

培養グリオーマ細胞に対する温熱の 殺細胞効果に関する研究

—特にACNUとの併用効果について—

岡山大学脳神経外科学教室 (指導: 西本 詮教授)

仲 宗 根 進

(昭和62年4月22日受稿)

Key words: 培養グリオーマ細胞

温熱, ACNU

細胞周期

フローサイトメトリー

緒 言

一般に悪性腫瘍に対しては、手術療法、化学療法、免疫療法、放射線療法などの治療が行なわれているが、いずれも単独では、充分満足のいく効果は得られておらず、種々の併用療法が試みられているのが現状である。近年悪性腫瘍に対する温熱療法が再び注目されるようになり、脳神経外科領域においても、その報告が散見されるようになってきた¹⁻³⁾。1965年 Popovic ら⁴⁾ はハムスター類囊移植腫瘍 (human adenocarcinoma) に対して、4°Cの全身低体温下に腫瘍部分のみを37°Cに10時間加温するという、いわゆる区別低体温法(Differential Hypothermia, 以下D.H.と略す)を行ない腫瘍の完全消失を認めた。さらにD.H.に5-Fluorouracil(5-Fu)を併用すれば、1時間のD.H.処置で同様の抗腫瘍効果が得られたとする一連の報告^{4,5)}を行なった。当教室においては、このD.H.療法を悪性脳腫瘍の補助療法として臨床に応用すべく、1969年以来、種々の基礎的および臨床的研究を続けてきている⁶⁻¹⁵⁾。しかし温熱を実際の臨床に応用するに際しては、脳という特殊な臓器を安全かつ確実に設定した温度に加温する方法が未だ確立されていない現在、D.H.療法単独で充分な

抗腫瘍効果を得ることは困難である。従って現段階では、より高い治療効果を期待するためには他の治療法との併用、たとえばある種の抗腫瘍剤との併用による効果について検討を加えることも重要な課題の1つであろうと考えられる。今回、著者は抗腫瘍剤として本邦において開発され、悪性脳腫瘍の治療に広く用いられているニトロソウレア系化合物であるACNU [1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride]を用いて培養グリオーマ細胞に対する温熱単独、あるいは温熱とACNUとの併用による殺細胞効果について、また温熱が細胞周期に及ぼす影響についても併せて検討した。その結果、温熱を悪性脳腫瘍の補助療法の1つとして確立していく上で興味ある知見が得られたので文献的考察を加えて報告する。

実験材料と方法

1. 培養グリオーマ細胞

C-6細胞は1968年 Benda ら⁹⁾により樹立されたラットグリオーマ細胞株で、当教室において継代培養されたもの(継代160代目から184代目まで)を用いた。さらに1981年4月に39歳の男性の神経膠腫(Astrocytoma Grade III)より

樹立され現在まで53代継代されたヒトグリオーマ (KY) 細胞を用いた。細胞培養には、10%新生児牛血清 (GIBCO, USA) 及び penicillin G (50 unit/ml), streptomycin (50 μ g/ml) を含む pH7.4 に調整した Eagle's MEM (GIBCO, USA) を使用し、ガラス培養瓶 TD-40 (40 \times 100 \times 20 mm, 池本理化工業, 東京) にて 37°C 下で閉鎖静置培養を行なった。

2. 加温および温度測定装置

発泡スチロールで被われた自作のアクリル樹脂製水槽 (30 \times 35 \times 50 cm) に約 50 ℓ の水を入れ、Thermount (大洋科学工業, C-550, 東京) で加温し、恒温槽として使用した。温度測定は Thermistor (Shibaura Electrics, M44-4, 東京) を用い、実験中は $\pm 0.1^\circ\text{C}$ の範囲内に厳密に温度コントロールを行なった。

3. Flow cytometry

培養細胞の細胞動態の解析には flow cytometer (BIO/PHYSICS, Cytofluorograf, 4800 A, USA) を使用した。試料の作製法は Vindelov¹⁶⁾ の変法で、1) 10^7 cells/ml の細胞浮遊液 0.2 ml, 2) 0.1% Triton X-100 溶液 4 ml, 3) 1% Ribonuclease 溶液 0.1 ml の 4 者を混合して用いた⁷⁰⁾。上記方法により DNA 染色を行なった個々の細胞の DNA 量を 20,000~30,000 個の細胞について集計することにより、DNA ヒストグラムの作製を行なった。

4. 温熱および温熱と抗腫瘍剤 (ACNU) との併用による殺細胞効果の検討

温熱単独処置の場合は、C-6 および KY 細胞をそれぞれ 11 本のガラス培養瓶 TD-40 に、C-6 細胞は 10^4 個づつ、KY 細胞は 2×10^4 個づつ植え込み、37°C にて培養を行なった。48 時間培養後に新鮮な培養液 10 ml づつと交換し、直ちに 41°C にセットした恒温槽に浸し加温を開始した。加温開始後 30 分毎に試料を取り出し、コロニー形成能を調べた。これらを加温開始直前のコロニー形成能との比より、41°C におけるそれぞれの細胞の survival curve を作成した。43°C および 45°C についても同様の実験を行なった。ACNU 単独処置の場合も同様に、C-6 細胞は 10^4 個づつ、KY 細胞は 2×10^4 個づつ植え込み、48 時間培養後に、ACNU の濃度が 5

μ g/ml となるように使用直前に調整した培養液 10 ml づつと交換し、直ちに 37°C で incubation を開始した。処置開始後 30 分毎に試料を取り出しコロニー形成能を調べ、コントロールとの比より、ACNU 5 μ g/ml 処置時の survival curve を作成した。20, 40, 80 μ g/ml の ACNU 濃度についても同様な実験を行ない、37°C における種々の濃度の ACNU 処置による survival curve を作成した。次に温熱と ACNU との併用による効果についての検討も、上記と同様な手順で行ない、41°C 加温と ACNU 濃度 5, 20, 40, 80 μ g/ml の同時併用時の survival curve をそれぞれ作成した。43°C 加温でも同様な実験を試みた。コロニー形成能の検索には、まず取り出した試料の培養液を捨て、0.05% トリプシン 5 ml を加えておだやかにピペッティングを行ない、single cell suspension を作製した。次に顕微鏡下で計算板により細胞数を算定した後、培養液を加えて、20 cells/ml の濃度に調整し、100 cells/5 ml づつ直径 6 cm の plastic tissue culture dish 3002 (60 \times 12 mm, Falcon, USA) 3 枚に分注した。これらの dish を 37°C, 5% CO₂ 下で培養器 (Water jacket incubator, Hirasawa, WJ-12-C, 東京) 内にて静置培養を行なった。培養開始後 10~14 日目に 10% ホルマリンで固定、0.2% クリスタルバイオレットで染色し、50 個以上の細胞を含む集落を 1 個のコロニーと算定した。以下それぞれの条件下で同様な操作を繰り返した。無処置コントロールのコロニー形成能は C-6 細胞で 60~70%, KY 細胞で 50~60% であった。

5. 温熱の細胞周期に及ぼす影響の検討

ガラス培養瓶 TD-40, 24 本にそれぞれ約 8~10 万個の C-6 細胞を植え込み、43°C にセットされた恒温槽に浸し、30 分間加温群 8 本、2 時間加温群 8 本、5 時間加温群 8 本の 3 群に分けて処置を行なった。加温終了直後すべての培養液を静かに除去し、新鮮な培養液 20 ml を加えると共に 37°C で incubation を開始した。incubation 開始後 6 時間毎に各群から 1 本づつ試料を取り出し、0.05% トリプシンで細胞を単離、浮遊させ flow cytometer により DNA histogram を作製し、42 時間まで経時的に変化

を観察した。

結 果

1. 温熱単独処置による殺細胞効果

C-6細胞およびKY細胞を41°, 43°, 45°Cにて, 5時間まで加温処置した時の survival curveを示した(図1 a. b). C-6細胞においては, 43°C加温では, 初め比較的大きな shoulderを持った曲線を描いた後, 直線的に cell survival が低下しており, この部分での Do [survival curveの直線部分で生存細胞数を37%に減少させるのに必要な加温時間(分)]は30であった. これに対し, KY細胞では, ほとんど shoulder がみられず, 直線的に cell survival が低下しているが, Doは100であり, C-6細胞に比べKY細胞の方が熱感受性に乏しい結果であった. また45°C, 30分間加温でも cell survival は, C-6細胞が1.8%, KY細胞が20%であり, KY細胞の方が熱耐性であると考えられた.

2. ACNU単独処置による殺細胞効果

培養細胞に種々の濃度の ACNU を単独で作

用させたときの survival curve を示した(図2 a. b). 種々の濃度で ACNU を5時間まで作用させたにもかかわらず, 2時間以降は cell survival に変化が認められなかった. さらに KY細胞は, C-6細胞よりも ACNU に対する感受性に乏しいことも明らかとなった.

3. 温熱と ACNU との併用による殺細胞効果

41°C加温と ACNU との同時併用処置では, C-6 および KY細胞とも ACNU 単独処置による殺細胞効果と比較して明らかな cell survival の低下は認められなかった(図3 a. b). 43°C加温では, 温熱と ACNU のそれぞれ単独処置時の cell survival の単純相加効果は計算上図4 a, 図5 a に示すごとくになる. ところが, 実際の43°C加温と ACNU との同時併用処置では, 図4 b, 図5 b に示すごとく, C-6細胞については, 10μg/ml以上の ACNU 濃度において, また KY細胞では, 5μg/ml以上の ACNU 濃度において, 明らかな相乗殺細胞効果が認められた.

4. 温熱の細胞周期に及ぼす影響

43°C加温処置がC-6細胞の細胞周期に及ぼす

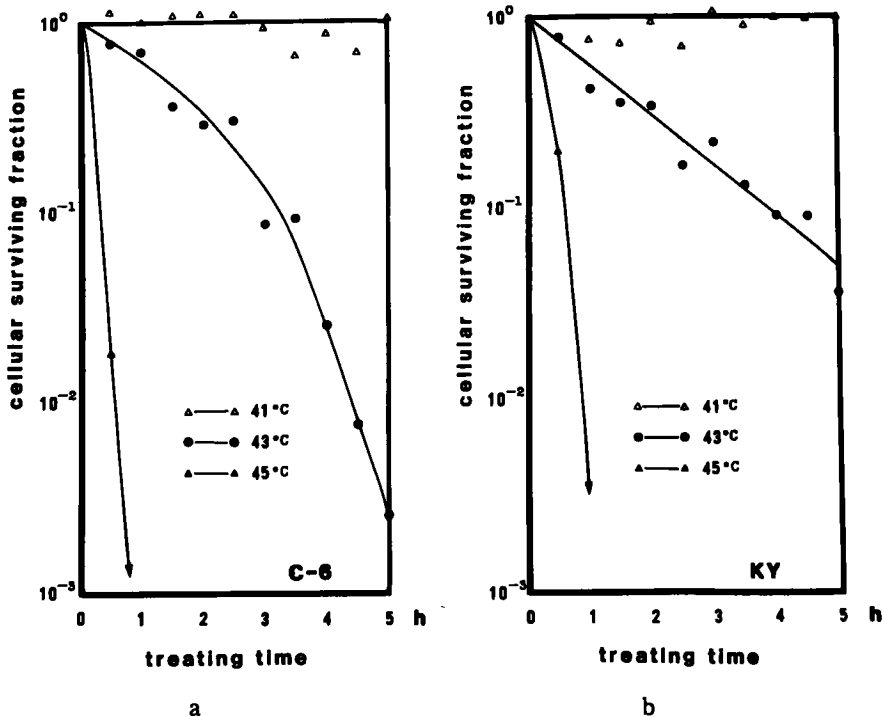


図1 a. b 培養グリオーマ細胞(C-6, KY)に対する温熱単独処置の殺細胞効果

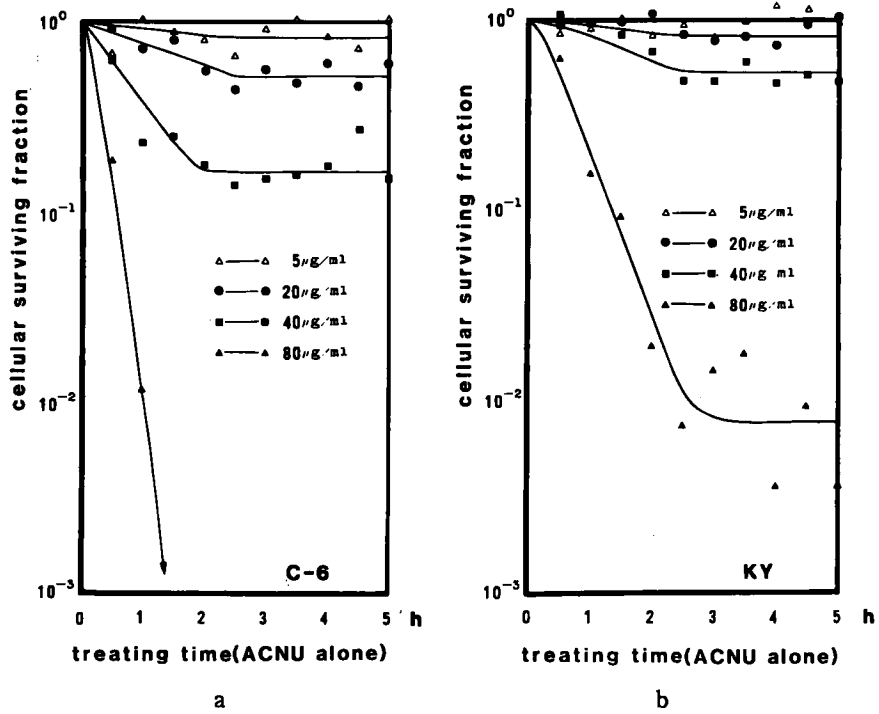


図2 a. b 培養グリオーマ細胞 (C-6, KY) に対する ACNU 単独処置の殺細胞効果

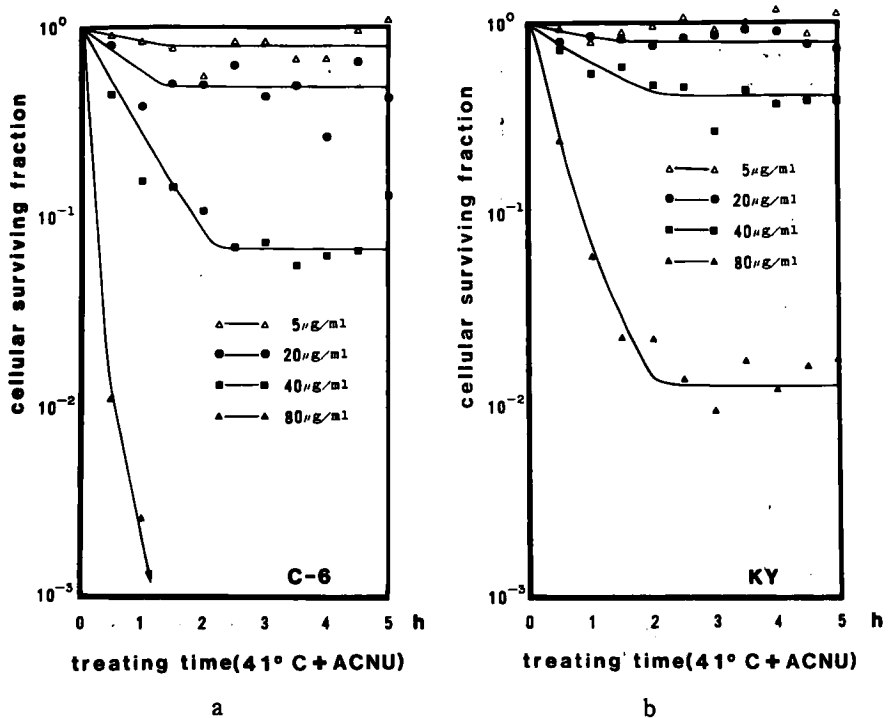


図3 a. b 培養グリオーマ細胞 (C-6, KY) に対する41°C加温とACNUとの同時併用処置による殺細胞効果

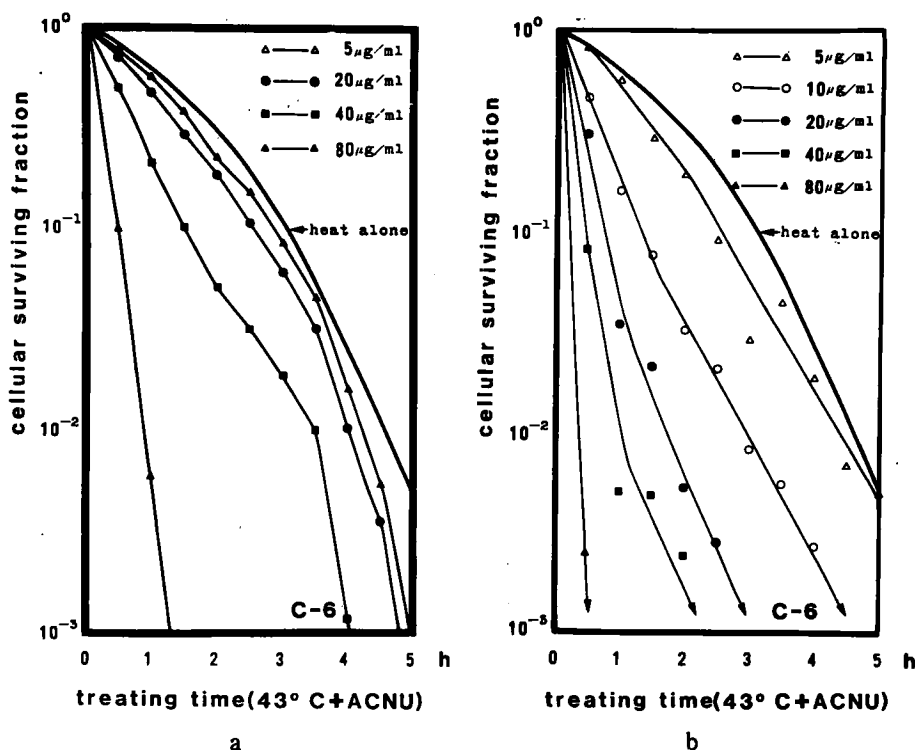


図4 a C-6細胞に対する43°C単独処置並びにACNU単独処置の単純相加殺細胞効果(図1aと図2aより作図)
 b C-6細胞に対する43°C加温とACNUとの同時併用処置による殺細胞効果(実測値)

影響について flow cytometer を用いて検索した。無処置コントロール細胞のDNA histogramを図6に示す。2CピークはGo+G1期(44%), 4CピークはG2+M期(23%)を示し、その間がS期(22%)を示し、残りがfragment(11%)である。本実験では、便宜上、各ピークの接点を垂線で区切り、各phaseの細胞数を算定した⁷⁰⁾。43°Cで30分間、2時間、5時間加温処置時のC-6細胞のcell survivalは、それぞれ80%、30%、0.3%であった(図7)。これら3つの異なった条件下で加温した細胞群の細胞周期の変動は図8の如くであった。その中で、30分間加温処置と2時間加温処置群で特徴的な変化が認められた。図9に、それら代表的DNAヒストグラムpatternを、図10に、各phaseの占める割合の経時的变化を示した。43°C、30分加温では、加温後6時間目に、S期、特にlate S期へ、6~12時間後にG2+M期への細胞の集積が著明となり、さらに12時間後には6C、8Cに相当

する部位に、polyploid cellsと思われるピークが認められた。43°C、2時間加温でも、加温後12時間から24時間にかけてS期へ、次いで30時間後を中心としてG2+M期への細胞の集積が認められ、同時に6C、8Cと思われる部位に小さいピークがみられた。なお、43°C、5時間加温では、細胞周期に明らかな変化は認められなかった。

考 察

培養細胞に対する加温実験は、1912年、Lambert²⁴⁾がマウスの肉腫細胞と正常の結合組織細胞を43°Cで加温し、両者の熱感受性に相違があることを報告したのが最初である。その後、腫瘍細胞と正常細胞との熱感受性の差を認めたとする報告が続いた²⁵⁻³⁰⁾。しかし、一方では、HeLa細胞とヒト線維芽細胞を比較し、両者の間で感受性にはほとんど差がなかったとする報告³¹⁾や、正常細胞の熱感受性の方がより高かったとする逆

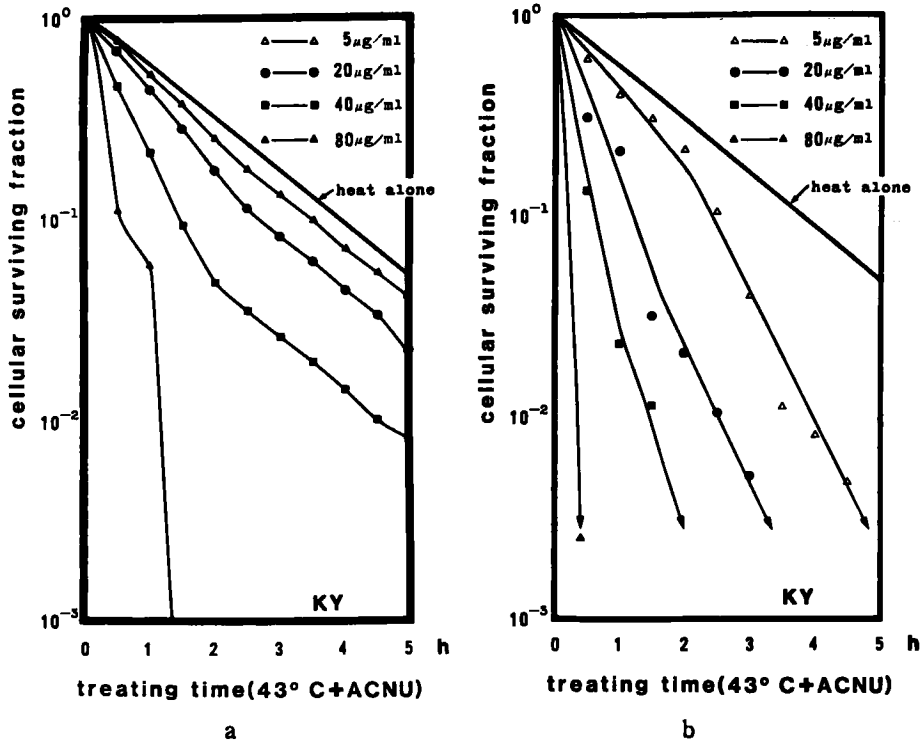


図5 a KY細胞に対する43°C単独処置並びにACNU単独処置の単純相加殺細胞効果(図1bと図2bより作図)
 b KY細胞に対する43°C加温とACNUとの同時併用処置による殺細胞効果(実測値)

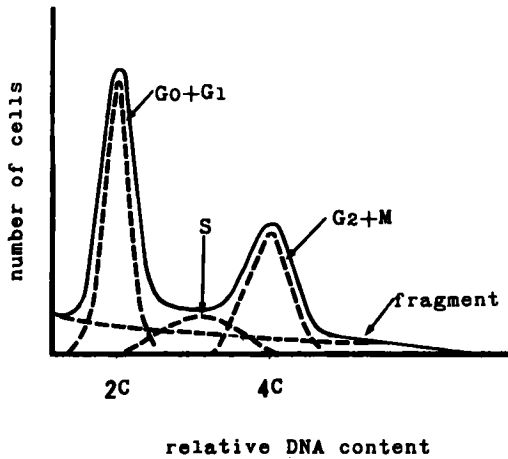


図6 Flow cytometerによる無処置コントロール細胞のDNA histogram

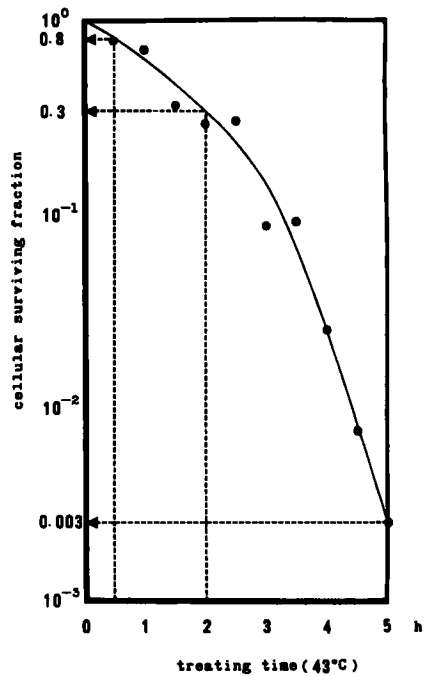


図7 43°C単独処置によるC-6細胞の生存曲線

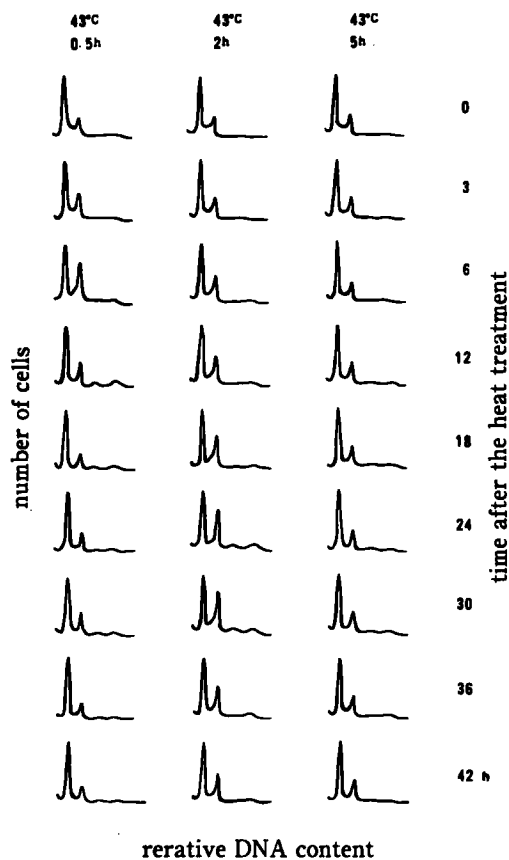


図8 43°C加温処置によるC-6細胞のDNA histogramの随時的変化

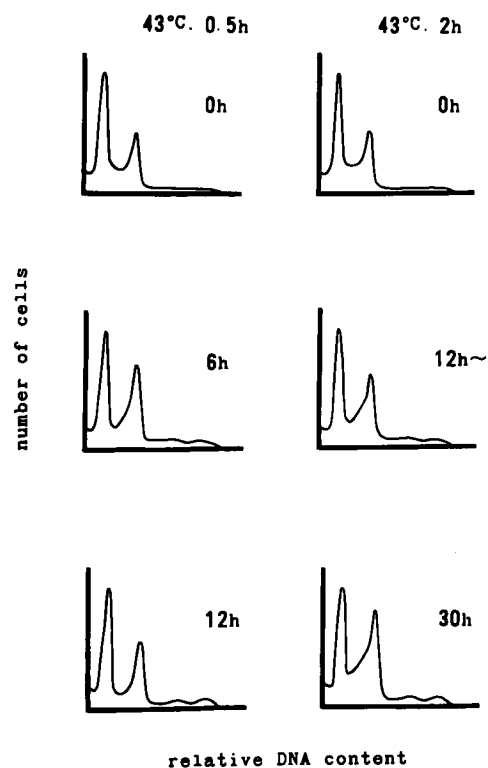


図9 43°C加温処置によりC-6細胞にみられたDNA histogramの代表的変動パターン

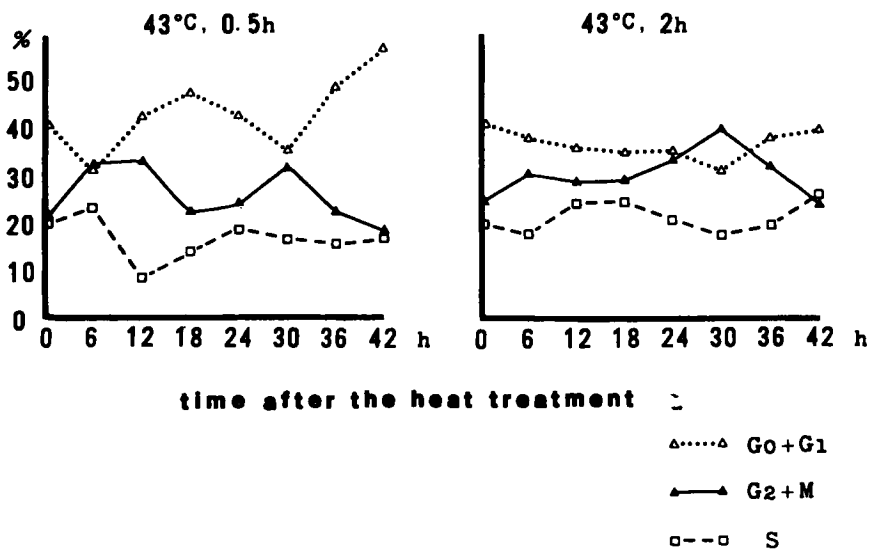


図10 43°C加温処置後の随時的変化

の結果の報告までみられた^{32,33)}。それ以来、温度と survival curve との関連について種々の検索がなされるにつれ^{32,33)}、個々の腫瘍細胞株間においても熱感受性に違いがあることが明らかとなった³⁶⁾。このように一般的には腫瘍細胞が正常細胞よりも熱感受性が高いという報告が多いが、熱感受性の相違は、基本的には、個々の細胞の持つ生物学的特性に起因するものと考えられている^{37,38)}。

ところで、*in vitro* で殺細胞効果を定量的に検討する方法は、いくつかあるが¹⁸⁻²¹⁾、1956年 Puck²²⁾ により確立された colony formation technique は最も信頼されており²³⁾、今回の実験でも本法を用いて、温熱および温熱と ACNU 処置による殺細胞効果を評価判定した。悪性脳腫瘍に対する化学療法剤としては、本邦において開発された水溶性ニトロソウレア剤である ACNU が、悪性脳腫瘍に対しても広く用いられており、現在その有効性が確認されている。これまでに BCNU、その他のニトロソウレア剤の温熱との併用効果は既に報告されていること^{53,54)} から、今回、温熱と併用する薬剤として、ACNU を用いた。ニトロソウレア剤の作用機序については、その分解産物であるカルボニウムイオンによる DNA のアルキル化と、イソシアン類による蛋白のカルバモイル化⁴¹⁾ とが推察されているが、ACNU においては専ら DNA のアルキル化による合成阻害が主たる作用であると報告されている^{41,42)}。このように ACNU は DNA-binder、すなわち cell cycle non-specific な薬剤として分類されているが細胞周期に及ぼす影響として、S 期、G2 + M 期へ細胞を集積させる効果があることも知られており⁴³⁻⁴⁶⁾、この特性を利用した脳腫瘍の同調化学放射線療法も、実際の臨床に試みられている⁴³⁾。

ACNU は溶解液の pH により、薬剤の安定性が著しく影響を受け、pH7.40 の培養液中では、その抗腫瘍活性の半減期は25分と比較的短いことが知られている¹⁷⁾。本実験でも、処置時間が、2時間を過ぎると、コロニー形成能からみた cell survival に変化がなかったことは、こうした ACNU の失活によるものと考えられる。また、ヒトグリオーマ由来の KY 細胞はラット

グリオーマ由来の C-6 細胞より ACNU に対する感受性が乏しいことが判明した。このように動物種が異なると、薬剤に対する感受性に相違があることはよく知られているが、Yung⁴⁷⁾ や、Heppner⁴⁸⁾ らは、同一腫瘍由来の細胞であっても細胞株の違いにより、種々の薬剤に対する感受性が異なることを報告している。Hoshino⁴⁹⁾ らは、flow cytometer を用いて種々の脳腫瘍組織を検討した結果、悪性脳腫瘍組織においては、腫瘍細胞を構成する個々の細胞は部位により異なった DNA 量を持った不均一な細胞の集合体であることを明らかにした。これらの事実は悪性脳腫瘍の補助化学療法を施行するに際して、常に念頭においておかねばならない重要な事項である。

In vitro における温熱と抗腫瘍剤の併用実験については、1961年 Mahaley⁵⁰⁾ らが VX 2 carcinoma に種々のアルキル化剤と 42°C 加温とを併用し、温熱の併用によりアルキル化剤の抗腫瘍効果が高められたと報告して以来、種々の薬剤や抗腫瘍剤について温熱との併用による殺細胞効果の増強が報告されている⁵¹⁻⁵⁶⁾。特に BCNU⁵³⁻⁵⁵⁾、bleomycin^{51,54,55)}、cisplatin⁵³⁻⁵⁵⁾ などについては、多くの報告がみられ、これらは温熱との併用による殺細胞効果増強の明らかな薬剤である。その中で BCNU と温度との同時併用時にみられる相乗効果は、42°C から 43°C の高温域にみられることや、adriamycin では、高濃度の場合にのみ認められることなどが報告されている⁵⁴⁾。このような温度と薬剤の併用による増強効果の機序は個々の薬物によって異なり、adriamycin の場合、37°C と比べて 45°C において、adriamycin の細胞内取り込みが増大することが示されている⁵⁹⁾ が、bleomycin においては、¹⁴C 標識 bleomycin の細胞内取り込みが 43°C 加温でも増加せず、併用効果の作用機序は、bleomycin による細胞障害からの修復機能を、温熱が阻害するためと考えられている⁵¹⁾。一方ニトロソウレア剤を含め、アルキル化剤は、一般に温度の上昇と共に薬物の代謝が増強され、その結果不活性前駆体から活性型誘導体の増加が観察されている^{54,58)}。従って本実験における温熱と ACNU との相乗効果は、他のニトロソ

ウレア剤と同様に加温により ACNU の活性化が促進されたことによるものと考えられる。

温熱自体の殺細胞効果については、細胞周期依存性があることが古くから知られており、Rao⁶⁰⁾、Selawry²⁵⁾らは、metaphase で最も熱感受性が高いと報告している。Coss⁶¹⁾らは、CHO 細胞に対して、45.5°C、5~15分間の加温を行ない、cinematography で metaphase の細胞を追跡し、88%以上が多核細胞となることと、電顕的に紡錘系の形成がみられなかったことを報告している。一方Palzer⁶²⁾らは、同調培養した HeLa 細胞を用いて、42°C、1~2時間の加温を行ない、熱感受性は late S 期では高いが、late G2 期では低いことを報告している。Westra³⁵⁾らは、CHO 細胞を用いて、細胞周期の各時期に、45.5°C、6~15分間の加温と、600 rads の放射線照射とを比較し、放射線に抵抗性の S 期の細胞が最も熱感受性が高いと報告している。これらのことから、本実験の図 9 でみられた polyploid cells は Coss⁶¹⁾らの指摘した、加温により多核となり脱落していく M 期の細胞群ではないかと推測される。また、Kal⁶⁴⁾らは、43°C、1時間加温により、マウスの mammary sarcoma cell が S 期、ついで、G2 + M 期に集積することを報告している。一方、Sapareto⁶³⁾らは、振盪法により同調した CHO 細胞を用いて、41.5°C 持続加温が細胞回転に遅延効果をもたらすことを確認している。そして、S 期における遅延効果の持続が、G1 期や G2 + M 期での遅延効果の持続よりも短いことより、非同調培養系では、S 期が減少し、G2 + M 期への細胞の集積がみられるであろうと推測している。しかし、本実験では初め S 期、特に late S 期の増加と、ついで G2 + M 期への集積がみられており (図 9)、このパターンはむしろ Kal⁶⁴⁾らの報告と一致している。このような、温熱による細胞の G2 + M 期への集積効果や、細胞回転の遅延効果は、温熱がある特定の phase (特に S 期と M 期) に感受性が高いという事実とも関連があるものと思われるが、これについては今後より詳細な検討が必要であろう。

さらに、温熱の殺細胞効果を左右する重要な因子として、培養液あるいは組織の pH の問題

と熱耐性獲得の問題とがある。Gerweck^{65,66)}らは、CHO 細胞について、37°C の条件下では、pH が 6.7~7.4 の範囲内であると、cell survival に変化は認められないが、42°C 加温の場合、pH が酸性に傾くと、温熱による殺細胞効果が著しく高められると報告している。逆に、熱感受性の低い細胞株であっても、pH を低くすることにより、熱感受性を高めることが可能であるとも述べている⁶⁹⁾。また Kang^{67,68)}らは、mammary carcinoma を用いて、in vitro と in vivo とで 43.5°C、30分加温の効果を比較して、in vivo の方が殺細胞効果が強かったと述べている。その理由として、腫瘍内の血管閉塞により、腫瘍細胞への酸素と栄養の供給が途絶え、局所の acidosis が進行したためであろうと結論している。その他低酸素細胞は、正酸素細胞よりも熱感受性が高いことなどが報告されているが⁷¹⁾、Overgaard⁷²⁾らは、pH を同一にした場合、低酸素細胞と正酸素細胞との間に熱感受性に差がないとしており、このことは細胞内外の pH が温熱の殺細胞効果の発現に大きく関与していることを示唆しているものと考えられる。

温熱処置を反復すると 2 回目以降では、同一条件下でも殺細胞効果が減弱してくることが、種々の in vitro^{73,74)}、および in vivo^{80~82)}の実験から明らかになっている。こうした、熱耐性の獲得には、初回加温処置後、細胞をある期間 37°C の生理的条件に戻すことが必要で、この期間を 4°C で置換すると熱耐性が発現しないことや⁷⁶⁾、この期間だけ pH 値を低下させると、熱耐性の発現が妨げられること^{83,84)}などが知られている。後者については、加温によって、腫瘍組織がより acidic な状態に陥ると考えられる腫瘍組織では、熱耐性の発現が押えられることになり⁸²⁾、温熱治療の点からは有利といえる。またこれら熱耐性を獲得した細胞には、新たにある種の蛋白の合成が行なわれていることが報告されており^{85~87)}、熱耐性との関連について、今後の検討が待たれるところである。

さて、本実験における温熱と ACNU との相乗効果発現の機序は、Hahn⁵³⁾らが述べているごとく、温度上昇に伴って、ニトロソウレア系薬剤の代謝が増強されることにより殺細胞効果

の増大がもたらされたものと推測される。しかし、殺細胞効果がほとんど見られなかった41°C加温との併用では増強効果がなかったことや、温熱およびACNUのどちらもが、細胞周期に対して、S期、G2+M期への集積作用を持っていたことなどから、温熱とACNUは共通の細胞内標的を有し、両者それぞれの細胞障害作用が重なって相乗殺細胞効果をもたらした可能性⁵⁹⁾も否定出来ない。しかし、いずれにしても、温熱やACNUに対して、C-6細胞に比べより抵抗性であったKY細胞についても、C-6細胞と同様に、温熱とACNUの併用による相乗殺細胞効果が認められたことは大いに注目すべきことである。このことにより、heterogeneousな細胞の集合体である悪性脳腫瘍の治療に、今後温熱とACNUとの併用療法がより有効な治療手段となり得る可能性が示されたものといえる。

また本実験においては、5~80 μ g/mlと比較的高い濃度のACNUを用いたが、脳腫瘍組織内のACNU濃度は、現実には5 μ g/g以下がほとんどであり⁸⁸⁾、今後さらに治療効果を高めるためには、ACNUの動注法⁸⁹⁾もしくは、高張浸透圧溶液の動注によるOsmotic blood-brain-barrier modification⁹⁰⁾を行なうなど、投与法の工夫を行ない、ACNUの腫瘍細胞への到達濃度を高めることも必要であろう。

一方、Mahaley⁵⁰⁾やHerman⁵⁵⁾らはin vitroにおいて低温処置下では抗腫瘍剤の殺細胞効果が減弱していることを報告しており、山田^{12,13)}はD.H.処置と5-Fuとの併用効果を検討し、担癌宿主に対する抗腫瘍剤の副作用が減弱される可能性を指摘している。

さらに、D.H.処置下では、加温局所の血管透過性が亢進⁷⁾、解糖系代謝の亢進³⁾により、acidicな状態となっており、ACNUのように酸性領域でより安定な薬剤では、より有効に作用するものと考えられることから、ACNUはD.H.

と併用する上で好都合な薬剤の1つといえよう。

結 語

ヒトグリオーマ由来の培養KY細胞およびラットグリオーマ由来の培養C-6細胞を用いて、温熱単独処置および温熱とACNUとの併用処置による殺細胞効果をコロニー形成法により検討した。さらに、C-6細胞については、43°C加温が細胞周期に及ぼす影響について、flow cytometerを用いて検討した。その結果、1)細胞の種類により、温熱およびACNUに対する感受性が異なっていた。2)43°C加温とACNUとの同時併用処置により、2種の細胞のいずれにも、相乗殺細胞効果が認められた。3)43°Cの加温処置により、C-6細胞のS期、ついでG2+M期への集積効果がみられた。この効果は、30分加温に比べ、2時間加温ではより大きく、かつ遅れて出現した。

これらの結果から、温熱とACNUとを同時に併用することは、各々単独使用時の殺細胞効果の単純相加以上の効果があり、両者の併用が悪性脳腫瘍に対する有用な補助療法の1つになり得る可能性が示唆された。一方、温熱により、C-6細胞のS期、ついでG2+M期への集積効果と細胞回転の遅延効果が明らかとなったが、このことは、今後温熱を他の薬剤あるいは治療法と併用するに際して、考慮すべき重要なことと考えられる。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師西本 詮教授に深甚なる謝意を捧げます。また本研究に御指導、御助言を頂きました佐賀医科大学脳神経外科の田淵和雄教授に感謝致します。尚、本論文の要旨は、第41回日本癌学会総会(S 57. 8. 大阪)および第42回日本癌学会総会(S 58. 10. 名古屋)において発表した。

また本研究は文部省科学研究費の助成を受けた。

文 献

1. Salzman M and Samaras GM: Hyperthermia for brain tumors: Biophysical rationale. Neurosurgery (1981) 9, 327-335.
2. 田中隆一: 悪性腫瘍の温熱療法-脳腫瘍治療への応用の可能性-。脳神経外科 (1982) 10, 7-19.

3. 池田幸明, 田淵和雄, 片木良典, 横山芳信, 原田泰弘, 西本 註: 区別低体温 (Differential hypothermia) 処置の脳代謝に及ぼす影響. 脳神経 (1982) 34, 165-171.
4. Popovic VP and Masironi R: Disappearance of euthermic tumors after 10-hour generalized hypothermia. Life Sci (1965) 4, 533-543.
5. Popovic VP and Masironi R: Enhancement of 5-Fluorouracil action on normothermic tumors by generalized hypothermia. Cancer Res (1966) 26, Part 1, 2353-2356.
6. 田淵和雄, 有森 稔, 吉津法爾, 松本 皓, 菅 健, 水川典彦, 岩槻 清, 松本勝治郎, 松本裕蔵, 大田浩右, 延藤栄男, 西本 註: Differential Hypothermia による脳腫瘍治療の試み. 日本外科学会雑誌 (1971) 72, 1591-1593.
7. Tabuchi K: Disappearance of tumors induced by adenovirus type 12 after differential hypothermia treatment. Acta Med Okayama (1972) 26, 39-50.
8. Tabuchi K: Effect of differential hypothermia on experimental brain tumor. Acta Med Okayama (1972) 26, 65-73.
9. 菅 健: Differential hypothermia 下における脳血管透過性亢進に関する研究. 岡山医学会雑誌 (1973) 85, 103-113.
10. 菅 健, 池田幸明, 山田 修, 大橋威雄, 楊 秀雄, 片木良典, 横山芳信, 有森 稔, 吉津法爾, 田淵和雄, 延藤栄男, 西本 註: Differential hypothermia による脳腫瘍治療の試み. 脳神経外科 (1973) 1, 51-57.
11. 西本 註: Differential hypothermia の脳外科への応用. 外科 (1975) 37, 638-640.
12. 山田 修: 家兎 VX 2 移植腫瘍におよぼす Differential Hypothermia の影響 (第 1 編). 岡山医学会雑誌 (1978) 90, 33-46.
13. 山田 修: 家兎 VX 2 移植腫瘍におよぼす Differential Hypothermia の影響 (第 2 編). 岡山医学会雑誌 (1978) 90, 47-59.
14. Nishimoto A, Tabuchi K, Arimori M, Suga K, Yamada O and Katagi R: Treatment of malignant brain tumors - Experimental and clinical studies -. Seara Med Neurocir (1978) 7, 211-229.
15. 三宅幾男: ハムスター類囊移植腫瘍の増殖並びに抗癌剤取り込みに及ぼす温熱の効果. 岡山医学会雑誌 (1980) 92, 367-385.
16. Vindeløv LV: Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. Virchows Arch B Cell Pathol (1977) 24, 227-242.
17. 三共製薬社内資料
18. 市橋秀仁, 近藤達平: 酵素活性を指標とした感受性テスト. 癌と化学療法 (1982) 9, 575-581.
19. 藤本 茂, 奥井勝二: Isotope を用いた感受性テスト. 癌と化学療法 (1982) 9, 582-589.
20. 鈴木利光, 本山梯一: 人癌培養株細胞の *in vitro* 薬剤感受性検定法の吟味とその応用. 組織培養 (1980) 6, 465-472.
21. 下山正徳, 田中和彦, 木村禰代二: 人がん細胞培養株の薬剤感受性度. 癌の臨床 (1979) 25, 75-83.
22. Puck TT, Marcus PI and Cieciura SJ: Clonal growth of mammalian cells *in vitro*. J Exper Med (1956) 103, 273-284.
23. Bhuyan BK: Kinetics of cell kill by hyperthermia. Cancer Res (1979) 39, 2277-2284.
24. Lambert RA: Demonstration of the greater sensitivity to heat of sarcoma cells as compared with actively proliferating connective-tissue cells. JAMA (J Am Med Assoc) (1912) 59, 2147-2148.
25. Selawry OS, Goldstein MN and McCormick T: Hyperthermia in tissue-cultured cells of malignant origin. Cancer Res (1957) 17, 785-791.

26. Levine EM and Robbins EB: Differential temperature sensitivity of normal and cancer cells in culture. *J Cell Physiol* (1969) 76, 373-380.
27. Giovanella BC, Morgan AC, Stehlin JS and Williams LJ: Selective lethal effect of supranormal temperatures on mouse sarcoma cells. *Cancer Res* (1973) 33, 2568-2578.
28. Giovanella BC, Stehlin JS Jr and Morgan AC: Selective lethal effect of supranormal temperatures on human neoplastic cells. *Cancer Res* (1976) 36, 3944-3950.
29. Kase K and Hahn GM: Differential heat response of normal and transformed human cells in tissue culture. *Nature* (1975) 255, 228-230.
30. Auersperg N: Differential heat sensitivity of cells in tissue culture. *Nature* (1966) 209, 415-416.
31. Love R, Soriano RZ and Walsh RJ: Effect of hyperthermia on normal and neoplastic cells *in vitro*. *Cancer Res* (1970) 30, 1525-1533.
32. Herman TS, Gerner EW, Magun BE, Stickney D, Sweets CC and White DM: Rate of heating as a determinant of hyperthermic cytotoxicity. *Cancer Res* (1981) 41, 3519-3523.
33. Kachani ZFC and Sabin AB: Reproductive capacity and viability at higher temperatures of various transformed hamster cell lines. *J Natl Cancer Inst* (1969) 43, 469-480.
34. Harris M: Criteria of viability in heat-treated cells. *Exp Cell Res* (1966) 44, 458-660.
35. Westra A and Dewey WC: Variation in sensitivity to heat shock during the cell-cycle of Chinese hamster cells *in vitro*. *Int J Radiat Biol* (1971) 19, 467-477.
36. Bhuyan BK, Day KJ, Edgerton CE and Ogunbase O: Sensitivity of different cell lines and of different phases in the cell cycle to hyperthermia. *Cancer Res* (1977) 37, 3780-3784.
37. Raaphorst GP, Romano SL, Mitchell JB, Bedford JS and Dewey WC: Intrinsic differences in heat and/or X-ray sensitivity of seven mammalian cell lines cultured and treated under identical conditions. *Cancer Res* (1979) 39, 396-401.
38. Connor WG, Gerner EW, Miller RC and Bono MLM: Prospects for hyperthermia in human cancer therapy. *Radiology* (1977) 123, 497-503.
39. 中尾英雄, 福島正美, 清水総明 他: 抗白血病薬の研究(第3報) N-2-Chloroethyl-N-nitrosourea 誘導体の合成および制癌作用. *薬学雑誌* (1974) 94, 1032-1037.
40. 松本健五, 田淵和雄, 古田知久, 藤原 敬, 仲宗根 進, 大西林吉, 守屋芳夫, 西本 詮, 土井章弘, 浅利正二, 菅 健: 悪性脳腫瘍に対する ACNU と 5-FU の併用補助化学療法. *神経外科* (1983) 23, 625-632.
41. 横山正和: Nitrosourea. *癌と化学療法* (1981) 8, 847-858.
42. 金丸龍之介, 朝村光雄, 佐藤春彦 他: ACNU (1-(4-amino-2-methyl-pyrimidine-5-yl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride) の培養 Hela S₂ 細胞に対する効果—作用機序について. *抗研誌* (1978) 30, 162-170.
43. 設楽信行: 脳腫瘍の Cellular synchronizing radiation therapy に関する基礎的研究ならびに臨床例の解析. *神経進歩* (1978) 22, 119-131.
44. 渋谷直樹, 古田 純, 小林達也 他: 脳腫瘍の ACNU に対する感受性・脳腫瘍細胞株における *in vitro* での検討. *癌と化学療法* (1980) 7, 1393-1401.
45. 藤原 敬: 培養グリオーマの細胞周期におよぼす ACNU の影響—Flow cytometer による検索—. *癌と化学療法* (1983) 10, 2055-2061.
46. Tobey RA and Crissman HA: Comparative effects of three nitrosourea derivatives on mammalian cell cycle progression. *Cancer Res* (1975) 35, 460-470.
47. Yung WKA, Shapiro JR and Shapiro WR: Heterogeneous chemosensitivities of subpopulations of human glioma cells in culture. *Cancer Res* (1982) 42, 992-998.

48. Heppner GH, Dexter DL, DeNucci T, Miller FR and Calabresi P: Heterogeneity in drug sensitivity among tumor cell subpopulations of a single mammary tumor. *Cancer Res* (1978) **38**, 3758–3763.
49. Hoshino T, Nomura K, Wilson CB, Knebel KD and Gray JW: The distribution of nuclear DNA from human brain tumor cells—flow cytometric studies. *J Neurosurg* (1978) **49**, 13–21.
50. Mahaley MS Jr and Woodhall B: Effect of temperature upon the *in vitro* action of anticancer agents on VX-2 carcinoma. *J Neurosurg* (1961) **18**, 269–272.
51. Braun J and Hahn GM: Enhanced cell killing by bleomycin and 43° hyperthermia and the inhibition of recovery from potentially lethal damage. *Cancer Res* (1975) **35**, 2921–2927.
52. Goss P and Parsons PG: The effect of hyperthermia and melphalan on survival of human fibroblast strains and melanoma cell lines. *Cancer Res* (1977) **37**, 152–156.
53. Hahn GM: Potential for therapy of drugs and hyperthermia. *Cancer Res* (1979) **39**, 2264–2268.
54. Marmor JB: Interactions of hyperthermia and chemotherapy in animals. *Cancer Res* (1979) **39**, 2269–2276.
55. Herman TS: Temperature dependence of adriamycin, cis-diamminedichloroplatinum, bleomycin, and 1, 3-Bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea cytotoxicity *in vitro*. *Cancer Res* (1983) **43**, 517–520.
56. Giovanella BC, Lohman WA and Heidelberger C: Effects of elevated temperatures and drugs on the viability of L1210 leukemia cells. *Cancer Res* (1970) **30**, 1623–1631.
57. Thuning CA, Bakir NA and Warren J: Synergistic effect of combined hyperthermia and a nitrosourea in treatment of a murine ependymoblastoma. *Cancer Res* (1980) **40**, 2726–2729.
58. Teicher BA, Kowal CD, Kennedy KA and Sartorelli AC: Enhancement by hyperthermia of the *in vitro* cytotoxicity of mitomycin C toward hypoxic tumor cells. *Cancer Res* (1981) **41**, 1096–1099.
59. Hahn GM, Braun J and Har-Kedar I: Thermochemotherapy: synergism between hyperthermia and adriamycin or bleomycin in mammalian cell inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1975) **72**, 937–940.
60. Rao PN and Engleburg J: HeLa cells—effects of temperature on the life cycle. *Science* (1965) **148**, 1092–1094.
61. Coss RA, Dewey WC and Bamburg JR: Effects of hyperthermia on dividing Chinese hamster ovary cells and on microtubules *in vitro*. *Cancer Res* (1982) **42**, 1059–1071.
62. Palzer RJ and Heidelberger C: Influence of drugs and synchrony on the hyperthermic killing of HeLa cells. *Cancer Res* (1973) **33**, 422–427.
63. Sapareto SA, Hopwood LE, Dewey WC, Raju MR and Gray JW: Effects of hyperthermia on survival and progression of Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* (1978) **38**, 393–400.
64. Kal HB and Hahn GM: Kinetic responses of murine sarcoma cells to radiation and hyperthermia *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res* (1976) **36**, 1923–1929.
65. Gerweck LE and Rottinger E: Enhancement of mammalian cell sensitivity to hyperthermia by pH alteration. *Radiation Res* (1976) **67**, 508–511.
66. Gerweck LE: Modification of cell lethality at elevated temperatures. The pH effect. *Radiation Res* (1977) **70**, 224–235.
67. Kang MS, Song CW and Levitt SH: Role of vascular function in response of tumors *in vivo* to hyperthermia. *Cancer Res* (1980) **40**, 1130–1135.
68. Song CW, Kang MS, Rhee JG and Levitt SH: The effect of hyperthermia on vascular function,

- pH, and cell survival. *Radiology* (1980) 137, 795-803.
69. Gerweck LE and Richards B: Influence of pH on the thermal sensitivity of cultured human glioblastoma cells. *Cancer Res* (1981) 41, 845-849.
 70. 古田知久: 培養グリオーマ細胞の形態学的分化に伴う DNA ヒストグラムならびに S-100 蛋白量の経時的変化に関する研究. *岡山医学会雑誌* (1982) 94, 1113-1125.
 71. Schulman N and Hall EJ: Hyperthermia: its effect on proliferative and plateau phase cell cultures. *Radiology* (1974) 113, 209-211.
 72. Overgaard J and Bichel P: The influence of hypoxia and acidity on the hyperthermic response of malignant cells *in vitro*. *Radiology* (1977) 123, 511-514.
 73. Gerner EW and Schneider MJ: Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature* (1975) 256, 500-502.
 74. Gerner EW, Boone R, Connor WG, Hicks JA and Boone MLM: A transient thermotolerant survival response produced by single thermal doses in HeLa cells. *Cancer Res* (1976) 36, 1035-1040.
 75. Harisiadis L, Sung DI and Hall EJ: Thermal tolerance and repair of thermal damage by cultured cells. *Radiology* (1977) 123, 505-509.
 76. Henle KJ, Karamuz JE and Leeper DB: Induction of thermotolerance in Chinese hamster ovary cells by high (45°) or low (40°) hyperthermia. *Cancer Res* (1978) 38, 570-574.
 77. Henle KJ and Dethlefsen LA: Heat fractionation and thermotolerance: A review. *Cancer Res* (1978) 38, 1843-1851.
 78. Nielsen OS and Overgaard J: Influence of time and temperature on the kinetics of thermotolerance in L₁A₂ cells *in vitro*. *Cancer Res* (1982) 42, 4190-4196.
 79. Gerweck LE, 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.
 80. Law MP: The induction of thermal resistance in the ear of the mouse by heating at temperatures ranging from 41.5 to 45.5°C. *Radiation Res* (1981) 85, 126-134.
 81. Kamura T, Nielsen OS, Overgaard J and Andersen A: Development of thermotolerance during fractionated hyperthermia in a solid tumor *in vivo*. *Cancer Res* (1982) 42, 1744-1748.
 82. Rhee JG, Song CW and Levitt SH: Changes in thermosensitivity of mouse mammary carcinoma following hyperthermia *in vivo*. *Cancer Res* (1982) 42, 4485-4489.
 83. Nielsen OS and Overgaard J: Effect of extracellular pH on thermotolerance and recovery of hyperthermic damage *in vitro*. *Cancer Res* (1979) 39, 2772-2778.
 84. Goldin EM and Leeper DB: The effect of reduced pH on the induction of thermotolerance. *Radiology* (1981) 141, 505-508.
 85. Subjeck JR, Sciandra JJ, Chao CF and Johnson RJ: Heat shock proteins and biological response to hyperthermia. *Br J Cancer (Suppl. 5)* (1982) 45, 127-131.
 86. Li GC, Petersen NS and Mitchell HK: Induced thermal tolerance and heat shock protein synthesis in Chinese hamster ovary cells. *Br J Cancer (Suppl. 5)* (1982) 45, 123-136.
 87. Landry J, Bernier D, Chrétien P, Nicole LM, Tanguay RM and Marceau N: Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Res* (1982) 42, 2457-2461.
 88. 村岡浄明: ACNU の悪性脳腫瘍組織内および血中への移行一投与方法ならびに phenobarbital 併用効果の検討一. *脳神経* (1983) 35, 1199-1206.
 89. 山下純宏, 武内重二, 大塚信一, 河 栄秀, 徳力康彦, 半田 肇: 脳腫瘍に対する ACNU 動注療法. *脳*

腫瘍懇話会記録集(1981) 2, 157-166.

90. 宮上光祐, 賀川幸英, 坪川孝志: Osmotic blood brain barrier modification による ACNU の悪性脳腫瘍組織内への移行. 脳神経外科(1985) 13, 955-963.
91. Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L and Sweet W: Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. Science(1968) 161, 370-371.

**Cytocidal effects of heat on cultured glioma cells
—with special reference to combined use of ACNU—**

Susumu NAKASONE

Department of Neurological Surgery, Okayama University Medical School

(Director: Prof. A. Nishimoto)

The effects of heat used either alone or in conjunction with 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride (ACNU) on cultured rat (C-6) and human (KY) glioma cell lines were quantitatively studied by colony formation assay. Flow-cytometric analysis of the cell cycle progression of C-6 glioma cells after exposure to 43°C was also carried out. The results obtained were as follows. 1) These cell lines had differences in heat sensitivity and in their response to the cytocidal effect of ACNU. 2) Synergistic effects of combined heat and ACNU were observed on both cell lines. 3) After exposure to 43°C asynchronous C-6 cells accumulated initially in late S phase and later in the G2+M phase. These results suggest that the combined use of heat and ACNU is effective in the management of malignant tumors.