

原 著

NMR 装置による腫瘍に対する RF hyperthermia とその治療効果の同時判定

RF Hyperthermia and Simultaneous Monitoring of its Effects on the Phosphate Metabolism of Tumor Using ^{31}P -NMR Spectrometer

成瀬昭二 (京都府立医科大学脳神経外科)
樋口敏宏 (同 上)
堀川義治 (同 上)
田中忠藏 (同 上)
中村公郎 (同 上)
平川公義 (同 上)

キーワード

^{31}P -NMR, RF hyperthermia, tumor, NMR spectrometer, surface coil

要旨

Radiofrequency (RF) hyperthermia on experimental tumor was made using the surface coil within the NMR spectrometer and its effects was monitored simultaneously in the same spectrometer by measuring ^{31}P -NMR spectra. Rat glioma cells (EA 285) were inoculated subcutaneously in the lumbar region of CD Fisher rats. When the tumor grew over 1.5 cm in diameter, *in vivo* ^{31}P -NMR spectrum was measured with use of a 1.1 cm surface coil in the SCM-200 spectrometer (JEOL, 4.8 Tesla).

Following this control study, RF pulse at various power levels was applied to the tumor tissue. After this hyperthermia therapy, *in vivo* ^{31}P -NMR spectra were again measured sequentially without changing the position of the rat. In the pre-irradiation stage, peaks of ATP and a phosphomonoesters (PME) peak were high and a Pi peak was low. After the RF pulse at 5 watts was continuously applied for 60 minutes, the ATP peaks decreased and the Pi peak increased immediately, resulting finally in a dominant Pi peak.

pattern within 30 minutes in all 10 cases examined. The tumor temperature rose to 43.5°C during the RF hyperthermia. These spectrum changes occurred much earlier than the histological changes. This Pi dominant pattern lasted at least for 7 days, when histological examinations revealed extensive necrosis.

There was no changes in the spectrum in any of 10 cases after irradiation with an RF pulse below 3 watts for 60 minutes. Thus, we could make the RF hyperthermia in the NMR spectrometer and its effects was monitored simultaneously within the same spectrometer. It is concluded that the NMR device can be used not only for the diagnosis of diseases but also as a therapeutic tool.

1 はじめに

最近、NMR の医学応用の進展は著しく、臨床診断機器として Magnetic Resonance Imaging (MRI) 装置が広く用いられるようになっただけでなく、³¹P, ¹³C, ¹⁹F, ²³Na などの多核種の spectrum が *in vivo* の系で測定できる動物実験用 NMR 分光器も開発され、基礎および臨床医学上、数多くの新しい知見が得られつつある。

しかし、NMR が医学領域に適用されてから日も浅く、まだまだその応用の可能性が残されていると考えられる。その一つとして、われわれは、腫瘍の治療にラジオ波を用いた温熱療法 (RF hyperthermia) が行われている¹⁾のに注目し、NMR 装置の発生する RF pulse を用いて NMR 装置内で、この RF hyperthermia ができるのではないかと考えた。さらにわれわれは、*in vivo* ³¹P-NMR spectrum の測定にて、腫瘍のエネルギー代謝が解明できるだけでなく、各種の治療効果の判定が容易に、かつ鋭敏に行い得ることを実証

してきた^{2),3)}ので、NMR 装置にて RF hyperthermia を行えば、その治療効果判定をも同時に行い得る利点もあると考えた。そこで、実験的移植腫瘍に対し、NMR 装置内で発生する RF pulse を利用して hyperthermia を行い、同時に *in vivo* ³¹P-NMR spectrum を測定してその効果を判定したところ、良好な結果が得られたので、NMR の新しい応用法の試みとして報告する。

2 方 法

1 実験腫瘍モデル

L 25 medium (Flow Laboratories, Virginia) に継代維持されている methylnitrosourea 誘発の rat glioma (EA 285) 細胞を $10^{6\sim 7}$ 個、CD Fisher rat の腰部皮下に移植したモデル²⁾を計 20 尾用了。移植後約 4 週間で腫瘍径 1.5 cm 位になり、この時点から *in vivo* ³¹P-NMR spectrum 測定と、RF hyperthermia を開始した。

2 *In vivo* ³¹P-NMR spectrum 測定および同一 NMR 装置による RF hyperthermia

用いた NMR 装置は SCM-200 (JEOL, Japan) である。本装置は 9 cm の bore-size, 4.8 Tesla の超電導磁石を有し、直径 1.1 cm の surface coil にて生体の局所から *in vivo* の NMR spectrum を得るものである。本実験では、剃毛した移植腫瘍の部分が、この surface coil 上に位置するよう

受付 1985 年 11 月 25 日

最終稿受付 1986 年 1 月 14 日

別刷請求先 (〒602) 京都市上京区河原町通

広小路上ル梶井町 465

京都府立医科大学脳神経外科

成瀬 昭二

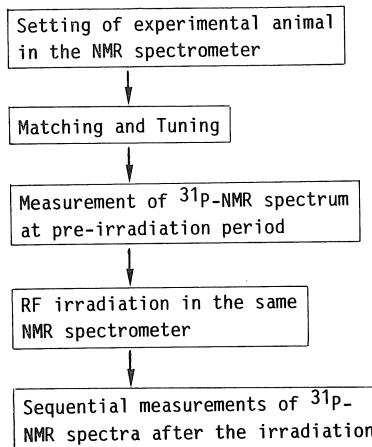


図 1 Flow chart of the procedure of RF hyperthermia and simultaneous monitoring of its effects using an NMR spectrometer.

にて rat を NMR プローブに固定し, ^{31}P の共鳴周波数である 80.75 MHz の RF pulseにて(pulse 幅 14 μs), 1.9 秒毎の繰り返し時間で 200 回または 400 回加算を行った。観測周波数は 7,500 Hz, data point は 2,048 で, 得られた free induction decay(FID) に 30 Hz の line broadening をかけた後に フーリエ変換を行い, ^{31}P -NMR spectrumを得た。

上記条件下で, まず control 時の腫瘍の *in vivo* ^{31}P -NMR spectrum を測定し, 次いで rat を動かすことなく, 同じ NMR 分光器中で, 同じ surface coil を用いて, 同じ ^{31}P の共鳴周波数の RF pulse にて腫瘍の RF hyperthermia を行った。この際用いた RF pulse は種々の power で連続波(continuous wave)として 60 分間照射した。RF pulse の power は NMR 分光器に備え付けの RF-pulse power meter にて測定した。

この RF hyperthermia に引続いて再び *in vivo* ^{31}P -NMR spectrum を連続的に測定して, hyperthermia による変化を観察した。

NMR 測定後, 一部は適時, 光頭による組織検索を行った。

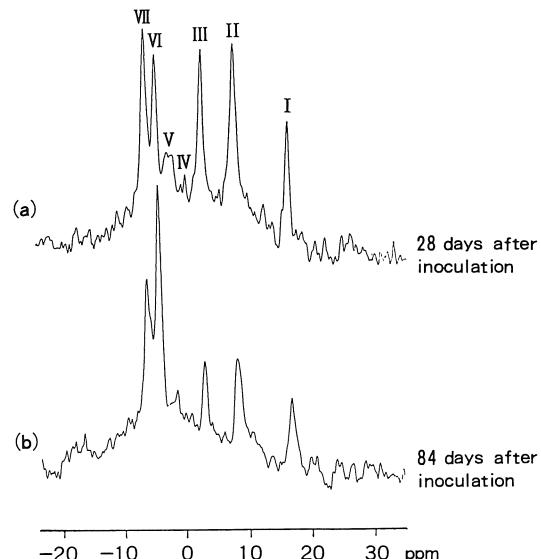


図 2 ^{31}P -NMR spectra of the rat glioma in two different stages of tumor growth. The assignments of ^{31}P -NMR signal peaks are: I, β -ATP; II, α -ATP and α -ADP with NAD^+ /NADH; III, γ -ATP and β -ADP; IV, phosphocreatine (PCr); V, phosphodiesters; VI, inorganic phosphate (Pi); VII, phosphomonoesters (PME). As the stage of tumor growth advanced from the active stage (a) to an advanced stage (b), ATP peaks decreased with a concomitant increase of Pi.

この一連の操作で, 同一の NMR 分光器内にて, 肿瘍に対する RF hyperthermia と, その治療効果判定を同時に行うことができた。

今回の実験の順序を簡明化し, フローチャートとして図 1 に示した。

また, 同一実験条件下の別の rat にて RF hyperthermia 中の腫瘍の組織内温度を 26 G の needle thermister (Bailey Intr., USA) で測定した。

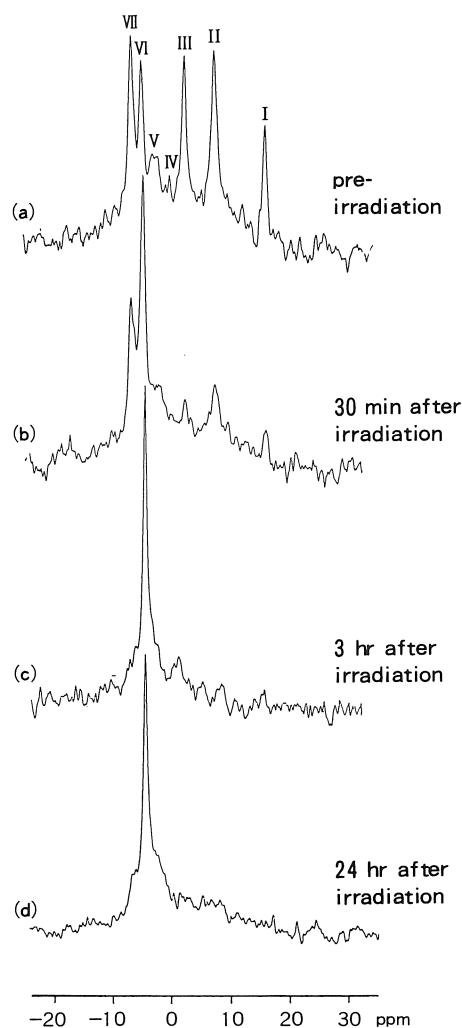


図 3 腫瘍に対する RF hyperthermia による ^{31}P -NMR スペクトルの経時変化

After the RF pulse was applied to the tumor continuously at a power of 5 watts for 60 minutes with a surface coil in the magnetic field of the NMR spectrometer, ATP peaks decreased and the Pi peak increased immediately, resulting finally in a Pi dominant pattern within 30 minutes.

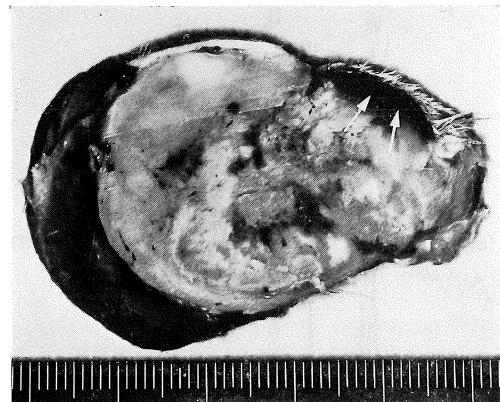


図 4 腫瘍組織のマクロスコピック所見。RF hyperthermia 行った後 7 日目。

Necrotic area was seen in the region from the surface to the 5 mm depth in the tumor (arrows), where the RF pulse was applied.

3 結 果

1 腫瘍の *in vivo* ^{31}P -NMR spectrum

Rat glioma の代表的な ^{31}P -NMR spectrum を図 2 に示した。既報のごとく²⁾、測定を開始した時期の腫瘍の spectrum には、ATP, phosphomonoesters (PME), 無機リン (Pi) の高いピークが認められ、phosphodiesters (PDE) は小さかった(図 2)。腫瘍に対する治療効果を ^{31}P -NMR spectrum 測定にて行う場合、自然経時変化との区別を行う必要がある²⁾。そのため、本腫瘍の ^{31}P -NMR spectrum の経時変化を調べた。rat glioma では図 2-b に示すごとく、移植 3 カ月後でも Pi のピークは高くなっているが、ATP ピークが依然として残っており、経時変化は緩慢であることが判明した。

2 RF hyperthermia による ^{31}P -NMR spectrum の変化

5 watts の RF pulse を 60 分間連続照射した時の典型的な ^{31}P -NMR spectrum 変化を図 3 に

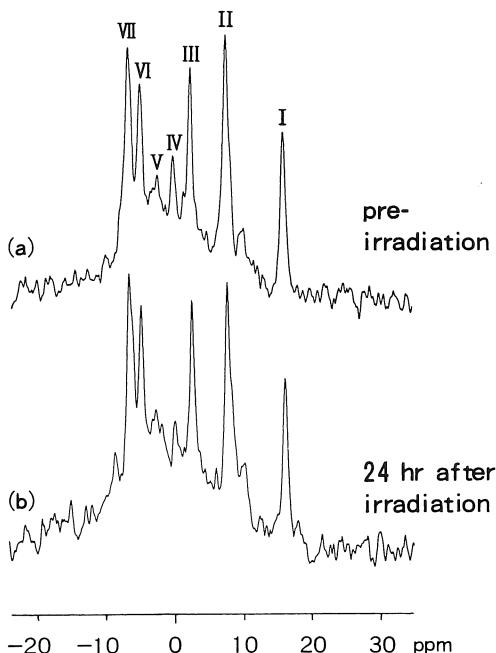


図 5 ^{31}P -NMR spectra in the rat glioma pre- and post RF hyperthermia at a power of 3 watts. There were no changes in the spectrum after 60 minutes irradiation.

示した。RF pulse 照射終了時すでに ATP, PME のピークは大幅に減少し, Pi のピークが著しく増大していた。1時間後には Pi のみのパターンになった。以後、この Pi のみのパターンは少なくとも 7 日間続いた。この rat では、7 日後に腫瘍を摘出し組織学的検索を行った。RF pulse の到達していると思われる 5~6 mm までの深さの部分は壊死に陥っていた(図 4)。5 watts 以上の 60 分間照射を行った他の rat 9 尾すべてに、同じ ^{31}P -NMR spectrum 変化が認められた。この中で、RF pulse 照射直後に ^{31}P -NMR spectrum が Pi のみになった例で、直ちに腫瘍を摘出し、組織学的検索を行ったが特別な変化の所見は認められなかった。

3 watts の RF pulse の 60 分間照射した群では、10 例全例に、照射後も ^{31}P -NMR spectrum

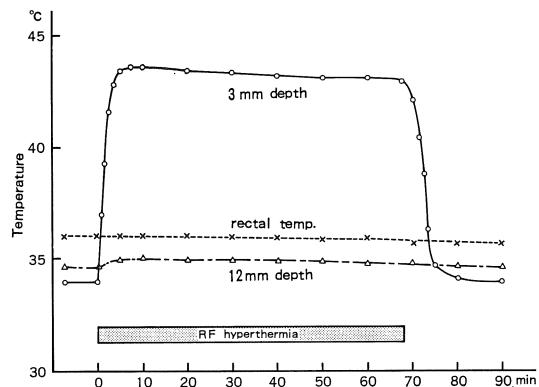


図 6 Changes in the intratumoral temperature during the RF hyperthermia.

Intratumoral temperature 3 mm depth under the skin rose to 43.5°C within a few minutes after the application of RF pulse and this level lasted during the RF hyperthermia. After discontinuing the application of RF pulse, it decreased to the pre-irradiation level within a few minutes.

の変化は認められなかった(図 5)。

3 RF hyperthermia 中の腫瘍内温度

5 watts の RF pulse 照射を同一の条件下で行った例の腫瘍内温度の経時変化を図 6 に示した。また同時に、直腸内温度をも測定した。RF pulse を照射すると、皮下 3 mm の部分の腫瘍内温度は直後から上昇し始め、4~5 分後に $43.5\sim43.8^{\circ}\text{C}$ の定常状態に達した。照射を中止すると直ちに温度は減じ、5~6 分後に元の温度に戻った。皮下 12 mm の深部では、ほとんど温度の上昇は認められなかった。また、直腸内温度も RF pulse 照射中、上昇は認められなかった。さらに、腫瘍内の温度分布を知るために、RF pulse 照射にて定常状態になった時点で、種々の深さの部分の腫瘍内温度を測定し、図 7 に示した。皮下より 5~6 mm の深さまで 43°C 以上になっており、それより深部では急激に温度は低下していった。

3 watts の RF pulse を 60 分間照射した例では、3 mm の深さの腫瘍内温度は 39°C 以上には

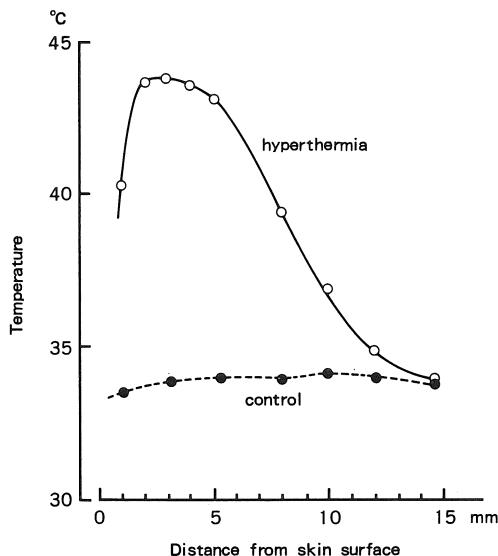


図 7 Distribution of intratumoral temperature during the RF hyperthermia.

Tumor temperature rose to above 43°C in the region of 2 mm to 6 mm depth from the surface.

ならなかつた。

4 考 察

RF hyperthermia は、深部臓器にまで治療可能な温熱療法としてもっとも期待がかけられており、臨床用機器もすでに開発されている⁴⁾。しかし、RF hyperthermia そのものの機序や、最適の RF pulse のかけ方、他の治療法との併用療法の有用性など、解明されねばならない基礎的研究課題が多く残されている。この理由の一つに、RF 加温中にその効果を判定する適当なモニター法がなかったことがあげられる。しかし、はじめに述べたように、最近、腫瘍部位の *in vivo* ³¹P-NMR spectrum を測定し、治療前後の変化を見ることによって容易に、かつ、実験動物を生かしたまま、その効果を判定し得ることがわかつってきた^{2), 3), 5), 6)}。³¹P-NMR は、腫瘍細胞のエネルギー代謝状

態を示しており、細胞そのものの生か死かが直接判明できるからである。この場合、化学療法²⁾ や放射線療法⁵⁾のみならず、microwave を用いた hyperthermia⁶⁾ に対する治療効果判定にも、その有用性が確認されてきた。今回のわれわれの行った実験は、このモニター法としての *in vivo* ³¹P-NMR の特徴を生かすだけでなく、NMR 装置の発する RF pulse を利用して、治療と同時に効果判定を行い得ることを示した点で意義深いと考えられる。臨床用の MRI 装置では、RF pulse の被験者に及ぼす加温作用をいかに小さくするかの検討がなされてきた⁷⁾。しかし、われわれは、この問題点を逆の発想で治療に結びつけ、NMR 装置を治療機器へ応用できるという可能性を示したわけである。ただし、今回の実験では、用いたコイルが ³¹P-NMR spectrum 測定用のものであり、直徑が 1.1 cm の平坦な形状をしている。RF 加温法としては inductive type⁸⁾ に属し、直徑も小さいため、RF pulse の到達範囲はせいぜい数 mm 位であり、腫瘍全体を加温するにはいたらなかつた。このことは、皮膚から 5~6 mm の深さしか 43.0°C 以上の温度にならなかつたという測定結果や、数日後の形態学的所見からも十分うかがい知れる。しかし、この問題点は若干のコイルの工夫により改善され得るものである。たとえば、コイルの形状を変えて腫瘍全体を被うよう形成して、その効果範囲を広げることができる。また、二つのコイルを用いて、¹H の共鳴周波数で RF 加温を行いつつ、照射中から、別のコイルで ³¹P-NMR spectrum を測定すれば、腫瘍の RF 加温中の変化を real time に知ることができる。一般に、hyperthermia が有効に行われているか否かを加温中に知るためには、腫瘍内温度をモニターする方法が採られており、正確に、non-invasive に測定を行う⁹⁾ 試みがなされている。しかし、加温中の ³¹P-NMR spectrum を測定すれば、このような温度測定を必要としなくなる可能性もある。

今回用いた腫瘍では、有効な結果を示した RF pulse の power は 5 watts 以上であり、3 watts 以下では効果はなかった。しかし、3~5 watts の間に関しては、個々の腫瘍によって反応に多様性が生じると推測され、今後の検討が必要である。これには、腫瘍の進行度別の RF 加温に対する反応¹⁰⁾、腫瘍の血管床と RF 加温との関係¹¹⁾などが複雑に影響しており、他の研究手段を併用して解決しなければならない問題点であると考えられる。なお、NMR 分光器では、広い範囲の周波数の RF pulse が使える（今回、われわれの用いた装置では 1~200 MHz）ので、どの周波数の RF pulse がもっとも効果的かの判定も可能である。また、RF hyperthermia の研究においては、腫瘍内の pH の変化を知ることが重要である^{12~14)}。この理由として、pH が低いと hyperthermia の効果が著しく増強される¹²⁾¹³⁾という事実や、hyperthermia を行えば、組織 pH が低下する^{15),16)}という事実があるからである。³¹P-NMR spectrum では、Pi の chemical shift 値から、組織内 pH を知ることができる²⁾。そのため、RF 加温中の問題点である腫瘍内 pH を知ることができる。今回われわれの行った実験系では、RF hyperthermia 前の腫瘍内 pH は 7.15 ± 0.07 (SD., n=20) であったが、RF hyperthermia 後 Pi のみの ³¹P-NMR spectrum を示した腫瘍では、pH は 6.96 ± 0.10 (S.D., n=10) と低下を示した。このように *in vivo* ³¹P-NMR spectrum 測定によって non-invasive に腫瘍組織内 pH の変化をも知ることができた。

今回の研究では、詳細な分析や実験を充分行えたとはいひ難いが、少なくとも NMR 装置を用いて有効な RF hyperthermia が行え、かつ同時に、その効果判定を *in vivo* ³¹P-NMR spectrum を測定することによって鋭敏に行い得ることを証明し得た。最近では、臨床用 MRI でも、高磁場で稼動する装置が実用化され、多核種の NMR データを得ることが可能となっている。そのため、本

法はこれらの装置にも応用することが可能であり、臨床用として実用化されることが期待できる。

本研究は文部省科学研究費 (No. 59570623, No. 60570677) の助成を受けた。

文 献

- 1) J.H. Kim, E.W. Hahn: Clinical and biological studies of localized hyperthermia, *Cancer Res.*, 39: 2258-2261, 1976.
- 2) S. Naruse, K. Hirakawa, Y. Horikawa, et al.: Measurements 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) S. Naruse, Y. Horikawa, C. Tanaka, et al.: Observations of energy metabolism in neuroectodermal tumors using *in vivo* ³¹P-NMR, *Magnetic Resonance Imaging*, 3: 117-123, 1985.
- 4) 阿部光幸, 平岡真寛: 癌の RF 波加温療法. 癌・温熱療法(柄川 順・編), 篠原出版, 東京, 1982, p. 259-269.
- 5) T.C. Ng, W. Evanochko, R.W. Hiramaoto, et al.: ³¹P-NMR spectroscopy of *in vivo* tumors, *J. Magn. Reson.*, 49: 271-286, 1982.
- 6) M.B. Lilly, T.C. Ng, W.T. Evanochko, et al.: Loss of high energy phosphate following hyperthermia demonstrated by *in vivo* ³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Cancer Res.*, 44: 633-638, 1984.
- 7) T. Budinger: Workshop on RF heating thermophysiology. Newsletter of Society of Magnetic Resonance in Medicine, No. 5, March 1985, p. 2-3.
- 8) W.S. Yamanashi, A.W. Boddie, Jr., J.W. Frazer, et al.: Further observations on tissue heating patterns using an invasive ground probe with radiofrequency hyperthermia system, *Med. Instr.*, 18: 220-223, 1984.
- 9) 平福三吉: 非侵襲的温度測定法. 癌・温熱療法(柄川 順・編), 篠原出版, 東京, 1982, p. 127-

NMR 装置による腫瘍に対する RF hyperthermia とその治療効果の同時判定

138.

- 10) R.L. Margin, R.K. Johnson: Effects of local tumor hyperthermia on the growth of solid mouse tumors, *Cancer Res.*, 39: 4534-4539, 1979.
 - 11) H.A. Eddy: Alterations in tumor microvasculature during hyperthermia, *Radiology*, 137: 515-521, 1980.
 - 12) L. Gerweck, E. Rottinger: Enhancement of mammalian cell sensitivity to hyperthermia by pH alteration, *Radiatr. Res.*, 97: 508-511, 1976.
 - 13) J. Overgaard: Influence of extracellular pH on exposed to hyperthermia, *J. Natl. Cancer Inst.*, 56: 1243-1250, 1976.
 - 14) H.I. Bicker F.W. Hetzel, T.S. Sandhu, et al.: Effects of hyperthermia on normal and tumor microenvironment, *Radiology*, 137: 523-530, 1980.
 - 15) C.W. Song, M.S. Kang, J.G. Rhee, et al.: The effects of hyperthermia on vascular function, pH and cell survival, *Radiology*, 137: 795-803, 1980.