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5報 PNC-1-JCK (ヒト上顎低分化型扁平上皮癌) に対するイミダゾール化合物の増感作用

酒泉 和夫・瀬沼 滋・佐藤 一人・永井 哲夫*
海老原 務*

Experimental radiosensitizer therapy of malignant
tumor transplanted to nude mice

(5) Radiosensitive effect of imidazole compounds for human
maxillary carcinoma

Kazuo SAKAIZUMI・Shigeru SENUMA・Kazuhiro SATO
Tetsuo NAGAI*・Tsutomu EBIHARA*

Abstract: The purpose of our investigation is to compare the radio-enhancement of three imidazole compounds to human oral malignant tumor transplanted on nude mice.

Methods and evaluation: Battelle Columbus Laboratories Protocol.

Tumor: PNC-1-JCK=human maxillary poorly differentiated squamous cell carcinoma.

Subjects: Male CD-1 (ICR) nu/nu, BALBc nu/nu and conventional C 57 BL/6 N (age 10 weeks, 20~25 g body weight).

Imidazole compounds: Misonidazole (MISO) 20 mg/mouse, dinitroimidazole ethanol (DNIE) 10 mg/mouse and 5-methoxy carbonyl-2-methyl sulfinyl-1-methyl imidazole (KIH-3) 40mg/mouse.

Tumors were transplanted to the subcutaneous region of the right thigh of CD-1 (ICR) nu/nu.

Radiation: ^{60}Co 15 Gy local radiation.

These imidazole compounds were administrated into the abdomen of the CD-1 (ICR) nu/nu prior to 30 minutes of local irradiation.

NK activity was compared among CD-1 (ICR) nu/nu, BALBc nu/nu and conventional C 57 BL/6 N.

Results: Radiosensitive effect was evaluated for MISO 20 mg+ ^{60}Co 15 Gy group. DNIE 10 mg+ ^{60}Co 15 Gy and KIH-3 40 mg+ ^{60}Co 15 Gy groups were observed to show radioprotective effects rather than radiosensitivity.

% NK activity was as follows:

CD-1 (ICR) nu/nu, 4.9 in YAC-1 100:1; 7.0 in RL-male 100:1. BALBc nu/nu 24.6 in YAC-1 100:1; 15.9 in RL-male 100:1. C 57 BL/6 N 21.4 in YAC-1 100:1; 24.0 in

東海大学医学部口腔外科学教室
(主任: 佐々木次郎教授)

* 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 Medi-

cine, Tokai University(Chief: Prof. Jiro Sasaki)

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

受付日: 昭和62年9月2日

RL-male 100:1.

Key words: imidazole radiosensitizer, squamous cell carcinoma, NK activities of nude mice

緒 言

われわれは、前報¹⁾においてヌードマウス CD-1 (ICR) nu/nu へ移植したヒト口腔悪性腫瘍 (KB cell) に対する、イミダゾール化合物の放射線増感効果を発表した。

今回使用した腫瘍は、ヒト上顎低分化型扁平上皮癌・PNC-1-JCK (写真1) で、国立がんセンターにて採取、実験動物中央研究所が継代に成功したものである。

イミダゾール化合物は、misonidazole (MISO), dinitroimidazole ethanol (DNIE), 5-methoxy carbonyl-2-sufinyl-1-methyl imidazole (KIH-3) の3種を(図1)使用し、その増感効果と倍化時間を測定した。ヌードマウスの腫瘍免疫はNK活性と深く関係しているといわれ、今回2種のヌードマウス CD-1 (ICR) nu/nu, BALB/c nu/nu, および通常マウス C 57 BL/6 N に

ついて %NK 活性を測定した。

実験方法

実験動物は、日本チャールス・リバーで産生された雄 CD-1(ICR)nu/nu, 日本クレアで産生された雄 BALB/c nu/nu, 星野試験動物飼育所で産生された雄 C 57 BL/6 N で、いずれも6週齢のものを使用した。

放射線増感効果試験に使用したマウスは CD-1 (ICR) nu/nu で、腫瘍移植方法は、前もってヌードマウス上に増殖させておいた PNC-1-JCK を無菌的に摘出、シャーレに移した MEM 液体培地中で細切、その2~3個をトロカール針にて、未使用のヌードマウスの右大腿部皮下へ移植した。

腫瘍重量が 100~300 mg に達した時、イミダゾール化合物をマウス腹腔内に投与し、30分後に ⁶⁰Co 15 Gy を局所照射した。

薬剤の投与量は、マウス当り MISO 20 mg, DNIE 10 mg, KIH-3 40 mg であった。

NK 活性は前述した3種マウスについて行い、測定方法は図2に示した。

腫瘍に対する増殖抑制効果の判定は、Battelle Columbus Laboratories Protocol にて行った。

実験結果

CD-1 (ICR) nu/nu マウス上での PNC-1-JCK の発育は良好で、コントロール群においては、実験開始より11日目には 300 mg を超過し、36日目には 1,000 mg 以上に発育、本実験に適すると判定された。

⁶⁰Co 15 Gy 単独照射群では、腫瘍縮小が認められ、22日目において最小となり、36日目でも 300 mg 以内で

写真1 PNC-1-JCK (ヒト上顎未分化扁平上皮癌) の病理組織像

図1 イミダゾール系放射線増感剤

エフェクター細胞 標的細胞

図 2 NK 活性測定方法

あった。

MISO 20 mg+⁶⁰Co 15 Gy 群においては、著明な腫瘍縮小が認められ、123.7 mgの腫瘍が32日目には49.5 mg となった。

この群は36日間の実験期間中 1,000 mg を超えることはなかった。

DNIE 10 mg + ^{60}Co 15 Gy 群においては、コントロール群と比較すれば腫瘍増殖抑制が認められ、25日目まではあまり重量変化はなく横ばい状態で増殖抑制が保たれたが、36日目に 300 mg を超過した。しかし単独照射よりも腫瘍増殖抑制が不良であった。

KIH-3 40 mg + ^{60}Co 15 Gy 群は、25日目まではあまり重量変化はなく、DNIE 群と同様な状態で、コントロール群よりは腫瘍増殖抑制が認められたが、単独照射群よりも腫瘍増殖抑制が不良であった。

グラフにも示したとおり，DNIE 併用群と KIH-3 併用群は類似した増殖を示した。

単独照射群よりも腫瘍増殖抑制が認められたものは、

表 1 PNC-1-JCK の効果判定(対照との比較)

マウス	治療方法	判定
ICR/nu/nu	^{60}Co 15 Gy	(+)
ICR/nu/nu	MISO 20 mg + ^{60}Co 15 Gy	(+)
ICR/nu/nu	DNIE 10 mg + ^{60}Co 15 Gy	(+)
ICR/nu/nu	KIH 40 mg + ^{60}Co 15 Gy	(+)

MISO 併用群のみであった (図 3).

各群の実験治療の結果をコントロール群および ^{60}Co 15 Gy 単独照射群と比較したものが表1, 2である。表1の ^{60}Co 15 Gy 群および MISO 併用群では腫瘍縮小を認め、(++)と判定された。表2は増感効果をみるために ^{60}Co 15 Gy 単独照射群と比較したもので、MISO 併用群が(+)以外は全群(-)であった。

PNC-1-JCK の腫瘍倍化時間は、コントロール群が 9.73 日でもっとも短く、KIH-3 併用群が 15.8 日、DNIE 併用群が 29.4 日、 ^{60}Co 15 Gy 単独群が 39.4 日、MISO

併用群がもっとも長く、97.1日であった(表3)。

NK 活性は YAC-1 に対しては BALB/c nu/nu が C 57 BL/6 N よりも高く、ヌードマウスの活性が高いことを示したが、CD-1 (ICR) nu/nu は BALB の約 1/5 で活性が低かった(表4)。

表 2 PNC-1-JCK の効果判定 (⁶⁰Co 15 Gy との比較)

マウス	治療方法	判定
ICR/nu/nu	MISO 20 mg+ ⁶⁰ Co 15 Gy	(+)
ICR/nu/nu	DNIE 10 mg+ ⁶⁰ Co 15 Gy	(-)
ICR/nu/nu	KIH 40 mg+ ⁶⁰ Co 15 Gy	(-)

表 3 PNC-1-JCK の倍化時間

対 照	治療方法	日数
9.73日	⁶⁰ Co 15 Gy	39.38
	MISO 20 mg+ ⁶⁰ Co 15 Gy	97.13
	DNIE 10 mg+ ⁶⁰ Co 15 Gy	29.39
	KIH 40 mg+ ⁶⁰ Co 15 Gy	15.82

考 察

今回の実験治療に使用した悪性腫瘍は、われわれの日常臨床で数多く遭遇する扁平上皮癌で、第4報¹⁾の KB cell (頬表皮癌) に比較すると悪性度は低いとされている。また未分化型であるため、放射線に対する感受性は高いであろうと考えられ、事実 ⁶⁰Co 15 Gy 単独照射にて腫瘍縮小が認められた。

DNIE および KIH-3 と ⁶⁰Co とを併用したものは、コントロール群よりは腫瘍増殖を抑制したが、放射線単独照射群よりも腫瘍増殖が著名で、期待された増感作用は認められなかった。

芝本²⁾の報告によれば、BALB/c マウスに Sarcoma EMT 6 を移植、DNIE 2 mg/マウスでは増感効果が認められたが、DNIE 4 mg/マウスでは放射線防護的であったとしている。

われわれの DNIE 投与量は10 mg/マウスで、芝本らの2.5 倍あるため、放射線防護的に作用したとも考えられた。

ヌードマウスの抗腫瘍機構は NK 活性と深く関係しているといわれ、その活性値は種属により変動が著しく、ヌードマウスを一括した標準値を設定することは困

図 3 CD-1 (ICR) nu/nu 上の PNC-1-JCK の増殖曲線

表 4 % NK 活性

E : エフェクター細胞
T : 標的細胞

マウス	YAC-1 (E/T)			RL-雄 (E/T)		
	100:1	50:1	25:1	100:1	50:1	25:1
BALB/c/nu/nu	24.6	18.3	11.2	15.9	18.9	12.8
ICR nu/nu	4.9	5.1	0.5	7.0	0.9	0
C 57 BL/6N	21.4	11.6	7.4	24.0	19.9	9.7

難であった。

畔柳³⁾は NK 活性の高いものはヌードマウス、C 3 H, CBA で、低いものはベージュ, SJL があり、活性は T cell growth factor (NK active factor) あるいは interferon にて増強されると報告している。

原中⁴⁾はマクロファージの産生する tumor necrosis factor (TNF) も抗腫瘍免疫に影響し、高値を示すマウスは DDY, ICR, CD-1, DAB/2, 中間値を示すものは DDD, C 57 BL/6J, C 3 H/HeN Crj, 低値を示すものは A/J, C 3 H/HeJms, BALB/c であったと報告している。さらにヌードマウスでは、DDDnu/nu, BALB/c nu/nu においては、前者が高く後者が低かったと述べている。

また TNF 産生は、BCG, コリネバクテリウムなどにより刺激されるという。

さらに局所照射により、リンパ球数の増加をみるという報告もあり、照射後の NK 活性の測定も試みる必要があると思われた。

低酸素細胞は放射線耐性のため増感剤を使用するが、Gupta ら⁵⁾によれば、エールリッヒ腹水癌およびリンホーマ P 388 を培養して放射線照射を行ったが、培養環境によりその効果に変化が生ずるという。すなわち、培養細胞における実験において、酸素濃度を 5% もしくは 0.1% に保持した系へ照射すると、細胞数は著明に減少し殺細胞効果が大であるが、酸素濃度を 0.1% にて開始し、照射後 5% へ上昇させた系では、細胞数の減少が認められなかったと述べている。

古川⁶⁾は、低酸素細胞の特長は酸素分圧低下、栄養失調、低い pH であるといい、また窪田⁷⁾は hyperthermia の実験治療において、V-79 spheroid は最外側よりも壊死巣付近の感受性が高いと報告している。

臨床においても NK 細胞をはじめとする T リンパ球サブセットには変動が多く、小川⁸⁻¹²⁾によれば、OKT₃ または Leu 4 と反応する末梢血リンパ球は 927.6 ~ 2,193.6/mm³, OKT_{M1} または Leu 7・Leu 11 と反応する NK/K 細胞は 287.3 ~ 1,030.5/mm³, OKT₄ または Leu₃ と反応する helper/inducer T リンパ球は 560.7 ~ 1,338.7/mm³ で、いずれの数値も上・下限にかなり差のあることが認められた。

放射線照射がリンパ球に与える影響については種々の論議があるが、照射野内に胸腺・脾臓を含むか否かにより左右されると考えられる。

Gross ら¹³⁾は乳癌 15, 肺癌 9, 膀胱癌 6, 声帯癌 3, 子宮癌 2, 食道癌 2, その他 8 に対して放射線治療をおこない、皮膚反応による免疫学的検査では、照射野の相違による変化はなかったと述べている。

Clement¹⁴⁾も喉頭癌 11, 乳癌 10, 肺癌 9, 脳腫瘍 3, 舌癌 3, 睾丸癌 2, 下垂体癌 2, 口底癌 2, その他 5 において cell mediated immunity をツベルクリンなどの

皮膚反応で検査を行ったが、照射野の相違による特徴は認めなかった。

一方 Stratton ら¹⁵⁾は照射によりリンパ球は減少し、胸腺を含むものはその程度が著しいと述べている。

大星¹⁶⁻¹⁸⁾は腫瘍組織周囲にリンパ球様細胞が出現することを報告したが、今中¹⁹⁾はこの細胞が T リンパ球であることを明らかにし、さらに Groosi ら²⁰⁾はこれが helper/inducer cell であったと述べている。

以上動物実験より臨床治療を考えてみると、T リンパ球増強剤、TNF 刺激剤の併用は意義のあるものと思われる。低酸素細胞には照射前・後の酸素濃度を一定に保ちつつ、高い pH の環境で、増感剤併用照射を行うと良好な結果の得られることが十分考えられる。

結 語

1. PNC-1-JCK は BALB/c nu/nu, CD-1 (ICR) nu/nu 上で十分発育し、本実験に使用可能であった。
2. コントロール群に比較して、実験治療群はいずれも腫瘍増殖抑制が認められた。
3. 増感効果をみるため、⁶⁰Co 15 Gy 単独照射群と比較した際、明らかに増感を認めたものは、MISO 20 mg + ⁶⁰Co 15 Gy 群のみであった。
4. DNIE 10 mg, KIH-340 mg を併用したものは、⁶⁰Co 15 Gy 単独照射群よりも腫瘍発育が良好で、放射線防護と思われる作用が認められた。
5. ヌードマウスの NK 活性は通常マウスより高いといわれるが、C 57 BL/6 N に比較して、BALB/c nu/nu は高値で CD-1 (ICR) nu/nu は低値であった。

稿を終えるに臨み、増感剤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、⁶⁰Co 照射にご協力いただいた東海大学医学部放射線科学 2 母里知之教授および放射線技師各位、東海大学医学部共同利用研究施設田中睦男氏、山崎秀雄氏、新田耕一氏に感謝の意を表します。

本論文の一部は第 41 回日本口腔科学会総会において発表した。

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 4 報 KB cell (ヒト口底から舌の poor differentiated epidermoid carcinoma) に対するイミダゾール化合物の増感作用—, 日口外誌 32: 11-15 1985.
- 2) 芝本雄太, 小野公二, 他: 放射線増感剤の大量投与時にみられたマウス腫瘍の放射線防護現象, 日本医放会誌 46: 725-727 1986.

- 3) 畔柳武雄, 大高祐一, 他編集: 新免疫学叢書10
キラー細胞. 第1版, 医学書院, 東京, 1984,
143-149頁.
- 4) 原中勝征: TNF. 第1版, 日本医事新報社, 東京,
1984, 8-193頁.
- 5) Gupta, V., Rangale, N.S., et al.: Enhancement
of radiation hypoxia. *Radiation research*
106: 132-136 1986
- 6) 古川雅代, 芳川伸治: 低酸素性細胞における放
射線感受性. *組織培養* 10: 39-41 1984.
- 7) 窪田宣夫, 松井謙吾: V-79 spheroid における
放射線と hyperthermia の作用 *組織培養* 10:
26-28 1984.
- 8) 小川恭弘, 木村修治: 肺癌の放射線化学療法併
用治療患者における免疫パラメータの評価. *日
医放会誌* 40: 341-354 1980.
- 9) 小川恭弘, 前田知穂, 他: 癌の放射線治療にお
けるリンパ球サブセットの検討. 第1報 OKT₁₁
+リンパ球について. *日癌治* 19: 64-70 1984.
- 10) 小川恭弘, 前田知穂, 他: 癌の放射線治療にお
けるリンパ球サブセットの検討. 第2報 OKT
M1+リンパ球について. *日癌治* 19: 566-572
1984.
- 11) 小川恭弘, 前田知穂, 他: 癌の放射線治療にお
けるリンパ球サブセットの検討. 第3報 OKT
4+リンパ球について. *日癌治* 19: 573-579
1984.
- 12) 小川恭弘, 前田知穂, 他: 癌の放射線治療にお
けるリンパ球サブセットの検討. 第4報
OKT₈+リンパ球について. *日癌治* 19: 1041-
1048 1984.
- 13) 小川恭弘, 前田知穂, 他: 癌の放射線治療にお
けるリンパ球サブセットの検討. 第5報
OKIa1+リンパ球について. *日癌治* 19: 2138-
2145 1984.
- 14) 小川恭弘, 前田知穂, 他: 癌の放射線治療にお
けるリンパ球サブセットの検討. 第6報
OKT₃+リンパ球について. *日癌治* 19: 2279-
2286 1984.
- 15) 小川恭弘, 前田知穂, 他: 癌の放射線治療にお
けるリンパ球サブセットの検討. 第7報
OKT₄/OKT₈ 比について. *日癌治* 20: 47-51
1985.
- 16) 小川恭弘, 前田知穂, 他: 癌の放射線治療にお
けるリンパ球サブセットの検討. 第8報
OKT₁₀+リンパ球について. *日癌治* 20: 542-
549 1985
- 17) 小川恭弘, 前田知穂, 他: 癌の放射線治療にお
けるリンパ球サブセットの検討. 第9報 頭頸
部癌について. *日癌治* 20: 2279-2285 1985.
- 18) Gross, L., Manfredi, O.L., et al.: Effect of
cobalt-60 irradiation upon cell mediated im-
munity. *Radiology* 105: 653-655 1973.
- 19) Clement, J.A. and Kramer, S.: Immunocompe-
tence in patients with solid tumor under-
going cobalt-60 irradiation. *Cancer* 34: 193-
196 1974.
- 20) Stratton, J.A., Byfield, D.E., et al.: A com-
parison of the acute effects of radiation the-
rapy, including or excluding the thymus, on
the lymphocyte subpopulations of cancer pa-
tients. *J of Clini Invest* 56: 88-97 1975.
- 21) 大星章一, 下里幸雄, 他: 癌放射線療法の病理
(I) 癌組織の治癒過程の組織学的追跡 (その
1). *医学のあゆみ* 61: 618-625 1967.
- 22) 大星章一, 下里幸雄, 他: 癌放射線療法の病理
(I) 癌組織の治癒過程の組織学的追跡 (その
2). *医学のあゆみ* 61: 665-671 1967.
- 23) 大星章一, 下里幸雄, 他: 癌放射線療法の病理
(II) 癌組織の治癒過程に出現するリンパ球様
細胞反応の免疫学的意義. *医学のあゆみ* 61:
725-730 1967.
- 24) 今中一文, 今城吉成, 他: 照射線量と腫瘍局所
の間質細胞の程度について. *臨床免疫* 14:
111-118 1982.
- 25) Grossi, C.E., Webb, S.R., et al.: Morpholo-
gical and histochemical analysis of two human
T cell subpopulations bearing receptors for
IgM or IgG. *J Exp Med* 147: 1405-1417
1978.