

Title	C3H/Heマウス移植乳癌に対するHyperthermia, Misonidazole併用の放射線増感効果
Author(s)	陶山, 純夫; 藪本, 栄三; 古西, 博明 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1981, 41(10), p. 998-1003
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/18649
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

C3H/He マウス移植乳癌に対する Hyperthermia, Misonidazole 併用の放射線増感効果

滋賀医科大学放射線医学教室

陶山 純夫 藪本 栄三 古西 博明
川西 克幸 山崎 武

京都大学医学部放射線医学教室

阿 部 光 幸

(昭和56年2月3日受付)

(昭和56年5月15日最終原稿受付)

Radiosensitization of C3H/He Mammary Carcinoma by Administration of Hyperthermia and/or of Misonidazole

Sumio Suyama*, Eizo Yabumoto*, Hiroaki Furunishi*, Katsuyuki Kawanishi*,
Takeshi Yamazaki* and Mitsuyuki Abe**

*Department of Radiology, Shiga University of Medical School

**Department of Radiology, Kyoto University School of Medicine

Research Code No.: 407

Key Words: Hyperthermia, Misonidazole, Radiosensitization, C3H/He mouse mammary carcinoma

The radiation response of C3H mammary carcinoma subjected to in vivo treatment with hyperthermia and/or misonidazole was studied. C3H mammary carcinoma of the second generation was transplanted subcutaneously into the mouse thigh. Tumors were irradiated with 32 Mev electron beams when they reached to a size of 1.3 cm in a mean diameter. Misonidazole of 0.1 mg/g body weight dissolved in normal saline was injected ip 30 min before irradiation. Hyperthermia treatment (43.5°C, 20 min) was made by 2450 MHz microwave immediately after irradiation. Each tumor was measured daily following irradiation until it reached to the initial tumor size. The dose modification factors were calculated from the growth delay times as well as from the TCD₅₀ values. The DMF calculated from the growth delay times were 1.3, 1.4 and 1.8 for hyperthermia, misonidazole and hyperthermia plus misonidazole respectively in the dose range of more than 2000 rad. In the dose range of less than 1000 rad, no significant sensitizing effects of misonidazole and hyperthermia were observed. On the other hand, the combined treatment of hyperthermia with misonidazole produced the same DMF obtained in the dose range of more than 2000 rad. The DMF calculated from TCD₅₀ values were 1.28, 1.50 and 1.84 for hyperthermia, misonidazole and hyperthermia plus misonidazole respectively. From these results, it can be considered that combined treatment of hyperthermia with misonidazole produces an additive effect.

I. はじめに

放射線治療上、腫瘍内に存在するRadioresistantなHypoxic tumor cellは放射線治療の成績を左右する重要な因子の1つと考えられている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。

この問題を克服する為、近年、Hypoxic cell sensitizer や Hyperthermia についての研究が進んでいる。又、これらを臨床に適用した場合についても、いくつかの報告がみられる⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾。これらの報告によれば、Hypoxic cell sensitizer, 又は Hyperthermia の放射線増感効果は、これまで in vitro で得ているような高い値を示していないと考えられる。そこで我々は、マウスの腫瘍を用いて、臨床に適用可能と考えられる量の Hypoxic cell sensitizer と Hyperthermia についての実験を行い、それらのそれぞれ片方、又は両方を併用したときの放射線増感効果を求め、検討を加えた。

II. 実験材料および方法

(1) 実験動物および腫瘍系

実験動物は8週齢の C3H/He 雌マウスを用いた。腫瘍は同系雌マウスに自然発生した乳癌である。この自然発生した乳癌と、その第1世代は液体窒素冷蔵庫に貯蔵し、実験の必要に応じて第1世代の乳癌を同系マウス側腹部皮下に移植し、増殖させた。この第2世代の乳癌は摘出して、クーパーで細かく刻み、試験管中で5%仔牛血清を含むHanks氏液で約4倍量に希釈し、20分間静置した。その後、生じた上澄みを取り、Swinnly filterで濾過し、これを5分間、1600rpmで遠沈した。生じた沈渣は約倍量のHanks氏液で希釈し、これを単細胞浮遊液とした。なお、細胞数はTrypan-blue染色を施した後、血球計算盤で計数した。この単細胞浮遊液10 μ l (約10⁶コの viable cellを含む)をマウス大腿部皮下に移植し、それが平均1.3cm直径(1cm³)に達した時、実験に用いた。この腫瘍のDoubling timeは5.4 \pm 0.6日であった。

(2) 放射線照射

照射は島津製 BT-32 型ベータトロンより発生する、32Mev電子線で行った。腫瘍への照射は

1回のみとした。電子線の線量率は、約1500rad/minであった。電子線の吸収線量測定はICRU Report 21¹⁰⁾に従い、Fricke線量計で行った。

(3) Hypoxic cell sensitizer の投与

Hypoxic cell sensitizer としてはMisonidazole (日本ロシュ提供)を用いた。Misonidazoleはあらかじめ、生理食塩水に溶解しておき、その0.1mg/g body weightをマウス腹腔内に投与した。Misonidazoleの投与時期はBrown¹¹⁾の実験結果に基づき、照射30分前とした。

(4) Hyperthermia 処理

マウス大腿部腫瘍の加温はミナト医科学製 Microtizer MT-150より発生する2,450MHzのMicrowaveで行った。加温を腫瘍部のみに限局する為、腫瘍部以外はすべて金属製の箱に入れて固定した。腫瘍内の温度測定にはBaily社製Model-BAT-4のThermometerと0.3mm ϕ のNeedle状copper/constantanのThermocoupleを用いた。この温度測定系はこのままの状態ではMicrowave照射下で使用できない為、Needle部分を除き、すべて電気的にShieldした。温度測定は腫瘍の中心で行い、その時の測定精度は \pm 0.3 $^{\circ}$ C以内であった。なお、Microwave照射下で測定用Needleの周辺が異常に加温され、Hot spotをつくる事実のないことをカンテンファントムであらかじめ確認した。

Hyperthermiaは放射線照射直後より、43.5 $^{\circ}$ C、20分間の処理とした。

(5) 併用の組合せ

マウス大腿部腫瘍は、(i)放射線単独、(ii)放射線とHyperthermiaの併用、(iii)放射線とMisonidazoleの併用、(iv)放射線とHyperthermia, Misonidazole両者との併用という4つのProtocolで処理した。

Misonidazole投与、放射線照射、Hyperthermia処理のそれぞれの手順と所要時間をTable 1に示す。

(6) 効果の判定

効果の判定には次の2つの方法を用いた。その第1は、腫瘍を放射線照射などの処理後、その腫

Table 1

Sequence of treatment	
min	
0	Intraperitoneal administration of misonidazole (0.1 mg/g)
30	Electron beam irradiation
35	Hyperthermia (43.5°C, 20 min)
60	Stop hyperthermia

瘍容積を毎日計測し、照射時の大きさにまで回復する時間、即ち、Growth delay time を求めて比較する方法である。この時の腫瘍容積 V は次式により算出した。

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot a \cdot b \cdot c$$

ここで、 a, b, c はそれぞれノギスで計測した腫瘍の長径、短径、および厚さである。

第2は、腫瘍を照射後90日間観察し、局所における再発の有無を検討して、Tumor control probability を求め、これをもとに Logit analysis¹²⁾ により TCD_{50} を算出して比較する方法である。いずれの方法においても、同一の効果を起させる時の線量の比、即ち、Dose modification factor (DMF) を求めた。

III. 実験結果

(a) Growth delaytime に関して

放射線単独の場合、放射線を Hyperthermia、又は Misonidazole との併用の場合、さらに放射線と Hyperthermia、Misonidazole 両者との併用の場合のそれぞれの処理によって得た Growth delay time と線量の関係を Fig. 1 に示す。

Fig. 1 に示す Dose response curve より DMF を求めると、2000rad 以上の高線量域では、Hyperthermia との併用の場合 1.3, Misonidazole との併用の場合 1.4, Hyperthermia, Misonidazole 両者との併用の場合 1.8 であった。一方、1000rad 以下の低線量域では、Growth delay time は放射線単独の場合と Hyperthermia、又は Misonidazole との併用の場合とでは有意差はみられず、それぞれの DMF は 1.0 に近い。ところが、Hyperthermia, Misonidazole 両考との併用の場合、DMF は 2 程

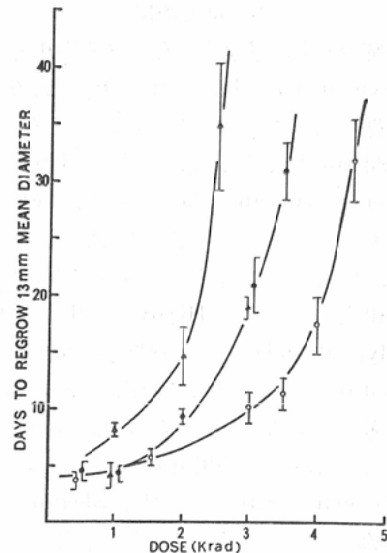


Fig. 1 Time taken to regrow 13mm as a function of single dose. ○, radiation alone; ▲, radiation plus hyperthermia ●, radiation plus misonidazole; △, radiation plus hyperthermia and misonidazole. The vertical bars represent standard deviation of the mean.

度の大きい値であった。

(b) Tumor control probability に関して

腫瘍を処理後、90日間、局所を観察して得た Tumor control probability と線量、又その時使用したマウスの匹数を Table 2 に示す。又、Tumor control probability と線量との関係を Fig. 2 に示す。Table 2 のデータをもとに、Logit Analysis で TCD_{50} を求め、これを Table 3 に示す。即ち、 TCD_{50} は放射線単独の場合、 6367 ± 250 rad であったが、Hyperthermia との併用で 4985 ± 157 rad Misonidazole との併用で 4238 ± 230 rad、さらに、Hyperthermia, Misonidazole 両者との併用で 3452 ± 130 rad となった。従って、DMF は Table 3 に示すように、Hyperthermia との併用の場合、1.28, Misonidazole との併用の場合 1.50, Hyperthermia, Misonidazole 両者との併用の場合、1.84 となった。

IV. 討 論

我々はこれまでの研究¹³⁾で、この腫瘍系は腫瘍

Table 2 Number of tumor controlled at 90days, Number of mice analysed and tumor control probability

Treatment	Dose (rad)	Number of controlled	Number of analysed	Tumor control probability (%)
Radiation alone	5000	0	9	0.0
	5500	3	13	23.0
	6000	6	16	37.5
	7000	12	16	75.0
	8000	18	22	81.8
Radiation+Hyperthermia	4100	0	4	0.0
	4500	1	8	12.5
	4900	3	7	42.9
	5300	3	4	75.0
Radiation+Misonidazole	4100	3	7	42.9
	4500	5	8	62.5
	4900	5	6	83.3
	5300	3	3	100
Radiation+Misonidazole+Hyperthermia	2800	0	5	0.0
	3100	1	6	16.7
	3400	3	7	42.9
	3700	3	4	75.0

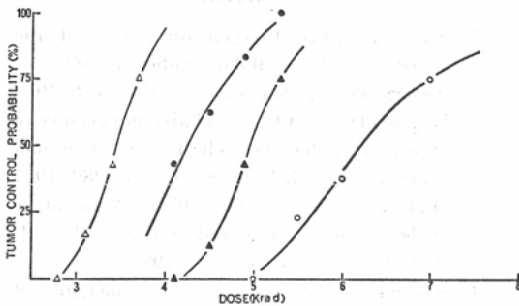


Fig. 2 Tumor control probability at 90 days versus radiation dose. O, radiation alone; ▲, radiation plus hyperthermia; ●, radiation plus misonidazole; △, radiation plus hyperthermia and misonidazole.

容積の増加に伴い、腫瘍内の局所血流量が減少することを示した。Howes¹⁴⁾によれば、1cm³大の自然発生乳癌には、約12%の Hypoxia cell が存在する。従って、今回、我々の用いた 1.0cm³大の腫瘍には、その値より多い Hypoxic cell が存在すると考えられる。

このRadioresistantと考えられる腫瘍に対し、併用による増感効果は Table 3に示している TCD₅₀から求めた値、又は Growth delay time より求

Table 3 TCD50 and DMF values of C3H/He mouse mammary carcinoma

Treatment	TCD50±S.D(rad)	DMF
Radiation alone	6367±250	
Radiation+Hyperthermia	4985±150	1.28
Radiation+Misonidazole	4238±230	1.50
Radiation+Hyperthermia+Misonidazole	3452±130	1.84

めた値、いずれもほぼ一致した。Hyperthermiaとの併用による増感効果は Thall 等¹⁵⁾の Water bath による、44°C、15分間処理で得た値に近かった。又、Hyperthermia、Misonidazole 両者との併用で、1.84とい高い増感効果を得たが、これは Hyperthermia、又は Misonidazole との併用で得た、それぞれの増感効果の相加的な値になっているといえる¹⁶⁾。

一方、Fig. 2において、その Dose response curve の傾きがいつれの併用の場合も、放射線単独のものより急になっている。このような傾きの変化は Suit 等¹⁷⁾も高圧O₂下での実験で得ている。我々の場合、Hyperthermia、又は Misonidazole さ

らに Hyperthermia, Misonidazole 両者との併用のいずれの場合も、併用により Hypoxic cell の damage が増加し、oxic cell の damage の level に近づいている事を示している。

ところが、Fig. 1 に示すように、1000rad 以下の低線量域では Hyperthermia, 又は Misonidazole の併用で増感効果は認められない。これは Hyperthermia, 又は Misonidazole の併用を低線量で行っても、Hypoxic cell の damage が cell death の level にまで達していない事を示している。即ち、Denekamp 等¹⁸⁾も述べているように、低線量域では Oxic cell の cell death が腫瘍縮小の主な因子になっている為であろう。しかし、Hyperthermia, Misonidazole 両者との併用では、この線量域においても、高い増感効果が得られた。

Dugle 等¹⁹⁾によれば Misonidazole は DNA 中の single strand break を増加させ、又、Ben-Hur 等²⁰⁾によれば、Hyperthermia は sublethal damage の repair を阻害する作用をもっている。Hyperthermia, Misonidazole 両者との併用は Hypoxic cell に対し、少なくとも、それぞれの作用による damage が相加され、cell death が増加した為と考えられる。

現在、放射線治療において、小線量多分割照射が主に用いられている。Misonidazole は Dische 等⁷⁾によると、その副作用の為、投与量の制限される。小線量にこのような許容できる濃度の Misonidazole を併用しても増感効果は期待できない事を先に示したが、分割照射においては分割照射間で生じる Reoxygenation の因子もあり、増感効果を得るには併用の方法を検討する必要がある。

これまで、臨床的に Hyperthermia, 又は Misonidazole の併用で十分な増感効果が得られていないが、Hyperthermia, Misonidazole 両者との併用は 1 回線量が少なくとも増感効果を期待できる 1 方法であるといえるだろう。

V. 結 語

腫瘍は C3H/He マウスの大腿部移植乳癌で平均直径 1.3cm となったものを用いた。腫瘍は

Microwave による Hyperthermia (43.5°C, 20分処理)、又は Misonidazole (0.1mg/g), さらにその両者との併用を行って、放射線増感効果を求めた。その結果、TCD₅₀ より求めた増感効果はそれぞれ、Hyperthermia との併用で 1.28, Misonidazole との併用で 1.50, Hyperthermia, Misonidazole 両者との併用で 1.84 となった。Growth delay time より求めた増感効果も高線量域では TCD₅₀ より求めた値とそれぞれ、ほぼ等しかったが、1,000rad 以下の低線量域では Hyperthermia, 又は Misonidazole の増感効果は認められなかった。ところがこのような低線量域でも、Hyperthermia, Misonidazole 両者との併用では高線量域と同じ、高い増感効果が得られることがわかった。従って、多分割照射にこのような併用を行えば、残存している Hypoxic cell に対し、有効な放射線増感が期待できると考えられる。

References

- 1) Tannock, I.F.: Oxygen diffusion and the distribution of cellular radiosensitivity in tumors. *Brit. J. Radiol.*, 45: 515—524, 1972
- 2) Kaplan, H.S.: On the relative importance of hypoxic cells for the radiotherapy of human tumors. *Europ. J. Cancer*, 10: 275—280, 1974
- 3) Hall, E.J.: The oxygen effect: Pertinent or irrelevant to clinical radiotherapy. *Brit. J. Radiol.*, 40: 874—875, 1967
- 4) Kallman, R.F.: The phenomenon of reoxygenation and its implication for fractionated radiotherapy. *Radiology*, 105: 135—142, 1972
- 5) Kim, J.H., Hahn, E.W. and Tokita, N.: Combination hyperthermia and radiation therapy for cutaneous malignant melanoma. *Cancer*, 41: 2143—2148, 1978
- 6) Hornback, N.B., Shupe, R., Shidnia, H., Joe, B.T., Sayoc, E., George, R. and Carol Marshall, R.N.: Radiation and microwave therapy in the treatment of advanced cancer. *Radiology*, 130: 459—464, 1979
- 7) Dische, S., Saunders, M.I., Lee, M.E., Adams, G.E. and Flockhary, I.R.: Clinical testing of the radiosensitizer R07-0582: Experience with multiple doses. *Brit. J. Cancer*, 35: 567—579, 1977
- 8) Thomlinson, R.H., Dische, S., Gray, A.J. and Errington, L.M.: Clinical testing of the

- radiosensitizer R07-0582: III. Response of tumors. *Clin. Radiol.*, 27: 167—174, 1976
- 9) Carabell, S.C., Bruno, L.A., Weinstein, A.S., Richter, M.P., Chang, C.H., Weiler, C.B. and Goodman, R.L.: Misonidazole and radiotherapy to treat malignant glioma: A phase II trial of radiation therapy oncology group. *Int. J. Oncol. Biol. Phys.*, 7: 71—77, 1981
- 10) ICRU (1972). International commission on radiation units and measurements, radiation dosimetry. ICRU report 21, International Commission on Radiation units and Measurements, Washington
- 11) Brown, J.M.: Selective radiosensitization of hypoxic cells of mouse tumors with the nitroimidazoles metronidazole and R07-0582. *Radiat. Res.*, 64: 633—647, 1975
- 12) Berkson, J.: A statistically precise and relatively simple method of estimating the bioassay with quantal response, based on the logistic function. *J. Amer. Statistical Association*, 48: 565—599, 1953
- 13) 阿部光幸, 陶山純夫, 西台武弘, 小野公二, 石井 靖, 鳥塚莞爾, 浜本 研: 術中照射における腫瘍容積と1回線量に関する基礎的研究. *癌の臨床*, 22: 194—198, 1976
- 14) Howes, A.E.: An estimation of changes in the proportions and absolute numbers of hypoxic cells after irradiation of transplanted C3H mouse mammary tumors. *Brit. J. Radiol.*, 42: 441—447, 1969
- 15) Thrall, D.E., Gillette, E.L. and Dewey, W.C. Effect of heat and ionizing radiation on normal and neoplastic tissue of the C3H mouse. *Radiat. Res.*, 63: 363—377, 1975
- 16) 渡辺郁雄, 寺島東洋三: 化学療法と放射線の併用, その生物学的基礎. *癌・放射線療法, 癌の臨床編*, 篠原出版, pp. 35—40, 1978
- 17) Suit, H. and Maeda, M.: Oxygen effect factor and tumor volume in the C3H mouse mammary carcinoma. *Amer. J. Roentgen.*, 96: 177—182, 1966
- 18) Denekamp, J. and Harris, S.R. Tests of two electron-affinic radiosensitizers in vivo using regrowth of an experimental carcinoma. *Radiat. Res.*, 61: 191—203, 1975
- 19) Dugle, D.L., Chapman, J.D., Gillespie, C.J., Borsa, J., Webb, R.G., Meeker, B.E. and Reuvers, A.P.: Radiation-induced strand breakage in mammalian cell DNA, I enhancement of single-strand breaks by chemical radiosensitizer. *Int. J. Radiat. Biol.*, 22: 545—555, 1972
- 20) Ben-Hur, E., Elkind, M.M. and Bronk, B.U.: Thermally enhanced radioresponse of cultured chinese hamster cell: Inhibition of repair of sublethal damage and enhancement of lethal damage. *Radiat. Res.*, 58: 38—52, 1974