

アルキル化剤に対する Sodium thiosulfate の 中和作用に就いて

京都大学医学部外科学教室第1講座（指導：荒木千里教授）

植 木 稠 雄

〔原稿受付 昭和39年9月15日〕

Experimental Studies on Neutralization of systemic toxicity of Alkylating agents by Sodium Thiosulfate

by

SHIGEO UEKI

From the 1st Surgical Division, Kyoto University Medical School

(Director : Prof. Dr. CHISATO ARAKI)

Since RHOADS, GILMAN and PHILIPS found a tumor-inhibiting action of nitrogen mustard in 1946, a great number of anti-cancer drugs has been developed. However, their toxic effects on normal hematopoietic tissue, due to the lack of their selective action to neoplastic tissue, limit the amounts of the drugs which can be used clinically.

Many attempts have been made to increase the cancericidal effects of the anti-cancer agents and to reduce their toxic side-effects. Administration of an anti-cancer agent in combination with its antidote has been studied for the similar purpose in the field of chemotherapy. Sodium thio-sulfate (Hypo) has been reported to provide effective protection against the toxicity of nitrogen mustard and nitrogen mustard N-oxide both experimentally and clinically. Up to this time, however, protective action of Hypo against systemic toxicity of thio-TEPA or Endoxan has remained obscure.

This study was initiated to investigate the possibility that Hypo might neutralize the toxicity of thio-TEPA and Endoxan.

I Studies on neutralization of toxicity of thio-TEPA by Hypo

The studies on neutralization of toxicity of thio-TEPA by Hypo was divided into three experiments.

In the first experiment, the lethal dose of thio-TEPA, combined with changing doses of Hypo, was administered to experimental groups of rats intraperitoneally. In some groups, Hypo was injected simultaneously with, 30 min. before or after the injection of thio-TEPA. In other groups, the aged mixed solution of Hypo and thio-TEPA, incubated for 30 min. at 37°C, was injected. The effects of the combined use of thio-TEPA and Hypo on the toxicity of thio-TEPA were evaluated on the basis of the mortality rate, the weight loss, and hemorrhagic manifestations of the animals.

In the second experiment, the smaller amount of thio-TEPA than that in the first experiment, that is, an effective dose of thio-TEPA against experimental tumors together

with changing doses of Hypo was administered intraperitoneally to rats, in order to study the effects of Hypo to prevent leukopenia which not infrequently develops during thio-TEPA treatment.

In the third experiment, neutralization of thio-TEPA by Hypo was investigated in vitro in mice. The aged mixed solutions of the lethal dose of thio-TEPA for mice and the dose of Hypo 80 times that of thio-TEPA, after the incubation for 1, 2, 4, 6 and 12 hours at 37°C, were administered respectively to the mice intraperitoneally. The mortality rate of the mice injected with the aged mixed solution was compared with that of control mice injected with an aged solution of thio-TEPA alone:

The results were as follows:

1) Hypo did not protect against the toxicity of thio-TEPA in vivo, even when the administration of thio-TEPA was combined with doses of Hypo 50 to 1000 times that of thio-TEPA.

2) When thio-TEPA was mixed with Hypo in an amount of 80 times that of thio-TEPA in vitro, it took more than one hour at 37°C to reduce the toxicity of thio-TEPA.

To summarize, no evidence was found to indicate that Hypo-thio-TEPA combination cancer chemotherapy might offer any practical benefit.

II Studies on neutralization of toxicity of Endoxan by Hypo.

The Studies on the protection against the toxicity of Endoxan by Hypo was divided into two experiments.

In the first experiment, Endoxan in the lethal dose or effective dose against experimental tumors, was administered intraperitoneally to rats, simultaneously with changing doses of Hypo. Their general conditions, survival days, mortality rate, leukocyte count, blood pictures both in the peripheral blood and the bone marrow and histological changes in the various organs were investigated.

In the second experiment, influence of Hypo on the anti-tumor effect of Endoxan was investigated. Hypo was injected in combination with Endoxan in mice bearing sarcoma 180. Growth of the tumors and survival days of the animals in the Hypo-Endoxan injected group were compared with those in the control group injected with Endoxan alone.

The results were as follows:

1) In the group injected with Hypo in an amount of 2.0 gm/kg/d daily for 6 days, in combination with Endoxan in an amount of 50 mg/kg/d every other day for 6 days, the systemic toxicity produced by Endoxan was remarkably reduced. Hypo could protect the animals almost completely from death due to toxicity of Endoxan which killed 75% of the animals, and keep their bone marrow free from panmyelophthisis produced by Endoxan.

2) Hypo in an amount of 0.5 gm/kg/d respectably protected the animals from leukopenia induced by administration of Endoxan in an amount of 10 mg/kg/d. The protective effect lasted for about 5 days. When Endoxan was administered in combination with Hypo in the dose schedule described above, the total amount of Endoxan, which could be administered before the leukocyte count fell to almost 50% of the initial count, was 2.5 times more than that in the group injected with Endoxan alone. However, pro-

tective effect of Hypo on the leukopenia induced by Endoxan became less effective, with increasing the total amount of Endoxan administered.

3) The combined use of Hypo in an amount of 2.0 gm/kg/d and Endoxan in an amount of 10 mg/kg/d did prevent the development of the leukopenia almost completely.

After the combined administration of Hypo and Endoxan daily for 7 days, the mean leukocyte count of the animals did not fall below 73% of the initial count, while in the group injected with the same amount of Endoxan alone, it fell down to 34% of the initial count.

4) Hypo which was used in combination with Endoxan did not cancel the anti-tumor effect of Endoxan when examined against Sarcoma 180 (solid form).

5) Administration of Hypo in an amount of 2.0 gm/kg/d daily for 7 days did not induce any toxic side-effect to rats.

This study has shown that the combined use of Hypo and Endoxan permits the administration of larger doses of Endoxan without inducing any greater side-effect or cancelling the anti-tumor effect of the agent.

Hypo-Endoxan combination cancer chemotherapy might offer some practical benefit in the clinical treatment of cancer.

結 言

1946年Rhoads⁴¹⁾, Gilman, Philips⁴⁶⁾により Nitrogen mustard (以下NM)の抗腫瘍性が認められて以来、癌の化学療法の研究は長足の進歩を遂げ、アルキル化剤を始めとし、各種制癌剤が相次で発見或は合成され、実用化されているが、化学療法の臨床的効果は未だ充分とは云い難い。

制癌化学療法の効果をあげるためには、薬剤を高濃度に腫瘍組織へ投与する事が必要であると考えられているが¹¹⁾33), 制癌剤の宿命的作用²⁴⁾60)とも云うべき造血機能障害のために、十分な制癌効果を得るに至らずして、投与を中止せざるを得ない場合が多い。この問題を解決せんとして種々の試みがなされた。

多くの研究者はSulphydryl, Amino又はCarboxyl基を有する化合物の中で、Sodium thiosulfate (以下Hypo), cysteine, methylamine, cysteamine, thiourea, glutathion等がNM, Nitromin(以下NMO)の副作用を減弱せしめる事を実験的に確認し、これを臨床的に用いて副作用の防止を計つた⁴⁾10)17)19)20)35)36)40)42)45)46)47)56)。この場合制癌剤と、その中和剤との投与は静脈内に行なわれているが、次に述べる如く、局所的に高濃度の薬剤を投与する方法も考案されている。即ち1960年Kloppらは動脈内挿管分割投与法を考案し²⁵⁾²⁶⁾, 1958年Crechらは体外循環装置を用いる局所灌流法を行なつた¹¹⁾¹²⁾,

更にWoodhall, Shingletonらは、局所灌流法にHypothermia, Hyperthermiaを併用する事により、制癌剤を腫瘍組織に高濃度に投与し、正常組織への副作用を減弱せしめんとした⁴⁹⁾⁵⁹⁾。然しながらこの種の方法を用いても、全身循環系への制癌剤の漏出を完全には防止出来ないのも、制癌剤投与量、灌流時間等に関して大なる制約からまねがれる事が出来なかつた²⁹⁾⁵¹⁾⁵²⁾。

一方1959年Sullivanらは、持続的動脈内注入法によるMethotrexateの局所投与と、Citrovorum Factor(C.F.)の全身投与とを併用する Antimetabolite-metabolite combination Cancer Chemotherapyを発表した⁵³⁾。これは全身循環系へ流出したMethotrexateを、そのantidoteであるC.F.により中和し、副作用を減少せしめ、Methotrexateの制癌効果をたかめんとするものであつた。この動脈内制癌剤投与と中和剤の全身投与の併用療法は、アルキル化剤に関しても行なわれた。Ross, Pereseらは、NMに対する中和剤としてHypoを用い、人腫瘍の治療を行なつたが³⁷⁾⁴²⁾、本邦でも藤森らは、人乳癌にNMOとHypoとの併用療法を行なつた¹⁴⁾¹⁵⁾。

アルキル化剤は、癌細胞の分裂及び増殖に関係の深い核酸、蛋白、酵素、特にDNAの合成、SH系酵素の活性を阻害し、細胞分裂の阻止、異常分裂、細胞崩壊をもたらすと考えられている¹⁾²⁾⁴⁾¹³⁾¹⁴⁾³¹⁾³⁴⁾⁵⁴⁾⁵⁸⁾。山本らによれば、アルキル化剤はその作用基により次の如くに分類出来る⁶¹⁾、

- 1) Chloroethylamine系物質: NM, NMO, Alanyl NMO, Endoxan
- 2) Ethylenimine 系物質: TEM, TEPA, Thio-TEPA
- 3) Sulfon酸ester系物質: Myleran, Nonane
- 4) Epoxide系物質及びその他.

これらのうち現今人癌治療によく用いられているものは、Chloroethylamine系及びEthylenimine系物質である。Chloroethylamine系の薬剤中NM, NMOとHypoとの併用の効果は多くの報告により認められているが¹⁰⁾

14)15)19)37)42)47), EndoxanとHypoとの併用効果に関してはまだ検討されていないし、又Ethylenimine系の制癌剤に対するHypoの中和効果もまだ検討されていない。EndoxanはChloroethylamine系物質の中で、又Thio-TEPAはEthylenimine系物質の中で最も安定な化合物である。しかも副作用が最も少ないので、臨床的にはしばしば用いられるものである。本実験はこのEndoxan, Thio-TEPAに対するHypoの中和作用を検討するために行なわれた。

第1篇 THIO-TEPAに対するHYPOの中和作用

Philipsらの研究によれば、NMの制癌作用は、その加水分解中間産物であるEthylenimonium誘導体に基づく³⁸⁾と云われている。この理論に基づいてEthylenimine系の制癌剤が作られたが、thio-TEPAはその中で最も副作用が少ないと云われている。本剤の抗腫瘍性は、始めShay, Zarafonitis, Batemanらにより証明され⁵⁾⁴⁸⁾、爾來臨床に広く利用されるようになった。

NMに対するHypoの中和作用は、HypoがNMの加水分解で生じたEthylenimonium誘導体と結合する事によりもたらされると云われているので⁴⁾、同じくEthylenimine基を有するthio-TEPAに対するHypoの中和作用を検討してみた。

第1章 thio-TEPA 中毒死に及ぼすHypoの影響

ラットにthio-TEPA致死量と、種々の量のHypoを併用投与し、ラットの生存日数、死亡率、中毒症状即ち体重減少、出血傾向、消化器障害を検索した。

第1節 実験材料及び実験方法

1) 実験動物: 生後約4ヵ月の成熟呑竜系ラット、雄、体重150~250gmのものを使用した。25℃前後の室温で一定の固型飼料及び水道水にて飼育した。

2) 薬剤: a) Thio-TEPA: 住友化学提供によるテスバミン即ちthio-TEPA5mgを含有するPolyethyleneglycol溶液0.5ccを1.5ccの注射用蒸溜水に溶解して使用した(以下thio-TEPAをTESPAと記す)。

b) Hypo: 50%Hypo蒸溜水溶液(田辺製薬製造50%ハイボン注射液)を注射用蒸溜水で3倍に稀釈して使用した。

3) 実験方法: 使用ラットは各群5匹宛とし、実験群では、TESPAとHypoとを併用投与したが、Hypoの投与量、投与時期等により動物群をA, B, C, D, Eの5群に分類し、このうちA, B, Cは更に夫々6群、2群及び4群に細分した。その詳細は表1に示す如くである。

表1

A群: TESP A 20mg/kg及びHypo1.0gm/kg

腹腔内1回併用投与群

- 1) TESP A単独投与群
- 2) TESP A投与30分前Hypo投与群
- 3) TESP A Hypo同時投与群
- 4) TESP A投与30分後Hypo投与群
- 5) TESP A, Hypo混合, 20℃, 30分間放置後投与群
- 6) TESP A, Hypo混合, 37℃, 30分間放置後投与群

B群: TESP A 20mg/kg及びHypo2.0gm/kg

腹腔内1回併用投与群

- 1) TESP A, Hypo同時投与群
- 2) TESP A, Hypo混合, 20℃, 30分間放置後投与群

C群: TESP A 4.0mg/kg/d及びHypo2.0gm/kg/d

6回、或いは3回反覆併用投与群

- 1) TESP A単独6日間連日投与群
- 2) TESP A及びHypo6日間連日同時併用投与群
- 3) TESP A単独隔日3回投与群
- 4) TESP A隔日3回, Hypo隔日3回同時併用し,

其の翌日 Hypo のみ上記量を隔日 3 回投与せる群

D 群：Hypo2.0mg/kg/d 6 日間毎日投与群

E 群：無処置群

使用したTESPAとHypoの重量比は、A群では1：50、B群では1：100、C群では1：500或いは1：1000である。

第2節 実験成績

A 群：TESPA 投与量はLD50の倍量即ち20mg/kg であるが、実験群では重量比で TESPA 1に対して50倍のHypoが併用投与された。A群のうちのA-1、TESPA 単独投与群では、投与後2～3日目より激しい下痢、嘔血、腸出血、体重減少等の中毒症状を呈し、11～13%の体重減少を示し、強度の全身衰弱の結果、4～6日目に全例死亡した(表2)。A-2乃至A-6のHypo併用群では、Hypo 非併用群と大体同様の経過を示して死亡した(表2)。しかしTESPAとHypoとを混合し、30分間室温中又は37℃の孵卵器中で incubate したものを

投与したA-5、A-6群の各群に5例中1例づつ即ち合計10例中2例に長期生存を認めた(表2)。

B 群：A群では重量比にして50倍のHypo が併用されたにも拘らず、HypoのTESPA 副作用軽減効果は殆ど認められなかつたので、B群ではHypo の量を更に増量し、重量比でTESPAの100倍のHypo を併用したが、Hypo併用群でもHypo 非併用群と同様、激烈な中毒症状の結果 TESPA 投与後3～6日目に全例死亡した(表2)。

C 群：C群ではHypo の使用量を更に増し、重量比でTESPAの500又は1000倍を使用した。同時にTESPA の副作用発現を緩徐にするために TESPA の投与を3回及び6回に分割し、之に対しHypo の投与は毎常6回に分割して行なつた。先ず500倍のHypoを投与したC-2では、TESPA 投与開始後7～10日目に全例中毒死し、Hypoを投与しない対照群C-1との間に差異はなかつた(表2)。1000倍量のHypoを併用投与したC-4の場合にも、TESPA 投与開始後6～12日目に全例中毒死した(表2)。この場合の対照群C-3即ち TESPA 単

表 2

薬 剤 投 与 方 式					使 用 死 亡		中 毒 症 状			
		TESPA	Hypo	Hypo投与時期	動物数	動物数	生存日数	死亡時体 重減少率	下 痢	出 血 傾 向
A	1	20mg/kg	0		5	5	4~5	12~30%	(+)	(+)
	2	20mg/kg	1.0gm/kg	TESPA投与前30分	5	5	4~6	20~25	(+)	(+)
	3	20mg/kg	1.0gm/kg	同 時	5	5	4~5	20~26	(+)	(+)
	4	20mg/kg	1.0gm/kg	TESPA投与後30分	5	5	4~5	11~31	(+)	(+)
群	5	20mg/kg	1.0gm/kg	混合, 30分間 20℃ 放置	5	4	3~6以上	11~33	(+)	(+)
	6	20mg/kg	1.0gm/kg	混合, 30分間37℃ incubate	5	4	4~6以上	12~25	(+)	(+)
B	1	20mg/kg	2.0gm/kg	同 時	5	5	4~5	21~26	(+)	(+)
群	2	20mg/kg	2.0gm/kg	混合, 30分間 20℃ 放置	5	5	4~6	22~31	(+)	(+)
C	1	4mg/kg/d 6 日間	0		5	5	7~10		(+)	(+)
	2	4mg/kg/d 6 日間	2.0gm/kg/d 6 日間	同 時	5	5	7~10		(+)	(+)
	3	4mg/kg/d 隔日 3 回	0		5	4	7~11以上		(+)	(+)
	4	4mg/kg/d 隔日 3 回	2.0gm/kg/d 6 日間	同時及び翌日	5	5	6~12		(+)	(+)
D	群	0	2.0gm/kg/d 6 日間	単独, 連日 6 日間	5	0			(-)	(-)
E	群	0	0		5	0			(-)	(-)

独隔日3回投与群では、TESPA投与開始後7～11日目に5例中4例が中毒死し、1例の長期生存例を得た。両者間には、大差は認められなかつた(表2)。

D群：C群に使用したHypoの量に相当する量を単独に投与してみたが、表2に示す如くHypoによる中毒死、体重減少、中毒症状は全く認められず、E群の無処置群と差を認めなかつた(表2)。

第3節 小 括

TESPAの致死量(LD50)或はその倍量をラット腹腔内に投与し、Hypoを併用投与し、Hypoの投与時期、投与量等の投与条件を種々変えてみた。重量比でTESPAの50～1000倍量のHypoを投与したに拘らず、TESPAの毒性を減弱せしめる事は困難であつた。TESPA及びHypo混合溶液を30分間放置したものを投与したA-5、A-6群で各々1例の長期生存を得たが、Hypoの量を2倍にして全く同様の操作を行なつたB-2群では生存例を得る事ができなかつた。

第2章 TESP Aによる白血球減少症に及ぼすHypoの影響

第1章の実験で致死量のTESPAに対して重量比で約1000倍のHypoを併用してもTESPAの毒性を減弱せしめる事ができなかつたので、本実験では、投与するTESPAの量を減じ、TESPAの動物腫瘍治療量を使用した。この使用量で惹起される白血球減少症を示標としてHypoの中和作用を検討した。

第1節 実験材料及び実験方法

1) 実験動物及び薬剤：第1章と同様のラット及びTESPA、Hypoを使用した。

2) 実験方法：ラットにTESPA 2.5mg/kg/d 7日間毎日投与し、これに併用するHypoの投与量に従い、ラットを以下に述べる6群に分けた。TESPA及びHypoは無菌的にラット腹腔内に、同時に投与した。

I群：TESPA単独投与群

II群：TESPAとHypo 0.5gm/kg/d 7日間併用群

III群：TESPAとHypo 1.0gm/kg/d 7日間併用群

IV群：TESPAとHypo 2.0gm/kg/d 7日間併用群

V群：Hypo 2.0gm/kg/d単独7日間投与群

VI群：無処置群

採血及び白血球計算法：薬剤投与開始後、4, 6, 8, 10, 13日目にラットの尾部先端を切断し、滴出する血液を白血球用メランジュールにて吸引し、Türk氏液にて稀釈後、Bürker-Türk氏計算盤にて算定した。

第2節 実験成績

TESPAを投与したI～IV群では、図1～4に見る如く、薬剤投与開始後4日目に既に著明な白血球減少を示し、8日目即ち薬剤投与終了後2日目には最大減少率を示したが、以後漸次回復し、薬剤投与終了後7日目には、元値以上に増加した。これらI～IV群間でTESPA注射後の各時期に於ける平均白血球減少率を比較すると図7に示す如くである。即ちTESPA投与開始後第4, 6, 8日目の各群の白血球減少率は、I群では40%, 60%, 75%, II群では35%, 60%, 77%, III群では25%, 65%, 77%, IV群では22%, 55%, 65%であつた。これらに対し、Hypo単独投与せるV群では、白血球変動率はHypo投与開始後第4, 6, 8日目では+8%, +16%, +13%であつて、いづれもやや白血球増加を示している(図5)。無処置VI群では8日目迄殆んど変化を認めなかつた(図6)。

第3節 小 括

TESPA単独投与群とHypo併用群との白血球減少を比較すると、両者間には著明な差は認められなかつた。又TESPA投与量を一定にした場合、Hypo投与量を増加しても、白血球減少率には差は認められなかつた。Hypo単独投与群では白血球はむしろ増加する傾向を認めた。

第3章 TESP A及びHypo混合溶液の毒性について

第1章、第2章において、TESPAとHypoとを混合直後、同時に投与してもTESPAの毒性を減弱せしめる事ができなかつた。又混合後30分間37°C又は室温に保つた場合にもHypoはTESPAの毒性を減弱する事ができなかつた。そこで本実験では、in vitroで両者を混和し、37°Cに保つ時間を1時間以上に延長した場合のHypoの中和効果を検討した。

第1節 実験材料及び実験方法

1) 実験動物：生後約2ヵ月のdd系マウス、雌、体重20gm以上のものを使用した。一定の固型飼料及び水道水を与え、27°Cの恒温下で飼育した。

2) 薬剤：TESPA及びHypoは第1章、第2章と同様なものを使用した。

3) 実験方法：マウスに対するTESPA LD50即ち25mg/kgと、Hypo 2.0gm/kgとを混和し、37°Cの孵卵器中で種々な時間incubateした後、マウス腹腔内に投与した。一方Hypoの代りに蒸留水を使用し、同様の処

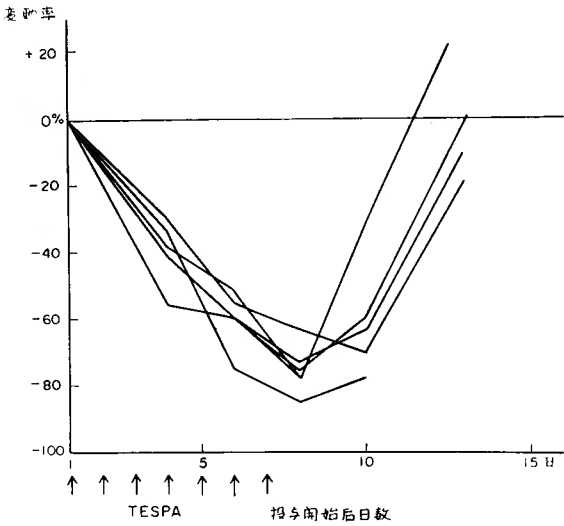


図1 白血球数変動率

I群 TESPA 2.5mg/kg/d 7日間投与群

図2 白血球数変動率
II群 TESPA 2.5mg/kg/d } 7日間併用
Hypo 0.5gm/kg/d }

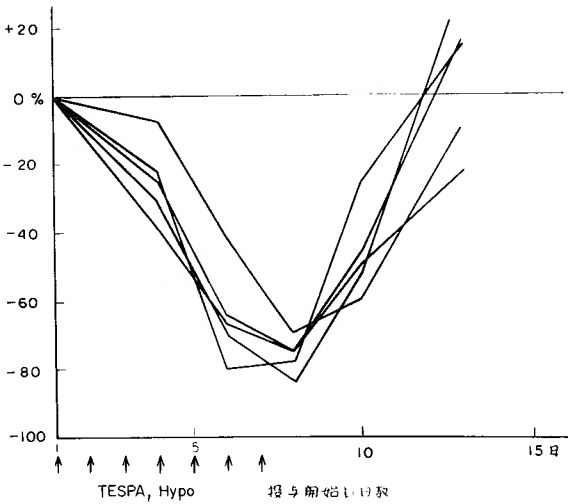
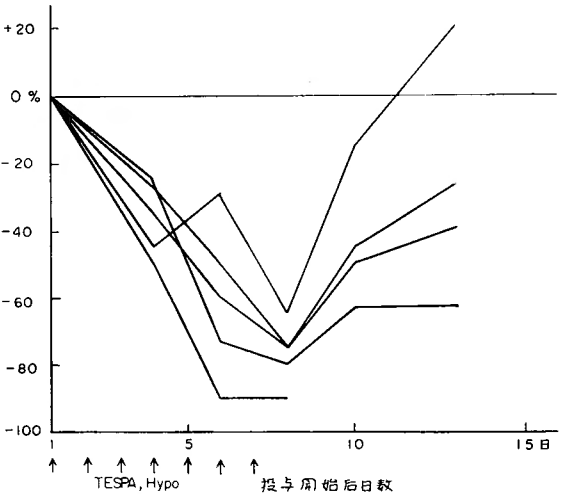


図3 白血球数変動率

III群 TESPA 2.5mg/kg } 7日間併用
Hypo 1.0gm/kg }

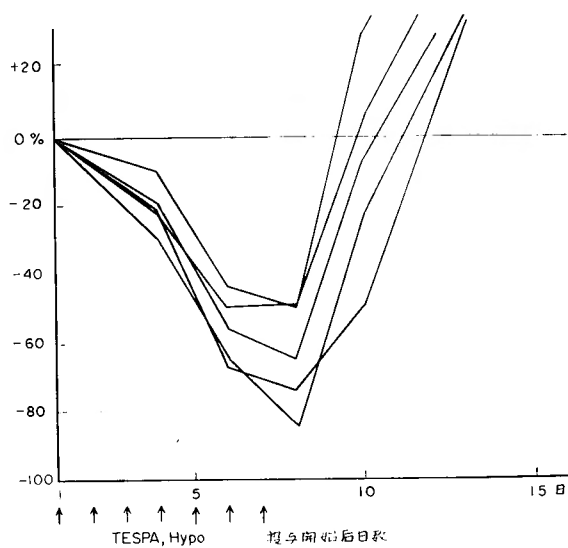


図4 白血球数変動率

IV群 TESP 2.5mg/kg/d } 7日間併用
Hypo 2.0gm/kg/d }

図5 白血球数変動率
V群 TESP 2.0gm/kg 7日間投与群

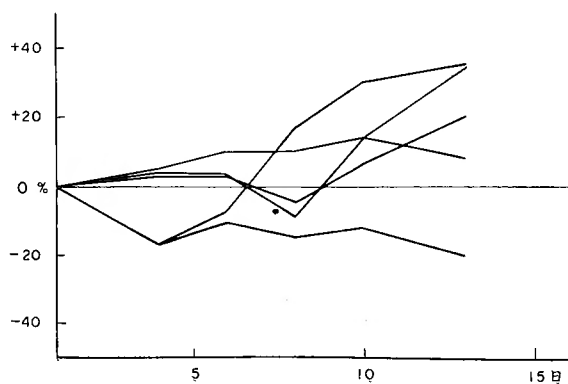
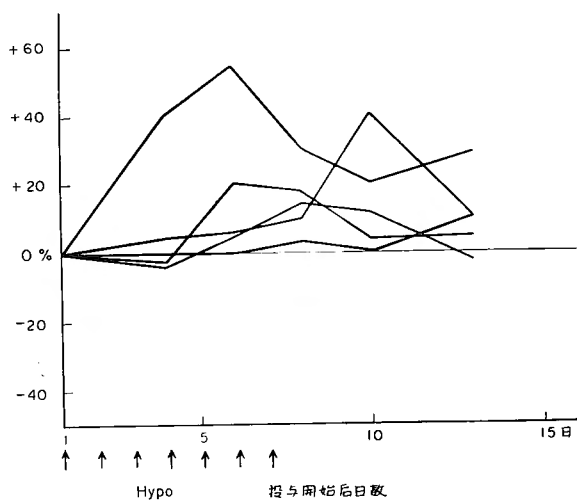


図6 白血球数変動率

VI群 無処置群

白血球数変動率
(各群平均変動率)

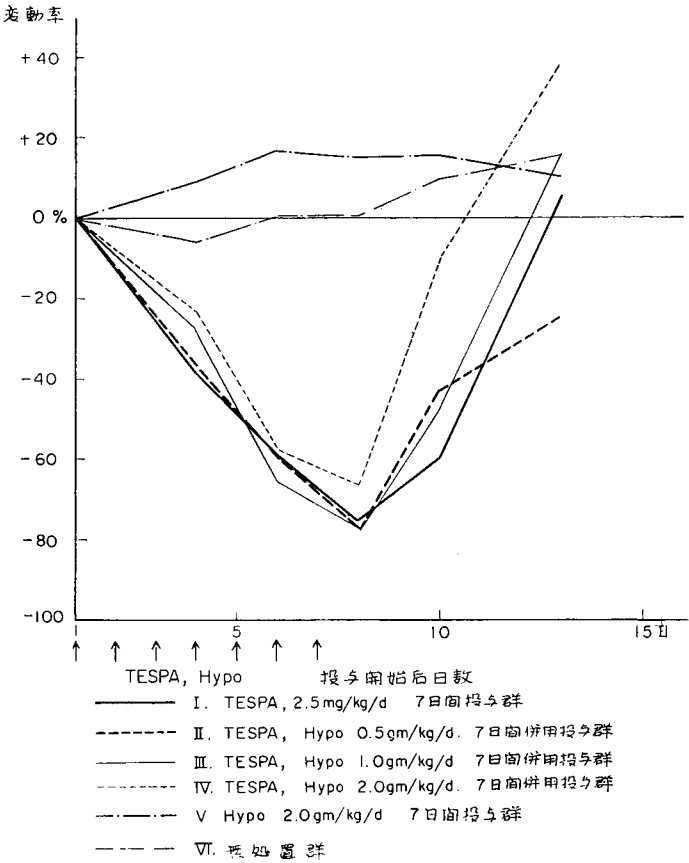


図 7

理を行なつた溶液を対照動物に投与して、その成績を比較した。混合液のincubation time に従い、マウスを6群に分ち、夫々の群を2分し、TESP A, Hypo 混合液注射動物及び対照の TESP A 蒸溜水混合溶液注射動物を比較した。各群共15日間経過を観察した。

- I 群：混合直後投与群
- II 群：混合液を1時間incubateせる後投与した群
- III 群：混合液を2時間incubateせる後投与した群
- IV 群：混合液を4時間incubateせる後投与した群
- V 群：混合液を6時間incubateせる後投与した群
- VI 群：混合液を12時間incubateせる後投与した群

第2節 実験成績

I 群、TESP A と蒸溜水 混合液投与の 対照群は、TESP A 投与後5日目より中毒死し、第9日目迄に65

%の動物が死亡した。その後の死亡例はなかつた。Hypo 併用群では第5日目70%の動物が死亡し、その後は死亡しなかつた。9日目以後の生存率は前者では35%、後者では30%であつた(図8)。

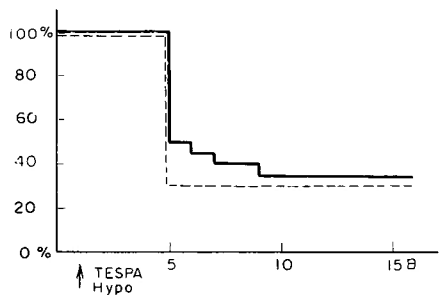
II, III, IV, V, VI 群：対照群(TESP A 単独投与群)では何れも20~60%の死亡率を示し、5日目より10日目に死亡したが、Hypo 併用群では、II~V 群迄、死亡したものは一例もなく、VI 群で20%が6日目~7日間に死亡したのみであつた(図9~13)。

第3節 小 括

TESP A と Hypo との混合液を一定時間 incubate した aged solution をマウス腹腔内に投与し、その毒性を検討した。I, II, III, IV, V, VI 群の対照群(TESP A 単独投与に相当する群)では、各群共50~60%の死亡率を

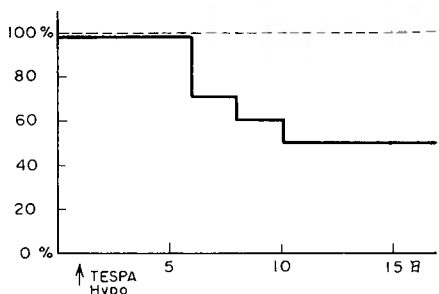
マウス生存日数

図 8



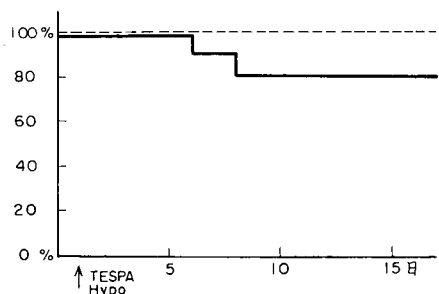
I 群: TESP A 25mg/kg, Hypo 2.0gm/kg
混合直后投与群

図 9



II 群: 1 時間 incubate 后投与群

図10

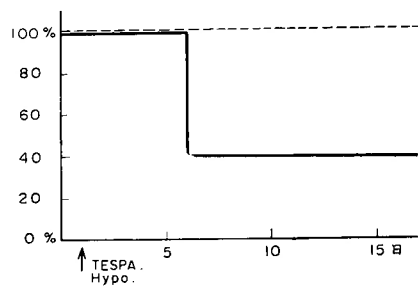


III 群: 2 時間 incubate 后投与群

—— TESP A 25mg/kg 単独投与群

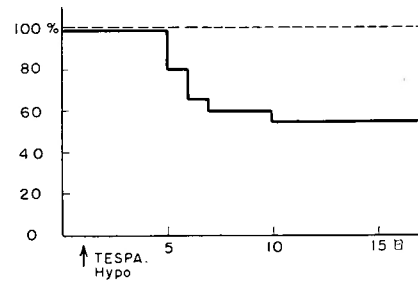
----- TESP A 25mg/kg, Hypo 2.0gm/kg 混合群

図11



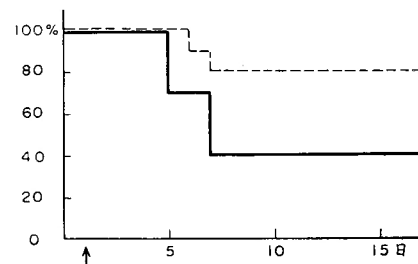
IV 群: 4 時間 incubate 后投与群

図12



V 群: 6 時間 incubate 后投与群

図13



VI 群: 12 時間 incubate 后投与群

—— TESP A 25mg/kg 単独投与群

----- TESP A 25mg/kg, Hypo 2.0gm/kg 混合群

第4章 考 按

NMの制癌作用は次の如くに説明されている。即ちその β -Chloroethyl基がCl⁻ionを遊離して活性なEthyleneimonium groupになる(図14)⁴⁾。このものは生体構成要素である核酸、核蛋白、代謝酵素系のAnion 原子団即ちSulfhydryl, Carboxyl, Imine, Amino基等と反応してアルキル化する事により、核蛋白、DNAにCross-linking反応を起し、DNAの低分子化、橋状形成等の変形、蛋白合成能の抑制、ひいては核分裂の異常、細胞崩壊を来たすと考えられている¹⁾²⁾⁴⁾²³⁾²⁴⁾³¹⁾³⁴⁾⁵⁴⁾⁵⁸⁾。一方TESP Aの制癌作用機序は、NMの場合と

示し、その平均死亡率は51.25%であつた。之に対しHypoを併用した場合には、TESP AとHypoとを混合直後マウスに投与したI群では何ら死亡率の低下は認められなかつたが、1時間以上のaged solutionを投与したII~VI群では、著明な死亡率の低下が認められた。即ちVI群の死亡率は20%で、II~V群では0%であつた。又Incubation timeが1時間以上の場合には、12時間迄は死亡率の変化に差異を認めなかつた。

Transformation of Nitrogen mustard in
Aqueous Medium free of Reactive solutes
(Philips)

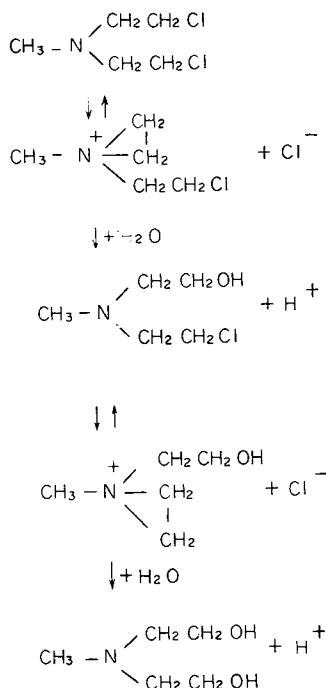
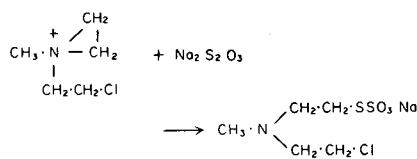


図14

同様であるが、Ethyleniminium groupが Ethylenimine 基として、安定な形で存在している点が異なっている²⁴⁾。SH 基含有化合物はHN2 型化合物と結合し、活性を中和するので一種の配合禁忌物質に属すると云われているが²⁴⁾、Hypo は SH 基含有化合物の1つとして NM、NMOの活性を中和する事が知られている⁴⁾¹⁰⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁷⁾¹⁹⁾²³⁾³⁷⁾⁴²⁾⁴⁷⁾。この中和反応は、前述の如く Ethyleniminium groupに対し図15の如く結合する事により起る単純な化学反応である⁴⁾¹²⁷⁾⁴⁾。そこで、Hypo が HN2を中和する如く TESPA をも中和するかどうかを検討するために本実験を行なった。

Barronによれば、Hypo 1000Molは、1 MolのNMの Choline oxidase 活性抑制作用を完全に抑制するが、Hypo 100Moleではその効果は半減、Hypo 10Molでは全く効果がないと云う⁴⁾。Hypoのラットに対する毒性は、Voegtlinによれば Hypo 投与量が2.5gm/kg 迄は殆ど認められなかつたと述べている⁵⁵⁾。これらに基き本実験に於ては、Hypoの投与量は1回量2.5gm/kg 以下とし、又TESPA 1Molに対して併用するHypoの比率



Thiosulfate reacts very rapidly with
the ethyleniminium derivative of Nitrogen Mustards

(Barron)

図15

は約60Mol, 120Mol, 600Mol, 1200Mol とした。アルキル化剤の反応機構上の特性は、単純な化学反応性即ち活性水素原子を容易にアルキル基で置換する事にあり、しかもその反応は殆ど不可逆性であると云われている⁴⁾²³⁾³⁸⁾。それ故アルキル化剤に対する中和剤の投与時期はそのアルキル化剤の投与前又は同時が適当と考えられるので、第1章の実験に於いて Hypo の投与を TESPA と同時、又は投与前30分に行なつた。これらの動物について延命、死亡率減少、中毒症状の軽減等の Hypo の効果を検討したが、いずれの点に於いても TESPAに対するHypoの中和効果を認める事ができなかった。次に TESPA の投与量を減じ、これに大量のHypoを併用した第2章の実験に於ても、TESPAによる白血球減少症を防ぐ事はできなかった。

さて、Nadkarni, Mellett, 小山らの P³²-TESPA, P³²-TESPAに就いての研究によれば、TESPAの静脈内投与後5分で、TESPA 注入量の90%が血中より消失すると云われている²⁷⁾³⁰⁾³²⁾。更に小山は、P³²-TESPA投与後3時間目の尿中に出現する P³² は、すべて TESPA を構成しているのではなかつたと云う事実から判断して、TESPAの体内での分解、排泄は極めて速いと述べている²⁷⁾。更に又、小山は、P³²-TESPA投与後21時間目に尿中に出現する P³²の95%が TESPA を構成している P³²である事を認めると共に、血中では6時間後になつても P³²-TESPA を証明した点より、血中或は臓器内の TESPA は何らかの物質と結合した形で存在しているために、単体の TESPA と比較して破壊され難い条件が形成されるのではないかと述べている²⁷⁾。

一方本実験に於ける TESPA と Hypo 混合液の検索では、混合直後又は30分以内では TESPA の生物学的活性は何ら減弱されなかつた。即ちHypoが TESPAを中

和するために両者混合後少くとも30分以上の時間を要する事になる。一方生体内に投与された TESPA は速かに細胞、組織に固着するので、TESPA とHypoを同時に投与した場合、HypoがTESPAを中和する以前にTESPAが細胞に作用する結果になる。その上核蛋白、核酸、酵素とTESPAとの結合は不可逆性であるから⁴⁾²³⁾³⁸⁾、HypoのTESPAに対する中和作用は尚更期待し難い事になる。アルキル化剤の活性の一表示法にThiosulfate titerが用いられる⁴⁾⁹⁾¹⁷⁾²³⁾即ちアルキル化剤とHypoを一定時間混合、反応せしめた後、残留するHypo量より消費Hypo量を算出し、その消費Hypo量(モル数)と、アルキル化剤の量(モル数)との比即ちThiosulfate titerで、アルキル化剤の活性を表示するものである。石館の論文²³⁾より引用すれば、表3に示す如く、TESPAのThiosulfate titerはNMのその約1/9に過ぎない。この事実は、in vivoに於いてTESPAに対するHypoの中和作用が認められなかつたと云う本実験成績と一致する。

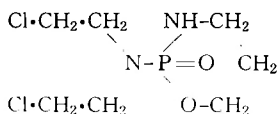
表 3

Compounds	Thiosulfate Titer		
	10min	2h	24h
$\text{CH}_3\text{-N-(CH}_2\text{CH}_2\text{Cl)}_2$	0.92	1.88	1.88
$\text{CH}_3\text{-N-(CH}_2\text{CH}_2\text{Cl)}_2$ ↓ O T E M S-TEPA	—	—	—
		0.12	0.85
		0.21	0.76
		(石館)	

要するにTESPAに対するHypoのin vivoに於ける中和作用が認められなかつたと云う事実は、次の如く説明する事ができるであろう。即ちTESPAとHypoとの反応速度が遅いのに對し、TESPAの組織への固着が早く、更に一旦組織成分と不可逆的に結合したTESPAは中和されないと云う事に起因するものであろう。従つてTESPAの副作用を中和するためにHypoを併用すると云う療法は成立し難いものと考えられる。

第2篇 ENDOXANに対するHYPOの中和作用

Endoxanは、前立腺癌の治療に於ける Stilbesterol の Transport form-Active form の原理 (Druckrey)¹³⁾をアルキル化剤に適用し、1958年 Arnold, Brock らにより合成されたNMの Cyclic phosphamide ester である³⁾。



EndoxanはNMと異なり、in vitroでは全く不活性であるが、in vivoに於いて生体内の phosphatase, phosphoramidase の作用、その他の機転により分子中のN-P間結合が解離され、β-Chloroethyl基より活性Clイオンを遊離して抗腫瘍性を発揮する²⁾⁷⁾。Endoxanのactive formはHN2型である事より³⁾⁷⁾⁵⁷⁾、HypoはHN2型化合物のNM、NMOを中和すると同様にEndoxanをも中和する作用があると考えられるが、この点を検討した報告はないようである。本研究はEndoxanに対するHypoの中和作用を検討するために行なわれた。

第1章 Endoxanの毒性に及ぼすHypoの影響

ラットに致死量又は治療量のEndoxanと種々の量の

Hypoを併用投与し、ラットの生存日数、死亡率、体重減少、白血球減少、骨髓障害、諸組織障害等の中毒症状を観察する事によりEndoxanに対するHypoの中和作用を検討した。

第1節 実験材料及び実験方法

1) 実験材料 a) 動物：生後約4ヵ月の呑竜系ラット、雄、体重150~250gmのものを使用した。一定の固型飼料、水道水を与え、27°Cの恒温下で飼育した。

b) 使用薬剤 i) Endoxan：塩野義製薬提供によるVial入りEndoxan 100mgを10或は20cc生理的食塩水に溶解して使用した。未溶解Endoxanは5°C以下の冷所に保存した。

ii) Hypo：50%Hypo蒸溜水溶液（田辺製薬の50%ハイボン注射液）を注射用蒸溜水で3倍に稀釈して使用した。

2) 実験方法：ラットをEndoxan及びHypoの投与量に応じて次の10群に分けた。

I群：Endoxan 50mg/kg/d 5日間連日腹腔内投与群

II群：Endoxan 50mg/kg/d及びHypo 2.0gm/kg/dを同時に腹腔内に連日5日間併用投与し、その後更に2日間毎日Hypoの上記量を投与せる群

Ⅲ群: Endoxan 50mg/kg/d隔日3回腹腔内投与群

Ⅳ群: Endoxan 50mg/kg/dとHypo 2.0gm/kg/dを同時に腹腔内に隔日3回併用投与し、更に各々を投与した翌日即ち隔日3回Hypoのみ上記量を腹腔内に投与せる群

Ⅴ群: Endoxan 10mg/kg/d 7日間連日腹腔内投与群

Ⅵ群: Endoxan 10mg/kg/dとHypo 2.0gm/kg/dを同時に1日1回腹腔内に、7日間連日投与せる群

Ⅶ群: Endoxan 10mg/kg/dとHypo 1.0gm/kg/dを同時に1日1回腹腔内に7日間連日投与せる群

Ⅷ群: Endoxan 10mg/kg/dとHypo 0.5gm/kg/dを同時に1日1回腹腔内に7日間連日投与せる群

Ⅸ群: Hypo 2.0gm/kg/d 7日間連日単独投与群

Ⅹ群: 無処置群

即ちⅠ群～Ⅳ群にはEndoxanの致死量が投与され、Ⅴ群～Ⅷ群には治療量が投与された。Endoxanに対するHypoの投与量の重量比は、Ⅱ群では10倍、Ⅳ群では80倍、Ⅵ群では200倍、Ⅶ群では100倍、Ⅷ群では50倍である。薬剤はいづれもラット腹腔内に無菌的に投与された。

以上の10群中、Ⅰ～Ⅵ群及びⅨ、Ⅹ群に就いて1)生存日数及び死亡率、2)体重変動、3)末梢血白血球変動、4)末梢及び骨髓血液像、5)諸臓器組織像を比較検討した。Ⅶ群及びⅧ群に就いては末梢血白血球変動のみを比較検討した。末梢血白血球数の算定は、ラット尾部尖端を切断し、滴出する血液を白血球用メランジュールで吸引し、Türk氏液で稀釈後、Bürker-Türk氏計算盤で行なつた。採血日は、薬剤投与開始後3, 6, 8, 10, 13日目又は4, 8, 10, 15日目とした。血液像は、薬剤予定量を完了した翌日に末梢血の塗抹標本を作成し、ギムザ染色を行なつた上で比較した。

骨髓血液像及び諸臓器組織像は、薬剤予定量を投与完了せる翌日に屠殺したラットについて調べた。即ち骨髓像の検索は、両側大腿骨を摘出し、その骨髓を搔把、塗抹し、一側毎に一枚のMay-Giemsa氏染色法で染色した標本につき行なつた。即ちラット一匹の骨髓の検索には2枚の標本を使用した。有核細胞は一枚の標本で必ず200コ以上を検索した。諸臓器組織像の検索は、摘出した脾、肝、小腸、睾丸、副腎及び腎組織をホルマリン固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色法により作製した標本で行なつた。

第2節 実験成績

1) 生存日数及び死亡率

Ⅰ群: Endoxan 50mg/kg/d 5日間連日投与した本群

では、Endoxan投与開始後次第に体重減少、脱毛、活動性減退等の中毒症状を呈し、全身衰弱の結果Endoxan投与開始後7～13日目に86%の動物が死亡した。その後の死亡例はなかつた(図16)。Ⅱ群: Ⅰ群と同様のEndoxan投与にHypoを併用した本群では、Ⅰ群と同様の経過を示し、9～12日目に全例死亡した(図16)。Ⅲ群: Endoxan 50mg/kg/d隔日3回投与せる本群の死亡率は75%で、Endoxan投与開始後8～13日目に死亡した。その後の死亡例はなかつた(図16)。Ⅳ群: Ⅲ群と同様なEndoxan投与にHypoを併用した本群では、Endoxan及びHypo投与開始後13日目に12例中1例が死亡したのみであつた(図16)。Endoxanの投与量を減じたⅤ群及びこれにHypoを併したⅥ、Ⅶ、Ⅷ群には死亡例はなかつた。対照群に相当するHypo単独投与のⅨ群及び無処置Ⅹ群でも死亡例は認められなかつた。

2) 体重変動

Ⅰ、Ⅱ群では薬剤投与開始後5日目に既に5～15%の体重減少率を示し、又死亡時には20～30%の体重減少率を示した(図17, 18)。Ⅲ群の死亡例は20～30%の体重減少率を示したが生存例では5～15%の減少率にとどまつた(図19)。Ⅲ群と同様なEndoxan投与にHypoを併用したⅣ群では、使用動物の75%は10%以下の減少率を示したに過ぎなかつた(図20)。Ⅴ、Ⅵ、Ⅸ、Ⅹ群の体重変動は、2週間の経過観察では殆んど認められなかつた(図21, 22, 23)。

3) 白血球変動

Ⅰ群では、白血球減少率はEndoxan投与開始後3日目に既に65～85%となり、8日目には全例90%以上の減少率を示した(図24)。Ⅰ群と同様なEndoxan投与にHypoを併用したⅡ群では、Endoxan及びHypo投与後3日目に10～75%、8日目は80～90%の減少率を示した(図25)。Ⅲ群及びⅣ群では、両群共4日目には60～85%、8日目には90%以上の白血球減少率を示した(図26, 27)。Ⅴ群のEndoxan 10mg/kg/d 7日間連日投与群では、Endoxan投与開始後1日目に50～60%、8日目に50～75%の減少率を示したが、その後次第に回復し、15日目には元の値を上廻る白血球数を示した(図28)。Ⅴ群と同様のEndoxan投与にHypo 2.0gm/kg/dを併用したⅥ群では、経過観察の全期間を通じて白血球減少率は全例50%以内にとどまつた(図29)。Ⅴ群と同様のEndoxan投与にHypo併用量を1.0gm/kg/dに減量して併用したⅦ群、及びHypoを更に0.5gm/kg/dに減量して併用したⅧ群の4日目及び8日目の白血球減少率は、Ⅶ群では10～45%、45～75%、Ⅷ群では5

生 存 日 数

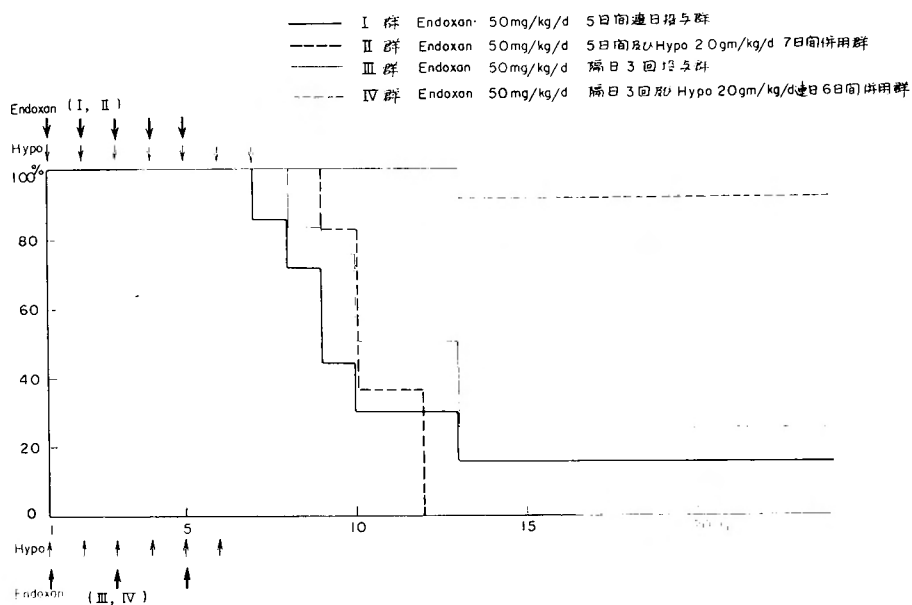


図16

体重変動率

I 群 Endoxan 50mg/kg/d 5日間連日投与群

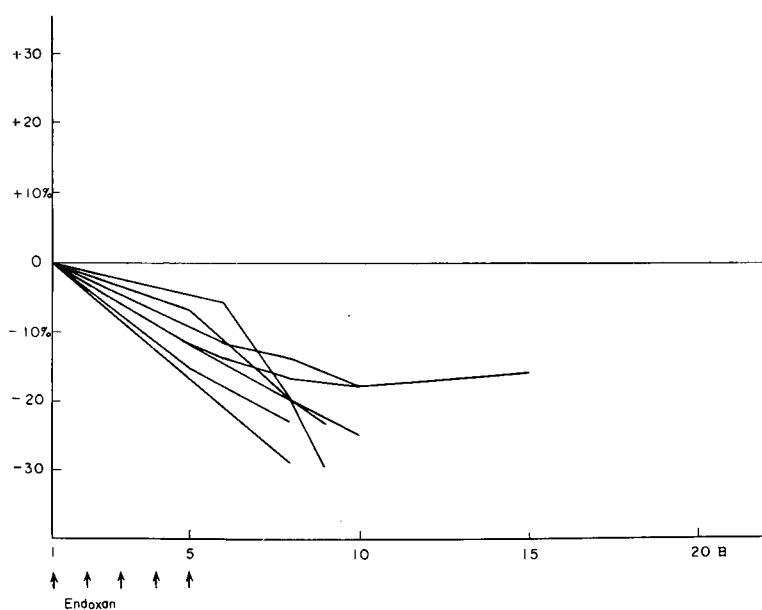


図17

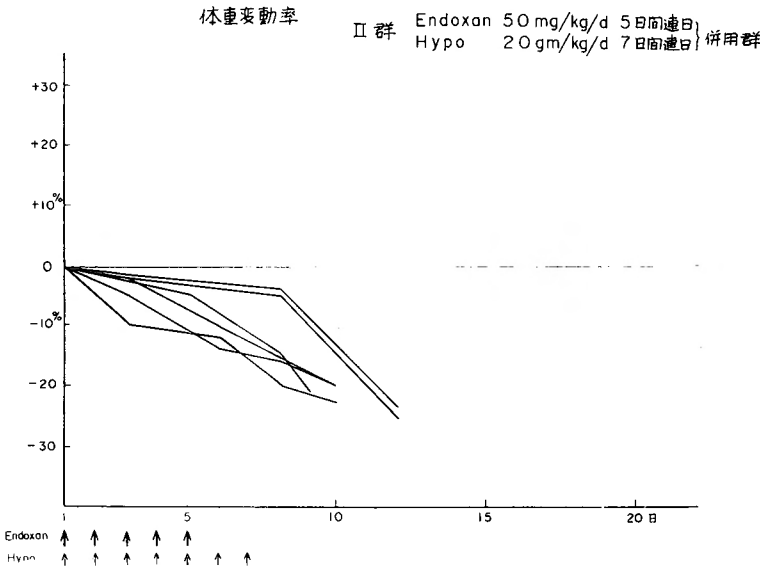


図18

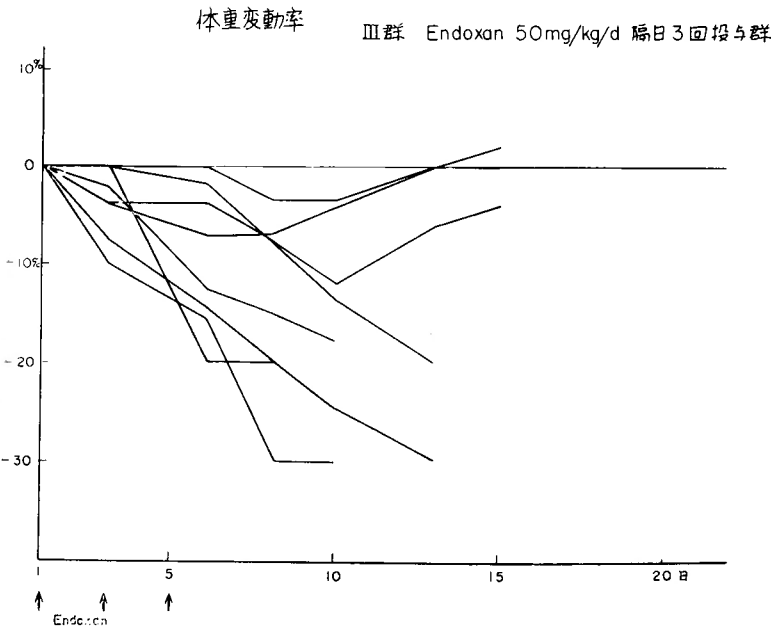


図19

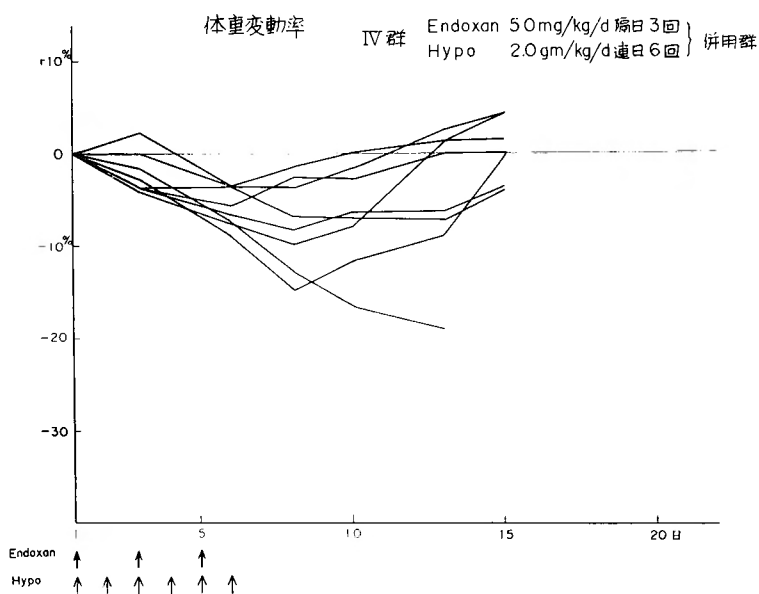


図20

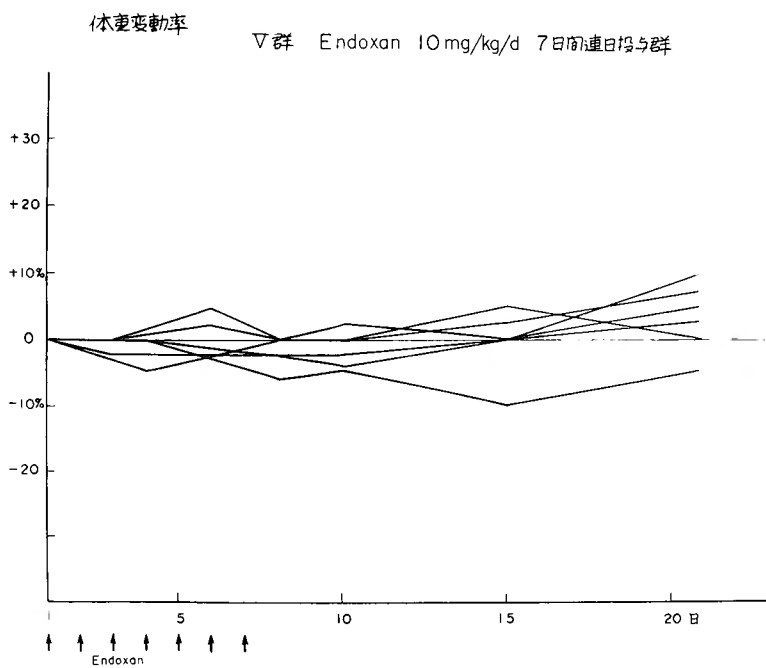


図21

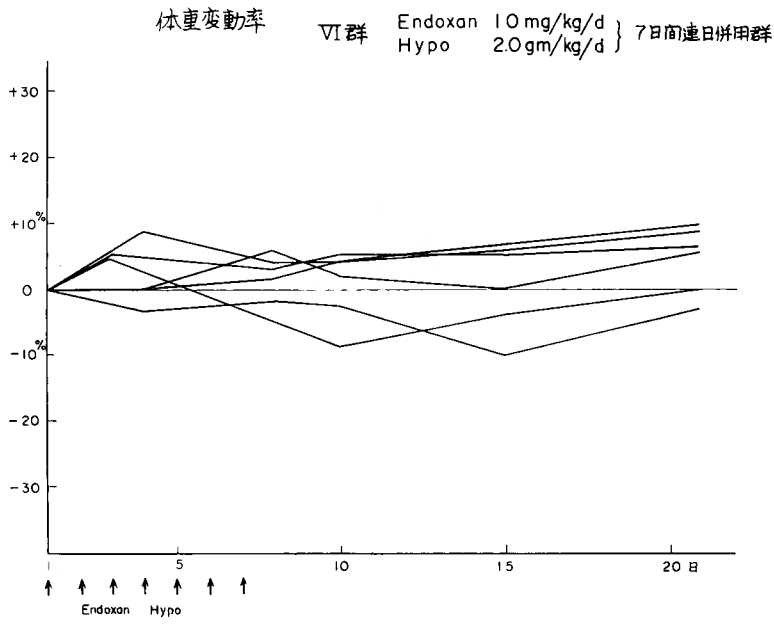


図22

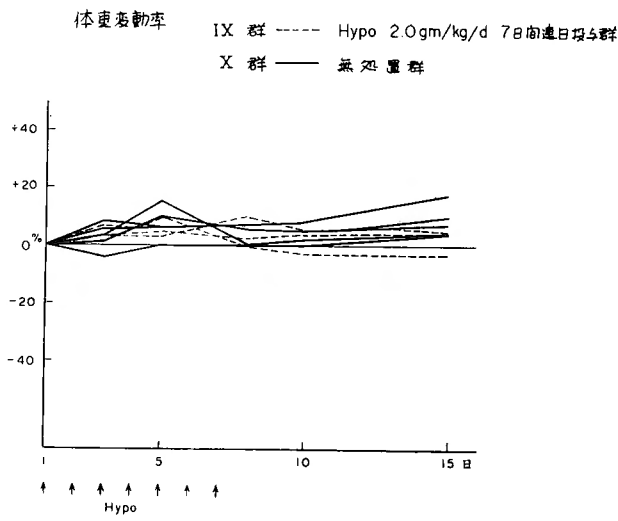


図23

白血球数変動率

I 群 Endoxan 50mg/kg/d 5日間連日投与群

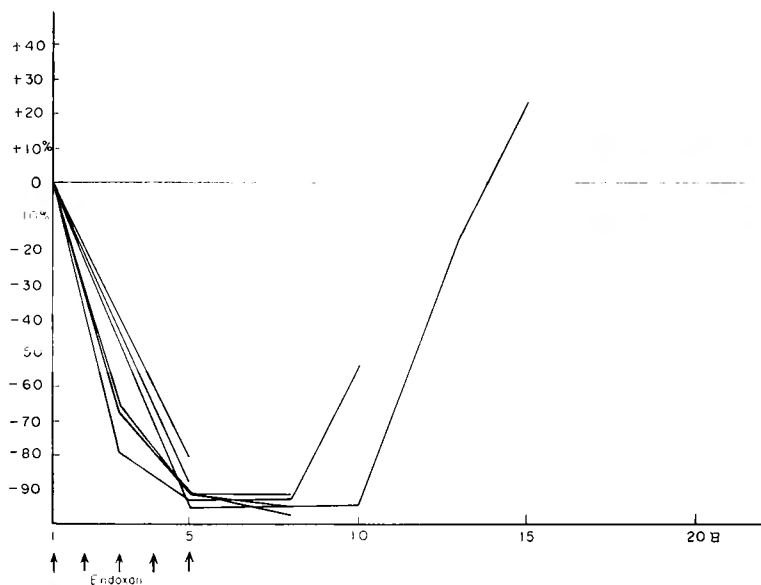


図24

白血球数変動率

II 群 Endoxan 50mg/kg/d 5日間連日投与群
Hypo 2.0gm/kg/d 7日間連日併用群

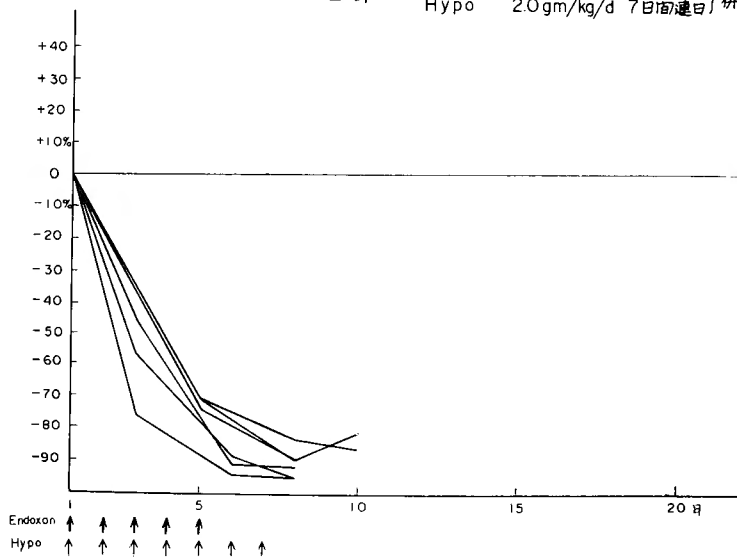


図25

白血球変動率
Ⅲ群 Endoxan 50mg/kg/d 隔日3回投与群

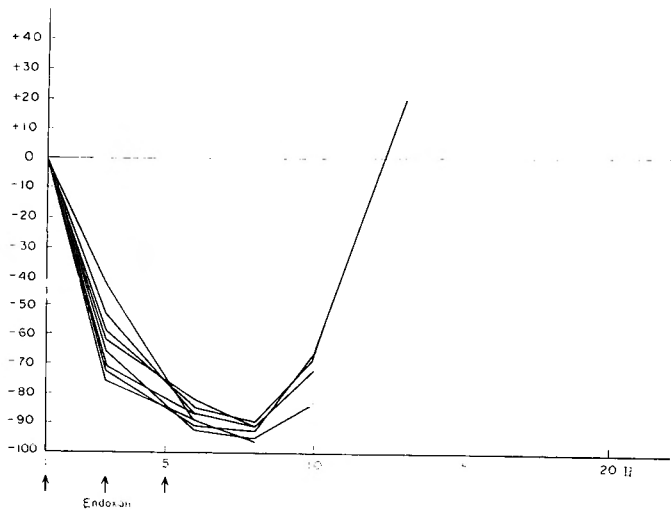


図26

白血球変動率
Ⅳ群 Endoxan 50mg/kg/d 隔日3回 } 併用群
Hypo 20gm/kg/d 連日6回 }

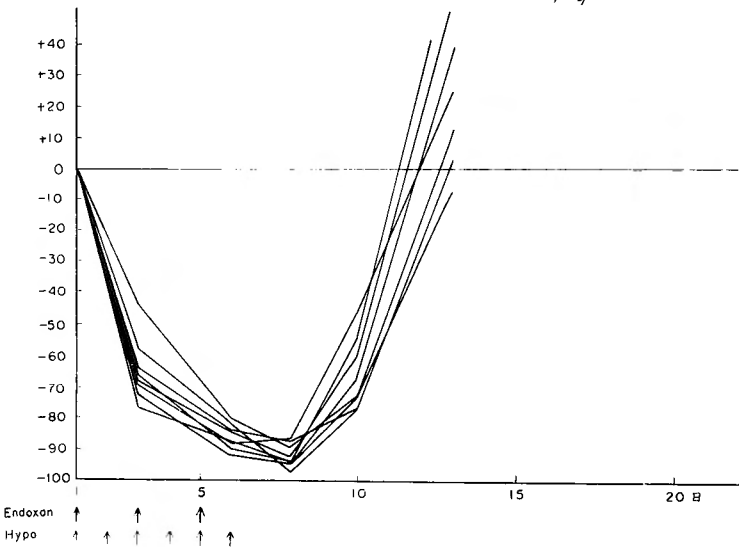


図27

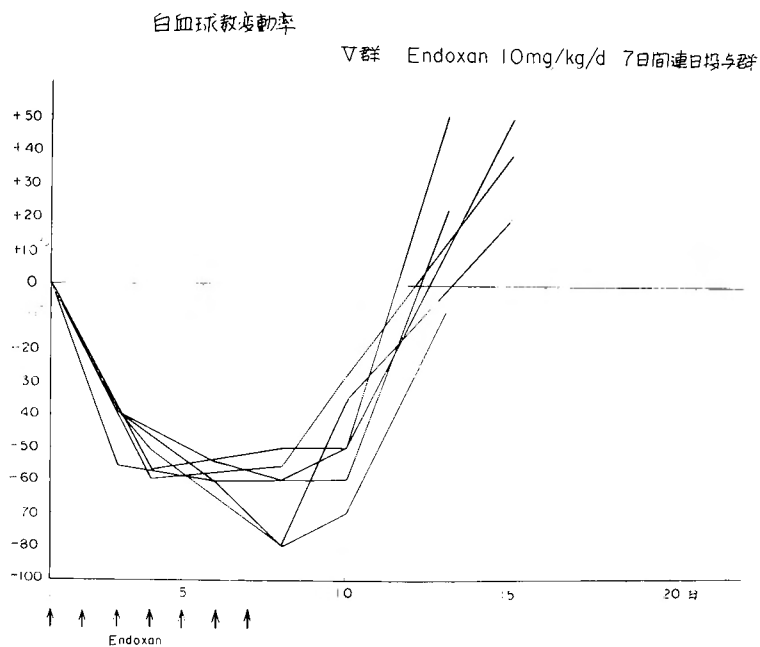


図28

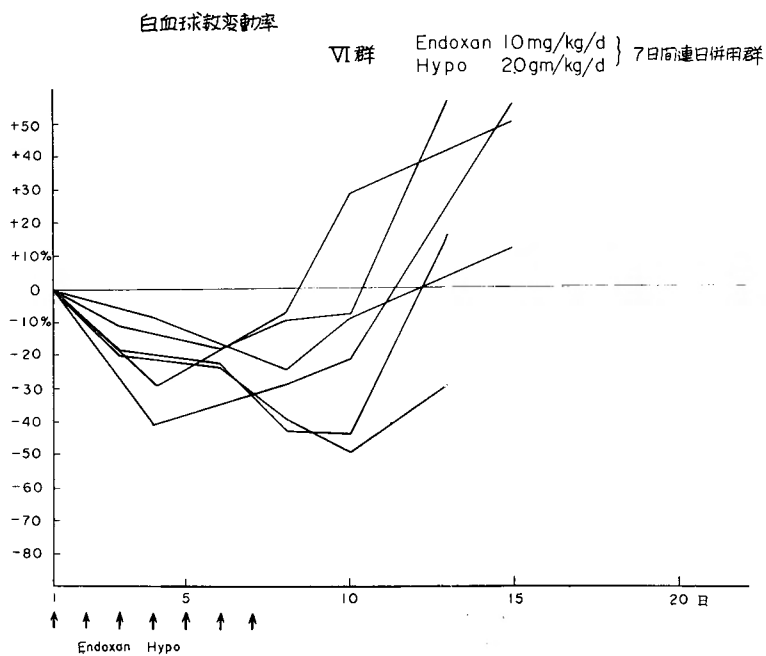


図29

白血球数変動率

VII群 Endoxan 10mg/kg/d } 7日間併用群
 Hypo 1.0gm/kg/d }

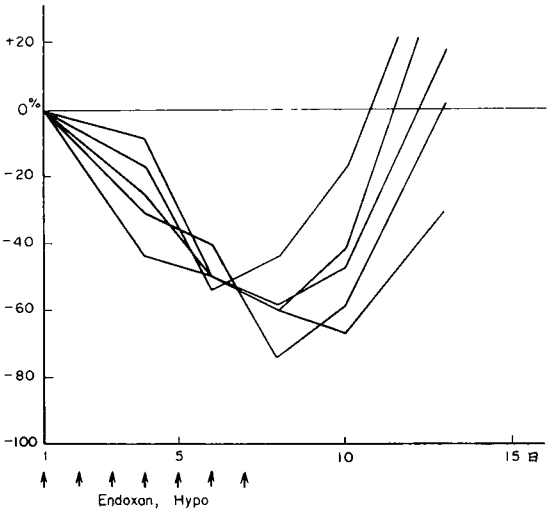


図30

白血球数変動率

VIII群 Endoxan 10mg/kg/d } 7日間併用群
 Hypo 0.5gm/kg/d }

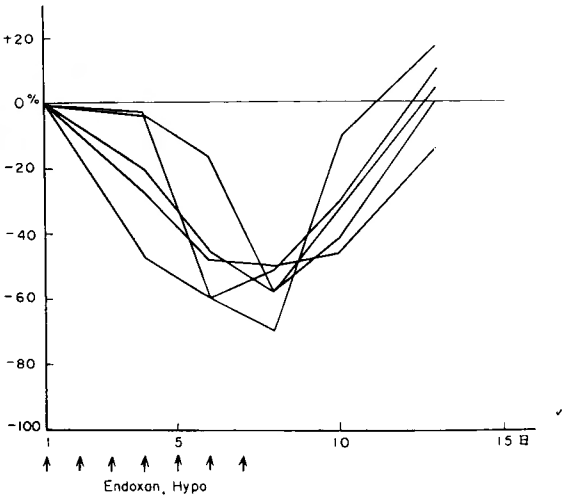


図31

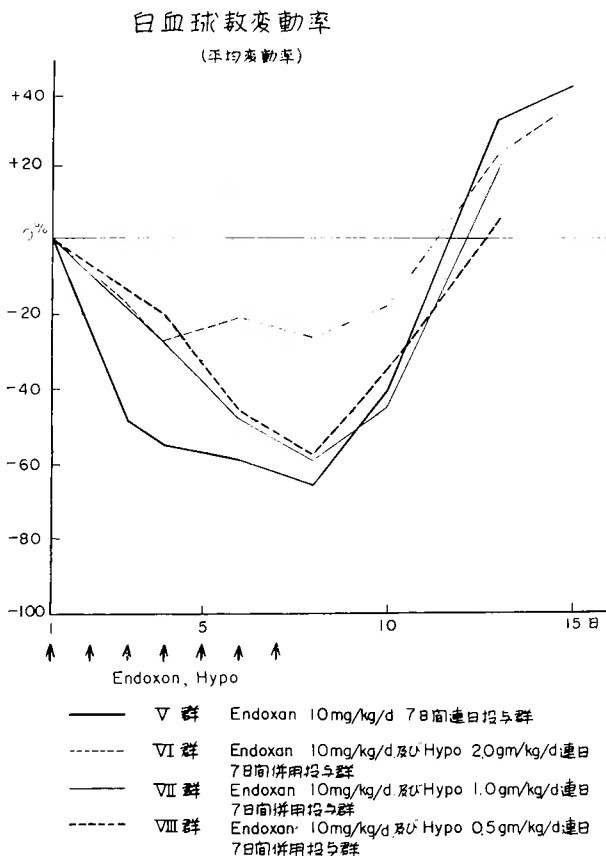


図32

5～50%, 50～70%であつた(図30, 31). Endoxan 10mg/kg/dを投与したV群及びそれにHypoを併用投与したVII, VII, VIII群の平均白血球減少率を比較すれば, 図32に示す如くである. 即ち薬剤投与開始後4, 6, 8日目の平均白血球減少率は, V群では55%, 59%, 66%であり, VI群では27%, 22%, 26%, VII群では27%, 47%, 58%, VIII群では20%, 46%, 57%であつた. これら各群共8日目即ち薬剤予定量投与完了翌日に最大減少率を示したが, それ以後は急速に恢復した. V群のEndoxan単独投与群ではEndoxan総投与量が20mg/kgに達した時には, 既に白血球減少率50%以上を示したが, Hypoを併用したVII, VIII群では, Endoxan総投与量が50mg/kgに達した頃に始めて白血球減少率が50%に達したにすぎなかつた. 又Hypo 2.0gm/kgを併用したVI群ではEndoxan総投与量が70mg/kgに達しても白血球減少率は27%以内であつた(図32). Hypoを単独に投与したIX群では, 白血球はむしろやや増加の傾向を示したが,

V群の無処置群では白血球の変動は殆んど認められなかつた(図5, 7, 7).

4) 末梢及び骨髓血液像

血液像の比較検討は, 死亡率, 体重変動, 白血球変動に就いて顕著な差を認めたHypo併用群との間, 即ちIII, IV群間及びV, VI群間で行なつた. 尚IX群Hypo単独投与群及びV群無処置群の成績との比較的検討も行なつた.

i) 末梢血液像

無処置群では, 顆粒白血球に比してリンパ球が多く, 又赤血球及び白血球の幼若細胞の出現は認められなかつた(表4). Hypo単独投与群では無処置群の血液像との間に大差は認められなかつた(表4). Endoxanを投与したIII, IV, V, VI群では, いずれも顆粒白血球の比較的增加とリンパ球の比較的減少を示した(表4). これはPliess³⁹⁾, Bizrbrauer⁶⁾の報告と一致する. 尚Hypo併用群と非併用群との間, 即ちVI群とIII群, VI

表 4

末梢血液像 (Rat)

				Normal	Hypo	E. 10	E10 + Hy	E. 50	E. 50 + Hy
好中球	幼分	若葉	型核	0	0	0	0	0	0
				39.6	40.4	43.5	53.6	57.5	49.6
好	エ	オ	ジ	0.3	2.0	6.4	3.6	0.5	1.4
好	塩	基	球	0	0	0	0	0	0
リ	ン	パ	球	56.3	57.6	48.8	42.4	39.0	45.0
単	核		球	2.7	0	0.3	0.4	3.0	2.0
有	核	赤	血球	0	0	0	0	9.7	2.8

骨髓血液像 (Rat)

				Normal	Hypo	E. 10	E. 10 + Hy	E. 50	E. 50 + Hy
骨 髓 母 細 胞				1.2	2.6	0.7	4.8	6.4	7.9
好中球	前	骨 髓	球	11.9	17.9	21.7	9.2	13.7	17.8
	骨	髓	球	13.0	12.0	5.3	5.5	1.5	14.6
	後	骨 髓	球	20.4	28.6	10.7	26.0	1.2	20.3
	分	葉	核	38.3	30.6	50.9	46.2	19.8	16.9
小 計				86.6	89.1	88.6	86.9	39.2	69.6
好エオジン球	前	骨 髓	球	0.8	0.9	1.3	0.9	0	1.2
	骨	髓	球	2.6	1.8	1.7	1.8	0.7	2.8
	後	骨 髓	球	1.6	1.3	1.9	3.9	3.0	5.8
	分	葉	核	0.3	0.4	1.7	1.4	1.5	6.5
小 計				5.3	4.4	6.6	8.0	5.2	16.3
巨 核 細 胞				0.4	1.3	2.1	0.4	2.1	0.5
リ ン パ 球				2.7	1.3	1.0	0.7	0.7	1.7
単 核 球				0	0	0	0	0.7	0.3
フ ラ ズ マ 細 胞				0.8	1.3	1.0	1.1	46.7	3.7
有 核 赤 血 球 %				318	543	221	566	343	357
Mitotic Index %				9	5	16	9	2	17

Normal : 無処置群

Hypo : Hypo 2.0gm/kg/d 7日間連日投与群

E 10 : Endoxan 10mg/kg/d 7日間連日投与群

E 10 + Hy : Endoxan 10mg/kg/d 7日間 } 連日併用投与群
Hypo 2.0gm/kg/d 7日間 }

E 50 : Endoxan 50mg/kg/d 隔日3回投与群

E 50 + Hy : Endoxan 50mg/kg/d 隔日3回 } 併用投与群
Hypo 2.0gm/kg/d 6日間連日 }

群とV群との間には白血球分類上顕著な差は認められなかつた(表4)。しかしⅢ群及びⅣ群即ち Endoxan 50mg/kg/d 隔日3回投与群及びそれに Hypo を併用した群では有核赤血球の出現が認められ、且つこの出現は Hypo 非併用群に多かつた(表4, 写真7)。骨髓内白

血球に与える NMO の影響に就いての研究によれば、末梢血中有核赤血球の出現は、骨髓荒廢の結果であるとされているので²⁸⁾、本実験に於ける Hypo 併用群と非併用群との有核赤血球出現の差は、両群間の骨髓障害の差を示すものと考えられる。

ii) 骨 髄 像

a) 肉眼的所見：無処置群の骨髓外観は、暗赤色で、ゼラチン状であつたが、Endoxan 50mg/kg/d 隔日3回投与したⅢ群では、この正常の所見は消失し、灰赤色となり、粘稠度も減少していた。Hypo を併用したⅣ群では、外観上無処置と差をつけ難かつた。Ⅴ及びⅥ群でも無処置群との差は認められなかつた。

b) 顕微鏡的所見

無処置群の骨髓像では、骨髓系細胞が96%を占め、非骨髓系細胞は4%に過ぎなかつた。骨髓細胞全体としての Mitotic index は9%であつた。(表4)。Hypo 単独投与群では、無処置群との間に大差を認めなかつた。Endoxan 50mg/kg/d 隔日3回投与したⅢ群では、骨髓有核細胞は著減し、骨髓は Panmyelophthisis 状となり、非骨髓系細胞である Plasma cell が46.7%を占める一方、Mitotic index も2%と著減した(表4, 写真5)。Ⅲ群と同様は Endoxan 投与に更に Hypo を併用投与したⅣ群では、Plasma cell は3.7%に過ぎず、又 Mitotic index は17%となり無処置群よりも増大した(表1, 写真6)。Endoxan 10mg/kg/d 7日間連日投与せるⅤ群では、Plasma cell の占める比率は1.0%であり、無処置群と差は認められなかつた。しかし Mitotic index は16%と増加を示した。又前骨髓球、多核白血球の比較的增加を示し、前骨髓球の細胞顆粒は増加し、胞体の好塩基性、胞体の大きさの増大が認められた(表4, 写真3)。Ⅴ群と同様な Endoxan 投与に更に Hypo を併用したⅥ群では、骨髓系細胞の比率、幼若細胞の細胞性状、Mitotic index 等に関していづれも無処置群及びHypo 単独投与群との間に大差は認められなかつた(表4, 写真1, 2, 4)。即ち骨髓障害の程度は、Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ, Ⅵ群の中では Endoxan 50mg/kg/d 隔日3回投与したⅢ群で最も大であつたが、この骨髓障害の程度はこれと同様な Endoxan 投与に Hypo を併用する事によりⅤ群の Endoxan 10mg/kg/d 7日間投与群のそれに近ずき、又Ⅴ群と同様な Endoxan 投与に Hypo を併用投与したⅥ群の骨髓所見は無処置群の所見に近似して来る事が判明した。

5) 諸臓器組織像、

脾、肝、腎、副腎、睪丸、小腸に就いて組織像を検索したが、脾臓以外には組織障害は見られなかつた。脾臓組織では Endoxan 投与後で Follicle の萎縮と共に、赤髄に著明な充血像が認められたが、Hypo 併用群では、非併用群に比して Follicle の萎縮は軽度であつた(写真8, 9, 10, 11, 12, 13)。

第3節 小 括

ラットに致死量の Endoxan と重量比にして40倍乃至200倍の量の Hypo を併用投与し、生存日数、死亡率、体重変動、白血球変動、血液像、諸臓器組織像に就いてHypoの併用効果を比較検討した。致死量の Endoxan にHypoを併用した場合、即ち総投与量で Endoxan 150mg/kg と Hypo 12gm/kg とを併用投与した場合、非併用群に比較して中毒死亡率、体重減少等は著しく減弱された。又末梢及び骨髓血液像、脾組織像に於いても、その障害の程度は軽度であつた。しかしこの Endoxan と Hypo の組合せでは、末梢白血球減少症に対しては何らの防禦作用も示さなかつた。そこで Endoxan の投与量を減じ、それに種々の量の Hypo を併用投与し白血球減少率を比較検討してみた。

Endoxan 10mg/kg/d 7日間連日投与した群と比較して、それに Hypo 2.0gm/kg/d を7日間併用した群では、白血球減少症に於いて Hypo 併用効果が著明に認められた。更に又、併用すべき Hypo の量が1.0gm/kg或いは0.5gm/kgの少量でも Endoxan 10mg/kg/d 7日間投与によつて惹起されるラットの白血球減少症を阻止し得る事が判明した。即ち Hypo 2.0gm/kg/d を7日間併用した場合には経過観察の全期間(15日間)を通じて白血球減少率は50%以下にはならなかつた。又白血球減少率50%を示す迄に投与し得た Endoxan の総量は、Hypo 非併用群では20mg/kg であつたが、これに Hypo を0.5gm/kg を併用すれば50mg/kg となり、2.5倍の Endoxan を投与し得た。しかし Endoxan と Hypo の投与量の比を上記の如くにした場合でも Endoxan の副作用を完全に防止している訳ではなく、この組合せを長期に亘り行なえばⅦ, Ⅷ群に見る如く副作用の発現を認めるようになった。従つて Endoxan の副作用防止の為に併用すべき Hypo の量としては、Endoxan 10mg に対し Hypo 0.5gm がほぼ限界量と考えられる。

第2章 Endoxan の制癌効果に及ぼす Hypo の影響

本報告の第1章に於いて Hypo の Endoxan に対する中和作用としての副作用軽減効果を確認したが、一方ではこの中和作用が Endoxan の制癌効果を減弱せしめる可能性も考慮されるので、本章では動物腫瘍を用いて、Endoxan の制癌効果に及ぼす Hypo の影響を検討した。

第1節 実験材料及び実験方法

1) 実験材料：i) 動物：生後約2ヵ月の dd 系マウ

ス、雄、体重 20~25gm のものを使用した。一定の固定飼料と水道水を与え、27°C の恒温下で飼育した。

ii) 動物腫瘍：Crocker Sarcoma 180 固型腫瘍を用いた。1961 年塩野義研究室より提供され、それ以後、本学外科学教室研究室にて継代移植せる Sarcoma 180 腹水型腫瘍細胞をマウス腹腔内に約 200 万コ移植し、移植後 8 日目に無菌的に腹水を採取して生理的食塩水にて 0.1cc 中約 500 コの腫瘍細胞を含むよう稀釈した。その 0.2cc をマウス皮下（背部）に接種し、接種後 8 日目に米粒大乃至豌豆大の固型腫瘍を触知せるものを実験に用いた。

iii) 薬剤：Endoxan 及び Hypo は、第 1 章の実験に使用せるものと同様のものを使用した。

2) 実験方法

移植後 8 日目の Sarcoma 180 固型腫瘍担癌マウスの腹腔内に Endoxan 及び Hypo を投与し、腫瘍の発育、延命効果を比較した。この場合の Endoxan 及び Hypo 投与量は、第 1 章、実験 I の Endoxan と Hypo との併用実験に於いて著明な中和作用の認められた Group と同じ投与量を用いた。即ち Endoxan は 50mg/kg/d 隔日 3 回投与し、Hypo は 2.0gm/kg/d を毎日 6 日間投与し

た。尚対照群として無処置、Hypo 単独投与群を置いた。即ち

I 群：無処置群

II 群：Hypo 単独投与群 (Hypo 2.0gm/kg/d 7 日間連日投与群)

III 群：Endoxan 50mg/kg/d 隔日 3 回投与群

IV 群：Endoxan 50mg/kg/d 及び Hypo 2.0gm/kg/d 隔日 3 回、同時にマウス腹腔内に投与し、その翌日即ち隔日 3 回上記 Hypo 量のみをマウス腹腔内に投与せる群

以上 4 群につき腫瘍の大きさと延命効果とを比較検討した。腫瘍の大きさは、腫瘍の長径と短径との積で表現した。

第 2 節 実験成績

I 群では腫瘍は急速な発育を示し、移植後 20~47 日目に全例腫瘍死した (図 33, 34)。平均生存日数は 32.4 日であつた。II 群 Hypo 単独投与群では I 群と同様の発育を示し、移植後 24~38 日目に全例腫瘍死した (図 33, 35)。移植後平均生存日数は 28.8 日であつた。III 群 Endoxan 単独投与群では、腫瘍の発育抑制が著明に認められ、50% のマウスは 68 日以上生存した (図 33, 36)。

主 存 日 数 (Sarcoma 180 担癌マウス)

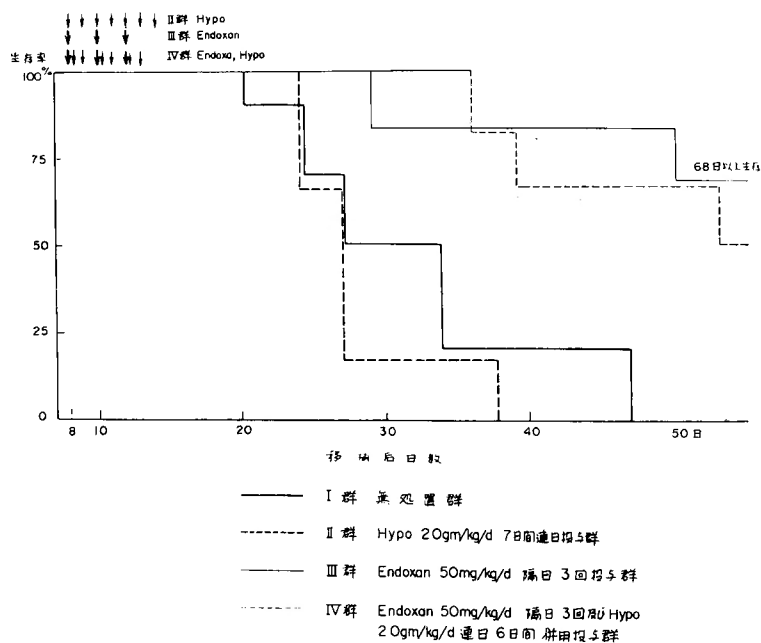


図33

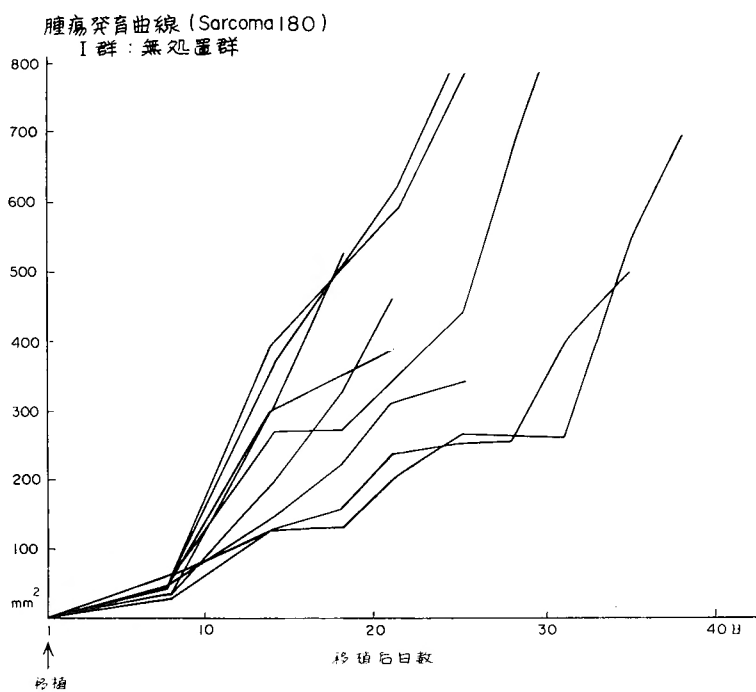


図34

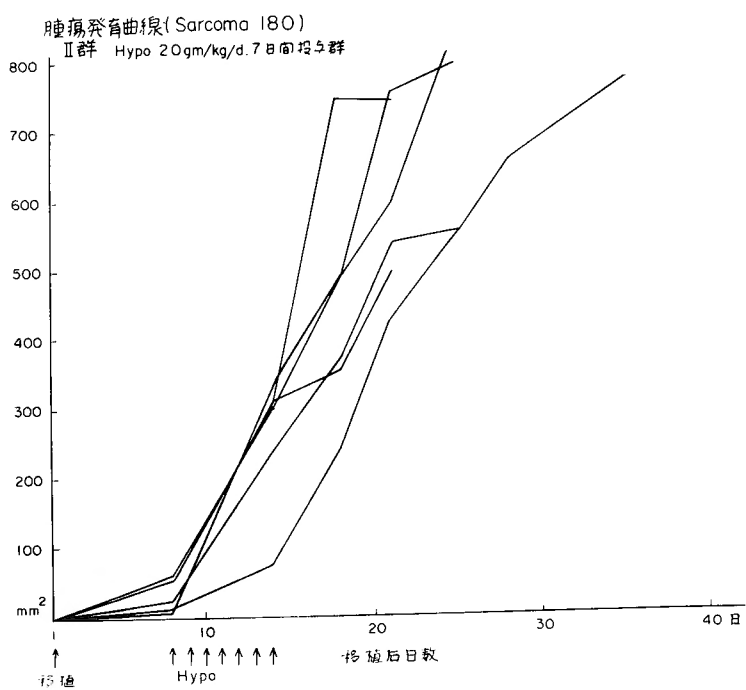


図35

腫瘍発育曲線 (Sarcoma 180)
Ⅲ群 Endoxan 50mg/kg/d 隔日3回投与

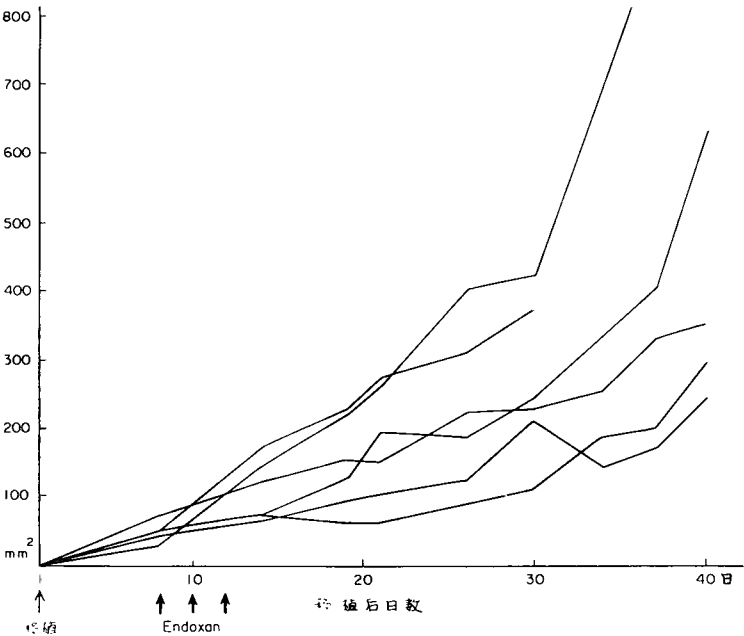


図36

腫瘍発育曲線 (Sarcoma 180)
Ⅳ群 Endoxan 50mg/kg/d 隔日3回13日 Hypo 20gm/kg/d 連日6日間併用投与群

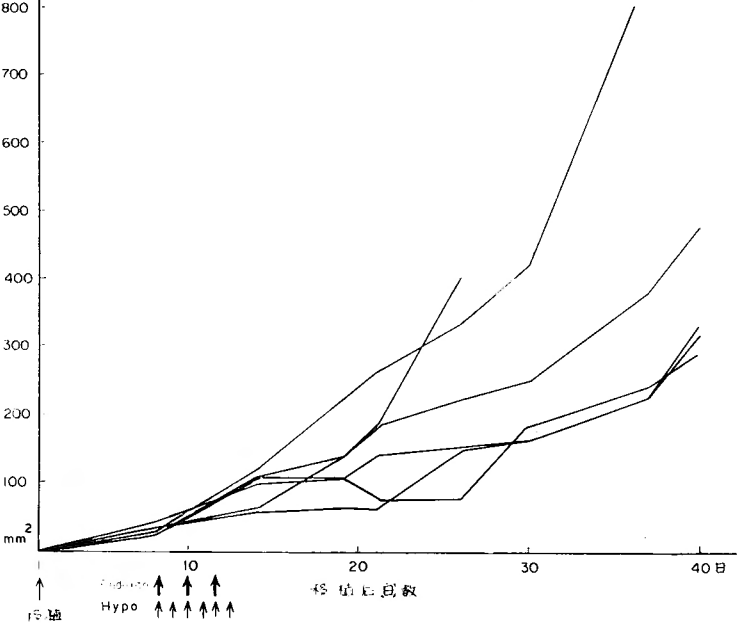


図37

移植後平均生存日数は 62.8 日であつた。Ⅲ群と同様の Endoxan 投与に Hypo を併用投与したⅣ群では、移植後 30 日目より腫瘍死するものが認められたが、67% のマウスは 68 日以上生存した。平均生存日数は 70.3 日であつた (図 33, 37)。

第 3 節 小 括

無処置群及び Hypo 単独投与群では、いずれも旺盛な腫瘍発育を示し、移植後 48 日迄に全例腫瘍死し、両群間には、発育及び生存日数についての差は認められなかつた。Endoxan 単独投与群では著明な腫瘍の発育抑制及び延命効果が認められたが、これに Hypo を併用投与しても、腫瘍の発育、延命効果に著しい影響は来なかつた。即ち本実験に於いて Endoxan の制癌効果は、Hypo を併用投与しても減弱されなかつた。

第 3 章 考 按

Endoxan の中和剤に関する文献は、Hastrup¹⁸⁾ の Endoxan と Cysteamine との併用療法の一編をみるのみで、Hypo に関しての報告は見出す事は出来なかつた。そこでラットに Endoxan と Hypo とを併用投与し、Endoxan による中毒症状、末梢血及び骨髓血、諸臓器組織の障害を示標として Hypo の中和作用を検討した。

Endoxan 50mg/kg/d 隔日 3 回投与した場合の中毒症状は、これに Hypo 2.0gm/kg/d 6 日間併用投与する事により著明に軽減された。即ち死亡率の低下、体重減少軽減、骨髓及び脾臓組織の障害軽減が確認された。

Endoxan LD 50 を投与したラット骨髓に就いての Pliess の研究によれば、このときの骨髓細胞の変化は、次の 4 Hphase に分類される³⁹⁾。

I-phase : Irritations phase

II-phase : Phthiase phase

III-phase : Regenerations phase

IV-phase : Normalisierungs phase

I-phase では、骨髓細胞の Reifungshemmung, Ausschwemmungshemmung, Mitosedauer の延長, Eintritt in die Mitose の障害が起る。これらの結果、細胞の膨大化、胞体の好塩基性の増大、アズール顆粒増加、骨髓細胞の減少、Mitoseindex の上昇、多核白血球増加を来すと云つてゐる。II-phase では、骨髓は Panmyelophthiase 状となり、骨髓細胞は著明に減少するが、Plasmazellen, Retikulumzellen 等の非骨髓細胞の比較的增加を来すと述べてゐる。本報告の第 1 章実験 I に於けるⅢ群即ち Endoxan 50mg/kg/d 隔日 3 回投与群の骨髓所見は、Pliess の II-phase の所見に一致し、Ⅳ群 En-

doxan 10mg/kg/d 7 日間投与群の骨髓所見は、I-phase の所見に類似している。Hypo を併用投与する事によりⅢ群のこの骨髓障害の程度は、Ⅳ群のそれに近づき、Ⅳ群の所見は、これに Hypo を併用する事により無処置群の所見に近似して来る事が判明した。又、白血球減少症に関しては、Endoxan 10mg/kg に対し Hypo 0.5 gm/kg ~ 1.0 gm/kg を併用投与すれば、白血球の 50% 減少率を示す迄に投与し得る Endoxan 総量を 2.5 倍に増量し得る事が判明した。併用する Hypo の量を増して 2.0 gm/kg とすれば、Endoxan 10mg/kg 1 週間連日投与しても白血球減少率は 50% 以内にとどまつた。一方 Crocker Sarcoma 180 担癌マウスの治療実験に於いては、Hypo を併用しても Endoxan の制癌効果そのものは減弱されないと云う成績を得た。

1) Endoxan と Hypo との中和機転に就いて

既に述べた如く、NM の抗腫瘍性は、その生物学的活性基である β -Chloroethyl 基のイオン化により、不安定な Ethylenimonium 基を形成し⁴⁾²³⁾²⁴⁾³⁸⁾、これが核蛋白、核酸、代謝酵素系の Anion 原子団である Sulfhydryl, Carboxyl, Imine, Amino 基等と反応し、核酸、核蛋白をアルキル化する事にあると考えられている¹⁾²⁾⁴⁾²³⁾²⁴⁾³¹⁾³⁴⁾⁵⁴⁾⁵⁸⁾。Golumbic, Barron らによれば、Hypo はこの Ethylenimonium 基と in vitro で直接的に、速やかに反応し、NM を不活性化すると云われている⁴⁾¹⁷⁾。一方 in vitro ばかりでなく、in vivo に於いても、実験的、臨床的に NM に対する Hypo の中和作用が確認されており、NM の副作用防止に Hypo が有効であると報告されている¹⁰⁾¹⁹⁾³⁷⁾⁴²⁾⁴⁹⁾。石館は Sulfhydryl 基を有する化合物と HN 2 型化合物とは一種の配合禁忌物質に届するものであると云つてゐる²³⁾。一方 Endoxan は in vivo で HN 2 となる NM の cyclic phosphoramidate ester であつて、その作用機序は NM と全く同一と考えられている³⁾⁷⁾⁵⁷⁾。従つて Endoxan と Hypo との中和反応は、生体内に於いて解環されて形成された active form である HN 2 との直接的な化学的中和反応によるものとする事が出来る。

2) 制癌効果に及ぼす Hypo の影響に就いて

アルキル化剤と中和剤との併用療法を行なつた諸家の報告によれば、制癌剤の副作用は中和剤併用によつて防禦されるが、制癌効果は減弱されなかつたと云つてゐる¹⁸⁾³⁶⁾³⁷⁾⁴⁶⁾⁵⁶⁾。即ち Hastrup は、Endoxan と Cysteamine とを併用投与した AKA マウスの N-J-Leukemie Tumor 及び C3H マウスの Adenocarcinoma PBH の治療実験では、むしろ Cysteamine 併用群の方に延命

効果が著明であつたと述べ³⁸⁾, Perese は, Glioblastoma multiforme の NM 療法の効果は Hypo を併用しても, 病理組織学的にも, 又臨床的にも減弱されなかつたと報告している³⁷⁾. 又 Weisberger は, NM と L-Cysteine 併用療法を, Hodgkin 氏病, 白血病, 食道癌等に行ない, 白血球減少症を防止し得たと共に, 充分な制癌効果を得ている⁵⁶⁾. 本実験に於いても Endoxan と Hypo との併用療法で, Endoxan の制癌作用を減弱する事なく Sarcoma 180 を治療し得ると云う成績を得た. 我々の研究も含めて, 他の中和剤併用療法の研究では, 中和剤の併用により制癌剤の副作用を軽減させる事が出来, しかも制癌剤の制癌効果そのものには何らの減弱をもたらしていない点に就いての証明は未だ明らかにされていない. 榊原は Cysteine 単独で白血球増多作用があると云い⁴⁴⁾, 日比野は白血病の治療に於いて Alanin NM と Cysteine を同時に投与すると, 幼若細胞に比べて成熟細胞は Alanin NM による侵襲に対し防禦されやすいと云う様相を呈すると述べている²⁰⁾. 一方桜井らは, NMO と cysteine と併用した場合, 夫々の薬剤につき, 生体内分布濃度の差があり, cysteine に就いて云えば腫瘍組織よりも骨髄内により高濃度に, より長時間保たれるのではないかと述べている⁴⁶⁾. 又 Weisberger も Cysteine の選択性は, 腫瘍に対するよりも骨髄に対する方が強いと述べている⁵⁶⁾. Hypo の場合も cysteine の場合と同様に, Endoxan と併用した場合, 制癌効果を減弱する事なく骨髄障害作用を防止し得たが, これは Hypo が Cysteine と同様に骨髄に強い選択性を示すためかも知れないが, この点の直接の証明は未だ得られていない.

Wilmans らは, 種々のアルキル化剤の DC84 による白血球減少率は, NM では 95%, NMO では 44%, Endoxan では 1.2% であり, この 3 者の中で Endoxan の腫瘍選択性が最も高いと述べている⁵⁷⁾. Brock は吉田肉腫担癌ラットを用い Endoxan, NMO, TESPA の化学療法係数 DL5/DC 95 を比較しているが, それによると Endoxan は 4.3, NMO は 2.7, TESPA 0.65 で, Endoxan の化学療法係数が最も高いと報告し, 更に Endoxan の active form への変化は, 専ら腫瘍組織内で行なわれると考えるべきだと述べている⁷⁾. Holzer によれば, 腫瘍組織内 DPN 濃度の減少は, 投与された薬剤の抗腫瘍性と平行するが²²⁾, Brock, Hohorst は, Endoxan 投与時の Jensen 肉腫担癌ラット骨髄及び腫瘍組織内 DPN 濃度を比較すると, 腫瘍内 DPN は著しく低下するが, 骨髄内濃度は正常である事から, Endo-

xan の腫瘍選択性は極めて高いと述べている⁸⁾. これらの事実から Endoxan の腫瘍選択性及び抗腫瘍性は極めて高いと考えられるので, 仮りに Hypo により Endoxan の抗腫瘍性が多少中和されたとしても, 充分量の Endoxan が投与されておれば, 臨臨床的な制癌効果は減弱されるに至らないものと推測される.

3) 臨床的投与法及び投与量に就いて

Hypo は一般に水銀, 鉛, 砒素, 青酸等の中毒の解毒剤として用いられ, その使用法は, 10%水溶液として静脈内に投与されているが, 4 gm/kg 迄は殆んど副作用がないと云われている²¹⁾. アルキル化剤に対する中和剤としての Hypo の投与必要量は報告者によつて異なっている. Schultz, Ross らは, 動脈内投与法により NM 1~2 mg/kg を投与し, それに対し Hypo 0.2~0.4 gm/kg を静脈内に投与しているが⁴²⁾⁴⁴⁾, Perese は, NM 5~10 mg/kg に対し, Hypo 0.1 gm/kg³⁷⁾, 藤森は NMO 10 mg/kg に対し Hypo 2.5 gm/kg を併用している¹⁴⁾¹⁵⁾. 本報告の実験に於いては, 制癌剤と Hypo を腹腔内に投与したが, Endoxan 10 mg/kg に対し Hypo 0.5 gm/kg 以上の併用, 同時投与で白血球減少症を防止し得た. 又 Endoxan 150 mg/kg に対し Hypo 12 gm/kg の併用投与で中毒死亡率を著しく低下せしめた. 即ち Endoxan に対する Hypo の投与量に, 白血球減少症防止のためには, 重量比で 50 倍と云う事になる. 本実験に於いては, Endoxan 及び Hypo は同時に且同一場所投与したが, 制癌効果の減弱は認められなかつた. しかしアルキル化剤の作用は非可逆的であるから⁴⁾²³⁾³⁸⁾, 白血球減少症防止の目的では骨髄組織にアルキル化剤が結合する前に Hypo が与えられる事が必要である. 即ち Hypo はアルキル化剤の投与に先立つて投与される事が好ましいと考えられる. 一般に中和剤併用療法は, 制癌剤を Intra-arterial infusion method, 又は Perfusion method で与える場合に特に意味がある. 白羽, 酒井らは動注法によつて, 静脈投与時よりも, 約 2 倍の制癌剤を投与出来ると述べているので⁴³⁾⁵⁰⁾⁵¹⁾, 私の実験成績を成人 (体重 50 kg として) に適用して Endoxan の投与量とこれに併用する Hypo 量を算出すれば次の如くとなる.

1) Endoxan 静脈内投与の場合

Endoxan 100 mg/d 静注と Hypo 5~20 gm/d 静注併用.

2) Endoxan 動脈内投与の場合

Endoxan 200~300 mg/d の動注と, Hypo 5~20 gm/d の静注併用.

Hypo を 10%水溶液として投与するとすれば, 50~

200cc/d を与えれば良い事になる。

第1篇及び第2篇の総括及び結論

ラットはマウスの腹腔内に TESPA 或は Endoxan と Hypo とを同時に投与し、TESPA 又は Endoxan による中毒現象を示標として Hypo の中和作用を検討した。又 Endoxan に就いてはその制癌効果に及ぼす Hypo の影響を Crocker Sarcoma 180 を用いて検討し次の結論を得た。

1) in vivo では TESPA に対する Hypo の中和作用は認められなかった。

2) in vitro では、TESPA 溶液を 37°C 孵卵器中に置いた場合、80倍の Hypo を混合しても、TESPA の毒性を著しく減弱するのに1時間以上を要した。

3) 要するに TESPA の中和療法剤として Hypo を臨床的に使用する事が出来ない事が判明した。

4) Endoxan 50mg/kg/d 隔日3回投与し、それに Hypo 2.0gm/kg/d 6日間併用したところ、Endoxan の毒性は著しく減弱し、中毒死亡率、造血機能障害、組織障害の程度は軽減した。

5) Endoxan 10mg/kg/d の投与によつて起るラットの白血球減少症は、Hypo の量を 0.5gm/kg/d に減じても相当の程度迄防止し得た。50%白血球減少率を来す迄には、Endoxan 総量として2.5倍量を投与し得る事が判明した。しかし上記量を1週間投与すれば、白血球減少は著明となり、Hypo 非併用群との差は少なくなつた。

6) Endoxan 10mg/kg/d に対し Hypo を 2.0gm/kg/d の量だけ併用すれば、1週間の連続投与後でも白血球減少率は50%以内にとどめる事が出来た。

7) Endoxan の Crocker Sarcoma 180 固型腫瘍に対する制癌効果は、Hypo を併用投与しても減弱されなかった。

8) Hypo そのものを、2.0gm/kg/d 7日間連日投与しても、ラットに何の副作用も現われなかった。

要するに Endoxan と Hypo とを併用すれば、制癌効果の減弱を伴わずに副作用を軽減出来、しかもこの方法により同程度の副作用をもたらす迄には、従来よりも遙かに大量の Endoxan を投与する事が出来る。

本論文の要旨は第94回近畿外科学会において発表した。稿を終るに臨み、終始懇切なる御指導及び御校閲を賜った荒木千里教授並びに横山育三助教授にあつく感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Alexander, P., Fox, M., Stacy, K. A. and Smith, L. F. : The reactivity of radiomimetic compounds. I. Cross-linking of proteins. *Biochem. J.*, **52** : 177, 1952.
- 2) Alexander, P., Swarebort, A. and Stacy, K. A. : The reactivity of radiomimetic compounds. III. Cross-linking of nucleoprotein. *Biochem. Pharmacol.*, **2** : 133, 1959.
- 3) Arnold, H., Boure-seaux, F. and Brock, N. : Neuartige Krebs-chemotherapeutika aus der Gruppe der zyklischen N-Lost-Phosphamid-ester. *Naturwiss.*, **45** : 61, 1958.
- 4) Barron, E. S. G., Bartlett, G. R., Miller, Z.B., Meyer, J. and Seegmiller, J. E. : The effect of nitrogen mustards on enzymes and tissue metabolism. I and II. *J. Exp. Med.*, **87** : 489, 503, 1948.
- 5) Bateman, J. C. : Chemotherapy of solid tumors with triethylene thiophosphoramide. *New Engl. J. Med.*, **252** : 879, 1955.
- 6) Bizrbrauer, U. : Die Einwirkung der Cytostatika Endoxan und Triäthyleniminobenzochinon auf das Knochenmark und periphere Blut der Ratte. *Folia haematologica, Neue Folge*, **5** : 143, 1961.
- 7) Brock, N. : Zur pharmakologischen Charakterisierung zyklischen N-Lost-Phosphamidester als Krebs-Chemotherapeutika. *Arzneim.-Forsch.*, **8** : 1, 1958.
- 8) Brock, N. and Hohorst, H. J. : zur Frage der Knochenmarkschädigung durch cancerotoxische Substanzen. *Klin. Wschr.*, **38** : 69, 1960.
- 9) Brock, N. and Hohorst, H. J. : Reaktion von Bis-(β -Chloräthyl)-amin in vitro und in vivo.
- 10) Callaway, S. and Pearce, K. A. : Protection against systemic Poisoning by mustard gas, di-(β -Chloroethyl)-sulfide, by Sodium thiosulfate and Thioctot in the albino rat. *Brit. J. Pharmacol.*, **13** : 396, 1958.
- 11) Creech, O., Jr., Krentz, E. T., Ryan, R. E. and Winblad, J. N. : Regional Perfusion Utilizing an Extracorporeal circuit. *Ann. Surg.*, **148** : 616, 1958.
- 12) Creech, O. Jr., Krentz, E. T., Ryan, R.E. and Winblad, J. N. : Experiences with the Isolation-Perfusion Techniques in the treatment of cancer. *Ann. Surg.*, **149** : 627, 1959.
- 13) Druckrey, H. and Reabe, S. : Organspezifische Chemotherapie des Krebs. (Prostata-Karzinom) *Klin. Wschr.*, **30** : 882, 1952.
- 14) 藤森正雄, 坂内五郎, 泉雄 勝, 森田 茂 : 制癌剤の局所灌流法並びに局所高濃度動注法の研究. (第一報). *日. 癌. 会. 記事*, **22** : 35, 1962.

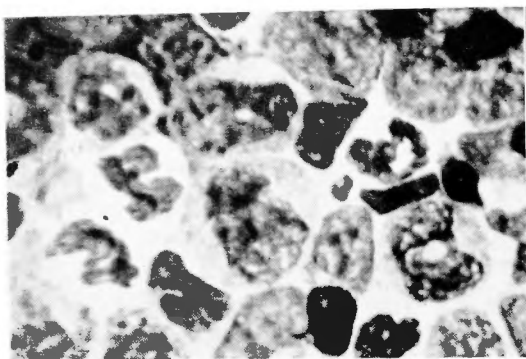
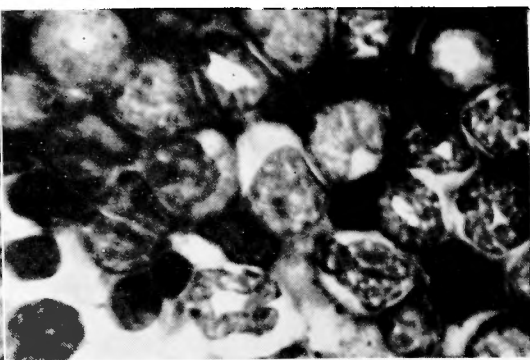
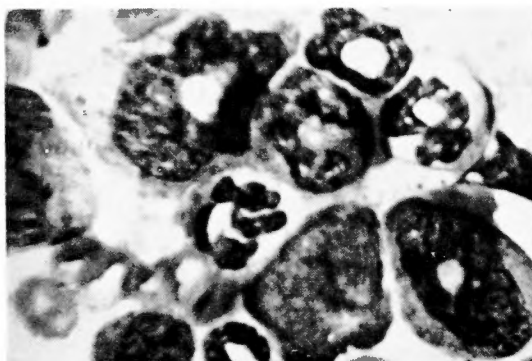
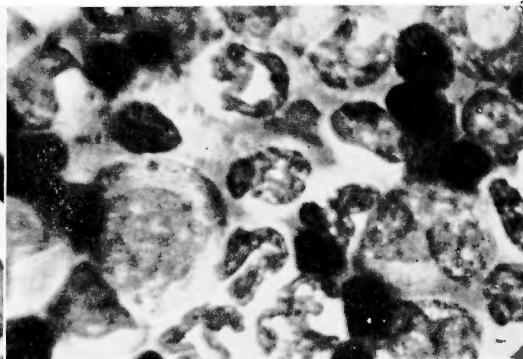
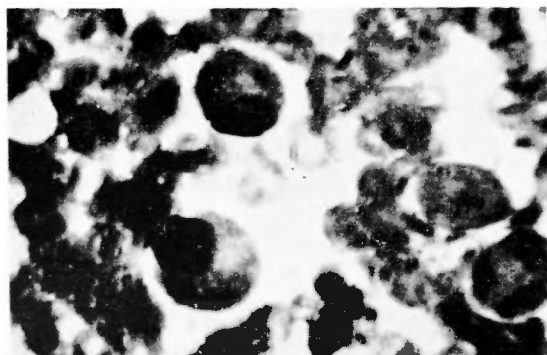
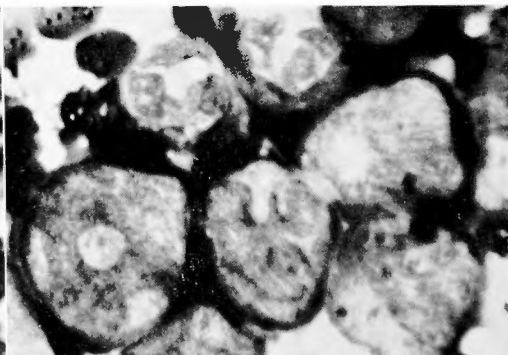


写真1 無処置ラット骨髓

写真2 Hypo 2.0gm/kg/d 7日間投与ラット
骨髓写真3 Endoxan 10mg/kg/d 7日間投与ラッ
ト骨髓写真4 Endoxan 10mg/kg/d及びHypo 2.0gm/kg/d
7日間併用投与ラット骨髓写真5 Endoxan 50mg/kg/d 隔日3回投与
ラット骨髓写真6 Endoxan 50mg/kg/d 隔日3回及び
Hypo 2.0gm/kg/d 6日間投与ラッ
ト骨髓

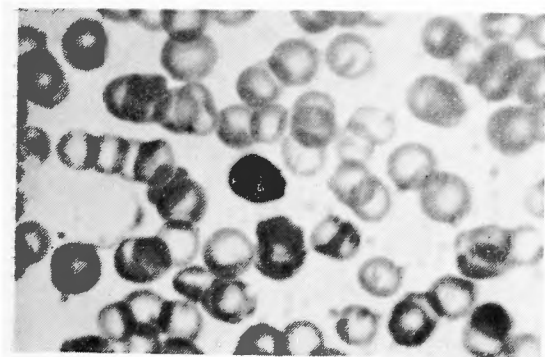


写真7 Endoxan 50mg/kg/d 隔日3回投与
ラット末梢血中有核赤血球

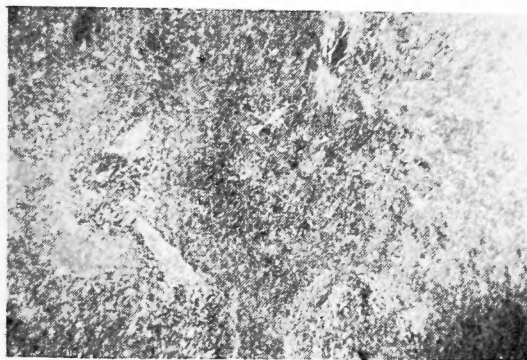


写真8 無処置ラット脾組織

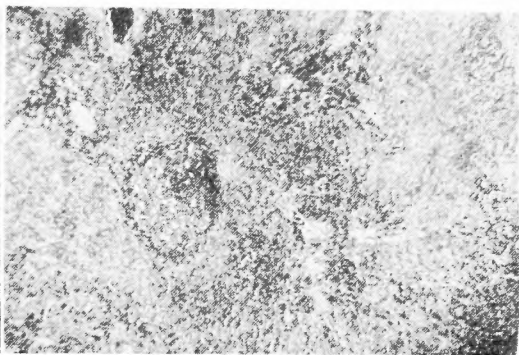


写真9 Hypo 2.0gm/kg/d 7日間投与
ラット脾組織

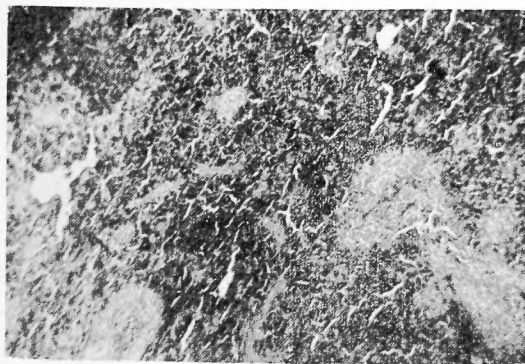


写真10 Endoxan 10mg/kg/d 7日間投与
ラット脾組織

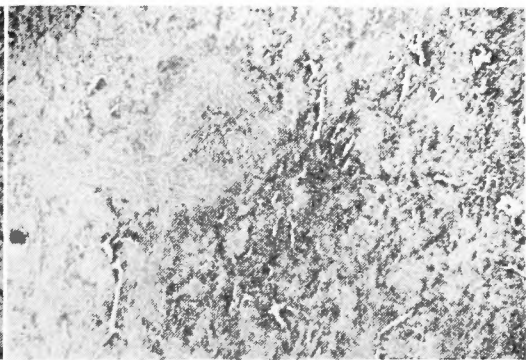


写真11 Endoxan 10mg/kg/d 及びHypo
2.0gm/kg/d 7日間投与ラット脾組織

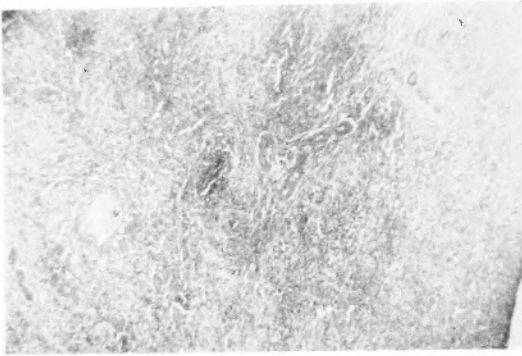


写真12 Endoxan 50mg/kg/d 隔日3回投与
ラット脾組織

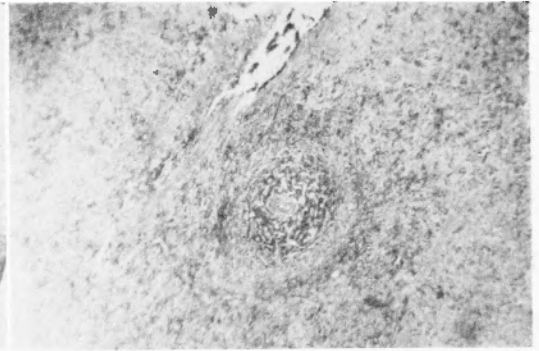


写真13 Endoxan 50mg/kg/d 隔日3回及び
Hypo 2.0gm/kg/d 6日間投与ラット
脾組織

- 15) 藤森正雄, 坂内五郎, 泉雄 勝, 森田 茂, 安斎徹男, 貞光 宏: 制癌剤の局所灌流法並びに動注法の研究. 特に乳癌, 胃癌を中心として手術, 17 : 477, 1963.
- 16) Gilman, A., and Philips, F. S. : The biological actions and therapeutic applications of the β -Chloroethylamines and sulfides. *Science*, **103** : 409, 1946.
- 17) Golumbic, C., Frutkin, J. S. and Bergman, M. : Chemical Reactions of the Nitrogen mustard gases. 1, The transformations of methylbis (β -Chloroethyl)-amines in water. *J. org. Chem.*, **11** : 518, 1946.
- 18) Hastrup, J. : Die Kombinierte Behandlung homologer Mäuse-Tumoren mit Cysteamin und Endoxan. *Arzneim.-Forsch.*, **11** : 177, 1961.
- 19) Hatiboglu, I. : Prevention of the toxicity of nitrogen mustard (HN_2) by Sodium thiosulfate (ST). *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, **3** : 117, 1960.
- 20) 日比野 進: 白血病の化学療法, 癌の化学療法, 第2版 (医歯薬出版), 224, 1957.
- 21) 平出須吉郎: 中毒と解毒. (南江堂), 1949.
- 22) Holzer, H. and Kröger, H. : zur Mechanismus der Wirkung von B 518 (Endoxan-ASTA) auf das Jensen-Sarkom und zur Hemmung der Chemotherapie von Tumoren durch das Vitamin Nicotinsäureamid. *Klin. Wschr.*, **36** : 677, 1958.
- 23) 石館守三: Nitrogen mustard 及びその N-oxide の作用機転に関する知見. 癌の化学療法, (医歯薬出版), 55, 1957.
- 24) 石館守三: アルキレーティング エージェントについて, 診療, **17** : 21, 1961.
- 25) Klopp, C. T., Alford, T. C., Bateman, J., Berry, G. N. and Winship, T. : Fractionated intraarterial cancer chemotherapy with methyl-bis-amine hydrochlorides. A preliminary report. *Ann. Surg.*, **132** : 811, 1950.
- 26) Klopp, C. T., Bateman, J., Berry, N., Alford, C. and Winship, T. : Fractionated Regional Cancer Chemotherapy. *Cancer Res.*, **10** : 229, 1950.
- 27) 小山善之, 林 康之, 木村英和: P³²-標識 TSPA (Triethylene thiophosphoramide) に依る臨床的並びに実験的研究, 癌の臨床, **8** : 293, 1962.
- 28) 楠本博一: 抗癌剤の骨髄内白血球に与える影響に関する研究. (中編), Nitrogen mustard N-oxide (ナイトロミン) の動脈内挿管投与に依る骨髄内白血球像の変化と, その試験管内実験について, 大阪市大医誌, **7** : 121, 1958.
- 29) Lawrence, W., Jr., Kuehn, P., Mori, S., Poppel, J. W. and Clarkson, B. : Regional perfusion of the pelvis: consideration of "Leakage" problem. *Surg.*, **1** : 248, 1961.
- 30) Mellett, L. D. and Woods, L. A. : The comparative physiological disposition of thio-TEPA and TEPA in the dog. *Cancer Res.*, **20** : 521, 1960.
- 31) 三浦義彰: アルキリ化剤の作用機序. 癌の生化学, (医学書院), 248, 1960.
- 32) Nadkarni, M. V., Goldenthal, E. I. and Smith, P. K. : The distribution of radioactivity following administration of Triethylenephosphoramide-P³² in tumor-bearing and control mice. *Cancer Res.*, **17** : 1956.
- 33) 中村卓次: Methyl- (bis- β -Chloroethyl)-amine-N-oxide 及び Iso-amyl- (bis- β -Chloroethyl)-amine-N-oxide の悪性腫瘍に対する動脈注射療法に関する研究. 日. 外. 誌, **55** : 385, 1951.
- 34) Noritane Harada and Kosai Yamana : Action of Nitrogen mustard on Desoxyribonucleic acid and the several protective agents. *Nagoya J. med. Sci.*, **14** : 266, 1951.
- 35) Paulet, G. and Chappet, J. : De L'activité Anti-Ypérite de Quelques Dérivés de la Thiourés. *Arch. int. pharmacodyn.*, **106** : 1, 1956.

- 36) Peczenik, O. : Influence of Cysteinamine, Methylamine and Cortisone on the toxicity and activity of nitrogen mustard. *Natur*, **172** : 45, 1953.
- 37) Perese, D.M., Day, C.E. and Chardack, W.M. : Chemotherapy of brain tumors by intra-arterial infusion. *J. Neurosurg.*, **19** : 215, 1962.
- 38) Philips, S. : Recent contributions to the Pharmacology of bis-(2-haloethyl)-amines and sulfides. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **99** : 281, 1950.
- 39) Pliess, G. and Fassbender, D. : Die Wirkung Sublethaler Dosen von Endoxan auf die Haemopoese der Ratte. *Arzneim. -Forsch.*, **11** : 179, 1961.
- 40) Rall, D. P., Kelly, M. G., Ogara, R.W., Shnider, B. I. and Zubrod, C. G. : Toxicity of S,2-Aminoethylisothiuronium (AET) and its effect on nitrogen mustard toxicity in normal and tumor-bearing mice. *J. Pharm. exp. Therap.*, **122** : Nr. 1, 1958.
- 41) Rhoads, C. P. : Nitrogen mustard in treatment of neoplastic disease. "Official statements." *J. Amer. Med. Ass.*, **131** : 656, 1946.
- 42) Ross, C. A., Carberry, D. M. and Kraus, G. E. : Protection against systemic toxicity due to Nitrogen Mustard. *Surg. Forum*, **11** : 43, 1960.
- 43) 酒井克治 : Nitrogen mustard N-oxide の動脈内挿管投与に関する実験的研究, 日. 外. 宝, **25** : 727, 1956.
- 44) 榑原栄一 : 含アミノ酸の生物学的研究第2報, シスチンの血液像に及ぼす影響, その6, 白血球像に及ぼす影響, 日. 血. 会. 誌, **1** : 88, 1947.
- 45) 桜井欽夫, 松井英一 : Nitromin に依る Wistar 系ラットの白血球減少に対する各種 Sulfhydryl 化合物の影響, 癌, **45** : 539, 1954.
- 46) 松井欽夫, 松井英一 : Nitromin と Cysteine の併用時に於ける吉田肉腫ラットの生命延長について, 癌, **47** : 337, 1956.
- 47) Schultz, P. E., Bonus, R. L., Salkin, M. S. and Scanlon, E. F. : The in vivo and in vitro neutralization of nitrogen mustard for use in cancer chemotherapy perfusion. *Surg. Gyn. and Obst.*, **121** : 91, 1962.
- 48) Shay, H., Zarafonitis, C., Smith N., Woldow, I. and Sun, D. C. H. : Treatment of leukemia, with triethylene thiophosphoramidate (thio-TEPA) *Arch. Int. Med.*, **92** : 628, 1953.
- 49) Shingleton, W. W., Parker, R. T. and Mahaley, M. S. : Abdominal perfusion of cancer chemotherapy with hypothermia and hyperthermia. *Surg.*, **1** : 260, 1961.
- 50) 白羽弥右衛門 : 抗癌剤の動脈内挿管投与, 癌の臨床, **2** : 534, 1956.
- 51) 白羽弥右衛門 : 制癌剤の局所性投与法, 外科診療, **6** : 60, 1962.
- 52) Stehlin, J. S., Jr., Clark, R. L., Jr., White, E. C., Healey, J. E., Jr., Dowey, W. C. and Beersteches, S. : The Leakage factor in regional perfusion with chemotherapeutic agents. *Arch. Surg.*, **80** : 934, 1960.
- 53) Sullivan, R. D., Miller, E. and Sikes, M. P. : Antimetabolite-metabolite combination cancer chemotherapy. *Cancer*, **12** : 1248, 1959.
- 54) Toshiro Shimizu : The mode of action of nitrogen mustard-N-oxide on various enzymes. *Nagoya J. Med. Sci.*, **15** : 159, 1952.
- 55) Voegtlin, C., Dyer, H. A. and Leonard, C. S. : On the Specificity of the so-called arsenic receptor in the higher animals. *J. Pharma. exp. Therap.*, **37** : 277, 1925.
- 56) Weisberger, A. S., Heinle, R. W. and Levine, B. : The effect of L-Cysteine on Nitrogen mustard therapy. *Amer. J. Med. Sci.*, **224** : 201, 1952.
- 57) Wilmanns, H. : 悪性腫瘍の化学療法, ホルモン剤とアルキル化剤との伝搬型について -Honvan から Endoxan へ, 癌の臨床, **6** : 203, 1960.
- 58) Wheeler, G. P. : Studies related to the mechanisms of action of Cytotoxic alkylating agents : A review. *Cancer Res.*, **22** : 651, 1962.
- 59) Woodhall, B., Pickbell, K. L., Georgiade, N.G., Mahaley, M. S. and Dukes, H. T. : Effects of Hyperthermia upon cancer chemotherapy, Application to external cancer of Head and Face Structures. *Ann. Surg.*, **151** : 750, 1960.
- 60) 山本 藏, 岩田平太郎 : 制癌剤の副作用に対する薬理学的考察, 最近医学, **13** : 2804, 1958.
- 61) 山本 正, 山岡静三郎 : 癌の化学療法剤, 癌研究の進歩, 第2版. (医学書院), 822, 1960.