

放射線治療に伴う子宮頸癌の cell kinetics

—特に落射型蛍光顕微測光法による核 DNA 変化の解析—

岡山大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 関場 香教授)

林 健 興

Tumor Cell Kinetics in Uterine Cervical
Carcinoma Following Irradiation

Chieng-Shing LIN

*Department of Obstetrics and Gynecology, Okayama University Medical School, Okayama
(Director: Prof. Kaoru Sekiba)*

概要 放射線による子宮頸癌の核 DNA 変化についての研究は透過型分光測光法が従来用いられて来たが、本研究はより優れた測定法である落射型蛍光顕微測光法を応用することによって tumor cell kinetics をより明確に解明することを目的とした。子宮頸部扁平上皮癌放射線治療例15例を対象とした。照射前, 600rad, 1,400rad, 2,000rad, 3,000rad 照射の各時点で colposcopy 下に生検を行い、捺印細胞標本と組織標本作製した。前者は pararosanillin-Feulgen 染色後, MMSP-RF にて癌細胞核 DNA を測定した。また、癌細胞を2C細胞 (G_0+G_1), 4C細胞 (G_2+M), 4Cを越えるものの3群に分け、各々の割合を算出して cell kinetics の解析を行い、併せて組織所見との比較検討を行った。以下の結果を得た。

1) 落射型顕微測光においては癌細胞の同定が困難な場合があるが、今回 Blue 励起光 (405nm) を併用することによって細胞形態を観察し、より正確に対象細胞を確認することが可能となった。今後、本法の併用は必須であると考えている。2) 放射線照射に伴う cell kinetics については放射線抵抗例 ($n=3$), 感受性良好例 ($n=12$) 共に1,400rad までは同様な変化を認めた。即ち、600rad で4C細胞の増加 (G_2 -Block), 1,400rad で over 4C細胞の増加 (Endoreduplication) 及び1,400rad までの2C細胞の漸減を認めた。3) 感受性良好例は2,000rad, 3,000rad まで2C細胞が引き続き減少するのに対し、抵抗例では逆に3,000rad で高率 (43~60%) になった。その組織像では放射線変化の少ない癌細胞が多数残存していた。4) 3,000rad 時点の放射線抵抗例に、治療前と同様な細胞が残存し、その大部分は2C細胞であることから、これらの細胞は non-cycling cells (G_0) である可能性が強く推察された。5) 治療前における2C細胞の割合は感受性良好例の平均46%に対し、抵抗例では65%であった。放射線抵抗性腫瘍を照射前に screening する指標のひとつとしてこの2C cell population の比率を参考にすることは臨床上有益であると考えられる。

Synopsis 15 cases of squamous cell carcinoma of uterine cervix which received radiotherapy were investigated in order to elucidate tumor cell kinetics following irradiation. The DNA content of Pararosanillin-Feulgen stained tumor cells were measured by fluorescence cytophotometry which provided great precision in the field of microspectrophotometry.

Besides the cell preparation, tumor cells were precisely identified under blue light excitation (405nm). It is of great value to obtain a reliable DNA histogram of tumor cells with this method.

In both groups of radioresistant cases ($n=3$) and radiosensitive cases ($n=12$), the same trend in cell kinetics was noted until 1400 rad, such as G_2 -block, endoreduplication, and a decrease in the 2c cell (G_0+G_1) population.

Most of the residual cells at 3000 rad of radioresistant cases showed little irradiation-induced morphological change. These cells were proved to be 2C cells in this study. This indicates that these radioresistant cells were non-cycling cells (G_0).

The mean value for the 2C cell population before irradiation was 65% in radioresistant cases and 46% in radiosensitive cases, respectively. The former contained a larger proportion of 2C cells than the latter.

Clinically, the 2C cell population before irradiation may be used as a useful parameter to forecast radiosensitivity.

Key words: Cytophotometry • DNA • Radiotherapy • Radioresistance • Uterine cervical carcinoma

緒言

表 1

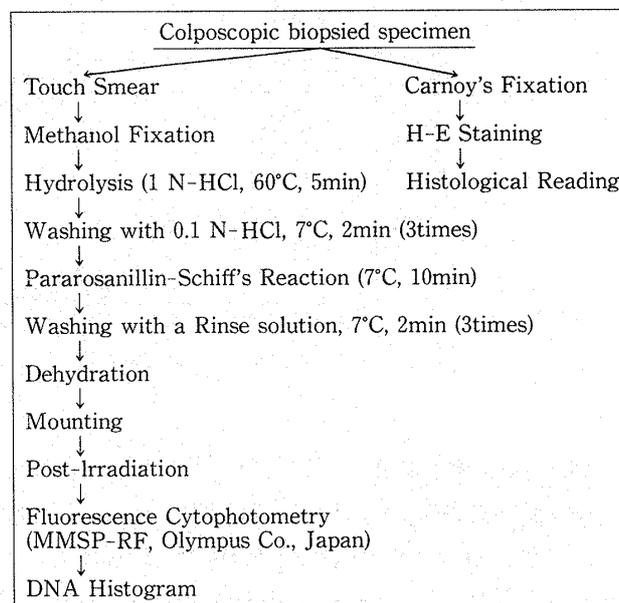
近年、放射線治療技術の進歩によつて子宮頸部扁平上皮癌における治療成績の向上が認められている。しかし、臨床進行期 I 期と II 期では残念ながら成績の改善は見られず、また、再発癌の放射線療法の場合は 10% 位の 5 年生存率しか得られていないのが現状である。これらのことは治療成績の上では放射線療法が限界に近づいたことを意味している³⁾。そしてその原因の一つは放射線耐性細胞の存在であることは古くから知られている³⁾⁷⁾。

一方、腫瘍細胞の細胞動態は放射線照射効果に関与することが放射線生物学の研究によつて明らかとなつている²²⁾²³⁾。しかしながら、子宮頸癌の臨床例について、これらの研究を行つたものは僅か²⁾⁴⁾⁶⁾⁸⁾²¹⁾しか見られていない。そこで、今回著者は子宮頸癌放射線療法例を対象として、従来の透過型測光法よりも優れた測定法である落射型蛍光顕微測光法⁹⁾¹⁰⁾を用いて核 DNA を測定し、放射線治療に伴う子宮頸癌の細胞動態及び放射線耐性細胞の関与の解明を試みた。

研究材料及び研究方法

1. 研究材料

1982年より 1 年間、当科で放射線治療を行つた子宮頸部扁平上皮癌 15 例を対象とした。患者年齢は 57 歳から 77 歳まで平均 67 歳であつた。臨床進行期は II 期 6 例、III 期 8 例、IV 期 1 例であつた。組織分類の内訳は large cell non-keratinizing type は 12 例で、small cell non-keratinizing type は 3 例であつた。放射線照射は、テレコバルト全骨盤照射で 1 回 200rad、週 5 回の分割照射とした。放射線治療前、600rad、1,400rad、2,000rad 及び 3,000rad 照射の各時点で colposcopy 下に癌組織を採取し、捺印細胞標本及び組織標本を作製した。前者は 100% メタノールで固定し、1N 塩酸にて 60°C、5 分間加水分解する。次いで 0.1N 塩酸、7°C で加水分解を停止した後、pararosanillin-



Feulgen reaction にて 7°C、10 分間、DNA 染色を行つた。また、蛍光を安定化させるために、Post-irradiation の処理¹⁰⁾¹⁶⁾をした (表 1)。

2. 癌細胞の同定及び核 DNA の測定

癌細胞核 DNA 測定は Olympus 製の落射型蛍光測光顕微鏡 MMSP-RF を用いて行つた。

癌上皮の捺印細胞標本を用いたにもかかわらず、かなりの遊走細胞 (histiocytes, plasma cells, lymphocytes) と少数の間質細胞が混じているため、まず Blue 励起光 (Blue excitation light, $\lambda = 405\text{nm}$) を用いて、測定対象になる細胞は癌細胞であることを確認したのちに、Green 励起光 ($\lambda = 546\text{nm}$) に切り替えて核 DNA 量を測定した。

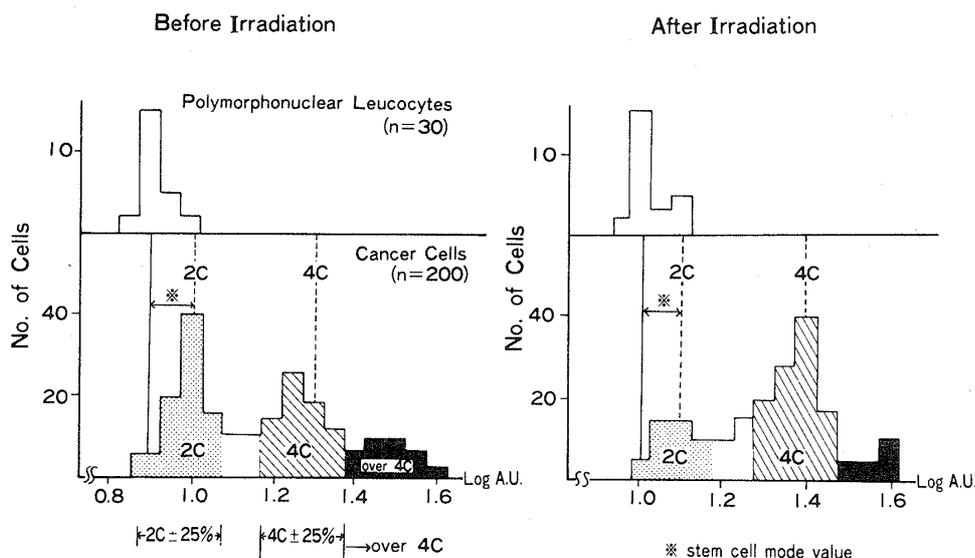
3. DNA 値による細胞動態の解析

1) 各時点で好中球 30 個、癌細胞 200 個の DNA 値を測定し、各々の値の対数をとつて、histogram (\log_{10} transformation histogram)¹⁷⁾を作成した。

2) 治療前、各症例の好中球に対する stem cells mode value を Fu et al.¹⁴⁾の方法にて求めた。

3) 治療前及び治療経過中における stem cells mode value に相当する DNA 値を 2C 値とし、そ

図1 Diploid, tetraploid and hypertetraploid cells in DNA histogram



の2倍を4C値とした。そして2C値或は4C値の±25%の範囲の細胞をそれぞれ2C細胞或は4C細胞とした²⁰⁾。4C細胞のDNA値を越えるものはover 4C細胞 (Hypertetraploid cell) とした。さらに2C細胞, 4C細胞, over 4C細胞それぞれの占める割合を算出した (図1)。これらの cell population の推移から放射線照射に伴う cell kinetics を検討した。

4. 細胞動態と組織所見との比較検討

核DNA測定から得た細胞動態の結果と各時点の組織所見と比較検討し、その臨床的意義を求めた。

研究成績

1. 癌細胞の同定について

Pararosanillin-Feulgen reaction で染色した細胞標本を用いて Green 励起光にて核DNA量を測定する際、胞体は発光しないで、ただ核が赤い蛍光を発するにとどまる。従ってそれが癌細胞の核であるか否かは判別困難な場合がしばしばある。写真1 a は組織球を Green 励起光で見たものであるが、核だけみると癌細胞の核として誤認される可能性がある。しかし Blue 励起光をあてると (写真1 b), 胞体は淡緑色, 核は淡橙~橙色を発光する。その結果、核と胞体両方の蛍光によって細胞全体の形態を明瞭に識別することができ、初めてこの細胞が組織球であることが確認でき

る。また、写真2 b は写真2 a の標本を Blue 励起光で見たものであるが、この操作によつて多数の癌細胞が明瞭に確認することができるようになる。Blue 励起を行つた癌細胞は不透明で硬い様相を呈する、厚く、濃く染色された胞体を有することがその形態的特徴である。このようにして細胞標本に混在した良性細胞 (主に、histiocytes, lymphocytes) を除外し、形態学的に確認しうる癌細胞の核のみを測定することによつて、癌細胞DNA histogram の信頼性を向上させることができる。

2. 放射線照射に伴う DNA histogram の変化について

代表的な3例につき、照射前、600rad, 1,400rad, 2,000rad, 3,000rad の順でそれぞれのDNA histogram を図2に示した。どの症例も1,400radまで4C細胞, over 4C細胞の増加、いわゆる“右方移動”が認められた。2,000rad, 3,000radに線量が増加すると症例4と症例10ではDNA増量は著明になり、16Cに至るものも出現してくるようになった (症例4では3,000rad照射時点で癌細胞の残存が極めて少なく、DNA histogram 作成は困難であつた)。一方2C細胞は極めて少数であつた。以上の2例と同様なDNA histogram 変化を認めたのは15例中12例であつた。いずれの症例も組織学的に良好な放射線感受性を示していた

図2 Changes of DNA histograms following irradiation

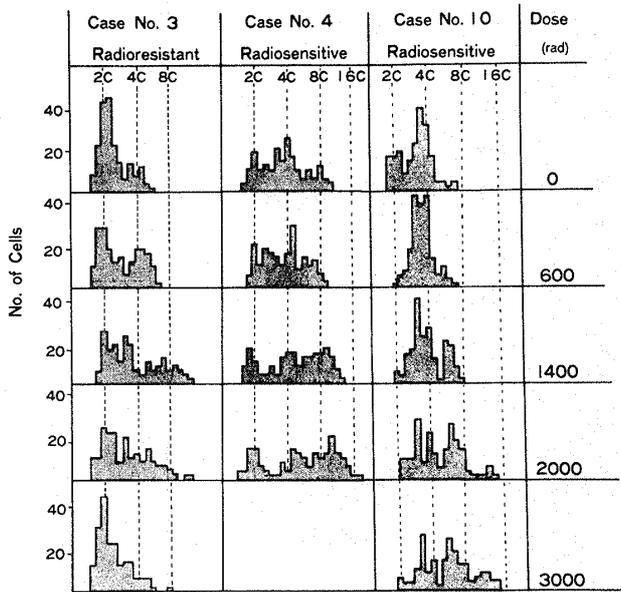


写真3 a Case 4, before irradiation. Large cell nonkeratinizing type. (×320)

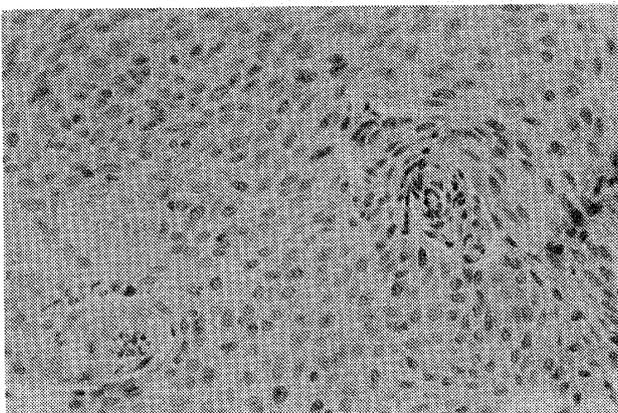


写真3 b Case 4, at 2,000rad of irradiation. Note marked radiosensitivity. (×320)

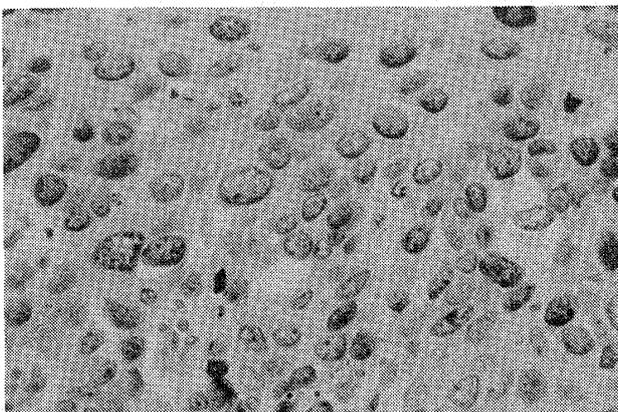


写真4 a Case 3, before irradiation. Large cell nonkeratinizing type. (×320)

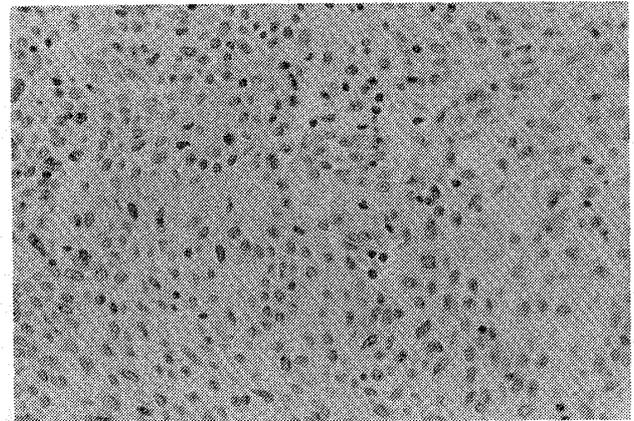
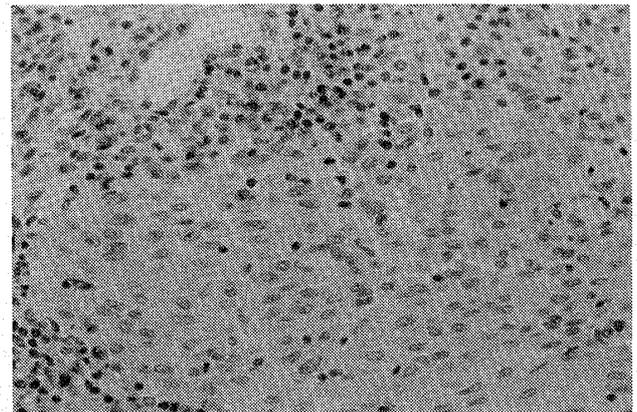


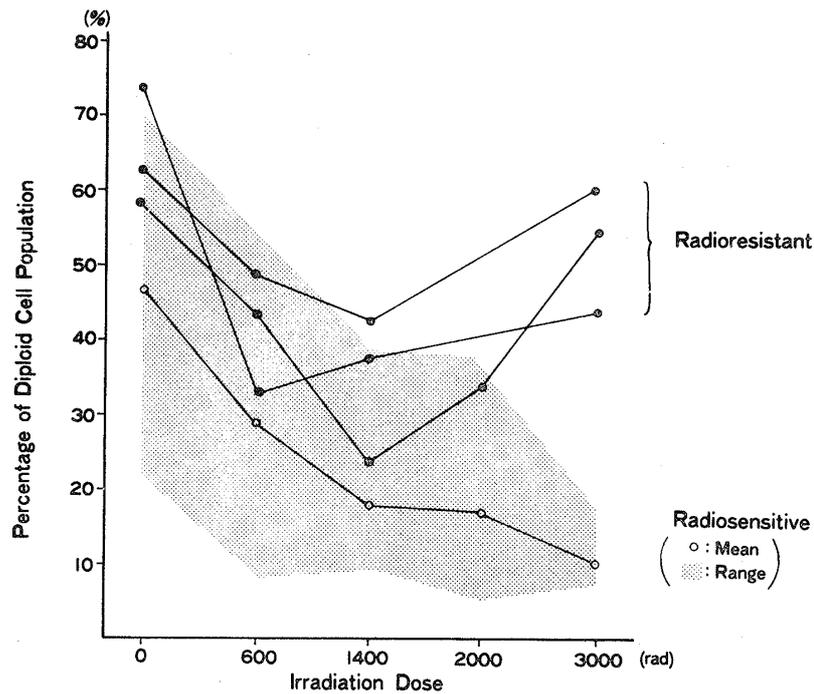
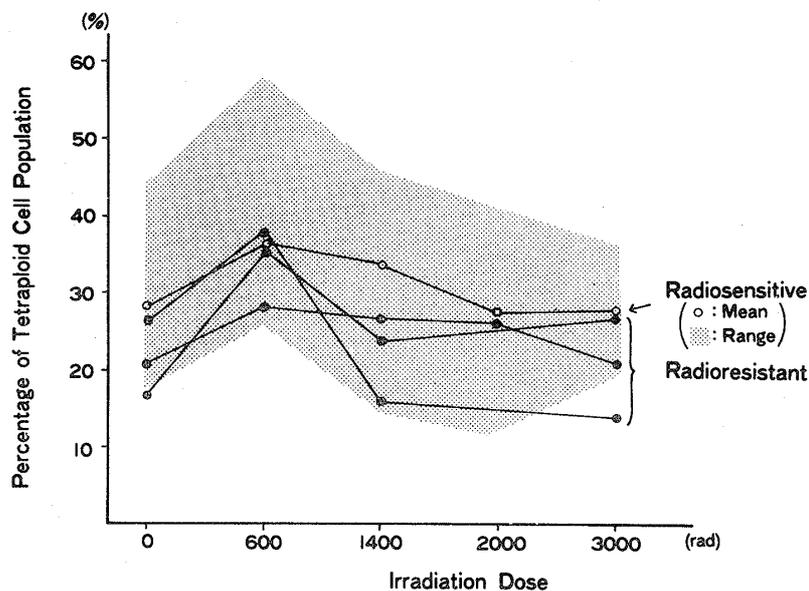
写真4 b Case 3, at 3,000rad of irradiation. There is little responsiveness of irradiation. (×320)



(写真3 a, 治療前; 3 b, 2,000rad). 症例3は3,000radにおいて, 多数の癌細胞が残存し, その多くは2C細胞であつた. 治療前から3,000radまでいずれの時点でも2C細胞にピークを有するものが特徴であつた. このようなDNA histogramの変化を認めたのは3例であつた. 組織学的には放射線抵抗性を認めた(写真4 a, 治療前; 4 b, 3,000rad).

3. 放射線照射に伴う各 cell population の変化について

2C cell population, 4C cell population, over 4C cell population の各 cell population の放射線照射に伴う変化について, 放射線抵抗群 (n=3), 感受性良好群 (n=12) に分けて検討した. 2C cell

図3 Changes of diploid cell population (G_0+G_1) following irradiation図4 Changes of tetraploid cell population (G_2+M) following irradiation

population (図3)は両群ともに1,400radまで同様な減少傾向を示した。その後、感受性良好群では2,000rad, 3,000radと線量が増えるに従って2C cell populationが16%, 10%と更に減少していくのが認められた。放射線抵抗群3例では、逆に3,000radの時点で2C cell populationは各々60%, 55%, 44%と増加した。

4C cell population (図4)は両群ほぼ同様な変化を認めた。即ち600radで増加傾向を認め、その後、やや減少または横ばいを示した。

over 4C cell population (図5)は1,400radまで両群ともに著明な増加を認めた。その後、感受性良好群では線量増加に伴って次第に増加した。一方放射線抵抗群では逆に1,400radの最高値か

図5 Changes of hypertetraploid cell population (endoreduplication) following Irradiation

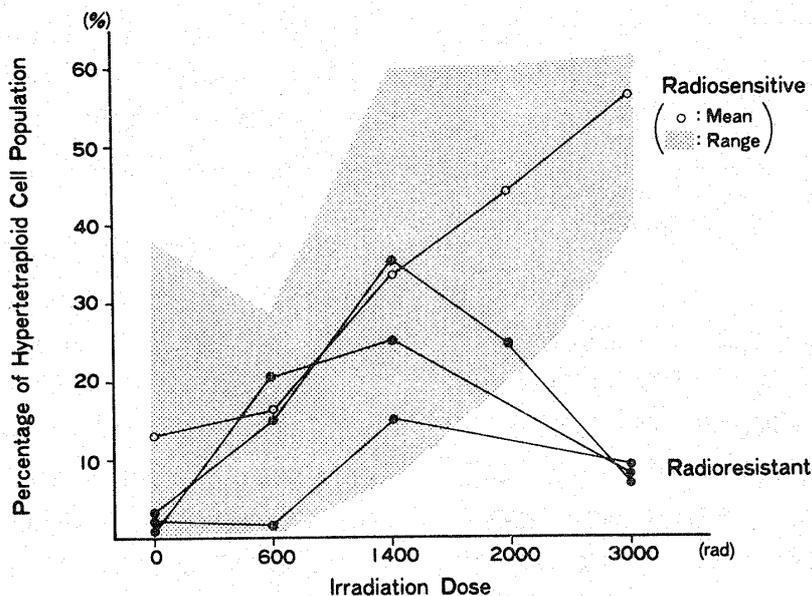


表2

| | Case No. | Age | Stage | Stem Cell Mode Value | Cell Population | | |
|----------------|----------|-----|------------------|----------------------|-----------------|------|---------|
| | | | | | 2C | 4C | over 4C |
| Radioresistant | 1 | 72 | II _b | 2.3 | 63.5 | 26.3 | 2.0 |
| | 2 | 71 | II _b | 1.7 | 74.0 | 17.0 | 1.5 |
| | 3 | 64 | III _b | 2.0 | 58.0 | 20.5 | 3.0 |
| Radiosensitive | 4 | 70 | II _b | 2.0 | 21.5 | 37.5 | 29.0 |
| | 5 | 68 | III _b | 2.4 | 70.0 | 19.5 | 2.0 |
| | 6 | 72 | II _b | 1.8 | 47.0 | 28.0 | 16.5 |
| | 7 | 57 | III _b | 1.9 | 57.0 | 23.0 | 0 |
| | 8 | 63 | III _b | 1.8 | 55.0 | 17.5 | 7.0 |
| | 9 | 77 | III _a | 2.7 | 54.0 | 26.0 | 1.0 |
| | 10 | 75 | III _b | 1.8 | 30.0 | 53.5 | 8.5 |
| | 11 | 71 | II _b | 2.3 | 37.5 | 32.5 | 14.0 |
| | 12 | 60 | III _b | 1.7 | 51.0 | 24.0 | 12.5 |
| | 13 | 71 | II _a | 1.7 | 52.0 | 21.5 | 9.5 |
| | 14 | 57 | IV _a | 1.7 | 33.0 | 25.5 | 38.5 |
| | 15 | 58 | III _b | 1.9 | 49.0 | 27.0 | 17.5 |

ら減少し始め、3,000radの時点における over 4C cell population は約8%と低率であった。

4. 放射線抵抗群の組織所見

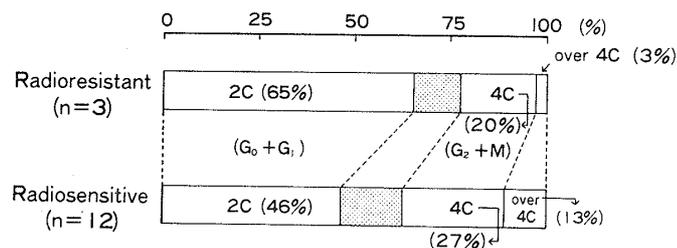
感受性良好群では組織学的に2,000radあるいは少なくとも3,000radの時点で写真3bの如く、照射による変性(核の増大、濃染、巨核化、空胞化など)及び壊死が著明であった。

放射線抵抗群においては3,000rad時点(写真4b)

でも治療前の組織像(写真4a)と殆ど変つておらず、放射線による変化が極めて少ない癌細胞が多く残存している。その残存している癌細胞の特徴は、核が小型で、クロマチン凝集を認めず、細胞境界が明瞭で、細胞の大小不同は乏しく、比較的分化した細胞の集団である。

5. 放射線抵抗群の治療前 cell population の特徴

図6 Comparison of cell populations before irradiation



放射線抵抗群及び感受性良好群の治療前における各 cell population の構成を比較した結果を表2・図6に示した。2C細胞、4C細胞、over 4C細胞それぞれの占める割合の平均値が、感受性良好群では46%、27%、13%であるのに対し、抵抗群では65%、20%、3%であった。このように、放射線抵抗群においては over 4C cell population は少なく、2C cell population が高率を占めるといふ細胞動態の特徴が判明した。

考案

癌細胞の細胞動態を知るには、その細胞のDNA量による分析が有効とされており、放射線照射に伴う腫瘍細胞動態を核DNA量から検討した報告は多くみられる。しかし、臨床症例における子宮頸部扁平上皮癌についての報告は比較的少なく、透過型顕微測光法による秋谷ら²⁾、岩田ら⁴⁾、海老原⁶⁾、佐々木⁸⁾、Sugimori et al.²¹⁾などの報告がみられる程度である。

現在、非固型腫瘍や実験腫瘍を材料とする場合は Flow cytometry が繁用されているが、固型腫瘍の臨床症例では、なお顕微分光測光法が一般的に用いられている。顕微分光測光法は Caspersson により開発されて以来、Ornstein, Patau et al. の2波長法、また Mendelsohn の計測方法の改良によつて広く用いられるようになった。ところで、近年 Ploem¹⁹⁾、藤田ら⁹⁾¹⁰⁾¹⁵⁾¹⁶⁾は顕微測光法のひとつとして、落射型蛍光測光法を開発し、透過型測光法の非特異的光喪失や励起光による蛍光ノイズの問題を著しく改善した。さらに非特異蛍光、或は励起光と共に起る減衰などの問題も Post-irradiation により解決されたことによつて、落射型測光法は従来の透過型測光法に比べ、より優れ

た測光法であることが認められている¹⁰⁾。

今回著者は、臨床例の病巣から得た捺印細胞標本を材料として、落射型蛍光顕微測光法を用いて核DNA量を測定し、放射線照射に伴う子宮頸部扁平上皮癌の細胞動態、さらには放射線耐性細胞がこの変化にどのように関与するのかという疑問への解明を試みた。

落射型測定法は癌細胞の同定という問題点が指摘されているが、多数の遊走細胞や正常細胞などが混入する臨床標本では特にこの問題は重要である。この点について、著者は临床上利用しやすく、又、信頼性の高い癌細胞同定法を考案した。即ち、pararosanillin-Feulgen 染色を行つた標本に対して、Blue 励起光 ($\lambda=405\text{nm}$) をあてることによつて、核のみならず胞体をも含めた細胞全体の形態を詳細に観察することが可能であることを明らかにした。この方法によつて標本内に混在している遊走細胞や間質細胞などを測定対象から除外して、正確に癌細胞のみを対象とすることができ、信頼性の高い癌細胞核 DNA histogram が得られる。今後、この方法は落射型蛍光測光法における癌細胞 DNA 測定においては、大いに利用されるべきものと考えている。

今回、対象症例は15例で、照射前、600rad、1,400rad、2,000rad、3,000rad の各時点における \log_{10} transformation DNA histogram¹⁷⁾ を作成し、2C細胞 (G_0+G_1)、4C細胞 (G_2+M)、over 4C細胞、各々の cell population を求めた。更に、これらの cell population の推移から放射線照射に伴う cell kinetics を検討した。また各時点の組織学的所見と比較検討し、その臨床的意義を追求した。

対象症例のうち、大星・下里放射線照射効果分類⁷⁾により3,000radまで良好な放射線感受性を示したのは12例(感受性良好群)で、3,000radの時点でもなお放射線抵抗性を示したのは3例(放射線抵抗群)であった。

放射線照射に伴つて、まず両群ともに600rad照射時点で2C細胞が減少し、4C細胞の増加、いわゆる G_2 -Block が認められた。これは4C細胞の分裂が arrest され、蓄積したことを示している。Pallavicinii et al.¹⁸⁾によるとこれらの4C細胞は、そ

の大部分が clonogenic potential を失った腫瘍細胞であると考えられる。更に線量が増えて1,400 rad になると、 G_2+M 期の DNA 量を越える over 4C 細胞の増加が認められた。この現象は諸家の述べている如く、metabolic death へ向つて進んでいる Endoreduplication⁽⁴⁾⁽⁶⁾⁽⁸⁾ (あるいは Endomitosis) によるものと考えられる。その後、線量が増加するに従つて、感受性良好群では2C細胞の減少、over 4C細胞の増加がより顕著になつてくる。つまり、感受性良好群の2C細胞は照射全過程にわたつて減少する一方で、3,000radの時点では大部分が消失してしまう。一般にヒト固型癌の2C細胞では G_0 細胞 (non-growth fraction) が多くを占めている⁽³⁾と言われているが、感受性良好群において、3,000radで2C細胞が消滅してしまつたということから考えると non-growth fraction の cyclic 化、即ち G_0 細胞の recruitment が高率に起きていると考えられる。この点に関し、岩間⁽⁵⁾は chemotherapy による同様の4C細胞の増加、即ち partial synchronization の際にも既にこの recruitment が発動している可能性があるとして述べているのは興味深いことである。

放射線抵抗群では線量が1,400radを越えるところまで進行して来た良好な感受性を示す細胞動態が停止し、逆に2C cell population の増加が現れて来る。また同時に over 4C cell population が次第に減少してくる(図3, 図5)。このように、放射線抵抗群において、2C細胞は感受性良好群のそれとは異なり、3,000rad照射においても消失していない。そして照射前から3,000radまで2C cell population にピークを保っている。実際、組織学的所見においても放射線変化の殆ど見られない腫瘍細胞が多く残存しているのが認められ、その形態的特徴は、核が小型、淡染、クロマチン凝集を認めず、細胞境界が明瞭で、細胞大小不同は乏しく、比較的分化した腫瘍細胞である。上記の cell population 分析の結果とあわせて考えるとこれらの放射線耐性細胞は2C細胞であることは明らかである。即ち、3,000radの照射によつても変化を示さない細胞で、そのDNA量が2Cであるという事は、これらの細胞は recruitment されな

つた G_0 細胞であるという可能性が強く示唆される。松沢⁽¹²⁾が移殖実験腫瘍において3,000rad照射後、残存した腫瘍細胞は³H-thymidineに標識されず、 G_0 細胞であることを報告していることと一致している。これらの細胞の存在こそ、放射線抵抗性を示す大きな要因であると考えられる。

放射線耐性細胞の存在は、細胞そのものの特性 (biological character) か、その周囲生物環境 (anoxic state 等) の影響によるかは未だ不明である。しかしながら、藤間⁽¹¹⁾も述べている如く、このような3,000radでも残存している放射線耐性細胞の存在が再発につながり、予後に影響を与える可能性が極めて大きいことは明らかである。

ところで今回の研究結果からみると、放射線感受性の良否をDNA histogramの推移から判定するためには、1,400rad以上の照射を行わなければならないことになる。しかしながら今回の検討で示したように放射線耐性を示すものは2C細胞であることから、照射前の各 cell population の構成を知ることによつて放射線感受性を予想しうる可能性⁽¹⁾は十分に示唆される。そこで放射線抵抗群、感受性良好群について、照射前のDNA histogramを分析すると(表2, 図6)、抵抗群の2C cell populationは65%と感受性良好群の46%に比べ、明らかに高率であつた。Yau et al.⁽²³⁾も実験腫瘍において放射線抵抗性と2C cell populationの大きさが相関することを報告しており、今回の成績からすると、臨床例においても同様な傾向がみられた。このことは照射前にDNA histogramにおける各 cell populationを調べることによつて、その放射線感受性をあらかじめ、ある程度予測することが可能であることを示唆している。そして、この放射線抵抗性症例を治療前に知ることができることは癌の放射線治療上極めて有益なことである。

稿を終るに臨み、御指導と御校閲を賜りました関場香教授に深謝し、また直接御指導いただいた奥田博之講師、石井良夫講師に厚くお礼申し上げます。また、標本作成等でお世話になつた岡崎靖子技師をはじめ、研究室諸兄に深く感謝いたします。

本研究の要旨は第35回日本産婦人科学会学術講演会なら

びに The Fifth World Congress of International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy において発表した。

文 献

1. 赤木 清, 中沢 緑, 村田貴史, 白石友邦, 播磨敬三, 沢田 敏, 長谷川武夫, 田中敬正: FCM による腫瘍細胞動態に対する放射線効果の解析. 癌の臨床, 27: 1523, 1981.
2. 秋谷 清, 根岸能之, 佐藤博巳, 梅林栄一, 原 捷平, 平岩幹夫, 小林一彦, 奴田原裕一: 子宮頸癌における放射線感受性の研究. 一とくに放射線治療後の予後判定法について. 日産婦誌, 28: 1339, 1976.
3. 荒居竜雄, 森田新六: 子宮頸癌 (扁平上皮癌) の放射線治療・癌・放射線療法. (癌の臨床編), 243, 篠原出版社, 東京, 1978.
4. 岩田正晴, 杉下 匡, 鱒坂 陽, 伊村公男, 石井博基, 金子貴子, 横山哲也, 西浦天宣, 大村峯夫, 神谷直樹, 恩田威一, 佐々木寛, 遠武孝育: 放射線による子宮頸癌の治癒過程に関する基礎的研究. 日産婦誌, 28: 892, 1976.
5. 岩間正文: Impulse cytophotometer (I.C.P.) による小児白血病細胞の増殖動態の検討とその応用, 第2編. 日癌治誌, 16: 56, 1981.
6. 海老原順一: 放射線による子宮頸癌の核 DNA の変化. 慈医誌, 86: 462, 1971.
7. 大星章一, 下里幸雄, 板倉克明, 梅垣洋一郎: 癌放射線療法の病理. 医学のあゆみ, 61: 665, 1967.
8. 佐々木寛: 放射線照射による子宮頸癌細胞の G₂-M 期同調化現象の研究, 特に DNA 量の解析とその臨床的意義について. 日癌治誌, 16: 1456, 1981.
9. 藤田哲也, 福田 優, 中西和夫: サイトフォトメトリー. 医学のあゆみ, 100: 873, 1977.
10. 藤田哲也: 顕微測光法. 組織細胞化学の最新技術. (濱島義博, 藤田哲也編), 日本組織細胞化学会, 京都, 1977.
11. 藤間利用: 子宮頸癌放射線治療. 癌の臨床, 15: 310, 1969.
12. 松沢大樹: 癌研究と放射線療法・癌・放射線療法, 1, 篠原出版社, 東京, 1978.
13. 御供奉治, 太田和雄: 固型癌の細胞回転と化学療法. 癌と化学療法, 5: 709, 1978.
14. Fu, Y.S., Reagen, J.W. and Richart, R.M.: Definition of precursors. Gynecologic. Oncology, 12: 220, 1981.
15. Fujita, S., Yoshida, S. and Fukuda, M.: Improvement of technique to minimize non-specific absorption in microspectrophotometric measurement of nuclear DNA. Acta Histochem. Cytochem., 4: 126, 1971.
16. Fujita, S. and Fukuda, M.: Irradiation of specimens by excitation light before and after staining with pararosanillin feulgen: A new method to reduce non-specific fluorescence in cytophotometry. Histochemistry, 40: 59, 1974.
17. Okagaki, T. and Izue, M.: Correction of modal DNA values obtained by microspectrophotometry and tests for their shifts. J. Natl. Cancer Inst., 60: 1251, 1978.
18. Pallavicini, M.G., Lalande, M.E., Miller, R.G. and Hill, R.P.: Cell cycle distribution of chronically hypoxic cells and determination of the clonogenic potential of cells accumulated in G₂+M phases after irradiation of a solid tumor in vivo. Cancer Res., 39: 1891, 1979.
19. Ploem, J.S.: The use of a vertical illuminator with interchangeable dichroic mirrors for fluorescence microscopy with incident light. Z. Wiss. Mikr., 68: 129, 1967.
20. Sprenger, E., Ulrich, H. and Schondorf, H.: The diagnostic value of cell-nuclear DNA determination in aspiration cytology of benign and malignant lesions of the breast. Analytical and Quantitative Cytology, 1: 29, 1979.
21. Sugimori, H. and Gusberg, S.B.: Quantitative measurements of DNA content of cervical cancer cells before and after test dose radiation. Am. J. Obst. & Gynec., 104: 829, 1969.
22. Terasima, T. and Tolmach, L.J.: Changes in X-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. Nature, 190: 1210, 1961.
23. Yau, T.M., Kim, S.C., Nygaard, O.F. and Gregg, E.C.: Correlation of cell cycle parameters with radiation sensitivity in a series of murine L5178Y cells. Int. J. Radiat. Biol., 37: 429, 1980.

(特別掲載 No. 5578 昭59・8・10受付)