培養癌細胞による抗癌剤の効果を高めるための実験的研究

— KB 細胞に対する Biscoclaurine alkaroid と
5-Fluorouracil, Peplomycin との併用効果 —

山 崎 健 太 郎

九州歯科大学大学院歯学研究科口腔外科学第2専攻 (指導: 梶山 稔教授)

平成6年10月25日受理

Experimental Study on Enhancement of Anticancer
Drug Effects on the Cultivated Cancer Cells

— The Effects of Biscoclaurine Alkaroid in Combination with
5-Fluorouracil and Peplomycin on the Cultivated KB Cells —

Kentaro Yamasaki

Second Department of Oral Surgery (Director: Prof. Minoru Kajiyama)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

In the chemotherapy for oral cancers, treatment results have gradually been improving through development of and improvement in drugs and also through studies on amounts and methods of clinical administration. At the same time, these anticancer drugs have various side effects and some drugs can often cause serious disorders of the lung, kidney, heart, myelopathy, and digestive apparatus.

In an attempt to minimize the side effects of 5-Fluorouracil (5-FU) and Peplomycin (PEP) frequently used in the chemotherapy for oral cancers and to enhance additive or multiplicative antitumor effects by combining them with non-anticancer drugs, effects of the combination with Cepharanthin (Ceph), a biscoclaurine alkaroid, were investigated *in vitro*.

For the cultivated cancer cells, KB cells of human pharynx cancer origin were used and cultivated for a fixed period. Then, two anticancer drugs, 5-FU and PEP, were combined with Ceph and administered to the cells. The cells were cultivated for 2, 3, and 5 days and their effects on the KB cells were investigated in terms of growth conditions by t-test and morphology. In addition, as to PEP found to be effective through the combination, combination ratios of PEP to Ceph were investigated.

The results were as follows:

I. Combination effects of various anticancer drugs with Ceph

1. No significant differences in genesistasis ($p < 0.01$) or in cytomorphologic changes were found in the Ceph alone group (group A), as compared with the control group. Between the 5-FU groups (groups B, C, D) and the PEP groups (groups E, F, G), significant differences in genesistasis ($p < 0.01$) and in cytomorphologic changes were found.

2. Between the 5-FU alone group (group B) and the 5-FU-Ceph combined groups (groups C, D), no significant genesistasis ($p < 0.01$) nor marked cytomorphologic changes were shown.

3. Between the PEP alone group (group E) and the PEP-Ceph combined groups (groups F, G), significant differences in genesistasis ($p < 0.01$) and in cytomorphologic changes were shown.

4. The foregoing results indicated that the combined application of PEP and Ceph in the present experimental concentrations enhanced antitumor effect, but the combination of 5-FU with Ceph did not show clear antitumor effect.

II. Combination effects of various combination ratios of PEP to Ceph

1. In the combination ratio of 1 : 3 (group H), as compared with the PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ alone group (group E), each of 3-, and 5-day groups showed significant genesistasis ($p < 0.01$).

2. In the combination ratios of 1 : 6 (group I) and 1 : 10 (group F), as compared with the PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ alone group (group E), each of 2-, 3-, and 5-day groups showed significant genesistasis ($p < 0.01$).

3. In the PEP 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ alone group (group J), as compared with the combination ratios of 1 : 3 (group H), 1 : 6 (group I), and 1 : 10 (group F), each of 2-, 3-, and 5-day groups showed significant genesistasis ($p < 0.01$).

4. In the combination ratio of 1 : 10 (group F), as compared with the combination ratio of 1 : 6 (group I), each of 2-, and 5-day groups did not show significant genesistasis ($p < 0.01$).

5. On the basis of the foregoing results, the combination ratios 1 : 6 (group I) and 1 : 10 (group F), as compared with the PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ alone group (group E), enhanced antitumor effect several times.

Since Ceph has natural killer activity and can reduce the side effects of PEP as a biological response modifier, the present experiment results gave considerable suggestions for the clinical aspect, although many further experimental studies need to be made.

Key words : Biscoclaurine alkaloid / KB cell / Cepharanthin / Genesistasis / Cytomorphologic change

緒 言

癌化学療法において薬剤の開発や改良, さらには臨床面での投与量, 投与法の改変などにより, 他科領域における悪性腫瘍の一部では, 治療成績が飛躍的に改善されつつある。しかしながら, 今日, 多くの抗癌剤は大量にしかも長期にわたっての投与がより効果的であることにも異論をみない¹⁾。反面, これらの目的から使用する抗癌剤には種々の副作用があり, 薬剤によっては肺障害²⁻⁴⁾, 腎障害^{3, 4)}, 心障害^{3, 4)}, 骨髄抑制^{3, 4)}, 消化器障害^{3, 4)}

など重篤な障害をきたすことが多い。従って, 副作用をできるだけ最小限とし, 抗癌剤を長期間にわたって投与し, 加えて相加的あるいは相乗的な効果を期待することは合目的である。このような観点から薬剤では抗癌剤の多剤併用⁵⁾, 他治療では放射線治療などとの併用⁶⁾が実施されている。一方, これらの観点を考慮し, ビタミン剤⁷⁾と非抗癌剤⁸⁻¹¹⁾との種々な併用による治療効果の向上が試みられ, その成果も報告されている。

これらのうち「タマサキツヅラフジ」から抽出されたビスコクラウリン型アルカロイドである Cepharanthin

については、細胞膜との相互作用によって癌細胞に対する抗腫瘍効果の活性化¹²⁾、あるいは免疫賦活効果^{13,14)}などが報告され、細胞膜に対して Ca^{2+} 流入、あるいは流出に作用し¹⁵⁾、さらに natural killer 活性¹³⁾をはじめ生物学的治療剤¹⁶⁾として、抗癌剤との併用による効果が期待されている。

今回、著者はヒト咽頭癌由来の培養細胞である KB 細胞を用い、*in vitro* で、臨床面で繁用されている 5-Fluorouracil および Peplomycin を対象として Cepharanthin との併用を試み、腫瘍細胞の増殖抑制効果あるいは形態学的変化について検索し、若干の知見を得たので報告する。

実験材料ならびに実験方法

I. 実験材料 (表 1)

A. 実験に使用した KB 細胞

KB 細胞は、1955 年、Eagle¹⁷⁾ により分離、株化された咽頭癌由来の癌細胞で、また、*in vitro* ではおおむね一定の増殖傾向を呈し、当教室で累代培養しているものである。実験には、本細胞を 3 日間静置培養し、対数増殖期にある細胞を使用した (写真 1)。

写真 1 対照群 5 日例
(May-Grünwald Giemsa 染色 × 109)

B. 培養液

5% 仔牛血清加 Eagle MEM 培養液 (Minimum essential eagle modified, Flow Lab.) を用い、1.4% 重曹水で、 $\text{pH} = 7.2$ に補正して、実験に使用した。

C. 被検薬剤

実験に使用した抗癌剤の選択には、代謝拮抗剤で、放射線治療との併用により、相加的な作用を発揮するといわれている 5-Fluorouracil (以下 5-FU, 協和発酵) および口腔外科領域で最も使用頻度の高い抗腫瘍性抗生物質 Peplomycin (以下 PEP, 日本化薬) の 2 剤を選

んだ。また、併用薬剤は、生物学的治療剤である Cepharanthin (以下 Ceph, 化研生薬) を使用した。

表 1 実験材料

1. 培養癌細胞
ヒト咽頭癌由来の KB 細胞
2. 培養液
5% CS 加 MEM
3. 被検薬剤
抗癌剤: 5-Fluorouracil (5-FU)
Peplomycin (PEP)
併用薬剤: Cepharanthin (Ceph)

D. 薬剤の作用濃度

5-FU, PEP の二種類の抗癌剤について、培養液内に含まれる薬剤作用濃度は、予備実験および、諸家の実験濃度、さらには一般臨床使用量などを参考として 5-FU と PEP はそれぞれ 5-FU $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$, PEP $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ として単独に作用させた。また、Ceph も同様に一般臨床使用量および諸家の実験濃度から、加えて単独で明らかな細胞増殖抑制を示さない濃度として $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ およびその倍量の $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ とし、抗癌剤と混合した培養液を使用した (表 2)。

表 2 薬剤作用濃度
(5-FU, PEP, Ceph の各群について)

1. Ceph 単独作用群
A 群: Ceph $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$
2. 5-FU 作用群
B 群: 5-FU $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$
C 群: 5-FU $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ + Ceph $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$
D 群: 5-FU $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ + Ceph $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$
3. PEP 作用群
E 群: PEP $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$
F 群: PEP $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ + Ceph $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$
G 群: PEP $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ + Ceph $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$

さらに、被検抗癌剤の中で、Ceph との併用効果がみられた PEP について、Ceph との混合比による増殖抑制効果の差を検討するため、PEP $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ + Ceph $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$, PEP $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ + Ceph $0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$, PEP $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ + Ceph $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$, すなわち、PEP : Ceph を 1 : 3, 1 : 6, 1 : 10 としたものを用いた。また、PEP 単独作用群として PEP $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ に加えて、併用効果の指標とし

て10倍量の PEP 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を設定した(表3)。

表3 薬剤作用濃度
(PEP 単独群, PEP・Ceph 併用群について)

1. PEP 単独作用群
E群: PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
J群: PEP 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
2. PEP・Ceph 併用作用群(混合比)
F群: PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +Ceph 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (PEP:Ceph=1:10)
H群: PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +Ceph 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (PEP:Ceph=1:3)
I群: PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +Ceph 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (PEP:Ceph=1:6)

II. 実験方法(表4)

A. 培養条件

対数増殖期にある KB 細胞が 5×10^4 個/mlとなるように, 5% 仔牛血清加 Eagle MEM 培養液(Flow Lab.)で調整し, 直径 12 mm, 長さ 75 mmの小試験管に 1 mlずつ分注し, 傾斜角 15° で, 37°C, 3日間静置培養したのち, 所定量の薬剤を含む培養液と交換した。

B. 観察方法

薬剤作用後 2, 3, 5 日で各試験管内の細胞を Phosphate Buffer Saline (PBS) で洗浄し, 0.25% trypsin (Difco)・PBS を 2 ml 加え, trypsin 処理を行ったのち, 2000 倍 Eosin-PBS¹⁸⁾ により有核細胞数を算定し, 増殖曲線を作成して増殖抑制効果について t 検定を用いて検討した。また, 各種抗癌剤に対する Ceph の併用実験については, 細胞を含む培養液内にあらかじめ挿入し

表4 実験方法

ておいた短冊型カバーガラス(6×20 mm)を取り出し, May-Grünwald Giemsa 染色¹⁹⁾を施し, 細胞形態学的な観察もあわせて行った。

実験成績

I. 各種抗癌剤と Ceph との併用効果について

A. Ceph 単独作用群(A群)

1. 有核細胞数の推移(図1, 2)

対照群と比較してほぼ同様な増殖傾向がみられ, 2日, 3日, 5日例ではいずれも対照群との間に有意差は認められなかった。しかしながら, 2日, 3日, 5日例において, B, C, D, E, F, G 群との間に有意差が認められた($p < 0.01$)。

2. 形態学的変化(表5, 6)

2日例では, 細胞増殖は集簇傾向を呈し, 円形で, 細胞質の腫大, 空胞形成などが所々に散見された。また, 核の変化は特に認められなかった(写真2)。3日例では, 細胞増殖は集簇傾向をさらに強め, 細胞はほとんど円形で, 細胞質の腫大, 空胞形成がみられ, 核では腫大, 核小体の腫大, 核縁の肥厚などが2日例に比べて, さらに多く認められるようになった(写真3)。また, 5日例でも, 細胞増殖は同様な集簇傾向を呈していたが, 不整形を呈しているものがかなり認められるようになった。なお, 集簇している細胞では, 細胞質の腫大, 核の腫大, 核小体の腫大, 核縁の肥厚などが著しく, 3日例に比べて, 細胞境界が不明瞭となり, 核の不整形を呈する細胞が散見された(写真4)。

B. 5-FU 作用群

1. 有核細胞数の推移(図1)

a) 5-FU 単独作用群(B群)

対照群と比較してほぼ同様な増殖傾向がみられたが, 2日, 3日, 5日例ではいずれも対照群との間に有意差がみられた($p < 0.01$)。

b) 5-FU・Ceph 併用作用群(C群, D群)

C群およびD群ともに対照群と比べ, 単独での作用群(B群)と同様な増殖傾向がみられたが, 2日, 3日, 5日例いずれも対照群に比べて, 有意な増殖抑制が認められた($p < 0.01$)。しかしながら, 単独作用群(B群)とでは有意差は認められなかった。また, C群とD群との間にも有意差は認められなかった。

2. 形態学的変化(表5, 6)

a) 5-FU 単独作用群

2日例では, 細胞はおおむね集簇性に増殖していたが, 細胞は長径が増大し, 不整形を呈するものが所々に

写真2 Ceph 単独作用群 2 日例
(May-Grünwald Giemsa 染色 ×109)

写真5 5-FU 単独作用群 2 日例
(May-Grünwald Giemsa 染色 ×218)

写真3 Ceph 単独作用群 3 日例
(May-Grünwald Giemsa 染色 ×218)

写真6 5-FU 単独作用群 3 日例
(May-Grünwald Giemsa 染色 ×109)

写真4 Ceph 単独作用群 5 日例
(May-Grünwald Giemsa 染色 ×218)

写真7 5-FU 単独作用群 5 日例
(May-Grünwald Giemsa 染色 ×109)

みられた。また、細胞質の腫大、小さな空胞形成、細胞境界の不明瞭化も軽度であった。また、核では核の濃染、核小体の腫大、核縁の肥厚、クロマチンの細網化、多核細胞などが所々散見された(写真5)。3日例では、

細胞はさらに集簇性に増殖し、細胞の外形は紡錘状となり、著しく不整形を呈するものを認め、細胞質では腫大、空胞形成、細胞境界が不明瞭となり、細胞質の崩壊も認められた。核では腫大、濃染、核小体の腫大、核縁

写真8 5-FU・Ceph 併用作用群2日例
(May-Grünwald Giemsa 染色 × 218)

写真11 PEP 単独作用群2日例
(May-Grünwald Giemsa 染色 × 218)

写真9 5-FU・Ceph 併用作用群3日例
(May-Grünwald Giemsa 染色 × 109)

写真12 PEP 単独作用群3日例
(May-Grünwald Giemsa 染色 × 218)

写真10 5-FU・Ceph 併用作用群5日例
(May-Grünwald Giemsa 染色 × 218)

写真13 PEP 単独作用群5日例
(May-Grünwald Giemsa 染色 × 218)

の肥厚がかなりみられ、クロマチンの粗大凝集も認められた。また、細胞分裂像も2日例に比べ減少していた(写真6)。5日例では、細胞は所々に散在し、細胞質の崩壊、消失がみられた。核では裸核状を呈するものや核

濃縮もみられ、また、核の濃染、クロマチンの粗大凝集もかなり強度にみられた。なお、細胞分裂像は著しく減少していた(写真7)。これら2, 3, 5日例の各例において、A群と比較して細胞形の不整、細胞質、核の変

写真14 PEP・Ceph 併用作用群 2 日例
(May-Grünwald Giemsa 染色 × 218)

写真15 PEP・Ceph 併用作用群 3 日例
(May-Grünwald Giemsa 染色 × 218)

写真16 PEP・Ceph 併用作用群 5 日例
(May-Grünwald Giemsa 染色 × 218)

性（とくに核の濃染）が強度となっていた。

b) 5-FU・Ceph 併用作用群

C 群と D 群との間には 2, 3, 5 日例において著明な形態学的変化の差は認められなかった。2 日例では、

細胞は集簇性に増殖していたが、細胞長径の増大、紡錘状をはじめとし、不整形を呈するものが散見された。また、細胞質の腫大、小さな空胞形成、細胞境界の不明瞭化、核の腫大、核の濃染、核小体の腫大、核縁の肥厚、クロマチンの細網化、多核細胞も所々で認められ、細胞分裂像は対照群に比べやや減少していた（写真 8）。3 日例では、細胞は集簇的な増殖傾向がさらに強くなっていたが、細胞外形は紡錘状となり、著しく不整形を呈するものがかなり認められた。また、細胞質の腫大、小さな空胞形成、細胞境界の不明瞭化、核では腫大、濃染、核小体の腫大、核縁肥厚がやや強度となり、細胞質崩壊、クロマチンの粗大凝集もみられた。また、細胞分裂像は 2 日例に比べて減少していた（写真 9）。5 日例では、細胞はやや散在性に増殖していたが、細胞質の崩壊、消失による裸核の傾向や核濃縮が認められ、核の濃染、クロマチンの粗大凝集がかなり強度となっていた。また、細胞分裂像も著しく減少していた（写真 10）。

C. PEP 作用群

1. 有核細胞数の推移（図 2）

a) PEP 単独作用群（E 群）

対照群と比較して同様な増殖傾向がみられたが、2 日例および 5 日例では有意に増殖抑制がみられた（ $p < 0.01$ ）。しかしながら、3 日例では対照群との間に有意差は認められなかった。

b) PEP・Ceph 併用作用群（F 群、G 群）

F 群、G 群では、ともに対照群および PEP 単独作用群（E 群）と比較して、同様な増殖傾向を呈していたが、2 日、3 日、5 日例の各例ではともにそれぞれの作用群との間に有意な増殖抑制が認められた（ $p < 0.01$ ）。なお、F 群と G 群の間では、2 日例、3 日例、5 日例ともに有意差は認められなかった。

2. 形態学的変化（表 5, 6）

a) PEP 単独作用群

2 日例では、細胞は集簇傾向を呈し、円形で、細胞質の腫大、空胞形成、核の腫大などが所々にみられる程度で、著しい変化は認められなかった（写真 11）。3 日例では、細胞は集簇し、不整形となり、細胞質は腫大し、小型の空胞形成、淡染化がみられた。また、核では腫大、核小体の腫大、核縁の肥厚がかなり認められた（写真 12）。5 日例では、細胞は散在性で、不整形を呈し長径が増大し、細胞質は著しく腫大し、細胞質内には空胞形成がかなり認められた。また、核では腫大、核小体の腫大、核縁の肥厚、核形不整、クロマチンの細網化などが強度に認められ、細胞分裂像も著しく減少していた

(写真13). これら2, 3, 5日例の各例において, A群と比較して細胞形の不整, 細胞質, 核の変性(とくに核の腫大)が強度となっていた.

b) PEP・Ceph 併用作用群

F群とG群の間には2, 3, 5日例において著明な形態学的変化の差は認められなかった. 2日例では, 細胞集簇は所々に散見され, おおむね集簇傾向を呈していた. 細胞は全般的に長径が増大し, 不整形であった. また, 細胞質は腫大し, 空胞形成や, 細胞境界が不明瞭と

図1 KB細胞増殖曲線(5-FU, Cephの各群について)

A群: Ceph 2.0 µg/ml
B群: 5-FU 0.5 µg/ml
C群: 5-FU 0.5 µg/ml + Ceph 1.0 µg/ml
D群: 5-FU 0.5 µg/ml + Ceph 2.0 µg/ml

図2 KB細胞増殖曲線(PEP, Cephの各群について)

A群: Ceph 2.0 µg/ml
E群: PEP 0.1 µg/ml
F群: PEP 0.1 µg/ml + Ceph 1.0 µg/ml
G群: PEP 0.1 µg/ml + Ceph 2.0 µg/ml

なり, 核では核小体の腫大, 核縁の肥厚, 断裂などの所見が認められた(写真14). 3日例では, 細胞の散在増殖傾向が強度となり, 細胞では長径が増大し, 紡錘形など不整形を呈し, 細胞質の腫大, 大小の空胞形成, 細胞境界の不明瞭化などがかなり強度となり, 細胞質の崩壊も所々で認められた. また, 核は不整形, 核小体の腫大, 核縁の断裂, 消失も強度となり, クロマチンの細網化, 多核細胞の出現, 細胞分裂像の減少が認められた(写真15). 5日例では, 細胞はさらに散在し, 細胞形も著しく紡錘状となり不整であった. また, 細胞質の崩壊, 消失, クロマチンの粗大凝集, 濃縮, 核内空胞形成などが認められ, 細胞分裂像はほとんど認められなかった(写真16).

表5 殺細胞効果度の判定基準

第0度	第I度に示すような細胞形態変化が, 全細胞の50%に満たないもの	
第I度	細胞質の変化	染色の変化, 長径の増大など.
	核の変化	染色性の変化, 核縁の肥厚, 核小体の腫大, 長径の増大など.
	これらが, 全細胞の50%以上に認められるもの.	
第II度	第I度の変化に加えて,	
	細胞質の変化	細胞境界不明瞭化, 空胞形成など.
	核の変化	核形不整, 核縁の断裂・消失, 核小体の断裂・消失, クロマチンの細網化など.
	これらの変化が, 強度に認められるもの.	
第III度	第I度, 第II度の変化に加えて,	
	細胞質の変化	崩壊・消失など.
	核の変化	クロマチンの粗網化, 濃縮, 空胞形成, 断裂, 崩壊など.
	これらの変化が, さらに強度に認められるもの.	

※柴田ら(1968)⁷⁶⁾, 西坂(1970)⁷⁷⁾, 林ら(1978)⁷⁸⁾らの基準を一部改変準用

表6 殺細胞効果 (表5の判定基準による)

		2日例	3日例	5日例
Ceph 単独作用群	A群	0	0	I
5-FU 単独作用群	B群	0~I	I~II	II
5-FU + Ceph 併用作用群	C群	0~I	I~II	II
	D群	0~I	I~II	II
PEP 単独作用群	E群	0	I	I~II
PEP + Ceph 併用作用群	F群	I	II	II~III
	G群	I	II	II~III

A群: Ceph 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ B群: 5-FU 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ C群: 5-FU 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + Ceph 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ D群: 5-FU 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + Ceph 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ E群: PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ F群: PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + Ceph 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G群: PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + Ceph 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$

以上の成績を小括してみると,

1) Ceph 単独作用群 (A群) は, 対照群と比較して有意な増殖抑制効果および細胞形態学的変化の差はみられなかった. また, 5-FU 作用群 (B, C, D群) および PEP 作用群 (E, F, G群) との間には有意な増殖抑制効果 ($p < 0.01$) および細胞形態学的変化の差がみられた.

2) 5-FU 単独作用群 (B群) と 5-FU・Ceph 併用作用群 (C, D群) との間には, 有意な増殖抑制効果および細胞形態学的変化の差はみられなかった.

3) PEP 単独作用群 (E群) と PEP・Ceph 併用作用群 (F, G群) との間には, 有意な増殖抑制効果 ($p < 0.01$) および細胞形態学的変化の差がみられた.

II. PEP と Ceph との種々の混合比による併用効果について (図3)

E, F, H, I, J群では, ともに対照群と比較して, 同様な増殖傾向を呈していたが, 2日, 3日, 5日例の各例ではともにそれぞれの作用群との間に有意な増殖抑制が認められた ($p < 0.01$). つぎに, H群では, E群との間に3日, 5日例において有意差を認めた ($p < 0.01$). また, F群, I群およびJ群では, E群との間に2日, 3日, 5日例において有意差を認めた ($p < 0.01$). しかしながら, F群とI群との間には2日, 5日例において有意差を認めなかった.

以上の成績を小括してみると,

1) 混合比 1:3 (H群) は, 3日, 5日例において PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独作用群 (E群) と比較して有意な増殖抑制効果を認めた ($p < 0.01$).

2) 混合比 1:6 (I群), 1:10 (F群) は, 2, 3, 5日例において PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独作用群 (E群) と比較して有意な増殖抑制効果を認めた ($p < 0.01$).

3) PEP 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独作用群 (J群) は, 2, 3, 5日例において混合比 1:3 (H群), 1:6 (I群), 1:10 (F群) と比較して有意な増殖抑制効果を認めた ($p < 0.01$).

4) 混合比 1:10 (F群) と 1:6 (I群) との間には2日, 5日例において有意差を認めなかった.

5) 以上の成績より, 2, 3, 5日例において混合比 1:6 (I群), 1:10 (F群) の増殖抑制効果は, PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独作用群 (E群) に比較して数倍増強された.

図3 KB細胞増殖曲線 (PEP 単独群, PEP・Ceph 併用群について)

E群: PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ F群: PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + Ceph 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
(PEP : Ceph = 1 : 10)H群: PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + Ceph 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$
(PEP : Ceph = 1 : 3)I群: PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + Ceph 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$
(PEP : Ceph = 1 : 6)J群: PEP 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$

総括ならびに考察

癌化学療法は, 癌の生物学的性状を考慮すれば術前術後の全身療法として, その重要性が極めて高く, 理論的にも癌に対する的確な治療法といっても過言ではない.

抗癌剤は長年の研究、開発、改良を経て、今日なお種々と研究されている。一方、臨床面においても報告者によって種々な投与方法が考案され、それぞれ報告されているが、画一的な投与方法はないものの、投与量、投与期間、投与方法などが検討され、各科領域における悪性腫瘍の治療成績はかなり向上しつつある。なお、治療面からすれば癌の生物学的性状から適応抗癌剤を大量に、しかも長期間にわたって投与することがより効果的であることに異論をみない¹⁾。しかしながら、これらの抗癌剤には種々な副作用があり、肺線維症²⁻⁴⁾、腎障害^{3,4)}、心障害^{3,4)}、骨髄抑制^{3,4)}、消化器障害^{3,4)}などを招来し、時として重篤な障害をきたす場合が少なくない。したがって、抗癌剤をできうだけ長期にわたって投与し、副作用の軽減を図るため、他抗癌剤や非抗癌剤などと併用して、相加的あるいは相乗的な効果を期待する試みは合目的である。

このような観点から抗癌剤の併用としては、長期頻回分割投与療法²⁰⁾や大量間歇投与療法²⁰⁾などが実施されている。また、非抗癌剤との併用についてはビタミン剤をはじめとして、種々な薬物⁷⁻¹¹⁾の併用が検討され、副作用の軽減と治療効果を高める試みもなされている。とくにビタミンAが細胞膜系に作用して、膜透過性を亢進し、いくつかの抗癌剤では腫瘍細胞内の濃度上昇が可能であるという報告²¹⁾もみられる。頭頸部領域においても、抗癌剤と放射線治療およびビタミンAとの局所動注などが実施され、その有用性が認められている⁷⁾。一方、インターフェロン¹¹⁾、カフェイン²²⁾、ベラパミール¹⁰⁾、アンホテリシンB²³⁾などとの臨床応用が治療効果をもたらすことも報告されている。このように、近年、癌化学療法において効果増強や副作用の軽減を目的として、非抗癌剤との併用が重要視されつつある。そこで著者は、口腔外科領域において繁用されている抗癌剤と非抗癌剤との併用による効果をヒト咽頭癌由来のKB細胞を用い、*in vitro*で検討した。

I. 被検薬剤について

実験に用いた抗癌剤は、日常の口腔癌化学療法で繁用されている抗癌剤のうち、代謝拮抗剤でしかも放射線増感作用⁶⁾を有する5-FU、および抗腫瘍性抗生物質であるPEPを選んだ。

5-FUはpyrimidin系の代謝拮抗剤の一種で、1957年Duschinsky²⁴⁾により合成されたものである。5-FUの作用機序は、uracilと競合してuracil→thymine→thymidineという核酸合成の過程を阻害し、癌細胞の分裂を阻止するとされ、Heidelbergerら(1957)²⁵⁾が

基礎的実験によって抗腫瘍性を立証している。本邦においても、柄川(1967)⁶⁾、石山ら(1967)²⁶⁾、芦川ら(1967)²⁷⁾、菊地ら(1967)²⁸⁾、梶山ら(1969)²⁹⁾らをはじめ、諸家により多数の基礎的、臨床的な報告が行われ、日常の臨床で多用されている。また、最近では5-FUは単独投与よりもシスプラチンなど他の抗癌剤やロイコボリン、インターフェロン、ジピリダモールなどの非抗癌剤との併用、あるいは放射線照射との併用により優れた治療結果を期待しうることも報告されている^{11, 29-33)}。さらに5-FUは、放射線増感剤⁶⁾としても知られ、頭頸部癌の治療でも放射線治療との併用が好まれている。

Bleomycin(以下BLMと略す)は、1962年Umezawaら³⁴⁾によりStreptomyces verticillusの培養濾液から発見された抗腫瘍性抗生物質で、頭頸部癌をはじめとする扁平上皮癌や悪性リンパ腫での有効性が確認され、広く臨床面で使用されている抗癌剤である。しかしながら、強い肺毒性を有し、肺線維症などが報告され、十分量の投与が難しく、とくに高齢者では極めて注意を必要とする²⁻⁴⁾ことから、BLMは種々と検討され、PEPに改良されるに至った。PEPは、BLMに比べてその高い臓器内分布性や低い肺毒性に加え、BLM同様に扁平上皮癌に著効することから、扁平上皮癌が多数を占める口腔領域の悪性腫瘍に対しては広く単剤あるいは併用薬剤として積極的に使用されている³⁵⁾。

併用薬剤として使用したCephは、植物性アルカロイドの一種であるタマサキツツラフジの根茎から抽出されたビスコクラウリン型アルカロイドで、白血球減少症に対する予防改善³⁶⁾をはじめ、抗アレルギー作用³⁷⁾、マムシ咬傷の中和作用³⁸⁾、血液幹細胞の増強作用³⁹⁾、脂質過酸化反応抑制作用^{40,41)}、免疫機能増強作用^{13,14)}によるnatural killer活性¹³⁾の増強、細胞膜に対してCa²⁺の透過性に変化をもたらす、抗癌剤の細胞内への流入促進あるいは流出抑制作用¹⁵⁾など多くの作用を有するとされている。一方、生物学的治療剤いわゆるbiological response modifier (BRM)^{16,42)}の開発が進み、臨床的にその有用性が証明されているものも少なくない。この作用機序としては、natural killer活性とマクロファージの細胞傷害活性を増強することなどが知られているが、抗癌剤と併用した場合の寿命の延長、寛解期間の延長などの点で使用されているにすぎないのが現状である。

また、BRMの中でもインターフェロン^{11,33,42)}などは副作用の強いことが問題とされているものの、これら免疫学的効果に加え、*in vitro*で腫瘍細胞に対する直接的抗

腫瘍効果、さらには各種抗癌剤との併用効果について報告され、臨床的に単独投与や抗癌剤との併用投与などにより良好な成績をおさめている。

Ceph は、インターフェロンと同様に直接的抗腫瘍効果と免疫学的な機序の両方を介して抗腫瘍効果を発揮することから^{13,14)}、BRM^{16,42)}として悪性腫瘍の免疫療法にも多用されている。加えて、癌化学療法において、とくに重要視されている抗癌剤耐性機構のうち、P-糖タンパクに作用して細胞内からの抗癌剤の排出を競合的に阻害し、細胞毒性を増強する細胞膜修飾物質として、耐性を克服する目的で Ceph はその使用価値が高く評価されている⁴³⁻⁴⁵⁾。さらに、Ceph は細胞の増殖障害が起こらない濃度でもカルシウム拮抗剤より細胞内における抗癌剤の貯留効果が強い⁴⁶⁾ことでも知られている。したがって、Ceph の使用は、副作用を軽減し、抗癌剤の効果を期待し得るものと考えられている。

II. 抗癌剤のスクリーニングテストについて

これまでに抗癌剤の薬効を検討するにあたっては *in vivo* あるいは *in vitro* で行われ、今日におよんでいる。このうち、*in vitro* でその薬効を、直接および間接的に検索するスクリーニングテストとしては、腫瘍細胞を用いる方法、あるいは細胞培養法により行われているのが現状である⁴⁷⁾。すなわち、近藤ら (1964)⁴⁸⁾、梶山ら (1965)⁴⁹⁾らは、人癌組織におけるコハク酸脱水素酵素の活性値を指標とした SDI 法による制癌剤感受性試験を、また、宮原 (1970)⁵⁰⁾は、KB 細胞におけるコハク酸脱水素酵素の活性値測定により細胞増殖抑制度を指標とした適応制癌剤の選択を、羽柴ら (1987)⁵¹⁾、窪田ら (1992)⁴³⁾らは、組織培養のコロニー形成法によるコロニー形成率抑制効果から、さらに、西山ら (1991)⁵²⁾、青儀 (1992)⁵³⁾らは、生細胞数をコールカウンターおよびトリパンブルー染色によって算定し、その増殖抑制率から薬剤選択をそれぞれ行っている。一方、道 (1964)⁵⁴⁾、園田 (1964)⁵⁵⁾、陸 (1965)⁵⁶⁾、赤司ら (1967)⁵⁷⁾らは、各種抗癌剤による細胞増殖抑制効果と形態学的な変化について探策し、大塚 (1960)⁵⁸⁾、梶山ら (1969)²⁹⁾らは、X 線照射と 5-FU およびマイトマイシンの併用が有用であると報告している。

KB 細胞を用いた一次スクリーニングテストとしての有用性は、Eagle ら (1958)⁵⁹⁾により 50% 増殖阻止濃度から各薬剤についての細胞増殖抑制度を検索し、実験動物における成績と比較して、ある程度の相関性を示唆している。その後、勝田ら (1967, 1970)^{60,61)}、梶山ら (1969)²⁹⁾、宮原 (1970)⁵⁰⁾、山中ら (1977)⁶²⁾、浦出

ら (1986)⁹⁾、川浦 (1994)⁶³⁾らなどによっても、KB 細胞を使用して抗癌剤のスクリーニングテストが種々と報告され、その有用性が確認されている。

著者は教室で累代培養、維持され、ヒト咽頭癌由来である KB 細胞を使用し、抗腫瘍効果の様々な検討を行った。

III. 薬剤の作用濃度および作用時間について

抗癌剤の *in vitro* におけるスクリーニングテスト⁶⁴⁻⁶⁶⁾にあたっては、濃度依存性が種々と論議されているが、本邦においては一般的な抗癌剤の作用濃度は、一般臨床使用量での血中濃度を基準としている。また、臨床面における投与法、血中濃度の維持、あるいは排泄時間などを参考として、種々な段階の濃度を設定し、濃度-生残率曲線から成績を判定している^{43,51-53,63,67,68)}。

一方、作用時間について、勝田ら (1967)⁶⁰⁾、宮原 (1970)⁵⁰⁾らは 30 分および 60 分という短時間作用実験を、山中ら (1977)⁶²⁾、浦出ら (1986)⁹⁾、川浦 (1994)⁶³⁾らは、4～5 日間の持続作用実験を行っているが、いずれも報告者の種々な知見を基準としており、統一的な方法はみられない。

併用薬剤として使用した Ceph は骨髓移行性もよく⁶⁹⁾、比較的低毒性⁷⁰⁾で、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度では毒性はほとんど認められないとされている^{15,71)}。この点について、関谷ら (1985)⁶⁸⁾は Ceph は 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの濃度では HeLa 細胞に対する核酸、タンパク合成抑制能は弱い、それ以上の濃度において抑制が強くなり、cytotoxic な作用を呈したと報告している。また、羽柴ら (1987)⁵¹⁾はチャイニーズハムスターの V79 細胞に対し、Ceph は 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で処理時間が 60 分以内では生残率に影響がなかったとし、加藤ら (1989)⁷²⁾は L 1210 細胞に対し、Ceph を持続接触で 4 日間培養したところ、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで死細胞を認めなかったと報告している。さらに、西山ら (1991)⁵²⁾は Ceph の作用は可逆的なものであり、その存在下でのみ効果が発揮されうると報告している。

以上のように、著者はそれぞれの薬剤作用濃度をこれら諸家の報告、あるいは予備実験の成績、さらには実験誤差を考慮し、一般臨床で投与される薬剤の血中濃度を参考として決定した。なお、作用時間については、下山 (1976)²⁰⁾の提唱する殺細胞作用様式による分類に準じた。すなわち、PEP は濃度依存性作用の他に時間依存性作用を併せ持っていること、また、5-FU は時間依存性作用のうち制限付き時間作用がみられることなどを考慮して、薬剤作用時間を 5 日間とした。

IV. 各種抗癌剤の単独効果について

梶山ら (1969)²⁹⁾ によると, KB 細胞における 5-FU 0.05 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 5.0 $\mu\text{g/ml}$ の単独作用での細胞増殖抑制効果は対照群に比べて有意にみられたとしている。さらに, 菊地ら (1967)²⁸⁾ は種々の悪性腫瘍患者に 5-FU の投与を行い, 組織学的に腫瘍細胞の変化について検索し, 核の濃染や構造不明化, 細胞質の空胞形成などを著明に認めている。

著者の実験成績においても, これらの報告と同様に 5-FU 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 単独作用群 (B 群) の細胞増殖抑制効果は対照群に比べ有意に認められ, 細胞形態学的変化も核の濃染を中心としたものであった。

PEP の培養癌細胞に対する増殖抑制効果は, BLM 同様その dose-response curve で二相性を示すことが知られている。すなわち, PEP の濃度が高くなるに伴い生残率は指数関数的に減少するが, 低濃度の範囲では生残率が急激に減少し, ある一定濃度以上の範囲では, この減少率の割合が緩徐になると報告⁷³⁾ されている。これについて宮本ら (1983)⁷⁴⁾ は, マウス腹腔内 EAT 細胞において BLM 抵抗性を検討し, 低濃度 BLM では細胞に BLM の損傷からの回復に時間を与えない持続投与法が最も合理的としている。また, 高原 (1990)⁷⁵⁾ の報告では, PEP の細胞周期に与える影響は S, G2M 期での薬物蓄積によるもので, フローサイトメトリーを使用した細胞周期の解析から持続投与の効果は間歇投与をうわまわっており, PEP は濃度依存性のほか時間依存性作用もかなり強く併せ持っているとしている。

著者の実験成績からしても, PEP は 5 日間という持続作用において対照群に比べて有意に増殖抑制効果を示しており, この時間依存性の性状がうかがわれた。

V. 各種抗癌剤と Ceph との併用効果について

A. 5-FU と Ceph との併用について

5-FU と Ceph との併用効果について, 山中ら (1977)⁶²⁾ は, KB 細胞において Ceph はビタミン A の併用により 1/4 倍の 5-FU 濃度 (12.5 $\mu\text{g/ml}$) でもその効果を発現したとしている。また, *in vivo* におて Sarcoma-180 細胞を使用した小野ら (1988)¹⁶⁾ は, Ceph は腫瘍組織内の 5-FU 濃度を上昇させた報告している。これに対し, Kato ら (1987)⁷⁵⁾ は L1210 マウス白血病細胞を使用した実験において, 5-FU と Ceph の併用効果を認めず, また, 西山ら (1991)⁵²⁾ によるヒト骨髄性白血病細胞株 K562 を使用した報告においても, 5-FU の Ceph による増強効果が認められなかったとしている。このように実験材料, 実験方法によりそ

の併用効果は統一的ではないようである。

著者は, 5-FU 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 単独作用群 (B 群) と 5-FU 0.5 $\mu\text{g/ml}$ に単独で明らかな細胞増殖抑制がみられない濃度の Ceph 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 併用作用群 (C 群) および 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 併用作用群 (D 群) について, その効果を検索した。その結果, 今回の実験濃度による成績からすれば, B 群では対照群に比べ有意な細胞増殖抑制効果を認めたが, B 群と C, D 群との間に明らかな有意差は認められなかった。また, 薬剤作用後の生残細胞に対する形態学的な観察では, 柴田ら (1968)⁷⁶⁾, 西坂 (1970)⁷⁷⁾, 林 (1978)⁷⁸⁾ らの判定基準を参考にして検討を行ったところ, B 群と C, D 群との間の所見に明らかな差違はみられなかった。

したがって, この知見は, Kato ら (1987)⁷⁵⁾, 西山ら (1991)⁵²⁾ による実験成績と類似したものであった。このように 5-FU に対する Ceph の効果増強に関する一定しない実験成績については今だ不明な点が多いが, 西山ら (1991)⁵²⁾ が述べているように, Ceph は抗癌剤耐性機構の中のひとつである細胞膜電位差の低下を上昇させることから, 生体内で中性に荷電する 5-FU との併用では抗腫瘍効果が増強されない可能性があると思われる。

B. PEP と Ceph との併用について

PEP に対する Ceph との併用効果について, 北島ら (1984)⁷⁹⁾ は HeLa 細胞を用い, PEP と Ceph を 1:6 の割合で混合併用した場合, 101.82% の増殖阻害が認められ, この割合が最適混比であるとしている。また, 羽柴ら (1987)⁵¹⁾ はチャイニーズハムスターの V79 細胞で生残率曲線上での生残率が 1×10^{-1} の効果を示す点を検討し, PEP 単独の場合に比べ Ceph を 5 $\mu\text{g/ml}$ 添加すると PEP の量を約 40% に減じても同じ生残率効果が得られ, 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加の場合は約 10% に減じても同様の効果が得られるが, Ceph 濃度を 50 $\mu\text{g/ml}$ 以上としてもあまり増強作用は認められなかったとしている。さらに, 羽柴ら⁵¹⁾ は PEP 5 $\mu\text{g/ml}$ に対して種々な濃度の Ceph との混合併用を行い, 作成された生残率曲線より PEP と Ceph は 1:10 以上の混合比では生残率の減少の割合は増強しないと報告している。

著者は, 5-FU と同様に PEP 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 単独作用群 (E 群) と Ceph 1.0 $\mu\text{g/ml}$ および 2.0 $\mu\text{g/ml}$ を加えた併用作用群, すなわち, F 群および G 群について, その効果を検索した。その結果, 併用作用群において単独作用群と比較して PEP の細胞増殖抑制効果の明らかな増強が観察された。なお, 併用作用群の F 群と G 群との

間に細胞増殖抑制効果の有意差はみられなかった。一方、薬剤作用後の生残細胞に対する形態学的な観察では、併用作用群 (F 群, G 群) では単独作用群 (E 群) に比べ、これらの細胞の形態変化はいずれの実験例においても著明となり、とくに 5 日例では細胞質だけでなく核の変性が単独作用群よりさらに強度となっていた。しかしながら、併用作用群の F 群および G 群の実験例では、細胞の形態変化に著明な差はみられなかった。

この成績は、羽柴ら⁶¹⁾による 1:10 以上の混合比では効果の増強がみられないという実験成績とほぼ一致するものであった。

さらに著者は、被検抗癌剤の中で Ceph との併用効果がみられた PEP について、Ceph との混合比による増殖抑制効果の差を検討するため、PEP と Ceph との混合比を 1:3 (H 群), 1:6 (I 群), 1:10 (F 群) とした併用作用群と単独作用群の PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (E 群) に加えて、効果の指標として 10 倍量の PEP 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独作用群 (J 群) を設定し、細胞増殖抑制効果検索した。すなわち、混合比 1:3 (H 群) では PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (E 群) との間に有意な増殖抑制効果の差がみられなかったのに対し、混合比 1:6 (I 群), 1:10 (F 群) において有意な細胞増殖抑制効果がみられた。また、PEP 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独作用群 (J 群) も混合比 1:6 (I 群), 1:10 (F 群) の併用作用群に対して有意な細胞増殖抑制効果がみられた。

これらの成績より、混合比 1:6 (I 群), 1:10 (F 群) の細胞増殖抑制効果は、PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独作用群に比較して数倍増強された。なお、混合比 1:6 (I 群) と 1:10 (F 群) との間には 2 日, 5 日例において明らかな有意差を認めることができず、北島ら (1984)⁷⁹⁾ の 1:6 の割合が最適混合比という知見については明らかにし得なかったが、使用した培養癌細胞や実験系の違いによるものと思われた。

以上の実験成績からすれば、5-FU と Ceph との併用では抗腫瘍効果の増強は認められなかったが、PEP と Ceph との併用では PEP 単独作用に比べ有意な細胞増殖抑制効果および殺細胞効果が得られた。また、その混合比では 1:6 および 1:10 において有意な細胞増殖抑制効果が得られ、PEP 単独作用の数倍の効果を示すことが示唆された。したがって、PEP と Ceph との併用は抗腫瘍効果を増強するのみならず、副作用軽減という目的においても臨床的に有用性があるものと考えられる。しかしながら、本実験は *in vitro* の実験であり、今後 *in vivo* の実験を含めて多くの研究が待たれる。

結 論

著者は、口腔癌治療に繁用される抗癌剤 5-FU, PEP の副作用を最小限にとどめるため、非抗癌剤の併用により相加的あるいは相乗的な抗腫瘍効果を高める試みとしてビスコクラウリン型アルカロイドである Ceph との併用効果について *in vitro* で実験を行った。すなわち、ヒト咽頭癌由来の KB 細胞を用いて、3 日間培養後、5-FU と PEP の 2 種類の抗癌剤と Ceph とを持続的に併用作用させ、さらに 2 日, 3 日, 5 日間培養した後に、これらの KB 細胞におよぼす影響を、細胞の増殖状況および形態学的な面より検索した。さらに併用効果の認められた PEP に対して Ceph との混合比についても検索し、以下の結果を得た。

I. 各種抗癌剤と Ceph との併用効果について

1) Ceph 単独作用群 (A 群) は、対照群と比較して有意な増殖抑制効果および細胞形態学的変化の差はみられなかった。また、5-FU 作用群 (B, C, D 群) および PEP 作用群 (E, F, G 群) との間には有意な増殖抑制効果 ($p < 0.01$) および細胞形態学的変化の差がみられた。

2) 5-FU 単独作用群 (B 群) と 5-FU・Ceph 併用作用群 (C, D 群) との間には、有意な増殖抑制効果および細胞形態学的変化の差はみられなかった。

3) PEP 単独作用群 (E 群) と PEP・Ceph 併用作用群 (F, G 群) との間には、有意な増殖抑制効果 ($p < 0.01$) および細胞形態学的変化の差がみられた。

4) 以上の成績より、今回の実験濃度において PEP と Ceph の併用による抗腫瘍効果の増強が認められたが、5-FU と Ceph とでは明らかでなかった。

II. PEP と Ceph との種々の混合比による併用効果について

1) 混合比 1:3 (H 群) は、3 日, 5 日例において PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独作用群 (E 群) と比較して有意な増殖抑制効果を認めた ($p < 0.01$)。

2) 混合比 1:6 (I 群), 1:10 (F 群) は、2, 3, 5 日例において PEP 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独作用群 (E 群) と比較して有意な増殖抑制効果を認めた ($p < 0.01$)。

3) PEP 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独作用群 (J 群) は、2, 3, 5 日例において混合比 1:3 (H 群), 1:6 (I 群), 1:10 (F 群) と比較して有意な増殖抑制効果を認めた ($p < 0.01$)。

4) 混合比 1:10 (F 群) と 1:6 (I 群) との間には 2 日, 5 日例において有意差を認めなかった。

5) 以上の成績より, 2, 3, 5日例において混合比 1:6 (I 群), 1:10 (F 群) の増殖抑制効果は, PEP 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 単独作用群 (E 群) に比較して数倍増強された。

Ceph は, natural killer 活性をはじめ生物学的治療剤として PEP の副作用を軽減し得るとされていることから, 今後さらに多くの実験研究が必要であるが, 今回の実験結果は, 臨床面において大きな示唆を与えるものと考えられた。

稿を終わるに臨み, 本研究に終始ご懇切なる御指導と御校閲を賜った恩師・梶山 稔教授に深甚なる感謝の意を表します。また, 種々御教示を戴いた, 黒川英雄助教授に感謝し, あわせて, 本研究に御協力を戴いた教職員各位に謝意を表します。

本論文の要旨は第47回日本口腔科学会総会 (1993年5月14日, 青森県弘前市) において発表した。

引用文献

- 1) 佐々木康綱: 癌化学療法における臨床薬理. JOHNS 9: 557-559, 1993.
- 2) 大熊 攻, 有吉 寛: 抗癌剤による肺毒性. 最新医学 45: 903-908, 1990.
- 3) 大熊 攻, 太田和雄: 抗癌剤の副作用. 最新医学 41: 534-545, 1986.
- 4) 齊藤匡人, 田端敏秀: 癌化学療法の副作用とその対策. JOHNS 9: 645-649, 1993.
- 5) 甲能直幸: 頭頸部がんに対する多剤併用療法. 耳鼻 29 補冊 1: 177-197, 1983.
- 6) 柄川 順: 放射線増感剤としての 5-Fluorouracil. 癌臨 13: 9-18, 1967.
- 7) 小宮山莊太郎, 広戸幾一郎, 笠 誠一, 桑野信彦, 中島格, 遠藤英也, 安河内 彰, 寺島広美, 大内 久: 5-FU, VitaminA, Radiation 併用療法 (FAR 療法) に関する研究. 耳鼻 22: 388-394, 1976.
- 8) 寺島雅典, 井上雄弘, 向山雄人, 三井郁雄, 小川一誠: 人癌培養株 PC-6, Hattori に対する種々の薬剤による VCR, ADM の効果増強に関する研究. 癌と化学療法 12: 343-347, 1985.
- 9) 浦出雅裕, 杉 政和, 五十嵐智一: ペプロマイシンによるヒト培養腫瘍細胞の殺細胞効果におよぼすポリエン系抗生剤フィリピンの影響. 癌と化学療法 13: 3244-3250, 1986.
- 10) 鶴尾 隆: Verapamil による抗癌剤の効果増強の試み. 癌と化学療法 8: 665-672, 1981.
- 11) 難波正義, 山本省一, 田中啓幹, 金森利至, 延原正弘, 木本哲夫: 培養ヒト悪性腫瘍細胞 (HeLa) に対する各種抗癌剤の細胞増殖抑制作用のインターフェロンによる増強効果の検討. 癌と化学療法 10: 1308-1312, 1983.
- 12) 藤原良一, 小野 稔, 田中紀章, 三輪恕昭, 万波徹也, 小長英二, 折田薫三: セファランチンの腫瘍増殖におよぼす効果. 癌と化学療法 7: 481-484, 1980.
- 13) 小野 稔: Cepharanthin の抗腫瘍効果—Lewis 肺癌転移抑制機序の解析—. 癌と化学療法 15: 249-255, 1988.
- 14) 小野 稔, 藤原良一, 田頭良章, 松井武志, 大橋勝英, 上川康明, 田中紀章, 小長英二, 折田薫三: 担癌マウス脾細胞の ADCC 活性におよぼすセファランチンの効果. 癌と化学療法 8: 1565-1569, 1981.
- 15) 長岡 榮, 川崎祥二, 佐々木功典, 中西 敬: アルカロイド (セファランチン) によるアドリマイシンの細胞内取り込みおよび排泄の修飾. 医学のあゆみ 133: 260-261, 1985.
- 16) 小野 稔, 谷田部 緑, 赤須通範, 田中紀章, 折田薫三: Cepharanthin による腫瘍組織内への 5-FU 到達性の増強. 医学のあゆみ 144: 639-640, 1988.
- 17) Eagle, H.: Propagation in a Fluid Medium of a Human Epidermoid Carcinoma, Stain KB. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89: 362-364, 1955.
- 18) Schreck, R.: A Method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions. Amer. J. Cancer 28: 389-392, 1936.
- 19) Jacobson, W. and Webb, M.: The two types of nucleoproteins during mitosis. Exp. Cell Res. 3: 163-183, 1952.
- 20) 下山正徳: 制癌剤 cell-kill-kinetics と至適投与法. 癌と化学療法 3: 1103-1110, 1976.
- 21) 井上正康, 山中直樹, 内海耕造: 癌細胞と細胞膜. 癌と化学療法 3: 589-603, 1976.
- 22) 土屋弘行, 富田勝郎: ヒト肉腫培養細胞におけるシスプラチンとカフェインの併用効果. 癌と化学療法 14: 3125-3130, 1987.
- 23) Krishan, A., Sauerteig, A. and Gordon, K.: Effect of amphotericin B on adriamycin transport in P388 Cells. Cancer Res. 45: 4097-4102, 1985.
- 24) Duschinsky, R.: The synthesis of 5-fluoropyrimidines. J. Am. Chem. Soc. 79: 4559-4600, 1957.
- 25) Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R. J., Plevin, E. and Scheiner, J.: Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor-inhibitory compound. Nature 179: 663-666, 1957.
- 26) 石山俊次, 坂部 孝, 潮 沙都也, 山形省吾, 船橋 渡, 岡本純哉, 小池敏雄, 伊藤正憲, 矢口 修, 塩坂雅司, 片倉富芳: 5-Fluorouracil とその制癌効果. 癌臨 13: 139-150, 1967.
- 27) 芦川和高, 黒岩卓夫, 佐丸義夫, 井上毅一, 吉田康三, 山崎信夫, 青山俊英, 波谷晋之: 5-Fluorouracil に関する基礎的研究. 癌臨 13: 412-417, 1967.
- 28) 菊地金男, 佐藤敏朗: 5-FU の外科的使用経験—とくに腫瘍組織像の変化について—. 癌臨 13: 670-676, 1967.

- 29) 梶山 稔, 古賀久保, 宮原弘次, 渥美剛重, 銅城将紘, 大庭 健, 勝田京一, 久恒一雄: 培養細胞による X 線・制癌剤の併用効果についての検討 (第 1 報) — 5-Fluorouracil, Mitomycin C について —. 九州歯会誌 23: 76-85, 1969.
- 30) 佐々木常雄: Biochemical modulation の研究の現状. 医学のあゆみ 164: 251-254, 1993.
- 31) 前原喜彦, 犬塚貞明, 杉町圭蔵: Dipyridamole による抗癌剤効果増強. 医学のあゆみ 164: 273-276, 1993.
- 32) 西條長宏, 杉本芳一: ロイコボリンによる 5-FU の効果増強—基礎と臨床—. 医学のあゆみ 164: 286-290, 1993.
- 33) 赤沢修吾: インターフェロンによる 5-FU の biochemical modulation. 医学のあゆみ 164: 305-309, 1993.
- 34) Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T. and Okami, Y.: New antibiotics bleomycin A and B. J. Antibiotics 19: 200-209, 1966.
- 35) 犬山征夫: ペブロマイシン. 最新医学 41: 472-479, 1986.
- 36) 鈴木眞一, 阿部力哉, 二瓶光博, 君島伊造, 土屋敦雄, 野水 整: 乳癌化学療法における白血球減少症, 血小板減少症に対する Cepharranthin[®] の防止効果について—prospective randomized study による検討—. 癌と化学療法 17: 1195-1200, 1990.
- 37) 鈴木正志, 川内秀之, 藤吉達也, 植山茂宏, 茂木五郎: 実験的滲出性中耳炎におけるセファランチンの効果. アレルギー 36: 268-276, 1987.
- 38) 左野千秋: マムシ咬傷の経験と治療に関する検討—7 年間 57 症例の経験より—. 外科 48: 595-598, 1986.
- 39) 宇野伸郎, 松岡信良, 内田哲史, 清水典子, 片山直之, 南信行, 白川 茂: セファランチンの顆粒球系幹細胞コロニー形成への効果. 医学のあゆみ 135: 595-597, 1985.
- 40) 白石則之: 生体膜脂質過酸化反応に対する膜安定化剤セファランチンの影響. 医学と生物学 98: 141-144, 1979.
- 41) 上者郁夫: 脂質過酸化反応に対するセファランチンの影響について. 岡山医会誌 97: 235-247, 1985.
- 42) 高久史磨: BRM の癌治療における役割. 癌と化学療法 15: 1597-1602, 1988.
- 43) 窪田朗子, 窪田和雄, 山田 進: 細胞膜修飾アルカロイド (セファランチン) による B16メラノーマ細胞に対する抗癌剤の効果増強—I, 植物由来の抗癌剤—. 癌と化学療法 19: 2163-2167, 1992.
- 44) 鈴木日出夫: 耐性克服を目的とした抗癌剤および効果増強剤. 癌と化学療法 17: 335-341, 1990.
- 45) Shiraishi, N., Akiyama, S., Nakagawa, M., Kobayashi, M. and Kuwano, M.: Effect of bisbenzylisoquinoline (biscoclaurine) alkaloids on multidrug resistance in KB Human Cancer Cells. Cancer Res. 47: 2413-2416, 1987.
- 46) 山本 茂, 彭 作輝, 辰巳和人, 三宅宗典, 福田弥一郎, 矢追公一: 臨床的ビンクリスチン耐性小児急性リンパ性白血病再発例に対するビンクリスチンとセファランチンの併用療法の検討. 日児誌 93: 1119-1125, 1989.
- 47) 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.
- 48) 近藤達平: 制癌剤の適応—感受性試験—. 最新医学 19: 2304-2311, 1964.
- 49) 梶山 稔, 久恒一雄: 制癌剤の感受性に関する研究 2. —口腔癌化学療法に際し, 感受性試験としての S. D. I. 法の追試経験—. 九州歯会誌 19: 92-98, 1965.
- 50) 宮原弘次: 口腔癌化学療法に対する実験的研究. 九州歯会誌 23: 669-697, 1970.
- 51) 羽柴光起, 山下正人, 村上晃一, 西川弘恭: 培養細胞に対するペブロマイシンの作用のセファランチンによる修飾. 癌と化学療法 14: 3245-3251, 1987.
- 52) 西山正彦, 青儀健二郎, 佐伯修二, 平林直樹, 峠 哲哉: ビスコクラウリン型アルカロイド (セファランチン[®]) による抗がん剤効果増強作用と機序: —ヒト培養消化器腫瘍細胞での検討—. 癌と化学療法 18: 2429-2433, 1991.
- 53) 青儀健二郎: ドキソルビシン抗腫瘍効果増強に関する基礎的研究—細胞膜電位差増強剤による biochemical modulation—. 広大医誌 40: 337-351, 1992.
- 54) 道 健一: 培養細胞に対するクロモマイシン A3 の作用 第一報 癌組織および正常組織由来細胞の増殖に対する影響. 口病誌 31: 146-157, 1964.
- 55) 園田重則: 諸種抗癌剤の臨床応用に対する基礎的検討. 久留米医会誌 27: 749-784, 1964.
- 56) 陸 亮介: 癌に関する実験的研究 第 1 編 Bashford 癌培養細胞に及ぼす各種抗癌剤の影響. 岡山医会誌 77: 1095-1111, 1965.
- 57) 赤司光弘, 辺見武彦, 森永英彦, 正義之: 培養細胞および腹水癌における cell number と mitotic index について. 長崎医会誌 42: 809-813, 1967.
- 58) 大塚勝章: Hela 細胞を対象とする各種制癌剤⁶⁰Co 照射併用効果に関する細胞病理学的研究. 慶応医学 37: 869-884, 1960.
- 59) Eagle, H. and Foley, G. E.: Cytotoxicity in human cell culture as a primary screen for the detection of anti-tumor agents. Cancer Res. 18: 1017-1025, 1958.
- 60) 勝田京一, 久恒一雄, 梶山 稔, 宮原弘次, 渥美剛重, 銅城将紘: 抗癌剤にかんする研究—試験管内短時間作用実験—. 医療 21: 1183-1192, 1967.
- 61) 勝田京一, 久恒一雄, 梶山 稔, 宮原弘次, 渥美剛重, 銅城将紘: 抗癌剤療法にかんする研究—多剤交差作用の培養 KB 細胞に及ぼす影響—. 医療 24: 281-289, 1970.
- 62) 山中直樹, 加藤武俊, 太田和雄: 細胞膜修飾による癌化学療法の効果増強. 癌と化学療法 4 supplement 第 35 回日本癌学会総会 特集号: 69-82, 1977.
- 63) 川浦光弘: 頭頸部癌 KB 細胞を用いた二剤併用による第二選択化学療法の検討. 慶応医学 71: 21-31, 1994.
- 64) 加藤武俊, 星野 章, 藤川智子, 西田敬子, 太田和雄: L

- 1210マウス白血病培養細胞に対する *in vitro* での各種制癌剤の併用効果. 癌と化学療法 1: 631-637, 1974.
- 65) 田代田鶴子: 組織培養とその応用 ヒト癌培養細胞を用いる抗癌効果の評価. 癌と化学療法 19: 2107-2112, 1992.
- 66) 広野正啓, 井上 浩: 抗癌剤感受性試験に関する研究. 癌と化学療法 4: 1077-1083, 1977.
- 67) 加藤武俊, 星野 章, 藤川智子, 西田敬子, 太田和雄: L1210マウス白血病の培養樹立株細胞における制癌剤の試験管内感受性. 癌と化学療法 1: 243-249, 1974.
- 68) 関谷 栄, 茂木正行, 谷川 恵, 林 裕人, 内山照雄, 岡安大仁: 制癌剤の *in vitro* 感受性試験およびビスコクラウリン型アルカロイドによる制癌剤作用増強効果. 癌と化学療法 12: 524-529, 1985.
- 69) 横島徹熹, 堤 修一郎, 大槻俊治, 高市松夫, 中島敏秀, 赤須通範: Cepharanthine の生体内動態に関する研究 ラットにおける吸収, 分布, 代謝, 排泄. 医薬品研究 17: 458-479, 1986.
- 70) 谷村実一, 定延和夫, 佐藤公彦, 三国友吉: 尿路性器悪性腫瘍治療時の血液変化に対する Cepharanthin の使用経験. 泌尿紀要 11: 1316-1323, 1965.
- 71) 水田昭文: Adriamycin の殺細胞効果の加温および Cepharanthine による修飾. 岡山医会誌 101: 303-314, 1989.
- 72) 加藤武俊, 鈴木恭子: L1210マウス白血病細胞の増殖に対するセファランチンの抑制効果. 医学のあゆみ 151: 565-566, 1989.
- 73) 高原正明: 硫酸ペプロマイシンの至適投与法に関する実験的研究—特に持続投与法の有効性について—. 口科誌 39: 907-931, 1990.
- 74) 宮本忠昭, 寺島東洋三: プレオマイシンの細胞致死作用と腫瘍治療. Oncologia 7 (WINTER): 61-78, 1983.
- 75) Kato, T. and Suzumura, Y.: Potentiation of anti-tumor activity of vincristine by the biscoclaurine alkaloid cepharanthin. J. N. C. I. 79: 527-532, 1987.
- 76) 柴田偉雄, 坪井栄孝, 尾形利郎, 鈴木 明: 経時的細胞診による肺癌の放射線療法および化学療法の効果判定について. 癌臨 14: 310-323, 1968.
- 77) 西坂康之: 口腔癌におよぼす制癌剤の影響—特に剥離細胞学的研究—. 九州歯会誌 23: 735-754, 1970.
- 78) 林 忠清: 細胞診よりみた肺癌放射線治療の効果判定に関する研究. 東京医大誌 36: 497-511, 1978.
- 79) 北島清彰, 吉田利夫, 岡田清己, 岸本 孝, 高橋克俊: PS (Peplomycin-Silicone) 弾頭カテーテルを用いた膀胱腫瘍の温水療法—Cepharanthin 併用療法—. 癌と化学療法 11: 2520-2525, 1984.