マウス移植悪性腫瘍に対するイミダゾール化合物の
放射線増感作用について
——第3報：エールリッヒ癌に対する 5-methoxy carbonyl-2-methyl
sulfinyl-1-methylimidazole の放射線増感作用——

酒泉和夫・瀬沼 滋・佐藤 一人・永井哲夫*
藤野雅美*・高門 渡*

Experimental radiosensitizer therapy for malignant
tumor transplanted into mice
——(3) Radiosensitive effect of 5-methoxy carbonyl-2-methyl
sulfinyl-1-methylimidazole for Ehrlich solid carcinoma——

Kazuo SAKAIZUMI • Shigeru SENUMA • Kazuhito SATO
Tetsuo NAGAI* • Masami FUJINO* • Wataru TAKAKADO*

Abstract: We have already reported that the effectiveness of radiosensitization and nitro-group radiosensitizer misonidazole (MISO) and dinitroimidazole-ethanol (DNIE).

These radiosensitizers have some side effects on human and mice.

5-methoxy carbonyl-2-methyl sulfinyl-1-methyl imidazole (KIH-3) is a non nitro-group radiosensitizers of hypoxic tumor cells.

Then, the purpose of our studies to compare the sensitizers enhancement of MISO, DNIE and KIH-3.

On *in vitro*, KIH-3 had effected 5 times of MISO in V 79 cell culture, so we have examined to give 100/mouse but all mice died (nude 5, ddY 5, conv. 5).

The safe maximum dosage of KIH-3 was 40 mg/mouse.

Methods and evaluation: Battelle Columbus Laboratories Protocol.

Radiation: ^{60}Co 15 Gy local radiation. These radiosensitizers were administrated into the mice's abdomen prior to 30 minutes of local irradiation.

Tumor: Ehrlich solid carcinoma. On the first day of the experiment, 2~3 pieces of a 1~3 mm tumor block in Eagle's MEM medium were transplanted to subcutaneous of the right thigh of each mouse.

Animals: Male nude ICR mice, ddY mice and conventionl ICR mice (10 weeks, 20~25 g).

Results: On Ehrlich solid carcinoma of nude mice and conv. ICR mice, KIH-3+ ^{60}Co 15 Gy therapies were more effective than the control group, but the carcinoma increased on ddY mice.

There were no significant difference in the tumore growth of nude, ddY and conv. ICR mice between KIH-3 combination therapy group and ^{60}Co 15 Gy single dose therapy group.

Key words: non-nitro radiosensitizer, Ehrlich solid carcinoma, experimental radiotherapy

東海大学医学部口腔外科学教室

(指導：酒泉和夫教授)

* 慶応義塾大学医学部歯科口腔外科学教室

(主任：野本種邦教授)

Department of Oral Surgery, School of Medicine, Tokai University (Group chairperson: Prof.

Kazuo Sakaizumi)

* Department of Dentistry and Oral Surgery, School of Medicine, Keio University (Chief: Prof. Tanekuni Nomoto)

受付日：昭和60年10月22日

緒 言

5-methoxy carbonyl-2-sufinyl-1-methyl imidazole (KIH-3) は放射線増感作用を期待して分子設計されたイミダゾール化合物で、図 1 に示す分子式を有し無味・無臭の水によく溶解する白色粉末である。電子親和性は -1.41 で misonidazole (MISO) の -1.40 に類似している^{1,2)} 第 1, 2 報で述べたように MISO および di-nitroimidazole ethanol (DNIE) は NO_2 基をもつイミダゾール化合物で、DNIE はいまだ臨床応用の時期にいたっていないが、MISO では悪心・嘔吐・難聴等の副作用がみられ、その原因としてこの NO_2 基が推定された。本化合物は MISO・DNIE と類似する分子式であるが、 NO_2 基を有せず低い毒性・低副作用が期待されている。著者らは本剤をマウス移植 エールリッヒ 癌に使用し、Battelle Columbus Laboratories Protocol により実験治療を行いその効果を判定した。

実験方法

動 物：ddY マウス雄（日本クレア），通常 ICR マウス雄（日本チャールズリバー）

図 1 5-methoxy carbonyl-2-sufinyl-1-methylimidazole = KIH-3

ウス雄（日本チャールズリバー）ヌード CD-1・ICR マウス雄（日本チャールズリバー）でいずれも 8 週齢体重約 20 g で、1 群 4～5 匹として実験した。通常マウスは通常クリーン環境、ヌードマウスはビニールアイソレータ内で飼育した。

腫 瘍：あらかじめ上記の 3 種類のマウスに継代移植してあったエールリッヒ固型癌をクリーンベンチ内で徹底的に無菌的に摘出、MEM 培養液中で細切その 2～3 片をマウス右側大腿部皮下ヘトロカール針を用いて移植した。実験開始時の腫瘍の大きさはプロトコールにより短径²⁾×長径/2 の式で得られる 100～300 mg の範囲内とした³⁾。

薬剤投与：KIH-3 はマウス 1 匹当たり 40 mg/1 ml として腹腔内へ投与、30 分後に放射線照射した。

放射線照射：マウス右大腿部が中央に集まるように動物を放射状に糸にて板上に固定、 ^{60}Co γ 線 15 Gy を局所照射した。

実験結果

図 2 はヌード ICR マウス上のエールリッヒ癌に対する KIH-3 40 mg + ^{60}Co 15 Gy 併用治療群とその他の治療群の腫瘍増殖を画いたグラフで、実験開始時の腫瘍の大きさが相違するため治療効果以外の影響が表れて、スタート時に腫瘍大なるものは一見効果が低い印象経過となり、また腫瘍小なるものは一見効果が高いようにみえるが、11日目では ^{60}Co 15 Gy 群・DNIE 10 mg + ^{60}Co 15 Gy 群・MISO 20 mg + ^{60}Co 15 Gy 群の 3 群が同時にグラフ線の下降するのが観察され、軽度ながら増殖抑制を認めた。図 3 は図 2 を補正したグラフで、実験開始時の腫瘍を 100 mg と仮定し、おのおのの治療効果の差を明らかにする目的で画いた。

図 3 では実験全期間を通して増殖著明なコントロール群・ ^{60}Co 15 Gy 群・DNIE 2 mg + ^{60}Co 15 Gy 群の 3 群

図 2 エールリッヒ癌の増殖曲線（ヌード ICR マウス）

図 3 エールリッヒ癌の増殖曲線 (ノド²ICR マウス)

図 4 エールリッヒ癌の増殖曲線 (ddY マウス)

図 5 エールリッヒ癌の増殖曲線 (ddY マウス)

図 6 エールリッヒ癌の増殖曲線 (通常 ICR マウス)

図 7 エールリッヒ癌の増殖曲線 (通常 ICR マウス)

図 8 エールリッヒ癌の増殖曲線 (KIH-3 40 mg + ^{60}Co 15 Gy)

と、11日目頃より増殖に抑制が認められる DNIE 10 mg + ^{60}Co 15 Gy 群・MISO 20 mg + ^{60}Co 15 Gy 群・KIH 40 mg + ^{60}Co 15 Gy 群の3群とに二分化する傾向が認められた。特に KIH 併用群についてみると、初期では増殖抑制、中期には他の2群と混交、後期では増殖著明となった。図4は ddY マウス上のエールリッヒ癌に対する KIH-3 40 mg + ^{60}Co 15 Gy 併用治療群とその他の治療群の腫瘍増殖を画いたグラフで、一見して治療法別に散在しているのが特長である。実験開始時に最小であった ^{60}Co 15 Gy 群は増殖抑制が良好で、スタート直後に DNIE 10 mg + ^{60}Co 15 Gy 群を越えるが、長期間横ばい状態が持続し、25日目に 300 mg を超過した。下位二位の DNIE 10 mg + ^{60}Co 15 Gy 群はスタート時の重量がほとんど変化せずに経過し、18日目に軽度上昇したが再び下降して、35日目でも上昇傾向にはあるが 300 mg にいたらなかった。KIH 40 mg + ^{60}Co 15 Gy をみるとスタート時の腫瘍は6群中最大で、ほとんど増殖抑制効果は認められないように見える。 ^{60}Co 15 Gy 群と MISO 20 mg + ^{60}Co 15 Gy 群はグラフが接近して両者の抗腫瘍効果が不明となるため、図3の場合と同様に補正グラフ図5を画いた。図5の KIH-3 併用群は4日目ではコントロール群よりもやや増殖を抑制しているが、8日目以後はコントロール群よりも増殖が進んでいる。図6は通常 ICR マウス上のエールリッヒ癌に対する KIH-3 40 mg + ^{60}Co 15 Gy 群とその他の治療群の腫瘍増殖を画いたグラフで、実験開始時では比較的腫瘍の大きさに差がなかった。どの治療群も中等度の腫瘍増殖抑制効果を示し、図7をみても明らかなようにコントロール群と他の治療群とは著明に相違していることが認められた。図8は KIH-3 40 mg + ^{60}Co 15 Gy 併用治療を行った3種類のマウス上のエールリッヒ癌の増殖曲線で、どの群も腫瘍増殖抑制効果がほとんど認められない。まずヌードマウスについてみると、実験開始より8日目にはすでに 300 mg を超過、18日目では 1,000 mg 以上に増殖、図3を参照すればコントロール群に比較し腫瘍増殖抑制効果が認められるが、絶対的に観察すると抗腫瘍効果は弱いものと思われた。

ddY マウスにおける腫瘍はヌードマウスよりもさらに著明な増殖を示し、4日目に 300 mg を超過、11日目には 1,000 mg 以上となった。

図5を参照すればコントロール群よりも増殖が著明であった。通常 ICR マウスにおける腫瘍は3者のうちで最も抗腫瘍効果の認められるもので、一度増殖しかけた腫瘍が11日目では抑制されているのが分る。図7を参照するとコントロール群よりも抑制が著明で、MISO 20 mg + ^{60}Co 15 Gy 群とはほぼ同様の抗腫瘍効果が認められた。表1は治療効果の判定を示したもので、腫瘍増殖抑制効果の認められたものは(+)、腫瘍の縮小を認めたものは(++)で表した。3種類のマウスを通して(+)

表 1 結 果 (コントロールとの比較)

マウス	治 療 法	判 定
Nude ICR	^{60}Co 15 Gy	(-)
Nude ICR	MISO 20 mg + ^{60}Co 15 Gy	(+)
Nude ICR	DNIE 2 mg + ^{60}Co 15 Gy	(-)
Nude ICR	DNIE 10 mg + ^{60}Co 15 Gy	(+)
Nude ICR	KIH 40 mg + ^{60}Co 15 Gy	(+)
ddY	^{60}Co 15 Gy	(+)
ddY	MISO 20 mg + ^{60}Co 15 Gy	(+)
ddY	DNIE 2 mg + ^{60}Co 15 Gy	(-)
ddY	DNIE 10 mg + ^{60}Co 15 Gy	(++)
ddY	KIH 40 mg + ^{60}Co 15 Gy	(-)
Conv. ICR	^{60}Co 15 Gy	(-)
Conv. ICR	MISO 20 mg + ^{60}Co 15 Gy	(+)
Conv. ICR	DNIE 2 mg + ^{60}Co 15 Gy	(-)
Conv. ICR	DNIE 10 mg + ^{60}Co 15 Gy	(+)
Conv. ICR	KIH 40 mg + ^{60}Co 15 Gy	(+)

表 2 結 果 (^{60}Co 15 Gy との比較)

マウス	治 療 法	判 定
Nude ICR	MISO 20 mg + ^{60}Co 15 Gy	(-)
Nude ICR	DNIE 2 mg + ^{60}Co 15 Gy	(-)
Nude ICR	DNIE 10 mg + ^{60}Co 15 Gy	(-)
Nude ICR	KIH 40 mg + ^{60}Co 15 Gy	(-)
ddY	MISO 20 mg + ^{60}Co 15 Gy	(-)
ddY	DNIE 2 mg + ^{60}Co 15 Gy	(-)
ddY	DNIE 10 mg + ^{60}Co 15 Gy	(+)
ddY	KIH 40 mg + ^{60}Co 15 Gy	(-)
Conv. ICR	MISO 20 mg + ^{60}Co 15 Gy	(-)
Conv. ICR	DNIE 2 mg + ^{60}Co 15 Gy	(-)
Conv. ICR	DNIE 10 mg + ^{60}Co 15 Gy	(+)
Conv. ICR	KIH 40 mg + ^{60}Co 15 Gy	(-)

以上の効果を示したものは、MISO 20 mg + ^{60}Co 15 Gy と DNIE 10 mg + ^{60}Co 15 Gy の2群であった。KIH 40 mg + ^{60}Co 15 Gy が(+)を示したものは、ヌードマウスと通常 ICR マウス上の腫瘍であった。表2は放射線増感剤の増感効果を検索する目的で放射線単独照射と比較した治療効果の判定で、増感したと認められるものは全12群のうち ddY マウスと通常 ICR マウスにおける DNIE 10 mg + ^{60}Co 15 Gy のみであった。

考 察

KIH 系は NO₂ 基をもたないイミダゾール系増感剤

で、KIH-1 から始まり、分子設計により多数の誘導体が産生され、1985年8月現在 KIH-114 までが合成されている⁴⁾ このうちから、毒性が少なくヒトへの応用が可能と考えられるものを選択、*in vitro* ではチャイニーズハムスターV79細胞、*in vivo* では、ddY、通常 ICR、ヌード ICR マウスに移植された癌について有効性が検討されている。KIH-3 は *in vitro* において MISO の1/5の毒性といわれたが^{5,6)}、*in vivo* において MISO の5倍量を腹腔内投与(100 mg/マウス)したが、全例(ヌード ICR マウス5匹・ddY マウス5匹・通常 ICR マウス5匹)が死亡した。これら3種類のマウスに対する安全最大投与量を検討した結果 40 mg/マウスであった。この数値は 200 mg/kg とはなるが、われわれは現在まで実験動物はマウスのみに試みただけであり、サル・ヒトへの最適投与量は不明で、本剤が非ニトロ系であるところから、ニトロ系の MISO の副作用と異なることも十分考えられるため、perkilogram 表示をしないこととしたい。KIH-3 40 mg 単独投与では抗腫瘍効果は認められなかった。KIH-3 の増感効果発揮機序は現在まだ十分に解明されていないが、マウス腹腔内注射後30分～2時間までの腫瘍内濃度を高速液体クロマトグラフィーで測定したところ、KIH-3 の原型は認められなかった。

しかし図7でも観察される通り、抗腫瘍効果は MISO 20 mg および DNIE 10 mg 併用例とはほぼ同様に認められ、実験開始日より22日目まで腫瘍増殖を抑制しているのは、第2報の DNIE と同様恐らく代謝産物が体内に残留して、増感効果をあげているものと推定される。

マウス別に KIH-3 併用の治療効果をみると、ヌードマウス群および通常 ICR マウス群ではコントロール群よりも抗腫瘍効果を認めているが、ddY マウス上の腫瘍は抑制を示す、コントロール群の増殖曲線以上の発育が認められ、この増殖パターンを検索したところヌードマウス・コントロール群のグラフとほとんど同一の曲線であった。KIH-3 併用治療の各マウスの実験開始時腫瘍重量はヌードマウスが203.0 mg、ddY マウスが211.0 mg、通常 ICR マウスが186.7 mg とほぼ同様の重量で、特に ddY マウスのものが進行例ではなかったが、増感剤併用であるのにコントロール群を上回る増殖を認めた。この理由として橋ら⁷⁾が報告したように、効果は癌細胞の差よりもマウスの系統による差異が著明であること、さらに野本ら⁸⁾の説えるその実験系によく適合する実験動物の選択も必要となる。たとえば今回の実験では著明な増殖を示したが、DNIE を中心とした実験中、ddY 系上の腫瘍は5匹1群で平均重量142.5 mg で実験を開始、4日目105.6 mg、8日目81.7 mg、11日目53.2 mg、15日目43.4 mg、18日目30.9 mg、22日目21.6 mg、25日目7.1 mg、29日目0 mg と順次減少⁹⁾、29日目には5匹すべての腫瘍が肉眼的に消失しその後6か月間観察を

続けたが再発を認めず、実験を終了した。その後追試を繰り返したが腫瘍消失したものはなく、実験の平均値を第2報に報告した。これらの現象を解明するには、マウスのおののリンパ球活性を明らかにすることが必要で、この方面の今後の研究が期待される。ddY マウス上腫瘍の異常な増殖のもう1つの理由として、KIH-3 の与える副作用が問題となる。すなわち KIH-3 は ddY マウスの抗腫瘍機構を著しく障害したか、あるいは ddY マウスにおいては増感効果が現れにくいなどである。

前述した母里⁵⁾によればヒトにおいてもどんな免疫背景をもつ宿主に、どんな腫瘍が存在しているかが治療の際に大きな問題となる。また、MISO の臨床効果が悪いのは、再発例・進行例に使用したためではなかったかと述べ、Panduro ら¹⁰⁾は手術不可能な肺癌に MISO 併用を試みたが、プラセボー併用よりも効果が悪く、これも手術不能進行例の成績であるため効果が低いのではないかと考えられる。山下¹¹⁾によれば同一効果をあげる実験治療線量は *in vivo* < *in vitro* で *in vivo* が少なくてすむのは生体のもつ免疫反応が作用するからであると述べている。さらに山下ら¹²⁾は全身照射は免疫が低下するが、局所照射は免疫を上昇させると述べている。土屋^{13,14)}も同様に局所照射の場合、その部分の組織細胞の放射線死の面だけでなく、免疫の関与を考える必要があり、C3H/He マウスの両側脚に MM 46 腫瘍を移植、片方に 20 Gy 局所照射すると他方の腫瘍も消失したと報告している。この現象は *abscopal effect* と呼ばれ、Fletcher¹⁵⁾、Murphy¹⁶⁾、戸部¹⁷⁾、Nobler¹⁸⁾、後藤田¹⁹⁾、松原²⁰⁾によって報告されている。また凍結外科分野においても *abscopal effect* が認められることが報告されている。これらの反応を推定すれば、刺激された腫瘍部位から腫瘍抗原性が放出し、自己の免疫作用が活性化して新たな全身の抗腫瘍システムができ上り、他部位の腫瘍にまで影響を及ぼし、縮小もしくは消失させると考えられ、リンパ球が大きく関連しているであろうと考えられている。放射線増感剤の投与方法はマウスにおいては腹腔内投与が多く行われているが、ヒトにおいては静注・動注が一般的で MISO は経口投与が可能であった。Sealy ら²¹⁾は最近粉状 MISO を穿刺器を介して腫瘍内に刺入し、頭頸部悪性腫瘍の治療を行っている。MISO の作用は総じて濃度依存性といわれるところから、新増感剤も十分これらの問題を検討し、マウスにおける投与方法においても、刺入法も試行されるべきと考えている。

結 語

3種類のマウスにエールリッヒ固型癌を移植し、イミダゾール化合物のうちニトロ基をもたない KIH-3 の増感作用を検討した。

1) 体重 20~25 g のマウスに対し, KIH-3 は 40 mg 使用可能であった。

2) ノードマウス上のエールリッヒ癌に対する KIH-3 40 mg + ^{60}Co 15 Gy 例はコントロール例に比較し, わずかながら腫瘍抑制効果が勝っていた。

3) ノードマウス上のエールリッヒ癌に対する KIH-3 40 mg + ^{60}Co 15 Gy 例は ^{60}Co 15 Gy 単独照射例に比較し, 特に増感効果は認められなかった。

4) ddY マウス上のエールリッヒ癌に対する KIH-3 40 mg + ^{60}Co 15 Gy 例は腫瘍を増悪させ, コントロール例よりも著しい増殖を認めた。

5) 通常 ICR マウス上のエールリッヒ癌に対する KIH-3 40 mg + ^{60}Co 15 Gy 例はコントロールに比較して, かなり良好な抗腫瘍効果が認められた。 ^{60}Co 15 Gy 単独照射と比較すると効果に差はなく, 両者はほとんど同様であった。

6) 同一腫瘍に対しても, 宿主の相違による効果の差が認められた。

7) イミダゾール化合物のうち, ニトロ基を有するものの方が増感作用が勝っていた。

稿を終えるに臨み, KIH-3 の分与をいただいた慶応義塾大学医学部薬化学研究所稲山誠一教授, ^{60}Co 照射にご協力いただいた本学放射線科学教室 II 母里知之教授・放射線技士各位および本学共同利用研究施設橋本一男教授・動物舎田中睦男氏・兼井 浩氏に感謝の意を表します。

なお, 本論文の一部は日本薬学会第 104 年会, 昭和 59 年厚生省がん研究がん放射線療法における化学増感の研究田中班班会議において発表した。

引用文献

- 1) 酒泉和夫, 瀬沼 滋, 他: マウス移植悪性腫瘍に対するイミダゾール化合物の放射線増感作用について——第 1 報: エールリッヒ固型癌に対するミソニダゾールの放射線増感作用——日口外誌 31: 1827-1833 1985.
- 2) 酒泉和夫, 瀬沼 滋, 他: マウス移植悪性腫瘍に対するイミダゾール化合物の放射線増感作用について——第 2 報: エールリッヒ固型癌に対する dinitroimidazole ethanol の放射線増感作用——日口外誌 32: 8-14 1986.
- 3) 酒泉和夫, 瀬沼 滋, 他: ヒト上顎扁平上皮癌移植ノードマウスにおける放射線増感剤 misonidazole の効果, 日口外誌 28: 1662-1666 1982.
- 4) 稲山誠一, 酒泉和夫, 他: 非ニトロ系増感剤の

in vitro 効果と非ニトロ系 DNIE の *in vivo* 効果, 厚生省がん研究, がん放射線療法における化学増感の研究, 田中班, 昭和 60 年度 (8 月) 第 1 回班会議.

- 5) 母里知之: 低酸素細胞増感剤(その 1), 臨床放射線 28: 727-728 1983.
- 6) 母里知之, 芝田千恵子, 他: Hypoxic cell sensitizer *in vitro*. 癌の臨床 27: 1447-1451 1981.
- 7) 橋 武彦, 吉田菊喜: がんの実験モデル, 臨床免疫 17: 149-159 1985.
- 8) 野本亀久雄, 谷口 徹, 他: 免疫応答遺伝子支配と修飾因子, 臨床免疫 7: 971-979 1975.
- 9) 酒泉和夫, 佐藤一人, 他: イミダゾール誘導体の放射線増感作用における免疫の関与について, 日本薬学会第 104 年会 昭和 59 年 3 月.
- 10) Panduro, J., Kjaer, M., et al.: Misonidazole combined with radiotherapy in the treatment of inoperable squamous cell carcinoma of lung: A double blind randomized trial. Cancer 52: 20-24 1983.
- 11) 山下 孝: マウスにおける細胞性腫瘍免疫能に対する放射線の効果, 日医放会誌 41: 887-893 1981.
- 12) 山下 孝, 早川幸子, 他: 腫瘍への放射線照射により誘導され腫瘍免疫について, 癌の臨床 29: 1506-1511 1983.
- 13) 土屋武彦: 局所照射における免疫作用の役割, 1 抗腫瘍細胞性免疫について, 日医放会誌 36: 922-929 1976.
- 14) 土屋武彦: 放射線治療における免疫機能の関与, 癌の臨床 29: 1499-1505 1983.
- 15) Fletcher, G.H.: Text-Book of Radiotherapy. Lea & Febiger, Philadelphia, 1966, p 80.
- 16) Murphy, W.T.: Radiation Therapy. 2nd Ed, Saunders Co, Philadelphia, 1967, p 944.
- 17) 戸部竜夫: 放射線治療の生物学的考察, 日医放会誌 28: 690-713 1968.
- 18) Nobler, M.P.: The abscopal effect in malignant lymphoma and its relationship to lymphocyte circulation. Radiology 93: 410-412 1969.
- 19) 後藤田栄貴: 腫瘍免疫学, 小林 博, 橋 武彦編集, 朝倉書店, 東京, 1974, 427-430 頁.
- 20) 松原 升, 堀内淳一: Abscopal effect のみられた皮膚細網肉腫症の一例, 日医放会誌 35: 860-867 1975.
- 21) Sealy, R., Korrubel, J., et al.: Interstitial misonidazole. A preliminary report on new perspective in clinical radiation sensitization and hypoxic cell chemotherapy. Cancer 54: 1535-1540 1984.