ヒト膀胱癌由来培養細胞 (KK-47細胞) における thio-TEPA の殺細胞作用に対する urokinase の併用効果の研究

金沢大学医学部泌尿器科学教室 田 谷 正
(主任: 黒田恭一教授)

ENHANCED CELL KILLING BY THIO-TEPA AND UROKINASE

Tadashi Taya

Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University

(Director: Prof. K. Kuroda)

The effect of urokinase on thio-TEPA toxicity has been studied in monolayer cultures of KK-47 cell line, which was established from a human bladder carcinoma in our department in 1977.

The results obtained are as follows:

1. The cell growth curve consisted of a 2-day lag phase and a 5-day logarithmic phase followed by a stationary phase. The average doubling time for the cells on Ham's F12 medium supplemented with 20 per cent calf serum was approximately 36 hours.

2. Thio-TEPA in Ham's F12 medium supplemented with 20 per cent calf serum was stable for 72 hours on incubation at 37°C. Urokinase and thio-TEPA showed no deteriorating effect on each other under some mixing conditions.

3. Remarkable toxicities of thio-TEPA were observed with each exposure of 2 and 24 hours at concentrations of the agent between 10^{-1} and 10^2 μ g/ml. Value of IC 50 at the 2-hour exposure was approximately 10 μ g/ml. A potent inhibitory effect of urokinase against the propagation of the cells in vitro was observed at a concentration of 100 CTAu./ml, although there was no significant change in cell growth at concentrations ranging from 10^{-4} to 10 CTA u./ml.

4. Using methods of assessing cell growth and 3 H-thymidine uptake, a combined use of urokinase (10 CTA u./ml) and thio-TEPA (10 μ g/ml) resulted in a significant increase of the thio-TEPA toxicity with both the exposure times.

5. A peak in 32 P-thio-TEPA uptake in the cells was observed 2 hours after administration of the agent (0.1 μ Ci /10 μ g/ml), and about 2-time increase in the peak was obtained by adding urokinase (10 CTA u. /ml).

From the results, it is quite possible to say that the increased cytotoxicity may be related with a gross change in cell permeability to thio-TEPA through plasminogen activation by urokinase.

Because of the substantial effect of urokinase obtained in vitro, a possible usefulness of urokinase as an adjunct to the topical use of thio-TEPA in the treatment of bladder carcinoma is discussed.

緒 言

癌の治療においては、早期発見と早期手術が望ましいが、現状ではなおこれが十分に行われていない。また、根治手術がたとえ的確に行われたとしても、術後の再発

や転移の可能性は否定できない。このため、癌の化学療法をいかに適切かつ効果的に併用するかが、癌治療上の重要な課題である。今日の抗癌剤による治療成績は決して満足すべきものではなく、そこには抗癌剤の副作用、

癌細胞の薬剤感受性, 癌組織や細胞内への薬剤透過性などの問題を有している. 特に膀胱癌の術後再発が多中心性であり, かつ極めて高頻度なことは, 泌尿器科領域における重要な知見となつているので, この方面の研究の進歩が強く望まれている.

担癌生体を線溶系の面から観察し, これを癌治療に応用する試みには, 近年著しい進歩がある. この治療面への応用理論は, 担癌生体では一般に過凝固, 低線溶状態に保持されていることに基づく¹²⁾. つまり, 癌組織周辺には fibrin の沈着が起きやすく, この fibrin barrier が抗癌剤の癌組織内への透過性を阻んでおり, さらに癌組織の支配血管内においても血栓形成や fibrin 沈着が起きやすいなどの理由により, 抗癌剤の癌組織内移行を一層困難なものにしている³⁾. そこで, 癌組織内への抗癌剤の透過性を亢進せしめると同時に, 過凝固性を抑圧するような方法が必要となる. そのため, 最近, plasminogen activator の一つである urokinase (UK と略す)⁴⁾⁵⁾, 線溶活性亢進剤である dextran sulfate⁶⁾ や蛋白分解酵素⁷⁾⁸⁾⁹⁾などと抗癌剤との併用療法により, 抗癌剤の効果増強をはかろうという試みがなされている.

当教室における膀胱癌と線溶に関する一連の研究^{10)~18)}においても, 膀胱癌患者の血液や癌組織には fibrinolysis inhibitors, なかでも urokinase inhibitors が増量し, fibrinolysis activators よりも優位にあり, 局所線溶活性は強く抑制された状態になつていことが示された. このような線溶の動きに対して, 当教室では膀胱癌の再発防止法として, アルキル化剤の一つである thio-TEPA (N-N'-N''-triethylene thiophosphoramidate) と UK の膀胱内併用注入療法を施行し, 好成績を得ている¹⁹⁾²⁰⁾.

しかしその詳しい作用機序は不明であるため, 今回, 当教室においてヒト膀胱移行上皮癌より継代培養され, 細胞株として樹立した KK-47 細胞²¹⁾を用いて, thio-TEPA の殺細胞作用に対する UK の併用効果を in vitro で検討したので, その成績について報告する. なお著者の知りえた範囲では, ヒト膀胱癌に対する抗癌剤の効果を組織培養法を用いて検討した研究は少なく, 加藤²²⁾²³⁾, Pavone-Macaluso ら²⁴⁾の成績が散見されるにすぎない.

実験材料ならびに実験方法

1. ヒト膀胱移行上皮癌由来培養細胞 (KK-47細胞) および培養方法

1972年以来, 当教室で組織培養を試みた73例のヒト膀胱癌のうち, 8例において上皮細胞の増殖をみた.

これらのうち, 1975年4月に52歳男子の膀胱移行上皮癌 (grade 1, stage A) より継代培養された細胞は1年6ヵ月後に75継代を経て, 細胞株として樹立し, KK-47細胞と命名された²¹⁾. この KK-47 細胞に対して, 20% calf serum ((株) 医学生物学研究所, 名古屋) を含む Ham F12 培地 (日本製薬 (株), 東京: この培養液を FC-20 と略す) を用いて 37°C にて閉鎖静置培養を行った.

2. 細胞増殖曲線

Evans ら²⁵⁾によつて考案された重複培養法に準じて, 日沼型培養角瓶 (32×44×10mm, 池本理化学工業 (株), 東京) に $5.0 \times 10^4/\text{ml}$ の KK-47 細胞を 5ml あて分注し, 組織培養を行った. 24時間ごとに経時的に5本の培養瓶を取り出し, 0.1% pronase と 0.02% EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) の混合液を加え, pipetting により細胞を剥離した後, trypan blue 染色を行い, 血球計算板を用いてその生細胞数を算定した. 時間ごとに取り出した5本の培養瓶における生細胞数の平均値を各時の細胞数として, 細胞増殖曲線を求めた. この細胞株の細胞周期解析や染色体をも含めた形態学的研究成績については, 別報において教室膀胱腫瘍研究班より詳しく述べられる予定である. ちなみに染色体数モードは $2n=60\sim62$ で hyperdiploidy を示し, marker chromosome が認められた.

3. thio-TEPA の培養液中での安定性

5ml の FC-20 に thio-TEPA (住友化学 (株), 大阪) を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように添加し, 37°C の孵卵器中に静置し, 2, 24および72時間後の thio-TEPA の安定性を Tan and Cole²⁶⁾の方法に準じ, γ -(4-nitrobenzyl) pyridine (NBP と略す) を用いて測定した. また, thio-TEPA $10\mu\text{g}/\text{ml}$ に urokinase (ミドリ十字 (株), 大阪) 1 CTAu./ml および 10 CTAu./ml の濃度に添加した時の thio-TEPA の安定性も同様の方法にて測定した. すなわち, 培養液 5ml を正確にとり, これに10%硫酸亜鉛溶液 5ml と飽和水酸化バリウム溶液 5ml およびメタノール 2ml を加え, よく混和し $3,000\text{rpm}/\text{min}$ で5分間遠心分離した. この上清液 2ml を正確にとり, pH 4.6 の 0.2M 酢酸緩衝液 0.5ml および 5% NBP アセトン溶液 0.2ml を加え, 沸騰水溶液中で20分間加熱した. これを氷冷し, アセトン 0.5ml, ジクロロエタン 2ml および 1N-水酸化ナトリウム 0.2ml を加えよく振り混ぜ, 下層のジクロロエタン層を層長 1cm のセルで波長 540 nm の吸光度を測定した. thio-TEPA を含まない培養液

について同様に操作し、測定値を補正した。別に標準液として、thio-TEPA 10, 8, 6, 4, 2, 0 μ g/ml の水溶液を各 5ml あて正確にとり、以下同様に操作し検量線を作成し、この検量線より各培養液中の thio-TEPA の濃度を求めた。

4. thio-TEPA による細胞増殖抑制の測定

前記日沼型培養瓶に 5.0×10^4 /ml の KK-47細胞を 5ml あて分注し、培養 2 日後に thio-TEPA を滅菌蒸留水で希釈して、10 倍の段階で $10^{-4} \sim 10^2 \mu$ g/ml の各最終濃度になるようにマイクロピペットでそれぞれ培養瓶に注入した。注入後 2 および 24 時間それぞれ薬剤を接触せしめ、その培養液を捨て Hanks 液で 2 回洗浄し、再び FC-20 を加え培養を続けた。5 日後に培養液を捨て、前記のごとく pronase と EDTA の混合液で sheet 状に増殖した細胞を単離浮遊させ、試験管に入れ 1,000rpm/min で 10 分間遠心し、沈澱した細胞を trypan blue にて染色し、その生細胞数を算定した。なお生細胞数の算定は薬剤の各濃度で triplicate に行い、その平均値を求めた。

5. urokinase の細胞増殖に与える効果

上記の thio-TEPA による細胞増殖抑制の測定と同様の方法で、UK を 10 倍の希釈段階ごとに $10^{-4} \sim 10^2$ CTA u./ml の各濃度で 2 および 24 時間細胞に接触させ、それぞれの濃度における生細胞数を算定した。

6. urokinase 併用による thio-TEPA の細胞増殖抑制効果の測定

1) 細胞成長度測定

Fig. 1 に示すように、日沼型培養角瓶に 5.0×10^4 /ml の KK-47細胞を 5ml あて分注し、静置培養した。2 日後に thio-TEPA (10 μ g/ml) 単独群、UK (10CTAu./ml)

Fig. 1 An experimental program of cell growth assessment

単独群、thio-TEPA (10 μ g/ml) と UK (10CTAu./ml) の併用群 および 対照の 4 群に分け、それぞれの最終濃度となるように薬剤をマイクロピペットで添加した。また、対照には滅菌蒸留水を添加した。2, 24 および 72 時間薬剤を接触させ、Hanks 液で 2 回洗浄後、FC-20 を

Fig. 2 An experimental program of cellular uptake of ^3H -thymidine

5ml 加え再び培養を続け、5 日後に前記のごとく trypan blue 染色により生細胞数を算定した。なお、それぞれの群は同一条件のもとに 7 本あて測定し、その平均値および標準偏差を求めた。また、thio-TEPA 単独群と thio-TEPA と UK の併用群とは t 検定を行い比較した。

2) ^3H -thymidine の取り込み測定

Fig. 2 に示すようにに培養角瓶 (18 $\times$ 18 $\times$ 75mm, 池本理化学工業 (株), 東京) に 5.0×10^4 /ml の KK-47 細胞を有する培養液を 2ml あて分注し、静置培養を行った。接種 2 日後に細胞成長度測定と同様な方法で薬剤を接触させ、4 日後に ^3H -thymidine (6.7Ci/mM, New England Nuclear, Boston, Mass., U.S.A., ^3H -TdR と略す) を最終濃度 0.5 μ Ci/ml になるようにマイクロピペットで注入した。接種 5 日後にこの培養液を捨て、Hanks 液で 2 回洗浄後、pronase と EDTA の混合液を加えて細胞をガラス面より遊離した。この細胞浮遊液に培養液を加え 1,000rpm/min で 10 分間遠心し、さらに 5% トリクロール酢酸溶液で 2 回遠心し、酸可溶性 ^3H -TdR を除いた。そして、NCS solubilizer (Amersham Searle Co., Arlington, Illinois, U.S.A.) を 1ml 加えよく振盪し、密栓して 1 昼夜放置し、細胞を消化した。これを液体シンチレーションカウンター用バイアル瓶に移し、トルエン 1,000ml につき PPO (2,5-diphenyl-oxazole, 和光純薬工業 (株), 東京) 4g, POPOP (1,4-bis [2-(5-phenyl oxazolyl)]-benzine, 和光純薬工業 (株), 東京) 0.1g を加えたシンチレーター液 10ml を添加して、液体シンチレーションカウンター LS 200B 型 (Beckman, Calif., U.S.A.) にて ^3H から出る β 線の cpm を測定した。

7. ^{32}P -thio-TEPA の細胞内取り込みの測定

Fig. 3 に示すようにに培養角瓶 (18 $\times$ 18 $\times$ 75mm) に 5.0×10^4 /ml の KK-47 細胞を有する培養液を 2ml あて分注し、静置培養を行った。接種 2 日後に ^{32}P -thio-TEPA (10mCi/g, 住友化学 (株), 大阪) を 1, 10 および 100 μ g/ml の最終濃度となるようにマイクロピペットで注入し、培養瓶を経時的に取り出し、 ^3H -TdR の取り込み測

Fig. 3 An experimental program of cellular uptake of ³²P-thio-TEPA

定と同様な操作により、NCS solubilizer で細胞を消化し、液体シンチレーションカウンターで ³²P から出るβ線の cpm を測定した。また、³²P-thio-TEPA 10μg/0.1 μCi/ml に UK を 1, 10 および 100CTAu./ml の濃度で併用した時の ³²P-thio-TEPA の細胞内取り込みも、上記と同様な操作により測定した。

実験成績

1. 増殖曲線

Fig. 4 に示すように接種後 2 日の lag phase をおいて logarithmic phase に入り、6 日後に stationary phase に達し、やがて logarithmic death phase に至った。この細胞株の倍加時間 (population doubling time) は約 36 時間と考えられた。

Fig. 4 A growth curve of KK-47 cells

この増殖曲線をもとに以下の実験では、logarithmic phase の始まる接種 2 日後に薬剤を接触させ、接種 5 日後に細胞数を算定することにより細胞増殖を測定した。

2. thio-TEPA の培養液中での安定性

thio-TEPA は Table 1 に示すように培養液 (FC-20) 中で比較的安定な薬剤で、thio-TEPA 10μg/ml 添加 2 時間後には 9.7μg/ml、24 時間後には 8.8μg/ml、72 時間後

Table 1 Stability of thio-TEPA in different medium at 37°C

Incubation time at 37°C	hrs 2	hrs 24	hrs 72
FC - 20 containing thio- TEPA (10 μg/ml)	9.7	8.8	8.7
FC - 20 containing thio- TEPA (10 μg/ml) and UK (1CTA u./ml)	9.2	9.0	8.4
FC - 20 containing thio- TEPA (10 μg/ml) and UK (10CTA u./ml)	9.5	9.4	μg/ml 8.7

には 8.7μg/ml の濃度を示した。また、UK 1CTAu./ml および 10CTAu./ml の併用によつてもごく軽度の低下を認めるのみで、2 時間後にはそれぞれ 9.2μg/ml、9.5 μg/ml の濃度を示し、72 時間後にはそれぞれ 8.4μg/ml、8.7μg/ml の濃度を示した。これらの成績より、thio-TEPA は 37°C の培養液 (FC-20) 中でごく軽度の濃度低下を示したが 72 時間後でも比較的安定な薬剤であり、また、UK 1CTAu./ml および 10CTAu./ml の併用によつても thio-TEPA の安定性に影響を与えるとは考えられなかった。

3. thio-TEPA による細胞増殖抑制

thio-TEPA 各濃度の生細胞数より、対照を 100% とした生残率 (survival rate) を求めると Fig. 5 のような曲線が得られた。thio-TEPA 10⁻²μg/ml 以下の濃度では細

Fig. 5 Growth inhibitory effects of thio-TEPA on KK-47 cells

胞増殖抑制作用はみられないが、10⁻¹μg/ml 以上ではほぼ直線的に生残率は低下し、10²μg/ml の濃度では 2 時間薬剤接触で 11.5%、24 時間薬剤接触で 0 であつた。IC₅₀ 値 (50% inhibitory concentration) は 2 時間接触で 10μg/ml、24 時間接触では 5μg/ml 付近に認められた。

Fig. 6 Growth inhibitory effects of urokinase on KK-47 cells

4. urokinase の細胞増殖に与える効果

UK 各濃度の生残率から Fig. 6 のごとき曲線が得られた. 10CTAu./ml 以下の濃度では, 対照と差はなく細胞増殖抑制作用は認められないが, 10²CTAu./ml の濃度では2時間および24時間接触により, 生残率はそれぞれ 61.7%, 66.1%となり細胞増殖抑制作用が認められた.

臨床上, 膀胱癌の膀胱内注入療法で薬剤の膀胱内注入時間は尿意や薬剤の刺激のため2時間の制限があることより, thio-TEPA 2時間接触における IC₅₀ 値 10μg/ml と, 培養液に UK を添加し, plasmin 活性の認められる UK の量10CTAu./ml で以下の実験を行った.

5. urokinase 併用による thio-TEPA の細胞増殖抑制効果

1) 細胞生長度測定による成績

Table 2 および Fig. 7 に示すごとく, 2時間薬剤接触では対照の生細胞数は 21.9±1.0×10⁴/ml, UK (10CTA u./ml) のそれは 22.7±1.7×10⁴/ml, そして thio-TEPA (10μg/ml) のそれは 9.9±1.1×10⁴/ml となり, thio-TEPA と UK 併用では 7.2±1.2×10⁴/ml であった. thio-TEPA 単独に比し, UK との併用では有意 (p<

Fig. 7 Growth inhibitory effects of the use of thio-TEPA and/or urokinase on KK-47 cells: 2hr-exposure

0.01) の細胞増殖抑制効果が認められた. また, Table 2 および Fig. 8 に示すごとく24時間薬剤接触において, thio-TEPA 単独では生細胞数は 7.6±0.6×10⁴/ml で, UK との併用では 6.5±0.6×10⁴/ml となり, UK との併用では有意 (p<0.01) の細胞増殖抑制効果が認められた. しかし, Table 2 より明らかなごとく, 72時間薬剤接触では thio-TEPA 単独 6.5±0.7×10⁴/ml, UK 併用 5.8±0.7×10⁴/ml となり, 両者間には有意差は認められなかった.

これらの成績を対照を100%とした生残率で示すと Fig. 9 のようになり, 薬剤接触時間が長くなるにつれて thio-TEPA 単独, および thio-TEPA と UK の併用ともに生残率は低下を示し, 両者間の生残率の差が小さくなった. つまり, thio-TEPA の UK との併用による細胞増殖抑制効果は2および24時間薬剤接触で有意の増強が

Table 2 Growth inhibitory effects of the use of thio-TEPA and/or urokinase on KK-47 cells in different exposure periods

	Number of cells (×10 ⁴ cells/ml)		
	Exposure time		
	2 hrs	24hrs	72hrs
Control	21.9 ± 1.0	21.9 ± 1.0	22.0 ± 1.2
Urokinase (10CTA u./ml)	22.7 ± 1.7	22.6 ± 0.9	21.7 ± 1.0
Thio- TEPA (10 μg/ml)	9.9 ± 1.1	7.6 ± 0.6	6.5 ± 0.7
Thio- TEPA+urokinase	7.2 ± 1.2	6.5 ± 0.6	5.8 ± 0.7

認められ、72時間接触では UK との併用効果は認められなかった。

2) ^3H -thymidine 取り込み測定による成績

Table 3 および Fig. 10 に示すごとく 2 時間薬剤接触

Fig. 8 Growth inhibitory effects of the use of thio-TEPA and/or urokinase on KK-47 cells: 24hr-exposure

Fig. 9 Survival rates of KK-47 cells by the use of thio-TEPA and/or urokinase in different exposure periods

Fig. 10 Combined effects of thio-TEPA and urokinase on ^3H -thymidine uptake of KK-47 cells

において、thio-TEPA 単独では $10552.4 \pm 1519.4 \text{ cpm}$ に対して thio-TEPA と UK の併用では $7862.7 \pm 773.1 \text{ cpm}$ を示し、UK との併用では有意 ($p < 0.01$) の ^3H -TdR の取り込みの低下が認められた。また、24時間薬剤接触においても thio-TEPA 単独に比し、UK との併用では有意 ($p < 0.01$) の ^3H -TdR 取り込み低下が認められた。しかし、72時間薬剤接触では thio-TEPA 単独と UK との併用の両者間に ^3H -TdR 取り込みに有意差は認められなかった。

6. ^{32}P -thio-TEPA の細胞内取り込みの成績

1) ^{32}P -thio-TEPA の各濃度における細胞内取り込みの経時的変化

Table 4 および Fig. 11 に示すごとく、 ^{32}P -thio-TEPA (10 mCi/g) を $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度に投与した場合、細胞内に取り込まれた ^{32}P -thio-TEPA の放射活性は、2 時間で $172.0 \pm 13.8 \text{ cpm}$ と peak に達し、以後経時的に下降した。これは thio-TEPA $100 \mu\text{g/ml}$ では強い殺細胞作用が出現するためと思われる。一方、 ^{32}P -thio-TEPA $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度を用いた場合には 2 時間で $69.3 \pm 8.8 \text{ cpm}$ とほぼ peak を示し、その後横ばいを示した。また、 $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度では 6 時間まで次第に cpm の上昇が認められた。

2) urokinase 各濃度の併用による ^{32}P -thio-TEPA ($0.1 \text{ Ci}/10 \mu\text{g/ml}$) の細胞内取り込みの経時的変化

Table 3 Combined effects of thio-TEPA and urokinase on ^3H -thymidine uptake of KK-47 cells

	Radioactivity (cpm)		
	Exposure time		
	2 hrs	24hrs	72hrs
Control	$12,274.3 \pm 1,655.7$	$10,426.7 \pm 324.8$	$10,779.7 \pm 572.8$
Urokinase (10 CTA u./ml)	$12,321.8 \pm 563.8$	$10,088.7 \pm 341.1$	$10,188.9 \pm 378.6$
Thio-TEPA ($10 \mu\text{g/ml}$)	$10,552.4 \pm 1,519.4$	$7,233.7 \pm 397.9$	$6,421.6 \pm 744.7$
Thio-TEPA + urokinase	$7,862.7 \pm 773.1$	$6,137.9 \pm 433.8$	$6,417.4 \pm 808.5$

Table 4 ³²P-thio-TEPA uptake of KK-47 cells in different concentrations and exposure periods

Concentration of ³² P-thio- TEPA	Radioactivity (cpm)				
	1 / 2	1	2	3	6 hrs
1	4.0 ± 3.0	6.5 ± 2.2	7.8 ± 3.4	10.0 ± 4.4	10.2 ± 3.9
10	55.5 ± 13.9	58.3 ± 8.6	69.3 ± 8.8	66.8 ± 19.1	66.3 ± 1.5
100 μg/ml	123.0 ± 2.5	157.2 ± 10.1	172.0 ± 13.8	165.3 ± 15.1	135.2 ± 0.7

Table 5 Effects of urokinase on cellular uptake of ³²P-thio-TEPA in different exposure periods

³² P-thio- TEPA (10 μg/ml) + Urokinase	Radioactivity (cpm)				
	1 / 2	1	2	3	6 hrs
Urokinase 1 CTA u./ml	46.8 ± 5.0	73.3 ± 18.0	59.2 ± 10.4	61.7 ± 16.4	54.3 ± 3.3
10	60.0 ± 9.2	92.8 ± 13.0	129.7 ± 10.8	113.7 ± 9.1	98.8 ± 22.0
100	78.2 ± 9.8	98.5 ± 20.8	93.1 ± 16.0	57.8 ± 6.8	63.8 ± 17.1

Fig. 11 ³²P-thio-TEPA uptake of KK-47 cells in different concentrations and exposure periods

Table 5 および Fig. 12 で明らかなごとく、³²P-thio-TEPA 10μg/ml と UK 10および100CTAu./ml の併用において、³²P-thio-TEPA の細胞内取り込みは両者とも30分後より急速な増加を示したが、UK 100CTAu./ml の併用では2時間後より ³²P-thio-TEPA の細胞内取り込みの低下が認められた。一方、UK 10CTAu./ml の併用では2時間後に129.7±10.8cpm と peak を示し、以後経時的に下降した。2時間値は ³²P-thio-TEPA 単独69.3±8.8の約2倍の放射活性を示し、UK 10CTAu./ml との

Fig. 12 Effects of urokinase on ³²P-thio-TEPA uptake of KK-47 cells

併用により有意 (p<0.001) の取り込み増加が認められた。また、UK 1CTAu./ml では1時間後に73.3±18.0 cpm と取り込みの peak を示し、以後 ³²P-thio-TEPA 単独とはほぼ同様な推移を示した。

考 按

1952年 Gey ら²⁷⁾ によつて子宮頸癌より HeLa 細胞が細胞株として樹立されて以来、ヒト悪性腫瘍由来の細胞株の樹立は数多く報告されるに至つた。一方、膀胱癌の組織培養は比較的古くから試みられているが、その培養成績は悪く、また細胞株樹立の報告も少ない^{21)28)~33)}。KK-47 細胞は1975年4月に当教室において【初代培養さ

れて以来100継代を越えたが、増殖力は旺盛で細胞増殖曲線より求めた倍加時間は矢島²⁸⁾の KU-1 細胞と同様に約36時間で、比較的活発な増殖を示した。原腫瘍との同定の目的でハムスター頬袋粘膜下に KK-47 細胞を異種移植し、光顕的には髄様癌であり、扁平上皮癌や腺癌への分化を示す所見のない移行上皮癌由来の癌として矛盾のない腫瘍結節組織を得た。現在、当教室において電顕的観察やヌードマウスの異種移植などの方法により、染色体や形態についてさらに検討中である。

組織培養を利用して、抗癌剤の細胞増殖に及ぼす影響を量的に検討する方法は、Eagle ら³⁴⁾によつて基本的な方法論が確立されて以来、形態学的変化³⁵⁾、生化学的变化³⁶⁾、DNA 合成阻害^{37)~39)}などを指標にした抗癌剤の感受性試験の報告が多数みられる。著者は trypan blue 染色による形態学的変化から、その生細胞数を算定する細胞成長度測定法⁴⁰⁾と ³H-TdR 取り込みにより細胞の DNA 合成を測定する方法^{41)~43)}を用いて抗癌剤による細胞増殖抑制効果を検討した。

膀胱癌に対する化学療法に thio-TEPA が使用されたのは、Bateman (1955)⁴⁴⁾の報告が最初である。その後、全身投与だけでなく膀胱内注入療法にも使用されるようになり、Jones ら (1961)⁴⁵⁾は13例のうち8例の多発性乳頭状癌の完全消失を認め、thio-TEPA は小さい乳頭状膀胱癌には非常に効果的であつたと述べている。Vennema (1962)⁴⁶⁾も stage A の腫瘍では10例のうち4例に腫瘍の完全消失を認め、6例に部分的腫瘍縮小を認めたが stage C, D の症例では全く無効であつたと述べている。また、Esquivel ら (1965)⁴⁷⁾は thio-TEPA, actinomycin D および 5-FU の単独膀胱内注入の成績を比較し、thio-TEPA が腫瘍消失や縮小に最も有効であつたと報告した。その後、Wescott (1966)⁴⁸⁾は膀胱癌再発防止に thio-TEPA の膀胱内注入療法を行い18例中14例に再発がなく、この方法は low grade, low stage の膀胱癌の再発防止に効果的な方法であると述べた。当教室においても、白井ら (1973)⁴⁹⁾が膀胱癌再発防止に thio-TEPA を用い、再発率の低下傾向を認めている。これらの臨床成績より、膀胱癌に対する膀胱内注入療法における thio-TEPA の有用性は一般に認められているが、さらに癌細胞に対する作用機序、膀胱壁からの吸収や尿中での安定性について、最近詳細に研究されつつある。

thio-TEPA はアルキル化剤 (alkylating agents) に属し、癌細胞に対するその作用機序については次のように考えられている。アルキル化剤はすべての nucleophilic

center と反応する。そして、低分子物質のアルキル化は細胞の生命に重大な作用を起こさないが、高分子特に核酸や蛋白のアルキル化は細胞に重大な効果をきたす。蛋白では細胞構築蛋白や酵素にアルキル化が生じるといわれ、核酸では DNA, RNA とともに targets となり、そのアルキル化は細胞の生命に最も大きな効果をきたす。アルキル化剤はその作用基の数により、monofunctional alkylating agents と polyfunctional alkylating agents に分けられるが、生物学的には、monofunctional なものは抗癌作用は弱く発癌剤として使用され、polyfunctional なものは抗癌剤として使用されることが多い。そして、polyfunctional alkylating agents は DNA の2本鎖の間に cross-links を生じ、DNA strand の分離を妨げ、DNA 合成が抑制されて mitosis が妨げられるため、細胞毒性効果 (cytotoxic action) を發揮すると考えられている⁵⁰⁾。

下山ら^{51) 52)}は L-1210 細胞と吉田肉腫細胞を用いて soft agar coloney assay 法により、各種抗癌剤の殺細胞作用を定量的に検討し、その殺細胞作用に2つの type があることを明らかにした。type 1 は concentration dependent な作用を示す薬剤で、type 2 は time dependent な作用を示す薬剤である。type 1 にはアルキル化剤や抗癌抗生物質が属し、薬剤と細胞の接触時間の長短にかかわらず、細胞に対して total cell killing が可能であり、その殺細胞作用は cytotoxic である。これに属する抗癌剤は Skipper ら⁵³⁾のいう cell phase nonspecific agent に当たる。アルキル化剤に属する thio-TEPA の殺細胞作用は concentration dependent であり、L-1210 細胞に対する平均致死量 (mean lethal dose) は接触2時間で $3.95 \mu\text{g/ml}$ 、24時間で $2.7 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ であつたと述べている。

最近、加藤^{22) 23) 33)}は Massachusetts General Hospital で継代培養されているヒト膀胱癌由来の MGH-U1 細胞と T 24細胞³⁰⁾を用いて、autoradiography により両細胞株の細胞周期を調べ、両細胞株には大差がなかつたと述べた。そして、MGH-U1 細胞に thio-TEPA を作用させ、thio-TEPA $100 \mu\text{g/ml/2hr}$ は cidal dose, $50 \mu\text{g/ml/2hr}$ は subsidal dose, $10 \mu\text{g/ml/2hr}$ は static dose とみなすことができ、thio-TEPA $10 \mu\text{g/ml/2hr}$ では細胞世代時間が32.4%遅延し、特に DNA 合成期の延長が著明であつたと述べている。著者の KK-47 細胞における細胞成長度測定の結果も、thio-TEPA $100 \mu\text{g/ml/2hr}$ は cidal dose で、 $10 \mu\text{g/ml/2hr}$ は static dose であるとみなすことが

できた。

次に, thio-TEPA のように分子量200以下の物質は拡散により容易に膀胱粘膜を通過し, 血中に移行するといわれ^{45) 46)}, Lunglmayr ら⁵⁵⁾は thio-TEPA の膀胱内注入により, 1時間後には正常膀胱粘膜から平均19%吸収されるのに対して, large papillary tumors を有する膀胱では38%, diffuse papillomatosis の膀胱では58%, cystitis の症例では47%, TURBt 後には91%と非常に高率に吸収されたと述べている。斉藤⁵⁶⁾や Hisazumi ら¹⁹⁾は ³²P-thio-TEPA を tracer として thio-TEPA の血中移行を測定し, 膀胱内注入後2時間前後に血中濃度の peak があり, 72時間後にはほとんど消失したと述べている。また, Pavone-Macaluso ら⁵⁷⁾は thio-TEPA, adriamycin, daunomycin の膀胱壁透過性を比較し, thio-TEPA が最も透過性が高かったと述べている。蒸留水に溶解された thio-TEPA は 0 ~ 4 °C で3週間安定とされている²⁷⁾。しかし, 尿中での安定性は温度とともに尿 pH の影響を受け, 酸性では不安定でアルカリ性では比較的安定であるといわれている⁵⁴⁾。久住ら⁵⁸⁾は thio-TEPA と UK の共存による両薬剤の安定性について in vitro で検討し, 両薬剤間には活性の相殺作用はないことを認めた。著者は培養液 (FC-20, pH 7.2) 中における thio-TEPA を定量し, 72時間後で約13%しか低下せず, また, UK 併用によつても安定性に变化のないことを認めた。

尿管留置器である膀胱は生理的に尿中に存在する UK と常に接触することより, 膀胱腫瘍組織における線溶の動態は注目される場所である⁵⁹⁾。久住ら^{10) ~12) 14) ~18)}によると, 膀胱組織には tissue activator とともに免疫学的に urokinase type とみなされる plasminogen activator が存在するが, 膀胱癌組織では線溶活性は低下し, 特に urokinase inhibitor 値が高値を示した。また, 膀胱癌患者の plasma urokinase inhibitor 値を検討してみると, 高悪性度, 高浸潤度の群がそれぞれ低悪性度, 低浸潤度の群に比較して有意の高値を示し, 腫瘍を外科的に摘除すると, この値は有意の低下を示した。Hisazumi and Fukushima¹³⁾は N-butyl-1-N-butanol-(4)-nitrosamine 投与により実験的に作成したラット膀胱移行上皮癌では, Todd 法により正常膀胱粘膜上皮細胞に沿つて認められた線溶活性は, 発癌過程の進行とともに次第に低下し, ついに消失することを認めた。また, この膀胱癌組織の plasminogen activator 値の増加は正常膀胱組織の約10倍であるのに比し, urokinase inhibitor 値の増加は100倍以上で, 発癌とともに fibrinolysis inhibitors は plasminogen

activators に対して圧倒的に優位の増加状態に至ることが認められた。これらの研究成果より, ヒト膀胱癌においても fibrinolysis activators の増加に比して, さらに著明な fibrinolysis inhibitors の増加を伴うことが推測された。

また, Bernik and Kwaan⁶⁰⁾は種々の臓器の正常組織における線溶活性を組織培養法により検討し, 培養細胞はすべて urokinase type の plasminogen activator を産生しており, 特に腎が高値を示すことを認めた。一方, 膀胱や肺の培養細胞は plasminogen activator 活性を示すが, 培養液上清には活性はなく, むしろ UK に対する強い阻止活性を示した。ヒト悪性腫瘍由来の細胞株には強い線溶活性が存在するという報告がある^{61) 62)}。Pearlstein ら⁶³⁾はヒト膀胱癌由来の3細胞株のうち1株に線溶活性を認めているし, Hisazumi ら⁶⁴⁾もヒト膀胱癌由来の3株 (T24³⁰⁾, RT 4²⁹⁾, MANO) のうち RT 4 に plasminogen activator の産生を認め, また, urokinase inhibitory activity は3株ともにわずかではあるが認められている。しかし, ヒト膀胱癌由来細胞株にみられる線溶活性は細胞株が有する1つの分化した機能で, 膀胱癌細胞そのものの生物学的機能とは考えにくく^{63) 65)}, 内藤⁶⁶⁾は膀胱癌由来の初代培養細胞3例ともに上清に plasminogen activator 活性は認められず, むしろ2例で urokinase inhibitory activity の高値を認めている。この2例のうち1例は KK-47細胞で, その初代培養時の urokinase inhibitory activity は26.5CTAu./ml/10⁴ cellsであり, 継代培養によつても urokinase inhibitor producer としての性質に変化がみられなかつたと述べている。なお, 久住ら⁶⁷⁾は KK-47細胞の130継代のものを用いて, この細胞の saline extract 中における凝固・線溶活性は極めて微弱であり, 一方 urokinase inhibitory activity は0.4CTAu./mlであつたと述べ, また76継代と130継代の各細胞の培養液上清 (Ham F12+2% gelatin) には, 凝固・線溶活性のいずれも認められなかつたことを確めている。

このように, 当教室における膀胱癌の一連の研究において, 膀胱癌組織, 膀胱癌細胞および膀胱癌由来培養細胞は, とともに fibrinolysis inhibitory dominant な性格を有することが知られた。膀胱癌の線溶におけるこのような性格に対して, fibrinolysis balance を activator 優位に転換するために, plasminogen activator である UK を抗癌剤と併用することは非常に興味深い方法である⁶⁸⁾。

仁井谷ら⁶⁹⁾は抗癌剤の作用を増強する目的で線溶系

薬剤を併用することに着目した。そして、吉田肉腫細胞を用いた実験で、mitomycin C による腫瘍細胞の変性崩壊の過程に lysosome が関与しており、mitomycin C の抗癌効果は lysosome labilizer である plasmin との併用によつて一層増強されることを明らかにした。また、細胞膜は lipoprotein complex からなることより、lipoprotein lipase や proteinase などの薬剤を利用して、細胞膜の透過性亢進をはかるとともに、lysosome 膜の透過性を高めて、内部に含まれる各種水解酵素の遊離放出、活性化などがもたらされるならば、抗癌剤の作用と相まつて癌細胞の崩壊を一層促進せしめうる可能性があるとしている。山本ら³¹⁾は吉田肉腫細胞、AH 7974 細胞などを腹腔内に移植したラットを用い、mitomycin C に UK や dextran sulfate を併用した時、特に強く lysosome の変化が現われることを光顕や電顕により組織化学的に立証し、UK や dextran sulfate は lysosome inducer であると推定した。また、吉田肉腫を移植したラットに ³H-5FU を静注し、腫瘍組織内への ³H-5FU の取り込みを測定すると、UK や dextran sulfate を併用した時には、取り込みは control に比し約 2~2.5 倍に亢進し、しかも ³H-5FU 投与 6 時間後まではほぼ平行に減衰し、12 時間後で Control のそれとほぼ同一レベルになることを認めた。また、³H-5FU の核酸への取り込みは dextran sulfate 併用により、60 分後には RNA 分画へは約 5 倍、DNA 分画へは約 2 倍に増加することを認めた。この成績は著者が KK-47 細胞で認めた UK 併用による ³²P-thio-TEPA の細胞内取り込み亢進の成績と一致するものであつた。末沢⁶⁹⁾はマウス腹腔内に移植した Ehrlich 腹水癌細胞を用いて、³H-TdR の取り込みの変化より、Ehrlich 腹水癌細胞に対する UK の至適作用濃度は $5 \times 10^{-4} \sim 2.5 \text{CTAu./ml}$ でほぼ 1CTAu./ml に最大の peak をもち、最大至適作用時間は UK 投与後 45 分であると考えた。著者の KK-47 細胞に対する thio-TEPA ($10 \mu\text{g/ml}$) と UK の併用効果を得るには、UK 1CTAu./ml 以上の濃度が必要であつた。当教室では、膀胱癌再発防止法として thio-TEPA 40mg と UK 6,000CTAu. の併用膀胱内注入療法を施行し、併用注入群に有意の再発率低下を認めている¹⁹⁾²⁰⁾が、著者の膀胱癌由来培養細胞 (KK-47 細胞) を用いた実験成績はこの臨床成績を十分に支持する結果と考えられた。

抗癌剤の腫瘍細胞に対する抑制効果は、同一腫瘍においても、その組織学的所見の差異や病期進行度により異なることが認められており⁴²⁾⁴³⁾、抗癌剤の効果をさら

に有効なものにするためには、各種細胞の cell kinetics を解明し、その特性を考慮した抗癌剤の投与法の確立が必要である。その際、薬剤の細胞内透過性も十分に検討しなければならない。また、現在ヒト悪性腫瘍に対し、培養細胞を用いた抗癌剤の screening test はおもに白血病細胞を中心に試みられ、臨床に応用されているが、今後、固形腫瘍に対する screening test の確立は、術後の化学療法、再発予防法上非常に有用であると考えられる。

結 語

ヒト膀胱移行上皮癌由来の細胞株 (KK-47 細胞) を用いて、thio-TEPA の殺細胞作用に対する urokinase の併用効果を in vitro で検討し、次のごとく結果を得た。

1. KK-47 細胞の増殖曲線は 2 日の lag phase をおいて logarithmic phase に入り、6 日後に stationary phase に達した。また細胞倍加時間は約 36 時間であつた。

2. thio-TEPA ($10 \mu\text{g/ml}$) は培養液 (FC-20) 中では 37°C 、72 時間後でも安定で、urokinase (10CTAu./ml or 1CTAu./ml) 添加によつてもその安定性に影響は認められなかつた。

3. 2 および 24 時間薬剤接触による KK-47 細胞に対する増殖抑制作用は、thio-TEPA では $10^{-4} \mu\text{g/ml}$ 以上で認められ、 IC_{50} は 2 時間の薬剤接触で約 $10 \mu\text{g/ml}$ であつた。また、urokinase では細胞増殖抑制作用は 10CTAu./ml 以下では認められないが、 100CTAu./ml で認められた。

4. thio-TEPA ($10 \mu\text{g/ml}$) と urokinase (10CTAu./ml) の併用による細胞増殖抑制効果を細胞成長度測定法と ³H-thymidine 取り込みにより検討し、2 および 24 時間薬剤接触で thio-TEPA ($10 \mu\text{g/ml}$) 単独に比し、urokinase 併用時には有意 ($p < 0.01$) の細胞増殖抑制効果が認められた。

5. ³²P-thio-TEPA ($0.1 \mu\text{Ci}/10 \mu\text{g/ml}$) の細胞内取り込みは、同薬剤添加 2 時間後に peak を示すが、この peak は urokinase の併用により約 2 倍の増加 ($p < 0.001$) が認められた。

6. urokinase はその plasmin activator 活性により併用薬剤の細胞透過性を高め、その結果抗癌作用を増強せしめるものと推定された。

また、今回の実験結果は、すでに、当教室で得ている膀胱癌再発防止法における抗癌剤と urokinase の膀胱内併用注入療法の有効性を支持するものと考えられた。

拙筆するに当り終始御懇篤な御指導、御校閲を賜わつ

た恩師黒田恭一教授に深謝致します。実験について御指導を頂いた久住治男助教授をはじめ、膀胱腫瘍研究班の諸兄、教室員各位、田中耕一文部技官の御厚意に感謝します。また組織培養に関して御教示を頂いた本学癌研究所波田野基一教授、ならびに本学薬学部堀川正克教授に深謝致します。最後に、本実験のために ^{32}P -thio-TEPA の提供を頂いた住友化学工業株式会社に感謝します。

本論文の要旨は、第15回日本癌治療学会総会において発表した。

文 献

- 1) O'Meara, R.A.Q.: Coagulative properties of cancers, *Irish J. Med. Sci.*, **6**, 474—479, 1958.
- 2) 田中健蔵: がんと線溶, 癌と化学療法, **2**, 545—557, 1975.
- 3) 山本政勝, 山田武夫, 福永州宏, 長島 明, 永松正字, 日置絃士郎: 制癌剤の効果増強策について—Urokinase 併用の意義—, 癌の臨床, **17**, 750—759, 1971.
- 4) 下山正徳, 仁井谷久暢, 木村禧代二, 谷口 猛, 稲垣治郎: Lysosome と癌化学療法, Ⅲ. lysosome labilizer としての plasmin と Mitomycin-C の併用効果, 医学のあゆみ, **65**, 349—352, 1968.
- 5) 仁井谷久暢: 抗がん剤と lysosome labilizer の併用, 最新医学, **28**, 912—919, 1973.
- 6) 山本政勝, 長島 明, 永松正字, 日置絃士郎, 平野洋一, 馬殿芳郎: 制癌剤の効果増強策に関する研究—とくに Dextran Sulfate の併用効果について—, 最新医学, **28**, 996—1009, 1973.
- 7) 柴田清人, 田中 昭, 水野 勇, 伊藤民雄, 舟橋国博, 林 順一, 江崎抑節: 抗癌剤と蛋白分解酵素の併用(臨床的研究), 最新医学, **28**, 926—933, 1973.
- 8) 鈴木磨郎, 阿部郁夫, 佐藤春郎: 抗がん剤と蛋白分解酵素の併用(実験的研究), 最新医学, **28**, 920—925, 1973.
- 9) 佐藤史朗: 制癌剤と蛋白分解酵素の併用に関する研究, 名市大医誌, **16**, 107—121, 1965.
- 10) 久住治男: 膀胱癌の線溶活性について, 日泌尿会誌, **62**, 519—526, 1971.
- 11) Hisazumi, H., Naito, K. and Misaki, T.: Fibrinolytic activity in normal and cancerous tissues of the bladder, *Invest. Urol.*, **11**, 28—34, 1973.
- 12) Hisazumi, H.: Inhibitory effect of normal and cancerous tissues of the bladder on plasminogen activation, *Invest. Urol.*, **11**, 258—262, 1973.
- 13) Hisazumi, H. and Fukushima, K.: A study on fibrinolysis in experimental bladder tumors, *Urol. Res.*, **1**, 186—191, 1973.
- 14) 久住治男, 打林忠雄, 内藤克輔, 三崎俊光: 泌尿器悪性腫瘍患者における dysproteinemia と線溶について, 日泌尿会誌, **65**, 488—499, 1974.
- 15) 久住治男, 内藤克輔: 膀胱における plasminogen activator activity の免疫学的研究, 日泌尿会誌, **65**, 500—505, 1974.
- 16) Hisazumi, H., Naito, K., Misaki, T. and Kosaka, S.: Urokinase inhibitor in patients with bladder cancer, *Urol. Res.*, **2**, 137—142, 1974.
- 17) Hisazumi, H.: Studies on the fibrinolytic activity in cancerous bladder tissues. A study by gel filtration, *Acta Urol. Jap.*, **21**, 731—734, 1975.
- 18) 小島 明: 膀胱癌組織における plasminogen activator activity の研究, 日泌尿会誌, **66**, 753—760, 1975.
- 19) Hisazumi, H., Uchibayashi, T., Naito, K., Misaki, T. and Miyazaki, K.: The prophylactic use of thio-TEPA and urokinase in transitional cell carcinoma of the bladder: A preliminary report, *J. Urol.*, **114**, 394—398, 1975.
- 20) 久住治男, 打林忠雄, 内藤克輔, 三崎俊光, 宮崎公臣, 黒田恭一: 膀胱癌再発防止法としての thio-TEPA と urokinase の併用 膀胱内注入療法, 泌尿紀要, **21**, 735—742, 1975.
- 21) 田谷 正, 小林徹治, 塚原健治, 打林忠雄, 内藤克輔, 久住治男, 黒田恭一: ヒト尿路悪性腫瘍の組織培養, 日泌尿会誌, **68**, 1003—1010, 1977.
- 22) 加藤哲郎: 膀胱癌の cell kinetics に関する研究. Ⅱ. 培養ヒト膀胱癌細胞に対する thio-TEPA の影響, 日泌尿会誌, **67**, 497—501, 1976.
- 23) 加藤哲郎, 石川 清, 根本良介: 膀胱癌の cell kinetics に関する研究. Ⅲ. thio-TEPA 投与後にみられる細胞周期の変化とその殺細胞効果に及ぼす影響, 日泌尿会誌, **68**, 1029—1035, 1977.
- 24) Ravone-Macaluso, M., Gebbia, N., Biondo, F., Rizzo, F.P., Caramia, C. and Rausa, L.: Experimental techniques for testing the sensitivity of bladder tumors to antineoplastic drugs, *Urol. Res.*, **1**, 60—66, 1973.
- 25) Evans, V.J., Earle, W.R., Sanford, K.K., Shannon, J.E. and Waltz, H.K.: The preparation and handling of replicate tissue cultures for quantitative studies *J. Nat. Cancer Inst.*, **11**, 907—927, 1961.
- 26) Tan, Y.L. and Cole, D.R.: New method for

- determination of alkylating agents in biologic fluids, *Clin. Chem.*, **11**, 58—62, 1965.
- 27) Gey, G.O., Coffman, W.D. and Kubicek, M.T.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium, *Cancer Res.*, **12**, 264—265, 1952.
 - 28) 矢島暎夫：膀胱腫瘍の単層培養，第2報，日泌尿会誌，**61**，805—821，1970.
 - 29) Rigby, C.C. and Franks, L.M.: A human tissue culture cell line from a transitional cell tumors of the urinary bladder: Growth, chromosome pattern and ultrastructure, *Brit. J. Cancer*, **24**, 746—754, 1970.
 - 30) Bubeník, J., Barešová, M., Viklický, V., Jakoubková, J., Sainerová, H. and Donner, J.: Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumor-specific antigen, *Int. J. Cancer*, **11**, 765—773, 1973.
 - 31) Elliott, A.Y. Cloveland, P., Cervenka, J., Castro, A.E., Stein, N., Hakala, T.R. and Fraley E.E.: Characterization of a cell line from human transitional cell cancer of the urinary tract, *J. Nat. Cancer Inst.*, **53**, 1341—1349, 1974.
 - 32) Elhilali, M.M. and Nayak, S.K.: Immunologic evaluation of human bladder cancer: In vitro studies, *Cancer*, **35**, 419—431, 1975.
 - 33) 加藤哲郎：膀胱癌の cell kinetics に関する研究．I．培養ヒト膀胱癌細胞の細胞周期解析，日泌尿会誌，**67**，491—496，1976.
 - 34) Eagle, H. and Foley, G.E.: The cytotoxic action of carcinolytic agents in tissue culture, *Am. J. Med.*, **21**, 739—749, 1956.
 - 35) Wright, J.C., Cobb, J.P., Gumpert, S. L., Safadi, D., Walker, D.G. and Golomb, F.M., Further investigation of the relation between the clinical and tissue culture response to chemotherapeutic agents on human cancer, *Cancer*, **15**, 284—293, 1962.
 - 36) 市橋秀仁，殿村邦彦，生駒夏彦，近藤達平：患者癌細胞の薬剤感受性測定法，日本臨床，**33**，1904—1910，1975.
 - 37) William, H.W. and Raymond, R.B.: Autoradiographic studies of in vitro incorporation of uridine and thymidine by human tumor tissue, *Cancer Res.*, **22**, 1113—1119, 1962.
 - 38) 貴島幸彦：核酸と蛋白の生合成に対する抑制効果を指標とする制癌剤感受性試験の基礎的研究，*Chemotherapy*, **14**，621—627，1966.
 - 39) Bickis, I.J., Henderson, I.W. D. and Quastel, J.H.: Biochemical studies of human tumor. II. In vitro estimation of individual tumor sensitivity to anticancer agents, *Cancer*, **19**，103—113, 1966.
 - 40) 大星章一，菅野晴夫：人癌細胞の培養，初版，p. 479，朝倉書店，東京，1975.
 - 41) 安藤隆雄，塚越 茂：マウス Ehrlich 腹水癌細胞の増殖に対する PS-K の in vitro 効果，基礎と臨床，**9**，1751—1753，1975.
 - 42) 菅沼 清，渡辺 至，西平哲郎：小児癌の培養細胞を用いた化学療法のスクリーニングの試み（第1報），癌と化学療法，**1**，397—408，1974.
 - 43) 菅沼 清，渡辺 至，西平哲郎，葛西森夫：小児癌の培養細胞を用いた化学療法のスクリーニングの試み（第2報），癌と化学療法，**1**，965—973，1974.
 - 44) Bateman, J.C.: Chemotherapy of solid tumors with triethylene thiophosphoramide, *New Eng. J. Med.*, **252**, 879—887, 1955.
 - 45) Jones, H.C. and Swinney, J.: Thiotepa in the treatment of tumors of the bladder, *Lancet*, **2**, 615—618, 1961.
 - 46) Vennema, R.J., Dean, A.L. JR., Roberts, M., Fingerhut, B., Chowhury, B.K. and Tarassoly, H.: Bladder carcinoma treated by direct instillation of thio-TEPA, *J. Urol.*, **88**, 60—63, 1962.
 - 47) Esquivel, E.L. JR., Mackenzie, A.R. and Whimore, W.F. JR.: Treatment of bladder tumors by instillation of thio-TEPA, actinomycin D or 5-Fluorouracil, *Invest. Urol.*, **2**, 381—386, 1965.
 - 48) Wescott, J.W.: The prophylactic use of thio-TEPA in transitional cell carcinoma of the bladder, *J. Urol.*, **96**, 913—918, 1966.
 - 49) 白井千博，津川竜三，黒田恭一：膀胱腫瘍の術後再発に関する研究（第1報），癌の臨床，**19**，45—49，1973.
 - 50) 古江 尚，太田和雄，田口鉄男，藤田 浩，塚越茂：癌化学療法の基礎と臨床，初版，p. 79—82，癌と化学療法社，東京，1977.
 - 51) 下山正徳，木村禮代二：各種抗癌剤の in vitro における殺細胞作用について．—L-1210細胞を中心に—，最新医学，**28**，1024—1040，1973.
 - 52) 下山正徳：抗がん剤の殺細胞作用の様式と cell-killing kinetics について．—培養吉田肉腫細胞を中心に—，*J. Jap. Soc. Cancer Ther.*, **10**，63—72，1975.
 - 53) Skipper, H.E., Schabel, F.M. JR., Mclett, L.B., Montgomery, J.A., Wilkoff, L.J., Lloyd, H.H. and Brckman, R.W.: Implication of biochemical, cytokinetic, pharmacologic and foxicologic relationships in the design of optimal therapeutic schedules, *Cancer Chemotherapy*, **54**, 431—450, 1970.
 - 54) Cole, D.R., Howley, T., Rowan, R., Dreyer, B., Tan, Y.L., Gonzalez, E. and Rousselot, L.M.: Absorption and activity studies on

- intraluminal thio-TEPA in the dog's bladder, *J. Urol.*, **94**, 556—558, 1965.
- 55) Lunglmayr, G. and Czech, K.: Absorption studies on intraluminal thio-TEPA for topical cytostatic treatment of low stage bladder tumor, *J. Urol.*, **106**, 72—74, 1971.
 - 56) 齊藤宗吾：膀胱癌の局所的化学療法，西日泌尿，**31**，501—507，1969.
 - 57) Pavone-Macaluso, M., Gebbia, N., Biondo, F., Bertolini, S., Caramia, G. and Rizzo, F.P.: Permiability of the bladder mucosa to thio-tepa, adriamycin and daunomycin in men and dog, *Urol. Res.*, **4**, 9—13, 1976.
 - 58) 久住治男，三崎俊光：共存による urokinase, thio-TEPA の薬剤安定性の検討，泌尿紀要，**21**，743—747，1975.
 - 59) 杉浦 式：Cellular plasminogen activator の組織化学的研究，日泌尿会誌，**64**，265—280，1973.
 - 60) Bernik, M.B. and Kwaan, H.C.: Plasminogen activator activity in tissues from human tissues. An immunological and biochemical study, *J. Clin. Invest.*, **48**, 1740—1753, 1969.
 - 61) Barnett, E.V. and Barou, S.: An activator of plasminogen produced by cell culture, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **102**, 308—311, 1959.
 - 62) Laug, W.E., Jones, P.A. and Benedict, W.F.: Relationship between fibrinolysis of cultured cells and malignancy, *J. Nat. Cancer Inst.*, **54**, 173—179, 1975.
 - 63) Pearlstein, E., Hynes, R.O., Franks, L.M. and Hemmings, V.J.: Surface proteins and fibrinolytic activity of cultured mammalian cells *Cancer Res.*, **36**, 1475—1479, 1976.
 - 64) Hisazumi, H., Anderson, L. and Collins, V.P.: Fibrinolytic activity of in vitro cultivated human bladder cell line, *Urol. Res.*, **5**, 133—139, 1977.
 - 65) 内藤誠二，金城 満，甲賀 新，岡 一成，田中健蔵，大星章一，早田義博，安元公正：培養人癌細胞の凝固線溶活性とヌードマウスにおける増殖に関する検討，癌と化学療法，**5**，89—95，1978.
 - 66) 内藤克輔：組織培養法による泌尿器悪性腫瘍の fibrinolysis の研究，日泌尿会誌，**68**，909—923，1977.
 - 67) 久住治男，西東康夫，加藤正博，中嶋和喜，小林徹治，塚原健治，打林忠雄，三崎俊光：ヒト膀胱癌由来の培養細胞KK-47の凝固・線溶活性について，日泌尿会誌，**69**，1328—1333，1978.
 - 68) 神谷 厚：担癌宿主における凝固線溶動態とその癌治療に及ぼす意義について，名市大医誌，**28**，638—659，1977.
 - 69) 末沢 実：抗癌剤の効果増強に関する研究，名市大医誌，**27**，1—31，1976.

(1978年7月17日受付，特別掲載)