

諸種制癌剤の腹水肝癌 AH 130 の各種細胞内分画の 核酸代謝におよぼす影響について

栗 原 稔

千葉大学医学部生化学教室

(昭和 39 年 11 月 27 日受付)

ま え が き

制癌剤といわれるものには主として癌細胞の核酸代謝を阻害するものが多い。著者は、佐藤ら¹⁻³⁾が EHRlich 腹水癌や Sarcoma 180 に制癌効果を報告した七員環化合物が、癌細胞の核酸代謝に何らかの影響をおよぼすのではないかと考えて、後に述べるような実験を行なった。

七員環化合物として制癌作用が最初に研究されたのは Cholicine である。Cholicine は、その強力な細胞分裂の阻止作用のために癌細胞の分裂阻止作用を期待され、その制癌効果を認めた報告もある⁴⁾。しかし癌細胞に対する親和性が少いので制癌剤としては用いられなくなつたが、その化学構造にある七員環と制癌作用の関係は注目されていた。東北大の野副教授が合成に成功した七員環化合物のうち、Azulenoide 系化合物については、三浦らが核酸代謝^{5,6)}やエネルギー産生系⁷⁾への影響を検討している。それによると肝細胞の RNA 代謝を促進するもの (6-Amino-1,3-diazazulene および 2-Amino-1-azazulene) と阻害するもの (1-Thia-3-azazulene-2-one, 2-Mercapto-1,3-diazazulene および Cholicine) に分けられるという。

著者は三共株式会社高峰研究所の合成になる七員環化合物のうち、制癌効果の著しい 2-Isonicotinoyl hydrazino-5-nitrosotropolone-N-oxide (INH-NT-NO) をはじめ Tropolone 誘導体 7 種について、AH 130 腹水肝癌細胞を用い、¹⁴C-オロット酸が細胞核の DNA と RNA、細胞質のリボソーム RNA、S-RNA などにとりこまれるのが如何に変化するかをみた。

なお制癌剤の種類により核酸代謝の阻害形式は異なるので、その差を見出して多剤併用療法の理論的基礎を樹立したいと考えて、アルキル化剤として Nitromin 及び Thio-TEPA の 2 種、抗生物質として Mitomycin C, Carzinophilin 及び Methyl-chromomycin A₃ の 3 種についても同じ実験をこころみた。

実験材料及び方法

1. 実験材料

呑竜系ダイコクネズミの腹腔中に佐々木研究所保存の腹水肝癌 AH 130 株を接種、5~7 日目に腹水とともに

肝癌細胞を採取した。

2. 実験方法

1) *In vitro* での反応条件

10~15 頭から腹水とともに採取した腹水肝癌細胞は、1,000×g 5 分間遠心沈殿を行ない腹水を分離した。この腹水は、37°C で数分加温後析出するフィブリンを γ 過して除去した後反応液に加えた。肝癌細胞は 0.25 M ショ糖液で 1 度洗った後、次の反応液をふくむ三角フラスコ 4~6 個に等量ずつ (通常 8~11 ml) 分注した。

反応液は、1 容器あたり 6-¹⁴C-オロット酸 40 μ moles (2 μ C), リボース-5-リン酸 40 μ moles, グルコース 40 μ moles, chick embryo extract EE 100 (Difco 社製, 1 びんを 2 ml の水に溶かしたもの) 0.1 ml, ROBINSON 液⁸⁾ 4 ml および上記の γ 過した腹水 2 ml からなる。なお一部の実験には、さらに ¹⁴C-AICA (4-¹⁴C-Aminomidazol carboxamide) 40 μ moles (2 μ C) および Leucovorin 8 μ moles を加えたが、特にことわらない限りこれらを欠いている。

制癌剤は、それぞれの溶解液を用いてつくつた溶液を反応液の 1/10 量加えると最終濃度が実験成績に示す濃度になるようにした。対照には同量の蒸留水を加えた。容器毎に pH を 7.4 に調整した後、O₂ 気流下で 37°C, 3 時間保温した。反応後は再び 1,000×g 5 分間の遠心沈殿で癌細胞を集め、¹³C-オロット酸 10 mg/dl をふくむ冷 0.25 M ショ糖液で洗い、未反応の ¹⁴C-オロット酸を可及的にのぞいた。

2) 細胞内器官の分画法

ラベルした肝癌細胞は、冷 0.25 M ショ糖液を加えてテフロン樹脂製ホモジナイザーで 2 分間ずつ 2 回ホモジナイズして 30% ホモジネートを作製した。この均一液を 5,000×g 10 分間の遠心沈殿を行ない、核とミトコンドリアを沈殿させ、ミクロゾームをふくむ上清液を分離した。

細胞核とミトコンドリアは、0.25 M ショ糖液 (0.0018 M CaCl₂ をふくむ) 中でよく均一化した後、0.35 M ショ糖液 (0.0018 M CaCl₂ をふくむ) 上に重畳し、600×g 10 分間遠心沈殿してミトコンドリアをのぞく。細胞核は、0.25 M ショ糖液 (0.0018 M CaCl₂ をふくむ) に

再懸濁しナイロン布で濾過した後、再び上記の遠心沈殿をくり返し精製した。この沈渣には赤血球を混じることがあるので、過量の冷水を加えて攪拌、溶血を起させ直ちに遠心沈殿して上清の溶血液を捨て、この沈渣を細胞核分画とした。

上清液は、 $78,000 \times g$ 120 分間の遠心沈殿でミクロゾーム分画と上清分画にわけた。ミクロゾーム分画は、0.7% デオキシコール酸で処理して膜系を除いた後、高浪⁹⁾にしたがつてリボゾームを調整した。上清分画は、pH メーターを用いて酢酸を加えながらその pH を 5.2 にあわせ、生じてくる沈殿を $600 \times g$ 5 分間の遠心沈殿で集め、pH を 7.4 に上げて溶かし S-RNA 分画とした。

3) 核酸の抽出

i) RNA の抽出

細胞核分画、リボゾーム分画、S-RNA 分画は、それぞれ終濃度 0.05% の Duponol, 0.04% のペントナイトを加え、等量の 90% フェノール液と混じて 65°C に熱し 3 分間よく振つた¹⁰⁾後、 $1,000 \times g$ 30 分間遠心沈殿して水層、中間層、フェノール層にわけた。このうち水層を等量のエーテルと 3 回振つてフェノールを除去してから、2 容のエタノールと 1 容のアセトン、終濃度の 1% の酢酸ソーダを加えて -20°C に冷却して RNA を沈殿させた。この RNA をエタノールで 1 回洗浄した後 4 ml の水に再び溶解して 10^{-3} M $MgCl_2$ 液に対して 3 時間透析した。この透析内液について 260 m μ の吸光度と放射能の測定を行ない比放射能を計算した。放射能の測定は、ガスフローカウンター (日本無線株式会社, DC-3 CR 659 型) を用い、infinite thinness として計算した。なお RNA は、日立分光光度計 (EPU-2 A 型) を用いて 220~300 m μ を測定した結果、260 m μ に吸収の極大が、230 m μ 又は 235 m μ に吸収の極小があること及び orcinol 反応陽性、diphenylamine 反応陰性であることを確めた。

ii) DNA の抽出

細胞核分画のフェノール層および中間層に 1 M NaCl を等量加えて 100°C 30 分間の抽出を 2 回行ない、水層について等量のエーテルで 2 回振つてフェノールを除去した後、2 容のエタノール、1 容のアセトン、終濃度 1% になるように酢酸ソーダを加えて -20°C に冷却する。沈殿してくる核酸をさらに 1 N NaOH 中に 37°C で 18 時間おき、流水中で 3 時間透析した後、過クロール酸を終濃度 4% になるように加えて生ずる沈殿をエタノールで 1 回洗つて DNA 標品とした。この沈殿を稀アルカリ液に溶解して RNA と同様に比放射能を求めた。DNA は、吸収極大が 260 m μ に、極小が 230 m μ 又は

235 m μ にあり、diphenylamine 反応陽性、orcinol 反応陰性であつた。

4) *In vivo* での反応条件

腹水肝癌 AH 130 株接種後 6 日目の呑竜系ダイコクネズミ 2 頭 (体重 290 g および 260 g) の腹腔内に、生理的食塩水に INT-NT-NO を 1 mg/ml に懸濁したものを体重あたり 15 mg/kg の割合に注射した。同時にコントロールとして他の 2 頭 (体重 290 g および 250 g) に相当する量の生理的食塩水を注射した。1 時間後 6-¹⁴C-オロット酸 3.3 μ moles (10 μ C……1 ml の蒸留水に溶解したもの) を各頭に腹腔内投与し、さらに 2 時間後 (制癌剤投与後 3 時間目) に動物を犠牲に供して腹水を採取した。採取した腹水は、制癌剤投与群、対照群別に混合した後、肝癌細胞を分離し、¹²C-オロット酸 10 mg/dl をふくむ冷 0.25 M ショ糖液で洗つて以下 *in vitro* のときと同様に処理した。

5) 癌細胞の呼吸測定

三浦ら¹¹⁾にならつて、癌細胞をグルコース 4 mg をふくむ Krebs-Ringer 液 3 ml に 30~35% の濃度になるように浮遊させて、WARBURG の呼吸装置中で 37°C 5 分間温度平衡を保たせた後、20 分間振とう (気相は空気)、この間の O₂ 消費量を測定した。

実験成績

1. 制癌剤の癌細胞の呼吸に対する影響

予備実験として行なつた制癌剤の O₂ 消費量に対する影響を第 1 表に示した。この表では制癌剤を加えないで同時に行なつたときの O₂ 消費量を 100% としてあらわした。この実験は ¹⁴C-オロット酸が核酸の中に入りこむためにはエネルギーを要するから、エネルギー生産酵素系がおかされていないことを確めるために行なつた。

この成績からみると、七員環化合物は 10^{-5} ~ 10^{-6} M で O₂ 消費量が 90% 前後を示した。これは同じ七員環化合物の Azulenoide 誘導体が AH 130 の酸素消費量を低下させない濃度 (10^{-6} ~ 10^{-7} M) よりやや薄く、Nitro-min, Thio-TEPA 等のアルキル化剤のそれ (10^{-5} M) よりやや薄い濃度のものである。Chromomycin A₃ およびその methyl 誘導体は 10^{-3} M ですら O₂ 消費量を低下させない。このようにして各種制癌剤について O₂ 消費量がほぼ 90% 以下にはならない濃度をみつけて以下の本実験を行なつた。

2. 癌細胞の各種細胞内分画の核酸への ¹⁴C-オロット酸のとり込みに対する制癌剤の影響

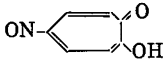
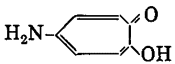
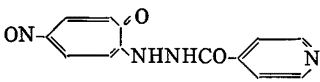
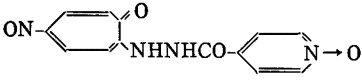
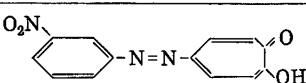
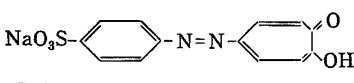
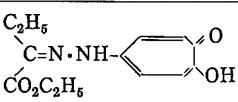
この成績が第 2 表に示してある。この表では、制癌剤を加えないでそのつと同時に行なつた対照の比放射能に対する阻害度 (%) をあらわした。

1) 七員環化合物

2-Isonicotinoyl hydrazino-5-nitrosotropolone (INH-NT) 及び INH-NT-NO が、リボゾーム RNA を特異

的に阻害する。しかし本実験法では、リボゾーム RNA には放射能のとり込みが少いことが多く、はつきりした

第1表 制癌剤の酸素消費量におよぼす影響

制 癌 剤	濃 度	酸素消費量 (%)
 5-Nitrosotropolone	10^{-5} M 10^{-4} M	94 91
 5-Aminotropolone	10^{-8} M 10^{-7} M	94 96
 2-Isonicotinoyl hydrazino-5-nitrosotropolone	1.5×10^{-6} M 10^{-5} M	92 85
 2-Isonicotinoyl hydrazino-5-nitrosotropolone N-oxide	10^{-6} M 10^{-5} M	102 82
 5-(3-Nitrophenylazo)-tropolone	10^{-6} M 10^{-5} M	92 89
 Sodium 4-(5'-troponylazo)-benzene sulfonate	10^{-5} M 10^{-4} M	96 93
 Ethyl propionyl formate-5-tropolonyl hydrazone	10^{-5} M	95
Nitromin*	10^{-5} M 10^{-3} M	95 85
Thio-TEPA*	10^{-5} M 10^{-3} M	93 53
Mitomycin C*	5 μ g/ml 10 μ g/ml 100 μ g/ml	103 82 79
Carzinophilin*	50 u/ml 500 u/ml	97 61
Methyl-chromomycin A ₃	2×10^{-8} M	99
Chromomycin A ₃	10^{-8} M	93

* 生化学 31(4): 323, 1959. より引用。

ことがいえないとも考えられるので、INH-NT-NO について *in vivo* の実験を試みた。この結果は第3表に示すようにリボゾーム RNA 代謝の阻害が特異的である。この実験法でも *in vitro* にくらべて ^{14}C -オロト酸のリボゾーム RNA へのとり込みがさほど多くはなかつたが、INH-NT-NO の作用点が、リボゾーム RNA 代謝阻害に関係あることを強く示唆する。

5-Nitrosotropolone (NT) は、 10^{-4} M で核 RNA, S-RNA 代謝を軽度、DNA 代謝もごく軽度に阻害している。 10^{-5} M ではリボゾーム RNA 代謝の阻害が一番強い。

他の Tropolone 誘導体には、阻害効果が認められない。

2) アルキル化剤

Nitromin は、 10^{-3} M で DNA 代謝を強く、核 RNA, S-RNA 代謝を中等度に阻害した。 10^{-4} M では、核 RNA 代謝を強く阻害したが、DNA へは ^{14}C -オロト酸のとり込みが低く効果は不明である。

Thio-TEPA は、 10^{-5} M で RNA 代謝を軽度に阻害するが、DNA 代謝は促進する結果となった。

3) 抗生物質

Mitomycin C は、DNA 代謝を 7.5 $\mu\text{g/ml}$ で促進するが 100 $\mu\text{g/ml}$ では著明に阻害する。尚 100 $\mu\text{g/ml}$ で核 RNA とリボゾーム RNA 代謝もかなり強く阻害する。25 $\mu\text{g/ml}$ では、核 RNA と S-RNA 代謝は 100 $\mu\text{g/ml}$ と同程度に阻害するが、DNA には、やはり放射能のとり込みが少かつたため阻害の有無をはつきりいえない。

Carzinophilin は、呼吸を阻害しない濃度 (50 u/ml) で核酸代謝を軽度に阻害するが、特にどの分画を特異的に阻害するとはいえないようである。

Methyl-chromomycin A₃ は、 10^{-4} M で核 RNA と S-RNA 代謝を強く阻害した。DNA には放射能のとり込

みが少かつたので、阻害効果は不明である。

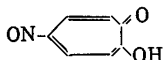
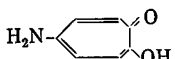
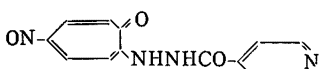
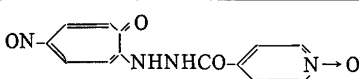
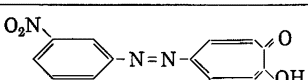
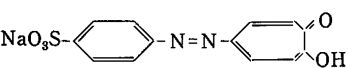
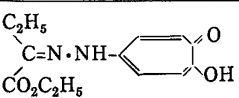
考 察

1. 制癌剤の作用点について

1) 七員環化合物

佐藤らの EHRlich 腹水癌を用いて七員環化合物をスクリーニング・テストした成績²⁾によると、1. INH-NT

第2表 制癌剤の細胞内分画の核酸代謝におよぼす影響(阻害%)

制 癌 剤	濃 度	RNA 代 謝			DNA 代謝
		核 RNA	S-RNA	リボソーム RNA	
 5-Nitrosotropolone	10 ⁻⁵ M*	21	22	29	19
	10 ⁻⁴ M*	30	38	—	19
 5-Aminotropolone	10 ⁻⁸ M	10	-14	—	0
 2-Isonicotinoyl hydrazino-5-nitrosotropolone	5 × 10 ⁻⁶ M*	-9	17	66	12
 2-Isonicotinoyl hydrazino-5-nitrosotropolone N-oxide	5 × 10 ⁻⁶ M { (1)* (2)	11 16	29 -11	67 —	-12 5
 5-(3-Nitrophenylazo)-tropolone	10 ⁻⁶ M	-4	10	-5	—
 Sodium 4-(5'-troponylazo)-benzene sulfonate	10 ⁻⁴ M	6	-15	—	-12
 Ethyl propionyl formate-5-troponyl hydrazone	10 ⁻⁶ M	0	-8	-3	-27
Nitromin	10 ⁻⁴ M	31	-9	2	—
	10 ⁻³ M	38	43	20	92
Thio-TEPA	10 ⁻⁵ M	18	12	13	-46
Mitomycin C	7.5 μg/ml	—	20	-22	-62
	25 μg/ml	62	32	—	—
	100 μg/ml	54	29	62	93
Carzinophilin	50 u/ml	—	25	20	28
		18	15	34	—
Methyl-chromomycin A ₃	10 ⁻⁴ M	49	44	—	—

* 反応液に ¹⁴C-AICA 及び Leucovorin も加えた。

-NO, 2. INH-NT, 3. NT の3種に延命効果があり、その効果はこの順であるという。今日の実験でもこの3種のみに呼吸阻害のない濃度で1次的にリボソーム RNA 代謝阻害が認められ、その程度は前2者に強く、NT に弱いことは制癌効果との関連を強く示唆する。ただNTは、

他の RNA 代謝、DNA 代謝も若干阻害するので前2者と作用点が、全く同一ではないかも知れない。最近 PRAAG ら^{12,19)}は、大腸菌を用いて Morphine に似た合成鎮痛剤 Levorphanol が m-RNA や S-RNA の合成を阻害せずに全 RNA としては 80% 以上合成阻害が起るのは、リボソーム RNA が特異的に阻害されるためだとしている。Tropolone 誘導体のリボソーム RNA 代謝阻害は、さらに角度をかえての検討が必要だが、作用機作の解明には、リボソーム RNA の合成系が明確になることが期待される。

2) アルキル化剤

三浦ら^{14,16)}は、Nitrogen Mustard が感受性株 AH 130 の RNA 代謝、蛋白質合成系を軽度、DNA 代謝を強く阻害することを認めている。Nitromin を用いた本実験の結果も DNA 代謝阻害が強い。同時に核 RNA 代謝の阻害も強いのは、後述の Mitomycin C に似ているが、DNA 代謝阻害との関係はなお研究を要する。

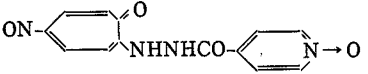
Thio-TEPA は、DNA 代謝を促進したが、Nitrogen Mustard も低濃度では DNA 合成を促進することが知られている^{14,15)}。

3) 抗生物質

三浦らは、Mitomycin C が 10 $\mu\text{g/ml}$ と 100 $\mu\text{g/ml}$ でエネルギー生産系におよぼす影響は差が小さいことをみている¹¹⁾(第1表)。したがって今回の成績から Mitomycin C の DNA 代謝阻害が特異的といえると思う。Mitomycin C が DNA の生合成を選択的に阻害することはよく知られており^{16,17)}、またすでにでき上っている DNA を崩壊し低分子化することも認められている¹⁸⁻²⁰⁾。その際 Mitomycin C が DNase を賦活するのではないかという報告もある^{19,20)}。さらに Mitomycin C は、その化学構造からみると ethyleneimine を有する1種のアルキル化剤であり、また DNA と covalent linkage を生ずるといふ報告もある²¹⁾。これらは、2次的に核 RNA が強く阻害されることを示唆し、組織化学的にも Mitomycin C が、DNA だけでなく RNA の構成に変化を起し細胞の機能を乱し崩壊に導くことが観察されている²²⁾。

Carzinophilin は、癌細胞の解糖作用を特異的に抑

第3表 *In vivo* における 2-Isonicotinoyl hydrazino 5-nitrosotropolone-N-oxide の細胞内分画の核酸代謝におよぼす影響 (阻害 %)

制 癌 剤	濃 度	RNA 代 謝		
		核 RNA	S-RNA	リボソーム RNA
	15 mg/kg	20	-11	55

制することが知られている²³⁻²⁵⁾。SCHMIDT²³⁾は、この抑制作用が Nicotinamide の添加で回復することを示して、Nicotinamide からつくられる NAD の低下が解糖作用の抑制をきたすのではないかと考えている。本実験に用いた 50 $\mu\text{g/ml}$ では、 O_2 消費量の低下は認められないが、核酸代謝全般にわたって軽度の阻害を示すのは、特異的な解糖作用の阻害によるものかも知れない。

Chromomycin A_3 は、RNA に対する選択的阻害作用が知られている^{26,27)}が、三浦ら²⁸⁾は、本実験法とほぼ同じ方法を用いて核 RNA と S-RNA の代謝を阻害することを発表している。今回試みたその methyl 誘導体も同様な阻害形式を示すと考えられる。

2. 作用点よりみた併用療法

実験に供した制癌剤は、大別して主として DNA 代謝と核 RNA 代謝を阻害すると考えられる Nitromin と Mitomycin C、1次的に核 RNA と S-RNA を阻害する Methyl-chromomycin A_3 、特異的にリボソーム RNA 代謝を阻害する INH-NT-NO、INH-NT (NT)、解糖系の阻害が核酸代謝に対する影響よりも強いと考えられる Carzinophilin とわけることができる。

癌細胞は、何らかの原因で遺伝子の制御機構が乱され無制限の増殖をしていると考えられる。したがって細胞の増殖機構を制御して細胞分裂をできるだけ抑制する DNA 代謝阻害剤が期待されることとなり、Nitromin と Mitomycin C は臨床的にも有効でその代表的なものであるが、一般に DNA 代謝阻害剤は、その阻害効果が強いほど骨髓細胞などに対する障害も甚しい。

これに反して S-RNA 代謝阻害を介して蛋白質合成阻害をする Chromomycin A_3 は、癌細胞では S-RNA の活性が強いので、比較的によく効くと考えられ、造血障害も少ない。

したがって Nitromin と Chromomycin A_3 の併用が考えられるが、実際に徳山²⁹⁾は、Nitromin 耐性吉田肉腫や AH 127 を用いて、両者の混合投与が相乗効果をもたらすといっている。同じ論拠で Cytosan C と Chromomycin A_3 の併用が考えられ、小山³⁰⁾らは臨床的にもその有効なことを論じている。

INH-NT-NO は、DNA 代謝阻害剤や Chromomycin

A₃と作用点異なる故、将来は併用療法の1剤となりうるかも知れない。

総 括

ダイコクネズミの腹水肝癌 AH 130 細胞を用いて、制癌剤がどの細胞内分画の核酸代謝に影響を与えるかをためてみて次のような結果をえた。

1) 2-Isonicotinoyl hydrazino-5-nitrosotropolone 及び同 N-oxide は、リボゾーム RNA 代謝を特異的に阻害した。5-Nitrosotropolone は、リボゾーム RNA 代謝の他に、核 RNA、S-RNA、DNA も軽く阻害した。

2) Nitromin と Mitomycin C は、DNA と核 RNA 代謝を強く阻害した。

3) Thio-TEPA は、 10^{-6} M で DNA 代謝を促進した。

4) Methyl-chromomycin A₃ は、核 RNA と S-RNA の代謝を強く阻害した。

終りに臨んで本研究に終始御指導を賜った三浦義彰教授に心から感謝の意を表します。また研究の機会を与えて下さった本学内科 三輪清三教授および直接実験に協力された大学院 榎本勝之医学士にも深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) ARAKAWA, M., SATO, Y.: Gann 51 suppl: 48, 1960.
- 2) 荒川順生, 佐藤裕信: 第 21 回日本癌学会総会記事: 23, 1962.
- 3) 荒川順生, 杉谷幸男, 稲津佳彦, 佐藤裕信: 第 22 回日本癌学会総会記事: 52, 1963.
- 4) LETTRÉ, H.: Ztschr. f. Physiol. Chem. 268: 59, 1941.
- 5) MIURA, Y., NOGUCHI, T., NOZOE, T.: Bull. Soc. Chimie. Biol. 38: 1441, 1956.
- 6) 塚越 茂: 生化学 31(4): 327, 1959.
- 7) 三浦義彰, 岡本直子, 島宗昭夫: 生化学 32(10): 744, 1961.
- 8) ROBINSON, J. R.: Biochem. J. 45(1): 68, 1949.
- 9) TAKANAMI, M.: Symp. Soc. Cellular Chemistry 11: 129, 1961.
- 10) SCHERRER, K., DARNELL, J. E.: Biochem. Biophys. Research Commun. 7(6): 486, 1962.
- 11) 塚越 茂, 前谷一雄, 岡本直子, 三浦義彰: 生化学 31(4): 323, 1959.
- 12) SIMON, E. J., PRAAG, D. V.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 51(6): 1151, 1964.
- 13) SIMON, E. J., PRAAG, D. V.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 51(5): 877, 1964.
- 14) MIURA, Y., MOMOSE, K., MORIYAMA, A.: J. Biochem. 49(6): 514, 1961.
- 15) MIURA, Y., MORIYAMA, A.: J. Biochem. 50(4): 362, 1961.
- 16) SHIBA, S., TERAWAKI, A., TAGUCHI, T., KAWAMATA, J.: Nature 183: 1056, 1959.
- 17) SEKIGUCHI, M., TAKAGI, Y.: Biochim. Biophys. Acta 41: 434, 1960.
- 18) REICH, E., SHATKIN, A. J., TATUM, L.: Biochim. Biophys. Acta 53: 132, 1961.
- 19) KERNSTEIN, H.: Ztschr. f. Physiol. Chemie. 329: 31, 1962.
- 20) KERNSTEIN, H., RAUEN, H. M.: Nature 190: 1195, 1961.
- 21) IYER, V. N., SZYBALSKI, W.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 50(2): 355, 1963.
- 22) KOBAYASHI, J.: Cytologia 25(2): 280, 1960.
- 23) SCHMIDT, C. G.: Oncologia 13: 426, 1960.
- 24) TAGUCHI, T., SHIBA, S., ITO, I., HORINO, K., AKAGI, A.: Gann 48: 420, 1957.
- 25) EBINE, T., OKAMURA, N., SATOW, K.: Gann 49 suppl: 39, 1958.
- 26) YANO, M., KUSAKARI, T., MIURA, Y.: Biochem. J. 53(6): 461, 1963.
- 27) WAKISAKA, G., UCHINO, H., NAKAMURA, T., SOTOBAYASHI, H., ADACHI, A., SAKURAI, A.: Nature 198: 385, 1963.
- 28) 三浦義彰, 守山洋一, 福井紀子: 第 22 回日本癌学会総会記事 157, 1963.
- 29) 徳山英太郎: トヨマイシン シンポジウム III: 105, 1964.
- 30) 小山善之: 内科 13(6): 1077, 1964.