膀胱癌の Cell kinetics に関する研究

III. Thio-TEPA 投与後にみられる細胞周期の変化と

その殺細胞効果に及ぼす影響

加 藤 哲 郎
石 川 清
根 本 良 介

秋田大学医学部泌尿器科学教室
(主任: 土田正義教授)

CELL KINETICS OF THE BLADDER CARCINOMA

III. Changes of the Cell Cycle Following Thio-TEPA Treatment and Possible
Factors for Kinetics of Cell Killing in Cultured Human
Bladder Carcinoma Cells

Tetsuro Kato, Kiyoshi Ishikawa and Ryosuke Nemoto

Department of Urology, Akita University School of Medicine

The cell cycle of MGH-UI cells, a cultured human bladder carcinoma cell line, were analyzed at various time points after the treatment with static dose of Thio-TEPA. Immediately after the treatment T_C (cell cycle time) prolonged by 32% of the untreated control, with a main effect in S phase. Forty-eight hours later, that was an interval shorter than 2 cell cycle time, T_C and T_S reduced to approximately the same level as the control. However, T_{G_1} was shorter and T_{G_2} was longer as compared to the corresponding values of the control, indicating a slight accumulation of G_2 cells in the cell cycle. Re-exposure at this time point to a high concentration of the agent, which was equal to cidal dose for the untreated cells, induced a regrowth of the cells.

The experimental results indicate that Thio-TEPA retains a certain sensitivity on the cell cycle phases and suggest that G_2 and G_1 keep a crucial role for kinetics of cell killing by the agent.

緒 言

著者らは2系列の培養ヒト膀胱癌細胞 MGH-U 1 と T_{24} の細胞周期を解析した結果, 両者はほぼ同じ細胞周期パラメーター (T_C) asym, corr $\div$ 26hr) をもつことを報告した¹⁾. ついで膀胱注入療法によく使用される Thio-TEPA (Triethylene Thiophosphoramidate, TTPA) の MGH-U 1 細胞に対する効果を検討したところ, temporarily static dose である TTPA 10 μ g/ml/2hr によって細胞周期が明らかに延長し, とくに S phase (DNA 合成期) の延長が著しいことを認めた²⁾. TTPA 投与直後に生じた細胞周期の延長が時間の経過とともにどのような変化を示すのか, またこのような細胞動態の変化がこの細胞の生物学的態度にいかなる影響を及ぼすのか興味もたれた. 制癌剤の投与方法にとつても重要な事柄と考えるので, 以下の実験を行なった.

材料ならびに方法

1972年以来継代培養されているヒト膀胱癌細胞 MGH-U 1 を実験対象とした. 培養は10% FCS 添加 McCoy 培地を用い, 37°C, 95%空気, 5% CO₂ の条件下で行なつた. 細胞周期の解析のためには径12mm の円形カバーガラス上に $5 \sim 8 \times 10^3$ の細胞を接種し, 3日後の log phase に実験を開始した. 実験群を3つに分け (1) TTPA 10 μ g 投与直後 (TTPA), (2) TTPA 10 μ g 投与48時間後 (TTPA single) ならびに, (3) TTPA 10 μ g 投与48時間後に再び TTPA 10 μ g を投与して (TTPA double) 各々の細胞周期を解析した. TTPA の培地内濃度は10 μ g/ml, 細胞への接触時間は2時間で, これは既報の如く MGH-U 1 細胞にとつて temporarily static dose である. Dipping 法による autoradiography から2

時間毎の Fraction of Labeled Mitoses (FLM) を求め、これより得た FLM 曲線を Mendelsohn and Takahashi の asymmetry method³⁾ によつて解析した。これら実験方法の詳細は既報の通りである¹⁾。一方、細胞周期の解析から得た情報をもとにしてカバーガラスまたはプラスチック皿 (Falcon) に培養した細胞に対し、種々の条件で TTPA を投与して trypan blue exclusion 法によつて生細胞数を算出した。TTPA 濃度は static dose である $10\mu\text{g/ml/2hr}$ と, cidal dose である $100\mu\text{g/ml/2hr}$ とし、また投与間隔は12時間と48時間とし、これらを組み合わせた実験系をつくつた。また光顕標本として酢酸エタノールで固定した細胞を、0.1% toluidine blue (pH 4) で染色した。

細胞周期パラメーター G_1 は DNA 合成前期, S は DNA 合成期, G_2 は合成後期, M は分裂期の如く各々の cycle phase を意味する。Ti はパラメーター i の経過時間 transit time を示し、例えば Tc は細胞周期 (世代) 時間を、また Ts は S phase の時間のことである。また S 細胞あるいは G_2 細胞等は、S phase あるいは G_2 phase にある細胞を意味する。

成 績

培養3日目の未処置細胞 (control) と TTPA $10\mu\text{g}$ 投与細胞の細胞周期については前報²⁾に記した通りであるが、ここでは参考のためにその解析結果を引用しておく。表1に示すように TTPA は Tc 34.7hr ($\rightarrow$ control 26.2hr, 以下同じ), Ts 12.0hr ($\rightarrow$ 8.2hr), $T_{G_2+0.7M}$ 4.1hr ($\rightarrow$ 3.6hr), $T_{G_1+0.3M}$ 18.6hr ($\rightarrow$ 14.4hr) とすべての phase の延長をもたらしたが、とくに S の変化が顕著であつた。

今回は TTPA $10\mu\text{g}$ 投与48時間後、すなわち培養5日目の細胞周期を解析したところ図1のような FLM 曲線が得られた。図にみるように TTPA 投与48時間を経過した細胞 (TTPA single) は control に近似した FLM 曲線を描き、薬剤投与直後にみられた細胞周期の延長が正常に復したようにみられた。図2の増殖曲線にみるよ

図1 培養5日目における MGH-U1 細胞の FLM 曲線。未処置 control 細胞 (—○—), 培養3日目に Thio-TEPA $10\mu\text{g/ml/2hr}$ を投与して48時間経過した細胞 (---●---) ならびに48時間後再び Thio-TEPA $10\mu\text{g/ml/2hr}$ を投与した細胞 (---×---) について同時に FLM を解析した。

図2 Thio-TEPA $10\mu\text{g/2hr}$ 重複投与後の MGH-U1 細胞の増殖曲線。投与間隔を12時間 (—▲—) と48時間 (—×—) に変えても、単一投与 (—●—) との間に差はない。矢印は薬剤投与時点を示す。

うに TTPA $10\mu\text{g}$ はこの細胞に対して約24時間の増殖抑制を来すが、投与48時間後には細胞は control と同じ

表1 培養3日目における MGH-U1 細胞の細胞周期 (asymmetry method による解析値)。() 内は Tc に対する各パラメーターの比率を示し、() * 内は Thio-TEPA $10\mu\text{g}$ 投与した場合の control に対する各パラメーターの比率を示す。

	Tc	Ts	$T_{G_2+0.7M}$	$T_{G_1+0.3M}$	CV
Control	26.2 hr (100%)	8.2 hr (31.2%)	3.6 hr (13.7%)	14.4 hr (54.9%)	34.3%
TTPA $10\mu\text{g}$	34.7 hr (100%) (+32.4%)*	12.0 hr (34.5%) (+46.3%)*	4.1 hr (11.8%) (+13.9%)*	18.6 hr (53.6%) (+29.1%)*	41.8%

表2 培養5日目における MGH-U 1 細胞の細胞周期解析結果. TTPA single は培養3日目に Thio-TEPA 10 μ g を投与した48時間後, また TTPA double は培養3日目と5日目の2回にわたって10 μ g を投与した細胞である. () 内は Tc に対する各パラメーターの比率, () * 内は control に対する比率を表す.

	T _c	T _s	T _{G2+0.7M}	T _{G1+0.3M}	CV
Control	21.9 hr (100%)	6.6 hr (30.1%)	3.6 hr (16.4%)	11.7 hr (53.4%)	32.7%
TTPA single	20.9 hr (100%) (- 4.6%)*	6.4 hr (30.6%) (- 3.1%)*	4.5 hr (21.5%) (+ 25.0%)*	9.9 hr (47.3%) (- 15.4%)*	31.8%
TTPA double	32.4 hr (100%) (+ 47.9%)*	10.2 hr (31.5%) (+ 54.5%)*	5.1 hr (15.7%) (+ 41.6%)*	17.1 hr (52.8%) (+ 46.1%)*	39.5%

増殖速度に回復する。すなわち FLM 曲線と増殖能の回復は時期的によく一致する成績となつた。FLM 曲線の解析結果は表2に示すように Tc 20.9hr ($\rightarrow$ 21.9hr, control) となり, 世代時間に関してはやはり control とほぼ同じレベルになつていた。しかしながら個々のパラメーターをみると, Ts は6.4hr ($\rightarrow$ 6.6hr) と control と同じ値であつたが, T_{G2+0.7M}は4.5hr ($\rightarrow$ 3.6hr) と control より約25%遅延し, 逆に T_{G1+0.3M}は9.9hr ($\rightarrow$ 11.7hr) と約15%短縮していた。T_Mは一般に1hr 内外と短く, 外界刺激による変化も少ないとされるので⁴⁾, T_{G1+0.3M}の変動は T_{G1}の変動を代表すると解釈することができ, また T_{G2}についても同様なことが推論される(以下同じ)。また TTPA 10 μ g を投与した細胞の Tc は34.7hr であるから(表1), 投与後48時間は薬剤の洗礼をうけた細胞集団が第2世代の途上にある時期に相当する。従つて TTPA 投与第2世代の細胞では細胞周期時間 Tc と Ts は control レベルにまで短縮しているが, T_{G2}は依然として遅延したままであり, T_{G1}はむしろ control より短縮した状態にあり, まだ薬剤の影響から完全に脱却していないと言える。

そこで TTPA 10 μ g 投与48時間後の細胞に再び同濃度の TTPA を投与して (TTPA double), 細胞動態を解析した。重複投与直後の FLM 曲線とその解析結果は図1と表2に示したようになり, 再び細胞周期の延長が観察された。Tc は32.4hr ($\rightarrow$ 21.9hr, control) となり, Ts 10.2hr ($\rightarrow$ 6.6hr), T_{G2+0.7M} 5.1hr ($\rightarrow$ 3.6hr), T_{G1+0.3M} 17.1hr ($\rightarrow$ 11.7hr) となつた。各パラメーターの control に対する延長度は大よそ40~55%で, 初回投与時(表1)と比較すると変化が大きく, かつ各パラメーター間の変化が均一化されているのが特徴である。しかし図2の増殖曲線から判断する限りでは, TTPA 10 μ g の重複投与は単一投与例と同様に1時的な static effect をもたらずのみであつた。重複投与の投与間隔を12hr と48hr

図3 Thio-TEPA 100 μ g/ml/2hr 投与後のMGH-U1細胞の増殖曲線. Thio-TEPA 10 μ g 投与48時間後に100 μ g投与すると, 生細胞数は一旦 exponential に減少するが, 2週間後にはコロニーを形成して再増殖する細胞が出現した(—●—)。↑は Thio-TEPA 10 μ g. ☆は100 μ g 投与の時点を示す。

に区分しても, 何ら差は認められなかつた。

次にあらかじめ TTPA 10 μ g を投与しておいてから, TTPA 100 μ g を投与する実験を行つた。TTPA 100 μ g/ml/2hr は培地を交換しないで培養を続けると, 当該細胞が約10日で全て死滅する cidal dose である²⁾。投与間隔は48時間(TTPA 10~100 μ g 48hr)と12時間(TTPA 10~100 μ g 12hr)としたが, 上述のように前者は TTPA 10 μ g 投与後に細胞が第2世代に入った時期, 後者は細胞がまだ第1世代にとどまっている時期に相当する。この実験では TTPA 10 μ g を単一投与した細胞 (TTPA 100 μ g, single) を treated control とした。図3にみるようにいずれの実験群でも細胞は exponential な細胞死

図4 Teio-TEPA 100 μ g 投与3週間後のコロニー形成能。左よりA—10 μ g 投与48時間後に 100 μ g 投与したもので、大小のコロニーをみる、B—12時間間隔で投与したものではコロニーはない、C—100 μ g を単一投与したものには少数の顕微鏡的コロニーがある。

図5 前図A, B, Cの光顕所見。Dは未処置細胞を示す。10 $\times$ 20, toluidine blue 染色。

A

B

C

D

に陥り、1週後には生細胞数は血球計算板で測定不能なレベルにまで減少した。しかしながら、ここで培地を5日毎に交換しながら培養を継続すると興味ある所見が得られた。すなわち TTPA 100 μ g 投与2週間になると TTPA 10~100 μ g 48hr 群に数コのコロニー形成細胞が出現し、コロニーの発育にともなつて20日後の生細胞数は 2.2×10^6 cells/dish にまで再び増殖した。これに対して TTPA 100 μ g single 群では3週間になつて1~2コのコロニーをもつたが、その多くはコロニー当りの細胞数が50以下でいわゆる visible colony ではなかつた。さらに TTPA 10~100 μ g 12hr 群では、コロニー形成細胞はついに観察されなかつた。図4は各実験群のコロニー形成能の肉眼的所見である。図5の光顕所見でも TTPA 10~100 μ g 48hr 群の細胞は総じて紡錘形を呈するが、増殖旺盛な形態をとりながらコロニーを形成することが明らかである。これに対して TTPA 100 μ g single 群では細胞の変性がかなり強くみられ、さらに TTPA 10~100 μ g 12hr 群では全ての細胞が完全に変性に陥つたままである。以上の成績は、TTPA 100 μ g 投与後の細胞の再増殖能 regrowing ability が TTPA 10~100 μ g 48hr $\gg$ TTPA 100 μ g single > TTPA 10~100 μ g 12hr の順となることを示している。

ここで TTPA 10~100 μ g 48hr 群に出現した再増殖細胞 regrowing cells を TTPA 100 μ g 投与3週間後に継代培養し、その増殖動態を検討した。図6の増殖曲線にみるようにこの再増殖細胞は未処置細胞に比較すると継代直後の lag が長く、また増殖速度も極めて緩慢であつた。しかし継代1週以降になると増殖速度は早まり、confluent cell sheet を作る傾向を示した。こうして継代した再増殖細胞に再び TTPA を投与してみたが、TTPA 10 μ g では増殖曲線上に何の変化も認められず、また TTPA 100 μ g は exponential な細胞死をもたらした。この成績は未処置細胞の場合と同一であり、この再増殖細胞が TTPA に対する耐性をもたないことを示している。一方、図7のように継代4日目の再増殖細胞について染色体分析を行なつたところ、染色体数は55~97に分布して未処置 control との差はなかつた。再増殖細胞の増殖能が低いため染色体分析に供された分裂期細胞は16コに過ぎず、モードは算出できなかつた。しかし染色体数分布図からみて、この再増殖細胞はクローン化された細胞系列ではないと言える。

考 按

制癌剤に関する従来の研究は主に薬剤の生化学的性質

図6 Thio-TEPA 10—100 μ g 48時間間隔投与後に生き残つた再増殖細胞の増殖曲線 (—○—) 増殖は緩慢だが、Thio-TEPA に対する反応は未処置細胞と変りない。

図7 染色体分析結果。上段の対照（染色体数70~97, モード85）に比較し、下段の Thio-TEPA 投与後の再増殖細胞の染色体分布（55~97）に差はない。

(薬理作用)を対象として行なわれてきた。しかし制癌剤の殺細胞様式 *kinetics of cell killing* は標的細胞の細胞動態によつて大きく左右されるものであり、効果的な化学療法を行なうには細胞動態の解明が重要な因子となる。一般に *cycling cell* (増殖系にある細胞) は *resting cell* (増殖能を内在するが実際には増殖していない細胞) よりも制癌剤に対する感受性が高いとされるが、その感受性は薬剤の種類によつても差があるとされている^{9,10)}。このようなことから Bruce ら⁹⁾は制癌剤を *cycle specific agents* と *cycle nonspecific agents* に分類し得ると考えた。その後 Skipper ら¹⁰⁾は *unbalanced growth* の概念¹⁰⁾と細胞周期の概念とを巧みに応用して、制癌剤を *cycle phase specific*, *self-limiting cycle phase specific* ならびに *cycle phase non-specific* の3種類に分類した。彼らはこの分類法に従えば適切な *dose schedule* をあらかじめ決定することができると想定して実験を行なつた。結果は必ずしも満足すべきものではなかつたが、従来の *at random* な投与法に比較すればはるかに良好な治癒率であつた。Skipper らの研究はまだ多くの点で不完全ではあるが、細胞周期の概念が実際に化学療法に応用できることを立証したことに大きな意義をもつものである。

アルキル化剤の *primary target* が DNA なのか、あるいは核蛋白なのかについてはまだ議論の余地が残されているが^{11,12)}、一般的に *polyfunctional alkylating agents* は DNA の *interstrand cross-linking* によつて強力な細胞障害効果を発揮すると説明される^{13,14)}。またアルキル化剤の殺細胞効果は *first-order kinetics* に従うと考えられ、これは薬剤濃度 (*concentration dependent*) と薬剤との接触時間 (*time dependent*) に比例して殺細胞効果が強くなることを意味する¹⁵⁾。たしかに高濃度のアルキル化剤を作用させると、あらゆる *cycle phase* の *cycling cell* ばかりでなく *resting cell* をも死滅させることができ^{9,16)}、その限りでは今日一般に考えられているようにアルキル化剤は *first-order kinetics* をもつた *cycle phase non-specific agent* と言うことができる。しかしながら細胞周期に関する近年の研究成果は、比較的低濃度を作用させた場合にアルキル化剤も細胞周期とは無関係ではないことを示すに至つた。すなわち *nitrosourea* は L 1,210 leukemia cell の S phase の遅延をもたらした^{18,19)}、また *nitrogen mustard*, TEM あるいは *nitrosourea* は *G₁ phase* と S phase にある H Ep cells の S phase から M phase への移行を遅延させるとい

う^{11,19)}。すでに著者らの一人加藤²⁰⁾も、ヒト膀胱細胞 MGH-U 1 が TTPA 投与後に細胞周期の延長を来し、ことに S phase が最も大きく遅延することを報告した。このように細胞周期とくに S phase の遅延は多くのアルキル化剤に共通してみられる効果であり、これは *cross-linking* によつて DNA double helix の分離が阻止された結果と解釈することができよう。

アルキル化剤によつて延長した細胞周期がその後どのように変化するものなのか、この点に関する研究はこれ迄報告されていなかった。今回の実験成績から、TTPA 10 μ g 投与48時間後には増殖曲線が未処置細胞と同じく *exponential* になり、同時に細胞周期時間と S phase も正常値に回復することが判明した。しかし $T_{G_2+0.7M}$ は4.5hr と control の3.6hr に比較して25%延長し、 $T_{G_1+0.3M}$ は9.9hr と control より約15%短縮していた。前にも述べたように T_M の変化は無視できるので、この場合は *G₂ phase* が延長し、*G₁ phase* が短縮しているとみなすことができる。また *growth fraction* が1.0に近い *log phase* 細胞集団では $T_i/T_c \approx N_i/N_c$ なる関係が成りたつ (N_c は総細胞数、 N_i は *i phase* の細胞数を表す)。従つて TTPA 投与48時間後すなわち第2世代の細胞集団では control に比較すると S 細胞は同数であるが、*G₂* 細胞は多く、*G₁* 細胞は少いことになる (表2)。これに対して TTPA 投与直後の第1世代の細胞集団では S 細胞がやや多く、*G₂* 細胞がやや少いが、しかし control との差は極めて僅かである (表1)。このように各々異なつた細胞周期パラメーターをもつ各世代の細胞集団に大量の TTPA を投与すると、TTPA 初回投与後第2世代の細胞集団にのみ *visible colony* を形成する少数の細胞が生き残つた。この第2世代細胞集団の特徴は前述の通り他に比べて *G₂* 細胞が多く、*G₁* 細胞が少い点にある。*G₂* 細胞は *nitrogen mustard*¹¹⁾, *nitrosourea*²¹⁾ あるいは *sulfur mustard*²²⁾ に対して感受性が低く、これに対して *G₁* 細胞と S 細胞は *nitrogen mustard* と *alkyl alkanesulfonates* に高い感受性を示す²⁰⁾と報告されている。著者らの実験でみられた再増殖細胞も、細胞周期の解析結果からみて TTPA 投与時に *G₂ phase* にあつた細胞に由来すると考えるのが妥当であろう。しかもそれが極めて高濃度の薬剤にも耐えて生き残つたことは、癌の化学療法にとつて大きな課題である。

化学療法の最終目標は腫瘍の完全治癒、すなわち全ての腫瘍細胞を死滅させることにある。しかし現状では唯一回の制癌剤投与で完全治癒を期待することは不可能で

あり、頻回にわたる薬剤投与が行われている。この際問題となるのは薬剤に対する耐性である。TTPA 処理後に出現した再増殖細胞の薬剤耐性について検討してみたが、幸いなことに耐性は認められなかった。また染色体数分布からみると、これらの細胞はクローン化した特殊な細胞系列でもなかった。但し今回の実験はまだ予備的な段階にあり、薬剤耐性に関しては今後種々の面から検討を加える必要があると考える。

結 語

培養ヒト膀胱 MGH-U 1 細胞に Thio-TEPA を投与し、細胞周期の変化を観察した。低濃度の薬剤投与によつて細胞周期時間が延長し、とくに S phase が著明に変化した。しかし G₂ phase は延長し、これに対して G₁ phase は短縮しており、G₂ 細胞の増加と G₁ 細胞の減少を示した。

未処置細胞にとつて致死量となる高濃度薬剤を、低濃度処理48時間後と12時間後の細胞に投与した結果、投与間隔48時間の場合にのみコロニー形成能をもつた再増殖細胞が出現した。この再増殖細胞は増殖速度が緩慢であったが、染色体分析ではクローンはみられず、また薬剤耐性も示さなかった。

細胞周期の解析を中心とした以上の成績から、Thio-TEPA がこの膀胱細胞の細胞周期に影響を与え、それが経時的に変化すること、またそれに伴つて薬剤の殺細胞効果も異なることを明らかにした。さらに殺細胞効果を左右する細胞周期パラメーターは G₂ と G₁ であり、G₂ 細胞の薬剤抵抗性が強いと考えた。

(本実験は伊藤誠子嬢の協力を得て行なつた。稿を終るにあたり謝意を表する。)

文 献

- 1) 加藤哲郎：日泌尿会誌, 67, 491, 1976.
- 2) 加藤哲郎：日泌尿会誌, 67, 497, 1976.
- 3) Mendelsohn, M.L. and Takahashi, M.: The Cell Cycle and Cancer, ed. by R. Baserga, pp. 58—95, Marcel Dekker, New York, 1971.
- 4) Baserga, R. and Wiebel, F.: Int. Rev. Exp. Path., 7, 1, 1969.
- 5) Skipper, H.E.: Cancer, 21, 600, 1968.
- 6) Pittilo, R.F., Schabel, F.M. Jr. and Skipper,

- H.E.: Cancer Chemotherapy Report., 54, 137, 1970.
- 7) 下山正徳：最新医学, 28, 850, 1973.
- 8) Bruce, W.R., Meeker, B.E. and Valeriote, F.A.: J. Natl. Cancer Inst., 37, 233, 1966.
- 9) Skipper, H.E., Schabel, F.M. Jr., Mellett, L.B., Montgomery, J.A., Wilkoff, L.J., Lloyd, H.H. and Brckman, R.W.: Cancer Chemotherapy Res., 54, 431, 1970.
- 10) Cohen, S.S. and Barner, H.D.: Pediatrics, 16, 704, 1955.
- 11) Wheeler, G.P., Bowdon, B.J., Adamson, D.J. and Vail, M.H.: Cancer Res., 30, 100, 1970.
- 12) Harrap, K.R., Riches, P.G., Gascoigne, E.W., Sellwood, S.M. and Cashman, C.C.: Advances in tumour prevention, detection and characterization. Vol. 3. Biological characterization of human tumours, ed. by C. Maltoni, pp. 106—121, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, 1976.
- 13) Lawley, P.D. and Brooks, P.: Nature, 206, 480, 1965.
- 14) Pullman, P. and Pullman, A.: Biochim, Biophys. Acta, 36, 343—350, 1959.
- 15) Wheeler, G.P.: Cancer Medicine, ed. by J.F. Holland and E. Frei, III., p. 801, Lea & Febiger, Philadelphia, 1973.
- 16) Schabel, F.M. Jr., Skipper, H.E., Trader, M.W. and Wilcox, W.S.: Cancer Chemotherapy Rep., 48, 17, 1965.
- 17) Heidelberger, C.: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. 4, ed. by J.N. Davidson and W.E. Cohn, pp. 1—50, Academic press, New York, 1965.
- 18) Young, R.C. and Devita, V.T.: Cancer Res., 30, 1789, 1970.
- 19) Wheeler, G.P., Bowdon, B.J., Adamson, D.J. and Vail, M.H.: Cancer Res., 30, 1817, 1970.
- 20) Mauro, F. and Madoc-Jones, H.: Cancer Res., 30, 1397, 1970.
- 21) Harrod, E.K. and Cortner, J.A.: J. Natl. Cancer Inst., 40, 269, 1968.
- 22) Walker, I.G. and Thatcher, C.J.: Radiation Res., 34, 110, 1968.

(1977年3月12日受付)