

原 著

抗癌剤と高圧酸素療法との併用に関する実験的研究

小 林 巖

信州大学医学部第一外科教室

EXPERIMENTAL STUDY ON THE COMBINATION OF ANTI-CANCER AGENT AND HYPERBARIC OXYGENATION THERAPY

Iwao KOBAYASHI

Department of Surgery, Faculty of Medicine,
Shinshu University

Key words: Hyperbaric Oxygenation, Mitomycin C, Brown-Pearce Tumor, Nucleic Acid

I. 緒 言

癌に対する治療、とくに進行癌に対する治療上、化学療法への期待はきわめて大きい、現在のところその成績は満足できる段階に達してはいない。抗癌剤による治療成績の向上をはかるためには、かぎられた抗癌剤を選択し、より効果的な使用方法を開発することが当面の課題であり、これらの点についてこれまでも種々の試みが行われてきた。一方、担癌生体側からながめた抗癌剤の効果を増強させる方法として、ひとつには癌細胞自体の被影響性をたかめる方法が考えられ、他の方法としては、担癌体の抗癌剤に対する抵抗性をたかめて、副作用を最少限にとどめるいわゆる host mediated の経路を求めることであろう。一般に抗癌剤は、抗癌効果が強力であればあるほど、正常細胞に対する侵襲も大きく、副作用が生じやすい欠点をもつが、生体が本来もっている抵抗性をたかめ、担癌体がこれらの点に耐え得る条件を作り抗癌剤本来の効果を發揮させることが後者の目的である。このように生体の抗癌剤に対する抵抗性をたかめる目的のために、Reinhold⁹⁾、Brandes¹⁾らによる vitamin A, D と抗癌剤の併用からはじまり、松永²⁾のグリチルリチン、システイン、グリシンなどの併用、近田³⁾らの vitamin B₆、藤田⁴⁾のイノシンとの併用などが提唱されている。一方、抗癌剤の効果を増強させる試みは、

免疫抵抗性、非特異的抵抗性の面からも種々報告⁵⁾⁻⁸⁾されている。さて、前者については Lysozyme Labilizer の応用¹⁰⁾、酸素供給など環境改善法の応用などの報告がある。癌の放射線療法において、酸素が Radiosensitizer として効果を示すことを Gray ら¹¹⁾が報告して以来、高圧酸素環境下で放射線治療を行う方法が種々検討され、よい成績が得られている一方、放射線に類似した作用をもつ抗癌剤と高圧酸素療法とを併用して、その効果をたかめようとする試みも行なわれている¹²⁾⁻¹⁴⁾。しかし、これまでの実験では主に腹水癌、皮膚癌が用いられており、腹部内臓器管などの固形癌に対する検討は行われていない現状であるので、著者は、Brown-Pearce 腫瘍を家兎肝に移植、生着させ、これに対して抗癌剤、高圧酸素療法を併用し、高圧酸素療法による全身的な環境の調整が、いかに抗癌効果を増強させ得るかを実験的に検討した。

II. 実験材料と検討

i) 実験方針

この実験では、家兎肝に移植した Brown-Pearce 腫瘍に対して、抗癌剤治療への高圧酸素療法の併用効果を検討するため、まず、Brown-Pearce 腫瘍に対して感受性がある抗癌剤を選択し、その上で腫瘍移植後

の生存期間、体重、血清各成分の変化、組織の核酸代謝、病理像の変化について検討した。

ii) Brown-Pearce 腫瘍移植法

佐野¹⁵⁾、竹前¹⁶⁾らが記載している手技で Brown-Pearce 腫瘍組織のエムルジョンを作成し（この溶液 1mm³ 中には腫瘍細胞が約 2 万個含まれている）、麻酔した家兎を開腹した上で、その 0.2ml を肝右葉辺縁から注射器を用いて肝実質内に注入した。その際、注入された腫瘍細胞が、注射針の刺入口から腹腔内に漏出、撒布されないように周囲をガーゼで被った上で注入し、注入後数分間刺入口を指先で圧迫した。なお、腹腔内感染防止のため、腹腔内にストレプトマイシンを散布した。

iii) 抗癌剤感受性試験-Succinic dehydrogenase inhibition 法 (S. D. I 法)

近藤¹⁷⁾が考案した S. D. I. 法試験による抗癌剤の感受性試験により Brown-Pearce 腫瘍に対する Mitomycin-C (以下, M. M. C), Cyclophosphamide (以下, Endoxan), Chromomycin (以下, Toyomycin), 5-Fluorouracil (以下, 5-FU), の各抗癌剤のうち、いずれがもっとも高い感受性を示すかをしらべた。まず、近藤らが考案した組織クラッシャーを用いて、新鮮な腫瘍組織を 0.5~3g おしくだき、碎いた組織片を 3ml の無菌 buffered saline 内に受けて、細胞浮遊液をつくり、この浮遊液を細胞数約 600 万個/0.3ml に調整し、その 0.3ml ずつを小試験管内に分注し、これに各抗癌剤を 0.2ml ずつ加えた。この混合液をふ卵器内

で、37°C、1 時間保温し、次いで 0.03% T. T C 液 (1/15 M phosphate buffered saline, PH 7.4, 100ml 中にコハク酸ソーダ 2.7g, 2,3,5-triphenyl tetrazorium chloride 30mg を加えたもの) 0.3ml を加えた後、37°C で 15 時間保温した。次いで 0.5% トリクロル酢酸加酢酸エチル 3ml を加え、振盪した後 2000 r. p. m, 5 分間遠心し、酢酸エチル内に移行した、発色した赤色々素 formazam の発色液を Beckmann Spectrophotometer を使い 480m μ で比色定量し、これによって得た値から Inhibition Index を算定した。なお、この感受性試験を大気圧下で行い、Brown-Pearce 腫瘍に対する抗癌剤の感受性をしらべるとともに、腫瘍細胞浮遊液と抗癌剤との混合液を高圧酸素 2 絶体気圧下に 30 分間さらした後、同様な手技で感受性試験を行ない、高圧酸素処理後の感受性の変化をしらべ、比較した。この結果、本感受性試験によって求めた Inhibition Index が 75 以上を有効、74~50 をやゝ有効、49 以下を無効と判定した。まず、大気圧下で本試験を行った場合、M. M. C の Inhibition Index は 76.3、5-FU の Inhibition Index が 56.4、Endoxan の Inhibition Index が 9.3、Toyomycin のそれは 8.1 であった。一方、OHP 処理後の Inhibition Index は、M. M. C 79.5、5-FU 55.5、Endoxan 9.0、Toyomycin 9.0 であった。以上の結果から Brown-Pearce 腫瘍に対しては M. M. C がもっとも有効であると判定されたので、以下 M. M. C を用いて、一連の実験を行った。(図 1)

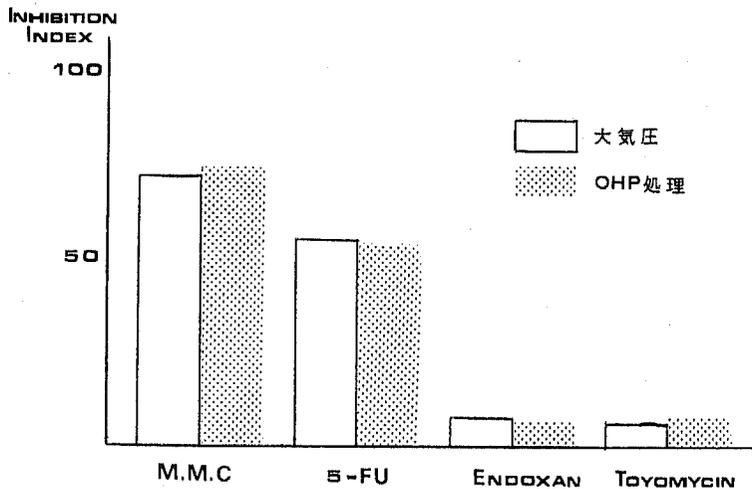


図 1 Brown-Pearce 腫瘍に対する制癌剤の感受性 (S. D. I 法による)

iv) 高圧酸素療法 (以下 OHP と略す)

高圧酸素療法には、五十嵐医科工業株式会社製高圧酸素用チェンバーを使用、Kremenz, 貝原¹⁹⁾-²⁰⁾らの報告を参考にして、毎分 0.3kg の速度で加圧した後、2 絶体気圧30分間おいた上、同じ速度で減圧し、ゲージ圧 0.3kg の状態に 6 分間おいた後、大気圧にもどした。このような高圧酸素療法後、大気圧に復帰させた直後に抗癌剤を静注し、静注終了後、再び前述したのと同じ条件で 2 絶体気圧下に 30分間おき、この一連の操作を一回の処置として、その処置を 1 日 1 回 5 日間つづけた。(表 1)

表 1 M. M. C. OHP 併用療法

Brown-Pearce 腫瘍移植家兎に、
2 ATA OHP 30分間
↓
M. M. C 0.4mg/kg 静注
↓
直後に
2 ATA OHP 30分間
以上の操作を五日間連日施行

III. 実験計画

i) 実験動物

実験動物として、体重 2~3kg, 健康な成熟家兎を、雌雄の区別なく、使用した。

ii) 実験群

Brown-Pearce 腫瘍移植家兎に、抗癌剤、OHP を併用した群のほか、抗癌剤単独投与群、OHP 単独群、無処置群を設け、各群 10羽ずつについて比較検討した。また、正常家兎に対し、抗癌剤単独投与群、OHP 単独群、抗癌剤 OHP 併用群を設けた。

iii) 併用効果の判定手技

- a. 腫瘍移植後の体重変動
- b. 腫瘍移植後の生存日数
- c. 腫瘍移植後の末梢血中の血小板数
- d. 腫瘍移植後の末梢血中の白血球数
- e. 腫瘍移植後の血清アルカリフォスファターゼ値 AL-P (King-King 法²⁴⁾)
- f. 腫瘍移植後の血清 Transaminase 活性 (Reitman-Frankel 法²³⁾)
- g. 組織の核酸代謝の変動——核酸測定法

連続五日間にわたる処置を終了した直後、³²P 正磷酸 30 μ ci/kg を静脈内に注射し、注射後 10時間、なら

びに 24時間目に、家兎を屠殺し、たゞちに、肝腫瘍組織、その周囲の肝組織および小腸粘膜(回腸)を採取し、ドライアイスで凍結した。これらの組織を 1g ずつ、0.05M Tris-Buffer (PH 7.4) の中で、Potter-Elvehjem のガラス製ホモジナイザーを用い、2000 r. p. m. 5 分間でホモジナイズレ、Schmidt-Thanhauser 法により、氷冷したホモジネート 1ml に 10% 過塩素酸 (PCA) 1ml を加え、沈澱させ、1 時間放置した後、2000 r. p. m., 5 分間で遠心し、上清を除き、沈澱を冷 5% PCA 2ml に懸濁して 2000 r. p. m. 5 分間遠心した。この操作を 2 回くりかえして行ない、この操作によって得た沈澱にエタノール 1ml を加え 2000 r. p. m., 5 分間遠心、沈澱にエタノールエーテル (3:1 v/v) 1ml を混じて、さらに 2000 r. p. m. で遠心する操作を 3 回繰り返した。この沈澱に 0.5N KOH 2ml を加え、18時間、ふ卵器中に放置、その後氷室内で、試料を冷却した後、10% PCA 2ml を混じ、30分間放置、2000 r. p. m., 5 分間で遠心し、その沈澱に 5% PCA 1ml を加え、2000 r. p. m. 5 分間遠心する操作を 2 回行った後、室温で次の操作により、その上清 (A) については RNA の抽出を、また沈澱 (A) については DNA の抽出を行った。まず、沈澱 (A) に 5% PCA 2ml を混じ、15分間 70°C で加温した上、冷却、2000 r. p. m. 5 分間遠心を行った後、上清 (B) 1ml を試料皿に入れ、赤外線ランプで乾燥させた後、GM 型低バックグランド放射能計測装置 (日本無線医理科学研究所製) を用い、³²P 放射能活性を測定した。一方、この上清 (B) 1ml を用い、Diphenylamine 反応で DNA の定量を行った。すなわち、上清 (B) 1ml に Diphenylamine 試薬 2ml と 0.07M Acetoaldehyde 0.1ml を加え、24時間室温に放置、紫色に発色したものを Colman 比色計 (610m μ) で比色し、Optical density を求めた。また、RNA の抽出、放射能の定量と測定については、前述した上清 (A) に 10N KOH 0.5ml を加え、中和、2000 r. p. m. 5 分間遠心して得た上清 (C) 1ml を試料皿に入れ、赤外線ランプで乾燥させ、前述の計測装置を用いて ³²P 放射能活性を測定するとともに、上清 (C) 1ml を用い、Orcinol 反応で RNA の定量を行った。すなわち、上清 (C) 1ml に、水 1ml を加え、これに Orcinol 試薬 2ml を加えた後、30分間 100°C で煮沸、冷却、緑色の発色液を Colman 比色計 (675m μ) で比色し、Optical density を求めた。そして、次の式から各々の比放射能を算出した。

$$\text{比放射能} = \frac{{}^{32}\text{P 放射能 (Count 数)}}{\text{核酸の Optical density}}$$

このようにして求めた各群の測定値について、その平均値と標準偏差を算出し、測定値間の差の有無をも検定により求めた。

h. 組織学的検査

各群における肝腫瘍組織、その周辺の肝組織および小腸粘膜を10%ホルマリン液で固定し、パラフィン切片を作成、ヘマトキシリン、エオジン染色を行い、組織学的検査を行った。

IV. 実験結果

a. 腫瘍移植後の体重に対する OHP, M.M.C 単独使用, M.M.C, OHP 併用の影響

各群の間で体重の変化を比較してみると、腫瘍移植後2週間目の体重を基準にして、その後の処置の有無、あるいはその内容の如何にかかわらず、4週間にわたる観察期間の間で、体重の推移には顕著な差が認められなかった。(図2)

b. 腫瘍移植後生存期間に対する OHP

単独, M.M.C 単独, M.M.C, OHP 併用の影響

各群の間で腫瘍移植後生存日数を比較してみると、無処置な対照群と OHP 単独群の間に差がない反面、M.M.C 単独群および M.M.C, OHP 併用群のいずれにおいても、対照群にくらべ、明らかに生存日数の延長が認められた。しかし、M.M.C 単独群と M.M.C, OHP 併用群との間には差が認められなかった。(図3)

c. 血小板数に対する OHP, M.M.C 単独使用, M.M.C, OHP 併用の影響

各群における末梢血の血小板数の変動を1週間毎に追跡比較してみたが、各群の間で明らかな差は認められなかった。(図4)

d. 白血球数に対する OHP, M.M.C 単独使用, M.M.C, OHP 併用の影響

各群における末梢血の白血球数の変動を1週間毎に追跡比較した結果、無処置の対照群をのぞいた他の3群では、治療開始後1週間目で減少が認められ、その後は次第にもとの値にもどる傾向がみられたが、治療法の違いによる差は認められなかった。(図5)

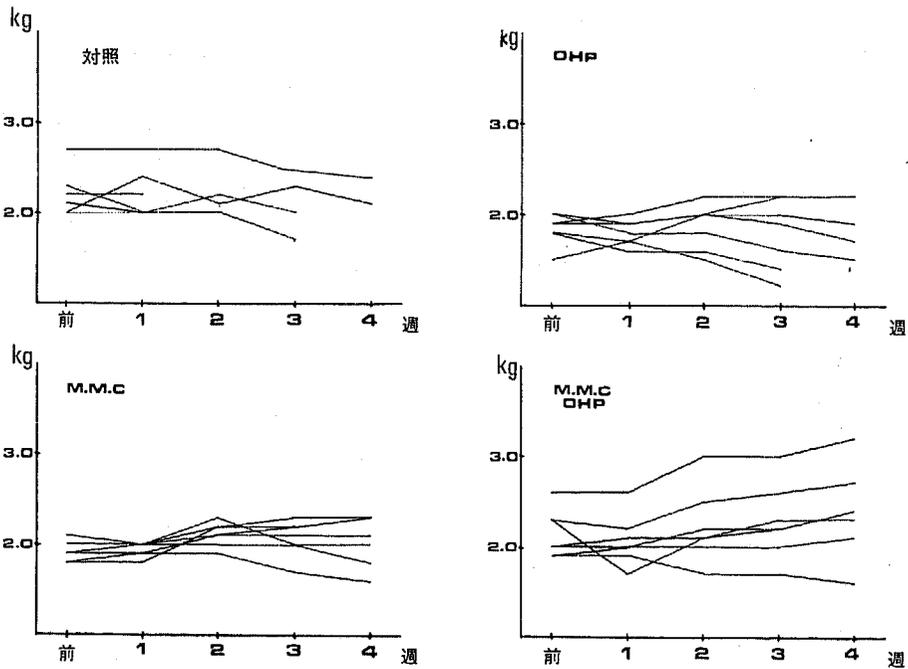


図2 腫瘍移植後の体重に対する OHP, M.M.C 単独使用と OHP, M.M.C 併用の影響

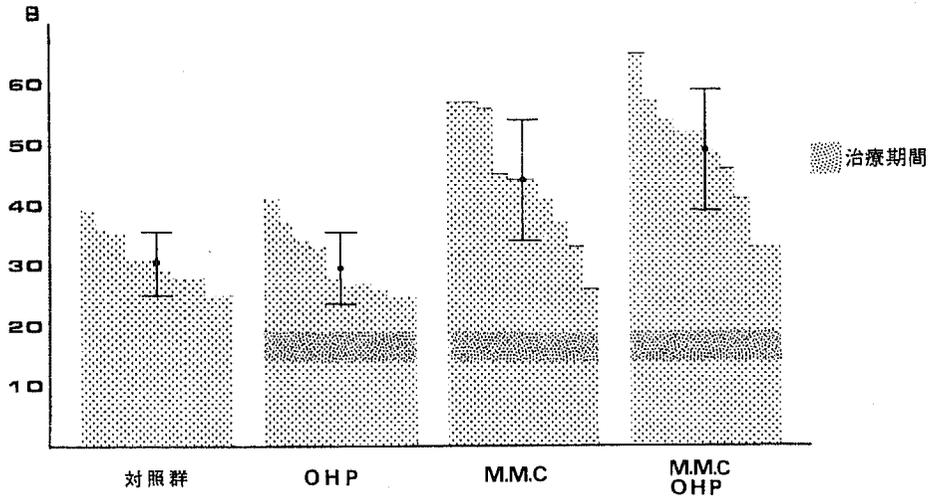


図3 Brown-Pearce 腫瘍移植家兎の M. M. C, OHP 療法と移植後生存日数

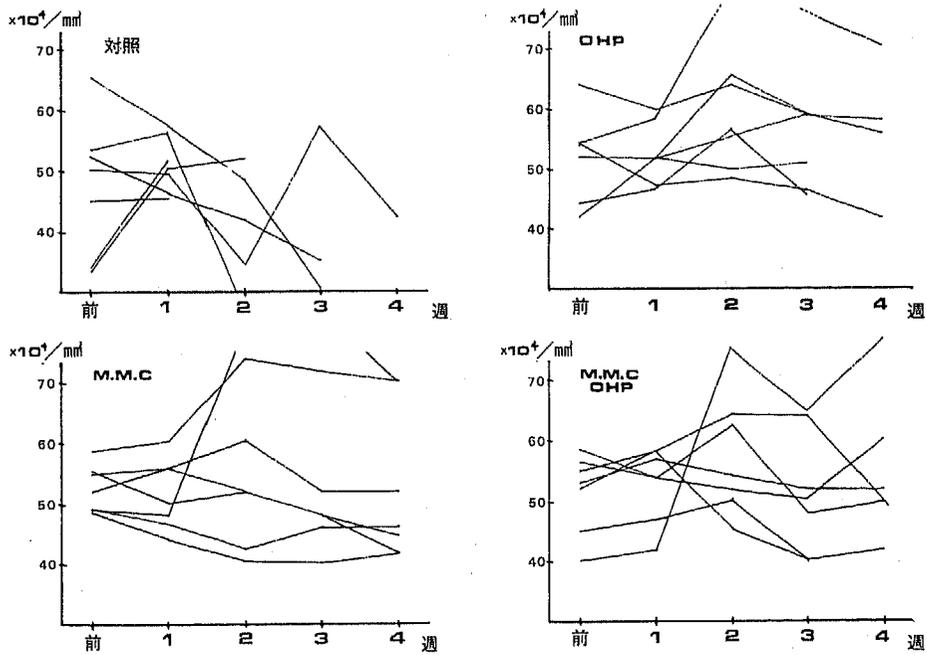


図4 末梢血の血小板数に対する OHP, M. M. C 単独使用, OHP, M. M. C 併用の影響

e. Alkaline-Phosphatase (Alk-Pase) 値に対する OHP, M. M. C 単独使用, OHP, M. M. C 併用の影響
移植後2週間以後の Alk-Pase 値の消長を各群で比

較してみると、いずれの群でも観察期間を通じて正常域内にとどまっていたが、無処置群と OHP 単独群においては増減がないのに対し、M.M.C 単独群, OHP 併用群では、治療開始1週間目に減少を示した。(図6)

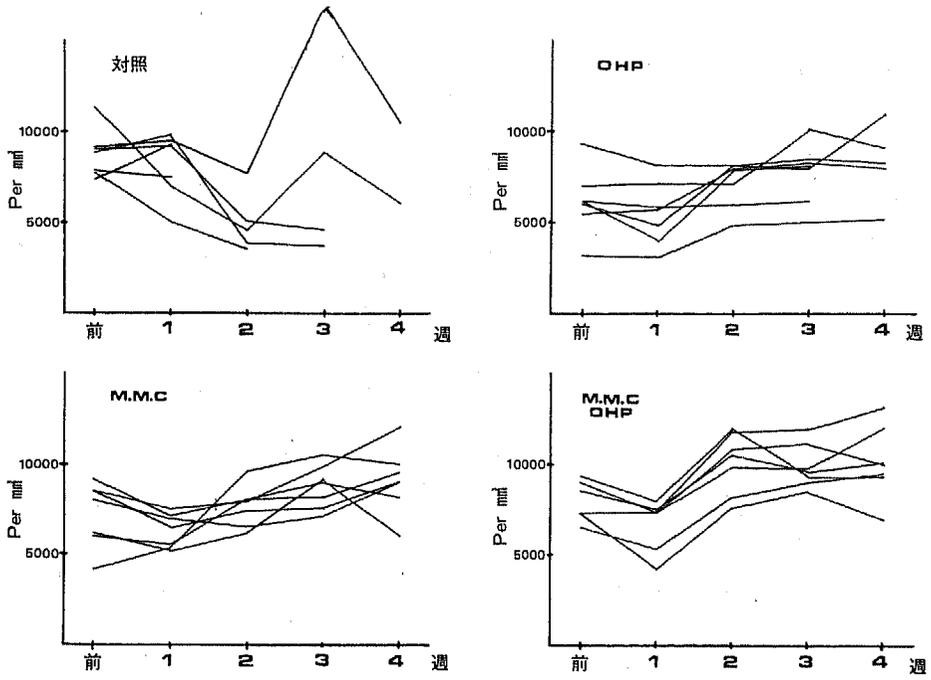


図 5 末梢血の白血球数に対する OHP, M. M. C 単独使用, OHP, M. M. C 併用の影響

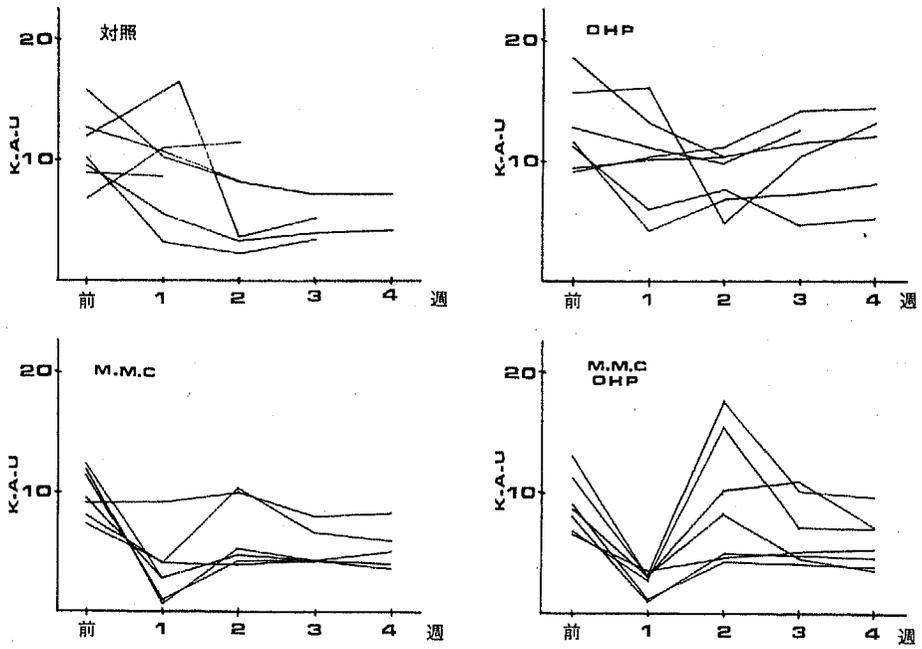


図 6 Alk-Pase 値に対する OHP, M. M. C 単独使用, OHP, M. M. C 併用の影響

抗癌剤と高圧酸素療法との併用に関する実験的研究

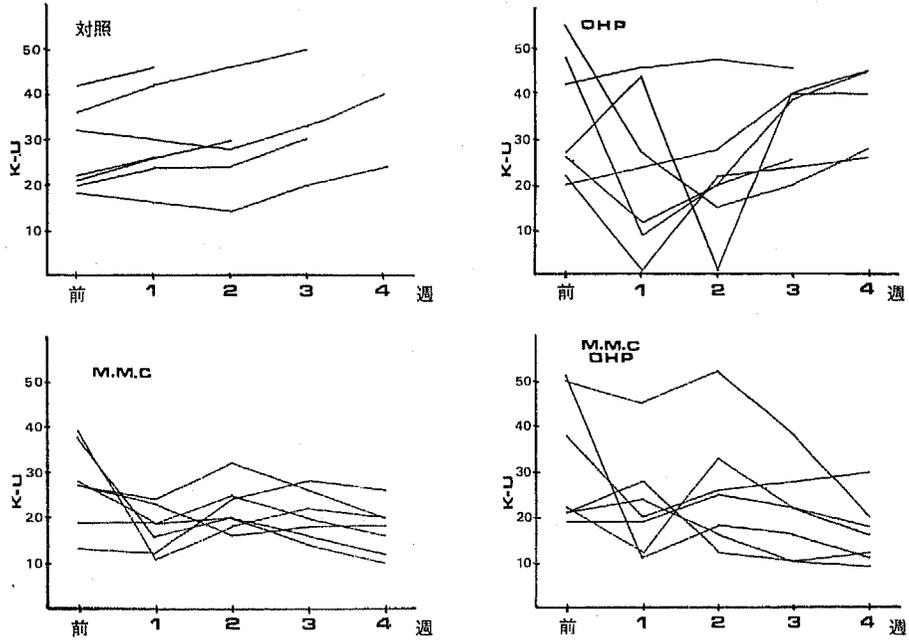


図7 S-GOT 値に対する OHP, M. M. C 単独使用, OHP, M. M. C 併用の影響

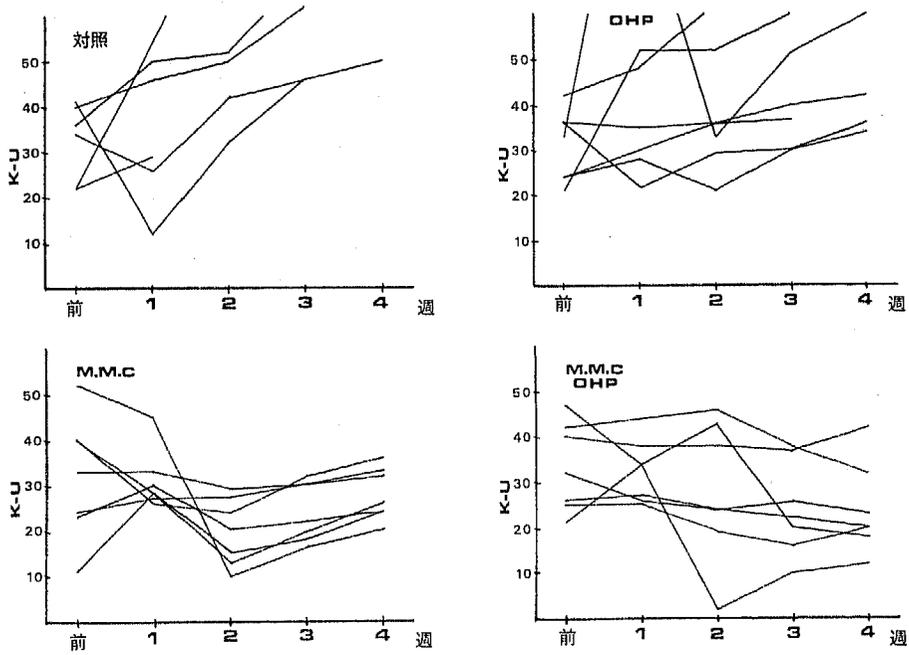


図8 S-GPT値 に対する OHP, M. M. C 単独使用, OHP, M. M. C 併用の影響

f. 血清 transaminase 活性に対する OHP, M. M. C 単独, M. M. C, OHP 併用の影響

血清 GOT (glutamic oxalacetic transaminase), 血清 GPT (glutamic pyruvic transaminase) のいずれについてみても, 無処置群, OHP 単独群においては次第に増加していくのに対して, M. M. C 単独群, M. M. C, OHP 併用群ではほとんど変化せず, 対照群, OHP 単独群と M. M. C 単独群, M. M. C, OHP 併用群との間に差が認められたが, M. M. C 単独か, それに OHP を併用するかによっては差が生じなかった。(図7, 8)

g. M. M. C 単独療法, OHP 単独療法 および M. M. C, OHP 併用療法が Brown-Pearce 腫瘍移植家兎の肝および小腸粘膜の核酸代謝におよぼす影響

i. 肝腫瘍組織の核酸比放射能

肝に移植された Brown-Pearce 腫瘍組織の RNA については, ^{32}P 投与後10時間目では, M. M. C 単独群の比放射能は, 対照とくらべて, まったく差を示さない一方, OHP 単独群 ($P < 0.05$) も, M. M. C, OHP 併用群 ($P < 0.01$) も有意な減少を示した。 ^{32}P 投与後24時間目でも M. M. C 単独群の RNA 比放射能は, 対照群とくらべて差を示さなかった一方, OHP 単

独群では, 対照群とくらべて減少し ($P < 0.05$), M. M. C, OHP 併用群も対照群とくらべて減少を示した ($P < 0.01$)。(図9)

次に, DNA 比放射能については, ^{32}P 投与後10時間目では, M. M. C 単独群では, DNA 比放射能が対照群とくらべて明らかに増加する ($P < 0.01$) 一方, M. M. C, OHP 併用群では, DNA 比放射能は対照群とくらべて減少を示しており ($P < 0.01$), また, OHP 単独群でも対照群とくらべて減少していた ($P < 0.01$)。 ^{32}P 投与後24時間目では, 対照群とくらべて, M. M. C 単独群, M. M. C, OHP 併用群のいずれにおいても, DNA 比放射能は増加を示したが, M. M. C 単独群とくらべて, M. M. C, OHP 併用群における DNA 比放射能は低い値を示した ($P < 0.01$)。(図10)

ii. 腫瘍以外の肝組織における核酸比放射能

腫瘍以外の肝組織における RNA については, ^{32}P 投与後10時間目では, M. M. C 単独群, M. M. C, OHP 併用群の RNA 比放射能は, 対照群とくらべて, いずれも明らかに減少していた ($P < 0.01$)。次に, OHP 単独群では, 対照群, M. M. C 単独群ならびに M. M. C, OHP 併用群のいずれよりも RNA 比放射能は増加を示していた ($P < 0.01$)。また, M. M. C 単独群とくらべて, M. M. C, OHP 併用群では, RNA 比放射能は減少を示していた ($P < 0.01$)。次に ^{32}P 投与後24時間目では, 対照群, M. M. C 単独群, M. M. C, OHP 併用

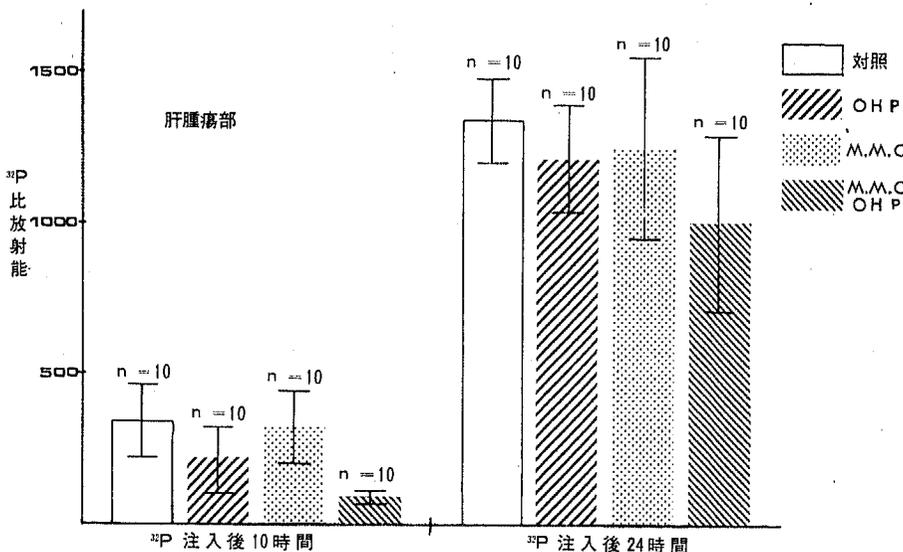


図9 M. M. C, OHP 併用療法の核酸代謝に及ぼす影響 (RNA)

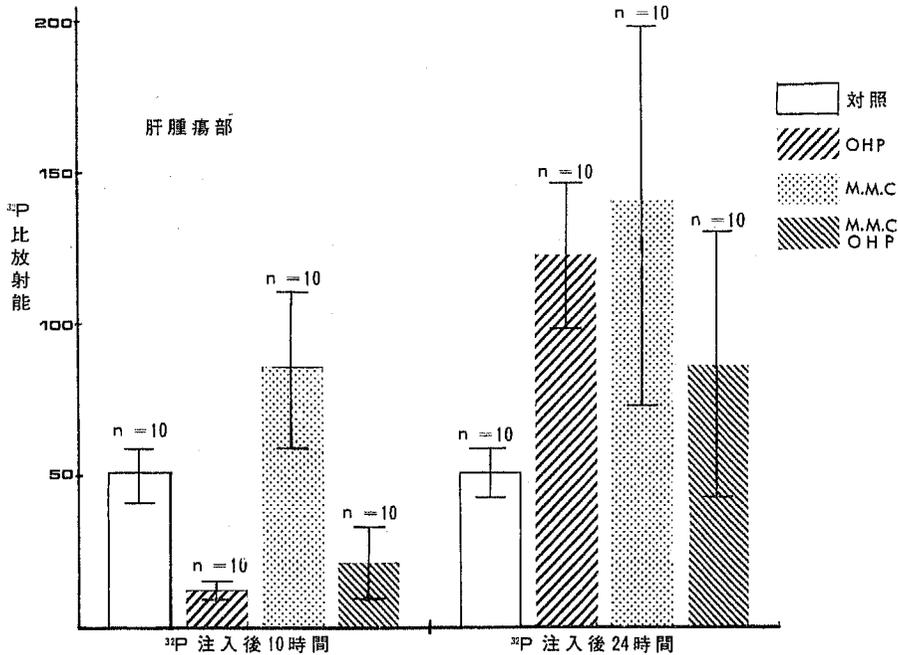


図10 M. M. C, OHP 併用療法の核酸代謝に及ぼす影響 (DNA)

群の間では、RNA 比放射能にまったく差がみられない反面、OHP 群では、他の3群にくらべて、RNA 比放射能は明らかに減少していた ($P < 0.01$)。(図11)

DNA については、 ^{32}P 投与後10時間目では、OHP 単独群が対照と全く差を示さない一方、M. M. C 単独群、M. M. C, OHP 併用群では、いずれも DNA 比放射能が、対照群、OHP 単独群にくらべて増加しており ($P < 0.01$)、また、M. M. C 単独群にくらべ M. M. C, OHP 併用群では DNA 比放射能が増加していた。次に、 ^{32}P 投与後24時間目では、対照群にくらべ、OHP 単独群、M. M. C 単独群、M. M. C, OHP 併用群いずれにおいても DNA 比放射能は差を示さなかった。(図12)

iii. 腫瘍移植家兔の小腸粘膜の核酸比放射能

RNA については、 ^{32}P 投与後10時間目で、M. M. C 単独群、M. M. C, OHP 併用群では、対照群にくらべて、RNA 比放射能が明らかに減少していた ($P < 0.01$) が、M. M. C 単独群と、M. M. C, OHP 併用群との間では差が認められなかった ($P < 0.1$)。また、OHP 単独群では、対照群にくらべて、まったく RNA 比放射能は差を示さなかった。 ^{32}P 投与後24時間目では、対照にくらべ、他の3群ともに、RNA 比放射能に有意な差を示さなかった ($P < 0.7$)。(図13)

は、対照にくらべ、他の3群ともに、RNA 比放射能に有意な差を示さなかった ($P < 0.7$)。(図13)

DNA については、 ^{32}P 投与後10時間目では、OHP 単独群が対照とくらべて、差を示さなかったが、M. M. C 単独群、M. M. C, OHP 併用群のいずれにおいても、対照より DNA 比放射能が増加していた ($P < 0.01$)。しかし、M. M. C 単独群と M. M. C, OHP 併用群との間には、差が認められなかった。 ^{32}P 投与後24時間目では、対照にくらべて OHP 単独群、M. M. C, OHP 併用群では DNA 比放射能が増加を示し ($P < 0.01$)、M. M. C 単独群では対照にくらべて、DNA 比放射能は増減を示さなかった。(図14)

h. 組織学的所見

i. 肝に移植した Brown-Pearce 腫瘍に対する M. M. C の影響

無処置の腫瘍組織と比較して核の変性が軽度認められた。しかし、その変性は、正常肝細胞のそれにくらべると軽度であった。(写真1)

ii. 肝に移植した Brown-Pearce 腫瘍に対する M. M. C, OHP 併用療法の影響

M. M. C 単独使用の組織変化と比較して、あきらか

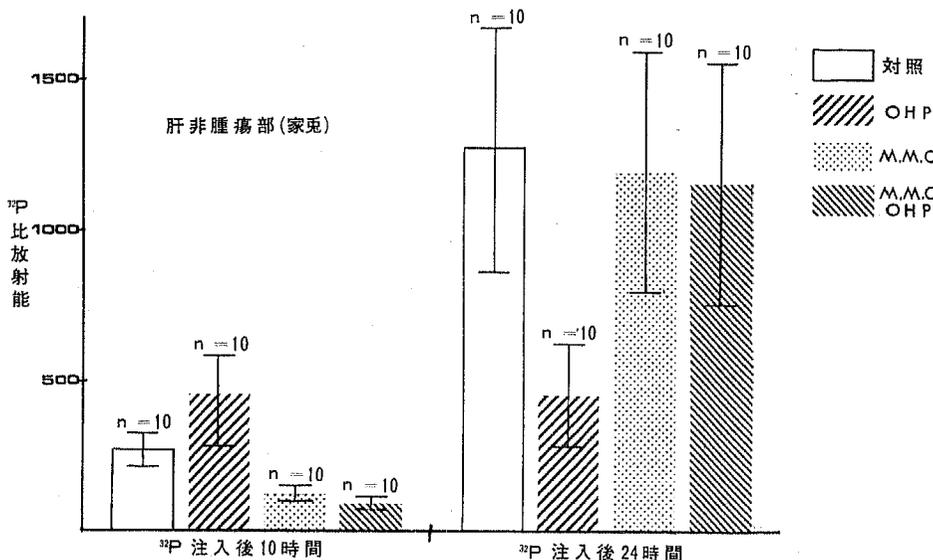


図11 M. M. C, OHP 併用療法の核酸代謝に及ぼす影響 (RNA)

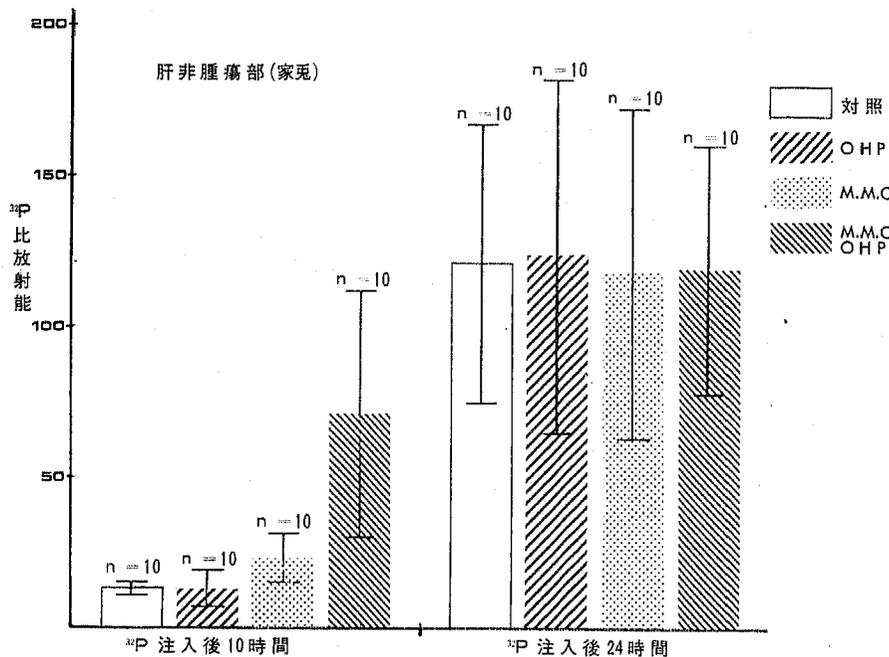


図12 M. M. C, OHP 併用療法の核酸代謝に及ぼす影響 (DNA)

な違いは認められなかった。腫瘍細胞の細胞質の変化にも差違が認められなかった。(写真2)

iii. 正常肝に対する OHP の影響
前述した実験群と同様な条件で OHP 療法を行なっ

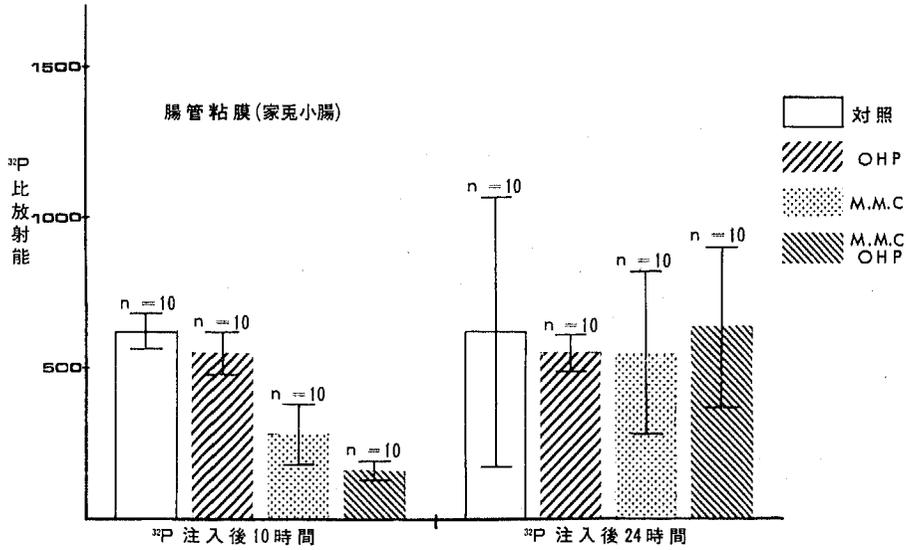


図13 M. M. C, OHP 併用療法の核酸代謝に及ぼす影響 (RNA)

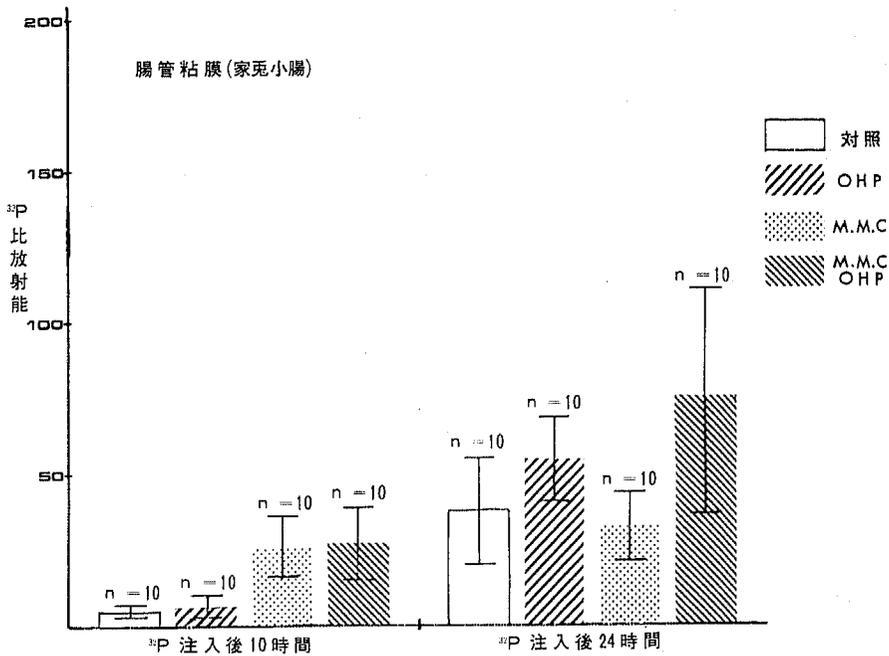


図14 M. M. C, OHP 併用療法の核酸代謝に及ぼす影響 (DNA)

た正常肝の小葉構造は正常であり、Glison 鞘にも著変を示さなかった。しかし肝細胞は腫大し、細胞質は

高度な変性、融解、消失を示した。核の変化はあまり強くなく、軽度のクロマチン濃縮がみとめられた。ま

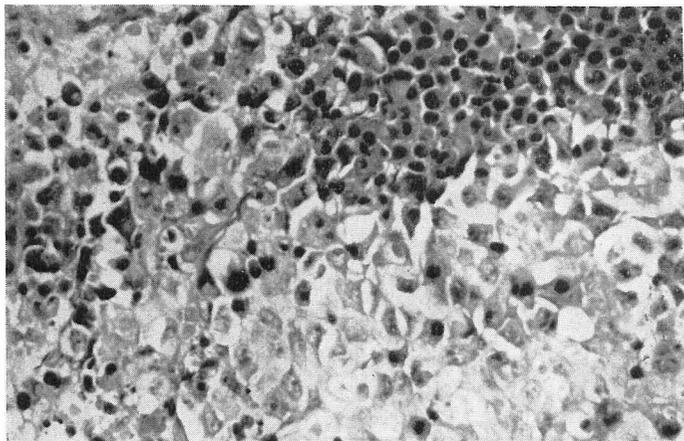


写真 1 肝に移植した Brown-Pearce 腫瘍に対する M. M. C. の影響—核の軽度な変性。

H. E. × 750

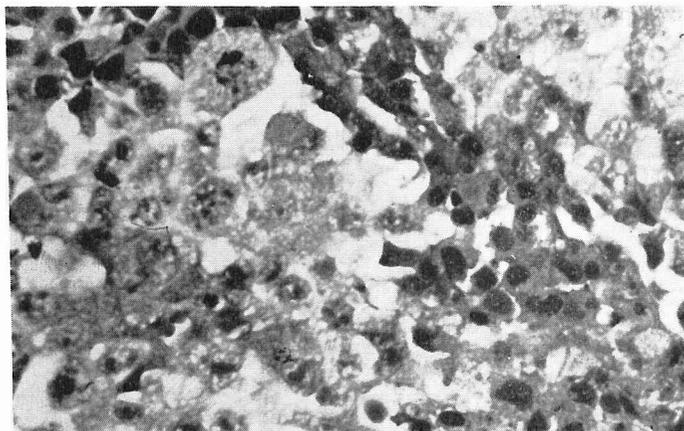


写真 2 肝に移植した Brown-Pearce 腫瘍に対する OHP, M. M. C. 併用の影響—M. M. C. 単独使用群と差がない。

H. E. × 1200

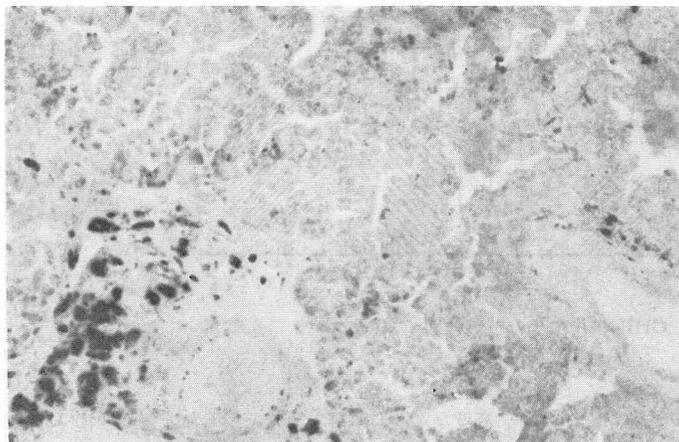


写真 3 正常肝に対する OHP の影響—類洞の変形。

H. E. × 300

小林論文附図(2)

写真4 正常肝に対するOHPの影響
—肝細胞の腫大, 細胞質の変性。

H. E. ×750

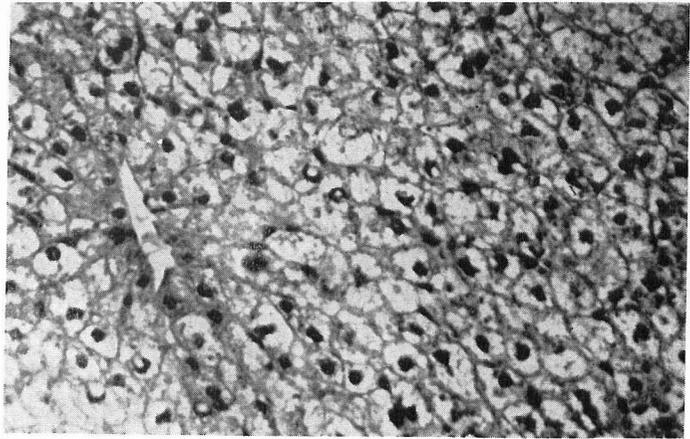


写真5 正常肝に対するM. M. Cの影響
—肝細胞索の軽度な乱れ, 類洞の拡張。

H. E. ×300

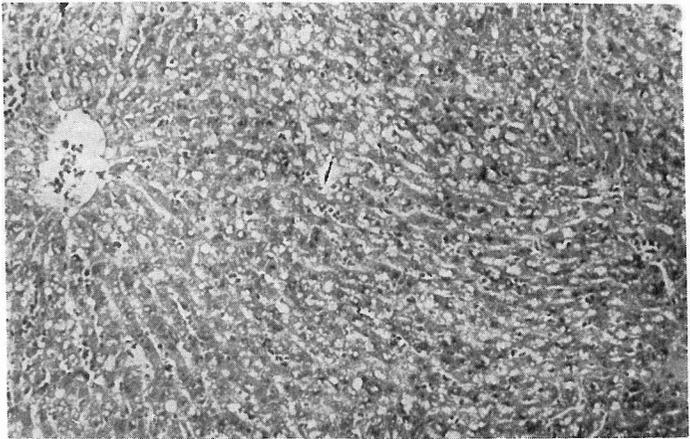
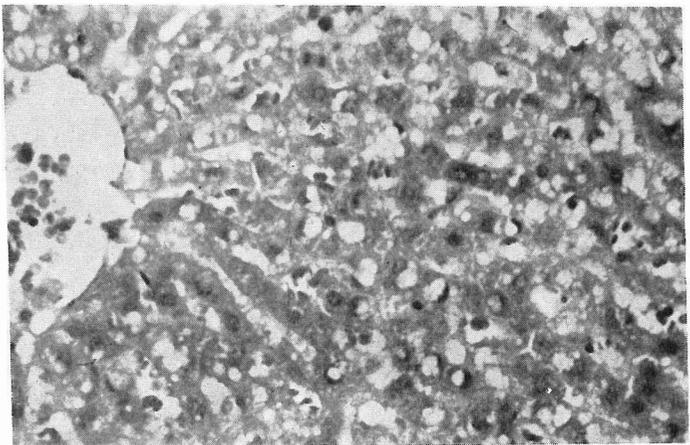


写真6 正常肝に対するM. M. Cの影響
—クロマチンの濃縮, 脱落。

H. E. ×750



小林論文附図(3)

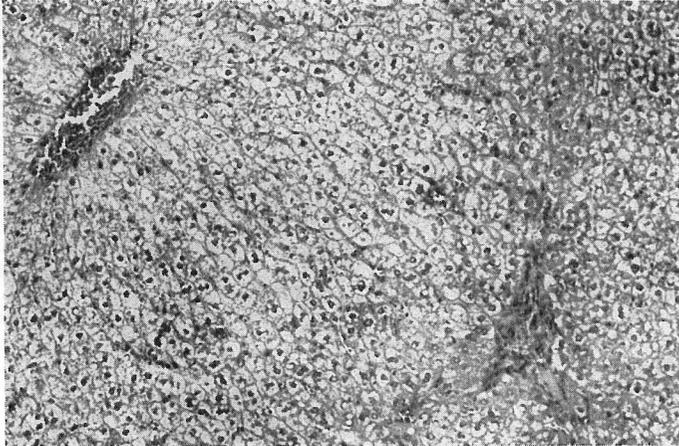


写真7 正常肝に対するOHP, M. C.併用の影響—類洞の変形, Glisson鞘の線維化。

H. E. × 300

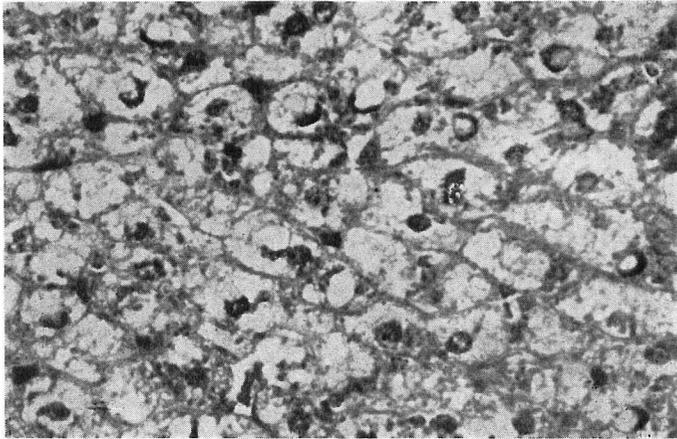


写真8 正常肝に対するOHP, M. C.併用の影響—肝細胞の腫大, 細胞質の変性。

H. E. × 1200

た、類洞は圧迫変形していた。(写真3, 4)

iv. 正常肝に対する M. M. C の影響

前述した実験群と同様な条件で M. M. C を投与した場合の正常肝の小葉構造は正常であり、Glison 鞘にも著変はみとめられなかった。一部の肝細胞索には、軽度な乱れが認められ、類洞は一般に拡張していた。肝細胞では、細胞値の変化は一般に軽度ではあったが、混濁、腫脹が認められた。一方、核の変化は強く、クロマチンの濃縮および脱落が著しかった。核小体には変化が認められなかった。これらの細胞の変化は小葉の中間帯で強く、星細胞の変性も顕著であった。(写真5, 6)

v. 正常肝に対する M. M. C, OHP 併用療法の影響

この群では、前にのべた OHP と M. M. C による影響が同時に認められ、肝細胞は小範囲の変性を示し、類洞は強く圧迫され、細胞質の変性、消失も著明で、核の変性やクロマチンの脱落、Glison 鞘の軽い線維化が認められたが、M. M. C を単独に使用した場合よりその変化は軽度であった。(写真7, 8)

V. 考 案

抗癌剤と高圧酸素療法との併用による抗癌効果増強に関する研究については、これまでのところ、主として実験的な面から検討されてきている。Nitrogen-mustard と OHP との併用に関して Kremetz¹²⁾, Cohen¹³⁾, De-Cosse¹⁴⁾ らがその有効性を報告しているが、一方 Marshall¹⁵⁾ らは、その増強効果をまったく否定している。他の抗癌剤、たとえば、6MP, 5-FU, Methotrexate, Amethopterin, Cyclophosphamide などについても報告されているが、いずれも断定的な結論が得られていない。また、M. M. C と OHP の併用についてもいくつかの報告があり、M. M. C 投与後に OHP を併用すると抗癌剤の抗癌効果の増強がみられるという報告や、逆に OHP の後で M. M. C 投与を行い、その効果がみられたという報告¹⁶⁾もある。また Kremetz¹²⁾ の報告では、Nitrogen-mustard を用い、まず担癌動物を絶体気圧3気圧、15分間高圧酸素環境下におき、次いで平圧下で抗癌剤を投与し、さらに30分間 OHP を追加することにより抗癌効果の増強を認めたと報告している。これらの報告は主として腹水癌、皮膚癌を用いたものであり、これらの実験例に関する限り、その有用性が報告されているが、著者の実験では、臓器に移植した固型癌を用いたので、前

述した報告者達の成績とはその実験条件の設定の上で多少趣きを異にしており、同じ基盤で対比させることには慎重でありたいが、抗癌剤と OHP 併用の試みは、次のようなことから理解できると考える。すなわち、OHP と抗癌剤の併用療法は、OHP と放射線療法との併用療法から発展したものであるが、OHP と放射線療法を併用する試みは、1) 腫瘍組織には anoxic tumor cell が存在し、2) 高圧酸素環境下では、腫瘍細胞、とくに anoxic tumor cell の放射線感受性が高まるが、比較的良好な酸素濃度が保たれている正常組織では放射線感受性の上昇が少ないという前提の上にならているのである。著者が実験で用いた抗癌剤 M. M. C は、alkylating agent であり、放射線類似作用を有するとされているので、OHP との併用により、その効果増強を充分期待し得ると思われる。OHP と M. M. C との併用についても、これまでに種々の方法が報告されており、まだ一致した結論はないが、著者が採用した、抗癌剤投与前後に高圧酸素療法を実施する、いわゆるサンドイッチ方式では、1) 貝原¹⁸⁾ の報告にあるような OHP により細胞膜の透過性が高まるという見解、2) Rueckert²¹⁾ の高濃度の酸素が Hela 細胞に対して、強力な growth inhibitory effect があるという報告、また、3) M. M. C に対する細胞の感受性が G₁ 期および S 期の前半にもっとも高いという土井²²⁾ の報告など、M. M. C, OHP 併用がより効果的であるとすると有効な根拠となる知見がある。しかし、著者の実験成績では、M. M. C 単独投与と、OHP, M. M. C 併用との間では、延命効果の面で差が認められず、白血球、血小板および肝機能の測定結果でも差を示さず、森らの報告²³⁾ にあるように OHP 併用により M. M. C の担癌体に対する副作用を軽減するという結果は得られなかった。

さて、M. M. C は癌細胞の DNA 合成を阻害するといわれ、芝^{27, 28)} は、RNA や蛋白合成に影響を与えない濃度でも DNA の合成は阻害されると報告している。著者は、M. M. C の DNA 合成阻害力を、これに OHP を併用することによりたかめ得ることを期待したが、OHP と M. M. C を併用した場合肝腫瘍部では、明らかに RNA と DNA の代謝活性の低下がみとめられた。しかし延命効果などとの間には、これらの核酸代謝との関連性を得ることができず、単開腹術など手術侵襲が肝核酸代謝へ影響を与えること³⁰⁾ など、実験条件の設定の問題など更に検討の余地があると考えられる。

また組織像の上でも、OHPは正常肝細胞の胞体に変性、融解、消失など強い変化を示すが、核に与える変化が少く、一方M.M.Cは肝細胞の核に変性、消失、クロマチンの減少などをひきおこすが、胞体に対する影響が少く、OHPとM.M.Cとは影響する場が異っているようであり、両者を併用した場合には、その影響が相加的に出現している。しかし、組織像の上では、腫瘍組織に対しては、両者の差がまったく認められなかった。このことから、少くとも、著者が設定した実験条件では、anoxic tumor cellが存在すると考えられる腫瘍部において、OHPは、M.M.Cの細胞内とりこみについてなんら増強効果を示す事実を得ることができなかった。

VI. 結 語

抗癌剤効果を増強させる方法として検討されてきた抗癌剤と高圧酸素併用療法について、Brown-Pearce腫瘍を肝に移植した家兎を用い併用療法を行い、延命効果、組織の核酸代謝、組織像などから検討を行い、次の成績を得た。

- (1) OHP, M.M.C併用によりM.M.C単独使用による効果を増強せしめるという可能性については延命効果の点では認められなかった。
- (2) OHP, M.M.C併用は、核酸への³²Pとりこみに関するかぎり、M.M.CのRNA, DNA合成阻害を増強していると考えられる成績を得た。
- (3) 正常肝組織像では、OHP, M.M.Cのそれぞれにより異った影響をうけていることを示し、両者の併用により、それぞれの影響が相加して現われている。しかし、肝に移植された腫瘍組織では、両者を併用した場合と単独の場合とはなんら変化を示さなかった。
- (3) 以上の点を総合すると、家兎肝に移植したBrown-Pearce腫瘍に関するかぎり、OHP, M.M.C併用によりM.M.Cによる腫瘍生育抑制効果を増強するという明白な結果を得ることができなかった。

本論文の要旨は、第6回日本高気圧環境医学会、および第9回術後代謝研究会において発表した。

稿を終るにあたり、実験について御助言、御協力をいただいた秋田和己、竹前徹也両博士、ならびに病理組織像の検討に際し御指導いただいた山

田和彦博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Brandes, D. & Anton, E.: The role of lysosomes in cellularlytic processes. 3. Electron histochemical changes in mammary tumors after treatment with cytoxan and vitamin A. Lab. Invest., 15: 987-1006, 1966.
- 2) 松永藤雄, 下山 孝, 三川 清, 石渡淳一, 菊池弘明, 仲屋佐太男, 奈良秀八州, 渋谷昭民, 梅原正, 阿保博己, 伊藤 隆, 山口 保: 胃癌の化学療法, 特に Mitomycin C 大量間歇療法を中心に、内科, 17: 1101-1115, 1966.
- 3) 近田千尋: 癌の化学療法に関する臨床的並に実験的研究, Mitomycin C 並にその併用療法を繞って, 日本癌治療学会誌, 3: 259-288, 1968.
- 4) 藤田 浩, 中山 昇, 沢部孝昭, 藤野冷子, 木村禎代二: Inosin の制癌剤副作用防止に関する実験的研究, The Clinical Reort. 4 (3): 590-595, 1970.
- 5) 小林 博, 細川真澄男, 仙道富士郎, 小玉孝郎, 白井俊一: 実験癌の免疫, 化学療法の試み, 第28回日本癌学会総会記事, 244, 1969.
- 6) Nieper, HA: Experimental principles and clinical use of electrolyte carrier compounds. 4. The normalizing effect of potassium and magnesium asparaginate on an atypical substrate balance appearing in cancer patients. The importance of problem for the host organism. Aertzl Forsch., 15: 510-518, 1961.
- 7) 大原弘通, 田中順三郎, 石井禎郎, 鬼原 彰, 野口英機, 和田武雄: 代謝性因子の変動よりみた癌化学療法の検討, 癌の臨床, 14: 486-493, 1968.
- 8) 加藤篤二, 高橋陽一: 治療医学-1970, 悪性腫瘍-前立腺癌-治療最近の動向, 日本臨床, 春季増刊, 116-1167, 1970.
- 9) Reinhold, H.: Vitamin A and C in cancer therapy. Zcschr. Inn. Med., 15: 651-658, 1960.
- 10) 仁井谷久暢, 谷口 猛, 稲垣治郎, 滝口正子, 鈴木和子, 木村禎代二: Lysosome と癌化学療法 (5) 報 Lysosome Labilizer による Mitomycin C の効果増強, 第28回日本癌学会総会記事, 235-236, 1969.
- 11) Gray, L. H., Conger, A. D., Ebert, M., Horn-

- sey, S. and Scott, O. C. A. : The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Brit. J. Radiol.*, 26 : 638-648, 1953.
- 12) Kremenz, E. T. and Knudson, L. : The effect of increased oxygen tension on the tumoricidal effect of Nitrogen-mustard. *Surg.*, 50 : 226-273, 1961.
- 13) Cohen, A., Weg, N., Fanning, G. L., Collea, J. V., Russo, M. A., Rogers, L. S. and De-Cosse, J. J. : The effect of high pressure oxygen and Nitrogen-mustard on the Ehrlich ascites tumor. *Arch. Surg.*, 93 : 638-642, 1966.
- 14) De-Cosse, J. J. and Rogers L. S. : Influence of high pressure oxygen and chemotherapy of the Amel 4 hamster melanoma, *Can. Res.*, 26 : 287-292, 1966.
- 15) 佐野 博 : 肝癌の治療に関する提案, 信州医誌, 18 : 502-538, 1969.
- 16) 竹前徹也 : 門脈血流区域遮断と肝の核酸代謝, 信州医誌, 18 : 1065-1087, 1970.
- 17) 近藤達平 : 制癌剤の適応-感受性試験, 最新医学, 2304-2311, 1964.
- 18) 具原信明, 池田俊彦, 服部孝雄, 八木博司 : 高圧酸素と制癌剤の併用効果について, 癌の臨床, 15 : 665-698, 1969.
- 19) 漆崎一朗, 井林 淳, 池田成之, 小山隆三, 高沢敏浩 : 高圧酸素環境下のがん化学療法, 日本癌治療学会誌, 4 : 186-191, 1969.
- 20) 秋田和己 : 急性上腸間膜動脈閉塞症に対する高圧酸素療法の効果 (実験的研究), 信州医誌, 18 : 1088-1118, 1970.
- 21) Fleck, A. and Munro, H. N. : The precision of ultraviolet absorption measurement in the Schmidt-Thanhauser procedure for nucleic acid estimation. *Biochem. Biophys. Acta*, 55 : 571-583, 1962.
- 22) Schmidt, G. and Thanhauser, S. J. : Method for determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 161:83-89, 1955.
- 23) Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Path.*, 28 : 56-63, 1957.
- 24) Bessey, O. A., Lowry, O. H., and Brock, M. J. : Method for rapid determination of alkaline phosphatase with 5 cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.*, 164 : 321-329, 1946.
- 25) Marshall, W. H., Hoppe, E. T. and Stark, F. : The effect of ambient oxygen tension on the toxicity and therapeutic effect of Mechlorethamine (Nitrogen-mustard). *Arch. Surg.*, 86 : 932-939, 1963.
- 26) Nathanson, L., Brown, B., Maddock, C. and Hall, T. C. : Effect of antitumor agents and hyperbaric oxygen in normal and tumor-bearing rodents. *Cancer*, 19 : 1019-1025, 1966.
- 27) Kinsey, D. L. : Hyperbaric oxygen and 5FU in the treatment of experimental melanoma. *Surg. Forum.*, 15 : 205-206, 1964.
- 28) Lottsfeldt, F. I., Schwartz, S. and Krivit, W. : Hyperbaric oxygen, whole body X-irradiation, and cyclophosphamide combination therapy in mouse leukemia L1210. *J. Nat. Can. Inst.*, 36 : 37-43, 1966.
- 29) Frimmer, M. : The hydration 2,5-bis-n-propoxy-3,6-bisethylamino-benzoquinone (1,4) (Bayer E 39) in Ehrlich ascites tumor cells. *Med. Exp.*, 3 : 135-9, 1960.
- 30) 森 澄, 服部龍夫, 早瀬友博, 小松克己, 川村陽一, 岡田 進, 榊原欣作, 橋本義雄 : 高気圧酸素環境の制癌剤の効果に及ぼす影響, 第24回日本癌学会総会記事, 285-286, 1965.
- 31) Rueckert, R. R., and Muller, G. C. : Effect of oxygen tension on Hela cell growth. *Can. Res.*, 20 : 944-949, 1960.
- 32) 土井 修 : マイトマイシンCの Hela 細胞増殖抑制機序の解析, 阪大医誌, 16 : 221-232, 1964.
- 33) 森 澄, 服部龍夫, 早瀬友博, 小松克己, 川村陽一, 岡田 進, 榊原欣作, 橋本義雄 : 高気圧酸素環境の組織培養による細胞増殖におよぼす影響, 第25回日本癌学会総会記事, 81-82, 1966.
- 34) 林 四郎 : 外科侵襲と代謝, 代謝-基礎と臨床, p. 676-690, 朝倉書店, 東京, 1970.

- 35) 池田成之) 高圧酸素環境下の癌化学療法に関する実験的研究, 第2報, M. M. Cとの併用, 第6回日本癌治療学会講演, 1968.
- 36) 服部龍夫: 高気圧酸素環境下における癌化学療法の臨床, 第3回日本高気圧環境医学会総会講演, 1969.
- 37) 芝 茂, 伊藤一二, 田口鉄男, 赤木朝治: Mitomycin X に関する実験的研究, 日本化学療法学会雑誌, 6: 212, 1958.
- 38) 寺脇朝治: マイトマイシンCの作用機序に関する研究, 阪大医誌, 12: 905-909, 1960.

(1973. 5. 21 受稿)