膀胱癌化学療法についての研究

第3報 制癌剤内腸骨動脈内持続注入療法が膀胱癌ならびに 膀胱上皮細胞核内DNA量に及ぼす影響についての研究

熊本大学医学部泌尿器科教室 右田 紀雄*
(前主任 橋原憲章教授, 現主任 池上奎一教授)

STUDIES ON THE CHEMOTHERAPY OF URINARY BLADDER CANCER REPORT III. STUDIES ON THE EFFECT OF THE CONTINUOUS INFUSION OF ANTICANCER AGENT INTO THE INTERNAL ILIAC ARTERY ON DNA CONTENT IN CELLULAR NUCLEUS BOTH OF HUMAN BLADDER CANCER AND CANINE BLADDER EPITHEL

Norio Migita

Department of Urology, Kumamoto University Medical School
(Directors: Prof. K. Narahara and Prof. K. Ikegami)

Five cases of bladder cancer were treated with continuous infusion of Mitomycin C into the internal iliac artery. The histological changes of the cancer cells and DNA content in nucleus were studied.

- 1) No relationship between histological malignancy and DNA content was found.
- 2) In four cases, decrease of DNA content with diminution in the range of DNA distribution and shift of the peak to the left was noted after the administration of Mitomycin C in the amount of 70-80 mg.
- 3) Histological changes did not always parallel to changes of the DNA content.

Histological changes and DNA content in nucleus of canine bladder epithelium were studied in four groups administered 1 mg/kg of Mitomycin C as follows,

- Group 1. Systemic administration
- Group 2. One shot injection into the internal iliac artery
- Group 3. Infusion into the lumen of the urinary bladder
- Group 4. Continuous injection into the internal iliac artery

1) No definite morphological changes were shown in groups 1 and 2, whereas atrophy, flattening and exfoliation of epithelial cells were revealed in groups 3 and 4.

2) DNA content in the nucleus of epithelial cells showed no changes in groups 1, 2 and 3 but decreased in group 4.

緒 言

先に教室の中村は¹⁾²⁾,膀胱癌患者に対するMitomycin C (以下MMCと略)内腸骨動脈内持続注入療法が,癌組織の高度の組織学的変化を招来,腫瘍の縮小ないし消失を来すと報告(第1報),さらに犬を用い,MMC全身投与,内腸骨動脈内一撃注入,膀胱内注入,内腸骨動脈内持続注入の各法を比較検討し,内腸骨動脈内持続注入

法が膀胱壁の組織学的ならびに組織化学的所見に最も強い変化をもたらすことを明らかにした(第2報)。

MMCは秦ら³⁾⁴⁾,若木ら⁵⁾によつてStreptomyces caespitosusの培養濾液から抽出された抗生物質で,悪性腫瘍に対し巾の広いスペクトラムをもつ強力な抗腫瘍作用を有し^{6)~11)},さらに細菌³⁾⁴⁾⁵⁾ないしある種のビールス¹²⁾¹³⁾の発育をも抑制することが知られている。その作用機序について,芝⁹⁾¹⁰⁾¹⁴⁾らはMMCがEhrlich癌細胞の自家呼吸を阻害しない程度の濃度で, cell level

* 大学院学生

における呼吸、解糖を抑制するが、homogenate levelではこの効果がみられないので、その呼吸、解糖阻害はこれに関与する酵素系に対する阻害ではなく、細胞内に招来された何らかの変化による二次的なものであろうと推断、細胞の変化を観察しやすい大腸菌B株をもちい、MMCがDNAの生合成を特異的に阻害することを発見した。

DNAなどの核物質に関する研究は古く Miesher (1871)¹⁵⁾¹⁶⁾が膿球を稀塩酸に懸濁してエーテルで振盪すると管底に沈む物質を発見、この物質はおおむね純粹の核物質であるとして nuclein と呼称したのに始まる。爾来、生きて細胞の生命現象の鍵を握る核酸および核蛋白の合成についての多くの業績がみられたが、特に1945年以後核酸の生物学的意義および生合成の機序についての研究の進展には目覚ましいものがあり、分子生物学として一分野をなすに至っている。核物質中RNAは細胞内で特に活動的な物質であり、細胞の代謝過程や蛋白全成に伴って量的変化がはげしいのに反し、DNAは核内に常に局在し、量的にきわめて安定し、細胞代謝の影響を受け難く、染色体と密接な関係をもつとされる。

DNAの測定には従来一定量の組織から生化学的に抽出、定量する方法が行なわれて来たが¹⁷⁾¹⁸⁾、この方法では細胞核当りに含まれるDNA量を測定することは難しく、また測定値が目的とした組織のみのDNA量を示すかどうかという疑問が残る。そこで細胞化学的検出法が検討され、先ず細胞内での核酸の分布を観察する定性的方法が考案された。その1つは古賀¹⁹⁾、Caspersson²⁰⁾、Thorellら²¹⁾の核酸構成要素の特異的吸収を利用した紫外線顕微鏡写真法であり、他の1つは核酸と特異的に親和性をもつ色素を利用する方法であるが、紫外線を用いるよりも可視光線を用いる方が定量的測定には簡便であるために、核酸と定量的に結合する色素についての検討がPollister²²⁾、Swiftら²³⁾によつて行なわれ、最近DNAについてはFeulgen染色²⁴⁾が定量の目的に十分利用できることが判明し、柴谷ら²⁵⁾は染色法の改良を試みている。また定量についても不規則な分布を示すこれら物質をできるだけ正確に測定するために、scanning法²⁶⁾²⁷⁾、2波長法による顕微分光測光法²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾などが開発され、現在では 10^{-7} ~ 10^{-8} gの核酸量をかなりの精度をもつて簡便に測定できるようになった。またこの方法による測定値と化学的手法で測定された細胞当りのDNA量平均値とはほぼ一致することも証明されている^{31)~34)}。

このような方法により種々の動物の正常組織悪性腫瘍などの細胞核内DNA量が測定され、Boivinら³⁵⁾は正常細胞の核内DNA量は同一種動物であれば一定であるという“DNA constancy theory”を説き、広く認められつつある^{36)~39)}。Boivinらはまた生殖細胞におけるDNA量は体細胞のその2分の1を示すことを明らかにし、染色体の主要構成物質はDNAであることを実証した⁴⁰⁾⁴¹⁾。癌細胞のDNA量についても多くの観察があり、癌細胞および前癌状態にある細胞のDNA量は増加し、また分布巾が大きいたことが指摘されている³⁶⁾⁴⁰⁾^{42)~46)}。しかしながら癌細胞におけるDNA量と染色体構成との間に正常細胞にみられるような一定の関連性があるかどうかは未だ報告が少なく明らかなでない。

腫瘍細胞核内DNAに対する放射線や各種薬剤の影響についての報告も多数にのぼるが、その大多数は実験的腫瘍細胞に関するもので、生体の正常組織や人癌についての業績は少い。

泌尿器科領域におけるこの方面の研究はきわめて少く、Persky and Leuchtenberger⁴⁷⁾の前立腺上皮細胞核内DNA量が肥大症では正常と差なく、癌では正常の2~3倍に増量しているとなす報告、大江⁴⁸⁾のパラフィンペレット挿入による実験的膀胱乳頭腫において、膀胱粘膜単純肥厚部ではDNA量は正常の約2倍に、乳頭腫の部では2~4倍に増加し、そのHistogramにおける配列が非常に乱れるとなす報告のほか、竹内⁴⁹⁾ら、稲田ら⁵⁰⁾の膀胱癌細胞DNA量の報告、治療の影響については、山内ら⁵¹⁾の前立腺癌における抗男性ホルモン療法についての報告をみるのみで、膀胱粘膜上皮あるいは膀胱癌細胞核内DNA量に対するMMCの影響を検討した報告に接しない。

私は前述の中村¹⁾の成績にもとづいて、膀胱癌における組織学的所見と腫瘍細胞核内DNA量との関連性を検討、さらに膀胱上皮細胞や癌細胞の核内DNAに対するMMCの影響を追究する目的をもつて、膀胱癌患者におけるMMC内腸骨動脈内持続注入療法施行前後の癌細胞核内DNA量を測定、組織学的所見と対比、検討するとともに、中村²⁾が第2報において報告した各種MMC投与法が犬の正常膀胱粘膜上皮の核内DNA量におよぼす影響を比較、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 臨床的観察

本学泌尿器科に入院した膀胱腫瘍患者で膀胱鏡および生検により膀胱癌と診断されたもののうち、腫瘤が拇指

表 1 臨床例

	年令	性別	組 織 診 断	治療前DNA量 (A.u.)
1. 林田某	64才	男	乳頭状移行上皮 癌Ⅱ—A	170.80± 17.82
2. 菊池某	53才	男	乳頭状移行上皮 癌Ⅲ—B ₂	175.70± 24.67
3. 白石某	67才	男	扁平上皮癌 Ⅳ—C	385.40± 27.08
4. 村上某	63才	男	乳頭状移行上皮 癌Ⅲ—C	371.20± 35.98
5. 河野某	69才	男	乳頭状移行上皮 癌Ⅱ—B ₁	297.00± 23.69

頭大以上で偏側に発生した5例を選び、第1報¹⁾と同様の方法によりMMC内腸骨動脈内持続注入療法を施行し、膀胱鏡検査、膀胱鏡写真および膀胱造影により腫瘍の変化を観察、併せて適宜腫瘍生検をおこない、HE染色および、腫瘍細胞核内DNA量の測定を行なった(表1)。

2. 動物実験

体重10kg内外の雑種成犬8頭を1群とし、第2報²⁾と同様全身投与(第1群)、内腸骨動脈内一撃注入(第2群)、膀胱内注入(第3群)、内腸骨動脈内持続注入(第4群)の4実験を行なった。第1、2群ではMMC体重1kg当り1mg宛投与、8頭中4頭は90分後に、他の4頭は24時間後に、第3群ではMMC体重1kg当り1mgを蒸留水10mlに溶解、空虚にした膀胱内に注入、90分後Wash out、4頭はWash out後90分、他の4頭は24時間後にそれぞれ膀胱壁生検を、第4群は注入ポンプを用い、偏側内腸動脈内にMMC体重1kg当り1mg宛を24時間かけて注入し、4頭は注入終了直後、他の4頭は注入終了後90分に注入側膀胱壁の生検を施行した。生検切片は2分し一部はHE染色を行ない、他部は膀胱上皮細胞の核内DNA量の測定に供した。

3. DNA測定法

1) 染色方法(DNA定量のためのFeulgen反応²⁵⁾)

- i) 切片をなるべく細切し、Carnoy氏固定液に30分～1時間固定、包埋、厚さ7μに薄切、0.17×25×50mmのカバーガラス上に貼布、脱パラ。
- ii) アルコールを通して水洗。
- iii) IN-HCl液(60℃±1℃)中に6分間浸漬(加水分解)
- iv) 水洗
- v) Schiff's solution(後述)中にて暗室、室温下4時間染色。
- vi) 洗滌液(0.1Mグリシン緩衝液pH2.28:、5%異性

- 亜硫酸ソーダ9:1)をとりかえて15分間宛3回洗滌。
- vii) 15分間水洗。
- viii) アルコール脱水、キシロール透徹、バルサム封入。

Schiff's solution Basicfuchsin (Merck) 1gを沸騰蒸留水200mlに溶解、さらに5分間煮沸、50℃に冷却後濾過、INHCl 20mlと異性重亜硫酸カリ1gを加えて濾過、濾液を密栓し冷暗所に24時間放置後活性炭1.5gを加え振盪、濾過、濾液を冷暗所に保存。使用に当り、本溶液0.5ml、0.1Mグリシン緩衝液(pH2.28)8.5ml、および15%異性重亜硫酸ソーダ1.0mlを混和し、染色液とした。たゞし犬膀胱粘膜上皮は上述の染色液では核の染色が不十分なため、本溶液1.0ml、0.1Mグリシン緩衝液(pH2.28)8.0ml、および15%異性重亜硫酸ソーダ1.0mlを混和したものを使用した。

以上のFeulgen反応により細胞核内DNAは赤紫色に着色する。なお染色液の違いによる染色性の差を除外するために、臨床例では各例の処置前後のものを、動物実験では対照および各群の1頭ずつ計5標本を1組として、常に同一染色液で同時に染色した。

2) 測定方法(顕微分光測光法⁵²⁾)

細胞核内DNAは不均一な分布を示すので測定誤差を少なくするために、Patau²⁸⁾、Swift³⁰⁾などにより提唱され、Mendelsohn²⁹⁾により簡易化された2波長法(two wave length method)にしたがつた。オリンパス光学製MSP A IV型顕微分光光度計を使用、先ず資料の吸収曲線を描き、その資料における最高吸収波長およびその波長で示される吸光度の2分の1の吸光度を示す波長の2つの波長を用いて同一箇所を2回測定し、そのおのおのが示す透過率と、測定野の面積とから次式に示すDNA量の相対値を算出した。使用した波長は560mμおよび505mμの2波長である。

$$mt = \frac{BLaC}{Ka \ln 10}$$

mt: 求めるDNA量
Ka ln 10: 定数
B: 測定野の面積(一定とした)
C: 定数
La: 吸光度

測定細胞数は1標本につき50個とし、癌細胞は無作意に選出、膀胱上皮細胞は中間層を選んだ。核内DNAの相対量算出に当つてはmendelsohnの数表を用いて計算の繁雑をさけた。

実験成績

1. 臨床成績

症例1. 林田某 64才, 男. 5年前血尿を訴え, 膀胱腫瘍の診断を受けたが放置, 2週前より再度血尿訴え来院. 膀胱鏡にて後三角部, 右尿管口附近に拇指頭大乳頭状腫瘍1個を認めるが, 膀胱造影に著変をみない. 組織学的所見 顕著な乳頭状を呈し, 腫瘍細胞は異型性少く規則的に配列するが, 核の分裂像はかなり著しい. 診断 乳頭状移行上皮癌, II-A (組織1).

MMC 1日5mg宛7日間, 3mg宛30日間持続動注, 注入総量 125mg. 104mg注入時腫瘍わずかに縮小, 組織学的には空胞変性を来した腫瘍細胞が多く, 細胞配列は粗となり, 核濃縮あるいは chromatin に乏しいものが増加, 間質に著しいうつ血を認めた (組織2). 注入終了12日後 TUR 施行, 腫瘍は注入前の大略2分の1に縮小, 腫瘍表面はほとんど不変. 組織学的に腫瘍細胞に空胞変性増強し, 間質の血管拡張, うつ血, 浮腫きわめて顕著. 腫瘍細胞核内 DNA 量 注入前 170.80 ± 17.82 , 104mg注入時 119.50 ± 10.41 , 125mg注入終了12日後 114.50 ± 11.66 , 注入前に比し注入後の2回とも明らかなピークの左方移動, 分布の縮小がみられた (図1).

症例2. 菊池某 53才, 男. 10年前より年に1度の血尿あるも放置, 1ヵ月半前より高度の血尿を来し来院.

図1 症例1のDNA量の変動

図2 症例2のDNA量の変動

右側壁, 右尿管口近くに鶏卵大乳頭状腫瘍1個を認め, 膀胱造影にて右側に鶏卵大の陰影欠損をみる. 組織学的所見 乳頭状構造を示し, 粘膜下および筋層に深く浸潤, 個々の細胞の異型性は少いが核の分裂像はきわめて顕著. 診断 乳頭状移行上皮癌, III-B₂ (組織3).

貧血高度なため 3,400ml 輸血, MMC 1日5mg宛および3mg宛各6日間, 2mg21日間持続動注, 注入総量87mg. 55mg注入時腫瘍は僅かに縮小を認め, 腫瘍表面は貧血様となり白苔におおわれる. 組織学的には巨核を示す腫瘍細胞の出現をみ, 間質の増生がある (組織4). 83mg注入時腫瘍は前回に比し約2分の1に縮小, 表面の光沢を失う. 組織学的には腫瘍細胞の配列の乱れ, 核の膨化, 濃縮, 間質の増生顕著. 白血球減少のため87mgで中止. 39日後には腫瘍は再び増大し, 右側壁大半を占めるに至り注入中止後49日目膀胱全剝, 右腎瘻術, 左皮膚尿管瘻術を施行した. 腫瘍細胞核内 DNA 量 注入前 175.70 ± 24.67 , 55mg注入時 150.00 ± 18.50 , 分布巾の軽度縮小, 83mg注入時 102.10 ± 8.57 , ピークの左方移動, 分布巾の著明縮小がみられた (図2).

症例3. 白石某 67才, 男. 半年前血尿を訴えたが放置, 1ヵ月前膀胱腫瘍と診断され当科へ転送された. 膀胱鏡所見 膀胱左半は花野菜状の腫瘍におおわれ, 左尿

図3 症例3のDNA量の変動

管口不顕，青排泄左陰性，右遅延。膀胱造影 左側壁に広汎な陰影欠損像。組織学的所見 腫瘍細胞は kerato-hyaline 化が認められ，大小不同，多形性，筋層に深く浸潤，核は異型性に富み分裂像顕著。診断 扁平上皮癌，IV-C（組織5）。

MMC 1日5mg宛15日間，3mg宛8日間，2mg宛3日間持続動注，注入総量 105mg。75mg注入時腫瘍の中心は大きな潰瘍を形成，陥凹し，潰瘍の辺縁に貧血性，壊死組織に覆われた腫瘍の残存をみるが，全体として腫瘍は著しく縮小。組織学的には腫瘍の空胞化著しく，細胞境界不明瞭，核は濃縮無構造となり，分裂像を示す核は全く認められない（組織6）。100mg注入時潰瘍はさらに増大するが潰瘍周囲は浮腫を認めるのみで，腫瘍は前回の所見に比べさらに縮小し，処置前の3分の1以下，組織学的には腫瘍細胞はその数を著しく減じ，数個集簇して間質内に混在する。しかし残存腫瘍細胞の分裂像再現がみられる。白血球減少のために105mgで中止。注入中止後7日目膀胱部分切除，左尿管膀胱再吻合術施行。腫瘍細胞核内DNA量は注入前 385.40 ± 27.08 （組織7），75mg注入時 172.90 ± 13.96 ，著明なピークの左方移動と分布巾の縮小がみられたが（組織8），105mg注入時 273.50 ± 28.10 と増加，分布巾も再び拡大，ピークも右方移動を示した（図3）。

症例4. 村上某 63才，男。2カ月前より血尿を訴え，専門医により膀胱腫瘍の診断を受け，来院。膀胱鏡にて左側壁で左尿管口近くに鳩卵大の乳頭状浸潤性腫瘍を認め，左尿管口不顕。膀胱造影にて左側壁に鳩卵大陰影欠損および浸潤像を認める。組織学的所見 腫瘍細胞は小さい胞巣を形成，筋層に深く浸潤，原形質は緻密でエオジンに淡染，核の異型性強く，分裂像は著しい。診断 移行上皮癌，Ⅲ-C（組織9）。

MMC 1日5mg宛3日間，2mg宛3日間持続動注，注入総量83mg。33mg注入時腫瘍の乳頭状形態は全くくずれ，広基性浸潤性腫瘍となり，周囲に強い浮腫を伴い腫瘍は一見増大したかの感がある。組織学的には間質の増生著しく，腫瘍細胞はその数を減じ，3，4個集簇して胞巣を形成，核は一部変性過程をみる。69mg注入時TUR-Bt施行，腫瘍の形態は一変し広基性の潰瘍を形成，左尿管口が顕現されるまでに著しく縮小，組織学的には腫瘍細胞はさらに減少し，間質の増生が著しい。核は膨化，濃縮などの変性顕著，しかしながら一部の腫瘍細胞に分裂像が残存する（組織10）。白血球減少のために83mgで注入を中止。注入終了後45日目に再度TUR-Bt施行。腫瘍細胞核内DNA量は注入前 371.20 ± 35.98 ，33mg注入時 436.40 ± 55.40 ，69mg注入時 389.90 ± 61.94 ，分布巾はかえって拡大する傾向を示した（図4）。

図4 症例4のDNA量の変動

症例5. 河野某 69才, 男. 2年前より時々無症候性血尿あるも放置, 1カ月前専門医より膀胱腫瘍を指摘され来院. 膀胱鏡にて左側壁に鶏卵大の乳頭状腫瘍1個を認め, 左尿管口不顕, 青排泄両側陰性. 膀胱造影 左側超鶏卵大陰影欠損. 組織学的所見 定型的乳頭状構造を示し, 個々の細胞の異型性少なく, 核の大小不同など認められないが分裂像著しい. 基質は広く浮腫, 血管充盈をみる. 診断 乳頭状移行上皮癌, II-B₁ (組織11).

MMC 1日5mg宛3日間, 2mg宛27日間, 1.5mg宛5日間持続動注, 注入総量76.5mg. 35mg注入時腫瘍は著しく縮小し, 乳頭形成部の一部は脱落, 茎部はかなり広基性であるが周囲粘膜とは明確に境されている. 組織学的には乳頭状構造は乱れ, 表面腫瘍細胞の剝離脱落をみる. 核は膨化, 空胞変性を来し, 間質における小円形細胞浸潤顕著. 65mg注入時 TUR-Bt 施行. 小鳩卵大の広基性乳頭腫瘍となり, 左尿管口は顕現. 組織学的には表層の腫瘍細胞に強い変性所見が認められ, 剝離, 脱落所見が著しい. 核は膨化, 原形質の空胞化をみる. しかしながら基底部に並ぶ腫瘍細胞はなお明らかな分裂像を示す (組織12). 69mg注入終了33日目より再度注入開始し, 5日間で7.5mg注入し, その間に第2回目の TUR-Bt 施行. 腫瘍細胞核内 DNA 量は注入前 297.00 ± 23.69

(組織13), 35mg注入時 305.70 ± 36.40 , ピーク, 分布巾ともほとんど不変, 65mg注入後 184.20 ± 30.82 , ピークの著明左方移動と分布巾の縮小傾向がみられた (組織14, 図5).

2. 動物実験成績

1) 膀胱上皮および筋層における組織学的所見

第1群 投与90分後の変化は対照に比べてほとんど差がなく, 5, 6層からなる定型的移行上皮の基底部は原形質の少ない細胞が密に並び円柱状形態を示すが, 表層になるにしたがい原形質が豊富となり, 核の分裂像が顕著となる. 原形質は eosin に好染する微細顆粒状を呈し, 最表層には刷子縁を思わせる緻密帯が認められる. 上皮下の固有層は密な結合織よりなる緻密帯とその下の細血管の豊富な疎鬆帯とがみられ, 筋層はきわめてよく達しおおよそ内, 中, 外の3層に分け得る (組織15). 24時間後も膀胱上皮最外層の刷子縁様形態にごくわずかな離断所見がみられるほかは対照に比べてほとんど変化をみない.

第2群 90分後では上皮における変化は少なく, わずかに上皮表層における細胞の配列が乱れ, 刷子縁様形態に破綻がみられる. 粘膜固有層においては軽度の浮腫が, 筋層においては筋線維束間にわずかな浮腫がみられ, 筋線維細胞の膨化がわずかながら認められる. 24時間後では刷子縁様形態の破綻がみられ, 最表層細胞の剝離脱落所見が認められる. 粘膜固有層, 筋層における浮腫が残存, 上皮における変化は90分後より増強の傾向がみられる (組織16).

第3群 90分後は原形質に富む上皮細胞が減少し, 刷子縁様形態はほとんど認められない. しかし基底層の細胞には形態学的変化はほとんどなく, 粘膜固有層および筋層にはまったく変化がない. 24時間後では上皮は扁平化し, 重層化の減少が認められる. しかし90分後に比しわずかな修復過程が認められ, 表層細胞配列の乱れは改善されている. 粘膜固有層にはわずかに浮腫があるが筋層には変化をみない (組織17).

第4群 持続注入終了直後では表層の上皮細胞は剝離脱落する傾向がうかがわれ, 分裂像の認められる表層細胞はほとんどみられなくなる. またところによつては上皮中間層を構成する細胞も剝離している部分がある. しかし基底層の細胞には形態学的変化は認められない. 粘膜固有層のとくに疎鬆帯には浮腫が著しく, 細血管は充盈する. 筋線維束間には著しい浮腫がみられ, 筋細胞も膨化がみられた (組織18). 90分後の変化は終了直後のそれ

図5 症例5のDNA量の変動

表2 MMC投与90分後の膀胱上皮細胞核内DNA量

	第1群	第2群	第3群	第4群	対照群
1	408.80±113.02	345.30± 29.67	375.50± 41.99	337.80± 39.74	294.70± 26.47
2	/	303.70± 26.53	284.60± 41.07	212.60± 22.87	292.10± 22.71
3	293.60± 25.87	256.70± 22.71	255.10± 22.94	218.70± 23.55	292.10± 22.71
4	236.90± 18.96	199.40± 13.84	208.40± 20.35	225.50± 19.86	239.60± 26.52
平均値	313.10± 40.03	276.28± 13.92	280.91± 18.26	248.68± 15.27	293.40± 17.16

表3 MMC投与24時間後の膀胱上皮細胞核内DNA量

	第1群	第2群	第3群	第4群*	対照群
1	247.72± 22.04	287.62± 19.16	280.94± 28.04	286.80± 30.05	257.58± 29.84
2	280.05± 24.17	265.40± 25.35	237.95± 27.41	202.55± 18.21	257.58± 29.84
3	277.53± 36.63	282.18± 22.80	213.99± 20.71	207.54± 32.28	245.36± 28.37
4	300.49± 26.55	212.21± 23.59	274.45± 28.15	189.98± 20.56	245.36± 28.37
平均値	276.45± 12.18	261.85± 11.43	251.83± 12.85	221.72± 14.38	251.47± 13.42

* 本群のみは24時間内腸骨動脈内持続注入終了直後の成績

とはほぼ同様の变化であつた。

2) 膀胱上皮細胞核内DNA量の変化(表2, 3)

第1群 投与90分後, 24時間後とも全例対照群のDNA量とほとんど差がなかつた。

第2群 投与90分後では4頭中2頭に対照群に比し減少傾向がみられたが有意ではなく, 他の2頭は差をみなかつた。24時間後では4頭中3頭は対照と差なく, 1頭に減少傾向がみられたが有意ではない。

第3群 90分後では4頭中2頭に対照に比し減少傾向をみたが有意ではなく, 他の2頭は差をみない。24時間後では4頭中3頭は対照と差なく, 1頭にわずかな減少傾向がみられた。

第4群 注入終了直後では4頭中2頭に対照に比し有意の差をもつてDNA量の減少が, 1頭に有意ではないが減少傾向がみられ, 他の1頭は差をみない。90分後では4頭中2頭は有意の差をもつて減少, 他の2頭は対照と差を認めなかつた。

総括ならびに考察

癌細胞核内DNA量と悪性度, 浸潤度などとの関係を検討した報告は少ない。三戸ら⁴⁶⁾は胃癌細胞のDNA量が表皮拡大発育型(Super型)では比較的低く, 進行型

(Pen型)では比較的高値を示すとしたが, 膀胱癌については竹内ら⁴⁹⁾はDNA量と悪性度とははつきりした関係はなく, 腫瘍の大きさが増すと, DNA patternは丈が低く, 巾が広くなる傾向があると述べ, 一方稲田ら⁵⁰⁾は悪性度の高いものでは明らかにDNA量の増加を認めたとした。私の症例では, 組織学的にIV-C, III-Cと悪性度, 浸潤度ともに高かつた症例3, 4ではDNA量も高値を示し, 組織学的にII-Aであつた症例1ではDNA量も低かつた。しかし症例2はIII-B₂で比較的進行癌でありながらDNA量は低く, 一方症例5は組織学的にII-B₁で浸潤度, 悪性度ともに低かつたがDNA量は比較的高値を示し, 組織学的悪性度, 浸潤度とDNA量とはある程度関連を有するようであるが, 必ずしも緊密な相関はみられなかつた。

腫瘍細胞に対するMMCの作用を実験的腫瘍細胞を用いて検討した報告は多い。主に細胞形態学の立場から, 小林⁵³⁾は紡錘形細胞肉腫について観察, MMCは特に分裂前期細胞に作用し, 核のDNAおよび仁のRNA構成に変化を来し, 核の著しい形態的变化と染色質の染色性喪失, 変形を惹起し, その結果細胞機能を乱し, 崩壊に導く。一方分裂期細胞では染色体に著しい切断や染色

組織 1 症例 1 MMC注入前, 乳頭状移行上皮癌,
II-A.

組織 2 症例 1 MMC 104mg注入時, 腫瘍細胞の
空胞化著しく, 細胞配列は粗となり, 核は
濃縮する.

組織 3 症例 2 MMC注入前, 乳頭状移行上皮癌,
III-B₂.

組織 4 症例 2 MMC 55mg注入時, 巨核を示す腫
瘍細胞の出現をみ, 間質の増生を認める.

組織 5 症例 3 MMC注入前, 扁平上皮癌,
IV-C.

組織 6 症例 3 MMC 75mg注入時, 腫瘍細胞の空
胞化著しく, 細胞境界不明瞭となり, 核は
濃縮無構造となり, 分裂像を示す核はきわ
めて少い.

組織7 症例3 MMC注入前
(Feulgen 染色)

組織8 症例3 MMC75mg注入時
(Feulgen 染色)

組織9 症例4 MMC注入前, 移行上皮癌,
Ⅲ-C.

組織10 症例4 MMC69mg注入時, 腫瘍細胞は減少し, 間質の増生著しい. 核は膨化, 濃縮などの変性顕著, 一部の腫瘍細胞に分裂像が残存する.

組織11 症例5 MMC注入前, 乳頭状移行上皮癌, Ⅱ-B₁.

組織12 症例5 MMC65mg注入時, 表層腫瘍細胞に強い変性所見がみられ, 剥離, 脱落所見が著しい. しかし基底部の腫瘍細胞はなほ明らかな分裂像を示す.

組織13 症例15 MMC注入前
(Feulgen 染色)

組織14 症例5 MMC65mg注入時
(Feulgen 染色)

組織15 全身投与後90分の膀胱組織 対照とほとんど差がなく, 5, 6層からなる定型的移行上皮細胞よりなる。

組織16 内腸骨動脈内一撃注入後24時間の膀胱組織 最表層細胞のわずかな剥離脱落所見をみる。粘膜固有層, 筋層に浮腫が残る。

組織17 膀胱内注入後24時間の膀胱組織 上皮は扁平化し, 重層化の減少, 粘膜固有層にわずかに浮腫が認められる。

組織18 内腸骨動脈内持続注入終了直後の膀胱組織 表層上皮細胞の剥離, 脱落所見があり, 分裂像を示す細胞の消失, 粘膜下組織の著しい浮腫。

体橋の形成がみられ、分裂がはなはだしく乱されるとし、Dellepiane⁵⁴⁾はSarcoma 180細胞に対するMMCの影響を観察、interphase nucleiに作用し、mitotic activityの減少、chromosomal abnormalityの出現を招来すると報告、Nakamura⁵⁵⁾は吉田肉腫細胞をWister系ラットの腹腔内に移植し各種薬剤を投与した後の細胞を電顕的に観察し、種々の抗腫瘍剤の中でMMC投与のみがendoplasmic reticulumに変化を招来し、濃度が高い時は細胞が完全に破壊するのを認め、Lapisら⁵⁶⁾もKB-cellでMMCの核小体微細構造に対する影響を観察し、最初の変化は核の腫脹であり、もつとも著しい変化は核小体にみられ、redistributionやsegregationが認められたと報告した。一方細胞化学の立場から、寺脇ら⁵⁷⁾はEhrlich腹水癌細胞の蛋白および核酸合成におよぼすMMCの影響を検討、MMC 10 μ g/mouse投与後10時間時癌細胞の蛋白、RNA量は対照とほとんど同程度の増加を示したが、DNA量のみは著明に減少し、癌細胞数の増加がやや抑制されたとし、MMCは癌細胞に対しても大腸菌と同様DNA合成のみを特異的に阻害する作用があるとなし、Shatkin⁵⁸⁾はS-91 mouse melanomaおよびL929 mouse fibroblast cellを、Goldbergら⁵⁹⁾、Kuroda⁶⁰⁾らはHeLa細胞を用いMMCのDNAの合成阻害を実証、紺谷⁶¹⁾はEhrlich腹水癌を用い、MMC作用下にある癌細胞DNAへの³H-チミジン取り込みが投与直後から著明に阻害されることを確めた後、MMC作用3時間目の癌細胞における³H-チミジン、³H-シチジン、³⁵S-メチオニンのDNA、RNAおよび蛋白への転入状況を比較観察し、³H-チミジンのDNAへの転入が特異的に少いと報告した。またLerman⁶²⁾は人癌より分離されたcell lineで実験をなし、MMCはDNAのみならずprotein合成を強く阻害すると報告・松田⁶³⁾も吉田肉腫その他の研究でMMC投与によりRNA/DNA比が増加するが、RNA量も変化するのを認め、杉村ら⁶⁴⁾もMMC投与によりDNA合成および核塩基性蛋白質の合成が阻害されると報告している。要するにMMCは実験的腫瘍細胞に対して形態学的には核構造を破壊し、細胞化学的にはDNA合成を阻害し、結果として核蛋白の生合成をも障害する作用があることはほぼ間違いないようである。しかしながら腫瘍細胞ないし増殖細胞はMMCによつて常に障害をうけるのではなく、cell cycleのある時期にのみ感受性を示すものごとくで、岩田ら⁶⁵⁾はラットの再生肝実験で、肝切除後早期にMMCを投与するとprior protein synthesis

に引き続いて起るDNAの合成が完全に阻害され、この変化は他剤に比し最も強力であるが、いつたんDNA合成がはじまつてからではたとえ大量のMMCを与えても全く影響がなかつたとし、土井⁶⁶⁾はHeLa細胞に対するMMCの作用時期はDNA合成前期後半および全成期前半にあるとなし、谷口⁶⁷⁾、神前ら⁶⁸⁾もHeLa細胞の世代時間の前半にMMCに対して高い感受性があるとしている。このことはMMCに限らず他の抗腫瘍剤⁶⁹⁾⁷⁰⁾⁷¹⁾あるいは放射線療法⁷²⁾⁷³⁾の場合にも認められており、草間ら⁷⁴⁾は人の癌細胞の世代時間は2週間から数カ月におよぶと推定し、腫瘍の治癒を期待するには腫瘍構成全細胞の全世代時間に制癌剤を作用させねばならないとし、山形ら⁷⁵⁾も人悪性腫瘍の世代時間を³H thymidin radioautographyにより測定し、制癌剤に対して癌細胞が感受性を示すのは合成前期後半から全成期の前半にかけてであり、制癌剤に接触してもこの時期にない細胞は何ら影響をこうむらずに生き残る筈であるとした。また木村⁷⁶⁾はin vitroでMH34腫瘍細胞を各種濃度のMMCに種々の時間接触後、これをC₃H/Heハツカネズミに移植、その生存率からMMCの殺腫瘍細胞効果を検討し、短時間で効果をあげるためにはきわめて高い濃度を、また濃度が低い場合にはきわめて長い時間を要するとし、MMCの最小有効濃度は5 μ g/ml、その接触時間は100分であるとした。しかしながらこのような腫瘍細胞の世代時間を越える期間、常に一定の濃度以上の制癌剤と接触せしめることは通常の制癌剤投与形式ではきわめて困難であり、ここに主幹動脈内持続注入療法の臨床的意義の1つがあると考えられる。

臨床例について放射線あるいは制癌剤が癌組織のDNA量におよぼす影響を観察した報告は比較的少い。Atkin⁷⁷⁾らは子宮癌の、木村⁴⁵⁾は耳鼻科領域の癌の放射線療法後癌細胞核内DNA量の分布巾が広がると報告、乾⁷⁸⁾は胃癌の放射線療法後染色体数の変異の巾が大きくなると報告したが、小原ら⁷⁹⁾は白血病細胞のDNA量が抗白血病剤使用群では非使用群に比し減少の傾向を示すも推計学的に有意ではなかつたとし、山内ら⁸¹⁾は前立腺癌に対する抗男性ホルモン療法後のDNA量の変化を観察、除睾術を行なわず短期間ホルモン療法を施行した群では、DNA量のピークがやや低下する傾向がみられ、長期間ホルモン療法を続けた症例ではDNA量の分布巾がせまくなり、正常のDNA量分布に近づく傾向があつたとした。制癌剤が癌細胞DNAにおよぼす影響についての臨床的報告が少いのは、子宮癌などに対する放射線療

法あるいは前立腺癌に対する抗男性ホルモン療法が癌の根治ないし根治に近い臨床効果を示し、癌細胞の DNA 量も当然高度に変化すると考えられるのに対し、従来もつばら行なわれた全身投与による制癌剤の臨床効果はきわめて不満足なものであり、癌細胞の DNA 量の変化を問題とするほどの期待がなかつたためと考えられる。膀胱癌における MMC 内腸骨動脈内持続動注療法は中村の報告例や私の症例でも明らかなごとく、かなりの臨床的効果と組織学的変化を招来するが、腫瘍細胞の核内 DNA 量も 5 例中症例 4 を除く 4 例に MMC70~80mg 持続注入頃より有意の差をもつて減少が認められ、同時に分布巾の縮小、ピークの左方移動がみられた。

しかし MMC 持続動注による膀胱癌細胞核内 DNA の推移は必ずしも単純ではなく、症例 1 のごとく MMC 注入中止後もその効果が持続した例もあつたが、症例 3 のごとく MMC 注入持続中であるにもかかわらず再び DNA 量が増加し、その分布が拡がる傾向を示した例もあり、また症例 4 では DNA 量の減少はみられず、その分布は一層拡大する傾向がみられた。一方 MMC 内腸骨動脈持続注入による膀胱癌の組織学的変化は、中村が第 1 報で報告したごとく、はじめ腫瘍細胞の膨化、核の濃縮所見があり、次いで原形質の空胞化および崩壊、腫瘍細胞の乳頭状構造よりの脱落、間質の浮腫、結合組織の増生がみられ、とくに浸潤癌においては間質の増生が顕著で、癌細胞の変性および数の減少と相まつて癌細胞巣は著しく縮小する。しかしながらこれらの組織学的変化と DNA 量の変化とは必ずしも並行せず、比較的組織学的変化が少かつた症例 1、2 においては著しい DNA 量の減少とピークの左方移動、分布巾の縮小がみられ、組織学的変化が最も著しく、顕著な間質の増生と癌細胞数の著明減少がみられた症例 4 では DNA 量の変化はみられなかつた。このように MMC 持続動注による膀胱癌細胞核内 DNA の推移が複雑であり、組織学的変化とも必ずしも並行しないのは主として残存腫瘍細胞の動行によるものと考えられる。事実光顕レベルで著しい障害をもたらされたと思われる標本においても詳細に観察すると残存腫瘍細胞の中かなりの分裂像を示す細胞が発見できることが多く、DNA 量測定に当つてはこれらの残存腫瘍細胞が成績に大きな影響をおよぼすことになる。症例 3 では MMC 投与が続けられたにもかかわらず一旦低下した DNA 量が再び増加を示したが、同時に組織学的にも分裂像の再現がみられ、DNA 量の低下がみられなかつた。症例 4 では腫瘍細胞の変性が著しく、間質の増生顕

著な中になお分裂像のみられる癌細胞の残存が認められた。このような残存癌細胞は当然癌拡大蔓延の拠点となるので、腫瘍の生物学的性格はその組織像よりむしろ細胞核内 DNA 量によつてよりよく表現されると思惟される。

Makino⁸⁰⁾, Tonomura⁸¹⁾, 三戸⁸²⁾, 山形⁷⁵⁾, Rachard⁸⁴⁾ は悪性腫瘍においては、多くの細胞の染色体に種々の変化がおこり、それぞれ増殖して cell line を形成するために、同一腫瘍の細胞でも同一の遺伝子のパターンを示さず、異つた染色体構成を示すことを明らかにしている。それ故に増殖の主体となるいわゆる種族細胞 (Stem cell) は 1 腫瘍に 2 系あるいはそれ以上存在することも多いわけで、これは私の症例の DNA 分布 pattern から十分首肯できる。ここで問題となるのは癌細胞においても染色体構成と DNA 量との間に正常細胞にみられるような密接な関連性があるかどうかについてであるが、小島⁴⁰⁾は胃癌 7 例の全例、子宮癌 4 例中 3 例に、木村⁴⁵⁾は耳鼻科領域の癌 6 例の全例に、三戸⁸²⁾は胃癌 29 例において密接な関連を認めたと報告している。したがつて DNA 分布巾の広い腫瘍においては染色体構成が異なる細胞が混在すると考えられる。従来制癌剤に対する癌の反応の違いは感受性の差として漠然と看過されて来たが、個々の癌細胞ないし核レベルにおける検討から、これが癌細胞のもつ遺伝子によつて規制され、遺伝子を担う染色体と深い関連を有することが明らかにされた。牧野⁸⁰⁾⁸³⁾は制癌剤投与や放射線治療を施すと、腫瘍細胞に細胞質の崩壊、染色体の切断、転座、粘着の増加など多くの変化がもたらされ、治療前とは異なつた染色体構成をもつた種族細胞が出現することもあるが、おそらくこのような変化を起した細胞の多くは死滅し、そのような変化をまぬがれて生き残つた細胞が次の増殖に当るので、一般には再発した腫瘍の染色体構成は治療前と同じであつて、種族細胞の染色体構成になら変化を認めない場合が多いとし、胃癌の腹水腫瘍細胞が 63, 65 個の染色体をもつ 2 系の種族細胞からなるものに放射性金による治療を施し、経過を追つて染色体を観察すると、2 系の種族細胞の示す反応は同一ではないが、放射性金の効果がなくなつたと思われる最後の段階ではふたたび治療前と同じ状態に戻つているのを認め、同じ腹腔中にあつて同じ放射線の影響を受けているにもかかわらず、この 2 系の種族細胞の示す反応が異なるのは細胞のもつ遺伝的要素により薬物に対する反応が異なることを示した。三戸⁸²⁾は Ehrlich 腹水癌を継代移植しても常に

73-細胞が種族細胞であるのに対し、MMC 処理後継代移植すると73-細胞はみられず、代つて79-細胞が種族細胞となるのを認め、73-細胞が消失するのは、これがMMC に対し高い感受性を有していたために全滅したのか、あるいは高度の染色体変化をおこした時期に移植されたために、新たな宿主内で増殖し得なかつたためとし、また新たな種族細胞となつた79-細胞の由来については、Ehrlich 腹水癌にあらはじめMMCに抵抗性をもつた細胞として少数ながら存在していたか、MMC によつて癌細胞の染色体に切断や転座などの変化がおこつた際に染色体上の遺伝子の組み換えがおこり、MMC に対して抵抗力を獲得した細胞が新生したかの何れかであろうとした。山形ら⁷⁵⁾も胃癌患者4例について腹水細胞染色体分布の化学療法による変化を観察し、臨床的には不変でも腫瘍細胞の交代が行なわれる可能性を示唆する報告をしている。このように癌細胞の染色体構成がDNA量と密接な関連があるとすれば、私のMMC持続動注例では症例4を除く全てにおいてMMC注入によりDNA量の少ない細胞へと交代が起り、DNA総量が減少したと考えられ、DNA量の低下をみなかつた症例4では種族細胞が明らかでなく、全ての腫瘍細胞はMMCにある程度の感受性をもち、組織レベルでは著しい変化がみられたが、いずれの細胞も壊滅には至らず、細胞の交代が明瞭でなかつたものと思われる。このように有効濃度のMMCを腫瘍細胞の世代期間以上に接触せしめれば、MMCに感受性ある種族細胞は死滅し、一時腫瘍は著しく縮小するが、MMCに抵抗性をもつ細胞群は増殖し続け、新たな種族細胞となつてcell lineを形成し、再燃の原因となる。ここに悪性腫瘍化学療法の限界が存在すると思われる。

MMC各種投与形式下の犬健常膀胱粘膜上皮の変化は、犬における1回投与極量と考えられる⁸⁵⁾1.0mg/kgが投与されたにもかかわらず、第1群(全身投与群)では形態学的にもDNA量にもほとんど変化はみられず、第2群(内腸骨動脈内一撃注入群)では粘膜下層にわずかな浮腫、上皮細胞の破綻がみられたが変化はごく軽微で、DNA量もわずかの減少傾向に止まり、第3群(膀胱内注入群)では表層上皮細胞にかなりの障害が認められたが、DNA量に有意の減少はなかつた。しかるに第4群(内腸骨動脈内持続注入群)においては表層上皮細胞の脱落所見があり、DNA量は有意の差をもつて減少がみられた。MMCの作用は有糸分裂の抑制が主で、静止核細胞障害は従と考えてよく⁸⁶⁾、分裂増殖の正常な健

常粘膜に対しては腫瘍組織におけるより影響が少いのは当然であるが、それでも投与方法によつては健常上皮にかなりの変化をもたらすことが明らかとなつた。犬の膀胱上皮最表層の細胞には無糸分裂によるものと考えられる2核を有するものも少くないが、かかる細胞も第4群においてはほとんど脱落し、分裂像を示す細胞が著しく減少する。したがつてDNA量の減少がみられたものと思われるが、臨床例における腫瘍周辺の健常粘膜にも恐らく類似の変化が招来されるものと考えられる。膀胱腫瘍がきわめて再発しやすいことは周知の通りであるが、その原因因子の1つとして、腫瘍近接部上皮の変化、すなわちBrunn上皮細胞巢、の嚢胞形成、上皮化生などが挙げられ、時には初期癌性変化が存在することが報告されている^{87) 88) 89)}。市川、辻ら⁸⁷⁾の述べるごとく、腫瘍周辺の一見正常とみられる粘膜はすでに正常粘膜よりも増殖性傾向に向つて一歩踏み出した状態にあり、発癌因子に対する反応性も高いと考えるべきで、これに対して何んらかの対策を講じないかぎり、治癒成績の向上は望み難い。私の実験成績によれば、MMC内腸骨動脈内持続注入時正常膀胱粘膜上皮細胞の核内DNA量の減少を招来することは明らかであり、腫瘍周辺の増殖性病変ないし増殖性傾向に対し抑制的影響をもたらす可能性は大きく、腫瘍再発抑制法としての臨床的意義も存すると思惟される。

要するに膀胱癌に対するMMC内腸骨動脈内持続注入療法は腫瘍細胞の世代時間を越えて有効濃度のMMCを接触し得るので、腫瘍の組織学的所見のみならず、癌細胞核内DNA量ならびにその分布にもかなりの変化を招来するが、この両者の推移は必ずしも並行せず、また後者の変化より治療による腫瘍種族細胞の交代が示唆され、根治療法とはなり得ないと考えられた。また本療法は他のMMC投与方法に比し、膀胱正常粘膜上皮の組織学的所見ならびに核内DNA量にかなりの変化を招来するので、腫瘍周辺の増殖性変化ないし傾向を有する粘膜上皮に起因する再発をかなり抑制する可能性が示唆され、手術との併用療法としても有用であると考えられた。

結 語

膀胱腫瘍患者5例にMMC内腸骨動脈内持続注入療法を施行し、その前後における腫瘍組織の病理組織学的所見と癌細胞核内DNA量の推移とを対比検討し、併せて犬を用い、MMCの全身投与、内腸骨動脈内一撃注入、膀胱内注入、内腸骨動脈内持続注入の各投与方法が膀胱粘膜上皮の組織学的所見ならびに核内DNA量によ

す影響を比較し、次のような結果を得た。

1) 膀胱癌における病理組織学的悪性度と DNA 量とはある程度の関連を有するが、緊密な相関はみられなかった。

2) MMC 内腸骨動脈内持続注入療法を施行した 5 例中 4 例に MMC 70~80mg 注入後、DNA 量の減少、分布巾の縮小、ピークの左方移動が招来されたが、1 例では DNA 量はわずかに増加し、分布巾の拡大傾向がみられた。

3) 同療法による組織学的変化と DNA 量の推移とは必ずしも並行しなかった。

4) 犬の膀胱上皮は、MMC 全身投与あるいは内腸骨動脈内一撃注入ではほとんど形態学的変化を来さなかったが、MMC 膀胱内注入および内腸骨動脈内持続注入では表層上皮細胞の萎縮、扁平化、脱落所見が招来され、特に後者において顕著であった。

5) 犬の膀胱上皮細胞核内 DNA 量は、MMC 全身投与により変化を示さず、内腸骨動脈内一撃注入あるいは膀胱内注入によりわずかな減少傾向をみたが、有意ではなく、内腸骨動脈内持続注入によつては有意の減少が招来された。

以上の成績から、MMC 内腸骨動脈内持続注入療法は膀胱癌に対してかなり有効ではあるが、根治療法にはなり得ないこと、手術療法を併施することにより、腫瘍周辺の膀胱粘膜上皮に起因する腫瘍再発の抑制の可能性があることなどが示唆された。

(本論文の一部は第21回西日本泌尿器科連合地方会において発表した。)

文 献

- 1) 中村恒雄：日泌尿会誌，**60**，633，1969.
- 2) 中村恒雄：日泌尿会誌，**60**，657，1969.
- 3) Hata, T., et al.: J. Antib. Ser., **A9**, 141, 1956.
- 4) Sugawara, R., et al.: J. Antib. Ser., **A9**, 147, 1956.
- 5) 若木重敏他：Antibiotics & Chemotherapy, **8**, 228, 1958.
- 6) 白淵勇，他：Chemotherapy, **5**, 222, 1957.
- 7) 白淵勇，他：癌，**48**, 447, 1957.
- 8) 芝茂，他：Chemotherapy, **5**, 322, 1957.
- 9) 芝茂，他：癌，**48**, 420, 1957.
- 10) 芝茂，他：Chemotherapy, **6**, 212, 1958.
- 11) Stock, C.C., et al.: Meeting of the Amer. Assoc. for Cancer Res. Philadelphia, April, 1958.
- 12) Reich, E.: Biochim. Biophys. Acta, **53**, 132, 1961.
- 13) 山本正：癌の臨床，**8**, 272, 1962.
- 14) 寺脇朝治，他：大阪医誌，**12**，905, 1960.
- 15) Miescher, F.: Untersuch, **441**, 502, 1871.
- 16) 牧野堅：核酸と核蛋白質，共立出版，1953.
- 17) Schneider, W.C.: J. Biol. Chem., **161**, 293, 1945.
- 18) Schmidt, G. and Thanhauser, S.T.: J. Biol. Chem., **161**, 83, 1945.
- 19) 古賀新，他：京医誌，**37**，1550, 1940.
- 20) Caspersson, T.O.: Skandinav. Arch. Physiol., **73**, 1, 1936.
- 21) Thorell, B.: Studies on the formation of cellular substances during blood cell production, Henry Kimpton, London, 1947.
- 22) Pollister, A.W., et al.: J. Gen. Physiol., **32**, 567, 1949.
- 23) Swift, H. et al.: Acad. Press. Inc. New York, **3**, 354, 1956.
- 24) Stowell, R.E.: Stain Technol., **31**, 137, 1946.
- 25) Shibatani, A. and Naora, H.: Experientia, **8**, 268, 1952.
- 26) Caspersson, T.O., et al.: Expt. Cell. Res., **4**, 9, 1957.
- 27) 内海耕造，妹尾左知丸：Sympt. Cell Chem. **10**, 221, 1960.
- 28) Patau, K.: Chromosoma, **5**, 341, 1952.
- 29) Mendelsohn, M.L.: J. Biophys. & Biochem. Cytol., **4**, 415, 1958.
- 30) Patau, K. and Swift, H.: Chromosoma, **6**, 149, 1953.
- 31) 三浦義彰：癌の臨床，**5**, 315, 1959.
- 32) Leuchtenberger, C., et al.: Exper. Cell Res., **3**, 240, 1952.
- 33) Leuchtenberger, C., et al.: Cancer Res., **12**, 480, 1952.
- 34) Rio, H.: J. Gen. Physiol., **33**, 125, 1949.
- 35) Boibin, A., et al.: Acad. Sci. Paris, **226**, 1061, 1948.
- 36) Leuchtenberger, C., et al.: Am. J. Path., **30**, 65, 1954.
- 37) Utsumi, K.: Acta. Med. Okayama, **14**, 1, 1960.
- 38) Pollister, A.W.: J. Cell & Cmp. Physiol., **38**, 101, 1951.
- 39) 直良博人：蛋白質，核酸，酵素，**2**, 39, 1953.
- 40) 小島吉雄：日臨，**19**, 2295, 1961.
- 41) Ojima, Y., et al.: Gann, **51**, 371, 1960.
- 42) Stowell, R.E., et al.: Cancer Res., **5**, 295, 1945.
- 43) 那須健治：大阪医誌，**12**，1123, 1960.
- 44) 徳岡潤三：癌の臨床，**11**，133, 1965.
- 45) 木村哲夫：和歌山医学，**17**，365, 1966.
- 46) 三戸康郎，他：癌の臨床，**14**，105, 1968.

- 47) Persky, L. and Leuchtenberger, C.: *J. Urol.*, **78**, 788, 1957.
- 48) 大江昭三: 日泌尿会誌, **50**, 813, 1959.
- 49) 竹内弘幸, 他: 日泌尿会誌, **58**, 958, 1967.
- 50) 稲田務, 他: 日泌尿会誌, **58**, 958, 1969.
- 51) 山内昭正, 他: 日泌尿会誌, **60**, 874, 1969.
- 52) 妹尾左知丸, 他: 日血全書, 6—II, 614, 1965.
- 53) 小林仁道: 遺伝学雑誌, **34**, 344, 1959.
- 54) Dellepiane, G.: *Att. Soc. Ostet. Gynec.*, **11**, 9, 1962.
- 55) Nakamura, M.: 岐阜医科大学紀要, **1**, 121, 1960.
- 56) Lapis, K., et al.: *Cancer Res.* **25**, 628, 1965.
- 57) 寺脇朝治, 他: 大阪医誌, **12**, 837, 1960.
- 58) Shatkin, A.J.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **55**, 277, 1962.
- 59) Goldberg, L.H., et al.: *Science*, **136**, 315, 1962.
- 60) Kuroda, Y., et al.: *Cancer Res.*, **23**, 682, 1963.
- 61) Kontani, H.: *Bicken's J.*, **7**, 9, 1964.
- 62) Lerman, M.L.: *Nature*, **206**, 1231, 1965.
- 63) 松田博清: 慶応医誌, **42**, 653, 1965.
- 64) 杉村隆: 癌の臨床, **10**, 85, 1964.
- 65) 岩田卓造, 他: 日本癌学会記事(第20回総会), 27, 1960.
- 66) 土井修: 大阪医誌, **16**, 221, 1964.
- 67) 谷口健三: 大阪医誌, **18**, 573, 1966.
- 68) 神前五郎, 他: 第25回日本癌学会記事, 239, 1966.
- 69) Wheeler, G.P.: *Cancer Res.*, **22**, 651, 1962.
- 70) Friedkin, M., et al.: *J. Biol. Chem.*, **220**, 653, 1956.
- 71) Slotnik, I.J.: *Antibiotics & Chemotherapy*, **7**, 476, 1958.
- 72) Lajtha, L.G., et al.: *Radiation Res.*, **8**, 1, 1958.
- 73) McQuade, H.A., et al.: *Expt. Cell Res.*, **11**, 256, 1956.
- 74) 草間悟, 他: 日外会誌, **63**, 1060, 1962.
- 75) 山形敏一, 他: 癌の臨床, 別冊, 癌・化学療法, 281, 1966.
- 76) 木村禧代二, 他: 癌の臨床, 別冊, 癌・化学療法, 172, 1966.
- 77) Atkin, N., et al.: *Brit. J. Cancer*, **13**, 773, 1959.
- 78) 乾直道: 癌の臨床, 7, 299, 1961.
- 79) 小原徹也, 他: 血液学会雑誌, **26**, 380, 1963.
- 80) Makino, S., et al.: *J. Nat. Cancer Inst.*, **32**, 741, 1964.
- 81) Tonomura, A.: *Gann*, **51**, 47, 1960.
- 82) 三戸康郎, 他: 癌の臨床, **12**, 89, 1966.
- 83) 牧野佐二郎: 人類の染色体, 紀伊国屋新書, 1963.
- 84) Richard, R.M., et al.: *Cancer Res.*, **26**, 60, 1966.
- 85) Philips, F.S., et al.: *Cancer Res.*, **20**, 1354, 1960.
- 86) 白淵勇, 他: *Chemotherapy*, 6, 378, 1958.
- 67) 市川篤二, 他: 日泌尿会誌, **43**, 19, 1952.
- 88) Melicow, M.M.: *J. Urol.*, **68**, 261, 1952.
- 89) Marcina, F.: *Brit. J. Urol.*, **24**, 344, 1952.

(昭和45年1月16日受付)