シスプラチン耐性誘導ヒト扁平上皮がん細胞における放射線との交差耐性

小 森 慶 一

東京医科歯科大学大学院歯学研究科歯科臨床学系歯科放射線学講座（主任・指導：佐々木武仁教授）

（1998 年 2 月 27 日 受付）

Cross-resistance to Radiation in Human Squamous Cell Carcinoma Cells
with Induced Cisplatin Resistance

Keiichi Komori

Department of Dental Radiology and Radiation Research, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University
(Chief and Director : Prof. Takehito Sasaki)

Accumulated evidence indicates that drug resistance is induced in tumor cells treated with a variety of anti-cancer drugs and that there is a possibility of cross-resistance to ionizing radiation associated with induced drug resistance. Most *in vitro* studies have shown inconsistent results on cross-resistance probably because of different cell lines used and protocols for drug induction. In this study, TE3 human squamous cell carcinoma cell line was treated with a 4-day cycle of cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum (II) ; CDDP) at a concentration yielding 10% cell survival. The treatment was repeated up to 3 cycles. After treatment, cells were tested for CDDP and X-ray sensitivity. One cycle of CDDP treatment induced CDDP resistance with a factor of 1.41 and 2 cycles of the treatment with a factor of 1.86. The resistance factor reached a plateau at 3 cycles of treatment. For analyzing the correlation of CDDP and X-ray resistance, 30 clones from both untreated and 3-cycle treated cells were isolated and analyzed for CDDP and X-ray sensitivity.

The sensitivity was expressed as the concentration of drug or dose of X-ray required to reduce the cell survival to x% (Dx). The correlation coefficient of clones with 3-cycle treatment between CDDP and X-ray sensitivity increased gradually by increasing the end point of Dx from D₁₀ to D₉₀, resulting in significant correlation at D₉₀. The result suggested that there is a certain common repair-related mechanism affecting both CDDP and X-ray resistance in CDDP-treated cells.

I. 緒 言

悪性腫瘍の放射線治療における問題点の一つに腫瘍細胞集団内の放射線抵抗性細胞の存在が挙げられる。腫瘍細胞そのものの持つ放射線抵抗性のなかには、細胞自身が本来保持している内因性放射線抵抗性のほかに、細胞微小環境、たとえば低酸素状態によって抵抗性を示す場合や、あるいは、腫瘍細胞の環境に対する反応に伴って二次的に発現してくるような誘導抵抗性（獲得抵抗性）が存在することが知られている。一方、化学療法に伴う薬剤耐性細胞の誘導に関しては、以前から多くの研究がなされており、そのメカニズムとして、多剤耐性遺伝子（*mdr* 1）産物である p-170 糖タンパクの細胞膜での発現の亢進による、細胞内薬剤蓄積レベルの低下^{1,2)}、p-53 依存性の細胞周期および apoptosis 制御機構の変化^{3,4)}、

DNA 損傷修復機構の亢進^{5,6)}、グルタチオンをはじめとする細胞内-SH 分子の関与^{7,8)}、薬剤代謝酵素活性の上昇^{9,10)}など、さまざまな因子の関与が報告されている。最近、こうした薬剤抵抗性細胞の一部に、作用機構が全く異なる X 線に対して交差耐性を示すもののあることが指摘されている^{11,12)}。*in vitro* での実験系による幾つかの報告においてこの交差耐性が調べられているが、用いた細胞株、薬剤の種類、耐性誘導の方法などの条件により、結果は一致していない。しかし、こうした交差耐性の存在は、放射線・薬剤併用療法において重要な考慮すべき要因の一つであり、その一般性や機序について明らかにすることは悪性腫瘍の治療における重要な研究課題の一つと考えられる。事実、化学療法後の腫瘍が放射線抵抗性を示す例が報告され、この抵抗性が交差耐性を獲得した細胞の存在による可能性が指摘されている^{13,14)}。

cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum (II), CDDP)は睾丸腫瘍などをはじめとして、固形腫瘍に幅広く用いられている化学療法剤であるが、この薬剤に関しても薬剤耐性誘導について多くの報告がなされている。CDDPはDNA cross-linking剤の一つであり、DNA鎖内・鎖間、あるいはタンパク分子とcross-linkを形成することによりその殺細胞効果を発現すると考えられている。CDDP耐性誘導の機序としても、多剤耐性遺伝子の関連を除いて、前述のほぼすべての機構の関与が指摘されている^{4,5,7)}。CDDPとX線との交差耐性に関しても、幾つかの報告があるが^{7,15,16)}、結果は一致していない。また、*in vitro*の実験系でのCDDPを用いた耐性誘導のプロトコルの多くは、最終的に高濃度の薬剤で処理を行い、ごく少数の生存細胞に関して調べるものであり^{5,17)}、観察された抵抗性が、果たして臨床症例で報告されるような抵抗性の現象を反映するものかどうか疑問がある。

本研究では、CDDP処理によって誘導されるCDDP抵抗性の程度とその安定性、さらにCDDP抵抗性とX線感受性との関連を調べることを目的とした。そのため実験では、ヒト腫瘍細胞に対し、実際に臨床的に用いられる程度の比較的低濃度のCDDPを用いて、4日間の処理を3回まで繰り返し、CDDP感受性とX線感受性を調べた。さらに、未処理細胞およびCDDP処理を3回行った細胞より、各30クローンを分離し、CDDPおよびX線感受性を調べ、両感受性の相関について検討した。

II. 材料および方法

1. 細胞および細胞培養

細胞株はヒト食道扁平上皮がんより樹立されたTE3細胞^{18,19)}を用いた。培地は、MEMアール培地(大日本製薬、大阪)に100 U/mlペニシリン、100 μ g/mlストレプトマイシンおよび10%ウシ胎児血清(大日本製薬、大阪)を添加して用い、37°C、5%CO₂の条件下で培養を行った。細胞は特に断らない場合にはすべて組織培養用100 mm ペトリ皿を用いて培養し、4~5日ごとに0.1%EDTAを含む0.25%トリプシンを用いて細胞分散と継代を行った。

2. CDDPによる前処理

CDDPは動物実験用シスプラチン原末(日本化薬、東京)を0.9%NaClに200 μ Mとなるよう溶解したものを原液として4°Cにて遮光保存し、適宜0.9%NaClにて希釈して使用した。CDDPによる前処理は、細胞を継代後、3日間普通培地にて増殖させた後、0.5 μ M CDDPを含む培地で4日間処理を1 cycle(図1)として、これを3 cycleまで行った。CDDP処理を行った細胞は、処理終了後普通培地で1週間培養後にCDDPおよびX線感受性を調べた。さらに、3 cycle処理を行ったものについては、

図1 CDDP処理の1 cycleのプロトコルを示したもの。細胞をplateし、3日間増殖させた後、0.5 μ M CDDPを含む培地で4日間処理を行った。

処理終了から4週間ごとに、12週間後まで、CDDPおよびX線感受性を調べた。

3. 未処理細胞およびCDDP 3 cycle処理細胞のサブクロニング

CDDP未処理の細胞に関しては、24穴プレートを用い、限界希釈法によりサブクロニングを行った。血清培地1 ml当たり平均3個の細胞が含まれるよう希釈した細胞懸濁液を、1穴当たり1 mlずつ分注した。2週間後、顕微鏡下に注意深く観察し、1穴内にコロニーが1個のみ含むものについて、さらに1週間程度増殖させた後、60 mmディッシュに継代し、増殖後さらに100 mmディッシュに継代した。

3 cycle処理を行った細胞に関しては、2 cycle処理終了後の細胞を100 mmディッシュに1ディッシュ当たり細胞1,000個となるようplateした後、3 cycle目の処理を行い、生き残った細胞のコロニーについて、ガラス製クロニングリングを用いて分離し、60 mmディッシュに継代し、増殖後さらに100 mmディッシュに継代した。

未処理細胞およびCDDP 3 cycle処理細胞に関して、それぞれ各30個のクローンを分離した。

4. CDDP感受性の評価

CDDP感受性の評価は、培養2日目の対数増殖期の細胞を用いて細胞懸濁液を調製し、各処理濃度ごとに適宜希釈して60 mmディッシュにplateした後、細胞がディッシュ表面に付着するよう37°Cインキュベータ内で4時間培養後、CDDPを含む培地に交換して行った。ただし生細胞数の算定は、血球算定盤を用いて顕微鏡下に観察し、erythrosin Bに非染色のものについてカウントして行った。CDDPを含む処理用の培地は、前述の200 μ M CDDP原液を、0.9%NaClを用いて最終濃度の10倍濃度まで希釈した溶液をさらに血清培地にて10倍希釈して用いた。このCDDPを含む処理用の培地は、処理開始の2時間前以内に調製し、処理開始直前まで、37°Cの恒温槽に保管した。CDDPによる処理時間は1時間とした。処理終了後、リン酸緩衝液にて2回洗浄した後、37°CのCDDPを含まない培地に交換し、インキュベータ

内に戻した。2 週間後、10%中性ホルマリンにて固定し、0.05%クリスタルバイオレット、20%エタノールにてコロニーを染色した。顕微鏡下に 50 個以上の細胞を含むコロニーをカウントし、plate した生細胞に対する割合から各濃度ごとの細胞生存率を算出した。

5. X 線感受性の評価

X 線感受性の評価は、培養 2 日目の対数増殖期の細胞を CDDP の場合と同様に計数し、細胞懸濁液を 1 ml 当たり 1×10^5 個となるよう希釈したものを照射直前まで 0℃に保管し、cell suspension の状態での照射により行った。X 線照射装置として、HF-100 (Pantak, Berkshire, UK) を用い、0.115 mmCu プラス 0.502 mmAl フィルターを付加し、管電圧 100 kV、線量率 0.657 Gy/min の条件下で照射した。ただし、CDDP 未処理の 30 クローンについては、Stabillipan II (Siemens, Erlangen, Germany) を用い、1 mmCu フィルターを付加して管電圧 250 kV、線量率 2.0 Gy/min の条件下で照射した。各線量を照射後、細胞懸濁液を適宜希釈し、60 mm ディッシュに plate し、インキュベータ内で 2 週間培養した。固定・染色および細胞生存率の算定は CDDP 感受性試験の場合と同様の方法にて行った。

6. データ分析

CDDP および X 線感受性に関する細胞生存率曲線のデータは、直線-2 次モデル²⁰⁾ (linear-quadratic model; 下に示す) に従い、Macintosh パーソナルコンピュータで汎用のグラフソフト (Delta Graph professional, DeltaPoint 社) を用いて curve fitting を行い、 α 、 β 値を求めた。(ただし、 $\alpha < 0$ あるいは $\beta < 0$ の場合は、それぞれ $\alpha = 0$ 、 $\beta = 0$ として再度 curve fitting を行った²¹⁾)

$$S = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$$

(S: 細胞生存率, D: 線量または濃度)

CDDP 未処理および 3 cycle 処理細胞の各 30 クローンに関しては、求めた α 、 β 値より、 $D_{10} \sim D_{90}$ (D_x : 細胞生存率 x% を与える線量または薬剤濃度) を算出し、各 30 クローンに関してそれぞれ、CDDP および X 線感受性を $D_{10} \sim D_{90}$ で評価した場合の両感受性の相関について、相関係数 (r 値) を求め、さらに、この相関係数 r の有意性を調べるために、母相関係数を 0 と仮定して Fisher の Z 変換により z 値を算出し、統計的検討を行った。

III. 結 果

1. 未処理細胞および CDDP 処理細胞の CDDP および X 線感受性

未処理細胞に対する CDDP 4 日間処理による細胞生存率曲線を図 2 に示す。濃度 0.5 μM の CDDP 4 日間処

図2 CDDP 4 日間処理による CDDP 濃度と細胞生存率の関係

理の TE 3 細胞に対する殺細胞効果は、細胞生存率 0.1 程度を与えるものであった (図 2)。この細胞の増殖曲線では、倍加時間が約 20 時間であり、3 日間の CDDP を含まない培地での培養で約 12 倍に増殖するため、1 cycle の処理の間に、生存細胞数はほぼ元の数に戻る。

未処理および CDDP 前処理 (1 ~ 3 cycle) 細胞の CDDP および X 線感受性を図 3 および図 4 に示す。未処理細胞の CDDP 1 時間処理に対する濃度・細胞生存率曲線を L-Q モデルに従って解析したところ、 $\alpha = 0.2004 (\mu\text{M})^{-1}$ 、 $\beta = 0.0066 (\mu\text{M})^{-2}$ 、 $D_{10} = 8.9 \mu\text{M}$ であった。これに対し、CDDP 処理を行った細胞では、1 ~ 3 cycle と処理を重ねるに従い、未処理株に比べ CDDP に抵抗性を示した。1 cycle 処理したものでは、 $\alpha = 0.1557 (\mu\text{M})^{-1}$ 、 $\beta = 0.0022 (\mu\text{M})^{-2}$ で、 $D_{10} = 12.6 \mu\text{M}$ 、2 cycle 処理したものでは、 $\alpha = 0.0787 (\mu\text{M})^{-1}$ 、 $\beta = 0.0036 (\mu\text{M})^{-2}$ で、 $D_{10} = 16.6 \mu\text{M}$ 、3 cycle 処理したものでは、 $\alpha = 0.0438 (\mu\text{M})^{-1}$ 、 $\beta = 0.0049 (\mu\text{M})^{-2}$ で、 $D_{10} = 17.6 \mu\text{M}$ であり、resistance factor (= $D_{10}(\text{pretreated}) / D_{10}(\text{untreated})$) は、それぞれ、1.41, 1.86, 1.98 であった。一方、X 線感受性については、未処理細胞では $\alpha = 0.2555 \text{ Gy}^{-1}$ 、 $\beta = 0.0299 \text{ Gy}^{-2}$ で、 $D_{10} = 5.49 \text{ Gy}$ であった。また、1 cycle, 2 cycle, 3 cycle 処理したものの D_{10} はそれぞれ、5.20 Gy, 5.33 Gy, 5.45 Gy で未処理細胞株との違いは認められなかった。これらの値を表 1 にまとめて示す。

図3 未処理および1～3 cycle 処理を行った細胞のCDDP感受性（各点はそれぞれ3回の独立した実験の平均値を，バーは標準誤差を示す）

図4 未処理および1～3 cycle 処理を行った細胞のX線感受性（各点はそれぞれ3回の独立した実験の平均値を，バーは標準誤差を示す）

図5 未処理および3 cycle 処理後4, 8, 12 週後の細胞のCDDP感受性

図6 未処理および3 cycle 処理後4, 8, 12 週後の細胞のX線感受性

2. CDDP 処理後の表現形質の安定性

3 cycle 処理を行ったものについて，処理終了後から12 週目まで4 週ごとに計3 回，CDDP の感受性を調べた（図5）。CDDP 抵抗性は少なくとも12 週間は変わらず，

安定した表現型であった。一方，同時にX 線に対する感受性に関しても調べたが，この間に変化はみられなかった（図6）。

表 1 未処理および 1～3 回 CDDP 処理を行った細胞の CDDP および X 線に対する生存率曲線における各パラメータ値 (RF: resistance factor)

treatment	CDDP sensitivity				X-ray sensitivity			
	$\alpha((\mu\text{M})^{-1})$	$\beta((\mu\text{M})^{-2})$	$D_{10}(\mu\text{M})$	RF	$\alpha(\text{Gy}^{-1})$	$\beta(\text{Gy}^{-2})$	$D_{10}(\text{Gy})$	RF
untreated	0.2004	0.0066	8.9	1.0	0.2555	0.0299	5.49	1.0
1 cycle treated	0.1557	0.0022	12.6	1.41	0.2970	0.0280	5.20	0.95
2 cycles treated	0.0787	0.0036	16.6	1.86	0.2672	0.0309	5.33	0.97
3 cycles treated	0.0438	0.0049	17.6	1.98	0.1904	0.0427	5.45	0.99

表 2 未処理細胞の 30 クローンの CDDP および X 線に対する細胞生存曲線パラメータ, α , β 値

clones	CDDP sensitivity			X-ray sensitivity		
	$\alpha((\mu\text{M})^{-1})$	$\beta((\mu\text{M})^{-2})$	$\alpha/\beta(\mu\text{M})$	$\alpha(\text{Gy}^{-1})$	$\beta(\text{Gy}^{-2})$	$\alpha/\beta(\text{Gy})$
P-103	0.3104	0.0061	50.79	0.2521	0.0450	5.60
P-017	0.0894	0.0081	11.02	0.2110	0.0285	7.40
P-101	0.1315	0.0042	31.63	0.1556	0.0543	2.87
P-104	0.0853	0.0072	11.92	0.1645	0.0525	3.13
P-009	0.0729	0.0090	8.11	0.2104	0.0352	5.98
P-011	0.1428	0.0118	12.09	0.1931	0.0485	3.98
P-013	0.1767	0.0104	17.01	0.1767	0.0104	17.01
P-015	0.1352	0.0187	7.25	0.5249	0.0000	-
P-105	0.1733	0.0061	28.42	0.1681	0.0488	3.45
P-106	0.2629	0.0097	27.22	0.1015	0.0562	1.81
P-108	0.2241	0.0116	19.30	0.4199	0.0105	39.91
P-115	0.0554	0.0122	4.56	0.3239	0.0270	12.01
P-107	0.1035	0.0060	17.11	0.2324	0.0379	6.13
P-109	0.2279	0.0132	17.24	0.7067	0.0000	-
P-111	0.1894	0.0005	385.35	0.4508	0.0006	757.14
P-119	0.0811	0.0146	5.55	0.3579	0.0115	31.18
P-121	0.2786	0.0105	26.51	0.1568	0.0549	2.86
P-117	0.1307	0.0032	41.23	0.3596	0.0181	19.83
P-120	0.1707	0.0018	96.60	0.2407	0.0238	10.13
P-122	0.0194	0.0170	1.14	0.2710	0.0412	6.58
P-123	0.2389	0.0087	27.48	0.3856	0.0079	48.83
P-127	0.3853	0.0058	66.41	0.2640	0.0758	3.48
P-129	0.2645	0.0150	17.60	0.2838	0.0664	4.27
P-125	0.3262	0.0152	21.53	0.3549	0.0529	6.70
P-126	0.1308	0.0085	15.46	0.0501	0.0719	0.70
P-124	0.3269	0.0092	35.54	0.3249	0.0317	10.24
P-130	0.1264	0.0027	46.44	0.2463	0.0498	4.94
P-132	0.0674	0.0035	19.00	0.1007	0.0608	1.66
P-118	0.0342	0.0083	4.10	0.4375	0.0226	19.34
P-134	0.1177	0.0094	12.54	0.2194	0.0388	5.65
mean	0.1693	0.0089	36.20	0.2782	0.0361	37.24
S.E.	0.0944	0.0045	67.82	0.0944	0.0045	139.02

3. 未処理細胞および CDDP 処理細胞のサブクローンにおける CDDP と X 線感受性との関係

未処理細胞および CDDP 3 回処理細胞から, それぞれ 30 個のクローンを分離し, それらクローンを CDDP で 1 時間処理, または X 線照射して感受性を調べた。生存曲線の解析は前述と同様に L-Q モデルに従って行った。算出した α , β 値を表 2 および表 3 に示した。CDDP 感受性では CDDP 3 回処理細胞クローンの平均 α 値は未処理細胞クローンのその約 42% で, 有意に小さく, β 値は両者で変わらない。また, X 線感受性については,

表 3 3 cycle CDDP 処理細胞の 30 クローンの CDDP および X 線に対する細胞生存曲線パラメータ, α , β 値

CDDP 感受性に関しては, CDDP 処理クローンの平均 α 値は未処理のクローンのそれより有意に小さい ($p < 0.001$)。平均 β 値および平均 α/β 値には有意差はみられない。
X 線感受性に関しては, CDDP 処理クローンの平均 β 値は未処理のクローンのそれより有意に大きい ($p < 0.001$)。平均 α 値および平均 α/β 値には有意差はみられない。

clones	CDDP sensitivity			X-ray sensitivity		
	$\alpha((\mu\text{M})^{-1})$	$\beta((\mu\text{M})^{-2})$	$\alpha/\beta(\mu\text{M})$	$\alpha(\text{Gy}^{-1})$	$\beta(\text{Gy}^{-2})$	$\alpha/\beta(\text{Gy})$
T-001	0.0683	0.0022	31.03	0.0819	0.0936	0.88
T-004	0.0372	0.0027	13.72	0.1080	0.0771	1.40
T-006	0.0599	0.0081	7.37	0.4152	0.0138	30.00
T-003	0.0782	0.0047	16.60	0.1793	0.0568	3.16
T-005	0.0594	0.0033	17.81	0.2930	0.0407	7.20
T-012	0.0556	0.0096	5.77	0.0000	0.1190	0.00
T-002	0.0672	0.0048	14.01	0.2037	0.0660	3.09
T-008	0.0644	0.0004	159.41	0.2626	0.0483	5.44
T-013	0.0670	0.0010	70.05	0.4918	0.0030	164.21
T-007	0.0743	0.0023	32.93	0.0524	0.0743	0.70
T-015	0.0357	0.0068	5.26	0.2771	0.0545	5.08
T-016	0.0702	0.0022	31.94	0.2858	0.0427	6.69
T-011	0.0000	0.0395	0.00	0.2027	0.0690	2.94
T-014	0.0774	0.0190	4.09	0.3591	0.0155	23.18
T-027	0.0011	0.0193	0.06	0.0336	0.0897	0.37
T-017	0.0396	0.0018	21.46	0.2848	0.0494	5.76
T-018	0.1533	0.0000	-	0.2090	0.1273	1.64
T-033	0.0718	0.0015	48.93	0.4784	0.0208	23.04
T-042	0.1385	0.0199	6.95	0.2239	0.0295	7.60
T-047	0.1050	0.0039	27.20	0.1057	0.0720	1.47
T-051	0.0358	0.0023	15.70	0.0967	0.0680	1.42
T-040	0.0749	0.0209	3.59	0.4022	0.0582	6.91
T-041	0.0655	0.0107	6.12	0.2816	0.0618	4.56
T-048	0.0247	0.0090	2.74	0.0000	0.0882	0.00
T-032	0.1079	0.0012	89.77	0.1619	0.0691	2.34
T-043	0.2004	0.0000	-	0.3461	0.0185	18.70
T-046	0.1242	0.0046	26.74	0.5210	0.0044	118.14
T-053	0.0229	0.0074	3.11	0.1970	0.0773	2.55
T-028	0.0599	0.0021	28.90	0.1413	0.0682	2.07
T-029	0.0936	0.0060	15.52	0.2028	0.0554	3.66
mean	0.0711	0.0072	25.24	0.2299	0.0577	15.14
S.E.	0.0423	0.0085	32.98	0.1402	0.0303	35.00

CDDP 3 回処理細胞クローンの平均 β 値は未処理細胞クローンのその約 160% で, 有意に大きく, α 値は両者で変わらない。これら各 30 クローンの平均の α , β 値で

図7 未処理および3 cycle 処理細胞の各30 クローンのCDDP 処理に対する生存曲線のパラメータの平均値で描いた生存曲線。CDDP 処理細胞のクローンは、未処理細胞のクローンと比較して、 α 値 β 値ともに小さく、低濃度から高濃度を通じて、未処理細胞よりも抵抗性を示す。

図8 未処理および3 cycle 処理細胞の各30 クローンのX 線に対する生存曲線のパラメータの平均値で描いた生存曲線。CDDP 処理細胞のクローンは、未処理細胞のクローンと比較して、 α 値が小さく β 値が大きいため、低線量域(2.25 Gy 以下)において未処理細胞よりも抵抗性を示す。

描いたCDDP 処理およびX 線の生存率曲線を図7および図8に示す。一方、個々のクローンの生存率曲線から、CDDP およびX 線感受性に関する $D_{10} \sim D_{90}$ を10%間隔で算出し、未処理細胞の30 クローンおよびCDDP 3 回処理細胞の30 クローンそれぞれについて、CDDP 感受性とX 線感受性の相関関係を分析した。それらの一部を図9 (未処理細胞の30 クローン) および図10 (CDDP 3 回処理細胞の30 クローン) に示す。未処理細胞のクローンについては $D_{10} \sim D_{90}$ のいずれにおいても有意な相関はみられなかった。一方、CDDP 3 回処理を行った細胞の30 クローンについては、 $D_{10} \sim D_{80}$ では相関は有意ではなかったが、 D_{90} において、有意な相関がみられた。3 回処理細胞のクローンについて、 $D_{10} \sim D_{90}$ で感受性を評価した場合における、CDDP 感受性と放射線感受性の相関係数 (r 値) の変化を図11に示した。危険率5%で相関が有意と判断される r 値の領域をドット域で示したが、 D_{90} において、CDDP 感受性とX 線感受性が有意な相関を示すことが明らかにされた。また、各30 クローンについて、CDDP 感受性とX 線感受性との相関関係を α 値および β 値に関して調べたが、未処理細胞の30 クローンについては、 α 値に関しては $r=0.115$ 、 β 値に関しては $r=0.137$ で有意な相関はなく、また、CDDP 3 回処理細胞のクローンについては、 α 値に関しては $r=0.313$ 、

β 値に関しては $r=0.0289$ であり、CDDP 3 回処理細胞のクローンの α 値に関しては有意差水準の危険率10%で、境界領域の有意な相関を示した。

IV. 考 察

培養細胞を用いた実験系での、CDDP 耐性誘導に関しては多くの報告がなされており、耐性機構に与する幾つかの因子も明らかになりつつあるが、放射線との交差耐性について論じたものは少ない。加えて、多くの実験は、耐性誘導に用いるCDDP 処理方法として、段階的に処理濃度を増加させ、最終的にきわめて高濃度での処理を行っている^{5,17)}。このような誘導耐性が通常臨床的に用いられるCDDP 投与量と投与スケジュールで生じるかどうか疑わしい。CDDP 化学療法で広く用いられている1週間に20~30 mg/m² CDDP の3~5日連日投与といったタイプの投与スケジュールにおいては、腫瘍細胞は、比較的低濃度のCDDP に持続的に曝されることとなるため、こうした状況に近い条件下での実験系が望ましいと考えられる。20 mg/m²/day×5 days CDDP 投与患者における血中Pt量に関するBonettiらの報告²²⁾によると、血中タンパク分子と結合のない遊離のPtの濃度は0.1 μg/ml (=0.51 μM) 前後であり、今回耐性誘導実験に用いたCDDP 0.5 μM とほぼ同じである。また、

図9 未処理細胞の30 クローンにおけるCDDP感受性と放射線感受性の相関 (D₁₀～D₉₀値間の関係)

図10 3 cycle CDDP 処理を行った細胞の30 クローンにおけるCDDP感受性とX線感受性の相関 (D₁₀～D₉₀値間の関係)

図11 CDDP 3 cycle 処理細胞の30 個のクローンについて、CDDP および X 線感受性を D₁₀～D₉₀で評価した場合における両感受性の相関係数の変化 (危険率5%の確率で相関が有意となる領域をドットで示した)

今回のような比較的短期間で、正確に制御された実験条件下での耐性誘導方法は、臨床的な条件下でのモデルとして有用であると考えられる。

今回の実験では、1 回よりも 2 回の CDDP 処理によ

り、より高い CDDP 抵抗性の誘導がみられた。しかし、3 回処理ではそれ以上の抵抗性誘導はみられていない。また、この誘導抵抗性は少なくとも 12 週間は変化せず、安定した表現型であることが確かめられ、このことはほかの報告^{15,23,24)}の結果と一致している。しかし、抵抗性の程度は D₁₀レベルで比較して、3 回処理を行ったもので、未処理細胞の約 2 倍であり、ほかの報告^{17,25,26)}と比べると比較的小さい値であった。このことは、今回観察された抵抗性機構が、高濃度処理によってきわめて大きな抵抗性変化のみられたほかの報告とは異なることを示唆するものと思われる。CDDP 耐性の機構は多因子性であることが知られており^{17,23,27)}、それらは、i) 細胞内 CDDP 蓄積量の低下^{28,29)}、ii) GSH などの-SH 分子の関与する機構^{24,26)}、iii) p 53 依存性の細胞周期および apoptosis 制御機構の変化^{4,30)}、iv) DNA 修復機構の亢進^{5,25,29)}などである。一方、放射線抵抗性機構としては、i) 細胞内-SH 分子の関与する機構^{7,31)}、ii) p 53 依存性の細胞周期調および apoptosis 制御機構の変化^{32,33)}、iii) DNA 損傷修復機構の亢進³⁴⁾などが知られている。したがって、CDDP 抵抗性と放射線抵抗性の共通の機構としては、GSH な

どの関与する機構、細胞周期および apoptosis 発現制御機構の変化、DNA 損傷修復の亢進といった機構が考えられている。DNA 修復に関しては、CDDP の主な殺細胞機構が DNA cross-link の形成であり、この DNA 損傷は主にヌクレオチド除去修復により修復される^{35,36)}と考えられている一方で、放射線による DNA 損傷は単鎖および二重鎖切断がその殺細胞効果において、より重要であり、CDDP による DNA 損傷とは違った修復機構^{37,38)}により修復されるという点を考慮すると、DNA 修復が交差耐性に関与するとすれば、こうした異なるタイプの修復過程の一部に共通する因子が存在するためによると考えられる。実際、DNA ポリメラーゼ δ または ϵ と結合し、DNA 合成開始に関与する PCNA (proliferating cell nuclear antigen) のような因子は、X 線・UV・CDDP による損傷の修復に共通して関与することが明らかにされている^{39,40)}。さらに最近、ヌクレオチド除去修復とは異なる電離放射線による DNA 損傷修復、おそらく塩基除去修復または主鎖切断修復、に PCNA が関与することも明らかにされている⁴¹⁾。

本研究では、CDDP 処理を行った 30 個のクローンにおいて、CDDP 感受性と X 線感受性との間に、細胞生存率のごく高い領域 (D_{90} 以上) において有意な相関がみられた。このことは、CDDP 抵抗性獲得細胞は亜致死損傷 (SLD; sublethal damage) の蓄積容量が増加したことを示唆するもので、CDDP・X 線双方の SLD 修復に影響する何らかの共通因子が関与している可能性がある。事実 CDDP 処理細胞のクローンの平均 α 値は未処理細胞と変わらないが、 β 値は有意に増加している。 β 値は理論的には亜致死損傷が 2 個以上蓄積して致死損傷になる係数を表すことから、この考え方を支持している^{20,42)}。Lehnert らは、melphalan および adriamycin に対する耐性を誘導したヒト腫瘍細胞がみられた放射線との交差耐性が、 α 値の減少と β 値の増加によるものであったことを指摘しており、さらに、split-dose irradiation による分析から、耐性細胞において亜致死損傷からの修復の亢進がみられたことを報告している¹²⁾。同様に、Britten らは、誘導 CDDP 耐性ヒト卵巣がん細胞においてみられた放射線との交差耐性が主に α 値の減少によるものであったことを報告しているが、彼らの実験では、GSH を枯渇させると、耐性細胞の放射線による生存曲線における α 値は親株程度まで上昇したことから、GSH の関与を示唆している¹⁵⁾。放射線抵抗性における GSH の機能は、radical scavenger としての直接的な作用だけではなく、DNA 損傷の修復に関与することを示唆する幾つかの報告^{43,44)}があることはこのような意味から重要である。

本研究の分析方法として、L-Q モデルを用いたが、放射線による生存率曲線を分析する別のモデルとして、従

来から D_0 と n (外挿値) をパラメータとする多標的 1 ヒットモデルが用いられている。この方法は、大線量域での分析には実測値との適合性の良いことからよく用いられてきたが、低線量域、特に曲線の肩の部分では実測値との適合が悪く、理論的にも初期勾配がゼロになる欠点が指摘された^{45,46)}。一方、L-Q モデルは 1 ヒットで致死的損傷を起こす係数の α と 2 ヒットで致死的損傷を起こす係数の β とをパラメータとする理論的根拠を持ち、多くの細胞で低線量域の実測値との適合が良いことが明らかにされた⁴⁷⁾。また、通常 1 回 2 Gy の比較的低線量域を用いる放射線治療において、腫瘍の放射線感受性は病理組織型に依存することが知られているが、L-Q モデルによる分析では低線量域での細胞生存率に病理組織型依存性がみられるが、 D_0 , n を用いる分析では、そのような依存性がみられず、放射線治療における観察結果と矛盾することも明らかにされている^{48,49)}。本研究で用いた L-Q モデルによる分析は、この意味で低線量域での分析に適していると考えられる。こうした低線量域における生存率は、実際の放射線治療に対する腫瘍の反応を分析するうえで重要な指標の一つと考えられており⁴⁸⁾、CDDP 前処理細胞において CDDP 感受性と放射線感受性との間に今回観察されたような相関が存在することは、放射線と薬剤の併用療法のスケジュールの最適化を検討するうえで十分に考慮されるべき要因の一つと考えられる。特に最近、大規模な第 III 相臨床試験でその有効性が確認された過分割照射法 (hyperfractionation, HF) のような照射方法においては、1 回の照射線量が 1.2 Gy 程度^{50,51)}と、従来の通常分割照射よりも小さくなるため、耐性誘導細胞はこのような放射線照射方法に抵抗性を示す可能性があり、注意が必要である。事実、図 8 に示したように、X 線感受性に関するクローンの平均的生存率曲線での違いはわずかであるが、CDDP 未処理と 3 回処理後のそれぞれにおいて、過分割照射法で一般に用いられる照射法である 1.2 Gy の 60 回照射後の生存率を、照射ごとにそれぞれの効果が独立していると仮定して計算すると、前者で 8.83×10^{-11} であるのに対し、後者では 4.42×10^{-10} と、CDDP 処理細胞では約 5 倍の値を示すことから理解できる。

CDDP を含む導入化学療法後に放射線治療を行う方式の併用療法では、放射線単独と比較して治療効果に有意差がないとする効果が多く⁵²⁻⁵⁴⁾、また、治療成績は放射線単独より、むしろ低下するとする報告がある⁵⁵⁾。このことの原因に化学療法による放射線抵抗性誘導が関与しているかどうかは、はっきりした結論が得られていないが、化学療法後の治療休止期間中に残存する薬剤耐性細胞の再増殖が大きな要因である可能性が大きい^{56,57)}。腫瘍内にもともと存在する細胞遺伝学的に不均一な細胞集

団の化学療法に対する応答やその機構は、それぞれの集団で異なる可能性があり⁵⁸⁾、今後の研究が必要である。

V. 結 論

培養ヒト扁平上皮がん細胞に対する低濃度の CDDP 処理によって明らかな CDDP 抵抗性が誘導された。このような誘導 CDDP 抵抗性は少なくとも 3 カ月は持続し、安定であった。CDDP 処理回数が多いと、より抵抗性は増大した。CDDP 前処理を行った細胞のクローン間において、生存率のごく高い領域での CDDP 感受性と X 線感受性の間に、有意な正の相関がみられた。また、CDDP 処理細胞クローンの X 線に対する細胞生存率曲線では重致死損傷の蓄積容量が増大する傾向が認められた。このことから、CDDP 処理細胞において、CDDP および X 線双方の重致死損傷の蓄積容量の増大に関する何らかの共通した因子が存在することを示唆していると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご検閲を賜りました東京医科歯科大学歯学部歯科放射線学講座佐々木武仁教授に深甚なる謝意を表します。さらに、本研究を遂行するにあたり、種々のご教示をいただきました、同講座土門正治助教授ならびに三浦雅彦博士に心より感謝いたします。最後に、終始温かいご支援をいただきました同教室の諸先生方に深くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Shen, D.-W., Fojo, A., Chin, J. E., Roninson, I. B., Richert, N., Pastan, I. and Gottesman, M. M. : Human multidrug-resistant cell lines : Increased *mdr* 1 Expression can precede gene amplification. *Science* 232 : 643-645, 1986.
- 2) Tsuruo, T. : Mechanism of multidrug resistance and implications for therapy. *Jpn. J. Cancer Res.* 79 : 285-296, 1988.
- 3) Lowe, S. W., Ruley, H. E., Jacks, T. and Housman, D. E. : p53-Dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74 : 957-967, 1993.
- 4) Perego, P., Giarola, M., Righetti, S. C., Supino, R., Caserini, C., Delia, D., Pierotti, M. A., Miyashita, T., Reed, J. C. and Zunino, F. : Association between cisplatin resistance and mutation of *p53* gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Res.* 56 : 556-562, 1996.
- 5) Masuda, H., Ozols, R. F., Lai, G.-M., Fojo, A., Rothenberg, M. and Hamilton, T. C. : Increased DNA repair as a mechanism of acquired resistance to *cis*-diaminedichloroplatinum (II) in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* 48 : 5713-5716, 1988.
- 6) Urade, M., Sugi, M. and Matsuya, T. : Further characterization of bleomycin-resistant HeLa cells and analysis of resistance mechanism. *Jpn. J. Cancer Res.* 79 : 491-500, 1988.

- 7) Louie, K. G., Behrens, B. C., Kinsella, T. J., Hamilton, T. C., Grotzinger, K. R., Mckoy, W. M., Winker, M. A. and Ozols, R. F. : Radiation survival parameters of antineoplastic drug-sensitive and -resistant human ovarian cancer cell lines and their modification by buthionine sulfoximine. *Cancer Res.* 45 : 2110-2115, 1985.
- 8) Green, J. A., Vistica, D. T., Young, R. C., Hamilton, T. C., Rogan, A. M. and Ozols, R. F. : Potentiation of melphalan cytotoxicity in human ovarian cancer cell lines by glutathione depletion. *Cancer Res.* 44 : 5427-5431, 1984.
- 9) Milbrandt, J. D., Heintz, N. H., White, W. C., Rothman, S. M. and Hamlin, J. L. : Methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cells have amplified a 135-kilobase-pair region that includes the dihydrofolate reductase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 6043-6047, 1981.
- 10) Wang, J., Kobayashi, M., Sakuraba, K., Imamura, M., Moriuchi, T. and Hosokawa, M. : Possible roles of an adult T-cell leukemia (ATL)-derived factor/thioridoxin in the drug resistance of ATL to adriamycin. *Blood* 89 : 2480-2487, 1997.
- 11) Britten, R. A., Wärenius, H. M., White, R., Browning, P. G. W. and Green, J. A. : Melphalan resistant human ovarian tumor cells are cross-resistant to photons, but not to high LET neutrons. *Radiother. Oncol.* 18 : 357-363, 1990.
- 12) Lehnert, S., Greene, D. and Batist, G. : Radiation response of drug-resistant variants of a human breast cancer cell line. *Radiat. Res.* 118 : 568-580, 1989.
- 13) Ensley, J. F., Jacobs, J. R., Weaver, A., Kinzie, J., Crissman, J., Kish, J. A., Cummings, G. and Al-Sarraf, M. : Correlation between response to cisplatin-combination chemotherapy and subsequent radiotherapy in previously untreated patients with advanced squamous cell cancers of the head and neck. *Cancer* 54 : 811-814, 1984.
- 14) Ochs, J. J., Tester, W. J., Cohen, M. H., Lichter, A. S. and Ihde, D. C. : "Salvage" radiation therapy for Intrathoracic small cell carcinoma of the lung progressing on combination chemotherapy. *Cancer Treat. Rep.* 67 : 1123-1126, 1983.
- 15) Britten, R. A., Peacock, J. and Wärenius, H. M. : Collateral resistance to photon and neutron irradiation is associated with acquired cis-platinum resistance in human ovarian tumor cells. *Radiother. Oncol.* 23 : 170-175, 1992.
- 16) Twentyman, P. R., Wright, K. A. and Rhodes, T. : Radiation response of human lung cancer cells with inherent and acquired resistance to cisplatin. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 20 : 217-220, 1991.
- 17) Shen, D.-W., Akiyama, S.-i., Schoenlein, P., Pastan, I. and Gottesman, M. M. : Characterization of high-level cisplatin-resistant cell lines established from a human hepatoma cell line and human KB adenocarcinoma cells : cross-resistance and protein changes. *Br. J. Cancer* 71 : 676-683, 1995.
- 18) Kamata, N., Chida, K., Rikimaru, K., Horikoshi, M., Enomoto, S. and Kuroki, T. : Growth-inhibitory effects of epidermal growth factor and overexpression of its receptors on human squamous cell carcinomas in

- culture. *Cancer Res.* 46 : 1648-1653, 1986.
- 19) Galiana, C., Fusco, A., Martel, N., Nishihira, T., Hirohashi, S. and Yamasaki, H. : Possible role of activated *ras* genes in human esophageal carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 54 : 978-982, 1993.
- 20) Chadwick, K. H. and Leenhouts, H. P. : A molecular theory of cell survival. *Phys. Med. Biol.* 18 : 78-87, 1973.
- 21) Fertil, B., Dertinger, H., Courdi, A. and Malaise, E. P. : Mean inactivation dose : A useful concept for intercomparison of human cell survival curves. *Radiat. Res.* 99 : 73-84, 1984.
- 22) Bonetti, A., Franceschi, T., Apostoli, P., Messori, A., Sperotto, L., Cetto, G. L., Molino, A. and Leone, R. : Cisplatin pharmacokinetics using a five-day schedule during repeated courses of chemotherapy in germ cell tumors. *Ther. Drug Monit.* 17 : 25-32, 1995.
- 23) Ohshita, F., Fujiwara, Y. and Saijo, N. : Radiation sensitivities in various anticancer-drug-resistant human lung cancer cell lines and mechanism of radiation cross-resistance in a cisplatin-resistant cell line. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 119 : 28-34, 1992.
- 24) Hospers, G. A. P., Mulder, N. H., de Jong, B., de Ley, L., Uges, D. R. A., Fichtinger-Schepman, A. M. J., Scheper, R. J. and de Vries, E. G. E. : Characterization of a human small cell lung carcinoma cell line with acquired resistance to *cis*-diamminedichloroplatinum (II) *in vitro*. *Cancer Res.* 48 : 6803-6807, 1988.
- 25) Eastman, A. and Schulte, N. : Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to *cis*-diamminedichloroplatinum (II), *Biochemistry* 27 : 4730-4734, 1988.
- 26) Godwin, A. K., Meister, A., O'Dwyer, P. J., Huang, C. S., Hamilton, T. C. and Anderson, M. E. : High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell line is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 3070-3074, 1992.
- 27) Richon, V. M., Schulte, N. and Eastman, A. : Multiple mechanisms of resistance to *cis*-diamminedichloroplatinum (II) in murine leukemia L 1210 cells : *Cancer Res.* 47 : 2056-2061, 1987.
- 28) Bungo, M., Fujiwara, Y., Kasahara, K., Nakagawa, K., Ohe, Y., Sasaki, Y., Irino, S. and Saijo, N. : Decreased accumulation as a mechanism of resistance to *cis*-diamminedichloroplatinum (II) in human non-small cell lung cancer cell lines : Relation to DNA damage and repair. *Cancer Res.* 50 : 2549-2553, 1990.
- 29) Chao, C. C. -K. : Decreased accumulation as a mechanism of resistance to *cis*-diamminedichloroplatinum (II) in cervix carcinoma HeLa cells : Relation to DNA repair. *Molec. Pharmacol.* 45 : 1137-1144, 1994.
- 30) Brown, R., Clugston, C., Burns, P., Edlin, A., Vasey, P., Vojtesek, B. and Kaye, S. B. : Increased accumulation of p 53 protein in cisplatin-resistant ovarian cell lines. *Int. J. Cancer* 55 : 678-684, 1993.
- 31) Miura, M. and Sasaki, T. : Role of Glutathione in the intrinsic radioresistance of cell lines from a mouse squamous cell carcinoma. *Radiat. Res.* 126 : 229-236, 1991.
- 32) Russel, J., Wheldon, T. E. and Stanton, P. : A radio-resistant variant derived from a human neuroblastoma cell line is less prone to radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.* 55 : 4915-4921, 1995.
- 33) Haas-Kogan, D. A., Yount, G., Haas, M., Levi, D., Kogan, S. S., Hu, L., Vidair, C., Deen, D. F., Dewey, W. C. and Israel, M. A. : p 53-Dependent G 1 arrest and p 53-independent apoptosis influence the radiobiologic response of glioblastoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 36 : 95-103, 1996.
- 34) Schwartz, J. L., Rotmensch, J., Giovanazzi, S., Cohen, M. B. and Weichselbaum R. R. : Faster repair of DNA double-strand breaks in radioresistant human tumor cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 15 : 907-912, 1988.
- 35) Dijt, F. J., Fichtinger-Schepman, A. M. J., Berends, F. and Reedijk, J. : Formation and repair of cisplatin-induced adducts to DNA in cultured normal and repair-deficient human fibroblasts. *Cancer Res.* 48 : 6058-6062, 1988.
- 36) Damia, G., Imperatori, L., Stefanini, M. and D'Incalci, M. : Sensitivity of CHO mutant cell lines with specific defects in nucleotide excision repair to different anti-cancer agents. *Int. J. Cancer* 66 : 779-783, 1996.
- 37) Weaver, D. T. : What to do at an end : DNA double-strand-break repair. *Trends Genet.* 11 : 388-392, 1995.
- 38) Rathmell, W. K. and Chu, G. : Involvement of the Ku autoantigen in the cellular response to DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 7623-7627, 1994.
- 39) Miura, M., Domon, M., Sasaki, T. and Takasaki, Y. : Induction of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) complex formation in quiescent fibroblasts from a xeroderma pigmentosum patient. *J. Cell. Physiol.* 150 : 370-376, 1992.
- 40) Miura, M., Domon, M., Sasaki, T., Kondo, S. and Takasaki, Y. : Restoration of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) complex formation in xeroderma pigmentosum group A cells following *cis*-diamminedichloroplatinum (II)-treatment by cell fusion with normal cells. *J. Cellular. Physiol.* 152 : 639-645, 1992.
- 41) Miura, M., Sasaki, T. and Takasaki, Y. : Characterization of X-ray-induced immunostaining of proliferating cell nuclear antigen in human diploid fibroblasts. *Radiat. Res.* 145 : 75-80, 1996.
- 42) Peacock, J. H., Cassoni, A. M., McMillan, T. J. and Steel, G. : Radiosensitive human tumour cell lines may not be recovery deficient. *Int. J. Radiat. Biol.* 54 : 945-953, 1988.
- 43) Edgren, M. and Revesz, L. : Induction and repair of single-strand DNA breaks after X-irradiation of human fibroblasts deficient in glutathione. *Int. J. Radiat. Biol.* 40 : 355-363, 1981.
- 44) Lai, G.-M., Ozols, R. F., Young, R. C. and Hamilton, T. C. : Effect of glutathione on DNA repair in cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 81 : 535-539, 1989.
- 45) Alper, T. : *Cellular Radiobiology*. Cambridge, 1979. Cambridge University Press, 33-49.
- 46) Fertil, B., Deschavanne, P. J., Lachet, B. and Malaise, E. P. : *In vitro* radiosensitivity of six human cell lines. A comparative study with different statistical models. *Radiat. Res.* 82 : 297-309, 1980.
- 47) Barendsen, G. W. : Dose fractionation, dose rate and

- iso-effect relationships for normal tissue responses. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8 : 1981-1997, 1982.
- 48) Deacon, J., Peckham, M. J. and Steel, G. G. : The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother. Onc.* 2 : 317-323, 1984.
  - 49) Fertil, B. and Malaise, E. P. : Intrinsic radiosensitivity of human cell line is correlated with radioresponsiveness of human tumors : Analysis of 101 published survival curves. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 11 : 1699-1707, 1985.
  - 50) 佐々木武仁 : 頭頸部腫瘍の放射線抵抗性要因の分析. 頭頸部腫瘍 21 : 570-575, 1995.
  - 51) Beck-Bornholdt, H.-P., Dubben, H.-H., Liertz-Petersen, C. and Willers, H. : Hyperfractionation : where do we stand? *Radiother. Oncol.* 43 : 1-21, 1997.
  - 52) Adjuvant chemotherapy for advanced head and neck squamous cell carcinoma. Final report of the head and neck contracts program. *Cancer* 60 : 301-311, 1987.
  - 53) Jaulerry, C., Rodriguez, J., Brunin, F., Jouve, M., Mosseri, V., Point, D., Pontvert, D., Validire, P., Zafarani, B., Blaszk, B., Asselain, B., Pouillart, P. and Brugere, J. : Induction chemotherapy in advanced head and neck tumors : results of two randomized trials. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 23 : 483-489, 1992.
  - 54) Lewin, F., Damber, L., Jonsson, H., Andersson, T., Berthelsen, A., Bjorklund, A., Blomqvist, E., Evensen, J. F., Hansen, H. S., Hansen, O., Jetlund, O., Mercke, C., Modig, H., Overgaard, M., Rosengren, B., Tausjo, J. and Ringborg, U. : Neoadjuvant chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck : a randomized Phase III study. *Radiother. Oncol.* 43 : 23-28, 1997.
  - 55) Leborgne, F., Leborgne, J. H., Doldan, R., Zubizarreta, E., Ortega, B., Maisonneuve, J., Musetti, E., Hekimian, L. and Mezzera, J. : Induction chemotherapy and radiotherapy of advanced cancer of the cervix : a pilot study and Phase III randomized trial. *Int. J. Radiat. Onc. Biol. Phys.* 37 : 343-350, 1997.
  - 56) Tannock, I. F. : Combined modality treatment with radiotherapy and chemotherapy. *Radiother. Oncol.* 16 : 83-101, 1989.
  - 57) Peters, L. J. and Withers, H. R. : Applying radiobiological principles to combined modality treatment of head and neck cancer-the time factor. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 39 : 831-836, 1997.
  - 58) Richardson, M. E. and Siemann, D. W. : Tumor cell heterogeneity : impact on mechanisms of therapeutic drug resistance. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 39 : 789-795, 1997.