ラット移植舌癌の電撃化学療法における至適電気条件の検討

長谷川 博・鹿野 真人*・佐藤 栄 需・臼 渕 公 敏
渡 辺 佑 治・菅 野 寿・川 寄 建 治

Optimum electrical conditions for eletrochemotherapy against rat tongue carcinoma

Hiroshi HASEGAWA・Makoto KANO*・Eijyu SATOH・Masatoshi USUBUCHI
Yuuji WATANABE・Hisashi KANNO・Tateharu KAWASAKI

Abstract: Electrochemotherapy (ECT) or electrical impulse chemotherapy, proposed by Okino and Mohri and Mir et al., is a new technique that enhances the antitumor effect of various anticancer agents by delivering high-voltage electrical impulses to tumors. Recently, several reports have described the effectiveness of ECT against tumor cell lines. However, few experimental studies have evaluated the optimum electrical conditions for ECT. We designed this study to determine the optimum electrical conditions for ECT against rat squamous cell carcinoma *in vitro* and *in vivo*.

SCC158 cells, a rat squamous cell carcinoma cell line, were cultured in Dulbecco's MEM with several concentrations of bleomycin (BLM) for 72 hours. The BLM concentration that inhibited cell growth by 50% (BLM-IC₅₀) was determined by MTT Assay. Tumor cells in the media containing BLM-IC₅₀×10⁻¹, BLM-IC₅₀×10⁻², or BLM-IC₅₀×10⁻³ recieved electrical pulses (200-1400V/cm, 0.1msec, 1-8 pulses) and were sequentially recultured for 72 hours. The surviving fraction of tumor cells was analyzed.

SCC158 cells were transplated into the tongue of Fischer rats. The rats recieved electrical pulses (125-1200V/cm, 0.1msec, 8 pulses) 30min after the administration of BLM. The antitumor effect of ECT on these tumors and damage to the surrounding normal tissue were then evaluated histologically.

The anticancer effect of ECT appeared when the voltage was more than 600V/cm. Futhermore, ECT of 1000-1200V/cm enabled the BLM concentration to be reduced to as low as 1/100 the BLM-IC₅₀ to obtain a similar anticancer effect *in vitro*. In addition, the anticancer effect of ECT was strongest when the voltage was 1000V/cm or more; however, the surrounding normal tissue within the electrical field was seriously damaged *in vivo*.

In conclusion, ECT is expected to be useful in the treatment of human oral cancers, and the optimum voltage is considered to be 1000V/cm or more. It is hoped that problems related to damage to normal tissue will be resolved by future investigations.

Key words: electrochemotherapy (電撃化学療法), optimum electrical conditions (至適電気条件), tongue cancer (舌癌)

福島県立医科大学歯科口腔外科
(主任：川寄建治助教授)

*福島県立医科大学耳鼻咽喉科
(主任：大谷 巖教授)

Department of Dentistry and Oral Surgery,

Fukushima Medical College (Chief: Associate
Prof. Tateharu Kawasaki)

*Department of Otolaryngology, Fukushima
Medical College (Chief: Prof. Iwao Ohtani)

受付日：平成10年7月14日

緒 言

電撃化学療法は Okino and Mohri¹⁾, Mir ら²⁾により提唱された治療法であり、高電圧パルスをかけることにより細胞膜に電氣的穿孔を生じさせ、癌細胞内に大量の抗癌剤を移入させて、抗腫瘍効果を増強するものである。近年、種々の細胞株でもその優れた抗腫瘍効果が証明され^{3~9)}, われわれもラット扁平上皮癌を舌に移植し、その実験モデルで本療法の有効性を報告した¹⁰⁾。また国外では、1993年に皮膚転移癌での初の臨床応用例が報告され¹¹⁾, 今後、本邦においても臨床応用が期待される。

一方、口腔癌で頻度の高い組織型である扁平上皮癌で本療法の基礎的検討を行った報告はほとんどなく²⁾, 高電圧パルスが癌細胞に与える影響や抗癌剤との相乗効果、またその至適電気条件については不明な点が多い。そこで、本研究では本療法の至適電気条件について、*in vitro*の系と*in vivo*の系に分けて検討したのでこれらの知見について報告する。

材 料 と 方 法

1. 動物

6~7週齢(100~150g)のフィッシャー系雌性ラット(日本クレア, 東京)を使用した。市販の固形飼料CE-2(日本クレア)で飼育し、福島県立医科大学動物実験指針に基づいて実験を行った。

2. 腫瘍細胞

ラット扁平上皮癌細胞株SCC158を用いた。SCC158細胞は外耳道由来の自然発生扁平上皮癌であり、JCRB細胞銀行(Japanese Cancer Research Resources Bank, 東京)より供与を受けた。

3. 装置

高電圧パルス発生装置としては、Electro square porator T820 (BTX, San Diego, USA)を用いた。本装置はパルス頻度が1回/秒に固定されており、高電圧パルスが電圧50~3000V, パルス幅5 μ sec~99msec, パルス回数1~99回まで出力可能である。パルス解析装置はOptimizer (BTX)を用い、高電圧パルス発生装置に接続し、実効波形を計測した。また、高電圧パルスを付加する先端部位は、*in vitro*用電極と*in vivo*用電極(ユニークメディカル イマダ, 宮城)を用いた。*in vitro*用電極はOgihara ら³⁾の方法を改良したもので、リング状の外筒電極(直径15mm, 幅1mm)と中心に対電極である芯棒電極(幅3mm)が埋め込んであり、電圧間距離は5mmに設定した。*in vivo*用電極は円形の電極(幅10mm)を先端にはめ込んであり、腫瘍を挟み電圧を加えた。なお、両電極とも表面は熱発生を少なくするため金で被覆した。

4. *in vitro*, *in vivo*の系の実験方法

1) *in vitro*の系の実験

(1) 単離細胞浮遊液の作成および高電圧パルスの付加

SCC158細胞を10%牛胎児血清(FBS)(IBL, 群馬)を加えたDulbecco変法MEM培地(ニッスイ, 東京)を用いて、37℃, 5%CO₂インキュベーター内にて静置培養した。SCC158細胞は付着型のため、8~9代継代し、0.25%トリプシン(GIBCO, New York, USA)と0.03%EDTA溶液内で5分間静置した後、十分にピペティングを行い、可及的に単離細胞とした。遠心操作(800rpm, 3分)の後、 1×10^6 個/mlの濃度の細胞浮遊液とし、24穴培養プレート(Corning, New York, USA)の各ウエルに1ccずつ分注した。その後、*in vitro*用電極を各ウエルに挿入し、高電圧パルスを加えた(写真1)。

(2) 殺細胞効果の検討

① 高電圧パルス単独の殺細胞効果

電気条件をパルス幅100 μ sec, パルス回数8回と固定し、設定電圧を200~2400V/cmまで変化させ、各ウエルの細胞に対し、高電圧パルスのみを付加した。その後、37℃, 5%CO₂インキュベーター内で72時間静置培養した後に、細胞増殖曲線を作製した。

② Bleomycin (BLM)(日本化薬, 東京)単独の殺細胞効果

BLMの濃度を10~1000 μ g/mlに調整し、(1)と同様に培養後、細胞増殖曲線を作製した。つづいて、その増殖曲線より、細胞増殖能を50%抑制する濃度、すなわちIC₅₀を算出した。

③ BLMと高電圧パルス併用による殺細胞効果

——電圧との関係——

BLMと高電圧パルス付加による相乗効果を検討するため、各ウエルのBLM濃度を②の実験結果から設定されたIC₅₀ $\times 10^{-1}$ (20 μ g/ml), IC₅₀ $\times 10^{-2}$ (2 μ g/ml)に調整した後に、溶液内の細胞に対し高電圧パルスを加えた。電気条件はパルス幅100 μ sec, パルス回数8回と固定し、設定電圧を200~1400V/cmまで変化させた。

④ BLMと高電圧パルス併用による殺細胞効果

——パルス回数との関係——

BLM濃度を3段階(20 μ g/ml, 2 μ g/ml, 0.2 μ g/ml)に調整後、電圧およびパルス幅をそれぞれ1000V/cm, 100 μ secに固定し、電撃暴露を1回, 2回, 5回, 8回とそれぞれ分割付加した。

(3) 殺細胞効果の判定法

殺細胞効果の判定はSDI法^{12~16)}により行い、水素受容体として、3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)(Sigma, St. Louis, USA)を用いた。MTTは生細胞によってのみ分解され、MTT formazanが生成され

写真1 *in vitro* 実験での高電圧パルス付加。
24穴培養用プレートに細胞を植え込んだ後、*in vitro* 用電極（矢印）を挿入し、高電圧パルスを加えた。

写真2 *in vivo* 実験での高電圧パルス付加。
舌に移植した腫瘍を*in vivo* 用電極（矢印）で挟み、高電圧パルスを加えた。

る。産出される MTT formazan の量と生細胞数および細胞増殖能は、ほぼ比例関係にある¹⁶⁾。本実験では、培養液あるいは BLM 溶液中の細胞を遠心分離 (1000rpm, 5分) し、上清を除去した後に 0.4% MTT 溶液 0.2ml, 10^{-1} M コハク酸ナトリウム 0.2ml, Phosphate buffered saline (PBS) (0.1M, pH7.4) 1.6ml を加えて、4 時間培養した。その後、産出された MTT formazan を遠心分離 (2000rpm, 15分) し、dimethyl sulfoxide 2ml を加え、MTT formazan を溶出させ、十分にビベッティングし呈色させた。その比色値 (OD) を分光光度計 (UNIDEC-340, 日本分光, 東京) にて 540nm の波長下で測定し、比色定量した。細胞増殖能は、Surviving fraction (SF) を指標として、次

表1 下里分類

Grade 0	癌細胞に認めるべき変化はない。
Grade I	細胞障害は認められるが、癌巣パターン破壊は認められない。
Grade II	細胞障害、癌巣パターン破壊が認められる。
a)	再増殖の可能性の強い、形態的にかなり良く保たれた癌細胞が広い範囲に (1/4 以上) 存在する。
b)	増殖の可能性のある、かなり良く保たれた癌細胞が小範囲に (1/4 以下) 認められる。
Grade III	Non-viable と思われる癌細胞のみが認められる。
Grade IV	癌細胞は全く認められない。

式より算出した。

$$SF = a / b$$

a : 各処置群における OD 値

b : 対照群における OD 値

2) *in vivo* の系の実験：ラット移植舌癌に対する検討

(1) 舌への移植方法

大量培養した SCC158 細胞をフィッシャー系ラットの背部に移植し、増殖が安定するまで背部で 9 代継代した。その後、最終継代移植の 14 日目に腫瘍を採取し、腫瘍片を金属メッシュで擦り潰し、PBS 中に浮遊させ、細胞数を 1×10^8 個/ml に調整した。この細胞浮遊液 0.025cc (細胞数: 2.5×10^6 個) を 27G 針付 0.25cc シリンジにて舌右側縁部の粘膜下に移植した¹⁰⁾。

(2) 電撃化学療法

舌への移植後、腫瘍長径が 4mm 前後になったラットを用い、電撃化学療法を行った。抗癌剤は BLM を用い、投与量はラットにおける最大耐量である LD₅₀ の 1/10 量 (3~4mg) を皮下注射し、30 分後に高電圧パルスを付加した。高電圧パルスはパルス幅を 100 μ sec, パルス回数を 8 回と固定し、設定電圧を 125~1200V/cm まで変化させ行った。

また、高電圧パルス付加はエーテル麻酔下で行い、ピンセットでラットの舌を牽引し、唾液を拭きとった後、electolyte jelly, (Myotronics, Seattle, USA) を塗布し、*in vivo* 用電極を接触させ行った (写真 2)。

(3) 電圧と抗腫瘍効果ならびに正常組織への影響

治療後のラットは 3 日目にエーテル過剰投与下で屠殺後、舌を摘出し、10% ホルマリンで固定、パラフィンに包埋し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施した

図1 電圧と Surviving fraction

図3 各 BLM 濃度における電圧と Surviving fraction

図2 BLM 濃度と Surviving fraction

図4 1000V/cm-各種 BLM 濃度における電撃回数と Surviving fraction

上で、下里の分類^{17, 18)}により組織学的抗腫瘍効果を判定した(表1)。同時に、各群における腫瘍に近接した正常組織への影響についても光顕的に観察評価した。

5. 統計処理の方法

統計学的検討は *in vitro* の系における SF の比較に関しては、Student T-test を用い、5%以下を有意差ありと検定した。

結 果

1. *in vitro* の系の実験：SCC158細胞における検討

1) 殺細胞効果の検討

(1) 高電圧パルス単独の殺細胞効果

高電圧パルス単独での SF 値は電圧の値が200~1000V/cm までは有意の低下は認められなかったが、1200V/cm 前後より SF 値は低下し始め、1400V/cm から

2400V/cm の群では、1000V/cm 以下の群に対し有意に低下した(図1)。すなわち、高電圧パルス単独では、1000V/cm 以下では殺細胞効果を認めないが、1200~1400V/cm 以上では殺細胞効果が発現し、その効果は電圧の増加にほぼ比例して増強した。

(2) BLM 単独の殺細胞効果

SF 値と BLM 濃度の関係は BLM 濃度が10~20 μg/ml では有意の低下を示さないが、50 μg/ml より有意に低下し始め、200 μg/ml では SF 値は0.51±0.04 となり、ほぼ50%に細胞増殖を抑制した(図2)。よって、IC₅₀は200 μg/ml と決定した。

(3) BLM と高電圧パルス併用による殺細胞効果 ——電圧との関係——

各 BLM 濃度(20 μg/ml, 2 μg/ml)における SF 値と電圧の関係をみると、400V/cm までは有意の低下を示さないが、電圧が600V/cm での SF 値は BLM 濃度が20 μg/ml で0.61±0.07, 2 μg/ml で0.76

表2 電圧と組織学的抗腫瘍効果

設定電圧 (V/cm)	125	250	500	750	1000	1200
ラット No1	0	0	I	I	II b	III
2	0	I	I	II a	II b	III
3	0	I	II a	II b	III	III
4	0	I	II a	II b	III	III

写真3-a. 電圧500V/cmでの電撃化学療法後3日目の組織像。

血管内皮細胞の核は円形化し立ち上がり、さらには一部の内皮細胞(矢印)が血管内膜から剥離している(×400, H-E染色)。

b. 間質には高度の浮腫があり、正常ではほとんど目立たないリンパ管が著明に拡張している(×200, H-E染色)。

±0.04と高電圧パルス単独群に対し有意に低下し始め、電圧の増加に従いSF値は低下した(図3)。さらに、1000V/cmでのSF値は20 μ g/mlで 0.34 ± 0.02 , 2 μ g/mlで 0.46 ± 0.06 , 1200V/cmでのSF値は20 μ g/mlで 0.34 ± 0.06 , 2 μ g/mlで 0.36 ± 0.04 となり、各BLM濃度とも50%以上に細胞増殖を抑制し、その相乗効果は1000~1200V/cmで最大となった。また、600~1400V/cmにおいては、各BLMの濃度のSF値の差は縮小する傾向を示した。

(4) BLMと高電圧パルス併用による殺細胞効果

——パルス回数との関係——

各BLM濃度(20 μ g/ml, 2 μ g/ml, 0.2 μ g/ml)における電撃回数とSF値との関係では、電撃回数が1回からすでに各濃度とも、電撃単独群に対しSF値は有意に低下した(図4)。また、電撃回数の増加につれ、20 μ g/ml群と2 μ g/ml群ではSF値は低下する傾向を示したが、0.2 μ g/ml群ではその傾向は明らかではなかった。

2. *in vivo* の系の実験：ラット移植舌癌に対する検討

1) 電撃化学療法後の組織変化——電圧と抗腫瘍効果ならびに正常組織への影響——

Hasegawaら¹⁰⁾によれば移植舌癌モデルでの電撃化学療法では約3日目に癌細胞が死滅することより、治療後3日目の組織学的変化を観察した。組織学的抗腫瘍効果は付加された電圧の上昇に従い、増強傾向にあり、gradeⅢ以上の抗腫瘍効果は1000V/cm以上の条件で認められた(表2)。また、それぞれのラットにおける腫瘍に近接した電場内の正常組織の特徴的病理組織所見は、125V/cm群では、上皮の配列の乱れや、小静脈の拡張と血管内皮細胞の核の円形化などが認められた。筋組織には特に変化を認めなかった。250V/cm群では、上皮の一部が剥離し、小静脈ならびに小動脈の血管内皮細胞の核の腫大が目立った。500V/cm群では、上皮は広範囲に壊死剥離し、血管組織では毛細血管、リンパ管の拡張が著明となり、内皮細胞下の空胞変性や剥離が認められた(写真3-a, b)。750V/cm群では、血管およびリンパ管の拡張がさらに著明となり、血管壁の壊死を一部に認めた。1000V/cmおよび

1200V/cm群では、血管およびリンパ管の内皮細胞の剥離、変性が著明で、筋組織でも一部に、核の濃縮した変性細胞が認められた。

以上の結果、抗腫瘍効果は電圧の上昇により増強するが、腫瘍に近接した正常組織でも、電圧の上昇に従い、高電圧パルスの影響を強く受け、最終的には壊死に陥った。

考 察

電撃化学療法においては電氣的穿孔を引き起こすことが必要であり、そのためには、電圧、パルス幅ならびにパルス回数の少なくとも3つの条件の設定が重要である。しかしながら、その条件設定は、遺伝子工学における報告¹⁹⁻²⁶⁾を見ても一定の見解がなされていない。そこで、本研究でのパルス幅は使用頻度が比較的高い100 μ secに固定し、電圧ならびにパルス回数を変

化させ検討した。以下に行った各実験項目毎に考察を加える。

1. 殺細胞効果およびその至適電気条件

— *in vitro* の系 —

Presse ら²⁶⁾ は 5 種類のヒト癌細胞株において、1000～1600V/cm の電圧付加が細胞の不可逆的变化を引き起こす臨界点であるとし、Ogihara ら³⁾ はマウス膀胱癌において、1200V/cm 以上では電圧自体が殺細胞効果を示したと報告している。本研究で用いたラット扁平上皮癌でも、1200～1400V/cm 以上で細胞の不可逆的变化を認め始め、同様の結果を得たが、その臨界点は細胞種や、溶液中の細胞密度にも影響を受けるのではないかと考えられた。

電氣的穿孔による物質の取り込みについて、Presse ら²⁶⁾ は細胞毒性のない Lucifur Yellow および DNA の取り込みを検討し、その最大取り込みを示す至適電圧は不可逆的な変化がおこる電圧に近い 1200～1400V/cm とし、パルス回数との関係において、5 回と 10 回では、その取り込みは 10 回の方が良好であったと報告している。一方、高電圧パルスと BLM の相乗作用について、Orlowski ら⁵⁾ はハムスター肺線維芽細胞に対し、高電圧パルスとの併用により、その殺細胞効果は BLM 単独効果に対し、700 倍にも増強したと報告している。

本研究では、高電圧パルス併用により、BLM の殺細胞効果は電圧が 600V/cm 前後より発現し、1000～1200V/cm で最も強い相乗効果が見られ、その殺細胞効果は BLM 単独効果に対し 100 倍前後に増強した。また、パルス回数の関係では 1 回よりも 8 回の方が殺細胞効果が増強することが確認された。

本来、BLM は DNA を損傷させ、それ自体に強い細胞毒性があり、低濃度でも強い殺細胞効果を示すが、その細胞内への移行は不良である²⁷⁾ とされている。一方、癌細胞の BLM 感受性は ① BLM の癌細胞膜透過性、② 細胞内の BLM 不活性化酵素活性、③ 障害 DNA 修復能の少なくとも 3 つの因子が関与し、その殺細胞効果を低下させると考えられている²⁸⁻³¹⁾。よって、高電圧パルスも BLM もそれぞれ単独では殺細胞効果を示さない条件で高い相乗作用を示したことは、高電圧パルスにより、BLM の膜の透過性が亢進し、強い殺細胞効果が発現したためと考えられた。また、BLM の感受性は種々の細胞により異なるため、その相乗効果の程度は細胞種によって異なると推測された。さらに、殺細胞効果で BLM 取り込みを推測すると、BLM の殺細胞効果が最大となる至適電圧は、不可逆的な変化が起り始める 1000～1200V/cm となるが、600V/cm よりその効果が発現していることを考えると、単一の株化されている細胞でも至適電圧には幅があり、また、溶液内に浮遊している個々の細胞に付加される電圧は決して一様ではないと考えられた。

2. 電圧と抗腫瘍効果 — *in vivo* の系 —

in vitro の系で 1000～1200V/cm で殺細胞効果が最大であったため、電圧を 125～1200V/cm まで変化させて、移植舌癌に対し電撃化学療法を行い、その抗腫瘍効果を検討した結果、その効果は電圧の増加につれ増強し、強度の抗腫瘍効果は 1000V/cm 以上の条件で認められた。つまり、*in vivo* の系でも最大抗腫瘍効果を示す至適電圧は 1000～1200V/cm となり、この結果は *in vitro* の系での条件とほぼ一致した。

3. 電場内の周囲組織の損傷

腫瘍の周囲組織は比較的低電圧の 125V/cm でも軽度の上皮および血管内皮細胞の障害が見られ、1000V/cm では、上皮や血管など、電場内のほとんどすべての組織が変性した。したがって、抗腫瘍効果の面からは 1000～1200V/cm 前後が至適電圧であるが、この電圧は腫瘍の周囲組織損傷も強いので、臨床応用を考える場合、この点について十分留意する必要がある。腫瘍に特異的に作用させる方法として、沖野ら³²⁾ は正常組織と腫瘍組織での抗癌剤に対する Dose-Response の相違に着目し、皮下移植腫瘍において、BLM 投与量を減少させることで、抗腫瘍効果を低下させることなく、皮膚損傷が有意に軽減したと報告している。粘膜上皮に覆われた舌においては報告がなく、Dose-Response の相違が存在するのかわからないが、抗癌剤の投与量の他、電撃の投与方法や電極形態の改良など、今後より腫瘍特異性の高い条件を明らかにする必要がある。また、電撃化学療法では組織学的に血管およびリンパ管も障害されることから、転移を促進する可能性も否定できず、この点も今後の実験で解明したい。

4. 電撃化学療法の臨床応用について

1993 年 Belehradsek ら¹¹⁾ は頸部皮膚転移をきたした 40 例に対し、初の臨床応用を行い、その著効率は 57% で、重大な副作用はなかったと報告している。なお、その時の電気条件は電圧 1300V/cm、パルス幅 100sec、パルス回数 8 回であった。よって、体表における高電圧パルス付加が重大な副作用をもたらすことは少ないと考えられ、今後、臨床応用が大いに期待される。

頭頸部癌は一般に体表または体腔に面していることが多いことより、電極の接触が比較的容易である。したがって、その臨床応用は他領域に比べ、手技的に容易であると考えられる。本研究では口腔癌への応用を想定したが、電極を改良し、内視鏡下治療を行えば、咽喉頭癌や他領域への応用も可能である。また、切除不能な進行癌や再発癌に対し、放射線治療に併用することにより機能を保存し、局所制御率の向上が期待できる。以上のごとく、電撃化学療法は新しい治療法として、その臨床応用方法も多様であり、きわめて有用性の高い治療法と考えられる。しかしながら、本療法は優れた抗腫瘍効果を示す反面、正常組織の損傷も強

いので¹⁰⁾、この点についても臨床応用では十分配慮されるべきである。

結 語

1. 本研究では、ラット移植舌癌の電撃化学療法について、ラット培養癌細胞株 SCC158細胞を用いて、*in vitro* および *in vivo* の両実験系で基礎的検討を加えた。

2. *in vitro* の実験により、電撃化学療法の殺細胞効果および至適電気条件は電圧1000~1200V/cm、パルス幅100 μ sec、パルス回数8回の条件がBLMとの相乗作用を最も増強し、その増強程度は、BLM単独群に比べ、約100倍となった。

3. *in vivo* の実験により、電撃化学療法の抗腫瘍効果は電圧の上昇に従い増強するが、電場内の正常組織の損傷も同時に高度となり、臨床応用のためには腫瘍特異性の高い条件や、転移への影響などを検討する必要があると考えられた。

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なる御指導を賜りました本学第2病理学講座 鈴木利光教授に深甚なる感謝の意を表します。また、多くの御助言と御協力を頂きました本学泌尿器科学講座 荻原雅彦助手ならびにユニークメディカル イマダ社 今田安信氏に心より感謝いたします。

本論文の要旨は第19回頭頸部腫瘍学会(1995年6月、大阪)、第33回日本癌治療学会(1995年9月、札幌)、第50回日本口腔科学会(1996年4月、鹿児島)にて発表した。

本研究は平成8年度福島医学振興会助成金により行われたものであり、ここに付記して謝意を表します。

文 献

- 1) Okino, M. and Mohri, H.: Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on *in vivo* growing tumors. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 78: 1319-1321 1987.
- 2) Mir, L.M., Orlowski, S., et al.: Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer* 27: 68-72 1991.
- 3) Ogihara, M., Yamaguchi, O., et al.: Potentiation of effects of anticancer agents by local electric impulse on murine bladder cancer. *J Urol (in press)*.
- 4) Melvik, J.E., Pettersen, E.O., et al.: Increase in cis-dichlorodiammineplatinum (II) cytotoxicity upon reversible electropermeabilization of the plasma mem-

- brane in cultured human NHIK 3025 cells. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22: 1523-1530 1986.
- 5) Orlowski, S., Belehradek, Jr. J., et al.: Transient electropermeabilization of cells in culture. *Biochem Pharmacol* 37: 4727-4733 1988.
- 6) 兼定博彦: 濃度依存性抗癌剤を用いた電撃化学療法の抗腫瘍効果—Lewis 肺癌に対する *in vivo* での検討—. *日癌治* 25: 2640-2648 1990.
- 7) 富恵 博: 電撃化学療法におけるアドリアマイシンの細胞内移行動態の解析. *山口医学* 41: 429-437 1992.
- 8) Yamaguchi, O., Irisawa, C., et al.: Potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses in mouse bladder tumor. *Tohoku J exp Med* 172: 291-293 1994.
- 9) Heller, R., Jaroszeski, M., et al.: Treatment of B16 mouse melanoma with the combination of electropermeabilization and chemotherapy. *Bioelectrochem. Bioenergetics* 36: 83-87 1995.
- 10) Hasegawa, H., Kano, M., et al.: An electrochemotherapy model for the rat tongue carcinoma. *J. oral Pathol. Med.* 27: 249-254 1998.
- 11) Belehradek, M., Domenge, C., et al.: Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. *Cancer* 72-12: 3694-3700 1993.
- 12) 近藤達平, 市橋秀仁: SDI 法による感受性試験. *最新医学* 33: 2239-2247 1978.
- 13) 斎藤和子, 佐々田裕子, 他: 制癌剤感受性テスト SDI の改良法. *癌と化学療法* 7: 1952-1958 1980.
- 14) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63 1983.
- 15) 菅原 勇, 石坂重昭, 他: MTT アッセイ—細胞増殖能および細胞障害試験に応用可能な迅速比色定量法. *医学のあゆみ* 128: 733-735 1984.
- 16) 西田正人, 河野圭子, 他: 抗癌剤感受性検査, 特に MTT assay の要点と問題点. *Human Cell* 5: 87-97 1992.
- 17) 下里幸雄, 尾形利郎: 病理学的にみた肺癌の術前照射. *肺と心* 13: 332-338 1966.
- 18) 大星章一, 下里幸雄, 他: 放射線療法の病理. *医学のあゆみ* 61: 618-625 1967.
- 19) Zimmermann, U.: Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim Biophys Acta* 694: 227-277 1982.
- 20) Gordon, P.B., Seglen, P.O.: Autophagic sequestration of [¹⁴C] sucrose, introduced into rat hepatocytes by reversible electropermeabilization. *Exp Cell Res*

- 142: 1-14 1982.
- 21) Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., et al.: Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1: 841-845 1982.
- 22) Potter, H., Weir, L., et al.: Enhancer-dependent expression of human κ immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 7161-7165 1984.
- 23) Toneguzzo, F., Hayday, A., et al.: Electric field mediated DNA transfer: transient and stable gene expression in human and mouse lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 6: 703-706 1986.
- 24) Mir, L.M., Banoun, H., et al.: Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electropermeabilization. Direct access to the cytosol. *Exp Cell Res* 175: 15-25 1988.
- 25) 稲葉浩子, 葛西道生: リンパ球細胞への DNA トランスフェクション-エレクトロポレーション法. *実験医学* 6: 979-985 1988.
- 26) Presse, F., Quillet, A., et al.: An improved electrotransfection method using square shaped electric impulses. *Biochem Biophys Res Commun* 151: 982-990 1988.
- 27) Roy, S.N., Horwitz, S.B.: Characterization of the association of radiolabeled bleomycin A₂ with HeLa cells. *Cancer Res* 44: 1541-1546 1984.
- 28) 浦出雅裕, 杉 政和, 他: ヒト培養腫瘍細胞のブレオマイシン (BLM) 感受性とそれに関与する因子の解析. *癌と化学療法* 10: 2382-2387 1983.
- 29) Akiyama, S., Ikezaki, K., et al.: Bleomycin resistant cells contain increased bleomycin-hydrolase activities. *Biochem Biophys Res Commun* 101: 55-60 1981.
- 30) Akiyama, S., Hidaka, K., et al.: Control of permeation of bleomycin A₂ by polyene antibiotics in cultured chinese hamster cells. *Cancer Res* 39: 5150-5154 1979.
- 31) Miyaki, M., Morohashi, S., et al.: Single strand scission and repair of DNA in bleomycin-sensitive and resistant rat ascites hepatoma cells. *J Antibiot* 26: 369-373 1973.
- 32) 沖野基規, 富恵 博, 他: 電撃化学療法による腫瘍特異的選択毒性の誘導-Dose Response Curve の解析より. *Oncologia* 24: 71-79 1991.