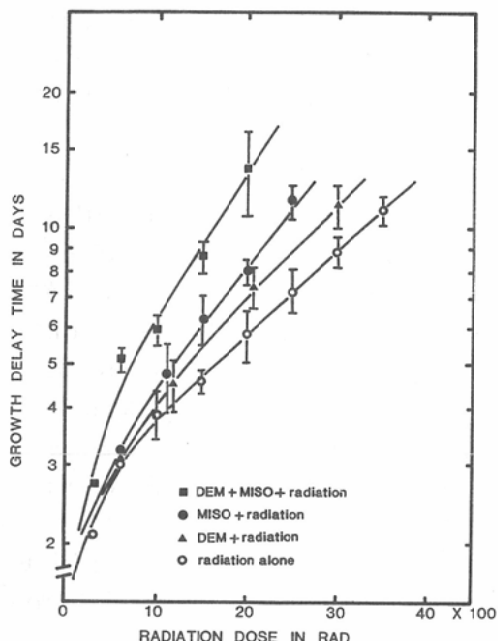


Fig. 2 Tumor growth delay time of C3H/He mouse mammary tumors treated by radiation alone, DEM (760mg/kg)+radiation, MISO (0.5 mmole/kg)+radiation, and DEM+MISO+ radiation as a function of radiation doses. Vertical lines represent standard deviations.

Table 1 GDT₁₀ dose according to treatment modalities and the enhancement ratios

Treatment	GDT ₁₀ dose	E.R.
Radiation alone	3300 rad	1.0
DEM + Radiation	2800 rad	1.18
MISO + Radiation	2300 rad	1.44
MISO + MISO + Radiation	1600 rad	2.06

DEM: 760mg/kg, MISO: 0.5mmole/kg

Fig. 2に放射線照射単独, ミソニダゾール0.5 mmole/kg 併用, DEM 760mg/kg 併用, DEM とミソニダゾールの併用時の線量効果曲線を示す。放射線単独群は1,000radにて屈折する二相性の曲線となる。1,000rad以下の傾きの急峻な部分は腫瘍内の正酸素性細胞の感受性を反映し, 1,000rad以上の傾きの緩慢な部分は低酸素性細胞の感受性を反映していると考えられる。

ミソニダゾール, DEM, また, 両者の併用では1,000rad以上の線量域で傾きが急峻になり低酸

素性細胞の増感効果が認められる。特に DEM とミソニダゾールの併用効果は著明である。

Table 1に Growth Delay Time₁₀日を得るに要する線量 GDT₁₀ DOSE とこれらの比から求めた増感率を示す。DEM 760mg/kg 併用の増感率1.18, ミソニダゾール0.5mmole/kg 併用の増感率1.44に対し, 両者の併用にて増感率2.06が得られた。この増感率2.06は各々の増感率の積1.70より大きく, DEM とミソニダゾールの相乗効果を示している。

3. DEM とミソニダゾールの併用時の増感率とミソニダゾール投与量の関係

次に DEM 760mg/kg 投与にミソニダゾールを併用した時の増感率と, ミソニダゾール投与量の関係について検討した。ミソニダゾール単独の場合は, 0.25, 0.5, 1.5, 3.0, 5.0mmole/kg 投与し各々の増感率を求め, DEM との併用では毒性も考慮してミソニダゾールの最高投与量は3.0 mmole/kg までとした。Fig. 3に示す如く, DEM とミソニダゾールの併用効果はミソニダゾールの小量投与域で相対的に大きく, ミソニダゾール0.25mmole/kg 投与でも増感率1.9を得た。

ミソニダゾールの増感率と DEM 760mg/kg 併用の増感率1.18の積から求めた, 相加効果増感率

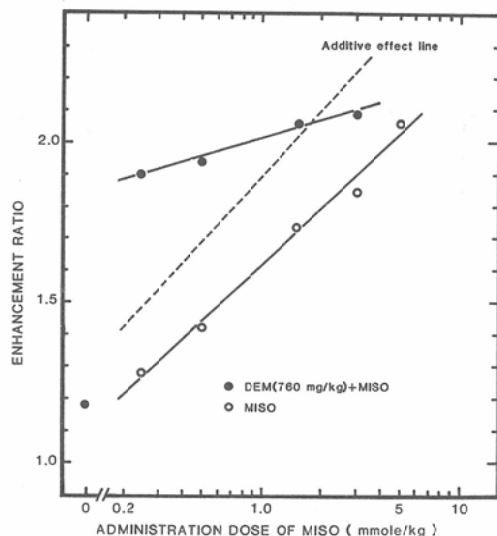


Fig. 3 Relationship between enhancement ratios and MISO doses, alone, or MISO doses combined with 760mg/kg of DEM.

は、ミソニダゾール1.5mmole/kg以下の投与域では両者併用の増感率より小さく、すなわちこの薬量域では相乗効果が得られ、又1.5mmole/kg以上の薬量域では併用効果が相加効果に達しないことが判った。

4. DEMとミソニダゾールの併用時の増感率とDEM投与量の関係

ミソニダゾール投与量を0.5mmole/kgあるいは1.5mmole/kgとし、併用するDEM投与量を変えて増感率の変化を検討した。Fig. 4に示す如く、DEM単独併用の時、DEMによる放射線増感効果は投与量が600mg/kg以下では発現しない。760mg/kg投与で増感率は1.18となる。

ミソニダゾール0.5mmole/kgにDEMを併用した時には、400mg/kg以下ではミソニダゾールによる増感効果のみでDEM併用効果は発現しない。600mg/kg、760mg/kgの併用ではミソニダゾール単独の増感率1.32に対して、増感率は各々1.56、1.96となった。

ミソニダゾール1.5mmole/kg投与では、DEM 200mg/kg以下の時にはDEMによるミソニダゾールの増感効果の増強はなく、ミソニダゾール単独による増感率1.82から変化しない。しかし300mg/kg、400mg/kg、760mg/kgと増加するにしたがってDEM投与による放射線増感効果の増強が

認められ、増感率は各々、1.88、1.94、2.08を得た。ミソニダゾール0.5mmole/kgへの併用に比し、DEMによる増感率増強効果は小さかった。

考 案

DEMは分子のSH基と反応し、化学的に安定な結合物を生成する。特にNPSHのSH基との反応性はprotein中のシステインのSH基との反応性より100倍以上高く、細胞内ではほぼ特異的にNPSHと反応していると考えられる¹⁴⁾。DEMはかくして投与量に応じて細胞内NPSHの濃度を低下させるため、例えば760mg/kg投与ではNPSH濃度は約20%に低下していると推定される¹⁴⁾。NPSHが低下し、Radical Scavengerとしての効果と、分子修復の効果が共に低下したため、DEM単独でも、低酸素性細胞の感受性を反映すると考えられる1,000rad以上の線量域で、増感効果が発現したと推定される。又1,000rad以下の正酸素性細胞の感受性を反映すると考えられる線量域では有意な増感は得られず、酸素の如く親電子度の非常に高い物質の共存下では酸素が分子の障害を固定するように強く作用しているため、NPSH濃度の低下による効果は発現しなかったと考えられる。Bump, Brownらは培養細胞を用い、DEM投与でNPSH濃度を対照の5%以下に低下させても、正酸素条件下では細胞の放射線感受性に影響しないという成績を得ており¹⁴⁾、我々の実験結果はこの成績と矛盾しない。

ミソニダゾールにDEM 760mg/kgを併用した時、ミソニダゾールの小量投与域でDEMによるミソニダゾールの増感効果の増強がみられたが、これはミソニダゾールの濃度が低ければその増感効果はNPSHの濃度に強く影響されることを示している。ミソニダゾールの臨床応用を考えると、許容される神経毒性の範囲内で得られる血中濃度は0.1~0.2mMと推定される¹⁵⁾ので、NPSH濃度を低下させることは臨床上有効な増感率を得る上で重要であり、我々の実験成績から推定すると、ミソニダゾール0.5~1.0g/m²の投与時、NPSH濃度を対照の約20%に低下させれば、増感率1.9が期待される。ミソニダゾールの大量投与域ではDEMによるミソニダゾールの増感率の増強は小

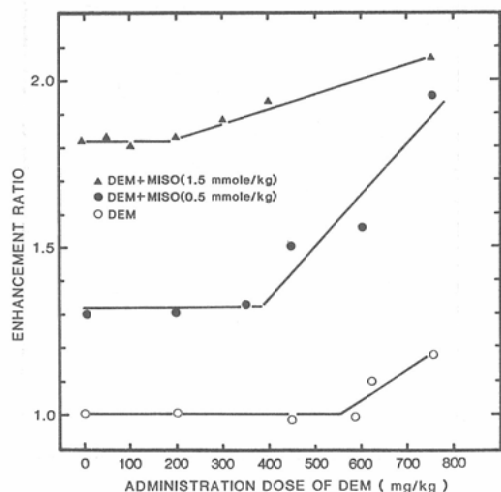


Fig. 4 Relationship between enhancement ratios and DEM doses or DEM doses combined with 0.5 or 1.5mmole/kg of MISO.

さくなくなったが、これはミソニダゾールの濃度が高い時は、その障害固定作用が本来非常に強く作用しているため、NPSHの分子修復作用はあまり有効に作用していないと考えられ、非常に強い親電子性を有する酸素に富む正常組織はNPSHの濃度を低下させるような処理で放射線増感は受けない可能性を示唆している。

DEM投与量を変化させ、ミソニダゾールの増感率に対する増強効果を検討すると、DEM単独では、600mg/kg以上で増感効果が発現し、ミソニダゾールを0.5mmole/kg、1.5mmole/kgへと増量すると、DEMによる増感効果発現の薬量が400mg/kg、200mg/kgと減少した。この第1の理由としてはNPSHが障害分子の修復に、MISOが障害の固定と競合的に作用しているため、MISOの量が多い条件下では低酸素状態に比してDEMによるNPSH濃度の減少が少なくとも増感率の上昇が得られたのではないかと考えられる。第2の理由としてはミソニダゾールが低酸素条件下ではnitro-reductaseの作用で、還元される¹⁰⁾が、この過程で1電子還元毎にGSH1分子が酸化されるため、DEMによるNPSHの低下に加え、ミソニダゾール自身のNPSH低下作用の効果が加わったためと考えられる。

結 論

1. DEM 760mg/kgとMISO 0.5mmole/kgの併用で増感率2.06を得た。これはDEM、MISOをそれぞれ単独で投与した時の増感率の積より大きく、両者の併用は相乗効果を示した。

2. DEM 760mg/kg併用時、MISO 1.5mmole/kg以下の薬量域では相乗効果を示し、低薬量域での併用効果は特に大きかった。又MISO 1.5mmole/kg以上の薬量域では相加効果以下になった。

3. DEMの放射線増感効果は600mg/kg以上の薬量域で増感効果を示し、MISO 0.5mmole/kg、1.5mmole/kgとの併用では各々400mg/kg、200mg/kg以上の薬量域で増感効果を示した。

4. 親電子物質の放射線増感効果におよぼすNPSH濃度の影響は大きく、今後低毒性で、安全にNPSH濃度を低下させる薬剤の開発が重要に

なると思われる。臨床的にも、これらの薬剤を併用することによって、放射線増感効果を損うことなしに低酸素性細胞増感剤の投与量を減らすことが可能となり得るものと考えている。

本研究を行なうにあたり、ミソニダゾールは日本ロッシェ社より提供を受けた。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57010062)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) Révész, L., Bergstrand, H. and Modig, H.: Intrinsic non-protein sulphhydryl levels and cellular radiosensitivity. *Nature*, 198: 1275—1277, 1963
- 2) Ueno, Y., Horikawa, M., Aoyama, T. and Sugahara, T.: Radiosensitivity and SH compounds in mammalian cells. *Folia. Biol.*, 10: 39—43, 1964
- 3) Ohara, H. and Terashima, T.: Variations of cellular sulphhydryl content during cell cycle of HeLa cells and its correlation to cyclic change of X-ray sensitivity. *Exptl. Cell Res.*, 58: 182—185, 1969
- 4) Nikaido, O. and Horikawa, M.: Analysis of the factors in determining radiosensitivity in mammalian cells by using radiosensitive and resistant clones. *J. Radiat. Res.*, 17: 154—173, 1976
- 5) Watanabe, M. and Horikawa, M.: Analyses of differential sensitivities of synchronized HeLa S3 cells to radiations and chemical carcinogens during the cell cycle. *Mutat. Res.*, 44: 413—426, 1977
- 6) Révész, L., Edgren, M. and Larsson, A.: Mechanism of radiosensitization by oxygen and misonidazole studied with glutathione deficient human fibroblast in culture. *Radiation Research* pp. 826—866, Okada et al. ed., Japanese Association of Radiation Research, 1979
- 7) Barron, E.S.G. and Flood, V.: Studies on the mechanism of action of ionizing radiations. VI. The oxidation of thiols by ionizing radiations. *J. Gen. Phys.*, 33: 229—241, 1950
- 8) 関 孝和: ESRによる生体内放射線効果の測定。第1報。SH放射線防護剤と遊離基。 *Radioisotopes*, 15: 132—138, 1966
- 9) 山口武彦: 放射線化学反応と逆反応。江上信雄編,

- 放射線障害の回復. pp. 19—33, 1970, 朝倉書店, 東京,
- 10) Alexander, P. and Charlesby, A.: Physicochemical methods of protection against ionizing radiation. (In) Bacq, Z.M., Alexander, P., ed.: Radiobiology Symp. Liege 1954, pp. 49—60, 1955, Butterworth, London
 - 11) Hall, E.J., Astor, M., Biaglow, J. and Parham, J.C.: The enhanced sensitivity of mammalian cells to killing by X-rays after prolonged exposure to several nitroimidazoles. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 8: 447—451, 1982
 - 12) Stratford, I.J.: Mechanism of hypoxic cell radiosensitization and the development of new sensitizers. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 8: 391—398, 1982
 - 13) Bump, E.A., Yu, N.Y. and Brown, J.M.: Radiosensitization of hypoxic tumor cells by depletion of intracellular glutathione. *Science*, 217: 544—545, 1982
 - 14) Bump, E.A., Yu, N.Y. and Brown, J.M.: The use of drugs which deplete intracellular glutathione in hypoxic cell radiosensitization. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 8: 439—442, 1982
 - 15) 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
 - 16) Wardman, P.: The use of nitroaromatic compounds as hypoxic cell radiosensitizers. (In) Ebert, M., Howard, A., ed.: Current topics in radiation research, XI, pp. 347—398, 1979, North-holland, Amsterdam
-