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

増山 祥二・片倉 隆一・高橋 康・北原 正和・鈴木 二郎・佐々木武仁*

Enhancement of the Effect of X-irradiation against Cultured Human Glioblastoma Cells by Pretreatment with ACNU

Shoji MASHIYAMA, Ryuichi KATAKURA, Kou TAKAHASHI, Masakazu KITAHARA,
Jiro SUZUKI and Takehito SASAKI*

*Division of Neurosurgery, Institute of Brain Diseases, Tohoku University, Sendai; *Department of Dental Radiology and Radiation Research, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo*

Abstract

Human glioblastoma A-7 (GB A-7) cells can apparently recover from potentially lethal X-irradiation. The authors, using a colony-forming assay, studied the influence of pretreatment with 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride (ACNU) on the effectiveness of X-irradiation against GB A-7 cells grown in monolayers and as multicellular spheroids. Pre-exposure to ACNU inhibited the recovery of irradiated GB A-7 cells. In monolayer cells, the combination treatment was most effective when ACNU was applied 2 to 8 hours prior to irradiation, and the larger the X-ray dose, the more potent the effect. ACNU pretreatment was more effective against large spheroids (enhancement ratio 1.86) than against small ones (1.34). Large spheroids showed necrosis, whereas small ones did not. Isobolographic analysis disclosed that the effect of combining X-irradiation and ACNU is within an additive envelope at the surviving fraction of 10^{-2} , while supra-additive at the surviving fraction of 10^{-3} . These results suggest that the potency of X-irradiation is augmented by ACNU pretreatment through an interactive mechanism. Further, suppression of recovery from X-ray induced potentially lethal damage was influenced by the presence of necrosis.

Key words: X-irradiation, ACNU, glioblastoma, anticancer therapy

I はじめに

脳腫瘍に対する放射線・化学療法の効果の解析は、主に樹立細胞株の単層培養細胞やスフェロイドを用いて研究され、放射線とニトロソウレア系薬剤の併用による効果増強についても報告されてきた^{5,16,17)}。一方、放射線や制癌剤に対する細胞の感受性は、用いる細胞株によって著しく異なることが最近明らかにされ、ヒト脳腫瘍に対する効果予測法としてはヒトの細胞を用い、しかも腫瘍組織構造を反

映した実験系を用いることが重要視されている。このような報告は今までのところいくつかみられる^{6,12,20)}が、ヒト脳腫瘍細胞に対して真に併用療法が有効かどうかは明らかでない。

本研究では、従来主に用いられてきたラットグリオーマ細胞^{7,16,17)}ではなく、ヒトグリオブラストーマ細胞を用い、固形腫瘍の組織構造を有するスフェロイドを構築して X 線と ACNU の併用効果を解析し、その効果増強機構を明らかにすることを目的とした。

東北大学脳疾患研究施設脳神経外科 *東京医科歯科大学放射線科

Address reprint requests to: S. Mashiyama, M.D., Division of Neurosurgery, Institute of Brain Diseases, Tohoku University, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980.

受稿 1988年5月2日 受理 1989年3月15日

II 材料および方法

1. 単層培養

腫瘍細胞はヒトのグリオブラストーマより樹立されたグリオブラストーマ A-7 (GB A-7) 細胞の継代50代以上のものを⁴⁾を用いた。培養は、Eagle's minimum essential medium (MEM) 液 (Earle's base, 非不可欠アミノ酸, 1 mM ビルビン酸ナトリウム, ペニシリン・ストレプトマイシン含有) に 10% fetal bovine serum (FBS, Flow Laboratories, Rockville, Maryland, U.S.A.) を使用し, 37°C, 5% CO₂, 95% air, 100% 湿度の条件下で行った。単層培養法において, 対数増殖期の細胞 (倍加時間19時間) と培養開始後14~16日間を経て定常状態になった細胞の両者を用いて実験を行った。なお, この定常状態では培地交換を行っても細胞数の変動はみられない。

2. スフェロイド培養

スフェロイドの作製は, 直径90 mm のプラスチックベトリ皿 (A/S Nunc Products, Roskilde, Denmark) に 10% FBS 含有の寒天層を作り, これに $2 \sim 3 \times 10^6$ 個の GB A-7 細胞を浮遊させた培養液 10 ml を乗せて培養²²⁾した。24時間後にできた細胞塊を 250 ml 容量のスピナーフラスコ (Techne 社, U.K.) に移し, CO₂ gas 培養器内で 50 rpm で回転培養^{2,18,19)}した。培地の交換は, 約2/3量を培養6日目までは2日ごとに, その後はほぼ毎日行った。回転培養開始後約6~10日で直径約150~250 μ m の壊死部を持たない小スフェロイドが得られ, 約21~28日後に直径約400~600 μ m の壊死部を持つ大スフェロイドが得られた。スフェロイドの容積は初期にはほぼ対数的に増加し, その後増加率はゆっくりと減少した。すなわち, 培養2~4日の初期の体積倍加時間は約48時間であったが, それ以後は徐々に増加し16日目には約144時間となった。培養日数20日の平均直径は約450 μ m である。スフェロイド (直径約500 μ m) は異形成に富む細胞より成り, 周辺には細胞分裂像も散見される。細胞間には空胞のようにみえる部分, または無構造でエオジンに淡く染まっている部分が認められ, いずれも腫瘍細胞の変性壊死に陥った部分と考えられ, 小スフェロイドにはみられない。このような壊死所見は中心部から周辺にかけて散見されるが, 中心部で多い。

3. 細胞生存率の推定

適当数のスフェロイドを 0.1% トリプシンで 1 回洗滌後, 0.04% ペルセン加 0.1% トリプシン溶液で 37°C, 10~20 分間 incubate し, 血清を含む同量培養液を加えピペットで分散すると, 完全な単離浮遊細胞が得られた。単層培養細胞および小スフェロイドの実験では Coulter counter (Coulter Electronics, Inc., Florida, U.S.A.) にて細胞数を算定し, ま

た大スフェロイドの実験では erythrosine B 液¹⁰⁾で染色し, 非染色性の生細胞数を改良型 Neubauer 血球算定盤にて算定し, 適当な細胞数に稀釈後の細胞浮遊液を 60 mm プラスチックベトリ皿にプレートし, 16 日間培養後固定染色したのち細胞数 50 個以上から成るコロニー数を数え, 対照群のコロニー形成率を 1.0 として細胞生存率を推定した。対数増殖期および定常期の細胞ともコロニー形成率は約 30~50% であった。生存率曲線の解析は多標的 1 ヒットモデルを用い, $\text{生存率} = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^n$, $D_q = D_0 \times \ln n$ で表わされる。 D_0 は生存率曲線の直線部分において生存率を e^{-1} にするのに必要な線量, n は直線部分の縦軸への外挿値, D_q は直線部分の外挿による横軸との交点で重致死損傷の蓄積容量 (肩の大きさ) を示す。

4. X 線照射

単層培養細胞の X 線照射はベトリ皿のまま行った。スフェロイドへの照射は, 照射 24 時間前に 100 ml スピナーフラスコ (Bellco 社, Vineland, New Jersey, U.S.A.) へ移したのち, 37°C 恒温槽内で回転 (150~200 rpm) させつつ行った。スフェロイドからの単離浮遊細胞 (2 ml) の照射は, クライオチューブ (5 ml 容量) に入れて行った。X 線照射装置は島津深部治療用 X 線装置 (SHT 250M-3) を用い, 250 kV, 20 mA, フィルターは 0.3 mmCu + 1 mmAl, 焦点表面間距離 50 cm, 単層培養細胞では 1.05 Gy/分, スピナーフラスコ内のスフェロイドでは 1.09 Gy/分の条件下で行った。

5. ACNU 処理

ACNU は塩酸ニムスチン (三共より供与) を蒸留水で溶解後, ただちに 10% FBS 加培地で実験で用いる濃度に稀釈した。単層培養細胞は ACNU 加培養液をベトリ皿に加え, スフェロイドはベトリ皿中の寒天上で作用させたのち, Dulbecco's phosphate buffered 塩類溶液で 3 回洗滌後にトリプシン処理を行った。

III 結 果

1. X 線の細胞致死効果

対数増殖期の単層培養細胞に対する X 線による線量・細胞生存率曲線は, 従来の報告⁹⁾と同様の肩を持つ指数関数曲線を示した。これらの生存率曲線パラメータ (D_0 , D_q , n) を Table 1 に, また定常期細胞の生存率曲線と 10 Gy 照射後細胞分散までの時間を 0~24 時間まで変えたときの生存率の変化を Fig. 1 に示す。定常期細胞では, 照射直後の生存率曲線は対数増殖期の細胞とほとんど変わらないが, 照射後細胞分散までの時間を延長すると明らかな生存率の上昇が認められた。このような生存率の上昇は, 対数増殖期の細胞では認められない。このことは, 定常期細胞にの

Fig. 1 X-ray dose-survival curves for plateau phase monolayer glioblastoma A-7 cells. Cells were trypsinized immediately and at 6 and 24 hours after irradiation. Surviving fractions at various times after 10-Gy irradiation are also shown ($\blacktriangle$).

み照射直後には本来致死性であった損傷からの回復、すなわち potentially lethal damage からの回復 (PLD 回復) が存在することを示している。

スフェロイド (大および小) の X 線照射による線量・細胞生存率曲線を Fig. 2 に、そのパラメータを Table 1 に示す。小スフェロイドにおける細胞の X 線感受性は定常期の単層培養細胞とほぼ同じであったが、大スフェロイドではより明らかな抵抗性が認められた。しかし、照射線量 14 Gy までの範囲では低酸素細胞の存在を示す二相性の曲線は得られなかった。スフェロイドからの cell suspension を照射したときの生存曲線でのパラメータも Table 1 に示すが、スフェロイドの大・小では差がなかった。また、照射 24 時間後に細胞を分散し細胞生存率を求めると、大・小いずれのスフェロイドでも生存率が上昇し、PLD 回復があることを示した。

2. ACNU の細胞致死効果

種々の濃度の ACNU を対数増殖期および定常期の細胞に 2 時間作用させた直後、6 時間後、および 24 時間後の生

Table 1 Cell survival parameters with X-irradiation alone and in combination with ACNU

Cells		D ₀ (Gy)	D _q (Gy)	n	
Exponentially growing cells					
X-ray alone	(0 hrs)	1.6	2.2	4.0	
	(24 hrs)	1.6	3.2	7.4	
ACNU (3 μg/ml) + X-ray		(0 hrs)	1.1	2.3	8.1
Plateau phase cells					
X-ray alone	(0 hrs)	1.2	2.6	8.7	
	(24 hrs)	1.8	2.2	3.4	
ACNU (3 μg/ml) + X-ray		(0 hrs)	1.1	2.2	7.4
Cell suspension					
large spheroids		1.6	1.9	3.2	
small spheroids		1.5	1.9	3.6	
Small spheroids					
X-ray alone	(0 hrs)	1.9	3.5	6.3	
	(24 hrs)	2.4	2.4	2.7	
ACNU (3 μg/ml) + X-ray	(0 hrs)	1.3	1.6	3.4	
	(24 hrs)	1.6	1.1	2.0	
Large spheroids					
X-ray alone	(0 hrs)	2.0	2.5	3.5	
	(24 hrs)	2.5	2.4	2.6	
ACNU (3 μg/ml) + X-ray	(0 hrs)	1.1	1.2	3.0	
	(24 hrs)	1.2	0.9	2.1	

D_0 : 37% dose slope, D_q : quasithreshold dose, n: extrapolation number, $\log_e n = D_q/D_0$.

Fig. 2 X-ray dose-survival curves for small and large glioblastoma spheroids. Spheroids were trypsinized immediately and 24 hours after irradiation.

Table 2 Cell survival parameters with ACNU treatment alone and in combination with X-irradiation

Cells	C_0 ($\mu\text{g/ml}$)	C_q ($\mu\text{g/ml}$)	n
Exponentially growing cells			
ACNU alone	1.4	2.2	4.8
ACNU+X-ray (4 Gy)	0.95	2.5	13.9
Plateau phase cells			
ACNU alone	1.2	2.3	6.8
ACNU+X-ray (4 Gy)	1.0	2.3	10.0
Small spheroids			
ACNU alone	1.2	1.6	3.8
Large spheroids			
ACNU alone	1.0	1.8	6.0

C_0 : 37% concentration slope, C_q : quasithreshold concentration, n: extrapolation number, $\log_e n = C_q/C_0$.

Fig. 3 ACNU concentration-survival curves for plateau phase monolayer glioblastoma cells. Cells were trypsinized immediately and 6 and 24 hours after ACNU treatment. Surviving fractions at various times after ACNU (7.5 $\mu\text{g/ml}$) treatment are also shown (Δ). All cells were treated with ACNU for 2 hours (washing, 3 times).

生存率曲線のパラメータを Table 2 に、また定常期の細胞生存率曲線を Fig. 3 に示す。同時に ACNU 7.5 $\mu\text{g/ml}$ を 2 時間作用させ、細胞分散までの時間を種々に変えた場合の

Fig. 4 ACNU concentration-survival curves for exponentially growing glioblastoma cells, small spheroids, and large spheroids. All cells were treated with ACNU for 2 hours (washing, 3 times).

曲線も図示する。生存率曲線では対数増殖期より定常期のほうが C_0 値がわずかに小さいが、処理後の細胞分散までの時間による生存率は両者とも変わらなかった。このことは、両細胞とも PLD 回復がないことを示している。Fig. 4 に大・小スフェロイドに ACNU を 2 時間作用させた直後に細胞分散を行った場合の濃度・生存率曲線および対照として対数増殖期の細胞生存率曲線を、また Table 2 にそのパラメータを示す。小スフェロイドでは対数増殖期に比して C_0 値がわずかに小さく定常期細胞と同じであるが、大スフェロイドでは明らかに C_0 値が減少していた。

3. X 線と ACNU の併用効果

併用時期：対数増殖期および定常期細胞における X 線と ACNU の投与間隔による細胞生存率の変化を Fig. 5 に示す。対数増殖期の細胞では X 線 (7 Gy) 照射 2~8 時間以前に、また定常期細胞では 2~24 時間以前に ACNU (3 $\mu\text{g/ml}$, 2 時間) 処理を開始すると、相加効果以上の効果が得られた。

生存率曲線(対数増殖期)：対数増殖期の単層培養細胞において、ACNU 濃度を固定させて X 線線量—生存率曲線を求めると、ACNU 併用により D_0 値が 1/1.5 に減少し、線量が多い場合には相加以上の効果を示した (Table 1)。また、X 線線量を固定させて ACNU 濃度—生存率曲線を

Fig. 5 Effects of ACNU (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) combined with 7-Gy X-irradiation on exponentially growing and plateau phase glioblastoma cells. Surviving fractions are plotted against the time interval between the addition of ACNU to the medium and X-irradiation. a, b: additive range.

求めると、X線照射の併用により C_0 値は減少し、各濃度を通じて相加以上の効果が認められた (Table 2)。

生存率曲線 (スフェロイド)：直径約200 μm の壊死部のない小スフェロイドを用いて、X線単独および ACNU (3

$\mu\text{g}/\text{ml}$, 2時間) 処理直後に X線照射を施行し細胞分散して求めた細胞生存率曲線を Fig. 6 left に示す。X線単独では、照射直後に比し24時間後に細胞分散を行ったほうが生存率は上昇し、 D_0 値でも1.9から2.4 Gy へと有意の増加を示した ($p < 0.05$)。ACNUを併用すると、X線単独の場合にみられる生存率の上昇はみられず、 D_0 値は照射直後には1.3 Gy, 24時間後には1.6 Gy で有意差はなかった。このことから、ACNUの併用によりX線によるPLDからの回復が阻害されていることが判る。 10^{-2} を示す線量をX線単独、ACNU併用時のPLD回復後の生存率曲線から推定すると、それぞれ 12.3 ± 1.2 Gy, 9.2 ± 2.2 Gy で、ACNUによる増感比 (ER) は 1.34 ± 0.36 であった。

壊死部を有する大スフェロイド (直径約500 μm) を用いて、X線単独および ACNU 処理2時間後に X線照射を行い細胞分散して得た細胞生存率曲線を Fig. 6 right に示す。ACNU併用によって同様にPLD回復が阻害されていることが判る。 10^{-2} を示す線量をX線単独、ACNU併用時のPLD回復後の生存率曲線から推定すると、それぞれ13.8 Gy, 7.4 Gy で、ACNUによるERは1.86であった。

isobologram：等効果 (細胞生存率 10^{-2} および 10^{-3}) を起こすのに必要なX線線量とACNU濃度が、併用によってどの程度減少するかを isobologram¹⁵⁾ によって解析した。Fig. 7 に X線あるいは ACNU 単独の生存率曲線から推定

Fig. 6 Dose-survival curves for glioblastoma cells in small spheroids (left) and large spheroids (right) treated by X-irradiation alone and by ACNU (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 hours) followed by X-irradiation. Cells were trypsinized immediately after irradiation, or 24 hours later. The surviving fraction for ACNU treatment alone was normalized to 1.0.

Fig. 7 Isobolograms of exponentially growing glioblastoma cells (*left*) and plateau phase cells (*right*). The effect of treatment with ACNU ($3 \mu\text{g/ml}$) prior to X-irradiation is supra-additive at the surviving fraction (SF) of 10^{-3} .

した相乗範囲を示す。生存率 10^{-2} に対しては対数増殖期および PLD 回復後の定常期細胞とも併用時の値(図中の Δ)は相乗効果の範囲に入るが、生存率 10^{-3} に対しては両者とも ACNU ($3 \mu\text{g/ml}$)との併用で明らかな相乗効果を示し、その程度は定常期細胞のほうが大きかった。同様に、PLD 回復後の小および大スフェロイドのデータからの isobologram では、やはり生存率 10^{-3} に対して両スフェロイドとも相乗効果を示し、その程度は大スフェロイドでより大きかった (Fig. 8)。

IV 考 察

1. GB A-7 細胞の放射線、ACNU 感受性

対数増殖期の GB A-7 細胞の放射線感受性は、 D_0 が 1.6 Gy , n が 4.0 と従来の報告^{16,17)}とほとんど差異はなく、HeLa 細胞をはじめとする多くの培養哺乳動物細胞とも D_0 および n 値において大きな相違は認められなかった^{3,11,14)}。しかし、通常の放射線治療で用いられる 2 Gy 照射時の生存率は約 $0.7 \sim 0.8$ で、ヒト腫瘍細胞のなかではもっとも放射線抵抗性を有する細胞と考えられる³⁾。

定常期細胞では、X 線照射後 24 時間経たのち細胞分散を行うと、対数増殖期ではみられなかった細胞生存率の上昇が認められ、これは PLD 回復と考えられた。神経膠芽腫からの培養細胞では、放射線による PLD 回復は大きいことが報告されている²¹⁾。スフェロイドでも同様に PLD 回復が観察され、ヒトの放射線抵抗性腫瘍からの培養細胞のうち数種について、定常状態での PLD 回復能が他の細胞種に比して大きいとの報告^{9,21)}もあることから、大線量

照射の際に重要な問題と考えられる。他方、ACNU に対する感受性はラットグリオーマ細胞 (RG C-6 細胞) に比して非常に高く、生存率 10^{-1} を与える濃度比で約 10 倍、 C_0 値で約 6 倍ほど小さい^{16,17)}。また、ACNU による細胞生存率の低下は時間が経っても回復せず、X 線照射後にみられたような PLD 回復は存在しないことが明らかになった。一般に、化学療法剤に対する感受性は放射線感受性よりもはるかに大きい相違が細胞間でみられるとされている¹³⁾が、GB A-7 と RG C-6 の間でも同様の傾向を示した。最近の報告では、細胞内の O^6 -alkylguanine alkyltransferase¹⁾を前投与しておけば、ニトロソウレア系薬剤に抵抗性を有する細胞の感受性が高まると言われている。RG C-6 細胞はかなり ACNU 抵抗性であるが、この薬剤の使用によって、GB A-7 細胞との差が縮小する可能性があると思われた。

2. ACNU と X 線の併用効果

ACNU と X 線との併用効果については、RG C-6 細胞を用いた杉山ら¹⁷⁾により詳細に報告されている。今回の実験では、ヒトより得られた GB A-7 細胞で同様の実験を行ったが、単層培養細胞で D_0 値および C_0 値が減少することから、杉山らと同様の結果が得られた。なお、C-6 細胞では定常期の単層培養細胞を作製するのが困難なため、杉山らの報告では PLD 回復についてはまったく触れられていない。

本実験で ACNU は X 線照射後の PLD 回復を阻害することが初めて明らかにされ、そのことも ACNU と X 線を併用した際に相乗効果以上の効果を示す因子であると考え

Fig. 8 Isobolograms of small spheroids (left) and large spheroids (right). At the surviving fraction (SF) of 10^{-3} , the effect on both small and large spheroids is supra-additive.

られる。PLD回復の阻害は定常期細胞の細胞生存率曲線でも明らかのように、線量が大きく生存率が低いところでより顕著である。このことから、ACNUとX線照射との併用ではX線の線量を多くしたほうがより有効であると言える。壊死部を持つ大スフェロイドでは、単層培養細胞や壊死部を持たない小スフェロイドに比して、ACNUがより有効に作用することが明らかにされている¹⁶⁾。事実、ACNUやBCNUはスフェロイドの辺縁部の細胞より中心部の細胞に対してより有効であることが知られている^{7,8)}。一方、中心部の細胞は一般に低酸素性でX線に対して抵抗性であるため、GBA-7細胞では両者を併用すると小スフェロイドに対するER(1.34)よりも大スフェロイドに対するER(1.86)のほうが大きくなったと考えられる。

V 結 語

ヒトグリオブラストーマ細胞(GBA-7)の対数増殖期および定常期の単層培養細胞、さらに固形腫瘍モデルのスフェロイドを用いて、X線とACNUとの併用による効果増強機構を解析し、以下の結論が得られた。

1. 対数増殖期および定常期細胞ともに、ACNU処理開始後2時間目にX線照射をすると真の相乗効果がみら

れることから、両者の致死効果に相互作用のあることが示唆された。

2. 定常期およびスフェロイドの細胞は、X線照射後にPLD回復がみられるが、ACNU単独処理後のPLD回復はなく、両者を併用するとX線によるPLD回復は阻害された。

3. ACNUは、小スフェロイドよりもX線に対してもっとも抵抗性を示す壊死部を持つ大スフェロイドに対してより有効であり、併用による増感率も大スフェロイドに対してもっとも大きい。

4. 生体内固形腫瘍では、両者の併用は本来相互作用を有すること、PLD回復を阻害すること、壊死部の存在による効果増強機構があることの3者が加算して殺細胞効果を増強することが考えられ、臨床応用上の有効性を示唆していると考えられた。

GBA-7細胞を供与頂きました東京大学放射線基礎医学教室 馬嶋秀行 博士に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Dolan ME, Young GS, Pegg AE: Effect of O⁶-alkylguanine

- pretreatment on the sensitivity of human colon tumor cells to the cytotoxic effects of chloroethylating agents. *Cancer Res* 46: 4500-4504, 1986
- 2) Durand RE, Sutherland RM: Growth and radiation survival characteristics of V79-171b Chinese hamster cells: A possible influence of intercellular contact. *Radiat Res* 56: 513-517, 1973
 - 3) Fertil B, Malaise EP: Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 7: 621-629, 1981
 - 4) Gerweck LE, Kornblith PL, Burlett PB, Wang J, Sweigert S: Radiation sensitivity of cultured human glioblastoma cells. *Radiology* 125: 231-234, 1977
 - 5) Hoshino T, Deen DF, William ME, Sano Y: Differential response of elutriated 9L cells to treatment with 1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res* 41: 4401-4407, 1981
 - 6) Jones AC, Stratford IJ, Wilson PA, Peckham MJ: In vitro cytotoxic drug sensitivity testing of human tumour xenografts grown as multicellular tumour spheroids. *Br J Cancer* 46: 870-879, 1982
 - 7) Kitahara M, Katakura R, Suzuki J, Sasaki T: Experimental combination chemotherapy of ACNU and 5-Fu against cultured glioma model (spheroid) and subcutaneous rat glioma. *Int J Cancer* 39: 675-682, 1987
 - 8) Kwok TT, Twentyman PR: The relationship between tumour geometry and the response of tumour cells to cytotoxic drugs. An in vitro study using EMT6 multicellular spheroids. *Int J Cancer* 35: 675-682, 1985
 - 9) 増田康治, 荒巻亮二, 高木東介: 人の脳腫瘍由来細胞の in vitro における放射線感受性. 癌の臨 26: 519-524, 1980
 - 10) Phillips R: Dye exclusion tests for cell viability, in Kruse PF Jr, Patterson MK Jr (eds): *Tissue Culture, Methods and Applications*. New York, Academic, 1973, pp 406-408
 - 11) 佐々木武仁: 放射線治療における癌細胞動態の意義. 癌の臨 27: 1507-1515, 1981
 - 12) 佐々木武仁: 培養固型腫瘍モデル(スフェロイド)の腫瘍生物学的研究における利用. 放線生物研 19: 195-208, 1984
 - 13) 佐々木武仁: 癌治療における細胞レベルの予後因子. 癌の臨 32: 1715-1722, 1986
 - 14) 佐々木武仁, 増山祥二: 多細胞球状体(スフェロイド)における固型腫瘍の放射線感受性の比較. 組織培養研 4: 12-16, 1985
 - 15) Steel GG, Peckham MJ: Exploitable mechanism in combined radiotherapy-chemotherapy: The concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5: 85-91, 1979
 - 16) 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 線および ACNU の細胞致死効果 — 単層培養細胞とスフェロイドにおける比較 —. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 24: 758-766, 1984
 - 17) 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
 - 18) Sutherland RM, Durand RE: Hypoxic cells in an in vitro tumor model. *Int J Radiat Biol* 23: 235-240, 1973
 - 19) Sutherland RM, Durand RE: Radiation response of multicell spheroids; an in vitro tumour model. *Curr Top Radiat Res* 11: 707-714, 1976
 - 20) Sutton JE, Roos IAG, Hillcoat BL: Combined actions of 5-fluorouracil and 1-(2-chloroethyl-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea on human colonic carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* 42: 5172-5175, 1982
 - 21) Weichselbaum RR, Nove J, Little JB: Radiation response of human tumor cells in vitro, in Meyn E, Withers HR (eds): *Radiation Biology in Cancer Research*. New York, Raven, 1980, pp 345-351
 - 22) Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ: A simplified method for production and growth of multicellular spheroids. *Cancer Res* 37: 3639-3643, 1977

〔別刷請求先: 〒980 仙台市青葉区星陵町1-1, 東北大学脳疾患研究施設脳神経外科, 増山祥二〕