

原

著

培養グリオーマ細胞に対する温熱と 抗癌剤の併用効果に関する研究

新潟大学脳研究所脳神経外科（主任：田中隆一教授）

葛 雲 龍

Combination Effect of Antineoplastic Agents and Hyperthermia on Glioma Cell Lines

Yunlong GE

*Department of Neurosurgery, Brain Research Institute
Niigata University, Japan
(Director: Professor Ryuichi TANAKA)*

Abstract

Antineoplastic agents have been reported to have little effect against malignant brain tumors. In the present study, the synergistic cytotoxicity of combination with hyperthermia and antineoplastic agents was investigated using glioma cell lines.

The glioma cell lines used in this study include rat glioma cell lines C6, 9L and human glioma cell line T98G. These cell lines were cultured with antineoplastic agents of ADR, CDDP, and MCNU with various concentrations and temperature. The cell survival of each cell line exposed to drugs of different concentration combined with various temperature stimulation was detected with WST-1 assay.

The cytotoxic effect was related to the temperatures and duration of exposure to the temperatures and duration of exposure to the temperature when the hyperthermia was done alone. The cytotoxicity increased according to the drug concentration when the drug were used alone. The cytotoxicity increased significantly if the cell line were cultured at 43°C for 1 hour combined with 0.5 μ g/ml of ADR, CDDP or 2.5 μ g/ml of MCNU ($p < 0.01$) compared with that of hyperthermia group or antineoplastic agents group assessed by combi-

Reprint requests to: Yunlong GE
Department of Neurosurgery
Brain Research Institute Niigata University
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市旭町通り1-757
新潟大学脳研究所脳神経外科学分野 葛 雲 龍

nation index (CI) method.

Combined therapy with hyperthermia and antineoplastic agents has synergistic cytotoxic effect on cultured glioma cell lines. WST-1 assay is more useful for assessing cell survival than colony assay or MTT assay.

Key words : hyperthermia, glioma cell line, WST-1 assay, Chemotherapy

はじめに

温熱療法（ハイパーサーミア）は癌の集学的治療の一つとして注目されている。温熱療法が癌治療に用いられるのは、単独でも癌細胞の致死効果を示し、それが正常細胞の感受性よりも高いことが第一の理由である¹⁾²⁾。更に組織レベルで温熱を行った時、腫瘍の血流、酸素状態、pHなどの組織変化が熱感受性を増加させることも知られている。癌の臨床において温熱と放射線、化学療法を併用すると、より高い治療効果が得られることも一般臓器において報告されている。我々の施設においても早くから温熱の抗腫瘍効果を期待して、悪性神経膠腫（悪性グリオーマ）に対して、温熱療法を展開してきた。特に再発グリオーマに対しては温熱治療単独で、初発グリオーマに対しては放射線併用温熱療法を行い良好な成績が得られている。

一方、悪性グリオーマの治療において、ACNU, MCNUといったニトロソウレア系の抗癌剤が化学療法剤として頻用されているが^{3)~6)}、その効果については良好とは言い難く、この化学療法剤の感受性増強の課題を克服することが求められてきた。そこで化学療法剤の温熱による増強効果が他の臓器癌と同様に脳腫瘍においても期待されるところである。しかし、これまで温熱がこれらの抗癌剤との併用で、グリオーマ細胞に対して殺細胞効果を示すかどうかは明らかにされていなかった。今回我々は従来より温熱生物学的研究に用いられてきた colony 法あるいは MTT assay 法よりも簡便性、正確性の優れている WST-1 assay 法を用い^{7)~9)}、各種培養グリオーマ細胞に対する温熱と抗癌剤との併用効果について実験し、その併用効果が相加ないし相乗効果を示すか否かを検討した。

材料と方法

1. 細胞及び培養

実験にはヒトグリオーマ株化細胞である T98G (Riken cell bank, Tsukuba, Japan), ラットグリオーマ株化細胞である C6 (Dainippon Laboratory, Tokyo, Japan) および 9L (Riken cell bank, Tsukuba, Japan) を用いた。

対数増殖期にあるこれらのグリオーマ細胞を10% fetal calf serum (FCS) 添加, Eagle's minimum essential medium (MEM) 中で、 $1 \times 10^4 / 180 \mu\text{l}$ に調整し、96 well マイクロプレート上に $1 \times 10^4 / 180 \mu\text{l} / \text{well}$ ずつ plating し、37℃かつ5% CO₂ 存在下で24時間培養した。

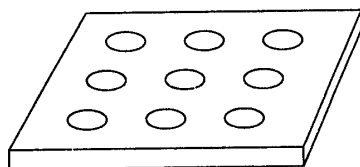
2. 薬剤処理と温熱処理

Doxorubicin hydrochloride (ADR) (Kyowa hakko, Tokyo, Japan), Cisplatin (CDDP) (Nippon Kayaku, Tokyo, Japan), Ranimstine (MCNU) (Mitsubishi Welfide, Tokyo, Japan), 各抗癌剤は、PBSで希釈して種々の濃度のものを作成した。まず、予備実験において各細胞に対する ADR, CDDP, MCNU の単独の薬剤感受性を検討し、本実験に用いる至適抗癌剤濃度は ADR では、C6 および 9L に対しては 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 2.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$, T98G に対しては 0.01, 0.1, 0.5, 5, 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度を、CDDP では C6 および 9L に対しては 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 2.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$, T98G に対しては 0.05, 0.5, 2.5, 12.5, 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度を、MCNU では C6 および 9L に対しては 0.05, 0.5, 2.5, 25, 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$, T98G では 0.05, 2.5, 50, 250, 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度をそれぞれ選択した。

24時間培養後の各 well に各濃度の抗癌剤を 20 μl ずつ添加した。

加温方法として、各抗癌剤を添加後、インキュベーターを用いて、37℃ (control), 42℃, 43℃ の

96 well plate に glioma cell (C6、9L、T98G) を播く



24 時間後

ADR、CDDP、MCNU 各抗癌剤を添加

インキュベーターで加温 (37℃、42℃、43℃)

72 時間後

WST-1 液を添加

4 時間後

吸光度の測定、生存率の解析

図 1 グリオーマ細胞株の培養と抗癌剤ならびに温熱刺激

各温度で 1 時間加温した。

3. WST-1 assay による細胞生存率測定

細胞生存率の測定は (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene methosulfate) (WST-1) assay (Wako Cell Counting Kit, Osaka, Japan)⁷⁾⁻⁹⁾ を用いた。

加温終了後、細胞を更に 72 時間培養し、各 well に WST-1 溶液を 20 μ l ずつ添加し、4 時間反応させた。反応終了後、各 well の吸光度 (optical density: OD) をマイクロプレート吸光度測定装置 (Dainippon Labosystem, Tokyo Japan) にて試験波長 450nm、参考波長 600nm で測定した (図 1)。

それぞれの実験において、well の吸光度 (OD)

の平均値を求めた。次に 37℃、抗癌剤無添加の well における OD 平均値を標準値 (100%) として、各温度、各抗癌剤、各濃度における OD 平均値を絶対値で表し、これを生存率としてそれぞれの殺細胞効果を検討した。また、各細胞のそれぞれの温度における各抗癌剤の 50% 抑制濃度 (inhibition concentration 50: IC₅₀) を求めた。

4. 統計処理並びに併用効果判定法

細胞生存率では、各抗癌剤 0.5 μ g/ml、43℃ 1 時間加温における温熱単独、抗癌剤単独、両者併用の三群を比較し、統計学的有意差はパーソナルコンピュータ統計解析ソフト (StatView, Japan) を用い、Student t-test にて解析した。

Chou ら¹⁰⁾ により確立された Combination index (CI) の概念を温熱と抗癌剤の併用効果の判定に

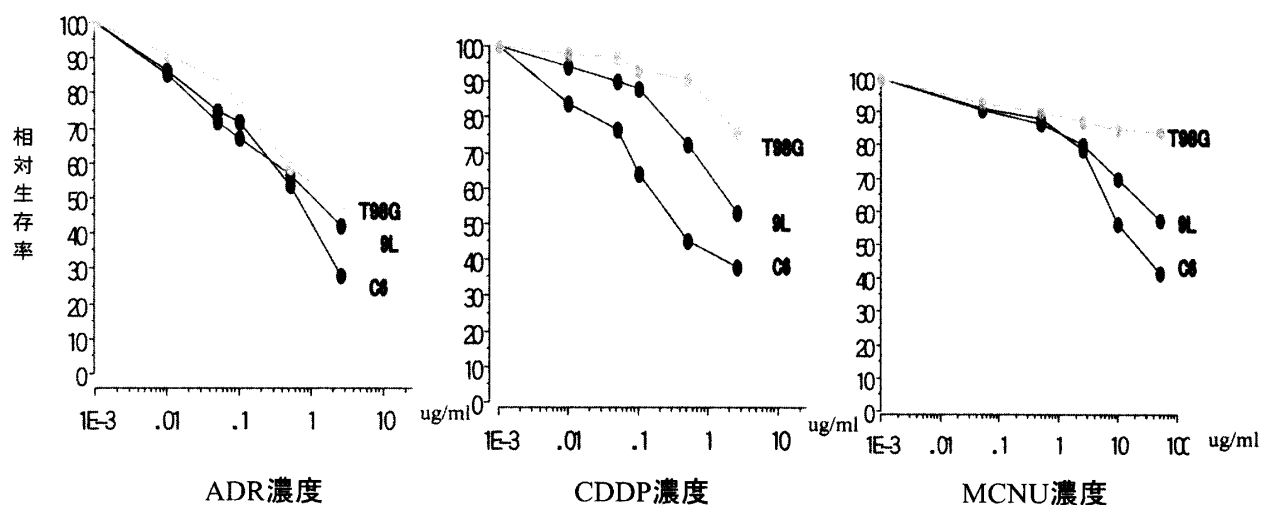


図2 抗癌剤単独の効果

C6, 9L, T98G細胞を 1×10^4 /well ずつ plating し, ADR, CDDP, MCNU を 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, $2.5 \mu\text{g/ml}$ の各濃度において, 殺細胞効果を分析した. ADR では T98G, 9L, C6 いずれにおいても, 濃度依存性に殺細胞効果が認められた. CDDP, MCNU においては培養グリオーマ株の違いにより, 殺細胞効果に差を認めた.

応用した馬場ら³⁷⁾の方法を用いた. すなわち, 温熱と抗癌剤の併用効果は増殖抑制率を(%)とした時に,

A=抗癌剤併用時のIC_xを示す加温時間(min)/温熱単独におけるIC_xを示す加温時間(min),

B=温熱併用時のICを示す抗癌剤濃度($\mu\text{g/ml}$)/抗癌剤単独におけるIC_xを示す濃度($\mu\text{g/ml}$)と定義し,

$$CI = A + B + A \times B$$

CI < 1 の場合を相乗作用, CI = 1 の時が相加作用, CI > 1 の場合が拮抗作用と判定した.

結 果

1. 抗癌剤単独効果

C6, 9L細胞ではADR, CDDP濃度 $0.01 \mu\text{g/ml}$ 以上で, MCNU濃度 $0.05 \mu\text{g/ml}$ 以上で濃度依存性に, 抗癌剤無添加群に対して有意な殺細胞効果が認められた(図2)($p < 0.01$).

一方, T98G細胞ではADR濃度 $0.01 \mu\text{g/ml}$ 以上で, CDDP濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 以上で, MCNU濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ 以上で濃度依存性に, 抗癌剤無添加

群に対して有意な殺細胞効果が認められた($p < 0.01$).

2. 温熱単独効果

図3のグラフは, 各細胞株に対する 37°C , 42°C , 43°C , 44°C の加温時間の生存率に及ぼす影響を見ている. C6, 9L細胞では 42°C 60分加温で殺細胞効果が認められた. T98G細胞では 43°C , 44°C 60分で初めて殺細胞効果が認められたものの, 温熱感受性は低い傾向が見られた.

3. 各抗癌剤と温熱併用効果

細胞生存率を比較すると, C6(図4), 9L(図5)細胞ともにADR, CDDP濃度が $0.01 \mu\text{g/ml}$ 以上および, MCNU濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 以上で 42°C および 43°C の加温の併用により殺細胞効果が増強した. とくにADR, CDDP濃度が $0.05 \mu\text{g/ml}$ から $2.5 \mu\text{g/ml}$ まで, MCNU濃度の $0.5 \mu\text{g/ml}$ から $50 \mu\text{g/ml}$ まで, 37°C の加温と比較し, 42°C および 43°C の加温の併用時に有意な殺細胞効果の増強を認めた.

一方, T98G細胞(図6)ではADR濃度が $0.01 \mu\text{g/ml}$ 以上で, CDDP濃度が $0.05 \mu\text{g/ml}$ 以上で, MCNU濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 以上では加温による増強

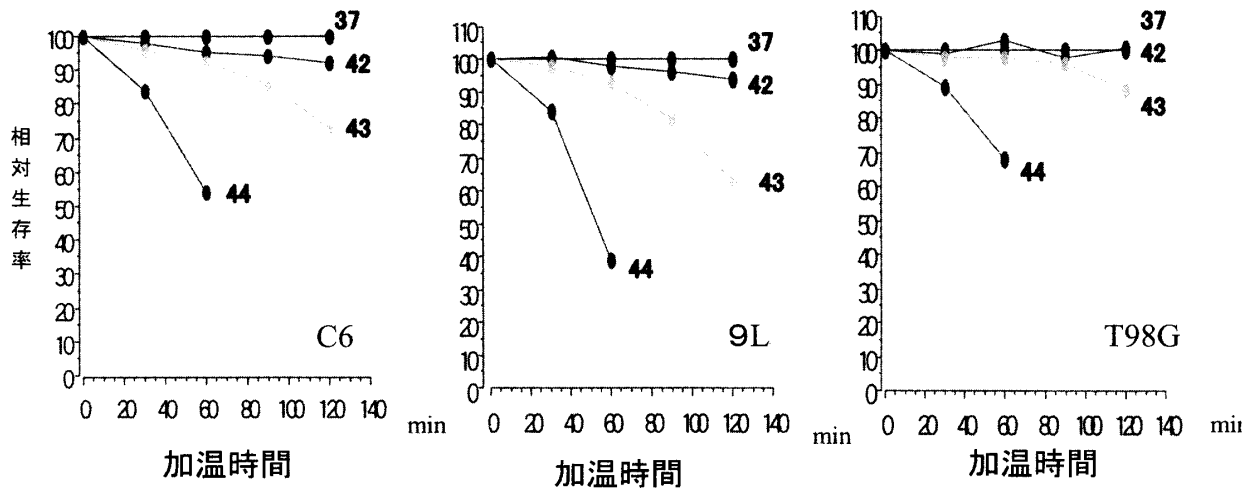


図3 加温単独の効果

各細胞株を 37℃ (control), 42℃, 43℃, 44℃ に加温し, それぞれ 30 分, 60 分, 90 分, 120 分の加温時間で, 殺細胞効果を調べた. すべての培養グリオーマ細胞において, 加温温度と加温時間の相互作用による殺細胞効果を認めた.

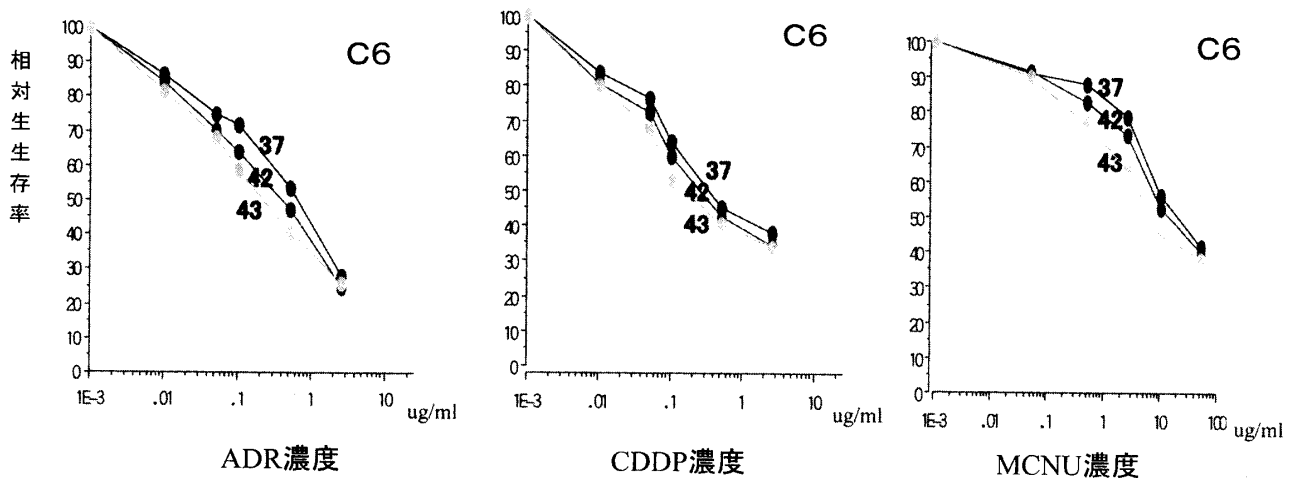


図4 C6 抗癌剤と温熱の併用効果

C6 細胞を 1×10^4 /well ずつ plating し, ADR, CDDP, MCNU を 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, $2.5 \mu\text{g/ml}$ の各濃度で設定し, 37 (control), 42℃, 43℃ 1 時間加温した. ADR, CDDP, MCNU のすべての抗癌剤で, $0.5 \mu\text{g/ml} \sim 2.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度において, 温度依存性に併用殺細胞効果が認められた.

効果は僅少であった. T98G 細胞においては各抗癌剤濃度における 37℃ の加温と比較し, 42℃ の加温の併用時に有意な殺細胞効果の増強を認めなかった.

この結果を踏まえて, 各抗癌剤と加温の併用効

果を見やすい $0.5 (\mu\text{g/ml})$ の濃度において, 43℃ 加温 1 時間温熱刺激単独, 抗癌剤単独, 両者併用の三群について細胞生存率を比較したグラフを (図 7) に示す. 細胞生存率では抗癌剤単独, 温熱単独治療に比して, 両者併用群の殺細胞効果は顕

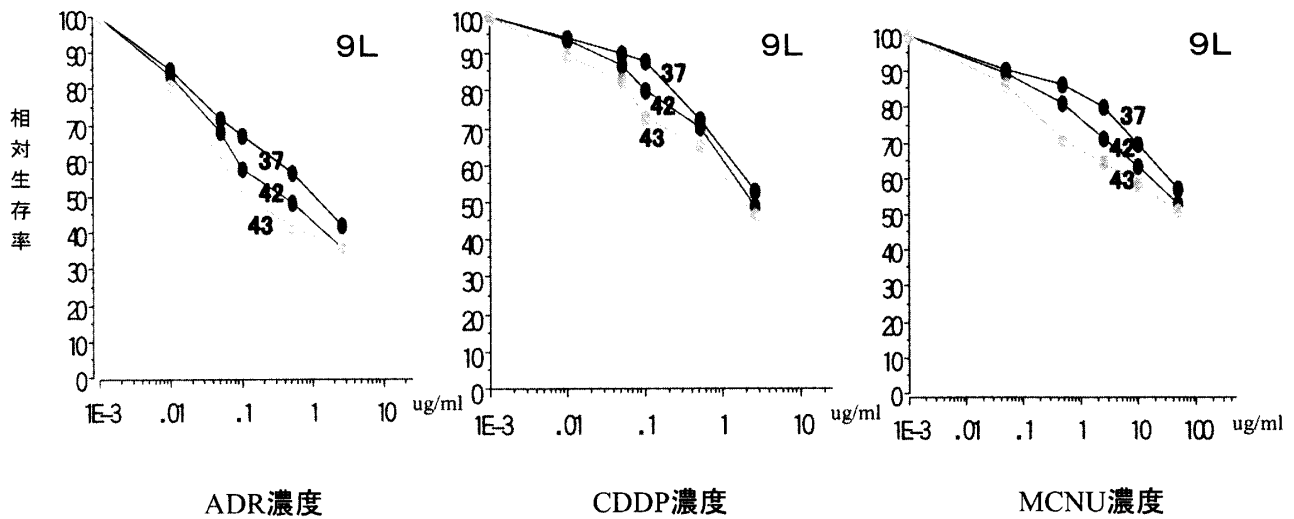


図5 9L 抗癌剤と温熱の併用効果

9L細胞を 1×10^4 /well ずつ plating し ADR, CDDP, MCNU を 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度下で 37°C (control), 42°C, 43°C 1 時間加温した. ADR, CDDP, MCNU のすべての抗癌剤で, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ~ 2.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度において, 温度依存性に併用殺細胞効果が認められた.

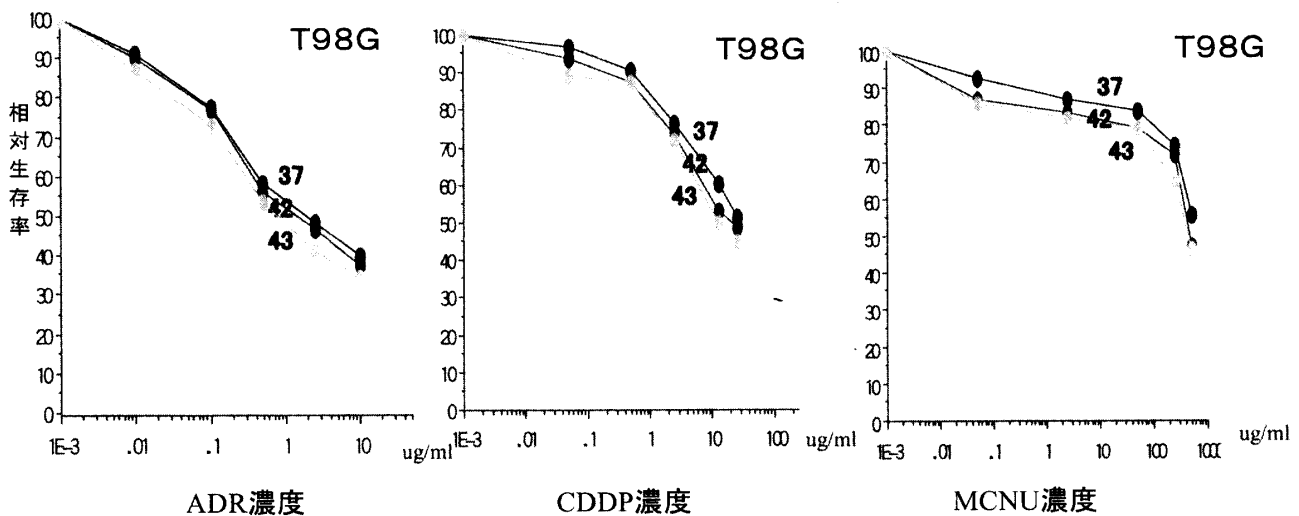


図6 T98G 抗癌剤と温熱の併用効果

T98G細胞を 1×10^4 /well ずつ plating し ADR, CDDP, MCNU を 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度下で 37°C (control), 42°C, 43°C 1 時間加温した. ADR, CDDP, MCNU のすべての抗癌剤で, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ~ 2.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度において, 温度依存性に併用殺細胞効果が認められた.

著であり, 特に温熱単独に比して, 両者併用群は有意な殺細胞効果が認められた ($p < 0.01$).

4. Inhibition concentration 50 (IC_{50})

C6, 9L, および T98G 細胞の IC_{50} は 37°C に比べ 42°C および 43°C では各抗癌剤がいずれも温度

の上昇と共に低下した (表 1).

5. Combination index (CI) による抗癌剤と温熱の併用効果の評価

通常悪性脳腫瘍に用いている 43°C で 60 分加温における各抗癌剤と温熱の併用効果を CI 方法で

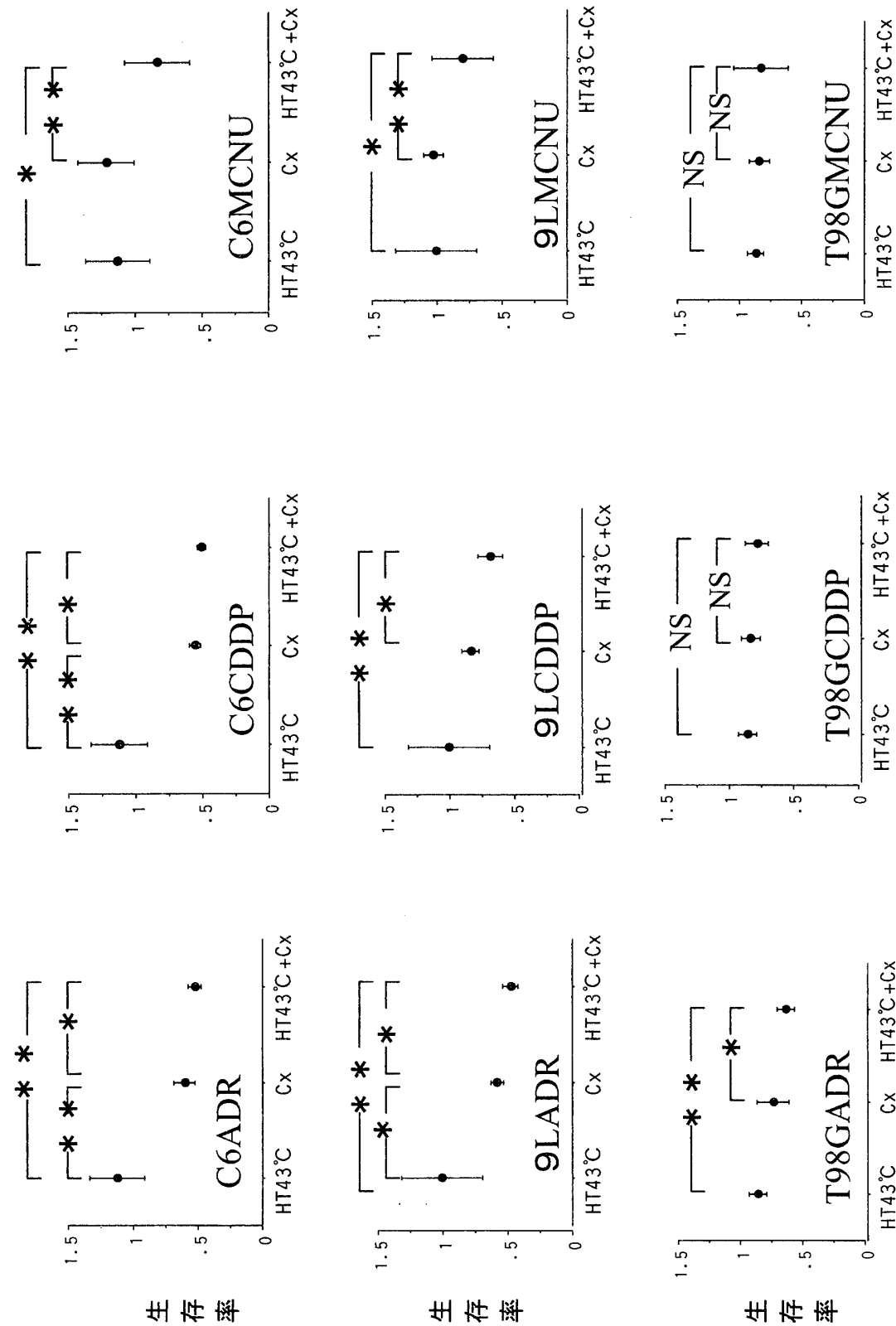


図7 温熱単独, 抗癌剤単独, 両者併用の比較
各抗癌剤0.5 μ g/mlの濃度で, インキュベーターで43 $^{\circ}$ C, 1時間加温を行った. 下記グラフのごとく, 温熱単独, 抗癌剤単独治療に比し, 両者併用群の殺細胞効果は特に顕著であった. 各群の比較は生存率を用いて比較し, その平均値の差の検定を行った.
(t-test) * : p<0.05, ** : p<0.01

表 1 各抗癌剤の 50%抑制濃度 (inhibition concentration 50: IC₅₀)
(μ g/ml)

(1-1)

The IC₅₀ values of **ADR** at various temperatures glioma cell lines (ug/ml)

Cell line	Temperature		
	37°C	42°C	43°C
C6	0.64	0.38	0.22
9L	0.39	0.28	0.18
T98G	20	15	7.9

(1-2)

The IC₅₀ values of **CDDP**

Cell line	Temperature		
	37°C	42°C	43°C
C6	1.12	0.39	0.13
9L	3.6	2.2	1.6
T98G	123	63	45

(1-3)

The IC₅₀ values of **MCNU**

Cell line	Temperature		
	37°C	42°C	43°C
C6	2.8	2.1	1.3
9L	19	15	11
T98G	490	450	410

表 2 温熱と抗癌剤の併用効果に関する combination index (CI) による評価

Cell line	Antineoplastic Agents		
	ADR	CDDP	MCNU
C6	0.9 (CI < 1)	0.94 (CI = 1)	0.6 (CI < 1)
9L	0.86 (CI < 1)	0.87 (CI < 1)	0.58 (CI < 1)
T98G	1.12 (CI = 1)	1.4 (CI > 1)	1.28 (CI > 1)

CI < 1 の場合を相乗作用, CI = 1 の場合を相加作用, CI > 1 の場合が拮抗作用と判定した.

評価したものを表 2 に表す。

C6, 9L 細胞に対して、抗癌剤と温熱 (43℃) の併用効果は $CI < 1$ で、相乗効果と認められた。ただし、C6 の CDDP 併用時は $CI = 1$ で、相加効果であった。

T98G 細胞に対して、抗癌剤と温熱 (43℃) の併用効果は ADR 併用時に $CI = 1$ で、相加効果が認められたものの、他は $CI > 1$ であった。T98G 細胞においては CDDP と MCNU では温熱との併用効果が認められなかった。

考 察

腫瘍細胞は正常細胞よりも熱感受性が高く、温熱に対する反応がより顕著であることは多くの *in vivo* および *in vitro* の研究によって知られている¹¹⁾。また腫瘍の中心部は低酸素、低栄養状態にあり、腫瘍の活発な解糖作用と相まって、pH は酸性に傾き、熱に対して感受性が高くなっている¹²⁾。さらに腫瘍血管は一般に正常血管に比べて構築も粗造で、神経支配もなく、正常血管より低い温度で障害を受けやすく、その結果として局所加温では腫瘍全体は血流による熱冷却効果も弱くなり、腫瘍は正常組織よりも加温されやすいと考えられている¹³⁾。

我々の施設ではこれまでに、悪性グリオーマに対する温熱療法について基礎的な並びに臨床的研究を行ってきており^{14)–16)}、RF 組織内加温法では実際に多くの症例において良好な治療効果を報告した¹⁷⁾。この方法では腫瘍は 43℃ 以上に加温するが、周囲の腫瘍浸潤域においては神経組織の保護のため 42℃ 60 分以上の加温は避けなければならず、加温単独の抗腫瘍効果は充分とはいえないものである。そこで腫瘍浸潤域の腫瘍細胞に対して温熱療法と化学療法を併用して行う治療法が期待される^{18)–19)}。

一方、悪性グリオーマの化学療法について考えた時、薬剤に対して耐性を獲得した細胞においても多くの場合、温熱に対する感受性には変化がなく、その上加温により耐性腫瘍細胞の抗癌剤に対する細胞毒性を増強することも知られており²⁰⁾、

その面からも温熱療法と化学療法の併用に対する期待は大きい。

現在悪性グリオーマの化学療法に頻用されている薬剤は脂溶性ニトロソウレア剤である ACNU とその副作用軽減の目的で臨床的に近年用いられている MCNU である。また、本来 BBB を通過しにくい薬剤と考えられてきたが臨床的に使われている抗癌剤に CDDP と ADR がある。また、この両剤は、温熱化学療法の観点からその併用効果が報告されており^{21)–25)}、我々も特に温熱の併用化学療法剤として注目してきた。そこで本研究ではこの ADR, CDDP, MCNU について検討した。

ADR の作用機序は DNA 構成塩基間に入り込み、RNA 合成および DNA ポリメラーゼ反応を阻害し、致死作用を示すものと考えられている。ADR の殺細胞作用発現には ADR が細胞内へ取り込まれることが必要である。ADR の細胞内への取り込みは加温温度が上昇すると増加し、細胞毒性は増感するという^{21)–23)}。CDDP は DNA 分子間に入り込み、DNA のグアニンと結合することで、殺細胞作用を示す。CDDP も加温により細胞内への取り込みが増加することも報告されている^{24)–25)}。また、アルキル化剤 MCNU は細胞膜を通過して、細胞内に入り、細胞内で活性化エチレンイミンを形成し、DNA 複製と RNA への転写が阻害される。MCNU は温熱による大きな増感作用の報告も散見される^{26)–28)}。

抗癌剤が作用するためには、薬剤が標的腫瘍細胞に充分浸透しなければ良好な結果が得られない。悪性グリオーマでは壊死巣とその周辺に毛細血管の豊富な腫瘍細胞巣が存在し、そこは低酸素状態でかつ栄養供給が悪く、この結果、抗癌剤の到達が悪く、放射線に抵抗性を示す。温熱療法は放射線に抵抗を示す低酸素状態の細胞で、細胞周期として S 期の細胞に有効であり、化学療法を増強する²⁹⁾。

一般に薬剤感受性・耐性の程度は腫瘍細胞株により相違が見られることが知られており、温熱・薬剤の併用効果を効率良く検討するため、今回は WST-1 assay 法を用いて各培養グリオーマ細胞

の温熱・抗癌剤に対する感受性を検討した。酸化還元発色試薬 WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene methosulfate) は PMS 還元型の存在下で細胞内の乳酸脱水素酵素などが関与した脱水素反応と共役する。この結果生じた WST-1 formazan は高い水溶性を持ち、黄色の呈色反応を起こし、比色定量が可能である。生成された formazan の色素量は細胞内の脱水素反応の活性に対応し、そのまま細胞の活性を示す。すなわち細胞増殖能に直接比例することとなる。この方法では可溶性のプロセスが不要で、大幅な時間短縮ができることや、formazan の安定性から、従来の MTT assay 法に比べ簡便性を有している³⁰⁾³²⁾³³⁾。また、薬剤の感受性を *invitro* で検討するのに多く用いられて来た colony formation assay は手技が複雑な上、時間も長くかかるという欠点があった³¹⁾。

今回、我々の用いたグリオーマ細胞株は C6, 9L, T98G の3株であり、ADR, CDDP, MCNU の化学療法単独での感受性を検討したところ、ADR に比して CDDP, MCNU においては T98G 細胞株は抵抗性を示した。また、加温単独の感受性の検討においても、T98G 細胞株は温熱に対しても抵抗性を示していた。一方、C6, 9L, 腫瘍細胞株では抗癌剤単独治療、温熱単独治療とともに両者併用の感受性は顕著に増強することが確認された。とくに MCNU においては化学療法単独では高濃度においてのみ殺細胞効果を示したが、温熱との併用においてはその効果に増強効果が認められ、温熱化学療法併用の有効性が高まる可能性を示したものと考えられた。

ADR, CDDP, MCNU の3種の抗癌剤においては、化学療法単独では MCNU の感受性が低かったものの加温との併用効果ではすべての薬剤で感受性が高まっていた。特に ADR は温熱との併用で、T98G 腫瘍株においても併用効果が認められ、今後の温熱化学療法として期待された。

一般に温熱と抗癌剤の併用効果を考える際、その相互作用は加温温度や加温時間、腫瘍細胞株によって様々な修飾を受けるため、客観的な評価が難しい。そこで複数の抗癌剤による併用効果が相

加ないし相乗効果であるかを判断するために Chou ら¹⁰⁾ により確立された CI の概念を温熱と抗癌剤の併用効果の判定に応用した馬場ら³⁷⁾ の方法を客観的評価法として用いた。これにより、相加、相乗、拮抗作用を簡便に定量でき^{22)34)–36)}、CI は温熱と抗癌剤の併用効果の評価に有用であった。

本研究で特に注目すべきは、殺細胞効果増強が 42℃60分の加温と抗癌剤併用において確認され、その作用が相加効果であったことである。このことは正常脳と浸潤腫瘍細胞が混在する悪性グリオーマの治療において極めて重要なことで、臨床における温熱化学療法の基盤となったものと考えられる。

結 語

1. C6, 9L, T98G の培養悪性グリオーマ細胞株に対する ADR, CDDP, MCNU と温熱の併用効果を WST-1 assay で検討した。
2. WST-1 assay は簡便かつ正確さや、感度も高く、温熱薬剤感受性の評価に応用可能と思われる。
3. 正常脳に障害を与えない 42℃, 60分加温と抗癌剤との併用で、脳腫瘍細胞に殺細胞効果の増強が認められた。ADR, CDDP, MCNU 薬剤は温熱化学療法に有用な薬剤と考える。
4. Combination index (CI) を用い、温熱と抗癌剤の併用効果の判定をおこない、その有効性を示した。

謝 辞

最後に、ご指導いただいた新潟大学脳研究所脳神経外科田中隆一教授に深甚なる謝意を表すと共に、直接実験にご協力いただきました高橋英明講師を始め、貴重なご助言をいただいた宇塚岳夫先生、山中龍也先生、青木洋先生、遠藤 深先生、森田幸太郎先生、柿沼健一先生に深謝いたします。また、本研究を進めるに当たり絶えずご協力いただきました森山幸子さん、東樹浩子さん、白川容子さん、山田澄子さん、倉松陸子さんに感謝いたします。

本要旨は日本ハイパーサーミア学会第 18 回大会において発表した。

文 献

- 1) Hahn GM: Hyperthermia and cancer. Plenum Press, New York, pp84 1982.
- 2) Takahashi S, Tanaka R, Watanabe M, Takahashi H, Kakinuma K, Suda T and Yamada M: Effects of wholebody hyperthermia on the canine central nervous system. *Int J Hyperthermia* 15: 203-216 1999.
- 3) Sugimachi K, Kitamura K, Baba K, Ikebe M, Morita M, Matsuda H and Kuwano H: Hyperthermia combined with chemotherapy and irradiation for patients with carcinoma of the esophagus: a prospective randomized trial. *Int J Hyperthermia* 8: 289-295 1992.
- 4) 柿沼健一, 田中隆一, 加藤 仁, 高橋英明, 高橋 祥: 温熱増感剤としての熱感受性リポソーム. *Jpn J Hyperthermic Oncol* 14: 87-97 1998.
- 5) 柿沼健一, 田中隆一, 高橋英明, 加藤 仁: 悪性脳腫瘍に対する熱感受性リポソームと脳組織内加温による化学療法. *Drug Delivery System* 11: 361-354 1996.
- 6) 原田 廉, 木矢克造, 小林益樹, 武田哲二, 向田一敏, 魚住 徹: 新水溶性ニトロソウレア制ガン剤 MCNU 脳腫瘍患者における生体内動態. *癌と化学療法* 8: 735-742 1981.
- 7) Ishiyama M, Sasamoto K, Mizoguchi M and Pingang H: A New Sulfonated Tetrazolium Salt Produces a Highly Water-soluble Formazan Dye. *Chem Pharm Bull* 41: 1118-1122 1993.
- 8) Scudiero DA, Shaemaker RH, Paull KD, Monks A, Toerney S and Nofziger TH: Evaluation of Tetrazolium / Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and other Tumor Cell line. *Cancer Res* 8: 4827-4833 1988.
- 9) Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM and Glasebrook AL: An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods* 142: 257-265 1991.
- 10) Chou TC and Talalay P: Quantitative analysis of dose effect relationships. The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22: 27-55 1994.
- 11) Fiese SB and Morris CC: The relationship between heating time and temperature: Its relevance to clinical hyperthermia. *Radiother Oncol* 1: 179-186 1983.
- 12) Gerweck LE: Modification of cell lethality at elevated temperatures: The pH effect. *Radiat Res* 70: 224-235 1977.
- 13) Song CW: Effect of hyperthermia on vascular functions of normal tissues and experimental tumors: Brief Communication. *J Natl Cancer Inst* 60: 711-713 1987.
- 14) Tanaka R, Kim CH and Yamada N: Radio-frequency hyperthermia for malignant brain tumors. *Neurosurgery* 21: 478-483 1987.
- 15) 高橋英明, 田中隆一, 渡辺正人, 中島 拓, 柿沼健一, 須田 剛, 高橋 祥, 増田 浩, 松田甚一, 加藤和夫, 久保誠雄, 加藤暁紀: 脳腫瘍に対する温熱療法のための温度分布シミュレーション—二次元有限要素解析による computer simulation. *Jpn J Hyperthermic Oncol* 11: 356-363 1995.
- 16) Takahashi H, Tanaka R., Hondo H, Nakajima T, Watanabe M, Sekihara, Y and Kakinuma K: Clinical experiences of RF hyperthermia for malignant brain tumors. *Neurosurgeons* 12: 245-255 1993 (in Japanese).
- 17) Tanaka R, Takahashi H, Nakajima T, Watanabe M, Suda T and Kakinuma K: Clinical trials of RF interstitial hyperthermia for malignant glioma: *Hyperthermic Oncology*, 1996, Vol. I, Proceedings of the 7th ICHO, Rome, pp158-160
- 18) Kakinuma K, Tanaka R, Takahashi H, Watanabe M, Nakagawa T and Kuroki M: Targeting chemotherapy for malignant brain tumor using thermosensitive liposome and localized hyperthermia. *J Neurosurg* 84: 180-184 1996.
- 19) Kakinuma K, Tanaka R, Takahashi H, Sekihara Y, Watanabe M and Kuroki M: Drug delivery to the brain using thermo-

- sensitive liposome and local hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2: 157-165 1996.
- 20) 植田和光：抗癌剤に付して膜輸送機構の変化を介した耐性機構. *日本臨床* 55: 1024-1029 1997.
- 21) Herman TS: Temperature dependence of adriamycin, cis-diamminedichloroplatinum, bleomycin, and 1, 3-bis (2-chloroethyl) - 1-nitrosourea cytotoxicity in vitro. *Cancer Res* 43: 517-520 1983.
- 22) Nagaoka S, Kawasaki S, Sasaki K and Nakanishi T: Intracellular uptake, retention, and cytotoxic effect of adriamycin combined with hyperthermia in vitro. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 77: 205-211 1986.
- 23) 川崎祥二, 佐々木功典, 長岡 栄, 江部和勇, 中西敬, 高橋 学: Adriamycin の細胞内取り込みへの hyperthermia の影響. *日本医学放射線学会雑誌*, 44: 727-731 1984.
- 24) 坂本泰宏, 柳谷謙一, 間野和哉, 高戸 毅, 赤川徹弥: CDDP を用いた温熱化学療法の薬剤投与時期に関する基礎的検索. *日本口腔科学会誌*, 43: 128-134 1994.
- 25) Mizuuchi H, Yoshida K, Sakurai K, Tsumura M and Takada K: Anticancer effect of carboplatin combined with hyperthermia on Ehrlich-ascites tumor in vivo. *Anticancer Res* 16: 381-388 1996.
- 26) Hahn GM: Potential for therapy of drugs and hyperthermia. *Cancer Res* 39: 2264-2268 1979.
- 27) Frankfurt OS, Seckinger D and Sugarbaker EM: Flow Cytometric analysis of DNA damage and repair in the cell resistant to alkylating agents. *Cancer Res* 50: 4453-4457 1990.
- 28) Sieman DW, Chapman M and Beikirch A: Effects of oxygenation and pH on tumor cell response to alkylating chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 20: 287-289 1991.
- 29) Salzman M and Samras GM: Hyperthermia for brain tumors: Biophysical rationale. *Neurosurgery* 9: 327-335 1981.
- 30) 高松範雄：加齢および Alzheimer 病によるリンパ球幼若化能の変化—WST-1 法による測定. *日老医誌* 35: 535-541 1998.
- 31) Hamburger AW and Salmon SE: Primary bioassay of human stem cell. *Science* 197: 461-463 1977.
- 32) Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 65: 55-63 1983.
- 33) Von Hoff DD: He is not talking about in vitro drug sensitivity testing again, is he? *J Nat Cancer Inst* 82: 96-101 1990.
- 34) Baba H, Siddik ZH, Sterebel FR, Jenkins GN and Bull JM: Increased therapeutic gain of combined cis-diammine-dichloro-platinum (II) and whole body hyperthermia by optimal heat/drug scheduling. *Cancer Res* 49: 7041-7044 1989.
- 35) Wallner KE, Banda, M and Li GC: Hyperthermia enhancement of cell killing by mitomycin C in mitomycin C-resistant Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 47: 1308-1312 1987.
- 36) 馬場秀夫：温熱と抗癌剤の併用効果に関する基礎的検討. *日本ハイパーサーミア誌* 11: 9-12 1995.

(平成14年1月11日受付)