

Neurol Med Chir (Tokyo) 17, Part II, 55~62, 1977

脳腫瘍の Phase-synchronization に関する基礎的研究

—Colcemid による細胞周期の変動—

設楽 信行・河野 武・高倉 公朋

In-vitro-study of Cellular Synchronization of Brain Tumor for Combined Chemotherapy and Radiotherapy by Colcemid

NOBUYUKI SHITARA, TAKESHI KOHNO and KINTOMO TAKAKURA

Department of Neurosurgery, National Cancer Center Hospital

Summary

The role of cellular synchronization using Colcemid as pretreatment for combined chemoradiotherapy was investigated. C6 rat brain tumor cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10^{-5} – 10^{-7} mol. of Colcemid for 24 hours. The basic cell kinetics were analysed with pulse-cytophotometer, which facilitated the analysis of tumor cell cycle phase distribution according to the DNA content. The effect of Colcemid depended on the concentration. The minimal concentration showing continuous blocking during 48 hours after removal of the drug was 10^{-6} mol. G_1 fraction with 2C DNA content was reduced from 74% to 36%. G_2 , M phase with 4C DNA content increased from 9% to 28%. S-phase-cells increased from 17% to 31%. Polyploid cells in the tetraploid cell cycle were reorganized. Further studies are necessary for elucidating the mechanism about the leakage of some arrested cells in metaphase into tetraploid cell cycle system. The resting 36% cells in G_0+G_1 peak with 2C DNA content might be evaluated as diploid G_0 fraction.

Key words: brain tumor, colcemid, synchronization, chemoradiotherapy, pulse-cytophotometer

I はじめに

悪性脳腫瘍の治療は、外科的摘出に加えて、化学・免疫・放射線療法の補助的手段を併用することにより、有意義な余命の延長をもたらすことにあるが、その壁は厚く、無配慮な化学療法剤の使用や画一的な放射線照射は、逆に生体の homeostasis を破壊し、ともすれば患者の有意義な生命をそこなうことになる。より慎重で有効な化学・放射線治療が求められるゆえんである。

1970年、Skipper²³⁾は制癌剤の殺細胞機序を腫瘍細胞の細胞周期に基づいて解明し、cell cycle phase specificity を考慮した化学療法の合理的な多剤併用理論を提唱した。また、Sinclair²¹⁾²²⁾や Terashima²⁶⁾らは放射線治療においても各 cell cycle phase により放射線感受性

が著しく異なることを証明し、特に G_2 phase (postsynthetic phase) および M phase (mitotic phase) が放射線感受性の高いことを報告した。つまり、腫瘍細胞はその周期において、すべて同じ治療感受性を有するのではなく、使用された薬剤や放射線に対してある定まった phase にある細胞のみが反応する (cell cycle phase specificity) ことが明らかにされたのである。

しかしながら、S-phase および G_2 , M phase に相当する細胞は分裂細胞群のうちでそれぞれ10%台にすぎず、また分裂細胞群自体の割合も脳腫瘍全体の細胞からみるとほぼ30~40%であるので、全 population からみると治療時の target cell cycle phase は数%しかないことになり、治療効率は著しく悪くなる。しかも、tumor population のうちで容易に分裂期に組み込まれない静止細胞

国立がんセンター脳神経外科

〔連絡先：〒104 東京都中央区築地 5-1-1, 国立がんセンター脳神経外科, 設楽信行〕

1976年11月19日 受稿

(quiescent cell, Q cell) の存在も大きな問題となっている。

つまり効果的な治療のためには、 G_0 fraction にある細胞を分裂細胞群へ移行動員 (recruitment)¹²⁾ するか、またはそのまま non-proliferating pool で凍結させてしまうという二つの方向性が考えられる。しかしながら、 G_0 fraction はあくまでも概念的なものであるから、まず、 G_0 fraction の正確な測定が先決となる。また脳腫瘍の各 cell cycle phase に散在する分裂細胞群に対してはより治療感受性の高い、target cell cycle phase に蓄積 (accumulation), 同調 (synchronization) せしめることにより、多剤併用化学療法 of 効率を高め、さらに放射線に対する感受性を強化させることができる。分裂しない神経細胞は同調法に対しては不応であるから、一層脳腫瘍細胞の性格が極立ち、両者の治療感受性の差が生じて腫瘍選択性が増進することにも通ずるのである。

このような理論をもとに、脳腫瘍の治療効果をあげるために、われわれは synchronized chemo-radiotherapy という新しい概念を導入し、臨床応用を行っているが、この間の基礎的事実を明白にするため、本研究を行った。ここでは、脳腫瘍の synchronized chemo-radiotherapy を背景に、metaphase で分裂阻止効果を有する Colcemid (desacetyl-methyl colchicine) の脳腫瘍培養細胞に対する各濃度における cytostatic effect, およびその間 cell cycle phase の変動を pulse-cytophotometer で測定し、1) Colcemid の phase-synchronizer としての役割および各 phase の動態、2) G_0 fraction (diploid) および growth fraction の測定法に関して検討した。

また生長解析手法としての pulse-cytophotometer の有用性についても考察を加え報告する。

II 方 法

1) 脳腫瘍は、N-nitrosomethylurea 誘発の実験脳腫瘍 rat glial tumor C6 cell line²⁾ を使用した。培養法は 37°C, 5% 炭酸ガス恒温静置培養で、培養液は, RPMI 1640 に bovin fetal calf serum (20%) (microbiological) を添加し、initial subcultivation は、細胞数 10^4 /ml で開始した。Colcemid (Ciba Gaigy) は、上記培養液中に溶解し、 10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-6} , 5×10^{-7} , 10^{-7} mol の5段階の最終濃度溶液を作製した。培養開始後3日目に各濃度の Colcemid を含有する培養液に置換し、24時間 Colcemid を作用させる。作用開始後、3, 6, 12, 24時間後の時点で細胞数の測定と cell cycle phase の動態解析用の資料を作製した。細胞を phosphate buffer solution (PBS) で3回洗浄し、十分 Colcemid を除去した後、再

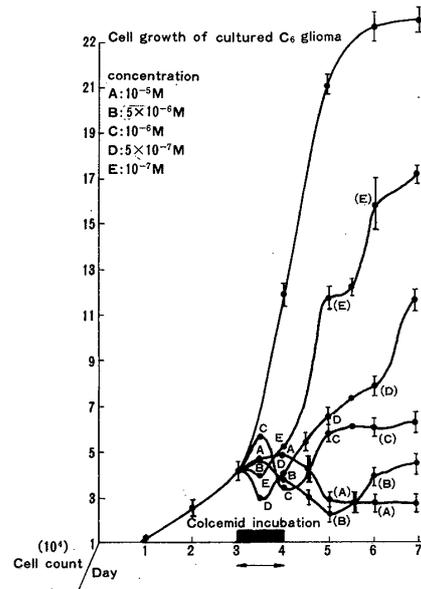


Fig. 1 The stathokinetic effect of 24 hour-Colcemid-infusion on the experimental rat C_6 glioma in culture

度培養を開始、24, 48, 72時間後における細胞の生長解析を行った。

2) Pulse-cytophotometer (PHYWE. ICP 11): 資料作製のための細胞処理。細胞を 0.2% trypsin 処理により、各シャーレより剝離し、遠心 (1,500 rpm, 10 min) さらに PBS で2回遠心洗浄 (1,500 rpm, 10 min)。その後、96% ethyl alcohol を加え、cell suspension の状態で細胞固定を行う (1時間)。PBS で2回遠心洗浄し、0.1% RNA ase 溶液を 10 ml 加え、37°C 20 min, incubation し、細胞内 RNA を溶解する。処理後、PBS で2回遠心洗浄を行う (1,500 rpm, 10 min)。さらに pepsine 液 10 ml (pepsine 10 mg: 0.2% HCl, 100ml) を加え、37°C 1時間 incubation する。Pepsine 処理後、さらに PBS にて2回遠心洗浄を行う。0.01% ethidium bromide (ethidium bromide 10 mg: tris-buffer 100ml) 染色液を 10 ml 加え、室温に1時間放置する。検体を pulse-cytophotometer にかき histogram を得る。

III 結 果

1. Colcemid の増殖抑制効果

各濃度における C_6 -strain の生長曲線を Fig. 1 に示す。Control では培養開始後3日目で logarithmic phase に入る。6日目より plateau stage に移行している。Colcemid 作用群は、 5×10^{-7} mol 以上の濃度では作用中完全な増殖抑制効果を認めるが、 10^{-7} mol の濃度では24時間作用中に細胞増殖の傾向が認められる。Colce-

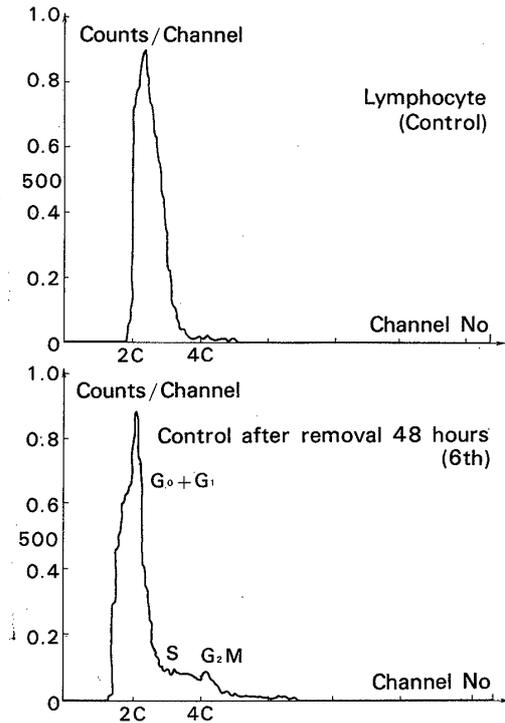


Fig. 2 Pulse-cytophotometric histograms of human lymphocytes (upper) and rat experimental glioma C_6 strain (lower). Ordinate: cell number/channel. Abscissa: relative fluorescent intensity of ethidium bromide stain proportional to the nuclear DNA content. The first peak at 2C represents cells with G_1 DNA content. The second peak is due to the cells with G_2 DNA content. S phase cells are lying between the two peaks

mid を除去した後の細胞増殖の状態は、各濃度によって異なる。① 10^{-5} mol $\sim 10^{-6}$ mol の高濃度においては細胞増殖が認められず、最低72時間は cytostatic effect は持続しうる。② 5×10^{-7} mol $\sim 10^{-7}$ mol 低濃度においては、Colcemid 除去後直ちに分裂能の回復が認められ、Colcemid の作用が reversible であることが示される。また、増殖 pattern は階段状を示し、同調増殖が認められる。

2. Pulse-cytophotometer による cell cycle phase の測定

a) 対照としての正常人リンパ球および実験脳腫瘍未処置群の histogram

分裂細胞は $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ の各 cell cycle phase を経るが、核内 DNA 量の観点からみると、核酸合成を行う以前の G_1 phase にある細胞は、その細胞固有の DNA 量を有する (2C DNA 量とする)。核酸合成期に入ると、DNA 量は増加し、この期に属する細胞は 2C \rightarrow 4C DNA 量の移行量を有する細胞に相当する。核酸合成を

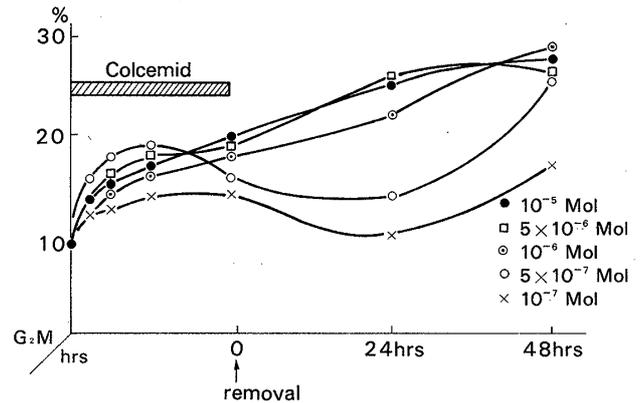


Fig. 3 The change of the fraction of G_2 , M phase by the Colcemid 24 hour-infusion of each concentration

終えた G_2 phase および M phase は、 G_1 の細胞の核酸量の倍の 4C DNA 量を有する細胞に相当することになる。Histogram の解析のために C_6 -strain の対照として、Ficoll-Conray 法によって得られたリンパ球を使用した (Fig. 2 upper).

リンパ球は blastogenetic stimulation のない限り、核酸合成、細胞分裂を行わず、すべての細胞は G_1 に相当する 2C DNA 量を有することになり、全 population が一つのピーク (2C DNA) に集積する。また、histogram にかげられた細胞数は 14,000 であり、横軸は核酸相対量、縦軸が細胞数である。リンパ球の histogram を pulse-cytophotometer の資料作製の対照としている。Fig. 2 lower に C_6 -strain の細胞数 18,000 の histogram を示すが、ガウス分布³⁾をとる二相性のピークを有する。最初の 2C DNA 量を有するピークは G_0 cell (diploid) ならびに分裂細胞の G_1 phase にあたる細胞で、2 番目の 4C DNA 量に一致したピークが G_2 phase および M phase にあたる細胞となり、2つのピークの移行部に S phase の細胞が存在する。各 phase は (diploid G_0+G_1) fraction 74%, S phase が 17%, (G_2+M) phase 9% となる。

b) Colcemid による cell cycle phase の変動

G_2 phase および M phase にある細胞を、各 histogram から計測し、Colcemid 作用中の 24 時間および Colcemid 除去後の 48 時間の経時的変化を Fig. 3 に示す。全濃度域 ($10^{-7} \sim 10^{-5}$ mol) で Colcemid 作用開始後、3 時間で G_2+M phase の増加が認められ、12 時間まで漸増する。12 時間後から低濃度域 ($5 \times 10^{-7} \sim 10^{-7}$) では、 G_2+M phase はむしろ減少するが、高濃度域 ($10^{-5} \sim 10^{-6}$) では漸増し、24 時間目に 18 \sim 20% に至る。また、Colcemid 除去後の変動をみても、 10^{-6} mol 以上の高濃度では、さらに G_2 , M への accumulation は漸増し、48 時間後には

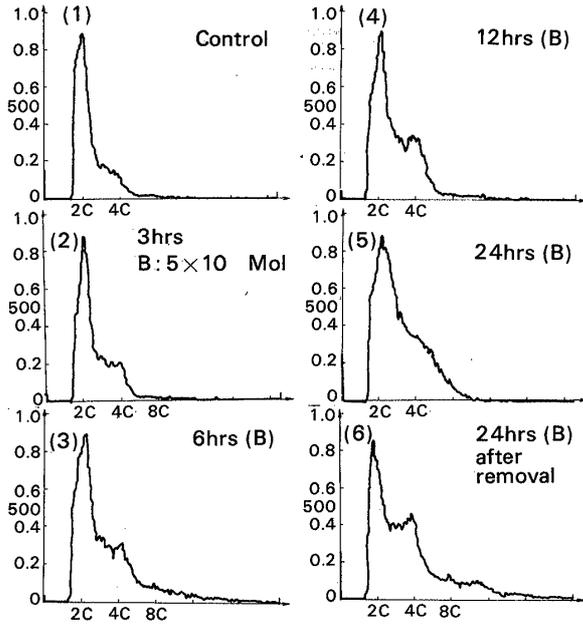


Fig. 4 Change of the cell cycle distribution under Colcemid effect (5×10^{-6} mol concentration). 1) Control: Before treatment. 2)-5) DNA histogram after 3, 6, 12 and 24 hours contact with Colcemid. 6) DNA histogram at 24 hours after the removal of Colcemid. Abscissa: nuclear DNA content. Ordinate: cell counts

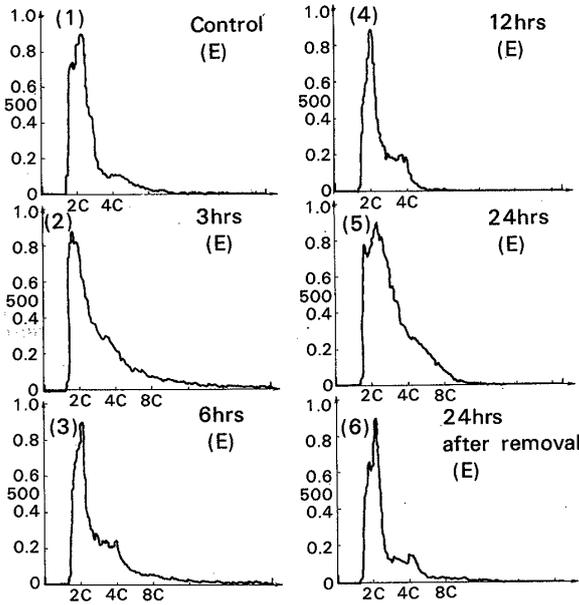


Fig. 5 The change of cell cycle phase distribution by the most diluted concentration of E: 10^{-7} mol 1) Control: before treatment. 2)-5) DNA histogram after 3, 6, 12 and 24 hours contact with Colcemid. 6) DNA histogram at 24 hours after the removal of Colcemid

28~30%の値に達する。 $5 \times 10^{-7} \sim 10^{-7}$ mol の低濃度では、24時間までさらに減少傾向を示すが、48時間後は再

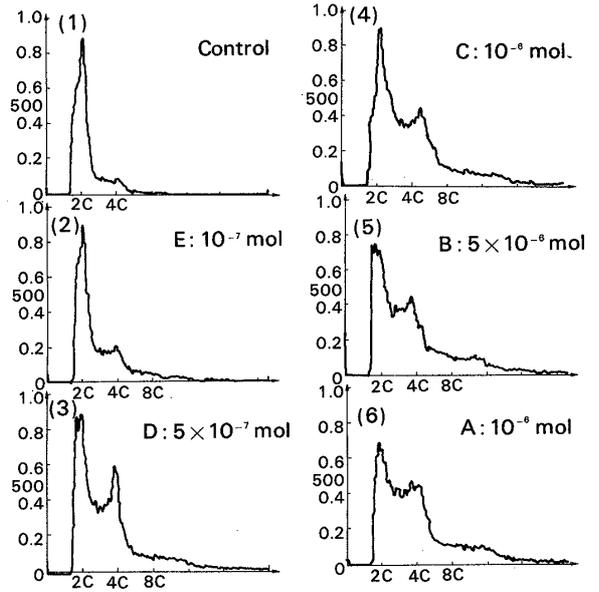


Fig. 6 The cell cycle distribution of C_6 glioma tumor at 48 hours after removal of Colcemid of each concentration

度 G_2 , M phase の増加が出現し、synchronous growth の pattern を示す。また、S phase に存在する細胞も、Colcemid 作用開始後、3時間目にすでに有意に増加し、その後さらに漸次増加傾向を示し、 10^{-5} mol 濃度では Colcemid の除去後48時間後には全 population の30%を占める。Histogram による変動を Fig. 4, 5, 6 に示す。

c) Colcemid により生ずる tetraploid cell cycle system

Fig. 6 に各濃度の Colcemid 除去後48時間の histogram を示すが、 G_2 および M phase が集積する第2のピークの右方に、4C DNA 量以上の核酸を有する tetraploid cell cycle に属する細胞群が出現している。これは、 10^{-7} mol においても Colcemid 作用開始後6時間目から認められ、漸増傾向を示す。

d) Diploid G_0 fraction と growth fraction の決定

Fig. 7 は 10^{-5} mol の Colcemid 除去後、48時間後の histogram であるが、 G_1+G_0 の 2C DNA 量に相応するピークは、最後まで認められる。この間、細胞増殖が認められていないこと (Fig. 1) を考慮すると、 G_0+G_1 ピークに遺残し、Colcemid に不応の細胞群を Diploid G_0 fraction とみなし、また、S phase, G_2 M phase, tetraploid cell cycle の細胞に移行した群を proliferating cell としうる。Fig. 7 より diploid G_0 fraction 36%, growth fraction 64% の値を得る。

IV 考 察

従来の生長解析学的手法においては、 H^3 -thymidine の

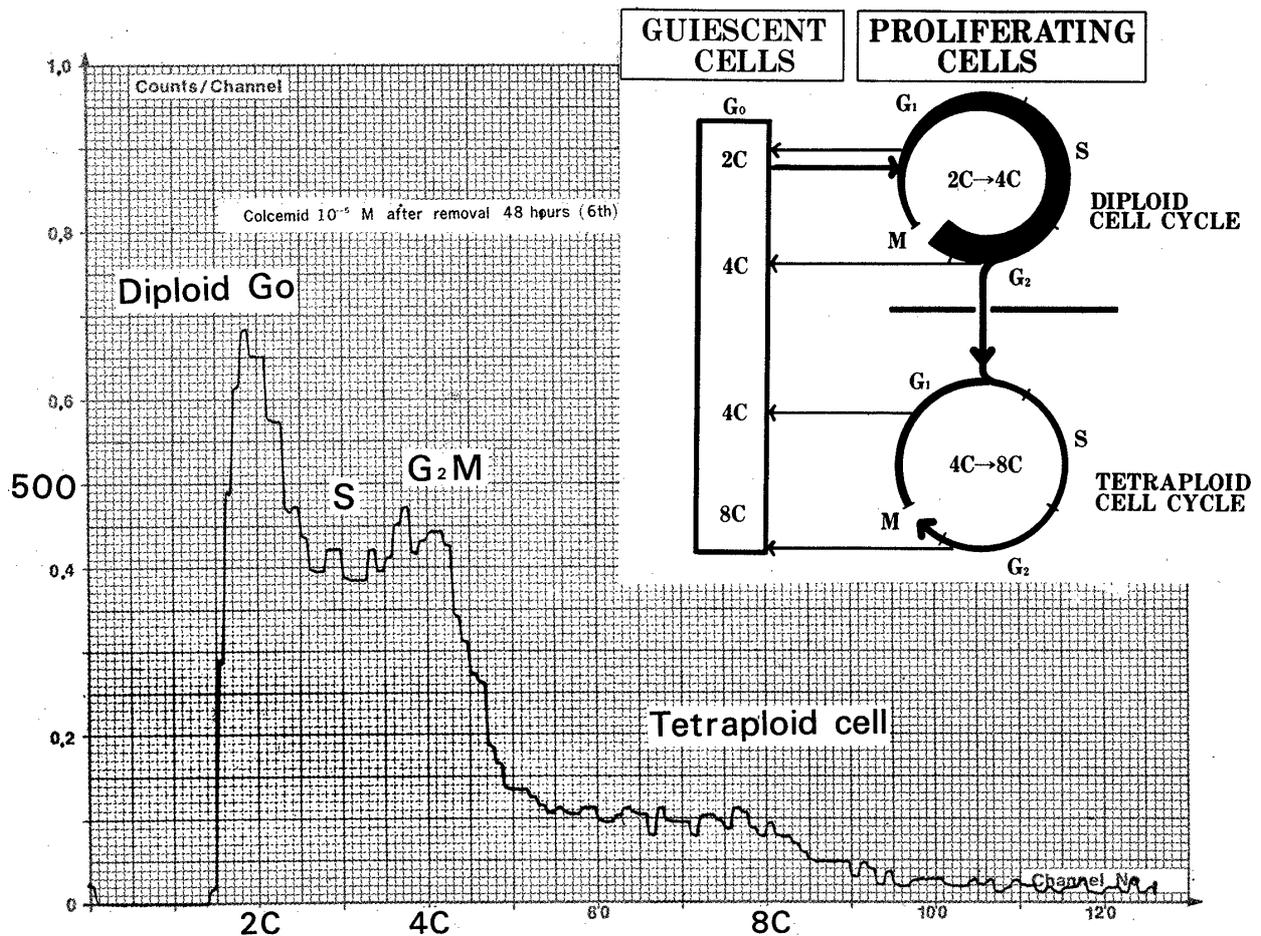


Fig. 7 The remaining cells within G_1+G_0 DNA content peak may be estimated diploid- G_0 cells and tetraploid cell cycle induced by endoreduplication can be recognized from the histogram

使用により autoradiography で核酸合成期にある細胞を識別し、顕微鏡下で、分裂期にある細胞を測定し、それらの数値をもとに各種のパラメーターが決定されてきたが、 G_1 phase および G_2 phase に関しては、直接的な計測が困難であった。近年、DNA 染色の染色度をもとに G_1 および G_2 phase を識別する方法が試みられ、特に Feulgen 染色法が有効とされてきたが、これも染色の安定度に問題があり、また扱う細胞数にも限度があった。ところが、1967年、Lepecq¹³⁾ が ethidium bromide による DNA 特異蛍光染色法を開発し、その後、Dittrich と Gohde⁶⁾ が automated pulse-cytophotometer を完成し、細胞の核 DNA 量を自動的にしかも莫大な細胞数 (10万~100万) の蛍光度に相応した DNA histogram として表すことに成功して以来、cell cycle の各 phase が DNA histogram として比較的容易に把握できるようになってきた。この方法では、資料が cell suspension の状態で固定、染色されることに特徴がある。また、操作や機器の conditioning として対照となる single cell を必要とするので、この実験では Ficoll-conray 法による人正常リンパ球を使用している。Histogram の特徴としては、 G_2 と

M phase は同じ DNA 量 (4C) を有するので、同一のピークに集積してしまい区別がつかない。この点は欠点であるが、この実験の場合には、 G_2 および M phase は同じ放射線感受性を有することから、あえて両者を区別する必要はなく、mitotic index の検索は行わなかった。

さて Colcemid の重要な薬理作用は、①分裂期中期 (metaphase) において、spindle の形成過程で subunit protein (6S) に結合し、microtubule の polymerization を障害し、分裂阻止効果を有すること²⁴⁾²⁵⁾、② late S phase および G_2 phase にある細胞に直接作用し、chromosome の分裂を生じ poliploid cell を誘発する endoreduplication の作用¹⁹⁾ があるという2点である。この2つの作用は、それぞれ独立した mechanism によるものである。また、分裂阻止作用は一定濃度では可逆的で、細胞内濃度が減少すると、subunit との結合は解離し、anaphase へと進行するが、また、 2×10^{-4} mol 以上の濃度では細胞構造に不可逆的な障害をもたらし、細胞は破壊されることになる。

本実験は、分裂阻止効果を利用して phase-synchronization を試みたわけである。C6-cell line の cell cycle

time は明らかに24時間以内であるから、理論的にみれば、すべての分裂細胞群は cell cycle が順調に進めば、mitotic phase に至り、Colcemid の作用をうけ分裂細胞群のすべてが G_2 M phase のピークに集積するはずであるが、Colcemid 作用開始後24時間の時点で $G_2 + M$ phase は21%であり、proliferating pool にある細胞がすべて集積を示さなかった。この現象は Püch と Steffan¹⁷⁾ の Colcemid による mitotic index の計算式：MI at time $t = \exp(t+tm) \ln 2/T - 1$ (MI = mitotic index, tm = duration of mitotic phase, T = cell cycle time) からみても、全 growth fraction を block できないことを示している。我々の結果から、この原因を類推すると、次の4点の要因をあげることができる。

① S phase の増加：growth curve の結果を総合して解析すると、S phase の増加は核酸合成阻害を示している。このため、S 期が延長し cell cycle time 全体が著しく遅延し、24時間以内に mitotic phase に達することができなくなる。Colcemid の核酸合成に与える作用は、Borum⁴⁾ や Lacour¹¹⁾ の報告では90%の合成阻害をみ、RNA, protein 合成にも影響を示し metabolism 全体に障害を及ぼすことを述べており、我々の結果と一致している。

② Endoreduplication による tetraploid cell cycle system²⁷⁾への leakage が生じる。この現象は 10^{-7} mol の低濃度においても見られ、polyploid cell が出現時間とともに増加する。

③ 5×10^{-7} mol 以下の濃度では、Colcemid の mitotic block の作用は一部解離しており、cell growth の傾向が認められる (10^{-6} mol 以上では mitotic block の作用は持続している)。

④ Long G_1 phase の存在： G_1 は cell cycle phase でもっともその時間が変動し、長時間 G_1 phase にとどまるものもある。

Synchronization においてもっとも重要と思われることは、24時間の contact においても 10^{-6} mol 以上では $G_2 + M$ phase の accumulation は S phase の延長により cell cycle が緩徐に進行するため、除去後48時間で $G_2 + M$ phase が maximum になるという点にある。また 5×10^{-7} mol 以下では mitotic block が解離し、同調増殖の結果、再度 $G_2 + M$ phase への集積を見る。この時点で28~30%の G_2 M phase の蓄積を得るわけであり、薬剤の投与とその効果出現の時間的關係を示唆している。Diploid G_0 fraction の測定は、我々の結果から G_0 36%、growth fraction 64%の数値を得たが、pulse-cytophotometer の使用により、放射性同位元素の使用なしに測定

が可能であり、また臨床例においても治療中に腫瘍の parameter の情報を得ることができ、治療方針の上で重要な指標となる。

放射線増感に関する研究は多いが、1963年 Bagshow¹⁾ が薬剤による感受性獲得機構として、sensitization (bromouridine, thimidine analogue), augmentation (O_2), potentiation (5FU, FUDR, methotrexate), additivity (alkylating agents, actinomycin D) の4群を分類している。また、1966年以来、佐野、星野らは、5-bromo-2-deoxyuridine による脳腫瘍への放射線増感剤としての基礎および臨床例の報告を行っている。これらの増感 mechanism とは別に、細胞の cell cycle phase による放射線感受性の差も研究されている。古くは、Henslow と Francis⁸⁾ の *Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ) の発生段階における放射線感受性の実験からはじまり、Dewey⁵⁾ は L-P 59 mouse の fibroblast および腹水癌における cell cycle phase の放射線感受性を論じ、また Sinclair²¹⁾²²⁾ は chinese hamster において、Tera-shima²⁶⁾ は HeLa 細胞の同調培養法をもとに、cell cycle phase のうちで G_2 および M phase に著明な放射線感受性のあることを報告している。

また、化学療法の分野においても、化学療法剤の殺細胞作用が cell cycle phase との関連で詳細に研究されている。化学療法剤は、① cell cycle specific (S-phase-specific, S phase specific with self-limitation), ② cell-cycle nonspecific に大別される。

1) S phase specific drugs

S 期にのみ作用し、他の phase にある細胞には影響を与えず、DNA 合成を選択的に阻害する (Ara-C, hydroxyurea, guanazole)。

2) S phase specific drugs with self-limitation

S 期にのみ殺細胞効果を示すが、RNA, protein 合成を障害し、他の phase にある細胞も障害することになり、全体の cell cycle time が遅延して S 期への流れ込みが遅れ、cell killing の率が低下する (methotrexate, 6-mercaptopurine, 5-FU)。

3) Cell-cycle non-specific

Proliferating, non-proliferating に関係なく既存の DNA と結合し、殺細胞効果を有する (Cyclophosphamide, BCNU, CCNU, dounomycin, actinomycin, adriamycin)。

以上のごとく、化学療法剤や放射線の cell cycle phase specificity が明らかになるに従い、前処置としての target cell cycle phase への細胞同調、蓄積の方向が提示されてきた。化学療法の分野では、methotrexate²⁾, hydroxy-

urea¹⁸⁾, Ara-C¹⁹⁾ の使用後, 同調蓄積された時点で, 再度 S phase specific drug を使用することにより, その有効性が報告されている。また, 放射線治療においても, 5-FU¹⁶⁾ および hydroxyurea¹⁵⁾ で, S phase の蓄積後, 腫瘍細胞の G₂ M phase への同調進行や, daunomycin¹⁴⁾, bleomycin²⁰⁾ 等による直接的な G₂ M phase の蓄積を利用した報告もある。しかしながら, synchronization を期待する場合, あまり cytocidal な効果の強い薬剤は同調増殖の点で問題が生ずることと, 同調法においても腫瘍細胞の薬剤感受性の違いを常に考慮しなければならない。

以上のような意味あいから, 脳腫瘍の synchronizing chemoradiotherapy に適した薬剤として, Vinca alkaloid と nitrosourea 系制がん剤の組み合わせのもとに, 放射線治療を行う治療法が有効であることが示唆されるであろう。また, 臨床においても, 薬剤の synchronizing effect を経時的に pulse-cytophotometer で効果判定し, 合理的な化学, 放射線療法を行われるとすれば, 患者の余命の延長に資するものと考えらる。

V 結 論

脳腫瘍に対する synchronized chemoradiotherapy の基礎的研究として, C6-rat glial strain を使用し, metaphase stopper として知られる Colcemid の同調, 蓄積効果を pulse-cytophotometer (ICP-11) で測定, 解析し, 以下の結果を得た。

1. Colcemid を $10^{-7} \sim 10^{-5}$ mol の全濃度域で24時間作用中, 完全な cytostatic effect を認めた。
 2. Colcemid 除去後, $5 \times 10^{-7} \sim 19^{-7}$ mol の低濃度では, cytostatic effect は直ちに消失し, synchronous growth を見る。また, $10^{-5} \sim 10^{-6}$ の高濃度においては生長抑制効果は持続し, 72時間以上効果が持続する。
 3. $10^{-5} \sim 10^{-6}$ mol の高濃度においては G₂ M phase accumulation が9%から最高30%まで得られ, また, $10^{-7} \sim 5 \times 10^{-7}$ mol では synchronous growth により程度認められる。
 4. S phase では17%→31%細胞増加を認めた。
 5. Endoreduplication により tetra ploid cell cycle system への移行が認められた。
 6. Colcemid に反応しない non-proliferating cell は36%の細胞に認められ, これを diploid G₀ fraction とし, また残りの64%を growth fraction とした。
 7. 全体の64%の分裂細胞群のうち44%を synchronize することができた。
- 以上, 臨床上的 synchronizing chemo-radiotherapy に

おいて, vinca alkaloid 投与量, 投与期間, ならびにその同調効果について基礎的知見を得たので報告した。

御校閲に賜った東京大学 佐野圭司教授に深謝致します。また, 本研究の一部は厚生省がん研究助成金より援助を受けた。

文 献

- 1) BAGSHAW, M. A.: Approaches for combined radiation and chemotherapy. *Lavel. Med.* 34: 124-133, 1963
- 2) BENDA, P., SOMEDA, K., MESSER, J. & SWEET, W. H.: Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J. Neurosurg.* 34: 310-323, 1971
- 3) BERKMAN, E.: Automated evaluation of proliferation parameters in cell cultures. pp 75-79. "Automation in microbiology and immunology", John Wiley & Sons, Inc., 1975
- 4) BORUM, K.: Cell and DNA kinetics in mouse thymus studied by simultaneous use of ³H-thymidine and Colcemid. *Expl. Cell Res.* 58: 451, 1969
- 5) DEWEY, W. C. & HUMPHREY, R. M.: Relative radiosensitivity of different phases in the life cycle of L-P 59 mouse fibroblasts and ascites tumour cells. *Radiat. Res.* 16: 503, 1962
- 6) DITTRICH, W. & GOHDE, W.: Impuls-fluorometrie bei einzelnzellen in suspensioned. *Z. Naturforsch.* 24b: 360-361, 1969
- 7) ERNST, P. E. & KILLMANN, S.: Effect of antileukemic drug on cell cycle of human leukemic blast cells in vivo. *Acta Med. Scand.* 186: 239, 1969
- 8) HENSHAW, P. S. & FRANCIS, D. S.: The biological measurement of gamma-rays in "equivalent roentgens". *Radiology* 27: 569, 1936
- 9) HOSHINO, T. & SANO K.: Radiosensitization of malignant brain tumors with bromouridine (Thimidine analogue). *Acta Radiol.* 8: 15-26, 1969
- 10) HOSHINO, T., WILSON, C. B., ROSENBLUM, M. L. & BARKER, M.: Chemotherapeutic implication of growth fraction and cell cycle time in glioblastoma. *J. Neurosurg.* 43: 127-135, 1975
- 11) LA COUR, L. F. & PELC, S. K.: Effect of colchicine on the utilization of thymidine labelled with tritium during chromosomal reproduction. *Nature* 183: 1455-1456, 1959
- 12) LAMPKIN, B. C., NAGAO & MAUER, A. M.: Synchronization and recruitment in acute leukemia. *J. Clin. Invest.* 50: 2204-2214, 1971
- 13) LEPECQ, J. B. & PAOLETTI, C.: A fluorescent

- complex between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 27: 87, 1967
- 14) LINDEN, W. A., ZYWIETZ, F., LANDEN, H. & WENDT, C.: Synchronization des Teilungszyklus von L-zellen in der G2-phase durch fraktionierete Rontgenbestrahlung und Daunomycin. *Strahlentherapie* 146: 216-225, 1973
 - 15) MADOC-JONES, H. & MAURO, F.: Age responses to X-rays, vincaalkaloids and hydroxyurea of murine lymphoma cells synchronized in vivo. *J. Nat. Cancer Instit.* 45: 1131-1143, 1970
 - 16) NITZE, H. R. & ROSEMAN, G.: Die Beeinflussung des Zellteilungsrythmus bei menschlichen Tumoren. *Arch. Klin. Exp. Ohr-Nas-kehlk-heilk* 193: 100, 1969
 - 17) PUCK, T. & STEFFEN, J.: Life cycle analysis of mammalian cells. 1. A method for localizing metabolic events within the life cycle and its application to the action of Colcemid and sublethal doses of X-irradiation. *Biophys. J.* 3: 379-397, 1963
 - 18) RAJEWSKY, M. F.: Synchronization in vivo; kinetics of a malignant cell system following temporary inhibition of DNA synthesis with hydroxyurea. *Exp. Cell Res.* 60: 269-276, 1970
 - 19) RIZZONI, M. & PAIATTI, F.: Regulatory mechanism of cell division, 1. Colchicine-induced endoreduplication. *Exp. Cell Res.* 77: 45-458, 1973
 - 20) SCHUMANN, J. & GOHDE, W.: Die Zellkinetische Wirkung von Bleomycin auf das Ehrlich-karzinom der Maus in vivo. *Strahlentherapie* 147: 298-307, 1974
 - 21) SINCLAIR, W. K. & MORTON, R. A.: Variations in X-ray response during the division cycle of partially synchronized chinese hamster cells in culture. *Nature (Lond.)* 199: 1158, 1963
 - 22) SINCLAIR, W.: Cell cycle dependence of the lethal radiation response in mammalian cells. Current topics. *Radiat. Res.* 7: 264, 1972
 - 23) SKIPPER, H. W., SCHABEL, F. M. JR., MELLETT, B. M., MONTGOMERY, J. A., WILKOFF, L. J., LLOYD, H. H. & BROCKMAN, R. W.: Implication of biochemical cytokinetic, pharmacologic and toxicologic relationships in the design of optimal therapeutic schedules. *Cancer Chem. Reports* 54: 431-449, 1970
 - 24) TANNOCK, I. F.: A comparison of the relative efficiencies of various metaphase arrest agents. *Exp. Cell Res.* 47: 345-356, 1967
 - 25) TAYLOR, W. E.: The mechanism of colchicine inhibition of mitosis. *J. Cell Biol.* 25: 145-159, 1965
 - 26) TERASIMA, T. & TOMACH, L. J.: Variation in several responses of Hela cells to X-irradiation during the division cycle. *Biophys. J.* 3: 11, 1963
 - 27) YANISCHEVSKY, R., MEDNELSOHN, M. L., MAYALL, B. H. & CRISTOFALO, V. L.: Proliferative capacity and DNA content of aging human diploid cells in culture; A cytophotometric and autoradiographic analysis. *J. Cell Physiol.* 84: 165-170, 1974