

## ダイズ培養細胞の生育におよぼすRNA塩基類の影響

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	大平, 幸次 小島, 邦彦 石上, 清
巻/号	45巻10号
掲載ページ	p. 469-474
発行年月	1974年10月

# ダイズ培養細胞の生育におよぼす RNA 塩基類の影響\*

大平 幸次\*\*・小島 邦彦\*\*・石上 清\*\*

## 1. 緒 言

核酸あるいはその構成成分であるヌクレオチド、ヌクレオシドさらには塩基類を外部から植物体に与えた場合植物体の生長、分化などにかなる影響をおよぼすかについては広範な研究がなされ、多数の報告がなされている<sup>1-4)</sup>。しかしこれらの実験の多くは有菌環境下でなされたものであるため微生物による影響が考えられ、さらに実験が長期におよぶ場合が多く、そのため環境の変動による影響などが加わり核酸関連物質供給による直接的な影響についての解析がむずかしい場合が少なくない。

植物カルスを用いた細胞培養法はこれらの点に関して有効な手法であり、そのため培養細胞を用いてその生育・分化等におよぼす核酸関連物質の影響について調べた研究が近年いくつか報告されている<sup>5-7)</sup>。しかし生育におよぼす核酸関連物質の影響については、抑制・促進などさまざまな結果が得られており、用いる細胞の植物種によりまた由来する組織により一定の傾向が得られていない。さらにまた、同一植物組織から由来した培養細胞においても継代培養の経過とともに核酸塩基類に対する生長の反応に異った傾向を生じる場合も報告されている<sup>8)</sup>。

これらの点に関しては、今後、個々の核酸関連物質について吸収・代謝の面からより詳細に研究を進めることにより解明されるものと考えられる。

著者らは、以上のような目的で、その予備実験として大豆胚軸由来カルスを用いた液体培養細胞の生長におよぼす核酸塩基類の影響について調べたのでその結果を報告する。

## 2. 実験材料および方法

### 1) 細胞の液体培養法

ダイズ(品種:シンメジロ)種子を70%アルコールに1分間、ついで10%サラン粉溶液に10分間浸漬して滅菌し滅菌水で3回洗浄した。この滅菌種子を滅菌シャーレ内のろ紙上で無菌的に発芽させ、3日~4日目に芽生えの胚軸部分を滅菌メスで5mm間隔に切り取り、第1表の組成の培養液に0.7%寒天を含む固体培地に移植した。暗所、28°Cに置くこと約2週間で胚軸の切口

\* 本報告の概要は第2回組織培養シンポジウム(昭和45年度)で報告した。

\*\* 東北大学農学部(仙台市堤通兩宮町1-1)  
昭和48年12月7日受理

日本土壤肥科学雑誌 第45巻 第10号 p.469~474(1974)

第1表 基本培地組成

化 合 物	濃 度	化 合 物	濃 度
	mM		mg/liter
KNO <sub>3</sub>	20.0	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·SO <sub>4</sub>	2.0	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.0	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.0	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
Fe·EDTA	0.1	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
	mg/liter	Sucrose	2.0%
Thiamine-HCl	10.0	pH	6.0
Pyridoxine-HCl	1.0		
Nicotinic acid	1.0		
2,4-D	2.0		

部分からカルスが発生する。このカルスを約10日ごとに植え継いでいくと生育速度の安定したやわらかな淡黄白色のカルスを生じる。このようにして得られたカルスを第1表に示す液体培地中に移して後述の方法で約8ヶ月間継代培養を続けたものを前培養物とした。

培養は、培養液50mlを入れた200ml三角フラスコを用い、これに高濃度の細胞を含む前培養物5ml(乾物にして約30~50mgの細胞を含む)をピペットで接種する。この際、前培養に用いた接種細胞けんたく液は新しい培養液により傾斜法で3回洗浄した後に接種した。これを27±1°C、2000ルクスの白色蛍光灯下に、水平回転振盪培養器により毎分120回転の速度で振盪、培養をおこなった。

核酸塩基類含有培地は、塩基類をあらかじめ少量の稀アルカリに溶解し、直ちに上記の基本培養液に添加、pHを調整後、オートクレーブで滅菌し作製した。

### 2) 生育量の測定ならびに分析方法

収穫時期は、通常培養6日目~7日目のいわゆる対数増殖期(Exponential phase)後期とした。なお場合によっては、接種細胞の量および前培養の状態などのちがいにより生育速度が若干遅れたため収穫は培養9日目以降となった。培養終了後、ミラクロス上に培養物をろ別し、脱塩水で3回洗浄したのち細胞を集めて新鮮重を測定、ついで60°C、24時間乾燥後に再び秤量し乾物重とした。

培養は1区3連とし、各実験ごとに最小標準偏差(LSD)を算出し、これにより有意差判定の基準とした。

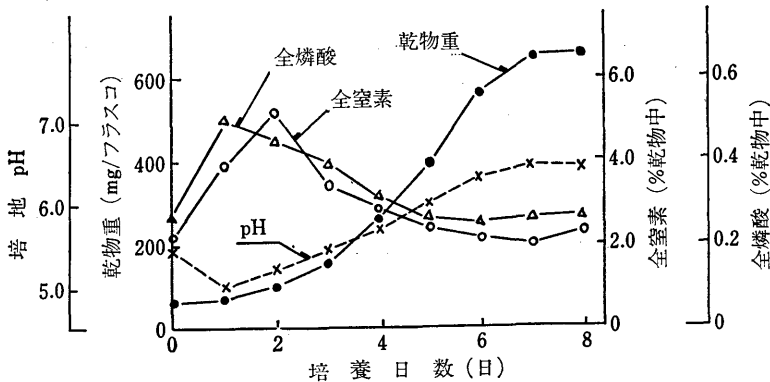
細胞数および細胞容積(Packed cell volume)の測定

は HENSHAW *et al*<sup>9)</sup> の方法に準じた。まず培養物をろ別し、細胞を 2.5% 三酸化クロム溶液 50 ml 中に入れ、水平回転振盪培養器で 8 時間振盪した。ついで 5 分間往復振盪器で激しく振盪し、これを適当に希釈したのちその一定量を細胞計数用スライドグラス上に乗せて顕微鏡下で細胞数を計数した。1 サンプルの計数には 1 枚のスライドグラスで 10 箇所ずつ 4 枚のスライドグラスを用いた。また全細胞容積は、目盛付尖底遠心管に細胞けんなく液 10 ml を入れ 2000 g で 10 分間遠心分離したのち細胞の容積を測定し、ml/フラスコで表した。

3. 実験結果および論議

1) ダイズ培養細胞の生育パターン

ダイズの液体培養による培養細胞は直径 50 μ 前後の球形のものが、単独のものから数十個集団をなして培養液中に比較的均一に分散しており、そのため移植の際のピペティング操作が容易で、また移植量の誤差も極めて小さい。またダイズ細胞はイネおよびスイートクローバー細胞に比して分裂増殖が著しく速かであるのも特徴である (第 3 図)。



第 1 図 ダイズ細胞の培養経過に伴う乾物重および全窒素と全リン酸含有率の変化  
接種量: 70 mg 乾物重/フラスコ

ダイズ培養細胞の生育経過は第 1 図に示すように移植後 3 日目ぐらいまでのいわゆる誘導期 (lag phase) を経たのち急激にその生育速度を増し、培養後 8 日目~10 日目ぐらいで定常期 (stationary phase) に達して増殖は止まる。ダイズ細胞の場合、定常期には新鮮重で約 15 g/フラスコ、乾物重では約 600 mg/フラスコとなり乾物 % は正常細胞の場合約 4.5% である。ただし場合によっては定常期に達するまでに 15 日以上を要することもあり (第 5 図)、培養物の前歴、接種量の多少および細胞の性質の変化などによってこの培養期間は変動するものと思われる。

生育の 1 サイクル期間中の細胞内の全窒素および全磷

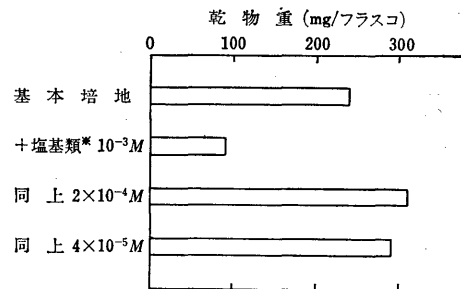
含有率は第 1 図のように生育の初期において最も高く、以後生育の経過とともに減少する。この傾向は RNA 含有率および全たんぱく質含有率においても同様であった。STREET<sup>10)</sup> *et al* のシカモアカエデ (*Acer Pseudo platanus*) の液体培養細胞を用いた実験においても、培養初期には窒素およびリン酸含有率が培養中・後期に比べて高いことが認められており、培養初期にはさらに中・後期に比べて細胞の分裂指数の高いことも示されている。

2) 4 種の RNA 塩基を同時に添加した場合の影響

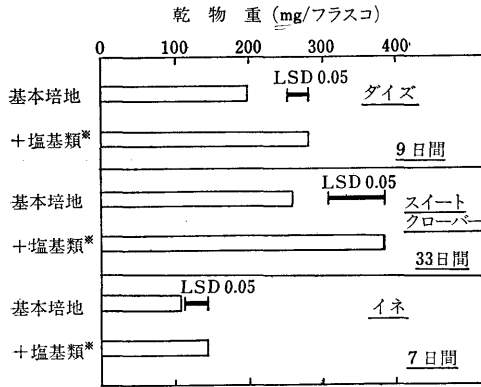
まずダイズの培養細胞の生育におよぼす RNA 塩基類 (アデニン, グアニン, シトシンおよびウラシルの等モル混合液) の各濃度における影響について調べた。その結果、第 2 図に示されるように、 $10^{-3} M$  の塩基類は生育阻害をもたらすが、 $2 \times 10^{-4} M$  および  $4 \times 10^{-5} M$  においては基本培地に比べて良好な生育を示すことが認められた。特に  $2 \times 10^{-4} M$  においては基本培地に比べて約 30% の生育量の増加が認められた。この塩基類添加による生育量の増加は当研究室においてイネ細胞の培養用

として上記基本培地を改良した R-2 培地<sup>11)</sup> を用いた液体培養においても明らかに認められた。R-2 培地は本実験における基本培地に対して  $NO_3-N, P$  および  $K$  が 2 倍、 $NH_3-N$  が 2.5 倍となっており、ダイズ培養細胞はイネ培養細胞と同様 R-2 培地において良好な生育を示す。

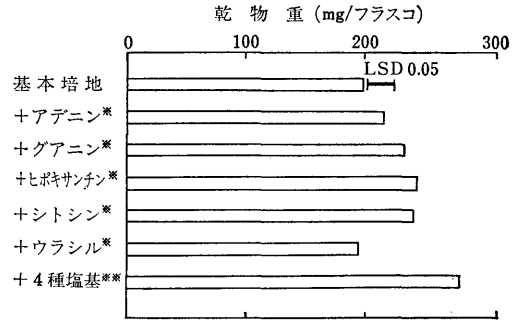
また、塩基類添加による生育量の増加はダイズ培養細胞のみならずスイートクローバーおよびイネの培養細胞においても同様に認められた (第 3 図)。



第 2 図 ダイズ細胞の生育に対する核酸塩基類の影響  
\* +塩基類区は基本培地にアデニン, グアニン, シトシンおよびウラシルをおのおの示した濃度含む。接種量: 39 mg 乾物重/フラスコ, 培養期間: 6 日間



第3図 各種培養細胞の生育に対する核酸塩基類の影響  
\* +塩基類区は基本培地中にアデニン、シトシンおよびウラシルをおのおの  $2 \times 10^{-4} M$  含む。  
接種量：ダイズ 30 mg 乾物重/フラスコ、スイートクローバー 32 mg 乾物重/フラスコ、イネ 40 mg 乾物重/フラスコ



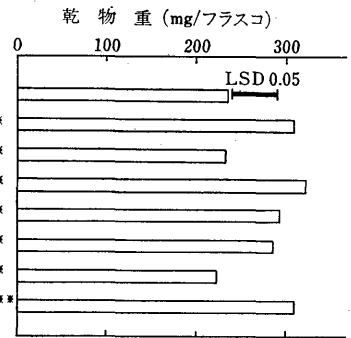
第4図 ダイズ細胞の生育に対する核酸塩基類の影響  
\* 濃度は  $2 \times 10^{-4} M$   
\*\* 基本培地中にアデニン、グアニン、シトシンおよびウラシルをおのおの  $2 \times 10^{-4} M$  含む。  
接種量：30 mg 乾物重/フラスコ、培養期間：9日間

以上のことから、RNA 塩基類は  $2 \times 10^{-4} M$  濃度において培養細胞の生育を促進し、この生育促進効果は比較的広範囲の植物種培養細胞においてみられるものと考えられる。これまで細胞液体培養による実験例は報告されていないが、カルス培養においては、例えばジャガイモ茎頂由来カルス組織<sup>9)</sup> およびタバコ茎由来カルス組織<sup>12)</sup>などで核酸塩基類が生育を促進することが報告されており、その最適濃度は約  $2 \times 10^{-4} M$  程度であり著者らのダイズ培養細胞における濃度にほぼ一致している。

3. 個々の塩基が細胞の生育におよぼす影響

前述のように、RNA 構成4種塩基を  $2 \times 10^{-4} M$  ずつ同時に添加した場合には、ダイズ培養細胞の生育量が基本培地での生育量に比べて約 30% 増加することが判明した。そこで次に、上記塩基のうちいずれが生育促進効果を有するのかを調べるために、各塩基を単独に添加した場合または2種類の塩基を組合せて添加した場合の生育量の変化を調べた。

第4図から明らかなように各塩基はウラシルを除いていずれも効果的であり、 $2 \times 10^{-4} M$  濃度では生育量は基本培地での生育量に比べて約 10%~23% 増加した。一方、第5図において示されるように2種類の塩基の組合せ添加においては、プリン塩基のアデニン+グアニン区およびプリン塩基とピリミジン塩基による組合せの3区においていずれも生育量の増加がみられたが、第4図の場合と同じようにウラシルを添加したグアニン+ウラシル区およびシトシン+ウラシル区においてはその生育量は基本培地での生育量とほぼ同程度であり、グアニンおよびシトシン単独ではみられた生育促進効果がウラシルによって打ち消されるような結果であった。

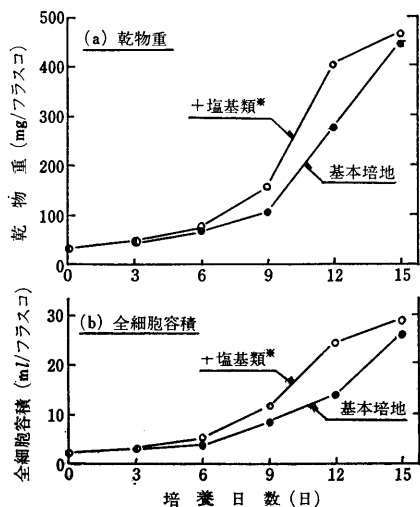


第5図 ダイズ細胞の生育に対する各核酸塩基のくみあわせによる影響  
\* 各塩基をおのおの  $2 \times 10^{-4} M$  含む。  
\*\* 基本培地中にアデニン、グアニン、シトシンおよびウラシルをおのおの  $2 \times 10^{-4} M$  含む。  
接種量：39 mg 乾物重/フラスコ、培養期間：6日間

各塩基は添加後速やかに細胞内に吸収され細胞の分裂・増殖に好結果をもたらすものと思われる。またウラシルが培養細胞の生育に対して促進効果を示さなかったことは今後の興味ある問題で、他の塩基類とは細胞内代謝の面で相違があるものと思われる。事実、動物（特に肝臓）<sup>14)</sup> や細菌細胞<sup>13)</sup> においてはウラシルを分解する一連の酵素系の存在が明らかにされており、植物細胞においてもウラシル分解酵素系の存在が推測される。

4) 乾物重、全細胞容積および細胞数の経時的変化

2), 3) において培養細胞の生育量が塩基類を添加することにより増加することを述べた。塩基類添加によってひきおこされる培養細胞の生育量の増加が、培養全期間を通してみた場合にどの時期からみられるのか、また生育量の増加が細胞数の増加によるのかあるいは細胞1



第6図 ダイズ細胞の生育経過に対する核酸塩基類の影響

\* +塩基類区は、基本培地に アデニン、グアニン、シトシンおよびウラシルをおのおの  $2 \times 10^{-4} M$  添加。  
接種量：30 mg 乾物重/フラスコ

個当たりの大きさが変化することによってひきおこされるのかを知ることは細胞内における塩基類の代謝とあわせて重要な問題である。そこで生育量の増加についてより詳細に検討するために以下の実験をおこなった。

第6図 (a), (b) には基本培地区および RNA 構成4種塩基をおのおの  $2 \times 10^{-4} M$  ずつ同時に添加した区における乾物重 (a) および全細胞容積 (b) の経時変化を調べた結果を示す。この実験の場合、図から明らかのようにその生育速度は第1図に示した場合と比べて遅く、基本培地区における生育は培養15日目に至っても定常期に達していない。両図における生育速度のちがいは、細胞接種量が第1図の場合は70 mg 乾物重/フラスコであるのに対して第6図の場合においては30 mg 乾物重/フラスコであることが最も大きく影響しているものと思われる。

塩基類を添加した場合、基本培地区に比べて培養中期の9日目において乾物重および全細胞容積の明確な増加がみられ、この差は12日目において最も大であった。しかしさらに培養を続けたところ、培養終了時である15日目においては乾物重および全細胞容積のいずれにおいても両区における明確な差は観察されず、生育の最終段階における生育量は両区においてほぼ等しいことが判明した。

また、培養12日目において両区における細胞数を計数したところ基本培地区に比べて塩基類添加区において

第2表 ダイズ細胞の生育(乾物重および細胞数)に対する核酸塩基類の影響

処 理	乾 物 重 mg/フラスコ (%)	細 胞 数 個/フラスコ (%)
基 本 培 地	274 (100)	$4.3 \times 10^7$ (100)
+塩 基 類*	406 (148)	$6.5 \times 10^7$ (151)

\* +塩基類区は基本培地にアデニン、グアニン、シトシンおよびウラシルをおのおの  $2 \times 10^{-4} M$  含む。

接種量：30 mg 乾物重/フラスコ、培養期間：12 日間

乾物重にほぼ比例してその増大が認められた(第2表)。したがって塩基類添加による乾物重の増加は細胞の大きさにおける増大ではなく細胞の数の増加によるものと思われる。

以上、両処理区において培養中期では明確であった生育量の差が培養後期においてはみられなくなることおよび細胞数の計数結果などから、塩基類添加による生育量の増大はそれによって細胞分裂が促進され、その結果生育時期が早められることによってひきおこされるものであることが推察された。

なお両処理区における細胞中の全窒素および全リン含有率の経時的変動を同時に調べた結果、そのいずれにおいても明確な差異をみることはできなかった。

#### 5) 8-アザグアニンによる生育阻害とプリン塩基添加によるその回復

これまで核酸塩基類添加により基本培地区に比べて生育量が増加すること、さらには塩基類添加による生育量の増加は塩基類添加により細胞分裂が促進されるために生育時期が早められ、その結果ひきおこされるものと推察した。

8-アザグアニンはグアニンのアナログであり、核酸中に取込まれて代謝異常をひきおこし細胞の増殖を阻害することが知られている。ここではまず8-アザグアニンによるダイズ培養細胞の生育阻害を調べ、ついで各プリン塩基による阻害の回復について検討を加え、上述の生育促進効果に対する塩基の役割について考察した。

まず培養開始と同時に添加した各濃度の8-アザグアニンによるダイズ細胞の生育阻害について調べた結果を第3表の(A)に示す。 $5 \times 10^{-6} M$  濃度の8-アザグアニンはまったく生育に阻害を与えないが、 $10^{-5} M$  で約11%、 $5 \times 10^{-5} M$  では約76%の生育阻害を示した。第3表(B)に、培養開始とともに  $5 \times 10^{-5} M$  の8-アザグアニンを添加し、同時に各プリン塩基を添加した場合の生育阻害の回復について調べた結果を示す。

8-アザグアニン ( $5 \times 10^{-5} M$ ) による生育阻害は、同時に添加したグアニンによって軽減され、その回復率はグアニン濃度の増加とともに増加し、 $10^{-3} M$  のグアニ

第3表 8-アザグアニンによるダイズ細胞の生育阻害および阻害に対するプリン塩基添加の影響

処 理	相対生育量
(A) 阻害実験	(%)
(1) 基本培地	100*
(2) (1)+8-アザグアニン $10^{-6} M$	112
(3) 〃 $5 \times 10^{-6} M$	94
(4) 〃 $10^{-5} M$	89
(5) 〃 $5 \times 10^{-5} M$	24
(B) 回復実験	
(6) (5)+グアニン $5 \times 10^{-5} M$	64
(7) 〃 $2 \times 10^{-4} M$	82
(8) 〃 $10^{-3} M$	95
(9) (5)+アデニン $2 \times 10^{-4} M$	65
(10) (5)+ヒポキサンチン $2 \times 10^{-4} M$	71

\* 基本培地での生育量は (A): 247 mg 乾物重/フラスコ  
(B): 223 mg 乾物重/フラスコ  
培養期間 (A): 9日間, (B): 10日間

ン添加ではその相対生育量はほぼ 95% に達した。また 8-アザグアニンによる生育阻害は  $2 \times 10^{-4} M$  のアデニンまたはヒポキサンチンの添加によってもその軽減度はグアニン添加区よりやや劣ったが、かなりの阻害軽減がみられた。

以上の結果から、グアニンは培養細胞内において核酸合成基質として積極的に利用され、そのため 8-アザグアニンによる生育阻害が軽減されるものと考えられる。さらにまた、アデニンおよびヒポキサンチンは細胞中に吸収されてからその一部はグアニンの代謝系に転換・供給されたのち核酸合成に利用されるため 8-アザグアニンによる生育阻害を軽減するものと推察される。この点に関して、微生物細胞などにおいてはプリンヌクレオチド転換系が存在しこれが細胞内におけるプリンヌクレオチドレベルをコントロールしていることが知られており<sup>15)</sup>、植物細胞においても同様の系が存在するものと思われる。

一般的に、個々の塩基の添加による培養細胞の生育量の変化については、緒言においても述べたように、用いた植物の種類、部位や実験条件などによって促進・抑制などさまざまな結果が報告されており、これに関しては一定の傾向が得られていない。また、Syono のニンジンカルスを用いた実験においては、カルスの生育量に対して継代期間の長いカルスと短いカルスで核酸塩基に対する反応に差異のあることが知られている<sup>9)</sup>。著者らの実験においても、ダイズ同一品種(シンメジロ)の異なる個体の胚軸に由来した 2 つの系統の培養細胞は形態的にもかなり異なり、一方はやわらかく均一なサスペンションを示すが他方はかたく米粒大の細胞集団を示すことが培養

結果から得られている。これら 2 つの系統は核酸塩基類に対する反応にも若干の相違がみられ、前者の系統については第 4 図に示すようにウラシルを除く各塩基は生育促進効果を示したが、後者の系統ではグアニンとヒポキサンチンもウラシル同様明瞭な促進効果は認められなかった。

また著者らが実験に用いたダイズ細胞は、タバコ培養細胞<sup>16)</sup>においてもみられているように染色体数に異数性がみられた。一般的に自然環境とはかなり異った状態において生育する培養細胞は継代培養中にその性質の変化する場合があることが予想される。

以上のように、培養細胞については継代培養中に遺伝的変異をおこす場合が考えられ、形質が必ずしも安定でない面がある。

しかし、培養細胞は無菌的な実験系であること、さらには高等植物または切り取られた器官などに比べて物質吸収が容易であり、また細胞内における物質のプールの大さを比較的容易に変化させることが可能であることなどの利点をもっている。このため細胞レベルにおける核酸塩基類の吸収・利用およびその代謝を研究するための実験材料として極めて好適であり、現在著者らは培養細胞の以上のような利点を生かして核酸塩基類の細胞レベルにおける代謝機構の解明を進めている。

#### 4. 要 約

ダイズ胚軸由来カルスの細胞液体培養 (Cell suspension culture) 法を用い、その生育におよぼす核酸塩基類の影響について二三の実験を試み以下の結果を得た。

1) ダイズ (品種: シンメジロ) 胚軸から得られたカルス細胞は、液体培地中で培養したところ細胞のけんたく状態が良好であり、生育速度もイネ、スイートクローバーなどの培養細胞に比べて極めて速くであり、8日間の培養で新鮮重・乾物重ともに接種細胞重量の約 15~20 倍に増加した。

2) RNA 構成 4 種塩基を  $2 \times 10^{-4} M$  ずつ同時に添加することにより細胞の生育量は基本培地での生育量に比べて約 30% の増加を示した。塩基類添加による生育量の増加はダイズ細胞の他、スイートクローバーおよびイネの培養細胞についても同様に観察された。

3) ダイズ細胞の生育に対する個々の塩基の影響を調べたところ、ウラシル以外の塩基では基本培地での生育量に比べて約 10~23% の生育量の増加を示した。この傾向は 2 種類の塩基の組合せ実験においてもみられた。

4) 塩基類添加による生育量の増加は経時的な生育量の観察および細胞数の計数結果などから、塩基類添加により細胞分裂が促進されることによって生育時期が早め

られることに起因することが示唆された。

5)  $5 \times 10^{-5} M$  濃度の 8-アザグアニンはダイズ細胞の生育を約 75% 阻害した。また 8-アザグアニンによる生育阻害はグアニンの添加により軽減された。8-アザグアニンによる生育阻害はアデニンおよびヒポキサンチンの添加によっても軽減されたが軽減度はグアニンよりやや劣った。

#### 文 献

謝辞：本研究を行なうにあたり、終始御懇切な御指導をいただいた東北大学名誉教授藤原彰夫博士に感謝の意を表します。

- 1) FRIES, N.: *Physiol. Plantarum*, 13, 468 (1960)
- 2) 藤原彰夫・黒沢 諦：土肥誌, 32, 315 (1961)
- 3) MATHUR, S.M. and SHARMA, R.A.: *Rhysiol. Plantarum*, 21, 911 (1968)
- 4) 千葉和彦・藤原彰夫：植物養分が花成に及ぼす影響, p. 125, 養賢堂 (1964)
- 5) LINGAPPA, Y.: *Am. J. Botany*, 44, 419 (1957)
- 6) NITSCH, C. and NITSCH, J.P.: *Planta*, 72, 355 (1967)
- 7) NITSCH, C. and NITSCH, J.P.: *Planta*, 72, 371 (1967)
- 8) SYONO, K.: *Plant & Cell Physiol.*, 6, 393 (1965)
- 9) HENSHAW, G. G. *et al*: *J. Exptl. Botany*, 17, 362 (1966)
- 10) STREET, H.E., *et al*: *Biochemisty and Physiology of Plant Growth Substances*, p. 489, The Runge Press Ltd, Ottawa (1968)
- 11) OHIRA, K., OJIMA, K. and FUJIWARA, A.: *Plant & Cell Physiol.*, 14, 413 (1973)
- 12) MILLER, C. and SKOOG, F.: *Am. J. Botany*, 40, 768 (1953)
- 13) CAMPBELL, L.L. JR.: *J. Bacteriol.*, 73, 220 (1957)
- 14) FRITZSON, P.: *J. Biol. Chem.*, 226, 223 (1957)
- 15) 杉野幸夫：代謝調節, p. 245, 朝倉書店, (1968)
- 16) Foy, J.E.: *Physiol. Plantarum*, 16, 793 (1963)