〔千葉医学 51, 81～89, 1975〕

L 1210 マウス白血病組織培養樹立株の浮遊培養を用いた癌実験化学療法の研究

石　渡　堅一郎*

(昭和 49 年 12 月 20 日受付)

要　旨

臨床効果の高い予言性を示すことが知られている L 1210 マウス白血病の組織培養樹立株浮遊培養細胞と初代培養細胞を用いて，各種制癌剤の試験管内作用様式を検討し，併せてこれら薬剤の生体内効果と比較を行なった結果，各種の薬剤は *in vitro* における作用の時間依存性や，対数増殖期と定常期細胞に対する効果および *in vivo* における投与量の相違の点から分類されることを見出した。すなわち 5-fluorouracil, methotrexate, cytosine arabinoside などのデオキシリボヌクレオチド生合成を阻害する代謝拮抗剤および vinblastine, vincristine などの分裂阻害植物アルカロイドは時間依存性が強く，対数期細胞には低濃度で作用するが，定常期細胞には作用が著しく弱かった。一方 nitromin, thio-TEPA, carbazilquinone, BCNU などのアルキル化剤や mitomycin C のように DNA 2 重鎖間に架橋形成を行なう薬剤および chromomycin A_3, actinomycin D, daunomycin, adriamycin など鋳型 DNA に作用する抗生物質は時間依存性は弱く，細胞増殖時期による効果に差があまりなかった。また *in vitro* (ED_{80}) と *in vivo* (i. p., per mouse per day) の有効量を比較してみると，代謝拮抗剤，植物アルカロイドではその比は約 1 : 1,700～5,000，アルキル化剤，抗生物質では約 1 : 4～100 と著しい差があった。

このようにして L 1210 細胞の試験管内浮遊培養系は，制癌剤の簡易な微量測定や，作様様式を予測するうえにすこぶる有用であり，制癌物質のスクリーニングへの応用は極めて能率性を高められるものと考えられた。さらに *in vitro* の成績は制癌剤の生体への投与法にも示唆を与えているものと思われた。

Keywords: L 1210 マウス白血病，組織培養樹立株，初代培養，試験管内感受性，癌化学療法

略語一覧: MED: minimum effective dose, OD: optimal dose

はじめに

癌や白血病などの悪性腫瘍の化学療法において，臨床的に多くの制癌剤が使用されているが，これらの薬剤はおびただしい数の天然物質と合成化合物の動物腫瘍による精力的なスクリーニングを経て開発されたものであり，現在でもこの方法は広く実施されている。中でも 1948 年 Law ら[1] によって DBA マウスに methylcholanthrene を投与してつくられたリンパ性白血病 L 1210 は，現在臨床で効果のある多くの薬剤に感受性を示し，予言性 (clinical predictability)[2] が高く制癌物質のスクリーニングには欠かせない動物腫瘍であると考えられており，アメリカの National Cancer Institute (NCI) で 1 次スクリーニングに用いられているが[3]，近年本邦

* 千葉大学大学院医学研究科病理系実験化学療法学（主任：新井　正教授）
KENICHIRO ISHIWATA: Studies on the experimental cancer chemotherapy employing established cell line of mouse leukemia L 1210.
Department of Antibiotics, Research Institute for Chemobiodynamics, Chiba Unibersity, Narashino 275.
Received for publication, December 20, 1974.

でも広く使われるようになってきた[4]。

他方 *in vivo* によるスクリーニングと同時に，培養細胞を用いた *in vitro* スクリーニングも古くから試みられているが，これは *in vivo* に比べて速やかに結果が得られ，同時に多数を試験することができ，検体も微量ですみ，経費が比較的安くてすみ，且つ均一な材料を試験管内で種々利用できるので定量的な操作に適しているなどの利点をもつことに基ずいているが，これについても予言性の高いことが要求されることは言を待たない。

Eagle ら[5] により人癌由来の KB 細胞株の有用性が認められて以来 NCI では *in vitro* スクリーニングにもっぱら本株が使用され続けているが[3,6]，近年 Thayer ら[7] および加藤ら[8,9] は L 1210 マウス白血病の組織培養樹立株細胞を用いて各種制癌剤の試験管内感受性試験を行ない，これに効果のあった薬剤は *in vivo* でも有効であり，且つ臨床上も有効なものが多数認められ，1次スクリーニングとして本株は有用であると報告している。

しかしながら現在臨床的にすぐれた効果を示す薬剤の数は極めて少なく，またそれらの制癌効果には限度があり，更に新しいすぐれた制癌剤の出現が待たれている。このような現況下で，いかに効率良く臨床上有用な制癌剤を選び出すか，また実験成績をいかに評価し臨床に応用させるかは実験化学療法が直面している最も重要な問題であると考えられる。

著者は L 1210 組織培養樹立株細胞を用いて各種制癌剤の試験管内作用様式を検討し，併せてこれら薬剤の生体内効果と比較を行ない，相関を求め，新しい制癌物質の探索の手段を考案し，予言性の高い試験管内抗腫瘍試験法の開発を意図したのでここに報告する。

実験材料および方法

1. L 1210 組織培養樹立株細胞（以下 L 1210/TC）

アメリカの NCI の Vincent Bono 博士より分与を受けたもので，長期継代浮遊培養されたものである。

2. L 1210 マウス白血病

Cancer Chemotherapy National Service Center (CCNSC) 由来で癌研究会，癌化学療法センターの桜井欽夫博士より分与を受け，腹水型として BDF_1 マウスに

Table 1. Antitumor agents tested.

Alkylating agents	Nitrogen mustard-N-oxide (Nitromin)	NM	Yoshitomi
	Cyclophosphamide (Endoxan)	EX	Shionogi
	Triethylenethiophosphoramide (Thio-TEPA)	TSP	Sumitomo
	Carbazilquinone	CQ	Sankyo
	1, 3-Bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea	BCNU	Bristol
	Bis (3-methylsulfonyloxypropyl)-amine p-toluenesulfonate	864-T	Yoshitomi
	N-Methyl-N, N-bis (3-methylsulfonyloxypropyl)-amine 4, 4′-biphenyldisulfonate	838-D	Yoshitomi
Antimetabolites	5-Fluorouracil	5-FU	Nakarai Chemicals
	Methotrexate	MTX	Nakarai Chemicals
	Cytosine arabinoside	CA	Sigma Chemicals
	6-Mercaptopurine	6-MP	Tokyo Chemical Industry
Antibiotics	Mitomycin C	MMC	Kyowa Hakko
	Chromomycin A_3	CHRM-A_3	Takeda
	Actinomycin D	ACT-D	Makor Chemicals
	Daunomycin	DM	Meiji
	Adriamycin	AM	Kyowa Hakko
	Phenomycin	PHEN	Dr. S. Nakamura
	Neocarzinostatin	NCS	Kayaku
	Azaserine	AS	Parke, Davis
Vinca alkaloids	Vinblastine (sulfate)	VLB	Lilly
	Vincristine (sulfate)	VCR	Lilly

継代維持しているもので，L 1210 腹水細胞の染色体の観察および初代培養はこのマウスの腹腔より採取した細胞を使用した。

3. 培養液および培養方法

イーグル MEM（日水製薬）に仔牛血清（千葉血清）を 20% 加えたものを用い，37°C，CO_2 incubator 内で回転培養（10 rph）を行なった。

4. 染色体の観察

L 1210/TC は培養液に colcemid (N-diacetyl-N-methylcolchicine, CIBA 製) を 0.1～1.0 μg/ml の割合に加え，3 時間以上培養後，生食水で洗浄，低張液（生食水 1，蒸留水 3）処理後，酢酸アルコール（氷酢酸 1，エタノール 3）で固定，スライドグラスに滴下乾燥後，ギムザ染色した。L 1210 腹水細胞は継代後 4～5 日目のマウスに colcemid を 1 mg/kg の割合に腹腔投与し，14～15 時間後に腹水を採取し，生食水で洗浄，以後は L 1210/TC に準じた。

5. 各種制癌剤

Table 1 に示したもので，アルキル化剤 7 剤，代謝拮抗剤 4 剤，抗生物質 8 剤および植物アルカロイド 2 剤，計 21 剤を使用した。

6. 制癌剤の添加および効果判定

L 1210/TC を 5×10^4 cells/ml に調整し，中試験管に 1.9 ml ずつ分注し，24 時間培養後，これに各種制癌剤の 20 倍濃度段階希釈液を 0.1 ml 加え，3, 24, 48, 72 時間後に trypan blue による dye exclusion method で生細胞数を血球計算盤でカウントし，対照の生細胞数に対する被検試験管の生細胞数の比率から 80% 致死効果濃度 (ED_{80}) を求めた。また初代培養は細胞を 5×10^5 cells/ml に調整し，中試験管に分注と同時に薬剤を加え，その他の方法は L 1210/TC に準じた。

7. 制癌剤の生体内効果の判定

NCI の方法[3,6]に従がって行ない，125% 以上の延命を示す minimum effective dose (MED) と最大延命率を示す optimal dose (OD) を求めた。

結　　果

1. L 1210 細胞の染色体

L 1210/TC および L 1210 腹水細胞の中期核板像を Fig. 1 および Fig. 2 に示したが，これらから染色体数を調べてみると，L 1210/TC は 38 本および L 1210 腹水細胞は 40 本であった (Table 2)。核型分析を両者について行なってみると，L 1210/TC は homologous chromosome 17 対と対のないもの 4 本で，このうちの 1 本は Moore ら[10]の報告にみられる M-type (metacentric) marker chromosome で，残りのうちの 2 本は auxiliary marker[11] といえる ST-type (subtelocentric) chromosome であった (Fig. 1)。L 1210 腹水細胞は homologous chromosome が 19 対で残りの 1 本

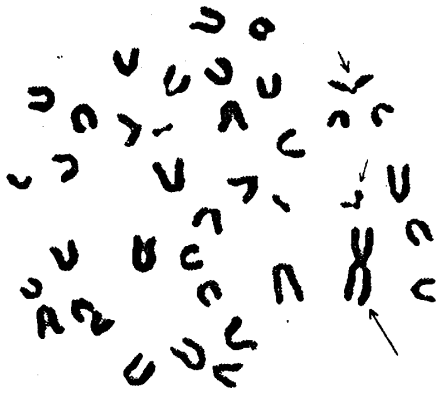

Fig. 1. Metaphase of cultured L 1210 cell containig 38 chromosomes. *Note* a large M-type (metacentric) marker chromosome (*long arrow*) and two ST-type (subtelocentric) auxiliary marker chromosomes (*short arrows*).

Fig. 2. Metaphase of ascitic L 1210 cell containing 40 chromosomes. *Note* the minute marker chromosome (*long arrow*) and the extra-small T-type (telocentric) chromosome (*short arrow*).

Table 2. Distribution of chromosome numbers in cultured and ascitic L 1210 cells.

Cell origin	Chromosome number					Total cells counted
	38	39	40	41	42	
Cultured cells	98	1	1			100
Ascitic cells	2	1	43	3	1	50

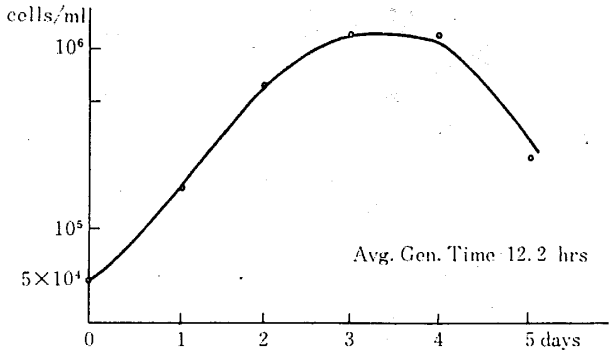

Fig. 3. Growth curve of L1210/TC cells.

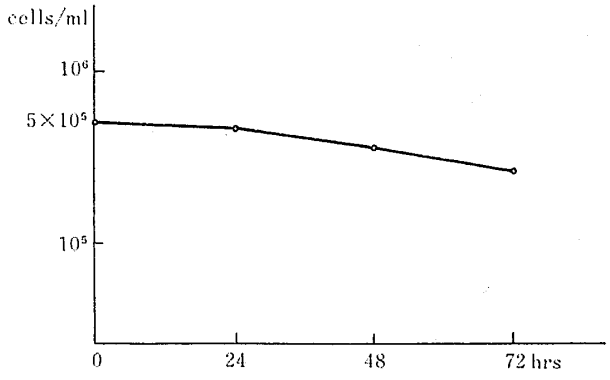

Fig. 4. Primary culture of ascitic L 1210 cells.

は微小なものであり，Moore ら[10]の報告にみられる minute marker chromosome と extra-small T-type (telocentric) chromosome に致していた (Fig. 2)。

2. L 1210 細胞の増殖

L 1210/TC は 20% 仔牛血清加イーグル MEM 中で回転浮遊培養すると良く増殖し，5×10^4 cells/ml の接種では 3 日で定常期に達し，対数期の平均分裂時間は 12.2 時間であった (Fig. 3)。一方 L 1210 腹水細胞の初代培養は Fig. 4 に示されるように分裂増殖はほとんど認められず，時間の経過と共に漸いに細胞数の減少を認めた。

3. 各種制癌剤の培養時間による細胞毒性効果

L 1210/TC に対する各種制癌剤の効果を培養時間を追って ED_{80} でみてみると，薬剤添加後 3 時間では効果はほとんど認められなかったが，24 時間で EX を除いて効果が現れ，NM, TSP, CQ, BCNU などのアルキル化剤および MMC, CHRM-A_3, ACT-D, DM, AM などの抗生物質に比べて，代謝拮抗剤とりわけ 5-FU,

Table 3. Effects of incubation periods on the cytotoxicities of test antitumor agents *in vitro*.

Antitumor agents	3 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
Nitrogen mustard-N-oxide	> 100*	2.5	1.0	0.75
Cyclophosphamide	> 100	> 100	> 100	> 100
Thio-TEPA	> 100	5.0	1.0	0.75
Carbazilquinone	> 100	0.5	0.075	0.05
BCNU	50.0	7.5	5.0	5.0
864-T	> 100	100.0	50.0	50.0
838-D	> 100	100.0	50.0	25.0
5-Fluorouracil	> 100	5.0	0.25	0.05
Methotrexate	> 100	0.5	0.0075	0.005
Cytosine arabinoside	> 100	0.75	0.05	0.01
6-Mercaptourine	> 100	1.0	0.25	0.075
Mitomycin C	> 100	0.75	0.75	0.75
Chromomycin A_3	100.0	0.05	0.025	0.025
Actinomycin D	100.0	0.075	0.05	0.05
Daunomycin	> 100	0.5	0.1	0.05
Adriamycin	> 100	0.75	0.1	0.075
Phenomycin	> 100	5.0	1.0	1.0
Neocarzinostatin	100.0	0.75	0.25	0.1
Azaserine	> 100	1.0	0.25	0.1
Vinblastine	> 100	0.25	0.01	0.005
Vincristine	> 100	0.5	0.025	0.005

* ED_{80}, μg/ml

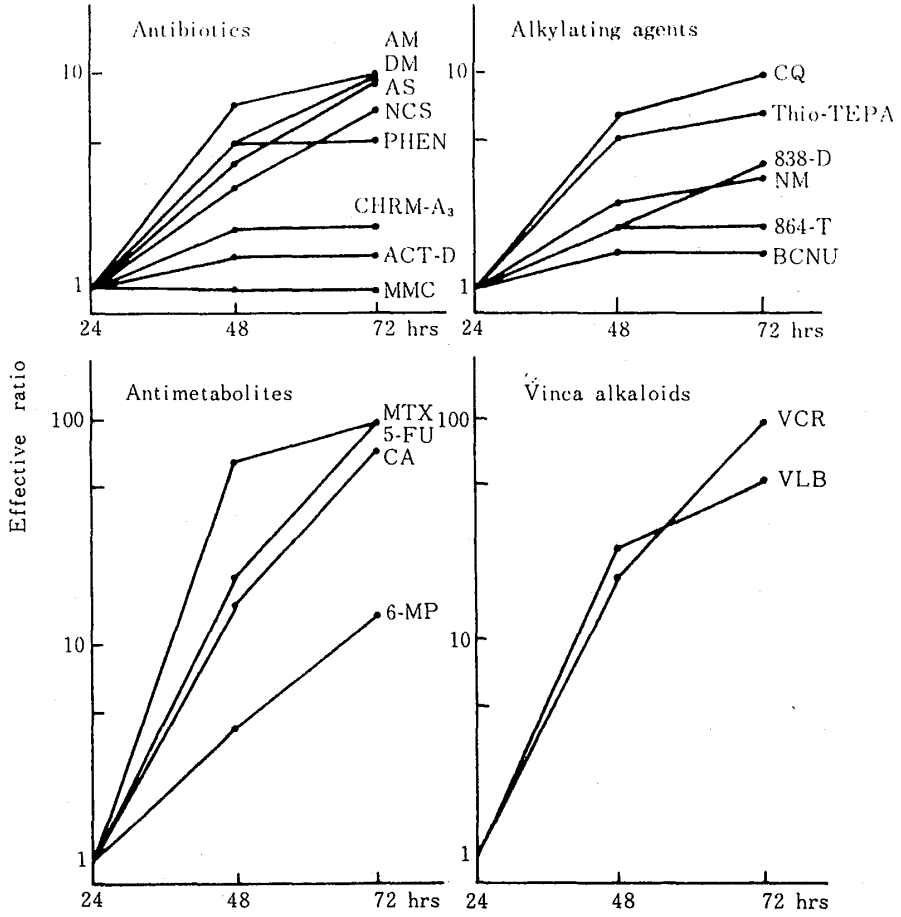

Fig. 5. Effects of incubation periods on the cytotoxicities of test antitumor agents *in vitro*.

MTX, CA および植物アルカロイド VLB, VCR は 48 時間, 72 時間と有効濃度が時間を追って著しく低くなる傾向を示した (Table 3)。

この結果をもとに 24 時間の ED_{80} を基準にして, 48 時間, 72 時間の濃度比の逆数を縦軸に目盛ったものが Fig. 5 である。すなわち MTX, 5-FU, CA および VCR, VLB にみられるように勾配の急なものほど, それらの効果に時間的影響を受けている訳であり, Table 3 の結果が一層明らかになっている。

4. 各種制癌剤の *in vivo* 化療効果と *in vitro* 細胞毒性

Table 4 は各種制癌剤の *in vivo* 化療効果と *in vitro* 細胞毒性をみたものであるが, *in vivo* 効果は主に Griswold ら[12]および星野[13]によるもので MED と OD で示し, *in vitro* 細胞毒性は L 1210/TC に対する 72 時間の ED_{80} で示した。これをもとに *in vivo* と *in vitro* を比較し, 生体内有効量 (μg/mouse/day) と ED_{80} の比を求めると, 生体内有効量は ED_{80} のアルキル化剤で 4～101 倍; 代謝拮抗剤, 1,720～5,000 倍; 抗生物質, 20～100 倍; 植物アルカロイド, 3,000～4,000 倍となった。AS は微生物由来ということで抗生物質群に加えたが, L-glutamine の拮抗物質であり, 840 倍と他の抗生物質に比べて高い値を示した。

5. L 1210/TC と初代培養細胞の各種制癌剤に対する感受性

各種制癌剤の L 1210/TC と初代培養細胞に対する効果を調べてみた結果が Table 5 であるが, 薬剤添加後 48 時間の ED_{80} で示した。アルキル化剤, 抗生物質では両者間に大きな有効濃度差は認めないが, 代謝拮抗剤 5-FU, MTX, CA および植物アルカロイド VLB, VCR は両者間に著しい濃度差が認められ, L 1210/TC の方が極めてこれら薬剤には感受性が高い結果となった。

考察および結論

染色体の変化は, 発癌性, 薬剤感受性, 栄養要求性やその他の代謝に関係していると考えられるが[10], 著者の使用した L 1210/TC は marker chromosome として M-type のものが存在しているが, 染色体数は 38 本で

Table 4. *In vivo* chemotherapeutic effects and *in vitro* cytotoxicities of test antitumor agents.

Antitumor agents	*in vivo* MED	*in vivo* OD (mg/kg i. p., daily)		*in vitro* ED_{80} (μg/ml, 72 hrs)	*in vivo* (MED)/*in vitro* (ml/mouse)
Nitrogen mustard-N-oxide	NE (none effective)		a	0.75	
Cyclophosphamide	37.0	56.0	a	> 100	
Thio-TEPA	3.8	4.8	a	0.75	101
Carbazilquinone	0.25	0.5	b	0.05	100
BCNU	5.0	10.0	b	5.0	20
864-T	10.0	50.0	b	50.0	4
838-D	10.0	25.0	b	25.0	8
5-Fluorouracil	5.8	13.0	a	0.05	2 320
Methotrexate	0.43	1.5	a	0.005	1 720
Cytosine arabinoside	2.5	20.0	b	0.01	5 000
6-Mercaptopurine	7.4	23.0	a	0.075	1 973
Mitomycin C	0.8	1.2	a	0.75	20
Chromomycin A_3	0.1	0.2		0.025	80
Actinomycin D	0.048	0.058	a	0.05	19
Daunomycin	0.25	1.0	b	0.05	100
Adriamycin	0.25	1.0	b	0.075	67
Phenomycin	NE			1.0	
Neocarzinostatin	0.25	0.5	b	0.1	50
Azaserine	4.2	10.0	a	0.1	840
Vinblastine	0.75	1.5	b	0.005	3 000
Vincristine	1.0	1.0	b	0.005	4 000

a. Griswold, D. P.[12]
b. Hoshino, A.[13]

Table 5. Effects of test antitumor agents on established cell line and primary culture.

Antitumor agents	L 1210/TC	Primary L 1210*
Nitogen mustard-N-oxide	1.0**	2.5
Carbazilquinone	0.075	2.5
BCNU	5.0	5.0
864-T	50.0	> 100
5-Fluorouracil	0.25	> 100
Methotrexate	0.0075	1.0
Cytosine arabinoside	0.05	25.0
Mitomycin C	0.75	5.0
Chromomycin A_3	0.025	0.05
Actinomycin D	0.05	0.01
Daunomycin	0.1	0.25
Vinblastine	0.01	7.5
Vincristine	0.025	10.0

* Primary culture
** ED_{80}, μg/ml, 48 hrs

あり，数の点で Moore ら[10]の報告と異なっている。著者が別に検討したマウス移植試験で腫瘍死するに要する期間は，L 1210 腹水細胞に比べて約2倍であった。一方薬剤感受性の面では実験材料や方法が違うので一概には結論できないが，Thayer ら[7]，加藤ら[8,9]および下山ら[14]の報告と大きな差はないようである。L 1210 腹水細胞は全く Moore らの報告に一致しており，Goldin 系の細胞と考えられる[10,11]。

L 1210/TC はいわゆる masked compound である EX を除いた 20 の制癌剤に *in vitro* で感受性を示した。Dolfini らは EX も *in vitro* で培養液に liver microsome を加えることにより効果があったと報告しているが[15]，通常の培養法では masked compound を *in vitro* で試験するのは困難であり，著者の実験でも効果がなかった。しかしその他の制癌剤には L 1210/TC は他の報告[7,8]にあるように，著者の実験でも極めて感受性が広いといえる。特に代謝拮抗剤に感受性の高いことは認められており[9]，著者の実験ではとりわけ MTX に対して高い感受性を示したが，このことは細胞の葉酸の

要求性の高いことによるのではないかと考えられる[10]。

ところで，代謝拮抗剤とくに 5-FU，MTX および CA のように DNA の前駆物質であるピリミジンヌクレオチド生合成を阻害したり，DNA ポリメラーゼ反応を阻害したりして，DNA 合成を選択的に抑制する結果，細胞が unbalanced growth を起して thymineless death あるいは deoxycytidineless death[16] を生じせしめると考えられている薬剤[17~20] および metaphase arrest を生じせしめる VLB および VCR などの植物アルカロイドは，それらの効果が時間を追って非常に増強した訳であり，時間依存性をもった薬剤といえる。しかるに 6-MP や AS は代謝拮抗物質としてプリンヌクレオチド生合成を阻害するのみならず，他にも作用点の多い multifunctional agent[21] であり，そのために 5-FU, MTX および CA に比べて効果に時間依存性が比較的低かったのではないかと考えられる。NM，TSP，CQ, BCNU などのアルキル化剤や抗生物質 MMC のように DNA 2 重鎖間に架橋を形成して DNA の複製を阻害する薬剤，CHRM-A_3, ACT-D, DM, AM などの抗生物質のように鋳型 DNA に結合し，DNA 依存 RNA ポリメラーゼ反応を阻害する薬剤，PM のように蛋白合成を阻害すると考えられている薬剤では，それらの効果に時間依存性が低い結果が得られた訳であり，著者の実験結果は制癌剤の効果を試験管内で経時的に観察することによって，その作用機作をある程度推測することが可能であることを示している。従がって化学構造や作用型式未知の制癌物質を試験管内でスクリーニングするにあたっては，経時的観察は極めて意味あるものといえる。

下山ら[14] は L 1210/TC を用いてコロニー形成法により各種制癌剤と細胞との接触時間から薬剤の効果を検討し，cytostatic な薬剤と cytocidal な薬剤に分類しているが，これは dye exclusion method で行なった著者の実験成績に基く薬剤の分類に図らずも一致した。従がって時間依存性があり cytostatic と考えられる薬剤は短時間の細胞との接触では，その効果がないことが示唆される。このことは *in vivo* や臨床上の薬剤の投与に極めて大切な点で，もちろん血中濃度，組織移行性や安定性など種々の因子が生体内ではかかわりあってくるが，薬剤によってその投与法により，その効果に著しい差のあるものと大差のないものとのあることが報告されており[22~24]，*in vitro* における作用様式と *in vivo* での投与法あるいは臨床的に相関を追求してみることは興味あることである。

in vitro と *in vivo* における各種制癌剤の効果を比較した結果，有効投与量の傾向はアルキル化剤，抗生物質群および代謝拮抗剤，植物アルカロイド群に期せずして大別できた訳であるが，これら 2 群の薬剤は作用機作の点でも相違があった訳である。この実験によって検体の試験管内作用様式を経時的に観察検討すれば，*in vivo* での有効投与量の推定が可能となり，NCI の毒性や耐量からみた最大許容投与法[3,6] に併用することによりスクリーニングの効率向上も計れるものと考える。

L 1210 腹水細胞の初代培養は分裂増殖がほとんど認められない定常期に近い状態と考えられ，このような細胞は L 1210/TC のように対数的に良く分裂増殖する細胞に比べて，5-FU, MTX, CA, VLB および VCR に対する感受性が極めて低かったが，アルキル化剤や抗生物質では両者間に大きな差が認められない結果が得られたが，これも細菌[25]，L 細胞[19,26]，KB 細胞[20] および L 1210 細胞[27,28] を用いた多くの報告に一致している。すなわち cell cycle 依存性の薬剤は時間依存性の薬剤ということができ，cell cycle にあまり関係なく効果の認められる薬剤は時間依存性も弱いといえるのではないだろうか。

微量の制癌物質を一次スクリーニングする場合は，できる限り制癌物質に対して幅広く且つ感度の高い試験法が望ましい訳であり，L 1210/TC を使用することは適切であり，この際検体の効果を経時的に観察してみることは，その作用機作を推測するうえにも，また *in vivo* スクリーニングにおける投与量，投与法を推定するうえからも意義あることが立証された。

稿を終るに臨みご指導，ご校閲を賜わった新井正教授に深謝するとともに，ご指導，ご協力頂いた放射線医学総合研究所大原弘博士，千葉大学生物活性研究所抗生物質研究部ならびに千葉県ガンセンター化学療法研究部の各位に厚く御礼を申し上げます。

なお，本論文の要旨は第22回日本化学療法学会総会，第33回日本癌学会総会において発表した。

本論文は審査学位論文である。

SUMMARY

Studies were undertaken to elucidate the action modes of various antitumor agents employing mouse leukemia L 1210 cells. *In vitro* activity of test compounds was determined using both a suspension culture of established cell line and a primary culture of L 1210 cells.

According to the experimental results, it was concluded that the antimetabolites such as 5-fiuorouracil, methotrexate, cytosine arabinoside and vinca alkaloids, vincristine and vinblastine, showed time dependency in their effects and were only effective on the exponentially growing cells but almost inactive against cells in stationary phase of growth.

On the other hand, the effects of alkylating agents, i. e., nitrogen mustard-N-oxide, thio-TEPA, carbazilquinone, BCNU as well as antibiotics, i. e., mitomycin C, chromomycin A_3, actinomycin D, daunorubicin, adriamycin were not dependent on incubation time. The latter compounds were also found to be active against the cultured cells not only in logarithmic phase but also in stationary phase. When the minimum effective doses (intraperitoneal injection, per mouse per day) *in vivo* and ED_{80} *in vitro* were compared, it was revealed that the ratio varied from 1,700 to 5,000 with antimetabolites and vinca alkaloids, while they were within the range of 4 to 100 with alkylating agents and antibiotics.

Above results also suggested that the suspension culture of established cell line of mouse leukemia L 1210 is highly useful for the estimation of action mechanisms in the primary stage of screening antitumor compounds and for the design of clinical treatment.

文 献

1) Law, L. W., Dunn, T. B., Boyle, P. J. and Miller, J. H.: Obserbations on the effect of a folic-acid antagonists on transplantable lymphoid leukemia in mice., J. Nat. Cancer Inst., 10, 179–192, 1949.

2) Goldin, A., Selpick, A. A. and Mantel, N.: A commentary. Experimental screening procedures and clinical predictability value., Cancer Chemotherapy Rept., 50, 173–218, 1966.

3) Geran, R. I., Greenberg, N. H., Macdonald, M. M., Schumacher, A. M. and Abbott, B. J.: Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems (third edition)., Cancer Chemotherapy Rept. Part 3, 3 (2), 1–103, 1972.

4) 星野 章: 日本における制癌剤スクリーニングシステムと人癌化学療法モデル, 癌と化学療法, 1, 615–630, 1974.

5) Eagle, H. and Foley, G. E.: Cytotoxicity in human cell culture as a primary screen for the detection of antitumor agents., Cancer Res., 18, 1017–1025, 1958.

6) Cancer Chemotherapy National Service Center (CCNSC): Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological Systems., Cancer Chemotherapy Rept., 25, 1–66, 1962.

7) Thayer, P. S., Himmelfarb, P. and Watts, G. L.: Cytotoxicity assays with L 1210 Cells *in vitro*: Comparison with *in vivo* and KB Cells *in vitro*., Cancer Chemotherapy Rept. Part 2, 2, 1–25, 1971.

8) 加藤武俊, 星野 章, 大田和雄: L 1210 マウス白血病組織培養細胞を用い制癌剤の試験管内スクリーニングに関する研究 (第1報), 日本癌学会総会記事, 30, 188, 1971.

9) 加藤武俊, 星野 章, 藤川智子, 西田敬子, 大田和雄: L 1210 マウス白血病の培養樹立株細胞における制癌剤の試験管内感受性, 癌と化学療法, 1, 243–249, 1974.

10) Moore, G. E., Sandberg, A. A. and Ulrich, K.: Suspension cell culture and *in vivo* and *in vitro* chromosome constitution of mouse leukemia L 1210., J. Nat. Cancer Inst., 36, 405–421, 1966.

11) Biedler, J. L., Schrecker, A. W. and Hutchinson, D. J.: Selection of chromosomal variant in amethopterin-resistant sublines of leukemia L 1210 with increased levels of dihydrofolate reductase., J. Nat. Cancer Inst., 31, 575–601, 1963.

12) Griswold, D. P., Laster, W. R., Jr., Snow, M. Y., Schabel, F. M., Jr. and Skipper, H. E.: Experimental evaluation of potential anticancer agents. XII. Quantitative drug response of the SA 180, CA 755 and leukemia L 1210 systems to a "standard list" of "active" and "inactive" agents., Cancer Res. (Cancer Chemother-

apy Screening Data XIV), 23, 271-522, 1963.

13) 星野 章: 癌化学療法の基礎(4), 癌及び白血病における実験化学療法の予言性, 医学のあゆみ, 85, 121-128, 1973.

14) 下山正徳, 木村禧代二: 培養細胞を用いた癌化学療法の研究(2), L 1210 mouse leukemia 培養細胞に対する各種制癌剤の殺細胞作用に就いて, 日本癌学会総会記事, 30, 189, 1971.

15) Dolfini, E., Martini, A., Donelli, G., Morasca, L. and Sarattini, S.: Method for tissue culture evaluation of the cytotoxic activity of drugs active through the formation of metabolites., Europ. J. Cancer, 9, 375-378, 1973.

16) Cohen, S. S.: On the nature of thymineless death., Ann. N. Y. Acad. Sci., 186, 292-301, 1971.

17) Heiderberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P. B., Mooren, D. and Griesbach, L.: Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds., Nature, 179, 663-666, 1957.

18) Taylor, J. H.: Effects of inhibitors of thymidylate synthetase on chromosome breakage and reunion., Exp. Cell Res. (Suppl.), 9, 99-106, 1963.

19) Borsa, J. and Whitmore, G. F.: Cell killing studies on the mode of action of methotrexate on L-cells *in vitro*., Cancer Res., 29, 737-744, 1969.

20) Karon, M., Henrry, P., Weissman, S. and Meyer, C.: The effect of 1-β-D-arabinofuranosyl-cytosine on macromolecular synthesis in KB spinner cultures., Cancer Res., 26, 166-171, 1966.

21) 田中信男: 抗生物質の作用メカニズム, 抗菌・制癌作用の分子生物学, 180-194, 東京大学出版会, 東京, 1972.

22) Skipper, H. E., Schabel, F. M., Jr. and Wilcox, W. S.: Experimental evaluation of potential anticancer agents. XXI. Scheduling of arabinosylcytosine to take advantage of its S-phase specificity against leukemia cells., Cancer Chemotherapy Rept., 51, 125-165, 1967.

23) Venditti, J. M.: Treatment schedule dependency of experimentally active antileukemia (L 1210) drugs., Cancer Chemotherapy Rept., Part 3, 2, 35-59, 1971.

24) 下山正徳, 木村禧代二: 培養細胞を用いた癌化学療法の研究 (3), L 1210 mouse leukemia 培養細胞の *in vitro* 感受性と *in vivo* 化療効果の相関について, 日本癌学会総会記事, 30, 178, 1971.

25) Pittilo, R. M., Schabel, F. M. and Skipper, H. E.: The "Sensitivity" of resting and dividing cells., Cancer Chemotherapy Rept., 54, 137-142, 1970.

26) Madoc-Jones, H. and Bruce, W. R.: Sensitivity of L cells in exponential and stationary phase to 5-fluorouracil., Nature, 215, 302-303, 1967.

27) Schabel, F. M., Jr., Skipper, H. E., Trader, M. W. and Wilcox, W. S.: Experimental evaluation of potential anticancer agents. XIX. Sensitivity of nondividing leukemia populations to certain classes of drugs *in vivo*., Cancer Chemotherapy Rept., 48, 17-30, 1965.

28) Lloyd, H. H., Dulmadge, E. A. and Wilkoff, L. J.: Kinetics of the reduction in viability of cultured L 1210 leukemia cells exposed to 5-azacytidine (NSC-102816)., Cancer Chemotherapy Rept., 56, 585-591, 1972.