

浸潤性膀胱癌に対する温熱化学療法

金沢大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 久住治男 教授)

打林 忠雄, 李 秀雄, 久住 治男

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 内藤克輔 教授)

内 藤 克 輔

金沢大学がん研化学療法部 (主任: 佐々木琢磨 教授)

遠藤 良夫, 野口 美香, 田中 基裕, 佐々木琢磨

STUDIES OF COMBINED TREATMENT OF RADIOFREQUENCY HYPERTHERMIA WITH ANTICANCER AGENTS OR IRRADIATION FOR INVASIVE BLADDER CANCER

Tadao Uchibayashi, Soo-Woong Lee and Haruo Hisazumi
From the Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University

Katsusuke Naito

From the Department of Urology, School of Medicine, Yamaguchi University

Yoshio Endo, Mika Noguchi, Motohiro Tanaka
and Takuma Sasaki

From the Therapeutics, Cancer Research Institute, Kanazawa University

Using an *in vitro* colony forming assay system, the cytotoxic effects of anticancer agents alone, adriamycin (ADM) and bleomycin (BLM), and the combined effects of hyperthermia and anticancer agents on cultivated KK-47 cells were investigated. When the hyperthermia was combined with various concentrations of ADM ranging from 0.005 to 0.1 $\mu\text{g/ml}$ and BLM from 0.01 to 1.0 $\mu\text{g/ml}$, enhanced cell killing effects were obtained at the concentration of less than 0.02 $\mu\text{g/ml}$ of ADM and with an increase of BLM concentration. In DNA specimens obtained from the livers of chick embryos inoculated with human tumor cultivated cells, the polymerase chain reaction technique was used to amplify a DNA fragment specific to the β -globin gene. By detecting these amplified DNA fragments, the feasibility of efficiently detecting metastatic cells present in chick embryo was demonstrated *in vivo*. Hyperthermic therapy showed inhibitory effects on the growth of metastasized cultivated cells in a thermal dose-dependent manner. Combination therapy of ADM, mitomycin and carboplatin and hyperthermia had an enhanced inhibitory activity on the growth of metastasized cultivated human tumor cells derived from bladder cancer. Hyperthermia using radiofrequency-capacitive heating in combination with irradiation or anticancer agents, was performed in a total of 56 patients with T2 to T4 invasive urinary bladder cancer. A tumor regression rate of 50 percent or more was obtained in 21 of these 56 patients. We have to follow up the patients for longer periods more precisely to evaluate the role of these treatments.

(Acta Urol. Jpn. 39: 1209-1213, 1993)

Key words: Colony forming assay, Chick embryo assay, Chemohyperthermia, Invasive bladder cancer

緒 言

温熱療法の歴史は、1866年ドイツの医師ブッシュにより顔面の肉腫が丹毒による発熱により消失したとい

う報告に始まる。本療法は、癌集学的治療のなかで放射線療法や各種抗癌剤との併用により、期待される治療法の一つとなっている。放射線併用療法は、基礎および臨床の両面より研究されており、現在ではす

に確立された治療法とされている。しかし、放射線は低酸素、低栄養状態さらにS期癌細胞に対して抵抗性であるとともに、治療法としては局所的なものでしかない。悪性腫瘍は本来全身疾患であり、特に温熱療法の対象となる癌患者には遠隔転移を有する場合も多く、抗癌化学療法との併用が考慮されるべきと考えられる。温熱療法と抗癌剤との併用に関しては、一部の抗癌剤において殺細胞効果の増強が報告されていることから、今回抗癌剤との併用効果につき基礎的研究を行うとともに、その臨床成績についても検討した。

材料および方法

I. *in vitro* の実験として、ヒト膀胱癌由来培養細胞株 KK-47 を、抗生物質を含有する Ham F-12 培地 (日本製薬㈱東京) に20% calf serum (Microbiological Associates, Md, USA) を加えた FC-20 培養液で細胞浮遊液とし、従来の報告に従い¹⁾、温熱処理を行う。コロニー形成法により細胞生残率を算定し、42°C および 43°C において細胞生残率を20%もしくは50%低下させるために必要な加温時間を、それぞれ IT20 (20% inhibition time) および IT50 として算出した。

II. 温熱療法として相乗効果を有する代表的抗癌剤として、bleomycin (BLM) と adriamycin (ADM) について検討した。各種濃度の抗癌剤および37, 42および43°Cの温熱処理を併用し、37°Cにおける抗癌剤処理群を対照としてそれぞれの抗腫瘍効果について比較検討した。

III. *in vivo* の実験として、温熱療法との併用薬剤の選択を目的に、鶏卵法を用い微小転移巣に対する温熱化学療法の検討を行った。材料および方法は、既報^{2,3)}のごとく受精鶏卵漿尿膜上の血管内に、ヒト膀胱癌由来培養細胞株 T24 を移植し、移植3日目に抗癌剤および温熱処理を行い、4日後すなわち細胞移植7日目に胎児の肝を摘出する。摘出した肝より抽出したDNAをpolymerase chain reaction法により増幅後、P³²でラベルしたプローブを用いたサザンブロット法によりPCR productsの検出、解析を行う。

1) まず42.0, 42.5および43.0°Cの温熱処理単独による治療実験を行った。転移巣治療実験における効果判定は、コントロール群でのPCR productsを100%とした場合の治療群でのPCR productsの減少率を比較することにより行った。

2) 各種抗癌剤および温熱併用効果の検討に用いた薬剤は、ADM, cisplatin (CDDP), carboplatin (CB-DCA), mitomycin (MMC) および cyclophospha-

mide (CPM) である。臨床投与量を参考にし、鶏卵胎児の平均体重に換算して薬剤濃度を決定した。

対象および方法

I. 1984年4月より1992年9月までにT2以上の浸潤性膀胱癌56例に対し、RF誘電加温装置、Thermotron-RF8を用いた温熱療法を施行した。control群として、温熱単独および放射線併用療法群をも含めて検討した。浸潤性膀胱癌56例の内訳は、男性47例、女性9例で、年齢は37歳から93歳、平均63.5歳であった。方法は、膀胱内に生理食塩水100mlを注入し、対向する直径21cmのアプリケーターを用いて膀胱内温度が42.5°C以上になるよう加温した。原則として週2回、60分加温を行い、治療効果判定は温熱療法を4回以上施行した症例を対象とし、治療終了1~2週間後に画像診断上腫瘍が完全消失したものをCR、腫瘍縮小率が50%以上のものをPR、25%以上、50%未満のものをMR、縮小率25%未満で25%以内の増大率のものをNC、25%以上の増大が認められた場合をPDと判定した。併用療法別では、温熱療法単独群が3例、36~42Gyの放射線併用が24例、30mg/m²の塩酸ピラルピシン (THP-adriamycin) 静脈内投与 (1回/3週、計2~3回) 併用群が18例、60mg/m²のCDDP内腸骨動脈内注入併用群が6例、10mg/m²のMMC内腸骨動脈内注入が2例、60mg/m²のCDDP内腸骨動脈内注入および放射線併用が2例、MMCおよび放射線併用が1例に施行された。

成 績

I. 温熱処理後のKK-47細胞の生残率曲線はFig. 1のごとく、42°Cと43°Cの間で著明な殺細胞効果の差が認められた。43°C温熱処理群で、処理時間が30分を経過すると、片対数グラフ上で直線的に細胞生残率の低下が認められた。一方、42°C温熱処理群での細胞生残率の低下は、温熱処理時間が60分以上ではより緩徐となった。42°CでのIT20は41分であり、43°CでのIT20およびIT50は、それぞれ22分および41分であった。

II. 各種濃度のBLMおよびADM単独処理群、さらにこれらの薬剤と温熱併用処理による細胞生残率曲線をFig. 2, 3に示す。BLMでは、42°Cおよび43°Cの温熱併用にて、いずれも殺細胞効果の増大が認められた。これに対し、ADMでは0.02μg/ml濃度以下の場合には、ADM濃度に比例した殺細胞効果の増大が認められた。一方、ADM濃度が0.05μg

/ml 以上では, 抗癌剤単独と温熱併用群での殺細胞効果の差は減少し, 併用での ADM に対する抵抗性が出現した。

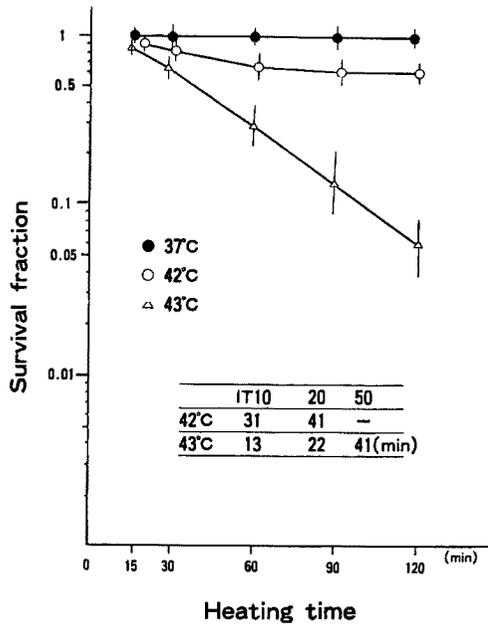


Fig. 1. Survival curves of KK-47 cells heated at 42 and 43°C for various lengths of time.

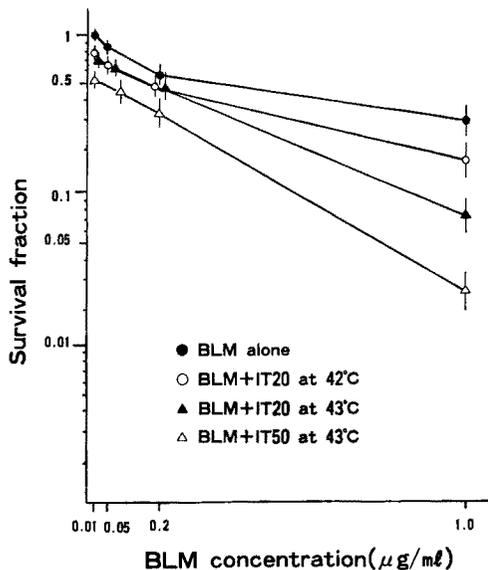


Fig. 2. Survival curves of KK-47 cells after the simultaneous treatment with bleomycin and hyperthermia (IT20 or IT50) at 42 or 43°C.

Ⅲ. 鶏卵胎児肝転移巣に対する温熱療法の抗腫瘍効果については, 対照群と比較し加温条件に応じた PCR products の減少が認められた (Fig. 4). Table 1 に示すように, 42.5°C, 20分および 43.0°C, 10分の加温にて, それぞれ69.2%および82.0%の統計学的に有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。一方, 42.5°C, 15分以下の加温では抗腫瘍効果は認められなかった。これらの結果より, 以下の併用実験の加温条件の基準として, 42.5°C, 10分加温を用いた。

Ⅳ. 鶏卵胎児肝転移巣に対する抗癌剤および温熱併用療法の抗腫瘍効果について, ADM 単独および温熱併用による治療効果について検討した。ADM 単独での inhibition rate は13.5%と低値であり, これに対し 42.5°C, 10分の温熱併用により 54.2%の inhibition rate がえられ, 相加効果以上の腫瘍増殖抑制効果が認められた。CDDP または CBDCA 単独投与により, それぞれ 29.1%および 27.3%の inhibition rate がえられ, CBDCA では温熱併用により抗腫瘍効果の増強を示唆する結果がえられた (Table 2). MMC または CPM 単独および温熱併用では, Table 3 に示すごとく CPM 単独群および MMC 温熱併用群で高い inhibition rate がえられた。

Ⅴ. 臨床成績について, まず腫瘍の局所浸潤度と温熱単独または併用治療効果について検討した。全体として 56例中 4例 (7.1%) に CR, 17例 (30.4%) に PR がえられ, PR 以上は37.5%であった。CR 例はいずれも T2 症例であり, T3 以上の高度浸潤癌症例での治療効果は不良である傾向が認められた (Table 4)。

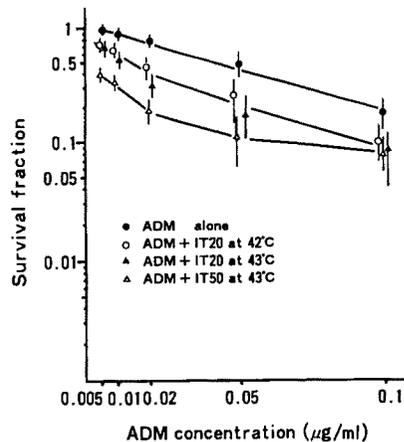


Fig. 3. Survival curves of KK-47 cells after the simultaneous treatment with adriamycin and hyperthermia (IT20 or IT50) at 42 or 43°C.

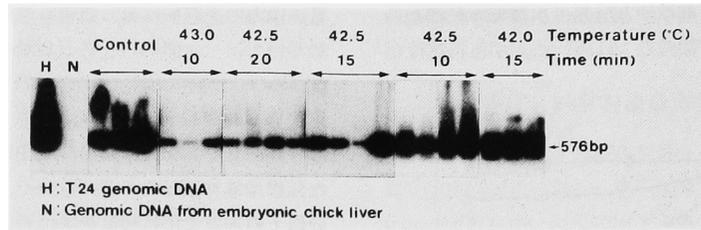


Fig. 4. Effect of hyperthermia on liver metastasis of T24 cells in chick embryo using PCR technique.

Table 1. Effect of hyperthermia on liver metastasis

Temperature-Time (°C, min)	Radioactivity (AU/mm ²) Mean±SD	IR (%) ^{a)}
43.0—10	33.2± 30.3	82.0 ^{b)}
42.5—20	56.7± 49.2	69.2 ^{b)}
42.5—15	104.6±118.8	43.2
42.5—10	135.0± 27.4	26.7
42.0—15	142.3± 94.0	22.7
Control	184.1±76.3	

a) Inhibition rate (%) = $|1 - (\text{Radioactivity of treated group}) / (\text{Radioactivity of control group})| \times 100$

b) P<0.01

Table 2. Effect of cisplatin and carboplatin with/without hyperthermia on liver metastasis of T24 cells in chick embryo

Chemotherapy (10 µg/egg)	Hyperthermia (°C, min)		IR (%) ^{a)}	
	None	42.5—10	None	42.5—10
None			24.5	
Cisplatin			29.1 ^{b)}	33.4 ^{c)}
Carboplatin			27.3 ^{b)}	44.5 ^{c)}

a) Inhibition rate (%) = $|1 - (\text{Radioactivity of treated group}) / (\text{Radioactivity of control group})| \times 100$

b) P<0.05

c) P<0.01

Table 3. Effect of mitomycin C with/without hyperthermia and cyclophosphamide on liver metastasis of T24 cells in chick embryo

Drugs (µg/egg)	HPT	
	None	42.5°C—10 min
None		18.6
MMC (10)	58.9 ^{a)}	82.4 ^{a)}
CPM (250)	75.4 ^{a)}	—
CPM (500)	92.3 ^{a)}	—

IR (%) = $|1 - (\text{Radioactivity of treated group}) / (\text{Radioactivity of control group})| \times 100$

a) P<0.05

Table 4. Relationship between tumor response and tumor stage

Tumor stage	No. of patients	Response				
		CR	PR	MR	NC	PD
T2	16	4	4	2	4	0
T3a	14	0	7	4	3	0
T3b	15	0	4	4	6	1
T4a	2	0	0	0	1	1
T4b	9	0	2	2	4	1
Total	56	4	17	12	18	3

Table 5. Relationship between tumor response and combined method with hyperthermia

Combined method with hyperthermia	No. of patients	Response				
		CR	PR	MR	NC	PD
HPT only	3	1	0	1	1	0
Radiation	24	3	8	6	5	1
THP i.v.	18	0	5	6	6	2
CDDP i.a.	6	0	1	0	5	0
MMC i.a.	2	0	1	0	1	0
Radiation +CDDP i.a.	2	0	2	0	0	0
Radiation +MTX i.v.	1	0	0	1	0	0
Total	56	4	17	14	18	3

温熱療法との併用別の治療効果について検討した。放射線療法との併用において24例中11例(45.8%)にPR以上の効果が認められ、最も良好な結果がえられた。各種抗癌剤との併用では、THP-adriamycinとの併用により18例中5例(27.8%)、CDDPとの併用により6例中1例(16.7%)さらにMMCとの併用により2例中1例(50.0%)にPRがえられた(Table 5)。

考 察

従来より浸潤性膀胱癌に対しては、膀胱全摘除術および尿路変更術が適応とされてきた。しかし、quality

of life の低下やインポテンズ等の問題もあり, 可能であれば膀胱保存のための治療が望まれるところである. また, 癌治療において患者の予後を左右する重要な因子は, 癌の局所浸潤と転移であり, 原発巣がある程度増大した段階では, すでに全身に微小転移が合併しているものと推定して癌治療を行う必要がある. 従って, 集学的癌治療の一つとして全身抗癌化学療法に放射線療法および温熱療法などを組み合わせることは, 癌治療を考えていく上で理に叶ったものといえる. 今回, 温熱療法との併用薬剤の選択を目的に, コロニー形成法および鶏卵法を用いた温熱化学療法の基礎的検討を行い, これらの結果に基づき, われわれは1984年4月より1992年9月までに T2 以上の浸潤性膀胱癌56例に対し, 温熱併用抗癌化学療法および症例によっては放射線照射の併用を行った. その結果全体としての奏効率は PR 以上が37.5%であり, 原理的には深部加温が可能とされている本機種を用いても, 治療時の limiting factor の一つである皮下脂肪の厚さや, 生体での血流による cooling 効果等の影響により腫瘍内温度を殺細胞効果のえられるに十分な有効温度にまで上げることの困難性を示唆しているものと考えられた. Thermotron-RF による加温時の腫瘍内および周囲組織の温度分布に関して, 30症例の膀胱腔内温度と腫瘍内最高温度の検討⁴⁾では, 約 400 W の加温出力にて膀胱腔内平均温度は $42.9 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$ で, こに対し腫瘍内温度は $44.2 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ と膀胱腔内に比べ 1°C 前後高い結果がえられた. 従って, 以後の症例に関しては間接的ではあるが, 非侵襲性に腫瘍内温度を知る指標として, 膀胱内温度測定を行った. 腫瘍局在部位と腫瘍内温度に関しては, 側壁および後壁腫瘍内温度は三角部, 頂部および膀胱頸部腫瘍内温度に比較し高い傾向が認められた. すなわち膀胱底部の直腸に接する部位では, 直腸ガスの存在により, 十分な温度上昇がえられにくく, 同様膀胱頸部も恥骨により加温電流が妨げられ温度上昇がえられにくいものと考えられる. 一方, 温熱療法を施行する際の副作用の一つである火傷を合併する limiting factor として, 患者の皮下脂肪の厚さがあげられる. 実際のところ膀胱腔内温度が 42.5°C 以上に加温される症例は, 皮下脂肪の厚さが 20 mm 以下であり, それ以上の厚さを有する症例での腫瘍への有効加温は期待できないものと考え

られる. すなわち火傷や疼痛といった副作用の点から, 肥満者に対する温熱治療の困難性を示唆する結果がえられた. しかし近年, オーバーレイ・ポーラスが開発され⁵⁾, これにより電極辺縁の過熱を除去し, 本療法の副作用である火傷, 脂肪壊死等の発生頻度を低下させることが可能となった. 今後これらの装置を用いることにより, 良好な奏効率がえられることが十分期待される.

結 語

良好な奏効率をえるためには, 適切な抗癌剤を選択し, その投与方法および時期等を検討するとともに, 温度モニターを行いながら有効加温をすることが重要である.

本研究の一部は文部省科学研究費補助金(課題番号04670955)の補助を受けたもので, 付記して謝意を表する.

文 献

- 1) Nakajima K and Hisazumi H: An experimental study of enhanced cell killing by hyperthermia and bleomycin. *Urol Res* 11: 43-46, 1983
- 2) Sasaki T: Human tumor drug sensitivity testing with chicken chorioallantoic membrane. *Med Philos* 6: 311-312, 1978
- 3) Uchibayashi T, Egawa M, Nakajima K, et al.: Responses of tumor cell lines implanted onto the chorioallantoic membrane of chick embryo to anticancer agents in combination with hyperthermia. *Urol Res* 20: 237-239, 1992
- 4) Uchibayashi T, Nakajima K, Hisazumi H, et al.: Studies of temperature rise in bladder cancer and surrounding tissues during radiofrequency hyperthermia. *Eur Urol* 21: 299-303, 1992
- 5) 柳川繁雄, 曾根康博, 土井偉誉, ほか: RF 電界型加温装置による深部加温技術の改良 —“オーバーレイポーラス”による edge 効果の改善とその臨床的有用性について—. *日本ハイパーサーミア誌* 1: 187-191, 1985

(Received on October 19, 1993)
(Accepted on October 22, 1993)

(迅速掲載)