

マウス扁平上皮癌における細胞周期とアポトーシスの関連 — Laser Scanning Cytometer (LSC) を用いて —

笹森 傑

岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任：関山 三郎 教授)

(受付：1999年12月29日)

(受理：2000年1月7日)

Abstract : Apoptosis is different from necrosis of the cell in terms of the morphology of its process. It has been shown that apoptosis is induced by many anticancer drugs. Recently, there are a lot of reports about the relationship between the cell cycle and apoptosis in tumor inhibition, but the relationship between the cell cycle and the morphology alteration of apoptosis *in vivo* have not been demonstrated. This study shows the relationship between the cell cycle and apoptosis of the murine squamous cell carcinoma cells with a Laser Scanning Cytometer (LSC). As a result, There was a significant correlation between the incidence of apoptosis and tumor inhibition by cisplatin in the murine squamous cell carcinoma cells. And the incidence of apoptosis increased in a dose-dependent manner. There was a trend toward higher incidence of the murine squamous cell carcinoma cells in the G2+M, G0+G1 phase in cisplatin administration group than in control group. In each phase of the cell cycle, the sequential change of the Apoptotic Index (AI) was not recognized.

In this study, it was confirmed that apoptosis was induced by cisplatin in the murine squamous cell carcinoma cells. Furthermore, the relationship between the cell cycle regulation mechanism and AI was suggested.

Key words : apoptosis, cisplatin, cell cycle, Laser Scanning Cytometer

緒 言

アポトーシスは、その過程において従来からのネクローシス^{1,2)}とは形態学的に異なる。このアポトーシスは各種抗癌薬により誘導されることが報告され^{3~7)}、核の凝縮、細胞表面微絨毛の消失、アポトーシス小体の出現といった形態学的変化と DNA のヌクレオソーム単位での断片化が特徴的である。また、アポトーシスにおける一連の形態変化のうち、核が凝縮する現

象は、細胞周期におけるG2+M期にみられる現象に類似していることなどから、アポトーシスと細胞周期との間に相関関係があると考えられ、特に遺伝子領域の研究が多数報告されてきた^{8~12)}。アポトーシス細胞の出現と細胞周期との関連は抗癌薬および細胞の種類により違いのあることが判明したが、扁平上皮癌での各細胞周期におけるアポトーシス細胞誘導量の生体内における変化に関する報告は見あたらない。

そこで本研究では、抗癌薬投与後のマウス扁

Relationship between cell cycle and apoptosis of murine squamous cell carcinoma cells by laser scanning cytometer (LSC)

Masaru SASAMORI

(Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University, 1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate. 020-8505 Japan)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020-8505)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 25 : 70-79, 2000

扁平上皮癌細胞における腫瘍抑制効果とアポトーシス細胞の出現率および細胞周期との関連について、スライドガラス上に静置された細胞集団の核 DNA 量の測定とその形態観察を同時に行うことを可能とした Laser Scanning Cytometer (LSC) を用いて検討した。

材料および方法

1. 実験動物

岩手医科大学歯学部口腔外科学第2講座にて兄妹交配により、近交系として維持している WHT/Ht マウス¹³⁾の雌、8~12週齢(体重24~32g)を1群あたり5匹とし、水と固形試料(オリエンタル酵母工業)は自由に摂取させた。

2. 腫瘍

WHT/Ht マウスに自然発生し、胸部皮下に継代移植している扁平上皮癌細胞を使用した。この腫瘍は、Tumorigenic dose rate 50 (TD₅₀)値が14.4と極めて低免疫原性である。

3. 細胞浮遊液の調整

近交系 WHT/Ht マウスに継代移植している腫瘍を無菌的に採取し、滅菌した少量の phosphate buffered saline (以下 PBS) を加え剪刀にて細切し、#150白金 mesh で濾過した。これに PBS を加え細胞を洗浄し、回収した細胞浮遊液を800rpm で3回遠心洗浄し、PBS に再浮遊させて使用した。生細胞数の算定は0.2%トリパンブルー染色で行い、細胞の viability は各ロットとも90%以上であった。浮遊液は、血球計算板上で生細胞数を算定した後 PBS で 1×10^6 個/0.1 ml に調製し、1.0 ml 注射器 (Terumo 社) を用いて、0.1ml をマウス胸部皮下に移植した。

4. 薬剤濃度および投与方法

シスプラチン (CDDP, 日本化薬) は生理食塩水に溶解し、濃度は0.1mg/kg, 1.0mg/kg, 10.0mg/kg, 25.0mg/kgになるように調製した。

シスプラチンは腹腔内投与とし、移植した腫瘍の短径が10.0mmに達した時点から投与を開始した。対照群は生理食塩水10.0mg/kgを投与した。

5. シスプラチンによる腫瘍抑制効果の判定

腫瘍体積の測定は、薬剤投与後1日目、2日目、4日目、6日目に行った。腫瘍体積は腫瘍の長径および短径をノギスにて計測し、(長径) × (短径)² × 0.5の式から求めた。腫瘍抑制効果は inhibition ratio (以下 IR) として、(1 - シスプラチン投与群腫瘍体積 / 対照群の腫瘍体積) × 100の式¹⁴⁾から求めた。また同時に体重の測定を行った。

6. アポトーシス細胞と細胞周期の経日的測定

アポトーシス細胞と細胞周期の経日的変化の測定は、予備実験より腫瘍抑制効果をもっとも著明であった10.0mg/kgを単回投与し、1日目、2日目、4日目、6日目のそれぞれにおいて腫瘍を摘出し検索した。

7. 標本作製

各条件下で摘出した腫瘍は、滅菌した少量の PBS を加え眼科用剪刀にて細切し、これに PBS を加え、800rpm で3回遠心洗浄し、1% paraformaldehyde で固定した後0.2% Triton X100で裸核化し、40 μ m ナイロン mesh で濾過した。回収した細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下した後室温で乾燥し、空気乾燥標本作製した。

8. アポトーシス細胞の検出

アポトーシス細胞の検出は terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay (TUNEL 変法) で行った。空気乾燥標本を PBS で2回洗浄し、ApopTag Direct-Fluorescein in situ Apoptosis Detection Kit (INTERGEN 社) を用いて fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識し、さらに propidium iodide (PI, Sigma 社) 5 μ g, 0.1% RNase (Sigma 社) 加 PBS で15分間室温で染色した。TdT 陽性細胞あるいはアポトーシス小体を認めたものをアポトーシス陽性細胞とした。細胞数1000個 (200 cell × 5 視野) に対するアポトーシス陽性細胞のパーセンテージを Apoptotic Index (以下 AI) として表した。

9. 細胞周期の解析

TdT assay で蛍光染色されたスライドガラ

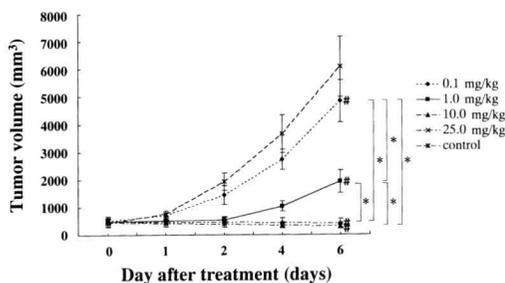


Fig. 1. Inhibition of tumor volume by cisplatin. Squamous cell carcinoma cells were subcutaneously injected into WHT/Ht mice. Cisplatin administration was initiated when the diameter of the inoculated tumor reached 10.0mm. The 0.1, 1.0, 10.0 and 25.0 mg/kg groups showed significant inhibition of tumor volume on the 6th day. Significance was determined by Fisher's PLSD ($p < 0.05$). Bars, SD.
#: significant difference from control ($p < 0.05$)

ス上の観察に適した部分を選択し、LSC (LSC 101, オリパス光学) を用いて5,000~10,000個の細胞の核DNA測定、DNAヒストグラム (Fig. 7~11, C) およびサイトグラム (Fig. 7~11, A, B) を作成した。PI Fluorescence ValueはPI染色された核の総蛍光量によってDNA量を表し、PI Fluorescence PeakはPI染色された核の中での最も強い蛍光量で核の凝縮を表す。また、細胞周期の変化はG0+G1期、S期、G2+M期の測定細胞総数に対するG0+G1期およびG2+M期細胞のパーセンテージで表した。

10. 統計学的検討

統計学的処理はFisher's PLSDで行い、 $p < 0.05$ を有意差とした。

結 果

1. WHT/Ht マウス扁平上皮癌に対するシスプラチンの腫瘍抑制効果

シスプラチン投与後6日目の平均腫瘍体積 (mean \pm SD) は、対照群では $6,070.1 \pm 1,092.4 \text{ mm}^3$ であった。対照群とシスプラチン投与群との比較では、0.1mg/kg投与群、1.0mg/kg投与群、

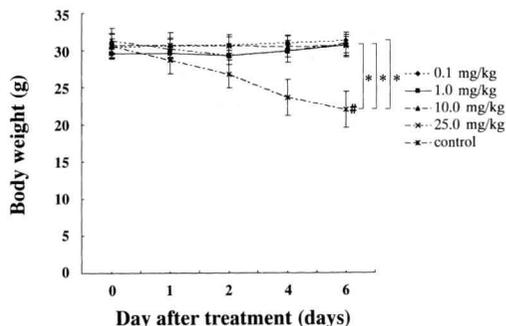


Fig. 2. Body weight of mice treated with cisplatin. The 25.0 mg/kg group showed significant decreases in body weight on the 6th day. Significance was determined by Fisher's PLSD ($p < 0.05$). Bars, SD.
#: significant difference from control ($p < 0.05$)

10.0mg/kg投与群および25.0mg/kgは4日目から腫瘍増殖が有意に抑制されはじめ、6日目にはそれぞれ $4,827.0 \pm 776.4 \text{ mm}^3$ (IR, 20.5%), $1,914.0 \pm 414.0 \text{ mm}^3$ (IR, 68.5%), 414.1 ± 164.3 (IR, 93.2%), 319.8 ± 108.3 (IR, 94.7%)と顕著な抑制効果が認められた (Fig. 1)。

シスプラチン投与後のマウスの体重は、0.1mg/kg投与群、1.0mg/kg投与群、10.0mg/kg投与群では対照群とほぼ同様の变化を示し、有意差は認めなかった。しかし、25.0mg/kg投与群では1日目から体重が有意に減少し、6日目の平均体重は対照群の71.0%であった (Fig. 2)。

2. シスプラチン濃度に対するAI

シスプラチン投与後6日目のAIは、対照群では 0.62 ± 0.16 であり、0.1mg/kg投与群の 1.08 ± 0.15 との間に有意差はみられなかったが、1.0mg/kg投与群では 2.92 ± 0.31 、25.0mg/kg投与群では 2.00 ± 0.51 と有意な増加が認められた。最高は10.0mg/kg投与群での 5.15 ± 1.03 であった (Fig. 3)。これは、当教室の長内¹⁵⁾の報告と同じ結果である。

3. シスプラチン投与後のAIと細胞周期との経日的変化

シスプラチン10.0mg/kg投与後のAIの経日的変化は、対照群は $0.62 \pm 0.16\%$ であり、シスプラチン投与後1日目では 2.90 ± 0.61 、2日目では

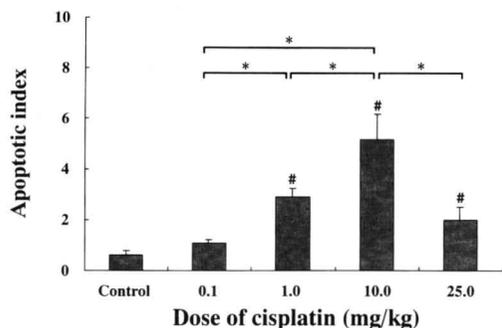


Fig. 3. Relationship between dose of cisplatin and apoptotic index. Tumors treated with each dose of cisplatin were stained with the TdT assay on the 6th day. Apoptotic Index increased dose dependently. Significance was determined by Fisher's PLSD ($*p < 0.05$). Bars, SD. # : significant difference from control ($p < 0.05$)

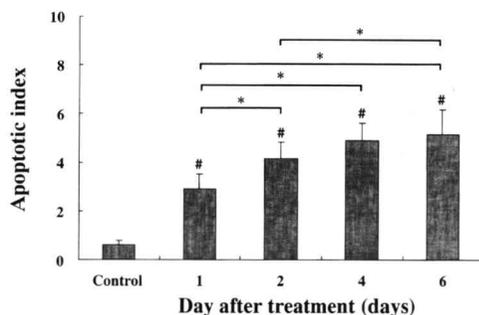


Fig. 4. Relationship between duration of administration and apoptotic index. The tumor was treated with 10.0 mg/kg of cisplatin, and stained with the TdT assay. Apoptotic Index increased time dependently. Significance was determined by Fisher's PLSD ($*p < 0.05$). Bars, SD. # : significant difference from control ($p < 0.05$)

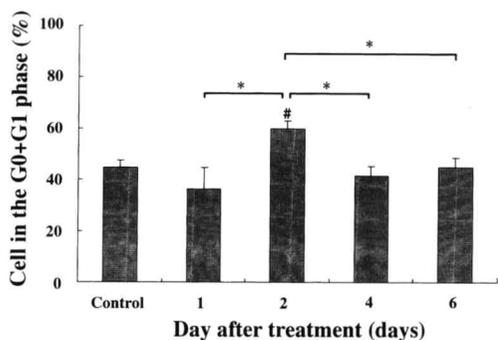


Fig. 5. Relationship between duration of administration and cell in the G2+M phase. The tumor was treated with 10.0 mg/kg of cisplatin, and stained with the TdT assay. Cell in the G0+G1 phase showed significant increases on the 2nd day. Significance was determined by Fisher's PLSD ($*p < 0.05$). Bars, SD. # : significant difference from control ($p < 0.05$)

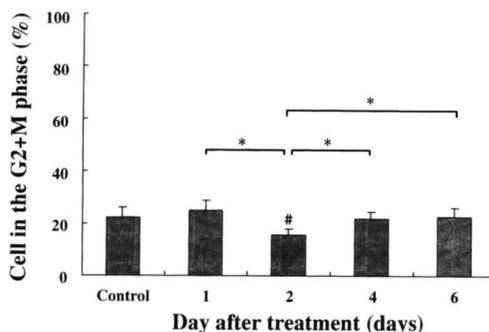


Fig. 6. Relationship between duration of administration and cell in the G2+M phase. The tumor was treated with 10.0 mg/kg of cisplatin, and stained with the TdT assay on the 6th day. Cell in the G2+M phase showed significant decreases on the 2nd day. Significance was determined by Fisher's PLSD ($*p < 0.05$). Bars, SD. # : significant difference from control ($p < 0.05$)

4.18 ± 0.66 と有意な増加が認められ、4日目には4.91 ± 0.70、6日目には5.15 ± 1.03と増加傾向を認めた (Fig. 4)。

細胞周期の経日的変化では、G0+G1期の細胞が対照群と比較し、シスプラチン投与後1日目では全ての細胞に対するG0+G1期の細胞が減少傾向を認めたものの、対照群に対して有意差は認められなかったが、2日目では有意な増

加を認めた (Fig. 5)。

G2+M期の細胞では、G0+G1期とは逆に1日目では全ての細胞に対するG2+M期の細胞が増加傾向を認めたものの、対照群に対して有意差はみられず、2日目では有意な減少が認められた (Fig. 6)。

4. 各細胞周期における AI

対照群では、subG1期にのみアポトーシス細

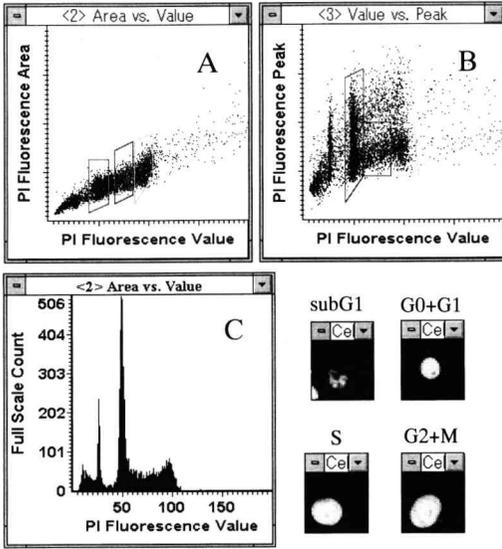


Fig. 7. Histogram, Cyctogram and Cell Features Obtained by LSC. The tumor was injected with 10.0mg/kg of physiological saline, and stained with the TdT assay on 6 th day. Morphological apoptotic cells were observed in subG1 area.

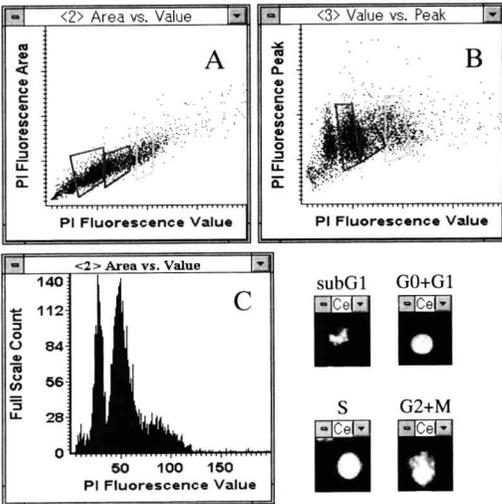


Fig. 9. Histogram, Cyctogram and Cell Features Obtained by LSC. The tumor was treated with 10.0 mg/kg of cisplatin, and stained with the TdT assay on the 2nd day. There was a significant higher incidence of the murine squamous cell carcinoma cells in the G0+G1 phase in cisplatin administration group than in control group. Morphological apoptotic cells were observed in the subG1, S and G2+M area.

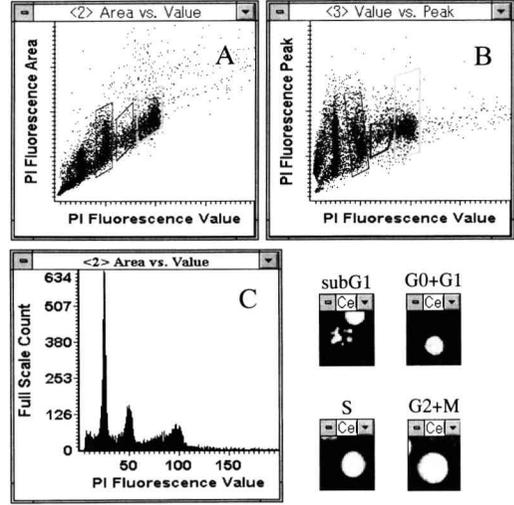


Fig. 8. Histogram, Cyctogram and Cell Features Obtained by LSC. The tumor was treated with 10.0 mg/kg of cisplatin, and stained with the TdT assay on the 1st day. There was a trend toward higher incidence of the murine squamous cell carcinoma cells in the G0+G1 phase in cisplatin administration group than in control group. Morphological apoptotic cells were observed in subG1 area.

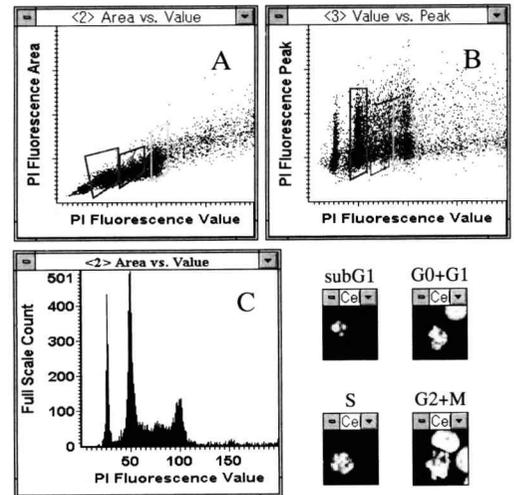


Fig. 10. Histogram, Cyctogram and Cell Features Obtained by LSC. The tumor was treated with 10.0 mg/kg of cisplatin, and stained with the TdT assay on the 4th day. Morphological apoptotic cells were observed in each phase of the cell cycle.

Table 1. Relation between duration of administration and AI of the cell cycle

Day	AI in each phase of cell cycle (mean±SD)			
	SubG1 phase	G0+G1 phase	S phase	G2+M phase
cont.	0.62±0.16	0	0	0
1	2.90±0.61#	0	0	0
2	3.00±0.35#	0	0	1.17±0.56#
4	2.96±0.18#	0.53±0.25#	0.28±0.15#	1.16±0.42#
6	3.24±0.84#	0.54±0.05#	0.27±0.08#	1.10±0.16#

The statistical significance was determined by Fisher's PLSD (**p*<0.05)

: significant difference from control (*p*<0.05)

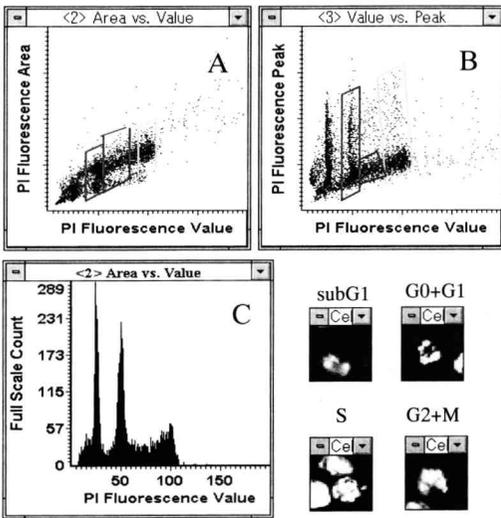


Fig. 11. Histogram, Cytogram and Cell Features Obtained by LSC. The tumor was treated with 10.0 mg/kg of cisplatin, and stained with the TdT assay on the 6th day. Morphological apoptotic cells were observed in each phase of the cell cycle.

胞が認められた (Fig. 7)。シスプラチン10.0 mg/kg投与後1日目ではG2+M期に細胞集積を認め、アポトーシス細胞はsubG1期のみ認められた (Fig. 8)。2日目ではG0+G1期への細胞集積を認め、アポトーシス細胞はsubG1期およびG2+M期に認められた (Fig. 9)。4日目、6日目では、ともにDNAヒストグラムは対照群に近づき、各細胞周期にアポトーシス細胞を認めた (Fig. 10, 11)。

シスプラチン投与後の各細胞周期において、アポトーシス細胞が出現した後は経目的に

AIの有意な増加は認められなかった (Table 1)。

考 察

現在、悪性腫瘍に対する化学療法は放射線療法、手術療法とともに臨床で広く用いられており、いくつかの腫瘍においては劇的な効果を示すものもある。口腔領域の扁平上皮癌は抗癌薬に対する反応性が比較的良好であることから、化学療法が行われることが多い。近年、この化学療法における細胞死誘導にはネクローシスとアポトーシスの2つの様式があることが示された。癌治療において最も重要なことは、できるだけ多くの癌細胞に死を誘導することであり、細胞死の様式はさほど重要ではない。しかし、一般にアポトーシス誘導に必要な抗癌薬濃度はネクローシス誘導に比べて低いと考えられ、本研究においても、高濃度のシスプラチン投与によりアポトーシス細胞の出現率が低下し、逆にネクローシス細胞の増加を認めた。このことから、アポトーシス誘導の研究が副作用の少ない、より効果的な化学療法を開発する上で重要であると思われる。

アポトーシスは、1972年 Kerr ら¹⁶⁾により、ネクローシスとは異なるもう一つの細胞死の形態として報告された。アポトーシスは核内のクロマチンの網状構造がなくなり、凝縮する。クロマチンは核膜周辺に半月状に凝縮することが多く、やがて凝縮した核は断片化し、それを細胞膜が包み込むようにして細胞自体が断片化し、アポトーシス小体 (apoptotic body) が形成さ

れた後、マクロファージなどの食細胞や隣接する細胞に貪食される。そのためアポトーシスではネクローシスと異なり炎症反応はみられないとされている。

アポトーシス細胞の検出法には、DNA のヌクレオソーム単位での断片化をアガロースゲル電気泳動により検出する生化学的検出法、光学顕微鏡および電子顕微鏡による形態学的検出法、flow cytometry (FCM) を用いた解析などがある。

今回使用した Laser Scanning Cytometer (LSC) は、1991年に Kamentsky ら¹⁷⁾によって開発された。この装置はこれまで個々の細胞および細胞集団測定に用いられてきた FCM および image cytometry (ICM) の長所を合わせもった機器である。これまで大量の細胞を迅速に測定するには FCM を、顕微鏡下の細胞の解析には ICM を用いてきた。しかしながら、FCM では、細胞周期に対応した細胞の形態を観察する目的にはソーティング (細胞分取) を行う必要があり、これは技術的に困難であり、膨大な時間を必要とするという欠点があった。一方、ICM は複雑な計算処理や多量の記憶容量を要するために、研究者の要求に十分に対応できなかった。しかし、最近のコンピューター技術の発展により、研究者の要求に十分対応する装置として、LSC が開発された。LSC の原理は、蛍光染色されたスライドガラス上の細胞をレーザー走査し、得られた蛍光から、蛍光標識した物質の成分量、大きさを測定し、同時にスライドガラス上の座標位置を記憶する。そのため、形態確認したい測定データを指定すると、その細胞の形態が顕微鏡下に、またはモニター上で観察することができる。あるいはその逆で、細胞像から測定データを呼び出すことも可能である。これにより測定データと形態観察の照合ができ、各細胞周期におけるアポトーシス細胞の観察が可能となった。

アポトーシス陽性細胞の検出において、LSC を用いて細胞を測定する際、一回の測定細胞数を 200 に設定して行ったが、測定単位を一画面

としているため、設定値を越えることもあった。

TdT assay¹⁸⁾ は、TdT を用いて DNA の 3'-OH 末端に FITC 標識 dUTP を付加し、蛍光顕微鏡でアポトーシス細胞を検出する方法として、非常に有用である。しかし、ネクローシスでも不均一な DNA 鎖の切断が生じること¹⁹⁾ や、核の濃縮がみられること^{20, 21)} がある。本研究においても、TdT assay にて DNA strand break 陽性細胞が 46.23% であるにも関わらず形態学的にアポトーシスを示す細胞は極めて僅かであった。これは、DNA strand break がアポトーシスでみられる double strand break ではなくネクローシスによる single strand break が多発しているのではないかと推察された。従って、本研究では形態学的なアポトーシスをアポトーシス陽性細胞の第一の判断基準とし、TdT assay を補助的なものとした。

シスプラチン^{22, 23)} の細胞障害作用は DNA のグアニン塩基への結合による DNA 合成の特異的阻害によって引き起こされるとされており、細胞周期上シスプラチンは、G2+M 期での細胞回転をブロックするという報告がある^{24~26)}。また、これまでもシスプラチンによりアポトーシスが誘導されたとの報告がいくつかある^{27~31)}。しかし、口腔癌においてシスプラチンがどのように細胞周期に影響を与え、殺細胞効果を発現するかについての詳細な研究は少なく、これを明らかにすることはシスプラチンの細胞障害機序を知るうえで非常に重要である。本研究では、シスプラチン投与後 1 日目で G2+M 期に細胞集積を認め、2 日目では G0+G1 期に細胞集積を認めた。

一方、細胞周期調節機構はいくつかのチェックポイントが存在していると考えられている。このチェックポイントの概念は、1989 年に Hartwell と Weinert によって提示された³²⁾。これは、細胞周期を進行させるために細胞に備わっている監視機構である³³⁾。この機構は細胞が正常な細胞周期進行を妨げられた際、速やかにそれを検知し、特定の位置で細胞周期を停止

させる。このチェックポイントは現在までに4つの存在が確かめられている。①DNA障害チェックポイント、②DNA複製チェックポイント、③形態チェックポイント、④紡錘体形成チェックポイントである。シスプラチンはこれらのうちDNA障害チェックポイントに影響すると考えられ、その際p53タンパク質が関与するという報告がある^{34,35)}。チェックポイントで細胞周期を停止させた後、DNA障害を受けた細胞は修復されるか、あるいは修復が不可能な場合は細胞をアポトーシスに陥らせることにより、異常なDNAを複製させないといわれている³⁶⁻³⁸⁾。本研究でも、アポトーシス細胞は対照群ではsubG1期にのみしか認められないが、シスプラチン投与群では、先ずG2+M期に、次いでG0+G1期に細胞集積を認めた後、同細胞周期にアポトーシス細胞の出現がみられ、細胞周期調節機構とアポトーシスとの関連が示された。

本研究では、シスプラチン1.0mg/kg, 10.0mg/kg, 25.0mg/kgの各投与群において腫瘍増殖の抑制とAIの増加を認めた。これは、アポトーシス誘導が10mg/kgまでは濃度依存性であることを示していた。また、シスプラチン10.0mg/kg投与群において1日目、2日目、4日目、6日目ではAIの増加を認めた。これを各細胞周期別のAIと比較すると、経日的なAIの増加は各細胞周期ごとにAIが増加するのではなく、アポトーシス細胞の認められなかった細胞周期へのアポトーシス細胞の出現によるものと考えられた。

本研究の結果は、各細胞周期におけるシスプラチンの影響と形態学的なアポトーシス細胞の出現との関連性を示した。現在、アポトーシスと細胞周期との関連性は遺伝子レベルで研究が進んでいる。従って、今後は各細胞周期における発癌遺伝子や癌抑制遺伝子との関連についてのさらなる検討を行い、シスプラチン等の各種抗癌薬の作用機序を明らかにしていくことで、癌化学療法における抗癌薬の選択や併用療法の指標になることが期待される。

結 論

シスプラチン投与後のWHT/Htマウスの扁平上皮癌細胞におけるアポトーシス細胞出現率と細胞周期との関連性について検討したところ、以下の結論を得た。

1. シスプラチン投与により誘導されたAIは経日のおよび濃度依存的に増加した。
2. 腫瘍増殖の抑制とそれに伴うAIの増加は、アポトーシスによる腫瘍抑制効果によるものとみなされた。
3. 細胞周期ではG2+M期、G0+G1期の順に細胞集積を認め、アポトーシス細胞もG2+M期、G0+G1期の順に出現した。
4. 各細胞周期において、AIの経日的な増加は認められなかった。
5. 細胞周期調節機構とAIとの関連性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤な指導と校閲を賜りました恩師関山三郎教授に深甚なる謝意を捧げます。また、貴重な器材の使用をご快諾頂きご懇切な助言を賜りました本学産婦人科学講座利部輝雄教授に衷心より謝意を捧げます。さらに本研究の遂行に際しご親切な指導と鞭撻を頂きました当講座杉山芳樹助教授に深く感謝するとともに口腔外科学第二講座医局員各位に心より謝意を表します。また、懇切な実験手技の指導を下された本学産婦人科学講座八角昌子氏に感謝を表します。

本論文の要旨は、1999年10月7日、第44回日本口腔外科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Farber, J. L., Kyle, M. E., and Coleman, J. B.: Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.* 62: 670-679, 1990.
- 2) Farber, J. L.: The role of calcium ions in toxic cell injury. *Environ. Health Pers.* 84: 107-111, 1990.

- 3) Gunji, H., Kharbanda, S., and Kufe, D. : Induction of internucleosomal DNA fragmentation in human myeloid leukemia cells by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.* 51 : 741-743, 1991.
- 4) Evans, D. L., and Dive, C. : Effects of cisplatin on the induction of apoptosis in proliferating hepatoma cells and nonproliferating immature thymocytes. *Cancer Res.* 53 : 2133-2139, 1993.
- 5) Ormerod, M. G., O'Neill, C. F., Robertson, D., and Harrap, K. R. : Cisplatin induces apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without concomitant internucleosomal degradation of DNA. *Exp. Cell Res.* 211 : 231-237, 1994.
- 6) Borner, M. M., Myers, C. E., Sartor, O., Sei, Y., Toko, T., Trepel, J. B., and Schneider, E. : Drug-induced apoptosis is not necessarily dependent on macromolecular synthesis or proliferation in the p53-negative human prostate cancer cell line PC-3. *Cancer Res.* 55 : 2122-2128, 1995.
- 7) Desjardins L.M., and MacManus J.P. : An adherent cell model to study different stages of apoptosis. *Exp. Cell Res.* 216 : 380-387, 1995.
- 8) Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M. : Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352 : 345-347, 1991.
- 9) Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace, A. J. Jr. : A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71 : 587-597, 1992.
- 10) Lowe, S. W., Ruley, H. E., Jacks, T., and Housman, D. E. : p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74 : 957-967, 1993.
- 11) Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillof, C., Liebermann, D. A., O'Connor, P. M., and Fornace, A. J. Jr. : Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 9 : 3743-3751, 1994.
- 12) de Stanchina, E., McCurrach, M. E., Zindy, F., Shieh, S. Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A. V., Prives, C., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Lowe, S. W. : E1A signaling to p53 involves the p19 (ARF) tumor suppressor. *Genes & Dev.* 12 : 2434-2442, 1998.
- 13) Hewitt, H. B., and Sakamoto, K. : The comparative survival of clonogenic cells of a murine epithelioma after irradiation in mice breathing air, oxygen and carbon dioxide, or hyperbaric oxygen. *British Journal of Radiology* 44 : 457-463, 1971.
- 14) Povlsen, C. O., and Jacobsen, G. K. : Chemotherapy of a human malignant melanoma transplanted in the nude mouse. *Cancer Res.* 35 : 2790-2796, 1975.
- 15) 長内宏夫 : マウス扁平上皮癌におけるシスプラチン誘導性アポトーシスの基礎的研究, 岩医大歯誌, 23 : 27-37, 1998.
- 16) Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. : Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Brit. J. Cancer* 26 : 239-257, 1972.
- 17) Kamentsky, L. A., and Kamentsky, L. D. : Microscope-based multiparameter laser scanning cytometer yielding data comparable to flow cytometry data. *Cytometry* 12 : 381-387, 1991.
- 18) Murakami, T., Li, X., Gong, J., Bhatia, U., Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z. : Induction of apoptosis by 5-azacytidine: drug concentration-dependent differences in cell cycle specificity. *Cancer Res.* 55 : 3093-3098, 1995.
- 19) Schwartzman, R. A., and Cidlowski, J. A. : Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.* 14 : 133-151, 1993.
- 20) Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. : Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68 : 251-306, 1980.
- 21) MucGee, J. O'D., and Isaacson, P. G. : Oxford textbook of pathology vol 1 principles of pathology. Oxford university press., Oxford, pp147-148 1992.
- 22) Rosenberg, B., VanCamp, L., and Krigas, T. : Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205 : 698-699, 1965.
- 23) Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J. E., and Mansour, V. H. : Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 222 : 385-386, 1969.
- 24) Sorenson, C. M., and Eastman, A. : Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum (II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 48 : 4484-4488, 1988.
- 25) Shinomiya, N., Tsuru, S., Katsura, Y., Sekiguchi, I., Suzuki, M., and Nomoto, K. : Increased mitochondrial uptake of rhodamine 123 by CDDP treatment. *Experimental Cell Research* 198 : 159-163, 1992.
- 26) Sherman, S. E., Gibson, D., Wang, A. H., and Lippard, S. J. : X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: cis-[Pt (NH3)2 {d(pGpG)}]. *Science* 230 : 412-417, 1985.
- 27) Sorenson, C. M., Barry, M. A., and Eastman, A. : Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by Cisplatin. *J. Natl. Cancer Inst.* 82 : 749-755, 1990.

- 28) Ormerod, M. G., Orr, R. M., and Peacock, J. H. : The role of apoptosis in cell killing by Cisplatin: a flow cytometric study. *Br. J. Cancer* 69 : 93-100, 1994.
- 29) Fan, S., el-Deiry, W. S., Baek, I., Freeman, J., Jondle, D., Bhatia, K., Fornace, A. J. Jr., Magrath, I., Kohn, K. W., and O'Connor, P. M. : p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. *Cancer Res.* 54 : 5824-5830, 1994.
- 30) Dixit, M., Yang, J. L., Poirier, M. C., Price, J. O., Andrews, P. A., and Arteaga, C. L. : Abrogation of Cisplatin-induced programmed cell death in human breast cancer cells by epidermal growth factor antisense RNA. *J. Natl. Cancer Inst.* 89 : 365-373, 1997.
- 31) Gallagher, W. M., Cairney, M., Schott, B., Roninson, I. B., and Brown, R. : Identification of p53 genetic suppressor elements which confer resistance to cisplatin. *Oncogene* 14 : 185-193, 1997.
- 32) Hartwell, L. H., and Weinert, T. A. : Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246 : 629-634, 1989.
- 33) 野島 博 : 細胞周期のチェックポイント制御, 実験医学, 16 : 1154-1188, 1998.
- 34) Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Craig, R. W. : Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51 : 6304-6311, 1991.
- 35) Murray, A., and Hunt, T. : The cell cycle an introduction. Oxford university press. Oxford, pp135-152, 1993.
- 36) Devita, Jr. V. T., and Hellman, S. : Important advances in oncology 1995. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, pp33-42. 1995.
- 37) Schulte-Hermann, R., Bursch, W., and Grasl-Kraupp, B. : Bedeutung der Apoptose für die Tumorentstehung. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 78 : 15-21, 1994.
- 38) Potapova, O., Haghighi, A., Bost, F., Liu, C., Birrer, M. J., Gjerset, R., and Mercola, D. : The Jun kinase/stress-activated protein kinase pathway functions to regulate DNA repair and inhibition of the pathway sensitizes tumor cells to cisplatin. *J. Biol. Chem.* 272 : 14041-14044, 1997.