

SCC-VII 腫瘍に対する TAXOL の放射線治療と 温熱治療の増強効果

長谷川 武夫^{1),2)}, 深谷 貴昭¹⁾, 具 然和^{1),2)}, 塚口 奉成¹⁾, 上田 久純¹⁾,
川野 哲史¹⁾, 林 広樹¹⁾, 大塚 正和¹⁾, 井上 貴嗣¹⁾, 暮木 実智弘²⁾

¹⁾ 鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部 放射線技術科学科

²⁾ 鈴鹿医療科学大学・大学院 保健衛生学研究科

キーワード: タキソール, SCC-VII腫瘍, 酸素分圧, 温熱治療, 放射線治療,

1. はじめに

悪性新生物（がん）は、1981年以降死亡原因の第1位を占め、2003年にはがん死亡数は309,543人、人口10万対死亡率は245.4で総死亡の30.5%となっている¹⁾。また、2003年のがんによる死亡を部位別にみると、男性では肺癌が最も多く41,634人でがん死亡の22.3%を占めており、次いで胃癌が32,142人で17.2%を占めている¹⁾。一方女性では、胃癌が最も多く17,393人でがん死亡の14.2%を占めており、次いで肺癌が15,086人で12.3%を占めている^{1),2)}。今日のがんの治療法としては、「外科的手術」、「放射線治療」、「化学療法」、「温熱療法」などがある。ひとつの治療法で完治が望めない場合にはいくつかの治療法を組合せ、それぞれの限値を補いあって治療をする併用治療（集学的治療）が行われている³⁾。

外科的手術、放射線治療に次ぐがんの治療法といえる化学療法は、1907年にドイツのエールリッヒ博士が、「微生物に対しては有効だが人体には害を及ぼさ

ない魔法の弾薬」という意味で使った言葉で、かつては細菌感染の治療に化学物質を用いる抗菌療法のことを意味していた⁴⁾。その後、1943年エール大学のグッドマン、ギルマンによりイペリットの誘導体であるナイトロジェンマスタードが悪性リンパ腫に対し効果があると示され、化学療法という言葉は微生物に対する治療だけでなく、がん治療にも用いられるようになった⁵⁾。現在では、化学療法というと大部分は、代謝拮抗剤やアルキル化剤などの抗癌剤を用いて、DNAを化学修復・複製阻害することにより細胞を攻撃し破壊する治療法として使われている。

確実に有効な抗癌剤は現時点では無く、薬剤の副作用も強いため使用制限が生じる⁶⁾。また、進行・再発乳癌の化学療法では、腫瘍の縮小、症状の寛解、延命を目的としてADMを含めた多剤併用療法が行われているが、心毒性などの致命的な副作用を生じる場合がある⁶⁾。

本研究では、天然のイチイ科の植物から得られ副作用が比較的少なく、これまで単剤での抗癌剤治療が困

難であった乳癌や非小細胞肺癌に対して、優れた治療効果を上げているタキサン系の抗癌剤である TAXOL を用いて、放射線治療又は温熱治療との併用による抗悪性腫瘍効果について検討した⁷⁾。

2. 目的

SCC-VII腫瘍を担癌した C3H/HeJ マウスに TAXOL (24mg/kg) を投与し、放射線治療 (X-ray, 10Gy) との併用、温熱療法 (43℃, 30min) との併用による腫瘍成長抑制効果について、腫瘍成長速度 (腫瘍容積比) 測定により評価した。更に TAXOL (24mg/kg) 投与後の腫瘍組織内の酸素分圧変化について、PO₂ Monitor を用いて経時観察し、組織内血流低下、PO₂ (酸素分圧) 低下を確認した。

3. 原理

3-1. TAXOL について

TAXOL (一般名：パクリタキセル) は、イチイ科の植物 (学名：Taxus baccata) の針葉または小枝から抽出される 10-deacetylbaccatin III を原料として半合成されたタキサン系の抗悪性腫瘍剤である⁷⁾。

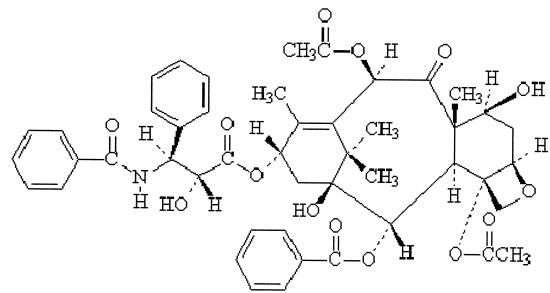
化学名は、(-)-(2R, 3S)-3-ベイズイルアミノ-2-ヒドロキシ-3-フェニルプロピオン酸(1S, 2S, 3R, 4S, 5R, 7S, 8S, 10R, 13S)-4, 10-ジアセトキシ-2-ベイズイルオキシ-5, 20-エポキシ-1, 7-ジヒドロキシ-9-オキソタキス-11-エン-13-イルエステル (IUPAC) で、分子式は C₄₇H₅₁NO₁₄、分子量 853.92、融点 220~223℃ で白色~微黄白色の粉末である⁷⁾。N, N-ジメチルアセトアミドに溶けやすく、アセトニトリル、メタノールまたはエタノールにやや溶けやすく、エーテルに極めて溶けにくく、水にほとんど溶けない性状である⁷⁾。

3-2. TAXOL の薬理作用

微小管の蛋白重合を促進することにより微小管の安定化・過剰形成を引き起こし、微小管の脱重合を起



TAXOL の化学構造式：



りにくくし、その結果、細胞分裂を阻害して抗腫瘍効果を発揮する⁷⁾。

3-3. TAXOL の奏効率・副作用

国内第Ⅱ相試験において、白金製剤不応・再発例の卵巣癌に対して 26.6%、手術不能・前化学療法のない非小細胞肺癌に対して 35.0%、進行・再発乳癌に対して 33.9%、進行・再発胃癌に対して 23.4%の奏効率⁷⁾が得られている。

主な副作用としては、末梢神経障害 (65.1%)、関節痛 (40.3%)、筋肉痛 (36.3%)、悪心・嘔吐 (36.9%)、下痢 (14.0%)、口内炎 (12.4%)、脱毛 (83.6%)、発熱 (42.3%) 等が認められている⁷⁾。

臨床検査異常には、白血球減少 (91.8%)、好中球減少 (94.5%)、ヘモグロビン減少 (76.1%)、血小板減少 (11.1%) 等の骨髓抑制、ALT (GPT) の上昇 (41.5%)、AST (GOT) の上昇 (30.4%) 等の肝機能検査値異常、BUN 上昇 (8.9%) 等の腎機能検査値異常が認められている⁷⁾。

3-4. 微小管とチューブリンの重合・脱重合について

微小管は真核細胞の細胞質内にあり、外径 24nm の細管状構造で、チューブリンという球状タンパク質の重合体である。この構造はグルタルアルデヒドによる前固定によって電子顕微鏡下で、また間接蛍光抗体法によって光学顕微鏡下でその存在が同定されている⁸⁾。

チューブリンタンパク質は分子量 57,000 (アミノ酸残基数 450) と 53,000 (同 445) の α と β があり、二量体 (分子量 110,000) として存在し、13 本のプロトフィラメント (原繊維) が平行に配列して管状構造をつくる。このシングレット構造のほか、ダブルレット、トリプレット構造があり、中心体や鞭毛、繊毛、基底小体を構築している。シングレット微小管は、多くの細胞の細胞質に存在し、その形状保持のほか、紡錘体構造、膜オルガネラや分泌細胞、色素細胞における顆粒の移動、神経の興奮伝達における神経軸索の速い物質輸送などの細胞機能、細胞運動に関与している⁷⁾⁸⁾。また、微小管の構成にはチューブリンのほかに微小管関連タンパク質 (MAPs) の存在が確認されている⁸⁾。

正常な細胞内ではチューブリンと微小管は動的平衡状態にあり、チューブリンの重合と脱重合は同時に起こっている。この平衡状態は、GTP、微小管関連タンパク質 (MAPs) 存在下では重合の方に反応は傾き、 Ca^{2+} 存在下や低温では脱重合の方に反応は傾く。また、TAXOL 存在下では、チューブリンの重合が促進され、 Ca^{2+} 、低温等の条件下でも脱重合が起こらなくなる⁷⁾⁸⁾。この事は脱重合阻害によって細胞分裂が阻害され、抗腫瘍効果が発生することを意味している。

3-5. 酸素分圧測定原理

隔膜ポーラログラフによる酸素分圧測定センサーの構造 (Fig 1.) は、水銀滴定ポーラログラフ法を発展改良したもので、酸素に対する透過性の高い隔膜 (ポリエチレン、ポリテトラフルオロエチレンなど) で電極と電解液とを試料液から遮断する方式となっている。電解液に塩化カリウムまたは水酸化カリウム溶液

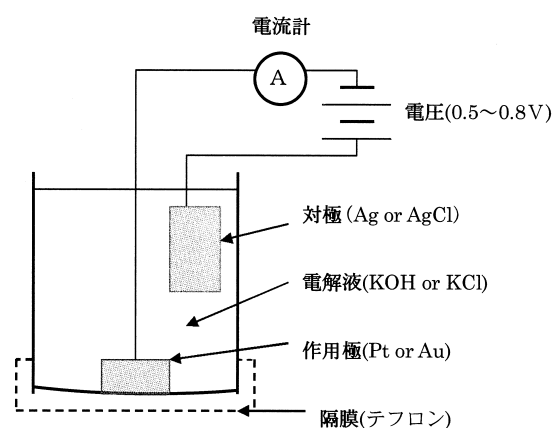
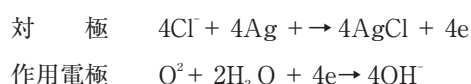


Fig 1. The structure of PO_2 sensor by diaphragm polarograph.

When a voltage is put between both electrodes which dipping in the electrolytic solution, a reduction response happens on the action side, and it is charged with electricity which was in proportion to PO_2 . Therefore O_2 atoms were polarized by -0.6 V voltage which produce the electric currents proportional to Oxygen levels in the tissue.

を用いて、両電極間に $-0.5 \sim -0.8$ V の電圧が印加されると、隔膜を透過した酸素が作用電極上で下記の還元反応を起こし、酸素が還元され、酸素濃度に比例したポーラログラフ的限界電流が外部回路に流れて酸素分圧 (PO_2) が測定される⁹⁾。



電極材料については、対極には銀-塩化銀などが多く用いられて、作用極には金または白金が用いられている。隔膜については、初期にはセロファンや高压ポリエチレンフィルムが使用されたが、現在ではテフロン膜 (膜厚は 25μ または 50μ 程度) を用いたものが多い⁹⁾。

4. 実験方法

4-1. 実験腫瘍

実験には C3H マウス自然発生の SCC-VII 腫瘍を用いた。移植用腫瘍は培養によって継体し、C3H マウス皮下に 1×10^6 個 / 0.05mL の細胞を 26G ツベリクリ

ン針によって移植した。移植用腫瘍細胞の継体は以下の方法で行った。

4-2. 冷凍（-80℃）保存細胞からの培養方法

- 1) SCC-VII腫瘍細胞 2~5 × 10⁶ 個を含む冷凍チューブ（10% DMSO + 30% FBS + 60% D-MEM）内の液体を 37℃ で急速解凍した。（DMSO：Dimethyl sulfoxide, FBS：fatal bovine serum, D-MEM：Eagle の minimum medium を Dulbecco が改変したもの）
- 2) 解凍した細胞を 10ml, D-MEM 入りの 10~15ml 遠心管に無菌状態で移した。
- 3) 時間が経過すると DMSO の毒性により細胞が死亡し、遠心管内に浮遊するので細胞は氷上にて維持する。
- 4) 1000RPM にて 5 分間遠心分離した。
- 5) 細胞は沈下して遠心管に底にベレットを作る。
- 6) 遠心管の底の細胞を吸い出さないようにし、遠心管を傾けて加熱殺菌した針で上澄み液を吸引し、培養液、凍結液を除去した。
- 7) 新に無菌の 10% FBS + 90% D-MEM 液を約 10ml 加え攪拌した。
- 8) シャーレに約 10ml の 10% FBS + 90% D-MEM 液を加え、この中に 7) の浮遊細胞を液ごと滅菌パスツールピペットで 0.5~1ml 撒きつけた。
- 9) 2~3 日後、細胞がシャーレの底に SCC-VII 細胞が付着していることを確認し、シャーレ内の液を無菌操作にて除去し、新しく培地（10% FBS + 90% D-MEM）を加え培養を継続した。
- 10) コンフルエンス状態（細胞が密着した状態）になったら実験に使用した。

4-3. 培養シャーレからの細胞剥離方法

- 1) シャーレ中の培地を加熱滅菌した針にて吸引し培養液を除去した。このとき生存している腫瘍細胞はシャーレの底に付着し、死亡した細胞と細胞片等は吸引によって除去した。
- 2) 無菌 PBS（CMF-PBS：Dulbecco's Ca, Mg-free

phosphate buffered saline）を培地除去したシャーレに 10ml 加え、4~5 分間放置し細胞表面を洗浄した。

- 3) 洗浄後の CMF-PBS 液を加熱滅菌した針にて吸引、除去した。
- 4) PBS にて希釈した 0.025% トリプシン液（無菌）を 2~3ml 加え、2~3 分間 37℃ で放置した。
- 5) 顕微鏡にて細胞が丸くなったことを確認した。
- 6) 無菌パスツールピペットにより、シャーレ中のトリプシン液を使い底に付着している細胞をピペティングして剥がした。
- 7) 剥がれた細胞を 10ml の D-MEM 入りの遠心管に加え、1000RPM にて 5 分間遠心し、細胞とトリプシン液を分離した。
- 8) トリプシン液と D-MEM を含む上澄み液を無菌ツールピペットにて吸引、除去した。
- 9) 沈殿した細胞が入っている遠心管内に 4~5ml の 10% FBS + 90% D-MEM を加えピペットで攪拌した。
- 10) 9) から 100~200 μl 採取しセルカウントした。

4-4. 移殖腫瘍細胞数の計測方法

- 1) 剥離した細胞 10) の細胞浮遊液をエッペンチューブに 100~200 μl 採取した。
- 2) 別のエッペンチューブ 4.25% NaCl を 1, 0.2% トリパンプルー液を 4 の割合で混合した溶液を作製した。
- 3) 1) のエッペンチューブから 100 μl 採取し、2) のエッペンチューブ（トリパンプルー溶液）からの 100 μl の液と混合しよく攪拌した後、血球計算盤に乗せ細胞数を計数した。

5. 使用機器・材料

5-1. 酸素分圧測定

- ・ C3H/HeJ マウス（♂）7 週齢 日本エスエルシー社
- ・ SCC-VII 腫瘍（扁平上皮癌） 5.5 × 10⁵ 個 / 0.05ml
- ・ TAXOL（タキソール 100mg/16.7ml）プリストル

製薬株式会社

- ・PDG 型 PO₂ Monitor RIKADENKI
- ・PO₂ クラーク針 UOE-40T 株式会社ユニークメ
ディカル
- ・ノギス MITUTOYO

5-2. 腫瘍容積測定

- ・C3H/HeJ マウス (♂) 7 週齢 日本エスエルシー社
- ・SCC-VII 腫瘍 (扁平上皮癌) 5.5×10^5 個 / 0.05ml
- ・TAXOL (タキソール 100mg/16.7ml) ブリストル
製薬株式会社
- ・放射線照射装置 PHILIPS
- ・WATER BATH CONTROLLER SBAC-40
HIMADZU
- ・ノギス MITUTOYO

5-3. マウスの飼育条件

C3H/HeJ マウス (♂) 7 週齢を, 動物舎にて温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$, 照明時間 12 時間 (AM7:00~PM7:00) の環境条件で 1 週間予備飼育を行った。餌は日本クレア株式会社の固形飼料 CE-2 を, 水はフィルターで濾過された水道水を自由摂取させた。

6. 実験方法

6-1. PO₂ Monitor の校正方法

- 1) 酸素分圧測定キャリブレーション・セルに生理食塩水を入れ, 水槽にエアポンプ (約 152mmHg) からの空気, N₂ + O₂ 5% ポンベ (約 38mmHg) からのガス, N₂ ポンベ (約 0mmHg) からのガスを金属ホースで接続した。
- 2) 水槽内に PO₂ クラーク針 UOE-40T を留置し, エアポンプでしばらくバブリングを行い酸素分圧が約 152mmHg (20% PO₂) になるように補正した。
- 3) 次に N₂ + O₂ 5% ポンベ (約 38mmHg: 5% PO₂), N₂ ポンベ (約 0mmHg: 0% PO₂) でバブリングを行い, 酸素分圧が正確に測定できているか確認した。

6-2. 腫瘍内酸素分圧の測定方法

- 1) 予備飼育後, 体重が約 22~25g のマウスの右大腿部皮下に SCC-VII 腫瘍 5.5×10^5 個 / 0.05ml を皮下移植し, 平均腫瘍サイズの長径×短径が 7mm × 7mm に成長した時点で, マウスを専用のアクリル容器に固定した (Fig 2.)。
- 2) PO₂ クラーク針を腫瘍内部へ刺入し, PO₂ Monitor にて酸素分圧値が平衡状態になるまで観測した (Fig 3.)。
- 3) 酸素分圧値が平衡状態となったら, 生理食塩水に

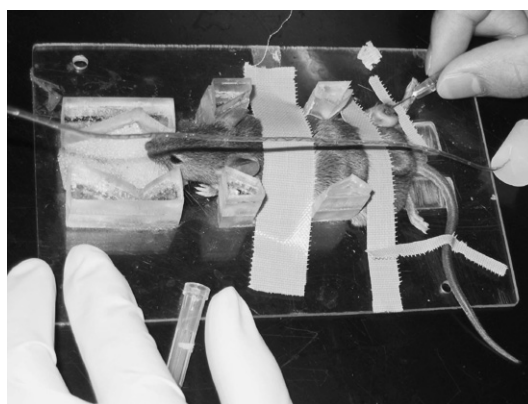


Fig 2. How to fix the mouse of PO₂ measurement.

Fix it on the exclusive acrylic plate by the tape to reduce body movement of the mouse, and Clark needle sensor was detained in the tumor transplanted to the right thigh, and PO₂ was measured.



Fig 3. PO₂ Monitor-type PDG

The electricity which was in proportion to PO₂ by Clark needle sensor was measured, and PO₂ was read on the monitor.

て希釈した TAXOL (24mg /kg) を 1ml, マウスの腹腔内に投与した。薬剤注入時の動きを抑制するために, マウス固定前に腹腔内に翼状針を刺入した。

6-3. 腫瘍成長の測定方法

1) 予備飼育後, 体重が約 22~25g のマウスの右大腿部皮下に SCC-Ⅶ腫瘍 5.5×10^5 個 /0.05ml を皮下移植し, 平均腫瘍サイズの長径×短径が 7mm × 7mm に成長した時点で以下のようにマウス 54 匹を 6 群に分け, 各群 9 匹で実験を開始した。

- | | | |
|--------------------------|---|-----|
| ①コントロール群 (無処理) | ; | 9 匹 |
| ②薬剤単独群 (TAXOL, 24mg /kg) | ; | 9 匹 |
| ③温熱療法単独群 (43°C, 30min) | ; | 9 匹 |
| ④放射線治療単独群 (X-ray, 10Gy) | ; | 9 匹 |
| ⑤薬剤 + 放射線治療併用群 | ; | 9 匹 |
| ⑥薬剤 + 温熱療法併用群 | ; | 9 匹 |

2) 薬剤単独群は, 生理食塩水にて希釈した TAXOL (24mg /kg) を 1ml, マウスの腹腔内に投与した。また, 薬剤を投与しない群には, 条件を同じにするため, TAXOL と同量の生理食塩水 1ml をマウスの腹腔内に投与した。

3) 温熱療法群は, マウスを専用のアクリル容器に固定し (Fig 4.), SCC-Ⅶ腫瘍 5.5×10^5 個 /0.05ml を皮下移植し平均腫瘍サイズの長径×短径が 7mm × 7mm に成長した腫瘍の右大腿部のみを, 約 43°C の温水で 30 分間 Heat した。また, 薬剤 + 温熱療法併用群は TAXOL (24mg /kg) 1ml を投与約 60 分後に, 腫瘍を移植した右大腿部のみを約 43°C の温水で 30 分間 Heat を行った。

4) 放射線治療群は, マウスを専用のアクリル容器に, SCC-Ⅶ腫瘍 5.5×10^5 個 /0.05ml を皮下移植し平均腫瘍サイズの長径×短径が 7mm × 7mm に成長した腫瘍の右大腿部のみ局所照射できるように固定し, 移植部以外の全身は鉛で遮蔽して, 一



Fig 4. How to fix the mouse of the hyperthermia.

Fix it on the exclusive acrylic plate by the tape to reduce body movement of the mouse, and the tumor part transplanted to the right thigh was heat with warm water of 43°C for 30 minutes.

様に右大腿部に X 線が当たる様に固定台を回転して照射した (Fig 5.)。照射条件は, 200kV, 9mA, 照射距離 30cm, フィルター 0.2mmCu, 照射線量率 1.04Gy/分で総線量 10Gy を照射した。

また, 薬剤 + 放射線治療併用群は TAXOL (24mg /kg) 1ml を投与約 60 分後に, 照射線量率 1.04Gy/分で総線量 10Gy を照射した。

5) 腫瘍体積測定は, 薬剤単独群は TAXOL 投与約 60 分後の測定を 1 日目, 温熱療法単独群と薬剤 + 温熱療法併用群は Heat 後の測定を 1 日目, 放射線治療単独群と薬剤 + 放射線治療併用群は照射後の測定を 1 日目とし, ノギスを用いて腫瘍の長径 (a), 短径 (b) を測定し次式より体積 (V) を求めた。測定 1 日目の 24 時間後に測定 2 日目, 48 時間後に測定 3 日目と, 毎日測定を行った。また, 1 日目の平均腫瘍体積値を 1 とし, 2 日目以降に測定した体積値を相対的に表わし, 全 6 群の平均腫瘍体積値が 4 倍に成長する日まで測定を行った。

$$V = \frac{\pi}{6} \times a \times b^2 \quad [\text{mm}^3]$$

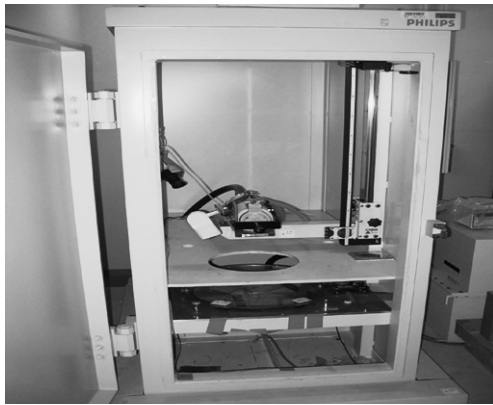


Fig 5. Radiation treatment apparatus.

Fix it on the exclusive acrylic plate by the tape to reduce body movement of the mouse, and only the tumor part transplanted to the right thigh rotation irradiated the X-rays of 10Gy. And the whole body except for the transplant department was shielded by the lead plate.

6) 体重測定は、腫瘍体積測定後、同一日に測定を行った。

7. 結果

7-1. 腫瘍内酸素分圧の経時観察

Fig 6. は、縦軸を酸素分圧値、横軸を測定時間とし、TAXOL 投与後の SCC-VII 腫瘍内の酸素分圧変化を経時的に表した。

TAXOL 投与前の酸素分圧は 23mmHg 程度であり、投与後速やかに酸素分圧は低下し、投与後約 60 分にて最小値が約 2mmHg に達し、薬剤投与後に約 20mmHg の酸素分圧低下が認められた (図 6)。

今回の実験では 60 分以降の測定は行わなかったため、薬効の持続時間は示せないが、TAXOL の半減期は 9.9~16.0 時間とされているので、約 10 時間は薬効があると考えられる¹⁰⁾。

Fig 7. は、縦軸を平均腫瘍体積、横軸を各群処理直後の測定を 1 日目として処理後からの日数とし、①コントロール群 (無処理)、②薬剤単独群 (TAXOL, 24mg/kg)、③温熱療法単独群 (43°C, 30min)、④放射線治療単独群 (X-ray, 10Gy)、⑤薬剤+放射線治療併

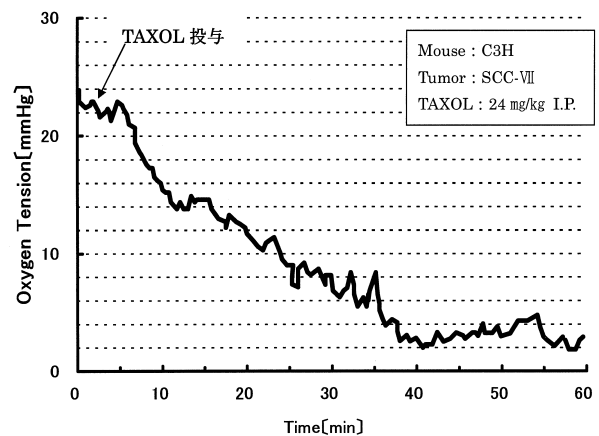


Fig 6. Continuous recording of the change in PO₂ in an SCC-VII tumor caused by an ip injection of 24mg/kg TAXOL. Arrow, time of TAXOL injection.

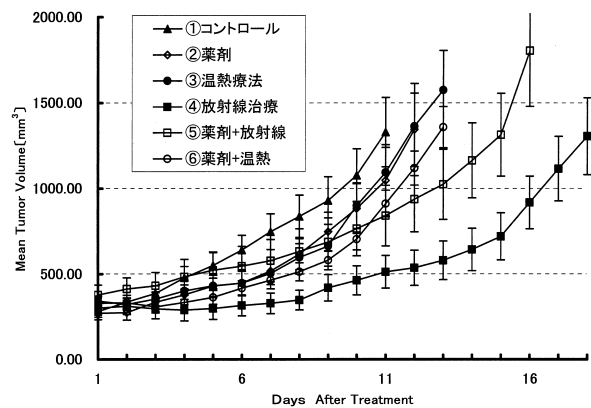


Fig 7. Changes in the mean volume of SCC-VII tumors are shown as a function of days after treatment of TAXOL alone (②), hyperthermia alone (③), radiotherapy alone (④), combination of TAXOL and radiotherapy (⑤), combination of TAXOL and hyperthermia (⑥). Control group (①) were not any treatment. Drug was an ip injection of 24mg/kg TAXOL. Hyperthermia was heated in a single exposure of 43°C. Radiotherapy was irradiated in a single exposure of 10Gy. An average of 6-9 tumors and 1 SE are shown. The tumor volume growth was detected with statistical significance ($p < 0.05$) each group by ANOVA test.

用群、⑥薬剤+温熱療法併用群における腫瘍成長曲線を表した。

腫瘍成長抑制効果は、①群<②群<③群<⑥群<⑤

群<④群の順で高くなった。

検定にはANOVA検定 ($p < 0.05$) を用いた。検定7日目のF値は2.70で有意な差が見られ、8日目以降も有意な差がみられた。

7-2. 腫瘍成長率

Fig 8. は、縦軸を各群処理直後(1日目)に測定した平均腫瘍体積を1とした場合の腫瘍成長倍数、横軸を処理直後からの日数とし、①コントロール群(無処理)、②薬剤単独群(TAXOL, 24mg/kg)、③温熱療法単独群(43°C, 30min)、④放射線治療単独群(X-ray, 10Gy)、⑤薬剤+放射線治療併用群、⑥薬剤+温熱療法併用群における平均腫瘍体積が4倍になるまでの腫瘍成長率曲線を表した。また、グラフの対象が多いため、グラフには偏差を省略して平均値のみを表した。

平均腫瘍体積が4倍になるまでの日数は、①コントロール群は10.18日、②薬剤単独群は11.10日、③温熱療法単独群は12.01日、④放射線治療単独群は17.44日、⑤薬剤+放射線治療併用群は15.40日、⑥薬剤+温熱療法併用群は12.82日であった。

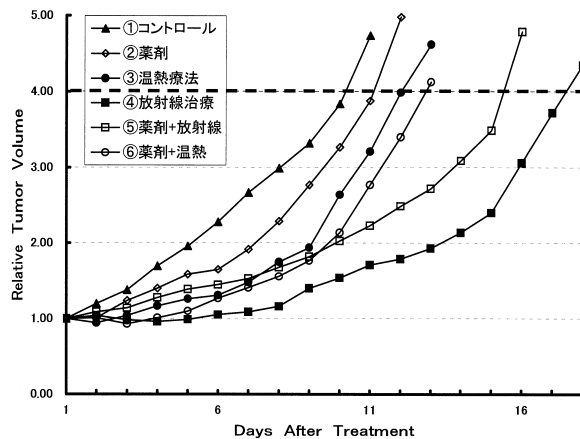


Fig 8. Relative changes in volume of SCC-VII tumors after about 60 min of an ip injection of 24mg/kg TAXOL, hyperthermia, radiotherapy. Combination of TAXOL and hyperthermia was an ip injection of 24mg/kg TAXOL about 60 min prior to heat of tumor. Combination of TAXOL and radiotherapy was an ip injection of 24mg/kg TAXOL about 60 min prior to irradiation of tumor.

7-3. マウスの体重変化

Fig 9. は、縦軸を平均体重、横軸を各群処理直後の測定を1日目として処理後からの日数とし、①コントロール群(無処理)、②薬剤単独群(TAXOL, 24mg/kg)、③温熱療法単独群(43°C, 30min)、④放射線治療単独群(X-ray, 10Gy)、⑤薬剤+放射線治療併用群、⑥薬剤+温熱療法併用群におけるマウスの体重変動曲線を表した。

全6群とも処理直後の体重変動は大きく、特にTAXOL投与群は、TAXOLによる食欲不振などの副作用により処理後体重減少がみられた。しかし、処理後2日目以降はTAXOLの薬理効果は少なくなり体重は増加傾向を表した。また、4日目以降TAXOL投与群以外も全体的に増加傾向がみられた。

7-4. 検定結果

今回の検定に用いたANOVA (analysis of variance) は、F分布検定(等分散検定)を応用した分散分析法であり、3群以上の平均値の一様性を検定する際に用いられる。原理は、各群のデータの平均のちらばり(群間変動)と群内のデータのちらばり(群内変動)の大

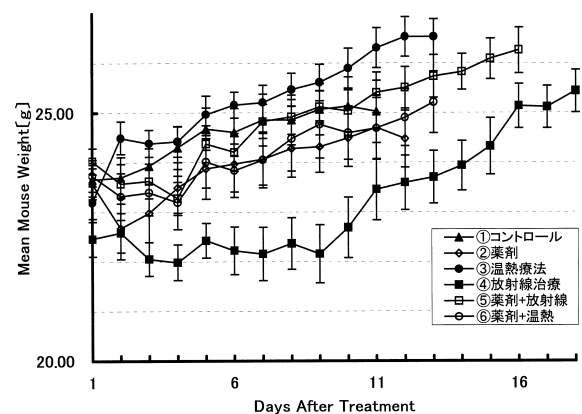


Fig 9. Changes in the mean body weight of C3H mouse are shown as a control group (①) were not any treatment and as a function of days after treatment of TAXOL alone (②), hyperthermia alone (③), radiotherapy alone (④), combination of TAXOL and radiotherapy (⑤), combination of TAXOL and hyperthermia (⑥). An average of 6-9 mice weights and 1 SE are shown.

きさの比較から、各群の母平均の違いを知ることである¹¹⁾。

変動から導いた不偏分散比 (F 値) と、正規分布, t 分布, カイ二乗分布をさらに一般化した, 応用範囲の広い確率密度分布曲線である F 分布曲線から, 自由度に規制される確率 P 値を読み取り比較した¹¹⁾。

Table 4. に, ①コントロール群 (無処理), ②薬剤単独群 (TAXOL, 24mg /kg), ③温熱療法単独群 (43°C, 30min), ④放射線治療単独群 (X-ray, 10Gy), ⑤薬剤 + 放射線治療併用群, ⑥薬剤 + 温熱療法併用群における「各測定日の平均腫瘍体積値は等しい」という帰無仮説をたて, 成立するか棄却できるか, 確立水準 5% で ANOVA 検定を行った結果を表した。

Table 4. ANOVA test

日数	F 値	P 値 (5,41) (0.05)	有意差
1	1.02	< 2.45	なし
2	0.85	< 2.45	なし
3	0.81	< 2.45	なし
4	1.32	< 2.45	なし
5	1.76	< 2.45	なし
6	2.13	< 2.45	なし
7	2.70	> 2.45	あり
8	2.90	> 2.45	あり
9	2.48	> 2.45	あり
10	2.51	> 2.45	あり
11	2.66	> 2.45	あり

From the table 4, a difference in some thought is seen in the official approval after the seventh day, and it can be said that mean tumor volume between each six group isn't equal.

8. 考察

8-1. 腫瘍内酸素分圧の経時観察

Fig 6. より, TAXOL (24mg/kg) 1ml を, SCC-VII 腫瘍を移植したマウスの腹腔内に投与した場合, 腫瘍内の酸素分圧は投与約 40 分後に最小値 (約 2mmHg) を示した。

TAXOL 投与により微小管の安定化・過剰形成が起こるが, チュブリンの微小管への重合促進は, GTP や微小管関連タンパク質 (MAPs) 存在下で起こる⁷⁾。

GTP, ATP は, 解糖系によってつくられたピルビン酸がミトコンドリアに取り込まれ, 内膜の基質で行われるクエン酸回路で, 酸化還元反応が繰り返されて H₂O, CO₂ にまで分解され 1 回転したときにつくられる¹²⁾。よって, 微小管の重合が促進するための ATP, GTP の産生には, 酸素が必要となり腫瘍内の酸素分圧が低下したと考えられる。また, 微小管関連タンパク質であるダイニンは, ATPase 活性により移動して鞭毛運動を起こすとされており⁷⁾, 微小管が過剰形成されたことにより, 微小管関連タンパク質も同時に増え, ATP が必要となったため, 酸素が使われ腫瘍内の酸素分圧が低下したと考えられる。

TAXOL による副作用として, ヘモグロビン減少, 赤血球減少等が認められており⁷⁾, 全身組織への酸素供給が少なくなったため, 腫瘍内の酸素分圧が低下したとも考えられる。

8-2. 腫瘍成長抑制効果

Fig 8. より, 平均腫瘍体積が 4 倍になるまでの日数から腫瘍成長抑制効果を比較すると, ①コントロール群 < ②薬剤単独群 < ③温熱療法単独群 < ⑥薬剤 + 温熱療法併用群 < ⑤薬剤 + 放射線治療併用群 < ④放射線治療単独群の順で高い腫瘍成長抑制効果を示し, ①コントロール群と④放射線治療単独群との腫瘍成長延長日数は 7 日であった。

温熱療法群を比較すると, ⑥薬剤 + 温熱療法併用群の方が③温熱療法単独群より腫瘍成長延長日数が 1 日長く高い抗腫瘍効果を示した。温熱療法は, 正常組織では Heat により血管が拡張しても冷却効果を起こすが, 腫瘍内部は低血流 (低酸素) であり熱拡散が少ないため Heat により細胞は死滅してしまうので, 低酸素組織ほど温熱療法が有効であるといえる¹³⁾¹⁴⁾。よって Fig 6. より, TAXOL 投与前の腫瘍内の酸素分圧は 23mmHg 程度であったのに対し, TAXOL 投与約 60 分後は, 2mmHg と最も腫瘍内の酸素分圧が低下した状態で Heat を開始したため, 温熱療法単独よりも腫瘍内は低酸素状態となり, 温熱療法と併用した方が高い抗腫瘍効果を示したと考えられる。

また柴本達は、TAXOLと同じ作用を持つタキサン系の抗癌剤であるTAXOTEREを、ヒト胆嚢由来細胞株NOZ C-1に用いて温熱療法との併用を行った結果、TAXOTERE無添加で42°C Heatを120分間行った場合は、腫瘍増殖は82.0%に抑制され、TAXOTERE濃度1.0ng/mlで42°C Heatを120分間行った場合は、腫瘍増殖は60.3%にまで抑制され、温熱療法併用との増強効果が認められたと報告している¹⁵⁾。

Riou達の報告では、TAXOTEREはTAXOLに比し細胞への取込みは良いが、細胞からの排出が遅いため細胞内濃度がTAXOLの3倍となり、2~4倍の細胞障害性を有するといわれている¹⁶⁾。

放射線治療群を比較すると、Fig 8. より④放射線治療単独群の方が⑤薬剤+放射線治療併用群より腫瘍成長延長日数が2日長く高い抗腫瘍効果を示した。これは、TAXOL投与後腫瘍内の酸素分圧が最も低くなる60分後にX線照射を行ったため、高酸素細胞に有効な放射線治療ではTAXOLによる放射線増感効果はみられなかったと考えられる。一般に、酸素分圧と放射線感受性の関係は、酸素分圧が20mmHg以下になると急激に放射線感受性が低下し、20mmHg以上の細胞と0mmHgの無酸素状態とでは3倍程感受性が異なるとされているので、TAXOLを投与しないときの腫瘍内の酸素分圧(23mmHg)とTAXOLを投与したときの腫瘍内の酸素分圧(2mmHg)とでは、放射線治療単独の方が高い抗腫瘍効果を示したと考えられる¹⁷⁾。また、通常M期では、微小管により形成される紡錘体を中心とした働きによって細胞が2つに分裂するが、TAXOL投与により、細胞内で中心小体をもたない異常な星状体が多数みられ、分裂期に不可欠な紡錘体が形成されず、細胞分裂ができなくなり⁷⁾、M期に有効な放射線治療では、TAXOLによる放射線増感効果がみられなかったと考えられる¹⁷⁾。しかし、上地達の報告では、再発部に放射線照射(40~60Gy)とWeekly TAXOL(70mg/m²を3週間連続投与、1週間休薬)を併用した子宮頸癌再発1例、卵巣癌再発5例に対して、再発までの期間2ヶ月~2年4ヶ月でCR3例、PR2例、MR1例と有用な治療効果が得られてい

る¹⁸⁾。一方、日浦達の報告では、rapid premedication後、TAXOL(60~70mg/m²)、CDDP(30~40mg/m²)を1、8、15日目に点滴静注、22日目は休薬とし28日間を1コースとして計91コース(平均4コース)投与した卵巣癌(漿液性腺癌11例、類内膜癌7例、明細胞癌5例)に対して、再発群PR:6/7(85%)、進行卵巣癌CR:4/5(80%)、PR:1/5(20%)と、Weekly TAXOL/CDDP投与のみでも十分な抗腫瘍効果が得られている¹⁹⁾。

TAXOLと放射線治療とを併用した場合、増強効果はあまり示さないが、治療効果は良いので、今後は投与用量、照射線量及び併用薬剤の選択について検討したいと思う。

9. 結語

- 1) TAXOLにより腫瘍内の酸素分圧が低下した。
- 2) TAXOLを温熱療法前に併用すると、腫瘍成長抑制効果が得られた。
- 3) TAXOLを放射線治療(X線)前に併用すると、腫瘍成長抑制効果が得られなかった。

参考文献

- 1) 厚生労働省大臣官房統計部「人口動態統計」上巻 死亡 第5「12表 死亡年次推移分類別にみた性別 死亡数・率(人口10万対)」(2003)
- 2) 大島明, 黒石哲夫: がん・統計白書—罹患/死亡/予後—篠原出版 pp. 220-233 (2004)
- 3) 大川智彦, 池田道雄: 臨床腫瘍学からみたがんの放射線治療 医学書院発行 pp. 8-9, pp. 432-438 (1983)
- 4) 井上清恒: 医学史ものがたり2 医人の探索 内田老鶴圃発行 pp.242-243 (1991)
- 5) Gilman A, et al: The biological actions and therapeutic applications of β -chloroethyl amines and sulfides, Science 103: 103 (1946)
- 6) 木村修治, 河野通雄: 放射線腫瘍学 金芳堂発行 pp. 102-104, 120 (1990)
- 7) プリストル製薬株式会社提供資料 タキソール注

- pp. 3, 7, 11, 12, 23-34, 46-48 (2001)
- 8) 新津恒良：図説現代生物学 丸善株式会社 pp. 72-74 (2003)
- 9) 社団法人日本電気計測器工業会：MandC Measurement and Control Portal 環境計測器ガイド 2, 3 「溶存酸素計測器」(2003)
- 10) 医療薬 日本医薬品集 日本医薬情報センター (編) クリタキセル p. 1595 (2004)
- 11) 小川龍：臨床医のためのやさしい医学統計学 真興交易社発行 pp. 97, 100-103 (1989)
- 12) 小林静子, 谷覚, 山川敏郎：ファーマコバイオサイエンス 廣川書店発行 pp. 56-68 (1990)
- 13) Takeo Hasegawa：The Biological Ground on Hyperthermia for Malignant Tumors Research Reports of Suzuka University of Medical Science and Technology 第3号 pp. 3-9 (1996)
- 14) 松田忠義, 菅原努, 安部光幸, 田中敬正：難治療への挑戦ハイパーサーミアの臨床 医療科学社発行 pp. 8-10 (1999)
- 15) Yuka Shibamoto, Ichiro Takagi：Cytotoxic effects of new antineoplastic agent docetaxel, which affects microtubules/tubulin system, on human gallbladder carcinoma cell line, NOZ C-1 胆道 14 卷1号 (2000)
- 16) Riou JF, Petigent O, Combeau C, Labelle F. Cellular uptake and efflux of docetaxel (Taxotere) and paclitaxel (Taxol) in P388 cell line. 「abstract」Proc Am Ass Cancer Res : 35 : 385 (1994)
- 17) 坂本澄彦：放射線生物学 秀潤社発行 pp. 18-19, pp. 47-49 (1998)
- 18) 上地秀昭, 中山理, 安部正和, 神農隆, 青木茂, 鳥居裕一 (聖隷浜松病院産婦人科), 野田恒夫 (聖隷三方原病院)：weekly Taxol と放射線照射の併用 日本癌治療学会誌 (0021-4671) 36 卷2号 p. 541 (2001-10)
- 19) 日浦昌道, 温泉川真由, 野河孝允, 伊藤啓次郎, 横山隆, 千葉丈 (国立病院四国がんセンター産婦人科臨床研究部)：卵巣癌に対する weekly paclitaxel/CDDP (TP) の検討 日本癌治療学会誌 (0021-4671) 36 卷2号 p. 541 (2001-10)

Enhancement of Effect on the Radiotherapy, Hyperthermia by TAXOL for SCC-VII Tumors.

Takeo Hasegawa^{1),2)}, Takaaki Fukaya¹⁾, Yeunwha Gu^{1),2)},
Tomonari Tukaguchi¹⁾, Hisazumi Ueda¹⁾, Satoshi Kawano¹⁾,
Hiroki Hayashi¹⁾, Masakazu Otsuka¹⁾, Takatsugu Inoue¹⁾, Michihiro Kureki²⁾

¹⁾Department of Radiological Technology, Suzuka University of Medical Science.

²⁾Department of health science, Graduate School of Suzuka University of Medical Science.

Key Words: TAXOL (Paclitaxel), SCC-VII tumors, Oxygen tension, Hyperthermia, Radiotherapy.

Abstract

We investigated the enhancement of anti-tumor effects combined with Radiotherapy, Hyperthermia and TAXOL as anti-cancer drug for C3H mice bearing SCC-VII tumors. TAXOL is the anti-malignant tumor drug of taxon that has been semisynthesized from the precursor (10-deacetylbaccatin III) derived from the needles of the European yew, *taxus baccata*. TAXOL has a mitotic spindle toxicity that increases the rate of microtubules assembly and inhibits the depolymerisation of microtubules in the cells. We confirmed that oxygen tension in the SCC-VII tumor were decreased after 24mg/kg of TAXOL injection to the mice. We also confirmed that a tumor growth were inhibited when combined with radiotherapy (10Gy of X-rays) and TAXOL (24mg/kg), and when combined with hyperthermia (43°C, 30min) and TAXOL (24mg/kg).