A Fundamental Study on Cytotoxic Effects of the Combined Therapy of Hyperthermia and Chemotherapy on Sarcoma Cells

金沢大学十全医学会雑誌　第97巻　第5号　974－988（1988）

肉腫細胞に対する温熱・化学療法併用効果の基礎的研究

金沢大学医学部整形外科学講座（主任：野村　進教授）
青　竹　康　雄
（昭和63年10月17日受付）

温熱療法は，単独にあるいは他の治療法と併用して癌の治療に応用されつつある．しかし，四肢の骨軟部肉腫に対しては実験的にも臨床的にも報告が少なく，未だに一般的な治療法となっていない．本研究では，肉腫細胞の温熱感受性ならびに温熱と制癌剤との併用に対する感受性を調べ，四肢の骨軟部肉腫への温熱療法および温熱化学療法の導入の可能性を検討することを目的とした．材料としては肉腫株細胞3株（OST株，HT-1080株，S-180株）と臨床新鮮材料38検体を用いた．効果判定には臨床効果との相関性が高い制癌剤感受性試験として注目されている human tumor clonogenic assay（HTCA）を更に当教室で改良した cultivated HTCA を用いた．細胞浮遊液を恒温槽にて加温し同時に制癌剤と接触させると，株細胞では温度（37°C～45°C）の上昇，加温時間（30分～240分）の延長とともに細胞生存率は低下した．3株の Arrhenius プロットを比較すると OST 株，HT-1080株に比べ S-180株の温熱感受性は低値を示した．制癌剤と温熱とを併用した場合，アドリアマイシン（adriamycin, ADM），シスプラチン（cis-platinum, CDDP），サイクロフォスファマイド（cyclophosphamide, CPA）では相乗効果を認め，ビンクリスチン（vincristine, VCR）では相加効果を認めた．またその効果発現の温度は株細胞および制癌剤により多少異なった．臨床新鮮材料で感受性判定可能であった27検体においてコロニー形成抑制率をみると，42°C加温と制癌剤とを併用した場合，各制癌剤とも制癌剤単独の場合と比べ有意にコロニー形成抑制率が高まった（$p<0.05$）．43°C加温と制癌剤との併用の場合では併用効果は42°C加温の場合と比べ更にコロニー形成抑制率が高まった（$p<0.05$）．以上より，温熱療法，特に制癌剤と併用した温熱化学療法は肉腫細胞においても有意な殺細胞効果が認められ，加温方法の問題が解決されれば臨床応用にも充分な期待がもてるものと考えられた．

Key words bone and soft tissue sarcoma, human tumor clonogenic assay, hyperthermia, thermosensitivity, thermochemosensitivity

近年，温熱療法を単独にあるいは他の治療法と併用して悪性腫瘍の治療に用いることが注目され，実験的・臨床的に多くの報告がなされつつある．しかし四肢の骨軟部悪性腫瘍（肉腫）に対しては，一見，温熱療法が行い易いと思われるにもかかわらずほとんど用いられていない．その大きな理由は特に四肢の長管骨では，骨皮質の電気抵抗が高いために深部にまで有効な加温が得られないことや，骨髄腔内は血液環流が豊富で熱が奪われ有効な温度を維持できないこと，また四肢の骨軟部肉腫は症例数が少ないため温熱療法そのものの有効性を示すまとまった基礎データーがないことなどによると思われる．一方，骨軟部肉腫の予後は最近の強力な化学療法の導入によりしだいに改善されつつあるが，制癌効果を期待するあまり薬剤の投与量，投与期間を増すことになり，その副作用のため投与中止を余儀なくされることも多い．したがって，制癌剤の抗腫瘍効果を減弱させることなくその投与量を削減することの可能な他の治療法との併用療法の研究が望

Abbreviations: ADM, adriamycin; CDDP, cis-platinum; C×T, concentration-time product; CPA, cyclophosphamide; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FCS, fetal calf serum; HI, heat-inactivated; HTCA, human tumor clonogenic assay; MFH,

まれている.

当教室のTomitaら[1]は，骨軟部肉腫に対する制癌剤感受性試験として，Hamburgerら[2]によるHuman Tumor Clonogenic Assay（HTCA）を改良したcultivated HTCAを開発し，これが臨床との相関性の高い方法であることを実証した.

そこで著者は，このcultivated HTCAを用い，肉腫培養株細胞および肉腫臨床材料に対する温熱感受性を温熱と制癌剤とを併用した場合の感受性と比べ，温熱化学療法が骨軟部肉腫に対する新しい治療手段の一つとなりうるかどうかについて検討した.

材料および方法

I．材　料

実験に使用した材料は，株細胞として当教室で樹立，継代培養されているヒト骨肉腫由来の培養細胞（OST株[3]）と，ヒト線維肉腫由来の培養細胞（HT-1080株[4]）（Flow Laboratories, North Ryde, Australia）ならびに，マウス肉腫由来の培養細胞（S-180株[5]）（Flow Labratories）である．また臨床新鮮材料としては過去2年間に当教室にて生検ならびに手術にて得られた骨軟部肉腫38検体を用いた．その内訳は，骨肉腫11例，軟骨肉腫6例，悪性線維性組織球腫5例，脂肪肉腫5例，ユーイング肉腫3例，平滑筋肉腫2例，悪性神経鞘腫2例，悪性骨巨細胞腫，横紋筋肉腫，類上皮肉腫，滑膜肉腫各1例である.

II．株細胞の培養条件及び単離細胞浮遊液の調製法

株細胞は，プラスチック製フラスコ（Corning，東京，#25,100または#25,110）内で15% heat-inactivated（HI）fetal calf serum（FCS）および1%ペニシリン・ストレプトマイシン（penicillin /streptomycin solution, PS）10,000 units（Gibco, New York, USA）を含むRoswell Park Memorial Institute Media-1640（RPMI-1640）培養液を用いて単層培養維持を続けた．これを温熱処理ならびに制癌剤と接触させる際には，0.025%トリプシンと0.02% ethylenediaminetetraacetic acid（EDTA）により単離細胞浮遊液の状態にして用いた（図1）.

III．臨床新鮮材料からの単離細胞浮遊液の調製法

腫瘍材料をPSを含む培養液〔McCoy's 5A（Gibco）wash〕内で，できるだけ速やかに無菌的にハサミで細切した．その後，酵素カクテル〔Hank's balanced salt solution（Gibco）＋コラゲナーゼtype I（Sigma, St. Louis, USA）0.2mg/ml，DNase（Sigma）0.2mg/ml，プロナーゼ（科研製薬，東京）0.5mg/ml〕にて37°C，30分間処理した後，ステンレス製メッシュ（50メッシュ）にて材料をろ過して単離細胞浮遊液を作成した.

肉腫細胞はHTCAにおいてコロニー形成率が低いという欠点を補うために，肉腫細胞を一旦単層培養系に移行してcell populationを増加させたうえでHTCAを行った（cultivated HTCA）．まず単離腫瘍細胞を一旦プラスチック製フラスコ内に5×10^3〜5×10^4個播種し，RPMI-1640培養液（15% HI-FCS＋1% PS）を用いて，37°Cで単層培養した．1〜2回の継代培養により腫瘍細胞がシート状になった時点で，0.025%トリプシンと0.02%EDTAにより再び単離細胞浮遊液を作成した（図1）.

IV．腫瘍細胞に対する温熱処理法

II，IIIにて得られた浮遊細胞を3×10^6個/mlの細胞浮遊液とし，これの0.5mlに0.15mlの制癌剤または対照液としての生理的食塩水とMcCoy's 5A wash 0.85mlを加えキャップ付試験管（Corning, #25319）中で恒温槽BT-23型（ヤマト科学，東京，温度調節精度±0.02〜0.08°C）浸浴にて加温を行った．加温の温度範囲は，株細胞では37〜43°Cの1°C毎に（温熱単独では37〜45°C），臨床材料では42°Cおよび43°Cの2点とした．また加温の時間は．株細胞では30，60，120，180，240分間とし，臨床材料では60分間とした．なお恒温槽に入れた後試験管内の浮遊液が43°Cに達するには約5分間を要した.

V．腫瘍細胞と制癌剤との接触及び温熱との併用方法

使用した制癌剤は，骨軟部肉腫の化学療法に頻用されているアドリアマイシン（adriamycin, ADM），シスプラチン（cis-platinum, CDDP），サイクロフォスファマイド（cyclophosphamide, CPA），ビンクリスチン（vincristine, VCR）である．Masked compoundであるCPAは活性型4-hydroperoxy cyclophosphamide（4OH-CPA）を用いた.

制癌剤濃度は，通常臨床的に投与された時の最高血中濃度および$C\times T$（concentration-time product，血中濃度と時間の積）の約10%とした．すなわちADM $0.04\mu g/ml$，CDDP $0.20\mu g/ml$，CPA 3.00

---

malignant fibrous histiocytoma; 4OH-CPA, 4-hydroperoxy cyclophosphamide; PE, plating efficiency; PS, penicillin-streptomycin solution; RPMI-1640, Roswell Park Memorial Institute Media-1640; VCR, vincristine.

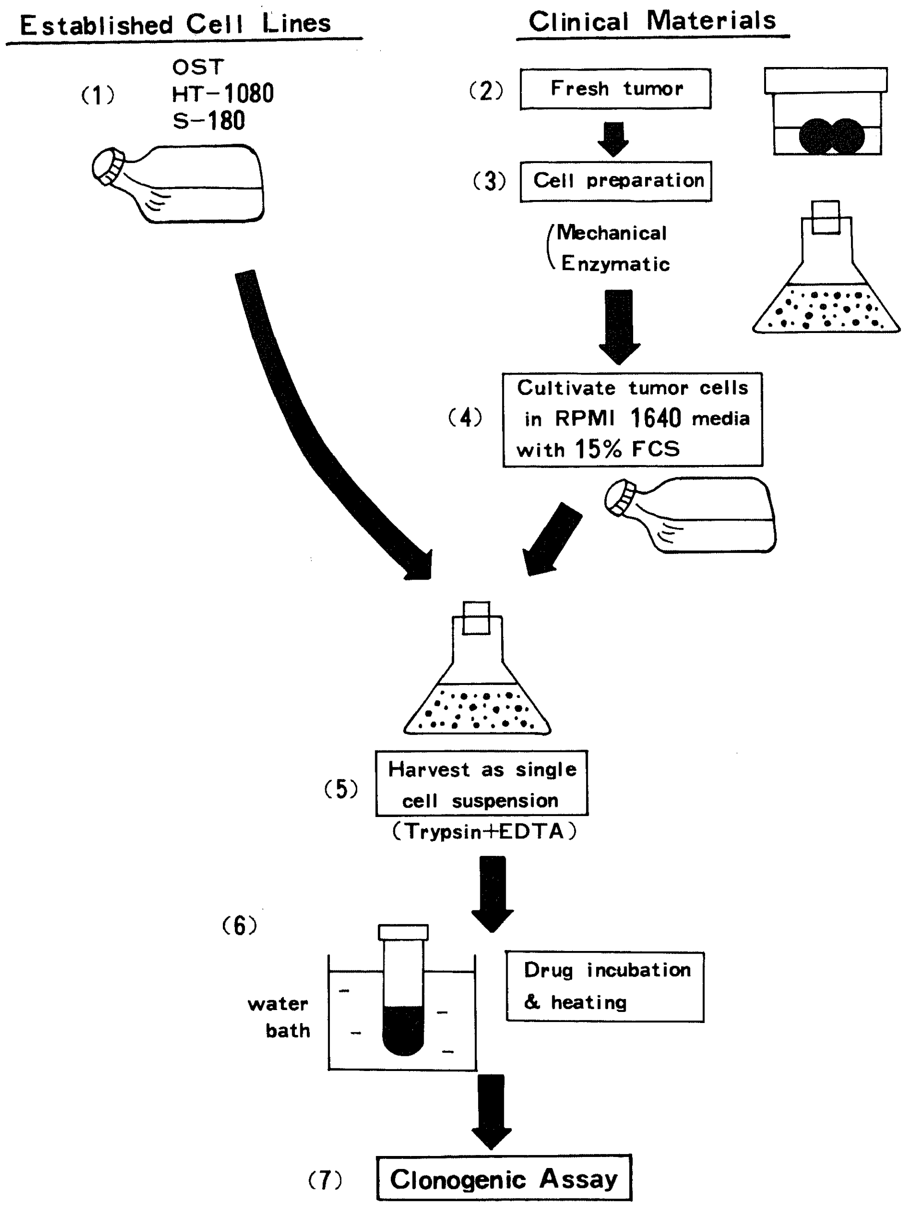


Fig. 1. Methods of thermochemosensitivity test for bone and soft tissue sarcomas.

1. Established cell lines were kept in RPMI-1640 medium with 15% fetal calf serum (FCS).
2. Fresh tumor specimens were obtained from biopsy or surgery.
3. A single cell suspension was prepared by mechanical and enzymatic disruption of the tumor.
4. The tumor cells were cultured in RPMI-1640 medium with 15% fetal calf serum (FCS) until a cell sheet formed in the bottle.
5. The cells were harvested as a refined single cell suspension by trypsin and EDTA.
6. The tumor cells were incubated in test tubes with or without drugs and heated by immersion in precision thermostatically controlled water bath.
7. The thermochemosensitivity of the tumor cells was evaluated by human tumor clonogenic assay.

μg/ml，VCR 0.01μg/mlの濃度を用いた．この濃度は，腫瘍内濃度にはほぼ一致することが証明されている[6)7)]．対照として生理的食塩水を用いた．温熱と制癌剤の接触は全て同一時期，同一時間とし，温熱処理後ただちに制癌剤を洗浄除去した．

VI．コロニーの算定と同定

温熱ならびに制癌剤処理した腫瘍細胞を Tomitaら[1)]の cultivated HTCA に準じ，5×10[5]個ずつ二重寒天培地に播種し，37°C水蒸気飽和状態で7.0〜7.5% CO_2を含んだ培養器で培養した．尚，各条件ごとに3デイッシュずつの二重寒天培地を作成し，株細胞では各条件の実験を5回繰り返して行った．

細胞播種後，株細胞では4〜6日目に，臨床材料では6〜8日目に細胞集塊の形成がみられ，10〜21日目でコロニー（50個以上の腫瘍細胞から成る細胞集団）の観察が可能となった．培養終了後，倒立顕微鏡にてコロニー数を算定した．また，形成されたコロニーが腫瘍細胞から成ることを Papanicolaou 染色により確認した．

VII．対照群におけるコロニーの評価

対照群（37°C生理的食塩水処理群）において，1デイッシュあたり30個以上のコロニー形成がみられたものを『感受性判定可能』とした．またコロニー形成率（plating efficiency, PE）は，

$$\mathrm{PE}(\%)=\frac{\text{形成されたコロニー数}}{\text{播種細胞数（}5\times10^5\text{個/デイッシュ）}}\times100$$

で表現した．

VIII．コロニー形成細胞の温熱感受性ならびに制癌剤併用による感受性の評価

腫瘍細胞の温熱感受性および制癌剤併用による感受性は，コントロール群と比較し，細胞生存率（percent survival）およびコロニー形成抑制率（percent colony inhibition）で表現した．

細胞生存率（%）

$$=\frac{\text{温熱，制癌剤処理群のコロニー数}}{\text{コントロール群のコロニー数}}\times100$$

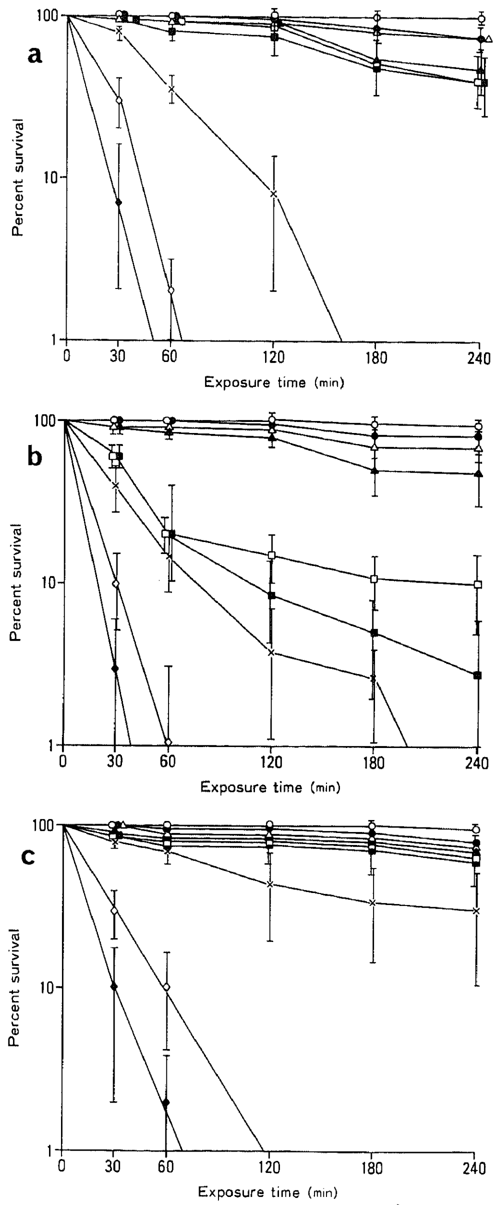
コロニー形成抑制率（%）

$$=\left(1-\frac{\text{温熱，制癌剤処理群のコロニー数}}{\text{コントロール群のコロニー数}}\right)\times100$$

また，温熱と制癌剤の相乗効果の判定は，Valerioteら[8)]の判定基準に準じ，温熱制癌剤併用の場合の細胞生存率の値が，温熱ならびに制癌剤単独の場合の細胞生存率の積より小さいときに相乗効果があるとした．

IX．統計学的検定法

コロニー形成抑制率（%）はすべて mean±SD で表した．多群の抑制率の差の検定は分散分析後 Duncan



Control

Fig. 2.　Survival as a function of duration of heating at 37〜45°C for sarcoma cells heated in vitro without drugs.　(a),OST; (b), HT-1080; (c), S-180 cell line.
The percent survival rates at each temperature represent the means (±SD) for five individual experiments and are illustrated by different symbols: ○, 37°C; ●, 38°C; △, 39°C; ▲, 40°C; □, 41°C; ■, 42°C; ×, 43°C; ◇, 44°C; ◆, 45°C.

の多重比較法を用い，p<0.05 を有意とした．

成　　績

I．コロニー形成について（コントロール群）

1．株細胞におけるコロニー形成

OST株，HT-1080株，S-180株におけるコロニー形成率は，それぞれ0.21±0.08%，0.38±0.15%，0.51±0.18%と高率であった．

2．臨床材料におけるコロニー形成

38検体の骨軟部肉腫症例において，27検体(71.1%)で感受性の判定が可能であった．その内訳は，骨肉腫7例，軟骨肉腫5例，ユーイング肉腫3例，悪性線維性組織球腫5例，平滑筋肉腫2例，脂肪肉腫1例，悪性骨巨細胞腫1例，横紋筋肉腫1例，類上皮肉腫1例，滑膜肉腫1例であり，悪性神経鞘腫は2例とも判定不能であった．またコロニー形成率は0.0212±0.0114%であった．

II．温熱ならびに温熱・化学療法併用による感受性

1．株細胞に対する効果

1）温熱感受性

3株の温熱単独での感受性を比較すると，株によって温熱感受性が異なっていた．各温度での細胞生存率を図2a～c に示した．たとえば42°C60分処理，43°C60分処理の条件での細胞生存率を比較すると，OST 株

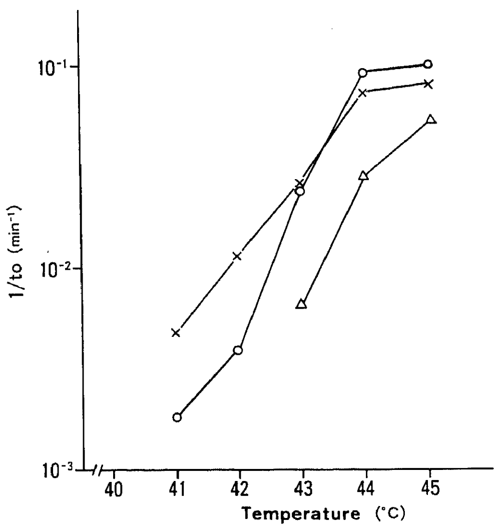


Fig. 3. Arrhenius plots of OST, HT-1080 and S-180 cell lines from the survival curves shown in Fig. 2.
The t_0 value is the exposure time for 37% of cells were killed.
○, OST ; ×, HT-1080 ; △, S-180.

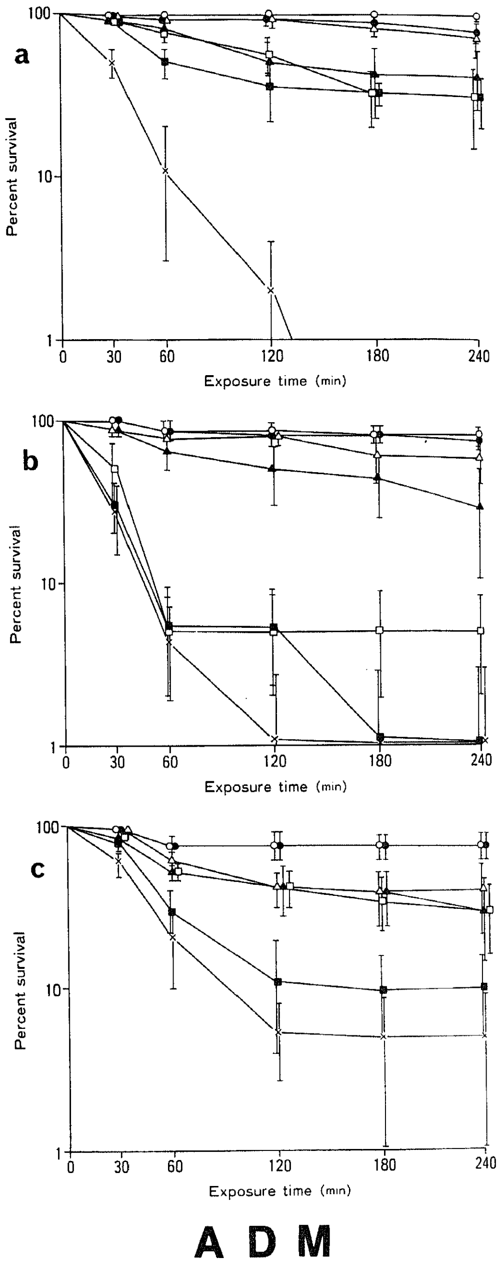


Fig. 4. Survival as a function of duration of heating at 37～43°C for sarcoma cells heated in vitro with ADM. (a),OST ; (b), HT-1080 ; (c), S-180 cell line.
The percent survival rates at each temperature represent the means (±SD) for five individual experiments and are illustrated by different symbols : ○, 37°C ; ●, 38°C ; △, 39°C ; ▲, 40°C ; □, 41°C ; ■, 42°C ; ×, 43°C.

では80.1%，34.8%，HT-1080 株では20.7%，15.7%，S-180 株では 75.5%，72.4%であった．この細胞生存率曲線において，各温度ごとに生存率を 1/e すなわち37%に下げるのに必要な加温時間 (t_0: 平均致死加温時間) を求めた．その逆数 $1/t_0$ は温熱感受性を示す一つの指標となり，各温度ごとに $1/t_0$ の値を示すと図 3 のようになった（Arrhenius プロット[9]）．OST 株，HT-1080 株に比べ S-180 株は低い温熱感受性を示した．

2）温熱と制癌剤併用による感受性

i) 温熱と ADM との併用効果

ADM 単独（37°C60分処理）での細胞生存率は，OST 株，HT-1080 株，S-180 株にて各々 95.5%，85.1%，75.1%と S-180 株細胞に与える影響が大きかった．温熱と ADM との併用による相乗効果は，OST 株では38°C，39°Cの低温域では認められなかったが，40°C～42°Cでは60分以降より，43°Cでは30分以降より認められた（図 4a）．HT-1080 株でも相乗効果は38°C，39°Cでは認められず，40°Cでは60分以降より，41°C～43°Cでは30分以降より認められた（図4b）．S-180 株では相乗効果は38°Cでは認められなかったが，39°C～42°Cでは60分以降より，43°Cでは30分以降より認められ，特に42°C以上での相乗効果が強かった（図 4c）．

ii) 温熱と CDDP との併用効果

CDDP 単独（37°C60分処理）での細胞生存率は，OST 株75.5%，HT-1080 株90.1%，S-180 株82.4%であり，CDDP は OST 株に対する殺細胞効果が強かった．温熱と CDDP との併用での相乗効果は，OST 株では38°Cでは認められなかったが，39°Cでは120分以降に，40°Cでは60分以降に，41°C～43°Cでは30分以降に認められ，39°C以降温度の上昇とともに相乗効果が高まった（図 5a）．HT-1080 株では相乗効果は38°Cでは認められず，39°Cでは180分以降に，40°Cでは60分以降に，41°C～43°Cでは30分以降に認められた（図5b）．S-180 株では相乗効果は38°Cでは認められなかったが，39°C，40°Cでは60分以降に，41°C～43°Cでは30分以降に認められ，39°Cの低温域でも相乗効果が強かった（図 5c）．

iii) 温熱と CPA との併用効果

CPA 単独（37°C60分処理）での細胞生存率は，OST 株55.7%，HT-1080 株92.0%，S-180 株71.2%であり，CPA も OST 株に対する殺細胞効果が強かった．温熱と CPA との併用での相乗効果は，OST 株では38°Cでは認められなかったが，39°C～43°Cでは30分以降全てで認められた（図 6a）．HT-1080 株でも相乗

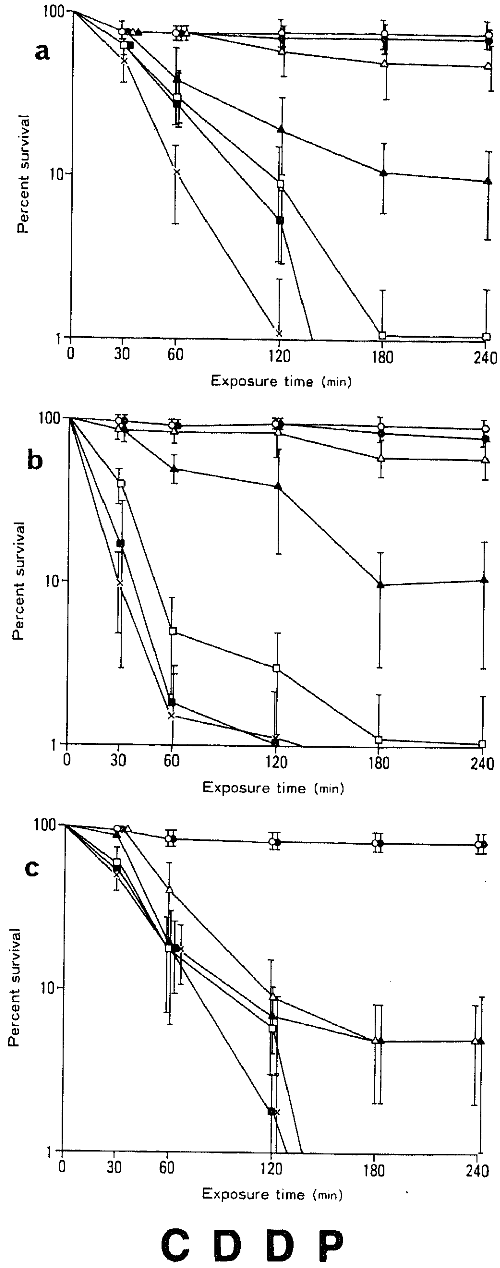


Fig. 5. Survival as a function of duration of heating at 37～43°C for sarcoma cells heated in vitro with CDDP. (a),OST ; (b), HT-1080 ; (c), S-180 cell line.
The percent survival rates at each temperature represent the means (±SD) for five individual experiments and are illustrated by different symbols : ○, 37°C ; ●, 38°C ; △, 39°C ; ▲, 40°C ; □, 41°C ; ■, 42°C ; ×, 43°C.

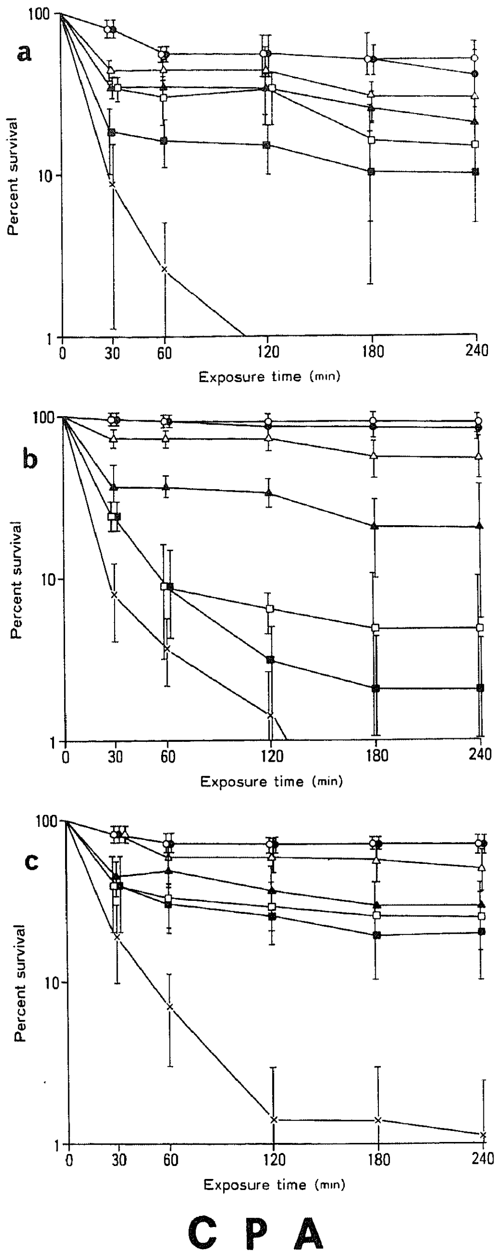


Fig. 6. Survival as a function of duration of heating at 37～43°C for sarcoma cells heated in vitro with CPA. (a),OST ; (b), HT-1080 ; (c), S-180 cell line.
The percent survival rates at each temperature represent the means (±SD) for five individual experiments and are illustrated by different symbols: ○, 37°C ; ●, 38°C ; △, 39°C ; ▲, 40°C ; □, 41°C ; ■, 42°C ; ×, 43°C.

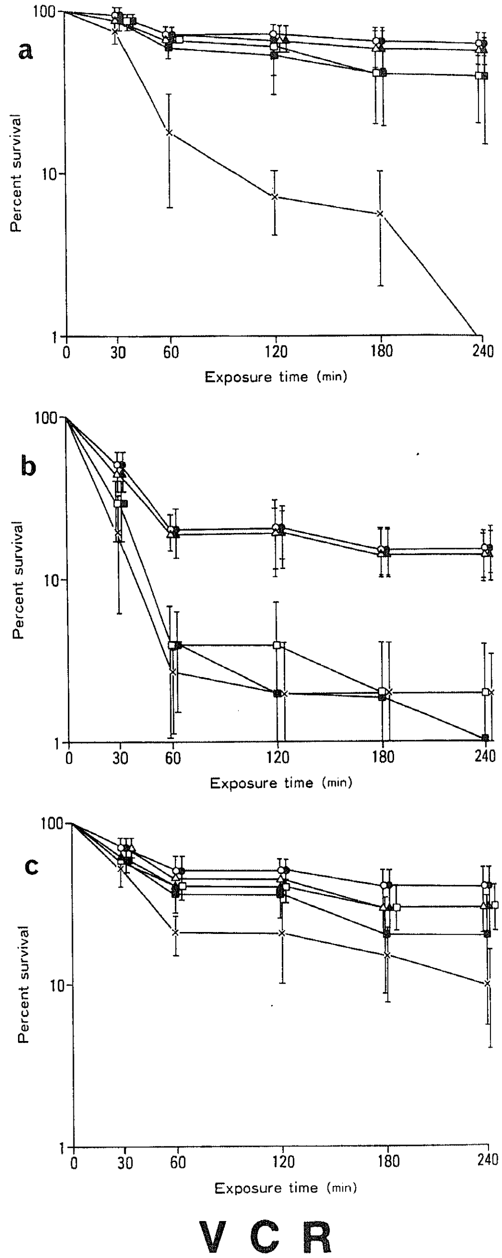


Fig. 7. Survival as a function of duration of heating at 37～43°C for sarcoma cells heated in vitro with VCR. (a),OST ; (b), HT-1080 ; (c), S-180 cell line.
The percent survival rates at each temperature represent the means (±SD) for five individual experiments and are illustrated by different symbols: ○, 37°C ; ●, 38°C ; △, 39°C ; ▲, 40°C ; □, 41°C ; ■, 42°C ; ×, 43°C.

Table 1. Thermochemosensitivity of bone and soft tissue sarcomas

Case	Type of tumor[a)]	Age	Sex[b)]	Site of primary tumor[c)]	PE[d)] (%)	Sensitivity of drug and heat[e)]													
						37℃				42℃					43℃				
						ADM	CDDP	CPA	VCR	None	ADM	CDDP	CPA	VCR	None	ADM	CDDP	CPA	VCR
1	Osteosarcoma	14	M	DF	0.0224	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
2	Osteosarcoma	17	M	DF	0.0321	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−
3	Osteosarcoma	18	M	DF	0.0225	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	+	+	+	−
4	Osteosarcoma	21	M	PFi	0.0127	−	−	−	−	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+
5	Osteosarcoma	36	F	PH	0.0260	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−
6	Osteosarcoma	40	M	Iliac bone	0.0278	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−
7	Osteosarcoma	56	F	Sacral bone	0.0092	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	Osteosarcoma	12	M	PT	no growth														
9	Osteosarcoma	20	M	DF	no growth														
10	Osteosarcoma	21	M	PFi	no growth														
11	Osteosarcoma	26	M	DT	no growth														
12	Chondrosarcoma	3	M	TS	0.0107	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+
13	Chondrosarcoma	30	F	PF	0.0084	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	+	+	+	+
14	Chondrosarcoma	53	F	DF	0.0064	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	+	+	+	+
15	Chondrosarcoma	70	M	DF	0.0238	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
16	Chondrosarcoma	70	M	DF	0.0356	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+
17	Chondrosarcoma	55	M	PT	no growth														
18	Ewing's sarcoma	16	F	Rib	0.0246	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−
19	Ewing's sarcoma	16	M	FS	0.0330	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
20	Ewing's sarcoma	17	M	Iliac bone	0.0136	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+	−
21	MFH(bone)	25	M	PT	0.0086	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	+	+
22	MFH(bone)	43	M	Pubic bone	0.0248	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	+	+	+	−
23	MFH(bone)	46	M	DF	0.0530	−	−	−	−	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+
24	MFH(bone)	70	M	DF	0.0144	−	−	+	−	−	−	+	+	−	−	−	+	+	−
25	MGCT	29	F	Pubic bone	0.0284	−	−	+	−	−	+	+	+	−	−	+	+	+	−
26	MFH(soft tissue)	66	F	Thigh	0.0169	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−
27	Liposarcoma	56	F	Thigh	0.0072	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	+	+	+	+
28	Liposarcoma	41	F	Thigh	0.0048														
29	Liposarcoma	47	M	Thigh	no growth														
30	Liposarcoma	51	M	Buttock	no growth														
31	Liposarcoma	62	M	Thigh	no growth														
32	Leiomyosarcoma	65	M	Buttock	0.0213	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+	+	+	+
33	Leiomyosarcoma	77	F	Buttock	0.0120	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
34	Rhabdomyosarcoma	39	M	Back	0.0277	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+
35	Epithelioid sarcoma	43	M	Thigh	0.0334	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	+	+	−
36	Synovial sarcoma	67	F	Thumb	0.0312	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+
37	Malignant schwannoma	39	M	Spinal cord	no growth														
38	Malignant schwannoma	71	F	Calf	no growth														

a) MFH, malignant fibrous histiocytoma; MGCT, malignant giant cell tumor; b) M, male; F, female; c) PH, proximal humerus; PF, proximal femur; FS, femoral shaft; DF, distal femur; PT, proximal tibia; TS, tibial shaft; DT, distal tibia; PFi, proximal fibula; d) Plating efficiency, Number of colonies/number of nucleated cells plated × 100%; e) +, Percent colony inhibition ≧ 70%; −, Percent colony inhibition < 70%.

Table 2. Percent colony inhibition rates of clinical specimens in each drug and heat (mean±SD).

	Control(37℃)	42℃	43℃
None	0	26.7±15.8*	43.7±23.3*+
ADM	34.5±20.7	53.0±22.1*	66.9±23.4*
CDDP	36.6±22.1	62.1±14.5*	74.3±15.9*+
CPA	38.3±23.8	61.6±15.9*	76.0±11.7*+
VCR	26.5±18.4	45.6±14.7*	60.0±19.6*+

*, $p < 0.05$ vs control; +, $p < 0.05$ vs 42℃ by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison.

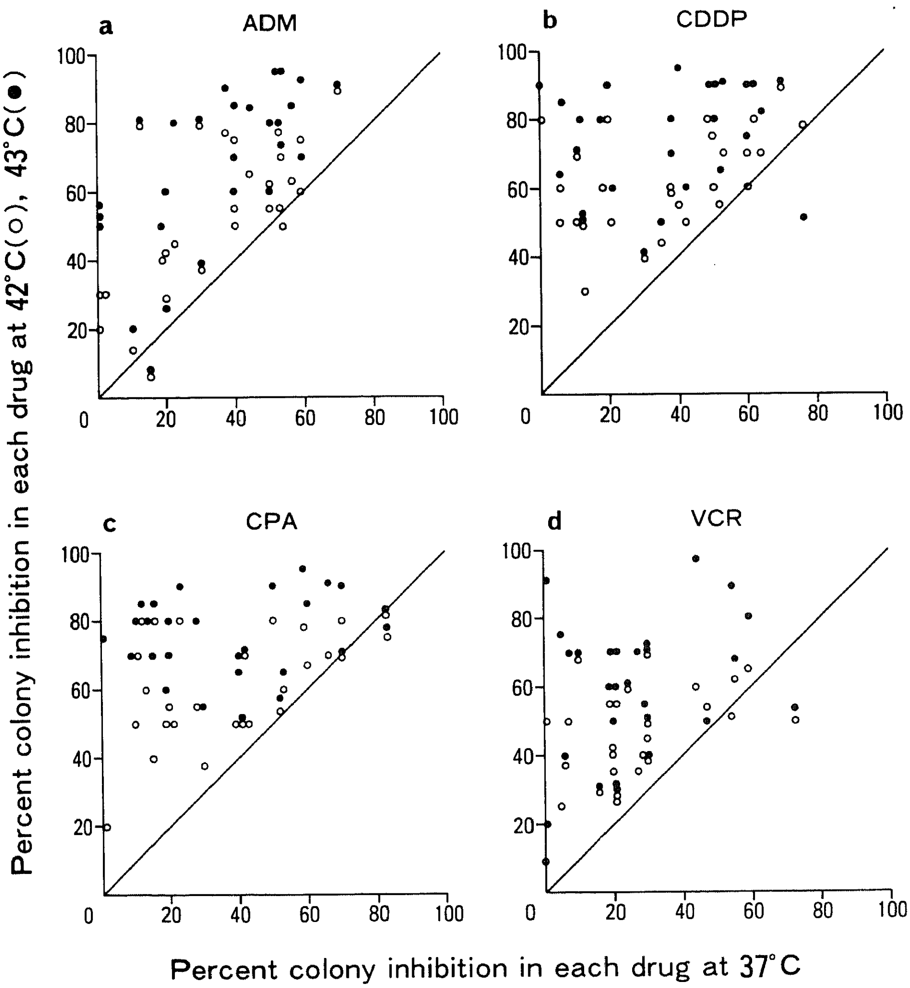


Fig. 8. Correlation between the percent colony inhibition rates of clinical specimens in each drug at 42°C and 43°C and those in each drug at 37°C. (a), ADM ; (b), CDDP ; (c), CPA ; (d), VCR. ○,42°C ; ●, 43°C.

効果は38°Cでは認められなかったが，39°C～43°Cでは30分以降より全てで認められた（図6b）．S-180 株では相乗効果は38°Cでは認められなかったが，39°Cでは60分以降，40°C～43°Cでは30分以降より認められた（図6c）．つまり CPA では，39°C以上の温熱にてしかも短時間処理でも相乗効果が出現した．

iv) 温熱と VCR との併用効果

VCR 単独（37°C60分処理）での細胞生存率は，OST 株71.1%，HT-1080 株20.7%，S-180 株50.5%であり，VCR は HT-1080 株に対する殺細胞効果が強かった．温熱と VCR との併用では，OST 株，HT-1080 株および S-180 株の 3 株すべてで43°Cまでの加温では温度上昇とともに細胞生存率は低下し相加効果は認めたが相乗効果を示すには至らなかった（図7a, b, c）．

2．臨床新鮮材料に対する温熱及び制癌剤併用効果（表1, 2）

感受性判定可能であった27検体において，制癌剤単独でのコロニー形成抑制率は，ADM，CDDP，CPA，VCR で各々 34.5±20.7%，36.6±22.1%，38.3±

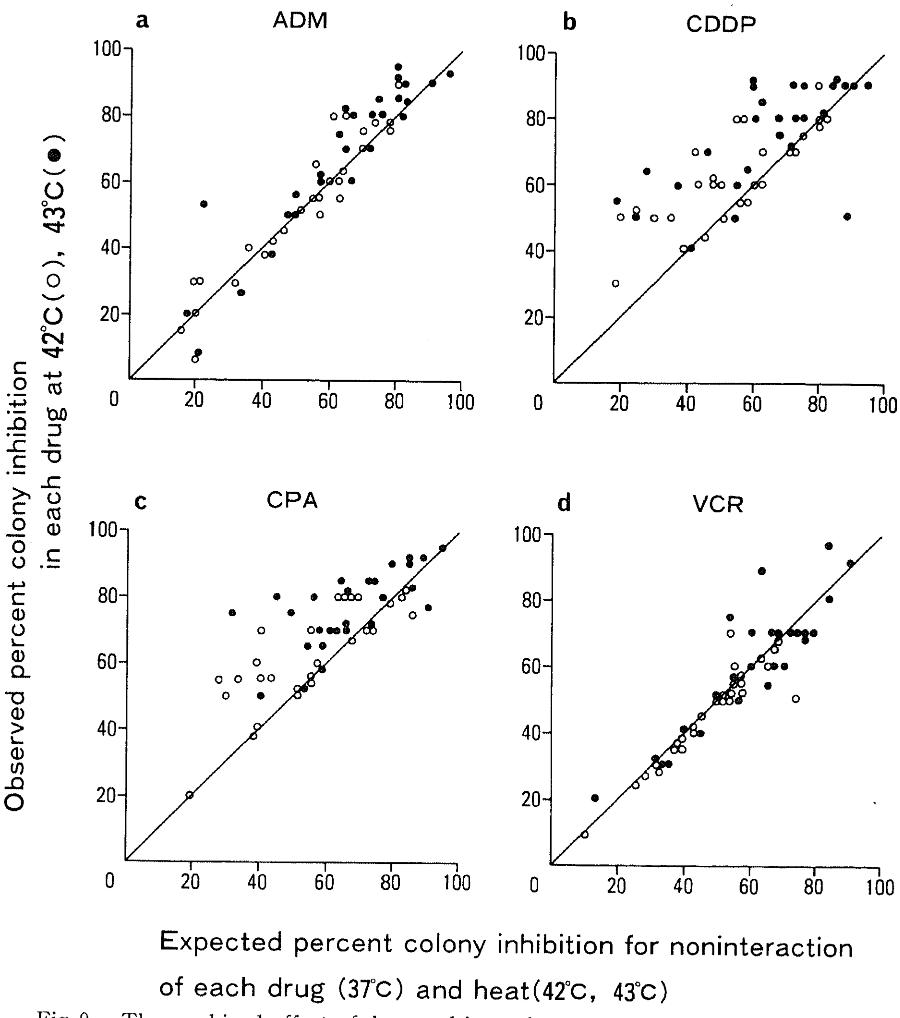


Fig. 9. The combined effect of drug and hyperthermea.
The percent colony inhibition rates observed in each drug at 42°C or are compared with the rates expected for the independent action of each drug and hyperthermia alone.
(a), ADM ; (b), CDDP ; (c), CPA ; (d), VCR. ○,42°C ; ●, 43°C.

23.8%，26.5±18.4%であり，70%以上の高いコロニー形成抑制率を示したのは ADM 1検体（3.7%），CDDP 2検体（7.4%），CPA 4検体（14.8%），VCR 1検体（3.7%）であった．臨床肉腫細胞に対し今回検討した制癌剤およびその使用濃度では CPA が最も感受性が高かった．

一方温熱単独での感受性をみると，42°C加温，43°C加温におけるコロニー形成抑制率は各々26.7±15.8%，43.7±23.3%であり，42°Cに比べ43°Cにおいて有意に感受性が高かった（$p<0.05$）．また70%以上のコロニー形成抑制率を示したのは，42°C加温で0検体（0%），43°C加温で3検体（11.1%）であった．

温熱と制癌剤併用の感受性をみると，42°C加温と ADM，CDDP，CPA，VCR との併用によるコロニー形成抑制率は，各々53.0±22.1%，62.1±14.5%，61.6±15.9%，45.6±14.7%であり各制癌剤とも制癌剤単独の場合と比べ有意にコロニー形成抑制率が高まった（$p<0.05$）．70%以上のコロニー形成抑制率を示したのは ADM 8検体（29.6%），CDDP 11検体（40.7%），CPA 12検体（44.4%），VCR 1検体（3.7%）であった．また43°C加温と制癌剤との併用では，ADM 66.9±23.4%，CDDP 74.3±15.9%，CPA 76.0±11.7%，VCR 60.0±19.6%であり各制癌剤とも制癌剤単独の場合と比べ，また ADM を除く3剤では42°C加温と制癌剤併用の場合と比べそれぞれ有意にコロニー形成抑制率が高まった（$p<0.05$）．70%以上のコロニー形成抑制率を示したのは ADM 16検体（59.3%），CDDP 18検体（66.7%），CPA 22検体（81.5%），VCR 12検体（44.4%）であった．制癌剤単独の場合と，42°C，43°Cの温熱と制癌剤を併用した場合のコロニー形成抑制率を各検体毎に比較したのが図8である．各制癌剤ともほとんどの検体において温熱により感受性が高まっていた．一方併用効果については図9の如く，42°C，43°Cの温熱と制癌剤を併用した場合において，その効果が相乗効果ではなく相加効果のみであると仮定した場合のコロニー形成抑制率を実測の値と各検体毎に比較した．その結果，42°C加温と制癌剤の併用において相乗効果を認めたものは ADM 9検体（33.3%），CDDP 15検体（55.6%），CPA 13検体（48.1%），VCR 3検体（11.1%）であり，43°C加温と制癌剤との併用において相乗効果を認めたものは ADM 18検体（66.7%），CDDP 20検体（74.1%），CPA 21検体（77.8%），VCR 8検体（29.6%）であった．つまり相乗効果は CDDP，CPA において，また42°Cより43°Cにおいて顕著であった．

考　　察

近年，組織培養法の進歩により温熱の細胞に対する生物効果が定量的に分析されるようになり，特に42°C～44°Cといった人体に適用可能な領域で，悪性腫瘍細胞が正常細胞よりも温熱感受性が高いという報告[10)11)]がなされ，また Woodhall ら[12)]や Crile[13)]により，局所加温と化学療法あるいは放射線療法との併用で抗腫瘍効果をみた臨床例が報告された．つづいて Cavaliere ら[14)]により四肢の悪性腫瘍に対する加温血液灌流による臨床報告がなされ，Stehlin[15)]により melphalan と加温血液灌流の併用療法で悪性黒色腫に対する優れた治療成績が報告された．そこで癌集学的治療法の一つとして温熱療法が注目され，基礎的臨床的研究が盛んに行われるようになってきた．そして現在，腹部外科，泌尿器科を中心に臨床応用化されつつある．しかし整形外科領域では，四肢の骨軟部肉腫に対しては温熱療法は未だ新しい治療法として取り入れられていない．その大きな理由として次の3点が挙げられる．①四肢の長管骨では骨皮質の電気抵抗が高いために，電磁波による加温が骨髄腔内まで十分に及ばないこと，②骨髄腔内では血液が貯留し環流を受けるため熱が奪われ一定な有効温度に維持できないこと，③四肢の骨軟部肉腫は症例数が少なく，その温熱感受性および温熱化学感受性についての基礎データは一般的な癌の温熱療法の実験結果ならびに臨床報告のなかでごく一部含まれているに過ぎず，温熱療法の有効性が不明確であったことなどである．一方骨軟部肉腫の治療成績は，最近の強力な化学療法の導入により次第に改善しつつあるとはいえ，現在使用されている制癌剤やその投与量では十分な局所制圧と転移予防ができない症例は尚多い．そこで現存の制癌剤の効果をより増強させる方法の開発が切望されている．その一方法として放射線治療があげられるが骨軟部肉腫は放射線抵抗性のものが多い[16)]ので併用療法としてはあまり期待できない．そこで，温熱療法，特に化学療法と併用した温熱化学療法を骨軟部肉腫に導入するのも一方法であろう．

著者は四肢の骨軟部肉腫に対する温熱化学療法を臨床応用する前段階として，今回肉腫細胞に対する温熱ならびに温熱と制癌剤併用の抗腫瘍効果について基礎的研究を行った．まず肉腫細胞の温熱感受性を検討するために，肉腫の代表的な株細胞3種に対して加温処理を行いその細胞生存率を求めた．加温処理の温度，時間と細胞生存率の関係をみてみると，3株細胞とも加温温度の上昇，加温時間の延長とともに細胞生存率

が低下した．また3株のArrhenius プロットを描いて各株の温熱感受性を比較してみると，OST 株とHT-1080 株に比べ S-180 株の感受性は低い結果となった．つまり細胞株により温熱に対する感受性が異なった．Raaphorst ら[17]は7癌腫細胞株にて，またMiyakoshi[18]は4癌腫細胞株にて各々温熱感受性を比較し細胞株間において差があることを報告しているが，肉腫の3株の間でも同じく差があるという結果を得た．また他の癌腫細胞株の Arrhenius プロット[19]と比較してみると肉腫と癌腫との差異は認められなかった．

温熱療法の抗腫瘍性と有効温度については，Muckle ら[20]，Overgaard[21]，Hofer ら[22]は担癌動物において恒温槽による加温によりそれぞれ抗腫瘍性を認め，抗腫瘍性のみられる温度範囲として41～43°Cを報告している．また Miyakoshi ら[23]もチャイニーズ・ハムスター V-79 細胞の生存率は43°Cを越えると急速に下降するとしている．著者の肉腫細胞の結果でも温熱感受性は41～43°Cで著明であった．また温熱療法の有効温度範囲については，平井[24]は44°C加温マウスの実験にて加温中死亡するマウスや加温肢の極端な浮腫，循環障害による壊死，脱落のためマウスは早期死亡することが多かったと報告しているように，生体に応用できる温熱療法としては44°C以上は不適当である．したがって，温熱療法は当然生体組織への影響が可逆的である一定温度範囲内で行われるべきである．このような点から，肉腫の温熱療法としての有効温度範囲は41～43°Cが妥当と考えられた．

制癌剤の殺細胞効果が温熱によって増強されるか否かということは大変興味のある，また重要な問題である．著者は骨軟部肉腫で頻用されている代表的かつ系統の異なる制癌剤4剤を用いて検討した．つまり抗癌性抗生物質の ADM，白金化合物の CDDP，アルキル化剤の CPA，植物アルカロイド類剤の VCR がヒト由来株細胞2株を含む3株の肉腫細胞において温熱とどのようなと併用効果を示すかについて検討した．各薬剤，各株細胞ごとに各温度（37°C～43°C）で経時的（30分～240分）に細胞生存率を求め比較してみた．その結果は3株，4剤とも，制癌剤単独あるいは温熱単独に比べ，両者を併用した場合温度上昇ならびに処理時間とともに細胞生存率が低下した．これまでに Hahn ら[25]はハムスター細胞に対する ADM の効果を，Nakajima ら[26]はヒト膀胱癌細胞に対する CDDP の効果を，Urano ら[27]はマウス線維肉腫に対する CPA の効果を各々報告しているが，筆者の実験でも肉腫3株にて4剤の温熱化学療法の併用効果が確認された．またこの併用効果が相加効果なのか相乗効果なのかを判定するため，併用時の細胞生存率をそれぞれ単独の場合の細胞生存率と比較した．その結果，ADM，CDDP，CPAの3剤では相乗効果が認められた．VCR では相乗効果は認められなかったが相加効果を認めた．この相乗効果の機序としては，DNA 損傷に対する制癌剤と温熱との相互作用が亢進すること，温熱により細胞膜の透過性が大となり細胞内薬剤濃度が高まること，あるいは制癌剤による DNA 鎖切断の修復過程が温熱により阻害されることなどが考えられる[25][28][29]．一方，制癌剤ごとの相乗効果の出現温度については異なった結果になった．まず ADM では，OST 株，HT-1080 株にて40°C60分以降，S-180 株にて39°C60分以降相乗効果を認めてはいるが，細胞生存率30%以下の著明な相乗効果が出現するのは，OST 株では43°C60分以降，HT-1080 株では41°C60分以降，S-180 株では42°C60分以降であり，株によって多少の差はあるがいずれも41～43°Cで強い相乗効果が出現した．CDDP では，3株とも39°Cで60～180分より相乗効果を認め著明な相乗効果は OST 株では40°C120分以降で出現しており，ADM に比して低温（39～40°C）でも強い相乗効果が出現していた．CPA の場合，OST 株，HT-1080株では39°C30分以降，S-180 株では39°C60分以降で相乗効果を認め，著明な相乗効果は3株とも40°C180分以降に出現していた．即ち CPA でも CDDP と同様に，40°Cでも強い相乗効果が出現した．しかし VCR では3株ともに相加効果を認めたが，43°Cまで加温しても相乗効果を示すまでにはいたらなかった．この結果に基づいて薬剤を以下の4群に分類できる．

①細胞毒性の増加と温度上昇が直線性を示すもの

②細胞毒性は，温度上昇にともない直線的に増加しないがある温度閾値を越えると増加するもの

③常温（37°C）では細胞毒性はないが，高温で細胞毒性を示すもの

④37～45°Cの間で細胞毒性を示さないもの

これらの分類によると，ADM は②に，CDDP と CPA は①に，VCR は④に属するものと考えられた．つまり温熱により増感作用を示す制癌剤は多数報告されているが，その増感に必要な温度は各々異なると考えられる．よって制癌剤の種類により加温温度の設定を変える必要があるといえよう．

腫瘍細胞は従来より，同一臓器の腫瘍，同一病理組織像を示す腫瘍であっても，その制癌剤感受性が異なるとされている．また，温熱感受性についてもいろいろな異なる細胞系より求められた細胞生存率曲線の結

果や，著者の行った株細胞での実験結果より，細胞ごとに著しく異なっていることがわかった．よって悪性腫瘍に対して有効な温熱化学療法を行うには，症例ごとにどの制癌剤をどの温度で用いたらよいのかを十分に検討する必要がある．その意味で，我々が骨軟部肉腫の制癌剤感受性試験に用いている cultivated HTCA は簡単に正確な温熱処理が可能であることから，この方法を用いて温熱化学療法感受性を評価してみた．その結果，臨床新鮮材料での肉腫細胞の温熱感受性は制癌剤感受性同様各々の症例により大きく異なった．またさらに温熱と制癌剤の併用により感受性が大きく増強されることが示された．そして制癌剤単独では感受性の低い症例の多くが，温熱の併用により強い感受性を示すことも確認された．この結果は，臨床例において既往に用いられて無効であった制癌剤でも，温熱療法時に併用されると抗腫瘍効果が発揮される場合があることを示唆する大変興味あるものであった．

温熱化学療法を四肢の骨軟部肉腫の治療に導入するにあたってはなお多くの問題が残されている．最大の問題点は骨の肉腫に対する加温の困難さである．つまり骨髄は血液環流がさかんなため体表面よりの加温では十分な温度まで上昇させることができないことである．また骨の電気抵抗が高いため，電磁波による加温の際には骨髄内と周辺での温度分布が一様とならないこともある．現在までのところ，骨皮質を破壊し進行した肉腫などにのみ応用可能と思われるが，骨髄内にとどまっている骨腫瘍に対する加温方法は未解決といえる．しかし四肢の軟部肉腫にたいしては，超音波加温，電磁波加温，組織内加温のいずれも使用可能である．また腫瘍の範囲を確認することや温度測定も比較的容易である．さらには加温によって損傷を受け易い重要臓器が少なく，加温による全身的影響も少ないと考えられ，むしろ有望な治療手段となるものと思われた．今後，実践的臨床応用への方向に研究を押し進めたいと考えている．

結　論

温熱化学療法を骨軟部肉腫の新しい治療法として臨床応用するための基礎的研究として，肉腫株細胞３種と肉腫臨床新鮮材料38検体を用いて，cultivated HTCA 法にて温熱感受性および温熱と制癌剤を併用した場合の感受性を検討し以下の結論を得た．

１．肉腫株細胞３種の温熱感受性は異なった．Arrhenius プロットを描くと OST 株と HT-1080 株に比べ S-180 株の温熱感受性は低かった．

２．制癌剤と温熱の著明な相乗効果は，ADM では41～43°Cで，CDDP と CPA では39～40°Cで出現し，VCR では43°Cまででは出現しなかった．即ち制癌剤ごとに効果増強に必要な温度がいくぶん異なるものと思われた．

３．肉腫臨床新鮮材料で感受性判定可能であったものは27検体（71.1%）であった．制癌剤（ADM, CDDP, CPA, VCR）と温熱（42,43°C）を併用した場合，各制癌剤とも各温度にて制癌剤単独の場合に比べ有意に感受性が高まった（$p<0.05$）．また制癌剤単独では感受性が低かった症例の多くが温熱との併用で高い感受性を示した．

４．四肢の軟部肉腫に対する温熱化学療法は現時点で臨床応用可能と考えられるが，骨の肉腫に対する温熱化学療法には骨に対する加温方法の問題をまず解決する必要がある．

謝　辞

稿を終えるに臨み，御指導と御校閲を賜りました恩師野村進教授に深甚なる謝意を表します．また終始直接御指導頂きました富田勝郎助教授に心から感謝致します．さらに御指導，御助言頂き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致します．

なお，本論文の内容の一部は第19回制癌剤適応研究会（1986年），第１回日本整形外科学会基礎学術集会（1986年）において発表した．

文　献

1) **Tomita, K., Yokogawa, A. & Nomura, S.:** Human tumor clonogenic assay in osteosarcoma for evaluation of clinical efficacy of anti-cancer drugs. Cancer Chemother. Pharmacol., **18**, 133-136 (1986).

2) **Hamburger, A. W. & Salmon, S. E.:** Primary bioassay of human tumor stem cells. Science, **197**, 461-463 (1977).

3) **山崎安朗**：ヒト骨肉腫細胞株の樹立とその形態学的観察．十全医会誌，**71**, 1-13 (1975).

4) **Rasheed, S., Nelson-Ress, W. A., Toth, E. M., Arnstein, P. & Gardner, M. B.:** Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). Cancer, **33**, 1027-1033 (1974).

5) **Foley, G. E., Drolet, B. P., McCarthy, R. E., Goulet, K. A., Dokos, J. M. & Filler, D. A.:** Isolation and serial propagation of malignant and normal cells in semi-defined media origin of CCRF cell lines. Cancer Res.,**20**, 930-939 (1960).

6) **Von Hoff, D. D., Casper, J., Bradley, E., Sandback, J., Jones, D. & Makuch, R.:** Association between human tumor colony-forming assay result and reponse of an individual patient's tumor to chemotherapy. Am. J. Med., **70**, 1027-1032 (1981).

7) **Alberts, D. S., Chen, H. S. G. & Salmon, S. E.:** In vitro drug assay: Pharmacologic considerations. In S. E. Salmon (ed.), Cloning of Human Tumor Stem Cells, 1st ed., p197～207. Alan R. Liss, Inc, New York, 1980.

8) **Valeriote, F. & Lin, H.:** Synergistic interaction of anticancer agents.: A cellular perspective. Cancer Chemther. Rep., **59**, 859-900 (1975).

9) **Johnson, H. A.:** On the thermodynamics of cell injury. Am. J. Pathol.,**75**, 13-26 (1974).

10) **Levine, E. M. & Robbins, E. B.:** Differential temperature sensitivity of normal and cancer cells in culture. J. Cell. Physiol.,**76**, 373-380 (1970).

11) **Love, R., Soviano, R. Z. & Walsk, R. J.:** Effect of hyperthermia on normal and neoplastic cells in vitro. Cancer Res., **30**, 1525-1533 (1970).

12) **Woodhall, B., Pickrell, K. L., Georglade, N. G., Mahaley. M. S. & Dukes, H. T.:** Effect of hyperthermia upon cancer chemotherapy: Application to external cancers of head and face structures. Ann. Surg., **151**, 750-759 (1960).

13) **Crile, G.:** Selective destruction of cancer after exposure to heat. Ann. Surg., **156**, 404-407 (1962).

14) **Cavaliere, R., Ciocatto, E. C., Giovanella, B. C., Heidelberger, C., Johnson, R. O., Margottini, M., Mondovi, B., Moricca, G. & Rossi-Fanelli, A.:** Selective heat sensitivity of cancer cells. Biochemical and clinical studies. Cancer, **20**, 1351-1381 (1967).

15) **Stehlin, J. S. & Giovanella, B. C.:** Result of hyperthermic perfusion for melanoma of the extremities. Surg. Gynec. Obstet., **140**, 339-349 (1975).

16) **Gilbert, H. A., Kagan. A. R. & Winkley, J.:** Soft tissue sarcomas of the extremities.: Their natural history, treatment and radiation sensitivity. J. Surgical Oncology, **7**, 303-317 (1975).

17) **Raaphorst, G. P., Romano, S. L., Mitcell, J. B., Benbord, J. S. & Dewey, W. C.:** Intrinsic difference in heat and/on X-ray sensitivity of seven mammalian cell lines cultured and treated under identical conditions. Cancer Res., **39**, 396-401 (1979).

18) **Miyakoshi, J.:** Responses to hyperthermia (42, 44°C) and/or radiation in four mammalian cells in vitro. J. Radiat. Res., **22**, 352-366 (1981).

19) **Flentje, M., Flentje, D. & Sapareto, S. A.:** Differential effect of hyperthermia on murine bone marrow normal colony-forming units and AKR and L1210 leukemia stem cells. Cancer Res., **44**, 1761-1766 (1984).

20) **Muckle, D. S. & Dickson, J. A.:** The selective inhibitory effect of hyperthermia on the metabolism and growth of malignant cells. Brit. J. Cancer, **25**, 771-778 (1971).

21) **Overgaard, J.:** Effect of hyperthermia on malignant cells in vivo. Cancer Res., **36**, 3077-3081 (1976).

22) **Hofer, K. G., Choppin, D. A. & Hofer, M. G.:** Effect of hyperthermia on the radiosensitivity of normal and malignant cells in mice. Cancer, 38, 279-287 (1976).

23) **Miyakoshi, J., Kano, E. & Heki, S.:** Cellular responses to hyperthermia and radiation in Chinese hamster cells. In T. Sugahara (ed.), Modification of Radiosensitivity in Cancer Treatment, 1st ed., p335-350, Academic Press, Tokyo, 1984.

24) **平井泰明**：悪性腫瘍に対する温熱ならびに温熱化学療法に関する実験的研究．米子医誌，**30**, 504-518 (1979).

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

26) **Nakajima, K., Hisazumi, H., Kumaki, O. & Ueki, O.:** Inhibitiln of cell growth by irradiation in combination with hyperthermia or anticancer drugs. Acta Radiol. Onc., **22**, 487-492 (1983).

27) **Urano, M., Kim, M. S., Kahn, J., Kenton, A. & Li, M. L.:** Effect of thermochemotherapy (combined cyclophosphamide and hyperthermia) given at various temperatures with or without glucose administration on a murine fibrosarcoma.

Cancer Res., **45**, 4162-4166 (1985).
28) **Johnson, H. A. & Pavelec, M.:** Thermal enhancement of thio-TEPA cytotoxicity. J. Nat. Cancer Inst., **50**, 903-908 (1973).
29) **Li, G. C. & Hahn, G. M.:** Ethanol-induced tolerance to heat and adriamycin. Nature, **247**, 699-700 (1978).

A Fundamental Study on Cytotoxic Effects of the Combined Therapy of Hyperthermia and Chemotherapy on Sarcoma Cells Yasuo Aotake, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **97**, 974-988 (1988)

Key words: bone and soft tissue sarcoma, human tumor clonogenic assay, hyperthermia, thermosensitivity, thermochemosensitivity

Abstract

Hyperthermia is often used for cancer therapy solely or with other types of treatments. However, it has not yet been a standard treatment for bone and soft tissue sarcomas. The present study examined the cytotoxic effect of hyperthermia alone or the combined therapy of hyperthermia and chemotherapy on sarcoma cells. Three cell lines of sarcomas (OST strain, HT-1080 strain, S-180 strain) and thirty-eight specimens freshly obtained from patients were used. Cell suspension was heated and incubated with anticancer drugs in a temperature-controlled water bath. Modified cultivated human tumor clonogenic assay (HTCA) method was used to evaluate sensitivity to drugs and heating. By increasing the temperature (37～45℃) and prolonging the exposure time (30～240min), the number of surviving cells was decreased. Arrhenius plots for three cultured sarcomas revealed that the thermosensitivity of S-180 was lower than that of OST and HT-1080. The combined effect of drug and hyperthermia was synergistic in ADM, CDDP and CPA, while it was merely additive in VCR. The effective temperature for hyperthermia was different in each cultured sarcoma and in each anticancer drug. In clinical specimens from twenty-seven patients, the percent colony inhibition rates were used for evaluation of thermochemosensitivity. When the anticancer drug was treated at 42℃, the percent colony inhibition rates were significantly higher ($p<0.05$) than the drug treated alone. Colony formation was even more inhibited at 43℃ than at 42℃ treatment with anticancer drugs. From these results, it is concluded that hyperthermia, especially when combined with chemotherapy, is highly effective in killing the sarcoma cells and it should be considered for application in clinical use.