

Title	アドリアマイシン併用40および43℃温熱療法の培養細胞並びに実験腫瘍に対する生物効果及び細胞腫瘍内薬剤濃度
Author(s)	吉田, 正徳
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1991, 51(9), p. 1098-1104
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/18575">https://hdl.handle.net/11094/18575</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## アドリアマイシン併用40及び43°C温熱療法の培養細胞並びに 実験腫瘍に対する生物効果及び細胞腫瘍内薬剤濃度

関西医科大学放射線科学教室（主任：田中敬正教授）

吉 田 正 徳

（平成2年9月27日受付）

（平成3年1月10日最終原稿受付）

### Effect of Adriamycin Combined with 40 and 43°C Hyperthermia on Cultured V79 Cells and S-180 Tumor and Their Uptake of the Drug

Masanori Yoshida

Department of Radiology, Kansai Medical University

---

Research Code No. : 407.3

---

Key Words : Hyperthermia, Adriamycin, Drug concentration,  
S-180 tumor, V79 cells

---

The combined effects of hyperthermia and chemotherapy with adriamycin (ADR) on both cultured mammalian cells and growing tumors were analyzed according to different temperatures and durations of heating, timing of drug administration, and fractionation of treatments. Furthermore, ADR uptake in tumor was measured to evaluate the effect of ADR in combination with hyperthermia. Hyperthermic cell killing with ADR *in vitro* was much more potent at 40°C than at 43°C. Results of sequential combinations heating followed by ADR and ADR followed by heating under hyperthermia of 40 and 43°C were not significantly different from those of simultaneous treatment. However, the anti-tumor effect of the combination was much more pronounced at 43°C than at 40°C for up to 60 min of treatment. ADR uptake showed a substantial increase under high temperatures of 40 and 43°C in both cultured cells and tumors.

Fractionated treatments combined with chemotherapy and hyperthermia showed no enhanced effects on tumor under temperatures of 40 and 43°C, since three fractionated experiments with ADR and 43°C hyperthermia had an effect almost identical to that of three fractionated experiments with hyperthermia alone, suggesting the possible induction of thermotolerance by ADR. The results of the present study indicate that potentiation of the combined effect of hyperthermia and chemotherapy with ADR may depend only upon the dose in one of these two modalities.

#### 1. はじめに

温熱化学療法は癌の新しい治療法として期待されており、臨床での有効性も認められている<sup>1)~4)</sup>。しかし、温熱療法と化学療法の併用についての基礎的な検討は十分なされていない。

加温と抗癌剤の相互作用は、用いる薬剤の種類

や加温温度により複雑に変化し<sup>5)6)</sup>、個々の薬剤について種々の条件での検討が必要である。また、温熱療法では血流や<sup>37) pH<sup>8)9)</sup>等の腫瘍の組織環境が効果に大きく影響するため培養細胞での実験のみばかりでなく、実験腫瘍を用いた研究も必要とされる。</sup>

今回我々は、臨床において用いられることの多い<sup>1)</sup>アドリアマイシン(ADR)について、加温との併用による抗腫瘍効果の変化を培養細胞と移植腫瘍の両者を用いて調べた。また、腫瘍細胞または腫瘍組織へのADRの取り込みに対する加温の影響についても検討した。

## 2. 材料と方法

**In Vitro:** 実験には、10%の牛胎児血清を含むEagl's MEM培地で培養された対数増殖期のChinesehamster V79細胞を用いた。ADRは原末をDulbeccoの燐酸緩衝液を用いて1mg/mlに希釈し培地中に添加した。細胞致死効果をみる実験には250ng/mlのADRを含む培地を用い、効果はcolony formation法で判定した。0.05%のトリプシンにて浮遊状態にした細胞を燐酸緩衝液で2回洗浄した後、ADRを含む培地中で浮遊状態とし、Water bathにフラスコ全体を浸して37℃、40℃または43℃に加温した。加温後、細胞を新鮮な培地で3回洗浄して、37℃で7から9日間培養し、colony数を計測した。ADRの細胞内への取り込みをみる実験では5μg/mlのADRを含む培地を用いた。上記と同様の方法で加温した後、細胞を燐酸緩衝液で3回洗浄し、その直後にeffluxを防ぐため50%エタノールで固定した。固定後の細胞の蛍光強度をflow cytometry(FACS III: Becton Dickinson)を用いて測定しADRの細胞内濃度とした。光源にはアルゴンレーザーを用い、488nmで励起し520nm以上を検出した。

**In Vivo:** ICRマウスの腹腔内で継代されたSarcoma-180 (S-180)細胞 $3 \times 10^6$ 個を、4週齢メスのICRマウスの大腿部皮下に移植した。2週間後に腫瘍径が約10mmになった時点で実験に用いた。1群に9から12匹のマウスを用いた。加温にはwater bathを用い、特製の固定具に固定したマウスの腫瘍移植側下肢全体を温水中に浸した。血流への影響を考慮して無麻酔で加温した。腫瘍内の温度は5分以内に目的の温度に達した。全身の加温を防ぐため送風を行い、直腸内の温度が39℃を越えないようにした。腫瘍の体積が4倍になるのに要した日数をtumor growth time(TGT)とし抗腫瘍効果の判定に用いた。ADRは生理食

塩水で1mg/mlに希釈し、10μg/g.b.w.を加温の直前に腹腔内に注入した。分割投与の影響をみる実験ではADR(3.3μg/g.b.w.)の腹腔内投与と30分の加温を72時間間隔で3回行った。ADRの腫瘍組織内濃度は増池らの方法<sup>10)</sup>に準じ高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて測定した。使用したカラムはTSK gel ODS-120T(4.6mmID \* 25cm:東洋曹達)で、移動相にはリン酸緩衝液とアセトニトリルの混液(70:30)を用い、流速は1.00ml/minとした。検出には蛍光検出器(FS-8000:東洋曹達)を使用し、励起波長には480nmを、検出波長には585nmを用いた。

## 3. 結果

**細胞致死効果:** Fig. 1にADRと加温を併用した時の培養V79細胞に対する致死効果を示す。40℃、43℃とも加温単独の場合よりも強い殺細胞効果がみられるが、43℃では加温単独との差は少なくADR単独の効果との相加効果程度と考えられる。これに対し、40℃では加温単独での殺細胞効果はほとんどなく、ADR併用による効果の増強は相乗的と考えられる。

**腫瘍増殖抑制効果:** ICRマウスに移植したS-180固形腫瘍に対する加温とADRの抗腫瘍効果をFig. 2に示す。40℃加温単独では腫瘍増殖の抑

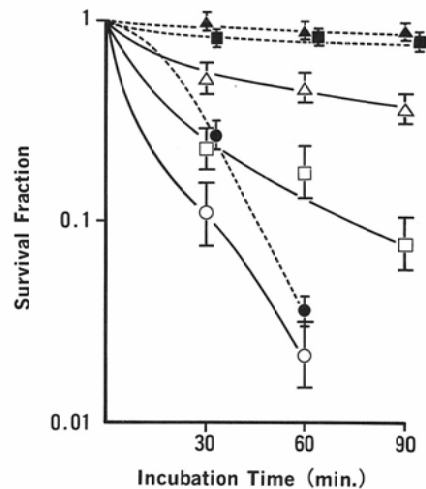


Fig. 1 Effect of elevated temperature on cell survival of V79 cells: hyperthermia [(▲) 37℃, (■) 40℃, (●) 43℃] and combined effect with ADR [250ng/ml: (△) 37℃, (□) 40℃, (○) 43℃].

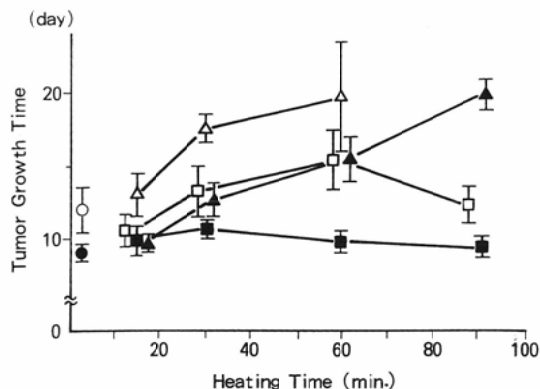


Fig. 2 Effect of local hyperthermia with ADR ( $10 \mu\text{g/g.b.w.}$ ) on tumor growth time (TGT) of S-180 solid tumors in vivo. This effect was compared with unheated controls (tumors treated only with ADR or local hyperthermia); (●) unheated control, (○) ADR alone, (■)  $40^\circ\text{C}$  without ADR, (▲)  $43^\circ\text{C}$  without ADR, (□)  $40^\circ\text{C}$  with ADR, (△)  $43^\circ\text{C}$  with ADR.

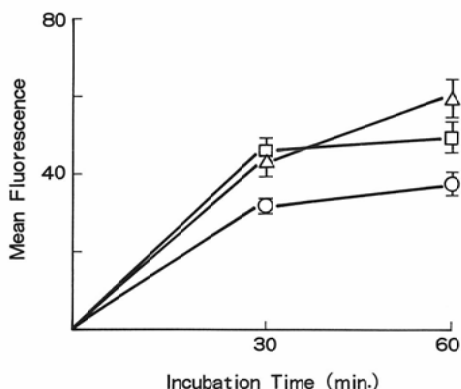


Fig. 3 Effect of temperature and duration of hyperthermia on the amount of ADR uptake by V79 cells. Cells were incubated with ADR ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) at  $37^\circ\text{C}$  (○),  $40^\circ\text{C}$  (△),  $43^\circ\text{C}$  (□).

制効果は全くみられず、 $43^\circ\text{C}$ でのみ加温単独で抗腫瘍効果が認められた。ADR と加温を併用した場合には $43^\circ\text{C}$ のみならず $40^\circ\text{C}$ でも ADR 単独よりも強い抗腫瘍効果が認められた。しかも、 $43^\circ\text{C}$ では加温単独と ADR 併用時の抗腫瘍効果の差は加温時間に関係なくほぼ一定であるのに対し、 $40^\circ\text{C}$ では加温時間が60分までは時間とともに差が大きくなる傾向にあり相乗作用があると考えられる。

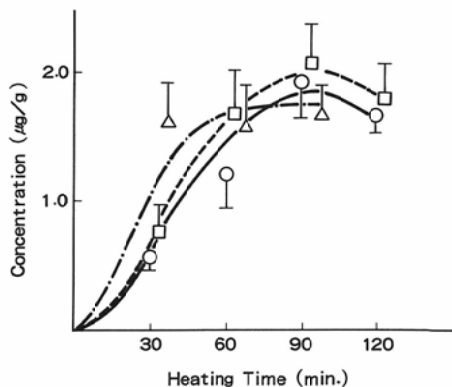


Fig. 4 Change in concentration of ADR in a solid S-180 tumor with and without hyperthermia. The drug concentration was measured at 30, 60, 90, and 120min after the i.p. administration of ADR ( $10 \mu\text{g/g.b.w.}$ ); (○) unheated, (□)  $40^\circ\text{C}$ , (△)  $43^\circ\text{C}$ .

$40^\circ\text{C}$  90分の加温と ADR の併用では60分加温時よりも効果の減少がみられ、培養細胞と異なる結果となった。

細胞内への ADR 取り込み：Fig. 3 に培養 V79 細胞を $5 \mu\text{g/ml}$  の ADR を含む培地中で $37^\circ\text{C}$ 、 $40^\circ\text{C}$  または $43^\circ\text{C}$  に保持したときの細胞内への ADR 取り込み量の変化を示す。 $37^\circ\text{C}$  に比べ $40^\circ\text{C}$ 、 $43^\circ\text{C}$  では ADR の細胞内濃度増加が著しいが、 $40^\circ\text{C}$  と  $43^\circ\text{C}$  の差は少ない。

腫瘍組織への ADR 取り込み：ICR マウスの腹腔内に ADR ( $10 \mu\text{g/g.b.w.}$ ) を投与したときの S-180 移植固形腫瘍での加温時及び非加温時の腫瘍組織内 ADR 濃度の変化を Fig. 4 に示す。非加温時には90分ではほぼピークに達し、徐々に低下した。 $40^\circ\text{C}$  の加温を行うとすべての時点で腫瘍組織内の ADR 濃度は非加温時よりも高値を示した。 $43^\circ\text{C}$  では加温時間が30分の場合には非加温、 $40^\circ\text{C}$  加温よりも高値であったが、それ以上の加温を行っても腫瘍組織内の ADR 濃度に変化がみられず、加温時間が90分の時点では非加温、 $40^\circ\text{C}$  加温の場合よりもむしろ低値を示した。

ADR の投与時期と抗腫瘍効果：ADR ( $10 \mu\text{g/g.b.w.}$ ) と加温 ( $40^\circ\text{C}$  60分) を併用した時の抗腫瘍効果が ADR 投与と加温の間の時間間隔の違いでどのように変わるかをみた (Fig. 5)。加温開始直前

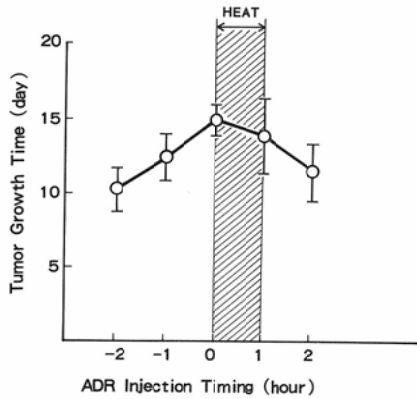


Fig. 5 Effect of sequential treatments with hyperthermia (40°C for 60min) and ADR (10 $\mu$ g/g.b.w.) on TGT of a solid S-180 tumor in vivo.

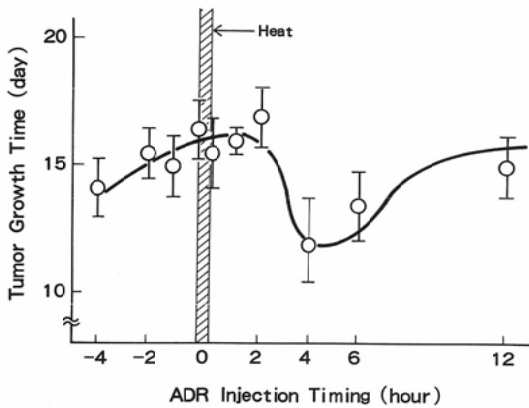


Fig. 6 Effect of sequential treatments with hyperthermia (43°C for 30min) and ADR (10 $\mu$ g/g.b.w.) on TGT of a solid S-180 tumor in vivo.

に ADR を投与した場合に最も強い抗腫瘍効果がみられ、ADR の投与と加温の時間間隔が開くほど抗腫瘍効果は低下した。加温前投与と加温後投与では加温と ADR 投与の時間間隔が同じであれば抗腫瘍効果はほぼ同じであった。

次に、43°C 30分加温について ADR (10 $\mu$ g/g.b.w.) の投与と加温との時間間隔の抗腫瘍効果に対する影響をみた (Fig. 6)。ADR を加温の前に投与した場合には加温との時間間隔が大きくなるにたがって抗腫瘍効果はほぼ直線的に減少した。これに対し、ADR を加温の後に投与した場合には 2 時間後までは抗腫瘍効果の減少はみられず、加

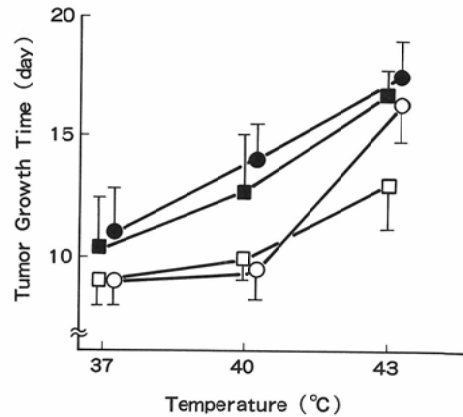


Fig. 7 Effect of fractionated ADR administrations combined with hyperthermia on TGT of a solid S-180 tumor in vivo: (□) hyperthermia (single: 30min), (○) hyperthermia (three fractionations: 30min $\times$ 3), (■) hyperthermia (single) with ADR (10 $\mu$ g/g.b.w.), (●) hyperthermia (three fractionations: 30min $\times$ 3) with ADR (three fractionations: 3.3 $\mu$ g/g.b.w.  $\times$ 3 with each fractionated heating).

温の 4 時間後に ADR を投与した場合に著明な抗腫瘍効果の減少が認められた。この抗腫瘍効果の低下はその後徐々に回復してきた。

ADR の分割投与と抗腫瘍効果：ADR の総投与量を 10 $\mu$ g/g.b.w. とし、1 回投与と 3 分割投与で抗腫瘍効果を比較した (Fig. 7)。加温単独の場合には 40°C では 1 回加温 3 回加温ともほとんど抗腫瘍効果がみられなかった。43°C では 1 回加温、3 回加温とも抗腫瘍効果があり、3 回加温でより強い抗腫瘍効果がみられた。ADR と加温の併用では 40°C、43°C とも 1 回加温と 3 回加温であまり差がみられなかった。

#### 4. 考 察

温熱療法による腫瘍細胞致死効果は、多くの細胞において 43°C 付近を境に急激に増大する<sup>(1)(14)</sup>。したがって、臨床における温熱療法でも 43°C 以上の加温が望ましいと考えられている。しかしながら、臨床的に腫瘍全体を 43°C 以上に加温することは容易ではなく、実際には 40°C 程度の加温しか得られないことが多い。化学療法と温熱療法を併用する場合の相互作用についても、43°C のみならず 40°C 程度の加温条件下でも検討する必要がある。

ブレオマイシン<sup>6)15)</sup>やアンホテリシン B<sup>16)</sup>では43℃以上に加温しないと相加以上の効果は得られず、BCNU<sup>5)17)18)</sup>、CCNU<sup>5)19)</sup>、シスプラチン<sup>20)21)</sup>では39℃から41℃の比較的低い温度でも相乗効果が認められている。ADRの場合には他の薬剤の場合と異なり、43℃の加温中に耐性が生じて細胞致死効果が減少するなど複雑な変化を示す<sup>5)6)22)</sup>。我々の実験結果でも43℃加温との併用では培養細胞への致死効果は相加以上ではなく、従来の報告とはほぼ一致している。一方、40℃の加温では加温単独での効果はほとんどみられないが、ADRとの併用により相加以上の効果が得られており、41℃の加温では43℃の様なADR耐性の誘導はみられないというHahnらの報告<sup>22)</sup>と同様の結果が得られた。細胞内へのADR取り込みの点でも、40℃と43℃であまり差がなく、加温開始後60分ではむしろ43℃のほうが取り込み量が低下していることは、43℃でのADR耐性の誘導を示唆するものと考えられる。移植腫瘍ではADRと加温の併用により抗腫瘍効果が増強される<sup>23)</sup>という報告と増強されない<sup>24)</sup>という報告があり一定していない。今回の我々の検討結果では43℃では相乗効果がみられず、40℃では相加以上の効果がみられた。この結果からはADRと加温の併用では比較的温度の上がりにくい腫瘍辺縁部や深部の腫瘍で効果が期待される。また、相乗効果のみられた40℃加温で、相乗効果しかみられなかった43℃加温時以上の腫瘍組織内ADR濃度増加がみられたことは抗腫瘍効果増強の一因として加温による腫瘍組織内取り込み増加が寄与していると考えられる。この腫瘍組織へのADR取り込みには細胞レベルでの取り込み増加の他に腫瘍血流も関与すると考えられるが、43℃では腫瘍血流が低下することが知られており<sup>25)26)</sup>、40℃という腫瘍血流の増加する温度が化学療法剤との併用には有利と考えられる。しかし、40℃加温においても移植腫瘍では90分加温のほうが60分加温よりも抗腫瘍効果が弱く、培養細胞の場合と異なる結果となった。この原因として、移植腫瘍では血液中のADR濃度減少に伴い血流増加部位でのADRの洗い出しが多くなること等が考えられるが、今後の検討課題で

ある。

加温と化学療法剤の投与時期の関係も抗腫瘍効果に重大な影響を与える。Wallnerら<sup>27)</sup>はマイトマイシンCとシスプラチンで、42℃加温での薬剤投与タイミングと殺細胞効果の関係を検討し、同時投与で最も強い効果が得られたと報告している。Hahnら<sup>28)</sup>も43℃加温とBUNUをもちいて同様の結果を報告している。今回の我々の移植腫瘍での検討結果でも40℃、43℃ともにADRと加温を同時に併用した場合に最も強い投腫瘍効果がみられ、臨床でも加温と抗腫瘍薬剤投与を同時に行うべきと考えられる。40℃では加温前投与と加温後投与で効果に差がみられなかったが、43℃では加温の4時間後にADRを投与した場合に抗腫瘍効果の抑制がみられ、その後しだいに効果が回復してきた。この原因としては、加温により誘導されるADR耐性<sup>22)</sup>、細胞周期による感受性の差、加温による腫瘍血流の変化<sup>25)</sup>等が関与していると考えられる。

ADRはその心毒性のために投与可能な総量が限定される。一方、温熱療法には重篤な副作用もなく、繰り返し治療を行うことが可能である。この点を考慮してADRの総投与量を一定にし、治療回数を変化させて抗腫瘍効果を比較した。すなわち1回治療ではADR 10 $\mu$ g/g.b.w.と43℃30分の加温を併用し、3分割治療では3.3 $\mu$ g/g.b.w.のADRと43℃30分加温の併用を72時間の処置間隔をおいて施行した。加温量としては3分割治療では1回治療の3倍の治療をしたことになる。しかし、抗腫瘍効果には明らかな差がなく、特に43℃では3分割治療での抗腫瘍効果は加温単独を3回施行した場合とほとんど差がみられなかった。この原因としては加温によるADR耐性の出現、ADRによる熱耐性の出現など複雑な要因が関与しているものと考えられるが、いずれにしても臨床においてADRと温熱療法を併用する場合には分割の影響を十分に考慮する必要があると考えられる。

## 5. 結 語

ADRと温熱療法の併用効果について、培養V79細胞と移植S-180固形腫瘍を用いて検討し以

下の結果を得た。

(1) 培養細胞では40℃の加温により ADR の抗腫瘍効果が増強されたが、43℃ではその増強は小さく認められた。

(2) 培養細胞、移植腫瘍とも加温により ADR の取り込みが増加したが、40℃と43℃であまり差がみられなかった。

(3) 加温と同時に ADR を投与したときに比較的強い抗腫瘍効果が得られた。

(4) ADR と温熱療法の分割処置は1回処置と比較して効果の差を示さなかった。

稿を終えるにあたり、御校閲を賜った関西医科大学放射線科学教室教授田中敬正先生ならびに直接指導をいただいた長谷川武夫先生、赤木 清先生、加藤 勲先生に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 前田迪郎, 古賀成昌: 全身温熱療法の現況と併用制癌化学療法, 癌と化学療法, 12: 2106—2113, 1985
- 2) 山中直樹, 加藤信夫: 化学療法と全身加温, 癌と化学療法, 12: 2100—2105, 1985
- 3) 田中敬正, 村田貴史, 吉田正徳, 他: 肝がんに対する動脈塞栓術と温熱療法併用による制がん効果増強, 癌と化学療法, 14: 396—403, 1987
- 4) 米村 豊, 藤村 隆, 竹川 茂, 他: 切除不能悪性肝腫瘍に対する温熱療法を用いた集学的治療, 日本ハイパーサーミア誌, 3: 41—47, 1987
- 5) Hahn GM: Potential for therapy of drugs and hyperthermia. *Cancer Res* 39: 2264—2268, 1979
- 6) Mizuno S, Amagai M, Ishida A: Synergistic cell killing by antitumor agents and hyperthermia in cultured cells. *Gann* 71: 471—478, 1980
- 7) Patterson, J, and Strang R: The role of blood flow in hyperthermia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5: 235—241, 1979
- 8) Song CW, Kang MS, Rhee JG, et al: The effect of hyperthermia on vascular function, pH and cell survival. *Radiology* 137: 795—803, 1980
- 9) Gerweck LE, Jennings M, Richards B: Influence of pH on the response of cells to single and split doses of hyperthermia. *Cancer Res* 40: 4019—4024, 1980
- 10) 増池健年, 大嶽純一, 小波蔵政弘, 他: 高速液体クロマトグラフィーによる生体試料中のアドリアマイシンとその代謝物の定量(第2報). 抽出法による組織の分析, 薬学雑誌, 104: 620—623, 1984
- 11) Miyakoshi J: Responses to hyperthermia (42, 44°) and/or radiation in four mammalian cells in vitro. *J Radiat Res* 22: 352—366, 1981
- 12) Robinson JE, Wizenberg MJ: Thermal sensitivity and the effect of elevated temperatures on the radiation sensitivity of Chinese hamster cells. *Acta Radiologica* 13: 241—248, 1974
- 13) Harisiadis L, Hall EJ, Kraljevic U, et al: Hyperthermia: Biological studies at the cellular level. *Radiology* 117: 447—452, 1975
- 14) Li GC, Hahn GM, Shiu EC: Cytotoxicity of commonly used solvents at elevated temperatures. *J Cell Physiol* 93: 331—334, 1977
- 15) Hahn GM, Braun J, Har-Kedar I: Thermochemotherapy: Synergism between hyperthermia (42°C—43°C) and adriamycin (or bleomycin) in mammalian cell inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 937—940, 1975
- 16) Hahn GM, Li GC, Shiu E: Interaction of amphotericin B and 43°C hyperthermia. *Cancer Res* 37: 761—764, 1977
- 17) Twentyman PR, Morgan JE, Donaldson J: Enhancement of hyperthermia of the effect of BCNU against the EMT6 mouse tumor. *Cancer Treat Rep* 62: 439—443, 1978
- 18) Herman TS, Sweets CC, White DM, et al: Effect of heating on lethality due to hyperthermia and selected chemotherapeutic Drugs. *J Natl Cancer Inst* 68: 487—491, 1982
- 19) Joiner MC, Steel GG, Stephens TC: Response of two mouse tumors to hyperthermia with CCNU or melphalan. *Br J Cancer* 45: 17—26, 1982
- 20) Barlogie B, Corry PM, Drewinko B: In vitro thermochemotherapy of human colon cancer cells with cis-dichloro-diammineplatinum (II) and mitomycin C. *Cancer Res* 40: 1165—1168, 1980
- 21) Meyn RE, Corry PM, Fletcher SE, Demetriades M: Thermal enhancement of DNA damage in mammalian cells treated with cisdiamminedichloro-platinum (II). *Cancer Res* 40: 1136—1139, 1980
- 22) Hahn GM, Strande DP: Cytotoxic effects of hyperthermia and adriamycin on Chinese hamster cells. *J Natl Cancer Inst* 57: 1063—1067, 1976
- 23) Overgaard J: Combined adriamycin and hyperthermia treatment of a murine mammary carcinoma in vivo. *Cancer Res* 36: 3077—3081, 1976
- 24) Marmor JB, Kozak D, Hahn GM: Effects of systemically administered bleomycin or ad-

- riamycin with local hyperthermia on primary tumor and lung metastasis. *Cancer Treat Rep* 63: 1279-1290, 1979
- 25) Kang MS, Song CW, Levitt SH: Role of vascular function in response of tumors in vivo to hyperthermia. *Cancer Res* 40: 1130-1135, 1980
- 26) Song CW, Rhee JG, Haumschild DJ: Continuous and non-invasive quantification of heat-induced changes in blood flow in the skin and RIF-1 tumor of mice by laser Doppler flowmetry. *Int J Hyperthermia* 3: 71-77, 1987
- 27) Wallner KE, Li GC: Effect of drug exposure duration and sequencing on hyperthermic potentiation of mitomycin-C and cisplatin. *Cancer Res* 47: 493-495, 1987
-