

## MC 29ウイルス誘発腫瘍移植雛における Amphotericin B 及び 6-Diazo-5-oxo-l-norleucine (DON) の効果について

石津彰博・中川万利子\*<sup>1</sup>・牧内浩幸\*<sup>2</sup>・安田宣紘・清水 孜・松野哲也\*<sup>3</sup>

(家畜病理学研究室)

平成4年8月5日 受理

### Effects of Amphotericin B and 6-Diazo-oxo-l-norleucine (DON) on Chickens Transplanted with MC29-Induced Liver Tumor

Akihiro ISHIZU, Mariko NAKAGAWA\*<sup>1</sup>, Hiroyuki MAKIUCHI\*<sup>2</sup>,  
Nobuhiro YASUDA, Tsutomu SHIMIZU and Tetsuya MATSUNO\*<sup>3</sup>  
(Laboratory of Veterinary Pathology)

#### 緒 論

先に我々は, glutamine を特異的に利用する性質が証明されている<sup>16-22)</sup> MC 29ウイルス<sup>1, 2, 3, 24)</sup> 誘発肝原発腫瘍<sup>2, 13, 14)</sup> を皮下に移植した雛を用い, 飼育室を45°Cに維持する全身温熱療法や glutamine 代謝阻害剤の投与, 並びに両者の併用を試みた<sup>26)</sup>. その結果, 全身温熱療法あるいは glutamine 阻害剤投与の単独処置でも腫瘍増殖が抑制され, 両者の併用により, 顕著な相乗効果がみとめられた<sup>26)</sup>. 阻害剤として用いた 6-diazo-5-oxo-l-norleucine (DON), aminooxyacetate (AOA), および Acivicin のうち, DON の有効性が顕著であった. しかし, 45°C の加温飼育と DON の投与は, 雛の体重増加率を著しく低下させた.

そこで我々は生体に対する負担を軽減するためにマイクロ波 (2450MHz) を用いた局所温熱療法<sup>4, 6, 8, 10-12, 15)</sup> を試み, 先に行なわれた全身温熱療法に近い制癌効果を認めた<sup>9, 27)</sup>. さらに, DON 投与との併用による相乗効果も顕著であった. 局所加温による体重増加率の低下は僅かで, 生体への影響の少ない有効な方法であることが明らかになった.

Amphotericin B は真菌の細胞膜のステロール部,

特にエルゴステロールに不可逆的に結合することによって膜の透過性を増加させ, 種々の分子が漏出するようになることで, 抗真菌性を発揮し, 数種のアメーバに対しても効力を持つが, 細菌, リケッチア, ウイルスに対しては高濃度 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) でも効力を持たないとされる. 動物細胞に対しても同様の機序で41~43°Cの加温処置によって著明な致死効果が *in vitro* および *in vivo* で認められ<sup>7)</sup>, 温度に対して閾値が存在すると報告されている. また, 幾つかの化学療法剤の効果を高める作用も報告されている<sup>5, 25)</sup>. さらに低濃度では培養真菌細胞および培養動物細胞の分化に対する促進作用や強力な体液性および細胞性免疫増強作用を持ち, その誘導体は正常な組織細胞よりむしろ腫瘍細胞において感受性が高いことも報告されている<sup>25)</sup>. また, ある種の白血病細胞に対する宿主の免疫反応を高めるという報告もある<sup>23)</sup>.

松野は *in vitro* において DON 処理後, amphotericin B の注射用製剤 Fungizone を加えて, さらに著しい細胞致死効果を認めた (未発表データ). 今回我々は, MC 29ウイルス誘発腫瘍移植雛において Fungizone の抗腫瘍性を証明し, さらに, DON および/あるいは局所温熱療法を併用して, 腫瘍の増殖および宿主に及ぼす影響を検討した.

#### 材 料 と 方 法

1. 実験用雛, 移植腫瘍組織の由来及び移植法は前報<sup>9, 27)</sup>と同じである.
2. 局所加温装置及び局所加温の方法は前報<sup>9, 27)</sup>の通りである.

\*<sup>1</sup> 熊本市新大江3-19-11

3-19-11 Sin-Ooe, Kumamoto 862

\*<sup>2</sup> 鹿児島県始良家畜保健衛生所, 始良郡加治木町木田1641-1  
Kagoshima Prefectural Aira Livestock Health Center,  
1641-1 Kida, Kajiki-chou, Aira 899-52

\*<sup>3</sup> 国立予防衛生研究所麻疹ウイルス部, 武蔵村山市学園4-7-1  
Department of Measles Virus, National Institute of Health,  
Gakuenn, Musasimurayama, Tokyo 190-12

## 3. 薬品

## 1) Fungizone (注射用 amphotericin B) (Fig. 1)

5%ブドウ糖液に溶解させた原液 (5 mg/ml) を小試験管に分注, 密栓して冷凍保存後, 使用前に5%ブドウ糖液で希釈し, 必要な用量に調整して用いた.

## 2) 6-diazo-5-oxo-1-norleucine (DON)

[Sigma Chem. Co.] (Fig.1)

使用法は前報<sup>9,27)</sup>の通りである.

4. 体重および腫瘍の測定は前報<sup>9,26,27)</sup>の通りである.

## 5. 実験計画

実験1. Fungizoneの抗腫瘍作用と局所温熱療法との併用効果.

第23継代目の腫瘍を移植した36羽の雛を腫瘍移植後7~9日目に, 腫瘍体積指標が450~800mm<sup>3</sup>に達した時点で次の4群に分け, 各処置を行った.

担癌対照群 (Tumor control)	12羽
Fungizone 投与群 (Tumor+Fungizone)	7羽
加温群 (Tumor+HypT)	6羽
Fungizone+加温群 (Tumor+Fungizone+HypT)	11羽

夕方16時の体重および腫瘍測定を処置開始点として, 測定後 Fungizone を12.5 μg 胸筋内に注射し, 3~4時間後に加温を行い, それぞれ7日間連続, 合計7回処置した.

実験2. Fungizoneの抗腫瘍作用.

第23継代目の腫瘍を移植した56羽の雛を腫瘍移植

後7~9日目に, 腫瘍体積指標が420~700mm<sup>3</sup>に達した時点で次の6群に分け, 各処置を行った.

担癌対照群 (Tumor control)	17羽
加温群 (Tumor+HypT)	7羽
Fungizone 多量投与群 (Tumor+F 25.0 μg)	8羽
Fungizone 中等量投与群 (Tumor+F 12.5 μg)	8羽
Fungizone 少量投与群 (Tumor+F 6.25 μg)	8羽
Fungizone 中等量+加温群 (Tumor+F 12.5 μg+HypT)	8羽

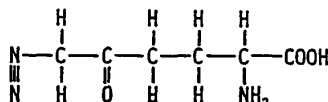
実験1と同様に, 夕方16時の体重および腫瘍測定を処置開始点として, 測定後 Fungizone 25.0 μg, 12.5 μg あるいは6.25 μg を, 胸筋内に注射し, 3~4時間後に局所加温を行い, それぞれ7日間連続, 合計7回処置した.

実験3. DONと Fungizone の併用効果と局所温熱療法との相乗効果.

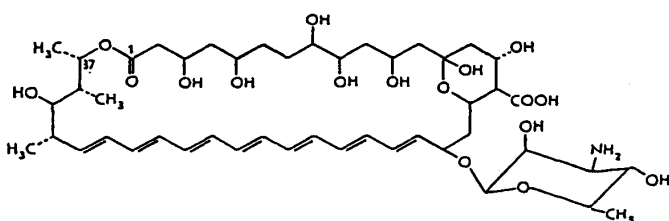
第26継代目の腫瘍を移植した雛40羽を, 7~10日目に腫瘍体積指標が430~600mm<sup>3</sup>に達した時点で6群に分け, 処置を開始した. また, 9羽の腫瘍を移植していない非担癌対照群を設けた. 非担癌対照群はその他の群から隔離して飼育した.

非担癌対照群 (Non-treatment control)	9羽
担癌対照群 (Tumor control)	9羽
加温群 (Tumor+HypT)	5羽
Fungizone 投与群 (Tumor+F)	7羽
DON投与群 (Tumor+DON)	6羽
Fungizone+DON投与群 (Tumor+F+DON)	6羽
Fungizone+DON+加温群 (Tumor+F+DON+HypT)	7羽

夕方16時の体重および腫瘍測定後, DON 5 mM PBS 溶液を0.1ml 右胸筋内に注射し, Fungizone は, 単独の場合は体重および腫瘍測定後, DON と併用する場合には DON 投与の翌日12時に, 10 μg を左胸筋内に注射した. 局所加温は体重および腫瘍測定から3~5時間後に行った. 各処置はそれぞれ7日間連続合計7回行った.



6-diazo-5-oxo-1-norleucine (DON)



Amphotericin B

Fig. 1 Chemicals used for chemotherapy

結 果

腫瘍増殖率および体重増加率

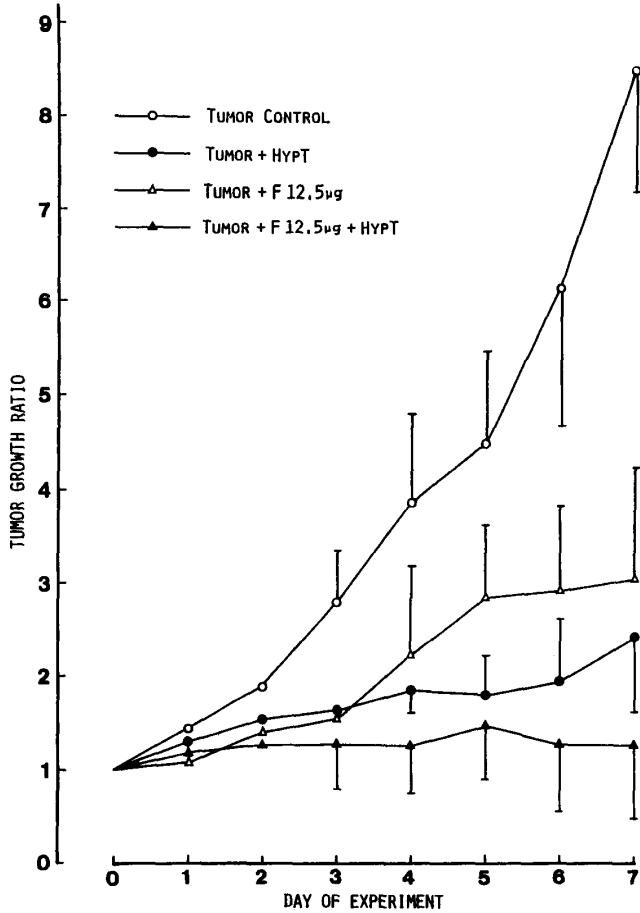


Fig. 2 Effect of Fungizone and/or hyperthermia on growth of transplanted tumor.

Table 1. Statistical evaluation of body weight gain and tumor growth among groups in experiment 1

		BODY WEIGHT RATIO			
		Tumor Control	Tumor +HypT	Tumor +F	Tumor+ F+HypT
TUMOR GROWTH RATIO	Tumor Control		4 D*	—	4 D* 7 D**
	Tumor +HypT <sup>a</sup>	3 D**		—	—
	Tumor +F <sup>b</sup>	2 D* 3 D**	—		—
	Tumor +F +HypT	1 D**	7 D*	4 D* 5 D**	

<sup>a</sup> = Local Hyperthermia    <sup>b</sup> = Fungizone 12.5 µg

D = day of experiment

\* p = 0.05    \*\* p = 0.01    — no significance

実験 1. Fungizone の抗腫瘍作用と局所加温の併用結果. (Fig. 2)

Fungizone 投与群では、無処置の担癌対照群に対し処置開始後2日目に  $p = 0.05$ , 3日目以降  $p = 0.01$  で有意に腫瘍増殖率の低下が見られた (Table 1). 加温群では、担癌対照群に対して3日目以降に  $p = 0.01$  で有意に腫瘍増殖率が低下した. Fungizone + 加温群では、担癌対照群に対して1日目以降  $p = 0.01$  で有意の腫瘍増殖率低下が見られ、Fungizone 単独投与群に対しても4日目に  $p = 0.05$ , 5日目以降  $p = 0.01$  で、また、加温群に対しても7日目に  $p = 0.05$  で有意の増殖率抑制効果が認められた.

処置開始後7日目における腫瘍増殖率は、担癌対照群  $8.52 \pm 1.32$ , Fungizone 投与群  $3.12 \pm 1.16$ , 加温群  $2.48 \pm 0.80$ , Fungizone + 加温群  $1.28 \pm 0.80$  であり、顕著な増殖抑制効果が認められた.

実験後半期には、加温群よりも Fungizone 群の方が腫瘍の増殖が抑制されている感じがあったが、両群とも標準偏差が大きく、腫瘍が著しい退縮を示

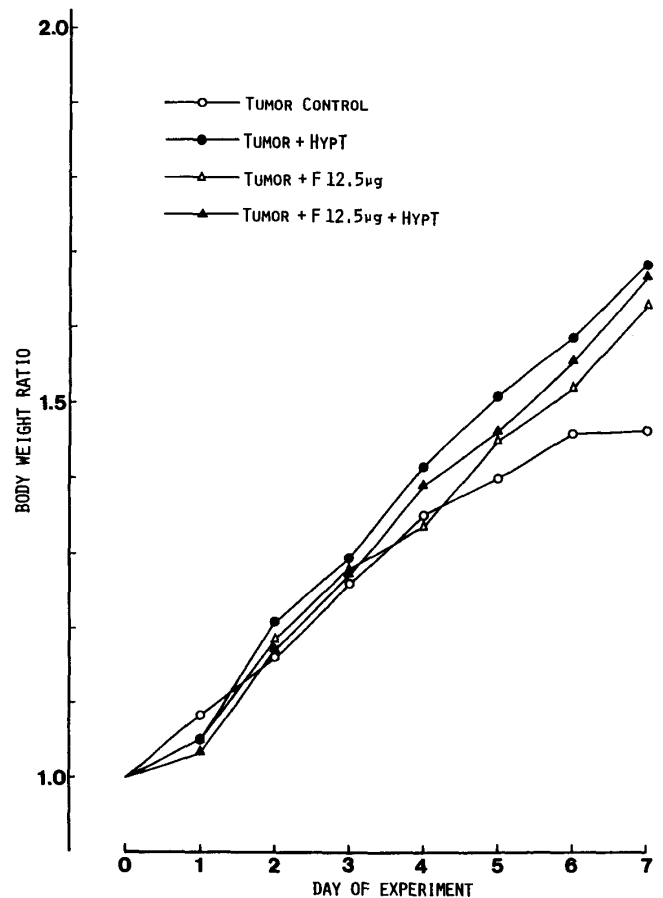


Fig. 3 Effect of Fungizone and/or hyperthermia on body weight of tumor-transplanted chickens.

すものもあれば、担癌対照群と変らないほど腫瘍が増殖するなど個体によるばらつきが著しく、有意差は認められなかった。しかし、加温を併用すると腫瘍の増殖抑制が顕著に現れ、さらに、11羽中6羽の腫瘍においては実験終了時の腫瘍体積指標が開始時の100%以下となり退縮傾向が明らかであった。

雛の体重増加率は、Fig. 3 に示した。担癌対照群では、移植腫瘍が著しく増殖し始めた実験後半から増加率が急激に低下し始め、加温群や Fungizone + 加温群に対して4日目以降  $p=0.05$  で有意に低値を示した。処置を行った3群 (Fungizone 群、加温群、Fungizone + 加温群) における体重増加率は、加温を行った2群では比較的高い値を示したが、各群間における有意差は見られなかった。

実験2. Fungizone の抗腫瘍作用

Fungizone 単独の抗腫瘍効果最適用量を検索するため、6.25  $\mu\text{g}$ 、25.0  $\mu\text{g}$  投与群を加えて12.5  $\mu\text{g}$  投与群と比較した (Fig.4)。

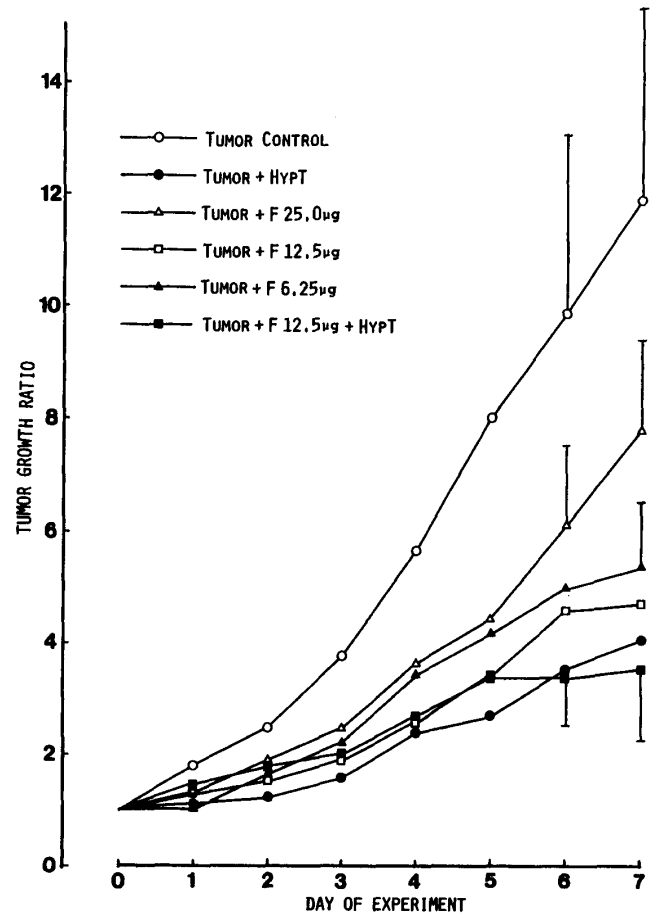


Fig. 4 Effect Fungizone and/or hyperthermia on growth of transplanted tumor.

Fungizone 単独投与群の間では、Fungizone の投与量の差が腫瘍増殖抑制効果に有意差を生じることではなく、投与量依存的傾向もみられなかった。特に大量投与がむしろ抗腫瘍性を減ずる傾向があり、平均値では12.5  $\mu\text{g}$  の中等量が最も有効であるように見えた。加温処置併用群と比較すると、6日目から、Fungizone 25.0  $\mu\text{g}$  投与群に対して  $p=0.01$ 、6.25  $\mu\text{g}$  投与群に対して  $p=0.05$  で有意差が認められた。しかしながら、Fungizone 投与量が同じである12.5  $\mu\text{g}$  投与群と比較すると、平均値では加温併用群の方が増殖率が低下しているが、有意差は認められなかった。加温処置のみの群は、平均値で2~5日の間最も良く腫瘍抑制を示したが、6~7日では Fungizone との併用群より下回るようになった。Table 2 に示すように、Fungizone 投与あるいは加温処置を行った群では、早い群では処置開始後1日目から、遅くとも2日目には  $p=0.01$ 、または  $p=0.05$  で有意に無処置担癌対照群に対して腫瘍増殖率の低下が見られた。

処置開始後7日目での腫瘍増殖率は、担癌対照群  $11.86 \pm 3.40$ 、Fungizone 25.0  $\mu\text{g}$  投与群  $7.86 \pm 1.66$ 、Fungizone 6.25  $\mu\text{g}$  投与群  $5.46 \pm 1.06$ 、Fungizone 12.5  $\mu\text{g}$  投与群  $4.80 \pm 1.55$ 、加温群  $4.13 \pm 1.25$ 、Fun-

Table 2. Statistical evaluation of body weight gain and tumor growth among groups in experiment 2

		BODY WEIGHT RATIO					
		Tumor Control	Tumor + HypT	Tumor + F <sub>25.0</sub>	Tumor + F <sub>12.5</sub>	Tumor + F <sub>6.25</sub>	Tumor + HypT + F <sub>12.5</sub>
TUMOR GROWTH RATIO	Tumor Control		4 D*	—	—	—	1 D* 4 D**
	Tumor + HypT*	1 D**		4 D**	—	3 D*	7 D**
	Tumor + F <sub>25.0</sub> <sup>b</sup>	2 D*	5 D*		—	—	1 D**
	Tumor + F <sub>12.5</sub> <sup>c</sup>	1 D**	—	—		—	—
	Tumor + F <sub>6.25</sub> <sup>d</sup>	1 D**	—	7 D**	—		—
	Tumor + HypT + F <sub>12.5</sub>	2 D**	—	6 D**	—	6 D*	

\* = Local hyperthermia    b = Fungizone 25.0  $\mu\text{g}$   
 c = Fungizone 12.5  $\mu\text{g}$     d = Fungizone 6.25  $\mu\text{g}$

D = day of experiment  
 \*  $p=0.05$     \*\*  $p=0.01$     — no significance

gizone 12.5  $\mu\text{g}$  + 加温群  $3.60 \pm 1.26$  であった。

体重増加率は、Fig. 5 に示した。Fungizone 12.5  $\mu\text{g}$  + 加温群は担癌対照群、Fungizone 25.0  $\mu\text{g}$  および 6.25  $\mu\text{g}$  投与群に対して処置開始1日目から  $p = 0.01$  もしくは  $p = 0.05$  で有意に体重増加の抑制が認められた。加温群は3～5日目では Fungizone 12.5  $\mu\text{g}$  併用群とほぼ同じ平均値を示したが、6～7日目で少し下がり、ばらつきの大きいこともあって、他の群との間に有意差は見られず、特に Fungizone 25.0  $\mu\text{g}$  や 6.25  $\mu\text{g}$  投与における体重増低下傾向が顕著であった。

Fungizone は投与量依存性が見られず、12.5  $\mu\text{g}$  が最も腫瘍抑制が有効で体重抑制も少なく、25.0  $\mu\text{g}$  や 6.25  $\mu\text{g}$  の場合は、体重増加抑制が強く、しかも腫瘍増殖抑制が低いという予想外の結果を示した。

### 実験3. DONとFungizoneの併用効果と局所温熱療法との相乗効果

各単独処置を比較するため、担癌対照群、加温群、

Fungizone 投与群、DON投与群、DON+Fungizone 投与群、DON+Fungizone+加温群の6群を比較した (Fig. 6)。Fungizone は各投与群とも10  $\mu\text{g}$  投与した。

各処置群の腫瘍増殖率は、担癌対照群と比較すると、加温群を除く全ての群において処置開始後1日目から有意差が認められ、加温群でも3日目より  $p = 0.01$  で有意に増殖率の低下が見られた。

処置開始後7日目の腫瘍増殖率の平均値±標準偏差は、担癌対照群  $11.03 \pm 2.86$ 、Fungizone 投与群  $3.37 \pm 2.63$ 、加温群  $2.86 \pm 1.55$ 、DON投与群  $2.69 \pm 0.26$ 、DON+Fungizone 投与群  $2.06 \pm 1.22$ 、DON+Fungizone+加温群  $1.66 \pm 0.34$  であった。DON+Fungizone+加温群は Fungizone 単独およびDON単独の各群に対して7日目に  $p = 0.01$  の有意差を示した。

雛の体重増加率は Fig. 7 に示した。非担癌対照群に対して腫瘍の移植を行った群では、Table 3 に示すように早い群では1日目から、遅くとも3日目に

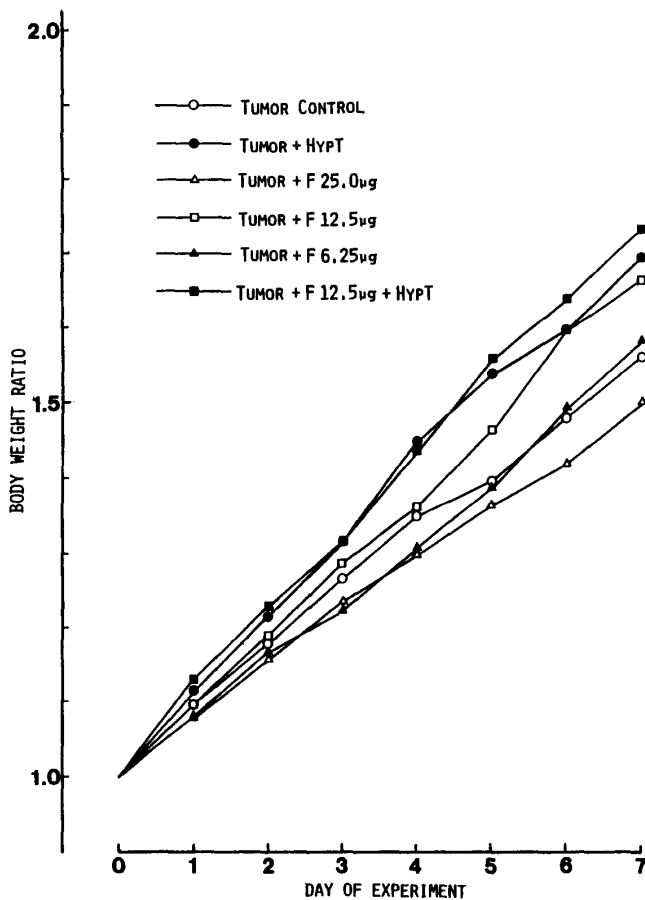


Fig. 5 Effect of Fungizone and/or hyperthermia on body weight of tumor-transplanted chickens.

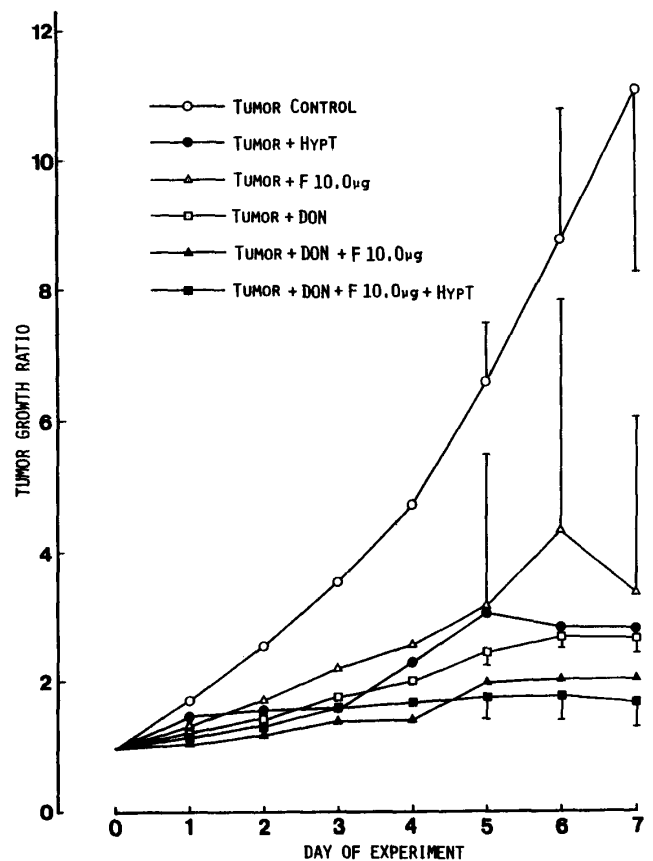


Fig. 6 Effect of DON, Fungizone and/or hyperthermia on growth of transplanted tumor.

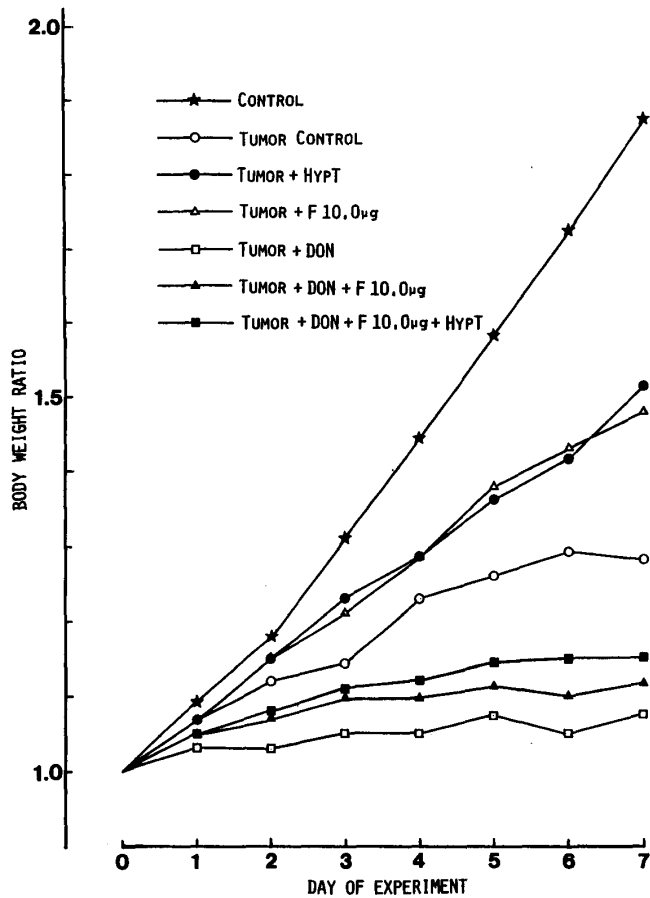


Fig. 7 Effect of DON, Fungizone and/or hyperthermia on body weight of tumor-grafted chickens.

は  $p = 0.01$  で有意に体重増加率の抑制が認められた。各処置を行った群を比較すると、特にDON投与群において極めて著明な体重増加率の抑制が認められ、Fungizone 単独投与群および加温群が担癌対照群と正常対照群の中間に近い体重増加率を示した。

考 察

鶏急性白血病ウイルスMC29誘発肝原発腫瘍を初生雛の背部皮下織に移植し、増殖した腫瘍に対して、ポリエー・マクロライド系抗真菌性抗生物質の Fungizone を投与し腫瘍増殖抑制効果を認めた。さらに、glutamine 代謝阻害剤であるDONの投与、およびマイクロ波 (2450MHz) による局所温熱療法の併用を試みた結果、著明な相乗効果を証明した。

まず、Fungizone (12.5  $\mu$ g/day) 単独投与および局所温熱療法との併用を試みた。処置開始後7日目の腫瘍増殖率は、担癌対照群が8.52であるのに対して、Fungizone投与群では3.12であり、Fungizone の有効性が証明された。さらに局所温熱療法を併用

Table 3. Statistical evaluation of body weight gain and tumor growth among groups in experiment 3

		BODY WEIGHT RATIO					
		Tumor Control	Tumor + HypT	Tumor + F	Tumor + DON	Tumor + DON + F	Tumor + DON + F + HypT
TUMOR GROWTH RATIO	Control	1 D*					
		2 D**	3 D**	3 D**	1 D**	1 D**	1 D**
	Tumor Control		7 D**	7 D*	1 D*	2 D*	6 D*
	Tumor + HypT <sup>a</sup>	3 D**		—	1 D**	—	2 D*
							3 D**
	Tumor + F <sup>b</sup>	1 D*			1 D*	—	2 D*
	7 D**	—				7 D**	
Tumor + DON	1 D**	—	—	—	—	—	
Tumor + DON + F	1 D**	—	—	—	—	—	
Tumor + DON + F + HypT	1 D**	—	7 D*	7 D*	—	—	

<sup>a</sup> = Local hyperthermia    <sup>b</sup> = Fungizone 10.0  $\mu$ g

D = day of experiment

\*  $p = 0.05$     \*\*  $p = 0.01$     — no significance

した場合には1.28と著明に腫瘍増殖が抑制された。局所加温処置のみの場合は2.48であったことから、Fungizone 投与と局所温熱療法の併用による相乗効果が示唆された。また、雛の体重増加率は、担癌対照群では腫瘍が増大した実験後半に著明に抑制されたが、Fungizone 投与あるいは局所加温処置を施した群では影響が少なく、Fungizone および局所加温処置が生体に与える影響が少ないことが確認された。

次に、化学療法剤としての Fungizone の最適用量を探るため、投与量6.25  $\mu$ g/day, 12.5  $\mu$ g/day, 25.0  $\mu$ g/day の3群を設けて比較した。処置開始後7日目でのそれぞれの腫瘍増殖率は、担癌対照群が11.86であるのに対して、6.25  $\mu$ g 投与群は5.46, 12.5  $\mu$ g 投与群は4.80, 25.0  $\mu$ g 投与群は7.86という結果になった。このように、Fungizone では投与量と腫瘍増殖抑制効果は相関せず、むしろ大量投与では効果が低下する傾向が見られた。このような反応は、Fungizone は大量投与と微量投与とは異なる作用があるためではないかと考えられるが、今後さらに投与量を変化させて追加試験を行う必要があろう。

さらに、以前我々が単独投与および局所温熱療法併用における著明な腫瘍増殖抑制効果を報告した<sup>9,20)</sup> glutamine 代謝阻害剤DONとの併用を試みた。また、局所温熱療法も併せて行った。Fungizone は 10  $\mu\text{g}/\text{day}$  を投与した。その結果、処置開始後7日目での腫瘍増殖率は、担癌対照群の11.03に対して、Fungizone 群で3.37、加温群で2.86、DON群で2.69であり、Fungizone とDONを併用した群では2.06、さらにFungizone+DON投与に加温処置を併用した群では1.66とより有効に腫瘍増殖が抑制された。各処置群の差は僅かであったが、この結果は両薬物と局所温熱療法との併用に今後の可能性が期待された。しかし、DONを単独あるいは併用投与した全ての群で体重増加率が担癌対照群より抑制されており、より生体への影響の少ない投与方法を検討する必要がある。

今回の実験で、Fungizone の抗腫瘍効果が確認され、局所温熱療法および glutamine 代謝阻害剤DONとの併用による相乗効果が認められた。しかし、大量投与ではむしろ効果が低下するなど作用機序にはまだ不明な点があり、今後さらに検討を要すると思われる。

## 要 約

1. Fungizone の最適投与量を探るため、投与量 6.25  $\mu\text{g}/\text{day}$ 、12.5  $\mu\text{g}/\text{day}$ 、25.0  $\mu\text{g}/\text{day}$  の3群を比較した。処置開始後7日目の平均腫瘍増殖率は担癌対照群11.86に対してそれぞれ5.46、4.80、7.86となり、投与量と増殖抑制効果は相関せず、大量投与ではむしろ効果が低下した。

2. MC29ウイルスによって誘発された可移植性肝原発腫瘍を初生雛の背部皮下に移植して7~9日後に大豆大(腫瘍体積指標が450~800 $\text{mm}^3$ )に達したものに対して、Fungizone (12.5  $\mu\text{g}/\text{day}$ ) を投与し、さらにマイクロ波による局所温熱療法を併用した。処置開始後7日目における腫瘍増殖率平均値は、担癌対照群が8.52であったのに対して、Fungizone 投与群は3.12、加温群は2.48であり、Fungizone の抗腫瘍効果が確認された。さらに、Fungizone 投与に加温処置を併用した場合では1.28と著明な増殖抑制が認められ、Fungizone と局所温熱療法の相乗効果が示唆された。

3. Glutamine 代謝阻害剤DONとFungizone との併用効果について検索し、さらに局所温熱療法の併用を試みた。処置開始後7日目の平均増殖率は

担癌対照群11.03、加温群2.86、Fungizone 投与群3.37、DON投与群2.96に対して、DON+Fungizone 併用群では2.06、DON+Fungizone に加温処置を併用した群では1.66となり、単独投与群よりも増殖抑制効果が増強された。

4. Fungizone 投与による体重増加率の抑制は僅かであり、生体への影響は少ないと思われる。

## 文 献

- 1) Beard, D., Chabot, J. F., Langlois, A. J., Hillman, E. A. and Beard, J. W. : Singularity of oncogenic activity of strain MC 29 avian leukosis viruses. *Arch. Geschwulstforsch.*, 35, 315-325 (1970)
- 2) Beard, J. W., Hillman, E. A., Beard, D., Lapis, K. and Heine, U. : Neoplastic response of the avian liver to host infection with strain MC 29 leukosis virus. *Cancer Res.*, 35, 1603-1627 (1975)
- 3) Beard, J. W., Langlois, A. J. and Beard, D. : Etiological strain specificities of the avian tumor viruses. Unifying concepts of leukemia. *Bibl. haemat.*, 39, 31-44 (1973)
- 4) Devall, L. R. : New agent summaries. 6-diazo-5-oxo-l-norleucine. *Cancer Chemother. Rep.*, 7, 86-98 (1960)
- 5) Fisher, P. B., Goldstein, N. I., Bonner, D. P., Mechlinski, W., Bryson, V. and Schaffner, C. P. : Toxicity of amphotericin B and its methyl ester toward normal and tumor cell lines. *Cancer Res.*, 35, 1996-1999 (1975)
- 6) Gillette, E. L. : Hyperthermia effects in animals with spontaneous tumors. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 61, 361-364 (1982)
- 7) Hahn, G. M., Li, G. C. and Shiu, E. C. : Interaction of amphotericin B and 43 °C hyperthermia. *Cancer Res.*, 37, 761-764 (1977)
- 8) Hugander, A., Hafstom, L., Jonssen, P., Bolmsjo, M., Persson, B. R. R. and Stenram, U. : Local hyperthermia in treatment of experimental liver tumor. *Cancer*, 53, 1686-1691 (1984)
- 9) 石津彰博, 中川万利子, 牧内浩幸, 安田宣紘, 清水孜 : MC29ウイルス誘発腫瘍移植雛における局所温熱療法について. 鹿大農学術報告, No. 42, 69-76 (1992)
- 10) Janiak, M. and Szmigielski, S. : Alteration of the immune reactions by whole-body and local microwave hyperthermia in normal and tumor-bearing animals. Review of own 1976-1980 experiments. *Br. J. Cancer*, 45, 122-126 (1982)
- 11) 小池寿男 : ハイパーサーミアの基礎と問題点. 北獣会誌, 30, 220-223 (1986)
- 12) 小坂光男 : 温熱の生理学的効果. 最新医学, 40, 2500-2504 (1985)

- 13) Lapis, K.: Histology and ultrastructural aspects of virus-induced primary liver cancer and transplantable hepatomas of viral origin in chickens. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 5, 469-501 (1979)
- 14) Lapis, K., Beard, D. and Beard, J. W.: Transplantation of hepatomas induced in the avian liver by MC29 leukosis virus. *Cancer. Res.*, 35, 132-138 (1975)
- 15) 馬嶋秀行, 坂本澄彦, 岡田重文: 動物実験療法における温熱療法研究. 最新医学, 40, 2490-2499 (1985)
- 16) 松野哲也: 腫瘍細胞におけるグルタミン代謝. *Oncologia*, 18, 117-123 (1986)
- 17) Matsuno, T., Ido, E., Hayami, M. and Shimizu, T.: Quantitative analysis by radioimmunoassay of alpha-fetoprotein in the sera of chickens bearing chemical or virus-induced liver tumors. *IRCS Medical Science*, 10, 390-310 (1982)
- 18) Matsuno, T. and Satoh, T.: A sensitive assay for chicken glutamyltransferase. *Int. J. Biochem.*, 17, 1369-1371 (1985)
- 19) Matsuno, T. and Satoh, T.: Glutamine metabolism in the avian host bearing transplantable hepatomas growth induced by MC29 virus. *Int. J. Biochem.*, 18, 187-189 (1986)
- 20) Matsuno, T., Satoh, T., Shirasawa, N. and Yamasaki, M.: Glutamine synthetase of chick embryo neural retina. Purification, physical and biochemical properties. *Sci. Pap. Coll. Gen. Educ.*, Univ. Tokyo 43, 35-41 (1984)
- 21) Matsuno, T., Satoh, T. and Suzuki, H.: Prominent glutamine oxidation activity in mitochondria of avian transplantable hepatoma induced by MC29 virus. *J. Cell. Physiol.*, 128, 397-401 (1986)
- 22) Matsuno, T., Satoh, T. and Suzuki, H.: The pathway of glutamine oxidation in isolated mitochondria from the hepatomatous growth induced by MC29 virus. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85, 393-396 (1986)
- 23) Medoff, G., Valeriote, F., Lynch, R. G., Schlessinger, D. and Kobayashi, G. S.: Synergistic effect of amphotericin B and 1, 3-bis (2-chloroethyl) -1-nitrosourea against a transplantable AKR leukemia. *Cancer Res.*, 34, 974-978 (1974)
- 24) Mladenov, Z., Heine, U., Beard, D. and Beard, J. W.: Strain MC29 avian leukosis virus. Myelocytoma, endothelioma, and renal growth. Pathomorphological and ultrastructural aspects. *J. Nat. Cancer Inst.*, 38, 251-283 (1967)
- 25) Sande, M. A., Kapusnik-Uner, J. E. and Mandell, G. L.: Antimicrobial Agents. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 8th ed.* p. 1018-1046, Pergamon Press, New York (1990)
- 26) 清水 孜, 石津彰博, 安田宣紘, 河野猪三郎, 松野哲也: MC29ウイルス誘発腫瘍移植鶏雛における温熱療法・化学療法の試み. 鹿大農学術報告, No. 38, 103-117 (1988)
- 27) Shimizu, T., Tatsumi (Nakagawa), M., Ishizu, A. and Matsuno, T.: Effect of local hyperthermia and chemotherapy on MC 29 virus-induced liver tumor transplanted into subcutis of chickens. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102C, 61-65 (1992)

### Summary

1. A transplantable liver tumor induced in the chicken by MC29-virus, whose specific utilization of glutamine in growth of the tumor had been well demonstrated, was implanted in the subcutis of day-old chickens. After 7-9 days, when the tumor reached a soybean size, they were treated with Fungizone, the amphotericin B solution for injection, 12.5  $\mu\text{g}/\text{day}$  intramuscularly and/or local hyperthermia with microwave once a day for 7 days successively. At the 7th day of experiment, the tumor growth ratio expressed by mean was, in the tumor control group 8.52; in Fungizone group 3.12; in local hyperthermia group 2.48; and in Fungizone + hyperthermia group 1.28. These results indicated the antitumor effect of amphotericin B and its synergism with hyperthermia.

2. In the same experimental system, the effect of treatment with Fungizone 6.25, 12.5 and 25  $\mu\text{g}/\text{day}$  was comparatively studied, and the mean tumor growth ratios at the 7th day of experiment were 5.46, 4.80 and 7.86, respectively. These data suggested that the tumor inhibition by Fungizone was not



dose-dependent. The dose 12.5  $\mu$ g/day seems to be the preferable, for its inhibition of body weight gain was as slight as that in the hyperthermia group.

3. Combined chemotherapy of Fungizone with 6-diazo-5-oxo-l-norleucine (DON) and/or the hyperthermia was undertaken in the above experimental system. At the 7th day of experiment, the tumor growth ratio expressed by mean was, in the tumor control group 11.03 ; in hyperthermia group 2.86 ; in Fungizone group 3.37; in DON group 2.96; in DON + Fungizone group 2.06; and in DON + Fungizone + hyperthermia group 1.66. These results may indicate that Fungizone enhances antitumor effect of DON. Again DON treatment caused marked lowering of body weight gain of the chickens, for which the hyperthermia had an alleviating effect.