原 著

組織内 pH 値の温熱感受性及び温熱耐性への影響 (In Vivo における検討)

長谷川武夫 稲田由紀 田中敬正 *高橋 徹

関西医科大学放射線科

// R I 施設

Effects of Hyperthermia Induced Changes in pH Value on Tumor Response and Thermotolerance.

Takeo Hasegawa, Yuki Inada, Yoshimasa Tanaka, *Tohru Takahashi

Department of Radiology, *Radioisotope Center, Kansai Medical University.

Abstract :

An intraperitoneal injection of glucose (6mg/g) was made to induce hyperglycemia, causing low pH specifically to the tumor to study the degree of thermosensitivity and thermotolerance caused by the glucose administration in an ICR mouse with sarcoma-180 tumor transplanted under the skin of the thigh. Heating was with a controlled water bath of 43°C for 30 minutes. A second heating of the same temperature and duration was applied at various intervals. After administration of the glucose, hyperglycemia resulted. The pH value in the tumor area fell by 0.3 to 0.6, while normal tissue registered a reduction of 0 to 0.1pH, and the time required for recovery was significantly shorter for normal tissue. The drop in pH during hyperthermia was 0.2 to 0.3pH for both the tumor and the normal tissue, while with the combination of heating and glucose administration, pH values of the tumor changed from 6.9 to 6.5, while the change was from 7.2 to 6.9 for the normal tissue. The normal tissue recovered to initial levels immediately after heating, but recovery time of the tumor tissue was slow. Thermotolerance of the group administrated with glucose was maximum at 6 hours after heating, and decayed after 12 hours. Groups without glucose administration showed maximum thermal resistance after 12 hours, and did not show complete decay even after 72 hours. The speed of tumor growth of the group administrated with glucose was 4 days slower than for the group without glucose administration, and showed a 1 to 2 day delay regardless of the interval of heating, showing significant thermal enhancement from the glucose. Further, hyperglycemia induced by glucose administration lowers pH values selectively in tumor areas, making it possible to apply the thermal effect selectively to the tumor areas.

Key Words :

温熱治療	Hyperthermia
高血糖症	Hyperglycemia
温熱耐性	Thermotolerance
グルコース	Glucose
温熱感受性	Thermosensitivity

抄 録

Sarcoma-180 腫瘍を大腿部皮下に移植した ICR マウスにグルコース (6 mg/g) を腹腔内投与し高血糖症を誘発させて、腫瘍部を特異的に低 pH にし、グルコースによる温熱増感及び温熱耐性の出現度合を調べた。温熱処理は恒温水槽を用い、43°C、30 分間の温熱を加えた後、種々の時間間隔を置いて、2 回目の 43°C、30 分間の温熱を加えた。グルコースの投与後、高血糖症が発生し、腫瘍部は 0.3 ~ 0.6pH の低下を示したが、正常部は 0 ~ 0.1pH の減少にとどまり、その回復時間も早かった。温熱処理時の pH 低下は腫瘍部も正常部も 0.2 ~ 0.3pH の低下が起こり、温熱とグルコース投与の併用では、pH の変化は腫瘍部では 6.9 から 6.5 へ、正常部では 7.2 から 6.9 へ減少し、加温後正常部はすぐに元の pH 値に回復したが、腫瘍部の回復時間は遅かった。温熱耐性はグルコース投与群で、加温後 6 時間目に最大を示し 12 時間目には消失しているが、グルコース非投与群では 12 時間目に温熱耐性が最大となり 72 時間後も温熱耐性の完全な消失を示していなかった。加温後 12 時間目にグルコース投与群の腫瘍成長速度は 4 日間も非投与群より遅れ、全加温間隔で 1 ~ 2 日間の遅れが示され、グルコースによる有意な温熱増感が示された。本研究の結果から、グルコース投与により誘発する高血糖症は腫瘍部を選択的に低 pH に出来る事が示された。これらの結果から本法は腫瘍部に対し、温熱効果を選択的に増強できることを示唆している。

緒 言

悪性腫瘍に対する治療として、現在、放射線治療、化学療法、温熱療法、外科的療法、その他これらの併用療法等が行なわれている。近年、放射線に抵抗性で大型の腫瘍に対して温熱療法が有効であるとの報告がなされている^{1)~5)}。この温熱治療の特徴としては、1) 温熱により正常部は血流は増加するが、腫瘍部は血流低下が発生し、温熱効果を受けやすい。2) 低酸素細胞を増感する。3) 栄養不足細胞を増感する。4) 低 pH 環境の

細胞を増感する。5) 新生物組織は正常組織よりも熱感受性である。6) 放射線効果の少ない DNA 合成期 (S 期) を増感する。7) X 線による PLDR が抑制される等があげられる。本研究は、組織内 pH の低下により温熱増感することに注目し、グルコース投与を行って高血糖症を誘発させ、これにより腫瘍部の血流が低下するに従って、腫瘍内 pH 値が低下する事を微小 pH 電極を用いて確認し、グルコース投与後の温熱耐性の消長及び温熱感受性の増強を In vivo 系で腫瘍成長速度を指標として調べた。

方法及び材料

本研究で使用した腫瘍は、ICR マウス (♂ 5 週令) の大腿部皮下に移植した Sarcoma-180 腫瘍細胞 (10⁶個/0.05ml) である。腫瘍は移植後、7 ~ 8 mm 径に成長したものを実験に使用した。腫瘍への温熱処理は循環温水槽 (43.0 ± 0.02°C, AGE-80, Taiyokagaku) を用い、7 匹を 1 グループとし、各マウスは特別なアクリル固定具にテープ止めして、腫瘍部を温水槽に浸して、43°C、30 分間の 1 回目の加温を行った。2 回目の加温は 1 回目の加温後、種々の時間間隔を置いて、1 回目加温と同様の 43°C、30 分間の加温処理を加えた。組織内 pH 値の測定は、マウスをペントバルビタール (0.3mg/匹) の背筋注によって麻酔を行い、その後、テープで一匹づつプラスチック固定台に固定し、マニピュレーターに設置された外径 40 ~ 60μm の pH 電極を数μm づつ刺入して組織内 pH 値の測定を行った。麻酔後、マウス腹腔に翼状針を確保し、連結チューブを通して、6 mg/g のグルコースを投与し、高血糖症の誘発時の腫瘍部及び正常部組織内の pH 値変化を経時的に測定した。本研究で使用した pH 微小電極は、外径 40 ~ 60μm の絶縁ガラス管の先端に、水素イオン通過ガラス (pH 感受部) の薄膜を有するもので、その内部に pH6.88 の緩衝液と塩化銀を飽和させた塩化カリウム溶液との混合液を満たし、その混合液内に塩素メッキ⁶⁾を行った銀線を浸して電極とした。腫瘍に対する温熱効果の評価は、2 回目

の温熱処理後に腫瘍体積が4倍に成長するまでの日数(腫瘍成長遅延日数)を用いた。グルコースの腹腔内投与の時期は、1回目の加温処理の30分前に6mg/gを腹腔内に刺入した翼状針より投与し、一群は温熱処理し、残りの群は高血糖症の誘発時の腫瘍部及び正常部組織内のpH値変化を測定した。本研究でのpH値の測定は銅網製のファラデーケージ内で行い、外部ノイズを低下させた。

結 果

pH微小電極の出力は図1に示すごとく、標準pH液pH4.01からpH9.18の範囲で電圧出力との間に完全な直線関係を示した。標準pH液へのpH微小電極の刺入後は、30～40秒で標準pH値の95%値を示して安定した。記録計での、

最終出力はpH4.01からpH9.18の間で全システムを通じて、最終的に481mVが得られ、微小な生体内pH変化を十分に測定し得た。2回の分割温熱処理を行なった後のマウス大腿部の腫瘍成長速度(腫瘍成長遅延日数)を見ると、1回目の43°C、30分間の温熱処理30分前に、グルコース(6mg/g)の腹腔内投与を行なった群と非投与群では、グルコース投与群は温熱処理後に有意な腫瘍成長の遅れを生じ、グルコースによる温熱増感が見られた(図2)。特に、1回目と2回目の温熱処理間隔が24時間の時に、グルコース投与群は非投与群よりも大きな腫瘍成長の遅れが観測され、グルコース投与による温熱増感効果が示された(図2)。グルコースの投与と腫瘍成長速度、つまりグルコースによる温熱感受性を腫瘍成長遅延日数で見ると、未処理のコントロール群では、7.

図1 図の左は標準 pH 液 (pH 4.01 ~ 9.18) を測定した時の pH 電極からの出力を増幅及び縮小し、93mV/pH に調整して、記録計に出力したグラフであり、横軸は時間 (60sec/Div)、縦軸は pH 値を示す。また、図右は標準液の pH 値と出力電圧及び記録計での出力幅との関係を示す。

図2 図は縦軸に2回の分割加温後に腫瘍が4倍に成長する日数を示し、横軸は1回目の加温処理と2回目の加温処理の間の処理間隔の時間を示す。白丸はグルコース非投与マウスの腫瘍成長速度をしめし、黒丸はグルコース投与マウスの腫瘍成長速度を示す。各点は7匹のマウスの腫瘍成長日数の平均値を示す。使用した腫瘍はICRマウス大腿部皮下に移植したS-180腫瘍(7-8mm径)である。

5日で腫瘍は4倍に成長したのに対し、2回目の温熱処理を行なった群は腫瘍が4倍に成長する日数は11.5日と、コントロール群に比べて4日間も腫瘍の成長は遅れを示した。

また、6mg/gのグルコース投与後に、2回の分割温熱処理を行なった群は温熱処理後に腫瘍が4倍に成長する日数は13.2日となり、コントロール群に比べて5日間も腫瘍成長は遅れ、グルコースによる温熱感受性の有意な増強が観測された。また温熱耐性を調べると、グルコース投与群は温熱処理間隔が6時間目が最大の温熱耐性を示し、12時間目には消失している。しかしグルコース非投与群では温熱処理後12時間目に最大の温熱耐性を示し、72時間目にも温熱耐性は残っている。

このことからグルコース投与による温熱耐性の抑制が観測された(図2)。一方、組織内のpHの変化を調べると、グルコース投与後30分で腫瘍組織内のpH値は急速に0.3~0.6pH低下し、その後、一定値を保った。一度低下したpH値はグルコース投与後、5~6時間目にゆっくりとした回復を示した(図3)。データには示していないが、温熱を加えることで組織内のpHは腫瘍部も正常部も0.2~0.3pH低下する。またグルコース投与と温熱処理の併用で正常部のpH値は7.2から6.9に低下し、腫瘍部は6.9から6.5まで低下を示した。また温熱停止後、正常部は急速に元のpH値に回復したが、腫瘍部はその回復時間が遅い。グルコース投与後の血中濃度と正常部

図3 図は縦軸に腫瘍組織内の pH 値の変化を示す。横軸はグルコース投与前及び投与後の経過時間を示す。グルコース投与時の高い pH 値はマウスの動きによるノイズである。

組織及び腫瘍部組織内の pH 値の変化を図4に示す。グルコース投与後30分で血中濃度は最大値を示し、その後急速に低下した。その時、腫瘍部の pH 値は血中濃度が最大値を示した時間よりも30分遅れて最低値を示した。血中のグルコース濃度がコントロール値に近づくに従って、腫瘍部の pH 値は回復を示し、グルコース血中濃度と腫瘍部の pH 値の変化は鏡像関係を示した。しかし、正常部組織内の pH 値の変化はグルコース血中濃度とは関係なく、わずかな低下を示し、グルコース投与後3時間で pH 値は 0.1 pH しか低下が見られず、グルコース投与後6時間後にはコントロール値に回復した(図4)。正常部組織内のグルコース投与後の pH 値の変化は、測定マウ

スを変え、pH 電極を変えても、0.1 pH しか低下は観測されず、pH 電極及びマウス固体の違いによる pH 値の変化には有意差を示していない。以上の結果から、グルコース投与後の腫瘍部での pH 値の変化は、正常部より有意に長時間低 pH 値を保つ事が判る。In vitro の実験で低 pH 環境下の細胞は温熱感受性であるとの報告が行われており^{7,8)}、本研究は In vivo の実験において組織内 pH の低下による温熱感受性と温熱耐性の出現期間の短縮を観測した。これらの結果は、グルコース投与による高血糖症の誘発と温熱処理の併用は、In vivo 系に於いても選択的に腫瘍部に温熱効果を与える事が可能である事を示唆している。

図4 図上段は、縦軸にグルコース血中濃度を、横軸はグルコース投与後の経過時間を示す。図中段は、縦軸に正常組織内の pH 値を、横軸はグルコース投与後の経過時間を示す。図下段は、縦軸に腫瘍組織内の pH 値を、横軸はグルコース投与後の経過時間を示す。

考 察

温熱処理によって、血流に変化が発生し、この血流量が温熱効果を左右する大きな要因となっている¹¹⁾。このような血流は組織内の酸素分圧、pH 値等、微小環境により大きく影響を受けている。温熱処理と血流の関係について、Song らは 43°C、1 時間の加温処理によって、ラットの正常部皮膚

と筋肉の血流、血管内容積、血管壁の透過性の増加がみられるが、腫瘍部では血流増加が認められないことを報告している⁹⁾。また Gullino らは加温後 18 時間目でも腫瘍内血流の増加がみられず、腫瘍径の約 1/3 が壊死領域になっていることを報告している¹⁰⁾。この様に腫瘍内の血流の低下は、熱拡散能の低下を腫瘍部のみに発生させ温熱によ

って選択的な温度上昇を引き起こすことを示唆している。一方、Tanaka らは、正常組織では血流は加温初期に大きな増加のあることを報告しており¹¹⁾、正常部は腫瘍部よりも温度上昇の少ないことが考えられる。また、Eddy や Sutherland らは、加温処理によって、腫瘍部に血管閉塞、うっ血、出血等が多く発生することを報告しており¹²⁾、以上の様な報告は、加温処理により、正常部の血流は増加し、腫瘍部内血流は低下するため、腫瘍内温度が容易に上昇することを示している。本研究では、グルコース投与によって、高血糖症を誘発させ、血流の低下を起こし、その時の組織内 pH の変化を pH 微小電極で直接に経時的に測定した。またこの組織内 pH 値の低下による温熱効果の増感と、温熱耐性の消長の程度を実験動物の腫瘍縮小によって測定した。マウス腹腔内にグルコース (6 mg/g) 投与を行うと、正常部筋肉は 0.1 pH の低下を示し、6 時間後に元の値に回復したが、腫瘍部は、0.3 ~ 0.6 pH 低下し、その回復には 6 時間以上の時間が必要であった。In vivo 系に於ける実験で高血糖症を誘発させて、その時点で温熱処理を加えた本研究の結果からは、正常部より特異的に腫瘍部の pH 値が低下し、腫瘍成長遅延が発生しグルコース投与による温熱効果の増強が示された。この様な結果は Gerweck⁷⁾¹³⁾や Overgaard⁸⁾らが In vitro 系で示した低 pH 環境下での細胞が温熱感受性になる観測結果と一致している。組織内 pH の低下の原因として、Overgaard や Nielson らは加温処理後に腫瘍内 Lysosomal enzyme の活性が増強することを報告しており、加温処理後に細胞膜の微小環境に変化を生ずることを報告している¹⁴⁾。Von Ardenne らは高血糖症について研究しており、ラットでの温熱処理時に血流障害が発生し、pH 低下が起こることを報告しており、血中グルコース濃度の増加により血流の低下が発生する原因として、赤血球の膜構造に変化が生じ、赤血球の硬化が発生すると共に血液粘性が上昇し、赤血球が腫瘍部毛細血管内を容易に通過できなくなり、血流が低下すると報告している¹⁵⁾。組織内血流の低下は pH 低

下を誘発し、低酸素細胞の拡大とともに生成される分解産物は血流低下によって蓄積が起こり、pH 値は更に低下し腫瘍血管は温熱効果に感受性となり、腫瘍部血管は温熱損傷を受け易くなり、血流は更に低下し腫瘍部全体に温熱効果は拡大していく。しかし、正常部では分解産物も温熱処理により血流増加が発生するために、容易に排出される。一方、正常部の組織温も生体の持つ恒常性が働き、温度の上昇は抑えられ、温熱効果は発生しにくくなる。これらの事から高血糖症の誘発は腫瘍部を選択的に低 pH 値とし、温熱効果が増強するものと考えられる。しかし、我々が行った 2-デオキシグルコース及び 5-チオデオキシグルコースの投与による動物実験では、腫瘍部の pH 値の変化はグルコース投与と同様な pH 低下の傾向が観測されているが、これらの薬剤は乳酸は生成されない。この事はグルコース投与により解糖作用が発生し、単に乳酸生成の促進が主な原因で pH 値が低下すると考えるには問題がある。我々は pH 低下の主な原因として、薬剤の投与により Overgaard¹⁴⁾や Von Ardenne¹⁵⁾らが考えている Lysosomal enzyme 活性や赤血球の硬化の増加と共に糖代謝の経路及びその速度が血流と関係すると考えている。しかし、正確な pH 低下のメカニズムは現在不明である。現在グルコース投与による腫瘍内 pH 低下のメカニズム解明が試みられているなかで、Thistlethwaite らは、100g のグルコースを実際に患者へ経口投与し、臨床での温熱効果を調べている¹⁶⁾。彼らの結果は、グルコースの血中濃度は 80 ~ 120mg/dl が 165 ~ 215mg/dl 上昇し、この時 pH 値は 7.14 から 6.90 に低下を記録し、温熱後に腫瘍の縮小傾向を観測している。しかし、この方法は糖尿病及び末期の衰弱した患者に対しては、現在種々の問題が残されている。その主な問題としては、グルコース投与による腫瘍内 pH 値の低下のメカニズムが明らかにされていない事である。また、高血糖症及び糖尿病の誘発患者に対して、温熱中の血糖値制御法の開発を行う必要がある。その他に、腫瘍部への選択的な温熱増感の出現する最小限のグル

コース投与量を決定する事等が上げられる。現在これらの問題が研究されており、本法の臨床応用への可能性は大きいと考えられる。

おわりに

本研究は文部省がん特別研究 1 (61010072) の援助をうけた。また、本研究の一部は第 5 回アジア・オセアニア放射線学会 (SEOUL, Sept. 21-25, 1987) で報告した。

文 献

- 1) Tanaka Y, Hasegawa T, Murata T, et al
Effect of hyperthermia combined with radiation on normal and tumor microcirculation. : *FUNDAMENTAL OF CANCER THERAPY BY HYPARTHERMIA, RADIATION AND CHEMICALS*. : Edited by E. Kano, MAG. BROS INC. TOKYO. 95-109 (1982)
- 2) H. A. Eddy : Alteration in tumor microvasculature during hyperthermia. : *Radiology*. : 137. 515-521 (1980)
- 3) C. W. Song. : Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment. : *Cancer Res.* : 44 4721-4730 (1984)
- 4) H. I. Bicher, F. W. Hetzel, T. S. Sandhu et al. : Effects of hyperthermia on normal and microenvironment. : *Radiology*. : 137, 523-530 (1980)
- 5) M. Urano, V. Montaya and A. Booth. : Effect of hyperthermia on the thermal response of murine normal and tumor tissue. : *Cancer Res.* : 43, 453-455 (1983)
- 6) J. G. Rhee, T. H. Kim, S. H. Levitt et al. : Changes in acidity of mouse tumor by hyperthermia. : *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* : 10, 393-399 (1984)
- 7) J. Overgaard : Influence of extracellular pH on the viability and morphology of tumor cells exposed to hyperthermia. : *J. Natl. Cancer Inst.* 56, 1243-1246 (1976)
- 8) L. E. Gerweck, M. Jennings and B. Richards : Influence of pH on the response of cells to single and split doses of hyperthermia. : *Cancer Res.* : 40, 4019-4024, (1980)
- 9) Song, C. W., Rhee, J. G., and Levitt, S. H. : Blood flow in normal tissue and tumors during hyperthermia. : *J. Natl. Cancer Inst.* : 64, 119-124 (1980)
- 10) Gullino, P. M., : Influence of blood supply on thermal properties and metabolism of mammary carcinomas. : In thermal characteristic of tumors. : *Application in detection and treatment*. : eds R. K. Jain and P. M. Gullino. : *Ann NY Acad. Sci.* : 335, 1-18 (1980)
- 11) Y. Tanaka, T. Hasegawa, T. Murata et al. : Effects of hyperthermia combined with radiation on normal and tumor microcirculation. : *Current Research in Hyperthermia Oncology*. : ed E. Kano, Academic Press 173-183 (1988)
- 12) Eddy H. A., Sutherland R. M. and Chmielewsky G. : Tumor microvascular response. : Hyperthermia, Drug, Radiation, Combinations. In Proceeding of the Third International Symposium on Cancer Therapy by Hyperthermia, Drugs and Radiation. eds L. A. Dethlefsen and W. C. Dewey. Bethesda Md. *National Cancer Inst. (Special Journal Supplement)* in Press.
- 13) L. E. Gerweck, M. Jennings, and B. Richards, : Influence of pH on the response of cells to single and split doses of hyperthermia. : *Cancer Res.* : 40, 4019-4024 (1980)
- 14) Overgaard J. and Nielson O. S. : The role of tissues environmental factors on the

- kinetics and morphology of tumor cells exposed to hyperthermia. *In thermal characteristics of tumors. : Applications in detection and treatment. eds R. K. Jain and P. M. Gullino, Ann NY Acad. Sci. :* 335, 254–280 (1980)
- 15) Von Ardenne M., : Selective multiphase cancer therapy. : Conceptual aspects and experimental basis. : *Adv. Pharmacol. :* 10, 339–380 (1972)
 - 16) A. J. Thistlethwaite, G. A. Alexander, D. J. Moylan III et al. : Modification of human tumor pH by elevation of blood glucose. : *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. :* 13, 603–610 (1987)