実験上皮癌に対する Retinoid (Ro 10-1670), Bleomycin および 5-Fluorouracil の局所塗布制癌効果に関する研究

森田 悦弥

Anticarcinogenic effects of Retinoid Ro 10-1670, Bleomycin and 5-Fluorouracil in topical application for experimental cancer

Etsuya MORITA

緒 言

近年、悪性腫瘍に対する化学療法の進歩は目ざましいものがある。多数の有効な化学療法剤の開発と同時に、臨床的には毒性と安全性の検討や投与方法の確立などは癌化学療法にとって最も重大な課題であるといえる。つまり言い換えればその有効性に相対する副作用が常に懸念されるからである。今回 Vitamin A 誘導体の Retinoid, Bleomycin, 5-Fluorouracil の3種類の薬物の局所塗布による制癌効果について研究を行った。Retinoid (Ro 10-1670) は角化病変に有効なビタミンA誘導体で、抗腫瘍効果があり重篤な副作用の発現が少ない抗腫瘍剤であるが、その局所塗布による作用機序や組織学的な報告はいまだ少ない。Bleomycin は抗腫瘍性抗生物質で DNA の合成系を阻害し扁平上皮組織にきわめて高濃度に取り込まれて、扁平上皮癌に特異的な制癌作用を有する。5-Fluorouracil はピリミジン代謝拮抗剤で癌腫に対して優れた効果を発揮する。これら既知の2剤と対比させて Retinoid の実験癌に対する局所塗布の制癌効果を研究した。これらの制癌剤の局所塗布を乳頭腫と扁平上皮癌に用いその有効性の検討を行った。実験誘発腫瘍としてはヒトの皮膚または粘膜に発生する乳頭腫および扁平上皮癌とその組織型がきわめて酷似する DMBA 誘発のマウス皮膚乳頭腫および扁平上皮癌を用いた。これを用いて肉眼的腫瘍所見、腫瘍縮小率および副作用の発現、組織学的検索および酵素組織学的証明による腫瘍治癒過程の変化とその特異性を検索したので報告する。

実験材料および実験方法

I. 実験材料

1. 実験動物

実験動物には雄、体重 20~22 g の ddY マウスを用いた。マウスゲージに各5匹ずつ入れ、オリエンタル酵母社の固形飼料 MF および給水瓶にて水を自由に摂取できるように与えた。室温は $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ 、湿度は $60\% \pm 5$ の条件下で照明時間は午前6時より午後6時まで12時間の明暗周期とした。この条件下で10日間飼育し、7週齢、体重30 g前後に成長した時点で発癌実験に移った。発癌および制癌実験は総数300匹のマウスについて行った。

2. 発癌実験

発癌剤として 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) の0.5%アセトン溶液を用いた。マウスの背部体毛を剃毛したのち、同部に毛筆にて0.5% DMBA アセトン溶液を1回量約0.1 ml (DMBA 0.1 mg) を塗布した。発癌剤は週3回、無麻酔下にて塗布した。発癌剤塗布後約2週間で脱毛、部分的な潰瘍形成を認め、12~14週で約82%のマウスに乳頭腫を形成、16~18週で約60%のマウスに扁平上皮癌を形成した。乳頭腫および扁平上皮癌を形成したマウスは、その時点で発癌剤の塗布を中止し、約10日間無処置にて経過観察後、次の制癌実験に供した。

3. 制癌物質と制癌実験

1) Anti Carcinogenic Retinoid (Ro 10-1670) (Retinoid と略す)。いわゆる抗腫瘍性ビタミンA酸誘導体であり、化学的には all-trans-9-(4-methoxy-2,3,6-trimethylphenyl)-3,7-dimethyl-2,4,6,8-nonatetraenoate ($\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_3$) で分子量は 326.46、化学構造式は図1のとおりである。

この Retinoid (スイス Roche 社製、日本 Roche 社から分与)、200 mg を 2 ml のピーナツ油にとり、マグネチックスターラで4時間攪拌し、完全な溶液を作っ

福井日本赤十字病院歯科口腔外科

岐阜歯科大学口腔外科第1講座

(主任: 森 昌彦教授)

Fukui Redcross Hospital, Department of Dent-Oral Surgery.

The 1st Department of Oral Surgery, Gifu College of Dentistry (Chief: Prof. Masahiko Mori)

受付日: 昭和58年5月17日

化学名；

all-trans-9-(4-methoxy-2, 3, 6-trimethylphenyl)-
3, 7-dimethyl-2, 4, 6, 8-nonatetraenoic acid.

化学構造式；

分子量；326.46

図 1 RETINOID (Ro 10-1670)

図 2 制癌剤の塗布方法

た。すなわち10%のピーナツ油溶液を用いた。

2) Bleomycin S. (BLM). 0.5% プレオマイシン S 軟膏 (日本化薬株式会社から分与) 1g 中 5mg 力価を用いた。

3) 5-Fluorouracil. (5-FU). 5% 5-フルオロウラシル軟膏 (協和醗酵工業株式会社から分与) 1g 中50mg 力価を用いた。

制癌実験：制癌実験は上述の3種の制癌剤を用いて3回行った。なお制癌剤の投与方法はすべて局所塗布とした。制癌実験に用いた化学発癌マウスは、肉眼的に乳頭腫および扁平上皮癌形成期のものである。

1回に行なった実験マウス数は表1のごとく総数100匹で行ない、この実験を総計3回、計300匹のマウスについて行なった。1回100匹のマウスの内訳は乳頭腫形成マウス群50匹と扁平上皮癌形成マウス群50匹の2群に分け、各群は Retinoid 塗布マウス15匹、BLM 塗布マウス15匹、5-FU 塗布マウス15匹および対象群5匹とした。飼育は3種類の制癌剤についておのおの動物群を5匹同一ゲージに入れ、制癌実験を行った。

制癌剤の塗布は図2で示すごとく腫瘍表面積の約1/2に塗布した。Retinoid の塗布は均一にそろえた細い毛筆を用い、前述の Retinoid ピーナツ油溶液を1回量

表 1 実験群

制癌実験マウス— 100匹	—乳頭腫— 50匹	—Retinoid (塗布) 群 15匹 (5n×3)
		—BLM (塗布) 群 15匹 (5n×3)
		—5-FU (塗布) 群 15匹 (5n×3)
	—扁平上皮癌— 50匹	—対象群 5匹
		—Retinoid (塗布) 群 15匹 (5n×3)
		—BLM (塗布) 群 15匹 (5n×3)
		—5-FU (塗布) 群 15匹 (5n×3)
		—対象群 5匹

約0.05 ml を塗布した。BLM および 5-FU はガラス棒の先端に薬剤 (軟膏) をとり腫瘍部に直接塗布した。塗布量は塗布前および塗布後の軟膏容器の重量をデジタル表示式上皿直示天びん、Libror ED-2000, Electric Reading Balance 計測精度 1/100 g (島津製作所 KK) で計測し、個体数から計算して塗布量を求めた。制癌剤の塗布は週3回2週間計7回塗布と週3回4週間計14回塗布の2群とした。制癌剤の塗布回数とそれらの実験期間は表2に示すごとくで、Group 1, 2 は Retinoid 塗布群で Group 1 は2週間塗布群、Group 2 は4週間塗布群で個体数は各15匹ずつである。同様に Group 3, 4 は BLM 塗布群、Group 5, 6 は 5-FU 塗布群である。制癌剤塗布と同時に腫瘍容積の経日の変化と体重を計測した。

制癌剤の分量および塗布量

1. 10% Retinoid ピーナツ油溶液。腫瘍に1回塗布量 0.05 ml, 総量 5mg を塗布した。体重から kg 当たりの塗布量は 125 mg/kg と計算された。以下同様に2週間総塗布量 30 mg, 体重当たり 750 mg/kg, 4週間総塗布量 60 mg, 1,500 mg/kg と計算された。

2. 0.5% Bleomycin S 軟膏。基剤としてプラスチックを含有する BLM は 1g 中硫酸プレオマイシン 5mg を有する。1回塗布量 20 mg で硫酸 BLM として 0.1 mg を塗布した。体重当たり 2.5 mg/kg, 2週間総塗布量 0.6 mg, 15 mg/kg, 4週間総塗布量 1.2 mg, 30 mg/kg であった。

3. 5% 5-Fluorouracil 軟膏。5-FU は軟膏基剤 1g 中 5-フルオロウラシルを 50 mg (5%) 含有し、白色ワセリン、ステアリアルアルコール等の基剤より成っている。腫瘍への1回塗布量は 30 mg で 5-FU として 1.5 mg となり体重当たりでは 37.5 mg/kg であった。2週間総塗布量 9 mg, 体重当たり 225 mg/kg, 4週間総塗布量 18 mg, 体重当たり 450 mg/kg であった。

- 1-1 : 実験的マウス皮膚乳頭腫, Retinoid 塗布前の所見. 背部中央の乳頭腫に Retinoid を塗布し下方の乳頭腫は無処置のまま対象とした.
 1-2 : Retinoid 2週間塗布時所見.
 1-3 : 実験的マウス皮膚扁平上皮癌, Retinoid 塗布前の所見. 中央の腫瘍に Retinoid を局所塗布した.
 1-4 : Retinoid 4週間塗布時所見.

写真 1 Retinoid 局所塗布マウスの肉眼的腫瘍縮小所見

バルサム樹脂にて封入を行ない, 鏡検し他の組織所見と比較した.

3. 酵素組織化学的方法

酵素組織化学的証明として, 以下の7種類の酵素群を用いて検索した^{4,5)}.

水解酵素群: (1) アルカリフォスファターゼ Alkaline phosphatase (ALP), (2) 酸フォスファターゼ Acid phosphatase (ACP), (3) ロイシン・アミノペプチターゼ Leucine aminopeptidase (LAP), (4) 非特異的エステラーゼ Esterase (Est)

酸化酵素群 (1) コハク酸脱水素酵素 Succinic dehydrogenase (SDH), (2) 乳酸脱水素酵素 Lactic dehydrogenase (LDH), (3) グルコース6-リン酸脱水素酵素 Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH).

新鮮な腫瘍材料または凍結保存した腫瘍を, Cryostat (-20°C) で8枚の連続切片 (12μ) を作り, 7種類の酵素と H-E 染色を行なった. 必要に応じ16枚の連続切片により, 各2枚の酵素を証明したものもある. 詳細はそれぞれの成書を参考とされたい.

結 果

1. 肉眼的腫瘍縮小所見

1) Retinoid (Ro 10-1670) 局所塗布マウスの所見.

乳頭腫に Retinoid を局所塗布すると3回目から腫瘍実質容積の縮小が強くみられた. 腫瘍上皮からの出血は

認められず, 腫瘍表層からの壊死脱落による腫瘍の縮小というよりむしろ腫瘍実質の基底部からの腫瘍体積の減少傾向がみられた. Retinoid を塗布した正常皮膚の糜爛や脱毛はまったくみられなかった. この所見を現わしたのが写真1で写真1-1(塗布前)のマウス背部中央(上側)の乳頭腫に Retinoid を局所塗布し, 下側の乳頭腫を無処置対象とした. 写真1-2が2週間塗布後の写真で局所塗布した乳頭腫は下側の対象の乳頭腫と比べて著しい腫瘍の縮小が認められる. そして局所塗布した乳頭腫の正常な周囲皮膚の糜爛, 脱毛やその他の異常所見はみられなかった. 基部の細い乳頭腫の場合, Retinoid の局所塗布効果により基部から腫瘍が脱落し, その結果, 乳頭腫は一塊となり脱落消失する知見を得た. 一般にマウスの実験上皮癌では腫瘍上皮の角化が著しいため Retinoid の経皮的吸収の大きな妨げとなっている. そのため Retinoid は腫瘍表面の角化部よりむしろ基底部の腫瘍組織から吸収されるものと思われそのため局所塗布された腫瘍組織は一塊として脱落し, その容積が減少する傾向がみられた. このような腫瘍容積の減少傾向は BLM においても認められるが, Retinoid の方がはるかに顕著である. 写真1-3, 1-4は扁平上皮癌に Retinoid を塗布したときのマウスの肉眼所見である. 写真1-3は Retinoid 塗布開始時のマウス扁平上皮癌の肉眼所見で, 左背部の腫瘍に Retinoid を塗布した. 写真1-4が Retinoid 4週間塗布時の肉眼所見写真で腫瘍容積の縮小が著しく, また腫瘍周囲における僅かな脱毛がみられ

BLEOMYCIN PAPILLOMA

5-FLUOROURACIL CARCINOMA

2-1

2-2

3-1

3-2

2-1 : 実験的マウス皮膚乳頭腫。BLM 塗布前の所見。上側の腫瘍に BLM を塗布、下方の腫瘍は対象とした。

2-2 : BLM 2週間塗布時所見。

写真2 Bleomycin 局所塗布マウスの肉眼的腫瘍縮小所見

3-1 : 実験的マウス皮膚扁平上皮癌。5-FU 塗布前所見。上頸部より耳介部にかけて腫瘍が認められ、同側側腹部に対象とした腫瘍がある。

3-2 : 5-FU 4週間塗布時所見。

写真3 5-Fluorouracil 局所塗布マウスの肉眼的腫瘍縮小所見

るが、正常皮膚には糜爛や炎症所見等は全くみられなかった。体重は開始時より、塗布4週間後には幾分減少傾向にあったが特異的なものではなく、日内変動の範囲内のものであった。

2) Bleomycin 局所塗布マウスの所見

乳頭腫および扁平上皮癌で2週間および4週間塗布した両群において脱毛、腫瘍周囲組織の炎症、体重の減少等の所見はみられなかった。腫瘍の肉眼的な縮小形式は、乳頭腫においては角化部が経日的に剝離、脱落しその腫瘍容積を減じていった。塗布による剝離、脱落部からの出血はみられなかった。写真2-1の BLM 塗布前の所見で背部中央の乳頭腫の下約半分に BLM を塗布した。下側の乳頭腫は無処置のまま対象とした。写真2-2が BLM 2週間塗布後の所見で、対象に比して、BLM を塗布した腫瘍部はほとんど治癒している。扁平上皮癌においては、角化した腫瘍が BLM 塗布回数に一致して一塊として脱落する所見を呈した。

3) 5-Fluorouracil 軟膏局所塗布マウスの所見

5-FU 局所塗布マウス所見は Retinoid, BLM とは異なった肉眼的所見を呈した。すなわち、乳頭腫においては、腫瘍基部からの腫瘍実質の縮小がみられ腫瘍表面(角化部)からの剝離、脱落はそれ程強くみられず、むしろほとんど変化はなかった。ところが、外向性の増殖を示す扁平上皮癌で、強い角化傾向の腫瘍に 5-FU を局所塗布すると、開始後4~5日で腫瘍表面が溶解壊死

化し脱落、その結果同部からの著明な出血をきたし、比較的軟らかい腫瘍実質が外表に露呈してくる。写真3はその肉眼的所見で、写真3-1にみられるように、上頸部から耳介直下にわたる大きな扁平上皮癌と、同側側腹部に米粒大の乳頭腫がある。この扁平上皮癌に 5-FU を塗布した4週間後の所見が写真3-2である。このマウスは塗布後約1週間で、急激に腫瘍上皮が脱落し腫瘍容積が少なくなったが、基底部には明らかに腫瘍間質を含む腫瘍の残存が認められた。腫瘍はきわめて易出血性であり通常の飼育条件下で軽度の出血や浸出液を認めた。続けて 5-FU を塗布してゆくと、腫瘍表面が乾燥、縮小していき明らかな瘢痕様治癒傾向を示した。側腹部の対象とした乳頭腫の発育と比べると、その制癌効果がきわめて優位であった。

2. 腫瘍縮小率

1) Retinoid 塗布実験群

Retinoid を乳頭腫に塗布した場合、塗布開始後3回目(1週間経過時)から、その腫瘍容積の減少を認め3~5回塗布時、つまり制癌剤塗布開始より6~10日目、平均8日目に腫瘍の顕著な縮小がみられた。これは肉眼的腫瘍縮小所見で述べたごとく、腫瘍実質の基部からの脱落を含む塊状の縮小として記録されたためである。すなわち表4-1に示すごとく1回目と2回目塗布時には腫瘍容積にはあまり変化がみられなかったが、3回目塗布時に17%の腫瘍縮小率を示した。ところが5回目

表 4-1 Retinoid 塗布による抗腫瘍効果

塗布時で20%~68%, 平均42%の腫瘍縮小率を示し、きわめて特徴のある腫瘍の縮小傾向をみせた。6回目および7回目と経日的に腫瘍の縮小を認め、7回塗布時42%~98%, 平均58%の腫瘍縮小率であった。マウス皮膚の実験的乳頭腫における Retinoid 局所塗布による最終腫瘍縮小率は BLM, 5-FU と比べて3剤中最も優位な値を得た。扁平上皮癌における Retinoid 局所塗布制癌効果は、その腫瘍の浸潤形式、腫瘍の大きさ、個体の抵抗力などのもろもろの複雑な因子との関わり合いのため、ばらつきがあり均一な縮小効果を得るには到らなかった。これらの点では BLM, 5-FU 塗布群においても共通の問題としてみられた。すなわち、Retinoid においては表1に示すごとく2週間経過、7回塗布時においてその腫瘍縮小率が+9%から40%までの差異を生じた。扁平上皮癌についても乳頭腫と同様に3回塗布時から5回塗布時および5回塗布時から7回塗布時と漸時腫瘍は小さくなったが、最終回の7回塗布時の腫瘍縮小率は平均21%であった。

2) BLM 塗布実験群

BLM 局所塗布による乳頭腫および扁平上皮癌に対する腫瘍縮小率を表したのが表4-2のグラフである。乳頭腫における縮小率は、BLM の塗布回数にほぼ一致して腫瘍の縮小が観察された。すなわち、5回目塗布時および6回目塗布時、つまり12日経過前後に BLM が有効に作用し効果的な腫瘍の抑制、縮小がみられた。4回目塗布時では22%の縮小であったが、7回目塗布時、2週間経過時において平均53%の縮小率を記録した。扁平上皮癌に対する BLM の制癌効果は、Retinoid で述べた

ごとくもろもろの因子が加わり、局所塗布した腫瘍に対して著効を示した例と、あまり有効でなかった例があった。短期すなわち2回塗布時には腫瘍の抑制は認められず僅かに腫瘍の増殖傾向があり(平均2%の増加)、その後塗布とともに僅かな腫瘍の縮小傾向を示し、7回目塗布、2週間経過時には平均29%の腫瘍の縮小を認めた。BLM は全制癌実験期間を通して、3剤中のマウス死亡率が最も低く、同時に体重測定による経日の生理状態の把握でも、開始時と終了時の変化はほとんどみられなかった。

3) 5-Fluorouracil 塗布実験群

5-FU 局所塗布による乳頭腫および扁平上皮癌の腫瘍縮小率を表4-3に示した。5-FU はその軟膏基剤の成分として、プロピレングリコール、白色ワセリン、ステアリルアルコールからなる親水性軟膏であるため角化した病像を呈するマウス皮膚乳頭腫や腫瘍上皮の角化が著明な扁平上皮癌に対しても非常に良好な腫瘍表面への親和性、進展性があった。また薬剤の吸収を肉眼的に観察する限り、正常皮膚では5-FU の停滞がみられるのに対して、病変部(腫瘍部)では正常よりもより速やかな吸収、移行が観察された。そのため乳頭腫においては3剤中2番目に、扁平上皮癌においては3剤中、最も高い腫瘍縮小率を示した。乳頭腫に5-FU を局所塗布した場合、2回目塗布時平均10%、4回目塗布時平均22%、6回目塗布時平均40%、7回目塗布時(2週間経過時)平均52%の腫瘍縮小率を示した。この縮小傾向は、ほぼ塗布回数に比例している。また各個体群における有効率として、5回目塗布時37%から52%、平均46%の腫瘍縮小

表 4-2 Bleomycin 塗布による抗腫瘍効果

表 4-3 5-Fluorouracil 塗布による抗腫瘍効果

率を示しその有効範囲に極端な差異がみられず、全体に均等な縮小傾向を示した。扁平上皮癌に対する 5-FU 局所塗布による腫瘍縮小率は 4 回目塗布時平均 15%，5 回目塗布時平均 20%，6 回目塗布時（12 日経過時）平均 32%，7 回目塗布時（2 週間経過時）平均 50% の扁平上皮癌に対する縮小率を得た。7 回目、2 週間の塗布時においては 5-FU の効果は乳頭腫も扁平上皮癌もほぼ同じぐらいの腫瘍縮小率を示した。5-FU 局所塗布によるマ

ウス皮膚扁平上皮癌に対する腫瘍抑制効果は他の 2 剤に比して最も優れたものであった。

制癌剤 7 回塗布時（2 週間経過時）において腫瘍縮小率は次のことが要約された。（1）乳頭腫の縮小率は Retinoid（58%），BLM（53%）が著しく良効な結果を得た。（2）扁平上皮癌の腫瘍縮小率は 5-FU（50%）が他の 2 剤に比べて明らかに優位に高かった。

腫瘍縮小率と制癌剤塗布回数（塗布量）との相関関係

においては、(1)Retinoid では塗布から腫瘍脱落までに時間的経過と相関がある、いわゆる Time dependent に腫瘍の縮小がみられた。(2)BLM および 5-FU では塗布回数に一致して塗布量と相関する、いわゆる Dose dependent に腫瘍の縮小がみられた。

3. 病理組織学および酵素組織化学的所見

マウス皮膚乳頭腫ならびに扁平上皮癌の所見

マウスに 0.5% DMBA アセトン溶液を塗布して作った乳頭腫は、主として棘細胞の増殖であり腫瘍表面には著しい過角化症がみられる。上皮細胞の異型性、基底膜の破壊はみられない。しかしなかには僅かの症例において基底細胞の異型性や大型細胞の出現が観察され基底膜を破壊して腫瘍細胞が下方へ浸潤、発育してゆく所見もみられ、このようなものは癌化したものと判断される。腫瘍下の結合組織には多量の線維芽細胞を認め、旺盛な結合組織線維の増殖、豊富な血管が存在した。また強い炎症性細胞の浸潤(主としてリンパ球)が存在する部位も認められた。PAS 染色においては増殖した棘細胞層に瀰漫性に陽性で、腫瘍下の結合組織も陽性反応を呈した。トルイジン・ブルー染色においては腫瘍下の皮下結合組織に肥満細胞が少量観察されたが腫瘍間質組織には全くみられなかった。(写真4-1)。

マウス皮膚扁平上皮癌はきわめて高度に角化した分化型扁平上皮癌の所見を呈する。腫瘍上皮は無制限に外向性に増殖しそれを栄養する血管を豊富に含む腫瘍間質よりなり、長くのびた腫瘍上皮突起が基底細胞膜を破り、上皮下の固有筋層に深く浸潤している。これらの基底部の細胞配列は乱れ、核も大小不ぞろいなどの細胞の異型が認められる。この角化型扁平上皮癌は乳頭腫の悪性化したものと考えられる。比較的基底膜の正常ないわゆる拡大性増殖の型をとるものと、深部増殖が旺盛でどちらかというと浸潤性増殖の型(写真5-1)をとるものに分けられる。また深部や腫瘍下結合組織には多数の大小不規則な病巣があり、それらの中心には角化巣(癌真珠)がみられるものもある。腫瘍間質には強い炎症性細胞浸潤や毛細血管を含む肉芽形成がみられる。PAS 染色においては癌細胞にわずかに陽性の顆粒を認めるのみでほとんど陰性である。トルイジン・ブルー染色において腫瘍下間質に肥満細胞の出現を認めた。

酵素組織学所見の概略は次のとおりである。酵素活性とその分布所見は乳頭腫も扁平上皮癌も同様である。Alkaline phosphatase は腫瘍直下の結合組織、線維細胞、毛細血管および遊走細胞(多くは炎症性反応による)に強い活性があり、腫瘍間質にも瀰漫性に弱く陽性に反応することもある。Acid phosphatase は組織球に強陽性で、炎症性細胞にも陽性に反応する。腫瘍上皮では角化部で陽性である。Leucine aminopeptidase は腫瘍上皮細胞にはほぼ陰性で、腫瘍間質および腫瘍下結合組織線維に強く反応する。とくに間質結合組織の線維細胞が最高

度陽性を示す。Esterase は腫瘍の発育増大に伴い活性が低下しほとんど反応がなく陰性であった。Succinic dehydrogenase は上皮の基底細胞層に相当する腫瘍細胞に陽性反応を示し、角化した腫瘍上皮には陰性である。間質結合組織の浸潤細胞は弱陽性で、筋層には非常に強い活性を認める。Lactic dehydrogenase は一般にきわめて強く染色される酵素である。腫瘍上皮細胞に最高度陽性、腫瘍間質と皮下結合組織の線維性細胞や浸潤細胞は陽性で両者に反応の相違はみられない。また筋肉程度の陽性反応を示す。Glucose-6-phosphate dehydrogenase は基底細胞層より腫瘍上皮表層に進むにつれて活性が強く錯角化層または棘細胞層の上層で反応が最も強いが角化部は陰性である。間質には強い反応を認めない(表5)。

1) Retinoid 局所塗布群

乳頭腫に Retinoid を塗布すると、塗布部に一致して腫瘍角化部の壊死脱落が著明にみられ(写真4-1)、脱落した腫瘍角化部の直下に存在する棘細胞に一致した腫瘍細胞の変性、その下層の基底細胞層と間質結合組織には高度な炎症性細胞の浸潤がみられた(写真4-2)。細胞浸潤は著しいものでは腫瘍表面にまで波及しているのがみられた。Retinoid を塗布した乳頭腫においては上皮直下ではほぼ基底膜に接する結合組織中に肥満細胞が対象群よりも多く観察された。トルイジン・ブルー染色による肥満細胞の出現は著しくなかった。

扁平上皮癌に対する Retinoid 塗布の所見は乳頭腫と同様に腫瘍表層の角化部の壊死消失を認める。この場合拡大増殖型癌に対する Retinoid の影響(写真4-3, 4, 5)と浸潤増殖型癌(写真5-1, 2, 3, 4)とはやや趣きを異にしている。前者は一樣に表層脱落型の消失を示すが、後者の症例は部分的に崩壊消失し基底部の細胞は依然として深部増殖を示している。拡大増殖型の癌に Retinoid を塗布すると広く表層全般が壊死におちいるが、そのなかにところどころに核を有する細胞の集団が認められる(写真4-4, 5)。浸潤増殖型癌においては、元来腫瘍下の結合組織の細胞浸潤が著しく(写真5-1)、部分的な壊死脱落部(写真5-2)においてはその周囲に濃縮核を有する悪性像を呈する癌細胞が多数存在している(写真5-3, 4)。そして直下の結合組織は血管が拡大し、著しい炎症性細胞浸潤が認められる。

Alkaline phosphatase は細胞浸潤の著明なまた増殖しつつある結合組織部に陽性反応がみられた。これは創傷部にみられるものと同様の所見であった。Acid phosphatase は腫瘍直下の線維結合組織の境界部に出現し Retinoid 塗布効果による組織球の浸潤とみられる所見を呈した。Leucine aminopeptidase は Alkaline phosphatase と同様の出現を示し強度陽性反応が円形細胞浸潤部に一致して認められた。残存した腫瘍上皮に弱い Succinic dehydrogenase と強い Lactic dehydrogenase の活性が認められた。Glucose-6-phosphate dehydrogenase は残存角化

4-1 : 実験的マウス皮膚乳頭腫, H-E 染色, 弱拡大 ($\times 4$).
腫瘍の下半分に Retinoid を塗布 ($\downarrow$), 腫瘍角下部の脱落とそれに伴い腫瘍体積の縮小が著明にみられる.

4-2 : 同 H-E 染色 ($\times 20$).
局所塗布による表面の腫瘍細胞は脱落し, 棘細胞に相当する腫瘍細胞の変性が認められる. 基底膜下の結合組織中に炎症細胞浸潤がみられる.

4-3 : 実験的マウス皮膚扁平上皮癌, H-E 染色 ($\times 40$).
外築性増殖型癌. Retinoid を塗布した結果, 腫瘍表層と大部分の腫瘍細胞の脱落が認められる.

4-4 : 同 H-E 染色 ($\times 100$).

Retinoid 塗布による腫瘍細胞の壊死.

4-5 : 同 H-E 染色 ($\times 100$). 写真 4-3 の強拡大像.

病巣中に散在的に核を有する細胞が存在している.

写真 4 Retinoid 局所塗布の病理組織学所見

5-1 : 弱拡大.

腫瘍中央部に Retinoid 塗布 (↓). 塗布の結果, 腫瘍上皮の著しい壊死部が認められる. 全体として浸潤性増殖を示し, 腫瘍浸潤が著明である.

5-2 : 同 H-E 染色 (×40).

腫瘍上皮が変性壊死化し, 脱落崩壊しその周囲には癌細胞が存在している.

5-3 : 同 H-E 染色 (×100). 写真 5-2 の A 部の強拡大.

核の異染性, 濃縮核を示す腫瘍細胞が残存する. 間質には細胞浸潤が著明である.

5-4 : 同 H-E 染色 (×100). 写真 5-2 の B 部の強拡大.

腫瘍の基部の癌細胞が存在し, その表層は角化した壊死組織からなる. 基底部に存在する腫瘍細胞は悪性のもので, 塗布された薬物の影響を受けていない.

写真 5 Retinoid 局所塗布後の病理組織学的所見. 浸潤増殖型癌.
実験的マウス皮膚扁平上皮癌 (H-E 染色).

表 5 各種酵素活性の出現部位

	ALP	ACP	SDH	LDH	G-6-PDH	PAS	Mast-Cell T.B
正常皮膚組織	0	+2~+3	+2	+3	+1~+2	+3	
上皮組織	0	+2~+3	+2	+3	+1~+2	+3	
皮下結合組織	+2~+3	±~+1	+1	+1~+2	±~+1	+2	少量
毛細血管							
腫瘍組織	0	+2↑	+2~	+3	+2~↑	+3	ほとんどなし
腫瘍性上皮組織	0	+2↑	+2~	+3	+2~↑	+3	ほとんどなし
乳頭腫腫瘍間質	+2	±~+1	+1	+2	0~±	+2	ほとんどなし
腫瘍下結合組織	+2→	+2~+3→	+1	+2	0~±	+2	少量
腫瘍性上皮組織	0	+3~↑	+2→	+3~+4↑	+2~+3↑	+3	ほとんどなし
扁平上皮癌腫瘍間質	+2↑	±~+1	0	+2	0~±	+2	ほとんどなし
腫瘍下結合組織	+3↑↑	+3↑	0~±	+2~↑	+1→	+2	少量
制癌剤塗布	0	+2~+3	+3	+3	+1~+2	+3	
正常皮膚組織	0	+2~+3	+3	+3	+1~+2	+3	
上皮組織	0	+2~+3	+3	+3	+1~+2	+3	
皮下結合組織	+2~+3	±~+1	+1	+1~+2	±1~+1	+2	ほとんどなし
腫瘍組織	0	+4↑	+2	+4↑	0~+3↓↑	+1~+2	
腫瘍上皮	0	+4↑	+2	+4↑	0~+3↓↑	+1~+2	
残存部	0	+4↑	+2	+4↑	0~+3↓↑	+1~+2	
壊死部	0~+1	0	0	0~±	0	±~+2	
炎症部	+3↑	±3↑	+1↑	+2↑	+1	+2	
乳頭腫腫瘍間質	+3↑	±3↑	+1↑	+2↑	+1	+2	
皮下結合組織線維芽細胞	+4↑	+3~↑	+1~+2↑	+3↑	+1	+3	増加
制癌剤塗布	0	+4↑	+2	+4↑	0~+3↓↑	+1~+2	
腫瘍組織	0	+4↑	+2	+4↑	0~+3↓↑	+1~+2	
腫瘍上皮	0	+4↑	+2	+4↑	0~+3↓↑	+1~+2	
残存部	0	+4↑	+2	+4↑	0~+3↓↑	+1~+2	
壊死部	0~+1	0	0	0~±	0	±~+2	
炎症部	+3↑	+3~+4↑	+1	+2↑	+1	+2	
扁平上皮癌腫瘍間質	+3↑	+3~+4↑	+1	+2↑	+1	+2	
腫瘍下結合組織	+4↑	+3~↑	+1~+2↑	+2↑	+1	+3	増加

0 : 陰性, ± : 痕跡, +1 : 弱陽性, +2 : 中等度陽性, +3 : 高度陽性, +4 : 最高度陽性, → : 活性, 反応変化なし, ↑ : 活性上昇, ↓ : 活性減少

癌細胞に強い活性を示すが, 浸潤増殖型癌においては著明な反応を示さない。

2) BLM 局所塗布群

乳頭腫において BLM を局所塗布した組織所見は腫瘍上皮最表層が消失し腫瘍細胞の欠落による間質または腫瘍下の結合組織線維が露呈している所見がみられた。BLM の塗布された乳頭腫表面は完全に壊死化し, そのなかに濃縮核を有する癌細胞が残存する(写真 6-1, 2)。露出した結合組織にはリンパ球を主とした炎症性細胞浸潤を認めるが, その程度は強弱まちまちであった。扁平上皮癌に BLM 塗布の所見は腫瘍塊の表層は脱落消失するが, 深部は著しい変化をうけないで残存している。トルイジンブルー染色においてこの残存している腫瘍間質中にきわめて多量の肥満細胞がみられた。腫瘍間質の一部に膿瘍の形成, 時に腫瘍上皮の壊死巣が観察された。この膿瘍は線維性肉芽組織により取り囲まれており線維細胞やリンパ球の浸潤がみられた。Alkaline phosphatase は腫瘍細胞の壊死した病巣に出現する細胞浸潤部(写真 6-3, 4, 5)と線維形成の旺盛な部位に出現していた。Acid phosphatase は癌巣周辺の間質に存在する組織球に陽性, Leucine aminopeptidase は壊死組織そのものと周辺の間質おそらく細胞浸潤部に一致して強い反応を

示し, 腫瘍細胞には陰性である。Succinic dehydrogenase は腫瘍の基部すなわち基底細胞層に相当する腫瘍細胞に陽性であり表層の壊死におちいった腫瘍組織には陰性である。Lactic dehydrogenase は残存した腫瘍上皮細胞に強度陽性, 線維組織にも軽度陽性である。Glucose-6-phosphate dehydrogenase は表面に BLM が塗布された結果, 腫瘍表面の角質部が消失するためほとんど陰性となるか弱い活性を示す。間質の毛細血管の新生が旺盛な部位に弱陽性であった。

3) 5-FU 局所塗布群

5-FU 局所塗布による乳頭腫および扁平上皮癌の制癌効果は次のような特徴ある所見がみられた。すなわち腫瘍上皮に接する腫瘍下結合組織の増殖が著しく, リンパ球, 組織球などの細胞浸潤も他の 2 剤と比してきわめて著明にみられた(写真 7-3)。腫瘍下結合組織には成熟した線維細胞や幼な線維芽細胞が多量にみられ, それらを栄養する血管の新生もみられた。これらの間質反応とともに好酸球浸潤, リンパ球および肥満細胞がみられたが, これらの腫瘍間質への浸潤は腫瘍下結合組織と比較して少なかった。5-FU を塗布した癌においては深部の癌病巣に部分的壊死巣が出現している(写真 7-1, 2)。著効を示した扁平上皮癌では腫瘍上皮はほとんど消失し,

6-1 : 実験的マウス皮膚乳頭腫, H-E 染色 (弱拡大).

右側の壊死巣が塗布側で, 左側は腫瘍の基底側. 腫瘍上皮が壊死化しているがそのなかには核を有する細胞が存在する.

6-2 : 同 H-E 染色 ($\times 100$). 写真6-1の強拡大. 残存している腫瘍細胞のなかには濃縮核を有する癌細胞が残存する.

6-3 : 実験的マウス皮膚扁平上皮癌, H-E 染色 ($\times 20$).

腫瘍上皮が脱落した結果, 潰瘍形成が認められる.

6-4 : 同 H-E 染色 ($\times 100$). 写真6-3の強拡大. 腫瘍の結合組織中に著しい炎症性細胞と癌細胞の存在がある.

6-5 : 同 TB 染色 ($\times 100$). 写真6-3の強拡大. 腫瘍の周囲間質中に多量の肥満細胞が出現している.

写真 6 BLM 局所塗布後の病理組織学所見

細胞浸潤のある潰瘍の表面にわずかに残存した腫瘍細胞を認めるのみであった (写真7-3, 4). トルイジン・ブルー染色において肥満細胞が腫瘍周辺部において腫瘍実質より少し離れた増殖しつつある結合織に出現してい

た (写真7-4). この部位の結合織はメタクロマジーを呈し粘液多糖類の存在を示した. Alkaline phosphatase は腫瘍直下の潰瘍面に接する増殖結合織に強度陽性で, Leucine aminopeptidase は Alkaline phosphatase と

7-1

7-2

7-3

7-4

7-1 : 実験的マウス皮膚扁平上皮癌, H-E 染色 ($\times 40$).
5-FU を扁平上皮癌へ塗布した深部の病巣に壊死巣がみられる. 5-FU の深部への到達が示唆される.

7-2 : 同 TB 染色 ($\times 40$). 写真7-1と類似の部位の組織像.
壊死巣をとり囲むような線維組織中に多量の肥満細胞がみられる.

7-3 : 同 H-E 染色 ($\times 40$).
5-FU が著効を呈した腫瘍で腫瘍上皮は脱落し, 線維組織の著明な増殖を認めそのなかに腫瘍細胞が残存している. 細胞浸潤は著明である.

7-4 : 同 TB 染色 ($\times 40$). 写真7-3と類似の部位の組織像.
結合織中に肥満細胞が出現し同時にその周辺でメタクロマジーが認められた. しかし細胞浸潤の著明な病巣中には肥満細胞はみられない.

写真 7 5-FU局所塗布後の病理組織学所見

同じく肉芽形成のみられる組織および残存した癌胞巣の一部に弱い活性がある. Succinic dehydrogenase は腫瘍細胞の壊死消失にともない, 腫瘍細胞には陰性で間質結合織中の細胞浸潤部にのみ低い活性がみられた.

Lactic dehydrogenase は残存した腫瘍上皮に強度陽性, 間質および腫瘍下の結合織に陽性である. Glucose-6-phosphate dehydrogenase は元来, 腫瘍の鎖角質部に強陽性であり 5-FU 塗布による腫瘍表層から消失するた

め強い活性の部位は認められないか非常に低い反応がみられる。

4. 制癌剤局所塗布による腫瘍組織の病理組織学的所見の概略

マウス皮膚の実験的乳頭腫と扁平上皮癌に対して Retinoid, BLM 5-FU を塗布した後の腫瘍の組織学的変化は多少の差異が認められるものの、およそ次のように要約される。

1) 腫瘍表面から著明に壊死化し脱落し、その結果潰瘍または痂皮を形成し、そのなかに腫瘍細胞が島状に存在している。著効例においては潰瘍のなかの癌細胞が消失し完全に治癒する。

2) 腫瘍上皮は一般に表層の角化層の喪失から始まり、正常上皮の棘細胞層に相当する腫瘍細胞が壊死におちいるが基底部の腫瘍細胞が残存することが多い。しかし壊死部においては細胞核の残存を認めるものがある。

3) 間質結合織は大きく分けて2つの反応を示す。すなわち腫瘍基底膜の破壊の少ない腫瘍、すなわち拡大型増殖腫瘍においては炎症性反応が少なく、これに反し浸潤型増殖腫瘍においては著明な反応性細胞浸潤が認められる。

4) 肥満細胞は細胞浸潤の著しい部位には出現せず、その周囲の結合織に出現する。制癌剤塗布により治癒しつつある癌の結合織(間質)には多数の肥満細胞が認められる。

5. 制癌剤局所塗布による腫瘍組織の組織化学的所見の概略

1) Alkaline phosphatase は間質の細胞浸潤の程度と関係がある。また結合織の増殖とも関係して出現する。

2) Acid phosphatase は間質中の組織球の出現と関係が深く、とくに潰瘍表層には著明な活性が認められる。

3) Aminopeptidase は細胞浸潤部と一致して認められ、Alkaline phosphatase 陽性部位と類似の分布を示す。組織壊死部には強い活性は認められないことがある。

4) Succinic dehydrogenase の活性は低く、残存腫瘍上皮に認められる。

5) Lactic dehydrogenase の染色性は強く、腫瘍上皮と間質に証明されるが、壊死部は陰性である。

6) Glucose-6-phosphate dehydrogenase は角化層に近接する顆粒細胞層に強陽性で制癌剤塗布による腫瘍の壊死消失の程度に比例して認められなくなる。

これらの組織学および組織化学的所見を集約した結果が表5である。

考 察

現在、悪性腫瘍に対する治療法には外科療法、放射線

療法、化学療法、内分泌療法および免疫療法等があり、これらの治療法は単独療法として癌腫に対して有効性を発揮する一方、幾つかの方法を組み合わせるその相乗効果を期待する併用療法が広く応用されている。制癌剤の開発には毒性と安全性の検討、副作用、投与方法の検討(第1相試験 phase I study)、有効性の検討(第2相試験 phase II study)、既存または他の制癌剤との治効の比較検討(第3相試験 phase III study)および制癌剤の臨床治験の検討(第4相試験 phase IV study)がなされている。このような経緯で登場した制癌剤も口腔領域の悪性腫瘍に対する位置づけや、治療法が確立されてきたのは僅かここ20年来のことである^{6,7)}。とくに近年、悪性上皮性腫瘍に対する治療法としての、化学療法には著しい進歩がみられているが⁸⁾、同時に癌化学療法の最大の難問として、制癌剤の副作用がある⁹⁾。一般的にいて抗腫瘍作用の強い制癌剤ほど副作用も強いと考えられている¹⁰⁾。制癌剤の利用は細胞毒性を利用するものであって⁶⁾、副作用は避け難い現状にあるといわねばならない。制癌剤の投与には重篤な副作用よりも効果が先に発現し、回復可能な副作用であることである。重篤な副作用としては、造血臓器に対する影響(白血球減少、血小板減少)、消化管に対するものとしての悪心嘔吐、下痢便秘等、呼吸器および循環器に対するものとしての肺線維症、心臓障害等、中枢神経に対する影響などがあげられている。これらの副作用の発現にきわめて相関性の高いものに制癌剤の投与方法があげられている。臨床的に制癌剤の投与方法にはおよそ次の方法があげられる。(A)単一薬剤投与方法、(B)併用療法(多剤併用療法、手術併用療法、放射線併用療法)、(C)局所的投与方法(動脈内投与方法、イオン導入法、局所塗布法)、(D)経口投与方法などの投与方法である。これらの投与方法は制癌剤個々の性質、作用機序、副作用の発現に加えて腫瘍側、宿主側の諸条件を考慮して投与方法を決定することが重要となっている。つまり抗腫瘍剤による癌治療を行なうにあたり、副作用の発現を最小限に抑え、抗腫瘍効果を最大限に発揮できる投与方法を確立する必要がある。口腔領域の悪性上皮性腫瘍の大部分は、粘膜由来の扁平上皮癌である。これらの癌の治療にあたり全身障害等の副作用の発現がきわめて少ない局所塗布による癌の治療は制癌剤の投与方法の一法として有意義であると考えこの実験を計画した。そのために実験的扁平上皮癌を用い、制癌剤局所塗布の実験を行ない相互の制癌剤の比較検討を行なった。実験動物による扁平上皮癌の形成はマウスの皮膚および子宮、ハムスターの頬嚢、ラットの口腔粘膜等でこれらの形態的所見は既に報告されている。今回行なった実験はヒトの扁平上皮癌に類似したマウスの実験的皮膚癌を用いて Vitamin A 誘導体である Retinoid, Bleomycin (BLM), 5-Fluorouracil (5-FU) の局所塗布による制癌効果について、肉眼的ならびに組織学的所見を検索し

比較検討した。

1. Retinoid (Ro 10-1670)

Retinoid はビタミンA誘導体で、角化病変の治療に有効で同時にある癌に対する制癌効果も期待されている。ビタミンAの生理的作用は網膜の機能維持として視覚と関係し、生殖作用の発達や上皮細胞の分化、発育に関係している。とくに上皮細胞の分化とその制御に果たすビタミンAの役割は古くから知られ、Fell, Mellanby¹¹⁾ (1953) により鶏胚皮膚を用いての粘膜上皮化生の報告がなされている。ビタミンA欠乏(症)と癌の関係、血中ビタミンA濃度と癌の相関性が述べられてきた。ビタミンA欠乏動物における上皮組織の組織学的変化は正常な粘液分泌性の単層絨毛上皮が次第に多層のKeratin化した非分泌性の細胞に変わる、いわゆる扁平上皮化生、表皮角化、上皮萎縮、基底細胞増殖などの所見がみられ、これらの変化の一部は臨床的にみられる前癌病変に類似しているとも考えられている。このような組織像を呈する動物にビタミンAを投与すると扁平上皮化生は消失して再びもとの正常の上皮組織にもどり、これらの一連の変化は可逆的であることが証明されている。以上の知見から少量のビタミンAを長期にわたり投与すると発癌を防止するのではないかとこの癌に対するChemopreventer ないしはもっと進んで積極的に癌に対しての治療効果も期待された。ところがこれらの臨床的応用に最大の障壁となったのはビタミンAの副作用である。その主たる原因はビタミンA酸の代謝、蓄積が肝臓で行なわれ、それらの副作用のため、暫くその治療的意義を放棄されていたが、より毒性の少ないビタミンA酸誘導体であるRetinoid が合成された。1974年、Bollag らにより合成されたビタミンA酸誘導体のうちRetinoid (Ro 10-1670) は末端基に $-\text{COOH}$ をもち、Etretinate (Ro 10-9359) は末端基が $-\text{COOHC}_2\text{H}_5$ の構造をもつ誘導体で、Etretinate (Ro 10-9359) の血中代謝物がRetinoid (Ro 10-1670) である。つまりEtretinate を全身投与するとEsterase により、主に肝臓で分解されてカルボン酸エステルが加水分解されたものがRetinoid (Ro 10-1670) である。

口腔粘膜の発癌とビタミンAとの関係はRowe ら(1959)¹²⁾がハムスター頬粘膜の実験的発癌はビタミンAの欠乏により増加し、これを投与することにより発癌がある程度抑制されることを立証した。これとは反対にLevij ら(1968)¹³⁾によるとハムスター頬嚢の発癌はVitamin A palumitate との併用投与により、促進し異型性の強いものが出現し、さらにLevij ら(1969)¹⁴⁾のVitamin A の局所塗布を発癌剤塗布の前に行なうと、発癌の促進を認めている。これらの実験はビタミンAは細胞内のlysosomal membrane に作用した結果、発癌剤の細胞内浸透を増加させ発癌が促進されたものと推測している。Shamberger ら(1971)¹⁵⁾によると β -carotene は

DMBA による発癌を増加させ、retinyl acetate は腫瘍の抑制を認めている。また polyene antibiotics filipin はこの発癌を著明に抑制し lysosomal labilizers, filipin とVitamin A は腫瘍の発生が少なく、反対に lysosomal stabilizer である chloroquine, hydrocortisone は腫瘍発生を増加させると注目すべき結果を報告している。lysosomal enzyme である ACP や anyl sulfatase の活性は chloroquine, hydrocortisone により減少し、filipin, Vitamin A により増加している。以上の実験的証明はVitamin A その種類と用い方により、さらに併用される薬剤によって発癌を促進もし、抑制もするということがある。ここに注意すべき事項は発癌実験と同時に与えられたVitamin A は発癌剤の細胞内取り込みを促進し、その結果癌の発生が増加することであり、癌に対して投与されたVitamin A と制癌剤は、これまた同様に細胞内に取り込まれやすく抗癌剤の効果を一層高めるものとも考えられる。これらの作用を利用したのが小宮山^{16,17)}により行なわれている5-FU, Vitamin A, Radiation のFAR療法といわれるものでありVitamin A のもつ polyene 構造が併用療法による制癌効果を高めている。最近に至りShklar ら(1980)^{18,19)}はハムスターの頬嚢粘膜と舌粘膜の実験癌の形成が13-cis retinoic acid (Retinoid) により遅れることを報告し、Gilmore ら(1981)²⁰⁾もハムスター頬嚢粘膜のDMBA発癌とRetinoid との関係を追究した結果、Retinoid とDMBA を投与すると上皮の発育増殖が行なわれず、Lymphoma と類似した腫瘍形成も認められ、これらのVitamin A 過剰症により癌の形成や、その進行には著しい変化を示さないと述べている。Prutkin (1973)²¹⁾は家兎に形成された実験的Kerathocanthoma についてEtretinate (Retinoid Ro 10-9359) を使用し、Mori ら(1981)²²⁾はマウスの実験的皮膚癌に、Ito (1982)²³⁾はShope papilloma に用いて抗腫瘍効果を認めている。これらの一連の実験腫瘍は角化度の高い乳頭腫または扁平上皮癌でありビタミンA誘導体のEtretinate はこのような組織型の腫瘍に対して有効であることが判明してきた。Matter ら(1977)²⁴⁾はマウスの実験皮膚腫瘍に使用し、その病変を電子顕微鏡的に検索して次のように述べている。(a) 癌細胞の壊死と自己融解によるライソゾームの遊離。(b) 細胞膜が不安定となるための細胞壊死。(c) ムコ多糖類の産生と細胞外への分泌亢進。(d) 細胞分裂の抑制、細胞間橋の破壊、核の濃縮などをあげている。一般にビタミンAはライソゾームを不安定化して酵素を放出させるとしているので、著者は本実験においてこれらに注目し、酸フォスファターゼはライソゾームのMarker enzyme であることから、組織化学的に証明した。上皮性腫瘍にRetinoid を塗布した腫瘍上皮脱落部位に相当する結合織にAcid phosphatase 活性の強度陽性細胞である組織球が出現し、同時にPAS反応の亢進やトリジンブルー染

色において多数の肥満細胞の出現が Retinoid の塗布部位に一致して出現していた。Retinoid は主として肝細胞において特異的細胞膜結合蛋白 specific plasma binding protein すなわち retinol binding protein (RBP) と結合し、血中の Retinoid の量を調節している。この RBP は分子量 21,000 であり、RBP-prealbumin complex として存在している。RBP から retinol が遊離されずに発表されたような角化抑制作用や抗腫瘍効果を示すものとも考えられる。一般に胎生期においては Retinoic acid の利用が大であり、cytosol retinoid-acid-binding protein (CRABP) は成熟した組織には認められず、胎生期の組織にのみ多量存在するといわれ、一方、cytosol retinol-binding protein (CRBP) は胎生期と成熟した組織に存在している。以上のことから生体に投与された Retinoid は、おそらく結合蛋白とさらに cytosol と結合し、核に取り込まれ細胞破壊をきたしたものと考えられているが、それらの詳細については不明の部分も多い (Elias ら 1981)²⁵⁾。

ビタミン A 酸誘導体である Retinoid の臨床的応用は Bollag²⁶⁾ が基底細胞癌患者 16 名に Retinoid を塗布し 15 例に有効という報告がなされ、Ott ら (1975)²⁷⁾ が Etretnate を経口投与にて乾癬の患者に用いた。このように Etretnate の適応症は皮膚科領域に多くみられ、尋常性乾癬、魚鱗癬、ダリエー病、扁平苔癬、毛孔性紅色靴擦疹、紅斑角化症、などの皮膚角化症や尋常性天疱瘡、尋常性座瘡、角層下膿疱症や、扁平上皮癌や基底細胞癌、皮膚乳頭腫などの皮膚悪性腫瘍に投与されてその有効性が認められている (Orfanos ら, 1981)²⁸⁾。口腔粘膜の角化病変、白板症、扁平紅色苔癬等にこの薬物を全身投与したり、また局所塗布により病変を治癒に導いたという報告があり、Koch (1978)²⁹⁾、天笠ら (1978)³⁰⁾、松浦ら (1980)^{31,32)}、今後、口腔粘膜の過角化病変について局所応用も可能と考えられる。上皮性悪性腫瘍の治療に Retinoid を単独で用いた報告は現在までにまだなく、併用療法でビタミン A を用いたのが二、三散見できる程度である (遠藤, 1979)³³⁾。

制癌実験に用いた Etretnate の人に対する副作用については 50 mg/day 以下の低用量の経口投与では主として口唇乾燥等が現われ、高用量においては口唇炎、皮膚亀裂、皮膚脱屑、脱毛等である。実験動物においても、投与動物の皮膚の落屑、脱毛がみられる。これらの副作用症状は休業により消退する。しかし局所塗布においては、本実験に用いたマウスにおいても副作用はみられず、また臨床報告例においても塗布の場合には副作用は出現しないものと考えられる。

2. Bleomycin (BLM)

BLM は 1962 年、梅沢らにより *Streptomyces Verticillus* から培養分離精製された水溶性塩基性グリコペプチドの抗生物質で、末端アミン部分が異なる 10 数種類

の物質の混合物である。その薬理作用は DNA 鎖の切断、DNA ligase の抑制と DNA Thymidine の取り込みの阻害であるといわれている。すなわち BLM が癌細胞内に取り込まれると DNA と結合し、二重らせん構造の 1 本鎖を切断する結果、細胞分裂を阻害すると考えられている。BLM は Fe^{2+} や Cu^{2+} とキレートを作りやすく、ヒトや動物に BLM を注射すると体液中で Cu^{2+} とキレート化合物を作るが細胞内の SH 基により還元され脱銅 BLM が生成される。BLM が SH 基および磷酸塩と強い親和性があることが証明されている。BLM は DNA にはきわめてよく結合するが RNA にはほとんど反応しない。BLM は皮膚、肺等の上皮組織に高濃度に取り込まれ、とくに扁平上皮は BLM をよく取り込み、BLM hydrolase 活性が弱いため BLM の不活化が少ないためと推定されている。すなわち BLM が扁平上皮癌にきわめて特異的にその制癌効果を発揮するのにはこのためである。本実験において BLM 局所塗布部に明らかな癌細胞間の拡大と空胞変性、核の変性、角化部の脱落の所見がみられた。腫瘍組織を取り囲む結合組織の増殖もみられた。また実験的な皮膚乳頭腫に対する腫瘍抑制効果は非常に安定した縮小率を示すのに対して扁平上皮癌では若干その抑制率が悪かった。また酵素組織化学的には BLM 塗布部に ALP 活性、LAP 活性の上昇がみられたのは、宿主側の炎症性反応の結果と考えられる。

本邦における BLM の臨床応用は市川らの泌尿器科領域からの報告³⁴⁾にはじまり皮膚科、口腔外科を含む頭頸部領域、そのほか広く上皮癌の治療に用いられ、悪性リンパ腫についても多剤併用として使用され多岐にわたって莫大な文献が出されている。そのなかで角化型の扁平上皮癌に対してとくに有効である。これらの悪性腫瘍に対して BLM は全身投与法が一般的であるが、上田ら (1977)³⁵⁾は油性プレオマイシンの局所適応を行なっている。良性病変では上皮性角化病変である尖圭コンジローム、疣贅、扁平苔癬、白板症、乳頭腫に多くの著効例の報告がある³⁶⁾。局所塗布療法による報告例では、悪性腫瘍 (基底細胞癌、扁平上皮癌)³⁷⁻⁴⁰⁾、癌前駆症 (Bowen 病、Paget 病、老人性角化腫、放射線角化腫、砒素角化腫、紅色肥厚症、Leukoplakie)⁴⁰⁾、良性腫瘍 (尋常性疣贅、扁平疣贅、尖圭コンジローム、Kerathocanthoma)^{40,41)}、伝染性軟属腫⁴⁰⁾等がある。BLM の局所使用については全身投与と同様に良性、悪性病変を問わず、一般に扁平上皮由来の過角化病変と角化型扁平上皮癌に選択的な効果が認められている。また局所塗布療法の一法として BLM イオン導入法 (Iontophoresis) と BLM 軟膏閉鎖密封療法 (ODT) がある。BLM イオン導入法とは直流電流を通電すると BLM が陰極へ移動する性質があることから表在性の病変に電極単子を直接触れさせ高濃度の BLM を組織内へ移行させて治療し

ようとする方法である。BLM の組織内移行実験は松本 (1980)⁴²⁾が家兎の口腔粘膜を用いて行なった結果、深部への BLM の到達性の良好さと血液中への移行が少ないと報告している。林崎ら (1977)⁴³⁾は扁平上皮癌、白板症 20例にこの方法を行なっている。BLM 軟膏閉鎖密封療法とは一般に 0.5% BLM 軟膏を患部に塗布しその上を密封し少なくとも 1 時間以上この状態を保ち BLM の局所の吸収と深部への到達を期待する治療法であり、制癌剤の局所塗布療法としてきわめて良好な結果を得ている。BLM の最も重篤な副作用として肺炎様症状および肺線維症がある。この副作用の予防法等の研究報告も多数みられる⁴⁴⁾。局所塗布およびイオン導入法における副作用はほとんどみられていない。

3. Fluorouracil (5-FU)

5-FU はピリミジン拮抗性の代謝拮抗剤で体内に入った 5-FU は Uracil と同一経路をたどり DNA 合成系に組み込まれる。5-FU の代謝産物はチミジン酸合成酵素 Thymidylate synthetase を抑制するため DNA の生合成が障害され、このために 5-FU の抗腫瘍効果が現われる。5-FU の代謝分解は主として肝で行われ、尿中に活性型または不活性の型で排泄される^{45,46)}。放射線に対する増感作用および相加作用があり臨床に応用されている。5-FU 局所塗布による経皮吸収の報告⁴⁷⁾では、塗布後 1~4 時間で 10% 以下の吸収を認め、腫瘍部からの吸収は 16~60% であるという。このことから腫瘍病変に対する 5-FU の局所塗布は有意義なものと考えられている。Bollag ら⁴⁸⁾はヒトの皮膚基底細胞癌に Retinoid を単独で局所塗布と 5-FU 軟膏局所塗布による比較で、5-FU 塗布には著効例があり Retinoid より成績が優れていたと報告している。この報告と一致するように本実験の 5-FU と Retinoid のマウス 扁平上皮癌における腫瘍縮小率は 5-FU で 50%、Retinoid で 21% の結果であった。

上皮性腫瘍に対する 5-FU 局所塗布による電顕所見ではミトコンドリアの膨化や空胞化、リボゾームの減少また核の内容物が粗になった所見をあげている⁴⁹⁾。本実験では 5-FU 塗布による腫瘍組織の破壊が著しく、そのために腫瘍直下の間質の結合繊維線維に旺盛な反応性増殖がみられ、さらにその外側に肥満細胞の出現がみられた。しかし線維形成の著明な炎症性細胞浸潤部位には肥満細胞は出現していない。この所見は 5-FU による腫瘍細胞崩壊の結果、結合繊維の著しい再生が現われたものと思われ、病巣は治癒にむかうものと考えられる。

5-FU 軟膏の適応症は扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、Bowen 病、Paget 病、紅色肥厚症、皮膚細網症、白板症、ダリエー病、乾癬症および悪性リンパ腫の皮膚転移である。副作用は主に消化器障害が高い発現率で報告されている。全身的に投与された 5-FU は肝機能および腎機能に対する障害は比較的少ない。その他の副作用

用として下痢、口内炎、悪心嘔吐が主なものである。

4. 実験上皮癌

発癌剤による齧歯類皮膚の実験癌は Ashlay (1961)⁵⁰⁾、Howell (1962)⁵¹⁾その他、数多くの報告がみられ、それらの報告は用いた発癌剤の種類に関係なく発生した腫瘍は初期のもので良性乳頭腫ないしは Keratoacanthoma、悪性の腫瘍として角化型扁平上皮癌が発生することが明らかにされている。一方、扁平上皮癌の組織化学的所見については、種々の物質や酵素分布について報告されている。一般に Alkaline phosphatase 活性は癌細胞に陰性、間質結合繊維に陽性、Acid phosphatase 活性は角化傾向の強い癌上皮細胞や組織球に活性がみられる^{5,52-54)}。Leucine aminopeptidase は間質結合繊維に強度陽性で、腫瘍増殖に対する間質反応としての意義が認められている^{5,55-58)}。Esterase は腫瘍細胞には活性が一樣でなく、間質にも認められる^{5,59-61)}。Succinic dehydrogenase 活性は腫瘍細胞に低く、Lactic dehydrogenase は癌細胞に高い⁵⁾。前者は基底細胞に主として分布し、後者は扁平上皮癌の全細胞層に強い活性がみられる。Glucose-6-phosphate dehydrogenase は上皮癌の錯角化部に比較的強い活性がみられる^{62,63,67)}。実験癌に制癌剤を塗布し、その後の病変を組織学的と同時に組織化学的に検索した報告は少ない。今回の実験において癌表面に塗布した 3 種の制癌剤の効果は大体一様に出現し、それは癌表層からの壊死脱落であり、腫瘍上皮の基部は残存していることが多い。これは制癌剤が癌表層から浸透したため当然の結果と考えられるが、注目すべき点は制癌剤による大きな壊死巣中においてもしばしば核を有する腫瘍細胞の生存を認めたことと、塗布した制癌剤から遠く離れた基部に癌細胞の生存が確認された点である。また臨床的に著効を認め潰瘍の形成された部位においても、そのなかに癌細胞の集団が認められている。これらの所見は制癌剤の局所塗布においては、腫瘍表層から離れた部位の腫瘍細胞の生存があり、このものが再発のもととなり得るので注意すべき所見であることを意味している。制癌剤による腫瘍細胞の障害による壊死は間質の炎症を惹起し、同時に線維化も著明となり、この部位には強い Alkaline phosphatase と Aminopeptidase の反応が出現する。同時にこれに関係して肥満細胞が出現するものと考えられる。一般に結合繊維線維の新生には肥満細胞が何らかの役割を演じており、Dilantin 性肉肉増殖症において結合繊維の旺盛な増殖のみられた症例に肥満細胞の発現率が 62.1% ときわめて高率に出現したと報告している (森ら, 1959)⁶⁴⁾。Alkaline phosphatase の活性は実験癌の発生と、制癌剤による癌の抑制とに直接の関係はない。発癌過程におけるその出現は、発癌剤塗布による刺激に関係して腫瘍組織中に出現した浸潤細胞由来のものであり腫瘍細胞には認められない。制癌剤塗布による腫瘍細胞の壊死脱落においても、その部に出現した円形

細胞由来の強い Alkaline phosphatase 活性が認められる以外には特異的な所見はみられなかった。以上の所見は動物やヒトの扁平上皮癌と似たものといえる^{5,65,66)}

Acid phosphatase の活性は主として組織球に一致して強い活性が出現し、これは腫瘍の著しい破壊を伴う部位に著明である。上皮組織においては角化と関係して認められるが制癌剤の塗布により腫瘍は主として表層の角質部から脱落するために強い Acid phosphatase 活性をもった部位は残存していない。Succinic dehydrogenase 活性は元来扁平上皮の基底細胞層に一致する腫瘍細胞に存在し、表層の角化部には陰性であり、制癌剤の塗布により角化部が脱落しても、Succinic dehydrogenase 活性そのものには著変を認めず、残存した腫瘍細胞に酵素活性が認められた。Lactate dehydrogenase は癌細胞に強く染まり、Succinic dehydrogenase と同様に制癌剤塗布後の残存癌細胞の本酵素活性は元来の癌細胞の活性と同様に著しく高い。Glucose-6-phosphate dehydrogenase の活性は鎖角化部の脱落に伴い、この酵素活性の存在する部位は喪失し、残存した基底部の腫瘍細胞の活性は低い⁶⁷⁾ 以上のごとく組織化学的な変化は病理組織学的な変化の進行に伴い当然の結果として認められたといえる。

結 語

実験的マウス皮膚腫瘍に Retinoid (Ro 10-1670), Bleomycin (BLM), 5-Fluorouracil (5-FU) を局所塗布して制癌効果を肉眼的、腫瘍縮小率、組織学的および酵素組織化学的に研究した結果、次の結論を得た。

1) マウス皮膚に 0.5% DMBA を塗布して発生した腫瘍は良性的乳頭腫と角化傾向が強い扁平上皮癌であった。これらの腫瘍に Retinoid, BLM, 5-FU を局所塗布し、制癌剤の局所適用された癌組織を観察した。

2) Retinoid 局所塗布による腫瘍縮小率は2週間塗布後、乳頭腫で平均58%、扁平上皮癌では平均21%、同様に BLM 局所塗布後、乳頭腫 53%、扁平上皮癌で29%の腫瘍縮小率を示した。5-FU 局所塗布における乳頭腫の縮小率は平均52%で扁平上皮癌では平均50%であった。以上の結果より乳頭腫では Retinoid の腫瘍縮小率が最も高く、扁平上皮癌では 5-FU の制癌効果が最も著明であった。

3) 病理組織学的所見として、3剤はその所見に若干の相違があるが次のごとく要約される。制癌剤を腫瘍表面から塗布すると塗布部表層から壊死化、脱落し、潰瘍形成後、痂皮を形成し治癒傾向に向かう。その際、癌細胞が島状に存在する場合もみられ、基底部の腫瘍細胞の残存は腫瘍の再燃の因子となりうるものと考えられ、この治療方法での限界を示唆した。間質結合織の反応は拡大型増殖腫瘍では炎症性反応は少なく、浸潤型増殖腫瘍

では炎症性反応がきわめて強い。それに呼応して肥満細胞は、炎症反応を示す間質の周囲の結合織に多数認められた。

4) 酵素組織化学的所見では次のことが観察された。Alkaline phosphatase 活性は間質の細胞浸潤と相関し、結合織の増殖とも関係して出現し、Acid phosphatase 活性は組織球と密接に相関していることが判った。Aminopeptidase は炎症性細胞に強い活性を示すが組織壊死部にはそれ程強い活性は認められなかった。Succinic dehydrogenase の活性は弱い活性が残存腫瘍細胞に認められ、Lactate dehydrogenase 活性は一般に強く、腫瘍上皮と間質に証明された。Glucose-6-phosphate dehydrogenase 活性は制癌剤塗布による腫瘍上皮の壊死脱落に比例して活性が認められなくなった。

5) 局所塗布による制癌剤の経皮的吸収には、その軟膏基剤の性状が吸収率と深く関係し影響していることを示唆した。

6) 副作用の発現はいずれの制癌剤にもほとんど認められなかった。

稿を終えるにあたり、本研究に終始御懇篤な御指導、御校閲を賜った岐阜歯科大学口腔外科学講座、恩師森昌彦教授に深甚なる謝意を表します。さらに数々の御助言、御協力をいただいた教室員各位に感謝の意を表します。

本論文の要旨は、第39回日本癌学会総会（昭和55年11月7日、於東京都）、第25回岐阜歯科学会例会（昭和56年2月21日、於岐阜歯科大学）、第26回日本口腔外科学会総会（昭和56年10月30日、於神奈川県）および第29回岐阜歯科学会例会（昭和56年11月21日、於岐阜歯科大学）において発表した。

引 用 文 献

- 1) 佐野 豊：組織学研究法、第5版、南山堂、東京、1977、34頁。
- 2) 小川和郎、武内忠男、森 富編集：新組織化学、第2版、朝倉書店、東京、1975、385頁。
- 3) 只野寿太郎、清水一男、他編集：Medical Technology ——染色法のすべて——、第5版、1977、997-1139頁。
- 4) 武内忠男、小川和朗編集：新酵素組織化学、第1版、朝倉書店、東京、1980、6頁。
- 5) 森 昌彦：腫瘍酵素組織化学、第1版、医学書院、東京、1966、235頁。
- 6) 梅沢浜夫：ブレオマイシン (Bleomycin) に関する研究。癌の臨床 13: 735 1967。
- 7) 大山征夫：口腔癌の化学療法。日口外誌 27: 1252 1981。
- 8) 太田邦夫、山本 正、杉村 隆、菅野晴夫編集：癌の制圧——最近の治療学——、第1版、南江

- 堂, 東京, 1981, 168頁.
- 9) 齊藤達雄: 癌化学療法と副作用, 癌の制圧. 第1版, 南江堂, 東京, 1979, 193頁.
 - 10) 齊藤達雄: 癌化学療法の進歩, 総論, 宿主に及ぼす影響——とくに副作用——. 総合臨床 20: 1386 1971.
 - 11) Fell, H.B. and Mellanby, E.: Metaplasia produced in cultures of chick ectoderma by high vitamin A. *J Physiol* 119: 470 1953.
 - 12) Rowe, N.H., et al.: The effect of vitamin A deficiency upon experimental oral carcinogenesis. *J D Res* 38: 72 1959.
 - 13) Levij, I.S., et al.: Potentiating effect of vitamin A on 9-10, dimethyl 1-2, benzantracene carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *Cancer* 22: 300 1968.
 - 14) Levij, I.S., Rwomushana, J.W. and Polliack, A.: Enhancement of chemical carcinogenesis in the hamster cheek pouch by prior topical application of vitamin A palmitate. *J Invest Dermatol* 53: 228 1969.
 - 15) Shamberger, R.J.: Inhibitory effect of vitamin A on carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 47: 668 1971.
 - 16) 小宮山莊太郎, 他: 5-FU, Vitamin A, Radiation 併用療法 (FAR 療法) に関する研究. 耳鼻 22: 388 1976.
 - 17) 小宮山莊太郎: 5-FU, Vitamin A, Radiation 併用療法に関する研究——FAR 療法——. 第35回日本癌学会総会特集号 4: 91 1977.
 - 18) Shklar, G., et al.: Retinoid inhibition of lingual carcinogenesis. *Oral surg* 49: 325 1980.
 - 19) Shklar, G., et al.: Inhibition of hamster buccal pouch carcinogenesis by 13-cis-retinoic acid. *Oral surg* 50: 45 1980.
 - 20) Gilmore, W., et al.: The effect of 13-cis-retinoic acid on hamster buccal pouch carcinogenesis. *Oral surg* 51: 256 1981.
 - 21) Prutkin, L.: Antitumor activity of vitamin A acid and fluorouracil used in combination on the skin tumor, keratoacanthoma. *Cancer Res* 33: 128 1973.
 - 22) Mori, M., Kobayashi, K.: Histochemical studies on the effect of antitumor retinoid (Ro 10-9359) on chemically induced epithelial tumors of the mouse skin. *Cell Morec Biol* 27: 27 1981.
 - 23) Ito, Y.: Effect of an aromatic retinoic acid analog (Ro 10-9359) on growth of virus-induced papilloma (shope) and related Neoplasia of rabbits. *Europ J Cancer* 17: 35 1982.
 - 24) Matter, A. and Bollag, W.: A fine structural study on the therapeutic effect of an aromatic retinoid on chemically induced skin papillomas of the mouse. *Europ J Cancer* 13: 831 1977.
 - 25) Elias, P.M. and Williams, M.L.: Retinoids, Cancer, and the skin. *Arch Dermatol* 117: 160 1981.
 - 26) Bollag, W. and Ott, F.: Vitamin A Säure in der Tumorthérapie Lokalbehandlung von praken Zerosen und basal Zellkarzinomen der Haut mit Vitamin A Säure. *Schweiz Med Wschr* 101: 17 1971.
 - 27) Ott, F. and Bollag, W.: Therapie der Psoriasis mit einem Oralwirksamen neuen Vitamin A Säurederivat. *Schweiz Med Wschr* 105: 439 1975.
 - 28) Orfanos, C.E., Braun-Falco, O., Farber, E.M., Grupper, Ch., et al.: Retinoids—Avances in basic research and therapy. ed 1, Springer-Verlag, Berlin, Heiderberg, NY, 1980, p 150.
 - 29) Koch, H.: Biochemical treatment of precancerous oral lesion, The effectiveness of various analogues of retinoic acid. *J Max-fae Surg* 6: 59 1978.
 - 30) 天笠光雄, 他: 口腔白板症の臨床型, 治療法と予後に関する研究——とくに白板症の悪性化について——. 日口外誌 24: 243 1978.
 - 31) 松浦正朗, 他: Etretnate (Ro10-9359) により著明に改善した過角化病変の2例. 日口外誌 26: 232 1980.
 - 32) 松浦正朗, 他: ビタミンA酸誘導体 Etretnate (Ro 10-9359) の口腔白板症, 扁平苔癬および乳頭腫に対する治療効果——多施設における臨床的検討——. 日口外誌 29: 372 1983.
 - 33) 遠藤英也: Vitamin A と癌. 癌と化療 6: 203 1979.
 - 34) 市川篤二, 他: Bleomycin (BLM) による皮膚腫瘍 (陰茎癌を含む) の治療. *Chemotherapy* 16: 882 1968.
 - 35) 上田恵一, 他: 油性プレオマイシン局注有棘細胞腫の電子顕微鏡的観察. 薬物療法 10: 553 1977.
 - 36) 石坂 隆: 疣贅に対するプレオマイシンの使用経験. *Jap J Antibotics* 28: 581 1975.
 - 37) 荒尾龍喜, 他: 皮膚悪性腫瘍に対するプレオマイシン外用の効果——とくに病理組織学的変化について——. 西日皮 37: 111 1975.
 - 38) 木下敬介, 他: 皮膚悪性腫瘍の Bleomycin 軟膏による治験. 西日皮 36: 845 1974.
 - 39) 上田恵一, 他: 2.3皮膚悪性腫瘍に対するプレオマイシン軟膏の臨床的検討. 薬物療法 7: 1257 1974.
 - 40) 石原和之, 他: 皮膚悪性腫瘍に対する0.5% プレオマイシン軟膏の効果について. 薬物療法 7: 1247 1974.
 - 41) Ebner, H.: Treatment of keratoacanthoma. *Wien Med Wochenschr* 125: 91 1975.
 - 42) 松本晃一: イオン導入法による Bleomycin の組織内移行に関する実験的研究. 日口外誌 26: 1201 1980.

- 43) 林崎勝武, 他: 頭頸部腫瘍に対する BLM-Iontophoresis. 癌治療誌 12: 522 1977.
- 44) 下山 孝, 三川 清, 他: 制癌剤の副作用とその防止対策. 癌と化療 3: 1111 1976.
- 45) 石山俊次, 他: 5-Fluorouracil とその制癌効果. 癌の臨床 13: 139 1967.
- 46) 藤田 浩, 他: 抗癌剤の Bioassay について. メディヤサークル 92: 1 1967.
- 47) 大石孝義, 他: 5-Fluorouracil-6-¹⁴C の経皮投与時での生体内運命について. 薬物雑誌 93: 749 1973.
- 48) Bollag, W. and Ott, F.: Therapy of actinic keratoses and basal cell carcinomas with local application of vitamin A acid (NSC-122758). Cancer Chemotherapy Rep 55: 59-seq 1971.
- 49) 上田恵一, 他: 5-Fluorouracil 外用皮疹の電子顕微鏡像. 臨床 29: 620 1975.
- 50) Ashlay, C.A.: Epithelial and stromal roles in carcinogenesis II. Tumor development in internal transplants of skin and epithelium treated with 3-methylcholanthrene. J Natl Cancer Inst 26: 1445 1961.
- 51) Howell, J.S.: Skin tumors in the rat produced by 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene and methylcholanthrene. Brit J Cancer 16: 101 1962.
- 52) Auerbach, W.M.: Histochemistry of hydrolytic and oxidative enzymes in experimental skin carcinoma of the mouse. Cancer Res 24: 937 1964.
- 53) Oka, R., et al.: Histochemical distributia of alkaline and acid phosphatases, esterase, β -glycosidases and protein-bound sulfhydryl groups in experimental carcinogenesis of the mouse skin. Gann 52 305 1961.
- 54) Reiner, L., Rutenburg, A.M. and Seligman, A.M.: Acid phosphatase activity in human neoplasm. Cancer 10: 563 1957.
- 55) Monis, B., et al.: Study of leucine aminopeptidase in neoplastic and inflammatory tissues with a new histochemical method. Cancer 12: 601 1959.
- 56) Nachlas, M.M., Crawford, D.T. and Seligman, A.M.: The histochemical demonstration of leucine aminopeptidase. J Histochem Cytochem 5: 264 1957.
- 57) Glenner, G.G., Burstone, M.S. and Meyer, D.M.: A study of aminopeptidase activity in the stroma of neoplastic tissue with comparison of techniques. J Natl Cancer Inst 23: 857 1959.
- 58) Bersaques, J. de.: Leucine aminopeptidase and naphthylamidases in human epidermis. Arch Klin exp Derm 234: 52 1969.
- 59) Monis, B., et al.: Histochemical study of 3 dehydrogenase systems in human tumors. Cancer 12: 1238 1959.
- 60) Cohen, R.B., Nachlas, M.M. and Seligman, A.M.: Histochemical demonstration of esterase in malignant tumors. Cancer Res 11: 709 1951.
- 61) Monis, B., et al.: Cytochemical study of esterase activity of human neoplasms and stromal macrophages. Cancer 14: 369 1961.
- 62) Mori, M., et al.: Histochemical comparison of dehydrogenases related to Glucose metabolism in human tumors: Localization and activity of lactate, Glucose-6-phosphate, and 6-phosphogluconate dehydrogenases. Gann 57: 627 1966.
- 63) Mori, M., et al.: Histochemical study on the localization of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human tumors. Gann 54: 433 1963.
- 64) 森 昌彦, 高田嘉定: 炎症歯肉に於ける Mast cell について. 阪大歯誌 4: 409 1959.
- 65) Monis, B., et al.: Alkaline phosphatase activity in neoplastic and inflammatory tissues of man. Cancer 13: 538 1960.
- 66) Murata, I., et al.: Histochemical study of alkaline phosphatase activity in human neoplasms. Gann 57: 513 1966.
- 67) Mori, M., et al.: Histochemical observation of NADP-dependent isocitrate and Glucose-6-phosphate dehydrogenase in the human neoplasms. Acta Histochemica Cytochemica 1: 154 1968.