



Title	蛍光色素(Nitroacridine)を用いた腫瘍細胞酸素分圧の測定に関する研究
Author(s)	加藤, 勤
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1990, 50(6), p. 661-668
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/16373">https://hdl.handle.net/11094/16373</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 蛍光色素（Nitroacridine）を用いた腫瘍細胞 酸素分圧の測定に関する研究

関西医科大学放射線科学教室（主任：田中敬正教授）

加 藤 勤

（平成元年7月10日受付）

（平成元年11月13日最終原稿受付）

### Measurement of Oxygen Concentration in Tumor Cells by Fluorescent Probe (Nitrocompound)

Tsutomu Katoh

Department of Radiology, Kansai Medical University

---

Research Code No. : 402.9

---

Key Words : Radiation, Hypoxic cell, Nitroacridine, Spheroid,  
Flow cytometry

---

The hypoxic cell fraction in tumors is considered to be responsible for radioresistance. Estimating the population of the hypoxic cell fraction in tumor could develop the effective means to predict radiosensitivity. In this study, nitroacridine (fluorescent dye) was tested to estimate hypoxic status in single cells and in spheroids.

The oxygen concentration in the medium was measured by oxygen electrodes utilizing polarography method, mean while that in cells was calculated from the fluorescence intensity of the dye. The fluorescent spectra from cells showed the same pattern in spite of the changed oxygen concentration in medium, on the other hand its intensity was dependent upon the oxygen concentration. Using a fixed nitroacridine concentration and a fixed staining time, oxygen concentration of cells could be determined within range from 0.1 to 1.0% values. These values are almost the same as the oxygen concentration of the radioresistant tumor cells. Thus, the fluorescent method we used in this study is considered to be useful to estimate radioresistance of tumor. However, fluorescent intensity would alter when used different cell lines, because of different cellular activity of nitro-reductase.

#### はじめに

癌放射線療法において腫瘍の放射線抵抗性の一つに低酸素細胞の存在がある。腫瘍組織中の酸素分圧、低酸素細胞の割合 (Hypoxic cell fraction) が把握できれば、分割照射や増感剤投与法等の工夫で治療効果の向上が期待できる。従来より、腫瘍組織内の酸素分圧や低酸素細胞の分画の測定には種々の試みがなされている。Surtherland らは実験腫瘍モデルであるスフェロイド (Spheroid)

の酸素分圧を酸素電極法で測定している<sup>1)</sup>。Rockwell, 芝本らは低酸素細胞の放射線抵抗性を用いて組織中の Hypoxic fraction の分画を求めている<sup>2,3)</sup>。これらの方法は組織の局所の酸素分圧、又は間接的な分画の測定には適しているが、組織全体での酸素分圧、分画を知ることは困難とされている。最近、Begg, Durand, Olive らは、ある種のニトロ化合物が低酸素状態で生物学的ニトロ還元を受けると蛍光を発することを示唆し、この現

象を利用した新しいHypoxic cell fractionの測定方法を報告している<sup>3)~5)</sup>。今回、このニトロ化合物のひとつであるニトロアクリジン(Nitroacridine)を用いて、組織内の酸素分圧とHypoxic cell fractionの同時測定を可能とする方法について、単一遊離細胞のスフェロイドで検討したので報告する。

#### 実験方法及び材料

##### 1) ニトロ化合物

用いた蛍光色素はニトロアクリジン(Nitroakridin 3582)であり、ヘキストジャパン社より供与された。実験には、磷酸緩衝液で1mg/mlで溶解したものを培養液で使用濃度に希釈して用いた。ニトロアクリジンの構造式をFig. 1に示す。

##### 2) 細胞

用いた細胞はチャイニーズハムスターV-79細胞(以下V-79細胞と略す)とHeLa S<sub>3</sub>細胞である。いずれの細胞もEagle MEM(日本)+10%牛胎児血清(Fetal calf serum:FCS), CO<sub>2</sub>インキュベーターで継代培養した。実験には対数増殖期にある細胞をトリプシンで処理し、培養液中に2~5×10<sup>6</sup>個/mlで浮遊させた単一遊離細胞を用いた。

##### 3) スフェロイド作製方法

V-79細胞を0.5%寒天培地に播種し、Eagle MEM+10%FCSで培養し、スフェロイドを作製した。実験には培養後7日から10日後の直径300~500μmに成長したものを用いた。

##### 4) Hypoxic Chamberと培養液の酸素濃度測定

任意の低酸素状態の細胞を得るために、窒素と空気の混合ガスを流す容器を作成し、混合ガスは99.99%窒素ガス(200ml/min)にマイクロインフィージョンポンプで一定の空気(1~5ml/min)を混入させることで得た。容器内の培養液の酸素濃度を一定に保つために混合ガスの流量、攪拌速度、培養液量は同一条件で行った。容器は気密性を維持するために硬質ガラス、ステンレス、シリコンゴム栓を用いた。培養液中の酸素濃度を経時に測定するためにポーラログラフィー(Unique Medical POG-200B)の酸素電極(径200μm)を

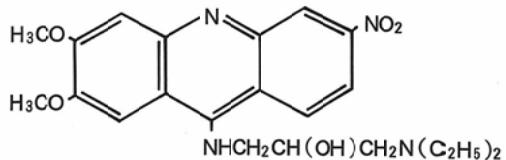


Fig. 1 The structure of Nitroakridin 3582

設置した。

##### 5) 蛍光スペクトルの測定

Aerobic(15%酸素濃度)、Hypoxic(0.25%酸素濃度)の状態の細胞をニトロアクリジン(5μg/ml)で2時間処理し、次にその細胞をホモジネートした後20%エタノールで抽出し、その抽出液の蛍光スペクトルを蛍光分光光度計(島津5000F)で測定した。

##### 6) 細胞内蛍光量の測定

0.1~20%の酸素濃度で培養されている細胞にニトロアクリジン(1, 2, 5, 10μg/ml)を1, 2, 3時間ずつ接触させた後、細胞をPBS液で2回洗浄し、70%エタノール、4℃、1時間で固定した。固定した細胞はその細胞内蛍光量を求めるために、1×10<sup>4</sup>個の蛍光ヒストグラムをフローサイトメトリー(Becton Dickinson FACS III)で測定し、この蛍光ヒストグラムの総蛍光量を測定した細胞数で除して1個当たりの平均蛍光量を算出した。この時の蛍光測定条件は、アルゴンレーザーの紫外線(360nm)で励起し、蛍光測光はLong pass filter(480nm)を用いて行った。ニトロアクリジン濃度と染色時間による蛍光量の変化、また同一染色条件での酸素濃度と細胞内蛍光量との関係を検討した。

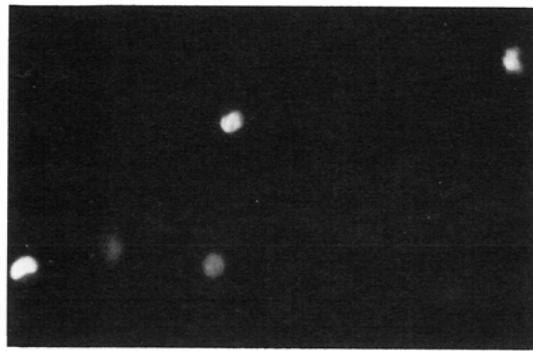
##### 7) スフェロイドにおける蛍光分布の観察

ニトロアクリジン(5μg/ml)を含む培養液中でスフェロイドを37℃、空気+5%炭酸ガス下で2時間染色後、クリオスタッフで凍結切片を作製し落射蛍光顕微鏡で顕微鏡測光を行った。

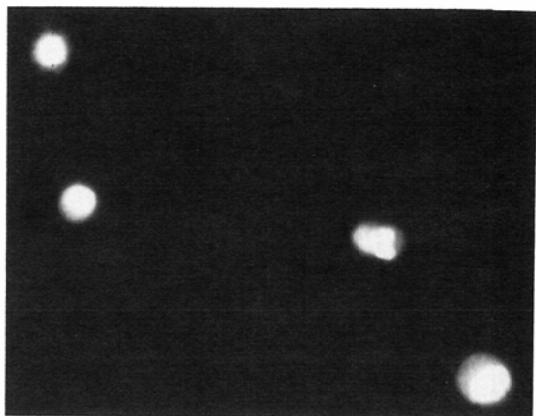
#### 結果

##### 1) 酸素濃度と蛍光量

容器内の培養液中の酸素濃度は、混合ガスを流すこと約1時間後には安定した酸素濃度が得られた(Fig. 2)。また、この混合ガス比を変化さすこ



a



b

Photo 1 Fluorescent photographs of V-79 cells (a) under aerobic conditions after 2hr incubation and (b) under hypoxic condition.

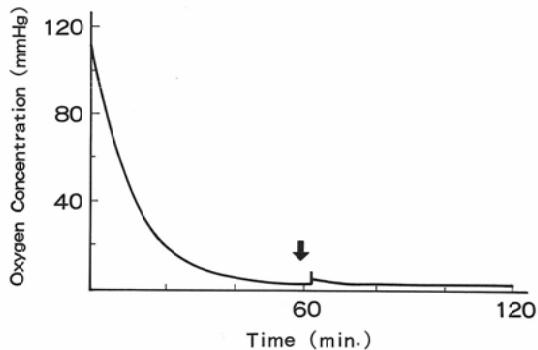


Fig. 2 The time course of oxygen concentration in the chamber. Injection timing of 0.2ml nitroacridine solution was 1hr after start of hypoxic gassing (arrow).

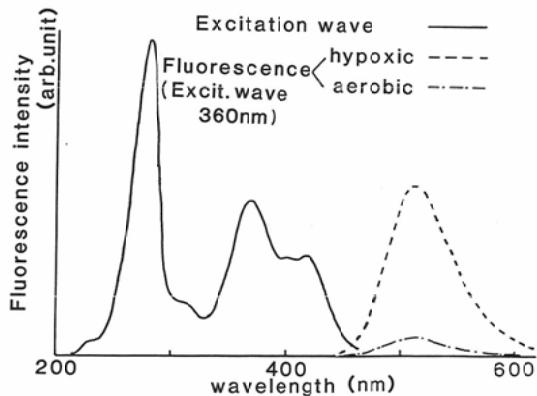


Fig. 3 Fluorescent spectrum of the nitroacridine compounds reduced in aerobic and hypoxic condition.

とで種々の酸素濃度の細胞を得られた。Photo 1 にニトロアクリジン5μg/mlで2時間染色した場合の Hypoxic (1b) と Aerobic (1a) 状態での V-79 細胞の蛍光像を示すが、Hypoxic (1b) 状態の方が強い蛍光を示した。

## 2) 蛍光スペクトル解析

Fig. 3 にニトロアクリジンで処理した細胞から抽出した溶液を紫外線(360nm)で励起して得られた蛍光スペクトルを示す。Hypoxic (0.25%酸素濃度) と Aerobic (15%酸素濃度) 状態とでは蛍光量の強度には違いを認めるが、蛍光スペクトル自身には差異を認められなかった。

## 3) 細胞内蛍光量の測定

Fig. 4 にニトロアクリジン5μg/mlで2時間染色した1×10<sup>4</sup>個のV-79細胞のHypoxic (0.25%酸素濃度) と Aerobic (15%酸素濃度) 条件でのフローサイトメトリーから得られた蛍光ヒストグラムを示すが、Hypoxic の方が強い蛍光量を示した。次に、①から③までV-79細胞で検討した結果を、④にHeLa S<sub>3</sub>細胞との比較した結果を示す。

① ニトロアクリジン濃度による蛍光量への影響：Fig. 5 に Hypoxic (0.25%酸素濃度) においてニトロアクリジン濃度を変えた時の蛍光量の経時的変化を示すが、ニトロアクリジン濃度の増加

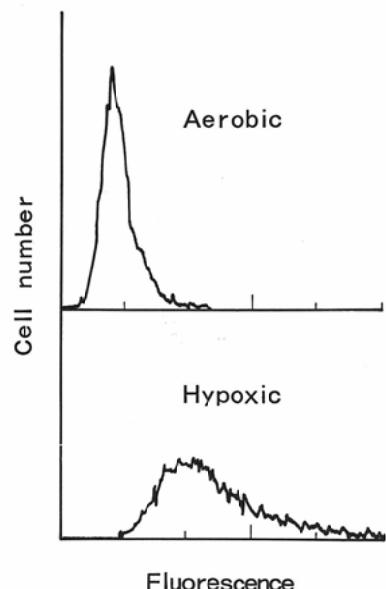


Fig. 4 Fluorescent histogram of V-79 cells (a) under aerobic conditions after 2hr incubation and (b) under hypoxic condition.

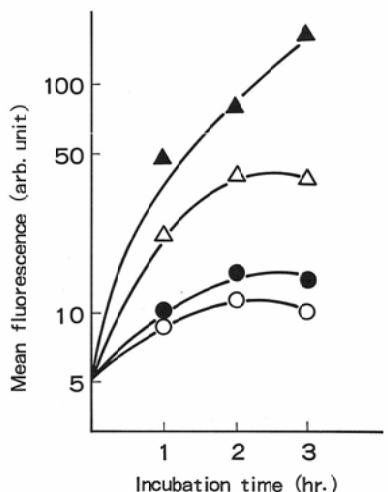


Fig. 5 Kinetics of fluorescent production of hypoxic (oxygen concentration 0.25%) V-79 cells incubated with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (▲), 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (△), 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (●), 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (○) nitroacridine.

と共に蛍光量は増加した。

② 染色時間による影響：Fig. 6 に示すようにニトロアクリジン濃度5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で2時間染色した時、Hypoxic (0.25%酸素濃度), Aerobic (15%

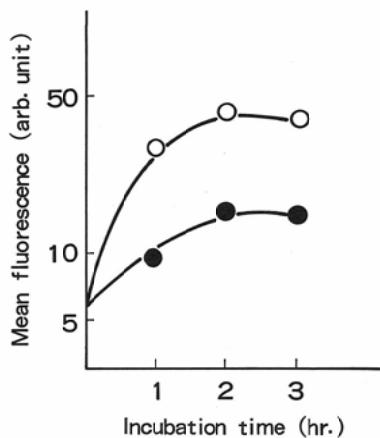


Fig. 6 Kinetics of fluorescent production of aerobic (●: oxygen concentration 15%) and hypoxic (○: oxygen concentration 0.25%) V-79 cells incubated with nitroacridine (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Mean fluorescence indicated total fluorescence/cell L numbers.

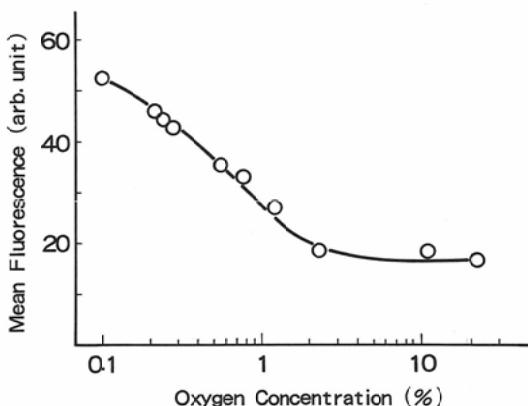


Fig. 7 Mean fluorescence of V-79 cells treated 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  nitroacridine after 2hrs at various oxygen concentrations.

酸素濃度) のいずれの状態でもその蛍光量は飽和状態に達した。しかし、Hypoxicの方が飽和状態の蛍光量は Aerobic よりも多かった。

③ 酸素濃度と蛍光量：5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のニトロアクリジン濃度で2時間染色した時の酸素濃度と蛍光量の関係を Fig. 7 に示す。酸素濃度1.0%以上では蛍光は発せず、1.0%以下では酸素濃度の低下に従って蛍光量は増大することが認められた。しかし、0.1%以下の酸素濃度の細胞は測定できなかつ

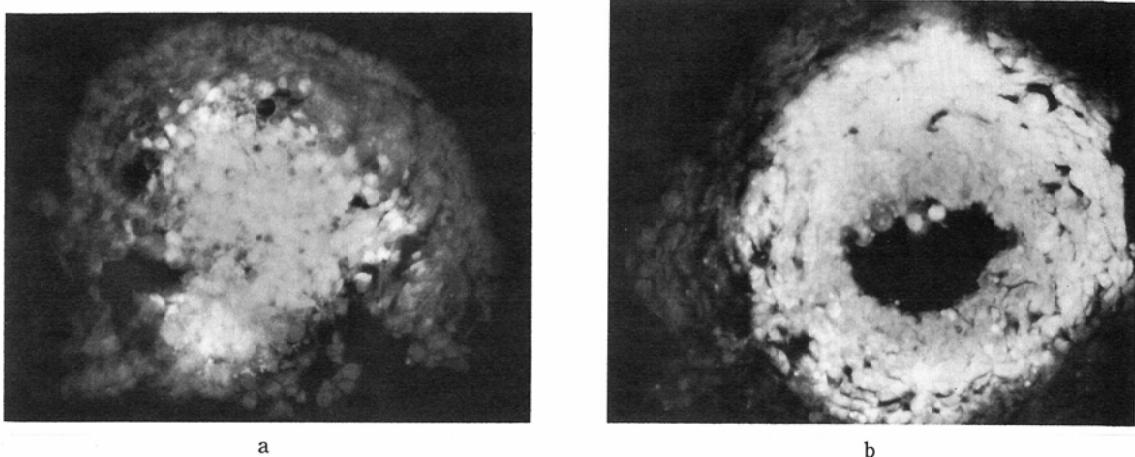


Photo 2 Fluorescent photographs of V-79 cells spheroids (a)  $\phi : 0.25\text{mm}$ , (b)  $\phi : 0.55\text{mm}$ .

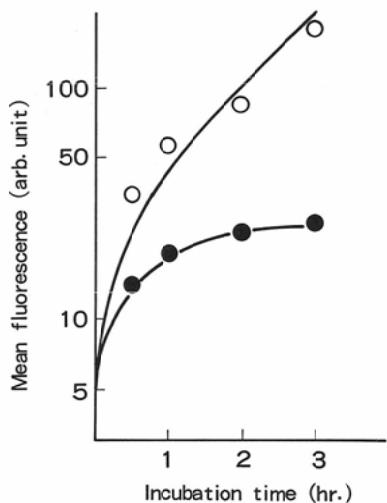


Fig. 8 Kinetics of fluorescence production of V-79 cells (○) and HeLa S<sub>3</sub> cells (●) in hypoxic condition (oxygen concentration 0.25%; NA concentration 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

た。

④ HeLa S<sub>3</sub>細胞との比較：Fig. 8 に示すように HeLa S<sub>3</sub>細胞では V-79細胞よりも蛍光量が少なく細胞系の違いによる差を認めた。

#### 2) スフェロイドにおける蛍光分布

中心部壊死を有しないスフェロイド(直径約350  $\mu\text{m}$ )においてはその中心部は周辺部よりも強い蛍光を発し、周辺部より中心部への蛍光の傾斜が

認められた (Photo 2a)。中心部壊死を有するスフェロイド(直径約550nm)では中心部分で蛍光は発せず壊死周辺部で蛍光の減弱が認められた (Photo 2b)。

#### 考 察

従来より腫瘍組織内での低酸素細胞の酸素分圧及びその分画を測定するために、種々の方法が報告されている。そのひとつに酸素電極法を用いて組織の酸素分圧を測定する手法<sup>19)</sup>があるが、これは酸素電極の破損、刺入による血管構築の破壊、電極自身の酸素消費等で正確で再現性のある結果を得にくいことが示唆されている。2番目に低酸素細胞の放射線抵抗性を利用して、間接的にその腫瘍組織中の Hypoxic cell fraction を求める方法がある<sup>6)~11)</sup>。この方法は、Hypoxic cell fraction を測定することは可能であるが、酸素分圧の程度を知ることはできない。3番目として低酸素細胞増感剤(ミソニダゾール)が低酸素細胞で代謝され細胞に結合することを利用した方法が報告<sup>12)13)</sup>されている。これは、組織内に放射性物質で標識したミソニダゾールを投与し、オートラジオグラフィーで観察することにより低酸素細胞の分布を検討するものである。しかし、この方法は低酸素細胞の分画を測定することは可能であるが、酸素分圧の測定するまでには至っていない。

最近、ある種のニトロ化合物が低酸素状態で生

物内還元を受け、その還元物質が蛍光を発することが報告<sup>3)</sup>され、その蛍光量を測定することにより、低酸素細胞の分画や酸素分圧を検討する手法が報告されている。Olive らは24種類の Nitro-heterocycle compound の Hypoxic 状態における蛍光量をフローサイトメトリーで測定し、その中で AF-2 (2-(2-furyl)-3,5-nitro-2-furyl) acrylamide) と 4NQO (4-nitroquinoline-1-oxide) が Hypoxic 細胞で Aerobic 細胞よりもその細胞蛍光量が数倍強いことを報告<sup>4)</sup>している。また、その細胞蛍光量についても蛍光色素が洗いだされてからも次第に増大するもの (AF-2, 4NQO) や 60 分後に退色するもの (NFVO : trans-5-amino-3-[(5-nitro-2-furyl) vinyl]-1,2,4, oxadiazole), また 30 分後に最大の蛍光量を示し退色するもの (NF-7 : nitrofurazone) 等さまざまな蛍光動態を示すものがあることを報告している。従って、元の色素とその還元物質の蛍光スペクトルを比較検討するだけでは、これらニトロ化合物の蛍光量やその経時的変化を予測できないと報告<sup>15)</sup>している。また、細胞系によって蛍光色素の蓄積、細胞毒性、代謝等が異なることも示唆され、この蛍光色素の化学的性質をより詳しく検討する必要があることを同時に述べている<sup>14)15)</sup>。しかし、Wardman らは nitroaryl compound のひとつである Nitrofuran で処理した細胞の蛍光量が酸素濃度と相関があり、その蛍光量が多い低酸素細胞に放射線抵抗性が認められ、蛍光色素による低酸素細胞の検討は有意義であるとしている<sup>16)</sup>。

われわれはこれらのニトロ化合物のひとつであるニトロアクリジンを用いて、低酸素細胞の酸素分圧と蛍光量の関係を検討した。蛍光スペクトルの結果からは、Hypoxic と Aerobic 状態の細胞から得られた蛍光スペクトルに差異はなく、その蛍光は同一の還元反応により発していることが示唆され、その蛍光量の差は細胞内での還元の活性の違いによるものと考えられる。また、ニトロアクリジンの処理濃度や処理時間を一定にするならば、蛍光量と酸素分圧 0.1~1.0% の間に高い相関性があることを見い出した。この結果は、蛍光量の測定することにより細胞の酸素分圧を半定量的

に測定し得ることを示唆していると考えられる。また、従来の酸素効果や増感剤等の報告<sup>17)</sup>で示されているように、放射線の抵抗性低酸素細胞の酸素分圧が 1.0% 以下であることを考慮すれば、この方法が Hypoxic cell fraction を測定する手法として充分な感度を示していると考えられる。

このニトロアクリジンを用いた手法は、蛍光像を得られないために酸素分画を測定し得る可能性がある。そのために、in vivo における本手法の可能性を検討するために実験腫瘍モデルであるスフェロイドを用いて検討した。中心壊死のないスフェロイドにおいては周辺部から中心部へ蛍光量が増加する傾斜が認められたが、これは中心部に至るほど酸素分圧が低いことを示唆していると考えられる。中心壊死を有するスフェロイドでは壊死細胞及び壊死組織近傍の細胞に蛍光がみられるかまたは蛍光量の減衰が認められたが、これは同細胞の還元活性が低下しているためではないかと考えている。しかし、壊死組織のないスフェロイドで見られた蛍光の傾斜の分布は、Surtherland らが直接に酸素電極法で測定したもの<sup>11)</sup>と良く一致しており、本手法によって、in vivo での本手法を用いた酸素分画の測定の可能性が示唆されたと考えられる。

しかし、このニトロアクリジンを用いた蛍光法による低酸素細胞を in vivo で定量的に測定するには種々の問題点がある。例えば、V-79 細胞と HeLa S<sub>3</sub> 細胞の細胞系間で蛍光量が異なること、低酸素状態での蛍光量が経時的に変化すること、ニトロアクリジン濃度の違いにより蛍光量が異なること等が挙げられる。いずれの問題点もその原因是、ニトロアクリジンの蛍光を発する機序が生物学的還元によるものであるためと考えられる。第一に、この蛍光現象には細胞内の Nitroreductase の活性が関与しており、細胞系間で蛍光量に差を生じるのも細胞系でこの Nitroreductase の活性に差があるためと考えられる。Straford らによれば、Nitroreductase によるニトロ還元量は酸素によって制限されるために、低酸素細胞であるほどニトロ化合物のアミン体への還元量が増加するとされている<sup>5)</sup>。ニトロアクリジンそれ自身は 360

nmで蛍光を発しないが還元されたアミン体は蛍光を発する。このために細胞が低酸素状態になるとほど蛍光量は増大することになる。第二にNitroreductaseによる還元反応には還元補酵素が関与しており、低酸素細胞における蛍光量増加の機序の上で、細胞内の酸素が還元補酵素に作用して、Nitroreductaseの活性を間接的に阻害することが考えられる。Nitroreductaseが還元補酵素を消費することから推測すると、好酸素状態では酸素の存在で活性にする酵素(DT-diaphorase等)が優先的に還元補酵素を消費するためにNitroreductaseの活性が低下するのではないかと考えられる<sup>20)</sup>。低酸素状態では還元補酵素が消費されにくくなるためにNitroreductaseの活性が高まり、ニトロアクリジンのアミン体への還元量が増加し、蛍光量も増大するものと考えられる<sup>21)</sup>。このようにニトロアクリジンの蛍光は、細胞の持つNitroreductaseを含めた酵素活性の程度や還元補酵素の状態に依存すると考えられる。従って、本法を用いて単一の細胞で構成されないin vivoの腫瘍組織の酸素分圧を測定するためには、今後組織ごとの生物学的還元活性を丹念に検討することが必要である。また、生物学的薬理動態や毒性についても検討しなければならないが、Stratfordらはニトロアクリジンのマウスの50%致死量(LD50)は0.19μM/gであり、この濃度で投与した30分後の血清濃度は2μM、腫瘍組織は10μM、肝臓は60μMであったとし、半減期が1時間以上あるので腫瘍組織でも十分検出可能であると報告している<sup>5)</sup>。しかし、ニトロアクリジンの毒性は強く、これにかわる低毒素のニトロ化合物の開発が望まれる。最後に、Mulcahyらによれば、低酸素細胞増感剤であるミソニダゾールも低酸素細胞内で生物内還元を受け増感効果を有する<sup>18)</sup>としており、本手法の発光の機序に類似していると考えられ興味深い。今後、ミソニダゾールの放射線増感効果とニトロアクリジンの蛍光量との関係を検討すれば、腫瘍に対する放射線増感効果の解明に役立つと考えられる。

### 結 語

ニトロアクリジンを用いた蛍光法による低酸素

細胞の酸素分圧の測定について基礎的検討を行い、以下の結果を得た。

- 1) チャイニーズハムスターV-79細胞を低酸素状態でニトロアクリジンで処理すると、その細胞内蛍光量はニトロアクリジン濃度及び染色時間により変化した。
- 2) ニトロアクリジン濃度と処理時間を一定にして染色すると、細胞内蛍光量と酸素濃度(0.1~1.0%)の間に高い相関を認めた。
- 3) HeLa S<sub>3</sub>細胞はV-79細胞よりも蛍光量が少なく、細胞系により蛍光量が異なることが認められた。
- 4) スフェロイドをニトロアクリジンで処理し、その蛍光分布を観察すると、スフェロイド周辺部から中心部への蛍光の傾斜が認められた。

最後に、本研究に当たってご助言を頂いた本教室の赤木清先生ならびに吉井義一先生に感謝致します。

本研究は昭和60年度厚生省がん研究助成金(田中班、課題番号59-11)によって遂行された。

### 文 献

- 1) Muller-Klieser WF, Surtherland RM: Influence of convection in the growth medium on oxygen tensions in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 42: 237~242, 1982
- 2) Moulder JE, Rockwell S: Hypoxic fractions of solid tumors: Experimental techniques, methods of analysis, and a survey of existing data. *Int J Radiat Biol Phys* 10: 695~712, 1986
- 3) Begg AC, Engelhardt EL, McNally NJ, et al: Nitroakridin 3582: A fluorescent nitroacridine stain for identifying hypoxic cells. *Br J Radiol* 56: 970~973, 1983
- 4) Olive PL: Cellular metabolism of fluorescent nitriheterocycles. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10: 1357~1360, 1984
- 5) Stratford MRL, Clarke ED, Hodgkiss RJ, et al: Nitroaryl compounds as potential fluorescent probes for hypoxia. II. Identification and properties of reductive metabolites. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10: 1353~1356, 1984
- 6) Howes AE: An estimation of changes in the proportions and absolute numbers of hypoxic cells after irradiation of transplanted C<sub>3</sub>H mouse mammary tumors. *Brit J Radiol* 42: 441~447, 1969
- 7) Shibamoto Y, Yukawa Y, Tsutui K, et al: Variation in the hypoxic fraction among mouse

- tumor of different types, sizes, and sites. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 77: 908-919, 1986
- 8) Denekamp J, Dische S: The proportion of hypoxic cell in a human tumor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2: 1227-1228, 1977
  - 9) Hill RP, Bush RS: A new method of determining the fraction of hypoxic cells in a transplantable murine sarcoma. *Radiat Res* 70: 141-153, 1977
  - 10) Thomlinson RH, Craddock EA: The gross response of an experimental tumor to single doses of X-rays. *Brit J Cancer* 21: 108-123, 1967
  - 11) Chapman JD, Franko AJ, Sharplin J: A marker for hypoxic cells in tumors with potential clinical applicability. *Br J Cancer* 43: 546-550, 1981
  - 12) Franko AJ, Chapman JD: Binding of <sup>14</sup>C-misonidazole to hypoxic cells in V79 spheroids. *Br J Cancer* 45: 694-699, 1983
  - 13) Denekamp J, Hirst DG, Stewart FA, Terry NHA: Is tumor radiosensitization by misonidazole a general phenomenon? *Brit J Cancer* 41: 1-9, 1980
  - 14) Olive PL: Evidence suggesting that the mechanism for aerobic and hypoxic cytotoxicity of nitroheterocycles is the same. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8: 687-691, 1982
  - 15) Olive PL, Durand RE: Fluorescent nitroheterocycles for identifying hypoxic cells. *Cancer Res* 43: 3276-3280, 1983
  - 16) Wardman P, Clarke ED, Phil M, et al: Nitroaryl compounds as potential fluorescent probes for hypoxia. 1. Chemical criteria and constraints. *Int. J Radiat Oncol Biol Phys* 10: 1347-1351, 1984
  - 17) Ling CC, Michaels HB, Gerweck LE, et al: Oxygen sensitization of a mammalian cells under different irradiation condition. *Radiat Res* 86: 325-340, 1981
  - 18) Mulcahy RT: Effect of oxygen on misonidazole chemosensitization and cytotoxicity in vitro. *Cancer Res* 44: 4409-4413, 1984
  - 19) Hasegawa T, Rhee JG, Levitt SH: Increase in tumor pO<sub>2</sub> by perfluorochemicals and carbogen. *Int Radiation Oncol Biol Phys* 13: 569-574, 1987
  - 20) Sartorelli AC: Therapeutic attack of hypoxic cells of solid tumors: Presidential address. *Cancer Res* 48: 775-778, 1988
  - 21) Keyes SR, Rockwell S, Sartorelli AC: Modification of the metabolism and cytotoxicity of bioreductive alkylating agents by dicoumarol in aerobic and hypoxic murine cells. *Cancer Res* 49: 3310-3313, 1989