

# がんの治療に直結した核医学的手法によるヒト腫瘍の細胞増殖動態評価法の開発

著者	福田 寛
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/41553">http://hdl.handle.net/10097/41553</a>

がんの治療に直結した核医学的手法による

ヒト腫瘍の細胞増殖動態評価法の開発

(研究課題番号：09470196)

平成9年度～12年度科学研究費補助金

基盤研究 (B) (2) 研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 福田 寛

(東北大学加齢医学研究所・教授)

東北大学図書



00021003846

附属図書館

# 目次

研究組織、研究経費	1
研究発表	2
1.研究の背景	6
2.研究目的・研究テーマ	6
3.研究結果	
3.1 マウス線維肉腫におけるポテンシャル倍加時間の腫瘍内不均一性の解析	7
3.2 Tpot の腫瘍内不均一性の解析－血管からの距離による増殖動態の違い	19
3.3 分割照射中の Tpot の解析	25
4.細胞増殖動態測定、放射線感受性予測用のポジロン標識薬剤の開発	30
4.1 [ <sup>18</sup> F]3'-deoxy-3'-fluorothymidine ([ <sup>18</sup> F]FLT) の合成法の確率	
5.低酸素細胞検出用ポジロン標識化合物の開発	35
5.1 1-[2-[ <sup>18</sup> F]fluoro-1-(hydroxymethyl)-ethoxy]methyl-2-nitroimidazole ([ <sup>18</sup> F]FENI)の標識合成	
5.2 <sup>18</sup> F-furuoromisonidazole ( <sup>18</sup> F-FMISO)のマウス腫瘍内分布の解析	
6.まとめ	36
7.論文別冊添付	37
6.1 Wada H, et al. J. Labelled Cpd. Radiopharm 43:785-793, 2000	38
6.2 Furumoto S, et al. J. Labelled Cpd. Radiopharm 43:1159-1172, 2000	47
6.3 Iwata R, et al. Appl Radiat and Isotopes 52:87-92, 2000	61
6.4 K.Kubota, et al. Eur. J. Nucl. Med. 26:750-757, 1999	67
6.5 Fukuda H, et al. Melanoma Res, 9:75-83, 1999	75
6.6 Abe Y, et al. Int J Clin Oncol, 3:365-369, 1998	85
6.7 Imran MB, et al. J Nucl Med 39:1219-1223, 1998	91
6.8 福田 寛、窪田和雄. 映像情報 32 : 1137-1141, 2000	97

## 研究組織

- ・研究代表者: 福田 寛(東北大学加齢医学研究所)
  
- ・研究分担者:
  - 岩田 錬(東北大学サイクロトロンラジオアイソトープセンター)
  - 阿部 由直(弘前大学医学部)
  - 赤井澤 隆(東北大学加齢医学研究所)
  - 窪田 和雄(東北大学加齢医学研究所)
  
- ・研究協力者:
  - 古本 祥三(東北大学サイクロトロンラジオアイソトープセンター)
  - 高井 良尋、金田 朋洋 (東北大学医学部)
  - 真里谷 靖 (弘前大学医学部)

## 研究経費

平成 9 年度	2,300 千円
平成 10 年度	2,100 千円
平成 11 年度	2,800 千円
平成 12 年度	2,400 千円
計	9,600 千円

研究発表

(1) 学会誌等

平成9年度

- 1) Yoshioka T, Takahashi H, Oikawa H, Maeda S, Ido T, **Akaizawa T, Fukuda H**, Kanamaru R: Influence of chemotherapy on FDG uptake by human cancer xenografts in nude mice. *J Nucl Med* **38**:714-717, 1997
- 2) Fujiwara T, Watanuki S, Yamamoto s, Miyake M, Seo S, Itoh M, Ishii K, Orihara H, **Fukuda H**, Satoh T, Kitamura K, Tanaka K, Takahashi S: Performance evaluation of a large axial field-of-view PET scanner: SET-2400W. *Ann of Nucl Med* **11**, 307-313, 1997
- 3) Girard F, **Fukuda H**, Nakamura H, Yamamoto K, Yoshida K: MR imaging of rat tumor with a  $^{10}\text{B}$  carborane gadolinium complex. *Advances in Neutron Capture Therapy*, edited by B. Larsson, J. Crawford and R. Weinreich ,Elsevier Science B.V., 271-275, 1997
- 4) 真里谷靖、渡辺定雄、甲藤敬一、樽沢信子、福田栄子、青木昌彦、安倍明、場崎潔、松倉弘明、阿部由直:舌癌T1T2症例の $^{226}\text{Ra}$  組織内照射治療成績および予後測定因子としてのploidy, potential doubling time の臨床的意義。日本放射線腫瘍学会誌 9 : 15-24、1997
- 5) 青木昌彦、渡辺定雄、真里谷靖、樽沢信子、福田栄子、安倍明、場崎潔、松倉弘明、甲藤敬一、阿部由直 : 分割法によるライナックを用いた定位脳照射の治療効果。日本放射線腫瘍学会誌 9 : 25-35、1997

平成10年

- 6) Imran MB, **Kubota K**, Yamada S, Yamada K, Fujiwara T, Ito M, **Fukuda H**: Lesion to Background Ratio in Non-attenuation corrected Whole Body FDG PET Images: A Semiquantitative Evaluation in Oncology. *J Nucl Med* **39**:1219-1223, 1998
- 7) **Abe Y**, Takahashi J, **Fukuda H**, Ono S, Yoshoka S, **Akaizawa T, Kubota K**, Yamada K, Takahashi T, Ohkuda K, Asoh N, yonechi M, Maehira N, Mariya Y, Aoki M: A phase II study of cisplatin, oral administration of etoposide, OK-432 and radiation therapy for inoperable stage III non-small cell lung cancer. *Int J Clin Oncol*, **3**, 365-369, 1998
- 8) K. Ohsaki, Y. Endo, S. Yamazaki, M. Tomoi and **R. Iwata**. "Polymer-supported catalysts for efficient on-column preparation of 2-deoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluoro-D-glucose". *Appl. Radiat. Isot.* **49**, 373-378, 1998.
- 9) A. Bogni, C. Pascali, **R. Iwata**, A. Cavalleri, V. de Sanctis, D. Decise, G. Cucchetti, F. Crippa, C. Chiesa, M. Schiavini and E. Bombardieri. " $^{18}\text{F}$ FDG synthesis by Anatech RB-86 robotics system: Improvements and general considerations" *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **230**, 45-50, 1998.
- 10) Y. Mariya, M. Aoki, A. Anbai, H. Matsukura, **Y. Abe**, T. Kimura, K. Matsuda, H. Ohnuma, S. Yokoyama : Response of unresectable pancreatic cancer to intraoperative radiotherapy. *Radiation Medicine* **16**:195-200, 1998

- 11) Y. Mariya, S. Watanabe, K. Kattou, **Y. Abe**, M. Aoki, A. Anbai, H. Matsukura, K. Basaki, M. Abo: The impact of biologically effective dose corrected for overall treatment time upon tumor control of stage I and II laryngeal cancers. *J Jpn Soc Ther Radiol Oncol* 10: 215-222, 1998
- 12) Y. Mariya, H. Matsutani, **Y. Abe**, S. Nakaji: Enhanced regeneration response of laryngeal and hypopharyngeal mucosa with accelerated hyperfractionated radiation therapy for glottic cancers. *Radiat Med* 16: 469-472, 1998

平成 11 年

- 13) Yoshioka T, **Fukuda H**, Fujiwara T, Iwata R, Ido T, Murakawa Y, Gamo M, Ishioka C, Kanamaru R: FDG-PET evaluation of residual mass and regrowing process in abdominal lymphnodal metastases from colonic cancer compared with CT during chemotherapy. *Clin Nucl Med* 24:261-263, 1999
- 14) Imran MB, **Kubota K**, Yoshioka S, Yamada S, Sato T, **Fukuda H**, Yoshioka T, Kanamaru R, Fujiwara T, Itoh M. Sclerosing mediastinitis: Findings on FDG positron emission Tomography. *Clin Nucl Med* 24:305-301, 1999
- 15) **Fukuda H**, Honda C, Wadabayashi N, Kobayashi T, Yoshino K, Hiratsuka J, Takahashi J, **Akaizawa T**, Abe Y, Ichihashi M, Mishima Y: Pharmacokinetics of 10B-p-boronophenylalanine in tumours, skin and blood of melanoma patients: A study of boron neutron capture for malignant melanoma. *Melanoma Res*, 9:75-83, 1999
- 16) C. Pascali, A. Bogni, **R. Iwata**, D. Decise, F. Crippa, and E. Bombardieri. "High efficiency preparation of L-[S-methyl-<sup>11</sup>C]methionine by on-column [<sup>11</sup>C]methylation on C18 Sep-Pak". *J. Labeld. Compd. Radiopharm.* 42, 715-724, 1999.
- 17) **K. Kubota**, M. Tada, S. Yamada, K. Hori, S. Saito, R. Iwata, **H. Fukuda** and T. Ido. "Comparison of the distribution of fluorine-18 fluoromisonidazole, deoxyglucose and methionine in tumor tissue" *Eur. J. Nucl. Med.* 26:750-757, 1999.
- 18) Fujiwara T, Miyake M, Watanuki S, Mejia MA, Itoh M, **Fukuda H** : Easy detection of tumor in oncologic whole-body PET by projection reconstruction images with maximum intensity projection algorithm. *Annal.Nucl.Med.* 13: 199-203, 1999.
- 19) Y. Mariya, F. Steinberg, C. Streffer, C. Fuhrmann and **Y. Abe**: Oxygenation status and tumor response during fractionated irradiation in two murine tumor cell lines of same origin but different intrinsic radiosensitivities. *Radiat Med* 17: 175-179, 1999
- 20) Y. Mariya, C. Streffer, **Y. Abe**: Utility of the cytokinesis-block micronucleus assay to assess combined effects of irradiation and cisplatin. *The Hirosaki Med J* 50: 215-222, 1999
- 21) **Y.Abe**, Y.Mariya and M.Aoki: Clinical and fundamental researches of radiotherapy. *Hirosaki Med J* 51: s203-207, 1999
- 22) Y. Mariya, F. Steinberg, C. Streffer, C. Fuhrmann and **Y. Abe**: Oxygenation status and tumor response

during fractionated irradiation in two murine tumor cell lines of same origin but different intrinsic radiosensitivities. *Radiat Med* **17**: 175-179, 1999

- 23) Y. Mariya, C. Streffer, **Y. Abe**: Utility of the cytokinesis-block micronucleus assay to assess combined effects of irradiation and cisplatin. *The Hirosaki Med J* **50**: 215-222, 1999
- 24) 真里谷靖、斎藤文男、木村 環、青木昌彦、安倍 明、場崎 潔、松倉弘明、阿保 満、近藤英宏、阿部由直: 脳腫瘍放射線治療症例における脳波を用いた脳機能評価。臨床放射線 **44**: 1163-1170, 1999

平成12年

- 25) Ohira H, **Kubota K**, Ohuchi N, Harada Y, **Fukuda H**, Satomi S.: Comparison of Intratumoral Distribution of <sup>99m</sup>Tc-MIBI and Deoxyglucose in Mouse Breast Cancer Models. *Brain*. **40**:1561-1568,2000.
- 26) **R. Iwata**, C. Pascali, A. Bogni, G. Horvath, Z. Kovacs, K. Yanai and T. Ido. "A new convenient method for the preparation of 4-[<sup>18</sup>F]fluorobenzyl halides". *Appl. Radiat. Isot.* **52**, 87-92, 2000.
- 27) C. Pascali, A. Bogni, **R. Iwata**, M. cambia, and E. Bombardieri. "[<sup>11</sup>C]Methylation on C18 Sep-Pak: a convenient way to produce [*N*-methyl-<sup>11</sup>C]choline". *J. Labeld. Compd. Radiopharm.* **43**, 195-203, 2000.
- 28) H. Wada, **R. Iwata**, T. Ido and Y. Takai. "Synthesis of 1-[2-[<sup>18</sup>F]fluoro-1-(hydroxymethyl)-ethoxy]methyl-2-nitroimidazole ([<sup>18</sup>F]FENI), a potential agent for imaging hypoxic tissues by PET". *J. Labeld. Compd. Radiopharm.* **43**, 785-793, 2000.
- 29) **R. Iwata**, G. Horvath, C. Pascali, A. Bogni, K. Yanai, Z. Kovacs and T. Ido. "Synthesis of 3-[1*H*-imidazol-4-yl]propyl 4-[<sup>18</sup>F]fluorobenzyl ether ([<sup>18</sup>F]fluoroproxyfan): a potential radioligand for imaging histamine H<sub>3</sub> receptors". *J. Labeld. Compd. Radiopharm.* **43**, 873-882, 2000.
- 30) T. Takahashi, T. Ido, S. Nagata and **R. Iwata**. "[F-18]Labeling of 1,2-diacylglycerols" *J. Labeld. Compd. Radiopharm.* **43**, 943-969, 2000.
- 31) S. Furumoto, **R. Iwata** and T. Ido. "Synthesis of 1-*O*-(8-[<sup>18</sup>F]fluorooctanoyl)-2-*O*-palmitoyl-*rac*-glycerol for Imaging Intracellular Signal Transduction" *J. Labeld. Compd. Radiopharm.* **43**, 1159-117, 2000.
- 32) F. Saito, Y. Nagashima, T. Kurihara, I. Fujiwara, **R. Iwata**, N. Suzuki, Y. Itoh, A. Goto and T. Hyodo. "Spot <sup>18</sup>F positron source electro-deposited on a graphite rod" *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. A* **450**, 491-494, 2000.
- 33) F. Saito, N. Suzuki, Y. Itoh, A. Goto, I. Fujiwara, T. Kurihara, **R. Iwata**, Y. Nagashima and T. Hyodo. "Automatic <sup>18</sup>F positron source supply system for a monoenergetic positron beam" *Radiat. Phys. Chem.* **58**, 755-757, 2000.
- 34) **Y. Abe**, Y. Mariya and M. Aoki: Clinical and fundamental researches of radiotherapy. *Hirosaki Med J* **51**: s203-207, 1999

- 11) 福田 寛、窪田和雄：PETによる腫瘍診断の進歩。映像情報メデイカル **32**:1137-1141 2000
- 36) 窪田和雄、田代 学、伊藤正敏、福田 寛：腫瘍診断の進歩。臨床放射線 **45(9)**:1065-1071,2000.
- 37) 窪田和雄、M B Imran,小野修一、赤井沢隆、後藤了以、大平広道、福田 寛、高橋寿太郎、山田健嗣、山口慶一郎、伊藤正敏：肺癌を中心とした全身 FDG-PET の臨床的有用性の検討。Jap.J.Clinical Radiol.**45**:199-208, 2000.
- 38) 阿部由直、阿保 満、安藤興一：炭素線分割照射の正常組織に与える影響。癌の臨床 **46** : 188-191、2000

## (2) 口頭発表

- 1) 赤井澤 隆、福田 寛、真里谷 靖、阿部 由直：二重標識法による腫瘍の照射後の増殖動態の解析。日本医学放射線学会第 36 回生物部会学術大会，横浜，1997. 4.
- 2) 赤井澤 隆、福田 寛、真里谷 靖、阿部 由直：二重標識法による腫瘍の照射後の増殖動態の解析。日本医学放射線学会第 37 回生物部会学術大会，神戸，1998. 4.
- 3) 赤井澤 隆、福田 寛、真里谷 靖、阿部 由直：二重標識法による腫瘍の照射後の増殖動態の解析。日本放射線腫瘍学会第 11 回学術大会，前橋，1998. 11.
- 4) 赤井澤 隆、福田 寛、真里谷 靖、阿部 由直：二重標識法による腫瘍の分割照射中の増殖動態の検討。日本医学放射線学会第 39 回生物部会学術大会，横浜，2000. 4.
- 5) 福田 寛、窪田和雄：Scitilating future of nuclear oncology。第 40 回日本核医学会総会，神戸，2000.11.

## (3) 出版物

- 1) 福田 寛.PETによる放射線感受性予測. 田中敬正ら著、癌の放射線治療, 154-161、金芳社、1998
- 2) 阿部由直. 放射線治療における 4(5)R.田中敬正ら著、癌の放射線治療, 179-189、金芳社、1998
- 3) 福田 寛、今堀良夫、平塚純一、市橋正光、三嶋 豊：熱中性子捕捉治療と PET. 画像診断の最前線—視覚でとらえる機能と形態（村田 啓偏） p.81-90,放医研シンポジウム シリーズ No29,1999.



## 1.研究の背景

癌の診断と治療は車の両輪であり、癌の正確な局在部位診断と悪性度などの特徴診断は、最適な治療法の選択、ひいては治療成績の向上に不可欠である。一方では、近年、客観的証拠に基づく医療 (evidence based medicine)あるいは、患者ひとりひとりの体質や癌の特性に応じて最適化された医療 (tailor medicine)が求められている。例えば、癌の放射線治療を行う場合、倍加時間、ポテンシャル倍加時間、増殖画分、DNA 標識率など、癌の放射線感受性を既定する多くの因子がある。これらの情報を治療前に知ることができれば、適切な分割照射の方法、併用する化学療法剤の選択など治療法の選択に大きく貢献することができる。放射線腫瘍学・生物学の分野では、これらの情報を得るための測定を Predictive assay (先行指標測定)と呼んでいる。しかし、これらの方法の多くは生検など腫瘍細胞を取り出す必要があり、侵襲的である。また、深部の癌には適用できない。

ポジトロン CT(PET)による核医学画像診断は、がんの代謝を非侵襲的に画像化する方法である。これまでに癌の悪性度診断、病期診断、治療効果の判定などに極めて有用であることが、基礎的にも臨床的にも示されている。この分野は、研究代表者を初め、東北大学のグループが 1980 年代初期に世界に先駆けて開発研究を行ったもので、多くの研究業績が蓄積している。また、現在もこの分野における世界的な指導的立場を堅持している。しかし、この分野のこれまでの研究は、トレーサが集積したかしないかといった画像診断的アプローチが主であり、細胞動態論的、放射線生物学的な観点から predictive assay の手段として PET を捉えた研究は極めて少ない。

## 2.研究目的・研究テーマ

本研究では、癌の放射線治療のための Predictive assay の手段として PET をとらえ、ヒト腫瘍において腫瘍の細胞増殖動態を測定するための手段を開発することをめざす。具体的なテーマは以下の通りである。

- 1) 動物の腫瘍のポテンシャル倍加時間測定法の確立およびこの方法を用いた放射線照射後の腫瘍細胞増殖動態の解析
- 2) 細胞増殖動態測定、放射線感受性予測用のポジトロン標識薬剤の開発
- 3) これらの手段のヒト腫瘍に対する臨床応用するための基礎研究

### 3. 研究成果

#### 3.1 マウス線維肉腫におけるポテンシャル倍加時間の腫瘍内不均一性の解析

赤井澤 隆、阿部 由直、真里谷 靖、福田 寛

##### 3.1.1 要旨

プロモデオキシウリジンに対するモノクローナル抗体による免疫染色と 3H チミジンのオートラジオグラフィーを組み合わせた二重標識法により腫瘍内のポテンシャル倍加時間(Tpot)の測定し、Tpot を指標として非照射の大きさの異なる腫瘍および放射線照射後の腫瘍の細胞増殖動態を検討した。

マウスの自然発生線維肉腫 FSa-II をマウス後足皮下に移植し非照射で直径 6-7 mm になった時点と 10-15 mm になった時点で腫瘍内複数領域の Tpot を測定した。また腫瘍が直径 6-7 mm の時点で 60Co ガンマ線 20 Gy1 回照射し、2 日目、4 日目、6 日目の Tpot を同様に測定し、平均値と分布の変化を検討した。

非照射の直径 6-7 mm の腫瘍の Tpot は  $46.2 \pm 10.6$  時間ではばらつきは極めて少なかった。一方、非照射の直径 10-15 mm の腫瘍では  $105 \pm 51.2$  時間と 6-7mm のものに比べて Tpot の平均値は延長し、ばらつきが大きくなった。このことは腫瘍体積の増加により腫瘍内に増殖能の不均一性が出現してくることを示すと考えられた。また放射線照射後 2 日目の腫瘍の Tpot は  $147 \pm 59.4$  時間と非照射のものに比べて延長し、4 日目には  $53.3 \pm 26.0$  時間と短縮した。また 6 日目には  $69.7 \pm 55.7$  時間となり、非照射の直径 6-7 mm の腫瘍と同等の短縮した群と延長した群が見られた。これらの Tpot の値の変化は放射線照射による腫瘍の増殖遅延と再増殖を反映していると思われた。

以上の結果から本二重標識法により、腫瘍内の不均一性を考慮した細胞増殖動態を把握できると思われた。

##### 3.1.2 はじめに

腫瘍の見かけ上の体積の増加は主に 3 つのパラメータにより決定される。つまり腫瘍細胞の増殖細胞分画 (growth fraction: 実際に細胞分裂をする生きている細胞の比)、細胞周期の長さ(Tc)、細胞喪失比 (cell loss factor: 細胞が新しく産生される率に対する細胞喪失率の比)である。一方、ポテンシャル倍加時間(Tpot)は 1977 年に Steel (1)が提唱した概念でクローン形成可能細胞の倍加時間と考えられる。

Tpot は腫瘍の放射線治療の効果を予測する指標の一つである。Begg (2, 3)らは頭頸部腫瘍患者に対し放射線治療の前にヨードデオキシウリジンを静注した後に腫瘍生検し、ヨードデオキシウリジンに対する蛍光モノクローナル抗体と flow cytometry 法により Tpot を測定した。彼らは通常分割照射と加速分割照射による放射線治療をランダムに行い、局所制御率と Tpot の値との関係を検討した。その結果 Tpot が 4 日より短い腫瘍では加速分割照射の方が局所制御率が良好であるとい

う結果を示した。このように増殖の速い腫瘍の放射線治療法を決定する上で Tpot は重要な指標となりうるということが示唆されている(4, 5, 6, 7)。

Tpot 測定法はモノクローナル抗体の免疫染色と flow cytometry 法の組み合わせが報告されている(8, 9, 10, 11)。しかし flow cytometry 法では生検組織から単細胞浮遊液を作成するために、得られる Tpot の値はその組織の平均値となってしまう、腫瘍内組織構築の違いによる細胞増殖能の不均一性を表現することは困難である。腫瘍内のより正確な Tpot の測定や細胞増殖能の不均一性観察のためには二重標識された DNA を顕微鏡下で組織構築を壊さずに観察する方法がよりよいと考えられる。動物腫瘍ではいくつかの二重標識法が試みられた。3H チミジンと 14C チンジンのオートラジオグラフィによる二重標識法(12, 13)は結果が得られるまでに時間がかかる上、現像後いずれの核種による銀粒子か区別がつきにくいという欠点がある。またプロモデオキシウリジンに対するモノクローナル抗体とプロモデオキシウリジンとヨードデオキシウリジンの両方を認識する抗体を利用した二重標識法(14, 15)も行われたが非特異的染色が多いという欠点がある。

動物実験での良好な定量性を得るために阿部ら(16, 17)はプロモデオキシウリジンに対するモノクローナル抗体による免疫染色と 3H チンジンのオートラジオグラフィを組み合わせた二重標識法を応用した。阿部らはこの方法を用いテーマウス小腸細胞増殖動態を明らかにしたが、ここではこの方法をさらに確立するとともに、非照射のマウス腫瘍を用いテーマウス腫瘍の大きさによる腫瘍内 Tpot の違い、放射線 1 回照射後の Tpot の変化を測定した。

### 3.1.3 対象と方法

#### 3.1.3.1 動物と腫瘍

動物は雌 C3H/He マウス(6-7 週齢)を用いた。これらの動物は船橋農場から購入し、東北大学加齢医学研究所動物実験施設で飼育、実験を行った。腫瘍は C3Hf/Sed マウスの自然発生線維肉腫である FSa-II を用いた。なお、この実験腫瘍は放射線医学総合研究所の安藤興一博士より提供を受けた。本研究は東北大学加齢医学研究所倫理委員会の許可を受けたものである。

#### 3.1.3.2 増殖曲線

0.1 ml に 105 個の FSa-II 腫瘍細胞を含むように調整した単細胞浮遊液 0.1 ml をマウス後肢皮下に移植した。腫瘍細胞を移植後、計測可能な大きさになった時点で毎日/日で腫瘍の縦、横、高さを測定して 3 方向の積を計算した。最大横径が 6-7 mm になった腫瘍の 3 方向の積を 1.0 とし、それに対する腫瘍の大きさ(Relative tumor volume)を求めた。各点は 6-7 腫瘍の平均とした。

#### 3.1.3.3 照射法

照射は腫瘍径が 6-7 mm に達した時点で  $^{60}\text{Co}$  ガンマ線遠隔照射装置を用いて行った。照射条件は SAD52 cm で線量率は 1.64 Gy/min であった。マウスを 3x3x9 cm のアクリル製の固定箱に右後肢を出して非麻酔下に固定した。足の圧迫による血流障害が起こらないように注意を払った。固定箱は透明アクリル板の上に置かれ、その下から照射を行った。フィルターは使用しなかった。吸収線量は TLD(BeO 系素子 UD-170A, ナショナル)を用いて測定した。照射野は 6x6 cm とし、腫瘍を含

んだ右後肢全体を入れた。1 回照射の線量は増殖遅延が生じ、適当な時間の後再増大するような線量とし、文献データ 18, 19)および過去の照射実験の結果から 20 Gy を選択した。1 回照射後の増殖曲線を作成し、コントロールとして非照射の腫瘍の増殖曲線を作成した。

#### 3.1.3.4 二重標識法による Tpot の算出

マウスの後肢皮下に移植された FSa-II が成長し実験に使用する時期にきたらマウスの腹腔内に bromodeoxyuridine(BrdUrd)を 50  $\mu$ g/g 体重投与した。2 時間の間隔をおいて 740 kBq(2  $\mu$  Ci)/g 体重の[3H]-thymidine([3H]dThd)を腹腔内投与した。[3H]dThd 投与 1 時間後にマウスを屠殺して、腫瘍を取り出しホルマリン液固定、パラフィン包埋後、パラフィン包埋組織を 4  $\mu$ m に薄切し、0.001 %poly-L-lysine 溶液で処理されたスライドガラス上に伸展、固定した。脱パラフィン、親水化処理後、非特異的染色の原因となる内因性ペルオキシダーゼ活性を除くために 0.3 %過酸化水素水に 15 分浸した。phosphate-buffered saline(PBS)に 5 分間浸した後、DNA を変性させるために 4 N HCl に 10 分間反応させた 14, 15)。PBS 洗浄後、非特異的反応を除くため正常マウス血清を加え、抗 BrdUrd マウスモノクローナル抗体(IU-4, MONOSAN 社)と 60 分間反応させた。PBS で洗浄後、ビオチン化第二抗体(ビオチン標識抗マウス IgG(マ))と 60 分間反応させた。PBS で洗浄後、アビジンとビオチン化マウスペルオキシダーゼの複合体(Abidin:Biotinylated Horseradish Peroxydase Complex)(ABC, Vector 社)と 30 分間反応させた。この複合体の酵素活性を利用し発色基質である DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)の溶液(0.05 %DAB、50 mMTris/HCl pH7.4、0.01 %H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)と反応させ、発色させた。

免疫染色を行ったスライドガラスを乾燥させた後、マイクロオートラジオグラフィーを行うために暗室内で 40 °C の恒温槽で溶解した乳剤(NR-M2, Konica 社)に浸した。半乾燥後、シゲルを入れた暗箱にスライドガラスを入れ冷蔵庫で 2-3 週間保存、露光した。現像、固定後ハトキシリンで後染色を行った。

得られた二重標識組織標本(Fig.1)を顕微鏡下で観察した。観察する領域は壊死組織や血液細胞がほとんど含まれず、腫瘍細胞が密につまった領域である。この領域に 220x320  $\mu$ m の長方形の関心領域を 1 腫瘍標本につき 3-11 か所設定した。この関心領域内のすべての腫瘍細胞(1 領域平均 800 個程)を数え、次の 4 種類の細胞数の占める割合(標識指数)を算出した。つまり、1)茶色の核(BrdUrd によってのみ標識された核)、2)茶色の核の上に銀粒子のある核(BrdUrd と[3H]dThd の両方によって標識された核)、3)青色の核の上に銀粒子のある核([3H]dThd によってのみ標識された核)、4)青色の核(標識されない核)の 4 種類である。

BrdUrd と[3H]dThd の投与間隔時間(Ti)は長すぎると最初に標識した細胞が G<sub>2</sub>, M 期を経て分裂してしまう。短すぎるとそれぞれのプローブだけで標識された細胞の数(単標識指数)が小さすぎて、ばらつきが大きくなる。Ti の値として、0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 時間を取り単標識指数から最適の Ti を検討した。

LI を BrdUrd または[3H]dThd の標識指数(二重標識されているかどうかは問わない)、LI\*を BrdUrd または[3H]dThd のみで標識され、二重標識されていない細胞の標識指数(単標識指数)とす

る。Ti を BrdUrd と[3H]dThd の投与間隔時間、Ts を S 期の長さとし、λ を細胞周期上の不均一な細胞分布の補正係数(ここでは 1.0 を用いた)とすると、Steel の方法 1)により Tpot は次の式で求められる。

$$T_{pot}=100\lambda \cdot T_s/LI=100\lambda \cdot T_i/LI^*$$

上式を用いて以下の腫瘍の Ts、Tpot を算出した。

- 1) 非照射で最大径が 6-7 mm(10 腫瘍、29 領域)の時と 10-15 mm(7 腫瘍、37 領域)になった時の腫瘍内 Tpot
- 2) 20 Gy1 回照射照射後 2 日目(2 腫瘍、9 領域)、4 日目(3 腫瘍、14 領域)、6 日目(3 腫瘍、24 領域)の時点での腫瘍内 Tpot

### 3.1.4 結果

#### 3.1.4.1 増殖曲線

非照射の腫瘍の増殖曲線を示した(Fig.2)。非照射の腫瘍の体積倍加時間(volume doubling time)は増殖曲線から、照射直前の腫瘍と同じ大きさになった時点から 6 日目までの間を取ると約 2 日であることがわかる。最大径が 6-7 mm の腫瘍が 10-15 mm になるのに 5-9 日かかった。1 回照射を行った時の増殖曲線も示した(Fig.2)。20 Gy1 回照射後、2 日目までは腫瘍体積の増加が見られるが、4 日目まで体積が減少してその後再増加に転じる。再増加直後の体積倍加時間は非照射のものと同じく約 2 日である。増殖遅延時間は約 4 日である。

#### 3.1.4.2 Ti の最適化

BrdUrd と[3H]dThd の投与間隔時間(Ti)を変化させた時の BrdUrd の単標識指数の変化を示した(Fig.3)。1-3 時間の範囲で単標識指数は直線的に増加しているが、4 時間では指数が急上昇しており、最初に標識された細胞が M 期を経て分裂してしまったことを示している。一方、0.5 時間の値は前述の直線上にはなくばらつきも多い。以上の結果から最適な Ti の値として 2 時間を選択した。

#### 3.1.4.3 Tpot

測定を行った各腫瘍の Ts、LI および Tpot の平均値と標準偏差、および Tpot 値の分布を示すヒストグラムをそれぞれ、Table 1, Figure 2 に示した。BrdUrd の標識指数と[3H]dThd の標識指数はほぼ同じであったため LI は[3H]dThd のものを用いた。

非照射の長径 6-7 mm の腫瘍の Ts は  $13.8 \pm 2.8$  時間、LI は  $30.5 \pm 5.3$  %、Tpot は  $46.2 \pm 10.6$  時間(mean ± S.D.)であった。長径 10-15 mm の腫瘍の Ts は  $25.6 \pm 9.9$  時間、LI は  $26.7 \pm 8.6$  %、Tpot は  $105 \pm 51.2$  時間であった。腫瘍が大きくなるにつれ Tpot は延長し、不均一性も大きくなった。ヒストグラムでは非照射の小腫瘍の Tpot は 46 時間を中心に、狭い範囲に分布している。大腫瘍では延長し、ばらつきがみられる。

20 Gy1 回照射後 2 日目の Ts は  $6.2 \pm 1.7$  時間、LI は  $5.9 \pm 5.4$  %、Tpot は  $147 \pm 59.4$  時間であった。4 日目の Ts は  $7.5 \pm 2.2$  時間、LI は  $17.8 \pm 9.6$  %、Tpot は  $53.3 \pm 26.0$  時間であった。6 日目の Ts は  $9.3 \pm 5.3$  時間、LI は  $22.2 \pm 15.1$  %、Tpot は  $69.7 \pm 55.7$  時間であった。ヒストグラムでは照射 2 日目は Tpot は

延長し、ばらつきが大きくなっている。4 日目には、Tpot の短縮が見られた。また 6 日目には、非照射コントロールと同等の Tpot の短い群と延長した群が見られ、ばらつきが増大していた。

照射後 2, 4, 6 日目いずれにおいても割合は異なるが、非照射コントロールと同等の Tpot の短い領域は存在していた。

### 3.1.5 考察

本研究で用いた方法は Hume ら(20)が 1989 年に報告して以来、マウスの小腸上皮(17,21)や乳腺(22)の増殖動態の研究に用いられてきた。1993 年に Schultz-Hector らがマウスの扁平上皮癌の増殖動態解析に応用し(23)、腫瘍体積の増加による腫瘍内 Tpot の不均一化を報告した。1995 年に阿部らはそれまでの方法を非照射のマウス線維肉腫 FSa-II に応用し Tpot を測定した。しかし腫瘍の大線量 1 回照射後の増殖動態をこの方法を用いて解析した報告はない。また本研究では予備実験により Ti の最適化を行い、この方法をより改良できたと考える。

Ramsay ら(18)はマウスの後肢皮下に移植された FSa-II が 250 mm<sup>3</sup> から 500 mm<sup>3</sup> に達する体積倍加時間を 2 日間としている。阿部ら(16)は二重標識法を使って FSa-II の Ts, LI および Tpot を測定した。それぞれ 12.3 時間、29.5%、42.6 時間と報告した。それぞれ今回の結果と矛盾せず、この腫瘍と二重標識法を使った実験が再現性を有することが示された。

長径 6-7 mm の腫瘍内には壊死組織はほとんど見られず、ほぼ均一の比較的高い LI(標識率)を示した。均一な速い増殖を反映すると思われる。腫瘍が大きくなると Tpot の延長が観察されるようになった(Table 1, Fig. 4b)。腫瘍が大きくなると次第に腫瘍成長が遅延するが、Tpot の延長も一つの要因であることが明らかになった。この原因としては、腫瘍内の酸素濃度、pH や栄養状態の不均一性等が考えられる(24, 25)。従来、腫瘍の大小による Tpot の平均値の違いを示した報告(23)はあるが、ばらつきを示していない。本研究では、初めて腫瘍の大小による Tpot の分布パターンの違いを示した(Fig.4a, 4b)。

非照射のヒト腫瘍内の Tpot のばらつきをみた報告がある。Wilson (26)らは、iododeoxyuridine(IUdR)と flow cytometry を用いて、ヒト大腸癌 30 腫瘍からそれぞれ複数のサンプルを採取し、Tpot を測定した。すべてのサンプルを集計すると Tpot の値はポアソン分布を示した。また個々の腫瘍内での Tpot の変動係数(C.V.)の 30 腫瘍の平均値は 0.35 であったと報告している。今回実験で用いた非照射の FSa-II の小腫瘍 10 腫瘍と大腫瘍 7 腫瘍をそれぞれ 1 つの小腫瘍、大腫瘍と仮定すると腫瘍内 Tpot の C.V.はそれぞれ 0.23, 0.49 となり同様の結果になった。

20 Gy1 回照射後 2 日目の腫瘍は LI の低下が顕著であった。4 日目には LI の回復傾向が見られた。6 日目には全体的に LI は上昇して不均一性が見られた。4 日目頃から見られる LI の再増加は、腫瘍体積の減少を代償する腫瘍細胞の再増殖を反映すると思われる。6 日目にも再増殖は続いていると考えられるが、腫瘍体積増大のため G0 期の細胞集団の出現等によって見かけ上 LI が不均一になると思われる。1988 年に

Ramsay ら(18)は同じ腫瘍 FSa-II を用いて BrdUrd に対するモノクローナル抗体と flow cytometry により、20 Gy1 回照射後の LI の変化を測定した。LI は今回の実験とほぼ同様の変化を示した。

20 Gy1 回照射後 Ts は有意に短縮した。これは放射線照射により細胞周期時間が短縮した細胞が存在することを示すと考えられる。6 日目に腫瘍体積増大が見られるようになると Ts は若干延長していた。これは腫瘍内に低酸素領域等が出現してきたため 24, 25)とされる。

照射後 2 日目、4 日目、6 日目いずれもほぼ同様に照射前に比べて Ts の有意な短縮が見られた。それにもかかわらず Tpot が延長したり短縮したりするのは LI の変動によるところが大きいと考える。照射後 2 日目の腫瘍は Ts が短縮しているにもかかわらず LI の減少が著しいため Tpot の延長が見られた。4 日目から見られる LI の再増加に伴う Tpot の短縮は腫瘍細胞の再増殖を反映すると思われる。照射後 6 日目の腫瘍は LI が増加し、Ts も延長しはじめたがいずれも不均一性を示すようになった。それに伴い Tpot も照射直前の腫瘍程に短縮した群の他に延長した群も見られるようになった。これはさかんに増殖を示す集団もあるものの全体としては非照射の大きい腫瘍の Tpot の分布に近づきつつある状態であると考えられる。また照射後 2 日目、4 日目、6 日目いずれの時期にも割合は異なるものの非照射小腫瘍と同等に Tpot の速い部分が見られたことは、より小さい 1 回線量を用いる分割照射中の加速再増殖に関係してくる分画と予想され注目すべき点である。

従来小腸などの正常組織の放射線照射後の増殖動態を二重標識法で評価した報告はあるが、Tpot を指標にして放射線照射後の腫瘍の増殖動態を評価した報告は少ない。増殖動態のより正確な把握には、標識率(S 期細胞の割合)と細胞周期の二つの情報を含む Tpot を測定できるこの方法は有用であると考えられる。

### 3.1.6 結論

- 1) 瘍内の Tpot の不均一性 (平均値と分布) を評価することができる。この方法により腫瘍の大小による増殖動態の違いを把握できた。
- 2) 同様の方法で放射線照射後の腫瘍の腫瘍内 Tpot の平均値と分布を評価することにより、照射後の腫瘍の増殖遅延および再増殖の動態を知ることができた。

### 引用文献

- 1) Steel GG: Basic theory of growing cell populations. In: Growth kinetics of tumours. Oxford, Clarendon press, 1977, pp 56-85.
- 2) Begg AC, Hofland I, Moonen L, et al: The predictive value of cell kinetic measurements in a European trial of accelerated fractionation in advanced head and neck tumors: an interim report. Int J Radiat Oncol Biol Phys 19: 1449-1453, 1990.
- 3) Begg AC, Hofland I, Van Glabbeke M, et al: Predictive value of potential doubling time for radiotherapy of head and neck tumor patients: Results from the EORTC Cooperative Trial 22851. Semin Radiat Oncol 2: 22-25, 1992.
- 4) Thames HD, Peters LJ, Withers HR, et al: Accelerated fractionation vs hyperfractionation: rationales for

- several treatments per day. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 9: 127-138, 1983.
- 5) Fowler JF: Potential for increasing the differential response between tumors and normal tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12: 641-645, 1986.
- 6) 佐々木武仁 : 頭頸部腫瘍の放射線抵抗性要因の分析. *頭頸部腫瘍* 21: 570-575, 1995.
- 7) 佐々木武仁, 増山祥二 : 細胞動態からみた分割照射法の生物学的基礎. *癌の臨床* 31: 1502-1511, 1985.
- 8) Begg AC, McNally NJ, Shrieve DC, et al: A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample. *Cytometry* 6: 620-626, 1985.
- 9) Wilson GD, Soranson JA, Lewis AA: Cell kinetics of mouse kidney using bromodeoxyuridine incorporation and flow cytometry: preparation and staining. *Cell Tissue Kinet* 20: 125-133, 1987.
- 10) Begg AC, Moonen L, Hofland I, et al: Human tumour cell kinetics using a monoclonal antibody against iododeoxyuridine: Intratumour sampling variation. *Radiother Oncol* 11: 337-347, 1988.
- 11) Bennet MH, Wilson GD, Dische S, et al: Tumor proliferation assessed by combined histological and flow cytometric analysis: implications for therapy in squamous cell carcinoma in the head and neck. *Br J Cancer* 65: 870-878, 1992.
- 12) Quastler H, Sherman FG: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp Cell Res* 17: 420-438, 1959.
- 13) Steel GG: Cell loss from experimental tumours. *Cell Tissue Kinet* 1: 193-207, 1968.
- 14) Shibui S, Hoshino T, Vanderlaan M, et al: Double labeling with iodo- and bromodeoxyuridine for cell kinetics studies. *J Histochem Cytochem* 37: 1007-1011, 1989.
- 15) Asai A, Shibui S, Barker M, et al: Cell kinetics of rat 9L brain tumors determined by double labeling with iodo- and bromodeoxyuridine. *J Neurosurg* 73: 254-258, 1990.
- 16) Abe Y, Takahashi J, Fukuda H, et al: Potential doubling time assayed in mouse jejunum and a mouse fibrosarcoma FSa-II: double labeling with bromodeoxyuridine and <sup>3</sup>H-thymidine. *J Jpn Soc Ther Radiol Oncol* 7: 195-200, 1995.
- 17) Abe Y, Takahashi J, Fukuda H, et al: Cell kinetic study of murine jejunal crypts during multiple doses per day. *Tohoku J Exp Med* 168: 311-315, 1992.
- 18) Ramsay J, Suit HD, Preffer FI, et al: Changes in labeling index during radiation treatment of an experimental tumor. *Radiat Res* 116: 453-461, 1988.
- 19) Abe Y, Urano M, Kenton LA, et al: The accelerated repopulation of a murine fibrosarcoma, FSa-II, during the fractionated irradiation and the linear- quadratic model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 21: 1529-1534, 1991.
- 20) Hume WJ: DNA-synthesizing cells in oral epithelium have a range of cell cycle duration: evidence from double-labelling studies using tritiated thymidine and bromodeoxyuridine. *Cell Tissue Kinet* 22: 377-382, 1989.



- 21) Chwalinski S, Potten CS, Evans G: Double labelling with bromodeoxyuridine and 3H-thymidine of proliferative cells in small intestinal epithelium in steady state and after irradiation. *Cell Tissue Kinet* 21: 317-329,1988.
- 22) Christov K, Swanson SM, Guzman RC, et al: Kinetics of mammary epithelial cell proliferation in pituitary isografted BALB/c mice. *Carcinogenesis* 14(10): 2019-2025,1993.
- 23) Schultz-Hector S, Begg AC, Hofland I, et al: Cell kinetic analysis of murine squamous cell carcinomas: A comparison of single versus double labelling using flow cytometry and immunochemistry. *Br J Cancer* 68: 1097-1103, 1993.
- 24) Shrieve DC, Begg AC: Cell cycle kinetics of aerated, hypoxic and re-aerated cells in vitro using flow cytometric determination of cellular DNA and incorporated bromodeoxyuridine. *Cell Tissue Kinet* 18: 641-651, 1985.
- 25) Born R, Hug O, Trott KR: The effect of prolonged hypoxia on growth and viability of chinese hamster cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1: 687-697, 1976.
- 26) Wilson MS, West CML, Wilson GD, et al: Intra-tumoral heterogeneity of tumor potential doubling times (Tpot) in colorectal cancer. *Br J Cancer* 68: 501-506, 1993.

表—1 未照射、20Gy 一回照射後の Tpot の挙動

		標識率	Ts (hr)	Tpot (hr)
未照射	小	30.5±5.3	13.8±2.8	46.2±10.6
	大	26.7±8.6	25.6±9.9	105±51.2
20 Gy 照射				
	2日	5.9±5.4	6.2±1.7	147±59.4
	4日	17.8±9.6	7.5±2.2	53.3±26.0
	6日	22.2±15.1	9.3±5.3	69.7±55.7

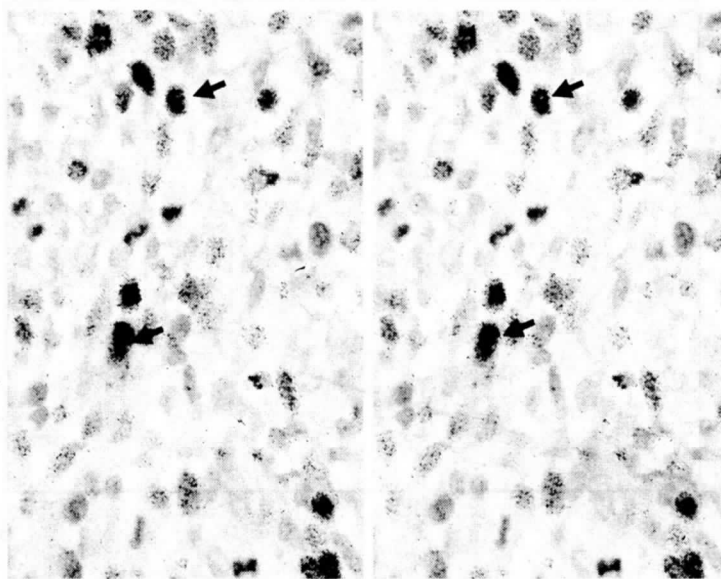


Fig. 1 FSa-II tumor double labeled by BrdUrd and [3H]dThd. Arrows represent only BrdUrd positive cells. Arrowheads represent only [3H]dThd cells. Dark nucleus with grains indicate both BrdUrd and [3H]dThd positive cells. Original magnification x 1000.

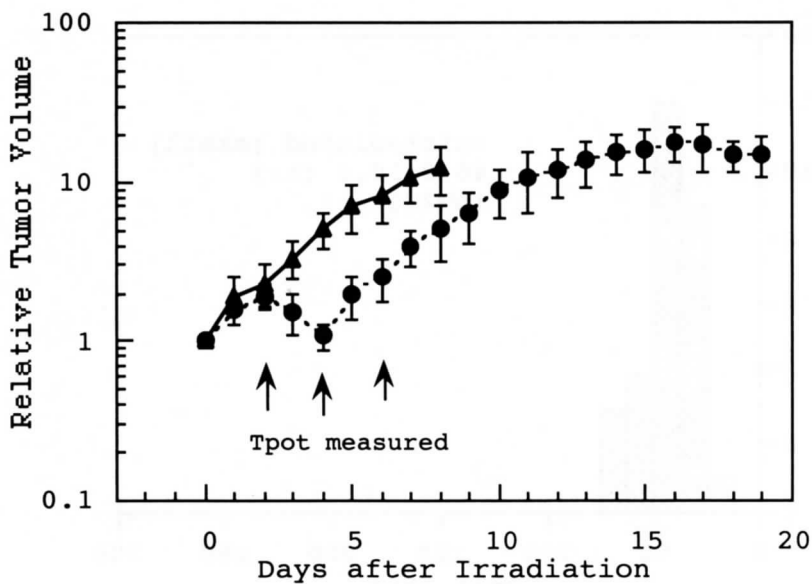


Fig. 2 Growth curve for FSa-II tumors, unirradiated (▲) and irradiated with 20 Gy (●). Tumor volumes were normalized to that of the tumors at day 0. Each point shows the mean value determined from 6-7 tumors and vertical bars represent standard deviations of the mean.

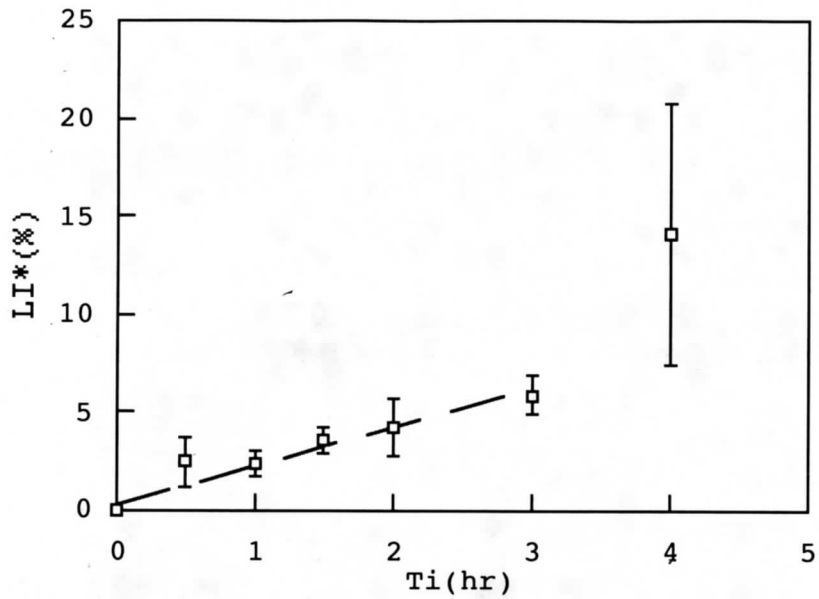


Fig. 3 Relationship between the time interval between administration of BrdUrd and  $[3H]dThd$  ( $T_i$ ) and the labeling index for cells labeled singly with BrdUrd ( $LI^*$ ). Each point shows the mean value determined from 4-24 areas and vertical bars represent standard deviations of the mean.

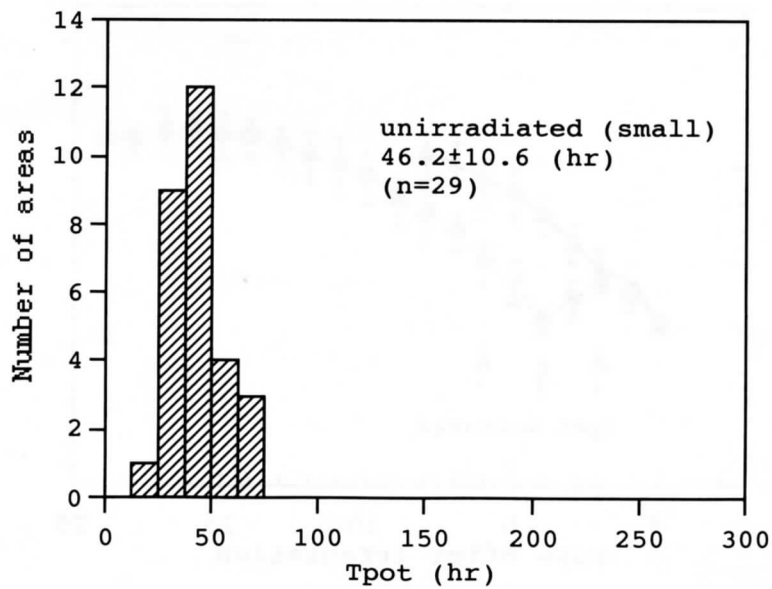


Fig. 4 (a) The distribution of  $T_{pot}$  for unirradiated small (6-7 mm in diameter) tumors.

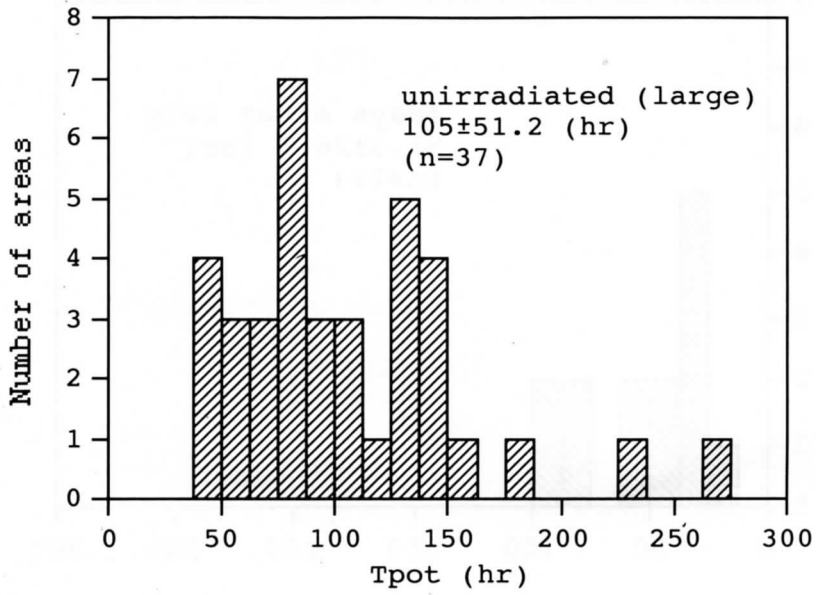


Fig. 4 (b) The distribution of Tpot for unirradiated large (10-15 mm in diameter) tumors.

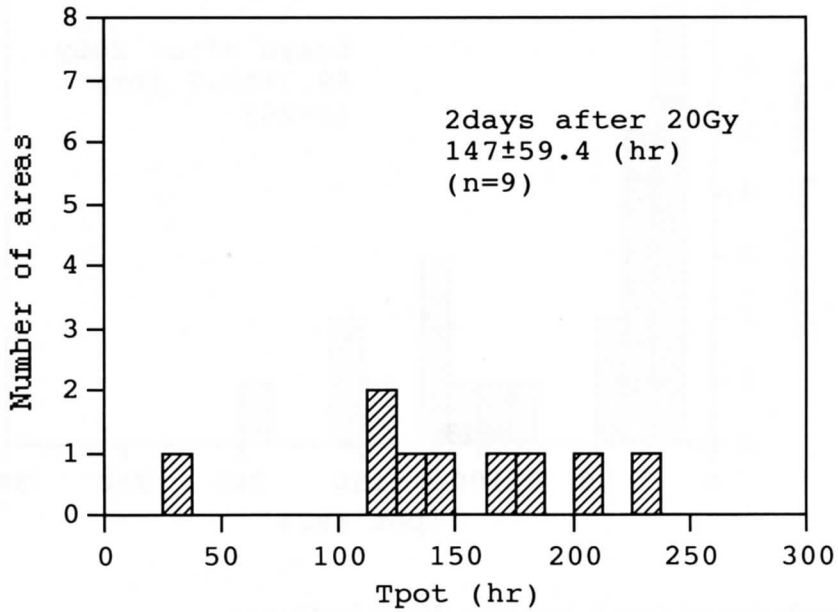


Fig 5(a) The distribution of Tpot 2 days after 20 Gy irradiation.

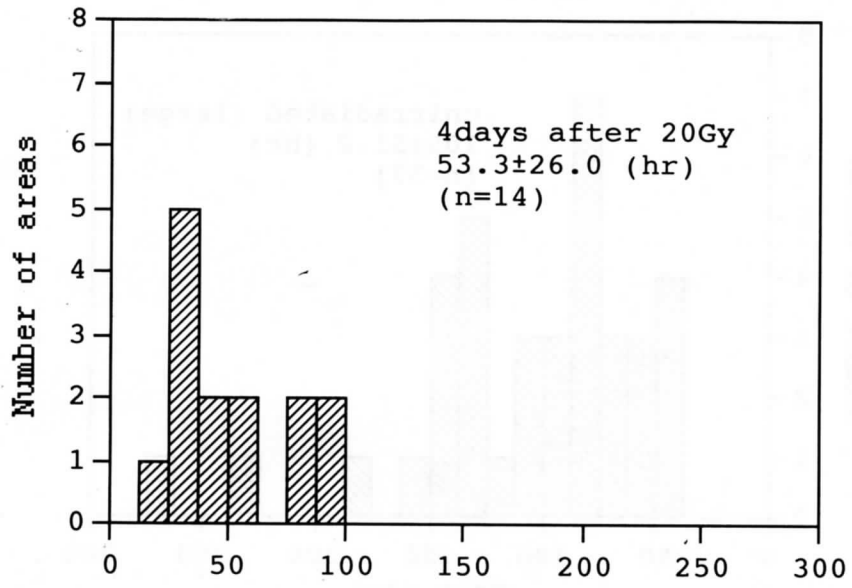


Fig. 5 (b) The distribution of Tpot 4 days after 20 Gy irradiation.

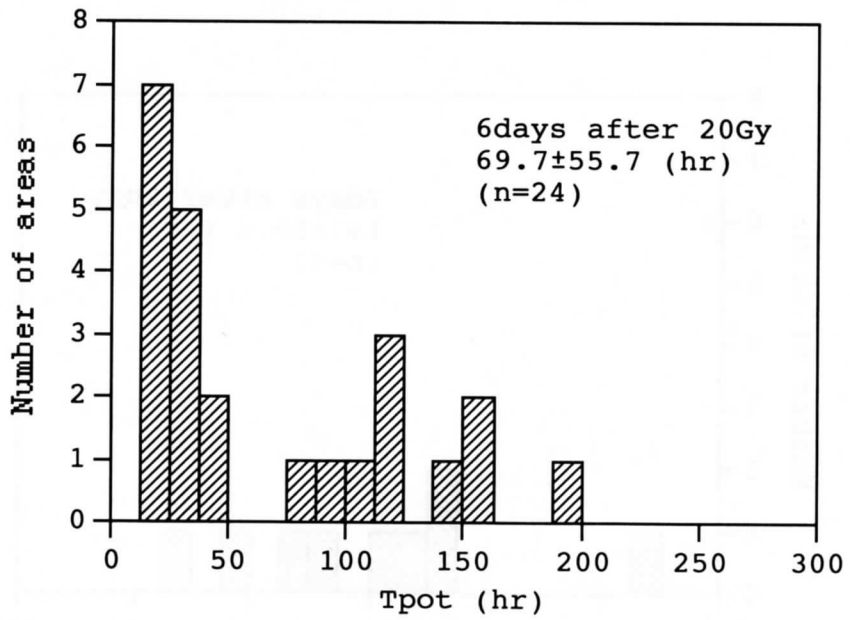


Fig 5(c) The distribution of Tpot 6 days after 20 Gy irradiation.

### 3.2 Tpot の腫瘍内不均一性の解析—血管からの距離による増殖動態の違い

赤井澤 隆、阿部 由直、真里谷 靖、福田 寛

#### 3.2.1 要旨

プロモテオキシリジンに対するモノクローナル抗体による免疫染色と 3H-チミジンのオートラジオグラフィを組み合わせた二重標識法による腫瘍内のポテンシャル倍加時間(Tpot)の測定法を確立し、Tpot を指標として未照射の大きさの異なる腫瘍および放射線照射後の腫瘍の血管からの距離の違いによる細胞増殖動態を検討した。

マウスの自然発生線維肉腫 FSa-II をマウス後足皮下に移植し未照射で直径 6-7mm になった時点と 10-15mm になった時点で腫瘍内血管からの距離により 2 領域(血管壁から 90 $\mu$ m までと 90-180 $\mu$ m まで、それぞれ内、外とする)の Tpot を測定した。また腫瘍が直径 6-7mm の時点で 60Co ガンマ線 20Gy 1 回照射し、3 日目、5 日目、7 日目の Tpot を同様に 2 領域について測定し検討した。

未照射の直径 6-7mm の腫瘍、直径 10-15mm の腫瘍の Tpot は、内ではそれぞれ 35.4 $\pm$ 8.1 時間、37.6 $\pm$ 9.9 時間、外ではそれぞれ 90.7 $\pm$ 23.6 時間、141 $\pm$ 58 時間であった。腫瘍の大小にかかわらず、内に比べて外では Tpot が延長していた。これは、標識指数(LI)の低下、および S 期の長さ(Ts)が延長する傾向があることに起因していた。また、大腫瘍の外では小腫瘍の外に比べて Tpot が延長していた。

放射線照射後 3 日目の腫瘍の Tpot は未照射の小腫瘍に比べて内では 3.0 倍、外では 3.2 倍に延長した。5 日目には内では 1.6 倍、外では 1.6 倍に短縮した。また 7 日目は内、外それぞれ 1.2、1.4 倍で 5 日目と同様の値を示した。7 日目までに照射直前の値には回復しておらず、また照射前より Tpot の短縮した細胞集団は認めなかった。以上の結果から、(1)未照射の腫瘍では、血管からの距離が遠くなると Tpot が延長すること、これは、LI の低下と Ts が延長する傾向があることによること、(2)20Gy 照射した腫瘍においても内外の増殖動態は上記と同じであること、(3) 20Gy 照射後に Tpot の延長、回復が見られたが、これは Ts ではなく主として LI の変動によることがわかった。

#### 3.2.2 はじめに

3.1 では、腫瘍血管からの距離は考慮せずに Tpot の解析を行ったが、ここではこの方法をさらに確立するとともに、マウス腫瘍の大きさによる腫瘍内血管からの距離による Tpot の違い、放射線 1 回照射後の血管からの距離による Tpot の変化を再解析した。

#### 3.2.3

3.1 で作成した二重標識標本を用いて以下について Tpot を再解析した。

A)未照射で最大径が 6-7mm(3 腫瘍, 9 領域)の時点と 10-15mm(3 腫瘍, 9 領域)になった時点での腫瘍血管からの距離が近い部分(0-90  $\mu$ m)と遠い部分(90-180  $\mu$ m)の Tpot を測定

B)20Gy1 回照射照射後 3 日目(3 腫瘍, 9 領域), 5 日目(3 腫瘍, 9 領域), 7 日目(3 腫瘍, 9 領域)の時点での腫瘍血管からの距離が近い部分(0-90  $\mu$ m)と遠い部分(90-180  $\mu$ m)の Tpot を測定

BrdUrd の標識指数と[3H]dThd の標識指数はほぼ同じであったため LI は BrdUrd のものを用いた。それぞれの群および腫瘍の内外による平均値の差の検定には t 検定を用いた。

### 3.2.4 結果

表-1 に測定を行った各腫瘍の Ts, LI および Tpot の平均値と標準偏差を示した。

#### 1)未照射腫瘍

未照射の長径 6-7mm の腫瘍の血管周囲の内(0-90  $\mu$ m)の LI は  $0.45 \pm 0.06$ , Ts は  $15.9 \pm 3.3$  時間, Tpot は  $35.4 \pm 8.1$  時間(mean  $\pm$  s.d.)であった。血管周囲の外(90-180  $\mu$ m)の LI は  $0.23 \pm 0.04$ , Ts は  $20.4 \pm 6.5$  時間, Tpot は  $90.7 \pm 23.6$  時間であった。長径 10-15mm の腫瘍の内 LI は  $0.40 \pm 0.07$ , Ts は  $14.5 \pm 2.5$  時間, Tpot は  $37.6 \pm 9.9$  時間であった。外の LI は  $0.15 \pm 0.03$ , Ts は  $20.3 \pm 8.1$  時間, Tpot は  $141 \pm 58$  時間であった(表-1)。

#### 2)20Gy1 回照射腫瘍

20Gy1 回照射後 3 日目の腫瘍の血管周囲の内 LI は  $0.17 \pm 0.05$ , Ts は  $17.3 \pm 3.6$  時間, Tpot は  $108 \pm 44$  時間であった。外の LI は  $0.07 \pm 0.02$ , Ts は  $20.8 \pm 6.5$  時間, Tpot は  $286 \pm 67$  時間であった。5 日目の内の LI は  $0.25 \pm 0.06$ , Ts は  $13.4 \pm 1.8$  時間, Tpot は  $56.8 \pm 19.5$  時間であった。外の LI は  $0.13 \pm 0.04$ , Ts は  $19.2 \pm 7.7$  時間, Tpot は  $145 \pm 63$  時間であった。7 日目の内の LI は  $0.39 \pm 0.05$ , Ts は  $16.4 \pm 1.9$  時間, Tpot は  $43.5 \pm 9.7$  時間であった。外の LI は  $0.16 \pm 0.04$ , Ts は  $21.0 \pm 12.2$  時間, Tpot は  $128 \pm 61$  時間であった(表-1)。

図-1 は、照射後の Tpot の変動を未照射腫瘍(小)との相対比で示したものである。放射線照射後 3 日目の腫瘍の Tpot は未照射の小腫瘍に比べて内では 3.0 倍、外では 3.2 倍に延長した。5 日目には内では 1.6 倍、外では 1.6 倍に短縮した。また 7 日目は内、外それぞれ 1.2、1.4 倍であった。

### 3.2.5 考察

組織標本を観察すると長径 6-7mm の腫瘍内には壊死組織はほとんど見られなかった。血管の周囲に LI の高い箇所が見られた。一方、長径 10-15mm の腫瘍には壊死組織が見られ、その周囲に、核が縮小し、これから壊死すると思われる腫瘍細胞が見られた。その周りには viable な細胞が見られた。血管の周囲に LI の高い箇所が見られた。腫瘍の大小に関係なく内(0-90  $\mu$ m)よりも外(90-180  $\mu$ m)の方が Tpot が延長していた。これは血管から離れるに従い LI が低下したこと、また Ts が延長する傾向がみられたことによるものと考えられる。血管からの距離による LI の低下については、一般的に

認められてきた事実であり多くの報告がある 1, 2)。一方、小腫瘍に比べて大腫瘍で  $T_s$  が延長しているという報告はあるが 3)、血管から離れた領域で延長しているという報告はない。一方 Tannock ら 1) は labelled mitoses 法によりマウス乳腺腺癌の腫瘍血管からの距離により  $T_s$  の値は変動しないと報告している。しかし彼等は腫瘍血管から  $90\mu\text{m}$  の距離を 3 領域に分けて論じている。本実験では腫瘍血管から  $180\mu\text{m}$  の距離を 2 領域に分けているため外領域ではより低血流状態にあることが予測される。

また小さい腫瘍と大きい腫瘍を比べると内での  $T_{pot}$  の値に差はないが外での  $T_{pot}$  は大きい腫瘍の方が有意に延長していた ( $p < 0.05$ )。この原因としては大きい腫瘍では小さい腫瘍に比べ外領域への血液灌流が低下していることが考えられる。従来、腫瘍の大小による  $T_{pot}$  の値の違いを示した報告 3) はあるが、部位を特定せず平均値を示したのみであった。本研究では、腫瘍の大小による腫瘍血管からの距離と  $T_{pot}$  の関係を測定した。

### 1 回照射後の増殖動態

20Gy1 回照射後 3 日目の  $T_{pot}$  は内外領域ともに照射直前の値の約 3 倍に延長した。5 日目の  $T_{pot}$  は両領域ともに 3 日目の 0.5 倍に短縮し、照射直前の値と有意差は無くなったが延長の傾向は続いていた。7 日目には内外領域とも 5 日目とほぼ同じ値を示した。これは 20Gy1 回照射後 7 日目までは増殖の速い血管周囲においても未照射の腫瘍の  $T_{pot}$  よりやや延長しており、照射前の腫瘍より  $T_{pot}$  の短縮した細胞集団が出現していないことを示す。マウス扁平上皮癌では 20Gy1 回照射後 12 日目に照射直前の腫瘍より  $T_{pot}$  が短縮したという報告 4) もあり、もう少し長い期間の追跡を要するかもしれない。どの時点においても内 ( $0-90\mu\text{m}$ ) の  $T_{pot}$  の方が外 ( $90-180\mu\text{m}$ ) よりも短縮していたのは未照射の腫瘍と同様だった。

$T_s$  は内外領域それぞれ、照射前と照射後いずれの時点においても有為差は見られなかった。内よりも外のほうが  $T_s$  が延長している傾向も未照射のものと同じであった。照射による細胞周期時間の変化に関しては本実験では言及できないが、 $T_s$  は照射前後で変化しないことは分かった。これは、以前の報告 5, 6) と一致する。

$T_s$  が照射前後で変化しないため  $T_{pot}$  の長さは LI に依存した。内外領域とも照射後 3 日目に LI が 3 分の 1 に低下すると  $T_{pot}$  が 3 倍に延長するというように同調した。このことは大線量 1 回照射においては、血管からの距離つまり血流の違いは放射線による細胞増殖遅延、再増殖の変化の割合にあまり影響を及ぼさないことを示すと思われる。

ここで、大小の腫瘍、照射後の腫瘍それぞれの内外領域あわせて 45 領域について LI と  $T_s/LI$  の相関を調べた。LI と  $T_s/LI$  の常用対数は有意の相関 ( $r=0.89$ ) を示し、回帰直線の有意性は  $p < 0.001$  であった (図- 6)。このことは FSa-II においても LI が推定できれば  $T_{pot}$  もある程度推定できることを示している 7)。しかし、より正確には二重標識法などを用いることがよいと思われる。

以上、増殖動態のより正確な把握には、標識率 (S 期細胞の割合) と細胞周期の二つの情報を含む



Tpot を測定できるこの方法は有用であると考える。

本実験では加速増殖をする細胞集団を捕えることはできなかった。一般に加速増殖は分割照射中に起こっていると考えられるので、本法を分割照射実験に適用して確認を要する。また分割照射中には血管からの距離の違いによって細胞増殖遅延、再増殖が本実験と異なる結果を示す可能性も考えられる。

### 3.2.5 結論

(1)BrdUrd と[3H]dThd を用いた二重標識法により腫瘍血管からの距離の違いによる Tpot の平均値と分布を評価した。

(2)未照射の腫瘍では血管からの距離が遠くなると Tpot が延長すること、これは、LI の低下と Ts の延長によること、20Gy 照射した腫瘍においても内外の増殖動態は上記と同じであること、20Gy 照射後に Tpot の延長、回復が見られたが、これは Ts ではなく主として LI の変動によることがわかった。

(3)二重標識法により、放射線照射後の腫瘍血管からの距離の違いによる Tpot の平均値と分布を評価することにより、照射後の腫瘍の増殖遅延および再増殖の動態を知ることができると思われる。

### 文献

- 1) Tannock IF. The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumor. *Br J Cancer* 22: 258-273, 1968.
- 2) Takai Y, Sakamoto K, Okada S. Oxic and hypoxic cells in a murine squamous cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 79: 523-528, 1988.
- 3) Schultz-Hector S, Begg AC, Hofland I, Kummermehr J, Sund M. Cell kinetic analysis of murine squamous cell carcinomas: A comparison of single versus double labelling using flow cytometry and immunochemistry. *Br J Cancer* 68: 1097-1103, 1993.
- 4) Murata R, Nishimura Y, Shibamoto Y, Hiraoka M, Abe M. Changes in cell proliferative parameters of SCCVII and EMT6 murine tumors after single-dose irradiation. *Jpn J Cancer Res* 87: 662-668, 1996.
- 5) Hermens AF, Barendsen GW. Changes of cell proliferation characteristics in a rat rhabdomyosarcoma before and after x-irradiation. *Europ J Cancer* 5: 173-189, 1969.
- 6) Szczepanki L, Trott KR. Post-irradiation proliferation kinetics of a serially transplanted murine adenocarcinoma. *Br J Radiol* 48: 200-208, 1975.
- 7) 佐々木武仁 増山祥二 細胞動態からみた分割照射法の生物学的基礎 癌の臨床 第 31 巻・第 12 号 1985 年 9 月

表-1 20Gy 一回照射後の Tpot の変動

	標識率	Ts (hr)	Tpot (hr)
未照射			
小：近	0.45±0.06	15.9±3.3	35.4±8.1
遠	0.23±0.04	20.4±6.5	90.7±23.6
大：近	0.40±0.07	14.5±2.5	37.6±9.9
遠	0.15±0.03	20.3±8.1	141.1±58.1
20 Gy 照射			
2日後：近	0.17±0.05	17.3±3.6	107.7±43.7
遠	0.07±0.02	20.8±6.5	285.8±67.4
4日後：近	0.25±0.06	13.4±1.8	56.8±19.5
遠	0.13±0.04	19.2±7.7	145.4±63.4
6日後：近	0.39±0.05	16.4±1.9	43.5±9.7
：遠	0.16±0.04	21.0±12.2	127.6±61.4

Ts: S 期時間、Tpot: ポテンシャル倍加時間

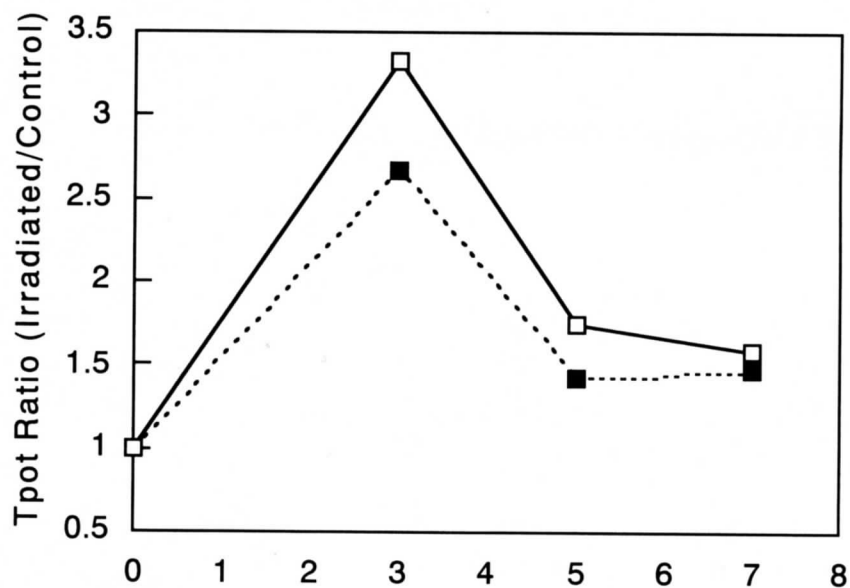


図-1 未照射腫瘍(小)との相対比で示した 20Gy1 回照射後の腫瘍の内外の Tpot の変動

■: 内 □: 外

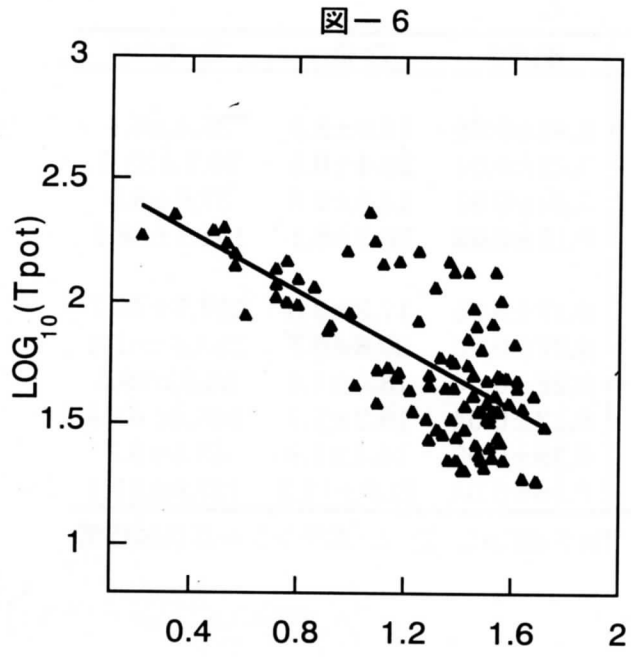


図-2 LI と Ts/LI の関係

### 3.3 分割照射中の Tpot の解析

—プロモデオキシウリジンと 3H-チミジンをを用いた二重標識法による測定—

赤井澤 隆、阿部 由直、真里谷 靖、福田 寛

#### 3.3.1 要旨

プロモデオキシウリジンに対するモノクローナル抗体による免疫染色と 3H チミジンのオートラジオグラフィを組み合わせた二重標識法により腫瘍内のポテンシャル倍加時間(Tpot)の測定し、Tpot を指標として放射線分割照射中の腫瘍の細胞増殖動態を検討した。

マウスの自然発生線維肉腫 FSa-II をマウス後足皮下に移植し直径 6-7mm になった時点で 1 日 1 回 6Gy の照射を 10 日間施行し、照射開始直前、5 回照射の 24 時間後、10 回照射の 24 時間後で腫瘍内複数領域の血管周囲の Tpot を測定した。非照射の照射開始直前の腫瘍の Tpot の中央値は 39.3 時間で分布のばらつきは小さかった。6Gy5 日間照射後の Tpot の中央値は 72.0 時間と延長し、ばらつきの大きい分布となったが照射開始直前の腫瘍と同等の Tpot の短縮した領域も存在していた。6Gy10 日間照射後の Tpot の中央値は 33.8 時間と短縮し、照射開始直前の腫瘍よりも Tpot の短縮した領域が増加した。

以上の結果から本二重標識法により、腫瘍内の不均一性を考慮した細胞増殖動態を把握できると思われる。また分割照射中、割合は異なるが照射開始直前の腫瘍と同等の短い Tpot を示す領域は常に存在すると思われる。10 回照射後に照射開始直前の腫瘍よりも Tpot の短縮した領域の割合が増加したことは加速再増殖を表すと思われる。この方法により 1 個の腫瘍の平均値としての Tpot では見えない情報を捉えられる可能性がある。

#### 3.3.2 はじめに

放射線照射中の再増殖は、腫瘍の放射線抵抗性の一つの重要な因子であることが知られている。本研究では、マウス腫瘍に分割照射を行っている最中の Tpot を測定することにより、照射中の細胞増殖動態を明らかにすることを目指した。

#### 3.3.3 方法

(1) 動物と腫瘍、(2) 増殖曲線計測、3.2 で示したとおりである。

(3) 分割照射法

照射は 60Co ガンマ線遠隔照射装置を用いた。照射条件は SAD52cm で線量率は 1.64Gy/min であった。マウスを 3x3x9cm のアクリル製の固定箱に右後足を出して非麻酔下に固定する。足の圧迫による血流阻害が起こらないように注意を払った。固定箱は透明アクリル板の上に置かれ、その下から照射を行った。フィルターは使用しなかった。吸収線量は TLD(BeO 系素子 UD-170A、ナショナル)を用いて測定した。照射野は 6x6cm とし、腫瘍を含んだ右後足全体を入れた。分割照射の 1 回線量は照射中増殖が抑制される線量とした。6Gy を 1 日 1 回 24 時間間隔で 10 回照射した。腫瘍の長径が 6-7mm に達した時に照射を開始した。分割照射中の増殖曲線を作成し、コントロールとして非照射の腫瘍の増殖曲線を作成した。

(4) 以下について Tpot を算出した。

- 1) 6Gy を 1 日 1 回 5 回照射照射後 24 時間後の腫瘍
- 2) 6Gy を 1 日 1 回 10 回照射照射後 24 時間後の腫瘍

標識率の測定は腫瘍血管からの距離で分けずに、壊死部を避けて行った。

### 3.3.4 結果

#### (1) 増殖曲線

非照射の腫瘍の増殖曲線を示した(Fig. 1)。非照射の腫瘍の体積倍加時間(volume doubling time)は増殖曲線から照射直前と同じ大きさになった時点から 6 日目までの間を取ると約 2 日であることがわかる。10 回照射を行った時の増殖曲線も示した(Fig. 1)。照射中は体積が一定であることがわかる。

#### (2) Tpot

Fig. 2 に照射開始直前のコントロール腫瘍内の Tpot の分布を示した。中央値は 39.3 時間で、分布のばらつきは小さかった。一方、6Gy-5 日間照射後の Tpot の中央値は 72.0 時間と延長し、ばらつきの大きい分布となったがコントロールと同等の短縮した領域も存在していた(Fig. 3)。また、6Gy-10 日間照射後の Tpot の中央値は 33.8 時間と短縮し、コントロールの中央値よりも Tpot の短い領域が増加した(Fig. 4)。

### 3.3.5 考察

本研究で用いた方法は Hume ら 1)が 1989 年に報告して以来、マウスの小腸上皮 2,3)や乳腺 4)の増殖動態の研究に用いられてきた。1993 年に Schultz-Hector らがマウスの扁平上皮癌の増殖動態解析に応用し 5)、腫瘍体積の増加による腫瘍内 Tpot の不均一化を報告した。1995 年に阿部らはそれまでの方法を非照射のマウス線維肉腫 FSa-II に応用し Tpot を測定した。しかし腫瘍の分割照射中の増殖動態をこの方法を用いて解析した報告はない。

組織標本を観察すると長径 6-7mm の腫瘍内には壊死組織はほとんど見られず、ほぼ均一の比較的高い LI(標識率)を示した。均一な速い増殖を反映すると思われる。一方、6Gy を 5 日間照射した腫瘍では腫瘍細胞が密で viable な部分だけを関心領域としたにもかかわらず、Tpot の延長、不均一化が見られた(Fig.4)。しかし非照射の腫瘍と同じような Tpot の短い領域も存在していた。この原因としては、腫瘍内の酸素濃度、pH や栄養状態の不均一性等が考えられる 6, 7)が、本当の理由は今後さらに究明が必要である。

10 回照射後に、非照射のコントロールの腫瘍の Tpot の中央値よりも Tpot の短い領域が増加したことは加速再増殖と思われる。ヌードマウスに移植されたヒトの子宮頸部扁平上皮癌に対する分割照射中に BrdUrd と IdUrd を用いた flow cytometry により Tpot を求めた報告がある 8)。それによると照射開始直後に Tpot は非照射のものより短縮している。われわれの結果では中央値としては 1 度延長してから短縮に向かっている。これは腫瘍の放射線感受性の違いや照射法の違いによると思われる。しかし flow cytometry 法では 1 個の腫瘍の平均値としての Tpot しか見ておらず、それでは捉えられない情報をわれわれの方法では得られる可能性がある。

### 3.3.6 結論

BrdUrd と<sup>3</sup>HdThd を用いた二重標識法により分割照射中の腫瘍内の Tpot の分布と中央値を評価することにより、腫瘍の照射中の増殖動態の違いを把握できると思われる。

#### [文献]

- 1) Hume WJ: DNA-synthesizing cells in oral epithelium have a range of cell cycle duration: evidence from double-labeling studies using tritiated thymidine and bromodeoxyuridine. *Cell Tissue Kinet* 22: 377-382, 1989.
- 2) Abe Y, Takahashi J, Fukuda H, et al: Cell kinetic study of murine jejunal crypts during multiple doses per day. *Tohoku J Exp Med* 168: 311-315, 1992.
- 3) Chwalinski S, Potten CS, Evans G: Double labelling with bromodeoxyuridine and <sup>3</sup>H-thymidine of proliferative cells in small intestinal epithelium in steady state and after irradiation. *Cell Tissue Kinet* 21: 317-329, 1988.
- 4) Christov K, Swanson SM, Guzman RC, et al: Kinetics of mammary epithelial cell proliferation in pituitary isografted BALB/c mice. *Carcinogenesis* 14(10): 2019-2025, 1993.
- 5) Schultz-Hector S, Begg AC, Hofland I, et al: Cell kinetic analysis of murine squamous cell carcinomas: A comparison of single versus double labeling using flow cytometry and immunochemistry. *Br J Cancer* 68: 1097-1103, 1993.
- 6) Shrieve DC, Begg AC: Cell cycle kinetics of aerated, hypoxic and re-aerated cells in vitro using flow cytometric determination of cellular DNA and incorporated bromodeoxyuridine. *Cell Tissue Kinet* 18: 641-651, 1985.
- 7) Born R, Hug O, Trott KR: The effect of prolonged hypoxia on growth and viability of chinese hamster cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1: 687-697, 1976.
- 8) Sham E, Durand RE: Repopulation characteristics and cell kinetic parameters resulting from multi-fraction irradiation of xenograft tumors in scid mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43(3): 617-622, 1999.

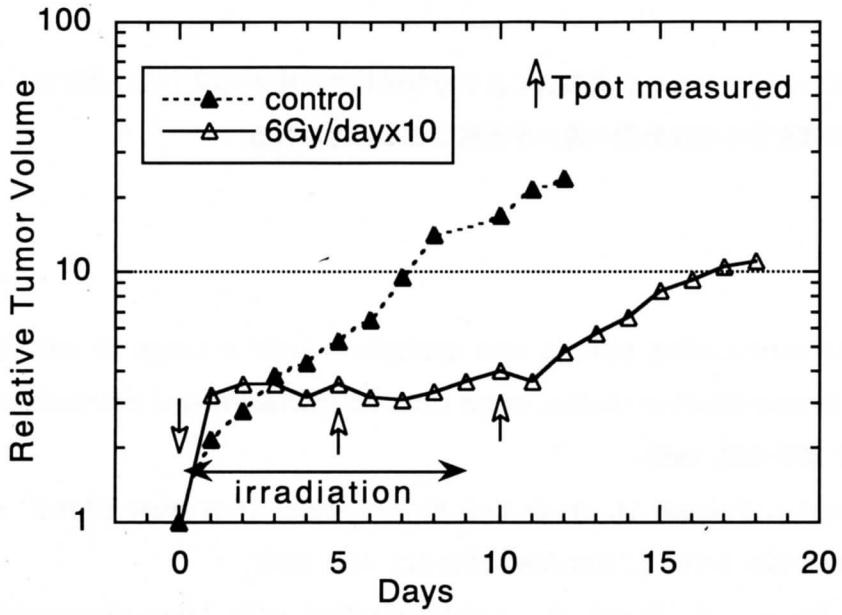


Fig. 1 未照射の腫瘍および6Gyを10回照射された腫瘍の増殖曲線

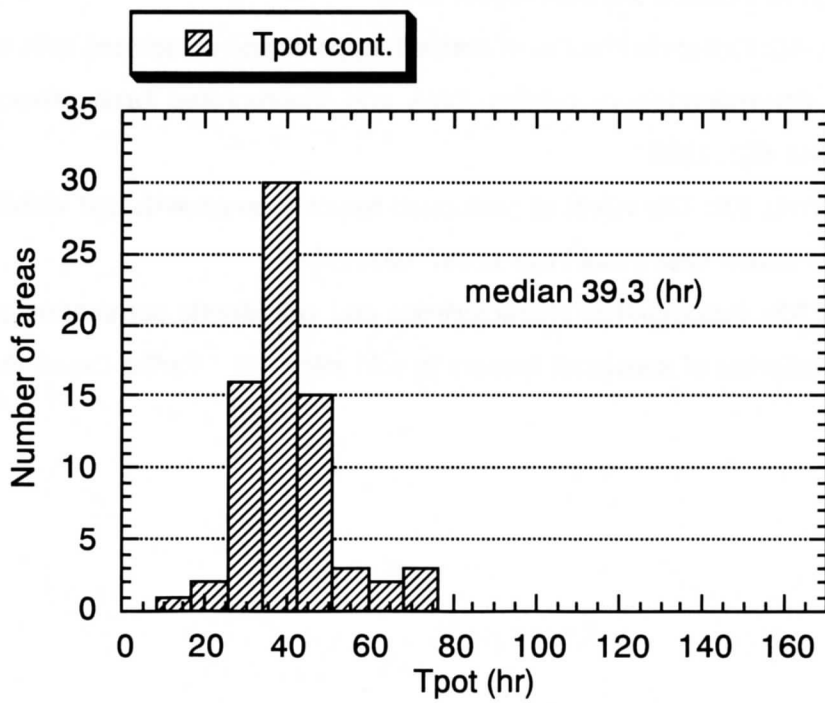


Fig. 3 照射直前の腫瘍のTpotの分布のヒストグラムと中央値

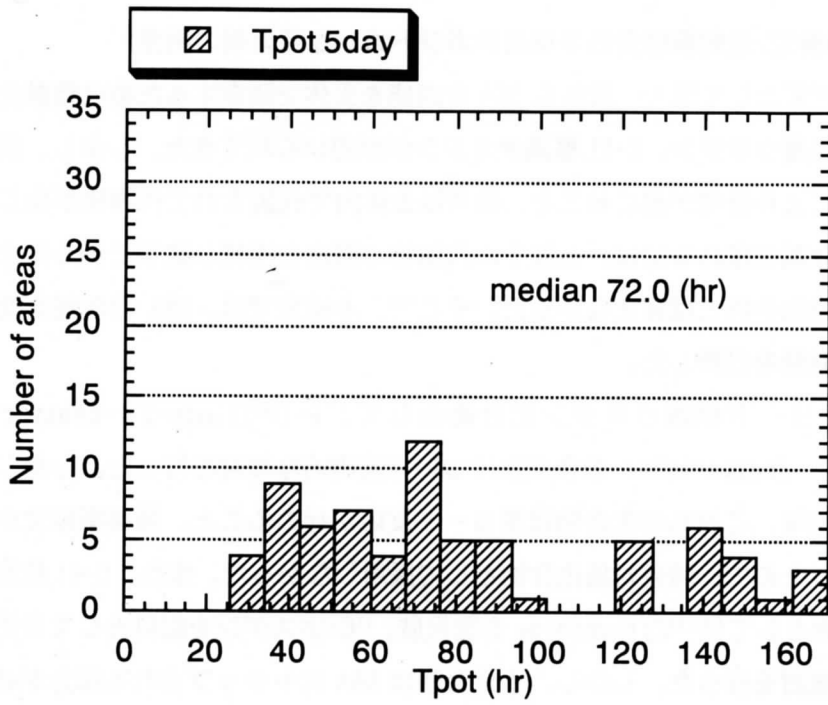


Fig. 3 6Gy を 5 回照射された腫瘍の Tpot の分布のヒストグラムと中央値

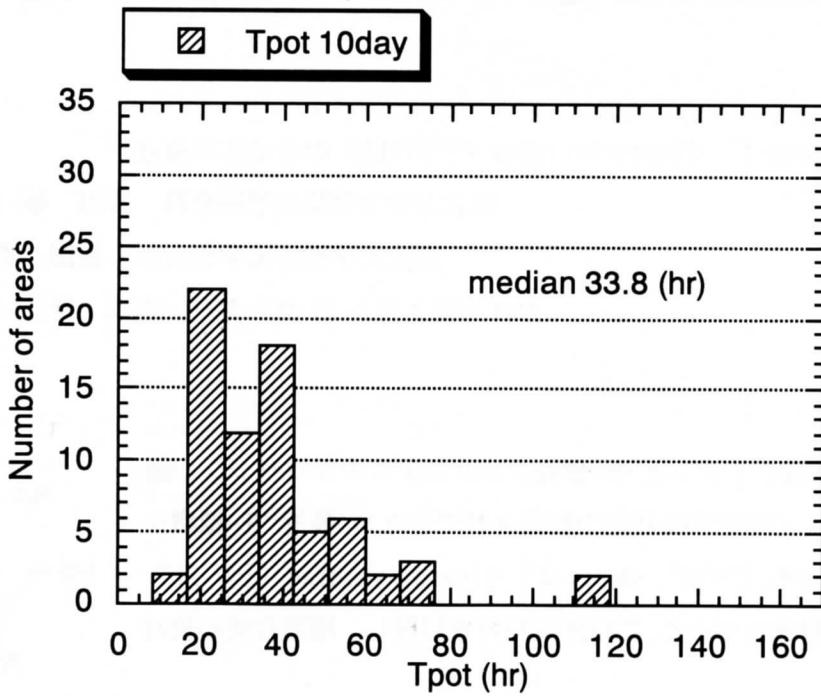


Fig. 5 6Gy を 10 回照射された腫瘍の Tpot の分布のヒストグラムと中央値



#### 4. 細胞増殖動態測定、放射線感受性予測用のポジトロン標識薬剤の開発

細胞増殖能の指標として最も一般的な DNA 合成能を生体で測定するための標識化合物として、これまでヨード標識ウリジン、C-11 標識チミジンが用いられてきた。しかし、前者は、体内での脱ヨード反応により分解が起こること、後者は生体内で代謝されて代謝物が生じることから、DNA に結合した分画を求めるには、血液中の代謝物の測定と複雑な数学モデルによる解析が必要で、実用的な標識化合物とは言えなかった。そこで、本研究では、DNA 合成能を簡便に測定できる標識化合物の開発を目指した。

まず、最初にヨード標識ウリジン化合物として、5-[<sup>131</sup>I]iodo-2'-deoxyuridine および 5-[<sup>18</sup>F]fluoro-2'-deoxyuridine の合成法について基礎的な検討を行った。しかし、その後文献等による検討の結果、これらの化合物は脱ヨード反応が起こること、腫瘍集積性があまり高くないことが予想されたので、開発対象化合物として採用しなかった。また、C-11 位置が体内で代謝されない、化合物として [2-<sup>11</sup>C] thymidine を選択肢、<sup>11</sup>C-ホスゲンを原料として目的物質を合成する標識合成法の検討を行った。しかし、本化合物は DNA にトラップされる部分が必ずしも多くないこと、比較的長い動態を示す増殖動態の解析には半減期が 20 分の C-11 では、短すぎることから、臨床応用に持ち込む化合物としては、採用しないことにした。

一方、Shields らは [<sup>18</sup>F]3'-deoxy-3'-fluorothymidine ([<sup>18</sup>F]FLT) の開発を行い、動物実験の良好な結果を踏まえて、臨床応用を開始した (Shields FA et al. Nature Medicine 1998;4:1334-1336)。これらの結果を検討した結果、この化合物がヒト腫瘍の細胞増殖動態を測定する標識化合物として最も適当であると判断して、合成法の基礎的検討を行うことにした。

##### 4.1 [<sup>18</sup>F]3'-deoxy-3'-fluorothymidine ([<sup>18</sup>F]FLT) の合成法の確立

東北大学大学院工学研究科 岩田 錬 (研究分担者)

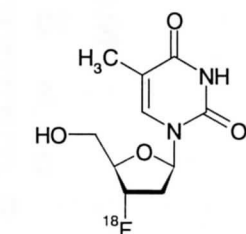
東北大学加齢医学研究所 福田 寛、赤井澤 隆

サイクロトロン RI センター 古本 祥三 (研究協力者)

###### 4.1.1 はじめに

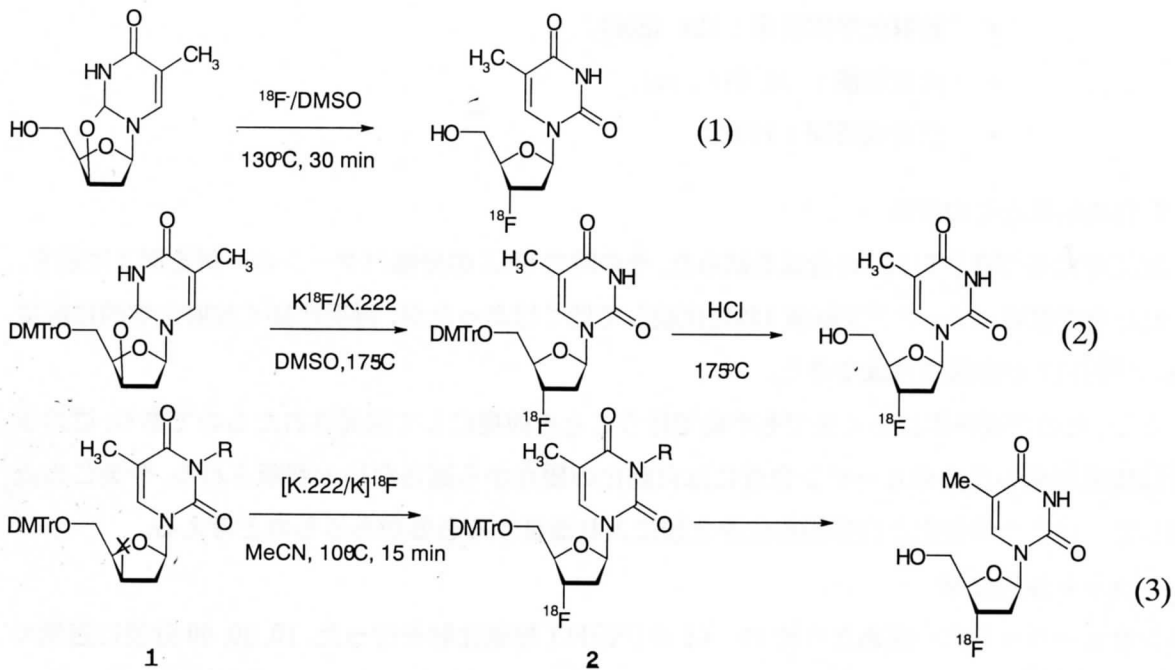
従来から <sup>11</sup>C-標識チミジンと <sup>18</sup>F-標識フルオロデオキシウリジンが腫瘍の増殖能を PET で測定する目的で利用されてきたが、最近 <sup>18</sup>F-標識チミジン誘導体である [<sup>18</sup>F]3'-deoxy-3'-fluorothymidine ([<sup>18</sup>F]FLT、図 1 参照) が注目されている。この臨床利用を目指し、標識合成の検討を行った。

[<sup>18</sup>F]FLT の標識合成法に関しては、図 2 に示す 3 種の合成法が報告されているが (論文 1-3)、出発原料 (前駆体基質) の入手の容易さと合成収率の点から合成法 3 を選択し、その実用性について検討した。



[<sup>18</sup>F]FLT  
(3'-deoxy-3'-[<sup>18</sup>F]fluorothymidine)

図-1



R: 2,4-dimethoxybenzyl  
 DMTr: 4,4'-dimethoxytrityl  
 X: 4-nitrobenzenesulfonyl

図—2

#### 4. 1. 2 標識合成操作の手順 (文献 3 による)

- 1)  $K_2CO_3$  (200  $\mu$ L, 40  $\mu$ mol) と  $[^{18}F]$  フッ素イオンを含む水溶液をバイアルに取り、これに K. 222 (15 mg, 40  $\mu$ mol) のアセトニトリル (MeCN) 溶液を加える。
- 2) バイアルを 100°C の油浴に浸し、He ガスを吹き付けて液体を留去する。
- 3) 残渣に MeCN (1 mL) を加え、再びこれを留去する。この操作を 2 回繰返し、水分を完全に除去する。
- 4) 残渣を無水 MeCN (2 mL) に溶解し、これに前駆体基質 (25 mg, 28  $\mu$ mol) の MeCN 溶液 (1 mL) を加える。溶液は直ちに深青色となる。
- 5) このまま 10 分間加熱を続ける。溶媒の MeCN は徐々に蒸発して減少する。
- 6) バイアルを油浴から引き上げて反応液を室温まで冷却した後、Sep-Pak Plus Alumina (neutral) に通し、溶出液をバイアルに受ける。
- 7) Sep-Pak を MeCN (1.5 mL) で 2 回洗い、先のバイアルに加えて 100°C の油浴に浸し、He ガスを吹き付けて大部分の MeCN を留去する。オイル状の濃青色の残渣が析出する。
- 8) 混合溶媒の MeCN/EtOH/water (4:1:1; 600  $\mu$ L) に溶かした Cerium ammonium nitrate (CAN, 40 mg, 73  $\mu$ mol) を残渣に加え、100°C で 3 分間加熱する。反応液はオレンジ色に変わる。
- 9)  $NaHCO_3$  水溶液 (4%, 1 mL) を加えて反応を停止する。反応液は濃茶色になる。

- 10) 加熱したまま He ガスを吹き付け溶液を 1 mL 以下に濃縮し、これに水 (2.5 mL) を加える。
- 11) 溶液を 0.2 μm のフィルターを付けた Sep-Pak Plus Alumina に通し、次に水 (1 mL) で洗う。
- 12) 溶出液をセミ分取 HPLC カラム (溶離液: 10%エタノール水) に注入し、 $[^{18}\text{F}]$ FLT 分画を集める。

- 放射化学的収率: 13% (EOB).
- 比放射能:  $>1 \text{ Ci/mol}$ .
- 全合成時間: 100 分

#### 4.1.3 合成結果とその評価

上記操作に基づき  $[^{18}\text{F}]$ FLT の合成を試みた。その時の HPLC の分離パターンの一例を図 3 に示す。得られた合成収率は 6~8% と文献値 13% に比較して低くはあったが、再現性良く放射化学的に純度の高い  $[^{18}\text{F}]$ FLT が容易に合成できた。

しかし、この合成操作はあくまでも手動で行うことを前提にして開発されたものであり、このままでは臨床利用のためのルーチン合成には自動化の観点から適さないと判断される。今後この点に関して、操作の簡便化と自動操作化を念頭に入れ改良する必要があるものとする。

#### 4.1.4 ラット体内分布

ドンリューラットに一匹あたり約 10 Ci の  $[^{18}\text{F}]$ FLT 静脈注射を行った。10, 30, 60 分後に過量のエーテルで屠殺して、各臓器を取り出して組織の放射能を測定、とりこみを %dose/g で表した。結果を表 1 に示した。

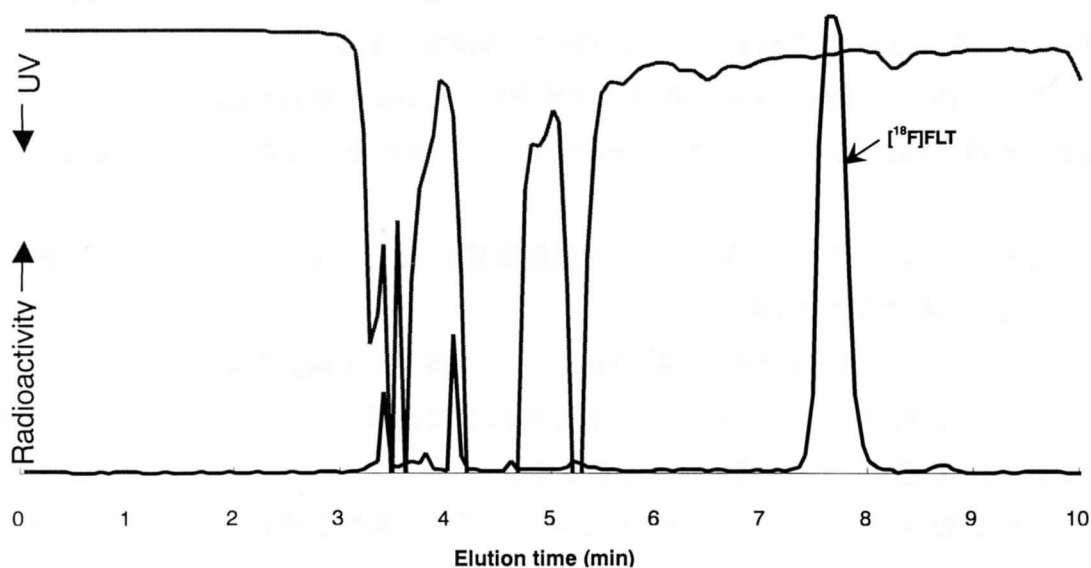


図 3

表—1  $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$  のラット体内分布

Organ	Uptake (DAR*)		
	10 min	60 min	120 min
Blood	5.57±1.18	1.07±0.19	0.40±0.07
Heart	5.06±1.24	1.08±0.08	0.47±0.06
Lung	6.73±3.27	1.47±0.53	0.71±0.26
Liver	7.23±2.53	1.77±0.58	0.75±0.14
Kidney	20.6±1.24	5.24±0.70	1.80±0.21
Jejunum	9.30±3.56	2.83±0.29	1.27±0.13
Muscle	4.94±1.47	1.34±0.44	0.55±0.17
Femur	5.31±1.77	4.85±1.35	2.76±0.76
Brain	0.68±0.24	0.24±0.12	0.13±0.05

\*DAR: tissue activity (cpm/g) / (injected dose (cpm)/body weight (g))

#### 4.1.4 被曝線量

F.A. Shields らは $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$  の臨床応用を既に行っており、その成果を *Nature Medicine*1998;4 に公表している。Shields 博士のご厚意により、被曝線量に関する計算結果を入手した（表—2）。

表—2 Estimated human  $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$  dosimetry data

Dose	Estimated from		
	monkey 1	monkey 2	
ED (ICRO 60)	0.89	0.79	mSv/100 MBq
ED (ICRP 30)	0.93	0.85	mSv/100 MBq
dose	0.54	0.47	mSv/100 MBq
redo bone marrow	0.98	0.78	mGy/100 MBq
intestine	1.06	1.05	mGy/100 MBq
kidneys	2.17	1.87	mGy/100 MBq
liver	0.96	0.87	mGy/100 MBq
lung	0.86	0.81	mGy/100 MBq
spleen	0.99	0.71	mGy/100 MBq
urine bladder		2.04	mGy/100 MBq

(Courtesy of Dr. FA Shields)

#### 4.1.5 今後の展望

最近、合成法 2 に基づいた [ $^{18}\text{F}$ ]FLT の自動合成装置が市販され (Nuclear Interface 社製)、今後世界的に [ $^{18}\text{F}$ ]FLT の利用は急速に進むものと予想される。日本においても、 [ $^{18}\text{F}$ ]FLT の臨床利用に向け真剣な努力が払われるべきと考える。

一方、我々は、腫瘍の増殖に大きく関わっている腫瘍血管新生に着目し、その阻害剤をベースとした全く新しい  $^{18}\text{F}$ -標識腫瘍イメージング剤の開発にも取り組んでいる。腫瘍血管新生阻害剤は、次世代型の有望な抗がん剤としての期待を集めており、世界的規模でその開発競争が繰り広げられている。そのような阻害剤の中でも、我々はチューブリン重合阻害剤とプロテアーゼ阻害剤について  $^{18}\text{F}$  標識化合物の合成を試みている。これらの標識薬剤は、従来型の腫瘍イメージング剤とは異なる集積原理により腫瘍を画像化するものであり、次世代型腫瘍診断薬の候補として、今後の研究開発の進展が大いに期待されている。

#### 文献

1. H.-J. Machulla, A. Blockher, M. Kuntzsch, M. Piert, R. Wei and J. R. Grierson. Simplified labeling approach for synthesizing 3'-deoxy-3'-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorothymidine ([ $^{18}\text{F}$ ]FLT). *J. Radiochem. Nucl. Chem.* **243**, 843-846 (2000).
2. C. Wodarski, J. Eisenbarth, K. Weber, M. Henze, U. Haberkorn and M. Eisenhut. Synthesis of 3'-deoxy-3'-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-thymidine with 2,3'-anhydro-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-thymidine. *J. Label. Compds. Radiopharm.* **43**, 1211-1218 (2000).
2. J. R. Grierson and A. F. Shields. Radiosynthesis of 3'-deoxy-3'-[F-18]fluorothymidine: [F-18]FLT for imaging of cellular proliferation in vivo. *Nucl. Med. Biol.* **27**, 143-156 (2000).

## 5. 低酸素細胞検出用ポジトロン標識化合物の開発

腫瘍組織中の低酸素細胞は極めて放射線抵抗性であり、放射線治療効果を減じる因子のひとつである。この低酸素細胞に特異的に結合して放射線感受性を高める低酸素細胞増感剤がいくつか開発され臨床試行も行われたが、副作用の点で実用化されるには至らなかった。しかし、近年ふたたび副作用の少ない低酸素細胞増感剤がいくつか開発されつつあり、その臨床応用が期待されている。この薬剤を癌の放射線治療に用いる場合、治療対象とする腫瘍にどのくらい低酸素細胞が含まれるか (hypoxic fraction) 治療前に評価する必要がある。この目的のために、いくつかのイミダゾール化合物が標識されている。本研究では、新規化合物として、ミソニダゾール化合物類似体の開発を行った。また、従来から報告されている、 $^{18}\text{F}$ -furuoromisonidazole ( $^{18}\text{F}$ -FMISO) を用いて、腫瘍内における分布を解析して、FDG、(糖代謝-viability)、血流分布と比較した。

### 5.1 1-[2- $^{18}\text{F}$ ]fluoro-1-(hydroxymethyl)-ethoxy]methyl-2-nitroimidazole ( $^{18}\text{F}$ FENI)の標識合成

J. Labelled Cpd. Radiopharm 2000;43:785-793.掲載論文を 6.1 に添付した。1-[2-(toluene-4-sulfoxy)-1-(acetoxymethyl)ethoxy]methyl-2-nitroimidazole を原料としてフッ素化を行い、HPLC により高純度の( $^{18}\text{F}$ )FENI が得られた。収率は 3-11%、比放射能は 26 GBq/ $\mu\text{mole}$  以上であった。本法によって合成された( $^{18}\text{F}$ )FENI は、心筋虚血部位に集積し、正常部位および壊死部には集積しないことが明らかとなった。また、腫瘍内分布については現在検討中であるが、極めて有望な標識化合物であることが推測される。

### 4.2 $^{18}\text{F}$ -furuoromisonidazole ( $^{18}\text{F}$ -FMISO) のマウス腫瘍内分布の解析

Eur J Nucl Med 1999; 26:750-757 掲載論文を以下に示す。二重標識オートラジオグラフィー法を用いて、マウス腫瘍内の  $^{18}\text{F}$ -FMISO の分布を調べたところ、 $^{11}\text{C}$ -メチオニンの集積の少ない部位 (低血流部位) に集積していた。また、 $^{14}\text{C}$ -2-デオキシグルコースは血流の多少にかかわらずほぼ均一に分布していたが、 $^{18}\text{F}$ -FMISO は壊死部の近くの低血流の部位に集積が高かった。以上より  $^{18}\text{F}$ -FMISO は確かに低酸素細胞に集積し、PET による低酸素細胞の画像化が可能であることが示された。また、FDG による PET 検査を相前後して行い、 $^{18}\text{F}$ -FMISO/FDG を求めれば、hypoxic fraction が求められることになり、臨床応用が期待される。

## 6. まとめ

本研究では、まずマウス腫瘍を用いて Tpot を測定するための方法論を確立し、次いでマウス腫瘍内の増殖動態の不均一性、一回照射、分割照射に対する腫瘍の増殖反応を解析した。その結果、1) 腫瘍の大小によって Tpot の腫瘍内分布は大きく異なること、2) 一回照射後、Tpot を経時的に測定すると Tpot の腫瘍内分布は不均一性が拡大し、回復増殖は一様ではないこと、3) 分割照射を行っている最中に、未照射コントロールと同等の Tpot を有する集団が現れること。すなわち加速増殖が起こっていることが示された。

もし、適当な標識化合物により、PET などの核医学的手段で Tpot が測定できれば、分解能の限界はあるものの放射線照射に対する腫瘍の反応を画像化できるので放射線治療上、極めて意義が大きいと考えられる。本研究の最終目標は、核医学的手法により Tpot などの細胞増殖パラメータを測定し、科学的に放射線治療を行うための基礎をかためることにある。そのためには、ヒトで DNA 合成能を正確に測定できる標識化合物が必要である。

本研究の初期に検討した各種ヨード標識ウリジンは多かれ少なかれ生体中での脱ヨード反応による分解がある。また、必ずしも腫瘍集積性特異性が高くない。さらに  $^{11}\text{C}$ -標識チミジンについても検討したが、本化合物は生体中で代謝されるために、DNA 合成能を定量することは困難である。一方、 $^{18}\text{F}$ -3'-デオキシ-3'-フルオロチミジン ( $^{18}\text{F}$ FLT) は生体中で代謝されず、増殖の盛んな組織にトラップされることが報告されており、本研究の目的に最も適した化合物と判断した。そこで  $^{18}\text{F}$ FLT の標識合成法の確立と臨床応用開始のための検討を行った。詳細は 4.1 で述べたのでここでは簡単に記す。

$^{18}\text{F}$  フッ素イオンを含む水溶液に「K.222/K+」のアセトニトリル溶液を加え、これに原料の前駆基質を加えて  $100^{\circ}\text{C}$ , 15 分間反応させた。次に、硝酸セシウムアンモニウムによる脱保護基反応を行った後、小さいカラムを通して反応物を精製し、最後に HPLC カラムに注入して  $^{18}\text{F}$ FLT 分画を収集した。全合成時間は 100 分、放射化学的収率は 6~8%、比放射能は  $1\text{Ci}/\mu\text{mole}$  以上であった。得られた収率は文献値 13% と比べて低かったが、再現性良く、放射化学的に純度の高い  $^{18}\text{F}$ FLT を合成することに成功した。これをラットに投与したところ、増殖の盛んな骨髄に高い集積を示し、予想どおりの結果が得られた。被曝線量、および急性毒性のデータについては米国の先行研究グループから入手することにより、臨床応用開始のための準備を完了した。しかし、今回行ったのは手動による合成であり、本格的な臨床応用を開始するためには本標識合成法の自動化と自動合成装置の開発を行う必要がある。今後別途予算を獲得して行う予定である。

一方、腫瘍の増殖に大きく関わる腫瘍血管新生に着目し、次世代の腫瘍診断薬としてチュブリン重合阻害剤とプロテアーゼ阻害剤をベースにした、全く新しい  $^{18}\text{F}$ -標識腫瘍イメージング剤の開発に着手して予備的な結果が得られている。

## 7. 論文別冊添付

- 6.1 Wada H, Iwata R, Ido T, Takai Y. Synthesis of 1-[2-<sup>18</sup>F]fluoro-1-(hydroxymethyl)-ethoxy]methyl-2-nitroimidazole([<sup>18</sup>F]FENI), a potential agent for imaging hypoxic tissues by PET. *J. Labelled Cpd. Radiopharm* 2000;43:785-793.
- 6.2 Furumoto S, Iwata R, Ido T. Synthesis of 1-O-(8-[<sup>18</sup>F]fluorooctanoyl)-2-O-palmitoyl-rac-glycerol for imaging intracellular signal transduction. *J Labelled Cpd Radiopharm* 43:1159-1172, 2000
- 6.3 Iwata R, et al. A new, convenient method for the preparation of 4-[<sup>18</sup>F]fluorobenzyl halides. *Appl Radiat and Isotopes* 52:87-92, 2000.
- 6.4 K. Kubota, et al. "Comparison of the distribution of fluorine-18 fluoromisonidazole, deoxyglucose and methionine in tumor tissue" *Eur. J. Nucl. Med.* **26**:750-757, 1999.
- 6.5 Fukuda H, et al. Pharmacokinetics of <sup>10</sup>B-p-boronophenylalanine in tumours, skin and blood of melanoma patients: A study of boron neutron capture for malignant melanoma. *Melanoma Res*, 9:75-83, 1999
- 6.6 Abe Y, et al. A phase II study of cisplatin, oral administration of etoposide, OK-432 and radiation therapy for inoperable stage III non-small cell lung cancer. *Int J Clin Oncol*, 3, 365-369, 1998
- 6.7 Imran MB, et al. Lesion to Background Ratio in Non-attenuation corrected Whole Body FDG PET Images: A Semiquantitative Evaluation in Oncology. *J Nucl Med* 39:1219-1223, 1998
- 6.8 福田 寛、窪田和雄。PETによる腫瘍診断の将来展望。映像情報 32:1137-140, 2000



本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録していません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。