小核試験感度増強に与える Ca^{2+} 拮抗剤の影響について

Enhancement of the Sensitivity of the Micronucleus Test by Calcium Antagonist

東京慈恵会医科大学公衆衛生学教室

鈴木 勇 司・益 頭 尚 典・長 嶋 敏 晴・清 水 英 佑

Yuji Suzuki, Naonori Mashizu, Toshiharu Nagashima and Hidesuke Shimizu

Department of Public Health, The Jikei University School of Medicine, Tokyo

In vitro and *in vivo* short term mutagenicity tests are widely used for screening environmental and industrial chemicals for carcinogenic potential. It is necessary to evaluate chemical carcinogens with the *in vivo* mutagenicity test system because of the difficulty of extrapolating the results of *in vitro* mutagenicity tests to human beings. But the *in vivo* mutagenicity test system has a low sensitivity for screening carcinogenic potential compared with the *in vitro* test.

The *in vivo* micronucleus test developed by Schmid is commonly used because of its simplicity, reproducibility, and economic return. We have tried to modify this test to elevate its sensitivity.

Verapamil is a calcium antagonist administered to patients with heart disease. It is known that verapamil has the ability to increase the permeability of the cell membrane. It is important that mutagens reach the DNA strands through the cell membrane in order to induce mutagenic changes of cells.

The aim of this study is to investigate the effects of a calcium antagonist on the sensitivity of *in vivo* and *in vitro* micronucleus tests using vincristine as a mutagen.

In the *in vivo* micronucleus test, both single and consecutive administration of verapamil showed a dose-response relationship between the dose of verapamil or vincristine and the incidence of micronucleated polychromatic erythrocytes (MPCE). However, there were no significant differences in MPCE incidence between single and consecutive administration of verapamil.

On the other hand, in *in vitro* micronucleus test, the longer the incubation time of vincristine and verapamil with cultured bone marrow cells, the higher the MPCE induction rates. The dose-response relationship between the incidence of MPCE and the concentration of verapamil or vincristine was also observed in the *in vitro* micronucleus test.

This present study suggests that the sensitivity of the micronucleus test can be increased by verapamil, a calcium antagonist.

Key words: Micronucleus test, Verapamil, Vincristine, Erythrocyte
小核試験, ベラパミル, ビンクリスチン, 赤血球

緒 言

近年我国における癌による死亡率は増加しており、1981年以来死因の第1位を占めている¹⁾。部位別死亡率からみると、特に肺癌、結腸・小腸癌、脾臓癌の増加が顕著である。その原因としては、(1) 大気汚染^{2,3)} や喫煙習慣による肺癌 (2) 天然物を含め食品中に存在する突然変異原物質(発癌性と密接な関係がある)。さらに、魚

や肉を焼いたときに生ずる発癌物質の存在 (3) 塩分のとりすぎと胃癌の発生 (4) アルコールの飲み過ぎと食道癌の発生等が指摘されている¹⁾。

このような状況のもとで、発癌物質を動物を用いた長期発癌実験によらずに短期試験法により検出することが第1次予防の観点から公衆衛生的にも重要と考える。1975年にカリフォルニア大学の Ames 教授らによって開発されたサルモネラ菌を用いた突然変異原性試験法

(Ames test)⁴⁾ は、発癌と密接な関係にある変異原物質を感度よく検出できるということから現在広く用いられており、多くの物質の有害性が評価されてきた。

しかし、Ames test は細菌を用いた *in vitro* の試験系であり、この試験結果を直ちにヒトへの発癌性に外挿することには問題がある。このギャップを埋める試験系として原核細胞でなく哺乳動物やヒトの細胞を用いる系や、*in vivo* の系が適当といえる。このような目的から、*in vivo* 小核試験が動物個体をそのまま用いる試験系であり、かつそれらの中では検出感度が高いことから評価されてきた。しかし、突然変異原性試験としての *in vivo* 小核試験は Ames test と比較すると変異原物質を検出する感度の点で低いことが問題となっている。そこで我々は、*in vivo* 小核試験による変異原物質の検出感度を高めるために、被験物質の代謝活性化の面から polychlorinated biphenyl 前処置法および S9 法を行い感度を高めることに成功した⁵⁾。さらに、*in vivo* では被験物質の毒性や骨髓細胞への到達性の問題を解決するために培養骨髓細胞を用いての *in vitro* 小核試験法を開発し、Ames test とほぼ同等の検出感度を得るとともに、Ames test で検出出来なかった抗癌剤等も陽性となる結果を得た⁶⁾。今回は、細胞膜の透過性への影響という面から *in vivo* および *in vitro* 小核試験の検出感度を高める試みを行った。すなわち、*in vivo* および *in vitro* 小核試験において変異原物質がその作用を発現するには、赤芽球の細胞膜を容易に通過するか、通過した物質が細胞外に出にくくなることによって染色体に影響を与えるのに十分な細胞内濃度になることが重要である。したがって、変異原物質の細胞内濃度を高めることができれば、*in vivo* および *in vitro* 小核試験による変異原物質の検出感度を増強できると考えられる。そこで、我々はカルシウムに対して拮抗作用を示す verapamil (5-[(3, 4-dimethoxyphenethyl) methylamino]-2-(3, 4-dimethoxyphenyl)-2-isopropyl valenonitrile hydrochloride) を用いて、vincristine の小核誘発頻度に与える影響を検討したので報告する。

方 法

1. 動 物

実験に使用した動物は BALB/c AnNCrj 雄マウス (6 週齢、体重 25 g) で Charles River Japan より購入した。

2. 試薬類

実験に用いた試薬類は verapamil (エーザイより供与された)、vincristine (塩野義製薬)、fetal bovine serum

(GIBCO)、May-Grünwald 染色液 (Merk) および Giemsa 染色液 (Merk) である。

3. *In vivo* 小核試験

水に溶解した 3 段階の濃度の verapamil (50, 25, 12.5 mg/kg) をそれぞれ 1 回又は 24 時間ごとに 3 回マウス腹腔内に投与した。Verapamil の最終投与時にさらに生理食塩水に溶解した vincristine (0.01, 0.02 および 0.03 mg/kg) を腹腔内にそれぞれ 1 回投与した。Vincristine を投与してから 30 時間目にマウスを頸椎脱臼屠殺し、大腿骨を摘出した後両端を切断し、近位端より 1 ml 注射器を用いて 0.2 ml の fetal bovine serum で骨髓細胞を洗い出した。対照群としては、verapamil のみを投与した群および verapamil を投与しないで vincristine のみを投与した群をもうけた。

4. *In vitro* 小核試験

我々が開発した *in vitro* 小核試験⁶⁾ を一部改変して以下のごとく行った。マウス大腿骨より得た骨髓細胞を 6×10^7 cells/ml となるように mixed medium に浮遊し、この浮遊液に verapamil が 5, 3, 1, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度ごとに vincristine が 0.01, 0.02, 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 含まれるように調製した後、0.5, 2 および 6 時間振盪培養してから、遠心洗浄して verapamil と vincristine を除く。その後、骨髓細胞を mixed medium に再浮遊し炭酸ガス培養器中で 30 時間培養した。また、骨髓細胞浮遊液中に verapamil および vincristine を含んだまま 35 mm プラスチックシャーレ中で 30 時間培養した群も設けた。

対照群として、骨髓細胞に verapamil のみを作用させた群、vincristine のみを作用させた群および無処置群をもうけた。

5. 標本の作製方法および結果の判定

それぞれの実験で得られた骨髓細胞は遠心洗浄後 Schmid⁷⁾ の方法に準じて塗抹標本を作製した。標本は、十分乾燥した後に May-Grünwald Giemsa 染色を施した。結果の判定は、光学顕微鏡にて 1 枚のスライドグラスあたり多染性赤血球 (PCE) を 1000 個 (*in vivo* 小核試験) または 500 個 (*in vitro* 小核試験) を数え、そこに存在する小核を有した多染性赤血球 (MPCE) の割合を求めた。有意差検定は χ^2 検定法を用いた。

結 果

In vivo 小核試験

Verapamil の投与量決定に際して、まず verapamil を 100, 75, 50, および 25 mg/kg の各投与量で各群 10 匹の

マウス腹腔内にそれぞれの濃度を 1 回投与した。その結果 1 週間以内に死亡したマウスは各々 10, 5, 0, 0 匹であったので 50 mg/kg を最高投与量として *in vivo* 小核試験を実施した。また verapamil それ自身には 50 mg/kg を 1 回および 3 回投与しても MPCE 誘発能は認められなかった。

In vivo 小核試験で行った verapamil の vincristine に対する MPCE 誘発頻度への影響を Table 1 および Table 2 に示した。小核誘発物質として用いた vincristine の投与量は、そのみをマウスに投与した場合に、

MPCE を誘発しないかまたはごくわずかに誘発する量で行った。Verapamil を 1 回投与した場合には vincristine の投与量が 0.01, 0.02 および 0.03 mg/kg の場合ともに verapamil の投与量の増加に伴って MPCE の出現頻度が高くなった。また, verapamil の 3 段階それぞれの濃度において vincristine の投与量と MPCE 誘発頻度との間に量-反応関係が認められた。特に, verapamil の投与量が 50 mg/kg の時 vincristine が 0.03 mg/kg で MPCE の誘発頻度は 3.15% となり最も高い値を示した (Table 1, Fig. 1)。Verapamil を 3 回前投与した場合

Table 1 *In vivo* micronucleus test. Incidence of micronucleated polychromatic erythrocytes (MPCE) induced by the injection of vincristine after a single administration of verapamil.

Verapamil (mg/kg)	Vincristine (mg/kg)	Number of mice	MPCE (%)
50	0.03	3	3.15*
	0.02	3	1.93*
	0.01	3	0.60
25	0.03	3	1.40
	0.02	3	0.93
	0.01	3	0.60
12.5	0.03	3	1.27
	0.02	3	1.07
	0.01	3	0.30
0	0.03	3	1.27
	0.02	3	0.60
	0.01	3	0.30
0	0	20	0.21

*: $p < 0.05$.

Fig. 1 *In vivo* micronucleus test. Incidence of micronucleated polychromatic erythrocytes (MPCE) by the injection of vincristine (VCR) after a single administration of verapamil.

Table 2 *In vivo* micronucleus test. Incidence of micronucleated polychromatic erythrocytes (MPCE) induced by the injection of vincristine. Verapamil was injected 3 times before administration of vincristine.

Verapamil (mg/kg)	Vincristine (mg/kg)	Number of mice	MPCE (%)
50	0.03	3	2.60*
	0.02	3	1.70*
	0.01	3	1.27*
25	0.03	3	1.33
	0.02	3	1.07*
	0.01	3	1.10*
12.5	0.03	3	1.13
	0.02	3	0.93
	0.01	3	0.60
0	0.03	3	1.27
	0.02	3	0.60
	0.01	3	0.30
0	0	20	0.21

*: $p < 0.05$.

には verapamil を 1 回投与した時とほぼ同様の傾向を示すとともに、両者の小核誘発頻度にはほとんど差は認められなかった (Table 2)。

In vitro 小核試験

In vitro 小核試験に用いた verapamil の濃度はそれ自身では骨髓細胞に強い毒性を示さない濃度、すなわち培養液中濃度が $5 \mu\text{g/ml}$ 以下で行った。さらに verapamil 自身の変異原性は、*in vitro* 小核試験において -S9mix (代謝活性化系を加えない場合) および +S9mix (代謝活性化系を加えた場合) において認められなかった。Vincristine は、そのみでは小核を誘発しない $0.03 \mu\text{g/ml}$ 以下の濃度を用いた。

まず、*in vitro* 小核試験において骨髓細胞に verapamil と vincristine を接触させる時間が小核形成に及ぼす影響について検討した。Verapamil の濃度を $5 \mu\text{g/ml}$ および vincristine の濃度を $0.02 \mu\text{g/ml}$ に設定した上で、シャーレ中で骨髓細胞に接触させる時間を 0.5, 2, 6, および 30 時間とした場合の MPCE 誘発頻度を求めた。その結果、0.5 時間では MPCE が 0.8 % となったが 30 時間ではさらに 1.5 % を示し、接触時間が長いほど高くなる傾向を示した (Fig. 2)。そこで、verapamil と vincristine を同時に骨髓細胞に接触させる時間として 0.5 時間と 30 時間の 2 点を取り MPCE 誘発頻度の差異

Fig. 2 Effects of different incubation times on the MPCE frequency induced by treatment of vincristine in the presence with verapamil. ●—● : vincristine ($0.02 \mu\text{g/ml}$) + verapamil ($5 \mu\text{g/ml}$), ○—○ : vincristine ($0.02 \mu\text{g/ml}$).

を比較検討した。Table 3 は接触時間が 0.5 時間の場合である。Vincristine の濃度が $0.01 \mu\text{g/ml}$ の場合 verapamil のいずれの濃度でも MPCE の誘発は認められない。しかし、verapamil が $5 \mu\text{g/ml}$ の時 vincristine が

Table 3 *In vitro* micronucleus test. Effects of verapamil treatment on the MPCE frequency induced by the treatment with vincristine —(Incubation for 0.5 hr.)—.

Verapamil ($\mu\text{g/ml}$)	Vincristine ($\mu\text{g/ml}$)	Number of PCE counted	MPCE (%)
5	0.03	1500	1.47*
	0.02	1500	0.80
	0.01	1500	0.47
3	0.03	1500	1.13
	0.02	1500	0.80
	0.01	1500	0.40
1	0.03	1500	0.93
	0.02	1500	0.40
	0.01	1500	0.47
0.5	0.03	1500	0.67
	0.02	1500	0.53
	0.01	1500	0.53
0	0.03	1500	0.73
	0.02	1500	0.60
	0.01	1500	0.33
0	0	4500	0.53

*: $p < 0.05$. Bone marrow cells were incubated with vincristine in the presence of verapamil for 0.5 hr. PCE: polychromatic erythrocytes, MPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes.

0.02 $\mu\text{g/ml}$ では0.8%と増加傾向を示し, 0.03 $\mu\text{g/ml}$ では1.47%と明らかに有意な ($p < 0.05$) MPCE 誘発能の亢進が認められた。さらに, verapamil の4段階の各濃度において vincristine の濃度と MPCE 誘発頻度との間に量-反応関係を示す傾向が認められた。Table 4 は接触時間が30時間の場合で, verapamil の濃度が5 $\mu\text{g/ml}$ の時 vincristine の濃度が0.01, 0.02および0.03 $\mu\text{g/ml}$ で小核を有した PCE の割合はそれぞれ0.67, 1.47および1.87%となり0.5時間よりも強い小核誘発能亢進が認められた。30時間での verapamil 3 $\mu\text{g/ml}$ と0.5時間での verapamil 5 $\mu\text{g/ml}$ がほとんど同じ値を示した。また0.5時間の場合と同様に verapamil の濃度と MPCE 誘発頻度との間に量-反応関係が認められた。

考 察

環境汚染物質あるいは工業化学物質を細胞の突然変異原性を指標として検出するための短期試験法が数多く知られている。しかし, *in vitro* の試験方法と比較して *in vivo* の試験方法は, 感度が低いために現在のところ主に

in vitro の試験系が主流となっている。最近, *in vitro* の試験で強い陽性を示す物質に対して動物を用いた発癌実験によらずに, 簡便で短期間で結果が得られ経済的でもある短期試験方法の必要性がいわれて来た。このような条件を満たす試験系の1つとして Schmid により開発された小核試験がある。この試験法は, *in vitro* の試験系と異なり *in vivo* の系であるという大きな特徴がある。しかし, 検出感度の点で充分満足できるものではなかった。そこで我々は, これまでに *in vitro* 小核試験法の開発も含めて, 小核試験の検出感度を高めるため種々の試みを行ってきた。今回は, 小核を誘発するためには赤芽球系の細胞内に十分量的の変異原物質が入り込むことが重要であるという考えから, カルシウムに対して拮抗作用を示し, かつ, 膜の透過性に影響を与える物質 (膜作用物質と略) の1つである verapamil を用いて小核を有する多染性赤血球 (MPCE) 誘発頻度にあたえる影響を検討した。

In vivo 小核試験において verapamil を1回および3回投与した場合, ともに verapamil の投与量と MPCE

Table 4 *In vitro* micronucleus test. Effects of verapamil treatment on the MPCE frequency induced by the treatment with vincristine —(Incubation for 30 hrs.)—.

Verapamil ($\mu\text{g/ml}$)	Vincristine ($\mu\text{g/ml}$)	Number of PCE counted	MPCE (%)
5	0.03	1500	1.87*
	0.02	1500	1.47*
	0.01	1500	0.67
3	0.03	1500	1.47*
	0.02	1500	0.90*
	0.01	1500	0.47
1	0.03	1500	0.80
	0.02	1500	0.40
	0.01	1500	0.53
0.5	0.03	1500	0.80
	0.02	1500	0.33
	0.01	1500	0.40
0	0.03	1500	0.33
	0.02	1500	0.33
	0.01	1500	0.60
0	0	4500	0.54

*: $p < 0.05$. Bone marrow cells were incubated with vincristine in the presence of verapamil for 30 hrs. PCE: polychromatic erythrocytes, MPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes.

誘発能および vincristine の投与量と MPCE 誘発能の間に量—反応関係が認められたが、1 回投与と 3 回投与との間に MPCE 誘発頻度の有意な差異は認められなかった。これは、前もって verapamil を投与しておいてもその効果は小さいものとする。In vitro 小核試験においても骨髓細胞と verapamil および vincristine が接触している時間が長いほど、MPCE 誘発能が強くなるという結果を得た。これら、in vivo および in vitro 小核試験の知見から、vincristine が verapamil の共存のもとに骨髓細胞に長時間接触していることが、MPCE を誘発しやすくするものとする。特に多染性赤芽球から多染性赤血球に分化する全経過を通じて⁸⁻¹⁰⁾、常に verapamil に接触することが MPCE をより多く誘発するために必要な要因と考えられる。

一方、癌の治療においても抗癌剤の効果を高めるために細胞膜に作用し、膜の透過性に影響を与える物質を併用投与する試みがなされている。鶴尾¹¹⁾は、verapamil が vincristine の P388 leukemia に対する制癌効果を増強することを報告し、そのメカニズムとして(1) vera-

pamil が vincristine-マイクロチューブルの結合を強める、(2) vincristine の細胞内への influx を上昇させる、(3) vincristine の細胞外への efflux を阻害する、の 3 つの可能性を考えた上で verapamil が細胞内の vincristine の濃度を上昇させるメカニズムとして(1)と(2)の可能性を否定し、(3)の仮説を立証するとともに、vincristine の制癌作用は verapamil 共存のもとに増強されることを明らかにした。In vivo および in vitro 小核試験の結果を解釈する上で、verapamil が vincristine の細胞外への流出を阻害するという理論にあてはめるとよく説明できる。Verapamil は P388 leukemia に対しても、また骨髓細胞に対しても vincristine の紡錘体機能傷害作用を助長し、その作用機作は同様であると考えられる。

Verapamil の他にも、制癌剤の効果を増強するために膜作用物質を用いた報告が多く見られる¹²⁻¹⁵⁾。すなわち amphotericin B, vitamine A, ouabain, phloridzin, oligomycin, dibucaine, diphenhydramine, persantin, pimaricin, filipin および pentamycin 等の膜作用物質は vinblastine, 6-mercaptopurine, 5-fluorouracil,

chromomycin A₃, bleomycin 等の制癌剤が癌細胞の染色体や紡錘体に対する作用を助長し、すぐれた抗腫瘍効果を発揮させている¹⁰⁾。

Ames test においても *S. typhimurium* TA100 や TA98 等のような菌体表面上にある糖脂質が部分欠如 (*rfa*) した突然変異株を用いて、正常の細胞壁では通過しないような大きな分子量の物質 (例えば benzo(a)-pyrene) が菌体内に入ることを容易にし、変異原物質の検出感度を高めている。

こうしたことから、*in vivo* および *in vitro* 小核試験における変異原物質の検出感度を高める方法の一つとして、骨髓細胞中の変異原物質の濃度を上げてやるのが考えられる。すなわち、膜作用物質等を用いて変異原物質が細胞膜を透過しやすくするとともに、細胞外に流出することを阻止すれば良いことになる。今回用いた膜作用物質は verapamil の 1 物質だけであるが、他の膜作用物質も *in vivo* および *in vitro* 小核試験の検出感度を増強できる作用を持つと考えられる。

膜作用物質の中にはカルシウム拮抗剤として心臓疾患の治療に用いられているものもあり、この医薬品を服用することにより環境中の未知の発癌物質の暴露を受けたり、あるいは喫煙や大気汚染物質、さらには産業現場での有害物質の暴露による影響を助長する可能性が考えられる。

ま と め

突然変異原物質検出法の 1 つである *in vivo* および *in vitro* 小核試験法にカルシウムに対する拮抗作用を示す物質 (膜作用物質) として知られている verapamil を応用したところ以下の結果を得た。

1) *In vivo* 小核試験

Verapamil を 1 回または 3 回投与した場合、ともに verapamil の投与量と MPCE 誘発頻度および vincristine の投与量と MPCE 誘発頻度の間に量一反応関係が認められたが、1 回投与と 3 回投与との間に著名な MPCE 誘発頻度の差は認められなかった。

2) *In vitro* 小核試験

Vincristine が verapamil の共存のもとに骨髓細胞に接触している時間が長い程 MPCE 誘発頻度が高かった。*In vivo* 小核試験と同様に verapamil または vincristine の投与量と MPCE 誘発頻度の間に量一反応関係が認められた。

以上の結果より、膜作用物質 (verapamil) を小核試験に応用することで変異原物質検出感度を増強させること

ができた。

(本研究の要旨は第56回日本衛生学会総会において発表した)。

文 献

- 1) 末 恵一：がんの統計, p 2~39, がんの統計編集委員会, 東京 (1982)。
- 2) Pott, F., Tomingas, R. and Misfeld, J.: In "Air Pollution and Cancer in Man", (Editors: U. Mohr, D.S. Schmähl, L. Tomatis and W. Davis), p. 79-87, International Agency for Reserch on Cancer, Lyon (1977)。
- 3) 清水英佑：大気中の変異原活性の現状, トキシコロジーフォーラム, **6**, 324-334, (1983)。
- 4) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **31**, 347-364 (1975)。
- 5) 鈴木勇司：高感度小核試験の開発に関する研究 (第 1 報) Polychlorinated biphenyl による誘導ならびに代謝活性化による方法, 慈恵医大誌, **100**, 695-705 (1985)。
- 6) 鈴木勇司：高感度小核試験の開発に関する研究 (第 2 報) 培養骨髓細胞を用いた *in vitro* の方法, 慈恵医大誌, **100**, 707-719 (1985)。
- 7) Schmid, W.: In "Chemical Mutagenesis. Principles and Methods for Their Detection, Vol. 4", (Editor: A. Hollaender), p. 31-53, Plenum, New York (1976)。
- 8) Heddle, J.A. and Salamone, M.f.: In "Short Term Tests for Chemical Mutagens", (Editor: H.F. Stich), p. 243-249, Springer-Verlag, Berlin, New York (1981)。
- 9) Adler, I.-D.: In "Mutagenicity Testing. A practical approach", (Editors: S. Venitt and J.M. Parry), p. 298-306, IRL Press, Oxford, Washington D.C. (1984)。
- 10) Cole, R.J., Taylor, N., Cole, J. and Arlett, C.F.: Short-term test for transplacentally active carcinogens. I. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts, *Mutat. Res.*, **80**, 141-157 (1981)。
- 11) Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Overcoming of vincristine resistance in P388

- leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil, *Cancer Res.*, **41**, 1967-1972 (1981).
- 12) Medoff, J., Medoff, G., Goldstein, M., Schlessinger, D. and Kobayashi, G.S.: Amphotericin B-induced sensitivity to actinomycin D in drug-resistant HeLa cells, *Cancer Res.*, **35**, 2548-2552 (1975).
- 13) Akiyama, S., Komiyama, S. and Kuwano, M.: Synergistic effect of vitamin A and fusidic acid on HeLa cells in vitro, *Gann*, **70**, 709-713 (1979).
- 14) Riehm, H. and Biedler, J.: Potentiation of drug effect by Tween 80 in chinese hamster cells resistant to actinomycin D and daunomycin, *Cancer Res.*, **32**, 1195-1200 (1972).
- 15) 桑野信彦：ポリエチレン系抗生剤と制がん剤との併用増強の試み, *癌と化学療法*, **8**, 681-688 (1981).
- 16) Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173-215 (1983).
- (受付 1986年11月17日 受理 1987年1月13日)