

# Antitumor Effects of Anticancer Agents and Tumor Necrosis Factor in Combination with/without Hyperthermia on Metastasized Human Bladder Cancer Cells in Chick Embryos

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8415">http://hdl.handle.net/2297/8415</a>

## 鶏卵法によるヒト癌転移巣に対する抗癌剤および腫瘍壊死因子の 抗腫瘍活性ならびに温熱併用効果に関する検討

金沢大学医学部泌尿器科学講座 (主任: 久住治男教授)

李 秀 雄

(平成5年1月4日受付)

受精鶏卵を用いるヒト腫瘍転移実験系により、鶏卵胎児臓器に形成されたヒト腫瘍転移巣に対する温熱化学療法による治療実験を行い、その実験系としての有用性について検討した。さらにこの実験モデルを用いて、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) の転移抑制効果について併せて検討した。孵卵10日目の受精鶏卵漿尿膜上の血管内より、ヒト膀胱癌培養細胞 T24 を  $1 \times 10^6$  個移植し、移植後3日目に抗癌剤投与および温熱処理を行った。TNF 投与は、移植30分後および3日後に行った。移植後7日目の胎児肝より抽出した DNA ( $1 \mu\text{g}$ ) に対して、ヒト  $\beta$ -グロビン遺伝子配列 (576塩基対) に特異的なプライマーを用いて、特異的 DNA 増幅反応 (polymerase chain reaction, PCR) 法およびサザンブロット解析を行った。肝転移巣に対する温熱処理により、加温条件に応じた治療効果が認められ、 $42.5^\circ\text{C}$ 、20分または $43.0^\circ\text{C}$ 、10分の加温により、それぞれ69.2%、82.0%の抗腫瘍効果が認められた。adriamycin (ADM)  $20 \mu\text{g}/\text{egg}$  および温熱 ( $42.5^\circ\text{C}$ 、10分) の単独処理による治療効果は、それぞれ13.5%および26.7%であったのに対し、それらを併用した場合、54.2%と相加効果以上の治療効果が認められた。一方、T24 細胞移植30分後に TNF を  $1 \times 10^5$  単位/egg 投与した場合、76.6%の肝転移抑制効果が認められ、移植3日後に TNF を  $1 \times 10^5$  単位/egg 投与した場合、63.9%の肝転移増殖抑制効果が認められた。移植後3日目に TNF ( $1 \times 10^5$  単位/egg) と温熱 ( $42.5^\circ\text{C}$ 、10分) とを併用した場合、91.9%と相加効果以上の腫瘍増殖抑制効果が認められた。以上の結果より、本実験系は、ヒト腫瘍転移巣に対する温熱化学療法による治療効果を評価する上で有用であることが明らかとなり、さらに TNF の転移抑制効果、および転移巣における腫瘍増殖抑制効果が認められた。

**Key words** chick embryo assay, T24 human bladder cancer cells, metastasis, hyperthermia, tumor necrosis factor

癌治療において、癌の転移は患者の予後を左右する重要な因子の一つである。早期に発見された原発巣に対しては、外科的摘除、放射線療法、温熱療法、癌化学療法あるいはこれらの併用療法により、局所の根治的治療が可能である。しかし、原発巣がある程度増大した段階では、すでに全身的に微小転移巣が存在するものと仮定して、全身療法としての癌化学療法、免疫療法または全身温熱療法などを施す必要がある。従って、癌の根治的治療を目的とする場合には、微小転移の段階で効率的に癌の増殖を抑制し癌の進行を阻止することが重要であり、微小転移巣に対するより有効な治療法の開発が重要な課題となる。

しかし、これまでヒト腫瘍に対する有用な転移実験系が確立されておらず、転移癌の治療に関する研究は少ない。本研究では、迅速、簡便に施行でき、かつ高い腫瘍生着率が得られる鶏卵法を用いて、特異的 DNA 増幅反応 (polymerase chain reaction, PCR) およびサザンブロット解析により、ヒト癌転移巣に対する温熱化学療法の治療実験を行い、その実験系としての有用性について検討した。次いでこのヒト腫瘍転移実験モデルを用いて、サイトカインの一つである腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) の抗腫瘍活性について検討したので併せ

て報告する。

### 材料および方法

#### I. 腫瘍細胞と培養

ヒト膀胱癌培養細胞 T24<sup>1)</sup> は、10% (v/v) 非働化ウシ胎児血清 (GIBCO, Grand Island, USA) を含む RPMI-1640 培地 (日本製薬株, 大阪) 中において  $\text{CO}_2$  濃度 5%,  $37^\circ\text{C}$  で培養した。また、非腫瘍性細胞であるヒト胎児線維芽細胞 KMST-6<sup>2)</sup> は、10% (v/v) 非働化ウシ胎児血清を含む D-MEM 培地 (日本製薬株) 中において同様に培養した。

#### II. 実験動物

宿主動物として用いた受精鶏卵 (ブリマウスロック種 × 白色レグホン種) は岐阜県後藤孵卵場より入手し、湿度70%,  $37^\circ\text{C}$  の孵卵器内で保温した。受精鶏卵の模式図を図1に示し、腫瘍細胞の移植方法を以下に記述する。

孵卵10日目の鶏卵に照明を当て、漿尿膜上の血管の位置を定め、卵殻に回転式のヤスリを用いて  $10 \times 5 \text{mm}$  程度の傷を付け、ピンセットを用いて卵殻を除去した。露出した卵殻膜に流動パラフィンを薄く塗り血管を見易くした後、30ゲージの注射

Abbreviations: ADM, adriamycin; bp, base pair; CAM, chorioallantoic membrane; CBDCA, carboplatin; CDDP, cisplatin; CPM, cyclophosphamide; HPT, hyperthermia; IR, inhibition rate; i. v., intravenous; MMC, mitomycin C;  $\text{OD}_{540}$ , optical density at 540 nm; PCR, polymerase chain reaction; TNF, tumor necrosis factor

針を用いてヒト膀胱癌培養細胞 T24 を血管内より鶏卵 1 個当たり  $1 \times 10^6$  個移植した。孵卵 17 日目に胎児を解剖し、摘出した肝より DNA を抽出した<sup>3)</sup>。

Ⅲ. PCR 法とサザンブロット解析

ヒトに特異的な DNA 配列として  $\beta$ -グロビン遺伝子配列<sup>4)</sup>を選び、PCR プライマー (Hu $\beta$ -1 と Hu $\beta$ -8) およびプローブ (Hu $\beta$ -2) を作製した。これらの PCR プライマーを用いて、各 DNA 1  $\mu$ g を鋳型として、PCR 法<sup>5)</sup>によりヒト  $\beta$ -グロビン遺伝子配列 (576塩基対) を増幅した。その後、<sup>32</sup>P-ATP (Amersham, Greenwich, USA) で 5' 末端を標識した Hu $\beta$ -2 を用いてサザンブロット・ハイブリダイゼーション解析<sup>6)</sup>を行い、オートラジオグラム上の各バンドの放射活性をバイオイメージアナライザー (富士フイルム株, 東京) により測定した (図 2)。PCR 法による増幅反応は 94°C, 1 分の熱変性ステップ, それに続く 55°C, 2 分のアニーリングステップ, そして 72°C, 1 分の伸長反応ステップを 1 サイクルとして, DNA サーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) を使用し 25 回繰返した。

Ⅳ. 抗癌剤および温熱併用による転移巣治療実験

転移巣に対する治療実験を行う場合、腫瘍細胞移植後 3 日目すなわち孵卵 13 日目に、卵殻の別な部位に窓を開け、血管内より薬剤を投与した。用いた薬剤は、adriamycin (ADM), cisplatin (CDDP), carboplatin (CBDCa), mitomycin C (MMC) および cyclophosphamide (CPM) である。薬剤濃度は臨床投与量を参考にし、鶏卵胎児の平均体重 (薬剤投与時で 5.1g) に換算して決定した。温熱処理を行う場合には、孵卵 13 日目の鶏卵を恒温水槽内に保持し全身加温した。

温熱化学療法を行う場合は、孵卵 13 日目にまず薬剤投与を行い、その後 30 分以内に鶏卵を恒温水槽にて加温した。温度測定は、タカラサーミスター D925 (宝工業株, 神奈川) およびセンサー SXX-67 (宝工業株) を用いて、卵黄中心部付近にセンサーを置いて行った。移植後 7 日目に摘出した肝より DNA を抽出し、PCR 法およびサザンブロット解析を行った。

転移巣治療実験における効果判定は、非治療群の PCR 産物を 100% とした場合の治療群での PCR 産物の減少率を比較することにより行った。抗腫瘍効果 (腫瘍増殖抑制率) は次式により求めた。

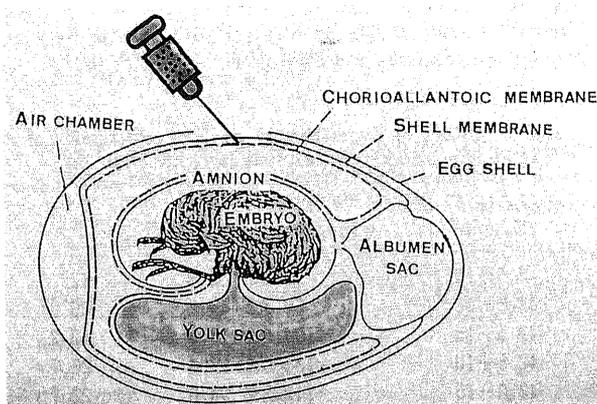


Fig. 1. Schema of the fertilized egg. Tumor cells were injected into the chorioallantoic membrane (CAM) vein of 10-day chick embryos with a 30 gauge needle through the shell membrane.

$$\text{抗腫瘍効果 (\%)} = (1 - T/C) \times 100$$

ただし、T は治療群の放射活性、C は非治療群の放射活性とした。得られた結果は学生 t 検定により統計学的処理を行い、危険率が 5% 以下である場合を有意とした。

V. TNF による試験管内 (in vitro) 温熱併用感受性試験

試験管内における TNF 感受性試験は、Carmichael ら<sup>7)</sup>の方法に準じ、生細胞の脱水素酵素の還元能を指標とする 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 法を用いて行った。使用した TNF (大日本製薬株, 大阪) は、ヒトマクロファージ由来 TNF cDNA を大腸菌で発現させ精製単離した試料 (エンドトキシン含量 10pg/10<sup>6</sup> 単位以下) である。このヒト遺伝子組み換え型 TNF の比活性は、 $2.55 \times 10^6$  単位/mg 蛋白であった。なお、1 単位は L-M 細胞の 50% を障害するのに必要な量である。

T24 細胞を培地中で  $1 \times 10^4$  個/ml に調整し、試験管内にこの細胞懸濁液を 0.9ml 分注し、同時に TNF 希釈液を 0.1ml 加え、37°C 恒温水槽において 30 分振盪した。その後 96 穴培養プレート (Nunc, Illinois, USA) に 1 穴当たり 200  $\mu$ l ずつ分注し、CO<sub>2</sub> 濃度 5%, 37°C で 48 時間培養した。TNF は、最終濃度が  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  および  $1 \times 10^5$  単位/ml になるよう調整した。温熱処理を併用する場合は、試験管内で TNF 処理した後、恒温水槽によって試験管内を加温した。温熱処理は、温度を 42.5°C, 時間を 10 分, 20 分, 30 分および 60 分とした。その後は培養プレートに 1 穴当たり 200  $\mu$ l ずつ分注し、同様に培養した。2  $\mu$ g/ml に調整した MTT 試薬 (Sigma, St. Louis, USA) のリン酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) (和光純薬, 大阪) を 1 穴当たり 25  $\mu$ l 加え、さらに 4 時間培養した。上清を吸引除去し、ジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) (和光純薬) 200  $\mu$ l を加え、生成した MTT フォルマザンを溶解した。各試料は scanning multiwell spectrophotometer (ImmunoReader NJ-2000, 日本インターメッド, 東京) を用いて 540nm における吸光度を測定した。

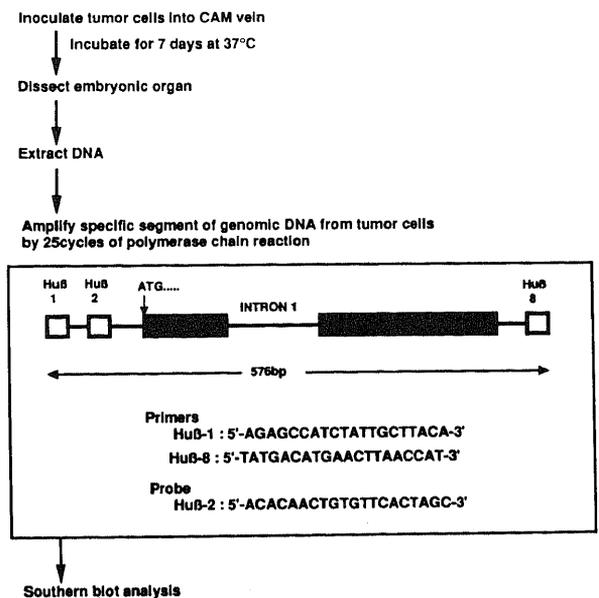


Fig. 2. Detection of metastasized tumor cells in chick embryos.

効果判定 (増殖抑制率) は、対照群の吸光度を100%とした場合の TNF および温熱処理群の吸光度を対照群と比較することにより行った。増殖抑制率の算出方法を次式に示す。

$$\text{増殖抑制率 (\%)} = (1 - T/C) \times 100$$

ただし、Tは TNF および温熱処理群の吸光度、Cは対照群の吸光度とした。得られた結果はスチューデント t 検定により統計学的処理を行い、危険率が 5% 以下である場合を有意とした。

VI. TNF および温熱併用による試験管外 (*in vivo*) 転移巣治療実験

TNF の試験管外における抗腫瘍活性を受精鶏卵を用いて検討した。鶏卵 1 個当たり TNF  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  および  $1 \times 10^6$  単位を漿尿膜上の血管内より投与した。投与は、孵卵10日目の鶏卵に腫瘍細胞移植30分後、および移植3日後の2通りで行った。温熱処理を併用する場合は、孵卵13日目に TNF を投与し、30分後に鶏卵を恒温水槽内に保持し加温した。温熱処理は 42.5°C, 10分とした。孵卵17日目に摘出した胎児肝より DNA を抽出し、PCR 法およびサザンブロット解析により効果判定を行った。



Fig. 3. Kinetics of growth of T24 and KMST-6 cells in embryonic liver after injection into the CAM vein. Two groups of 10-day embryos received either T24 or KMST-6 cells ( $1 \times 10^6$  cells/embryo). Three or four embryos from each group were killed at the stated time (1, 3, 5, and 7 days) after cell inoculation. Embryonic livers were dissected and weighed, and the DNA was extracted. DNA from each embryonic liver was mixed and 1  $\mu$ g of DNA was tested by the polymerase chain reaction (PCR) technique and Southern blot analysis.

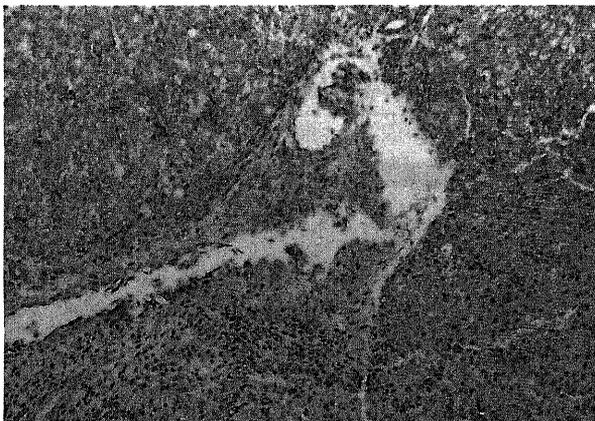


Fig. 4. Photomicrograph of a 13-day embryonic liver showing metastasis of T24 human bladder cancer cells. (hematoxylin and eosin stain,  $\times 100$ )

成 績

I. 鶏卵胎児肝における T24 細胞の経時的増殖動態

ヒト膀胱癌培養細胞 T24, または非腫瘍性のヒト線維芽細胞 KMST-6 を鶏卵漿尿膜上の血管内より  $1 \times 10^6$  個移植し、移植後 1, 3, 5 および 7 日目に胎児肝より DNA を抽出し、PCR 法およびサザンブロット法により解析した。T24 細胞の場合、移植 1 日目から 7 日目まで経時的に増幅 DNA 断片のバンドは増強していた。一方、KMST-6 細胞では、移植後 1 日目より 3 日目まではバンドが認められたが、5 日目より急激に減少し、7 日目では PCR 産物はほとんど検出されなかった (図 3)。また、T24 細胞移植後 3 日目の鶏卵胎児肝の組織学的検索を行った結果、多数の転移巣が確認された (図 4)。これに対して KMST-6 細胞は、移植後 7 日目では組織学的に検出されなかった。

II. 鶏卵胎児肝転移巣に対する温熱療法

T24 細胞移植後 3 日目の鶏卵を恒温水槽内で加温した。対照群と比較し、加温条件に応じた増幅 DNA 断片の減少が認められた (図 5)。42.5°C, 20分および 43.0°C, 10分の加温によって、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が、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 (表 1)。

以下の実験では薬剤との併用効果を検討するため、加温条件を 42.5°C, 10分と low dose に設定した。

III. 鶏卵胎児肝転移巣に対する抗癌剤単独および温熱併用療法

ADM 単独投与および温熱処理併用による治療実験を行った。ADM 20 $\mu$ g/egg 単独投与では、13.5% と治療効果は僅かであったのに対し、42.5°C, 10分の温熱併用により、54.2% と相

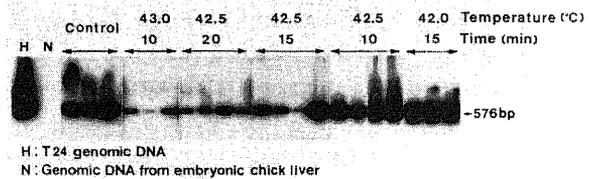


Fig. 5. Effect of hyperthermia (HPT) on liver metastasis of T24 human bladder cancer cells in chick embryos. HPT was performed by immersing each of the eggs 3 days after tumor cell inoculation in a circulating water bath at various temperatures and for various lengths of time.

Table 1. Effect of hyperthermia on liver metastasis of T24 human bladder cancer cells in chick embryos

Temperature—Time (°C, min)	Radioactivity Mean $\pm$ SD (AU/mm <sup>2</sup> )	IR (%)
43.0—10	33.2 $\pm$ 30.3	82.0*
42.5—20	56.7 $\pm$ 49.2	69.2*
42.5—15	104.6 $\pm$ 118.8	43.2
42.5—10	135.0 $\pm$ 27.4	26.7
42.0—15	142.3 $\pm$ 94.0	22.7
control	184.1 $\pm$ 76.3	

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

\* P < 0.01 by Student's t-test

加効果以上の治療効果が認められた(表2).

次に CDDP または CBDCA 単独投与, および温熱処理併用による治療実験を行った. CDDP 10 $\mu$ g/egg または CBDCA 10 $\mu$ g/egg 単独投与では, それぞれ29.1%, 27.3%の抗腫瘍効果が認められ, それらの効果はいずれも温熱併用により増強されなかった(表3).

次いで MMC または CPM 単独投与, および温熱処理併用による治療実験を行った. MMC 10 $\mu$ g/egg 単独投与では58.9%, CPM 250 $\mu$ g/egg および 500 $\mu$ g/egg 単独投与では, それぞれ75.4%, 92.3%, MMC と温熱との併用では, 82.4%の抗腫瘍効果が認められた(表4).

IV. TNF による試験管内感受性試験の結果

温熱単独処理では, いずれの処理時間においても低感受性を示し, 42.5 $^{\circ}$ C, 60分加温にて増殖抑制率が29.4%であった. TNF 単独処理でも, 1 $\times$ 10<sup>3</sup>, 1 $\times$ 10<sup>4</sup> および 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 単位/ml の濃度において, それぞれ26.0%, 24.3%および19.5%と低感受性を示した. 一方, TNF に温熱処理を併用した場合, 42.5 $^{\circ}$ C,

20分以上の併用により, いずれも相加効果以上の殺細胞効果が得られ, 加温時間の延長とともに併用効果の増強が認められた(表5).

V. TNF および温熱併用による試験管外転移巣治療実験の結果

図6に示すように, TNF 単独投与では, 孵卵10日目および

Table 5. Effect of hyperthermia (HPT) and tumor necrosis factor (TNF) on the growth of T24 human bladder cancer cells *in vitro*<sup>a)</sup>

HPT Time (min)	TNF (U/ml)			
	none	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
none		26.0 <sup>b)</sup>	24.3 <sup>b)</sup>	19.5 <sup>b)</sup>
42.5 $^{\circ}$ C-10	6.5 <sup>b)</sup>	28.5 <sup>b)</sup>	32.8 <sup>b)</sup>	19.5
20	10.7 <sup>b)</sup>	39.8 <sup>b)</sup>	43.5 <sup>b)</sup>	38.1 <sup>b)</sup>
30	11.0 <sup>b)</sup>	52.8 <sup>b)</sup>	49.4 <sup>b)</sup>	36.2 <sup>b)</sup>
60	29.4 <sup>b)</sup>	73.2 <sup>b)</sup>	70.9 <sup>b)</sup>	59.6 <sup>b)</sup>

IR (%) = {1 - (OD<sub>540</sub> of treated group) / (OD<sub>540</sub> of control group)}  $\times$  100

a) MTT assay

b) P < 0.01 by Student's t-test

Table 2. Effect of adriamycin (ADM) and hyperthermia (HPT) on liver metastasis of T24 human bladder cancer cells in chick embryos

Drugs ( $\mu$ g/egg)	HPT	
	none	42.5 $^{\circ}$ C-10min
none		26.7
ADM (20)	13.5	54.2*

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

\* P < 0.01 by Student's t-test

Table 3. Effect of cisplatin (CDDP) and carboplatin (CBDCA) with/without hyperthermia (HPT) on liver metastasis of T24 human bladder cancer cells in chick embryos

Drugs ( $\mu$ g/egg)	HPT	
	none	42.5 $^{\circ}$ C-10min
none		24.5
cisplatin (10)	29.1*	33.4*
carboplatin (10)	27.3*	44.5*

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

\* P < 0.05 by Student's t-test

Table 4. Effect of mitomycin C (MMC) with/without hyperthermia (HPT) and cyclophosphamide (CPM) on liver metastasis of T24 human bladder cancer cells in chick embryos

Drugs ( $\mu$ g/egg)	HPT	
	none	42.5 $^{\circ}$ C-10min
none		18.6
MMC (10)	58.9*	82.4*
CPM (250)	75.4*	-
CPM (500)	92.3*	-

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

\* P < 0.05 by Student's t-test

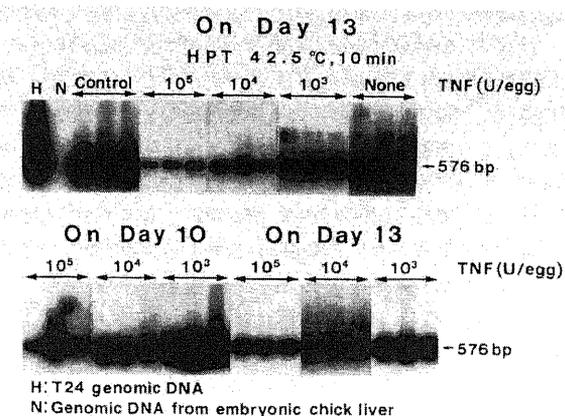


Fig. 6. Effect of hyperthermia (HPT) and tumor necrosis factor (TNF) on liver metastasis of T24 human bladder cancer cells in chick embryos. Injection of TNF was performed either 30 min, or 3 days after tumor cell inoculation (on day 10, 13 after incubation). Administration of TNF combined with HPT was carried out 3 days after the inoculation (on day 13).

Table 6. Effect of hyperthermia (HPT) and tumor necrosis factor (TNF) on liver metastasis of T24 human bladder cancer cells in chick embryos

TNF (U/egg)	HPT		
	none		42.5 $^{\circ}$ C-10min
	Day 10	Day 13	Day 13
10 <sup>3</sup>	9.0	22.3*	41.9*
10 <sup>4</sup>	62.0*	49.8*	78.8*
10 <sup>5</sup>	76.6*	63.9*	91.9*
none			22.3

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

\* P < 0.01 by Student's t-test

13日目 (Day 10 および Day 13) とともに投与量に応じて PCR 産物のバンドが減弱していた。温熱処理を併用した場合、TNF の投与量に応じてバンドの減弱が認められた。孵卵10日目、T24 細胞移植後30分に TNF を投与した場合、 $1 \times 10^4$  および  $1 \times 10^5$  単位/egg 投与にて、それぞれ62.0%および76.6%と腫瘍細胞の肝転移抑制効果が認められた。孵卵13日目、移植後3日目に TNF を投与した場合、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$  および  $1 \times 10^5$  単位/egg 投与にて、それぞれ22.3%、49.8%および63.9%の肝転移増殖抑制効果が認められた。移植後3日目に TNF 投与および42.5℃、10分の温熱処理を併用した場合には、TNF の  $1 \times 10^4$  および  $1 \times 10^5$  単位/egg 投与にて、それぞれ78.8%、91.9%と相加効果以上の肝転移増殖抑制効果が認められた (表6)。

### 考 察

1912年 Murphy<sup>9)</sup> は、鶏卵漿尿管上に移植腫瘍組織が生着し、増殖することを初めて見出した。1954年には、ヒト類上皮癌 HEp-3 細胞の鶏卵漿尿管上あるいは卵黄内への移植により、肝、後腎、肺、脳などの鶏卵胎児臓器に転移することが見出され、同時にナイトロジェンマスタードによる治療実験が行われ、転移腫瘍の増殖抑制が報告された<sup>9)</sup>。

受精鶏卵を用いる場合、実験可能期間が7日間と短いため鶏卵胎児臓器における転移巣が肉眼的に確認されることは稀である。従って、転移巣の検出は組織学的検索に頼らねばならず、受精鶏卵を転移実験モデルとして広く応用するには定量性に問題があった。鶏卵胎児臓器中のヒト腫瘍細胞を特異的に検出するには、ヒト腫瘍細胞に特異的なマーカーを見出すことが重要である。Endo ら<sup>10)11)</sup> は、ヒトに特異的な DNA 配列としての  $\beta$ -グロビン遺伝子配列を PCR 法を用いて増幅することにより、鶏卵胎児臓器中のヒト腫瘍転移細胞を特異的に検出できることを報告した。本研究では、Endo らの方法を用いてヒト膀胱癌培養細胞 T24 の微小転移巣に対する温熱化学療法による治療効果について検討した。

鶏卵胎児肝におけるヒト膀胱癌培養細胞 T24 の増殖動態を調べた結果、PCR による増幅 DNA 断片のバンドは移植後経時的に増強していた。一方、非腫瘍性の KMST-6 細胞では、移植後1日目より3日目までバンドが認められたが、5日目より急激に減少し、7日目ではほとんど検出されなかった。すなわち、非腫瘍性の KMST-6 細胞は、鶏卵胎児肝では増殖できないが、高転移性の T24 細胞は単に肝に捕捉されただけではなく、肝に生着し、増殖して転移巣を形成することが確認された。以上より、PCR 法を用いることによって鶏卵胎児肝におけるヒト腫瘍転移細胞を定量的かつ特異的に検出できることが確認された。

次に温熱療法による治療実験を行った。試験管内では、T24 細胞は温熱に対して低感受性であることが判明した。試験管外では、加温条件に応じた抗腫瘍効果が認められ、42.5℃、20分および43.0℃、10分の加温によって、それぞれ69.2%および82.0%の腫瘍増殖抑制効果が認められた。試験管外において高い腫瘍増殖抑制効果が認められた理由として、温熱により腫瘍血管が閉塞、出血、うっ滞することにより、腫瘍内の低酸素、低 pH 状態を引き起こし細胞死を促進することが知られており<sup>12)</sup>、試験管外では温熱により腫瘍血管の障害が起きるためと考えられた。

次いで抗癌剤および温熱処理併用による治療実験では、ADM と温熱との併用により相加効果以上の腫瘍増殖抑制効果が認められ、MMC と温熱処理との併用ではほぼ相加効果に相当する抗腫瘍効果が認められた。一方、CDDP および CBDCA では、単独投与と比較し温熱による有意な増強効果は認められなかった。ADM や bleomycin は、温熱によりその作用が増強される代表的な薬剤であるが、その作用機序としては、1) 加温により細胞膜の透過性が高まり薬剤の細胞内濃度が高められる、2) 加温により、薬剤による細胞の潜在的致死効果からの回復が阻止される、ためとされる<sup>13)14)</sup>。CDDP は比較的低い加温によりその作用が増強される薬剤<sup>15)</sup> であるが、今回の実験結果はそれに反しており、T24 細胞の温熱感受性が低いこと、CDDP に対する感受性が低いことなどがその原因と考えられた。また Ohno ら<sup>16)</sup> は、ラットの側腹部皮下に線維肉種を移植した実験系において、CBDCA 投与に温熱処理を併用した場合、CBDCA 単独と比較し、その治療効果が3~4倍増強されたと報告しているが、本実験では温熱併用による有意な増強効果は認められなかった。

次に本法を用いて、TNF の抗腫瘍活性について検討した。TNF は、1975年 Carswell ら<sup>17)</sup> により、カルメット・ゲランウーシ型結核菌 (bacille Calmette Guérin, BCG) とエンドトキシンで処理したマウスの血清中に発見された抗腫瘍因子で、腫瘍細胞に特異的にしかも種を越えて細胞障害ないし増殖阻止作用を示す<sup>18)19)</sup> ことより、興味ある生物反応修飾物質 (biological response modifiers, BRM) として注目されている。従来、TNF の試験管外における効果は、移植腫瘍の原発巣に対する壊死あるいは腫瘍退縮の程度で表現されてきたが、1984年渡辺ら<sup>20)21)</sup> は、マウスに B-16 メラノーマ細胞を移植する人工転移実験系を用いて、TNF 投与を腫瘍細胞静注20分後、およびすでに微小転移巣の形成された2日後の2通りで行い、3週間後に肺表面転移結節数を数えた結果、著明な肺転移抑制効果を示し、また組織学的検索では転移巣以外の肺組織には壊死像、炎症細胞浸潤などの所見は認められなかったと報告した。本研究では、鶏卵漿尿管上の血管内より TNF を投与し、TNF の抗腫瘍活性を肝転移抑制効果、および肝転移巣に対する増殖抑制効果の面から検討した。

試験管内における実験結果から、T24 細胞は TNF に対して低感受性であることが判明したが、TNF に温熱処理を併用した場合、加温時間の延長とともに併用効果の増強が認められた。試験管外において、まず T24 細胞移植後30分に TNF を投与した段階では、腫瘍細胞は肝の血管内に存在し、まだ転移巣を形成しておらず、 $1 \times 10^4$  および  $1 \times 10^5$  単位/egg 投与にて、それぞれ62.0%および76.6%の抗腫瘍効果が認められたことより、TNF による腫瘍細胞の肝転移抑制効果が判明した。さらに移植後3日目に TNF を投与した段階では、すでに肝に微小転移巣を形成していることより、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$  および  $1 \times 10^5$  単位/egg 投与にて、それぞれ22.3%、49.8%および63.9%の肝転移巣に対する増殖抑制効果が明らかとなった。これらの抑制効果はいずれも TNF の投与量に応じて増強された。一方、移植後3日目に TNF 投与に温熱処理を併用した場合、TNF の  $1 \times 10^4$  および  $1 \times 10^5$  単位/egg 投与にて、それぞれ78.8%、91.9%と増殖抑制効果が相加効果以上に増強された。TNF および温熱併用による抗腫瘍性増強効果の作用機序<sup>22)23)</sup> として、1) 加温による TNF の細胞内への取り込みの増加、2) TNF の

細胞障害に対する修復機能の阻害, 3) 細胞周期特異性の相補的作用, 4) 加温による TNF の腫瘍血管障害性の増強, 5) 加温による TNF のライソゾーム蛋白分解酵素の活性化および活性酸素発生の増強, などが考えられ, 試験管内および試験管外の実験結果から, 腫瘍血管障害性の増強がより密接に関与しているものと推察された。

温熱療法に関して, これまで特別な副作用は報告されておらず, TNF と温熱療法との併用は, 副作用の軽減のみならず, その効果を増強する意味で有用な方法と考えられた。温熱療法では温度測定のために腫瘍内に直接温度センサーを刺入しており, これを用いることにより容易に TNF を腫瘍局所に投与<sup>24)</sup>することが可能であり, 静脈内投与時にみられる発熱や血圧低下などの副作用を軽減できるものと考えられる。

以上の結果より, 本鶏卵法は, 簡便で効率の良い, いわゆる普及型のヒト腫瘍転移実験モデルとして, ヒト腫瘍微小転移巣を特異的かつ定量的に検出することが可能であり, 温熱化学療法による転移巣治療実験に適用可能であることが明らかとなった。また, TNF の抗腫瘍活性として, 腫瘍細胞の肝転移抑制効果および肝転移巣における腫瘍増殖抑制効果が認められた。

## 結 論

1. 試験管内では, T24 細胞は温熱に対して低感受性を示した。試験管外では, 温熱治療によって, 加温条件に応じた肝転移巣増殖抑制効果が認められた。

2. ADM と温熱療法との併用によって, 相加効果以上の抗腫瘍効果が認められた。CDDP, CBDCA は, 温熱療法併用による増強効果が認められなかった。MMC と温熱療法との併用によって高い抗腫瘍効果が認められたが, 温熱併用による相乗性効果は認められなかった。

3. 試験管内では, T24 細胞は TNF に対して低感受性を示した。一方, TNF に温熱処理を併用した場合, 相加効果以上の増殖抑制効果が認められた。試験管外では, TNF 単独投与によって, T24 細胞の肝転移抑制効果, および肝転移巣における腫瘍増殖抑制効果が認められた。TNF と温熱療法との併用によって, 肝転移巣に対して相加効果以上の高い抗腫瘍効果が認められた。

4. 本鶏卵法は簡便, 迅速かつ定量性に優れたヒト腫瘍転移実験モデルとして, 温熱化学療法の基礎実験に適用可能であり, TNF の抗腫瘍活性を検討する上でも有用であることが明らかとなった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, 懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師久住治男教授に深甚なる謝意を表します。また, 多大なる御協力と御鞭撻を賜りました金沢大学がん研究所化学療法部佐々木琢磨教授に深く感謝いたします。また, 本研究の遂行に際し, 御協力を頂きました打林忠雄講師, 國見一人先生, および終始直接御指導下さいました金沢大学がん研究所化学療法部遠藤良夫先生に心より感謝いたします。さらに, 多大なる御協力を賜りました金沢大学医学部泌尿器科学講座諸兄, ならびに金沢大学がん研究所化学療法部の皆様にも厚く御礼申し上げます。

尚, 本論文の一部は, 第80回日本泌尿器科学会総会(1992年東京), 日本ハイパーサーミア学会第9回大会(1992年金沢), 第51回日本癌学会総会(1992年大阪)において発表した。

## 文 献

1) Bubenick, J., Perlmann, P., Helmstein, K. &

Moberger, G.: Cellular and humoral immune responses to human urinary bladder carcinomas. *Int. J. Cancer*, 5, 310-319 (1970).

2) Namba, M., Nishitani, K., Hydo, F., Fukushima, F. & Kimoto, T.: Neoplastic transformation of human diploid fibroblasts (KMST-6) by treatment with <sup>60</sup>Co gamma rays. *Int. J. Cancer*, 35, 275-280 (1985).

3) Davis, L. G., Dibner, M. D. & Battey, J. F.: *Basic Methods in Molecular Biology*, p42-43, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 1986.

4) Lawn, R. M., Efstratiadis, A., O'Connell, C., & Maniatis, T.: The nucleotide sequence of the human  $\beta$ -globin gene. *Cell*, 21, 647-651 (1980).

5) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491 (1988).

6) Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517 (1975).

7) Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. & Mitchell, J. B.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, 47, 936-942 (1987).

8) Murphy, J. B.: Transplantability of malignant tumors to the embryos of a foreign species. *J. Am. Med. Assoc.*, 59, 874-875 (1912).

9) Dagg, C. P., Karnofsky, D. A., Toolan, H. W. & Roddy, J.: Serial passage of human tumors in chick embryo: Growth inhibition by nitrogen mustard. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 87, 223-227 (1954).

10) Endo, Y., Sasaki, T., Harada, F. & Noguchi, M.: Specific detection of metastasized human tumor cells in embryonic chicks by the polymerase chain reaction. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81, 723-726 (1990).

11) Endo, Y., Seiki, M., Uchida, H., Noguchi, M., Kida, Y., Sato, H., Mai, M. & Sasaki, T.: Experimental metastasis of oncogene-transformed NIH 3T3 cells in chick embryo. *Jpn. J. Cancer Res.*, 83, 274-280 (1992).

12) Song, C. W., Kang, M. S., Rhee, J. G. & Levitt, S. H.: The effect of hyperthermia on vascular function, pH, and cell survival. *Radiology*, 137, 795-803 (1980).

13) Hahn, G. M., Braun, J. & Har-Keder, I.: Thermochemotherapy: Synergism between hyperthermia (42-43°C) and adriamycin (or bleomycin) in mammalian cell inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 937-940 (1975).

14) 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).

15) Meyn, R. E., Corry, P. M., Fletcher, S. E. & Demetriades, M.: Thermal enhancement of DNA damage in mammalian cells treated with cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res.*, 40, 1136-1139 (1980).

- 16) Ohno, S., Siddik, Z. H., Baba, H., Stephens, L. C., Strelbel, F. R., Wondergem, J., Khokhar, A. R. & Bull, J. M. C.: Effect of carboplatin combined with whole body hyperthermia on normal tissue and tumor in rats. *Cancer Res.*, 51, 2994-3000 (1991).
- 17) Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. & Williamson, B.: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 3666-3670 (1975).
- 18) Helson, L., Green, S., Carswell, E. A. & Old, L. J.: Effect of tumor necrosis factor on cultured human melanoma cells. *Nature*, 258, 731-732 (1975).
- 19) Matthews, N. & Watkins, J. F.: Tumor necrosis factor from the rabbit. I. Mode of action, specificity and physicochemical properties. *Br. J. Cancer*, 38, 302-309 (1978).
- 20) 渡辺直樹, 新津洋司郎, 曾根久雄, 根田 寛, 石垣聖史, 漆崎一郎: Tumor Necrosis Factor (TNF) による肺転移抑制効果について. *日癌治*, 19, 1049-1054 (1984).
- 21) Niitsu, Y., Watanabe, N., Umeno, H., Sone, H., Neda, H., Yamauchi, N., Maeda, M. & Urushizaki, I.: Synergistic effects of recombinant human tumor necrosis factor and hyperthermia on *in vitro* cytotoxicity and artificial metastasis. *Cancer Res.*, 48, 654-657 (1988).
- 22) Watanabe, N., Niitsu, Y., Umeno, H., Kuriyama, H., Neda, H., Yamauchi, N., Maeda, M., & Urushizaki, I.: Toxic effect of tumor necrosis factor on tumor vasculature in mice. *Cancer Res.*, 48, 2179-2183 (1988).
- 23) Yamauchi, N., Watanabe, N., Maeda, M., Okamoto, T., Sasaki, H., Tsuji, N., Tsuji, Y., Umeno, H., Akiyama, S. & Niitsu, Y.: Mechanism of synergistic cytotoxic effect between tumor necrosis factor and hyperthermia. *Jpn. J. Cancer Res.*, 83, 540-545 (1992).
- 24) Amano, T., Kunimi, K., Nakashima, K., Uchibayashi, T. & Hisazumi, H.: A combined therapy of hyperthermia and tumor necrosis factor for nude mice bearing KK-47 bladder cancer. *J. Urol.*, 144, 370-374 (1990).

**Antitumor Effects of Anticancer Agents and Tumor Necrosis Factor in Combination with/without Hyperthermia on Metastasized Human Bladder Cancer Cells in Chick Embryos** Soo-Woong Lee, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 102, 10—16 (1993)

**Key words** chick embryo assay, T24 human bladder cancer cells, metastasis, hyperthermia, tumor necrosis factor

#### Abstract

This study was carried out to evaluate whether the chick embryo assay system could serve as an *in vivo* model for the preliminary investigation of chemohyperthermia on human tumor metastasis. Anti-metastatic effects of tumor necrosis factor (TNF) were also examined in this system. Human bladder cancer cells, T24 ( $1 \times 10^6$  cells/egg), were inoculated into the chorioallantoic membrane (CAM) vein of 10-day chick embryos. Hyperthermia (HPT) was performed, following injection of drugs into the CAM vein 3 days after tumor cell inoculation. Intravenous (i. v.) administration of TNF was carried out either 30 min or 3 days after the inoculation. The embryonic livers were dissected 7 days after the inoculation, and DNA of the embryonic livers was extracted. The DNA ( $1 \mu\text{g}$ ) was tested by the polymerase chain reaction (PCR) technique with the specific primers for the human  $\beta$ -globin gene (576 bp), and Southern hybridization method. Hyperthermic therapy showed inhibitory effects on the growth of metastasized T24 cells in a thermal dose-dependent manner. The antitumor effects of HPT at  $42.5^\circ\text{C}$ -20 min and  $43.0^\circ\text{C}$ -10 min were 69.2% and 82.0%, respectively. HPT ( $42.5^\circ\text{C}$ -10 min) alone and adriamycin (ADM)  $20 \mu\text{g}/\text{egg}$  alone showed 26.7% and 13.5% tumor growth inhibition, respectively. Combination therapy of ADM and HPT revealed an enhanced inhibitory activity (54.2% inhibition) on the growth of metastasized T24 cells. I. v. injection of TNF at  $1 \times 10^5$  units/egg showed 76.6% anti-metastatic effects, when administered 30 min after the inoculation. When administered 3 days after the inoculation, TNF at  $1 \times 10^5$  units/egg in combination with HPT ( $42.5^\circ\text{C}$ -10 min) revealed 91.9% tumor growth inhibition, whereas TNF alone at the same dose showed 63.9%. A synergistic inhibition of metastatic tumor growth by the combination of TNF and HPT was observed. The results obtained suggest that this system can be useful for evaluating the effects of chemohyperthermia on metastasized human tumor cells and that TNF has a preventive effect on metastasis and an inhibitory effect on metastatic tumor growth. Inhibition of tumor metastasis by TNF was greatly enhanced with hyperthermia.