

実験腫瘍の温熱療法における³¹P-MRSによる thermal dose および治療効果判定の評価

外山芳宏, 高島 均, 細川敦之, 佐藤 功,
田邊正忠

香川医科大学放射線医学教室

緒 言

温熱療法の有用性は癌治療において確立したのものになっているが, 様々の生物物理学的な要因によりいまだ治療量, 効果判定について一定の基準は定まっていない。一般的には治療量に関しては, 温度センサーを病巣部に刺入し thermal dose の評価が行われているが, 刺入部位によって温度は異なり全体を表すものとは言えない。効果判定においても腫瘍の縮小が必ずしも治療効果を表しているとはいえず, このためCT値による検討なども行われている¹⁾。また *in vivo* においては, 加温による直接の細胞障害と同様, 腫瘍組織内の血流の低下は治療効果と密接に関係しているとも言われている²⁾。

³¹P-MRS (magnetic resonance spectroscopy) は組織内部のエネルギー代謝を経時的, 非侵襲的に観察することができ, これまでも放射線治療, 温熱療法, 化学療法に伴うリンの代謝の変化について多くの報告がみられる^{3)~6)}。しかし³¹P-MRS のパラメーターと thermal dose との関係についての報告は少なく, さらに治療効果判定との関連において基礎的実験を行った報告はみられない。今回実験腫瘍を用い温熱療

法における thermal dose の評価, 腫瘍内組織血流の変化, および治療効果との関連において³¹P-MRS 測定の有用性について検討した。

装置および方法

1) 実験動物および腫瘍系

実験動物はクラレより入手した7週令のC3Hマウス(メス 体重30~50g)を用いた。murine mammary 16 adenocarcinoma ascites cells (以下MM16と略す)をC3Hマウス大腿部皮下に 1.0×10^5 個移植し, 移植後14日目(腫瘍径14~15mm)に固形腫瘍として実験に使用した。

2) 温熱療法

実験群は thermal dose の異なる3群として, 43°C 30分(以下43/30と略す), 44°C 30分(以下44/30), 45°C 30分(以下45/30)の加温を, さらに44°C 30分と thermal dose が同等の2群として43°C 60分(以下43/60), 45°C 15分(以下45/15)の加温を行った(各群n=5~6)。C3Hマウスを麻酔用エーテルにて数分間の麻酔下に四肢を固定後, マイクロ波加温装置2450MHz hyperthermia system HMS-020(アロカ社製)にて腫瘍部を加温した。アプリケーションは5×5cmを使用, 腫瘍上方5

キーワード ³¹P-MRS, tumor blood flow, hyperthermia, thermal dose.

cmに置き、また温度センサーは腫瘍のほぼ中心で表面より約5 mmの部分に刺入した。治療温度には加温開始後約2分にて到達した。

3) ³¹P-MRS 測定

³¹P-MRS は加温前より経時的に測定した。測定装置はBEM-250/80 NMR system 2.0 T (大塚電子社製) を使用、直径1.5 cmのサーフェスコイルを腫瘍部上方に設置し測定した。測定は各群とも加温直前、直後、6時間後、24時間後に行った。測定条件は³¹P共鳴周波数34.5 MHz、観測帯域3000 Hz、サンプルポイント2048、パルス幅0.02秒、繰り返し時間5.0秒、積算回数400回にて測定した。各パラメーターの比はその面積比を用いた。pHはクレアチンリン酸のスペクトルを0 ppmとし無機リン酸の化学シフト(δ)より算出した。

各群間のデータの解析はT検定により行った。

4) 腫瘍内組織血流量

腫瘍内組織血流量はdigital UH-meter model MHG-D1 (ユニークメディカル社製) を用い、水素ガスクリアランス法にて測定した。電極は直径0.8 mmニードルタイプを腫瘍中心部上端より約5 mmの位置に刺入した。

結 果

1) ³¹P-MRS スペクトルの経時的变化

Fig. 1 に44°C 30分加温前後のスペクトルの経時的变化を示す(以下PMEはphosphomonoesterを、Piは無機リン酸を、PDEはphosphodiesterを、PCrはクレアチンリン酸を、ATPはアデノシン3リン酸を表す)。加温直後よりPiの上昇、PCr、ATPの低下が見られ、6時間後が最も強く、以後次第に回復した。この結果より以後測定値は直後、6時間後、24時間後にて検討した。

2) 腫瘍体積増加率の推移

Fig. 2 は加温後の腫瘍体積増加率(加温前の

体積に対する割合)の推移である。腫瘍体積は $1/2 \times [(\text{長径}) \times (\text{短径})^2]$ の式より算出した⁸⁾。5群とも加温後24時間以内では変化は認められなかった。5~10日後ではコントロール群に比べ加温群では腫瘍の増殖抑制効果が明らかであり、またthermal doseが大きくなるほど抑制効果は強く認められた。

3) 加温後の各パラメーターの変動

Fig. 3, 4 に thermal dose の異なる3群間において有意差を認めたパラメーターであるPCr/Pi, PME/PME+PDEの変動を示した。PCr/Piは加温直後より6時間後にかけて低下した後、24時間後にかけて回復した(Fig.3-a)。加温直後、6時間後の43/30群、45/30群間に統計的有意差を認めた(P<0.05)。PME/PME+PDEは44/30群、45/30群では直後より6時間後

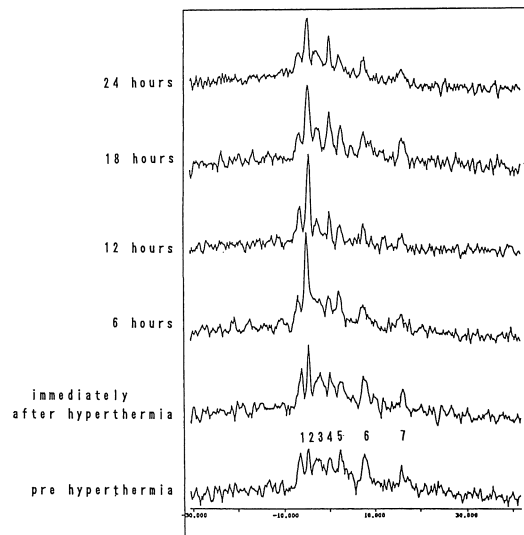


Fig.1. The changes on ³¹P-spectra of MM16 tumors after hyperthermia

1 : PME (phosphomonoester), 2 : Pi (inorganic phosphate), 3 : PDE (phosphodiester), 4 : PCr (creatinephosphate), 5 : γ -ATP 6 : α -ATP 7 : β -ATP

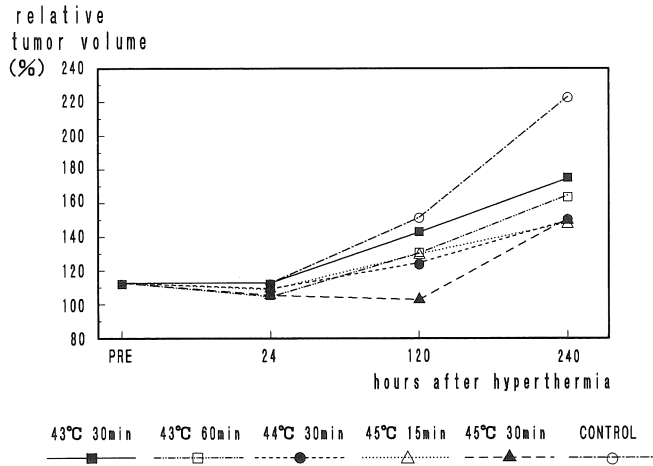


Fig.2. Growth curves
Hyperthermia had dose dependent retarding effects on tumor growth.
(mean±SD)

増加した後、24時間後にかけて低下、また43/30群では6時間後まで変動なく、その後24時間後にかけて低下した(Fig.3-b)。6時間後の43/30群、45/30群間に統計的有意差を認めた($P < 0.05$)。これに対し thermal dose の同等の3群間においては有意差は見られなかった(Fig. 4)。

4) 治療効果と PCr/Pi, PME/PME+PDE の関連性

以上の結果から³¹P-MRS測定により thermal dose の評価が可能と考えられたが、次いで個々の腫瘍について thermal dose の指標と考えられる上記パラメーターと治療効果との関係を検討した。加温後5日目、10日目で腫瘍体積の変化の割合によりそれぞれ3群に分け (A群: 50%未満, B群: 50%以上~100%未満, C群: 100%以上)、この3群間で加温前、直後、6時間後、24時間後の各点における PCr/Pi, PME/PME+PDE の有意差を検定した。その結果、PCr/Pi では加温直後の PCr/Pi において加温後5日目のA, B群間 ($P < 0.05$)、PME/PME+PDE では6時間後の PME/PME+PDE において10日目のA, B群間 ($P < 0.05$)、A, C群間 ($P < 0.01$) に統計的有意差を認めた

(Fig. 5)。特に PME/PME+PDE では、A群、B群、C群となるにつれ6時間後の PME/PME+PDE の平均値は低下しており、6時間後の値が小さいほど10日後での腫瘍の体積増加の割合が大きくなることが示唆された。

pH は直後より低下の傾向を示したが、ばらつきが大きく、各群では一定した傾向をとらえられなかった。

5) 腫瘍内組織血流量の変化

腫瘍内組織血流量は加温直後より低下し、6時間後に最低値を示した後、24時間後にかけて回復した。この変化は thermal dose の異なる3群間では thermal dose が多いほど著明に認められた。また thermal dose の同等の3群間においては44/30群に比べ43/60群、45/15群は低下の度合いが強い傾向がみられたが有意差はなかった(Fig. 6)。

考 察

温熱療法の治療量に関して温度センサーを病巣部に刺入し thermal dose の評価が行われているが、刺入部位によって温度は異なり全体を表

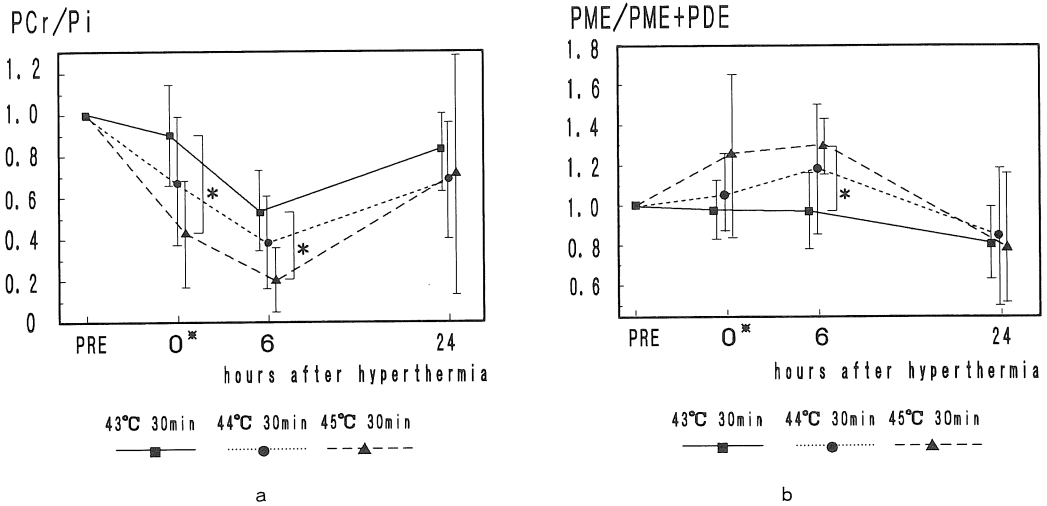


Fig.3. The changes of metabolites at different thermal doses.

a) The changes of PCr/Pi ratio at different thermal doses.

b) The changes of PME/PME+PDE ratio at different thermal doses.

(Each point represents a percentage of the value prior to treatment. mean \pm SD) O* : immediately after hyperthermia * : P < 0.05

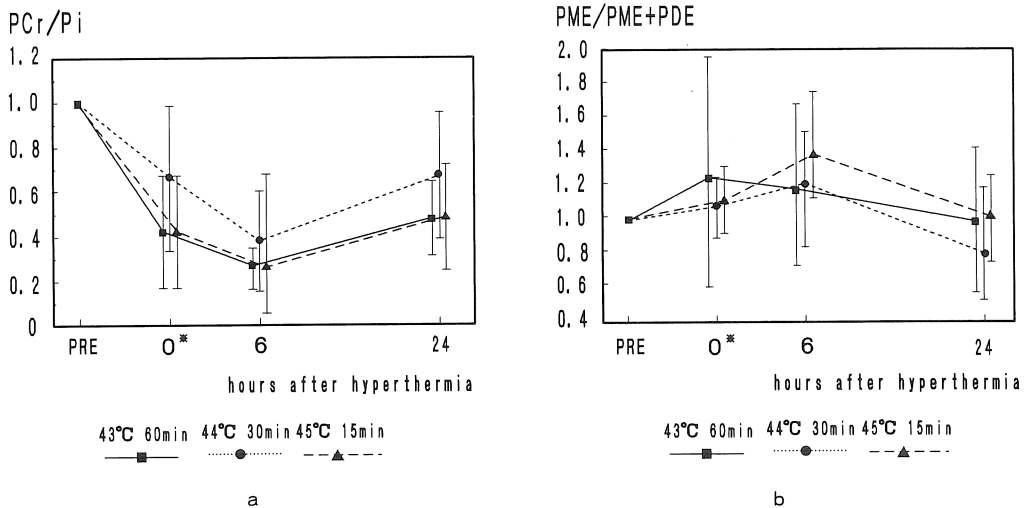


Fig.4. The changes of metabolites at equivalent thermal doses.

a) The changes of PCr/Pi ratio at equivalent thermal doses.

b) The changes of PME/PME+PDE ratio at equivalent thermal doses.

(Each point represents a percentage of the value prior to treatment. mean \pm SD) O* : immediately after hyperthermia * : P < 0.05

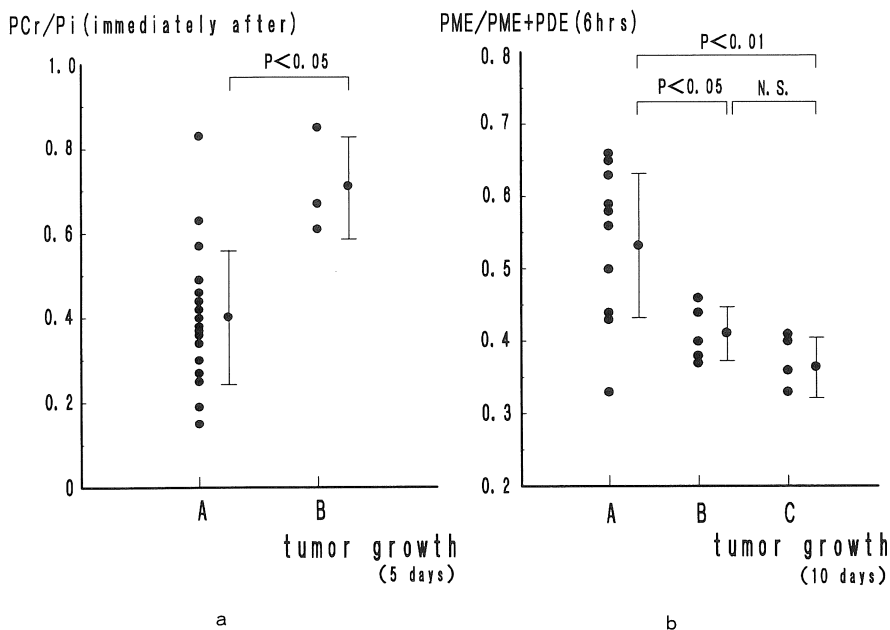


Fig.5. The relationship between ratio of tumor growth and metabolites.

a) Comparison of PCr/Pi immediately after hyperthermia among two groups at 5 days after hyperthermia.

b) Comparison of PME/PME+PDE 6 hr after hyperthermia among three groups at 10 days after hyperthermia.

A : Tumor growth rate was less than 50%. B : Tumor growth rate was more than 50% and less than 100%. C : Tumor growth rate was more than 100%. N.S. : not significant

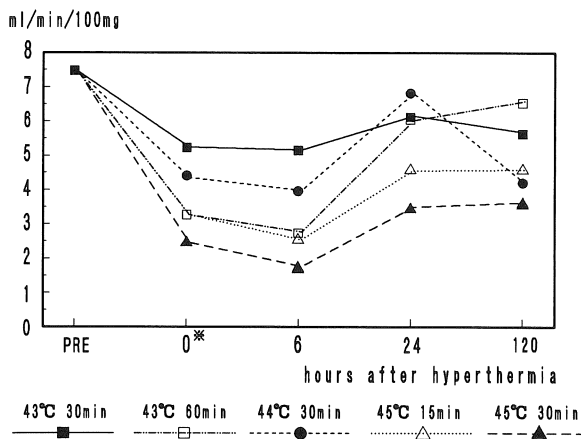


Fig.6. The changes of tumor blood flow of MM16 tumors after hyperthermia (means \pm SD)

O* : immediately after hyperthermia

すものとは言えない⁸⁾。臨床的に thermal dose は、43°C以上の温度にて温度時間曲線の面積 ($\int 2^T-43 dt$) より求められている。今回の実験においてもこの概念を使用した⁹⁾が、5群間の腫瘍体積増加率は thermal dose を良く反映したと考えられる。

³¹P-MRS は組織内部の高エネルギーリン酸やリン脂質代謝に関係する代謝物質を経時的、非侵襲的に観察することができる。しかし一方では測定部位の精度の不正確さ、周波数分解能および感度の悪さ、定量的評価の確立など問題も多い。本実験にて使用したサーフェスコイル法も感度領域がコイルの大きさによって一定であり、腫瘍径の縮小による周辺組織からの信号の混入や増大に伴う感度領域の変化の問題がある。そのため今回のスペクトルの測定は5群とも腫瘍径の変化がみられなかった加温後24時間までとした。

温熱療法後の³¹P-MRSの変化についてはこれまでも数多くの報告があり^{3)-6),11)}、加温後のスペクトルの変化としてPCr, ATPの低下, Piの上昇がみられるとされている。今回の結果においても44°C 30分の加温にて、加温直後よりPiの上昇, PCr, ATPの低下を認めた。Sijens⁶⁾らは、subcutaneous mammary carcinoma NU-82を使い、41°C, 43°C, 44°C, 45°C各15分加温後のATP/Piの経時変化および43°C, 44°C各15, 30, 45, 60分加温18時間後のATP/Piの値を検討し、加温後のATP/Piは2~4時間後を最低値として低下するが、その変化の度合いおよびその後の回復の程度はdoseに依存して変化し、thermal doseの評価に有用であると報告している。私共の結果では、PCr/Pi, PME/PME+PDEは異なるthermal doseでは加温直後、6時間後のPCr/Pi, 6時間後のPME/PME+PDEに統計的有意差を認め、加温後24時間までの早期においてはdoseに依存して変化した。さらに同等のthermal doseでは変化に差が見られずthermal doseの指標となる可能性が示唆された。

PMEはその主成分としてphosphocholine, phosphoethanolamineを、またPDEはその主成分としてglycerophosphorylcholine, glycerophosphorylethanolamineを含み、それぞれ細胞膜を構成するリン脂質の前駆体および代謝物として細胞膜代謝に関連するとされている^{12),13)}。加温後のPME, PDEの変化については一定の見解は得られていない^{14),15)}。今回の結果では、PME/PME+PDEは加温直後に上昇した後24時間後にかけて低下した。有意差の認められたPME/PME+PDEはPME/PDEの変化をより強調したものである。PMEおよびPDEの変化については明らかではないが、加温後6時間までは温熱による直接的障害および腫瘍組織内の血流低下により、PMEよりPDEにいたる細胞膜代謝過程のいずれかが障害されたため、PMEの蓄積とPDEの低下が起り、さらに加温6時間以後血流の回復と共にPMEの洗い出しと膜新生の再開によりPMEの低下、PDEの上昇をきたしたと推測した。

温熱療法において加温による腫瘍細胞の直接的障害の他に重要な位置を占めているのが腫瘍組織内血流量の変化である⁹⁾。加温による腫瘍組織内血流についてSong¹⁰⁾は文献的に諸家の報告をまとめている。それによると加温中の腫瘍組織内血流の変化は腫瘍系により様々であるが、加温後は全て低下し、24時間以後回復するとしている。Nishimura²⁾らは温熱感受性の異なる4種類の腫瘍において、加温による血管障害と温熱感受性の関連について組織学的検討を行った結果、加温後の血管障害の差が血管構築の差に起因し、これら血管障害の差が*in vivo*での温熱感受性の差と密接に関係していると報告している。腫瘍組織の血流量が低下した場合、腫瘍細胞は好気性代謝が行えなくなり、嫌気性解糖によりATPを産生するようになる。しかし好気生代謝に比べATP産生量は少ないため同時にPCrよりATPの産生も行われる(PCr+ADP→ATP+Pi)。Lilly¹¹⁾らはmurine RIF-1を使った実験で、個々の腫瘍においてATP/Piと腫瘍

組織内血流量との間に強い相関関係があったと報告している。今回の検討では PCr/Pi は dose に依存して変化し、腫瘍組織内血流量測定の結果と類似しており、PCr/Pi が腫瘍組織内血流量の変化と相似して推移する事が示唆された。腫瘍組織内の虚血時 PCr からの ATP 産生が起こることから、腫瘍組織内血流量の指標としては ATP, PCr いずれも考え得る。ただ Lilly らの RIF-1 の加温前のスペクトルでは ATP のピークに対して PCr のピークは低いのに比べ、私共の使用した MM 16 は逆に PCr のピークが高く、腫瘍系の違いによりいずれかを選択するのが良いと考えられる。

^{31}P -MRS を用いた温熱療法での治療効果判定はほとんどが臨床応用に関する報告であり^{15),16)}、動物を使った基礎的検討はない。今回温熱療法による一次効果判定には腫瘍体積の増加率を使用した。腫瘍体積増加率の5群間比較ではほぼ dose に依存して推移した。治療効果と PCr/Pi, PME/PME+PDE の関連性を検討したところ、加温後5日目、10日目の腫瘍体積の変化の割合により分けた3群間で (A群:50%未満, B群:50~100%未満, C群:100%以上), PCr/Pi, PME/PME+PDE に統計的有意差を認めた。特に PME/PME+PDE では、A, B, C 群となるにつれ6時間後の PME/PME+PDE の平均値は低下し、6時間後の値が小さいほど10日後での腫瘍の体積増加の割合が大きくなる事が示唆された。

温熱療法における生物学的効果は加温による細胞への直接的障害と組織血流の低下があり、それらにより組織内壊死から腫瘍の縮小を引き起こすと推論した。 ^{31}P -MRS は加温後早期においてこれらの生物学的効果やその後の治療効果を予測でき、thermal dose の評価および治療効果の先行指標として有用であると考えられた。

結 語

- 1) ^{31}P -MRS を用い温熱療法での thermal dose

の評価および治療効果における有用性について実験腫瘍を用い基礎的検討を行った。

- 2) 加温後の腫瘍体積増加率の推移は、コントロール群に比べて加温群では抑制効果が明らかであり、また高温になるほどその効果は強く、dose に依存して変化した。

- 3) PCr/Pi, PME/PME+PDE は加温24時間後までは dose に依存して変化し、直後、6時間後の PCr/Pi, 6時間後の PME/PME+PDE は thermal dose の指標となる可能性が示唆された。

- 4) 加温後腫瘍組織内血流は dose に依存して低下し、PCr/Pi は腫瘍組織内血流の変化と相似して推移した。

- 5) 治療効果と PCr/Pi, PME/PME+PDE の関連性を検討したところ、加温後5日目、10日目の腫瘍体積の変化の割合により分けた3群間で (A群:50%未満, B群:50~100%未満, C群:100%以上), PCr/Pi, PME/PME+PDE に統計的有意差を認め、加温直後の PCr/Pi, 6時間後の PME/PME+PDE は治療効果の先行指標と考えられた。

本論文中の要旨は第18回日本磁気共鳴医学会総会 (1991, 熊本) において発表した。

尚, RSNA (Radiologic society of north america) にて受理され第77会大会 (1991, Chicago) にて発表の予定である。

文 献

- 1) Hiraoka M, Akuta K, Nishimura Y, et al. : Tumor response to thermoradiation therapy : Use of CT in evaluation. *Radiology*, 164 : 259-262, 1987.
- 2) Nishimura Y, Shibata Y, Jo S, et al. : Relationship between heatinduced vascular damage and thermosensitivity in four mouse tumors. *Cancer Research*, 48 : 7226-7230, 1988.
- 3) Evanchko WT, Ng TC, Lilly MB, et al. : In vivo ^{31}P 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.
- 4) Naruse S, Higuthi T, Horikawa Y, et al. : Radio-frequency hyperthermia with successive monitoring of its effects on tumors using NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83 : 8343-8347, 1986.
 - 5) Vaupel P, Okuniff P, Neuringer LJ : In vivo ³¹P-NMR spectroscopy of murine tumours before and after localized hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia*, 6 : 15-31, 1990.
 - 6) Sijens PE, Bovee WMMJ, Koole P, et al. : Phosphorus NMR study of the response of a murine tumour to hyperthermia as a function of treatment time and temperature. *International Journal of Hyperthermia*, 5 : 351-357, 1989.
 - 7) Klieser WM, Schaefer C, Walenta S : Assessment of tumor energy and oxygenation status by bioluminescence, Nuclear magnetic resonance spectroscopy, and cryospectrophotometry. *Cancer Research*, 50 : 1681-1685, 1990.
 - 8) Woo SY, Anderson RL, Kapp DS, et al. : Heterogeneity of heat response in murine canine and human tumors : Influence on predictive assays. *Int J Radiation Oncology Biol. Phys*, 20 : 479-488, 1990.
 - 9) Vaupel P, Kallinowski F : Physiological effects of hyperthermia. *Recent Results in Cancer Research*, 104 : 71-109, 1987.
 - 10) Song CW : Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment : A review, *Cancer Research (suppl.)*, 44 : 4721s-4730s, 1984.
 - 11) Lilly MB, Katholi CR, Ng TC : Direct relationship between high-energy phosphate content and blood flow in thermally treated murine tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 75 : 885-889, 1985.
 - 12) Daly PF, Lyon RC, Faustino PJ, et al. : Phospholipid metabolism in cancer cells monitored by ³¹P-NMR spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, 262 : 14875-14878, 1987.
 - 13) Burt CT, Ribolow HJ : A hypothesis : Noncyclic phosphodiesterases may play a role in membrane control. *Biochemical Medicine*, 31 : 21-30, 1984.
 - 14) Antich PP, Marson RP, Nunnally RL : Applications of magnetic resonance techniques to deep tumor hyperthermia. *Strahlenther Onkol*, 165 : 734-737, 1989.
 - 15) Semmler W, Gademann G, Schlag P, et al. : Impact of hyperthermic regional perfusion therapy on cell metabolism of malignant melanoma monitored by ³¹P MR spectroscopy. *Magn Reson Imag* 6 : 335-340, 1988.
 - 16) Karczmar GS, Meyerhoff DJ, Boska MD, et al. : P-31 spectroscopy study of response of superficial human tumors to therapy. *Radiology*, 179 : 149-153, 1991.
 - 17) Vaupel P, Okunieff P, Kallinowski F, et al. : Correlations between ³¹P-NMR spectroscopy and tissue O₂ tension measurements in a murine fibrosarcoma. *Radiation Research*, 120 : 477-493, 1989.

Experimental Study on Evaluation of Thermal Dose and Effectiveness by ^{31}P -MRS in Treatment of Hyperthermia

Yoshihiro TOYAMA, Hitoshi TAKASHIMA, Nobuyuki HOSOKAWA,
Katashi SATO, Masatada TANABE

*Department of Radiology, Kagawa Medical School
1750-1 Ikenobe Kita-gun Miki-cho Kagawa 761-07*

We have investigated the usefulness of ^{31}P -MRS (Magnetic Resonance Spectroscopy) for the assessment of thermal doses. Murine mammary adenocarcinoma, ranging from 14mm to 15mm diameter, which had been implanted in the right thigh of C3H mice, were treated with local hyperthermia using a 2450MHz microwave hyperthermia system. Tumors were heated at 43°C for 60min, 44°C for 30min, 45°C for 15min for three groups that received the same thermal dose. The groups received a higher dose was 45°C for 30min, and lower dose was 43°C for 30min. ^{31}P -MRS was obtained before, immediately after, 6hr and 24hr after treatment. Spectra were acquired with a 2.0T spectrometer with surface coil of 15mm diameter. Level of PCr/Pi decreased temporarily at 6hr followed by a partial recovery. Level of PME/PME+PDE increased temporarily at 6hr followed by a recovery to almost the starting level at 24hr. The spectral changes in the three groups with equivalent doses corresponded well. In the higher dose group the change was more intense and in the lower group the change was more weak. Hyperthermia had dose dependent retarding effects on tumor growth. We classified the effect of hyperthermia into 3 groups. According to tumor growth rate, A : less than 50%, B : more than 50% and less than 100%, C : more than 100%. PCr/Pi immediately after treatment of group A at 5days after treatment was significantly lower than group B at same time. Level of PME/PME+PDE 6hr after treatment of A at 10days was significantly higher than group B and C at same time. In conclusion, the ratio of PCr/Pi and PME/PME+PDE can be used as an indicator for the effectiveness of hyperthermia. ^{31}P -MRS can be useful for assessment of thermal dose.