

Sensitivity to Vinblastine and Mechanisms of Intracellular Accumulation of Vinblastine by Reserpine in Rat Ascites Hepatoma Cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7049

薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
104 (12) 1288-1294 (1984)

ラット腹水肝癌細胞のビンブラスチン感受性とレセルピンによる
ビンブラスチン細胞内蓄積機作

涌沢伸哉,* 宮本謙一, 柳岡利一, 越浦良三
北陸大学薬学部

Sensitivity to Vinblastine and Mechanisms of Intracellular Accumulation
of Vinblastine by Reserpine in Rat Ascites Hepatoma Cells

SHINYA WAKUSAWA,* KENICHI MIYAMOTO, TOSHIKAZU YANAOKA,
and RYOZO KOSHIURA

Department of Pharmacology, Hokuriku University School of Pharmacy,
Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa, 920-11, Japan

(Received August 13, 1984)

The relationship between the intracellular accumulation of vinblastine (VBL) and the effect of reserpine in four rat ascites hepatoma cell lines having different sensitivities to VBL was investigated. The order of the sensitivity to VBL was AH66 cells < AH109A cells < AH44 cells < AH13 cells. The intracellular VBL content for 30 min incubation was higher in sensitive cells than in natural resistant cells and after washing out extracellular VBL, VBL retained in sensitive cells was more than that in resistant cells. Reserpine suppressed the extrusion of VBL, accumulated VBL in all cells, and enhanced VBL sensitivity of the cells. These effects of reserpine were significant in VBL resistant cell lines, AH66 cells and AH109A cells, rather than in sensitive cell lines, AH13 cells and AH44 cells, and the VBL resistance was completely overcome by reserpine. The activities of adenosine triphosphatase (ATPase), especially Mg^{2+} ATPase, in the plasma membrane of VBL resistant cells were higher than those of sensitive cells. Reserpine markedly suppressed the activities of Mg^{2+} ATPase and Ca^{2+} ATPase but had no effect on (Na^+ - K^+) ATPase activity.

From these results, it was indicated that rat ascites hepatoma cells possessing higher ATPase activities in the plasma membrane were more resistant to VBL and reserpine overcame the natural resistance to VBL suppressing the active efflux of VBL.

Keywords—vinblastine (VBL); reserpine; ATPase; vinblastin (VBL) sensitivity enhancement; natural resistance; rat ascites hepatoma cells

癌組織における個々の癌細胞の制癌剤に対する感受性の違いは、癌化学療法における重要な問題である。特に、自然薬剤耐性株の存在は、癌治療効果を著しく妨げる原因となっている。

著者らは、非制癌剤による制癌剤耐性の克服を目的として研究し、major tranquilizer の1つであるレセルピンが、各種の制癌剤の効果を相乗的に高めることを見出し、¹⁾ その効果増強の機作として、本剤が、ビンブラスチン (VBL) のラット腹水肝癌細胞 AH44 及び AH66 からの流出を抑制することにより、VBL の効果を高めるのであろうと推論した。²⁾ 本報では、VBL に対する感受性の異なるラット腹水肝癌細胞への細胞内 VBL 取り込み量、各細胞膜 ATPase 活性を測定し、これらに及ぼすレセルピンの影響を検討することにより、VBL 感受性とレセルピンによる VBL 増感作用機作との関係を論じた。

実 験 の 部

実験材料

癌細胞 ラット腹水肝癌細胞 AH13, AH44, AH66, AH109A を用いた。癌細胞を1週間毎にドンリュール系6週齢雌性ラット (静岡実験動物農業協同組合) の腹腔内に移植して継代維持した。実験には、各癌細胞移植後1週間の細胞を用いた。

使用薬物 レセルピン (Sigma), 硫酸ビンプラスチン (VBL: 塩野義製薬), ^3H -VBL (9.9 Ci/mmol, Amer-sham), adenosine triphosphate disodium salt (ATP·2Na: 半井化学), その他の試薬は特に断わりのない限り和光純薬の特級品を用いた。なお, レセルピンは, 水に不溶のため, dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解し, 実験には最終 DMSO 濃度が 0.5% 以下となるように加えた。したがって, 0.5% DMSO を対照とした。

実験方法

細胞培養 Eagle's minimum essential medium (MEM: pH 7.4 日本製薬) 中癌細胞 (6×10^6 cells/2 ml) を VBL, レセルピンと 37°C にて 30 分間接触させた後, 細胞をリン酸緩衝液 (PBS: pH 7.4) にて洗浄し, ウシ胎仔血清 (京都微研) 10% 添加した MEM 中に再浮遊させ, 35 mm プラスチックシャーレ (Falcon) 中, 炭酸ガス培養器 (池本理化) 内にて 37°C , 2 日間培養した。細胞数を顕微鏡下計数した。なお, AH66, AH109A の島形成細胞については, トリプシン処理後細胞数を計数した。培養開始時よりの増殖率を VBL の対数濃度に対してプロットし, 50% 増殖抑制濃度 (IC_{50}) を求めた。

細胞内 VBL 取り込み量の測定 癌細胞 (5×10^6 cells/ml) をウシ胎仔血清 10% 添加 MEM に浮遊させ, 37°C にて 10 分間培養後, 1×10^{-5} M レセルピン存在下あるいは非存在下 $0.1 \mu\text{Ci}$ ^3H -VBL と非放射性 VBL 1×10^{-7} M を添加し 37°C にて培養した。培養後, 細胞浮遊液 1 ml を 1 検体として冷 PBS にて洗浄し, protosol® (New England Nuclear) 1 ml にて溶解し, トルエンシンチレーター (polyphenylene oxide 4 g, 1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl) benzene 0.1 g, トルエン 1 l) 中放射活性を液体シンチレーションカウンター (Beckman LS-230) により測定した。

細胞内 VBL 残存量の測定 前述のごとく, レセルピン非存在下 ^3H -VBL を 30 分間取り込ませ, 細胞を洗浄後, 1×10^{-5} M レセルピン存在下あるいは非存在下 37°C にて 30 分間培養後, 放射活性を測定した。

細胞内レセルピン取り込み量の測定 ウシ胎仔血清 10% 添加 MEM 中癌細胞 (5×10^7 cells/5 ml) を 1×10^{-6} M VBL 存在下あるいは非存在下 1×10^{-5} M レセルピンとともに 37°C にて 30 分間培養した後, 細胞を冷 PBS にて洗浄後, homogenize し, homogenate を 3 倍量のクロロホルム:メタノール (3:1) 混液にて, 次いで 3 倍量のクロロホルムにて振盪抽出し, クロロホルム層を減圧乾固後, 0.5 ml のクロロホルムに再溶解し, その 5 μl を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に付した。なお, 上記抽出法によりレセルピンの回収率はほぼ 100% であった。

HPLC の装置及び条件 装置: 日立 HPLC 638-30, 検出器: 日立 635-M LC director, 波長: 270 nm, カラム: 東洋曹達 TSK gel Silica-150 (粒子径 5 μm , カラムサイズ 4.6 \times 250 mm), 移動相: ヘキサン:エタノール:酢酸:トリエチルアミン (7:3:0.05:0.03), 流速: 1.0 ml/min, 記録計: Sic intelligent integrator Model 7000A. 以上の測定条件において, レセルピンのピークは注入後約 6 分で現われ, ピーク高の比により, あらかじめ作成しておいた検量線により定量した。

細胞容積の測定 細胞をウシ胎仔血清 10% 添加 MEM 中約 1×10^6 cells/ml に調整し, 少量のトリパンプル-PBS 溶液を加え, 非染色性の生細胞の直径 (d) を Bürker-Türk 血球計算板上で, ocular micrometer と object micrometer を用いて測定した。⁸⁾ 細胞容積 (V) は,

$$V = \frac{1}{6} \pi d^3$$

により求めた。

細胞膜調製法⁴⁾ 癌細胞 1 ml を 2 M NaHCO_3 -1 mM CaCl_2 溶液中氷冷下 15 分間膨潤させた後, Dounce ホモジナイザーを用いて homogenize し, homogenate を 1500 g で 15 分遠心し, 沈渣を 0.25 M ショ糖-10 mM Tris-塩酸緩衝液-2 mM ethyleneglycol-bis (β -aminoethylether) N,N' -tetraacetic acid (EGTA) (STE 緩衝液: pH 7.4) 4 ml に懸濁した。懸濁液を 150 g で 10 分遠心後, 上清を 5000 g で 10 分間遠心し, 沈澱を再び 1.6 ml の STE 緩衝液に懸濁し, この 0.4 ml を Percoll® (Pharmacia): 2 M ショ糖-8 mM EGTA-80 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4): STE 緩衝液 (7:1:32) 混液 8 ml と混合し, 10000 g で 15 分間遠心し, 表面直下の細胞膜層を大量の 10 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4) にて 10000 g 5 分間で 2 回洗い, 細胞膜標本とし, Na^+ - K^+ ATPase を細胞膜のマーカー酵素⁵⁾として, 以下に示す方法により活性を測定し, 細胞全 homogenate に対して比活性が約 10 倍のものを実験に用いた。

ATPase 活性の測定 Morcos らの方法⁶⁾ に従い行った。(Na^+ - K^+) ATPase 活性については, 3 mM ATP·2Na, 120 mM NaCl, 12.5 mM KCl, 5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25 mM EGTA, 25 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4) 0.95 ml に細胞膜懸濁液 0.05 ml を添加することにより反応を開始させ, 37°C にて 30 分間培養後, 煮沸湯浴中に 1 分間つけることにより反応を停止させた。冷後, Fiske-Subbarow 法⁷⁾ により生成した無機リン (Pi) を測定した。

Mg²⁺ ATPase 活性の測定に際しては、120 mM NaCl, 12.5 mM KCl を除いた。(Ca²⁺-Mg²⁺) ATPase 活性測定には、これに 5 μM CaCl₂·2H₂O を加えた。Ca²⁺ ATPase 活性の測定には、更に MgCl₂ を除き、5 mM CaCl₂·2H₂O と 0.25 mM ethylenediamine tetraacetic acid·2Na を加えて反応を行った。各活性は Pi μmol/mg protein/h として表したが、塩類を含まない Tris-塩酸緩衝液中で反応を行った際の Pi 生成量を差し引くことにより求めた。

蛋白質の測定 ウシ血清アルブミンを対照として Lowry 法⁹⁾に従い定量した。

結 果

1. VBL の細胞増殖抑制作用とレセルピンによる増感作用

ラット腹水肝癌細胞 AH13, AH44, AH66, AH109A の増殖に及ぼす VBL の用量反応曲線と、これに及ぼすレセルピンの影響を示したのが Fig. 1 である。各細胞に対する VBL の IC₅₀ を Table I に示すが、AH13 < AH44 < AH109A < AH66 の順で VBL 感受性が低いことは明らかである。更に、単独では細胞の増殖に何ら影響を示さない濃度のレセルピンの併用によりいずれの細胞においても VBL の効果は相乗的に高まるが、その程度は、VBL に対して低感受性の細胞程著しいこともまた明らかである。一方、DMSO は VBL の効果には何ら影響を及ぼさなかった。

2. VBL の細胞内取り込みと細胞外流出に及ぼすレセルピンの影響

いずれの肝癌細胞においても VBL は速やかに取り込まれるが、約 30 分で plateau に達する。しかし、30 分間の取り込み量は、Fig. 2 で示すように細胞間で著しい差が認められ、VBL に対して感受性の高い細胞 (AH13, AH44) で多く、低感受性の細胞 (AH66, AH109A) では少ない傾向を示した。また Fig. 3 は、洗浄により細胞外の VBL を除去後 30 分の細胞内 VBL の残存率を示す。この結果からも VBL 低感受性細胞の VBL 残存率が低く、ラット腹水肝癌細胞の VBL 耐性機序は、VBL の細胞外への汲み出し能との関係が示唆される。一方、VBL

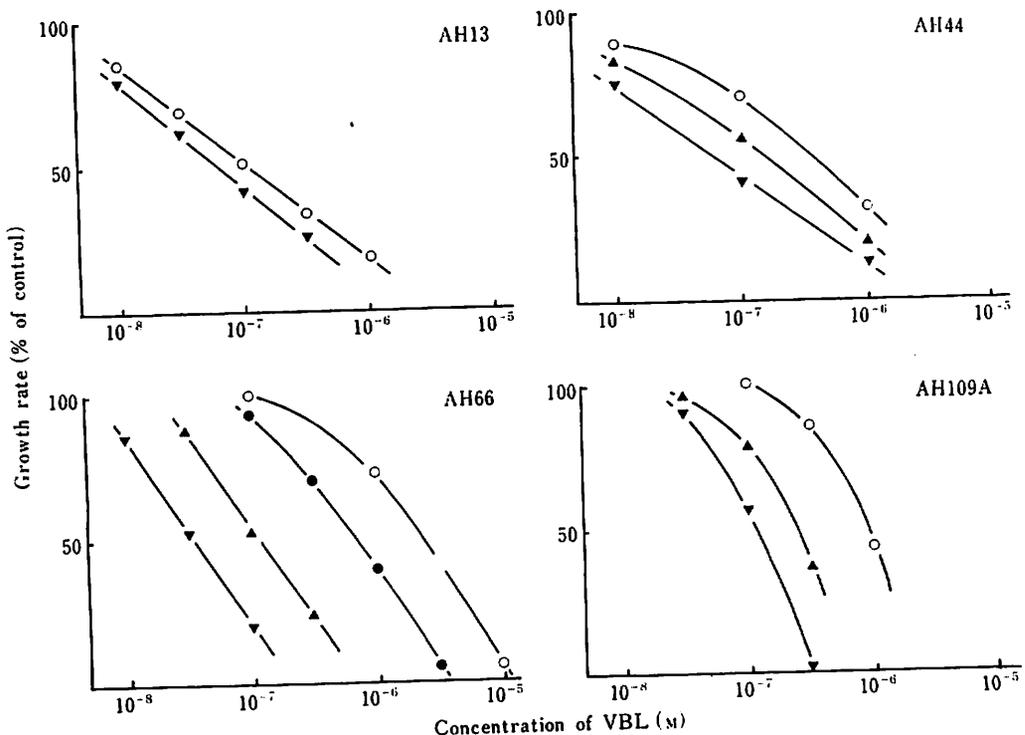


Fig. 1. Effect of Reserpine on the Growth Inhibitory Action of VBL in AH13, AH44, AH66 and AH109A Cells

The cells were treated with VBL for 30 min in the absence (○) or presence of 0.5 (●), 1.0 (▲) and 2.0 (▼) × 10⁻⁵ M of reserpine. Each point represents the mean of triplicate determinations.

TABLE I. Intracellular VBL or Reserpine Concentration and VBL Sensitivity

	AH13	AH44	AH66	AH109A
Cell size (μm^3)	3114	1762	1882	863
VBL alone				
VBL concentration ^{a)} ($\times 10^{-6}$ M)	2.65	3.06	0.80	2.08
IC ₅₀ ($\times 10^{-7}$ M)	1.1	3.7	23	7.5
Combination ^{b)}				
VBL concentration ($\times 10^{-6}$ M)	2.70	3.58	2.66	4.86
IC ₅₀ ($\times 10^{-7}$ M)	0.9	1.3	1.1	2.1
Reserpine concentration ^{c)} ($\times 10^{-5}$ M)	4.95	6.13	6.59	5.09

a) Intracellular concentration after 30 min incubation with 1.1×10^{-7} M of VBL.

b) Combination with 10^{-5} M of reserpine.

c) Intracellular concentration after 30 min incubation with 10^{-5} M of reserpine.

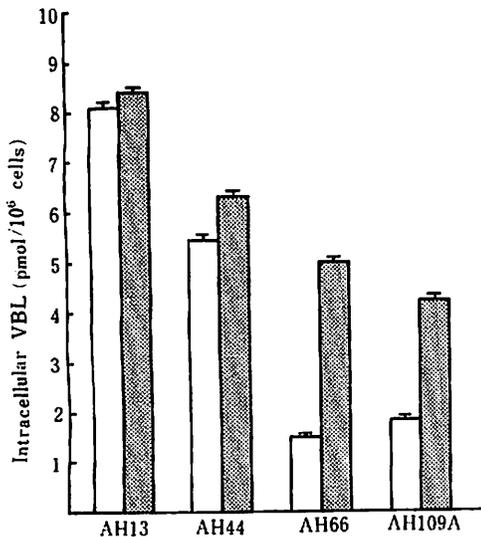


Fig. 2. Effect of Reserpine on the Intracellular Uptake of VBL

The cells were incubated with 1.1×10^{-7} M of VBL for 30 min in the absence (□) or presence of 1×10^{-5} M of reserpine (▨). Each bar represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations.

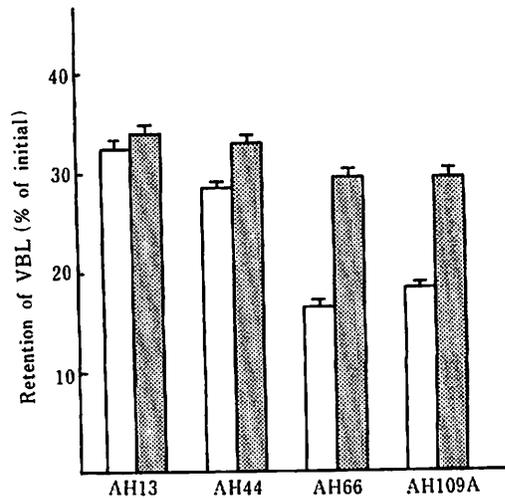


Fig. 3. Effect of Reserpine on the Intracellular Retention of VBL

The cells were loaded with 1.1×10^{-7} M of VBL for 30 min, washed and incubated for 30 min in the absence (□) or presence of 1×10^{-5} M of reserpine (▨). Each bar represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations.

の細胞内取り込みに関して、レセルピンは初期取り込み速度には明らかな影響を及ぼさず、レセルピン前処理した細胞における VBL の取り込み量は、レセルピン共存下の取り込み量と何ら変わらないことより、レセルピンは VBL の細胞内流入には影響しないであろうことは前報において示した。²⁾ しかしながら、VBL 取り込み量が plateau になる 30 分間の細胞内 VBL 量はレセルピンによりそれぞれ増加し、細胞外流出もレセルピンにより抑制された。その程度は、VBL に対して低感受性の細胞程大きいことも Fig. 2 及び Fig. 3 より明らかである。

3. レセルピンの細胞内取り込み量とこれに及ぼす VBL の影響

いずれの細胞においてもレセルピンの細胞内濃度は約 10–15 分で最大となり、以後一定の level を保つ。しかし、各細胞あたりの取り込み量はそれぞれ異なったが、VBL 感受性との間には関係を見出すことはできなかった。更に、レセルピンの細胞内取り込みに及ぼす VBL の影響も検討したが、細胞増殖抑制実験や取り込み量測定に用いた濃度より約 10 倍高い VBL 1×10^{-6} M によっても細胞内レセルピン量には何ら影響を示さなかった (Fig. 4)。

TABLE II. ATPase Activities of Plasma Membrane

	AH13	AH44	AH66	AH109A
(Na ⁺ -K ⁺)ATPase	3.36±0.41	7.02±0.51	12.20±0.59	10.55±0.27
Mg ²⁺ ATPase	3.86±0.66	6.96±1.06	11.68±0.82	9.57±0.55
Ca ²⁺ ATPase	12.42±1.62	14.78±0.74	15.98±2.44	15.31±2.73
(Ca ²⁺ -Mg ²⁺)ATPase	0.69±0.32	0.55±0.28	1.61±0.44	0.54±0.17
Total ATPase	20.33	29.31	41.47	35.97

Each value is the mean±S.E. ($\mu\text{mol Pi/mg protein/h}$) of triplicate determinations.

4. 細胞内薬物濃度と VBL 耐性及びレセルピンによる VBL 増感作用の解析

細胞径より算出した細胞容積と VBL あるいはレセルピンを 30 分間細胞と接触後の細胞単位容積あたりの細胞内濃度及び VBL の IC₅₀ を Table I に示す。細胞容積は AH109A, AH44, AH66, AH13 の順で大きく、最も大きかった AH13 は、最も小さかった AH109A の約 3.6 倍の容積を有していた。しかし、VBL 感受性との間には何ら関係は認められなかった。一方、細胞内 VBL は細胞外液 (1×10^{-7} M) に対して約 10—30 倍高濃度となるが、最も VBL 感受性の低い AH66 の細胞内 VBL 濃度は高感受性の細胞より著しく低かった。しかしレセルピン 1×10^{-5} M により、VBL 感受性の差はほとんど消失するとともに、細胞内 VBL 濃度も 4 細胞とも近似した値となることが明らかとなった。他方、レセルピンは細胞外液 (1×10^{-5} M) に対して約 5—6 倍に濃縮されるが、細胞内濃度は細胞間に明らかな差は認められなかった。すなわち、レセルピン自身の細胞内濃度は細胞間で差は認められないものの、レセルピンは VBL 耐性細胞の VBL 濃度を感受性細胞の level にまで高めることにより、ラット腹水肝癌の VBL 自然耐性をほぼ完全に克服したことを示している。

5. 細胞膜 ATPase 活性とレセルピンの影響

4 種のラット腹水肝癌細胞の細胞膜 ATPase 活性を Table II に示す。Ca²⁺ ATPase については、各細胞間に活性差はなく、(Ca²⁺-Mg²⁺) ATPase 活性も AH66 細胞のみが高いにとどまった。一方、総 ATPase, (Na⁺-K⁺) ATPase, Mg²⁺ ATPase 活性は、AH13<AH44<AH109A≤AH66 の順で高く、VBL 耐性度と良い相関を示した。各 ATPase 活性に対するレセルピンの影響を最も活性の高い AH66 細胞について検討した結果を Fig. 5 に、対照に対する活性比で示す。Mg²⁺ ATPase 及び Ca²⁺ ATPase 活性はレセルピンにより明らかに抑制されたが、(Na⁺-K⁺) ATPase には影響を与えず、(Ca²⁺-Mg²⁺) ATPase 活性は、レセルピンの溶媒として用いた 0.5% DMSO 溶液によって強く抑制されており、レセルピンはむしろこれを回復させる傾向を示した。

考 察

ラット腹水肝癌細胞間の VBL 感受性の違いは、市村⁹⁾ が *in vivo* 実験ですでに報告しているが、本報では *in vitro* においても AH13<AH44<AH109A<AH66 の順で VBL 自然耐性度が高いことを示した。しかもレセルピンは耐性細胞に対してより強い VBL 増感作用を示した。しかしながら、ラット腹水肝癌細胞の VBL 耐性機序、さらにはレセルピンの VBL 増感機序についてまだ明確な説明はなされていない。

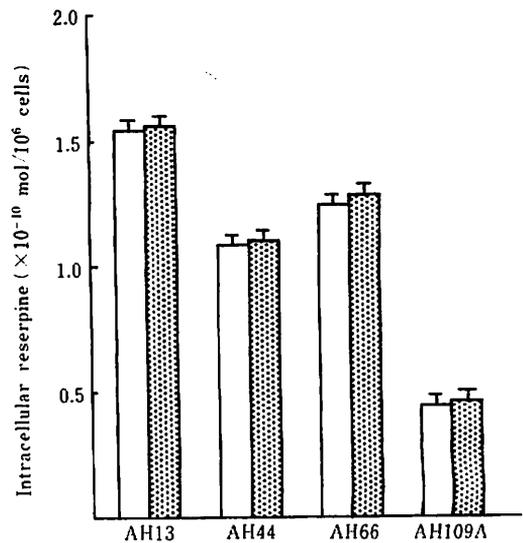


Fig. 4. Intracellular Uptake of Reserpine and Influence of VBL

The cells were incubated with 1×10^{-5} M of reserpine for 30 min in the absence (□) or presence of 1×10^{-6} M of VBL (▨). Each bar represents the mean±S.E. of triplicate determinations.

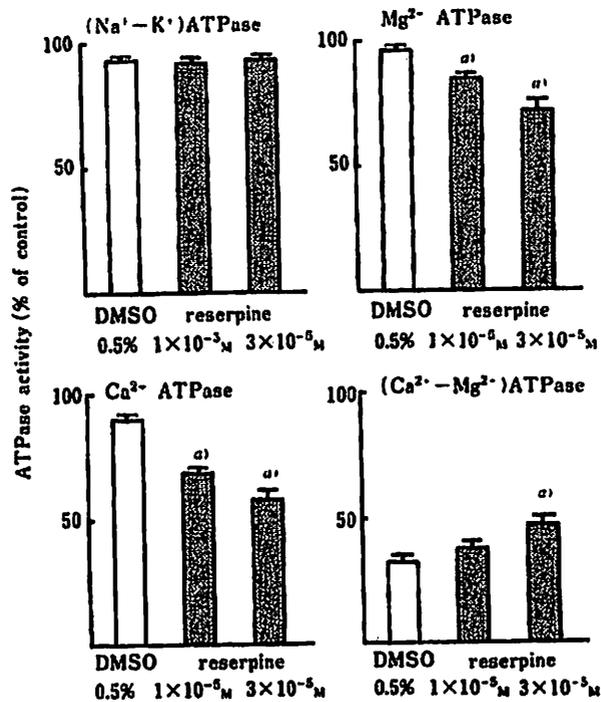


Fig. 5. Effect of Reserpine on ATPase Activities in AH66 Cell Plasma Membrane

Each ATPase activity in AH66 cell plasma membrane is shown in Table II and data are indicated as percent of each non-treated control activity. Each bar represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations. ^{a)} $p < 0.05$ versus 0.5% DMSO.

本実験において、VBL に対して感受性の低い細胞程 VBL 取り込み量が少なかった。また細胞外液中の VBL を洗淨除去後 30 分の細胞内残存率も低いことより、低感受性細胞では、感受性細胞に比して VBL の細胞外流出速度が速いため細胞内 VBL 量を高 level に維持できないものと考えられる。Vinca alkaloids のラット腹水肝癌細胞内蓄積機序については、Inaba ら¹⁰⁾及び著者ら²⁾がエネルギー産生機脱共役剤 dinitrophenol は vincristine あるいは VBL の細胞内取り込みを増加させ、細胞外流出を抑制すると報告している。またこのような dinitrophenol の作用はグルコースの添加により消失することを示している。すなわち、Vinca alkaloids の細胞外流出にはエネルギー依存性の機構が考えられる。そこで各肝癌細胞の膜 ATPase 活性を比較したところ、VBL 低感受性の細胞程総 ATPase 活性が高く、エネルギー依存性の VBL 細胞外流出機構の存在を支持する結果を得た。特に、Mg²⁺ ATPase 活性が VBL 耐性と相関性を示すようであった。塚越ら¹¹⁾は、吉田肉腫の nitrogen mustard 耐性細胞においても総 ATPase 及び Mg²⁺ ATPase 活性が高いことを示している。

一方、レセルピンは VBL の細胞内流入には何ら影響を示さないが、²⁾ VBL 低感受性細胞に対してより強い VBL の細胞外流出抑制作用を示し、細胞内 VBL 濃度を感受性細胞の level にまで引き上げた。ここでレセルピンの VBL 蓄積機序について、レセルピンと VBL が細胞膜輸送機構において競合することが考えられたのでレセルピンの細胞内取り込み量を測定したが、取り込み量はそれぞれの細胞容積にはほぼ依存しており、単位容積あたりのレセルピン濃度に換算すると細胞間で明らかな差は認められず、細胞の VBL 感受性との間には何ら関係を見出すことはできなかった。また VBL 取り込み実験に用いた VBL 濃度の 10 倍 (1×10^{-6} M) にてもレセルピン (1×10^{-5} M) の取り込み量には何ら影響を示さなかった。しかしながら、細胞内濃度に相当する濃度のレセルピンは、細胞膜 ATPase のうち (Na^+ - K^+) ATPase 活性には全く影響を及ぼさないが、Mg²⁺ ATPase 及び Ca²⁺ ATPase 活性を有意に抑制した。

細胞内 VBL は、その細胞障害作用の主な作用点である microtubules を始め多くの細胞成分と可逆的に結合する。¹²⁾ 本実験では、VBL 高感受性細胞あるいはレセルピン処理細胞の細胞内 VBL 濃度は細胞外液 VBL 濃度の

約 30 倍であった。この細胞内 VBL の高濃度は遊離 VBL 量の増加を意味するものではなく、大部分が結合型 VBL と考えられ、これが細胞内 VBL 濃度の高い細胞が VBL に対して高感受性を示す要因であろう。一方、VBL の細胞外流出は能動的な機構が示された。物質の能動的膜輸送は濃度勾配に逆って行われるとの定義に従うとすれば、能動的細胞外流出の対象となる遊離型 VBL 濃度は細胞外液濃度に比して低いものと考えられる。

以上の結果より、ラット腹水肝癌細胞間の VBL 感受性の違いは、VBL の細胞外流出速度の違いに基づき、レセルピンの VBL 増感作用は、VBL の細胞外流出を抑制することによる。一方、VBL 耐性細胞の細胞膜 ATPase 活性は一般に高く、VBL の細胞外汲み出しには細胞膜 ATPase の関与が示唆された。レセルピンは Mg^{2+} ATPase 及び Ca^{2+} ATPase 等の ATPase 活性を抑制するが (Na^+-K^+) ATPase には何ら影響を及ぼさないことより、VBL の細胞外汲み出しや、レセルピンの VBL 増感作用への細胞膜 (Na^+-K^+) ATPase の関与は少なくとも否定できるものと推察される。

引用文献

- 1) R. Koshiura, K. Miyamoto, F. Sanae, *Gann*, **71**, 45 (1980); K. Miyamoto, S. Wakusawa, R. Koshiura, *ibid.*, **71**, 408 (1980); S. Wakusawa, K. Miyamoto, R. Koshiura, *ibid.*, **73**, 637 (1982).
- 2) S. Wakusawa, K. Miyamoto, R. Koshiura, *Jpn. J. Pharmacol.*, **36**, 187 (1984).
- 3) 医科学研究所学会編, “細菌学実習提要,” 丸善, 東京, 1973, p. 111.
- 4) T. Nakamura, A. Tomomura, C. Noda, M. Shimogi, A. Ichihara, *J. Biol. Chem.*, **258**, 9283 (1983).
- 5) 佐藤 了編, “細胞分画法,” 岩波書店, 東京, 1972, pp. 330—339.
- 6) N. C. Morcos, G. I. Drummond, *Biochim. Biophys. Acta*, **598**, 27 (1980).
- 7) C. M. Fiske, Y. Subbarow, *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925).
- 8) O. H. Lowry, N. T. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 9) 市村宏子, 癌と化学療法, **2**, 605 (1975).
- 10) M. Inaba, K. Takayama, Y. Sakurai, *Gann*, **72**, 562 (1981).
- 11) S. Tsukagoshi, A. Moriwaki, Y. Sakurai, *Gann*, **62**, 65 (1971).
- 12) R. J. Owellen, D. W. Donigian, C. A. Hartke, R. M. Dickerson, M. J. Kuhr, *Cancer Res.*, **34**, 3180 (1974).