

—原 著—

BHK 21 株細胞の増殖に与える フッ素イオン (NaF) の効果

小 黒 章

新潟大学歯学部予防歯科学教室 (主任 堀井欣一教授)

(昭和50年11月4日受付)

The Effect of Fluorine Ion (NaF) Upon Proliferation of
BHK 21 Cell Line Cells.

Akira OGURO

*Department of Preventive Dentistry, Niigata University School of Dentistry
(Director: Prof. Kin-ichi Horii)*

緒 言

1938年, Dean¹⁾ が斑状歯とう蝕罹患について発表して以来, う蝕予防にフッ化物を用いることが試みられている。フッ化物のう蝕抑制作用については, 今日まで, 数多く報告され, その生体に及ぼす作用についても研究がすすめられた²⁾³⁾。そのなかに, 細胞レベルに基礎をおいてフッ化物の作用を解明しようとする動向があり, 1950年代に長足の進歩をとげた細胞培養の技術を導入した研究が多くみられる。

1960年, Pace と Elrod⁴⁾ は呼吸阻害剤とL細胞のブドウ糖, 蛋白利用度, 及びその増殖について記している。そのなかで NaF 濃度と細胞増殖の関係についてふれ, 10^{-3} M の F^{-} 濃度において, 24%の増殖抑制を報じている。

Berry と Trillwood⁵⁾ はう蝕予防剤として NaF が細胞増殖に与える影響に着目し, 1963年, $0.1mg/l$ (1/10 ppm) の NaF 濃度で, 15%程度の増殖抑制を認めると報告した。これに対して, Albright⁶⁾ 及び Armstrong⁷⁾ らは, 各々, 4.4×10^{-4} M (8-9 ppm F^{-}), 15 ppm のフッ素濃度

において細胞増殖の抑制を認めるが, 3×10^{-4} M (5-6 ppm F^{-}), 10 ppm では変化がないと報告した。この観察結果の相違は, Berry ら, と Armstrong ら, の間にしばし論争を呼んだが⁸⁾⁹⁾, Nias¹⁰⁾ は前者と同じ実験条件により 1 ppm の NaF 濃度で増殖抑制を認めないと結論した。

Carlson と Suttie¹¹⁾, Le Coultre-Mulder ら¹²⁾, 及び Hongslo ら¹³⁾¹⁴⁾ は引き続き, この問題と取り組み, その結果を発表しているが, ここでもくい違いを生じている。即ち, Carlson と Suttie のそれは Armstrong らの結果に一致し, Le Coultre-Mulder らは同じ HeLa 細胞について 2 ppm のフッ素イオン濃度で影響を認め, T-細胞は 4-8 ppm, 羊膜細胞は 8 ppm で増殖抑制を発現すると報告し, Hongslo らは L 細胞の LS 株において, 17 ppm (0.9×10^{-3} M) のフッ素イオン濃度で変化を認めず, 増殖抑制を示す最低限の濃度は, 1.1×10^{-3} M (約21 ppm) であると報告している。これに加え de Jong¹⁵⁾ は HeLa および L, 両細胞株に関し, $4.5mg/l$ (4.5 ppm) のフッ素イオン濃度では, 増殖抑制を認めないと報告している。

Carlson と Suttie¹⁶⁾, Drescher と Suttie¹⁷⁾ 及び Quissell と Suttie¹⁸⁾¹⁹⁾ は細胞増殖とフッ素イオン濃度の関係についてふれた後に, 細胞生理学的, あるいは, 細胞遺伝学的視野にたち, 解析を試みた。その収穫として, 細胞膜内外のフッ素イオン濃度分布¹⁷⁾¹⁸⁾, それに関連して突然変異によるフッ素イオン耐性株の出現¹⁸⁾¹¹⁾¹³⁾¹⁴⁾, そのメカニズムが, 能動輸送に由来するものであること¹⁸⁾, そして, この形質は遺伝すること¹³⁾¹⁴⁾, また, フッ素イオンは解糖過程¹⁶⁾¹⁸⁾, 細胞内の ATP 濃度¹⁶⁾, Na^+ , K^+ 濃度¹⁹⁾に影響を及ぼす, などの知見を得ることができたが, 細胞増殖の阻害に関しては確固たる結論を得られないままに終わった。

さらに, これらの経緯によれば, HeLa 細胞では, およそ 45 ppm のフッ素イオン濃度で細胞分裂は完全に抑制される¹¹⁾ という報告がある一方, LS 細胞においては, この濃度で細胞死すらもたらされ¹³⁾¹⁴⁾, LS 細胞の原型の L 細胞では 80 ppm が細胞分裂を完全に抑制する濃度である¹⁷⁾¹⁹⁾ と報告された。

これら一連の報告から, 細胞株による多少の効果発現の差は考えうるにしても, 増殖抑制の発現する濃度, 分裂能を完全に失わせ, 細胞死をもたらす濃度はいずれにあるのか, また, それを生じさせる機構は何であるのか, などの疑問は当然, 生じてくる。

この観点から, 筆者は, BHK 21株細胞²⁰⁾²¹⁾を用い, フッ素イオン濃度と細胞増殖の関係を調べ, ここにその観察結果を報告する。

研究方法と材料

実験材料: 本研究には, 新潟大学医学部公衆衛生学教室 (主任: 須永寛教授) より分株させて頂いた BHK 21株細胞を用いた。

この BHK 21株細胞を, 5~6 日毎に, PBS (一)²²⁾ (Ca^{++} , Mg^{++} イオンを除いたリン酸緩衝塩類溶液) に溶解した 0.25 %トリプシン液^{a)}で分散し, 19mm×11cm のスピッツ型試験管を用い, 閉鎖系単層静置培養法で継代培養を行なった。培養継代の操作は以下の通りである。PBS (一) で 2 回細胞を洗い, 5~10 分間トリプシン液を作用させ, ただちに, その 2 倍量の PBS (一) を加えて後, ピペティングにより細胞層を剝離, 1,000 rpm, 5 分間遠沈の後, 遠沈管を傾け, 上清を捨て, 10~15 倍の稀釈率で培養液に浮遊させる。この細胞浮遊液を, 1.5ml ずつ, 3 本の試験管に分注し, 37.5°C で培養している。スピッツ型試験管を培養管として用いたのは, 遠沈管としても応用可能であることと, 形態的に, 丸底のものより単層静置培養に適しているためである²³⁾。また, 実験に用いた培養管は, 継代培養に用いているものと同じで, 後に述べる核数算定の操作の便を計るため, 1 ml の目盛を刻んだ。

培養液: 培養液の組成は, 以下の通りである。

- ① Eagle's MEM^{24)b)} 100ml
- ② 2.92 % L-glutamine^{c)} 1 ml
- ③ 2.95 % Triptose phosphate broth^{d)} 12.5ml
- ④ 仔牛血清^{e)} 6 ml
- ⑤ 7 % NaHCO_3 ^{f)} 1.8ml

実験中, 培養液を 2 度にわたり調製したが, これを, Lot 1, Lot 2 の培地とする。Singer と Armstrong²⁵⁾²⁶⁾, wharton²⁷⁾ の方法に基づいて, これらの培地中のフッ素濃度を測定し, 各々, 0.03 ppm, 0.06 ppm の値を得た。

フッ素イオン濃度の測定は, 合成樹脂製のコンウェイユニット²⁸⁾を用い, 60°C, 22 時間の拡散条件によった。²⁵⁾²⁶⁾²⁹⁾。比色はジルコニウム, スパ

a) Difco Laboratories (1: 250) made in USA

b) 日水製薬 東京

c) 和光純薬 大阪 試薬特級

d) Difco Laboratories

e) 千葉県血清研究所 千葉 濾過除菌56°C30分加温

f) 大塚製薬 東京

ンズ法^{30)g)}により、波長 580 m μ 、液層 1 cm³¹⁾で吸光度の測定を行なった。

実験方法：前述の継代培養から 30ml の細胞浮遊液を作り、300ml の角型培養瓶でこれを培養し、monolayer (単層細胞膜) を形成させてから、再び細胞分散を行ない、実験に用いる均一浮遊液を作った。

このようにして得た均一細胞浮遊液に種々の濃度のフッ素イオン溶液を加え、同型培養を行った。細胞の増殖度は核数計算法により算定した。以下に、その手順を述べる。

(1) 同型培養の作製、同型培養法は、Evans ら³²⁾によって考案され、勝田ら²³⁾³³⁾はこれを Simplified replicate tissue culture として改良した。筆者は勝田らの技法に従った。

既知濃度の NaF 水溶液を高圧滅菌の後、培養液中に期待するフッ素イオン濃度の 100 倍溶液を無菌的に調製し、その 0.01ml と均一細胞浮遊液の 0.99ml を合して同型培養に供した。即ち、試験管立て (metal rack³³⁾) に前述のスピッツ型試験管を並べ、0.01ml 用マイクロピペット^{h)}を用い、100倍フッ素イオン濃度の溶液 0.01ml を底におき、1ml 用の自動分注器ⁱ⁾を用い、細胞浮遊液 0.99ml を加え、シリコン栓で密栓した。これを、metal rack ごと振盪し、試験管の内容を攪拌した。

細胞接種濃度 $2 \sim 4 \times 10^4$ 個/ml、培養温度 37.5°C、試験管の傾斜角 5°、の場合²³⁾³³⁾³⁴⁾に、ほぼ 4 日で monolayer を形成し、むらのない良好な発育が得られたので、これを実験条件とした。

(2) 核数計算：増殖した細胞は核のみを遊離させ、その数を数えた³⁵⁾。

全ての試験管から栓をとり払い、metal rack を傾けて培養液を捨てる。この時流失

する細胞数は無視しうるものとする¹¹⁾³³⁾。

次に、0.01% クリスタル紫を含む 0.1 M クエン酸溶液 2 ml を各試験管に加え、37°C で 1 時間半培養する。その後直ちにシェーカーで 10 分間、70 回/min の振盪を与える。しかる後、この細胞質の破片と核の混合浮遊液を 1,600 rpm、10 分間遠沈し、毛細管ピペットで上清を吸引し、1 ml を残す²³⁾³³⁾³⁶⁾³⁷⁾。

このようにして得た核浮遊液を、毛細管ピペットで均一に攪拌し、Bürker-Türk 型計算盤に入れ、計算盤内の全ての核数を数えた。

筆者は数個の同型培養を用い、1 本の試験管につき数回の計測を行ない、結果を F 検定し、ほぼ 3 回以上の計測で 1 本の試験管の核浮遊液の濃度を決定できることを知った。従ってこの実験では 4 回の平均をとって細胞濃度とした。

フッ素濃度により、次の実験 I, II, III, を行った。

実験 I：フッ素濃度と細胞増殖の関係について、全体としての傾向を把握するために、0.1, 1, 10, 100, 1000 ppm のフッ素濃度を有する同型培養を各 10 本ずつ作製した。これと同時に細胞接種濃度を測定した。即ち接種細胞浮遊液 (前述の均一細胞浮遊液 0.99ml) 10 本に、前述の 0.01% クリスタル紫を含む 0.1 M クエン酸溶液 7.5ml を加え、これを前述の操作で 1 ml の核浮遊液としてから核数を算定した。

被験群に関しては、先ず、脱水した NaF 2.210 g を 100.0ml の蒸留水に溶解した 1.00% フッ素イオン溶液を原液とし、これを蒸気滅菌してから、無菌的に蒸留水で希釈し、10, 100, 1,000 ppm 1.00% のフッ素イオン水溶液を準備し、前述の如く 0.01ml をとり、0.99ml の細胞浮遊液を加えた。

g) スパズ試薬：半井化学、京都 試薬特級

オキシ塩化ジルコニウム：和光純薬 試薬特級

h) EKDS 東京

i) Oxford Laboratories made in USA

j) フッ素濃度測定の際の標準液には、和光純薬の三溜水を使用し、培地、フッ素溶液用には、東洋化学の採水装置 GS-20N より蒸留水を得た。

1,000 ppm 群については、その調製のための 100 倍溶液を得ることは NaF が飽和に達するため、できないので、0.0022 g を秤量し、1 ml の細胞浮遊液に直接投入した。従って後述の表 1 にはその対照を C' として表わした。

実験 II: 測定点をさらに細かくとり、10, 15, 20, 30, 50, 80, 100, 200, 500 ppm のフッ素濃度について観察を行なった。培養試験管数は各 4 本である。各フッ素濃度培養液の作製は、200, 500 ppm を除き、実験 I の 100 ppm 以下と同様である。500 ppm 群に関しては 1,000 ppm の場合と同じく、溶解度に関係して得られないので、0.01 ml の蒸留水を加えた後、0.0011 g を秤量し、0.99 ml の細胞浮遊液中に直接投入した。200 ppm の場合は 100 倍溶液の濃度が飽和の臨界点に近接するので 100 ppm 用の溶液から 0.02 ml とり 0.99 ml の細胞浮遊液を加えた。従って、その対照 C' には 0.02 ml の蒸留水を加えた。

実験 III: 10 ppm 以下の低濃度での影響をみるためにこの実験を行なった。フッ素濃度は、0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 5.0, 8.0, 10.0 ppm である。これらのフッ素濃度培養液の作製は 2.201 g の NaF を 1000 ml の蒸留水に溶解した 1000 ppm フッ素イオン溶液を原液として用い、他は実験 I, II と同様である。また、培養試験管数は各 4 本である。

以上 3 つの実験において培養完了後、すべての培養管について、前述の核数算定により細胞濃度の測定を行った。

実験結果

表 1, 及び図 1 は実験 I の結果を示すものである。この実験の細胞接種濃度は $3.4 \pm 0.1 \times 10^4$ 個/ml であった。同型培養の対照群の培養 4 日後の細胞濃度は $100.4 \pm 5.6 \times 10^4$ 個/ml に達した。フッ素添加の 0.1 ppm 群は対照群と同じ増殖を示したが、1 ppm 群、及び 10 ppm 群は、 107.0 ± 3.0 , $126.7 \pm 9.6 \times 10^4$ 個/ml になった。100 ppm 群は細胞濃度が非常に低く、僅か、 $18.8 \pm 5.9 \times 10^4$ 個/ml であった。最高濃度の 1,000 ppm 群では、 $0.2 \pm 0.1 \times 10^4$ 個/ml であり、接種細胞はほぼ

死滅したと思われる。対照群と各フッ素濃度群との差の検定を行ったところ、1 ppm 群との間には $P < 0.005$, 10 ppm 群との間には $P < 0.001$ で有意の増加がみられた (表 2)。以上のことから、対照群では接種した細胞は、4 日間の培養でほぼ 5 回近く分裂し、monolayer を形成するが、フッ素濃度が 10 ppm までの間は、細胞濃度はむしろ増加する。しかし、そのピークが、1 ppm と 10 ppm, 10 ppm と 100 ppm の間のいずれにあるかは不明である。

実験 II は、フッ素イオン濃度が 10 ppm から 500 ppm の間において、100 ppm 以下を実験 I よりさらに細かく区切り、その影響をみたものであ

表 1 フッ素イオン濃度と細胞濃度の関係

フッ素イオン濃度 (ppm)	N	\bar{X} ($\times 10^4$ 個/ml)	SD
Inn. S	10	3.4	0.1
0(C)	9	100.4	5.6
0.1	10	99.6	6.2
1	10	107.0	3.0
10	9	126.7	9.6
100	9	18.8	5.9
C'	10	121.8	10.1
1000	10	0.2	0.1

N: 培養試験管数
 \bar{X} : 平均細胞濃度
 SD: 標準偏差
 Inn. S: 接種細胞濃度

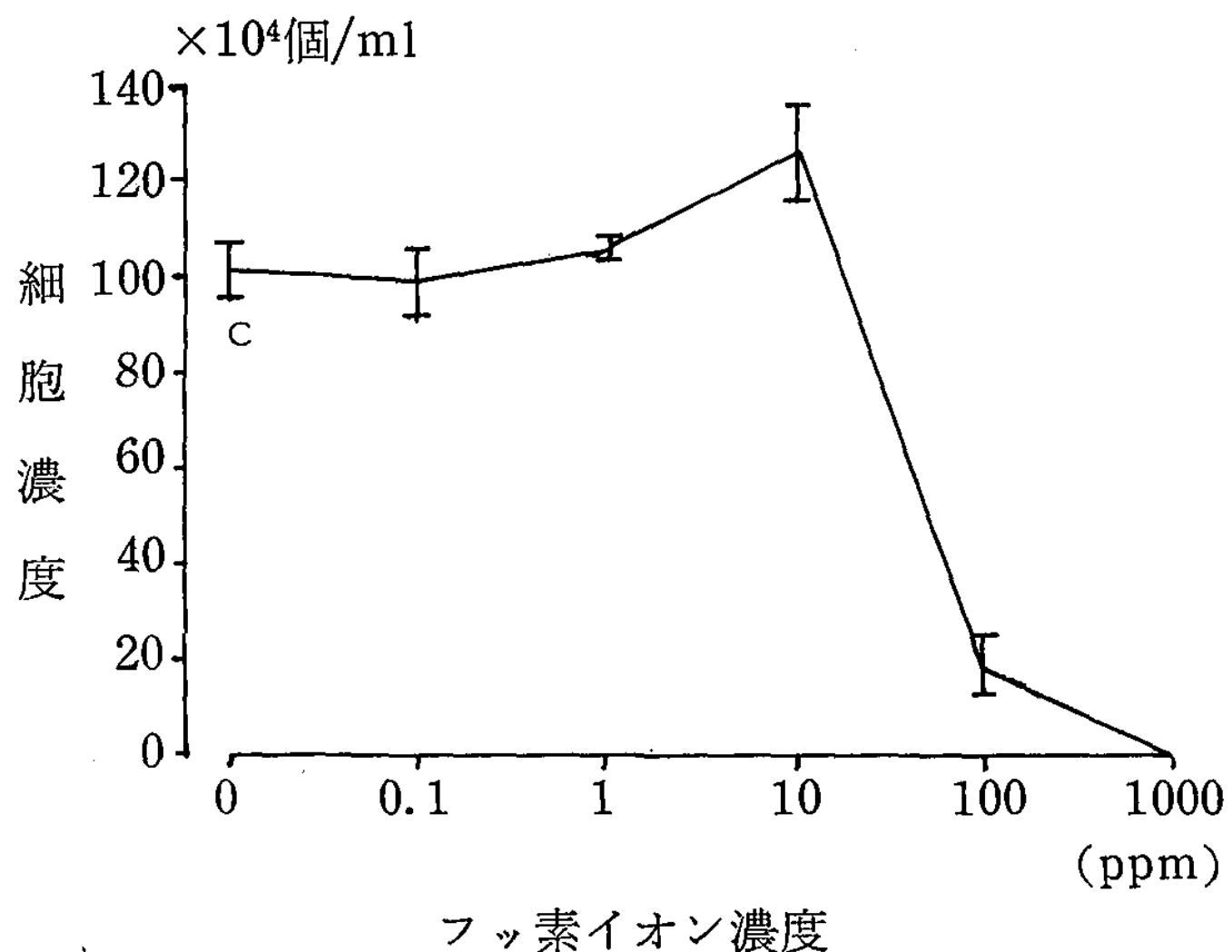


図 1 フッ素イオン濃度と細胞濃度の関係

表 2

検 定	d	w	$\sqrt{\frac{1}{N_1}+\frac{1}{N_2}}$	t	分散比
C— 0.1	0.8	5.936	0.460	0.293	1,244
C— 1	6.6	4.412	0.460	$\frac{3.256}{P<0.005}$	3,452
C—10	26.3	7.835	0.471	$\frac{7.121}{P<0.001}$	2,935

d：2 平均値の差 N：例数 P：危険率
w：共通分散 t：t 値

表 3 フッ素イオン濃度と細胞濃度の関係

フッ素イオン濃度 (ppm)	N	\overline{X} ($\times 10^4$ 個/ml)	SD
C	3	44.8	5.0
10	4	81.4	4.2
15	4	85.6	9.8
20	4	91.2	3.6
30	4	88.4	6.0
50	4	72.7	17.2
80	4	53.2	3.2
100	4	16.2	11.0
C'	4	47.6	2.9
200	4	0.1	0.0
500	4	0.0	0.0

N：培養試験管数
 \overline{X} ：平均細胞濃度
SD：標準偏差

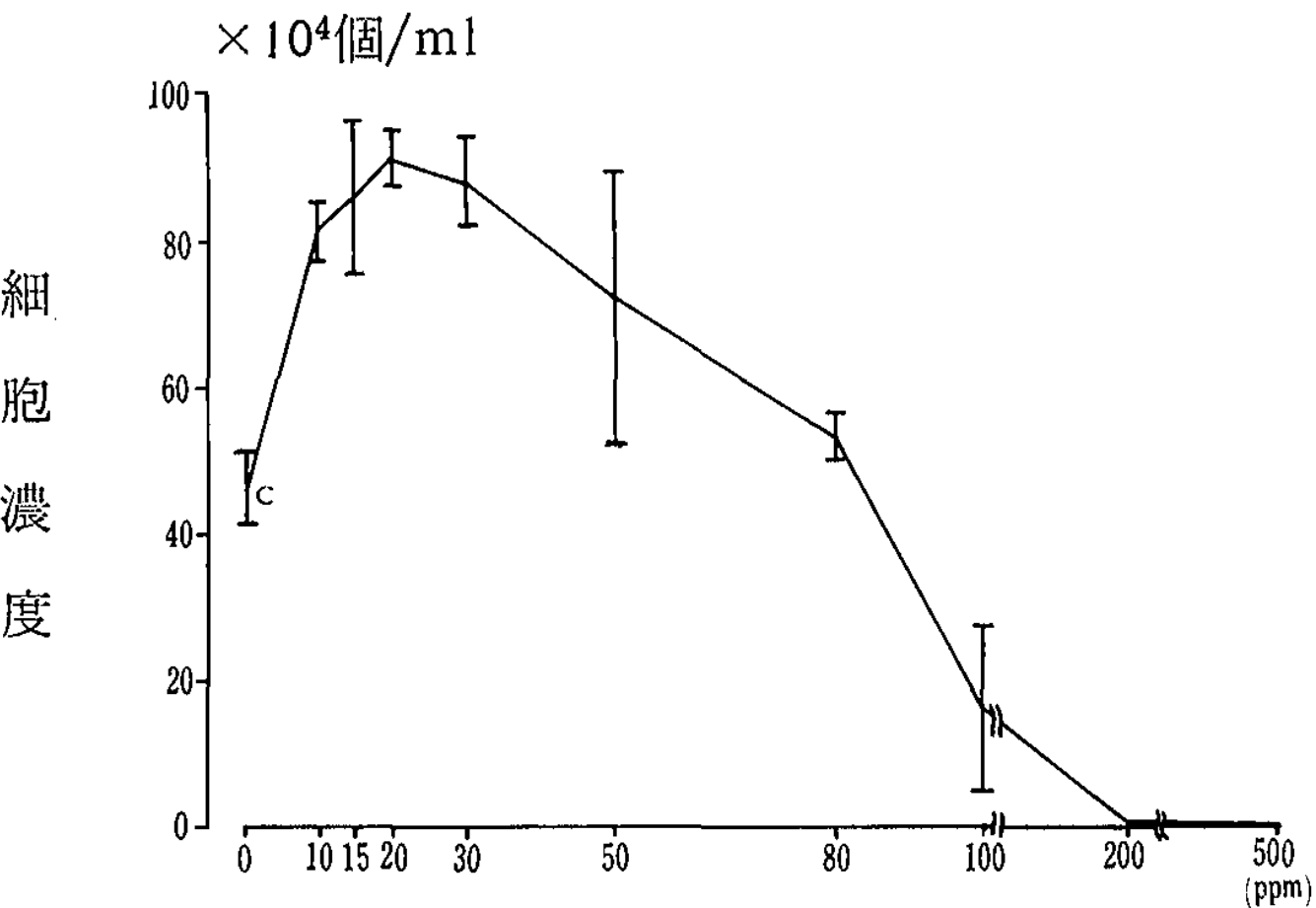


図 2 フッ素イオン濃度と細胞濃度の関係

表 4 フッ素イオン濃度と細胞濃度の関係

フッ素イオン濃度 (ppm)	N	\overline{X} ($\times 10^4$ 個/ml)	SD
C	4	72.7	6.1
0.05	4	83.9	3.0
0.1	4	75.0	6.8
0.2	3	78.9	1.7
0.5	4	79.1	9.4
1.0	4	88.8	6.0
1.5	4	77.3	6.1
2.0	4	82.7	9.6
3.0	3	82.0	3.5
5.0	4	81.0	8.8
8.0	4	93.8	5.2
10.0	4	90.0	5.8

N：培養試験管数
 \overline{X} ：平均細胞濃度
SD：標準偏差

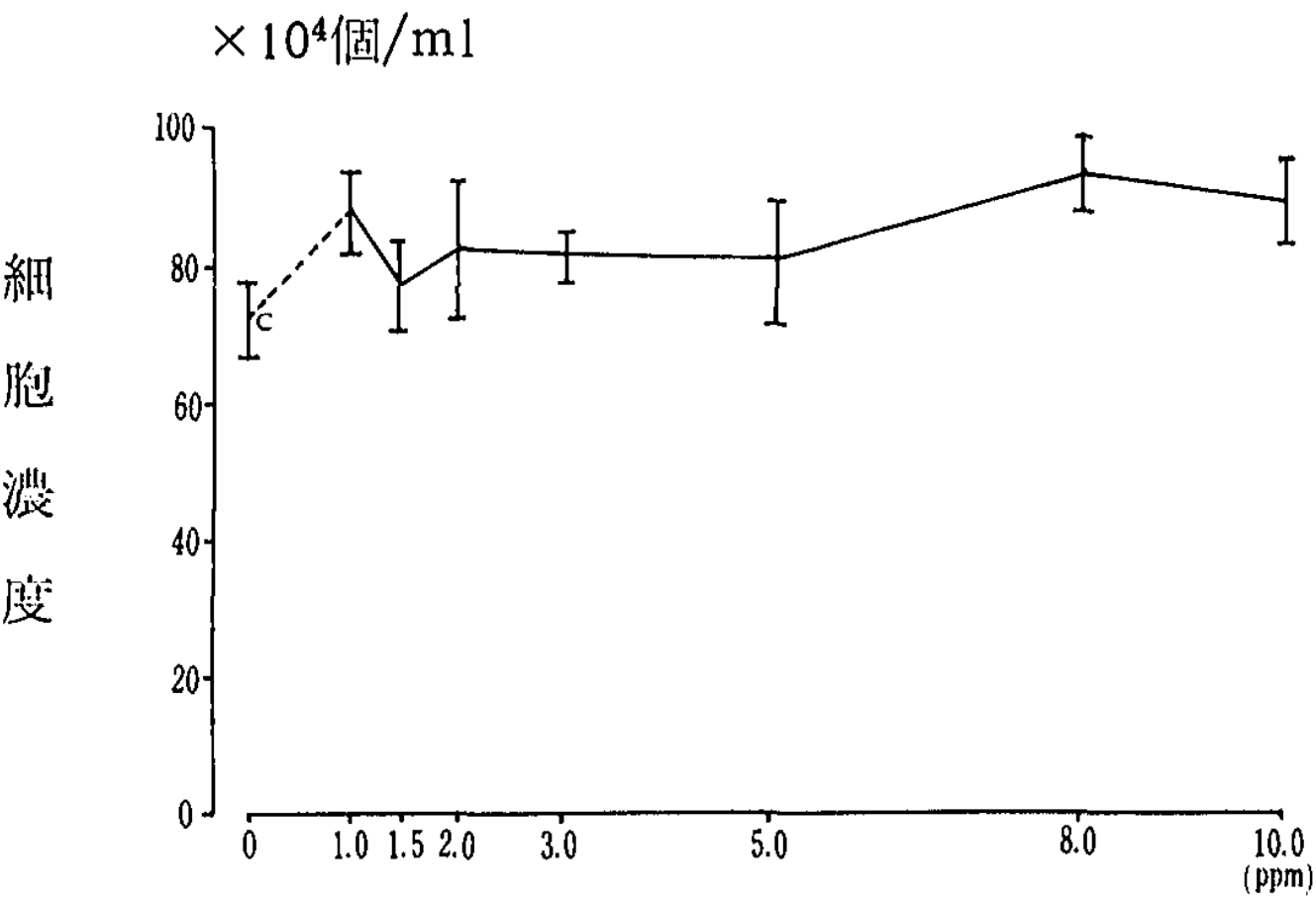


図 3 フッ素イオン濃度と細胞濃度の関係

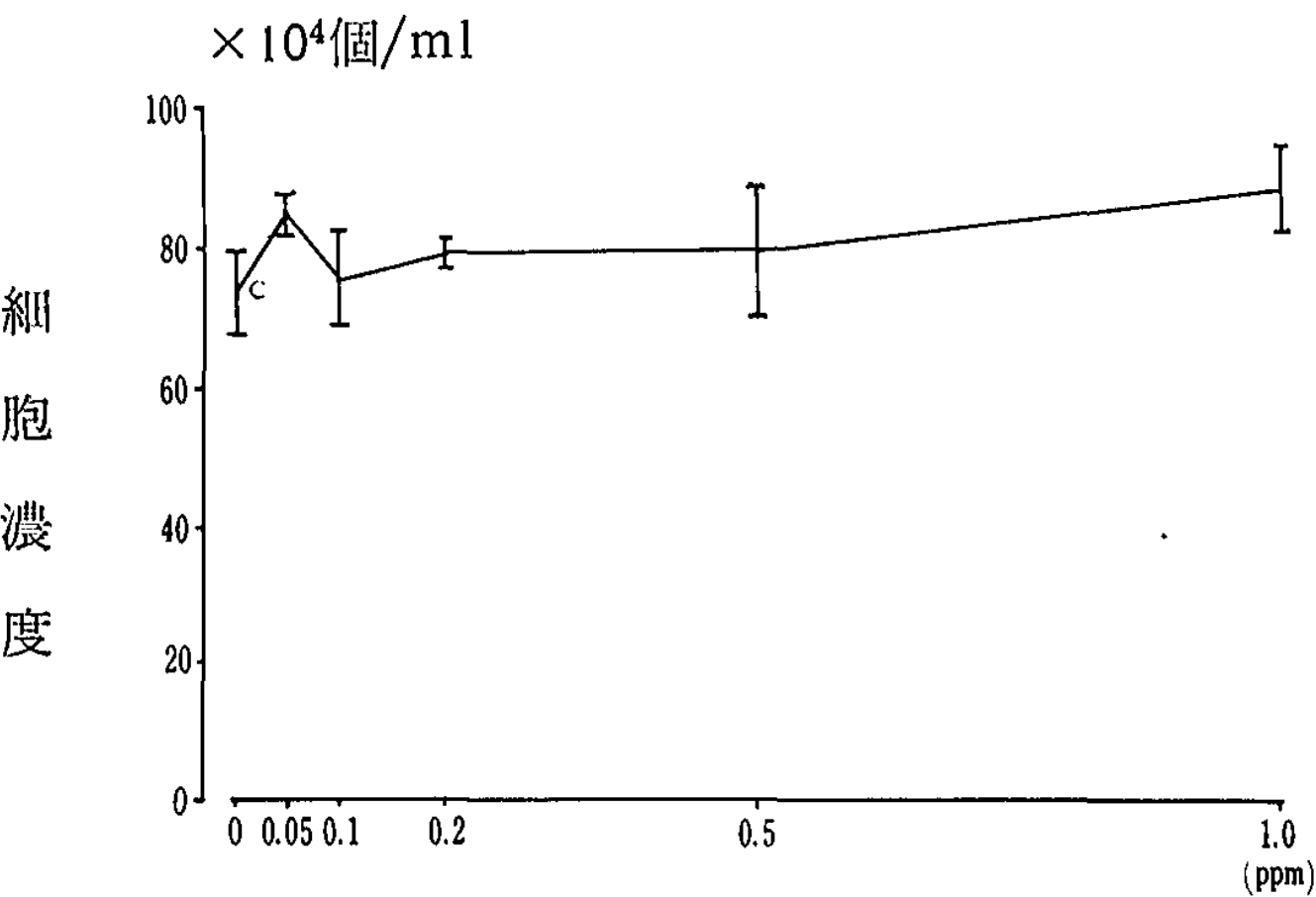


図 4 フッ素イオン濃度と細胞濃度の関係

る。培養結果は表 3 のようであった。即ち、対照群 $44.8 \pm 5.0 \times 10^4$ 個/ ml に対して 20 ppm 群 $91.2 \pm 3.6 \times 10^4$ 個/ ml までフッ素イオン濃度に応じ、細胞濃度は増加する傾向があり、以後 100 ppm 群 $16.2 \pm 11.0 \times 10^4$ 個/ ml までは漸減した。200 ppm 群 500 ppm 群では、細胞濃度はほぼ 0 であった。これらを図示したものが図 2 である。実験 I において、対照群が monolayer を形成する時期を待機していたところ、10 ppm 群は過成長となったので、実験 II においては 20 ppm 群が monolayer を形成した時点で培養を終了した。表には示さなかったが接種細胞濃度が低く、 $18.2 \pm 1.14 \times 10^4$ 個/ ml であった。また各フッ素濃度の plot に用いた試験管数が 4 本ずつであったため、標準偏差のばらつきが大きい。10 ppm 群と 20 ppm 群間は $P < 0.05$ で有意の差を認める。10 ppm 群と 30 ppm 群間、及び 20 ppm 群と 30 ppm 群間の差は有意ではない。このことからフッ素濃度 20 ppm 附近に細胞濃度のピークがあると想像される。

実験 III は、10 ppm 以下のフッ素濃度に対する細胞濃度の変化を観察したものである (表 4)。対照群 $72.7 \pm 6.1 \times 10^4$ 個/ ml に対して、全てのフッ素イオン濃度で細胞濃度は高かったが 8.0 ppm 群と 10.0 ppm 群が最も高く、対照群に比べ $P < 0.01$ で有意であった。この傾向について 1.0 ppm から 10 ppm までを図 3 に、0 から 1.0 ppm までを図 4 に示した。

以上 3 つの実験より、BHK 21 株細胞は、約 4 日間の培養で、フッ素イオン濃度が 20 ppm までは、濃度に応じ、細胞濃度を増し、20 ppm を越すと、漸減し、100 ppm までこの傾向がみられた。なお、200 ppm 以上での細胞の生存は不可能と思われる。

考 察

生体に対するフッ素の作用について多くの報告がある。この物質の細胞レベルでの知見についても細胞培養の技術を用いて、その作用を観察した研究はかなりみられる。この場合、結果の分析には細胞培養という特殊環境に伴う要因を考慮しなければならない。

生体内において、細胞は、例えば、皮膚、粘膜では、内層における旺盛な細胞分裂の一方、最も表層の細胞は脱落をくり返し³⁸⁾⁻⁴²⁾、また肝においては通常、核分裂像の出現頻度は低いが、組織欠損を生ずれば、肝細胞はただちに脱分化を起し活発に増殖を始める⁴³⁾。今日、成熟した神経細胞は分裂しないといわれているが、培養環境に移された神経細胞については、自律神経系細胞の分化、分裂に関して記載がみられる⁴⁴⁾⁻⁴⁷⁾。しかし、体性神経系細胞については度重なる試みにもかかわらず⁴⁸⁾⁻⁵⁴⁾、成熟した神経細胞を分裂させることは不成巧に終わっている⁴⁷⁾。生体内の肝再生過程における細胞増殖は個体の年齢が若い程速かであるが⁴³⁾、培養環境における肝細胞の分裂、増殖は再生過程にある細胞には年齢差がなく、正常肝に由来する細胞では、矢張り年齢差を認めるという⁵⁵⁾。

一般に、生体の細胞はその分化程度に応じ、組織、器官レベルでの統御を受けているが、生体環境から培養環境への移行に伴い、細胞固有の増殖能を発揮し⁵⁶⁾、ほぼ 50 回でその分裂が止むといわれる⁵⁷⁾。

さらに生体環境と培養環境の間には次のような事実も成り立っている。即ち、培養細胞は、その由来する組織を、形態的にも⁵⁸⁾⁻⁶²⁾、機能的⁶³⁾にも再形成しようとする働きがある。これは組織分化の過程の早い時期にある細胞に顕著で、由来組織の加齢とともに⁶⁴⁾⁶⁵⁾、また in vitro での時間経過とともに⁶⁴⁾⁶⁶⁾薄らぎ、ついには由来細胞の機能を失い、増殖のみを目的とした細胞集団に至る⁶⁷⁾。これが細胞株化の過程であるが、この間に細胞は形質転換を起し、染色体数は異数性となる。しかし、株化した培養細胞について山田は、栄養要求、薬物に対する反応性などに等質性があると結論づけている⁶⁸⁾。

培養細胞に対するフッ素の作用について、Hongslo¹³⁾¹⁴⁾らは、0.45 mM, 0.90 mM, 1.3 mM の NaF 添加培養液で LS 細胞を 11 日間培養し、NaF 0.45 mM, 0.90 mM では、対照と同様の生長曲線を描いたが、1.3 mM では増殖抑制を示すことを観察した。このことから彼らは、LS 細胞に対

する NaF の分裂抑制が 1.1 mM (フッ素イオン濃度 20 ppm) で発現すると報じている。また Carlson と Suttie¹¹⁾ も HeLa 細胞を用いて同様の実験を行ない、フッ素イオン濃度 20 ppm 以上で細胞増殖が阻害されることを報告している。その他、Armstrong ら⁷⁾は、15 ppm で分裂阻害が発現し、10 ppm では影響を及ぼさない⁹⁾と述べている。

この実験に用いた BHK 21 株においては、フッ素イオン濃度 20 ppm 前後を越えると細胞増殖の抑制がみられ (図 2), HeLa⁶⁹⁾, L⁷⁰⁾, E. E⁷¹⁾, HeLa-S3⁷²⁾ など由来の異なる細胞株に関する結果と同じであったことは、細胞モデルとしてのこれらの株細胞が、この濃度から分裂を抑制されるものと解釈できる。

しかし、Albright⁶⁾ は、これより低濃度の 4.4×10^{-4} M (フッ素イオン濃度 8 ~ 9 ppm) において増殖抑制を観察し、Le Coultre-Mulder ら¹²⁾ は、DNA 分析の結果から 2 ~ 8 ppm をその濃度に挙げている。

つぎに、完全に細胞分裂を阻害され、細胞が死滅するフッ素イオン濃度は、この実験では 100 ~ 200 ppm の間に存在した。Suttie ら¹⁷⁾⁽¹⁸⁾ は 80 ppm 4 日間の培養で L 細胞の分裂は完全に抑制されたと述べ、これより先の HeLa 細胞に関する結果では 45 ppm でこれが観察されたと述べている¹¹⁾。また、Hongslo ら¹³⁾⁽¹⁴⁾ は LS 細胞に関して 3 mM を細胞の死滅する濃度とし、結果は一致していない。

フッ素の細胞増殖に及ぼす影響を経時的に観察することは幾度か試みられ⁷⁾⁽⁹⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾、その全ての場合に対照群と被験群の増殖度はある一定比を保っている。これは、見かけ上分裂が完全に抑えられる濃度まで観察されるが¹¹⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾、実際のところ、細胞分裂が抑えられてから細胞死が招来されるのか、細胞死ゆえに細胞分裂の抑制が見かけ上観察されるのか、また、そういった両者の平衡関係であるのかは mitotic index⁷³⁾⁽⁷⁴⁾ によらなければ正しく結論づけることはできない。しかし一般的に言って、単体の原子であるフッ素イオンが蛋白に働きかけ、細胞の構造を破壊し、細胞死

をもたらすより、酵素系を阻害し、分裂を抑制する可能性の方が大きい⁷⁵⁾⁽⁷⁶⁾。

増殖の盛んな細胞では DNA ポリメラーゼの活性が高く、さらに重要なことは、DNA ポリメラーゼの分子は、動物種あるいは、細胞種によらず、2 ないしは 3 種に限られるという報告である⁷⁷⁾⁻⁸⁰⁾。DNA 合成は、大きくわけて、この DNA ポリメラーゼと前駆物質であるピリミジンヌクレオチドの生成、及びその生成系酵素によって規制され、この DNA 合成への阻害作用⁸¹⁾⁽⁸²⁾、またはこれに関連して蛋白合成への阻害作用⁸³⁾ が近年報告されている。

これより先、1966 年、Albright⁸⁴⁾ は NaF によって増殖を阻害された細胞にピルビン酸ナトリウムを与えることによって 60 ~ 70 % の阻害からの回復を観察している。これはフッ素イオンが細胞内に於て解糖過程を阻害し、ピルビン酸塩の生成を低下させる⁸⁵⁾⁻⁸⁹⁾ という知見に一致し、また、最近では細胞内の代謝系に添って、より細部まで阻害作用の研究がすすんでいる⁹⁰⁾⁻⁹⁴⁾。細胞内のリボゾーム⁹⁵⁾⁻⁹⁸⁾、ミトコンドリア⁹⁹⁾ に対する影響、カテコールアミン¹⁰⁰⁾、ビタミン¹⁰¹⁾⁽¹⁰²⁾、アセチルコリンエステラーゼ¹⁰³⁾⁻¹⁰⁵⁾、細胞膜あるいはミクロゾームの ATP¹⁰⁶⁾⁻¹⁰⁸⁾ ase など細胞内部、細胞周辺部の生活反応にかかわり、そこに及ぼす影響はフッ素に対する細胞の反応を、複雑化、広範化することが予想される。その意味で Albright の知見は無細胞系における酵素反応に関する知見とは異った現実 に即した証明でもある。

この実験の BHK 21 株では、分裂阻害の発現する濃度より低い濃度において、むしろ、細胞分裂が促進されることを観察した。今日までの報告では細胞増殖度を測定する際に、2 ないし 3 の培養瓶を用いて細胞濃度を決定していたが、この実験では培養管の数を 10 に増し、一点を plot したので統計処理が可能となり、分裂促進の傾向が明らかになった。過去の報告において、このことが看過されたのか、あるいは BHK 21 株にのみ特有な現象であるのかは定かでないが、Pace と Elrod⁴⁾ の実験データでは (彼らはそれについてふれていないが)、各 20 づつの同型培養を用い、 10^{-4} M NaF

(フッ素イオン濃度 2 ppm) において対照群に比べ、8%の細胞増殖の増加を記載している。

古くは、1931年、Sellei と Jany¹⁰⁹⁾ は癌組織の呼吸がフッ素イオンにより昂揚されると報告し、Hintzsche¹¹⁰⁾ は、1954年、chick embryo の心筋片を懸滴培養し、NaF を24時間作用させ、0.25 ppm で細胞分裂頻度が高くなることを観察した。この2つの報告は低濃度のフッ素イオンが細胞に働き、その活性を刺激することを示唆するものである。

さらに、近年に至り、フッ素イオンがホルモン様の働きをし、adenylate cyclase を賦活し、活性を促進するという報告が多くみられる。フッ素イオンは、adenylate cyclase に働き、糖¹¹¹⁾⁻¹¹⁵⁾、脂質¹¹⁶⁾¹¹⁷⁾の代謝を活発化すると考えられる。活性化された adenylate cyclase は cyclic 3', 5'-AMP を増量させ phosphorylase, phosphofructokinase を活性化、グリコーゲン分解を経て、グルコース 6 リン酸を増量するといわれ、解糖過程の障害が細胞分裂の抑制に關与する如く、その促進が、細胞分裂の促進に影響する可能性は濃い。

この実験では、上述のように、フッ素イオン濃度 20 ppm を境とし、それより低濃度では、細胞分裂に対し促進的に作用し、高濃度ではこれを抑制することが観察された。これらの結果に文献的考察を加え、細胞内のフッ素イオン濃度がある濃度を境にしてそれ以下では細胞内代謝を亢進させ、それ以上では抑制的に作用するとの推論を試みた。

総 括

BHK 21株細胞について、単層静置培養を4日間行ない、この細胞株の増殖に対するフッ素の作用を観察した。細胞増殖の抑制は、フッ素イオン濃度 20 ppm を越えると現われ、100 ppm までの間で細胞濃度は漸減した。培養細胞が死滅する濃度は 100~200 ppm の間に存在した。20 ppm より低濃度においては、対照群に比べ、むしろ細胞濃度は増加し、細胞分裂促進の傾向がみられた。

以上の結果に關し、細胞増殖の抑制について

は、今日までの報告結果と一致した。しかし、細胞増殖の促進については、その報告がなく、フッ素と細胞内代謝に関する文献からこの結果に対する考察をこころみた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜わりました堀井欣一教授に衷心より感謝し謝意を表します。

実験に臨み、種々、御指導、御助言を賜わりました本学医学部公衆衛生学教室須永寛教授ならびに沢田清子助手、他教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Dean H. T. : Endemic fluorosis and its relation to dental caries. Pub. Health Rep. **53**: 1443-1452, 1938.
- 2) WHO: Fluorides and human health WHO, Geneva, Switzerland 1970.
- 3) Hodge H. C. and Smith F. A. : Fluorine chemistry vol. **IV** ed. Simons J. H. Academic Press, N. Y and Lond. 1965.
- 4) Pace D. M. and Elrod L. M. : Effects of respiratory inhibitors on glucose and protein utilization and growth in strain L cells. P. S. E. B. M. **104**: 469-472, 1960.
- 5) Berry R. J. and Trillwood W. : Sodium fluoride and cell growth. Brit. Med. J. **2**: 1064. 1963.
- 6) Albright J. A. : Inhibitory levels of fluoride on mammalian cells. Nature **203**: 976, 1964.
- 7) Armstrong W. D., Blomquist C. H., Singer L., Pollock M. E. and McLaren L. C. : Sodium fluoride and cell growth. Brit. Med. J. **1**: 486-488, 1965.
- 8) Berry R. J. and Trillwood W. : Sodium fluoride and cell growth. Brit. Med. J. **1**: 793-794, 1965.
- 9) Armstrong W. D., Pollock M. E. and Singer L. : Sodium fluoride and cell growth. Brit. Med. J. **1**: 1435, 1965.
- 10) Nias A. H. W. : Sodium fluoride and cell

- growth. Brit. Med. J. **1**: 1672-1673, 1965.
- 11) Carlson J. R. and Suttie J. W.: Effects of sodium fluoride on HeLa cells. I. Growth sensitivity and adaption Exptl. Cell Res. **45**: 415-422, 1967.
- 12) Le Coultre-Mulder G. W. A. E., Veldhuizen C., Bouman J. and Wise M. E.: Influence of the fluorine ion on the growth in vitro of human amnion cells, T-(Kidney) cells and HeLa cells. Acta Physiol. Pharmacol. Neerl. **15**: 1-19, 1969.
- 13) Hongso J. and Jonsen J.: Effect of sodium fluoride on cells in vitro. J. Dent. Res. **50**: 717, 1971.
- 14) Hongso J. K., Holland R. I. and Jonsen J.: Effect of sodium fluoride on LS cells. J. Dent. Res. **53**: 410-413, 1974.
- 15) de Jong J. C.: De invloed van fluoride op de groei van menselijke en dierlijke cellen in vitro. Ned. T. Geneesk. **112**: 2266-2267, 1968.
- 16) Carlson J. R. and Suttie J. W.: Effects of sodium fluoride on HeLa cells. II. Metabolic alterations associated with growth inhibition. Exptl. Cell Res. **45**: 423-432, 1967.
- 17) Drescher M. and Suttie J. W.: Intracellular fluoride in cultured mammalian cells. P. S. E. B. M. **139**: 228-230, 1972.
- 18) Quissell D. O. and Suttie J. W.: Development of fluoride-resistant strain of L cells: membrane and metabolic characteristics. Am. J. Physiol. **223**: 596-603, 1972.
- 19) Quissell D. O. and Suttie J. W.: Effect of fluoride and other metabolic inhibitors on intracellular sodium and potassium concentration in L cells. J. Cell. Physiol. **82**: 59-64, 1973.
- 20) Stoker M. and MacPherson I.: Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus in vitro. Virology **14**: 359-370, 1961.
- 21) MacPherson I. and Stoker M.: Polyoma transformation of hamster cell clones—
an investigation of genetic factors affecting cell competence. Virology **16**: 147-151, 1962.
- 22) 遠藤浩良, 山田正篤, 奥村秀夫: 組織培養—基礎と応用—第4版, 中井準之助, 岡本道雄, 山田正篤, 井上幸重, 小川和郎, 堀川正克編集, 朝倉書店, 東京, 昭和43年, p 27.
- 23) Katsuta H., Takaoka T., Oishi Y., Baba T., and Chang K. C.: Cultivation of fibroblast from chick embryo heart in the simplified replicate tissue culture. Japan. J. Exp. Med. **24**: 125-139, 1954.
- 24) Eagle H.: Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science **130**: 432-437, 1959.
- 25) Singer L. and Armstrong W. D.: Determination of fluoride, procedure based upon diffusion of hydrogen fluoride. Analyt. Biochem. **10**: 495-500, 1965.
- 26) Singer L. and Armstrong W. D.: Modified diffusion method for analysis of fluoride. J. Dent. Res. **41**: 910, 1962.
- 27) Wharton H. W.: Isolation and determination of microgram amounts of fluoride in materials containing calcium and orthophosphate. Anal. Chem. **34**: 1296-1298, 1962.
- 28) Öbrink K. J.: A modified Conway unit for microdiffusion analysis. Biochem. J. **59**: 134-136, 1955.
- 29) Wharton H. W.: Recoveries of fluoride by microdiffusion: Effect of heat and diffusion time. Anal. Chem. **35**: 406-407, 1963.
- 30) Bellack E. and Schouboe P. J.: Rapid photometric determination of fluoride in water, use of Sodium 2-(p-Sulfophenylazo)-1,8-dihydroxynaphthalene-3, 6-disulfonate-Zirconium lake. Anal. Chem. **30**: 2032-2034, 1958.
- 31) 日本薬学会編: 衛生試験法 注解, 改訂 第2版, 第2回増刷, 金原出版, 東京, 昭和42年, p. 927.
- 32) Evans V. J., Earle W. R., Sanford K. K.,

- Schannon J. E. and Waltz H. K. : The preparation and handling of replicate tissue cultures for quantitative studies. *J. Nat. Cancer Inst.* **11**: 907-927, 1951.
- 33) Katsuta H., Takaoka T. and Oishi Y. : Further studies on the cultivation of fibroblasts in the simplified replicate tissue culture. *Japan. J. Exp. Med.* **27**: 19-29, 1957.
- 34) Earle W. R., Sanford K. K., Evans V. J., Waltz H. K. and Shannon, Jr. J. E. : The influence of inoculum size on proliferation in tissue cultures. *J. Nat. Cancer Inst.* **12**: 133-153, 1951.
- 35) Sanford K. K., Earle W. R., Evans V. J., Waltz H. K. and Shannon J. E. : The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. *J. Nat. Cancer Inst.* **11**: 773-795, 1950.
- 36) Katsuta H., Takaoka T. and Saito S. : Cultivation of liver cells from chick embryos in the simplified replicate tissue culture. *Japan. J. Exp. Med.* **27**: 367-380, 1957.
- 37) Katsuta H., Endo H., Takaoka T. and Oishi Y. : Studies on the growth-promoting substance for fibroblasts in the simplified replicate tissue culture. *Japan. J. Exp. Med.* **27**: 343-365, 1957.
- 38) Ashihara T., Kitamura T., Takeoka O., Fujita S., Kodama M., Shinoda M. and Hashimoto I. : Autoradiographic studies on cell proliferation and differentiation in the human epidermis in vivo. *Arch. histol. Jap.* **28**: 399-410, 1967.
- 39) 加来 博: 胃粘膜上皮の動態とその解析— ^3H -thymidine オートラジオグラフィによる研究, *日組録*, **27**: 223-246, 1966.
- 40) 加来 博, 五十嵐靖雄, 藤田哲也: ^3H -thymidine オートラジオグラフィによる人の表皮, 汗腺, 皮脂腺の細胞増殖と分化の分析, *日組録*, **24**: 457-470, 1964.
- 41) 加来 博, 小島 晃, 林 孝次, 堀井正清, 中村清文, 藤田哲也: 腸管上皮の動態とその解析, *日組録*, **23**: 7-19, 1962.
- 42) Lipkin M. : Newer measurement of cell proliferation in the colon. *Gastroenterology* **51**: 851-854, 1966.
- 43) 山田和夫: 老白鼠肝臓の再生機転に関する実験病理学的研究. *老年病*, **4**: 94-108, 1960.
- 44) Cavanaugh M. W. : Neuron development from trypsin-dissociated cells of differentiated spinal cord of the chick embryo. *Exptl. Cell Res.* **9**: 42-48, 1955.
- 45) Murray M. R. and Stout A. P. : Adult human sympathetic ganglion cells cultivated in vitro. *Am. J. Anat.* **80**: 225-250, 1947.
- 46) Nakai J. : Dissociated dorsal root ganglia in tissue culture. *Am. J. Anat.* **99**: 81-130, 1956.
- 47) Lumsden C. E. : Nervous tissue in culture, in "The structure and function of nervous tissue." vol. 1 (ed. ; Bourne G. H.) Academic press N. Y and Lond. 1968, p. 78.
- 48) Hansson H. A. and Sourander P. : Studies on cultures of mammalian retina. *Zeitschrift für Zellforschung* **62**: 26-47, 1964.
- 49) Hogue M. J. : Brain cells from human fetus and infants, cultured in vitro after death of the individuals. *Anat. Rec.* **108**: 457-475, 1950.
- 50) Hogue M. J. : A study of adult human brain cells grown in tissue cultures. *Am. J. Anat.* **93**: 397-427, 1953.
- 51) Kim S. : Neurons in the tissue culture. *Arch. histol. jap.* **23**: 401-429, 1963.
- 52) Martinović P. N. : Migration and survival in vitro of the nerve cells cultivated in the cerebro-spinal fluid of the embryo and young animal. *Arch. exper. Zellforsch.* **10**: 145-156, 1931.
- 53) Okamoto M. : Observations on neurons and neuroglia from the area of the reticular formation in tissue culture. *Zeitschrift für Zellforschung* **47**: 269-287, 1958.
- 54) Pomerat C. M. and Costero I. : Tissue

- cultures of cat cerebellum. *Am. J. Anat.* **99**: 211-246, 1956.
- 55) Glinos A. D. and Bartlett E. G. : The effect of regeneration on the growth potentialities in vitro of rat liver at different ages. *Cancer Res.* **11**: 164-168, 1951.
- 56) 山田正篤: ヒトの正常細胞を培養する, 科学, **34**: 295-300, 1964.
- 57) Hayflick L. and Moorhead P. S. : The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exptl. Cell Res.* **25**: 585-621, 1961.
- 58) Moscona A. : Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos. *Exptl. Cell Res.* **3**: 535-539, 1952.
- 59) Moscona A. and Moscona H. : The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *J. Anat.* **86**: 287-301, 1952.
- 60) Moscona A. : Developement of heterotypic combinations of dissociated embryonic chick cells. *P. S. E. B. M.* **92**: 410-417, 1956.
- 61) Moscona A. : The developement in vitro of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **43**: 184-194, 1957.
- 62) Moscona A. : Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. *Exptl. Cell Res.* **22**: 455-475, 1961.
- 63) Weiss P. and Taylor A. C. : Reconstitution of complete organs from single-cell suspensions of chick embryos in advanced stages of differentiation. *proc. Natl. Acad. Sci.* **46**: 1177-1185, 1960.
- 64) Moscona A. A. : Analysis of cell combinations in experimental synthesis of tissues in vitro. *J. Cell. Compt. Physiol.* **60**, suppl., **1**: 65-80, 1962.
- 65) Moscona A. A. : How cell associate. *Sci. Amer.* **205**: 142-162, 1961, September.
- 66) Kuroda Y. : Changes in aggregation and differentiation of cartilage cells grown in monolayer cultures. *Exptl. Cell Res.* **30**: 446-448, 1963.
- 67) Chang R. S. : A comparative study of the growth, nutrition, and metabolism of the primary and the transformed human cells in vitro. *J. Exp. Med.* **113**: 405-417, 1961.
- 68) 山田正篤: 哺乳動物の細胞培養・科学, **29**: 641-644, 1959.
- 69) Gey G. O., Coffman W. E. and Kubicek M. T. : Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**: 264-265, 1952.
- 70) Earle W. R. : Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the lining cells. *J. Nat. Cancer Inst.* **4**: 165-212, 1943.
- 71) Syverton J. T. and McLaren L. C. : Human cells in continuous culture. I. Derivation of cell strains from esophagus, palate, liver, and lung. *Cancer Res.* **17**: 923-929, 1957.
- 72) Puck T. T., Marcus P. I. and Cieciura S. J. : Clonal growth of mammalian cells in vitro. Growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a "Feeder" Layer. *J. Exp. Med.* **103**: 273-289, 1956.
- 73) Willmer E. N. and Jacoby F. : Studies on the growth of tissues in vitro. IV. On the manner in which growth is stimulated by extracts of embryo tissues. *J. Exptl. Biol.* **13**: 237-248, 1936.
- 74) Jacoby F. : The rate of cell-division of hen monocytes in vitro. *J. Physiol.* **90**: 23P-25P, 1937.
- 75) Watanabe Y. : Some factors necessary to produce division conditions in tetrahymena pyriformis. *Jap. J. M. Sc. and Biol.* **16**: 107-124, 1963.
- 76) McIvor K. L. and Weiser R. S. : Mechanism of target cell destruction by alloimmune peritoneal macrophages. I. The effect of treatment with sodium fluoride.

- Immunology **20**: 307-313, 1971.
- 77) 杉野幸夫: DNA 代謝の調節, 蛋白質, 核酸, 酵素, **10**: 655-667, 1965.
- 78) 塚田欣司: 動物細胞における DNA 複製—特に DNA 複製に関与する諸酵素について—蛋白質, 核酸, 酵素, **18**: 692-701, 1973.
- 79) 藤井節郎, 秋吉博登, 塩坂孝彦: DNA 合成系酵素, 代謝, **11**: 1060-1087, 1974.
- 80) 田部一史, 高橋泰常: 動物細胞の DNA ポリメラーゼ—その分子種について—蛋白質, 核酸, 酵素, **20**: 666-682, 1975.
- 81) Hellung-Larsen P. and Klenow H.: On the mechanism of inhibition by fluoride ions of the DNA polymerase reaction. *Biochim. Biophys. Acta* **190**: 434-441, 1969.
- 82) Greenaway P. J.: A possible error during assays for the enzymatic phosphorylation of proteins and nucleic acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**: 639-644, 1972.
- 83) Poole B. and Wibo M.: Protein degradation in cultured cells. The effect of fresh medium, fluoride, and iodoacetate on the digestion of cellular protein of rat fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **248**: 6221-6226, 1973.
- 84) Albright J. A.: Effect of fluoride on mammalian cells: Partial reversal by pyruvate. *J. Oral Therapeutics and Pharmacology.* **2**: 436-439, 1966.
- 85) Shearer T. R. and Suttie J. W.: Effect of fluoride on glycolytic and citric acid cycle metabolites in rat liver. *J. Nutrition* **100**: 749-756, 1970.
- 86) Feig S. A., Shohet, S. B. and Nathan, D. G.: Energy metabolism in human erythrocytes. I. Effects of sodium fluoride. *J. Clin. Invest.* **50**: 1731-1737, 1971.
- 87) Millman M. S. and Omachi, A.: The role of oxidized nicotinamide adenine dinucleotide in fluoride inhibition of active sodium transport in human erythrocytes. *J. Gen. Physiol.* **60**: 337-350, 1972.
- 88) Olsen I. and Sögnen E.: A comparative study on the effect of fluoride, laurylsulphate and chlorhexidine on glucose utilization in rat intestinal mucosal cells. *Acta pharmacol. et toxicol.* **33**: 348-352, 1973.
- 89) Thorn W., Kaufmann P. und Müldener B.: Kohlenhydratumsatz, Energiedefizit und Plasmapolypenbildung in der Placenta nach Vergiftung mit Monojodacetat und NaF. *Arch. Gynäk.* **216**: 175-183, 1974.
- 90) Erman J. E.: Kinetic studies of fluoride binding by cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* **13**: 34-39, 1974.
- 91) Crum L. R., Harbecke R. G., Lech J. J. and Calvert D. N.: Substrate specificity and inhibition characteristics of a fluoride-sensitive tributyrinase. *Biochim. Biophys. Acta* **198**: 229-235, 1970.
- 92) Dirksen T. R.: In-vitro effect of fluoride on lipid synthesis by rat calvaria. *Archs Oral Biol.* **17**: 55-59, 1972.
- 93) Szabo A. J., Grimaldi R. D. and de Lellis R.: Triglyceride synthesis by the human placenta. II. The effect of cyanide and fluoride on the incorporation of labeled palmitate into placental triglycerides. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **115**: 263-266, 1973.
- 94) Goris J., Pijnenborg-Vercruysse L. and Merlevede W.: Effect of fluoride on liver phosphorylase phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* **268**: 158-165, 1972.
- 95) Vesco C. and Colombo B.: Effect of sodium fluoride on protein synthesis in HeLa cells: Inhibition of ribosome dissociation. *J. Mol. Biol.* **47**: 335-352, 1970.
- 96) Bleiberg I., Zauderer M. and Baglioni C.: Reversible disaggregation by NaF of membrane-bound polyribosomes of mouse myeloma cells in tissue culture. *Biochim. Biophys. Acta* **269**: 453-464, 1972.
- 97) Terada M., Metafora S., Banks J., Dow L. W., Bank A. and Marks P. A.: Conservation of globin messenger RNA in rabbit reticulocyte monoribosomes after

- sodium fluoride treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**: 766-774, 1972.
- 98) Geraghty M., Galler M., Schiffman F. and Freedman M. : Monoribosomal attachment to messenger ribonucleic acid in sodium fluoride-treated rabbit reticulocytes. *Biochem. J.* **133**: 409-411, 1973.
- 99) Batenburg J. J. and Van Den Bergh S. G. : The mechanism of inhibition by fluoride of mitochondrial fatty acid oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **280**: 495-505, 1972.
- 100) Cheon Y. S. and DiStefano V. : Effect of catecholamine concentrations in tissues from developing rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **24**: 468-473, 1973.
- 101) Yamada K. and Tsuji M. : Transport of vitamin B₆ in human erythrocytes. II. Effects of incubation temperature, glycolytic inhibitor and vitamin B₆ analogues on transport of vitamin B₆ in human erythrocytes. *J. Vitaminol.* **16**: 237-242, 1970.
- 102) Scott J. M., Bloomfield F. J., Stebbins, R. and Herbert, V. : Studies on derivation of transcobalamin III from granulocytes. Enhancement by lithium and elimination by fluoride of in vitro increment in vitamin B₁₂-binding capacity. *J. Clin. Invest.* **53**: 228-239, 1974.
- 103) Greenspan C. M. and Wilson I. B. : The effect of fluoride on the reaction of acetylcholinesterase with carbamates. *Mol. Pharmacol.* **6**: 266-272, 1970.
- 104) Brestkin A. P., Ivanova L. A. and Khripunova T. E. : Action of sodium fluoride on the activity of erythrocyte acetylcholinesterase. *Biokhimiia* **36**: 747-751.
- 105) Knappwost A. und Westendorf J. : Zur Hemmung der Acetylcholinesterase durch Fluorid. *Naturwissenschaften* **61**: 274-275, 1974.
- 106) Farias R. N., Goldemberg A. L. and Trucco R. E. : The effect of fat deprivation on the allosteric inhibition by fluoride of the (Mg²⁺)-ATP ase and (Na⁺+K⁺)-ATPase from rat erythrocytes. *Arch. Biochim. Biophys.* **139**: 38-44, 1970.
- 107) Dunnick J. K., Marinetti G. V. and Grendland P. : Effect of detergent and sodium fluoride on the enzyme activities of the rat liver plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **266**: 684-694, 1972.
- 108) Goldemberg A. L., Farias R. N. and Trucco R. E. : Allosteric transitions and membrane-bound ATP-ase from rat tissues: The effect of fat deprivation on the allosteric inhibition by fluoride. *Biochim. Biophys. Acta* **291**: 489-493, 1973.
- 109) Sellei C. und Jany J. : Die Beeinflussung des Stoffwechsels der Tumoren mittels Fluornatrium. *Biochem. Z.* **239**: 94-99, 1931.
- 110) Hintzsche E. : Die Wirkung von Natriumfluorid auf Kulturen embryonaler Hühnerherzen. *Z. mikr. -anat. Forsch.* **60**: 137-144, 1954.
- 111) Hepp K. D., Edel R. and Wieland O. : Hormone action on liver adenyl cyclase activity. The effects of glucagon and fluoride on a particulate preparation from rat and mouse liver. *Eur. J. Biochem.* **17**: 171-177, 1970.
- 112) Birnbaumer L., Pohl S. L. and Rodbell M. : The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. *J. Biol. Chem.* **246**: 1857-1860, 1971.
- 113) Drummond G. I., Severson D. L. and Duncan L. : Adenyl cyclase. Kinetic properties and nature of fluoride and hormone stimulation. *J. Biol. Chem.* **246**: 4166-4173, 1971.
- 114) Harwood J. P. and Rodbell M. : Inhibition by fluoride ion of hormonal activation of fat cell adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **248**: 4901-4904, 1973.
- 115) Oka H., Kaneko T., Yamashita K., Suzuki S. and Oda T. : The glucagon and fluoride sensitive adenyl cyclase in plasma

- membrane of rat liver. *Endocrinol. Japon.* **20**: 263-270, 1973.
- 116) Layne P., Constantopoulos A., Judge J. F. X., Rauner R. and Najjar V. A. : The occurrence of fluoride stimulated membrane phosphoprotein phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **53**: 800-805, 1973.
- 117) Najjar V. A. and Constantopoulos A. : The activation of adenylate cyclase. A postulated mechanism for fluoride and hormone activation of adenylate cyclase. *Mol. Cell. Biochem.* **2**: 87-93, 1973,