



Title	Adriamycinの細胞内取り込みへのhyperthermiaの影響
Author(s)	川崎, 祥二; 佐々木, 功典; 長岡, 栄 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1984, 44(5), p. 727-731
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/17369
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Adriamycin の細胞内取り込みへの hyperthermia の影響

山口大学医学部放射線医学教室

* 山口大学医学部第2病理学教室

川崎 祥二 佐々木功典* 長岡 栄
 江部 和勇 中西 敬 高橋 学*

(昭和58年 9月26日受付)

(昭和58年10月17日最終原稿受付)

Increased Accumulation of Adriamycin in Mouse 3T3 Cells with Hyperthermia

Shoji Kawasaki¹⁾, Kohsuke Sasaki²⁾, Sakae Nagaoka¹⁾, Kazuyu Ebe¹⁾,
 Takashi Nakanishi¹⁾ and Manabu Takahashi²⁾

1) Department of Radiology, 2) Department of 2nd Pathology, Yamaguchi University School
 of Medicine, 1144, Ube 755, Japan

Research Code No. : 408

Key Words : Hyperthermia, Adriamycin, Cell progression,
 Flow cytometry

The cellular accumulation of the adriamycin (ADM) was investigated as a function of the concentration and temperature and the duration of heating in exponentially growing culture and G₀ phase of NIH 3T3 cells.

The flow cytometry techniques provide a mechanism for quantitation of the cellular ADM. At 39–44°C, the mean ADM accumulation reached the plateau within 60 min and the mean cellular ADM amount was dependent on temperature of hyperthermia. The increases uptake of mean ADM was continued to 120 min after hyperthermia at 43°C for 30 min. The cellular mean ADM amount was influenced by the concentration of ambient ADM.

The mechanisms of ADM action were discussed on the bases of these results.

緒 言

癌の治療を目的とする Hyperthermia (以下加温) の基礎的研究は、広範囲に行なわれ、数多くの知見が得られている¹⁾²⁾。加温が行なわれる際の条件として、pH、熱耐性、細胞周期等が加温の効果と大きく左右する因子として報告されている^{3)~6)}。癌治療へ加温を応用する試みが、近年急速に進みつつある背景には、① 加温の殺細胞効果、② 放射線照射との併用による増感効果、③ 各種制癌剤との併用による増感効果等があげられる。

現在、癌の治療に数多くの制癌剤が使用されて

いるが、それら制癌剤の腫瘍組織に対する効果を決定するには、薬剤が目的とする腫瘍細胞にどれほど到達し、どれほど取り込まれるかということが重要である。又、加温にともなう制癌剤の増感効果が言われているが、① 加温にともなう制癌剤、取り込み量の変化、② 加温による制癌剤の効果の変更が考えられる。従って、細胞への制癌剤取り込みや、細胞動態での制癌剤の作用の関連性を明らかにすることができれば、加温との併用による薬剤の増感機序を明らかにすることができ、腫瘍への効果的な治療が期待できる。

Adriamycin (ADM) は、強力な制癌効果と広い制癌スペクトルを有しており、単独でも他剤との併用でも、最も高頻度で使用されている制癌剤のひとつである。しかしながら、細胞レベルでのADMの取り込みについての研究は極めてすくない。

著者らは、flow cytometry (FCM) にてADMの取り込みを検討した。

方法及び材料

① 細胞

NIH 3T3 細胞 (Temple 大学 R. Baserga 教授から分与) は、Dulbecco's modified Eagle medium (日水製薬) に10% calf serum (Gibco), ペニシリン(100単位/ml), ストレプトマイシン(100 μ g/ml)を加えた培養液にて継代培養した。この細胞は、対数増殖期では18時間の倍加時間で増殖する。増殖期の細胞は、10%血清培地に、播種48時間後に実験に使用した。又、NIH 3T3 細胞は1%の低血清培地で4日間培養すると、3H-TdR24時間標識率0.5%以下となり、殆ど増殖がみられなくなる。この状態の細胞をG₀細胞として用いた⁷⁾。

② ADM

ADM (Farmitalia 社より供与) は、実験の都度、上記培養液に溶解し、最終濃度2, 4, 6及び10 μ g/mlで、及び処理時間30, 60, 90, 120分で使用した。平均ADM量は、FCMにて得られた曲線の積分値を測定した細胞数で割り、1細胞当りのADM量を平均ADM量として表わした。

結 果

① ADMの細胞への取り込みのFCM:

37°CでのG₀期細胞のADMの取り込みを経時的に観察した(Fig. 1)。ADM無処理の細胞では、その蛍光は、ほとんどみられなかった。ADMで処理すると、1細胞当りのADM取り込み量を測定することができる。10 μ g/ml ADM30分処理群では、Fig. 1にみられる如く、各細胞によって大きく異っているが、略々正規分布を示している。同処理を60, 90, 120分間行なうと、この正規分布曲線のピークが移動し、細胞当りのADM量の増加が認められた。

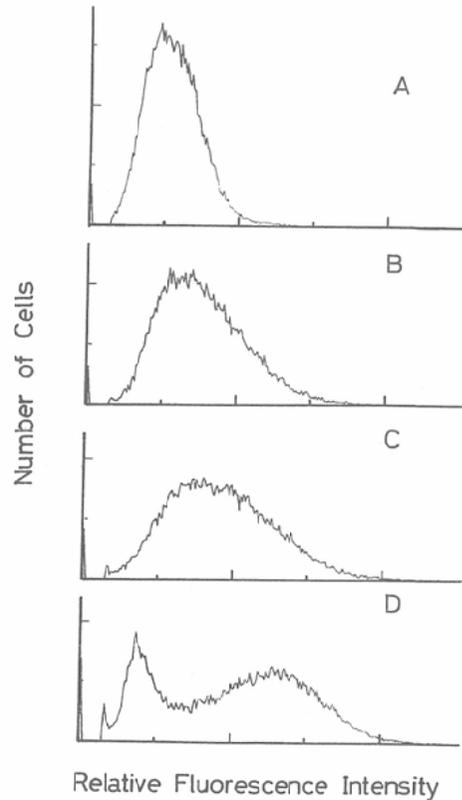


Fig. 1 Fluorescence profiles of G₀ cells of NIH 3T3 strain after the treatment of adriamycin (10 μ g/ml). Incubation time were 30 min (A), 60min (B), 90min (C) and 120min (D). Adriamycin was added in culture medium. Incubation was carried out at 37°C under the saturatedly humidified condition of 5% CO₂+95% air.

② 各温度による ADM 取り込みの変化:

G₀期の細胞で培養液中にADMを添加直後37°C, 39°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°Cにて加温し、ADMの細胞内取り込みを観察した(Fig. 2)。37°Cで観察されたADMの細胞への取り込みは加温により増強される。加温、39°Cでも、ADMの取り込みはすでに増強し、41, 42, 43及び44°Cと温度の増加にともなって、ADM取り込みの増加が認められた。

③ ADM 処理濃度と取り込みの関係:

ADM 処理濃度を2, 4, 6及び10 μ g/mlと変化させて取り込み量を観察した(Fig. 3)。ADMの各濃度とも最初の30分間は急激に取り込むが、そ

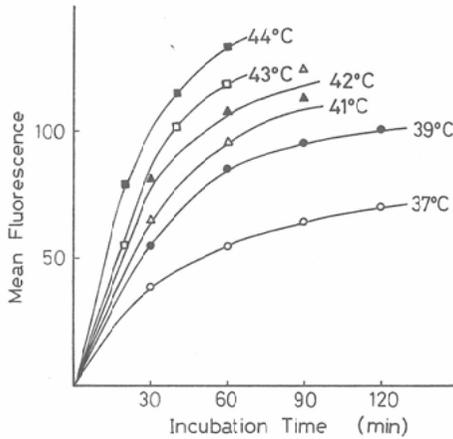


Fig. 2 Effect of time and temperature on uptake and content of adriamycin by G_0 cells of NIH 3T3 strain. G_0 cells of NIH 3T3 strain were incubated at 37, 39, 41, 42, 43 and 44°C with 10 μ g/ml of adriamycin.

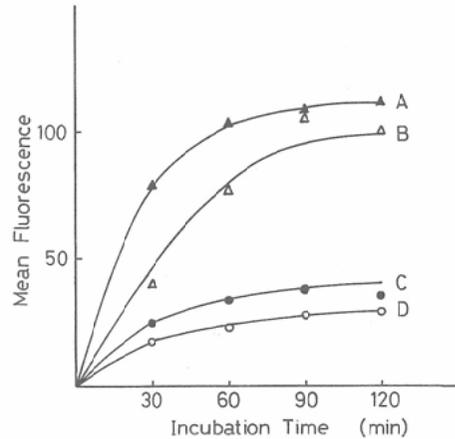


Fig. 4 Accumulation of adriamycin (10 μ g/ml) by G_0 cells and exponentially growing cells of NIH 3T3 strain. Cells were incubated at 37°C after hyperthermia (43°C, 30min). A; G_0 cells with hyperthermia, B; G_0 cells without hyperthermia, C; exponentially growing cells with hyperthermia, D; exponentially growing cells without hyperthermia.

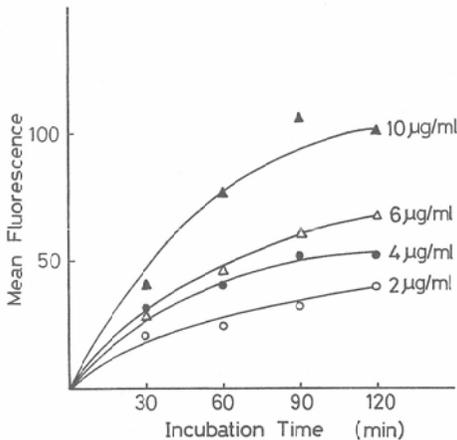


Fig. 3 Accumulation of adriamycin by G_0 cells of NIH 3T3 strain. Cells were incubated at 37°C with various concentrations of adriamycin.

の後、細胞内濃度は漸増し約2時間処理で、ほぼプラトーとなり ADM の処理濃度にともない、細胞あたり ADM 平均取り込み量の増加が認められた。

④ 細胞状態と ADM の取り込み：

対数増殖期細胞と G_0 期細胞の ADM の取り込みを比較した。Fig. 4 に示す如く、 G_0 期細胞が対数増殖期細胞よりも多くの ADM を取り込むことが認められた。又、43°C、30 分間加温後、37°C

での ADM の取り込みは対数増殖期細胞、 G_0 期細胞共に増加し、加温の効果が残っていることが認められた。

考 察

加温の殺細胞作用は、いろいろの薬剤により増強されることが報告されている^{8)~10)}。なかでも、癌の化学療法に使用される Bleomycin, Mitomycin C, Cis-platinum, ADM 等との併用により、著しい増感効果が注目されている^{11)~14)}。ADM は、488 nm の波長で励起されると、556nm と 562nm とに peak を呈する蛍光を発する。FCM にて蛍光量を測定することにより、細胞1つ当りの ADM 量を測定できる¹⁰⁾。ADM の細胞への取り込み及び分布は、autoradiography を使用することにより得られるが、組織標本の作製にかなりの時間と手間が必要であり、切片作製の仕方等で取り込み量が不正確になりやすい。一方、FCM による取り込み量の測定は、容易に1つ1つの細胞の取り込み量の分布を得ることができる。FCM にて測定された細胞 ADM 量の分布は Fig. 1 に示す如く、広範囲に分布している。この分布曲線から平均 ADM 量を求め、その経時的変化を観察すると、処理開

始してから比較的早期(60分以内)に大量の ADM の取り込みが認められる。この平均 ADM 量は、ADM の処理濃度に依存している (Fig. 3)。このことは、ADM の効果が ADM の処理濃度に依存するであろうことを示唆するものである¹⁶⁾。加温にともない ADM の細胞への取り込みが著しく促進されており (Fig. 2)、加温による ADM の増強作用機序の1つとして ADM の取り込み量の増大が考えられる¹⁸⁾。今後、加温による ADM 取り込みの増大と、その殺細胞効果との関係を検討する必要があるが、加温が39°Cで行なわれても ADM の細胞内取り込みが増加していることは注目すべきことと考えられる。平均 ADM 量の取り込みは、処理温度に依存し増加することが認められた。一方、加温処理 (43°C, 30分) 後、37°Cで ADM の取り込みを観察した場合、ADM の取り込みが多いことは加温後も加温の効果が細胞に残存していることを意味している。又、加温にともない細胞骨格の変化が認められており¹⁹⁾、その上細胞膜を変化させる麻酔薬は加温の効果を増強することが報告されている²⁰⁾²¹⁾。これらのことから、加温にともない細胞膜の変化が引き起こされ、膜の透過性を増大させた結果、ADM の取り込みが増大することが暗示される。一方、細胞動態から ADM の取り込みを観察すると、G₀期の細胞が対数増殖期にある細胞よりも、はるかに多くの ADM を取り込むことが認められた (Fig. 4)。細胞内に取り込まれた ADM は DNA と結合して作用すると考えられるので、増殖期にある細胞群程、ADM の取り込みが多いのではないかと著者等は予想していたが、これとは矛盾する結果が得られた。この点については、今後、検討を加えていきたい。

結 論

Hyperthermia (加温) にともない、培養細胞、マウス NIH 3T3 細胞への Adriamycin (ADM) の取り込みを flow cytometry (FCM) にて測定し、次のような結果を得た。

1. G₀期の NIH 3T3 細胞に処理温度37, 39, 41, 42, 43及び44°Cにて ADM 処理 (10 μ g/ml) を併せ行なうと、37°Cに比較し、いずれの場合も ADM

の細胞内取り込みが増加する。

2. ADM の各処理濃度 (2, 4, 6 及び10 μ g/ml) における37°Cでの取り込みは、ADM の濃度にしたがって増加する。

3. 対数増殖期細胞は、G₀期細胞に比較して取り込みが少ない。

4. 43°C, 30分処理後、ADM (10 μ g/ml) を培地に加えた場合も、ADM の取り込みが増加する。

以上のことについて若干の考察を加えた。

この研究は、放射線影響協会研究奨励助成金並びに、厚生省癌研究助成金 (田中班) の援助を受けた。ここに感謝の意を表明する。

文 献

- 1) 奥村 寛: Hyperthermia の医学生物学的基礎。放射線生物研究, 15: 32-47, 1980
- 2) 宮越順二: Hyperthermia の細胞生物学。放射線生物学研究, 18: 105-122, 1983
- 3) Gerweck, L.E.: Modification of cell letharity at elevated temperatures the pH effect. Rad. Res., 70: 224-235, 1977
- 4) Harisiadis, L., Sung, D. and Hall, E.J.: Thermal tolerance and repair of thermal damage by cultured cells. Radiology, 123: 505-510, 1977
- 5) Westra, A. and Dewey, W.C.: Variation in sensitivity to heat shock during the cell-cycle of Chinese hamster cells in vitro. Int. J. Rad. Biol., 19: 467-477, 1971
- 6) Gerweck, L.E., Gillette, E.L. and Dewey, W.C.: Killing of Chinese hamster cells in vitro by heating under hypoxic or aerobic conditions. Eurp. J. Cancer, 10: 691-693, 1974
- 7) Kawaski, S., Diamond, L. and Baserga, R.: Induction of cellular deoxyribonucleic acid synthesis in butyrate-treated cells by silian virus 40 deoxyribonucleic acid. Mol. Cell. Biol., 1: 1038-1047, 1981
- 8) Kim, S.H., Kim, J.H. and Hahn, E.W.: Selective potentiation of hyperthermic killing of hypoxic cells by 5-thio-D-glucose. Can. Res., 38: 2935-2936, 1978
- 9) Gloria, C.L., Hahn, G.M. and Shice, E.C.: Cytotoxicity of commonly used solvents at elevated temperature. J. Cell. Physiol., 93: 331-334, 1977
- 10) Stratford, I.J. and Adams, G.E.: Effect of hyperthermia on differential cytotoxicity of hypoxic cell radiosensitizer Ro-07-0582 on mammalian cells in vitro. Grit. J. Can., 35: 307-313, 1977

- 11) Hahn, G.M., Broun, J. and Har-Kedar, I.: Thermochemotherapy; synergism between hyperthermia (42-43°C) and adriamycin (or bleomycin) in mammalian cell inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 72: 937-940, 1975
- 12) Morgan, J.E., Honess, D.J. and Bleehen, N.M.: The interaction of thermal tolerance with drug cytotoxicity in vitro. *Brit. J. Can.*, 39: 422-428, 1979
- 13) Barlogic, B., Corry, P.M. and Drewinko, B.: In vitro thermochemotherapy of human colon cancer cells with cis-dichlorodiamineplatinum (II) and mitomycin C. *Can. Res.*, 40: 1165-1168, 1980
- 14) Meyn, R.E., Corry, P.M., Fletcher, S.E. and Demetriades, M.: Thermal enhancement of DNA damage in mammalian cells treated with cis-dichlorodiamineplatinum (II). *Can. Res.*, 40: 1136-1139, 1980
- 15) Teicher, D.A., Kawol, C.D., Kennedy, K.A. and Sartorelli, A.C.: Enhancement of hyperthermia of the in vitro cytotoxicity of mitomycin C toward hypoxic tumor cells. *Can. Res.*, 41: 1096-1099, 1981
- 16) 佐々木功典, 川崎祥二, 長岡 栄, 中西 敬, 高橋 学: Flow cytometryによるAdriamycin取り込み排出の解析. *日本癌治雑誌*, (投稿中)
- 17) Durand, R.E.: Flow cytometry studies of intracellular adrimaycin in multicell spheroid in vitro. *Can. Res.*, 41: 3495-3498, 1981
- 18) Hahn, G.M. and Strande, D.P.: Cytotoxic effects of hyperthermia and adriamycin on Chinese hamster cells. *J. Natl. Can. Inst.*, 57: 1063-1067, 1976
- 19) Kawasaki, S., Nishioka, M. and Nakanishi, T.: Changes of microfilament of mammalian cells with treatment of hyperthermia or irradiation. *J. Rad. Res.*, 24: 39, 1983
- 20) Yatvin, M.B.: The influence of membrane lipid composition and procaine on hyperthermic death of cells. *Int. J. Rad. Biol.*, 32: 513-521, 1977
- 21) Dennis, W.H. and Yatvin, M.B.: Correlation of hyperthermic sensitivity and membrane microviscosity in *E. coli* K1060. *Int. J. Rad. Biol.*, 39: 265-271, 1981