

脳腫瘍の phase-synchronization に関する基礎的研究

— II 各種制癌剤および物理的要因に基づく細胞周期の変動 —

設楽 信行・河野 武*・永宗 明仁
高倉 公朋・佐野 圭司

Pulse-cytophotometric Studies on Experimental Brain Tumor under the Effect of Chemotherapeutic Agents, Microwave Irradiation and Hyperthermia

NOBUYUKI SHITARA, TAKESHI KOHNO*, AKIHITO NAGAMUNE,
KINTOMO TAKAKURA and KEIJI SANO

Department of Neurosurgery, University of Tokyo Hospital

**Department of Neurosurgery, National Cancer Center Hospital*

Summary

Perturbed cellular kinetics of experimental C₆ brain tumor under the effect of chemotherapeutic agents and physical condition was investigated for establishing the optimal regime of brain tumor synchronization as pretreatment for radiotherapy. Cultured C₆ strain was treated for 72 hours with Vincristine, Vinblastine, ACNU, BCNU, 5-FU, Methotrexate, Bleomycin, hyperthermia or microwave irradiation. The cell cycle distribution was analysed by the histograms of pulse-cytophotometry with DNA specific fluorescent stain of ethidium bromide in cell suspension. The quantitative evaluation of cell cycle phase was obtained using a computerized mathematical model. Potent synchronization in the G₂-M phase was observed in the group treated with Vincristine, Vinblastine, ACNU and BCNU. In the Vincristine and ACNU-treated group, G₂-M phase accumulation increased gradually during 72 hrs. Maximum level of G₂-M phase was 47.6% of diploid cell population by 72 hrs-contact with Vincristine, and 47.2% by ACNU (control 10%). In the Vinblastine and BCNU-treated group, G₂-M phase-accumulation increased rapidly during 24 hrs. and then the accumulated cells in G₂-M phase became dead within 72 hrs. Hyperthermia (40°) accumulated 37% of total cells into the G₂-M phase. In other treatments, the cells in G₂-M phase were below 30% of total cells. Significant synchronization depends on concentration, exposure time and tumor specificity of agents, even *in vitro* system.

The effect of combined use of ACNU and Vincristine was investigated *in vivo* in intracerebrally inoculated C₆ tumor. A relatively low amount of proliferating fraction was shown in comparison with cultured C₆ glioma. After the 9th day from inoculation, combined administration of Vincristine, 0.025 mg/kg on 3 successive days, and ACNU, 0.8 mg/kg, on 2 successive days from the second day of Vincristine was intravenously performed via femoral vein of rats. The administration of Vincristine 0.25mg/kg and ACNU 0.8 mg/kg was also tried in the same regimen in another group of rats. The cells in G₂-M phase increased to 21% in lower concentration and 29% of total cells in higher concentration (control 6%). These results showed the possibility of the choice of vinca alkaloids and nitrosourea derivatives for cellular synchronization as pretreatment for radiotherapy.

東京大学脳神経外科

*国立がんセンター脳神経外科

〔連絡先：〒113 東京都文京区本郷7-3-1, 東京大学脳神経外科, 設楽信行〕

1978年2月24日 受稿

Key words: brain tumor, vinca alkaloids, nitrosourea derivatives, hyperthermia, cellular synchronization, pulse-cytophotometry, quantitative analysis

I はじめに

近年生長解析学の進歩は、腫瘍学を一層明解なものにし、実に化学療法、放射線療法における意義も大きい。

腫瘍の治療感受性が Sinclair¹⁶⁾ や Skipper¹⁷⁾により細胞周期との関連で解明されてから、漫然とした経験主義から理論的な治療体系が確立されつつある。Dewey⁶⁾, Sinclair¹⁶⁾ ならびに Terashima¹⁹⁾等は、放射線の殺細胞効果を腫瘍細胞の cell cycle phase の phase specificity に基づいて研究し、細胞周期のうちで G₂ (post-synthetic) 期およびM (mitotic) 期にある細胞がもっとも放射線感受性が高いことを報告している。

以来、放射線の cell cycle phase specificity は放射線生物学上の大きな問題として提起されている。これらの cell cycle phase に基づく放射線感受性の違いを、いかに治療上に反映しうるかという命題である。つまり、腫瘍細胞群のうちで G₂ およびM期にある細胞の絶対数が増加すれば、cell kill の効率が良くなるわけである。

放射線の target cell cycle phase (G₂M phase) に脳腫瘍細胞を高率に蓄積し、蓄積後の同調増殖の状態では放射線治療を計画すれば、脳腫瘍の放射線増感を得ることが可能となる。

以上の目的で、実験脳腫瘍細胞に対する各種製癌剤 (Vincristine, Vinblastine, ACNU, BCNU, Bleomycin, 5FU ならびに Methotrexate) および、加温法、マイクロ波照射等の物理的要因が、培養細胞周期に与える影響を pulse-cytophotometer で観察し、G₂M phase への蓄積効果に関し比較検討した。さらに Vincristine および ACNU の合併投与による脳内移植モデルにおける同調効果を追加し、pulse-cytophotometer の DNA histogram の自動解析の方法について述べる。

II 方 法

1. 培養実験

脳腫瘍は、N-nitrosomethylurea 誘発の実験腫瘍 rat glial tumor C₆ strain¹⁾ 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 bovine fetal calf serum (20%) を添加し、initial subcultivation は細胞数 10⁴/ml で 2 ml の dish で開始した。培養開始後3日目の log phase に移行する時点で、Vincristine sulfate (Oncovin) を 10 μg/ml および 1 μg/ml, ACNU: 1-(4-amino-2 methyl-5 pyrimidinyl) methyl-3-(2-chlo-

roethyl)-3-nitrosourea hydrochloride (三共), を 100 μg および 10 μg/ml, BCNU: 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea, 100 ~ 10 μg/ml, 5-fluorouracil, Methotrexate, Bleomycin を各 10 μg/ml の各濃度を含有する培養液に置換し、24時間、72時間の各時点で pulse-cytophotometer 用の検体を作製した。

Micro-wave 照射は、DC power supply 13.8 V, 3.5 A から 432.24 MHz, 10W の micro-wave で、dish の上から irradiation-plate を装置した。さらに hyperthermia は、恒温培養40°Cで control dish の温度を保ちながら行った。

2. 動物実験

実験脳腫瘍 C₆ strain を Wister 系ラットの脳実質に 10⁶ cells/0.03 ml で移植する。方法は右前頭葉部の頭皮を切開し、動物実験用ドリルで頭蓋に穿頭し、硬膜下 2 mm の深さに腫瘍細胞を注入し、穿頭部は bone wax を塗布する。移植後9日目(A) Vincristine 0.025 mg/kg を3日間、2日目より ACNU 0.8 mg/kg を併用静注、B) 10倍量の Vincristine を 0.25 mg/kg を3日間、さらに2日目より ACNU 8 mg/kg を大腿静脈より24時間ごとに、併用静注を行う。各時点の cell cycle phase の変動を観察した。

3. Pulse-cytophotometer 用検体の作成

培養細胞を0.2% trypsin処理により各シャーレより剝離し、遠心 (1,500 r. p. m. · 10 min), さらに PBS で2回遠心洗浄を行う。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 添加、37°C 20 min incubation し、細胞内 RNA を溶解処理後 PBS で2回遠心洗浄を行う。その後、pepsine 液 10 ml (pepsine 10 mg: 0.2% HCl 100 ml) を加え、30°C で15 min incubation する。処理後 PBS にて2回遠心洗浄を行う。0.01% ethidium bromide (ethidium bromide 10 mg: tris buffer 100 ml) 染色液で染色し、室温に30分放置し、検体を cell suspension の状態で pulse-cytophotometer にかけて、DNA histogram を得る。

4. Pulse-cytophotometry の各 peak からの cell cycle phase の計測法

Histogram からの計測の数字モデルには、著者などが小杉らと作成した Fried の変法を開いた。

$$F = FG_1 + FS + F(G_2 + M)$$

$$G_1 = A_1 \exp \{B_1 (i - \mu_1)^2\}$$

$$G_2 + M = A_3 \exp \{B_3 (i - \mu_3)^2\}$$

$$FS = A_2 \sum_{K=\mu_1+1}^{\mu_3-1} C^{(K)} \exp \{B_2^{(K)} (i - k)^2\}$$

K = Channel number $C^{(K)}$ = normalizing factor

$$B_2^{(K)} = B_1 + \frac{(B_3 - B_1)(K - \mu_1)}{\mu_3 + \mu_1}$$

上式から F は、7 個の parameter; $A_1, A_2, A_3, B_1, B_3, \mu_1, \mu_3$ で表現されることになる。Histogram からの値をもとに FACOM 230-38 で $FG_1, FS, FG_2 + M$ を computer で自動計算している。

III 結 果

1. 培養実験に基づく結果

各種制癌剤および加温法、マイクロ波照射による細胞周期の変動を pulse-cytophotometer による DNA histogram から得たが、無処置群の実験培養細胞 C_6 の pattern を Fig. 1 に示す。横軸は DNA の染色量を示し、相対 DNA 量になり、縦軸は各 channel に相当する細胞数を表わしている。2C DNA 量に位置する peak が細胞周期のうちで、核酸合成を開始する以前の細胞、すなわち G_1 phase であり、また non-proliferating cell (G_0) もこの部分に位置すると考えられ、この peak は G_1 +diploid G_0 cell の集積とみなしうる。また、4C DNA 量の peak は核酸合成が終了した G_2 phase および mitotic phase にある細胞を表現している。さらに核酸合成期の S phase は、2C→4C の 2 つの peak の移行部に相当することに

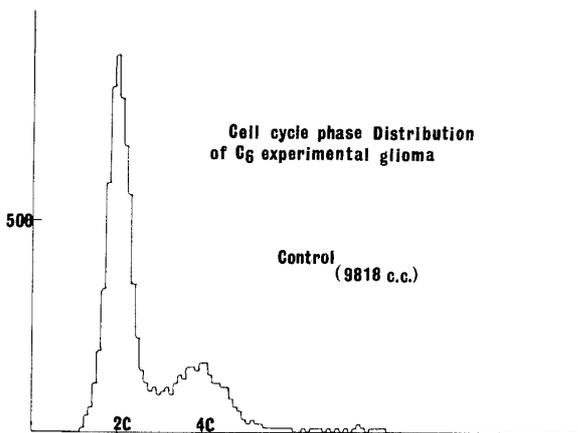


Fig. 1 Pulse-cytophotometric histogram of cultured rat experimental glioma C_6 strain. The first peak at 2C represents cells with G_1 DNA content. The second peak is due to cells with G_2 M-DNA content. The cells in S phase are lying between the two peaks. Ordinate; cell number, abscissa; relative fluorescent intensity of ethidium bromide stain proportional to the nuclear DNA content.

なる。Simulation により測定すると、各 phase は G_1 +diploid G_0 70.9%, S phase 18.5%, G_2 +M phase にある細胞は、全体の腫瘍のうちで 10.6% になる。

1) 放射線感受性の高い G_2 M phase への集積効果

Fig. 2, Fig. 3, Table 1 に phase の変動を示すが Vincristine, ACNU, Vinblastine, BCNU, に強い G_2 M

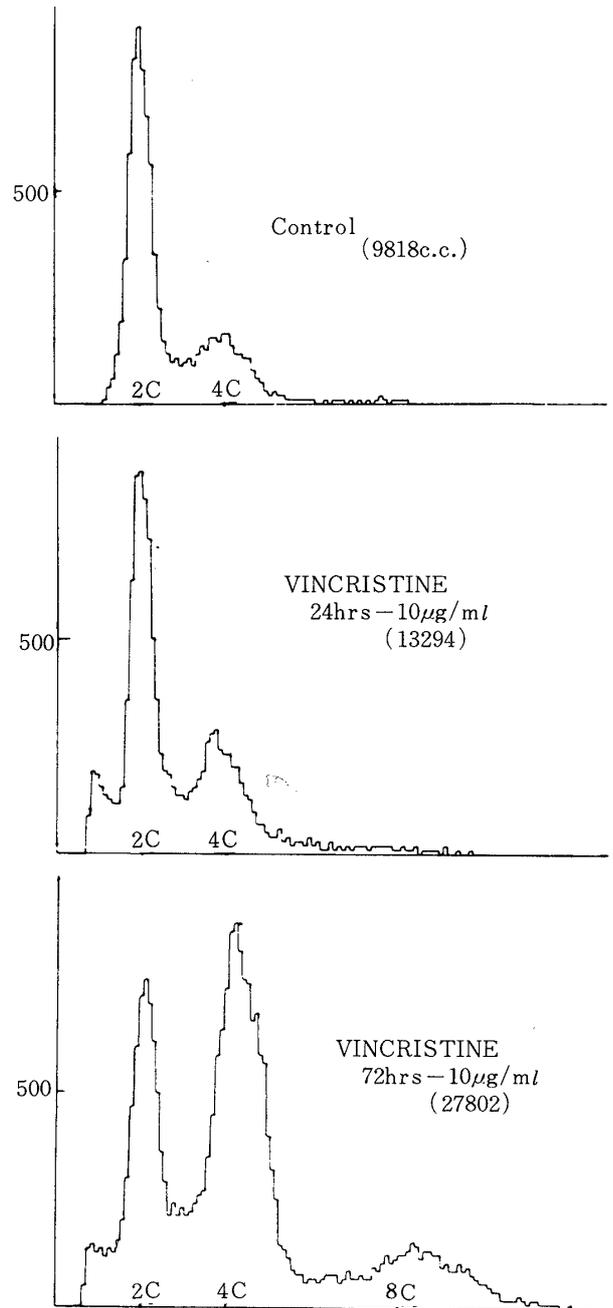


Fig. 2 The histograms indicate the change of the cell cycle phase distribution under the effect of Vincristine ($10 \mu\text{g/ml}$). 47.6% cells of diploid cell population were accumulated into the G_2 M phase. Polyploid cells are induced by Vincristine treatment.

Table 1 The quantitative values of cell cycle phase under the effect of chemotherapeutic agents, hyperthermia and micro-wave irradiation.

	Concentration	Time (h)	G ₁ %	S %	G ₂ +M %
Vincristine	10 μ	24	61.4	18.7	19.9
		72	26.0	26.4	47.6
	1 μ	24	59.6	18.8	21.6
		72	52.2	21.0	26.8
ACNU	100 μ	24	66.8	16.5	16.5
		72	41.1	18.4	40.5
	10 μ	24	53.3	16.6	30.1
		72	23.3	29.9	47.2
BCNU	100 μ	24	40.1	22.9	37
		72		cell death	
	10 μ	24	30.5	30.9	38.6
		72		cell death	
Vinblastine	100 μ	24	32.8	25.0	42.2
		72		cell death	
	10 μ	24	40.3	29.1	30.6
		72	43.6	21.8	34.7
Methotrexate	10 μ	24	60.4	18.5	21.1
		72	42.8	28.4	28.8
5-FU	10 μ	24	61.0	21.5	17.5
		72	50.5	23.5	25.9
Bleomycin	10 μ	24	58.9	14.3	26.7
		72	41.0	26.0	33.0
Microwave	432.24 MHz 10W	24	60.4	18.5	21.1
		72	42.8	28.4	28.8
Hyperthermia	40°C	24	46.8	32.3	20.9
		72	44.1	18.7	37.2

phase accumulation を認める。集積効果と時間の推移との関連から 2 群に分けうる。

(i) G₂M phase への集積が72時間に漸増する群。

Vincristine, ACNU では漸時 cell cycle phaseの変動が認められ, diploid cell cycle の47.6%が集積し, ACNU では47.2% (10 μ g), 40.5% (100 μ g) の値を示す。

(ii) G₂M phase への集積が24時間以内に生じ, その後細胞死を示す群。

BCNU は100 μ g で24時間後に37%, 10 μ gで38.6%を示すが, 72時間では各濃度で細胞死を示す。Vinblastine も同様に 100 μ g では24時間後42.2%, その後細胞死をみる。10 μ g では細胞は生存し, 34.7%が72時間後まで

認められる。

(iii) G₂M phase への集積は生じるが, 72時間後で30%以下の薬剤群は Methotrexate 28.8%, 5-FU 25.9%, Bleomycin 26.7%である。また, 物理的方法としての hyperthermia (40°C) 37.2%, microwave 28.8%であり, 加温法が高い値を示すのが注目される。

2) S phase の変動

Methotrexate 28.4%, Vinblastine 25%, 5-FU 23.5%で, いずれも72時間後に maximum level に達するが, G₂M phase accumulationの比率からみると低値を示す。

3) G₁ phase の変動

Vincristine 26.0%, ACNU 23.3%と低値を示す。

4) Polyploid cell (tetraploid cell cycle) の出現

Vincristine, ACNU, Bleomycin で72時間後, Vinblastine, BCNU に24時間後に 4C DNA の右方に polyploid cell の細胞が出現する.

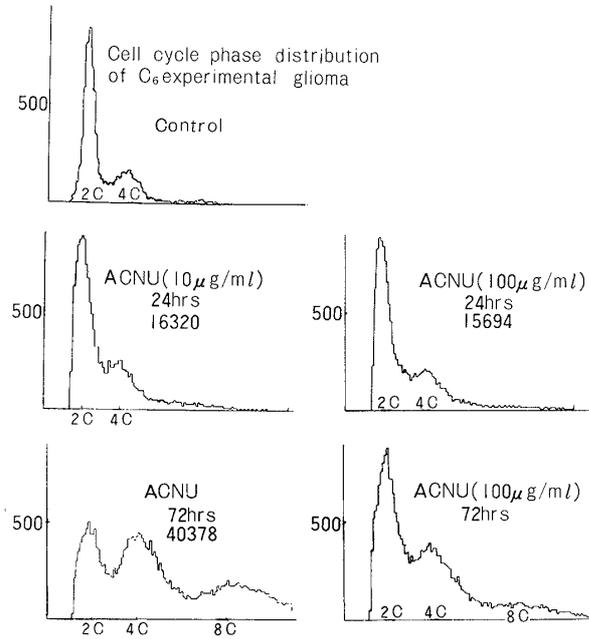


Fig. 3 Typical change of DNA distribution of ACNU-treated glioma. G₂M phase fraction is gradually increased during 72 hrs. 47.2% of G₂M phase were obtained in 72 hrs. at the concentration of 10 μg/ml (left).

2. 動物実験に基づく結果

Wister rat に移植した C₆ tumor を Fig. 6 に示すが, 10⁶ cell/0.03 ml の濃度で100%の移植率を得ることができた. 平均生存日は23±1.4日である. 未処理群の C₆

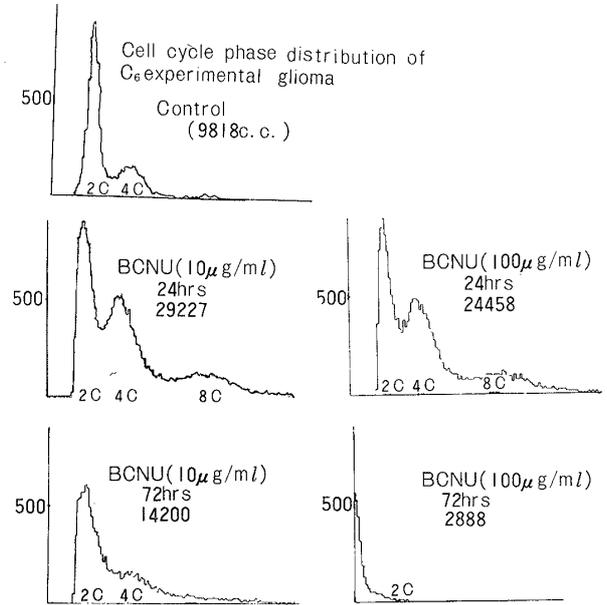


Fig. 4 The histograms exhibit rapid accumulation of G₂M phase at 24-hr contact of BCNU at the concentration of 10 μg and 100 μg/ml. The accumulated cells in G₂M phase had completely died in 72-hr incubation with the agent at the higher concentration.

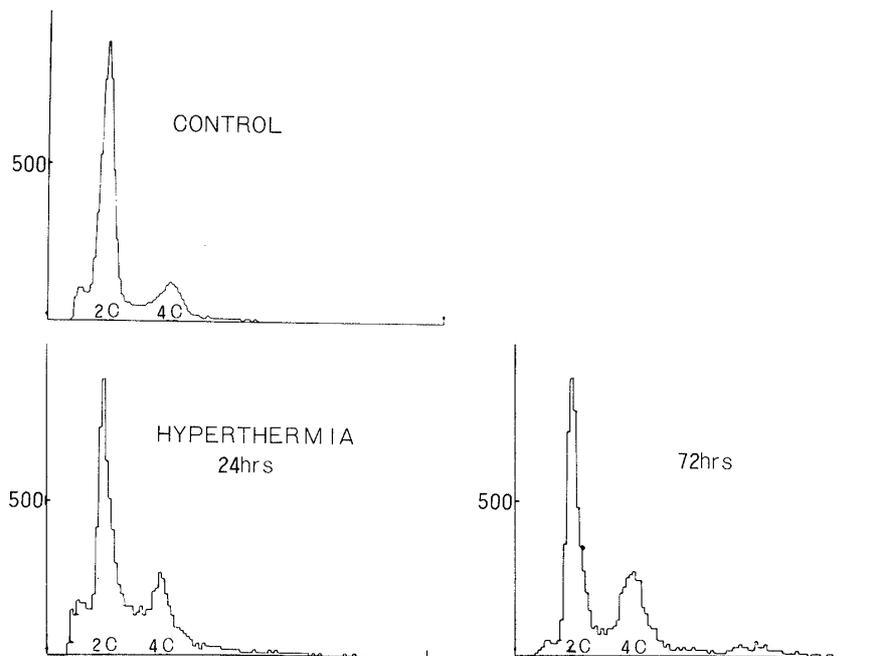


Fig. 5 The hyperthermic state induce the mild change of cell cycle phase. G₂M phase is calculated as 37.2% using computerized mathematic model.

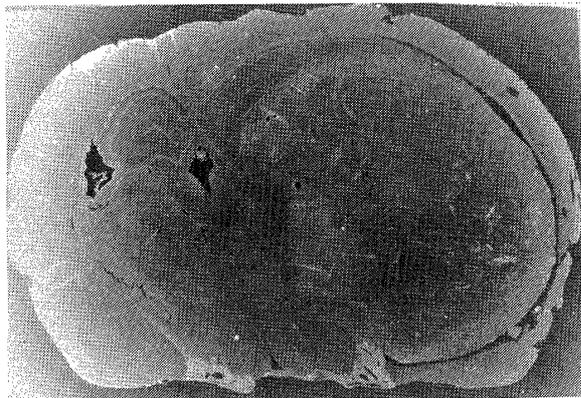


Fig. 6 Implanted C₆ glioma in the cerebral tissue of Wister rat.

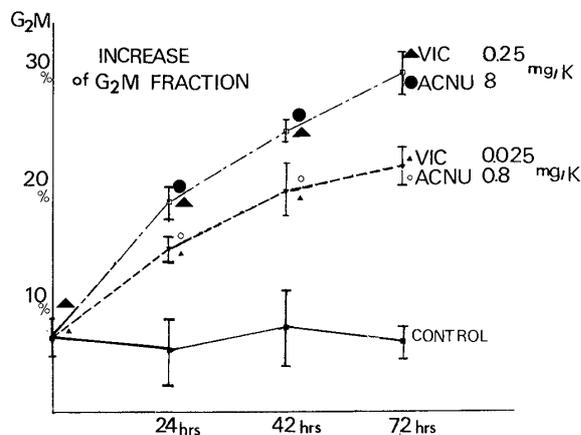


Fig. 8 The gradual increase of G₂M phase by the effect of intravenous injection of ACNU and Vincristine.

tumor の histogram は Fig. 7 に示すごとく、G₁+G₀ 84%, S phase 10%, G₂M phase 6%で、培養時に比較して S phase, G₂M phase が低値である。Fig. 8 は、各薬剤の濃度と投与期間における G₂M phase の推移を図に示したものであるが、連続静注により漸時増加傾向を示し、72時間後には Vincristine 0.025 mg/kg, および ACNU 0.8 mg/kg の合併臨床許容濃度では21%, 10倍量の Vincristine 0.025 mg/kg, および ACNU 8 mg/kg の投与では29%の値を示し、各々 control 群の6%と比較すると、3.5倍、および4.8倍の G₂M phase の増加を認めている。Fig. 9 は、各濃度の histogram を示すものであるが、*in vivo* model においては 4C DNA content より右に位置する polyploid cell の発生は認められない。また、*in vivo* model 特に脳内移植腫瘍においても G₂M phase accumulation を生じると理解しうる結果を得た。

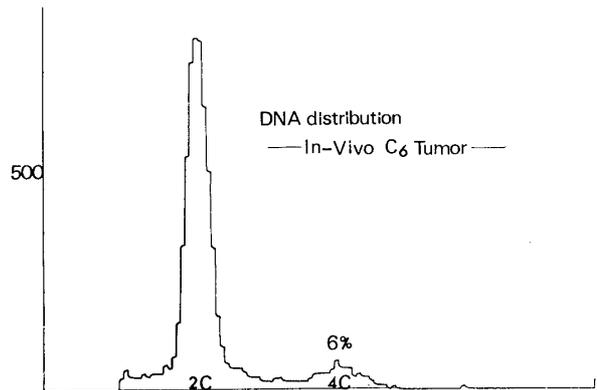


Fig. 7 The histogram of implanted C₆ tumor in the cerebral tissue of Wister rat. The relative low rate of growth fraction was indicated in comparison with the cultured C₆ glioma. G₂M phase fraction is 6% of total cells.

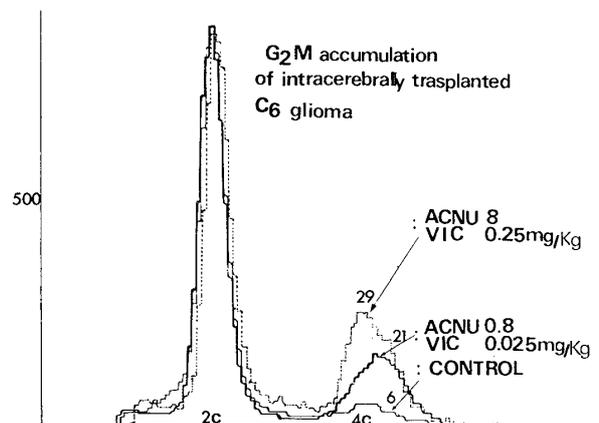


Fig. 9 The maximum value of G₂M phase is 29% in higher dosage and 21% in lower dosage during 72 hrs treatment.

IV 考 察

Ethidium bromide DNA 特異蛍光染色法を基にした pulse-cytophotometer⁶⁾ による DNA histogram の分析は、生長解析学に新しい手法として導入されたが、histogram としての pattern の認識から各 cell cycle phase の計量化の方向性が求められてきた。二相性の peak が Gauß 分布をとることが前提であるが、Berkham²⁾らは、G₁, S, G₂M phase の component の合成 pattern として histogram の数値から simulation model を作成した。Simulation data より各細胞相の数値を逆算することになる。著者らと小杉⁹⁾は Fried の求めた simulation model を改良したが、それは Fried の式が完全な Gauß 分布を想定しているが、現実の pattern は noise 成分の混入や peak の deformity があることから、original pat-

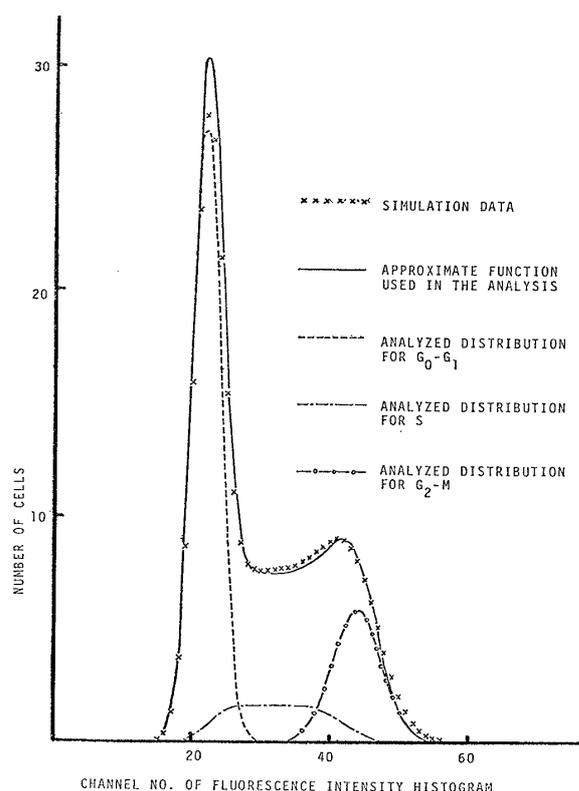


Fig. 10 Mathematical model of simulation of histogram is based on the Fried and Kosugi methods.

ternの全点が計算値を適正化させる最小自乗法を基にした analytic model を作成した。この方法により得られた S-phase の値を H_3 -thymidine の labeling index と比較すると C_6 cell line の control 値は各 18.4%, および 18% と近似の値を得ることができる。しかしながら、この simulation model は S-phase にある細胞が一定の speed で核酸合成を行うことを想定した model で、S-phase に障害が生じると、値はばらつきが多くなるのが今後の問題である (Fig. 10)。

本実験の目的は、脳腫瘍に対する単なる感受性の screening を目的としたものではなく、脳腫瘍に使用しうる化学療法剤が cellular synchronization という観点からの効果の検定である。化学療法剤のうちで、vinca alkaloid の有する cytostatic effect に関しては、Tannock¹⁷⁾, Puck¹⁰⁾, Rizzoni¹¹⁾ らの研究があるが、cytophotometer を使用した実験では Colcemid で 28~30% の G_2M phase accumulation が認められ¹³⁾¹⁵⁾, 今回 *in vitro* の実験で Vincristine 10 μg で 47.6% の高値が得られたわけである。

しかしながら、Vincristine 1 μg では、26.8% であり、concentration dependent であることは留意すべき点と思われる。また 72 時間の経過で、漸増的に増加を示す傾向

は Colcemid と同様である。 C_6 cell line の cell cycle time から考えると、十分な濃度があれば 24 時間以内に、 G_2M phase accumulation が全細胞で完成されることが予測されるわけであるが、実験結果では、72 時間でも G_1 phase, S-phase に残存細胞が認められる。

おそらくこの現象は cytostatic effect が、一回の mitotic impairment は block が完成せずに、数回の機会が必要であることから生じる現象であることが示唆されるわけである。また G_1 peak に遺残する細胞群と、長時間薬剤を使用すると必ず出現する 4C 以上の DNA 量を有する polyploid cell の解釈が問題となる。 G_1 peak に最終的に遺残する細胞を quiescent cell いわゆる G_0 cell と考えているが³⁾¹⁴⁾, この点は将来 cell soater と vital stain の開発がみられない限り、明確にならないであろう。

さらに、polyploid cell が functional cell fusion の結果で生じる多核細胞を意味するのか、endoreduplication¹¹⁾ による polyploid の出現によるか、または tetraploid cell cycle への移行が行われているのか、その機構は現在 histogram からは区別がつかず、形態的な検索ではいずれの可能性をも示唆する所見を得ている。

Nitrosourea 系制癌剤である ACNU, BCNU は、一般的に Skipper の cell cycle non-specific とされているが、cytophotometric analysis によると G_2M phase の peak に集積をみている。

両者の大きな違いは、BCNU の方が cytotoxic effect が ACNU よりも強く、72 時間以内に G_2M phase に集積した細胞が、cell death の過程を進むことにある。ACNU の G_2M phase accumulation は漸増的で持続性である。Bleomycin の作用は多くの報告があるが、Schüman¹²⁾ は、melanoma の細胞を G_2M phase に集積させた報告をしているが、今回の C_6 cell line においては十分な効果を示さなかった。これは腫瘍の薬剤感受性にに基づく結果と考えている。

Hyperthermia による phase accumulation は、Dertinger-chinese hamster を使用した spheroid culture の実験がある⁴⁾。

報告によると、外層は partial synchronization を示し、後に内層の non-cycling cell が growth fraction に移行する recruiting model を示し、12 時間後に 32% の G_2M phase accumulation を得ている。我々の実験結果では、37.2% の G_2M 値を示している。

動物実験 model は、もっとも選択性の強い Vincristine と持続性の ACNU の併用効果を検討することを目的としている。

3日間の連続静注は培養実験の結果が漸増的で、数回の mitotic phase での block が必要である可能性が強いことから以上の投与法を試みた。Wistar rat を使用したことは、本来 C₆ glial tumor は Fisher由来であるが、100%の transplantability があることと、全例が脳腫瘍を示すので、cell cycle phase の変動の model に使用した。

脳内移植の C₆ tumor pattern は *in vitro* に比較して、S-phase, G₂M phase とともに低値で、G₂M phase は培養条件と同様に漸増的に増加する。この結果は、72時間以上の連続投与が十分な G₂M phase accumulation に必要であることを示すものである。以上脳腫瘍の cellular synchronization を目的とした化学療法に Vincristine, ACNU の選択が有効であると考えられる。

V 結 論

脳腫瘍に対する synchronized chemoradiotherapy の基礎的研究として、C₆-rat glial tumor cell line を使用し、培養およびラット脳内移植モデルにおいて、各種制癌剤および加温法、マイクロ波照射の同調、蓄積効果を pulse-cytophotometer (ICP-11) で解析した。

Vincristine に強い G₂M phase への選択的な蓄積が47.6%認められ、さらに nitrosourea 系制癌剤、加温法に強い同調効果を認めた。また脳内移植 model では、ACNU, Vincristine の併用療法で、29%の G₂M phase の蓄積を認めた。また時間的要素が重要で、開始後72時間目まで漸増傾向を示す。

In vivo model においても同調効果が確認され、今後の synchronization-radiation therapy の可能性を示唆するものである。

本研究の一部は、厚生省の癌研究助成金より援助を受けた。

文 献

- 1) 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
- 2) BERKHAM E.: Automated evaluation of proliferation parameters in cell cultures. pp 75-79. In "Automation in microbiology and immunology", John Wiley & Sons, Inc., 1975
- 3) CHAN, B. W. B., HAYHOE, F. G. J. & BULLIMORE, J. A.: Effect of extracorporeal irradiation of the blood on bone marrow activity in acute leukaemia. *Nature* 221: 972-974, 1969
- 4) DERTINGER, H. & LUCKE-HUHLE C.: Cytophotometric studies on an *in vitro* tumor system after hyperthermic treatment, Pulse cytophotometry. 1976, pp 266-272
- 5) DEWEY, W. C. & HUMPHREY, R. M.: Relative radiosensitivity of different phases in the life cycle of L-P 59 mouse fibroblasts and ascites tumor cells. *Radiat Res* 16: 503, 1972
- 6) DITTRICH, W. & GÖHDE, W.: Impuls-fluorometrie bei Einzelzellen in Suspensionen. *Z Naturforsch* 24b: 360-361, 1969
- 7) ERNST, P. E. & KILLMANN, S.: Effect of anti-leukemic drug on cell cycle of human leukemic last cells *in vivo*. *Acta Med Scand* 186: 239, 1969
- 8) FRIED, J.: Method for the Quantitive Evaluation of Data from Flow Microfluometry. *Computers and Biomedical Research* 9: 263-276, 1976
- 9) KOSUGI, Y., IKEBE, J., SEKINE, M., MUSHI, T., SHITARA, N., KOHNO, T. & TAKAKURA, K.: Computer aided analysis of cell cycle phase from cytophotometric histogram. (Impress) Institute of electrical and electronics engineering, Inc. Transactions on biomedical engineering.
- 10) PUCK, T. & STEFFEN, J.: Life cycle analysis of mammalian cells. I. 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
- 11) RIZZONI, M. & PALATTI, F.: Regulatory mechanism of cell division, I. Colchicine-induced endoreduplication. *Exp Cell Res* 77: 450-458, 1973
- 12) SCHÜMANN, J. & GÖHDE, W.: Die Zellkinetische Wirkung von Bleomycin auf das Ehrlich-Karzinom der maus *in vivo*. *Strahlentherapie* 147(3): 298-307, 1974
- 13) SHITARA, N., KOHNO, T. & TAKAKURA, K.: New approach to brain tumor chemoradiotherapy with cellular synchronization by colcemid. *Acta Neurochir* 35: 123-133, 1976
- 14) SHITARA, N., KOHNO, T. & TAKAKURA, K.: The estimation of diploid G₀ fraction and induced tetraploid cell cycle under the cytostatic effect of colcemid for brain tumor cells. pp 261-265, In "Pulse-Cytophotometry" European press, GHENT BELGIUM, 1976
- 15) 設楽信行, 河野 武, 高倉公朋: 脳腫瘍の Phasesynchronizationに関する基礎的研究. *Neurol Med Chir* 17: 55-62, 1977
- 16) SINCLAIR, W.: Cell cycle dependence of the lethal radiation response in mammalian cells. *Curr Top Radi Res* 7: 264-268, 1972
- 17) SKIPPER, H. W., SCHABEL, F. M. JR., MELETT, 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
- 18) TANNOCK, L. F.: A comparison of the relative efficiencies of various metaphase arrest agents. *Exp Cell Res* 47: 345-356, 1967
- 19) TERASHIMA, T. & TOLMACH, L. J.: Variation in several responses of HeLa cells to X-irradiation during the division cycle. *Biophys J* 3: 11-33, 1963
- 20) YANISCHEVSKY, R., MENDELSON, M. L., MAYALL, B. H. & CRISTOFALO, V. L.: Proliferative Capacity and DNA Content of Aging Human Diploid Cell in Culture: A Cytophotometric and Autoradiographic Analysis. *J Cell Physiol* 84: 165-170, 1974