

Title	制癌剤cyclophosphamide(endoxan)の放射線による活性化に関する研究
Author(s)	吉村, 彰介
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1967, 27(8), p. 1064-1071
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/18604
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

制癌剤 Cyclophosphamide (Endoxan) の 放射線による活性化に関する研究

大阪大学医学部放射線医学教室 (主任: 立入弘教授)

吉 村 彰 介

(昭和42年3月4日受付)

Studies on the Activation of Cyclophosphamide (Endoxan)
with Ionizing Radiation

By

Shosuke Yoshimura

Department of Radiology, Medical School, Osaka University

(Director: Prof. H. Tachiiri, M.D.)

Endoxan exposed to ionizing radiation was found to acquire enhanced activity for inhibition of growth of cultured human tumor cells (HeLa cells), and of colony forming ability of *Escherichia coli*.

The enhanced activity of Endoxan was approximately in proportion to the exposure dose of the radiation in the range from 5×10^4 to 3×10^6 R.

The enhanced activity of Endoxan to inhibit colony formation of *E. coli* increased when M/15 PO_4 buffer was added prior to irradiation and the activity was most enhanced with the least concentration in the range of 2.5 to 20.0 mg/ml. Dry Endoxan was least activated.

The *E. coli* killing activity of Endoxan irradiated in solution was approximately equal to the sum of activity of irradiated dry Endoxan and of Endoxan in irradiated buffer solution.

That is, the irradiation enhancement of Endoxan activity was largely due to an indirect effect of radiation on the solvent rather than a direct effect, probably through some molecular products or free radicals of rather long half life.

The active fraction of irradiated Endoxan solution was isolated by means of thinlayer chromatographic analysis; the Rf value of the active fraction was found around zero point and was different from that of nor-HN₂ (nor-Nitrogen mustard).

緒 言

Cyclophosphamide (Endoxan) は Arnold²⁾³⁾ 等によつてはじめて合成され、現在広く制癌剤として臨床的に用いられている Alkyl 化剤の一種であるが、その作用機序についてはいまだに不明の点が多い。研究の遅れている原因の一つは Endoxan そのものは生物学的に殆んど不活性であり¹⁰⁾、生体内で何らかの変化を受けてはじめて活性が増

強するという特性のためである²⁾³⁾⁴⁾⁷⁾¹¹⁾。すなわち、Endoxan は *in vitro* では高濃度で長時間、細胞に作用させないと効果をあらわさない。著者は放射線と Endoxan の併用効果についての研究中にヒントを得て、Endoxan 溶液 (Endoxan を純水あるいは適当な緩衝液に溶解したもの) をあらかじめ、電離放射線照射することによつて、Endoxan が活性化されることを発見した。すな

わち培養人癌細胞に対する増殖抑制効果、あるいは細菌に対する致死効果が著しく強められることを見出したので、それについて研究し、その活性化におよぼす放射線の作用機構および活性化 Endoxan の本態を追求し、2, 3の知見を得たので報告する。

実験材料ならびに方法

I. HeLa 細胞に対する増殖抑制効果を指標とした実験

1) Endoxan: ドイツ Asta 社より直送の NaCl を含まない純粋なものを用いた。

2) HeLa 細胞¹³⁾: Lactalbumin 水溶液を Earle の塩溶液²²⁾に0.5%の割合に混和し、それに牛血清を全容量中15%になるように加えた培養液中で37°Cにて継代培養されたものである。

3) 放射線照射装置および照射条件: 東芝製 RI 107型放射性同位元素回転治療装置による⁶⁰Co γ線, 線源被写体間距離38cm, 照射野10×10cm², 線量率 241R/min.

4) 照射方法: 内径 2.5cm, 高さ 0.8cmの円型ガラス容器に約 2 ml の試料(結晶の場合は 100 mg)を入れて常温下で照射した。

5) Endoxan 投与方法および効果の判定方法: Endoxan は照射終了直後、培養液で稀釈したのち細胞に投与した。HeLa 細胞増殖抑制効果の判定は simplified replicate tissue culture method¹⁷⁾にもとづいた。すなわち、各短試験管に細胞数が約 5×10^4 /tube となるようにして培養を開始し、2日毎に培養液を交換して、6日目まで対数的増殖を行なわせる。培養開始後2日目に Endoxan を含む培養液を与え、48時間目にこれを除去し、標準培養液で二度洗滌後、さらに2日間培養した時の細胞数を算え、対照群の細胞数に対する百分率によって効果を比較した。各実験でそれぞれ3本の短試験管を一単位として、その平均値をもとめた。

6) 細胞数算定法: 2%クエン酸を含む Crystal violet 液で核染色を施し、血球計算板で各チューブの細胞数を算えた。

(実験 a) Endoxan 水溶液(20mg/ml)に⁶⁰Co

γ線 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ Rの種々の線量を照射したものを 0.5mg/mlの濃度で細胞に投与して、その効果を比較した。対照となる非照射 Endoxan の処理は、照射を除いてすべて試料と同条件下においた。

(実験 b) ① Endoxan 水溶液(20mg/ml), ② 結晶 Endoxan, ③ 純水のそれぞれに γ線 5×10^4 R照射後、細胞に投与してそれらの効果を比較した。投与濃度は Endoxan は 0.25mg/ml, 照射水は 2.5%となるようにした。

II. Escherichia coli に対する致死効果を指標とした実験

1) E. coli: 阪大医学部放射線基礎医学教室にて Strain H/r30²⁵⁾²⁶⁾より分離された紫外線高感受性を有する Strain H_s30¹⁸⁾を培養液中で定常期まで増殖させ、さらに24時間、37°Cで M/15-phosphate buffer 中で飢餓培養して得た、完全に分裂の停止した細胞群を用いた。

2) 放射線照射装置、照射条件および線種: 日本放射線高分子研究所に設定されている Van de Graaff (1.5MeV)による電子線, 線量率 6.3×10^3 R/sec.

3) 照射方法: 試料を直径 1 cm, 長さ 2.5cm, 厚さ 0.5mmのガラス製アンプルに封入したものを横位にして氷水に浮かべ、上方から照射した。照射された試料は使用時(約3時間後)まで dry ice 中に凍結保存した。

4) Endoxanの溶解: すべて phosphate buffer, trisaminomethane を 3:1の比に混和した緩衝液を用いた。これによつてかなりの高濃度(10mg/ml)に溶解した場合も、ほぼ生理的に近い pH(7.3 ~ 6.8)を保ち得た。

5) Endoxan 投与方法: 試験管中で上述の飢餓培養した定常期細胞に Endoxan 溶液を加えて所定の濃度とし、細胞の最終濃度は常に約 2×10^4 /ml となるようにして37°Cで6時間まで振盪処理を行なった。

6) Endoxan の効果判定法: Endoxan 処理後、室温(22±1°C)で細胞懸濁液を phosphate buffer で必要な細胞数になるように稀釈して、

Peptone agar 固型培地にまき、それを37°Cで24時間培養した後の Colony 数を肉眼で算えて生存数とした。すなわち Colony 形成能を有する細胞数の減少の程度によつて、致死効果を判定した。なお Endoxan の細胞致死効率の定量的尺度としては、37%生存率濃度（細胞の生存率が37%に低下させるのに要する薬剤濃度）の逆数を用いた。

(実験 a) 20mg/ml の濃度で 4×10^5 R 照射された Endoxan を10mg/ml にうすめて投与して、同濃度の非照射 Endoxan の効果と比較した。

(実験 b) 照射時の Endoxan 濃度およびそれに与える照射線量をいろいろかえた場合の Endoxan の効果判定増強を定量的に検定した。用いた Endoxan 照射時濃度：2.5, 5.0, 10.0, 20.0mg/ml および結晶、与えた線量： 1×10^5 , 3×10^5 , 6×10^5 , 10×10^5 , および 30×10^5 R。

(実験 c) Endoxan 溶解に用いる緩衝液のみを 30×10^5 R 照射して、その細胞致死効率を検討した。

(実験 d) 照射緩衝液に非照射 Endoxan を溶解した際の Endoxan の細胞致死効率を検討した。

Ⅲ. 照射 Endoxan の薄層クロマトグラフィによる分析実験

1) 試料：20mg/ml の濃度で 1×10^5 R 照射された水溶液 Endoxan。

2) 展開液：acetone, chloroform を 2 : 1 の比に混和した有機溶媒

(実験 a) 上記試料を凍結乾燥して、析出した結晶を methanol で再溶解したのち、シリカゲル薄層クロマト法で展開、乾燥後ヨードガス中で発色させた。

(実験 b) 一方、Rf 値0を含む区劃およびそれ以外の Rf 値1までの範囲を10等分した各区劃から培養液で溶出したものをそれぞれ HeLa 細胞に投与して、それらの細胞増殖抑制効果を調べた。(判定法は実験 I の場合と同様である)。

実験結果

I. HeLa 細胞に対する照射 Endoxan の増殖抑制効果

a) $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ R の範囲で照射された水溶液 Endoxan を細胞に投与した場合、 1×10^4 R 程度までの線量では、Endoxan は有意の活性化を起さないが、 5×10^4 R 以上になると著しい増殖抑制効果を示した (Fig. 1)。すなわち、非照射 Endoxan 投与細胞群の増殖率は対照群に比べて、

Fig. 1 Growth inhibiting effect of irradiated Endoxan on HeLa cells. (Concentration of Endoxan: 0.5mg/ml, Treatment duration: 48hrs)

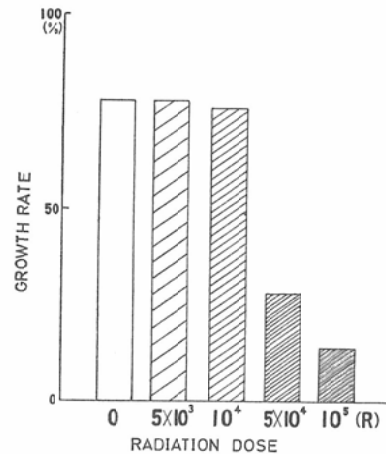
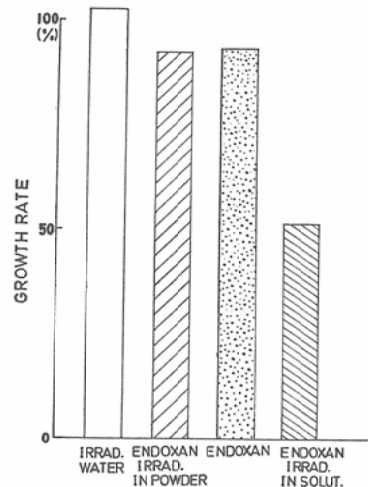


Fig. 2 Growth inhibiting effect of Endoxan and water both irradiated with 5×10^4 R of ^{60}Co -ray. (Concentration of Endoxan: 0.25mg/ml, Concentration of irradiated water: 2.5%, Treatment duration: 48hrs)



約78%を維持しているのに、 5×10^4 R照射 Endoxan 投与群では約29%、 1×10^5 R照射 Endoxan 投与群では約14%と著しい増殖率の低下を示した。

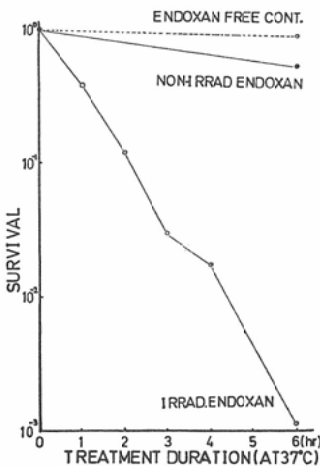
b) 水溶液 Endoxan, 結晶 Endoxan, 純水のそれぞれに 5×10^4 R 照射して、これらの細胞増殖抑制効果の比較をしたが、照射水溶液 Endoxan の効果が最も著しく、照射結晶 Endoxan は非照射 Endoxan と同程度の効果しかあらわず、照射純水投与群と対照との差は見られなかった (Fig. 2)。

以上を小括すると、Endoxan 水溶液に 5×10^4 R 以上照射すると、この溶液は細胞増殖抑制効果を増強する。この度合は照射線量が増加するにしたがつて著明となる。一方、結晶 Endoxan はこの程度の線量では測定し得るほどの活性化を示さない。照射された純水もまた細胞に有意の影響をあたえない。したがって、Endoxan 水溶液の効果増強は Endoxan そのものが活性化されたためであることを確認した。

II. 放射線による Endoxan 活性化の E. coli を用いての定量的解析

a) 照射 Endoxan と非照射 Endoxan の致死効果

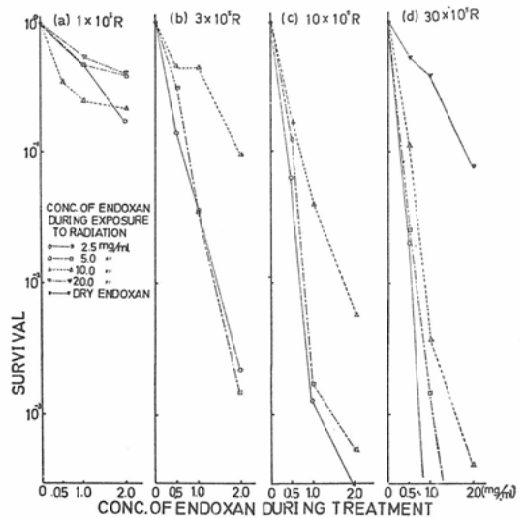
Fig. 3 Lethal effect of irradiated Endoxan on E. coli H₃₀. (Radiation dose: 4×10^5 R, Concentration of Endoxan during exposure to radiation: 20mg/ml)



非照射 Endoxan と 20mg/ml の濃度で 4×10^5 R 照射された Endoxan を、それぞれ 10mg/ml の濃度で E. coli H₃₀ に 6 時間作用させて致死効果を比較した。非照射 Endoxan 溶液の場合は僅かの致死効果しかみられないのに対して、照射された Endoxan の溶液中では細胞生存率は 0.1% 程度にまで低下した (Fig. 3)。

b) 上記の結果を参考にして、照射時の Endoxan 濃度の差および照射線量の差による Endoxan の効果増強の差を検討した結果は Fig. 4 に示さ

Fig. 4 Lethal effect of Endoxan on E. coli H₃₀. (as varied by the radiation dose and concentration during exposure to radiation.)

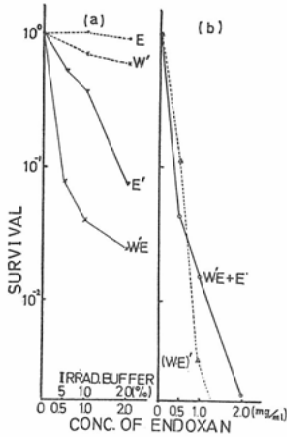


れているように、同一線量でも照射時濃度が稀薄であるほど、効果が増強することが認められた。この傾向は線量が増加するにつれて明らかとなる (Fig. 4, d)。また実験の範囲で照射線量が増加するほど、効果の増強を示した。極端な場合として、結晶 Endoxan に 30×10^5 R 照射してもやはり効果の増強を示した (Fig. 4, d)。注) しかしその活性化は溶液 Endoxan 照射による活性化よりはるかに弱い。

c) Endoxan 溶解に用いる緩衝液のみを $30 \times$

注) 放射線による結晶 Endoxan の活性化については蒲生がすでに報告している。

Fig. 5 Dose-response curves of *E. coli* Hs30 to Endoxan activated by radiation in various conditions. (Radiation dose: 30×10^5 R. E: non-irradiated Endoxan, E': irradiated, Endoxan, W'·E: Endoxan dissolved in irradiated buffer, (W·E)': Endoxan irradiated in solution, W': irradiated buffer.)

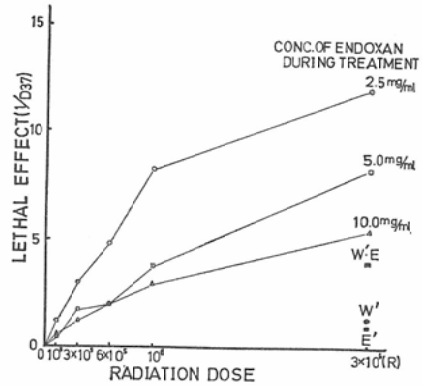


10^5 R照射して細胞にあたえると、照射 Endoxan よりはるかに弱いが、有意の致死効果を示した (Fig. 5, a).

d) 次に上記の照射された緩衝液で非照射 Endoxan を溶解して10mg/mlとし、これを希釈して細胞に作用させると、Endoxan の致死効果が照射緩衝液中で増強されるのを認めた (Fig. 5, a の W'·E). しかし、あらかじめ Endoxan を緩衝液に溶解し、溶液の状態に照射した方がはるかに強い致死効果を生じる (Fig. 5, b の (W·E)'). Endoxan を照射緩衝液に溶解したときに発現する効果 (Fig. 5, a の W'·E) に、結晶状態で Endoxan に照射した場合に生じる効果 (Fig. 5, a の E') を加えると Fig. 5, b の (W'·E+E') のようになり、溶液 Endoxan を照射した場合の致死効果 (Fig. 5, b の (W·E)') に近い値となった。

種々の照射線量と照射方法の組合せによって調整された Endoxan 溶液の致死効果を総括的に D_{37} の逆数によって定量的に表わしたのが Fig. 6 である。これによると照射線量が同じでも、照射時の Endoxan 濃度が異なれば、致死効果の増強程度が異なることが歴然としている。

Fig. 6 Increased lethal effects of Endoxan caused by indirect action of radiation.

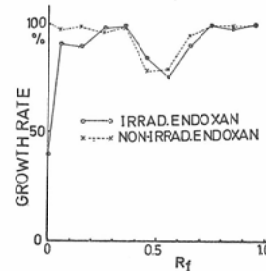


以上を小括すると、① 放射線照射された Endoxan は *E. coli* の定常期細胞に対しても致死効果をあらわす。② 放射線による Endoxan の活性化は照射時濃度が稀薄であるほど強くなり (稀釈効果¹⁾)、同線量照射の場合、結晶 Endoxan の活性化は溶液 Endoxan の活性化に比べて、きわめて弱い。したがって、Endoxan の活性化は稀薄溶液では、一部放射線の直接作用にもよるが、主として間接作用によると推定できる。③ 實際上、照射された水分子による Endoxan の活性化実験で、間接作用を定量的に証明した。④ 高線量照射された緩衝液自体も、わずかながら細胞致死作用を示すことは無視できない事実である。

II. 薄層クロマトグラフィーによる分析結果

a) ヨード発色反応では照射 Endoxan, 非照射 Endoxan 共に R_f 値0.55附近に濃厚な spot をあらわすのみで、両者間に肉眼的差異が認めら

Fig. 7 Analysis of the effective substance in irradiated Endoxan with thinlayer chromatogram.



れなかつた。

b) 一方、各区劃より溶出された物質を含む培養液を HeLa 細胞に投与すると Fig. 7 に示されるように、Rf 値 0.55 附近での増殖抑制効果は両者ほど等しいが、原点 (Rf 値 0) 附近で照射 Endoxan のみが強い効果を示した。すなわち、放射線照射によって、非照射 Endoxan には認められない、何らかの活性物質が Endoxan より生成されたことが確かめられた。

考 按

以上のように水溶液 Endoxan が放射線大量照射によって活性化される事実が明らかにされたが、一般には放射線照射によって物質がその化学結合に影響を受けて、破壊あるいは分解され、その物質本来の作用が弱化する事実について報告が多くなされてきた。その点に関しては本研究結果はかなり特異な場合であるといえよう。これは Endoxan そのものが生物学的、化学的に不活性化された、いわゆる transport form²³⁾ であり、放射線の電離あるいは励起作用、さらにそれらの作用によって水中に生成された反応物質がたまたま Endoxan を active form に導いたものであろうと考えられる。それはあたかも、生体内での肝臓における解毒作用あるいは代謝作用が不活性化型である Endoxan を逆に活性化することと類似している。この点については後に考察することにする。

I. 水溶液 Endoxan の活性化におよぼす放射線の作用機構について

稀薄溶液 Endoxan の場合の活性化は主として放射線の間接作用が働いていることが確かめられた。放射線の間接作用は一般に照射された水中に発生した遊離基および分子状生成物¹⁶⁾によるものと考えられている。実験 II (d) の結果に見られるように、照射緩衝液がたとえドライアイスに凍結保存されたとはいえ、約 3 時間経過した後もなお、かなり強力な Endoxan 活性化能を有していることより、単なる H \cdot や OH \cdot 等の遊離基のみではなく、長寿命の分子状生成物の作用がこの場合、主要な役割を果しているものと考えられ

る。なお、照射された結晶 Endoxan の効果 E' と照射された緩衝液に溶解して発現した Endoxan の効果 W' \cdot E を加えると、溶液 Endoxan 照射の場合の効果 (W \cdot E)' にほど近い値を示したが、実際には稀薄溶液に照射した場合の直接作用は結晶に照射した場合の直接作用より多少は少いはずである。すなわち、溶液 Endoxan 照射時の実際の直接作用による効果と、実験における間接作用による効果 W' \cdot E を加えた値は Fig. 5, (b) W' \cdot E + E' で表わされる効果よりは少なく、したがって、厳密には実験における照射緩衝液の、時間経過による Endoxan 活性化能の減少、すなわち間接作用の減少は見かけ上よりは多いと考える方が妥当であろう。しかし、それを考慮に入れてもなお、長寿命の分子状生成物の作用は意義のあるものと考えられる。

II. 放射線照射による活性化物質について

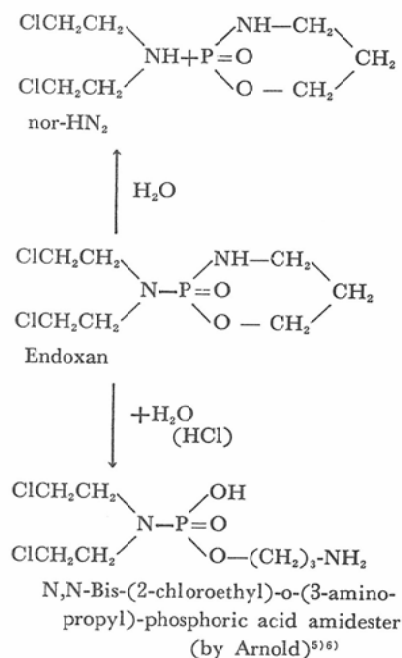
Endoxan は本来不活性であり、in vivo で活性化されてはじめて効果をあらわす特性を有することはすでに多数の報告によって周知の事実であるが、その生体内活性化は当初、Arnold^{23,27)} 等によって、腫瘍細胞中で酵素作用によって加水分解されるためであると推論されたが、その後の研究により、Foley¹¹⁾ 等が Endoxan の活性化は肝臓で起ると報告したのをはじめとして、Brock, Hohorst²⁹⁾ 等によって、活性化は主として肝臓で行なわれることが確認された。

さらに生体内活性物質の分離が Hohorst¹⁵⁾, 神崎¹⁹⁾²⁰⁾, 森田²¹⁾, 棚野²⁴⁾ 等によって試みられ、その性状が次第に明らかにされてきた。すなわち、活性物質としては、一部、Endoxan の加水分解生成物である nor-HN $_2$ (nor-Nitrogenmastard)⁵⁾ (Schema I) も生じるが (これとその分子内反応による N- β -chloroethylaziridine を主な活性物質とする説もある²⁸⁾), 主な活性物質は肝 microsome 中の TPNH の関与する酸化的過程による代謝産物であるといわれる。棚野²⁴⁾, 神崎²⁰⁾ 等は薄層クロマト法で、その主要活性物質を原点あるいはそれに近い部分に認めている。著者は棚野等の用いる薄層クロマト法によって照射 Endoxan よ

り活性物質の分離を試みたのであるが、今回は実験の都合上、照射線量の少ない Endoxan を用いた。

したがって、ごくわずかの活性物質しか生じていないと推定されるので、確言はできないが、本研究での主要な活性物質は原点附近に存在することが確かめられており、少なくとも Rf 値 0.8 附近に存在する nor-HN₂ とは異なる、しかも Endoxan が生体内で活性化されたときにできる物質に類似した構造を有しているのではないかと推論される。一方、この生体内活性物質と類似した性状を有するといわれる N, N-Bis-2 (chloroethyl)-o-(3-amino-propyl)-phosphoric acid amideter (Schema I) は塩酸の触媒的作用によって Endoxan の環状部分の amide 結合の加水分解的解離によって生じ得る物質であるが⁶⁾、これは Grunicke¹⁴⁾によれば、腫瘍細胞の解糖作用を阻止することにより、in vitro の実験でも、細胞増殖抑制効果を示すという。しかも、それは pH 6.0 の弱酸性で作用し、pH 7.4 ではもはや作用をあらわさないという。これに対して照射による活性物質は pH 7.2~7.4 の範囲でも充分効果を示し得る。この点から

Schema I



は両者は相違するものと考えられる。ただし、実験方法および実験対象の違いもあるため、推定の域を出ない。現段階では照射による活性物質についての詳細はいまだ研究途上にあり、その性状および生体内活性物質との関係あるいは作用機序、あるいはまた臨床面での応用方法等、今後検討すべき興味ある問題が多く残されている。

総括

1. 水溶液 Endoxan に放射線を大量照射したのちに、これを HeLa 細胞および *Escherichia coli* に投与すると、強い増殖抑制効果あるいは致死効果をあらわすことを発見した。

2. これは本来不活性な Endoxan が放射線によって活性化されたためであることを確認した。

3. 照射による Endoxan の効果増強は稀薄な溶液であるほど強くあらわれる(稀釈効果)。また結晶 Endoxan の照射による活性化と比べると、溶液 Endoxan の場合の方が極めて強い。一方、実際に照射された水による非照射 Endoxan の活性化によって、間接作用を定量的に証明した。

したがって、溶液 Endoxan の場合、その活性化は主として放射線の間接作用によることが結論できた。

4. 放射線照射溶液 Endoxan から活性物質を分離した。これは単なる Endoxan の加水分解生成物とは異なる未知の物質であることを確認した。

5. 分裂停止した *E. coli* の致死効果を指標とした実験より、Endoxan の細胞致死作用には細胞が成長期にあることが必要条件ではないことが証明された。

6. 最後に、単なる緩衝液でも大線量照射されると、ある期間は細胞傷害作用をあらわし得る事実もまた無視できない。

稿を終るに当って、終始御指導と御校閲を賜った恩師立入弘教授並びに放射線基礎医学講座近藤宗平教授、更に当教室吉井義一講師に深く感謝いたします。また、実験に当って、種々御助言と御協力を戴いた放射線基礎医学教室員各位、特に猪尾和弘氏、塩野義研究所峰下鏡雄、羽野義博両博士、岩田豪氏、日本放射線高分子研究所松田光司、高垣虎雄両氏、更に当教室員各位に感謝の意を

表明します。

(本研究は一部第25回日本医学放射線学会総会(鹿児島)において発表した)。

文 献

- 1) Alper, T.: Discussions of the Faraday Society. Radiation Chemistry, 234, 1952.
- 2) Arnold, D. und Bourseaux, F.: Angew. Chem., 70 : 539, 1958.
- 3) Arnold, D. und Bourseaux, F.: Naturwissenschaften, 45 : 64, 1958.
- 4) Arnold, H., Bourseaux, F. and Brock, N.: Nature, 181 : 931, 1958.
- 5) Arnold, H. und Klose, H.: Arzneim. Forsch., 11 : 159, 1961.
- 6) Arnold, H. und Bourseaux, F.: Arzneim. Forsch., 13 : 927, 1963.
- 7) Brock, N.: Arzneim. Forsch., 8 : 1, 1958.
- 8) Brock, N. und Hohorst, H. J.: Naturwissenschaften, 49 : 610, 1962.
- 9) Brock, N. und Hohorst, H. J.: Arzneim. Forsch., 13 : 1022, 1963.
- 10) Cancer Chemotherapy National Service Center. New Agent Summaries. Cancer Chemotherapy Rep., 3 : 21, 1959.
- 11) Foley, G.E., Friedman, O.M. and Drolet, B.P.: Cancer Research, 21 : 57, 1961.
- 12) 蒲生鉄男, 吉村彰介, 牧野利雄, 吉井義一: 日本医学放射線学会総会(鹿児島)において発表, 1966.
- 13) Gey, G.O., Coffman, W.D. and Kubicek, M.T.: Cancer Research, 12 : 264, 1952.
- 14) Grunicke, H., Liersch, M., Holzer, H. und Arnold, H. Biochem. Pharmacol., 14 : 1485, 1965.
- 15) Hohorst, H.J., Ziemann, A. und Brock, N.: Arzneim. Forsch., 15 : 432, 1965.
- 16) 本城市次郎, 崔英哲: 基礎放射線生物学, 119, 1966.
- 17) Katsuta, H., Endo, H., Takaoka, T. and Oishi, Y.: Jap. J. exp. Med., 27 : 243, 1957.
- 18) Kondo, S. and Kato, T.: Photochem. and Photobiol., 5 : 827, 1966.
- 19) 神崎五郎, 寺沢敏夫, 福井務, 青木行俊, 田中元, 日下部博, 土井修, 高井新一郎, 高木英幸: 第24回日本癌学会総会記事, 318, 1965.
- 20) 神崎五郎, 青木行俊, 日下部博: 癌の臨床, II 基礎編, 73, 1966.
- 21) 森田実, 岩田豪, 棚野義博, 峰下鏡雄: 第24回日本癌学会総会記事, 320, 1965.
- 22) Parker, R.C.: Methods of tissue culture. 3 Ed. Haerber Inc. N.Y., 113, 1961.
- 23) Rauen, H.M. und Dirschka, U.: Arzneim. Forsch., 14 : 159, 1964.
- 24) 棚野義博, 岩田豪, 峰下鏡雄: 日本薬理誌, 62 : 152, 1966.
- 25) Witkin, E.M. and Theil, E.C.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 46 : 226, 1960.
- 26) Witkin, E.M., Sicurella, N.A. and Bennett, G.M.: Proc. Natl., Acad. Sci. U.S., 50 : 1055, 1963.