1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) と放射線との併用効果についての研究

呉 乃 榮

Study on the combined effects of 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) and X-ray irradiation

Nai-Rong Wu

Abstract: For the purpose of evaluating the combined effects of 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) and X-ray irradiation, the inhibition of isoproterenol (IPR) stimulated DNA synthesis in mice parotid glands and the survival time of mice bearing Ehrlich ascites tumors were used. When HCFU was given after irradiation, the combined effects were seen to be more potent than HCFU given before irradiation in both experiments. Especially when given at intervals of 2 hours after irradiation, the combined effect of HCFU (20 mg/kg) and irradiation (400 rad) was found to have a synergistic effect on the mice bearing tumors and at least an additive combined effect on inhibiting IPR-stimulated DNA synthesis in the combination of HCFU (20 mg/kg) with irradiation (100 rad). It was suggested that the synergistic effect can be expected in the clinical treatment of cancer, with 2 agents used in combination.

Key words: combined effect, synergistic effect, additive effect.

緒 言

顎、口腔領域は食物摂取の門戸であり、上気道の一部を形成すると同時に顔面の一部も形成し、審美的ならびに機能的にきわめて重要な部位である。したがってこの部位の悪性腫瘍の治療に当たっては、腫瘍の制御と同時に審美的、機能的障害を最小限に抑える配慮が大切である。これらの点より、治療効果の増強ならびに副作用の軽減を目的にして種々の併用療法が試みられている。

口腔癌は、その約90%が扁平上皮癌であり、その治療にあたっては一般に手術、化学療法および放射線療法が併用されている。近年、制癌剤の著しい進歩につれ、放射線との併用療法が広く試みられ、その治療成績も向上しつつあることが多く報告されている¹⁻³⁾。

1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) は 1975 年

1-Hexylcarbamoyl-
5-fluorouracil

図 1 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) の化学構造式

尾崎ら⁴⁾により合成された 5-fluorouracil (5-FU) の masked compound である。その構造式は図 1 に示すように、5-FU の 1 位の水素が n-hexylcarbamoyl group で置換されたもので、各種実験腫瘍に対し、広い抗腫瘍スペクトラムを有していることが証明されている⁵⁻⁷⁾。また動物実験では経口投与後ただちに腸管より吸収され、血液中で 5-FU および futraful より不活化され難

広島大学歯学部口腔外科学第 1 講座
(主任：高田和彰教授)

The First Department of Oral and Maxillo-facial
Surgery, Hiroshima University, School of Dentistry
(Chief: Prof. Kazuaki Takada)

受付日：昭和61年 1 月21日

いため、HCFU および中間代謝物の形で長時間存在し、これから徐々に遊離される 5-FU も比較的長時間、高濃度を維持できることが認められる⁸⁻¹⁰⁾ 臨床的にも Phase 1 study において、fluoropyrimidine に共通の副作用である消化器症状の出現頻度が 5-FU、futrafal に比し、少なくとも軽微であることが報告されている¹¹⁾ 従って HCFU と放射線を併用することより、さらに大きい抗腫瘍効果が期待できると考えられる。

しかしながら制癌剤と放射線との併用療法は、癌周囲の正常組織や造血系、免疫系などに及ぼす障害も大きいので、治療途中で中断せざるを得ない場合が多く、期待される治療効果が得られ難いのが現実である。したがって両者を併用する際に、最適な併用時期、最適投与量および線量などに関する詳細な検討が必要である。しかし、*in vivo* の実験系を用いた HCFU と放射線との併用に関する基礎的研究はほとんどなされていない。

本研究は HCFU と X 線照射との併用効果および併用方法に関する詳細な検討を行う 目的で、isoproterenol (IPR) 投与マウス耳下腺同調増殖系を用い、DNA 合成能の抑制率を指標として検索を行った。さらにエーリッヒ腹水腫瘍の担癌マウスを用い、両者併用治療の延命効果を指標とした検索をも加えて行った。

実験材料および方法

1. IPR 投与マウス耳下腺同調増殖系に関する実験

1) 実験動物

実験には生後 8 週齢、体重 25~35 gm の DDY 系雄性マウスを使用した。実験期間中、固型飼料と水は自由に与えたが、咀嚼による唾液分泌の影響を除くため、屠殺 4 時間前より水のみと絶食とした。

2) 薬物投与

IPR は 80 mg/kg を 0.25 ml の注射用蒸留水に溶解し、48 時間間隔で 2 回腹腔内投与した。HCFU は 0.5% methyl cellulose 溶液 0.3 ml に懸濁し、チューブにて胃内に強制経口投与した。コントロールには同量の 0.5% methyl cellulose 溶液を経口投与した。

3) X 線照射

X 線照射は、マウスを鉛板にテープにて固定し、頭頸部を照射野とし、他部を厚さ約 6 mm の鉛板にて遮蔽したのち、島津社製 Shnai 2 号 X 線照射装置を用い、200 kVp, 25 mA, 半価層 1.11 mmCu, 焦点皮膚間距離 60 cm の条件下で、100 rad および 200 rad の 1 回照射を行った。

4) DNA 合成能の測定

マウスに [methyl-³H] thymidine (specific activity: 25.0 Ci/mmol) 0.33 mCi/kg および [¹⁴C] formic acid (specific activity: 59.0 Ci/mmol) 0.1 mCi/kg を、それぞれ屠殺前 30 分および 60 分に腹腔内投与し、頸椎脱臼に

て致死させたのち、ただちに両側耳下腺を摘出し、隣接する脂肪組織およびリンパ組織を可及的に除去し、生理的食塩水にて洗浄後、重量を測定し試料に供した。耳下腺細胞中の DNA は Schmidt-Thannhauser-Schneider の変法¹²⁾ に準じて抽出した。すなわち、摘出水冷された耳下腺に 9 倍の蒸留水を加えて水冷しながらホモジナイズし、10% 組織ホモジネートを作製した。ホモジネート 1 ml を、水冷の 10% TCA 2.5 ml にて 2 回洗浄、遠心分離し、酸可溶性画分を除去した。沈澱について 99.5% エタノール 5.0 ml および エタノール・エーテル (1:1) 5.0 ml にて脂質を除去し、得られた沈澱に 0.3 N KOH 2.0 ml を加え、37°C で 16 時間加水分解を行った。6 N HCl 0.15 ml にて中和したのち、5% TCA 2.0 ml を加え、遠心分離により RNA 画分を除去した。沈澱に 5% TCA 5 ml を加え、90°C で 15 分間加熱し、冷却後遠心分離し、沈澱を 5% TCA 2.5 ml で 1 回洗浄し、上清液を合わせて DNA 画分とした。この DNA 溶液について仔牛胸腺 DNA を標準液として、Diphenylamine 法¹³⁾ にて DNA 量を定量した。また DNA 中に取り込まれた [methyl-³H] thymidine および [¹⁴C] formic acid の放射比活性を調べるため、DNA 画分を Insta-Gel に溶解し、溶体シンチレーションスペクトロメーター (Aloka spectrometer LSC-900) で測定した。DNA 合成能は dpm/μg にて表わした。

5) 試薬

IPR は半井化学薬品株式会社製 DL-isoproterenol HCl を用いた。HCFU は三井製薬工業株式会社より供与されたカルモフルを用いた。[methyl-³H] thymidine および [¹⁴C] formic acid は Amersham International Plc (England) より購入されたものを使用した。DNA 標準液の調整には、Sigma 社製仔牛胸腺 DNA を用いた。シンチレーターは Packard 社製の Insta-Gel を使用した。

2. エーリッヒ腹水腫瘍系に関する実験

1) 実験動物

恒温の動物飼育舎で 1 週間飼育した生後 6 週齢、体重 20~25 gm, DDY 系雄性マウスを実験に用いた。実験期間中は固型飼料および水を自由に摂取させた。

2) エーリッヒ腹水腫瘍細胞

実験に用いたエーリッヒ腹水腫瘍細胞は、当教室にてマウスの腹腔内で継代されているものを使用した。約 1×10^6 個のエーリッヒ腫瘍細胞を、0.2 ml の生理的食塩水に浮遊させ、これをマウスの腹腔内に移植し、移植後 24 時間より実験を開始した。

3) 薬物投与および X 線照射

移植後 24 時間目から HCFU を胃内に強制経口投与した。X 線照射は、マウスをネプタールの尾靜脈麻酔下で腹部を照射野とし、他部は鉛板にて遮蔽し、IPR 投与実験系と同様の条件下で 1 回照射を行った。

図 2 IPR 投与後に $[^3\text{H}]$ thymidine を先駆物質とした場合のマウス耳下腺 DNA 合成能の経時的変化
(各値は15~20匹のマウスの平均値±標準誤差)

図 3 IPR 投与後に $[^{14}\text{C}]$ formic acid で標識したマウス耳下腺 DNA 合成能の経時的変化
(各値は15~20匹のマウスの平均値±標準誤差)

4) 治療効果の判定

治療効果の判定は、移植24時間後からの平均生存期間 (mean survival time; MST)¹⁴⁾を算出し、治療群とコントロールとの MST の比 (T/C value) にて判定した。

$$\text{MST} = \frac{\sum(t \cdot f)}{n}$$

t : 移植24時間後から腫瘍死するまでの日数

f : 第 t 日目に死亡した動物数

n : 観察した動物数

$$\text{T/C value} = \frac{\text{治療群の MST}}{\text{コントロール群の MST}}$$

実験結果

1. IPR 投与マウス耳下腺同調増殖系における実験結果

1) 耳下腺 DNA 生合成に対する IPR の影響

IPR 80 mg/kg を48時間間隔で2回投与した後の耳下

図 4 IPR 投与後に ^3H thymidine を先駆物質とした場合のマウス耳下腺 DNA 合成能に及ぼす HCFU の影響
(各値は 8~10 匹のマウスの平均値 $\pm$ 標準誤差)

図 5 IPR 投与後に ^{14}C formic acid で標識したマウス耳下腺 DNA 合成能に及ぼす HCFU の影響
(各値は 8~10 匹のマウスの平均値 $\pm$ 標準誤差)

腺細胞での DNA 合成能の変化は、図 2, 3 に示すごとく、 $[\text{methyl-}^3\text{H}]$ thymidine を前駆物質とした場合および ^{14}C formic acid で標識した場合、両者とも IPR 投与後 16 時間頃より急激に上昇し始め、22 時間で最高となり、以後次第に減少した。一方、無処置群では、マウス耳下腺の DNA 合成能の変動は全く認められなかった。

2) HCFU の投与による DNA 合成能に対する影響

IPR 投与後 30 分に HCFU 100 mg/kg, p.o. を投与したところ、 ^{14}C formic acid で標識した場合では、DNA への取り込み能はコントロールに比し強く抑制されたが、 $[\text{methyl-}^3\text{H}]$ thymidine を前駆物質とした場合は、その取り込み能はコントロールに比べ増加していた。すなわち HCFU は ^{14}C formic acid の DNA への取り込みを強く抑制したが、 $[\text{methyl-}^3\text{H}]$ thymidine の取り込みはむしろ促進する傾向を示した。この結果より、

図 6 IPR 投与した後の各時間における HCFU のマウス耳下腺 DNA 合成抑制率

図 7 IPR 投与後のマウス耳下腺 DNA 合成能に及ぼす X 線照射の影響

(各値は 8～10 匹のマウスの平均値 ± 標準誤差)

HCFU により DNA 合成抑制効果を調べるには、 $[^{14}\text{C}]$ formic acid で標識しなければならないことが確認された (図 4, 5).

3) HCFU の投与時期と DNA 合成抑制効果との関係

HCFU の投与時期による DNA 合成抑制効果の差違

を調べるため、IPR 投与直後、30 分後、1 時間後、3 時間後、5 時間後、7 時間後および 16 時間後に HCFU 20 mg/kg を投与した。その結果、図 6 に示すごとく、その DNA 合成に対する抑制効果は、IPR 投与後 30 分に HCFU を投与した場合にやや強く認められたが、7 時間まではほとんど差がなかった。しかし 16 時間後の

図 8 HCFU を X 線照射前に投与した場合のマウス耳下腺 DNA 合成能に及ぼす併用抑制効果
(各値は 8～10 匹のマウスの平均値 ± 標準誤差)

表 1 IPR 投与マウス耳下腺 DNA 合成能に及ぼす HCFU の濃度による抑制効果

Dose of HCFU (mg/kg)	Activity of DNA biosynthesis		
	dpm/μg DNA (mean ± S.E.)*	%	delay of peak (hr)
(control) 0	6.02 ± 0.55	100.0	—
5	5.52 ± 0.33	87.2	0
10	5.12 ± 0.54	77.0	0
20	4.39 ± 0.22	58.4	2
100	4.03 ± 0.30	49.2	2
300	3.25 ± 0.45	29.3	6

*: 各値は 8～10 匹のマウスの平均値 ± 標準誤差

HCFU 投与ではその DNA 合成抑制効果は明らかに弱かった。

4) HCFU 投与量と DNA 合成抑制効果との関係について

IPR 投与後 30 分に 5, 10, 20, 100 および 300 mg/kg の HCFU を投与したところ, HCFU 投与量の増加とともに, DNA 合成抑制効果が増強した。したがって HCFU の DNA 合成に対する抑制効果は濃度依存的であることが示された。また DNA 合成のピークは 2～6 時間遅延した (表 1)。

5) DNA 合成に及ぼす X 線照射の影響

図 7 に示すごとく, X 線 100 rad および 200 rad を IPR 投与後 60 分に照射したところ, 100 rad 照射した場合では, その DNA 合成能は, コントロールに比べ 50.8

表 2 IPR 投与マウス耳下腺 DNA 合成能に及ぼす HCFU と X 線照射との併用抑制効果

Group	Activity of DNA biosynthesis		Inhibition rate (%)
	dpm/μg DNA (mean ± S.E.)*	delay of peak (hr)	
Control	6.02 ± 0.55	—	0.0
HCFU 20 mg/kg	4.39 ± 0.22	2	41.6
X-ray irradiation 100 rad	4.09 ± 0.19	2	50.7
HCFU → X-ray before irradiation			
0.5 (hr)	3.83 ± 0.42	6	55.8
1.5	3.16 ± 0.25	6	72.9
2	2.97 ± 0.41	6	77.8
X-ray → HCFU after irradiation			
0.5 (hr)	2.80 ± 0.39	6	82.1
1.0	2.73 ± 0.29	6	83.9
2	2.52 ± 0.36	6	89.3
4	2.99 ± 0.33	4	77.3
8	3.39 ± 0.51	4	67.1

*: 各値は 8～10 匹のマウスの平均値 ± 標準誤差

% 抑制され, そのピークも約 2 時間遅延した。一方, 200 rad 照射した場合では, DNA 合成のピークは 22 時間および 26 時間に現れ, DNA 合成抑制率はそれぞれ 69.4%, 58.2% であった。

表 3 エーリッヒ腹水腫瘍の担癌マウスに及ぼす HCFU および X 線照射の抗腫瘍効果

Group	Number of mice	HCFU (mg/kg/day)	X-ray irradiation (rad)	Life span (day)		T/C value
				mean $\pm$ S.E	extreme	
Control	58	—	—	14.8 $\pm$ 4.7	8~25	1.00
HCFU	10	5	—	14.0 $\pm$ 3.6	9~22	0.95
	10	10	—	14.0 $\pm$ 2.1	11~19	0.95
	10	20	—	15.8 $\pm$ 3.4	10~22	1.06
	10	50	—	15.9 $\pm$ 2.5	13~20	1.07
	10	100	—	16.1 $\pm$ 3.7	10~24	1.09
X-ray	20	—	200	14.5 $\pm$ 3.2	8~21	0.98
	20	—	400	15.2 $\pm$ 3.8	9~25	1.03
	20	—	800	19.4 $\pm$ 3.0	14~25	1.31**
	10	—	1,000	21.1 $\pm$ 5.2	16~31	1.44**

** : P < 0.01 ; t-検定

図 9 HCFU を X 線照射後に投与した場合のマウス耳下腺 DNA 合成能に及ぼす併用抑制効果
(各値は 8~10 匹のマウスの平均値 $\pm$ 標準誤差)

6) HCFU と X 線照射との併用における DNA 合成抑制効果
HCFU と X 線照射との併用方法の違いによる DNA 合成抑制効果の差違についての検索を行うため、IPR 投与後 60 分に X 線 100 rad を照射し、照射前 30 分、90 分および 120 分に HCFU 20 mg/kg を投与した (図 8, 表 2)。その結果、いずれの併用群においても、HCFU 単独投与群および X 線単独照射群に比し、DNA 合成能はやや強く抑制されたが、有意な差はなかった。一方、照射後 30 分、1 時間、2 時間、4 時間および 8 時間に HCFU 20 mg/kg を投与した場合では、DNA 合成能の抑制率

はおおの 82.1%, 83.9%, 89.3%, 77.3% および 67.1% と強く抑制された (図 9, 表 2)。従って DNA 合成能の抑制率からみると、照射前投与群に比べ、照射後投与群の方がより強い DNA 合成抑制効果を有し、特に X 線照射後 2 時間に HCFU を投与した場合には DNA 合成のピークは約 6 時間と長時間遅延し、DNA 合成能も約 90% と最も DNA 合成抑制効果を有していることが考えられ、その効果は相加的であった。
2. エーリッヒ腹水腫瘍系における実験結果
1) エーリッヒ腹水腫瘍マウスに対する HCFU の延命効果

表 4 エーリッヒ腹水腫瘍担癌マウスに及ぼす HCFU と X 線照射との併用による抗腫瘍効果

Group	Number of mice	X-ray irradiation (rad)	Chemotherapy		MST (days)		T/C value
			Time of treatment	HCFU (mg/kg)	mean $\pm$ S.E.	extreme	
Control	58	—	—	—	14.8 $\pm$ 4.7	8~25	1.00
HCFU alone	10	—	—	20	15.8 $\pm$ 3.4	10~22	1.06
X-ray alone	20	400	—	—	15.2 $\pm$ 3.8	9~25	1.03
	20	800	—	—	19.4 $\pm$ 3.0	14~25	1.31
HCFU $\rightarrow$ X-ray			before				
	10	800	0.5(hr)	20	15.5 $\pm$ 2.3	11~19	1.05
	10	800	1	20	19.9 $\pm$ 4.5	14~28	1.34
	10	800	2	20	19.1 $\pm$ 1.6	17~21	1.29
	10	800	4	20	20.2 $\pm$ 2.6	16~23	1.36
	10	400	0.5	20	17.0 $\pm$ 2.9	12~21	1.15
	10	400	1	20	15.1 $\pm$ 2.6	12~19	1.02
	10	400	2	20	16.8 $\pm$ 3.1	12~20	1.13
	10	400	4	20	16.7 $\pm$ 3.6	12~23	1.13
X-ray $\rightarrow$ HCFU			after				
	10	800	0.5(hr)	20	21.1 $\pm$ 1.5	18~23	1.42
	10	800	1	20	21.3 $\pm$ 4.3	15~30	1.43
	10	800	2	20	21.6 $\pm$ 2.4	16~26	1.45
	10	800	4	20	20.8 $\pm$ 1.4	19~23	1.41
	10	400	0.5	20	17.2 $\pm$ 2.7	14~22	1.16
	10	400	1	20	18.4 $\pm$ 3.5	13~26	1.24
	10	400	2	20	23.7 $\pm$ 4.5	15~30	1.60**
	10	400	4	20	20.9 $\pm$ 5.6	18~31	1.41*

** : $P < 0.01$, * : $P < 0.05$; 繰り返しのある二元配置の検定

図 10 エーリッヒ腹水腫瘍担癌マウスに及ぼす HCFU と X 線照射との併用による抗腫瘍効果

表 5 エーリッヒ腹水腫瘍担癌マウスに及ぼす HCFU と X 線照射との併用において両者の投与量を減少した場合の抗腫瘍効果

Group	Number of mice	X-ray irradiation (rad)	Chemotherapy		MST (days)		T/C value
			Time of treatment	HCFU (mg/kg)	mean ± S.E.	extreme	
Control	58	—	—	—	14.8 ± 4.7	8~25	1.00
HCFU alone	10	—	—	10	14.0 ± 2.1	11~19	0.95
	10	—	—	20	15.8 ± 3.4	10~22	1.06
X-ray alone	10	100	—	—	13.3 ± 3.5	8~20	0.90
	20	200	—	—	14.5 ± 3.2	8~21	0.98
	20	400	—	—	15.2 ± 3.8	9~25	1.03
	20	800	—	—	19.4 ± 3.0	14~25	1.31
X-ray → HCFU			after				
	10	800	2(hr)	20	21.6 ± 2.4	16~26	1.45
	10	400	2	20	23.7 ± 4.5	15~30	1.60**
	10	400	2	10	21.5 ± 3.5	18~29	1.45*
	10	200	2	20	18.7 ± 3.3	13~25	1.26
	10	200	2	10	18.1 ± 4.1	12~26	1.22
	10	100	2	20	13.3 ± 4.0	9~21	0.89
	10	100	2	10	14.0 ± 3.9	9~20	0.94

** : P < 0.01, * : P < 0.05 ; 繰り返しのある二元配置の検定

図 11 エーリッヒ腹水腫瘍担癌マウスに及ぼす HCFU と X 線照射との併用において両者の投与量を減少した場合の抗腫瘍効果

エーリッヒ腹水腫瘍細胞 1×10^6 個をマウス腹腔内に移植し、移植後24時間からの平均生存日数 MST は14.8 ± 4.7日であり、これをコントロールとした。

移植後24時間に HCFU を経口投与したところ、表3に示すごとく、HCFU 5, 10, 20, 50 および 100 mg/kg を1回投与した場合、有意な延命効果は認められなかった。

2) エーリッヒ腹水腫瘍動物に対するX線照射の影響
移植後24時間目にX線 200, 400, 800 および 1,000 rad を1回照射し、その延命効果を調べたところ、X線 200 および 400 rad を照射した群では、コントロールと比べ、有意な差は認められなかった。しかし 800 および 1,000 rad 照射した場合では、その T/C value はそれぞれ 1.31, 1.44 と有意な延命効果が認められた(表3)。

3) HCFU とX線照射との併用方法および併用量の違いによる併用効果の差違

次に HCFU とX線照射との併用方法の違いによる延命効果の差違についての検索を行うため、移植後24時間目にX線 400 あるいは 800 rad を照射し、これに対し照射前4時間、2時間、1時間、30分および照射後30分、1時間、2時間、4時間に HCFU 20 mg/kg を投与した。その結果、図10と表4に示すように、照射前に投与した群に比べ、照射後に投与した群の方が60%より強い併用延命効果が認められた。特にX線 400 rad 照射後2時間に HCFU 20 mg/kg を投与した場合が最も強い併用延命効果を示すことが認められた。この結果を、繰り返しのある二元配置¹⁵⁾にて調べると、HCFU 単独投与群またはX線単独照射群と併用群との間に、1%の危険率で有意差が認められた。したがって両者の併用効果が相乗的效果であることが判明した。

次に HCFU の投与量を 20, 10 mg/kg に減少させ、X線照射線量も 200, 100 rad に減少し、両者の組み合わせにより併用延命効果の差違についての検索を行った。その結果、図11と表5に示すごとく、コントロールおよび両者単独処置群に比べ、減量された両者の併用群は有意な延命効果が認められず、dose を減少させると、併用効果が出現しなくなることが確認された。

以上の結果より、HCFU とX線照射とを併用した場合には、HCFU を照射後に投与した群の方が、照射前に投与した群に比べ、より強い併用延命効果が現れ、特に照射後2時間に HCFU を投与した場合に、最大の併用延命効果が認められ、その効果は相乗的であることが明らかとなった。

考 察

顎、口腔領域において悪性腫瘍の治療として薬剤と放射線との併用療法に関する基礎的知見を得る目的で、IPR 投与マウス耳下腺同調増殖系細胞における DNA 合

成能の抑制率およびエーリッヒ腹水腫瘍の担癌マウスの延命効果率を指標として検索を行った。

一般に細胞周期を外れ、 G_0 期の状態にある細胞が何らかの刺激により再び細胞周期に入り分裂増殖を起こすことは以前より良く知られている¹⁶⁾。アドレナリン作動性 β -受容体作用薬 IPR をマウスやラットに投与すると、唾液腺細胞、特に耳下腺が増殖かつ肥大することが報告されている^{17,18)}。この IPR による耳下腺細胞増殖機構に関しては、cAMP 依存性蛋白質リン酸化酵素系と Ca^{2+} カルモデュリン系が調節機構として重要な働きを担っていると考えられている¹⁹⁻²⁴⁾。すなわち IPR の投与により、膜受容体に存在するアデニレート・シクラーゼが活性化され、cAMP の一過性上昇が起こることにより、増殖休止期にある唾液腺細胞が細胞周期に入るといふメカニズムが考えられている。また IPR を1回腹腔内投与することによって約60%の唾液腺細胞が DNA 合成を行うのに比し、48時間間隔で2回投与すると、約80%の腺細胞が同調され、その DNA 合成の開始時期も約4~6時間早く起こることが知られている²⁵⁻²⁸⁾。以上のことより、IPR 投与耳下腺同調増殖実験は、*in vivo* において各種薬剤や放射線照射の増殖機構に対する影響を調べるのに適切な実験系と考えられる。

5-FU は1957年 Duschinsky ら²⁹⁾によって合成され、Heidelberger ら³⁰⁻³²⁾が広い抗腫瘍スペクトラムを示し、かつ優れた制癌作用を有していることを発見して以来、現在世界で最も広汎に使用されている制癌剤の1つである。5-FU の作用機序としては現在大きく2つに分けて考えられている。まず第1に5-FU は細胞内でリン酸化され、5-fluorouridine monophosphate (FdUMP) となり、これが DNA 合成の *de novo* 経路で、deoxythymidine monophosphate (dTMP) を生成する唯一の酵素である thymidylate synthetase を阻害することで DNA 合成を抑制し殺細胞作用を現すという作用機序である³³⁻³⁶⁾。もう1つの機序としては、5-FU はリン酸化された後、種々の RNA に取り込まれ、特に ribosome RNA の processing を阻害し、その代謝異常をもたらすという機序も考えられている³⁷⁻³⁹⁾。さらに最近、5-FU は直接 DNA に取り込まれることで、細胞毒性を発揮し、制癌作用を現すという報告も多くされている⁴⁰⁻⁴²⁾。HCFU は5-FU の masked compound で、経口投与後体内にて徐々に直接5-FU に変換されたり、酸化酵素介在による種々の中間代謝物を経たのち5-FU に変換される^{43,44)}。それゆえ血漿中および組織内での5-FU は長時間、高濃度を維持できるため、HCFU は5-FU や futraful に比較し、より強力な抗腫瘍効果を有していることが報告されている⁴⁵⁾。したがって HCFU とX線照射とを併用することにより、さらに大きい抗腫瘍効果が期待できると考えられる。

従来、5-FU による DNA 合成抑制効果の検索におい

では, thymidine を前駆物質にすると, その抑制効果の判定ができないといわれている⁴⁶⁻⁴⁸⁾。本研究においても, [methyl-³H] thymidine を前駆物質とした場合, HCFU 投与によりその DNA への取り込みが促進され, 一方, [¹⁴C] formic acid で標識した場合では, その DNA 合成能は強く抑制された。[methyl-³H] thymidine を用いた場合の DNA 合成促進の理由としては, HCFU は de novo 経路において thymidylate synthetase を抑制するため, salvage 経路が代償的に賦活される。その結果, [methyl-³H] thymidine が大量に利用され, 腫瘍細胞内の全 deoxy-thymidine triphosphate (dTTP) の量に対する [methyl-³H] thymidine によって標識される dTTP の割合が相対的に増加し, 単位 DNA 当たりの [methyl-³H] thymidine が見かけ上促進すると考えられる⁴⁸⁾。したがって HCFU による DNA 合成抑制効果を調べるには, [¹⁴C] formic acid で標識しなければならないことが確認された。

5-FU の殺細胞作用は細胞周期において, S-phase specific with self-limitation であるため, DNA 合成阻害作用のみならず, RNA および蛋白質合成阻害も示し, さらに G₁ 期から S 期への移行を遅延させる作用を有しているといわれている⁴⁹⁾。また殺細胞様式からみると, 5-FU の作用は時間依存的であることが認められている⁴⁹⁾。本研究では, IPR 投与マウス耳下腺同調増殖系において, IPR 投与直後から 7 時間までの間に HCFU を投与した場合, DNA 合成抑制効果が認められ, 特に IPR 投与後 30 分に投与した場合, 比較強い抑制効果を示した。しかし, IPR 投与後 7 時間以降に HCFU を投与した場合は, DNA 合成抑制効果が次第に減弱した。また細胞周期に対する作用については, HCFU により DNA 合成能のピークが, 約 2~6 時間遅延されたことより, HCFU は細胞周期の遅延作用 (G₁ 期から S 期への移行の遅延) を有していることが確認された。さらに HCFU の DNA 合成に対する抑制効果はその濃度に依存することが認められた。HCFU は 5-FU の masked compound であるため, HCFU の投与量を増すに連れ, 遊離される 5-FU の量もさらに長時間, 高濃度を維持でき, 5-FU の効果発現が時間依存的であるため HCFU の効果が濃度依存的に出現したと考えられる。

一方, 放射線が細胞を死滅させる様式としては, 形態学的には分裂期死 (mitotic death) と間期死 (interphase death) に区別されている^{50, 51)}。分裂期死は, X線, γ 線および少線量の Linear energy transfer (LET) 放射線などを照射した時に主として観察される。これに対し, 間期死は高 LET 放射線あるいは大線量の低 LET 放射線を照射した時に多く観察される。さらに細胞分子レベルでの放射線の生物作用については, 放射線エネルギーが細胞核内にある標的 (Target) に直接作用し, 細胞を不活化させる直接作用と, 他の分子に作用して励起

状態の分子, またはラジカルを作り, それが細胞内の他の分子に作用する間接作用とに分けることができる⁵²⁾。放射線による細胞障害を起こす標的は, 細胞の核内 DNA と考えられ, 理論的には細胞内にいくつかの標的があり, ある数の標的が損傷を受けると細胞増殖ができなくなり細胞が不活化すると考えられている⁵³⁾。

また放射線に対する細胞の感受性は細胞周期に依存することが知られている。すなわち培養細胞を用いた実験においては, G₁-S 期および G₂-M 期には細胞は放射線に対して高い放射線感受性を示しており, 逆に G₁ 期, S-G₂ 期には細胞は放射線に対して抵抗性を示すといわれている⁵³⁻⁵⁵⁾。また細胞周期に対する放射線の遅延効果は, G₂ 期が最も感受性が高く, いわゆる G₂ delay と呼ばれている⁵³⁻⁵⁵⁾。

ところが Sasaki ら⁵⁶⁾は IPR をマウスの腹腔内に投与し, その 1 時間後 (G₁ 初期), 16 時間後 (G₁ 後期) および 20 時間後 (S 期) に γ 線照射を行い, マウス唾液腺に対する照射の影響を調べ, IPR で同調された唾液腺細胞では G₁ 期に照射すると DNA 合成が線量依存的に抑制されると報告している。この影響には, 唾液腺細胞の数の減少や, 腺細胞中で行われている DNA 合成率の減少などが関係していると考えられている。このように細胞周期により放射線感受性に差違が生じる原因はまだ不明であるが, IPR 投与による細胞内の cAMP 濃度の変動が関与している可能性も考えられている⁵⁷⁾。

本研究においても, X線照射は IPR 投与後 60 分 (G₁ 初期) に行い, 100 rad 照射した場合, DNA 合成能は顕著に抑制され, 細胞周期の遅延効果も認められた。200 rad を照射した場合は, DNA 合成のピークは二峰性に出現した。この原因については, まだ明らかではないが, IPR および放射線に対する耳下腺細胞の感受性の差違によるものではないかと考えられる。

従来, 化学療法と放射線との併用療法を行ううえにおいて期待されることは, (1) 転移の予防, (2) 正常組織に対する副作用の減少, (3) 治療効果の向上という 3 つのことが考えられている。また制癌剤と放射線との併用による効果について, Bagshaw は増感作用 (sensitization), 相乗作用 (potentiation) および相加作用 (additivity) に分類している^{58, 59)}。5-FU と放射線との併用に関する研究はいままで多くなされてきたが, 併用効果に対する意見は一致していない。Lowry⁶⁰⁾は培養細胞を用い 5-FU と放射線照射との併用効果を調べたところ, 両者の効果は相加的であると報告している。これに反し, Berry⁶¹⁾は HeLa 細胞を用いた実験で, 5-FU と放射線との併用効果が相乗的であると報告している。また使用する実験腫瘍の種類によって併用効果が異なるという報告もある⁶²⁾。しかし最近では併用時期を工夫することにより相乗効果が期待できるという報告が多く出されるよう

になってきた。Viette⁶³⁾は白血病の担癌マウスを用いた実験において、照射直後から8時間までの間に5-FUを投与した場合、照射前に5-FUを投与した群に比しより大きな相乗効果を現すことを報告している。さらにHo⁶⁴⁾はマウスを5-FUと放射線と処置したのち、空腸の腺窩細胞の生存数を指標とした実験を行い、照射後6時間から18時間までの間に5-FUを投与した場合、強い相乗の効果を現すことを認めている。また他の報告^{65,66)}においても照射後の5-FU併用は照射前の5-FU併用に比しより強い相乗の併用効果が認められている。

本研究においては、5-FUのmasked compoundであるHCFUとX線照射との併用によるDNA合成抑制効果を調べた結果、X線照射後にHCFU 20 mg/kgを投与した場合は照射前に投与した場合に比べより強いDNA合成抑制効果が認められた。特に照射後2時間にHCFUを投与した場合約90%と最も強いDNA合成併用抑制効果が認められ、DNA合成のピークも6時間遅延された。その併用効果は相加的であった。

しかしIPR投与マウス耳下腺同調増殖系は、*in vivo*の増殖ではあるが、細胞の増殖が一過性であるため、さらにエーリッヒ腹水腫瘍の担癌マウスを用いて、両者の併用効果および併用方法についての検索を行った。IPR投与実験と同様、照射後HCFUを投与した群の方が照射前投与群に比べより強い併用延命効果が認められた。特にX線400 rad照射後2時間にHCFU 20 mg/kgを投与した場合最も強い相乗的併用延命効果が認められた。一方、HCFUの投与量とX線線量とを減少させ併用効果を調べた結果、有効な併用効果は現れなかった。その理由としては、X線照射線量が有効線量以下になったため、腫瘍に対する有意な併用効果の出現が認められなかったということが考えられる。

5-FUとX線照射とを併用することにより出現する相乗効果についての作用機序に関しては、いまだ明確な結論が出されていない。照射前に5-FUを投与した場合は、5-FUはsensitizerあるいはsynchronizerとして働き、照射される腫瘍細胞の標的域(target volume)が化学的に変えられて拡大するためという説や、5-FUによってDNA合成が抑制され、腫瘍細胞がS期に入れないことにより放射線感受性が高まるという説などがある^{63,67)}。一方、照射後投与により認められる相乗効果の機序としては、従来は照射によりsublethal damageからのrepair (SLDR)を5-FUが抑制すると考えられていた⁶³⁾。しかし、最近の報告では、照射後に5-FUを投与した場合は、5-FUはSLDRを抑制しないともいわれている⁶⁸⁻⁷⁰⁾。また放射線障害からのrepairには他に、potential lethal damageからのrepair (PLDR)があるが、5-FUの照射後投与による相乗効果が、このPLDRの抑制によるために起こるという可能性も低い。その理由は低線量照射の条件ではPLDRは起こり難いと考え

られているからである⁷¹⁾。

本研究においては、DNA合成に対する抑制効果およびエーリッヒ腹水腫瘍の担癌マウスに対する延命効果のいずれを指標とした場合でも、照射後にHCFUを投与した群の方が、照射前投与群と比し、より強い併用効果が認められた。特に照射後2時間にHCFUを投与した場合は、有意な相乗的併用効果が確認された。その作用機序としては、X線照射により生じた潜在的損傷(latent damage)に対し、HCFUおよびその中間代謝物から徐々に遊離される5-FUが長時間、高濃度に維持されることにより引き起こされた損傷が、何らかのinteractionを現し、その結果腫瘍細胞への相乗的致死効果が認められたと考えられる。

化学薬剤と放射線との併用療法は、顎、口腔領域の悪性腫瘍の治療においてきわめて有力な武器であり、機能を保存し得るのみならず、その治療成績の向上も十分期待できるものである。しかし臨床の応用に際し、いかに両者の長所を最大限に発揮させるように併用するかが、治療効果を上げるために重要な点である。従って今後も両者の併用時期、投与量および併用方法などを、さらに詳細かつ慎重に検討することが、治療成績の向上の鍵を握っているといっても過言ではない。

結 論

本研究はHCFUとX線照射との併用効果についての基礎的知見を得るため、IPR投与マウス耳下腺同調増殖系のDNA合成抑制率を指標とした実験を行った。さらにエーリッヒ腹水腫瘍の担癌マウスを使用し、両者の併用による延命効果についての検索も合わせて行い以下の結果を得た。

1. IPR投与実験では、HCFUのDNA合成抑制効果は濃度依存的であった。またHCFUは細胞周期に対する遅延効果も有していることが判明した。

2. HCFUとX線照射とを併用した場合、DNA合成抑制率からみると、HCFUを照射前に投与した群に比べ照射後に投与した群の方がやや大きい併用効果を示し、特に照射後2時間にHCFUを投与した場合は約90%と最も強くDNA合成を抑制し、その効果は相加的であった。

3. エーリッヒ腹水腫瘍実験においては、HCFUとX線照射とを併用した場合、照射後投与群の方が、照射前投与群に比し、より強い併用延命効果を示し、特にX線400 rad照射後2時間にHCFU 20 mg/kgを投与した場合に、最大の併用延命効果が認められ、その効果は相乗的であった。

以上の結果より、臨床の場においてHCFUと放射線との併用により相乗効果が期待でき、また、その併用方法は照射後2時間にHCFUを投与する場合が最も効

果的であることが示唆された。

稿を終えるに臨み、本研究課題を与えられ、終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました広島大学歯学部口腔外科学第1講座高田和彰教授に深厚なる感謝の意を表します。また、ご助言、ご校閲をいただいた本学歯科薬理学講座辻本明教授ならびにご校閲をいただいた本学歯科放射線学講座和田卓郎教授に心からお礼を申し上げます。さらに本研究を進めるに当たり終始ご教示を賜りました宗永泰一博士に深厚の謝意を表します。同時に本研究の照射に関しご援助、ご協力を賜りました広島大学原爆放射能医学研究所障害基礎研究部門沢田照三教授、竹岡清二技官、辻村智隆技官および黒田トクエ技官に深謝します。最後に本学口腔外科学第1講座吉賀浩二助教授を始めとする諸先生に心から感謝いたします。

本論文要旨は、第42回広島大学歯学会例会（昭和58年2月）、第17回広島大学歯学会総会（昭和59年3月）および第8回日本頭頸部腫瘍学会（昭和59年6月）において発表した。

引用文献

- 1) 堀内淳一, 奥山武雄, 他: 口腔癌に対する放射線と抗癌剤との併用, 癌の臨床 22: 144-148 1976.
- 2) Will, C.H., Hering, K.G., et al.: Combination of 5-fluorouracil and Co⁶⁰ irradiation in the treatment of carcinoma of the oral-facial region. *Int J Oral Surg* 12: 141-146 1983.
- 3) Hall, B.E. and Good, J.W.: Treatment of far-advanced cancer with 5-fluorouracil, used alone and in combination with irradiation. Incidence and duration of remission and survival-time date in 233 patients. *Cancer Chemother Rep* 16: 369-386 1962.
- 4) Ozaki, S., Ike, Y., et al.: 5-Fluorouracil derivatives. I. The synthesis of 1-carbamoyl-5-fluorouracil by oral administration. *Bull Chem Soc Jpn* 50: 2406-2412 1977.
- 5) Hosi, A., Iigo, M., et al.: Antitumor activity of carbamoyl derivatives of 5-fluorouracil by oral administration. *Gann* 66: 673-674 1975.
- 6) Hosi, A., Iigo, M., et al.: Antitumor activity of 1-alkylcarbamoyl derivatives of 5-fluorouracil against L 1210 leukemia. *Chem Pharm Bull* 26: 161-165 1978.
- 7) Iigo, A., Hosi, M., et al.: Antitumor activity of 1-alkylcarbamoyl derivatives of 5-fluorouracil in a variety of mouse tumor. *Cancer Chemother Pharmacol* 1: 203-208 1978.
- 8) Hosi, A., Iigo, M., et al.: Antitumor activity of 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil in a variety of experimental tumor. *Gann* 67: 725-731 1976.
- 9) Iigo, M., Hosi, A., et al.: Antitumor activity of 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil in Lewis lung carcinoma and B16 melanoma. *J Pharm Dyn* 1: 49-54 1978.
- 10) Tsuru, T., Iida, H., et al.: Inhibition of murine colon adenocarcinoma and Lewis lung carcinoma by 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol* 4: 83-87 1980.
- 11) Koyama, Y., Koyama, Y., et al.: Phase I study of a new antitumor drug, 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) administered orally. *Cancer Treat Rep* 64: 861-867 1980.
- 12) Schneider, W.C.: Phosphorus compound in animal tissue. IV. A. comparison of methods for the estimation of nucleic acid. *J Biol Chem* 164: 747-751 1964.
- 13) Schneider, W.C.: Determination of nucleic acid in tissue by pentose analysis. *Method in Enzymol* III. Academic Press, New York, 1956, p 680-684.
- 14) Schmidt, F.A., Cappuccino, J.G., et al.: Chemotherapy studies in an animal spectrum, biological characteristics of the tumors. *Cancer Res* 26: 173-180 1966.
- 15) 石居 敬: 生物統計学入門, 第1版, 培風館, 東京, 1976, 181-196頁.
- 16) 団 勝磨: 細胞周期の概念とその研究法. 細胞周期 (日本動物学会編), 第1版, 学会出版センター, 東京, 1976, 1-16頁.
- 17) Selye, H., Veill eux, R. et al.: Excessive stimulation of salivary gland growth by isoproterenol. *Science* 133: 44-45 1961.
- 18) Brown-Grant, K.: Enlargement of salivary gland in mice treated with isoproterenol. *Nature* 191: 1076-1078 1961.
- 19) Malamud, D.: Adenylate cyclase: relationship to stimulated DNA synthesis in parotid gland. *Biochem Biophys Res Commun* 35: 754-758 1969.
- 20) Burk, R.R.: Reduced adenyl cyclase activity in a polyoma virus transformed cell line. *Nature* 219: 1272-1275 1968.
- 21) MacManus, J.P. and Whitefield, J.F.: Stimulation of DNA synthesis and mitotic activity of thymic lymphocytes by cyclic adenosine 3'5'-monophosphate. *Exptl Cell Res* 58: 188-191 1969.
- 22) Hidaka, H., Sasaki, Y., et al.: N-(6-amino-hexyl)-5-chloro-1-naphthalene-sulfoamide, a calmodulin antagonist, inhibit cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci* 78: 4354-4357 1981.
- 23) Sasaki, Y. and Hidaka, H.: Calmodulin and cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 104: 451-456 1982.
- 24) Dreisbach, R.H.: Effect of isoproterenol on

- calcium metabolism in rat salivary gland. *Proc Soc Exp Biol Med* 125: 953-956 1964.
- 25) Barka, T.: Stimulation of DNA synthesis by isoproterenol in the salivary gland. *Expl. Cell Res* 39: 355-364 1965.
  - 26) Baserga, R.: Inhibition of stimulation of DNA synthesis by isoproterenol in submandibular glands of mice. *Life Sci* 5: 2033-2039 1966.
  - 27) Whitlock, J.P. Jr., Kaufman, R., et al.: Changes in thymidine kinase and α -amylase activity during isoproterenol-stimulated DNA synthesis in mouse salivary gland. *Cancer Res* 28: 2211-2216 1968.
  - 28) 佐々木武仁: Isoproterenolによるマウス唾液腺の増殖誘導機構. *医学のあゆみ* 80: 285-292 1972.
  - 29) Duschinsky, R., Plevin, E., et al.: The synthesis of 5-fluoropyrimidine. *J Am Chem Soc* 79: 4559-4560 1957.
  - 30) Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., et al.: Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor-inhibitory compounds. *Nature* 179: 663-666 1957.
  - 31) Heidelberger, C., Griesbach, L., et al.: Studies on fluorinated pyrimidines II. Effects on transplanted tumors. *Cancer Res* 18: 305-317 1958.
  - 32) Chaudhuri, N.K., Mukherjee, K.L., et al.: Studies on fluorinated pyrimidines VII. The degradative pathway. *Biochem Pharmacol* 1: 328-341 1959.
  - 33) Bosch, L., Harber, E., et al.: Studies on fluorinated pyrimidines V. Effects on nucleic acid metabolism in vitro. *Cancer Res* 18: 335-343 1958.
  - 34) Harber, E., Chaudhuri, N.K., et al.: Studies on fluorinated pyrimidines VIII. Further biochemical and metabolic investigation. *J Biol Chem* 234: 1225-1262 1959.
  - 35) Heidelberger, C., Sunthankar, A.V., et al.: Fluorinated pyrimidines XII. Effects of simple nucleotides on transplanted tumors. *Proc Soc Exptl Biol Med* 104: 127-129 1960.
  - 36) Hartmann, K.-U. and Heidelberger, C.: Studies on fluorinated pyrimidines XIII. Inhibition of thymidylate synthesis. *J Biol Chem* 236: 3006-3013 1961.
  - 37) Mayo, V. and Dekloet, S.R.: Effects of 5-fluorouracil on the synthesis and stability of ribosomal RNA in *Saccharomyces carlsbergensis*. *Arch Biochem Biophys* 153: 508-514 1972.
  - 38) Tseng, W.-C., Medina, D., et al.: Specific inhibition of transfer RNA methylation and modification in tissue of mice treated with 5-fluorouracil. *Cancer Res* 38: 1250-1257 1978.
  - 39) Cory, J.G., Breland, J.C., et al.: Effect of 5-fluorouracil on RNA metabolism in Novikoff hepatoma cells. *Cancer Res* 39: 4905-4913 1979.
  - 40) Danneberg, P.V., Heidelberger, C., et al.: The incorporation of 5-fluoro-2'-deoxyuridine into DNA of mammalian tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 102: 654-658 1981.
  - 41) Cheng, Y.-C. and Nakayama, K.: Effects of 5-fluoro-2'-deoxyuridine on DNA metabolism in HeLa cells. *Mol Pharmacol* 23: 171-174 1982.
  - 42) Lönn, U. and Lönn, S.: Interaction between 5-fluorouracil and DNA of human colon adenocarcinoma. *Cancer Res* 44: 3414-3418 1984.
  - 43) Kono, A., Tanaka, M., et al.: Determination of 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil and its metabolites in biomedical specimens by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 163: 109-113 1979.
  - 44) 藤田 浩, 小川カツイ: 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) の体内分布と活性化. *臨床薬理* 12: 73-83 1981.
  - 45) 小山善之, HCFU 共同研究グループ: 共同研究による新抗癌剤 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) Phase II study. *癌と化学療法* 7: 1181-1190 1980.
  - 46) Danneberg, P.B., Montag, B.J., et al.: Studies on fluorinated pyrimidines IV. Effects on nucleic acid metabolism in vivo. *Cancer Res* 18: 329-334 1958.
  - 47) 東 弘, 伊藤英太郎, 他: 核酸の生合成に対する抑制効果を指標とした制癌剤感受性試験. その 4-INAS 法について. *最新医学* 27: 1441-1444 1972.
  - 48) 芝 良祐, 杉村正仁, 他: DNA 合成抑制を指標とした in vitro 抗癌剤感受性試験. 第2報 ^3H -thymidine と ^{14}C -formate を前駆物質とした二重標識法. *日口外誌* 24: 505-509 1978.
  - 49) 藤井節郎, 白坂哲彦: 放射線および抗癌剤の使用上の基礎的問題. 1. 化学療法の立場から. *癌の臨床* 23: 1063-1069 1977.
  - 50) Marin, G. and Bender, M.A.: Radiation induced mammalian cell death, lapse-time cinematographic observation. *Exptl Cell Res* 43: 413-423 1966.
  - 51) Goldstein, R. and Okada, S.: Interphase death of culture mammalian cells (L5178Y). *Radiat Res* 35: 567-568 1968.
  - 52) 菅原 努, 上野陽里: 放射線基礎医学, 第71版, 金芳堂, 京都, 1983, 125-147頁.
  - 53) Terashima, T. and Tolmach, L.J.: Changes in X-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. *Nature* 190: 1210-1211 1961.

- 54) Terashima, T. and Tolmach, L.J.: Variation in several response of HeLa cells to X-irradiation during the division cycles. *Biophys J* 3: 11-33 1963.
- 55) Sinclair, W.K. and Morton, R.A.: X-ray sensitivity: during the cell generation cycle of cultured chinese hamster cells. *Radiat Res* 29: 450-474 1966.
- 56) Sasaki, T. and Toda, M.: Effect of irradiation on mouse salivary glands during the prereplication phase of isoproterenol-stimulated DNA synthesis. *Cancer Res* 32: 2807-2812 1972.
- 57) 青山 喬, 篠原茂生, 他: 放射線感受性と細胞内サイクリック AMP. *組織培養* 9: 321-327 1983.
- 58) 山下久雄, 橋本省三, 他: 放射線と化学療法との併用. 癌の臨床別冊, 癌化学療法 233-243 1966.
- 59) 森田皓三: 放射線と薬剤との併用療法について. *臨放* 19: 329-337 1974.
- 60) Lowry, G.M.: Additive cytotoxicity of 5-fluorouracil and γ -irradiation on diploid cell strain. *Cancer Res* 25: 760-763 1965.
- 61) Berry, R.J.: Effects of some metabolic inhibitors on X-ray dose-response curve for the survival of mammalian cells in vitro, and on early recovery between fractioned X-ray doses. *Br J Radiol* 39: 458-463 1966.
- 62) Vermund, H., Hodgett, J., et al.: Effects of combined roentgen irradiation and chemotherapy on transplanted tumors in mice. *Am J Roentgen* 85: 559-567 1961.
- 63) Viette, T., Eggerding, F., et al.: Combined effect of X-irradiation and 5-fluorouracil on survival of transplanted leukemia cells. *J Nat Cancer Inst* 47: 865-870 1971.
- 64) Ho, E., Coffey, C., et al.: Enhancement of radiation effect on mouse intestinal crypt survival by timing of 5-fluorouracil administration. *Radiology* 125: 531-532 1977.
- 65) Looney, B.W., Schaffner, J.G., et al.: Solid tumor models the assessment of different treatment modalities: IV. the combined effects of radiation and 5-fluorouracil. *Br J Cancer* 34: 254-261 1976.
- 66) Nakajima, Y., Miyamoto, T., et al.: Enhancement of mammalian cell killing by 5-fluorouracil in combination with X-ray. *Cancer Res* 39: 3763-3767 1979.
- 67) Kim, J.H., Eidinoff, M.L., et al.: Recovery from sublethal X-ray damage of mammalian cells during inhibition of synthesis of deoxyribonucleic acid. *Nature* 204: 598-599 1964.
- 68) Byfield, J.E. and Lee, Y.C.: Effect of 5-fluorouracil and actinomycin D on repair of DNA single-strand breaks in cervix cancer cells. *J Natl Inst* 50: 573-575 1973.
- 69) Byfield, J.E., Chan, P.Y.M., et al.: Radiosensitization by 5-fluorouracil(5-FU), molecular origins and clinical scheduling implication. *Proc Am Assoc Cancer Res* 18: 74 1977.
- 70) Byfield, J.E., Paula, C-J. et al.: Pharmacologic requirements for obtaining sensitization of human tumor cells in vitro to combine 5-fluorouracil or fltaraful and X-rays. *Int Radiation Oncology Biol Phys* 8: 1923-1933 1983.
- 71) Shibamoto, Y., Takahashi, M., et al.: Recovery from potentially lethal damage after X-irradiation in three experimental tumors in mice. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 76: 278-283 1985.