脳腫瘍摘出手術が残存腫瘍細胞に及ぼす影響に関する一考察

村岡 勲・星野 孝夫・小柏 元英*

Effects of Surgery on Remaining Brain Tumor Cells

ISAO MURAOKA, TAKAO HOSHINO and MOTOHIDE OGASHIWA*

Brain Tumor Research Center, Department of Neurological Surgery, University of California,
San Francisco, California 94143, USA

Summary

9L tumor cells were transplanted into the left lobe of the brain in Fischer 344 rats. In one group, the brain tumor was grossly removed from the rats microsurgically on the 14th to 18th day after transplantation (operated group). These rats were decapitated 1, 6, 24, or 48 hr after surgery, having received $250 \mu\text{C}$ ^3H -thymidine (^3H -TdR) intraperitoneally 30 min before sacrifice. Both frontal lobes (operated left side and non-operated normal side) were removed and DNA was extracted using a modified Schmidt-Thannhauser method. ^3H activity was then measured with a liquid scintillation spectrometer (LSC) to determine the ^3H -TdR uptake into the DNA of the remaining tumor cells. A second group of rats which did not undergo tumor removal (non-operated group) received the same dosage of ^3H -TdR 30 min before decapitation; the brain was removed postmortem, the tumor was then removed from the brain, and the same extraction procedures and uptake measurements were performed. For comparison of the two groups, the relative increased radioactivity (RIRA) in the brain was determined as a ratio of the counts per gram (cpg) in the tissue of the left lobe, from which tumor was removed, to the cpg in the normal right lobe. RIRA in the non-operated group was 5.7, indicating that the ^3H -TdR uptake of tissue in the left lobe, which contained some remaining tumor cells, was 5.7 times higher than that in the normal lobe. In the operated group, RIRA was 1.5 and 1.7 respectively in the rats sacrificed 1 and 6 hr after surgery, which indicated that remaining tumor cells had virtually ceased to proliferate; however, in rats sacrificed 24 hr after surgery, RIRA was 4.9, which approached the same level as that in the non-operated group. In the rats sacrificed 48 hr after surgery, RIRA was as high as 9.5. These results showed that for at least 6 hr after surgery there was almost no proliferation, but by 24 hr after surgery, active division of the remaining tumor cells had resumed. To confirm both ^3H -TdR perfusion in the tissue and tissue permeability, a third group consisting of operated rats received ^3H -TdR and ^{14}C -urea before being decapitated. Both frontal lobes were lyophilized and activities of the ^3H and ^{14}C were measured with LSC. During an observation time of up to 48 hr, there was no significant fluctuation in the level of available ^3H -TdR in tissue or in the tissue permeability, as indicated by ^{14}C -urea space.

Key words: brain neoplasms; neoplasms, experimental; surgery; chemotherapy; thymidine

I はじめに

近年、白血病やある種の腫瘍は化学療法による治癒例も報告されるようになってきた²⁾³⁾⁹⁾。この事実は、宿主の正常細胞に非可逆的の傷害を与えることなく腫瘍細胞を

抗腫瘍剤により除去できることを示している。脳腫瘍の化学療法でも明確にその理由がわからないにしても、時に劇的な効果がみられることがある。特に、BCNUをはじめとする nitrosourea 系の薬剤を含めていくつかの薬剤は、glioma 系の腫瘍に対して確かに治療効果が認め

カリフォルニア大学 (サンフランシスコ) 脳神経外科 (*現籍 杏林大学脳神経外科)

[Correspondence: Isao Muraoka, M. D., Department of Neurological Surgery, University of California, San Francisco, California 94143, USA]

1979年9月25日 受稿

られており^{4,10,12,14)}、これらの抗腫瘍剤を併用することによりさらに治療成績が改善しつつあることも事実である。

しかしながら BCNU を用いた治療を始めとして、併用する薬剤の選択から投与時期まで、従来までは、試行錯誤の繰返しによって設定されたり、または単に医師の経験から決定されるのが常であった。いくつかの報告が明らかにしているように、抗腫瘍剤の効果は画一ではなく、それぞれの薬剤が投与されたときの腫瘍細胞のおかれている状態によっても異なる。すなわちそれぞれの抗腫瘍剤が、DNA の合成の阻止だとか同調効果(synchronization)などの形で腫瘍細胞にさまざまな影響を及ぼすため、併用薬剤の選択や投与間隔の決定にもそれらの事実を考慮に入れて行うのが望ましい。脳腫瘍の生長解析^{6,7,8)}ならびに薬理解析¹¹⁾は、その意味でも解決しなければならない重要な課題である。

一方、脳腫瘍において化学療法に手術がどのように影響するかについてはあまり調べられていない。腫瘍摘出操作に付随する周囲組織の血流障害、浮腫、hypoxia、代謝障害といった多くの変化が、残存する腫瘍細胞になんらかの影響を与えることは想像に難くないが、その影響を知ることは術前・術後の治療を考慮する際には有益なことであるかもしれない。

星野ら⁹⁾はラット脳腫瘍モデルで腫瘍全摘出を行い、BCNU の投与時期とその延命効果の関係を調べて次のように報告している。すなわち BCNU を手術前1時間または手術後1～12時間経たあとで投与した群は200%以上の相対的延命率[increased life span, ILS=(実験群の平均生存日数/対照群の平均生存日数)×100-100(%)]の延長がみられたが、手術前12時間、術中および手術後24時間にBCNUを投与した群ではILSは40～100%と悪くなるという。この事実は、手術そのものが残存腫瘍細胞の化学療法に与える影響が、決して見過ごせるものでないことを暗示している。

我々は同じラット脳腫瘍モデルを用いて、上記報告の延命効果が著明に認められた術後1～12時間と、効果が余り認められなかった24時間以後とで、術後に残存する腫瘍細胞にどのような変化があるのかを増殖パターンの点から調べてみた。

Ⅱ 研究方法

実験動物：脳腫瘍モデル(9L脳腫瘍)作成の詳細は、すでに報告されている¹⁾ので省略するが、Fischer 344ラットに定量的に 4×10^4 /ラットの9L細胞を左半球に注入することにより作る。このようにして腫瘍細胞を

移植されたラットは約2週間して体重減少が始まり、次に右片麻痺および涙腺の色素沈着による眼縁の赤変が見られ、約3週間後に脳実質の下方変位による大孔嶺症候状にて死亡する。死亡時腫瘍の重量は平均約280 mgであり、このネズミ系での腫瘍細胞の接種率は100%に近い。

手術手技：腫瘍移植14～18日後、前記の脳腫瘍症状を呈する時期(腫瘍重量は約50～100 mg)に、ペントバルビタールにて麻酔後、小動物用頭部固定器に固定し歯科用ドリルで開頭し、microsurgical techniqueにて腫瘍を全摘出した。腫瘍は移植部を中心に限局して発育しており剝出は容易であった。摘出術はすべて同一術者によって行われた。

手術したラットは次の二つの実験グループに at random に分けた。

グループA：手術後1, 6, 24, 48時間の時点で断頭したが、断頭30分前に各ラットに250 μ C の 3 H-thymidine (3 H-TdR, specific activity 0.36c/ mM, New England Nuclear, Boston, Mass.) を腹腔内に注入した。断頭後脳を取り出し、左右半球を分け、腫瘍摘出創およびその周囲組織を十分に含む左前頭葉と、正常脳組織である右前頭葉を切り出して重量測定し、各組織のDNAを次のSchmidt-Thannhauser 法¹³⁾の変法にて抽出した。各組織をDounce tissue grinder (pestle A) に入れ、4 ml の生理的食塩水と活性剤(NP 40)を加えてhomogenize後、sonicateしてから遠沈(2,000 rpm, 10 min.)した。沈査に10% trichloroacetic acid (TCA) を2 ml 加えて4℃に30分間放置後に遠沈し、この操作をもう1回繰返した。沈査を1 ml のエタノールで2回(室温, 30分)洗い、次いでエタノール：エーテル(90:30)液1 ml を加え30分間加熱(60℃)してから遠心分離した。沈査に1 ml の1 N KOHを加えて加水分解(90℃, 60分)し、遠沈後、沈査に0.1 ml の6 N HCl と0.5 ml の15% TCAを加え4℃に60分間放置した。遠沈後、沈査に15% TCA 2 ml を加えて4℃に10分間放置後遠沈し、沈査に2 ml の15% TCAを加え90℃で45分間加熱してから4℃に30分間放置した。遠沈後、上清にPCS (Phase Combining System, Amersham, Arlington Heights, Ill.) を10 ml 加え、Beckman LS-250 scintillation spectrometer (LSC, Beckman Instruments, Fullerton, Cal.)にて 3 H量を測定した。

グループB：手術後1, 6, 24, 48時間の時点で断頭したが、断頭前にエーテル麻酔下で各ラットの股静脈にPE-50カテーテル(外径0.968 mm, 内径0.58 mm, Clay Adams, Parsippany, N.J.)を挿入しておき、先ず15 μ C の 3 H-TdRをbolusとして与え、1時間後に5 μ C

Table 1 ^3H levels in DNA extracts from both sides of the rat brain

Interval* (hour)	Tumor-removed side Counts ^3H /Gram (Mean $\pm$ S.E.)	Non-tumor side Counts ^3H /Gram (Mean $\pm$ S.E.)	RIRA** (Mean $\pm$ S.E.)
Non-operated group***	11,609.25 $\pm$ 5,928.43	2,679.25 $\pm$ 1,542.62	5.76 $\pm$ 1.97
Operated group			
1	550.00 $\pm$ 68.16	371.00 $\pm$ 97.48	1.72 $\pm$ 0.47
6	434.66 $\pm$ 102.95	339.00 $\pm$ 162.91	1.58 $\pm$ 0.32
24	12,101.33 $\pm$ 11,312.94	1,604.66 $\pm$ 315.19	4.97 $\pm$ 1.00
48	53,260.00 $\pm$ 39,962.67	4,399.75 $\pm$ 313.49	9.59 $\pm$ 2.56

* Time of sacrifice after surgical removal of tumors

** Relative increased radioactivity = $\frac{\text{Counts } ^3\text{H}/\text{Gram on operated side}}{\text{Counts } ^3\text{H}/\text{Gram on non-operated side}}$

*** Tumors removed after sacrificing

の ^{14}C -urea (specific activity 7.9 mc/mM, New England Nuclear, Boston, Mass.) を同様に与え、その5分後に採血して断頭した。断頭後はグループAと同様に左右の前頭葉を切り出し、重量を測定してから次の処理をした。各組織を十分に細切した後に24時間凍結乾燥して ^3H -TdR の分解産物である tritium water (TOH) を完全に除いた。次に0.1 ml の蒸留水を加え乾燥組織に水分が十分にゆきわたってから、NCS tissue solubilizer (Amersham, Arlington Heights, Ill.) 1 ml を加えて組織が完全に溶解するまで60°Cの water bath に入れた。溶解後、12 ml の Permablend (Packard, Downers Grove, Ill.) を加え LSC にて ^3H と ^{14}C の量を測定した。

非手術群：上記A、B群の実験に際して腫瘍摘出術を施行せず、単に ^3H -TdR あるいは ^3H -TdR および ^{14}C -urea を注入したのちそれぞれの方法で処理し ^3H , ^{14}C を測定した。すなわちグループAの非手術群は、 ^3H -TdR を腹腔注入してから30分後に断頭し、腫瘍摘出は脳を取り出してから行い、腫瘍摘出部を含む左前頭葉と正常脳組織である右前頭葉を切り出した。以後の処理は手術群と同じであった。またグループBの非手術群は、股静脈から ^3H -TdR と ^{14}C -urea を与えてから断頭し、腫瘍摘出後に左右前頭葉を切り出し、以後は手術群と同じ処理をした。断頭後の腫瘍摘出は手術的摘出よりもはるかに容易であり、肉眼的にはほぼ完全に近く摘出可能である。

さらにグループAの非手術例にて摘出した腫瘍について重量を測定し、グループAの他の組織と同様にDNAを抽出してLSCで ^3H 量を測定した。この摘出腫瘍の ^3H 量 (count per gram, CPG) とグループAの非手術群における腫瘍摘出側と正常側の前頭葉から求められたCPGを用いて、次の式で残存する腫瘍細胞の重量の算出を試みた。

(腫瘍摘出側の CPG - 正常側の CPG) $\times$ 腫瘍摘出側の重量 $\div$ 摘出腫瘍の CPG

Ⅱ 結 果

Table 1 はグループAのDNA抽出後 ^3H を測定した結果である。腫瘍側の組織は正常側の組織のDNAに比べて ^3H をより多く摂取していることがわかるが、比較の際にLSCのカウント数 (count per material, CPM) を組織重量で割ったCPGを用いるのは動物間でのバラツキが大きいため、同一ラットの左右前頭葉の比であるRIRA (relative increased radioactivity = 腫瘍摘出側の CPG / 正常脳側の CPG) を求めて検討した。その結果は、非手術群のRIRAが5.7であるのに、術後1時間と6時間とはそれぞれ1.7および1.5と低く、これが24時間後になると4.9と非手術群と同程度になり、48時間後では9.5と2倍近くに高くなることがわかった。StudentのT解析によるP値をみると、術後1時間および術後6時間のRIRAが術後48時間のそれに対して有意差を認められた (それぞれ $P < 0.01$, $P < 0.05$) が、非手術群と手術群および上記以外の手術群相互の間に有意差を認めることができなかった。しかるに、術後1時間と術後6時間のRIRAをひとつとして他の値と比較してみると、非手術群、術後24時間および術後48時間に対して明らかな有意差 (それぞれ $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.005$) を認めることができた。

Table 2 はグループBを凍結乾燥処理してから ^3H と ^{14}C の量を測定した結果である。この場合もグループA同様にRIRAを比較検討してみた。 ^3H のRIRAは0.9～1.7の範囲にあり、相互間に有意差は認められなかった。また ^{14}C のRIRAは1.0～1.4の範囲にあり、相互間の有意差はなかった。これらのことから、thymidineの

Table 2 ^3H and ^{14}C activity in lyophilized samples from both sides of the rat brain

Interval (hour)	Tumor-removed side Counts ^3H /Gram (Mean $\pm$ S.E.)	Non-tumor side Counts ^3H /Gram (Mean $\pm$ S.E.)	RIRA* (Mean $\pm$ S.E.)
Non-operated group	2,604.73 $\pm$ 467.54	1,576.43 $\pm$ 342.57	1.74 $\pm$ 0.29
Operated group			
1	1,745.54 $\pm$ 58.69	1,643.92 $\pm$ 197.51	1.09 $\pm$ 0.11
6	2,154.77 $\pm$ 370.47	1,784.13 $\pm$ 231.11	1.20 $\pm$ 0.10
24	1,864.55 $\pm$ 465.46	1,883.72 $\pm$ 321.53	0.97 $\pm$ 0.11
48	2,964.45 $\pm$ 539.60	2,173.10 $\pm$ 629.49	1.46 $\pm$ 0.26
*RIRA = $\frac{\text{Counts } ^3\text{H}/\text{Gram on operated side}}{\text{Counts } ^3\text{H}/\text{Gram on non-operated side}}$			
Interval (hour)	Tumor-removed side Counts ^{14}C /Gram (Mean $\pm$ S.E.)	Non-tumor side Counts ^{14}C /Gram (Mean $\pm$ S.E.)	RIRA** (Mean $\pm$ S.E.)
Non-operated group	595.25 $\pm$ 125.17	501.41 $\pm$ 177.08	1.35 $\pm$ 0.20
Operated group			
1	903.58 $\pm$ 191.34	672.78 $\pm$ 99.47	1.39 $\pm$ 0.34
6	583.33 $\pm$ 149.59	491.97 $\pm$ 116.35	1.14 $\pm$ 0.12
24	918.96 $\pm$ 255.02	902.52 $\pm$ 189.45	1.01 $\pm$ 0.12
48	1,077.76 $\pm$ 495.85	775.34 $\pm$ 412.65	1.41 $\pm$ 0.26
**RIRA = $\frac{\text{Counts } ^{14}\text{C}/\text{Gram on operated side}}{\text{Counts } ^{14}\text{C}/\text{Gram on non-operated side}}$			

Table 3 Calculated weight of residual tumor*

Sample No.	Tumor-removed side		Non-tumor side Counts ^3H /Gram	Tumor		Weight of residual tumor (mg)
	Counts ^3H /Gram	Weight (mg)		Counts ^3H /Gram	Weight (mg)	
1	8,295	109	722	261,811	45	3
2	29,177	241	7,226	239,536	86	22
3	3,951	385	793	116,897	96	10
4	5,014	210	1,976	209,316	16	3

* Calculated from the equation:

$$\frac{\text{Counts } ^3\text{H}/\text{Gram of tumor-removed side} - \text{Counts } ^3\text{H}/\text{Gram of non-tumor side}}{\text{Counts } ^3\text{H}/\text{Gram of tumor}} \times \text{Weight of tumor-removed side}$$

組織濃度は非手術群も手術群も差がないと考えられ、術後48時間まで有意差のある変動はなかったといえる。

^{14}C の場合も、非手術群も手術群も差がないと考えられ、組織の浸透圧 (permeability) は術後48時間まで手術による影響が顕著でないといえる。

Fig. 1 は Table 1 と Table 2 の結果をグラフにしたものである。

Table 3 は非手術群の摘出脳腫瘍、周囲組織および正常脳組織の DNA に取り込まれた ^3H 量から、腫瘍摘出後の周囲脳組織にどれほどの腫瘍細胞が取り残されたか試算したものである。これによると、2例で3 mg、他の

2例で10 mg、22 mg と算出された。

Ⅳ 考 按

脳腫瘍の手術に関しては、特にそれが悪性 glioma の場合には、先ずそれを手術するか否かで始まってどの程度に摘出するかに至るまで人により今だに意見が異なるところである。現在のところ、病歴、神経症状、CT、血管写などで術前に大体の診断はついても組織像を確かめる必要もあり、すでに存在する神経症状や脳圧亢進症状を軽減させる意味からできるだけ摘出することが望ましいと思われる。腫瘍が非優位半球の前頭葉や側頭葉で

Fig. 1 Relative increased radioactivity (RIRA) of DNA extracts and lyophilized samples. The vertically striped column and the hatched column represent the mean RIRA of ^3H and ^{14}C , respectively, in lyophilized samples. The open column represents the mean RIRA of ^3H in DNA extracts. Vertical bars represent standard errors.

あれば腫瘍を含めての lobectomy をも試みられ、稀には肉眼的にほぼ完全摘出に近い場合もある。しかしそのような場合でも、多くは短期間のうちに再発してしまい、不治の転帰をとることはよく経験するところである。

我々はこの研究で、特に術後の1時間から48時間の間に注目して、ラットの脳腫瘍モデルで腫瘍を手術的に全摘出された左側の前頭葉と正常脳組織のみである右側前頭葉を比較することにより、手術によって惹起された残存腫瘍細胞の動態の変化を解析してみたわけである。

DNA 抽出法により ^3H -TdR の DNA への取り込みを左右の脳組織で比較すると、術後1時間と6時間では左右差がほとんどないのに、24時間では腫瘍細胞の残っている左側の DNA 内の ^3H 量が多くなりはじめ、この時点で RIRA が非手術群とほぼ同程度であることから、手術前の状態に復すると考えられる。48時間後に RIRA は

2 倍に達する。すなわち、24時間後から DNA 合成が活発になり残っていた腫瘍細胞が分裂を開始したか、あるいは、実際にこの期間に腫瘍細胞数が倍化したと考えられる。それでは術後24時間まで本当に腫瘍細胞が分裂しなかったのか、あるいは、手術のために惹起された血流障害などで手術部の perfusion が不十分なために ^3H -TdR が残存細胞まで到達しなかったのではないかと、という疑問が生ずる。そのために我々はグループ B の実験を試みたのであるが、左右の脳組織を凍結乾燥して TOH を除去した組織に含まれている ^3H -TdR を測定した結果では、術後1~48時間の間に左右の比の著しい変化が認められなかった。すなわち thymidine に関するかぎり、この全期間を通じて組織濃度にほとんど変化がなく、残存している腫瘍細胞は増殖しているかぎり DNA 合成のために ^3H -TdR を取り込むことができたことを示している。そしてこの間に毛細血管の permeability の変化がなかったことも、 ^{14}C -urea の組織浸透度の左右比が腫瘍側ではやや高いものの、ほぼ一定であるということから明らかである。次に、手術により残存している腫瘍細胞が非常に少なかったために、術後も分裂してはいたが著明な左右差にまで至らなかったのではないかとという疑問も生ずるが、このことは DNA を抽出した非手術群のラットで腫瘍側の ^3H -CPG が正常側よりはるかに高いことから否定される。すなわち、非手術群はラットを断頭してから腫瘍摘出したものであるが、この場合の摘出は手術的摘出に比べると出血ももちろんなく、enucleate されるがごとく容易に en bloc に取り出せるので肉眼的には本当に全摘出していると思われるほどであるが、それでも右側の正常脳組織と比べると 5.7 倍も ^3H -TdR を周囲組織に残存する腫瘍細胞が DNA に取り込んでいる。それと同程度または多めの腫瘍細胞が残存していると考えられる手術群の術後1時間と6時間のラットで、正常側脳実質の ^3H -CPG 量が手術側組織に近い量であったことは、やはり“腫瘍細胞は存在していたが ^3H -TdR を取り込まなかった”すなわち、一時的に増殖を中止したと解釈できる。残存腫瘍量については、非手術群でそれぞれ4匹のラットについて3, 3, 10, 22, mg と概算された。取り残された細胞量の測定は非常に困難であるが、星野ら⁶⁾はこれら手術したラットの延命率から逆算して、約1~2 mg に相当する腫瘍細胞が残存していたと想定している。我々の方法による残存腫瘍細胞の算定は、 ^3H -TdR の perfusion の状態や腫瘍の growth fraction その他の条件が、腫瘍本体とその周囲の脳組織に浸潤している腫瘍細胞群とで同じと仮定しており、正確な値とはいえないが、この程度の腫瘍組織が見

落されて残存していた可能性は否定できない。

以上のような理由からこのラット脳腫瘍モデルでは、手術的に全摘出すると、周囲脳組織に取り残された腫瘍細胞は半日くらいまでは少なくとも増殖を停止するが、24時間以後になると生長を開始し、以後増殖し続けると考えることができる。

しかしながら、この一時的な増殖停止が何故術後1時間から12時間までに BCNU の効果が高まるのか、というその機構の解明にはならない。DNA 合成が停止したために効いたとも考えられるし、あるいは術後生ずる微妙な血流の変化や代謝異常によってひきおこされる hypoxia や pH の変化などが原因であるとも考えられるが、現在のところ不明である。いずれにせよ、BCNU の組織浸透度など薬理解析も含めて、術後半日までは残存腫瘍細胞が BCNU に非常に敏感になる時期があることを示している。そして、もしこのような事実がヒト glioma の治療にもあてはまるとすれば、手術後12時間以内、おそらくは組織診断が確定直後に BCNU を投与することは、同じ量の薬剤でより多くの tumor cell kill を得られるという意味で、悪性腫瘍の治療理念にかなうと思われる。

稿を終えるにあたり、この研究に御協力頂いた Anne Byrd と Shirley Hervatin に感謝いたします。

This work was supported in part by grants CA-13525, CA-19992 from the National Cancer Institute and a gift from the Association for Brain Tumor Research.

文 献

- 1) BARKER, M., HOSHINO, T., GURCAY, O., WILSON, C. B., NIELSEN, S. L., DOWNIE, R. & ELIASON, J.: Development of an animal brain tumor model and its response to therapy with 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res* 33: 976-986, 1973
- 2) CLARKSON, B. D. & FRIED, J.: Changing concepts of treatment in acute leukemia. *Med Clin North Am* 55: 561-600, 1971
- 3) DE VITA, V. T., CANELLOS, G. P., CHABNER, B., SCHEIN, P., HUBBARD, S. P. & YOUNG, R. C.: Advanced diffuse histiocytic lymphoma, a potentially curable disease. *Lancet* 1: 248-250, 1975
- 4) FEWER, D., WILSON, C. B., BOLDREY, E. B., ENOT, K. J. & POWELL, M. R.: The chemotherapy of brain tumors. Clinical experience with carmustine (BCNU) and vincristine. *JAMA* 222: 549-552, 1972
- 5) HOSHINO, T., WILSON, C. B., ROSENBLUM, M. L. & MARKER, M.: Chemotherapeutic implications of growth fraction and cell cycle time in glioblastoma. *J Neurosurg* 43: 127-135, 1975
- 6) 星野孝夫, TEL, E., BARKER, M., ROSENBLUM, M. L. & 野村和弘: 脳腫瘍動物モデルと治療法の考え方. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 16: 201-206, 1976
- 7) HOSHINO, T. & WILSON, C. B.: Kinetic characteristics of cerebral gliomas. *Clin Neurosurg* 25: 326-341, 1978
- 8) HOSHINO, T., NOMURA, K., WILSON, C. B., KNEBEL, K. D. & GRAY, J. W.: The distribution of nuclear DNA from human brain-tumor cells, flow cytometric studies. *J Neurosurg* 49: 13-21, 1978
- 9) KAPLAN, H. S. & ROSENBERG, S. A.: The management of Hodgkin's disease. *Cancer* 36: 796-803, 1975
- 10) KUMAR, A. R. V., RENAUDIN, J., WILSON, C. B., BOLDREY, E. B., ENOT, K. J. & LEVIN, V. A.: Procarbazine hydrochloride in the treatment of brain tumors. Phase 2 study. *J Neurosurg* 40: 365-371, 1974
- 11) LEVIN, V. A.: Pharmacological principles of brain tumor chemotherapy. pp 315-325, In Thompson, R. A. & Green, J. R. (eds): *Advances in Neurology, Volume 15, "Neoplasia in the Central Nervous System"*, Raven Press, New York, 1976
- 12) ROSENBLUM, M. L., REYNOLDS, A. F., SMITH, K. A., RUMACK, B. H. & WALKER, M. D.: Chloroethyl-cyclohexyl-nitrosourea (CCNU) in the treatment of malignant brain tumors. *J Neurosurg* 39: 306-314, 1973
- 13) SCHMIDT, G. & THANNHAUSER, S. J.: A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. *J Biol Chem* 161: 83-89, 1945
- 14) WILSON, C. B., BOLDREY, E. B. & ENOT, K. J.: 1,3-bis (2-chloroethyl) -1- nitrosourea (NSC-409962) in the treatment of brain tumors. *Cancer Chemother Rep [Part 1]* 54: 273-281, 1970