



Title	HeLa細胞のCell Cycle Progressionに対するHyperthermiaと放射線の影響
Author(s)	窪田, 宜夫
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1982, 42(2), p. 188-199
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/15869">https://hdl.handle.net/11094/15869</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## HeLa 細胞の Cell Cycle Progression に対する Hyperthermia と放射線の影響

横浜市立大学医学部放射線医学教室（主任：松井謙吾）

窪田 宣夫

（昭和56年6月18日受付）

（昭和56年7月17日最終原稿受付特別掲載）

### Effect of Hyperthermia and Radiation on the Cell Cycle Progression of HeLa Cells

Nobuo Kubota

Department of Radiology, School of Medicine, Yokohama City University  
(Director: Prof. Kengo Matsui)

Research Code No.: 402

Key Words: Hyperthermia, Radiosensitization, Flow cytometry, Cell cycle kinetics

The effect of hyperthermia and irradiation on cytokinetics was studied using exponentially growing HeLa cells. To determine the effect of heat and/or radiation on the cell cycle progression, the changes in the DNA distribution of the cell population after different time intervals after treatment were studied. The cellular DNA content of the cell population was measured by flow cytometry.

The results obtained were as follows:

- Compared with the control, the cellular DNA content distribution of HeLa cells treated with 43°C for 20 min and 60 min showed cell accumulation in S and G<sub>2</sub>M phases 8 hours after treatment.
- Hyperthermic treatment at 45°C for 20 min caused cells to accumulate in S phase in the first 4 hours and G<sub>2</sub>M phase after 8 to 14.5 hours, whereas heat treatment at 45°C for 60 min caused cells to accumulate in G<sub>2</sub>M phase after 24 hours.
- Irradiation of exponentially growing cells induced a block in the progress from G<sub>2</sub>M to G<sub>1</sub> phase.
- Dose survival curves of HeLa cells with and without postirradiation thermal treatment (43°C, 60 min) showed significant enhancement of radiosensitivity by hyperthermia.
- The sequential treatment, i.e. 5 Gy irradiation followed immediately by heat treatment at 43°C for 60 min, caused more cells to accumulate in G<sub>2</sub>M phase after 24 and 48 hours, as compared with 5 Gy irradiation alone.

#### 1. はじめに

近年、hyperthermia が悪性腫瘍の新しい治療手段として取りあげられ、放射線<sup>1)2)3)4)</sup>、化学療法<sup>5)6)7)</sup>との併用などについて多くの基礎研究が進

められている。また一部では臨床応用も試みられている<sup>8)9)</sup>。それは両者の併用が殺細胞効果に関して相乗作用を有すること<sup>10)11)12)</sup>、しかも、併用のタイミングを工夫すると熱による増強作用

(Thermal Enhancement Ratio) が腫瘍組織に対しては大きく、正常組織に対しては小さくすることが可能であることが動物実験で明らかにされてきたためであろう<sup>13) 14) 15)</sup>。

しかしながら、基礎研究の分野においては、hyperthermia の細胞に対する殺細胞効果の研究に比して、cell cycle progression に及ぼす影響については、わずかな報告しかみられない<sup>16) 17) 18)</sup>。hyperthermia の cell cycle progression に対する作用は細胞生物学的に興味あるばかりでなく、放射線、化学療法と hyperthermia の併用を考える上でも非常に重要な因子であると思われる。

一方、flow cytometry (以後 FCM と略す) は、近年、新たに開発された DNA 自動測定装置である<sup>19) 20) 21)</sup>。細胞の DNA 量の測定には、以前より顕微分光測定法 (microspectrophotometry)<sup>22)</sup> が行なわれてきた。しかしながら、この方法は長時間と多大の努力を必要とする。これに対して、FCM では個々の細胞の DNA 量を自動的に測定することにより、細胞集団の cell cycle の各 phase の割合を速やかに把握することが可能である。そのため、化学療法剤の細胞動態に対する作用などの解析には、この方法が最も活用されている<sup>23)</sup>。

今回、著者は FCM を使用して、in vitro 培養細胞の cell cycle progression に対して、hyperthermia、放射線照射、及び両者の併用が及ぼす作用について解析を試み、2、3 の知見を得たので報告する。

## 2. 実験材料と方法

### 1) 細胞と培養法

実験には HeLa 細胞を用いた。細胞は Flow Laboratory 由来のもので、今回の実験を始める前に、当研究室で1回クローニング培養した。使用した培養液はイーグル MEM (日本製) で、L-glutamine 0.292g/l, NaHCO<sub>3</sub> 2.2g/l を添加し、また 10% Fetal Bovine Serum (Flow Lab.) を加えた。

細胞は  $2 \times 10^5$  個を TD-40 培養びん (池本) に播種し、48時間後の対数増殖期にあるものを実験

に用いた。殺細胞効果の実験は単層培養で増殖している細胞に放射線照射、あるいは温熱処理を行い、0.05% トリプシン処理により单細胞浮遊液とし、コロニー形成能により細胞の survival を求める方法によった。細胞は血球計算盤でカウントし、培養液で適当に稀釈し、60mm プラスチックシャーレ (ファルコン3002) に播種した。炭酸ガス培養器 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Air) で12日間培養し、培養終了後、直ちにホルマリン固定を行い、0.1% crystal violet 液で染色した。50コ以上の細胞から成るコロニーを1つの生細胞由来のコロニーとしてカウントした。実験期間を通じて、未処理の細胞の plating efficiency は常に70%以上であった。

### 2) 放射線照射と温熱処理

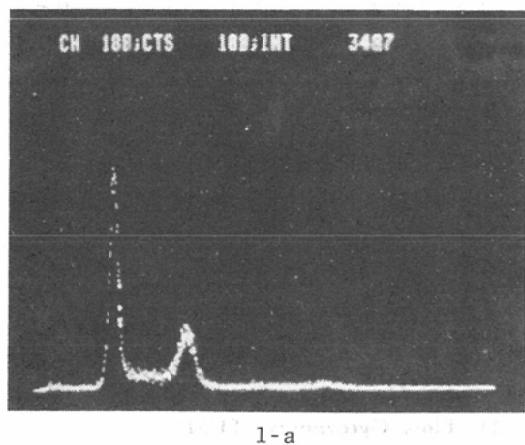
放射線照射は <sup>60</sup>Co ガンマ線で行った。線量率は毎分 0.73Gy であり、室温にて照射した。線量は Radcon 555型線量計にて測定した。

温熱処理は TD-40 培養びんにゴム栓をし、パラフィルムでシールして、恒温水槽 (ヤマト BT-45) に浸した。

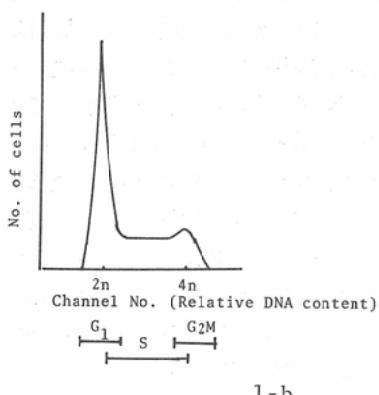
### 3) Flow Cytometry (FCM)

FCM による細胞動態の解析は  $2 \times 10^5$  個の細胞を TD-40 培養びんに播種し、48時間後に放射線照射ないしは温熱処理を施し、以後、炭酸ガス培養器にもどし経時的に細胞浮遊液を作製して行った。予備実験で培養液に対する 45°C 60 分の温熱処理は、その後の細胞増殖に何らの影響も及ぼさないことが示されたので、温熱処理後の培養液の交換は行なわれなかった。使用した FCM の装置は Model 4800A Cytofluorograph (Bio/Physics System Inc.) である。測定試料の作製は Krishan<sup>24)</sup> の方法によった。細胞は 70% エチルアルコールで固定した。固定された細胞は 4°C で少くとも 4、5 日は保存可能であった。固定された細胞は FCM で DNA 量を測定する前に、2 回、蒸留水で洗浄し、Ribonuclease 処理 (1mg/ml, 37°C 30 分) を行った。最終的に試料は Propidium Iodide (0.05mg/ml, 1.12% Sodium Citrate) で染色し測定した。

FCM は蛍光色素で染色された細胞の DNA 量を瞬時に測定する能力をもつ新しい細胞解析装置である<sup>19)20)</sup>。DNA に特異的に結合する蛍光色素で染色された細胞は 1 個 1 個遊離した状態で細い管を通過し、この時にアルゴンイオンレーザー光が照射される。すると個々の細胞の色素が蛍光を発し、それは電気的信号に変換される。細胞の相対的な DNA 量が蛍光の強弱として測定されるわけである。結果は横軸に DNA 量、縦軸に細胞



1-a



1-b

Fig. 1 DNA distribution of exponentially growing cells.

(1-a) Flow cytometric measurement of HeLa cells.  
(1-b) Schematic representation of DNA-histogram.  
First peak (2n) corresponds to cells in G<sub>1</sub> phase and second peak (4n) corresponds to cells in G<sub>2</sub> and M phases. The DNA values between 2n and 4n are due to cells in S phase.

数を示すヒストグラムとして表示される。対数増殖期にある細胞集団のヒストグラムは一般的に Fig. 1 に示されるような二峰性のパターンとする。DNA 量が 2n のピークは cell cycle phase のうちの G<sub>1</sub> 期、4n のピークは G<sub>2</sub> 期と M 期、2n から 4n にかけての細胞集団は S 期 (DNA 合成期) を示す。細胞動態の解析は従来より <sup>3</sup>H-Thymidine によるオートラジオグラフィー法<sup>25)26)</sup> が最も一般的な方法であるが、FCM はアイソトープを使うことなく、しかも短時間で cell cycle の解析を可能とする画期的な方法である。今回は放射線、hyperthermia の cell cycle progression に対する影響について、FCM のヒストグラムのパターンの変化を中心に解析を行った。

### 3. 結 果

#### 1) HeLa 細胞の増殖曲線

HeLa 細胞  $2 \times 10^5$  個を TD-40 培養瓶に播種後の細胞増殖曲線を Fig. 2 に示す。細胞は播種後、20 時間の誘導期を経て対数増殖期に入り、5 日目以後には定常状態へ移行した。対数増殖期の doubling time は約 20 時間であった。以後の実験にはすべて細胞播種後 48 時間の対数増殖期の細胞を用いた。

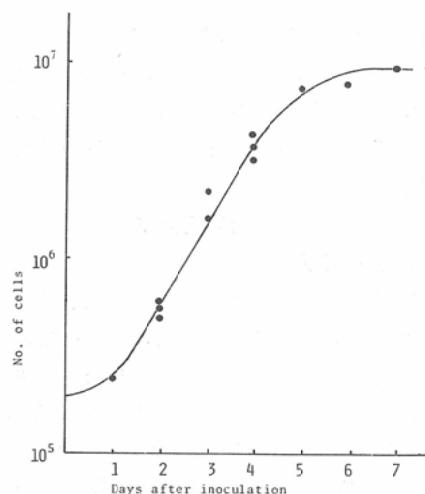


Fig. 2 Growth curve of HeLa cells. Number of cells inoculated was  $2 \times 10^5$  per TD-40 flask. The culture medium was not changed after plating the cells.

## 2) hyperthermia の殺細胞効果

HeLa 細胞に対する温熱処理の殺細胞効果については、コロニー形成法で求めた (Fig. 3). 対数増殖期の HeLa 細胞は43°Cの温熱処理では、顕著な cell killing はみられず、240分処理でも survival は0.2程度であった。これに対して45°C

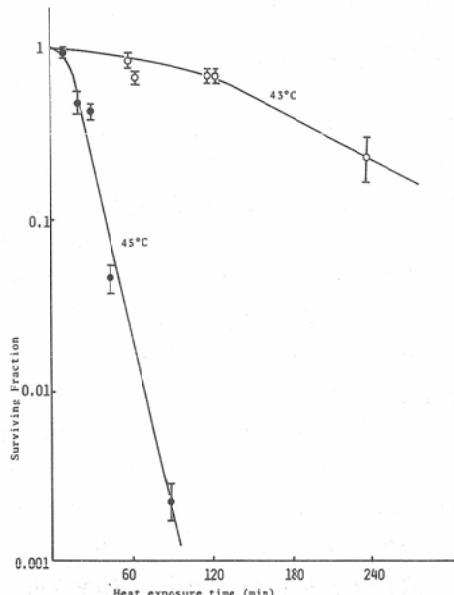


Fig. 3 Survival of exponentially growing HeLa cells exposed to elevated temperatures for various times.

の温熱処理では著るしい cell killing が観察された。

## 3) hyperthermia の cell cycle progression に対する影響

43°Cと45°Cの温熱処理の対数増殖期の細胞の cell cycle progression に対する影響について、FCMによるヒストグラムの変化を調べた (Fig. 4, 5, 6)。コントロールのヒストグラムは典型的な2峰性のパターンを呈し、43°C20分及び60分の温熱処理後もヒストグラムの著しい変化は認められなかった。20分処理では8時間後にS期とG<sub>2</sub>M期のわずかな増加がみられた。60分処理では4時間と8時間後に同じくS期とG<sub>2</sub>M期の細胞の蓄積が観察されたが、両処理群ともに24時間後にはコントロールと同じパターンに復帰した。

次に45°Cの温熱処理についてみると、20分処理 (Fig. 5) では4時間後にS期細胞の蓄積が認められ、その後、細胞はG<sub>2</sub>M期へ流入し14.5時間後には多くの細胞がG<sub>2</sub>M期へ蓄積した。G<sub>2</sub>M期でprogressionが阻害されていた細胞は、その後、cycleを回りはじめG<sub>1</sub>期へ流入し、22.5時間後ではヒストグラムは再びもとと同じパターンを呈した。

45°C60分処理 (Fig. 6) では20分処理よりも全体的にcell cycleのprogressionは抑制され、20

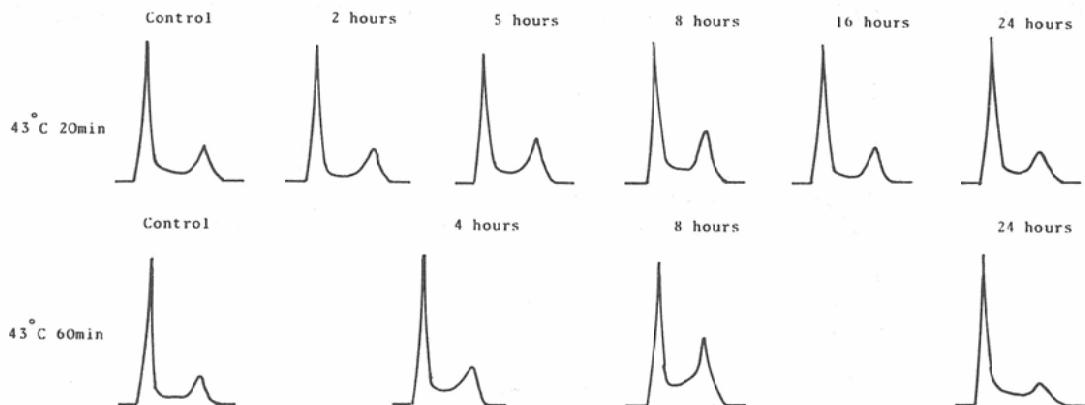


Fig. 4 DNA-histograms of HeLa cells at different times after hyperthermic treatment at 43°C for 20min and 60min.

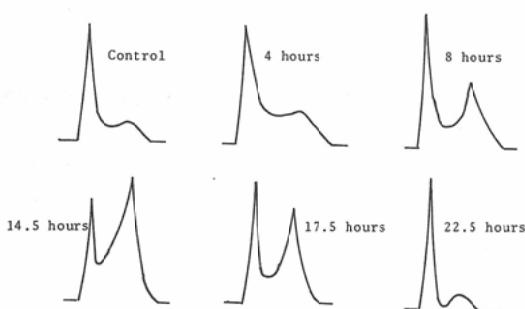


Fig. 5 DNA-histograms of HeLa cells at different times after hyperthermic treatment at 45°C for 20min.

分処理でみられた  $G_2M$  期の細胞の蓄積が処理後24時間で観察された。また9時間以後には 8n にも小さなピークが認められた。

45°C温熱処理後の細胞の growth curve を Fig. 7 に示す。20分処理では14.5時間後に  $G_2M$  期へ蓄積した細胞が、その後、 $G_1$  期へ流入したデーターと一致して、16~20時間の delay をもってコントロールと同じ growth rate で細胞は増加した。一方、60分処理では細胞の増加は全く認められなかった。

#### 4) 放射線の cell cycle progression に対する影響

放射線照射の cell cycle progression に対する影響について、線量は  $^{60}\text{Co}$  ガンマ線2.3Gy と 10Gy で調べた。Fig. 8 は 2.3Gy, Fig. 9 は 10Gy 照射後のヒストグラムの変化を示す。2.3Gy 照

射では照射後6時間ピーカーとして  $G_2M$  期への細胞の蓄積があり、また S 期細胞もかなりの増加が認められた。 $G_2M$  期へ蓄積した細胞は、その後、分裂して  $G_1$  期へ流入し17.5時間後にはコントロールと同様のヒストグラムを描いた。

10Gy 照射では照射後5時間で S 期にかなりの細胞の蓄積が起こり、S 期細胞はその後、急速に  $G_2M$  期へ流入し、そこで顕著な  $G_2$  ブロックが観察された。11時間後ではまだ一部の細胞は S 期に残っていたが、17時間後では大部分の細胞が  $G_2M$  期に蓄積した。また11時間以後には 8n にも小さなピークが認められた。 $G_2M$  期でブロックされていた細胞は再び  $G_1$  期へ流入し、24時間後ではヒストグラムのパターンはコントロールに似た2峰性を示した。しかし、48時間では 4n から 8n にかけて細胞の増加があり、正常な細胞増殖が阻止されていることが予想された。

照射後の growth curve をみると、2.3Gy 照射では細胞は6時間以後の  $G_2$  ブロックの回復と一致して、約8時間の delay をもってコントロールと同様に増加した。10Gy 照射では細胞はわずかずつ増加するにすぎなかった。(Fig. 10)。

#### 5) 放射線と hyperthermia の相乗作用

放射線照射と hyperthermia の併用による殺細胞効果についてコロニー形成能で調べた。温熱処理は放射線照射直後に43°C20分、または60分処理を行った。線量効果関係は Fig. 11, Table 1 に示す。43°C20分及び60分の単独処理の効果は差し

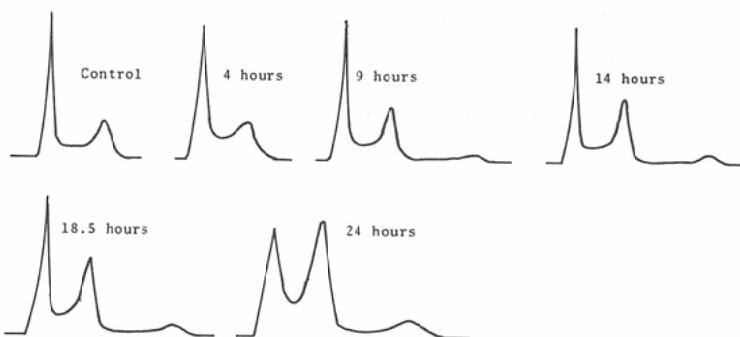


Fig. 6 DNA-histograms of cells at different times after hyperthermic treatment at 45°C for 60min.

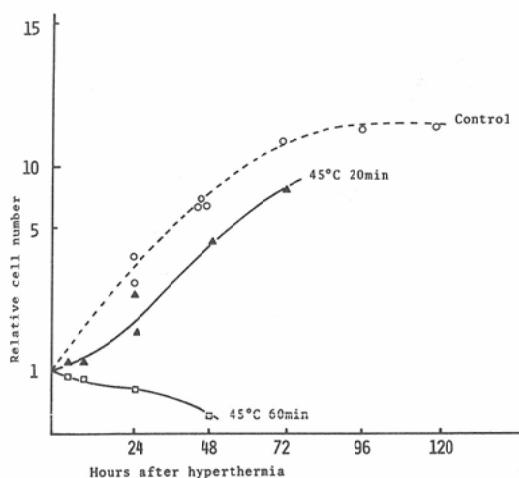


Fig. 7 Growth curves of HeLa cells after hyperthermia.

- control cells.
- ▲ cells exposed to 45°C for 20min.
- cells exposed to 45°C for 60min.

引いて survival curve を描いた。43°C20分処理では温熱の放射線増感効果は小さいものであったが、60分処理では放射線と温熱の併用で顕著な相乗作用が認められた。

#### 6) 放射線と hyperthermia 併用の cell cycle progression に対する影響

放射線照射とその直後の温熱処理の併用が cell cycle progression に及ぼす影響について、同じく FCM で調べた (Fig. 12, 13)。照射線量は 5Gy、温熱処理時間は 43°C20分及び60分とした。温熱処理20分の併用群では、照射単独群と比べて3時間後でS期、9時間後ではG<sub>2</sub>M期への蓄積の遅延がみられたが、24時間では両群ともコントロールと同じヒストグラムを示した。

一方、放射線 5Gy と 43°C60分の併用群では、照射単独群と比べ、同様に S 期及び G<sub>2</sub>M 期への蓄積の遅延がみられた。さらに、放射線単独群で

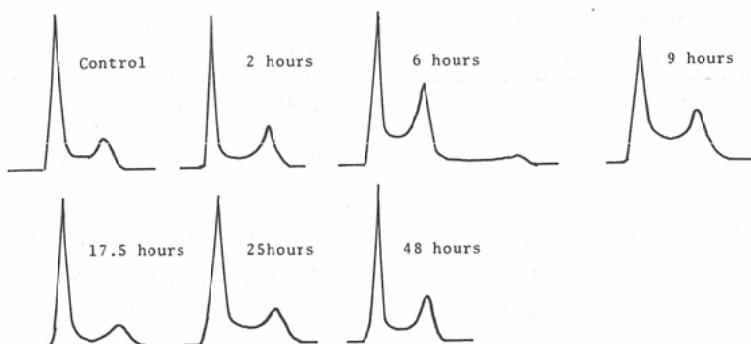


Fig. 8 DNA-histograms of HeLa cells at different times after exposure to 2.3Gy.

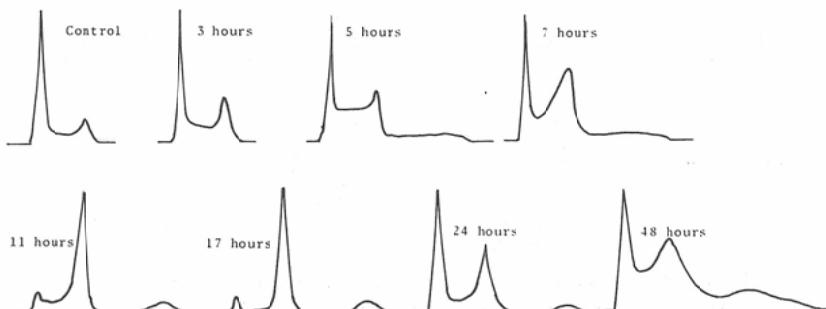


Fig. 9 DNA-histograms of cells at different times after exposure to 10Gy.

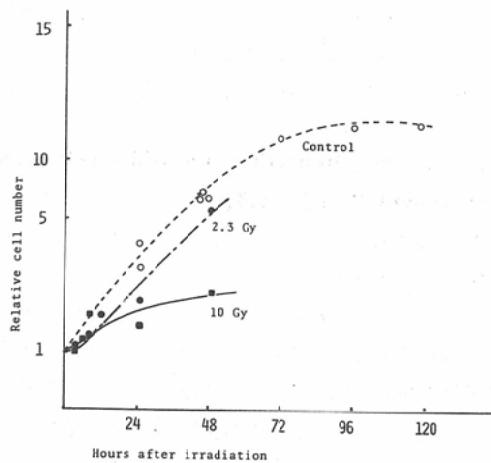


Fig. 10 Growth curves of HeLa cells after irradiation.

- control cells.
- cells exposed to 2.3Gy.
- cells exposed to 10Gy.

Table 1 Dose response curve parameters of HeLa cells irradiated alone and incubated for 20min or 60min at 43°C immediately after irradiation

	N Value	D <sub>q</sub> (Gy)	D <sub>0</sub> (Gy)
Irradiation alone	1.3	0.55	2.15
Irradiation + 43°C, 20 min	1.3	0.45	1.70
Irradiation + 43°C, 60 min	1.3	0.45	0.90

は16時間後では G<sub>2</sub>M 期へ蓄積した細胞がすでに一部は G<sub>1</sub> 期へ流入していたが、60分処理併用群ではまだ大部分が G<sub>2</sub>M 期にあり、一部は S 期に

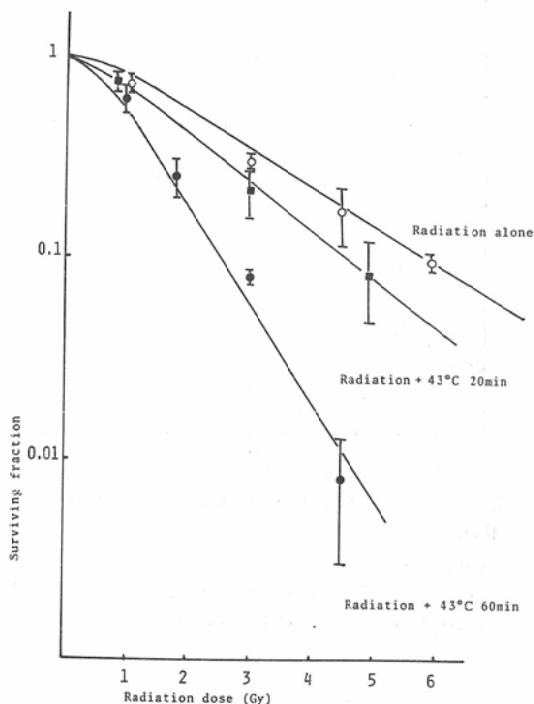


Fig. 11 Survival curves of cells exposed to radiation alone and incubated for 20min or 60min at 43°C immediately after irradiation. Log phase cells were irradiated.

も留まっていた。24, 48時間後には照射単独群はほぼコントロールと同じヒストグラムを示した。しかし、併用群では24時間後にはまだ多くの細胞が G<sub>2</sub>M 期に蓄積しており、48時間後でもコントロールに比して G<sub>2</sub>M 期のピークは高く、かなり

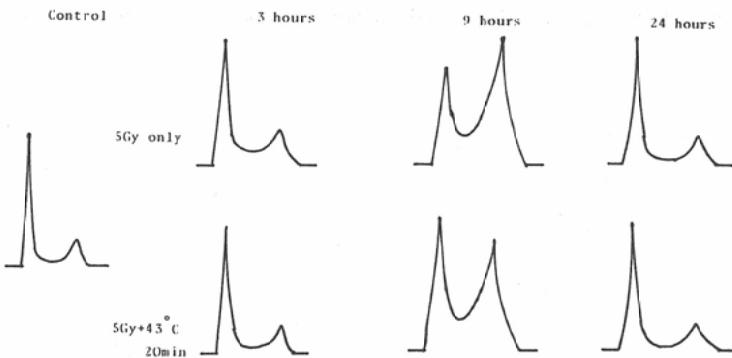


Fig. 12 DNA-histograms of HeLa cells at different times intervals after treatment. Cells were exposed to 5 Gy alone or 5 Gy followed immediately by exposure at 43°C for 20min.

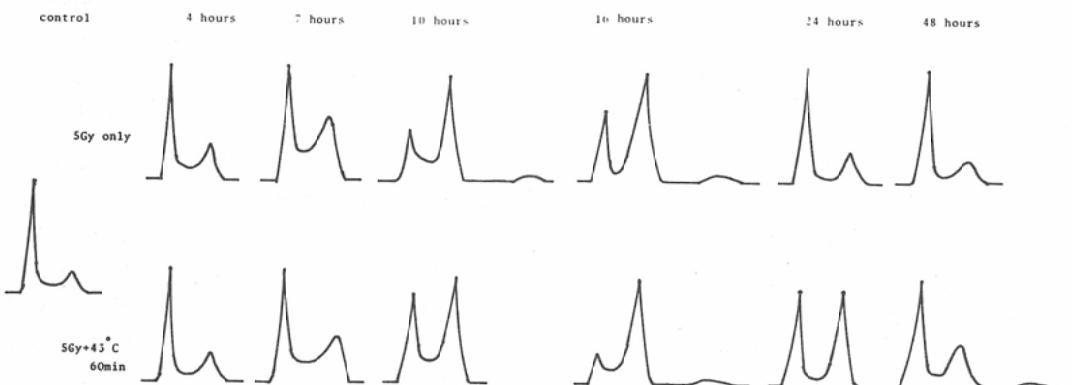


Fig. 13 DNA-histograms of cells at different time intervals after treatment. Cells were exposed to 5 Gy alone or 5 Gy followed immediately by exposure to heat for 60min at 43°C

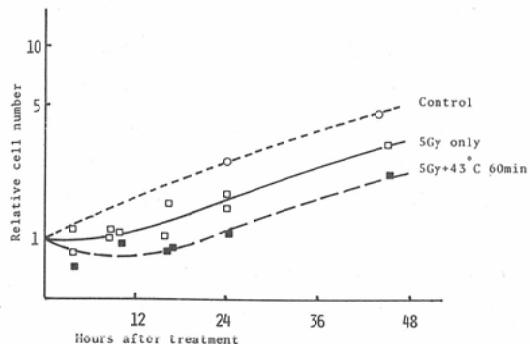


Fig. 14 Growth curves of cells after treatment.

- control cells.
- cells exposed to 5 Gy alone.
- cells exposed to 5 Gy followed immediately by hyperthermic treatment at 43°C for 60min.

の細胞が G<sub>2</sub>M 期に留まっていることが示された。

5Gy 放射線照射後の growth curve では、温熱処理60分との併用で、照射単独に比べて明らかな増殖の遅延がみられた (Fig. 14).

#### 4. 考 案

対数増殖期にある HeLa 細胞に対して、hyperthermia と放射線照射が細胞動態に及ぼす影響について、FCM による解析を行った。今回はこの方法で得られる細胞数と DNA 量のヒストグラムのパターンの変化について調べ、細胞集団の動態について検討を加えた。FCM により個々の細胞集団の正確な cell cycle phase の割合を求める

には、一般的にコンピューター処理が必要とされているが<sup>27)</sup>、細胞集団の cell cycle progression の把握には、ヒストグラムのパターンの変化から解析が可能であると思われる。それは後に述べるよう、よく知られている放射線の cell cycle progression に対する影響についての知見と、よく一致した結果が FCM のヒストグラムの解析から得られることからもいえるであろう。

hyperthermia では 43°C の温熱処理に対して、細胞は S 期と G<sub>2</sub>M 期のわずかな増殖が観察されたが、この効果は速やかに消失した (Fig. 4)。一方、45°C の温熱処理では処理時間が 20 分については、最初に 4 時間後に S 期細胞の蓄積が認められ、次に 14.5 時間後では G<sub>2</sub>M 期での蓄積がみられた (Fig. 5)。同様の報告が Kal ら<sup>17)</sup>と Schlag ら<sup>18)</sup>によってそれぞれ mammary sarcoma (EMT-6) と Chinese hamster lung cell (V 79) でなされている。HeLa 細胞は熱に抵抗性<sup>28)</sup>であるといわれているためか、これらの報告と本報とでは処理温度は異っているが、HeLa 細胞でも hyperthermia は S 期と G<sub>2</sub>M 期で細胞回転をブロックする作用のあることが認められた。次に 45°C 60 分の温熱処理では FCM のヒストグラムの著しい変化は認められず、細胞は少しづつ G<sub>2</sub>M 期へ蓄積する現象が観察された。また、温熱処理後の growth curve では、細胞数は全く増加しなかった。これらの知見より、45°C 60 分の温熱処理で

は細胞は cell cycle 全体の progression が阻害され、その中でゆっくりと G<sub>2</sub>M 期へ蓄積してゆくものと考えられる。45°C60分の温熱処理の HeLa 細胞の生残率は約0.02であったが、Schlag ら<sup>18)</sup>は V 97細胞で同じく生残率が0.02程度である42°C240分の温熱処理で、処理開始後より S 期の増加と10時間での G<sub>2</sub>M 期の蓄積のピークを報告している。本報の結果との相違は使用した細胞の違いと処理温度の違いによると思われる。

放射線照射の cell cycle progression に対する影響については2.3Gy と10Gy で調べた。今回の FCM による解析では、HeLa 細胞は照射後の S 期の増加と、それに引き続いて顕著な G<sub>2</sub>M 期の蓄積が観察された。また G<sub>2</sub> ブロックからの回復時間は線量に依存しているようであった。放射線 (Fig. 11) と hyperthermia (Fig. 3) の不活性化曲線より、2.3Gy 放射線照射と45°C20分の温熱処理はほぼ同じ生残率を与える。FCM による cell cycle progression の解析より、両者とも S 期と G<sub>2</sub>M 期の蓄積を起こすことが明らかとされたが、G<sub>2</sub>M 期への細胞の蓄積、及び G<sub>2</sub>M 期から G<sub>1</sub> 期への progression は、放射線では温熱処理に比べて早期に起こるようである。

従来より放射線の cell cycle progression に対する影響については、オートラジオグラフィー法などを使って調べられてきた<sup>25)</sup>。寺島<sup>29)</sup>は哺乳動物細胞に中等度の線量が照射された時の細胞集団に起こる変化について、すでに報告された多くのデータをまとめて模型的な記載を行っている。それを要約すると、放射線照射後、M期細胞は分裂を完了して G<sub>1</sub> 期に入る。G<sub>2</sub> 期細胞はきびしい G<sub>2</sub> ブロックを起こし、S 期細胞は一時的に DNA 合成率の低下、あるいは S 期の終りにブロックが起こり、S 期は延長する。S 期のブロックは G<sub>2</sub> ブロックより早期に解消して S 期の一部と G<sub>2</sub> 期の集団は混合して M 期に入る。これらの記載は今回の FCM の解析結果とよく一致する。このように、FCM は個々の細胞についての解析はできないが、細胞集団の cell cycle progression の把握にはきわめて優れた方法である。

そこで次に放射線と hyperthermia の併用に関しての解析を行った。両者の併用は同時併用が最も相乗致死効果が大きいとする報告が多い<sup>30)31)</sup>。今回は同時併用とほとんど同じ効果があると思われる放射線照射直後に温熱処理を行った併用実験を試みた。まず放射線と43°Cの温熱処理の併用の殺細胞効果を調べた (Fig. 11)。放射線と43°C20分の併用では、わずかな相乗致死効果がみられたにすぎなかったが、60分処理との併用では顕著な相乗効果が認められた。このように hyperthermia の放射線増感作用は処理時間に依存するようである。そして相乗作用には Do の減少が大きく関与している事が判明した。Kano ら<sup>32)</sup>は 4 種類の培養細胞について hyperthermia の放射線増感効果を調べ、生残率曲線から Do と Dq の減少がみられることを報告している。また、Raaphorst ら<sup>33)</sup>も CHO 細胞で両者の併用により、Do と Dq の減少をみている。このように、hyperthermia の放射線増感作用は一般的に Do と Dq の減少に起因すると考えられる。しかし、Freeman ら<sup>34)</sup>は CHO 細胞で Do の減少のみを報告しており、本報の結果も Do は 2.15Gy から 0.9Gy へと大きく減少し、Dq の減少はほんのわずかであった (Table 1)。これは使用した HeLa 細胞の Dq が他の培養細胞に比べて小さいこともその理由の一つであろう。

次に 5Gy 放射線照射と43°Cの温熱処理の併用の cell cycle progression に及ぼす影響について調べた。放射線との併用により、わずかな増感効果しか認められなかった20分処理では、照射後の S 期及び G<sub>2</sub>M 期の蓄積の遅延がみられたが、24 時間後のヒストグラムは放射線単独群と温熱処理の併用群で違いはみられず、コントロールと同じパターンを示した。それに比べて顕著な増感効果のあった43°C60分処理との併用では、同様に S 期と G<sub>2</sub>M 期の蓄積が遅延し、さらに 24, 48 時間後でもなおヒストグラムは放射線単独群に比して 4n のピークが高く (Fig. 13), G<sub>2</sub>M 期から G<sub>1</sub> 期への progression が阻害されている細胞のあることが想定された。放射線と hyperthermia の

併用による相乗作用の機序については、1つには Sublethal Damage の Pepair と Potentially Lethal Damage の Repair の阻害作用が知られているが<sup>35)36)37)</sup>、いまだ詳細には明らかにされていない。しかしながら、今回の FCM による細胞動態の解析より、次のようなことが示唆される。放射線により潜在的な損傷を受けた細胞が、hyperthermia による損傷をさらに受け、両者が相互作用を起こす。その結果として、放射線によって G<sub>2</sub>M 期でプロックされていた細胞はさらに G<sub>2</sub>M 期から G<sub>1</sub> 期への progression が阻害される。のために放射線による潜在的損傷は致死的損傷に固定され、相乗的致死効果が発現するものと思われる。

## 5. 結 語

対数増殖期にある HeLa 細胞の cell cycle progression に対する hyperthermia と放射線照射の影響について、flow cytometry により調べ次の結果を得た。

① 43°C20分と60分の温熱処理では、細胞はわずかに S 期と G<sub>2</sub>M 期に蓄積が認められた。

② 45°C20分の温熱処理では、4時間後に S 期細胞が増加し、その後 4~14.5 時間にかけて細胞は G<sub>2</sub>M 期に蓄積した。一方、45°C60分処理では、cell cycle 全体の progression が抑制され、24時間後にはじめて G<sub>2</sub>M 期の顕著な集積がみられた。

③ 放射線照射では、細胞は S 期の遅延による S 期細胞の増加と、その後に線量に応じた顕著な G<sub>2</sub>M 期の細胞の蓄積がみられた。

④ 放射線照射直後の43°C60分の温熱処理は殺細胞効果に関して放射線増感作用があり、それには放射線の生残率曲線の D<sub>0</sub> の減少が関与していた。

⑤ 放射線 5Gy 照射と43°C60分の温熱処理の併用では、照射後に G<sub>2</sub>M 期にプロックされた細胞の G<sub>1</sub> 期への progression が一部の細胞ではなく、24, 48時間後においても阻害されていることが観察された。

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜わりまし

た松井謙吾教授に深謝いたします。また御指導いただきました神奈川県立こども医療センター放射線部長、岡野滋樹博士に感謝いたします。さらに、flow cytometry の使用を心よくお許し下さいました本学組織培養研究室、梅田誠助教授に御礼申し上げます。

本論文の要旨は55年10月第3回ハイパーサーミア研究会、56年4月第40回日本医学放射線学会総会において発表した。

## References

- 1) Suit, H.D. and Shwayder, M.: Hyperthermia: Potential as an antitumor agent. *Cancer*, 34: 122—129, 1974
- 2) Hahn, E.W., Alfieri, A.A. and Kim, J.H.: Increased cures using fractionated exposure of X irradiation and hyperthermia in the local treatment of the Ridgway osteogenic sarcoma in mice. *Radiology*, 113: 199—202, 1974
- 3) Suit, H.D.: Hyperthermic effects on animal tissue. *Radiology*, 123: 483—487, 1977
- 4) Dewey, W.C., Hopwood, L.E., Sapareto, S.A. and Gerweck, L.E.: Cellular responses to combinations of hyperthermia and radiation. *Radiology*, 123: 463—474, 1977
- 5) Hahn, G.M. and Strande, D.P.: Cytotoxic effects of hyperthermia and adriamycin on Chinese hamster cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 57: 1063—1067, 1976
- 6) Braun, J. and Hahn, G.M.: Enhanced cell killing by bleomycin and 43°C hyperthermia and inhibition of recovery from potentially lethal damage. *Cancer Res.*, 35: 2921—2927, 1975
- 7) Margin, R.L., Sikic, B.I. and Cysyk, R.L.: Enhancement of bleomycin activity against Lewis lung tumors in mice by local hyperthermia. *Cancer Res.*, 39: 3792—3795, 1979
- 8) Kim, J.H., Hahn, E.W., Tokita, N. and Nisce, L.Z.: Local tumor hyperthermia in combination with radiation therapy. 1. Malignant cutaneous lesions. *Cancer*, 40: 161—169, 1977
- 9) Storm, F.K., Harrison, W.H. and Elliot, R.S.: Normal tissue and solid tumor effects of hyperthermia in animal models and clinical trials. *Cancer Res.*, 39: 2245—2251, 1979
- 10) Kim, S.H., Kim, J.H. and Hahn, E.W.: The radiosensitization of hypoxic tumor cells by hyperthermia. *Radiology*, 114: 727—728, 1975

- 11) Kim, J.H., Kim, S.H. and Hahn, E.W.: Thermal enhancement of the radiosensitivity using cultured normal and neoplastic cells. Am. J. Roentgenol., 121: 860—864, 1974
- 12) Overgaard, K. and Overgaard, J.: Radiation sensitizing effect of heat. Acta Radiol., 13: 501—511, 1974
- 13) Robinson, J.E., Wizenberg, M.J. and McCready, W.A.: Radiation and hyperthermia response of normal tissue in situ. Radiology, 113: 195—198, 1974
- 14) Overgaard, J. and Suit, H.D.: Time temperature relationship in hyperthermic treatment of malignant and normal tissue in vivo. Cancer Res., 39: 3248—3253, 1979
- 15) Stewart, F.A. and Denekamp, J.: The therapeutic advantage of combined heat and X-rays on a mouse fibrosarcoma. Brit. J. Radiol., 51: 307—316, 1978
- 16) Kase, K. and Hahn, G.M.: Differential heat response of normal and transformed human cells in tissue culture. Nature, 255: 228—230, 1975
- 17) Kal, H.B., Hatfield, M. and Hahn, G.M.: Cell cycle progression of murine sarcoma cells after X-irradiation or heat shock. Radiology, 117: 215—217, 1975
- 18) Schlag, H. and Lücke-Huhle, C.: Cytokinetic study on the effect of hyperthermia on Chinese hamster lung cells. Europ. J. Cancer, 12: 827—831, 1976
- 19) Crissman, H.A. and Tobey, R.A.: Cell-cycle analysis in 20 minutes. Science, 184: 1297—1298, 1974
- 20) 太田和雄, 高本 澄, 御供泰治: DNA 瞬間自動測定装置. 癌と化学療法, 4 : 179—185, 1977
- 21) 佐藤温重, 小沢和子, 日景 盛, 新井 泉, 田端恒雄: フローセルサイトフォトメータ. 細胞培養, 6 : 210—215, 1980
- 22) Mendelsohn, M.L. and Richards, B.M.: A comparison of scanning and two-wave length microspectrophotometry. J. Biophysic. and Biochem. Cytol., 4: 707—709, 1958
- 23) 高本 澄, 太田和雄: F.M.F. による細胞回転と癌化学療法. 癌と化学療法, 5 : 727—736, 1978
- 24) Krishan, A.: Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. J. Cell Biol., 66: 188—193, 1975
- 25) 松沢大樹: トリチウム 標識化合物のミクロラジオオートグラフによる細胞動態の解析. 松沢大樹編: ラジオオートグラフ—手技と応用—. pp. 125—187, 1970, 朝倉書店, 東京
- 26) 松井謙吾:  $^3\text{H}$ -Thymidine,  $^3\text{H}$ -Cytidine in vitro labeling の臨床的応用. 日本医放会誌, 25 : 930—942, 1965
- 27) Baisch, H., Göhde, W. and Linden, W.A.: Analysis of PCP-data to determine the fraction of cells in the various phases of cell cycle. Rad. and Environm. Biophys., 12: 31—39, 1975
- 28) Bhuyan, B.K., Day, K.J., Edgerton, C.E. and Ogunbase, O.: Sensitivity of different cell lines and of different phases in the cell cycle to hyperthermia. Cancer Res., 37: 3780—3784, 1977
- 29) 寺島東洋三: 細胞の増殖周期と放射線感受性. 著原 努編: 放射線細胞生物学, pp. 216—230, 朝倉書店, 東京
- 30) Sapareto, S.A., Hopwood, L.E. and Dewey, W.C.: Combined effects of X irradiation on CHO cells for various temperatures and orders of application. Radiat. Res., 73: 221—233, 1978
- 31) Meyer, K.R., Hopwood, L.E. and Gillette, E.L.: The response of mouse adenocarcinoma cells to hyperthermia and irradiation. Radiat. Res., 78: 98—107, 1979
- 32) Kano, E., Miyakoshi, J. and Sugahara, T.: Difference in sensitivities to hyperthermia and ionizing radiation of various mammalian cell strains in vitro. Streffler, et al., ed: Cancer therapy by hyperthermia and radiation. pp. 188—190, 1978, Urban and Schwarzenberg, Baltimore-Munich
- 33) Raaphorst, G.P., Freeman, M.L. and Dewey, W.C.: Radiosensitivity and recovery from radiation damage in cultured CHO cells exposed to hyperthermia at 42.5 or 45.5°C. Radiat. Res., 79: 390—402, 1979
- 34) Freeman, M.L., Raaphorst, G.P. and Dewey, W.C.: The relationship of heat killing and thermal radiosensitization to the duration of heating at 42°C. Radiat. Res., 78: 172—175, 1979
- 35) Harris, J.R., Murthy, A.K. and Bekki, J.A.: The effect of hyperthermia on the repair of radiation damage in plateau phase cells. Radiology, 119: 227—229, 1976

- 36) Ben-Hur, E., Elkind, M.M. and Bronk, B.V.: Thermally enhanced radioresponse of cultured Chinese hamster cells: Inhibition of repair of sublethal damage and enhancement of lethal damage. Radiat. Res., 58: 38—51, 1974
- 
- 37) Li, G.C., Evans, R.G. and Hahn, G.M.: Modification and inhibition of repair of potentially lethal X-ray damage by hyperthermia. Radiat. Res., 67: 491—501, 1976