

## MC29 ウイルス誘発腫瘍移植雛における温熱療法・化学療法の試み

清水 孜・石津彰博・安田宣紘・河野猪三郎・松野哲也\*

(家畜病理学研究室)

昭和62年8月10日 受理

### Experiments of Hyperthermia and Chemotherapy for Chickens Transplanted with MC29-Induced Liver Tumor

Tsutomu SHIMIZU, Akihiro ISHIZU, Nobuhiro YASUDA, Isaburo KONO

and Tetsuya MATSUNO\*

(Laboratory of Veterinary Pathology)

#### 結 言

鶏急性白血病ウイルスの1つであるMC29株は1960年 Bulgaria に自然発生した白血病罹患雌鶏から最初に分離された<sup>3, 20)</sup> retroviridae, type C oncovirus group に属する腫瘍原性ウイルスの一つであって、赤芽球症ウイルス(AEV)や骨髄芽球症ウイルス(AMV)と近縁の欠損ウイルスとして、骨髄球症を起し、その増殖には helper virus を必要とする。またMC29株は、赤芽球症、内皮腫、中皮腫、腎の上皮性腫瘍、肝細胞腫、リンパ腫、骨腫など広汎な腫瘍誘発性を特徴とする<sup>1, 2, 3, 4, 9, 20)</sup>。なかでも肝細胞腫は<sup>3, 11)</sup>、高率な移植可能性と継代後も形態的特徴の維持性が高いことから、ウイルス性肝細胞腫の一実験系として注目されている<sup>3, 10)</sup>。

先に、我々がMC29ウイルスによる腫瘍誘発実験を行った際<sup>13)</sup>、肝原発腫瘍を初生雛の皮下に移植継代に成功し、松野らはその腫瘍細胞の①エネルギー産生、②核酸合成、③細胞膜合成等における glutamine 利用の特異性について詳細な in vitro の研究を行った<sup>14, 15, 16, 17, 18)</sup>。一般に増殖の速い腫瘍細胞は glutamine 要求性が高いが、この腫瘍細胞は正常肝細胞とは異なり、mitochondria に glutamine dehydrogenase を持たず、glutamine synthetase 活性が低いので、肝や筋肉で合成された glutamine を利用して増殖すると考えられた。また、transaminase を介して glutamate からエネルギーを産生し、mitochondria には glutaminase を持つ等の特徴が判明した。さらに、cytosol において、glutamine は glutamine

phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase (gln-PRPP-amido TF) および GMP synthetase を介して核酸の塩基合成に、また、glucosamine synthetase を介して細胞膜合成に関与する事が明かにされた。これらの知見により、この腫瘍細胞の glutamine 代謝に関係する諸酵素を特異的に阻害することによって、in vivo における腫瘍増殖抑制(制癌)効果を得る可能性が示唆された。

以上のような経過で、この腫瘍細胞の glutamine 代謝阻害剤による in vivo の腫瘍成長抑制効果を調べる必要を生じ、既に in vitro で細胞増殖抑制を認められている<sup>19)</sup>下記の三種の阻害剤を使用する実験が企てられた(Fig. 1)。

1) 6-diazo-5-oxonorleucine (DON). 未同定 Streptomyces から分離された抗生物質で、腫瘍細胞の mitochondria の glutaminase を 1mM で50%、細胞質の gln-PRPP-amido TF を 0.01mM で50%、glucosamine-6-P synthetase を 0.3mM で95%阻害する。

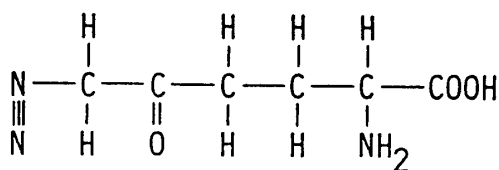
2) Aminooxyacetate(AOA). アミノ酸と競合することにより、腫瘍細胞の mitochondria の transaminase を 2mM で50%阻害する。

3) Acivicin<sup>®</sup>(Upjohn Pharmaceut., Ltd. Co.). Streptomyces suviveus から分離された抗生物質で、DON と同じく glutamine analogue である。腫瘍細胞細胞質の glucosamine-6P synthetase を 0.3mM で90%、GMP synthetase を 0.3mM で100%阻害する。

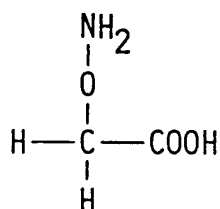
それぞれの分子構造式は Fig. 1 に示した。

化学療法に加えて、近年注目を浴びている腫瘍の温度療法<sup>6, 7, 21, 23)</sup>をこの in vivo の実験系に適用し、単独および glutamine 代謝阻害剤との併用効果を調べる

\* 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, Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 190-12



6-diazo-5-oxonorleucine (DON)



aminoxacetate (AOA)

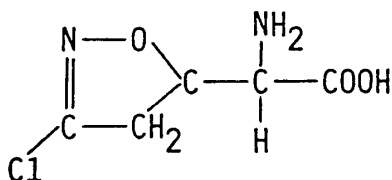
L- $\alpha$ -amino-3-chloro, 4, 5-dehydro-5-isoxazole acetic acid (Acivicin)

Fig. 1. Chemicals used for chemotherapy.

ことにした。腫瘍に対する加温は、正常組織に比して血管系の発達が悪いため、血流による熱放散が障害されて細胞致死温度に達するとされ、また低 pH、低栄養、低酸素状態の細胞は一般に温度感受性が増加する<sup>22,23</sup>ことも細胞致死効果を高める。従って、正常細胞が耐熱可能な温度において腫瘍の選択的破壊が期待される。加温方法は全身加温と局所加温に大別され、加温手段としては温水、赤外線、超音波、マイクロ波などが利用されている。我々は、雛の飼育室の温度を床上約 5cm で、対照群の約 30°C に対し 45°C に保つことにより、背中の皮下に移植した腫瘍への全身加温効果を認め、化学療法との併用効果も観察し得たので、その病理学的観察も含めてここに報告する。

#### 材料および方法

##### 実験雛

鹿児島県郡山町組合ヒナセンターより白色レグホン種 1 日齢雄雛を入手。

##### 移植腫瘍

Rous associated virus-2 (RAV-2) をヘルパーウイルスとして MC29 ウィルス RIF free の日生研 MT 種初生雛に静脈内接種して誘発した肝原発腫瘍を

雛の背部皮下織に移植し、6 代継代したものをを用いた。

##### 腫瘍組織移植

1 日齢雛の背中の皮下織に移植し、2~3 週間後に径 2cm 位の腫瘍となったものから、無菌的に 1~2g を滅菌乳鉢に採り、眼科用ハサミで細切して 2 倍量の滅菌 PBS で稀釈した材料を 18 gauge 針で皮下注射した。

##### 飼育および全身加温療法

非加温対照群の飼育には自家製およびゼンケイ式バッテリー TS 型の育雛器を使用し、寝室部入口の温度を 30°C 位に調節し、飼料はチックフード（光産業、熊本）を 1 日 3 回飲水とともに与えた。

全身加温飼育には、前記ゼンケイ式バッテリー TS 型の寝室部と同面積の運動場部の間を段ボールで仕切り、室灯の代わりに 60W ランプをつけ、天井部の 200W 熱源と併せて、85×70×25 cm<sup>3</sup> の空間を温め、前面の針金部分を左右約 4cm 残してプラスチックあるいはガラスで覆って換気を制限し、入口から約 10cm 奥にある温度計（球部が床に約 5cm）が 45°C を示すように調節した。約 10-14 羽をこの中で飼育したが、加温第 1 日は 42°C から始めて 10 時間ぐらひかけて序々に 45°C に順応させた。

##### 化学療法 (glutamine 代謝阻害剤投与)

移植腫瘍の活着を触診で確認後、DON, AOA (ともに Sigma Chem. Co. 製) および Acivicin<sup>®</sup> (Upjohn 製) の投与を開始した。DON は 5mM PBS 溶液を移植後 9 日目から 0.1ml/chick/day を腹腔内に 11 回連続投与した。AOA は 100mM PBS 溶液を移植後 11 日目から 0.05ml/chick/day 筋肉内注射し、連続 9 回投与 (初回のみ 0.1ml) した。Acivicin は 5mM PBS 溶液を移植後 10 日目から 0.05ml/chick/day の腹腔内注射を 2 回続けて 1 回休み、合計 8 回投与した。なお、各 PBS 溶液は濾過滅菌され、注射には 1ml ツベルクリン注射筒 (テルモ) を用いた。

##### 実験群 (使用動物数)

1. 加温効果実験
  - i) 担癌加温群 (7)
  - ii) 担癌対照群 (5)
  - iii) 加温対照群 (7)
  - iv) 無処置対照群 (5)
2. DON 投与・加温実験
  - i) 担癌 DON 加温群 (6)
  - ii) 担癌 DON 群 (6)
  - iii) DON 対照群 (8)
  - iv) 担癌加温群 (6)

- v) 担癌対照群 (6)
- vi) 無処置対照群 (8)
- 3. AOA 投与・加温実験
  - i) 担癌 AOA 加温群 (7)
  - ii) 担癌 AOA 群 (7)
  - iii) AOA 対照群 (3)
  - iv) 担癌加温群 (7)
  - iv) 担癌対照群 (7)
  - vi) 無処置対照群 (7)
- 4. Acivicin 投与・加温実験
  - i) 担癌 Acivicin 加温群 (9)
  - ii) 担癌 Acivicin 群 (9)
  - iii) Acivicin 対照群 (5)
  - iv) 担癌加温群 (9)
  - v) 担癌対照群 (9)
  - vi) 無処置対照 (4)

各実験とも各群の体重および腫瘍の長径、短径、高さをノギスで毎日1回測定し、それを掛け合せた数値を腫瘍増殖の指標として、加温等の処置を開始した日を1として比率を算出した。

#### 病理学的検索

実験群および対照群の雛は最終投与日の翌日に体重

測定後、上腕静脈採血および心臓採血後に剖検し、腫瘍および全身諸臓器をとり出して秤量後、10%中性緩衝フォルマリン液で固定した。各群の代表的な2~3例についてパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色後光学顕微鏡で観察した。

加温および非加温の腫瘍の一部を2.5% glutaraldehyde, 0.1M cacodylate buffer solution pH 7.3 で固定し、2% OsO<sub>4</sub> buffer で後固定, Epok 812 で包埋, 醋酸ウランとクエン酸鉛で染色し, H-600 電子顕微鏡で観察した。

血液および血清生化学的検索：上腕静脈採血により hematocrit (Ht) 値, hemoglobin (Hb) 値および血漿総蛋白 (p-TP) を測定した。

心臓採血により分離した血清を -20°C で保存し, glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic-pyruvic transaminase (GPT),  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GTP), alkaline phosphatase (ALP), lactic dehydrogenase (LDH), 尿酸 (UA) および総コレステロールを, 前述の Hb 値とともに, ユニキット<sup>®</sup> (中外製薬 KK) を用いて RaBA-SUPER (中外) で測定した。また, cellulose acetate

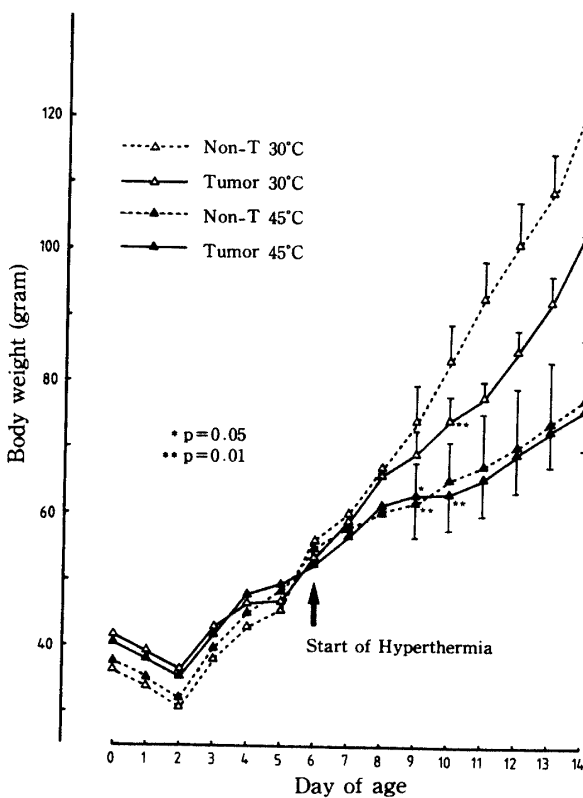


Fig. 2. Effect of hyperthermia on chickens with or without tumor.

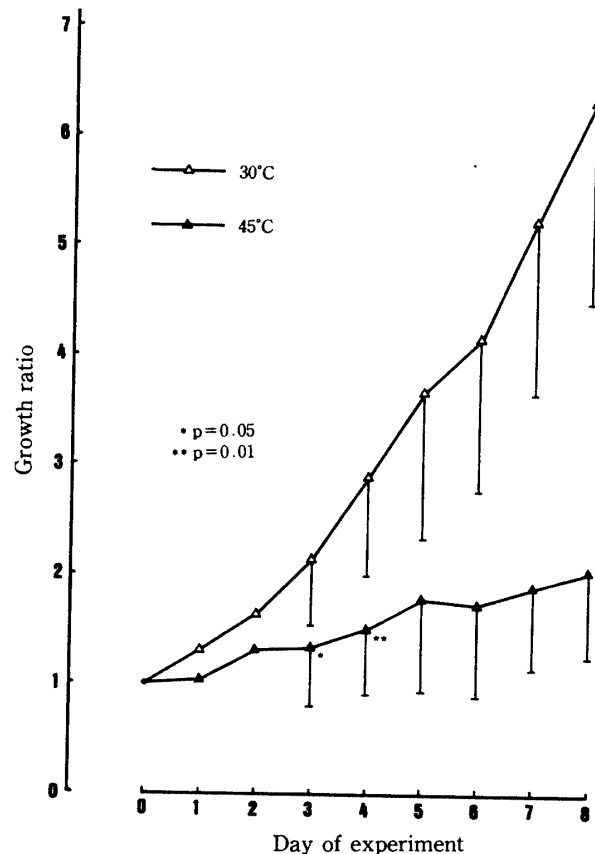


Fig. 3. Effect of hyperthermia on tumor grafted into chickens.

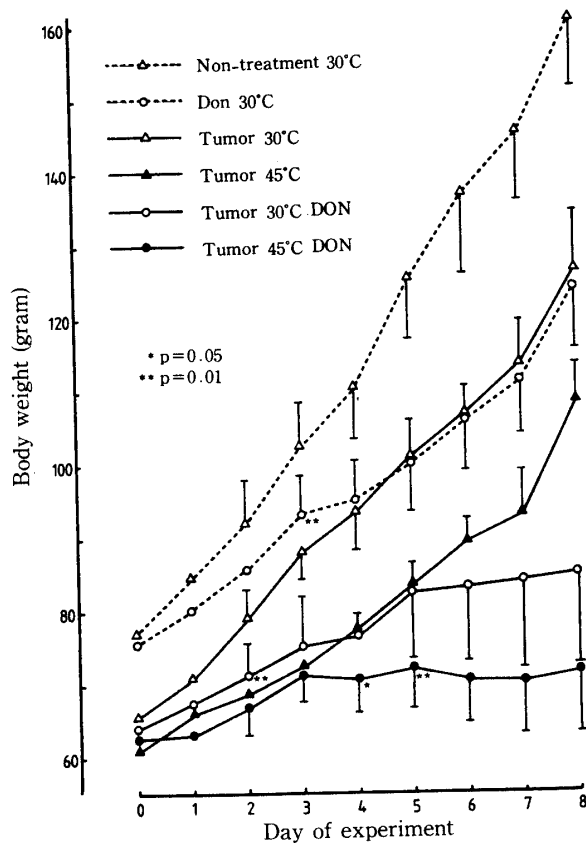


Fig. 4. Hyperthermia and chemotherapy in chickens with transplanted tumor. Experiment I: 6-diazo-5-oxonorleucine (DON) and body weight.

膜電気泳動法により、血清蛋白分画および A/G 比の算出を行った。血清蛋白量も血漿蛋白量同様、屈折式蛋白計を用いて測定した。

担癌・非担癌の各群について加温・非加温の例を各 2～3 個体分、血清アミノ酸分析を行った。

## 結 果

### 1. 加温効果実験

Fig. 2 に示すように、全群給飼開始までの 2 日間の体重低下を除いて体重増加を認めたが、30°C 飼育に対し 45°C 飼育は著しい増体重低下を引起した。非担癌の場合は加温 3 日目で  $p=0.01$ 、担癌の場合は加温 3 日目で  $p=0.05$ 、4 日目で  $p=0.01$  とそれぞれの対照群に対し有意差を示した。30°C 飼育では担癌による増体重の低下が移植後 10 日目で有意差 ( $p=0.01$ ) となった。

移植腫瘍は 3～4 日後に触知可能となるものが多く、6 日目頃から元気・食欲低下、増体重の低下が認められ、腫瘍増殖の加速とともに立毛、あえぎ呼吸、翼下

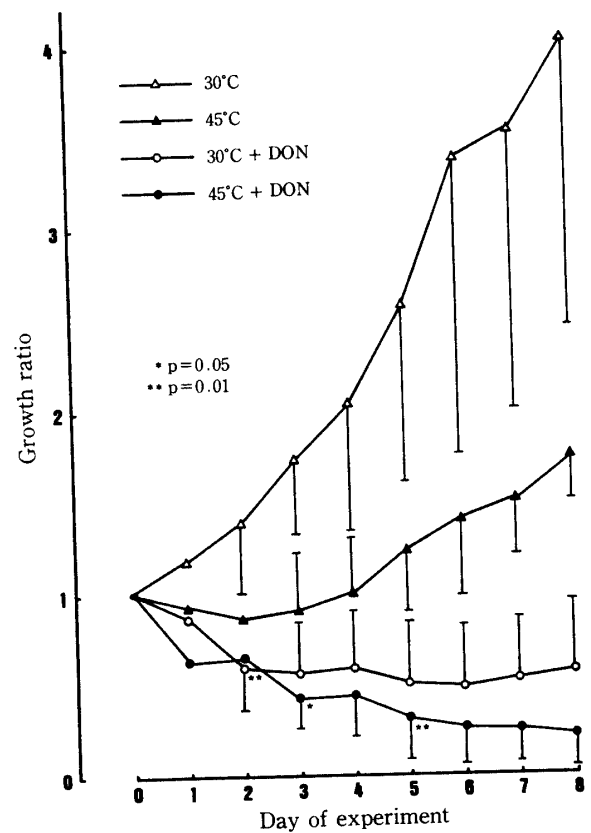


Fig. 5. Hyperthermia and chemotherapy in chickens with transplanted tumor. Experiment I: 6-diazo-5-oxonorleucine (DON) and tumor growth.

垂、体温低下などの症状を呈した。

45°C 加温飼育により、元気消失、食欲低下は顕著となり、飲水量増加し、あえぎ呼吸、羽毛の汚れが目立った。

Fig. 3 は腫瘍増殖率を示し、加温開始時の腫瘍の大きさは、前述の概測法で  $556 \pm 297$  ( $\text{mm}^3$ ) であった。加温による顕著な腫瘍増殖抑制を呈し、加温 3 日後に  $p=0.05$ 、4 日後に  $p=0.01$  の有意差を認めた。

臓器体重比  $\times 10^4$  の数値を Table 2 の上部に示した。加温は胸腺、脾、ファブリキウス囊 (F囊)、肝、腎、心、等を萎縮させることが非担癌・担癌ともに認められた (脾、腎は  $p=0.05$ 、それ以外は  $p=0.01$ )。担癌により肝、脾の肥大がそれぞれ  $p=0.05$ 、 $p=0.01$  で認められたが、加温により無処置対照に近い値に下った。F囊は担癌加温で相乗的に萎縮が強まり、肺は担癌加温により  $p=0.01$  の肥大を呈した。肝などの臓器に腫瘍の転移がみられた個体は上記の臓器重量比から除外した。

移植腫瘍は背部皮下織に通常限界明瞭な腫瘤を形成

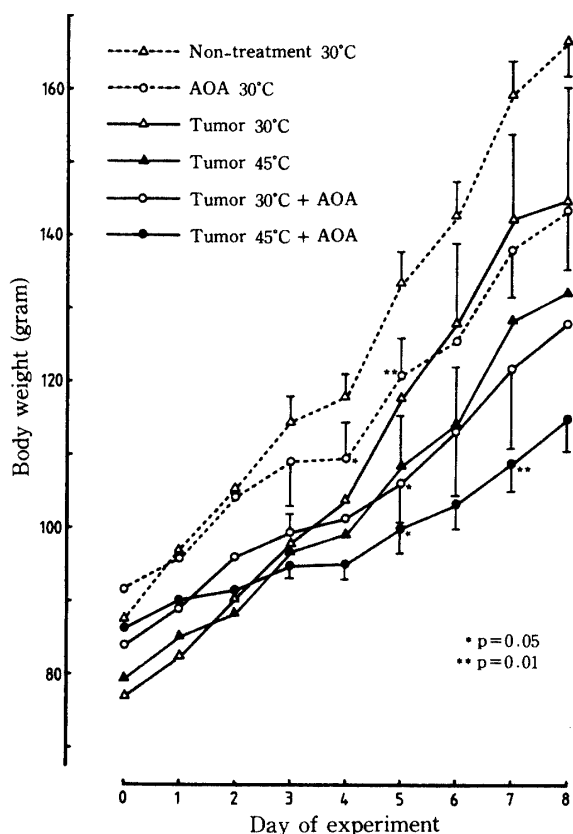


Fig. 6. Hyperthermia and chemotherapy in chickens with transplanted tumor. Experiment II: aminooxyacetate (AOA) and body weight.

し、一部筋肉への浸潤増殖も認められた。大型の腫瘍は表層を残して内部の壊死が進む。加温による特別な変化はみられなかった。

組織学的に腫瘍細胞がシート状や索状に配列し、少量の結合織の介在により小葉構造を呈した。弱好酸性細胞質と大型卵円形単核を有し、明瞭な核仁1箇と周辺散在性核質を特徴とする。有糸分裂像に富み、多数の単細胞壊死が認められた。リンパ様細胞の集簇が主に腫瘍組織周辺部に散見された。加温により、有糸分裂像が減少し、腫瘍辺縁部にリンパ様細胞の濾胞性増殖が多数認められた。

加温対照雛は、肝細胞の萎縮と水腫性疎開および類洞の拡張を示した。脾の水腫性疎開、胸腺の皮質萎縮、F囊のリンパ小節萎縮および細胞疎開と変性が見られた。副腎髄質細胞の空胞化強く、染色性低下のため、皮質細胞との識別困難を呈し、骨髓の赤芽球造血低下を認めた。

担癌対照雛には、肝のKupffer細胞の腫大と増殖、リンパ濾胞増殖、類洞の形質細胞散在等を認めた。

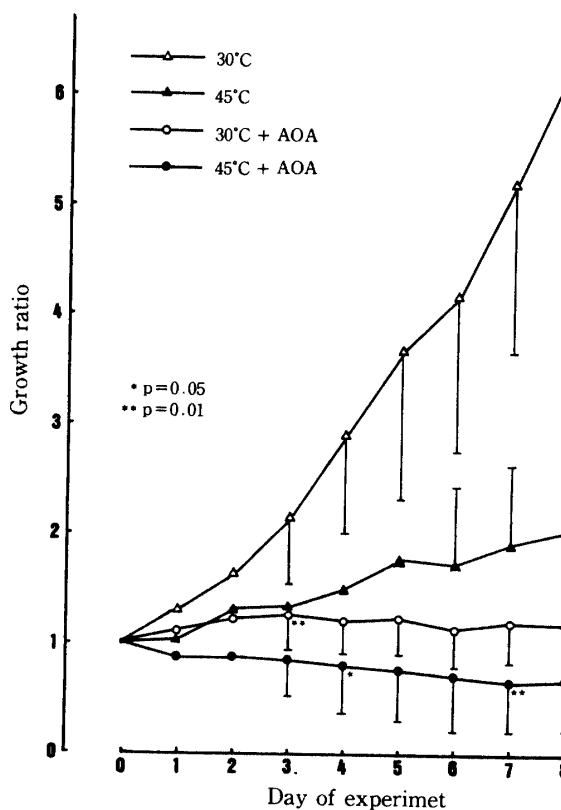


Fig. 7. Hyperthermia and chemotherapy in chickens with transplanted tumor. Experiment II: aminooxyacetate (AOA) and tumor growth.

脾にもリンパ様細胞多く、胚中心が見られた。F囊の濾胞中心部の崩壊像顕著。副腎皮質・髄質細胞の識別容易。骨髓造血旺盛(骨髓芽球系、赤芽球系ともに)であった。

担癌加温雛の肝もKupffer細胞活性化とリンパ様細胞集簇が認められ、脾の細胞分裂像減少し胚中心不明瞭、胸腺の有糸分裂像は担癌対照雛より減少し細胞崩壊も少い。F囊のリンパ小節萎縮、細胞崩壊像多く、有糸分裂像減少著明。副腎の皮髄細胞識別容易。骨髓の細胞充実し、造血旺盛であった。

電子顕微鏡的に、腫瘍細胞は明瞭な核膜で境された円形核内にgranular elementsに富む核仁が1箇あり、細胞質内にはpolysomesの形をとる多数のribosomesと少数の粗面小胞体を容し、mitochondriaが一側に偏在する傾向を示した(Fig.10)。これらの特徴はBeardら(1975)<sup>2)</sup>の報告した'hemocytoblastoma'または'endothelioma'に一致する。加温による微細形態学的影響は特に認められなかった。C型ウイルス粒子が時々細胞間隙にみられた(Fig.11)。

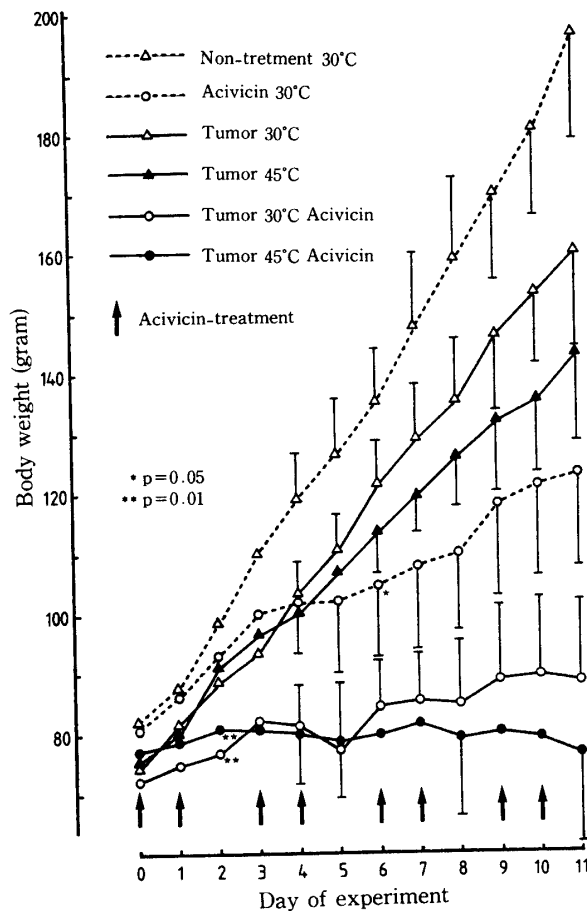


Fig. 8. Hyperthermia and chemotherapy in chickens with transplanted tumor. Experiment III: Acivicin and body weight.

血液および血清生化学的検査により、加温対照雛は GOT の有意な上昇と albumin の低下、A/G 比の低下を認め、Ht 値および Hb 値はわずかに上昇した、担癌対照雛は GOT、LDH の上昇、UA の低下、albumin の低下および  $\gamma$ -globulin の上昇、A/G 比の低下が認められ、腫瘍増殖の著しい個体 (No. 303) では血清中の ser と gln が低下していた (Table 1)。担癌加温雛では、GOT、LDH が更に上昇し、p-TP と Ht 値は低下した。Albumin の上昇と  $\alpha$ -globulin の低下、A/G 比の上昇が著明で、総コレステロール値は不安定であった (Tables 3~5)。

## 2. 化学療法と加温飼育

### 1) DON を用いた実験

DON 投与した各群は、加温、担癌の有無に拘らず、翌日から食欲低下、元気消失し、Fig. 4 に示すように増体重減少し、DON 対照群は3日目から無処置対照群に対して  $p=0.05$  の有意差を呈した。担癌非加温の

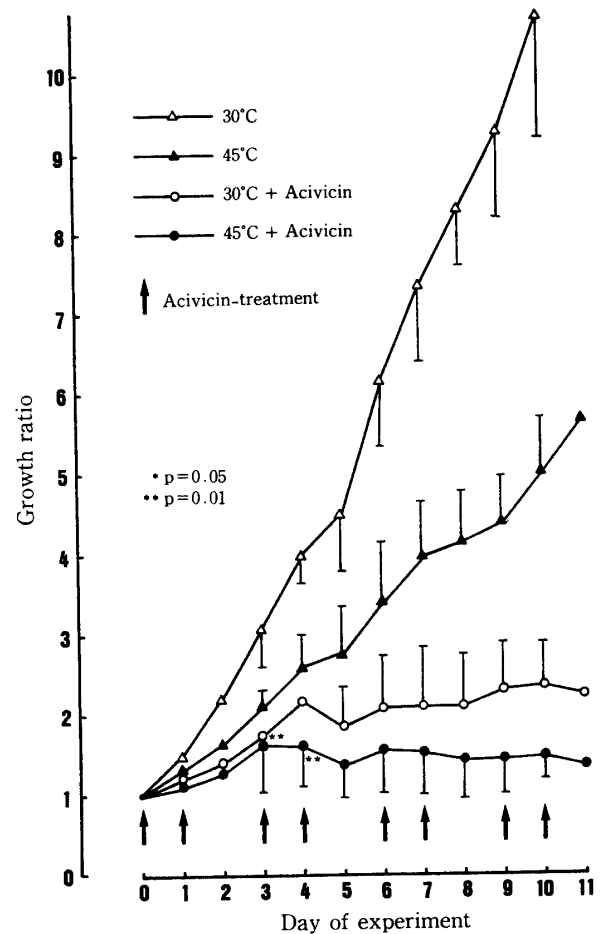


Fig. 9. Hyperthermia and chemotherapy in chickens with transplanted tumor. Experiment III: Acivicin and tumor growth.

場合、DON 投与群は2日目から  $p=0.01$  の有意差で無投与群より体重が低下した。担癌加温の場合、DON 投与群は3日目以後体重が横這い状態になり、4日目から非投与群との間に  $p=0.05$  の有意差を認めた。

Fig. 5 の腫瘍増殖率が示すように、DON 単独でも投与翌日から腫瘍を退縮させ、無処置群との間に  $p=0.01$  の有意差を認め、5日目に6羽中1羽の腫瘍が消失した。DON・加温併用では、3日目に加温のみの群に対し  $p=0.05$  の退縮を示し、8日目には DON 単独群に対して  $p=0.05$  の有意差で抗腫瘍効果を認めた。また6羽中1羽は5日目に腫瘍が消失した。なお、この実験における処置開始時の腫瘍の大きさは  $330 \pm 261$  ( $\text{mm}^3$ ) であった。

DON 投与により、担癌加温および担癌非加温群において、それぞれの対照群に対して肝体重比の増加傾向、腎・脾・胸腺・F 囊の萎縮を認め、肺は担癌加温の場合肥大傾向を示した。(Table 2)

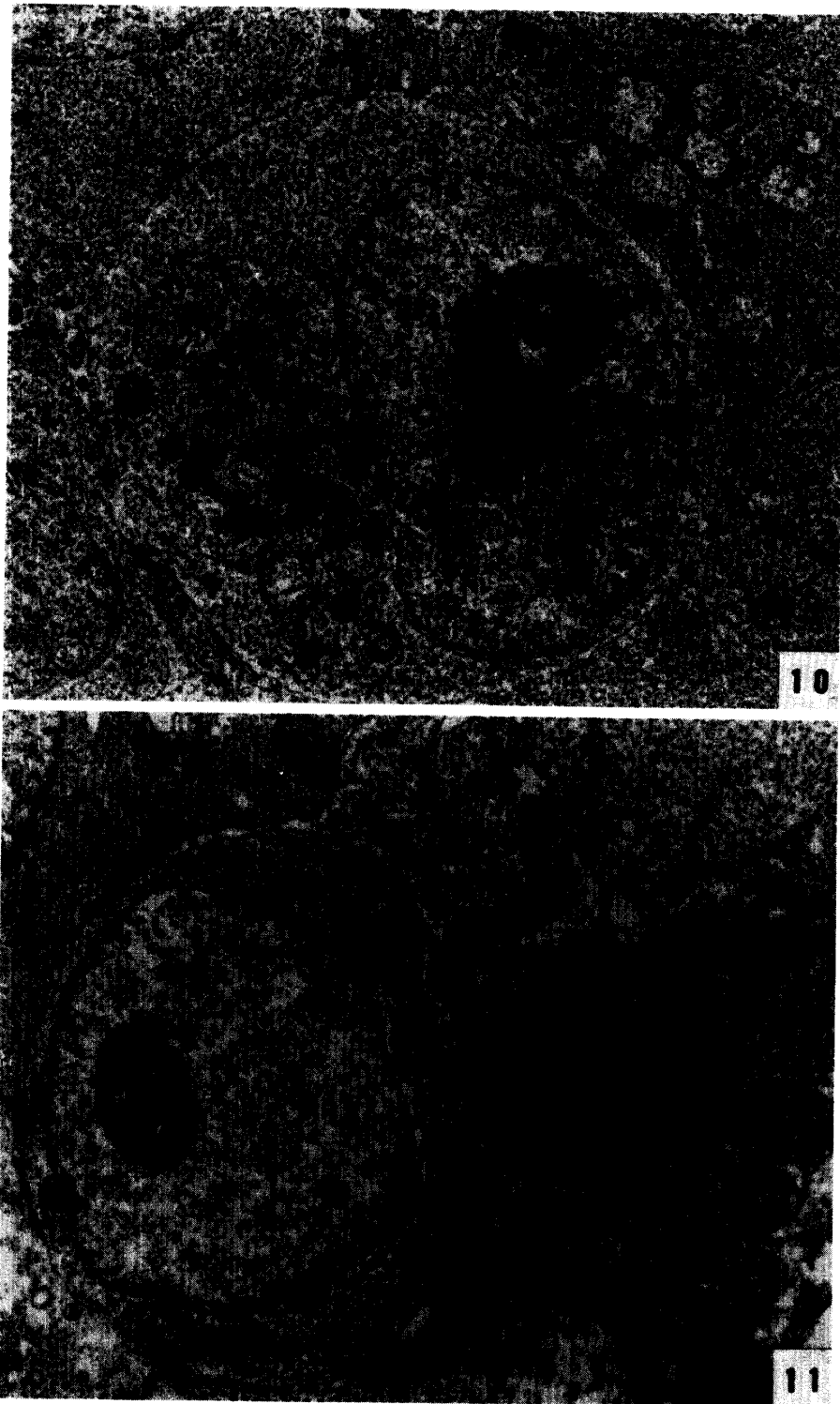


Fig. 10 Electron photomicrograph of MC 29-induced transplanted tumor cell in a tumor bearing control chicken. Note ribosome-rich cytoplasm and unevenly distributed mitochondria.  $\times 10000$ .

Fig. 11 The same tumor transplanted in a chicken which received whole body hyperthermia by being kept in a cage regulated at  $45^{\circ}\text{C}$ . No obvious ultrastructural alteration was observed. Some virus particles of C type were occasionally found in either heated or non-heated tumor.  $\times 10000$ .

Table 1. Analysis of serum amino acids (nM/ml)

| X   | Non-T 30°C |         |         | Non-T 45°C |        | Tumor 30°C |         | Tumor 45°C |        |
|-----|------------|---------|---------|------------|--------|------------|---------|------------|--------|
|     | No.17      | No.18   | No.20   | No.158     | No.161 | No.303     | No.312  | No.324     | No.325 |
| Asp | 30.53      | 45.40   | 18.61   | 133.31     | 38.06  | 45.78      | 30.01   | 206.63     | 271.12 |
| Thr | 873.64     | 1243.51 | 1042.97 | 558.07     | 424.33 | 467.96     | 614.84  | 789.67     | 775.13 |
| Ser | 958.63     | 1068.42 | 1080.05 | 1004.13    | 878.46 | 519.16     | 1191.13 | 1117.08    | 947.35 |
| Glu | 369.65     | 298.50  | 225.48  | 457.47     | 244.28 | 262.33     | 260.93  | 304.08     | 309.07 |
| Gln | 852.71     | 987.44  | 1198.72 | 977.33     | 808.66 | 375.08     | 978.31  | 1342.23    | 121.93 |
| Gly | 929.13     | 867.98  | 731.96  | 726.01     | 513.76 | 404.29     | 598.23  | 902.63     | 689.09 |
| Ala | 960.74     | 989.15  | 1005.24 | 963.00     | 768.76 | 315.90     | 862.78  | 1079.39    | 992.39 |
| Val | 438.12     | 380.10  | 399.22  | 197.53     | 179.06 | 179.73     | 219.49  | 399.66     | 270.16 |
| Cys | 54.35      | 50.08   | 57.87   | 34.88      | 40.53  | 14.50      | 37.08   | 34.04      | 23.78  |
| Met | 94.56      | 82.15   | 74.36   | 54.12      | 57.15  | 29.50      | 65.49   | 88.74      | 70.79  |
| Ile | 188.16     | 161.47  | 147.01  | 76.61      | 78.06  | 82.79      | 113.25  | 144.34     | 107.04 |
| Leu | 391.16     | 374.02  | 395.72  | 207.61     | 208.28 | 161.49     | 217.37  | 344.62     | 284.20 |
| Tyr | 212.42     | 214.52  | 195.45  | 202.32     | 184.49 | 60.25      | 95.54   | 151.85     | 153.00 |
| Phe | 204.08     | 181.37  | 161.21  | 109.81     | 105.86 | 95.22      | 141.87  | 162.19     | 124.99 |
| Trp | 106.14     | 74.34   | 84.75   | 51.24      | 45.92  | 25.55      | 53.13   | 77.41      | 54.80  |
| Lys | 411.23     | 236.72  | 417.32  | 250.74     | 189.38 | 133.14     | 422.91  | 231.96     | 126.37 |
| His | 101.73     | 113.38  | 104.36  | 102.50     | 80.67  | 37.76      | 56.13   | 90.80      | 91.75  |
| Arg | 415.32     | 428.48  | 385.40  | 259.51     | 197.86 | 89.21      | 261.04  | 439.91     | 300.78 |

DON 投与により、移植腫瘍は無処置対照より萎縮し、やや固く、割面に壊死巣が散見された。また、腫瘍の転移がみられなかった。

DON 対照雛の肝において、Kupffer 細胞が活性化し、軽度の胆管増生があった。脾のリンパ濾胞と胚中心は発達していた。DON 投与担癌雛の腫瘍細胞は水腫性に疎開し、有糸分裂像の減少を認めた。また、肝門脈域における小壊死巣が散見され、リンパ様細胞の増殖も認められた。脾は幼若リンパ様細胞の濾胞性増殖、胸腺の有糸分裂像減少、骨髄では赤芽球の減少傾向がみられた。DON と加温の併用により、腫瘍細胞の分裂像減少、単細胞壊死の増加、リンパ様細胞の濾胞性増殖が認められた。肝の Kuffer 細胞活性化や門脈域の顆粒球造血、リンパ様細胞集簇などを認め、脾のリンパ濾胞萎縮減少傾向、胸腺皮質の萎縮、F 囊リンパ小節の萎縮と中心部の上皮様化性を認めた。肝細胞壊死はみられなかった。

DON 投与により、すべての雛の GOT, LDH が顕著に上昇し、ALP は非加温で上昇傾向、担癌加温で低下を示した。 $\gamma$ -GTP も担癌加温で著しく低下した。担癌の場合、DON は Ht 値と p-TP を下げ、加温併用で albumin 低下、 $\gamma$ -globulin 上昇、A/G 比低下を起した。(Tables 3~5)

## 2) AOA を用いた実験

AOA を腹腔内投与すると、興奮状態に続いて、元氣消失、体温低下を認めたので、半量筋肉内注射にし

て副作用を軽減させた。

Fig. 6 に示すように、AOA 対照群は無処置対照群に対して、4 日目  $p=0.05$ , 5 日目  $p=0.01$  の増体重抑制が見られ、AOA 投与担癌群における増体重抑制は、担癌対照群に対して、5 日目に  $p=0.05$  の有意差を示した。担癌加温の場合、AOA 投与は増体重を顕著に抑制し、非投与群に対して 5 日目に  $p=0.05$ , 7 日目に  $p=0.01$  の有意差を認めた。

Fig. 7 はこの実験における腫瘍増殖率を示すが、腫瘍の生着率と増殖率は高く、各処置開始時の腫瘍の大きさは  $562 \pm 297$  ( $\text{mm}^3$ ) であった。AOA 投与は翌日から効果を現わし、3 日目で担癌対照群に対し、 $p=0.01$  の制癌効果を認め、加温併用群は担癌加温群に対し 4 日目に  $p=0.05$ , 7 日目に  $p=0.01$  の有意差を認めた。AOA と加温の併用は AOA 単独よりも制癌効果が強く、7 日目に  $p=0.05$  の有意差となり、腫瘍消失例を 2 羽 (3 日目と 6 日目) 認めた。

AOA 投与は胸腺萎縮効果を有し、担癌の場合更に顕著であった。F 囊萎縮効果は担癌の場合のみ著しく、逆に腎は肥大傾向を示した。AOA 対照群の脾は肥大傾向だが、担癌の場合不顕著だった。AOA・加温併用群の心臓・肺が萎縮傾向を示した。(Table 2)

AOA 投与雛 8 例中 2 例の肝、腎、副腎、肺等に腫瘍の転移を認めたが、加温併用雛 8 例には転移は見られなかった。AOA 単独投与および加温併用時の移植腫瘍は、やや固く、割面に微細な壊死巣が散在してい



Table 2. Organ weight ratio (Organ weight / Body weight)  $\times 10^4$ 

|                         | Thymus  | Spleen                | Liver                  | Heart                 | Lung                  | Kidney                 | Bursa F.              |
|-------------------------|---|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| Non-T <sup>a</sup> 30°C | 85.9 $\pm$ 12.2 <sup>b</sup><br>18 <sup>c</sup> | 15.8 $\pm$ 6.7<br>18  | 334.6 $\pm$ 58.9<br>18 | 84.0 $\pm$ 9.8<br>18  | 91.6 $\pm$ 17.5<br>16 | 115.9 $\pm$ 11.6<br>18 | 64.8 $\pm$ 15.9<br>18 |
| Non-T 45°C              | 52.6 $\pm$ 12.9<br>9                            | 11.8 $\pm$ 2.7<br>9   | 301.1 $\pm$ 26.8<br>9  | 72.1 $\pm$ 6.2<br>9   | 88.1 $\pm$ 14.9<br>9  | 100.7 $\pm$ 6.4<br>9   | 32.3 $\pm$ 9.5<br>9   |
| Tumor 30°C              | 70.2 $\pm$ 15.3<br>29                           | 30.7 $\pm$ 12.4<br>39 | 390.5 $\pm$ 72.5<br>35 | 85.4 $\pm$ 12.2<br>38 | 92.5 $\pm$ 19.9<br>39 | 121.5 $\pm$ 14.7<br>37 | 34.6 $\pm$ 12.3<br>38 |
| Tumor 45°C              | 58.9 $\pm$ 14.3<br>29                           | 17.5 $\pm$ 6.0<br>30  | 338.9 $\pm$ 43.2<br>35 | 78.8 $\pm$ 10.0<br>38 | 98.5 $\pm$ 13.0<br>39 | 113.3 $\pm$ 10.3<br>37 | 19.6 $\pm$ 9.1<br>38  |
| Non-T 30°C<br>DON       | 78.8 $\pm$ 9.1<br>6                             | 12.0 $\pm$ 4.5<br>6   | 343.4 $\pm$ 34.6<br>6  | 85.8 $\pm$ 7.3<br>6   | 91.4 $\pm$ 10.7<br>6  | 118.2 $\pm$ 12.0<br>6  | 57.3 $\pm$ 17.2<br>6  |
| Tumor 30°C<br>DON       | 57.3 $\pm$ 18.4<br>6                            | 21.7 $\pm$ 5.8<br>6   | 385.7 $\pm$ 48.0<br>6  | 83.0 $\pm$ 12.7<br>6  | 91.9 $\pm$ 12.2<br>6  | 109.1 $\pm$ 12.1<br>6  | 28.2 $\pm$ 15.5<br>6  |
| Tumor 45°C<br>DON       | 32.7 $\pm$ 8.0<br>6                             | 11.0 $\pm$ 4.1<br>8   | 368.9 $\pm$ 29.3<br>8  | 70.7 $\pm$ 5.6<br>6   | 94.3 $\pm$ 8.1<br>6   | 101.0 $\pm$ 13.1<br>8  | 12.9 $\pm$ 7.7<br>8   |
| Non-T 30°C<br>AOA       | 65.7 $\pm$ 3.2<br>3                             | 22.3 $\pm$ 7.4<br>3   | 343.3 $\pm$ 52.4<br>3  | 81.3 $\pm$ 11.0<br>3  | 96.7 $\pm$ 8.5<br>3   | 118.0 $\pm$ 10.6<br>3  | 66.3 $\pm$ 18.8<br>3  |
| Tumor 30°C<br>AOA       | 57.1 $\pm$ 11.9<br>7                            | 17.9 $\pm$ 4.7<br>7   | 339.3 $\pm$ 40.3<br>6  | 84.9 $\pm$ 11.5<br>7  | 92.3 $\pm$ 8.8<br>7   | 131.0 $\pm$ 8.9<br>5   | 28.4 $\pm$ 15.1<br>7  |
| Tumor 45°C<br>AOA       | 51.2 $\pm$ 15.2<br>6                            | 19.3 $\pm$ 4.8<br>6   | 326.2 $\pm$ 46.4<br>6  | 75.8 $\pm$ 7.0<br>6   | 88.3 $\pm$ 1.6<br>6   | 120.0 $\pm$ 17.6<br>6  | 22.8 $\pm$ 3.6<br>6   |
| Non-T 30°C<br>Acivicin  | 58.4 $\pm$ 4.8<br>5                             | 12.2 $\pm$ 4.0<br>5   | 322.6 $\pm$ 33.7<br>5  | 82.4 $\pm$ 4.0<br>5   | 94.6 $\pm$ 10.3<br>5  | 112.2 $\pm$ 7.7<br>5   | 34.2 $\pm$ 13.1<br>5  |
| Tumor 30°C<br>Acivicin  | 32.4 $\pm$ 14.9<br>8                            | 9.6 $\pm$ 3.8<br>8    | 381.7 $\pm$ 36.3<br>6  | 82.1 $\pm$ 10.4<br>8  | 80.7 $\pm$ 10.0<br>7  | 104.0 $\pm$ 12.0<br>8  | 10.1 $\pm$ 3.1<br>8   |
| Tumor 45°C<br>Acivicin  | 24.6 $\pm$ 7.4<br>9                             | 8.8 $\pm$ 5.5<br>9    | 434.8 $\pm$ 67.0<br>8  | 84.8 $\pm$ 7.8<br>9   | 82.0 $\pm$ 9.0<br>8   | 105.8 $\pm$ 11.1<br>8  | 7.9 $\pm$ 2.9<br>9    |

a = Non-Tumor-bearing Control    b = Mean  $\pm$  Standard Deviation    c = Number

た。

AOA 対照雛の肝門脈域から中心静脈に及ぶ変性病巣がかなりの頻度で見られ、一部壊死に陥っていたが、細胞浸潤は認めなかった。小葉間胆管の拡張と胆汁鬱滞、軽度の胆管増生も見られた。脾のリンパ濾胞には胚中心があり、胸腺皮質の有糸分裂減少傾向と細胞崩壊を認めた。

AOA 投与により、移植腫瘍には有糸分裂像減少と単細胞壊死の増加、水腫性疎開部を生じ、リンパ様組織の増生を認めた。加温併用により上記の傾向が強まる他に間質結合織の増生が顕著であった。

担癌 AOA 投与雛の肝には、AOA 対照雛に見られたような変性病巣が数個ずつ集って観察され、小葉間胆管の拡張、細胆管増生、肝細胞の脂肪滴消失傾向が認められた。骨髄にリンパ様細胞増殖巣が見られたが、造血組織は著変なし。加温併用により、肝細胞の変性

巣は著しく縮小し、僅かに門脈域に小病巣が散見されるのみであった。肝細胞の脂肪滴は消失し、細胆管増生、骨髄のリンパ様細胞増生も顕著であった。

AOA 対照雛 3 例中 2 例に、肝の変性病巣の存在に一致する、GOT の上昇を認めた。軽度ながら ALP 上昇、UA 低下、Ht 値上昇、p-TP 低下を認めた。担癌 AOA 投与雛も肝病変と相関する GOT 上昇、UA 低下が見られ、LDH は上昇傾向を示した。加温併用で GOT、LDH の上昇が著明で、UA は低下傾向を示した。AOA 投与は各群の  $\gamma$ -globulin 上昇と  $\alpha$ -globulin 低下を来し、A/G 比は非担癌群で変わらず、担癌群で低下した。Ht 値も担癌の場合正常範囲であった。(Tables 3~5)

### 3) Acivicin を用いた実験

Acivicin の強い毒性により、投与翌日から著明な元氣消失、食欲と体温の低下、立毛を呈し、投与休止

Table 3. Blood examination

|                        | Hematocrit (%)        | (N)  | Plasma Total Protein (g/dl) | (N)  | Hemoglobin (g/dl) | (N) |
|------------------------|-----------------------|------|-----------------------------|------|-------------------|-----|
| Non-T 30°C             | 30.0±2.7 <sup>b</sup> | (22) | 3.0±0.4                     | (19) | 9.81±0.78         | (4) |
| Non-T 45°C             | 31.0±3.9              | (10) | 2.9±0.3                     | (10) | 10.40±0.33        | (4) |
| Tumor 30°C             | 29.5±5.3              | (34) | 3.0±0.4                     | (40) | 9.39±0.17         | (4) |
| Tumor 45°C             | 26.9±2.9              | (29) | 2.6±0.3                     | (29) | 5.38±1.59         | (4) |
| Non-T 30°C<br>DON      | 30.1±1.4              | (8)  | 3.1±0.2                     | (8)  | N. D.             |     |
| Tumor 30°C<br>DON      | 24.8±1.9              | (6)  | 2.7±0.3                     | (6)  | N. D.             |     |
| Tumor 45°C<br>DON      | 27.6±3.0              | (5)  | 2.4±0.4                     | (6)  | N. D.             |     |
| Non-T 30°C<br>AOA      | 32.3±1.2              | (3)  | 2.8±0.4                     | (3)  | N. D.             |     |
| Tumor 30°C<br>AOA      | 30.0±5.1              | (6)  | 3.2±0.3                     | (7)  | N. D.             |     |
| Tumor 45°C<br>AOA      | 29.7±2.2              | (6)  | 3.1±0.7                     | (6)  | N. D.             |     |
| Non-T 30°C<br>Acivicin | 30.5±2.4              | (4)  | 3.7±0.2                     | (4)  | N. D.             |     |
| Tumor 30°C<br>Acivicin | 29.0±3.1              | (7)  | 3.4±0.4                     | (7)  | N. D.             |     |
| Tumor 45°C<br>Acivicin | 25.8±4.1              | (9)  | 2.9±0.5                     | (8)  | N. D.             |     |

a = Non-Tumor-bearing Control    b = Mean ± Standard Deviation  
N.D. = Not determined    N = Number of chickens

の翌日に僅かな改善を認めた。Acivicin 対照群よりも担癌投与と加温併用群における症状が重かった。

Fig. 8 に示すように、Acivicin 連続投与の翌日に体重減少し、投与休止の翌日に体重増加する形で、特に担癌の場合増体重抑制が顕著であった。Acivicin 対照群は無処置対照群に対し投与4回後に  $p=0.05$  の低下を示した。Acivicin 投与は担癌雛の増体重をほとんど停止させ、加温、非加温の各対照群に対し、投与2回後に  $p=0.01$  の有意差を認めた。

Fig. 9 は腫瘍増殖率を示し、移植腫瘍の退縮も連続投与の翌日に顕著にみられた。Acivicin 投与群は投与2回後に担癌対照群に対し有意の制癌効果を現わし、加温併用群も加温群に対し3回投与後に有意差 ( $p=0.01$ ) となった。加温併用群は Acivicin 単独投与群

に対し9日目に  $p=0.05$ 、10日目に  $p=0.01$  の有意差で腫瘍増殖を抑制した。この実験における各処置開始時の腫瘍の大きさは  $386 \pm 269$  ( $\text{mm}^3$ ) であった。

Table 2 に示すように、Acivicin は胸腺、脾、F 嚢を萎縮させ、特に担癌の場合顕著であった。加温併用群では肝体重比が増加 ( $p=0.01$ ) がみられた。担癌 Acivicin 投与のみで腎、肺の萎縮、また加温併用で肺の萎縮が各対照群に対し有意差となった。

Acivicin 投与の各群は、著明な胆嚢腫大と胆汁貯留を呈した：非担癌 5/5、担癌 5/9、担癌加温 7/9。腫瘍転移は Acivicin 投与で防止されず、肝や腎への転移が非加温で1例、加温例で2例認められた。

Acivicin 投与対照雛の肝には肝門脈域から中心静脈に至る変性・壊死巣、小葉間胆管の内腔拡張、軽度

Table 4. Fractionation of serum protein

|                        | N <sup>b</sup> | Total Protein <sup>c</sup> | Albumin <sup>d</sup> | $\alpha$ -Globulin | $\beta$ -Globulin | $\gamma$ -Globulin | A/G       |
|------------------------|----------------|----------------------------|----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-----------|
| Non-T 30°C             | 4              | 2.9±0.1 <sup>e</sup>       | 72.9±1.9             | 13.5±2.0           | 6.6±1.5           | 7.1±3.1            | 2.69±0.26 |
| Non-T 45°C             | 4              | 2.9±0.2                    | 60.3±2.9             | 14.2±1.9           | 11.7±1.7          | 13.8±3.2           | 1.53±0.20 |
| Tumor 30°C             | 4              | 3.1±0.4                    | 65.6±5.3             | 13.3±2.6           | 8.1±3.9           | 13.1±3.6           | 2.21±0.28 |
| Tumor 45°C             | 4              | 2.5±0.1                    | 78.5±4.1             | 8.0±1.3            | 7.3±2.3           | 6.3±2.5            | 3.76±0.86 |
| Non-T 30°C<br>DON      | 4              | 2.7±0.3                    | 73.8±5.3             | 9.3±3.3            | 9.7±2.8           | 7.3±0.9            | 2.95±0.91 |
| Tumor 30°C<br>DON      | 4              | 2.3±0.3                    | 70.5±4.9             | 10.4±2.0           | 10.6±4.2          | 8.5±1.1            | 2.46±0.50 |
| Tumor 45°C<br>DON      | 4              | 2.4±0.5                    | 64.4±1.4             | 13.3±3.2           | 8.9±1.0           | 13.4±3.2           | 1.82±0.11 |
| Non-T 30°C<br>AOA      | 3              | 2.6±0.4                    | 71.2±1.6             | 7.3±0.8            | 8.3±0.4           | 13.2±2.0           | 2.48±0.19 |
| Tumor 30°C<br>AOA      | 4              | 2.9±0.6                    | 58.8±8.0             | 9.3±3.4            | 9.3±1.9           | 22.6±4.1           | 1.49±0.46 |
| Tumor 45°C<br>AOA      | 4              | 2.8±0.7                    | 70.4±10.6            | 5.6±2.2            | 8.0±3.9           | 16.0±4.9           | 2.77±1.49 |
| Non-T 30°C<br>Acivicin | 4              | 3.3±0.1                    | 74.3±1.9             | 5.0±1.5            | 8.9±3.4           | 12.7±1.0           | 2.91±0.29 |
| Tumor 30°C<br>Acivicin | 4              | 3.3±0.2                    | 67.6±2.7             | 5.7±1.7            | 11.3±3.9          | 15.4±2.2           | 2.11±0.24 |
| Tumor 45°C<br>Acivicin | 4              | 2.2±0.2                    | 62.5±7.9             | 6.3±2.4            | 13.1±2.3          | 18.2±6.2           | 1.75±0.55 |

a = Non-Tumor-bearing Control    b = number    c = g/dl    d = %  
e = Mean ± Standard Deviation

の細胆管増生が認められ、脾のリンパ濾胞減少と胚中心消失、胸腺皮質萎縮と有糸分裂減少、F囊のリンパ小節萎縮と有糸分裂少、および骨髄の骨髄芽球系造血の低下も認められた。

Acivicin 単独投与で腫瘍細胞は水腫性疎開から壊死を起し、リンパ様組織はやや減少した。加温併用では、腫瘍中心部の大きな壊死巣と辺縁部の腫瘍細胞の水腫性疎開が認められ、有糸分裂の減少とリンパ様組織の減少は更に顕著となった。

担癌 Acivicin 投与雛の肝にも門脈域から中心域に至るやや軽度の変性・壊死巣、胆管拡張と胆汁鬱滞、細胆管増生がみられ、加温併用により門脈域の壊死巣は更に軽度になったが、肝細胞の単細胞壊死が瀰漫性に多数出現し、細胆管増生は明瞭となった。胸腺、脾、

F囊の萎縮性変化も担癌 Acivicin 投与雛と加温併用雛において認められた。担癌 Acivicin 例の骨髄は Acivicin 対照に比して骨髄球造血が活発で、加温併用例の骨髄は赤芽球造血が旺盛で骨髄芽球性造血が低調であった。

Acivicin 投与した各群は著明な GOT の上昇を示し、ALP、 $\gamma$ -GTP の低下は担癌例に顕著であった。非担癌で総コレステロールと LDH は上昇し、UA は低下した。担癌の場合 UA は著しく上昇し、LDH は低下した。担癌非加温で GPT が上昇し、加温併用で総コレステロールが上昇した。(Table 5)

Acivicin 投与は担癌加温群の Ht 値低下を起し、各群の p-TP を各対照群よりも高めたが、担癌加温群の p-TP は低下した。Acivicin は  $\alpha$ -globulin を低

Table 5. Effects of hyperthermia and/or chemotherapy on enzyme activities and concentration of substances in sera of chickens with or without transplanted tumor

|                        | n | G O T<br>(K-U)               | G P T<br>(K-U) | $\gamma$ -GTP<br>(IU/l) | A L P<br>(W-U)  | L D H<br>(W-U) | U A<br>(mg/dl) | Chol<br>(mg/dl) |
|------------------------|---|------------------------------|----------------|-------------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|
| Non-T 30°C             | 4 | 149.9 <sup>a</sup><br>±12.10 | 12.16<br>±1.85 | 14.37<br>±3.17          | 86.58<br>±31.43 | 1232<br>±266.2 | 8.08<br>±1.95  | 130.9<br>±13.71 |
| Non-T 45°C             | 4 | 217.0<br>±42.64              | 13.53<br>±1.41 | 13.25<br>±2.13          | 84.15<br>±32.37 | 1571<br>±157.3 | 7.10<br>±1.61  | 127.1<br>±4.87  |
| Tumor 30°C             | 4 | 210.6<br>±23.53              | 12.49<br>±3.26 | 16.54<br>±3.55          | 69.89<br>±38.66 | 2353<br>±376.0 | 4.54<br>±0.81  | 160.0<br>±17.13 |
| Tumor 45°C             | 4 | 364.6<br>±104.3              | 15.84<br>±2.12 | 18.02<br>±1.85          | 90.94<br>±37.29 | 3676<br>±1498  | 8.43<br>±0.17  | 94.09<br>±50.27 |
| Non-T 30°C<br>DON      | 3 | 196.6<br>±20.38              | 11.82<br>±1.49 | 17.07<br>±4.17          | 108.3<br>±11.12 | 2143<br>±386.1 | 6.65<br>±1.46  | 180.8<br>±70.45 |
| Tumor 30°C<br>DON      | 3 | 239.6<br>±51.82              | 10.83<br>±1.81 | 11.48<br>±1.50          | 112.8<br>±9.41  | 2027<br>±330.4 | 6.55<br>±1.35  | 128.9<br>±71.57 |
| Tumor 45°C<br>DON      | 3 | 270.2<br>±76.02              | 13.91<br>±1.54 | 7.77<br>±2.18           | 61.71<br>±11.09 | 2135<br>±768.8 | 8.71<br>±1.79  | 116.5<br>±13.40 |
| Non-T 30°C<br>AOA      | 3 | 184.8<br>±33.45              | 9.09<br>±0.39  | 18.67<br>±4.27          | 105.2<br>±4.24  | 1538<br>±545.3 | 3.80<br>±1.12  | 106.1<br>±16.14 |
| Tumor 30°C<br>AOA      | 3 | 203.1<br>±19.20              | 12.04<br>±1.91 | 13.44<br>±2.93          | 68.56<br>±28.15 | 1697<br>±453.5 | 4.14<br>±0.52  | 144.5<br>±65.8  |
| Tumor 45°C<br>AOA      | 3 | 213.5<br>±68.22              | 13.18<br>±3.69 | 14.79<br>±4.89          | 62.15<br>±17.34 | 2204<br>±705.2 | 5.75<br>±0.92  | 133.3<br>±23.30 |
| Non-T 30°C<br>Acivicin | 3 | 319.4<br>±50.11              | 12.73<br>±1.17 | 11.17<br>±1.17          | 81.67<br>±25.98 | 1733<br>±53.03 | 6.16<br>±3.31  | 174.9<br>±19.37 |
| Tumor 30°C<br>Acivicin | 3 | 315.2<br>±136.9              | 16.04<br>±4.19 | 7.47<br>±1.00           | 56.05<br>±16.58 | 1962<br>±623.6 | 11.70<br>±1.98 | 160.8<br>±42.26 |
| Tumor 45°C<br>Acivicin | 3 | 265.6<br>±94.14              | 15.65<br>±3.22 | 9.85<br>±3.10           | 65.98<br>±45.44 | 1513<br>±655.2 | 11.39<br>±4.55 | 153.3<br>±41.96 |

$\alpha$  = Non-Tumor-bearing Control     $\beta$  = Mean  $\pm$  Standard Deviation

下させ、 $\beta$ -および  $\gamma$ -globulin を高める傾向があり、特に担癌加温群では albumin 低下と関連して A/G 比を低下させた。(Tables 3 and 4)

### 考 察

鶏急性白血病ウィルス MC29 によりニワトリ雛の肝に誘発した可移植性腫瘍を初生雛の皮下に同種移植し、全身加温による温熱療法ならびに3種のグルタミン代謝阻害剤による化学療法を試みた結果、それぞれの制癌効果を認め、更に両者の併用による相乗効果が観察された。これは、この細胞系がグルタミンを特異的に利用して増殖する特性から、既に *in vitro* で認められている阻害剤の効果と glutamine 欠損下で44°C加温により RNA 合成が著しく低下する等の知見<sup>19)</sup>

を裏付ける *in vivo* の成績であった。

温熱療法として今回用いた加温飼育は、腫瘍の増殖を担癌対照例に比して53~70%(平均63%)抑制したが、増体重も31~40%(平均35.5%)低下した。約45°C環境中で飼育する結果、非担癌でも著しい増体重低下、免疫担当臓器および主要臓器の体重比の低下、肝機能および造血能の低下を認めたが、担癌加温の場合、担癌対照例の変化が加温によって相殺的に軽減されたものとして、肝・脾の腫大、リンパ様組織の増生、UAの低下があり、担癌の影響がそのまま現わされているものとして、肝の Kuffer 細胞や骨髓造血の活性化があり、担癌と加温の併用により顕著となったものに、造血能低下、F囊の萎縮、GOT・LDHの上昇、 $\alpha$ -globulin 低下、総コレステロールの低下がある。移

植腫瘍内のリンパ様細胞集簇は、上記の傾向とは逆に加温によって濾胞性増殖を示したが、これは加温の影響が体表の腫瘍と内臓とで異なるためとも考えられるが、むしろ、腫瘍組織の周囲および内部のリンパ球浸潤は抗腫瘍免疫に関係する腫瘍増殖抑制の表現ととるべきであろう<sup>8)</sup>。

移植腫瘍肉眼的内臓転移は加温の影響を受けなかった。Janiak ら<sup>7)</sup>が Sarcoma L1 移植マウスをマイクロ波により全身加温した場合、骨髓由来の非特異的防御機構の低下により、肺転移の数が増加したが、今回の加温飼育はより温和な方法と言えよう。

加温対照雛の副腎は髄質細胞の空胞化によって皮質細胞との区別が困難になり、ストレスとの関連が想定される最も顕著な変化であったが、担癌加温例ではこの変化は不顕著であった。更に詳しい検討を要すると思われる。

電子顕微鏡的観察により、この移植腫瘍は Mladenov ら (1967)<sup>20)</sup> の報告した “Endothelioma” に一致し、肝細胞腫ではないことがわかった。また、10日間前後の加温によっては形態学的特徴の変化を生ずるに到らなかった。

化学療法に用いた DON, AOA, Acivicin は、それぞれ投与 1 日, 3 日, 3 日目と担癌対照例に対し  $p=0.01$  の有意差で制癌効果が認められ、加温併用により単独投与に対し DON は 8 日目, AOA は 7 日目, Acivicin は 9 日目に  $p=0.05$  の有意差が認められた。DON と Acivicin はともに制癌剤で、特に後者は細胞毒性が強く、腫瘍ばかりでなく雛の増体重をほとんど停止させた。一方、DON が毒性が弱くて効果があるように思われたが、二つの実験における腫瘍増殖率に 2 倍近い差があるので、同時対比実験を行う必要があるだろう。連続的に雛に継代する場合、毎回腫瘍増殖率が上昇する傾向がみられたので、これを一定に保つ工夫が望まれた。

AOA は単なる transaminase 阻害剤であるが、今回制癌剤に近い効果を表わしたことは注目に値する。最近、ヒトの白血病細胞培養系に 0.4mM の低濃度で AOA が増殖抑制効果を示した報告<sup>12)</sup>が漸く出たところである。AOA による増体重抑制は比較的軽い、肝細胞の巣状変性は顕著であった。Acivicin はこれに次ぐ肝の変性壊死巣を起し、DON では担癌非加温例に小壊死巣を認めた。これらの肝病変が加温併用により減少または消失したことは、glutamine 代謝阻害剤の毒性を軽減する効果が全身加温にあると考えられ興味を引いた。

化学療法 3 種の全例において腫瘍組織の変性と関連して水腫性疎開が認められ、加温と併用しても存続した。glutamine 代謝阻害剤の直接的効果による非特異的な変性像と思われる。また、各実験における代表的な例について有糸分裂率の算定を試みたところ、各阻害剤投与による有糸分裂像の減少は DON (60%), Acivicin (68%) の順に著明で、AOA (74%) は加温による低下 (76%) と同程度であった。加温併用により更に各々の 20~30% 低下を認めた。

すべての glutamine 代謝阻害剤投与例において GOT と LDH の上昇が認められたが、これは腫瘍細胞の崩壊ばかりでなく、活発に増殖する雛の体細胞の傷害によるところが大きいと思われる。ニワトリ雛とウイルス誘発移植腫瘍という特殊な系であるが、温熱療法のモデルを提供し、制癌剤の便利な試験法となる可能性がある。これらを指標として、生体に及ぼす悪影響をより少なく、腫瘍増殖抑制効果をより大きくする方向でこの加温法を改良する必要がある。

## 要 約

MC29 ウイルスにより誘発された可移植性肝原発腫瘍で、特異的な glutamine 利用によってその腫瘍細胞が増殖する特性が明かになったものを、初生雛の皮下に移植して 9~11 日後に 45°C の加温飼育による全身温熱療法を glutamine 代謝阻害剤による化学療法および両者の併用効果について病理学的に調べた。化学療法には 6-diazo-5-oxonorleucine (DON), aminooxiacetate (AOA), Acivicin<sup>®</sup> の三種を用い、投与対照、加温対照、無処置対照を置いて、9~13 日間観察した。

加温により腫瘍は平均 63% 抑制され、増体重は平均 35.5% 抑制された。宿主はリンパ諸臓器の萎縮、造血能低下、血清 GOT, LDH の上昇等が顕著であった。電子顕微鏡的に腫瘍細胞は内皮細胞腫と判定されたが、加温による微細形態の変化は乏しかった。

DON は加温よりも腫瘍増殖と増体重を抑制し、加温併用により相乗効果を認め、6 羽中 1 羽は腫瘍が消失した。AOA による増体重抑制は加温と同等であったが、腫瘍増殖抑制が顕著で、加温併用効果もみられ、7 羽中 2 羽の腫瘍消失を認めた。Acivicin は腫瘍増殖および増体重を加温より強く抑制し、加温併用効果によりほとんど横這い状態を呈した。

AOA や Acivicin 投与による肝変性壊死巣は加温併用時に著しく軽減されたが、化学療法剤投与全例に GOT, LDH の上昇を認めた。

加温法の改善, glutamine 代謝阻害法の検討などが今後の問題点となろう。

### 文 献

- 1) Beard, D., Chabot, J. F., Langlois, A. J., Hillman, E. A. and Beard, J. W.: Singularity of oncogenic activity of strain MC29 avian leukosis viruses. *Archiv für Geschwulstforschung.*, **35**, 315-325 (1970)
- 2) 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)
- 3) Beard, J. W., Hillman, E. A., Beard, D., Lapis, K. and Heine, U.: Neoplastic response of the avian liver to host infection with strain MC29 leukosis virus. *Cancer Res.*, **35**, 1603-1627 (1975)
- 4) Burmester, B. R., Walter, W. G., Adrian Gross, M. and Fontes, A. K.: The oncogenic spectrum of two "pure" strains of avian leukosis. *J. Nat. Cancer Inst.*, **23**, 277-291 (1959)
- 5) Hopper, S. and Segal, H. L.: Kinetic studies of rat liver glutamic-alanine transaminase. *J. Biol. Chem.*, **237**, 3189-3195 (1962)
- 6) Hugander, A., Hafström, L., Jönsson, P., Bolmsjö, M., Persson, B. R. R., and Stenram, U.: Local hyperthermia in treatment of experimental liver tumors. *Cancer*, **54**, 1686-1691 (1984)
- 7) Janiak, M. and Szmizielski, 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)
- 8) Jones, T. C. and Hunt, R. D.: *Veterinary Pathology.*, Lea & Febiger, Philadelphia. pp.137-138 (1983)
- 9) Langlois, A. J., Beard, D. and Beard, J. W.: Strain MC29, an avian leukosis virus of unique properties. *Comparative Leukemia Res.*, **36**, 96-105 (1969)
- 10) Lapis, K., Beard, D. and Beard, J. W.: Transplantation of hepatomas induced in the avian liver by MC 29 leukosis virus. *Cancer Res.*, **35**, 132-138 (1975)
- 11) 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)
- 12) López-Alarcón, L. and Eboli, M.-L.: Oxidation of reduced cytosolic adenine dinucleotide by the malate-aspartate shuttle in the K-562 human leukemia cell line. *Cancer Res.*, **46**, 5589-5591 (1986)
- 13) 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 Med. Sci.*, **10**, 309-310 (1982)
- 14) Matsuno, T. and Satoh, T.: A sensitive assay for chicken glutamyltransferase. *Int. J. Biochem.*, **17**, 1369-1371 (1985)
- 15) 松野哲也: 腫瘍細胞におけるグルタミン代謝. *Oncologia*, **18**, 117-123 (1986a)
- 16) Matsuno, T. and Satoh, T.: Glutamine metabolism in the avian host bearing transplantable hepatomatous growth induced by MC29 virus. *Int. J. Biochem.*, **18**, 187-189 (1986b)
- 17) 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 (1986c)
- 18) Matsuno, T., Satoh, T. and Suzuki, H.: The pathway of glutamate oxidation in isolated mitochondria from the avian hepatomatous growth induced by MC29 virus. *Comp. Biochem. Physiol.*, **85**, 393-396 (1986d)
- 19) Matsuno, T.: unpublished data
- 20) Mladenov, Z., Heine, U., Beard, D. and Beard, J. W.: Strain MC29 avian leukosis virus. Myelocytoma, endothelioma, and renal growth: Pathomorphological and ultrastructural aspect. *J. Nat. Cancer Inst.*, **38**, 251-283 (1967)
- 21) Murthy, M. S., Harold, N. K., Travis, J. D., Cohen, J. D., Mollick, J. A., Khandekar, J. D. and Scanlon, E. F.: Effect of localized hyperthermia on TA 3Ha tumor transplanted subcutaneously in the tails of mice. *Cancer Res.*, **44**, 3836-3840 (1984)
- 22) Olch, A. J., Bs, Kaisser, L. R., Silberman, A. W., Storm, F. K., Graham, L. S., and Morton, D. L.: Blood flow in human tumors during hyperthermia therapy: demonstration of vasoregulation and an applicable physiological model. *J. Surgical Oncol.*, **23**, 125-132 (1983)
- 23) von Ardenne, M. and Reitnauer, P. G.: Hyperthermia and hyperglycemia for manipulated inhibition of tumor microcirculation. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **107**, 66-67 (1984)
- 24) van der Zee, J., van Rhoon, G. C., Wike-Hooley, J. L., Faithfull, N. S. and Reinhold, H. S.: Whole-body hyperthermia in cancer therapy: a report of a phase I-II study. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **19**, 1189-1200 (1983)

### Summary

A transplantable liver tumor induced by MC29 virus, whose specific utilization of glutamine in growth of the tumor cells had been well demonstrated, was implanted in the subcutis of day-old chickens, and 6–11 days later, those were given whole body hyperthermia by being kept in cage at 45°C and/or chemotherapy using 3 kinds of inhibitors of glutamine metabolism. For chemotherapy 6-diazo-5-oxonorleucine (DON), aminooxiacetate (AOA) and Acivicin<sup>®</sup> were used and after 9–13 days of administration the chickens were sacrificed for pathological observation together with the administration control, hyperthermia control and non-treatment control.

Hyperthermia inhibited the tumor growth 53–70% (average 63%) and the body weight gain 31–40% (average 36%) and caused in the host chickens atrophy of lymphatic organs, lowered erythropoiesis, rises in serum GOT and LDH. The tumor cells were identified as 'endothelioma' by electron microscopy, showing little morphological alteration induced by hyperthermia.

All the 3 inhibitors of glutamine metabolism depressed tumor growth more effectively than hyperthermia, and the depression was augmented by combined treatments of the chemical and hyperthermia. The inhibitors lowered weight gain of the host: AOA did it as well as hyperthermia; DON more completely; and Acivicin almost perfectly. Disappearance of tumor was observed in 2 chickens treated with AOA-combined hyperthermia, and in 1 treated with DON-combined hyperthermia.

Focal degeneration and necrosis in the liver caused by AOA and Acivicin were markedly mitigated when combined with hyperthermia, while increase in the levels of GOT and LDH was seen in all groups treated with the chemotherapeutic agents.