

る。細胞障害の修復に關与する GSH を抑制することで、温熱と化学療法に対する細胞の感受性を高め、臨牀的に、より有効な温熱療法の効果をあげる目的で基礎的実験を行った。

#### 実験材料と方法

HeLa 細胞を RPMI に 10% fetal calf serum と penicillin G potassium と streptomycin sulfate を添加した培養液で、増殖させた。細胞は 37°C、5%CO<sub>2</sub> を含む加湿した恒温槽で維持した。対数増殖期 HeLa 細胞を 6wells のプレートに各々 500/well 蒔き 24 時間後、加温、cisDDP、BSO 処理する条件を設定して 1 時間行い、8 日後 PBS で 2 回洗浄後、メチルアルコールで 30~60 分固定後、水洗し Giemsa 染色し 50 以上の細胞集落をコロニーとして計算した。

その結果は加温単独では 42°C を越えると著明なコロニー形成能の低下が認められた。cisDDP の 1 時間接触時の 75% コロニー形成能は 0.08 $\mu$ g の濃度であった。また、コロニー形成能に影響しない BSO の濃度は 1 mM であった。

以上より、加温、cisDDP と BSO の三者併用でのコロニー形成能を検討した。加温は臨牀に応用可能な 40°C、41°C とした。cisDDP は 75% のコロニー形成能である 0.08 $\mu$ g に設定した。BSO はコロニー形成能に影響しない 1 mM とした。加温 40°C と cisDDP と BSO の三者併用では 45% のコロニー形成能であった。41°C 加温と cisDDP 0.08 $\mu$ g と BSO 1 mM の三者併用では 19% のコロニー形成能しかなく、BSO の併用により臨牀に応用可能な低加温による細胞増殖抑制効果が認められた。次に、BSO 併用による温熱化学療法時の癌細胞動態解析を行った。

HeLa 細胞を 100mm シャーレに 5 × 10<sup>5</sup> ずつ蒔き、24 時間 CO<sub>2</sub> 細胞培養恒温器で培養後、37°C、40°C、41°C、42°C、43°C 各々 1 時間加温単独、加温と cisDDP 0.08 $\mu$ g 併用 1 時間接触時、加温と BSO 1 mM 併用 1 時間接触時、及び加温と cisDDP 0.08 $\mu$ g と BSO 1 mM 三者併用 1 時間接触時の cell cycle に与える影響を接触後 12 時間と 24 時間で検討した。各々条件で 1 時間接触した HeLa 細胞を、PBS 液で 2 回洗浄後、0.02% EDTA と 0.05% トリプシン液で、ピペッティングレスピツ・グラスにとり 600—800 回転で 5 分間遠沈し、その上清をすて PBS で洗浄し、600—800 回転で遠沈後、上清をすてる。攪拌しながら 70% エタノールを 3—5 ml 添加した。その後 30 分間、-4°C で放置する。次いで、Propidium iodide (PI) 5 ml 添加後 30 分間室温(暗所)にて染色する。検体を Flow Cytometry (FACS IV) を用い核 DNA 量の解析を Dean の方法で行った。HeLa 細胞を用いた 43°C 加温と cisDDP 0.08 $\mu$ g/ml では著明な G<sub>2</sub>M 期の蓄積を呈したが、この条件下に

國崎忠臣(福岡県)昭和15年9月11日生

授与年月日 平成3年3月31日

主論文 BSO併用による温熱化学療法  
A Study on Enhancement of Hyperthermotherapy  
—in the Presence of Buthionine Sulfoximine (BSO)—

#### 論文内容の要旨

##### 緒言

癌の集学的治療の一貫として臨牀上、温熱療法が行われているが、実際には腫瘍内温度を 43°C に維持することは、困難な場合が多い。Buthionine sulfoximine (BSO) は Glutathione (GSH) の特異的 inhibitor であ

於ける BSO の存在は同様に、G<sub>2</sub>M 期蓄積であり細胞回転の変化に差異を認めなかった。一方、41°Cまたは42°C加温と cisDDP0.08 $\mu$ g/ml でも G<sub>2</sub>M 期の蓄積を呈し、この条件下における BSO の存在は G<sub>2</sub>M 期の蓄積を認めることが出来なかった。そこで、HeLa 細胞の増殖曲線を41°Cより43°C加温と cisDDP 併用時12時間、24時間と BSO を加えた三者併用時の12時間、24時間について検討した。41°Cより43°Cの各温度でも BSO を加えた三者併用では24時間目に細胞数の増加が認められた。この結果より、細胞内グルタチオンレベルを低下させる BSO は、HeLa 細胞では41°C、42°Cで BSO 1 mM 接触時に、細胞障害からの修復機構の回避に働いた事が示唆された。この時の細胞内グルタチオンの量につき、以下の実験を行った。

HeLa 細胞  $5 \times 10^5$  を100mm シャーレに蒔き、5% CO<sub>2</sub>を含む加湿した恒温槽で24時間培養後、41°Cでの1時間、12時間、24時間での細胞内総グルタチオン量を測定した。また、cisDDP0.08 $\mu$ g、BSO 1 mM と cisDDP と BSO 1 時間接触時の総グルタチオン量を各時間で測定した。塩原らにより Owens 等の方法を改変した GSH reductase-DTNB 法で測定した。

その結果1°C加温単独、cisDDP 併用及び BSO 付加による三者併用でも24時間後に各群で増加していた。また、BSO 投与群でグルタチオン量の減少が見られた。特に BSO 付加直後では加温単独に比べて2.4%に減少していた。

#### 結果と考察

癌の集学的治療の一貫として温熱治療が行われているが、温熱化学療法の基礎的、臨床的検討が行われている。加温による細胞障害については生物学的に確立しているが、熱耐性や加温時間、加温温度の維持など臨床に用いるとき、まだ解決すべき問題がある。深部加温で、43°Cに腫瘍内温度を上げることは必ずしも容易ではない。そこで、グルタチオンの特異的合成阻害剤である BSO を併用することでより臨床に応用可能な温熱療法の効果を高められないかと考えて HeLa 細胞を用いて実験を行った。

- 1) BSO 併用温熱化学療法はコロニー形成能より見て著明なコロニー形成能の低下が認められた。
- 2) Flow Cytometry の解析から G<sub>2</sub>M 期の蓄積ではなく、ある温度では、G<sub>2</sub>M 期の抑制が見られた。
- 3) 増殖曲線から見ると24時間目では BSO 併用で、増加傾向にあった。又24時間目の細胞内グルタチオン量は BSO 付加直後に比べて増加していた。BSO 併用温熱化学療法は HeLa 細胞では細胞回転をしながら次第に細胞障害からの修復が出来ず、コロニー形成能の減少がみられる事から細胞障害からの回避に働いたことが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

国崎忠臣は昭和41年3月長崎大学医学部を卒業後、長崎大学医学部附属病院、長崎済生会病院、国立東佐賀療養所、大分県立病院、佐世保中央病院を歴任し、外科診療の経験を重ねる一方で長崎大学附属病院医員・研究生として癌の治療成績に関する研究を続け外科治療の補助療法として温熱療法に興味を持ち昭和62年5月21日より講師として昭和63年3月31日まで就任し、その間温熱療法の効果をあげるための研究成果として平成2年5月主論文 A study on enhancement of hyper-thermochem-otherapy in the presence of Buthionine Sulfoximine(BSO)-を完成し参考論文43篇を附して長崎大学医学部研究科委員会に医学博士の学位を申請した。

長崎大学医学部研究科委員会は、これを平成3年1月9日の定例委員会に付議し論文内容の要旨を検討し研究歴を審査した結果受理して差し支えないものと認めたので、上記の通り審査委員を選定した。委員は主査を中心として慎重審査の上平成3年3月6日の定例委員会でその結果を報告した。

主論文は、癌集学的治療の一つである温熱療法の効果をあげるために glutathione(GSH)の特異的 inhibitor である buthionine sulfoximine(BSO)を用いることにより、細胞障害の修復に必要とされる glutathionine の作用を抑制して細胞の温熱の感受性を高め更に化学療法の作用効果を高めうるか否かについても検討した。実験材料として HeLa 細胞を用いて培養液(10%仔牛血清)中で増殖させ化学療法剤として CDDP (Cisplatinum) を用い BSO 処理1時間後のコロニー形成能の低下について検討したコロニー形成が75%に低下する CDDP の濃度は0.08 $\mu$ g であることおよび BSO のコロニー形成能に影響しない濃度は1 mM であることを予備実験で確かめた。

加温40°Cに CDDP と BSO 併用でコロニー形成能は45%となり、41°C加温でコロニー形成能は19%と細胞増殖抑制効果をもとめた。

次いで BSO 併用時の癌細胞動態解析として cell cycle を12時間および24時間で検討した。すなわち HeLa 細胞  $5 \times 10^5$  を40°C、41°C、42°C、43°C各1時間加温単独 CDDP0.08 $\mu$ g 併用 BSO 1 mM 併用、加温に BSO・CDDP 併用時につき flow cytometry を用いて検討した。43°C加温と CDDP で G<sub>2</sub>M 期蓄積をみとめたが41°Cまたは42°C加温と CDDP では BSO の G<sub>2</sub>M 期蓄積をみとめることができなかった。41°C~43°C加温で CDDP・BSO 併用でも24時間目に細胞数の増加を認めた。このことは、41°C~42°Cの加温 BSO 併用し G<sub>2</sub>M 期蓄積をみとめたことは細胞障害からの修復機構の回避に働いた事を示した。この時の細胞内

glutathione の濃度を塩原法 (Owen 法改変) による GSHreductase DTNB 法で測定した。BSO 附加で glutathione 2.4% 減少していたが、加温 CDDP・BSO 併用 24 時間後では glutathione 濃度は略前値に増加していたことをみとめた。以上、温熱効果を高めるため細胞障害の修復機序の回避に働く BSO の併用は加温ないし化学療法の併用効果を高めるが、その時間的限界は細胞内グルタチオン濃度の推移から 24 時間以内にあることを明らかにしたもので集学的癌治療効果をあげその成績向上に新しい知見を提供したものとして合格と判定した。

審査担当者 主査 教授 富田 正雄  
副査 教授 奥村 寛  
副査 教授 小坂 光男