

## マウス白血病由来の放射線感受性細胞の 温熱と放射線の併用効果の検討

山 田 信 一

### Thermal Radiosensitization in Radiation-Sensitive Mutant Mouse Leukemic Cells

Toshikazu Yamada

(平成6年1月19日受付)

#### 緒 言

温熱療法は、ここ20年間に放射線との併用または単独による癌治療法の一つとして確立してきた (Dewey ら, 1977; Overgaard, 1989; Robins ら, 1990)<sup>1-3)</sup>。しかしながら、温熱処理により腫瘍組織に誘導される温熱耐性の大きさならび持続期間の測定が困難なために温熱治療を困難にさせている (Henle と Dethlefsen, 1978)<sup>4)</sup>。

ところで、温熱と放射線との併用療法の特長は、温熱によって放射線に抵抗性細胞を選択的に殺傷したり、細胞の放射線感受性を高くしたりすることにある (Dewey 1984)<sup>5)</sup>。それゆえ、温熱による放射線増感効果の機序を解明することは、臨床において併用療法のプロトコルの改善に大いに役立つと考えられるが、今のところ、温熱と放射線との併用療法によって引き起こされる細胞死の大きさを決める機序ははっきりしていない (Iliakis と Seaner 1990)<sup>6)</sup>。

一般に温熱による放射線増感効果は、放射線による亜致死損傷 (Sublethal Damage: SLD) や潜在的致死損傷 (Potentially Lethal Damage: PLD) からの回復を阻害することにより増感を示すと言われている (Ben-Hur ら 1974, Li ら 1976)<sup>7,8)</sup>。また、細胞の放射線感受

性の違いは放射線による SLD や PLD からの回復能の違いによるものと考えられている (Elkind と Sutton 1960, Little ら 1973)<sup>9,10)</sup>。

したがって、親株と放射線高感受性の変異株との温熱による放射線増感効果を比較した研究では、変異株の方が親株よりも増感の幅が少なかったという報告があるが (Baba ら 1988, Iliakis と Seaner 1990)<sup>11,6)</sup>、逆に放射線による SLD や PLD からの回復能が欠損している変異株の方が親株と同程度かまたはそれ以上の増感を示したことより、SLD や PLD 回復の阻害以外の機序を考えなければ説明が困難だと言われている (Beer と Kapiszewska 1982, Raaphorst ら 1993, Kampinga ら 1993)<sup>12-14)</sup>。また、放射線や温熱感受性の違ういろいろな種類の細胞の温熱による放射線増感効果の大きさを比較した報告では、増感の大きさは細胞の温熱感受性ではなく放射線感受性と関係しているという報告 (Miyakoshi 1981)<sup>15)</sup>、逆に放射線感受性ではなく温熱感受性と関係しているという報告 (Raaphorst ら 1979)<sup>16)</sup>、放射線と温熱感受性のどちらも関係しないという報告 (柏戸, 1988)<sup>17)</sup> もあり、温熱による放射線増感の大きさは細胞の温熱感受性や放射線感受性と関係しているかどうか未だははっきりしていない。

温熱耐性期の放射線照射においても温熱処理直後の放射線照射と比較して放射線増感の大きさは変化しなかったという報告 (Nielsen 1983, Hartson-Eaton ら 1984, Jorritsma ら 1985, Kampinga ら 1989)<sup>18-21)</sup> と、逆に減少したという報告 (Raaphorst と Azzam 1983, van Rijn ら 1984, Holahan ら 1986, Haveman ら 1987)<sup>22-25)</sup> とがあり、未だははっきりしていない。

一方、最近の研究で癌組織は単一のクローンの細胞

広島大学歯学部歯科放射線学講座 (主任：和田卓郎教授) 本論文の要旨は平成3年8月の第16回中国地区放射線影響研究会、平成3年11月の第34回日本放射線影響学会、平成4年10月の第33回日本歯科放射線学会総会および平成5年6月の The 16th international symposium on clinical hyperthermia において発表した。

より形成されているのではなく、多くの種類のクローンより形成されているものもあることがわかってきた (Welch ら, 1983; Heppner, 1984)<sup>26,27)</sup>。Rofstad と Brustad (1986)<sup>28)</sup> は、ヒト melanoma より5つのクローンを分離し、その放射線感受性や温熱感受性が違っていたことを報告し、温熱を臨床に応用するためには、細胞の放射線感受性、温熱感受性、温熱耐性、及び温熱による放射線増感が重要であると主張している。

本研究では、マウス白血病細胞 L5178Y とその放射線高感受性株の LX830 細胞を比較することにより、放射線感受性と温熱感受性および両者併用効果の間に一定の関係があるかないか、また温熱耐性時に放射線増感はどうに変化するか、細胞周期によって放射線および温熱感受性に違いがあるかどうかを実験的に検討した。

## 材料及び実験方法

### I. 細胞及び培地

浮遊培養のマウス白血病 L5178Y 細胞とその放射線感受性株の LX830 細胞 (Sato ら1983)<sup>29)</sup> を、継代培養し実験に使用した。継代培養及び実験に使用した培地は、Fisher medium (GIBCO 社, New York) にペニシリン100単位/ml, ストレプトマイシン100 u/ml, 及び10%馬血清 (GIBCO 社, New York) を含むものを用いた。

細胞浮遊液を 37°C 孵卵器内で密栓培養し、指数増殖期の適切な濃度 (LX830 細胞では  $2.0 \times 10^5$  個/ml, L5178Y では  $4.0 \times 10^5$  個/ml) に増殖した細胞を用いた。また、培養液の pH は細胞数によって異なり、しかも細胞の温熱感受性は pH に敏感に依存するため、細胞濃度を厳密に合わせた。その時の細胞浮遊液の pH はそれぞれ LX830 細胞では 7.4, L5178Y 細胞では 7.3 であった。なお、細胞倍加時間はそれぞれ13時間と7.3時間であった。

### II. コロニー形成法

コロニー形成法を用いて主として細胞の増殖死を検出した。コロニー形成法には、17%の馬血清を加えた Fisher 培地に、最終濃度が0.12%になるように AGAR NOBLE (DIFCO 社, U.S.A.) を加えた軟寒天培地を使用した。放射線照射または温熱処理終了後速やかに細胞浮遊液の希釈を行い、15 ml 培養試験管を用い、全量で 5 ml の軟寒天培地中に適当な細胞数 (各試験管で50~80個のコロニーが生成される程度) となるように植えつけ、5 分間氷冷後、37°C の孵卵器または 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で培養を行っ

た。LX830 細胞では14日、L5178Y 細胞では7日間それぞれ培養した後、試験管中に形成されたコロニー数を計測し生存率を求めた。

### III. エオシン染色法

温熱による細胞の間期死 (または非分裂死) はエオシン Y による色素排除法を用いて検出した (Sawada と Kimura, 1985)<sup>30)</sup>。すなわち、温熱処理直後から 37°C の恒温水槽中で培養を継続し、培養試験管から適時、細胞浮遊液を一滴スライドグラス上にとり、1%エオシン Y 生理食塩水溶液を一滴加えよく混和し、カバーガラスをのせ5分後より10分間の間に位相差顕微鏡下 (×400) で約1000個の細胞を観察し、染色細胞数と非染色細胞数をカウントした。エオシン染色率は以下の式を用いて算出した。

$$\text{エオシン染色率 (\%)} = \frac{\text{染色細胞数}}{\text{染色細胞数} + \text{非染色細胞数}} \times 100$$

### IV. $\gamma$ 線照射

$\gamma$  線照射はテレコバルトユニット  $1.1 \times 10^{14}$  Bq (烏津製作所 RTGS-21) を使用し室温下で、5 ml 細胞浮遊液を入れた 15 ml 培養試験管に照射した。照射線量の多い試験管から順次照射を開始し、最終的には各線量の照射が同時に終了するように設定した。実験期間中の線量率は、約 53cGy/min であった。

#### 1. 分割照射

両細胞の SLD 回復の違いを比較するために分割照射実験を行った。1 回目照射線量を LX830 細胞では 0.5 Gy, L5178Y では 3 Gy とし、2 回目に種々の線量を照射して生存率曲線を求めた。初回照射と 2 回目照射の間は、培養試験管を 37°C 恒温水槽中に 4 時間静置した。

#### 2. 定常増殖期での照射

両細胞の PLD 回復の違いを比較するために定常増殖期の細胞に照射を行い、照射してからそれぞれ 0, 2, 4, 6, 8 時間 37°C で培養した後、コロニー形成法にて細胞の生存率を求めた。照射線量は LX830 細胞で 2 Gy, L5178Y 細胞で 8 Gy とした。なお定常増殖期の細胞数は LX830 細胞では  $1.5 \times 10^6$  個/ml, L5178Y 細胞では  $1.6 \times 10^6$  個/ml であった。

#### 3. 各細胞分裂周期での照射

##### (1) 細胞の同調法

細胞周期の同調は Beckman JE-6 elutriator roter (Beckman 社, U.S.A.) を使用して、セントリフュージ エルトリエーション法 (Meistrich ら, 1977)<sup>31)</sup> に行なった。実験前日、システムに70%エチルアルコール

ルを満たし一晩置くことにより滅菌した。実験直前エチルアルコールを滅菌蒸留水、続いて培養液の灌流により洗い流した。システム全体を 4°C に保ち、全量 15 ml に濃縮した細胞浮遊液 (LX830 は  $5 \times 10^7$  個, L5178Y は  $8 \times 10^7$  個) を、灌流液 (培養液) が流速 10.6 ml/min で流れかつローターが 1720 ( $\pm 10$ ) rpm のスピードで回転しているエルトリエーターのチャンバーに入れた。流速 11.0 ml/min に上昇させることにより最も小さな細胞 ( $G_1$  期) のみを最初のフラクションとして灌流液と共に全量が 140 ml になるように集めた (Anderson ら 1970, Mitchell と Tupper

1977)<sup>32,33</sup>。集めた細胞浮遊液を 5 ml ずつ 26 本の 15 ml 培養試験管に分注し、37°C の温度下で細胞周期を進行させた。

## (2) 同調率の測定

エルトリエーターにより集めた  $G_1$  細胞を通常により 70% エチルアルコールで固定し、エチジウムブロマイドで染色した (Adams ら 1981)<sup>34</sup>。染色された細胞はフローサイトメトリー (EPICS PROFILE II; Coulter 社 U.S.A.) で DNA 量を計測した。この細胞と対数増殖期の細胞の DNA ヒストグラムを Figure 1 に示した。細胞の同調率は細胞当りの DNA 量と細胞数の

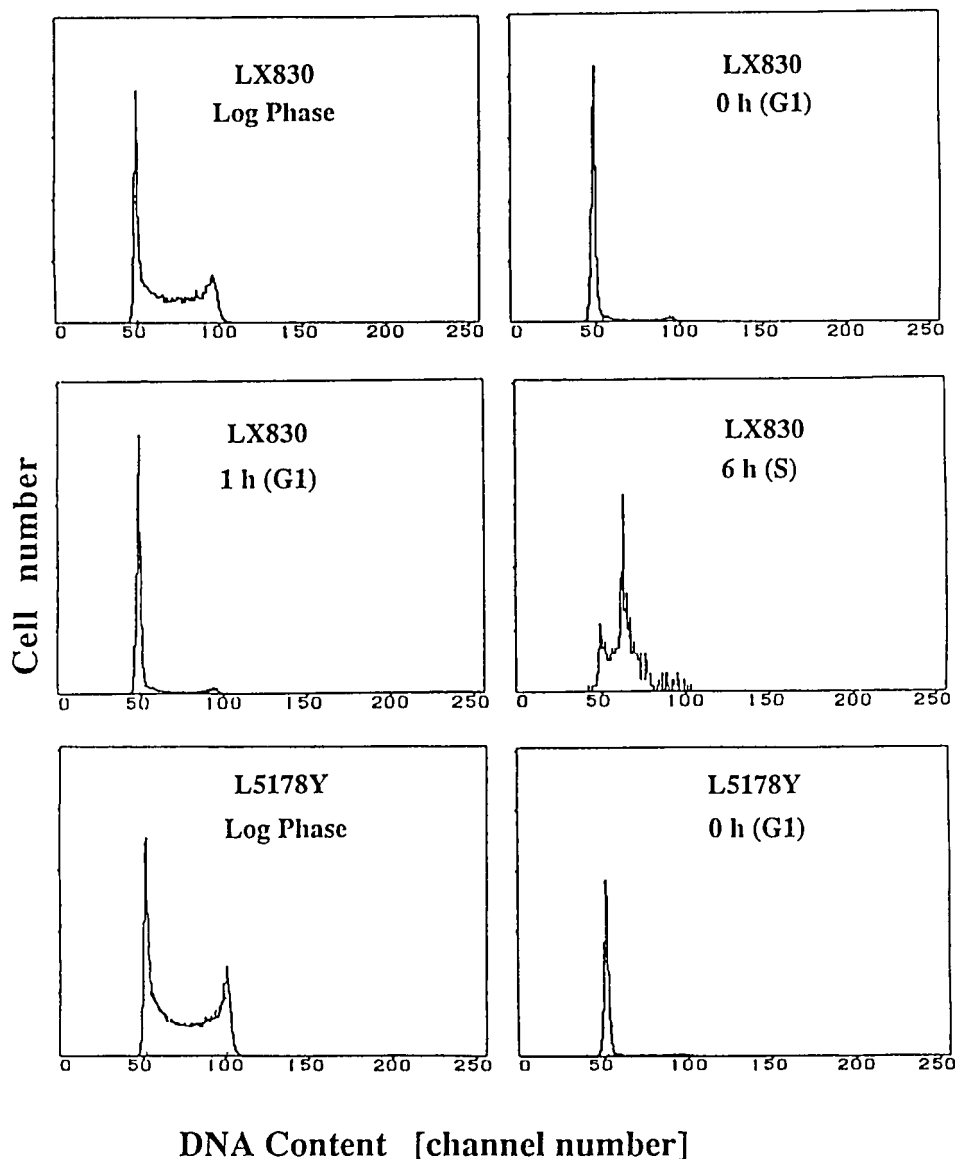


Figure 1. DNA histograms for LX830 and L5178Y cells after synchronization.

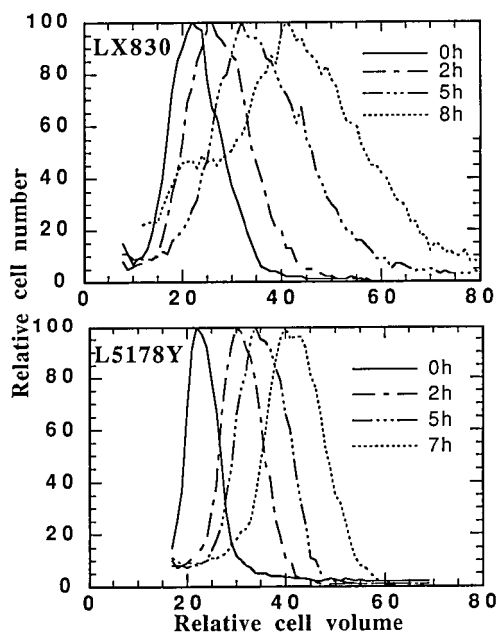


Figure 2. Change in cell size with incubation time at 37°C after synchronization in LX830 and L5178Y cells.

割合をコンピュータ解析 (Dean と Jett, 1976)<sup>35)</sup> によって求め、両細胞共に80%~96%の同調率であった。DNA ヒストグラムより S 期の長さは LX830 細胞では3時間~10時間 (8時間)、L5178Y 細胞では2時間~6時間 (5時間) であった。

G<sub>1</sub> 期に同調させてそれぞれの細胞密度が  $1.0 \times 10^4$ ,  $2.0 \times 10^4$  個/ml になった細胞を、15 ml の培養試験管に 5 ml ずつ入れ 37°C で培養を続けて細胞周期を進行させ、経時的に細胞の容積変化を測定した (Figure 2)。この図が示すように時間と共に細胞容積が増大していった。経時的に LX830 細胞には 1.25 Gy, L5178Y 細胞には 6 Gy をそれぞれ照射し、コロニー形成法にて各細胞周期での生存率を求めた。

## V. 温熱処理

温熱処理には恒温水槽 (サーモミンスター DX-80, 太洋サービスセンター株式会社) を用い、水銀柱式棒状標準温度計でモニターを行った。恒温水槽の温度安定性は、標準温度計のルーペ使用下目視で  $\pm 0.05^\circ\text{C}$  の範囲内であった。細胞の温熱処理はテーハー式斜位型試験管台に培養試験管を装着し、37°C の恒温水槽に試験管台とともに10分間入れ、次に温度設定された水槽に移した。ただちに水槽内で約40回 (約30秒間) 試験管台を手動で振盪させて、できるだけ短時間内に試験管内の温度を設定温度に近付ける様に努めた。所定

処理時間終了後ただちに、37°C の恒温水槽に戻し、再び振盪した。

各細胞周期における温熱処理条件は、指数増殖期の両細胞で10%程度の生存率を得る時間とし、LX830 細胞で 44°C, 12 min, L5178Y 細胞で44°C, 15 min とした。

### 1. 分割加温

両細胞の温熱耐性の誘導を同一条件下で比較するため、処理温度を 43°C とし、初回加温時間は両細胞共に50%程度の生存率を得る時間とし、LX830 細胞では19分、L5178Y 細胞では24分とした。また、第2回目の加温時間は1回加温で約10%の生存率が得られる時間とし、LX830 細胞では25分、L5178Y 細胞では30分とした。初回加温と2回目の加温との間、培養試験管は 37°C 恒温水槽中に静置しておいた。初回加温のみを行った後、37°C 恒温水槽中に静置しておいたものをコントロールとした (柏戸, 1988)<sup>17)</sup>。2回目の加温による生存率をコロニー形成法及びエオシン染色法により求め、温熱耐性の出現ならびに消失の動態を調べた。

### 2. $\gamma$ 線と温熱の併用

温熱処理直前または直後に  $\gamma$  線照射して、併用効果を調べた。また温熱処理後 37°C に戻して培養を続け、最大の温熱耐性を誘導したときに (両細胞ともに6時間後)、 $\gamma$  線照射を行った。この時の温熱処理は前述 (V. 1.) のごとく 43°C で19分 (LX830 細胞) または24分 (L5178Y 細胞) とした。温熱による温熱増感効果 (TER) は、下のようにして求めた。

TER (Thermal Enhancement Ratio)

$$= \frac{\gamma \text{ 線単独照射時の } D_0 \text{ 値}}{\gamma \text{ 線} \cdot \text{温熱併用時の } D_0 \text{ 値}}$$

## VI. 細胞の計測

細胞数はクーラーカウンター (ZBI型, クーラーカウンター社, U.S.A.), 細胞の容積はクーラー1000チャナライザー (クーラーエレクトロニクス, U.S.A.) で計測した。

## 結 果

### I. 放射線感受性

まず両細胞の放射線感受性の違いを検討した。 $\gamma$  線に対する感受性は、Figure 3 のごとく両細胞で大きく異なっていた。両細胞の  $D_0$  値と  $D_q$  値は、LX830 細胞では 0.41 Gy と 0.0 Gy, L5178Y 細胞では 1.39 Gy と 1.70 Gy であった。両細胞の  $D_0$  値を比較すると、L5178Y 細胞に比べて LX830 細胞が3.4倍放射線に対して高感受性であった。また LX830 細胞では  $D_q$  値

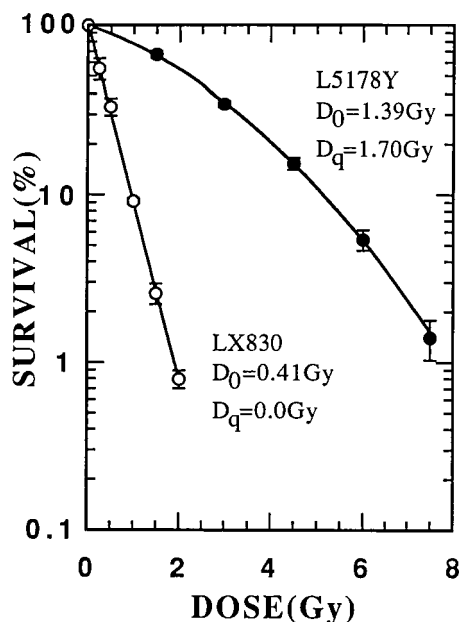


Figure 3. Survival curves of LX830 (○) and L5178Y (●) cells after irradiation with various doses of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays.

が 0 に近く、生存率曲線の肩の部分 (initial shoulder) がほとんど認められなかった。

## II. 細胞の SLD 及び PLD 回復の測定

放射線による細胞の生存率曲線の最初の肩の部分は SLD 回復の大きさを示すと考えられている (Elkind と Sutton 1960)<sup>9)</sup>。LX830 細胞は肩の部分をはほとんど認めなかったので SLD 回復が親株と比べどれだけ異なるかを分割照射によって比較した。結果は Figure 4 に示した様に LX830 細胞の回復能は L5178Y 細胞と同等にあることがわかった。しかし、定常増殖期の PLD 回復は L5178Y 細胞と比較して LX830 細胞ではほとんど認められなかった (Figure 5)。

## III. 放射線感受性の細胞周期依存性

放射線高感受性変異細胞では放射線感受性の細胞周期依存性が通常の放射線感受性を持つ細胞と異なっていた報告 (Whitmore ら 1989)<sup>36)</sup> があるので、LX830 細胞における放射線感受性の細胞周期依存性について調べた。結果を Figure 6a に示す。

放射線感受性の細胞周期依存性は両細胞共に G<sub>1</sub>-S 境界期で最大の感受性を示し、S 後期で最大の抵抗性を示した。G<sub>2</sub>/M 期に入ると感受性が再び増大していった (Figures 6a と 7a)。この変動は一般的に知られている放射線感受性の細胞周期依存性と同じであった。また、G<sub>1</sub> 期 (同調後 1 時間目) と S 期 (同調後 6 時間目) の LX830 細胞について放射線の線量-効果関係を比較してみたが S 後期細胞が明らかに抵抗性であることが確認された (Figure 8a)。

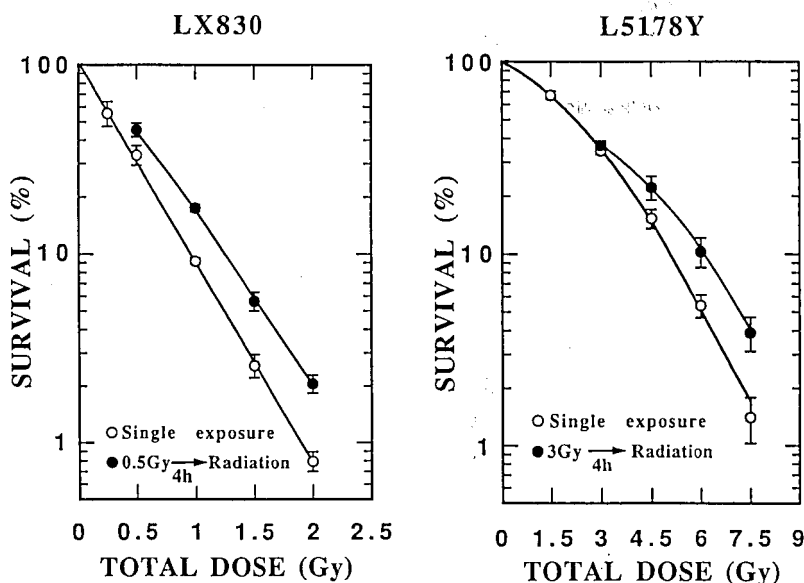


Figure 4. Recovery from sublethal damage in LX830 and L5178Y cells. (●); Second  $\gamma$ -ray (graded) doses survivals related to 4h incubation at 37°C after first  $\gamma$ -ray dose: 0.5 Gy for LX830, 3 Gy for L5178Y cells. (○); Single exposure

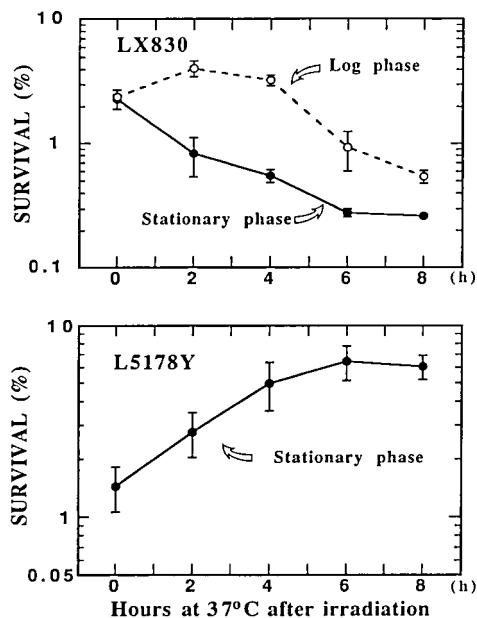


Figure 5. Recovery from potentially lethal damage after  $\gamma$ -irradiation for LX830 and L5178Y cells in the stationary or exponential phase. Dose: 1.5 Gy for LX830, and 8 Gy for L5178Y cells.

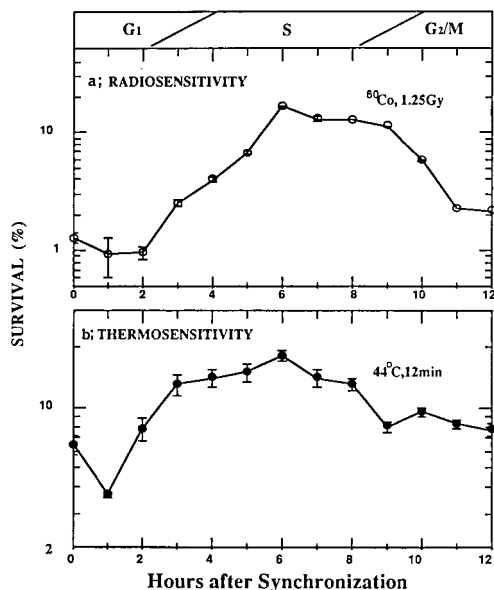


Figure 6. Variation in radiation (a) or heatsensitivity (b) through the cell cycle of synchronized LX830 cells.

#### IV. 温熱感受性

両細胞の温熱感受性をコロニー形成法を用いて比較検討した。各温度処理における生存率曲線を Figure 9

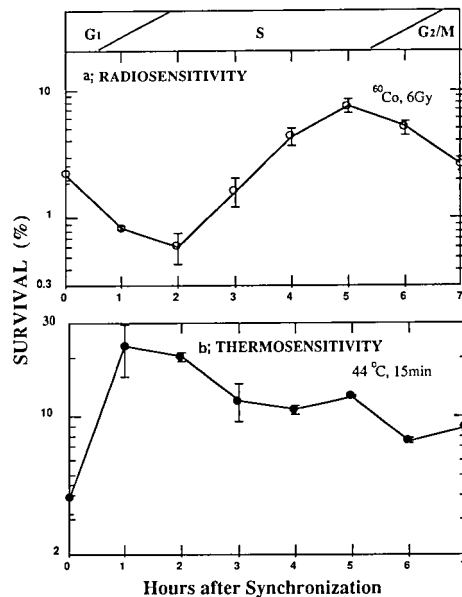


Figure 7. Variation in radiation (a) or heatsensitivity (b) through the cell cycle of synchronized L5178Y cells.

に、生存率曲線の  $T_0$  値及び  $T_q$  値をそれぞれ Table 1 に示した。これらの結果が示す通り、両細胞の温熱感受性 ( $T_0$  値) は非常によく似ており、例えば  $43^\circ\text{C}$  では生存率曲線の  $T_0$  値が共に 4.1 分であった。ただし、LX830 細胞の方が一般的に生存率曲線の肩 ( $T_q$  値) が小さくなる傾向がみられた。

#### V. エオシン染色法を用いた温熱による細胞死の検討

##### 1. エオシン染色率の経時的変化

$42\sim 44^\circ\text{C}$  の各温熱処理後、 $37^\circ\text{C}$  に戻して培養を続けたときの両細胞のエオシン染色率の経時変化を Figure 10 に示した。両細胞共にエオシン染色率は温熱処理終了後、時間と共に上昇し、約 4 時間でプラトーに達した。この傾向は、他の処理時間でもほぼ一定であった。

##### 2. 温熱処理後の細胞数の経時的変化

Figure 11 に LX830 細胞と L5178Y 細胞における温熱処理後  $37^\circ\text{C}$  で培養中の細胞数の変化を示す。LX830 細胞、L5178Y 細胞は加温終了後、それぞれ 5 ないし 6 時間まで細胞数は減少し、その後はほぼ一定になった。但し、L5178Y 細胞の減少度がより顕著であった。

##### 3. 温熱処理後の細胞容積の経時的変化

温熱処理後、 $37^\circ\text{C}$  に戻し培養を続けた時の両細胞

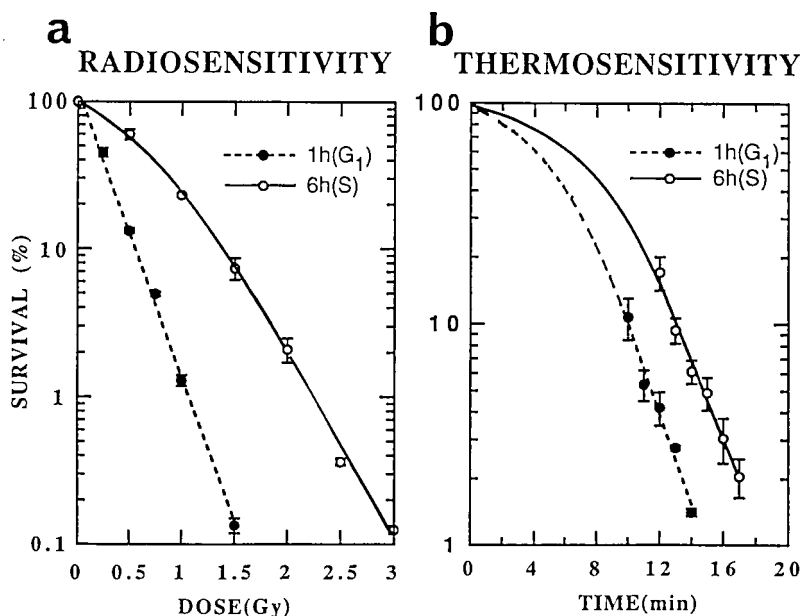


Figure 8. Dose survival curves of LX830 cells after irradiation (a) or heating (b) at G<sub>1</sub> and S phases.

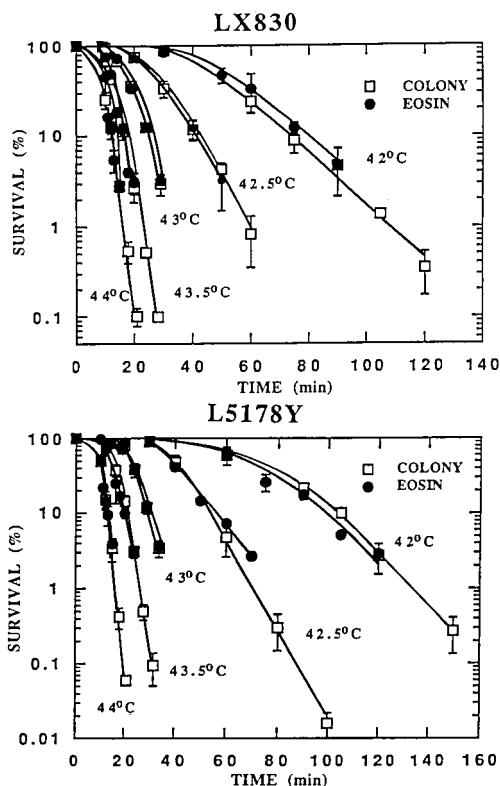


Figure 9. Survival curves of LX830 and L5178Y cells after heat treatments. Percentage survival obtained by colony forming method (□), or eosin staining method (●).

Table 1.  $T_q$  and  $T_0$  values of LX830 and L5178Y cells at different temperatures

Cell line	Temperature (°C)	42.0	42.5	43.0	43.5	44.0
LX830	$T_q$ (min)	41.8	22.3	14.9	10.1	7.7
	$T_0$ (min)	14.3	8.1	4.1	2.6	1.9
L5178Y	$T_q$ (min)	69.5	34.9	20.1	14.4	9.0
	$T_0$ (min)	13.7	7.9	4.1	2.6	1.8

の容積の経時的変化を Figure 12 に示した。細胞の容積は温熱処理直後から減少し始め、LX830 細胞では少なくとも 5 時間、L5178Y 細胞は 2 時間まで続いた。

#### 4. 非染色細胞率とコロニー形成法による生存率との比較

両細胞共に、コントロールの細胞におけるエオシン染色率は 1 % 以下であった。よって以下の式により、非染色細胞率すなわち細胞の生存率を求めた。

$$\text{非染色細胞率 (\%)} = 100 - (\text{エオシン染色率のプラートの平均値})$$

両細胞での非染色細胞率をコロニー形成法により求めた細胞生存率と比較したところ、両細胞共に良好な一致を示した (Figure 9)。よって両細胞共、温熱による細胞死はほとんどが間期死であることが考えられ

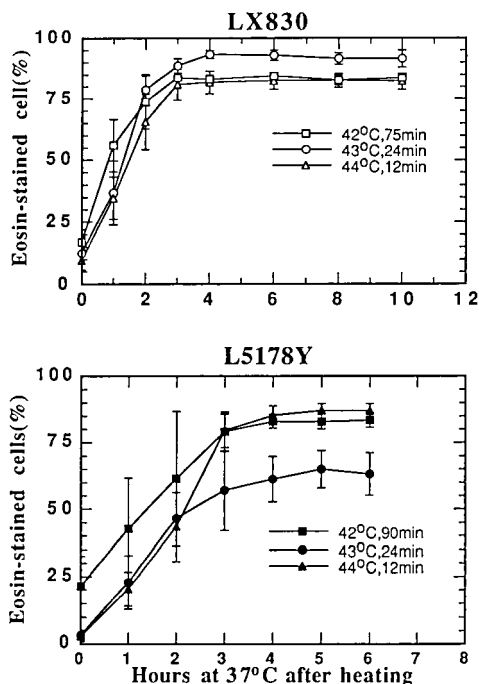


Figure 10. Time course of eosin staining after heating in LX830 and L5178Y cells.

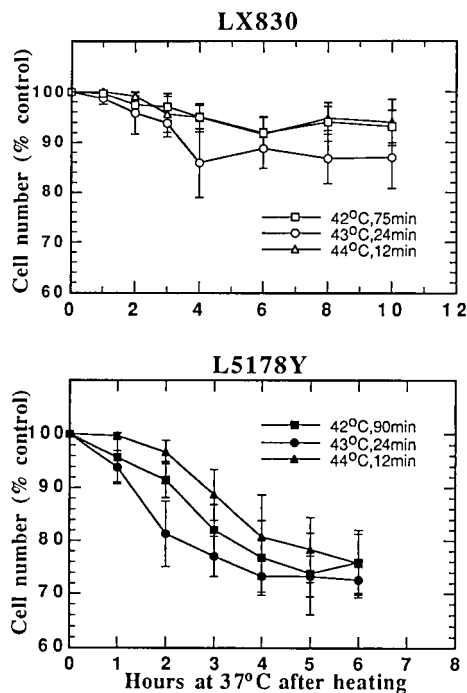


Figure 11. Percentage decrease in cell number after heating in LX830 and L5178Y cells.

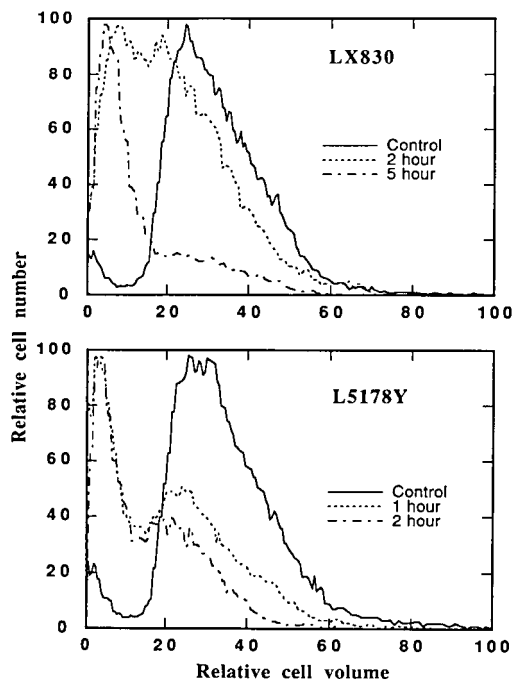


Figure 12. Change in cell size determined by Coulter Channelyzer after heating (LX830; 43°C, 19 min, L5178Y; 43°C, 24 min).

た。

## VI. 温熱感受性の細胞周期依存性

両細胞の細胞周期による温熱感受性の違いについて比較した。44°Cで温熱処理を行った時の各細胞周期における両細胞の感受性の変化を Figures 6b と 7b に示した。L5178Y 細胞では G<sub>1</sub> 期 (同調後 1 時間目) で最も抵抗性, S 期 (同調後 4 時間目) で感受性を示し, 標準的な細胞周期依存性を示した。しかしながら, LX830 細胞では G<sub>1</sub> 期 (同調後 1 時間目) で最も感受性, S 期 (同調後 6 時間目) で抵抗性を示し, L5178Y 細胞と異なっていた。さらに同調後 1 時間目 (G<sub>1</sub> 期) と 6 時間目 (S 期) に 44°C における処理時間と細胞生存率の関係をコロニー形成法で調べ, Figure 8b に示した。この実験によっても, LX830 細胞の G<sub>1</sub> 期は温熱に感受性であり, S 期は逆に抵抗性であることが再確認された。

## VII. 温熱による放射線増感効果

### 1. 非温熱耐性期での放射線増感効果

臨床では放射線照射後に温熱療法の併用を行うことが多い (Arcangeli ら 1983)<sup>37)</sup> が, 本研究では温熱処理直前と直後に放射線照射を行った場合の温熱による放



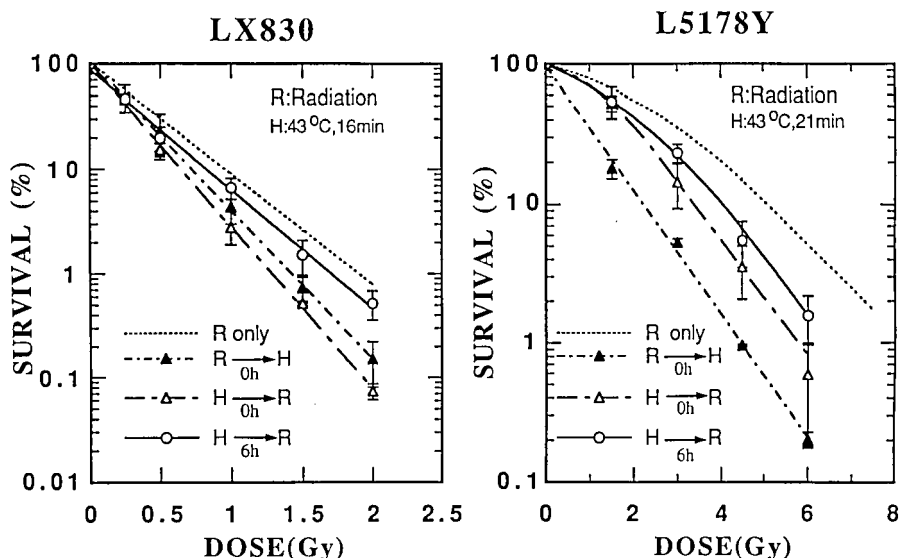


Figure 13. The effect of heat immediately before or after irradiation on cell survival. This figure also shows cell survival curves after irradiation at thermotolerance (6 hours after heating). Survival values were corrected for the effect of heating alone.

Table 2. Thermal Radiosensitization

Cell line	Treatment	Interval (hours)	Do (Gy)	TER <sup>#</sup>	D <sub>0</sub> ratio <sup>*</sup>
LX830	Radiation only		0.41		
	Radiation→Heating	0	0.29	1.41	
	Heating→Radiation	0	0.28	1.46	
	Heating→Radiation	6	0.38	1.08	
L5178Y	Radiation only		1.39		3.4
	Radiation→Heating	0	0.97	1.43	3.4
	Heating→Radiation	0	0.94	1.48	3.4
	Heating→Radiation	6	1.11	1.26	2.9

<sup>#</sup>TER (Thermal Enhancement Ratio)=Do (γ-ray only)/Do (γ-ray + Heating)

<sup>\*</sup>Do ratio=Do (L5178Y)/Do (LX830)

放射線増感効果を検討した。温熱処理は、温熱単独で50%の生存率が得られる加温時間として、LX830細胞16分、L5178Y細胞21分とした。結果はFigure 13とTable 2に示した様に両細胞とも温熱による放射線増感効果 (TER) は温熱処理直前に照射した場合と直後の場合においてほとんど差がなかった。

## 2. 温熱耐性期での放射線増感効果

### (1) 温熱耐性について

温熱耐性の出現ならびに消失動態をコロニー形成法とエオシン染色法を用いて比較検討した (Figure 14)。温熱耐性は、初回加温後短時間で出現し両細胞ともコロニー形成法では約6時間後、エオシン染色法では約8時間後に最大となり、2回目加温の殺細胞効果はほ

とんど現われず100%に近い生存率が得られ、著しい温熱抵抗性を示した。しかし、L5178Y細胞では約15時間後、LX830細胞では約20時間後に生存率が第2回目加温による生存率10%となりほぼ温熱耐性が消失した。

### (2) 放射線増感効果について

最大の耐性期である加温後6時間目に放射線照射を行った。その時の生存率曲線をFigure 13に示した。増感の大きさ (TER) は、LX830細胞では1.08、L5178Y細胞では1.26をそれぞれ示し、また、両細胞の放射線感受性の違いは、加温しなかった場合と比較して小さくなった (Table 2)。

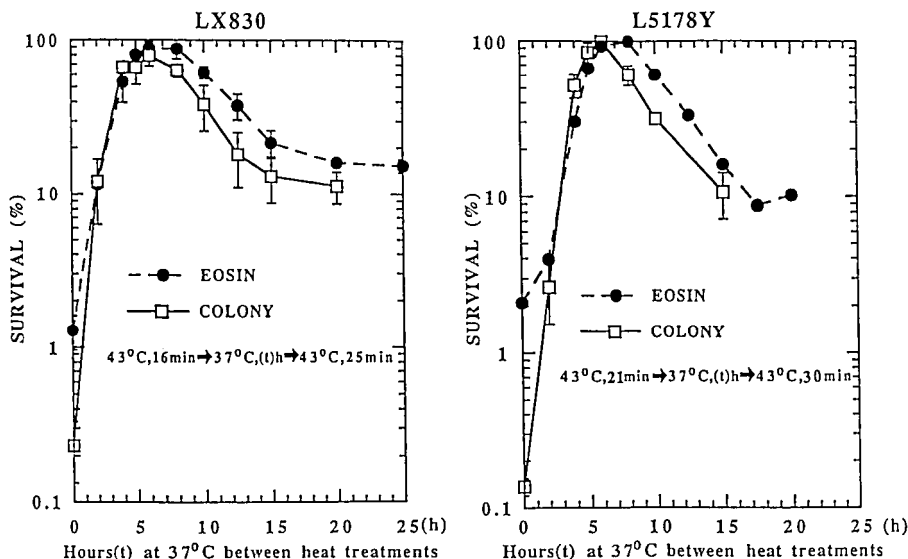


Figure 14. Kinetics of thermotolerance in LX830 and L5178Y cells. Percentage survival obtained by colony forming method (□), or eosin staining method (●).

## 考 察

本研究では、放射線高感受性の LX830 細胞が、その親株で放射線抵抗性の L5178Y 細胞と比較して、いかなる温熱感受性を有しているか、また放射線・温熱併用効果はどう違うか、さらに放射線と温熱の細胞周期依存性などについて、同一培養条件下でコロニー形成法ならびにエオシン染色法を用いて比較検討した。

### I. 放射線感受性と温熱感受性の比較

#### 1. 放射線感受性について

両細胞の放射線感受性を  $\gamma$  線を用いて比較した。両細胞の  $D_0$  値の比から LX830 細胞が 3.4 倍放射線に高感受性であることがわかった。また LX830 細胞では、 $D_0 = 0.0$  Gy と生存率曲線の肩がほとんどなく、片対数グラフ上ではほぼ直線となった (Figure 3)。Raaphorst ら (1979)<sup>16)</sup> は同一培養条件下で、7 種類の哺乳類培養細胞について放射線感受性の比較を行ない、 $D_0$  値の比において最大 1.36 倍の違いを示した。また Miyakoshi (1981)<sup>15)</sup> も同一培養条件下で、4 種類の哺乳類の培養細胞について同様の比較を行い  $D_0$  値の比において最大 1.95 倍という結果を報告している。著者が実験に用いた両細胞はこれらの報告に比べて、放射線感受性の違いがはるかに大きい。一般に細胞の放射線感受性の違いは、放射線による SLD や PLD からの回復能の違いによるのではないかと推測

されている (Elkind と Sutton 1960, Little ら 1973)<sup>9,10)</sup>。SLD 回復の大きさは両細胞共にほぼ同程度であったが (Figure 4), PLD 回復は LX830 細胞では見られず、L5178Y 細胞においてのみ認められた (Figure 5)。

ところで、生存率曲線の肩の部分は SLD 回復の大きさを示すと考えられているので (Elkind と Sutton 1960)<sup>9)</sup>、生存率曲線に肩が認められなかった LX830 細胞 (Figure 3) では SLD 回復が小さいか、または無いと予測され、分割照射の結果 (Figure 4) が違った。これに似た報告は著者が調べた限りでは、生存率曲線の肩が小さい Burkitt 細胞が分割照射でかなりの回復能を示した (Sawada, personal communication) 以外は見出せなかった。逆の報告としては、電子線を照射したとき肩の有る HeLa 細胞が分割照射では SLD 回復を示さなかった (Nias ら 1973)<sup>38)</sup>。少なくとも LX830 細胞は放射線による生存率曲線の肩が SLD 回復の大きさを示さないという極めてユニークな細胞で、今後さらに詳細な放射線生物学的な研究が必要と思われる。

一方、放射線高感受性株では放射線感受性の細胞周期依存性が違っていったという報告があるので (Whitmore ら 1989)<sup>36)</sup>、両細胞における放射線感受性の細胞周期依存性を調べたが、細胞周期による放射線感受性は共に  $G_1$ -S 境界期が最も感受性で、S 後期が最も抵抗性を示し (Figures 6a と 7a)、細胞周期依存性に差を認めなかった。類似の結果は他の多くの細胞でも認められている (Okada 1970)<sup>39)</sup>。

以上の結果から、両細胞の放射線感受性の違いは

PLD 回復に関係していることが推察される。

## 2. 温熱感受性について

両細胞の温熱感受性を 42°C~44°C の各温度でコロニー形成法を使って比較した。両細胞における各温度の感受性  $T_0$  はほぼ一致した (Table 1)。Raaphorst ら (1979)<sup>16)</sup> は 7 種類の培養細胞について、温熱感受性と細胞の大きさ、細胞の倍加時間、染色体数、及び DNA 量との間に相関性が認められないことを示し、一方、動物由来の細胞ではその動物本来の体温と温熱感受性に相関性があることを報告した。著者が実験に使用した細胞は両方ともマウス由来白血病細胞であり、温熱感受性が一致するのは当然かも知れない。しかし、Baba ら (1988)<sup>11)</sup> は、同じマウス白血病由来の L5178Y 細胞とその放射線感受性株 M10 細胞との間で温熱感受性が大きく異なることを報告しており、細胞の温熱感受性差が生ずる原因についてはまだよくわからない。

### (1) エオシン染色法について

L5178Y 細胞では、温熱による細胞死がエオシン染色法により簡単に判定できることを Sawada と Kimura (1985)<sup>30)</sup> によって最初に明らかにされた。本研究では、この方法が LX830 細胞にも適用されるかどうかについて検討した (Figures 9~12)。その結果、LX830 細胞では L5178Y 細胞と同様に、温熱処理後エオシン染色率が上昇し、4 時間でプラトーとなった。また細胞数は逆に減少し、4 時間以降はほぼ一定となった。しかし、細胞体積の減少時間は両細胞で違った (Figure 12)。大山 (1989)<sup>40)</sup> は、アポトーシスを起した細胞はサイズが単純に縮小することより、クーラーチャナライザーを用いた細胞体積の測定を手軽なアポトーシスの判定法として使用できることを報告している。事実、温熱処理された L5178Y 細胞ではアポトーシスが容易に誘発されることが最近の光学顕微鏡的にも電子顕微鏡的にも明らかにされた (Akagi ら 1993)<sup>41)</sup>。

エオシン染色法は、放射線による細胞の間期死の判定に使用されており、Goldstein と Okada (1976)<sup>42)</sup> は最初、大線量の X 線照射後短時間に生じる間期死をエオシン染色率の上昇という形で検出し、さらに放射線による間期死は膜の障害による可能性があることを示唆した。一方、温熱処理後に認められるエオシン染色率の上昇も、Malyapa と Sawada (1991)<sup>43)</sup> によると、 $[^3\text{H}]$  チミジンでラベルされた L5178Y 細胞の放射活性が温熱処理後に細胞内から流失して培養液中に移行し、同時に細胞のエオシン染色率が上昇することから、膜の障害による間期死だと考えている。また、著者の実験でも LX830 及び L5178Y 細胞共に、エオ

シン染色法により推定した細胞生存率とコロニー形成法により求めた生存率とがよい一致を示した。このことは、LX830 細胞は L5178Y 細胞と同様に温熱による細胞死の大半が間期死であることを示している。

一方、Baba ら (1988)<sup>11)</sup> と西岡 (1990)<sup>44)</sup> は、L5178Y 細胞の放射線感受性細胞株である M10 及び L5178Y-sensitive 細胞を用いて、エオシン染色法とコロニー形成法で温熱感受性を比較検討し、温熱による細胞死には間期死だけではなく増殖死の存在を報告している。同様に、柏戸 (1988)<sup>17)</sup> は 3 種類の培養細胞の温熱感受性を比較し、エオシン染色法は細胞間の温熱感受性の違いを推定するのに役立つと報告している。また西岡 (1990)<sup>44)</sup> は 44°C において、間期死の割合とコロニー法で調べた細胞の温熱感受性との相関性の有無を 5 種類の培養細胞について検討し、温熱に高感受性になるほど間期死の割合が増すことを示している。著者が得た結果もこれを支持することになり、エオシン染色法は温熱感受性を判定する簡便な方法の一つと考えられる。

### (2) 温熱感受性の細胞周期依存性

細胞周期による温熱感受性は  $G_1$  期が最も抵抗性で S 期は感受性であると Westra と Dewey (1971)<sup>45)</sup> によって最初に報告された。同様なことは HeLa 細胞 (Kim ら 1976)<sup>46)</sup>、CHO, L1210 及び P388 細胞 (Bhuyan ら 1977)<sup>47)</sup>、9L 細胞 (Henderson ら 1982)<sup>48)</sup>、L5178Y と M10 細胞 (Malyapa と Sawada 1991, 1992)<sup>43, 49)</sup> など多くの細胞でも確認されている。著者の研究では、LX830 細胞の温熱感受性は上述の報告と全く異なる周期依存性を示すことがわかった。すなわち  $G_1$  期の細胞は温熱感受性、S 期の細胞は温熱抵抗性を示した (Figures 6b と 8b)。なぜ、他の多くの細胞と逆の結果になったか、今のところ理由はわからないが、必ずしも全ての細胞系で温熱感受性の細胞周期依存性が一致するとは限らないこと、及び細胞の温熱感受性が類似している L5178Y 細胞 (Figure 7b) とともに異なることがわかった。

## 3. 放射線感受性と温熱感受性の相関性の有無

両細胞の温熱感受性がほぼ同程度だったのに対し、放射線感受性は大きな差が認められた。この結果から、細胞の放射線感受性と温熱感受性との間には相関性がないことがわかった。また、著者の調べた限りでは培養細胞の放射線感受性と温熱感受性の間に相関関係を指摘した報告はなく、むしろ否定したのが多い (Raaphorst ら, 1979, 1985, Rofstad と Brustad 1984)<sup>16, 28, 50)</sup>。放射線による細胞障害のターゲットが DNA であり (Okada, 1970)<sup>51)</sup>、一方、温熱のターゲットとしては膜に関連したものが有力視されている

(Coss と Dewey, 1982; Sawada, 1989)<sup>52,53</sup>。また細胞死の様式に関しても放射線の場合は通常、増殖死であり (Okada, 1970)<sup>54</sup>、温熱の場合には、間期死と増殖死の両方が認められている (西岡, 1990)<sup>44</sup>。故に放射線と温熱では、細胞障害のターゲット及び細胞死の様式に違いがあるらしいことが十分に予想され、従って細胞の放射線感受性と温熱感受性の間に相関がなくとも矛盾はしないと思われる。

## II. 温熱による放射線増感効果

### 1. 非温熱耐性期での放射線増感効果

温熱による放射線増感効果の機序は、温熱によって放射線の SLD や PLD の回復を阻害することにより起こると報告されている (Ben-Hur ら 1974, Raaphorst ら 1979, Wolters ら 1987)<sup>7,55,56</sup>。さらに温熱によって放射線による DNA 二重鎖切断数や一重鎖切断数, base damage には変化がなく, DNA 修復酵素の活性低下により増感を示すと報告されている (Dewey 1989, Dikomey と Franzke 1992)<sup>57,58</sup>。本研究に用いた LX830 細胞は放射線高感受性細胞であるにもかかわらず温熱による放射線増感効果 (TER) が放射線低感受性の親株とほぼ等しかった。一方 Figures 4 及び 5 に示したように、予想に反して LX830 細胞は親株と同等の SLD 回復能を示したが、PLD 回復は親株に比べてほとんど回復能を示さなかった。したがって、この増感の機序は温熱による SLD 回復の阻害であることが強く考えられる。

また、本研究で放射線感受性は大きく異なるが温熱感受性はほぼ同じ 2 種類の細胞がほぼ等しい増感効果 (TER) を示したこと及び CHO 細胞を用いた実験で温熱の前処理が強くなればなるほど放射線増感が増すという報告 (Holahan ら 1984, Dikomey と Jung 1991)<sup>59,60</sup> から、温熱による放射線増感効果は細胞の放射線感受性でなく温熱感受性に支配されているのではないかと考えられる。

Table 3 にまとめたごとく、温熱による放射線増感効果の大きさは細胞の放射線感受性及び温熱感受性によって異なるようである。Raaphorst ら (1979)<sup>16</sup> も 7 種類の培養細胞を用いて、温熱による放射線増感効果と細胞の温熱感受性との間には相関が認められたと報告している。また Beer and Kapiszewska (1982)<sup>12</sup> や西岡 (1990)<sup>44</sup> も L5178Y と L5178Y-sensitive 細胞を用いて温熱による放射線増感効果の違いは両細胞の放射線感受性の差ほど違っていなかったことより、温熱による放射線増感効果は細胞の放射線感受性とは関係してなかったと報告している。同様な結果を 2 組の CHO 細胞とその放射線感受性変異細胞を用いて報告している (Raaphorst ら 1993)<sup>13</sup>。一方、Miyakoshi (1981)<sup>15</sup> は 4 種類、Kampinga ら (1986)<sup>61</sup> は 3 種類の培養細胞を用いて、温熱による放射線増感効果と細胞の放射線感受性との間には相関が認められたと報告している。また Baba ら (1988)<sup>11</sup> は LX830 細胞と似たような放射線感受性を示す M10 細胞を用いてその親株 L5178Y 細胞と温熱による放射線増感効果を比較

**Table 3.** Relationship between the degree of heat radiosensitization (TER: thermal enhancement ratio), and cellular thermosensitivity ( $T_0$ ) or radiosensitivity ( $D_0$ )

Cell lines	Treatment temperature	Relationship between TER and $T_0$	Relationship between TER and $D_0$	References
CCL33, CCL157, CCL56 HeLa S <sub>3</sub> , LP59, V79, CHO-10	42.5°C	Yes	No	Raaphorst et al. (1979) <sup>16</sup>
L5178Y-W, L5178Y-S	42°C, 44°C	—	No	Beer and Kapiszewska (1982) <sup>12</sup> , Nishioka (1990) <sup>49</sup>
V-3, 5-11, AA8-4, K-1	43°C	—	No	Raaphorst et al. (1993) <sup>13</sup>
EAT, HeLa S <sub>3</sub> , LM mouse fibroblast	44°C	No	Yes	Kampinga et al. (1986) <sup>66</sup>
V79, HeLa S <sub>3</sub> , EAT, murine L-fibroblast	42°C, 44°C	No	Yes	Miyakoshi (1981) <sup>15</sup>
L5178Y, M10	42°C	—	Yes	Baba et al. (1988) <sup>11</sup>
Burkitt Lymphoma L5178Y, FM3A	42°C, 43°C, 45°C	No	No	Kashiwado (1988) <sup>17</sup>
L5178Y, LX830	43°C	Yes	No	Present study

した結果、M10 細胞が全く増感効果を示さなかったことより、温熱による放射線増感効果は細胞の放射線感受性に関係して可能性があると報告している。柏戸 (1988)<sup>17)</sup> は 3 種類の培養細胞を用いて、温熱による放射線増感効果と細胞の放射線感受性や温熱感受性との間には相関が認められないと報告している。

このように、著者の結果と違う結論が得られた報告について考察すると、前述したごとく、温熱の前処理が強くなれば放射線増感が増すことから、M10 細胞に対する温熱処理が L5178Y 細胞よりも弱かったために (生存率; M10 細胞: 90%, L5178Y 細胞: 40%), Baba ら (1988)<sup>11)</sup> が報告したような結果になったのではないかと考えられる。また、Miyakoshi (1981)<sup>15)</sup> や Kampinga ら (1986)<sup>61)</sup> が用いた培養細胞のうち、fibroblasts を除いた EAT, HeLa S3, V79 細胞との間には温熱による放射線増感効果は温熱感受性に関係している結果となっている。マウス由来の Fibroblasts や柏戸の報告 (1988)<sup>17)</sup> がこの関係と異なる理由については今後研究が必要だが、少なくとも本研究では温熱による放射線増感効果は細胞の温熱感受性に依存していることが強く示唆された。

## 2. 温熱耐性期での放射線増感効果

細胞が温熱耐性の状態にある時でも放射線増感効果が得られるかどうかは臨床上極めて重要な問題であるので、実験的に放射線感受性の異なる細胞について温熱耐性時の放射線増感効果を比較した。

### (1) 温熱耐性について

温熱耐性とは、一度、温熱処理を受けた細胞が一過性に温熱抵抗性を獲得する現象である (Henle と Leeper, 1976)<sup>62)</sup>。両細胞において、温熱感受性と温熱耐性の大小、及び温熱耐性の発現と消失を比較するため、分割加温を行い検討した。その結果、最大温熱耐性発現に要する時間は、両細胞で同じであった。同様の傾向はエオシン染色法でも認められている (Figure 14)。Dikomey ら (1988)<sup>63)</sup> は、CHO 細胞では初回加温が強いほど発現する温熱耐性が大きく、温熱耐性が最大に達する時間も長くなることを報告している。柏戸 (1988)<sup>17)</sup> は、LX830 細胞と似た倍加時間を持ち、かつ L5178Y 細胞よりも温熱抵抗性の FM3A 細胞を用いて初回加温してから最大温熱耐性発現まで約 5 時間であったことを報告している。よって著者の結果も考慮すると最大温熱耐性発現までの時間は細胞の倍加時間や温熱感受性に関係がないと思われる。一方、温熱耐性の消失に関して、Gerweck と Majima (1987)<sup>64)</sup> は、CHO 細胞、V79 細胞及び A-7 細胞を用いて、また西岡 (1990)<sup>44)</sup> は L5178Y と L5178Y-sensitive 細胞を用いて温熱耐性の消失実験を

行った。そして、細胞倍加時間が短いほど、つまり細胞の増殖速度の速いものほど耐性の消失が速やかであるという報告をしている。著者の結果も細胞の増殖速度の速い L5178Y 細胞が LX830 細胞に比べて温熱耐性の消失が速やかであった (Figure 14)。

### (2) 放射線増感効果について

温熱耐性期の放射線増感効果は温熱処理直後に照射した場合と比較して放射線増感が減少したという報告 (Raaphorst と Azzam 1983, van Rijn ら 1984, Holahan ら 1986, Haveman ら 1987)<sup>22-25)</sup> と逆に変化しなかったという報告 (Nielsen 1983, Hartson-Eaton ら 1984, Jorritsma ら 1985, Kampinga ら 1989)<sup>18-21)</sup> がある。しかしながら、これらの報告はいずれも一種類の細胞で処理条件を変えることによって調べたものであり、著者の知る限りでは温熱耐性期の放射線増感効果を複数の種類の細胞株で比較した報告はない。よって本研究では、放射線感受性が顕著に異なる両細胞の温熱耐性期における放射線増感効果について比較検討した。両細胞の温熱耐性期の放射線増感効果は非耐性期と比べて小さくなり、特に LX830 細胞において L5178Y 細胞よりも減少度が大であった (Table 2)。したがって、両細胞の放射線感受性 ( $D_0$ ) の違いが小さくなった理由は、主として LX830 細胞において温熱耐性期の放射線増感効果が減少したことによる。本研究に用いた LX830 と L5178Y 細胞はその温熱感受性と温熱耐性がほぼ等しいので、LX830 細胞における温熱耐性期の放射線増感効果が特に著しく減少した理由は、細胞の放射線感受性が特に高かったことによるものではないかと考えられた。しかしながら、その減少の機序は温熱耐性との関係を指摘した報告 (van Rijn ら 1984)<sup>22)</sup> や全く温熱耐性と関係がない報告 (Nielsen 1983)<sup>18)</sup> があり、はっきりしない。

## Ⅲ. 本研究の臨床的意義

本研究によって、放射線療法に温熱療法を併用する場合、温熱による放射線増感効果の大きさは、細胞の放射線感受性の違いよりも温熱感受性に関係している可能性を見出したこと、及び温熱耐性期の放射線照射は温熱処理直後の照射と比べて放射線増感効果が減少し、その減少度は放射線感受性の高い細胞ほど大きいことを見出した。このことは、臨床上注意すべき点を実験的に指摘したことになり、今後の放射線・温熱併用療法による癌治療の改善につながるものと期待される。

## 総 括

マウス白血病由来の L5178Y 細胞とその放射線高感

受性株 LX830 細胞を用い、細胞死を指標として、放射線感受性、温熱感受性、温熱と放射線との併用効果をコロニー形成法ならびにエオシン染色法にて比較検討し、以下のような結果を得た。

1. 放射線感受性 ( $D_0$ ) は、LX830 細胞が 0.41 Gy, 親株 L5178Y 細胞が 1.39 Gy で、 $D_0$  値の比は 3.4 となり、LX830 細胞が放射線高感受性であった。しかも LX830 細胞は、生存率曲線の肩がほとんどなく ( $D_q=0.0$ ) ほぼ直線となった。しかしながら、放射線による SLD 回復は親株と同程度に認められたが、PLD 回復は親株に比べてほとんど回復能を示さなかった。また、細胞周期による放射線感受性の変化は両細胞で変わらなかった。よって両細胞の放射線感受性の違いは PLD 回復に関係していることが推察された。

2. 両細胞の温熱感受性 ( $T_0$ ) は等しかった。したがって、放射線感受性と温熱感受性には相関性が認められなかった。しかし、同じ温度と処理時間では、LX830 細胞は肩 ( $T_q$ ) が小さいために生存率がやや低い値を示した。

3. エオシン染色法により、LX830 細胞は L5178Y 細胞と同様に温熱による細胞死のほとんどが間期死であることが示唆された。

4. 細胞周期による温熱感受性の変化は、L5178Y 細胞では  $G_1$  期で低く、S 期で高い標準的な細胞周期依存性を示したのに対し、LX830 細胞では  $G_1$  期で高く S 期で低い、L5178Y 細胞と逆の関係を示した。したがって、必ずしもすべての細胞系で温熱感受性の細胞周期依存性が一致するとは限らないことがわかった。

5. 同じ程度の生存率を得る温熱処理では、両細胞の温熱耐性の発現時期及びその程度はほぼ同じであった。しかし、温熱耐性の消失は、細胞倍加時間の短い L5178Y 細胞の方が速やかであった。また、温熱耐性の発現と消失は簡便なエオシン染色法でも確認された。

6. 温熱と放射線の同時併用では、放射線感受性に大差があるにもかかわらず、両細胞で同程度の増感効果を示した。このことより、温熱による放射線増感効果は細胞の放射線感受性よりも温熱感受性によって決まる可能性が示唆された。また、増感の機序は温熱による SLD 回復の阻害であることが推察された。

7. 最大の温熱耐性を示す時に放射線照射を行うと、両細胞の放射線感受性 ( $D_0$ ) の違いは小さくなった。これは主として LX830 細胞における放射線増感効果が減少したことによると考えられる。

以上の結果から、温熱による放射線増感効果は細胞

の温熱感受性に依存していること、及び温熱耐性時の放射線照射は放射線感受性細胞では特に放射線増感効果が減少するということがわかった。これらのことは臨床における温熱と放射線併用の際に十分考慮されるべきものと考ええる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を始める機会を与えて下さり、御懇切なる御指導と御校閲を賜りました広島大学歯学部歯科放射線学講座、和田卓郎教授に衷心より感謝の意を表しますとともに本研究において終始懇切丁寧な御指導、御校閲を賜った本学原爆放射能医学研究所障害基礎研究部門、澤田昭三教授に深厚なる謝意を表します。また、実験に使用した LX830 細胞を分与していただいた放射線医学総合研究所 (千葉市) の佐藤弘毅部長に心よりの感謝の意を表しますとともに本論文作成にあたって御校閲を賜りました歯学部歯科薬理学講座、土肥敏博教授、ならびに口腔外科学第一講座、高田和彰教授に深謝致します。さらに実験に際し終始格別な御協力を賜った原爆放射能医学研究所障害基礎研究部門、田内広博士、Robert S. Malyapa 博士、ならびに諸兄姉に心より感謝致します。最後に、御協力戴いた本学医学部放射線医学講座、医学部附属病院輸血部、歯学部歯科放射線学講座の諸先生に深く感謝致します。

## 参 考 文 献

- 1) Dewey, W.C., Hopwood, L.E., Sapareto, S.A. and Gerweck, L.E.: Cellular responses to combinations of hyperthermia and radiation. *Radiology* 123, 463-474, 1977.
- 2) Overgaard, J.: The current and potential role of hyperthermia in radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16, 535-549, 1989.
- 3) Robins, H.I., Longo, W.L., Steeves, R.A., Cohen, J.D., Schmitt, C.L., Neville, A.J., O'keefe, S., Lagoni, R. and Riggs, C.: Adjunctive therapy (whole body hyperthermia versus lonidamine) to total body irradiation for the treatment of favorable B-cell neoplasms: A report of two pilot clinical trials and laboratory investigations. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 18, 909-920, 1990.
- 4) Henle, K.J. and Dethlefsen, L.A.: Heat fractionation and thermotolerance: a review. *Cancer Res.* 38, 1843-1851, 1978.
- 5) Dewey, W.C.: Interaction of heat with radiation and chemotherapy. *Cancer Res. (Suppl.)*, 44, 4714s-4720s, 1984.
- 6) Iliakis, G. and Seamer, R.: A DNA double-strand

- break repair-deficient mutant of CHO cells shows reduced radiosensitization after exposure to hyperthermic temperatures in the plateau phase of growth. *Int. J. Hyperthermia* 6, 801-812, 1990.
- 7) Ben-Hur, E., Elkind, M.M. and Bronk, B.V.: Thermally enhanced radioresponse of cultured Chinese hamster cells: Inhibition of repair of sublethal damage and enhancement of lethal damage. *Radiat. Res.* 58, 38-51, 1974.
  - 8) Li, G.C., Evans, R.G. and Hahn, G.M.: Modification and inhibition of repair of potentially lethal X-ray damage by hyperthermia. *Radiat. Res.* 67, 491-501, 1976.
  - 9) Elkind, M.M. and Sutton, H.: Radiation response of mammalian cells grown in culture. I. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster cells. *Radiat. Res.* 13, 556-593, 1960.
  - 10) Little, J.B., Hahn, G.M., Frindel, E.M. and Tubiana, M.: Repair of potentially lethal radiation damage *in vitro* and *in vivo*. *Radiology* 106, 689-694, 1973.
  - 11) Baba, Y., Yasunaga, T., Uozumi, H., Takahashi, M. and Sawada, S.: Radiation and thermal characteristics of mouse lymphoma cells and their radiation-sensitive mutant. *Radiat. Med.* 6, 232-239, 1988.
  - 12) Beer, J.Z. and Kapiszewska, M.: Effects of hyperthermia and radiation in two L5178Y cell lines with different efficiencies of DNA repair. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 61, 115-117, 1982.
  - 13) Raaphorst, G.P., Thakar, M. and Ng, C.E.: Thermal radiosensitization in two pairs of CHO wild-type and radiation-sensitive mutant cell lines. *Int. J. Hyperthermia* 9, 383-391, 1993.
  - 14) Kampinga, H.H., Kanon, B., Konings, A.W.T., Stackhouse, M.A. and Bedford, J.S.: Thermal radiosensitization in heat- and radiation-sensitive mutants of CHO cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 64, 225-230, 1993.
  - 15) Miyakoshi, J.: Responses to hyperthermia (42°C, 44°C) and /or radiation in four mammalian cell lines *in vitro*. *J. Radiat. Res.* 22, 352-366, 1981.
  - 16) Raaphorst, G.P., Romano, S.L., Mitchell, J.B., Bedford, J.S. and Dewey, W.C.: Intrinsic differences in heat and /or X-ray sensitivity of seven mammalian cell lines cultured and treated under identical conditions. *Cancer Res.* 39, 396-401, 1979.
  - 17) 柏戸宏造: 培養細胞における放射線感受性と温熱感受性の比較およびエオシン染色法による温熱効果の検出. 広大医誌 36, 1081-1098, 1988.
  - 18) Nielsen, O.S.: Influence of thermotolerance on the interaction between hyperthermia and radiation in L1A2 cells *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.* 43, 665-673, 1983.
  - 19) Hartson-Eaton, M., Malcolm, A.W. and Hahn, G.M.: Radiosensitivity and thermosensitization of thermotolerant Chinese hamster cells and RIF-1 tumors. *Radiat. Res.* 99, 175-184, 1984.
  - 20) Jorritsma, J.B.M., Kampinga, H.H., Scaf, A.H.J. and Konings, A.W.T.: Strand break repair, DNA polymerase activity and heat radiosensitization in thermotolerant cells. *Int. J. Hyperthermia* 1, 131-145, 1985.
  - 21) Kampinga, H.H., Keij, J.F., van der Kruk, G. and Konings, A.W.T.: Interaction of hyperthermia and radiation in tolerant and nontolerant HeLa S3 cells: role of DNA polymerase inactivation. *Int. J. Radiat. Biol.* 55, 423-433, 1989.
  - 22) van Rijn, J., van den Berg, J., Schamhart, D.H.J. and van Wijk, R.: Effect of thermotolerance on thermal radiosensitization in hepatoma cells. *Radiat. Res.* 97, 318-328, 1984.
  - 23) Holahan, P.K., Wong, R.S.L., Thompson, L.L. and Dewey, W.C.: Hyperthermic radiosensitization of thermotolerant Chinese hamster ovary cells. *Radiat. Res.* 107, 332-343, 1986.
  - 24) Haveman, J., Hart, A.A.M. and Wondergem, J.: Thermal radiosensitization and thermotolerance in cultured cells from a murine mammary carcinoma. *Int. J. Radiat. Biol.* 51, 71-80, 1987.
  - 25) Raaphorst, G.P. and Azzam, E.I.: Thermal radiosensitization in Chinese hamster (V79) and mouse C3H 10T 1/2 cells: The thermotolerance effect. *Br. J. Cancer* 48, 45-54, 1983.
  - 26) Welch, D.R., Milas, L., Tomasovic, S.P. and Nicolson, G.L.: Heterogeneous response and clonal drift of sensitivities of metastatic 13762NF mammary adenocarcinoma clones to  $\gamma$ -radiation *in vitro*. *Cancer Res.* 43, 6-10, 1983.
  - 27) Heppner, G.H.: Tumor heterogeneity. *Cancer Res.* 44, 2259-2265, 1984.
  - 28) Rofstad, E.K. and Brustad, T.: Heterogeneity in radiosensitization by heat of cloned cell lines derived from a single human melanoma xenograft. *Int. J. Radiat. Biol.* 50, 93-102, 1986.
  - 29) Sato, K., Hieda-Shiomi, N. and Hama-Inaba, H.: X-ray-sensitive mutant mouse cells with various sensitivities to chemical mutagens. *Mutation Res.* 121, 281-285, 1983.
  - 30) Sawada, S. and Kimura, K.: Hyperthermia-induced interphase death in cultured mouse leukemic L5178Y cells. *J. Radiat. Res.* 26, 29, 1985.
  - 31) Meistrich, M.L., Meyn, R.E. and Barlogie, B.: Synchronization of mouse L-P59 cells by centrifugal elutriation separation. *Exp. Cell Res.* 105, 169-177, 1977.
  - 32) Anderson, E.C., Petersen, D.F. and Tobey, R.A.: Density invariance of cultured Chinese hamster cells with stage of the mitotic cycle.

- Biophys. J.* **10**, 630-645, 1970.
- 33) Mitchell, B.F. and Tupper, J.T.: Synchronization of mouse 3T3 and SV40 3T3 cells by way of centrifugal elutriation. *Exp. Cell Res.* **106**, 351-355, 1977.
  - 34) Adams, E.G., Crampton, S.L. and Bhuyan, B.K.: Effect of 7-*con-O*-Methylnoganol on DNA synthesis, survival, and cell cycle progression of Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* **41**, 4981-4987, 1981.
  - 35) Dean, P.N. and Jett, J.H.: Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow microfluorometry. *J. Cell Biol.* **60**, 523-527, 1974.
  - 36) Whitmore, G.F., Varghese, A.J. and Gulyas, S.: Cell cycle responses of two X-ray sensitive mutants defective in DNA repair. *Int. J. Radiat. Biol.* **56**, 657-665, 1989.
  - 37) Arcangeli, G., Cividalli, A. Nervi, C. and Creton, G.: Tumor control and therapeutic gain with different schedules of combined radiotherapy and local external hyperthermia in human cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **9**, 1125-1134, 1983.
  - 38) Nias, A.H.W., Swallow, A.J., Keene, J.P. and Hodgson, B.W.: Absence of a fractionation effect in irradiated HeLa cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **23**, 559-569, 1973.
  - 39) Okada, S.: Radiation effects on cell progress through the life cycle; in *Radiation Biochemistry* (Altman, K.I., Gerber, G.B. and Okada, S., editor). Vol. I, Academic Press Inc., New York, 190-246, 1970.
  - 40) 大山ハルミ: プログラム細胞死の分子機構. 細胞 **21**, 125-128, 1989.
  - 41) Akagi, Y., Ito, K. and Sawada, S.: Radiation-induced apoptosis and necrosis in Molt-4 cells: a study of dose-effect relationships and their modification. *Int. J. Radiat. Biol.* **64**, 47-56, 1993.
  - 42) Goldstein, R. and Okada, S.: Interphase death of cultured mammalian cells (L5178Y). *Radiat. Res.* **39**, 361-373, 1969.
  - 43) Malyapa, R.S. and Sawada, S.: Cell-cycle dependence of heat-induced interphase death in mouse L5178Y cells. *Radiat. Res.* **125**, 134-140, 1991.
  - 44) 西岡康二: L5178Y-S 細胞の温熱感受性と放射線, 薬剤との併用効果及びエオシン染色法の有用性の検討. 広大医誌 **38**, 729-751, 1990.
  - 45) 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.
  - 46) Kim, S.H., Kim, J.H. and Hahn, E.W.: The enhanced killing of irradiated HeLa cells in synchronous culture by hyperthermia. *Radiat. Res.* **66**, 337-345, 1976.
  - 47) Bhuyan, B.K., Day, K.J., Edgerton, C.E. and Ogunbase, O.: Sensitivity of different cell lines and of different phases in the cell cycle to hyperthermia. *Cancer Res.* **37**, 3780-3784, 1977.
  - 48) Henderson, S.D., Kimler, B.F. and Scanlan, M.F.: Interaction of hyperthermia and radiation on the survival of synchronous 9L cells. *Radiat. Res.* **92**, 146-159, 1982.
  - 49) Malyapa, R.S. and Sawada, S.: Variation in heat sensitivity through the cell cycle of M10 and Burkitt P3HR-1 cells. *Int. J. Hyperthermia* **4**, 463-473, 1992.
  - 50) Raaphorst, G.P., Vadasz, J.A., Azzam, E.I., Sargent, M.D., Borsa, J. and Einspinner, M.: Comparison of heat and / or radiation sensitivity and membrane composition of seven X-ray-transformed C3H 10T 1/2 cell lines and normal C3H 10T 1/2 cells. *Cancer Res.* **45**, 5452-5456, 1985.
  - 51) Okada, S.: DNA as target molecule responsible for cell killing; in *Radiation Biochemistry*, (Altman, K.I., Gerber, G.B. and Okada, S., editor). Vol. I, Academic Press Inc., New York, 103-147, 1970.
  - 52) Coss, R.A. and Dewey, W.C.: Heat sensitization of G<sub>1</sub>-and S-phase cells by procaine hydrochloride. *Radiat. Res.* **92**, 615-617, 1982.
  - 53) Sawada, S.: Interphase death; main cause of cell killing by hyperthermia in L5178Y cells.; in *Proceedings of 5th International Symposium on Hyperthermic Oncology, Kyoto, Japan* (Sugahara, T. and Saito, M., editor). Vol. I. Taylor & Francis Co., London, 27-29, 1989.
  - 54) Okada, S.: Radiation-induced death; in *Radiation Biochemistry* (Altman, K.I., Gerber, G.B. and Okada, S., editor). Vol. I, Academic Press Inc., New York, 247-307, 1970.
  - 55) Raaphorst, G.P., Freeman, M.L. and Dewey, W.C.: Radiosensitivity and recovery from radiation damage in cultured CHO cells exposed to hyperthermia at 42.5 or 45.5°C. *Radiat. Res.* **79**, 390-402, 1979.
  - 56) Wolters, H., Kelholt, D. and Konings, A. W. T.: Effect of hyperthermia on the repair of sublethal radiation damage in normal and membrane fatty acid substituted fibroblasts. *Radiat. Res.* **109**, 294-302, 1987.
  - 57) Dewey, W.C.: The search for critical cellular targets damaged by heat. *Radiat. Res.* **120**, 191-204, 1989.
  - 58) Dikomey, E. and Franzke, J.: Effect of heat on induction and repair of DNA strand breaks in X-irradiated CHO cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **61**, 221-233, 1992.
  - 59) Holahan, E.V., Highfield, D.P., Holahan, P.K. and Dewey, W.C.: Hyperthermic killing and Hyper-



- thermic radiosensitization in Chinese hamster ovary cells: effects of pH and thermal tolerance. *Radiat. Res.* **97**, 108-131, 1984.
- 60) Dikomey, E. and Jung, H.: Thermal radiosensitization in CHO cells by prior heating at 41-46°C. *Int. J. Radiat. Biol.* **59**, 815-825, 1991.
- 61) Kampinga, H.H., Jorritsma, J.B.M., Burgman, P. and Konings, A.W.T.: Differences in heat-induced cell killing as determined in three mammalian cell lines do not correspond with the extent of heat radiosensitization. *Int. J. Radiat. Biol.* **50**, 675-684, 1986.
- 62) Henle, K.J. and Leeper, D.B.: Interaction of hyperthermia and radiation in CHO cells: recovery kinetics. *Radiat. Res.* **66**, 505-518, 1976.
- 63) Dikomey, E., Eickhoff, J. and Jung, H.: Effect of pH on development and decay of thermotolerance in CHO cells using fractionated heating at 43°C. *Int. J. Hyperthermia* **4**, 555-565, 1988.
- 64) Gerweck, L.E. and Majima, H.: Variability in the kinetics of thermotolerance decay in three cell lines. *Radiat. Res.* **112**, 365-373, 1987.