原 著

ルイス肺癌における局所温熱による 肺転移についての再検討

大泉幸雄 今宮 聡 前沢 博
玉井好史 福原 昇 母里知之

東海大学 医学部 放射線科学教室

Re-evaluation on Lung Metastases by Local Hyperthermia in Lewis Lung Carcinoma.

Yukio Ohizumi, Satoshi Imamiya, Hiroshi Maezawa,
Yoshifumi Tamai, Noboru Fukuhara and Tomoyuki Mori
Department of Radiation Oncology, School of Medicine, Tokai University.

Summary :

Local hyperthermia at 43.5 °C without raising body-temperature above 40 °C was performed in mice with Lewis lung tumors. Effects of the hyperthermia on tumor growth and development of metastases were studied. The growth of the primary tumors was inhibited, but the growth delay was only within a day. With the tumor-bearing mice, the number of large-sized metastatic lung colonies, which were considered to develop before or at the hyperthermia, were not different from control group, but the number of small-sized colonies considered to develop after the hyperthermia were significantly decreased. With non-tumor-bearing mice by resection of the primary tumors after the hyperthermia, total number of lung colonies were not significantly different from 37.5 °C of control group. There were no differences on tumor growth and development of metastases among the tumors ranging from 150 to 800 mm³ in volume at the hyperthermia and among the tumors growing in intracutis, subcutane or intramuscle. There was also no influence on development of metastases with handling of the mice at the hyperthermia.

Key Words :

局所温熱療法	Local hyperthermia
肺転移	Lung metastasis
成長遅延	Growth delay
ルイス肺癌	Lewis lung carcinoma

1. はじめに

局所温熱によって転移の亢進があるか否かは、進行癌を扱う温熱療法にとって重大な関心事である。実験腫瘍では、局所温熱によっては転移の促進はないという報告が多いが¹⁾⁻⁶⁾、腫瘍系や実験条件によっては転移が促進されるという報告もある⁷⁾⁻¹⁰⁾。我々の用いたルイス肺癌では、43℃以上の局所温熱処理時に肺転移の促進傾向がみられることを報告した¹¹⁾。その時の全身温は41℃近くになったが、41.4℃60分の下半身温熱で転移促進がみられなかった為、転移促進は全身温の上昇の為ではなく、局所加温による腫瘍血管のダメージによる血中への腫瘍細胞の流入増加によるものだろうとした¹¹⁾。しかし、マウスの全身温の上昇の影響が直接的には否定できなかった。

そこで今回は全身温の上昇を40℃まで抑えた43.5℃前後の局所加温法の改良を行い、腫瘍の成長及び転移に及ぼす効果について調べた。転移の評価は、前報告では温熱後も担癌状態のマウスだけであったが、今回は温熱後腫瘍を切除した時の転移の状態も加えて再検討した。また、転移に影響を与えるかも知れない実験日の腫瘍容積の違い、皮内・皮下・筋肉内腫瘍等、発育場所での違い、温熱操作自体による転移促進をみるために無処置と37.5℃処置での違いについても調べた。

2. 材料と方法

実験動物と腫瘍：C 57 BL/6 マウスの側腹部皮下に継代されているルイス肺癌を無菌的に取り出し、壊死部を除き、洗浄後生食中で鉄にて細切し、浮遊細胞を得た。細胞を $1 \sim 7 \times 10^5$ 個/30 $\sim$ 50 μ l に調整し、5週令の雌のBDF 1 マウス(日本チャールズ・リバー社、厚木)の右下腿部筋肉・皮下・皮内に移植した。マウスは7 $\sim$ 10匹毎をケージに入れ、クリーンラックにて飼育した。移植後数日で測定可能となり、以後週に2 $\sim$ 3回腫瘍径を測定した。腫瘍径は3径を同一実験者が測定し、腫瘍容積を楕円体とし、 $3.14 / 6 \times$ 長径 $\times$ 短径 $\times$ 厚さの式で求めた。腫瘍容積が150 $\cdot$ 350 $\cdot$ 400 $\cdot$ 800 mm^3 の時点で温熱を行った。尚、一群

のマウスの数は7 $\sim$ 10匹とした。

温熱：担癌下肢を恒温槽(Thermo-minder ; 太陽科学工業株式会社、東京)で加温した。恒温槽の温度は、設定温度の ± 0.1 ℃に保たれた。温度測定は、標準温度計で更正された銅-コンスタンタン熱電対を用いて、腫瘍内と肛門より2 $\sim$ 3cmの腸内温度を測定した。腫瘍内温度は温熱開始後約3分で温水とほぼ一致した。43.7℃の温熱では、腸内温は最高39.7℃であり、マウスの体温上昇は1.0℃以内であった。温熱処理は、実験シリーズ間で異なるが、43.5℃前後で45分あるいは60分とした。対照群は、温熱群と同様に37℃の恒温槽に60分以上おいた。温熱はすべて無麻酔で行った。

アッセイ法：

(1) 担癌マウス：温熱後も引き続き移植腫瘍の径を計測し、温熱の移植巣への効果を観察した。その評価は、対照群の平均腫瘍容積が2000 mm^3 付近で、処置群の腫瘍容積との比較及び成長遅延日数とした。成長遅延日数は、移植巣の成長曲線を描き、処置群の腫瘍容積が150 mm^3 より1500 mm^3 あるいは200 mm^3 より2000 mm^3 に至るまでに必要な日数を求め、対照群のその日数を差し引いた日数とした。肺転移は、一定の日(主に移植後18日目)に解剖し、その時点での肺転移数を大きさ別に数えた。転移発生の時期については、前報告で詳しく述べたが、解剖時の転移の大きさから逆に転移の発生時期を推定した¹²⁾。この方法に準じて転移発生曲線を求め、温熱処理時及びその以前に発生したと考えられる大きな肺転移と温熱後に発生したと考えられる小さな転移とに分けて、それぞれについて対照群とt-検定をした。

(2) 温熱後担癌下肢を切断したマウス：温熱後30分、6、24、48時間後に担癌下肢を麻酔下のもとに膝より切断した。麻酔は、ネンプタールを60mg/kg腹腔内投与した。上記の担癌マウスの場合と同様に一定の日(主に移植後18日目)に解剖し、直後に肺転移の数を大きさ別に数えた。

(3) 実験日の腫瘍容積の違いについては、150 $\cdot$ 350 $\cdot$ 400 $\cdot$ 800 mm^3 の時点で43.5℃と37℃の温熱

を行った場合の、成長遅延日数・肺転移の数の違いを(1)の方法に従って求めた。皮内・皮下・筋肉内腫瘍での違いも同様の方法に従った。温熱操作自体による転移の影響をみるためには、無処置と37.5 °C処置での違いを同様の方法で調べた。

3. 結 果

(1)温熱後担癌状態のマウスでの抗腫瘍効果と肺転移への影響：Fig. 1は、43.5 °C 60 分間の局所温熱時の腫瘍成長曲線及び肺転移発生曲線を示す。腫瘍容積は、温熱1日後に浮腫によって一時

Fig. 1 : Growth curves (upper) and metastasis curves (lower).

Local hyperthermia at 37.5 °C for 60 min. (○) or 43.5 °C for 60 min. (●) was performed 10 days after implantation of Lewis lung carcinoma. Growth delay was assayed. Number and size of lung metastases counted at autopsy were plotted according to growth of lung metastasis¹²⁾. Number of large-sized metastases (developed around hyperthermia) and small-sized metastases (developed after hyperthermia) were compared between 43.5 °C and 37.5 °C.

的な増大があったが、3～4日後には対照より小さくなった。肺転移は大きなものは対照群と変わらなかったが、温熱処理以降に発生すると考えら

れる小さな転移は減少した。また、肺転移の発生曲線は、移植巣の成長曲線と良く似た曲線が描かれた。Table 1は、各実験における処置による成

Table 1 : Effects of local hyperthermia on tumor growth.

Exp.	Tumor volume ^a mm ³	Growth delay (days)	Mean tumor volume (mm ³) ± S.D.	
			37.5 °C 60min.	43.5 °C 45-60min.
1	150	0.4	2656 ± 225 (10)	2628 ± 354 (10)
2	300	0.8	1964 ± 210 (10)	1578 ± 417 (10) **
3	350	0.6	1545 ± 139 (10)	1320 ± 320 (10)
4	350	0.7	1704 ± 197 (9)	1443 ± 207 (9) *
1	400	0.2	2604 ± 211 (14)	2494 ± 417 (16)
3	800	0.0	1896 ± 167 (10)	1914 ± 264 (10)

^a : Tumor volume at hyperthermia. *: p < 0.05 **: p < 0.001

(): Number of mice

長遅延日数及び腫瘍容積の比較を示す。実験間で効果に違いがみられたが、成長遅延日数は、0.2 ~ 0.8 日の間にあった。腫瘍容積が 1500 ~ 2000 mm³の付近での腫瘍容積を t-検定で比較すると、4 実験中 2 実験で有意差があった。各群の腫瘍容積の比較と成長遅延日数との間に不一致があるのは、各群間の腫瘍容積が処理前から既に差があったためである。Table 2 は、各実験における肺転移数を大きさ別にみたものである。大きな肺転移（温熱処理時及び前に発生と考えられる）の増加はなかったが、小さな転移（温熱後に転移発生と考えられる）は 6 実験中 5 実験で有意に抑制された。

(2)温熱後に担瘤下肢を切断したマウスでの肺転移：Table 3 は、温熱後に担瘤下肢を切断し、移植後 20 日目の肺転移を示す。温熱直後切断時の肺転移は、各サイズの肺転移数は 37 °C の対照群と差がなく、転移の促進はなかった。温熱 6 時間後の切断では、温熱直後切断時より転移数が少な

いが有意ではなかった。温熱 24 時間後及び 48 時間後の切断では、温熱直後切断時と比べると、大きな転移は変わらなかったが、小さな転移は温熱直後切断時より増加する傾向にあった。37 °C の場合との比較では、大きな転移は温熱直後切断時と同様に転移の促進はなかったが、小さな転移は減少傾向にあった。同実験での非切断群との比較では、大きな転移は不変であるが、小さな転移は温熱後の切断時期が延びるに従い非切断群の転移数に近づく傾向にあった。

(3)温熱時の腫瘍容積による効果の違いについて：Table 1 に示すように、腫瘍容積が小さい時に温熱処理を行ったほうが成長遅延日数が大きいようにみえる。Fig. 2 は、43.5 ± 0.1 °C、30 ~ 60 分の温熱による成長遅延と温熱時の腫瘍容積との関係を前報告のデータを含めて示す。両者の関係をピアソンの相関係数で表すと $r = 0.389$ であった。Table 2 の肺転移についてみると、温熱時の腫瘍の大きさの違いは、温熱による肺転移の

Table 2 : Effects of hyperthermia on development of metastases in tumor-bearing mice.

Exp.	at treatment (mm ³)	Mean number of metastases $\pm$ S.D.			
		large metastases		small metastases	
		37.5°C	43.5°C	37.5°C	43.5°C
1	150	7.5 $\pm$ 4.0	7.3 $\pm$ 6.3	53 $\pm$ 36	33 $\pm$ 12 *
2	300	6.6 $\pm$ 8.8	6.7 $\pm$ 5.8	43 $\pm$ 20	23 $\pm$ 7 **
3	350	5.1 $\pm$ 5.0	2.9 $\pm$ 3.0	24 $\pm$ 14	17 $\pm$ 10
4	350	7.9 $\pm$ 5.5	4.4 $\pm$ 3.4	67 $\pm$ 24	32 $\pm$ 17 **
1	400	8.6 $\pm$ 4.9	13.3 $\pm$ 9.6	52 $\pm$ 25	31 $\pm$ 10 *
3	800	6.4 $\pm$ 4.4	3.6 $\pm$ 2.2	33 $\pm$ 9	21 $\pm$ 11 *

*: p < 0.05

**: p < 0.01

Table 3 : Effects of hyperthermia on development of metastases in the mice amputated tumor-bearing legs after hyperthermia.

Resection t hour after hyper- thermia	Mean number of metastases $\pm$ S.D.			
	large metastases		small metastases	
	37.5°C	43.5°C	37.5°C	43.5°C
t= 0.5	1.6 $\pm$ 1.4(2)	2.2 $\pm$ 2.0(2)	14.7 $\pm$ 10.1	11.6 $\pm$ 7.6
6	—	0.9 $\pm$ 1.9(7)	—	7.1 $\pm$ 7.4
24	1.2 $\pm$ 1.2(4)	1.6 $\pm$ 1.2(2)	20.8 $\pm$ 18.4	14.0 $\pm$ 11.0
48	1.3 $\pm$ 1.6(5)	1.4 $\pm$ 1.6(4)	25.3 $\pm$ 12.1	26.5 $\pm$ 13.4
no resection	1.4 $\pm$ 1.2(2)	1.9 $\pm$ 2.3(3)	66.2 $\pm$ 34.1	37.6 $\pm$ 15.9*

(): Number of mice without large-sized metastases. Each group consisted of ten mice. *: p < 0.05

Fig. 2 : Relation between growth delay and tumor volume at local hyperthermia.

Intramuscular tumors in present study (open circles) and previous studies (closed circles) and subcutaneous tumors (triangles) were heated at 43.4 ~ 43.7 °C for 30 ~ 60 min.

効果に影響を及ぼさないようにみえる。

腫瘍の発育部による温熱の効果の違いについて：皮下移植腫瘍は、筋肉内移植腫瘍と比べると、移植後やや遅れて出現し、腫瘍容積の倍加時間もやや長かったが、温熱の効果は筋肉内移植腫瘍と同様に僅かであった (Fig. 3)。転移についても筋肉内の場合と同様である。Table 4 は皮下・皮内腫瘍における成長遅延日数と転移数について対照群と比べたものである。成長遅延日数は1日までであり、肺転移は大きい転移は不変、小さい転移は不変ないし抑制され、筋肉内腫瘍の場合とほぼ同様の結果であり、発育部位の違いで温熱による効果の違いはみられなかった。

温熱操作自身による肺転移の影響：Table 5 は、無処置と 37 °C、60 分の温熱処理時の効果の差をみたものである。37 °C 処理によって、肺転移の発生に差は認められなかった。

4. 考 察

温熱等の処置によって転移促進があるか否かを論ずる場合、いつ発生する転移がどうか明確でなくて、総転移数だけで結論づけることは危険を伴う場合がある。我々は、転移発生の時期を転移コロニーの成長率を参考にし、解剖時のその大きさからさかのぼって推定してきた¹¹⁾⁻¹²⁾。この方法での温熱による転移発生への影響は、温熱後には原発腫瘍への効果と共に明らかに転移の発生は抑制されることが、今回の実験ではっきりとわかった。これは、温熱による Killing effect のため腫瘍細胞数の減少によるものと考えられる。

一般に、原発腫瘍容積と転移数は比例関係にある¹²⁾⁻¹³⁾。もし、原発巣の成長が抑制されているにも係わらず転移数が非処置腫瘍と変わらないのであれば、転移は促進状態にあるのかもしれない。ここで問題になるのは、温熱処理時に転移の促進

Fig. 3: Growth curves (upper) and metastasis curves (lower).

Intramuscular (triangles) or subcutaneous tumors (circles) were heated at 37.5 °C (open) or 43.5 °C (closed) 7 or 8 days after tumor cell implantation.

Table 4: Effects of hyperthermia on tumor growth and metastases for intradermal or subcutaneous tumors.

Tumor	Treat- ment °C	n	Growth delay (days)	Median number of metastases (range)	
				large meta.	small meta.
Subcut.	37.5	10	-	3 (1-13)	16 (12-60)
	43.5	8	1.0	2 (0-15)	18 (8-45)
Subcut.	37.5	8	-	7 (0-20)	49 (39-79)
	43.5	9	0.8	7 (1-20)	36 (11-71)
Intra- cutis	37.5	9	-	6 (0-13)	66 (40-109)
	43.5	10	0.0	3 (0-6)	50 (17-56)

n: Number of the mice. ns: No significant difference. *: $p < 0.05$

Table 5: Effect of handling the mice on development of metastases.

Exp.	Treatment	n	Median number of metastases (range)	
			large meta.	small meta.
1	No	16	7 (2-20)	49 (22-106)
	37.5°C 60min.	14	8 (1-17)	48 (19-105)
			ns	ns
4	No	9	3 (1-11)	47 (31-118)
	37.5°C 60min.	9	6 (2-16)	58 (41-105)
			ns	ns

n: Number of the mice.

ns: no significant difference.

がないかどうかである。今回の実験で温熱後も担癌状態のマウスでは、温熱時の転移は対照群と変わらなかったが、例え温熱時に促進がなくてもその後抑制があれば温熱時の促進が隠されている可能性もある。そこで温熱腫瘍切除マウスでの実験でも検討したが、担癌マウスでの実験結果と同様に処理時に転移は促進しないという結論が得られた。

局所温熱による転移促進の理由は、1) 温熱による腫瘍細胞自身の活性化による為、2) 腫瘍床の変化による血中への腫瘍細胞流出増加の為、3) 全身温の上昇による影響の為、4) 温熱操作自体の為等が考えられる。1) について、Dicksonらは吉田肉腫において 42 °C以下の温熱で転移促進が起こり、これを酸素消費度等からみて温度上昇による腫瘍細胞のメタボリズムの亢進の結果としている⁸⁾。前報告のルイス肺癌では 43 °C以下の温熱では腫瘍成長の促進もなく転移の促進もなかった¹¹⁾。2) に関しては、鈴木らは NFSa2ALM1 腫瘍で温熱後の血中腫瘍細胞数は抑制されるとしているが¹⁴⁾、小田ルイス肺癌において 42 °Cの全身温熱で血中腫瘍細胞数の増加を

認めている³⁾。しかし、43 °Cの局所温熱では転移促進はなく、全身温熱時の促進は血中の腫瘍細胞増加と共に腫瘍細胞の着床が起こりやすい環境となることから転移促進の原因としている。我々の前報告で 43 °C以上の局所温熱時に転移促進傾向は、2)の原因とした。その理由は、局所温熱で 40 °C以上に全身温が上昇したが、41.4 °Cの下半身温熱でも転移亢進がなく、3)の理由が間接的に否定された為であった。しかし、今回の実験で全身温の上昇を 40 °C以下に抑えることによって転移の促進がなくなってしまったことから、前報告の転移亢進は3)の理由によるものと考えている。小田の考えをもとに前報告での転移促進の機構を考えると、原発巣からの血中への腫瘍細胞の流出増加にはある程度の局所温度 (42 °C) が必要であり、さらに 40 °C以上の全身温の上昇による着床促進があつてはじめて転移が亢進するのかもしれない。この考えでは、43 °C以下での血中への腫瘍細胞の流出増加にも係わらず、局所温熱で転移の増加しないことに対して、疑問が生ずる、なぜなら、一般には、血中腫瘍細胞数と転移数は比例するからである¹⁵⁾。これに対しては、例え血中腫瘍細胞

胞が増えようと局所温熱の殺細胞効果で生存細胞が少なくなっているためと説明がつく。また、ルイス肺癌は、弱いながらも免疫原性をもっているため、多くの免疫原性の高い腫瘍のように、局所温熱による腫瘍破壊による免疫獲得によって転移が抑制され⁹⁾、結果として不変であったのかも知れない。しかし、この腫瘍は成長が速く、数日かかる免疫獲得による効果は出ないとも考えられる¹⁰⁾。また、温熱後の腫瘍摘除に係わらず温熱時付近の転移発生パターンは変わらず、この可能性は低いと考える。4)のArtifactによる転移促進も報告されているが¹⁷⁾、この実験では否定された。

温熱時の腫瘍の大きさは、当然温熱の効果に影響を与え、腫瘍が大きくなれば壊死も増え、温熱に効果の高い環境になっているといわれる¹⁰⁾。しかし、この実験では、150 - 800 mm³の間で著しい違いはみられなく、かつ小さい腫瘍の方に効果が高い傾向にあった。勿論、このサイズの腫瘍では、中心部壊死が起こっている。大きい腫瘍では加温が充分深部までいきとどかなかった結果と疑われるかも知れないが、皮下と筋肉内発育腫瘍との差も明瞭でなかった。確実に均等に加温を受けているはずの小さな皮下・皮内腫瘍でも効果がなかったということは、この腫瘍はかなり温熱抵抗性であると考えられる。43.5 °C、45 ~ 60 分の温熱であっても、成長遅延日数で一日足らずである。他の報告でもルイス肺癌は温熱抵抗性である^{2), 17)}。この腫瘍のように成長が速い腫瘍では、温熱の効果が低いといわれている¹⁷⁾。この理由として、温熱によって腫瘍中心部壊死が拡がろうとも、ルイス肺癌は中心部壊死に陥りやすく 200 mm³で既に壊死があり、非温熱の腫瘍の成長による自然壊死と変わらないのかも知れない。また、温熱による血流低下のため壊死細胞の除去能が悪く、見かけ上腫瘍容積はあまり変わらない可能性もある。腫瘍容積では効果が少ない場合にも、温熱後発生する小さな転移数の抑制がかなり見られることから窺える。あるいは、温熱で腫瘍細胞がたとえ死んでも、生きている細胞の再増殖が一段と促進され、効果として現われないのかも知れない。

い。

転移について、実験腫瘍で種々の結果が報告されている以上、臨床の場でも転移促進を起こすかも知れないことを念頭において温熱療法を進めるべきであろう。また、実験腫瘍では臨床に結びつく転移抑制の研究をさらに進める必要性を感じる。

5. 結 語

下腿部に移植されたルイス肺癌をもつマウスにおいて、43.5 °Cの局所温熱法による腫瘍の成長・肺転移に及ぼす効果について検討した。成長遅延日数は、一日前後と温熱抵抗性であった。肺転移は、温熱により、温熱時発生と考えられる大きな転移が増加し、温熱後発生すると考えられる小さな転移が有意に減少した。また、温熱後担癌下肢を切除したマウスの肺転移は、37 °Cの場合と変わらなかった。温熱時の腫瘍容積(150 ~ 800 mm³)の違い、皮内・皮下・筋肉内腫瘍、37 °Cと非温熱の間に、いずれも差は認められなかった。局所温熱処理時に転移は促進しないという結論を得た。

本論文の要旨は、第6回日本ハイパーサーミア学会(1989年、東京)にて発表した。この研究の一部は、文部省がん特別研究(I)(加納班)の援助によった。

文 献

- 1) Dickson J. A. and Muckle D. S. : Total-body hyperthermia versus primary tumor hyperthermia in the treatment of the rabbit VX-2 carcinoma. *Cancer Res.* 32 : 1916 - 1923, 1972.
- 2) Yerushalmi A. : Influence on metastatic spread of whole body or local tumor hyperthermia. *Europ. J. Cancer* 12 : 455 - 463, 1976.
- 3) 古賀正之 : 腫瘍転移に及ぼす全身並びに局所加温の影響に関する実験的研究. *日外会誌* 86 : 121 - 129, 1985.

- 4) Harn E. W., Alan A. A. and Kim J. H. : The significance of local tumor hyperthermia / radiation on the production of disseminated disease. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 5 : 819 - 823, 1979.
- 5) Shah S. A. : Metastasis and hyperthermia. In "Hyperthermia in cancer treatment", Anghileri L. J. and Robert J. des. Vol. 1 : pp. 191 - 227, 1986. CRC Press, Inc., Florida.
- 6) Urano M., Rice L., Epstein R., Suit H. D. and Chu A. M. : Effect of whole-body hyperthermia on cell survival, metastasis frequency, and host immunity in moderately and weakly immunogenic murine tumors. *Cancer Res.* 43 : 1039 - 1043, 1983.
- 7) Dickson J. A. and Ellis H. E. : Stimulation of tumor cell dissemination by raised temperature (42 °C) in rats with transplanted Yoshida tumors. *Nature* 248 : 354 - 358, 1974.
- 8) Dickson J. A. and Ellis H. E. : The influence of tumor volume and the degree of heating on the response of the solid Yoshida sarcoma to hyperthermia (40 - 42 °C). *Cancer Res.* 36 : 1188 - 1195, 1976.
- 9) Walker A., McCallum H. M., Wheldon T. E., Nias A. H. and Abdelaal A. S. : Promotion of metastasis of C3H mouse mammary carcinoma by local hyperthermia. *Br. J. Cancer* 38 : 561 - 563, 1978.
- 10) Nathanson S. D., Haas G. P., Bobrowski R., Lee M., Tilley B., Schultz L. and Hetzel F. : Regional lymph node and pulmonary metastases after local hyperthermia of metastases in C57BL / 6 mice. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 13 : 243 - 249, 1987.
- 11) Ohizumi Y., Maezawa H. and Mori T. : Effect of local hyperthermia on lung metastasis in Lewis lung carcinoma. *Jpn. J. Hyperthermic Oncol.* 4 : 199 - 205, 1988.
- 12) Ohizumi Y., Maezawa H. and Mori T. : Relationship between primary tumor volume and metastasis in Lewis lung carcinoma. (1) Assay for time course of development of metastasis. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 12 : 299 - 235, 1987.
- 13) Nathanson S. D., Haas G. P., Mead M. J. and Lee M. : Spontaneous regional lymph node metastases of three variants of the B16 melanoma : Relationship to primary tumor size and pulmonary metastases. *J. Surg. Oncol.* 33 : 41 - 45, 1986.
- 14) Suzuki N., Harrison G. H. and Eddy H. A. : Effect of hyperthermia treatment on tumor cell release into the blood circulation from mouse tumors in the foot. In "Progress in hyperthermic oncology", ed. Egawa, S., pp. 158 - 159, 1986.
- 15) Liotta L. A., Kleinerman J. and Saidel G. M. : Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res.* 34 : 997 - 1004, 1974.
- 16) Urano M. : Tumor response to hyperthermia. In "Hyperthermia and Oncology", eds. Urano M. and Douple E Vol. 1 : pp. 161 - 200, 1988. VSP, Utrecht.
- 17) Ando K., Urano M., Kenton L. and Kahn J. : Effect of thermochemotherapy on the development of spontaneous lung metastases. *Int. J. Hyperthermia* 3 : 453 - 458, 1987.
- 18) Magin R. L. and Johnson R. K. : Effects of local tumor hyperthermia on the growth of solid mouse tumors. *Cancer Res.* 39 : 4534 - 4539, 1979.