

マウス腹腔マクロファージおよびエールリッヒ癌細胞の 1-メチルアデノシンによる増殖抑制

黒川 忠, 佐藤 泰

東北大学医療技術短期大学部衛生技術学科

Growth Inhibitory Effect of 1-Methyladenosine on Mouse Peritoneal Macrophage and Ehrlich Tumor Cell

Tadasi KUROKAWA and Tai SATO

Department of Medical Technology, College of Medical Sciences, Tohoku University

Key word: 1-メチルアデノシン, 腹腔マクロファージ, エールリッヒ癌細胞, 増殖抑制

Cancer patients and tumor bearing animals excrete in their urine elevated levels of various modified nucleosides. 1-Methyladenosine (m^1 Ado), in addition to uric acid, uracil and pseudouridine have been detected from the ascites of Ehrlich tumor-bearing mouse as substances which elevated levels of them in the development of the tumor. The administration of a μg order of m^1 Ado to mice two or three days before i.v. infection with *Listeria monocytogenes* caused a definite acceleration in the number of deaths due to infection. It is known that host macrophage is significantly involved in the defense mechanism against *Listeria* infection.

In this study, we found that the administration of 1 mg of m^1 Ado to mice led to 80% inhibition of migration of peritoneal exudate macrophage stimulated by Concanavalin A and that m^1 Ado had directly cytotoxic effect with relatively low concentration such as 42 $\mu\text{g}/\text{ml}$ when the malignant cells was incubated in vitro. On the other hand, Incubation in vitro of Ehrlich ascites tumor cells with m^1 Ado led to inhibition of cell growth on a concentration of 10~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Higher concentration such as 1 mg/ml was necessary for expression of necrosis. It has been reported that m^1 Ado was detected with amount of 1~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ from the urine of a wide variety of cancer patients. These observations suggest that m^1 Ado is one of immunosuppressive factors presented in ascites of tumor-bearers.

はじめに

Borek¹⁾²⁾らは癌患者尿中にシュウドウリジン, 1-メチルアデノシン(以下 m^1 Ado と略す), 2-ジメチルグアノシンを見出し, これらの修飾塩基は健康人と比較し増加していること, さらにその理由として癌患者では t-RNA メチラーゼ活性の上昇と t-RNA の代謝回転の亢進によることを報告している³⁾。

石田⁴⁾⁵⁾らは担癌状態における免疫低下に關与する因子の研究の一環として, マウスのエールリッヒ腹水癌の腹水中に存在し, 癌の増殖に伴い増加する物質として尿酸, ウラシル, シュウドウリジンおよび m^1 Ado を報告した。尿酸はヒトなどではプリン代謝の最終生成物であり, 通常成人男子では血漿中に 2.6~7.5 mg/dl 含まれ, この量はアスコルビン酸の数倍にも達する。Ames⁶⁾らはアスコルビン酸同様尿酸は電子供与性であり,

生体内において活性酸素やフリーラジカルに起因する老化や発癌に関して防御的に働くものであると推定した。石田らは尿酸およびウラシルはマウスおよびヒトのNK細胞のインターフェロンによる活性化を阻害する活性を有することおよび m^1 Adoはマウスのリステリア菌感染実験で感染促進作用のあることを報告している⁷⁾。さらに白血病などの癌患者尿中の m^1 Ado量が健康人より高く、腫瘍マーカーとなりうることを明らかにした⁸⁾。シュウドウリジンについても正常ラットに比べ担癌ラットの尿中で増加し⁹⁾、特にヒト白血病やリンパ腫において腫瘍マーカーとなりうることを報告されている¹⁰⁾。

一方、担癌状態において免疫の低下をきたすことは良く知られている。その一因として癌細胞あるいは担癌生体の産生する因子が関与するという報告も多く、例えば Snyderman¹¹⁾らは種々の癌抽出物の低分子分画をマウスに投与後、腹腔にフィトヘマグルチニン (PHA) を投与するとマクロファージの遊走が著しく阻止されると報告している。また Nelson¹²⁾らは癌細胞培養上清についてPHAの代わりにコンカナバリン A (ConA) を用いて同様の報告を行っている。さらにリステリア菌の初期感染防御にマクロファージが深く関与し、続く感染防御に細胞性免疫の成立が要求されることが知られている¹³⁾。最近、リステリア菌と宿主マクロファージとの相互作用により産生されるインターロイキン12がTh1タイプT細胞の分化をうながし、細胞性免疫が成立することが明らかにされた¹⁴⁾。

1-メチルアデニンがヒトデ卵の成熟分裂を誘発し¹⁵⁾、またナマコの配偶子の放出を誘起¹⁶⁾するなどの生理活性を有すること、さらに植物ホルモンとして知られるサイトカイニンが修飾塩基であり、そのヌクレオシド類はPHAによるリンパ球芽球化反応を濃度依存的に抑制する¹⁷⁾などアルキルアデニンおよびアデノシンが種々の生理活性物質として知られている。また、エールリッヒ癌細胞抽出物中にもサイトカイニンの一種、N-6-イソペンテニルアデニンおよび8-ヒドロキシ-N-6-イソペンテニルアデニンが見出されている¹⁸⁾。

以上のことから我々は癌性腹水中に見出される m^1 Adoに注目し、このものがマクロファージの遊走あるいは活性化を抑制し担癌状態の免疫低下の一因になっているのではないかと考えた。そこで m^1 Adoの腹腔マクロファージおよびエールリッヒ癌細胞に対する影響を調べ、 m^1 Adoがin vivoにおいてConA刺激によるマウス腹腔マクロファージの遊走を阻止し、また、in vitroでも上記腹腔マクロファージに42 μ g/mlで直接細胞壊死作用のあることを明らかにすると共にエールリッヒ癌細胞に対してin vitroで10~100 μ g/mlの範囲ではほぼ直線的に増殖抑制作用を認めるが壊死作用の発見には1 mg/mlという高濃度が必要であることを明らかにしたので報告する。

I. 実験方法

マウスは東北大学実験動物施設で飼育しているBALB/cの5~6週令雄マウスを用いた。ConAは生化学工業社製のものを5 mg/mlの濃度にRPMI1640培地に溶かし、1-メチルアデノシンはシグマ社製のものを2 mg/mlの濃度に溶かして使用した。

マウスにおける腹腔マクロファージ遊走阻止能試験は次の方法で行った。マウス腹腔内にConA 1 mg/マウスを投与したものを対照とし、ConA 1 mgと m^1 Adoを0.5 mg, 1 mgおよび2 mg/マウスを同時に腹腔内に投与することにより、 m^1 Adoの効果を調べた。またRPMI1640培地のみのものと m^1 Adoをそれぞれ0.5 mg/マウス, 1 mg, 2 mg単独投与群についても検討した。いずれも総容量1.2 mlとし、25G×1注射針で投与した。96時間後にRPMI1640培地5 mlを21G×1 1/2注射針を用いて勢いよく腹腔内に注入し腹部をもんだ後腹腔浸出細胞浮遊液を氷冷した試験管に回収した。チュルク液(和光純薬工業)を用いて血球計算板により細胞数を算出した。残りの細胞浮遊液は1,100 rpm, 5分間遠心し、その沈渣で3枚の塗抹標本を作成し、ギムザ液(メルク社製)によるギムザ染色を行い、その標本を用いて細胞出現率を算出した。実験は1群3匹で行い浸出細胞数および細胞出現率はいずれもその平均値を示した。

次に ConA 1 mg を腹腔投与し、同時に m^1 Ado 1 mg を腹腔内、静注、皮下に投与するとともに、 m^1 Ado 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の水溶液を ConA 投与時より飲料水として自由に与えることによる経口投与を行い、 m^1 Ado の投与法の違いについての影響を調べた。 m^1 Ado および ConA を投与し、96 時間飼育後に腹腔浸出細胞数を測定した。

マウス腹腔マクロファージの *in vitro* 培養は、マウスに ConA 1 mg を腹腔内投与し、96 時間後に RPMI1640 培地を注入し腹腔浸出細胞を採集し 10% 牛胎児血清加 RPMI1640 培地に浮遊しカバーグラスを入れた 24 穴のマイクロプレートで培養した。 m^1 Ado 添加濃度は 333 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 166 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 83 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 42 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および無添加とした (各群 5 ウェル)。

次にヒト由来の骨髄性白血病細胞樹立株の一つ、THP-1 について検討した。単球様培養細胞 THP-1 細胞はトランスフェリン (5 mg/l), インスリン (5 mg/l) および牛胎児血清を 5% に添加した RPMI 1640 培地にて培養した。細胞数を $1.8 \times$

$10^5/\text{ml}$ とし、96 時間培養後、生細胞数を算出し、残りの浮遊液にて塗抹標本を作成した。

エールリッヒ癌細胞の *in vitro* 培養は RPMI1640 培地に 10% 牛胎児血清を加えた培地を用い、直径 52 mm のプラスチックシャーレにて 96~120 時間培養した。細胞数はトリパンブルー染色による生細胞測定法により行い、残りの細胞浮遊液は 1,100 rpm, 5 分間遠心し、その沈渣で塗抹標本を作成し、ギムザ染色し形態観察を行った。

II. 実験結果および考察

初めに至適 ConA 濃度を定める目的で ConA 1 μg , 10 μg , 100 μg , 1 mg をマウス腹腔内に投与し腹腔浸出細胞中のマクロファージの割合を調べた結果、ConA 1 mg 投与の時にもっとも多いことがわかったので以後の実験では ConA 1 mg を投与した。また経時的には投与後 24 時間、48 時間とマクロファージの割合は増え、72 時間と 96 時間では 80% 以上がマクロファージで、両者にほとんど

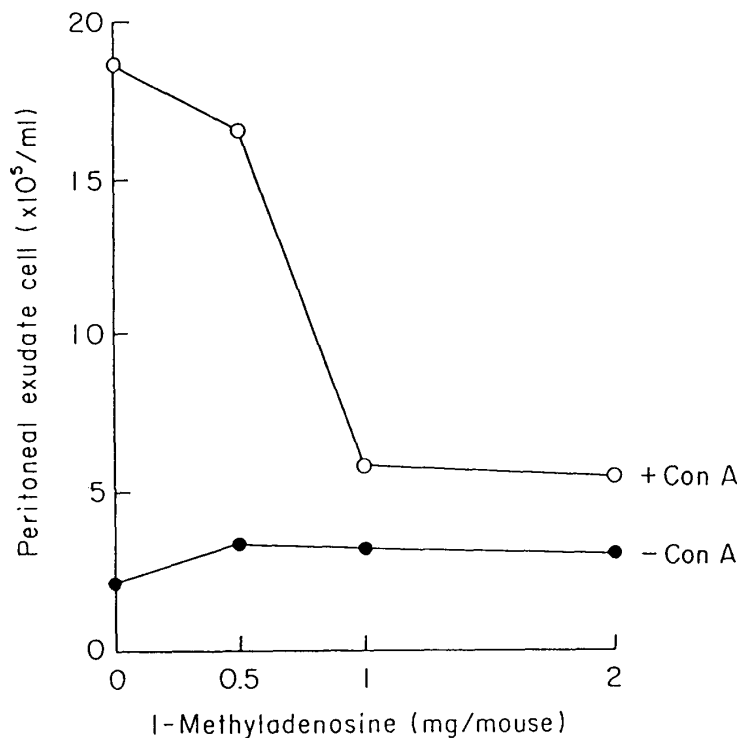


図1. ConA 刺激により遊走される腹腔浸出細胞数に及ぼす m^1 Ado の効果
ConA, m^1 Ado いずれも腹腔内投与で m^1 Ado は ConA と同時投与

差異は認められなかったので以後の実験では ConA 投与 96 時間後に検定を行った。

ConA 1 mg/マウス投与群と非投与群に分け、両者に m^1 Ado をそれぞれ 0.5 mg, 1 mg, 2 mg および RPMI1640 培地のみを腹腔内に同時投与した。96 時間後の腹腔内浸出細胞を採集し、その細胞密度を調べた結果が図 1 である。ConA 非投与群では $2.03 \times 10^5 \sim 3.45 \times 10^5$ /ml の範囲にあり、 m^1 Ado の影響は細胞数で見ると認められなかった。一方、ConA 投与群では ConA 単独の時、 1.85×10^6 /ml であるのに対し ConA と m^1 Ado を 0.5 mg, 1 mg, 2 mg/マウス同時投与すると m^1 Ado の投与量が増えるに従い、浸出細胞は 1.64×10^6 /ml, 82×10^5 /ml, 5.75×10^5 /ml と順次減少した。 m^1 Ado 1 mg 投与群では対照群に比べ、腹腔浸出細胞の遊走が 86% 阻止された。また各群の浸出細胞の塗抹標本によりマクロファージの割合を調べてみるといずれの群でも 75~96% がマク

ロファージであった。

馬島ら⁷⁾は Boyden chamber を用い、in vitro で m^1 Ado によりマウスマクロファージの遊走が著しく阻止されることを報告しているが、以上の結果は ConA と m^1 Ado の腹腔内同時投与により in vivo でも m^1 Ado により阻止されることを示唆している。

次に投与方法の相違による阻止率を調べた結果 ConA 単独投与群に比べいづれの投与方法においても 16.1~61.4% の範囲で阻止した。このことは m^1 Ado が単球・マクロファージ系への直接的作用と骨髄中の前駆細胞に作用し単球・マクロファージ系への分化を抑制することを示唆する。そこで in vitro での腹腔マクロファージ培養系を用いて m^1 Ado の直接的効果を検討した。24 時間では m^1 Ado 添加群と対照群に差は認められないが、48 時間後では m^1 Ado 333 μ g/ml および 166 μ g/ml 添加群が対照群に比較して肉眼的に明らかにカ

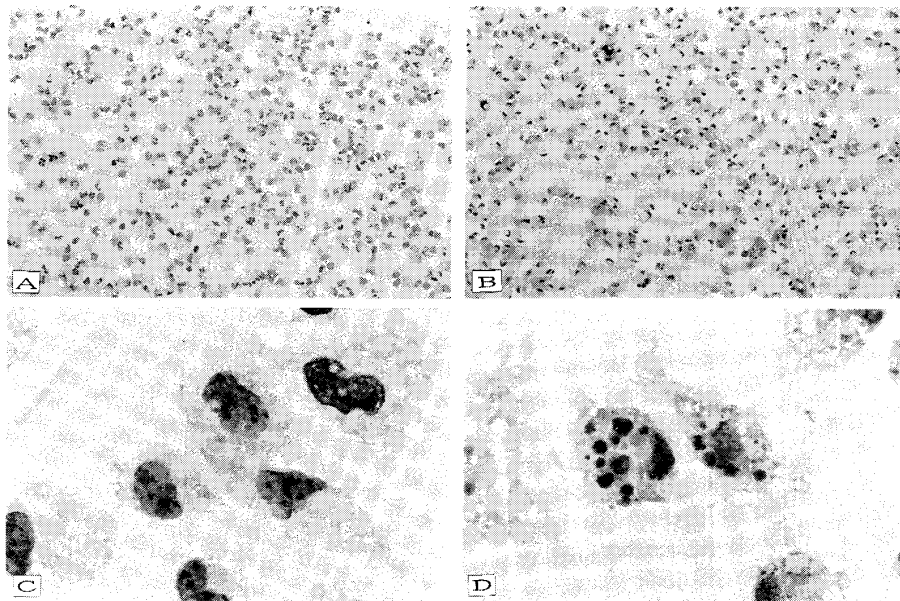


図 2. ConA 刺激による腹腔浸出細胞の m^1 Ado による形態変化

- A. 対照
- B. m^1 Ado 42 μ g/ml 添加
- C. 対照
- D. m^1 Ado 42 μ g/ml 添加
- A, B は培養 48 時間培養後の細胞 (50 倍)
- C, D は培養 96 時間培養後の細胞 (500 倍, 油浸)

バークラスに付着していない細胞が多いので、各濃度のカバーグラス一枚ずつを-PBSで2回洗浄し非吸着細胞を除去後、メタノール固定しギムザ染色を行った。その標本でもっとも細胞数が平均的と思われる部分の顕微鏡写真の一部が図2である。m¹ Ado 非添加群(対照群)に比べ m¹ Ado 333 $\mu\text{g/ml}$ および 166 $\mu\text{g/ml}$ 投与群では明らかに細胞数が減少している。これらの群においてカバーグラス上に付着しているものでもほとんどは正常な細胞の形態をとどめず、クロマチンが破碎状になっているものが多く、壊死細胞が数多く見られる。一方、m¹ Ado 83 $\mu\text{g/ml}$ や 42 $\mu\text{g/ml}$ 添加群では一見トリパンブルーによる生細胞観察法で、対照と同程度の細胞数がみられるが、ギムザ染色による強拡大観察での所見で差異が認められる。対照群の細胞は類円形や紡錘状で、核の形も類円形あるいはそらまめ状で核小体を1~3個所有しているのに対し 83 $\mu\text{g/ml}$ 添加群の培養48時間後で一部壊死細胞が出現しており、培養96時間後では核は濃縮状でクロマチンの構造は不明瞭で、細胞質は好酸性に濃染し、いわゆる変性像を示している細胞が多い。もっとも低濃度の 42 $\mu\text{g/ml}$ 添加群でも培養48時間後では対照と変わらない(図2 A,B)が培養96時間後ではそのほとんどの細胞質に2~7 μm 位の大小不同の濃紫色を呈した滴状の変性像が1細胞あたり2~10数ケ含まれている(図2 C,D)。以上の結果は m¹ Ado が比較的 low 濃度でマクロファージに直接作用し壊死させる作用があることを示している。先に馬島ら⁷⁾は PHA 誘起マクロファージに対する Boyden chamber を用いた *in vitro* 遊走能試験において m¹ Ado がマクロファージに直接作用することを明らかにしているが、この結果もそれを支持している。

単球様培養細胞 THP-1 細胞について検討した結果も同様であり、m¹ Ado 80 $\mu\text{g/ml}$ 添加群では培養120時間後、ほとんどが壊死物のみであった。一方、16 $\mu\text{g/ml}$ 添加群では対照と同程度の細胞数がトリパンブルー染色法でみられるが、その塗抹標本では対照群の細胞は輪郭円形で突起を有する細胞が多くみられたが、m¹ Ado 添加群ではその

様な細胞が少なくなり細胞質の周辺が丸みをおびクロマチンは融解状態で核は破碎状に変性しているものが多く、細胞の形態をとどめないものもみられた。すなわち、マウス腹腔マクロファージを m¹ Ado 42 $\mu\text{g/ml}$ 存在下培養した場合と同様、変性している細胞が多い。このことより m¹ Ado に対し単球・マクロファージ系細胞が動物種に関係なく強い感受性を示すことが明らかとなった。

次に、この m¹ Ado のエールリッヒ癌細胞に対する *in vitro* の増殖抑制作用を検討した。エールリッヒ癌細胞を m¹ Ado 存在下で120時間培養後トリパンブルー液で生細胞数を算出した結果が図3である。m¹ Ado 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 添加群で15%、25 $\mu\text{g/ml}$ で32%、50 $\mu\text{g/ml}$ で56%、100 $\mu\text{g/ml}$ で90%の増殖抑制がみられ、m¹ Ado 12.5 $\mu\text{g/ml}$ から100 $\mu\text{g/ml}$ までの濃度範囲でほぼ直線的に増殖抑制がみられた。しかし、m¹ Ado 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加群でも先の腹腔マクロファージの場合の様に壊死細胞は見られない。培養開始時の細胞密度は $5.8 \times 10^4/\text{ml}$ であり、120時間培養後の m¹ Ado 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加群の生細胞数は $1.4 \times 10^5/\text{ml}$ であり、このことは m¹ Ado が細胞毒として作用する

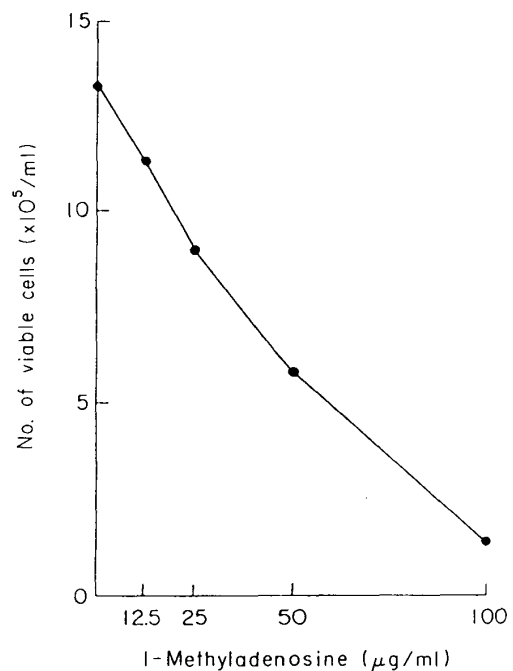


図3. エールリッヒ癌細胞の *in vitro* 培養系に対する m¹Ado の増殖抑制効果

表 1. 塗抹標本所見

細胞 1 個中の核数	細胞の出現率				細胞分裂像の出現率
	1	2~5	6~9	10 以上	
対 照 数	99.7%	0.3	0	0	0
m ¹ Ado 12.5 μg/ml 添加群	95.3	4.2	0	0.5	0.9
25 μg/ml 添加群	93.4	4.7	0.8	1.1	0.3
50 μg/ml 添加群	89.6	6.5	3.3	0.6	1.5
100 μg/ml 添加群	63.4	15.9	12.8	7.9	3.7

1 標本あたり 164~553 個の細胞を観察し細胞の核数で分類した。細胞の大きさは単核細胞では 39 μm 以下, 2~5 核細胞では 40~59 μm, 6~9 核細胞では 60~79 μm, 10 核以上の細胞では 80~100 μm であり対照群ではそのほとんどの細胞が単核細胞で 6 核以上の細胞の出現はなく 100 μg/ml 添加群における多核細胞の出現が顕著であった

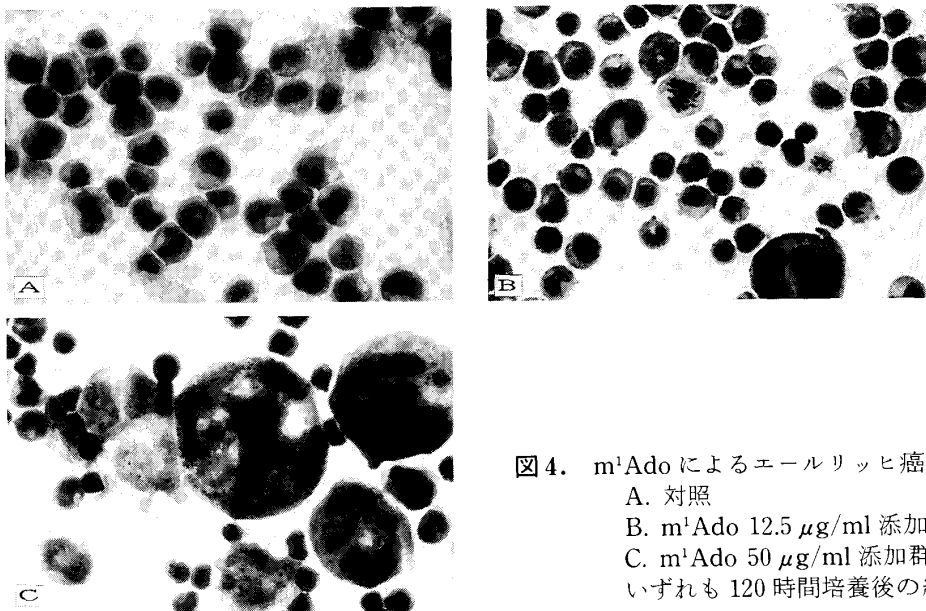


図 4. m¹Ado によるエールリッヒ癌細胞の形態変化
 A. 対照
 B. m¹Ado 12.5 μg/ml 添加群
 C. m¹Ado 50 μg/ml 添加群
 いずれも 120 時間培養後の細胞 (400 倍)

のに一定の潜伏期が必要であることを考慮すると潜伏期中に細胞はある程度増殖し、その後増殖が抑制されたものと考えられる。対照群および m¹ Ado 添加群のギムザ染色塗抹標本の所見は表 1 および図 4 (A, B, C) の通りである。対照群は単核細胞がほとんどで、その大きさは比較的均一で約 30±2 μm であるのに対し m¹ Ado 濃度が増加するのに従い多核細胞が多くなり、また細胞の大きさについても 2~5 核の中型細胞 (40~59 μm), 6 核以上の核を有する巨細胞 (60~100 μm) が多くなる。また m¹ Ado 50 μg/ml あるいは 100 μg/

ml 添加群では対照群よりも小さい細胞 (16~20 μm) も多くなり m¹ Ado 濃度が増加するに従い細胞の大小不同性が顕著になる。一方、対照群においては分裂細胞がほとんどみられないのに対し、m¹ Ado 濃度が高くなるに従い全細胞あたりの分裂細胞の割合が高くなる傾向がある。また m¹ Ado 100 μg/ml 添加群の塗抹標本においても形態的壊死細胞がみられないことが確かめられた。

そこで、エールリッヒ癌細胞に対し壊死作用があるかどうかを調べる目的でエールリッヒ癌細胞の in vitro 培養系に 1 mg/ml という高濃度の m¹

Ado を添加し 96 時間培養し、生細胞数を調べた。その結果、培養開始時の細胞密度が $1.3 \times 10^5/\text{ml}$ であるのに対し m^1 Ado 1 mg/ml 添加群でも $7.5 \times 10^4/\text{ml}$ の細胞の存在がトリパンブルーによる生細胞測定法により認められた。またこの細胞液の塗抹標本では対照群と同様な正常の細胞が約半数と細胞質がすでに融解消失し細胞の形態をとどめず核はかろうじて壊死物質状 ($6 \sim 8 \mu\text{m}$) に残存しているものが約半数認められた。この結果は m^1 Ado が比較的低濃度でエールリッヒ癌細胞の増殖を抑制するが壊死作用の発現にはより高濃度の m^1 Ado を必要としていることを示しており、腹腔マクロファージの場合のように増殖抑制が細胞の壊死を意味しているケースとは大いに異なる。マクロファージは貪食能を有しており、その貪食能により比較的低濃度の m^1 Ado によりほとんどすべての細胞の形態変化あるいは壊死がみられるものと考えられる。 m^1 Ado がマクロファージなど免疫担当細胞に作用し細胞壊死をおこし生体防衛上不利に働くのに対し、癌細胞には同程度の濃度である程度の増殖抑制をおこすが壊死までには至らず少なくとも癌細胞の生存を許す比較的広い濃度範囲が存在することが明らかになった。伊藤ら⁸⁾ は癌患者尿中に m^1 Ado を $1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で認めており、以上の結果から m^1 Ado が担癌状態における免疫低下の一役を担っているものと考えられる。

おわりに

マウスエールリッヒ癌性腹水中に見出された修飾核酸塩基の 1 つ、 m^1 Ado のマウス腹腔マクロファージおよびエールリッヒ癌細胞への影響を調べた。その結果、ConA による腹腔内へのマクロファージの遊走を阻止し、また生理的濃度に近い濃度で単球・マクロファージ系の細胞に直接作用し壊死に導くことを明らかにした。一方、エールリッヒ癌細胞の *in vitro* 培養系では同程度の濃度である程度の増殖抑制を示すが壊死までには至らず、少なくとも癌細胞の生存を許す比較的広い濃度範囲が存在し、マクロファージとエールリッヒ癌細胞の m^1 Ado に対する感受性が異なることが

明らかになった。以上の結果は m^1 Ado が担癌状態における免疫低下の一因を担っていることを示唆している。 m^1 Ado の単球・マクロファージ系細胞への作用機序は現在不明であるが、癌性腹水や尿中に増加する核酸修飾塩基の生体防御における役割の解明が今後、さらに進められることが期待される。

文 献

- 1) Borek, E., Sharma, O. K., Waalkes, T. P.: New application of urinary nucleoside markers. Recent Result. Cancer Res. **84**, 301-316, 1983.
- 2) Fischbein, A., Sharma, O. K., Selikoff, I. J. et al.: Urinary excretion of modified nucleosides in patients with malignant mesothelioma. Cancer Res. **43**, 2971-2974, 1983.
- 3) Borek, E., Balga, B. S., Gehrke, C. W. et al.: High turnover rate of transfer RNA in tumor tissue. Cancer Res. **37**, 3362-3366, 1977.
- 4) 石田名香雄; 担癌動物に見られる免疫抑制の実態, 薬学雑誌 **105**, 90-108, 1985.
- 5) Takano, S., Sami, S., Majima, T. et al.: Low molecular weight immunosuppressive factors found in elevated amounts in cancer ascitic fluids of mice 2. 1-Methyladenosine isolated from cancer ascitic fluids enhances Listeria-infection in mice. J. Immunopharmacol. **8**, 59-73, 1986.
- 6) Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E. et al.: Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 6858-6862, 1981.
- 7) 馬島敏郎, 高野昇一, 品川保弘ほか: 低分子免疫抑制物質と細菌感染-担癌末期に増加する修飾核酸塩基のリステリア菌感染促進作用-, 臨床免疫 **17** (Suppl. 9), 48-57, 1985.
- 8) Itoh, K., Mizugaki, M., Ishida, N.: Preparation of a monoclonal antibody specific for 1-methyladenosine and its application for the detection of elevated levels of 1-methyladenosine in urines from cancer patients. Jpn. J. Cancer Res. (Gann), **79**, 1130-1138, 1988.
- 9) Shimizu, M., Fujimura, S.: Studies on the

- abnormal excretion of pyrimidine nucleosides in the urine of Yoshida ascites sarcoma bearing rats. Increased excretion of deoxycytidine, pseudouridine and cytidine. *Biochim. Biophys. Acta.*, **517**, 277-286, 1978.
- 10) Itoh, K., Mizugaki, M., Ishida, N. : Detection of elevated amounts of urinary pseudouridine in cancer patients by use of a monoclonal antibody. *Clin. Chim. Acta.*, **181**, 305-316, 1989.
- 11) Clancio, G. J., Herberman, R. B., Snyderman, R. et al. : Depression of murine macrophage accumulation by low-molecular-weight factors derived from spontaneous mammary carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **65**, 829-834, 1980.
- 12) Nelson, D. S., Farram, E., Hopper, K. E. et al : Macrophage diversity, with special reference to host-tumor relationship. In *Self-Defense Mechanisms-Role of macrophage* (edited by Mizuno, D., Cohn, Z. A., Takeya, K. et al), Tokyo University Press and Elsevier/North Holland Biochemical Press, 1982, P83.
- 13) Mitsuyama, M., Takeya, K., Nomoto, K, et al. : Three phases of phagocyte contribution to resistance against *Listeria monocytogenes*. *J. gen. Microbiol.*, **106**, 165-171, 1978.
- 14) Hsieh, C. H., Macatonia, S. E. Tripp, C. S. et al : Development of T_H1CD4^+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science*, **260**, 547-549, 1993.
- 15) Kanatani, H., Shirai, H., Nakanishi, K. et al : Isolation and identification of meiosis inducing substance in starfish *Asterias amurensis*. *Nature*, **221**, 273-274, 1969.
- 16) Ikegami, S., Kanatani, H., Koide, S. S. : Gamete-release by 1-methyladenine in vitro in the sea cucumber, *Leptosynapta inhaerens*. *Biol. Bull.*, **150**, 402-410, 1976.
- 17) Saito, T., Shibata, Y., Kurokawa, T. et al. : Inhibitory effects of cytokinins on PHA-induced human lymphocyte stimulation. *Experientia*, **35**, 685-686, 1979.
- 18) Lee Adair, W., Brennan, S.L. The role of N-6- isopentenyladenine in tumor cell growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **137**, 208-214, 1986.