

テトラサイクリンの蛍光による腫瘍浸潤 限界判定の可能性に関する研究

京都大学医学部第1外科学教室（指導：本庄一夫教授）

水 野 正 彦

（原稿受付：昭和43年7月4日）

Studies on the Feasibility of Tetracycline-Fluorescence Method in Cancer Detection

by

MASAHIKO MIZUNO

From the Department of Ist Surgery, Kyoto University Medical School
(Director : Prof. Dr. ICHIO HONJO)

In 1957, RALL et al. found that systemic administration of tetracycline gave rise to the appearance specifically in the tumor tissue and not in normal ones. The phenomenon has been applied clinically as a supplementary measure in cancer detection. In the present study, distribution of tetracycline-fluorescence was studied in transplantable ascites and solid tumors to re-appraise the feasibility of the technique in cancer detection.

MATERIALS AND METHODS

Five kinds of tumors (Ehrlich, S 180, SN-36, NFS, FVL) were used in the study. The tumor was transplanted to d-d mouse, subcutaneously, intraabdominally, or into the liver, and appearance of fluorescence was compared in tumors of different size and location. Non-malignant cells in the ascites of casein-induced peritonitis served as control for ascitic tumor cells. Each mouse carrying a solid tumor received 5 mg of tetracycline subcutaneously daily for 5 days and mouse with ascites tumor 1 mg of tetracycline daily for the same period of time.

Distribution of fluorescent material in the cells was also studied by dividing fluorescent cells into subcellular fractions by homogenization and ultra-centrifugation.

RESULTS AND CONCLUSION

The fluorescence was invariably observed in the ascites tumors. Distribution of the fluorescent material was limited to the cytoplasm and mostly confined to mitochondria. The inflammatory cells of casein-induced peritonitis also showed fluorescence of similar degree and localization as the ascites tumor cells. On the other hand, ascites tumors transplanted subcutaneously or in the liver and growing as solid tumors did not show the fluorescence.

According to the other condition in vitro, the solid tumors however, did take tetra-

cycline when broken up into isolated cells, the distribution of fluorescent material being same with that of ascites tumor.

The results suggest that tetracycline fluorescence observed by other workers with solid human tumors may have been limited to foliative cells or cell debris covering parts of the tumor.

To accomplish such a object, I believe, it is necessary to use something which has specific affinity to the tumor—fluoro-antibody method.

は じ め に

テトラサイクリンは、腫瘍あるいはその剝落細胞に多くとり込まれる性質があり、これに紫外線を照射すると鮮明な黄色の螢光を示す事が知られている。この事実は、すでに多くの研究者によつてとりあげられ¹⁾ 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9) 10)、簡易診断法として細胞診に利用する試みもなされている^{11) 12) 13) 14) 15) 16) 17) 18) 19) 20) 21) 22)}。

さて、悪性腫瘍の手術時に、手術野において腫瘍の浸潤範囲を肉眼的に判定することは困難な場合が多い。リンパ節転移についても同様である。もし腫瘍の浸潤範囲を肉眼的に識別し易くする方法があれば、切除範囲や廓清範囲の決定に資するところ大なるものがあり、ひいては手術による根治率を著しく高め得るであろう。テトラサイクリンの螢光は、この目的に利用し得るものであるかどうかを検討することが、この研究の目的である。

実 験 材 料

1) 動物：d-d系成熟マウス

2) 腫瘍：エールリッヒ癌

ザルコーム180 (S180)

SN 36

NF ザルコーム (NFS)

フレンド・グヴィールス・白血病 (FVL)

註：記載の都合で、略称が広く用いられているものは、それに従うことにした。

3) 薬品：塩酸テトラサイクリン

4) 光源：オリンパス高圧水銀灯

フィルター：BG 3, BG 12, Y 3, Y 4.

実験およびその成績

1) カゼイン腹膜炎による腹水中細胞の螢光

(i) 実験目的

腫瘍に対するテトラサイクリン投与の実験に先立ち、正常(非腫瘍性という意味で)細胞に対するテト

ラサイクリン投与の効果をみるため、カゼイン腹膜炎による実験を行なった。

(ii) 実験方法

7%カゼイン溶液2mlを腹腔内へ注入した²³⁾ マウスを3群(A, B, C)にわけて、A群：0.1mg, B群：1mg, C群：10mg(1群は10匹)のテトラサイクリンを、それぞれ皮下に投与した。

第2日目より、まず腹水の採取を行ない、その直後に前日と同量のテトラサイクリン投与を行なった。この操作を、腹水採取が可能な間にわたつて反復した。

採取した腹水は、充分大量の生理食塩水で洗滌し、遠心分離によつて炎症性細胞を集めた。このようにして得られた沈渣の一部は、直ちに、固定することなく紫外線顕微鏡によつて、螢光の強さおよび分布の状態などの検査をした。残りの沈渣は濾紙上に塗抹して乾燥させたのち、紫外線を照射して、肉眼的に螢光の強さを判定した。

(iii) 実験成績

紫外線顕微鏡による観察では：

(i). A群(0.1mg/日投与)の炎症性細胞には螢光を認めるようにならなかった。

(ii). B群(1mg/日投与)では、わずかに螢光を認めるようになった。

(iii). C群(10mg/日投与)は、投与回数を重ねるにつれて次第に螢光を増し、かなり強い螢光を示すようになったが、この場合のテトラサイクリンの投与量は、単位体重当りに換算すると500mg/kgにも及んだ。これは、テトラサイクリンの皮下投与時におけるLD₅₀=350mg/kgをはるかに越えていたため、大部分のマウスが第1回のテトラサイクリン投与で急性中毒死した。また、2回以上のテトラサイクリン投与に耐えたマウスはなかった。

螢光を認めるようになったB群とC群の炎症性細胞内での螢光の分布は、数種別になつていた。しかし、

細胞質中の特定な部位に蛍光が集中して分布するようになることもないようであつた。また、核膜や核内には蛍光が分布しないようであつた。

腹水中の炎症性細胞の構成は、炎症の時間的経過によつて、多少の変化があつたか、大部分は白血球が占め、ついで淋巴球が占めていた²³⁾。しかし、蛍光像から細胞の種類を鑑別することはできなかった。

濾紙上に塗抹して乾燥させた標本を肉眼的に観察したところ、紫外線顕微鏡を用いた観察と同じように：

ⅴ). A群(0.1mg/日投与)では、全経過を通じて蛍光を認めなかつたが、

ⅵ). B群(1mg/日投与)では、投与回数に比例して次第に強くなるが、C群の1回投与後の標本が示すよりは弱い蛍光を示した。

ⅶ). C群(10mg/日投与)は、1回の投与で、B群の3回投与後の標本が示した蛍光よりも強い蛍光を示した。

しかし、B群・C群が示した蛍光の強さは、のちにエールリッヒ癌などの実験腫瘍の腹水型について行なつた同様な実験で観察した蛍光よりも、はるかに弱いものであつた。

2). エールリッヒ腹水癌。

(a). テトラサイクリン投与量の決定

(i). 実験目的

前の実験によつて、テトラサイクリンを投与すると、腹水中の炎症性細胞に蛍光があらわれることが判つた。そこで、実験腫瘍にも蛍光があらわれるか否かを検討するために、以下の実験を行なつた。

エールリッヒ腹水癌を用いたのは、入手しやすかつたことによるか、腹水型腫瘍を用いたのは、同一個体の経時的变化を追跡するのに便利なためである。

(ii). 実験方法

エールリッヒ腹水癌の腫瘍細胞を約 10^4 個腹腔内へ移植して、1週間経過したマウス30匹を、各10匹ずつの3群(D, E, F)にわけた。それぞれのマウスに前の実験と同じように、テトラサイクリンの皮下投与と腹水の採取とを行なつた。テトラサイクリンの投与回数は最高5回であつた。したがつて、腹水の採取は、テトラサイクリン投与前のコントロールを含めて合計6回である。採取した腹水の処理と観察の方法は、前の実験と同様である。

なお、テトラサイクリンの1回当り投与量は、D群：0.1mg/匹、E群：1mg/匹、F群：10mg/匹とした。

(iii). 実験成績

D群は、5回のテトラサイクリン投与では十分な強さの蛍光を示すに到らなかつた。投与回数を6～7回までふやしたが、それでもなお、極めて弱い蛍光を認める程度で、蛍光の強さが極大に達するまでに腫瘍死した。この所見は、紫外線顕微鏡で検査した場合も、濾紙上の塗抹標本を肉眼的に検査した場合でも同じであつた。

E群(1mg/匹投与)は、投与回数を重ねるにつれて次第に蛍光が強くなり、4～5回投与で、この群の最高の強さの蛍光を示すようになった。それ以後は、投与回数をふやしても蛍光の強さは増強しなかつた。

F群(10mg/匹投与)は、第1回のテトラサイクリン投与で、すでにE群(1mg/匹投与)の最高の強さの蛍光よりもなお強い蛍光を示したが、前の実験と同じように急性中毒死するため、2回以上のテトラサイクリン投与に耐える個体はなかつた。

以上の結果よりみて、1回1mgずつ5回にわたつてテトラサイクリンの投与を行なうのが、最少有効投与法であると判断した。

(b). 休薬期間の決定

(i). 実験目的

テトラサイクリンは投与直後より吸収がはじまり、急激に血中濃度がたかまる。その後、全身の骨に沈着したり、或いは細網内皮系の細胞にとり込まれ、さらに肝や腎より排泄され、血中濃度は次第に低下してゆく。従つて、血行性にテトラサイクリンの供給を受けている腫瘍細胞や体細胞中のテトラサイクリンの量は、これらの細胞が選択的にテトラサイクリンを取り込んで保持するのでないかぎり、時間的なずれはあるにしても、結局血中濃度の変動に従うものと考えられる。

一方、前の2つの実験よりみて、正常な細胞にくらべて腫瘍細胞の方がテトラサイクリンを、多少なりとも多くとり込むように思われる。Helander²⁴⁾、Böttiger³⁴⁾の論文によれば、正常体組織のテトラサイクリンによる蛍光は投与後2時間を頂点として急速に減退する。もし腫瘍組織の蛍光減退が正常体組織の蛍光減退よりもおそければ、正常体組織のテトラサイクリン蛍光の強さと腫瘍組織のテトラサイクリン蛍光の強さの差が最も大きくなる時期があるはずで、この時期に検査を行なえば、正常体組織と腫瘍組織を明瞭に区別し得るであろう。

そこで、このような適切な時期があるとすれば何時であるか、それを検討するために、次の実験を行な

つた。

(ii) 実験方法

前述の条件でテトラサイクリンの投与を継続し、逐日検査で最も強い蛍光を示すようになったところでテトラサイクリンの投与を止めた。その後、毎日腹水穿刺を行なつて、得られた資料を前述の実験と同じように処理したのち、腫瘍細胞の蛍光の強さを観察した。

(iii) 実験成績

各群とも、投与後6時間までの蛍光の強さはいくらか増強した。24時間後までは、蛍光の強さの減少がほとんど認められないが、その後急速に減弱してゆき、72時間後には、ほとんど蛍光が消失した。

以上の所見より、最終投与の後、24時間前後に検査するのが良いと考えられる。

3). エールリッヒ結節癌による実験

a). テトラサイクリン投与量の検討—1—

i). 実験目的

エールリッヒ腹水癌に対するテトラサイクリンの投与量と休薬期間が判つたので、エールリッヒ結節型腫瘍についても、腹水型腫瘍と同じようにテトラサイクリン投与により、正常組織と腫瘍組織との区別をつけ得るほど充分な強さの限局性の蛍光が、腫瘍組織にあらわれるかどうか検索するため、次の実験を行なつた。

(ii). 実験方法

エールリッヒ腹水癌細胞を約 10^4 個とり、マウスの背部皮下に移植して、約1週間経過すると、皮膚の上より腫瘤を触れるようになる。このように準備したマウス10匹を一群として、毎日1mg/匹ずつ、5日間にわたつてテトラサイクリンを投与した。最終投与のあと24時間目に紫外線を照射しながら剖検した。

(iii). 実験成績

肋骨や四肢の長幹骨、さらに脊椎およびテトラサイクリンの注射部に中等度の蛍光を認めた。また、皮膚にも極めて弱い蛍光を認めたが、腫瘤の表面と断面には全く蛍光を認めなかつたので、正常組織と腫瘍組織とを、蛍光の有無によつて区別することはできなかつた。一部のマウスでは、肝・胆嚢壁・腸内容・膀胱壁に弱い蛍光を認めた。

b). テトラサイクリン投与量の検討—2—

i). 実験目的

a)の実験で腫瘍に蛍光があらわれなかつたのは、テトラサイクリンの投与量が充分でないことに原因があると考えた。そこで、結節型に適した投与量を調べる

ため、次の実験を行なつた。

(ii) 実験方法

a)の実験と同様に準備したマウス20匹を、各10匹ずつのG群およびH群にわけた。G群には1日5mg/匹、H群は1日10mg/匹のテトラサイクリンを皮下に投与した。投与回数は、G群で5回、H群で1回としたが投与回数をこれ以上にすると、大部分のマウスが中毒死した。投与終了後の蛍光検索は、前述と同じ方法である。

(iii). 実験成績

H群(10mg/匹投与)は、腹水癌の場合と同じように、1回のテトラサイクリン投与で全例が中毒死した。

剖検したところ、腫瘤の表面と断面に蛍光を全く認めなかつたが、四肢の長幹骨など、3)-a)の実験と同一部位に蛍光を認めた。

G群(5mg/匹投与)では、一部の例で腫瘍中の壊死部にかかなり強い蛍光を認めたが、腫瘍細胞が変性を起こしていない部分では、腫瘍の表面にも断面にも蛍光を認めなかつた。骨をはじめ、胆嚢壁・膀胱壁・腸内容などH群と同じ部位に蛍光を認めた。しかし、その蛍光の強さは、すべての蛍光陽性の部位でH群が示す蛍光の強さより弱かつたが3)-a)の実験の場合よりはかなり強い蛍光であつた。

4). エールリッヒ癌の肝内および腹膜上転移に対する実験

(i). 実験目的

3)-a)および3)-b)の実験では結節腫瘍に蛍光があらわれなかつたが、これは移植部位の差違や周囲組織の影響によるのではないかと考えて、次のごとく実験を行なつた。

肝移植を行なつたのは、移植床である肝組織がテトラサイクリンの排泄臓器の1つである上に、血液循環にめぐまれているから、移植腫瘍組織片に充分な量のテトラサイクリンが供給されるであろうと考えたためである。

また、腹膜直下に移植を行なつたねらいは、腫瘍の表面が腹膜を破つて増殖して、その表面がテトラサイクリンを含んだ腹水によつて洗われるようになる点にあつた。

(ii). 実験方法

マウスをエーテル麻酔のもとに開腹して、肝内・肝の漿膜直下および腹膜直下に、エールリッヒ癌腹水を0.01ml ($10^2 \sim 10^3$ 個) 注入した。移植してから1週間後より、3)-b)の実験に基づいて、テトラサイクリンを

毎日 5 mg/匹 づつ 5 日間皮下投与した。最終投与のあと 24 時間目に、紫外線照射を行ないながら剖検した。

(iii) 実験成績

肝内・肝漿膜直下、腹膜直下いずれの転移にも、腫瘍の表面と断面に蛍光を認めなかつた。従つて、正常組織と腫瘍組織を蛍光によつて区別することはできなかつた。稀に、肝実質に弱い蛍光を認める例があつたが、この場合にも腫瘍には蛍光を認めなかつた。

5). 破碎した結節型エールリッヒ癌の蛍光

(i). 実験目的

腹水型の腫瘍細胞にはテトラサイクリンがとり込まれて蛍光をあらわすのに、結節型の腫瘍になると、移植部位を替えたり、腫瘍の表面を腹水が洗うような状態にしても、蛍光を示すにはいたらなかつた。このような差違か、結節型と腹水型とで、エールリッヒ癌細胞そのものの性格が異なることに起因するかどうかを調べるため、次の実験を行なつた。

(ii). 実験方法

マウスの背部に移植して約 1 週間経過したエールリッヒ癌の腫瘍をとつて、これをホモジェナイザーで軽く破碎した。この破碎物を生理食塩水に浮遊させたものと、エールリッヒ癌腹水とをそれぞれ小試験管にとり、これにテトラサイクリンを 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 混入した系列を作つて、37°C に保ち、蛍光の経時的变化を観察した。

(iii) 実験成績

腹水中の腫瘍細胞も、破碎した固型腫瘍の小細胞塊も、蛍光の強さの増強は全く同じ傾向を示して、両者の各時間における蛍光の強さに差を認め得なかつた。

6). 他の実験腫瘍について。

(i). 実験目的

エールリッヒ癌を用いた実験では、前述のごとく、期待通りの成績が得られなかつた。そこで、他の腫瘍について同様な実験を行なつた。

実験は、動物側の条件を一定にするために d-d 系マウスを用いた。したがつて、実験に用いる腫瘍は d-d 系マウスに移植できる腫瘍に限られた。

(ii) 実験方法

次の腫瘍について、エールリッヒ癌の場合と同様な方法で実験を行なつた。

ザルコーム 180 (S 180)

NF ザルコーム (NFS)

SN 36

フレンドヴィールス白血病 (FVL)

このうち、腹水型移植も可能な S 180, SN 36, FVL については腹水型と結節型の両者について実験を行なつた。

テトラサイクリンの投与量は、腹水型は 1 mg/匹 づつ 5 日、結節型は 5 mg/匹 づつ 5 日、休薬期間はいずれも 24 時間とした。

(iii). 実験成績

S 180, SN 36, FVL については、エールリッヒ癌と同じように腹水型の腫瘍細胞には著明な蛍光を認めるようになったが、結節型腫瘍では、腫瘍の表面にも断面にも、全く蛍光を認めなかつた。

身体各部や臓器の蛍光の分布と強さは、エールリッヒ癌の場合と全く同じであつた。

NFS だけが腫瘍の表面にかなり強い蛍光を示した。また、その断面でも層状になつた強い蛍光を示す部分があつた。

この場合、蛍光による腫瘍細胞の浸潤境界の判定と、可視光線による肉眼的判定はほぼ一致した。

特に、腫瘍の周囲が被膜で包まれたような形になっていると、蛍光を示す範囲と肉眼的にみた腫瘍の境界は完全に一致した。しかしながら、腫瘍細胞がびまん性に浸潤している場合には、殊に筋層の間や血管周囲の結合織に沿つた浸潤がある場合には、蛍光による腫瘍境界の判定に従つて腫瘍を切除したところ、組織学的には、断端より 5 mm 以上も腫瘍の浸潤が残されていた。

7). 腫瘍細胞内におけるテトラサイクリンの分布について、

(i). 実験目的

実験に用いたすべての腹水型腫瘍と、結節型のうちただ 1 種類の NFS のみが腫瘍細胞に明らかな蛍光が認められた。そこで、これらの腫瘍では、テトラサイクリンが細胞内のいかなる構造に結びついているかを検討するため、次の実験を行なつた。

(ii). 実験方法

次の 3 種類の資料について細胞内におけるテトラサイクリンの分布をしらべた。

(i). 蛍光を示すようになったエールリッヒ腹水癌細胞

(ii). エールリッヒ癌, S 180, SN 36 の結節型腫瘍を破碎して小細胞塊としたもので、テトラサイクリンと接触させて蛍光を示すようになったもの。

(iii). 蛍光を示すようになった NFS.

腹水型腫瘍の資料と結節型腫瘍を破碎した資料は、

それぞれ0.25M蔗糖液で洗滌して遠心分離にかけてから、更に、沈渣の約10倍量の0.25M蔗糖液を加えて、ポッターのガラス・ホモジナイザーを用いてホモジエネートにした。

NFSは資料1gについて約10mlの0.25M蔗糖液を加え、同じように操作してホモジエネートを作った。

これらの資料を、いずれも富永90UV型冷却遠心器を用いて600G10分の遠心分離を行なった²⁷⁾²⁹⁾。得られた沈渣に0.25M蔗糖液を加えて懸濁させたのち、再び600G10分の遠心分離を行なつて核分画を得た。

核分画を落し上清を、日立55PA型超遠心分離器によつて5000G10分の遠心分離を行なつた。得られた沈渣を再び0.25M蔗糖液に懸濁したのち、24,000G10分の遠心分離を行なつてミトコンドリア分画を得た。

ミトコンドリア分画を落した上清に54,000G10分の遠心分離を行なつて、ミクロゾーム分画を得た。この遠心分離の際の上清が細胞質上清である。

(iii). 実験成績

各々の資料について蛍光を観察したところ、ミトコンドリア分画に強い蛍光を認めた。ミクロゾーム分画と核分画には蛍光を認めないか、まれに、極めて弱い蛍光を認めた。

8). 蛍光顕微鏡所見

(i). 実験目的

形態学的にテトラサイクリンの細胞内での分布を検査した。

(ii). 実験方法

被検組織に普通の固定と包埋を行なうと、テトラサイクリンが水溶性であるため、流れ去ってしまうので、凍結切片を作製して検査した。

(iii). 実験成績

1). 腹水型腫瘍

エールリッヒ癌、S 180、SN 36、FVLのいずれも、カゼイン腹膜炎の炎症性細胞と同じように、核内に蛍光を認めず、細胞質内に顆粒状に蛍光を認めた。しかし、蛍光像のみからは、それ以上の特徴的分布状態を判定することは困難であつた。

また、蛍光像だけで腫瘍の種類を鑑別することもできなかった。

2). 破碎した結節型腫瘍

軽くホモジナイザーにかけたとき破壊された細胞では全体が一様な蛍光を示しており、核の区別もつかなくつた。

破碎されていないが小塊に分離された細胞群では、

腹水中の腫瘍細胞と同じように、核には蛍光を認めず、細胞質中に顆粒状の蛍光を認めた。

3). 結節型腫瘍

肉眼的にテトラサイクリンによる蛍光を認めなかつたエールリッヒ癌、SN 36、S 180、FVLでは、組織像でも蛍光を認めなかつた。

肉眼的に弱い蛍光を認めた肝の組織像では、肝細胞の細胞質内に弱い蛍光が顆粒状に認められた。また細胆管内の分泌物には、肝細胞に比較してやや強い蛍光を認めた。

胆嚢では、粘膜上皮に弱い蛍光を認めた。

肉眼的に腫瘍に蛍光を認めた NFS の組織像では、腫瘍細胞および腫瘍中に含まれる血管の上皮細胞や結合組織細胞に弱い蛍光を認めた。細胞内の蛍光の分布のしかたは、腹水中の腫瘍細胞などと全く同じ様子であつた。しかし、最も強い蛍光を示したのは、腫瘍中に層状あるいは塊状に存在する壊死に陥つた部分であつた。エールリッヒ癌皮下結節のある例では、腫瘍中の壊死に陥つた部分に、NFS の場合と同じようなかなり強い蛍光を認めた。

紫外線照射下で蛍光を肉眼的に観察して、腫瘍と判断された蛍光陽性の部分を切除し、残りの部分について紫外線顕微鏡による検査を行なつたところ、断端に蛍光を示す腫瘍組織が取り残されていた。

また、H. E. 染色標本によれば、断端より5mm離れた部分に腫瘍細胞の浸潤を認めた。

9). 腫瘍断面の生体染色

(i). 実験目的

以上の実験によつて、腫瘍によつてはテトラサイクリンを全身投与した場合、遊離細胞および一部の腫瘍細胞、ならびに壊死部にテトラサイクリンが多く集まることが判つた。壊死部か、『腫瘍の他の部分にくらべて血行がよく、血行性に供給されるテトラサイクリンの量が特に多い』とは考えられないので、腫瘍細胞が変性をおこしてから壊死に到る過程の間にテトラサイクリンを選択的にとり込むものかもしれないと考えられる。この疑問を検討するため、次の実験を行なつた。

(ii). 実験方法

1μg/ml, 10μg/ml, 100μg/ml, 1mg/mlの濃度でテトラサイクリンを含む5%ブドウ糖液を準備する。実験3), 6)と同じように皮下に移植したのち2週間以上を経過して、一部に軟化、崩壊がはじまつているエールリッヒ癌、NFS、S 180の腫瘍を、それぞれ厚さ

2～3 mmのスライスとし、各々テトラサイクリン溶液の中に投入する。約1分後、これらのスライスを取り出し、5%ブドウ糖液で充分洗滌して表面に附着しているテトラサイクリンを除去したのち、これを紫外線照射下に、肉眼的観察を行なつた。凍結切片によつて紫外線顕微鏡観察を行なおうとしたが、資料が崩壊して標本を作れなかつた。従つて、スライス表面のスタンブ標本について紫外線顕微鏡検査を行なつた。

肉眼的観察では、被検標本を浸漬したテトラサイクリン溶液の濃度が10 μ g/ml, 100 μ g/mlのとき腫瘍の一部に強い螢光を示すようになった。1 μ g/mlでは螢光を認めず、1mg/mlのテトラサイクリン溶液浸漬した標本では、腫瘍と周囲組織との区別なく全体に強い螢光を示した。また、100 μ g/mlのテトラサイクリン溶液で処理した標本では、肉眼的に壊死に陥つたり溶解しかけた部分に螢光を認めた。この標本では、変性をおこしておらない腫瘍部分は螢光を示さなかつた。したがつて、腫瘍周辺部の筋肉との境界を螢光によつて判定することはできなかつた。

螢光を示す部分のスタンブ標本では、細胞の破壊物と思われる無構造の螢光を示す物質が存在したが、細胞のいかなる構造物に由来するものであるか判断することはできなかつた。

螢光を示す部分のパラフィン切片をH. E. 染色したところ、腫瘍が変性ないしは壊死に陥つてゐる像を示した。

100 μ g/mlのテトラサイクリン溶液で螢光を示すようにならない部分は、筋肉・結合織・変性をおこしていない腫瘍細胞であつた。

実験成績の総括

1) NFSでは、5mg/匹5日間のテトラサイクリン投与で結節型腫瘍に螢光を認めた。しかし、肉眼で認められる螢光の限界を越えた範囲にまで、腫瘍の浸潤のあることが組織学的に明らかにされた。

2) エールリッヒ癌、S 180、SN 36、FVLでは、いずれも腹水型のとき1mg/匹5日間のテトラサイクリン投与で腫瘍細胞に螢光があらわれた。しかし、これらの腫瘍を結節型にすると、テトラサイクリンの投与量を5mg/匹5日間に増加しても腫瘍に螢光を発しなかつた。

3). これらの螢光を発しない結節型腫瘍を数ヶの細胞よりなる小塊に破碎したのち、テトラサイクリンを含む溶液に入れておくと、腹水型腫瘍細胞と同じ速度

で同じ強さの螢光を示すようになった。

4). すべての螢光陽性の腫瘍細胞では、テトラサイクリンは細胞質内に顆粒状に分布しており、核内には螢光が存在しなかつた。

超遠心分離によつて細胞成分を各分画にわけると、ミトコンドリア部分に強い螢光を認めた。核・ミクロゾーム・細胞質上清にはほとんど螢光を認めなかつた。

5). 炎症性細胞(主として好中球)も、腹水型腫瘍細胞と同じ条件で螢光を示すようになったが、その螢光の強さは腹水型腫瘍細胞が示す螢光よりも弱かつた。

6). 腫瘍断面をテトラサイクリン溶液に浸漬して螢光検査を行なつたところ、肉眼的観察では同一腫瘍内に部分的にテトラサイクリンで染まりやすい部分が存在した。

7). 組織学的検査では、筋肉その他結合織および変性していない腫瘍細胞はテトラサイクリンに染まり難く、壊死に陥つた部分と変性した腫瘍細胞が強い螢光を示した。

考 察

テトラサイクリンが腫瘍組織に親和性をもち、紫外線照射下に黄色の螢光を示すことは、1957年 Rall¹⁾が報告して以来、すでに多数の基礎的研究^{2) 24) 27) 32) 33)} あるいは臨床的報告が行なわれている^{3) 4) 5) 6) 7) 8) 9)} 13)。これらの文献をみると、テトラサイクリンの腫瘍に対する親和性に関して、所見が必ずしも一致していない。

即ち、Rall¹⁾らのごとく腫瘍に局限した螢光を認めたと報告しているもの^{1) 3) 5) 7) 21) 12) 17) 18) 21) 26)} あるいは腫瘍部位にはほぼ一致した螢光を認めたが、腫瘍細胞そのものには螢光が存在せず腫瘍間質²⁾・組織球^{10) 15) 16)}・腫瘍分泌物^{8) 14) 17) 19) 27)}が螢光を示すというもの、更に、腫瘍細胞とテトラサイクリンの間に特別な親和性を認め得なかつた^{6) 13)}とする文献まである。

また、臨床例において、テトラサイクリンを全身的に投与した患者の手術野で、腫瘍に紫外線を照射し、その腫瘍が癌性であるか否かを判定しようとする試み⁴⁾も行なわれている。

われわれは、はじめに述べたごとく、この試みを更に一歩進めて、肉眼的には判定し難い腫瘍浸潤の限界とリンパ節転移の有無を、テトラサイクリンの螢光の助けをかりて直視下に判断しながら切除し、必要以上

の手術侵襲を避けながら、なるべく徹底的な廓清を行なうことが合理的であると考えた。それには、テトラサイクリンが腫瘍に対して特異な親和性を有することが前提となる。

腫瘍に対する化学薬剤の特異的親和性は、診断的価値よりも、副作用の強い制癌剤を個体に悪影響を及ぼすことなしに選択的かつ効果的に腫瘍のみに作用させようという意図で検討されている。しかし、一部の実験腫瘍で証明されている免疫抗体の他には、このような特異的親和性を有する物質の存在は確認されていない。

ところで、テトラサイクリンの蛍光に関する諸家の文献をみると、漠然とテトラサイクリンは腫瘍に『親和性』があると表現しているものが多い。われわれの実験では、期待に反して、非特異的親和性は認められたが、腫瘍細胞に対する特異的親和性を認めることはできなかった。

われわれは、高等動物にとつてテトラサイクリンが一種の生体色素であると考えた。この観点より『親和性』についてすこしく考察したい。

一般に薬物がある細胞に親和性を示すということは、その薬物がまずその細胞に到達し、ついで細胞膜を通過し、細胞内の何らかの構造物質に結びつくということである。さらに、その細胞に特異的な親和性を示すためには、種々なる要因が考えられるが、結合する細胞内物質が質的あるいは量的に、その細胞独特のものであることが必要である。薬物の親和性を論ずる場合、薬物が細胞に到達する過程がまず問題になることは、実験 2)、3)、4)、5)、6) によつて示された。即ち、腹水中の遊離腫瘍細胞はテトラサイクリンを含んだ medium 中に浮かんでおり、細胞の全表面から直接テトラサイクリンを吸収することができる。結節型腫瘍では、たとえ血液循環が良好であつても、多数の腫瘍細胞が密に存在するため、腫瘍組織に血行を介して運び込まれるテトラサイクリンの量は、相対的には低くなる。私の実験成績では、腹水型のとき蛍光を示す腫瘍が結節型にすると蛍光を示さなかつた。しかしこの結節を破砕して遊離状態にすると、腹水型のときと同じように蛍光を示した。腫瘍細胞は、その株を維持するのに組織培養法を用いた場合でも、動物に移植する方法を用いた場合でも、相当長い期間を経過しないかぎり、その性質がかわるものではない²⁸⁾ので、私の実験の場合でも、腹水型のときテトラサイクリンの蛍光が陽性でありながら、結節型にしたとき蛍光が陰

性になつた原因を、腫瘍細胞の性質が変化したためとは考えられない。実験 5)、7) の示すごとく、テトラサイクリンの蛍光を発しない結節型腫瘍を破砕してテトラサイクリン溶液を作用せしめるとテトラサイクリンの蛍光を示すようになった事実も、これを裏付けるものである。これらの所見は、制癌剤が一般に腹水型腫瘍の場合に効果をあらわしやすいという臨床および動物実験²⁰⁾の成績を説明する一つの資料になり得るものである。

ところで実験 3)、6) によれば、腫瘍の種類が違えば結節型腫瘍でもテトラサイクリン投与によつて蛍光を示した。しかしこの場合、腫瘤を形成する全腫瘍細胞がテトラサイクリンの蛍光を示すようになったのではなく、腫瘤のごく一部あるいは変性・壊死に陥つた部分に蛍光があらわれたにすぎなかつた。実験 2)、5)、6) の場合のように、腫瘍細胞が遊離の状態で腹水型ないしはそれに近い条件下におかれた場合には、実験に用いたすべての腫瘍でテトラサイクリンによる蛍光のあらわれ方にほとんど差違を認めなかつた。また、後藤²¹⁾の組織培養による実験でも、腫瘍の種類の違いによるテトラサイクリン蛍光の消長に差異がなかつた。この事実は、同じ量のテトラサイクリンが細胞に到達したとき、これを取り込むか否かは細胞の遺伝的に固定された性質によつて決定されるのではなく、そのときおかれている細胞の状態によつて決まることを示している。しかし、細胞内にとり込まれているテトラサイクリンが、細胞表面における受動的移行によるものではなく、何らかの能動的機能が関与しているものと考えられるが、田中³⁰⁾は超生体染色による実験で、この点を検討している。細胞内被系の機能の一つである貪食作用は、細菌の如き巨大な異物やコロイド粒子・高分子物質を対象とするものであり、生体染色色素のごとき低分子の物質が細胞内へ入る過程については、貪食作用以外の機能が関与しているものと考えられる。

私の実験でも、テトラサイクリンによる蛍光は、細胞内被系の細胞でも腫瘍細胞でも全く同じようにミトコンドリア部分に観察された。従つて、テトラサイクリンの細胞内侵入を考察するにあつては、必ずしも貪食機能にとらわれる必要はないと考える。

ある物質が貪食によらないで細胞内へ侵入するためには、その物質の粒子の大きさが細胞膜を構成する Polypeptid の網目の大きさより小さくなければならない。一般に用いられる超生体染色色素の分子量は、ヤ

ーヌス緑：539.1，カルミン：225.7，トリパン青：960.8であるのに対し，テトラサイクリン（アクロマイシン・V）は分子量480.9である。分子量と分子の大きさは必ずしも比例しないが，テトラサイクリンの粒子が細胞内へ侵入し得ないほど大きいものではないようである。

次に，色素粒子の荷電性が問題になる。生体染色に於ては，色素はイオンに解離して細胞膜または Pino-cytosis 膜を透過する。色素が塩基性であれば，すべての種類の細胞で生体染色が可能であるが，酸性色素では生体染色される範囲はるかに狭くなる。これは，一般の細胞では細胞膜表面の蛋白が負に荷電しており，カチオンである酸性色素の侵入を許さないのに，細胞内皮系など一部の細胞では，細胞膜荷電が中性に近い弱陰性であるため，比較的長期間の後には，酸性色素の通過を許すものである³⁰⁾。ところで，腫瘍細胞では解糖の著しい促進があり，乳酸の生成・pHの低下がある³¹⁾³²⁾³³⁾³⁷⁾ので，負に荷電したテトラサイクリン粒子の細胞内侵入は困難であると考えられる。しかしながら，現実にはテトラサイクリンの侵入が見られる。Drummond³⁸⁾によれば，腫瘍，殊に悪性なものほど，腫瘍組織蛋白に塩基性アミノ酸が多い。従つて，組織全体としてみるとときは乳酸の増加・pHの低下があつても，細胞膜表面の荷電の状態は，正常な体細胞に比較して，より弱い陰性に留まっているのではないだろうか。それ故，正常体細胞よりも腫瘍細胞にテトラサイクリンが入りやすかつたのではないかと考えられる。

腫瘍細胞内に侵入したテトラサイクリンは，単独では蛍光を発せず，Ca⁺⁺の存在³⁵⁾，Polypeptide との結合³⁾， β -lipoprotein との結合³⁷⁾などが必要であるとされているが，テトラサイクリンによる蛍光を発した腫瘍でも，腫瘍全体が一樣な蛍光を示さなかつたことは，腫瘍組織の局所的循環条件の差異による細胞の状態や機能の変化が影響しているためと考えられる。

細胞基質内へ侵入した色素は，ヤーヌス緑の場合，基質蛋白と結合し，これがミトコンドリアの膜構造に認むべき変化を件わずに侵入し，やがてミトコンドリア内に限局して濃縮される。その結果，ミトコンドリアは cristae の排列が不規則化し，やがてミトコンドリア内に空胞を形成する。次でこの空胞がミトコンドリアの外に排出される。即ち，ヤーヌス緑色素粒子を，ミトコンドリア内で濃縮隔離して，正常な機能を恢復せんとする過程が行なわれるわけである。テトラ

サイクリンについても，細胞基質の蛋白或いは lipoprotein との結合が認められており³⁾，ヤーヌス緑と同じ過程によつてミトコンドリアに集まるものと考えられる。私の超遠心分離による実験では，テトラサイクリンはミトコンドリアと行動を共にすることが判つた。

Du Buy³³⁾らは，猿腎を用いて組織培養を行ない，テトラサイクリンの細胞内分布を蛍光顕微鏡と位相差顕微鏡によつて観察している。この論文によれば，テトラサイクリンの蛍光はミトコンドリアに認められ，核・空胞・細胞質・間隙・細胞境界には分布しなかつた。また，Loo³⁾もミトコンドリアと結合したテトラサイクリンの蛍光を認めている。

テトラサイクリンの大腸菌に対する作用機序に関する実験³⁶⁾によれば，テトラサイクリンの薬理作用の本態は，酵素活性に必要な Mg⁺⁺・Fe⁺⁺・Mn⁺⁺などの2価の陽イオンをキレートするため，呼吸酵素系・脂肪酸酸化酵素系・アミノ酸活性化酵素系を阻害し，また Ribosome の破壊による蛋白合成の阻害であるとされている。私の実験腫瘍では，テトラサイクリン投与による制癌効果を認めなかつたし，松岡らの実験²⁷⁾でも，テトラサイクリンによる制癌効果はなかつた。したがつて，テトラサイクリンが腫瘍細胞の中でも大腸菌に対するのと同じような生物学的影響を及ぼしているとは考え難い。しかしながら，後藤²¹⁾をはじめ多くの実験で⁶⁾²⁴⁾³¹⁾³²⁾³³⁾，テトラサイクリンが Ca⁺⁺と結合していることは明らかである。腫瘍組織中では，正常組織にくらべて Ca⁺⁺の量が低下し，Mg⁺⁺が増加していると云われており³⁸⁾，殊に腫瘍細胞の遊離性は Ca⁺⁺の減少によると云われているので，腫瘍細胞でテトラサイクリンの蛍光が発せられた理由を Ca⁺⁺との結合で説明することはできない。Ca⁺⁺と結合しやすい性質は，骨が容易に強い蛍光を示すようになる事実の方を説明するものである。

ところで Mc Leay⁷⁾は壊死部にテトラサイクリンの蛍光を認めなかつた。そして，その原因は血行の欠乏であると説明している。しかしながら本実験では，一部の腫瘍（エールリッヒ結節癌，NFS）で壊死部に強い蛍光を認めた。Vasser¹⁶⁾，Sandlow⁸⁾らも細胞の debris に蛍光を認めている。

剖検時に，壊死部に蛍光が認められるためには，次のいずれかの過程が関与していると考えられる。

(i)，何らかの理由でテトラサイクリンを多くとり込んだ部分が壊死に陥つた。

(ii)，細胞に変性がおきてくると，テトラサイクリ

ンが入りやすくなる。細胞はテトラサイクリンをとつたまま、変性が進んで壊死に陥つた。

(iii), 壊死に陥つたあとで、テトラサイクリンが正常細胞より沈着しやすくなつて集まつた。

これらの点を明らかにするため実験9)を行なつた。腫瘍剖面に 100 μ g/ml のテトラサイクリン溶液を塗布したところ、損傷のない腫瘍細胞は螢光を示さなかつたが、壊死部は強い螢光を示した。一方、実験8)の所見では変性のある腫瘍細胞の方が損傷のない細胞より螢光を示しやすいようであつたが、しかし、テトラサイクリンを取り込んだために壊死に陥る経過を示す所見は得られなかつた。すくなくとも、壊死に陥るとテトラサイクリンに染まりやすくなる事が判つた。服部のアクリジン・オレンジを用いた生体染色では、健全な細胞は染まり難く、変性の度が進むにつれて染色性が増強した。

壊死の古さには3段階が区別されるが、螢光を認めるようになった壊死は概して最も古いもので、その部分では細胞は完全に微細顆粒状となり、炎症性浸出細胞は乏しく、ヘマトキシリン・エオジン染色では殆んど何も染まらず、凍結切片を作製しようとするれば、伸展操作中に溶解してしまうほどであつた。Vasser¹⁶⁾, Sandlow⁸⁾が螢光を認めた細胞の debris と一致するものと考えられる。

壊死部をはじめ、死物の染色には、生体染色と違つてすべての生理的機能は関与しない。従つて単なる物理化学的反応に左右される。壊死部が染まりやすいのは、蛋白が生理的機能から解放され、単純な塩基性物質としての蛋白に変化したため、酸性のテトラサイクリンと反応しやすくなつたものと考えられる。

結 び

テトラサイクリンを担癌生体に投与した場合にみられる腫瘍の螢光出現は、一種の生体染色現象で、その機転に関しては、他の生体染色色素と同じであると考えられる。

ある腫瘍細胞がテトラサイクリンによつて染められるためには、まずテトラサイクリンの充分な量が細胞壁に運び込まれる必要がある。それには、一般に結節型腫瘍よりも腹水型腫瘍或いは剝脱細胞や破碎細胞塊の方が有利である。

細胞に運ばれて来たテトラサイクリンは、解離して負に荷電しているので、細胞膜が強い負に荷電していると反発されて細胞内へ侵入できない。また、テトラ

サイクリンの粒子が細胞膜表面を構成する polypeptide の網目よりも大きいと、これを通過できない。細胞膜の構造・荷電性を文献的に検討³⁰⁾³⁷⁾したが、腫瘍細胞と正常細胞に大差はないようであつた。また、実験成績からみても、テトラサイクリンが選択的に腫瘍細胞に入りやすいという根拠を認めることはできなかった。

細胞内へ侵入したテトラサイクリンは、ヤーヌス緑と同じようにミトコンドリアで濃縮されるのであろう。

一般に、水溶性色素は呼吸が亢進している組織によく集まると云われる⁷⁾¹²⁾¹⁸⁾。かかる部分では細胞の呼吸機能に關与するミトコンドリアの機能も亢まつており、細胞内に侵入したテトラサイクリンの濃縮が、他の呼吸が亢まつていない細胞とは異なつた所見を呈することは可能であろう。テトラサイクリンが肉芽組織に集まることや、本実験で一部の腫瘍細胞に弱い螢光を認めた事実と関連があると考えられる。しかしながら、この点でもテトラサイクリンに腫瘍細胞のみに限られた特異的親和性は認められない。

以上のような実験成績および文献的考察より、テトラサイクリンによる腫瘍組織の染色に関して、特異的親和性を期待することは極めて困難であることが判明した。従つて、かかる親和性が存在するとして設定した本実験の仮説の成立は極めて怪しい。当初の目標を追求するためには、特異的親和性が確立している抗原抗体反応等を利用するのも一つの方法であらう。

要 約

エールリッヒ癌、S-180、SN 36、NFS、FVL をもつ担癌動物にテトラサイクリンを投与し、その後の腫瘍にあらわれる螢光を検討し、対照としてカゼイン腹膜炎の腹水細胞についての成績と比較して次の結論を得た。

1. 腹水型腫瘍細胞は、どの腫瘍でもテトラサイクリンの螢光が陽性になり、腫瘍の種類の違いによる所見の差はなかつた。

2. 炎症性細胞も腹水型腫瘍と同じようにテトラサイクリンの螢光を示した。

3. 腹水型のとき螢光を示す腫瘍を皮下結節型とすると螢光を示さないか、または極めて弱い螢光を示した。腫瘍の壊死部は強い螢光を示した。

4. 結節型腫瘍で螢光を示さない腫瘍細胞を破碎してからテトラサイクリンに接触させると、腹水型と同

のように螢光を示すようになった。

5. テトラサイクリンによる螢光出現は、一種の生体染色と考えられる。生体染色の機転と本実験の成績を考察したが、腫瘍細胞に対するテトラサイクリンの特異的親和性の存在は期待できない。

以上の点を総合して考えると、このような非特異的因子に支配されるテトラサイクリンの螢光出現によって、腫瘍の限界や転移の有無を判断することは困難である。

稿を終るに臨み、御指導を賜った本庄一夫教授並びに横山育三教授に心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ralll, D.P., Loo, T.L., Lane, M.G. : Appearance and persistence of fluorescent material in tumor tissue after tetracycline administration. J. National cancer Institute, **19** : 79-86, 1957.
- 2) McLeay, J.F. : The use of systemic tetracycline and ultraviolet in cancer detection. Preliminary report. American J. Surg., **96** : 415-419, 1958.
- 3) Loo, T.L., Titus, E.D., Rall, D.P. : Nature of fluorophore localizing in tetracycline treated mouse tumor. Science, **126** : 253, 1957.
- 4) 北川司良他 : テトラサイクリン投与による悪性腫瘍組織の螢光について。京都府立医大雑誌, **65** : 994, 1959.
- 5) McLeay, J.F., Walske, B.R. : Tetracycline in tumor, Surg. Forum, **11** : 79, 1960.
- 6) Phillipa, J.W., Cobb, E.G., Richards, V., Rhodes, W.D., Loehrer, D.C., Ritchie, J.L. : The deposition and retention of tetracycline in cancer. American J. Surg., **100** : 384-388, 1960.
- 7) McLeay, J.F., Walske, B.R. : Relationship of tetracycline to carcinoma. Ann. Surg., **156** : 313-317, 1962.
- 8) Sandlow, L.J., Necheles, H. : Tetracycline fluorescence in detecting malignancy. J.A.M.A., **189** : 5,
- 9) 桃田, 江崎 : テトラサイクリン系抗生物質による癌の診断について。実験治療, **387** : 7, 1964.
- 10) 天木一太 : 癌と螢光。実験治療, **387** : 7, 1964.
- 11) Berk, J.E., Plascencia, H. : Tetracycline induced fluorescence test for gastric cancer. A means of differentiating benign from malignant lesions of the stomach. 49th Annual Clinical Congress of the American College of Surgeons.
- 12) Sherman, H.H. et al. : Tetracycline fluorescence in the diagnosis of gastric cancer. Gastroenterology, **45** : 1,
- 13) 小塚 堯, 内田嘉具 : 螢光顕微鏡による胃癌細胞診の新方法。第50回日本消化器病学会
- 14) 三宅靖彦, 小塚 堯 : 螢光顕微鏡による癌細胞の細胞化学的研究。第23回日本癌学会
- 15) Berk, J.E., Kantor, S.M. : Demethylchlortetracycline induced fluorescence of gastric sediment. J.A.M.A., **179** : 13, 1962.
- 16) Vassar, P.S., Saunders, A.M., Culling, C.F. : Tetracycline fluorescence in malignant tumor and benign ulcer. Arch. Pathol., **69** : 613, 1960.
- 17) Klinger, J., Katz, R. : Tetracycline fluorescence in the diagnosis of gastric carcinoma. Gastroenterology, **41** : 29, 1961.
- 18) Yothida, Y. : The trials in the cytological diagnosis of gastric cancer. Part II. Use of tetracycline fluorescence technique in exfoliative cytology. Arch. für Japanische Chir., **XXI** : 296-301, 1962.
- 19) 柴田清人, 江崎柳節 : テトラサイクリン系抗生物質による癌の簡易診断法について。臨床と研究, **40** : 8, 1963.
- 20) 立神高郎 : 癌組織の螢光について。外科, **25** : 14, 1963.
- 21) 後藤義治 : テトラサイクリン螢光による胃癌診断法に関する研究。日本消化器病学会誌, **62** : 1, 1965.
- 22) 柴田清人, 江崎柳節 : テトラサイクリン系抗生物質による消化器癌の診断的価値について。日本消化器病学会誌, **62** : 9, 1965.
- 23) 稲田道夫 : 微量呼吸測定法による白血球の呼吸に関する研究。京都府立医大雑誌, **67** : 1, 1960.
- 24) Halander, S., Böttiger, L.E. : On the distribution of tetracycline in different tissues. Acta Medica Scandinavica, **147** : 71-75, 1953.
- 25) Whalley, P.J., Adams, R.H., Combes, B. :

- Tetracycline toxicity in pregnancy. J.A.M.A. **189** : 5
- 26) 土井康稔：マーキュロクロームの腫瘍組織親和性に関する研究。熊本医学会誌，**38** : 5, 1964.
- 27) 松岡寿夫：悪性腫瘍組織親和性物質に関する実研的研究。熊本医学会雑誌，**40** : 2, 1966.
- 28) 浜崎充彦：長期培養されたエールリッヒ腹水癌の性状について。岡山医学会誌，**76** : 1, 2, 3, 1964.
- 29) 東昇，中垣正幸：医学薬学実験装置ハンドブック。1965.
- 30) 田中春高：生体染色機転の電子顕微鏡的解析。最新医学，**17** : 1,
- 31) Milch, R.A., Rall, D.P., Tobie, J.E.: Bone localization of the tetracyclines. J. National Cancer Inst. **19** : 1, 1961.
- 32) Scheiner, J., Altemeier, W.A. : Experimental study of factors inhibiting absorption and effective therapeutic levels of declomycioe. Surg. Gynec. Obst. **114** : 9-14, 1962.
- 33) Du Buy, Showacre, J.L. : Selective localization of tetracycline in mitochondria of living cells. Science, **133**: 196, 1961.
- 34) Böttiger L.E. : On the distribution of tetracyclin in the body. Antibiotics and chemotherapy, **5** : 332, 1955.
- 35) Shibata, K., Esaki, R. : A study of diagnostic value in cancer detection by tetracycline. Nagoya Ked. J.
- 36) 横田 健，秋葉朝一郎：細菌の薬剤耐性伝達の機序と耐性の機構。医学と生物学，**64** : 2, 1962.
- 37) 中原和郎：癌の生化学。医学書院，1960.
- 38) Drummond, J.C. : Biochem. J., **10** : 473, 1916.