抗腫瘍剤 Podophyllic acid-ethyl hydrazide の実験的臨床的研究

小 池 敏 雄
日本大学医学部第三外科教室（指導：石山俊次教授）

（昭和 44 年 8 月 11 日受付）

目 次

I） 緒 言
II） 実験材料ならびに実験方法
1. *in vitro* の実験
A） 吉田肉腫
a） 実験動物および実験腫瘍
b） 実験方法
B） EHRLICH 腹水腫瘍
a） 実験動物および実験腫瘍
b） 実験方法
2. *in vivo* の実験
A） 腹水型腫瘍
i） EHRLICH 実験動物
a） 実験動物および実験腫瘍
b） 実験方法
ii） Sarcoma-180 腹水型
a） 実験動物および実験腫瘍
b） 実験方法
B） 結節型腫瘍
i） EHRLICH 腹水腫瘍結節型
a） 実験動物および実験腫瘍
b） 実験方法
ii） Sarcoma-180 結節型
a） 実験動物および実験腫瘍
b） 実験方法
3. 腫瘍細胞の形態学的変化
A） 実験腫瘍
B） 実験方法
III） 実験成績
1. *in vitro* の成績
A） 吉田肉腫に対する抗腫瘍効果
B） EHRLICH 腹水腫瘍に対する抗腫瘍効果
C） 小 括
2. *in vivo* の成績
A） 腹水型腫瘍
i） EHRLICH 腹水腫瘍
ii） Sarcoma-180
B） 結節型腫瘍
i） EHRLICH 腹水腫瘍結節型
ii） Saroma-180 結節型
C） 小 括
3. 腫瘍細胞の形態学的変化
IV） 臨床実験
I） 症 例
II） 使用法および使用量
III） 臨床効果
i） 他覚的改善所見
ii） 自覚的改善所見
IV） 副作用
V） 考 按
VI） 結 語

I） 緒 言

悪性腫瘍に対する治療法は，古くから外科的療法と放射線療法が行なわれてきたが，近年流血中の腫瘍細胞の検出[1~5]，特に手術時におけるその増加が認められ[6~7]，これが転移に大きな意義を有しており，外科的療法も放射線療法も局所的療法という点でその限界に達したといえよう。即ち，ある程度進展した悪性腫瘍は局所療法では治癒せしめることは不可能で，全身療法としての化学療法に大きな期待がもたれている。この癌化学療法の歴史は，いちおう，19 世紀にさかのぼることができる。即ち，1865 年 LISSAUER の白血病に対する Potassium arsenite の使用から始まり[8]，第 2 次世界大戦後の Nitrogen Mustard が臨床的に使用されてその効果が認められ，以後 TEPA, Nitromin-D, Cyclophosphamide 等のアルキル化剤，Sarkomycin, Carzinophilin, Actinomycin-C, Mitomycin-C, Chromomycin A_3 等の抗腫瘍性抗生物質，6-Mercaptopurin, 5-Fluorouracil 等の代謝拮抗剤等が相次いで開発されたが，近年 Podophillium, Vinca alkaloid 等の植物製剤も抗腫瘍性が認められて臨床的に使用されている。しかし，いずれも副作用を有して臨床的には充分な抗腫瘍効果が得られない実状で，多くの場合，外科的療法，放射線療法あるいはホルモン療法と併用されて，わずかに臨床効果を挙げているにすぎない。従がつて，長期間使用が可能で，副作用発現の極めて少ないものが望まれ，今後の新しい抗腫瘍剤の開発が待たれるわけである。今回，著者は，1947 年 SULLIVAN[14] により開発された。細胞分裂毒といわれる

Podophyllic acid-ethyl hydrazide(以下, SP-I) を実験する機会を得たので, *in vitro* および *in vivo* における抗腫瘍性について追求し, 臨床症例に使用して, いささかの知見を得たので報告する。

II) 実験材料ならびに実験方法

1. *in vitro* の実験

A) 吉田肉腫

a) 実験動物および実験腫瘍 (Fig. 1)

実験動物には, 肉眼的に健康な, 体重 60～80 g の雄の呑竜ラッテを用い, 微生物化学研究所から分株された吉田肉腫を使用した。

b) 実験方法

堀氏の方法に従がつた。即ち, 吉田肉腫細胞 160×10^4 cell/ml をラッテの腹腔内に移植し, 4日目に 3.8% クエン酸ソーダ 0.25 ml を混じて腹水腫瘍細胞を採取し細織培養を行なつた。細織培養に用いた培地は, LT, DLT および馬血清を用いて作製した (Table 1, 2)。この総量を三角コルベンにとり, 滅菌試験管に 5.1 ml ずつ分注した。SP-I は1管 200 mg/ml のものを使用し, 滅菌蒸留水で 10 段階に倍数稀釈して, 吉田肉腫細胞との接触時に, 1 mcg/ml から 0.00125 mcg/ml となるようにし, それぞれ 37°C 72 時間作用させた。この操作は, SP-I と接触時に, 10×10 cell/ml となるように, LT で稀釈した細胞浮遊液を, 3つの試験管に 3 ml ずつ分注し, 稀釈した SP-I を 0.9 ml ずつ分注する。この3つの試験管の培地および細胞の混合液を, 1検体につき5本の短試験管に 1.5 ml ずつ分注し二重栓をして孵卵器に入れる。72時間培養後, 5本の短試験管の細胞を1本の遠心管にまとめ, さらに-GTS (Tylode Solution から glucose と $NAHCO_3$ を除去したもの)を用い短試験管内を洗い同一の遠心管に注入する。次に 2,000 rpm 10 分間遠沈して上清をすて, -GTS 5 ml を加えて同様に遠沈して上清をすてる。沈渣に 5 ml の硫酸抽出液を加えアルミ箔で蓋をして, 90°C 以上の温湯で 20 分間煮沸し, 直ちに冷却して遠心分離する (3,000 rpm 10 分間)。この上清液を Beckmann type Spectrophotometer を用い, 268 mμ にて purine および pyrimidin の量を測定し, 対照群と比較して SP-I の抗腫瘍性を生化学的に判定した。SP-I の各種の濃度における Inhibitory effect は次の Percent growth により算出した。即ち,

$$\text{Percent growth}=\frac{\text{Optical density of cells treated with SP-I}}{\text{Optical density of untreated cells}}\times100(\%)$$

したがつて

Inhibitory coefficient(=I.C.)=100−Percent growth

で示した (Fig. 1)。

Table 1

(1) Media		
(a) LT	10 Tyrode solution	50 ml
	glucose	0.5 g
	$NaHCO_3$	0.5 g
	Penicillin	64.5 mg
	Streptomycin	100 mg
	Nystatin	10 mg
	Lactoalbumin hydrolysate	2.5 g
	distilled water	
		500 ml
(b) DLT	10 Tyrode solution	50 ml
	$NaHCO_3$	0.5 g
	glucose	1.0 g
	Lactoalbumin hydrolysate	5 g
	distilled water	
		500 ml
(2) Extractive sulfuric acid		
	Conc. H_2SO_4	4.2 ml
	NaCl	100 g
	distilled water	
		1 litre
(3) PBS (Phosphate buffered)		
	NaCl	8 g
	KCl	0.2 g
	Na_2HPO_4 12 H_2O	2.9 g
	KH_2PO_4	0.2 g
	distilled water	
		1 litre

Table 2 Composition of culture medium

LT	2.4×(The number of sample +The number of control)
DLT	0.9×(The number of sample +The number of control)
Serum	1.8×(The number of sample +The number of control)

B) EHRLICH 腹水腫瘍 (Fig. 2)

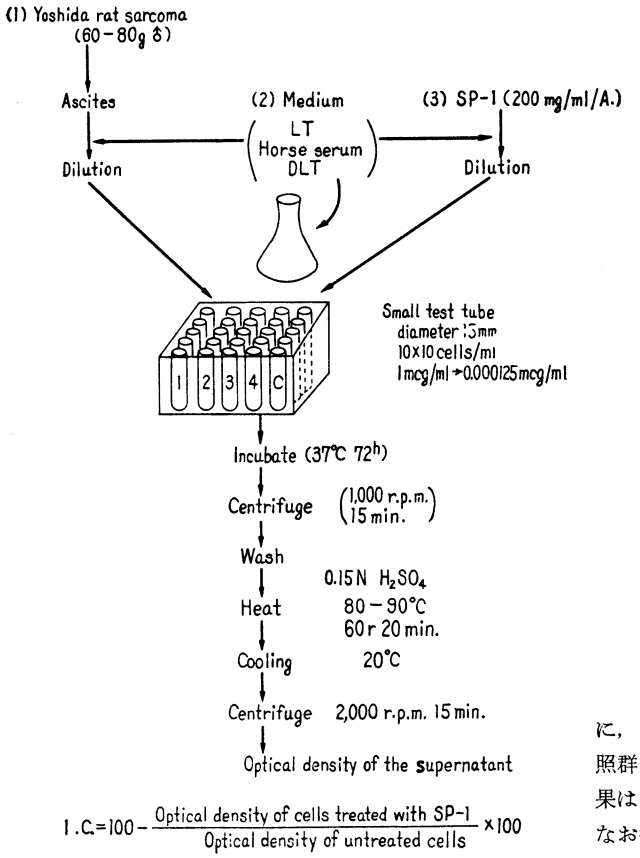
a) 実験動物および実験腫瘍

生後約2カ月目の健康な体重 18～20 g 前後の dd 系雄マウスを使用し, 実験腫瘍としては微生物科学研究所から分株された EHRLICH 腹水腫瘍を用いた。マウスは, SP-I 各濃度につき, 1群4匹として, 計 576 匹使用した。

b) 実験方法

移植後 5～7 日目のマウスから摂取した EHRLICH 腹水腫瘍細胞を, 実験 (1) と同様の培養液を用いて稀釈し SP-I 接触時 2×10^7 cells/ml になるようにした。また SP-I の稀釈法は, 1管 200 mg/ml の SP-I を, 腫瘍細胞と接触時の濃度が 50 mg/ml から 0.2 mcg/ml ま

Fig. 1 METHODS

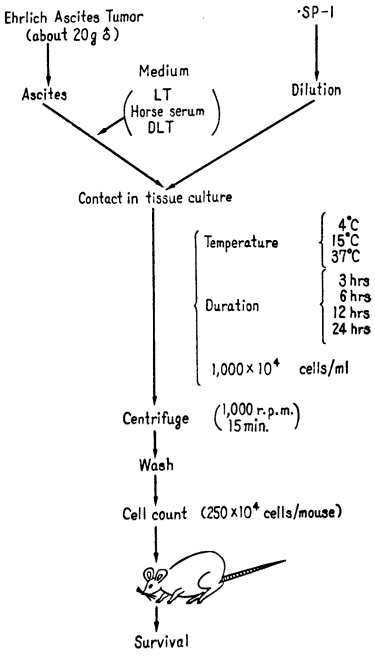


$$I.C.=100-\frac{\text{Optical density of cells treated with SP-1}}{\text{Optical density of untreated cells}}\times 100$$

で，10段階に P. B. S. で倍数稀釈した（Table 1）。

SP-I の各濃度について，培養小試験管を各5本ずつ準備し，それぞれに SP-I を 0.5 ml と EHRLICH 腹水腫瘍細胞 2×10^7 cell/ml の 0.5 ml を混和し，二重栓をして次のような諸条件で接触せしめた。即ち，接触時間は，3時間，6時間，12時間および24時間の4段階とし，接触温度は，4℃ の冷温室内，15℃ の室温，および 37℃ の恒温槽内での3段階で作用させた。なお，対照群として SP-I 非接触腫瘍細胞群を各条件につき，それぞれ試験管5本ずつ用意した。試験管内での薬剤との接触中は，各試験管を30分毎にゆるやかに振盪せしめて薬剤との混和を充分に行なつた。各種の条件で接触させた後，試験管を軽く振盪して試験管内壁に附着した腫瘍細胞を浮遊させた後，同一条件の5本の検体を1本の遠沈管にあつめ，15分間 1,500 rpm で遠心分離し上清を捨て，さらに腫瘍細胞を生理的食塩水で2回洗滌した。以上の操作の後，再び細胞数を測定し 1×10^7 cell/ml となるように生理食塩水で稀釈し，準備したマウス腹腔内に，この 0.25 ml（250×10^4 cell/ml）を移植した。なお対照群についても同一条件で操作した。SP-I の抗腫瘍効果はそれぞれの群の生存日数について対照群と比較し，なお観察期間後も生存するものにあつては，これを屠殺して腹水の状態および他臓器への転移の有無を肉眼的，病理組織学的に観察した。

Fig. 2 METHODS



2. *in vivo* の実験

A） 腹水型腫瘍

i） EHRLICH 腹水腫瘍

a） 実験動物および実験腫瘍

実験動物には生後約2カ月目の健康な体重 18～20 g の dd 系雄マウスを，SP-I 各濃度1群8匹として 40 匹，対照群 16 匹，計 56 匹使用した。実験腫瘍は実験 B)(a)と同様のものを用いた。

b） 実験方法

マウス腹腔内移植後7日目の EHRLICH 腹水腫瘍を使用し，腫瘍細胞 200×10^4 cell/0.25 ml を実験マウス腹腔内に移植した。SP-I の稀釈は，1管 200 mg/ml の SP-I を，滅菌蒸溜水で，8 mg/ml，4 mg/ml，2 mg/ml および 1 mg/ml の4段階の濃度に稀釈した。移植後3日目から，おのおのの濃度の SP-I 0.25 ml/mouse ずつ1日1回マウス腹腔内に注入して治療を開始し，連続10日間続け，その間，マウスの体重測定および全身の

状態を観察し，マウスの延命日数を対照群と比較検討した。

ii） Sarcoma-180 腹水型

a） 実験動物および実験腫瘍

生後約2カ月目の，健康な体重 18～20 g の dd 系雄マウスを，SP-I 各濃度1群8匹として 40 匹，対照群として 16 匹をおき，計 56 匹使用した。実験腫瘍は微生化学研究所から分株された Sarcoma-180 腹水型を使用した。

b） 実験方法

腫瘍細胞 200×10^4 cell/0.25 ml を実験マウス腹腔内に移植した。EHRLICH 腹水腫瘍の実験と同様に SP-I を稀釈し，同様な操作で治療実験を行ない延命日数により Sarcoma-180 に対する効果を観察した。

B） 結節型腫瘍

i） EHRLICH 腹水腫瘍結節型

a） 実験動物および実験腫瘍

移植後7日目，純培養の状態の EHRLICH 腹水腫瘍細胞 200×10^4 cell/0.25 ml を 18～20 g の雄のマウスの背部皮下組織に接種して，固型化したものを用いた。

b） 実験方法

EHRLICH 腹水腫瘍をマウスの皮下組織に接種，固型化してから3日目から 8 mg/ml，4 mg/ml，2 mg/ml および 1 mg/ml の4段階に稀釈した SP-I 溶液の 0.25 ml を担癌マウスの腹腔内へ連続 10 日間，1 日1回注入し接種後 14 日目に移植腫瘤を切除し重量を測定して，対照群の腫瘤に対する SP-I 使用群の腫瘤重量の比を Tumor index として発育抑制率で表わし，75% 以上を（卄），50% 以上 75% 迄を（+），50% 以下 25% 迄を（±），25% 以下を（−）として効果判定を行なつた。

ii） Sarcoma-180 結節型

a） 実験動物および実験腫瘍

実験B）ii）と同様の動物および腫瘍を用いた。

b） 実験方法

Sarcoma-180 移植後 14 日目の腫瘍結節を無菌的に摘出し，Chloramphenicol 約 100 mg を混入した滅菌生理的食塩水中にて約 1 mm^3 に細切した。その細片を腰椎穿刺針を応用して，マウスの前肢腋窩皮下組織に移植し，3日目より治療を開始した。SP-I の使用法は 8 mg/ml，4 mg/ml，2 mg/ml および 1 mg/ml の 0.25 ml/mouse を1日1回，10日間腹腔内に注射し，移植後 14 日目に結節を摘出して重量を計り，対照群の腫瘤重量に対する SP-I 使用群の腫瘤の重量比をもつて Tumor index とし，前項の実験と同じ方法で効果を判定した。

3. 腫瘍細胞の形態学的変化

A） 実験腫瘍

実験腫瘍は継代移植後7日目の EHRLICH 腹水腫瘍細胞を用いた。

B） 実験方法

SP-I を接触時の濃度が 50 mg/ml，3.125 mg/ml，0.2 mg/ml，12.5 mcg/ml および 0.8 mcg/ml となるように5段階に稀釈し，EHRLICH 腹水腫瘍細胞はフスコの 199[9]を用いた組織培養法により，接触時細胞数 4×10^7 cell/ml となるようにして 37°C 12 時間試験管内接触を行なつた後，遠心管に移し，0.9% NaCl を加えて遠心分離し（1,000 rpm 5分間）上清を捨てる。この操作を2回くり返した後，直ちに電子顕微鏡による検索をした。なお SP-I 非接触細胞群を対照としておいた。

電子顕微鏡による検索法は，摂取した腫瘍細胞の集塊を，PALADE の変法[10]により 20% オスミウム酸固定液に入れ，冷所で1時間半～2 時間固定し，50%，70%，90%，100% のアルコールで順次 5～10 分間脱水を行ない，LUFT 法[11]による Epoxy resion 包埋を行なつた。薄切はガラスナイスを使用し，L. K. B. 480 Ultrome で 300～400Å の超薄切片を作成し，酢酸ウラニール飽和水溶液と硝酸鉛の二重染色を行ない，日立 Electron mikroscope Type Hu-II A で観察し，2,000～10,000 倍率で撮影した。

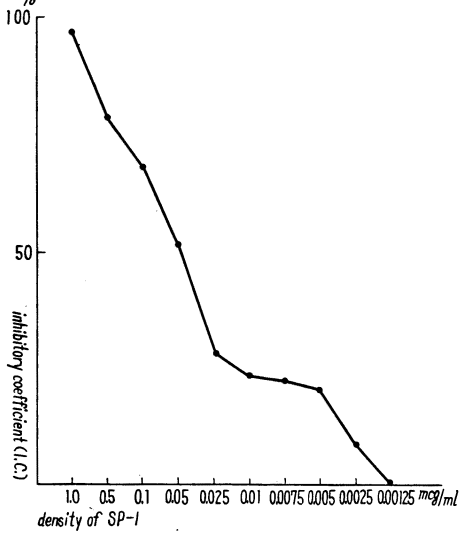
III） 実 験 成 績

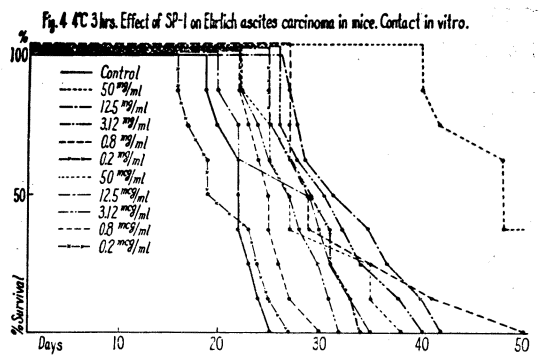
1. *in vitro* の成績

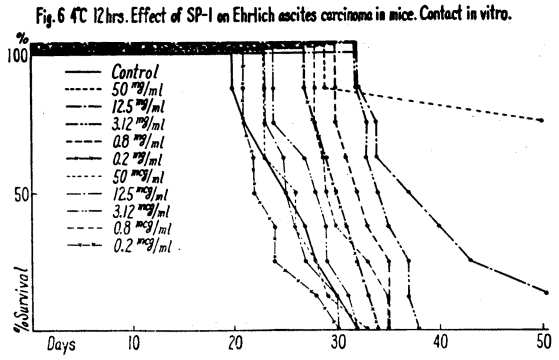
A） 吉田肉腫に対する抗腫瘍効果（Fig. 3）

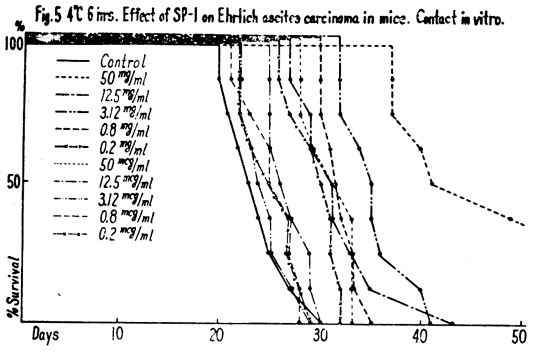
SP-I 1 mcg/ml の接触実験では，95.5% の増殖抑制率（Inhibitory Coefficient＝I.C）を示し，0.025 mcg/

Fig.3 Effect of SP-I on Yoshida rat sarcoma contact in vitro.









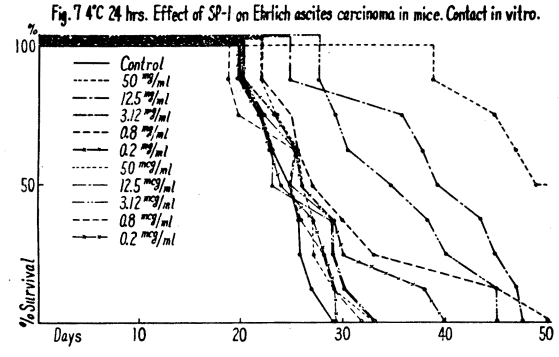


Table 3

temperature \ concentration/ml, time	0.2 mcg	0.8 mcg	3.12 mcg	1.25 mcg	50 mcg	0.2 mg	0.8 mg	3.12 mg	12.5 mg	50 mg
4℃ 3 hrs.	2.5	2.7	3.5	3.3	5.4	6.9	10.9	10.8	11.5	12.5% Survived
4℃ 6 hrs.	0.2	0.8	1.6	5.1	9.1	9.3	12.7	9.7	13.1	37.5% Survived
4℃ 12 hrs.	−3.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	7.0	9.0	12.0	75% Survived
4℃ 24 hrs.	1.0	0.5	1.0	2.0	2.5	3.0	7.5	9.9	14.5	50% Survived
15℃ 3 hrs.	2.5	3.0	3.0	3.0	4.5	6.2	12.0	10.5	12.5	13.0%
15℃ 6 hrs.	0	3.0	2.0	3.0	5.0	6.5	10.5	10.5	10.6	37.5% Survived
15℃ 12 hrs.	−1.5	−1.0	3.0	3.5	3.5	6.5	8.5	9.0	12.5% Survived	2.5% Survived
15℃ 24 hrs.	3.5	5.5	5.5	8.5	8.5	8.5	8.5	10.5	50% Survived	100% Survived
37℃ 3 hrs.	3.5	2.5	3.5	5.5	6.0	5.5	10.5	14.5	18.5	100% Survived
37℃ 6 hrs.	0.5	0	3.0	6.0	7.5	8.5	11.5	15.5	12.5 Survived	100% Survived
37℃ 12 hrs.	2.5	3.5	3.5	5.5	6.0	6.1	11.5	17.2	100% Survived	100% Survived
37℃ 24 hrs.	0	3.5	4.0	5.5	5.5	5.8	10.5	17.0	100% Survived	100% Survived

ml までは，SP-I の濃度の低下にともなつて I.C は低下するが，0.025～0.005 mcg/ml の間では I.C の低下はやや緩慢となり，0.005 mcg/ml 以下の低濃度で再び著しい低下を示し，0.00125 mcg/ml の濃度では増殖抑制は全く認められなかつた。

B） EHRLICH 腹水腫瘍に対する抗腫瘍効果

i） 接触温度 4℃ の場合（Fig. 4～7, Table 3）

接触時間の延長による影響は余り認められないが，SP-I の濃度に比例して，平均生存日数が延長し，12.5 mcg/ml で平均 3.3 日，50 mcg/ml で 5.2 日，0.2 mg/ml で 6.1 日，0.8 mg/ml で 9.5 日，12.5 mg/ml で 15.3 日であつたが，12.5 mg/ml 以下の濃度では 50 日まで生存したものは認められないが，50 mg/ml で接触した場合は各接触時間において生存例を得，特に 12 時間接触においては 75% の生存率を示した。

ii） 接触温度 15℃ の場合（Fig. 8～11, Table 3）

0.2 mcg/ml から 3.12 mcg/ml までの間の低濃度では，接触時間の延長による生存日数への影響は少なく，0.2 mcg/ml で平均 1.1 日，0.8 mcg/ml で 2.6 日，3.12 mcg/ml で 3.4 日と，生存日数の延長は認められないが，12.5 mcg/ml 以上になると濃度および接触時間に比例して，やや生存日数の延長が認められ，12.5 mcg/ml で平均 4.5 日，0.2 mg/ml で 8.6 日，3.12 mg/ml で 10.1 日である。12.5 mg/ml では接触時間の延長により 50 日後の生存例が得られ，24 時間接触で 50% を示した。50 mg/ml 24 時間接触では全例 50 日後まで生存した。

iii） 接触温度 37℃ の場合（Fig. 12～15, Table 3）

濃度 0.2 mcg/ml から 3.12 mcg/ml の間では，接触時間および濃度による生存日数への影響は余り認められないが，12.5 mcg/ml 以上の濃度になるとその影響が認められ，濃度 12.5 mcg/ml では平均 4.6 日，0.2 mg/ml で 6.1 日，3.12 mg/ml では 17.2 日，12.5 mg/ml では 50 日生存例が増加し，12 時間および 24 時間接触群では全例生存した。50 mg/ml では各接触時間群において全例 50 日生存した。

iv） 病理解剖所見（Fig. 4～15）

前項の実験において生存したマウスは，接触温度 4℃ の場合に 14 匹，15℃ で 13 匹，37℃ の場合には 48 匹，計 75 匹認められたが，これらは SP-I 接触腫瘍細胞移植後 50 日目に屠殺して剖検した。全例に腹水は認めず，また他臓器の肉眼的および組織学的異常所見は認められなかつた。

一方，腫瘍死したマウスの剖検所見では，全例に腹水を認め，粘稠性で濃く出血性のものが多くみられ，腫瘍細胞は形および核は正常でも大きさが大小不同のものが

Fig. 8 15℃ 3 hrs. Effect of SP-I on Ehrlich ascites carcinoma in mice. Contact in vitro.

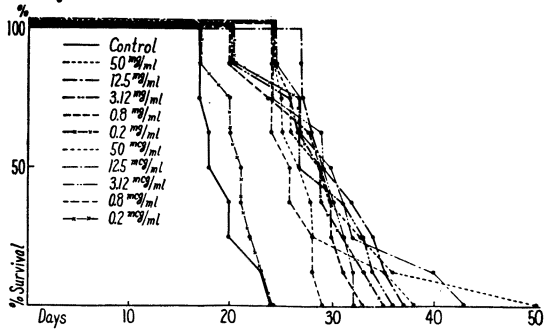


Fig. 10 15℃ 12 hrs. Effect of SP-I on Ehrlich ascites carcinoma in mice. Contact in vitro.

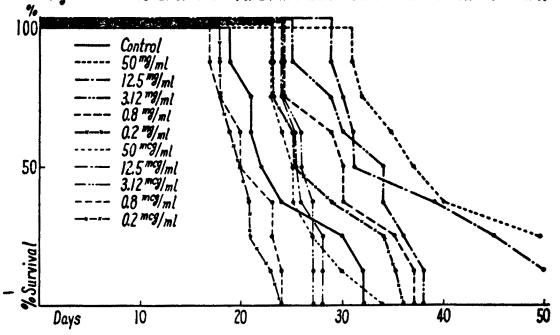


Fig. 9 15℃ 6 hrs. Effect of SP-I on Ehrlich ascites carcinoma in mice. Contact in vitro.

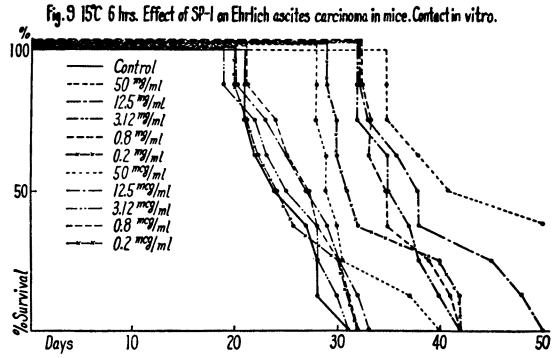


Fig. 11 15℃ 24 hrs. Effect of SP-I on Ehrlich ascites carcinoma in mice. Contact in vitro.

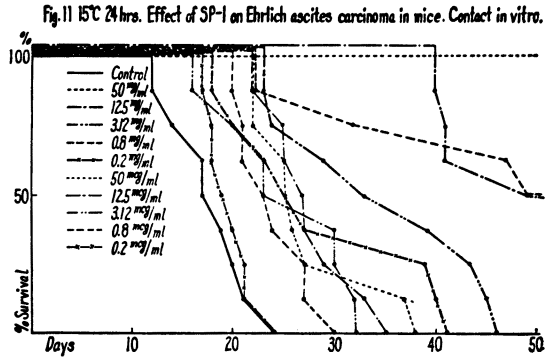


Fig. 12 37℃ 3 hrs. Effect of SP-I on Ehrlich ascites carcinoma in mice. Contact in vitro.

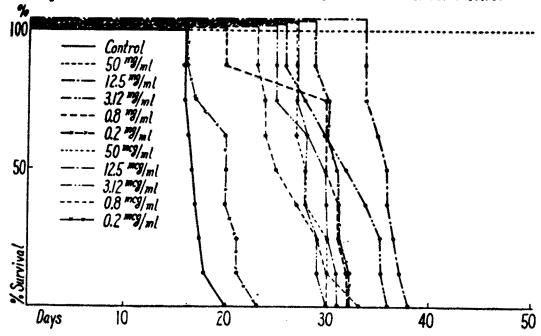
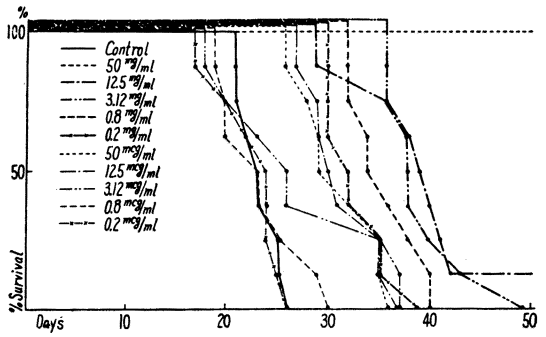


Fig. 13 37℃ 6 hrs. Effect of SP-I on Ehrlich ascites carcinoma in mice. Contact in vitro.



多く認められた。また，肉眼的および組織学的にも，他臓器への転移所見は認められなかつた。

C） 小 括

吉田肉腫に対する抗腫瘍効果は，堀氏法[25]に基づく *in vitro* の接触実験では，SP-I 0.00125 mcg/ml 以上の濃度で認められ，0.05 mcg/ml において 50% の細胞増殖抑制効果を認めた。

EHRLICH 腹水腫瘍に対する抗腫瘍効果を *in vitro* で腫瘍細胞と薬剤との接解時の温度，時間および濃度をかえて行なつた後，この細胞を腹腔内に移植して延命効果から判定した。まず，接触時の温度を中心にみると 0.2 mcg/ml から 0.8 mg/ml の間では，4%，15℃ および 37℃ のいずれの温度でも，ほとんど延命効果に有意の差を認めず，3.12 mg/ml 以上の高濃度で接触させた場合にのみ温度による差を認め，37℃ の場合が最も長い延命がみられた。また，0.8 mg/ml 以下では接触時間による延命効果の差はほとんど認められず，0.8 mg/ml 以上の濃度では平均 2～3 日延長し，50 日目生存率も比較的増加する。次に，接触時の薬剤濃度の面からみると，3.12 mcg/ml 以下では温度および時間に関係なく延命の差を認めないが，12.5～50 mcg/ml 以上では各濃度に比例して生存日数の延長が認められた。以上のとおり，接触時に与える諸条件の影響を総合して検討すると，接触温度 37℃，接触時間 12 時間，12.5 mcg/ml

Fig. 14 37℃ 12 hrs. Effect of SP-I on Ehrlich ascites carcinoma in mice. Contact in vitro.

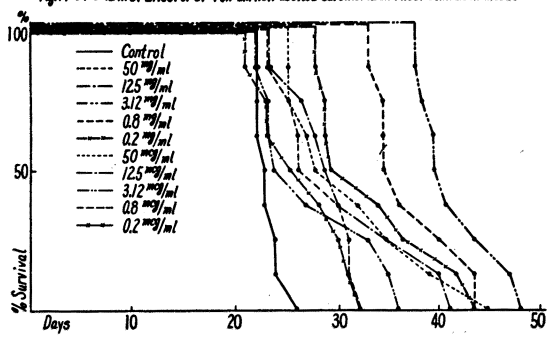


Fig. 15 37℃ 24 hrs. Effect of SP-I on Ehrlich ascites carcinoma in mice. Contact in vitro.

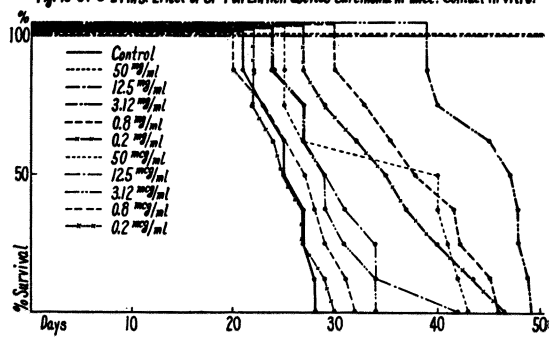
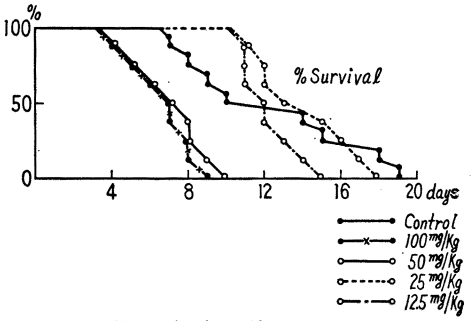


Fig. 16 Antitumor effect of SP-I on Ehrlich ascites tumor in mice.



Change of body weight in mice.

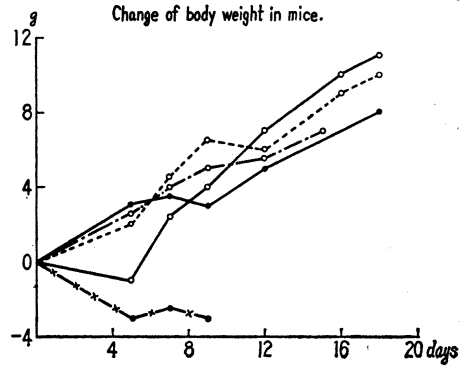
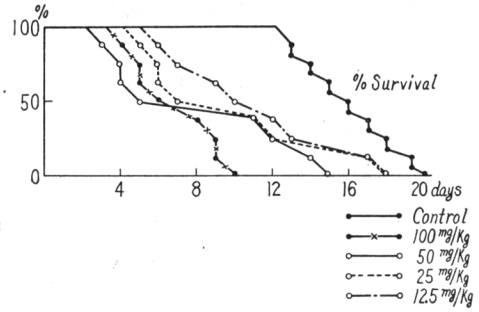
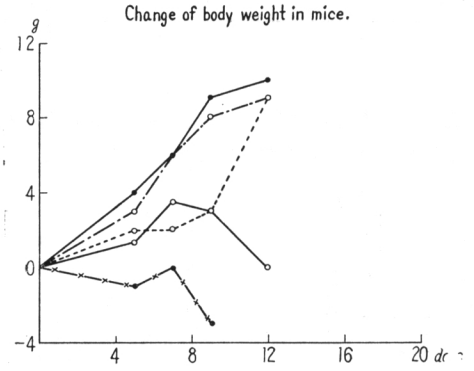


Fig. 17 Antitumor effect of SP-I ascites form of Sarcoma 180 in mice.



Change of body weight in mice.



以上の濃度で生存日数の延長を認めた。

2. *in vivo* の成績

A） 腹水型腫瘍

i） EHRLICH 腹水腫瘍（Fig. 16）

対照群の平均生存日数は 12.5 日に対して，SP-I 100 mg/kg 使用群では，平均生存日数 6.8 日，50 mg/kg 使用群では 7.1 日であるが，25 mg/kg 使用群では 14.1 日と最も長い生存日数が得られた。しかし 12.5 mg/kg 使用群では 12.2 日と再び短縮する。また，50 mg/kg 使用群では治療開始後 4～5 日体重が減少し，以後は漸次増加していくのが認められた。25 mg/kg および 12.5mg/kg 使用群では，治療開始後 4～5 日は対照群にくらべ，体重の増加率は低いが，以後対照群より増加しておるのが観察された。従がつて，25 mg/kg および 12.5 mg/kg 使用群では，僅かながら対照群にくらべ，生存日数の延長を認めた。

Table 4 Effect of SP-I on solid form of EHRLICH carcinoma

	Control	100 mg/kg	50 mg/kg	25 mg/kg	12.5 mg/kg
Tumor Wt. (mg)	1465	Tox.	657	941	998
Inhibited (%)	0	0	55.4	36.5	32.0
Evaluation	−	−	+	±	±

Therapy; I.P. injection daily for 10 days.
Mice; D.D. Strain.

ii） Sarcoma-180（Fig. 17）

治療マウスの延命日数は，対照群では平均生存日数 16.3 日，100 mg/kg 使用群では 7.0 日，50 mg/kg 群では 8.5 日，25 mg/kg 群では 10.3 日，12.5 mg/kg 群では 11.5 日であつた。また，体重の変化は，100 mg/kg 群では治療開始後体重が減少し，10 日目で毒性のため全例死亡した。50 mg/kg 群では治療開始後 7 日目までは増加するが，以後漸次減少し，15 日目で全例死亡した。25 mg/kg および 12.5 mg/kg 群では，体重は治療中にもかかわらず増加し，腹水の増加を意味しておる。以上のとおり，生存日数は対照群より延長せず，また，腹水の増加も抑制しないので，Sarcoma-180 に対しては SP-I の効果は認められなかつた。

B） 結節型腫瘍

i） EHRLICH 腹水腫瘍結節型（Table 4, Photo. 1）

SP-I 100 mg/kg 使用群においては，5 日以内に全例

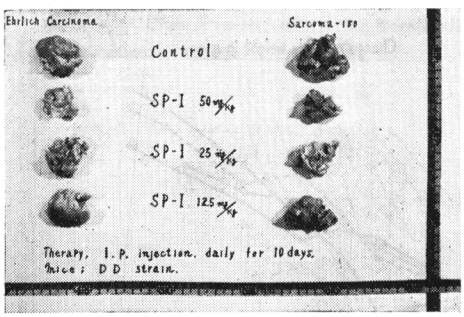


Photo 1 Effect of SP-I on solid form of EHRLICH carcinoma & Sarcoma-180 in Mice.

Photo 2 EHRLICH ascites carcinoma. control

Photo 3 Contact *in vitro* effect of SP-I 0.8 mcg/ml on EHRLICH ascites carcinoma.

Table 5 Effect of SP-I on solid form of Sarcoma 180 in mice

	Control	100 mg/kg	50 mg/kg	25 mg/kg	12.5 mg/kg
Tumor Wt. (mg)	945	Tox.	278	357	834
Inhibited (%)	0	0	70.6%	62.2%	11.9%
Evaluation	−	−	+	+	−

Therapy; I.P. injection daily for 10 days.
Mice; D.D. Strain.

Table 6 Clinical materials treated with SP-I

	Radical operation	Exploratory laparotomy palliative operation	Post operative recurrences	Total
Cancer of stomach	1	9	12	22
Cancer of esophagus	1		1	2
Cancer of liver		3		3
Cancer of colon	1	1		2
Cancer of rectum		1		1
Cancer of bile duct		1		1
Cancer of pancreas		2		2
Cancer of neck		1		1
Lymphoma		1		1
Cancer of corpus uteri			1	1
Cancer of thyroid	1			1
Total	4	19	14	37

Table 6a Side effects of SP-I

Subjective effect	
Nausea	2
Diarrhea	2
General fatigue	1
Depilation	1
Total	6 cases

死亡し，50 mg/kg 使用群では，移植後14日目に摘出した腫瘍結節平均重量は 657 mg で，対照群にくらべ 55.4% の増加抑制を認め，25 mg/kg 群では平均重量 941 mg で，36.5% の増加抑制を，12.5 mg/kg 群では平均重量 998 mg で 32.0% の増加抑制を認めた。移植後14日目の腫瘍発育状態では SP-I 50 mg/kg 使用で最も高い発育抑制効果がみられ，腫瘍の重量は対照群の約 1/2 であつた。

ii) Sarcoma-180 結節型 (Table 5)

SP-I 100 mg/kg 使用群では，治療開始後 5～6 日目で全例死亡し，50 mg/kg 群では 70.6%，25 mg/kg 群では 62.2%，12.5 mg/kg 群では 11.9% の腫瘍結節平均重量増加の抑制を認めた。即ち，50 mg～25 mg/kg の使用で著明な発育抑制がみられたが，12.5 mg/kg 使用ではそれが少なかつた。

C) 小 括

In vivo における腹水型腫瘍に対する抗腫瘍効果を，EHRLICH 腹水腫瘍及び Sarcoma-180 を用いて検索した。EHRLICH 腹水腫瘍では僅かながら生存日数の延長を認めたが，対照群のそれの2倍には達しなかつた。一方，Sarcoma-180 に対しては効果は全く認められなかつた。

結節型腫瘍に対する抗腫瘍性は，EHRLICH 腹水腫瘍結節型と Sarcoma-180 結節型を使用したが，EHRLICH 結節型に対しては，SP-I 50 mg/kg 使用群で発育抑制効果が認められ，Sarcoma-180 結節型に対しては，50 mg/kg 使用群および 25 mg/kg 使用群で著明な発育抑制がみられた。

ここに *in vivo* の実験成績を小括すると，SP-I の抗腫瘍効果は腹水型においてはほとんど認められないが，結節型では 50 mg～25 mg/kg で発育抑制がみられた。

3. 腫瘍細胞の形態学的変化

SP-I 非使用群 (Photo. 1) の場合には，細胞の外界は形質膜によつて明らかに堺され，細胞基質内には，類円形のミトコンドリア，コルジ体，小胞体などが観察された。核膜は2層で細胞質とは堺され，核質は交錯した網状構造を示し，核小体には均質の構造の中に粒状あるいは網状の構造を認めた。また，他の細胞にあつては，核質に密となつた糸状構造をみるもの，仁と核膜が不明となつたもの，また，リボゾームを多数含む細胞質が核へ陥入しているもの等が認められた。

50 mg/ml の高濃度で接触させた場合には，形質膜はほとんど破壊されて消失し，細胞質内の空腔化が目立ち，細胞質基質て網状を呈し，小器官の識別が困難であつた。しかし，大部分の細胞では核膜は明瞭で，核質は網状構造を呈し，核小体は濃染され，粒状の構造を認め，対照群と比較すると，核膜，核小体は形態学的にほとんど同様な形態を保つていた。3,125 mg/ml および 0.2 mg/ml で接触させた場合には，50 mg/ml の場合とほとんど類似した所見であつたが，大部分が静止核であり，細胞膜の明瞭化，細胞質内小器官の識別化が明瞭となり，核小体は散乱するが，細胞質内への流入，核膜の消失，核小体の萎縮あるいは膨化などの変化は認められなかつた。

12.5 mcg/ml および 0.8 mcg/ml の低濃度では，形質膜は明瞭で，細胞質基質中には異常を認めず，仁と核膜が不明瞭のもの，完全に消失したものなど少数認められたが，大部分は静止核の状態で仁の濃染されたものが

Table 7 Clinical cases treated with SP-I

No.	Patient name	Sex	Age	Cancer	Recurrences	Dosis mg/daily	Total dosis	Minimal counts leucocytes	Side effects	Objective Improvement	Outcome	Survival duration aft. onset of cancer	Survival duration after admin.	Surgery	Time points of administration	Stage	Metastasis
1	I. S.	m.	75	Stomach	re.	400	4000	7200			D.	1y. 7m.	2w.	Gastre.	admin. again	IV	Lymph node
2	M. M.	f.	66	Stomach	re.	400	9200	5000			D.	1y. 4m.	1m.	Gartre.	admin. again	IV	Lymph node
3	G. T.	f.	31	Stomach	re.	400	5400	6200			D.	9m.	3w.	Gst. Jej.	admin. again		Stomach greater
4	N. Y.	f.	31	Uterus	re.	400	2800	3000			D.	1y. 3m.	3m.	Gst. Jej.	preop.		Omentum
5	E. H.	m.	47	Bile duct		400	1200	10300	Nausea		D.	1y. 2m.	1w.	Chole. stomy	post op.		—
6	S. Y.	f.	53	Esophagus	re.	400	3200	5200			D.	2y.	1y.	Radical	post op.		Lymph node
7	N. S.	m.	67	Stomach	re.	400	4000	4300			D.	7y. 3m.	3m.	Gastre.	admin. again		Liver
8	K. Y.	m.	59	Stomach		400	7200	6000	Nausea		D.	4y. 2m.	2y. 2m.	Gastre.	post op.	II	—
9	T. T.	m.	59	Esophagus		400	6400	5600			D.	2y. 3m.	1y.	Radical	post op.		
10	W. T.	m.	48	Rectomy	re.	400	7800	3800		+	D.	1y. 5m.		Radical	admin. again		Lung
11	K. Z.	m.	62	Stomach	re.	400	5200	4900	Diarrhea		D.	1m. 11m.	2m.	Gastre.	post op.	II	Stomach
12	N. A.	m.	46	Stomach		400	9400	7300			D.	6y. 4m.	1m.	Ex. Lap.	post op.		—
13	K. K.	f.	72	Liver		400	9400	8100			D.	6m.	3w.	Ex. Lap.	post op.		—
14	N. F.	f.	42	Pancreas		400	6800	8600			D.	7m.	1m.	Chole. stomy	post op.		
15	S. H.	m.	52	Stomach	re.	400	8400	4800	Diarrhea	+	D.	2y.	1y. 8m.	Ex. Lap.	post op.		Lymph node
16	F. T.	f.	69	Stomach	re.	400	4600	5300			D.	1y. 2m.	3w.	Gastre.	admin. again		Lymph node
17	Y. S.	m.	60	Neck Stomach		400	15200	6400			D.	8m.	2m. 3w.	Ex. Lap.	post op.		
18	S. I.	f.	70	Sarcoma		400	18800	3900	General Fatigue		D.	4y. 6m.	6m.	Ex. Lap.	post op.		
19	N. T.	m.	55	Stomach		200	2400	4200			D.	7m.	3m.	Gastre.	post op.		Lymph node, Liver
20	F. T.	f.	69	Stomach	re.	400	4000	10200			D.	1m.	2w.	Ex. Lap.	post op.		
21	H. I.	m.	76	Stomach	re.	400	2000	8900			D.	1y. 11m.	5d.	Ex. Lap.	admin. again		Stomach
22	S. T.	m.	30	Stomach		400	12800	6200			D.	6m.	2m.	Ex. Lap.	post op.	III	
23	M. I.	m.	68	Stomach	re.	400	3200	6400			D.	2y. 5m.	8m.	Gastre.	post op.	IV	Liver
24	F. S.	m.	69	Liver		200	200	6800			D.	3m.	1m.	Ex. Lap.	post op.		
25	O. I.	m.	63	Colon		400	4000	4200			D.	2y. 5m.	1y. 5m.	Colontectomy	post op.		
26	S. T.	f.	61	Stomach	re.	200	2000	5500			D.	3y. 8m.	1w.	Ex. Lap.	post op.		Lymph node

27	F. K.	f.	52	Colon		800	5200	5300			L.	3y.	7m.	2y.	7m.	Colontectomy	post op.		Peritoneum		
28	S. S.	m.	63	Stomach		800	17600	5200			D.		5m.		1m.	Gst. Jej.	post op.	Ⅳ	Liver		
29	S. K.	m.	42	Stomach	re.	800	18400	5200			D.	2y.		2y.		Gastre.	post op.	Ⅱ	Lymphnode		
30	I. A.	f.	45	Stomach		800	41600	6100			D.		4m.		2m.	Gst. Jej.	post op.	Ⅳ	Lymphnode		
31	S. A.	f.	39	Stomach	re.	800 —400	2800	4900			D.	1y.	1m.		1m.	Gastre.	post op.	Ⅲ	Lymphnode		
32	Y. M.	m.	28	Stomach	re.	400 ~800	23200	6500			D.		10m.	2m.		Gastre. chole. Jej.	admin. again				
33	I. K.	m.	35	Struma		800	3200	7800			L.	2y.	6m.	2y.	3m.	Exst.	post op.		skin		
34	Y. N.	m.	33	Pancreas		400	4400	4500			D.	1y.	3m.	2m.		(—)	admin. again		Lymphnode		
35	H. M.	f.	73	Stomach		400	5600	5500			D.	1y.		2m.		Gst. Jej.	post op.				
36	H. T.	f.	63	Liver		200	3400	7200	Nausea		D.	6m.		1m.		Ex. Lap.	post op.		Anus, Adn. ut.		
37	H. Y.	f.	52	Stomach		200	1600	3200			D.	3m.		1m.		(—)	admin. again				

m : male. f : female. re : recurrences. Gastre : Gastrectomy. Gst. Jej : Gastrojejunostomy. Chole. stomy : Cholecystostomy.
Ex. Lap : Exploratory Laparotomy. admin. again : admission. y : year. m : month. w : week. d : day. D : death.
L : living Ext : Exxtirpation. chole. Jej.: cholecystojejunostomy. Adn. ut.: Adnexa uteri.

多くみられた。しかし，紡錘糸の出現，染色体の赤道上配列像，核の散乱，膨化などは認められなかつた。したがつて，分裂過程上の細胞はほとんど見当らず，大部分が静止核の状態で認められ，核膜，仁，核質には形態学的変化は認められなかつた。

IV) 臨 床 実 験

I. 症 例

SP-I を使用した症例については，既に教室の坂本が1967年に発表しているが，その後の症例を加えて再検討を行なつた。疾患別には胃癌 22，食道癌 2，S状結腸癌 2，胆道癌 1，その他 6 例の総計 37 例である（Table 6, 7)。このうち，根治手術後，再発防止の目的で使用したものは，胃癌 1，食道癌 1，S状結腸癌 1，甲状腺癌 1 の計 4 例で，手術直後ないし 1 週間目から使用開始した。根治手術不能で，試験開腹および姑息的手術後に使用した症例は，胃癌 9，肝癌 3，膵臓癌 2，頸部癌，結腸癌，直腸癌，悪性リンパ腺腫，胆道癌の各 1 例の計 19 例で，根治的手術後の再発例では，胃癌 12，食道癌 1，子宮癌 1 の計 14 例である。

II. 使用法および使用量

SP-I は，すべて静脈内使用で，1 回使用量は 200～800 mg(4～16 mg/kg) とし，手術直後では連日 5% ブドウ糖，リンゲル液等の輸液に混じて，1 日 1 回ないし 2 回点滴法により緩慢に静注を行なつた。その際混濁凝固などの変化は全く見られず，簡単に使用し得た。使用期間は 3 日から 47 日間で，使用総量は 1,200～41,600 mg であつた。

III. 臨 床 効 果

根治的手術後再発防止の目的で投与した胃癌症例は 1 例で，胃癌研究会の stage 分類に従がえば，stage Ⅱ に属し，遠隔成績をみると，SP-I 使用時からの生存期間は 2 年 2 カ月であり，食道癌では 1 年であつたが，結腸癌では 3 年後，甲状腺癌は 2 年半後の現在，なお生存している。これら再発防止のために使用した症例を除いた他の症例について臨床効果を他覚的および自覚的改善に分けてみると，他覚的に臨床効果の認められた症例は 33 例中 2 例である。即ち，1 例は直腸の腺癌の肺転移がレ線学的に縮少し，かつ左鼠径部リンパ腺腫脹の消失を認めたもので，他の 1 例は胃原発の腺癌例でウイルヒョウ氏腺の腫脹が消失し，上腹部の手拳大，表面凹凸，境界明瞭な腫瘤の縮少ならびに腹水の減少をみた症例である。この 2 症例に使用した SP-I の使用法は，前者には 1 日 400 mg 連日 13 日，総量 5,200 mg で，後者には 1 日 400 mg 21 日間，総量 8,400 mg である（Table 6, 7)。この 2 症例のほかに自覚的に症状の改善をみたものが，33 例中 1 例あり，他覚的には改善を認めなか

つたが，自覚的には心窩部痛の軽減および食欲増加が認められた。この効果発現までに使用したSP-I量は2,800 mgであつた。姑息的手術19例中1例はSP-I使用1年後に死亡したが，他は9～2カ月の比較的短期間に死亡している。再発14例は3カ月以内に死亡した。

IV. 副作用

副作用については，悪心，嘔吐，下痢，食欲不振などの自覚症状は，SP-I使用直後から12時間以内にみられ，注射3回以上で同一症状があり，使用中止により恢復した場合，副作用発現ありと認めた。また他覚的症状中，造血器障害はSP-I使用後1週間毎に検索し，他の皮膚，毛髪，爪等に対する副作用にも注意した。その結果5例に次のような副作用がみられた。即ち悪心2，下痢2，全身倦怠感1，脱毛1であつた。しかし，白血球減少，血小板数減少等の造血器障害はまつたく認められなかつた。全症例中副作用のための使用中止例は悪心を強く訴えた1例のみであつた（Table 6）。

V) 考按

Podophyllinは北米やヒマラヤに産する植物*Podophyllum emodi* および *Podophyllum peltatum* の根茎から抽出されたもので，この根茎の煎じ汁は古くから経験的に北米およびヒマラヤ地方で緩下剤，利胆剤，駆虫剤として利用されていたといわれ，今回使用したSP-IはPodophyllinの有効成分Podophyllotoxinをヒドラジンで処理し，ラクトン環を開裂せしめてPodophyllic acidのhydrazideとし，これを更にエチル化して得られた誘導体でPodophyllic acidのethyl hydrazideである。

Podophyllinの作用機序は1947年SULLIVAN[14]らによつて究明され，細胞核分裂中期の有糸分裂阻害作用を有することが明らかになつた。化学的には1880年PODWYSSOTZKI[15]により，Podophyllinの有効成分としてPodophyllotoxinを抽出分離され，その後STOLL[16]の研究により，*Podophyllum emodi* および *Podophyllum peltatum* の根茎はPodophyllotoxin並びにその誘導体の種々のglucosideを多数含有していることが明らかになつた。

従来，抗腫瘍性物質の開発には実験腫瘍を用いるスクリーニングが行なわれてきたが，この実験成績がそのまま人癌に対する抗腫瘍効果と一致しないことはいうまでもない。しかし，この方法で開発された物質が臨床的に効果の認められる場合も少なくない[51]。

著者はSP-Iの抗腫瘍性について，実験腫瘍を用いて *in vitro* および *in vivo* の実験を行ない，臨床使用の基礎的考察を行なつた。

抗腫瘍剤のスクリーニングについては多くの方法が行なわれており，それぞれ一長一短を有している。秦及び梅沢ら[17]はスクリーニング法を，1)細胞培養法，2)移植腫瘍を用いる方法，3)抗菌作用による方法，4)菌の形態的変化による方法，5)生化学的方法，6)その他，に分類している。これらのうちしばしば用いられる方法として，1)および2)の方法があげられる。1)の組織培養法によるスクリーニングは，*in vitro* の代表的な方法であるが，基礎となる組織培養法は歴史的にはLOEB(1897)，HARISON(1907)[18]によつて創案され，CARREL & BURROWS[19]らによつて今日の組織培養の基礎が築かれた。培養される細胞は，Hela細胞[20]，HB株[21]，Maben株[22]，J-96株[23]等のヒトの悪性腫瘍から株化された細胞も用いられるが，一般には吉田肉腫およびEHRLICH腹水腫瘍等が広く使用されている。実験方法は培養細胞に種々の濃度の抗腫瘍物質を一定時間接触させた後効果を判定するものであるが，抗腫瘍性の効果判定には生化学的判定法と生物学的判定法が主として行なわれている。生化学的判定法とは薬剤を接触した細胞の増殖の度合を，細胞中の核酸，蛋白，窒素および燐などを測定し，対照のそれと比較判定するもので，1958年MC INTIREおよびSMITH[24]らは，細胞に含まれている核酸量の測定に分光光度計を用いる方法を発表し，1962年堀ら[25]はこの方法を吉田肉腫を用いて各種の抗腫瘍剤のスクリーニングに利用している。生物学的判定法とは，薬剤を一定時間試験管内で作用させた後に腫瘍細胞を動物に移植して，その動物の延命または移植率によつて薬剤接触細胞の増殖度を基準として判定するか，あるいは試験管内接触直後の腫瘍細胞の形態学的変化を観察する方法である。次に，2)の移植腫瘍を用いる方法は，実験腫瘍の条件として性状が明らかで且つ安定性で移植後一定の増殖を行ない，しかも自然治癒の認められないものを選ぶべきで，腹水型と結節型の2種類がある。腹水型腫瘍は容易に継代移植ができ，しかも100%腹水死をおこすもので，主としてEHRLICH腹水腫瘍，Sarcoma-180，SN 36，吉田肉腫，腹水肝癌AH 130，AH 7974，その他の数種の肝癌等が用いられる。このような腹水腫瘍は前述した *in vitro* の細胞培養法にも用いられるが，多くは動物の腹腔内に移植後薬剤を作用して，延命効果により抗腫瘍効果を判定する *in vivo* の方法が行なわれる。結節型腫瘍を用いる実験には，一般にEHRLICH腹水腫瘍皮下結節型，Sarcoma-180皮下結節型，Walker 265等が用いられるが，腹水型から皮下に移植するEHRLICH腹水腫瘍などでは，移植時に細胞数を一定に出来る利点があり，移植後一時的に発育増殖するが，移植10日目頃から発育が鈍つて自然縮少を始め，消失してしまう場合もあり，また，腫瘍がかなり大きくなつても腫瘍死せ

ず，長時間生存して判定に苦しむ場合があるので，実験の結果を判定するのに生存日数で判定するよりも，移植後 10～14 日目で皮下から腫瘍瘤を摘出して，対照群との重量比で効果判定したほうがよい。しかし，Sarcoma-180 のような結節型腫瘍の移植には，細胞数を一定数にすることができない欠点があるが，3 週間前後で動物は 100% 腫瘍死するので，移植腫瘍の重量比だけでなく延命率でも効果判定が可能である。

このような種々なスクリーニングの方法のそれぞれの長所短所について考察すると，細胞培養法の生化学的判定法は極めて容易で短期間に抗腫瘍性の結果判定が出来るが，腫瘍細胞と薬剤が直接接触するので，細胞毒性を有する物質の場合はしばしば鋭敏すぎて効果が過大に評価されがちであり，また，生物学的判定法の接触直後の形態学的変化の観察も同様の欠点を有しており，これらの成績のみで抗腫瘍効果を論ずることは困難である。従がつてスクリーニングの基礎的検索として行ない，効果の判定には接触後の細胞を動物に移植して延命効果を観察する生物学的判定法に重点をおくべきである[27]。

次に移植腫瘍を用いる担癌動物の治療実験のうち，腹水型腫瘍を用いる方法は薬剤を腹腔内に注入する *in vitro* の接触実験に類似した方法であるから，この成績のみでは抗腫瘍効果の評価は不適当である。従がつて薬剤を皮下あるいは静脈内に注入するか，または皮下の結節の結節型腫瘍を用いるべきで[28]，特に結節型腫瘍の場合は薬剤の使用部位から腫瘍に到達するまでに別のルートを経由するので，薬剤の組織内濃度にも限度があり，臨床実験に最も類似した実験方法である。

以上のような実験方法およびそれらの長所短所を考慮にいれて，著者は SP-I の抗腫瘍効果の基礎実験としてまず *in vitro* の細胞培養法を吉田肉腫を用い堀氏法[25]にしたがつて生化学的に，次いで EHRLICH 腫瘍を用いて細胞培養中に接触させ腹腔内に移植して延命効果から生物学的に判定した。また，同時に接触直後の EHRLICH 腹水腫瘍細胞の形態学的変化を電子顕微鏡で観察した。

移植腫瘍を用いる担癌動物の治療実験は，EHRLICH 腹水腫瘍および Sarcoma-180 のそれぞれの腹水型及び結節型を用い，薬剤の使用方法はいずれも腹腔内注入を行なつた。

実験成績は，吉田肉腫細胞培養法による生化学的判定では，0.00125 mcg/ml 以上の極めて低い濃度で細胞増殖抑制を認め，50% I.C. は 0.05 mcg/ml で極めて高い抗腫瘍性のあることが推察された。堀氏は多くの抗腫瘍剤のスクリーニングをこの方法で行なつているが，SP-I については未だ発表なく，他にも比較検討すべき成績の報告を見ない。次に，*in vitro* の実験の EHRLICH 腹水腫瘍細胞を種々の SP-I 濃度で温度および時間を変えて接触させた後マウスに移植して延命効果をみた生物学的判定では，先ず接触温度の点からみると，12.5 mcg/ml 以上の濃度においていずれの温度でも生存日数の延長を認め，特に 12.5～50 mcg/ml の高濃度において接触させた場合は 50 日で 100% の生存を得ている。3.12 mcg/ml 以下の濃度では温度に関係なくほとんど延命効果は認められなかつた。4℃ で接触の場合には，いずれの濃度及び接触時間でも 50 日の 100% 生存は認められず，50 mcg/ml で，3 時間接触の場合には 12.5%，6 時間接触で 37.5%，12 時間接触で 75%，24 時間接触で 50% の 50 日生存率を認めるのみである。15 ℃では，50 mcg/ml で 24 時間接触の場合にのみ 100% 生存が認められるが，3 時間，6 時間および 12 時間接触では 50 日生存率は 37.5% 以下である。37℃ で接触した場合は，12.5 mcg/ml の濃度で 3 時間もしくは 6 時間接触では 18.5% 以下であるが，12時間及び 24 時間接触では 100% の 50 日生存率を認め，50 mcg/ml では 3 時間，6 時間，12 時間および 24 時間のいずれの接触時間でも 100% の 50 日生存率を認めた。この成績から接触温度は 4℃ よりも 15℃，15℃ よりも 37℃ の場合のほうが生存日数の延長が認められた。

接触時間による影響は，4℃ で接触した場合には，3 時間，6 時間及び 12 時間には延命効果に差が認められず，24 時間接触の場合で 0.8 mg/ml 以上の濃度でのみ延命効果が認められた。15℃ で接触した場合には 3.12 mcg/ml 以下の濃度では抗腫瘍効果は認められず，12.5 mcg/ml 以上の濃度では接触時間に比例して延命効果を認めた。37℃ で接触した場合も同様に 3.12 mcg/ml 以下では延命効果を認めず，12.5 mcg/ml 以上では濃度および接触時間に比例して生存日数が延長しているが，24 時間接触の場合よりも 12 時間接触のほうが僅かに延命効果が高く認められた。

服部ら[31]はマイトマイシンCの最少有効濃度を知る目的で MH 134 腹水腫瘍を用いて同様の方法で実験を行なつているが，SP-I について行なわれた報告はない。

著者の行なつたこの 2 つの実験成績を比較すると，*in vitro* における SP-I の接触実験で，化学的判定を行なうと 0.05 mcg/ml の低い濃度でも 50% I.C の細胞増殖抑制がみられるが，生物学的判定法の成績では 3.12 mcg/ml 以下の濃度では接触温度をあげても，接触時間を延長しても抗腫瘍効果はほとんど認められず，12.5 mcg/ml 以上の濃度で始めて延命効果が認められた。以上のような *in vitro* の実験成績に基ずき，次に *in vivo* の実験，即ち腹水型と結節型の実験腫瘍に対する SP-I の治療効果を観察した。

EHRLICH 腹水腫瘍担癌動物では 25 mg/kg および 12.5 mg/kg 使用群で，対照群の平均生存日数 12.5 日に対して，それぞれ 14.1 日および 12.2 日で延命効果はほとんど認められず，また，Sarcoma-180 担癌動物でも生存日数は対照群より延長せず，また腹水増加の抑制も認められない。既に述べたとおり腹水腫瘍に対して抗腫瘍剤を腹腔内注入法で治療した場合は効果が高くなるべきであるが，本実験に用いた EHRLICH 腹水腫瘍及び Sarcoma-180 に対してはほとんど抗腫瘍効果は認められない。

腹水型腫瘍に対する SP-I の効果を追求した報告中，マウスの EHRLICH 腹水腫瘍および Sarcoma-100 を用いた実験報告例はみられず，Podophyllotoxin の誘導体である Podophyllotoxin-benzlidin-glucosid（以下，SP-G とする）を使用した EMMERNEGER[32] の実験成績を参考にすると，マウス腹腔内に EHRLICH 腹水腫瘍を接種して，7 時間後に SP-G 2×10 mg/kg または 2×20 mg/kg を腹腔内に注射し，以後同量を 10 日間連続した後，腹水量と腫瘍細胞数を計測したところ，20～40 mg/kg/day の使用量で明らかな治療効果を認め，また同量を 18 日間腹腔内注射してその延命効果をしらべたところ，2×10 mg/kg の場合も 2×20 mg/kg の場合も同様に 87.5% の延命効果を認めたと述べ，また，マウスの Leukenie 1210 を用いた実験では，SP-G 80 mg/kg 腹腔内注射で 14% 生存期間の延長を認めている。著者の実験は SP-I のマウス EHRLICH 腹水腫瘍及び Sarcoma-180 に対する延命効果を観察した成績なので被検薬剤と実験腫瘍の組合せに相違があるので比較は困難である。

皮下結節型腫瘍に対する SP-I の治療実験は EHRLICH 腹水腫瘍を他のマウスの皮下に移植して固型化したものと，Sarcoma-180 の腫瘍細片を他のマウス皮下に接種したものを用いた成績で，EHRLICH 腹水腫瘍の結節型では SP-I の 1 日使用量 50 mg/kg で 55.4%，それ以下の濃度の 25 mg/kg では 36.5%，12.5 mg/kg では 32.0% の腫瘍重量の増加抑制を認め，Sarcoma-180 では 50 mg/kg/day の使用量で 70.6%，25 mg/kg/day で 62.2%，12.5 mg/kg で 11.9% の腫瘍重量増加抑制を認めており，結節型腫瘍に対しては抗腫瘍性は高かつた。同様の実験を H. STAHELIN[29] および A. CERLETLI[30] はマウス Sarcoma-37 および Sarcoma-180，ラットの WALKER-Carcinosarcoma 及び吉田肉腫を用いて，SP-I および SP-G について行なつているが，腫瘍接種の翌日から SP-I，SP-G による治療を開始し，9 日後に腫瘍重量を計測したところ，マウスの Sarcoma-37 では 52～79%，Sarcoma-180 で 42～50%，ラッテの WALKER-Carcinosarcoma で 56～87%，吉田肉腫で 27～44% の腫瘍重量の増加抑制を認めたと報告している。著者の成績のほうがやや良いようである。

坂本[50]はトリウムで標識した SP-I-H^3 を EHRLICH 腫瘍皮下結節型の担癌動物に注入し，組織内の分布状態を放射能測定と autoradiography で検索している。組織内濃度は SP-I-H^3 の静脈内注入も腹腔内注入もほぼ同一の傾向で，15 分後最高値に達し，臓器別にみると肝に最も高く全注入薬剤の 15.98% が集中しており，腫瘍内への移行は 15 分値 2.96% であるが，6 時間後でもなお肝に 1.58%，腫瘍内に 1.26% が残存していると報告している。この成績から概算すると，SP-I 25 mg/kg (0.5 mg/mouse) 使用では腫瘍内濃度は 15 分後 15 mcg/g，6 時間後 6.5 mcg/g となり，50 mg/kg (1 mg/mouse) の使用量では 15 分後 30 mcg/g，6 時間後 13 mcg/g となる。著者の行なつた接触実験で生物学的判定法を行なうと，12.5 mcg/ml 以上の濃度で抗腫瘍効果の認められたこと，および EHRLICH 腫瘍の結節型を用いた治療実験で 25 mg/kg 使用で 36.5%，50 mg/kg 使用で 55.4% の腫瘍重量の増加抑制が認められたことと，坂本の腫瘍内濃度の成績とを併せ考えると一致した点が多い。

腫瘍細胞に与える形態学的変化については，1964 年 H. STAHELIN および A. CERLETLI はニワトリの線維芽細胞を組織培養し，SP-I を種々の濃度で接触して有糸分裂阻止作用と，休止期細胞に対する障害効果を検討した結果，SP-I は休止期の細胞に対しては障害作用を示さず，有糸分裂の中期に選択的に阻止作用が認められると報告した。また，*in vivo* における有糸分裂阻止作用を追求する目的で，吉田肉腫を皮下に接種したラットの腹腔内に SP-I を注入した実験を行ない，70～140 mg/kg の使用量で明らかな有糸分裂の阻止を認めたと報告している。次に犬を用いた実験では，SP-I 10，20，50 mg/kg/day を 13 週間静注した後の睾丸の組織像は，精粗細胞の段階での精子生成の停止を示し，卵巣においては肥厚した濾胞上皮に有糸分裂の阻止と細胞核萎縮が認められたと報告している。

現在まで，細胞の染色体の分裂機能を電子顕微鏡で仔細に観察した発表は少なく，最近アミーバーについての報告[33]があるが，染色体が微小で特殊染色となるため分裂機能を説明するには不充分であつた。1962 年安澄，杉原[34]により腹水癌細胞の分裂過程についての電子顕微鏡像による詳細な研究が発表され従来は不明であつた点が明らかにされつつある。しかし，抗腫瘍剤と接触させた腹水癌細胞の分裂過程を電子顕微鏡で追求した報告例はまだみてない。

著者の実験では，SP-I 無投与群の場合に種々の細胞分裂過程を認めたのに反し，SP-I 接触細胞群の電子顕微鏡像では，50 mg/ml から 0.2 mg/ml までの各段階の濃度では分裂過程の像は認められず，すべて静止核の状態で認められ，12.5～0.8 mcg/ml の低濃度では核膜および仁の不明となつたものが少数認められた。即ち，大部分の細胞が静止核の状態であり，分裂途上の像はほとんど見当らなかつた。したがつて H. STÄHELIN および A. CERLETLI らが報告しておるような有糸分裂中期に，特異的に作用している分裂阻止像は確認出来なかつた。

SP-I の臨床使用は HUBACHER[35], DEUCHER[36], ECKMANN[37], FALKSON[38], LARSEN[39], GRÜTTERS[40], BOFFI[41], SATTLER[42], NEWTON[43], BURGI[44], STAMM[45], AQUILINI[46], SHANTA[47], NEIGER[48], および和田[49] らの報告がみられ，HUBACHER は乳癌の肺および骨への転移巣に良好な反応を呈したと報告しており，DEUCHER は主として外科手術との併用により SP-I および SP-G の効果を検討し，185 例中 6 例に術後経過良好で一部の例では転移巣の縮少が認められ再発もみられず明らかに有効と報告し，ECKMANN は姑息的手術患者 100 例に使用し 7 例に 1 年以上の，また，11 例に 6～12 カ月におよぶ症状緩解の傾向を認めたと報告している。そのほか，放射線と SP-I との併用[40]，単純投与での耐容量の検討等の報告がある[37,39]。また，SP-I の副作用については極めて少ないとされており副作用を認める場合は主として下痢，悪心，嘔吐などの胃腸障害があげられ，特に骨髄系に対する障害はほとんどみられないと報告されている[39]。

吾々の臨床作用症例 37 例のうち根治手術と併用した症例は 4 例であるが，癌の原発臓器も異なり，症例数も僅かであるため SP-I 併用の効果を判定することは全く不可能である。根治的手術不能で試験開腹および姑息的手術に終つた 19 症例のうち，肺転移病巣を認めた 1 例では SP-I 総量 7,800 mg 使用により，1 年 5 カ月まで生存した症例を経験しているが，他の 18 症例は 3 カ月以内に死亡している。この群については，腫瘤の大きさの減少，血液所見および臨床症状の改善，体重の増加などを基準に効果判定を行なつたが，吾々が経験した有効症例は 1 例のみである。

しかし，HUBACHER[35] の報告によると，最も良好な成績を示したのは原発腫瘍を有する肺，骨への転移病巣であつたと述べており，吾々の有効症例と一致している。再発症例 14 例では，SP-I 使用開始後全例 3 カ月以内に死亡しており，有効症例は認められなかつた。

ECKMANN[37] および FALKSON ら[38] を含めた多くの報告例や，著者が経験した臨床例からも，副作用，特に骨髄系への障害がきわめて少ない。LARSEN ら[39] の報告によると，症例により最大耐容量 1 日 25～35 mg/kg の使用が可能であると述べ，また，GRÜTTERS[40] および BOFFI[41] らの報告によつても，有効と判定されたものは 1 日使用量 800～2,000 mg の比較的大量を使用している。一方，坂本[50] の実験成績による SP-I の腫瘍内濃度，著者の行なつた基礎実験中 EHRLICH 腫瘍結節型に対しては 50 mg/kg 使用で 55.4%，Sarcoma-180 結節型に対しては 70.6% の抗腫瘍性を認め，且つ，比較的長時間作用させた時にその効果が高かつたことなどを合せ考慮すると，SP-I の使用方法，特に使用量，使用期間等についてはなお検討の余地があると思われる。

VI) 結　　語

教室では，抗腫瘍剤 SP-I について，各方面の臨床的実験的研究を行なつている。著者は，この研究の一環として，担癌動物における SP-I の抗腫瘍性を，実験腫瘍として吉田肉腫，EHRLICH 腹水腫瘍および Sarcoma-180 を用い，*in vitro* および *in vivo* で検索し，臨床的に SP-I を使用し，次の結果を得た。

（1） *In vitro* の実験で，吉田肉腫に対する抗腫瘍性は，SP-I 濃度 0.00125 mcg/ml 以上で認められ，0.05 mcg/ml で 50% の細胞増殖抑制を認めた。EHRLICH 腹水腫瘍に対する抗腫瘍性は，12.5 mcg/ml 以上の高濃度で接触した後移植した場合に延命効果を認め，接触条件としては，37°C 12 時間接触が最もよかつた。

（2） *In vivo* の実験で，EHRLICH 腹水腫瘍に対しては，延命効果はほとんど認められず，Sarcoma-180 腹水型腫瘍に対しても，軽度の延命効果しか認められず，この両者には差を認めなかつた。

EHRLICH 腹水腫瘍の結節型に対しては，SP-I 50 mg/kg の使用で 55.4%，Sarcoma-180 の結節型に対しては，50 mg/kg の使用で 70.6% の腫瘍重量の発育抑制を認めた。

（3） 細胞に与える形態学的変化は，*in vitro* の実験で，SP-I 濃度 50 mg/ml より 0.8 mcg/ml までの間で核分裂阻止像を認めたが，分裂過程の特定時期にのみ作用することは確認できなかつた。

（4） 臨床例では，使用症例数は 37 例で，根治手術後再発防止の目的で使用した症例は 4 例，試験開腹および姑息的手術に終つた症例には 19 例，根治手術後の再発には 14 症例使用し，そのうち 2 例に他覚的改善がみられた。全症例 37 例中 11 症例に副作用として消化器障害を認めたが骨髄系の障害は認められなかつた。

稿を終るに臨み，終始懇切なる御指導御校閲を賜わつた石山俊次教授に深甚の謝意を表するとともに，御指導をいただいた微生物化学研究所 竹内富雄博士ならびに

第三外科学 坂部助教授および教室員各位に感謝します。

本論文の要旨は，第 14 回日本化学療法学会において発表した。

文　献

1) SANDBERG *et al.* : J. Nat. Cancer Inst. 19, 1 (1957)
2) POOL, E. H. *et al.* : Am. J. Cancer 21, 99(1934)
3) Seal, S. H. : Cancer : Am. J. Cancer 12, 590 (1959)
4) 宇野広治：最近医学 13；184（昭和 33 年）
5) 佐藤春郎ら：癌の臨床 6；3(1960)
6) 宗像秀夫：腫瘍転移の研究，Ⅶ，血中癌細胞の転帰に関する実験。福島医誌 1281(1961)
7) 林紀予子：血行性転移の成立機序に関する実験的研究，抗酸菌病研究所雑誌 17；128(1965)
8) 黒川利雄：癌化学療法の現況と将来，癌・化学療法，癌の臨床別冊，医歯薬出版，第 1 版 12(1966)
9) 中井準之助ら：組織培養，基礎と応用 41(1965)
10) 東昇：Palade の処方，医学生物学用電子顕微鏡学，文光堂，第 1 版 57(1964)
11) LUFT 氏法；JBBC, 9；409(1961)
12) BENTLEY, R. : Pharm. J. Trans. (London) 3; 456(1861)
13) KAPLAN, I. W. : New Orleans Med. Surg. J. 94；388(1942)
14) SULLIVAN, B. J. *et al.* : Science 105；433(1947)
15) PODWYSSOTZKI, V. : Arch. Exp. Path. U. Pharmakol. 13；29(1880)
16) STOLL, A. *et al.* : J. Amer. Chem. Soc. 76; 3103(1954)
17) 秦藤　樹，梅沢　巌：抗癌剤のスクリーニング，癌・化学療法，癌の臨床別冊，医歯薬出版，第 1 版；35(昭和 41 年)
18) HARISON, R. : Observations on the living developing nerve fiber. Proc. Soc. Exp. Biol. 4; 140(1907)
19) CARREL, A. & M. T. BURROWS ; Cultivation of adult tissues and organs outside the body. J. Amer. Med. Ass. 55；1379(1910)
20) GEY, G. O. *et al.* : Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Res. 12；264 (1952)
21) EAGLE, H. : Progation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. Proc. Soc. Exp. Biol. 89：362(1955)
22) FRISH, A. W. *et al.* : A human epithelium-like cell (Maben) derived from an adenocarcinoma of the lung. Amer. J. Clin. Path. 25：1107(1955)
23) OSSGOD, E. E. & J. H. BROOKE : Continuous tissue culture of leucocytes from human bloods by application of gradient principle. Blood 10：110(1955)
24) MC INTIRE, F. C. & M. F. SMITH : A new clinical method for measuring cell populations in tissue cultures. Proc. Exp. Biol. 98：76～79 (1958)
25) HORI, M. *et al.* : Inhibitory effect of antitumor substances on growth and glycolysis of Yoshida rat sarcoma cell. J. Antibiotics, Ser. A 16：1～6(1962)
26) T. HATA & I. UMEZAWA：抗癌剤のスクリーニング，癌の臨床別冊，癌・化学療法，医歯薬出版，第 1 版，38(1966)
27) T. HATA & I. UMEZAWA：抗癌剤のスクリーニング，癌の臨床別冊，癌・化学療法，医歯薬出版，第 1 版，37(1966)
28) T. HATA & I. UMEZAWA：抗癌剤のスクリーニング，癌の臨床別冊，癌・化学療法，医歯薬出版，第 1 版，37(1966)
29) STÄHELIN, H. *et al.* : Schweiz. Med. Wschr. 94：1490(1964)
30) CERLETTI, A. *et al.* : Actualites Pharmacol. 12：103(1959)
31) 服部孝雄：癌の化学療法，臨床と研究 40(12)：1894(1963)
32) EMMENEGER, R. *et al.* : Arzneim. Forsch. 11; 327(1961)
33) ROTH, L. E & DLANIELS. E. W. : Electron microscopic studies of mitosis in Amebae, Ⅱ, The giant Ameba pelomyxa Carolinensis. J. Cell Biol. 12：57～78(1962)
34) YASUTOMI, G. & SUGIHARA, R. : Fine structure of chromosomes in the mitotic prophase of ascites tumor cells. Nature 196；395～396 (1962)
35) HUBACHER, O. : Radiol. Clin. 31；194(1962)
36) DEUCHER, F. : Symposium über Zytostatika. Spiez, Feb. 1；14(1962)
37) ECKMANN, L. : Schweiz. Med. Wschr. 94；1690 (1964)
38) FALKSON, G. *et al.* : S. A. Journal of Radiology, 2；1～7(1964)
39) LARSEN, V. *et al.* : Paper presented at "Symposium sobre mitosis e inhibidores en la quimioterapia oncologica" Madrid, June 5～6 (1964)
40) GRÜTTERS, L. : Mitteilung der Gesellschaft zur Bekampfuny der Krebs Krankheiten Nordrhein-Westfalen 3(3)；417(1964)
41) BOFFI, L. : Paper presented at "Symposium sobre mitosis e inhibidores en la quimioterapia oncologica" Madrid, June 5～6(1964)
42) SATTLER, A. *et al.* : *Ibid.*
43) NEWTON, K. A. : *Ibid.*
44) BURGI, H. *et al.* : Praxis 53(25)；886(1964)
45) STAMM, O. : Münch. Med. Wschr. 106(1)；41 (1963)
46) AQUILINI, E. : Minerva Ginecologica 16(23)；996(1964)
47) SHANTA, V. *et al.* : "Chemical Sensitization in Radio-Therapy of Oral and Cervical Carcinomas"（スイス・サンド社社内データ）

48) NEIGER, M. : Pract. Oto-rhino-laryng. 26 ; 268 (1964)
49) 和田武雄；単独全身連続投与法，癌の臨床別冊，癌・化学療法；医歯薬出版，第1版，167(1966)
50) 坂本俊雄；日大医学雑誌 26(6)；10(1967)
51) 秦 藤樹，梅沢 巌；抗癌剤のスクリーニング，癌・化学療法，癌の臨床別冊，医歯薬出版，第1版，36，1966

EXPERIMENTAL AND CLINICAL STUDIES ON THE ANTI-TUMOR AGENT PODOPHYLLIC ACID-ETHYL HYDRAZIDE

TOSHIO KOIKE, M. D.
The 3rd Department of Surgery, Nihon University School of Medicine

In 1861 BENTLEY reported the effectiveness of podophyllin on skin cancer, and in 1942 KAPLAN used this substance on condyloma acuminata and also ascertained its effectiveness. The mechanism of its action was attributed by SULLIVAN *et al.* in 1947 to the impediment of the mitosis of the cells in its metaphase.

In the present studies, the anti-tumor agent ethyl hydrazide of podophillic acid (SP-I) was administered to the animals with such experimental tumors as YOSHIDA's sarcoma, EHRLICH's ascites carcinoma and sarcoma-180. and the antitumor effect of the substance *in vitro* and *in vivo* was explored together with a study on the clinical application of SP-I. The results obtained were as follows :

1. In the experiments *in vitro*, the anti-tumor effect of SP-I on YOSHIDA's sarcoma was recognized at a concentration of 0.00125 mcg/ml and above, and its inhibitory effect on the growth of the cells reached 50% at a concentration of 0.05 mcg/ml. Its anti-tumor effect on EHRLICH's ascites carcinoma was not remarkable so as to allow the survival of the animal until its concentration reached 12.5 mcg/ml and above. The survival of the animal was most effected by keeping SP-I in contact with the tumor at 37°C for 12 hours.

2. In the experiments *in vivo*, SP-I had little life prolonging effect against a sarcoma-180 of the ascites type. As to the tumors of a solid type, it was noted that the increase of the tumor weight was inhibited up to 55.4% in the case of EHRLICH's solid ascites carcinoma and 70.6% in the case of solid sarcoma-180 at a dose level of 50 mg/kg body weight.

3. As to the morphological changes suffered by the cells, inhibition of karyokinesis was observed at SP-I concentrations between 50 mg/ml and 0.8 mcg/ml.

4. SP-I has been clinically applied to a total of 37 cases of cancers of the stomach, esophagus, liver *etc.* over five years and objective improvement was attained in 14 cases of postoperative cancer recurrence and 2 cases still under administration.