

グリオーマに対する ACNU・放射線併用療法の基礎的研究

—ACNU の細胞周期内進行に及ぼす効果と
放射線の併用時期—

新潟大学脳研究所脳神経外科学部門（主任：田中隆一教授）

村上直人

Role of ACNU-induced Cell Cycle Perturbations in
Enhancing Effect on Radiotherapy

Naoto MURAKAMI

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

The cell cycle perturbations induced by ACNU and their role in enhancing effect on radiotherapy were studied using C₆ rat glioma cells.

The cell cycle perturbations were analyzed with flow cytometry from 3 to 72 hours after ACNU treatment. The major effect of ACNU on cell cycle progression was G₂M accumulation. Alteration of the DNA histograms after exposure to ACNU (10, 25 μg/ml) showed common features; the G₂M accumulation increased to a maximum at 24hr, remained by 30hr, then decreased gradually. From these analyses, the temporal course of accumulation to G₂M phase of cell cycle in the presence of ACNU (10, 25 μg/ml) was demonstrated.

To examine whether the G₂M accumulation induced by ACNU is responsible for the potentiation of irradiation, the following study was performed. Cells were irradiated (6 Gy) at various time intervals after ACNU treatment (25 μg/ml, 1hr), and post-treatment survival was assessed by colony forming assay. All survival values obtained from the combination treatment schedules were normalized for the ACNU cell kill and then compared with the survival value obtained after irradiation alone. It appeared that combined treatment had a similar synergistic effect in all combination schedules.

From these studies, it was concluded that the G₂M accumulation induced by ACNU

Reprint requests to: Naoto MURAKAMI,
Department of Neurosurgery, Tsubame
Rousai Hospital, Tsubame City, 959-12,
JAPAN.

別刷請求先：〒959-12 新潟県燕市大字佐渡 633
燕労災病院脳神経外科

村上直人

would not be the partial synchronization as the mechanism responsible for the potentiation of irradiation.

Key words: cell cycle perturbation, flow cytometry, ACNU, C₆ cells, chemo-radiotherapy
細胞周期移行阻害, フローサイトメトリー, ACNU, C₆細胞, 化学放射線療法

I. はじめに

悪性グリオーマに対する化学療法剤の中で、現在最も効果的と考えられているのはニトロソウレア系薬剤である¹⁾。本邦では ACNU が主として用いられ、放射線との併用による有効性が実験的にも²⁾³⁾、臨床的にも⁴⁾ 確認されている。どのような併用スケジュールが効果的かについても種々の検討がなされているが³⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾、未だ一定の結論は得られていない。

近年、化学療法剤と放射線との併用においては化学療法剤による腫瘍細胞同調効果が重要視され⁸⁾、ACNU にも細胞同調効果を期待できる可能性が示唆されている⁹⁾。しかし、ACNU による放射線感受性の増強が細胞同調効果に基づくものかどうかに関しては、十分解明されていない。

今回、効果的な同調化学放射線療法を確立する目的で、*in vitro* における ACNU の抗腫瘍性ならびに cell progression に及ぼす効果を詳細に検討するとともに、放射線を併用して同調効果が認められるかどうかを検討したので報告する。

II. 材料および方法

1. 腫瘍細胞および培養

腫瘍細胞は N-nitrosomethylurea 誘発のラットグリオーマ細胞 (C₆細胞) を用い、培養は10% fetal bovine serum 加 TC-199 培養液 (Nissui) にて37°C、5% CO₂ 培養器内で単層培養した。本細胞の対数増殖期における平均倍加時間は約19時間であった。

2. ACNU 処理および放射線照射

ACNU は蒸留水にて溶解し、適当濃度に希釈したのち一定量を培養液に添加して最終濃度が目的の濃度になるよう調整した。放射線照射は ⁶⁰Co 遠隔照射装置を用いて、焦点表面間距離 80 cm、0.6 Gy/min の条件で室温にて行なった。

ACNU 処理の終わった細胞は培養液を取り除き、Hanks 液で2回細胞表面を洗ってから以後の実験に利用した。放射線照射終了後は直ちに培養液を新しいものと交換した。

3. Flow cytometry

細胞を0.01% EDTA 含有0.02% trypsin により採集し、PBS で2回遠心洗浄 (1,500 rpm, 5分) 後75% ethanol で4°Cにて固定した。固定の終わった細胞は PBS で2回遠心洗浄、0.1% RNAase で37°C、20分間処理したのち pepsin 液 (0.01% pepsin, 0.2% HCl 溶液) にて37°C、15分処理し裸核化した。その後 PBS で遠心洗浄をしてから ethidium bromide 液 (ethidium bromide 1 mg/0.1 M Tris-HCl buffer, 10 ml) による DNA 染色 (室温, 30分) を行なった。

各細胞集団の DNA 量は Cytofluorograf (Ortho) で解析し、得られた DNA ヒストグラムから細胞周期各期の分布を分析した。各ヒストグラムの作成には 1×10⁵ 個の細胞 DNA を計数した。

4. 実験方法

1) ACNU の抗腫瘍効果

抗腫瘍効果を細胞増殖曲線とコロニー法で検討した。

細胞増殖曲線の作成には 75 cm² Falcon tissue culture flask を用い、2×10⁶ 個の細胞を移植し 20 ml の培養液で培養した。培養開始48時間後、細胞が対数増殖期に移行した時点で ACNU を添加し、24時間毎に生細胞数を算定した。生細胞数の算定にはおのおの3個の flask を用い、trypan-blue dye exclusion 法により非染色細胞数を計数した。対照には同量の蒸留水のみを添加した。

コロニー法の概略は以下の通りである。まず対数増殖期にある細胞を前述の trypsin で処理後、数回ピペティングして単離細胞浮遊液を作成した。これを適当濃度にして 60 mm プラスチックシャーレ (Falcon) に植え込み、12時間後細胞がシャーレ底面に付着して対数増殖を始める時期に ACNU を添加した。治療の終わった細胞は新しい培養液でさらに10日間培養し、10% formalin 固定および Giemsa 染色を行ない、50個以上の細胞から成るコロニーを計数して細胞生存率を算定した。細胞生存率の算定には3個以上のシャーレを用い、平均値±標準誤差を求めて生存曲線を作成した。

なお対照のコロニー形成率は、全実験を通じて50~70%であった。

2) ACNU の cell progression に及ぼす効果

対数増殖期にある細胞を最終濃度 10, 25, 100 $\mu\text{g/ml}$ の ACNU で持続および 1 時間処理し, その後の DNA ヒストグラムの変化を, Cytofluorograf により 72 時間後まで経時的に分析した. 対照として蒸留水のみを添加した細胞群も, 同様に分析した.

3) ACNU と放射線との併用時期および併用効果

併用時期を変化させて, 放射線の抗腫瘍効果が ACNU によって増強される (相乗効果) かどうかをコロニー法で検討した. 併用時期は flow cytometry 施行の時期と一致させ, ACNU の cell progression に及ぼす効果が最も効果的な併用時期とどのように関連するかについても検討した. ACNU の濃度は一定とし, 持続処理および 1 時間処理の両者で検討した.

III. 結 果

1. ACNU の抗腫瘍効果

細胞増殖曲線では, 濃度依存的な増殖抑制効果を認め

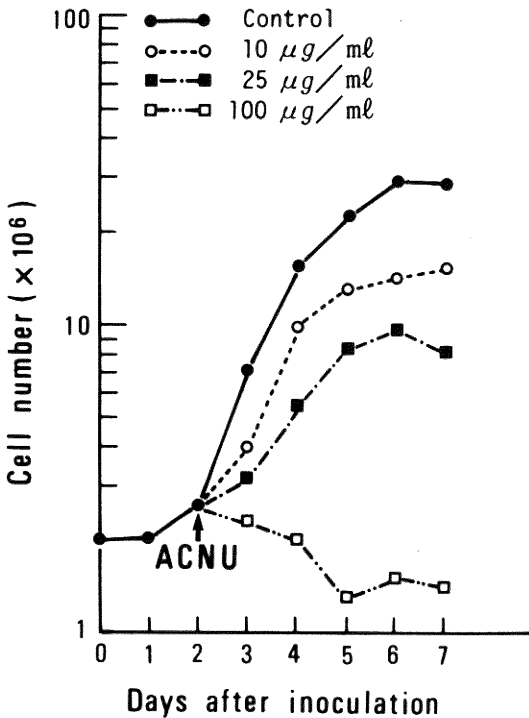


Fig. 1 Growth of C_6 rat glioma cells treated with various dose of ACNU: 10 (\circ), 25 (\blacksquare), and 100 $\mu\text{g/ml}$ (\square).

た (Fig. 1).

すなわち, 10, 25 $\mu\text{g/ml}$ 処理では一定期間増殖速度が減少した後に増殖が停止した. 最終的な増殖抑制効果は, 10 $\mu\text{g/ml}$ よりも 25 $\mu\text{g/ml}$ でより著明であった. 100 $\mu\text{g/ml}$ では, 当初より増殖は停止し細胞数は数日間かけて徐々に減少した.

ACNU 1 時間処理を行なった場合の用量生存曲線は, 50 $\mu\text{g/ml}$ まではゆるやかに生存率が減少しそれ以上の濃度で指数関数的に生存率が減少する, threshold-type となった. 増殖が完全に抑制される 100 $\mu\text{g/ml}$ での殺細胞効果は 99.6% であった (Fig. 2).

2. ACNU の cell progression に及ぼす効果

ACNU 持続処理および 1 時間処理とも共通した DNA ヒストグラムの変化を示した. すなわち, 濃度が高くなるほど G_2M 期に相当する DNA 量を有する細胞の比率が増加し, 対照群のパターンに戻りにくくなる傾向が認められた.

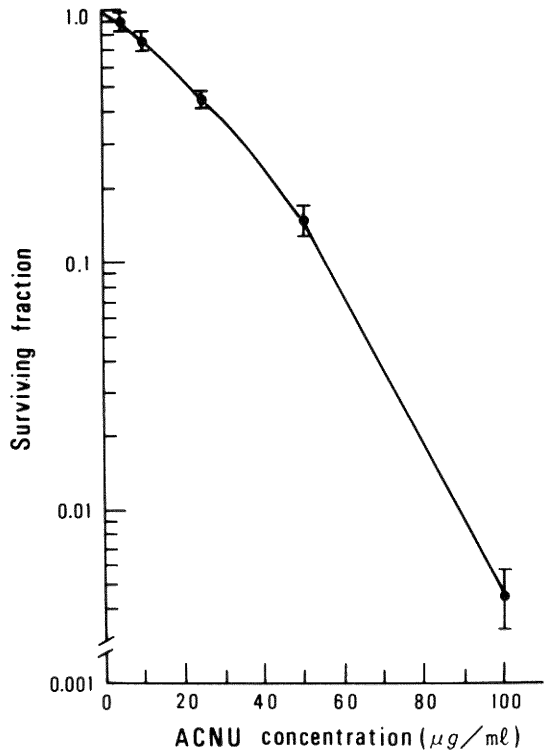


Fig. 2 Dose survival curve of cultured C_6 cells treated for 1 hr with ACNU. Each point represents the mean and the bar do the standard error in this and all subsequent survival curves.

持続処理での DNA ヒストグラムの変化を検討すると、10, 25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では6時間後より徐々に G_1 期細胞群が減少するとともに G_2M 期細胞群が増加し、24~30時間後に G_2M 期への細胞集積（以下 G_2M 集積）が最大となった。その後は時間経過とともに対照群の DNA ヒストグラムに戻り、72時間後にはほぼ対照群に類似したパターンとなった（Fig. 3, 4）。100 $\mu\text{g/ml}$ では、 G_1 期細胞群の減少および G_2M 集積は72時間後まで持続し、さらに48時間以降には壊れた DNA を持つと考えられる、 G_1 期細胞群よりも DNA 量の少ない細胞群が出現した（Fig. 5）。

1時間処理では、 G_2M 集積の程度は持続処理の場合よりも軽くなるが、DNA ヒストグラムの経時的変化は持続処理の場合と類似の傾向を示した（Fig. 6）。

以上より、ACNU により引き起こされる主な変化は G_2M 集積であり、また増殖を完全に抑制する濃度以下では G_2M 集積は一過性であることが明らかとなった。

3. ACNU と放射線との併用時期および併用効果

1) ACNU 24時間処理と放射線との併用

ACNU 濃度を 25 $\mu\text{g/ml}$ と一定にし、放射線照射の前後に ACNU を併用して殺細胞効果を検討した。照射線量は 0~10 Gy と変化させ放射線単独の生存曲線と、放射線に ACNU を併用した場合の生存曲線とを比較した。なお放射線に ACNU を併用した場合の生存曲線は ACNU 単独の効果を差し引いて示してあり、併用療法の生存曲線の方が放射線単独の場合よりも下方にあれば、相乗効果といえる¹⁰⁾。

その結果、照射終了後に ACNU を併用しても併用効果は相加的であることが分かった（Fig. 7）。一方照射の前に ACNU 処理を行なうと、併用の場合の生存曲線は放射線単独の生存曲線より下方に偏位し、軽度ながら相乗効果が認められた（Fig. 8）。ここで、放射線単独の生存曲線が Fig. 7 に比べ Fig. 8 でより大

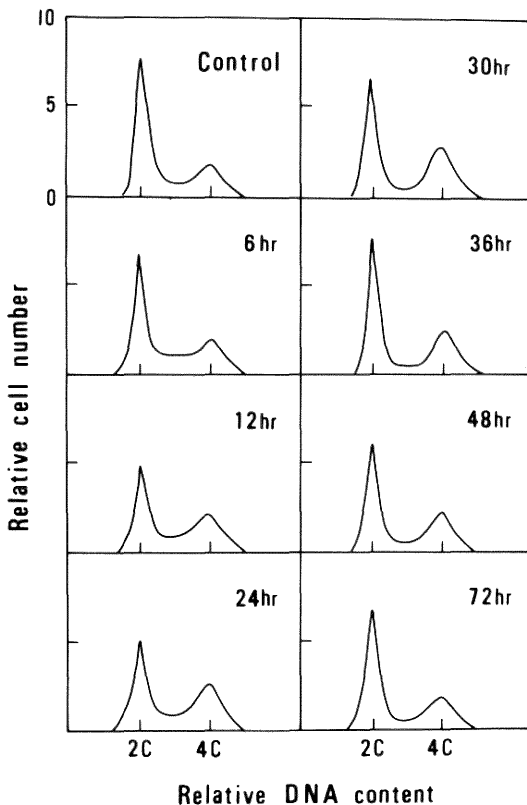


Fig. 3 Flow cytometric analysis of C_6 cells exposed to ACNU (10 $\mu\text{g/ml}$).

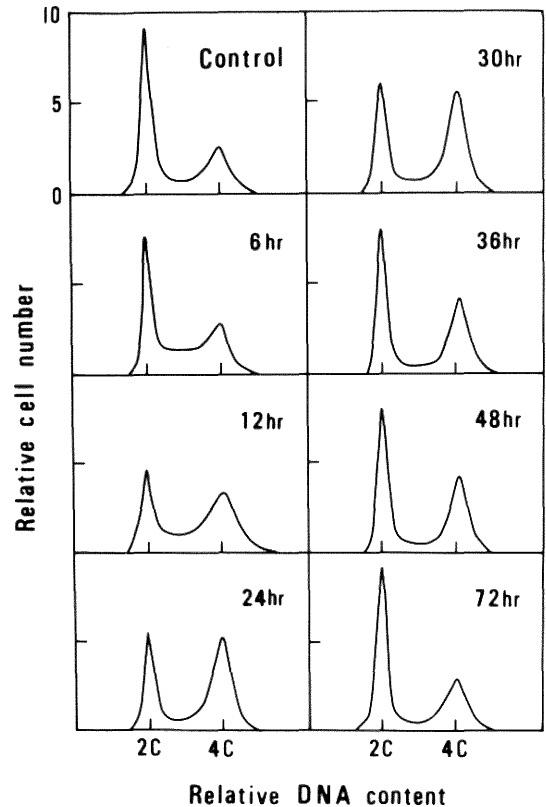


Fig. 4 Flow cytometric analysis of C_6 cells exposed to ACNU (25 $\mu\text{g/ml}$).

きな肩を持つのは、細胞を植えてから照射する迄の時間が Fig. 8の方が長く、その間に細胞が分裂増加しているためである。

以上、ACNU と放射線との併用では放射線照射前に ACNU を併用するのが、より効果的であるとの結果を得た。

2) ACNU 1時間処理と放射線との併用

ACNU と放射線との併用において、どのような併用時期が最も効果的であるかを検討する目的で以下の実験を行なった。

ACNU の濃度を 25 $\mu\text{g/ml}$ 、照射線量を 6 Gy と一定にして、ACNU 処理後に種々の間隔で放射線を併用し、併用時期の違いによる放射線増強効果の差を比較検討した。併用時期は、ACNU 処理直後 (0時間)、3、6、12、24、30、48、72時間後とした。

その結果、調べた併用時期すべてにおいてほぼ同程度の相乗効果が認められた。12時間後併用で最も相乗効果

が強い傾向を認めたが、有意な差ではなかった (Fig. 9)。なお、併用療法の場合の生存率は ACNU 単独の効果差を差し引いて示してある。

IV. 考 察

化学療法剤と放射線との併用では、化学療法剤による分裂細胞の同調効果が重要視されている⁸⁾。悪性グリオーマの治療でも、同調効果を期待した化学療法剤と放射線との併用が試みられているが¹¹⁾⁻¹⁴⁾、未だ十分満足できる結果は得られていない。

ACNU は悪性グリオーマに対する第一選択薬剤と考えられ、放射線との併用効果も確認されている⁴⁾。しかし ACNU による放射線感受性の増強が同調効果によるのかどうかに関する基礎的検討は十分なされていない。

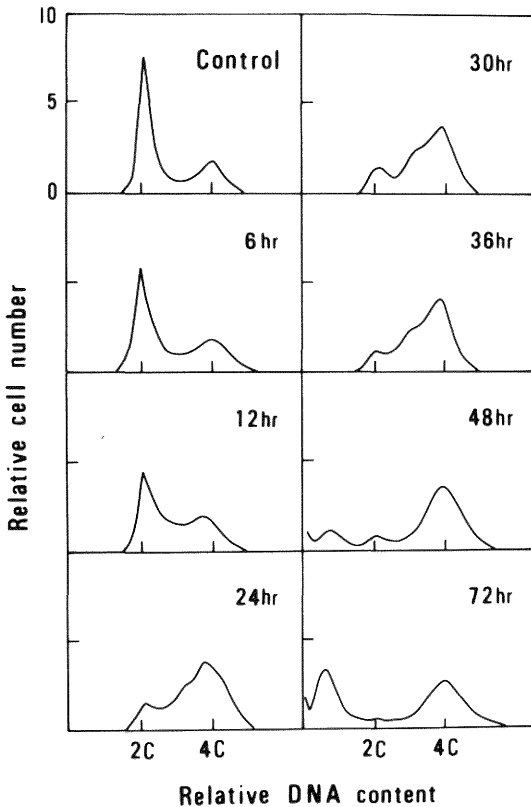


Fig. 5 Flow cytometric analysis of C₆ cells exposed to ACNU (100 $\mu\text{g/ml}$).

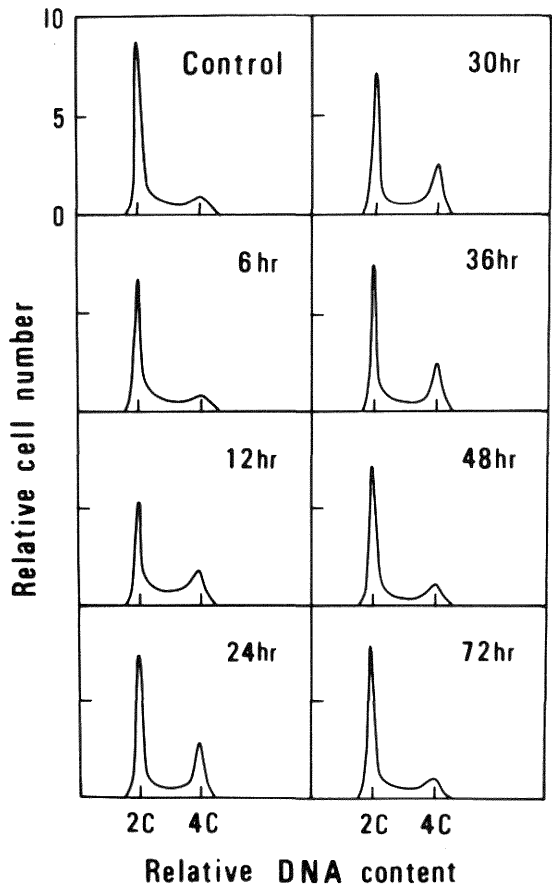


Fig. 6 Flow cytometric analysis of C₆ cells treated for 1 hr with ACNU (25 $\mu\text{g/ml}$).

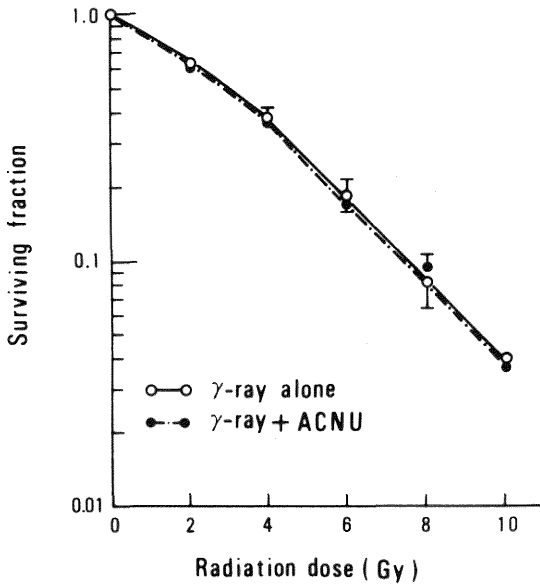


Fig. 7 Survival curves of cultured C₆ cells treated for 24 hr with ACNU after irradiation. Survival values in the combination protocols were normalized for the ACNU kill. γ -ray alone (○), γ -ray+25 μ g/ml of ACNU (●).

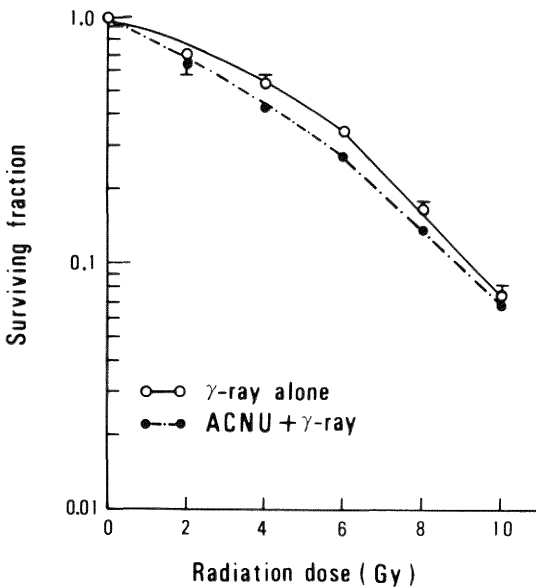


Fig. 8 Survival curves of cultured C₆ cells treated for 24 hr with ACNU before irradiation. Survival values in the combined treatment were normalized for the ACNU kill. γ -ray alone (○), 25 μ g/ml of ACNU+ γ -ray (●).

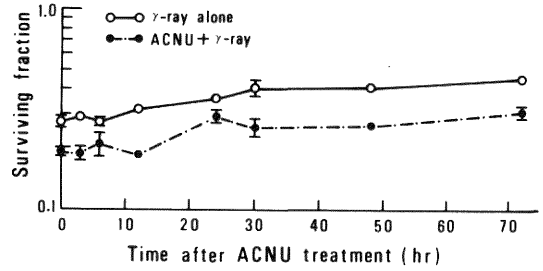


Fig. 9 Schedule dependence of the combined treatment of ACNU and irradiation. Cells were irradiated with γ -ray (6 Gy) at various time intervals after ACNU treatment (25 μ g/ml, 1 hr). Survival values in the combined treatment were normalized for the ACNU kill. γ -ray alone (○), 25 μ g/ml of ACNU+6 Gy of γ -ray (●).

近年化学療法剤の cell progression に及ぼす影響が検討されるようになり、ACNU には G₂M 集積効果のあることが報告されている⁹⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。そこで、G₂M 集積が同調効果と考えられるのかどうかを、G₂M 集積が最大となる時期およびその前後に放射線照射を行なって、放射線感受性増強効果に差があるかどうかで検討した。

まず flow cytometry により ACNU の G₂M 集積効果を種々の濃度で72時間まで経時的に追跡した。その結果、ACNU の各濃度 (10, 25, 100 μ g/ml) で G₂M 集積が認められたが、細胞増殖を完全に抑制する高濃度 (100 μ g/ml) を除いて G₂M 集積は一過性であった。すなわち 10, 25 μ g/ml の ACNU 処理では、持続処理・1時間処理とも24~30時間後に G₂M 集積が最大となるが、その後次第に軽減して72時間後にはほぼ G₂M 集積は消失した。

設楽⁹⁾は同じ C₆ 細胞で、ACNU (10 μ g/ml) 処理後72時間まで G₂M 集積が持続すると報告しているが、野村ら¹⁸⁾は、10 μ g/ml 処理後24時間に G₂M 集積を認めるが48時間、72時間では G₂M 期の細胞が減少していると述べている。当施設で行なったヒトグリオーマ細胞株 (NP-1, NP-2, NP-3) による検討でも、増殖を完全に抑制する濃度よりも低い濃度での G₂M 集積は72時間までに軽快する傾向があり¹⁹⁾、低濃度の ACNU による G₂M 集積効果は一過性であると考えられた。

実際、臨床的に達成可能な腫瘍内 ACNU 濃度はせいぜい 3.8 μ g/ml 程度であり²⁰⁾、臨床的に引き起こされる G₂M 集積も恐らく一時的なものであろうと推察

される。

つぎに、ACNU と放射線との併用時期の違いにより殺細胞効果に差があるかどうかを検討した。ACNU (25 $\mu\text{g/ml}$) 持続処理と放射線との併用では、照射後に ACNU 処理を行なっても相加的效果であったが、ACNU 処理後照射では照射線量にかかわらず相乗の効果を確認した。ACNU (25 $\mu\text{g/ml}$) 1 時間処理後、種々の併用時期に照射を行なって細胞生存率を算定すると、ACNU 直後、3, 6, 12, 24, 30, 48, 72 時間後いずれの併用でも同程度の相乗効果が認められた。

flow cytometry による分析から ACNU (25 $\mu\text{g/ml}$) による G_2M 集積効果は 24~30 時間後に最大となることが分かっており、以上の結果は、そのような時期に放射線照射を併用しても特に優れた相乗効果をもたらさないことを示したものと考えられた。したがって、ACNU により誘導される G_2M 集積は分裂細胞の同調効果とは異なるものである可能性が示唆された。ACNU 持続処理と放射線との併用でも、持続処理の方が 1 時間処理よりも明らかに G_2M 集積効果が強いにもかかわらずそれ程強い相乗効果を示さなかったことも、この考えを支持する結果と考えられた。

Wheeler ら²¹⁾ は、BCNU の放射線感受性に対する効果を検討し、相乗効果の機序として BCNU の部分同調を完全に除くことはできないが可能性は少ないと述べており、今回の結果と一致する報告をしている。

ACNU による G_2M 集積効果に関して、野村ら¹⁸⁾ は治療前 SG_2M 期細胞数に対する治療後 SG_2M 期細胞数の増減の割合で、ACNU に対する感受性を推測できる可能性があるとして述べており、 G_2M 集積効果は ACNU の細胞障害の程度を反映しているのかもしれない。今回の実験でも、増殖抑制効果および殺細胞効果が強くなるほど G_2M 集積が高度となっており、このような可能性が推察された。Tobey ら²²⁾ は、CHO cell で BCNU, CCNU, Me-CCNU の cell progression に及ぼす効果を検討し、 G_2 で阻止される細胞は最初に死に至る細胞に含まれると述べている。しかし、ACNU によって G_2M に集積される細胞が死に至る運命にあるかどうかに関しては不明であり、今後さらに詳細な検討が必要である。

ACNU と放射線との効果的な併用時期に関しては、in vivo の実験から、鈴木ら³⁾ は同時併用が、金子ら⁵⁾ は ACNU 投与 1 時間後の照射併用が、最も効果的と報告している。in vitro では、単層培養において、ACNU 後 44 時間²⁾、2~24 時間⁶⁾ に照射して相乗効果を見たとき、スフェロイドにおいては、ACNU 後 0~24 時間⁶⁾、

2~8 時間⁷⁾ の照射で相乗効果が見られている。いずれの報告も放射線照射の前に ACNU を投与するのが効果的としており、著者の結果と一致する結果であった。しかし本研究で、ACNU 後 72 時間までの長時間にわたって相乗効果を確認した理由は不明である。

ACNU と放射線との併用における相乗効果発現機序に関しては、BCNU, CCNU での研究結果²³⁾ から推論されるにとどまっておき、そこに述べられているように、薬剤による sublethal damage と放射線による sublethal damage との組み合わせによる可能性が考えられている。この点に関しては今後さらに検討が必要であるが、そのような検討から一層効果的な併用スケジュールが開発されることが期待されるものと考えられる。

V. ま と め

1. ACNU による放射線感受性の増強が細胞同調効果に基づくものかどうかを、 C_6 細胞を用いて in vitro で検討した。

2. ACNU の cell progression に及ぼす影響を flow cytometry で 72 時間まで経時的に分析すると、主なる変化は 24~30 時間後に最大となる一過性の G_2M 集積であった。

3. ACNU 処理後 0~72 時間に照射を行なって細胞生存率を算定すると、いずれの併用スケジュールでもほぼ同程度の相乗効果であった。

4. 以上より ACNU に誘導される G_2M 集積は、細胞同調効果とは異なるものである可能性が示唆された。したがって、ACNU と放射線との併用における相乗効果発現の機序は、同調効果とは異なる機序による可能性が考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました田中隆一教授に深甚なる謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Kornblith, P.L. and Walker, M.: Chemotherapy for malignant gliomas. J Neurosurg, 68: 1~17, 1988.
- 2) 中川秀光, 堀 正治, 長谷川洋, 最上平太郎, 早川徹, 中田陽造: 実験脳腫瘍に対するニトロソウレア系制癌剤 ACNU と放射線の併用効果—in vitro および in vivo における細胞増殖抑制効果の検討—。脳神経, 31: 927~936, 1979.
- 3) 鈴木康夫, 田中隆一: 実験脳腫瘍に対する ACNU

- の抗腫瘍効果. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, **20**: 405~413, 1980.
- 4) **Takakura, K., Abe, H., Tanaka, R., Kitamura, K., Miwa, T., Takeuchi, K., Yamamoto, S., Kageyama, N., Handa, H., Mogami, H., Nishimoto, A., Uozumi, T., Matsutani, M. and Nomura, K.**: Effects of ACNU and radiotherapy on malignant glioma. *J Neurosurg*, **64**: 53~57, 1986.
- 5) **金子貞男, Allen, N.J., Clendenon, N.R. and Kartha, M.**: 悪性脳腫瘍に対する放射線照射と ACNU の併用タイミングについて. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, **23**: 849~855, 1983.
- 6) **杉山 聡, 森 照明, 鈴木二郎, 佐々木武仁**: グリオーマ細胞に対する X線と ACNU の併用効果, 単層培養細胞と多細胞スフェロイドにおける解析. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, **25**: 707~714, 1985.
- 7) **増山祥二, 片倉隆一, 高橋 康, 北原正和, 鈴木二郎, 佐々木武仁**: ヒトグリオブラストーマ細胞のスフェロイドにおける ACNU と X線との併用による殺細胞効果増強作用. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, **29**: 1070~1077, 1989.
- 8) **寺島東洋三**: 細胞周期依存的感受性変動にもとづいた腫瘍治療の考え方. *癌と化療*, **1**: 533~541, 1974.
- 9) **設楽信行**: 脳腫瘍の Cellular Synchronization-Radiation Therapy に関する基礎的研究ならびに臨床例の解析. *神経進歩*, **22**: 119~131, 1978.
- 10) **渡部郁雄, 寺島東洋三**: 化学療法と放射線の併用, その生物学的基礎. *癌・放射線療法 (癌の臨床別冊)*. 篠原出版, 1978. p. 35~40.
- 11) **高倉公朋**: 脳腫瘍の Synchronized Chemo-radiotherapy. *神経進歩*, **26**: 105~111, 1982.
- 12) **柴田尚武**: グリオーマに対する術後放射線, 同調化放射線化学, 放射線化学免疫療法の検討—ACNU を中心として—. *Prog. Med.*, **2**: 1237~1246, 1982.
- 13) **田中隆一, 村上直人, 鈴木康夫, 武田憲夫, 新井弘之, 今野公和, 谷村憲一**: 悪性脳腫瘍に対する bleomycin, ACNU, vincristine 併用照射療法, 腫瘍縮小効果について. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, **24**: 557~563, 1984.
- 14) **会田敏光, 杉本信志, 徳田耕一, 阿部 弘, 伊古田俊夫, 伊藤輝史, 上野一義, 柏葉 武, 金子貞男, 河本 俊, 北岡憲一, 齊藤久壽, 佐藤正治, 中川翼, 三森研自**: 悪性グリオーマに対する放射線化学療法. *日癌治*, **25**: 952~959, 1990.
- 15) **朝村光雄, 金丸龍之介, 佐藤春彦, 斎藤達雄**: ACNU の阻害動態. *最新医学*, **32**: 1417~1419, 1977.
- 16) **金沢春幸, 宮本忠昭**: 水溶性ニトロソウレア系抗癌剤 ACNU の培養 HeLa S₃ 細胞に対する細胞致死効果および細胞周期内進行におよぼす影響. *癌と化療*, **10**: 2007~2015, 1983.
- 17) **Genka, S., Shitara, N., Tsujita, Y., Kosugi, Y., Wu, Y. and Takakura, K.**: Cell cycle perturbation of cultured C₆ glioma cells following short-term contact with a low dose of ACNU. *Cytometry*, **8**: 386~391, 1987.
- 18) **野村和弘, 山本博昭, 渋谷壮一郎, 三木啓全, 関政子**: 脳腫瘍の化学療法に対する flow cytometry 分析の応用—第一報 各種抗癌剤による細胞動態の変化—. *脳神経*, **33**: 341~350, 1981.
- 19) **恩田 清, 田中隆一, 村上直人, 鈴木康夫, 山崎一徳**: ヒト glioma 由来株化細胞の DNA 含量と ACNU 感受性. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, **26**: 937~944, 1986.
- 20) **Harada, K., Kiya, K. and Uozumi, T.**: Pharmacokinetics of a new water-soluble nitroso-urea derivative (ACNU) in human gliomas. *Surg Neurol*, **15**: 410~414, 1981.
- 21) **Wheeler, K.T., Deen, D.F., Wilson, C.B., Williams, M.E. and Sheppard, S.**: BCNU-modification of the in vitro response in 9L brain tumor cells of rats. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **2**: 79~88, 1977.
- 22) **Tobey, R.A. and Crissman, H.A.**: Comparative effects of three nitroso-urea derivatives on mammalian cell cycle progression. *Cancer Res.*, **35**: 460~470, 1975.
- 23) **Leenhouts, H.P. and Chadwick, K.H.**: An analysis of the interaction between two nitroso-urea compounds and X-radiation in rat brain tumor cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, **37**: 169~181, 1980.

(平成3年12月16日受付)