Osaka University Knowledge Archive

Title	大腸菌C株に対する放射線と抗癌剤の作用についての遺伝学的研究
Author(s)	西木, 雅裕
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1972, 32(9), p. 744-759
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/18156
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

大腸菌C株に対する放射線と抗癌剤の作用についての遺伝学的研究

岩手医科大学医学部放射線医学講座（主任：足沢三之介教授）
西　木　雅　裕

（昭和47年7月3日受付）

Genetic Studies on the Actions of Radiation and Anti-cancer Drugs on *E. coli* Strain C

by

Tsunehiro Nishiki
Department of Radiology, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka, Japan
(Director: Prof. Dr. Sannosuke Tarusawa)

Research Code No.: *406*
Key Words: *Anti-cnncer drug, Escherichia coli strain C, Mutation, Ultraviolet light irradiation, Yellow color formation*

To compare the effects of radiation with that of anti-cancer drugs on bacterial cells, experiments have been carried out, mainly with *E. coli* strain C-436, especially on the lethal effect of radiation and anti-cancer drugs, isolation of mutants, and their genetic analysis.

The effects of ultraviolet light, X-rays, and anti-cancer drugs were compared on their lethal effects and induction of mutation. *E. coli* strain C-436 was as resistant against ultraviolet light and X-rays as *E. coli* strain K-12. Mitomycin-C revealed a marked lethal effect, whereas the effect of cyclophosphamide was found to be weak. Ultraviolet light and mitomycin-C acted as powerful mutagenic agents, whereas mutagenic effect of cyclophosphamide was weak. Larger number of arginine prototrophic mutants were obtained than histidine prototrophic mutants, and tryptophane prototrophic mutant could not be obtained. Further, the comparative investigation was done on the yellow color forming ability and the alteration of genetic characters derived from *E. coli* strain C-436 after ultraviolet light irradiation or the anti-cancer drug treatment. The results indicated that the arginine prototrophic mutants with yellow color forming ability amounted to 98.8% (97.6–100%), and the histidine prototrophic mutants with the same ability remained at 14.7% (0–33.3%).

With regard to the relation between the arginine requirement and the yellow color formation of *E. coli* strain C, the progeny analysis of their recombinants derived from the conjugation experiment between strain C-167 (Hfr-7) and strain C-9 suggested that the determinant of color formation is related genetically to the arginine locus rather than the tryptophane locus. That is, the alteration from Arg^- to Arg^+ is accompanied with the yellow colony. The yellow color determinant of *E. coli* strain C, therefore, was revealed to be linked to the arginine locus.

I. 緒　言

放射線診断や放射線療法に際してしばしば問題となる放射線障害には遺伝的障害，放射線宿酔等があり，それらのしくみや予防に対する研究はこれまで数多く報告されている．

足沢[30]をはじめ，我が教室[9)10)16)]では高等動物における放射線障害について，自家抗体による免疫反応の面から研究してきた．また足沢[29]は単細胞系生物である酵母について紫外線の障害を形態学的に研究している．

また，近年，放射線障害の分子レベルでの研究が進展した結果，放射線の作用は主としてＤＮＡにはたらき[28]，その他蛋白質や多糖類にも影響をおよぼすことが知られている[17]．すなわち，Ｘ線の障害はＤＮＡの主鎖切断であり[24]，紫外線の場合はＤＮＡにおけるチミンダイマーの形成であり[25]，しかもその障害は可視光線によつて回復する[18]．さらに，抗癌剤もＤＮＡに作用すると報告されている[2)14)27)]．このように，放射線や抗癌剤のＤＮＡに対する作用機序には違いはあるが，ＤＮＡの変化が細胞の致死や突然変異の原因となることにそれらの共通点がある．

その他，放射線や抗癌剤に関する研究は数多くあるが，それらの作用に関して微生物における知見を臨床上の放射線障害や抗癌剤の作用に結びつけるには，あまりにもかけはなれているのが現状である．それらを結びつけるために微生物について得られた分子生物学的知見と人体細胞についての知見等[7]とを比較検討することが必要であり，さらにそれらの作用を質的，量的に表現し，高等生物に利用しうる研究の系を見出すことがさし当つて必要となる．

しかして，放射線や抗癌剤の致死や突然変異誘発の作用機序を研究するための新しい実験系として大腸菌Ｃ株を選び，致死効果，突然変異の誘導について実験し，その変異株をアルギニン要求性と色素産生の面から比較検討した．また，大腸菌Ｃ株のアルギニン合成能と黄色色素産生能との関連性が示唆[23]されているが，以下に述べる遺伝的組換えや突然変異様の分離によりその事が確認されたので報告する．

II. 実験材料

1）細菌

Table 1に示すように大腸菌Ｃ株 C-9 ($F^-Try^-Arg^-Sm^dW$)[1], C-132($Hfr\text{-}7Ura^-Y$)[22], C-167($Hfr\text{-}7Ura^-Sm^rY$)[22], C-436($F^-Try^-His^-Arg^-Sm^rW$)[22]，さらに，C-132 と C-436 を接合させ，組換えられた黄色色素産生能のある変異株EA-37 ($Ura^+Try^+His^-Arg^-Sm^rY$)，その他，大腸菌Ｂ株，B/r 株，K-12 株（以上三株とも阪大放射線基礎医学教室

Table 1 List of Bacterial Strains Used

Strain	Genetic Structure	Origin
E. coli strain C-9	F^- Try^- Arg^- Sm^d W	Bertani ane Sex derivated fromC-3
C-132	Hfr-7 Ura^- Y	Sasaki and Bertani
C-167	Hfr-7 Ura^- Sm^r Y	Sasaki and Bertani
C-436	F^- Try^- His^- Arg^- Sm^r W	Sasaki and Bertani derivated from C-3
E. coli EA-37	Ura^+ Try^+ His^- Arg^- Sm^r Y	recombinant from the cross between C-132 and C-436
E. coli strain B		obtained from Dr. Kondo, S. and Dr. Kada, T.
B/r		obtained from Dr. Koneo, S. and Dr. Kada, T.
K-12		obtained from Dr. Kondo, S. and Dr. Kada, T.

Explanation of Symbols

F^-, Hfr: fertility types. Try^-: requiring tryptophan for growth. His^-: requiring histidine for growth. Arg^-: requiring arginine for growth. Ura^-: requiring uracil for growth. Sm^r: resistant to streptomycin. Sm^d: dependent to streptomycin W: white colony. Y: yellow colony.

近藤教授，遺伝研の賀田博士よりそれぞれ分与を受けた）等を用いた．

2）培地

ＰＹＢは蒸留水1000ml 中にポリペプトン（武田）10ｇ，酵母エキス (Difco) 10ｇ，食塩５ｇを含み，pHを 7.2に修正したものである．

ＰＹＡはＰＹＢ1000ml 中に粉末寒天 (Difco) 12ｇを含んでいる．

ＴＢは蒸留水1000ml中にBacto-tryptone(Difco) 10ｇ，食塩５ｇを含み，pHを 7.0～ 7.2に修正したものである．

ＴＡはＴＢ1000ml 中に粉末寒天 (Difco) 10ｇを含んでいる．

最小栄養培地として使用した Davis 培地は蒸留水1000ml 中に K_2HPO_4（関東化学）７ｇ，KH_2PO_4（関東化学）２ｇ，$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$（関東化学）0.5ｇ，$(NH_4)_2SO_4$（和光純薬）１ｇ，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$（小島化学）0.1ｇ，Bactoagar (Difco) 14ｇ，アスパラギン (Difco) １ｇ，ブドウ糖（関東化学）５ｇを含む．さらに Davis 培地には必要に応じて Davis agar 1000ml に対して DL-トリプトファン0.04ｇ，L-アルギニン0.02ｇ，L-ヒスチジン0.02ｇ，streptomycin 0.02ｇ，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.028ｇを加えた．

選択培地としては，選択するもの以外のアミノ酸を加えた．すなわち，アルギニン非要求性変異株の選択培地としては，Davis 培地に DL-トリプトファン，L-ヒスチジンを加えた．ヒスチジン非要求性変異株の選択培地としては，Davis 培地に DL-トリプトファン，L-アルギニンを加えた．トリプトファン非要求性変異株の選択培地としては，Davis 培地に L-アルギニン，L-ヒスチジンを加えた．また色素検定用培地としては Davis 培地に DL-トリプトファン，L-ヒスチジン，L-アルギニン，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ を加えた．

色素産生に対する培地の影響をみる実験で使用した培地は Davis 培地＋DL-トリプトファン（40 μg/ml）＋L-ヒスチジン（20μg/ml）を基礎培地として，A培地では L-アルギニン（20μg/ml），B培地ではL-アルギニン（20μg/ml）と$FeSO_4 \cdot 7H_2O$（７μg/ml），C培地では L-アルギニン（20μg/ml）と $FeSO_4 \cdot 7H_2O$（28μg/ml），D培地ではL-アルギニン（20μg/ml）と $FeSO_4 \cdot 7H_2O$（70μg/ml）を加え，E培地では加えず（基礎培地），F培地では L-アルギニン（５μg/ml），G培地では L-アルギニン（40μg/ml）を加えた．

懸濁液，稀釈液として用いた緩衝液は蒸留水1000ml 中に Na_2HPO_4 ７ｇ，KH_2PO_4 ３ｇ，食塩４ｇを含んでいる．

3）抗癌剤

使用した抗癌剤はMitomycin-C（２mg/Vial, 以下MMCと略記），Cyclophosphamide(100mg/Vial, 以下ＣＰＡと略記），Sarkomycin（１g/Vial），8-Azaguanine（35mg/Ampule）等である．なお，ＣＰＡを活性化する[34]ためにＣＰＡ100mgを５ml の生食水に溶解し，シャーレに入れて，管電圧 180 kVp, 管電流20mA, 濾過板 Cu 0.7mm＋Al 0.5mm, 照射距離16cm，線量率 475R/min. の条件でＸ線照射した．

4）装置

Ｘ線発生装置としては東芝製ＫＸＣ・８型，紫外線発生装置としては東芝殺菌ランプ GL-15，15 w（2537Å）を用いた．

III. 実験方法

1）細菌の集落計算

細菌数の算出は，それぞれのサンプルを適当に稀釈し，その 0.1ml をＴＡにまき，それをガラス棒で拡げ，少時間乾燥した後，37℃で一夜培養した後，出現した集落を数え，サンプルを１ml 当りの濃度に換算して細菌数を求めた[31]．

2）細菌の洗滌

ＰＹＢまたはＴＢで一夜培養した菌液，あるいは抗癌剤を作用させた菌液を遠心（3000rpm, 20 min.）し，上澄をすて，沈渣を再び緩衝液に懸濁した．これを２回繰返した．

3）突然変異株の選択

①　栄養非要求性株の選択

大腸菌 C-436株の菌液を洗滌後，各々の選択培地にまき（菌数約10^9個/ml），37℃で２日間培養し，発育してきた集落を取り，再び同じ組成の培

地に白金耳で線状に接種し，37℃で2日間純粋培養して，栄養非要求性株を分離した．

② 黄色色素産生株の選択

大腸菌 C-436株の菌液を洗滌後，色素検定用培地にまき（菌数約10^8個/ml），37℃で2日間培養し，生じた集落中から肉眼で黄色集落を選び出し，それを同じ組成の培地に白金耳で線状に接種し，37℃で2日間純粋培養して黄色色素産生株を分離した．

③ 突然変異株の遺伝的性状の検索

分離された変異株を各々1ml のＰＹＢに接種し，37℃で一夜培養し，それを緩衝液で 100倍に稀釈して，栄養の要求性に関してはそれぞれのアミノ酸を別々の組合せで入れた最小栄養培地に一滴ずつ滴下し，一方，集落の色調に関しては色素検定用培地に一滴ずつ滴下し，37℃で2日間培養して，栄養の要求性と集落の色調とを調べた．

4） 接合実験

遺伝形質の移行は Hfr 菌から F^- 菌へと行なわれるので，対数増殖期の一定数の Hfr 菌と過剰の F^- 菌とを液体培地[22]で混合し，接合を行なわしめた．組換えの頻度は供与菌 100個当りの組換え体の数で示し，それを組換えの頻度とした．

また，Hfr 菌の標識のF^-菌への移行の時間を調べるための接合の中断は，接合中の液体培地から種々の時間にサンプルを取り出し，高速ミキサーで5秒間かきまわして接合を中止せしめ[22]，適当に稀釈して選択培地にまき，37℃で2日間培養して，組換え体を調べた．

5） 抗癌剤処理

① 致死効果の比較検討

抗癌剤の致死効果を調べるために，大腸菌 C-436株に抗癌剤を作用させる場合，ＰＹＰ培養液（菌数約 10^8個/ml）にＭＭＣを 1.1×10^{-4}M, Sarkomycin を 1.3×10^{-1}M, CPA を 6.7×10^{-3}M, 8-Azaguanine を 4.6×10^{-3}Mとなるように加え，緩衝液中（菌数約10^8個/ml）で作用させる際にはＭＭＣを 1.1×10^{-4}M, 1.1×10^{-5}M, 1.1×10^{-6}M, CPA を 6.7×10^{-3}M, 6.7×10^{-4}M 6.5×10^{-5}M, Sarkomycin を 1.3×10^{-1}Mとなるように加えて，それぞれ37℃で作用させ，所定の時間毎にサンプルを取り出し，適当に稀釈してＴＡにまき，37℃で一夜培養して集落形成菌数を調べて抗癌剤の致死効果を比較検討した．

② 抗癌剤処理後の突然変異株の選択

抗癌剤の変異誘導性を調べるために，大腸菌 C-436株の菌液（緩衝液に菌を約10^8個/ml の割合で懸濁） 100ml を，ＭＭＣは 1.1×10^{-4}M で15分間，1.1×10^{-5}M で30分間，1.1×10^{-6}M で30分間，120分間，1.1×10^{-7}M で30分間，ＣＰＡに関しては，無処理のＣＰＡ，Ｘ線 10000Ｒを照射したＣＰＡ，20000Ｒを照射したＣＰＡそれぞれ 6.7×10^{-4}M で4時間，それぞれ37℃で処理し，2回洗滌し，100倍に濃縮し，0.1ml ずつ各選択培地にまき，変異株を分離し，変異誘導性を調べた．

6） Ｘ線照射

大腸菌 C-436株，K-12株のそれぞれの菌液（緩衝液に菌を約10^8個/ml の割合で懸濁）10ml をそれぞれ別々のシャーレに入れて室温でＸ線照射した．そのシャーレの中から所定の線量毎にサンプルを取り出し，冷暗所に2時間静置し，その後適当に稀釈してＴＡにまき，37℃で一夜培養し，集落形成菌数を調べて，Ｘ線の C-436 株，K-12 株に対する致死効果を観察した．

Ｘ線照射の条件は，管電圧 180kVp，管電流20 mA，濾過板Cu 0.7㎜＋Al 0.5㎜，照射距離16㎝，線量率 475R/min. である．線量は3000Ｒ，6000Ｒ，9000Ｒ，12000Ｒ，15000Ｒ，20000Ｒ，30000Ｒ，40000Ｒおよび 50000Ｒとした．

7） 紫外線照射

大腸菌 C-436 株，C-132 株，Ｂ株，B/r 株，K-12株のそれぞれの菌液（緩衝液に菌を約10^8個/ml の割合で懸濁）10mlをそれぞれ別々のシャーレに入れて，室温で，手でシャーレを振盪しつつ紫外線照射を行なつた（照射距離50㎝）．所定の時間毎にサンプルを取り出し，それらを2時間冷暗所に静置し，その後適当に稀釈してＴＡにまき，37℃で一夜培養し，集落形成菌数を調べて，紫外線のそれぞれの菌株に対する致死効果を観察した．

また，大腸菌C-436株の菌液（緩衝液に菌を約10^8個/ml の割合で懸濁した）をシャーレに10mlずつ入れて，60秒間，120秒間および240秒間それぞれ別々に紫外線照射し，各々を2時間冷暗所に静置し，その後，10倍に濃縮して0.1mlずつ各選択培地にまき，37℃で2日間培養し，さらに2日間室温に静置し，栄養非要求性変異株を分離した．

8）自然突然変異

大腸菌C-436株の菌液（緩衝液に菌を約10^8個/ml の割合で懸濁した）100mlを100倍に濃縮し，0.1mlずつ各選択培地にまき，37℃で2日間培養し，さらに2日間室温に静置し，栄養非要求性変異株を分離した．

IV. 実験ならびに成績

1）黄色色素産生におよぼす培地の影響

①　目的および方法

大腸菌C株の色素形成はしばしば培地上で不鮮明になることが観察されたので，色素産生菌と非産生菌とを培地上で容易に識別できる培地の条件を求めるための実験をした．

使用した菌株は大腸菌C-436株から分離されたアルギニン非要求性変異株で，色素産生に関して安定な8株（M_1～M_8），培地の影響を受ける不安定な8株（N_1～N_8），対照としてC-436株，EA-37株を用いた．

各々PYBで一夜培養した後，洗滌して緩衝液に再懸濁し，それを一滴ずつ各培地（A～G）に滴下し，37℃で2日間培養し，さらに2日間室内に静置して各集落の色調を判定した．

②　成績

Table 2は黄色色素産生状況が分離株により，安定なものと不安定なものがあること，そして色素産生の識別に対して培地の組成，特に鉄とアルギニンの含有量が重要であることを示している．

A培地ではM_1～M_8株の全部が黄色，N_1～N_8株のうち6株が帯黄色，他の2株が黄色，EA-37株は黄色，C-436株は白色の集落を形成した．

B培地ではM_1～M_8株の全部が黄色，N_1～N_8株のうち5株が帯黄色，他の3株が黄色，EA-37株とC-436株は白色の集落を形成した．

C培地ではM_1～M_8株の全部が黄色，N_1～N_8株のうち4株が帯黄色，他の4株が黄色，EA-37株とC-436株は白色の集落を形成した．

D培地ではM_1～M_8株の全部が黄色，N_1～N_8株のうち5株が帯黄色，他の3株が黄色，EA-37株とC-436株は白色の集落を形成した．なお，この培地上では全体にサビ色がかつていた．

Table 2　Relationship Between Yellow Color Formation of E. Coli Strain C and the Composition of Media
Fundamental Media: Davis agar media supplemented with try (40μg/ml) and his(20μg/ml)

Media	addition of arg and $FeSO_4$	color formation of colony			
		M_1-M_8	EA-37	N_1-N_8	C-436
A	arg (20μg/ml)	Y(8)	Y(1)	Y′(6), Y(2)	W(1)
B	arg (20μg/ml) $FeSO_4$ (7μg/ml)	Y(8)	W(1)	Y′(5), Y(3)	W(1)
C	arg (20μg/ml) $FeSO_4$ (28μg/ml)	Y(8)	W(1)	Y′(4), Y(4)	W(1)
D	arg (20μg/ml) $FeSO_4$ (70μg/ml)	Y(8)	W(1)	Y′(5), Y(3)	W(1)
E	none	Y(8)	did not grow	Y(8)	did not grow
F	arg (5μg/ml)	Y(7),mY(1)	mY(1)	Y(7),mY(1)	mY(1)
G	arg (40μg/ml)	Y(8)	Y(1)	Y(8)	Y(1)

mY: markedly yellow colony　Y: yellow colony　Y′: yellowish colony
W: white colony　( ): No. of clones tested

The buffer suspension of E. coli strain C (M_1-M_8: eight isolates stably forming yellow colonies, N_1-N_8: eight isolates unstably forming yellow colonies, EA-37 and C-436) were spotted on the fundamental media supplemented with arginine and $FeSO_4$ at 37°C for 2 days, and at a room temperature for 2 days. Color formation of colonies was checked.

E培地では M_1～M_8 株の全体が黄色，N_1～N_8 株も全部黄色の集落を形成した．EA-37株と C-436株は培地にアルギニンが含まれていないので発育しなかつた．

F培地では M_1～M_8株のうち7株が黄色，他の1株が著明な黄色，N_1～N_8 株のうち7株が黄色で，他の1株が著明な黄色，EA-37 株と C-436 株は共に著明な黄色の集落を形成した．

G培地では M_1～M_8 株の全部，N_1～N_8 株の全部，EA-37 株と C-436 株はそれぞれ黄色の集落を形成した．

③　小括

i）培地にアルギニンの含有量が少ないか，あるいは多すぎると白色，黄色の区別がつかない．

ii）EA-37 株は鉄の存在する培地では白色の集落をつくり，鉄のない培地では黄色の集落を形成した．

iii）以上のことから，この一連の実験では，Davis 培地＋トリプトファン（40μg/ml）＋ヒスチジン（20μg/ml）＋アルギニン（20μg/ml）＋ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$（28μg/ml）の培地が集落の色調の識別に適していることがわかつた．

2）紫外線，X線，抗癌剤の大腸菌に対する致死効果

①　目的および方法

紫外線，X線および抗癌剤の大腸菌 C-436株に対する作用を比較する目的でそれぞれの処理による生残率を求めた．

また，一般に良く知られている菌についても同じ実験を行ない，それぞれの処理による大腸菌 C-436株とそれらの菌株の生残率を比較した．

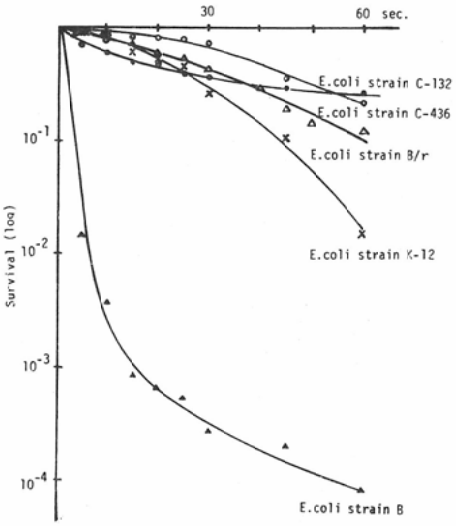
使用した菌株は紫外線照射の場合は C-436株，C-132 株，K-12 株，B株，B/r 株を用い，X線照射の場合はC-436株，K-12株を用い，抗癌剤の処理の場合には C-436株を用いた．

実験は次のように行なつた．各菌株について所定の時間，紫外線，X線および抗癌剤とを作用させてサンプルをとり出し，適当に稀釈してＴＡにまき，37℃で一夜培養し，生残菌数を調べた．なお，紫外線照射後光回復による影響を防ぐため，2時間冷暗所に静置した後，うす暗い部屋で，適当に稀釈してＴＡにまいた．なお，抗癌剤の処理温度は37℃であつた．

②　成績

i）紫外線照射の場合

紫外線照射による大腸菌の生残曲線は Fig. 1 に示す通りで，C-436株は紫外線に対して B/r 株とほとんど同じ程度の抵抗性を示した．



E. coli was suspended into buffer solution, and then was treated by UV-irradiation (15-watt sterilization lamp, FSD: 50 cm) while shaken in a Petri dish. At various times, the samples were taken out and spreaded on complete media for assay of survivals.

Fig. 1. Survival curve after UV-irradiation

ii）X線照射の場合

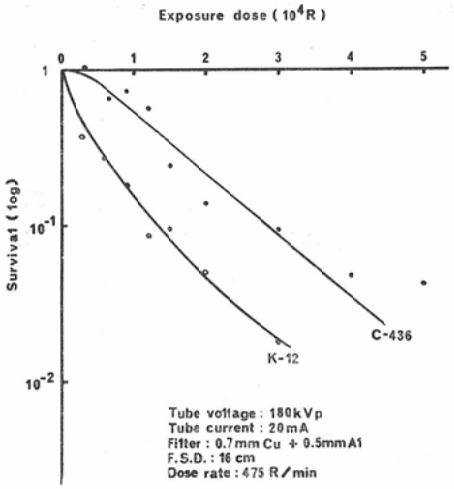
X線照射による C-436株と K-12株の生残曲線は Fig. 2に示すようになり，C-436株はX線に対して K-12株とほとんど同じ程度の抵抗性を示した．

iii）抗癌剤処理の場合

抗癌剤の C-436株に対する作用は Fig. 3，Fig. 4に示す通りであつた．

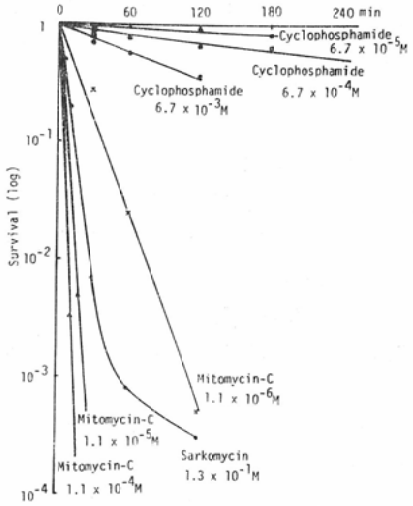
③　小括

i）新しい実験系としての大腸菌 C-436株は紫外線に対しては B/r 株，K-12株とほとんど同じ程



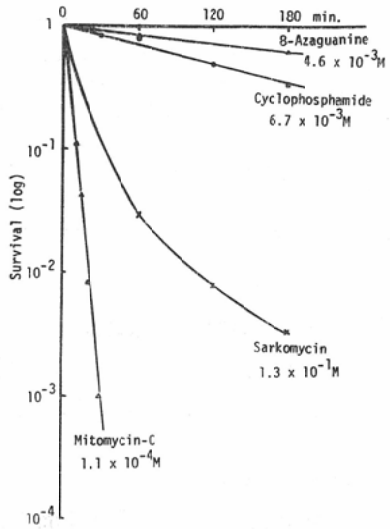
E. coli was suspended into buffer solution, and then was treated by X-ray irradiation in Petri dish. At various dose, the samples were taken out and spreaded on complete media for assay of survivals.

Fig. 2. Survival curve after X-ray irradiation



Curves show the survivals of E. coli strain C-436 (suspended in buffer solution) treated by various concentration of anti-cancer drug

Fig. 4. Survival curve treated by anti-cancer drug



Curves show the survivals of E. coli strain C-436 (suspended in PYB) treated by various concentration of anti-cancer drug

Fig. 3. Survival curve treated by anti-cancer drug

度の抵抗性を示し，X線に対しては K-12株とほとんど同じ程度の抵抗性を示した．よつて C-436株は B/r 株やK-12株と同じ程度の放射線抵抗株であることが判明し，このことを今後の研究をすすめるための基礎的資料とした．

ii）使用した抗癌剤は，人間の常用量をそれぞれ同じ倍数に稀釈した状態で C-436株に作用させたものだが，実験した範囲内では，相対的にMMCは致死効果が強く，次いで Sarkomycin で，CPA, 8-Azaguanine の順に弱かつた．このことも今後の研究の基礎的資料とした．

3）紫外線ならびに抗癌剤処理による突然変異の誘導

①　目的および方法

紫外線および抗癌剤の大腸菌 C-436株に対する突然変異誘導性について比較検討した．

実験には大腸菌 C-436株を用い，10ml の緩衝液に菌を懸濁（菌数約10^8個/ml）し，紫外線照射（60秒間，120秒間および 240秒間の三通り）を行なつた．照射後菌液を 10倍に濃縮し，0.1ml ずつ選択培地にまいた．

また，大腸菌 C-436株の菌液（菌を約10^8個/mlの割合で緩衝液に懸濁）を所定の濃度で抗癌剤を作用させ，それぞれ所定の時間処理し 100倍に濃縮し，各々を 0.1ml ずつ選択培地にまき，37℃で2日間培養して変異株をひろつた．

② 成績

i）紫外線照射の場合

Fig. 5に示すように生残菌数10^{10}個当り，アルギニン非要求性変異株は60秒間照射では 5.5×10個であるが，120秒間照射では 1.0×10^5個生じ，自然変異の 1.6×10個より著明に多かつた．また，ヒスチジン非要求性変異株は60秒間照射では 1.5×10個であるが，120秒間照射では 3.2×10^4個生じ，自然変異の 6.1×10^0個に比較して有意の差を示した．

なお，240秒間照射では変異株は得られなかつた．また，どの照射方法でもトリプトファン非要求性変異株は得られなかつた．このことは，大腸菌 C-436株のトリプトファン要求性は欠失変異によるためである．

ii）抗癌剤処理の場合

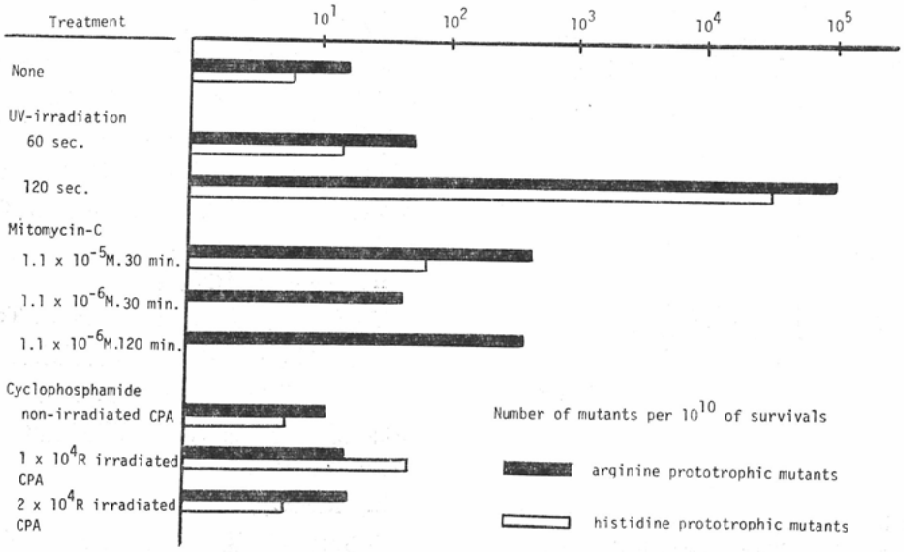
いずれの場合もトリプトファン非要求性変異株は得られなかつた．

㋑ MMC処理の場合

1.1×10^{-5}M で30分間処理，1.1×10^{-6}M で30分間処理および 1.1×10^{-6}M で 120分間においてアルギニン非要求性変異株は Fig. 5に示すように生残菌数10^{10}個当りそれぞれ 4.5×10^2個，4.5×10個，4.3×10^2個で自然変異の 1.6×10個よりも多く得られた．ヒスチジン非要求性変異株は，1.1×10^{-5}M で30分間処理においてのみ得られ，7.5×10^2個であつた．

㋺ CPA処理の場合

アルギニン非要求性変異株は Fig. 5に示すように，生残菌数10^{10}個当り，非照射のCPA処理の場合には 1.2×10個，10000R照射CPAの場合には 1.6×10個，20000R照射CPAの場合には 1.8×10個生じた．一方，ヒスチジン非要求性変異株については，それぞれ 6.2×10^0個，5.5×10個，6.2×10^0個で，自然変異の場合と比べ



Buffer solution of E. coli C-436 was treated by UV-irradiation or anti-cancer drug, and spreaded on selective media. The number of mutants was noted in 10^{10} of survivals.

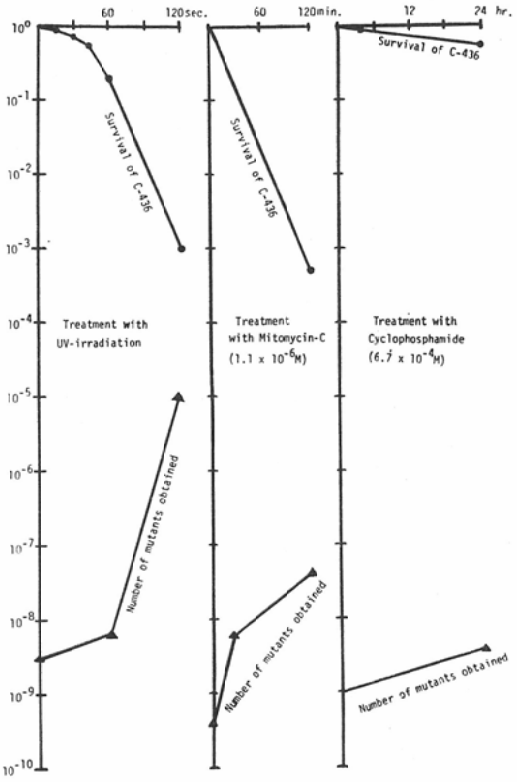
Fig. 5. Comparison of the number of mutants treated by UV-irradiation and anti-cancer drugs

て，ほとんど同じ程度で，X線照射もこの程度では効果がなかつた．

③　小括

i）アルギニン非要求性変異株に関して，紫外線照射，MMC処理では突然変異の誘導効果が認められたが，CPA処理の場合には誘導効果はほとんど認められなかつた．

ii）紫外射，MMC 1.1×10^{-6}M 処理，およびCPA 6.7×10^{-4}M 処理の場合の致死効果とアルギニン非要求性変異株の出現を Fig. 6に示したが，致死効果の強い場合ほど誘導効果も強かつた．相対的に紫外線，MMCでは致死効果が強く，突然変異の誘導効果も大きいが，CPAの場合には致死効果が弱く，自然変異との間には差はみられなかつた．



E. coli C-436 was suspended into buffer solution, and then treated by either UV-irradiation or anti-cancer drugs. The suspension was spreaded on selective media, and mutants were counted.

Fig. 6. Corralation between lethal effect of anti-cancer drug or UV-irradiation and the number of mutants obtained

4）紫外線，抗癌剤処理により誘導された突然変異株の遺伝形質および黄色色素産生能についての遺伝学的分析

①　目的および方法

アミノ酸の要求性と黄色色素産生能との関連性について検討するため，紫外線あるいは抗癌剤処理により大腸菌 C-436株より誘導された突然変異株の遺伝形質を調べた．

紫外線あるいは抗癌剤処理により分離された突然変異株を無作為にひろい，それぞれを純粋培養し，各コロニーを1ml のTBで37℃で一夜培養し，それを緩衝液で 100倍に稀釈し，栄養要求性を調べる培地および黄色色素産生能を調べる培地に一滴ずつ滴下し，37℃で2日間培養してそれらの変異株の遺伝形質を調べた．

②　成績

どの処理方法においてもトリプトファン非要求性変異株は得られなかつた．

i）自然変異の場合

生残菌数10^{10}個当りアルギニン非要求性変異株は 1.6×10個，ヒスチジン非要求性変異株は 6.1×10^{0}個得られた．アルギニン非要求性変異株で黄色色素産生能のあるものは98.4%あり，ヒスチジン非要求性変異株で黄色色素産生能のあるものは6%にすぎなかつた．

ii）紫外線照射の場合

得られた変異株の数と遺伝形質は Teble 3に示すごとくであり，アルギニン非要求性変異株で黄色色素産生能のあるものは97.7%あり，ヒスチジン非要求性変異株で黄色色素産生能のあるものは33.3%であつた．

iii）MMC処理の場合

得られた変異株の数と遺伝形質は Table 4に示す通りであり，アルギニン非要求性変異株の 100%は黄色色素産生能があり，ヒスチジン非要求性変異株で黄色色素産生能のあるものはなかつた．

iv）CPA処理の場合

Table 3 Number of mutants obtained by UV-irradiation, and their genetic characters

UV-irradiation			Control	60 sec.	120 sec.	240 sec.
selective marker		mutants / survivals	40 / 4.8×10^{10}	1 / 6.6×10^{8}	57 / 1.8×10^{7}	0* / 1.3×10^{4}
His^+	Arg^+	Y	2	1	0*	0*
		W	1	0*	0*	0*
	Arg^-	Y	3	0*	6	0*
		W	20	0*	12	0*
selective marker		mutants / survivals	180 / 9.6×10^{10}	7 / 1.3×10^{9}	390 / 3.6×10^{7}	0* / 2.7×10^{5}
Arg^+	His^+	Y	0*	0*	6	0*
		W	0*	0*	0*	0*
	His^-	Y	38	7	117	0*
		W	0*	0*	3	0*

Y: yellow colony W: white colony

Histidine prototrophic mutants and arginine protorophic mutants isolated from E. coli C-436 after UV-irradiation were spotted on selective media, and their genetic characters were checked on unselective markers and color formation. The integers show the number of mutants checked. 0*: could not be obtained

Table 4 Number of mutants obtained by Mitomycin-C treatment, and their genetic characters

Mitomycin-C			Control	1.1×10^{-4}M 15 min.	1.1×10^{-5}M 30 min.	1.1×10^{-6}M 30 min.	1.1×10^{-6}M 120 min.	1.1×10^{-7}M 30 min.
selective marker		mutants / survivals	0* / 4.8×10^{10}	0* / 10×10^{4}	1 / 13.2×10^{6}		0* / 1.8×10^{6}	
His^+	Arg^+	Y	0*	0*	0*		0*	
		W	0*	0*	0*		0*	
	Arg^-	Y	0*	0*	0*		0*	
		W	0*	0*	1		0*	
selective marker		mutants / survivals	5 / 12.1×10^{9}	0* / 20×10^{4}	5 / 10.9×10^{7}	13 / 28.8×10^{8}	2 / 46.1×10^{6}	0* / 15.2×10^{8}
Arg^+	His^+	Y	1	0*	0*	0*	0*	0*
		W	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	His^-	Y	4	0*	5	13	2	0*
		W	0*	0*	0*	0*	0*	0*

Y: yellow colony W: white colony

Histidine prototrophic mutants and arginine prototrophic mutants isolated from E. coli C-436 with Mitomycin-C treatment were spotted on selective media, and their genetic characters were checked on unselective markers and color formation. The integers show the number of mutants checked. 0*: could not be obtained

得られた変異株の数と遺伝形質は Table 5に示す通りである．アルギニン非要求性変異株で黄色色素産生能のあるものは97.6%あり，ヒスチジン非要求性変異株で黄色色素産生能のあるものは19.2%であつた．

③ 小括

アルギニン非要求性変異株で黄色色素産生能のあるものは98.8% (97.6～ 100%) で，ヒスチジ

Table 5　Number of mutants obtained by Cyclophosphamide treatment, and their genetic characters

Cyclophosphamide			Control	Non-irradiated CPA	1×10^4R irradiated CPA	2×10^4R irradiated CPA
selective marker	mutants / survivals		23 / 7.1×10^9	3 / 5.0×10^9	23 / 4.2×10^9	2 / 3.2×10^9
His^+	Arg^+	Y	0*	1	1	0*
		W	0*	0*	0*	0*
	Arg^-	Y	0*	0*	5	0*
		W	23	2	17	2
selective marker	mutants / survivals		17 / 20.8×10^9	24 / 20.0×10^9	31 / 18.4×10^9	28 / 14.8×10^9
Arg^+	His^+	Y	0*	0*	0*	0*
		W	0*	0*	0*	0*
	His^-	Y	17	23	31	27
		W	0*	1	0*	1

Y: yellow colony　W: white colony

Histidine prototrophic mutants and arginine prototrophic mutants isolated from E. coli C-436 with Cyclophosphamide treatment were spotted on selective media, and their genetic characters were checked on unselective markers and color formation. The integers show the number of mutants checked.
0*: could not be obtained

ン非要求性変異株で黄色色素産生能のあるものは14.7%（0～33.3%）だつた．これからアルギニン合成能と黄色色素産生能との間に関連性があるように思われる．

5）大腸菌 C-167株と C-9株との接合実験

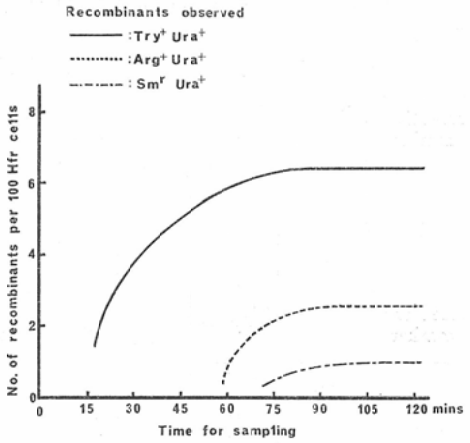
①　目的および方法

以上の事からアルギニン合成能と黄色色素産生能との間に関連性があると考えられ，接合実験によりこの点について検討した．

菌株はHfr菌として大腸菌 C-167株（$Hfr^-7Ura^-Sm^rY$），F^- 菌として C-9株（$F^-Try^-Arg^-Sm^d$ W）を用い，各々の対数増殖期の細菌を洗滌し，Hfr菌の菌数を1，F^- 菌の菌数を5となるような割合で交叉緩衝液[22]に懸濁し，37℃で接触を行なわせ，サンプルを所定の時間毎（0分から 120分まで15分毎）に取り出し接触を中断せしめて適当な濃度で選択培地にまき，37℃で2日間培養した．

②　成績

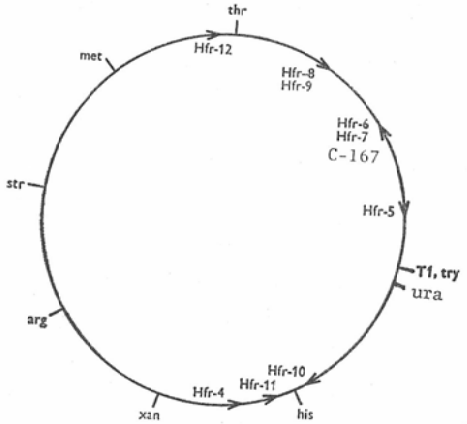
Hfr から F^- に移行した遺伝標識は Fig. 7に示すごとく，トリプトファン，アルギニン，ストレプトマイシンの順序であり，組換え頻度もトリプトファン，アルギニン，ストレプトマイシンの順に多かつた．



Hfr cells and F^- cells were mixed into a crossing buffer for conjugation in the proportion of 1 : 5. At various times, samples was stirred for 5 sec. by high speed mixer, and then the conjugation was interrupted. After diluted, the samples were spreaded on selective media.

Fig. 7.　Genetic recombination experiment with C-167 ($Hfr\text{-}7Ura^-Sm^rY$) and C-9 ($F^-Try^-Arg^-Sm^dW$)

Sasaki & Bertani による大腸菌C株の染色体地図[22]を Fig. 8に示したが，本実験でもこれを支



Preliminary genetic map of *Escherichia coli* strain c constructed from results of interrupted conjugation experiments following the criteria of Jacob & Wollman (1961). The arrows indicate the *approximate* locations of the points of origin of the corresponding Hfr strains and their directions of transfer. The total length of the map is approximately 110 min. Symbols are explained in the legend to Table 1.
Refered to Sasaki et al., J. Gen. Microbiol., 40, 365–376, 1965. and Wiman et al., Molec. Gen. Genetics., 107, 1–31, 1970.

Fig. 8. Genetic map of E. coli Strain C

持する成績を得た．（㊟正確な測定が報告されている[32]）．

6） 大腸菌 C-167株と大腸菌 C-9株との接合による組換え体（Ura^+Sm^r）の子孫分析

① 目的および方法

選択培地（Davis 培地＋アルギニン＋トリプトファン＋ストレプトマイシン）上で得られた組換え体について非選択標識のトリプトファン，アルギニン，黄色色素産生能との関係を調べる目的で，栄養要求性を調べる培地および色素検定用培地に，得られた組換え体の菌液（1集落ごとに1 ml の緩衝液に懸濁）をそれぞれ一滴ずつ滴下し，37℃で2日間培養した．

② 成績

Table 6のごとく，調べた組換え体 131クローンのうち，Try^+Arg^- は86クローンあり，それらの集落は白色だつた．また34クローンのTry^-Arg^-の集落は白色で，10クローンの Try^+Arg^+ の集落

Table 6 Analysis of Recombinants

Type	Unselected Markers			No. of Colonies
	Try	Arg	color formation	
A	+	−	W	86 (65.6%)
B	−	−	W	34 (26.0%)
C	+	+	Y	10 (7.6%)
D	−	+	Y	1 (0.8%)
				131 (100.0%)

+ : prototroph　　Y : yellow colony
− : auxotroph.　　W : white colony

The recombinants selected by (Ura^+Sm^r) from the cross between E. coli strainC-167 and C-9 were spreaded on selective media, and the recombinants were analysed on the relationship between unselected markers and color formation.

は黄色だつた．残りの1クローンの Try^-Arg^+ の集落も黄色だつた．

③ 小括

Arg^+ のものは Try^+, Try^- にかかわらず全部の集落が黄色色素を産生し，Arg^- のものは Try^+, Try^-にかからず黄色色素を産生できずに集落は全部白色だつた．このことから，黄色色素産生の支配因子はトリプトファンを支配する遺伝子の座よりもアルギニンを支配する遺伝子の座に近いと考えられる．

7） 大腸菌 C-436株のアルギニン非要求性変異と黄色色素産生の変異との関連性について

① 目的および方法

紫外線や抗癌剤によつて誘導された変異株や接合実験とその組換え体について検討した結果，アルギニン合成能と黄色色素産生能とが関連している事を認めたが更にアルギニン非要求性株や黄色集落をそれぞれ取り出して相互の関係をしらべた．

菌株は大腸菌 C-436株を用い，それから分離されたアルギニン非要求性変異株を50個，黄色色素産生株を50個とり出し，各々を1 ml のＴＢ中で一夜37℃で培養し，それを 100倍に稀釈し，一滴ずつ栄養要求性を調べる培地および色素検定用培

地に滴下し，37℃で2日間培養して遺伝学的性質を調べた．

② 成績

アルギニン非要求性変異株の50個は黄色色素を産生し，原株と同様にトリプトファン，ヒスチジンを要求した．

一方，黄色色素産生変異株の50個はすべてArg^+となつているが，原株と同様にトリプトファン，ヒスチジンを要求した．

なお，アルギニン添加培地上では黄色色素産生株は黄色の集落を形成したが，アルギニンを含まない培地上では黄色色素産生株は白色の集落を形成した．

③ 小括

アルギニン非要求性変異株は黄色色素を産生した．一方，黄色色素産生能を獲得した変異株はアルギニンを必要としなくなつている．すなわち，集落が白色から黄色へと変化すると同時にArg^-からArg^+に変異している．したがつて黄色色素産生能はアルギニン要求性に関連している事実を支持する結果が得られた．

V. 考案ならびに総括

1） 大腸菌C株の黄色色素産生におよぼす培地の影響

色素を産生する細菌として黄色ブドウ球菌，緑膿菌等が有名であり，しかも色素産生は培地の組成の影響を受けることも知られている．また色素産生の変異についても古くから報告されている．しかし著者は大腸菌に関しては色素産生に関する文献を見出せなかつた．

大腸菌C株のあるものは合成培地上では灰白色の集落を形成するが，しばしばクリーム様の黄色色素を産生するものがあることが観察された．しかもそれらは培地の組成の影響を受ける．

大腸菌 C-436株から分離されたArg^+の株で，黄色色素産生に関して不安定な菌株が，培地のアルギニンの量によつて色調が濃くなつたり淡くなつたりすることが認められ，しかも培地に鉄が含まれていると黄色の色調がより強くなるように観察された．しかし，EA-37株のように鉄があるために色素産生が抑制されたものもあつた．このように色素産生が鉄と，菌のアミノ酸の要求性に関連のあるアルギニンとによつて影響を受けるということは色素産生過程の研究にとつて非常に興味あることである．しかし，色素の生化学的性状については，今後の研究にまたねばならない．

2） 致死効果と突然変異の誘導

放射線や抗癌剤の致死作用ならびにその突然変異の誘発は主としてＤＮＡに対する障害のためであることは明らかである[6)24)25)]．

本実験では種々の細胞に紫外線，Ｘ線ならびに抗癌剤を作用させ，ＤＮＡの障害の測定を将来の目標として，生残率の比較や，突然変異株の分析を試みた．

それによれば，大腸菌 C-436株に対して実験した範囲で，相対的に紫外線，ＭＭＣはＣＰＡよりも致死効果が強く，変異株の出現は紫外線，ＭＭＣ，ＣＰＡの順に多かつた．また大腸菌 C-436株からの変異株の分析では，紫外線ではアルギニン非要求性変異株とヒスチジン非要求性変異株とはほとんど同じ程度に出現し，ＭＭＣではアルギニン非要求性変異株が多く，ヒスチジン非要求性変異株をみつける機会が少なく，ＣＰＡではアルギニン非要求性変異株とヒスチジン非要求性変異株とはほとんど同じ程度に出現したが，自然変異の場合と比べてほとんど同じ程度であつた．

Demerec[4)] は種々の作用源を用いて大腸菌の突然変異を誘導し，選択標識の違いによる変異率の差を認めており，近藤ら[12)]は作用源の致死効果と突然変異の誘発との関係について比較検討し，浜田[7)]は HeLa 細胞のコロニー形成を指標としてＭＭＣとＸ線の作用を比較して，生残率や変異率の差を認めている．

生残曲線の違いは処理するものによつて異なるのか，それとも反応の効率が異なるのか不明である．それを調べるためには，それぞれの処理したものについて回復する手段を見つければ良い．その手段が異なれば，紫外線，Ｘ線，抗癌剤の作用の仕方が異なると云うことになる．

また，細胞の生活に重要なものは単一ではな

く，複のものであるかもしれない．よつて放射線障害の実体をつかむことに困難がある．突然変異については塩基類似物質による場合，紫外線による場合，その他の変異誘発物質について分子レベルでの報告がある[5)33)]．

次に，照射線量と変異株の出現との関係，抗癌剤処理時間と変異株の出現との関係を調べてみるとFig. 6に示すような相関関係があり，Stapleton[26)]，Russell ら[19)]や Sager & Ryan[20)] の云うように，線量や処理時間が延長すると変異株の出現は増加している．しかし処理する量の増大につれて，放射線障害や抗癌剤の障害が増加することは当然であるが，ある点以上は横ばい状態か減少すると考えられている[8)]．このように処理の最も高率に突然変異体が出現する時に，どのような障害を細胞内に伴つているか興味がもたれる．

このように，紫外線，X線，抗癌剤が大腸菌C-436株に対して作用に差があることは人体の細胞においても予想される．

また，細菌の白色から黄色への変異は，通常の突然変異と異なつて，選択なしに簡単，かつ確実に見出し得る．このため，集落の色調の変化は放射線障害の研究において，用い方によつては役立つであろう．

3）アルギニン合成能と黄色色素産生能との関連性について

この一連の実験において，自然変異，紫外線，抗癌剤で誘導した変異株の分析で，アルギニン非要求性変異株の98.8%が黄色色素を産生したことから，アルギニン合成能と黄色色素産生能とが関連していることが予想された．

また，大腸菌 C-167株 (Hfr-$7Ura^-Sm^rY$) と大腸菌 C-9株 ($F^-Try^-Arg^-Sm^dW$) との接合では，選択培地 (Davis 培地＋トリプトファン＋アルギニン＋ストレプトマイシン) 上で組換え体をひろい，それらの娘細胞について，非選択標識の Arg と Try と黄色色素産生能とについて調べてみた．Table 6のように，調べた組換え体 131クローンのうち，Arg^+の11クローンは黄色で，Arg^-の 120クローンは白色，Try^+では白色もあれば黄色もあり，また Try^- でも黄色もあれば白色もあり，アルギニン合成能と黄色色素産生能とが関連していることが予想された．また，大腸菌 C-436株から分離された Arg^+ は全部が黄色で，黄色で分離したものは全部が Arg^+ となつており，アルギニン合成能と黄色色素産生能とが関連していると云う考えが成り立つのである．

しかし，自然変異，紫外線，抗癌剤での誘導変異の子孫分析で，Arg^+が 100%黄色にならなかつたこと，His^+で黄色のものがあつたことから，染色体上の位置づけは更に詳細な実験を必要とする．

4）人類の放射線障害

人類の放射線障害については，実験のために人類を照射できないので，原爆被爆者の調査や，放射線を多量にあびた人達の追跡調査[3)11)13)15)21)]が主体となる事は当然の事で，高等動物の実験結果と比較検討し，人類における放射線障害について考察している．

本実験は，放射線や抗癌剤の細菌におよぼす影響の研究の第一歩にすぎないが，微生物における情報から，個々の細胞について放射線障害を質的，量的に表現することが可能となれば，その手技や成果は高等動物や人間における放射線障害の解明に大いに役立つと思われる．

VI. 結　論

1）大腸菌 C-436株の黄色色素産生能の識別には，Davis 培地＋DL-トリプトファン (40μg/ml) ＋L-ヒスチジン (20μg/ml) ＋L-アルギニン (20μg/ml) ＋$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (28μg/ml) の培地が適している．

2）大腸菌 C-436株は紫外線に対して，大腸菌 B/r 株および K-12株とほとんど同じ程度の抵抗性を示した．

3）大腸菌 C-436株はX線に対して，大腸菌K-12株とほとんど同じ程度の抵抗性を示した．

4）抗癌剤の大腸菌 C-436株に対する致死効果は，人間における常用量をそれぞれ等倍数稀釈した状態で実験したものだが，調べた範囲内では相対的にMMCが強く，CPA，8-Azaguanine は

弱かつた.

5) 相対的に紫外線やMMCは致死効果が強く，変異株の出現も多く，CPAは致死効果が弱く，変異株の出現も少なかつた．しかし，照射線量やそれぞれの抗癌剤の処理時間に比例して変異株の出現が多くなる.

6) 大腸菌C株のアルギニン合成能と黄色色素産生能との間に遺伝的に関連性がある.

稿を終るに臨み，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師足沢三之介教授，大竹久助教授に深く感謝しますと共に，研究に際して終始種々の御教示，御援助を載いた歯学部口腔微生物学教室佐々木市郎講師に心から感謝致します.

なお，本論文の要旨は第26，27，28回日本医学放射線学会総会，第12回国際放射線医学会議（1969年10月，東京）において発表した.

この研究の一部は文部省科学研究費の援助によつて行なわれた．感謝の意を表します.

文　献

1) Bertani, G. and Six, E.: Inheritance of P_2 prophage in bacterial crosses, Virology, 6, 357—381, 1958.
2) Brookes, P. and Lawley, D.: Reaction of some mutagenic and carcinogenic compounds with nucleic acids. J. Cell. Comp. Phys., 64: Suppl., 1, 111—127, 1964.
3) Crow, J.F.: A comparison of fetal and infant death in the progeny of radiologists and pathologists. Am. J. Roentgenol., 73, 467—471, 1955.
4) Demerec, M.: 吉川秀男：遺伝と変異，微生物学ハンドブック編集委員会編，微生物学ハンドブック，64—81，技報堂，東京，1964，より引用.
5) Freese, E.: The difference between spontaneous and base-analogue induced mutations of phage T_4. Proc. Ac. Sci. U.S., 45, 622—633, 1959.
6) Freifelder, D.: Lethal changes in bacteriophage DNA produced by X-ray. Radiat. Res., Suppl., 6, 80—96, 1966.
7) 浜田辰巳，山崎　武，三浦貴士：培養細胞のコロニー形成能におよぼすマイトマイシンCおよびX線の作用，日医放会誌，28：1015—1019. 1968.
8) Hollaender, A. and Emmons, C.W.: Wavelength dependence of mutation production in the ultraviolet with special emphasis of fungi. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 9, 179—186, 1941.
9) 加藤弘道：腎臓X線照射に際して産生する自家抗体の腎組織呼吸に及ぼす影響に関する実験的研究，日医放会誌，19：2416—2458, 1960.
10) 城戸正光：膵臓「レ」線照射の血清学的並びに生化学的研究，日医放会誌，15：1046—1079. 1955.
11) 北畠　隆，小見山喜八郎，堀江謙三：エックス線技師の死因および死亡率調査，日医放会誌，25：213—223，1965.
12) Kondo, S., Ichikawa, H., Iwo, K. and Kato, T.: Base-change mutagenesis and prophage induction in strains of Escherichia coli with different DNA repair capacities. Genetics, 66, 187—217, 1970.
13) 黒川茂樹，北畠　隆：放射線誘発人白血病についての二三の検討，日医放会誌，29：1081—1086，1969.
14) Iijima, T. and Hagiwara, A.: Mutagenic action of mitomycin C on Escherichia coli. Nature, 185, 395—396, 1960.
15) Macht, S.H. and Lawrence, P.S.: National survey of congenital malformation resulting from exposure to roentgen radiation. Am. J. Roentgenol., 73, 442—466, 1955.
16) 中村守男：放射線照射に際して産生する組織分解成分の血清学的研究，日医放会誌，20：288—304，1961.
17) Pollard, E.: Radiation inactivation of enzymes, nucleic acids, and phage particles. Revs. Modern. Phys., 31, 273—281, 1959.
18) Rupert, C.S., Goodgal, S.H. and Heriott, R.M.: Photoreactivation in vitro of ultraviolet inactivated hemophilus influenzae transforming factor. J. Gen. Physiol., 41, 451—471, 1958.
19) Russell, W.L., Russell, L.B. and Kelly, E.M.: Radiation dose rate and mutation frequency. Science 128, 1546—1550, 1958.
20) Sager, R. and Ryan, F.J.: 可変遺伝単位，池田・田中訳，細胞の遺伝．32—57，岩波書店，東京，1966.
21) 粟冠正利：我が国のエックス線技師の死亡分析，日医放会誌，27：611—613，1967.
22) Sasaki, I. and Bertani, G.: Growth abnormalities in Hfr derivatives of E. coli strain C. J. Gen. Microbiol., 40, 365—376, 1965.
23) Sasaki, I. 私信
24) Scholes, G., Ward, J.F. and Weiss, J.: Mechanism of the radiation induced degradation of nucleic acid. J. Mol. Biol., 2, 379—391,

1960.
25) Setlow, R.B. and Setlow, J.K.: Evidence that UV-induced thymine dimers in DNA cause biological damage. Proc. Nat. Ac. Sci. U.S., 48, 1250—1257, 1960.
26) Stapleton, G.E., Hollaender, A. and Martin, F.L.: Mechanism of lethal and mutagenic action of ionizing radiations on Aspergillus terrens. II. Use of modifying agants and conditions. J. Cell. Comp. Physiol., 39. Suppl., 1, 101—113, 1952.
27) Strauss, B.S.: Specificity of the mutagenic action of the alkylating agants. Nature, 191, 730—731, 1961.
28) 武部　啓：放射線障害の回復，日本臨床，24：1549—1572，1966.
29) 足沢三之介：紫外線照射に対する細胞の放射線感受性について．日本レントゲン学会雑誌，15：259—326，，1937.
30) 足沢三之介：生体に対する放射線作用の血清学的研究，日本医放会誌，17：466—497，1957.
51) 東京大学伝染病研究所学友会編：生菌数測定法．細菌学実習提要，164—166，丸善，東京，1958.
32) Wiman, M., Bertani, G., Kelly, B. and Sasaki, I.: Genetic map of Escherichia coli strain C. Molec. Gen. Genetics. 107, 1—31, 1970.
33) Yanofsky, C., Helinski, D.R. and Maling, B.D.: The effects of mutation on the composition and properties of the A protein of Escherichia coli tryptophan synthetase. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 26, 11—24, 1961.
34) 吉村彰介：制癌剤Cyclophosphamide(Endoxan)の放射線による活性化に関する研究．日本医放会誌，27：1064—1071，1967.