

インドメタシンの腫瘍細胞に対する放射線増感作用の基礎的検討

紺野 勝信¹⁾, 友光 達志¹⁾, 今城 吉成¹⁾, 大倉 保彦²⁾, 高橋 浩二郎²⁾

1) 川崎医療短期大学 放射線技術科, 〒701-0194 倉敷市松島316

2) 広島国際大学 保健医療学部 診療放射線学科, 〒739-2695 広島県東広島市黒瀬学園台555-36

抄録 非ステロイド系抗炎症剤であるインドメタシンは、抗腫瘍作用を持つこと、放射線増感作用を持つことが知られている。今回、インドメタシンの放射線増感作用について、グリーンズメラノーマを移植したハムスターを対象として基礎的検討を行った。

インドメタシンの正常組織に対する放射線増感作用は、ハムスターの皮膚反応から評価した。その結果、Skin reaction score で評価したインドメタシン投与群と対照群の皮膚反応は、インドメタシン投与群の方が高値を示す傾向が認められたが、両群間に統計学的な有意差は示されなかった。腫瘍に対するインドメタシンの放射線増感作用は、照射直後の腫瘍体積を基準として算出された腫瘍体積比で評価した。その結果、薬剤投与群と腫瘍体積比との対照群のそれとの間には、照射後11日以降では統計学的な有意差が認められた(11日目以降： $p < 0.05$, 25日目以降： $p < 0.01$)。

これらの結果により、インドメタシンの放射線増感作用は、腫瘍細胞に対して明らかに認められるが、正常細胞に対しては影響しないことが示された。

(平成22年1月6日受理)

キーワード：放射線増感剤, インドメタシン, 放射線治療

緒言

悪性腫瘍に対する放射線治療効果を高めるため、高LET放射線の利用や腫瘍への線量集中を目的とした強度変調照射放射線治療(Intensity Modulated Radiation Therapy, IMRT)などの工夫がなされている。これら物理学的な工夫に対して生物学的な工夫として、正常組織の放射線感受性を低下させる放射線防護剤、あるいは腫瘍細胞の放射線感受性を高める放射線増感剤の研究も報告されている。

放射線増感剤は、放射線照射によって損傷を受けた腫瘍細胞に対して、その損傷を増幅する作用もしくは損傷からの回復を阻害する作用を有する薬剤である。しかも、その増感作用は腫

瘍に特異的であり、正常細胞には作用しない必要がある。

非ステロイド系抗炎症剤であるインドメタシンは、抗腫瘍作用を持つこと、放射線増感作用を持つことが知られている。放射線増感作用については多くの報告がされているが¹⁻⁶⁾、その作用機序などは未だ十分に解明されているとはいえない。

今回、ハムスターに移植したグリーンズメラノーマに対するインドメタシンの放射線増感作用の基礎的検討として、正常組織と腫瘍に対する放射線増感効果について検討を行ったので報告する。

別刷請求先
紺野勝信
〒701-0194 倉敷市松島316
川崎医療短期大学 放射線技術科

電話：086 (462) 1111
ファックス：086 (463) 4339
Eメール：konno@jc.kawasaki-m.ac.jp

材料と方法

実験材料

実験動物には、8週齢、体重100~150gの雌性シリアンゴールドデンハムスター（日本SLC）を用いた。ハムスターに対して、継代移植用ハムスターから採取した2~3mm角の腫瘍塊を背部皮下に移植し、腫瘍径が約1cmに成長した時点で以下の実験に供した。使用した移植腫瘍は、Greeneによって発見されたハムスターの悪性腫瘍のグリーンズメラノーマ（Greene's Melanoma）である。この腫瘍は、ヒトの悪性腫瘍と生物学的にも病理学的にも類似しており、放射線抵抗性の腫瘍として知られている。

インドメタシン（和光純薬社）は、1規定の炭酸水素ナトリウム液で溶解し、2規定の塩酸でpHを調整したものを用いた。腫瘍移植したハムスターへのインドメタシンの投与は、濃度を5mg/mlに調整し、投与量50mg/kgで腹腔内投与した。他方、対照群には薬剤投与群と同容量の生理的食塩水を投与した。

ハムスターへの局所照射は、装置として直線加速器（三菱ML-15MDX、三菱電機社）の6MeV電子線（線源皮膚表面間距離：110cm、照射野3cm直径、線量率400cGy/分）を使用し、週2回で2週間の計4回照射とした。

実験方法

インドメタシンの放射線増感作用を検討するために、正常組織および腫瘍に対するインドメタシンの放射線増感効果について実験した。

（1）正常組織に対するインドメタシンの放射線増感効果

インドメタシンの正常組織に対する放射線増感効果について、ハムスターの皮膚反応から評価した。ハムスターの正常皮膚の急性反応の評価には、腫瘍を移植していない無処理ハムスターを実験に用い、インドメタシンの50mg/kg（薬剤投与群）もしくは同量の生理食塩水（対照群）を腹腔内投与し、その30分後に0.1~0.2mlのネンブータル麻酔を行い、ハムスターを伏臥位にしてアクリル台に固定し、電子線入射側の

背部に直径3cmの円範囲を設定して照射した。なお、照射部位は剃毛し、その他の部位は鉛板で遮蔽した状態で照射を行った。

照射線量は、薬剤投与群および対照群ともに1回線量を5Gyもしくは6.5Gyに設定し、4回の分割照射で合計線量をそれぞれ20Gyと26Gyとした。実験に供したハムスターは、20Gy照射群は6匹、26Gy照射群は8匹である。

正常皮膚の急性反応については、照射後30日間わたって隔日に皮膚反応を観察し、その程度はFowlerら⁷⁾が報告しているSkin reaction score (SRS)を用いて評価した（表1）。

（2）腫瘍に対するインドメタシンの放射線増感効果

担癌ハムスターにインドメタシンの50mg/kg（薬剤投与群、5匹）もしくは同量の生理食塩水（対照群、7匹）を腹腔内投与し、前述した麻酔およびハムスターの固定法を用いて電子線照射を行った。照射線量は、薬剤投与群および対照群ともに1回線量を5.5Gy、合計線量を22Gyに設定した。

放射線増感効果は、照射直後の腫瘍体積を基準として29日間にわたって隔日に腫瘍体積を計測し腫瘍体積比を算出し、対照群と薬剤投与群における腫瘍体積比の増加抑制効果から評価した。

（3）統計解析

統計解析には、急性皮膚反応の評価にはMann-WhitneyのU検定（Wilcoxon ranksum test）を、腫瘍に対するインドメタシンの放射線増感効果にはt検定をそれぞれ用いた。なお、有意水準は5%未満とした。

本研究は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け、川崎医科大学の動物実験指針に基づき

表1 Skin reaction score

score	reaction
0.0	No apparent difference from normal
0.5	Slight reddening
1.0	Severe reddening or dry desquamation(+)
1.5	Dry desquamation(+)
2.0	Moist desquamation of one small area
2.5	Moist desquamation of large area
3.0	Moist desquamation of most of skin of irradiated area

文献7)より引用

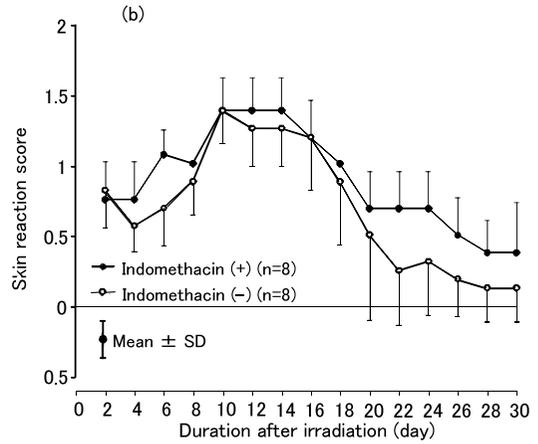
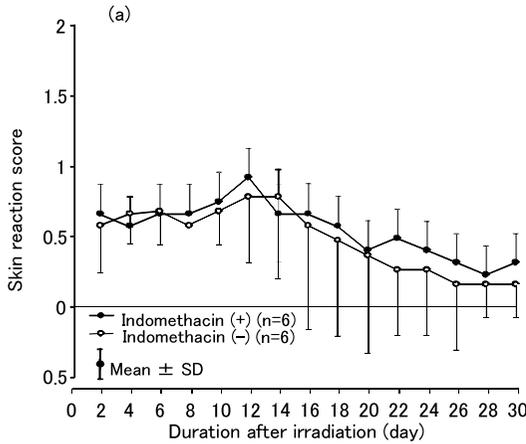


図1 インドメタシン投与群と非投与群におけるハムスター正常皮膚の急性反応の比較
 (a) 照射線量 20Gy(5Gy × 4分割)
 (b) 照射線量 26Gy(6.5Gy × 4分割)

実施した。

結果

正常組織に対するインドメタシンの放射線増感効果について

薬剤投与群と対照群における照射後のSRSで評価した正常皮膚の急性反応を図1に示す。20Gy照射後のSRSは10~14日後にピークに達し、その後緩徐に低下を示して20日後以降では照射2日後よりも低い値を示した。26Gy照射後のSRSも同様のパターンを示した。ただし、26Gy照射後のSRSは、20Gy照射後のそれに比して30~40%高値を示した。

薬剤投与群と対照群のSRSの比較では、照射線量が20Gy、26Gyにかかわらず、薬剤投与群が高値を示す傾向が認められたが両群間に統計学的な有意差は示されなかった(20Gy: p=0.57, 26Gy: p=0.26)。

なお、実験に供したハムスターは、20Gy照射の対照群の1匹が照射6日後に死亡により欠落した。

腫瘍に対するインドメタシンの放射線増感効果について

薬剤投与群と対照群の照射後の腫瘍体積比を図2に示す。薬剤投与群の腫瘍体積比は、経時

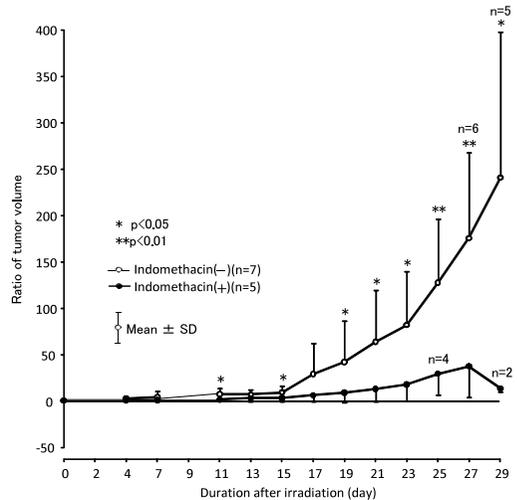


図2 放射線照射後のハムスター・グリーンズメラノマ増殖曲線
 -インドメタシン投与群と非投与群の比較-

的に緩徐に増加して27日後に約33倍の値を示した。それに対して対照群は、15日以降に急峻に増加して29日後には約240倍の高値を示した。両群の腫瘍体積比の比較では、11日以降では5%未満の、25日以降では1%未満の有意差が認められた。

なお、実験に供したハムスターは、薬剤投与群では照射25日後に1匹、29日後にはさらに2匹が死亡により欠落した。対照群については、照射27日後に1匹、29日後にはさらに1匹が死

亡により欠落した。

考察

放射線照射はアラキドン酸誘導体（プロスタグランジンやトロンボキサンなど）の量を上昇させる。非ステロイド系抗炎症剤であるインドメタシンは、アラキドン酸からプロスタグランジン H_2 への経路で作用するシクロオキシゲナーゼ (COX) 活性を阻害しプロスタグランジン、トロンボキサン生成を抑制するとされている¹⁻³⁾。

Milas ら⁶⁾ は、インドメタシンは放射線防護作用を有するプロスタグランジン E2 を抑制することにより、放射線感受性を高めていると仮定している。また、インドメタシンによるネズミの腫瘍中のプロスタグランジンの抑制は、電離放射線の 1 回照射に対する腫瘍の放射線感受性を高めているとの報告もある²⁾。さらに、Crokart ら⁸⁾ は、インドメタシンを含む非ステロイド系抗炎症剤は腫瘍中の酸素分圧を増加させ酸素効果により、放射線増感していると仮説を立てている。

このようにインドメタシンの放射線増感作用に関する多くの報告がなされているが、その作用機序については解明されていないのが現状である。

放射線増感剤は、放射線照射によって損傷を受けた腫瘍細胞に対してその損傷を増幅する作用もしくは損傷からの回復を阻害する薬剤であり、しかもその増感作用は腫瘍に特異的であり正常細胞は作用しないことが要求される薬剤である。この観点から、今回の基礎的検討では、インドメタシンの正常組織および腫瘍組織それぞれにおける放射線増感作用について検討を行った。

正常組織に対するインドメタシンの放射線増感効果の検討として行った急性皮膚反応の検討では、薬剤投与群と対照群の SRS に統計学的な有意差は示されなかったものの、薬剤投与群の方が高値を示す傾向が認められた。しかも、26Gy 照射群の方が 20Gy 照射群よりもその傾向

が顕著であった。このことは、インドメタシンが正常組織に対しても線量に依存した若干の放射線増感作用を有することを示唆するものである。しかし、田村⁵⁾ はハムスターを対象とした検討において、15Gy 1 回照射では有意差を示さず ($p=0.67$)、10Gy 1 回照射では有意差を認めた ($p<0.05$) と報告している。また、Simonea ら⁹⁾ は、人間の皮膚を対象として、5Gy を 4 回照射した時と 0.2~1.4Gy を 5 回照射した時にできる紅斑に対して、インドメタシンは影響を与えなかったと報告している。これらの報告はわれわれの実験系に比して、前者は 1 回照射であること、後者は対象がヒトであることなどが異なり、それが結果に差を生じさせた一因と考えられた。

ただし、われわれの結果においても統計学的な有意差を認めておらず、たとえインドメタシンが正常組織に対して放射線増感作用を有していたとしても、大きな増感率ではないと結論するのが妥当と考えた。

腫瘍に対するインドメタシンの放射線増感効果として検討した腫瘍体積比は、薬剤投与群に比して対照群は急峻に増加することが示された。そして、両群の腫瘍体積比の間には、照射 11 日以降では統計学的な有意差が認められた。この結果は、インドメタシンは腫瘍体積の増加に対する抑制効果を有することを示唆している。しかし、この抑制効果は、インドメタシンの腫瘍に対する抑制効果と放射線の腫瘍に対する効果が相乗して得られたものか、あるいはインドメタシンが放射線の効果を増強して得られた結果なのかは不明である。今回の検討では薬剤投与群と対照群の 2 群としたが、放射線 (-) でかつ薬剤 (-) の群、放射線 (-) で薬剤 (+) の群、放射線 (+) で薬剤 (-) の群、放射線 (+) で薬剤 (+) の 4 群を設定した検討を行うことにより、ある程度は解明されると推察される。

今回の検討において、放射線を照射しているにもかかわらず、腫瘍体積が増加を示した。これは、合計の照射線量が不足している、腫瘍が放射線抵抗性である、あるいはこの両者が起因

していると考えられた。今後、合計線量の選択や、ハムスターに移植する腫瘍についても検討が必要である。

COXにはCOX-1とCOX-2があり、インドメタシンはその両者を阻害する。COX-2阻害剤でCOX-2活性を抑制すると、腫瘍の発生・増殖に影響を与え、腫瘍血管新生の阻害やアポトーシスの誘導によって腫瘍の増殖を抑制している可能性が報告されている¹⁰⁻¹³⁾。したがって、COX-2の活性を研究することによってインドメタシンの放射線増感作用の機序の解明につながる事が期待される。今後、このCOX-2の活性を加味した検討を進めて行く予定である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導をいただきました川崎医科大学放射線治療学教室の平塚純一教授、山本美貴子技術員、また本研究にご協力下さいました同大学附属病院中央放射線部の長瀬尚巳主任技師、成廣直正副主任技師ならびに同医用生物センターの皆様と川崎医療短期大学一般教養の阿部利則氏に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Furuta Y, Hall E, Sanduja S, Barkly T Jr, Milas L: Prostaglandin production by murine tumors as a predictor for therapeutic response to indomethacin. *Cancer Res* 48:3002-3007, 1988
- 2) Furuta Y, Hunter N, Barkley T Jr, Hall E, and Milas L: Increase in radioresponse of murine tumors by treatment with indomethacin. *Cancer Res* 48:3008-3013, 1988
- 3) Shalinsky DR, Menamara DB, Agrawal KC: Modulation of prostaglandin biosynthesis in hypoxic murine mammary adenocarcinoma cells by misonidazole. *Cancer Res* 49:3853-3856, 1989

- 4) Shenoy MA, Singh BB: Studies on indomethacin as a potentiator for hyperthermic and radiation response in a mouse fibrosarcoma. *Cancer Lett* 45:227-232, 1989
- 5) 田村博文: 臨床応用を目的とした放射線増感作用薬剤の基礎的検討. *川崎医学会誌* 23: 99-112, 1997
- 6) Milas L, Furuta Y, Hunter N, Nishiguchi I, Runkel S: Dependence of indomethacin-induced potentiation of murine tumor radioresponse on tumor host immunocompetence. *Cancer Res* 50:4473-4477, 1990
- 7) Fowler JF, Denekamp J, Delapeyre C, Harris SR, Sheldon PW: Skin reactions in mice after multifraction x-irradiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 25:213-223, 1974
- 8) Crockart N, Radermacher K, Jordan BF, Baudelet C, Cron GO, Gregoire V, Beghein N, Bouzin C, Feron O, Gallez B: Tumor radiosensitization by antiinflammatory drugs: evidence for a new mechanism involving the oxygen effect. *Cancer Res* 65:7911-7916, 2005
- 9) Simonen P, Hamilton C, Ferguson S, Ostwald P, O'Brien M, O'Brien P, Back M, Denham J: Do inflammatory processes contribute to radiation induced erythema observed in the skin of humans? *Radiother Oncol* 46:73-82, 1998
- 10) Ziche M, Jones S, Gullino PM: Role of prostaglandin E2 and copper in angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst* 69:475-481, 1982
- 11) Taketo MM: Cyclooxygenase-2 inhibitor in tumorigenesis (Part I). *J. natl Cancer Inst* 90:1529-1536, 1998
- 12) Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K: Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 59:198-204, 1999
- 13) Hida T, Kozaki K, Muramatsu H, Masuda A, Shimizu S, Mitsudomi T, Sugiura T, Ogawa M, Takahashi T: Cyclooxygenase-2 inhibitor induce apoptosis and enhance cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 6:2006-2011, 2000

An investigation of the radiosensitization effect of indomethacin on tumor cells.

Katsunobu KONNO¹⁾, Tatsushi TOMOMITSU¹⁾, Yoshinari IMAJOU¹⁾,

Yasuhiko OOKURA²⁾, Koujirou TAKAHASHI²⁾

1) Department of Radiological Technology, Kawasaki College of Allied Health Professions,
316 Matsushima, Kurashiki, 701-0194, Japan

2) Department of Clinical Radiology, Faculty of Health Sciences, Hiroshima International University,
555-36 Kurosegakuendai, Higashihiroshima, 739-2695, Japan

ABSTRACT It is well known that indomethacin, which is nonsteroidal anti-inflammatory drug, has an anti-tumor effect and a radiosensitization effect. In this study, the radiosensitization effect of indomethacin was examined using a hamster into which Green's melanoma had been transplanted.

The radiosensitization effect on normal tissue of indomethacin was evaluated by hamster's skin reaction. It's skin reaction score was higher for the experimental group than the control group, although the difference between the two groups was shown statistically insignificant.

The radiosensitization effect of indomethacin on the tumor was evaluated by the tumor volume ratio, which was calculated based on the tumor volume immediately after irradiation. A statistically significant difference was indicated between the tumor volume ratio of the experimental group and that of the control group from 11 days after the irradiation (11 days after: $p < 0.05$; 25 days after: $p < 0.01$)

These results showed a clear radiosensitization effect of indomethacin on tumor cells, while the normal cells were unaffected.

(Accepted on January 6, 2010)

Key words : **Radiosensitizer, Indomethacin, Radiation therapy**

Corresponding author

Katsunobu Konno

Department of Radiological Technology, Kawasaki
College of Allied Health Professions, 316 Matsushima,
Kurashiki, 701-0194 Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 463 4339

E-mail : konno@jc.kawasaki-m.ac.jp