

制癌剤の細胞分裂および染色体に及ぼす影響について*

渡 辺 哲 弥**

日本大学大学院医学研究科
外科学Ⅲ専攻(指導 石山俊次教授)

(昭和 45 年 1 月 30 日受付)

目 次

- I 緒 言
- II 実験材料ならびに実験方法
 - 1 実験動物
 - 2 実験方法
 - a 細胞分裂頻度の観察
 - b 染色体
 - 3 使用薬剤
 - a 使用量
 - b 注入法
- III 実験成績
 - 1 対照群について
 - 2 薬剤注入後の成績
- IV 総括および考按
- V 結 論

I. 緒 言

癌の治療に対して化学療法が選ばれる最大の理由は、外科的或いは放射線療法が、局所的であり、種々の制約があるのに対し、化学療法は、全身的であり、治療上の制約がほとんど無いことである。

このような観点で癌治療を考えても、現実には、手術、放射線、制癌剤(化学療法)の順に選択されており、その評価は2次的な場合が多い。しかし術後の再発対策や、手術放射線療法の不可能な例の治療は、化学療法が主役を演ずることになる。そこで副作用を少なくして如何に癌の発育を阻止するか、薬剤の選択、投与量、期間、間隔およびその投与経路などの検討が急がれている。しかし薬剤の作用機序などが、研究され、如何に解明されても、個々の薬剤に対する癌細胞の感受性は、個々に異なっており、別に調べてみる必要がある。

正常体細胞は、必要に応じて失われた細胞を補充する程度にしか増殖してないが、癌細胞は、宿主の制御機構とは関係なく分裂増殖しており、この点をうまく利用した制癌剤の使用法が期待されている¹⁾。ここに癌細胞の世代時間や染色体に関する研究の重要性が指摘され

る。BOVERI(1914)らを始めとする初期の研究者達は、核分裂異常が染色体の異常をもたらし、高倍数性細胞の出現が、癌細胞における共通現象であることを重視した。その後マウスやラットの可移植性腹水腫瘍の確立によつて、1951年牧野は腫瘍細胞における種族細胞説を打立てて、腫瘍細胞の中には、その増殖の中心となる細胞群が存在し、その染色体構成は、腫瘍の性状を規定するものであることを突きとめた。このような現象はその後、外村および佐々木(1957)、俣野および牧野らに依つて確められ、腫瘍細胞の変化に付随して腫瘍の性状も変ることが見出された²⁾。以来、実験動物腫瘍のみならず人癌の細胞の染色体を調べた報告が、数多くなされて来たが、一般に、solid tumorからの標本作成は難かしく、明確な病理学的所見との関係を究明することは困難である³⁻⁵⁾。そこで solid tumor に較べて標本作成が容易な胸腹水などの effusion を用いた研究が進められてきた⁶⁻¹²⁾。近年になつて染色体研究技術の進歩に伴ない、消化管などの solid tumor では鮮明な分裂像が得られるようになり^{13,14)}、多くの腫瘍細胞の染色体には数的、構造的変化が伴ない、それぞれの腫瘍にはそれぞれの同一腫瘍に特有な染色体型をもっていることが明らかにされてきた。しかし、染色体異常と部位、病理組織の型、悪性度、浸潤度などのあいだには強い相関関係は見られていない¹⁵⁻¹⁸⁾。

現在、人癌の染色体研究は、盛んに行なわれているが、個々の症例について、染色体およびその薬剤感受性を調べて治療を開始するところまでには至っていない。人癌には真の意味での対照例はなく、また実験的な方法が取れない上、研究の material 収集さえなかなか困難である。そこで、本研究では人癌細胞に類似した動物の実験腫瘍を利用し、人癌適用時の効果を持つものとして¹⁹⁾、実験的な研究を行なつた。使用した制癌剤は現在市販されているもので、マウスの腫瘍細胞について、最も効果を発現し易い投与方法を使用して、腫瘍細胞における細胞学的な動態と染色体の変化、異常細胞の出現率を観察し、薬剤との接触に依る細胞変化および延命効果について、検討を試みた。

* 本論文の要旨は第 16 回日本化学療法学会東日本支部総会(昭和 44 年 11 月 7 日)において発表した

** 大学院学生 第 38 回卒

II. 実験材料ならびに実験方法

1. 実験動物

実験には、生後 4~6 週、体重 18~22 g(平均 20.7 g) の DD 系雄マウスを使用した。実験動物には、微生物化学研究所から譲渡を受けた EHRlich ascites tumor (継代 126 代)を使用した。腫瘍の移植は、各マウス腹腔内に移植後 12~14 日目の細胞を 7×10^6 個生食水 0.5 ml に浮遊して注入した。薬剤の注入は、1 群 3 匹ずつとし、移植後無処置のマウスを対照とした。

2. 実験方法

a 細胞分裂の観察……押しつぶし法

継代移植後の腹水を 25 guage の注射針を用いて採取し、最少必要量の 1 滴をスライドガラスの上ののせ、30% acetic dahlia 液と混和、2~3 分後カバーガラスをかけ、親指で強く押しつぶして、周囲をバルサム・パラフィンで封ざると、約 1 カ月間の観察が可能であった。観察には光学顕微鏡 (1,000 \times) を用い、静止期の細胞を約 1,000 個数える間に認められた分裂細胞の各期細胞数を記録し、静止期および各期の細胞数を集計し、総観察細胞数に対する各期の percentage を求めた。観察は、各期の境界判定を同一にするため、1 人で行ない、細胞分裂の各期のうち初期および後期の識別は (photo A-H) に示すような基準のもとに行なつた。

b 染色体標本作成……air-drying 法²⁰⁾

腹水約 0.25~0.5 ml を採取、Hunks 液で洗い低張液処理後、アルコール氷醋酸 (3:1) 液で 2 回固定を行ない、air drying 法によつて標本作製し、Giemsa 染色を行なつて観察に供した。なお対照群については、腹水採取後コルヒチンを添加して約 3 時間培養を行なつたが、実験群に対しては薬剤注入後の染色体観察にコルヒチンを使用せず、採取後直ちに標本作成した。

3. 使用薬剤

a 使用薬剤名および量

5-Fluorouracil (以下 5-FU と略す) 25 mg/kg (500 mcg/mouse)。Mitomycin C (以下 MMC と略す) 2 mg/kg (40 mcg/mouse)。

b 使用法

生食水 0.5 ml 中に上記濃度の薬剤が含まれるように稀釈し、27 guage 針で腹腔内に注入した。注入法は次の 6 種である。

- 5-FU 群……移植第 4 日目に 5-FU 1 回注入
- MMC 群……移植第 4 日目に MMC 1 回注入
- 5 FU-5 FU 群……5-FU 注入後 2 日目に 5-FU 注入 (移植 6 日目)
- 5 FU-MMC 群……5-FU 注入後 2 日目に MMC 注入 (移植 6 日目)

e) MMC-MMC 群……MMC 注入後 2 日目に MMC 注入 (移植 6 日目)

f) MMC-5 FU 群……MMC 注入後 2 日目に 5-FU 注入 (移植 6 日目)

5-FU および MMC 単独 1 回注入群は注入後 30 分あるいは 1 時間後から 96 時間までの分裂頻度と、5 時間から 10 日まで染色体変化とを観察した。5 FU-5 FU 以下の各群は、移植 4 日目の初回注入後 2 日目に 2 回目の注入をしたのであるが、3 時間後から 96 時間まで分裂頻度を、1 日後から 8 日まで (MMC-MMC 群は 4 週まで) 染色体を観察した。

III. 実験成績

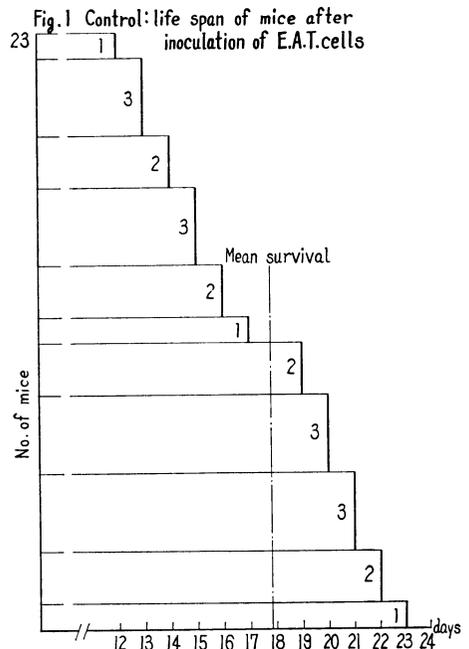
1. 対照群について

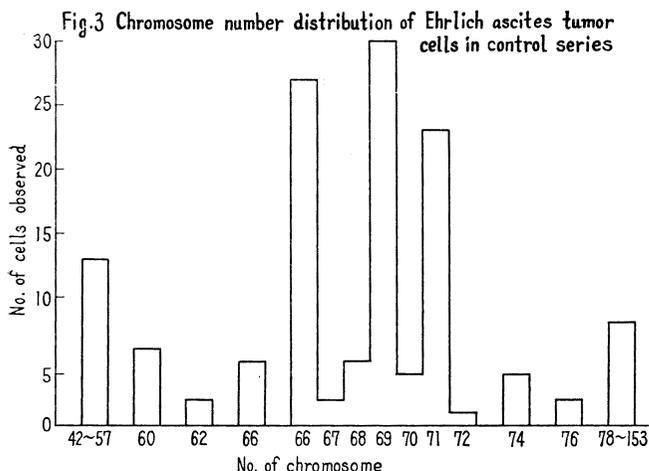
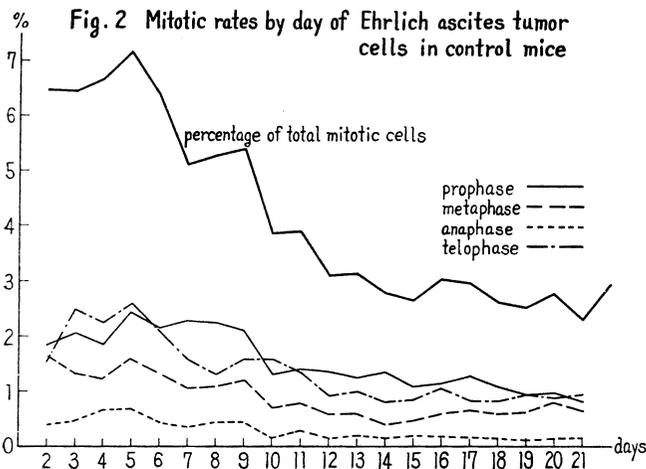
a) 体重の変化

移植直前にまず体重を測定しておき、さらに 0.5 ml の生食水に浮遊した細胞を移植後 4 日目に再び体重を計つた。この作業は継代移植時に代々 5 匹ずつについて行ない、体重の減少したもの、異常に増加したものを除いた 53 匹についてみると、平均の体重増加量は、1.35 g である。角谷²¹⁾に依ると、体重増加 1 g 当りの腹水量は 0.9 ml と報告されているので、腹水増加量は 1 匹平均 1.22 ml となる。

b) 生存日数

実験時のものを含めて、継代ごとに観察した 23 匹についてみると、早いものでは 12 日目、最も長く生存したものでは 23 日で、平均生存日数は 17.8 日である





(Fig. 1).

c) 分裂頻度

移植後2日目から、3匹のマウスから腹水を採取し、各期細胞を前述の基準に従がつて観察分類した。分裂細胞の頻度は平均値で見ると、一般に高値を示したが (Fig. 2)、5日目には最も高く (7.25%)、以後段階的に低下し、15日目には 2.61% という低値を示した。しかし、さらに延命したものでは、再び上昇する傾向を示すが、その場合でも anaphase および telophase の頻度は下降する。全般的に見て、移植後6日までに高率を示し、9日目に prophase を主体として再び活発となり、約2週間目頃が最も分裂頻度が低下する。

d) 染色体

移植後7日、11日、23日目の対照群マウスの腹水を採取、7日目のものについてはコルヒチン添加後標本を作成し、133個の中期

核板像について、調査した。染色体数の変化は 42 から、153 までの広範囲にわたっているが、66 のもの 27 個 (20.3%)、69 のもの 30 個 (22.6%)、71 のもの 24 個 (18.0%) でこれから3種類の細胞群が 61% を占め、いずれも次中部着糸型の2次狭窄 (secondary constriction) を有する大型の標識染色体 (marker chromosome) が1個認められ、これから3種類の細胞群は stem line cells と推定された (Fig. 3, photo 1)。なお、この marker chromosome は、染色体数 66、69、71 以外の細胞でも認められることが多い。Marker chromosome 以外はすべて端部着糸点 (acrocentric) をもつ染色体で、中には minute あるいは fragment の見られるものもあつた Endoreduplication²²⁾ を示す細胞は 133 個中 2 個 (1.5%) に認められた。11日、23日目にはコルヒチンを使用せず、異常染色体²³⁾の出現頻度を調べた (photo J. K. L. M. N)。

11日、23日目とも約10%の細胞に sticky, chromatid gap & chromatid breaks, chromosomal exchange のような異常を一部に示す染色体を有していた。

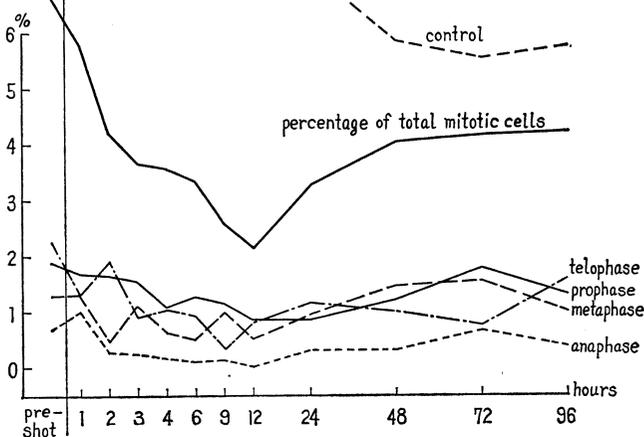
2. 薬剤注入後の成績

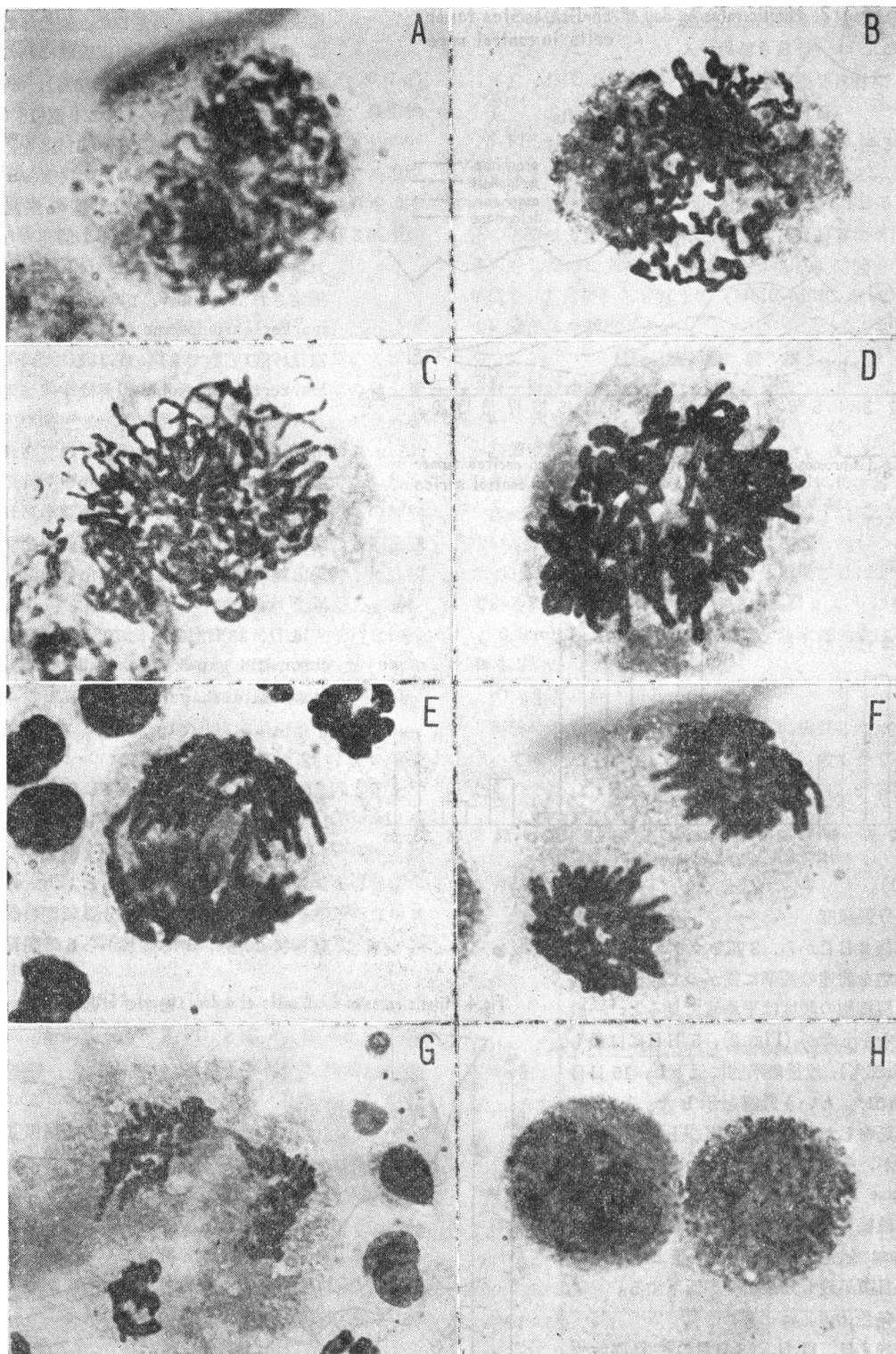
a) 移植後第4日目 5-FU 500 mcg/mouse 1回注入群

i) 分裂頻度

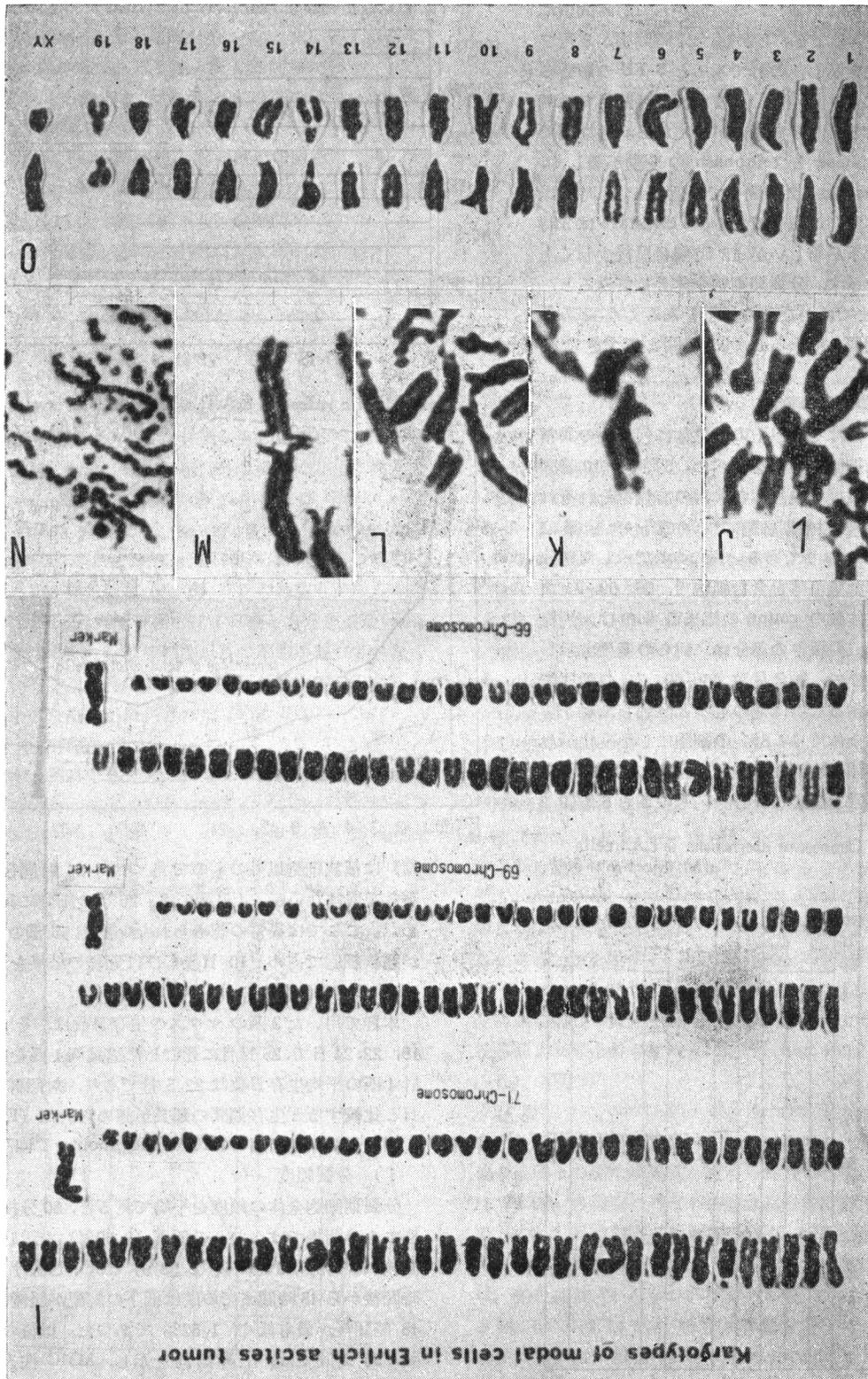
3匹の平均について見ると (Fig. 4)、腹腔内薬剤注入後2時間から分裂頻度の低下が目立ち (4.20%)、3時間目から6時間目にかけて

Fig. 4 Mitotic rates of E.A.T. cells at a dose (level) of 5FU 25mg/kg.





A & B : early and late prophase, C & D : early and late metaphase, E & F : early and late anaphase, G & H : early and late telophase, I : karyotypes of modal cells in Ehrlich ascites tumor (M ; Marker), J : sticky, K : chromatid gap, L : chromatid breaks, M : chromosomal



exchange, N : marked destruction, O : karyotypes of normal cell observed after 4 weeks in MMC-MMC groups.

て低下の度度が衰え、9時間から12時間頃には2.16%となる。しかし、24時間頃から再び上昇傾向を示し、これで見ると5-FUの影響の持続性は余り長くない。また96時間目では対照群の第8日目と有意差がなくなる。各期別ではmetaphaseとtelophaseの変動が著しく、metaphaseは12時間までの低下と24時間以後の上昇傾向が顕著である。Telophaseは3時間目に低下が著しいが12時間目以後少く上昇傾向を示す。分裂期細胞全体としてみると、12時間までにかかなりの低下をみるようであるが、各期個々にみると、96時間まで大きな変動はない。

ii) 染色体の変化

一部またはそれ以上の染色体に何らかの異常を認めた細胞の推移を調べた。5時間、10時間、1、4、10日後の染色体の異常の有無をそれぞれ40~65の分裂中期細胞について調べた結果はFig. 5のとおりである。図のdotで示した部分が、異常な染色体を含む細胞で、66、69、71などの染色体数のcountの出来るものは、別枠で示した。白抜き部分は、何らの変化も示していないもので、染色体数66、69、71の種族細胞と思われるものは他のものと区別した。5時間後では全体で14.8%の細胞にしか変化がなく、10時間後でも、65個を観察して10個の細胞に異常を認め(15.4%)、そのうち6個(9.2

Fig.5 Chromosome aberrations in E.A.T. cells after injection of 5FU

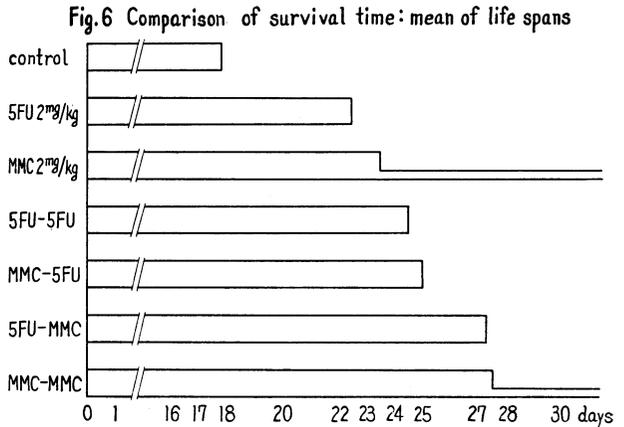
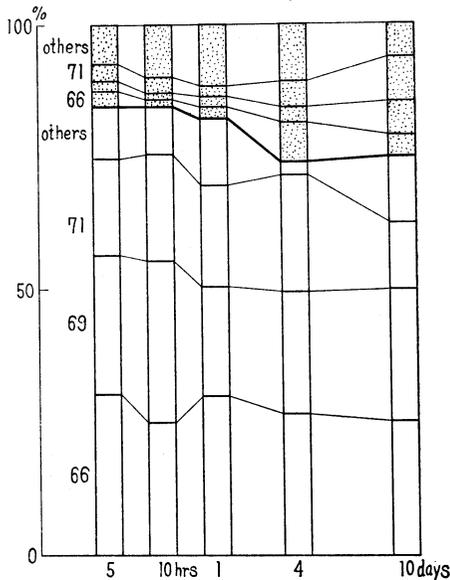
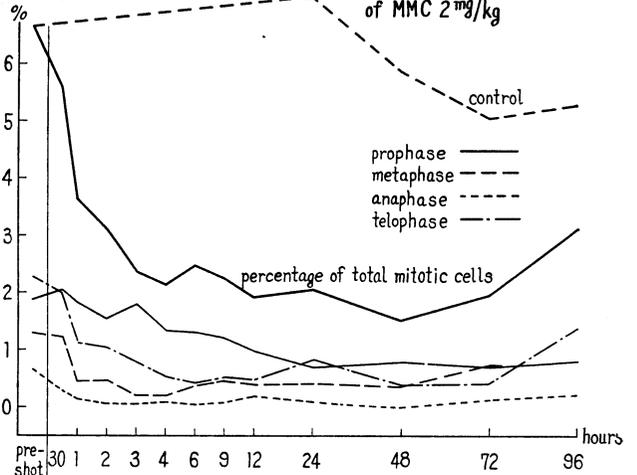


Fig.7 Mitotic rates of E.A.T. cells at a dose level of MMC 2mg/kg



%)は種族細胞以外のものであつた。24時間後では顕著な差異はないが、4日後には、25%の細胞に異常を認めた。ここでは異常の認められない細胞45個のうち43が種族細胞で占め、10日後もほぼ同様の結果を示した。

iii) 生存日数

本群で用いた3匹のマウスの生存日数は、それぞれ19、22、24日で、25日目に死亡した追試例1匹を加えた。計4匹の平均生存日数は22.5日であり、対照群の17.8日と比較すると生存期間の延長が認められた (Fig. 6)。

b) 移植第4日目 MMC 40 mcg/mouse 1回注入群

i) 分裂頻度

分裂期細胞全体の頻度を平均で見ると、30分後から軽度で1時間後ではかなりの低下(3.60%)を示し、2時間後(3.1%)、3時間後(2.38%)と低下し続けるが、4時間後から48時間までの間は低下の勾配が緩慢になる。48時間後が最も低く、1.52%であつた。以後の72時間、96時間では、上昇傾向を示し、MMC注入後2時間目の値とほぼ同様になる。96時間の値は、この群の

2匹についてのみであるが、24時間 1.94%、48時間 1.75%と低下傾向を示していた。Prophaseについてみると注入後1時間後から徐々に低下の傾向を示すが、96時間では僅かに上昇傾向をみせた。

Metaphase, anaphaseとも同様の傾向を示すが、telophaseはこの傾向が極端で、1時間目に1.12と急激に低下し、6時間後で0.43%となるが、24時間後には0.8%と少し回復を見せ、72時間(0.41%)から96時間(1.34%)へとかなり上昇が急である(Fig. 7)。

ii) 染色体

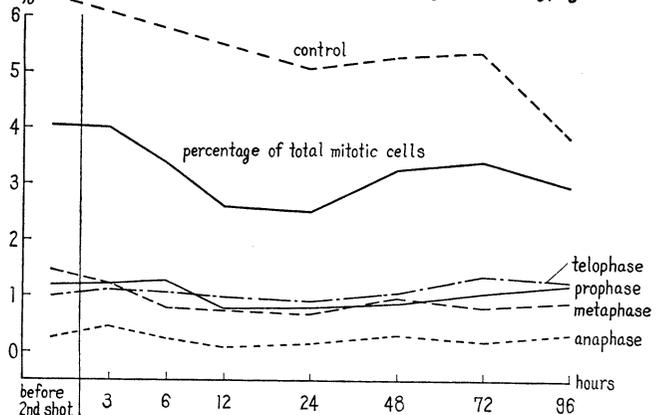
5時間には53個の観察細胞中26個(49.1%)に異常を認め、24時間後も少し増加してはほぼ半分が異常を示したが、種族細胞以外の細胞にとくに異常染色体が多い。異常はchromatid gapおよびbreaksが殆んどでstickyは少なく、24時間後にはchromosomal exchangeが出現してくる。4日後には7.5%の細胞に影響があり、染色体数66, 69, 71の細胞もかなりの影響を受けている。10日後では4日後と有意差がないが、影響を受けていない種族細胞以外の細胞が観察されなくなっている。この時期になると染色体数40の全体として形の小さな細胞が散見された(Fig. 8)。

iii) 生存日数

3匹中2匹はそれぞれ21, 26日目に死亡したが残る1匹は2カ月を過ぎてもなお生存している。

c) 5-FU 25 mg/kg 注入 48時間後 5-FU 25 mg/kg

Fig. 9 Mitotic rates of E.A.T. cells at a dose (level) of 5FU 25mg-5FU 25mg/kg



注入群

i) 分裂頻度

2回目の注入後、3時間目から腹水を採取、鏡検したが、5-FU 25 mg/kg 初回注入後48時間目と変わりなく、6時間後から分裂期細胞全体の低下がみられ、12時間目2.58%から24時間目2.51%と低くなるが、48時間目では3.25%と上昇傾向がみられた。96時間目では2.93%で、対照の10日目(3.87%)と有意差がなくなる。内訳を見ると、Prophaseの変動は大体mitotic cells全体の変化と似ている。すなわち、12時間から48時間にかけて0.78%, 0.79%, 0.88%と低いが72時間、96時間では1.20%と上昇の傾向を示す。

Metaphaseは処理前には最も高頻度を示していたが、6時間後に1.45%から0.79%へと低下し、48時間目から少し回復するが(0.98%)、そのままの状態経過する。Anaphaseは3時間目では変化がないが、12時間目では0.1%と他の期の細胞の出現頻度よりいちじるしく低い値を示す。しかし間もなく回復し、48時間で0.32%、96時間で0.83%であった。Telophaseは全経過を通じて変化を示さず、72時間目より、第2回投与前よりも上昇の傾向を示した(Fig. 9)。

ii) 染色体

24時間目にchromatid gap & breaksなどの異常を有する細胞はほぼ半数の49.1%に出現し、種族細胞と他の細胞との間には差異が認められなかった。4日目では79.6%の細胞に異常が観察され、特に種族細胞以外のものに、異常細胞の出現率が高く、完全に破壊したと考えられる細胞が1個(2.0%)見られた。種族細胞中では、染色体数71のものが9個中6個、69では11個中8個、66では14個中10個が影響を受けており、影響を受けていない細胞の2倍以上であった。8日目になると完全に破壊された細胞は観察されなくなり、全体で

Fig. 8 Chromosome aberrations in E.A.T. cells after injection of MMC

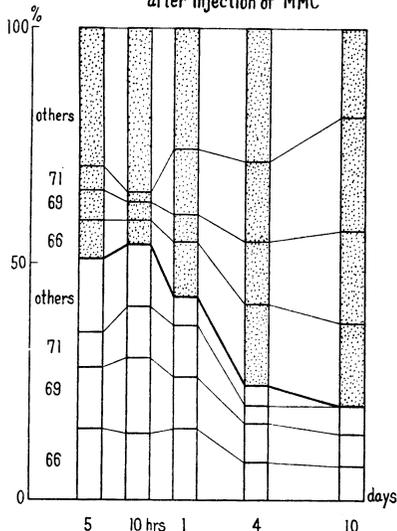
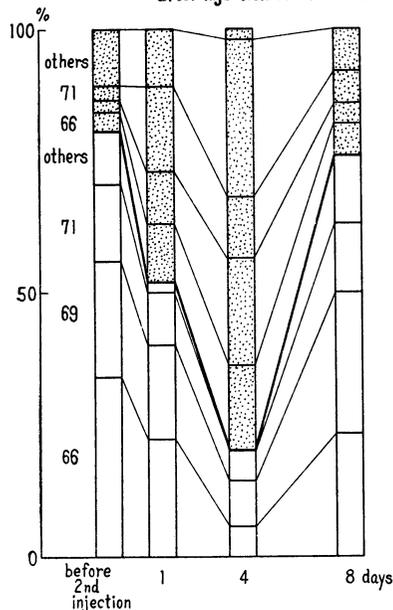


Fig.10 Chromosome aberrations in E.A.T. cells after injection of 5FU-5FU



12% の細胞に異常を認めるだけとなり、薬剤注入しない 10 日前後の対照群での異常染色体出現率と差がない (Fig. 10)。

iii) 生存日数

4 匹について観察した結果、生存日数は 19, 22, 25, 37 日で、平均 24.5 日となり、対照群の 17.8 日に較べて生存日数が認められた。

d) 5-FU 25 mg/kg 注入後 48 時間目 MMC 2 mg/kg 注入群

i) 分裂頻度

5-FU 25 mg/kg 注入後 48 時間の分裂細胞全体の頻度は 4.03% であるが、MMC 2 mg/kg を追加注入すると 3 時間目から急激な低下 (2.30%) が見られた。

それから 6, 12 時間と少しく低下傾向をたどり、24 時間では 1.1%, 48 時間では 1.23% と最低値を示した。72 時間、96 時間では 1.54% で僅かながら細胞分裂の回復傾向が窺われた。しかしその時点に相当する対照群の 10 日目の分裂頻度 3.87% と比較すると、極めて低値を示している。Prophase については、注入後 1 時間から多少影響を受け始め、徐々に減少し続けて、48 時間では 0.1% と極端に少ない。72, 96 時間後に少しく上昇するが、0.3% に止つたままである。Metaphase は全般に他のどの期よりも多くを占めており、24 時間に最も低くなるが (0.46%), 他の期のものよりは高い。96 時間目には 0.80% となり、他の期に比較して高く、対照群 10 日目の出現頻度と比較してほとんど

Fig.11 Mitotic rates of E.A.T. cells at a dose (level) of 5FU 25^{mg}/kg-MMC 2^{mg}/kg

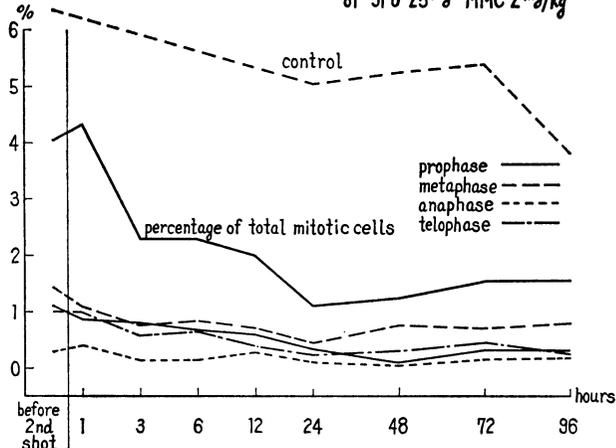
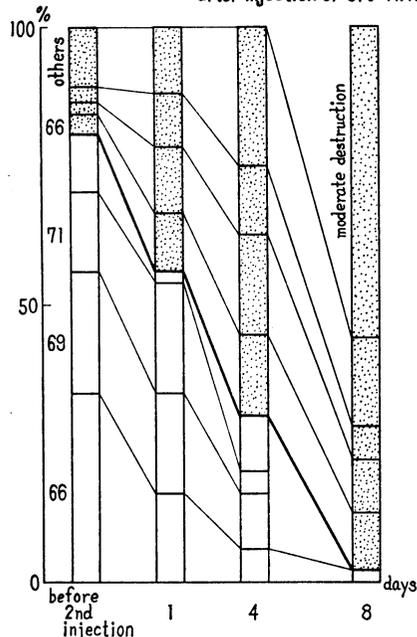


Fig.12 Chromosome aberrations in E.A.T. cells after injection of 5FU-MMC



差がない程である。Anaphase に大きな変動はないが、12 時間目だけが少し高い値を示している。Telophase はほぼ prophase と同じような経過を辿り、24 時間で最低 (0.23%) となつて、その後やや上昇傾向を示しながら 96 時間に至る (Fig. 11)。

ii) 染色体

第 2 回注入後 24 時間にほぼ半数の 44% に染色体の異常が見られ、染色体数 66, 69, 71 以外の細胞に異常の頻度が高い。4 日後では更に高くなり、49 個の観察細胞中 34 個 (69.4%) に何らかの異常を認めた。種族細胞にも一様な影響を与えたものと考えられる。正常な染

染色体は1個(2%)しか見当らず、他はかなり強度の影響を受けたと見られる28個(56%)の細胞(図の moderate destruction)を含め約98%の細胞に異常が認められた。なお、この28個は染色体数の算定が出来なかつたものである(Fig. 12)。

iii) 生存日数

3匹の平均は27.3日である。1匹は19日、他は26日と37日でそれぞれの間の差は大きい。対照群と比較して約10日間長く生存した。

e) MMC 2 mg/kg 注入 48 時間後 MMC 2 mg/kg 注入群

分裂期細胞全体の頻度で見ると、注入後1時間で1.52%から1.07%へと低下し、24時間目には最低の0.47%へと下降したが、第1回目のMMC 2 mg/kgですでに1.52%と低値を示していたので、低下が著明となつた。72時間目では0.94%と上昇傾向を示したが対照群の9日目に比較すると顕著な低下であつた。Prophaseは全体の中で常に高い出現率を示す傾向がありMMC単独注入群の場合と似ているが、48時間目に少しく上昇(0.91%)を見せるが、そのままの状態経過する。Metaphase, anaphase, telophaseとも全般に低い値を示して、変動も少なく96時間目にanaphaseを除いて少し上昇する傾向にあつた。Anaphaseについては、12時間から48時間にかけて約2,800個の細胞を観察したが、この分裂期の細胞は1個も認められず強く分裂の進行が抑制されているものと推定された。なお、MMC単独注入群の48時間目におけるanaphaseの頻度は0%であつた(Fig. 13)。

ii) 染色体

MMC 2 mg/kg 単独注入によつて60%の細胞に異常が誘起されているところへMMC 2 mg/kgを追加注入

Fig.13 Mitotic rates of E.A.T. cells at a dose (level) of MMC 2mg-MMC 2mg/kg

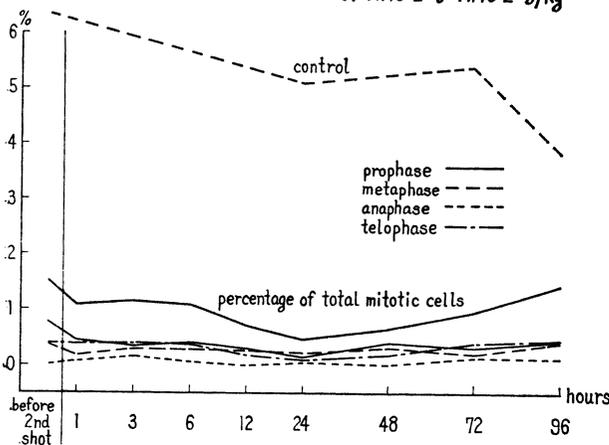
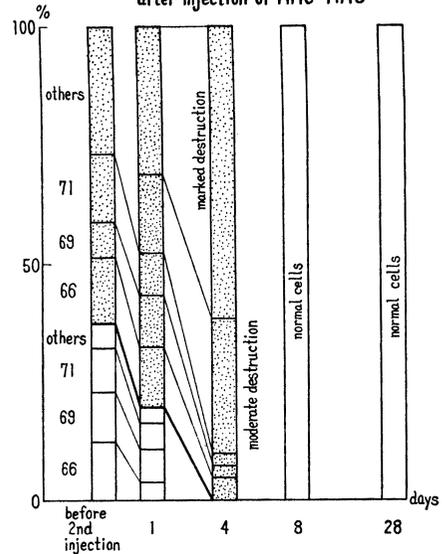


Fig.14 Chromosome aberrations in E.A.T. cells after injection of MMC-MMC



すると、1日後には80%の細胞に影響が出現する。55個の観察細胞中17個(30.9%)は完全崩壊、9個(16.4%)は破壊が強く染色体数の算定が不可能であつた。4日後になると影響は更に著しくなり、42個中26個(61.9%)が完全な崩壊、12個(28.6%)が強い崩壊、染色体数66のもの2個(4.8%)、69のもの1個(2.4%)、71のもの1個(2.4%)となり、影響を受けていない細胞はほとんど観察されなかつた。8日目では分裂もしくは崩壊した腫瘍細胞は認められず、染色体数40の細胞42個が観察された。4週間後に再検してみると、22個の観察で全てが染色体数40を示した。いずれもacrocentricな染色体から成つており、これらは反応性の体細胞であると判定された(Fig. 15, Poto. 0)。

iii) 生存日数

3匹中2匹は24日と31日目に死亡したが、1匹は3ヵ月後の現在も生存中で、腹水も貯留していない。死亡した2匹の平均生存日数は27.5日である。

e) MMC 2 mg/kg 注入 48 時間後 5FU 25 mg/kg 注入群

i) 分裂頻度

分裂期細胞全体で見ると、分裂頻度は6時間目にいちじるしく低下した(0.67%)。以後12時間、24時間、48時間と横ばい状態で経過するが、72時間以降少しく上昇の傾向を示した。96時間目の1.09%は対照群の10日目に比較して大きな差がある。

各 phase について見ると、3時間目(0.52%)から6時間目(0.26%)にかけての低下がそれ以

降に較べて急である。3 時間目における prophase は metaphase や anaphase より低い出現率を示していた。

Metaphase はほぼ prophase と同じような出現頻度を示したが、3 時間目と 72 時間目では prophase より高頻度であつた。

Anaphase は第 2 回目注入前から少ないが 5-FU 注入後も全く低い状態のまま経過した。しかし 72 時間、96 時間目には 2,963 の細胞中 6 個 (0.2%)、3,022 個中 5 個 (0.17%) と上昇傾向を示した。

Telophase は 3 時間目、6 時間目とも他の分裂期に較べて非常に少なく、24 時間目では 0.13% で anaphase の場合と同じ程度の出現率であつたが、48 時間以後上昇傾向を示して 96 時間では 0.43% となり、MMC 単独注入後 48 時間値のその 0.38% を少しく上回る結果となつた (Fig. 15)。

ii) 染色体

5-FU 追加注入後 1 日目で影響を受けていない細胞は全く見当らず、66, 69, 71 の染色体数を算定し得る細胞はそれぞれ 1, 1, 2(3.9%) しかなく、比較的破壊の強くないと思われた細胞が 18 個 (35.3%)、全く分裂を続けることが出来ないと思われた細胞が 29 個 (56.9%) であつた。4 日目になると観察された細胞のなかで、染色体数 66 の細胞が 7 個 (7.6%)、69 が 4 個 (5.1%)、71 のものが 2 個 (2.5%)、合計 13 個 (15.2%) が出現した。残りの 84.8% は異常を含む細胞で、完全な破壊を示すもの 46.8% と最も多く、種族細胞で数の確認出来たものは Fig. 16 のとおりであつた。8 日目に再度鏡検すると影響を受けたが、染色体数の算定が出来る細胞が見当らなくなり、完全破壊が 62.5% 破壊の軽度なものが 30.4% となつた (Fig. 16)。

iii) 生存日数

3 匹の生存日数は、ほぼ一定して、それぞれ 24,

Fig. 15 Mitotic rates of E.A.T. cells at a dose (level) of MMC 2mg-5FU 25mg/kg

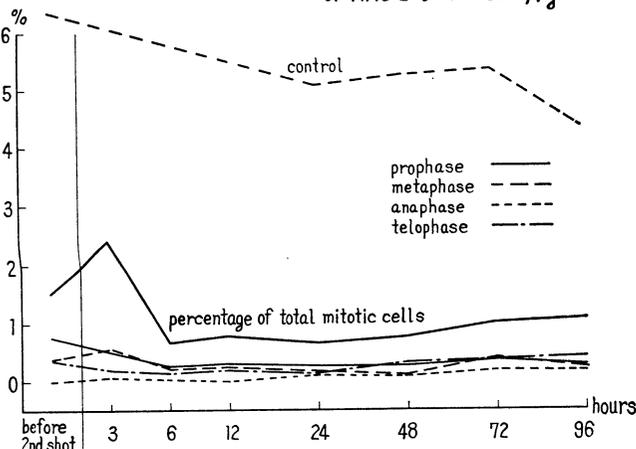
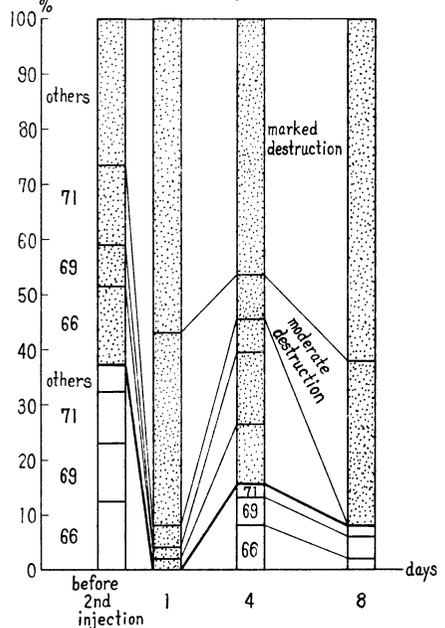


Fig. 16 Chromosome aberrations in E.A.T. cells after injection of MMC-5FU



25, 26 日目に死亡、平均は 25 日であつた。対照群の平均生存日数と較べて延長が認められた。

IV. 総括および考按

腹腔内移植後の腫瘍細胞の分裂に関しては、数々の報告があつて、まず使用薬剤の作用する細胞数に関する問題を考えたい。

EHRlich 腹水腫瘍細胞の成長に関する文献に²⁴⁾依ると、移植後経時的に浮遊細胞数を調べた結果、移植後の細胞増殖はある潜伏期があつて、移植細胞数に反比例して長く、何日目の細胞を移植したかどうかは関係が無い。細胞数は、移植細胞数に拘らず、最大 $1.5 \sim 2 \times 10^9$

個で止り、 7×10^8 個移植後の 4 日目の細胞数は、ほぼ 25×10^7 であるという。LUCKE & BERWICK²⁵⁾ に依ると、 2×10^7 個移植後の全細胞数と、腹水増加量とは 10 日目まではほぼ平行して増加し、第 4 日目ではほぼ 25.6×10^7 個である。本実験では 4 日後の腹水は 1 mm^3 中 15×10^4 であり、腹水量 1.22 ml 中には 18.3×10^7 個となる。しかし注入時の生食水 0.5 ml を除いて計算すると、4 日目の腹水は 0.77 ml となり、細胞数は 11.6×10^7 個となる。上述の 2 文献に於ける理論値と合すると 18.3×10^7 のほうが近く、生食水の分は考慮に入れて良いと考えられる。

本実験のような、腹腔内への薬剤注入方式、す

なわち腫瘍細胞と薬剤との接触試験は、*in vitro* の contact test とほぼ同じであるとする考えがあるが、細胞の移植と同時に薬剤を注入するのではなく、4日目となると細胞分裂はほぼピークを示すほど活発であり、腹膜、実質臓器への侵潤、転移なども起こつて、細胞はすでにその生体のもとなつており¹⁹⁾、*in vitro* の試験と同一とは考え難い。本実験ではこれらの細胞に作用した薬剤は、マウスの平均体重を 20 g とすると 18.3×10^7 個の細胞に対し、ほぼ 5-FU 25 mcg MMC 2 mcg が作用したことになる。

各種腫瘍細胞の分裂頻度および世代時間について考えてみる。牧野ら²⁶⁾は吉田肉腫を用いてヌメアに依り分裂頻度を調べた。それに依ると、移植後 24 時間から分裂開始し、3日目および6日目に分裂期細胞は最も増加し、16日目に死亡したという。MTK Sarcoma I II III について外村²⁷⁾らは、MTK I が3日目 5.0%、4日目 4.8%、MTK II は4日目 4.2%、6日目 4.5%、MTK III は3日目が最も高く 4.7% 11~12 日で死亡したと報告している。EHRlich ascites tumor cell を用いたものでは、EDWARDS *et al*²⁸⁾ に依ると 1.8×10^6 個移植したものでは、5日目が最も高く 22.1% である。この値は BERTALANFFY *et al*²⁹⁾ が LEIGHTON³⁰⁾ 法で標本を作つて 8,000 個以上を数えて得た結果、常に分裂期の細胞は 5.9% (うち prophase 2.6%, metaphase 1.6%, anaphase 0.25%, telophase 1.5%) であるとする値よりも、また、本実験の値よりも遙かに高い。本実験の5日目を後者の報告と比較すると telophase 以外の分裂期ではほぼ一致した。なお telophase に関しては前者の報告における telophase が metaphase の約 1.4 倍である点は近似的であり、従つて mitotic phase の検討に関しては諸家の報告と大略一致した結果を得た。なお、核分裂には時間的変動があつて、ラッセ肝細胞有糸核分裂では、午前4時に多くなる(尾持ら³¹⁾)とする報告もあるが、BERTALANFFY *et al*²⁹⁾ の観察では、腫瘍細胞の場合昼夜を通じて大差ないとされており、本実験においてはこの因子はとくに考慮しなくていいと思われる。

緒言で述べたような理由から、世代時間について、数々の報告を参考にしたい。吉田肉腫の分裂を生体外で観察し、映画で撮影、実測した値では generation time(GT)は16時間である³²⁾。Hela 細胞を Thymidine 投与で観察した結果、高崎ら³³⁾は generation time を 48 時間としている。EHRlich ascites tumor cell についての諸家の報告は次のとおりである。KLEIN & RÉVÉZ²⁴⁾ が HUGHES³⁴⁾ の式を用いた値では mitotic time (MT) 55~72 分, generation time (GT) 35 時間

とし、B. LUCKE²⁵⁾ は GT 21.4 時間とし、EDWARDS²⁸⁾ は MT を 5 時間, GT を 18 時間, 特に S-phase を 8.5 時間, G₂-phase を 1.5 時間と報告し、HORNSEY & HOWARD³⁵⁾ の Adenin¹⁴ C を用いた方法では GT 18 時間と同様だが MT 30 分, G が 12 時間と長く S-phase は 5.5 時間であるとしている。熱海らは「38 分 56 秒 + α 」とし、MT を約 1 時間であるとしている。宮地ら³⁶⁾の DPNH-diaphorase 活性を有する細胞を利用した実験に依ると、S 期の終り頃から活性が出現するとすれば、GT は約 20 時間となる。小林ら³⁷⁾に依ると、GT 37, G₂ 5.5, S-phase 7.5, G₁+M 4 時間としている。BERTALANFFY²⁹⁾ に依ると、コルヒチンで Metaphase を蓄積する方法で, doubling time として計算した結果 GT 21 時間, MT 75 分とした。以上の報告を考察すると、EHRlich 細胞の GT は 18~21 時間でほぼ 20 時間と考えて良いと思われる。

次いで染色体について考える。

EHRlich ascites tumor は、自然発生乳癌の腹水型として継代に成功して以来、各国で継代されているが、同一の条件下で移植継代されているものでなく、数種の亜系が更に変異して行くという形が普通である。Heidelberg Lettré の研究室で LÖWENTHAL & JAHN の腹水転化以来の系である染色体数 45~47 のものや、アメリカにある系統(Copenhagen の FISHER → Stockholm の KLEIN を経ていると思われる)は、near tetraploid または hypotetraploid で、日本に来ているのは、このアメリカのほうの系統である³⁸⁾。多くの EHRlich 腹水腫瘍では、HAUSCHKA³⁹⁾ が要約したとおり、染色体数 mode が 45~47 の LETTRE 型⁴⁰⁾、70~76 の hypotetraploid、80 前後の tetraploid 90~92 の hypertetraploid⁴⁵⁾ などについて多く報告されており^{41~44)}、3n 附近のものが少ない。しかし、Harvard Medical School から受けた tumor では 62~73 迄の distribution を示していたのが、だんだん狭くなり 64~69 の hypertriploid の subline が報告⁴⁶⁾されている。この tumor を移植されたマウスは、腹腔内出血傾向が強くなり、悪性度は 3 倍体細胞のほうが強く、8日目に死亡したという。Ascites tumor を長期に亘つて移植していると染色体構成の変化を示すことが知られているが^{47~49)}、本実験に用いた細胞は 69, 66, 71 であり、hypertriploid と思われる。この tumor は微生物化学研究所から譲渡を受けたもので、継代移植 130 代にも及ぶが、一度肝転移したものを再び腹水腫瘍として戻したこともあり、この辺にも hypertriploid となつた原因があるかも知れない。本腫瘍の異常染色体の出現頻度は前述のとおりであるが、核分裂異常は 8日目に最も激しいとする報告があ

り⁶⁰⁾、本実験での薬剤注入後の1つの指標としたこれらの変化も、約10%の自然に出現して来る分裂異常の結果を考慮せねばならない。本実験後の染色体変化は、stem cell lineの改変をおこすまでには至っていない。変化を受け易かつたのは、stem cell以外の細胞に多かつたといえる。

制癌剤として実験に用いた5-FUはピリミジン代謝拮抗剤として^{61,62)}、発表されて以来、動物移植癌に対する抗癌性が認められ⁶³⁻⁶⁵⁾、臨床的に最も多く用いられている制癌剤の1つである。作用はthymidine monophosphate synthetaseを阻害し、DNA合成を阻害するものであり、本実験に於ける成績(5-FU単独)にあてはめると、効果はG₁の後半、S期の前半にあるとすると、諸家の報告から約8時間となり分裂可能な細胞の約44%に対し、薬剤注入後G₂期を経るまでは、現われないことになるが、実際は1時間後から僅かに影響(分裂頻度)が出ている。しかし中期核型は5時間後が第1回の標本作成であるので、このときは既にS期にあつた細胞は中期に到達しているので影響があつてよいと思われる。分裂頻度への影響は例えばS期にあつた細胞が、薬剤の接触後すぐ、G₂の移行が停止すれば、分裂細胞数は少なくなるので、当然影響があつたものと見做していい訳である。そして分裂細胞について考えると、移植4日目の合計6.65%のうちの56%、すなわち3.4%は、薬剤の影響下に無く、分裂阻止を免れている筈である。実測値は6時間目3.38%、9時間目2.57%で、次々とG₁、S期へ入つて来た細胞もそこで中断されたものとする。24時間目にやや回復の傾向があるのは、generation timeが18時間とすると、娘細胞のS期で影響を受けないものが、かなり出現したことを示唆している。

5FU-5FU群の分裂頻度についても、同様の傾向がうかがえる。すなわち、12時間から24時間にかけて、第2回目の注入前の約40%が減少し、48~96時間では、約20%の細胞数減に止まるという経過を示しており、中期で中断された細胞が一時的に増加している。このことから注入を数回繰返せば、効果のあることが、推定出来る。24時間後の染色体について見ると、異常頻度は20%に達せず、4日目で25%に達する程度で、しかも異常を示す細胞は種族細胞以外のものに多い。5FU-5FU群の24時間後で約50%に異常染色体を認め、4日後には80%に異常を見たのは、48時間で中期細胞が次の分裂へ入る力を失つていることに依るものと考えられる。5FU-5FU群の8日目では、かなり著明な回復が見られ、計50mg/kgでは分裂を完全に押えきれぬものでないことを物語っている。量的な問題もちろん

関係があつて実験しなければならないところであつたが、本実験における投与量と種類との組合せは次のような理由にもとづいている。

HEIDELBERGER⁶⁶⁾らの実験では20mg/kg、芦川⁶⁶⁾では、11.8mg/kgを総量82.6mg/kg(LD₅₀の約1/2)、石山⁶⁷⁾では12.5mg/kgを総量125mg/kgで最も延命効果を認め、しかも、単独大量注入したものは、何れも効果がなく、連日少量使用したものに効果を認めており、本実験では、少量連続で、他薬剤との併用が、臨床的にも実際の応用が可能なような目的を持つたものである。

MMCもDNA合成を選択的に阻害する薬剤である⁶⁸⁾が、DNAのdouble strand間にcross linkageを引起し、そのためにstrandは互いに分離出来なくなることにより、2次的にDNA合成が阻害され、またcross linkageは自然にphosphodiester bandで切れて正常塩基で修復され、DNA合成能が再開される⁶⁹⁾という。動物に於けるその抗腫瘍性は高度で、9種のtumorに対し完全な破壊または抑制が見られ⁶⁰⁾、投与後1時間から休止期の癌細胞の核、仁および附近のchromatinに特異的に変化が起り、ついで核の変性崩壊を来す⁶¹⁾と報告されている。これはRNAへの影響に依ると考えられる。本実験の結果では2mg/kg注入後30分後から影響が現われているが、量的な因子が関係している。本実験はone shotを目的としており、次の報告を参考とした。SOKOLOF⁶²⁾は2mg/kgのEHRlich ascites tumorへの実験で3~4日後に最も著しい変化を認め、間歇投与で十分に薬剤の効果があるとし、紺谷は50mcg/mouse(約2mg/kg)注入後3時間でDNAへのThymidineの取込み、6~9時間で分裂頻度の著明な低下が認められたと報告⁶³⁾しており、1mg/kgが極量であるとする報告もあるが、LD₅₀の約半量⁶⁵⁾以下であり、出来るだけ大量を用いて、完全にtumorの消失が見られればという意図で選択した。MMC2mg/kg単独1回注入後、急激な細胞分裂頻度の低下は、DNA合成G₁後半⁶⁶⁾、S期前半に作用し、細胞毒といわれるように休止期の仁にも影響を与えるため、5-FUに較べて早期に著明な変化が出たものと考えられる。MMC-MMC群についても分裂周期⁶⁷⁾の1回終了した24時間で最も低く、24時間目の時点でmetaphaseが一時的に最も多いのは、blockされていたためと考えられる。Total4mg/kg注入後、4日目の染色体で異常を示さないmetaphaseが見えないのに、分裂頻度は上昇傾向を見せている。これは、静止核で影響を受けていても、押しつぶし標本で、中期染色体の一部に現われるような微細な細胞変化は見付け得なかつたからと考える。MMC1回注入群で

は染色体変化を見ても明らかに有効ではあるが影響を受けないで、通常の分裂を続けている細胞が 20% も残っている。これに MMC を追加した場合は 8 日目に既に染色体数 40 のものしか見当らず、念のため 4 週後に再検して見ても、40 のものだけで分析してみると、正常マウスの雄の核型を示し、正常円形細胞が浸潤して来て、何らかの刺激で分裂したものと考えられる。その後 2 週以降、腹水採取不可能となり、生存日数も 100 日を越え、治癒したものと思われる。このように MMC の場合は、間歇的に大量に用いれば、完全に癌細胞を破壊することが出来ると考えられる。5-FU と MMC との変更併用投与の結果は、細胞分裂の頻度の変化からみると、5FU-MMC よりも MMC-5FU のほうの抑制が steady であるが、染色体異常から見ると、MMC-5FU は 5FU 注入で異常染色体を持つ細胞の出現率はいつたん高くなるが 4~8 日目頃から低くなるのに対して、5FU-MMC 群では、徐々に異常細胞が増加し、8 日目では種族細胞が僅かながら認められただけで、5FU-5FU 群に較べて格段の差が認められ、生存日数についても同様であった。しかし MMC が大量なために制癌剤の種類によるよりも、量的影響のほうが強く、完全な比較とはなり得ない。ただし MMC 単独使用よりも 5FU を併用した場合のほうが、延命効果の点からも有効であると思われる。

本実験の結果から、細胞遺伝学的見地からも大量投与方法が効果を取る事実は確認されたが、臨床の実際にあたって 2 mg/kg という量は使用し得ない。如何にして高濃度に病巣へ投入するか、如何にして宿主側へ与える副作用を少なくするか、併用療法⁶⁸⁻⁷⁰⁾については多くの問題が残されている。

同時多剤、間歇併用等その組合せは限りないが、MMC、5FU を用いた場合、MMC を大量間歇的に、5FU を連続で併用したほうが、腫瘍側の抵抗性^{94, 95)}に対しても効果が大きいと考えられる。腫瘍によつて生理的変異があつて、それぞれの薬剤感受性が異なる⁷¹⁾ということもあり、薬剤注入に依り同一腹腔内の癌細胞にも感受性の異なることが確認⁷²⁾されている。

V. 結 語

EHRlich 腹水腫瘍を用いて 5-Fulorouracil および Mitomycin C の制癌効果を調べ、その投与方法を検討した。評価の指標として細胞分裂頻度、染色体における異常染色体の出現率および生存期間を調べた。それに依つて、5FU, MMC 投与後の細胞学的な影響が確認された。投与後の数的な変化としては、個々の分裂各期細胞が減少しその占める頻度が、5-FU では緩徐な低下を示し再上昇が早い。MMC 投与では generation time の 1

回目頃に最も低く、上昇は遅く分裂頻度抑制が強い。染色体への影響は chromatid gap あるいは chromatid breaks, stick などで、一部に変化を示すものが多く、高度な破壊像が見られるのは MMC では、ほぼ作用後 4 日以後、変更して投与したものでは 1 ないし 2 日後であり、5-FU ではほとんど高度な破壊は見られなかつた。たとえ高度の変化が見られても、数日ないし数週後に観察して種族細胞が残存していれば、完全治癒とはならない。この場合影響を受けずに残るのは、種族細胞が多い。特に影響が少ないものでも、一時的な metaphase の増加などの所見が得られ、1 匹についてではあるが、腫瘍細胞が消失し、体細胞だけとなり長期生存したのを認めた。抗腫瘍効果は、分裂頻度の観察、染色体変化の観察、生存日数の確認をして総合的に判断すべきである。

5-FU, MMC およびその組合せに依る投与方法のうち、単独で投与したものの影響よりも、同一薬剤を再度投与したもの、他薬剤と変更投与したもののほうが影響が大きい。特に染色体変化の傾向からみて、5-FU-MMC, MMC-5FU 群の効果が著しい。MMC は大量、5FU は少量連続で投与するとしても、両者を互いに変更して用いたほうが効果がある。

稿を終るに臨み、終始懇切な御指導と御校閲を賜つた恩師 石山俊次教授ならびに東京医科歯科大学染色体異常研究室 外村晶教授をはじめとする教室員の方々に深甚な謝意を表すとともに、絶えず側面から御教示いただいた坂部孝助教授はじめ石山外科教室の方々に深謝致します。

参 考 文 献

- 1) 草間, 他: 癌の根治を目標とする抗癌剤の投与方法。癌・化学療法, 別冊, 101, 1966
- 2) 牧野: 種族細胞説。人類の染色体, 紀伊国屋新書, 1963
- 3) S. MAKINO, M. SASAKI & A. TONOMURA: Chromosome conditions in 52 human tumors. J. N. C. Inst. 32, 741, 1964
- 4) S. MAKINO, T. ISHIHARA & A. TONOMURA: Chromosome conditions in thirty tumors. Proceeding of J. Acad. 35, 252~257, 1959
- 5) K. YAMADA & A. A. SANDBERG: Preliminary notes on the chromosomes of eleven primary tumors of colon. Proceeding of J. Acad. 42, 1966
- 6) T. ISHIHARA *et al.*: Chromosome constitution of cells in effusions of cancer patients. J. N. C. Ints. 27, 893~933, 1961
- 7) T. ISHIHARA *et al.*: Chromosome of 20 cancer effusions correlation of karyotypic, clinical and pathologic aspect. J. N. C. Inst. 30, 1303~1323, 1963

- 8) T. ISHIHARA *et al.*: The *in vitro* chromosome constitution of cell from human tumors. *Cancer Res.* 22, 375~379, 1962
- 9) T. ISHIHARA *et al.*: Chromosome constitution of diploid and pseudodiploid cells in effusions of cancer patients. *Cancer* 16, 885~895, 1963
- 10) T. ISHIHARA: Cytological studies of tumors. XXXI. A chromosome studies in human gastric carcinoma. *Gann* 50, 403~408, 1959
- 11) A. I. SPRIGGS, D. M. & M. R. C. P.: Karyotype changes in human tumor cells. *British Inst. of Radiology* 37, 210, 1963
- 12) AVERY A. SANDBERG *et al.*: Usually high polyploidy in a human cancer. *Cancer* 16, 1246~1254, 1963
- 13) HELEN A. TOEWS *et al.*: Chromosomes of benign and malignant lesions of the breast. *Cancer* 22, 1296~1307, 1968
- 14) J. BANKE & K. SCHÖFFLING: Polyploidy in human malignancy. *Cancer* 22, 686~694, 1968
- 15) AVERY A. SANDBERG *et al.*: Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. *Cancer* 21 et 22, 77~82, 1268~1282, 1968
- 16) T. KAJII *et al.*: Chromosomal abnormalities in lymph node cells from patient with familial lymphoma. *Cancer* 22, 218~224, 1964
- 17) SHELDON K. GOTTIEB: Chromosomal abnormalities in certain human malignancy. *JAMA* 209, 1063~1066, 1969
- 18) S. MESSINETTI *et al.*: Benign and malignant epithelial tumors of the gastroenteric tract. *Cancer* 21, 1000~1009, 1968
- 19) 佐藤 博: 動物実験における癌化学療法の判定基準。癌・化学療法, 別冊, 123, 1966
- 20) ROTHEFELS, K. H. & L. SIMINOVITCH: An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown *in vitro*. *Stain. Techn.* 33, 73~77, 1958
- 21) 角谷: 正常マウスの発育並びにエールリッヒ腹水癌移植マウスの腹水癌増殖に関する研究。広島女学院大学論文集 1961
- 22) LEVAN & HAUSCHKA: Endomitotic reduplication mechanisms in ascites tumors of mice. *J. N. C. I.* 14, 1~42, 1953
- 23) J. WHANG-PENG *et al.*: The effect of daunomycin on human cells *in vivo* and *in vitro*. *Cancer* 23, 113~121, 1969
- 24) GEORGE KLEIN & L. RÉVÉSZ: Quantitative studies on the multiplication of neoplastic cells *in vivo*. I. Growth curves of the EHRlich and MCIM ascites tumors. *J. N. C. I.* 14, 229, 1953
- 25) LUCKE & BERWICK: Quantitative relation between growth of EHRlich ascites tumor and reduction of liver catalase activity. *J. N. C. I.* 15, 99~112, 1954
- 26) S. MAKINO: A cytological study of the YOSHIDA sarcoma, an ascites tumor of white rats. *Chromosoma* 4, 649~674, 1952
- 27) TANAKA & TONOMURA: The cytological effect of chemicals on ascites sarcomas III damage induced by podophyllotoxin, alpha-peltatin, beta-peltatin and quercetin. *Gann* 46, 15~27, 1955
- 28) EDWARDS *et al.*: Some characteristics of DNA synthesis and the mitotic cycle in EHRlich ascites tumor. *J. Biophys. & Biochem. Cytol.* 7, 273~282, 1960
- 29) BERTALANFFY *et al.*: Mitotic rate and doubling time of intraperitoneal and subcutaneous EHRlich ascites tumor. *Cancer Res.* 25, 685~691, 1965
- 30) LEIGHTON, J. *et al.*: The similarity in histologic appearance of some human "cancer" and "normal" cell strains in sponge-matrix tissue culture. *Cancer Res.* 17, 359~363, 1957
- 31) 尾持, 永田, 百瀬: ラット肝臓細胞核分裂数の時間的変動及び二核細胞の運命について。解剖学雑誌第 23 卷 1957
- 32) H. SATO: Time necessary for the completion of a mitosis in the YOSHIDA sarcoma cell. *Gann* 43, 303~306, 1952
- 33) 高崎, 他: 抗癌剤マイトマイシンCの作用機序に関する研究。総合臨床 18, 594~601, 1961
- 34) HUGHES ARTHUR: The cytoplasm and nucleus during interphase and mitosis. *The mitotic cycle* 89 Butterw. S. Pub. London 1952
- 35) HORNSEY S. & HOWARD A.: A autoradiography studies with mouse EHRlich ascites tumor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 63, 915~928, 1956
- 36) 宮地, 本村: EHRlich 腹水癌細胞の生活環に於ける DPNH-diaphorase 活性の出現時期。ビタミン 32, 429, 1965
- 37) F. KAWAMURA & J. KOBAYASHI: Biological protection mechanisms of the radioprotectors on the mammalian cells. *Tokushima J. of Exper. Med.* 12, 1966
- 38) 梶原: 癌細胞の形態。癌研究の進歩, 629, 医学書院, 1960
- 39) HAUSCHKA T. S.: Cell population studies on mouse tumors. *N. Y. Acad. Science Ser. II* 16, 773, 1953
- 40) K. BAYREUTHER: Der Chromosomen Bestand des EHRlich Ascites Tumor der Maus. *Z. Naturforschg.* 7 b, 554~557, 1952
- 41) 吉田俊秀: マウスにおけるエールリッヒ腹水癌の核学的研究。国立遺伝研究所年報 3, 46, 1953
- 42) 野田, 佐藤: エールリッヒ細胞株の染色体について。岡山大学医学雑誌 73, 96, 1961
- 43) 吉田俊秀: 癌細胞の染色体変化 (9)。遺伝学雑誌 38(5~6), 342~350, 1961
- 44) 吉田俊秀: 癌の発生, 増殖と染色体。日本臨床 19 卷, 2273~84, 1961

- 45) K. KAJIWARA : Derivation of stable polyploid sublines from a hyperdiploid EHRlich ascites carcinoma. *Cancer Res.* 14, 795~801, 1954
- 46) H. TSUKADA *et al.* : A new subline of EHRlich ascites tumor ; Hypertriploid. *Cytologia* 26, 419~422, 1961
- 47) 井坂英彦 : 癌細胞と染色体。代謝 6, 19, 1969
- 48) 外村 晶 : 癌と染色体異常。癌の臨床 15, 527, 1969
- 49) 栗野玄佐武 : 腫瘍と染色体。総合臨床 18, 112~120, 1969
- 50) 日比野司 : EHRlich 腹水癌に於ける核分裂異常。日本組織記録 6, 121, 1954
- 51) R. DUSCHINSKY *et al.* : The synthesis of 5-Fluoropyrimidines. *J. Am. Soc.* 79, 4559, 1957
- 52) R. DUSCHINSKY *et al.* : Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor-inhibitory compound. *Nature* 179, 663~666, 1957
- 53) C. HEIDELBERGER *et al.* : Studies on Fluorinated pyrimidines. II. Effects on transplanted tumors. *Cancer Res.* 18, 305~317, 1958
- 54) ANTON LINDER : Cytochemical effects of 5-Fluorouracil on sensitive and resistant EHRlich ascites tumor cells. *Cancer Res.* 19, 189~194, 1959
- 55) AGNETA HÄGGMARK : Studies on resistance against 5-Fluorouracil II. Thymidylate synthetase from drug-resistant tumor lines. *Cancer Res.* 22, 568~572, 1962
- 56) 芦川, 他 : 5-Fluorouracil に関する基礎的研究。癌の臨床 13 (6), 412~417, 1967
- 57) 石山, 他 : 5-Fluorouracil とその制癌効果。癌の臨床 13 (3), 139~150, 1967
- 58) 寺脇, 他 : エールリッヒ腹水癌細胞の核酸代謝に及ぼす MMC の影響。大阪大医学雑誌 12 (2), 837~839, 1960
- 59) 寺脇, 他 : 5-FU の使用経験と 2, 3 の問題点。日癌治 4 (4), 91~101, 1969
- 60) K. SUGIURA : The effect of mitomycin C on the growth of a variety of mouse, rat, and hamster tumors. *Cancer Res.* 19, 438, 1959
- 61) 小林仁道 : 培養した腫瘍細胞に及ぼすマイトマイシン C の影響。遺伝学雑誌 34 (10), 344~350, 1959
- 62) B. SOKOLOFF : Experimental studies on mitomycin C. *Growth* 23, 109~136, 1959
- 63) H. KONTANI : Effect of MMC on nucleic acid biosynthesis in EHRlich ascites tumor cells. *Biken J.* 7, 9~20, 1964
- 64) 坪井, 他 : 制癌剤投与形式の研究 (第3報)。癌の臨床 13, 1967
- 65) 芝 茂 : マイトマイシン C の薬理作用。マイトマイシンの基礎と臨床, 医学書院, 1967
- 66) 陣内伝之助 : 最新医学 19(9), 2290~2297, 1964
- 67) 武田 進 : 癌細胞。新細胞学, 朝倉書店, 1965
- 68) H. E. SKIPPER : The anti-leukemic action of combinations of certain known anti-leukemic agents. *Cancer Res.* II, 109~112, 1951
- 69) GOLDIN & MENTAL : The employment of combination of drugs in the chemotherapy of neoplasia. *Cancer Res.* 17, 635~654, 1957
- 70) 木村 : 癌の化学療法。外科診療 10, 104~113, 1968
- 71) H. ISAKA : Variable drug sensitivity and chromosomal features of a cancer clone. *Gann* 56, 443~460, 1965
- 72) 井口, 他 : 染色体から見た癌細胞の制癌剤感受性について。日本癌学会総会記事 24 回, 1965

ON EFFECT OF ANTI-TUMOR AGENTS TO MITOSIS AND CHROMOSOME OF EHRlich ASCITES TUMOR CELLS

TETSUYA WATANABE, M. D.

The 3rd Department of Surgery, Nihon University, School of Medicine

Cytological effects of 5-Fluorouracil and Mitomycin C on EHRlich ascites tumor were observed to discuss the method of employment of the drugs. The frequency of cell divisions and chromosome aberrations were calculated to quantitatively determine the degree of growth inhibition of tumor cells. Cytological characteristics of untreated tumor cells were as follows ;

In the peritoneal cavity of each mouse, 7×10^6 tumor cells were inoculated. The body weight increased by days and it was 1.35 g on average on the 4th day. Mitosis rate was 6.65% at the top frequency and the mitotic phases were frequent in prophase, telophase, metaphase and anaphase in order from high to low. Average life time of untreated mice bearing tumors was 17.8 days. The distribution of the chromosome number of the tumors was varied in the range from 42 to 153, and characterized by hypertriploidy 66, 69 and 71 in each sampling, which were stem cell lines. The idiogram analysis indicated that the stem cell contained 1 marker chromosome with secondary constriction and that the [remaining chromosomes were acrocentric in shape. Chromosome aberrations such as chromatid gap and breaks were counted about 10% on the 11th and 23rd day after inoculation.

On the 4 th day after inoculation of the tumor cells 5 FU or MMC was injected intraperitoneally at a dose of 25 mg/kg or 2 mg/kg. In the same way cytological changes were investigated at the time from 30 minutes to 8 days after injection. The experiments were divided into following 4 groups :

5 FU-MMC ; 2 mg/kg of MMC were added 48 hours after injection of 25 mg/kg 5 FU.

MMC-5 FU ; 25 mg/kg of 5 FU were added 48 hours after injection of 2 mg/kg MMC.

MMC-MMC ; 2 mg/kg of MMC were added 48 hours after injection of 2 mg/kg MMC.

5 FU-5 FU ; 25 mg/kg of 5 FU were added 48 hours after injection of 25 mg/kg 5 FU.

The cytological effects and prolongations of the life time were particularly evident in the groups MMC-5 FU and 5 FU-MMC, excepting in a mouse of MMC-MMC group. However, some of the tumor cells remained unaffected. Almost of these resistant cells were cells of stem cell lines.

The results might indicate that successive combination chemotherapy, in which for instance a large dose of MMC was used intermittently and a continuous small dose of 5 FU followed it, was the most effective application.