KK-47膀胱癌細胞移植ヌードマウスにおける8MHz高周波誘電加温装置による温熱化学療法の検討

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: 三原, 信也
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8349

金沢大学十全医学会雑誌　第100巻　第5号　847－857（1991）

KK-47 膀胱癌細胞移植ヌードマウスにおける 8MHz 高周波誘電加温装置による温熱化学療法の検討

金沢大学医学部泌尿器科学講座（主任：久住治男教授）
三　原　信　也

（平成3年8月16日受付）

ヌードマウス背部皮下に移植した KK-47 膀胱移行上皮癌に対し，*cis*-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP) を用いた温熱化学療法を施行し，抗腫瘍効果を検討した．すなわち CDDP (2.5mg/kg) は尾静脈より投与し，加温は Thermotron-RF Model 8 ハイパーサーミア動物実験用装置を用いた．温熱化学療法併用群は，加温直前に CDDP を投与し，温熱療法は30分施行した．処置後21日間毎日腫瘍体積を測定し，腫瘍増殖曲線を求めた．処置直後，30分，2時間，1，2，4，7，11および21日後に腫瘍を摘出し，光顕にて検討した．また30分および1日後の腫瘍に関しては，透過型電子顕微鏡にて血管内皮の状態を検索した．腫瘍増殖曲線からは，温熱療法単独群，抗癌化学療法単独群 (2.5および5.0mg/kg)，温熱化学療法併用群はいずれもコントロール群に比較し，有意の増殖抑制効果が見られ，このうち温熱化学療法併用群では12日目まで腫瘍縮小が継続した．併用群とそれぞれの単独群との比較では，併用群に有意の継続した増殖抑制が認められた．光顕では，温熱療法単独群で加温30分後より，腫瘍血管の拡張が観察され，2日後には壊死領域は，全腫瘍面積の 80～90% に達した．併用群にても同様な所見が得られた．しかし，処置後11日目には，併用群では温熱療法単独群に比し，壊死面積の減少が有意に抑制された．このことから，温熱に抗癌剤を併用することによる再増殖に対する抑制効果の存在が推察された．また腫瘍周辺の残存腫瘍細胞層の上面，側面および下面の最大および最少の厚さを温熱療法単独群および併用群にて計測し，比較検討した．最少の厚さは両群において，すべての部位で全経過を通し，類似した推移を示した．側面では，11日目に単独群に比べ，併用群に最大の厚さの増大抑制傾向が見られ，この傾向は，7～11日目の下面でも認められた．さらに直腸温が42.5°Cを越える加温を行った場合，腸管粘膜上皮の脱落，出血が高頻度に観察され，温熱療法後のヌードマウスの死因の一つと考えられた．また温熱療法単独群，併用群とも腫瘍血管内皮の障害は電顕上同等と考えられた．

Key words　8 MHz 高周波加温，温熱化学療法，*cis*-diamminedichloroplatinum (II)，ヌードマウス移植腫瘍

近年，臨床的に深部悪性腫瘍にたいして高周波 (radiofrequency) 加温装置を用いたハイパーサーミア (癌温熱療法) が広く行われている[1)~3)]．当教室においても，1984年4月に 8MHz の高周波を発振する Thermotron-RF 8 を導入し，泌尿性器悪性腫瘍に対して治療を行ってきた[4)~6)]．一方，温熱療法に関する基礎的研究もめざましい進歩をとげ，数多くの報告がなされている[7)~9)]．しかし，担癌動物を用いた温熱化学併用療法に関する報告は，細胞レベルにおけるものに比べ，実験手技の繁雑さも加わり，従来からあまりなされていないのが現状である[10)11)]．また少数の報告にみられる加温方法は，主に恒温水槽を用いた検討であり，実際臨床的に用いられている高周波加温装置モデルを用いた実験系に関する報告は極めて少ない[12)13)]．さらに温熱療法の対象となる進行癌では転移を有する症例も多く，抗癌剤との併用温熱療法の必要性はつと

Abbreviations: BCNU, 1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea; CDDP, *cis*-diamminedichloroplatinum (II); RF, radiofrequency

に注目されているところである[5)14)].

今回，著者は KK-47 膀胱癌細胞をヌードマウス背部皮下に移植し，得らえた腫瘍に対し Thermotron-RF Model 8 ハイパーサーミア動物実験用装置による温熱療法および抗癌剤との併用効果について検討したので報告する．

材料および方法

I．実験動物および腫瘍

実験動物として，BALB/c, nu/nu 6週齢　雌性マウス (三協ラボ，富山)，体重 20g 前後のものを使用した．腫瘍は継代されてきたヒト膀胱移行上皮癌由来培養細胞 KK-47[15)~17)] (生細胞 1×10^7個) をヌードマウス背部皮下に移植したものを用いた．移植腫瘍を摘出し，3mm 角の腫瘍片を作成後，再度ヌードマウス背部皮下に移植した．移植後2～3週間で腫瘍の長径が約 1cm，体積 200～300mm^3 に達したものを使用した．

II．温熱療法および抗癌化学療法

温熱療法単独群および温熱化学療法併用群では，ヌードマウス腹腔内へ Nembutal® (Abbot Laboratories, North Chicago, USA) 20mg/kg の投与にて麻酔を行なった．その後，8MHz の誘電加温方式による Thermotron-RF Model 8 ハイパーサーミア動物実験用装置 (山本ビニター，大阪) にて背部移植腫瘍に1回，有効加温時間30分の局所温熱療法を施行した．なお，室温は20°C前後となるよう設定した．アプリケーターの円形電極板は，背側の上電極板に直径 20mm，腹側の下電極板に直径 30mm のものを用いた．塩化ビニール製ボーラスをヌードマウスと電極板の間に設置し，ボーラス内を0.3%塩化ナトリウム溶液で充填した．ボーラスは両側とも直径 35mm のものを使用した．ボーラスとマウス体表との接着面には，6%カルボキシメチルセルロースナトリウム糊 (和光純薬，大阪) を使用した．抗癌剤は *cis*-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP) (ブリストル・マイヤーズ，東京) を用い，マウス尾静脈より投与した．抗癌化学療法単独群では2.5および 5.0mg/kg を，温熱化学療法併用群では 2.5mg/kg を加温直前に投与した．

III．温度測定

高周波加温による腫瘍組織への温熱の到達程度および体内への温度分布を具体的に把握するために，1；腫瘍被覆皮膚表面，2；腫瘍中心部，3；腫瘍側面，4；腫瘍直下，5；直腸内，6；頸部皮下の温度を測定した (図1)．温度測定用センサーは直径0.64mm の銅－コンスタンタン熱電対 Type IT-18 (Physitemp., Clifton, USA) を用い，20ゲージサーフロー® 留置針 C 型外套管 (テルモ，東京) にて目的の部位に誘導した後，外套管のみを抜去して温度測定を施行した．

IV．観察方法

1．腫瘍増殖曲線による検討

温熱療法単独群，抗癌化学療法単独群 (2.5および 5.0mg/kg)，温熱化学療法併用群およびコントロール群それぞれ6匹について，いずれも処置直後より21日目まで毎日腫瘍径を測定し，楕円体の近似式 $V=\pi(a\times b\times c)\div6$：(a：長径，b：短径，c：高さ) を用いて，各群ごとの腫瘍の体積を算出した．加温当日の腫瘍体積を1として，腫瘍体積の比率にて片対数グラフ上に腫瘍増殖曲線を作成し，比較検討した．

2．光顕的観察

1）病理組織学的検討

処置直後，30分，2時間，1，2，4，7，11および21日後に温熱療法単独群，抗癌化学療法単独群 (5.0 mg/kg)，温熱化学療法併用群およびコントロール群から4匹のマウスを無差別に選び，屠殺して腫瘍を摘出した．さらに治療による各臓器の影響を把握するために，肺，肝，脾，腎および腸管も併せて摘出した．摘出した組織は，H-E 染色により病理組織学的に検討した．

2）壊死巣の面積の測定

加温後腫瘍内に生じる壊死巣が，温熱療法効果の1つと考えられるため[18)~19)]，長径に一致する組織断面に

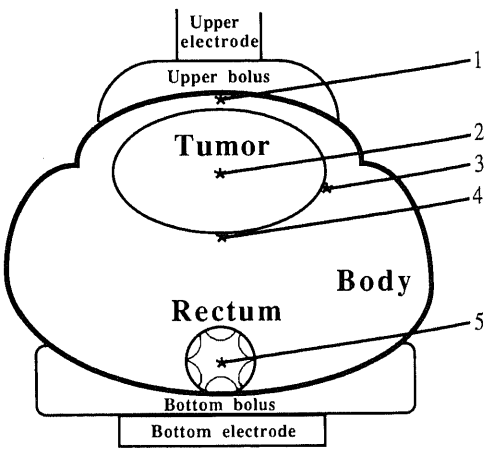

Fig. 1. Scheme of temperature measurement of several regions. Temperatures were measured by thin Teflon-coated probes of copper-constantan microthermocouples. The microthermocouple was inserted into the surface (1), center (2), side (3) and deep layer (4) of the tumor, rectum (5) and neck (control).

て壊死巣の面積を測定した．温熱療法単独群，抗癌化学療法単独群 (5.0mg/kg)，温熱化学療法併用群およびコントロール群につき，処置直後，1，2，4，7，11および21日後の腫瘍組織標本を光学顕微鏡を用いて，写真に焼き付けた後プラニメーター (PLANIX 7P，精度±0.2%，タマヤテクニクス，東京) を用いて，腫瘍の全面積に対する壊死巣の占める面積の比率を4個の腫瘍について算出し，比較検討した．

3）腫瘍辺縁部の生存腫瘍細胞層の厚さの測定

温熱療法単独群および温熱化学療法併用群につき，処置後腫瘍辺縁部に残存する腫瘍細胞層の経時的変化を把握するため，図2のごとく，上面，側面および下面に区分し，その領域における最大および最小の厚さを測定し，長径に対する比率を算出した．結果は，4個の腫瘍から得られた値の平均値にて示した．

なお，腫瘍増殖曲線および壊死巣の面積の解析は二元配置分散分析後，Scheffe の多重比較による平均値の差の検定 ($\alpha=0.05$) で行なった．

3．電顕的観察

温熱療法単独群および温熱化学療法併用群のマウス2匹ずつを療法30分および1日後に屠殺し，主に5～10μm の腫瘍血管の形態的変化につき，透過型電顕にて検討した．

成　　績

I．温度分布

図3は腫瘍直下の温度を横軸にとった際の，腫瘍中心部，腫瘍被覆皮膚表面，腫瘍側面，直腸内および頸部皮下の温度分布を示している．それによると，腫瘍直下の温度が42.5°Cであれば，腫瘍内は全て42.5から43.5°Cであった．従って，以後の実験では腫瘍直下の温度を42.5°Cとし，有効加温時間を30分とした．またコントロールとして測定された頸部皮下の温度は終始35°C前後であり，局所加温の体温への影響は軽微と考えられた．

II．腫瘍増殖曲線

各処置群の21日目までの腫瘍増殖曲線を図4に示す．処置後21日目まで温熱療法単独群，抗癌化学療法単独群 (2.5および5.0mg/kg) および温熱化学療法併用群はいずれもコントロール群に比較し増殖抑制効果が認められた．このうち温熱化学療法併用群では12日目まで腫瘍縮小が継続した．

コントロール群と各処置群の比較では，抗癌化学療法単独群 (2.5および5.0mg/kg) では3～6日目より，温熱療法単独群では2日目より，温熱化学療法併用群では1日目より腫瘍容積の有意の増殖抑制がみられ，21日目まで継続した．さらに抗癌化学療法単独群 (2.5および5.0mg/kg) または温熱療法単独群と併用群との比較では，併用群で1日目から有意の増殖抑制が継続して認められた．

III．光顕所見

1．病理組織学的検討

今回用いたヌードマウス移植腫瘍は，grade 1 のヒト膀胱癌より樹立されたヒト膀胱癌由来細胞株 KK-47 細胞を用いて作成したものであり[15)~17)]，移植後2～3週間で組織学的に低分化移行上皮癌の形態を示した．さらに検討してみると，腫瘍中心部を主体に10.6±9.2% (mean±S.D.) の壊死巣が認められたが，

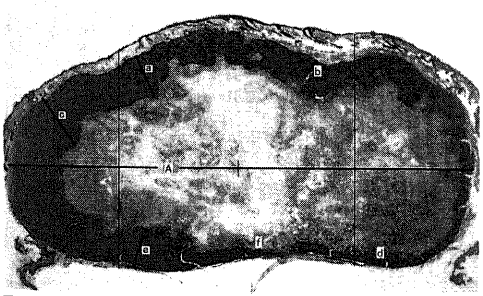

Fig. 2. Photomicrograph of tumor tissue 2 days after hyperthermia. (A) indicates the maximum length of the tumor section. (a), (c) and (e) indicate the maximum thickness in the upper, lateral and lower peripheral layers, and (b), (d) and (f) indicate the minimum thickness in the upper, lateral and lower peripheral layers, respectively. (hematoxylin-eosin stain, ×16)

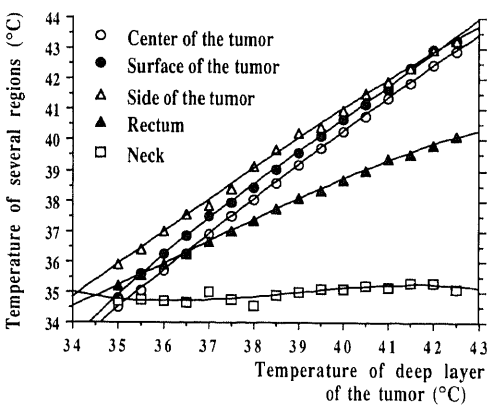

Fig. 3. Changes in temperature of the tumor and surrounding tissues. The horizontal axis shows the deep layer of the tumor.

腫瘍血管に著変は認められなかった．これに対し，温熱療法単独群では，加温直後から2時間後にかけて腫瘍内および被膜血管の一部に拡張およびうっ血が認められた（図5）．また加温1および2日後には，温熱処置によると思われる腫瘍細胞の壊死性変化の増大が認められ，残存生細胞は，腫瘍辺縁部に認められる傾向にあった（図2）．

加温が不十分と考えられた腫瘍では，図6のごとく血管周囲を取り囲むように腫瘍細胞が残存し，血流による熱の放散が血管周囲組織の温度上昇を妨げることを示唆する所見と考えられた．

処置後7日目では腫瘍細胞が再増殖し，腫瘍下面および側面に接した辺縁部に特にその傾向が強く認められた．

温熱化学療法併用群では，温熱療法単独群と同様，血管のうっ血および拡張，出血さらに腫瘍細胞の壊死巣増大傾向などが認められ，光顕上温熱療法単独群との差は認められなかった．

各処置群の肺，肝，脾，腎および腸管の組織学的検討では，光顕所見上では，肺，肝，脾および腎にはいずれも障害は認められず，局所温熱療法による各臓器への影響は比較的軽微と考えられた．しかしながら，直腸温が42.5°Cを越える加温処置により，図7のごとく多発性の腸管粘膜上皮の脱落および出血が高頻度に合併しており，温熱療法後のヌードマウスの死因の一つと考えられた．

2．壊死巣の面積の検討

図8に示すごとく，コントロール群および抗癌化学

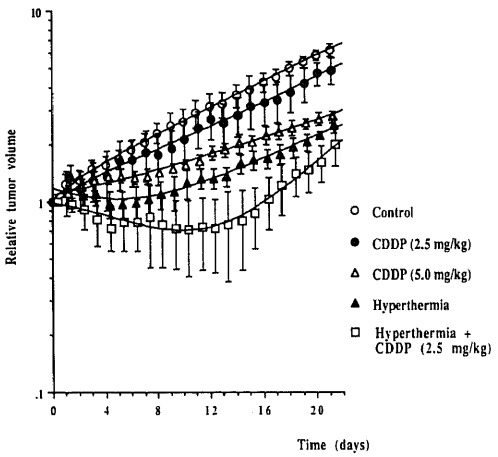

Fig. 4. Tumor growth curves after treatment with hyperthermia and CDDP. Each point represents the mean±S.D. in 6 mice.

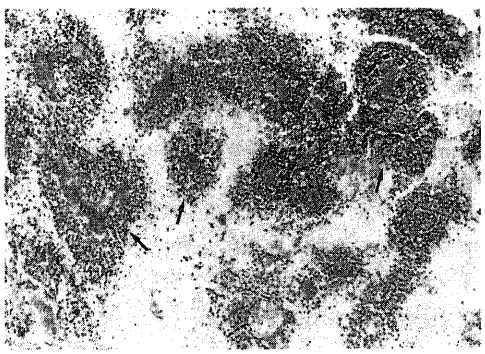

Fig. 6. Photomicrograph of tumor tissue showing blood vessels surrounded by remaining cancer cells (arrows). (hematoxylin-eosin stain, ×50)

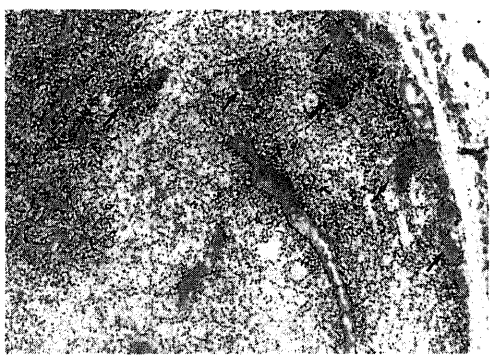

Fig. 5. Photomicrograph of tumor tissue 2 hr after hyperthermia showing dilatation and congestion of blood vessels (arrows). (hematoxylin-eosin stain, ×50)

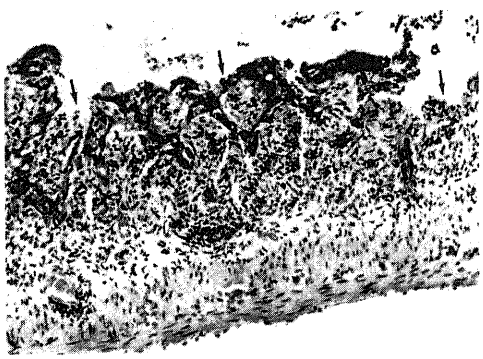

Fig. 7. Photomicrograph of the intestine. When the rectal temperature rose to more than 42.5°C, intestinal mucosal desquamation (arrows) and hemorrhage were observed. (hematoxylin-eosin stain, ×80)

療法単独群では，壊死巣は4～7日目で最大となり，それぞれ腫瘍全体の58%および41%前後を占めた．

温熱療法単独群および温熱化学療法併用群では，2日目に壊死巣は約80～90%となり，4日目までこの状態は持続し，両群間に有意差は認められなかった．しかし，11日目になると，温熱化学療法併用群では，温熱療法単独群に比し，処置後の腫瘍壊死の減少つまり再増殖を有意に抑制する結果が得られた．

3．腫瘍辺縁部生存腫瘍細胞層の厚さの経時的変化

1）最大の厚さ

i．上面（図9）

温熱療法単独群および温熱化学療法併用群とも，7日目に最小値となり以後は増大傾向にあった．

ii．側面（図10）

上面に比較すると，細胞層の厚さの最低値は6～9%に留まり，減少傾向は軽度であった．11日目では，温熱療法単独群に比し，温熱化学療法併用群では厚さに対する増大抑制傾向がみられた．

iii．下面（図11）

7～11日目にかけて温熱化学療法併用群では温熱療法単独群に比し，増大抑制傾向がみられた．

2）最小の厚さ

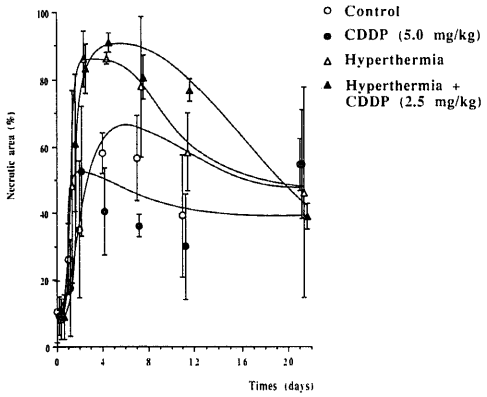

Fig. 8. Changes in the percentage of the necrotic area in the tumor section. Each point represents the mean±S.D. in 4 mice.

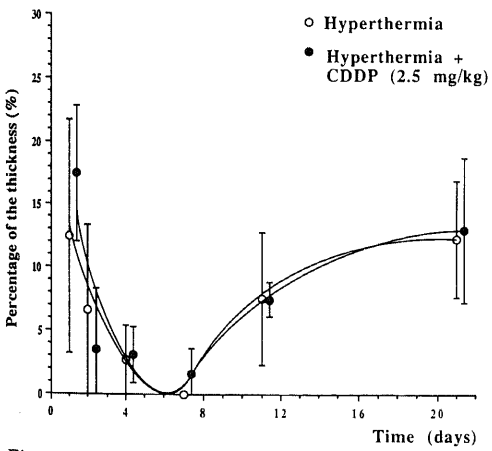

Fig. 9. Changes in the percentage of the maximum thickness (a) in the upper peripheral layers to maximum length (A) of the tumor section. Each point represents the mean±S.D. in 4 mice.

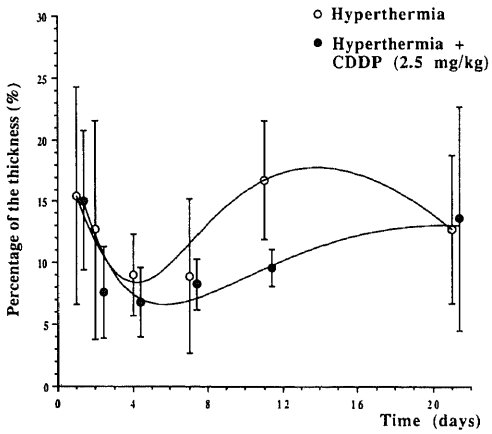

Fig.10. Changes in the percentage of the maximum thickness (c) in the lateral peripheral layers to maximum length (A) of the tumor section. Each point represents the mean±S.D. in 4 mice.

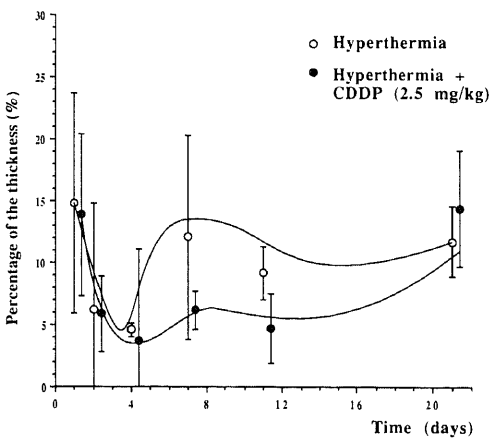

Fig.11. Changes in the percentage of the maximum thickness (e) in the lower peripheral layers to maximum length (A) of the tumor section. Each point represents the mean±S.D. in 4 mice.

i．上面（図12）

処置1日後より減少し，11日目にはやや増大傾向が認められたが，両群とも同様な増減を示した．

ii．側面（図13）

処置4～7日目に両群とも減少し，11日目には同様に増大傾向が認められた．

iii．下面（図14）

7日目に温熱療法単独群がやや高値を示したが，両群とも減少傾向が認められた．

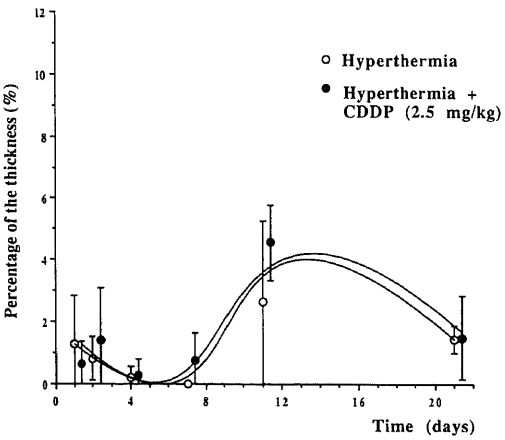

Fig.12. Changes in the percentage of the minimum thickness (b) in the upper peripheral layers to maximum length (A) of the tumor section. Each point represents the mean±S.D. in 4 mice.

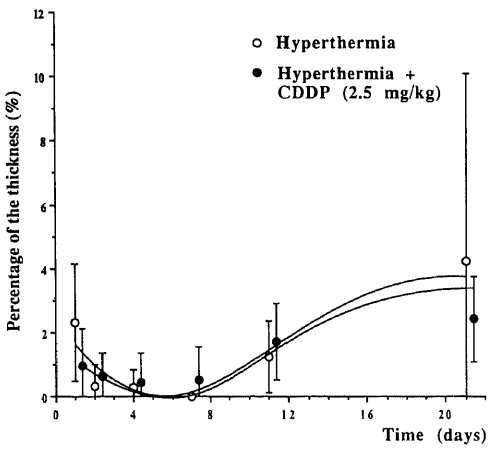

Fig.13. Changes in the percentage of the minimum thickness (d) in the lateral peripheral layers to maximum length (A) of the tumor section. Each point represents the mean±S.D. in 4 mice.

以上の結果をまとめると，最小の厚さに関しては，両群ともいずれの面でも同様の増減傾向を示し，温熱療法に抗癌化学療法を併用しても最小の厚さには影響を与えないものと考えられた．一方，最大の厚さは上面においては，最小の厚さと同様，両群間に差が認められず，類似した増減傾向を示した．側面では，11日目に温熱療法単独群に比べ，併用群で厚さの増大抑制効果が認められ，この傾向は，7～11日目の下面においても認められた．

IV．電顕所見

未処置の KK-47 細胞移植腫瘍は，グリコーゲンを胞体内に含み，細胞自由縁には，微絨毛を認めた．移

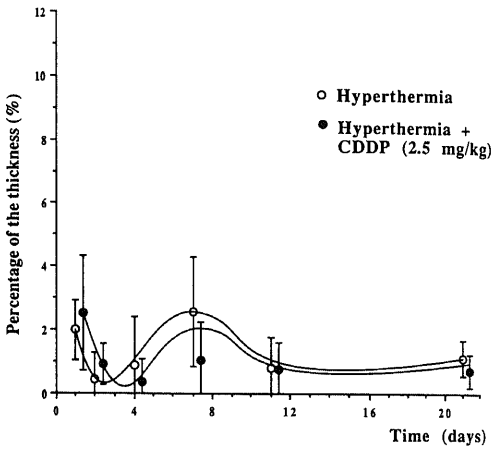

Fig.14. Changes in the percentage of the minimum thickness (f) in the lower peripheral layers to maximum length (A) of the tumor section. Each point represents the mean±S.D. in 4 mice.

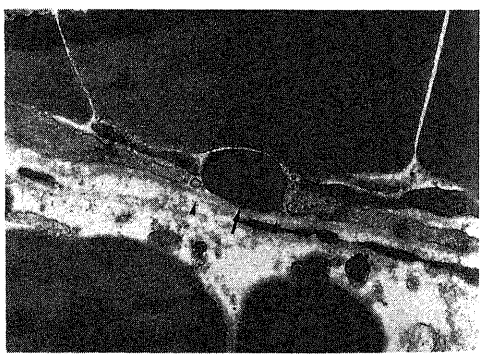

Fig.15. Electron micrograph of the tumor vessels 30 min after hyperthermia. The endothelial cells separated by gaps (arrow heads) and erythrocyte leakage (arrow) from these gaps are observed. (×18,000)

植腫瘍血管は，正常血管に比べ，基底膜の一部に粗な部分や断裂などの不連続性が認められた．図15に温熱療法単独群の腫瘍血管の電顕像を示すが，温熱効果によると考えられる血管内皮の解離が認められた．

温熱化学療法併用群の腫瘍血管の電顕像では，温熱療法単独群と同様な血管内皮の解離が認められた．

考　　察

温熱療法は放射線の効果を増強することから，放射線療法との併用が試みられてきた[20)~22)]．放射線と同様に DNA に共通の標的を有する抗癌剤も温熱療法との併用により癌細胞の致死効果を高めることが推測される．温熱療法の抗癌剤作用増加機序として，腫瘍細胞の修復機序の抑制，細胞膜の薬剤透過性の増大さらに薬剤反応の亢進など種々の仮説[23)24)]が考えられている．

温熱療法と併用効果を有する抗癌剤として，1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU), cyclophosphamide, adriamycin, bleomycin および CDDP 等が報告されている[10)11)14)]．

アルキル化剤の１つである BCNU の殺細胞効果は41～42°Cより温度上昇に伴い順次増強し，担癌マウスを用いた実験においても温熱処置との併用により抗腫瘍効果の増強を示すことより，期待できる抗癌剤の１つと考えられる[25)26)]．Cyclophosphamide も温熱療法との併用によりその有効性が増強する薬剤と考えられているが，高温下で肝が cyclophosphamide をより活性化にしうるかどうか，また活性型 cyclophosphamide の高温下での安定性については現在のところ明らかにされていない[27)]．

Adriamycin は42°Cでの増強効果は弱く，43°Cで併用効果が増大するが，加温が１時間以上になると薬剤抵抗性が誘導されるとされている[28)]．また動物実験での併用効果に関しては，必ずしも明確な結果が得られていない[11)24)]．

Bleomycin は42°C以上にて併用による相乗効果が出現し，43°C以上で顕著な作用の増強が認められると報告されている[24)]．また，担癌動物における温熱療法併用による作用増強も確認されており，局所温熱療法との併用に極めて有望な薬剤の１つと考えられる[29)]．

CDDP は DNA 鎖の架橋形成を引き起こし[30)]，この DNA 鎖の架橋形成が温熱により著しく増強されることから[31)]，bleomycin と同様期待できる抗癌剤と考えられる．当教室の中嶋ら[14)] は CDDP, mitomycin C, THP-adriamycin および 5-fluorouracil の各種抗癌剤と42°Cもしくは43°C併用加温による殺細胞効果を KK-47 細胞を用い，コロニー形成法にて検討した．その結果，CDDP は温熱処置との併用により傾きの増大を伴う著明な殺細胞効果の増加が見られ，温熱併用効果は相乗的と述べている[32)]．以上の基礎的実験結果より，今回の実験における併用抗癌剤として CDDP を用いた．

本実験の腫瘍増殖曲線から，温熱療法による増殖抑制は治療後早期よりみられ，一方，抗癌化学療法による抑制効果は約１週間後より出現し，両療法を併用することにより腫瘍の著明な縮小が認められた．注目すべき点は，CDDP (2.5mg/kg) に温熱療法を併用することで，CDDP (5.0mg/kg) の効果をはるかに越える抑制効果が得られており，温熱療法の併用により抗癌化学療法剤の投与量を減らすことにより正常組織の障害を抑制し，かつより高い抗腫瘍効果を得る可能性を示唆するものと考えられた．

壊死巣の面積の検討では，温熱療法と抗癌化学療法の併用にても２～４日目に認められる急激な壊死巣の増大を増強することはなかった．しかし，併用効果は11日目の壊死巣の減少，つまり腫瘍の再増殖の抑制に有効性が認められた．

今回，加温方法として高周波加温装置を用いたが，従来よりの局所温熱療法の動物実験では下肢足背に移植した腫瘍を恒温水槽内に温浴する方法が主体で，実際臨床的に用いられる高周波加温装置による実験系の報告は少ない[12)13)]．今回，高周波加温による全身への影響も考慮するため背部に腫瘍を移植し，高周波加温実験を行った．その結果，直腸温が42.5°Cを越える加温を行った場合，腸管粘膜上皮の脱落出血が高頻度に観察され，臨床的に腹部や骨盤腔の腫瘍に高周波加温を行う場合，直腸温の上昇は加温制限の目安となりうる可能性が示唆された．全身温熱療法にて比較的障害されやすいと報告されている肝に関しては[27)33)]，本実験では著変は認められなかった．

また，背部移植腫瘍に高周波加温を施行することにより，加温装置に対して上面，側面および下面に分け，その抗腫瘍効果の検討が可能であった．本実験では，温熱療法に抗癌化学療法を併用することにより，腫瘍側面および下面の最大の厚さの増殖を抑制する傾向が認められた．側面および下面は腫瘍周囲の正常組織からの豊富な血管支配を持ち，細胞の栄養や酸素濃度が高いと考えられ，臨床的には腫瘍側面や深部がこれにあたり，温熱療法後の再増殖あるいは再発部位となりやすいのは従来より経験されるところである[6)]．最大の厚さの増大は，加療後の腫瘍の再増殖の指標と推察され，このような部位の厚さの増大を抑制することは，臨床上有意義と思われる．

培養細胞や担癌動物を用いて，温熱療法による殺細胞効果の機序の検討が行われているが，動物実験レベルでは，器官や組織構造物の相互作用により，実験結果はより複雑となると考えられる[11]．特に血管系の反応が重要と言われており[34]，本実験においても加療後2日目に温熱療法単独群，併用群とも血管障害によると考えられる壊死巣の急激な増大を認めた．

形態学的変化に関しては，放射線治療時に出現する血管内皮細胞の内腔への突出が，温熱にて増強するという報告があり[35)~37)]，興味がもたれる．しかし，CDDP の併用では，電顕で検索した限りでは，温熱療法単独群と比較し，形態的変化の差異は認められなかった．移植腫瘍内の壊死巣の面積の検討で，温熱療法単独群および温熱化学療法併用群間で加療後11日目に有意差が認められたが，この理由として温熱に抗癌化学療法を併用することにより，腫瘍の再増殖が抑制されたためと考えられた．しかしながら，抗癌化学療法の併用にても，血管障害に基づくと考えられる早期の腫瘍細胞の壊死性変化の増強は認められなかった．

今回，著者はヌードマウス移植腫瘍を用いて，抗癌化学療法単独，温熱療法単独および温熱化学療法併用効果の検討を行なった．その結果，温熱療法に投与量を減量した抗癌化学療法の併用により，腫瘍増殖曲線上単独療法に比較し，著明な腫瘍の縮小が認められた．以上の併用効果は壊死巣の面積および腫瘍辺縁部の生存細胞層の厚さの検討から，再増殖に対する抑制と考えられた．これらの所見から抗癌化学療法に温熱療法を併用することは，抗癌剤の投与量を減らし，かつ再発しやすい腫瘍深部の再増殖を抑制するうえで有用と考える．

結　　論

ヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 を背部皮下に移植したヌードマウスに，8MHz 高周波誘電加温装置を用いた温熱化学療法を行い，以下の結果を得た．

1．温熱療法と抗癌化学療法の併用により，著明な腫瘍増殖抑制効果が見られ，CDDP (2.5mg/kg) に温熱療法を併用することで，CDDP (5.0mg/kg) の効果を上回る有意の抑制効果が得られた．

2．移植腫瘍内の壊死巣の検討では，温熱療法と抗癌化学療法の併用でも処置後早期の急激な壊死巣増大の増強効果は認められなかった．一方，併用効果として11日目の壊死巣の減少，つまり腫瘍の再増殖を抑制するという結果が得られた．

3．直腸温が42.5°Cを越える高周波加温を行った場合，腸管粘膜上皮の脱落出血が高頻度に観察され，マウスの死因の一つと考えられた．

4．温熱療法に抗癌化学療法を併用することで，腫瘍側面および下面の最大の厚さの増大を抑制する傾向が認められた．

5．電顕上，CDDP を併用しても温熱療法単独群と比較し，血管内皮の形態的変化に差は認められなかった．

以上から，温熱化学療法は，抗癌剤の投与量を減らし，かつ再発しやすい腫瘍深部の再増殖を抑制するうえで有用と考える．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導，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．また本研究の遂行に際し，御教示，御協力を頂きました打林忠雄講師，中嶋和喜講師，平田昭夫博士はじめ当教室腫瘍班の諸兄，教室員各位に深く感謝の意を表します．さらに，病理学的検索に御指導頂きました金沢大学医学部第一病理学教室河原栄講師に厚く感謝します．

本研究の一部は，文部省がん特別研究(1) (課題番号，63010046，杉町班) および文部省科学研究費補助金 (課題番号，63570742 および 01570882) の補助を受けたもので，付記して謝意を表します．

なお本論文の要旨の一部は第78回日本泌尿器科学会総会 (1990年6月，札幌)，第7回日本ハイパーサーミア学会 (1990年10月，岡山) および文部省がん特別研究(1)杉町班平成2年度第2回班会議 (1991年2月，博多) において発表した．

文　　献

1) **Abe, M., Hiraoka, M., Takahashi, M., Egawa, S., Matsuda, C., Onoyama, Y., Morita, K., Kakehi, M. & Sugahara, T.:** Multi-institutional studies on hyperthermia using an 8-MHz radiofrequency capacitive heating device (Thermotron RF-8) in combination with radiation for cancer therapy. Cancer, **58,** 1589-1595 (1986).

2) **Irish, C. E., Brown, J., Galen, W. P., Gallucci, J. J., Hyman, M. D., Horowitz, I. J., Snedecor, P. A. & Baker, H. W.:** Thermoradiotherapy for persistent cancer in previously irradiated fields. Cancer, **57,** 2275-2279 (1986).

3) **平岡真寛，徐　志堅，芥田敬三，高橋正治，阿部光幸，福田善弘，中野　博：**局所進行性肝細胞癌に対する RF 加温療法の臨床経験．日癌治，**20,** 2033-2040 (1985).

4) **Hisazumi, H.:** Radiofrequency hyperthermia for urological malignancies. *In* S. Egawa (ed.), Progress in Hyperthermic Oncology., p53-56, Shinohara Publishers Inc., Tokyo, 1986.

5) **久住治男，中嶋和喜：**泌尿性器進行癌に対する 8 MHz-RF 加温療法．癌と化学療法，**13,** 1381-1386 (1986).

6) **中嶋和喜，久住治男，山本　肇，内藤克輔，三崎俊光，小橋一功，横山　修，斉藤泰雄：**手術不能の進行泌尿性器悪性腫瘍に対する 8 MHz-RF 加温療法の研究（第 2 報）．日泌尿会誌，**77,** 304-309 (1986).

7) **Gerweck, L. E.:** Modification of cell lethality at elevated temperatures. The pH effect. Radiat. Res., **70,** 224-235 (1977).

8) **Overgaard, J. & Bichel, P.:** The influence of hypoxia and acidity on the hyperthermic response of malignant cells *in vitro*. Radiology, **123,** 511-514 (1977).

9) **Bicher, H. I., Hetzel, F. W., Sandhu, T. S., Frinak, S., Vaupel, P., O'Hara, M. D. & O'Brien, T.:** Effects of hyperthermia on normal and tumor microenvironment. Radiology, **137,** 523-530 (1980).

10) **Marmor, J. B.:** Interactions of hyperthermia and chemotherapy in animals. Cancer Res., **39,** 2269-2276 (1979).

11) **Dahl, O. & Mella, O.:** Effect of timing and sequence of hyperthermia and cyclophosphamide on a neurogenic rat tumor (BT_4A) *in vivo*. Cancer, **52,** 983-987 (1983).

12) **Dickson, J. A., Shah, S. A., Waggott, D. & Whalley, W. B.:** Tumor eradication in the rabbit by radiofrequency heating. Cancer Res., **37,** 2162-2169 (1977).

13) **Marmor, J. B., Hahn, N. & Hahn, G. M.:** Tumor cure and cell survival after localized radiofrequency heating. Cancer Res., **37,** 879-883 (1977).

14) **中嶋和喜，久住治男，新田政博，国見一人，小松和人：**ヒト膀胱癌由来細胞 (KK-47 細胞) における温熱と抗癌剤併用による殺細胞効果の検討．日本ハイパーサーミア誌，**2,** 439-445 (1986).

15) **久住治男，西東康夫，加藤正博，中嶋和喜，小林徹治，塚原健治，打林忠雄，三崎俊光：**ヒト膀胱癌由来の培養細胞 KK-47 の凝固・線溶活性について．日泌尿会誌，**69,** 1328-1333 (1978).

16) **久住治男，鹿子木基二，中嶋和喜，小林徹治，塚原健治，内藤克輔，黒田恭一，松原藤継：**ヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 の生物学的特性について．日泌尿会誌，**70,** 485-494 (1979).

17) **田谷　正，小林徹治，塚原健治，打林忠雄，内藤克輔，久住治男，黒田恭一：**ヒト尿路悪性腫瘍の組織培養．日泌尿会誌，**68,** 1003-1010 (1977).

18) **Storm, F. K., Harrison, W. H., Elliott, R. S. & Morton, D. L.:** Hyperthermic therapy for human neoplasms. Cancer, **46,** 1849-1854 (1980).

19) **Hill, S. A. & Denekamp, J.:** Histology as a method for determining thermal gradients in heated tumours. Br. J. Radiol., **55,** 651-656 (1982).

20) **Dewey, W. C., Hopwood, L. E., Sapareto, S. A. & Gerweck, L. E.:** Cellular responses to combinations of hyperthermia and radiation. Radiology, **123,** 463-474 (1977).

21) **Perez, C. A., Nussbaum, G., Emami, B. & VonGerichten, D.:** Clinical results of irradiation combined with local hyperthermia. Cancer, **52,** 1597-1603 (1983).

22) **Abe, M. & Hiraoka, M.:** Localized hyperthermia and radiation in cancer therapy. Int. J. Radiat. Biol., **47,** 347-359 (1985).

23) **Field, M., Block, J. B., Oliverio, V. T. & Rall, D. P.:** Cellular accumulation of methylglyoxal-bis-guanylhydrazone *in vitro*. Cancer Res., **24,** 1939-1946 (1964).

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

25) **Twentyman, P. R., Morgan, J. E. & Donaldson, J.:** Enhancement by hyperthermia of the effect of BCNU against the EMT6 mouse tumor. Cancer Treat. Rep., **62,** 439-443 (1978).

26) **Neilan, B. A. & Henle, K. J.:** *In vivo* response of murine RIF tumors to thermochemotherapy. J. Med., **20,** 107-112 (1989).

27) **Hahn, G. M.:** Potential for therapy of drugs and hyperthemia. Cancer Res., **39,** 2264-2268 (1979).

28) **Hahn, G. M. & Strande, D. P.:** Cytotoxic effects of hyperthermia and adriamycin on Chinese hamster cells. J. Natl. Cancer Inst., **57,** 1063-1067 (1976).

29) **Margin, R. L., Sikic, B. I. & Cysyk, R. L.:** Enhancement of bleomycin activity against Lewis lung tumors in mice by local hyperthermia. Cancer Res., **39,** 3792-3795 (1979).

30) **Zwelling, L. A. & Kohn, K. W.:** Mechanism of action of *cis*-dichlorodiammineplatinum (II).

Cancer Treat. Rep., **63**, 1439-1444 (1979).

31) **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).

32) **Barlogie, B., Corry, P. M. & Drewinko, B.:** *In vitro* thermochemotherapy of human colon cancer cells with *cis*-dichlorodiammineplatinum (II) and mitomycin C. Cancer Res., **40**, 1165-1168 (1980).

33) **Larkin, J. M., Edwards, W. S., Smith, D. E. & Clark, P. J.:** Systemic thermotherapy: Description of a method and physiologic tolerance in clinical subjects. Cancer, **40**, 3155-3159 (1977).

34) **Eddy, H. A.:** Alterations in tumor microvasculature during hyperthermia. Radiology, **137**, 515-521 (1980).

35) **藤原康次:** 温熱単独，放射線単独および温熱放射線治療に対する腫瘍内血管の反応．日本ハイパーサーミア誌，**3**, 375-389 (1987).

36) **Eddy, H. A. & Chmielewski, G.:** Effect of hyperthermia, radiation and adriamycin combinations on tumor vascular function. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., **8**, 1167-1175 (1982).

37) **Merwin, R. & Algire, G. H.:** Transparent-chamber observations of the response of a transplantable mouse mammary tumor to local roentgen irradiation. J. Natl. Cancer Inst., **11**, 593-623 (1950).

Thermochemotherapy Using Radiofrequency Current in KK-47 Transplanted Mouse Tumor

Shinya Mihara, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920

J. Juzen Med Soc., **100**, 847－857 (1991)

Key words eight MHz-radiofrequency current heating, thermochemotherapy, *cis*-diamminedichloroplatinum (Ⅱ) (CDDP), KK-47 bladder tumor

Abstract

The *in vivo* effects of hyperthermia combined with *cis*-diamminedichloroplatinum (Ⅱ) (CDDP) were studied. Heat was produced by a Thermotron-RF Model 8 at a radiofrequency current of 8 MHz, using nude mice bearing KK-47 bladder tumors. CDDP was injected via the tail vein. The chemotherapy group was treated with CDDP 5.0 or 2.5 mg/kg. The thermochemotherapy group was administered CDDP 2.5 mg/kg immediately prior to the hyperthermic treatment. The tumor growth curve was obtained by measuring the tumor volume for 21 consecutive days after the treatment. After the treatment, immediately, 30 minutes, 2 hours, 1, 2, 4, 7, 11 and 21 days, the tumor was removed and examined light-microscopically. In addition, 30 minutes and 1 day after the treatment, the endothelium of the tumor vessels was scrutinized through a transmission electron microscope. Tumor growth was inhibited for 21 days after chemotherapy, hyperthermia, or thermochemotherapy, as compared with the control group. In the thermochemotherapy group, the size of the tumor decreased for 12 days. Comparing the thermochemotherapy group with other 3 groups receiving single treatment, it was found that tumor reduction rate was greater in the former group. The combined treatment significantly enhanced the anti-tumor efficacy of CDDP. In the hyperthermia group, tumor vasodilation was observed 30 minutes after heating light-microscopically. Two days after heating, the necrotic region of the tumor increased in size up to 80~90% in the hyperthermia group and in the thermochemotherapy group. But 11 days after the treatment, the decrease in the size of the necrosis was more significantly inhibited in the thermochemotherapy group than in the hyperthermia group. The maximum and minimum thicknesses of the viable cell layers in the periphery of the tumor were measured after hyperthermia or thermochemotherapy. In both groups, the changes in minimum thick-

ness always showed the same tendency in all of the regions. Eleven days after the treatment, the increase in the maximum thickness in the lateral peripheral region was inhibited in the thermochemotherapy group, more than in the hyperthermia group. Moreover, 7 to 11 days after the treatment, the increase in the maximum thickness in the lower peripheral region was inhibited in the thermochemotherapy group. When the rectal temperature rose to more than 42.5℃, intestinal mucosal detachment and hemorrhage were frequently observed. These complications resulted in the death of the mice in this experiment. The endothelial cell damage observed electron-microscopically in the thermochemotherapy and in the hyperthermia groups was found to be identical in both groups.