

Title	家兔VX2腫瘍に対する放射線増感剤RK28動注と放射線の併用効果の検討
Author(s)	須田, 博喜
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1991, 51(6), p. 678-685
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/17916
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

家兎 VX2腫瘍に対する放射線増感剤 RK28動注と 放射線の併用効果の検討

山口大学放射線医学教室（主任：中西 敬教授）

須 田 博 喜

（平成2年7月2日受付）

（平成2年10月1日最終原稿受付）

Intraarterial Infusion of Hypoxic Radiosensitizer RK28 in Rabbit VX2 Tumor System

Hiroki Suda

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

Research Code No. : 407.1

Key Words : Hypoxic radiosensitizer RK28,
Intraarterial infusion, Rabbit VX2 tumor

The effect of regional intra-arterial infusion of a hypoxic cell radiosensitizer RK28 (2-nitroimidazole uncleside analogue) on rabbit VX2 tumor was evaluated.

Rabbits each weighing 2.5—3 kg were implanted with VX2 tumor in the left hind legs. Solid tumors grown up to 3 cm in diameter were treated with X-ray irradiation. Tumor volumes were assayed weekly by computed tomography (CT). Six rabbits were treated with 15 Gy of X-ray irradiation alone, and the other six rabbits were treated with intra-arterial infusion of RK28 (80 mg/kg) two minutes before 15 Gy of irradiation. The latter tumors regressed more rapidly than the former ($p < 0.01$), and the latter rabbits seemed to survive longer than the former.

The pharmacokinetics of RK28 and its metabolites in tumor tissue and serum were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) using six rabbits. During irradiation, a high concentration of the agent was achieved in tumor tissue.

It is suggested that a successful radiosensitizing effect will be obtained when regional intra-arterial infusion of RK28 is clinically combined with intraoperative radiation therapy and brachytherapy.

はじめに

我々が悪性腫瘍に対して放射線治療を施行する際おこる問題の一つとして、腫瘍細胞内の放射線抵抗性低酸素細胞の存在がある。この問題を解決する為に、様々な放射線増感剤が開発され in vivo および in vitro でその効果について検討された^{1)~5)}。その中でも、2-nitroimidazole 誘導体である misonidazole は、実験的には低酸素細胞に対

して優れた放射線増感作用を認めた³⁾⁵⁾。しかし副作用、特に神経毒性の出現のため、臨床的には効果を示すための十分な量が投与できないという問題を残した⁶⁾。

2-nitroimidazole 誘導体の一つで、側鎖に糖鎖を有した構造を持つ低酸素腫瘍細胞放射線増感剤 RK28は、これまでの実験的研究において misonidazole に匹敵する放射線増感効果を認めており、

また misonidazole と比較し副作用の少ない薬剤として期待されている⁷⁻¹¹⁾。

今回我々は、おもに臨床における術中照射および密封小線源による放射線治療のモデルとして家兎 VX2腫瘍を用い、RK28を腫瘍の栄養血管から動注直後に放射線照射を施行しその抗腫瘍効果について、また動注後の RK28およびその代謝物の腫瘍内および血清内濃度の推移について検討したので若干の文献的考察を加え報告する。

対象および方法

1. 実験動物および腫瘍

実験には体重2.5~3.0kgの日本白色雄性家兎

24羽を用いた。

VX2腫瘍は我々の施設で継代移植されており、約 5×10^7 個の細胞を左下腿筋肉内に経皮的に移植した。移植後10日程で、CTで最大径が描出されるスライスにおいて腫瘍は長径が約3cmとなる。経静脈的に造影剤を投与すると腫瘍辺縁部は強い造影効果を認め、中心部は造影効果に乏しい(Fig. 1a, c, e)。組織学的に検討すると、造影効果の強い辺縁部はほとんど壊死を認めない腫瘍細胞で占められており、豊富な腫瘍血管の存在を認める(Fig. 2a)。一方、造影効果の乏しい中心部は腫瘍細胞の壊死や変性が強く血管の存在に乏しい状態

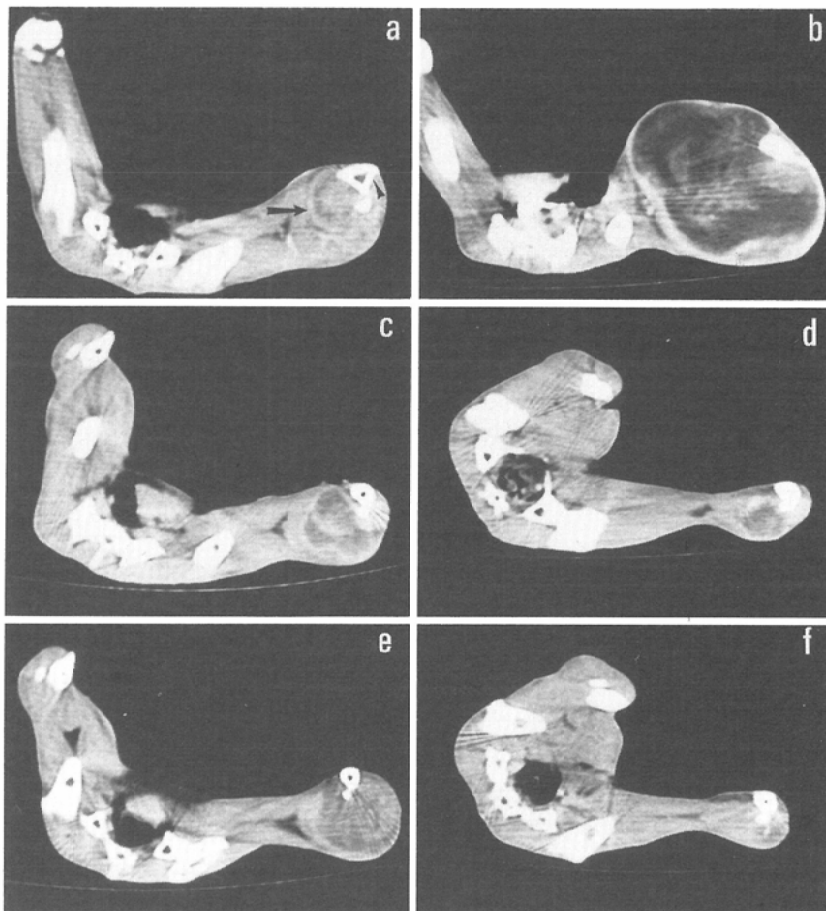


Fig. 1 Contrast enhanced CT images of VX2 tumor in left hind leg. (Tumor ; arrow, Left tibia ; arrowhead)
Control : 10 (a) and 30 days (b) after tumor implantation. Irradiation alone : Before (c) and 4 weeks after therapy (d). Irradiation with intraarterial RK28 : Before (e) and 4 weeks after therapy (f).

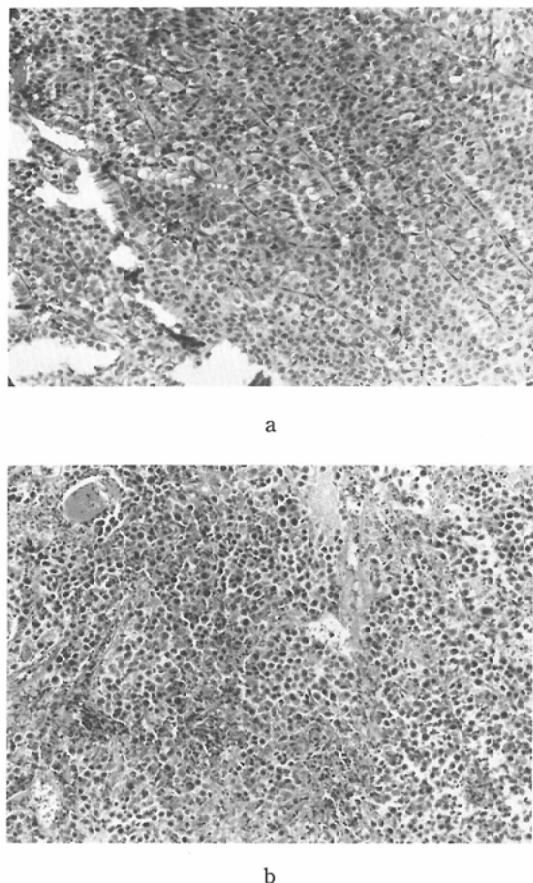


Fig. 2 Histological findings of VX2 tumor when tumor grown up to 3cm in diameter measured by CT. (H.E. stain, 200)

(a) Peripheral zone, (b) Central zone

であった (Fig. 2b).

腫瘍を移植された家兎を下記の3群に分けた。

A群 (6羽): 対象群 (未治療)

B群 (6羽): 放射線照射単独群

C群 (6羽): RK28動注+放射線照射群

実験は腫瘍がCT上最大径が約3cmの大きさとなり、明らかな局所リンパ節転移が認められない段階で開始した。また実験はすべて5倍希釈の pentobarbital sodium を静脈内投与し、全身麻酔を施した後に施行した。

2. 薬剤

RK28<1 (4'-Hydroxy-2'-Butenoxy) Methyl-2-Nitroimidazole>, およびその代謝物(a~f)の化学構造式を Table 1 に示す。薬剤は生理食塩水

に融解し50mg/mlの濃度として用いた。動物への投与量は80mg/kgとした。

大腿動脈の分枝のうち腫瘍の栄養動脈として大腿動脈、無名動脈、前および後脛骨動脈があり、伏在動脈は腫瘍の非栄養動脈である¹²⁾。そこで左伏在動脈より24ゲージのサーフロー針を用い逆行性に腫瘍の栄養動脈に選択的に薬剤を注入した¹³⁾。薬剤動注後、左伏在動脈は結紮し、2分以内に放射線照射を施行した。

3. 放射線照射

放射線発生装置は島津社製深部治療用 X線発生装置を使用し、200KV, 10mA, 線量率70cGy/min, 0.5mmCu+10mm Al filter, source-specimen distance=37cmの条件で15Gyを腫瘍部に照射した。

4. 腫瘍体積

腫瘍の経時的な体積変化はCTより計算した。CTはSomatom社製DR3を使用し、スライス厚8mm, 間隔8または10mmで撮像した。CTは治療前、治療後1週ごとに撮像した。腫瘍のvascularityを検討するために、撮像前にIopamidol 1ml/kgを耳静脈より注入した。

各々の腫瘍体積はCT画像より次式にて求めた。

$$V = \pi/4 \times \alpha^2 \times \beta (a_1 \times b_1 + \dots + a_n \times b_n)$$

V: 腫瘍体積 (mm³)

α : 拡大率, β : スライス厚 (mm)

a: 長径 (mm), b: 短径 (mm)

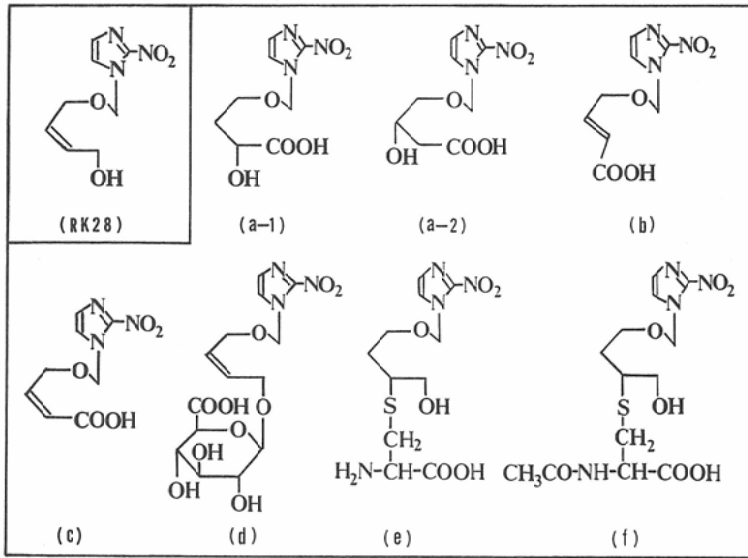
n: スライス数

Tumor regression slope は治療前の体積を1.0として体積比を求め作成した。A群については腫瘍移植後10日目の体積を1.0として体積比を求め治療群と比較した。

5. 生存期間

生存期間は放射線照射後200日までを観察期間とした。A群については腫瘍移植後10日目を0日として生存期間を計算した。生存率はKaplan-Meier法にて示し、各群の有意差の有無はGeneralized Wilcoxon testにて検定した。治療後、CT上で下腿腫瘍の消失した家兎については解剖で下腿腫瘍の有無について検索した。

Table 1 Chemical structures of RK28 and its metabolites. The metabolites of RK28 consist of oxidized compounds (a~c), glucuronated compound (d) and compounds with cysteine (e, f).



6. 薬剤濃度

6羽について、RK28動注後の腫瘍内および血清内のRK28およびその代謝物(a~f)の濃度を測定した。濃度測定にはHigh Performance Liquid Chromatography(以下HPLC)を用いてRK28動注直後、10分、20分、30分、60分後の濃度を測定した。測定後、家兎はすべて原液のpentobarbital sodiumを静脈内投与し屠殺した。

実験結果

1. 腫瘍体積変化

Fig. 3はA, B, C各群における腫瘍体積比のtumor regression slopeを示したものである。A群においてはすべての腫瘍は急速に増大しており、腫瘍移植後20日目で体積が移植後10日目の約3~4倍となる(Fig. 1b)。B, C群については治療後1週では浮腫による一時的な腫瘍体積の増加を認めるものの、それ以後は体積は減少傾向を示した。C群はB群と比較しより良好な腫瘍縮小効果を確認した(Fig. 1f)。特にC群のうち3羽において、治療後8~12週でCT上下腿の腫瘍はほとんど認められなくなった。3群間のregression slopeには統計学的に有意差を認めた(p<0.01)。

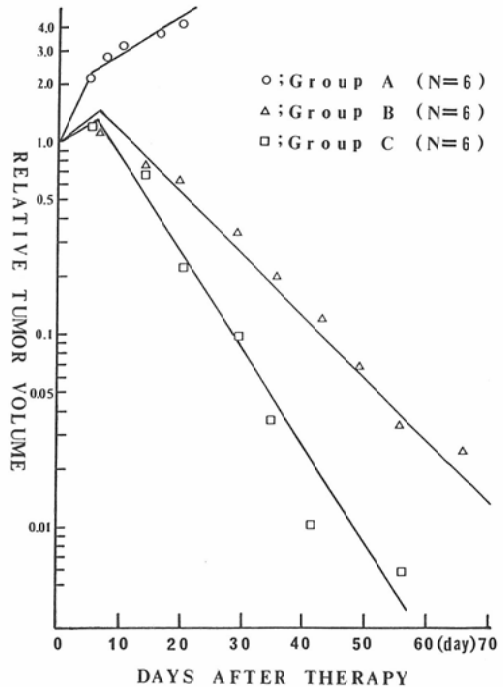


Fig. 3 Tumor regression slopes in group A (○), group B (△), and group C (□). The difference in tumor regression slopes in each group was statistically significant (p<0.01).

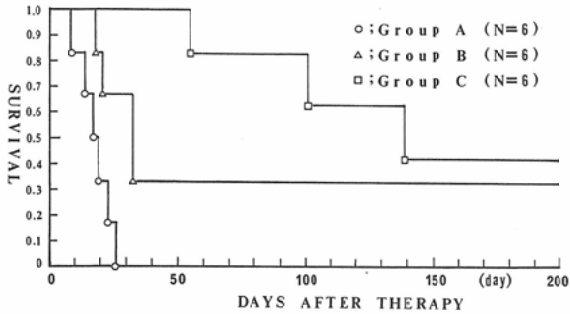


Fig. 4 Survival rates in group A (○), group B (△), and group C (□) using a Kaplan-Meier method. Statistical analysis of entire survival showed significant difference between group A and group B, group A and group C ($p < 0.05$).

2. 生存期間

Fig. 4 は各群についての生存期間を Kaplan-Meier 法を用いて示したものである。家兎の死因は局所腫瘍の増大，局所リンパ節転移，および肝，肺などの遠隔転移による衰弱死と考えられた¹⁸⁾。A 群については 8～25 日（腫瘍移植後 18～35 日）の間にすべて死亡し，平均生存期間は 17.8 日であった。B，C 群の平均生存期間はそれぞれ 59.5 日，142.5 日であり，両群とも A 群と比較し有意に生存期間の延長を認めた ($p < 0.05$)。C 群は B 群と比較し，生存期間の延長傾向を示したものの 5% の危険率では有意差は認められなかった。CT 上局所の腫瘍がほとんど消失した C 群 3 羽のうち 2 羽は 200 日以上生存を認めたが，1 羽は治療後 139 日目に死亡した。この家兎については解剖により下腿の腫瘍は消失していたが，両肺に多数の転移巣を認めこれが死因であると考えられた。200 日以上生存した 2 羽については解剖にていずれも非担癌状態であった。

3. 薬剤の腫瘍内および血清内濃度

HPLC を用い測定した 6 羽における RK28 の腫瘍内および血清内濃度は，動注直後に最高値を示し，その値はそれぞれ $158.8 \pm 40.8 \mu\text{g/g}$ ， $157.6 \pm 53.8 \mu\text{g/ml}$ であった。その後両者とも同じような減少傾向を示し，20 分後の濃度はそれぞれ $37.5 \pm 17.1 \mu\text{g/g}$ ， $31.2 \pm 7.9 \mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 5)。

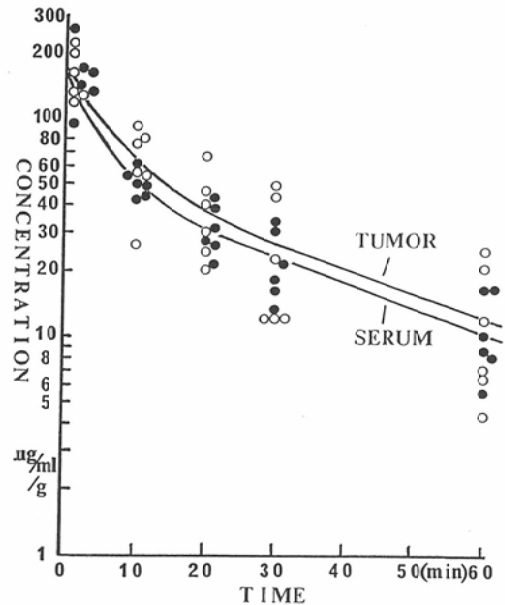


Fig. 5 The concentrations of RK28 in tumor tissue and serum after intraarterial drug infusion. Tumor; (○), Serum; (●)

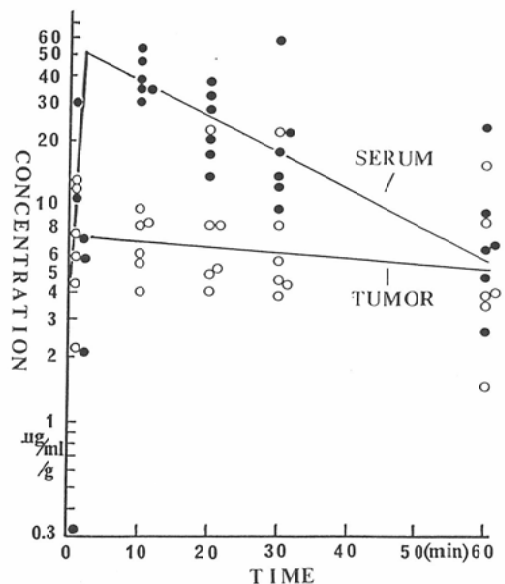


Fig. 6 The concentrations of RK28's metabolites in tumor tissue and serum after intraarterial drug infusion. Tumor; (○), Serum; (●)

腫瘍内および血清内における代謝物の濃度推移を Fig. 6 に示す。血清内における代謝物 (a～f)

の濃度は、動注後に血清内 RK28のそれにやや遅れて最高値を示し以後比較的速やかに減少し、動注後60分値は10分値の約1/5となった。腫瘍内の代謝物は動注直後から60分後の間大きな濃度変化は示さなかった。また腫瘍内の代謝物の内容は主として d, e が認められた。

以上の結果から RK28を腫瘍の栄養血管より動注することにより高濃度の RK28が腫瘍内に存在し、その結果良好な放射線増感効果を認めた。

考 察

悪性腫瘍内に存在する放射線抵抗性低酸素細胞に対し misonidazole は実験的に優れた増感効果が示されたものの、臨床応用に際してはその神経毒性のために十分な成果を上げるには至らなかった⁶⁾。

今回実験に用いた RK28は、misonidazole が臨床応用の際問題となった神経毒性を解決するため坂口により開発された2-nitroimidazole 誘導体である⁷⁾。その化学構造式は Table 1 に示したように側鎖を糖鎖とした nucleoside 誘導体であり、misonidazole と比較し脳血流閥門を通過し難く、体内からより速やかに排泄されるという特徴から、神経毒性を軽減し得る薬剤として期待されている⁹⁾¹¹⁾。

Hela S3 cell を用いた in vitro の実験では hypoxic な条件下で 1mM の濃度における RK28, および misonidazole の Enhancement Ratio (ER) はそれぞれ 1.56, 1.40 であったと報告されている¹⁰⁾。また ICR マウスに移植した Ehrlich 腹水腫瘍を用いた in vivo の実験においては、hypoxic な条件下で RK28 腹腔内投与における ER は 0.075mg/gbw, 0.15mg/gbw 投与でそれぞれ 1.63, 1.97 と良好な結果を示しており、misonidazole と同等またはそれ以上の放射線増感効果を示すと考えられている⁸⁾。さらに RK28 は正常組織に対しては障害を及ぼさないことも示されており⁸⁾、Adams²⁾ の提唱する優れた放射線増感剤であるための criteria を満足した薬剤であると考えられる。

抗癌剤の動注療法は全身投与と比較し、少量で腫瘍内の薬剤濃度を高濃度に保つことが可能で、かつ全身的な副作用が軽減できるという観点か

ら、その有用性に関して最近では実験的、臨床的に多くの報告がなされている^{14)~17)}。Ridge ら¹⁵⁾ は、VX2腫瘍を用いた実験肝腫瘍における Adriamycin の動注と静注を比較した報告では、薬剤投与30分後において動注後の腫瘍内濃度は静注後のその約3倍であったと報告している。RK28の放射線増感作用は薬剤投与量依存性が示されていることから⁸⁾、動注後の腫瘍内における高濃度の RK28の存在はより優れた放射線増感効果をもたらすと思われる。そして増感剤の放射線照射野外の部位への存在は意味がないということも考え合わせれば、放射線増感剤の選択的な腫瘍栄養血管への注入は、腫瘍内に高濃度の増感剤が存在し、かつ放射線照射に関係のない部位への増感剤の濃度を減ずることが可能で有用な方法であると思われる。

家兎 VX2腫瘍は Shope papilloma virus により誘発された低分化扁平上皮癌で¹⁸⁾、下腿に移植することにより急速に腫瘍は増大する。この腫瘍系は薬剤動注が比較的容易で、腫瘍体積が CT で正確に測定でき、また造影剤を用いることにより腫瘍の vascularity も評価できるという理由から、今回の検討にこの腫瘍系を用いた。動注法に関して、左伏在動脈から逆行性に薬剤を注入しているが、0.5ml/sec 以下の注入速度であればこの方法で簡便かつ確実に腫瘍の栄養血管への選択的な薬剤注入が可能であった¹³⁾。CT 上最大径が約 3 cm となった腫瘍を組織学的に検討すると中心部は辺縁部と比較し腫瘍血管系に乏しく、より低酸素状態であることが予想される。

未治療群の腫瘍は、移植後全例が体積を減ずることなく急速に増大し、移植20日目では移植10日の約3~4倍の体積となる。またこの時点では、ほとんどの家兎で局所リンパ節転移を認める。それに対し放射線治療単独群、RK28動注併用群においては、両群の腫瘍ともその体積は減少傾向を示した。そこで両群の regression slope を検討した結果、統計学的に有意差を認めた。Kallman¹⁹⁾ の報告によれば、一部の例外を除いて実験動物腫瘍内には10~20%の低酸素腫瘍細胞が存在する。VX2腫瘍にもある程度の低酸素腫瘍細胞が存在

すると考えられるが、腫瘍中心部により多く存在すると思われる低酸素腫瘍細胞に対する RK28の放射線増感作用の有無が両群間の regression slope の差に大きく関与しているものと推察される。

今回の検討においては治療前における肺、肝などの遠隔転移の有無については検索していない。しかしながら、移植後比較的早期に出現する局所リンパ節転移が認められない家兎を選択しており、治療時には腫瘍は下腿部に局限していたものと考えた。RK28動注併用群と比較し生存期間では明らかな有意差を認めなかったものの延命効果に寄与する傾向が認められた。これは治療による腫瘍の局所制御の差を反映するものと考えられる。

RK28の腫瘍内濃度は動注直後に約150 μ g/gの最高値を示し放射線照射がほぼ終了する20分後には最高値の1/5程度となるものの約30 μ g/gを示した。このことは動注直後から放射線を照射すれば80mg/kgの投与量で動注により十分な増感効果が得られていると考えられる。

Murayama¹⁰⁾は、Sarcoma 180を移植したICRマウスについてRK28 0.5mg/gbwを腹腔内に投与し経時的に腫瘍内および血清内濃度を測定している。その報告では、RK28は血清内から速やかに消失するものの、それと比較し腫瘍内からの排泄は遅延している。今回の我々の動注における検討では、腫瘍内および血清内の薬剤濃度は経時的にほぼ同じようなパターンで比較的速やかに減少している。この原因については動物—腫瘍系、薬剤投与量および投与方法、腫瘍内血流量などの違いがあると思われる。

代謝物に関しては、血清中ではa~fのすべてが検出されており速やかに排泄されている。腫瘍内ではおもにd, eが検出されている。eについてはシステイン付加体であり、腫瘍組織により代謝された結果生じたと考えられる。

dはグルクロン酸抱合体であり肝内での代謝物と考えられるが、腫瘍内でも比較的多く検出されている。misonidazoleにおいては、腫瘍内における代謝産物が放射線増感機構に関与することが報

告されている²⁰⁾²¹⁾。RK28の腫瘍内の代謝過程、および代謝物の放射線増感機構について今後詳細な検討が必要かと思われる。

結 語

家兎 VX2下腿腫瘍系を用い、低酸素細胞放射線増感剤 RK28の動注併用による放射線療法について検討した。

1. RK28動注併用放射線照射群は、未治療群、放射線照射単独群と比較し良好な腫瘍縮小効果を認めた ($p < 0.01$)。

2. RK28動注併用放射線照射群は未治療群と比較し、5%の危険率で生存期間の延長を認めた。また放射線照射単独群と比較し、5%の危険率では生存期間に有意差は認めなかったものの延命効果に寄与する傾向を認めた。

3. RK28の腫瘍内および血清内の濃度は動注直後に最高値を示し以後速やかに減少したが放射線照射中は高濃度の RK28が腫瘍内に存在した。

4. RK28代謝物 a~f は動注後比較的速やかに血清内より消失した。RK28代謝物の腫瘍内濃度は経時的に大きな変動は認められなかった。

5. 今後、肺癌などの術中照射による治療、あるいは Remote after Loading System (RALS) による小線源治療において、RK28動注併用放射線療法を試み、臨床的検討を加えていきたい。

本稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました中西敬教授ならびに江部和勇博士に深甚の誠意を表します。また VX2腫瘍を供与して頂いた神戸大学医学部放射線医学教室(河野通雄教授)の諸氏に、また薬剤の提供および本実験に御協力を賜りましたポーラ新薬研、坂口正一博士、宮田正之氏に深謝致します。さらに、本実験に際し、御協力頂いた本間 稷医局員はじめ教室員の皆様に深謝致します。

文 献

- 1) Ston HB, Withers HR: Tumor and normal tissue response to metronidazole and irradiation in mice. *Radiology* 113: 441-444, 1974
- 2) Adams GE: Chemical radiosensitization of hypoxic cells. *Br Med Bull* 29: 48-53, 1973
- 3) Hole EJ, Roizin-Towle L: Hypoxic sensitizers: Radiobiological studies at the cellular level. *Radiology* 117: 453-457, 1975
- 4) Kleine W, Stange S, Nagy D, et al: Misonidazol und Hochvoltbestrahlung an xenotransplan-

- tierten menschlichen karzinomen auf thymus-aplastischen nu / nu-Mäusen. Strahlentherapie 158: 498—503, 1982
- 5) 田中紀元, 坂崎富夫, 長谷川隆, 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
 - 6) Urtasun RC, Band P, Chapman JD, et al: Clinical phase I study of the hypoxic cell radiosensitizer Ro-07-0582, a nitroimidazole derivative. Radiology 122: 801—804, 1977
 - 7) Sakaguchi M, Larroquette CA, Agrawal KC: Potential radiosensitizing agents. 6. 2-nitroimidazole nucleosides: Arab-inofuranosyl and hexopyranosyl analogues. J Med Chem 26: 20—24, 1983
 - 8) 宮本裕二: 新低酸素細胞増感剤 RK28 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: 1142—1151, 1985
 - 9) 田中正博, 福田晴行, 中島俊文, 他: ニトロイミダゾール系低酸素細胞放射線増感剤に関する実験的研究, 日本医放会誌, 48: 1249—1260, 1985
 - 10) Murayama C, Tanaka N, Miyamoto Y, et al: In vitro and in vivo radiosensitizing effects of 2-nitroimidazole derivatives with sugar component. Strahlentherapie und Onkologie 163: 385—390, 1986
 - 11) Shibamoto Y, Nishimoto S, Mi F, et al: Evaluation of various types of new hypoxic cell sensitizers using the EMT6 single cell-spheroid-solid tumour system. Int J Radiat Biol 52: 347—357, 1987
 - 12) 大槻修平, 佐古正雄, 広田省三: 温熱療法の血管系に及ぼす実験的研究, 特に家兎 VX2 腫瘍における血管造影像並びに組織像との対比による検討一, 日本医放会誌, 48: 130—143, 1985
 - 13) 本間 穰, 須田博喜, 江部和勇, 他: 家兎 VX-2 下腿腫瘍に於ける簡便な動注および血管造影法, 日本医放会誌, 50: 80—82, 1990
 - 14) Kemeny N, Daly J, Reichman B, et al: Intrahepatic or systemic infusion of fluorodeoxyuridine in patients with liver metastases from colorectal carcinoma. A randomized trial. Ann Int Med 107: 459—465, 1987
 - 15) Ridge JA, Collin C, Bading JR, et al: Increased adriamycin levels in hepatic implants of rabbit VX-2 carcinoma from regional infusion. Cancer Res 48: 4584—4587, 1988
 - 16) Anderson LL, Collins GJ, Ojima Y, et al: A study of the distribution of methotrexate in human tissue and tumors. Cancer Res 30: 1344—1348, 1970
 - 17) Swistel AJ, Bading JR, Raaf JH: Intraarterial versus intravenous adriamycin in the rabbit VX2 tumor system. Cancer 53: 1397—1404, 1984
 - 18) Muckle DS, Dickson JA: Hyperthermia (42°C) as an adjuvant to radiotherapy and chemotherapy in the treatment of the allogenic VX2 carcinoma in the rabbit. Br J Cancer 27: 307—315, 1973
 - 19) Kallman RF: The phenomenon of reoxygenation and its implications for fractionated radiotherapy. Radiology 105: 135—142, 1972
 - 20) Wong TW, Whitmore GF, Gulyas S: Studies on the toxicity and radiosensitizing ability of misonidazole under conditions of prolonged incubation. Radiat Res 75: 541—555, 1978
 - 21) Michaels HB, Peterson EC, Ling CC, et al: Combined effects of misonidazole radiosensitization and hypoxic cell toxicity in mammalian cells. Radiat Res 88: 354—368, 1981