

Title	腫瘍細胞および正常組織細胞における放射線照射後の回復(repair of potentially lethal damage)の研究
Author(s)	大沼, 直躬
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1977, 37(12), p. 1168-1175
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/20550
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

腫瘍細胞および正常組織細胞における放射線照射後の 回復 (repair of potentially lethal damage) の研究

千葉大小児外科
大 沼 直 躬

(昭和52年 6月23日受付)
(昭和52年 8月29日最終原稿受付)

Repair of Potentially Lethal Radiation Damage in Mouse Squamous Tumor Cells and Mouse Embryo Cells Grown *in vivo*

Naomi Ohnuma

Pediatric Surgical Department, Chiba University Hospital

Code No.: 407

Key Words: *Repair of potentially lethal damage, Mouse squamous cell carcinoma, Normal tissue, Mouse embryo, Neutron*

The repair of potentially lethal damage induced on two different *in vivo* tissues by radiation was studied using *in vitro* colony assay method. The tissues used in this study were transplantable squamous cell carcinoma (NRS-1) spontaneously derived from C3Hf/He mouse and developing embryos of the same animal strain. These were regarded as a model for tumor and for normal tissue, respectively.

1) The squamous cell carcinoma and embryo tissue were excised, trypsin-dispersed and assayed for colony survival with increasing time after X-irradiation. Increase of surviving fraction of cells was demonstrated either with a slight lag period in tumors irradiated under local hypoxia or immediately after irradiation in embryos. For both *in vivo* tissues, survival values attained to the maximum at 4 to 6 hours and, then, stayed constant until 24 hours. It can be concluded that the repair develops not only in cells of nonproliferative state, but also in cells of oxic and proliferative state.

2) The repair was accompanied mainly by increase of the Do value in the survival curve. The ratio of Do values at 4—6 hours to 0 hour was 1.2 for NRS 1 tumor cells, 1.8 for embryo cells.

3) Contrary to X-rays, fast neutrons did not induce repair of potentially lethal damage in embryo cells.

緒 言

培養哺乳類細胞を放射線照射した後、蛋白合成を抑える薬剤サイクロヘキシマイド (cyclohexamide) を含む培養液中においたり¹⁾、5℃という低温下に数時間放置する²⁾ことによつて、生存率の増加が認められた。これは、放射線照射によつて細胞に与えられた損傷が潜在致死的 (poten-

tially lethal) なものであつて、ある条件では致死的な効果をあらわすが、別の培養条件を与えるときは損傷は回復するものであると説明された。その後、*in vitro* においては、定常期の細胞³⁾⁴⁾⁸⁾⁹⁾、¹⁰⁾、即ち、培養液中でもはや増殖不能なほどに過密状態になつた細胞でこの現象が認められること、さらに *in vivo* の組織においてもこの種の回

復が認められることが報告されるにいたり、一躍悪性腫瘍の治療上の問題点とされるようになった。一般的に悪性腫瘍は放射線に感受性の高い有気的条件下 (aerobic) の細胞集団と、感受性の低い低酸素条件下 (hypoxic) の細胞集団とから成り立っていると考えられている¹¹⁾。ところが、この低酸素性細胞集団においても、潜在致死的損傷の回復が起り易いという報告がある⁹⁾¹²⁾。このことは、腫瘍細胞の有効な不活化を妨げる大きな要因の一つであろうことはいうまでもない。

元来、放射線治療に際しては、腫瘍細胞の不活化から、正常組織の放射線による障害という問題をきりはなすことができない。したがって、腫瘍組織の放射線に対する反応との比較において正常組織の反応をも知ることが重要である。

照射線量に対する細胞の致死率を定量的に測定する方法は、腫瘍細胞では可能であるが、正常組織では特殊な方法を除いては不可能であつた。しかし、われわれは正常組織のモデルとしてマウス胎児を用いることによつて、腫瘍細胞と同様に放射線の致死効果を定量的にかつ *in vitro* で測定することに成功した。本論文では、C3Hf/He マウスに自然発生した扁平上皮癌 (NRS-1) と、正常組織のモデルとして、C3Hf/He マウスの胎児の線維芽細胞を用い、放射線照射を *in vivo* で施行後、潜在致死的損傷の回復を *in vitro* 検定で証明したので報告する。

実験材料と実験方法

1) 実験動物

specific pathogen-free (SPF) の条件下で飼育されている8~10週齢のC3Hf/He マウス (30~35g) を使用した。マウスは滅菌済みの市販の固型飼料 (船橋農場) と塩素添加水とを自由に与え飼育した。

2) 実験腫瘍とその移植

C3Hf/He 雌マウスに自然発生した扁平上皮癌 (NRS-1) の第1世代より第3世代までは液体窒素中に保存し、第4世代をC3Hf/He 雌マウスの側腹部に移植、実験に使用した。実験腫瘍は次のようにして作製した、4代目の腫瘍が移植されて

いるマウスを頸椎脱臼にて屠殺後、腫瘍塊を無菌的にとり出し、ハサミで細切し、37°Cの条件下で0.25%トリプシン (Difco, 1:250) 磷酸緩衝液 (pH 6.7) を用い、15分間ずつ3回トリプシン分散を行なつた。えられた細胞浮遊液を試験管にとり、水中で15分間静置して細胞塊を沈殿させたのち、その上清を約2/3採取し、1600rpm で5分間遠沈した。その沈渣を5%仔牛胎児血清を含むハンクス (Hanks) の培養液で再浮遊させ、一定量の0.5%エリスロシンB溶液と混和した。2分後血球計算盤を用い、色素をとり込まない細胞を生細胞として数えた後、 $1\sim 5 \times 10^5$ 個の生細胞をC3Hf/He マウスの右大腿皮下に移植した。NRS-1細胞の世代時間は³H-チミジン・オートラジオグラフ法により約14時間であることが知られた。腫瘍細胞移植後約2週間で腫瘍の大きさは約8mm直径以上 (定常期) となつた。

3) X線照射

腫瘍が平均直径8mm以上となつた時X線を照射した。照射条件は管電圧200KVP, 管電流20mA, 半価層0.8mm Cu, TSD 15cm, 線量率700rad/min であつた。

腫瘍細胞に人工的に低酸素条件をつくるためには、腫瘍の頭側に金属クランプ (heavy metal clamp) を照射前2分から照射中にわたり装着し、腫瘍への血流を断つた。照射前に実験動物には腹腔を介してネンブタール (Nembutal, 60mg/kg) 麻酔を施行した。

4) In vitro 集落形成法

照射された腫瘍細胞の生存率は次のようにして求められた。即ち、マウスを頸椎脱臼にて屠殺した後、無菌的に腫瘍塊を採取、これをハサミで細切後、0.25%トリプシン (NBC社, 1:300) 磷酸緩衝液 (pH 6.7) にて、37°Cの条件下で15分間4回のトリプシン分散を施行した。1回目、2回目の上清はすて、3回目と4回目の上清を氷中で試験管内に貯えた。この上清に5%の割合で仔牛血清を加え、トリプシンの作用を停止した後、1500rpm 5分間遠沈した。この沈渣を増殖培地 (10%仔牛血清加F10培地, ペニシリン100units/

ml, ストレプトマイシン $100\mu\text{g/ml}$)にて再浮遊した。生細胞を血球計算盤で数えた後、目的とする細胞数を細胞培養用プラスチック・ディッシュ ($60\times 15\text{mm}$, Falcon Plastics) に播種し、 5% CO_2 湿気相、 37°C の培養器内で14日間培養した。これを 10% ホルマリン液で固定後、メチレン・青水溶液で染色し、形成されたコロニー数を算定した。

5) 腫瘍の増殖

in vivo に移植された腫瘍細胞の成長を知るために、移植後触知可能となつてより、少くとも週3回その3方向の直径 a, b, c をノギスにて計測した。腫瘍体積 (V) は球体として下記の式より求められた。 $V=1/6\cdot\pi\cdot a\cdot b\cdot c$ 値は片対数紙上に接種後の時間に対してプロットされた。

6) 正常組織

正常組織のモデルとして、 C3Hf/He マウスの胎児線維芽細胞を用いた。交尾後15日目の C3Hf/He 雌マウスに全身照射を施行した。

照射条件は 200KVp , 20mA , 半価層 1.16mm Cu TSD 50cm , 線量率 100rad/min であつた。マウスに全身照射した後、頸椎脱臼により経時的に屠殺した。各マウスより約10匹の胎児を得ることができた。これらの胎児より頭部、四肢および内部臓器を除去し、ハサミで 4°C の条件下で細切した。これに 0.25% トリプシン液を 30ml 加え、 37°C で15分間トリプシン分散した。この操作を3回施行し、1回目の上清は除去し、2回目、3回目の上清を試験管内に貯え、*In vitro* 集落形成法の項で述べたように培養に供した。

7) フィーダー細胞 (Feeder layer)

正常組織細胞のコロニー形成率を上げる目的でフィーダー細胞を使用した。このために、 C3Hf/He マウスの胎児組織をトリプシン分散して $1\sim 2\times 10^6$ 細胞/アンフルに調整し、液体窒素中に保存した。これを実験の1週間前にプラスチック・ディッシュ ($100\times 20\text{mm}$) に播種すると、線維芽細胞が増殖して5, 6日で単層が形成される。実験前日に 0.1% トリプシンにて細胞を分散し、プラスチック・ディッシュ ($60\times 15\text{mm}$) 当り $1\sim 3\times 10^4$ の濃度で再播種した。約20時間の培養ののち

これらを軟X線発生装置 (Softex) にて 4000rad づつ照射し、細胞分裂能を消失せしめた後 *in vitro* 集落形成法に供した。軟X線による照射条件は、 60KVp , 30mA , 線量率 9200rad/min であつた。

8) 速中性子線照射条件

放医研に設置されたサイクロトロンで加速した 30MeV の重陽子をペリリウムのターゲットにあてることにより発生せしめた速中性子線を用いた。TSD は 150cm で線量率は 50rad/min であつた。

実験結果

1) 扁平上皮癌 (NRS-1) の成長曲線

C3Hf/He マウスの大腿皮下に NRS-1細胞 2×10^5 個を移植した時の腫瘍体積の成長増加を Fig. 1に示した。この腫瘍成長曲線より、実験に使用した $8\sim 10\text{mm}$ 直径の腫瘍はすでに指数関数的な増殖期を過ぎ、移行期ないし定常期のものであることがわかる。

2) NRS-1腫瘍におけるX線照射後の潜在致死の損傷の回復。

マウスの大腿皮下に移植された NRS-1腫瘍に低酸素条件をつくつた後、 2500rad 照射し、経時的

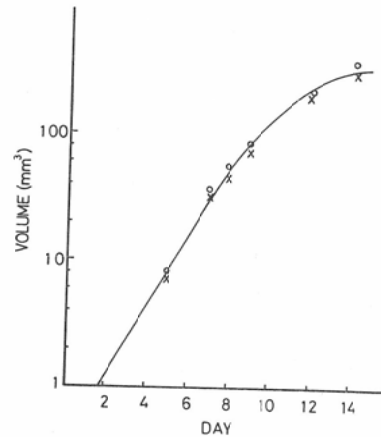


Fig. 1. Growth of NRS-1 tumor in C3Hf/He mouse. The tumor volume was measured every other days after 2×10^5 cells were inoculated subcutaneously at the thigh of mouse. Different symbols represent two separate experiments. Volume doubling time in the exponential growth was approximately 24 hours.

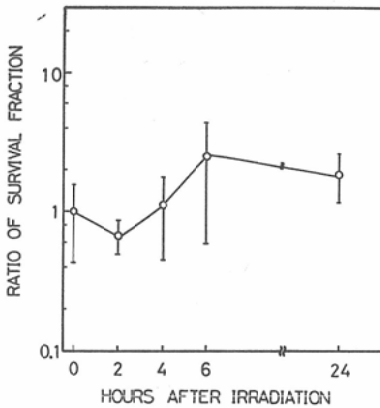


Fig. 2. Change in survival fraction of NRS-1 tumor cells after irradiation with 2,500 rad under hypoxic condition. Tumor was excised as a function of time after irradiation, and the tumor cells dispersed by trypsinization were plated out in dishes for colony survival assay. Survivals obtained were normalized to the 0 hour value. Each symbol represents the average with S.D. obtained from several separate experiments.

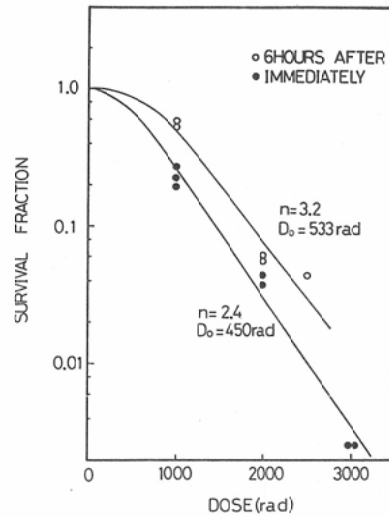


Fig. 3. X-ray survival of NRS-1 tumor cells irradiated *in vivo*. The tumors were exposed to graded doses of radiation under local hypoxia, and were excised either immediately or 6 hours after irradiation. Following dispersion of tumor cells, colony survival was determined for each radiation dose.

にマウスを屠殺して *in vitro* 集落形成法にて腫瘍細胞の生存率の変化を検討した。Fig. 2には照射後2～24時間にわたる細胞の生存率を照射直後に摘出した腫瘍細胞の生存率の比として示した。生存率はX線照射後2時間より時間の経過とともに上昇し、6時間以降24時までほぼ定常状態にあると思われる。これはX線照射による細胞の障害が、いわば潜在致死的な状態にあつて、*in vitro* の環境条件にもちこむと致死的な障害となるが、*in vivo* にあるときは時間とともに回復するというを示している。

Fig. 3は、定常期のNRS-1に *in vivo* かつ低酸素条件下で1000, 2000, 3000radの各線量を照射した後、照射直後および照射後6時間にこれを摘出し、*in vitro* にて生存率を求めた場合の生存曲線の比較である。照射直後では $D_0=450\text{rad}$, $n=2.4$ 、6時間後には $D_0=533\text{rad}$, $n=3.2$ であつた。即ち、後者の生存曲線の勾配は、前者の勾配よりゆるやかであり、かつ n 値 (Extrapolation number) で表わされる肩部分 (shoulder) も軽度の増加を示した。

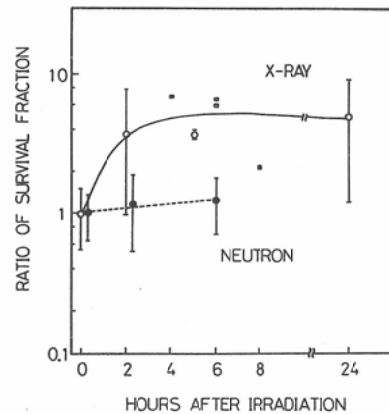


Fig. 4. Change in survival of mouse embryo cells after irradiation either with 850 rad X-rays or 500 rad neutrons in utero. C3Hf/He mice, 15 days pregnant, were sacrificed as a function of time after irradiation, and the embryo cells dispersed by trypsinization were plated out in dishes with feeder layer for colony survival assay. Survivals obtained were normalized to the 0 hour value. Average values (circles) and their S.D. were obtained from several separate experiments. Individual data points, not treated statistically, were shown by squares.

3) 正常組織のX線照射による潜在致死的損傷の回復。

正常組織のモデルとして、C3Hf/He マウスの胎児線維芽細胞が用いられた。集落形成率と値の再現性を高めるためにフィーダー細胞を使用した。その結果、集落形成率は約4～5倍に上昇した。

本実験では、交尾後15日目の雌 C3Hf/He マウスに850radの全身照射を施行後、直後より24時間目まで経時的にマウスを屠殺し、胎児を取り出し、*in vitro*にて生存率を検討した。この操作中、特に留意したことは、マウス屠殺後胎児にトリプシンを作用せしめるまでの間はすべて4°Cの条件を保ち、操作中に起こるかもしれない回復を抑制したことである。Fig. 4に示した実験結果から、正常組織でも、X線照射後胎児が*in vivo*にある時間の長さとともに、生存率の上昇することがしられる。

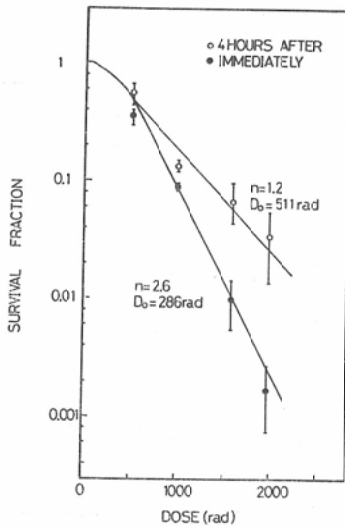


Fig. 5. X-ray survival of mouse embryo cells irradiated *in utero*. C3Hf/He mice, 15 days pregnant, were irradiated with graded doses, and sacrificed either immediately or 4 hours after for embryos. Embryo cells collected by trypsinization procedure were plated into dishes with feeder layer. Colony survival was determined for each radiation dose to embryos. Each point represents the average and S.D. of repeated experiments,

生存率の上昇は照射直後に急速で、5—6時間で最高値に達し、その時の値は照射直後の生存率のほぼ5倍であった。即ち正常組織においても潜在致死的な損傷は明らかに時間に依存して回復されることがわかる。

Fig. 5は、同じく C3Hf/He マウスの胎児線維芽細胞のX線照射直後の生存曲線とX線照射後4時間目のそれとの比較である。前者の D_0 は286 rad, n は2.6で、後者はそれぞれ511rad および1.2であった。この2つの生存曲線の比較は回復による著しい D_0 値の増加(1.8倍)を示したが、逆に n 値は減少した。

Fig. 6は、C3Hf/He マウスの胎児線維芽細胞の初代培養をトリプシン分散し、えられた単離細胞浮遊液を適宜稀釈してふたたびプラスチック・ディッシュ (60×15mm) に播種し、6時間後単離細胞としてディッシュに定着した状態で照射してえた生存曲線である。この曲線の D_0 および n は251rad と1.2で、Fig. 5に示した如く、*in vivo*

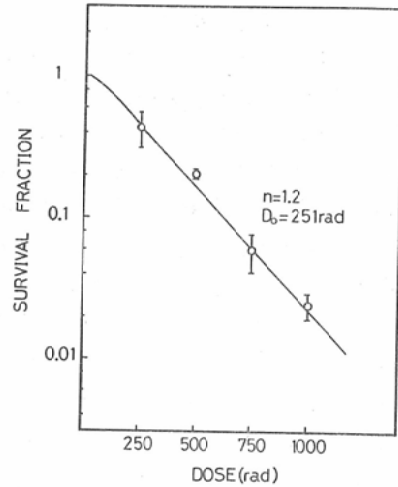


Fig. 6. X-ray survival of mouse embryo cells grown *in vitro*. Primary culture of C3Hf/He embryos was trypsinized and dispersed cells were plated on feeder layer grown in dishes. Following attachment and spreading of cells, dishes were exposed to graded doses of radiation and kept incubated for colony survival. Each point represents the average and S.D. of repeated experiments,

照射直後に測定してえた生存曲線のそれと近似することが注目される。

4) 正常組織に対する速中性子線照射後の潜在致死損傷の回復

交尾後15日目の雌 C3Hf/He マウスに速中性子線を500rad 全身照射し、X線照射の場合と同様にして照射直後より時間を追って生存率を求めた。Fig. 4の破線で示されるように、X線照射時に観察された著明な生存率の上昇は6時間にわたって全く認められなかつた。

考 案

1966年 Phillips と Tolmach により放射線による潜在致死損傷の回復がはじめて報告されて以来、*in vitro* 細胞においては、同種の観察が相次いで報告されている。Whitmore と Gulyas²⁾ は、5°Cという低温に数時間おくこと、Phillips と Tolmach らは蛋白合成阻害剤としてのサイクロヘキシマイドを作用させること、Djordjevic¹³⁾ は過剰チミジン ($10^{-4}M$) に数時間作用させること、Belli¹⁴⁾ は生理的緩衝塩類液 (balanced salt solution) に数時間作用させることなど、をその誘発因子として挙げている。しかしこれらはあくまでも *in vitro* でのことであつて生理的には *in vivo* で起こりえない条件である。1969年の Little らの報告³⁾ によると、LICH 細胞 (ヒト肝由来培養細胞) を *in vivo* 条件のモデルとされる定常期の状態で照射したあと、定常期培養の状態では数時間にわたって潜在致死損傷の回復が誘発されたという。その後、P-388マウス、リンパ腫や NCTC と称される腹水および固形の実験腫瘍で同種の回復が確認された^{5) 6) 7)}。これらの研究者によると、*in vivo* でおこる回復は、腫瘍の中の非増殖性 (non-cycling) の、あるいはきわめて増殖率の低い細胞分画が関与していると考えられている。これに対し、ごく最近浦野¹²⁾ は、固形腫瘍の非増殖性あるいは増殖率の低い細胞が多いと考えられる低酸素性分画のみならず、これらの成分がはるかに少ないであろう、一時的に低酸素状態におかれた (acutely hypoxic) 腫瘍細胞分画にも潜在致死損傷の回復が認められると報告し

ている。

ここに報告した固形腫瘍 (NRS-1) を使つての潜在致死損傷の回復に関する実験結果も諸家の報告^{6) 7) 12)} と一致し、(1) 経時的な生存率の増加はほぼ6時間で定常状態に達すること、(2) この増殖能の回復は D_0 の増大を (NRS-1では、 n 値の増大も) 伴なつた。浦野らは *in vivo* 検定で潜在致死損傷の回復を証明したが、*in vitro* 検定でも同様の結果が得られたことに本報告の意義があるだろう。この種の損傷の回復は概して照射後急速に発生すると期待されるが、本腫瘍の実験では2時間目に生存率の低下が起こつたか、少なくとも回復は遅滞期 (lag) を経過したとみられる (Fig. 2参照)。Little らの報告⁷⁾ でも $1cm^3$ 以下の固形腫瘍においてはまったく同様の現象がみられている。このことは、潜在致死回復が単一なメカニズムに支配されているのではないことを暗示している。

この回復は腫瘍治療の効果を減少させる主要な因子となるので、その回復反応をおさえる方法が見出されなければならない。実験の段階では、可能な条件 (例えば高温処理の併用も^{15) 16)} 見いだされているが、臨床的には、現段階では少くとも容易ではない。他方サイクロフォスファミド (cyclophosphamide)、フルオロウラシル (5-fluorouracil)、プレオマイシンなどの化学療法剤にも潜在致死損傷の回復が認められており^{17) 18) 20) 21)}、これらの化学療法剤とX線との併用法をくふうすることにより、両者のつくる非致死損傷 (non-lethal damage) を相互に結びつけて、致死損傷 (lethal damage) に変換させようという試みもなされている^{22) 23)}。

従来、正常組織への放射線の効果をみる方法としては、マウス十二指腸²⁴⁾、ラット空腸²⁵⁾、ラット骨髄²⁶⁾、マウス空腸²⁷⁾、などをつかう方法がとられてきた。しかしこれらはいずれもが *in vivo* で照射し、*in vivo* で集落形成能をみる方法であり、潜在致死損傷の回復がおこり得るか否かを検討するには適していない。そこで本研究では、正常組織のモデルとしてマウスの胎児を用い、こ

れを *in vivo* で照射し、照射後適時に *in vitro* 集落形成法により生存率の変化を測定することによって回復の証明に成功した。その結果、Fig. 4, Fig. 5に示された如く、正常組織にも生存曲線における D_0 値の顕著な増加に反映される潜在致死損傷の回復が認められた。胎生組織の細胞が増殖性が低いためであると考えより、*in vivo* のような高い細胞密度の条件下で回復が起こり易いと考えらるべきであろうか。この見解は放射線治療に際しての正常組織のレスポンスを推測するに適切な基礎を提供するものと思われる。*in vitro* で、かつ単離細胞の条件下で照射してえられた胎児細胞の生存曲線は、*in vivo* 照射の直後測定してえた生存曲線とはほぼ一致している (Fig. 6)。このことは単離細胞では潜在致死損傷の回復がたとえ起こつても顕著でないことを示し、前述の仮説と矛盾しない。また通例、培養細胞でなされる単離細胞の照射ではここに証明されたタイプの回復は起らないことを意味している。

速中性子線に対し正常組織モデルとしてのマウス胎児細胞は、潜在致死損傷の回復を示さない。これは諸家が、腫瘍細胞についてえた結果と一致した。速中性子線の一般的な特徴の一つとして、回復可能な亜致死損傷 (sublethal damage) が効率よく誘発されないことが知られており、中性子損傷の大部分は致死性であるために潜在致死損傷の回復も検出しえないと考えることは妥当であると思われる。

まとめ

腫瘍モデルとして C3Hf/He マウスに自然発生した扁平上皮癌 (NRS-1) を、正常組織のモデルとして C3Hf/He マウスの胎児線維芽細胞を用いて、*in vivo* 条件下で放射線照射を行ない、誘発される潜在致死損傷の回復を *in vitro* 集落形成法で検討した。

(1) 低酸素条件下でX線照射された腫瘍では、軽度の遅滞期に続いて、胎児組織では照射直後より急速に細胞生存率の増加が認められ、4～6時間で定常状態に達した。その結果潜在致死損傷の回復は腫瘍でも正常組織でも、また低酸素

条件 (NRS-1腫瘍) で照射されたのちでも、酸素に富んだ条件 (胎児組織) でも起こることがわかつた。

(2) この回復は主として生存曲線の D_0 値の増大として表現される。その増大比は NRS-1腫瘍で20%、胎児組織で80%であった。

(3) 速中性子線は潜在致死損傷の回復を誘発しない。これは中性子線で起こされる損傷の大部分が致死性であるためと考えられた。

稿を終えるにあたり、直接御指導および御校閲をいただいた放射線医学総合研究所・生理病理研究部長寺島東洋三博士、同臨床研究部浦野宗保博士、千葉大小児外科長高橋英世博士に深甚の感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Phillips, R.A. and Tolmach, L.J.: Repair of potentially lethal damage in x-irradiated Hela cells. *Radiat. Res.*, 29: 413—432, Nov. 1966
- 2) Whitmore, G.F. and Gulyas, S.: Studies on recovery processes in mouse L cells. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 24: 141—156, Feb 1967
- 3) Little, J.B.: Repair of sub-lethal and potentially lethal radiation damage in plateau phase cultures of human cells. *Nature*, 224: 804—806, 22 Nov. 1969
- 4) Hahn, G.M. and Little, J.B.: Plateau phase cultures of mammalian cells: An *in vitro* model for human cancer. *Curr. Top. Radioat Res.*, 8: 39—83, 1972
- 5) Belli, J.A., Dicus, G.J. and Nagle, W.: Repair of radiation damage as a factor in preoperative radiation therapy. *Frontiers of Radiation Therapy & Oncology*, 5: 40—57, 1970
- 6) Hahn, G.M., Rockwell, S., Kallman, R.F., et al.: Repair of potentially lethal damage *in vivo* in solid tumor cells after x-irradiation. *Cancer Res.*, 34: 351—354, Feb. 1974
- 7) Little, J.B., Hahn, G.M., Frindel, E., et al.: Repair of potentially lethal radiation damage *in vitro* and *in vivo*. *Radiology*, 106: 689—694, Mar. 1973
- 8) Evams, R.G., Bagshaw, M.A., Gordon, L.F., et al.: Modification of recovery from potentially lethal x-ray damage in plateau phase Chinese hamster cells. *Radiat Res.*, 59: 597—605, Sep. 1974
- 9) Hahn, G.M., Bagshaw, M.A., Evans, R.G., et al.: Repair of potentially lethal lesions in x-irradiated, density-inhibited Chinese hamster cells: Metabolic effects and hypoxia. *Radiat. Res.*, 55: 280—290, Aug. 1973

- 10) Little, J.B.: Factors influencing the repair of potentially lethal radiation damage in growth-inhibited human cells. *Radiat. Res.*, 56: 320—333, Nov. 1973
- 11) Hewitt, H.B. and Wilson, C.W.: The effect of tissue oxygen tension on the radiosensitivity of leukemia cells irradiated in situ in the livers of leukemic mice. *Br. J. Cancer*, 13: 675—684, 1959
- 12) Urano, M., Nesumi, N., Ando, K., Koike, S. and Ohnuma, N.: Repair of potentially lethal radiation damage in acute and chronically hypoxic tumor cells *in vivo*. *Radiology*, 118: 447—451, Feb. 1976
- 13) Djordjevic, B. and Perez, A.G.: Repair of damage in irradiated HeLa cells. *Radiat. Res.*, 43: 270—271, Jul. 1970
- 14) Belli, J.A. and Shelton, M.: Potentially lethal radiation damage: Repair by mammalian cells in culture. *Science*, 165: 490—492, 1 Aug. 1969
- 15) Braun, J. and Hahn, G.M.: Enhanced cell killing by bleomycin and 43 hyperthermia and the inhibition of recovery from potentially lethal damage. *Cancer Res.*, 35: 2921—2927, Nov. 1975
- 16) Hahn, G.M., Braun, J. and Har-Kedar, I.: Thermochemotherapy: Synergism between hyperthermia (42—43) and adriamycin (or bleomycin) in mammalian cell inactivation. *proc. Nat. Acad. Sci.*, 72: 937—940, Mar. 1975
- 17) Barranco, S.C., Novak, J.K. and Humphrey, R.M.: Studies on recovery from chemically induced damage in mammalian cells. *Cancer Res.*, 35: 1194—1204, 1975
- 18) Hahn, G.M., Ray, G.R., Gordon, L.F. and Kallman, R.F.: Response of solid tumor cells exposed to chemotherapeutic agents *in vitro*: Cell survival after 2- and 24 hour exposure. *J. Natl. Cancer Inst.*, 50: 529—533, 1973
- 19) Ray, G.R., Hahn, G.M., Bagshaw, M.A. and Kurkjian, S.: Cell survival and repair of plateau-phase cultures after chemotherapy-Relevance to tumor therapy and to the *in vitro* screening of new agents. *Cancer Chemotherapy Rept.*, 57: 473—475, 1973
- 20) Takabe, Y., Watanabe, M., Miyamoto, T. and Terasima, T.: Demonstration of repair of potentially lethal damage in plateau phase cells of Erlich ascites tumor after exposure to bleomycin. *Gann.*, 65: 559—560, 1975
- 21) Twentyman, P.R. and Bleehen, N.M.: The sensitivity to bleomycin of a solid mouse tumor at different stages of growth. *Brit. J. Cancer*, 30: 469—472, 1974
- 22) 高部吉庸, 寺島東洋三: エールリッヒと腹水腫瘍に対するX線とブレオマイシンの併用効果. 癌の臨床, 22: 134—137, 1976.
- 23) Takabe, Y., Miyamoto, T., Watanabe, M. and Terasima, T.: Potentiating effect of X-ray and Bleomycin in combination on Ehrlich ascites tumor cells. *Brit. J. Cancer*, in press, 1977
- 24) Leshner, S., Fry, R.G.M. and Sacher, G.A.: Effect of chronic gamma irradiation on the mouse duodenum. *Exptl. Cell. Res.*, 25: 398—404, 1961
- 25) Cairnie, A.B.: Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat, Response to continuous irradiation. *Radiat. Res.*, 32: 240—264, 1967
- 26) Lord, B.I.: Cellular proliferation in normal and continuously irradiated bone marrow studied by repeated labelling with tritiated thymidine. *Brit. J. Haematol.*, 11: 130—143, 1965
- 27) Withers, H.R. and Chu, A.M.: Response of jejunal mucosa to fractionated doses of neutrons or X-rays. *Europ. J. Cancer*, 10: 249—252, 1974