

NIH 3T3 細胞の温熱耐性に対するケルセチンの作用

第 1 編

細胞の生存率からみたケルセチンの作用

岡山大学医学部放射線医学教室 (主任: 平木祥夫教授)

黒田昌宏, 平木祥夫

岡山大学医療技術短期大学部

川崎 祥 二

(平成 3 年 5 月 15 日受稿)

Key words: ケルセチン, 温熱耐性, 温熱療法

緒 言

細胞に熱ショックをかけ37°Cで一定期間放置し, この細胞に再び熱ショックを与えると, さきの熱処理を受けていない細胞に対して生存率が増加し温熱耐性を示す。温熱耐性の出現は, 2回の熱ショックの間を0°Cで保つこと¹⁾, 重水培地の使用²⁾, 蛋白合成阻害剤 cycloheximide³⁾などで抑制されることが報告されている。また初回加温後, 時間経過とともに細胞内に熱ショック蛋白が増加するとの報告^{4,5)}もある。これらは初回加温後37°Cでの細胞の代謝が温熱耐性形成に関わっていることを示唆しているが温熱耐性の出現機序はいまだ明らかでない。小石らは植物性フラボノイドの一種であるケルセチンが熱ショック蛋白を特異的に抑制し温熱耐性も抑制すると初めて報告した⁶⁾。温熱耐性を抑制する薬物の研究は温熱耐性の出現機序の解明に役立つものであり, 今回我々は NIH 3T3 細胞を用いて温熱耐性出現の時間経過に与えるケルセチンの影響をより詳細に検討したので報告する。

材 料 と 方 法

1. 細胞および培養法

実験にはマウス線維芽細胞由来の NIH 3T3 細胞を用いた。培養液として Dulbecco's

modified Eagle medium (日水製薬) に10%非働化仔牛血清(Hyclone Lab.), 100 µg/ml streptomycin (明治製薬) および100 units/ml penicillin (明治製薬) を加えたものを用いた。10⁵個の細胞を含んだ5 mlの培養液を25cm² screw-topped polystyrene culture flask (Becton Dickinson Co.) に入れ, screw-top をゆるめた状態でCO₂ incubator (Sanyo Electric Co.) 中におき95% air + 5% CO₂, 37°Cの状態で行った。播種後48時間では指数増殖状態の細胞が flask の底に一層に並んでおり, この状態で実験を開始した。

2. 温熱処理

温熱処理は45°Cに設定した恒温槽 (Taitec Co.) に screw-top をしめた flask をつけることによって行った。温度は ± 0.05°Cの誤差で維持された。

3. 薬 剤

ケルセチン (Sigma) をアルコールにて溶解し培養液に加え10 µg/ml, 100 µg/mlの濃度としたものを薬液として使用した。いずれも最終アルコール濃度が1%となるように調整した。

4. 細胞の生存率の判定

細胞の生存率はコロニー形成法にて判定した。各処理後に flask 内の細胞を trypsin (Difco) にて個々に分離し60 × 15mmシャーレ (Becton

に入れた 5 ml の培養液の中にうえこみ, 11日間 incubator の中で培養した。その後 10%ホルムアルデヒド液にて固定, 10%ギムザ染色液にて染色した。細胞の生存率は50個以上の細胞を含むコロニーの数を求め, 同数の無処理細胞の作るコロニーの数で除してもとめた。

5. 処理方法

1) ケルセチンの殺細胞効果

5 ml中にケルセチン 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む培養液に入れ換え incubator の中で12, 48および72時間培養した。その後細胞を新しい培養液で2回洗滌した後細胞の生存率の判定を行った。

2) ケルセチンの加温致死増感効果

ケルセチン10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1%アルコールを含んだ 5 mlの培養液および対照として薬剤を含まない 5 mlの培養液に入れ換え, 各々の flask で45°Cで0, 10, 20, 30, 40および50分間の加温処理を行った。その後細胞を新しい培養液で2回洗滌した後細胞の生存率の判定を行った。

3) 細胞の増殖に及ぼすケルセチンおよび加温の影響

10⁵個の細胞を 5 mlの培養液に播種し, incubator の中で培養後24時間目に flask 内の細胞数を計測しそれをコントロールとして, 次の群に分けて実験を行った。flask 内の培養液を①薬剤を含まない 5 mlの培養液に入れ換えただけの無処理群, ②ケルセチン10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 5 mlの培養液に入れ換えた群, ③薬剤を含まない 5 mlの培養液に入れ換え45°C20分の加温を行った群, ④薬剤を含まない 5 mlの培養液に入れ換え45°C20分の加温を行ったのちケルセチン10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 5 mlの培養液に入れ換えた群である。処理後 incubator の中に入れ, 各群の処理後24, 48, 72および96時間後に細胞数を計測しコントロールと比較して細胞数の増減を調べた。

4) 45°C20分間加温後37°C 3時間後の温熱耐性のケルセチンによる抑制

加温前に flask 内の培養液を37°C, 5 mlの新しい培養液に入れ換え45°C20分間の加温を行った。その後37°Cの培養の間の熱耐性出現に対するケルセチンの効果を次の群に分けて観察した。培養液を①5 mlの新しい培養液に入れ換え incu-

bator の中で3時間培養したコントロール群, ②ケルセチン10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 5 mlの培養液に入れ換え incubator の中で3時間培養した群, ③ケルセチン10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 5 mlの培養液に入れ換え incubator の中で3時間培養した後, 細胞を新しい培養液で2回洗滌した後37°C, 5 mlの新しい培養液を入れ再び incubator の中で3時間培養した群, ④5 mlの新しい培養液に入れ換え incubator の中で3時間培養した後, ケルセチン10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 5 mlの培養液に入れ換え incubator の中で3時間培養した群である。その後各群で細胞を新しい培養液で2回洗滌した後37°C, 5 mlの新しい培養液に入れ換え45°Cで0, 10, 20, 30, 40および50分間の加温を行った。各時間後, 処理した細胞の生存率の判定を行った。

5) 45°C20分間加温後37°C12時間後の温熱耐性のケルセチンによる抑制

加温前に flask 内の培養液を37°C, 5 mlの新しい培養液に入れ換え45°C20分間の加温を行った。その後37°Cの培養の間の熱耐性出現に対するケルセチンの効果を次の群に分けて観察した。培養液を①5 mlの新しい培養液に入れ換え incubator の中で12時間培養したコントロール群, ②ケルセチン10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 5 mlの培養液に入れ換え incubator の中で12時間培養した群, ③ケルセチン10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 5 mlの培養液に入れ換え incubator の中で12時間培養した後, 細胞を新しい培養液で2回洗滌した後37°C, 5 mlの新しい培養液を入れ再び incubator の中で12時間培養した群, ④5 mlの1%アルコールを含んだ培養液に入れ換え incubator の中で12時間培養した群である。その後各群で細胞を新しい培養液で2回洗滌した後37°C, 5 mlの新しい培養液に入れ換え45°Cで0, 30, 60, 90, 120, 150および180分間の加温を行った。各時間後, 処理した細胞の生存率の判定を行った。

6) 温熱耐性の時間経過に及ぼすケルセチンの抑制効果

加温前に flask 内の培養液を37°C, 5 mlの新しい培養液に入れ換え45°C20分間の加温を行った。その後37°Cの培養の間の熱耐性出現に対するケルセチンの効果を次の群に分けて観察した。培養液を①5 mlの新しい培養液に入れ換え incuba-

tor の中で 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 および 72 時間培養したコントロール群, ②ケルセチン 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 5 ml の培養液に入れ換え incubator の中で 12 時間培養した後, 細胞を新しい培養液で 2 回洗滌した後 37°C, 5 ml の新しい培養液を入れ換え再び incubator の中で 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, および 72 時間培養した群, ③ケルセチン 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 5 ml の培養液に入れ換え incubator の中で 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 および 72 時間培養した群である. 各群, 各時間の培養後, 細胞を新しい培養液で 2 回洗滌した後 37°C, 5 ml の新しい培養液に入れ換え 45°C で 60 分間の加温を行った. 加温後, 2 回目の加温処理をしない細胞を対照として生存率の判定を行った.

結 果

1. 37°C でのケルセチンの殺細胞効果

Fig. 1 に示す如く, 37°C でのケルセチンの殺

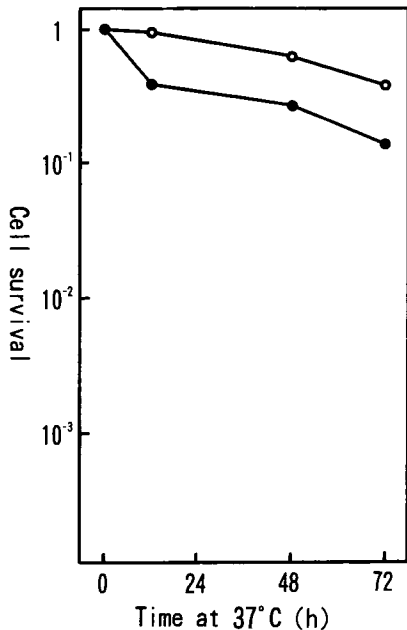


Fig. 1 37°C でのケルセチンの殺細胞効果
○—○ケルセチン 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ●—●ケルセチン 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

細胞効果はケルセチンの濃度の増加 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および接触時間の増加 (12, 48 および 72 時間) とともに増加した. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 72 時間の接触でも細胞の生存率は 0.14 と殺細胞効果は軽度であった.

2. ケルセチンの加温致死増感効果

Fig. 2 に示す如く, 1% アルコール液, ケルセチン 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ は対照群と比べて同程度の加温致死増感効果を示した. ケルセチン 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での加温致死増感効果はそれに含まれる 1% アルコールの作用とおもわれ, ケルセチン自体に加温致死増感効果はないものと考えられる.

3. ケルセチンの細胞増殖抑制作用

Fig. 3 は細胞の増殖に及ぼすケルセチンおよび加温の影響を示す. 10^5 個の細胞の播種後 24 時間目の flask 内全細胞数をコントロールとすると, その後 24, 48, 72 および 96 時間目の flask 内の全細胞数は, 新しい培養液に入れ換えただけの無処理群では 24 時間目より増加した (倍加時間 14.5 時間). ケルセチン 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 5 ml の

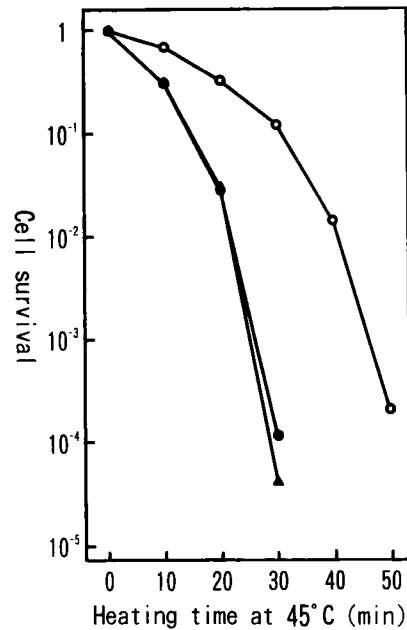


Fig. 2 ケルセチンの加温致死増感効果
○—○ケルセチン 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ●—●ケルセチン 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, △—△1% アルコール

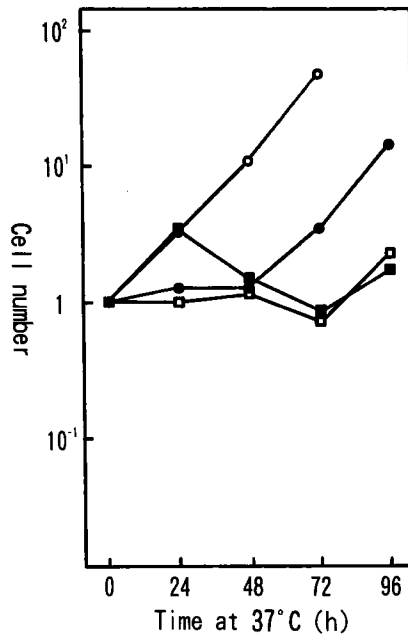


Fig. 3 ケルセチンの細胞増殖抑制作用
○—○ケルセチン 0 μg/ml, ●—●45°C 20分
加温後ケルセチン 0 μg/ml, □—□ケルセチ
ン 10 μg/ml, ■—■45°C 20分加温後ケルセチ
ン 10 μg/ml

培養液に入れ換えた群では、72時間までは変化なく96時間目より増加しはじめた。新しい培養液に入れ換え45°C 20分の加温を行った群では48時間までは変化なく72時間目より増加しはじめた。新しい培養液に入れ換え45°C 20分の加温を行ったのちケルセチン10 μg/mlを含む5 mlの培養液に入れ換えた群では96時間目まで細胞数の増加がみられなかった。37°Cでのケルセチンの接触により72時間程度細胞増殖が抑制されることがわかった。

4. 45°C 20分間加温 3時間後の温熱耐性に対するケルセチンの抑制作用

Fig. 4 は45°C 20分間加温後37°C 3時間の温熱耐性の出現状態およびそのケルセチンによる修飾を示す。45°C 20分間加温後新しい培養液に入れ換え3時間培養したコントロール群では、2回目加温時の細胞の生存率は先の加温を行っていない細胞の生存率に比べて増加しており温熱耐性の出現を示した。45°C 20分間加温後ケルセ

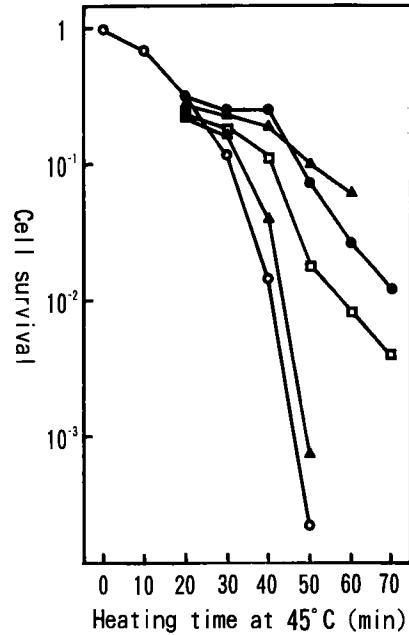


Fig. 4 45°C 20分間加温 3時間後の温熱耐性に対するケルセチンの抑制作用
○—○45°C 初回加温, ●—●45°C 20分間加
温後 3時間目の 2 回目加温, △—△45°C 20
分間加温後ケルセチン 10 μg/ml 3時間目の
2 回目加温, ▲—▲45°C 20分間加温後ケ
ルセチン 10 μg/ml 3時間 + ケルセチン 0 μg/ml
3時間目の 2 回目加温, □—□45°C 20分間
加温後ケルセチン 0 μg/ml 3時間 + ケルセ
チン 10 μg/ml 3時間目の 2 回目加温

チン10 μg/mlを含む培養液に入れ換え3時間培養した群では、2回目加温時の細胞の生存率はコントロール群に比べて減少しており温熱耐性の形成が抑制された。さらに45°C 20分間加温後ケルセチン10 μg/mlを含む培養液に入れ換え3時間培養した後、新しい培養液に入れ換え再び3時間培養を追加した群では、抑制されていた温熱耐性の形成はコントロール群と同程度まで回復した。45°C 20分間加温後新しい培養液に入れ換え3時間培養した後、ケルセチン10 μg/mlを含む培養液に入れ換え3時間培養した群では、2回目加温時の細胞の生存率はコントロール群とほぼ同程度であり温熱耐性の形成の進行が抑制された。

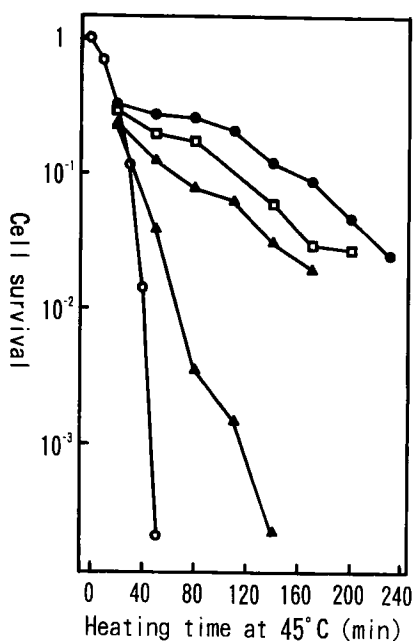


Fig. 5 45°C20分間加温12時間後の温熱耐性に対するケルセチンの抑制作用
 ○—○45°C初回加温, ●—●45°C20分間加温後12時間目の2回目加温, △—△45°C20分間加温後ケルセチン10µg/ml12時間目の2回目加温 ▲—▲45°C20分間加温後ケルセチン10µg/ml12時間 + ケルセチン0µg/ml12時間目の2回目加温, □—□45°C20分間加温後1%アルコール12時間目の2回目加温

5. 45°C20分間加温12時間後の温熱耐性に対するケルセチンの抑制作用

Fig. 5は45°C20分間加温後37°C12時間の温熱耐性の出現状態およびそのケルセチンによる修飾を示す。45°C20分間加温後新しい培養液に入れ換え12時間培養したコントロール群では、2回目加温時の細胞の生存率は先の加温を行っていない細胞の生存率に比べて著明に増加しており強い温熱耐性の出現を示した。45°C20分間加温後ケルセチン10µg/mlを含む培養液に入れ換え12時間培養した群では、2回目加温時の細胞の生存率はコントロール群に比べて減少しており温熱耐性の形成が抑制された。さらに45°C20分間加温後ケルセチン10µg/mlを含む培養液に入れ換え12時間培養した後、新しい培養液に入れ換え再び12時間培養を追加した群では、抑制され

ていた温熱耐性の形成はコントロール群と同程度まで回復した。45°C20分間加温後1%アルコールを含んだ培養液に入れ換え12時間培養した群では、2回目加温時の細胞の生存率はコントロール群とほぼ同程度でありアルコールは1%の濃度では45°C20分間加温12時間後の温熱耐性の形成に影響を与えなかった。

6. 45°C20分間加温後に出現する温熱耐性の推移とそのケルセチンによる修飾

Fig. 6は45°C20分間加温後に出現する温熱耐性の推移とそのケルセチンによる修飾を示す。45°C20分間加温後新しい培養液に入れ換え0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48および72時間の各時間培養したコントロール群では、2回目加温時の細胞の生存率は12時間目まで増加し12時間をピークとして以後時間とともに減少し温熱耐性の形成および消失の時間経過を示した。45°C20分間加温後ケルセチン10µg/mlを含む培養液に入れ換え2時間培養した後、新しい培養液に入れ換え再び incubator の中で0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66および72時間の各時間培養を追加した群では、ケルセチン存在下の6, 12時間まではコントロール群と比べて温熱耐性の形成が抑制されるが、ケルセチン排除後耐性形成の回復がみられケルセチン排除後12時間目(初回加温後24時間目)をピークとして温熱耐性の形成および消失を示した。45°C20分間加温後ケルセチン10µg/mlを含む培養液に入れ換え0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66および72時間の各時間培養した群ではケルセチン存在下でコントロール群と比べて初回加温後30時間目をピークとする温熱耐性の形成の遅れを示した。一方、ケルセチン存在下でも温熱耐性の形成の大きさ(温熱耐性の形成のピークの時点の2回目加温時の細胞の生存率)および温熱耐性の消失の時間経過についてはコントロール群とほぼ同様であった。

考 察

ケルセチンは植物界に広く存在しているフラボノイドの一つで、食用とされる果物や野菜の中には成分の一つとしてたいい含まれている⁷⁾。通常の食事にて1日当り50mgを摂取していると

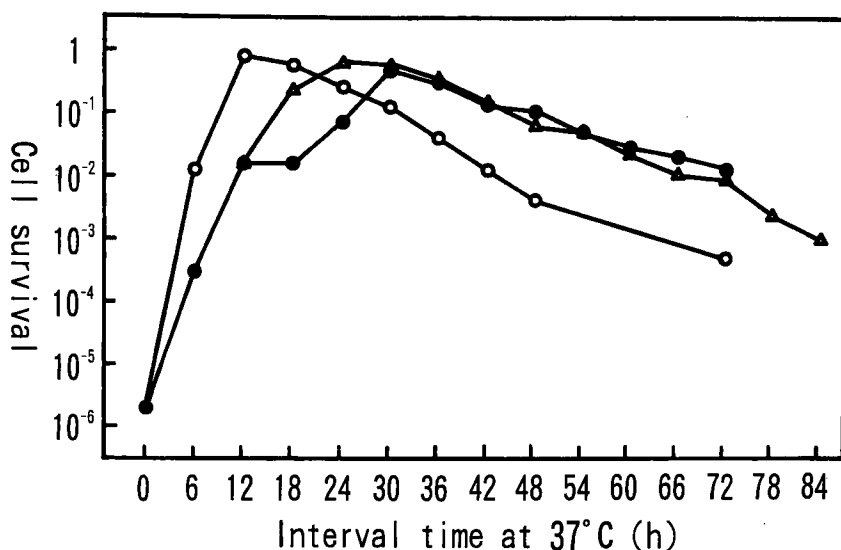


Fig. 6 45°C 20分間加温後に出現する温熱耐性の推移とそのケルセチンによる修飾

○—○ケルセチン 0 μg/ml, ●—●ケルセチン 10 μg/ml, △—△ケルセチン 10 μg/ml 12時間後ケルセチン 0 μg/ml

いわれている⁸⁾。ケルセチンの細胞への作用は多彩で、細胞の c-AMP レベルを増加し高分子合成を阻害し⁹⁾、lactate transport を阻害し intracellular acidification および解糖阻害をひきおこし¹⁰⁾、Na⁺、K⁺-ATPase¹¹⁾、Ca²⁺、Mg²⁺-ATPase¹²⁾、protein kinase C¹³⁾ および phospholipase A₂¹⁴⁾ などの多くの細胞内酵素を阻害し、脂質過酸化反応を阻害し¹⁵⁾、topoisomerase II dependent DNA cleavage をひきおこし¹⁶⁾、estrogen type II binding site に相互作用し¹⁷⁾、発癌性はないが¹⁸⁾突然変異性があり¹⁹⁾、17-kDa タンパクの合成を抑制し細胞周期をG₁/S境界部で止め細胞増殖を抑制²⁰⁾することが報告されている。

ケルセチンと加温との相互作用については lactate transport の阻害により加温増感作用があることが報告されているが²¹⁾、今回用いた細胞、ケルセチンの濃度ではケルセチン自身の加温増感作用は証明されなかった。今回の実験で示されたケルセチンの加温増感作用 (Fig. 2) は、従来報告されているアルコールによる加温増感作用²²⁾によるものと思われる。

ケルセチンと温熱耐性との関わりについては、

Lee らは42°C加温中におこる温熱耐性をケルセチンが抑制しこれが26-kDa タンパクの合成の抑制と関連していると報告しており²³⁾、小石らはケルセチンが熱ショック蛋白を特異的に抑制し温熱耐性も抑制すると報告している⁶⁾。今回我々はケルセチンと温熱耐性との関わりについて45°Cでの2分割加温を用いて調べたがケルセチンは初回および2回目加温の間の37°Cの加温間隔中のみ投与した。これは2つの理由による。一つはケルセチンの加温増感作用の報告があるため²¹⁾特に2回目加温にケルセチンが加わると温熱耐性が修飾されてみえる危険性があるためであり、もう一つは温熱耐性の出現が、初回および2回目加温の間を0°Cで保つこと¹⁾、重水培地を使うこと²⁾、蛋白合成阻害剤 cycloheximide を使うこと³⁾などで抑制されることが報告されており、これらは初回加温後37°Cでの細胞の代謝が温熱耐性形成に必要であることを示唆しており、温熱耐性を修飾する薬剤は初回および2回目加温の間の37°Cの加温間隔中で働くことが考えられたためである。今回の実験によりケルセチン (10 μg/ml) が温熱耐性の形成に要する時間経過を遅らせるが、最終的に獲得される温熱耐性の

大きさおよび温熱耐性の消失の時間経過については影響を与えないことが明らかとなった(Fig. 4-6)。この温熱耐性の形成および消失の時間経過中、細胞数の増加はケルセチンの存在により止まっており(Fig. 3)、細胞増殖を止めるようなケルセチンの細胞の代謝阻害作用が温熱耐性の形成の遅れに関与している可能性がある。前述のようにケルセチンの細胞への作用は多彩でありいずれの作用が温熱耐性の形成と関わっているのかは今回の実験のみでは不明である。ケルセチンが温熱耐性の消失の時間経過について影響を与えないことは、温熱耐性の消失のメカニズムが前述の多彩なケルセチンの細胞の代謝阻害作用と無関係であることを示唆している。

結 論

NIH 3T3細胞を用いて、in vitro での温熱耐性出現の時間経過にあたるケルセチンの抑制効果を検討したので報告した。

1) 37°Cでのケルセチンの殺細胞効果はケルセチンの濃度の増加(10 μ g/mlおよび100 μ g/ml)および接触時間の増加(12, 48および72時間)

とともに増加したがその程度は軽度だった。

2) ケルセチン(10 μ g/ml)自身の加温致死増感効果はみられなかった。

3) ケルセチン(10 μ g/ml)は37°Cでの指数増殖状態の細胞の増殖を72時間程度抑制した。

4) ケルセチン(10 μ g/ml)を45°C20分間初回加温後2回目加温前の加温間隔時に投与することにより、温熱耐性の形成に要する時間経過の遅れがみられたが、一方、最終的に獲得される温熱耐性の形成の大きさに与える影響は少なかった。

5) ケルセチン(10 μ g/ml)は温熱耐性の消失の時間経過に影響を与えなかった。

謝 辞

本研究は、文部省科学研究費(課題番号63010052, 01010026, 02151022, 03857136)の援助を受けた。また、本文の要旨は第50回日本医学放射線学会総会(1991年4月、京都)で発表した。終わりに臨み、実験遂行にあたり終始快くご協力下さいました研究室の赤木悦子さんに感謝いたします。

文 献

- 1) Gerner EW and Schneider MJ : Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature* (1975) **256**, 500—502.
- 2) Fisher GA, Li GC and Hahn GM : Modification of the thermal response by D₂O. I. Cell survival and the temperature shift. *Radiat Res* (1982) **92**, 530—540.
- 3) Henle KJ and Leeper DB : Modification of the heat response and thermotolerance by cycloheximide, hydroxyurea and lucanthone in CHO cells. *Radiat Res* (1982) **90**, 339—349.
- 4) Subjeck JR, Sciandra JJ, Chao CF and Jhonson RJ : Heat shock protein and biological response to hyperthermia. *Br J Cancer* (1982) **45** (Suppl. V), 127—131.
- 5) Landry J, Bernier D, Chretien 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.
- 6) 小石元紹, 細川暢子, 佐藤 衛, 中井 彰, 平芳一法, 平岡真寛, 阿部光幸, 永田和宏 : 熱ショック蛋白質合成阻害剤である quercetin によって温熱耐性は阻害される. *Jpn J Hyperthermic Oncol* (1990) **6**, 329.
- 7) Kuhnau J : The flavonoids. A class of semi-essential food components : their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* (1976) **24**, 117—191.
- 8) Brown JP : A review of the genetic effect of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and

- related compounds, *Mutat Res* (1980) **75**, 243—277.
- 9) Graziani Y and Chayoth R : Regulation of cyclic AMP level and synthesis of DNA, RNA and protein by quercetin in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem Pharmacol* (1979) **28**, 397—403.
 - 10) Belt JA, Thomas JA, Buchsbaum RN and Racker E : Inhibition of lactate transport and glycolysis in Ehrlich ascites tumor cell by bioflavonoids. *Biochem* (1979) **18**, 3506—3511.
 - 11) Lang DR and Racker E : Effects of quercetin and FI inhibitor on mitochondrial ATPase and energy-linked reactions in submitochondrial particles. *Biochem Biophys Acta* (1974) **333**, 180—186.
 - 12) Shoshan V and MacLennan DH : Quercetin interaction with the (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* (1981) **256**, 887—892.
 - 13) Ferriola PC, Cody V and Middleton E : Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. *Biochem Pharmacol* (1989) **38**, 1617—1624.
 - 14) Lanni C and Becker EL : Inhibition of neutrophil phospholipase A_2 by p-bromophenylacetyl bromide, nordihydroguaiaretic acid, 5, 8, 11, 14-eicosatetrayenoic acid and quercetin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* (1985) **76**, 214—217.
 - 15) Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA and Potapovitch AI : Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* (1989) **38**, 1763—1769.
 - 16) Yamashita Y, Kawada S and Nakano H : Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orobol. *Biochem Pharmacol* (1990) **39**, 737—744.
 - 17) Markaverich BM, Roberts RR, Alejandro MA, Johnson GA, Middleditch BS and Clark JH : Bioflavonoid interaction with rat uterine type II binding sites and cell growth inhibition. *J Steroid Biochem* (1988) **30**, 71—78.
 - 18) Hirano I, Ueno I, Hosaka S, Takahashi H, Matsushima T, Sugimura T and Natori S : Carcinogenicity examination of quercetin and rutin in ACI rats. *Cancer Lett* (1981) **13**, 15—21.
 - 19) Bjeldanes LF and Chang GW : Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science* (1977) **197**, 577—578.
 - 20) Hosokawa N, Hosokawa Y, Sakai T, Yoshida M, Marui N, Nishino H, Kawai K and Aoike A : Inhibitory effect of quercetin on the synthesis of a possibly cell-cycle-related 17-kDa protein, in human colon cancer cells. *Int J Cancer* (1990) **45**, 1119—1124.
 - 21) Kim JH, Kim SH, Alfieri AA and Young CW : Quercetin, an inhibitor of lactate transport and a hyperthermic sensitizer of HeLa cells. *Cancer Res* (1984) **44**, 102—106.
 - 22) Massicotte NP, Glofcheski DJ, Kruuv J and Leapock JR : Relationship between hyperthermic cell killing and protein denaturation by alcohols. *Radiat Res* (1981) **87**, 284—299.
 - 23) Lee YJ, Hou Z, Curetty L, Borrelli MJ and Corry PM : Correlation between redistribution of a 26 kDa protein and development of chronic thermotolerance in various mammalian cell lines. *J Cell Phys* (1990) **145**, 324—332.

**The effect of quercetin on thermotolerance in NIH 3T3 cells :
From a view point of cell survival**

Masahiro KURODA, Shouji KAWASAKI¹⁾ and Yoshio HIRAKI

Department of Radiology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

1) Department of Radiation Technology,

School of Health Sciences,

Okayama University,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. Y. Hiraki)

The inhibition of thermotolerance development by quercetin was examined in NIH 3T3 cells. The cytotoxicity of quercetin increased with the increase in the concentration (10,100 μ g/ml) and duration (12,48,72 hours) of treatment. The cell killing effect of heat was not enhanced by quercetin (10 μ g/ml) itself. Quercetin (10 μ g/ml) inhibited the proliferation of cells for about 72 hours. Quercetin (10 μ g/ml) delayed the development of thermotolerance, but did not decrease the degree of maximum thermotolerance. Quercetin (10 μ g/ml) exhibited no effect on the decay of thermotolerance.