The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	温熱耐性に及ぼすセファランチン及びニカルジピンの影響
Author(s)	宇田, 光伸; 赤木, 清; 田中, 敬正
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1988, 48(10), p. 1236-1242
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/16689
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

日本医放会誌：48（10），1236—1242，1988（昭63）

温熱耐性に及ぼすセファランチン及びニカルジピンの影響

関西医科大学放射線医学教室（主任：田中敬正教授）
宇田　光伸　　赤木　　清　　田中　敬正

（昭和62年10月22日受付）
（昭和63年4月19日最終原稿受付）

Effect of Cepharanthin and Nicardipine on Thermotolerance

Mitsunobu Uda, Kiyoshi Akagi and Yoshimasa Tanaka
Department of Radiology, Kansai Medical University

Research Code No. : 402.9

Key Words : Hyperthermia, Thermotolerance, Cepharanthin, Nicardipine

Hyperthermia is one of developing modalities of human cancer treatment, which is usually combined with radiotherapy and/or chemotherapy. However sublethal heating of cells results in development of transitional thermotolerance, which is the problem for the future hyperthermia oncology. The mechanism in which thermotolerance is induced is not clear, but the possible target of hyperthermic cell killing may be in plasma membranes. Membrane active drugs are thus expected to suppress the phenomenon of thermotolerance. Possible decrement in survival fractions of thermotolerant cells was investigated by treatment with Cepharanthin or Nicardipine.

Cepharanthin did not enhance hyperthermic cell killing (single heating), nor decrease survial fraction of sublethally heated cells when administered during interval period (fractionated heatings). Since thermotolerance is suggested to be induced during interval time of 45°C fractionated heatings, Cepharanthin may not inhibit the induction of thermotolerance. On the other hand, survival fractions were decreased when Cepharanthin was administered during the second heating. Thus we would hypothesize that Cepharanthin inhibits a mechanism through which the induced thermotolerance during the interval period is expressed.

Nicardipine did not enhance hyperthermic cell killing (single heating), nor decrease survival fraction of sublethally heated cells when administered during interval period or second treatment fractionated heatings.

緒　　言

癌の温熱療法は，放射線療法・化学療法と併用され，臨床的に多くの有効例が報告されている．温熱の生物学的効果について，①腫瘍細胞の致死効果，②S期や低酸素細胞の致死，細胞修復の阻害による放射線との相乗効果，③化学療法剤の作用増強などの存在が示され[1)2)]，温熱療法は癌治療の新しい手段として期待されている．しかし，一度亜致死的な温度処理を受けた細胞は次の温度処理に対して一過性に抵抗性を示し[1)3)~5)]，温熱耐性（Thermotolerance）と呼ばれている．この現象は温熱療法のひとつの欠点である．温熱耐性は無脊椎動物から哺乳動物まで共通してみられ，細胞でも組織でも発現することが知られている．何らかの方法で，腫瘍細胞・腫瘍組織での温熱耐性の発現を阻止できれば，癌治療としての温熱療法の効果の増大が期待できる．

温熱耐性の出現と Heat Shock Proteins（以下

HSPsと略す）の合成率の時間経過が相関する[6)7)]ことから，HSPsが温熱耐性発現に関わる1つの要因であるとする報告が多いが，温熱耐性発現のメカニズムは現在のところ明らかでない．一方，温熱の細胞致死効果の作用点として細胞膜の関与が考えられる．Yatvinらは温熱に曝された細胞の致死の最大の要因は細胞膜の流動性の変化であるとし[8)]，GernerらはCHO cellにおいてポリアミンが熱感受性を高め，この効果は細胞膜のレベルで作用することを報告している[9)]．そこで種々の膜作用物質を用いて，温熱耐性の出現消長の変化を調べることがこれの発現の機序解明の一助となると考えた．

この報告においては，V-79細胞を用い，①温熱耐性を誘導し，②膜作用物質であるセファランチン（Cepharanthin）及びニカルジピン（Nicardipine）による温熱耐性発現の阻止の試みについて述べる．

材料および方法

実験にはV-79細胞を用いた．培地はMEM培養液を用い，これにFetal Calf Serumを10%添加した．培養条件は37℃±0.5℃，5%CO_2 in airとした．細胞は組織培養用プラスチック・フラスコを用い単層培養し，2～3日間隔で継代した．実験には指数的増殖期の細胞を用い，トリプシン処理後1×10^2～1×10^5個の細胞をフラスコに播種し，18時間後に実験に供した．加温には恒温槽（ADVANTEC ET-45D）を用い，設定温度に対し±0.5℃の精度に保った．単独加温による生存率曲線は，各々42℃（0.5，1，1.5，2，3，4，6及び10時間），43℃（15，30，45，60，90，120，150及び180分間），44℃（5，10，15，20，30及び45分間）及び45℃（5，10，15，20及び30分間）の加温により描いた．温熱耐性の出現と消退の時間的経過は，45℃，5分間の一次加温後，37℃で各々0，1，2，4，8，12及び22時間（間隔時間）培養し，引き続き45℃で5，10，15，20及び30分間の二次加温に対する生存率を求めて検討した．

以上の処置を施されたフラスコは，37℃で7～10日間培養し，コロニーが肉眼で観察可能となった時点でクリスタルバイオレット・ホルマリン溶液で固定染色した．生存率の判定はcolony forming unit（CFU）に拠った．

温熱耐性を及ぼす膜作用物質の効果は以下の方法で検討した．用いた薬剤は膜流動性及び膜透過

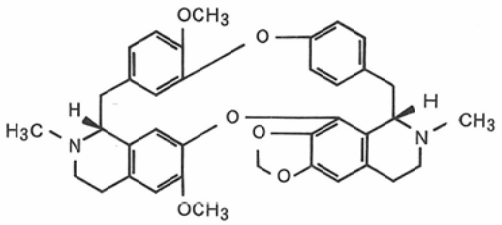

Fig. 1　The Structure of Cepharanthin.

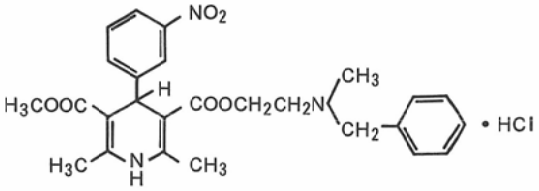

Fig. 2　The Structure of Nicardipine.

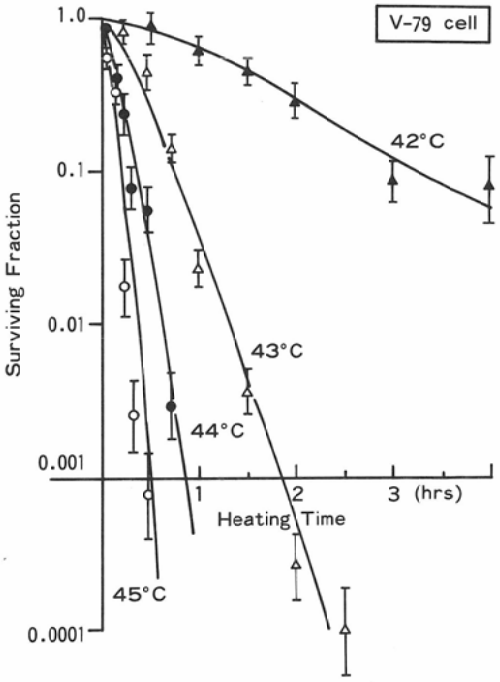

Fig. 3　Hyperthermic cell killing effect.
42℃（▲），43℃（△），44℃（●）and 45℃（○）：heat alone

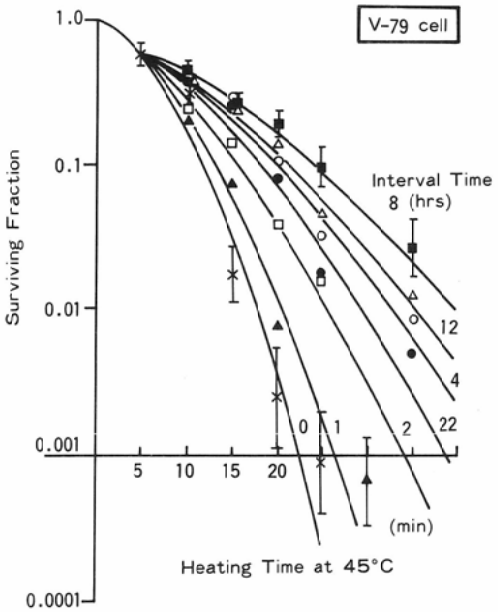

Fig. 4 Thermotolerance development and decay of 45℃ preheated V-79 cells.
Time interval : 0(+), 1(▲), 2(□), 4(○), 8(■), 12 (△) and 22 (●) hours after 45℃ 5minutes' heating. Second heat was given at 45℃. Maximum thermotolerance was developed at 6～8 hours after first heating, and decayed gradually.

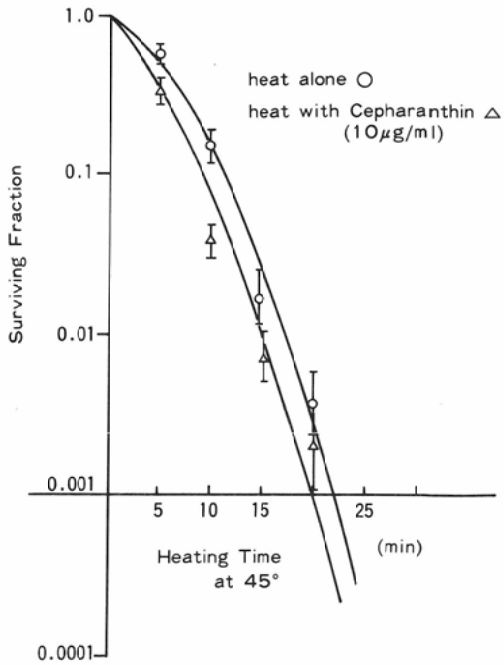

Fig. 5 The effect of Cepharanthin on hyperthermic cell killing.
heat alone (○), heat with 10μg/ml Cepharanthin (△). Cepharanthin did not significantly enhance the hyperthermic cell killing effect.

性を低下させるセファランチン（化研生薬）とカルシウム拮抗剤ニカルジピン（山之内製薬）である．温熱耐性は45℃ 5分加温後37℃で5時間培養して誘導した．セファランチン及びニカルジピンはそれぞれ最終濃度10μg/mlとなる様にmedium中に加えた．投与時期はそれぞれの薬剤について間隔時間5時間のうちの後4時間と二次加温期間とした．

結　果

1）単独加温効果：42℃，43℃，44℃および45℃の各温度で単独加温をした場合の生存率曲線をFig. 3に示す．すべての温度で指数関数的減少を示す曲線となった．42℃加温開始後約3～4時間から加温期間～生存率曲線の勾配が緩くなり加温中に温熱耐性出現が認められた．43℃以上では加温中の耐性出現は認められなかった．

2）温熱耐性の消長：45℃ 5分の一次加温後，0，1，2，4，8，12及び22時間の間隔時間をおいて45℃で二次加温した際の生存率曲線をFig. 4に示す．温熱耐性は一次加温後6～8時間で最大となり，以後時間経過と共に約72時間後には消失した．

3）薬剤と温熱の併用効果：セファランチン及びニカルジピン(各々10μg/ml)を温熱と併用してもこの濃度では温熱単独の場合と生存率に差は認められなかった（Fig. 5，Fig. 6）．

4）温熱耐性に及ぼす薬剤の効果：セファランチンを二次加温期間中培養液に加えた場合には，生存率の低下が認められた(Fig. 7)．しかし，これを間隔時間に投与しても生存率に大きな差を認られめなかった(Fig. 8)．ニカルジピンは間隔時間に投与しても，又は二次加温期間に投与しても生存率の低下は認められなかった（Fig. 9，Fig. 10）．

考　察

温熱耐性（Thermotolerance）は温熱療法の臨

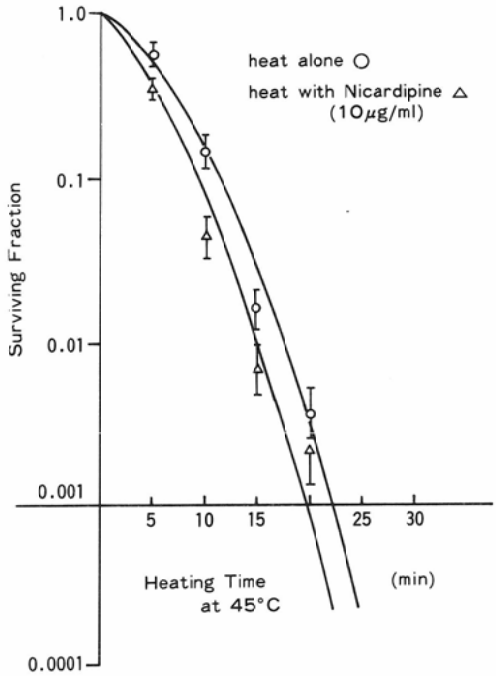

Fig. 6　The effect of Nicardipine on hyperthermic cell killing.
heat alone (○), heat with 10ug/ml Nicardipine (△). Nicardipine did not significantly enhance the hyperthermic cell killing effect.

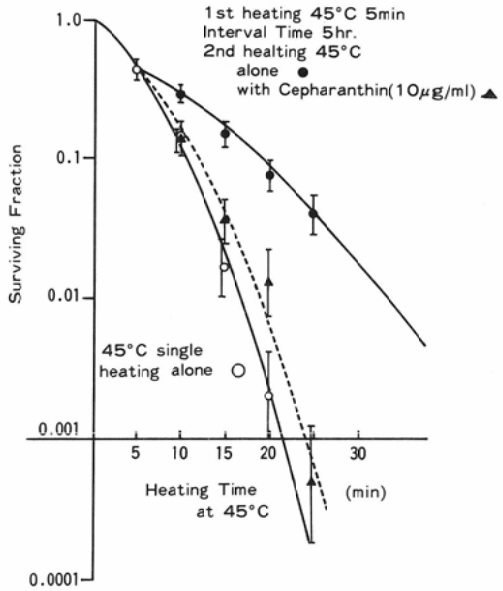

Fig. 7　The modification of Thermotolerance by Cepharanthin (administrated during 2nd heating).
Thermotolerance was induced by first heating at 45℃ for 5min followed by interval incuvation at 37℃ for 5hrs. 2nd heating was given at 45℃ for graded periods. Cepharanthin (10ug/ml) was administrated during 2nd heating (○) 45℃ alone, (●) 45℃ 5min →37℃ 5hr.→45℃ alone, (▲) 45℃ 5min.→37℃ 5hr.→45℃ with Cepharanthin. Survival fraction were decreased by the Cepharanthin administration during second heating.

床応用上の難点である．その発現のメカニズムはいまだ明らかでないが，耐性の発現と HSPs の合成率の時間経過は相関する[6)7)]ことが報告されている．また Henle, Leeper らは CHO 細胞において，温熱耐性の発現に新たな蛋白の合成を必要とすることを示し[10)]，温熱耐性と HSPs の2つの現象の関係を示唆している．しかし Landry らは，モーリス肝癌細胞においてサイクロヘキシミドで HSPs の産生を抑えても温熱耐性が出現することを示し，HSPs の新たな産生と温熱耐性の発現は必ずしも相関しないことを報告している[11)]．大塚らは温熱低感受性の V-79細胞は42℃ 2 時間－44℃の step-up heating により耐性が発現し，このときサイクロヘキシミド5μg/ml を添加して蛋白合成を阻害しても耐性発現は抑制されず，温熱高感受性のマウス L 細胞では同様の処理により耐性が抑制されることを示した．サイクロヘキシミドの温熱耐性発現阻止効果には細胞間で差が認められ，V-79細胞の様に構成的に HSP を合成している細胞では，サイクロヘキシミドで新たな HSPs の合成を阻害しても温熱耐性は発現し，構成的に合成していない細胞ではサイクロヘキシミドにより HSPs の合成を抑えることで温熱耐性の発現を阻止できると報告している[12)]．以上のように温熱耐性の発現と HSPs の相関については未だ見解が一致していない．

一方，耐性に影響を及ぼす因子について，① pH が低いと温熱耐性の発現が抑えられる[13)~15)]，② step-down heating で温熱耐性の発現が抑えられる[16)17)]，③ D_2O が温熱耐性を抑制する[18)]，④ポリアミン[9)]，プロカイン[19)]が温熱耐性の発現を阻止する，などの報告がある．このうち，low pH, D_2O, ポリアミン，プロカインは細胞膜に作用して温熱

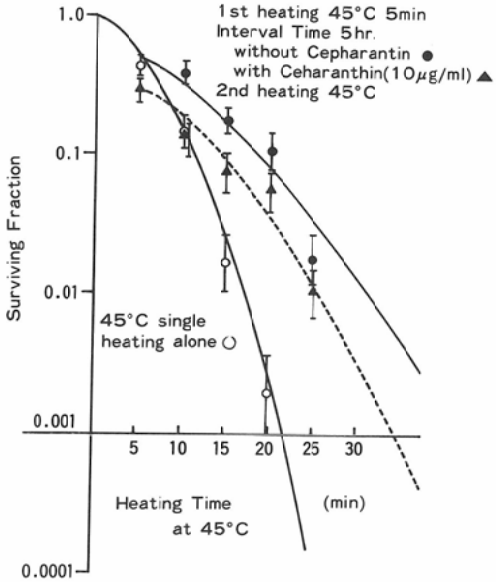

Fig. 8 The modification of Thermotolerance by Cepharanthin (administrated during interval time).
Thermotolerance was induced by first heating at 45℃ for 5min followed by interval incuvation at 37℃ for 5hrs. 2nd heating was given at 45℃ for graded periods. Cepharanthin (10μg/ml) was administrated during the latter 4 hours of interval time. (○) 45℃ alone, (●) 45℃ 5min.→37℃ 5 hr. without Cepharanthin →45℃, (▲) 45℃ 5min. →37℃ 5hr. with Cepharanthin →45℃. Survival fraction were not decreased by the Cepharanthin administration during the interval time.

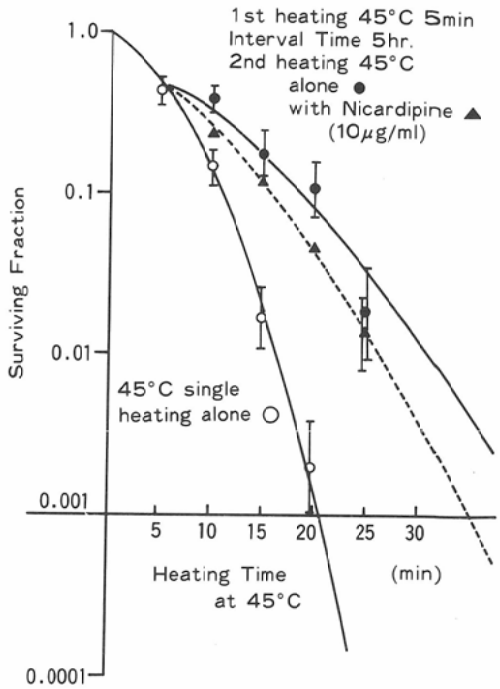

Fig. 9 The modification of Thermotolerance by Nicardipine (administrated during 2nd heating). Thermotolerance was induced by first heating at 45℃ for 5min followed by interval incuvation at 37℃ for 5hrs. 2nd heating was given at 45℃ for graded periods. Nicardipine (10μg/ml) was administrated during 2nd heating. (○) 45℃ alone, (●) 45℃ 5min.→37℃ 5hr.→45℃ alone, (▲) 45℃ 5min.→37℃ 5hr.→45℃ with Nicardipine. Survival fraction were not decreased by the Nicardipine administration during the interval time.

耐性を阻止することが示唆された．さらに，温熱処理の細胞膜に及ぼす影響について，温熱処理が細胞膜の透過性・Na/K ポンプの活性を変化させる[20]などの報告があり，温熱の細胞致死効果の作用点として細胞膜の関与が大きいと考えられる．著者等は，膜作用物質であるセファランチン及びニカルジピンを用いて温熱耐性発現の阻止を試みた．セファランチンは，タマサキツツラフジ(Stephania cepharanthahayataminispermaceae) から抽出，精製されたアルカロイド (Bisbenzylisoquinoline Alkaloids) でありその構造式を Fig. 1 に示す．生体膜に作用してその細胞質側に偏在するフォスファチジルセリンと結合し，能動的排出機能を持つ膜蛋白質の活性を間接的に阻害する可能性が示唆されている[21]．45℃ 5 分間の一次加温後37℃で 5 時間（間隔時間）培養して温熱耐性を誘導し次の45℃10，15，20及び30分の二次加温に対する生存率をみた．セファランチン10μg/ml を間隔時間と二次加温時間にそれぞれ培養液中に加えて生存率の変化をみた．セファランチンを間隔時間に投与しても無投与の場合に比べて生存率に大差を認めなかった (Fig. 8)．温熱耐性はこの間隔時間に誘導されると考えられるので，セファランチンは温熱耐性の誘導そのものは阻止しないと考えられよう．しかし，二次加温時間に投与すると生存率の低下が認められた (Fig. 7)．セファランチンと温熱の併用では温熱単独の場合と比較し

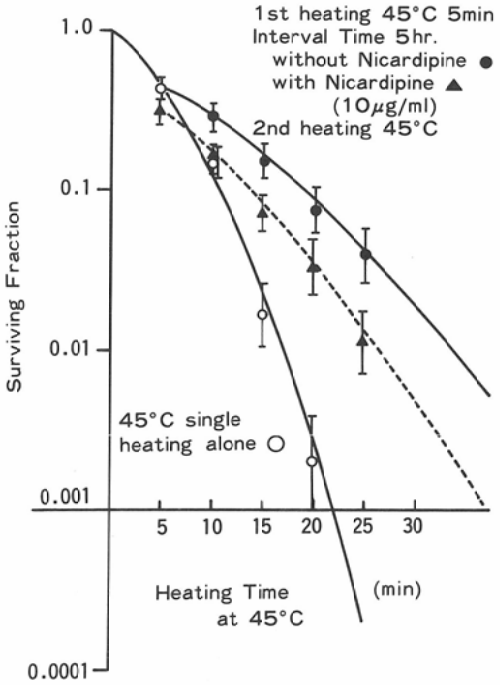

Fig. 10　The modification of Thermotolerance by Nicardipine (administrated during interval time).
Thermotolerance was induced by first heating at 45℃ for 5min followed by interval incuvation at 37℃ for 5hrs. 2nd heating was given at 45℃ for graded periods. Nicardipine (10μg/ml) was administrated during the latter 4 hours of interval time. (○) 45℃ alone, (●) 45℃ 5min.→37℃ 5hr. →45℃ without Nicardioine →45℃, (▲) 45℃ 5 min.→37℃ 5hr. with Nicardipine →45℃. Survival fraction were not decreased by the Nicardipine administration during the interval time.

て生存率に大きな差は認められず（Fig. 5），セファランチンによる温熱致死効果の増強や温熱によるセファランチン毒性の増強は認められなかった事から，セファランチンは誘導された温熱耐性出現のための諸段階のある部分を阻止していると考えられる．

カルシウム拮抗剤ニカルジピン（構造式をFig. 2に示す）は温熱感受性を増強せず（Fig. 6），温熱耐性にも影響を与えなかった（Fig. 9, Fig. 10）．

結　論

1）温熱耐性は45℃ 5分の加温後6～8時間で最大となり，以後時間経過と共に約72時間で消失した（Fig. 4）．

2）セファランチン（10μg/ml）を間隔時間に投与しても生存率の低下が認められなかった（Fig. 8）．

3）セファランチン（10μg/ml）を二次加温時間に投与すると生存率の低下が認められ，既に温熱耐性を獲得したはずの細胞の温熱耐性出現を抑えた（Fig. 7）．

4）ニカルジピン（10μg/ml）を間隔時間に投与しても二次加温時間に投与しても生存率の低下を認めなかった（Fig. 9, Fig. 10）．

この研究は一部昭和61，62年度文部省科学研究費がん特別研究Ⅰ（田中班）（#61010072及び#62010072）の援助により遂行された．

文　献

1) Dewey WC, Hopwood LE, Sapareto SA, et al: Cellular responses to combinatins of hyperthermia and radiation. Radiol 123: 463—474, 1977
2) Gerweck LE: Thermoradiotherapy: Molecular and cellular kinetics. "Hyperthermia in Cancer Therapy" (FK Storm, ed), GK Hall & Co, Boston, p447—465, 1983
3) Nielsen OS, Overgaard J: Influence of time and temperature on the kinetics of thermotolerance in L1A2 cells in vitro. Cancer Research 42: 4190—4196, 1982
4) Nielsen OS, Henle KJ, Overgaard J: Arrhenius analysis of survival curves from thermotolerant and step—Down heated L1A2 cells in vitro. Radiatin Research 91: 468—482, 1982
5) Majima H, Gerweck LE: Kinetics of thermotolerance decay in chinese hamster ovary cells. Cancer Research 43: 2673—2677, 1983
6) Landry J, Bernier D, Chretien P, et al: Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. Cancer Res 42: 2457—2461, 1982
7) Li GC, Werb Z: Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in chinese hamster fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 79: 3218—3222, 1982
8) Yatvin MB: The influence of membrane lipid composition and procaine on hyperthermic death of cells. Int J Radiat Bio 32: 513—521,

1977
9) Gerner EW, Cress AE, Stickney DG, et al: Factors regulating membrane permeability alter thermed resistance. Ann New York Acad Sci 335: 215—233, 1980
10) Henle KJ, Leeper DB: Modification of the heat response and thermotolerance by cycloheximide, hydroxyurea, and lucanthone in CHO cells. Radiat Res 90: 339—347, 1982
11) Landry J, Chretien P: Relationship between hyperthermia-induced heat-shock proteins and thermotolerance in Morris hepatoma cells. Can J Biochem Cell Biol 61: 428—437, 1983
12) Ohtsuka K, Furuya M, Nitta K, et al: Effect of cycloheximide on development of thermotolerance and the synthesis of 68-kilodalton heat shock protein in chinese hamster V79 and mouse L cells in vitro. J Radiat Res 27: 291—299, 1986
13) Gerweck LE, Dahlberg WK, Greco B: Effect of pH on single or fractionated heat treatment at 42—45℃. Cancer Res 43: 1163—1167, 1983
14) Goldin EM, Leeper DB: The effect of low pH on thermotolerance induction using fractionated 45℃ hyperthermia. Radiat Res 85: 472—479, 1981
15) Nielsen OS, Overgaard J: Effect of extracellular pH on thermotolerance and recovery of hyperthermic damage in vitro. Cancer Res 39: 2772—2778, 1979
16) Henle KJ, Dethelfsen LA: Time-temperature relatinships for heat-induced killing of mammalian cells. Ann New York Acad Sci 335: 234—253, 1980
17) Li GC, Cameron RB, Sapareto SA, Hahn GM: Reinterpretatin of arrhenius analysis of cell inactivation by heat. Natl Cancer Inst Monogr 61: 111—113, 1982
18) Sideris EG, Mukherjee R, Vomvoyanni V: Effect of deuterium water on the mitotic cycle, the deoxyribonucleic acid stability, and the frequency of radiation-induced chromosome aberrations in barley. Radiat Res 61: 457—467, 1975
19) Konings AWJ: Development of thermotolerance in mouse fibroblast LM cells with modified membranes and after procaine treatment. Cancer Res 45: 2016—2019, 1985
20) Boonstra J, Schamhart DHJ, Laat SW, et al: Analysis of K^+ and Na^+ transport and intracellular contents during and after heat shock and their role in protein synthesis in rat hepatoma cells. Cancer Research 44: 955, 1984
21) Shiraishi N, Akiyama S, Nakagawa M, et al: Effect of Bisbenzylisoquinoline (Biscoclaurine) Alkaloids on Multidrug Resistance in KB Human Cancer Cells. Cancer Res 47: 2413—2416, 1987