研究速報

SDI 法による制癌剤に対する温熱の影響

藤 村 隆¹⁾ 米 村 豊¹⁾ 二 宮 致¹⁾
 杉 山 和 夫¹⁾ 西 村 元 一¹⁾ 三 輪 晃 一¹⁾
 宮 崎 逸 夫¹⁾ 遠 藤 良 夫²⁾ 田 中 基 裕²⁾
 佐々木 琢 磨²⁾

1) 金沢大学第2外科

2) 金沢大学がん研究所化学療法部

キーワード：温熱化学療法, SDI 法, KATOⅢ, COLO 320

はじめに

腹膜播種を有する消化器癌の予後は極めて不良であるが、現在まで有効な治療方法は確立されていない。当科では腹膜播種を有する胃癌¹⁾、大腸癌²⁾に対して、mitomycin C (MMC), cisplatin (CDDP), etoposide (ETP) を溶解した加温生食水にて腹腔内を灌流する持続温熱腹膜灌流 (continuous hyperthermic peritoneal perfusion; CHPP) を施行してきた。今回我々はこれらの制癌剤に対する温熱感受性について、培養癌細胞を用いて基礎的検討を行ったので報告する。

I. 対 象 と 方 法

対象とした培養癌細胞株は、ヒト胃癌継代細胞である KATOⅢと、大腸癌継代細胞である COL-O320 の2種類である。使用した抗癌剤は MMC, J CDDP, ETP の3種類で、これらの薬剤をヒトに静注したときの最高血中濃度 (peak plasma concentration; PPC) は MMC, 1.5, CDDP, 2.5, ETP, 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

殺細胞効果の判定には、当科で以前より行っている制癌剤感受性試験の一つである Succinate dehydrogenase inhibition test (SDI test) により行った。4×10⁵ cell/ml に調整した癌細胞浮遊液 (90 μl) と抗癌剤 (10 μl) を 96 well microplate (Falcon Assay Plate 3912) に分注したものを2枚作製し、各々 43℃, 1時間と 37℃, 1時間の処理を行った。この時 43℃, 1時間の処置には行った Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc., USA) を使用し、温熱と抗癌剤の同時併用の影響を検討した。その後 5% CO₂ incubator にて 37℃, 3日間の培養を行い、MTT 試薬を加えさらに 37℃, 3時間の培養を行った。形成された formazan に dimethylsulfoxide を加え optimal density (540nm) を ELISA Reader により測定した。

II. 結 果

両細胞株ともに細胞数と、SD 活性の吸光度はよく相関し、KATOⅢは細胞数千から10万までの間で、COLO 320 は1万から30万までの間で、正比例的な増加が認められた。

両細胞株ともに、43℃ 1時間単独処理により

1994年3月7日受付 1994年4月4日採用

Fig. 1 Inhibition Rate in KATO III cell under the treatment of 43°C and 37°C

Fig. 2 Inhibition Rate in COLO320 cell under the treatment of 43°C and 37°C

増殖は抑制され、その抑制率は KATO III, 27%, COLO320, 17% であった。KATO III の PPC における抑制率は 37°C で MMC 70%, CDDP 72%, ETP 36% であり 43°C では順に 89, 81, 79% でいずれも 43°C の方が高かった (図 1)。COLO 320 の PPC における抑制率は 37°C で MMC 43%, CDDP 32%, ETP 34% であり 43°C では順に 55%, 63%, 65% でやはり 43°C の方が高かった (図 2)。

Valeriotte ら³⁾の定義に順じて、 $1 - (1 - 43^\circ\text{C 時}$

の抑制率) $\times$ (1 - 抗癌剤使用時の抑制率) を相加的抑制率として計算した。KATO III では MMC, CDDP, ETP の順に 78%, 79%, 53%, COLO 320 では 53%, 43%, 45% であり、いずれも実際の 43°C 加温下の各種抗癌剤併用時の抑制率より低かった。

考 察

今回我々が使用した Programmable Thermal

Controller⁴⁾は頂部に 96 well microplate を載せることができる thermal cycler であり、細胞を各 well に注入した後に加温を行うことができるので抗癌剤との同時併用を行える。また加温冷却面の形状が microplate の各 well 毎に対応できるように 96 個の穴があいているため、加温冷却面との接触面積が大きく温度管理が迅速に、正確にできる特徴がある。

武内⁵⁾は癌細胞株を用いて SDI 法による温熱感受性について報告しており、生細胞数と SDI 活性との間に高い相関関係のあることを指摘し、SDI 法が温熱処理後の細胞の viability 判定に有用であることを指摘した。さらに彼らによれば Hela 細胞を 40℃ の間で温熱処理をおこなったところ、43℃ 以上で抑制率が著明に上昇したとしている。

今回我々は CHPP に使用している抗癌剤と温熱との併用効果を SDI 法にて検討した。43℃ の温熱単独での抑制率は KATO III 27%, COLO320 17% であったのに対して、CDDP, MMC, ETP を組み合わせることにより抑制率は両細胞株とも高くなった。温熱と抗癌剤との併用時に予想される相加的抑制率は、実際の併用時の値より低かったことより、温熱とこれらの抗癌剤との併用は相乗効果を有するものと考えられた。CDDP, MMC は DNA 二重鎖間の架橋形成により、ETP は topoisomerase II の阻害により S 期細胞に効果を示す

抗癌剤であるが、温熱も S 期細胞により有効であることから相乗効果を発揮するものと考えられる。

両癌細胞株とも、抗癌剤の濃度が低いほど 43℃ と 37℃ との抑制率の差が大きいことが認められた。すなわちいずれの薬剤も低濃度において、併用効果の意義が大きく現れる傾向があった。これらのことより薬剤濃度を低下させても、温熱と抗癌剤との併用の有効性を維持しながら、CDDP の腎毒性、MMC, ETP の骨髄毒性などの副作用を軽減させることができる可能性があると考えられた。

文 献

- 1) Fujimura, T., Yonemura, Y., Fushida, S., et al.: Continuous hyperthermic peritoneal perfusion for the treatment of peritoneal dissemination in gastric cancers and subsequent second-look operation. *Cancer* 65: 65-71, 1990.
- 2) Yamaguchi, A., Tsukioka, Y., Fushida, S., et al.: Intraperitoneal hyperthermic treatment for peritoneal dissemination of colorectal cancers. *Dis. Colon Rectum* 35: 964-968, 1992.
- 3) Valeriote, F., Lin, S.: Synergistic interaction of anti-cancer agents: A cellular perspective. *Cancer Chem. Rep.* 58: 895-900, 1975.
- 4) Bagasra, O., Seshamma, T., Pomerantz, R.J.: Polymerase chain reaction in situ: intracellular amplification and detection of HIV-1 proviral DNA and other specific genes. *J. Immunol. Methods* 158: 131-145, 1993.
- 5) 武内秀也, 犬塚貞明, 馬場秀夫・他: SDI 法を用いた温熱感受性試験の確立に関する研究 日本ハイパーサーミア誌 9: 98-103, 1993.

Effects of Hyperthermic Treatment for Anticancer Drugs by SDI Test:

Takashi Fujimura¹⁾, Yutaka Yonemura¹⁾, Itasu Ninomiya¹⁾,
Kazuo Sugiyama¹⁾, Gen-ichi Nishimura¹⁾, Kouichi Miwa¹⁾,
Itsuo Miyazaki¹⁾, Yoshio Endou²⁾, Motohiro Tanaka²⁾,
Takuma Sasaki²⁾

1) The Second Department of Surgery, School of Medicine, Kanazawa University

2) Department of Experimental Therapeutics, Cancer Institute, School of Medicine, Kanazawa University

Key Words: Hyperthermochemotherapy, SDI test, KATO III, COLO 320