



Title	培養絨毛癌細胞株(BeWo)の熱感受性に関する基礎的研究
Author(s)	佐川, 正; SAGAWA, Tadashi
Description	博士論文
Citation	日本産科婦人科学会雑誌, 36(2), 271-279
Issue Date	1984-02-01
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/28767">https://hdl.handle.net/2115/28767</a>
Type	journal article
File Information	n36-2. pdf



## 培養絨毛癌細胞株 (BeWo) の熱感受性に関する基礎的研究

旭川医科大学産科婦人科学教室 (主任: 清水哲也教授)

佐 川 正

### Studies on Heat Sensitivity of Cultured Choriocarcinoma Cell Line (BeWo)

Tadashi SAGAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, Asahikawa Medical College, Asahikawa

(Director: Prof. Tetsuya Shimizu)

**概要** 絨毛癌細胞に対する、より効果的な加温条件を求めめるため、種々の条件下での BeWo 株の細胞増殖および  $\beta$ -HCG 産生の変化を検討した。

1. 加温条件の違いによる効果について

培養4日目に39℃, 41℃, 43℃に加温した。43℃, 1時間加温時の効果は, 39℃, 120時間加温時と同程度でかつ41℃, 24時間加温時より大きく, 加温効果が43℃にて著しく増強することが明らかとなった。

2. 加温時期の違いによる効果について

対数増殖期の4日目, 5日目, 6日目に43℃, 1時間または3時間加温した。増殖抑制は4日目が最大で, 加温開始時期が遅れるにつれて加温効果の減少が認められた。

3. MTX と併用した場合の加温効果について

培養4日目から MTX  $10^{-7}$ M を48時間添加し, 加温 (43℃, 1時間) 開始の時期は, MTX 添加開始から除去後10時間までの種々の時期に設定した。その結果, 併用効果は MTX 添加開始後24時間から除去後4時間以内が最大であり, また  $\beta$ -HCG の産生は細胞増殖抑制効果の大きい程高値を持続し, 増殖抑制効果が小さくなるにつれて漸減することが示された。

以上の結果, BeWo の熱感受性は43℃で急激に増大し, 他の細胞株と同様の加温効果が期待できると思われる。また BeWo は対数増殖期の各時期および MTX 添加および除去後の時間により熱感受性が異なっており, 細胞増殖速度の減少および MTX による細胞周期の変化が熱感受性の重要な因子となることをうかがわせた。また加温のみでは,  $\beta$ -HCG の産生亢進が認められなかつたのに対し, MTX と併用した場合には,  $\beta$ -HCG の産生亢進が高値で持続した。これは, MTX による効果と加温による効果が各々異なる機序により引き起こされることを示している。

**Synopsis** In order to elucidate the effect of hyperthermia, gestational choriocarcinoma cell line (BeWo) was studied with respect to cell growth and hormone ( $\beta$ -HCG) production in various conditions of hyperthermia.

1. BeWo was heated in the 39.0-43.0°C temperature range on Day 4. The cell growth was reduced significantly at 43°C for 1 hour. The same effect was observed at 39°C for 120 hours. And this effect was more severe than that at 41°C for 24 hours.

2. BeWo was heated at 43°C on Day 4, Day 5, and Day 6 during the logarithmic growth phase. Maximum suppression of the cell growth was observed on Day 4, and the effect was reduced with the length of time that heat application was delayed.

3. MTX ( $10^{-7}$ M) was added for 48 hours beginning on Day 4, and heat (43°C for 1 hour) was applied at various points during or after MTX exposure. Heat showed an adjuvant effect with MTX when heat was applied between 24 hours after administration of MTX and 4 hours after removal of MTX. These findings strongly suggest that the heat sensitivity of BeWo is greatly related to the cell cycle. Elevated HCG production was not observed following heat alone, but observed following simultaneous heat and MTX administration. To elucidate the mechanism involved here, further studies will be needed.

**Key words:** Choriocarcinoma · BeWo · Hyperthermia · Methotrexate · Human chorionic gonadotropin

#### 緒 言

癌治療における温熱療法は, 歴史的にはかなり

以前から行なわれていたが<sup>9)28)</sup>, 近年, 温熱療法に関する基礎的, 臨床的研究が進むにつれて, 悪性

腫瘍治療の一つとして再び注目されるようになった。

培養細胞を用いた実験では、加温による致死効果<sup>6)11)19)</sup>、細胞周期による熱感受性の違い<sup>6)18)20)</sup>、放射線や化学療法剤との相乗効果が明らかにされているが<sup>16)17)</sup>、ほとんどの報告はコロニー法による生存率を指標としてその効果を判定しており、ホルモン産生能を指標とした細胞の機能的面からの効果を検討した報告は、今のところ見当たらない。

今回、著者は、絨毛癌細胞株を用いて種々の加温条件下で培養した場合と、絨毛癌治療に用いられる MTX と併用した場合の加温効果を、細胞増殖および  $\beta$ -HCG 産生の変化から観察し、より効果的な加温条件について検討した。

### 研究方法

#### 1. 培養絨毛癌細胞株

Hertz et al. によつて人脳転移巣より摘出後、ハムスター頬袋に継代移植した後、Pattillo et al. によつて培養株化された BeWo 株<sup>21)</sup>を用いた。

#### 2. 培養方法

培養液は、RPMI 1640 (日本製薬) に胎児牛血清 (GIBCO) を10%加えたものを使用した。培養は、加温実験以外は37°C、5% CO<sub>2</sub> 濃度、湿度100%の培養器 (Hot-pack Model 351920) 内で静置培養した。BeWo は上記培養液で、 $1.0 \times 10^6$ 個/3.0ml を50ml Plastic flask (Lux 社) に植え込み、培養液交換は24時間毎に行なつた。

#### 3. 加温方法

加温方法は、温度センサー (CHINO RO series 表面温度測定用センサー) と記録計 (CHINO EL series 1 ペン記録計) で、培養器内温度が一定の加温温度に保たれていることを確認した後、同温度に加温した培養液をフラスコ内に入れ、あらかじめ加温してある培養器内で一定時間加温した。

#### 4. 加温効果の検討

加温効果の判定のため、経日的な細胞数および細胞当りの培養液中の  $\beta$ -HCG 値を測定した。細胞数は、0.2% Trypsin + 0.02% EDTA 溶液で細胞を壁面から剝離し、よく混和した後、Bürker-Türk 計算盤で算定した。培養液中の  $\beta$ -HCG は CIS 社 RIA-kit (測定感度0.2~50ng/ml) を用い

duplicate で測定した。経日的に採取した培養液は、-40°C で凍結保存しておき測定時に解凍して測定した。intra-assay および inter-assay の変動係数は、それぞれ8.5%、13.5%であつた。

#### 5. 使用薬剤

MTX (日本レダリー社) を RPMI 1640 で使用直前に溶解し、培養液で  $10^{-7}$ M に希釈して使用した。

#### 6. 実験方法

実験は、第1に加温条件の違いによる効果、第2に加温時期の違いによる効果、第3に MTX と併用した場合の加温効果の3点について行なつた。第1の実験方法は、培養4日目より39°Cにて24時間および120時間加温した場合の細胞数および  $\beta$ -HCG 値の変動を検討した。同様に培養4日目より、41°Cにて5時間、24時間、48時間加温した場合と、43°Cにて1時間および3時間加温した場合についても検討した。

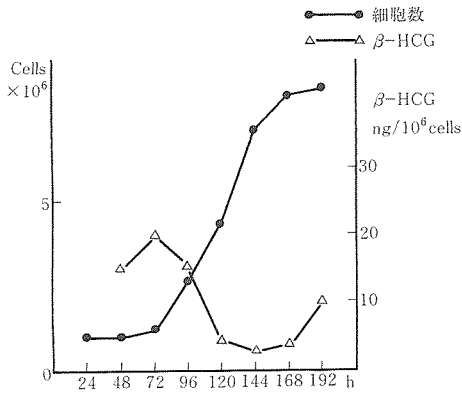
第2の実験方法は、加温時期を変え、対数増殖期の4日目、5日目、6日目に43°Cにて、1時間および3時間加温し、加温開始時期の違いによる加温効果の変化を観察した。

第3の実験方法は、培養4日目より MTX  $10^{-7}$ M を含む培養液を24時間毎に取り換え、MTX を48時間添加し、その後は MTX free の培養液を24時間毎に取り換えて培養を続けた。MTX の濃度は、加温との相乗効果を検討するために、牟禮<sup>1)</sup>の報告より増殖を軽度抑制する  $10^{-7}$ M とし、添加時間は細胞周期に入っているすべての細胞が、少なくとも1回はS期に入り MTX による DNA 合成障害を受けるように、世代時間を考えて48時間とした。加温 (43°C, 1時間) は MTX 添加開始と同時に、添加開始後24時間、MTX 除去直後、2時間後、4時間後と加温開始時期を変え、加温と MTX 両者の相乗効果を観察した。

### 研究成績

BeWo の細胞増殖動態は、培養3日目頃まで細胞数の変化はなく (増殖遅延期)、4日目頃から著明な増加を示した (対数増殖期)、以後、ほぼ直線的に増殖するが、7日目頃ピークに達し細胞数の増加は認められなかつた (定常増殖期)。培養液中

図1 MTX非添加時, 非加温時の細胞増殖およびβ-HCG分泌動態 (BeWo)



の細胞当りのβ-HCG値は, 増殖遅延期から対数増殖期に移行する3日目前後にピークを示し, 対数増殖期には減少し, 定常増殖期に再び産生増加が認められた(図1).

図2-aに示すように, 培養4日目から39℃にて24時間加温した場合は, 加温後2日間は増殖は一時抑制され, その後再び増殖を再開し, 8日目に細胞数は非加温時のレベルに達した. β-HCGは加温後の増殖抑制時期である6日目と7日目に, それぞれ16ng/10<sup>6</sup> cells, 18ng/10<sup>6</sup> cellsと高値を示すが, 増殖の再開に伴い低下する傾向を示した. 39℃, 120時間加温時では, 細胞数は2.0~3.8×10<sup>6</sup>に抑制されたまま増加を示さず, またβ-HCG産生も2.5ng/10<sup>6</sup> cells以下と低値を示した(図2-b). 41℃, 5時間加温時では細胞数およびβ-HCG値とも非加温時と変わりなく, 加温効果は

図2 a 39℃, 24h加温時の細胞増殖およびβ-HCG分泌動態 (BeWo)

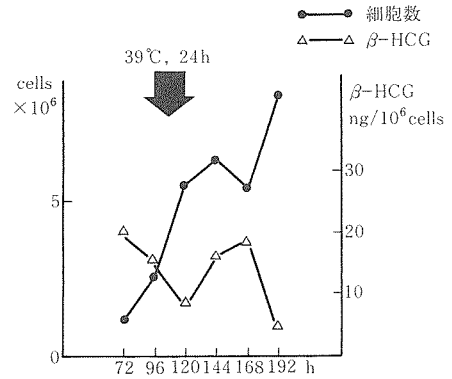
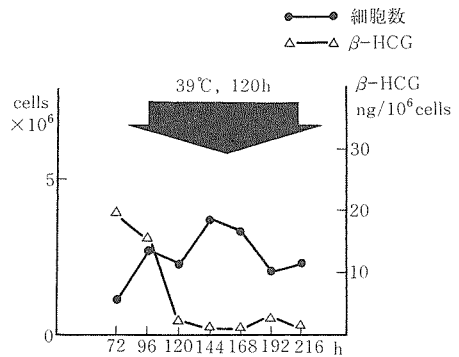


図2 b 39℃, 120時間加温時の細胞増殖とβ-HCG産生動態 (BeWo)



認められなかつた(図3-a). 41℃, 24時間加温時では, 細胞数は5日目に加温前の約1/2に減少した後増加を始め, 7日目では4.5×10<sup>6</sup>まで増加した. またβ-HCGは, 増殖を開始する5日目にピークを示した後に減少し, 定常期と考えられる8日目

図3 a 41℃, 5h加温時の細胞増殖とβ-HCG分泌動態 (BeWo)

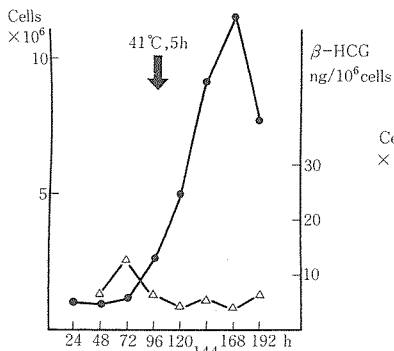


図3 b 41℃, 24h加温時の細胞増殖とβ-HCG分泌動態 (BeWo)

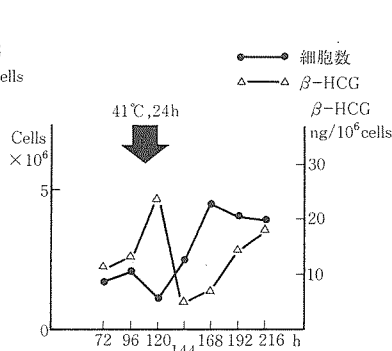


図3 c 41℃, 48h加温時の細胞増殖とβ-HCG分泌動態 (BeWo)

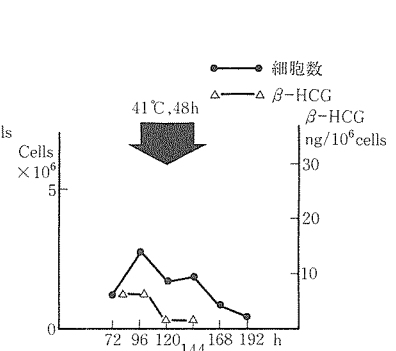


図4 a 43℃, 1h加温時における細胞増殖とβ-HCG分泌動態 (BeWo)

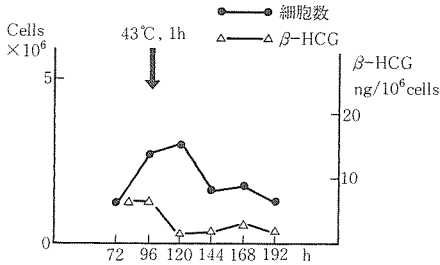
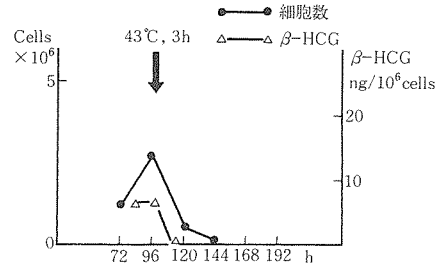


図4 b 43℃, 3h加温時における細胞増殖とβ-HCG分泌動態 (BeWo)



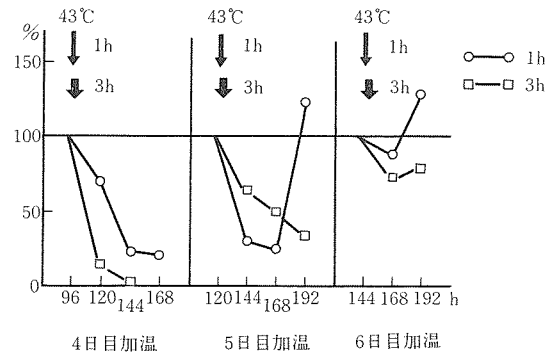
以後に再び増加する傾向を示した (図3-b). 41℃, 48時間加温時では, β-HCG 産生は7日目には消失し, 8日目には細胞数も  $0.4 \times 10^6$  まで減少した (図3-c).

43℃, 1時間加温時では, 細胞数は加温前の約1/2となり, 培養13日目まで培養しても細胞数の増加はみられなかった. また β-HCG 値は, 終始  $2 \text{ ng}/10^6 \text{ cells}$  以下の低値を示した (図4-a). 43℃, 3時間加温時では, β-HCG 産生は5日目には消失し, 6日目には細胞は完全に剝脱死滅した (図4-b).

以上をまとめると, 加温による増殖抑制が軽度で加温後増殖を再開する場合には, β-HCG 産生は増殖期に入る頃にピークを示し, 増殖期に入ると低下する対照と同様の傾向を示すことが明らかとなった. しかし, 加温による増殖抑制が強くなると β-HCG 産生も低下し, さらに加温による増殖抑制が強い場合には, 細胞は次第に剝脱死滅していき β-HCG 産生機能も完全に失われることが示された. したがって, 細胞増殖と β-HCG 産生動態からみると, 培養4日目の43℃, 1時間加温時の効果は39℃, 120時間加温時と同程度で41℃, 24時間加温時より大きいと考えられ, 加温効果が41℃と43℃の間で著しく増強することが明らかとなった.

次に, 対数増殖期の4日目, 5日目, 6日目に, 43℃にて1時間または3時間加温した場合の細胞数の変化を, 非加温時の細胞数に対する比率で表わすと, 細胞数の変化からは, 4日目に加温した場合が最も加温効果が大きく, 5日目, 6日目と加温開始時期が遅れるにつれて, 増殖抑制効果は

図5 加温開始時期の違いによる細胞増殖動態



低下していく傾向を示した (図5). この時の β-HCG 産生は, 4日目の43℃, 1時間加温時 (図4-a), 6日目の43℃, 3時間加温時 (図6-a) のように, 増殖の抑制され続ける場合では低く, 5日目の43℃, 1時間加温時のように, 細胞数が減少した後増殖を再開するような場合では, 増殖期に入る頃に亢進が認められた (図6-b). また, 6日目の43℃, 1時間加温時のように, ほとんど増殖抑制が認められない場合には, β-HCG 産生の推移も非加温時と同様の傾向であつた (図6-c).

以上の結果から, 同一加温条件下では, 4日目, 5日目, 6日目と加温開始時期が遅れるにつれて, その効果の小さくなることが明らかとなった.

次に, 加温と MTX との併用効果を見るため, まず培養4日目から MTX ( $10^{-7} \text{ M}$ , 48時間) 単独添加による効果のみをみた. この場合, 6日目には細胞数は MTX 添加前の約1/2に減少し, MTX 除去後再び増殖を再開し, 7日目には細胞数は添加前の約2倍に達した. β-HCG 産生は6日目に最高 ( $17 \text{ ng}/10^6 \text{ cells}$ ) となり, 細胞増殖期に入ると

図 6 a 6 日目, 43°C・3h 加温時の細胞増殖および  $\beta$ -HCG 分泌動態 (BeWo)

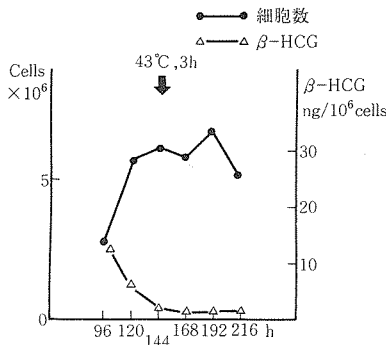


図 6 b 5 日目, 43°C・1h 加温時の細胞増殖および  $\beta$ -HCG 分泌動態 (BeWo)

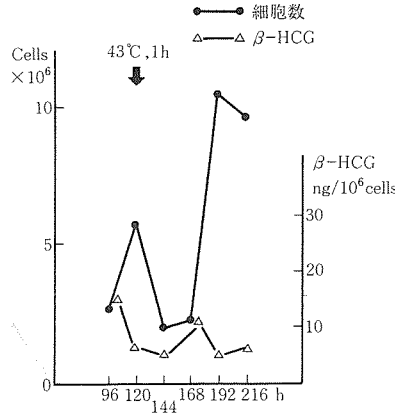


図 6 c 6 日目, 43°C・1h 加温時の細胞増殖および  $\beta$ -HCG 分泌動態 (BeWo)

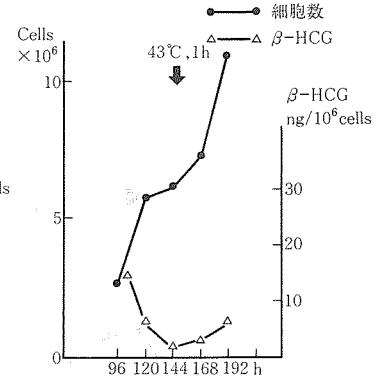


図 7 MTX 添加時 ( $10^{-7}$ M, 48h) の細胞増殖および  $\beta$ -HCG 分泌動態 (BeWo)

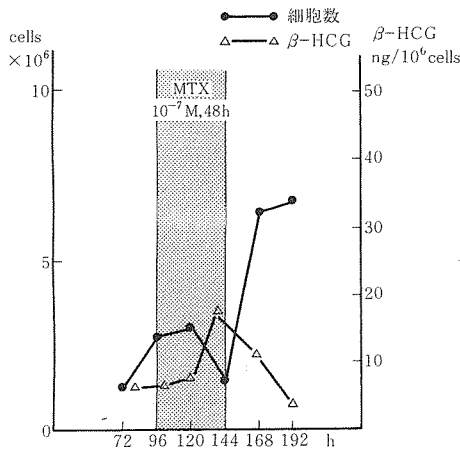
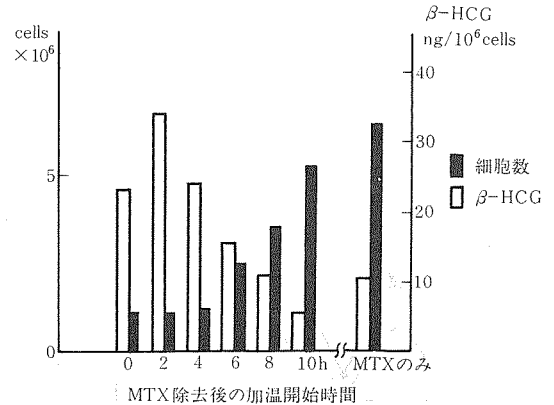


図 8 MTX ( $10^{-7}$ M, 48h) 除去後における加温 (43°C, 1h) の開始時期と細胞数および  $\beta$ -HCG の関係



にも漸減する傾向を示した (図 7)。

MTX 除去後 4 時間以内の加温 (43°C, 1 時間) では, その後の細胞数の増加は認められないのに対し,  $\beta$ -HCG 産生は逆に 20ng/ $10^6$  cells 以上の高値を持続した。MTX 除去後 6 時間以降に加温した場合には, 加温開始時期が遅れるにつれて細胞数は次第に増加し始め,  $\beta$ -HCG 産生は逆に低下する傾向が示された (図 8)。

加温 (43°C, 1 時間) を MTX 添加開始と同時にこなった場合には, 6 日目に細胞数は MTX 添加前の約 1/3 まで減少し, その後  $4.0 \times 10^6$  まで増加した。この場合,  $\beta$ -HCG 産生は 6 日目では 54ng/

$10^6$  cells まで増加し, その後も 30ng/ $10^6$  cells 以上の高値を持続した (図 9-a)。加温 (43°C, 1 時間) を MTX 添加後 24 時間目に開始した場合には, 6 日目に細胞数は MTX 添加前の約 1/3 となり, その後の細胞数の増加も認められなかった。しかし,  $\beta$ -HCG 産生は 7 日目以後, 25~30ng/ $10^6$  cells と亢進している傾向を示した (図 9-b)。

加温と MTX の相乗効果を細胞数の面から客観的に求めるため, 加温と MTX による処理後の実測値を, 加温と MTX 処理による期待値 (MTX 単独処理時の細胞数 (図 7) に, 4 日目, 5 日目, 6 日目に 43°C, 1 時間加温時の対照に対する比率 (図 5) を乗じて得られた細胞数) と比較検討した。

図9 細胞増殖とβ-HCG産生に及ぼすMTX (10<sup>-7</sup>M, 48h) と加温 (43℃, 1h) の影響 (BeWo)

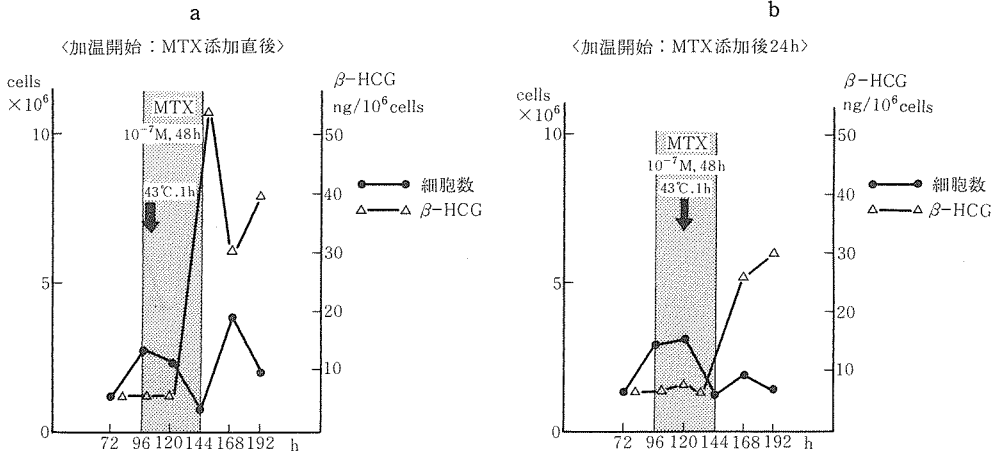
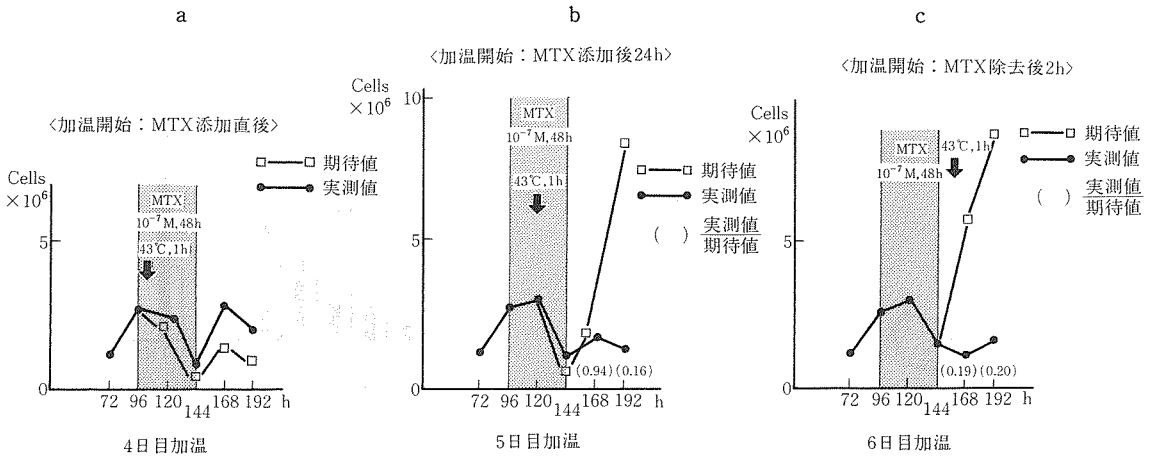


図10 細胞増殖に及ぼすMTX (10<sup>-7</sup>M, 48h) と加温 (43℃, 1h) の影響 (BeWo)



MTX 添加開始と同時に(培養4日目)に加温した場合には、実測値は期待値を上まわり、相乗効果は認められなかつた(図10-a)。MTX 添加後24時間目(培養5日目)に加温した場合およびMTX 除去後4時間以内(培養6日目)に加温した場合には、実測値は期待値の約1/5以下となり、明らかな相乗効果が認められた(図10-b, 図10-c)。

考 察

Connor et al.は、異なる数種類の細胞株を検討した結果、熱感受性は細胞株により非常に異なるが、すべての細胞株は、43℃前後を境界域として急激に熱感受性を増すと報告している<sup>6)10)11)19)</sup>。著

者の実験でも、細胞増殖およびβ-HCG産生からみて、BeWoにおける熱感受性は43℃で急激に増大することがうかがわれ、BeWoも他の細胞株(CHO<sup>27)</sup>, CH Lung<sup>22)</sup>, Gliosarcoma<sup>10)</sup>, HeLa<sup>14)</sup>)と同様の加温効果が期待できると考えられる。

加温による細胞致死機序は、十分に解明されていないが、43℃以上の加温時の細胞の不活化エネルギーが、酵素や蛋白の不活化エネルギーとよく一致することから<sup>11)27)</sup>、43℃以上の加温では、染色体のDNAと関連した蛋白<sup>8)</sup>、またはDNAの修復酵素が<sup>10)11)</sup>変性を受け、DNA合成期にDNAの複製が障害されることが、細胞致死の急激に増大す

る原因と考えられており、BeWoにおいても、43°C加温時において、これと同様の機序で細胞致死が増大すると推測される。

細胞株の違いにより、熱感受性はかなり異なることが知られているが<sup>10)</sup>、BeWoの熱感受性の程度を検討するために、BeWoを、中程度の感受性を持つ Chinese hamster ovary (CHO) 細胞と比較<sup>10)27)</sup>すると、培養4日目に加温した場合は、ほぼCHO細胞と同程度の熱感受性を示すが、5日目、6日目と加温開始時期が遅れるにつれて、CHO細胞より著しく熱感受性は低下していた。また細胞増殖の各時期における熱感受性について、対数増殖期と遅延期または定常期の熱感受性が異なるという報告はあるが<sup>12)18)</sup>、対数増殖期それ自体における熱感受性の変化を検討した報告は見当たらない。著者の実験によれば、BeWoは対数増殖期の各時期において熱感受性が異なっており、これは、BeWoに特異的な変化であるか、一般に定常期に近づくことによる増殖速度の減少によるものであるか否かについては、現在未だ不明である。しかし、一般的に培養細胞では対数増殖期から定常期に近づくに従って、休止期の細胞の占める割合が多くなる<sup>3)</sup>ことが知られており、加温による細胞致死がDNA合成阻害と密接な関係を持つことから考えて<sup>8)10)11)</sup>、BeWoにおいても増殖速度の減少による細胞周期の変化が、熱感受性の低下に影響を与えている可能性も充分考えられる。

今回、MTXと加温の併用により、相乗効果が認められたが、他の抗癌剤と加温の併用では、nitrosoureaやcis-platinumのように42°Cで相乗効果の認められるものや<sup>17)</sup>、bleomycinのように43°C以上で相乗効果の生じるもの<sup>8)</sup>、adriamycinやactinomycin Dのように、一定時間以上加温すると、逆に薬剤に抵抗性を示すようになるもの<sup>13)14)</sup>まであり、これらは抗癌剤の作用機序の違いにより、相乗効果に差異が生じたためと考えられている<sup>17)</sup>。MTXの作用機序と加温時の相乗効果の関係についての報告は、今のところ見当たらない。しかし、bleomycinや放射線と加温の併用時には、加温により生じたDNA修復酵素の変性により、bleomycinや放射線によるDNA障害が回復

されないために、相乗効果が生じるとされている<sup>8)11)</sup>。

今回、MTXと加温の併用効果が、MTX添加後24時間からMTX除去後4時間以内に最大に認められた。絨毛癌細胞は、低濃度のMTX添加により次第にS期に同調され<sup>2)24)25)</sup>、また、MTX除去後はS期の細胞は次第に減少し、除去後9時間でMTX添加前のレベルまで減少する<sup>26)</sup>ことが知られている。また、熱感受性がS期に最大で、G<sub>2</sub>期に最小であり、S期とG<sub>2</sub>期では熱感受性に7倍の差があること<sup>6)20)</sup>を考えると、MTX添加および除去後の時間により相乗効果が著しく異なる理由は、MTX添加により細胞が次第に熱感受性の高いS期に集まり、除去後は次第に熱抵抗性の高いG<sub>2</sub>期に進行することが大きな原因の一つと推測される。また、Bhuyan et al.の実験では<sup>9)7)</sup>、低濃度の5FuでL12 10細胞をS期に同調させた後に、S期に特異的に働くara-Cを添加すると、相乗効果は最大であるが、5Fu除去後はS期の細胞が次第に減少するために、相乗効果は減少し、5Fu除去後12時間で相乗効果は認められなくなったと報告している。この報告は、今回の実験結果ともよく一致しており、MTXと加温を組み合わせる場合には、MTXによる細胞周期の変化を考慮した加温のタイミングの工夫が必要と考えられた。

絨毛癌細胞の、HCG産生機序およびMTXによるHCG産生亢進機序についての解析は、未だ充分とはいえないが、MTXだけでなく、fluorodeoxyuridine、hydroxyurea、ara-Cなどの、MTXとは異なる機序でDNA合成を阻害する薬剤の添加によっても、絨毛癌細胞のHCG産生が亢進する事実はよく知られている<sup>4)</sup>。またDNA合成阻害とHCG産生亢進の間に相関が認められることより<sup>4)23)</sup>、抗癌剤による一時的なHCG産生亢進は、その抗癌剤によるDNA合成阻害作用と密接な関係を有していると思われる。しかし、どのようなDNA合成阻害機序で、HCG産生が亢進するかは未だ明らかでない。ただ、Speeg et al.は、HCG産生がG<sub>1</sub>-S期に最大であると報告しており<sup>23)</sup>、またG<sub>2</sub>期にHCG産生のrepressorが生じ

ることも報告されている<sup>4)</sup>。以上の点から考えると、今回、MTX 添加開始と同時に、あるいは24時間後、MTX 除去後4時間以内などに各々加温した場合、 $\beta$ -HCG 産生亢進が持続したが、これはMTX によるDNA 合成阻害作用が持続する間に加温すると、DNA 合成阻害が加温により回復されず持続する<sup>8)11)</sup>ためと推測される。また加温のみでは、HCG 産生の亢進が認められなかつた。このことは、加温によるDNA の合成阻害が、DNA に対する直接的な障害ではないことが<sup>8)10)11)</sup>関与しているとも考えられ、HCG 産生亢進には、MTX などによる直接的なDNA 合成阻害または、それにより生じたDNA 自体の障害の関与が推測されるので、今後さらに詳細な検討が必要と考えられた。

擧筆するに当り御懇篤な御校閲を頂いた清水哲也教授、直接の御指導を賜った山下幸紀助教授に深甚の謝意を表します。

#### 文 献

1. 牟禮一秀, 山下幸紀, 林 博章, 佐川 正, 清水哲也: 絨毛癌細胞株 (BeWo, GCH-2, SCH) の細胞増殖, HCG,  $\beta$ -HCG 分泌能について. 日臨細胞誌, 22: 209, 1983.
2. 高木 滋, 太田和雄: F.M.F.による細胞回転と癌化学療法. 癌と化学療法, 5: 709, 1978.
3. 草間 悟: 臨床腫瘍学. 224, 南江堂, 1982.
4. Azizkhan, J.C., Speeg, K.V., Stromberg, K. and Goode, D.: Stimulation of human chorionic gonadotropin by JA<sub>r</sub> line choriocarcinoma after inhibition of DNA synthesis. Cancer Res., 39: 1952, 1979.
5. Bhuyan, B.K., Fraser, T.J. and Day, K.J.: Use of cell-cycle information on the preparation of drug combinations: Results with cytosine arabinoside plus actinomycin D. Cancer Treat. Rep., 60: 1813, 1976.
6. Bhuyan, B.K.: Kinetics of cell kill by hyperthermia. Cancer Res., 39: 2277, 1979.
7. Bhuyan, B.K., Blowers, C.L., Neil, G.L., Bono, V.H. and Day, K.J.: Partial synchronization of L1210 cells by 5-fluorouracil and its use in drug combinations. Cancer Res., 37: 3204, 1977.
8. Braun, J. and Hahn, G.M.: Enhanced cell killing by bleomycin and 43°C hyperthermia and the inhibition of recovery from potentially lethal damage. Cancer Res., 35: 2927, 1975.
9. Coley, W.: The treatment of malignant

- tumors by repeated inoculation of erysipelas—With a report of ten original cases. Am. J. Med. Sci., 105: 487, 1893.
10. Connor, W.G., Gerner, E.W., Miller, R.C. and Boone, M.L.M.: Prospects for hyperthermia in human cancer therapy. Radiology, 123: 497, 1977.
  11. Dewey, W.C., Hopwood, L.E., Sapareto, S.A., and Gerweck, L.E.: Cellular responses to combination of hyperthermia and radiation. Radiology, 123: 463, 1977.
  12. Dickson, J.A. and Shah, D.M.: The effects of hyperthermia (42°C) on the biochemistry and growth of a malignant cell line. Europ. J. Cancer, 8: 561, 1972.
  13. Donaldson, S.S., Gordon, L.F. and Hahn, G.M.: Protective effect of hyperthermia against the cytotoxicity of actinomycin D on chinese hamster cells. Cancer Treat. Rep., 62: 1489, 1978.
  14. Gerner, E.W., Boone, R. and Connor, W.G.: A transient thermotolerant survival response produced by single thermal doses on HeLa cells. Cancer Res., 36: 1035, 1976.
  15. Hahn, G.M. and Strande, D.P.: Cytotoxic effects of hyperthermia and adriamycin on chinese hamster cells. J. Natl. Cancer Inst., 57: 1063, 1976.
  16. Hahn, G.M., Braun, J. and Har-Kedar, I.: Thermochemotherapy: Synergism between hyperthermia (42-43°C) and adriamycin (or bleomycin) in mammalian cell inactivation. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 72: 937, 1975.
  17. Hahn, G.M.: Potential for therapy of drugs and hyperthermia. Cancer Res., 39: 2264, 1979.
  18. Kase, K. and Hahn, G.M.: Differential heat response of normal and transformed human cells in tissue culture. Nature, 255: 228, 1975.
  19. Palzer, R.J. and Heidelberger, C.: Studies on the quantitative biology of hyperthermic killing of hela cells. Cancer Res., 33: 415, 1973.
  20. Palzer, R.J. and Heidelberger, C.: Influence of drugs and synchrony on the hyperthermic killing of hela cells. Cancer Res., 33: 422, 1973.
  21. Pattillo, R.A. and Gey, G.O.: The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells *in vitro*. Cancer Res., 28: 1231, 1968.
  22. Robinson, J.E. and Wizenberg, M.J.: Thermal sensitivity and the effect of elevated temperatures on the radiation sensitivity of chinese hamster cells. Acta Radiol., 13: 241, 1974.

23. Speeg, K.V., Azizkhan, J.C. and Stromberg, K. : The stimulation by methotrexate of human chorionic gonadotropin and placental alkaline phosphatase in cultured choriocarcinoma cells. *Cancer Res.*, 36 : 4570, 1976.
  24. Taylor, I.W. and Tattersall, M.H.N. : Methotrexate cytotoxicity in cultured human leukemic cells studied by flow cytometry. *Cancer Res.*, 41 : 1549, 1981.
  25. Taylor, I.W., Slowiaczek, P., Francis, P.R. and Tattersall, M.H.N. : Biochemical and cell cycle perturbations in methotrexate-treated cells. *Mol. Pharm.*, 21 : 204, 1981.
  26. Turner, M.K., Abrams, R. and Lieberman, I. : Levels of ribonucleotide reductase activity during the division cycle of the L cell. *J. Biol. Chem.*, 243 : 3725, 1968.
  27. 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, 1971.
  28. Wetermark, F. : Uber die Behandlung des ulcerierendent Cervixcarcinoms mittles konstanter Wärme. *Zbl. Gynaek.*, 22 : 1335, 1898.  
(特別掲載 No. 5404 昭58・11・11受付)
-