

Title	放射線分割照射あるいは化学療法分割投与と直流通電療法との併用効果
Author(s)	中山, 俊威; 伊東, 久夫; 橋本, 省三
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1988, 48(10), p. 1269-1275
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/18060">https://hdl.handle.net/11094/18060</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 放射線分割照射あるいは化学療法の分割投与と 直流通電療法との併用効果

慶応義塾大学医学部放射線科学教室

中山 俊威 伊東 久夫 橋本 省三

(昭和63年5月10日受付)

### Anti-Tumor Activities of Direct Current (DC) Therapy Combined with Fractionated Radiation or Chemotherapy

Toshitake Nakayama, Hisao Ito and Shozo Hashimoto  
Department of Radiology, Keio University, School of Medicine, Tokyo

---

Research Code No. : 407

---

Key Words : Direct current therapy, Fractionated radiation,  
Cyclophosphamide

---

Anti-tumor activities of direct current (DC) therapy combined with fractionated radiation or cyclophosphamide were studied in mice which were transplanted with murine fibrosarcoma (FSa) in the right thighs. Using TCD<sub>50</sub> assay, DC therapy, given in a single fraction, enhanced the effect of a single dose of radiation with the dose-modifying factor of 1.3. Tumor control rates were more improved by the combination therapy with the smaller doses of radiation than the larger ones. When DC therapy was applied one time immediately after the first radiation of fractionated ones, the combination therapy still showed the enhanced effect. However, both of DC therapy and radiation were divided in three fractions and DC therapy was applied everytime after radiation, tumor growth retardations were not different between the combination therapy and radiation alone. This result suggests that there is a minimum amount of Coulombs to improve the effect of radiation alone.

On the other hand, DC therapy combined with cyclophosphamide given in one fraction showed the same enhancement effect as those divided in three fractions. These results suggest that DC therapy combined with radiation or cyclophosphamide is effective to improve tumor control, but the mechanisms to enhance the effect of radiation or cyclophosphamide are different.

#### はじめに

悪性腫瘍の治療は、手術、放射線療法および化学療法を主体としてそれぞれ単独あるいは併用することにより治療成績の改善がみられている。しかし、進行癌には、これらの治療法のみでは十分に満足すべき結果が得られていないのが現状であろう。したがって、これらの従来確立された治療法に併用すると、相乗あるいは相加効果があり、一方、副作用の発現機序が異なり、副作用を軽減

できる新しい治療法を開発する必要があると考えられる。最近、注目されている新しい治療法には、温熱療法や免疫療法がある。前者は臨床的にも多く実績を重ねており<sup>1)</sup>、後者ではモノクローナル抗体による治療<sup>2)</sup>が試みられている。ここで述べる直流通電療法(以下DC療法)は、1970年代後半Karolinska大学のNordenströmにより癌の肺転移巣の治療に導入され<sup>3)</sup>、その後世界中で臨床応用が試みられている。この治療法も理学的療法

の一つと考えられるが、放射線療法や温熱療法とは異なって、使用する機器が極めて安価であり、特別な施設を必要とせず、有効性が確かめられれば、広く普及する可能性が高いと思われる。本治療法に対する基礎的検討は乏しく、有効な実施法も未だ確立されていない。我々は、動物実験により1回投与の放射線や化学療法剤とDC療法を併用した場合、良好な成績が得られることを報告した<sup>4)5)</sup>。しかし、臨床応用のためには、分割投与による治療成績が必要であろう。本研究は、分割投与とした場合の放射線あるいは化学療法剤とDC療法の併用効果について、動物実験により検討し、臨床応用の可能性の有無を検討する目的で行った。

### 実験材料と実験方法

#### 1. 実験動物および移植腫瘍

実験に用いた動物は、すべて8～9週のC3H雄性マウスである。これらの動物は、静岡実験動物研究所より8週齢で購入し、1ケージあたり4匹として、クリーンラックで飼育した。購入5～10日後、腫瘍を移植して実験に供した。

本実験にはC3Hマウスにメチルコラントレンで誘発した線維肉腫(FSa)を用いた。液体窒素下に凍結保存しておいた腫瘍を、C3Hマウスの皮下に移植し、腫瘍が20mmに達したところで外科的に切除して実験に供した。切除した腫瘍より壊死部分を除去し、ハサミで細切後、0.02%トリプシン処理により単一細胞浮遊液を作成した。細胞浮遊液の生細胞の割合は、トリパンブルー液染色によれば90～95%であり、マウスの大腿部皮下に、1匹あたり $2.5\sim 3\times 10^6$ 個の生細胞になるよう移植した。腫瘍の平均直径が7～7.5mmに発達したところで実験に供した。

腫瘍に対する治療効果の判定は、腫瘍サイズを週3回、ノギスにより3方向測定し、平均直径を求めて行った。1群に7～10匹のマウスを用い、直径の平均値をその群の腫瘍サイズとして、腫瘍増殖曲線を作製し、標準誤差も図示した。治療120日後に腫瘍が認められない場合は、治癒として増殖曲線の計算より除き、治癒率として示した。

#### 2. 直流通電療法 (DC 療法)

DC療法は、以前に報告した方法で行った<sup>4)</sup>。すなわち、当教室で作製した10チャンネルより成る定電流装置を用いた。マウスの右大腿部腫瘍内と腫瘍より頭側の大腿健常部皮下にそれぞれ1本ずつ周囲をテフロン加工した直径0.1mmの白金線を刺入し電極として使用した。電流は原則として1分あたり0.3mAずつ上昇させ、0.6mAの定電流を用いた。

#### 3. 放射線照射

腫瘍の放射線治療は、6MV直線加速器(三菱ML6MA)の6MeV電子線を線量率3Gy/minにて用いた。マウスを固定具にセットした後、腫瘍の上に組織等価物質として5mm厚のフレーションベッドパット(志水医科製)をbolusとして置き、右下肢のみを局所的に照射した。

#### 4. 麻酔

DC療法、放射線療法いずれも原則として麻酔下に行った。5mg/mlに希釈したペントバルビタールナトリウムを、マウスの体重(g)あたり0.01ml腹腔内に投与した。長時間のDC療法のため覚醒した場合は、初回の半量の薬剤を腹腔内に追加した。

#### 5. 化学療法剤

本実験には、サイクロホスファミド(塩野義製薬、以下CPA)を用いた。マウスの体重(g)あたり0.01mlの投与量になるように、使用直前に生理食塩水を用いて溶解、希釈して濃度を調整し、腹腔内に投与した。

#### 6. 分割治療法

DC療法、放射線療法および化学療法の投与は、1回治療法と分割治療法を用いて、効果を比較検討した。いずれの治療法も分割で治療する場合は、早朝(午前7～8時)と夕方(午後6～7時)に治療を行い、3分割の場合には、翌日の早朝(午前7～8時)に3回目の治療を行った。したがって、分割治療の場合の間隔は10～14時間となった。

### 実験結果

#### 1. DC療法単独の分割投与による抗腫瘍効果

FSa腫瘍をDC療法単独で治療する場合は、腫瘍内電極を陰極とする方が有効であった<sup>6)</sup>。したがって、今回の実験でも腫瘍内電極は陰極として、

Table 1 Tumor Doubling Time of FSa Treated with Fractionated DC

Treatment	Doubling Time (7.5-15mm) (Mean±S.E.)
No Treatment	7.7±0.5days
DC 120min 1X	12.3±1.1
DC 60min 2X	11.6±1.3
DC 40min 3X	9.1±0.9

DC : 0.6mA, Cathode in the tumor

0.6mA の定電流により120分 1回, 60分 2回, 40分 3回の通電治療を行った。

腫瘍の治療時の直径7.5mmが15mmの2倍になるまでの日数(doubling time)を Table 1 に示した。120分 1回と60分 2回の通電治療の間には、腫瘍の doubling time に明かな差異を認めないが、40分 3回に分割すると DC 療法の効果が低下した。

2. 放射線と DC 療法の併用

FSa 腫瘍を放射線と DC 療法の併用で治療する場合は、放射線照射直後に腫瘍内電極を陽極として通電する方法が有効であったため<sup>4)</sup>、本研究でもこの方法に従って、0.6mA の定電流で通電を行った。

2-1) 放射線と DC 療法のいずれも 1 回治療

放射線照射直後、0.6mA で120分の DC 療法を併用した場合の腫瘍の治癒率と、放射線の線量の関係を Fig. 1 に示した。

照射単独群では、50%の腫瘍を制御するのに必要な線量(TCD<sub>50</sub>)は38Gyであったが、DC 療法を併用すると30Gyになり、DC 療法による線量修飾係数は1.3となった。治癒率の曲線を検討すると、DC 療法併用群では低い線量域から腫瘍の治癒がみられるが、高線量域では照射単独群との間に差異がなくなり、治癒率の曲線の傾きが放射線単独群に比べて平坦になった。これは、DC 療法を放射線に併用すると、照射線量が少ない場合にその併用効果を示すことを示唆している。

2-2) DC 療法は 1 回治療とし、放射線は分割照射にした場合

放射線治療は 1 回線量を、11Gy および、15Gy

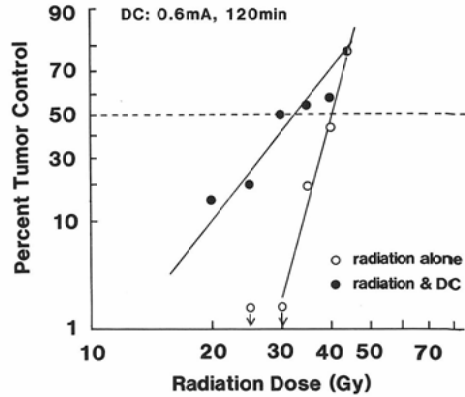


Fig. 1 Radiation dose-response curves for local control of FSa. Tumor control probability (logit transformation) is plotted against logarithm of radiation dose.

として 3 回照射し、DC 療法は 0.6mA、120 分の治療を 1 回目の照射直後に併用した場合の腫瘍の増殖曲線を Fig. 2 に示した。

放射線照射単独の場合は、11Gy と 15Gy の間で腫瘍の増殖に明らかな差異がみられた。一方、DC 療法を併用すると、11Gy、15Gy のいずれの腫瘍増殖曲線も、15Gy 単独の場合と同様になり、照射線量の差が認められなくなった。1 回照射の場合、DC 療法の併用効果は低線量域でみられたが、放射線を分割照射した場合も同様の結果がみられた。

2-3) DC 療法と放射線療法のいずれも分割して治療した場合

放射線治療の 1 回線量を 9~13Gy までとして 3 回照射し、DC 療法は毎回照射直後に 0.6mA で 40 分ずつ通電した。治療時の腫瘍サイズ 7mm が 14mm に達するまでの日数(doubling time)と治癒率を Table 2 に示した。

DC 療法併用群と照射単独群の間で、doubling time を比較すると、両者の間に明らかな差異は認められなかった。治癒率で検討した場合も、両群ともに 13Gy 3 回照射群で 25~29% の治癒がみられたのみで、低線量域、高線量域のいずれにも DC 療法の併用効果がなかった。

DC 療法の分割回数が放射線との併用効果に及ぼす影響を検討するため、総線量 30Gy と 0.6mA

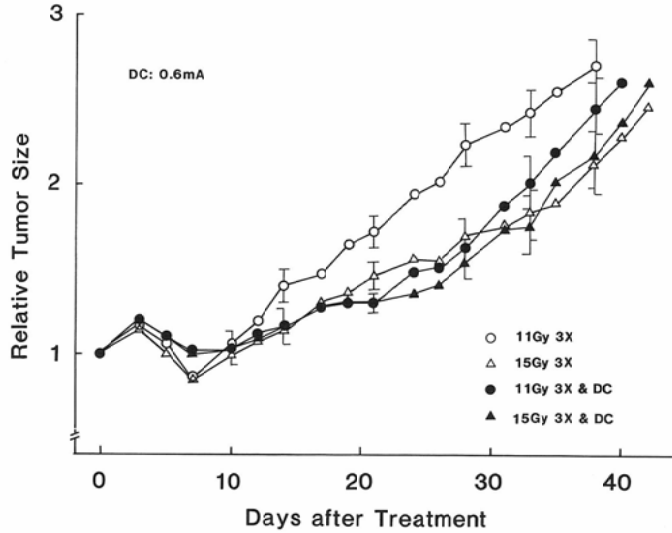


Fig. 2 Effect of DC therapy combined with radiation on FSa growing.

Table 2 Tumor Doubling Time and Cure Rate of FSa after Treatment with Fractionated Irradiation and DC

Dose(Gy)	Irradiation alone (Mean±S.E.)	Irradiation and DC (Mean±S.E.)
<u>Tumor Doubling Time(7.5-15mm)</u>		
9X3fx	17.6±1.1days	22.2±2.3days
10X3fx	21.1±1.8	21.5±1.7
11X3fx	21.0±3.9	20.7±2.9
12X3fx	28.2±2.4	28.3±2.7
13X3fx	25.1±3.7	28.0±3.3
<u>Cure Rate</u>		
9X3fx	0/7	0/7
10X3fx	0/7	0/7
11X3fx	0/7	0/7
12X3fx	0/7	0/7
13X3fx	2/8(25%)	2/7(29%)

DC : 0.6mA, 40min, 3 times, Anode in the tumor

120分のDC療法を、いずれも1, 2, 3回に分割して治療し、腫瘍の曲線をFig. 3に示した。

放射線単独の場合は、30Gyを1回で照射しても、2, 3回に分割しても腫瘍の増殖に有意な差はみられなかった。一方、DC療法併用群では、120分1回と60分2回を併用した群には併用効果がみられ、放射線治療単独群より腫瘍の発育遅延が認められた。DC療法を3回に分割して併用した群は、照射単独群よりはわずかに発育遅延を示した

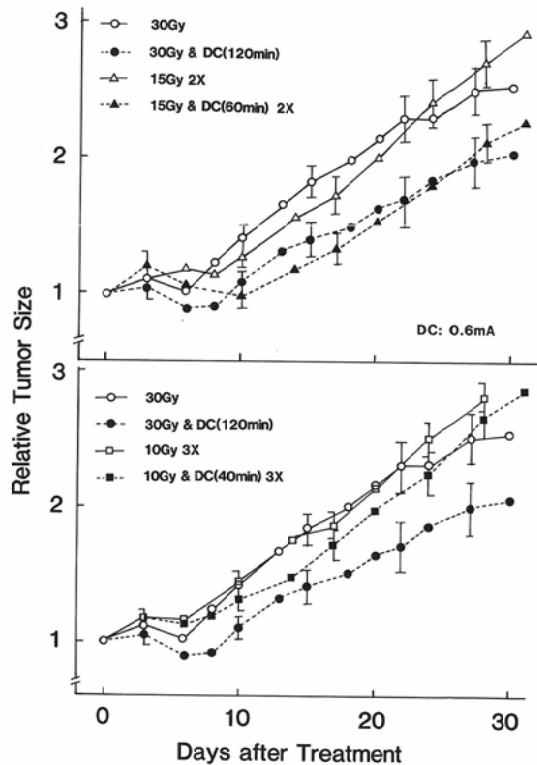


Fig. 3 Growth of FSa which were treated with radiation alone or radiation combined with DC therapy. DC therapy and radiation were given in one fraction or in fractionated schedules.

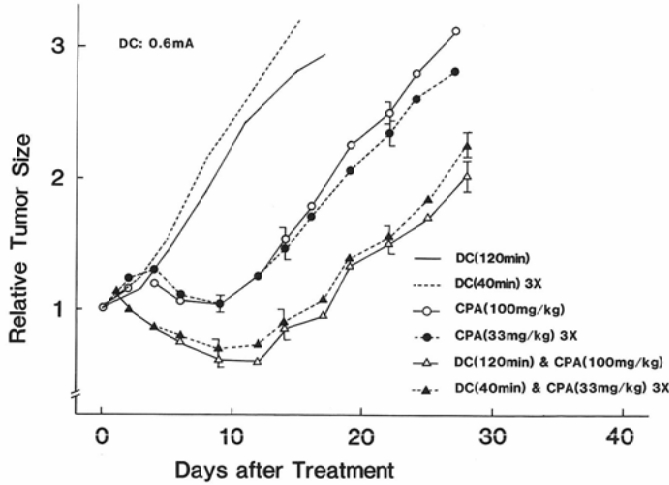


Fig. 4 Effect of DC therapy combined with cyclophosphamide on FSa growing. DC therapy and cyclophosphamide were given in one fraction or in three fractions.

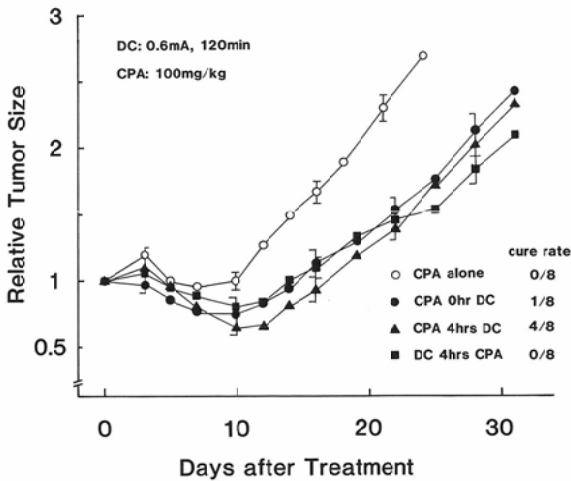


Fig. 5 Effect of DC therapy on growths of FSa which were treated with cyclophosphamide. DC therapy was combined with cyclophosphamide at the different time schedules.

が、有意な差はなかった。

### 3. DC療法と化学療法との併用効果

FSa腫瘍は、cyclophosphamide (CPA) によく反応するため<sup>9)</sup>、本研究では、CAP 100mg/kg と腫瘍内電極を陰極にして0.6mA、120分のDC療法を併用した。それぞれの治療法を3回に分割して投与した場合の腫瘍の増殖曲線を Fig. 4 に示

した。

CAP 100mg/kg 単独投与の場合は、1回投与と3回分割投与の間に差異はなかった。DC療法を併用すると、腫瘍の発育遅延がみられたが、分割投与しても1回投与と同様の併用効果がみられた。これは放射線治療にDC療法を併用した場合と著しく異なる結果となった。

CPA と DC 療法の併用間隔が治療効果に及ぼす影響を検討するため、CPA 100mg/kg と0.6 mA、120分の通電を1回投与として、DC療法をCPAの4時間前、同時、4時間後に併用し、腫瘍の増殖曲線と治癒率を Fig. 5 に示した。

CPA 単独群に比べて、DC療法併用群では、再増殖した腫瘍の増殖は遅延していたが、併用間隔による差はなかった。一方、CPA投与4時間後にDC療法を併用すると、高い治療率が得られた。

### 考 察

DC療法が抗腫瘍効果を示すことは、既に臨床試験<sup>7)</sup>や動物実験<sup>8)</sup>により報告されている。しかし、臨床的に有効な治療法として確立されていくためには、多くの問題が未解決である。例えば、抗腫瘍作用の作用機序が全く不明であること、临床上どのように応用するのが有効であるか等の問題がある。我々は、動物実験により、1回投与方法

で放射線<sup>9)</sup>や化学療法剤<sup>9)</sup>と併用すると良好な成績が得られることを報告してきた。しかし、臨床の治療は副作用を軽減する目的で、分割して少量ずつ投与する方法が用いられ、一般には1回大量投与法は行われない。特に放射線治療では1回線量を小さくして多数回照射する分割法が注目されている<sup>9)</sup>、1回大量照射と分割照射では、放射線に対する反応に関与する因子が著しく異なり<sup>10)</sup>、これらの因子が併用する治療法に及ぼす影響、あるいは逆に併用する治療法が放射線治療に及ぼす作用は推測することが困難である。したがって、1回大量投与法の成果から分割治療法を主体とする臨床上的結果を予想することは危険である。

本研究では、放射線治療と併用するDC療法を分割して、その併用効果について検討した。放射線治療は分割しても、DC療法を1回治療とした場合は、併用効果は十分に認められた。

一方、分割照射にDC療法も分割して併用すると、2回分割の場合は併用効果があったが、3分割にするとDC療法の併用効果が消失した。DC療法は微小血管に血栓を形成するため<sup>9)</sup>、毎照射後DC療法を行うと、hypoxic cellsを増加させて、次の照射効果を低下させる可能性がある。しかし、(1) DC療法単独の場合、60分2回通電は有効であるが、40分3回に分割すると効果がなくなること、(2) DC療法と放射線照射を1回治療で併用した場合、60分以上通電しないと効果がないこと<sup>4)</sup>、(3) 併用時、2分割にして60分以上通電すると、1回治療の場合と同様の効果が得られることなどより、DC療法を一定時間(60分)以上行うことが併用効果を期待するためには必要と考えられる。したがって、放射線を分割照射にする場合も、DC療法の分割は少なくして併用することが必要と思われる。

CPAとDC療法を併用する場合は、DC療法を分割して短時間の通電を繰り返しても、1回に長時間通電した場合と同様の効果がみられた。さらに、CAP投与後4時間してDC療法を併用すると、CAP投与4時間前や直前にDC療法を併用した場合より、高い治癒率が得られた。これは放射線照射後にDC療法を併用すると、最も有効なこ

とも異なっている。すなわち、DC療法を放射線あるいはCPAと併用してみられる増強効果は、その作用機序が異なっていると考えられる。

直流通電が細胞に与える障害として報告されているものは、(1)細胞膜の透過性を変化させ、物質の透過が変化する<sup>11)</sup>、(2)細胞内の酵素活性が抑制される<sup>12)</sup>、(3)細胞内のタンパクを変性させる<sup>3)</sup>、(4)細胞及び周囲環境のpHが著しく変化する<sup>3)</sup>、(5)細胞融合をおこして巨細胞を形成する<sup>3)</sup>ことなどがある。DC療法が細胞に作用して障害をおこし、CPAの作用を増強する場合、少量の電気量でおこり長時間持続する障害である。CPA投与後4時間してDC療法を行った場合に、最大の効果が得られたのは、CPAがmasked compoundで生体内で代謝されて作用し、半減期が6~7時間と長く<sup>13)</sup>、血中濃度と関係しておこるためと考えられる。一方、放射線の作用を増強する因子は、短時間のうち放射線障害と相互に作用して、一定量以上の電気量を必要とする細胞障害である。上記の通電による障害のいずれかが該当するか、あるいは上記以外の因子があるかは、今後解決しなくてはならない問題であろう。

#### まとめ

分割治療により、DC療法と放射線あるいはサイクロホスファミドの併用療法を行い、併用効果について検討した。

1) 放射線とDC療法を1回投与で行った場合は、放射線の線量が小さい場合、併用効果が著明で、TCD<sub>50</sub>による線量修飾係数は1.3であった。

2) 放射線とDC療法の両者を分割して併用する場合は、併用効果を期待するためには、最低必要電気量が存在し、DC療法は分割回数を少なくする必要がある。

3) CPAとDC療法の併用では、分割しても、1回投与でも、併用効果に差がなかった。

以上のことより、DC療法は放射線と併用する場合と、CPAと併用する場合とは、増強作用の作用機序が異なると考えられる。

本研究の一部は、第46回日本癌学会総会(昭和62年、東京)、8th international congress of radiation research (Edinburgh, 1988)において発表した。

また、文部省科学研究費(61870046)、成人病研究所記念財団研究助成金(昭和62年度)、資生会研究所助成金(理事長大島武雄)、及び伊藤テルミー研究助成金によったことを記して謝意を表する。

#### 文 献

- 1) Perez CA, Emai B: A review of current clinical experience with irradiation and hyperthermia. *Endocurie Hypertherm Oncol* 1: 265—277, 1985
- 2) Cobb LM, Humm JL: Radioimmunotherapy of malignancy using antibody targeted radionuclides. *Br J Cancer* 54: 863—870, 1986
- 3) Nordenstroem BEW: Biokinetic impacts on structure and imaging of the lung. The concept of biologically closed electric circuits. *AJR* 145: 447—467, 1985
- 4) 西口 郁: 悪性腫瘍に対する直流通電療法, 日本医放会誌, 47: 621—628, 1987
- 5) 伊東久夫, 中山俊威, 橋本省三: マウス移植腫瘍に対する直流通電療法の化学療法増強効果, 癌と化学療法, 14: 1854—1859, 1987
- 6) 伊東久夫, 茂松直之, 橋本省三: 直流通電療法(DC療法)の腫瘍増殖抑制効果, 日癌治誌, 23(3): 696—702, 1988
- 7) Yokoyama M, Kasagi Y, Wada J, et al: Local cancer therapy by means of direct current. Postersession 29, 24th Congress of the Japan Society for Cancer Therapy, Matsue, 1986
- 8) 山下 孝, 小松崎敏子: 直流通電による癌治療—BCEC理論に基づく—, 放射線生物研究, 19: 157—163, 1984
- 9) Thames HD, Withers HR, Fletcher GH, et al: Changes in early and late radiation responses with altered dose fractionation: Implications for dose-survival relationships. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 8: 219—226, 1982
- 10) Withers HR, Peters JL: Basic principles of radiotherapy: Biological aspects of radiation therapy. *Textbook of Radiotherapy*. Fletcher GH (ed), 3rd ed., 3rd ed. 103—180, 1980, Lea & Febiger
- 11) Latorre R, Alvarez O: Voltage-dependent channels in planar lipid bilayer membranes. *Physiol Rev* 61: 77—150, 1981
- 12) 松永 是: 光年導体微粒子による殺菌, 防菌防黴誌, 13(5): 211—220, 1985
- 13) Goodman LS, Gilman A: Alkylating agents: Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, (ed), 7th ed. 1255—1258, 1985, Macmillan, New York