

マウス膀胱腫瘍 (MBT-2) に対する CDDP 投与と 温熱療法併用効果の検討

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 酒徳治三郎教授)

清水 功 基

COMBINATION EFFECTS OF CDDP AND HYPERTHERMIA IN MOUSE BLADDER TUMOR (MBT-2)

Koki SHIMIZU

*From the Department of Urology, School of Medicine Yamaguchi University
(Director: Prof. J. Sakatoku)*

The combination effects of CDDP and hyperthermia in mouse bladder tumor (MBT-2) were investigated both in vivo and in vitro. MBT-2 was transplanted into the hind leg of a C3H/He mouse. Then the leg was dipped in a hot water bath immediately after the intraperitoneal administration of CDDP. The antitumor effects were evaluated from tumor volume. The CDDP plus hyperthermia (43°C) group showed remarkable tumor growth retardation. The in vitro colony forming assay showed that MBT-2 cultured cells treated with CDDP at 42°C exhibited great colony forming inhibition in comparison with the CDDP alone cells. The effects of CDDP plus hyperthermia on the cell cycle progression of MBT-2 cultured cells were studied by using flow cytometry. The results showed that the cells treated with CDDP at 42°C exhibited an accumulation of cells in the G₂ phase for many hours as compared with the CDDP alone cells, indicating thermal enhancement of DNA damage in MBT-2 cultured cells treated with CDDP.

Key words: CDDP, Hyperthermia, Mouse bladder tumor, Flow cytometry

緒 言 方 法

Cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP) は膀胱腫瘍に対して最も有効な抗癌剤とされ、その有効率は33%~55%と報告されている¹⁻³⁾。しかし、CDDP 単剤ではその治療効果に限界があり、他の抗癌剤の併用や、放射線療法の併用などにより治療効果を向上させる試みがなされている。一方、従来膀胱腫瘍に対して膀胱温灌流による温熱療法が試みられ、その有効率は62%~66%と報告されている^{4,5)}が、この膀胱温灌流法は膀胱壁深部の加温が不十分であった。ところが、近年電磁波により身体深部を加温できる装置が開発され、癌の治療手段の1つとして温熱療法が注目されるようになってきた。この温熱療法は単独で用いるよりもむしろ、化学療法や放射線療法との併用で用いることにより癌の新しい治療法として期待されている。そこで著者は膀胱腫瘍に対する CDDP と温熱療法の併用療法に着目し、マウス膀胱腫瘍を用いて *in vivo* および *in vitro* で CDDP と温熱の併用効果の基礎的検討を行った。

1. *In vivo* 抗腫瘍試験 (Fig. 1)

実験動物は6週齢雌性 C3H/He マウス (千代田開発社) を用い、1群6~7匹とした。

実験腫瘍は化学発癌剤 N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide (FANFT) で誘発したマウス膀胱腫瘍 (MBT-2)⁶⁾ を用いた。マウス皮下で継代されている MBT-2 腫瘍を細切し、0.1% collagenase にて細胞浮遊液を作製後 1×10^6 の MBT-2 細胞をマウス後肢皮下に移植した。

治療開始時期は腫瘍が測定に適度な大きさ (450~550 mm³) になる移植11日目とした。この時点で CDDP と温熱による治療を施行し、経日的に各治療群の腫瘍の縦 (x), 横 (y), 高さ (z) を測定し腫瘍体積 (V) を $V=xyz$ として算出して腫瘍増殖曲線を作成した。

抗腫瘍効果の判定は治療開始後7日目の腫瘍体積の分散分析で行った。

1) 治療法別抗腫瘍試験

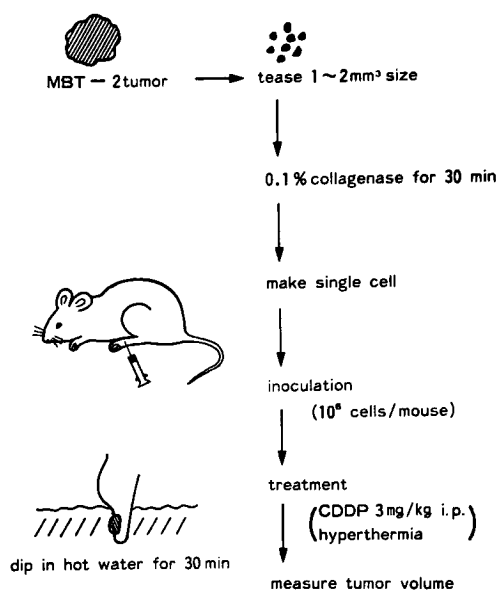


Fig. 1. Method of in vivo antitumor test.

CDDP の抗腫瘍効果の温熱による増強効果を検討する目的で、①対照群、②CDDP 単独治療群、③温熱単独治療群、④ CDDP+温熱併用治療群の4群に大別し、治療法別の抗腫瘍効果を判定した。CDDP 単独治療群の CDDP の投与量は 3 mg/kg、投与方法は腹腔内投与とした。温熱単独治療群の加温方法は、avertin (tribromoethanol + tertiary amyl alcohol +

ethanol) 麻酔下に先端を切除して加工した 50 cc の注射筒内にマウスを固定し、腫瘍移植後肢を恒温槽内に 43°C 30分間温浴した。CDDP+温熱併用治療群は、CDDP (3 mg/kg) 腹腔内投与直後に同様にして腫瘍移植後肢を 43°C 30分間温浴した。

2) CDDP+併用温度別抗腫瘍試験

CDDP の抗腫瘍効果の併用温度の違いによる増強効果を検討する目的で、CDDP+温熱併用治療群について恒温槽の温度条件を変えて、① 37°C、② 41°C、③ 43°C の3群に大別し、併用温度別の抗腫瘍効果を判定した。

2. In vitro コロニー形成試験 (Fig. 2)

実験細胞は、MBT-2 腫瘍を単層培養して単一の細胞より増殖した細胞集落をメスピペットにて採取し、この細胞を再び単層培養で継代維持した MBT-2 培養細胞を 25 cm³ tissue culture flask 内で 10%胎児牛血清含有 MEM にて 3日間 preculture し、対数増殖期にある細胞を用いた。

MBT-2 培養細胞に対する CDDP および温熱の細胞増殖抑制効果を検討する目的で、① 対照、② CDDP 単独処理、③ 温熱単独処理、④ CDDP+温熱併用処理の各処理別のコロニー形成能を比較した。CDDP 処理は 1 µg/ml の濃度の continuous exposure とした。温熱処理は 42°C 30分間 incubation した。CDDP+温熱併用処理は CDDP 処理と温熱処理を同時に行った。各処理後48時間単層培養し

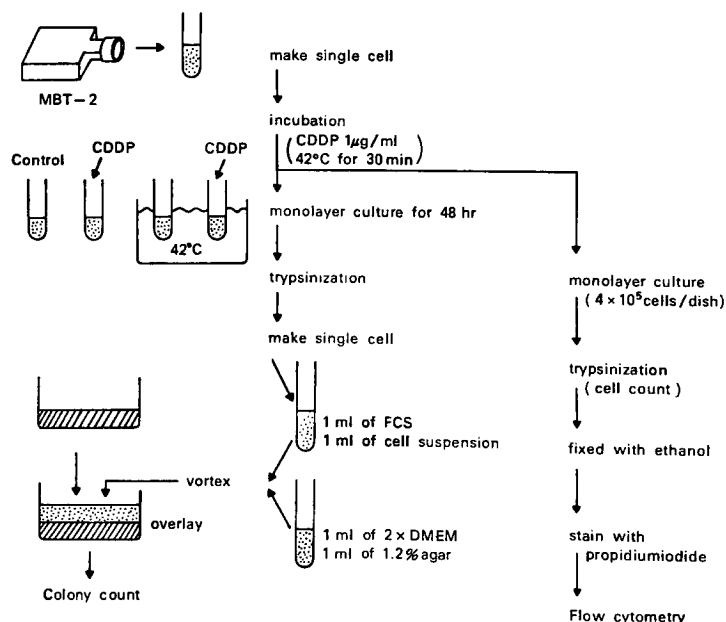


Fig. 2. Method of colony forming assay and FCM analysis.

た時点で 0.1% trypsin にて単離細胞浮遊液とし、2 回遠沈洗浄後、播種細胞数が 2×10^3 cell/dish となるよう調整して、base layer と top layer からなる二層軟寒天培地で培養した。base layer の作製には、① 1×DMEM (Dulbeccou's MEM), ② 2×DMEM, ③ 胎児牛血清, ④ 1.2% agar を各々等量ずつ加えよく混和し 1 ml ずつ 35 mm grid 付 plastic dish に分注した。top layer の作製には、① 2×DMEM, ② 胎児牛血清, ③ 1.2% agar, ④ 先に調整した単離細胞浮遊液を各々 1 ml ずつ加えよく混和し、3 枚の base layer 上に 1 ml ずつ重層させて、最終濃度 25% 胎児牛血清, 0.3% agar の二層軟寒天培地を作製した。各 dish を incubator 内で 2 週間培養後、倒立位相差顕微鏡下にて 30 個以上の細胞より形成されるコロニーの数を算定し、percent colony survival を次式にて算出した。

percent colony survival =

$$\frac{\text{各処理のコロニー数}}{\text{対照のコロニー数}} \times 100 (\%)$$

3. 細胞回転の進行に及ぼす影響 (Fig. 2)

MBT-2 培養細胞に対する CDDP および温熱の細胞回転の進行に及ぼす影響を検討する目的で、① 対照, ② CDDP 単独処理, ③ 温熱単独処理, CDDP+温熱併用処理の各処理別に flow cytometry (FCM) により検索した。

実験細胞は実験 2 と同じく 25 cm² tissue culture flask 内で preculture し対数増殖期にある MBT-2 培養細胞を用い、CDDP 処理および温熱処理も同じ条件で行った。各処理後 60 mm petri dish 内で 4×10^5 cell/dish の細胞を単層培養し、培養開始後 24 時間, 48 時間, および 72 時間の各時点で、petri dish 内の培養液を吸引除去し、リン酸緩衝液で 2 度洗浄後リン酸緩衝液で溶解した 0.1% trypsin 液で単離細胞

浮遊液を作製し、①細胞数を算定し細胞増殖曲線を作成した。②細胞 (3×10^4 cell) の核 DNA 量を FCM を用いて測定し経時的 DNA ヒストグラムを作成した。

FCM の試料作製は、細胞を 4°C 70% ethanol で固定し、30 分間 RNase 処理および 15 分間 pepsin 処理後、核 DNA を 50 μg/ml propidium iodide にて染色した。FCM の装置は FACS III を使用し、標準試料としてマウスリンパ球を用いて、CV 値を 6 % 以下に調整した。

結 果

1. *In vivo* 抗腫瘍効果

1) 治療別抗腫瘍効果 (Fig. 3)

治療開始後 7 日目の平均腫瘍体積 ($V \pm SD$ mm³) は、対照群 ($2,257 \pm 463$ mm³), CDDP 単独治療群 ($1,856 \pm 213$ mm³), 温熱単独治療群 ($1,653 \pm 341$ mm³), CDDP+温熱併用治療群 (812 ± 291 mm³) であった。対照群, CDDP 単独治療群, 温熱単独治療群の 3 群間には抗腫瘍効果の有意差を認めなかった。一方、CDDP+温熱併用治療群は他の 3 群との間に有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた ($p < 0.01$)。

2) CDDP+併用温度別抗腫瘍効果 (Fig. 4)

治療開始後 7 日目の併用温度別の平均腫瘍体積 ($V \pm SD$ mm³) は、37°C ($2,662 \pm 449$ mm³), 41°C ($2,263 \pm 445$ mm³), 43°C (913 ± 384 mm³) であった。37°C 温熱併用群と 41°C 温熱併用群の 2 群間には抗腫瘍効果の有意差を認めなかった。一方、43°C 温熱併用群は他の 2 群との間に有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた ($p < 0.01$)。

2. コロニー形成法による *In vitro* 抗腫瘍効果 (Fig. 5)

対照のコロニー数 ($\pm SD$) は 493 ± 23.9 で、plating

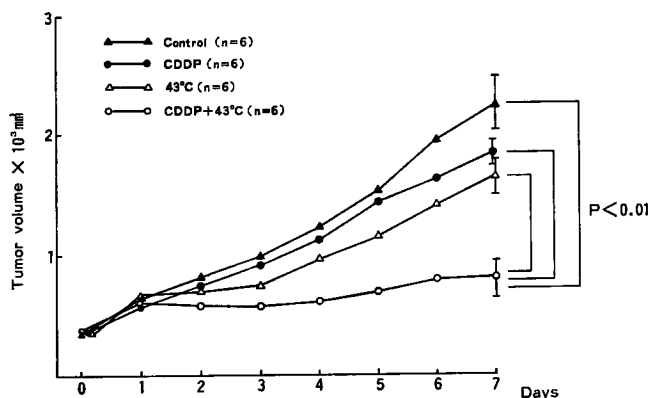


Fig. 3. Tumor growth curve according to treatment.

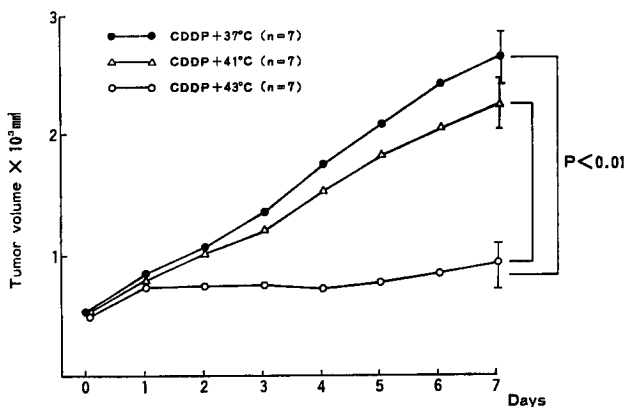


Fig. 4. Tumor growth curve according to temperature in CDDP plus hyperthermia group.

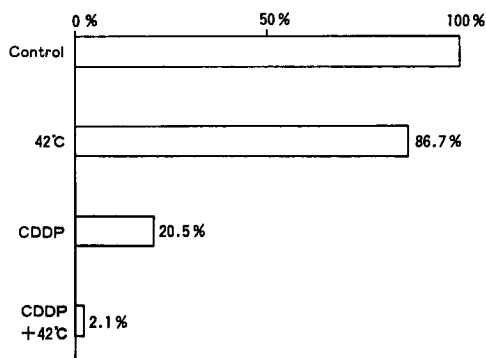


Fig. 5. Percent colony survival.

efficiency は24.7%であった。各処理別のコロニー数 (±SD) は、温熱単独処理 (428 ± 31.2), CDDP 単独処理 (101 ± 13.1), CDDP+温熱併用処理 ($10 \pm$

1.25) であった。各処理別の percent colony survival は各々、86.7%, 20.5%, 2.1%であった。

3. 細胞回転の進行に及ぼす影響 (Fig. 6)

細胞増殖曲線および DNA ヒストグラムの経時変化を Fig. 6 に示した。対照では、単層培養開始後24時間で exponential phase に入り、doubling time は30.9時間であった。温熱単独処理では、細胞増殖抑制は軽度で、DNA ヒストグラムの経時変化はほとんど認められなかった。CDDP 単独処理では、細胞増殖抑制は軽度であったが、DNA ヒストグラムは24時間後に S 期、G₂ 期の細胞蓄積がみられた。しかし、48時間後に G₂ 期の細胞蓄積の減少がみられ、72時間後には G₂ 蓄積は消失し対照と同様の DNA ヒストグラムを示した。CDDP+温熱併用処理では、細胞増殖抑制が強く認められ、DNA ヒストグラムは24

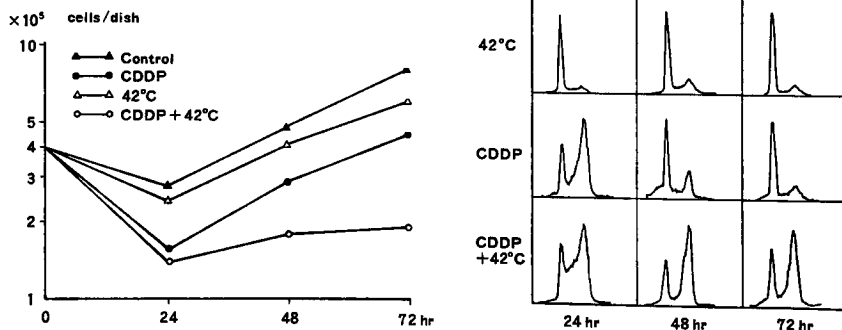


Fig. 6. Cell growth curve and DNA histogram (ordinate: cell number per a channel abscissa: relative DNA content per cell).

時間後に S 期、G₂ 期の細胞蓄積がみられた。48 時間後には S 期の細胞蓄積は減少したが、G₂ 期の細胞蓄積は持続し、72 時間後も G₂ 期の細胞蓄積がみられ、CDDP 単独処理に比べて G₂ 蓄積作用は長時間に及んだ。

考 察

マウス膀胱腫瘍を用いた動物実験で、CDDP 単独治療および温熱単独治療では腫瘍増殖抑制効果は軽度で対照群との間に有意差は認められないにもかかわらず、両者を併用すると著しい抗腫瘍効果を認めることは興味深い。このことは CDDP の効果が温熱の併用により増強することを示唆していると考えられる。Hhan⁷⁾ らは温熱により抗癌剤の効果が増強する作用機序として、修復機序の抑制、細胞膜の透過性の増大を述べている。しかし、個々の抗癌剤によって効果の増強に必要な温度や作用様式が異なり、例えば bleomycin は 42°C 以下ではあまり効果が増強されないが、43°C 以上で著明に効果が増強され⁷⁾、アルキル化剤は 39°C~41°C の比較的低い温度でも効果増強がみられる⁸⁾。本実験では、CDDP は 41°C では効果増強を認めず、43°C で効果増強がみられ、臨床応用には腫瘍を 43°C 程度に加温する必要があると考えられる。

ところで、*in vivo* の実験では、血流、薬剤の分布、代謝、PO₂、pH などの外部条件によって CDDP と温熱の併用効果が修飾されていると考えられ、腫瘍細胞に対する直接の CDDP と温熱の併用効果を検討するには、外部条件を除いた *in vitro* の細胞レベルで詳細に検討する必要がある。Salmon⁹⁾ らは二層軟寒天培養法で腫瘍細胞の抗癌剤に対する感受性を調べる方法を考案したが、その後本法は放射線や温熱に対する感受性試験にも用いられている¹⁰⁾。そこで著者はこのコロニー形成法を応用し、細胞レベルで CDDP + 温熱併用の MBT-2 培養細胞に対する細胞増殖抑制効果を検討したところ、CDDP + 温熱併用処理では、percent colony survival が温熱単独処理の約 1/40、CDDP 単独処理の約 1/10 に減少し、著しいコロニー形成の抑制が認められた。このことは、細胞レベルでの CDDP と温熱併用による細胞増殖抑制効果の増強を裏付けていると考えられる。

次に、MBT-2 培養細胞の細胞回転の進行に及ぼす影響をみると、CDDP + 温熱併用処理では細胞数の増加をほとんど認めず、G₂ 期の細胞蓄積が 72 時間後も持続し、長時間の G₂ 蓄積作用を示している。高本ら¹¹⁾は adriamycin, bleomycin などの抗癌性抗生

物質の G₂ 蓄積作用を示し、DNA の構造に物理的変化を与えることが G₂ 蓄積の要因と推察している。CDDP は DNA 鎖の cross links 形成を引き起こすこと¹²⁾と、この DNA 鎖の cross links 形成は温熱により著しく増強すること¹³⁾から、CDDP 単独処理に比し CDDP + 温熱併用処理で長時間の G₂ 蓄積作用を示すことは、CDDP によって引き起こされる DNA の構造の異常が温熱併用によってより増強されることに帰因すると考えられる。

臨床上 CDDP と温熱療法を併用する場合、CDDP + 温熱併用処理により長時間の G₂ 蓄積作用を示すことと、G₂ 期の細胞は放射線感受性が高いことを考慮すると、CDDP と温熱併用療法を施行後 G₂ 期に細胞蓄積がみられる時点で放射線療法を併用することはより有効であると推定される。今後の課題として、より正確な温度の設定が可能な加温装置の開発が重要であるが、本実験結果より、膀胱腫瘍に対する集学的治療の 1 つとして、CDDP と温熱療法の併用療法は治療効果が大きいと期待できるといえる。

結 語

MBT-2 を用いて *in vivo* および *in vitro* で CDDP + 温熱併用効果の基礎的検討を行った。MBT-2 移植マウスを用いた動物実験では、CDDP + 43°C 温熱併用により著明な腫瘍増殖抑制効果がみられ、CDDP の効果が 43°C 温熱併用により増強すると考えられる。MBT-2 培養細胞を用いたコロニー形成試験では、CDDP + 温熱併用処理すると著しいコロニー形成抑制を示し、CDDP と温熱を併用すると細胞増殖抑制効果が増強すると考えられる。MBT-2 培養細胞を CDDP + 温熱併用処理すると CDDP 単独処理に比し長時間の G₂ 蓄積作用を示し、CDDP によって引き起こされる DNA の異常が温熱によってより増強されることが示唆される。本実験結果より、臨床上膀胱腫瘍に対する CDDP と温熱療法の併用療法は十分効果が期待できると思われる。

稿を終るにあたり、終始ご指導ならびにご校閲を賜りました恩師酒徳治三郎教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究に際し直接ご指導いただきました山本恵男助教授に深謝致します。

なお本論文の要旨は第 73 回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Schwartz S, Yagoda A, Natale RB, Watson RC, Whitmore WF and Lesser M: Phase II

- trial of sequentially administered cisplatin, cyclophosphamide and doxorubicin for urothelial tract tumors. *J Urol* **130**: 681-684, 1983
- 2) Yagoda A: Phase II trials with cis-dichlorodiammineplatinum (II) in the treatment of urothelial cancer. *Cancer Treat Rep* **63**: 1565-1572, 1979
- 3) Kawai H: Phase II study on cis-diamminedichloroplatinum (II) in advanced malignancies of the genitourinary organs. *Jpn J Cancer Chemother* **9**: 433-442, 1982
- 4) Hall RR, Schade ROK and Swinney J: Effects of hyperthermia on bladder cancer. *Br Med J* **15**: 593-594, 1974
- 5) Okada K, Kiyotaki S, Kawazoe K, Sato Y, Tahara R, Kinoshita M, Kumagai S, Kitazima K, Onoe Y, Takimoto Y and Kishimoto T: Hyperthermic treatment for the bladder tumor (II). *Jap J Urol* **68**: 128-135, 1977
- 6) Soloway MS: Intravesical and systemic chemotherapy of murine bladder cancer. *Cancer Res* **37**: 2918-2929, 1977
- 7) Hahn GM, Braun J and Har-Kedar I: Thermochemotherapy: synergism between hyperthermia (42-43°) and adriamycin (or bleomycin) in mammalian cell inactivation. *Proc Nat Acad Sci USA* **72**: 937-940, 1975
- 8) Hahn GM: Potential for therapy of drugs and hyperthermia. *Cancer Res* **39**: 2264-2268, 1979
- 9) Hamburger AW and Salmon SE: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**: 461-463, 1977
- 10) Kawasaki S, Ebe K and Nakanishi T: Evaluation of sensitivities to radiation and hyperthermia (43°C) with the human tumor colony forming assay. *Tissue Culture* **10**: 29-31, 1984
- 11) Takamoto S and Ota K: Effect of antitumor antibiotics on the cell cycle traverse of cultured FL cells —By flow microfluorometric analysis—. *Jpn J Cancer Chemother* **6**: 59-70, 1979
- 12) Zwelling LA and Kohn KW: Mechanism of action of cis-dichlorodiammineplatinum (II). *Cancer Treat Rep* **63**: 1439-1444, 1979
- 13) Meyn RE, Corry PM, Fletcher SE and Demetriades M: Thermal enhancement of DNA damage in mammalian cells treated with cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res* **40**: 1136-1139, 1980

(1987年11月30日受付)