

Title	温熱による放射線増感効果の温度依存性に関する実験的研究
Author(s)	津村, 昌; 中島, 俊文; 田中, 正博 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1985, 45(11), p. 1441-1454
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/17968">https://hdl.handle.net/11094/17968</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 温熱による放射線増感効果の温度依存性に関する実験的研究

大阪市立大学放射線医学教室 (主任：小野山靖人教授)

津村 昌 中島 俊文 田中 正博 木田 彰雄

(昭和60年4月30日受付)

(昭和60年6月25日最終原稿受付)

### Dependence of Radiosensitizing Effect on the Temperature of Hyperthermia

Masashi Tsumura, Toshifumi Nakajima, Masahiro Tanaka and Akio Kida

Department of Radiology, Osaka City University Medical School

(Director: Prof. Yasuto Onoyama)

---

Research Code No. : 600.4

---

Key Words : *Hyperthermia, Thermal equivalence factor, Thermal enhancement ratio, Therapeutic gain factor*

---

An experimental study was undertaken to quantify the thermal enhancement of radiation effect to normal tissue and tumor of mice and to determine the biological isoeffect relationship between treatment time and temperature of hyperthermia.

C3H/HeN male mice and FM3A tumor were used for the experiment. Graded doses of irradiation were given to their hind limb and immediately thereafter local heat treatment was administered by immersing the mice foot into warm water at graded temperatures.

The heating times at graded temperatures, required to cause early skin reaction of score 3, was determined for the mice irradiated with doses of 20, 30 or 40 Gy. A log-linear relationship was observed between temperature and reciprocals of heating time for getting the equivalent biological response on Arrhenius plot. The estimated activation energy was about 140 kcal/mole over the temperature range. Thermal Equivalence Factor (TEF), increase of thermal enhancement by every 1°C elevation of the temperature, were 2.26, 2.13 and 1.92 for 20, 30 and 40 Gy, respectively. TEF for late skin reaction of score 3 appeared similar to those for the early reaction, i.e. 2.39, 2.43 and 2.10 for 20, 30 and 40 Gy, respectively. We did not find any dependence of TEF on the radiation doses between 20 and 40 Gy. Although it is known that there is a breaking point of Arrhenius plot at about 43°C for heat alone, we did not observe such a point in normal tissue reaction treated by radiation immediately followed by heat.

A similar log-linear relationship was also observed between temperature and heating time to get tumor-doubling time of 15 days after irradiation with dose of 10 or 20 Gy. There appeared no breaking point in radiosensitizing effect on the tumor. Activation energy, 123 and 142 kcal/mole, and TEF, 1.85 and 2.03, respectively, were approximately the same as the values for early skin reaction. Thermal Enhancement Ratio (TER) for 40 minutes of heating at 43°C with radiation of 20 Gy, was 1.9 for normal and 2.1 for tumor tissues, respectively. Therapeutic Gain Factor (TGF) was estimated about 1.1 in hyperthermia immediately after radiotherapy.

#### 緒 言

Hyperthermia の歴史は古く、19世紀後半に

Busch<sup>1)</sup>, Coley<sup>2)</sup>らにより発熱による悪性腫瘍治療の可能性が報告されている。著者等の施設でも

1980年以後、種々の難治癌に対し Hyperthermia 併用放射線療法を施行し、臨床の有用性を示唆する結果を得ている<sup>34)</sup>。Hyperthermia の治療効果を定量的に検討するには、腫瘍および周辺の正常組織に与えられた加温量 thermal dose を正しく評価する必要がある。加温量は温度と時間の積に比例する量として定義される<sup>5)</sup>が、生物学的な効果からみると、温熱単独の細胞致死効果は42.5~43°Cを境として、温度効果曲線の傾斜が劇的に変化することが示されている<sup>67)</sup>。傾斜係数については、種々の細胞系、組織などで多くの報告がみられ、43°C以下では1°Cの変化に対して約4~6、それ以上では約2といわれており<sup>67)</sup>、これらをもとに thermal dose の計算がなされている<sup>8)-12)</sup>。Hyperthermia 併用放射線療法の場合、熱が放射線の効果を増感する事は種々の実験で明らかであるが<sup>13)-15)</sup>、増感効果の温度・時間関係を定量化する試みはほとんどなされていない。

Hyperthermia 併用放射線療法の基礎実験として、マウスの正常組織並びに腫瘍を用い、温熱による放射線増感効果の温度依存性の定量化を試み、さらに併用療法の有用性について Therapeutic Gain Factor を検討した結果を報告する。

#### 材料と方法

マウスは日本クレア社より購入したC3H/HeN、6~7週齢の雄を使用した。放射線発生装置及び条件はシーメンス社製スタビリパン、200kVp、20mA、フィルター2mmAl、SSD 34cmでR→rad変換係数0.95として線量率は3.7Gy/minであった。加温には東洋製作所製恒温槽を用い、水温測定には標準温度計で校正された水銀温度計を使用した。実験腫瘍としてはFM3A細胞<sup>16)17)</sup>を用いた。マウスの固定にはゴムホースを利用し自作した固定具を用い、血流阻害のないよう下腿を細いチューブを用いゆるくしばり、無麻酔下に2匹同時に照射ならびに加温を施行した。照射部位は右足背のみとし、他の部は厚さ4mmの鉛で遮蔽した。照射直後にマウスの右足のみを恒温槽内の温水に浸して加温し、温水に浸している時間を加温時間とした。すべての実験はエアコンディショニング下、20~25°Cの室温にて行い、各群の実験匹数

は6~10匹であった。

正常組織反応：生後7週のマウスを用い、X線照射は放射線単独群では20, 30, 40, 45, 50, 55, 60Gy及び加温併用群では20, 30, 40Gyで、照射終了後直ちに恒温槽により40~45°C、5~180分間の種々の条件で加温した。早期皮膚反応としては、足背の皮膚の変化を2~3日毎に観察してscore 0~6の12段階に分類し<sup>13)</sup>(Table 1)治療後13~34日間のscoreを平均したものを指標とした<sup>19)</sup>。晚期皮膚反応としては、治療3カ月後の足の変形を指標とし、score 1~6と6段階に分類し、これに変化が認められなかった群のscoreとして0を加え計7段階に分類した<sup>20)</sup>(Table 2)。

実験腫瘍と効果判定：実験腫瘍は、C3Hマウス自然発生乳癌であるFM3A細胞でsuspension cultureで継代したものを長崎大学原医研・奥村より供給を受けた<sup>16)</sup>。腫瘍細胞は液体窒素中に保存され、一旦マウス背部に移植し、長径約2cmとなった時点で摘出した。細切後、MEM培養液を用い単細胞浮遊液とし、これを遠沈して得られた細胞 $10^6 \sim 10^7$ 個を生後約6週のマウス足背に移植した。約2週後、腫瘍径が5~7mmとなった時点で実験に供した。線量は10, 20, 30, 40, 50Gy、加温は40~44°C、10~60分とした。照射後2~3日毎に腫瘍径を3方向測定し $V = \pi abc/6$ により体積を計算した<sup>6)</sup>。得られた計測データをHewlett Packard社製コンピュータ(HP9816)のBasic Statisticsを用いて統計処理してgrowth curve

Table 1. Score system for the early reaction

Score	Signs
0	Normal foot
0.5	50% chance of damage
1.0	Red foot, partial epilation
1.5	Slight edema, epilation
2.0	Severe edema, complete epilation
2.5	Fusion of toes
3.0	Partial wet desquamation
3.5	Wet desquamation of most of foot
4.0	Loss of 1 toe (loss of 1 to 4 segments)
4.5	Loss of more than 2 toes (more than 5 segments)
5.0	Partial loss of foot
6.0	Complete loss of foot up to the ankle

(Urano M. et al: Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 6: 1520, 1980)

Table 2 Score system for the late reaction

Arbitrary score	Observations
1	Slight change of shape
2	Definite change in shape and/or toes stuck together
3	Considerable change in shape and/or toes missing
4	Almost shapeless foot with only proximal parts of toes
5	Foot shapeless with no toes
6	No foot

(Field S.B. et al: Br. J. Radiol. 40: 834, 1967)

を求め、growth delay assay により腫瘍に対する増感効果を検討した。

結果

1. 加温に関する基礎的検討

恒温槽の水表面は外気温との差による冷却が予想されるため水面を保温シートで覆い、マウスの足を浸す部分にのみ穴を開けて使用した。恒温槽内に任意に選んだ7箇所の温度を熱電対温度計を用いて測定した。測定部位によるバラツキは小さく誤差は±0.05℃以内であった。また3時間までの時間経過による誤差も±0.05℃以内であった。

Fig. 1 はマウス足背部腫瘍(11×7×6mm)内に熱電対を挿入し、43℃の恒温槽に浸した時の温度変化を示す。腫瘍内温度がマウス直腸温に等しい約35℃からはほぼ水温と等しい42.9℃に達するのに45

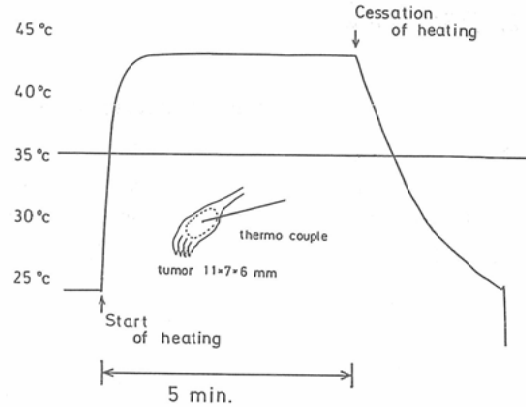


Fig. 1 Temperature profile of the tumor immersed in 43°C water bath as a function of time.

秒を要した。また恒温槽から取出した後の腫瘍内温度が35℃になるのに48秒を要した。非担癌正常

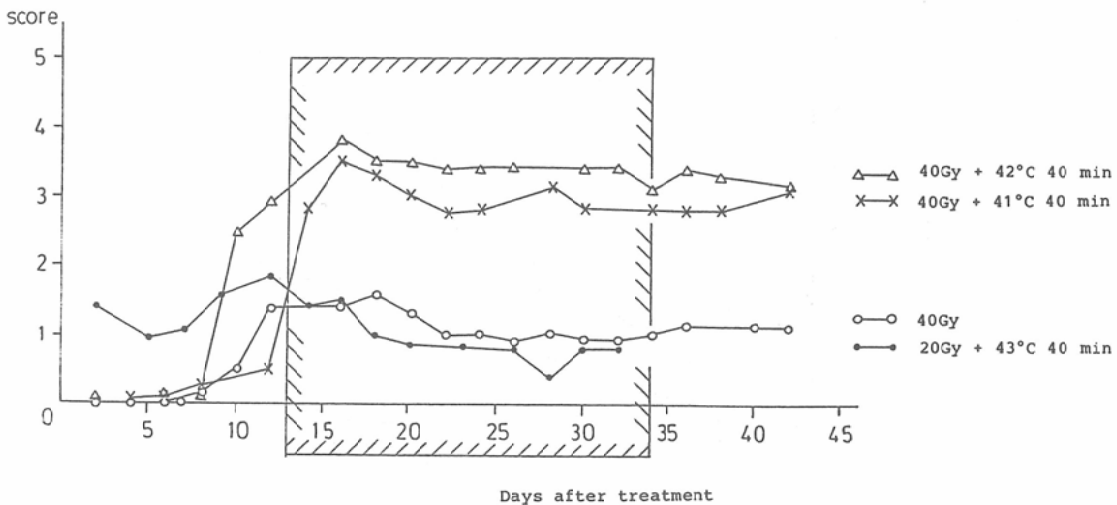


Fig. 2 The early skin scores as a function of time after the treatment. Each point represents the mean of 6 mice. The hatched area indicates the range of calculation for early skin reaction.

足では温度上昇に20秒、下降に22秒と腫瘍内に比べ速い変化を示した。これらの実験結果より加温時間を定義する上で、温度上昇に要する時間と、下降に要する時間がほぼ相殺され、加温時間に比しおおむね無視できるものとして加温時間の補正は行わず、恒温槽の水温を加温温度とした。マウス直腸温の測定では加温前35.8℃であったが、右後足の43℃加温により約30分後に37.3℃に上昇しそれ以後ほぼ一定の温度を示した。

## 2. 早期皮膚反応

Fig. 2は放射線単独40Gy、加温併用時(40Gy+41℃40分加温、40Gy+42℃40分加温、20Gy+43℃40分加温)の皮膚反応の経時的scoreの変化を示す。41℃、42℃では治療1～2週後よりscoreは上昇し平坦化するが、43℃では初期に熱によると思われる反応の為高いscoreを示す。初期反応は約2週後には治癒し、初期のscoreは必ずしも組織の損傷とは一致しない。そこで今回は早期反応として13～34日間のscoreの平均値を正常組織早期反応の指標とした<sup>19)</sup>。

Table 3 Average scores of the early reaction after 20 Gy + heat

heating time temperature	heating time								
	10 min	20 min	30 min	40 min	60 min	90 min	120 min	180 min	
41.0°C							0.52 ±0.39	0.79 ±0.38	
42.0°C					0.11 ±0.23	1.50 ±0.64	1.13 ±0.22	2.88 ±0.23	
43.0°C			0.01 ±0.01	0.92 ±0.14	1.54 ±0.35	2.50 ±0.48	4.15 ±0.44		
44.0°C		0.53 ±0.23	1.92 ±0.11	3.29 ±0.06	4.84 ±0.23				
45.0°C	1.56 ±0.11	2.51 ±0.33	5.7 ±0.24						

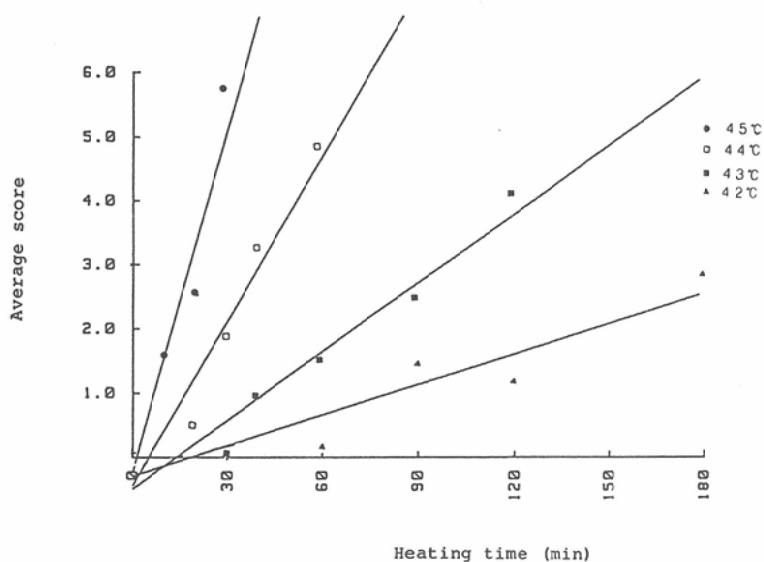


Fig. 3 Relationships between heating time and average score of the early skin reaction after 20Gy.

Table 3は20Gy+加温での、それぞれの加温温度、時間における13~34日の score の平均値を示したものである。Fig. 3はTable 3をグラフで表わしたもので、横軸は加温時間を縦軸は score の平均値を表わす。同様に30Gy+加温、40Gy+加温で加温時間と score の関係をグラフで表わし、これらのグラフより平均 score が3となるのに必要な加温時間を求め、温度と一定の生物学的効果を起こすのに必要な処理時間との関係を求めた<sup>9)13)</sup>。併用する放射線線量により各温度での皮膚反応は大きく異なり20Gy、41℃加温では反応は軽微であり180分加温においても score は低く、また40Gy、44℃以上加温では5分加温でも反応が強くいずれも今回の検討より除外した。Fig. 4はアレニウスプロットによる表示で、横軸は絶対温度の逆数、縦軸は score 3を得るのに必要な加温時間の逆数を対数表示で示している。20Gy+加温では42~45℃、30Gy+加温では41~45℃、40Gy+加温では40~43.5℃の範囲において、各実験値を結ぶとほぼ直線となり、その傾き即ち Thermal Equivalence Factor(温度が1℃低下したときに、変化する以前の温度の効果と等価の効果を得るための時間補正に必要な係数、以下 TEF)<sup>12)21)</sup>はそれぞれ2.26、2.13、1.92であった。

### 3. 晩期皮膚反応

Table 4は20Gy+加温での治療3ヵ月後のマウス皮膚反応の平均 score を示す。これと同様に

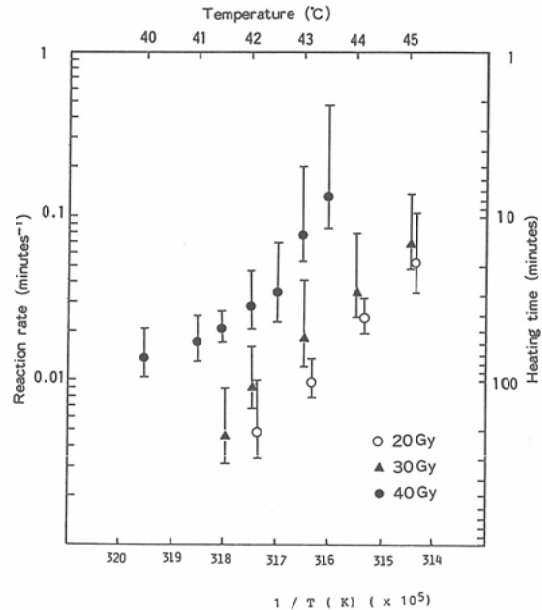


Fig. 4 An Arrhenius plot of the relationship between reciprocals of absolute temperature and log. reciprocals of heating time to give scores 3 early reaction in mouse foot treated by radiation combined with heat. Bars represent 95% confidence intervals. TEF were 2.26, 2.13 and 1.92 for 20Gy+heat, 30Gy+heat and 40Gy+heat, respectively.

30Gy+加温、40Gy+加温での平均 score も求めた。これらの結果より平均 score が3となるのに必要な加温時間を求め、温度と加温時間の関係を

Table 4 Average scores of the late reaction after 20 Gy + heat

heating time temperature	heating time								
	10 min	20 min	30 min	40 min	60 min	90 min	120 min	180 min	
41.0°C							0.33 ±0.22	1.00 ±0	
42.0°C					1.00 ±0	1.50 ±0.50	1.50 ±0.50	2.80 ±0.84	
43.0°C			1.00 ±0	1.33 ±0.33	1.33 ±0.33	3.58 ±0.90	5.75 ±0.25		
44.0°C		1.00 ±0	3.00 ±0.82	3.33 ±0.60	6.00 ±0				
45.0°C	1.50 ±0.50	3.11 ±0.65	6.00 ±0						

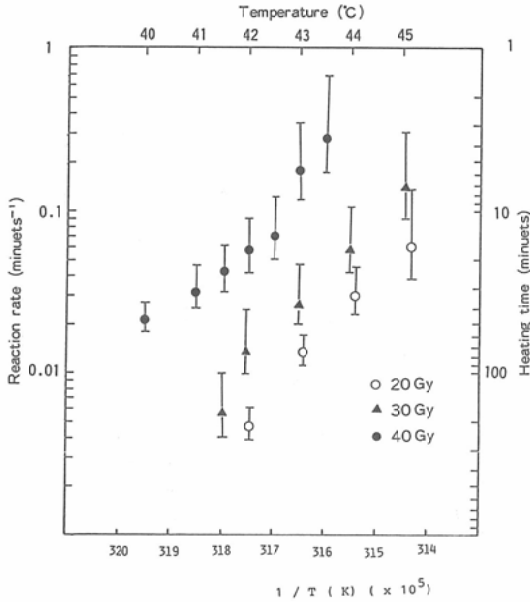


Fig. 5 An Arrhenius plot of the relationship between reciprocals of absolute temperature and log. reciprocals of heating time to give score 3 late reaction in mouse foot at 3 month after the combined treatment. Bars represent 95% confidence intervals. TEF were 2.39, 2.43 and 2.10 for 20Gy+heat, 30Gy+heat and 40Gy+heat, respectively.

アレニウスプロットであらわした (Fig. 5). 早期反応と同様, 各線量各温度域ではほぼ直線となり, TEF はそれぞれ2.39, 2.43, 2.10であった.

4. 腫瘍に対する効果

Fig. 6は20Gy+43°C, 20分加温後の腫瘍のgrowth curveを示す. 2~3日毎に測定したデータをコンピュータに入力し横軸に日数, 縦軸に治療前の体積を1とした体積比をとりプロットした. 腫瘍体積は治療後早期の浮腫などのため一旦大きくなりその後縮小, 再び増大を示す. そのため腫瘍増殖曲線を3次回帰曲線で近似し, 腫瘍効果は doubling time (腫瘍体積が2倍になるのに要する日数) で比較した.

Table 5は20Gy+加温後の doubling timeを示す. Fig. 7は Table 5をグラフで表わしたもので縦軸は doubling time, 横軸は加温時間を示す. このグラフにより各温度で doubling timeが15日になるのに必要な加温時間を求め, 温度と一定の効果を得るのに必要な加温時間の関係をアレニウスプロットで表わした (Fig. 8). 明らかな屈曲点はみられず TEFは10Gy+加温及び20Gy+加温でそれぞれ1.85及び2.03であった.

5. 温熱併用による Therapeutic Gain Factor 正常組織の Thermal Enhancement Ratio (TER)

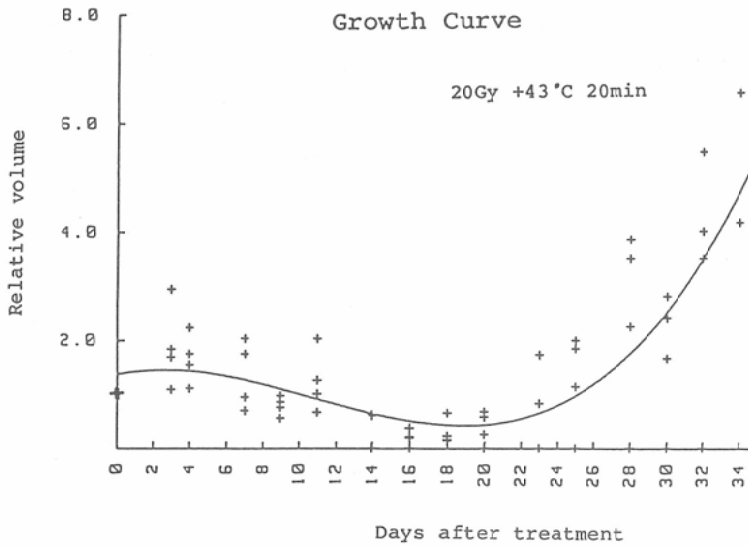


Fig. 6 Relative volumes of the tumor as a function of time after 20Gy + 43°C 40 minutes. Solid line represents a cubic regression curve of the experimental data.

Table 5 Doubling time (days) of mice tumors in volume after 20 Gy + heat

temper- ature	heating time					
	0	10 min	20 min	30 min	40 min	60 min
40°C	6.4		8.1		6.9	11.0
41°C		8.3	13.6	11.3	14.9	16.0
42°C		11.1	12.7	17.9	27.9	
43°C		10.7	21.2		28.9	
44°C		17.6	30.5			

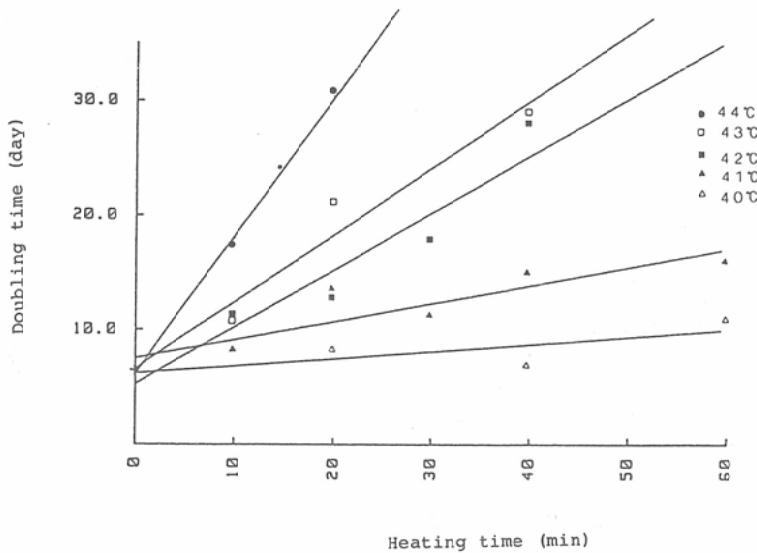


Fig. 7 Relationship between heating time and doubling time in tumor volume after 20Gy.

と腫瘍での TER を比較することにより Therapeutic Gain Factor (TGF) を求めた<sup>14)15)22)</sup>。放射線単独での早期及び晩期皮膚反応を併用群と同じ score を用いて求めた。

Table 6 は 20~60Gy 照射後の score の平均を示す。早期反応では 30~50Gy で score は急激に上昇し 50Gy 以上では線量の変化に対し著明な増加はみられない (Fig. 9)。これに対し晩期反応では 60Gy まで score は上昇しつづける (Fig. 10)。これは放射線単独では治療後の皮膚反応が比較的ゆっくりと進行し治療 34 日の時点では必ずしも皮膚反応は完成していないことを示唆している<sup>23)24)</sup>。しかし腫瘍効果を growth delay で評価して TGF を求める場合、今回の実験では endpoint

を doubling time 15 日としたのでその意味ではこれを正常組織の早期反応と比較するのが妥当と考えられる。Fig. 11 は放射線単独群の線量と doubling time の関係を示す。ここでは臨床プロトコルの加温量である 43°C、40 分と照射を併用した場合の TER を比較することにより TGF を求めた。20Gy+43°C、40 分加温での早期皮膚反応 score は 0.92 である (Table 3)。この score は放射線単独では、38Gy に相当し (Fig. 9)、TER は 38Gy/20Gy=1.9 となる。また 20Gy+43°C、40 分加温での tumor-doubling time は 28.9 日であり (Table 5)、放射線単独では 42Gy に相当し (Fig. 11)、TER は 42Gy/20Gy=2.1 となる。TGF は腫瘍における TER と正常組織での TER の比であらわされる



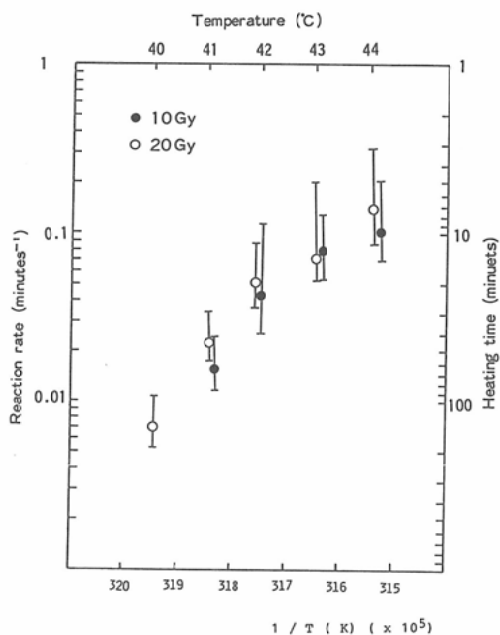


Fig. 8 An Arrhenius plot of the relationship between reciprocals of absolute temperature and log. reciprocals of heating time to give doubling time of 15 days in mouse tumor after the combined treatment. Bars represent 95% confidence intervals. TEF were 1.85 and 2.03 for 10Gy+heat and 20Gy+heat, respectively.

ので、 $2.1/1.9=1.1$ となり高い Therapeutic Gain は得られなかった。

考案

癌治療における Hyperthermia は、歴史的には 1866年の Busch<sup>1)</sup>, 1893年の Coley<sup>2)</sup>らの報告より始まる。その後空白期間が在り1960年代になり加温方法の開発、培養細胞についての温熱の致死効果、放射線増感効果などの基礎的研究が進むにつ

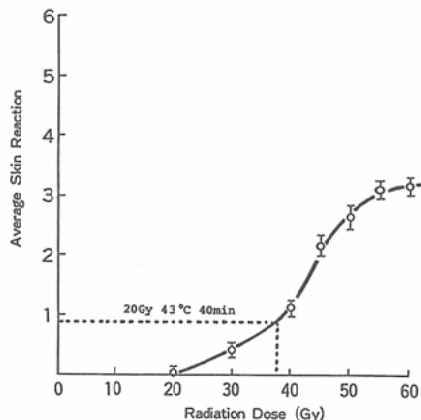


Fig. 9 Dose-response curve in the early skin reaction to radiation alone.

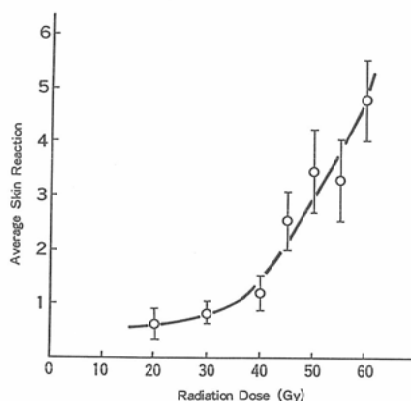


Fig. 10 Dose-response curve in the late skin reaction to radiation alone.

れて再び注目されるようになった<sup>25)</sup>。1963年には Crile<sup>26)</sup>が Hyperthermia による癌治療の可能性を実験腫瘍で系統的に解析した。その有用性は Fieldら<sup>27)</sup>により明快にまとめられている (Table

Table 6 Average scores of early and late reactions after various doses of radiation alone

dose (Gy)	20	30	40	45	50	55	60
early reaction score	0.06 ±0.02	0.43 ±0.11	1.13 ±0.08	2.18 ±0.14	2.64 ±0.14	3.10 ±0.11	3.17 ±0.12
late reaction score	0.67 ±0.33	0.83 ±0.17	1.22 ±0.36	2.57 ±0.68	3.50 ±0.78	3.33 ±0.80	4.83 ±0.79

(Mean±S.E.)

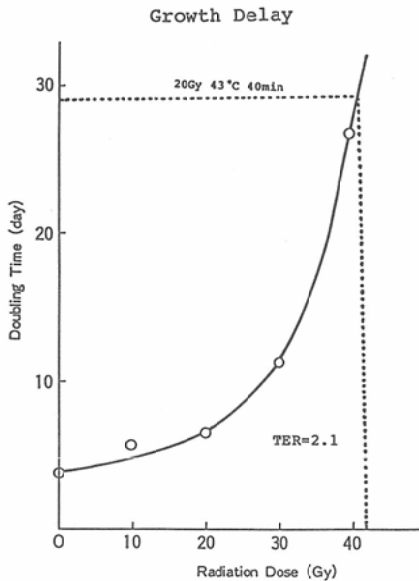


Fig. 11 Dose-response curve in doubling time of mouse tumor to radiation alone.

7). 放射線治療においては腫瘍内の低酸素細胞の存在が、治療効果を減弱する大きな要因となっている。これに対し温熱の効果は、低酸素<sup>28)</sup>、低pH<sup>29)30)</sup>、低栄養状態<sup>28)</sup>においてむしろ著しく、放射線抵抗性であるDNA合成期に効果が著しいと

報告されている<sup>23)31)</sup>。また、温熱は放射線の亜致死障害、潜在的致死障害からの回復を阻害する<sup>31)~33)</sup>。さらに、組織レベルでは、正常組織に比べて腫瘍の方が血流による冷却効果が少ないため加温されやすくなっている (differential heating)<sup>34)~37)</sup>ことも、加温の効果を増強すると考えられる。

これらの基礎的データを基に難治癌を対象とした臨床治験が試みられており、特に放射線や化学療法との併用の有効性が報告されている<sup>35)38)~40)</sup>。著者らの施設でも1980年以後、Hyperthermia併用放射線療法を施行し<sup>34)</sup>、1985年3月現在、61症例中術後照射ならびに治療回数が3回以下のため効果判定を除外した10例を除くと、Complete Response (腫瘍の完全消失) 17例、Partial Response (腫瘍縮小率50%以上) 24例、有効率(CR+PR)80%と良好な成績を得ている。しかし臨床的にその効果を論ずる上で、治療における温熱の寄与を定量的に知る必要がある。特にHyperthermia併用放射線療法の臨床においては、加温の都度および加温中を通じて、一定の温度を維持しがたい場合も少なくない。異なる温度条件で与えられた生物学的効果からみた加温量 thermal dose を

#### Talbe 7 Biological rationale for hyperthermia in cancer treatment

1. Hypoxia does not protect cells from damage by heat; it may even be a sensitizer.
2. Nutritionally deprived cells, which probably exist in many tumors, are more sensitive to heat than adequately fed cells.
3. Heat is more damaging at low pH, and it is commonly thought that tumors tend to be acidic due to anaerobic metabolism.
4. It is possible that neoplastic cells be intrinsically more sensitive to heat than normal cells.
5. Heat is more damaging to cells in the DNA synthetic phase of the mitotic cycle, when X-rays are least effective. Heat may be useful, therefore, for treatment of tumors in which there are more cells in the S phase than there are in the limiting normal tissue.
6. Heat has been shown to prevent the repair of potentially lethal damage (PLD) from X-rays. Since repair of PLD is observed in irradiated tumors (probably in the nutritionally deficient cells) but presumably does not occur in normal cells, heat would be expected to be selective in potentiating the radiation response of the tumor.
7. If heat is applied locally with microwave or ultrasound, tumors with a poor blood supply may attain higher temperature than the surrounding normal tissue.

(Field, S.B., et al.: Br. J. Radiol. 50: 129, 1977)

表現する方法の一つとして, Equivalent time at 43°C (Eq43) が提唱され<sup>11)</sup>, 我々の施設でもコンピュータによる温度情報処理の一部に Eq43 を組込んで検討中である<sup>8)</sup>.

$$\text{Equivalent time at } 43^{\circ}\text{C} = \sum_{i=1}^n Y_i$$

$$\begin{cases} Y_i = \Delta t \times 2^{(f(i)-43)} & (f(i) \geq 43^{\circ}\text{C}) \\ Y_i = \Delta t \times 4^{-(43-f(i))} & (f(i) < 43^{\circ}\text{C}) \end{cases}$$

$$\Delta t = \frac{\text{治療時間}}{n} \text{ (min)}$$

$f(i)$ :  $i$  番目の  $\Delta t$  における治療温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )

$Y_i$ :  $\Delta t \times$  (生物学的補正值)

Eq43とは, 種々の温度条件で行われた加温を, その温度での生物学的効果で補正して, 43°Cでの加温時間に換算することにより thermal dose を定量化する方法である. そのためには, 各温度での生物効果の補正係数 (TEF) を知る必要がある. 細胞生存率を指標とした温熱単独の効果における温度・時間関係のアレニウスプロットにおいては, 従来42.5~43°Cを境として TEF が異なり, 高温域においては約2, 低温域においては4~6であるとされている<sup>6)7)</sup>. しかし, これらの TEF は温熱単独の場合であり, 作用機序の異なる放射線を併用した場合にもそのまま適用できるかどうかは未だ明確でない. そこで Hyperthermia 併用放射線療法時の放射線に対する増感効果と温度・時間関係を定量化する目的でマウスを用い基礎的実験を行った.

Hyperthermia 併用放射線治療において, 両者の順序ないし時間的間隔によって, 増感効果が変化するという報告<sup>23)41)42)</sup>も多いが, この実験においては, 著者らが臨床的に行っている放射線照射直後加温について検討した.

恒温槽での加温に関しては腫瘍内温度が水温に比し0.2°C低く<sup>6)43)</sup>, さらに温度上昇に要する時間, 加温終了後の下降に要する時間も無視できないといわれている<sup>9)</sup>. しかしこの実験では腫瘍径が小さいことが原因となり腫瘍内温度と水温の誤差は0.05°C以内であり, 温度上昇の際の time lag と下降の際の time lag も相殺され, しかも加温時間に比べて短いので加温時間の補正は行わなかった.

低温度での長時間加温では熱耐性 (thermotole-

rance)の誘導が問題となり, 42°C以下の加温に対しては, 細胞は加温中に耐性を獲得するといわれる<sup>44)45)</sup>. しかしこの因子を除外することは実験的には制癌剤の併用によってほぼ可能と報告されている<sup>46)47)</sup>が臨床的には未だその一般化がなされておらず, 従ってこの実験において低温域での放射線増感効果については熱耐性の影響を包含することになる.

放射線照射直後に加温を併用した今回の実験では, 一定の正常組織反応を起こすのに必要な温度・時間関係のアレニウスプロット上で, 加温単独療法で従来報告されている42.5~43°C付近での屈曲点は見られなかった. アレニウスプロットの傾斜から得た TEF は早期反応では20Gy+加温, 30Gy+加温, 40Gy+加温でそれぞれ2.26, 2.13及び1.92であり, また晩期反応ではそれぞれ2.39, 2.43及び2.10であった. 早期反応, 晩期反応についてそれぞれの線量に対する TEF 間の F 検定を行ったが, 5%の危険率で有意差は認められず, 併用する放射線線量20~40Gyの範囲においては TEF の線量依存性は認められなかった. 早期反応と晩期反応の TEF を比較すると, 晩期反応のほうが TEF の高くなる傾向はみられたが有意差を認めず, 熱の寄与が晩期反応において明らかに大きいと推定するのは困難であった. 腫瘍では10Gy+加温, 20Gy+加温について tumor-doubling time を比較することにより増感効果を検討した. 腫瘍においても, 一定の growth delay を得るための温度・時間関係のアレニウスプロット上で, 40~44°Cの間に屈曲点を認めなかった. 10Gy+加温での TEF は1.85, 20Gy+加温では2.03であり, 両者の間には5%の危険率で有意差を認めなかった.

放射線併用時の温熱の増感効果については, 43°C付近に屈曲点を持つという報告がある<sup>48)</sup>一方, その存在を否定する報告もあり屈曲点の有無についての定説はない<sup>49)</sup>. Overgaard<sup>50)</sup>は, 放射線併用の場合照射後4時間の間隔において加温すると43°C付近に屈曲点を持つが, 同時加温の場合には屈曲点はないと報告している. すなわち間隔をおくと熱単独の cytotoxicity による効果が重要と

なるため屈曲点を持ち、同時に施行した場合は放射線効果の増感が主体となるため屈曲点を示さないと述べている。

温度と生物学的効果の関係を検討するために化学反応速度論を適用し下記の式にて活性化エネルギーを求めた<sup>5)13)48)49)51)</sup>。

$$\Delta H = \frac{2.303RT_1T_2}{T_1 - T_2} \log_e \frac{K_1}{K_2}$$

$\Delta H$ : 活性化エネルギー

$K_1, K_2$ : 速度定数

$R$ : 気体定数 1.987cal/deg · mole

$T_1, T_2$ : 絶対温度 (K)

正常組織早期反応では20Gy+加温, 30Gy+加温ならびに40Gy+加温でそれぞれ163, 151及び131 kcal/moleであり, 晩期反応ではそれぞれ175, 178及び149kcal/moleであった。また腫瘍では, 10Gy+加温, 20Gy+加温でそれぞれ123及び142 kcal/moleであった。温熱単独での細胞致死効果における温度・時間関係から求めた活性化エネルギーは140kcal/mole前後で, この値は蛋白(酵素)失活の活性化エネルギー(110~198kcal/mole)と一致する事から, 従来より温熱のtargetは蛋白であると考えられている<sup>52)</sup>。放射線併用時の効果について, Lawら<sup>49)</sup>はマウスの耳の早期反応についての実験で, TEFが温熱単独では2であるが, 放射線(15Gy, 17.5Gy)併用では3であったと報告している。この様に併用治療では活性化エネルギーが大きくなり, 温熱単独とは異なる過程ならびにtargetの存在を指摘する報告も見られるが<sup>53)54)</sup>, 今回の結果では正常組織, 腫瘍ともに活性化エネルギーは123~178kcal/moleとなり, このことから考えれば放射線増感効果においてもtargetはやはり蛋白であると推定された。

現在まで正常組織と腫瘍におけるTEFを比較した報告はみあたらないが, 20Gyに加温を併用したこの実験では, 正常組織早期皮膚反応のTEFは2.26, 腫瘍のTEFは2.03であり両者の間に有意差をみとめなかった。以上のことより照射直後に加温を併用した場合, 正常組織では20~40Gy, 41~45°C, 腫瘍では10~20Gy, 41~45°Cの範囲で, いずれもTEFは約2となり, この範囲において

は放射線線量の大小, 加温温度の高低によるTEFの変化はないと考えられる。すなわち加温温度と放射線増感効果の間には, 正常組織, 腫瘍のいずれにおいてもほぼ比例する関係が得られ, 41~45°Cの範囲では治療温度が1°C低い時に同じ増感効果を得るためには加温時間を2倍にすれば良いことがわかった。臨床症例に対しTEF2を用い前述のEq43を求め治療効果との関連性を検討したが明白な結果は得られず, 臨床への導入には分割照射や温度測定等の問題点を更に解明する必要があると考えられる。

併用療法の有用性を評価するには, 治療比の改善が最も重要で, 腫瘍増感効果が正常組織増感効果を上回る事が期待される。両者に対する増感効果比TGFを求めるうえでHyperthermia併用放射線療法では放射線線量, 加温温度, 加温時間と3つの変数があり比較が難しい<sup>22)</sup>。線量の違い或いは正常組織と腫瘍でのendpointのとり方によりTGFは異なると考えられる。一般に線量, 温度が大きいくほど熱による増感は大きくなるといわれる<sup>15)49)</sup>がこの実験における検討では臨床プロトコルの加温量である43°C, 40分加温と照射を併用した場合のTGFを求めた。20Gy照射直後43°C40分加温後に, 正常組織早期反応と腫瘍のgrowth delayをendpointとして求めたTGFは1.1と低く, 僅かなGainが得られたのみであった。TEFは正常組織, 腫瘍のいずれにおいても線量, 加温温度に依存せずほぼ一定であるので, 照射直後加温では特に有利な温度はなく温度によってTGFは変化しないと考えられる。

正常組織並びに腫瘍に対する生物学的な効果は加温と放射線照射を同時併用, もしくは直前, 直後に加温した場合に最も大きい<sup>23)41)42)</sup>。しかし腫瘍とともに周辺正常組織も増感されるためにTGFは高くなり, 照射2~4時間後加温で高いTGFが得られるといわれている<sup>41)47)55)56)</sup>。しかし, 日常の臨床においてはこのようなプロトコルは実用的でないので, この実験では照射直後の加温併用について報告した。臨床においては腫瘍内と正常組織の血流の違いにより腫瘍内温度が正常組織より高くなる, いわゆるdifferential heating<sup>33)35)~37)</sup>が

期待され、照射直後加温でも高い TGF が得られるものと考えられる。

### 結 語

1. 温熱による放射線増感効果の温度依存性に関しマウス正常組織皮膚反応と腫瘍の growth delay を指標として検討した。

2. 恒温槽でマウスの足は安定して加温され、加温温度、加温時間に関する補正の必要は認められなかった。

3. Thermal Equivalence Factor は正常組織、腫瘍ともに約 2 であった。また線量への依存性は見られず、アレニウスプロットにおいて 41~45°C の間に明らかな屈曲点は認められずほぼ一定の割合で放射線の効果を増強する事が明らかになった。

4. 20Gy に 43°C, 40分加温を併用した場合の Therapeutic Gain Factor は約 1.1 で正常組織と腫瘍を同じ温度で加温した場合、高い Therapeutic Gain は得られなかった。このことより臨床での治療においては加温と照射の間隔や順序, differential heating の重要性が示唆された。

稿を終るにあたり、終始御懇切な御指導並びに御校閲を賜りました恩師小野山靖人教授に深甚なる謝意を捧げますとともに、本研究に御協力いただいた伊藤敬三、泉 昭生、椎崎信彦、辻政代各技師及び放射線医学教室医局員各位に心からお礼を申しあげます。本研究は文部省科研費(がん特 I) による。

### 文 献

- 1) Busch, W.: Uber den Einfluss welchen heftigere Erysipelen zuweilen auf organisierte Neubildungen ausuben. Verhandlungen des Naturh. Press Rhein Westphal 23: 28-30, 1866
- 2) Coley, W.B.: The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas with a report of 10 original cases. Am. J. Med. Sci., 105: 487-511, 1893
- 3) Nakajima, T., Tsumura, M. and Onoyama, Y.: Clinical experience with hyperthermia in cancer radiotherapy: Special reference to in vivo thermometry. In Sugahara, T. ed.: Modification of Radiosensitivity in Cancer Treatment. pp. 381-414, 1984, Academic Press Japan, Tokyo
- 4) 小野山靖人, 中島俊文, 梅川智三郎, 中島秀行, 谷口脩二, 津村 昌, 伊藤敬三, 泉 昭生: Radio-frequency 加温の臨床-生体内温度測定を中心に一柄川順編, 癌温熱療法, pp. 270-282, 1982, 篠原出版, 東京
- 5) Bowman, H.F.: Heat transfer mechanism and thermal dosimetry. Natl Cancer Inst Monogr 61: 437-445, 1982
- 6) 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
- 7) Field, S.B. and Morris, C.C.: The relationship between heating time and temperature: its relevance to clinical hyperthermia. Radiotherapy and Oncology, 1: 179-186, 1983
- 8) 津村 昌, 中島俊文, 梅川智三郎, 田中正博, 松岡利幸, 伊藤敬三, 小野山靖人: Hyperthermia における温度情報のコンピュータ処理. 日本医学放射線学会雑誌, 43: 1426-1428, 1983
- 9) Sapareto, S.A. and Dewey, W.C.: Thermal dose determination in cancer therapy. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 10: 787-800, 1984
- 10) Dunlop, P.R.C., Dickinson, R.J., Hand, J.W. and Field, S.B.: The use of thermal dose in the clinical application of localized hyperthermia. Proc. 4th International symposium on Hyperthermia Oncology, 187-190, 1984
- 11) Sapareto, S.A. and Dewey, W.C.: Thermal dose determinations in cancer therapy. Program and Abstract of 2nd NAHG Meeting 27, 1982
- 12) 柳川繁雄, 笥 正兄: Thermal Dose の概念について. Hypothermia, Radiation & Chemicals 13: 16-19, 1983
- 13) Dewey, W.C., Hopwood, L.E., Sapareto, S.A. and Gerweck, L.E.: Cellular response to combinations of hyperthermia and radiation. Radiology, 123: 463-474, 1977
- 14) Robinson, J.E., Wizenberg, M.J. and McCready, W.A.: Radiation and hyperthermal response of normal tissue in situ. Radiology, 113: 195-198, 1974
- 15) Hill, S.A. and Denekamp, J.: The response of six mouse tumors to combined heat and X rays: implications for therapy. Br. J. Radiol., 52: 209-218, 1979
- 16) Okumura, Y.: Nutritional depletion of the established stationary phase during growth of mouse mammary carcinoma cells in suspension culture. Gann, 69: 389-393, 1978
- 17) 斎藤武郎: C3H マウス乳癌の腹水型転換-マウス腹水乳癌 FM3A の樹立. 福島医学雑誌, 12:

- 335—352, 1962
- 18) Urano, M., Rice, L., Kahn, J. and Sedlacek, R. S.: Studies on fractionated hyperthermia in experimental animal systems 1. The foot reaction after equal doses: Heat resistance and repopulation. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 6: 1519—1523, 1980
- 19) Brown, J.M., Goffinet, D.R., Cleaver, J.E. and Kallman, R.F.: Preferential radiosensitization of mouse sarcoma relative to normal skin by chronic intra-arterial infusion of halogenated pyrimidine analogs. *J. Nat. Cancer Inst.*, 47: 75—89, 1971
- 20) Field, S.B., Jones, T. and Thomlinson, R.H.: The relative effects of fast neutrons and X rays on tumour and normal tissue in the rat. *Br. J. Radiol.*, 40: 834—842, 1967
- 21) Gibbs, F.A. Jr.: Regional hyperthermia: a clinical appraisal of noninvasive deep-heating method. *Cancer Res.*, 44: 4765—4770, 1984
- 22) Hahn, G.M.: *Hyperthermia and Cancer*. pp. 156—163, 1982, Plenum Press, New York
- 23) Law, M.P., Ahier, R.G. and Field, S.B.: The response of mouse skin to combined hyperthermia and X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, 32: 153—163, 1977
- 24) Wondergem, J. and Haveman, J.: A study of the effects of prior heat treatment on the skin reaction of mouse feet after heat alone or combined with X-rays: Influence of misonidazole. *Radiotherapy and Oncology*, 2: 159—170, 1984
- 25) 菅原 努: 癌治療の新しい方法. 菅原 努, 阿部光幸編, ハイパーサーミア—癌治療と新しい方法一. pp. 4—14, 1984, マグプロス出版, 東京
- 26) Crile, G. Jr.: The effects of heat and radiation on cancers implanted on the feet of mice. *Cancer Res.*, 23: 372—380, 1963
- 27) Field, S.B., Hume, S.P., Law, M.P. and Myers, R.: The response of tissues to combined hyperthermia and X-rays. *Br. J. Radiol.*, 50: 129—134, 1977
- 28) Gerweck, L.E., Nygaard, T.G. and Burlett, M.: Response of cells to hyperthermia under acute and chronic hypoxic conditions. *Cancer Res.*, 39: 966—972, 1979
- 29) Freeman, M.L., Raaphorst, G.P., Hopwood, L. E. and Dewey, W.C.: The effect of pH on cell lethality induced by hyperthermic treatment. *Cancer*, 45: 2291—2300, 1980
- 30) Gerweck, L.E., Dahlberg W.K. and Greco, B.: Effect of pH on single or fractionated heat treatments at 42—45'. *Cancer Res.*, 43: 1163—1167, 1983
- 31) Marmor, J.B. and Hahn, G.M.: Combined radiation and hyperthermia in superficial human tumors. *Cancer*, 46: 1986—1991, 1980
- 32) Suit, H.D.: Hyperthermic effects of animal tissues. *Radiology*, 123: 483—487, 1977
- 33) Leith, J.T., Miller, R.C., Gerner, E.W. and Boone, L.M.: Hyperthermic potentiation: Biological aspects and applications to radiation therapy. *Cancer*, 39: 766—779, 1977
- 34) Shrivastav, S., Kaelin, W.G. Jr., Joines, W.T. and Jirtle, R.L.: Microwave hyperthermia and its effect on tumor blood flow in rats. *Cancer Res.*, 43: 4665—4669, 1983
- 35) Kim, J.H., Hahn, E.W. and Ahmed, S.A.: Combination hyperthermia and radiation therapy for malignant melanoma. *Cancer*, 50: 478—482, 1982
- 36) Storm, F.K., Harrison, E.H., Elliott, R.S. and Morton, D.L.: Normal tissue and solid tumor effects of hyperthermia in animal models and clinical trials. *Cancer Res.*, 39: 2245—2251, 1979
- 37) LeVeen, H.H., Wapnick, S., Piccone, V., Falk, G. and Ahmed, N.: Tumor eradication by radiofrequency therapy: Response in 21 patients. *JAMA*, 235: 2198—2200, 1976
- 38) Perez, C.A., Nussbaum, G., Emami, B. and VonGerichten, D.: Clinical results of irradiation combined with local hyperthermia. *Cancer*, 52: 1957—1603, 1983
- 39) 平岡真寛, 李 成吉, 小野公二, 西台武弘, 高橋正治, 阿部光幸, 陶山純夫, 藪本栄三, 松宮 昭, 中島俊文, 小野山靖人: 難治癌に対する加温併用放射線治療の研究. 第一編, 表在性腫瘍に対するマイクロ波加温併用放射線療法の臨床経験. *日本医学放射線学会雑誌*, 41: 975—984, 1981
- 40) Kubota, Y., Shuin, T., Miura, T., Nishimura, R., Fukushima, S. and Takai, S.: Treatment of bladder cancer with a combination of hyperthermia, radiation and bleomycin. *Cancer*, 53: 199—202, 1984
- 41) Overgaard, J.: Simultaneous and sequential hyperthermia and radiation treatment of an experimental tumor and its surrounding normal tissue in vivo. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 6: 1507—1517, 1980
- 42) Li, G.C. and Kal, H.B.: Effect of hyperthermia on the radiatiion response of two mammalian cell lines. *Europ. J. Cancer*, 13: 65—69, 1977
- 43) Kamura, T., Nielsen, O.S., Overgaard, J. and

- Andersen, A.H.: Development of thermo-tolerance during fractionated hyperthermia in a solid tumor in vivo. *Cancer Res.*, 42: 1744—1748, 1982
- 44) Miyakoshi, J., Kano, E. and Heki, S.: Cellular responses to hyperthermia and radiation in Chinese hamster cells. In Sugahara, T. ed: *Modification of radiosensitivity in cancer treatment*, pp. 335—350, 1984, Academic Press, Japan Tokyo.
- 45) 宮越順二, 菅原 努: ハイパーサーミアの基礎—細胞レベル—. 菅原 努, 阿部光幸編, ハイパーサーミア—癌治療の新しい方法—. pp. 55—99, 1984, マグブロス出版, 東京
- 46) Kano, E.: Hyperthermia and Drug. In Overgaard, J. ed: *Hyperthermic Oncology 1984*, vol. 2, *Procs. 4th Int'l. Symp. Hyperthermic Oncology Aarhus*. pp. 277—282, 1985, Taylor & Francis, London.
- 47) 加納永一, 古川雅代, 芳川伸治, 堀内 進, 近藤隆: がん温熱療法の基礎, とくに制がん剤との併用. *Oncologia*, 12: 114—118, 1985
- 48) Law, M.P., Coultas, P.G. and Field, S.B.: Induced thermal resistance in the mouse ear. *Br. J. Radiol.*, 52: 308—314, 1979
- 49) Law, M.P., Ahier, R.G. and Field, S.B.: The response of the mouse ear to heat applied alone or combined with X-rays. *Br. J. Radiol.*, 51: 132—138, 1978
- 50) Overgaard, J.: Time-temperature relationship for hyperthermic cytotoxicity and radiosensitization—implications for a thermal dose unit: *Proc. 4th International Symposium on Hyperthermic Oncology*, pp. 191—194, 1984
- 51) Bhuyan, B.K.: Kinetics of Cell Kill by Hyperthermia. *Cancer Res.*, 39: 2277—2284, 1979
- 52) Westra, A. and Dewey, W.C.: Variation in sensitivity to heat shock during the cell-cycle of chinese hamster cells in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.*, 19: 467—477, 1971
- 53) 奥村 寛: 温熱療法, 組織培養, 10: 11—14, 1984
- 54) 奥村 寛: 細胞レベルの高温処理の影響, 癌の臨床, 27: 1419—1423, 1981
- 55) Stewart, F.A. and Denekamp, J.: Sensitization of mouse skin to X irradiation by moderate heating. *Radiology*, 123: 195—200, 1977
- 56) 松山敏剛, 吉野輝雄: Hyperthermia の Therapeutic Gain Factor に関する研究, 日本産婦人科学会雑誌, 35: 1913—1922, 1983