

저온온열치료에 의한 종양 내 저산소상태 개선효과를 ¹⁸F-Fluoromisonidazole의 섭취 변화를 이용한 평가

울산대학교 의과대학 서울아산병원 방사선종양학과*, 핵의학과[†], 원자력병원 핵의학과, 방사선의학연구소센터[‡]
건국대학교병원 응급의학과[§]

이상욱* · 류진숙[†] · 오승준[‡] · 임기천[†] · 천기정[‡] · 이소령* · 송도영*
임수정[‡] · 문은숙* · 김중훈* · 안승도* · 신성수* · 이경룡[§] · 문대혁[†] · 최은경*

목적: 종양 내에서 산소공급 부족현상으로 발생하는 저산소증 조직에서 저온온열치료(42°C)와 nicotinamide에 의한 perfusion limited 저산소증의 개선 효과를 마우스 종양 모델을 이용하여 종양 내 [¹⁸F]FMISO 섭취변화를 이용하여 증명할 수 있는지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법: C3H 마우스에 [¹⁸F]FMISO를 정주하고 11개 장기에서 %ID/g을 구하여 biodistribution을 관찰하였다. 또한 같은 마우스에 동종 종양세포인 SCC7을 이식하여 종양모델을 만들고 저온온열치료(42°C)와 nicotinamide를 투여한 마우스와 대조군 마우스에서 [¹⁸F]FMISO의 섭취정도 차이를 %ID/g, autoradiography, PET scan을 시행하여 비교하고자 하였다.

결과: 대조군에서 종양의 FMISO의 섭취는 5.1+/-2.28 %ID/g였고, 종양/근육, 종양/혈액의 섭취비는 2.2와 1.8이었다. 실험군에서는 각각 2.4+/-0.64 %ID/g, 1.4와 1.2를 나타내어 대조군보다 유의하게 낮았다(p < 0.021). Autoradiography에서 대조군의 종양 내부에 FMISO가 섭취됨을 확인하였고, 저온온열치료와 nicotinamide를 투여한 실험군에서는 섭취가 감소된 것을 관찰하였다.

결론: C3H 마우스와 동종 종양세포인 SCC-VII을 이용한 종양모델에서 [¹⁸F]FMISO가 종양내에 섭취가 되어 저산소증 종양모델로 적절함을 확인하였고, 저온온열치료(42°C)와 nicotinamide에 의한 perfusion limited 저산소증 개선효과를 [¹⁸F]FMISO의 종양 내 섭취가 감소하는 것을 통하여 확인할 수 있었다.

핵심용어: 저온온열치료, Nicotinamide, ¹⁸F-Fluoromisonidazole, Autoradiography, 양전자 방출단층촬영

서 론

종양 내 존재하는 저산소증 암세포는 종양치료의 주요한 실패원인 중의 하나이다.^{1~6} 고형종양에서 저산소증이 발생하는 이유는 종양이 자라는 속도만큼 신생 혈관생성이 이루어지지 못해 종양 내 혈액공급이 불충분하여 발생하고 혈관에서 멀어질수록 저산소증은 악화된다.^{7,8} 저산소증 암세포가 방사선에 내성을 보인다는 사실은 이미 50여년 전 밝혀졌고 이후 여러 연구결과에서 증명되었다.^{4,9~11} 암세포는 저산소증 상태에서 신생혈관 생성물질을 발현, p53의 돌연변이, 세포증식 조절의 변화, 포도당 대사의 변

화 등이 일어난다.¹² 이런 일련의 변화는 불량한 조건에서 암세포가 생존하기 위해서 적응하기 위한 과정으로 이해된다.^{13,14} 저산소증 상태에 있는 종양은 악성도가 심해지고 예후 역시 불량한 것으로 알려져 있다.^{12~17} 저산소증 암세포는 항암제에 대해서도 내성을 나타내는 것으로 알려져 있으며¹⁸ 혈관공급의 부족으로 약물이 효과적으로 전달되지 못하는 문제점을 가지고 있다.⁶ 두경부 종양에서는 방사선학적 방법으로 분석하여 의미있는 저산소증이 약 40%에서 나타나는 것으로 알려져 있다.^{19~21}

종양 내 저산소증을 확인하기 위한 방법으로 산소에 반응하는 전극(electrode)을 이용하여 산소분압을 측정하는 연구에 따르면 조직 내 산소분압이 낮은 종양이 높은 종양에 비해서 예후가 불량한 것으로 나타나 있다.^{22~30} 그러나 산소분압을 측정하는 방법은 몇 가지 문제점을 가지고 있다. 측정되는 종양의 부위에 생존세포가 있지 않는 괴사 조직일 문제점이 있고 같은 종양 내에서도 측정부위에 따라 산소분압이 차이가 심하여 일관성 있는 결과를 얻기 어렵다.^{31,32} 고형종양 내에는 급성 저산소증(acute hypoxia)과 만성 저산소증(chronic

이 논문은 2004년 8월 24일 접수하여 2004년 10월 29일 채택되었음. 본 논문은 대한방사선종양학회 2004년 추계학술대회에서 구연 발표되었음. 본 연구는 보건복지부 암정복추진연구개발사업 지원에 의해 이루어진 것임.

책임저자: 이상욱, 서울아산병원 방사선종양학과
Tel: 02)3010-4435, Fax: 02)486-7258
E-mail: ccrt@korea.com, lsw@amc.seoul.kr

hypoxia)이 있는 것으로 알려져 있고,^{33,34)} 이런 원인 때문에 종양 내 저산소증의 분포는 매우 다양하고 복잡한 것으로 알려져 있다.^{33,35,36)} 따라서 산소분압을 측정하는 방법은 매우 직접적인 방법이어서 실제 pO₂ 농도를 알 수 있는 장점은 있지만 측정하는 위치에 따른 측정값의 오차가 크다는 한계를 가진다고 할 수 있다. 이런 이론적인 면 이외에 임상에서 적용하기에도 문제점이 있는데 침습적 방법이기 때문에 환자의 고통이 수반되고 합병증 발생 위험성이 있는 것이다.

종양 내 저산소증을 확인하기 위한 비침습적 방법 중에서 2-nitroimidazoles은 가장 보편적으로 많이 연구되어온 물질이고,³⁷⁾ 저산소증 세포에 결합하고 결합된 조직에 대한 영상을 얻을 수 있다는 것이 증명되었다.^{38,39)} 저산소증 증감제로 개발된 nitroimidazole 계통의 화합물인 misonidazole과 fluoromisonidazole은 저산소 상태의 조직에서 비가역적으로 축적되는 것으로 알려져 있다.^{40~44)} Fluorine-18 fluoromisonidazole (¹⁸F]FMISO)이 조산소증 조직에 결합한다는 사실은 *in vitro*, *in vivo* 실험에서 증명되어 있다.^{45~54)} [¹⁸F]FMISO-PET 검사를 통해서 뇌경색이나 뇌출혈로 인한 뇌조직에서 저산소증을 증명하였고,^{55~57)} 사람종양에서도 확인하였다.^{20,58~62)}

방사선에 내성을 나타내는 저산소증을 개선하기 위한 방법으로 저온온열치료를 이용하여 종양 내 혈관공급 상태를 향상시켜 종양조직 내 산소공급을 증가시켜 종양 내 저산소 상태를 개선하는 방법이 있다.^{63~67)} Nicotinamide는 비타민 B3의 amide 형태로 방사선 민감제로 개발된 물질인데,^{68~70)} nicotinamide 역시 혈액순환을 개선시켜 저산소증 개선에 도움이 된다고 알려져 있다.^{68,71,72)} 저온온열치료와 nicotinamide를 같이 사용하면 단독으로 사용하는 것에 비해서 저산소증 개선 효과가 더 큰 것으로 알려져 있다.⁶⁶⁾ 본 연구는 마우스에 종양을 이식하여 인위적으로 종양 내 저산소증 상태를 만들고 저온온열 치료와 nicotinamide를 이용하여 저산소증 상태를 개선하고 이런 개선을 [¹⁸F]FMISO-PET을 이용하여 평가할 수 있는지 알아보고자 하였다. 이런 연구를 진행하기 위하여 일차적으로 본 저자들은 본원에서 자체 생산한 [¹⁸F]FMISO의 생체 내에서 정상장기의 섭취와 분포를 알아보고 종양 내 섭취가 온열치료에 의해 변화하는 섭취 양상을 알아보고자 하였다. 이 실험 결과를 토대로 [¹⁸F]FMISO-PET이 종양 내 저산소증 상태의 변화를 반영하는지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물 및 마우스 종양

실험에 사용된 동물은 주령 7주인 CH3/HeJ 암컷 마우스

를 사용하였다. 마우스는 무균 상태로 공급받아 사육하였고, 사육조건으로 온도 22°C, 습도 55%를 일정하게 유지하면서 상자당 3마리씩 사육하였다. 실험에 사용된 암세포는 동종 마우스 종양인 SCC-VII (편평상피종양)을 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)에서 구입하여 지침에 따라 배양하였다. 지수성장기에 있는 5×10⁵개 세포를 마우스 상지 또는 하지 피하조직에 주사하여 이식하였다. 매일 종양의 크기를 관찰하여 11일째 종양의 장경이 1 cm 이상인 마우스만 선택하여 실험에 이용하였다. 마우스를 비교군과 대조군으로 나누는 기준은 종양의 크기를 고려하여 분류하였다.

2. Fluorine-18 fluoromisonidazole (¹⁸F]FMISO)의 합성

FMISO의 [¹⁸F]F 표지를 위한 전구체 합성은 nitroimidazole을 기본 구조로 하여 시작하였다. FMISO의 화학 구조에서 F가 있는 위치에 [¹⁸F]F를 표지하였다. [¹⁸F]F의 도입은 친핵성 치환반응(nucleophilic substitution)을 이용하였고 그 이유는 FMISO의 구조 내에 이미 불소(F; fluoride)를 함유하고 있기 때문에 화학적 구조의 변경 없이 FMISO에 [¹⁸F]F를 표지하여 [¹⁸F]FMISO로 만들었다. 이런 합성 과정은 자체 개발한 자동화 장치를 이용한 [¹⁸F]FMISO의 자동화된 방식으로 합성하였다. 자동화를 위해서 현재 본원에서 보유하고 [¹⁸F]FDG (¹⁸F]fluorodeoxyglucose) 자동합성장치의 mechanism을 기반으로 하여 [¹⁸F]FMISO의 합성에 적합하도록 구동 프로그램의 작성 및 실험과 더불어 최적의 조건에서 높은 재현성을 가질 수 있는 프로그램 및 시스템을 제작하여 사용하였다.

3. 온열치료 및 nicotinamide 투여

온열치료 시 마우스는 마취하지 않은 상태에서 42°C, 1시간 동안 시행하였다. 온열치료를 위해서 자체 고안하여 제작한 기구를 이용하여 수조에서 시행하였다. 온열치료 종료 후 마우스의 털에 묻은 수분을 습지를 이용하여 제거하고 드라이기를 이용하여 가능한 단시간에 말렸다. 마우스의 털이 다 마르면 생리적 식염수에 녹인 nicotinamide (Sigma Chemical, St. Louis, USA, 50 mg/kg)를 복강 내로 투여하였다. Nicotinamide를 투여하는 마우스에서 [¹⁸F]FMISO의 투여는 30분에서 2시간 내에 시행되었다.

4. Biodistribution

마우스 꼬리 정맥으로 [¹⁸F]FMISO (100μCi)를 투여하고 3시간 지난 후 경추탈구사 시켰다. 심장에서 혈액을 채취하

고 대뇌, 근육, 소장, 신장, 심장, 폐, 대퇴골, 간, 비장, 종양을 적출하여 무게를 측정하고 gamma counter에서 방사능을 측정하고 조직의 무게 당 방사능을 계산하였다 (%ID/g).

5. 자가방사선촬영법(Autoradiography)

마우스 꼬리 정맥으로 [¹⁸F]FMISO (1 mCi)를 투여하고 3시간 지난 후 경추탈구사 시키고 종양과 간을 적출하여 isopentane으로 냉동(-50°C)시킨 후 10µm 두께로 절단하여 유리 슬라이드에 올린 다음 필름으로 덮은 후 Molecular Imager FX (Bio-rad, Elk Grove Village, Illinois, USA)에서 12시간 동안 image plate에 감광한 후 얻은 영상을 분석하였다. 방사능량의 표준을 정하기 위하여 ³H와 ¹⁸F stripe standard를 함께 exposure 하였다.

6. 마이크로 PET 촬영

마우스 꼬리 정맥으로 [¹⁸F]FMISO (200µCi)를 투여하고 3시간 지난 후 PET 촬영을 시행하였다. PET 촬영 전 처치로 100 mg/kg ketamine과 10 mg/kg xyline을 혼합하여 복강내로 투여하였다. 마우스가 완전히 마취되면 PET 촬영을 시행하였다. 20분 동안 방출되는 방사선을 검출하여 영상을 감쇄보정(attenuation correction) 하지 않고 OSEM 방법으로 재구성하였다. Background activity와 양쪽 tumor의 activity를 측정하여 비교하였다.

7. 통계처리

양 군 간의 [¹⁸F]FMISO 섭취의 차이는 Mann-Whitney U 검사법과 t-test를 이용하여 통계적 처리를 시행하였다.

결 과

본원에서 자체 생산된 [¹⁸F]FMISO가 마우스(n=19)에서 흡수되어 분포하는지 알아보기 위하여 11개 장기에서 bio-distribution study를 시행하였다. [¹⁸F]FMISO가 가장 많이 섭취되어 분포하는 장기는 간이었고, 다음으로 신장과 소장에서 높게 분포하였다(Fig. 1). [¹⁸F]FMISO는 간과 신장으로 주로 배출되는 것으로 생각되었다. 종양을 이식한 15마리 마우스(대조군: 8마리, 실험군: 7마리)에서 마우스와 온열치료를 시행하지 않는 마우스에서 종양에 섭취된 [¹⁸F]FMISO를 알아보기 위하여 % ID/g을 구하여 비교한 결과 온열치료를 시행한 마우스에서 [¹⁸F]FMISO의 분포는 간, 신장, 소장에서 역시 높게 관찰되었고 대조군에서 종양의 FMISO의 섭취는 5.1+/-2.28 %ID/g였고, 종양/근육, 종양/혈액의 섭취비는 2.2와 1.8이었다. 실험군에서는 각각 2.4+/-0.64 %ID/g, 1.4와 1.2를 나타내어 대조군보다 유의하게 낮았다(Fig. 2, p<0.021). 한 마리 마우스에서 autoradiography를 시행하였는데 Fig. 3에서 보이는 바와 같이 각 종양의 크기는 차이가 없으나 [¹⁸F]FMISO가 섭취된 영역은 온열치료를 시행한 마우스에서 현저히 감소함을 관찰할 수 있었다. 또한 [¹⁸F]FMISO의 높은 섭취는 종양 내에서만 관찰되었다. 총 3마리의 마우스를 양쪽 상지에 종양을 이식하고 마우스의 우측 종양에는 온열치료를 시행하고 온열치료 전후로 이틀간 마이크로 PET을 시행한 결과 종양의 크기는 오히려 다음날 증가하였지만 [¹⁸F]FMISO 섭취는 오히려 감소하였다(Fig. 4). [¹⁸F]FMISO의 섭취를 프로그램을 이용하여 정량

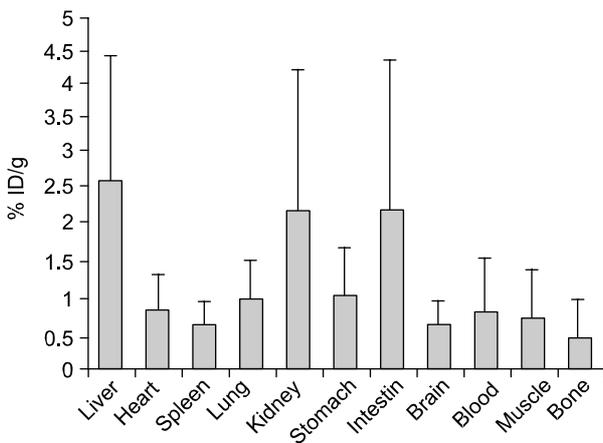


Fig. 1. [¹⁸F]FMISO (% ID/g) biodistribution in C3H mice measured with gamma counter at three hours of uptakes after injection. Data are the mean and standard deviation of thirty C3H mice (n=19).

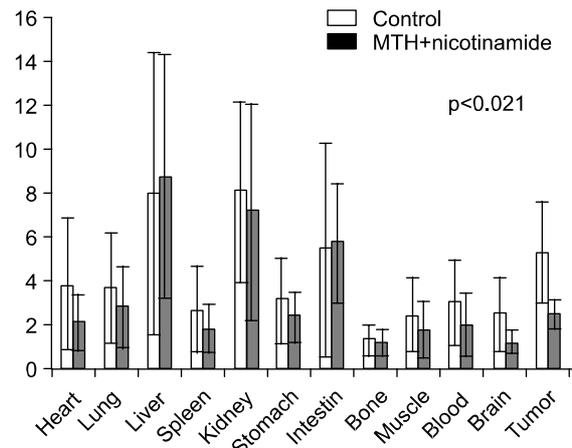


Fig. 2. [¹⁸F]FMISO uptake (% ID/g) of tumor compare with control and hyperthermia. Data are the mean and standard deviation of thirty C3H mice (n=10).

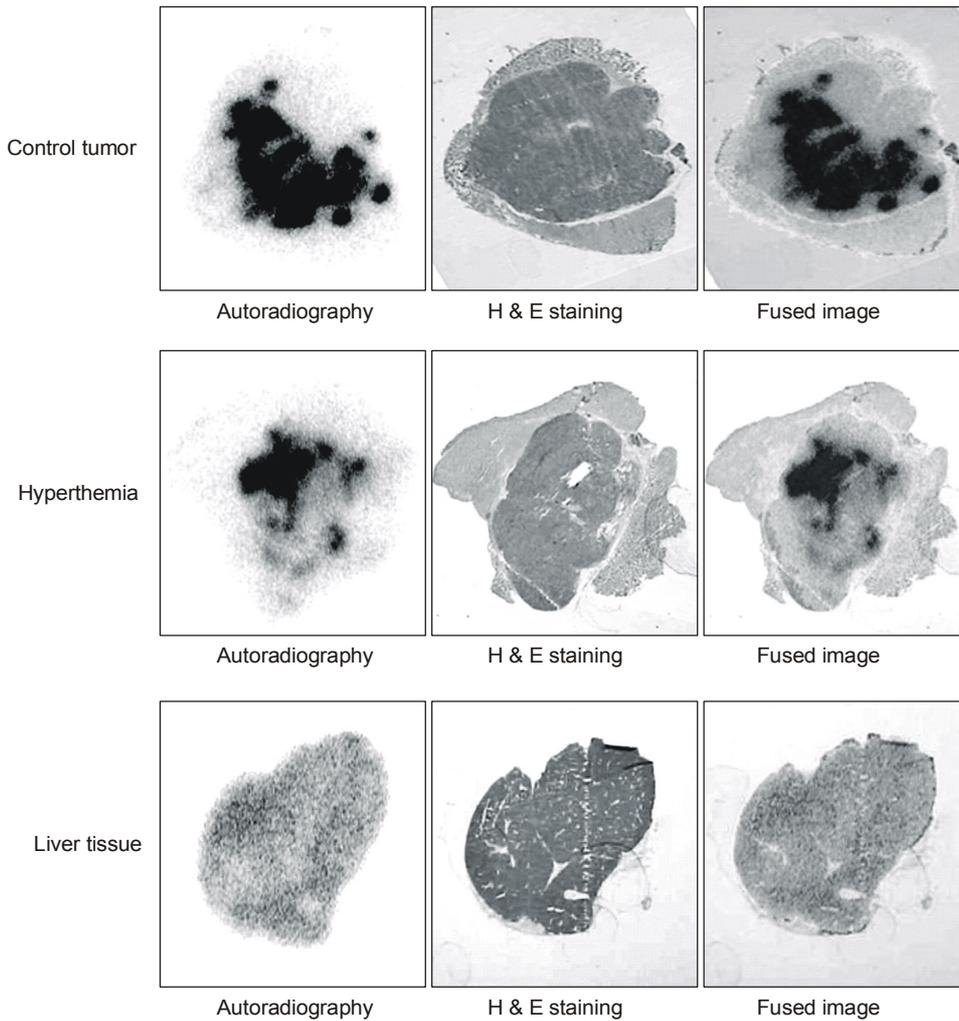


Fig. 3. Coronal section of the tumor and liver of mice sacrificed 3 hours post-injection of $100\mu\text{Ci}$ of ^{18}F FMISO at 12 days after the SCC7 cells implantation. Left image: histological section, center image: corresponding FUJI BAS image, right image: fused images.

화하여 보았을 때 저온온열치료를 시행한 종양에서 통계적으로 의미 있는 차이가 관찰되었다(Fig. 5, $p=0.0031$).

고찰

종양이 일정 크기 이상으로 자라나면 필연적으로 저산소증 암세포가 생길 수밖에 없다.^{7,8,73,74} 한편 이런 저산소증은 암세포의 악성도를 증가시키고 전이를 유발하게 되고 암치료에 대한 반응을 나쁘게 하는 것으로 알려져 있다.^{1~4,13,14,16,75} 종양 내에는 만성 저산소증과 급성 저산소증이 혼재해 있기 때문에 저산소증 양상이 다양하여,³⁵ 적출해 내지 않은 종양에서 저산소증 암세포의 위치나 정도를 파악하는 방법은 현재로는 만족스럽지 않다. 따라서 종양 내 저산소증 상태를 개선시킬 수 있는 방법이 개발되었다고 해도 저산소증을 위치적으로 정량화해서 개선효과를 확인하기는 불가능하다. 본 연구는 종양 내 저산소증 상태

를 위치적으로 정량화할 수 있는 방법으로 ^{18}F FMISO-PET의 가능성을 알아보려고 하였다. ^{18}F FMISO-PET은 종양 내 저산소증 분포를 파악할 수 있는 것으로 알려져 있다. 저온온열치료와 nicotinamide는 perfusion limited 저산소증을 개선시킬 수 있는 효과적 방법으로 이미 증명되어⁶⁶ 있기 때문에 이 방법을 이용하였다. 이식된 종양의 크기를 측정하여 마우스를 2개의 군으로 분류할 때 양 군 마우스의 종양의 크기를 같게 하였지만 각 마우스 간에 종양 내 저산소증 상태의 차이가 많아 %ID/g에서는 통계학적으로 의미가 있지는 않았고 다만 경향성은 관찰되었다고 생각한다. 또한 종양 내 저산소증인 부위가 고정되어 있는 것이 아니고 시간에 따라, 종양의 조건에 따라 변하므로 완전한 파악은 불가능할 것으로 생각한다.

종양 내 저산소증을 파악하는 방법으로 gold standard로 쓰이고 있는 방법은 종양에 전극을 꽂아 직접 산소분압을 측정하는 방법이다.^{76~79} 하지만 이 방법은 재현성이 매우

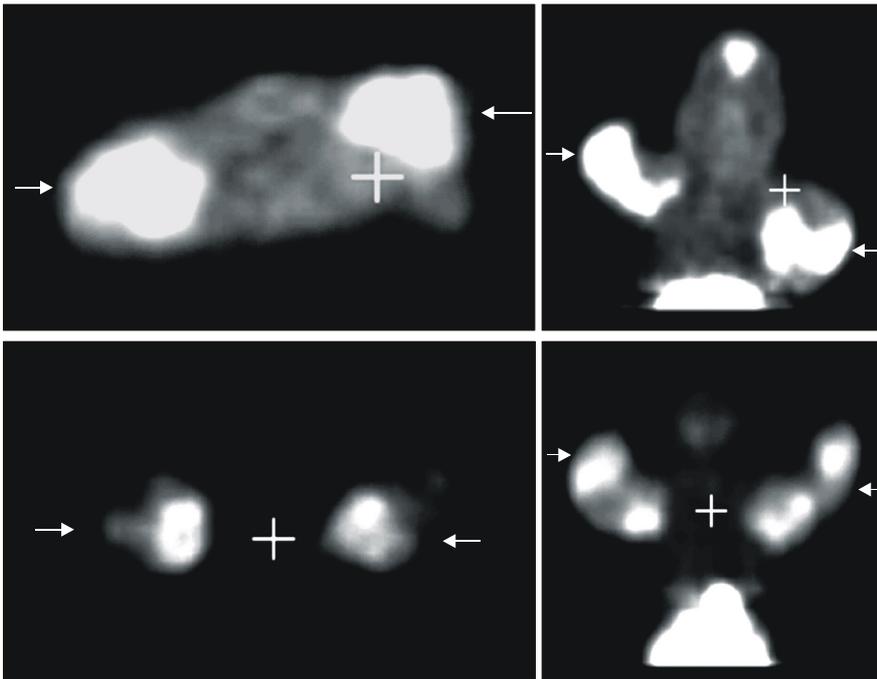


Fig. 4. This figures showed the $[^{18}\text{F}]$ FMISO-PET findings. Upper panel: Pre-hyperthermia, lower panel: Post-hyperthermia.

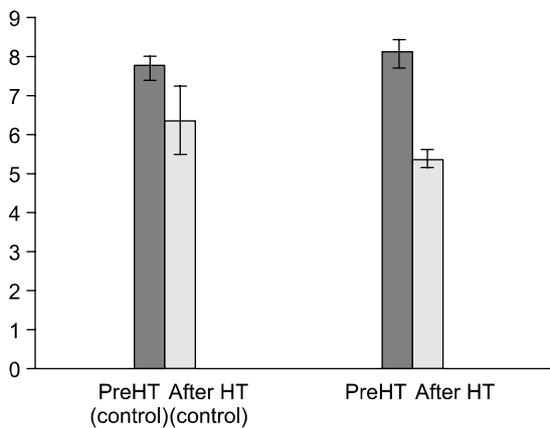


Fig. 5. Quantitative analysis of the $[^{18}\text{F}]$ FMISO uptake using PET scans.

낮은데,⁷⁹⁾ 그 이유는 종양 내에서 저산소증인 부분을 알지 못하고 무작위로 측정하기 때문이다. 그렇기 때문에 다행히 저산소증이 존재하는 부분에 전극이 위치하면 산소분압이 낮게 측정되고 혈관이나 혈관 주변에 전극이 위치하면 산소분압이 높게 측정되는 단점을 가지고 있다. 또한 이 방법은 일정한 점에 대한 산소분압만 파악할 수밖에 없는 단점을 가지고 있다. 즉 이 검사방법은 저산소증의 형태학적 위치적 분석이 불가능하다는 단점을 가지고 있다. 만약 실제 환자의 종양에서 산소분압을 측정하려는 경우 전극을 꽂기 힘든 위치에 종양이 존재하거나 심부에 종양

이 있는 경우에는 검사하는 것이 불가능하여 모든 환자를 대상으로 적용하는 것은 어렵다고 생각한다. 저산소증의 분포나 위치를 파악할 수 있는 방법으로 종양을 적출해서 autoradiography를 하거나 면역화학염색을 시행하는 경우와^{58,80)} 종양을 적출하지 않는 방법으로는 hypoxic tracer를 이용하여 PET이나 SPECT 검사법이 있다.^{60,81~84)} 특히 hypoxic PET tracer를 이용하여 PET 촬영을 시행하면 3차원적으로 저산소증의 상태를 파악할 수 있어 위에서 언급한 문제점들이 대부분 해결될 수 있을 것으로 생각한다. 그런데 이런 방법은 간접적으로 저산소증을 파악하는 방법이므로 산소분압을 알 수 없어 저산소증의 정도를 파악하는데 한계가 있다 하겠다. 그럼에도 불구하고 $[^{18}\text{F}]$ FMISO를 이용한 PET 검사는 Washington 대학에서 최초 개발되어 현재 가장 보편적으로 임상에서 사용 가능한 방법이다.^{20,58,85,86)} 앞으로 PET 촬영한 영상을 이용하면 종양 내 저산소증 상태를 형태적으로, 위치적으로 파악할 수 있게 되고 소프트웨어를 이용하여 정량적 분석도 가능하여 임상에 적용하면 많은 도움이 될 수 있을 것이다. 한편 $[^{18}\text{F}]$ FMISO의 반감기는 약 110분이기 때문에 $[^{18}\text{F}]$ FMISO를 투여하고 3시간 후 방사능을 측정하는 것은 최초 $[^{18}\text{F}]$ FMISO의 방사능이 반 이하로 감소한 상태를 측정하는 것이다. $[^{18}\text{F}]$ FMISO는 모든 조직에 흡수되지만 정상적으로 산소가 공급되는 조직에는 약 1시간에 대부분 배출되는데, 이때 저산소증 조직에서는 $[^{18}\text{F}]$ FMISO가 고정되어 배출되

지 않는다. 이런 배출정도의 차이를 이용하여 종양 내 저산소증 상태를 파악하는 방법이기 때문에 이론적으로는 [¹⁸F]FMISO 투여 후 시간이 지날수록 저산소증 조직과 정상산소 농도를 유지하는 조직 간의 차이는 더 커질 것이다. 그러나 시간이 지날수록 [¹⁸F]FMISO의 방사능도 약해지기 때문에 검사하는 시점이 매우 중요할 것으로 생각한다.

Nicotinamide는 종양 내 혈류를 개선하여 종양조직의 산소공급을 증진시키는 것이 가능하여 급성저산소증을 감소시키는 데 효과적인 물질로 알려져 있다.^{70,87,88} 이 약물은 비교적 안전하여 심각한 합병증으로는 오심과 구토 외에는 없는 것으로 알려져 있다.^{69,89,90} Horsman 등⁹¹에 따르면 마우스에서 혈장 내 nicotinamide 농도는 복강 내 투여 후 2시간에 최고값이 되므로 nicotinamide 투여 후 1~2시간에 실험을 계획하는 것이 적절한 것으로 알려져 있다. 일반적으로 온열치료와 병합하는 경우 온열치료 전에 투여하는 것이 일반적이다.⁶⁸ 그러나 본 연구에서는 온열치료 직후 nicotinamide를 투여하였는데 그 이유는 온열치료의 반감기보다 nicotinamide 반감기가 더 실험에 영향을 줄 수 있다는 가정하에 nicotinamide 투여 후 1시간 전후에 [¹⁸F]FMISO를 투여하였다. 본 실험에서 사용한 50 mg/kg의 nicotinamide의 용량은 일반적으로 사용하는 용량에 비해 적다.⁹² Ogawa 등⁶⁸에 의하면 50 mg/kg nicotinamide나 용량을 250 mg/kg로 증가시켜도 세포독성이 증가하지는 않는 것으로 되어 있다. Nicotinamide 200 mg/kg 용량은 온열치료나 방사선치료의 효과를 증감시키지 않는 용량으로 알려져 있다.⁹³ 사람이 구강으로 nicotinamide를 섭취 할 때의 적절한 용량은 80~85 mg/kg 이하로 정하는 것이 오심과 구토를 줄일 수 있다고 알려져 있다.^{94,95} 그런데 Ogawa 등⁶⁸의 연구 결과에 의하면 저산소증을 개선하는 데 있어서 50 mg/kg nicotinamide도 저온온열치료와 병용하는 경우 효과적인 것으로 나타나 있어 비교적 부작용이 거의 없는 50 mg/kg 용량으로 실험을 고안하였다.

본 실험에서 종양 내 저산소증을 개선하기 위해서 이용한 저온온열치료나 nicotinamide는 작용기전이 종양 내 혈류를 개선하여 급성저산소증을³³ 감소시키는 것이고,^{87,88} 만성저산소증을³⁴ 감소시키는 방법은 이용하지 않았다. 이런 이유가 %ID/g 실험에서 통계적으로 의미 있는 차이를 증명하지 못한 원인이 있을 것으로 생각한다. 자가방사선 촬영(autoradiography)이나 PET 촬영에서 대부분 육안으로 관찰되는 저산소증은 산소의 확산이 되지 않아 혈관 일정 거리에서 발생하는 만성저산소증보다는 급성저산소증일 가능성이 높고 이런 가정이 옳다면 %ID/g에서는 통계적

차이가 없고 autoradiography나 PET 촬영에서는 의미 있는 차이가 있었던 것으로 해석할 수 있을 것이다.

결 론

C3H 마우스와 동종 종양세포인 SCC-VII을 이용한 종양 모델에서 [¹⁸F]FMISO가 종양 내에 섭취가 잘되어 저산소증 종양모델로 적절하여 실험에 활용하는 것이 가능하다고 생각되었다. 저온온열치료(42°C)와 nicotinamide에 의한 perfusion limited 저산소증 개선효과를 autoradiography나 PET 촬영을 통해서 [¹⁸F]FMISO의 종양 내 섭취가 감소함을 확인할 수 있어 [¹⁸F]FMISO-PET 촬영은 종양 내 저산소증을 파악하는 데 효과적일 것이다.

참 고 문 헌

1. Moulder JE, Rockwell S. Hypoxic fractions of solid tumors: experimental techniques, methods of analysis, and a survey of existing data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984;10:695-712
2. Grau C, Horsman MR, Overgaard J. Improving the radiation response in a C3H mouse mammary carcinoma by normo-baric oxygen or carbogen breathing. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;22:415-419
3. Grau C, Horsman MR, Overgaard J. Influence of carboxy-hemoglobin level on tumor growth, blood flow, and radiation response in an experimental model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;22:421-424
4. Overgaard J, Horsman MR. Modification of hypoxia-induced radioresistance in tumors by the use of oxygen and sensitizers. *Sem Radiat Oncol* 1996;6:10-21
5. Brown MJ. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy. Eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 1999;59:5863-5870
6. Chaplin DJ, Horsman MR, Trotter MJ, Siemann DW. Therapeutic significance of microenvironmental factors. In: Molls M, Vaupel P, eds. *Medical radiobiology: blood perfusion and microenvironment of human tumours*. Heidelberg Berlin New York: Springer. 1998:133-143
7. Hockel M, Schlenger K, Knoop C, Vaupel P. Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: evaluation by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res* 1991;51:6098-6102
8. Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Hockel M. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res* 1991;51:3316-3322
9. Gray LH, Conger AD, Ebert M, et al. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 1953;26:638-648
10. Fairbairn DW, Olive PC, O' Neill KL. The comet assay:

- A comprehensive review. *Mutat Res* 1995;339:37-59
11. Olive PL, Horsman MR, Grau C, et al. Detection of hypoxic cells in a C3H mouse mammary carcinoma using the comet assay. *Br J Cancer* 1997;76:694-699
 12. Sutherland RM. Tumor hypoxia and gene expression: implications for malignant progression and therapy. *Acta Oncol* 1998;37:567-574
 13. Sutherland RM, Ausserer WA, Murphy BJ, Laderoute KR. Tumour hypoxia and heterogeneity: challenges and opportunities for the future. *Semin Radit Oncol* 1996;6:59-70
 14. Giaccia AJ. Hypoxic stress proteins: survival of the fittest. *Semin Radit Oncol* 1996;6:46-58
 15. Kolstad P. Intercapillary distance, oxygen tension and local recurrence in cervix cancer. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 106(Suppl):145-157
 16. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996;379:88-91
 17. Nordmark M, Overgaard J. A confirmatory prognostic study on oxygenation status and loco-regional control in advanced head and neck squamous cell carcinoma treated by radiation therapy. *Radiother Oncol* 2000;57:39-43
 18. Teicher BA. Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 1994;13:139-168
 19. Adam M, Gabalski EC, Bloch DA, et al. Tissue oxygen distribution in head and neck cancer patients. *Head Neck* 1999;21:146-153
 20. Rasey JS, Koh WJ, Evans ML, et al. Quantifying regional hypoxia in human tumors with positron emission tomography of [¹⁸F]fluoromisonidazole: a pretherapy study of 37 patients. *Int J Radiat Biol Phys* 1996;36:417-428
 21. Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, Scher RL, Dewhirst MW. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;38:285-289
 22. Nordmark M, Overgaard M, Overgaard J. Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 1996;41:31-39
 23. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 1996;56:4509-4515
 24. Nordmark M, Aisner J, Keller J, et al. Hypoxia in human soft tissue sarcomas: adverse impact on survival and no association with p53 mutations. *Br J Cancer* 2001;84:1070-1075
 25. Khalil AA, Horsman MR, Overgaard J. The importance of determining necrotic fraction when studying the effect of tumour volume on tissue oxygenation. *Acta Oncol* 1995;34: 297-300
 26. Nordmark M, Overgaard J. A confirmatory prognostic study on oxygenation status and loco-regional control in advanced head and neck squamous cell carcinoma treated by radiation therapy. *Radiother Oncol* 2000;57:39-43
 27. Fyles A, Milosevic M, Hedley D, et al. Tumor hypoxia has independent predictor impact only in patients with node-negative cervix cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:680-687
 28. Brizel DN, Scully SP, Harrelson JM, et al. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 1996;56:941-943
 29. Hockel M, Knoop C, Schlenger K, et al. Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol* 1993;26:45-50
 30. Gatenby RA, Kessler HB, Rosenblum JS, et al. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastasis and its relationship to outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;14:831-838
 31. Nordmark M, Lancaster J, Chou SC, et al. Invasive oxygen measurements and pimonidazole labeling in human cervix carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;49:581-586
 32. Iyer RV, Haynes PT, Schneider RF, Movas B, Chapman JD. Marking hypoxia in rat prostate carcinomas with β-D-[¹²⁵I] azomycin galactopyranoside and [^{99m}Tc]HL-91: correlation with microelectrode measurements. *J Nucl Med* 2001; 42:337-344
 33. Brown JM. Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours and a possible mechanism of reoxygenation. *Br J Radiol* 1979;52:650-656
 34. Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955;9:539-549
 35. Denekamp J, Dasu A. Inducible repair and the two forms of tumour hypoxia: time for a paradigm shift. *Acta Oncol* 1999;38:903-918
 36. Evans SM, Hahn SM, Magarelli DP, Koch CJ. Hypoxic heterogeneity in human tumors: EF5 binding, vasculature, necrosis, and proliferation. *Am J Clin Oncol* 2001;24:467-472
 37. Chapman JD, Engelhardt EL, Stobbe CC, Schneider RF, Hanks GE. Measuring hypoxia and predicting tumor radioresistance with nuclear medicine assays. *Radiother Oncol* 1998;46:229-237
 38. Varghese AJ, Gulyas S, Mohindra JK. Hypoxia-dependent reduction of 1-(2-nitro-1-imidazolyl)-3-methoxy-2-propanol by Chinese hamster ovary cells and KHT tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1976;36:3761-3765
 39. Chapman JD. Hypoxic sensitizers-implications for radiation therapy. *N Engl J Med* 1979;301:1429-1432
 40. Franko AJ, Chapman JD. Binding of ¹⁴C-misonidazole to hypoxic cells in V79 spheroids. *Br J Cancer* 1982;45:694-699
 41. Raleigh JA, Franko AJ, Koch CJ, Born JL. Binding of misonidazole to hypoxic cells in monolayer and spheroid culture: evidence that a side-chain label is bound as efficiently as a ring label. *Br J Cancer* 1985;51:229-235
 42. Chapman JD, Franko AJ, Sharplin J. A marker for hypoxic cells in tumours with potential clinical applicability. *Br J Cancer* 1981;43:546-550
 43. Grunbaum Z, Freauff SJ, Krohn KA, Wilbur DS, Magee S, Rasey JS. Synthesis and characterization of congeners of misonidazole for imaging hypoxia. *J Nucl Med* 1987;28:68-75
 44. Hirst DG, Hazlehurst JL, Brown JM. Changes in misoni-

- dazole binding with hypoxic fraction in mouse tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985;11:1349-1355
45. Rasey JS, Grunbaum Z, Magee S, et al. Characterization of radiolabeled fluoromisonidazole as a probe for hypoxic cells. *Radiat Res* 1987;111:292-304
 46. Rasey JS, Nelson NJ, Chin L, Evans ML, Grunbaum Z. Characteristics of the binding of labeled fluoromisonidazole in cells in vitro. *Radiat Res* 1990;122:301-308
 47. Piert M, Machulla H, Becker G, et al. Introducing fluorine-18 fluoromisonidazole positron emission tomography for the localisation and quantification of pig liver hypoxia. *Eur J Nucl Med* 1999;26:95-109
 48. Bentzen L, Keiding S, Horsman MR, Falborg L, Hansen SB, Overgaard J. Feasibility of detecting hypoxia in experimental mouse tumours with 18F-fluorinated tracers and positron emission tomography - a study evaluating [18F]Fluoro-2-deoxy-glucose. *Acta Oncol* 2000;39:629-637
 49. Rasey J, Koh WJ, Grierson JR, Grunbaum Z, Krohn KA. Radiolabeled fluoromisonidazole as an imaging agent for tumor hypoxia. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1989; 17:985-991
 50. Kubota K, Tada M, Yamada S, et al. Comparison of the distribution of fluorine-18 fluoromisonidazole, deoxyglucose and methionine in tumour tissue. *Eur J Nucl Med* 1999;26: 750-757
 51. Rasey J, Casciari JJ, Hofstrand PD, Muzi M, Graham MM, Chin LK. Determining hypoxic fraction in a rat glioma by uptake of radiolabeled fluoromisonidazole. *Radiat Res* 2000;153:84-92
 52. Bentzen L, Keiding S, Horsman MR, Falborg L, Hansen SB, Overgaard J. Feasibility of detecting hypoxia in experimental mouse tumours with 18F-fluorinated tracers and positron emission tomography; a study evaluating [18F]fluoromisonidazole and [18F]fluoro-2-deoxyglucose. *Acta Oncol* 2000;39:629-637
 53. Tochon-Danguy HJ, Sachinidis JI, Chan F, et al. Imaging and quantitation of the hypoxic cell fraction of viable tumor in an animal model of intracerebral high grade glioma using [18F]fluoromisonidazole (FMISO). *Nucl Med Biol* 2002; 29:191-197
 54. Bentzen L, Keiding S, Horsman MR, Gronroos T, Hansen SB, Overgaard J. Assessment of hypoxia in experimental mice tumours by [18F]fluoromisonidazole PET and pO₂ electrode measurements: influence of tumour volume and carbogen breathing. *Acta Oncol* 2002;41:304-312
 55. Hirano T, Read SJ, Abbott DF, et al. No evidence of hypoxic tissue surrounding an intracerebral haemorrhage using PET and 18F-fluoromisonidazole. *Neurology* 1999;53: 2179-2182
 56. Read SJ, Hirano T, Abbott DF, et al. Identifying hypoxic tissue after ischemic stroke using PET and 18F-fluoromisonidazole. *Neurology* 1998;51:6117-6121
 57. Read SJ, Hirano T, Abbott DF, et al. The fate of hypoxic tissue on 18F-fluoromisonidazole PET after ischemic stroke. *Ann Neurol* 2000;48:228-235
 58. Koh WJ, Rasey JS, Evans ML, et al. Imaging of hypoxia in human tumors with [F-18]fluoromisonidazole. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;22:199-212
 59. Valk PE, Mathis CA, Prados MD, Gilbert JC, Budinger TF. Hypoxia in human gliomas: demonstration by PET with fluorine-18-fluoromisonidazole. *J Nucl Med* 1992;33:2133-2137
 60. Yeh SH, Liu RS, Wu LC, et al. Fluorine-18 fluoromisonidazole tumour to muscle retention ratio for the detection of hypoxia in nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Nucl Med* 1996; 3:1378-1383
 61. Rajendran JG, Wilson DC, Conrad EU, et al. [18F]FMISO and [18F]FDG PET imaging in soft tissue sarcomas: correlation of hypoxia, metabolism and VEGF expression. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:695-704
 62. Bentzen L, Keiding S, Nordmark M, et al. Tumour oxygenation assessed by 18F-fluoromisonidazole PET and polarographic needle electrodes in human soft tissue tumours. *Radiother Oncol* 2003;67:339-344
 63. Vujaskovic Z, Poulson JM, Gaskin AA, et al. Temperature-dependent changes in physiologic parameters of spontaneous canine soft tissue sarcomas after combined radiotherapy and hyperthermia treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;46:179-185
 64. Song CW, Shakil A, Osborn JL, Iwata K. Tumour oxygenation is increased by hyperthermia at mild temperatures. *Int J Hyperthermia* 1996;12:367-373
 65. Okajima K, Griffin RJ, Iwata K, Shakil A, Song CW. Tumor oxygenation after mild-temperature hyperthermia in combination with carbogen breathing: Dependence on heat dose and tumor type. *Radiat Res* 1998;149:294-299
 66. Ogawa A, Griffin RJ, Song CW. Effect of a combination of mild-temperature hyperthermia and nicotinamide on the radiation response of experimental tumors. *Radiat Res* 2000;153:327-331
 67. Griffin RJ, Okajima K, Barrios B, Song CW. Mild temperature hyperthermia combined with carbogen breathing increases tumor partial pressure of oxygen (pO₂) and radiosensitivity. *Cancer Res* 1996;56:5590-5593
 68. Horsman MR. Nicotinamide and other benzamide analogs as agents for overcoming hypoxic cell radiation resistance in tumours. a review. *Acta Oncol* 1995;34:571-587
 69. Horsman MR, Chaplin DJ, Brown JM. Radiosensitization by nicotinamide in vivo: a greater enhancement of tumor damage compared to that of normal tissues. *Radiat Res* 1987;109:479-489
 70. Lee I, Song CW. The oxygenation of murine tumor isografts and human tumor xenografts by nicotinamide. *Radiat Res* 1992;130:65-71
 71. Siemann DW, Horsmann MR, Chaplin DJ. The radiation response of KHT sarcomas following nicotinamide treatment and carbogen breathing. *Radiother Oncol* 1994;31:117-122
 72. Lee I, Song CW. The oxygenation of murine tumor isografts and human tumor xenografts by nicotinamide. *Radiat Res*

- 1992;130:65-71
73. Chapman JD. The detection and measurement of hypoxic cells in solid tumors. *Cancer* 1984;54:2441-2449
 74. Wiebe LI, Machulla HJ. Hypoxia: an introduction. In: Machulla HJ, eds. *Imaging of hypoxia-tracer developments*. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers. 1999: 1-18
 75. Dachs GU, Chaplin DJ. Microenvironmental control of gene expression: implications for tumor angiogenesis, progression, and metastasis. *Sem Radiat Oncol* 1998;8:208-216
 76. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 1996;56:4509-4515
 77. Kallinowski F, Zander R, Hoeckel M, Vaupel P. Tumor tissue oxygenation as evaluated by computerized-pO₂-Histography. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1990;19:953-961
 78. Kavanagh MC, Sun A, Hu Q, Hill RP. Comparing techniques of measuring tumor hypoxia in different murine tumors: Eppendorf pO₂ histogram, [³H]misonidazole binding and paired survival assay. *Radiation Research* 1996;145:491-500
 79. Nordmark M, Overgaard J. Oxygenation of human tumors: the Aarhus experience. In: P. Vaupel, D.K. Kelleher eds. *Tumor hypoxia-pathophysiology, clinical significance and therapeutic perspectives*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart: Stuttgart, 1999, 19-27
 80. Urtasun RC, Chapman JD, Raleigh JA, Franko AJ, Koch CJ. Binding of ³H-misonidazole to solid human tumors as a measure of tumor hypoxia. *Int J Radit Oncol Biol Phys* 1986;12:1263-1267
 81. Cook GJR, Houston S, Barrington SF, Fogelman I. Technetium-99m-labeled HL91 to identify tumor hypoxia, correlation with Fluorine-18-FDG. *J Nucl Med* 1998;39:99-103
 82. Groshar D, McEwan AJB, Parliament MB, et al. Imaging tumor hypoxia and tumor perfusion. *J Nucl Med* 1993;34: 885-888
 83. Nunn A, Linder K, Strauss HW. Nitroimidazoles and imaging hypoxia. *Eur J Nucl Med* 1995;22:266-280
 84. Urtasun RC, Parliament MB, McEwan AJ, et al. Measurement of hypoxia in human tumours by non-invasive SPECT imaging of iodoazomycin arabinoside. *Br J Cancer* 1996;74:209-212
 85. Grierson JR, Link JM, Mathis CA, Rasey JS, Krohn KA. A radiosynthesis of fluorine-18 fluoromisonidazole. *J Nucl Med* 1989;30:343-350
 86. Casciari JJ, Graham MM, Rasey JS. A modeling approach for quantifying tumor hypoxia with [¹⁸F]fluoromisonidazole PET time-activity data. *Med Phys* 1995;22:1127-1139
 87. Horsman MR, Wood PJ, Chaplin DJ, Brown JM, Overgaard J. The potentiation of radiation damage by nicotinamide in the SCCVII tumour in vivo. *Radiother Oncol* 1990;18:49-57
 88. Chaplin DJ, Horsman MR, Trotter MJ. Effect of nicotinamide on the microregional heterogeneity of oxygen delivery within a murine tumor. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:672-676
 89. Zackheim HS, Vasily DB, Westphal ML, Hastings CW. Reactions to niacinamide. *J Am Acad Dermatol* 1981;4: 736-737
 90. Horsman MR, Brown DM, Lemmon MJ, Brown JM, Lee WW. Preferential tumor radiosensitization by analogs of nicotinamide and benzamide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986;12:1307-1310
 91. Horsman MR, Hoyer M, Honess DJ, Dennis IF, Overgaard J. Nicotinamide pharmacokinetics in humans and mice: a comparative assessment and the implications for radiotherapy. *Radiother Oncol* 1993;27:131-139
 92. Horsman MR, Chaplin DJ, Overgaard J. Combination of nicotinamide and hyperthermia to eliminate radioresistant chronically and acutely hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 1990; 50:7430-7436
 93. Kjellen E, Pero RW, Nilsson P, Hill SA. Effect of hyperthermia and/or nicotinamide on the radiation response of a C3H mammary carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989;25: 1733-1737
 94. Hoskin PJ, Saunders MI, Phillips H, et al. Carbogen and nicotinamide in the treatment of bladder cancer with radical radiotherapy. *Br J Cancer* 1997;76:260-263
 95. Denekamp J, Fowler JF. ARCON--current status: summary of a workshop on preclinical and clinical studies. *Acta Oncol* 1997;36:517-525

Abstract

Feasibility of Reflecting Improvement of Tumor Hypoxia by Mild Hyperthermia in Experimental Mouse Tumors with ¹⁸F-Fluoromisonidazole

Sang-wook Lee, M.D.* , Jin Sook Ryu, M.D.[†] , Seung Joon Oh, Ph.D.[†] , Ki Chun Im, Ph.D.[†] ,
Gi Jeong Chen, M.D.[‡] , So Ryung Lee, B.S.* , Do Young Song, B.S.* , Soo Jeong Im, M.S.[†] ,
Eun Sook Moon, B.S.* , Jong Hoon Kim, M.D.* , Seung Do Ahn, M.D.* , Seong Soo Shin, M.D.* ,
Kyeong Ryong Lee, M.D.[§] , Dae Hyuk Moon M.D.[†] and Eun Kyung Choi, M.D.*

Departments of *Radiation Oncology and [†] Nuclear Medicine, Asan Medical Center, College of Medicine, University of Ulsan, [‡] Department of Nuclear Medicine, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, [§]Department of Emergency Medical, Konkuk University, Seoul, Korea

Purpose: The aims of this study were to evaluate the change of [¹⁸F]fluoromisonidazole ([¹⁸F]FMISO) uptake in C3H mouse squamous cell carcinoma-VII (SCC-VII) treated with mild hyperthermia (42°C) and nicotinamide and to assess the biodistribution of the markers in normal tissues under similar conditions.

Methods and Materials: [¹⁸F]FMISO was produced by our hospital. Female C3H mice with a C3H SCC-VII tumor grown on their extremities were used. Tumors were size matched. Non-anaesthetized, tumor-bearing mice underwent control or mild hyperthermia at 42°C for 60 min with nicotinamide (50 mg/kg i.p. injected) and were examined by gamma counter, autoradiography and animal PET scan 3 hours after tracer i.v. injected with breathing room air. The biodistribution of these agents were obtained at 3 h after [¹⁸F]FMISO injection. Blood, tumor, muscle, heart, lung, liver, kidney, brain, bone, spleen, and intestine were removed, counted for radioactivity and weighed. The tumor and liver were frozen and cut with a cryomicrotome into 10-μm sections. The spatial distribution of radioactivity from the tissue sections was determined with digital autoradiography.

Results: The mild hyperthermia with nicotinamide treatment had only slight effects on the biodistribution of either marker in normal tissues. We observed that the whole tumor radioactivity uptake ratios were higher in the control mice than in the mild hyperthermia with nicotinamide treated mice for [¹⁸F]FMISO (1.56±1.03 vs. 0.67±0.30; p=0.063). In addition, autoradiography and animal PET scan demonstrated that the area and intensity of [¹⁸F]FMISO uptake was significantly decreased.

Conclusion: Mild hyperthermia and nicotinamide significantly improved tumor hypoxia using [¹⁸F]FMISO and this uptake reflected tumor hypoxic status.

Key Words: [¹⁸F]Fluoromisonidazole, Mild hyperthermia, Nicotinamide, Autoradiography, Positron emission tomography