原 著

温熱単独, 放射線単独および温熱併用放射線治療に対する腫瘍内血管の反応

藤原康次

佐賀医科大学歯科口腔外科学教室 (指導: 香月 武教授)

佐賀医科大学病理学教室 (指導: 渡邊照男教授)

Effects of Hyperthermia, Radiotherapy and Thermoradiotherapy on Tumor Microvasculature: Light and Electron Microscopic Study.

Kouji Fujiwara

Department of Oral Surgery, Saga Medical School (Director: Prof. T. Katsuki)

Department of Pathology, Saga Medical School (Director: Prof. T. Watanabe)

Summary

The therapeutic effects of hyperthermia (immersion of tumor-bearing leg in a water bath at 46°C for 60 min), radiotherapy (500 rad or 1000 rad) and thermoradiotherapy on VX-2 tumors of the rabbits were studied morphologically. Especially, vascular morphological changes and vascular permeability to ferritin after treatment were investigated by electron microscopy.

As assessed by decrease in tumor volume, local hyperthermia potentiated the destructive effect of radiotherapy. The light microscopic pictures invariably suggested prolonged necrotic tendency of tumor cells following thermoradiotherapy. Electron microscopically, 1 day and 3 days after thermoradiotherapy, small blood vessels in the tumors showed swelling and protrusion of endothelial cells in the lumen. Similar morphological changes were obtained only at 3 days after radiotherapy. When vascular permeability to ferritin was examined by electron microscopy, an increase in tumor vascular permeability was occurred at 1 day after hyperthermia or thermoradiotherapy, while at 3 days after radiotherapy.

These results suggest that the early reaction of tumor microvasculature may be a contributing factor to delayed cell death in tumors after hyperthermia or thermoradiotherapy.

Key Words:

温熱療法

病理組織学的変化

内皮細胞

血管透過性

VX-2 腫瘍

Hyperthermia

Histopathological change

Endothelial cell

Vascular permeability

VX-2 tumor

緒 言

悪性腫瘍に対する温熱治療の効果について、近年、動物実験および臨床例による数多くの研究がなされており、温熱治療のみ¹⁾あるいは温熱治療を放射線^{2,3)}や化学療法^{4,5)}と併用することによって、著明な抗腫瘍効果が現れることが報告されている。現在では、多くの施設においてその臨床応用が進められており^{6,7)}、悪性腫瘍の治療に温熱治療の果たす役割が大なることは、その臨床データからも明らかである。

温熱治療の基礎的研究として *in vitro* において、加温による細胞致死効果⁸⁾、加温効果の細胞周期依存性⁹⁾、pH 効果¹⁰⁾、加温による細胞の熱耐性⁸⁾、温熱処理による放射線増感作用⁸⁾、温熱による制癌剤作用の修飾⁸⁾さらに加温による細胞内損傷^{11,12)}などに関する研究がなされており、温熱治療の有効性に関する生物学的な基礎固めは着実に進んでいるように思われる。

しかし、*in vivo* においては、温熱治療に対する腫瘍細胞の反応は腫瘍細胞を取り巻く環境に対する温熱の影響が加わるためにより複雑となる。一般に腫瘍細胞の温熱感受性は、*in vitro* よりも *in vivo* の方が高いことが多くの研究者によって報告されており、生体においては温熱による直接的な影響に加えて種々の環境的あるいは生理学的な要因、とりわけ温熱に対する腫瘍内血管の反応が温熱の効果に重要な影響を与えていることが注目されている¹³⁻¹⁵⁾。腫瘍内血管は不規則に屈曲し、1層の薄い内皮細胞しかなく、筋層および結合組織を欠くことが多く、また、神経支配や receptor がいないため温度などのストレスに対し微妙な調節機構が働かないといった特徴を有する¹⁶⁾。こういった理由から、腫瘍内の血流は遅く熱拡散が少ないため、同じ加温量でも正常組織に比べ温度が上がりやすく、また血管の破綻を生じやすいといわれている^{16,17)}。

温熱に対する腫瘍内血管の反応については、血流量の変化に関する研究は多いが^{14,17-21)}加温による血管壁の形態的变化^{16,22-25)}およびその透過性^{17,26,27)}に関する検討はあまりなされていない。

今回、著者は、家兎 VX-2 腫瘍を用いて、温熱単独、放射線単独および温熱併用放射線治療の治療効果を肉眼および光顕的に確認するとともに、その効果に関して腫瘍内血管の反応に着目し、その形態的变化および透過性の変化について電顕的に比較検討したので報告する。

実験材料および実験方法

1. 実験動物および腫瘍

実験動物として、雄性日本白色家兎（体重約 2 kg）を使用した。腫瘍は、佐賀医科大学口腔外科において家兎大腿部筋肉内に継代移植してきた VX-2 腫瘍を用いた。腫瘍組織を摘出したのち、 1×10^7 個/ml の細胞浮遊液を作成し、家兎腓腹筋内へ 0.5 ml 接種した。実験には移植後 13-17 日で腫瘍の長径が 3.0-3.5 cm に達したものをを用いた。

2. 温熱治療

家兎を Nembutal[®] (Abbot Laboratories, USA) 50 mg/kg.i.v. にて麻酔し、恒温槽(サーモメイト BF-41, ヤマト科学, 東京)に移植下肢を浸して、46°C, 1時間, 1回, 局所温熱治療を行った。

3. 温度計測

恒温槽を用いた加温による腫瘍組織への温熱の到達の程度や、得られた高温の持続時間などを具体的に把握するために、本実験に先立って、腫瘍移植家兎6羽、正常家兎3羽を用いて温度計測を行った。腫瘍移植家兎に対しては、腫瘍内（皮膚表面より 0.5 cm および 1.0 cm の深さ）、直腸内、腫瘍被覆皮膚表面、正常家兎に対しては、腓腹筋内（皮膚表面より 1.0 cm の深さ）の温度を測定した。直径 0.1 mm の銅-コンスタンタン熱電対を 18 ゲージのエラストー針外筒を用いて目的の部位に誘導した後、外筒のみを抜き、線を温度計に接続した。温度の計測および記録は、ポータブルハイブリッドレコーダ（横河北辰電機、東京）により、5分間隔で行った。

4. 放射線治療

放射線治療は、SOFTEX TYPE M-1005W 特 (80 kV, 10 mA, 1 mmA 1 フィルター) (ソフテックス, 東京) を用いて後下肢腫瘍部外側面より 1000 rad (あるいは 500 rad) 1 回照射した。温熱併用放射線治療では加温直前に照射した。

5. 観察方法

(1) 成長曲線

温熱治療のみ (7 羽), 放射線治療 (1000 rad, 6 羽; 500 rad, 3 羽) のみ, 温熱併用放射線治療 (1000 rad, 7 羽; 500 rad, 3 羽), 無処置 (6 羽) について, 治療後 3 日毎に腫瘍体積 ($\pi ab^2/6$; a: 長径 b: 短径) を測定し, 腫瘍成長曲線を作成した。

(2) 光顕的観察

光顕的には, それぞれの治療 (放射線照射は 1000 rad) 後, 6 時間 (4 羽), 1 日 (4 羽), 3 日 (4 羽), 7 日 (2 羽), 9 日 (2 羽) にと殺し, 放射線源に最も近い外側から最も遠い内側にかけての腫瘍最大断面の組織標本を作成し観察した。特に, 腫瘍細胞の壊死の程度に関しては, 断面を放射線源に最も近い外側辺縁部, 中心部さらに放射線源から最も遠い内側辺縁部に分けて判定した。

(3) 電顕的観察

電顕的には, それぞれの治療 (放射線照射は 1000 rad) 後, 1 日目 (各 4 羽), 3 日目 (各 4 羽) に, 耳静脈よりフェリチン (Sigma Chemical Co. USA) を 500 mg 注入し, 注入後 2 分 (2 羽), 5 分 (2 羽) でと殺し, 放射線および温熱の影響が最も強いと考えられる外側辺縁部の腫瘍血管の形態, および透過性について観察した。この研究では特に長径が 30 μm 以下の血管に注目し, その形態的観察を行った。フェリチンの透過性に関する半定量的検討には 5000 倍で撮影したフィルムを, 1.5 倍に拡大焼き付けし, 10 倍の拡大鏡を用いて血管内外に存在するフェリチン粒子の数と分布の程度をできるだけ広範囲にわたって観察するようにした。判定は, フェリチン粒子が認められないもの (-), 少量から中等量認められるもの (+), 多量に認められるもの (++) とした。なお, フェリチン粒子の観察はすべて無染色の超薄切片を使用した。

実験結果

1. 恒温槽による加温パターン

腫瘍移植家兔の腫瘍内 0.5 cm および 1.0 cm, 直腸内, 腫瘍被覆皮膚皮膚表面および正常家兔の腓腹筋内 1.0 cm の部位における加温中の

Fig.1 Sequential change of the tissue temperature during and after local heating. Points, mean; bars, range.

温度変化を Fig.1 に示す. 46°C , 1時間の加温により腫瘍内 0.5 cm ならびに 1.0 cm の部位において, 42.5°C 以上の加温が約 50 分間可能であった.

2. 腫瘍成長曲線

それぞれの治療後, 21 日目までの腫瘍成長曲線を Fig.2 に示す. 温熱治療のみの場合, 治療後 3 日目まで腫瘍の増殖抑制がみられたが, それ以後は無処置のものと同様の増殖パターンを示した. 放射線治療 (1000 rad) のみの場合, 治療後 9 日目まで腫瘍は緩やかに縮小したが, その後は再増殖の傾向を示した. これに対し, 温熱併用放射線治療の場合, 治療後 3 日目に腫瘍の容積が治

療前の約半分となり, それ以後も縮小を続け, 21 日目にはすべての家兎で腫瘍を触知しなくなった. また, 放射線を 500 rad にした場合には, 放射線治療のみでは腫瘍は縮小しなかったが, これに温熱を併用することにより 6 日目まで縮小傾向を示し, それ以後は再び増殖した.

3. 光顕所見

移植後 13-17 日で長径 3.0-3.5 cm の未処置の腫瘍では, 中心部に軽度の壊死が認められるのみで, 腫瘍内血管には著変は認められなかった. 温熱治療のみの場合, 治療後 6 時間では特に腫瘍辺縁部において血管の拡張およびうっ血, 浮腫などが認められた (Fig.3). 同様の変化は, 1 日目, 3 日目でも認められたがその程度は時間の経過とともに弱くなっていた. 逆に, 腫瘍中心部では腫瘍細胞の壊死が強くなる傾向があり, 治療後 7 日目あるいは 9 日目になると, 腫瘍中心部は比

Fig. 2 Changes of tumor volume after various combination of treatments. Points, mean; bars, SD.

Fig. 3 Tumor tissue 6 hours after hyperthermia showing dilatation of blood vessels and interstitial edema (X150).

較的広範囲にわたって壊死に陥っていた。しかし、辺縁部には壊死はほとんど認められず、腫瘍細胞が胞巣状あるいは索状構造を示しながら増殖していた。放射線治療のみの場合、治療後6時間ではほとんど変化は認められなかった。しかし、1日目になるとうっ血と共に腫瘍細胞に変性あるいは壊死傾向が認められるようになった。すなわち、腫瘍細胞の膨化、細胞相互の接着性の消失、核濃縮などが出現し、これらの変化は特に放射線の影響が最も強いと考えられる腫瘍外側部から中心部にかけて目立った (Fig.4)。3日目になると、

Fig. 4 Degeneration and necrosis of tumor cells observed 1 day after radiotherapy (X200).

これらの変化はさらに著明となったが、放射線の影響が最も弱い内側辺縁部には、ほとんど変性所見を示さない腫瘍細胞の胞巣が存在していた。7日目さらに9日目になると、腫瘍本来の胞巣状あるいは索状構造をとりつつ腫瘍細胞が再増殖している像が、主として内側辺縁部に認められるよう

になった。温熱併用放射線治療の場合、治療後6時間では、温熱治療のみの場合と同様に、血管の拡張およびうっ血、軽度の浮腫が認められた。1日目では、軽度の浮腫は認められるものの血管の拡張は目立たず、放射線治療のみの場合と同様に、腫瘍細胞の変性および壊死傾向が認められるようになった。この腫瘍細胞の変性および壊死の傾向は放射線治療のみの場合と比べ、その程度がやや強く範囲も広いように思われた。3日目になると、腫瘍細胞は広範囲にわたって壊死に陥っており、内側辺縁部に存在する腫瘍細胞も本来の胞巣状あるいは索状構造を失って強い変性壊死の像を示していた (Fig.5)。7日目さらに9日目になっても腫瘍は壊死に陥ったままで、内側辺縁部においても再増殖を思わせる所見は認められなかった (Fig.6)。以上の光顕所見を腫瘍の壊死の程度という観点から表にまとめると Table 1 のようになる。

Fig. 5 Degeneration and necrosis of tumor cells observed in the inner portion of the tumor 3 days after thermoradiotherapy (X200).

Fig. 6 Widespread necrosis of tumor cells observed
9 days after thermoradiotherapy (X100).

Table 1 Degree of tumor necrosis after treatment

Treatment	Degree of tumor necrosis		
	zone: outer	central	inner
Untreated	-	±	-
Hyperthermia:			
6 hours	-	±	-
Day 1	-	±~+	-
Day 3	-	+	-
Day 7or9	-	+	-
Radiation:			
6 hours	-	±	-
Day 1	±~+	±~+	-
Day 3	+	+	±~+
Day 7or9	++	+	-~±
Radiation +			
Hyperthermia:			
6 hours	-	±	-
Day 1	+	+	-~±
Day 3	+~++	+~++	+
Day 7or9	++	++	++

Irradiation(1000rad) was performed from the outside of the tumor-bearing leg.
Degree of the tumor necrosis are graded as no tumor necrosis:(-), slight or spotty necrosis:(±), moderately extensive necrosis:(+), extensive necrosis:(++).

4. 電顕所見

腫瘍内血管の形態的变化としては、温熱治療のみの場合、1日目、3日目共に血管内皮細胞は伸展し、血管内腔の拡張が認められた (Fig.7). 放射線治療のみの場合、1日目には目立った変化はなかったが、3日目になると内皮細胞の血管腔内への突出が散見されるようになった (Fig.8). これらの変化に対して、温熱併用放射線治療では、1日目には温熱治療のみの場合のような内腔の拡張は稀で、むしろ放射線治療のみの場合に3日目で見られた内皮細胞の内腔への突出がすでに治療後1日目で発生していたことが注目された (Fig.9). この変化は3日目になるとさらに顕著となった (Fig.10). このような特異な内皮細胞の変化にはいくつかの形態があり、胞体の著明な腫大のために内腔を狭窄するように見えるものから (Figs.8,9), 胞体の一部が長く突出し、ポリープ状に内腔へ隆起したもの (Fig.10) などが観察された。また、温熱治療のみと温熱併用放射線治療の場合には1日目、3日目ともに、さらに放射線治療のみの場合でも3日目には、血管周囲の浮腫が認められた。

Fig. 7 Dilatation of a small blood vessel. One day after hyperthermia (X5,400).

Fig. 8 Tumor vessel showing swelling of endothelial cell. Three days after radiotherapy (X5,000).

Fig. 9 Swelling and villous formation of endothelial cell. One day after thermoradiotherapy (X6,900).

Fig. 10 Swelling and polypoid projection of endothelial cell cytoplasm into the vascular lumen. Three days after thermoradiotherapy (X3, 300).

次に、透過性の変化について電顕的に検討した。トレーサーとして用いたフェリチンは、分子量 450,000、分子径 10-11 nm の鉄蛋白質であり、透過型電子顕微鏡下では 5-6 nm の鉄ミセルがフェリチン粒子として観察された。これを耳静脈より注入すると、無処置のものでは、2 分後には血管内のみに認められていたものが、5 分後に観察すると血管外に散在性に透過していた。それぞれの治療群におけるフェリチンの透過性の程度を Table 2 に示す。温熱治療のみの場合、治療後 1 日目では、注入後 2 分ですでに血管外に透過しており (Fig.11), 5 分後にはさらに多くのフェリチン粒子が血管外に認められるようになった。治療後 3 日目になると、注入後 2 分ですでに血管外に多くのフェリチン粒子があり、5 分後も同様であった。放射線治療のみの場合、治療後 1 日目では無処置のものと変わらず、フェリチン粒子は 2 分後においては血管腔内のみに認められ、5 分後になって血管外にも散在性に見出されるようになった。治療後 3 日目では、2 分後においてすでに血管外に散在性に認められ、5 分後には多くのフェリチン粒子が血管外に透過していた。また、温熱併用放射線治療の場合には、治療後 1 日目、3 日目共に 2 分後ですでに血管外に散在性にフェリチン粒子の透過があり (Fig.12), 5 分後にはさらに高度となった (Fig.13)。

Table 2 Permeability to ferritin of tumor vessels after treatment

Treatment	2 mins		5 mins	
	Intraluminal	Extravasated	Intraluminal	Extravasated
Untreated	+	-	+	+
Hyperthermia:				
Day 1	+	+	+	++
Day 3	+	++	+	++
Radiation:				
Day 1	+	-	+	+
Day 3	+	+	+	++
Radiation + Hyperthermia:				
Day 1	+	+	+	++
Day 3	+	+	+	++

Degree of the permeability are graded as none: (-), slight to moderate: (+), marked: (++) .

Fig. 11-a

Fig. 11-b

Fig. 11-c

Fig. 11 Higher magnification of the blocked areas of Figs. 7, 9 and 10 are shown in (a), (b) and (c) respectively. (a) and (b) reveal scattered intraluminal (I) and extravasated (E) ferritin particles (arrows). Number of extravasated (E) ferritin particles is apparently increased in (c). a & b 2 minutes and c 5 minutes after intravenous injection of ferritin (a: X118,000, b: X57,000 c: X72,000).

考 察

最近の癌の温熱治療に対する期待と関心はきわめて高く、その抗腫瘍効果に関して種々の腫瘍、動物を用いた *in vitro*, *in vivo* における基礎的研究が数多く報告されている。今回著者が用いた家兎 VX-2 腫瘍を使った *in vivo* の研究も散見されるが²⁸⁻³¹⁾腫瘍の移植部位、治療の対象とした腫瘍の大きさ、加温の方法、加温温度などの基本的な実験条件が異なるため、得られた結果は必ずしも一様ではない。VX-2 腫瘍は、Shope papilloma virus によって発生する家兎皮膚の乳頭腫の中から悪性化したものを移植可能な癌として確立されたもので³²⁾、正常組織に比べ血管に富み、また、温熱抵抗性を示す腫瘍の1つであるとされている³³⁾。そこで著者は、まず、本実験で用いた家兎 VX-2 腫瘍の、温熱治療のみ、放射線治療のみ、温熱併用放射線治療に対する反応を腫瘍成長曲線を求めることにより確認した。加温装置としては恒温槽を用い、46°C、1時間、1回の加温を行った。腫瘍内は 42.5°C 以上に少なくとも 50 分間加温できており、温熱の抗腫瘍効果を検討する上でほぼ満足すべき加温ができたものと考えた。それぞれの治療を行った後の腫瘍成長曲線 (Fig.2) を比較検討すると、温熱治療のみの場合、治療後3日目までの増殖抑制はあったが、その後は無処置のものとはほぼ同様の傾きを持った曲線を描き、本実験で用いた加温方法では温熱治療のみの抗腫瘍効果はわずかしき期待できなかった。これは、Muckle ら³⁰⁾が家兎の大腿に移植した VX-2 腫瘍に対して、著者と同じように恒温槽 (46°C, 75分) による加温を行った結果とほぼ同様の結果であった。しかし、著者の研究でも彼らと同様に放射線と併用することにより著明な腫瘍縮小効果が現れた。

温熱治療と放射線治療を併用することにより相乗的な抗腫瘍効果が現れることは、すでに多くの研究者により認められている^{2,30,34)}。本実験では、放射線 (1000 rad) 治療のみでは、治療後9日目までは腫瘍縮小効果が認められたが、それ以後はゆっくりではあったが再増殖した。これに比べ温熱併

用放射線治療では治療後早期より腫瘍が縮小し、治療後21日目にはすべての腫瘍が触知できなくなった。また、放射線量を 500 rad にした場合、温熱治療と併用することにより放射線 (1000 rad) 治療のみの場合とほぼ同様の成長曲線が得られた。これらの結果は、温熱治療を放射線治療と併用することにより相乗的な効果が得られることを明らかに裏づけるものであった。

次に著者は、上記の肉眼的な変化を組織学的に検討するために光顕による観察を行った。温熱治療のみの場合、治療後6時間では血管の拡張およびうっ血、浮腫などが認められ、これらの変化は3日目まで持続したが、その程度は次第に弱くなっていた。これとは逆に、腫瘍中心部の壊死は強くなる傾向があった。これらの変化は温熱治療のみの場合に認められた3日目までの増殖抑制を反映したものと思われた。放射線治療のみの場合には治療後6時間目までは目立った変化は無く、1日目になってうっ血、軽度の腫瘍細胞の壊死傾向などが認められた。3日目より腫瘍細胞の壊死の範囲は増大したが、7-9日目より放射線による影響が最も少ないと考えられた内側辺縁部より腫瘍組織の明らかな再増殖が発生した。一方、温熱併用放射線治療の場合には、治療後6時間では、温熱治療のみの場合と同様に血管の拡張およびうっ血、浮腫などが目立ち、治療後1日目にはうっ血、浮腫に加えてすでに広範囲にわたる腫瘍組織の変性壊死の像が認められた。治療3日目になると、辺縁部に強い変性像を示す腫瘍細胞が存在するのみで、7-9日目には、ほぼ完全に壊死に陥っていた。以上より、加温を放射線と併用することにより腫瘍細胞の壊死傾向が長期間持続することが組織学的に判明した。

これらの光顕的な変化の差をさらに詳しく検討するために腫瘍内の血管の反応に着目して、その形態的变化ならびに透過性の変化を電顕的に観察した。形態的には温熱治療のみの場合、1日目、3日目共に血管内皮細胞は伸展し、血管内腔は拡張していた。放射線治療のみの場合には1日目には目立った変化はなく、3日目になって血管内皮

細胞の血管内腔への突出が散見されるようになった。これらの変化に対して、温熱併用放射線治療では、温熱治療のみの場合に観察された血管内腔の拡張は稀で、むしろ放射線治療のみの場合に3日目まで認められたような血管内皮細胞の内腔への突出が、すでに治療後1日目に発生していた。この変化は3日目になるとさらに著明となり、観察した多くの血管で認められた。また、透過性の変化については、温熱治療のみあるいは温熱併用放射線治療の場合には、治療後1日目よりすでにその亢進があり、この変化は3日目まで続いていたが、放射線治療のみの場合には、治療後3日目になって初めて透過性の亢進が観察された。

温熱治療による血管系の形態的および機能的な変化については、種々の腫瘍や動物を用いて研究されており、血管系に何らかの障害が発生することが、腫瘍内に広範囲な壊死を導く原因となると考える研究者は多い¹⁶⁻²⁷⁾。今回著者が行った実験で、温熱単独治療後6時間、1日目に認められた血管の拡張およびうっ血などの所見は、Eddy¹⁶⁾あるいはEmamiら²⁴⁾がすでに報告している。彼らは、温熱治療に対する腫瘍内血管のこのような病理生理学的な反応が、*in vivo*における腫瘍の反応に重要な役割りを果たしていると述べている。Eddy¹⁶⁾もEmamiら²⁴⁾も加温後24時間目までしか観察していないが、著者の実験では3日目でも、その程度は弱くはなったが、血管の拡張やうっ血が持続していた。また、著者の研究では温熱併用放射線治療の場合、温熱治療のみでは認められなかった血管内皮の形態的变化が観察された。それは血管内皮細胞の血管内腔への突出で、温熱併用放射線治療後1日目にすでに発生しており3日目にはさらに著明となった。このような内皮細胞の変化は、放射線治療のみの場合には3日目になって初めて見い出される所見であり、温熱併用放射線治療の場合に比べ発生の時期が遅く、程度も一般に軽度であった。

放射線治療あるいは温熱併用放射線治療に対する腫瘍内血管の反応について検討したEddyら²⁵⁾の報告によると、放射線治療(2000 rad)後1

時間で加温したものでは、5時間後に腫瘍の50%の領域に完全な血行停止が起こり、残る腫瘍部分も軽度から中等度の血管径ならびに血液灌流量の減少が発生している。これに対して、放射線治療のみでは照射後6分までは一過性の血管径の減少がみられているが、1時間、5時間、24時間後には血管径、血行ともに照射前の状態にもどっている。一方、放射線照射に対する血管の反応を長時間に渡って観察したMerwinら³⁵⁾によると、腫瘍内血管の血管腔の狭小化は照射後2日目より目立ってくると記載している。温熱併用放射線治療後1日目ですでに発生し、また放射線治療のみでも治療後3日目になって観察された内皮細胞の内腔への突出は、Eddyら²⁵⁾およびMerwinら³⁵⁾が報告している血管径の狭小化や血液灌流量の減少を形態学的に裏付ける所見と思われる。Emamiら²⁴⁾およびFallonら²²⁾は、類似の内皮細胞の変化を加温のみでも認めたと記載しているが、著者の実験では温熱治療のみではこのような内皮細胞の変化は見い出せなかった。

治療法の違いによる腫瘍内血管の反応の差を、その透過性の変化という観点から検討した報告には、Song¹⁷⁾や、Gerlowskiら²⁷⁾のものがある。彼らは加温中あるいは加温直後の透過性の変化を¹²⁵I標識アルブミンまたはデキストランをトレーサーとして観察しているが、腫瘍内血管に有意の透過性亢進は見い出せなかったと報告している。しかし、著者がフェリチンを用いて行った研究では、温熱治療のみおよび温熱併用放射線治療において治療後すでに1日目から透過性の亢進があり、3日目においても透過性の亢進は持続していた。これに対し、放射線治療のみでは3日目より透過性の亢進がみられたにすぎず、治療に温熱を加えたほうに早期より明らかな透過性の亢進が発生していた。このような透過性の亢進は血管周囲の浮腫としても観察されており、温熱刺激によってもたらされる透過性の異常な亢進が血管内外の恒常性を破綻することにより腫瘍細胞を取り巻く環境に影響を与え、その結果二次的に腫瘍細胞に重篤な障害が発生し、腫瘍細胞の壊死が誘導され

やすくなることは十分に考えられる。Emami ら²⁴⁾は、血漿が浸出することによって腫瘍内を流れる血液の粘性が高まり、ついには血流の停止を招き、さらにこのような変化に高度の充血が加わって血管壁の破綻や出血が引き起こされると述べている。

温熱治療が腫瘍内の血管に直接損傷を与えることによって、二次的に腫瘍細胞を障害するような現象は、*delayed cell death in tumors after hyperthermia*^{15,36)}あるいは“*latent*” *tissue injury following hyperthermia*³⁷⁾と呼ばれている。Badylak ら³⁷⁾は、この“*latent*” *tissue injury* は加温後の血栓形成および虚血によるものであろうと推論している。著者の研究では、明らかな血栓の形成は認められなかったが、加温により早期に出現する腫瘍内血管の内皮細胞の腫大と内腔への突出および透過性の亢進に示される内皮細胞の閉塞機能の破綻などは、やはり温熱治療あるいは温熱併用放射線治療における *delayed cell death in tumors* の発生機序に関与した血管壁の障害の存在を示す重要な変化と考えられた。

結 語

家兎 VX-2 腫瘍を用いて、温熱単独、放射線単独および温熱併用放射線治療の効果を腫瘍成長曲線を求めることにより検討した。さらに、それぞれの治療法に対する腫瘍の反応を光顕的に観察すると共に、その抗腫瘍効果に関して腫瘍内血管の反応に着目して、形態的变化および透過性の変化を電顕的に比較検討した。

1. 温熱併用放射線治療では著明な抗腫瘍効果が認められた。

2. 光顕的に、温熱併用放射線治療では腫瘍細胞の壊死傾向が長く続くように思われた。

3. 電顕的に腫瘍内血管の形態的变化を検討すると、放射線治療のみでは治療後3日目に認められた内皮細胞の腫大と内腔への突出が、温熱併用放射線治療では1日目ですでに発生しており、3日目にはさらに著明となった。

4. 腫瘍内血管の透過性の変化を、フェリチンを

トレーサーとして電顕的に検討すると、温熱治療のみあるいは温熱併用放射線治療では、治療後1日目から透過性の亢進が発生していたが、放射線治療のみでは3日目になって透過性の亢進が観察された。

5. 加温により早期に出現する腫瘍内血管の内皮細胞の腫大と内腔への突出および透過性の亢進は、温熱治療あるいは温熱併用放射線治療における *delayed cell death in tumors* の発生に関与した血管壁の障害の存在を示す重要な所見と考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った、佐賀医科大学口腔外科学教室香月武教授、病理学教室渡邊照男教授、杉原甫教授に深謝致します。

本論文の要旨は、日本ハイパーサーミア学会第3回大会(昭和61年11月、大阪)、第46回九州癌学会(昭和62年6月、佐賀)および日本ハイパーサーミア学会第4回大会(昭和62年10月、鳥取)において発表した。

文 献

- 1) Rofstad, E. K. and Brustad, T.: Primary and secondary cell death in human melanoma xenografts following hyperthermic treatment. *Cancer Res.* 46: 355-361, 1986.
- 2) Hill, S. A. and Denekamp, J.: The response of six mouse tumours to combined heat and Xrays: Implications for therapy. *Br. J. Radiol.* 52: 209-218, 1979.
- 3) Emami, B., Mittal, B. M. and Sapareto, S.: Sequencing of the total course of hyperthermia and irradiation. *Cancer Res.* 44: 4731-4732, 1984.
- 4) Hahn, G.M.: Potential for therapy of drugs and hyperthermia. *Cancer Res.* 39: 2264-2268, 1979.
- 5) Marmor, J. B.: Interactions of hyperthermia

- and chemotherapy in animals. *Cancer Res.* 39: 2269–2276, 1979.
- 6) Abe, M., Hiraoka, M., Takahashi, M., Egawa, S., Matsuda, C., Onoyama, Y., Morita, Kakehi, M. and 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.
 - 7) Irish, C. E., Brown, J., Galen, W. P., Gallucci, J. J., Hyman, M. D., Horowitz, I. J., Snedecor, P. A. and Baker, H. W.: Thermoradiotherapy for persistent cancer in previously irradiated fields. *Cancer* 57: 2275–2279, 1986.
 - 8) 奥村 寛: 温熱療法。組織培養 10: 11–14, 1984.
 - 9) Westra, A. and Dewey, W. C.: Variation in sensitivity to heat shock during the cell cycle of Chinese hamster cells in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* 19: 467–477, 1971.
 - 10) Gerweck, L. E., Dahlberg, W. K. and Greco, B.: Effect of pH on single or fractionated heat treatments at 42–45. *Cancer Res.* 43: 1163–1167, 1983.
 - 11) Lepock, J. R.: Involvement of membranes in cellular responses to hyperthermia. *Radiat. Res.* 92: 433–438, 1982.
 - 12) Wong, R. S. L. and Dewey, W. C.: Molecular studies on the hyperthermic inhibition of DNA synthesis in Chinese hamster ovary cells. *Radiat. Res.* 92: 370–395, 1982.
 - 13) Marmor, J. B., Hilerio, F. J. and Hahn, G. M.: Tumor eradication and cell survival after localized hyperthermia induced by ultrasound. *Cancer Res.* 39: 2166–2171, 1979.
 - 14) Song, C. W., Kang, M. S., Rhee, J. G. and Levitt, S. H.: Vascular damage and delayed cell death in tumours after hyperthermia. *Br. J. Cancer* 41: 309–312, 1980.
 - 15) Kang, M. S., Song, C. W. and Levitt, S. H.: Role of vascular function in response of tumors in vivo to hyperthermia. *Cancer Res.* 40: 1130–1135, 1980.
 - 16) Eddy, H. A.: Alterations in tumor microvasculature during hyperthermia. *Radiology* 137: 515–521, 1980.
 - 17) Song, C. W.: Effect of hyperthermia on vascular functions of normal tissues and experimental tumors: Brief communication. *J. Natl. Cancer Inst.* 60: 711–713, 1978.
 - 18) Song, C. W., Kang, M. S., Rhee, J. G. and Levitt, S. H.: The effect of hyperthermia on vascular function, pH, and cell survival. *Radiology* 137: 795–803, 1980.
 - 19) Stewart, F. and Begg, A.: Blood flow changes in transplanted mouse tumours and skin after mild hyperthermia. *Br. J. Radiol.* 56: 477–482, 1983.
 - 20) Dudar, T. E. and Jain, R. K.: Differential response of normal and tumor microcirculation to hyperthermia. *Cancer Res.* 44: 605–612, 1984.
 - 21) Song, C. W.: Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment: A review. *Cancer Res.* 44: 4721–4730, 1984.
 - 22) Fallon, J. T. and Stehbens, W. E.: Effect of ultrasound on arteries. *Arch. Path.* 94: 380–388, 1972.
 - 23) Emami, B., Nussbaum, G. H., TenHaken, R. K. and Hughes, W. L.: Physiological effects of hyperthermia: Response of capillary blood flow and structure to local tumor heating. *Radiology* 137: 805–809, 1980.
 - 24) Emami, B., Nussbaum, G. H., Hahn, N.,

- Piro, A. J., Dritschilo, A. and Quimby, F.: Histopathological study on the effects of hyperthermia on microvasculature. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 7: 343-348, 1981.
- 25) Eddy, H. A. and Chmielewski, G.: Effect of hyperthermia, radiation and adriamycin combinations on tumor vascular function. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8: 1167-1175, 1982.
 - 26) Song, C. W., Kang, M. S., Rhee, J. G. and Levitt, S. H.: Effect of hyperthermia on vascular function in normal and neoplastic tissues. *Ann. NY. Acad. Sci.* 335: 35-47, 1980.
 - 27) Gerlowski, L. E. and Jain, R. K.: Effect of hyperthermia on microvascular permeability to macromolecules in normal and tumor tissues. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 4: 363-372, 1985.
 - 28) Muckle, D. S. and Dickson, J. A.: The selective inhibitory effect of hyperthermia on the metabolism and growth of malignant cells. *Br. J. Cancer* 25: 771-778, 1971.
 - 29) Dickson, J. A. and Muckle, D. S.: Total-body hyperthermia versus primary tumor hyperthermia in the treatment of the rabbit VX-2 carcinoma. *Cancer Res.* 32: 1916-1923, 1972.
 - 30) Muckle, D. S. and Dickson, J. A.: Hyperthermia (42°C) as an adjuvant to radiotherapy and chemotherapy in the treatment of the allogeneic VX2 carcinoma in the rabbit. *Br. J. Cancer* 27: 307-315, 1973.
 - 31) Dickson, J. A., Shah, S. A., Waggott, D. and Whalley, W. B.: Tumor eradication in the rabbit by radiofrequency heating. *Cancer Res.* 37: 2162-2169, 1977.
 - 32) Kidd, J. G. and Rous, P.: A transplantable rabbit carcinoma originating in a virus-induced papilloma and containing the virus in masked or altered form. *J. Exp. Med.* 71: 813-848, 1940.
 - 33) Dickson, J. A. and Calderwood, S. A.: Thermo-sensitivity of neoplastic tissues in vivo, In: Storm F. Kristian, ed. *Hyperthermia in cancer therapy*. Boston: GK Hall Medical Publishers 63-140, 1983.
 - 34) Overgaard, J.: Simultaneous and sequential hyperthermia and radiation treatment of an experimental tumor and its surrounding normal tissue in vivo. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 6: 1507-1517, 1980.
 - 35) Merwin, R. and Algire, G. H.: Transparent-chamber observations of the response of a transplantable mouse mammary tumor to local roentgen irradiation. *J. Nat. Cancer Inst.* 11: 593-623, 1950.
 - 36) Fajardo, L. F., Egbert, B., Marmor, J. and Hahn, G. M.: Effects of hyperthermia in a malignant tumor. *Cancer* 45: 613-623, 1980.
 - 37) Badylack, S. F., Babbs, C. F., Skojac, T. M., Voorhees, W. D. and Richardson, R. C.: Hyperthermia-induced vascular injury in normal and neoplastic tissue. *Cancer* 56: 991-1000, 1985.