

培養細胞における細胞周期の変動と熱耐性の 発現に関する研究

岡山大学医学部放射線医学教室 (指導: 平木祥夫教授)

松 原 伸 一 郎

(平成4年3月24日受稿)

Key words: 熱耐性, 細胞周期, 培養細胞, ハイパーサーミア

緒 言

近年, 温熱療法は癌の集学的治療の一つとして注目されている。細胞に温熱処理すると殺細胞効果を示し, 処理温度と処理時間に依存している¹⁾。温熱の殺細胞効果は細胞の種類や温熱の処理方法によってその反応が異なるし, 細胞の環境例えば温熱処理時の pH^{2),3)}, 栄養状態⁴⁾, 酸素の供給状態⁵⁾に左右される。温熱に対する細胞学的研究は温熱治療時の生体内の腫瘍環境を類推し, その状態を in Vitro で検討されている。温熱は放射線との併用で増強効果があることが知られており⁶⁾, また, 制癌剤との併用でより効果が増強されている⁷⁻¹⁰⁾。

一方, 生体が温熱にさらされると生体は温熱に対し防護反応 (熱耐性) を示す¹¹⁻¹³⁾。臨床での温熱療法で腫瘍細胞が熱耐性を獲得することは治療効果の低減, あるいは治療の方法が制限される。従って, この熱耐性の発現機序を明らかにすることはより有効な温熱治療を行う上で重要なことである。

熱耐性の発現機構に関する研究は主に培養細胞を使用して行われており, 温熱処理に伴い細胞内に出現する heat shock protein (HSPs) と熱耐性との関連が注目されている¹⁴⁻¹⁷⁾。熱耐性が発現される際, 細胞内に合成される HSPs の種類と出現する時間が幾種類の細胞で研究されている。NIH 3 T 3 細胞は温熱に対し大きな耐熱性を発現することが認められており, その熱耐性はセファランチン, ベラパミール, グリチルリチン及びケルセチンによって抑制されるこ

とが報告されている¹⁸⁻²⁰⁾。また, ケルセチンは特殊な細胞内タンパク質の合成を阻害し熱耐性を抑制すると考えられている^{20),21)}。

一方, 細胞は温熱に対して細胞周期依存性があり放射線に低抗性の S 期が温熱に感受性が高いことから併用の有用性が報告された¹⁹⁾。また, S 期細胞は比較的緩い温熱処理 (42°C) によっても S 期の移行が阻害されるし, G₂-block が惹起される^{1),22-23)}。しかしながら, 温熱処理後の細胞の動態と熱耐性の発現の関連, 並びに熱耐性の発現の細胞周期依存性に付いては未だ明らかでない。

温熱処理後の細胞の動態の変動, 温熱に対する細胞周期依存性, 熱耐性の発現様式及び細胞周期依存性について検討を加えた。

材 料 と 方 法

1. 細 胞

使用した細胞は, NIH 3 T 3 細胞 (Thomas Jefferson 大学 Renato Baserga 教授供与) である。培養は, Dulbecco's modified Eagle medium (日水製薬) に Penicillin (100単位/ml) (明治製菓) および10%仔牛血清 (Gibco) を添加した培養液を使用し, 細胞は10⁵個/シャーレ (Falcon) で継代培養し, 37.0°C で 5% CO₂ + 95% air の CO₂ インキュベーターで培養した。対数増殖期の実験開始48時間前に播種した。同調細胞は1%仔牛血清で4日間培養することによって G₀期細胞を作成した²⁴⁾。

2. 細胞周期の分画の測定

細胞当たりの DNA 量の測定は Propidium

Iodide (PI) (Sigma) 染色を行いその蛍光量を Flow Cytometry (FCM; EPICS 753型) を用いて測定した。測定標本の作成は次の如くである。対数増殖期の細胞を温度処理を行った後トリプシンにて単一細胞とし、冷 Phosphate Buffer Saline (PBS) にて洗滌し、冷70%エタノールで固定し、-20℃で24時間保存した。遠心 (1,000 rpm, 5分) によりエタノール除去後、PBSで洗滌後 PBS にて細胞を浮遊させ、これに等量の1% RNase (Sigma) 液を加え37℃, 30分間 incubation 後、RNase を除去するため PBS で

洗滌した。再び PBS に細胞を浮遊させ PI を 50 µg/ml になるように添加し、40 µm ナイロンメッシュで濾過した。FCM は、488 nm で励起し 530 nm 以上の蛍光量を測定し、10,000個の細胞から DNA ヒストグラムを得た。このヒストグラムから細胞周期の各分画を求めた¹⁰⁾。

3. 加温

加温処理は25cm² フラスコ (Nunc) に細胞を播種し、密栓したのち恒温水槽 (大洋科学) に浸けて行った。温度は基準温度計で計測し、温度は±0.05℃でコントロールされた。

4. 熱耐性の発現の測定

温熱処理を行った後細胞を37℃に放置し再び温熱処理を行うと、初回での温熱に対する感受性に比較して2回目の温熱に対しては抵抗性を示す。本実験では初回、2回目の温熱処理に45℃を使用 (45℃ 2分割法) し熱耐性の発現を測定した。実験の温度処理の方法は図1の如くである。

5. 細胞の生存率

細胞の温熱に対する感受性はコロニー形成法を使用した生存率から測定した。温熱処理した細胞をシャーレ (細胞周期での熱感受性を観察した場合はフラスコを直接使用) に播種後、CO₂ incubator 中にて10日間培養した。コロニーはホルマリンで固定後ギムザ染色し細胞数50個以上

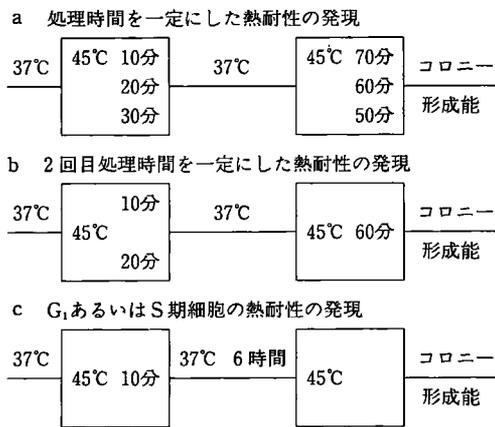


図1 温熱耐性の発現を観察する45℃分割の処理順

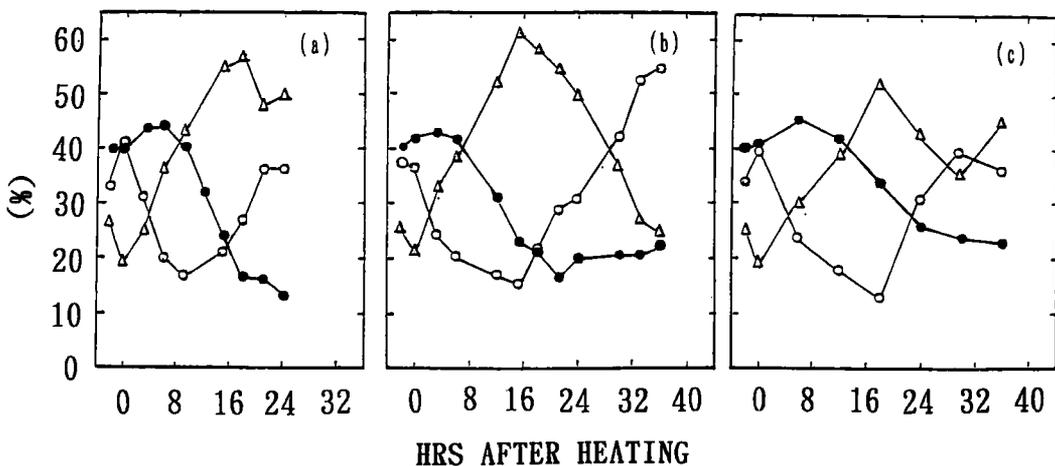


図2 温熱処理後の細胞周期の変動

温熱処理は a : 43℃ 60分, c : 45℃ 10分処理を示す。

○ : G₁期細胞, ● : S期細胞, △ : G₂+M期細胞

のコロニー数を計測し、コントロールに対する比から生存率を求めた。

結 果

1. 各種温度処理に伴う細胞周期の変動

対数増殖期の細胞に43℃60分、44℃20分、40分及び45℃10分処理後の細胞周期の変動を観察した。播種後48時間（コントロール）の細胞周期でG₁、S、G₂+M期の分画はそれぞれ36、40、24%であった。44℃20分の温熱処理を行うとG₂+Mの分画が蓄積し（G₂ブロック）、処理後16時間にはピークとなり、その後減少するS期の細胞は温熱処理直後から僅かな増加が観察され、処理後8時間から減少する。G₁期分画は温熱処理直後から減少し、処理後16時間から増加する（図2b）。43℃60分、45℃10分の処理でもほぼ同様な結果が得られた（図2a、c）。また、44℃40分処理では20分処理に比較して効果が増強され、温熱処理後40時間にG₂+M分画の増加が続いた（図3）。

2. 43℃、44℃及び45℃処理による殺細胞作用

43℃、44℃及び45℃連続処理による殺細胞効果を観察した。横軸に温熱処理時間、縦軸に生存率を対数で示すと図4のように処理時間が短い所で肩を持つ直線となる。生存率10%にする43℃、44℃、45℃の処理時間はそれぞれ140分、74分、27分であり、43℃、44℃、45℃と処理温度を増加させると曲線の勾配が急峻となる。

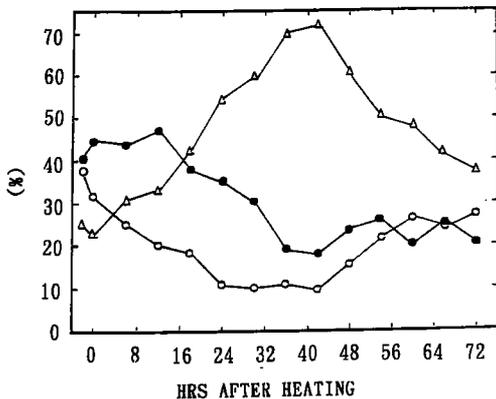


図3 温熱処理（44℃ 40分）後の細胞周期の変動
○；G₁期細胞，●；S期細胞，△；G₂+M期細胞

3. 細胞密度と温熱感受性

対数増殖中の細胞をフラスコ（25cm²）当たりの細胞数を変えて播種した後24時間に45℃30分処理し、その殺細胞効果を観察した。7×10⁴細胞/25cm²から1.6×10⁵細胞/25cm²では生存率は8%では一定であるが、細胞の播種密度が増加すると生存率が增加する。4.6×10⁶細胞/25cm²か

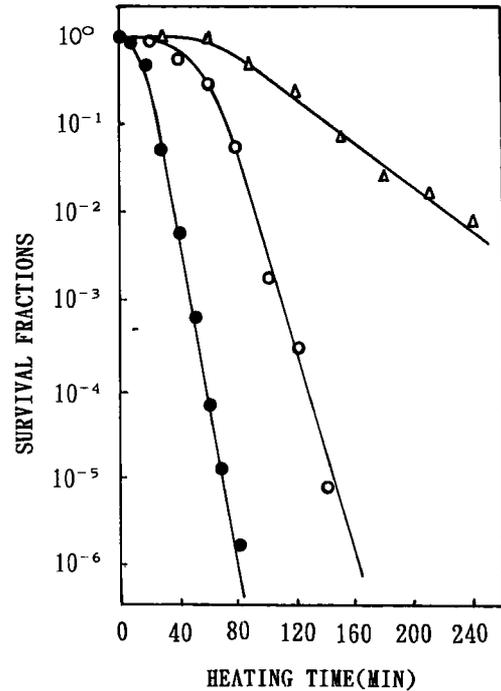


図4 43℃、44℃及び45℃処理による殺細胞効果
●；45℃，○；44℃，△；43℃

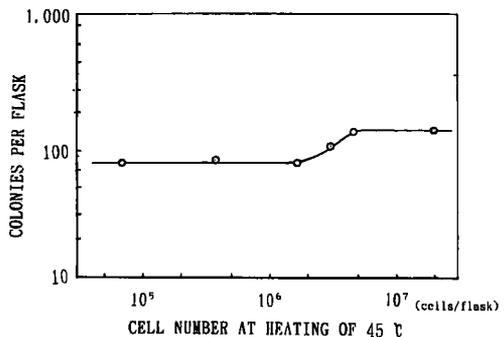


図5 細胞濃度の違いによる温熱感受性
対数増殖期の細胞をフラスコ当たり7×10⁴から2×10⁷細胞を播種した後24時間に45℃ 30分間処理後生存率を観察した。

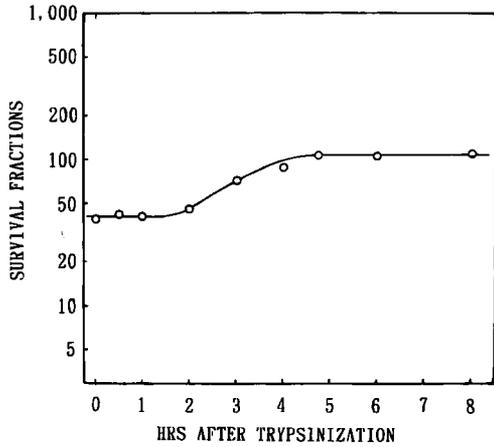


図6 トリプシン処理後の熱感受性の変化
トリプシンにて対数増殖中の細胞を単一細胞とし、1000個/フラスコを播種した後各時間に45℃ 30分処理した後の殺細胞効果を示す。

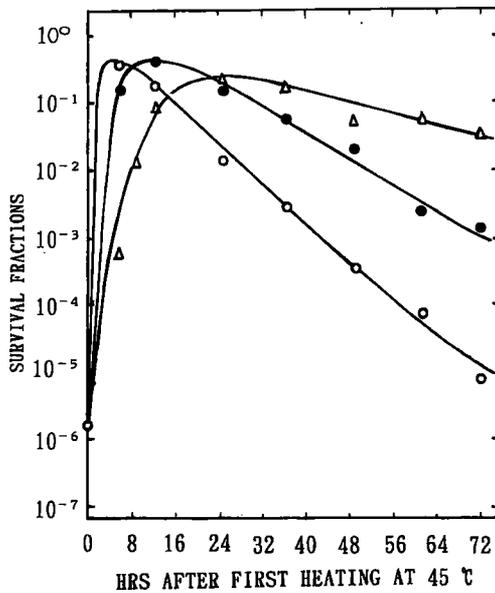


図7 45℃ 2分割における熱耐性の発現
45℃の初回加熱(10分, 20分, 30分)後、37℃にいろいろな時間放置し、再び45℃の2回目加熱(70分, 60分, 50分)後生存率を観察した。
○ ; 45℃10分→37℃(各種時間)→45℃ 70分,
● ; 45℃20分→37℃(各種時間)→45℃ 60分,
△ ; 45℃30分→37℃(各種時間)→45℃ 50分

ら 2×10^7 細胞/25cm²では再び一定となる(図5)。

4. トリプシン処理後の熱感受性の変化

トリプシンにて対数増殖中の細胞とし、1,000個/フラスコを播種した後各時間に45℃30分処理し、殺細胞効果を観察した(図6)。細胞をフラスコに播種後4時間まで生存率の増加が認められ、トリプシンの作用は処理後4時間に消失する。

5. 熱耐性の発現

45℃ 2分割処理による熱耐性の発現を観察した。45℃温熱処理を80分と一定にし、初回の処理を10, 20, 30分とし2回目の処理時間をそれぞれ70分, 60分, 50分処理を行った(図1a)。初回と2回目の間の37℃に置く時間を変化させたときの生存率を図7に示す。熱耐性が最大になるのは10分処理では6時間、20分処理では処理後12時間、30分処理では処理後24時間であった。熱耐性はピークに達した後減少する。初回の処理時間が短い(細胞に対する温熱障害が少ない)程、熱耐性の消失時間が早かった。

一方、2回目の処理時間を60分と一定にし、初回の処理時間10分, 20分と変え、その効果を

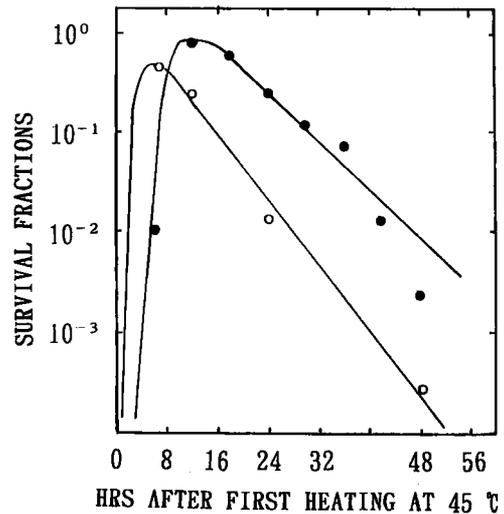


図8 45℃ 2分割における熱耐性の発現
45℃の初回加熱(10分, 20分)後、37℃にいろいろな時間放置し、再び45℃の2回目加熱(60分)後生存率を観察した。
○ ; 45℃10分→37℃(各種時間)→45℃ 60分,
● ; 45℃20分→37℃(各種時間)→45℃ 60分

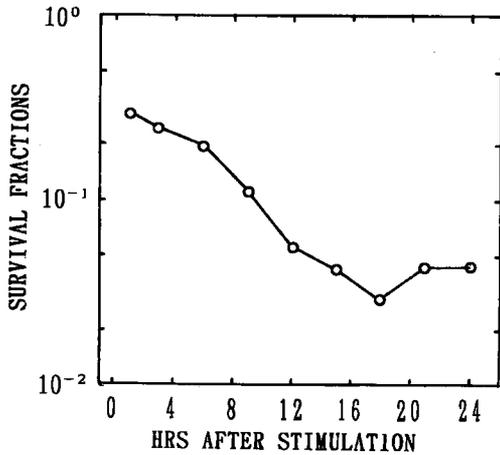


図9 温熱感受性の細胞周期依存性
1%血清で作られた G₀細胞を Fresh DMEM (10%血清を含む) で刺激し、細胞の分裂周期を進行させた。刺激後10時間からS期細胞が出現する。G₀細胞を刺激後各時間に45°C 30分間処理後生存率を観察した。

比較した(図1 b)。図8に示すように熱耐性のピークに達するのは10分処理で6時間、20分処理で12時間であった(図8)。初回の処理時間が短い程、熱耐性の消失時間が早かった。

6. 細胞周期と熱感受性

G₀細胞を10%仔牛血清を含む fresh DMEM で刺激した後、各時間に45°C 30分処理後に生存率を観察した。刺激直後から刺激後10時間まではほとんどの細胞が DNA 量 2c の G₁期にある。対数増殖期野細胞では45°C 30分処理では生存率は約6% (図4) であるがG₁期の生存率は28~20%であり、細胞がS期に入ると生存率が低下し刺激後18時間には生存率は3%であった(図9)。DNA合成が始まると温熱感受性が増加した。

7. G₁期細胞とS細胞の熱耐性の発現

G₁期細胞 (G₀細胞を刺激後6時間) とS細胞 (G₀細胞を刺激後18時間) と45°C 10分の前処理

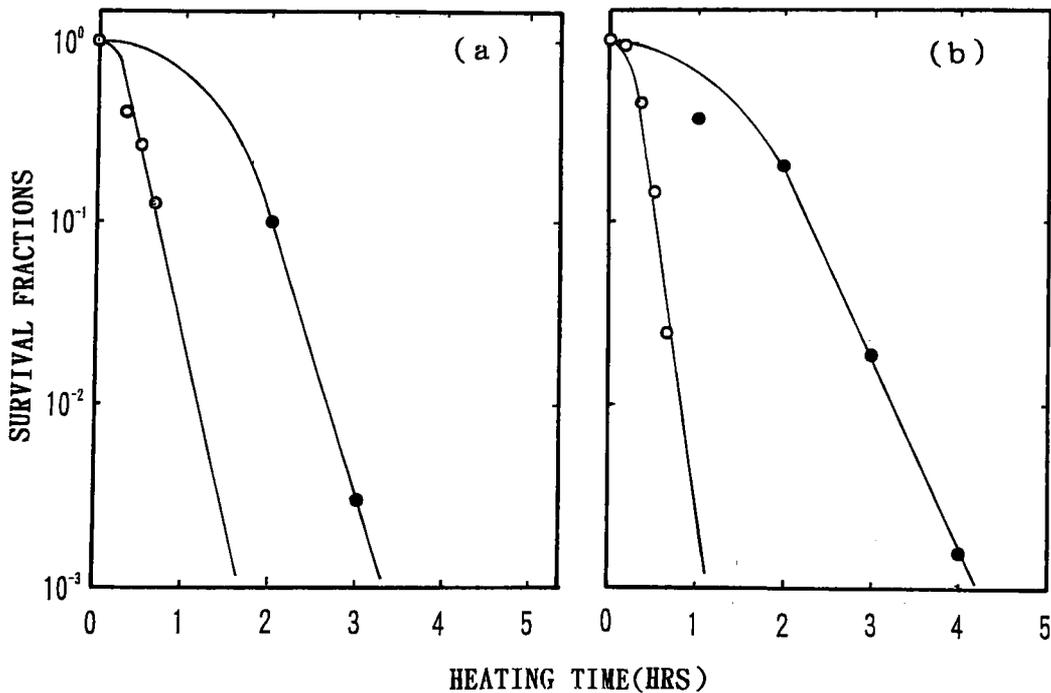


図10 G₁期細胞とS細胞の熱耐性の発現の違い
G₁期細胞は G₀細胞を10%仔牛血清を含む Fresh DMEM で刺激後6時間の細胞で、S期細胞は刺激後18時間の細胞である。それぞれの細胞の温熱感受性 (○) と熱耐性を獲得した細胞の温熱感受性 (●)。熱耐性の測定はそれぞれの細胞に初回加温 (45°C 10分) 後、37°C 6時間放置し、2回目加温として45°C 処理を行い生存率曲線を求めた。
a ; G₁期細胞, b ; S期細胞

により熱耐性を獲得したに G_1 , S 期細胞の 45°C に対する生存率曲線を求めた。図10(a)は G_1 期細胞, (b)は S 期細胞を示す。これらの生存率曲線から外挿値, 直線の勾配 (D_0) 及び肩の大きさ (D_q) を求めると表1のようなになる。 G_1 期の細胞より低かった。しかしながら, 熱耐性を獲得した S 期の細胞 (S_R) の D_0 は G_1 期の細胞より大きかった。従って, 初回の曲線と 2 回目の比を求めると, S 期細胞がいずれの数値とも大きくなる。

表1 G_1 期細胞と S 期細胞の熱耐性の発現の比較

	G_1 細胞		S 期細胞	
	G_1	G_{1R}	S	S_R
外挿値 (n)	3.45	17.8	6.2	23.0
D_q 値	15.0	62.0	14.0	79.0
D_0 値	14.0	22.0	8.0	25.0
(2 回目/初回)				
外挿値 (n) 比	5.16		3.71	
D_q 値 比	4.13		5.64	
D_0 値 比	1.57		3.13	

注 外挿値, D_0 , D_q 値は図9の生存率曲線から求めた。 G_{1R} , S_R : それぞれの耐性獲得細胞

考 察

温熱による細胞の殺細胞効果は, 細胞を温熱処理するときの環境で大きく左右される²⁻⁵⁾。その上, 細胞は温熱で一度処理すると, 次回の温熱に対して耐性を示す¹¹⁻¹³⁾。従って, 癌の温熱療法で, 腫瘍細胞が熱耐性を獲得することは臨床での治療方法の制限, 治療効果の低減となり, 良好な成績を得る上で大きな問題となっている。固形腫瘍における治療時の腫瘍細胞の環境をいろいろと考えて, in Vitro の培養細胞を使用し, 実験が進められている。

培養細胞を使用する場合には温熱を処理するときの細胞への実験条件を一定にしなければならない²⁵⁾。温熱を処理するときの細胞の濃度(細胞密度)で影響されるかどうかを検討した, sparse な状態と dense な状態では同じ温熱処理でもその効果が異なる(図5)ことから本実験では sparse な条件を使用した。また, 膜修飾剤は温熱に対

する増感作用が認められており²⁶⁾, また, 実験ではトリプシン処理により単一細胞にすることから, トリプシン効果を観察し, 細胞が播種後完全にプラスチック面に付着するまでの間に温熱処理すると生存率に影響することが観察された。これらのことを考えに入れて, 本実験を遂行し, 温熱処理にともなう細胞周期の変動と熱耐性の発現について, 及び温熱に対する細胞周期依存性並びに熱耐性の発現の細胞周期依存性について検討した。

温熱に対する感受性はいくつかの細胞で報告されているが¹¹⁻¹³⁾²²⁾, 実験で使用した NIH 3 T 3 細胞は温熱に対して比較的抵抗性を示す細胞である²⁰⁾(図7, 8)。その上, この細胞は熱耐性の発現は大きい細胞であることから²⁰⁾, 本実験を遂行するに有用な細胞であると考えられる。

温熱の殺細胞効果から観察すると細胞周期による依存性は, CHO 細胞で S 期後半に入ると感受性が増加することが認められている⁶⁾。著者の特殊な条件で作成した NIH 3 T 3 細胞の同調細胞でも同様に細胞集団が S 期に入ると温熱感受性が高まる(図9)ことを認めた。

一方, 熱耐性の発現は処理時の障害が大きいほど遅くまで持続し, 45°C 10分処理すると処理後72時間において耐性が消失するが, 30分処理では耐性がまだ発現されている(図8)。細胞回転の進行が遅いと熱耐性の消失は遅いことから²⁵⁾から, 温熱処理後の細胞周期の回転と熱耐性の消失が密接に関係していることが考えられる。

対数増殖している細胞が温熱で処理されると, 細胞周期の進行は各時期(stage)の細胞で感受性が異なり, G_1 期は余り影響されないが, S 期の細胞は遅延する。 G_2 期では G_2 -block が引き起こされる¹⁾。本実験でも加温処理43, 44, 45°C いずれの場合の温熱処理直後から G_2 期の蓄積, S 期の蓄積が観察された(図2)。その上, 加温処理時間が長くなるとその障害も大きくなる(図3)。 45°C 10分処理で S 期分画は処理後12時間まで微増が続き, その後減少する(図2b)。 45°C 2分割により, 熱耐性を観察すると 45°C 10分処理で熱処理後6時間, 20分処理で12時間に耐性がピークになる(図3)。この時間は, 細胞周期では S 期細胞の分画がもっとも多い時期である。

1回の温熱処理ではS期の細胞がもっとも温熱感受性が高いことから(前述)、2回目の温熱処理時に細胞集積により耐性を現したのではないことが明らかになった。

従来、各細胞周期における熱耐性発現は明確にされていない。そこで、著者は同調培養によりS期、G₁期細胞の熱耐性の発現を比較した。45℃10分の前処理後6時間の耐性をG₁、S期細胞で測定し、S期細胞の耐性の発現よりは大きいことを認めた(図1, 表1)。この結果は熱耐性の発現が大きい時に細胞周期のS期、G₂期細胞の蓄積があることから、熱耐性の発現(2分割2回目の温熱処理)では、S期細胞も異なった条件に変化していると考えられる。すなわち、熱耐性発現にも細胞周期依存性があり、各時期(特にS期)で行われる細胞内代謝と密接に関連していることが示唆された。

温熱による耐性の発現はHSPsの産生(特に72kDaのタンパク質)と深く関係していると考えられている²⁷⁾が、これらのタンパク質の合成が温熱の刺激によってS期により盛んに行われている可能性が示唆される。熱耐性を抑制するケルセチンは17, 47, 72kDa等のいくつかのタンパク質の合成を抑制し、72kd HSPsの合成を阻害が熱耐性を抑制すると考えられ²⁸⁾、また、低濃度ではS期細胞の進行を抑制すると考えられる²¹⁾。従って、G₀、G₁期の細胞がDNA合成等代謝が盛んであり、1回温熱処理では感受性が高いけれども、温熱により引き起こされる障害にS期細胞は早く対応し、大きな熱耐性を示すことが考えられ、今後、これら72kDa HSPsの合成と細胞周期の変化との関連を明らかにすることは熱耐性の発現機構を解明する上で興味ある問題である。

結 論

温熱療法の基礎的問題を解決するためにマウス NIH 3 T 3 細胞を使用し、温熱処理にともなう細胞周期の変動、温熱感受性、細胞周期の変動、温熱感受性、細胞周期の変動、温熱感受性、細胞周期での温熱感受性、細胞周期による温熱耐性の発現について検討を加え、次のような知見を得た。

1. 対数増殖期の細胞に43℃60分、44℃20分及び45℃10分の温熱処理を行うと細胞周期のS期の細胞は僅かな蓄積があり、同時にG₂+M期の分画の蓄積(G₂-block)が認められた。これらのS期、G₂+M期の進行の障害は処理する時間が長くなると(44℃40分)、その効果が大きい。

2. 対数増殖期の細胞に43℃、44℃の温熱処理を行い生存率を観察した。処理温度が高くなると殺細胞効果が大きい。

3. 温熱を処理するときの細胞密度が $4.6 \times 10^6/24\text{cm}^2$ 以上では $1.8 \times 10^6/25\text{cm}^2$ 以下と比較して温熱の殺細胞効果が小さくなる。

4. 細胞をトリプシン処理すると、処理後の時間で温熱の殺細胞効果が異なり、処理後4時間には効果が消失する。

5. 45℃2分割における熱耐性の発現の状態を観察すると、処理時間が一定(80分)の場合、初回処理時間が短いほど耐性が最大になる時間が遅れ、2回目処理時間を一定にすると初回の処理時間が少ない程回復が早い。

6. 温熱に対する細胞周期依存性を観察すると、S期になると温度感受性が高い。

7. 細胞周期でS期細胞の熱耐性の発現は、G₁期細胞の発現よりは大きい。

以上の結果から、温熱処理に伴う細胞動態の変動と細胞の温熱耐性の発現の関連について若干の考察を加えた。

本研究の一部は第50回日本医学放射線学会(平成3年4月京都)、並びに第34回日本放射線影響学会(平成3年11月東京)において発表した。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました平木祥夫教授に深甚なる謝辞を捧げるとともに、終始研究の御指導をいただいた岡山大学医療技術短期大学川崎祥二教授に深謝いたします。また快く御協力下さいました教室員諸兄の方々に心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) Dewey W C, Hopwood L E, Sapareto S A and Gerweck L E : Cellular responses to combinations of hyperthermia of hyperthermia and radiation. *Radiology* (1977) **123**, 463—474.
- 2) Freeman M L, Dewey W C and Hopwood L E : Effect of pH on hyperthermic cell survival : Brief communication. *J Natl Cancer Inst* (1977) **58**, 1837—1839.
- 3) Gerweck L E, Jennings M and Richards B : Influence of pH on the response of cells to single and split doses of hyperthermia. *Cancer Res* (1980) **40**, 4019—4024.
- 4) Kim S H, Kim J H and Hahn E W : Selective potentiation of hyperthermic killing of hypoxic cells by 5-thio-D-glucose. *Cancer Res* (1978) **38**, 2935—2938.
- 5) Overgaard J : Effect of hyperthermia on the hypoxic fraction in an experimental mammary carcinoma *in vivo*. *Br J Radiol* (1981) **54**, 245—349.
- 6) Gerweck L E, Gillette E L and Dewey W C : Effect of heat and radiation on synchronous Chinese hamster cells : killing and repair. *Radiat Res* (1975) **64**, 611—623.
- 7) 川崎祥二, 佐々木功典, 長岡 栄, 江部和勇, 中西 敬, 高橋 学 : Adriamycin の細胞内取り込みへの hyperthermia の影響. *日医放線会誌* (1984) **44**, 727—731.
- 8) Nagaoka S, Kawasaki S, Sasaki K and Nakanishi T : Intracellular uptake, retention and cytotoxic effect of adriamycin combined with hyperthermia *in vitro*. *Jpn J Cancer Res* (1986) **77**, 205—211.
- 9) Nagaoka S, Karino Y, Sasaki K and Nakanishi T : Modification of cellular efflux and cytotoxicity of adriamycin by bisclaulin alkaloid *in vitro*. *Eur J Cancer & Clin Oncol* (1987) **23**, 1297—1302.
- 10) 井上信浩 : Ehrlich 腹水癌細胞における adriamycin 耐性とその克服に関する研究. *岡山医誌* (1990) **102**, 679—690.
- 11) Henle K J, Karamus J E and Leeper D B : Induction of thermotolerance in Chinese hamster ovary cells by high (45°) or low (40°) hyperthermia. *Cancer Res* (1978) **38**, 570—574.
- 12) Henle K J and Deslefsen L A : Heat fractionation and thermotolerance : A review. *Cancer Res* (1978) **38**, 1843—1851.
- 13) Dewey W C and Fsch J L : Transient thermal tolerance : Cell Killing and polymerase activities. *Radiat Res* (1982) **92**, 611—614.
- 14) 大塚健三, 加納永一 : Heat shock protein の生化学的性質及び温熱耐性とのかわり. *日本ハイパーサーミア誌* (1986) **2**, 90—103.
- 15) 畑山 巧, 藤尾長久, 本田謙一, 加納永一, 行岡宗彦 : Heat shock protein 生化学 : 誘導機構と機能. *日本ハイパーサーミア誌* (1986) **2**, 90—103.
- 16) 永田和宏, 平芳一法 : 熱ショック蛋白質の発現と機能. *日本ハイパーサーミア誌* (1987) **3**, 135—154.
- 17) Mehdi S Q and Hahn G M : Effects of hyperthermic temperatures and the synthesis of heat—shock proteins on the lateral diffusion in H-2K. *Int J Hyperthermia* (1990) **6**, 553—561.
- 18) 宇田光伸, 赤木 清, 田中敬正 : 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. *日医放線会誌* (1988) **48**, 1236—1242.
- 19) 奥村 寛, 小松賢志 : 熱耐性と薬剤. *医のあゆみ* (1989) **148**, 8—11.
- 20) Kuroda M, Kawasaki S and Hiraki Y : Modification of thermotolerance by cepharanthin, verapamil and glyzirrizine in NIH 3 T 3 cells. *Acta Med Okayama*, In press.
- 21) 黒田昌宏, 川崎祥二, 平木祥夫 : NIH 3 T 3 細胞の温熱耐性に対するケルセチンの作用. *岡山医誌* (1991) **103**, 973—981.

- 22) Read R A, Fox M H and Bedford J S : The cell cycle dependence of thermotolerance 1. CHO cells heated at 42°C. *Radiat Res* (1983) **93**, 93—106.
- 23) Mackey M A and Dewey W C : Cell cycle progression during chronic hyperthermia in S phase CHO cells. *Int J Hyperthermia* (1989) **5**, 405—415.
- 24) Kawasaki S, Diamond L and Baserga R : Induction of cellular deoxyribonucleic acid synthesis in butyrate-treated cells simian virus 40 deoxyribonucleic acid. *Mol Cell Biol* (1981) **1**, 1038—1047.
- 25) Gerweck L E and Delaney T F : Persistence of thermotolerance in slowly proliferating plateau-phase cells. *Radiat Res* (1984) **97**, 365—372.
- 26) Gloria C L, Shiu E C and Hahn G M : Similarities in cellular inactivation by hyperthermia or by ethanol. *Radiat Res* (1980) **82**, 257—268.
- 27) 大塚健三, Laszle A : ハイパーサーミアにおける熱ショックタンパク質. *細胞工学* (1988) **7**, 58—68.
- 28) 永田和宏 : 熱ショック蛋白質と温熱耐性発現. *代謝* (1988) **25**, 臨時増刊号 癌 235—240.

**The relationship between thermotolerance and changes
of cell cycle after hyperthermia in culture cells**

Shinichiro MATSUBARA

Department of Radiology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. Y. Hiraki)

To examine the appearance of thermotolerance in a random growing population, changes in cell cycle fractions after hyperthermia, thermosensitivity and thermotolerance during the cell cycle were studied in mouse NIH3T3 cells.

Progression of S phase cells was disturbed slightly and a marked increase of G₂ + M cells fraction (G₂-block) was observed after heating (43°C 60min, 44°C 20min, 40min, and 45°C 10 min).

Maximum thermotolerance after 10, 20, and 30min at 45°C appeared at 6, 12, and 24 hrs after heating, respectively.

G₀ cell stimulated with fresh medium containing 10% calf serum, entered into the G₁ and S phase. When these cells were exposed to 45°C for 30min at each point after stimulation, the thermosensitivity to heating changed with progression of time after the stimulation. S phase cells showed the highest thermosensitivity.

Thermotolerance of S phase was larger than that of G₁ phase.

The mechanisms involved in the appearance of thermotolerance were discussed.