原 著

ヒト卵巣癌株の in vitro 制癌剤感受性試験に関する研究

——特に細胞形態を指標とする基礎的検討を中心に——

東京慈恵会医科大学産科婦人科

乾 裕昭 安田 允 寺島 芳輝 蜂屋 祥一

佐々木研究所付属杏雲堂病院婦人科

杉下 匡 天神 美夫

In vitro 制癌剤感受性試験で細胞形態と薬剤感受性、および制癌剤の細胞回転に与える影響を検討、化学療法による細胞死の問題も含め、臨床応用をはかるべく本研究を行った。

卵巣未分化胚細胞腫由来の細胞株 (JOHYL-1) をヌードマウスに移植、この皮下腫瘍より、Single cell suspension を作製、5-fluorouracil, Mitomycin C, Vincristine, Carbazil quinone の4制癌剤を高濃度短時間、低濃度長時間をそれぞれ単独接触させ検討した。

- 1) 位相差顕微鏡所見では、細胞質内顆粒と細胞質ならびに核の腫大を伴った大小突起細胞の出現を認めた。
- 2) Pap. 染色所見では、(1) 細胞質の染色性低下ならびに腫大、空胞出現、細胞膜の不明瞭化、(2) 核の腫大と空胞出現、クロマチンの粗網状変化、(3) 核小体の腫大、不明瞭化をそれぞれ認めた。
- 3) Tripa blue による dye exclusion method と、核長径測定による核腫大を検討した結果では、核腫大と死細胞率の増加が相関関係にあることから、両者には密接な関連性があることが示唆された。
- 4) ICP による核 DNA ヒストグラムの解析では CQ による高度な核腫大化をきたした細胞が細胞回転の停止を認めた。

以上より核腫大と細胞死は密接な関連があり、感受性試験のパラメーターとなり得ることが示唆された。

Key words : Ovarian cancer cell line—Sensitivity test in vitro—Anti cancer drug—Morphology

A study on sensitivity testing in vitro of human ovarian cancer cell line to anticancer drugs — Fundamental study using the parameter of morphological changes —

Hiroaki INUI, M.D., Makoto YASUDA, M.D., Yoshiteru TERASHIMA, M.D., Shouichi HACHIYA, M.D.

Dept. of Obst. and Gynec., The Jikei University, School of Medicine

Tadashi SUGISHITA, M.D., Yoshio TENJIN, M.D.

Dept. of Gynec., The Medical Institute of Sasaki Foundation Kyoundo Hosp.

論文別刷請求先 182 東京都狛江市和泉 106 東京慈恵会医科大学第3病院産婦人科

昭和57年6月15日受付

I. 緒 言

近年、各種制癌剤の開発に伴い、宿主に対し副作用が少なく、かつ腫瘍細胞に高い感受性を示す、いわゆる制癌剤感受性試験が多数試みられている。

in vitro 系における制癌剤と細胞形態の関係を検討した報告は^{6,9,10,13)}、種々みられるけれども細胞形態そのものを直接、指標とした制癌剤感受性試験の報告は、ほとんど認められていない。それゆえ、制癌剤による細胞死

判定の問題も含め、臨床応用をはかるべく本研究を行った。また制癌剤が細胞回転に与える影響は、薬剤の投与方法ならびに投与量を決定する際にきわめて重要であり、この問題解決の一助として Impuls cytophotometer (ICP) により核 DNA ヒストグラムを作製し検討するとともに細胞形態の変化もあわせて観察した。

II. 研究材料ならびに方法

われわれが樹立した、いわゆる高度異型性の卵巣未分化胚細胞腫由来と考えられる細胞株 (JOHYL-1)¹⁸⁾ をスードマウス皮下に移植、経代 6 および 7 代目の同皮下腫瘍を使用した。

上記腫瘍を約 1 mm³ に細断、ディスパーゼにて single cell suspension (約 10⁶/ml), を作製し、5-fluorouracil (5 FU), Mitomycin C (MC), Vincristine (VCR), Carbazilquinone (CQ) の 4 制癌剤につき感受性試験を試みた。濃度決定には JOHYL-1 株の各種薬剤に対する LD 50 を指標とし、薬剤濃度 $5 \times 10^{-1} \sim 1 \mu\text{g/ml}$, 30 分および $5 \times 10^{-2} \sim 10^{-1} \mu\text{g/ml}$, 24 時間, それぞれ単独接触させ, dish と Labtek 上に撒布, 合計 72 時間 10% 仔牛血清を含む, Eagle MEM にて静置培養し, 以下に述べるような各種の検索を行った。

A) 各種制癌剤に対する生残率の測定

Dish 上の生着細胞を 0.25% トリプシンにて剥離, 非生着細胞とともに tripan blue の Dye exclusion method にて生細胞を算定し, 無処置コントロール群に対する比率で表現した。

B) 薬剤接触前後の細胞形態の変化

Dish 上に生着した培養細胞を位相差顕微鏡 200 倍にて観察, 10 視野につき 1 mm² あたりの平均細胞数を算定し, 生残率と同様の比率で表すことにした。また Labtek 上に生着した細胞を 50% エーテルアルコールにて固定, Papanicolaou 染色, 細胞密度の均一な細胞を中心に 400 倍の光頭で観察, とくに核長径を Micrometer を用いて測定, 細胞 1,000 個の平均値をもって核腫大の測定値とした。

C) 薬剤接触前後の細胞回転の解析

1) Labeling index (LI) および Mitosis index (MI) の検討

前記 4 種の制癌剤を 30 分, 24 時間それぞれ接触させた後, LI は, ³H-thymidine 1 $\mu\text{Ci/ml}$ にて 30 分培養し, かつ dipping 法にて処理, Silver grain 30 個以上の細胞を, MI は核分割像を示す細胞を対象として, それぞれ細

図 1 材料と方法

胞数 1,000 個についての比率を算出した。

2) ICP を用いた核 DNA ヒストグラムの検討

Dish 上の生着および非生着細胞を 0.25% トリプシンにて剥離し, 50% エタノールにて固定, Pepsin 処理後, Etidium bromide にて蛍光染色し ICP 測定に供した (図 1)。

III. 研究成績

A) 各種制癌剤に対する生残率測定

30 分接触群では 5FU ($5 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$), MC ($1 \mu\text{g/ml}$), VCR ($1 \mu\text{g/ml}$), CQ ($1 \mu\text{g/ml}$) の順に生残率は低下し, とくに殺細胞効果は, VCR, CQ で著明であった。

24 時間接触群では, 生残率は当然のことながら 30 分接触群に比し著しく低下した。とくに MC ($10^{-1} \mu\text{g/ml}$), CQ ($10^{-1} \mu\text{g/ml}$) は, 殺細胞的に働き, VCR では 30 分接触とほぼ同値を示した (図 2)。

B) 形態学的観察

1) 位相差顕微鏡所見

各種制癌剤を, これまた 30 分, 24 時間, 接触させ検討した。無処置コントロール 72 時間培養における細胞は, 敷石状に増殖し, 細胞質, 核ともに円形~楕円形で, 核内に 1 個以上の核小体を認めた (写真 1)。

5 FU 30 分接触の位相差顕微鏡における所見では, 細胞密度が対照群に比し約 40% 程度, 疎となり, 細胞質内は対照群にあまり認めない顆粒が出現し, 細胞質, 核ともに腫大かつ扁平化を呈した (写真 2)。

5FU 24 時間接触では, 生着しない浮遊細胞が増加したためか, 細胞密度は対照群に比し約 10% と極度に疎となり, 細胞周辺に小突起が出現するとともに細胞質内顆粒をもった細胞が増加し, 核および細胞質の腫大傾向も著明となった (写真 3)。

MC 30 分接触では, 細胞密度がこれまた対照群に比

図 2

写真 1 無処置コントロール (×200)

写真 2 5FU, $5 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ 30分接触 (×200) 写真 3 5FU, $5 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ 24時間接触 (×200) 写真 4 MC, $1 \mu\text{g/ml}$ 30分接触 (×200)

し約40%程度、疎となり、小突起や顆粒細胞など5FUと同様の所見を呈した(写真4)。

MC 24時間接触は、細胞密度約10%弱と極度に疎と

なり、大突起細胞の出現や核の扁平化をきたし、大多数の細胞に顆粒を認めた(写真5)。

VCR 30分接触では、5FU, MC 接触群とほぼ同様の所

写真 5 MC, 10^{-1} µg/ml 24時間接触 (×200)

写真 6 VCR, 1 µg/ml 30分接触 (×200)

写真 7 VCR, 10^{-1} µg/ml 24時間接触 (×200)

写真 8 CQ, 1 µg/ml 30分接触 (×200)

写真 9 CQ, 10^{-1} µg/ml 24時間接触 (×200)

見を示し、細胞密度も約40%弱程度疎となった(写真6)。

VCR 24時間接触では、5FU, MC 接触群に比し突起を有する細胞が少なくなり、細胞密度も約20%程度、疎となった(写真7)。

CQ 30分接触では、他剤に比し細胞密度が約10%弱と著しく疎となり、大小突起と細胞質内顆粒も多数認められた(写真8)。

CQ 24時間接触では、30分接触群よりも細胞密度が

	5 FU	MC	VCR	CQ
30分接触群	38	41	36	9
24時間接触群	8	8	19	6

図 3 位相差顕微鏡下での無処置コントロールに対する細胞密度(%)

さらに疎となり、大小突起を有する細胞も一層多く観察され、同時に細胞質と核の腫大、および細胞質融解が著明となった(写真9)。

以上要約すると殺細胞効果の所見としては、細胞密度が疎となり(図3)、細胞質内顆粒と大小突起の出現、核の扁平化、核および細胞質腫大などが観察された。

2) Pap. 染色所見

無処置コントロール群では、細胞が敷石状に密に配列し、細胞質は強塩基性、細胞膜は明瞭、核は円形～楕円形でクロマチンに濃染し、核膜も明瞭で、核小体は数個観察された(写真10)。

5FU 30分接触では、細胞質は弱塩基性で、軽度腫大し、一部に小空泡を認め、細胞膜はやや不明瞭となった。核は多少腫大し、クロマチンは顆粒状、核膜は薄いが明瞭で、核小体は腫大傾向を示した(写真11)。

写真 10 無処置コントロール (Pap. 染色, ×400)

写真 11 5 FU, $5 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ 30分接触 (Pap. 染色, ×400)

写真 12 5 FU, $5 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ 24時間接触 (Pap. 染色, ×400)

写真 13 MC, $1 \mu\text{g/ml}$ 30分接触 (Pap. 染色, ×400)

写真 14 MC, $10^{-1} \mu\text{g/ml}$, 24時間接触 (Pap. 染色, ×400)

写真 15 VCR, $1 \mu\text{g/ml}$ 30分接触 (Pap. 染色, ×400)

5FU 24時間接触では、小突起細胞の出現を認め、細胞質内に小空胞を有する細胞が多く出現した。核は中等度腫大し、クロマチンは粗網状となり、一部空胞を有し、核小体は不明瞭となった(写真12)。

MC 30分接触では、細胞質の一部に小空胞を認め、核は軽度腫大し、クロマチンは対照群と同様、細網状で

核膜はよく保たれ、核小体は軽度腫大傾向を示した(写真13)。

MC 24時間接触では、細胞質、核ともに著しく腫大し、小空胞が多数出現、核小体の腫大も著明であった(写真14)。

VCR 30分接触では、細胞質が中等度腫大し、一部レース状を示し、空胞も少数出現した。核は軽度腫大し、

		無処置 コントロール	5 FU	MC	VCR	CQ
細胞質	染色性	強塩基性	弱塩基性	弱塩基性	弱塩基性 (一部レース状)	低下
	腫大	(-)	(+)	(±)	(±)	(+)
	空胞	(-)	(+) 小空胞	(+) 小空胞	(+) 小空胞	(+) 大小空胞
	細胞膜	明瞭	やや不明瞭	やや不明瞭	やや不明瞭	不明瞭~融解
核	クロマチン	細網状	顆粒状	細網状	顆粒状	粗顆粒状
	腫大(μ)	(-) 38.7	(+) 60.7	(±) 43.2	(+) 49.1	(#) 80.3
	空胞	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
	核膜	明瞭	明瞭	明瞭	明瞭	やや不明瞭
核小体腫大		(-)	(+)	(±)	(±)	(+)

図4 30分薬剤接触群のPap.染色所見

写真16 VCR, $10^{-1} \mu\text{g/ml}$ 24時間接触 (Pap. 染色, $\times 400$) 写真17 CQ, $1 \mu\text{g/ml}$ 30分接触 (Pap. 染色, $\times 400$)

クロマチンは顆粒状, 核膜, 核小体に著しい変化を認めなかった (写真15).

VCR 24時間接触では, 細胞質の染色性が低下し, 小空胞が多数出現, 細胞膜は不明瞭となった. 核は軽度腫大するとともに一部に凝集, 融解像や核内空胞も認められた (写真16).

CQ 30分接触では, 細胞質が著明に腫大するとともに大小突起の出現を認めた. 核は粗顆粒状を呈し, 核ならびに核小体腫大も著明であった (写真17).

CQ 24時間接触では, 細胞質が腫大かつ融解するとともに, 小空胞の出現や突起状変化が観察された. 核は粗網状に変化し, 核破砕像も認められた (写真18).

以上 PAP. 染色所見を要約すると位相差所見と同様, 各薬剤間で差異は認められなかった. しかし 30分接触群で 5FU, CQ が細胞質と核および核小体の腫大を認め, 24時間接触群で細胞質が突起状を呈し, 空胞化や腫大さらに融解像を認めるとともに核は腫大かつ粗網状を示し, 核膜の不明瞭化や核小体の腫大などが各薬剤ともに観察された (図4, 5).

写真18 CQ, $10^{-1} \mu\text{g/ml}$ 24時間接触 (Pap. 染色, $\times 400$)

3) 薬剤接触後の核腫大

核長径は, 各薬剤接触後, 対照群に比し, いずれも増大した. すなわち 30分接触群の平均核長径は対照群の 38.7μ に比し CQ 80.3μ , 5FU 60.7μ , VCR 49.1μ , MC 43.2μ の順に増大した. また 24時間接触群では CQ 85.0μ , MC 74.6μ , 5FU 69.1μ , VCR 58.3μ の数値を示した. さらに各薬剤とも, 当然のことながら 24時間接触群が 30分接触群に比し腫大率が大きく, と

		無処置 コントロール	5FU	MC	VCR	CQ
細胞質	染色性	強塩基性	低下	低下	低下	低下
	腫大	(-)	(+) 突起状	(+) 突起状	(+) 突起状	(+) 突起状
	空胞	(-)	(-) 小空胞	(+) 小空胞	(+) 小空胞	(+) 大小空胞
核	細胞膜	明瞭	不明瞭~融解	不明瞭~融解	不明瞭~融解	不明瞭~融解
	クロマチン	細網状	粗網状	粗網状	粗網状	粗網状
	腫大(μ)	(-) 38.7	(+) 69.1	(+) 74.6	(+) 58.3	(+) 85.0
核小体腫大	空胞	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
	核膜	明瞭	不明瞭	不明瞭	不明瞭	不明瞭
	核小体腫大	(-)	(+) 不明瞭化	(+) 不明瞭化	(+) 不明瞭化	(+) 不明瞭

図5 24時間薬剤接触群のPap. 染色所見

図6 薬剤接触後の核長径

くに CQ は他剤に比し著しく増大し、対照群の約2倍の高値を示した。以上のことは各薬剤の生残率——CQ, MC 10% 以下, 5FU 20% 弱, VCR 20% 強——の順位と相関を有することになり核腫大と生残率~細胞死の関連性が強く示唆された(図6)。

4) ICP による DNA ヒストグラムの解析

5FU では, LI が対照群の 20.0 に比し 35.5 と上昇したことから S 期における蓄積が考えられた。VCR では, MI が対照群の 3.21 に比し 8.65 と上昇したことから late G_1 ~S 期蓄積と G_2 +M の増加が示唆され, MC でも同様, 軽度 G_2 +M の増加が考えられた。CQ の解析では, LI=0, MI=0 を示したことから細胞回転の停止が考えられ, 2n 以下の debris と S 期蓄積, および多数の高倍体細胞の出現が観察された(図7~10)。

図7 5FU $5 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ 30分接触

図 8 MMC 1 µg/ml 30 分接触

図 9 VCR 1 µg/ml 30 分接触

図 10 CQ 1 µg/ml 30 分接触

IV. 総括ならびに考案

In vitro 制癌剤感受性試験は種々行われているが、いまだ確立されたとはいえない。現在、各種脱水素酵素を指標とした試験^{1,7,11)}, isotope を用いた方法⁵⁾, 組織培養を利用した試験¹⁶⁾と、種々試みられているが、われわれは薬剤接触後の細胞形態変化に注目し、とくに位相

差顕微鏡, Pap. 染色所見, 核腫大率および DNA ヒストグラムを中心に検討を試みた。

位相差顕微鏡を用いた観察では、対照群 72 時間培養により円形～楕円形の腫瘍細胞が密に増殖した。一方、薬剤接触群では、(1) 細胞質内顆粒、(2) 大小突起細胞の出現が特徴的であり、その他、細胞質ならびに核腫大、細胞質および核融解といった所見が観察された。しかしながら、これら形態的变化は各薬剤間での特徴的变化としては認められなかった。

また殺細胞効果の認められた CQ 群では、ほとんど生着能が失われて浮遊細胞となった。すなわち生着能を失った細胞は薬剤接触により細胞活性が低下し、高度の細胞障害を受けていることが観察された。しかしながら非生着細胞をすべて死細胞と認定するには問題があり、細胞周期内に不可逆性変化を受け死滅する interphase death を示すのか、または薬剤の作用を受けた後の周期に死滅する reproductive death を示すのか不明であり、さらには逆に修復細胞として活性を獲得するのか本実験では結論を見い出すことができなかった。

Pap. 染色所見では、位相差と同様、薬剤間で特異な形態的变化は観察されなかったが、薬剤により細胞質、核、および核小体に種々の変化が認められた。すなわち細胞質では、染色性の低下、腫大、空胞出現、細胞膜の不明瞭化を認め、核ではクロマチンの粗網状変化や腫大、空胞が出現し、核小体では腫大、不明瞭化が特徴的であった。以上の所見は安田¹⁹⁾の in vivo における制癌剤の腫瘍細胞の形態変化とほぼ同様であり、in vitro においてこの形態的变化は薬剤濃度や作用時間にある程度相関を有することが判明した。

また西浦¹²⁾は、Hela 細胞を用い、放射線照射による形態的变化を観察し、とくに核腫大と細胞死の関係について検討、放射線照射後、核径が 1.5 倍を凌駕した場合は、もはや無限増殖能をもち得ないとし、やがて死に至る細胞といい得ると述べている。本実験の成績でも生残率の著明な減少を示した CQ では、30 分、24 時間ともに他剤に比し 2 倍以上の核腫大を示しており、死細胞の増加と核腫大との間には、きわめて密な相関を有すると考えられ、in vitro 制癌剤感受性試験のパラメーターになり得ることが強く示唆された。

DNA ヒストグラムの検討は、制癌剤の細胞回転に与える影響を観察することにより薬剤の腫瘍細胞に対する作用機序を知ることができ、制癌剤感受性試験上きわめて重要である。

5FU の実験成績では、細胞回転上 G₁, G₂, M 期に細胞にあまり影響を与えず、LI が上昇したことから S 期に

入って DNA 合成阻害をきたしたことが推察され, S 期蓄積を示したと考えられた. 以上のことは, 諸家の報告による phase specific²⁾, しかも S-phase specific⁷⁾ な薬剤といわれていることとも一致する.

MC の解析では, 軽度 G_2+M の増加を認めたにすぎなかったが, 従来の報告^{4,14)}によれば本剤は G_2 期に感受性を示すとされている.

VCR では, 接触後, 対照群の $MI=3.21$ に比し 8.65 と上昇したことから分裂阻止作用が推察された. 本剤は phase specific²⁾で, かつ metaphase arrest 作用を有することが多数報告されており, これまた本実験結果と同様の成績を示した.

CQ では, $LI=0$, $MI=0$ を示したことから Krishan⁹⁾らの細胞回転の進行停止と考えられ, その作用は短時間速効性を有すると思われた.

V. 結 論

ヒト卵巣腫瘍由来の細胞株 (JOHYL-1) を用い制癌剤感受性試験を行い薬剤接触前後の細胞形態を観察, 以下の結果を得た.

1) 位相差顕微鏡では, 細胞質内顆粒を認め, 細胞質ならびに核腫大を伴った大小突起細胞が観察された.

2) Pap. 染色では細胞質の染色性が低下し, 腫大, 空胞化ならびに細胞膜の不明瞭化を呈し, 核は腫大し, 空胞の出現やクロマチンの粗網状変化を示すとともに核小体の腫大が観察された.

3) Tripian blue による dye exclusion method と核長径測定による核腫大の検討では, 核腫大と死細胞増加の間に, きわめて密接な相関を有することが判明した.

4) ICP による核 DNA ヒストグラムの解析では, 5 FU, MC, VCR とともに cycle specificity を示し, 殺細胞効果のもっとも高度な CQ では細胞回転の停止を認めた.

以上の成績より核腫大と細胞死の間には密接な関連が認められ, in vitro 制癌剤感受性試験のパラメーターとなりうる事が強く示唆された.

Summary

Using a cell line (JOHYL-1) of human ovarian anaplastic disgerminoma, a sensitivity testing of anticancer drugs was studied. After exposure of anticancer agents, a cytomorphological study was made to obtain results as follows.

1) A phase-contrast microscopic examination revealed that

(1) large and small prickle cells with swelling of the cytoplasm and the nucleus and (2) cytoplasmic granules.

2) Papanicolaou staining revealed that (1) a decline in staining, swelling, and vacuoles of the cytoplasm, and obscure cell membrane, (2) a reticular change in chromatin, swelling and vacuoles of the nucleus and (3) swollen and obscure patterns of the nucleoli.

3) By the measurement of the major axis of the nucleus suggested that the number of the swollen nucleus correlated to the number of dead cells each other.

4) By analysis of nuclear DNA histogram by Impuls cytophotometer, 5 FU, MC and VCR showed a cycle specificity as reported previously. CQ rated as the foremost in the cytotoxic effect showed stoppage of the cell cycle.

Therefore, we concluded that it was possible to state that nuclear diameter can be used as the parameters for the sensitivity testing of anticancer agents assess the relationship between swelling of the nucleus and death of the cell can be data of nuclear decline the as the parameters for the sensitivity testing of anticancer drugs.

文 献

- 1) Black, M.M. and Speer, F.D.: In vitro and clinical effects of urethane plus triethylene-melaniline on human breast cancer, Surg. Gynec. Obst., 102: 420~426, 1955.
- 2) Bruce, W.R., Meeker, B.E. and Valeriote, F.A.: Comparison of the sensitivity of normal hematopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic agents administered in vivo, J.N.C.I., 37: 233~245, 1966.
- 3) Cutts, J.H.: The effect of vinca leukoblastine on dividing cells in vivo, Cancer Res., 21: 168~172, 1961.
- 4) Djordjevic, B. and Kim, J.H.: Different lethal effect of mitomycin C and actinomycin D during the division cycle of HeLa cells, J. cell Biol., 38: 477~482, 1968.
- 5) 貴島幸彦: 核酸と蛋白の生合成に対する抑制効果を指標とする制癌剤感受性試験の基礎的研究, Chemotherapy, 14: 621~627, 1966.

- 6) 小林仁道：培養した腫瘍細胞に及ぼすマイトマイシンの影響，遺伝学雑誌，34：344～350，1959.
 - 7) 近藤達平・他：制癌剤適応判定法について，癌の臨床，10：17～21，1964.
 - 8) Krishan, A. and Frei, III.E. : Effect of adriamycin on the cell cycle traverse and kinetics of cultured human lymphoblasts, *Cancer Res.*, 36 : 143～150, 1976.
 - 9) Lapis, K. and Bernhard, W. : The effect of mitomycin C on the nucleolar fine structure of KB cells in cell culture, *Cancer Res.*, 25 : 628～645, 1965.
 - 10) 本山悌一・他：制癌剤の効果判定に関する基礎的研究，日臨細胞誌，21：15～25，1982.
 - 11) 西岡久寿弥・他：人の悪性腫瘍の制癌性ウイルス及び化学療法剤に対する感受性試験のこゝろみ，日本臨床，15：23～34，1937.
 - 12) 西浦天宣：放射線照射による Hela 細胞の形態学的変化に関する研究，特に核腫大現象からみた細胞死の判定のために，日臨細胞誌，19：524～531，1980.
 - 13) 野嶽幸雄：細胞水準における放射線・制癌剤効果判定の基準私見，産婦人科の世界，13：1879～1896，1961.
 - 14) Ohara, H. and Terasima, T. : Lethal effect of mitomycin C on cultured mammalian cells, *GANN*, 63 : 317～327, 1972.
 - 15) Palmer, C.G., Iivengood, D., Warren, A.K., Simpson, P.J. and Johnson, I.S. : The action of vinculeukoblastine on mitosis in vitro, *Exp. Cell. Res.*, 20 : 198～201, 1960.
 - 16) 下山正徳，木村禧代二：抗癌剤の殺細胞作用の定量法，*Chemotherapy*, 20 : 787～794, 1972.
 - 17) Skipper, H.E., Schabel, Jr., F.M., Mellet, L.B., Montgomery, J.A., Wilkoff, L.J., Lloyd, H.H. and Brockman, R.W. : Implications of biochemical, cytokinetic, pharmacologic, and toxicologic relationships in the design of optimal therapeutic schedules, *Cancer Chemother. Rept's.*, 54 : 431～450, 1970.
 - 18) 安田 允・他：ヒト卵巣胚細胞由来の性状と HCG 産生能，日本癌学会総会記事，40：182，1981.
 - 19) 安田 允・他：卵巣癌腹水細胞の抗癌剤による形態的变化，日臨細胞誌，20：268～274，1981.
-