

ハムスター頬嚢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

岡山大学脳神経外科学教室（指導：西本 詮教授）

三 宅 幾 男

（昭和55年2月14日受稿）

Key words: Experimental tumor, thermotherapy,
differential hypothermia, anti-cancer drug.

緒 言

悪性腫瘍に対しては、一般に手術療法のみで十分な治療効果を期待するのは困難であり、手術療法に加えて放射線療法、化学療法、免疫療法、物理療法など種々の補助療法が試みられている。物理療法の一つである温熱療法を悪性腫瘍の治療に応用せんとする試みは、既に文献上19世紀後半よりみられ、歴史的にみて必ずしも新しい治療法とは言えない。温熱療法初期の腫瘍加温方法は、細菌或いはトキシソイドによる発熱療法⁷⁾⁸⁾¹⁴⁾であったが、この方法は患者の生命に対する危険性が極めて高く、しかも抗腫瘍効果は不十分であった。その後、加温方法の改良とともに、動物実験及び臨床上でも腫瘍部分のみを加温する方が全身加温法に比べてより有効であることが明らかとなった^{10)12)16)~18)45)81)}。一方、1965年 Popovic ら⁵²⁾は、ハムスター頬嚢移植腫瘍 (Toolan H. Ad. No. 1U, originally an human adenocarcinoma) を用い、4℃の全身低体温下に腫瘍部分のみを37℃に10時間保つという、いわゆる区別低体温 (Differential Hypothermia, 以下 D. H. と略す) 療法を行なって、処置後腫瘍が完全に消失したと報告している。更に、彼らは D. H. 療法に抗癌剤を併用すると温熱の抗腫瘍効果が一層増強されることを確認した⁵³⁾。これまでに当教室では、実験動物に D. H. 療法を行なって良好な結果を得ているが、臨床応用については必ずしも満足すべき結果は得ら

れていない。^{21)29)39)47)~49)69)71)72)82)85)86)}そこで今回著者は、より臨床応用可能で、しかも抗腫瘍効果の期待出来る温熱療法の条件を探る目的で、全身低体温下に腫瘍部分のみを正常温に保つ D. H. 療法の代りに、腫瘍を高温に維持することにより、どの程度の抗腫瘍効果が得られるのか、またその際の抗癌剤の腫瘍内取り込みの変化をも検索する目的で以下の如き実験を行なった。

実験材料及び方法

1. 実験動物

実験動物商 (香川津田動物) より供給された雌雄ハムスター (Syrian golden hamster, *mesocricetus auratus*) を当教室の飼育室で固型飼料 (オリエンタル, MF) と水道水を適宜与えて飼育し、体重約40g となったもの計181匹を本実験に使用した。

2. 移植腫瘍

Simian virus 40 (SV40) にて新生児ハムスター皮下に誘発した実験腫瘍 (岡山大学医学部癌源研究施設, 小田琢三教授より供与を受けた) をハムスター皮下に継代移植したものをを用いた。腫瘍を無菌的に摘出し、血管、結合組織などを肉眼的に出来る限り除去し、細切後0.25%トリプシン処理を行ない⁵⁾²⁴⁾⁵¹⁾, Eagle's Minimum Essential Medium に5% calf serum, 5% fetal calf serum, 50U/ml penicillin, 50r/ml streptomycin を加えた培養液15ml を TD40 培養管に入れ、単層培養の後クローニングを行なった。⁴⁶⁾

50) クローニング後継代培養67~124代目の腫瘍細胞を silicon rubber policeman にて剥離し、生理食塩水中に 10^7 cells/ml の細胞浮遊液として、その 0.3ml (3.3×10^6 viable cells) を 24 ゲージ針を用いて体重約 40 g のハムスター頬嚢粘膜下に移植した。

実験方法

a) 腫瘍加温方法

腹腔内に投与された抗癌剤 (^3H -5-fluorouracil, 以下 ^3H -5-FU と略す) のハムスター頬嚢移植腫瘍組織内取り込みに及ぼす温熱の影響を検索する目的で以下の実験を行なった。

両側頬嚢に腫瘍細胞を移植後、腫瘍体積が約 100mm^3 となった時点で担癌ハムスターに塩酸ケタミン 10mg/kg を皮下投与し、体温は小アルコール温度計 (4 mm ϕ $\times$ 60 mm, 大計工社製) を直腸に約 15 mm 挿入して測定し、ハムスターの頸部以下に適宜氷水をかけることにより、直腸温が $25 \pm 1^\circ\text{C}$ に保たれるようにした。一側頬嚢腫瘍加温は、マイクロウェーブ (2,450 MHz, MICRO THERMY ME-50, O.G. GIKEN Co., Ltd.) を用い、腫瘍温測定は、マイクロウェーブ照射側の腫瘍表面とその裏面に各々 1 個上記の小アルコール温度計を設置し、各温度計は $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 或いは $40 \pm 1^\circ\text{C}$ にそれぞれ保たれるようにマイクロウェーブ照射の出力及びアンテナの位置を調整し、以下の如き 5 群に分けて実験を行った。なお各群に使用したハムスターは各々 13 匹で、各群 13 匹中 10 匹は液体シンチレーション法に、3 匹はオートラジオグラフィ法による検索に用いた。本実験群に使用した ^3H -5-FU (specific activity 1.0Ci/m mol , radiochemical purity 96%, MW-130, Amersham, England) は、 $1\mu\text{Ci/g}$ body weight を腹腔内に投与した。

A 群：非処置下に ^3H -5-FU を投与し 60 分後に腫瘍組織を採取。

B 群：直腸温 25°C 、一側腫瘍温 37°C 処置下に ^3H -5-FU を投与し 60 分後に腫瘍組織を採取。

C 群：B 群と同様の処置を 60 分継続後に ^3H -5-FU を投与し、更に 60 分を経て腫瘍組織を採取。

D 群：直腸温 25°C 、一側腫瘍温 40°C 処置下に ^3H -5-FU を投与し 60 分後に腫瘍組織を採取。

E 群：D 群と同様の処置を 60 分継続後に ^3H -5-FU を投与し、更に 60 分を経て腫瘍組織を採取。(図 1)

Experimental Methods(I)

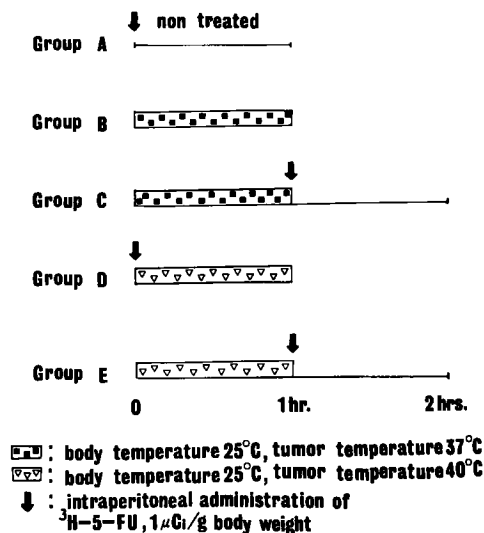


図 1. 各実験群における温熱処置条件及び ^3H -5-FU の投与時期を矢印で示す。

各群の担癌動物より実験後直ちに、血液は心腔内穿刺で、尿は膀胱穿刺にて採取した。

b) 液体シンチレーション法による放射活性の測定

摘出した両側頬嚢腫瘍は約 100mg の腫瘍片とし、付着した血液はガーゼで出来る限り除去し、微量天秤 (type L-D, 島津製作所) で正確な重量測定を行なった²¹⁾。血液及び尿は採取後 $6,000\text{rpm/min}$ で 5 分間遠沈 (KC-20, Kubota) し、各々の上清 0.1ml を放射活性測定に用いた。上記試料に Soluen 100 (Packard) 1ml を加え、 60°C にて 24 時間 incubation 後、Cab-O-Sil (Packard) 0.38g , シンチレーター-[ppo (2,5 diphenyl oxazole) 4g , popop (22'-p-phenylene-bis-5-phenyl oxazole) 100mg , toluen 1L)] 15ml を加え、シンチレーションカウンター (Aloka liquid scintillation spectrometer, Model LSC-635) で放射活性を測定し

た33)~37)。

C) オートラジオグラフィー法による腫瘍組織内アイソトープ局在の検索

実験後直ちに両側頬嚢腫瘍を摘出し、ポリエチレン薄膜で被覆後、ドライアイス・アセトンで急速凍結し、 -30°C 下にクリオスタット (Lips-haw) で厚さ 4μ の凍結切片を作製し、表面が平滑なシリコンゴム (KE44RTV, 信越化学) を -30°C に冷却し、この上に凍結切片を置き、 -60°C , $25\mu\text{Hg}$ で24時間凍結乾燥 (Model 2FS5, Hull Co.) した。得られた凍結組織切片は、写真乳剤 (サクラ NR-M2, 小西六) をコーティングしたスライドガラスにマウントし、 4°C 下に10日間露出後、 20°C で10分間現像 (サクラ Conidol X, 小西六), 30分間定着 (サクラ Conifix, 小西六) 処理後, Hematoxylin and Eosin 染色を行ない鏡検した^{41)60)64)~66)}。

次に抗癌剤或いは温熱、及び両者の併用による抗腫瘍効果を検索する目的で以下8群に分けて実験を行なった。平均体積 100mm^3 となった一側頬嚢移植腫瘍を有する担癌ハムスターを用い、上記実験群と同様の全身低体温処置を行なった。本実験群は処置時間が長いため、動物の体動を抑制する目的で塩酸ケタミン 5mg/kg の皮下投与を適宜追加した。腫瘍加温は、thermostat regulator (UNI-BATH, 千代田製作所) を装着した灌流生理食塩水恒温槽内に腫瘍部分のみを浸して行なった。抗癌剤として 5-fluorouracil (5-FU, 協和発酵) 50mg/kg を1回腹腔内に投与した。

第 i) 群：非処置コントロール。

第 ii) 群：5-FU のみ投与。

第 iii) 群：直腸温 25°C , 腫瘍温 37°C 処置10時間。

第 iv) 群：5-FU 投与60分後より第 iii) 群と同様の処置10時間。

第 v) 群：直腸温 25°C , 腫瘍温 40°C 処置6時間。

第 vi) 群：5-FU 投与60分後より第 v) 群と同様の処置6時間。

第 vii) 群：第 v) 群と同様の処置8時間。

第 viii) 群：5-FU 投与60分後より第 v) 群と同様の処置8時間。(図2)

各群には10匹のハムスターを用い、実験後隔日に体重測定を行ない、caliper で腫瘍径の三次元測定を行なって、各三次元の数値を乗じ、更

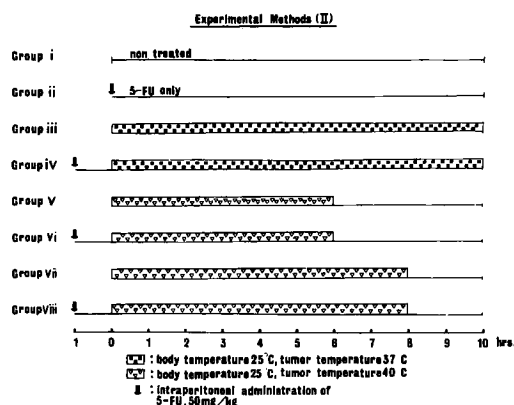


図2. 各実験群における温熱処置条件及び 5-FU の投与時期を矢印で示す。

にこれに 0.53 (ovoid-spheroid factor)⁴³⁾ を乗じて腫瘍体積とした。腫瘍の消失をみなかったものは処置後30日目に全例屠殺し、腫瘍の消失をみたものはその後60日間飼育した後に屠殺し、全身剖検を行なった。更に温熱或いは温熱と抗癌剤の併用による腫瘍の経時的な病理組織学的変化を検索するため、第 iii) 群~第 viii) 群については各群の10匹以外に処置直後及び処置後72時間目に各々3匹、計36匹の頬嚢移植腫瘍についても検討を加えた。腫瘍は摘出後10%中性ホルマリン固定を行ない、パラフィン包埋後厚さ 6μ の切片を作製し、主として Hematoxylin and Eosin 染色を行ない検索した⁴¹⁾。また第 i) 群~第 viii) 群については、屠殺後全例頬嚢を摘出し、上記と同様な病理組織標本作製し、病理組織学的検索を行なった。

実験結果

1. 温熱処置による抗癌剤の腫瘍組織内取り込みの変化

^3H -5-FU を腹腔内に投与した各実験群について腫瘍組織、血中及び尿中の放射活性を液体シンチレーション法で測定し、各々の平均値と標準偏差値を $\text{cpm}/100\text{mg}$ 或いは cpm/ml で算出した。その結果表1-1に示す如く、A群では右側腫瘍 $6,483 \pm 565\text{cpm}/100\text{mg}$, 左側腫瘍 $6,873 \pm 713\text{cpm}/100\text{mg}$ と左右の腫瘍組織内取り込みに有意差はなく、血中 $76,720 \pm 8,184\text{cpm}/\text{ml}$, 尿中 $3,845,040$

表1—1. 実験群Aにおける腫瘍組織, 血中及び尿中の各放射活性値,
左右の腫瘍の放射活性比及びこれらの平均値と標準偏差値.

Group A.					
Case	Rt. Tumor	Lt. Tumor	Blood	Urine	% of Rt./Lt. or Lt./Rt.
1.	5,952	6,670	82,660	4,883,120	112
2.	6,540	7,177	88,360	3,840,320	109
3.	7,120	7,434	72,430	3,880,600	104
4.	6,781	7,348	62,220	3,668,650	108
5.	7,625	6,588	86,170	3,425,600	116
6.	6,717	7,211	71,420	4,134,220	117
7.	6,083	7,719	86,360	2,729,550	126
8.	5,636	5,973	70,300	3,492,430	106
9.	6,186	6,021	73,500	3,976,050	102
10.	6,187	5,880	73,800	4,419,850	105
Mean	6,483	6,873	76,720	3,845,040	111
S. D.	565	713	8,184	555,498	7
Tumor: cpm/100mg tissue weight					
Blood and Urine: cpm/ml					

表1—2. 実験群Bにおける腫瘍組織, 血中及び尿中の各放射活性値, 非加温腫瘍に対する
加温腫瘍の放射活性比及びこれらの平均値と標準偏差値.

*は表1—1の血中及び尿中放射活性値に比し有意差があることを示す。(p<0.05)

**は非加温腫瘍組織の放射活性値に比し有意差があることを示す。(p<0.05)

Group B.					
Case	Heated Tumor	Non Heated Tumor	Blood	Urine	% of Heated T./Non Heated T.
1.	5,819	3,004	56,560	968,170	194
2.	7,409	3,097	66,190	1,163,040	239
3.	6,965	4,562	54,090	1,094,410	153
4.	5,476	3,175	46,590	1,744,400	173
5.	6,604	3,101	50,440	1,803,470	213
6.	5,472	4,239	57,030	1,801,070	129
7.	6,520	3,455	56,780	2,012,350	189
8.	6,603	4,407	45,860	1,648,430	149
9.	5,392	3,829	65,920	1,858,230	140
10.	6,109	4,841	60,420	1,904,200	126
Mean	6,237**	3,771	55,990*	1,599,780*	171
S. D.	657	659	6,706	357,776	35
Tumor: cpm/100mg tissue weight					
Blood and Urine: cpm/ml					

±555,498cpm/mlであった。B群では加温側腫瘍6,237±657cpm/100mg, 非加温側腫瘍3,771±659cpm/100mgと加温側腫瘍は非加温側腫瘍に比し約66%の取り込み増加を示した(表1—2)。C群では加温側腫瘍5,610±451cpm/100mg, 非加温側腫瘍4,140±418cpm/100mgで加温側腫瘍

は非加温側腫瘍に比し約35%の取り込み増加を示した(表1—3)。D群では加温側腫瘍818±38cpm/100mg, 非加温側腫瘍3,947±581cpm/100mgでB群, C群とは逆に加温側腫瘍は非加温側腫瘍に比し約80%の取り込み低下であった(表1—4)。E群では加温側腫瘍717±52cpm/100

表 1—3. 実験群Cにおける腫瘍組織, 血中及び尿中の各放射活性値, 非加温腫瘍に対する加温腫瘍の放射活性比及びこれらの平均値と標準偏差値.

*は表 1—1 の血中及び尿中放射活性値に比し有意差があることを示す. ($p < 0.05$)**は非加温腫瘍組織の放射活性値に比し有意差があることを示す. ($p < 0.05$)

Group C.					
Case	Heated Tumor	Non Heated Tumor	Blood	Urine	% of Heated T./Non Heated T.
1.	5,197	4,071	61,100	1,398,930	127
2.	5,215	4,254	58,970	1,520,990	123
3.	6,334	4,681	69,650	1,788,800	135
4.	4,894	3,751	52,410	1,477,410	130
5.	5,783	4,548	66,530	2,102,710	126
6.	6,059	3,353	54,420	1,354,870	180
7.	5,519	4,036	58,180	1,422,070	128
8.	6,061	4,773	69,320	1,937,270	127
9.	5,640	3,846	60,380	1,915,350	146
10.	5,761	4,092	62,510	1,313,330	141
Mean	5,610**	4,140	61,350 *	1,623,170 *	137
S. D.	451	418	5,525	270,521	16

Tumor: cpm/100mg tissue weight

Blood and Urine: cpm/ml

表 1—4. 実験群Dにおける腫瘍組織, 血中及び尿中の各放射活性値, 非加温腫瘍に対する加温腫瘍の放射活性比及びこれらの平均値と標準偏差値.

*は表 1—1 の血中及び尿中放射活性値に比し有意差があることを示す. ($p < 0.05$)**は非加温腫瘍組織の放射活性値に比し有意差があることを示す. ($p < 0.05$)

Group D.					
Case	Non Heated Tumor	Non Heated Tumor	Blood	Urine	% of Heated T./Non Heated T.
1.	932	4,821	66,180	1,315,100	19
2.	877	4,517	51,030	2,011,750	19
3.	661	3,383	56,590	1,554,590	20
4.	553	3,121	50,970	1,896,470	18
5.	946	4,196	61,890	1,148,330	23
6.	782	4,792	62,870	1,369,770	16
7.	856	3,740	53,730	2,067,160	23
8.	931	3,740	68,080	1,050,700	25
9.	842	3,884	55,870	1,616,630	22
10.	801	3,312	56,560	1,342,360	24
Mean	818**	3,947	53,380 *	1,537,290 *	21
S. D.	38	581	5,751	338,373	2

Tumor: cpm/100mg tissue weight

Blood and Urine: cpm/ml

mg, 非加温側腫瘍 $3,870 \pm 529$ cpm/100mgでD群と同様加温側腫瘍は非加温側腫瘍に比し約80%の取り込み低下を示した(表 1—5). B群~E群の非加温側腫瘍の ^3H -5-FUの取り込みは, 各

群相互に p 検定を行なったが有意差は認められなかった. またB群~E群における血中及び尿中の放射活性値は, 血中では各々 $55,990 \pm 6,706$ cpm/ml, $61,350 \pm 5,525$ cpm/ml, $58,380 \pm$

表1—5. 実験群Eにおける腫瘍組織, 血中及び尿中の各放射活性値, 非加温腫瘍に対する加温腫瘍の放射活性及びこれらの平均値と標準偏差値.

*は表1—1の血中及び尿中放射活性値に比し有意差があることを示す. ($p < 0.05$)

**は非加温腫瘍組織の放射活性値に比し有意差があることを示す. ($p < 0.05$)

Gr Group E.E.

Case	Heated Tumor	Non Heated Tumor	Blood	Urine	% of Heated T./Non Heated T.
1.	498	4,038	61,810	2,232,760	12
2.	762	4,412	50,460	2,385,410	17
3.	848	3,921	51,820	1,259,250	22
4.	844	3,820	61,860	1,157,940	22
5.	529	3,306	50,060	1,766,400	16
6.	620	4,169	54,050	2,148,830	15
7.	918	3,117	64,830	1,552,000	29
8.	973	3,837	66,580	1,970,310	25
9.	546	4,889	50,070	1,654,760	11
10.	629	3,194	51,640	1,876,550	20
Mean	717**	3,870	56,320*	1,800,420*	19
S. D.	52	529	6,312	384,045	2

Tumor: cpm/100mg tissue weight

Blood and Urine: cpm/ml

5,751cpm/ml, $56,320 \pm 6,312$ cpm/ml, 尿中では各々 $1,599,780 \pm 357,776$ cpm/ml, $1,623,170 \pm 270,521$ cpm/ml, $1,537,290 \pm 338,373$ cpm/ml, $1,537,290 \pm 338,373$ cpm/ml, $1,800,420 \pm 384,045$ cpm/mlで血中, 尿中とも各群相互にp検定を行なったが有意差は認められなかった.

しかしA群と比較するとB群～E群の血中及び尿中放射活性値は, p検定の結果有意の低下を示した(表1—2, 1—3, 1—4, 1—5). 以上A群～E群の腫瘍組織内, 血中及び尿中の放射活性値をグラフにしたのが図3であり, B

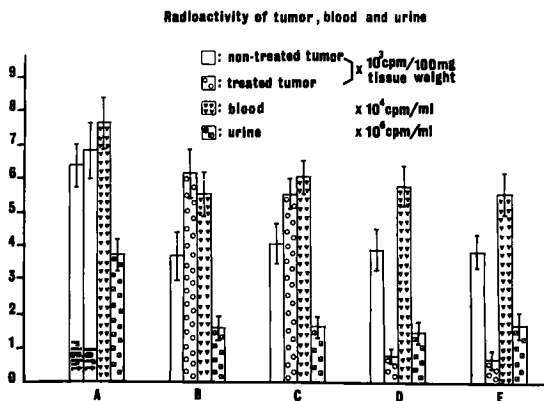


図3. 実験群A～Eの腫瘍組織, 血中及び尿中の平均放射活性値.

群～E群の各群について非加温側腫瘍の ^3H -5-FUの取り込みに比し加温側腫瘍のそれを百分率で表わしたものが図4である.

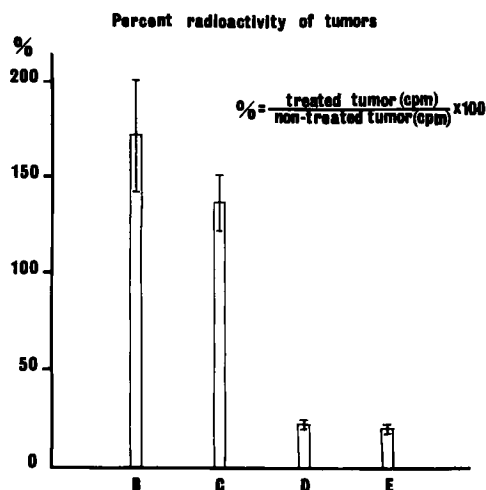


図4. 実験群B～Eにおける非加温腫瘍に対する加温腫瘍の放射活性百分率.

次に各群の腫瘍組織のオートラジオグラフィーを作製し, ^3H -5-FUの腫瘍組織内分布状態について検索した結果, A群では血管腔内, 腫瘍細胞内にほぼ一様に銀粒子の分布がみられ, 細

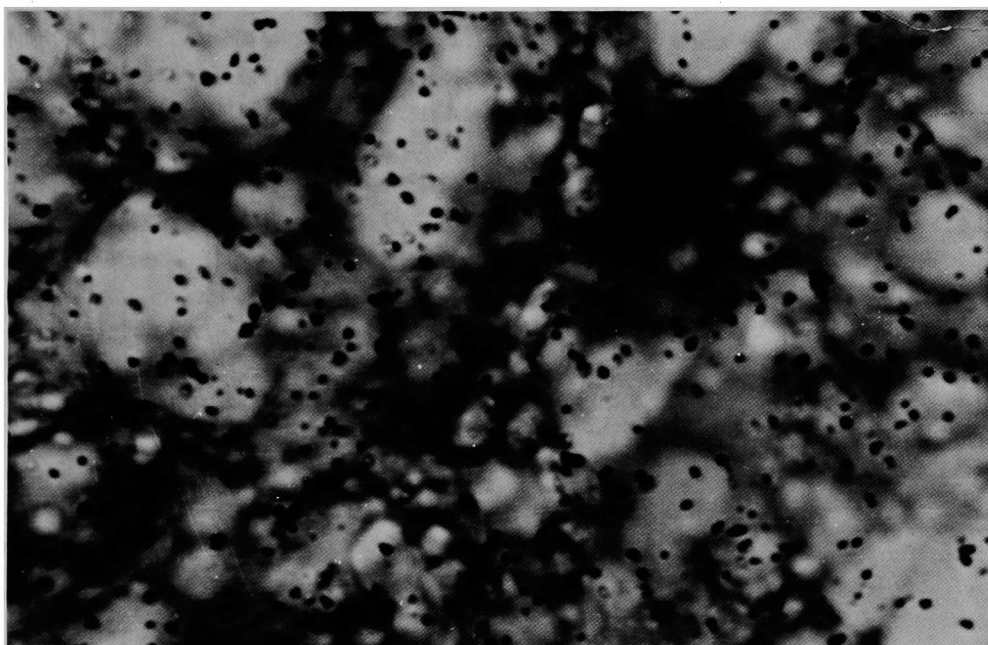


図5. 実験群Aの頬嚢腫瘍組織のオートラジオグラフィー。銀粒子がび慢性にみられる。
($\times 1,000$, 動物番号A-12)

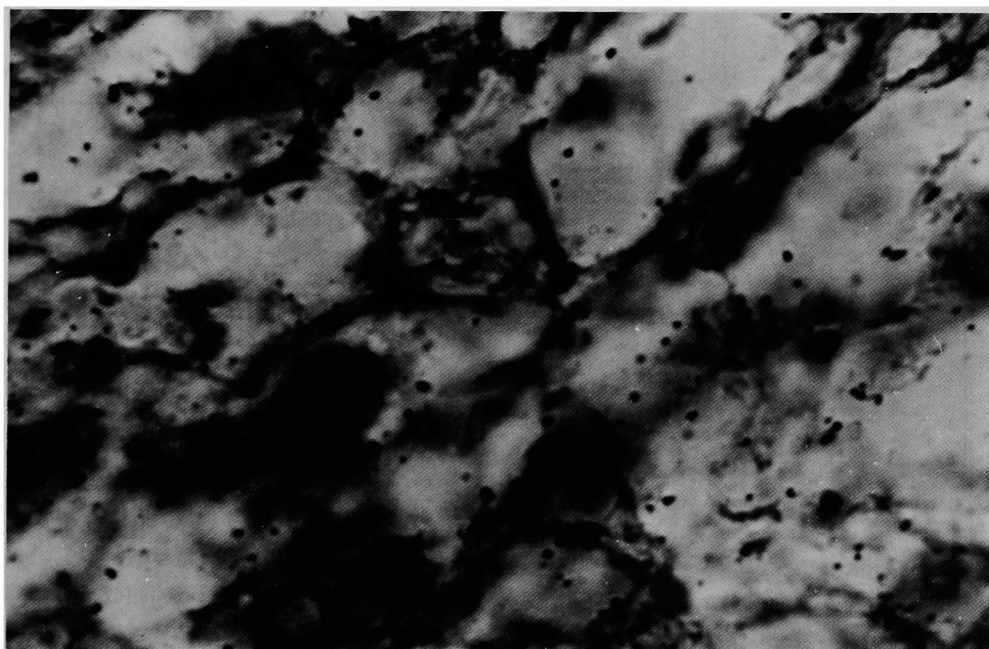


図6. 実験群Dの頬嚢腫瘍組織のオートラジオグラフィー。銀粒子はび慢性にみられるが、
図5に比較すると粒子密度は低い。($\times 1,000$, 動物番号D-11)

胞内銀粒子の分布も慢性であった(図5)。B群～E群加温側腫瘍及び非加温側腫瘍の銀粒子分布状態もA群と同様に慢性に分布していたが、液体シンチレーション法による腫瘍組織内への ^3H -5-FUの取り込み結果と一致して、放射活性値の低い腫瘍組織程、銀粒子密度は低い傾向を示していた(図6)。

2. 抗癌剤及び温熱の抗腫瘍効果

非処置コントロールとした第i)群では、腫瘍細胞移植後8日目に平均腫瘍体積は 100mm^3 に達し、以後25日目まではほぼ指数関数的發育を示し、平均 $6,500\text{mm}^3$ に達したが、この頃より發育は緩徐となり、移植後38日目には平均 $7,900\text{mm}^3$ であった。動物の体重は腫瘍細胞移植時平均40gであったが、腫瘍の發育が緩徐となる25日目頃には平均95gとほぼ直線的体重増加を示したが、この頃より担癌動物の飼料及び水分摂取量は減少し、体重増加率も軽度となり、移植後38日目には平均109gであった(図7-1)。この

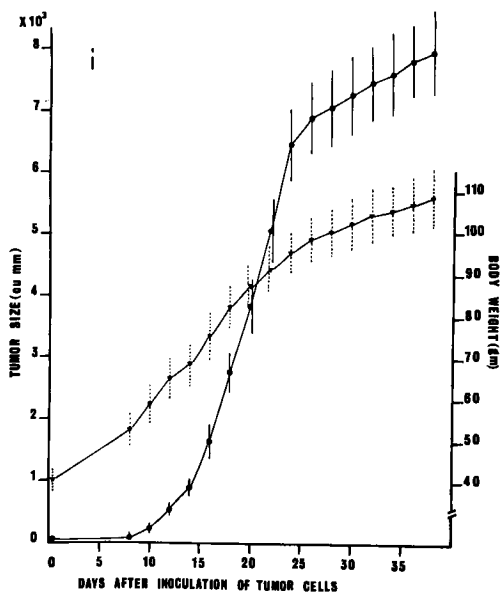


図7-1. 実験群 i) における平均腫瘍体積(●—●)と担癌動物の平均体重(○—○)の変化。

時点で全例屠殺し、全身剖検を行なったところ、頬粘膜下に移植した腫瘍は全例とも頬嚢より背部皮下にまで進展していたが、諸臓器への転移所見は肉眼的にはみられなかった。5-FU 50mg/

kgを1回腹腔内に投与した第ii)群及び25℃の全身低体温下に腫瘍部分のみを37℃に10時間維持した第iii)群では腫瘍の生長抑制効果は認められなかったが、5-FU 50mg/kgを投与し、第iii)群と同様な処置を10時間行なった第iv)群では、腫瘍生長は著明に抑制された(図7-2, 7-3, 7-4)。25℃の全身低体温下に腫瘍部分のみを

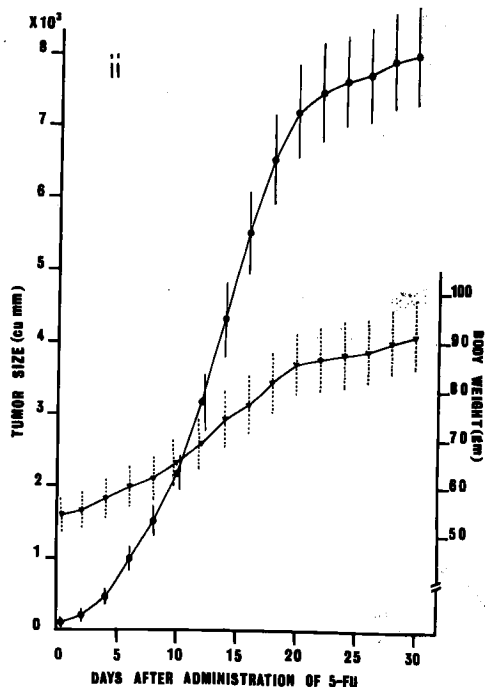


図7-2. 実験群 ii) における平均腫瘍体積(●—●)と担癌動物の平均体重(○—○)の変化。

40℃に6時間維持した第v)群は、第iv)群に比し腫瘍生長抑制はやや劣っていたが、5-FU 50mg/kgを投与し、第v)群と同様の処置を6時間行なった第vi)群は、第iv)群とほぼ同程度の腫瘍生長抑制を示した(図7-5, 7-6)。25℃の全身低体温下に腫瘍部分のみを40℃に8時間維持した第vii)群及び5-FU 50mg/kgを投与し、第vii)群と同様の処置を8時間行なった第viii)群では、各々10例中2例及び10例中8例に腫瘍の消失がみられ、両群のうち腫瘍の消失がみられなかった例でも、腫瘍生長は極めて著明に抑制された(図7-7, 7-8)。腫瘍の消失をみた例では、処置後90日間飼育観察したが、腫瘍の

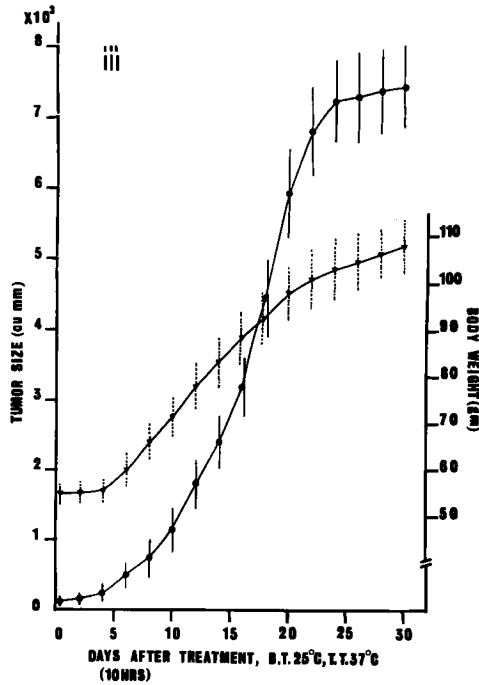


図7-3. 実験群iii)における平均腫瘍体積(◆◆)と担癌動物の平均体重(◆◆)の変化。

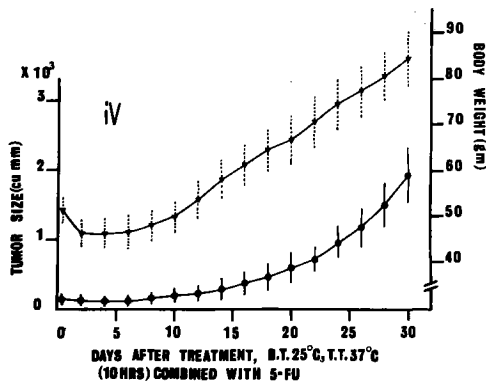


図7-4. 実験群iv)における平均腫瘍体積(◆◆)と担癌動物の平均体重(◆◆)の変化。

再発は認められなかった。また第ii)群～第viii)群とも全例剖検を行なったが、諸臓器への転移性病変は肉眼的には認められなかった。動物の体重は、温熱処置のみの場合は処置後2日目頃までは増加がほとんどみられず、その後は次第に増加し、処置後30日目には大部分の例で100gを越えていたが(図7-3, 7-5, 7-7),

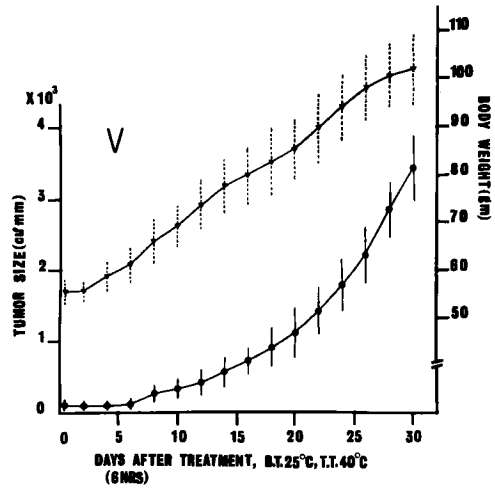


図7-5. 実験群v)における平均腫瘍体積(◆◆)と担癌動物の平均体重(◆◆)の変化。

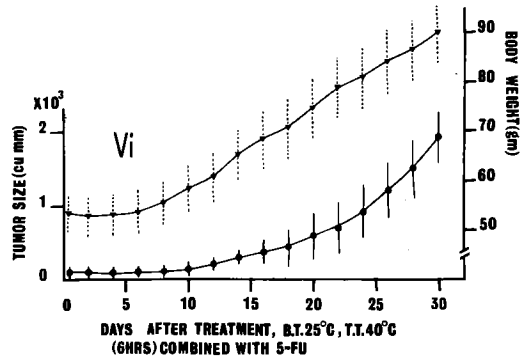


図7-6. 実験群vi)における平均腫瘍体積(◆◆)と担癌動物の平均体重(◆◆)の変化。

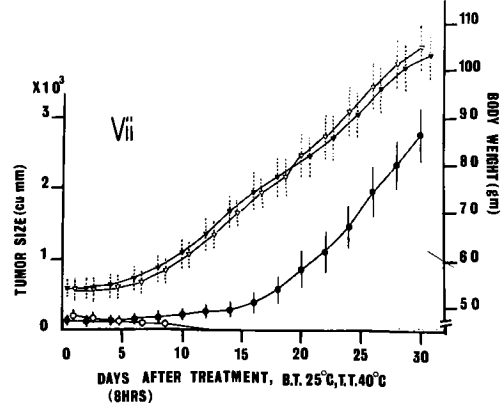


図7-7. 実験群vii)における腫瘍非消失例の平均腫瘍体積(◆◆)と担癌動物の平均体重(◆◆)及び腫瘍消失例の平均腫瘍体積(◇◇)と担癌動物の平均体重(◇◇)の変化。

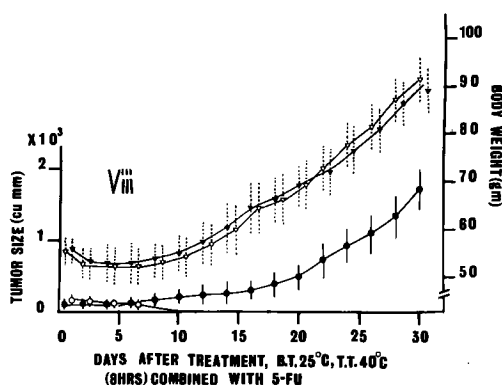


図7-8. 実験群viii)における腫瘍非消失例の平均腫瘍体積(●—●)と担癌動物の平均体重(○—○)及び腫瘍消失例の平均腫瘍体積(●---●)と担癌動物の平均体重(○---○)の変化。

5-FUのみを投与した第ii)群では体重増加は軽度で、5-FU投与後30日目には全例100g以下にとどまった(図7-2)。温熱処置に抗癌剤を併用した第iv)群、第vi)群、第viii)群ではほとんどの例で処置後一過性に体重減少がみられ、処置後30日目にも大部分の例で100g以下であった(図7-4, 7-6, 7-8)。

次に第i)群～第viii)群について頰囊腫瘍の病理組織学的検索を行なった。まずSV40誘発ハムスター皮下腫瘍の継代培養細胞67代目のものと124代目のものとをハムスター頰囊に移植し、組織学的に変化がみられるか否かを検索したが、基本的には両者間に何ら相異は認められなかった。即ち個々の細胞は紡錘形で、比較的細胞質に乏しく、細胞膜は不明瞭であった。核は円形～楕円形で大小不同がみられ、クロマチンに富んでいた。核分裂像も処々みられた。腫瘍生長を観察した第i)群～第iii)群では腫瘍が大きく、中心性壊死が著明であった。第iii)群、第iv)群で処置直後の腫瘍は、肉眼的に軽度浮腫状、充血性で、組織学的には腫瘍実質内に散在性小出血巣がみられ、腫瘍細胞質の軽度染色性低下がみられたが、核の形態学的変化は認められなかった。第iii)群、第iv)群で処置後72時間目の腫瘍は、肉眼的にはほぼ処置前と同様であり、病理組織学的にも腫瘍細胞は両群とも未だ軽度染色性の低下を示していたが、両群の間に

相異はみられなかった。第v)群～第viii)群では処置直後の腫瘍は、第v)群、第vi)群と第vii)群、第viii)群の間には加温時間に2時間の差があったが、肉眼的にも病理組織学的にも基本的には同様の所見であった。即ち腫瘍は肉眼的に著明な浮腫とうっ血を呈していた。病理組織学的には腫瘍細胞間隙の疎化がみられ、核形態に変化は認められないが腫瘍細胞質と核の染色性低下を示す部分と核形態が不整になりクロマチン顆粒の消失或いは核濃縮像を示す部分とがみられた。第v)群～第viii)群で処置72時間目の腫瘍は肉眼的に未だうっ血状であった。第v)群と第vi)群の間には明らかな病理組織学上の相異がみられず、両群とも腫瘍細胞が崩壊し、核濃縮像を示すものと腫瘍細胞質及び核の染色性低下はみられるが本来の細胞形態を有しているものとが混在してみられた。ところが、第vii)群、第viii)群では腫瘍細胞は一様に崩壊し、核濃縮像が著明で、本来の形態を有する腫瘍細胞はみられなかった。第vii)群、第viii)群の腫瘍の消失をみた例について、処置後90日目の頰囊組織標本はいずれにも腫瘍細胞の残存を認めなかった。

考 察

1. 腫瘍加温法について

発熱療法も含めて担癌生体の全身を高温にして抗腫瘍効果を期待するというこれまでの多くの試みは、担癌宿主の全身状態を悪化させる危険性が高い。Dicksonら¹⁷⁾は、全身を高温にするよりも腫瘍部分のみを選択的に加温する方が宿主への悪影響も少なく、抗腫瘍効果も高いと言っている。腫瘍部分のみを選択的に加温する方法として、これまでに温水^{11)~13)18)81)}, diathermy¹⁰⁾¹⁹⁾, microwave⁴⁾⁴⁵⁾⁷¹⁾⁸⁴⁾, 加温血液の灌流²²⁾⁶⁷⁾などの報告がある。しかし未だ十分満足すべき加温方法はない。本実験で³H-5-FUを投与した実験群についてマイクロウェーブを用いた理由は、温水中に頰囊腫瘍を浸すと、唾液等で温水が³H-5-FUに汚染され、摘出した腫瘍の放射活性値測定に少なからず影響を及ぼす可能性があるからである。一方腫瘍のマイクロウェーブ照射側の腫瘍表面とその裏面の腫瘍表

面との温度差を1℃以下に維持し得たこと、また温水加温を行なった腫瘍は、平均腫瘍径5.7mmであり、Crileら¹³⁾の報告によると、平均腫瘍径7mmのものでも腫瘍の中心温度は温水の温度と一致するという結果より、両者の加温効果はいずれも満足すべきものであったと考えられる¹⁹⁾22)38)44)。

2. 抗癌剤の腫瘍組織内取り込みに及ぼす温熱の影響

5-FUは、1956年Dushinskyら²⁰⁾により合成され、Heidelberger²⁷⁾²⁸⁾により基礎的実験が行なわれた結果、本剤がピリミジンに拮抗する代謝阻害性抗癌剤であることが明らかとなった。

腫瘍組織内にもかなり長時間残留し、温度、pHに対する安定性も高いことより¹⁾³⁰⁾、悪性腫瘍の温熱療法に併用する抗癌剤として抗腫瘍効果の期待できる薬物の一つであると考えられる。本実験について、正常体温下と全身低体温下に³H-5-FUを腹腔内に投与し、60分後の血中濃度を比較すると、前者に比し後者の場合には有意の低下がみられた。即ち低体温処置下では、心拍出量、腹腔内に分布する血管の透過性低下⁴⁾⁵³⁾⁶²⁾などにより、投与した³H-5-FUの血中への移行が遅延するものと考えられる。更に腎代謝も抑制され、尿中への排泄が遅延するため⁵⁶⁾、尿中³H-5-FU活性が低値を示したものと思われる(表1—2, 1—3, 1—4, 1—5, 図3)。Popovicら⁵⁶⁾は、ハムスター頬嚢移植腫瘍を用い、¹⁴C-5-FUの静脈内投与により、4℃の低体温処置のみのものと4℃の低体温処置下に腫瘍部分のみを37℃に加温したものについて腫瘍内取り込みを検索した結果、投与10分後、後者では前者の約5倍の取り込みを認めた。また菅ら⁶⁸⁾は、22℃の低体温下に犬の両側大脳半球皮質に対称性に作製したcold induced lesionの一側を37℃に5時間加温すると、対側非加温部に比し静脈内に投与されたRISAの取り込みは約2.5倍であったと報告している。本実験では25℃の低体温下に腫瘍を37℃に維持したB群では³H-5-FU投与60分後の腫瘍内取り込みは正常体温下に投与したA群とほぼ同じレベルに達し、低体温非加温側腫瘍に比べ約1.7倍であった(表1—1, 1—2, 図4)。

本実験とPopovic, 菅らの実験とでは、アイソトープの投与方法、低体温処置条件、実験時間などが異なっているが、低体温下に腫瘍部分のみを正常温にすると、低体温処置のみを行なったものに比べ加温局所へのアイソトープの取り込みは有意に増加してくるものと考えられる。更に本実験のC群の如くあらかじめ低体温処置下に腫瘍部分のみを正常温に維持し、加温中止後より³H-5-FUを投与しても、非加温側腫瘍に比し約1.4倍の取り込みを示したことより、しばらくの間は、ある程度の腫瘍内アイソトープ取り込み増強効果が持続しているものと考えられる(表1—3, 図4)。低体温下に腫瘍部分のみを正常温に加温すると低体温処置のみのものに比し腫瘍内への抗癌剤の取り込みが増加することは、主として腫瘍組織内の血管の透過性亢進に基づくものと説明されているが⁵⁶⁾⁶⁸⁾、腫瘍組織内の循環血液量、血管床の変化などによることも考えられ、今後その機序の究明には詳細な検討が必要であると思われる。腫瘍或いは正常組織を37℃よりも高温に維持する、hyperthermiaの実験については報告者により加温方法、加温時間、加温々度などが異なっているため、加温部の循環血液量、血管透過性の変化を一義的に論ずることは不可能であろう。しかしSuttonら⁷⁰⁾は、マイクロウェーブを用いて正常体温のラット脳を30分間42℃に加温すると血管透過性が亢進したと報告している。Rasis⁵⁷⁾は、正常体温のサルの内頸動脈より42℃加温血液を灌流し、著明な血管抵抗の増大をみた。更にLeveenら⁴²⁾は、高温処置により加温部の循環血液量が著明に低下したと報告している。これらの実験は、いずれも正常組織を用いたものであり、同じような効果が腫瘍という異常組織に分布する血管についても得られるか否かは、はなはだ疑問であるが、本実験D群、E群では加温側腫瘍は加温早期より肉眼的にうっ血していた。このことより局所の血液循環障害が推測され¹⁹⁾⁵⁷⁾、³H-5-FUの腫瘍内取り込みが著明に低下したものととも考えられる(表1—4, 1—5, 図3)。

次に、抗癌剤の腫瘍組織内分布状態について、Tatorら^{73)~76)}は、ハムスターに移植したependymoblastomaを用い、³H-methotrexate(³H-

MTX)のオートラジオグラフィによる解析を行なっているが、本実験結果と同様、 ^3H -MTXは腫瘍細胞内にび慢性に分布していた。 ^3H -MTX、 ^3H -5-FUともに核内への取り込みは少ないとされており⁷⁸⁾⁸⁰⁾本実験でもみられた核上の銀粒子の大部分は、細胞質内のアイソトープを反映しているものと考えられる。

3. 腫瘍増殖に及ぼす温熱の影響

1866年 Busch⁸⁾は、顔面に発生した肉腫患者が丹毒に罹患し、発熱後腫瘍が消失したと報告し、1884年 Bruns⁷⁾は、メラノーマ再発患者が丹毒に罹患し、数日間 40°C 以上の発熱が続いた後、8年間生存したと報告した。1891年 Coley¹⁴⁾は、38例の癌患者を人為的に丹毒に罹患せしめ、12例に腫瘍の消失をみたとしている。1918年 Rohdenburg⁶¹⁾は、文献上検索し得た166例の癌患者に腫瘍の消失がみられ、このうち72例は高熱または加温療法によるものであったとしている。しかし高温処置による抗腫瘍効果のメカニズムは未だ十分に解明されておらず、報告者により必ずしも意見の一致をみていない¹⁰⁾¹²⁾¹⁷⁾¹⁹⁾⁴⁵⁾⁸¹⁾。一般的に悪性腫瘍細胞は正常細胞よりも代謝が盛んであるため、高温の影響をより受け易いとされている¹⁰⁾²²⁾⁶⁷⁾⁷⁹⁾。腫瘍細胞を高温にすると酸素消費量は減少し¹⁵⁾³¹⁾、嫌気性解糖、DNA合成、RNA合成、蛋白合成などは全て抑制され⁶⁷⁾、乳酸産生が増加する³¹⁾。更に本実験でも腫瘍を高温にすると肉眼的にうっ血を来たしたことより、腫瘍内血液循環障害も抗腫瘍効果に何らかの作用を及ぼすものと考えられる。これを示唆する実験として Crile ら¹³⁾は、血管収縮剤の一種であるセロトニンを腫瘍内に反復投与して腫瘍の増殖が抑制されることを観察した。また腫瘍細胞の種類によりそれぞれ温度感受性が異なるということは既に確認されている¹⁰⁾¹¹⁾²²⁾²⁶⁾²⁹⁾。一方、同一腫瘍細胞であっても cell cycle phase によって温度感受性が異なり⁵⁾²⁵⁾²⁶⁾³²⁾⁴⁴⁾⁶¹⁾⁸¹⁾、更に同じ種類の細胞でも exponential growth phase のものは stationary phase のものに比し温度感受性が高いと言われている⁵⁾⁶⁾²⁵⁾。次に腫瘍の加温処置を定量化するために、thermal dose⁴⁹⁾ [(加温腫瘍温-低体温)×処置時間(分)]を算出し、本実験と Popo-

vic⁵⁴⁾⁵⁵⁾、田淵⁷¹⁾⁷²⁾、大橋⁴⁹⁾、山田⁸³⁾らの結果とを比較し(表2)、thermal doseと腫瘍消失率との間に一定の相関が存在するか否かについて検討したが、必ずしも相関があるとは言えなかった。これは報告者により、使用した細胞の種類、温熱処置条件などが異なっていたことによるためかも知れない。本実験の第iii)群、第v)群、第vii)群の thermal doseは各々7,200, 5,400, 7,200であったが、加温条件が異なっており、本実験結果について thermal dose と抗腫瘍効果との相関を論ずることは困難である。

加温腫瘍の病理組織学的変化についてみると、D.H.処置のみを行なった Popovic ら⁵⁴⁾及び田淵⁷¹⁾の実験、D.H.処置に5-FUを併用した大橋⁴⁹⁾の実験では処置条件及び腫瘍細胞の種類が異なっていたが、共通の所見をみている。即ち、処置直後の腫瘍組織では腫瘍細胞質及び核の軽度染色性低下がみられ、処置後48~72時間目では細胞の著明な崩壊、核濃縮像をみている。ところが本実験第iii)群、第iv)群では、彼らの実験程著明な形態学的変化はみられなかった。このことは、本実験に用いたSV40誘発腫瘍細胞が、彼らの用いた腫瘍細胞よりも温度或いは抗癌剤に対する感受性が低いことを示唆しているのかも知れない。更に本実験で全身低体温下に腫瘍部分のみを 40°C に6時間或いは8時間加温した群では、処置直後の腫瘍組織は腫瘍細胞間隙の著明な疎化及び細胞質、核の染色性低下を示すものと、核形態が不整となり核濃縮像を示すものとがみられた。これは同じ腫瘍組織であっても各々の細胞の cell cycle phase が異なっているために温度感受性に差があることを反映した結果とも考えられよう⁵⁾²⁵⁾²⁶⁾³²⁾⁶¹⁾。このように処置直後或いは処置後72時間目の腫瘍の病理組織学的変化とその後の各実験群の腫瘍増殖の程度についてみると、一般的に形態学的変化の強いもの程腫瘍増殖が抑制されるという傾向が認められると言えよう。

4. 抗癌剤と温熱処置の併用効果

悪性腫瘍に対する補助療法の一つである温熱療法に放射線療法或いは化学療法を併用し、より有効な抗腫瘍効果が得られたという報告は多

表2. 温熱処置による腫瘍消失率と thermal dose との比較.

Time-temperature relationship of thermal effect									
	Popovic, V.P., et al., 1965	Popovic, V.P., et al., 1966	Tabuchi, K., 1972	Popovic, V.P., et al., 1966	Ohashi, T., 1975	Yamada, O., 1978	author, 1979		
tumor temperature	37°C		37°C	37°C		36-37°C	37°C	40°C	
body temperature	4°C		10-15°C	30°C		23-24°C	25°C	25°C	
temperature difference	33°C		27-22°C	7°C		14-12°C	12°C	15°C	
combination with anti-tumor agent	-	+	-	-	+	-	+	-	+
duration of treatment (hour(s))	10	1	10	24	10	10	10	8	
disappearance rate of tumor [%]	100	100	50	100	20	20 30	0 0	20 80	
thermal dose [temp. diff. °C x duration of treat. min.]	19,800	1,360	16,200-13,200	10,080	4,200	8,400-7,200	7,200		

い。放射線単独療法の場合には、腫瘍組織の酸素分圧が低下すると言われているが⁵⁸⁾、腫瘍を加温すると腫瘍組織の酸素分圧は低下するにもかかわらず、放射線単独療法の場合に比しより有効であると言う⁹⁾²²⁾⁵⁹⁾⁷⁷⁾。同様に温熱療法に化学療法を併用すると両者いずれか単独療法の場合に比しより有効であるといわれている⁶⁾¹⁶⁾²³⁾⁴⁹⁾⁵¹⁾⁵³⁾⁵⁴⁾⁵⁶⁾⁶³⁾⁸³⁾。Popovic ら⁵³⁾は、5-FU 50mg/kg を併用し、体温 4°C、腫瘍温 37°C の D.H. 処置を 1 時間行ない 100% の腫瘍消失を認め、大橋⁴⁹⁾は、5-FU 50mg/kg を併用し、体温 30°C、腫瘍温 37°C の D.H. 処置を 10 時間行ない 20% に腫瘍消失をみた。本実験では 5-FU 50mg/kg を投与し、体温 25°C、腫瘍温 37°C の D.H. 処置を 10 時間行なった第 iv) 群には腫瘍の消失例はみられなかったが、全例に増殖抑制がみられた。これら報告者により結果は異なるが、本実験も含め D.H. 単独療法よりも抗癌剤を併用した方が一層抗腫瘍効果が高いことは明らかである。また本実験では、腫瘍を高温に維持すると腫瘍組織内への抗癌剤の取り込みが著明に減少したことより (表 1-4, 1-5, 図 3), あらかじめ非処置下に抗癌剤を投与した後に温熱処置を行なったところ、第 vi) 群では全例に腫瘍の増殖抑制をみ (図 7-6), 第 viii) 群では 80% に腫瘍の完全消失をみている (図 7-8)。第 iv) 群と第 viii) 群とは腫瘍の加温々度は異なっているが、thermal do-

se はいずれも 7,200 であるにもかかわらず第 viii) 群の方がより強い腫瘍増殖抑制を示したことより、高温に維持する方がより効果的であると考えられる。腫瘍の消失或いは増殖抑制という現象に高温処置及び抗癌剤の併用がどのようなメカニズムで抗腫瘍作用をもたらすかということは、現在のところ十分には解明されていない。しかし、本実験より、腫瘍を高温にするとうっ血を来たすこと、また馬場³⁾、木寺⁴⁰⁾らは、前処置として腫瘍への血流を完全に遮断すると、高温処置と抗癌剤の併用療法がより一層増強されると報告していることなどより考え、当然血液循環障害も抗腫瘍作用に関与しているものと思われる。

以上述べてきた如く、腫瘍を正常温に維持する D.H. 療法よりも腫瘍を高温に維持する方が抗腫瘍効果はより高いと言える。ところが脳外科領域において D.H. 療法を臨床に応用せんとする最大の目的は、神経症状を悪化させない範囲で腫瘍を可能な限り摘出した後に正常組織を何ら障害することなく残存せる浸潤腫瘍細胞のみを選択的に死滅せしめることにある。しかし高温処置を行なえば、腫瘍浸潤部のみならず該部の正常脳組織も障害されることが高温処置の最大の欠点である。従って D.H. 療法が理想的温熱療法に近いことは言うまでもないが、現状では D.H. 療法のみでは十分な抗腫瘍効果は得られないため、D.H. 療法に併用し、より有効な抗腫瘍効

果が得られ得る抗癌剤の開発が望まれる。

結 論

腫瘍の増殖並びに抗癌剤の腫瘍内取り込みに及ぼす温熱の影響を検索する目的で実験を行ない、以下の如き結果を得た。

1. ハムスター両側頬嚢にSV40誘発腫瘍細胞を移植し、5実験群に分けて ^3H -5-FUを腹腔内に投与し、60分後の腫瘍内放射活性値を比較した。その結果、全身低体温下に腫瘍のみを正常温(37℃)に維持すると腫瘍内への ^3H -5-FUの取り込みは対照非加温側に比し約66%増加したが、全身低体温下に腫瘍のみを高温(40℃)に維持すると逆に対照非加温側より約80%低下した。またオートラジオグラフィによる解析での腫瘍組織内銀粒子密度は、各群の放射活性値よりみた ^3H -5-FUの取り込みの程度に一致していた。

2. ハムスターの一側頬嚢にSV40誘発腫瘍細胞を移植し、8実験群に分けて温熱或いは温熱と抗癌剤併用による抗腫瘍効果を検索した。その結果、D.H.処置のみを10時間行なった実験群と、これと同様の条件下に5-FU50mg/kgを併用した実験群のいずれにも腫瘍の消失はみられ

なかったが、後者の実験群では腫瘍の増殖抑制が観察された。更に体温25℃、腫瘍温40℃処置6時間の実験群と、これと同様の条件下に5-FU50mg/kgを併用した実験群においても腫瘍の増殖抑制がみられ、また体温25℃、腫瘍温40℃処置8時間の実験群と、これと同様の条件下に5-FU50mg/kgを併用した実験群では各々20%、80%に腫瘍の消失がみられた。一方処置腫瘍の病理組織学的検索を行なった結果、腫瘍増殖が強く抑制された実験群ほど、処置直後或いは処置後72時間目の腫瘍細胞の病理組織学的変化が大きい傾向を示した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究のご指導、ご校閲を戴きました恩師、岡山大学脳神経外科教授西本詮先生に深甚なる感謝の意を捧げます。また実験腫瘍を供与して下さいました岡山大学医学部癌源研究施設教授小田琢三先生、終始ご助言戴きました当教室の田淵和雄博士はじめ、諸先生、諸氏諸嬢に感謝致します。なお本論文の要旨は、1978年第16回日本癌治療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. 芦川和高, 黒岩卓夫, 佐丸義夫, 井上毅一, 吉田康三, 山崎信夫, 青山俊英, 渋谷尊之: 5-fluorouracilに関する基礎的研究. 癌の臨床13, 412~417, 1967.
2. 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. 臨床神経11, 740, 1971.
3. Baba, T., Aoki, K., Kidera, Y., Kimura, M., Kanematsu, T., Kimura, N. T.: Temporary interruption of regional blood flow combined with local hyperthermia for cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 36, 2146~2152, 1976.
4. Bering, E. A., Taren, J. A., McMurrey, J. D., Bernhard, W. F.: The effect of hypothermia on the general physiology and cerebral metabolism of monkeys in the hypothermic state. *Surg. Gynec. Obst.* 102, 134~138, 1956.
5. Bhuyan, B. K., Day, K. J., Edgerton, C. E., Ogunbase, O.: Sensitivity of different cell lines and of different phase in the cell cycle to hyperthermia. *Cancer Res.* 37, 3780~3784, 1977.
6. Braun, J., Hahn, G. M.: Enhanced cell killing by bleomycin and 43°C hyperthermia and the inhibition of recovery from potentially lethal damage. *Cancer Res.* 35, 2921~2927, 1975.
7. Bruns, P.: Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwulste. *Beitr. Klin. Chir.* 3, 443~466, 1887.
8. Busch, W.: Über den Einfluss welchen Heftigere Erysipeln Zuweilen auf Organisierte Neubildungen

- Ausüben. Verhandl. *Naturh. Preuss. Rhein, Westphal.* 23, 28—30, 1886.
9. Cater, D. B., Silver, I. R., Watkinson, D. A.: Combined therapy with 220Kv roentogen and 10cm microwave heating in rat hepatoma. *Acta. Radiol.* 2, 321—336, 1974.
 10. Cavaliere, R., Ciocatto, E. C., Giovanella, B. C., Heidelberger, C., Johnson, R. O., Margottini, M., Mondovi, B., Moricca, G., Fanelli, A. R.: Selective heat sensitivity of cancer cells. *Cancer* 20, 1351—1381, 1967.
 11. Crile, G.: Heat as an adjunct to the treatment of cancer-Experimental studies. *Cleveland Clin. Quart.* 28, 75—89, 1961.
 12. Crile, G.: Selective destruction of cancers after exposure to heat. *Ann. Surg.* 156, 404—407, 1962.
 13. Crile, G.: The effect of heat and radiation on cancers implanted on the feet of mice. *Cancer Res.* 23, 372—380, 1963.
 14. Coley, W. B.: The treatment of malignant tumors by repeated inoculation of erysipelas-with a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* 105, 487—511, 1893.
 15. Dickson, J. A.: Stimulation of tumor cell dissemination by raised temperature (42°C) in rats with transplanted Yoshida tumors. *Nature* 248, 354—358, 1971.
 16. Dickson, J. A., Sugangar, M.: In vitro-in vivo studies on the susceptibility of the solid Yoshida sarcoma to drugs and hyperthermia. *Cancer Res.* 34, 1263—1274, 1974.
 17. Dickson, J. A., Muckle, D. S.: Total body hyperthermia versus primary tumor hyperthermia in the treatment of the rabbit VX-2 carcinoma. *Cancer Res.* 32, 1916—1923, 1976.
 18. Dickson, J. A., Ellis, H. A.: The influence of tumor volume and heating on the response of the solid Yoshida sarcoma to hyperthermia (40°C—42°C). *Cancer Res.* 36, 1188—1195, 1976.
 19. Dickson, J. A., Shah, S. A., Waggott, D., Whally, W. B.: Tumor eradication in the rabbit by radiofrequency heating. *Cancer Res.* 37, 2162—2169, 1977.
 20. Dushinsky, R.: The synthesis of 5-fluoropyrimidine. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4559—4560, 1957.
 21. Galbratth, W. M., Mellett, L. B.: Disposition of [³H] Actinomycin D in tumor-bearing mice. *Cancer Res.* 36, 1242—1245, 1976.
 22. Gerner, E. W., Connor, W. G., Boone, L. M., Doss, J. D., Mayer, W. G., Miller, R. C.: The potential of localized heating as an adjunct to radiation therapy. *Radiology* 116, 433—439, 1975.
 23. Giovanella, B. C., Lohman, W. A., Heidelberger, C.: Effects of elevated temperatures and drugs on the viability of L1210 leukemia cells. *Cancer Res.* 30, 1623—1631, 1970.
 24. Giovanella, B. C., Morgan, A. C., Stehlin, J. S., Williams, L. J.: Selective lethal effect of supranormal temperatures on mouse sarcoma cells. *Cancer Res.* 33, 2568—2578, 1973.
 25. Hahn, G. M.: Metabolic aspects of the role of hyperthermia in mammalian cell inactivation and their possible relevance to cancer treatment. *Cancer Res.* 34, 3117—3123, 1974.
 26. Harris, M.: Growth and survival of mammalian cells under continuous thermal stress. *Exp. Cell Res.* 56, 382—386, 1969.
 27. Heidelberger, C.: Fluorinated pyrimidines. A new class of tumor-inhibitory compound. *Nature* 179, 663—666, 1957.
 28. Heidelberger, C.: Studies on fluorinated pyrimidines. II effects on transplanted tumors. *Cancer Res.* 18, 305—317, 1958.
 29. 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61, 1973.
 30. 石山俊次, 坂部孝, 潮沙都也, 山形省吾, 般橋渡, 岡本純哉, 小池敏雄, 伊藤正憲, 矢口修, 塩坂雅司,

- 片倉富芳：5-Fluorouracil とその制癌効果。癌の臨床13(3), 139—150, 1967.
31. Johnson, L. G., Newell, R. C.: Temperature-compensated oxygen consumption of subcellular preparations from vertebrate ectotherm, endotherm, and tumor tissue. In *Effects of Temperature on Ectothermic Organisms*. Wieser ed. Springer-Verlag Berlin: pp.107—121, 1973.
32. Kachani, Z. F., Sabin, A. B.: Reproductive capacity and viability at higher temperature of various transformed hamster cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 43, 469—480, 1969.
33. 上田英雄, 開原成允, 飯尾正宏：医学における液体シンチレーション計測法(1)。医学のあゆみ 58, 39—43, 1965.
34. 開原成允, 町田喜久雄, 飯尾正宏, 上田英雄：医学における液体シンチレーション計測法(2)。医学のあゆみ, 58, 159—166, 1965.
35. 開原成允, 町田喜久雄, 飯尾正宏, 上田英雄：医学における液体シンチレーション計測法(3)。医学のあゆみ, 58, 445—449, 1965.
36. 開原成允, 本木達也, 飯尾正宏, 上田英雄：医学における液体シンチレーション計測法(4)。医学のあゆみ, 58, 564—568, 1965.
37. 開原成允, 本木達也, 飯尾正宏, 上田英雄：医学における液体シンチレーション計測法(5)。医学のあゆみ, 58, 680—685, 1965.
38. Kantor, G.: New type of microwave diathermy applicators-comparison of performance with conventional types. *Symposium on Biological Effects and Measurement of Radiofrequency/Microwaves*, pp.230—249, 1977.
39. 片木良典, 横山芳信, 池田幸明, 山田修, 大橋威雄, 有森稔, 田渕和雄, 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回日本癌治療学会抄録, 285, 1974.
40. Kidera, Y., Baba, T.: Blood flow-interrupting hyperthermic chemotherapy on established autochthonous mouse sarcoma induced by 3-methylcholanthrene. *Cancer Res.* 38, 556—559, 1978.
41. 小林忠義, 影山圭三編：病理組織標本の作り方。医学書院。1970.
42. Leveen, H. H., Wapnick, S., Piccone, V., Falk, G., Ahmed, N.: Tumor eradication by radiofrequency therapy. *J. Am. Med. Assoc. (JAMA)* 235, 2198—2200, 1976.
43. Lurie, A. G., Nintzel, B. B., Rippey, R. M.: Vascular volume and perfusion in hamster cheek pouch carcinoma and tumor-bearing cheek pouches. *Cancer Res.* 37, 3484—3489, 1977.
44. Marmor, J. B., Hahn, N., Hahn, G. M.: Tumor cure and cell survival after localized radiofrequency heating. *Cancer Res.* 37, 879—883, 1977.
45. Mendecki, J., Friedenthal, E., Botstein, C.: Effects of microwave-induced local hyperthermia on mammary adenocarcinoma in C3H mice. *Cancer Res.* 36, 2113—2114, 1976.
46. 中井準之助, 山根績, 山田正篤, 井上幸重, 堀川正克編集：組織培養。朝倉書店, pp. 90—99, 1976.
47. 西本 詮：Differential Hypothermia の脳外科への応用。外科37, 638—640, 1975.
48. 西本 詮：脳神経外科学。朝倉書店, pp. 117—120, 1975.
49. 大橋威雄：Differential Hypothermia のハムスター移植腫瘍におよぼす影響について。岡山医学会雑誌, 89, 955—977, 1977.
50. 大星章一, 菅野晴夫編集：人癌細胞の培養。朝倉書店, pp. 44—47, 1975.
51. Palzer, R. J., Heidelberger, C.: Influence of drug and synchrony on the hyperthermic killing of HeLa cells. *Cancer Res.* 33, 422—427, 1973.
52. Popovic, V. P., Masironi, R.: Disappearance of eutermic tumors after 10-hours generalized hypothermia. *Life Sci.* 4, 533—543, 1965.
53. Popovic, V. P., Masironi, R.: Enhancement of 5-fluorouracil action on normothermic tumors by

- generalized hypothermia. *Cancer Res.* **26**, 2353—2356, 1966.
54. Popovic, V. P., Masironi, R.: Effect of generalized hypothermia on normothermic tumors. *Am. J. Physiol.* **211**, 462—466, 1966.
55. Popovic, P., Popovic, V. P.: Protective effects of differential hypothermia. In *Depressed Metabolism*, ed. X. J. Musacchia, and J. F. Sanders, American Elsevier Publishing Company, Inc., New York, pp. 499—524, 1969.
56. Popovic, V. P., Masironi, R., Lehr, R.: Distribution of fluorouracil-2-C in hypothermic animals with normothermic tumors. *Cryobiology* **6**, 87—92, 1969.
57. Rasis, J. E., Kindt, G. W., McGillicuddy, J. E.: The effect of temperature on cerebrovascular resistance and cerebral metabolism in the primate. In *Blood Flow and Metabolism in The Brain*, Churchill Livingstone **11**, pp. 36—37, 1975.
58. Robinson, J. E., Wizenberg, M. J., McCready, W. A.: Combined hyperthermia and radiation suggest an alternative to heavy particle therapy for reduced oxygen enhancement ratio. *Nature* **251**, 521—522, 1974.
59. Robinson, J. E., Wizenberg, M. J., McCready, W. A.: Radiation and hyperthermal response of normal tissue in situ. *Radiology* **113**, 195—198, 1974.
60. ロジャーズ著, 加藤幹夫訳: オートラジオグラフィーの技術. 吉岡書店. 1974.
61. Rohdenburg, G. L.: Fluctuations in the growth of malignant tumors in man, with special reference to spontaneous recession. *Cancer Res.* **3**, 193—225, 1918.
62. Rosomoff, H. L., Holaday, D. A.: Cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption during hypothermia. *Am. J. Physiol.* **179**, 85—88, 1954.
63. Shingleton, W. W., Bryan, F. A., O'Quinn, W. L., Krueger, L. C.: Selective heating and cooling of tissue in cancer chemotherapy. *Ann. Surg.* **156**, 408—416, 1962.
64. Stumpt, W. E., Roth, L. J.: Vacuum freeze drying of frozen sections for dry-mounting, high-resolution autoradiography. *Stain Technol.* **39**, 219—223, 1964.
65. Stumpf, W. E., Roth, L. J.: High resolution autoradiography with dry mounted, freeze-dried frozen sections-Comparative study of six methods using two diffusible compounds ^3H -estradiol and ^3H -mesobilirubinogen. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 274—287, 1966.
66. Stumpf, W. E., Roth, L. J.: Freeze-drying of small tissue samples and thin frozen sections below -60°C -A simple method of cryosorption pumping. *J. Histochem. Cytochem.* **15**, 243—251, 1967.
67. Suit, H. D., Shwayder, M.: Hyperthermia-potential as an anti-tumor agent. *Cancer* **34**, 122—129, 1974.
68. 菅 健: Differential Hypothermia 下における血管透過性亢進に関する研究. 岡山医学会雑誌 **85**, 103—113, 1973.
69. 菅 健, 池田幸明, 山田修, 大橋威雄, 楊 秀雄, 片木良典, 横山芳信, 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.
70. Sutton, C. H.: Effects 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.
71. Tabuchi, K.: Disappearance of tumors induced by adenovirus type 12 after differential hypothermia treatment. *Acta. Med. Okayama* **26**, 39—50, 1972.
72. Tabuchi, K.: Effects of differential hypothermia on experimental brain tumor. *Acta. Med. Okayama* **26**, 65—73, 1972.
73. Tator, C. H.: The uptake of tritiated methotrexate by an experimental glioma. *Cancer Res.* **31**,

- 1600—1605, 1971.
74. Tator, C. H.: Chemotherapy of brain tumors-uptake of tritiated methotrexate by a transplantable intracerebral ependymoblastoma in mice. *J. Neurosurg.* **37**, 1—8, 1972.
75. Tator, C. H.: Retention of tritiated methotrexate in a transplantable mouse glioma. *Cancer Res.* **36**, 3058—3066, 1976.
76. Tator, C. H., Wassenaar, W.: Intraneoplastic injection of methotrexate for experimental brain tumor chemotherapy. *J. Neurosurg.* **46**, 165—174, 1977.
77. Tator, C. H., Wassenaar, W., So, W. S.: Therapy of an experimental glioma with systemic or intraneoplastic methotrexate or radiation. *J. Neurosurg.* **46**, 175—184, 1977.
78. Ushio, Y., Hayakawa, T., Mogami, H.: Uptake of tritiated methotrexate by mouse brain tumors after intravenous or intrathecal administration. *J. Neurosurg.* **40**, 706—716, 1974.
79. Warren, S. L.: Preliminary study of the effect of artificial fever upon hopeless tumor cases. *Am. J. Roentgen.* **33**, 75—87, 1935.
80. Wilkinson, D. S., Crumley, J.: The mechanism of 5-fluorouridine toxicity in Novikoff hepatoma cells. *Cancer Res.* **36**, 4032—4038, 1976.
81. Woodhall, B., Pickrill, K. L., Georgiade, N. G., Mahaley, M. S., Dukes, H. T.: Effect of hyperthermia upon cancer chemotherapy—Application to external cancer of head and face structures. *Ann. Surg.* **151**, 750—759, 1960.
82. 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.
83. 山田修: 家兎 Vx2 移植腫瘍におよぼす Differential Hypothermia の影響(第1編). 岡山医学会雑誌**90**, 33—46, 1978.
84. 山田修: 家兎 Vx2 移植腫瘍におよぼす Differential Hypothermia の影響(等2編). 岡山医学会雑誌**90**, 47—59, 1978.
85. 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回日本外科学会抄録**17**, 1975.
86. 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療法. 第30回日本脳神経外科学会抄録**88**, 1971.

**The effects of heat on the growth
and uptake of anti-cancer agent of tumors implanted
in hamster cheek pouch**

Ikuo MIYAKE

Department of Neurological Surgery, Okayama University Medical School

(Director : Prof. A. Nishimoto)

SV40 induced tumor cells were inoculated to hamster cheek pouches. When the tumor was about 6 mm in diameter, tritiated-5-fluorouracil (^3H -5-FU), $1 \mu\text{Ci/g}$ body weight, was administered intraperitoneally, and the unilateral tumor of each animal was warmed at 37°C or 40°C under total body hypothermia (25°C). The uptake of ^3H -5-FU into the tumors kept at 37°C for 60 minutes increased about 70% as compared with that of the contralateral hypothermic tumor, whereas 80% increase of the uptake was observed with the tumors kept at 40°C for 60 minutes. The uptake of ^3H -5-FU into the tumors of non-treated normothermic animals was higher than that of normothermic tumors under total body hypothermia. Autoradiography revealed that silver grains were diffusely present in the tumor tissue. Their density seemed to increase in parallel with the radioactivity of ^3H -5-FU measured with a scintillation counter. The results suggested that capillary permeability might be increased in normothermic tumors under total body hypothermia, whereas circulatory disturbances might develop in the hyperthermic tumors. In order to estimate the anti-tumor effects of the thermal treatment combined with anti-cancer agents, 5-fluorouracil (5-FU), 50 mg/kg, was administered intraperitoneally, and the unilaterally implanted SV40 induced tumors (about 6 mm in diameter) of hamster cheek pouch were kept at 37°C or 40°C under total body hypothermia (25°C). Thirty days later, the growth of the tumors kept at 37°C for 10 hours combined with 5-FU administration was markedly inhibited as compared with that of non-treated control tumors. As for the tumors kept at 40°C for 8 hours, 20% of the tumors disappeared without 5-FU administration, and 80% of the tumors disappeared with 5-FU administration. It was concluded that hyperthermia (40°C) on the tumor under total body hypothermia had a greater anti-cancer effect than normothermia (37°C).