

Differential Hypothermiaのハムスター 移植腫瘍におよぼす影響について

I) Shallow Differential Hypothermia と抗癌剤併用の効果について

岡山大学脳神経外科 (指導: 西本詮教授)

大 橋 威 雄

(昭和52年2月1日受稿)

目 次

- I 緒 言
- II 実験材料および実験方法
 - 1. 実験動物
 - 2. 担癌動物の作成
 - 3. 実験方法
 - 4. 実験群
 - 5. 病理組織標本
- III 実験結果
 - 1. 腫瘍生長
 - 2. 病理組織学的検索
- IV 考 察
 - 1. 腫瘍の温熱処置について
 - 2. 腫瘍の differential hypothermia 処置について
 - 3. 本実験結果の考察
 - 4. 高温処置と differential hypothermia 処置との比較
 - 5. Differential hypothermia 処置の腫瘍選択的作用について
 - 6. Differential hypothermia 処置と抗癌剤併用について
- V 結 論

I 緒 言

現在悪性脳腫瘍に対する治療の原則は、神経症状を悪化させないように配慮しつつ、手術的に可能な限り腫瘍剔出を行ない、さらに残存する腫瘍浸潤組織に対して非手術的補助療法を併用することである。この補助療法については、従来放射線療法¹⁾化学療法²⁾免疫療法³⁻¹⁰⁾あるいは物理療法など種々の

治療法が試みられてきている。¹¹⁻¹³⁾このうち物理療法としては、脳腫瘍は悪性のもので頭蓋外転移を稀にしか起こさない¹⁴⁻¹⁶⁾ことを利用して、局所的に温熱や超音波¹⁷⁾レーザー光線¹⁸⁾などを用いて腫瘍に侵襲を加えることが実験的あるいは臨床的に研究されている。

温熱が悪性腫瘍の治療に応用されはじめたのは古く、1866年 Busch¹⁹⁾は丹毒に罹患した患者の肉腫が消失したと報告し、1891年 Coley²⁰⁾が肉腫患者を丹毒に罹患、発熱せしめ腫瘍の縮小あるいは消失を観察したことに始まるといえよう。Busch¹⁹⁾や Coley²⁰⁾らの研究は、最近注目されている免疫化学療法²¹⁾の嚆矢とされているが、温熱療法に関する最初の報告ともみられる。その後高温療法²²⁻²⁶⁾低温療法^{27, 28)}など、悪性腫瘍への応用について研究がなされており、いずれも腫瘍組織や細胞の温熱による選択的破壊を目的としたものである。また単に温熱のみでなく、これに放射線療法を併用した場合は放射線の生物学的効果が増強されることも観察されている。^{22, 25, 29, 30)}他方組織の物理的温度変化が抗癌剤の組織内濃度分布を変化させることから、温熱と抗癌剤を併用した場合、高温では抗癌剤の作用が増強され低温では減弱されるという³¹⁻³⁵⁾

上記の腫瘍に対する温熱療法は、すべて腫瘍を高温あるいは低温にした場合の研究であるが、1965年 Popovic³⁶⁾はハムスター類囊の移植腫瘍 (Toolan H. Ad. No. 1U, originally an human adenocarcinoma)を用いて、4℃の全身超低体温下に腫瘍局所のみを37℃の正常温に10時間保つという區別低体温処置、すなわち differential hypothermia (以下 D. H. と略す)を行うと、処置後腫瘍は完全に消失したと報告している。³⁶⁻³⁸⁾当教室においても、すで

にハムスターのアデノウィルス12型誘発移植腫瘍³⁹⁾を用いて追試を行って、腫瘍消失がみられた⁴⁰⁾さらに当教室ではこのD. H. 療法を悪性脳腫瘍患者に対する補助療法として応用する目的で、種々の病理学的⁴¹⁻⁴⁴⁾病態生理学的^{45, 46)}および生化学的検索⁴⁷⁻⁵⁰⁾を行ってきた。一方高温療法と抗癌剤の併用により抗腫瘍効果が増強される^{32-35, 51-55)}ことに類似して、D. H. 療法に抗癌剤を併用した場合、全身低体温下においては正常温に保たれた局所腫瘍組織の代謝、血液循環が亢進し、抗癌剤の腫瘍局所の濃度は高値となり、その効果が増強されると考えられている。このような観点から Popovic ら⁵⁶⁾は上記と同じ実験モデルを用いて、全身を4℃の超低体温にする deep D. H. 処置に代謝拮抗剤 5-Fluorouracil (5-FU) を同時に投与することにより、正常温に保たれた腫瘍は1時間の処置で消失して行くことを観察している。さらに全身を30℃の軽度低体温下に24時間のD. H. 処置を行った場合も全例に腫瘍が消失している⁵⁹⁾ここで実際に臨床例に応用するにあたって^{57, 58)}4℃超低体温で1時間あるいは10時間、また30℃軽度低体温であっても24時間という長時間のD. H. 処置は、ハムスターなどのhibernatorでは充分耐え得るが、non-hibernatorであるヒトでは、いかに麻酔学が進歩したとはいえ、患者にとっては大きな侵襲となり、臨床応用にはかなりの困難を伴うことになると思われる⁶⁰⁻⁶³⁾そこで臨床応用可能な温度ならびに時間的条件下におけるD. H. 処置がどの程度の効果を示すかを知る目的で以下の実験を行った。すなわちハムスターのアデノウィルス12型誘発頬嚢移植腫瘍を用いて、全身30℃軽度低体温下に腫瘍のみを37℃正常温に保つ shallow D. H. 処置に抗癌剤を併用し、腫瘍生長の測定と病理組織学的検索を行った。

II 実験材料および実験方法

1. 実験動物：香川津田動物（香川県）より供給のハムスター（syrian golden hamster, mesocricetus auratus）を当教室の繁殖室で飼育し、正常な外観を示す体重70～80gの雌雄を使用した。動物は固型飼料（オリエンタル, MF）および水道水を ad libitum に与え、20～23℃で飼育した。

2. 担癌動物の作成：アデノウィルス12型ウイルス☆の $10^{2.5}$ TCID₅₀/0.1mlの0.1mlを生後24時間以内のハムスター新生仔の背部皮下に接種し、誘発腫瘍を作成した³⁹⁾その後の腫瘍移植は、無菌的に採取

した腫瘍組織を phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) 中で細切し、次いで0.25% trypsin を加え、37℃温浴槽中で攪拌し細胞を分離した。ステンレス製80メッシュで濾過し、血管結合組織を除去後、

☆ Adenovirus type 12, strain "Huie", was kindly supplied by Prof. Y. Yabe, who had obtained it from the American Type Culture Collection.

0.5% trypan blue 染色にて判定した viable cell 10^7 /ml の PBS 細胞浮遊液を作成した。この細胞浮遊液0.1ml (10^6 viable cells) を両側頬嚢の粘膜下組織へ接種した。接種後5～7日目頃、腫瘍の直径が8mm前後（約500cu mm）に生長したものを下記の如き実験に用いた。これらは腫瘍継代移植の33代から39代までのものであった。

3. 実験方法：Shallow D. H. 処置は動物を5%

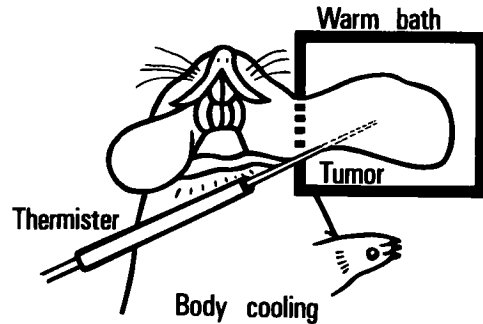


Fig. 1 Scheme showing treatment of shallow differential hypothermia for cheek pouch tumor.

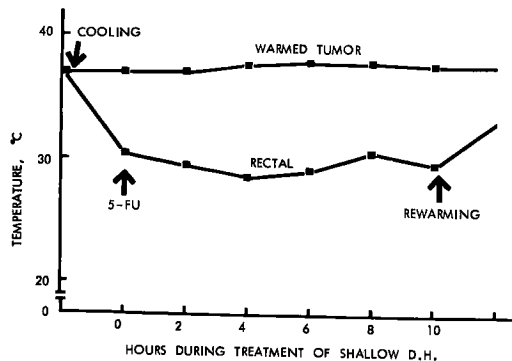


Fig. 2 Temperature diagram during treatment of shallow differential hypothermia and administration of 5-FU 50mg/kg I. P. in the group IV (animal No. 131).

nembutal (pentobarbitalum sodicum) 0.8 ml/kg を腹腔内に投与して麻酔し、全身と一側の頬嚢腫瘍を氷塊中に置いて恒温槽とは断熱材で隔壁し、他側の頬嚢腫瘍は恒温槽内に挿入した (図1). 全身体温は直腸温で electrothermometer (Nihonkoden Co., Ltd.) を用いて常時測定し、 $30^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ に保たれるよう氷塊の量を調節した。また thermostat regulator (Nisso Co., Ltd.) を装置した恒温槽の側壁に開けられた1.5 cm 直径の穴にコンドームを接着し、この中に一側の頬嚢腫瘍を挿入して恒温灌流水にて加温されるようにした。加温される腫瘍の中心部に21ゲージ needle thermistor を刺入して、常時 $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ に調節した (図2). このような shallow D. H. 処置を10時間行った後、室温に放置して復温せしめると、約8~12時間後には処置前の状態に回復した。

4. 実験群：合計91匹のハムスターを下記のような5群に分けてそれぞれの実験を行った (表1).

Table 1 Group of experimentation

group	number of animal	treatment
I	tumor-bearing* ×20	not-treated
II	tumor-free ×10	5-FU 50 mg/kg I. P. ** at normal temperature
III	tumor-bearing ×10	5-FU 50 mg/kg I. P. at normal temperature
IV	tumor-bearing ×15 ×22	Shallow D. H. for 10 hours and 5-FU 50 mg/kg I. P.
V	tumor-bearing ×14	Shallow D. H. for 10 hours

* tumor-bearing animal in the bilateral cheek pouches

** abbreviation: I. P., intraperitoneal administration

第I実験群；両側頬嚢腫瘍を有するハムスター20匹を用い、無処置コントロール群として、腫瘍生長と体重の測定を隔日に行った。

第II実験群；腫瘍を有しない、体重約80gの正常ハムスター10匹を用い、ピリミジン拮抗性抗腫瘍剤である5-Fluorouracil (5-FU)⁶⁴⁾を50mg/kg (Albino mouse で腹腔内一回投与のLD 50は188mg/kg⁶⁵⁾、腹腔内一回投与を正常温で行い、その後の全身状態の観察と体重測定を隔日に行った。

第III実験群；両側頬嚢腫瘍を有するハムスター10匹を用いて、正常体温において5-FU 50 mg/kg 腹腔内一回投与を行い、腫瘍生長と体重の測定を隔日に行った。

第IV実験群；両側頬嚢腫瘍を有するハムスターを用いて、上記の如き shallow D. H. 処置を10時間行い、一側の腫瘍は 37°C 正常温、他側の腫瘍は全身と同じく 30°C 軽度低温にした。また両者の温度が安定した shallow D. H. 処置の開始時に、5-FU 50mg/kg

腹腔内一回投与を行った (図2). 本実験群では併用処置の影響を経時的に形態学的変化で検索する目的で、i) 10時間処置直後、ii) 10時間処置後24時間目、iii) 10時間処置後48時間目、の三群で各5匹、合計15匹の動物を用いた。さらに処置後長期の腫瘍生長と体重測定の目的で30匹の動物を用いたが、そのうち7日以上生存した22匹を腫瘍生長および体重測定用とした。第I~III実験群と同じく、腫瘍生長は caliper にて隔日に測定した。

第V実験群；両側頬嚢腫瘍を有するハムスター20匹を用いて、一側の腫瘍は 37°C 正常温にし、他側の腫瘍と全身を 30°C 軽度低温とする shallow D. H. 処置10時間を単独で行った。20匹のうち7日以上生存した14匹について腫瘍生長と体重を隔日に測定した。

5. 病理組織標本作成：shallow D. H. 処置中および処置後の経時的な実験を行った第IV実験群の動物および他の実験群では観察中死亡もしくは腫瘍死し

た動物を全身解剖し、10%ホルマリンに固定後病理組織標本に用いた。標本の染色は、hematoxylin and eosin (H. E.) 法、Feulgen 反応 (Lillie's method), methyl greenpyronin (Taft's method) 法；核酸抽出の対照は過酸化水素法を用いた。phosphotungstic acid hematoxylin (PTAH) 法, elastica van Gieson 法, 渡辺鍍銀法など行った。^{66, 67)}

III 実験結果

1. 腫瘍生長および体重の測定：腫瘍の生長という現象を定量的に表わすために、経時的にその大きさ (cu mm) を測定し、これを時間軸に対してプロットする方法を行った。⁶⁸⁻⁷⁰⁾

第I実験群；長期に継代されたハムスターのアデノウィルス12型誘発移植腫瘍の無処置での生長は、腫瘍細胞を頬嚢へ接種後5~7日目頃に約500 cu mm に達した。それ以後の生長曲線は接種20日目頃までは対数関数的な生長を示し、^{71, 72)} 腫瘍塊中に壊死がみ

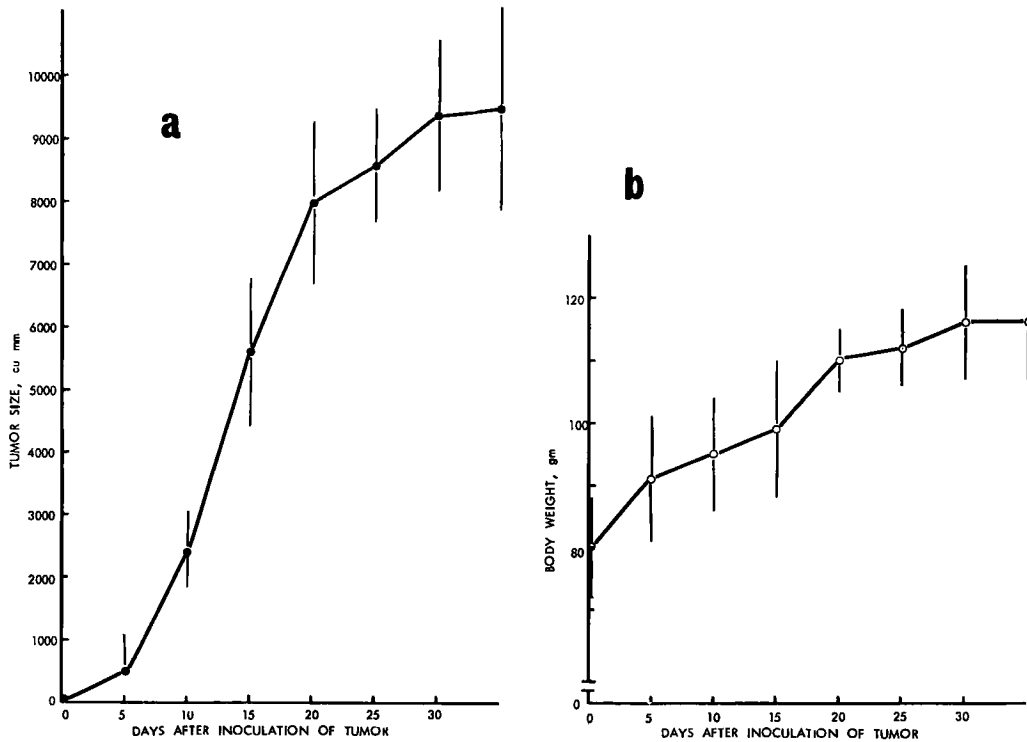


Fig. 3 Growth of transplanted cheek pouch tumors (Adenovirus type 12 induced) (a), and development of body weight (b), in control non-treated animals, the group 1. Each full dot and open circle represents mean value; the vertical bars represent standard deviations (S.D.).

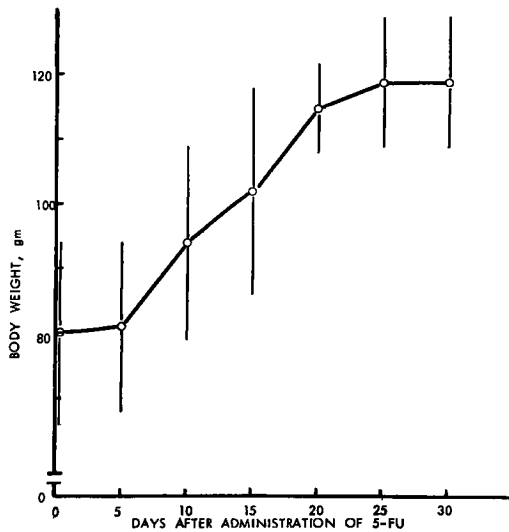


Fig. 4 After a single intraperitoneal injection of 50mg/kg of 5-FU, the body weight of normothermic tumor-free animals in the group 11 continued to grow almost normally. The open circles represent mean value; the vertical bars represent S.D.

られる接種20日以後は立方根関数的生長に変わり^{71, 72)}接種後30日目頃より9,000~100,00 cu mmの極限サイズへ漸進的に近づいた。この時期には腫瘍が頸部あるいは胸背部へ著明に浸潤しており、そのためS.D.の値は大きくなった(図3-a)。この生長曲線は、多くの実験動物の移植腫瘍とほぼ類似の傾向を示すものである^{71, 72)}腫瘍接種後の体重曲線は、接種後20日目頃腫瘍が8,000 cu mm位に生長する時期より約115gのレベルにplateauを示した。この時期の動物はほとんど運動することなく、体毛の光沢は明らかに失われており、やがてcachecticとなり、接種後30~40日目頃に腫瘍死した(図3-b)。

第II実験群;非担癌ハムスターで、外観上正常にみられ、体重約80gの正常温動物に5-FUを50mg/kg腹腔内一回投与を行った場合の体重曲線をみた。投与後5~7日まで軽度に体重増加が抑制されたが、外観上に著変を認めなかった。その後はほぼ正常の増加を示し、なんら障害はみられなかった(図4)。

第III実験群;担癌ハムスターに、正常温で5-FU 50mg/kgを腹腔内一回投与を行った。腫瘍の大きさ

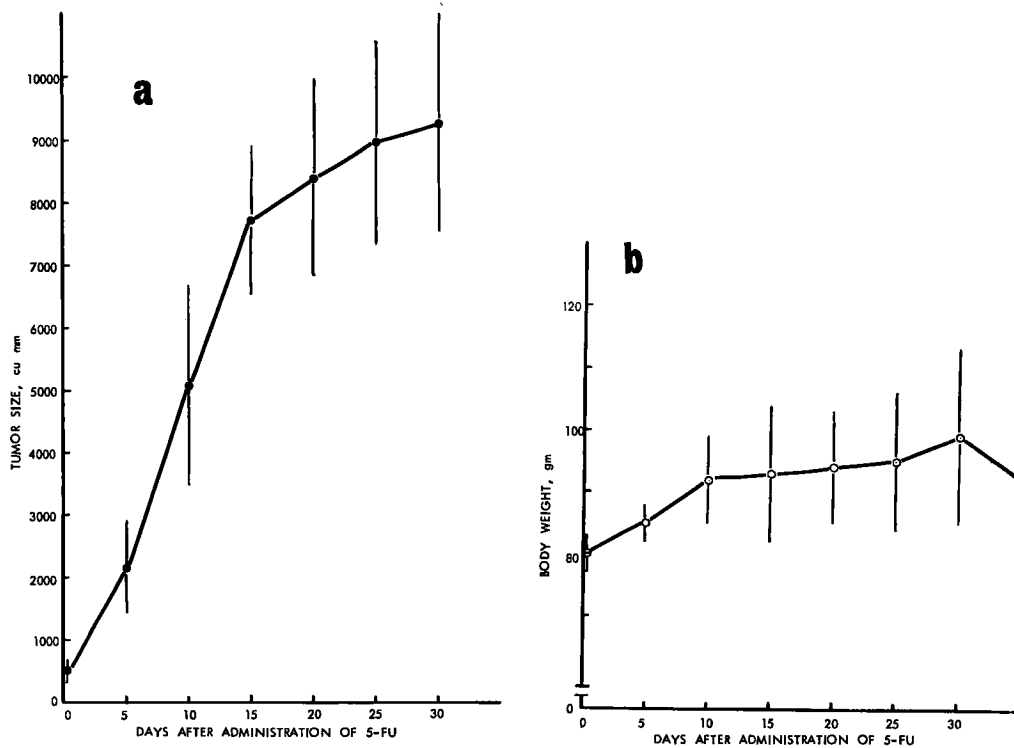


Fig. 5 After intraperitoneal administration of single dose of 50mg/kg of 5-FU, normothermic animals with normothermic cheek pouch tumors in the group 111 did not affect the growth of tumors (a), and slightly affected body weight (b).

The full dots and open circles represent mean value. the vertical bars represent S. D.

は、投与後5～10日目（腫瘍移植後10～15日目）に平均値で300～500 cu mmの減少を認めたが、第I実験群とはほぼ同様な生長を示した（図5-a）。体重曲線では、投与後10日目頃より増加がみられず、大多数は体重100g以下で経過し、これらの動物の肛門部は糞便により汚れていた（図5-b）。しかし解剖時、肉眼的に腸や肺に出血性病変はみられなかった。

第IV実験群；一側の頬嚢腫瘍に shallow D. H. 処置を10時間行い、同時に5-FU 50 mg/kgの腹腔内一回投与を処置開始時に行った（図1, 2）。低温側の頬嚢腫瘍は第III実験群とはほぼ同様な生長曲線を示した（図6-a）。しかし37℃正常温処置側の頬嚢腫瘍は、合計22例のうち4例（18.2%）は処置後腫瘍の著明な退縮を認め、5～7日目頃には肉眼的に頬嚢粘膜の癒痕巣様にみられる状態となった（図8）。それ以後動物が反対側低温腫瘍の生長により死亡するまで、癒痕部に腫瘍の再発はみられなかった。ま

た22例中の12例（54.5%）は処置後10日目頃まで反対側低温腫瘍の50%以下の大きさとどまり、腫瘍の一時的な生長停止、抑制がみられた（表3）。しかしその後の生長曲線は対数関数的な傾斜を示した。22例のうち残りの6例（27.3%）では、処置後も腫瘍の生長は急速で、反対側低温腫瘍と同じ生長パターンであった（図6-b, 表2）。本実験群の体重曲線のうち、正常温処置側腫瘍の消失がみられた動物は、処置後から腫瘍が消失する5～7日目頃まで著明な体重減少を示し、その後体重増加は抑制されるが、処置後20日目頃より急速に増加した。これらの動物は、体重減少および増加抑制時期において、肛門周囲の汚れや体毛光沢の喪失が認められた。しかし正常温処置側腫瘍の一時的な生長停止、抑制を示した動物および無効であった動物の体重曲線は、処置後より体重増加は軽度で第III実験群と類似の傾向が認められた（図6-c）。

第V実験群；shallow D. H. 単独処置を行った場

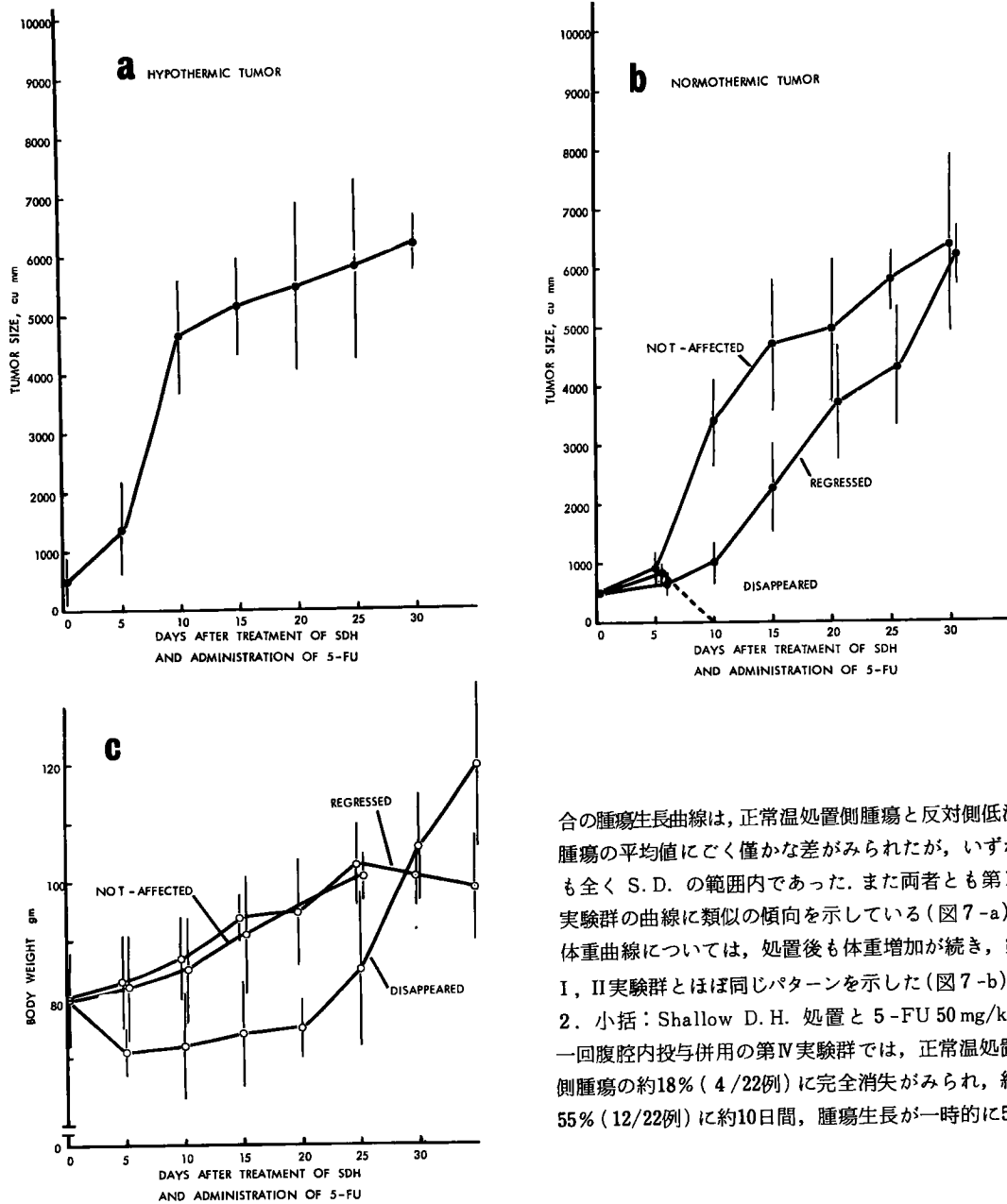


Fig. 6 When a single dose of 50 mg/kg of 5-FU was administered intraperitoneally in the hypothermic animals with one hypothermic cheek pouch tumor, while the other tumor was kept at the normothermic level in the group IV, the normothermic tumors disappeared and regressed during a period of 15 days and some ones were not-affected (b) (Table 2, 3), the all hypothermic tumors continued grow similarly to Fig. 5 - a (a).

Loss of body weight was revealed in the tumor-disappearing animals during 25 days after treatment (c). The full dots and open circles represent mean value ; the vertical bars represent S.D..

合の腫瘍生長曲線は、正常温処置側腫瘍と反対側低温腫瘍の平均値にごく僅かな差がみられたが、いずれも全く S.D. の範囲内であった。また両者とも第 III 実験群の曲線に類似の傾向を示している (図 7 - a)。体重曲線については、処置後も体重増加が続き、第 I, II 実験群とほぼ同じパターンを示した (図 7 - b)。2. 小括: Shallow D. H. 処置と 5-FU 50 mg/kg 一回腹腔内投与併用の第 IV 実験群では、正常温処置側腫瘍の約 18% (4/22 例) に完全消失がみられ、約 55% (12/22 例) に約 10 日間、腫瘍生長が一時的に 50

Table 2 Effect of shallow differential hypothermia treatment combined with administration of 50 mg/kg 5-FU on transplanted cheek pouch tumors induced by adenovirus type 12 in hamsters (group IV).

	number of animal	per cent
disappeared	4	18.2
regressed	12	54.5
not-affected	6	27.3
total	22	100

Table 3 Mean value (cu mm) of tumor size and normothermic-hypothermic tumor size ratio (per cent) after shallow D.H. treatment combined with 5-FU 50mg/kg administration in the group IV.

days after treatment	0	5	10	15	20	25	30
course of tumor							
normothermic, regressed	500	655	1007	2294	3705	4318	6211
normothermic, not-affected	500	906	3361	4731	4953	5806	6420
hypothermic, control	500	1388	4648	5164	5473	5839	6250
regressed/control $\times 100$		47.2	21.7	44.4	68.5	74.0	99.3
not-affected/control $\times 100$		65.3	72.3	91.6	90.5	99.4	102

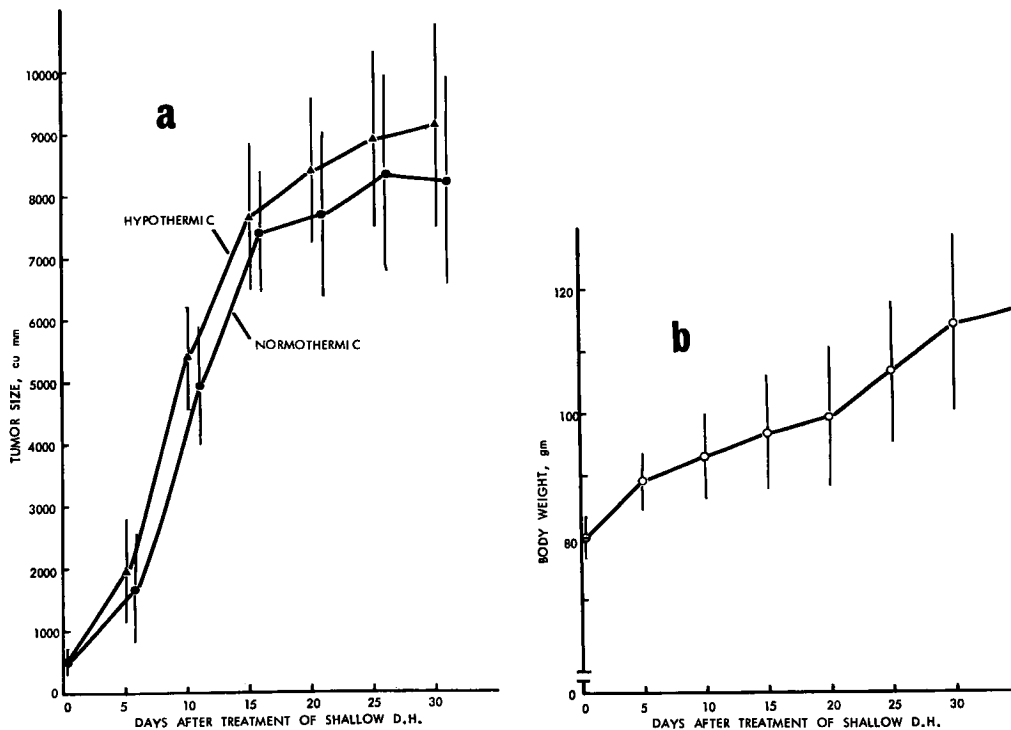


Fig. 7 After treatment of shallow differential hypothermia only, with one hypothermic tumor, while the other tumor was kept at the normothermic level in the group V, no difference of tumor growth was seen between normothermic and and hypothermic tumors (a). Body weight developed normally as same as in Fig. 3-b(b). The full dots and open circles represent mean value ; the vertical bars represent S. D. .

%以下の大きさに停止,抑制された。shallow D. H. 単独処置群や5-FU単独投与群では,腫瘍の消失あるいは明らかな生長抑制は全く認められなかった。体重曲線については,上記第IV実験群のうち,処置側腫瘍が消失した動物において,著明な体重減少が認められた。しかしその他の処置群では体重増加の軽度の抑制がみられたのみである。

3. 病理組織学的検索:ハムスターのアデノウィルス12型誘発腫瘍を長期継代移植したものは,基本的には初代誘発腫瘍と同じ組織像を示していた。すな



Fig. 8 Left normothermic cheek pouch tumor had disappeared and formed scar on 7 days after shallow D.H. treatment combined with 5-FU administration, while right hypothermic tumor continued to grow (animal No. 122).

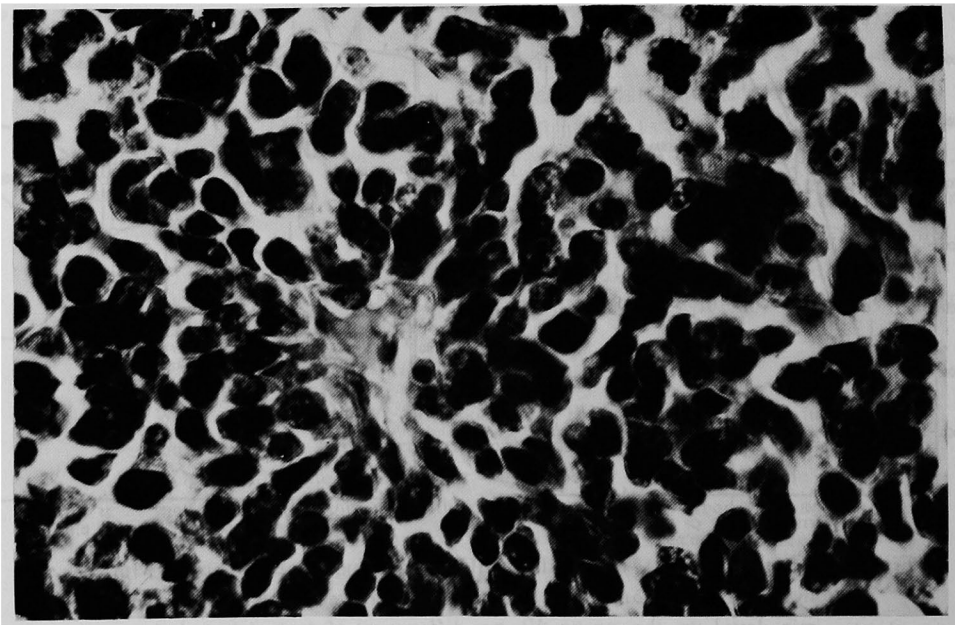


Fig. 9 Formation of tumor cells similar to perivascular pseudo-rosette in non-treated transplanted tumor induced originally by adenovirus type 12 of hamster (H. E. $\times 400$, animal No. 9).

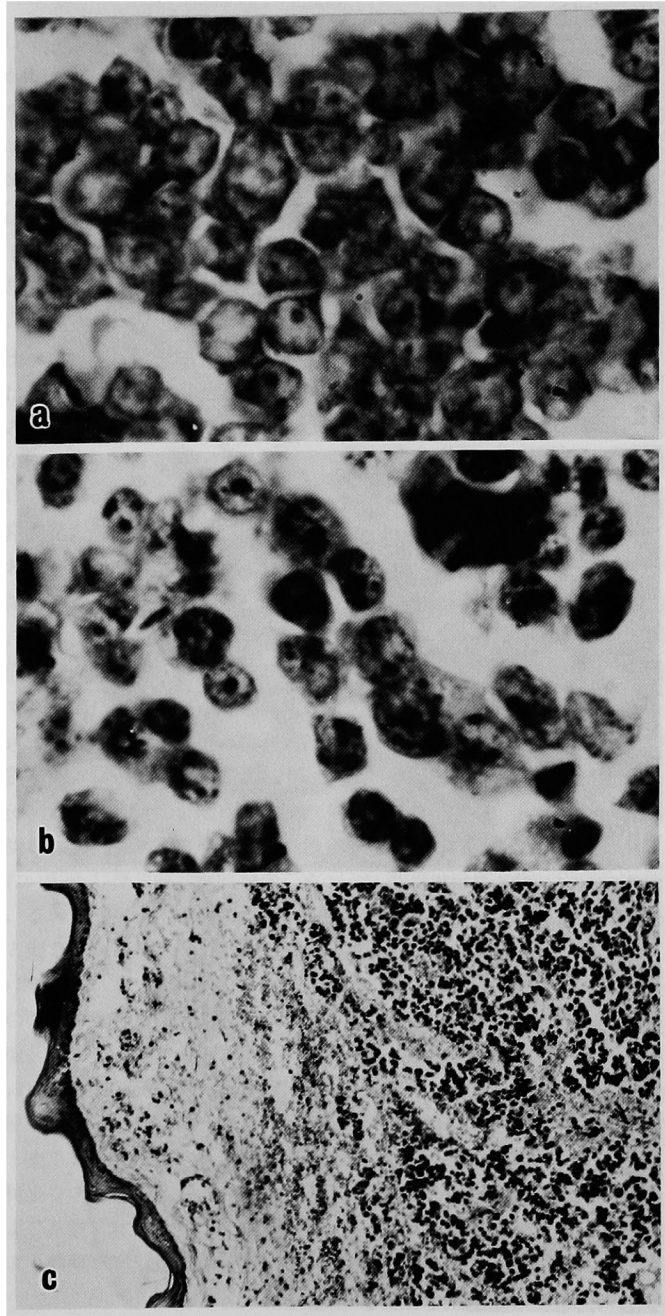


Fig. 10 Slightly decreased stainability of nucleolei in treated, normothermic tumor cells (methyl green-pyronine $\times 1,000$, a), in contrast with normal nucleolar and nuclear stainability as well as abnormal mitotic figure (right upper portion) in hypothermic tumor cells (methyl green-pyronine $\times 1,000$, b), immediately after shallow differential hypothermia treatment and 5-FU administration (group IV, animal No. 52).

Normothermic tumor tissue showing rarefaction and minute hemorrhage of the substance, while submucosal tissue revealing dilated capillaries and small amount of cell infiltration as well as preserved epithelial layer of cheek pouch of hamster immediately after the same experimental group (animal No. 56) as fig. 10-a, b (H. E. $\times 100$, c).

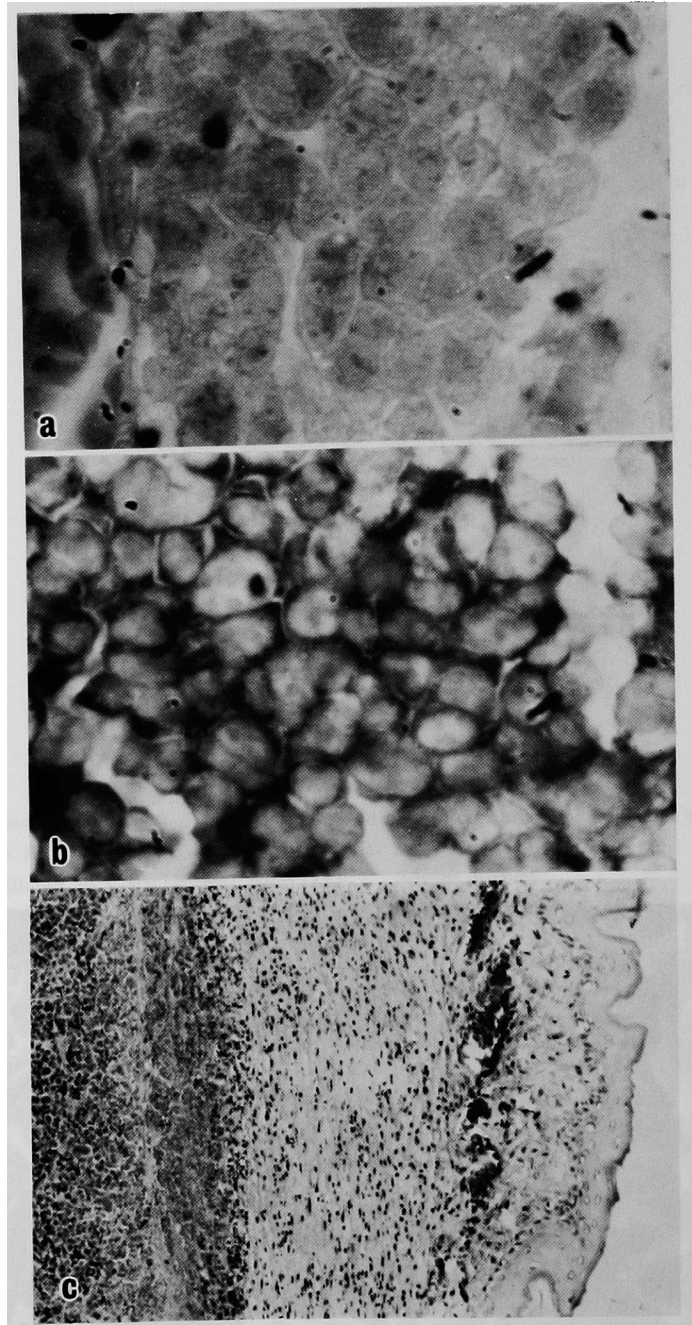


Fig. 11 Markedly decreased stainability of dismixtured chromatin (Feulgen $\times 1,000$, a) and loss of nucleolar stainability, but showing of stainable substance in cytoplasm (methyl green pyronine $\times 1,000$, b) of the treated, normothermic tumor cells 24 hours after shallow differential hypothermia treatment combined with 5-FU administration (group IV, animal No. 99).

Hemorrhagic necrosis of tumor tissue, in contrast with moderate cell infiltration and congestive capillaries in submucosal tissue as well as preserved epithelial lining of cheek pouch of hamster in the normothermic tumor 48 hours after the same experimental group (animal No. 114) as fig. 11-a,b (H.E. $\times 100$, c).

わち小型で球型もしくは卵型の核には、豊富な粗大クロマチン顆粒とかなりはっきりした1個もしくは2, 3個の核小体を有しており、細胞質は非常に乏しく、通常のH. E. 標本では細胞の輪郭ははっきりしないが、ほぼ多角型から紡錘型を示している。腫瘍組織の大部分では腫瘍細胞に特別な構造はみられずdiffuseに配列しているが、小部分では血管周囲に紡錘型細胞が配列し、perivascular pseudorosette⁷⁾に類似した構造がみられた(図9)。しかし初代誘発腫瘍に比べ、長期継代腫瘍では細胞分裂像、単核性あるいは多核性の巨細胞、および腫瘍生長の比較的早期にみられる散在性の小壊死巣など、anaplastic transformationがみられた。

第IV実験群における早期の変化; 処置後経時的に動物を屠殺し、正常温処置側および反対側低温の頬嚢腫瘍を、肉眼的および光顕的に比較検索した。本腫瘍細胞は前記の如く、細胞質は非常に乏しく、核が主体であるため、主に核の所見を観察した。

i) 10時間処置直後; 肉眼的に正常温処置側の腫瘍は全体に浮腫状で、一部は充血性であった。この腫瘍細胞は、methyl green-pyronin 標本において核小体および細胞質などは淡い赤色を呈しており、(図10-a)、Feulgen 標本においても核内クロマチン顆粒の赤紫色は淡いなど、核内物質の軽度の染色性低下が認められた。しかし反対側低温腫瘍のこれらの染色標本では、このような染色性低下はみられず、コントロールと同じくあざやかな核小体やクロマチン顆粒が染め出されていた(図10-b)。弱拡大では正常温処置側の腫瘍細胞は著明な疎化を示し、強い血管拡張と充血、および一部では腫瘍実質内への小出血が認められた(図10-c)。粘膜下組織にも浮腫性の変化と、腫瘍組織に比べてvascularityは低いが血管の拡張と充血がみられた。しかし粘膜の重層扁平上皮層に特別な所見はみられなかった。これらの腫瘍細胞および粘膜組織の所見は腫瘍の末梢部、すなわち頬部より離れた部分により著明であった(図10-c)。

ii) 10時間処置後24時間目; 肉眼的に正常温処置側腫瘍の多くは、黒褐色、腫脹および弾性軟な状態が特に腫瘍末梢半側部に認められた。これらの腫瘍細胞の核は主に類壊死様(necrobiotic)の変化を示していた。H. E. 標本で核膜はなお染め出されているが、クロマチン質分離(dismixture of chromatin)から核融解(karyolysis)⁷⁾を示すものが多く、Feulgen 標本でも僅かに染め出されている網

目状の核内物質がみられるのみである(図11-a)。またmethyl green-pyronin 標本では核小体は殆んど染め出されず、むしろ細胞質中に赤色染色物質が見立った。この物質は10%過酸化水素処置により消失したことからRNAが含まれていると考えられる。

(図11-b)。一部には核濃縮像(karyopyknosis)を示し、強いFeulgen反応を示す細胞も混在していた。なお反対側低温腫瘍には、一部に軽度の基質疎化がみられた以外に著変は認められなかった。

iii) 10時間処置後48時間目; 肉眼的には、ii)の24時間目とほぼ同様であるが、少数例の腫瘍に末梢側先端部に小潰瘍がみられ、腫瘍組織は特に末梢側部でかなりはっきりとした出血壊死巣を示していた。壊死巣内の血管に内皮細胞の軽度な肥厚、増殖がみられたが、その他の部の血管は比較的よく保たれていた。また粘膜下組織には著明な顆粒白血球浸潤の他に、少数のリンパ球や大食細胞なども認められた。血管内には新鮮な赤血球が充満しており、thrombusなどは見当らなかった。なお粘膜重層扁平上皮に著変はみられなかった(図11-c)。

第IV実験群における晩期の変化; 処置後腫瘍生長と体重測定用の動物が死亡した時点で解剖されたものである。

iv) 10時間処置後5日目; 肉眼的に正常温処置側腫瘍はほぼ全体に灰褐色で軟かく、壊死の状態であったが、反対側低温腫瘍は淡赤色弾性硬の状態であった。組織学的には腫瘍の基部、すなわち頬部に接する部に薄い層状の正常(viable)な腫瘍細胞がみられ、この末梢側に既存の構造を保ったままの壊死組織が層状に連続しており、さらに末梢側の大部分の腫瘍組織は一部に融解を示す凝固壊死巣であった。粘膜下組織および粘膜層も末梢部において上記の腫瘍壊死に巻き込まれた壊死巣が認められたが、それは腫瘍組織の壊死巣に比べより末梢の一部のみであった(図12-a)。

v) 10時間処置後10日目; 処置側正常温腫瘍は乾性で硬い壊死の状態であった。組織像では、壊死の分布は、iv)の5日目とほぼ同様であるが、腫瘍の壊死中に多数の石灰沈着巣がみられ、粘膜下組織には細胞浸潤とfibrocytic fibrosisが著明に認められた(図12-b)。反対側低温腫瘍では、組織学的に主に腫瘍の中心部に小壊死巣が散在してみられた。

vi) 腫瘍消失部; 処置後に腫瘍が消失し、その後20~30日頃に死亡した動物(animal No. 81, 122, 162, 168)である。肉眼的には粘膜に直径1~2mm

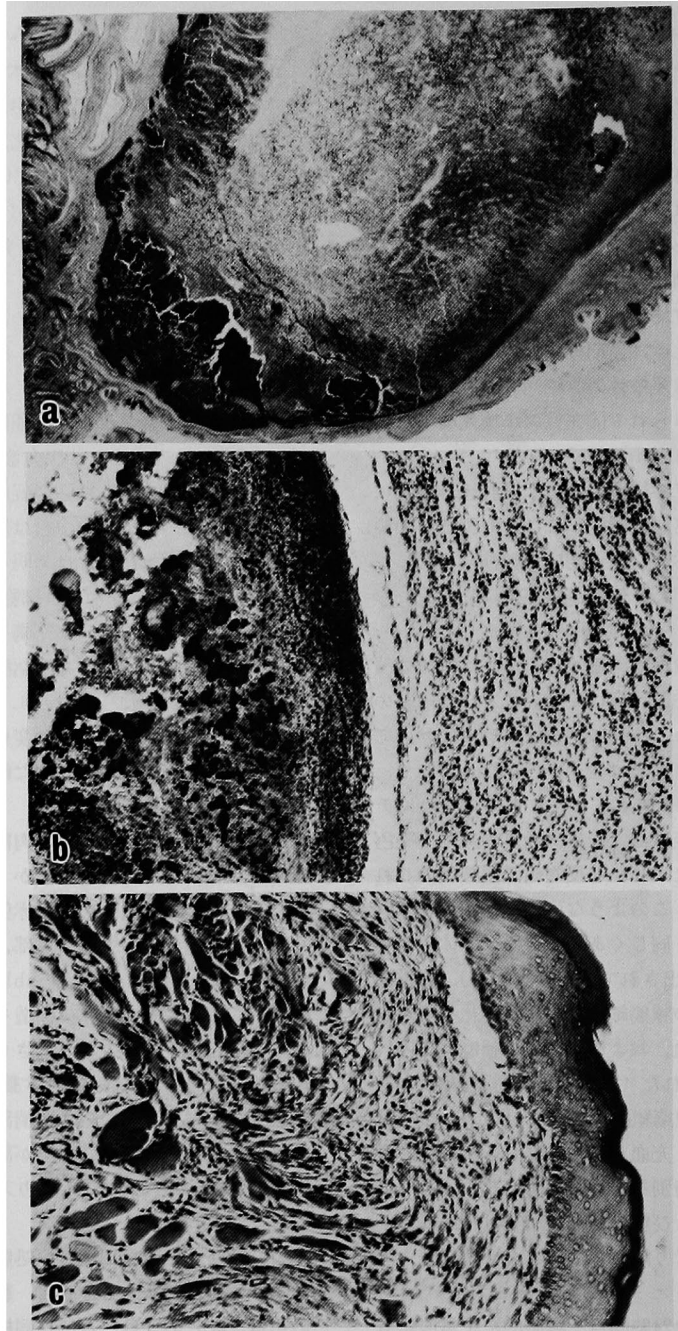


Fig. 12 Selected necrosis of effectively warmed tumor tissue at 37°C while viable neoplastic tissue of uneffectively warmed portion at the base of tumor (left lower portion) and preservation of effectively warmed mucosal tissue of cheek pouch of hamster 5 days after shallow differential hypothermia treatment combined with 5-FU administration (group IV animal No. 154) (H. E. $\times 12$, a).

Scattered calcified deposition in necrotic tumor tissue, and marked cell infiltration and mild fibrosis in submucosal tissue of the treated, normothermic tumor 10 days after the same experimental group (animal No. 167) as fig. 12-a (H. E. $\times 100$, b).

の陥凹と、これに集束する皺壁とがみられる(図8)。連続切片標本の検索では、腫瘍細胞はいずれにも見当らず、粘膜重層扁平上皮層直下の fibrosis とリンパ球を主体とした細胞浸潤および筋線維層の構築の乱れがみられるのみであった(図12-c)。

4. 小括: Shallow D. H. および 5-FU 投与の併用処置後、正常温処置側腫瘍の核の変化は10時間処置直後にみられ、methyl green-pyronin 法および Feulgen 法にて核内物質の染色性低下が認められた。さらに処置後24時間目では核内物質は殆んど染め出されなかったが細胞質に核酸物質を思わせる染色性がみられた。これらの変化は、腫瘍の加温が最も有効であった腫瘍末梢側部に著明で、肉眼的にも壊死を認める5日目頃では、中心性壊死とは異なるこの末梢側部壊死の形態がはっきりと示されていた。また組織学的に腫瘍の壊死がはっきりする処置後48時間およびそれ以後においても、粘膜下組織および粘膜扁平上皮層はよく保たれていた。そこには細胞浸潤を主体とする炎症反応はみられるが、壊死はみられなかった。

IV 考 察

1. 腫瘍の温熱処置について

動物あるいはヒトの腫瘍におよぼす温熱の影響について考察する。まず低温処置については担癌動物を低温冬眠状態に保つと、処置中に腫瘍の生長はみられないが、復温後はコントロールと同じ速度で生長するのが通常である。^{27, 28)} またヒト悪性腫瘍の末期例に全身20℃低温療法が行われているが、^{75, 76)} その効果は少く、処置による腫瘍の退縮や消失は認められていない。他方腫瘍に対する高温処置は低温処置に比べより有効で、臨床例の報告も多い。^{22, 77)} しかし高温処置は消耗性の悪性腫瘍患者に不適當であり、⁷⁸⁾ また反復処置により効果が減ずることもある。²⁹⁾ さらにヒト悪性腫瘍由来細胞は39~40℃以上の加温で不可逆的な損傷を受けるが、38℃では細胞増殖がより急速になるという。⁷⁹⁾ このことは全身を低温下に腫瘍局所のみを37℃前後に保つ D. H. 処置において注意すべきことであるが、D. H. 処置により腫瘍の生長が促進したという報告はない。^{36-38, 40, 42, 43, 56, 59)} 本実験の正常温処置側腫瘍においても、腫瘍消失あるいは生長の停止、抑制例はあるが、腫瘍生長が刺激された例は全く認められなかった。

2. 腫瘍の D. H. 処置について

1965年この D. H. 処置を最初に腫瘍に対して試み

た Popovic ら³⁶⁾ は、ハムスター移植腫瘍を用い、全身を4℃とし、腫瘍のみを37℃に加温した。その場合2および4時間処置では著効なく、10時間では全例の腫瘍が完全に消失し、その後再発もみられなかったと報告した。また田淵は全身10~15℃の D. H. 処置を10時間行えば、処置腫瘍の50%が完全に消失することを観察し、⁴⁰⁾ Popovic らは全身30℃の軽度低体温下で24時間 D. H. 処置を行えば、全例に腫瘍が消失すると報告した。⁴⁹⁾ さらに5-FU を併用して D. H. 処置を行った場合、全身4℃で1時間の処置で全例に腫瘍が消失することも観察された。⁵⁶⁾ しかしこれらの D. H. 処置条件では、短時間の処置を行おうと思えば4℃という超低体温が必要であり、30℃の軽度低体温の場合には24時間も処置時間を要している。低温下での抵抗性は hibernator と non-hibernator では差があり、⁶¹⁻⁶³⁾ 上記の D. H. 処置に使用されているハムスター(コーモリ型冬眠)と違って、non-hibernator であるヒトの超低体温処置は不可能ではないが、⁶⁰⁾ 悪性脳腫瘍患者に対して D. H. 療法を試みる時、超低体温あるいは長時間の低体温による危険性や、合併症が大きな問題となった。^{57, 58)} そこで臨床応用のためにより安全な30℃軽度低体温下で10時間の shallow D. H. 処置に抗癌剤を併用した場合の効果について検索したのが本実験である。その結果、処置腫瘍の18%が完全消失、55%に明らかな腫瘍生長の停止、抑制と計73%に抗癌効果のみられた。ここで有効であったと考えられる D. H. 処置の動物実験から、D. H. 処置条件すなわち腫瘍組織と全身との温度差および処置時間の関係を thermal dose (温度差, °C × 処置時間, 分) についてみる。表4の如く温度差が20℃以上では腫瘍の種類に関係なくその効果は thermal dose に比例しており、また抗癌剤を併用した場合は D. H. 単独処置の1/10の thermal dose で同じ効果を示している。^{36, 40, 56)} しかし温度差7℃の shallow D. H. 単独で、thermal dose 10,080 (min. × °C) を行い100%腫瘍が消失しているのに、⁵⁹⁾ 本第IV実験群では同じ shallow D. H. で、4,200 (min. × °C) の thermal dose に抗癌剤を併用しているのに約20%の腫瘍消失率しか得られなかった(表4)。

3. 本実験結果について考察

上記の如く同種のハムスターの同じ類腫瘍を用いながら、なぜ Popovic らの実験³⁶⁾ と本第IV実験群との抗癌効果に違いを生じたかということについては、i) 腫瘍加温方法の違い、ii) 腫瘍の温度感

Table 4 Time-temperature relationship of D. H.

tumor temperature	37°C		37°C		37°C	
rectal temperature	4°C		10~15°C		30°C	
temperature difference	33°C		27~22°C		7°C	
combination with anti-tumor agent	-	+	-	-	+	+
duration of treatment	10hr	1 hr	10hr	24hr	10hr	
disappearance rate of tumor	100%	100%	50%	100%	20%	
thermal dose (temp. diff. °C × duration of treat. min.)	19,800	1,980	10,200~7,200	10,080	4,200	
	Popovic, Popovic, V. P., V. P., et al., et al., 1965 1966		Tabuchi, K., 1972		Popovic, author, V. P., 1975 et al., 1966	

受性の違い, iii) 腫瘍の抗癌剤感受性の違い, および, iv) 抗癌剤の投与方法の違いなどが要因と考えられる。

i) 腫瘍加温法については, Popovic³⁶⁾らは, electric heating device を用いて電熱加温しているが, 本実験では温水灌流による加温である。いずれも腫瘍組織内温度は needle thermister で腫瘍中心部を測定し, 37°Cに調節しているが, 加温法により組織内の温度勾配深達度が異なる^{44, 57)}ことから, 腫瘍表面部の温度には差があったことも考えられる。ii) の腫瘍の D. H. 処置に対する温度感受性あるいは抵抗性についての研究はみられないが, 高温処置に対して動物およびヒト腫瘍の種類の違いによって温度感受性に差が認められている。^{23, 79, 80)} Harris⁸⁰⁾によればヒト腺癌組織は比較的高い温度感受性を有しているということから, Popovic ら^{36-38, 56, 59)}の用いたヒト結腸腺癌由来の移植腫瘍と, 本実験のアデノウィルス12型誘発移植腫瘍とは, D. H. 処置に対する温度感受性が異なるとも考えられる。この D. H. 処置に対する感受性については, 組織学的にみても多種に分類されるヒト脳腫瘍⁷³⁾に D. H. 処置を試みる場合には大きな問題点となろう。iii) の腫瘍の種類別により抗癌剤に対する感受性が違うということは, Bleomycin⁸¹⁾や 5-FU^{65, 82)}などについて報告されている。D. H. 処置に併用された 5-FU が, 本実験のアデノウィルス誘発腫瘍と, Popovic ら^{36-38, 56, 59)}の用いたヒト結腸腺癌由来腫瘍とのいずれに高い感受性を示すかについての実験は行われていない。しかし 5-FU はヒト腺癌に最も高い感受性を示すとされている⁸³⁾ことから, Popovic らの実験と本実験におけ

る D. H. 処置において 5-FU 併用の効果に差がみられたのかも知れない。iv) の抗癌剤の投与方法, 特に 5-FU の種々の全身投与方法における血中濃度は静脈内投で最も高値で, 腹腔内, 筋肉内あるいは経口投与の 5~10倍となり, また尿中排泄も最も遅延するという⁸⁴⁾したがって同量の 5-FU を用いてはいるが, 静脈内投与を行った Popovic ら⁵⁶⁾の場合は, 腹腔内投与の本実験より高い血中濃度が得られたと考えてよいであろう。

4. 高温処置と D. H. 処置の比較

正常脳におよぼす高温処置の形態学的変化としては, 正常温下の犬の脳を 43°C以下で30分間加温しても変化はみられないが, 43°C以上30分間加温では出血壊死巣がみられている。⁸⁵⁾また D. H. 処置では, 23°C全身低体温下で家兔脳を 36~38°Cに10時間加温しても形態学的変化はみられない。しかしながら同じ低体温下で局所を 40°Cの高温で10時間加温すれば, 加温された脳組織中には出血壊死が認められている⁴⁶⁾脳血液関門におよぼす影響については, 高温処置では, 正常温下のラット脳を 42°C, 30分間加温すれば horseradish peroxidase の脳血管透過性が亢進するという⁸⁶⁾他方 21~23°C全身低体温下で犬の正常大脳局所を正常温に 5時間保つ D. H. 処置を行った結果, 処置脳の血管透過性は亢進し, ¹³¹I-HSA のとりこみは反対側低温部の約 5.9倍であった⁴⁵⁾これらから動物の正常脳に対する高温および D. H. 処置により, 脳血液関門は類似の変化を示すが, 形態学的変化は明らかな違いを示している。

次に腫瘍に対する高温処置の生化学的変化としては, in vitro で 42°C, 0.5~6時間処置で嫌氣的解

糖代謝に影響を認めないという。⁷⁷⁾しかし D. H. 処置においては, in vivo で23~24℃全身低体温下, 10時間の処置により, 腫瘍組織では処置中より嫌気性解糖が上昇していることが判明している。⁶⁹⁾腫瘍の, lysosome について, HeLa 細胞では43℃高温処置により lysosome の増加がみられたという。⁶⁷⁾in vivo の D. H. 処置では, 腫瘍組織の lysosome の total enzymal activity は減少するが, free activity は増加した。⁵⁰⁾これらのことから高温および D. H. 処置による腫瘍壊死過程に lysosome も関与していることが窺える。

さらに腫瘍に対する高温あるいは D. H. 処置による形態学的変化について, まず種々の培養細胞における高温処置の変化は, 核小体 (heat-sensitive cellular function in the nucleolus)⁶⁸⁾にみられるという。すなわち42~43℃, 15~30分で核小体のリボ核酸 granular component が消失, ³H-uridine や ³H-thymidine のとりこみを検索した結果, あるいは高温処置後の細胞に DNA ウィルスの感染はみられないが, RNA ウィルスの replication は障害されなかったことなどから, 高温処置により核小体存在する DNA dependent RNA の合成が障害されると考えられている。^{67~91)}また Love ら⁸⁹⁾は HeLa 細胞などを用いて, 45℃, 5分で核小体物質が intracytoplasmic inclusion としてみられ, さらに高温, 長時間では inclusion が増加し, Feulgen 反応にて核小体 DNA は消失するが, 核 DNA はなお存在するという。一方本第IV実験群において shallow D. H. 処置直後に核小体や核内クロマチン顆粒は pyronin あるいは Feulgen 反応に対して染色性低下を示し (図10-a), 処置後24時間には核小体およびクロマチン顆粒はほとんどみられず, わずかに網目状の構造が認められる程度であった (図11-a)。ただ興味あることは, 核内の pyronin 染色性は著明に低下したのに比べ細胞質内には部分的に被染色性物質が認められ, この物質は過酸化水素処置にて RNA が主体であると考えられた (図11-b)。この物質は前記 Love ら⁸⁹⁾の intracytoplasmic inclusion と類似のもの, またその他の D. H. 処置後の核内の変化も高温処置による変化と類似するのではないかという解釈もできよう。もしそうであれば, 腫瘍に対する D. H. 処置も腫瘍細胞の核小体あるいは核に作用するのではないかと推察される。以上高温処置と D. H. 処置による正常脳および腫瘍の変化を比較してみると, 両者の異同をいちがいに論ずることは困難であ

る。唯, D. H. 処置による腫瘍細胞の核小体および核の興味ある形態学的変化は, 高温処置との類似性を窺わせ, かつまた D. H. 処置の作用機序が推察された。

他方本第IV実験群は, shallow D. H. に 5-FU を併用しており, thymidylate synthetase を阻害することにより DNA 合成阻害をきたす 5-FU が⁸⁴⁾形態学的に核内の変化を示すことも考えられる。actinomycin D や bleomycin により, 特に核小体に形態学的変化を認めるという報告もあり^{92~94)}本実験の核小体や核の変化が D. H. 処置によるものか, 5-FU によるものかについて今後検討すべき問題である。

5. D. H. 処置の腫瘍選択的作用について

高温処置の場合も周囲正常組織に比べ腫瘍に対してより選択的に作用するという in vivo^{21, 24)}および in vitro^{77, 91)}の研究をみる。特に Levine ら⁹¹⁾は HeLa 細胞を42℃, 2時間処置すると核酸代謝の障害をきたし, 24時間以上生存しないが, 2倍体の眼球レンズ上皮細胞は9日間も42℃で生存したという。D. H. 処置の腫瘍選択的作用は本実験で明確となった。すなわち10時間の shallow D. H. 処置直後すでに腫瘍細胞に変性の初期像がみられた (図10-a) のに対して, 粘膜下組織には軽度の浮腫や炎症反応が認められたのみであった (図10-c)。さらに腫瘍の変性壊死は進行し (図11-a, b) 処置後5~10日目頃には完全に壊死となるに対して, 粘膜下組織には fibrosis がみられ, 重層扁平上皮には著変は認められなかった (図12-a, b)。脳腫瘍治療に際して, 腫瘍周囲組織の損傷はそのまま神経症状として現われることになり, 腫瘍のみに選択的破壊作用を示すものでなければならない。この意味においても D. H. 処置は脳腫瘍補助療法として有利であろう。

6. D. H. 処置と抗癌剤併用について

さらに D. H. 処置と抗癌剤併用について, 特に高温処置に抗癌剤を併用した場合と比較し, i) 抗癌剤の濃度分布, ii) 脳血管透過性におよぼす影響, iii) 抗癌剤の副作用, iv) D. H. 処置と併用した利点, などについて考察する。

i) 高温処置では, 抗癌剤が加温部に高濃度な分布を示し,³⁵⁾また腫瘍組織温度の上昇と抗癌剤濃度あるいは抗癌剤の生物活性とは直接的相関関係がみられている。^{52, 53, 55, 95)}D. H. 処置でも, 処置腫瘍の抗癌剤組織内濃度は, コントロールの3倍となり, さらに処置中の血中濃度も高いレベルに保持されることが判明している。^{43, 96, 97)}本実験でも, 5-FU 投与単独

第III群, Shallow D.H. 単独第V群のいずれも抗腫瘍効果はみられず, 両者併用第IV群にのみ効果がみられた。つまり D. H. 処置の温熱効果に加えて処置腫瘍に抗癌剤がより高濃度に分布したための相乗作用であろう。抗癌剤治療の観点から, 例えば bleomycin が皮膚扁平上皮癌に特異的効果が認められるのは, 抗癌剤の感受性と, 生体内分布の特異性とが大きな要素である⁸¹⁾ ヒト脳腫瘍, 特に glioma に著効を示す抗癌剤が開発されていない現在, D. H. 療法に併用して, 通常の投与方法では得られない局所高濃度が得られる点は興味ある方法といえよう。ii) 脳血管透過性の亢進は, 高温処置によってもみられているが⁸²⁾ D. H. 処置でも亢進していた。さらに脳血液関門が障害されている脳腫瘍⁸³⁻¹⁰¹⁾に近い状態として cold induced lesion に対して D. H. 処置を行った場合, より著明な血管透過性の亢進が認められ⁴⁵⁾ 脳腫瘍における抗癌剤局所濃度が高められる一つの要因となっている。iii) 全身正常温下で行う局所高温処置では抗癌剤の副作用に問題があり, 実際の臨床応用には抗癌剤添加の加温血で局所灌流することで副作用を防止しようとしている^{32, 33, 102-104)} しかしながら他臓器と違い脳の耐熱限界は低く^{85, 105, 106)} ヒト脳腫瘍患者の脳局所を高温灌流するのは大変に危険である。さらに高温処理に抗癌剤を併用した場合, 腫瘍周囲組織にも抗癌剤のとりこみが増加している⁵⁴⁾ しかるに D. H. 処置は脳組織および脳腫瘍を正常温までしか加温せず, 加えて全身低体温下での抗癌剤中毒作用は著明に防止される³⁴⁾ など有利な点が認められる。iv) 最後にこれら D. H. 処置と抗癌剤併用が有利な点をまとめてみると(図13), ㉑全身低体温下にあるため抗癌剤の分解排泄が遅延し, 持続的に比較的高い血中濃度を保つことが可能である, ㉒低温正常組織に対する中毒作用が著明に軽減されることになる, ㉓腫瘍局所の正常温部では, D. H.

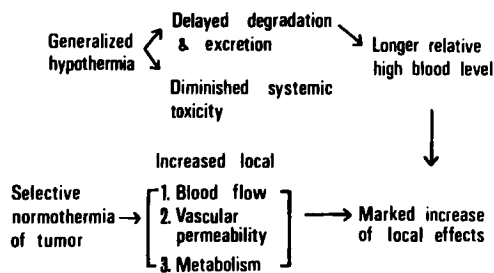


Fig. 13 Advantage of combination with treatment of differential hypothermia and administration of anti-tumor agent.

処置の腫瘍選択的作用に加えて, 相対的に血流が持続的に増加し, 血管透過性も亢進することなどから, 局所の抗癌剤は高濃度で腫瘍に作用すること, ㉔ D. H. 処置の温熱効果の一つとして, 高温処置と同様に腫瘍細胞の代謝異常をきたし⁸⁰⁾ 抗癌剤感受性が高まる⁸⁵⁾ などが相乗的に作用し抗腫瘍効果が増強されるものと推察される。

7. 小 括

以上 D. H. 処置について, 特に高温処置と対比しながら文献的考察を加えた, 本実験を通して, D. H. 処置の腫瘍選択的破壊作用と, その作用機序の一つとして核小体あるいは核の形態学的変化について論じた。また臨床応用可能な条件として shallow D. H. 処置 10 時間に抗癌剤を併用した結果について, その効果におよぼす種々の要因について考察した。さらに補助療法として, D. H. 処置と抗癌剤の併用は高温処置の場合に比して有利な点についてまとめた。耐熱限界の低い脳組織にあっては腫瘍局所を正常温に保てばよいということ, しかも腫瘍に対して選択的作用を示すこと, さらにまた抗癌剤感受性の低い脳腫瘍, 特に glioma において, D. H. 処置に抗癌剤を併用した場合, 腫瘍局所の抗癌剤濃度は長時間高いレベルに保持され, しかも全身の副作用は著減されるということなどから, D. H. 処置と抗癌剤併用は脳腫瘍の補助療法として有利な方法と考えられた。

V 結 論

1. アデノウイルス 12 型誘発腫瘍をハムスターの頬嚢に移植し, これらのハムスターを 5 実験群に分けて D. H. の効果を検討した。すなわち第 I 実験群は頬嚢移植腫瘍を担う無処置コントロール, 第 II 実験群は非担癌動物に正常温で 5-FU 50 mg/kg 腹腔内一回投与, 第 III 実験群は頬嚢腫瘍を担う動物に, 正常温で 5-FU を第 II 実験群と同量投与, 第 IV 実験群は全身と一側頬嚢腫瘍を 30°C 軽度低体温とし, 他側腫瘍を温水にて 10 時間正常温に保つ shallow D. H. 処置に加えて, 処置開始時に 5-FU を第 II 実験群と同量投与, 第 V 実験群は第 IV 実験群と同条件の shallow D. H. 単独, の 5 群である。

2. 臨床に応用可能な条件である第 IV 実験群において, 処置腫瘍は処置後 1 週間目頃までに約 18% が完全消失, 約 55% に処置後約 10 日間まで反対側低温腫瘍の 50% 以下の大きさに生長停止, 抑制がみられたが, 残り 27% には効果がみられなかった。

3. 第 IV 実験群において病理組織学的検索の結果,

周囲粘膜組織に比べて腫瘍加温部の変性壊死は選択的であった。また処置直後より核酸染色標本において、核小体および核の特異的な変性像がみられた。

4. 正常脳および腫瘍に対する D. H. 処置と高温処置による変化を比較検討した。また温熱療法のなかで D. H. 療法, 特に臨床応用可能な shallow D. H. 処置に抗癌剤を併用した場合の利点についてまとめた。

拙筆にあたり、終始厳正なる御指導、御校閲を賜りました恩師、岡山大学脳神経外科教授西本詮先生に深甚の謝意を捧げます。また終始御援助を頂きました教室の諸先生、諸氏諸嬢に感謝いたします。なお本論文の要旨は 1971年第30回日本脳神経外科学会総会において発表した。また本研究は厚生省がん研究助成金による。

文 献

- 1) Sano, K., Hoshino, T. and Nagai, M.: Radioseusitization of brain tumor cells with a thymidine analogue (Bromouridine). *J. Neurosurg.*, **28**: 530-538, 1968.
- 2) 亙理勉: 脳腫瘍の放射線療法. 癌臨床, 別冊, 131-136, 1969.
- 3) 山下純宏, Gillingham, F. J.: グリオブラストーマに対する放射治療の効果. *脳神経外科*, **3**: 329-336, 1975.
- 4) 大橋威雄, 田淵和雄, 有森稔, 吉津法雨, 延藤栄男: Bioassay による Bleomycin の脳腫瘍組織内濃度. *臨床神経*, **12**: 185-190, 1972.
- 5) Garfield, J. and Dayan, A. A.: Postoperative intracavitary chemotherapy of malignant gliomas. *J. Neurosurg.*, **39**: 315-322, 1973.
- 6) 本多拓, 石井録二, 西田和男, 植木幸明, 大橋威雄, 生田房弘: 脳腫瘍のブレオマイシン局所投与による効果. *ブレオマイシン研究会脳腫瘍部会誌*, **5**: 427-434, 1974.
- 7) 竹内一夫: 脳腫瘍の化学療法, 殊に膠芽腫102例について. 第19回日本医学会総会会誌, 236-237, 1975.
- 8) 高倉公朋, 三木啓全, 久保長生, 小川信子, 松谷雅生, 佐野圭司: 脳腫瘍の免疫治療法に関する研究. *脳神経外科*, **1**: 135-142, 1973.
- 9) 漆崎一郎: 癌の免疫療法—その可能性. *医学のあゆみ*, **91**: 528-529, 1974.
- 10) 祖父江八紀, 谷村憲一, 植木幸明: 溶連菌製剤 OK-432による脳腫瘍の非特異的免疫療法の試み. 第12回癌治療学会抄録, p. 273, 1974.
- 11) 佐野圭司, 佐藤修, 早川勲: 脳腫瘍の補助療法. *臨床外科*, **21**: 37-46, 1966.
- 12) 西本詮: 腫瘍治療最近の話題. *外科*, **35**: 441-444, 1973.
- 13) 西本詮: 脳神経外科学. 朝倉書店, 東京, 117-120, 1975.
- 14) Rubinstein, L. J.: Development of extracranial metastases from a malignant astrocytoma in the absence of previous craniotomy. *J. Neurosurg.*, **26**: 542-547, 1967.
- 15) Smith, D. R., Hardman, J. M. and Earle, K. M.: Metastasizing neuroectodermal tumor of the central nervous system. *J. Neurosurg.*, **31**: 50-58, 1969.
- 16) 武田文和, 半田一郎, 相羽正, 川淵純一, 深井孝治: Malignant glioma の extraneural metastases の 1 剖検例. *神経進歩*, **15**: 720-730, 1971.
- 17) 三島隆生, 岸政次, 津田耕平, 間頭, 大崎昭子, 林靖二, 林泰資, 岡益尚: 移植 glioma に対する強力超音波侵襲作用に関する研究. 第31回日本脳神経外科学会抄録, p. 55, 1972.
- 18) 神川喜代男, 早川徹, 池田卓也, 黒田良太郎, 無留井宏昌, 生塩之敬, 木村高大: 脳腫瘍治療にレーザー光線を応用するための基礎的研究. 第31回日本脳神経外科学会抄録, p. 56, 1972.
- 19) Bush, W.: Niederrheinische Gesellschaft für Natur-und Heilkunde in Bonn, Aus der Sitzung der medicinischen Section vom 13, November 1867, Berlin. *Klin. Wochensch.*, **5**: 137-139, 1868.

- 20) Coley, W. B.: Contribution to the knowledge of sarcoma. *Ann. Surg.*, **14** : 199-220, 1891.
- 21) Westermarck, N.: The effect of heat upon rat tumors. *Scand. Arch. für Physiol.*, **52** : 257-322, 1927.
- 22) Warren, S. L.: Preliminary study of the effect of artificial fever upon hopeless tumor cases. *Am. J. Roentgen.*, **33** : 75-87, 1935.
- 23) Johnson, H. J.: The action of short radio waves on tissues, III. A comparison of the thermal sensitivities of transplantable tumors in vivo and in vitro. *Am. J. Cancer*, **38** : 533-550, 1940.
- 24) Crile, G. Jr.: Heat as an adjunct to the treatment of cancer, Experimental studies. *Cleveland and Clinic Quarterly*, **28** : 75-89, 1961.
- 25) Crile, G. Jr.: Selective destruction of cancers after exposure to heat. *Ann. Surg.*, **156** : 404-407, 1962.
- 26) Ardenne, M.: Spontanremission von Tumorer nach Hyperthermie-ein Ruckkopplungsvorgang?. *Naturwissenschaften*, **23** : 645, 1965.
- 27) Bischoff, F. and Long, M. L.: Influence of induced hibernation on mouse sarcoma 180. *Am. J. Cancer*, **39** : 241-244, 1940.
- 28) Lyman, C. P. and Fawcett, D. W.: The effect of hibernation on the growth of sarcoma in the hamster. *Cancer Res.*, **14** : 25-28, 1954.
- 29) Müller, C.: Die Krebskrankheit und ihre Behandlung mit Röntgenstrahlen und hochfrequenter Elektrizität resp. Diathermie. *Strahlentherapie*, **2** : 170-191, 1913.
- 30) Rohdenburg, G. L. and Prime, F.: The effect of combined radiation and heat on neoplasms. *Arch. Surg.* **2** : 116-129, 1921.
- 31) Woodhall, B., Hall, K., Mahaley, S. Jr. and Jackson, J.: Chemotherapy of brain Cancer, Experimental and clinical studies in localized hypothermic cerebral perfusion. *Ann. Surg.*, **150** : 640-652, 1959.
- 32) Woodhall, B., Pickrill, K. L., Georgiade, N. G., Mahaley, M. S. Jr. and Dukes, H. T.: Effect of hyperthermia upon cancer chemotherapy, Application to external cancers of head and face structures. *Ann. Surg.*, **151** : 750-759, 1960.
- 33) Shingleton, W. W., Parker, R. T. and Mahaley, S.: Abdominal perfusion for cancer chemotherapy with hypothermia and hyperthermia. *Surg.*, **50** : 260-265, 1961.
- 34) Shingleton, W. W. and Smith, A. G.: Hypothermia against lethal dose of mechlorethamine. *Arch. Surg.*, **82** : 400-404, 1961.
- 35) Shingleton, W. W., Bryan, F. A. Jr., O'quinn, W. L. and Kruger, L. C.: Selective heating and cooling of tissue in cancer chemotherapy. *Ann. Surg.*, **156** : 408-416, 1962.
- 36) Popovic, V. P. and Masironi, R.: Disappearance of euthermic tumors after 10-hour generalized hypothermia. *Life Science*, **4** : 533-543, 1965.
- 37) Popovic, V. P. and Masironi, R.: Effect of generalized hypothermia on normothermic tumors. *Am. J. Physiology*, **211**, 462-466, 1966.
- 38) Popovic, P. and Popovic, V. P.: Protective effect of differential hypothermia. 499-524, edited by Musrcchia, X. J. and Sanders, J. F.: *Depressed Metabolism*, American Elsevier Publishing Company, Inc., New York, 1969.
- 39) Tabuchi, K.: Intracranial transplanted of the tumor induced by adenovirus type 12 in syrian hamster — An experimental brain tumor model — *Acta med. Okayama*, **25** : 605-613, 1971.
- 40) Tabuchi, K.: Disappearance of tumors induced by adenovirus type 12 after differential hypothermia treatment. *Acta Med. Okayama*, **26** : 39-50, 1972.
- 41) Tabuchi, K., Arimori, M., Yoshizu, H., Suga, K., Ohashi, T., Yamada, O. and Nishimoto, A.:

- Ultrastructural findings of adenovirus type 12-induced tumor cells treated by differential hypothermia. *GANN*, **63** : 725-730, 1972.
- 42) Tabuchi, K.: Effect of differential hypothermia on experimental brain tumor. *Acta med. Okayama*, **26** : 65-73, 1972.
- 43) 山田修, 池田幸明, 田淵和雄, 菅 健, 有森稔, 吉津法爾, 楊秀雄, 石光宏, 片木良典, 横山芳信, 西本詮: Differential hypothermia による脳腫瘍治療の試み(第4報). *日本外科学会雑誌*, **75** : 1605-1607, 1974.
- 44) 西本詮: Differential hypothermia の脳外科への応用. *外科*, **37** : 638-640, 1975.
- 45) 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*, **85** : 103-113, 1973.
- 46) 吉津法爾, 菅健, 田淵和雄, 有森稔, 大橋威雄, 水川典彦, 延藤栄男, 西本詮: Differential hypothermia による脳腫瘍の補助的療法. 第30回日本脳神経外科学会抄録, p. 88, 1971.
- 47) 有森稔, 田淵和雄, 吉津法爾, 松本皓, 菅健, 延藤栄男, 西本詮: 実験腫瘍ならびに人脳腫瘍に及ぼす Differential Hypothermia の影響. 第12回日本神経学会抄録, *臨床神経*, **11** : 740, 1971.
- 48) 池田幸明, 横山芳信, 片木良典, 山田修, 菅 健, 有森稔, 吉津法爾, 田淵和雄, 西本詮: Differential hypothermia による脳腫瘍治療の試み(第5報). 第32回日本脳神経外科学会抄録, p. 61, 1973.
- 49) 片木良典, 横山芳信, 池田幸明, 山田修, 大橋威雄, 有森稔, 田淵和雄, 菅 健, 吉津法爾, 西本詮: Differential hypothermia による脳腫瘍治療の試み(第6報). 第12回日本癌治療学会総会抄録, p. 285, 1974.
- 50) 横山芳信, 片木良典, 池田幸明, 山田修, 原田泰弘, 大橋威雄, 菅 健, 吉津法爾, 田淵和雄, 有森稔, 西本詮: Differential hypothermia による脳腫瘍治療の試み(第7報). 第75回日本外科学会総会抄録, p. 17, 1975.
- 51) Druckrey, H., Schmahl, D., Danneberg, P., Kaiser, K., Nieper, H. A., Lo, H. W. and Mecke, R. Jr.: Vergleichende Prüfung der chemotherapeutischen Wirkung von N-oxyd-Lost und anderen alkylierenden Substanzen auf Tumoren von Ratten. *Arzneimittel-Forsch.*, **9** : 539-550, 1956.
- 52) 岡田進: 制癌剤の担癌生体内分布に関する実験的研究, とくに腫瘍組織温度の影響について. *名古屋医学*, **79** : 184-215, 1966.
- 53) Suzuki, K.: Application of heat to cancer chemotherapy, Experimental studies. *Nagoya J. med. Sci.*, **30** : 1-21, 1967.
- 54) Rochlin, D. B., Thaxter, T. H., Dickerson, A. G. and Shiner, J.: The effect of tissue temperature of alkylating agents in the isolation perfusion treatment of cancer. *Surg. Gynecolog. and Obstet.*, **113** : 555-561, 1961.
- 55) Mahaley, M. S. Jr. and Woodhall, B.: Effect of temperature upon the in vitro action of anticancer agents on VX₂ carcinoma. *J. Neurosurg.*, **18** : 269-272, 1961.
- 56) Popovic, V. P. and Masironi, R.: Enhancement of 5-Fluorouracil action on normothermic tumors by generalized hypothermia. *Cancer Res.*, **26** : 2353-2356, 1966.
- 57) 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, 西本詮: Differential hypothermia による脳腫瘍治療の試み. *脳神経外科*, **1** : 51-57, 1973.
- 58) 西本詮: 物理的方法による非観血的治療の現況. 第33回日本脳神経外科学会抄録, p. 133, 1974.
- 59) Popovic, V. P. and Masironi, R.: Disappearance of normothermic tumors in shallow (30°C) hypothermia. *Cancer Res.*, **26** : 863-864, 1966.
- 60) Niazi, S. A. and Lewis, F. J.: Profound hypothermia in man, Report of a case. *Ann. Surg.*, **147** : 264-266, 1958.
- 61) Popovic, V.: Lethargic hypothermia in hibernators and nonhibernators. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **80** : 320-331, 1959.

- 62) Popovic, V.: Survival time of hypothermic white rats (15°C) and ground squirrels (10°C). *Am. J. Physiol.*, **199** : 463-466, 1960.
- 63) Popovic, P. and Popovic, V. P.: Survival of newborn ground squirrels after supercooling or freezing. *Am. J. Physiol.*, **204** : 949-952, 1963.
- 64) Duschinsky, R., Plevin, E. and Heidelberger, C.: The synthesis of 5-Fluoropyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.*, **79** : 4559-4560, 1957.
- 65) Heidelberger, C., Griesbach, L., Montag, B. J., Mooren, D. and Cruz, O.: Studies on fluorinated pyrimidines, 11 Effects on transplanted tumors. *Cancer Res.*, **18** : 305-317, 1958.
- 66) Luna, L. G. edited: Manual of histologic staining methods of the Armed Force Institute of Pathology. McGraw-Hill Book Company, New York, 1968.
- 67) 小林忠義, 影山圭三, 編: 病理組織標本の作り方. 医学書院, 東京, 1970.
- 68) Mayneord, W. V.: On a law of growth of Jensen's sarcoma. *Am. J. Cancer*, **16** : 841-846, 1932.
- 69) Haddow, A.: The biological characters of spontaneous tumors of the rate of growth. *J. Path. Bact.*, **47** : 553-565, 1938.
- 70) Durbin, P. W., Jeung, N., Williams, M. H. and Arnold, J. S.: Construction of a growth curve for mammary tumors of the rat. *Cancer Res.*, **27** : 1341-1347, 1967.
- 71) Patt, H. M., Blockford, M. E. and Drallmeier, J. L.: Growth characteristics of the krebs ascites tumor. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **83** : 520-524, 1953.
- 72) Patt, H. M. and Blackford, M. E.: Quantitative studies of the growth response of the krebs ascites tumor. *Cancer Res.*, **14** : 391-396, 1954.
- 73) Rubinstein, L. J.: Tumors of the central nervous system. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 1972, p. 125.
- 74) 浜崎幸雄編: 病理組織の見方と鑑別診断. 医歯薬出版株式会社, 東京, 21-29, 1972.
- 75) Fay, T.: Early experience with local and generalized refrigeration of the human brain. *J. Neurosurg.*, **16** : 239-260, 1959.
- 76) Fay, T. and Henny, G. C.: Correlation of body segmental temperature and its relation to the location of carcinomatous metastasis. *Surg. Gynec. Obstet.*, **66** : 512-524, 1938.
- 77) Cavaliere, R., Ciocatto, E. C., Giovanella, B. C., Heidelberger, C., Johnson, R., Margottini, M., Mondovi, B., Morocca, G. and Rossi-Fanelli, A.: Selective heat sensitivity of cancer cells, Biochemical and clinical studies. *Cancer*, **20** : 1351-1381, 1967.
- 78) Piersol, G. M.: Therapeutic application of heat: Its uses and abuses. *New Eng. J. Med.*, **247** : 346-349, 1952.
- 79) Salarwy, O. S., Goldstein, M. N. and McCormick, T.: Hyperthermia in tissue-cultured cells of malignant origin. *Cancer Res.*, **17** : 785-791, 1957.
- 80) Harris, J. J., Janes, W. C. and Woolley, G. W.: The effect of temperature on tumor growth. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, **3** : 329, 1962.
- 81) 市川篤二: 新制癌剤ブレオマイシンについて. *日本癌治療学会誌*, **5** : 7-9, 1970.
- 82) Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R. J. and Scheiner, J.: Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor-inhibitory compounds. *Nature*, **179** : 663-666, 1957.
- 83) 石山俊次, 坂部孝, 湖沙都也, 山形省吾, 船橋渡, 岡本純哉, 小池敏雄, 伊藤正憲, 知 修, 塩坂雅司, 片倉富芳: 5-Fluorouracil とその制癌効果. *癌臨床*, **13** : 139-150, 1967.
- 84) Mukherjee, K. L., Boothe, J., Wentland, D., Ansfield, F. J. and Heidelberger, C.: Studies on fluorinated pyrimidines, XVI Metabolism of 5-fluorouracil-2-C¹⁴ and 5-fluoro-2'-deoxy-

- uridine-2- C^{14} in cancer patients. *Cancer Res.*, **23** : 40-66, 1963.
- 85) Harris, A. B., Erickson, L. Kendig, J. H., Mingrino, S. and Goldring, S.: Observations on selective brain heating in dogs. *J. Neurosurg.*, **19** : 514-521, 1962.
- 86) Sutton, C. H.: Effect of selective microwave heating on blood-brain barrier and glioma blood flow. The American Association of Neurological Surgeons, Annual Meeting, Scientific Program Manuscripts, 1-6, 1974.
- 87) Heine, U., Suerak, L., Kondratick, J. and Bonar, R. A.: The behavior of Hela-S₃ cells under the influence of supranormal temperatures. *J. Ultrastruct. Res.*, **34** : 375-396, 1971.
- 88) Simard, R. and Berrhard, W.: A heat sensitive cellular function located in the nucleolus. *J. Cell Biol.*, **34** : 61-76, 1967.
- 89) Love, R., Soriano, R. Z. and Walsh, R. J.: Effect of hyperthermia on normal and neoplastic cells in vitro. *Cancer Res.*, **30** : 1525-1533, 1970.
- 90) Charpure, M. A.: A heat-sensitive cellular function required for the replication of DNA viruses but not RNA viruses. *Virology*, **27** : 308-319, 1965.
- 91) Levine, E. M. and Robbing, E. B.: Differential temperature sensitivity of normal and cancer cells in culture. *J. Cell Physiol.*, **76** : 373-379, 1970.
- 92) Stevens, B. J.: The effect of actinomycin D on nucleolar and nuclear fine structure in the salivary gland cell of *chironomus thummi*. *J. Ultrastruct. Res.*, **11** : 329-353, 1964.
- 93) Ogawa, K. and Onoe, T.: Nuclear changes produced by bleomycin in the 3-methylchoranthrene-induced mouse epidermal carcinoma cells. *GANN*, **60** : 503-507, 1969.
- 94) 田沢賢次, 曾我淳, 藤巻雅史, 興沼建部, 和田寛治, 武藤輝一: プレオマイシン投与による核小体の分離像(食道癌症例). *医学のあゆみ*, **85** : 483-484, 1973.
- 95) Mahaley, M. S., Knisely, W. H. and Woodhall, B.: In vitro-in vivo screening of during for use in regional brain cancer chemotherapy. *J. Neurosurg.*, **8**-13, 1961.
- 96) Masironi, R. and Popovic, V. P.: Differential hypothermia-normothermia as a new tool to enhance the activity of anticancer drugs. *Acta Isot.*, **7** : 289-298, 1967.
- 97) Popovic, V. P., Masironi, R. and Lehr, R.: Distribution of Fluorouracil-2- ^{14}C in hypothermic animals with normothermic tumors. *Cryobiology*, **6** : 87-92, 1969.
- 98) 柴崎浩: 血液脳関門の形態的基礎. *神経進歩*, **13** : 164-174, 1969.
- 99) Tator, C. H. and Olszewski, J.: Factors responsible for the distribution of radioactivity in a mouse glioma and brain after injection of radioiodinated human serum albumin (RIHSA). *Cancer Res.*, **26** : 1569-1581, 1966.
- 100) Totar, C. H. and Schwartz, M. L.: Permeability in brain tumors. *J. Neurosurg.*, **34** : 460-462, 1971.
- 101) Long, D. M.: Capillary ultrastructure and the blood-brain barrier in human malignant brain tumors. *J. Neurosurg.*, **32** : 127-144, 1970.
- 102) Mahaley, M. S. Jr., Odom, C. L. and Wookhall, B.: Histological changes after regional chemotherapy. *Arch. Surg.*, **87** : 765-774, 1963.
- 103) 坂内五郎, 浮島仁也, 渥美和彦, 榎井靖久, 藤森義蔵, 阿部光俊, 東博彦, 伊藤維郎, 立石昭夫, 三上隆三, 岩倉博光: 制癌剤の局所灌流の研究(第1報). *癌臨床*, **9** : 59-65, 1963.
- 104) 白羽弥右衛門, 酒井克治: 制癌剤の腫瘍局所灌流. *診断治療*, **51** : 1698-1709, 1963.
- 105) Burger, F. J. and Fuhrman, F. A.: Evidence of injury by heat in mammalian tissues. *Am. J. Physiol.*, **206** : 1057-1061, 1964.
- 106) Burger, F. J. and Fuhrman, F. A.: Evidence of injury to tissues after hypothermia. *Am. J. Physiol.*, **206** : 1062-1064, 1964.

Influence of differential hypothermia on transplanted hamster tumor

I) Effect of combination with shallow differential hypothermia and antimetabolites

Takeo OHASHI

Department of Neurological Surgery, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Akira NISHIMOTO, M.D.)

How to treat the malignant brain tumors has been one of the biggest problems in neurosurgery. It has been in the past, and it is still now. In addition to surgical removal of tumors, various non-surgical methods have been tried for the treatment of malignant gliomas. The use of heating or of cooling are some of these methods. They have been tried for a long time.

Already in 1866 Busch, W. observed disappearance of sarcoma in patients suffering from erysipelas. Westermarck, N. in 1927 observed that rat transplanted tumors were caused to disappear by exposing to heating, while the adjacent normal tissues were not damaged under conditions lethal to the tumors. In 1960 Woodhall, B. heated tumors locally that were perfused with chemotherapy. Shingleton, W. W., in 1962, heated localized tumor tissue on the patients with cancer, combined with regional chemotherapy under generalized hypothermia.

According to Popovic, V. P. et al. in 1965, they were first to report that differential hypothermia, keeping tumors normothermic under total body hypothermia at a temperature of 4 °C during a period of 10 hours in experimental animals, induced disappearance of tumor without resuming their growth afterward. Popovic, V. P., et al. in 1966 carried out further experiments and observed that tumors of the animals disappeared also subsequent to cooling whole body to 4 °C for 1 hour with anti-tumor agent, as well as to cooling whole body to 30 °C for 24 hours without chemotherapy while the tumor kept at 37 °C.

However, in order to induce tumor disappearance the differential hypothermia has to last at least 4 °C for 1 ~ 10 hours, or 30 °C for 24 hours. Since deep hypothermia lasting several hours or shallow hypothermia for long time is not well tolerated in non-hibernators, namely human beings, present experiment has been performed in an attempt to simulate the conditions of clinical work as close as possible. For this purpose the bodies of 22 hamsters were mildly cooled to a temperature of 30 °C, while cheek pouch transplanted tumors induced originally by adenovirus type 12 remained uncooled at 37 °C for 10 hours (Fig. 1, 2). The dose of 50 mg/kg of 5-fluorouracil (5-FU) was administered intraperitoneally in single injection at the beginning of treatment of shallow differential hypothermia (Table 1, Fig. 2). This resulted in that within 7 days later 4 out of 22 tumors (20%) disappeared completely without resuming their growth afterward, and 12 out of 22 tumors (55%) regressed temporarily for a period of 10 days after treatment (Table 2, 3, Fig. 6-b, 8). When the same amount of 5-FU was administered into normothermic tumor-bearing animals or into hypothermic animals with hypothermic tumors, tumor size of the animals was not affected (Table 1, Fig. 5-a, 6-a). When shallow differential hypothermia was treated without any anti-tumor agent, neither normothermic tumor size nor hypothermic one of the animals was also affected (Table 1, Fig. 7-a).

Histological findings were degeneration of tumor cells. Stainability of nucleolar RNA and nuclear DNA by means of methyl green-pyronine and Feulgen's methods was decreased already immediately after the shallow differential hypothermia treatment for 10 hours with 5-FU administration (Fig. 10-a). This was followed by, at 24 hours after the treatment, marked decreasing and loss of the stainability of nucleolar RNA and nuclear DNA as well as dismixture of chromatin and karyolysis of nuclei (Fig. 11-a, b). Scattered necrotic foci in the tumor tissue were obviously revealed 48 hours after the treatment. Tumor cells showed selectively these degenerative finding after treatment, while adjacent mucosal tissue of cheek pouch preserved their normal appearance almost wholly even 12 hours after the treatment (Fig. 10-c). Although inflammatory cell infiltration was observed 48 hours after the treatment, and followed by fibrocytic fibrosis in the submucosa thereafter, degenerative and necrotic change was never showed (Fig. 11-c, 12-a, b).

The author discussed that 1) combination with differential hypothermia and anti-tumor agent was effective for experimental tumor, 2) selective destroying and normothermic state of the treatment should be useful for non-surgical therapy of malignant brain tumor, as well as 3) cellular sensitive function of differential hypothermia might be existed in nucleolus or nucleus of tumor cell.