

肺扁平上皮癌の治療に関する研究

第 2 編

ヒト肺扁平上皮癌細胞株を用いた 温熱化学療法に関する検討

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

瀬 戸 匠

(平成元年 3 月 25 日受稿)

Key words : human lung cancer cell line, thermochemotherapy

緒 言

肺小細胞癌に対する化学療法は、近年長足の進歩がみられ、長期生存例の報告も認められるようになってきた¹⁾。しかしながら肺扁平上皮癌は、化学療法に対する感受性が低く進行期症例に対する化学療法の成績は必ずしも良好とは言えない²⁾。進行期肺扁平上皮癌に対する治療成績の向上には、新しい抗癌剤の開発と共に、より効果的な治療法の確立が必要と思われる。

ところで癌細胞は、正常細胞に比し温熱に対する感受性が高いことが知られている。また、ある種の抗癌剤は、温熱を加えることによりその細胞毒性が増強することが知られている。最近、このことを利用し、化学療法と温熱療法を併用した温熱化学療法についての種々の基礎的検討が加えられており³⁾、進行癌における臨床応用もいくつか報告されている。そこで進行期肺扁平上皮癌に対する新しい治療法として本療法に注目し、ヒト肺扁平上皮癌細胞株を用い、in vitroにおける抗癌剤と温熱との併用効果について検討を加えた。

実験材料および方法

1. 細 胞

腫瘍細胞株としては、当教室で継代培養されているヒト肺扁平上皮癌細胞株 EBC-1⁴⁾を用いた。実験用の細胞を得るため、 1×10^6 個の EBC

-1 細胞を、炭酸水素ナトリウム 1.2 g/l (三光純薬製)、2-メチルカプトエタノール 10 mEq/ml (Shigma 製)、ストレプトマイシン $100 \mu \text{ g/ml}$ (明治製菓製)、ペニシリン 100 単位/ml (明治製菓製)、5%胎児ウシ血清 (Fetal Calf Serum; FCS, Gibco 製) を含む Rosewell Park Memorial Institute 1640 (RPMI1640; Gibco 製) を培養液として、ペトリリッシュ (Falcon 製) 内で 37°C 、5% CO_2 、95% air の加湿培養器にて 48 時間 subculture し、生細胞率 95% 以上の対数増殖期の細胞を実験に供した。

2. 薬 剤

実験に用いた薬剤は、adriamycin (ADM; 協和発酵製)、bleomycin (BLM; 日本化薬製)、mitomycin C (MMC; 協和発酵製) および cis-dichlorodiammineplatinum (II) (CDDP; 日本化薬製) の 4 薬剤で、目的濃度になるよう生理食塩水にて用時調整した。

3. 実験方法

1) 薬剤の接触および加温

subculture 開始後 48 時間経過した EBC-1 細胞から培養液を除き、0.05% EDTA 加トリプシン液 (Gibco 製) を加えた培養器にて 5 分間作用させて単一細胞浮遊液を作成しこれを 1500 r. p. m. 5 分間遠沈し培養液にて 2 回洗浄した。つぎに EBC-1 細胞の細胞密度を $6 \times 10^4/1.8 \text{ ml}$ とするよう培養液で調整し、3, 4 段階の目的濃度に溶解した薬剤溶液 0.2 ml を加え、 10 ml 用ガラス

製試験管に浮遊し、目的温度に設定した循環式浴槽 (Lab Thermobath LHB-10; 東洋科学工業製, 誤差 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$)にて1時間加温した, なお, 加温のみの実験においては培養液にて調整した細胞浮遊液に0.2mlの生理食塩水のみを加えた, いずれの実験においても温浴槽内温度を通産省検定書付きの温度計にてモニターしたが, 温度誤差範囲は $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 以内であった.

2) 効果判定

薬剤および温熱による致死効果は, 2層軟寒天培地を用いた cloning assay 法により判定した. すなわち, 2mmグリッド付き直径35mmのプラスチックペトリディッシュ (Lux 製) に, あらかじめ15% FCS, 炭酸水素ナトリウム1.2g/l, 2-メルカプトエタノール10mEq/l, RPMI1640を含む0.5% agarose (Marine Colloid 製) 1mlからなる feeder layer を作成しておき, その上に前述の処置を加えた細胞を, 培養液にて2度洗浄したのち plating した. すなわち, feeder layer と同じ成分を含む0.3% agarose を用いて 2×10^4 個/mlの細胞密度となるよう調整し, これを plating layer として feeder layer の上に重層させた. これを 37°C , 5% CO_2 , 95% air 加湿培養器にて2週間静置培養したのち, 倒立顕微鏡下でコロニー数を算定した. なお, コロニー算定にあたっては, 30個以上の細胞集塊をコロニーと判定した. 各実験の対照は 37°C における薬剤無添加のコロニー数とし, 各温度, 各薬剤濃度におけるコロニー数との比をプロットし, これをもとに survival curve を作製して

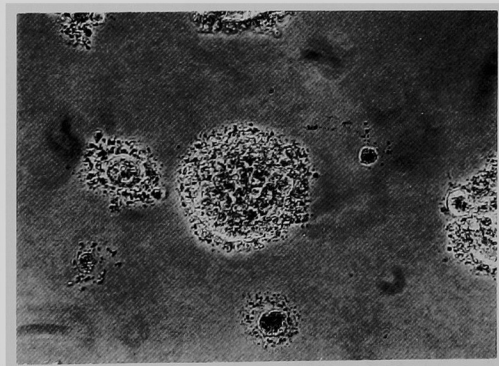


図1 EBC-1細胞の plating 14日目のコロニー

殺細胞効果を評価した (surviving fraction). 各実験は triplicate で行い, 少なくとも2回以上の実験にて再現性を確認した.

成 績

EBC-1細胞のコロニーを図1に示す. 細胞が密に増殖し境界明瞭な球形の細胞集塊を形成した. なお, EBC-1細胞のコロニー形成率 (colony forming efficiency) は, 無処置の場合, いずれの実験においてもほぼ4~6%の間にあり, 安定していた.

EBC-1細胞に対する温熱のみによる殺細胞効果を検討した成績を図2に示す. 41°C では, 6時間加温後も温熱による致死効果は全く認められなかったが, 42°C では1時間加温にて約20%, 3時間加温にて約50%, 6時間加温にてほぼ90%の殺細胞効果が認められた. 43°C では1時間加温にて約40%, 3時間加温にて約90%の殺細胞効果が認められ, 6時間加温後には生残細胞はほとんど認められなかった.

つぎに, 各薬剤添加における温熱の増強効果を検討した成績を示す. まず BLM についてみると, 各温度における EBC-1 の dose-response curve (図3) から得られた BLM の90%殺細胞濃度 (LD_{90}) は, 表1に一括して示すごとく, 37°C において $120\mu\text{M}$, 41°C $86\mu\text{M}$, 42°C $32\mu\text{M}$,

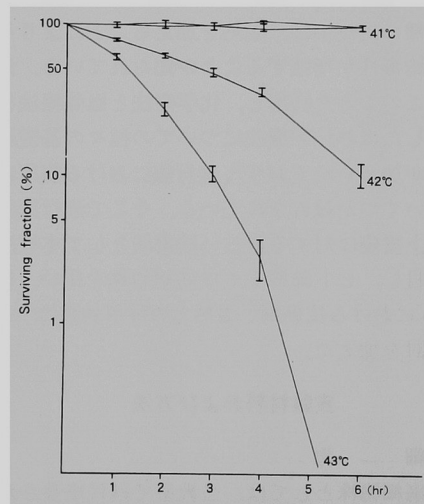


図2 EBC-1細胞における加温時間とそれによる致死効果の関係

43°C 8 μM と、高温になるほどその増強効果は著明であり、BLM と温熱の相互作用は相乗的な傾向を示した。

ADM に対する各温度の EBC-1 の dose-response curve を図 4 に示す。それから求めた各温度における LD_{90} は、37°C 1.05 μM 、41°C 0.76 μM 、42°C 0.45 μM 、43°C 0.18 μM であり(表 1)、BLM の場合と同様に温熱による増強効果は高温

になるほど明瞭に現れた。しかし、その傾向は BLM におけるほど著明ではなかった。

同様に、CDDP についてみると(図 5)各温度における EBC-1 の dose-response curve はほぼ平行線を呈した。すなわち、各温度における CDDP の LD_{90} は、37°C 78 μM 、41°C 52 μM 、42°C 36 μM 、43°C 22 μM であり(表 1)、温熱と CDDP の相互作用は相加的とする所見であった。

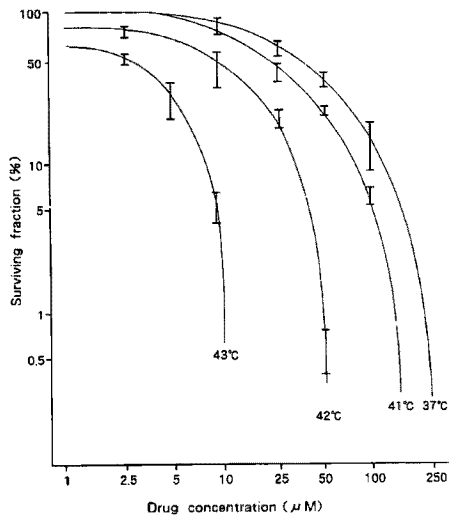


図 3 bleomycin の各温度における殺細胞効果

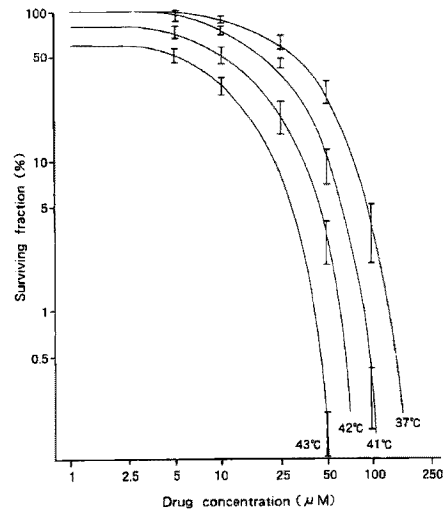


図 5 cis-dichlorodiammineplatinum (II) の各温度における殺細胞効果

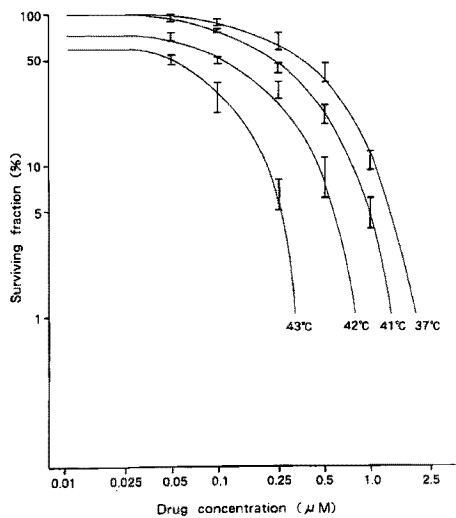


図 4 adriamycin の各温度における殺細胞効果

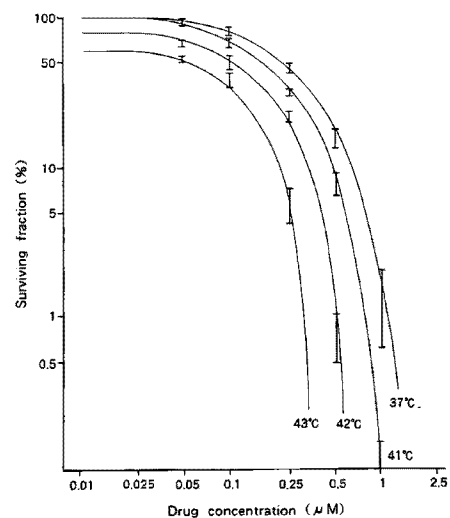


図 6 mytomyacin C の各温度における殺細胞効果

MMCについては、CDDPの場合とほぼ同様の結果が得られた(図6)。すなわち、各温度における dose-response curve は平行線を呈し、各温度における LD₉₀は、37°C 0.60 μ M, 41°C 0.45 μ M, 42°C 0.32 μ M, 43°C 0.20 μ M であり(表1)、薬剤と温熱は相加的とする所見であった。

薬剤と温熱の相互作用をより明確にするため、Hahn⁹⁾が提唱する thermal dose modifying factor (TDMF) を各薬剤、各温度について、LD₅₀, LD₉₀, LD₉₉の3点で算出し、表2に示す。TDMFとは、37°Cにおいて一定の目標点に到達するために必要な薬剤濃度と、ある温度において同じ目標点に到達するために必要な薬剤濃度を比として表したものであり、この場合、TDMFの数値が大きいほど温熱による増強効果が高いことを意味する。

TDMFは、41°Cにおける比較では、4薬剤ともにほぼ同程度の数値を示したが、42°CにおけるTDMFは、BLMとADMにおいて高く、特に43°CにおけるTDMFはBLMにおいて12.8 (LD₅₀)、15.4 (LD₉₀) 16.7 (LD₉₉)と著

しく高値であった。一方、CDDPとMMCにおけるTDMFは、温度の上昇とともに若干の増加を示したが、その程度はBLM、ADMに比較して軽微であった。

考 案

一般に、腫瘍細胞は正常細胞に比べて温熱に対する感受性が高いことが知られており⁵⁻⁷⁾、温熱療法は古くより癌治療における魅力的なテーマの一つであった。その発端は19世紀中頃にさかのぼることができるが、その副作用、全身管理の不備などにより十分な治療効果をあげることができなかった。しかし近年医療技術の目覚ましい進歩により、加温技術の改善、全身管理の向上がもたらされた結果、より安定で確実性の高い温熱療法が可能となってきた。時を同じくして、ある種の抗癌剤は温熱との相互作用により、薬剤の殺細胞効果が著しく増強することが注目されてきた。現在、温熱との相互作用により効果増強が認められる薬剤として、BLM、ADMなどのanthracyclin系、actinomycin D, thio-TEPAなどのアルキル化剤、BCNU, CCNU, methyl-CCNUなどのnitrosourea剤、MMC, CDDPなどが知られているが⁵⁻⁷⁾、これらの多くは、chinese hamster ovary cellなどの実験腫瘍を用いた結果にもとづくものである。

温熱による抗癌剤の効果増強が何によってもたらされるかは必ずしも明らかではないが、温熱による薬剤の細胞内 uptake の亢進、薬剤によるDNA損傷を修復する修復酵素の阻害などが主たる要因とみなされている⁷⁻¹¹⁾。

近年増加傾向の著しい肺癌は、早期発見の努

表1 薬剤の各温度における90%殺細胞濃度 (μ M)

Drug	Temperature (°C)			
	37	41	42	43
Bleomycin	120	86	32	8
Adriamycin	1.05	0.76	0.45	0.18
CDDP*	78	52	36	22
Mitomycin C	0.60	0.45	0.32	0.20

* Cis-dichlorodiammineplatinum (II)

表2 各薬剤における温熱による Thermal dose modifying factor

	Thermal dose modifying factor								
	at 41°C			at 42°C			at 43°C		
	LD ₅₀	LD ₉₀	LD ₉₉	LD ₅₀	LD ₉₀	LD ₉₉	LD ₅₀	LD ₉₀	LD ₉₉
Bleomycin	1.5	1.4	1.5	3.9	3.8	4.2	12.8	15.4	16.7
Adriamycin	1.5	1.3	1.4	3.0	2.2	2.4	8.6	5.8	5.9
CDDP*	1.5	1.4	1.4	2.3	2.2	1.9	5.0	3.5	3.2
Mitomycin C	1.3	1.3	1.3	1.8	1.9	2.0	3.7	3.0	3.1

* Cis-dichlorodiammineplatinum (II)

力にもかかわらず、確定診断時すでに手術不能の進展期にある症例が大部分を占め、全身療法たる化学療法が重要な役割を担っている。しかし、小細胞癌は別として、非小細胞癌の薬剤に対する反応性は極めて乏しく、効果的な化学療法法の確立が望まれるところである。今回著者は、非小細胞癌の化学療法効果増強を計ることを目的に、当教室で樹立されたヒト肺扁平上皮癌株細胞 (EBC-1 細胞) を用い、肺非小細胞癌に活性を示すいくつかの薬剤と温熱の相互作用について検討を加えた。

まず、EBC-1 細胞に対する温熱のみの効果を検討したところ、41°C では温熱による殺細胞効果は全く認められなかったものの、42°C、43°C においては、加温時間による生細胞率は指数関数的に減少し、このヒト肺扁平上皮癌由来の細胞が、他の実験腫瘍と同様に温熱に対して感受性を有することを知ることができた。すなわち、この所見は、Deway らが42°C 以上の加温下での chinese hamster ovary cell において認めた、加温時間と生細胞率の指数関数的関係をよく再現するものであった¹²⁾。

BLM と温熱との併用効果については、相乗効果をもたらせることが、実験腫瘍を用いた報告において示されている^{5,8,9)}。Hahn らの chinese hamster ovary cell を用いた成績をみると、温熱による BLM の細胞内 uptake の亢進は認めておらず、その相乗効果には膜透過性の亢進は関与していない。そして彼らは BLM の温熱による効果増強は、BLM により生じた potential lethal damage を修復する酵素を温熱が阻害した結果であろうと推論している^{8,9)}。

著者の用いたヒト肺扁平上皮癌株細胞 (EBC-1) においても、BLM と温熱の相互作用は、41°C よりも42°C、42°C よりも43°C と増強効果は著しく、TDMF の数値からしても相乗的とも言うべきものであり、実験腫瘍の成績をよく再現していた。

ADM と温熱との相互作用についても、著者が用いた EBC-1 細胞は、他に報告されている実験腫瘍と同様の態度を示した。すなわち、ADM は BLM と同様に、温熱との併用により相乗的とも言うべき効果増強が認められたが、その要因は

温熱による膜透過性の変化に基づく薬剤の細胞内 uptake の亢進と考えられている^{7,13)}。しかし温熱による膜透過性の亢進は長時間は持続せず、chinese hamster ovary cell^{5,13)}、マウス M 3 A 細胞^{7,14)}においてはその時間は最初の30分のみであり、それ以上経過するとむしろ細胞は ADM に対して抵抗性を示す所見が述べられている。Ohnosi らもヒトメラノーマ細胞において長時間の過熱が ADM に対する抵抗性を誘導する成績を示しており¹⁵⁾、温熱と薬剤投与のタイミングは、anthracycline 系薬剤においては極めて重要と考えられた。

MMC、および最近肺非小細胞癌の化学療法において重要な役割を占めている CDDP は、ともに double strand DNA と cross-linking を形成することにより抗腫瘍効果を発揮するとみなされている^{16),17)}。実験腫瘍を用いた Meyn らの成績では、温熱と CDDP の相互作用は高温になるほど強く現れ、薬剤の細胞内 uptake の亢進が効果増強の要因であり、修復酵素の阻害は関与しないことが示されている¹¹⁾。一方、MMC についても温熱との相互作用は相乗的であるとする成績が多く、EMT 6 mouse mammary tumor 細胞を用いた Bevely らによると、その機序には膜透過性の増強による薬剤の細胞内 uptake の亢進、修復酵素の阻害の両者が関与が示唆されている¹⁸⁾。一方、著者が用いたヒト肺扁平上皮癌由来の EBC-1 細胞では、CDDP、MMC と温熱の相互作用は実験腫瘍で認められるほどには著明でなく、両者が相加的に作用すると考えた方が妥当であり、実験腫瘍との間に若干の解離を認めた。

以上を総括すると、今回著者が検討した薬剤は、温熱との相互作用により効果増強が認められ、全身加温として耐容できる42°C^{19),20)}においても TDMF は2ないし4倍の値を示した。この意味においてこれら4剤は全身温熱療法において利用しうる薬剤と考えられた。さらに温熱を43°C に設定することにより、BLM と ADM では相乗的とも言うべき著しい効果増強が認められたことから、これら2剤は局所温熱療法において著しい効果を期待しうる薬剤と考えられた。

著者の実験結果は、以上のごとくヒト肺癌細

胞においても温熱が抗癌剤の効果を増強することを示すものであるが、全身温熱療法として用いるにはなお多くの問題が残されている。温熱そのものによる宿主の障害はともかくとして、温熱と薬剤の相互作用による正常細胞への障害性が、どの程度増強するかは必ずしも明らかではない。さらに、腫瘍側からみても、目標とする温度に到達するまでに要する時間 preheating time などにより、薬剤との相互作用は種々に変化することが類推されており²⁾、薬剤投与のタイミングについても重要な課題が提起されている。しかし、温熱化学療法は、肺非小細胞癌のように薬剤に対して初めから耐性を示す腫瘍においてのみならず、小細胞癌においてしばしばみられるように、薬剤と接触することによって発現する獲得耐性を示す腫瘍に対しても、耐性解除の対策の一つとしてこの効果を期待することができるのではないかと思われる。

結 論

ヒト肺扁平上皮癌細胞株を用い、in vitro における抗癌剤と温熱の併用効果について検討した。検討した薬剤は、ADM, BLM, CDDP および

MMC の 4 薬剤で、37°C の survival curve をコントロールとして 41°C, 42°C および 43°C 加温時の survival curve より増強効果を判定した。その結果、4 薬剤とも 41°C, 42°C および 43°C の各温度においては、37°C に比し細胞毒性の増強効果が認められた。そして BLM, ADM は高温度ほど増強効果が強く認められ、特に BLM 43°C 加温にて相乗的とも言うべき著しい増強効果が認められた。CDDP, MMC は BLM, ADM に比しその増強効果は若干弱く、温度上昇と平行して相加的とも言うべき増強効果が認められた。

以上の所見は、ヒト肺扁平上皮癌の治療において、温熱化学療法が効果をあげる可能性を示唆するものであり、肺癌における温熱療法の臨床治験を試みる上での基礎的知見として、意義を有すると思われる。

本論文を撰筆するにあたり、御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表します。また、直接御指導を賜りました大熨亮助教授、平木俊吉先生に深謝致します。

なお本論文の要旨は第21回日本癌治療学会総会（昭和58年、名古屋市）において発表した。

文 献

- 1) Seifer EJ and Ihde DC : Therapy of small cell lung cancer : A perspective on two decades of clinical research. *Semin Oncol* (1988) **15**, 278—299.
- 2) 木村郁郎, 大熨泰亮, 平木俊吉 : 肺癌の化学療法. *内科* (1987) **59**, 439—447.
- 3) 加納永一, 他 : 癌の温熱療法—細胞レベル : 癌・温熱療法, 柄川 順編, 篠原出版, 東京 (1982) pp. 141—159.
- 4) 平木俊吉, 他 : ヒト肺癌 (扁平上皮癌, 腺癌, 小細胞癌) 細胞株の樹立と異種移植. *肺癌* (1982) **22**, 53—57.
- 5) Hahn GM : Potential for therapy of drugs and hyperthermia. *Cancer Res* (1979) **39**, 2264—2268.
- 6) 水野左敏 : 温熱療法と抗癌剤併用による治療効果向上への試み. *癌と化療* (1980) **5**, 689—197.
- 7) Mizuno S, Amagai M and Isida A : Synergistic cell killing by antitumor agents and hyperthermia in cultured cells. *Gunn* (1980) **71**, 471—478.
- 8) Braun J and Hahn GM : Enhanced cell killing by bleomycin and 43°C hyperthermia and the inhibition of recovery from potentially lethal damage. *Cancer Res* (1975) **35**, 2921—2927.
- 9) Hahn GM, Braun J and Har-Kedar I : Thermochemotherapy : Synergism between hyperthermia (42°C—43°C) and adriamycin (or bleomycin) in mammalian cells inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1979) **72**, 937—940.
- 10) Barlogie B, Corry PE and Drewinko B : In vitro thermochemotherapy of human colon cancer cells

- with cis-dichlorodiammineplatinum (II) and mitomycin C. *Cancer Res* (1981) **40**, 1165—1168.
- 11) Meyn RE, Coory PM, Flecher SE, et al : Thermal enhancement of DNA damage in mammalian cells treated with cis-dichlorodiammineplatinum (II). *Cancer Res* (1980) **40**, 1136—1139.
 - 12) Dewey WC, Hopwood LE, Saparto SA et al : Cellular response to combination of hyperthermia and radiation. *Radiology* (1977) **123**, 467—474.
 - 13) Hahn GM and Strand DP : Cytotoxic effect of hyperthermia and adriamycin on chinese hamster cells. *J Natl Cancer Inst* (1976) **57**, 1063—1067.
 - 14) 水野左敏, 他 : 高温による制癌剤の効果増強, 癌と化療 (1988) **8**, 147—153, 1981.
 - 15) Ohnoshi T, Ohnuma T, Beranek JT, Holland JF : Combined cytotoxicity effect of hyperthermia and anthracycline antibiotics on human tumor cells. *J NCI* (1985) **74**, 275—281.
 - 16) Zwelling LA, Kohn KW, Ross WE, Ewing RAG and Anderson T : Kinetics of formation and disappearance of a DNA crosslinking effect in mouse leukemia L1210 cells treated with cis-dichlorodiammineplatinum (II). *Cancer Res* (1978) **38**, 1762—1768.
 - 17) Lyer W and Szybalski W : A molecular mechanism of mitomycin C action linking of complementary DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* (1974) **50**, 355—362.
 - 18) Beverly AT, Charles DK, Katherine AK and Alan CS : Enhancement by hyperthermia of the in vitro cytotoxicity of mitomycin C hypoxic tumor cells. *Cancer Res* (1981) **46**, 1096—1099.
 - 19) Pettigrew RT, Galt JM, Ludgate CM and Smith AN : Clinical effects of whole-body hyperthermia in advanced malignancy. *Br Med J* (1974) **4**, 679—682.
 - 20) Larkin JM, Edwards WJ, Smith DE and Clark DJ : Systemic thermotherapy : description of method and physiologic tolerance in clinical subjects. *Cancer* (1977) **40**, 3155—3159.
 - 21) Terence SH, Cynthia CS, David MW and Eugene AWG : Effects of heating on lethality due to hyperthermia and selected chemotherapeutic drugs. *JNCI* (1982) **68**, 487—491.

**Studies of the treatment of pulmonary epidermoid carcinoma
Part 2. Thermochemotherapy in human epidermoid carcinoma cells
in culture**

Takumi SETO

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

The effectiveness of hyperthermia in combination with anticancer drugs on EBC-1 cell line established from a patient with pulmonary epidermoid carcinoma was investigated. Anticancer drugs tested in the present study were adriamycin, bleomycin, cis-dichlorodiammineplatinum (II) and mitomycin C. EBC-1 cells were incubated with the drug for one hour at 37°C or at elevated temperature (41°C, 42°C and 43°C). The enhancement of cytotoxicity by hyperthermia was found in combination with all of the drugs. The degree of enhanced cytotoxicity was positively related to the temperature in combinations with adriamycin and bleomycin. Especially, a synergic enhancement of cytotoxicity was found with the combination of hyperthermia and bleomycin. The present study showed that the combination of hyperthermia and anticancer drugs produced potential cytotoxicity on EBC-1 cells in vitro, and may provide useful information for the clinical trials in the future.