[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.67, No.11, pp.1591~1597, 1993]

デキストラン硫酸を用いた初代ヒト癌細胞の選択的培養方法

肥塚正博^{*,***}, 只左弘治, 原 聡^{**}

小田幸子^{***}, 谷坂圭造^{***}, 茅原 紘

(*岐阜大学大学院連合農学研究科, 信州大学農学部,

近畿大学医学部, *新田ゼラチン研究所)

平成5年6月17日受理

Selective Method for Primary Culture of Human Cancer Cells with Dextran Sulfate

Masahiro KOEZUKA^{*,***}, Koji TADASA, Satoshi HARA^{**}, Sachiko ODA^{***},

Keizo TANISAKA^{***}, and Hiroshi KAYAHARA

* *United Graduate School of Agricultural Sciences, Gifu University,*

1-1 Yanagido, Gifu 501-11

Department of Bioscience and Biotechnology, Shinshu University, 8304

Minamiminowa, Kamiina, Nagano 399-45

** *Department of Surgery, Kinki University School of Medicine, 377-2*

Ohnohigasi, Osakasayama, Osaka 589

*** *Research Laboratory, Nitta Gelatin Inc., 2-22 Futamata, Yao, Osaka 581*

To develop a method to inhibit the growth of fibroblasts that contaminate primary cultures of human cancer cells, we examined the effects of dextran sulfate in the medium when human cancer cells and fibroblasts were cultured. Dextran sulfate of the molecular weight of 8000, 15,000, 50,000, and 500,000 was used. The dextran sulfate of the molecular weight of 500,000 inhibited the growth of MRC-5 fibroblasts most strongly of all molecular weights tested. The same dextran sulfate inhibited the growth of six other human fibroblast cell lines concentration-dependently. Its inhibition of the nine human cancer cell lines tested was slight. The cytoplasm of the seven fibroblast cell lines became hypertrophic in a concentration-dependent way when dextran sulfate was present. When human cancer cells obtained from forty-two surgical specimens were cultured with 10 μ g/ml dextran sulfate, the growth of the fibroblasts in the stroma of the cancer was suppressed, and the cancer cells grew. These results suggest that culture media containing dextran sulfate can be used for the selective culture of human cancer cells.

(Received June 17, 1993)

緒 言

ヒトの悪性腫瘍の細胞株の樹立はヒト腫瘍の研究手段としてその原因, 診断, 治療にきわめて有用である⁽¹⁾. しかし, HeLa 細胞の樹立以来, 幾多の培養法の進歩が報告されたにもかかわらず, 株細胞の樹立の際の大きな技術的問題点は残されたままである. その問題点とは, ヒト悪性腫瘍の初代培養において, 通常, 癌細胞以外の

細胞が混入し, 増殖してくる. とくに間質の線維芽細胞の増殖は, 癌細胞に比べてきわめて盛んであり, その除去は非常に困難である.

線維芽細胞のみを選択的に除去, あるいはその増殖を抑制させる方法として, 酵素処理法⁽²⁾, 細胞の比重の差を利用した分離法⁽³⁾, L-Valine の代わりに D-Valine を添加した選択培地⁽⁴⁾, arginine の代わりに citrulline を添加した選択培地⁽⁵⁾, *cis*-hydroxyproline を添加した選

択培地⁽⁶⁾などが開発されている。しかし、これらいずれの方法も初代培養に用いるには線維芽細胞と癌細胞の選択性、特異性という点でいくつかの欠点があり、現在、一般的には用いられていない。

Hata⁽⁷⁾らは、コラーゲン合成活性化作用を持つ、L-アスコルビン酸 2-リン酸がヒト皮膚線維芽細胞の増殖を促進することを示した。一方、Sorimachi⁽⁸⁾は、デキストラン硫酸が培養細胞株のコラーゲン合成を抑制することを報告している。

そこで今回、癌細胞の増殖を抑制することなく、線維芽細胞のみの増殖を抑制する新しい選択培地を開発するために、コラーゲン合成抑制剤であるデキストラン硫酸に注目し、その選択的増殖抑制効果、および特異性について検討した。

実験方法

1. 材料 ヒト線維芽細胞株として、HUC-F (ヒトへそ緒由来正常線維芽細胞)、NB1 RGB (ヒト新生児皮膚正常線維芽細胞)、HFL-1 (ヒト胎児肺由来正常線維芽細胞)、MRC-5 (ヒト胎児肺由来正常線維芽細胞)、およびわれわれがヒト肺癌組織より単離し、樹立化した F-1, F-2, F-3 を用いた。

ヒト肺癌細胞株は、MOB-P, LgS-D, HLC-1, PC-3, QG-56, PC-13, ヒト胃癌細胞株は、MKN-1, MKN-7, ヒト大腸癌細胞株は DLD-1 を実験に用いた。

HUC-F, NB1 RGB, HFL-1, MRC-5, HLC-1 は理化学研究所より、PC-3, QG-56, PC-13, MKN-1, MKN-7 は免疫生物研究所より、DLD-1 は JCRB 細胞バンクより、MOB-P, LgS-D は大阪府立成人病センター児玉博士より、それぞれ分与されたものである。それぞれの細胞株は、Dulbecco's modified Eagle's medium (DME, 日本製薬) に 10% ウン胎児血清 (FBS, Gibco), 100 μ g/ml ペニシリン, 100 units/ml ストレプトマイシンを含む培地で継代培養した。臨床手術材料としては、近畿大学第1外科学教室において、ヒト癌患者から手術によって摘出されたヒト肺癌 12 例、ヒト大腸癌 13 例、ヒト胃癌 8 例、ヒト乳癌 9 例を対照とし、次に述べる方法によって単離癌細胞を得た。

2. 単離癌細胞の作製 得られた手術材料は無菌下でハサミ、ピンセットにて被膜、脂肪などを除去し、カミソリで細切にした。次に細切にした組織を DME 液 50 ml に移し、0.1% コラゲナーゼ (Type I, 190 units/

mg: Sigma), および 0.2% ディスパーゼ (合同酒精) で 37°C で 2 時間処理し、組織中の結合組織を消化した。その後、ナイロンメッシュ・フィルター (ϕ 250 μ m) にて濾過し、遠心分離にて単離した細胞を回収した。

3. 培養操作 ヒト癌細胞株、ヒト線維芽細胞株、および上記の処理によって得られたヒト癌細胞を 10% FBS 含有 DME 培養液にて 5×10^4 個/ml 濃度になるように細胞分散液を 0.5 ml ずつ 16 mm マルチウェル (Corning) に播種し、細胞が接着後、デキストラン硫酸ナトリウム (Sigma) を任意の濃度になるように添加した。培養条件としては 5.0% CO₂, 95.0% air, 37.0°C のインキュベーター内で培養を行った。デキストラン硫酸ナトリウム、および培養液は 2 日おきに交換した。

デキストラン硫酸ナトリウムによる細胞増殖抑制度は培養開始後、7 日目のマルチウェル内の細胞の DNA 量を測定することによって inhibition rate で表示した。すなわち、inhibition rate = $(1 - B/A) \times 100(\%)$ (A, 対照群の DNA 量; B, デキストラン硫酸ナトリウム添加群の DNA 量)。

また、DNA 量は Hinegardner の方法⁽⁹⁾に準じて塩酸ジアミノ安息香酸液 (Aldrich) を用いた蛍光法によって、測定した。

実験結果

まず、最初に予備的な検討として、4 種類の分子量の異なるデキストラン硫酸 (分子量、8 k, 15 k, 50 k, 500 k) を用いてヒト正常線維芽細胞である MRC-5 に対する増殖抑制効果を調べた。MRC-5 に対しては Fig. 1 に示されるように、分子量 8 k と分子量 15 k のデキストラン硫酸には、ほとんど増殖抑制効果は認められなかった。しかし、分子量 50 k と分子量 500 k のデキストラン硫酸は濃度依存的に増殖抑制効果を示した。とくに分子量 500 k のデキストラン硫酸がもっとも強い増殖抑制効果を示した。

そこで、分子量 500 k のデキストラン硫酸を用いて、7 種類のヒト線維芽細胞株と 9 種類のヒト癌細胞株に対する増殖抑制効果について調べた。実験にはヒト線維芽細胞株として、NB1 RGB, HUC-F, HFL-1, MRC-5, F-1, F-2, F-3 を、ヒト癌細胞株として、MOB-P, LgS-D, HLC-1, PC-3, QG-56, PC-13, MKN-1, MKN-7, DLD-1 を用いた。デキストラン硫酸はすべての線維芽細胞株に対して濃度依存的に強い増殖抑制効果を示した。

Fig. 1. Effect of Dextran Sulfate on Growth of MRC-5 Fibroblast Cell Line. The cells were cultured in DME medium + 10% FBS containing dextran sulfates for 7 days. Inhibition rate of cell growth was determined by measuring DNA content per well. ○, 0.8kDa; △, 15kDa; □, 50kDa; ●, 500kDa. Data are expressed as mean of triplicate cultures. The standard deviation was less than 10% in all cases.

Fig. 2. Effect of Dextran Sulfate on Growth of 7 Fibroblast Cell Lines (A) and 9 Cancer Cell Lines (B). The cells were cultured in DME medium + 10% FBS containing different concentrations of dextran sulfate (MW: 500kDa) for 7 days. Inhibition rate of cell growth was determined by measuring DNA content per well. A: ○, NB1RGB; ⊙, HUC-F; △, HFL-1; □, MRC-5; ◇, F-1; ▽, F-2; ●, F-3. B: ○, MOB-P; ⊙, LgS-D; △, HLC-1; □, PC-3; ◇, QG-56; ▽, PC-13; ●, MKN-1; ▲, MKN-7; ■, DLD-1. Data are expressed as mean of triplicate cultures. The standard deviation was less than 10% in all cases.

(Fig. 2 A). その 50% 増殖抑制濃度 (IC_{50}) は, NB1RGB; 1.0 μ g/ml 以下, HUC-F; 1.0 μ g/ml 以下, HFL-1; 5.6 μ g/ml, MRC-5; 6.4 μ g/ml, F-1; 1.0 μ g/ml 以下, F-2; 4.9 μ g/ml, F-3; 1.1 μ g/ml であった。また, その増殖抑制効果, および IC_{50} 値は線維芽細胞株の種類によって多少異なっており, NB1RGB, HUC-F, F-1, F-3 に比べると, MRC-5, HFL-1, F-2 はデキストラン硫酸に対して低感受性であった。次に Fig. 2 B に肺癌 6 株 (MOB-P, LgS-D, HLC-1, PC-3, QG-56, PC-13), 胃癌 2 株 (MKN-1, MKN-7), 大腸癌 1 株 (DLD-1) に対するデキストラン硫酸の増殖抑制効果を示した。Fig. 2 B に示されるようにデキストラン硫酸の癌細胞株に対する増殖抑制効果は 10 μ g/ml 以下の濃度ではほとんど認められず, 100 μ g/ml の高濃度においても非常に弱かった。また, その IC_{50} 値は実験に用いたすべての癌細胞株において 100 μ g/ml 以上であり, 癌細胞の由来には依存しなかった。

次にデキストラン硫酸の細胞の形態に及ぼす影響を調べた。細胞の形態の変化は顕微鏡観察によって判定した。Fig. 3 に線維芽細胞株である HFL-1, Fig. 4 にはヒト肺癌である QG-56 のデキストラン硫酸による形態

の変化を示した。Fig. 3 に示されるように HFL-1 にデキストラン硫酸を加えると濃度依存的に細胞質の肥大化が観察された。しかし, ヒト癌細胞である QG-56 では形態の変化は観察されなかった。また, 他の 6 例のヒト線維芽細胞においても HFL-1 と同様にデキストラン硫酸によって細胞質の肥大化が観察された。また, ヒト癌細胞株 8 例においては, QG-56 と同様に形態の変化は観察されなかった。

以上のことから, 分子量 500 k のデキストラン硫酸は, ヒト癌細胞株の増殖を抑制することなく, ヒト線維芽細胞株の増殖を著しく抑制するとともに細胞の形態を変化させることが明らかになった。

そこで, デキストラン硫酸を含む選択培地が培養細胞株で得られた結果と同様に, ヒト癌細胞の初代培養においても有効であるか否かを検討した。実験にはヒト癌患者から外科手術によって得た肺癌 12 例, 大腸癌 13 例, 胃癌 8 例, 乳癌 9 例を用いた。

Fig. 3. Photomicrographs of Fibroblast Cell Lines Cultured in Medium Containing Different Concentrations of Dextran Sulfate. The MRC-5 cells were cultured without (A) and with dextran sulfate (B, 10 μ g/ml; C, 25 μ g/ml) for 7 days. Bars indicate 100 μ m.

Fig. 4. Photomicrographs of Cancer Cell Lines Cultured in Medium Containing Different Concentrations of Dextran Sulfate. The QG-56 cells were cultured without (A) and with dextran sulfate (B, 10 μ g/ml; C, 25 μ g/ml) for 7 days. Bars indicate 100 μ m.

また、ヒト癌細胞の初代培養においては、プレート内に癌細胞と線維芽細胞が混在した状態であるので、それぞれを別々に定量化することは不可能である。そこで、本実験では顕微鏡観察によってデキストラン硫酸の効果を実定的に判定した。ヒト癌細胞の初代培養における典型的なデータとして、Fig. 5 には肺癌細胞 (A, B)、大腸癌細胞 (C, D)、胃癌細胞 (E, F)、乳癌細胞 (G, H) のデキストラン硫酸を 10 μ g/ml 添加した群 (A, C, E, G)、およびデキストラン硫酸無添加群 (B, D, F, H) の顕微鏡写真を示した。デキストラン硫酸無添加群 (B,

D, F, H) では、線維芽細胞の優先的増殖が観察されたのに対し、デキストラン硫酸添加群 (A, C, E, G) においては、線維芽細胞の増殖が抑制され、癌細胞の優先的増殖が観察された。Fig. 5 の B, D, F, H に示されるようにデキストラン硫酸無添加群において、線維芽細胞の優先的増殖が観察された症例は、肺癌 12 例中 5 例、大腸癌 13 例中 4 例、胃癌 8 例中 6 例、乳癌 9 例中 8 例であった。しかし、デキストラン硫酸添加群においては実験に使用した全例において、Fig. 5 の A, C, E, G に示されるように線維芽細胞の増殖が抑制され、癌細胞

Fig. 5. Effect of Dextran Sulfate on Growth of Human Cancer Cells in Primary Culture. The cells were cultured with (A, C, E, G) dextran sulfate at $10\mu\text{g/ml}$ and without (B, D, F, H) for 7 to 14 days. A and B, Lung cancer cells; C and D, Colon cancer cells; E and F, Stomach cancer cells; G and H, Breast cancer cells. Bars indicate $100\mu\text{m}$.

の優先的増殖が観察された。

以上のことから、デキストラン硫酸を添加した培地はヒト癌細胞の初代培養系においても、癌細胞および線維芽細胞の由来に関係なく、線維芽細胞の増殖を著しく抑制し、癌細胞の優先的増殖を誘起することが確認された。

考 察

われわれは癌細胞の増殖を抑制することなく、線維芽

細胞のみの増殖を抑制する新しい培養方法を開発するために本研究を行った。

これまでに報告された線維芽細胞の除去方法の問題点は、目的とする癌細胞を選択的に培養できるか否かという点である。酵素処理法⁽²⁾、および比重の差を利用した分離法⁽³⁾、D-Valine 法⁽⁴⁾などは、比較的良好に用いられているが、線維芽細胞の混入、および増殖はかなり多い。われわれはこれらの方法を用いて、約 30 例のヒト乳癌

細胞の初代培養を試みたが、ほとんどの培養系で線維芽細胞が優先的に増殖した（未発表結果）。

Okabe らは、ヌードマウス移植可ヒト悪性腫瘍株に対する免疫学的選択方法を報告している⁽¹⁰⁾。これは、ヌードマウス移植可ヒト悪性腫瘍株の初代培養の際に培養細胞を抗ヌードマウス脾細胞ウサギ血清にて処理する方法である。この処理によってヌードマウス由来の間質細胞（線維芽細胞など）のみが選択的に除去されてヒト由来の癌細胞のみの培養が得られる。この免疫学的選択方法はマウス由来の間質細胞に対する選択性、および特異性が高く、現在、もっとも高く評価され広く用いられている。しかし、この方法はヒト癌組織をヌードマウスに移植し、生着させることが必須であるが、ヒト癌組織はヌードマウスへの生着率が低いという問題点が残る。

一方、われわれのヒト悪性腫瘍の初代培養の検討では、通常の FBS を含む DME 培地では線維芽細胞の優先的な増殖が観察された。とくに線維芽細胞の初代培養系における混入は元来間質組織の多い乳癌、胃癌に多く、間質組織の少ない肺癌、大腸癌では少なかった。しかし、デキストラン硫酸を含む培地では乳癌、胃癌、大腸癌、肺癌など癌の種類にかかわらず、線維芽細胞の増殖が選択的に抑制され、癌細胞の優先的な増殖が観察された。培養細胞株を用いた検討においても、デキストラン硫酸は線維芽細胞の増殖を選択的に抑制するとともに細胞の形態を著しく変化させた。

デキストラン硫酸はウイルス学の分野では古くから研究され、ポリオウイルスの増殖がデキストラン硫酸によって抑制されることが報告されている⁽¹¹⁾。また、デキストラン硫酸がエイズウイルスの増殖を抑制することも報告されている⁽¹²⁾。動物細胞においては *in vitro* でマクロファージの multinucleation を誘起することが報告されている⁽¹³⁾。

最近、Sorimachi⁽⁸⁾ はデキストラン硫酸が肝細胞株のコラーゲン合成を阻害することを報告している。一方、Hata ら⁽⁷⁾は、コラーゲン合成活性化作用を持つ L-アスコルビン酸 2-リン酸がヒト皮膚線維芽細胞の増殖とコラーゲン合成を促進することを報告している。*in vitro* において細胞の基質への接着、増殖、組織形成、細胞の機能発現にコラーゲンが重要な役割を果たしていることを示す報告は多い^(14,15)。とくに線維芽細胞の増殖にはコラーゲン合成が必須であることが知られている^(16,17)。これに対して、細胞の癌化に伴ってその増殖にコラーゲン

合成は必須ではなくなり、コラーゲン基質への依存度は低下する⁽¹⁸⁾。これらのことから判断すると、デキストラン硫酸が線維芽細胞に対して特異的な増殖抑制効果を示した1つの要因として、デキストラン硫酸が線維芽細胞の産生するコラーゲン合成を抑制した結果、線維芽細胞はその足場を失い、細胞質の著しい増大が起こり、細胞増殖能を失ったと考えられる。これに対して癌細胞では、コラーゲン合成が抑制されたとしてもコラーゲン基質への依存度が低いため、細胞増殖、細胞形態に影響を受けなかったと考えられる。

血清中のリポタンパク質は線維芽細胞、平滑筋細胞、リンパ腫細胞などに対して増殖促進活性を示す⁽¹⁹⁾。これに対して形質転換した線維芽細胞（CT-1 細胞）に対しては増殖促進活性を示さない⁽²⁰⁾。デキストラン硫酸はこの血清中のリポタンパク質と反応し、不活性の複合体を形成する⁽²¹⁾。すなわち、デキストラン硫酸が線維芽細胞の増殖を特異的に抑制したもう1つの要因としては、デキストラン硫酸を添加することによって血清を含む培養液からリポタンパク質が不溶性の複合体を形成した結果、その増殖活性が失われたと考えられる。

デキストラン硫酸の構造は天然に存在するヘパラン硫酸などの酸性多糖体と、よく類似している。ヘパラン硫酸は細胞増殖制御作用、細胞接着、神経突起の伸長、リポタンパクリパーゼの結合、抗凝血作用など多様な機能を持つことが明らかにされている⁽²²⁾。

Matuoka ら⁽²³⁾は、ヘパラン硫酸が細胞接着阻害活性によって線維芽細胞の増殖を阻害し、一方、形質転換した線維芽細胞では、その増殖を促進することを報告している。われわれの検討においても、ヘパラン硫酸は線維芽細胞の増殖を抑制した。しかし、この増殖抑制効果はデキストラン硫酸の効果と比べると非常に弱かった（未発表結果）。

以上、これらの諸家の報告から判断すると、デキストラン硫酸の線維芽細胞に対する特異的な増殖抑制効果のメカニズムとしては、①線維芽細胞のコラーゲン合成能の抑制、②血清からのリポタンパク質の除去、③ヘパラン硫酸様の細胞接着阻害効果等が考えられる。現在、デキストラン硫酸の線維芽細胞に対する増殖抑制メカニズムについて、詳細に検討中である。

結論としては、デキストラン硫酸の線維芽細胞に対する増殖抑制効果のメカニズムは不明な点が多いが、デキストラン硫酸を用いた選択培地は癌細胞と線維芽細胞の

選択的抑制効果が従来の方法よりも非常に高く、実用面では優れた方法であると考えられる。

要 約

ヒト癌細胞の初代培養系に混入した線維芽細胞の増殖を選択的に抑制する方法を開発するために、われわれはデキストラン硫酸を添加した培地を用いて、癌細胞と線維芽細胞に対する増殖抑制効果を調べた。

(1) 分子量の異なる4種類のデキストラン硫酸(8 k, 15 k, 50 k, 500 k)を用いて、ヒト線維芽細胞株(MRC-5)に対する増殖抑制効果を調べた結果、分子量500 kのデキストラン硫酸がもっとも強い増殖抑制効果を示した。

(2) 分子量500 kのデキストラン硫酸は、7種類のヒト線維芽細胞株の増殖を濃度依存的に抑制した。しかし、9種類のヒト癌細胞株に対する増殖抑制効果は非常に弱かった。さらに、ヒト線維芽細胞株の細胞質の形態はデキストラン硫酸によって濃度依存的に肥大化した。

(3) 外科手術から得たヒト癌細胞を10 µg/mlのデキストラン硫酸を含む培地で培養したとき、癌間質から混入したヒト線維芽細胞の増殖は抑制された。そして、ヒト癌細胞が優先的に増殖した。

以上の結果から、デキストラン硫酸を添加した培地は、ヒト癌細胞の選択的培養方法として有用であることが示唆される。

- (1) 菅野晴夫：「人癌細胞の培養」，大野章一，菅野晴夫編，朝倉書店，東京，1975，pp.3—6.
- (2) E. Y. Lasfargues and D. H. Moore : *In Vitro*, **7**, 21—25 (1971).
- (3) J. A. Sykes, J. Whitescarver, L. Briggs, and J. H. Anson : *J. Natl. Cancer Inst.*, **44**, 855—864 (1970).
- (4) S. F. Gilbert and B. R. Migeon : *Cell*, **5**, 11—17 (1975).
- (5) N. C. Sun, C. R. Y. Sun, R. W. Tennant, and A. W. Hsie : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**,

- 1819—1823 (1979).
- (6) W. W. Kao and D. J. Prockop : *Nature*, **266**, 63—64 (1977).
- (7) R. Hata and H. Senoo : *J. Cell. Physiol.*, **138**, 8—16 (1989).
- (8) K. Sorimachi : *Biomed. Res.*, **13**, 75—79 (1992).
- (9) R. T. Hinegardner : *Anal. Biochem.*, **39**, 197—201 (1971).
- (10) T. Okabe, A. Suzuki, N. Ohsawa, K. Kosaka, and T. Terasima : *Cancer Res.*, **39**, 4189—4194 (1979).
- (11) K. K. Takemoto and H. Liebhafar : *Virology*, **17**, 499—501 (1962).
- (12) H. Nakashima, O. Yoshida, T. Tochikura, T. Yoshida, T. Mimura, Y. Kido, Y. Motoaki, Y. Kaneko, T. Uryu, and N. Yamamoto : *Jpn. J. Cancer Res.*, **78**, 1164—1168 (1987).
- (13) K. Sorimachi, K. Akimoto, S. Yamazaki, S. Toda, A. Niwa, and Y. Yasumura : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 241—242 (1991).
- (14) J. Yang and S. Nandi : *Int. Rev. Cytol.*, **81**, 249—286 (1983).
- (15) 畑隆一郎：蛋白質 核酸 酵素, **31**, 29—52 (1986).
- (16) 畑隆一郎：生化学, **60**, 201—206 (1988).
- (17) E. M. L. Tan, L. Ryhamen, and J. Uitto : *J. Invest. Dermatol.*, **80**, 261—267 (1983).
- (18) L. A. Liotta, D. Vembu, H. K. Kleinman, G. R. Martin, and C. Boone : *Nature*, **272**, 622—624 (1978).
- (19) R. Ross and J. A. Glomset : *New Engl. J. Med.*, **295**, 420—425 (1976).
- (20) H. Hoshi, M. Kan, I. Yamane, T. Ohno, and M. Namba : *Cell Struct. Funct.*, **8**, 67—75 (1983).
- (21) W. G. Dangerfield and G. Faulkner : *Clin. Chim. Acta*, **10**, 123—133 (1964).
- (22) 松岡耕二：「細胞成長因子 Part II」，日本組織培養学会編，朝倉書店，東京，1987，pp.119—121.
- (23) K. Matuoka, Y. Mitsui, and S. Murota : *Cell Struct. Funct.*, **9**, 357—367 (1984).