



|              |                                                                                     |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 制がん剤による温熱耐性細胞の温熱増感効果及び温熱耐性出現の阻止効果                                                   |
| Author(s)    | 古家, 雅代                                                                              |
| Citation     | 日本医学放射線学会雑誌. 1986, 46(12), p. 1429-1438                                             |
| Version Type | VoR                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/17469">https://hdl.handle.net/11094/17469</a> |
| rights       |                                                                                     |
| Note         |                                                                                     |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 制がん剤による温熱耐性細胞の温熱増感効果及び 温熱耐性出現の阻止効果

大阪市立大学医学部解剖学教室

古 家 雅 代

(昭和61年 6 月 5 日受付)

(昭和61年 7 月21日最終原稿受付)

### Effects of Anti-Tumor Drugs on Thermosensitivity of Thermotolerant Cells and on Thermotolerance Development

Masayo Furukawa-Furuya

Department of Anatomy Osaka City University School of Medicine

---

Research Code No. : 407.3, 752

---

Key Words : Hyperthermia, Chemical inhibition of thermotolerance, Chemical thermoenhancement

---

Effects of anti-tumor drugs, Peplomycin and Mitomycin C, on the thermotolerance development of Chinese hamster V-79 cells and on the thermosensitivity of the thermotolerant cells were examined by the surviving colony formation *in vitro*. Remarkable thermoenhancement to the thermotolerant cells appeared by the treatment with these drugs. Complete inhibition against thermotolerance development was observed by fully continuous treatment with the drugs during the 42°C—44°C step-up heating. It could be stressed that the present concentration of Mitomycin C for the results mentioned was of clinical use. It was suggested that the combined treatments with hyperthermia and anti-tumor drugs were useful in the cancer treatment.

#### I. 緒 言

温熱療法はそれ単独でも殺細胞効果が認められるが、放射線或いは化学療法剤との併用による集学的治療としても広く用いられている。基礎的実験において、温熱と化学療法剤との併用処理ではアルキル化剤<sup>1)~5)</sup>、Bleomycin<sup>6)~8)</sup>、Peplomycin<sup>9)</sup>、Adriamycin<sup>6)10)</sup>、Mitomycin C<sup>11)</sup>及び Cisplatin<sup>11)</sup>等との相乗効果が認められている。又、制がん剤以外の薬剤である電子親和性物質<sup>12)</sup>、抗真菌剤<sup>13)</sup>及び Benzaldehyde 誘導体<sup>14)15)</sup>との併用処理においても相乗効果が報告されている。

一方、温熱の生物学的影響のうちでがん温熱療法にとっても重要な現象として温熱耐性の出現がある。温熱耐性とは、初めに比較的致死率の少な

い温熱処理を行うと2回目の温熱処理において温熱感受性が低下することを言う。温熱耐性は43°Cの上と下の両温度域でおのおのその出現の様相に差異が認められる。すなわち、43°C以下の温度域(low hyperthermia)では加温処理中に温熱耐性が誘導され、これに続く加温に対して抵抗性になる<sup>16)~18)</sup>。一方、43°C以上の温度域(high hyperthermia)では加温処理後37°Cに incubate することによって温熱耐性が徐々に出現し、約8~12時間でその最大値に達し、24~36時間まで保持され、その後消失していく<sup>16)19)</sup>。また、温熱耐性の出現と heat shock protein (HSP と略す)の合成が密接に相関しているという報告がある<sup>20)~25)</sup>。HSPは大腸菌、酵母、ショウジョウバエから哺乳動物細

胞まで見られ、20k~120k ダルトンの分子量を示し、数十種見つけられている。HSP の機能はまだよくわかっていないがある分画の HSP は一定の障害から細胞を保護する働きがあるのではないかと考えられている。温熱耐性の出現は臨床上の問題点となっている。この温熱耐性の出現に対して既存の制がん剤がどのように相互作用を示すかを知することは重要なことだと考えられる。

この報告では、low hyperthermia によって導かれる温熱耐性の出現に対する制がん剤の作用について培養細胞の集落形成能を指標に実験を行ない、生体内腫瘍についても同様の結果が期待されることを示唆した。

## II. 材料と方法

細胞：全ての実験は Chinese hamster V-79 細胞培養株を用いて行われた。

培地：増殖培地は1000ml 中に730ml/Eagle's MEM 培地（日水）、20ml/2.5% Lactalbumin 水解物溶液(Difco)、100ml/NCTC-135 培地(Difco)及び150ml/非働化成人血清(Gibco)を含む混液を用いた(以下、MLN-15 と呼ぶ)。MLN-15に続く数字は、血清の体積%を示している。

温熱：加温は42℃及び44℃に設定した恒温槽で行った。恒温槽はモデル ESP-47（東京製作所）を用いた。この恒温槽の温度は±0.05℃以内の誤差範囲で制御できる。

薬剤：Peplomycin（日本化薬 K.K., 以下 PEP と呼ぶ）は10μg/ml の濃度で、又 Mitomycin C（協和発酵 K.K., 以下 MMC と呼ぶ）は0.05μg/ml 及び0.2μg/ml の最終濃度で MLN-3 に溶解して用いた。

培養及び実験条件：細胞は Falcon 製ポリスチレン樹脂ねじ栓40ml 用フラスコに播種され、ねじ栓をゆるめて18時間6ml の増殖培地とともに CO<sub>2</sub> incubator (37℃) で単層培養された。加温を含む種々の処理はすべて単層培養細胞が付着したフラスコ中に MLN-3 又は薬剤溶液を満ちし、これを所定の温度の恒温槽に所定の期間浸して行なった。

指標：所定の実験処理が終わった全てのフラスコには6ml の増殖培地(MLN-15)を注入し、再び

ねじ栓をゆるめて CO<sub>2</sub> incubator 内に 5~10 日間培養し、集落形成法によりその細胞生存率を colony forming units (C.F.U.) で算定した。細胞温熱感受性を表すための指標として用いた To 値は、処理時間~生存率曲線の指数減少部分（片対数グラフ紙上では直線部分）で生存率を1/e に減少させるに要する時間を言う。

## III. 結果

### (1) 温熱耐性の出現

42℃加温を行うと、片対数グラフ紙上の処理時間~生存率曲線は2~3時間で勾配がゆるくなり、二相性となった (Fig. 1a)。

42℃ 2時間加温後、ただちに44℃ (step-up) 加温を行うと、その対照である44℃単独加温の To 値7.25分に比べて、42℃加温生存細胞の温熱感受性は約1/4.5に低下し、その To 値は32.50分を示し、抵抗性となった (Fig. 1b)。

### (2) 42℃加温と薬剤の併用

PEP 10μg/ml と42℃加温とを同時に併用すると、2D の生存率曲線が得られた。2A 及び2B はそれぞれ42℃単独加温及び37℃で PEP 処理を行った場合の生存率曲線を示し、2C は2A と2B の理論的積算値を表している。すなわち、PEP と42℃とを同時に併用することによって相互効果が見られるが、3時間以上併用処理を続けると、処理時間~生存率曲線に水平化傾向が見られた (Fig. 2)。

同様に、MMC 0.05μg/ml と42℃処理を併用すると、著しい相互効果が見られるが、3時間以上併用処理を続けると処理時間~生存率曲線の勾配はゆるくなり折れ曲る (Fig. 3)。

### (3) 44℃加温と薬剤の併用

37℃で PEP 10μg/ml 処理を行うと、50分まではわずかな殺細胞効果しか示さなかった。一方、44℃単独加温は To 値7.25分を示した。PEP 10μg/ml と44℃加温を同時に併用すると To 値は3.75分となり、細胞温熱感受性は約2倍に増感された (増感率=44℃単独加温の To 値/PEP, 44℃同時併用の To 値=7.25分/3.75分=1.93) (Fig. 4)。

同様の実験を MMC 0.05μg/ml 及び0.2μg/ml を用いて行なった。この両濃度の MMC を37℃で

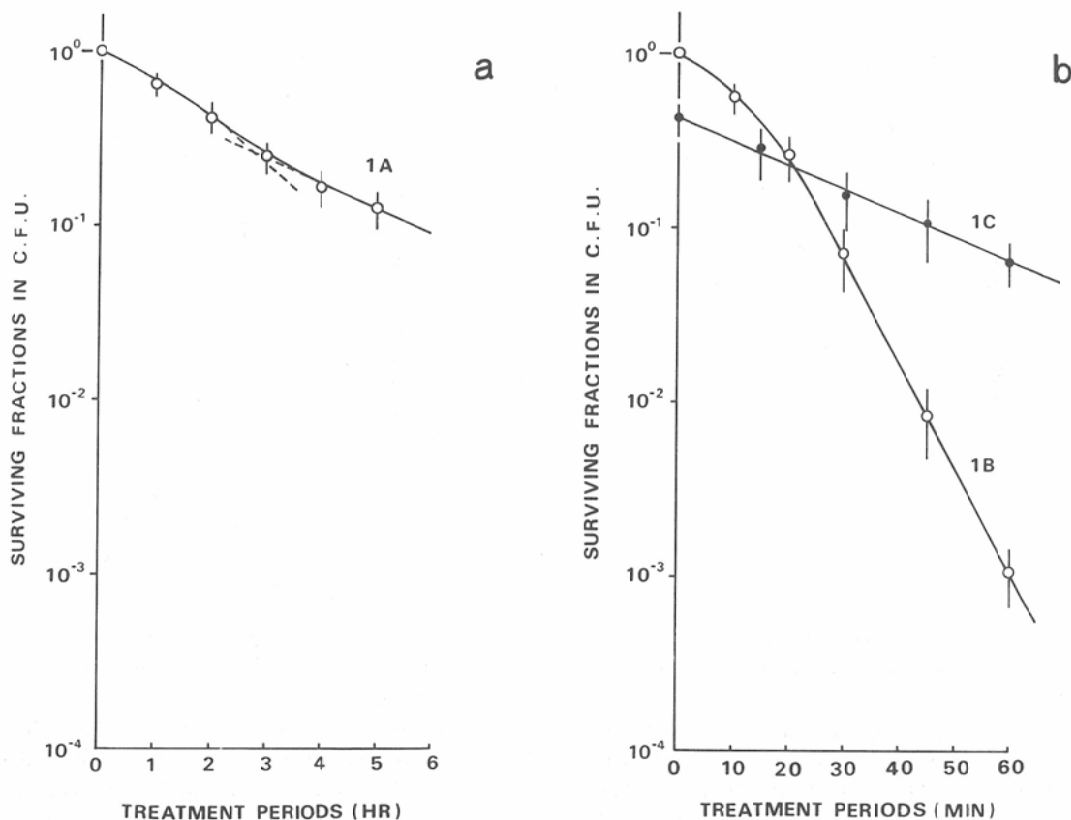


Fig. 1a 42°C immersion periods-survival curve.

Ordinate: surviving fractions in C.F.U.. Abscissa: hours at 42°C. Monolayer cultures of Chinese hamster V-79 cells were immersed in water bath at 42°C. Development of thermotolerance was observed. Bars of symbols represent standard deviations.

Fig. 1b 44°C immersion periods-survival curves of control V-79 cells (open circles, 1B) and the preheated cells (closed circles, 1C).

Ordinate: surviving fractions in C.F.U.. Abscissa: minutes at 44°C. The preheated cells were conditioned by immersion in water bath at 42°C for 2 hours immediately prior to 44°C heating. Monolayer cultures of control and the preheated V-79 cells were immersed at 44°C in water bath. Reduced slope of the preheated cells showed transitional thermotolerance to 44°C heating which was developed through 42°C preheating. Bars of symbols represent standard deviations.

処理しても1時間まではわずかな殺細胞効果しか示さなかった。MMCと44°C加温を同時に併用すると明らかに濃度に依存する増感効果が認められた。MMC  $0.05\mu\text{g/ml}$  又は  $0.2\mu\text{g/ml}$  と44°C加温の同時併用処理の  $T_0$  値はそれぞれ5.75分及び4.25分となった(それぞれ増感率は7.25分/5.75分=1.26及び7.25分/4.25分=1.71)(Fig. 5)。

#### (4) Step-up 加温と薬剤の併用

この報告における step-up 加温と薬剤との併用は

- a) 42°C (2時間) → 44°C + 薬剤(種々の期間)
- b) 42°C + 薬剤(2時間) → 44°C (種々の期間)
- c) 42°C + 薬剤(2時間) → 44°C + 薬剤(種々の期間)

の3種の sequences で試みられた。a) の sequence では、42°C 2時間処理によって温熱耐性が出現し

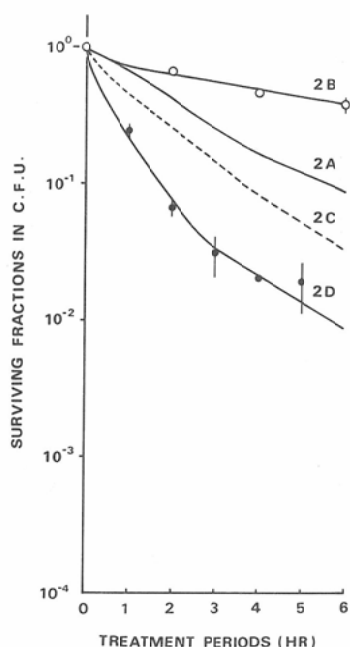


Fig. 2 PEP treatment periods-survival curves of V-79 cells.

Ordinate: surviving fractions in C.F.U.. Abscissa: treatment periods (hours). 2A: 42°C alone (Fig. 1a) (solid line). 2B: PEP in 10µg/ml at 37°C (open circles). 2C: estimated survivals from 42°C and PEP 10µg/ml (2A×2B) (broken line). 2D: PEP in 10µg/ml at 42°C (closed circles). Enhanced cell killing was observed in simultaneous treatments of the heat and the drug which was shown as a difference between 2C and 2D. Bars of symbols represent standard deviations.

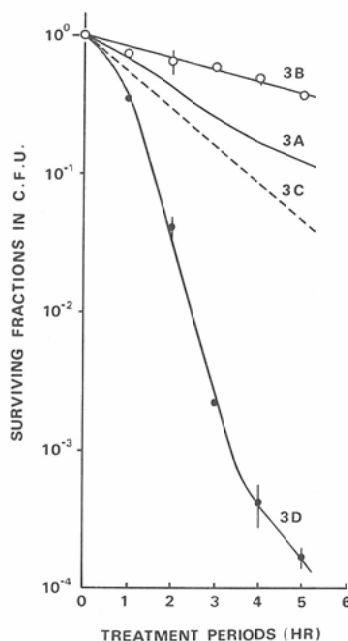


Fig. 3 MMC treatment periods-survival curves of V-79 cells.

Ordinate: surviving fractions in C.F.U.. Abscissa: treatment periods (hours). 3A: 42°C alone (Fig. 1a) (solid line). 3B: MMC in 0.05µg/ml at 37°C (open circles). 3C: estimated survivals from 42°C and MMC 0.05µg/ml (3A×3B) (broken line). 3D: MMC in 0.05µg/ml at 42°C (closed circles). Enhanced cell killing was observed in simultaneous treatments of the heat and the drug. Bars of symbols represent standard deviations.

た細胞（以下、いずれも温熱耐性細胞と呼ぶ）に44°C加温を行う際に薬剤を併用し、b)のsequenceでは、42°C加温中に薬剤を併用することによる温熱耐性の出現に対する薬剤の影響を引き続く44°C加温によって観察し、c)のsequenceでは、step-up加温中を通じて薬剤と同時併用した。

#### a) 42°C (2時間)→44°C+薬剤(種々の期間)

温熱耐性細胞を37°Cで PEP 10µg/ml 処理すると、その初めの15～30分には対照群の37°C、PEP 単独処理よりは大きな致死効果が見られるが、それ以降は対照 PEP 単独処理群のそれと同様に生存率曲線はほぼ水平化する (Fig. 6)。次に、温熱耐性細胞を44°C加温する際に PEP 10µg/ml を併用すると生存率曲線6Bから生存率曲線6Eまでそ

の勾配が急となり、To 値は対照の step-up 加温の32.50分から7.50分へと著しく減少した (Fig. 6)。この PEP 併用による増感率は4.33(32.50分/7.50分)となり、44°C単独加温にこの濃度の PEP を併用した時に見られる増感率1.93よりも大きかった。

同様の実験は MMC 0.05µg/ml 及び0.2µg/ml を用いても行なわれた。温熱耐性細胞は37°Cで MMC 処理すると、処理時間～生存率曲線の勾配は対照群の37°C、MMC 処理時間～生存率曲線の勾配よりわずかに急となった。又、この曲線の勾配は MMC の濃度に依存しているように見えた (Fig. 7)。温熱耐性細胞を MMC と44°C加温を同時処理すると、44°C加温に対して著しい増感効果

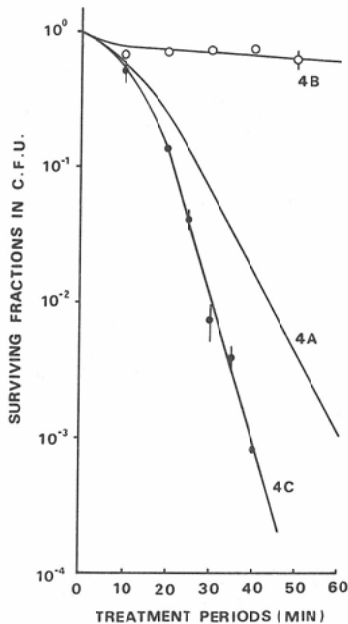


Fig. 4 PEP treatment periods-survival curves of V-79 cells.

Ordinate: surviving fractions in C.F.U.. Abscissa: treatment periods (minutes). 4A: 44°C alone (Fig. 1b) (solid line). 4B: PEP in 10  $\mu$ g/ml at 37°C (open circles). 4C: PEP in 10  $\mu$ g/ml at 44°C (closed circles). Enhanced cell killing was observed in simultaneous treatments of the heat and the drug. Bars of symbols represent standard deviations.

が認められ、MMC 0.05  $\mu$ g/ml 及び 0.2  $\mu$ g/ml 処理群はそれぞれ 9.25 分及び 5.75 分の  $T_0$  値を示し、増感率はそれぞれ 3.51 (32.50 分/9.25 分) 及び 5.65 (32.50 分/5.75 分) となった (Fig. 7).

b) 42°C + 薬剤 (2 時間) → 44°C (種々の期間)

42°C 2 時間加温と PEP 10  $\mu$ g/ml とを同時に併用し、続いて 44°C 加温は drug free で行う群 (8C) においては 42°C 2 時間加温と PEP の同時併用によって相互効果が見られたが、引き続き 44°C 加温についての感受性に対してはわずかな影響が認められた。対照群の step-up 加温の  $T_0$  値 32.50 分に比べ、8C のそれは 20.25 分を示した (Fig. 8).

42°C 2 時間加温と MMC 0.05  $\mu$ g/ml との同時併用に続いて、44°C 加温を drug free で行えば (9C), 42°C 加温と MMC 同時併用によって相互効果が認められたが、引き続き 44°C 加温についての感

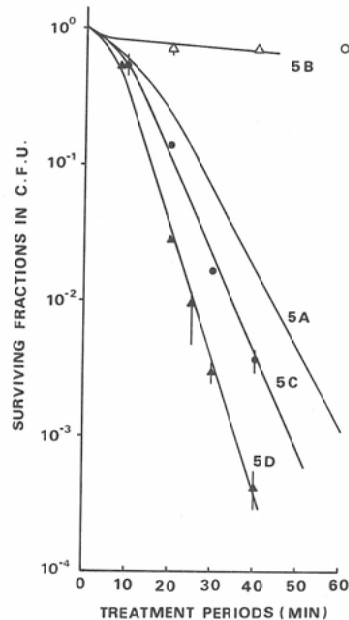


Fig. 5 MMC treatment periods-survival curves of V-79 cells.

Ordinate: surviving fractions in C.F.U.. Abscissa: treatment periods (minutes). 5A: 44°C alone (Fig. 1b) (solid line). 5B: MMC in 0.05  $\mu$ g/ml at 37°C (open circle) and in 0.2  $\mu$ g/ml at 37°C (open triangles). 5C: MMC in 0.05  $\mu$ g/ml at 44°C (closed circles). 5D: MMC in 0.2  $\mu$ g/ml at 44°C (closed triangles). Enhanced cell killing was observed in simultaneous treatments of the heat and the drug. Bars of symbols represent standard deviations.

受性は加温時間 40~60 分間の範囲内ではその影響が認められなかった (Fig. 9).

c) 42°C + 薬剤 (2 時間) → 44°C + 薬剤 (種々の期間)

Step-up 加温期間を通じて PEP 10  $\mu$ g/ml を同時に併用し続けた。この 44°C 処理時間~生存率曲線には 44°C 単独加温と同様の肩が現われ (8D),  $T_0$  値は対照群の step-up 加温の 32.50 分に比べ、6.50 分と著しく減少し、増感率は 5.00 (32.50 分/6.50 分) となった (Fig. 8).

同様の実験を MMC 0.05  $\mu$ g/ml を用いて行った。PEP と同様、生存率曲線には肩が現われ (9D),  $T_0$  値は 4.75 分を示し、増感率は 6.84 (32.50 分/4.75 分) となった (Fig. 9).

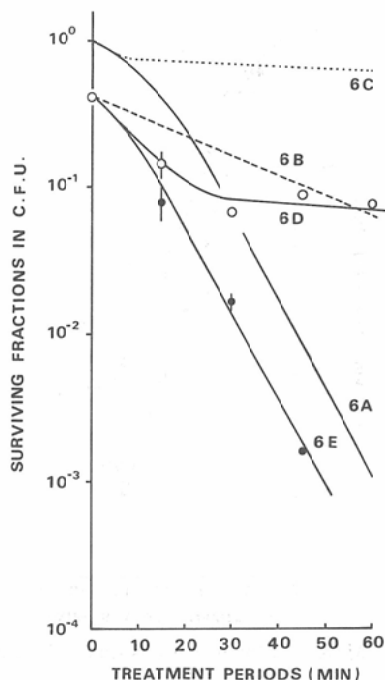


Fig. 6 PEP treatment periods-survival curves of control and 42°C preheated V-79 cells.

Ordinate: surviving fractions in C.F.U.. Abscissa: treatment periods (minutes). 6A: 44°C alone (Fig. 1b) (solid line). 6B: step-up heating of 42°C for 2 hours followed by 44°C for graded periods (Fig. 1b) (broken line). 6C: PEP in 10 µg/ml at 37°C (Fig. 4) (dotted line). 6D: 42°C for 2 hours alone followed by PEP in 10 µg/ml at 37°C for graded periods (open circles). 6E: 42°C for 2 hours alone followed by PEP in 10 µg/ml at 44°C for graded periods (closed circles). Thermotolerant cells after 42°C for 2 hours alone were thermo-enhanced by simultaneous PEP treatment with 44°C heating in 6E. The thermotolerant cells showed enhanced PEP sensitivity at 37°C for the first 30 minutes followed by the same sensitivity to the control PEP treatment at 37°C. Bars of symbols represent standard deviations.

#### IV. 考 察

温熱と薬剤との併用効果については、既に多くの報告が見られ<sup>1-15)</sup>、PEP<sup>8,9)</sup>又は、MMC<sup>11)</sup>と温熱との併用における増感効果についても報告されている。この報告においては制がん剤による温熱耐性の阻止に基づく化学的温熱増感の可能性について培養細胞の集落形成能を指標に明らかにし、生

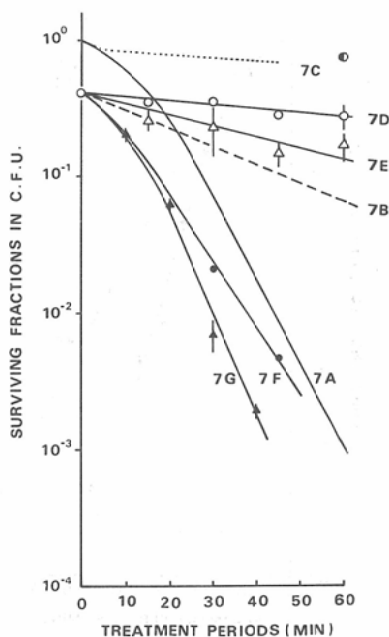


Fig. 7 MMC treatment periods-survival curves of control and 42°C preheated V-79 cells.

Ordinate: surviving fractions in C.F.U.. Abscissa: treatment periods (minutes). 7A: 44°C alone (Fig. 1b) (solid line). 7B: step-up heating of 42°C for 2 hours followed by 44°C for graded periods (Fig. 1b) (broken line). 7C: MMC in 0.05 µg/ml at 37°C (semiclosed circle) and in 0.2 µg/ml at 37°C (dotted line) (Fig. 5). 7D: 42°C for 2 hours alone followed by MMC in 0.05 µg/ml at 37°C for graded periods (open circles). 7E: 42°C for 2 hours alone followed by MMC in 0.2 µg/ml at 37°C for graded periods (open triangles). 7F: 42°C for 2 hours alone followed by MMC in 0.05 µg/ml at 44°C for graded periods (closed circles). 7G: 42°C for 2 hours alone followed by MMC in 0.2 µg/ml at 44°C for graded periods (closed triangles). Thermotolerant cells after 42°C for 2 hours alone were thermo-enhanced by simultaneous MMC treatment with 44°C heating in 7F and 7G. The thermotolerant cells (7D and 7E) showed similar MMC sensitivities at 37°C to control MMC treatment (7C). Bars of symbols represent standard deviations.

体内腫瘍温熱治療においても同様の可能性が期待されることを示唆した。

(1) 42°C加温による細胞致死実験においては、加温期間は5時間までのいろいろな期間が採用さ

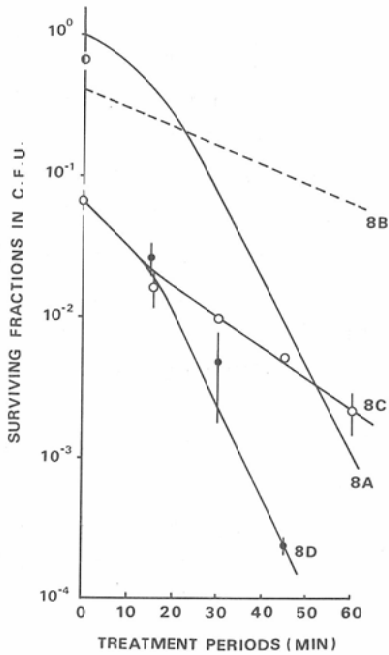


Fig. 8 PEP treatment periods-survival curves of V-79 cells.

Ordinate: surviving fractions in C.F.U.. Abscissa: treatment periods (minutes). 8A: 44°C alone (Fig. 1b) (solid line). 8B: step-up heating of 42°C for 2 hours followed by 44°C for graded periods (Fig. 1b) (broken line). 8C: PEP in 10  $\mu$ g/ml at 42°C for 2 hours followed by 44°C alone for graded periods (open circles). 8D: PEP in 10  $\mu$ g/ml at 42°C for 2 hours followed by PEP at 44°C for graded periods (closed circles). Semiclosed circle represents survival from PEP in 10  $\mu$ g/ml at 37°C for 2 hours. Thermotolerance as shown in 8B was apparently inhibited by the simultaneous PEP treatment through the step-up heating in 8D. Bars of symbols represent standard deviations.

れたが、同様の実験を44°Cで行う場合には60分までのいろいろな加温期間が採用された。熱エネルギー量は絶対温度を用いた関係式で求められるので42°Cと44°Cの間では実際上の差異はほとんどないとみなすことができるかもしれない。それにもかかわらず、44°Cにおいては42°Cに比べ、極めて短い加温期間中に著明な細胞致死が認められるのは、細胞致死の為に活性化エネルギーが43°C以下で365kcal/mol、43°C以上では148kcal/molであることが原因と考えられる<sup>26)</sup>。

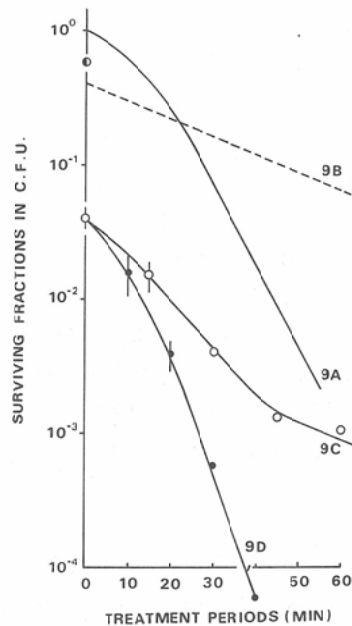


Fig. 9 MMC treatment periods-survival curves of V-79 cells.

Ordinate: surviving fractions in C.F.U.. Abscissa: treatment periods (minutes). 9A: 44°C alone (Fig. 1b) (solid line). 9B: step-up heating of 42°C for 2 hours followed by 44°C for graded periods (Fig. 1b) (broken line). 9C: MMC in 0.05  $\mu$ g/ml at 42°C for 2 hours followed by 44°C alone for graded periods (open circles). 9D: MMC in 0.05  $\mu$ g/ml at 42°C for 2 hours followed by MMC at 44°C for graded periods (closed circles). Semiclosed circle represents survival from MMC in 0.05  $\mu$ g/ml at 37°C for 2 hours. Thermotolerance as shown in 9B was apparently inhibited by the simultaneous MMC treatment through the step-up heating in 9D. Bars of symbols represent standard deviations.

42°C単独加温を行うと、加温期間2～3時間で処理時間～生存率曲線の勾配がゆるくなったことから、42°C加温中に温熱耐性が出現したことが示唆された (Fig. 1a)。

42°C 2時間加温後、44°Cで種々の期間加温するいわゆる step-up 加温においては、44°C温熱感受性が著明に低下し、42°C 2時間加温後生存細胞に温熱耐性が出現したことが認められた。この温熱耐性は42°C加温後、間隔時間なく引き続き44°C加温に対する温度感受性をモニターする系で認めら

れた (Fig. 1b).

すなわち、43℃以上の加温では細胞は極めて短い時間に致死の障害を受け、43℃以下の加温では致死の障害へ到るまでの時間は長く、しかもその期間中に温熱耐性が出現するようである。

(2) この報告において用いた薬剤の濃度は PEP は  $10\mu\text{g/ml}$ 、MMC は  $0.05\mu\text{g/ml}$  及び  $0.2\mu\text{g/ml}$  であった。臨床投与薬剤量は体重 kg あたりに換算すると PEP は  $0.1\sim 0.2\text{mg/kg}$ 、MMC は  $0.04\text{mg/kg}\sim 0.6\text{mg/kg}$  であり、この実験において用いた濃度は、PEP がこの50~100倍相当の濃度であったが、MMC はほぼ臨床投与量相当の濃度域であった。

薬剤と42℃加温を同時に併用処理することにより温熱耐性出現の阻止を試みた。PEP と42℃とで同時に併用処理すると相互効果が認められたが、3時間以上の同処理において、処理時間~生存率曲線に水平化が認められたことから温熱耐性出現の阻止は完全ではなく、むしろ温熱増感効果が示唆された (Fig. 2)。MMC と42℃とで同時併用処理すると、PEP におけるそれよりも著しい相互効果が認められたが、3時間以上の処理において、なお処理時間~生存率曲線の勾配の減弱が認められたことから温熱耐性出現の阻止が完全ではなく、むしろ温熱増感効果が示唆された (Fig. 3)。

(3) 37℃における PEP  $10\mu\text{g/ml}$  による処理時間~生存率曲線は10分以降1時間まではほぼ水平化を示したにもかかわらず、44℃加温と同時併用すると44℃単独加温の  $T_{50}$  値に比べ、この併用処理での  $T_{50}$  値は減少し、相互効果を示した (Fig. 4)。

MMC についても  $0.05\mu\text{g/ml}$  及び  $0.2\mu\text{g/ml}$  共に37℃処理時間~生存率曲線は処理時間20分以降1時間まではほぼ水平化を示したが、44℃加温と同時に併用すると、その濃度に依存して相互効果が著しくなった (Fig. 5)。

(4) 第2回目の加温を第1回目の加温より高い温度で行う事を step-up 加温と呼ぶが、実際上は第1回目の加温を細胞致死の為のいわゆる活性化エネルギーが大きい温度域である43℃以下で、第2回目の加温を活性化エネルギーの小さい43℃以上で行い、实际的に効果的な温熱耐性の出現をは

かる。

a) 42℃加温による温熱耐性細胞はその対照細胞に比べ、37℃での PEP 感受性が高く、PEP 処理開始後初めの15~30分における生存率減少が対照細胞のそれよりも大きい。このことから42℃加温はこれによる 1) 細胞致死、2) 生存細胞の温熱耐性出現及び 3) これに引き続き投与される PEP に対する化学増感の3種の効果を示すことがわかった (Fig. 6)。

42℃加温後の温熱耐性細胞に対して、引き続き44℃加温時に PEP を同時併用すると、PEP によって44℃加温に対する著しい温熱増感効果が認められた (Fig. 6)。

MMC についても、温熱耐性細胞は引き続き44℃加温と MMC の同時併用における温熱増感効果が著明であった (Fig. 7)。

b 及び c) Step-up 加温において、初めの42℃2時間加温中に温熱耐性が出現したと認められたので、この期間に制がん剤の併用を行い、引き続き44℃加温を drug free で行い、温熱耐性出現の阻止を観察した。42℃加温と PEP  $10\mu\text{g/ml}$  との同時併用により相互効果が見られた。その後、44℃単独加温を行うと、その対照群である step-up 加温単独群に比べて  $T_{50}$  値はわずかな減少を示したが、温熱耐性は明らかに出現したことが認められた。しかし、44℃加温中にも引き続き PEP を同時併用 (step-up 加温の全期間を通じての PEP 併用) を行えば、44℃単独加温と同程度までの  $T_{50}$  値の減少として温熱増感効果が見られ、見かけ上温熱耐性の出現が阻止された (Fig. 8)。

同様の実験を MMC  $0.05\mu\text{g/ml}$  を用いて行った。42℃加温と MMC との同時併用によって相互効果が認められ、それに引き続き44℃単独加温を行うと44℃加温期間40分以降は対照群の step-up 加温におけるほぼ同程度の  $T_{50}$  値を示した。すなわち、温熱耐性の出現はその時点以降に認められた。しかし、引き続き44℃加温中にも MMC を同時併用 (step-up 加温全期間を通じての MMC 併用) すれば、44℃単独加温と同程度又はそれ以上の  $T_{50}$  値の減少として温熱増感効果が見られ、見かけ上温熱耐性の出現が阻止された (Fig. 9)。

V-79 細胞において、PEP を50 $\mu$ g/ml という高濃度で37℃で前処理した後、drug free でstep-up 加温を行うと、見かけ上温熱耐性の出現を阻止すると報告されている<sup>8)</sup>。

一方、Chinese hamster ovary (CHO) 細胞において、37℃から42.4℃まで3時間にわたってゆっくり加温することによって著明な温熱耐性が出現する系においては、これにBCNU, Cisplatin, Bleomycin, Adriamycin 又はMethotrexate の併用を行うと、薬剤による細胞致死率の増加が観察されるので、温熱耐性出現の機構は、薬剤の細胞致死作用に対する細胞の抵抗性に関係している機構とは別であると報告されている<sup>27)</sup>。

本報告においては、既に温熱耐性が出現した細胞に対してPEP 又はMMC がいずれも著しい温熱増感作用を示したこと、及びstep-up 加温においてその全期間中を通じてPEP 又はMMC のいずれかが同時併用されれば、温熱耐性出現は見かけ上完全に阻止されたことが述べられた。MMC においては用いられた濃度は臨床投与量水準であることが意味深い。

この報告から臨床がん治療において温熱と制がん剤併用の有効性についての根拠が一部示唆された。

### 要 約

43℃以下のいわゆる low hyperthermia によって導かれる温熱耐性の出現に対する制がん剤の阻止効果及び温熱耐性出現細胞に対する制がん剤の温熱増感効果について培養細胞を用いて実験を行った。Step-up 加温(42℃, 2時間→44℃)期間を通じてPEP 10 $\mu$ g/ml 又はMMC 0.05 $\mu$ g/ml を同時併用処理した場合のいわゆる To 値はおのおの6.50分及び4.75分を示し、control のstep-up 加温時におけるTo 値(32.50分)から44℃単独加温時におけるそれ(7.25分)の領域まで増感され、見かけ上は温熱耐性の出現が阻止された。更に温熱耐性出現細胞に対しても、PEP 10 $\mu$ g/ml 又はMMC 0.05 $\mu$ g/ml 及び0.2 $\mu$ g/ml と44℃との同時併用によっておのおのTo 値7.50分、9.25分及び5.75分と著しい温熱増感作用を示した。用いられたMMC 濃度が臨床投与量水準であることは意

味深い。この報告から臨床がん治療において温熱と制がん剤併用の有効性及びその根拠の一部が示唆された。

この論文は、大阪市立大学医学部解剖学教室山形健三教授の御指導御校閲により脱稿した。研究の遂行にあたっては福井医科大学放射線基礎医学教室加納永一教授の御助言に負うところが大きい。ここに記して、深甚の謝意を表明する。

### 文 献

- 1) Suzuki, A.: Application of heat to cancer chemotherapy: Experimental studies. Nagoya J. Med. Sci., 30: 1—21, 1967
- 2) Johnson, H.A. and Pavelec, M.: Thermal enhancement of thio-TEPA cytotoxicity. J. Nat' l. Cancer Inst., 50: 903—908, 1973
- 3) Stehlin, J.S.: Hyperthermic perfusion with chemotherapy for cancer of the extremities. Surg. Gynecol. Obstet., 129: 305—308, 1969
- 4) Dickson, J.A. and Suzanger, M.: *In vitro-in vivo* studies on the susceptibility of the solid Yoshida sarcoma to drugs and hyperthermia (42 degrees C). Cancer Res., 34: 1263—1274, 1974
- 5) Hahn, G.M.: Interactions of drugs and hyperthermia *in vitro* and *in vivo*. "Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation". Procs. 2nd Int' l Symp. on Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation, Essen, 1977, Ed. Streffer, C., et al., 72—79, Urban & Schwarzenberg, 1978
- 6) Hahn, G.M., Braun, J. and Har-Kedar, I.: Thermochemotherapy: Synergism between hyperthermia (42—43℃) and adriamycin (or bleomycin) in mammalian cell inactivation. Proc. Nat' l. Acad. Sci. U.S.A., 72: 937—940, 1975.
- 7) Braun, J. and Hahn, G.M.: Enhanced cell killing by bleomycin and 43℃ hyperthermia and the inhibition of recovery from potentially lethal damage. Cancer Res., 35: 2921—2927, 1975
- 8) Kano, E., Furukawa, M., Yoshikawa, S., Tsubouchi, S., Kondo, T. and Sugahara, T.: Hyperthermic chemopotential and chemical thermosensitization. "Hyperthermic Oncology 1984", vol. 1, Procs. 4th Int' l Symp. On Hyperthermic Oncology, Aarhus, 1984, Ed. Overgaard, J., 437—449, Taylor & Francis, 1984
- 9) Mizuno, S. and Ishida, A.: Potentiation of bleomycin cytotoxicity toward cultured mouse cells by hyperthermia and ethanol. Gann, 72:

- 395—402, 1981
- 10) Hahn, G.M. and Strande, D.P.: Cytotoxic effects of hyperthermia and adriamycin on Chinese hamster cells. *J. Nat'l Cancer Inst.*, 57: 1063—1067, 1976
  - 11) Barlogie, B., Corry, P.M. and Drewinko, B.: *In vitro* thermochemotherapy of human colon cancer cells with *cis*-Dichlorodiammine-platinum (II) and Mitomycin C. *Cancer Res.*, 40: 1165—1168, 1980
  - 12) Hall, E.J., Astor, M., Geard, C. and Biaglow, J.: Cytotoxicity of R<sub>0</sub>-07-0582; enhancement by hyperthermia and protection by cysteamine. *Br. J. Cancer*, 35: 809—815, 1977
  - 13) Hahn, G.M., Li, G.C. and Shiu, E.: Interaction of Amphotericin B and 43°C hyperthermia. *Cancer Res.*, 37: 761—764, 1977
  - 14) Ishida, A., Miwa, N. and Mizuno, S.: Differential enhancement of cytotoxicity by combination of the carcinostatic agent Benzaldehyde and hyperthermia in simian virus 40 transformed and normal cell lines. *Cancer Res.*, 43: 4216—4220, 1983
  - 15) Kano, E.: Personal communication
  - 16) Miyakoshi, J., Heki, S., Yamagata, K., Furukawa, M. and Kano, E.: Induction of thermotolerance by redundant hyperthermia (42°, 44°) in Chinese hamster cells. "Fundamentals of Cancer Therapy by Hyperthermia, Radiation and Chemicals" The Proceedings of The International Conference on Cancer Therapy by Hyperthermia, Radiation and Drugs, Kyoto. Ed. Kano, E., et al., 135—147, MAG BROS. Inc., Tokyo, 1983
  - 17) Palzer, R.J. and Heidelberger, C.: Studies on the quantitative biology of hyperthermic killing of HeLa cells. *Cancer Res.*, 33: 415—421, 1973
  - 18) Jung, H. and Koelling, H.: Induction of thermotolerance and sensitization in CHO cells by combined hyperthermic treatments at 40° and 43°C. *Europ. J. Cancer*, 16: 1523—1528, 1980
  - 19) Henle, K.J. and Leeper, D.B.: Interaction of hyperthermia and radiation in CHO cells: Recovery Kinetics. *Radiat. Res.*, 66: 505—518, 1976
  - 20) Landry, J., Chretien, P., Bernier, D., Nicole, L. M., Marceau, N. and Tanguay, R.M.: Thermotolerance and heat shock proteins induced by hyperthermia in rat liver cells. *Int'l. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 8: 59—62, 1982
  - 21) Li, G.C., Petersen, N.S. and Mitchell, H.K.: Induced thermal tolerance and heat shock protein synthesis in Chinese hamster ovary cells. *Int'l. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 8: 63—67, 1982
  - 22) Li, G.C. and Werb, Z.: Correlation between synthesis of heat shock protein and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 3218—3222, 1982
  - 23) Li, G.C., Shrieve, D.C. and Werb, Z.: Correlation between synthesis of heat-shock proteins and development of tolerance to heat and to adriamycin in Chinese hamster fibroblasts: Heat shock and other inducers. "Heat shock from bacteria to man", Ed. Schlesinger, M.J., et al., 395—404, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982
  - 24) Landry, J., Bernier, D., Chretien, P., Nicole, L. M., Tanguay, R.M. and Marceau, N.: Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Res.*, 42: 2457—2461, 1982
  - 25) Tomasovic, S.P., Steck, P.A. and Heitzman, D.: Heat-stress proteins and thermal resistance in rat mammary tumor cells. *Radiat. Res.*, 95: 399—413, 1983
  - 26) 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
  - 27) Herman, T.S., Sweets, C.C., White, D.M. and Gerner, E.W.: Effect of heating on lethality due to hyperthermia and selected chemotherapeutic drugs. *J.N.C.I.*, 68(3): 487—491, 1982