

マウス実験腫瘍における ^{31}P -MRSを用いた温熱効果の評価

—腫瘍組織中 ATP と腫瘍成長曲線の対比—

関西医科大学放射線科学教室

北田 憲彦 赤木 清 宇田 光伸
長谷川武夫 大嶋 太一 田中 敬正

（平成3年2月25日受付）

（平成3年8月27日最終原稿受付）

Evaluation of Thermal Damage after Hyperthermia on Murine Experimental Tumor by ^{31}P -NMR Spectroscopy —Correlation between ATP and Growth Curve—

Norihiko Kitada, Kiyoshi Akagi, Mitsunobu Uda, Takeo Hasegawa,
Taichi Oshima and Yoshimasa Tanaka
Department of Radiology, Kansai Medical University

Research Code No. : 401

Key Words : Hyperthermia, ^{31}P -MRS, ATP,
Experimental tumor

The possibility of using ^{31}P -NMR spectroscopy (^{31}P -MRS) to estimate the effect of hyperthermic treatment on mouse FM3A tumor was investigated. 1×10^6 cells, suspended in saline, were subcutaneously inoculated to the right thigh of C₃H mice. For hyperthermic treatment, the tumor-bearing leg was heated by immersing it in a water bath at 44°C for 10, 20 or 30 min. The signal intensities of ATP and Pi of the tumor were measured utilizing the ^{31}P -MRS technique to calculate the ATP/Pi ratio. Immediately after heating, the ATP/Pi ratio decreased markedly. Eighteen hours after hyperthermic treatment, the ratio recovered but was still smaller than the control value, then became almost constant by 24 hours after heating. The ATP/Pi ratio at 24 hours after heating decreased with increased length of heating and was inversely related to tumor regrowth after hyperthermic treatment. We concluded that non-invasive monitoring with ^{31}P -MRS might provide a good indication of the effect of hyperthermic treatment.

緒 言

癌治療において、温熱療法は放射線療法、化学療法と同様に確立された新しい方法の1つである。しかし、治療効果を評価するには、治療を行う際の温熱量（thermal dose）を明確にする必要がある。化学療法では薬剤投与量、放射線療法では照射線量が明確であるが、温熱療法では腫瘍の大きさ及び腫瘍の種類によって加温温度と加温後の腫瘍内の温度分布も異なり、治療の基礎となる

温熱量が明確に出来ていないのが現状であり、これを正確に測定する事の困難さが温熱療法の発達において障害となっている。MRSは1975年 Zaner と Damadian により生物への応用が発表されて以来、今まで数多くの報告がある。 ^{31}P -MRS ではアデノシン三リン酸(ATP)とその原料の無機リン酸(Pi)、一時的に ATP を蓄えておくクレアチンリン酸(PCr)などのリン酸代謝産物が測定できる。ATP は細胞活性に必要な化学反応のための

エネルギー貯蔵物質である。 ^{31}P -MRS により細胞内の種々の ATP 量を測定できることから、放射線療法、化学療法^{1)~4)}による腫瘍組織の損傷を腫瘍細胞の ATP 量による活性エネルギーの損失から評価する報告がある⁵⁾。温熱処理により、腫瘍細胞活性の低下がこの ATP 量と相関するならば、この動態が Thermal dose の指標となり得ないかと考えた。マウス実験腫瘍を用いて、温熱処理24時間後に存在する腫瘍組織中の ATP 量を調べ、各温熱処理後の腫瘍成長曲線と対比し温熱効果の評価の指標となり得るかを検討した。また同時に ^{31}P -MRS による ATP 等の代謝物の分析方法についての諸問題について検討を行った。

方 法

1. 実験腫瘍

$\text{C}_3\text{H}/\text{He}$ マウス（静岡実験動物(株)、雄、4週令）に腹水継代している乳ガン由来の FM3A 腹瘍を、右大腿部皮下に 1×10^6 個/0.05ml 移植し、約1週間後に直径が7mm 前後に成長した腫瘍を実験に用いた。腫瘍体積は、腫瘍の長径 a 及び短径 b を測定し、 $\pi a^2 b/6$ の式から算出した。尚腫瘍部の周辺正常組織からの信号の混入を除去するため腫瘍を覆っている毛は十分に剃り、測定は腫瘍部を表面コイルの感度領域内に完全におさまるようにして行った。

2. 温熱装置

温熱処理は、循環温水槽（AGE-80、大洋科学）を用い、温度設定は 44°C 、温度誤差は $\pm 0.02^\circ\text{C}$ である。温度測定は熱電対（Bailey 社製）を用いて行い、測定部位は腫瘍皮下2mm と中心部である。温熱処理後約2分で皮下、中心部とも腫瘍内温度は設定温度に達した。温熱処理は無麻酔で行った。マウスを特製の亚克力固定具に血行障害のないように右大腿部をテープで固定し、腫瘍部を恒温水槽に10分、20分、30分と浸して行った。

3. MRS

使用した NMR 装置は GE 社製 CSI spectrometer（静磁場強度4.7T）である。 ^{31}P -MRS 測定は、体動による測定誤差を少なくするためにネンブータル（ $50\mu\text{g/g}$ ）の腹腔内投与による麻酔下で行った。表面コイルは円形で径10mm、2turn で送

受信兼用のものを用いた。設置したコイル内に腫瘍がおさまる、腫瘍部のみを表面コイルの感度領域内に設置した。測定前に表面コイルのチューニング、マッチングを行い、次に ^1H の信号で静磁場内のシミングを行った。測定条件は共鳴周波数： 81.08MHz 、繰り返し時間： 1.1sec 、RF パルス幅： $35\mu\text{sec}$ である。測定周波数帯域は PCr のピークを基準（0ppm）とし約 $+30\text{ppm} \sim -30\text{ppm}$ である。得られた FID 信号は600回加算し、FID 信号の右側にゼロを挿入して全データポイントを2048ポイントにして、 25Hz の exponential line broadening のフィルター関数にて信号/雑音比（S/N 比）の向上をはかり、高速フーリエ変換を行ってスペクトルを得た。このスペクトルに位相補正、ベースラインの補正を加えて最終のスペクトルを得た。これをもとに ATP、Pi、PCr ピークの分析を行った。

結 果

Fig. 1 は腫瘍の 44°C 30分の温熱処理後24時間までの ^{31}P -MRS の経時的変化を示す。下段のスペクトルはコントロールであり、 α 、 β 、 γ の3本の ATP のピークと PCr のピークが明確に識別できる。Pi のピークはこれら3本のピークに比べると低い。温熱直後から ATP、PCr のピークが急激に

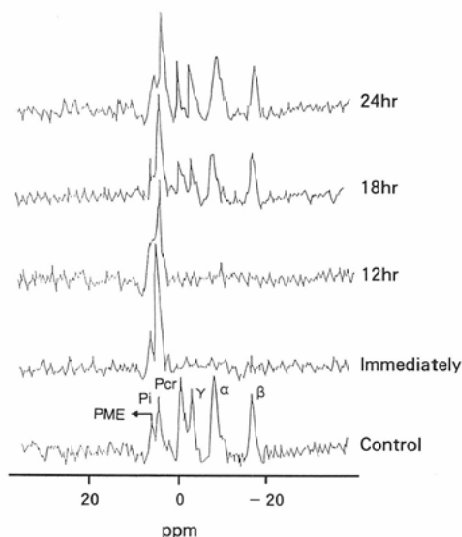


Fig. 1 Changes in the ^{31}P NMR spectra before and after hyperthermia at 44°C for 30min.

低下し、雑音レベルと同程度に減少した。これに対し Pi のピーク高は相対的に上昇していることが観測された。温熱処理12時間後のスペクトルでも温熱処理直後のスペクトルと同様に、3本の ATP ピークは認められず Pi ピークのみが認められた。しかし、温熱処理18時間後では、 α , β , γ の3本の ATP がともに再上昇を示し、細胞活性の回復が認められた。温熱処理24時間後でも処理後18時間と同様な傾向が認められた。

Fig. 1 に示す ^{31}P -MRS から求めた ATP/Pi 比の経時的变化を Fig. 2 に示す。Control では ATP/Pi 比が 1.4 ± 0.08 であったものが温熱処理

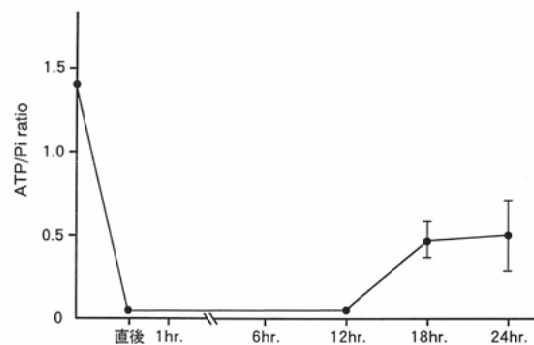


Fig. 2 Changes in tumor ATP/Pi ratio calculated from their relative peak areas after hyperthermia at 44°C for 30 min.

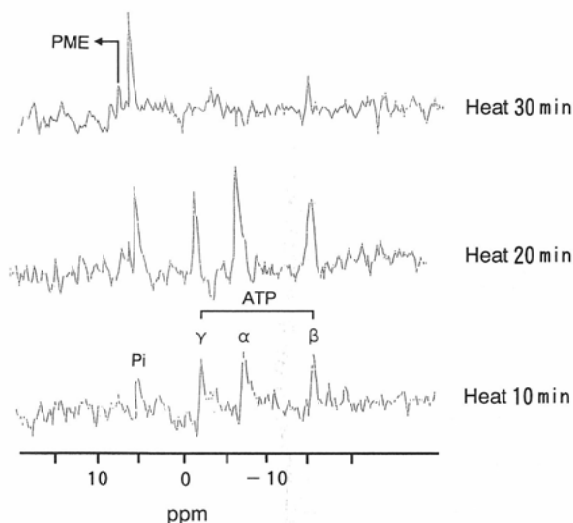


Fig. 3 ^{31}P -NMR spectra, 24hrs after hyperthermia at 44°C for different heating times.

直後から、 α , β , γ の ATP 及び PCr は Noise 域まで急激に低下した。その後変化なく18時間後には 0.47 ± 0.09 , 24時間後には 0.52 ± 0.14 と回復を示した。

Fig. 3 に44°Cで温熱処理時間10分, 20分, 30分と熱量を増加した時の、処理後24時間後の ^{31}P -MRSを示す。熱量の増加に従って、 α , β , γ の各 ATP ピークの低下と Pi ピークの上昇を認めた。

Fig. 4 に温熱による腫瘍成長遅延日数と ATP/Pi 比の関係を示す。44°Cで各処理時間による腫

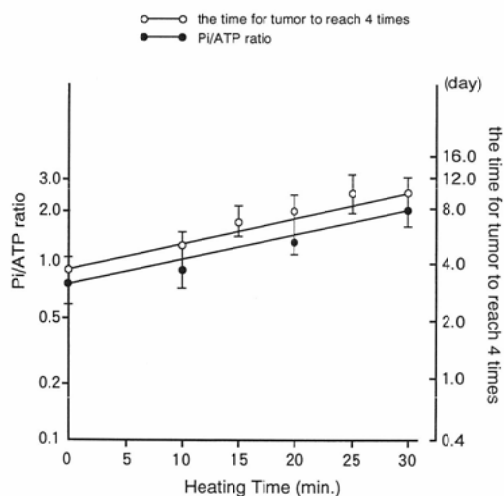


Fig. 4 Pi/ATP ratio of tumors, 24hrs after hyperthermia at 44°C and tumor growth for different heating times.

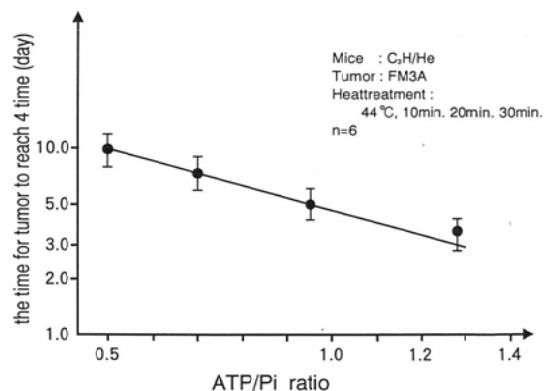


Fig. 5 Correlation of tumor regrowth time and ATP/Pi ratio.

瘍成長遅延を腫瘍体積が4倍に要する日数で示し、同時に温熱処理24時間後に存在する ATP/Pi 比の逆数と熱量の関係を示した。この44℃の熱量に対し、この腫瘍成長遅延と ATP/Pi 比の逆数は共に比例関係にあり、対数グラフ上、直線比例関係が示された。このことから温熱量と成長抑制の抗腫瘍効果は相関することが示された。この成長遅延日数と ATP/Pi 比の関係を Fig. 5 に示す。温熱処理24時間後に存在する腫瘍細胞の ATP/Pi 比は腫瘍成長遅延と高い相関が示された。

考 察

最近の NMR, 特に ^{31}P -MRS 技術の発達により、腫瘍組織中の高エネルギー磷酸である ATP, PCr などが非観血的に測定できるようになった。実験腫瘍、人腫瘍において放射線、温熱、化学療法等の処理後の細胞活性を示すエネルギー代謝物である ATP, PCr 量の経時変化を調べた報告が数多くある^{1)~4),7)}。多くはスペクトル上 PCr, ATP の低下, Pi の相対的上昇を報告している。この MRS の変化の機序として以下の様に考えられている。温熱による腫瘍血管系障害により血流低下が起り、腫瘍組織が低酸素状態になる。この状態ではまず PCr が消費され creatinine kinase の作用によりアデノシン二磷酸 (ADP) を ATP に再生する方向に傾き、さらに ATP が分解され Pi が蓄積する。その結果 ATP が減少し Pi が増加する⁵⁾⁸⁾。大久保らは FM3A 腫瘍を用いて腫瘍増大に伴う ^{31}P -MRS の変化を報告している⁹⁾。これによると FM3A 腫瘍は放射線や化学療法後の反応と同様に、腫瘍体積の増大により PCr, ATP の低下, Pi の相対的上昇がみられ1,000mm³を越えるとより著明な変化を認めると報告している。しかし、我々の実験に用いた腫瘍体積200~300 mm³前後の範囲の control 群での腫瘍増大によるスペクトルへの影響は認めなかった。温熱による MRS の影響は直接の細胞活性の傷害だけに起因しているのか、血管系等の損傷による腫瘍組織障害にともなう2次的細胞損傷に関係するのかは不明である。Lilly ら¹⁰⁾は RIF-1腫瘍を用いて、同じ温熱量を In Vitro, In Vivo で与えた時の ATP/Pi 比の変化を比較し、In Vivo の方が ATP/Pi 比

がより強く低下した事を報告している。この事は ATP/Pi 比の低下は直接の温熱の細胞障害だけでなく、温熱の血管床の損傷の要素が加わることを示している。又、SIJENS ら¹¹⁾は温熱の ATP/Pi 比の変化を NU-82実験腫瘍を用いて細胞障害と腫瘍内の血流の変化で検討している。43℃, 44℃10分~60分の温熱処理では処理後早期の変化には細胞傷害と腫瘍血流の両者が関与し、ATP/Pi 比が一定の状態になる時期では腫瘍の血流は回復しており、細胞障害が主に関与すると報告している。我々は今回血流の検討はしていないが、Fig. 2 に示す如く温熱44℃30分処理後の経時変化は温熱直後に急激な低下を示した。この急激な減少は加温中に既に低下していることが考えられる。この低下した ATP/Pi 比は処理後18時間で回復を示し、以後は一定の値を保持していることから18時間以後の ATP/Pi 比は温熱の細胞障害による変化と考える。また ATP/Pi 比の経時変化は44℃で温熱10分、20分でも同様な変化を示し、少なくとも温熱後18時間から24時間は一定の値を示した。このことは温熱処理24時間後に存在する細胞内の ATP/Pi 比は温熱の細胞傷害の指標になることを示している。この24時間後の ATP/Pi 比をみると44℃で温熱10分、20分と熱量増加に従って低下を認める。これを腫瘍成長曲線と対比させると Fig. 4 の如く温熱量の増加に伴う腫瘍の成長遅延と良い相関を示した。このことは44℃温熱処理後の腫瘍細胞中の ATP/Pi 比は24時間後であっても温熱による抗腫瘍効果を予知していることを示している。Fig. 5 より温熱処理後24時間に存在する ATP/Pi 比と腫瘍成長遅延日数が直線的な関係で相関を示すことはこの ATP/Pi 比が温熱の抗腫瘍効果の指標となり得、即ち温熱の生物的热量指標、単位として有用なものであると考えられる。今回、42℃, 43℃, 45℃、での同様な実験は行っていないが、他の温度領域でも同程度の ATP/Pi 比の低下があれば同様の抗腫瘍効果があると思われる。固形腫瘍中の ^{31}P -MRS 測定には様々の技術的困難を伴う。第一に腫瘍組織周囲の正常筋肉からの信号の混入の問題がある。今回用いた腫瘍は比較的腫瘍径が小さく(7mm 前後)

また使用した表面コイルは径10mmであり、実際の測定感度部位はコイル径よりも1~2mm狭いので我々のMRSの測定値には正常組織からの信号の混入はないと考える。Jasonらは¹²⁾大腿部に移植した85mm³の腫瘍のスペクトルではPCrの信号に周囲の正常組織から15%の関与が認められたが、腫瘍径が大きくなるほどPCrの信号への周囲組織からの関与が減少すると報告している。第二にMRSのデータ処理方法の問題である。このデータ処理法の違いにより、細胞内のATP等の磷酸代謝物の測定値が異なる。そのために定量測定については様々な算出法が報告されているが、未だ確立したものはない⁶⁾¹³⁾。

そこで我々はATP量を β -ATP/Pi比を用いて検討したが、この基準ピークにPiを用いることは議論の余地がある。しかし³¹P-MRSで得られるATP/Pi比は温熱による腫瘍組織損傷を非侵襲的に予知できる可能性が示唆された。

稿を終えるにあたりMRS測定に御協力頂きました日本シェーリング研究部ベルンハード フィリッツ ツィーロー博士に感謝致します。

文 献

- 1) Evanchko TW, Thian CNg, Lilly MB, et al: In vivo ³¹P-NMR study of the metabolism of murine mammary 16/C adenocarcinoma and its response to chemotherapy, X-Radiation, and Hyperthermia. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 334—338, 1983
- 2) Naruse S, Hirakawa K, Horikawa Y, et al: Measurement of in vivo ³¹P nuclear magnetic resonance spectra in neuroectodermal tumors for the evaluation of the effects of chemotherapy. *Cancer Res* 45: 2429—2433, 1985
- 3) Semmler W, Gademann G, Bachert-Baumann P, et al: Monitoring human tumor response to therapy by means of ³¹P MR spectroscopy. *Radiology* 166: 533—539, 1988
- 4) Griffiths JR, Cady E, Edwards RH, et al: ³¹P-NMR studies of a human tumor in situ. *Lancet* 1: 1435—1436, 1983
- 5) Alberts B, Bray D, Lewis J, et al: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc New York & London, 43—89, 1983
- 6) Dawson MJ, Gadian DG, Wilkie DR, et al: Contraction and recovery of living muscles studied by ³¹P nuclear magnetic resonance. *J Physiol* 267: 703—735, 1984
- 7) Lilly MB, Ng TC, Evanchko WT, et al: Loss of high-energy phosphate following hyperthermia demonstrated by in vivo ³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res* 44: 633—638, 1984
- 8) 香川靖雄: ハイポキシアとATP合成系, 呼吸と循環, 38: 942—949, 1990
- 9) 大久保真樹, 酒井邦夫, 伊藤 猛, 他: マウス移植腫瘍の増殖に伴う³¹P-MRSの変化, 日磁医誌, 10: 285—292, 1990
- 10) Lilly MB, Katholi CR, Ng TC: Direct relationship between high-energy phosphate content and blood flow in thermally treated murine tumors. *JNCL* 75: 885—889, 1985
- 11) Sijens PE, Bovee WMMJ, Koole P, et al: Phosphorus NMR study of a murine tumor to hyperthermia as a function of treatment time and temperature. *INT J Hyperthermia* 5: 351—357, 1989
- 12) Jason KA, Barnett D, Kornblith AB, et al: Relationship of changes in pH and energy status to cell fraction and hyperthermia sensitivity. *I J Radiation Oncology Biol Phys* 18: 1429—1435, 1990
- 13) Dawson MJ, Gadian DG, Willkie DG: Muscle fatigue investigation by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Nature* 274: 861—866, 1978