

ヌードマウス継代移植ヒト膀胱癌を用いた cis-Diamminedichloroplatinum (II) を 主剤とする非交差耐性同調多剤併用化学療法の研究

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 吉田 修教授)

山 内 民 男*
岡 田 謙 一 郎
吉 田 修

“NON-CROSS-RESISTANT” SEQUENTIAL COMBINATION CHEMOTHERAPY CONSISTING OF CIS-DIAMMINE- DICHLOROPLATINUM (II) MAINLY, BASED ON SYNCHRONIZATION THEORY, FOR HUMAN BLADDER CANCER XENOGRAFTS IN ATHYMIC NUDE MICE

Tamio YAMAUCHI, Kenichirou OKADA and Osamu YOSHIDA

From the Department of Urology, School of Medicine, Kyoto University

(Chairman: Prof. O. Yoshida)

We examined the chemotherapies with cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP) alone and in combination, using the human bladder cancer xenografts (BT-8 and BT-11 strains) in athymic nude mice (BALB/C), to establish the most effective and useful method for urothelial cancer in clinical use. First, to assess the anti-tumor activities of single-drug and our devised VPM or CisCF combination chemotherapies, experiments were done using the BT-8 strain bladder cancer (transitional cell carcinoma and grade III). The schedule and dosage of each chemotherapy were as follows.

Vincristine (VCR): 0.06 mg/kg, days 1–6, peplomycin (PEP): 0.9 mg/kg, days 1–6, methotrexate (MTX): 0.6 mg/kg, days 1–6, cytosine arabinoside (Ara-C): 3 mg/kg, days 1–6, 5-fluorouracil (5-FU): 30 mg/kg, days 1–6, adriamycin (ADM): 3 mg/kg, days 1–6, cyclophosphamide (CPM): 10 mg/kg, days 1–10, and CDDP: 2.5 mg/kg, days 1–6. These were for single-drug chemotherapies. The VPM combination consisted of VCR (0.06 mg/kg, days 1 and 4), PEP (0.3 mg/kg, days 1–6) and MTX (0.3 mg/kg, days 2, 3, 5 and 6), and the CisCF combination consisted of CDDP (2.5 mg/kg, days 1 and 4), Ara-C (3 mg/kg, days 1 and 4) and 5-FU (15 mg/kg, days 2, 3, 5 and 6).

The control group was given normal saline of 0.1 ml/20 g body weight, intraperitoneally. All anti-cancer drugs were also given intraperitoneally.

Secondly, to assess the anti-tumor activities of CDDP alone and various modes of combination chemotherapies with or without CDDP, the following experiments were done using the BT-11 strain bladder cancer (a mixed type of transitional cell carcinoma and squamous cell carcinoma). CDDP: 2.5 mg/kg, days 1–6. VPM×2: VCR (0.04 mg/kg, days 1, 4, 8 and 11), PEP (0.2 mg/kg, days 1–4) and MTX (0.2 mg/kg, days 2, 3, 5, 6, 9, 10, 12 and 13). CisCF×2: CDDP (2.5 mg/kg, days 1 and

* 現: 財団法人癌研究会附属病院泌尿器科
(部長: 河合恒雄)

8), Ara-C (3 mg/kg, days 1, 6, 8 and 13) and 5-FU (30 mg/kg, days 3, 4, 5, 10, 11 and 12).

VPM-CisCF (I): VCR (0.04 mg/kg, days 1 and 4), PEP (0.2 mg/kg, days 1-7), MTX (0.2 mg/kg, days 2, 3, 5 and 6), CDDP (2.5 mg/kg, day 8), Ara-C (3 mg/kg, days 8 and 13), and 5-FU (30 mg/kg, days 10-12). VPM-CisCF (II): VCR (0.06 mg/kg, days 1 and 3), PEP (0.3 mg/kg, days 1-4), MTX (0.3 mg/kg, days 2 and 3), CDDP (3.75 mg/kg, day 4), Ara-C (3 mg/kg, days 4 and 7) and 5-FU (30 mg/kg, days 5 and 6).

Cis-A-F (by Williams et al) and Cis-CPM-A (by Yagoda) chemotherapies were selected for the comparison with our devised regimens (VPM-CisCF). Cis-A-F: CDDP (1.25 mg/kg, days 1-5), ADM (3 mg/kg, day 1) and 5-FU (30 mg/kg, day 1). Cis-CPM-A: CDDP (5 mg/kg, day 1), CPM (15 mg/kg, day 2) and ADM (3 mg/kg, day 3).

Thirdly, the synchronized effects, especially the accumulation in the G₂M phase, were assessed in our devised regimens, by means of flow cytometric method using a flow cytometer (Bio/physics 4800A).

VCR, PEP and MTX were not effective against tumor growth and acted only as short-term inhibitors during the 6-day period they were administered. Neither Ara-C or 5-FU were effective. CDDP, ADM and CPM proved to be effective, and their effects continued long after the cessation of administration.

VPM combination was effective, but the effect did not continue so long as those of CDDP, ADM or CPM. VCR, PEP and MTX were not effective when given alone, even though the total dose of each agent was three times of that used in the VPM combination. The activity of each agent in the VPM combination proved to be enhanced by the combined use.

CisCF combination was just as effective as the CDDP single-drug chemotherapy. Each agent in the CisCF combination was also found to be enhanced by the combined use, even though the dose of CDDP, Ara-C or 5-FU in the CisCF combination was one third of that used in single-drug chemotherapy.

First, we had assessed whether the VPM-CisCF chemotherapies were more effective than VPM or CisCF combination alone, or not. VPM $\times$ 2, was moderately effective and CisCF $\times$ 2 was more effective, but VPM-CisCF chemotherapies were more effective than them. In conclusion, the combined use of VPM and CisCF combination was reasonable.

Next, the combination chemotherapies of VPM-CisCF (I) or (II), Cis-A-F and Cis-CPM-A, and CDDP single-drug chemotherapy against tumor growth were compared. CDDP single-drug chemotherapy was the most effective and the others were similarly effective. However, from the standpoint of usefulness which was determined by anti-tumor activity and toxicity which was seen in the body weight loss affected by chemotherapy, VPM-CisCF (II) was the most useful.

In the VPM-CisCF (I) or (II) chemotherapy based on the synchronization theory by the affection of VCR and/or PEP, the cell accumulation in the G₂M phase was seen and it was more strongly accumulated in regimen (II).

We concluded that the anti-tumor activity of the VPM-CisCF combination included a synchronization effect except for the additive or synergistic effect. We believe that the VPM-CisCF chemotherapies, especially regimen (II), would be useful clinically against urothelial cancer.

Key words: Nude mice, Bladder cancer, Multi-drug combination chemotherapy, Cis-Diamminedichloroplatinum (II), Synchronization, Non-cross-resistance

緒 言

近年、膀胱癌の治療において、転移を有する進行期癌はもちろん、転移のない浸潤癌の治療にも集学的治療¹⁻³⁾の一環として、化学療法が手術とともに行なわれるようになった⁴⁻¹⁰⁾。

しかし、従来単剤としてある程度有効性の認められている薬剤は doxorubicin hydrochloride (adriamycin : ADM)¹¹⁾ cyclophosphamide (CPM)¹²⁾ 5-fluorouracil (5-FU)¹³⁾ methotrexate (MTX)^{14, 15)} および vinblastine (VBL)¹⁶⁾ などであるが、その有効率は20~40%である¹⁷⁾。

また、Rosenberg らの cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP) の抗腫瘍効果の発見¹⁸⁾ 以来、種々の悪性腫瘍に試みられ、とくに睾丸腫瘍にすぐれた成績を示している¹⁹⁾ 膀胱癌に対しても、Yagoda²⁰⁾ がその有効性を報告し、その後諸家により追試され、CDDP は膀胱癌にも最も有効な抗癌剤であると認められている¹⁷⁾。しかし、その有効率は40%程度であり、まだ満足すべきものではない。

多剤併用療法に関しては諸家により種々の薬剤の組合わせが報告されているが²¹⁻³⁰⁾、その効果は CDDP 単剤効果に比べて期待されたほどではない¹⁷⁾。また、有効率の比較的高いもの²⁶⁾でも、副作用のわりには完全寛解率は低く、容易に行なえるものではない。

多剤併用療法を行なうにあたっては、薬剤の種類、投与量、投与方法を十分に検討し、より副作用の少ない、より優れた効果が得られる組合わせを考えることが大切である^{31, 32)}。この点に関しては、従来より基礎

的研究があり、vincristine (VCR) と MTX の併用³³⁾、bleomycin (BLM) と MTX の併用³⁴⁾、CDDP と cytosine arabinoside (Ara-C)³⁵⁾ および CDDP と 5-FU³⁶⁾ の併用で、相加ないしは相乗効果があるとされている。また、効率のよい殺細胞効果を得る方法として、Barranco ら³⁷⁾ の BLM による同調法および Bhuyan ら³⁸⁾ が示唆した Ara-C と 5-FU による同調法などがある。臨床的には、Livingston ら³⁹⁾ の VCR と BLM、また Costanzi ら⁴⁰⁾ の BLM と MTX の併用療法があり、同調法の有用性が示されている。

われわれは、できるだけ副作用を少なくし、抗腫瘍効果を能率よく挙げるために、先に述べた基礎的臨床的報告を検討して、同調理論にもとづき各薬剤の配分を考慮した薬剤の組合わせとして、VCR, peplomycin⁴¹⁾ (PEP), MTX, CDDP, Ara-C, 5-FU の6剤を用いた同調多剤併用化学療法を考案した。

この化学療法について、ヌードマウス継代移植ヒト膀胱癌を用いて抗腫瘍効果、副作用および同調性につき実験検討を行ない、総合的效果判定において優れたものであるという結果を得たので報告する。

実験材料および方法

ヌードマウス (BALB/c) は、京都大学医学部泌尿器科学教室実験動物施設での SPF 下繁殖飼育の8~10週齢の雌を使用した。

ヌードマウス継代移植ヒト膀胱癌 BT-8 株 (79歳男性の原発巣から採取し、1978年5月初代移植した移行上皮癌悪性度Ⅲの組織型)、BT-11 株 (1980年9月、

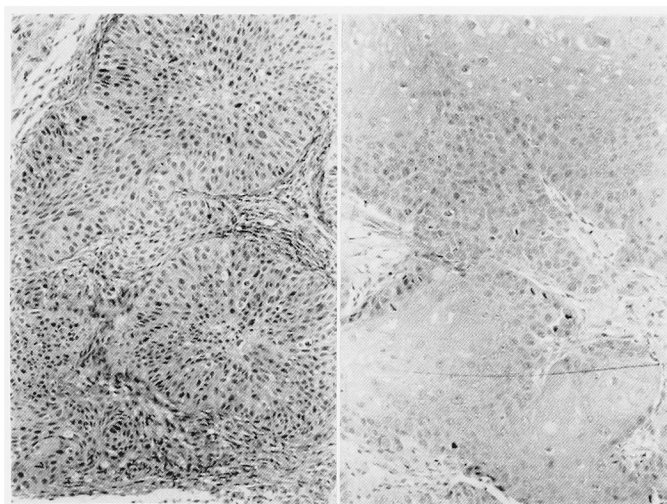


Fig. 1. Histopathologic view of the BT-8 (left) or BT-11 (right) strain bladder cancer (H.E. stain, $\times 100$).

69歳男性の原発巣から採取し初代移植した、移行上皮癌および扁平上皮癌の混合型)の各2株を使用した(Fig. 1).

BT-8 株は、10~12世代を、BT-11 株は5~6世代を使用した。BT-8 株では、対照群10匹、各試験群3匹を使用し、BT-11 株では対照群10匹、各試験群5匹を使用した。

抗癌剤は CDDP (日本化薬株式会社より供与)、cyclophosphamide (CPM), adriamycin (ADM), vincristine (VCR), peplomycin (PEP) (日本化薬株式会社より供与), methotrexate (MTX), cytosine arabinoside (Ara-C), 5-FU を使用した。

各薬剤および各併用法の投与方法・投与量は Table 1a, b にまとめた如くに行なった。薬剤濃度は体重 20 g あたり 0.1 ml の投与量となるように、生食にて希釈した。また、各併用群においても1日投与量が各薬剤総和として 20 g あたり 0.1 ml となるように、各薬剤濃度の調節を行なった。対照群には体重 20 g あたり 0.1 ml の生食を投与し、全て腹腔内投与とした。

各薬剤および併用法の効果判定は以下の諸点について行なった。

1)腫瘍増殖曲線および増殖抑制率(%T/C inhibition)

継代移植腫瘍を細切のうえ、トラカール針にてマウ

ス背部皮下に約 200 mm³ 程度、各マウスに移植した。移植腫瘍が再増殖し、約 200~250 mm³ になったところで腫瘍体積を経時的に測定した。体積は $\pi/6$ (長径-0.4)(短径-0.4)(高さ-0.2), 単位:mm, で求めた⁴²⁾。

このようにして得られた各薬剤および各併用法の腫瘍増殖曲線と対照群の増殖曲線との比較により効果を判定した。増殖曲線は半対数グラフ上に作成した。

増殖抑制率(%T/C inhibition)は、試験開始日より1定の期間での対照群に対する試験群の増殖率の比較で、 $(1-T/C) \times 100 (\%)$, T: 試験群の増殖率(平均値±標準偏差), C: 対照群の増殖率(平均値), で求められる。なお、50%以上をもって有効とする。

2)体重減少および治療係数(therapeutic index : T.I.)

総合的效果判定の意味で、治療係数(T.I.)を算出した。治療係数の算出は、 $T.I. = \%T/C \text{ inhibition} \div \%T/C \text{ body weight loss}$ より求め、%T/C body weight loss は %T/C inhibition と同様の方法で対照群、各治療群の経時的体重減少測定(body weight loss in ratio; %)から算出した。

3)組織学的効果判定

下里、大星ら⁴³⁾の組織学的効果判定基準により、各治療法の効果を判定した。各療法開始後経時的に腫瘍を採取し、HE染色のうえ光顕にて判定した。grade

Table 1a. Schedules for single-drug chemotherapies (vincristine (VCR), peplomycin(PEP), methotrexate (MTX), cytosine arabinoside (Ara-C), 5-fluorouracil (5-FU), cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP), adriamycin (ADM) and cyclophosphamide (CPM)), and for combination chemotherapy with VPM-combination which consists of VCR, PEP and MTX, or Cis CF-combination which consists of CDDP, Ara-C and 5-FU, against the human bladder cancer xenograft (BT-8 strain) in athymic nude mice.

<u>Single-drug chemotherapy</u>	
Vincristine(VCR):	0.06 mg/kg, days 1-6.
Peplomycin(PEP):	0.9 mg/kg, days 1-6.
Methotrexate(MTX):	0.6 mg/kg, days 1-6.
Cytosine Arabinoside: (Ara-C)	3 mg/kg, days 1-6.
5-Fluorouracil(5-FU):	30 mg/kg, days 1-6.
Adriamycin(ADM):	3 mg/kg, days 1-6.
Cyclophosphamide(CPM):	10 mg/kg, days 1-10.
CDDP:	2.5 mg/kg, days 1-6.
<u>VPM-combination</u>	
VCR:	0.06 mg/kg, days 1 and 4.
PEP:	0.3 mg/kg, days 1-6.
MTX:	0.3 mg/kg, days 2, 3, 5 and 6.
<u>CisCF-combination</u>	
CDDP:	2.5 mg/kg, days 1 and 4.
Ara-C:	3 mg/kg, days 1 and 4.
5-FU:	15 mg/kg, days 2, 3, 5 and 6.

Table 1b. Schedules for CDDP single-drug chemotherapy and combination chemotherapies of VPM-combination for 2 weeks, CisCF-combination for 2 weeks, VPM-CisCF (I) or (II) which consists of VPM-combination and CisCF-combination, Cis-A-F which consists of CDDP, ADM and 5-FU, and Cis-CPM-A which consists of CDDP, CPM and ADM, against the human bladder cancer xenograft (BT-11 strain) in athymic nude mice.

<u>CDDP:</u>	2.5 mg/kg, days 1-6.
<u>VPM x 2</u> (VPM-combination for 2 weeks)	
VCR:	0.04 mg/kg, days 1, 4, 8 and 11.
PEP:	0.2 mg/kg, days 1-14.
MTX:	0.2 mg/kg, days 2, 3, 5, 6, 9, 10, 12 and 13.
<u>CisCF x 2</u> (CisCF-combination for 2 weeks)	
CDDP:	2.5 mg/kg, days 1 and 8.
Ara-C:	3 mg/kg, days 1, 6, 8 and 13.
5-FU:	30 mg/kg, days 3, 4, 5, 10, 11 and 12.
<u>VPM-CisCF(I)</u>	
VCR:	0.04 mg/kg, days 1 and 4.
PEP:	0.2 mg/kg, days 1-7.
MTX:	0.2 mg/kg, days 2, 3, 5 and 6.
CDDP:	2.5 mg/kg, day 8.
Ara-C:	3 mg/kg, days 8 and 13.
5-FU:	30 mg/kg, days 10-12.
<u>VPM-CisCF(II)</u>	
VCR:	0.06 mg/kg, days 1 and 3.
PEP:	0.3 mg/kg, days 1-4.
MTX:	0.3 mg/kg, days 2 and 3.
CDDP:	3.75 mg/kg, day 4.
Ara-C:	3 mg/kg, days 4 and 7.
5-FU:	30 mg/kg, days 5 and 6.
<u>Cis-A-F</u>	
CDDP:	1.25 mg/kg, days 1-5.
ADM:	3 mg/kg, day 1.
5-FU:	30 mg/kg, day 1.
<u>Cis-CPM-A</u>	
CDDP:	5 mg/kg, day 1.
CPM:	15 mg/kg, day 2.
ADM:	3 mg/kg, day 3.

IIb 以上を効果ありと判定した (Table 2.)

4) Flow cytometry (FCM)⁴⁴⁻⁴⁶⁾ による同調効果および殺細胞効果の検討

Flow cytometer は Bio/physics 社製 (New York, USA) 4800 A および Model 2102-multi-channel distribution analyzer を使用した。得られた DNA-content distribution から, Baisch ら⁵⁰⁾ の計算式 Model I を使用して G₀-1 期, S 期, G₂M 期の細胞数および比率を算出した。なお, 細胞数は総計 3 万個以上を計測した (Fig. 2)。

対照群として生食投与群をおき, 投与開始 4 日目, 8 日目, 14 日目にそれぞれ腫瘍を採取し, FCM 測定

を行なった。

結 果

1) 腫瘍増殖曲線および増殖抑制率 (%T/C inhibition)

BT-8 株膀胱癌における単剤および併用投与群の効果を Fig. 3a, b に示した。

BT-8 株膀胱癌は移植後 1 週～10 日後には約 250 mm³ に再増殖し約 5.3 日の doubling time で計測期間中は, 半対数グラフ上ではほぼ直線的な増殖を示した。

VCR, PEP, MTX は, 投与期間中はよく増殖を

Table 2. Histopathologic criteria of Shimosato and Ohboshi.

Grade I	Characteristic changes are noted in tumor cells but tumor structures have not been destroyed (there is no defect in tumor nests resulted from lysis of individual tumor cells).
Grade II	In addition to characteristic cellular changes, tumor structures have been destroyed as a result of disappearance of tumor cells. However, variable number of "viable cells" still remain. a: Destruction of tumor structures is of mild degree, i.e., "viable tumor cells" are frequently observed. b: Destruction of tumor structures is of severe degree, that is, "viable tumor cells" are few in number.
Grade III:	Markedly altered, presumably non-viable tumor cells are present singly or in small clusters and "viable cells" are hardly seen.
Grade IV	No tumor cells remain in any of section (local cure). a: Extensive areas of coagulation necrosis are present. b: Granulation tissue with or without small foci of necrosis including keratotic debris remains. c: Only cicatrix is observed.

抑え、投与終了と同時に再増殖を示し、時間依存性の作用⁵¹⁾を試験投与量では示した。Ara-C および 5-FU においては、この試験投与量では効果を認めず、若干 5-FU において時間依存性抑制効果をうかがわせた (Fig. 3a)。

VPM 3 剤群は、VCR, PEP, MTX と同様に強い時間依存性抑制効果を示した。CisCF 3 剤群は、投与終了後もかなりの増殖抑制を示した。これは、CDDP 単剤の効果と同程度であり、ADM も同様の効果を示した。

CPM は masked compound のアルキル化性抗癌剤であり、その作用として薬剤投与量、投与間隔において、時間依存性作用と濃度依存性作用⁵¹⁾の両面があるとされ、今回の実験では中等量頻回投与法の効果をみる意味で、10日間投与とした。結果は Fig. 3b に示す如く、投与終了後もよく増殖抑制効果を示し、時間依存性および濃度依存性薬剤の両者の作用を示唆した。

BT-11 株膀胱癌においては、移植後 2 週間後で 250 mm³ と再増殖し doubling time は約 7 日で計測期間中は一定の増殖を示した。これを用いて VPM-CisCF (I) および (II) 法の効果検討を行なった。ま

ず、VPM および CisCF 3 剤群を各々 2 週投与した場合と、VPM-CisCF (I) および (II) 法との比較を行なった。これで明らかとなったことは、VPM 3 剤群、CisCF 3 剤群だけを投与するよりも、VPM-CisCF 多剤併用療法のほうがより効果的であるということである。なお、VPM-CisCF (I) と (II) においては、コース終了時点での評価は有意差を認めなかった (Fig. 4)。

また、BT-11 株膀胱癌において、CDDP 単剤投与、Williams ら²²⁾の Cis-A-F 併用療法、Yagoda²²⁾の Cis-CPM-A 併用療法と、VPM-CisCF (I) および (II) の併用療法の効果を比較した。コース終了時点では、CDDP 単独群が最も増殖抑制が強く、各併用群においてその差は認められず同程度であった (Fig. 5)。

腫瘍増殖曲線の結果にもとづき、%T/C inhibition で現わしたものが、Table 3a および 3b である。50%以上の抑制率を示したものが有効とすると、BT-8 株膀胱癌においては、VCR, PEP, MTX が 7 日目では有効であるが、コース終了時では有効ではなかった。ADM, CisCF 3 剤群は全経過を通じて有効であった。CDDP, CPM は 7 日目以後コース終了

Extirpation of the tumor.

↓
Mince the tumor tissue after cutting into fine pieces.

↓
0.1% trypsinization in MEM, for 3 to 5 minutes, at 37°C.



(Leave it still for 1 or 2 minutes after pipetting and/or stirring)
(Filtration of supernatant through 40 μ nylon mesh
after inhibition of trypsin activity by 10% calf serum in MEM)
(single cell suspension)

↓
Wash with MEM and centrifuge 800 r.p.m. (71.5G) for 7 minutes, twice.
(discard the supernatant)

↓
Wash with 50% methanol in phosphate buffer saline (PBS) 300 r.p.m. (10G)
, twice or thrice.
(discard the supernatant)

↓
Centrifuge 800 r.p.m. for 10 minutes and discard the supernatant.

↓
Resuspend the pellet in 1 ml of PBS and add RN ase (0.2 ml/10⁷ cells).

↓
Leave it still for 30 minutes at 37°C.

↓
Full tube with glass distilled water, centrifuge 800 r.p.m. for 10 min.
and discard the supernatant.

↓
Stain with 10 ml of cold Propidium Iodide solution at 4°C for 1 hour.

↓
Keep the sample at 4°C until measurement of FCM.

Reagents.

1) MEM, Trypsine & calf serum (Flow Laboratories Inc., Rockville, Maryland, USA)

2) 40 μ nylon mesh (Kyoushin-Rikou K.K., Tokyo, Japan)

3) RN ase
Ribonuclease (Sigma Chemical Co., Saint Louis, Missouri, USA).
1 mg/ml in Sorenson's phosphate buffer (0.2M) approximately
pH 7.0-stock solutions.

Sorenson's buffer : $\begin{cases} \text{NaH}_2\text{PO}_4 & \cdots \cdots \cdots 19.5 \text{ ml (of stock 27.8 gms/liter)} \\ \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} & \cdots \cdots \cdots 30.5 \text{ ml (of stock 53.6 gms/liter)} \\ \text{H}_2\text{O} & \cdots \cdots \cdots 50 \text{ ml} \end{cases}$
100 ml

4) Propidium Iodide (Sigma Chemical Co.)
0.05 mg/ml in 1.12% Sodium Citrate

Fig. 2. Materials and methods for flow cytometry (FCM).

時には効果を認め、遅発性・持続性の増殖抑制を認めた。VPM 3 剤群は、当初顕著な増殖抑制を認めたが、コース終了時の24日目では増殖抑制を認めなかった (Table 3a)。

BT-11 株膀胱癌においては、各薬剤投与終了後7日目と、コース終了 (24日目) で比較したが、VPM 3 剤群単独では全経過を通じて有効ではなかった。薬剤投与終了後7日目では、CDDP 単剤群、VPM-CisCF 併用群において有効で、コース終了時の24日目では、VPM 3 剤群を除いて全て有効であった (Table 3b)。

2) 体重減少および治療係数 (therapeutic index: T.I.)

体重減少の結果を Fig. 6 に示した。経時的体重減

少は、body weight loss in ratio で示し、治療開始時を0%とした。%T/C body weight loss は、コントロール群との差で現わされ、これらの結果から、CDDP 単剤群が最も悪く、次いで VPM-CisCF (I) 併用群であった。

VPM 3 剤群2週投与および VPM-CisCF (II) 併用群が体重減少でみる限りでは、副作用は軽度であった (Fig. 6)。

この体重減少と %T/C inhibition からなる治療係数 (T.I.) で比較してみると、その総合的効果がある程度推測可能で、VPM-CisCF (II) が結果として最も良好であった (Fig. 7)。ただし、最終日の24日目だけでなく、それ以前の途中経過においても同様の結果であった。

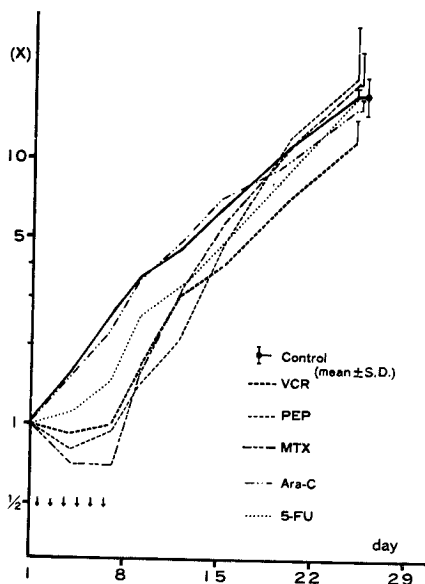


Fig. 3a. Tumor growth curves of the BT-8 strain bladder cancer, treated with single-drug chemotherapy of vincristine (VCR), peplomycin (PEP), methotrexate (MTX), cytosine arabinoside (Ara-C) or 5-fluorouracil (5-FU).

Arrows indicate the administration schedules. Ten mice were used in control group and three mice were used in each test group.

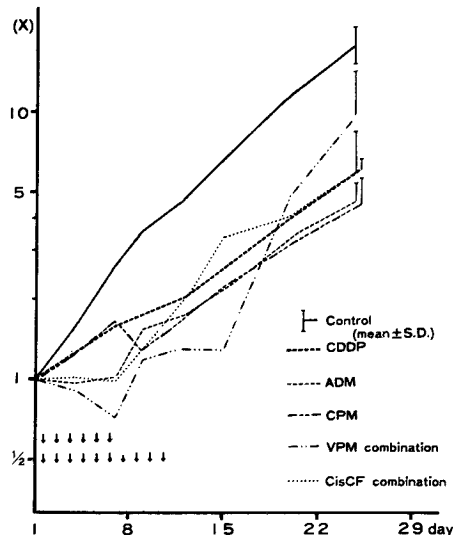


Fig. 3b. Tumor growth curves of the BT-8 strain bladder cancer, treated with single-drug chemotherapy of cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP), adriamycin (ADM) or cyclophosphamide (CPM), and with VPM-combination which consists of VCR, PEP and MTX, or CisCF-combination which consists of CDDP, Ara-C and 5-FU.

3)組織学的効果判定

各治療群における8日, 15日, 22日目の組織学的効果判定結果を Table 4 に示した. 組織学的には種々の変化を認めるが, 一番変化の強い所をもってその治療群の効果と判定した.

結果として, %T/C inhibition とよく一致した.

4) FCM による VPM-CisCF 併用療法の同調効果および殺細胞効果の検討

VPM-CisCF 併用療法の FCM による分析結果を Table 5a, b に示した.

VPM-CisCF (I) において VPM 3 剤群1週間投与により, 7日目まで G_2M 期に細胞群が同調されていると考えたが, 結果は同調されておらず, むしろ減少していた. これに比べて, VPM-CisCF (II) は4日目までは G_2M 期同調効果を認めた. なお, 第I法での4日目でも弱いながらも G_2M 期への同調効果を認めた.

8日目では, VPM-CisCF (I) および (II) とともに, ほぼ同様の結果であり, VPM 3 剤群投与でもかなりの抗腫瘍効果があることが解った. 14日目では, 両者ともに S, G_2M 期の細胞数の減少を認めたが,

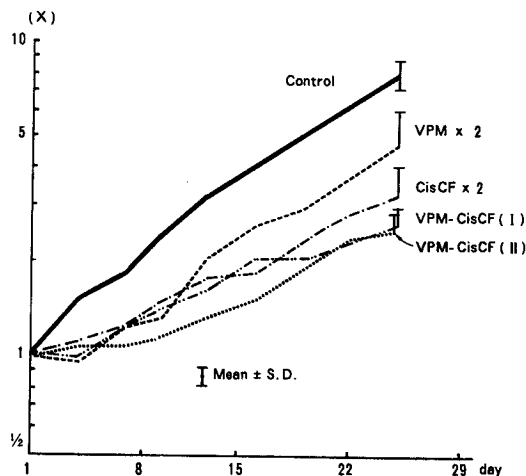


Fig. 4. Tumor growth curves of the BT-11 strain bladder cancer, treated with CisCF-combination for 2 weeks (CisCF $\times$ 2), VPM-combination for 2 weeks (VPM $\times$ 2), VPM-CisCF (I) or VPM-CisCF (II) chemotherapy.

The effect of VPM-combination or CisCF-combination alone is weaker than those of the VPM-CisCF combinations.

第Ⅱ法においてより強い減少を認め、細胞回転の障害、つまり、殺細胞効果が強力であることを示唆した。

Table 5b に各群間の有意差検定の結果を示したが、ことに、14日目での両者の比較において、全てに有意差を認めたのは、第Ⅱ法においてより優れていることを示すものである。

考 察

腫瘍増殖曲線および % T/C inhibition で認めたように、VPM-CisCF 第Ⅰおよび第Ⅱ法ともに有効である。しかし、抗癌剤による治療効果を評価するに、腫瘍縮小効果だけをみる直接効果判定だけでなく、これに必然的に随伴するところの副作用も併わせて評価しなければ臨床応用への参考とはならない。そこで、われわれは基礎実験薬効判定によく用いられる治療比 (LD_{50}/ED_{50} , ED_{50} : 50% 抑制率を示す最低投与量) になって、二律背反する両者を含んだ総合的效果判定法として治療係数を算出した。この治療係数で総合的に判定した有用性では、CDDP 単剤群に次いで第Ⅰ法が低値を示した。したがって、第Ⅰ法は臨床応用にあたっては、有用性が低いように思われた。

なお、比較に用いた Williams²³⁾ または Yagoda

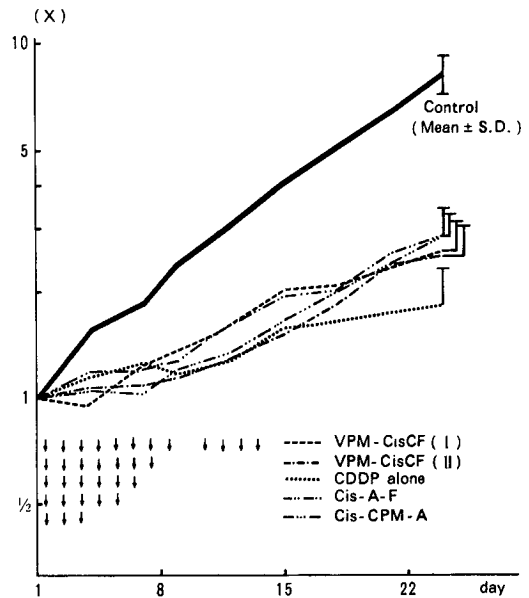


Fig. 5. Tumor growth curves of the BT-11 strain bladder cancer, treated with various modes of chemotherapies (VPM-CisCF (I), VPM-CisCF (II), CDDP alone, Cis-A-F (CDDP+ADM+5-FU), or Cis-CPM-A (CDDP+CPM+ADM)). Arrows indicate the administration schedules.

Table 3a. %T/C inhibitions of various modes of single-drug or combination chemotherapies for the BT-8 strain bladder cancer, on day 7, day 15 and day 24 after initiation of medication. Unit %, Mean $\pm$ S.D. (n=3).

anti-tumor agent	day 7	day 15	day 24
Vincristine	62.2 $\pm$ 1.2	38.8 $\pm$ 12.8	32.4 $\pm$ 14.8
Peplomycin	64.6 $\pm$ 18.5	27.9 $\pm$ 35.4	-16.0 $\pm$ 66.6
Methotrexate	73.5 $\pm$ 13.0	13.4 $\pm$ 44.5	9.6 $\pm$ 33.6
Cytosine Arabinoside	14.3 $\pm$ 8.4	-10.0 $\pm$ 19.0	11.1 $\pm$ 8.7
5-Fluorouracil	44.1 $\pm$ 4.9	26.7 $\pm$ 1.0	2.7 $\pm$ 9.1
CDDP	40.8 $\pm$ 17.6	60.6 $\pm$ 10.1	66.3 $\pm$ 13.8
Adriamycin	62.7 $\pm$ 2.2	67.0 $\pm$ 2.1	73.9 $\pm$ 4.1
Cyclophosphamide	38.0 $\pm$ 4.6	66.3 $\pm$ 5.7	75.1 $\pm$ 6.2
VPM-combination	72.9 $\pm$ 15.9	80.3 $\pm$ 14.9	45.1 $\pm$ 23.3
CisCF-combination	63.2 $\pm$ 4.8	48.6 $\pm$ 2.1	66.3 $\pm$ 2.9

Table 3b. % T/C inhibitions of various modes of chemotherapies for the BT-11 strain bladder cancer, 7 days after completion of medication (*) and on day 24 after initiation of medication. Unit: %, Mean $\pm$ S.D. (n=5).

day	VPM x 2	CisCF x 2	VPM-CisCF(I)	VPM-CisCF(II)	Cis-A-F	Cis-CPM-A	CDDP
*	42.0 $\pm$ 21.2	57.1 $\pm$ 10.6	60.1 $\pm$ 7.2	59.9 $\pm$ 7.3	45.7 $\pm$ 11.7	49.8 $\pm$ 6.3	54.0 $\pm$ 9.0
24	45.3 $\pm$ 20.1	58.4 $\pm$ 9.4	68.1 $\pm$ 6.2	68.5 $\pm$ 5.4	64.9 $\pm$ 6.1	65.2 $\pm$ 4.8	78.1 $\pm$ 6.0

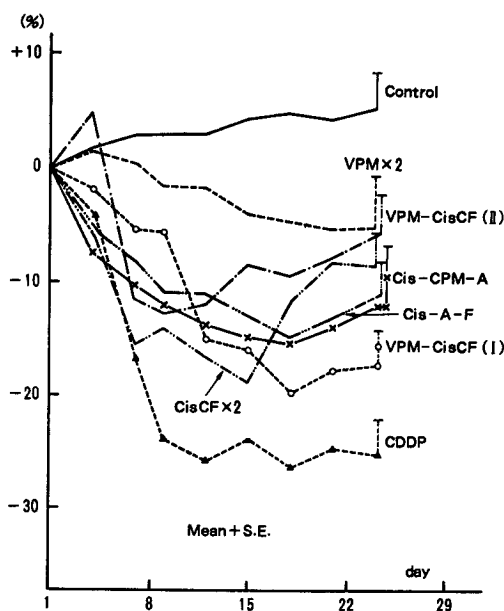


Fig. 6. Body weight loss in ratio.

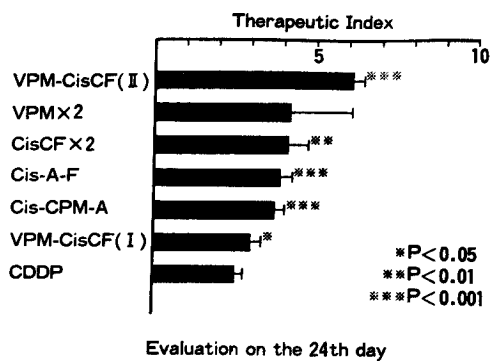


Fig. 7. Therapeutic indices of various modes of chemotherapies, on day 24 after initiation of medication for the BT-11 strain bladder cancer.

Statistically analysed against CDDP single-drug chemotherapy by student T-test.

Table 4. Histopathologic evaluations of various chemotherapeutic effects for the BT-8 or BT-11 strain bladder cancer on day 8, day 15 and day 22 after initiation of medication.

strain chemotherapy	day 8	day 15	day 22
BT-8: Vincristine	II b	II a	I
Peplomycin	II b	II a	I
Methotrexate	II b	II a	I
Cytosine Arabinoside	I	I	I
5-Fluorouracil(5-FU)	II a	I	I
CDDP	II b	■	II b
Adriamycin(ADM)	II b	■	■
Cyclophosphamide(CPM)	II b	■	■
VPM-combination	■	II b	II b
CisCF-combination	II b	■	■
BT-11: VPM × 2	II a	II b	II b
CisCF × 2	II b	■	■
VPM-CisCF (I)	II b	II b	■
VPM-CisCF (II)	II b	■	■
CDDP	II b	■	■
Cis-A-F(CDDP+ADM+5-FU)	■	II b	II b
Cis-CPM-A(CDDP+CPM+ADM)	■	■	II b

ら²²⁾の多剤併用療法と比べても、直接効果の点では第Ⅰおよび第Ⅱ法とも優るとも劣らないものの、治療係数での有用性においては、第Ⅱ法が最も優れていた。

これらの結果は、第Ⅰ法では1コースあたり2週間の薬剤投与により、PEP, MTXの量が1日投与量において減じられていると言っても、慢性蓄積性の毒性が副作用におよび、この結果が治療係数での有用性に

Table 5a. Results of flow cytometric analyses for VPM-CisCF (I) or (II) chemotherapy, on the 4th, 8th and 14th day after initiation of medication, using the BT-11 strain bladder cancer in athymic nude mice. Unit: %, Mean $\pm$ S.D. (n=3).

day	Phase	Control	VPM-CisCF(I)	VPM-CisCF(II)
4th	G0-1	73.5 $\pm$ 2.8	70.0 $\pm$ 1.5	67.8 $\pm$ 2.8
	S	17.8 $\pm$ 1.3	15.2 $\pm$ 0.6	14.3 $\pm$ 0.8
	G2M	8.7 $\pm$ 1.6	14.8 $\pm$ 2.1	17.8 $\pm$ 2.9
8th	G0-1	70.1 $\pm$ 2.7	79.5 $\pm$ 1.5	80.4 $\pm$ 1.7
	S	18.4 $\pm$ 0.6	13.2 $\pm$ 0.5	12.1 $\pm$ 1.0
	G2M	11.5 $\pm$ 2.6	7.3 $\pm$ 1.2	7.6 $\pm$ 1.4
14th	G0-1	73.3 $\pm$ 1.8	80.6 $\pm$ 0.7	86.4 $\pm$ 1.2
	S	16.3 $\pm$ 1.4	10.3 $\pm$ 0.6	9.2 $\pm$ 0.4
	G2M	10.5 $\pm$ 2.4	9.2 $\pm$ 0.6	4.5 $\pm$ 0.9

Table 5b. Statistical analysis (p value by student T-test) of the result of DNA-content distribution obtained by FCM in the BT-11 strain.

day	Phase	Cont. - (I)	Cont. - (II)	(I) - (II)
4th	G0-1	-	0.01>	-
	S	0.05>	0.05>	-
	G2M	-	0.01>	-
8th	G0-1	0.05>	0.05>	-
	S	0.01>	0.05>	-
	G2M	-	-	-
14th	G0-1	0.05>	0.05>	0.05>
	S	0.05>	0.05>	0.05>
	G2M	-	0.05>	0.002>

影響したと考えられる。

また、1コースあたりの PEP, MTX の総量が第Ⅰ法と第Ⅱ法においては、第Ⅱ法の方で減じられており、副作用の点でより有用性が向上したものと考えられる。

当初、第Ⅰ法を考案するうえでの意図は、VPM 3 剤群投与による G₂M 期への同調効果およびある程度の殺細胞効果を期待し、次いで CisCF 3 剤群投与による同調細胞を含め、他の周期 (G₀₋₁ または S 期) の細胞集団の一掃的殺細胞効果をねらうというものであった。

また、VPM 3 剤群の最適投与期間の確たる証拠はないものの、VPM 3 剤群投与により、同調された細胞は薬剤投与されている期間、G₂M 期にとどまっているだろうとの考えで、また、通常の癌細胞の細胞回転周期は1週間以内とされるところ⁵⁴⁾から、1週投与をひとつの目安とした。

VPM 3 剤群, CisCF 3 剤群を併用で投与する VPM-CisCF 併用療法の合理性が、Fig. 4 および Table 3b で示した如くに明らかとなったが、この各

3 剤群併用療法たる VPM-CisCF 療法の合理的な効果が、同調効果によるものかはまだ判然とはしていない。

この点を解明するために、FCM を用いて実験を行った訳であるが、VPM-CisCF (I) は4日目では軽度の G₂M 期への同調効果を認めるが、生食投与群の対照と比べても有意ではない (student T-test)。これに比べて、VPM-CisCF (II) では G₂M 期同調効果を認めた (P<0.01)。8日目では、VPM-CisCF (I) においてはもはや同調されておらず、当初の推測とははずれた結果となった。14日目では、G₀₋₁ 期, S 期, G₂M 期の各周期において、VPM-CisCF (I) および (II) との比較では有意差を認め、FCM で抗腫瘍効果を検討した場合でも、VPM-CisCF (II) においてより強力な、より速効性の効果を認めた。これは、G₀₋₁ 期の増加, S, G₂M 期の細胞数の減少より強い細胞回転阻止作用を認めるところから判断される。

以上より、CisCF 3 剤群投与は VPM 3 剤群投与開始後4日目で適当であると考えられ、VPM-CisCF

(II) に、より強い同調効果を認めることから、同調多剤併用療法と呼称しようとする。

VPM-CisCF 多剤併用療法では、同調された細胞に有効に作用する主たる薬剤は、CDDP だけとなっているので、collateral sensitivity⁵⁸⁾ という現象があるものの、CDDP に低感受性の腫瘍に対しては、その効果に疑問が残る。

その点、Williams²³⁾ または Yagoda ら²²⁾ の CDDP + ADM + 5-FU, CDDP + CPM + ADM は、抗腫瘍効果の強い濃度依存性薬剤¹⁾ を主体に組合わせており、前者は 2 者のうち、後者は 3 者のうちひとつでも感受性を示せば効果を現わすように、抗癌スペクトラムが広がっている。

抗癌剤の併用療法において、Devita³¹⁾ や Krakoff ら³²⁾ の述べる如くに、抗癌スペクトラムの拡大は重要である。VPM-CisCF 多剤併用療法においては、確かに 6 剤を使用しているが、CDDP を除いて他薬剤はそれぞれ十分に抗腫瘍効果を示すほどの量は投与されておらず、また、その効果も主に時間依存性抑制効果を示す薬剤ばかりで占められ、効果をみるには長期投与を要するものばかりである。故に、本療法は CDDP の効果増強を主眼にした組合わせと言える。ただ、Yagoda²²⁾, Williams ら²³⁾ の組合わせと違って、副作用の点で長期投与も可能で、本実験結果からも理解されるように、時間依存性抑制効果を示す VPM 3 剤の組合わせが効果を現わしてくると考えられ、できるだけ本療法を長期投与することが望ましいと思われる。

抗癌剤の組合わせでは、副作用の分散をはかるのも併用療法の基本である。この点、6 剤使用した VPM-CisCF 療法では、理にかなっていると考えられる。すなわち、VCR の主たる副作用は神経症状で骨髄抑制は比較的少なく、PEP は肺線維症でこれまた骨髄抑制は少ない。MTX は、肝・腎機能障害に加えて、骨髄抑制、ことに血小板減少症を主副作用とするが、低用量では頻度が少ない。CDDP は腎機能障害が問題である。

比較に用いた CDDP + ADM + 5-FU および CDDP + CPM + ADM の併用療法では、CDDP の腎機能障害および骨髄抑制に加えて、更に ADM, CPM などの骨髄抑制の強い薬剤ばかりを加え、また、ADM の心筋毒性も加わる。これは、比較的高齢者の多い尿路性器癌患者にとっては、かなりの damage と考えられ、2~3 コース投与は可能でも長期投与は不可能となり、したがって予後に影響してこないのではないかと、推測された更に、腎機能に関して

は、このような化学療法を施行される患者においては、当初から尿路閉塞、片側腎などの腎機能障害を有するものが多く、その CDDP の総投与量も考慮される必要がある。

その他、多剤併用療法の組合わせにおいて、相加ないし相乗効果の組合わせとなるように構成されるのが普通であるが、この点でもほぼ満足のいくものであった。ことに、BT-8 株の系で認めた如くに CisCF 3 剤群は、CDDP 単剤投与群に比べて CDDP の量が総量で、 $\frac{1}{2}$ に減じられているにもかかわらず同等以上の効果を挙げたことは、Ara-C, 5-FU との併用にて CDDP の効果増強が可能となり、また、Ara-C, 5-FU の単剤投与群では全く効果を認めなかったことを考えると、予想以上の効果であった。

CDDP と Ara-C, または、5-FU との併用で効果増強があることは、Schabel ら³⁶⁾ が L1210 細胞培養系で、また、Ara-C との併用では、Drewinko ら³⁸⁾ が colon adenocarcinoma の細胞培養系での実験で証明している。

Drewinko ら³⁸⁾ は、Ara-C による増強効果を、potentially lethal damage repair (以下 PLD-repair) の抑制効果^{56~61)} で説明している。5-FU においても同様に PLD-repair の抑制効果^{62~65)} の報告があり、これは、われわれの CisCF 3 剤群の投与法の組合わせの根拠としたところでもある。

また、これに加えて、Bhuyan ら³⁹⁾ の 5-FU と Ara-C との併用において、L1210 細胞培養系で、同時投与よりも 5-FU の先行投与後に Ara-C を投与する sequential combination としたほうが、より効果的である S 期同調効果を示唆しており、この点も効果増強の一因と考えられる。

更に、近年は細胞回転の解析により、緒言で述べた如く、より合理的な投与法として同調効果をねらった組合わせが普遍的となりつつある^{66~71)}。この点では、高本ら^{48~49)} の FLM 細胞培養系で、各種抗癌剤の作用機序解明において証明した如く、また、われわれの今回の実験で示した如く、FCM による細胞回転の解析をもとに多剤併用療法を考案することの合理性が理解できるところである。

耐性獲得の問題については、併用療法によって薬剤耐性を克服しようとするのも、根本理念のひとつであるが、原則的には併用薬剤が多ければ多いほど、理論上は不耐性となる訳である^{72,73)}。今回の実験では、この点については検討を行っていないが、Livingston ら⁷⁴⁾ が用いている non-cross-resistant combinations という言葉があてはまるならば、VPM-CisCF

併用療法にもあてはまるだろうと想像された。もしそうであるならば、臨床上的副作用の少ないところから、長期投与が可能となり、また、不耐性の故に再増悪後にも投与可能で、予後の改善、つまり、延命が期待できると考えられる。

近年、膀胱癌に対して MTX^{14,15,17)} の使用が考慮されるようになり、ことに、Yagoda¹⁷⁾、Soloway⁷⁶⁾ は臨床応用の可能性を強調している。また、最近では MTX を主剤とした併用療法^{76,77)} が行なわれるようになり、大いに有望であるとの報告もある。この点、われわれは Costanzi ら⁴⁰⁾ の予備試験的併用療法の臨床応用結果を参考に、VPM 3 剤群を考えた訳であるが、今後とも、MTX の臨床応用の結果が蓄積されれば、更にこの 3 剤群の投与法の改良も考慮されねばならない。

また、この実験系でも認めた如く、ADM および CPM も、単剤および併用療法において抗腫瘍効果の点では有効と考えられ、殺作用多剤群として Cis-CF 3 剤群の他に、これらと CDDP を加味した殺作用多剤併用を今後とも検討していく必要がある。

結 語

Vincristine (VCR), peplomycin (PEP), methotrexate (MTX), cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP), cytosine arabinoside (Ara-C), 5-fluorouracil (5-FU) の 6 剤併用化学療法を考案し、BT-8 株および BT-11 株のヌードマウス継代移植ヒト膀胱癌を用いてその効果を検討した。

1) 直接抗腫瘍効果では、BT-8 株において、CDDP (2.5 mg/kg/day×6), ADM (adriamycin: 3 mg/kg/day×6), CPM (cyclophosphamide: 10 mg/kg/day×10) の単剤投与群は、それぞれに有効で濃度依存性抗腫瘍効果を認めた。

VCR (0.06 mg/kg/day×6), PEP (0.9 mg/kg/day×6), MTX (0.6 mg/kg/day×6) では、一過性の抑制効果を認めた。

Ara-C (3 mg/kg/day×6), 5-FU (30 mg/kg/day×6) は全経過を通じて無効であった。

2) VPM 3 剤群 (VCR+Ara-C+5-FU) および Cis CF 3 剤群 (CDDP+Ara-C+5-FU) 投与では、前者において時間依存性の抑制効果を認め、後者では CDDP 単剤投与群と同等以上の効果を認めた。

BT-11 株の系においては、各種多剤併用療法につき検討したが、VPM-CisCF 第Ⅱ法が有効で、比較として用いた Williams らの CDDP+ADM+5-FU および Yagoda の CDDP+CPM+ADM と比べ

ても優るとも劣らないものであった。また、体重減少で評価した副作用を加味した有用性の点では、第Ⅱ法が有意に優れていた。

3) VPM-CisCF 多剤併用療法において、第Ⅰ法および第Ⅱ法の G₂M 期同調効果を flow cytometry で検討したが、VPM 3 剤群投与では 4 日目に同調効果を認め、第Ⅱ法においてより強い効果を認めた。

4) VPM-CisCF 多剤併用療法では、第Ⅱ法が臨床応用のうえで、より有用であろうと考えられた。

本論文の要旨は、一部、第13回国際癌学会にて発表した。また、flow cytometry を行なうにあたって、日本化薬株式会社総合研究所の木間恭成、関利之の両氏、および高橋克俊室長に多大の御助力を願ったことを、ここに深く感謝いたします。

文 献

- 1) 松村陽右：進行膀胱癌の集学的治療。西日泌尿 43: 235~242, 1981
- 2) Nakagami Y, Minowa T, Tozuka K, Hiraoaka Y, Chin H and Matsumoto K: Evaluation on multidisciplinary treatment in the carcinoma of urinary bladder. J Nippon Med Sch 50: 139~140, 1983
- 3) 福井 巖：膀胱癌の集学的治療。医学のあゆみ 132: 261~266, 1985
- 4) Socquet Y: Combined surgery and adjuvant chemotherapy with high dose methotrexate and folinic rescue (HDMTX-CF) for infiltrating tumours of the bladder. Brit J Urol 53: 439~443, 1981
- 5) Schaeffer AJ, Grayhack JT, Merrill JM, Bulkley GJ and Shetty RM: Treatment of stage D bladder cancer with adjuvant doxorubicin hydrochloride and radiation. Urol 20: 393~400, 1982
- 6) Smith PH, Child JA, Mulder JH, Van Oosterom AT, Martinez-Pineiro JA, Richards B, Stoter G, Dalesio O, De Pauw M and Sylvester R: Cooperative studies of systemic chemotherapy. A review of the work of the EORTC Urological Group and of the Yorkshire Urological Cancer Research Group (YUCRG). Cancer Chemother Pharmacol 11 (suppl): S25~S31, 1983
- 7) Herr HW, Yagoda A, Batata M, Sogani PC

- and Whitmore WF Jr: Planned preoperative cisplatin and radiation therapy for locally advanced bladder cancer. *Cancer* 52: 2205~2208, 1983
- 8) Skinner DG, Daniels JR and Lieskovsky G: Current status of adjuvant chemotherapy after radical cystectomy for deeply invasive bladder cancer. *Urol* 24: 46~52, 1984
- 9) Herr HW : Preoperative irradiation with and without chemotherapy as adjuvant to radical cystectomy. *Urol* 25 : 127~134, 1984
- 10) Hill DE, Ford KS and Soloway MS: Radical cystectomy and adjuvant chemotherapy. *Urol* 25: 151~154, 1985
- 11) Yagoda A : Future implications of phase 2 chemotherapy trials in 95 patients with measurable advanced bladder cancer. *Cancer Res* 37: 2775~2780, 1977
- 12) Richards B: Adjuvant chemotherapy following primary irradiation in T3 tumors and other topics in urological oncology. In: Pavone Macaluso M, Smith PH and Edsmyr F (eds), *Bladder tumors and other topics in urological oncology*, pp395~397, Plenum, New York, 1980
- 13) Smalley RU, Bartolucci AA, Hemstreet G and Hester M : A phase II evaluation of a 3 drug combination of cyclophosphamide, doxorubicin and 5-fluorouracil and of 5-fluorouracil in patients with advanced bladder carcinoma or stage D prostatic carcinoma. *J Urol* 125: 191~195, 1981
- 14) Turner AG, Hendry WF, Williams GB and Bloom HJG : The treatment of advanced bladder cancer with methotrexate. *Brit J Urol* 49: 673~678, 1977
- 15) Hall RR : Methotrexate treatment for advanced bladder cancer. A review after 6 years. *Brit J Urol* 52: 403, 1980
- 16) Blumenreich MS, Yagoda A, Natale R and Watson RC : Phase II trial of vinblastine sulfate for metastatic urothelial tract tumors. *Cancer* 50: 435~438, 1982
- 17) Yagoda A : Chemotherapy of metastatic bladder cancer. *Cancer* 45: 1879~1888, 1980
- 18) Rosenberg B, Van Camp L, Trasko JE and Mansour VH: Platinum compounds: a new class of potent anti-tumor agents. *Nature* 222: 385~386, 1969
- 19) Einhorn LH : Testicular cancer as a model for a curable neoplasm The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res* 41: 3275~3280, 1981
- 20) Yagoda A, Watson RC, Gonzalez-Vitae JC, Grabstald H and Whitmore WF: cis-Dichlorodiammineplatinum (II) in advanced bladder cancer. *Cancer Treat Rep* 60: 917~923, 1976
- 21) Sternberg JJ, Bracken RB, Handel PB and Johnson DE : Combination chemotherapy (CISCA) for advanced urinary tract carcinoma. A preliminary report. *JAMA* 238 : 2282~2287, 1977
- 22) Yagoda A: Phase II trials with cis-dichlorodiammine-platinum (II) in the treatment of urothelial cancer. *Cancer Treat Rep* 63 : 1565~1572, 1979
- 23) Williams SD, Donohue JP and Einhorn LH : Advanced bladder cancer : Therapy with cis-dichlorodiammineplatinum (II), adriamycin and 5-fluorouracil. *Cancer Treat Rep* 63: 1573~1576, 1979
- 24) Troner MB and Hemstreet GP III : Cyclophosphamide, doxorubicin and cisplatin (CAP) in the treatment of urothelial malignancy : A pilot study of the Southeastern Cancer Study Group. *Cancer Treat Rep* 65: 29~32, 1981
- 25) Campbell M, Baker LH, Oipari M and Al-Sarrat M: Phase II trial with cisplatin, doxorubicin and cyclophosphamide (CAP) in the treatment of urothelial transitional cell carcinoma. *Cancer Treat Rep* 65: 897~899, 1981
- 26) Kedia KR, Gibbons C and Persky L : The management of advanced bladder carcinoma. *J Urol* 125: 655~658, 1981
- 27) Mulder JH, Foss SD, De Pauw M and Van Oosterom AT : Cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin combination chemotherapy in advanced bladder carcinoma: an EORTC phase II study. *Eur J Cancer Clin*

- Oncol 18: 111~112, 1982
- 28) Citrin DL, Hogan TF and Davis TE : A study of cyclophosphamide, adriamycin, cisplatin and methotrexate in advanced transitional cell carcinoma of the urinary tract. Cancer 51: 1~4, 1983
- 29) Schwartz S, Yagoda A, Natale RB, Watson RC, Whitmore WF and Lesser M: Phase II trial of sequentially administered cisplatin, cyclophosphamide and doxorubicin for urothelial tract tumor. J Urol 130: 681~684, 1983
- 30) Gagliano R, Levin H, El-Bolkainy MN, Wilson HE, Stephens RL, Fletcher WS, Rivkin SE, O'bryan RM, Coltman CA Jr, Saiki JH, Stuckey WJ, Balducci L, Bonnet JD and Dixon DO : Adriamycin versus adriamycin plus cis-diamminedichloroplatinum (DDP) in advanced transitional cell bladder carcinoma. A Southwest Oncology Group Study. Am J Clin Oncol 6 : 215~218, 1983
- 31) Devita VT Jr, Young RC and Canellos GP : Combination versus single agent chemotherapy : A review of the basis for selection of drug treatment of cancer. Cancer 35: 98~110, 1975
- 32) Krakoff IH Cancer chemotherapeutic agents. Ca-A Cancer Journal for Clinicians 27: 130~143, 1977
- 33) Bender RA, Bleyer WA, Frisby SA and Oliverio VT : Alteration of methotrexate uptake in human leukemia cells by other agents. Cancer Res 35: 1305~1308, 1975
- 34) Skeel RT and Bertino JR Combination chemotherapy of sarcoma 180 with methotrexate and bleomycin. Cancer Res 33: 1028~1031, 1973
- 35) Drewinko B, Corry P, Bergerat JP and Barlogie B : The lethal activity of platinum compounds in combination with pyrimidine derivatives. In "CisPLATIN", pp37~55, Academic Press, New York, 1980
- 36) Schabel FM Jr, Trader MW, Laster WR Jr, Corbett TH and Griswold DP Jr: cis-Dichlorodiammineplatinum (II) : Combination chemotherapy and cross-resistance studies with tumors of mice. Cancer Treat Rep 63: 1459~1473, 1979
- 37) Barranco SC, Luce JK, Romsdahl MM and Humphrey RM : Bleomycin as a possible synchronizing agent for human tumor cells in vivo. Cancer Res 33: 882~887, 1973
- 38) Bhuyan BK, Blowers CL, Neil GL, Bono VH and Day KJ : Partial synchronization of L 1210 cells by 5-fluorouracil and its use in drug combinations. Cancer Res 37: 3204~3208, 1977
- 39) Livingston RB, Bodey GP, Gottlieb JA and Frei E III : Kinetic scheduling of vincristine (NSC-67574) and bleomycin (NSC-125066) in patients with lung cancer and other malignant tumors. Cancer Chemother Rep 57: 219~224, 1973
- 40) Costanzi JJ, Loukas D, Gagliano RG, Griffiths C and Barranco SC : Intravenous bleomycin infusion as a potential synchronizing agent in human disseminated malignancies. A preliminary report. Cancer 38 : 1503~1506, 1976
- 41) Matsuda A, Yoshida O, Yamashita T, Ebihara K, Umezawa H, Miura T, Katayama K, Yokoyama M and Nagai S : Fundamental and clinical studies on new bleomycin analogs. Carter SK, Umezawa H, Douroces T and Sakurai Y : Antitumor Antibiotics, pp 191~210, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978
- 42) 岡田謙一郎・吉田 修：ヌードマウスを用いた非ホルモン性抗癌剤による前立腺癌化学療法に関する研究. 泌尿紀要 25 : 993~1007, 1979
- 43) Shimosato Y, Oboshi S and Baba K Histological evaluation of effects of radiotherapy and chemotherapy for carcinomas. Jap J Clin Oncol 1: 19~35, 1971
- 44) Tobey RA and Crissman HA : Use of flow microfluorometry in detailed analysis of the effects of chemical agents on cell cycle progression. Cancer Res 32: 2726~2732, 1972
- 45) Crissman HA and Tobey RA : Cell cycle analysis in 20 minutes. Science 184 : 1297~1298, 1974

- 46) Krishan A : Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* **66**: 188~193, 1975
- 47) 太田和雄・高本 滋・御供泰治 : DNA 瞬間自動測定装置. 癌と化療 **4**: 179~185, 1977
- 48) 高本 滋・太田和雄 : FMF による細胞回転と癌化学療法. 癌と化療 **5**: 727~736, 1978
- 49) 高本 滋・太田和雄 : 抗癌性抗生物質の細胞回転に及ぼす影響—Flow microfluorometry 分析による—. 癌と化療 **6**: 59~70, 1979
- 50) Baisch H, Gohde W and Linden WA: Analysis of PCP-data to determine the fraction of cells in the various phases of cell cycle. *Rad & Environm Biophys* **12**: 31~39, 1975
- 51) 下山正徳・木村禰代二 : 各種抗がん剤の *in vitro* における殺細胞作用について. 最新医学 **28**: 1024~1040, 1973
- 52) Skipper HE, Schabel FM Jr and Wilcox WS : Experimental evaluation of potential anticancer agents. XIII. On the criteria and kinetics associated with curability of experimental leukemia. *Cancer Chemother Rep* **35**: 1~111, 1964
- 53) Bruce WR, Meeker BE and Valeriote FA : Comparison of the sensitivity of normal hematopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic agents administered *in vivo*. *J Natl Inst* **37**: 233~245, 1966
- 54) 御供泰治・太田和雄 : 固型癌の細胞回転と化学療法. 癌と化療 **5**: 33~39, 1978
- 55) 塚越 茂 : IV. 癌化学療法における基礎的問題. 癌化学療法の基礎と臨床. 古江 尚・太田和雄・田口鉄男・藤田 浩, p45, 癌と化学療法社, 東京, 1977
- 56) Little JB : Repair of sub-lethal and potentially lethal radiation damage in plateau phase cultures of human cells. *Nature* **224**: 804~806, 1969
- 57) Little JB, Hahn GM, Frindel E and Tubina M: Repair of potentially lethal radiation damage *in vitro* and *in vivo*. *Radiology* **106**: 689~694, 1973
- 58) Bay GR, Hahn GM, Bagshaw MA and Kurkjian S : Cell survival and repair of plateau phase cultures after chemotherapy—relevance to tumor therapy and the *in vitro* screening of new agents. *Cancer Chemother Rep* **57**: 473~475, 1973
- 59) Hahn GM, Ray GR, Gordon LF and Kallman RF : Response of solid tumor cells exposed to chemotherapeutic agents *in vivo*: Cell survival after 2- and 24- hour exposure. *J Natl Cancer Inst* **50**: 529~533, 1973
- 60) Takabe Y, Watanabe M, Miyamoto T and Terasima T : Demonstration of repair of potentially lethal damage in plateau phase cells of Ehrlich ascites tumor after exposure of bleomycin. *Gann* **65**: 559~560, 1974
- 61) Twentyman RR and Bleehen NM : Studies of potentially lethal damage in EMT 6 mouse tumor cells treated with bleomycin either *in vitro* or *in vivo*. *Brit J Cancer* **3**: 491~501, 1975
- 62) 高部吉庸・渡辺道典・宮本忠昭・勝俣剛志・寺島東洋三 : プレオマイシンのエールリッヒ腹水腫瘍細胞に対する致死効果およびその最適投与法の提案. 癌と化療 **3**: 137~144, 1976
- 63) Byfield JE, Chan PYM and Seagren S: Radiosensitization by 5-fluorouracil: Molecular origins and clinical scheduling implications. *Proc Am Assoc Cancer Res* **18** (ASCO abstract 294): 74, 1977
- 64) 中嶋征男・宮本忠昭・田辺政裕・渡辺郁雄・寺島東洋三 : マウス L 細胞における X 線と 5-Fluorouracil の相乗致死効果. 癌の臨床 **24**: 883~888, 1978
- 65) Vietti T, Eggerding F and Valeriote F: Combined effect of X radiation and 5-fluorouracil on survival of transplanted leukemic cells. *J Natl Cancer Inst* **47**: 865~870, 1971
- 66) Putten LM, Keizer HJ and Mulder JH : Perspective in cancer research : Synchronization in tumor chemotherapy. *Europ J Cancer* **12**: 79~85, 1976
- 67) Watanabe M, Takabe Y, Katsumata T and Terasima T : Effects of bleomycin on progression through the cell cycle of mouse L cells. *Cancer Res* **34**: 878~881, 1974
- 68) 設楽信行 : 脳腫瘍の Cellular Synchronization-

- Radiation Therapy に関する基礎的研究ならびに臨床例の解析. 神経進歩 22: 119~131, 1978
- 69) Samuels ML: Bleomycin (NSC-125066) followed by cyclophosphamide (NSC-26271), vincristine (NSC-67574), methotrexate (NSC-740) and 5-fluorouracil (NSC-19893) for non-oat cell bronchogenic carcinoma. Cancer Treat Rep 60: 61~68, 1976
- 70) Lampkin BC, Nagao T and Mauer AM: Drug effect in acute leukemia. J Clin Invest 50: 2204~2214, 1971
- 71) Valeriote FA and Edelstein MB: The role of cell kinetics in cancer chemotherapy. Semi Oncol 4: 217~226, 1977
- 72) Fischer GA: Predictive tests in culture of drug resistant mutants selected *in vivo*. Prediction of response in cancer therapy (T.C. Hall ed.). Natl Cancer Inst Monog 34: 131~134, 1971
- 73) Schmid FA and Hutchison DJ: Effect of different dose of methotrexate, cytosine arabinoside and cyclophosphamide on drug resistance in mice with L 1210 leukemia. Cancer Chemother Rep 56: 473~480, 1972
- 74) Livingston R and Mira J: Non-cross-resistant combinations in patients with extensive small-cell lung cancer. Proc Am Assoc Cancer Res (ASCO abstract C-512): 449. 1980
- 75) Soloway MS, Ikard M and Ford K: cis-Diamminedichloroplatinum (II) in locally advanced and metastatic urothelial cancer. Cancer 47: 476~480, 1981
- 76) Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, Watson RC, Ahmed T, Weiselberg LR, Geller N, Hollander PS, Herr HW, Sogani PC, Morse MJ and Whitmore WF: Preliminary results of M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for transitional cell carcinoma of the urothelium. J Urol 133: 403~407, 1985
- 77) Meyers FJ, Palmer JM, Freiha FS, Harker EG, Shortliffe LD, Hannigan J, McWhirter K and Torti FM: The fate of the bladder in patients with metastatic bladder cancer treated with cisplatin, methotrexate and vinblastine: A Northern California Oncology Group Study. J Urol 134: 1118~1121, 1985
(1986年8月18日迅速掲載受付)