The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	マウス睾丸に対するHyperthermia, YM-08310, およびMisonidazoleと放射線併用効果について 相対的睾丸重量比を指標とした併用効果の検討
Author(s)	中野, 泰彦
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1985, 45(8), p. 1152-1166
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19874
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

日本医放会誌：45（8），1152—1166，1985（昭60）

マウス睾丸に対するHyperthermia, YM-08310, および Misonidazoleと放射線併用効果について

相対的睾丸重量比を指標とした併用効果の検討

京都府立医科大学放射線医学教室（主任：村上晃一教授）
中　野　泰　彦

（昭和60年4月8日受付）
（昭和60年5月21日最終原稿受付）

Effect of Combined Radiotherapy, Hyperthermia, Radioprotective Agent and Hypoxic Cell Sensitizer on Mice testes

Yasuhiko Nakano
Department of Radiology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Research Code No. : *403.4*

Key Words : *Hyperthermia, Relative testie weights, YM-08310, Misonidazole, Radiotherapy*

The response of mice testes were evaluated to hyperthermia, radiotherapy, radioprotective agent (YM-08310, S-2-{3-aminopropylamino} ethyl phosphorothioic acid monohydrate) (=WR-2721) and hypoxic cell sensitizer (Misonidazole, 1-{2-nitroimidazole-1-yl}-3-methoxy-2-propanol).

ICR male mice were used for the experiment and application of hyperthermia was executed by immersing pelvis, testes and legs of mice in a thermostatically controlled water bath. Irradiation was carried out using Toshiba KXC-18 type X-ray therapy machine operated at 180 kVp and 25 mA with filter of 2.0 mm Al. Mice were killed 30 days after treatment and their testes weights were measured.

The testis weights obtained after hypertheramia alone were compared with that of the control and the relative testis weight ratios were calculated. The testis weights of mice treated for 5, 10, 20 and 40 min. in 40°C water and for 5 and 10 min. in 43°C water were not significantly different from the control. Their weights were reduced when treated for 20 min. in 43°C water and for 5 min. in 46°C water and their testis weight ratios were 0.81 and 0.46, respectively.

The testis weights of irradiated mice decreased to about 45% of the control at 250 rad. Beyond this dose, reduction of their weights was slowed down and testis weight at 1,000 rad was 28%.

There was not significantly difference between the relative testis weight ratios of the irradiation alone and that of the radiotherapy combined with YM-08310. But when hyperthermia was added to their treatment, the effectiveness of the YM-08310 was slightly increased. The relative testis weight ratio on 400 rad X-ray combined with YM-08310 was 0.32 of the control, while its ratio on the radiotherapy and YM-08310 combined with the hyperthermia (43°C, 10 min.) was 0.43. ($p<0.01$)

The misonidazole treatments at the radiation dose of 50, 100 and 200 were found to be effective. Radiation alone gave the relative testis weight ratios of 0.78, 0.71 and 0.49, respectively. In contrast, its ratios on the irradiation combined with the misonidazole were 0.57 ($p<0.01$), 0.46 ($p<0.01$) and 0.41 ($p<0.001$). But, the additional hyperthermia combined with their treatment was found to be ineffective.

I. はじめに

癌の放射線治療に際しては腫瘍細胞を不活性化させ，そしてなお正常組織に対する障害を最小限に保ちTherapeutic Gainを得る事が最も重要な事である．

ここ数年来，癌の放射線治療の補助手段として加温療法が注目されてきたが，その基礎研究はまだ充分といい難い．しかし，正常組織に対する加温と放射線との併用による効果については，いくつかの研究が報告されている．すなわちCrile[1]，Thrall[2]，Robinson[3]，Urano[4]およびLaw[5)~7)]らをはじめとし多くの人達[8)~10)]はマウス足部や耳介の皮膚障害が放射線単独に比べて加温を併用することによって増強することを示し，加温の放射線増感効果を報告している．さらにField[11)]らはマウス，ラットを用いて耳介の反応，尾部脊椎の発育抑制，そして腸に対する効果を検討している．睾丸の加温単独による障害については，過去ラット，モルモットを用いて行なわれておりその効果が示されている[12)~16)]．又，一方，加温とX線照射とを併用すればその障害が増大することも報告されている[17)]．

他方，腫瘍に対する加温と放射線との併用に関しては，腫瘍に含まれるhypoxic fractionが加温に対してsensitiveであるという事から数多くの研究が行われており，多くの場合は加温が放射線効果をenhanceしていることが報告されている[1)~3)8)~10)18)19)]．

加温処理による生物学的効果の発現は加温量すなわち，加温温度と加温時間に関係する[20)21)]．しかも，温度と細胞生存率曲線の関係から43℃にcritical pointを持ち，この点を境として傾斜が異なるいわゆるArrhenius plot（アレニアス・プロット）が存在する．すなわち，縦軸に$1/D_0$（D_0：ある温度で細胞の生存率を37%に減少するに必要なその温度処理時間）を，横軸に1/T（T：絶対温度）をとりプロットすると43℃の温度でその傾斜が異なる．このことは細胞死のターゲットが43℃以上と以下とで異なることを意味している．

現在までの研究の多くは加温温度を高くしたり，その処理時間を長くすることによって行われているために，腫瘍細胞の不活性化と共に正常組織に対する効果も増加しTherapeutic Gain Factor（腫瘍の生物学的効果比/正常組織の生物学的効果比）が多く得られていない．そして尚，加温処理時間の増加と共に細胞，組織の耐性が生じることも多く発表されている[21)~24)]．

加温のcritical pointである43℃の温度で加温時間を短かくした，すなわち加温量を減らした放射線との併用でその増感効果が腫瘍に対して得られていることから[18)19)]加温によって正常組織に対する効果（障害）を減少させることが可能であるか，また放射線に対するradioprotectorであるYM-08310の使用により正常組織の防護が可能であるか否かについて検討した．またhypoxic cellに特異的に作用するradiosensitizerであるMisonidazoleの併用効果についても併わせて検討した．

正常組織としてマウス睾丸を使用したが，睾丸は放射線感受性が高く，その重量の減少と放射線吸収線量との間に密接な相関関係があることが知られている．すなわち200～300radまでの線量域ではマウス睾丸重量の減少する割合は急峻であり，それ以上の線量ではその減少する割合はゆるやかになるという二相性の減少曲線が描かれる．従ってその重量を測定することにより障害の程度を客観的に評価できると考えられる．今回の実験では効果の指標としては対象群に対する重量比を用い，放射線，加温および化学薬剤，三者併用による効果について検討したのでその結果を報告する．

II. 実験材料および実験方法

(1) 実験動物

実験に用いた動物は全て実験時8週齢のSIC：ICR雄マウスである．動物は船橋農場より6週齢で購入し，空調化された実験動物室で2週間飼育してから実験に使用した．飼育中および実験中は固形飼料と水道水とを自由に与えた．一回の実験には100から150匹を用い，使用動物の総数は約900匹である．

(2) 加温方法

加温にはwater bathを用いた．必要温度に制御した温湯中にマウス骨盤部，睾丸および下肢を

浸漬した．実験中の water bath 内の温度差は目的の温度±0.2℃であった．

動物を浸漬するために麻酔されたマウスの四肢をセロテープでアクリル固定板に固定し所定の温度に所定の時間浸漬した．加温装置はマウスが9匹同時に行えるように設計した．

(3) 睾丸内温度測定

まず，マウス睾丸の中心部の温度測定の実験を行い，目的温度到達までの時間及びその後の温度変化を検討した．この実験結果をもとに以後の各実験を行なった．温度測定には東芝製サーミスター温度計（MGA・II・III 型）を用いた．あらかじめ麻酔したマウスを浸漬板に固定し，測定針を睾丸中心に刺し，その直後所定の温度に温められている water bath 内に浸漬し，浸漬後の温度，時間を計測した．

(4) X 線照射

X 線照射には，東芝製 KXC-18型深部治療装置を用いた．X 線照射条件は180kVp，25mA，2.0 mmAl フィルター，半価層8mmAl で743.9rad/min. の線量率で照射した．焦点動物間距離は19 cm である．動物の X 線照射に際しては照射用の板に麻酔したマウスを固定し睾丸のみを露出し，他の部位は2mm 厚さの鉛板で shield して行なった．

加温との併用の際にはまず X 線照射を行ないその終了 2 ～ 5 分後に加温を行なった．

(5) 薬剤

実験に用いた薬剤は放射線防護剤の YM-08310（＝WR-02721，以下 YM と略す）（S-2-〔3-aminopropylamino〕ethylphosphorothioic acid monohydrate）と低酸素圧細胞放射線増感剤の Misonidazole（1-〔2-nitroimidazole-1-yl〕-3-methoxy-2-propanol）の 2 種類である．YM は山ノ内製薬より供給を受けた．この薬剤(powder)を生理食塩水で所定の濃度に溶解し，X線照射30分前にマウス腹腔内に投与した．用いた薬量は0.25mg/マウス体重 1 グラムになるように作製した．田中らの実験では，YM はマウスに対して2～300mg/kg の間で投与量が増す程600～1,200rad 全身照射時の死亡率が減少しており，その防護効果が上昇している[45]．今回の薬量（250mg/kg）で睾丸に対してその効果がみられるかどうかを検討した．Misonidazole はロッシュ社より供給され，1.0 mg/マウス体重 1 グラムに作製し，同様に X 線照射30分前にマウス腹腔内に投与した．この薬量およびその1/2の薬量で実験腫瘍に対して田中[51]や山下[18]らはすでにその効果があることを報告している．今回の薬量で正常マウス睾丸に対してその効果がみられるかどうかを検討した．

(6) 麻酔

実験にあたっては，動物の固定を容易にするためにすべてネンブタールによる麻酔を行った．ネンブタールは0.1mg/マウス体重 1 グラムの割合で腹腔内に投与した．

(7) 実験方法

加温単独を含めて以下の実験を行った．

(a) 加温単独による効果

(b) X 線照射単独および加温と放射線との併用による効果

(c) X 線照射，加温および放射線防護剤（YM）との三者併用効果

(d) X 線照射，加温および低酸素圧細胞放射線増感剤（Misonidazole）との三者併用効果

なお，加温は43℃で10分間または46℃で 5 分間行ない，X 線照射線量は50，100，200，400，800，1,200rad である．

(8) 実験分析法

マウス睾丸の重量比を指標とした．睾丸の重量測定は実験開始後30日目に摘出のうえ行ない，非処理の対照群の睾丸重量を1.0として各実験群の重量比を算出した．なお，マウスは cervical dislocation にて殺し，睾丸は wet weight を上血天秤で測定した．

組織学的には各実験群のうち，いくつかの groups について実験後30日目の睾丸を control 群のそれと対比して若干の検討をくわえた．組織作製は通常の H.E. 染色法によった．

III. 実験結果

まず所定温度に到達する必要な時間を hot water bath 内に浸した睾丸中心部で測定した．Fig. 1は睾丸内中心温度変化を示している．横軸

に秒で示した時間，縦軸に温度を示している．hot water bath 内温度を43℃にセットした時，睾丸内温度が43℃に上昇するまでの時間はすべてのマウスで2分以内であり，以後温度変化は認められなかった．同様に Fig. 2で示されているように46℃においても2分以内に目的の温度に到達した．図に示されていないが40℃でも同様であった．

以下で示す実験での加温時間は hot water bath

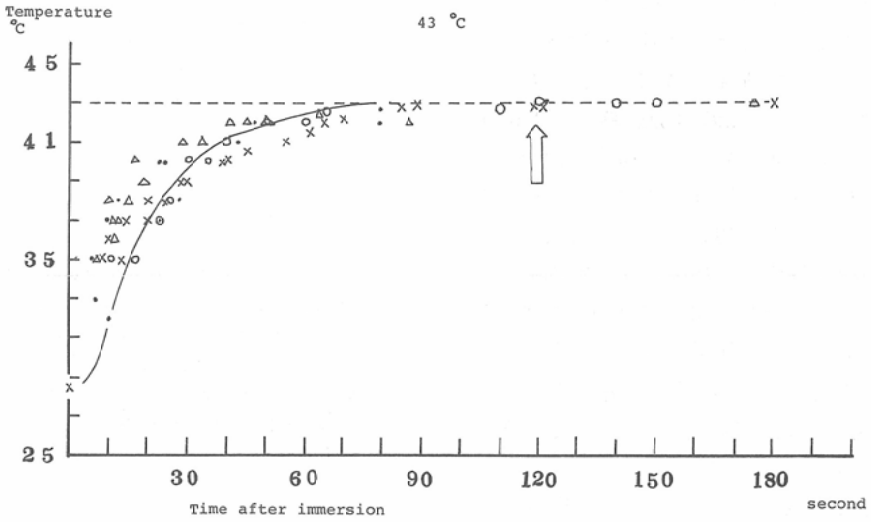

Fig. 1　The temperature of the center of the mice testes when heating treatment is 43℃.
The vertical axis shows the temperature measured (℃).
The transverse axis shows the time, where time zero means the starting point of heating.
The temperature of the center of the testis is elevated to 43℃ within 2 minutes.

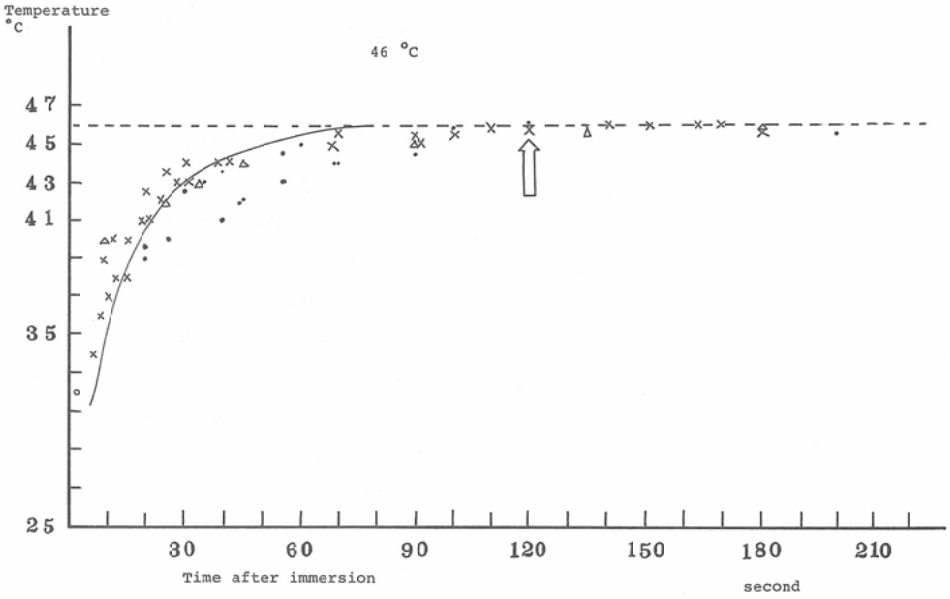

Fig. 2　Similarly, the temperature of the center of the testis is elevated to 46℃ within 2 min. when heating treatment is 46℃

に浸して2分後から測定した．

(a) 用いた温度は40℃，43℃および46℃であり，処理時間は40℃で5分，10分，20分，40分間，43℃で5分，10分，20分間，46℃で5分間である．43℃で40分間および46℃で10分間以上の処理ではマウスはすべて死亡したための実験の対象とはなりえなかった．Fig. 3は横軸に温度，縦軸に非加温群の睾丸重量を1.0とした時の加温群の相対的重量比を示している．40℃で5分，10分，20分，40分間および43℃で5分，10分間の加温では重量の減少は認められないが，43℃より高温または43℃でも処理時間を延長すると加温単独でも効果が認められた．すなわち43℃で20分間の効温では0.81となり，46℃で5分間の加温では0.46となった．

これらの結果と山下，岡部の腫瘍に対する結果[18)19)]から今回は43℃で10分間および46℃で5分間の2つの加温群で実験した．

(b) Fig. 4はX線照射単独の場合の睾丸重量比とX線照射と放射線防護剤YMとの併用の場合の睾丸重量比をSemi-logスケールで示したものである．横軸にX線線量を，縦軸に睾丸重量比の対数を示している．200～300radまでは急峻に減少し，その後ゆるやかな勾配を有する二相性の曲線が得られている．相対的睾丸重量比はX線照射単独では400radで約39%，1,000radで約28%であるのに対し，X線照射とYMとの併用では各々約45%，31%であった．この両者の間には統計学的には有意な差は認められなかった．

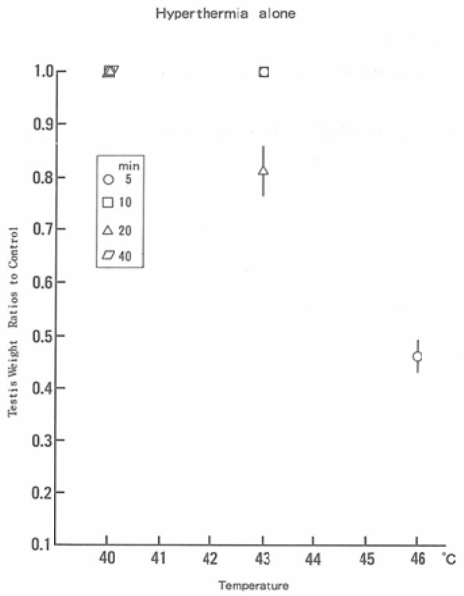

Fig. 3　The relative testis weight ratios in hyperthermia-treated mice. The vertical axis shows the relative testcs weight ratios. The transverse axis shows the temperature.
The testis weights are reduced when treated for 20min. in 43℃ water and for 5 min. in 46℃ water. Their testis weight ratios are 0.81 and 0.46, respectively.

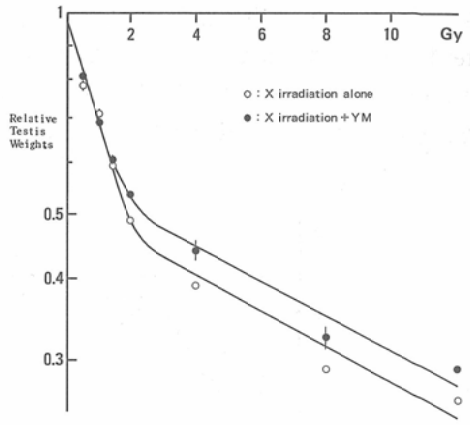

Fig. 4　The relative testis weight ratios in X-irradiation-treated mice and mice treated with both X-irradiation and YM-08310.
There is not significantly difference between the relative testis weight ratios of the irradiation alone and that of the radiotherapy combined with YM-08310.

(c) 次にX線照射単独およびX線照射とYMとの併用に，43℃で10分間の加温を加えた時の結果をFig. 5に示した．同様に二相性の曲線が得られており，傾斜のゆるやかな部分の一部でYM附加による放射線防護効果が認められた．すなわち，400radの照射でX線と43℃で10分間の加温との併用では相対的睾丸重量比は0.32，これに対しYMを附加すると0.43であった($p<0.01$)そのほかの照射線量領域では有意な差はみられなかった．

Fig. 4とFig. 5の結果を1つのグラフにしたものがFig. 6である．X線照射単独とX線照射と加温との併用の間にはその効果に統計学的に有意差

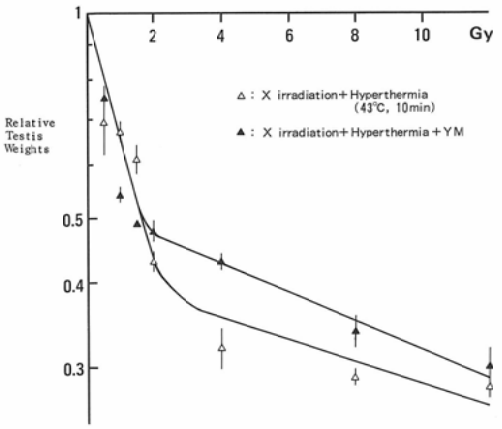

Fig. 5 The relative testis weight ratios in mice treated with both X-irradiation and hyperthermia (43℃, 10 min.) and mice treated with both X-irradiation and hypertermia combined with YM-08310.
The effectiveness of the YM-08310 is shown at 400 rad.

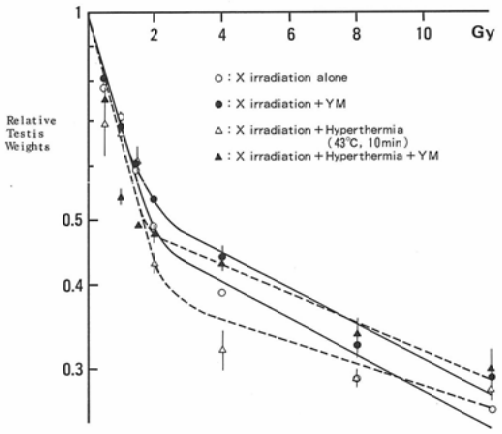

Fig. 6 This figure is shown the consequencens of the Fig. 4 and 5 in the lump.
There is not significantly difference between the relatdve testes weights ratios of the irradiation alone and that of the radiotherapy combined with hyper thermia (43℃, 10 min.).

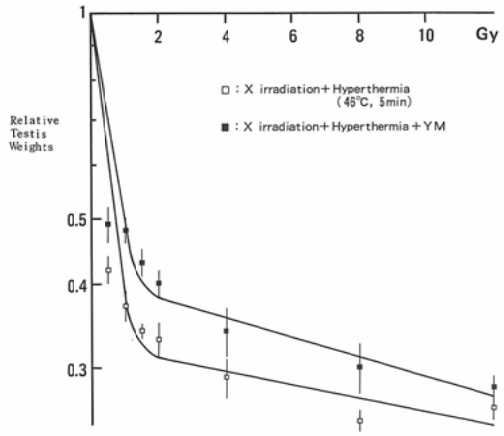

Fig. 7 The relative testis weight ratios in mice treated with both X-irradiation and hyperthermia (46℃, 5 min.) and mice treated with both X-irradiation and hyperthermia combined with YM-08310.
The effectiveness of the YM-08310 is shown at 50, 100, 150 and 200rad.

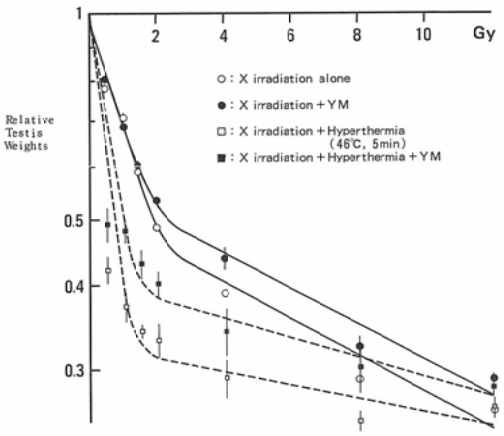

Fig. 8 This figure is shown the consequences of the Fig. 4 and 7 in the lump.
The effectiveness of the X-irradiation combined with the hyperthermia (46℃, 5 min.) is shown at 50, 100, 150, 200 and 400rad.

差は認められなかった．

X線照射単独およびX線照射とYMとの併用に46℃で5分間の加温を加えた時の結果をFig. 7に示した．同様に二相性の曲線が得られ，YM附加による効果が認められた．しかし，この効果は50～200radの低線量域においてのみ認められ，400rad以上のより高線量域では有意な差としてはあらわれなかった．

Fig. 4とFig. 7の結果を一つのグラフに示したものがFig. 8である．400radと46℃で5分間の加温との併用では相対的睾丸重量比上ほぼ1,000rad単独の場合と同程度の障害が認められる．

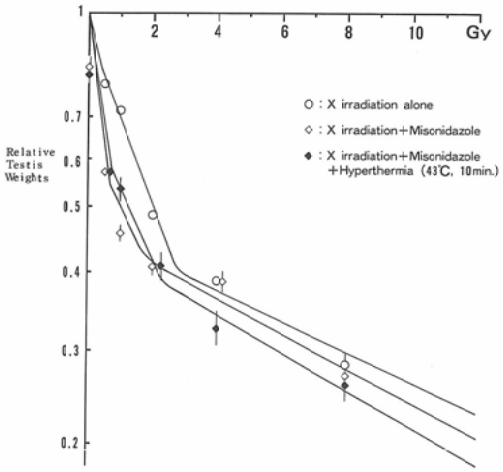

Fig. 9 The relative testis weight ratios in X-irradiation-treated mice, mice treated with both X-irradiation and misonidazole and mice treated with both X-irradiation and misonidazole combined with the hyperthermia (43℃, 10 min.). The effectiveness of the X-irradiation combined with the misonidazole is shown at 50, 100 and 200 rad.

50～400radのX線線量域で46℃で5分間の加温との併用効果が有意に認められたが，800rad以上の線量域ではその差がみられなかった．いずれにしてもX線線量が増加するほど相対的睾丸重量比は一点に収束する傾向を示し，YM附加や加温との併用効果はみられなくなる傾向が認められた．

(d) 低酸素圧細胞増感剤であるMisonidazoleを用いた実験結果をFig. 9に示した．これまでの結果と同様に二相性の曲線が得られ300rad附近でその勾配がゆるやかになっている．Misonidazoleを併用することによってX線照射単独より300rad以下の低線量域で睾丸重量比の勾配はより急峻となっている．X線照射単独では50rad, 100radおよび200radでの相対的睾丸重量比は各々0.78, 0.71および0.49であるのに対しMisonidazoleとの併用では各々0.57 ($p<0.01$), 0.46 ($p<0.001$) および0.41 ($p<0.001$) とその効果が認められた．しかし，X線照射とMisonidazoleとの併用に加温を加えても少くともこの急峻な勾配領域では加温による効果の増強は認められなかった．

病理組織学的には量的な分析はできなかったが一般的傾向はある程度判定可能であった．すなわち睾丸重量比の減少は曲精細管内のspermatogenic elementsの減少に極めて密接な相関をもっているということである．一方間質組織の増加は睾丸の障害すなわち睾丸重量の減少に応じてみられるようであるが，spermatogenic elementsの減少に対して，量的にうめあわせるほどではなかった．Sertoli cellも障害が強いほど増加する傾向が認められた．Fig. 10は正常睾丸の組織像である．Fig. 11は43℃で10分間加温した場合の組織像である．tubules内は明らかな障害はうけていな

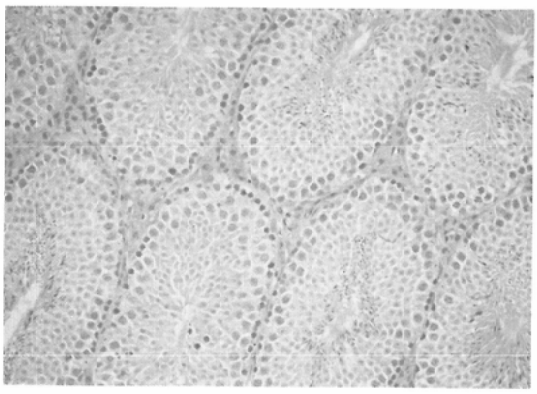

Fig. 10 Histological section of control mice testes (×50).

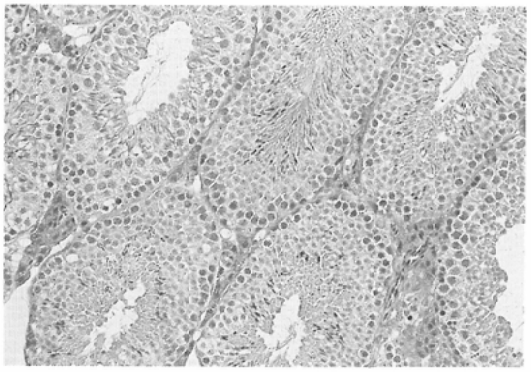

Fig. 11 Histological section of mice testes, 30 days after treatment with water 43℃ for 10 minutes (×50).
Notice no damage of spermatogenesis in all tubules.

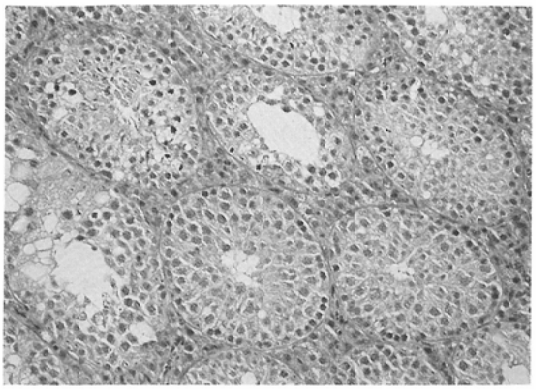

Fig. 12　Histological section of mice testes, 30days after treatment with X-irradiation at 200rad (×50).
The diameters of tubules appeare to be less.
Notice the occurrence of normal spermatogenesis in some tubules and incomplete spermatogenesis in others.

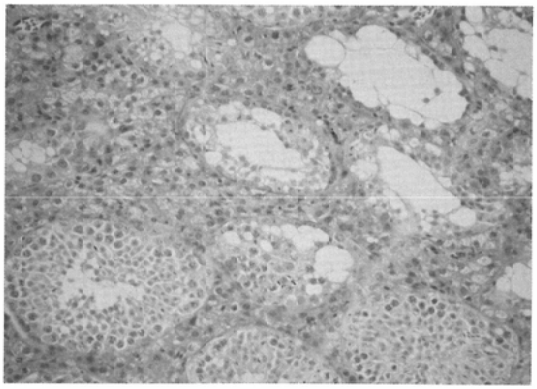

Fig. 13　Histological section of mice testes, 30 days after treatment with water 46℃ for 5 minutes (×50).
Notice the reduction of spermatogenesis and the increase of interstitial tissue.

い．Fig. 12は200rad 照射の際の組織像である．tubules 内の spermatogenic elements に障害がみられ個々の tubules の大きさの縮小も認められる．Fig. 13は46℃で5分間加温した場合で200rad 照射の場合より明らかに tubules 内の障害が高度になっている．間質組織も増加の傾向がみられる．Fig. 14は400rad 照射の場合で tubules 内の障害はさらに著明となっている．Sertori cell は増加の

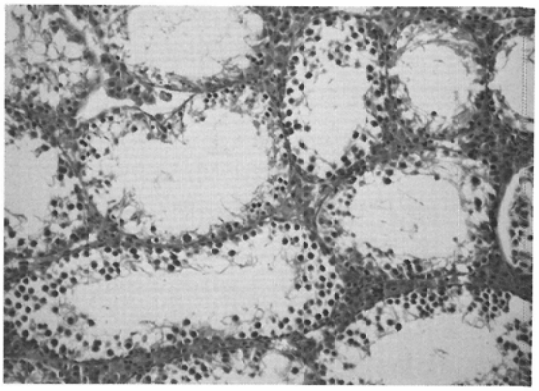

Fig. 14　Histological section of mice testes, 30 days after treatment with X-irradiation at 400rad (×50).
Notice the abscence of complete spermatogenesis.

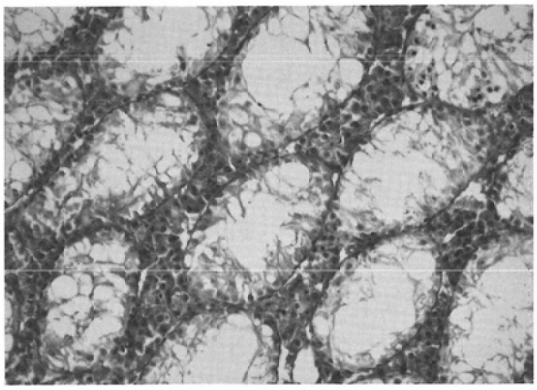

Fig. 15　Histological section of mice testes, 30 days after treatment with X-irradiation at 800 rad (×50). Notice the scarcity of spermatogenic elements and the increase of Sertoli cells.

傾向が認められる．さらに Fig. 15の800rad 照射では tubules 内の障害は極めて強く spermatogenic elements はほぼ消失している．一方，Sertoli cell はより増加している．間質組織も増加してみられる．

IV. 考　　察

加温について

加温と放射線との併用が臨床的に使用されるには，基礎実験において種々の正常組織に対して種々の角度で多くの検討がなされなければならない．

加温により細胞が死ぬことはすでに明らかな事実である．加温に対する細胞の生存曲線はX線に対して得られるものと全く同様な肩をもった指数関数を示す曲線となる．異なる点は横軸がX線の吸収線量でなく加温の処理時間だということのみである．ある一定温度で処理時間を長くすると細胞の生存率は減少し，その温度を上げることでこの生存曲線の傾斜はより急峻となる[20)21)]．しかもこの性質は43℃にcritical pointを持ち細胞の生存曲線の傾斜が変わり細胞致死に対する標的がこの温度を境として異なることが知られている[21)22)25)]．その標的としては細胞膜構成成分あるいは染色体構成蛋白などが考えられているが未だ統一された説明はなされていない．

哺乳動物の陰嚢内睾丸の温度は体温より数度低い．したがって，潜伏睾丸は通常の睾丸温度より，より高い腹腔内温度に保たれることになる．このことが潜伏睾丸の精上皮の障害に密接に関係していると考えられている．一方，実験的にもラットやモルモットの睾丸を加温することによって，その障害が生じることが過去いくつかの報告によって立証されている[12)~17)]．Fahimらはhot water bath. 赤外線，microwave, ultrasoundを用いたラットの睾丸に対する加温の結果spermatogenesisに障害が生じることを報告している[14)]．又，加温法によりその影響に相違があり，ultrasoundがもっとも効果的であったと述べている．A. Dumontierはultrasoundを用いた加温のラットの睾丸に対する影響について次のように報告している[12)]．1 watt/cm²の10分間の加温で睾丸内温度は39±0.1℃となり48時間後の組織学的検討でspermatids, spermatocyteの細胞膜に高度な変形がみられ，又精細管のほぼ35%にはspermatid, spermatocyteが認められなかった．一方，spermatogonia, Sertoli cell, Leyding cellには異常はみられなかった．この睾丸に対する障害は細胞膜の透過性変化にあるとしている．イオンの細胞膜通過に選択性が失なわれ，そのためイオンのバランスがくずれspermatogenic processを障害すると考えている．

今回のマウスを用いた実験では相対的睾丸重量比の減少は40℃で40分間までの加温および43℃で10分間の加温では認められないが43℃で20分間の加温で重量比は0.81，一方，46℃でわずか5分間の加温にもかかわらず0.46と著明な減少が認められた．正常睾丸の障害は加温の温度および処理時間に密接に関係していることがわかる．

正常組織の加温に対する反応は一般にマウス足部や時には耳介をhot water bathに浸すことによって得られている[1)~11)]．一般に43℃で60分間の加温ではマウス正常皮膚には目にみえる反応は認められない．このことは皮膚と比較し睾丸が加温に対してsensitiveであることを示している．その理由は睾丸が皮膚と比較して分裂の盛んな組織であり，加温にsensitiveなDNA合成期後半のS期細胞[20)26)]が多いためと推察される．また睾丸は低酸素細胞を含んでいるとの報告があり[27)]この低酸素細胞が加温にsensitiveであるということもすでに知られている事実である[28)~30)]．従ってこのことも一因となっていると考えられる．一方，正常皮膚も加温処理時間が延長したり温度がより高くなるにつれ皮膚障害反応が高度になっていく[1)3)5)~8)10)11)]．正常皮膚反応はスコア法により評価されている．すなわちUranoらのマウス肢足部を用いた正常組織の反応の検討では加温により生ずる皮膚障害の程度を正常の0から足首までの足部の完全消失を6とした0.5きざみのスコアで示している[4)]．加温にはhot water bathを使用し温度は43.5℃±1に保たせている．スコア法による平均皮膚障害は加温時間の延長とともに増加している．一方，宮越らの実験では44℃では障害を示したが温度を42℃に保ち加温時間を120分まで延長してもほとんど皮膚障害は認められていない[8)]．先に述べたように43℃を境とした加温温度に原因があることを示唆しているものと考えられる．睾丸においても40℃で40分間の加温では睾丸重量の減少がみられないことは同じ理由であると思われる．

X線照射について

1906年にBergomie, Tribondeauがすでに示しているように[31)]動物組織の中で放射線感受性の高い睾丸を用いた放射線生物学の報告は数多くなさ

れている[32)~39)]．A.B. Eschenbrennerは1950年マウス全身照射の際の睾丸の放射線効果の組織学的分析を行なっている[33)]．すなわち放射線にもっとも感受性が高い細胞はspermatogoniaであり放射線による障害は致死的効果にあるのではなくspermatogoniaの分裂の阻害にある．又spermatogoniaの放射線感受性はみな一定であるのではなく異なる細胞群があり，放射線照射後にみられるspermatogenesisは放射線感受性の低いresting spermatogoniaから正常なspermatocyte, spermatid, spermatozoaへと分裂分化していく．すなわちspermatogoniaはいくつかの異なる集団からなり，それぞれ放射線感受性も異なる[36)~39)]．1,000rad以上の照射においても生き残る放射線抵抗性の強いspermatogoniaの存在が報告されている[37)39)]．

マウス睾丸重量が最も少なくなるのは放射線照射後4週間目であり[33)34)]400radの線量では12週間後に睾丸重量は照射前の重量まで回復していることが知られている[33)]．

睾丸重量減少が二相性の曲線としてみられることは1954年N.I. Kohnらによって検討されている[34)]．0～300radまでは線量が増加するに従って睾丸重量は急激に減少し，その後ゆるやかな勾配を有する減少曲線に移行することを報告している．すなわち睾丸を構成する細胞には放射線感受性の高いものと低いものとが含まれており，高いものは低いものに比較して25倍もの感受性の差を有していると述べている．同様な二相性の睾丸重量減少曲線は今回の実験でも認められており加温，放射線防護剤および低酸素圧細胞増感剤との併用においてもそのpatternは同じであった．

この二相性のpatternに関係するものとしてtubules内のspermatogenic elementsおよび間質組織の放射線感受性の相違がまず考えられる．

放射線を照射された睾丸内間質組織についてA.B. Eschenbrennerらは照射後の睾丸内間質組織の増加はspermatogenic elementsと比較して相対的なものであり，絶対的なものではないと述べている[35)]．すなわち睾丸重量の減少はspermatogenic elementsの減少によるものであり照射後の間質組織の重量は照射されていない対照群の間質組織の重量とほぼ同じ程度であった．

今回の実験で800, 1,200radと放射線線量が増加すれば相対的睾丸重量比は，ほぼ0.2～0.3領域に収束するようになる．この重量比は睾丸の間質組織の重量を反映しているものと考えられる．このことは800rad照射したマウス睾丸の組織学的所見からも明らかである．個々の細胞の感受性の差については充分に解明されているとは言い難い．X線線量の増加とともにtubules内の障害は強くなり細胞の減少を生じる．すなわちspermatogoniaが最もsensitiveであり，以後の細胞の分裂分化が阻害され，spermatocyte以後の細胞の減少につながる．一方，spermatocyte以後の細胞にも線量の増加とともに障害が増大しtubules内の細胞減少の一因となることが考えられる．しかしX線照射後のtubules内のcell populationの回復はspermatogoniaから始まることも事実でありspermatogoniaにかなりの放射線抵抗性がある細胞群が存在することはすでに述べたとおりである．このことは相対的睾丸重量比の二相性のpattern特に勾配のゆるやかな300rad以上の照射領域に強く関連しているものと思われる．

加温とX線照射との併用について

先に述べたように細胞周期の中で加温にもっとも感受性がよい時期は電離放射線に対してもっとも抵抗性のあるDNA合成期すなわちS期である[20)26)]．一方，放射線に対して低感受性である低酸素圧細胞もまた加温には高感受性である[28)~30)]．したがってX線照射と併用することによりはるかに治療的効果が期待できる．実際に加温のみでは致死効果のない条件で放射線照射と併用すると増感作用がみられる．併用の際は加温の処理時間を延長したり温度を上げることにより増感作用も増加することが知られている[20)~22)25)26)40)]．この場合，43℃を境としてその増感作用が異なる[21)22)25)]．そして時間的には加温と放射線とを同時に併用する時が一番増感作用が大きい[40)41)]．

睾丸に対する併用療法の実験としてはR. Abadierのラットを用いた報告がある[17)]．加温に

はultrasound(1watt/cm², 5分間)とmicrowave(30watts, 5分間)が使用され，各々睾丸内温度は37.6±0.3℃，39.9±0.4℃であった．X線照射と同様にultrasound又はmicrowaveによる加温でspermatogenesisは減少し，X線照射後の加温でその障害は増大している．そしてultrasoundによって生じた温度はmicrowaveによって生じた温度より低いにもかかわらずX線照射と併用した時はより強い障害が生じultrasoundの加温以外の効果の問題が生じている．

J.E. Robinsonらはmouse skinに対する併用効果について次の様に述べている[3]．43℃で60分間の加温ではみるべき皮膚反応は生じなかったが放射線と併用することにより正常温度の37.5℃の場合より2倍の感受性増加がみられた．C_3Hmammary tumorでは4倍もの感受性増加があり好ましい治療効果比が得られている．Orergaardらの報告でも同様に加温処理がX線効果を増強し治療効果比が改善されている[10]．

Fieldらはmurineの3つの正常組織に対する放射線と加温との併用効果について報告している[11]．すなわち耳介の反応を調べることにより皮膚を，ラット尾部脊椎の発育抑制を調べることにより軟骨を，そして早期死を調べることで腸に対する障害を検討している．加温時間は60分であり，温度の上昇とともに熱増感比（一定レベルの生物学的障害を加温と併用あるいは単独に起こすに必要なX線線量の比）も増加し，障害の程度は温度に依存している．

実験動物の移植腫瘍についても加温と放射線との併用効果はほぼ一般的に認められている．すなわち腫瘍をコントロールするに必要なX線線量が加温により減少することが多くの研究者により報告されている．たとえばDenekampらは英国のGray研究所で所有している7種の移植腫瘍でそれぞれ熱増感比を算出している[9]が熱増感比はそれぞれ1.1から1.7の範囲であり，あきらかに腫瘍に対する併用効果が得られている．しかし同時に得られた正常皮膚の熱増感比は41.5℃で1.5，42.5℃で1.8であることからこの場合の治療効果比の改善は得られていない．

今回の実験では睾丸に対して放射線を43℃で10分間の加温との併用効果は有意な差として示されなかったが，46℃で5分間の加温とを併用することにより50～400radの領域でその効果が認められた．睾丸への併用効果は加温温度に影響を受けるものと考えられる．このことは43℃，10分間の加温で腫瘍に対する併用効果が認められるとすれば正常組織に対する併用効果が認められないことは治療上有利であることとなる．

放射線防護剤との併用について

Yuhasらが1969年マウス骨髄死を指標としてWR-2721（＝YM-08310)に放射線防護作用のあることを報告し[42]，臨床放射線治療に用いられることを示唆して以来，今日もっとも幅広く研究され効果的な放射線防護剤として注目を集めている．

正常組織ではYMの濃度分布の高いと考えられる骨髄，消化管，皮膚などがYMにより放射線から防護されることがすでに報告されている[42)~44]．一方，田中らはYMの正常組織内濃度分布について次のごとく検討を行なっている[45]．^{14}Cでラベルした YM, 100mg/kgを静脈内に1回投与した際，投与30分後の放射能濃度の高い組織を順にみると唾液腺，腎，肝，肺，小腸，脾，膵，心筋，骨，甲状腺，胃となり睾丸は唾液腺の約1/10と非常に低濃度分布であったと報告している．濃度分布のみからみれば睾丸に対する放射線防護効果は期待できない．YMは血液の多い周辺部にのみ多くの集積がみられ[45)46]，睾丸は血行に乏しいと考えられる．又spermatogoniaにはhypoxic cellsが含まれていることが知られている[27]．一方，A. Rrojasらによると Misonidazoleの radiosensitizationはYMと併用する時に減少するという結果からYMがhypoxic cellsの中に適当に浸透されうると述べている[47]．

今回の結果ではYM投与で相対的睾丸重量比上有意な効果は認められなかった．しかし一方，今回の実験に比べてYMの投与量が多いこと，組織学的定量的分析で検討していること，1,400radという高線量などの違いはあるがLuka MilasらはC_3Hf/kam miceの腹腔内にYMを400mg/kg投与し，15分後に1,400radの放射線照射を行なっ

た実験で睾丸に対して放射線防護効果のあったことを示している[44]．Dose Modyfying Factor は1.54であった．今後睾丸に対する放射線防護効果は睾丸内全体の濃度に関係しているのかどうか，すなわち YM の spermatogonia に対する濃度が問題であるのかなど細胞レベルでの YM 濃度分布の検討も必要かと考えられる．加温との併用時の方が YM の効果が若干みられた結果は加温による血流量の増加が一因となっている可能性がある．加温によるこの血流量の増加が腫瘍に比し正常組織により著明である時[48][49]，YM の濃度分布は正常組織により強まると考えられ加温と YM との併用は放射線療法に好ましい結果を生じるかもしれない．しかし一方，YM 投与と加温との時間的間隔，放射線照射の時期が今後の課題として残る．すなわち YM が腫瘍に対してより正常組織により多く集積するには YM 投与後どの程度の時間的間隔をおいて加温するのがよいのか，また同時に放射線照射をどの時期に行なうのがもっとも治療効果を上げるのか今後の問題となる．

低酸素圧細胞増感剤との併用について

低酸素圧細胞に対する放射線増感剤である Misonidazole はその致死作用が温度に強く依存していることが知られている．すなわちその毒性は温度を42～45℃に高めた時著しく増加する[50]．このことは Misonidazole が放射線増感剤として使用されるだけでなく，加温を併用することにより化学療法剤として用いられることを示唆している．実験動物腫瘍に対する Misonidazole の放射線増感効果については一般にその効果がみられる[51]．一方，正常組織に対する放射線増感効果についてはマウス大腿部を用いた報告があり，正常皮膚においては放射線単独と，放射線と Misonidazole との併用ではその障害に有意な差はなく放射線増感効果は認められていない[52]．

Misonidazole（0.5mg/g body weight）と加温（41.5℃，45分間）によるマウスを用いた併用療法で K.G. Kofer らは hypoxic BP-8 murine sarcoma cells に対する著明な放射線増感効果を報告している[53]．Dose Modyfying Factor は4.3である．一方，正常組織である皮膚，消化管および骨髄では各々その D.M.F は1.57, 1.0, 1.0であり，併用療法の放射線増感効果は比較的少ないか全くみられていない．山下らは C_3H マウス，FM3A 腫瘍に対して加温（43℃，10分間），X線照射そして Misonidazole（0.5mg/g body weight）を用いた実験を行ない，X線単独照射の TCD_{50} 値を1.0として比較すると加温とX線との併用で1.2三者併用で1.9の増感比が得られたと述べている[18]．N. Suzuki と H.B. Stone らはマウスの spermatogonia は Misonidazole によって放射線感受性が増強され酸素に飽和されていないことが推定されるという実験結果を報告している[27]．今回の実験でもわかるようにX線単独にくらべX線と Misonidazole との併用では50～200rad 領域ではその差が相対的睾丸重量比としてみられた．すなわち睾丸内に hypoxic cells の存在を示唆するものである．しかし，この併用群に加温（43℃，10分間）を加えてもその重量比にはあまり差がみられなかった．少くとも43℃で10分間の加温では睾丸内の hypoxic cells は Misoniazole により放射線感受性が増強されるが加温は影響しないことが明らかとなった．

V．まとめ

1．非加温群に比してマウス睾丸の重量は40℃で5分，10分，20分および40分間又，43℃で5分および10分間の加温単独では減少は認められなかった．

2．加温単独において非加温群を1.0とした時43℃で20分間の加温時のマウス睾丸重量比は0.81であり，46℃で5分間では0.46であった．

3．照射単独の場合，マウス睾丸重量比は200～300rad 迄は急激に減少し，それ以後ゆるやかな勾配を有する二相性の曲線が得られた．この二相性の pattern は加温，YM および Misonidazole との併用においても同様に示された．

4．マウス睾丸に対してX線照射単独にくらべX線照射と加温（46℃，5分）とを併用することによりその障害は増加した．しかし，43℃で10分間の加温では有意な併用効果はみられなかった．

5．X線照射に YM を併用してもマウス睾丸に対する放射線防護効果は認められないが，加温を

併用することによりその効果がみられた.

6. マウス睾丸に対してX線照射にMisonidazoleを併用することにより50～200rad領域で相対的睾丸重量減少曲線はX線単独にくらべその勾配が急峻となり効果がみられた. しかし, これに加温を併用しても少くともこの領域ではその効果は認められなかった.

稿を終えるに当たり御指導御校閲を賜わりました恩師村上晃一教授に深甚かる謝意を捧げます. また, 本研究に際し組織学的検討の際に御助言御協力を頂いた本学第一病理学教室 芦原司教授に深甚なる謝意を捧げます. また絶えず御助言御協力を頂いた講師 田中紀元博士に感謝の意を表します.

この研究は文部省科学研究費がん特別研究, 小野山班の一部資金の援助によったことを付記する.

文 献

1) Crile, G. Jr.: The effects of heat and radiation on cancers implanted on the feet of mice. Cancer Res., 23: 372—380, 1963
2) Thrall, D.E., Grillette, E.L. and Dewey, W.C.: Effect of heat and ionizing radiation on normal and neoplastic tissue of the C_3H mouse. Radiation Res., 63: 363—377, 1975
3) Robinson, J.E., Wizenberg, M.J. and McCready, W.A.: Radiation and Hyperthermal Reseponse of normal tissue in situ. Radiology, 113: 195—198, 1974
4) Urano, M., Rice, L., Kahn, J. and Sedlacek, R. S.: Studies on fractionated hyperthermia in experimental animal systems I. The foot reaction after equal doses: Heat resistance and repopulation. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 6: 1519—1523, 1980
5) Law, M.P.: Some effect of fractionation on the response of the mouse ear to combined heat and X-rays. Radiation Res., 80: 360—368, 1979
6) Law, M.P., Ahier, R.G. and Field, S.B.: The response of the mouse ear to heat applied alone or combined with X-rays. Brit. J. Radiol., 51: 132—138, 1978
7) Law, M.P., Ahier, R.G. and Field, S.B.: The response of mouse skin to combined hyperthermia and X-rays. Int. J. Radiat. Biol., 32: 153—163, 1977
8) 宮越順一, 日置辰一郎, 古川雅代, 加納永一: Hyperthermiaの基礎とくにin vitroからin vivoへの接点. 癌の臨床, 27: 1424—1432, 1981
9) Denekamp, J., hill, S.A. and Stewart, F.A.: Combined heat and X-ray treatment of experimental tumors, Symposium on the current status of clinical hyperthermia, Detroit, June, 1980
10) Overgaard, J. and Suit, H.D.: Time-temperature relationship in hyperthermic treatment of malignant and normal tissue in vivo. Cancer Res., 39: 3248—3253, 1979
11) Field, S.B., Hume, S.P., Law, M.P. and Myers, R.: The response of tissues to combined hyperthermia and X-rays. Brit. J. Radiol., 50: 129—134, 1977
12) Dumontier, A., Burdick, A., Ewigman, B. and Fahim, M.S.: Effects of sonication on mature rat testes. Fertility and sterility, 28: 19—204, 1977
13) Fridd, C.W., Murphy, J., Linke, C.A. and Bonfiglio, T.A.: Response of rat testis to localized induced hyperthermia. Urology, 5: 76—86, 1975
14) Fahim, M.S., Fahim, Z., Der, R., Hall, D.G. and Harman, J.: Heat in male contraception (Hot water 60℃, infrared, microwave, and ultrasound) Contraception, 11: 549—562, 1975
15) Moore, C.R.: Properties of the gonads as controllers of somatic and psychical characteristics. Am. J. Anat., 34: 337—358, 1924
16) Young, W.C.: The influence of high temperature on the guinea-pig testis. J. Exp. Zool., 49: 459—499, 1927
17) Abadir, R., Harman, J. and Fahim, M.: Enhancement of ionizing radiation effect on the testes of rats by microwave or ultrasound-induced hyperthermia. J. Medicine, 10: 1—12, 1979
18) 山下正人: C_3H マウスFM3A腫瘍に対する放射線, ハイパーサーミアおよびミソニダゾールの併用効果. 日本医放会誌, 44: 1181—1188, 1984
19) 岡部春海, 田中紀元, 長谷川隆, 坂峡富夫, 村上晃一: C_3H マウス乳癌に対する放射線とHyperthermiaの併用効果. 昭和57年3月24日, 第41回日本医学放射線学会にて発表, Unpublished data
20) Westra, A. and Dewey, W.C.: Variation in sensitivity to heat shock during the cell-cycle of Chinese hamster cells in vitro. Int. J. Radiat. Biol., 19: 467—477, 1971
21) Dewey, W.C., Hopwood, L.E., Sapareto, S.A. and Gerweck, L.E.: Cellular responses to combinations of hyperthermia and radiation. Radiology 123: 463—474, 1977
22) Miyakoshi, J., Ikebuchi, M., Furukawa, M., yamagata, K., Sugahara, T. and Kano, E.: Combined effects of X-irradiation and hyper-

thermia (42 and 44℃) on Chinese hamster V-79 cells in vitro. Radiation Res., 79 : 77—88, 1979

23) Henle, K.J., Bitner, A.F. and Dethlefsen, L.A. : Induction of thermotolerance by multiple heat fractions in Chinese hamster ovary cells. Cancer Res., 39 : 2486—2491, 1979

24) Henle, K.J. and Leeper, D.B. : Interaction of hyperthermia and radiation in CHO cells : Recovery kinetics. Radiation Res., 66 : 505—518, 1976

25) Henle, K.J. and Leeper, D.B. : The modification of radiation damage in CHO cells by hyperthermia at 40 and 45℃. Radiation Res., 70 : 415—424, 1977

26) Sapareto, S.A., Hopwood, L.E. and Dewey, W. C. : Combined effects of X irradiation and hyperthermia on CHO cells for various temperatures and orders of application. Radiatio:n Res., 73 : 221—223, 1978

27) Suzuki, N., Stone, H.B., Meistrich, M.L., Munter, N.M. and Withres, H.R. : Radiosensitization of Spermatogenic stem cell by Ro-0582. Abstracts of papers for the twenty-fourth annual meeting of the radiation-research society. San Francisco, California 27 June-2 July, 1976

28) Kim, S.H., Kim, J.H. and Hahn, E.W. : The radiosensitization of hypoxic tumor cells by hyperthermia. Radiology, 114 : 727—728, 1975

29) Robinson, J.E., Wizenberg, M.J. and Mccready, W.A. : Combined hyperthermia and radiation suggest an alternative to heavy particle therapy for raduced oxygen enhancement ratios. Nature, 251 : 521—522, 1974

30) Gerweck, L.E., Gillette, E.L. and Dewey, W.C. : Killing of Chinese hamster cells in vitro by heating under hypoxic or aerobic conditions. Europ. J. Cancer, 10 : 691—693, 1974

31) Bergonié, J. and Tribondeau, L. : Interpretation of some results of radiotherapy and an attempt at determining a logical technique of treatment. Radiation Res., 11 : 587—588, 1959

32) 岡村重昭，中村　寛，古貫　充：はつかねずみの睾丸重量を指標にしたCo-60γ線の等効果比及び等線量比．日本医放会誌，28：355—358，1968

33) Eschenbrenner, A.B. and Miller, E. : Effect of roentgen rays of the testis. Archives of Pathology, 50 : 736—749, 1950

34) Kohn, H.I. and Kallman, R.F. : Testes weight loss as a quantitative measure of X-ray injury in the mouse, hamster and rat. Brit. J. Radiol., 27 : 586—591, 1954

35) Eschenbrenner, A.B., Miller, E. and Lorenz, E. : Quantitative histologic analysis of the effect of chronic whole body irradiation with gamma rays on the spermatogenic elements and the interstitial tissue of the testes of mice. J. Nat. Cancer Inst., 9 : 133—147, 1948

36) Withers, H.R., Hunter, N., Barkley, H.T. Jr. and Reid, B.O. : Radiation survival and regeneration characteristics of spermatogenic stem cells of mouse testis. Radiation Res., 57 : 88—103, 1974

37) Clow, D.J. and Gillette, E.L. : Survival of type A. spermatogonia following X-irradiation. Radiation Res., 42 : 397—404, 1970

38) Searle, A.G., Evans, E.P., Ford, C.E. and West, B.J. : Studies on the induction of translocations in mouse spermatogonia 1. Tne effect of dose-rate. Mutation Res., 6 : 427—436, 1968

39) Oakberg, E.F. : A new concept of spermatogonial stem-cell renewal in the mouse and its relationship to genetic effects. Mutation Res., 11 : 1—7, 1971

40) Meyer, K.R., Hopwood, L.E. and Gillette, E.L. : The response of mouse adenocarcinoma cells to hyperthermia and irradiation. Radiation Res., 78 : 98—107, 1979

41) Field, S.B., Hume, S., Law, M.P., Morris, C. and Myers, R. : International symposium on radiological research needed for the impovement of radiotherapy, 22—26 November 1976, Vienna, Austria.

42) Yuhas, J.M. and Storer, J.B. : Differential chemoprotection of normal and malignant tissues. J. Nat. Cancer Inst., 42 : 331—335, 1969

43) Clement, J.J. and Johnson, R.K. : Influence of WR-2721 on the efficacy of radiotherapy and chemotherapy of murine tumors. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 8 : 539—542, 1982

44) Milas, L., Hunter, N. and Reid, B.O. : Protective effects of WR-2721 against radiation-induced injury of murine gut. testis, lung, and lung tumor nodules. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 8 : 535—538, 1982

45) 田中敬正，赤木　清，長谷川武夫，中沢　緑，播磨敬三，村田貴史，沢田　敏：YM-08310（＝WR-2721）の放射線防護効果に関する研究．その1．マウスの正常組織及び腫瘍に及ぼす防護効果について．日本医放会誌，43：700—709，1983

46) Utley, J.F., Marlowe, C. and Waddell, W.J. : Distribution of ^{35}S"Labeled WR-2721 in normal and malignant tissues of the mouse. Radiation Res., 68 : 284—291, 1976

47) Rojas, A., Stewart, F.A. and Denekamp, J.: Experimental radiotherapy with WR-2721 and misonidazole. Int. J. Radiation Oncology Biol. phys., 8: 527—530, 1982
48) Song, C.W., Kang, M.S., Rhee, J.G. and Levitt, S.H.: The effect of hyperthermia on vascular function, pH, and cell survival. Radiology, 137: 795—803, 1980
49) Streffer, C. by editor: Cancer therapy by hyperthermia and radiation pp. 90—91, 1978, Urban & Schwarzenberg. Baltimore-Munich
50) Hall, E.J., Astor, M., Ceard, C. and Biaglow, J.: Cytotoxicity of RO-07-0582: Enhancement by hyperthermia and protection by cysteamine. Br. J. Cancer, 35: 809—815, 1977
51) 田中綜元，坂崎富夫，長谷川隆，岡部春海，山下正人，村上晃一，竹内　博：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
52) 陶山純夫，西台武弘，数本栄三，高橋正治，岡部光幸：Ro-07-0582の放射線増感効果．癌の臨床，24：923—926，1978
53) Hofer, K.G., Mackinnon, A.R., Schubert, A.L., Lehr, J.E. and Grimmett, E.V.: Radiosensitizatiojn of tumors and normal tissues by combined treatment with misonidazole and heat. Radiology, 141: 801—809, 1981