

肝硬変合併肝癌発生過程における肝および血漿 cyclic AMP の変動

東京慈恵会医科大学第2外科

中本 実 高橋 恒夫 井出 哲也
森永 泰良 成瀬 勝 三穂 乙実
高橋 正人 加藤 信夫 長尾 房大
同 第1病理
高 崎 健

THE PERIODICAL CHANGES OF THE LIVER AND PLASMA CYCLIC AMP IN THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL HEPATOMA WITH CIRRHOSIS OF RAT

Minoru NAKAMOTO, Tsuneo TAKAHASHI, Tetsuya IDE,
Yasuyoshi MORINAGA, Masaru NARUSE, Otomi MIHO,
Masahito TAKAHASHI, Nobuo KATOH, and Fusahiro NAGAO

2nd Dpt. Surgery, Jikei University School of Medicine

Satoshi TAKASAKI

1st Dpt. of Pathology, Jikei University School of Medicine

生化学や分子生物学の進展は細胞の動的過程の多くが細胞表面膜によって control されてきていることが次第に明らかになってきた。

そこで、細胞膜内に存在し、細胞の増殖を調節するといわれる cyclic AMP の動態を、前癌状態という不明瞭な概念に少しでも段階的な理解の1因子として、ラットを使用した肝硬変合併肝癌発生過程において測定し、あわせて組織学的に光顕および電顕的な観察を行った。

肝硬変合併肝癌は initiator として、0.06%p-dimethylaminoazobenzene を基礎食に混ぜて摂取し、promotor として、15%CCl₄/ml を週2回皮下注射して作製した。肝および血漿 cyclic AMP と肝組織像を月1回の割で検討した。

肝および血漿 cyclic AMP は frequent transient appearance があり、それは肝切後1カ月、脂肪肝時および多発性の肝癌発生時期に一致して出現した。肝硬変完成時期には肝 cyclic AMP は低下してきたが、肝癌発生時期では肝癌部では376pmol/g・wet、非癌部では304pmol/g・wet と肝癌部の方が高い傾向ではあったが有意の差は認められなかった。同じ肝硬変でも、肝硬変完成時期では低く、肝癌発生時期での肝硬変では高値を示すことは興味あることであり、このことは、癌部周辺の肝硬変組織は癌状態と同様、つまり前癌状態の性質を持つてくるのではないかと推察された。

索引用語：cyclic AMP, p-dimethylaminoazobenzene, 前癌状態, 肝硬変合併肝癌

緒 言

日本をはじめとする、東南アジアや南アフリカなどの温暖あるいは熱帯地方に見られる人肝癌の多くが肝硬変に合併して発現することは周知の事実である。この肝硬変という病態を前癌状態として位置づけるか否かに関しては従来より種々の論議がなされているが、

いまだに定説がない。また実験肝癌に関する幾多の研究は、発癌過程の多くが環境物質に起因するという carcinogenesis の概念を確立してきた。

近年、発癌過程が initiation と promotion のそれぞれ独立した機構により発現するという二段階発癌の概念が Berenblum¹⁾によって提唱されたが、以来、多くの

人発癌に関しても多段階的発癌の過程が想定され、徐々に明確化されつつある。一方、形態学的な癌追求においては、正常肝細胞から in-situ 癌、さらに結節性腫瘤形成に至る経過の中で、前癌状態という過程をとらえることは極めて困難であり、まったく不明瞭な概念であるという過言ではない。ただし、一度、initiator で作用を受けた細胞には、潜在的に癌原性が残るという不可逆的变化は、これらの段階的理解として、生化学的、形態学的にも非常に重要な point であるように思われる。

肝硬変という病理形態の一側面は、再生肝細胞によって構造の歪められた改変小葉の集団であるが、これらの再生肝細胞に、発癌物質が投与された場合に、carcinogenesis が変化するものか否か、あるいはこれらの細胞の状態を initiate された変性過程としてとらえるか、さらには promote されやすい準備状態としてとらえるか、といった段階的理解が重要な意味を持つと考えられる。

また一方、生化学や分子生物学の進展は、細胞の動的過程の多くが細胞表面膜によってコントロールされていることを次第に明らかにしてきたが、癌細胞の示す腫瘍性は正に細胞表面膜の異常に起因することが注目されつつある。

Thrower²⁾や Short³⁾らは、再生肝細胞における DNA や蛋白代謝は細胞膜内面に存在する adenosin 3':5'-monophosphate (cyclic AMP) に大いに関係があると述べ、また、Thomas⁴⁾らは種々の肝癌において、cyclic AMP や cyclic guanosine 3':5'-mono-phosphate (cyclic GMP) が正常よりも高値を示すと報告している。また、癌細胞培養にて、cyclic AMP の投与は癌細胞の増殖を抑制するという報告もある^{5)~7)}。

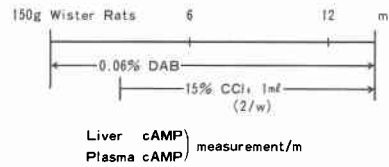
これらの現状をふまえて、われわれはラットを用いて Berenblum の two stage theory に基づいた実験系を整え、tumor initiator として p-dimethylaminoazobenzene (DAB), promotor として tetrachloride (CCl₄) を二段階的に投与して肝硬変合併肝癌を作製した。同時に肝の部分切除による再生肝と、硬変肝とを対比しつつ、生化学的に cyclic AMP の動きを中心に、経時的に比較検討し、前癌状態という不明瞭な概念に、いくらかでも段階的な理解をするべく接近する努力を試みた。

材料および方法

1. 動物

Wister 系ラット、雄、平均150g、200匹を用い、実験

図1 実験方法



を開始した。

肝硬変合併肝癌の作製は0.06%DAB (東京化生 K.K.) を混入の基本食餌 CE-2 (日本クレア K.K.) 粉食、水を自由に与え飼育し、実験開始 4 カ月目より、オリーブ油に混ぜ、10%CCl₄, 1ml を週 2 回皮下注射を施行した。また、ラットを 2 群に分類し、1 群を約30%肝切除群と他群を非肝切除群とした。

2. 生化学的検査

月 1 回の割で、Nembutal (アボットラボラトリーズ) 麻酔 (4mg/100g, 腹腔内投与) 下にて開腹し、試料として肝部分切除と、採血は下大静脈より施行した。

肝および血漿 cyclic AMP の測定は YAMASA cyclic AMP Assay Kit (ヤマサ醤油 K.K.) を用いた。

GOT, GPT, LDH, Al-P, γ -GTP は Technicon 社の SMAC の方法にて測定した。

Al-P および LDH isozyme は生化学工業 K.K. 菅野剛史らの方法にて測定した。

γ -GTP の isozyme は Angelo Bulima の方法によった。

血清 glucagon は第 1 ラジオアイソトープ社のグルカゴンキット「第 1」にて測定した。

結 果

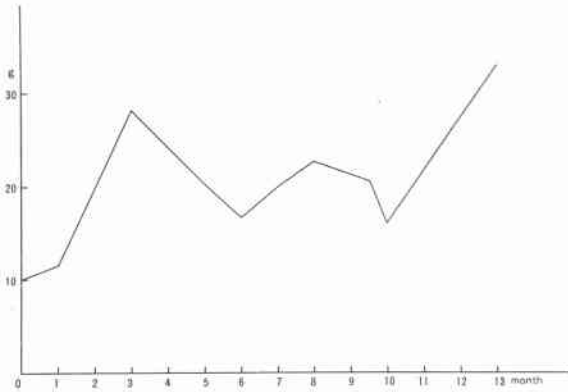
I. 体重変化

実験開始は体重150gより開始、4カ月までは平均75g/month割で体重の増加が見られ450g前後となった。4カ月目より、CCl₄の投与により体重増加は緩慢となり、肝硬変完成時期にやや減少したが、以後再び増加し、500gを越えるようになった。

II. 肝重量の変化 (図 2)

実験開始、体重150gの時の肝重量は平均10gで、DAB投与後、1カ月齢から3カ月齢にかけて急速に増加し、28gと実験開始に比較し約3倍となった。4カ月目からは週2回CCl₄を投与し始めたが、その影響のためか、その後、6カ月齢までは減少し、平均18gとなった。この時期は脂肪肝の時期であった。その後は肝硬変の完成する時期を経て、再び8カ月齢まで上昇し、平均23gとなった。10カ月齢になると、実験開始時

図2 肝重量の変化



と似かよった重量まで減少した。平均して、この時期に肝癌の発生を見ている。肝癌の増殖に一致して、これ以後は増量の一途をたどり、13カ月齢には平均33gにもなった。ただし、全例に測定している訳ではない。

III. 生化学的变化

i) 肝および血漿 cyclic AMP の変動

肝および血漿 cyclic AMP の変動は肝切群では大きく3つの phase を、非肝切群では2つの phase を示した。また、両群とも、肝 cyclic AMP 値の上昇が、血漿のそれよりもやや時期を先行して出現した。

a. 肝 cyclic AMP の変動 (図3, 4)

実験開始前のラット cyclic AMP 値は、 180.7 ± 52.5 pmol/g・wet であった。

DAB 投与後1カ月齢では肝切群 447.2 ± 25.2 で、非肝切群は 222.1 ± 19.1 と、肝切群の cyclic AMP 値の上昇が著しく、肝切群での第1 phase 期を示した。2, 3カ月になると肝切群 291.3 ± 36.6 , 306 ± 79.2 と減少してきたが、非肝切群では 162.4 ± 24.8 , 220 ± 67.3 となり、やや減少した程度であった。

実験開始4カ月齢になると、つまり CCl₄投与1カ月には、肝切群では 48.0 ± 10.9 , 非肝切群では 61.8 ± 9.8 となり、両群とも著明な減少を呈し、全経過を通じて最低値を示し、CCl₄の影響が強く現われた。

6カ月齢になると、肝切群、非肝切群とも同様な値を示し、 371.0 ± 43.9 と急上昇し、肝切群では第2 phase, 非肝切群では第1 phase を呈した。

7カ月齢になると、やはり肝切群、非肝切群の差は認められず、 220.0 ± 43.8 と減少し始めた。

8カ月齢を過ぎてからは両群とも徐々に増加し、13ヶ月齢では 342.1 ± 25.3 となり、肝切群では第3 phase を、非肝切群では第2 phase を呈した。

次に、肝硬変合併肝癌発生時期に、癌部と非癌部の cyclic AMP 値を比較して見ると、癌部では、 376.3 ± 59.3 , 非癌部では 304.5 ± 77.5 と癌部の方が高い傾向ではあったが、統計学上、有意の差は認められなかった。

b. 血漿 cyclic AMP の変動 (図3, 4)

実験開始前の血漿 cyclic AMP は 51.5 ± 12.1 pmol/ml であった。

実験開始1カ月齢では、肝切群 304.4 ± 122.8 , 非肝切群では 64.5 ± 3.9 と、肝切群では著明に上昇し、肝切群では第1 phase を呈した。

2カ月齢では、肝切群 58.0 ± 20.6 と著明に減少し、実験開始前の値に復した。非肝切群では 63.4 ± 37.1 と1カ月齢と比較し、変化が認められなかった。

4カ月齢、つまり、CCl₄投与1カ月では、肝切群は 168.0 ± 94.6 と上昇し、第2 phase を、非肝切群では

図3 肝切群における肝および血漿 cyclic AMP の周期的変動

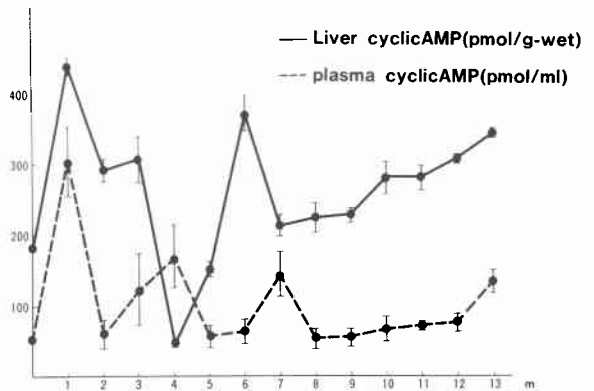
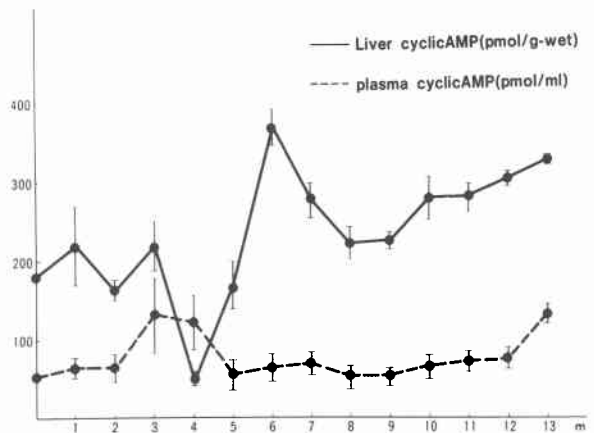


図4 非肝切群における肝および血漿 cyclic AMP の周期的変動



132.7±101となり、第1 phaseを呈した。この時期の肝 cyclic AMP値は最低値を示したが、血漿 cyclic AMP値は上昇と矛盾するような結果であった。

5カ月齢になると、肝切群、非肝切群とも減少し、それぞれ63.7±35.4, 55.4±31.8と低値を示した。

7カ月齢になると肝切群は144.0±65.9と再び上昇し、第3 phaseを示したが、非肝切群は71.4±34.8とやや上昇した程度であった。

8カ月齢になると、両群とも同様な値を示し、53.9±26.0となった。

9カ月齢以後は両群とも徐々に上昇し、13カ月齢では、134.0±27.4と上昇し、肝切群では第4 phaseを、非肝切群では第2 phaseを呈した。

ii) 血清 Glutamic Oxaloacetic Transaminase (GOT), Glutamic Pyruvic Transaminase (GPT) の変動 (図5)

肝切群、非肝切群とも全経過を通じて差が認められなかった。血清 GOT, GPTとも大きく、3つの phaseを示した。

実験開始前、GOTは80±12.5U, GPTは19±3.4Uであった。

GOTは実験開始後、1~2カ月齢はほとんど変化は認められなかったが、3カ月齢には330±175.6Uと上昇した。しかし、4カ月齢、つまり、CCl₄投与1カ月齢では149±59.9Uと一時低値を示したが、5カ月齢になると1,335±156.4Uと著明な上昇を呈したが、6カ月齢になると、また正常域内へ落ち着いた。7カ月齢になると再び上昇し、575±120.4Uとなったが、それ以後は漸次低下し、13カ月齢には115±25.5Uと

なった。

GOTもGPTとだいたい同様な推移をたどった。4カ月齢までは正常域内と100U前後を繰り返したが、5カ月齢にはGOTと同様急激な立ち上がりを示し、762±75.6Uと著明な上昇を示した。6カ月齢には52±14.5Uと著しい減少を示し、7カ月齢には再び上昇し、375±56.6Uとなった。以後はGOTと同様、漸次減少傾向を呈し、13カ月齢には62±16.9Uとなった。

iii) 血清 Lactic Dehydrogenase (LDH) の変動 (図6)

実験開始前のLDHは956±282.6Uであった。

LDHの変動は、肝切群では3つの phaseを、非肝切群では2つの phaseを呈した。1つの差は実験開始1カ月齢の肝切群の上昇時期でその他は同じであった。

肝切群の第1 phaseは1カ月齢で、7,700Uと上昇、2カ月齢では減少し3,960Uとなり、3カ月齢では再び上昇し6,700Uとなった。

7カ月齢では11,400Uと著明な上昇を示したが、9カ月齢では992Uとなり、以後漸次減少したが、13カ月齢では700Uとやや上昇した。

非肝切群の第1 phaseは3カ月齢で、5,500U、第2 phaseは7カ月齢で同値の5,500Uであった。

LDHの isozymeでは全経過を通じ、両群ともLDH₅が90~98%を示し、その傾向の差は認められなかった。

iv) 血清蛋白の変動 (図7)

実験開始前、総蛋白量 (T.P) は7.6±0.25g/dlで、

図5 血清 GOT, GPT 値の変動

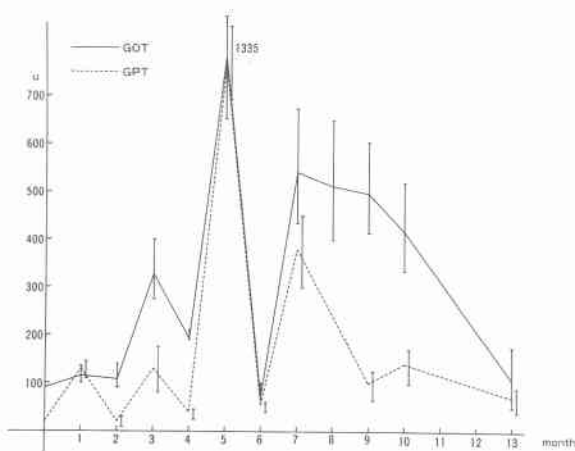


図6 血清 LDH 値の変動

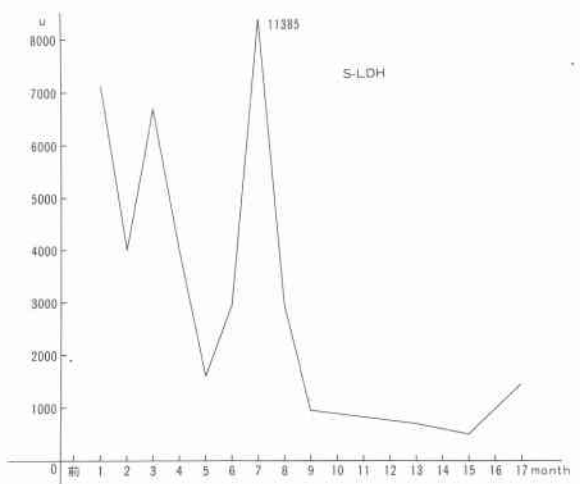
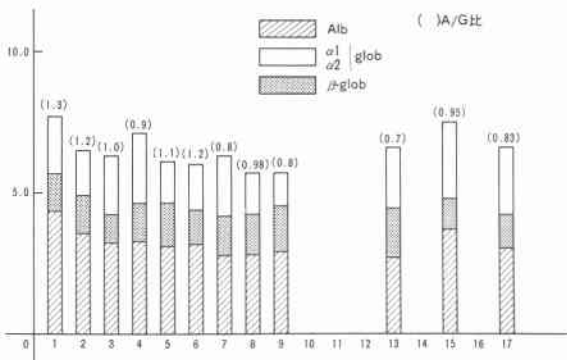


図7 血清蛋白の変動



分画は Albumin 56.7%, α_1 -glob 12.9%, α_2 -glob 7.0%, β -glob 17.6%および γ -glob 5.6%であった。T.Pは実験開始後、漸次減少し、5、6カ月齢の脂肪肝時期では、T.P 6.1 ± 0.12 g/dl, A/G比は1.1となり、肝硬変完成時期にはT.Pは 5.6 ± 0.76 g/dlで、A/G比は0.8であった。globulinの中でも β -globは28.1%と上昇した。

13カ月齢になると、T.Pは 6.4 ± 0.14 で、A/G比は0.83で、やはり、 β -globはかなり上昇し、30.6%となった。

考 察

今回 Berenblum の two stage carcinogenesis の考えから、initiator として DAB, pomotor としての CCl_4 とから、ラットで肝硬変合併肝癌を作製し、肝細胞の増殖を調節するといわれている cyclic AMP を測定し、その変動に興味ある結果を得た。

肝および血漿 cyclic AMP の変動

実験経過中、肝切群より1つ多い3つの phase を呈した。肝切群では第1の phase は実験開始後1カ月で、肝切による肝再生による高値であると思われた。肝再生による cyclic AMP の上昇に関しては Throter や Short らにより、肝部分切除後に上昇し、DNA と大いに関係があると報告している。McManus^{8)~10)}, Whitfield¹¹⁾¹²⁾ らも肝切除後、4~12時間で肝 cyclic AMP 上昇が見られ、cyclic GMP は変化してないと報告している。このようなことから、非肝切群では上昇せず、肝切群では上昇しているということから、肝切群の cyclic AMP の上昇は肝部分切除の影響と考えるのが妥当と思われる。

その後2~3カ月齢では小健康状態が続くが、4カ月齢つまり、 CCl_4 投与1カ月では一時急激な cyclic AMP の減少を呈し、蛋白合成阻害がうかがわれた。5カ月齢になると肝 cyclic AMP は上昇し始め、6カ月

で、肝切群では第2の phase を、非肝切群では第1の phase を示した。この時期は組織的に著明な脂肪肝を呈する時期であった(図8)。GOT, GPT 値も5カ月齢で著明な上昇を示し、肝細胞の障害を強く表わしていた。この時期の cyclic AMP の上昇は、肝再生への起点として上昇するのではないかと考えられるが、組織学的には、わずかに残った正常肝細胞あるいは未熟な肝細胞だけで、他は著明な脂肪滴である。果してこのような状況下で cyclic AMP の形成あるいは DNA 合成を促進する能力があるのか非常に矛盾した状況であると思われた。この解明には組織酵素学分野から追求せねばならないと考えられた。7カ月齢になると、肝硬変が完成されるのであるが(図9)。肝 cyclic AMP は減少した。肝切群と非肝切群とでは、多少時期を前後するが、その後 cyclic AMP は徐々に上昇し始

図8 実験開始168日齢

著明な脂肪化が中心静脈域を中心として観察される。膠原線維が glisson 鞘からひも状に伸展しているのも散見される。

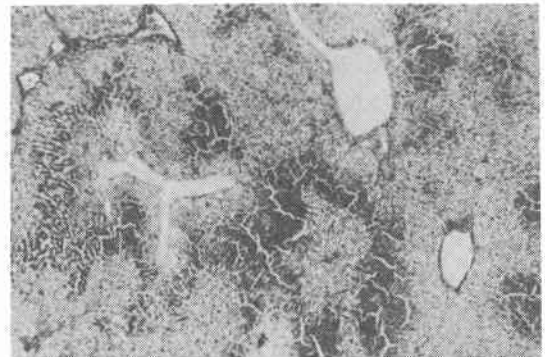
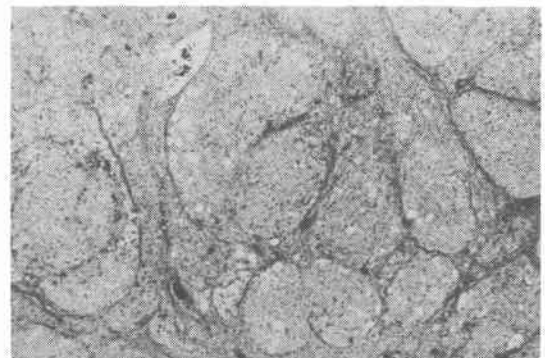


図9 実験開始246日齢

膠原線維の幅は増強し、大小様々な結節を呈している。



め、13カ月齢では両群とも、第2、第3 phaseを示した。この時期はすべての症例に多発性の腫瘍結節を形成していた(図10, 11)。

Kitagawaら¹³⁾は、3'-Me-DAB投与による carcinogenesis をラットを使用し、血清 AFP を測定しているが、過程中2つの phase を示し、第1の phase は3~5w で出現し、これは癌発生にとって必要なものではなく、第2の phase が肝癌発生時期に一致したと述べ、また、Watabeら¹⁴⁾も、azo-dye による carcinogenesis の過程において AFP の frequent transient appearance があると報告している。今回、われ

図10 実験開始400日齢

不規則な配列を示す肝細胞癌。核内周に付着し、核小体が目立つ。また不規則に増生するミエリン体が滑面小胞体の塊状増生。糸粒体の小型化と不規則な小集簇性配置を示し、これらの細胞の周辺には dark cell が散見される。

5 μ × 3000

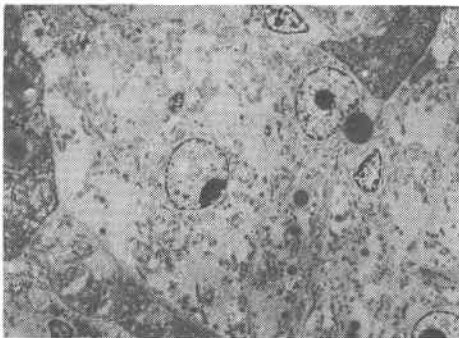


図11 実験開始400日齢

肝細胞々体内に増生するミエリン体。脂肪球を包み込むように層状の滑面小胞体の増生が見られる。

5 μ × 14000



われは AFP は測定していないが、また CCl₄ を投与した肝硬変合併肝癌ではあるが cyclic AMP の frequent transient appearance が見られ、肝癌発生過程にある周期が存在すると考えられた。

今回の実験での肝切群では第3 phase 非肝切群では第2 phase の cyclic AMP 上昇ほどの様な理由によるのだろうか。癌完成時期の非癌部と癌部の肝 cyclic AMP は癌部の方が高い傾向ではあるが両者に有意の差はなかった。このことは癌部周囲の肝硬変組織が癌状態と同様な意味つまり、前癌状態の性質をもって来ると理解して良いのであろうか。Boydら¹⁵⁾は、3-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene 投与により、腫瘍部と非腫瘍部の cyclic AMP の上昇を認め isoproterenol との関係を強調している。つまり、この時期の cyclic AMP の上昇は異常な transcription あるいは translation が行われているのではないだろうかと述べている。

遠藤ら¹⁶⁾は、in vitro で癌細胞培養で cyclic AMP を投与すると、細胞形態の変化 contact inhibition に影響をおよぼし、癌細胞からメジウム中へ蛋白分泌は、蛋白全体としては抑制されるが AFP 分泌は促進される。また DB cyclic AMP は AH66細胞の増殖は抑制すると報告している。井坂ら⁵⁾も同様に、吉田腫瘍に cyclic AMP を投与すると、AFP の上昇が見られ、細胞の増殖を抑制し、theophyllin を投与するとその変化はさらに著明になり、元の培養地に戻すと、投与前の状態に復帰し、細胞の増殖が認められ、cyclic AMP は DNA 合成を著明に阻害し、RNA は中等度に阻害、逆に蛋白合成は相対的に増加し、surface membrane organization に変化をもたらすと報告している。小山ら¹⁷⁾は癌細胞培養地に cyclic AMP を投与すると Hyaluronic acid の増加が見られ、反して細胞増殖は抑制されると述べている。その他同様な報告が見られている¹⁸⁾⁻²⁰⁾が、総合すると、in vitro で腫瘍細胞に cyclic AMP を投与すると、① 細胞増殖の抑制、② 細胞構造の変化、③ adhesiveness、④ restoration of contact inhibition、⑤ collagen の増加、⑥ HA 合成と他の酵素の増加などが挙げられる。また、Whitfield¹¹⁾¹²⁾は calcium-cyclic AMP control system は正常肝細胞においては DNA 合成や肝細胞の増殖を増強させるが、腫瘍細胞に関してはほとんど効果がないと報告している。

in vivo の実験では rapidly growing intermediate growth rate や slow growing などの Morris he-

patoma を利用して cyclic AMP 動を観察している²¹⁾²²⁾。Robert, A. Hickie²³⁾²⁴⁾は cyclic AMP の形成において, Morris hepatoma と normal liver の大きな違いは glucagon に対する tumor adenylyl cyclase の responsiveness が減少すること, とくに rapidly growing hepatoma において著明で, これは glucagon の plasma membrane 結合が減少するのと同関係があると述べている。このことは, Schumm ら²⁵⁾も報告している。また, cyclic nucleotide と tumor growth rate との間に強い関係はないと述べている。Brown ら²⁶⁾は hepatoma 7777, 7794A, 9618A で hepatoma cyclase activity は正常肝よりかなり高いと報告している。反して, Weber ら²⁷⁾は rapidly growing hepatoma の adenylyl cyclase activity は著明に低く, slow growing hepatoma (66, 7794A) では正常肝と同じ程度と報告している。また, Criss and Morris²⁸⁾は種々の Morris hepatoma で, plasma membrane の adenylyl cyclase activity は肝 preparation より低かったと報告している。

以上のように, 同じ hepatoma を使用しても違った意見がある。これは, 今回肝硬変合併肝癌についてはあるが hepatoma が完成した時期やそれ以後の時期でも肝 cyclic AMP は異って来るため, 時期的な相違, あるいは測定方法などにも問題があると思われる。その他, adenylyl cyclase の activity について cyclic GMP/cyclic AMP 比を検討したり多くの報告があるが, いまだに統一された見解はない。

われわれの今回の実験では, 腫瘍組織での cyclic AMP は周囲の host liver に比較して, 有意差は認められなかったが, 高値を示していた。このことと, in vitro での肝切除による cyclic AMP の著明な上昇は矛盾する結果と思われる。

この結果を理解するには, 肝切除後の cyclic AMP と, 脂肪肝から肝硬変移行時期の cyclic AMP 上昇は細胞の増殖をうながし, 腫瘍細胞には, 癌細胞の増殖抑制をうながす二重作用があるのであろうか。また Sharma ら²⁹⁾³⁰⁾は Morris hepatoma の ER membrane は cyclic nucleotide と 2 つの binding site を持っているが, 正常の ER membrane は 1 つの binding site しか持っていないと報告しているが, この cyclic AMP の矛盾する作用を説明するのに興味ある報告と考えられた。

文 献

1) Bernblum I: Carcinogenesis and tumor path-

- ogenesis. *Advance Cancer Res* 2: 129—175, 1954
- 2) Thrower S, Ord MG: Hormonal control of liver regeneration. *Biochem J* 144: 361—369, 1974
- 3) Short J, Tsukada K, Rudert WA, et al: Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and the induction of deoxyribonucleic acid synthesis in liver. *J Biol Chem* 250: 3602—3606, 1975
- 4) Thomas EW, Murad F, Looney WB, et al: Adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate: Concentration in Morris hepatomas of different growth rates. *Biochem Biophys Acta* 297: 564—567, 1973
- 5) Isaka H, Umehara S, Umeda M, et al: Increased production by cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-treated Yoshida ascites sarcoma cells in vitro. *Gann* 65: 79—83, 1974
- 6) Ryan WL: Inhibition of cell growth in vitro by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 162: 1484—1485, 1968
- 7) Whitfield JF, MacManus JP, Rixon RH, et al: The positive control of cell proliferation by the interplay of calcium ions and cyclic nucleotides. *In Vitro* 12: 1—18, 1976
- 8) MacManus JP, Frank DJ, Youdale T, et al: Increases in rat liver cyclic AMP concentrations prior to the initiation of DNA synthesis following partial hepatectomy of hormone infusion. *Biochem Biophys Res Commun* 49: 1201—1207, 1972
- 9) MacManus JP, Braceland BM, Youdale T, et al: Adrenergic antagonists and a possible link between the increase in cyclic Adenosine 3',5'-monophosphate and DNA synthesis during liver regeneration. *J Cell Physiol* 82: 157—164, 1973
- 10) MacManus JP, Whitfield JF: Stimulation of DNA synthesis and mitotic activity of thymic lymphocytes by cyclic AMP. *Exp Cell Res* 58: 188—191, 1969
- 11) Whitfield JF, Boynton AL, MacManus JP, et al: The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP. *Mol Cell Biochem* 27: 155—179, 1979
- 12) Whitfield JF, MacManus JP, Rixon RH, et al: The positive control of cell proliferation by the interplay of calcium ions and cyclic nucleotides. *In Vitro* 12: 1—18, 1976
- 13) Kitagawa T, Yokochi T, Sugano H: α -Fetoprotein and hepatocarcinogenesis in rats fed 3'-methyl-4-(dimethylamino) azobenzene or N-2-fluorenylacetylacetamide. *Int J Cancer* 10: 368—381,

- 1972
- 14) Watabe H, Hirai H, Sato H: α -Fetoprotein in rats transplanted with ascites hepatoma. *Gann* 63: 189-194, 1973
 - 15) Boyd H, McAfee DA, Rubin JJ: A study of cyclic nucleotide metabolism and the histology of rat liver during 3'-methyl-4-dimethylamino azobenzene carcinogenesis 11, cyclic AMP metabolism. *Tissue & Cell* 10: 477-494, 1978
 - 16) Endo Y: Diagnosis of primary liver cancer by α -feto-globulin. *Acta Hepatol Japan* 10: 143-146, 1969
 - 17) 小山秀機, 富田幹夫, 小野哲生: 培養ラット線維芽細胞におけるサイクリック AMP およびその誘導体によるヒアルロン酸合成の誘導. 日癌会31回総会記: 73, 1972
 - 18) Shappard JR: Reversion of contact-inhibited growth to transformed cells by dibutyl adenosine 3',5'-cyclic nonophosphate. *Proc Nat Acad Sci USA* 68: 1316-1320, 1971
 - 19) Wicks WD, Leichtling BH, Wimalasena J, et al: Regulation of cAMP metabolism, protein kinase activation, and specific enzyme synthesis in cultured hepatoma cells. *Adv in Cyclic Nucleotide Res* 9: 411-424, 1978
 - 20) Wimalasena J, Wicks W: Coordinate protein kinase activation and specific enzyme induction by cyclic nucleotide derivatives in intact cultured hepatoma cells. *Mol Pharmacol* 16: 449-461, 1979
 - 21) Criss WE, Maganda P, Sakai A, et al: Cyclic nucleotide metabolism in solid tumor tissues. *Adv Exp Med Biol* 92: 489-516, 1977
 - 22) Swierenga SHH, Whitfield JF, Boynton AL, et al: Regulation of proliferation of normal and neoplastic rat liver cells by calcium and cyclic AMP. *Ann NY Acad Sci* 349: 294-311, 1980
 - 23) Hickie RA, Thompson WJ, Strada SJ, et al: Comparison of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and cyclic guanine 3',5'-monophosphate levels, cyclases in Morris hepatomas and liver. *Cancer Res* 37: 3599-3606, 1977
 - 24) Hickie RA: Regulation of cyclic AMP and cyclic GMP in Morris hepatoma and liver. *Adv Exp Med Biol* 92: 451-488, 1977
 - 25) Schumma DE, Webb TE: Effect of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate on RNA release from Isolated nuclei. *J Biol Chem* 253: 8513-8517, 1978
 - 26) Brown HD, Chattopadhyay SK, Morris HP, et al: Adenyl cyclase activity in Morris hepatomas 7777, 7794A and 9618A. *Cancer Res* 30: 123-126, 1970
 - 27) Weber G: In *The role of cyclic nucleotides in carcinogenesis*. Ed. by J Shultz, HG Gratzner. vol 6. Academic Press, New York, 1973, p57
 - 28) Criss WE, Morris HP: Regulation of adenyl cyclase system in transplantable hepatomas. *Cancer Res* 36: 1740-1743, 1976
 - 29) Sharma RK, McLaughlin CA, Pitot HC: The binding of cyclic nucleotides to membranes of the endoplasmic reticulum of normal and neoplast in rat liver. *Arch Biochem Biophys* 175: 221-228, 1976
 - 30) Sharma RK, McLaughlin CA, Pitot HC: Protein phosphorylation of the smooth and rough endoplasmic reticulum in normal and neoplastic liver of the rat. *Eur J Biochem* 65: 577-586, 1976