

腎細胞癌化学療法の *in vitro* での実験的研究

1. 細胞回転からみた各種制癌剤の併用効果について

滋賀医科大学泌尿器科学教室（主任：友吉唯夫教授）

神 波 照 夫

EXPERIMENTAL STUDY OF CHEMOTHERAPY OF RENAL CELL CARCINOMA

1. COMBINATION EFFECT THROUGH THE USE OF CELL KINETICS-DIRECTED TREATMENT SCHEDULES

Teruo KONAMI

From the Department of Urology, Shiga University of Medical Science

(Director: Prof. T. Tomoyoshi)

To establish a useful combination chemotherapy of advanced renal cell carcinoma, I determined the optimal design of therapeutic schedules with an *in vitro* experimental model. At first, I determined the chemosensitivity of the NC-65 cell line established from human renal cell carcinoma. The method used is an original growth inhibition test which traces the cell growth in the same area by photography. This method can be completed in a short term and cell growth inhibition rate evaluated sequentially and precisely as well.

Among 8 tested drugs, vincristine (VCR), adriamycin (ADM) and carboquone (CQ) were the most effective drugs. The effect of these three drugs on cell cycle traverse was estimated by flow cytometry. With all of these three drugs, at a concentration which inhibits cell growth less than 50%, an accumulation of cells in the S and G2-M phases was observed 12 hours after the exposure to the drugs. Although 24 hours later, the histogram showed the increase in cells of a G1 phase and decrease in G2-M cells, followed by the cell progression partially synchronized. The tendency was the most characteristic in VCR although it was not so significant in CQ.

Effectiveness of the simultaneous or sequential combination of two-drugs was compared to the calculated expected effect using the t-test. At a low concentration which inhibits cell growth 32% (IC 32), most of the combination groups showed a weak effect. Sequential treatment at 12-hour intervals such as with VCR-ADM, CQ-VCR, CQ-ADM, were considered more effective than that of a 24-hour interval.

In the medium concentration which inhibits cell growth 50% (IC 50), simultaneous administration of ADM and CQ showed a relatively high inhibition rate. Sequential treatment of CQ followed by VCR was the most cytotoxic. Comparison of sequential administration schedules, administration at 12-hour intervals showed a higher inhibition rate than that of a 24-hour interval, in the combination of VCR-ADM, CQ-ADM.

Key words: Renal cell carcinoma, Chemotherapy, Cell kinetics, *in vitro* chemosensitivity

緒 言

腎細胞癌は初診時すでに遠隔転移を有するものが約30%をしめ^{1,2)}、腎摘除術後に転移が出現する症例も加えると約半数が転移を有し²⁾、しかもこのような進行した腎細胞癌の予後はきわめて不良である¹⁻⁴⁾。化学療法も従来からさまざまな方法で行なわれてきたが、いまだ、適切な治療法は確立されるに至っていない⁴⁻⁸⁾。近年インターフェロンの有効性が注目され^{9,11)}、また新しい観点に立脚した免疫療法剤も試みられているが^{12,13)}、その有効性は当初期待されたほどのものではなく、再度化学療法の検討に関心が高まりつつある。とくに近年 *in vitro* および *in vivo* での薬剤感受性評価システムが進歩し、臨床へのフィードバックが比較的容易になったことも背景のひとつに挙げられるであろう。なかでも1977年 Salmon & Hamburger ら¹⁴⁾により開発された human tumor cell colony forming assay は臨床効果と高い相関をもつ抗癌剤スクリーニング法として、とくに腎細胞癌においては高いコロニー形成率が得られるため、近年、諸家により多くの報告がなされている¹⁵⁻¹⁷⁾。これによると、腎細胞癌においても、従来考えられたほ

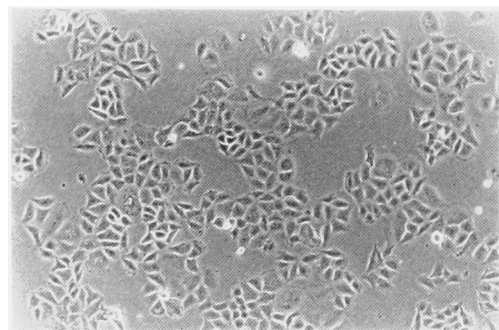


Fig. 1. Microphotographic view of NC-65 cells. Polygonal epithelial cells cover the plastic vessels. Reduced 200 times by a phasecontrast microscope.

Table 1. Biological characteristics of NC-65 cells.

Origin : Renal cell carcinoma
67 yo male
(moderately differentiated granular cell carcinoma)
Date of establishment : June 1976
Doubling time : 25.6 hr
Mode of chromosome : 61 (52~66)
Plating efficiency : 65.74 ± 6.76
Heterotransplantation : (+)

ど有効薬剤は皆無というのではなく、投与法をいまい度吟味する価値のある薬剤も知られている。

しかし、従来の制癌剤感受性試験では、固形癌に対して、薬理学的特性をも考慮した併用療法の検討は困難であり、報告は少ない¹⁸⁾。*in vitro* での cell kinetics からみた薬剤の効果検討は、*in vivo* よりも容易かつ正確であり、臨床応用への貴重な基礎的データを提供するものである。とくに、従来 radio autograph (RA) により行なわれてきた細胞回転の研究は、flow cytometry (以下 FCM) の開発により、近年飛躍的な進歩を遂げてきた¹⁹⁾。そこで今回著者はヒト腎細胞癌継代培養株 NC-65 細胞を対象に、まず独自の工夫を加えた薬剤感受性試験を用いて有効薬剤のスクリーニングを行ない、これらの薬剤をどのように併用すれば最も効果的であるかを、FCM を用い cell kinetics の面からも検討したので報告する。

材料ならびに方法

細胞

実験に使用した培養細胞は、1976年 Höehn ら²⁰⁾によって、67歳男子腎細胞癌患者の原発巣より樹立された NC-65 細胞で、培養皿上で単層に増殖する (Fig. 1)。その生物学的特徴を、Table 1 に示すが、この細胞の plating efficiency は比較的低く、少数の細胞を培養するコロニー形成法には不適當である。細胞は10% FCS 添加 Eagle's MEM (大日本製薬、東京) を基本培養液とし、通常、1週間ごとに0.25% トリプシン (阪大微研) 処理後、プラスチックシャーレ (Corning 25010) を培養皿として、5% CO₂ 環境下にて継代培養された。

実験 1

細胞増殖曲線

上記の直径 6 cm の培養皿の培養面に、A から P まで、560 μ m 四方の計16区画の樹目を刻印し、NC-65 細胞を 1×10^4 /ml の単離細胞浮遊液とし、均等に接種した。A 群として、シャーレ7枚について、連日7日目まで写真撮影し、観察区域内の増殖比率を算出した。B 群として、無作為に連日7枚のシャーレを取り出し、細胞剥離後、トリパンブルー不染の生細胞数を血球計算盤にて計算し、増殖率を求めた。A、B 2 群の増殖比率の平均値、および標準偏差を求め、片対数グラフ上で比較した。

実験 2

有効薬剤の選定

a. 薬剤

計8種類の薬剤について、臨床投与時の末梢血中濃

度を参考として、濃度設定の予備実験の後に、1 薬剤について 5 段階の濃度について実験を行なった (Table 2).

b. 方法

Fig. 2 に示すごとく、 1×10^4 /ml 個の細胞を接種し、48 時間後に薬剤接触前の観察区域内をあらかじめ写真撮影したのち、各薬剤を 2 時間、あるいは 24 時間接触し、phosphate buffered saline, Ca・Mg free (以下 PBS (-)) で洗浄し、培養液を 3 ml 加え静置培養した。薬剤接触 96 時間後、この区域を写真撮影し、薬剤接触前後のフィルムを比較し、薬剤接触前に

比べ明らかに増殖を示すコロニー内の細胞数を数え、対照群に対する増殖比率を算出し、これを片対数表上に plot して、dose response curve を作成した。得られた曲線から、50% 増殖抑制する濃度 (以下 IC50) を算出し、*in vivo* におけるマウスの LD50 との比を有効係数 (以下 EI) とし、臨床的な有効性を示唆する指標とした。実験は原則として triplicate で 3 回繰り返し、平均値および標準偏差を求めた。

実験 3

各薬剤の細胞回転に及ぼす効果

実験 2 で EI が大きく有効と考えられた vincris-

Table 2. Drugs used in chemosensitivity test.

Drug		Concentration	
		24 hr exposure (mcg/ml)	2 hr exposure (mcg/ml)
Carbaziquinone	(CQ)	5×10^{-4} , 7.5×10^{-4} , 10^{-3} , 2.5×10^{-3} , 5×10^{-3}	5×10^{-3} , 10^{-2} , 2.5×10^{-2} , 5×10^{-2} , 1
5-Fluorouracil	(5-Fu)	10^{-1} , 5×10^{-1} , 1, 5, 75	
Methotrexate	(MTX)	5×10^{-2} , 10^{-1} , 5×10^{-1} , 1, 5	10^{-1} , 5×10^{-1} , 1, 5, 10
Nimustine hydrochloride (ACNU)		5×10^{-1} , 7.5×10^{-1} , 1, 5, 10	
Doxorubicin	(ADM)	5×10^{-4} , 7.5×10^{-4} , 10^{-3} , 5×10^{-3} , 10^{-2}	5×10^{-3} , 10^{-2} , 2.5×10^{-2} , 5×10^{-2} , 10^{-1}
Mitomycin C	(MMC)	10^{-3} , 5×10^{-3} , 10^{-2} , 5×10^{-2} , 10^{-1}	10^{-2} , 10^{-1} , 5×10^{-1} , 1, 5
Vincristine	(VCR)	5×10^{-4} , 7.5×10^{-4} , 10^{-3} , 2.5×10^{-2} , 5×10^{-3}	10^{-3} , 5×10^{-3} , 10^{-2} , 2.5×10^{-2} , 5×10^{-2}
Cisplatin	(CDDP)	10^{-2} , 5×10^{-2} , 10^{-1} , 5×10^{-1} , 1	5×10^{-1} , 1, 5, 10, 50

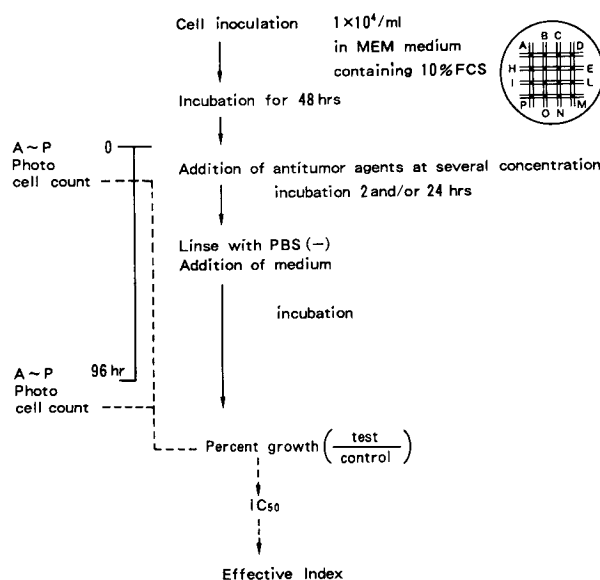


Fig. 2. Assay system of cytotoxicity by drugs.

tine (VCR), adriamycin (ADM), carboquone (CQ) の3剤について、FCMを用い、各薬剤2時間単独接触で増殖を約32%抑制する低濃度群 (VCR 1×10^{-2} /ml, ADM 2×10^{-2} /ml, CQ 1.2×10^{-2} /ml)と、約50%抑制する中濃度群 (VCR 1.6×10^{-2} /ml, ADM 3×10^{-2} /ml, CQ 1.8×10^{-2} /ml) の2種類の濃度における薬剤接触後のDNAヒストグラムの経時的变化を検討した。方法は、Fig. 3のごとく、細胞数を 5×10^4 /ml に調整し、培養フラスコ (Corning 25100) に細胞浮遊液 6 ml を入れ培養した。培養48時間後に、それぞれの濃度の薬剤を2時間接触させ、PBS (-) で洗浄後、培養液を加え、静置培養した。その後、12時間あるいは24時間ごとに細胞をトリプシンで剥離し、30%, 50% MEOH で固定し、RNase (0.1% Sigma) 処理、propidium iodide (PI, Hoechst) 染色を行ない、40 mcm メッシュでろ過し、FCM用検体とした。使用した flow cytometer は BIO/PHISICS 480A で、得られたヒストグラムから、Baischら²¹⁾の方法に準じ、各周期の比率を算出した。実験は3回繰り返し、各周期の比率はその平均値であらわした (Fig. 3)。

実験4

薬剤の併用効果の検討

VCR, ADM, CQ の3剤を用い、2剤同時あるいは時間差接触による増殖抑制効果を、低濃度群と中濃

度群に分け比較検討した。実験3の結果から、時間差接触では1剤接触後、その細胞周期の変化が著明な12時間、および24時間後に他剤を接触させ、初回薬剤接触後96時間で効果判定を行なった。これらの結果を推計学的に比較するために、次のような方法で検討を行なった。第1に、得られた増殖比率は、対照群に対するパーセントであらわされ (percent growth, P.G.), これらの値を正規分布として比較する必要があるため、個々の増殖比率を Fisher の逆正弦変換をもちい角変換し、その平均値と標準偏差を求めた ($\text{Arcsin } \sqrt{P.G.}$)。第2に、時間差接触の有効率を比較する場合、培養から薬剤接触までの時間で増殖率が異なるものを比較することになるため、培養後48時間、60時間、72時間後にそれぞれ単独で接触させた場合での対照群に対する増殖比率およびそれらを角変換した値をあらかじめ測定した。この各薬剤単独での効果の積をそれぞれの条件下での期待値 (expected effect) とし、実際に実験で得られた値との差を、併用による有効性の指標 (combination value) とした。さらに、各併用法における比較を、対応の無い場合の t 検定で、1%以下の危険率で有意に増殖が抑制された組み合わせのみを有用 (significance) として示した。

結 果

実験1 細胞増殖曲線 (Fig. 4)

1×10^4 /ml の細胞を培養した場合、培養後24時間の lag phase をおいて、48時間後より logarithmic phase に入り (倍加時間: 25.6時間)、144時間後には、stationary phase に達した。写真撮影により増殖率を算定したA群においては、培養後24時間から144時間まで、細胞を剥離後生細胞数を算定したB群と非常によく相関した増殖率を示した。前述のとおり、培養後144時間以降では、増殖は plateau となるので、以下の実験では培養後48時間に薬剤を接触させ、培養144時間後における細胞の増殖率を比較することにした。

実験2 有効薬剤の選定 (Fig. 5 a,b, Table 3)

すべての薬剤において濃度依存性に増殖抑制がみられた。なかでも VCR, ADM, CQ の3剤は、2時間接触でも24時間接触においても、低濃度領域から著明な増殖抑制効果がみられた。このほか、mitomycin C (MCC) が2時間接触、24時間接触でも高い増殖抑制を示した。cisplatin (CDDP) は、24時間接触で比較的強い抑制効果を示したのに反し、2時間接触では軽度であった。methotrexate (MTX), 5-fluorouracil (5-FU), nimustine hydrochloride

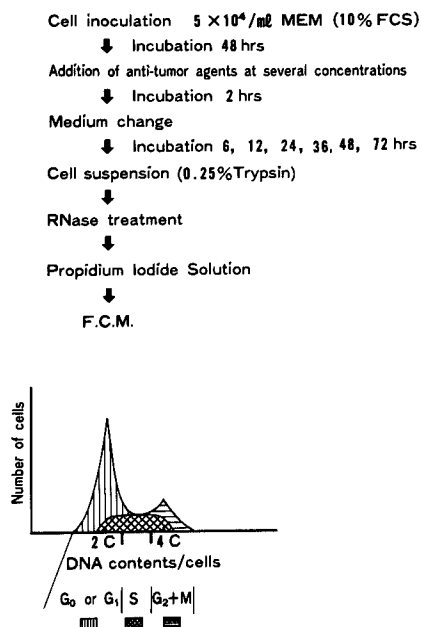


Fig. 3. Method of FCM analysis.

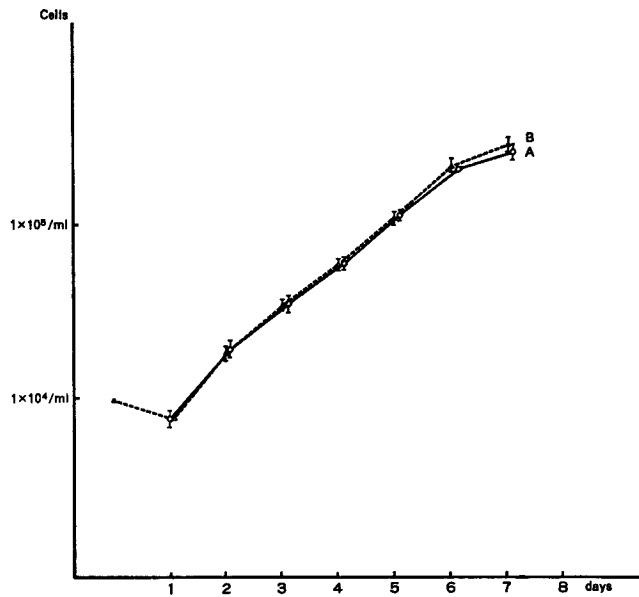
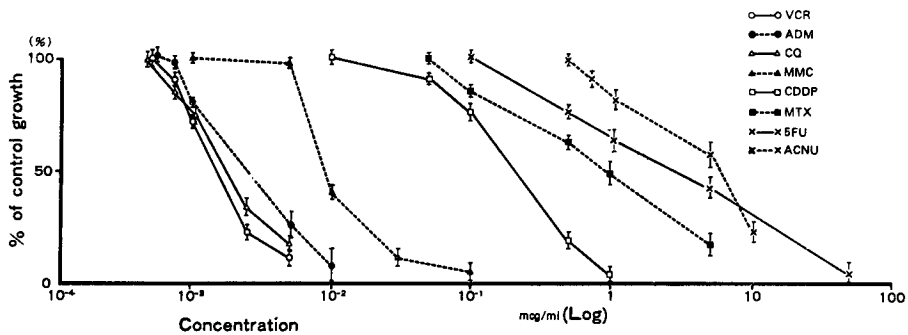
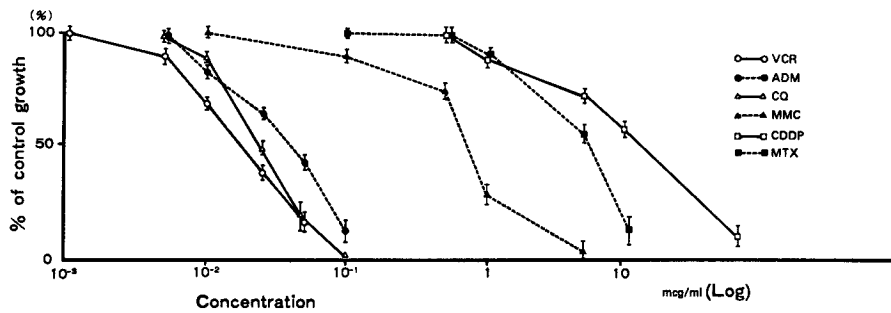


Fig. 4. Cell multiplication of NC-65 cells during 7 days. Close correlation was obtained in the growth curve by 2 different methods, serial microphotographic method (A) and actual counting of whole cells (B).



(A)



(B)

Fig. 5. Effect of varying concentration of tested drugs on growth of NC-65 cells. The results are expressed as percentage of control growth.
A. 24 hrs exposure B. 2 hrs exposure

(ACNU) の3剤では24時間接触でも高濃度領域で僅かに増殖抑制がみられたのみで、感受性は低かった (Fig. 5). IC₅₀ をみると, VCR, ADM, CQ, MMC, MTX では, 2時間接触では24時間接触の10~20倍の濃度を要したが, CDDPは約100倍の濃度を要した.

EI は, VCR, ADM, CQ の3剤で24時間接触, 2時間接触のいずれにおいても高値を示し, 本細胞のこれら3剤に対する高感受性が証明された (Table 3). 実験3 各薬剤の細胞回転に及ぼす効果 (Fig. 6, 7)

単独で増殖を約32%抑制する低濃度群では, 3剤とも12時間後にS期からG2-M期の軽度の増加を示し, 24時間後には逆にG1期は増加しS期, G2-M期の比率は減少した. VCRではとくにG2-M期細胞の比率の変化, ADMではS期細胞の比率の変化が顕著であった. CQは12時間後に, G2-M期の増加にともないS期も軽度増加するが, 24時間後では対照群と比べ, 軽度のS期減少を示すのみであった. 36時間以降では対照群とほぼ同様の波形を呈した (Fig. 6).

単独で増殖を約50%抑制する中濃度群では, 低濃度群でみられた細胞周期の変化はより顕著となった. 12時間後でVCR, ADM, CQの順にG2-M期への強い集積を示し, 24時間後では逆にこの順にS期, G2-M期の減少を示した. VCRでは, 36時間後にG1期の増加, G2-M期の減少を示した後, 48時間から72時間にかけてS期の軽度の増加を認めた. ADM, CQでは, 36時間後にG1期の増加, G2-M期の減少を示し, 72時間後には再び対照と同様の波形となった (Fig. 7).

Table 3. 50% growth inhibition concentration *in vitro* (IC₅₀) and effective index.

$$(EI = \frac{LD_{50} \text{ in vivo}}{IC_{50} \text{ in vitro}})$$

Drug	IC 50 in vitro		LD 50 in vivo	Effective Index (E · I)	
	2 hr	24 hr		2 hr	24 hr
CQ	1.8×10 ⁻² mg/ml	1.9×10 ⁻³ mg/ml	6.0 mg/kg	333.3	3158
ACNU	—	5.8 mg/ml	65 mg/kg	—	11.2
ADM	3.0×10 ⁻² mg/ml	2.1×10 ⁻³ mg/ml	9.8 mg/kg	326.7	4665.7
MMC	7.1×10 ⁻¹ mg/ml	8.6×10 ⁻² mg/ml	5.0 mg/kg	7.0	58.2
5 FU	—	5.2 mg/ml	262 mg/kg	—	50.4
MTX	5.2 mg/ml	6.2×10 ⁻¹ mg/ml	180 mg/kg	34.6	290.3
VCR	1.6×10 ⁻² mg/ml	1.7×10 ⁻³ mg/ml	2.1 mg/kg	131.3	1235
CDDP	10.4 mg/ml	9.4×10 ⁻² mg/ml	17.8mg/kg	1.7	189.4

実験4 薬剤の併用効果の検討 (Table 4~6)

a. 低濃度群

Dose response curve より, 培養後48時間で薬剤を単独で接触させた場合, 32%増殖抑制を示す濃度は,

Table 4. Relative growth rate (percent growth P.G.) at low concentration group—a and middle concentration group—b.

After 48 hrs: Drug exposure 48 hrs after cell seeding

After 60 hrs: Drug exposure 60 hrs after cell seeding

After 72 hrs: Drug exposure 72 hrs after cell seeding

$\text{Arcsin } \sqrt{P.G.} = \sin^{-1} \sqrt{P.G.}$

Group	Drug	Concentration mg/ml	After 48 hrs		After 60 hrs		After 72 hrs	
			Percent Growth (P. G)	$\text{Arcsin } \sqrt{P.G.}$	Percent Growth (P. G)	$\text{Arcsin } \sqrt{P.G.}$	Percent Growth (P. G)	$\text{Arcsin } \sqrt{P.G.}$
a	VCR	1×10 ⁻²	68.24 ± 4.63	56.84 ± 2.86	70.32 ± 5.19	57.01 ± 3.22	71.62 ± 6.23	57.51 ± 3.86
	ADM	2×10 ⁻²	67.46 ± 4.72	55.28 ± 2.99	68.64 ± 6.23	55.95 ± 3.86	72.86 ± 5.46	58.61 ± 3.38
	CQ	1.2×10 ⁻²	69.50 ± 4.28	56.52 ± 2.63	69.81 ± 5.33	56.69 ± 3.30	70.35 ± 7.13	58.26 ± 4.42
b	VCR	1.6×10 ⁻²	53.33 ± 4.58	46.92 ± 2.64	56.24 ± 6.32	48.60 ± 3.92	58.31 ± 5.27	49.79 ± 3.27
	ADM	3×10 ⁻²	53.63 ± 4.87	47.09 ± 2.81	58.63 ± 4.86	49.91 ± 3.02	59.72 ± 6.56	50.60 ± 3.93
	CQ	1.8×10 ⁻²	52.91 ± 4.70	46.67 ± 2.70	53.35 ± 4.92	46.93 ± 3.06	56.67 ± 5.68	48.82 ± 3.52

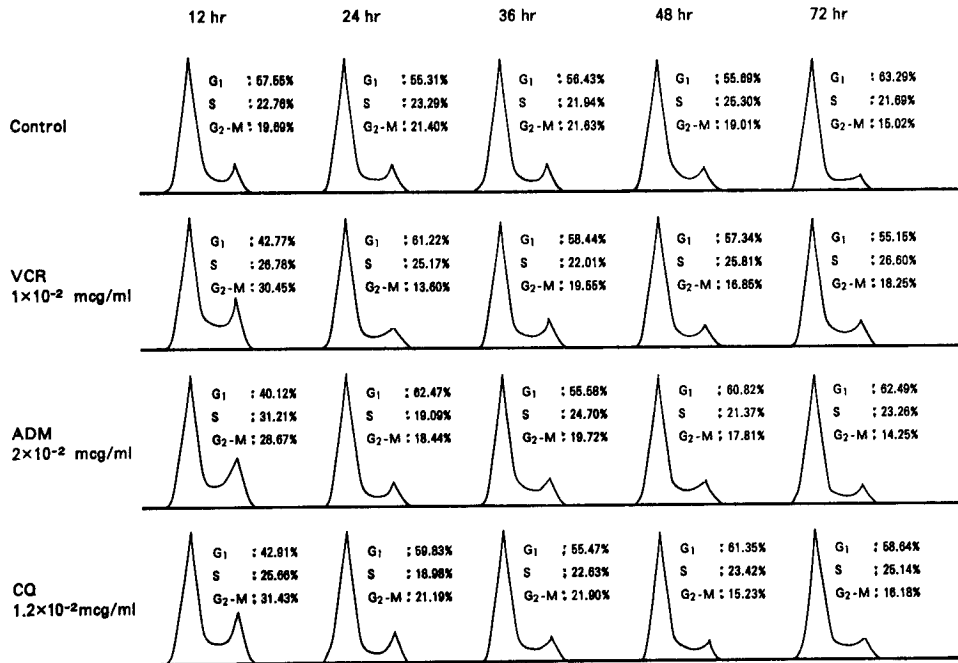


Fig. 6. Changes of DNA histograms after exposure of the drugs for 2 hrs.
Low concentration group
Minor accumulation of cells in S and G2-M was observed 12hrs after the drug exposure, decrease 24 hrs after.

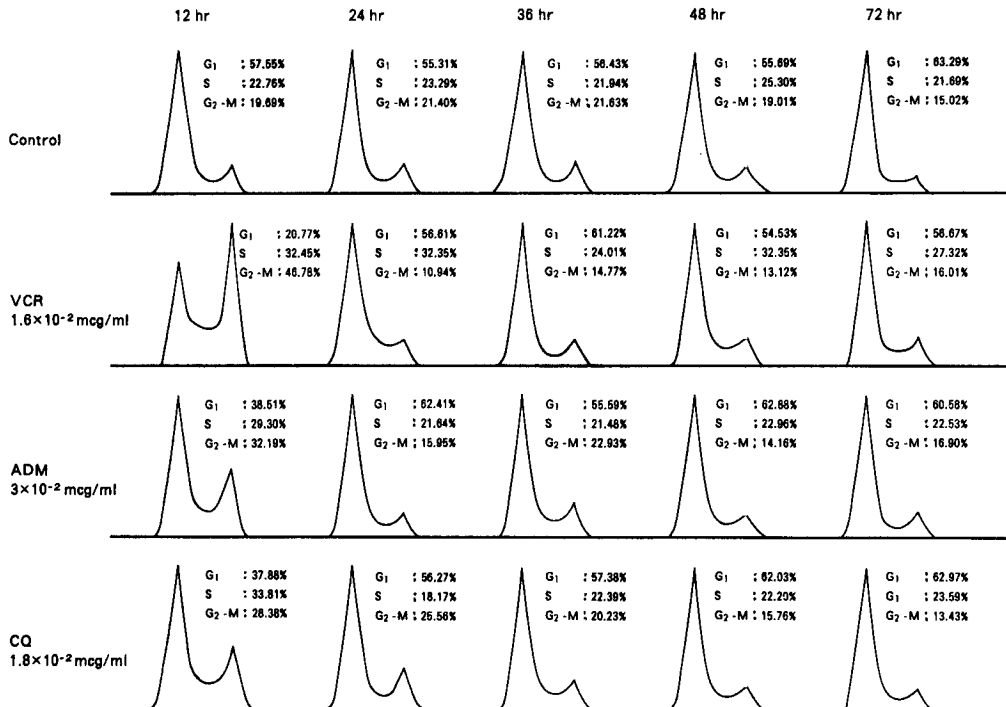


Fig. 7. Changes of DNA histograms after exposure of the drugs for 2 hrs.
Middle concentration group
Change of S and G2-M accumulation was seen more significantly than low concentration group. After 36 hrs cell cycle progression was partly synchronized.

Table 5. Comparison of combination effect among the different combination schedules. Low concentration group

	Drug combination (mcg/鼠)	Percent Growth (P.G)	Arcsin $\sqrt{P.G}$	Expected effect	Combination value
VCR ↓ ADM	VCR 1×10^{-2} + ADM 2×10^{-2}	53.48 ± 4.78	47.00 ± 2.76	30.67	-16.33
	VCR $1 \times 10^{-2} \xrightarrow{12hr}$ ADM 2×10^{-2}	50.12 ± 5.18	45.07 ± 2.98	31.24	-13.83
	VCR $1 \times 10^{-2} \xrightarrow{24hr}$ ADM 2×10^{-2}	60.22 ± 3.67	50.91 ± 2.17	32.73	-18.18
	ADM $2 \times 10^{-2} \xrightarrow{12hr}$ VCR 1×10^{-2}	60.42 ± 5.79	51.05 ± 3.42	31.51	-19.54
	ADM $2 \times 10^{-2} \xrightarrow{24hr}$ VCR 1×10^{-2}	56.86 ± 4.78	48.96 ± 2.80	31.79	-16.81
					*
VCR ↓ CQ	VCR 1×10^{-2} + CQ 1.2×10^{-2}	58.94 ± 5.15	50.18 ± 3.02	31.56	-18.62
	VCR $1 \times 10^{-2} \xrightarrow{12hr}$ CQ 1.2×10^{-2}	59.19 ± 4.08	50.31 ± 2.38	31.77	-18.53
	VCR $1 \times 10^{-2} \xrightarrow{24hr}$ CQ 1.2×10^{-2}	64.37 ± 4.29	53.38 ± 2.58	32.72	-20.66
	CQ $1.2 \times 10^{-2} \xrightarrow{12hr}$ VCR 1×10^{-2}	51.70 ± 4.77	45.98 ± 2.75	32.22	-13.76
	CQ $1.2 \times 10^{-2} \xrightarrow{24hr}$ VCR 1×10^{-2}	62.16 ± 4.29	52.00 ± 2.61	32.50	-19.50
					*
ADM ↓ CQ	ADM 2×10^{-2} + CQ 1.2×10^{-2}	55.42 ± 6.93	48.14 ± 4.03	31.24	-16.74
	ADM $2 \times 10^{-2} \xrightarrow{12hr}$ CQ 1.2×10^{-2}	58.54 ± 3.45	49.88 ± 1.99	31.30	-18.58
	ADM $2 \times 10^{-2} \xrightarrow{24hr}$ CQ 1.2×10^{-2}	55.88 ± 4.89	48.34 ± 2.75	32.21	-16.13
	CQ $1.2 \times 10^{-2} \xrightarrow{12hr}$ ADM 2×10^{-2}	50.20 ± 3.97	45.11 ± 2.28	31.62	-13.49
	CQ $1.2 \times 10^{-2} \xrightarrow{24hr}$ ADM 2×10^{-2}	58.67 ± 5.67	50.23 ± 3.24	32.84	-17.39
					*

*P<0.01

Table 6. Comparison of combination effect among the different combination schedules. Medium concentration group

	Drug combination (mcg/鼠)	Percent Growth (P.G)	Arcsin $\sqrt{P.G}$	Expected effect	Combination value
VCR ↓ ADM	VCR 1.6×10^{-2} + ADM 3×10^{-2}	42.34 ± 6.16	40.58 ± 3.58	22.09	-18.49
	VCR $1.6 \times 10^{-2} \xrightarrow{12hr}$ ADM 3×10^{-2}	30.81 ± 2.92	33.70 ± 1.81	23.42	-10.28
	VCR $1.6 \times 10^{-2} \xrightarrow{24hr}$ ADM 3×10^{-2}	41.81 ± 3.74	40.27 ± 2.16	23.74	-16.53
	ADM $3 \times 10^{-2} \xrightarrow{12hr}$ VCR 1.6×10^{-2}	35.53 ± 3.64	36.57 ± 2.16	22.89	-13.68
	ADM $3 \times 10^{-2} \xrightarrow{24hr}$ VCR 1.6×10^{-2}	34.37 ± 5.35	35.84 ± 3.25	23.45	-12.39
					*
VCR ↓ CQ	VCR 1.6×10^{-2} + CQ 1.6×10^{-2}	38.30 ± 7.41	38.13 ± 4.58	21.90	-16.23
	VCR $1.6 \times 10^{-2} \xrightarrow{12hr}$ CQ 1.6×10^{-2}	36.91 ± 4.48	37.39 ± 2.63	22.02	-15.37
	VCR $1.6 \times 10^{-2} \xrightarrow{24hr}$ CQ 1.6×10^{-2}	37.79 ± 2.49	37.92 ± 1.47	22.91	-15.06
	CQ $1.6 \times 10^{-2} \xrightarrow{12hr}$ VCR 1.6×10^{-2}	18.66 ± 3.39	25.51 ± 2.50	22.68	-2.83
	CQ $1.6 \times 10^{-2} \xrightarrow{24hr}$ VCR 1.6×10^{-2}	16.61 ± 5.89	23.78 ± 4.45	23.24	-0.54
					*
ADM ↓ CQ	ADM 3×10^{-2} + CQ 1.6×10^{-2}	27.75 ± 6.27	31.65 ± 4.11	21.98	-9.67
	ADM $3 \times 10^{-2} \xrightarrow{12hr}$ CQ 1.6×10^{-2}	40.74 ± 3.13	39.66 ± 1.82	22.16	-17.56
	ADM $3 \times 10^{-2} \xrightarrow{24hr}$ CQ 1.6×10^{-2}	33.89 ± 3.03	35.62 ± 1.85	22.99	-12.63
	CQ $1.6 \times 10^{-2} \xrightarrow{12hr}$ ADM 3×10^{-2}	26.88 ± 4.62	31.17 ± 2.95	23.29	-7.88
	CQ $1.6 \times 10^{-2} \xrightarrow{24hr}$ ADM 3×10^{-2}	31.15 ± 3.54	33.68 ± 2.33	23.62	-10.06
					*

*P<0.01

VCR 10^{-2} mcg/ml, ADM 2×10^{-2} mcg/ml, CQ 1.2×10^{-2} mcg/ml で、その増殖比率に3剤間で有意差は認められなかった。培養後60時間、72時間に上記の濃度で接触させ、144時間後に増殖比率を算定すると、48時間後に接触させたものに比し、若干増殖比率は高値を示した (Table 4)。

この濃度における併用では、期待値に比べ、高い増殖比率を示すものが多いが、時間差接触においては、VCR 接触後12時間で ADM を接触した場合および CQ 接触後12時間で VCR あるいは ADM を作用させた場合に、24時間後に接触させた併用群に比べ、増殖は強く抑制された (Table 5)。

b. 中濃度群

Dose response curve より、50%増殖を抑制する、VCR 1.6×10^{-2} mcg/ml, ADM 3×10^{-2} mcg/ml, CQ 1.8×10^{-2} mcg/ml の濃度を選び、対照群に対する増殖率を比較すると3剤間に有意差は認められなかった。また培養後60時間、72時間で薬剤を接触すると増殖比率は軽度増加した (Table 4)。

この濃度における併用効果をみると、2剤同時接触では、ADM と CQ の同時接触で期待値に近い効果を示したが、他の2つの組み合わせではいずれも期待値に比べ、非常に低い増殖抑制しか認められなかった。時間差接触では、CQ 接触後12時間、24時間に VCR を作用させたものが期待値とほぼ同等の増殖抑制を示し、同時併用に比べても顕著な効果を認めた。その他では、VCR 接触後12時間で ADM を接触させた組み合わせ、ADM 接触後24時間で CQ を接触させた組み合わせ、CQ 接触後12時間で ADM を接触させた組み合わせに、強い増殖抑制が示された (Table 6)。

考 察

In vitro における制癌剤感受性試験は、新しく開発された制癌剤の1次スクリーニングとして、あるいは臨床材料を用い、有効な薬剤を選定し、臨床応用への基礎データとして、その果たす役割は大きい。しかし、近年ではさまざまな悪性腫瘍において併用療法の有効性が確認され、どのような併用を行なえば最も効果的で、しかも少ない投与量で副作用を分散できるかも、臨床医にとって重大な関心事である。とくに、Skipper ら²²⁾が、*in vivo* で、抗癌剤の殺細胞作用の cell cycle specificity から、至適投与法によって schedule dependency があることを報告して以来、同調培養法や、ラジオアイソトープ、FCM などを用い、抗癌剤の細胞周期上の致死効果や、細胞回転に及ぼす効果について、多くの基礎的な研究がなされてき

た²³⁻³⁶⁾。しかし、*in vitro* における併用効果の判定は、手技的にも煩雑になり、またその評価も難しい面があるため、応用できる感受性試験の方法も限定されざるを得ない。従来用いられてきたおもな感受性試験のうち、増殖抑制法は、短時間で判定できる方法として多くの研究者により愛用されてきたが、本法の最大の欠点として、分裂増殖はするがやがて死滅していく細胞、すなわち reproducing death を示す細胞を識別することは困難で、このため、判定日より IC50 値は変化し、定量性に欠けることが指摘され³⁷⁾、現在ではあまり用いられなくなった。また、Puck ら³⁸⁾により開発されたコロニー形成法は、細胞の増殖能を比較的正確に反映する方法として現在広くもちいられている。しかしこの方法も、細胞の単離率が100%に近いこと、コロニー形成能が高いこと、接種細胞数に比例してコロニーが形成されることなどが必須の条件となるため、応用できる細胞は限定され、しかも判定に長期間を要することが最大の問題点とされている。また、従来から映画法による増殖動態の解析や^{39,40)}、マイクロプレートを用い、microcolony を算定する方法⁴¹⁻⁴³⁾も行なわれてきたが、著者は、これらの変法として、薬剤接触前後の一定区域内の生細胞数を正確に、短期間に数値として表わす方法として本法を考案した。この方法は対数的増殖期にはいった細胞(コロニー)のみを対象とするので、薬剤の効果を正確に判定することがまず特徴として挙げられる。この他、細胞に対するトリプシンや EDTA の影響を排除でき、薬剤の併用効果をみる目的でも、経時的に薬剤を接触させ、その増殖動態の変化を検討することが可能である。もちろん、本法でも reproducing death を全く除外できないものの、Table 4 に示されたように判定日による誤差はごく軽度で、dye exclusion method に比べ、増殖能を正確に反映しているといえる。事実 FCM の実験結果からも、薬剤接触後72時間での FCM のパターンは、いずれの濃度でもコントロールに近い波形に復し、72時間以降では薬剤による細胞の増殖動態への影響は軽微であった。

腎細胞癌の *in vitro* における制癌剤感受性試験は、近年さかんに 行なわれつつある clonogenic assay^{15 ~17)}を除くと、報告例は少ない。久住らは、継代培養株 KN-41 を用い、コロニー形成法により感受性試験を行ない、ADM に強い感受性を認め⁴⁴⁻⁴⁵⁾、小泉らは、ヌードマウスを用いた *in vivo* での実験系で類似した結果を報告している⁴⁶⁾。clonogenic assay によれば、個々の症例で、各薬剤に対する感受性はかなり異なり、また、感受性を示す薬剤は少ないことが報告

されている¹⁵⁻¹⁷⁾。臨床における諸家の報告例をみても、単剤としては Hrushsky らの vinblastine 単独大量投与により比較的高い有効率 (25%) が認められる¹⁷⁾以外、有効な薬剤は報告されていない。また、併用療法については、一般に併用による効果増強は少ないとされているが、Ishmal ら⁴⁸⁾の報告では、VCR, ADM, BCG, medroxyprogesterone の併用で、33%と高い有効率が認められている。他にも、VCR あるいは vinblastine, ADM を含めたいくつかの併用療法で、比較的良好な成績が報告されており^{49,50)}、本実験で有効とされた薬剤の併用で、臨床でも良好な成績を示すものが多い。

薬剤の併用効果については、以前より同時併用による相加効果、相乗効果を示すものが実験的に確認され、このような共同作用は臨床的にも広く応用されてきた。しかし、このような併用効果検討の実験系では、*in vivo*においても、*in vitro*においても、各薬剤で種々の濃度をもちて検討することは莫大な実験を必要とし、限られた濃度設定で行なわざるをえない。したがって、作用機序が非常に異なるものの組み合わせにおいては、併用によっても効果の増強がみられないという可能性もあることは考慮されなければならないが、逆に効果の得られた組み合わせは、個々の薬理学的作用が効果的に作用しあって得られたものと考えて良い。今回有効と判定した3剤について、ADM と CQ の同時接触で比較強い効果が認められたが、この組み合わせは星野らの動物実験においても同様に相乗効果が証明されている⁵¹⁾。

ところで、現在用いられている抗癌剤の多くは、細胞回転に対し、それぞれ特有な作用を発揮することが知られている。一般に、細胞回転からみた抗癌剤の作用についての研究は、3つに大別されている。第1は、細胞の増殖動態の差 (増殖期、安定期) をみることで、第2は、各細胞周期で、抗癌剤に対する感受性が異なることをもとに検討するものであり、第3としては、抗癌剤の細胞周期の進行に及ぼす影響をみるものである。とくに細胞回転の検討は、FCM の出現により従来 RA で測定し得た DNA 合成期 (S 期) および分裂指数の算定による分裂期だけでなく、分裂後休止期 (G1 期)、分裂前休止期 (G2 期) を含めた細胞周期全体を把握することが可能となり、また数万個の細胞を僅か数分でヒストグラムに描出でき、抗癌剤添加後の細胞集団の動きを観察することは比較的容易となった³⁰⁾。そこで著者は、まず FCM による細胞周期の進行に対する効果を調べ、これをもとに薬理作用を考慮しつつ各薬剤の有効性を検討した。VCR

は、細胞周期上の作用点は S 期にあるとされているが、細胞周期の進行においては、分裂中期で arrest を起こし^{24-26,30,31)}、今回の実験でも12時間後での G2-M 期への集積は低濃度領域から顕著で、同調薬剤としての特性を有している。併用実験では CQ を最初に接触させた場合、低濃度群では12時間後に、中濃度では12時間後でも24時間後でも強い増殖抑制がみられた。しかし、ADM 接触後 VCR を接触させた組み合わせでは12時間、24時間後でも増殖率に顕著な差はなかったことや、FCM の動きからみても、細胞回転の作用点 (S 期) に VCR が強く作用したものと考えるににくい。したがって、後に述べるように cycle nonspecific な薬剤である CQ により障害をうけた DNA の修復過程における VCR の作用が効果的であったことが示唆された。ADM の細胞周期の進行に対する作用について、高本らは、G2 蓄積作用は不可逆的であるとしている^{24,25,29-33)}が、本実験では、低濃度領域から中濃度においては、G2-M 期への部分的な蓄積を示したのち、時間的な経過とともに対照群と同様の波形に復し、細胞回転は同調して進行しているものと考えられた。その効果は cycle & phase nonspecific であるが、濃度依存性で、短期間でも cytotoxic な効果が期待できるとされている。また最近では、age response curve から比較増殖期に感受性が高く、cell cycle 内でも相対的感受性を示す phase があることが知られてきた^{24,25,32)}。しかし ADM の作用点は、諸家の報告により、また、実験に用いられた細胞によっても相違があり、S 期、S-G2 期、M 期、あるいは early S 期と、その見解は一定ではない。今回の併用効果の検討では、VCR や CQ により12時間後に高率に S 期、G1-M 期に蓄積された細胞集団に対し、ADM による増殖抑制効果は増強され、NC-65 細胞においては、この時期に高い感受性を有することが示唆された。CQ は分裂期から G1 期、G1 期から DNA 合成期への移行阻害はなく、DNA 合成が阻害されるため、DNA 合成期が延長し、その結果 S 期から G2 期への移行が阻害され、また G2 期から分裂期への移行も阻害される G2 block による分裂遅延も認められると言われている^{24-27,30)}。本実験でも低濃度、中濃度で G2-M 期への蓄積を示したが、この濃度における細胞回転の変化は比較的軽微であった。その作用は一般に cycle nonspecific な薬剤に分類されるが、主として M 期、G1-early S 期に感受性が高く、次いで G2 期に感受性をもつ、X-ray type に属する。今回の実験からは、VCR により G2-M 期に蓄積された細胞集団に対しては増殖抑制効果の増強は

認めず、中濃度群においては ADM 接触後、24時間で G1 期が増殖した細胞集団に対して増殖を抑制するものの同時併用に優るものではなく、cycle nonspecific な薬剤としての作用を重視した投与法が望ましいと考えられた。

以上より、NC-65 細胞に対する併用療法の有効性を細胞回転の変化からみると、全般に、12時間後に S, G2-M期に集積した細胞集団に対する効果は、24時間後にG1期の増加、S, G2-M期の減少をしめす細胞集団に比べ、強い増殖抑制効果を示した。このうちでは、VCR や CQ により、S 期、G2-M 期に同調された細胞にたいして ADM を作用させると、その増殖抑制効果は増強され、また、cycle nonspecific な薬剤である CQ を接触後 VCR を接触するとその効果が増強された。もちろん、*in vitro* と *in vivo* では、その増殖動態はかなり異なるものであり、また、*in vitro* においても、対数的増殖期にある細胞と安定期にある細胞では、感受性にも差があることが報告されている^{34,35}。とくに増殖が緩徐な腎細胞癌では、growth fraction も小さく⁵²、臨床においては、このような cell cycle specificity を考慮し、同調理論に基づいた投与は行ないたいといえる。しかし、近年、FCM を用い、腎腫瘍組織中の相対的DNA量を測定すると、早期に転移をおこし、臨床的にも悪性度が高い aneuploid tumor では、S 期+G2 期+M期の割合は、臨床的に悪性度の低い diploid tumor に比し、明らかに高いことが報告されている^{53,54}。したがって、化学療法を必要とするような症例においては、腫瘍細胞は仮に個々の薬剤には感受性は低いとしても、細胞周期依存の感受性もあり、選択された薬剤で倍加時間を考慮した投与法により、増殖を効果的に抑制することのできるであろう。さらにホルモン療法、インターフェロン、免疫療剤との併用を行なえば、有効性が低いとされる現在の腎癌化学療法においても、さらに治療効果の改善も期待できるものと考えている。

結 語

1) 従来の *in vitro* における制癌剤感受性試験に若干の工夫を加え、写真撮影法により、薬剤接触後の増殖動態を観察し、短時間で比較増殖能を忠実に反映する感受性試験を考案した。

2) 検討した8種類の薬剤のうち、vincristine (VCR), adriamycin (ADM), carboquone (CQ) の3剤が、腎細胞癌由来の NC-65 細胞に対し強い増殖抑制効果を示した。

3) 上記3剤の cell cycle に及ぼす効果を FCM

を用いて調べた。この結果、3剤とも、単独で50%増殖を抑制する濃度までは、12時間後にS期からG2-M期への蓄積を示し、24時間後には、逆にG1期の増加、S, G2-M期の減少を示し、その後は部分的な同調を示しつつ細胞回転は進行し、72時間後には対照とほぼ同様の波形に復した。

4) 2剤の同時併用による効果では、ADM と CQ の同時接触で比較的強い併用効果を示した。

時間差接触では、CQ 投与後の VCR 投与が、有効な投与法であることが示唆され、細胞回転を考慮した併用では、VCR や CQ により S, G2-M期に蓄積した細胞集団に対し、ADM の有効性が示された。

5) 上記3剤は、臨床的にもしばしば用いられる薬剤であるが、臨床的に悪性度の高い腎細胞癌では、今回の結果に基づいた投与法の工夫により、臨床効果を増強する可能性が示唆された。すなわち臨床における倍加時間を考慮した VCR→ADM, CQ→VCR の投与はその一法であると考えられる。

なお本研究は一部文部省科学研究費(1981)の援助により行なわれ、その要旨は、第69回および第70回日本泌尿器科学会総会(1981, 1982)において口演された。稿を終えるにあたり、本論文のご指導、ご校閲を賜りました滋賀医科大学泌尿器科学講座友吉唯夫教授に感謝の意を表します。また、本実験の計画に際し、尿路腫瘍の全般にわたり、懇切なご指導をいただいた京都大学医学部泌尿器科学教室吉田修教授に感謝いたします。さらに、培養細胞を用いた感受性試験や、Flow cytometry について、終始適切な助言とご指導をいただいた、京都大学医学部泌尿器科学教室岡田謙一郎助教授に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Kantor AF: Current concepts in the epidemiology and etiology of primary renal cell carcinoma. J Urol 117: 415~417, 1977
- 2) deKernion JB, Ramming KP and Smith RB: The natural history of metastatic renal cell carcinoma: A computer analysis. J Urol 120: 148~152, 1978
- 3) 真田寿彦: 腎細胞癌の予後. 日泌尿会誌 72: 10~25, 1981
- 4) deKernion JB and Berry D: The diagnosis and treatment of renal cell carcinoma. Cancer 45: 1947~1956, 1980
- 5) McDonald MW: Current therapy for renal cell carcinoma. J Urol 127: 211~217, 1982

- 6) Carter SK and Wasserman TH: The chemotherapy of urologic cancer. *Cancer* 36: 729~747, 1975
- 7) Talley RW: Chemotherapy of adenocarcinoma of the kidney. *Cancer* 32: 1062~1066, 1975
- 8) Poster DS, Bruno S, Penta JS, Pinna K, Vilk P and Macdonald JS: Current status of chemotherapy, hormonal therapy and immunotherapy in the treatment of renal cell carcinoma. *Am J Clin Oncol* 5: 53~60, 1982
- 9) Quesada JR, Swanson DA, Trindale A and Gutterman JU: Renal cell carcinoma: Antitumor effect of leukocyte interferon. *Cancer Res* 43: 940~947, 1983
- 10) Dekerniom JB, Sarna G, Figlin R, Linder A and Smith RB: The treatment of renal cell carcinoma with human leukocyte alpha-interferon. *J Urol* 130: 1063~1066, 1983
- 11) 川村寿一・山内民男・橋村孝幸・吉田 修・神波照夫・友吉唯夫・小倉啓司・福山拓夫・中川清秀: 腎細胞癌に対する α 型インターフェロンの治療成績. *泌尿紀要* 31: 377~386, 1985
- 12) Richie JP, Steele GD, Wilson RE, Ervin T, Wang BS and Mannick JA: Current treatment of metastatic renal cell carcinoma with xenogeneic immune ribonucleic acid. *J Urol* 131: 236~238, 1984
- 13) Droller MJ: Immunotherapy in genitourinary neoplasia. *J Urol* 133: 1~5, 1985
- 14) Salmon SE, Hamburger AW, Soehnlen BJ, Durie BGM, Alberts DS and Moon TC: Quantitation of differential sensitivities of human tumor stem cells to anticancer drugs. *New Engl J Med* 298: 1321~1327
- 15) Lieber MM: Soft agar colony formation assay for *in vitro* chemotherapy sensitivity testing of human renal cell carcinoma: Mayo clinic experience. *J Urol* 131: 391~393, 1984
- 16) Sarosdy MF, Lamm DL, Radwin HM and Von Hoff DD: Clonogenic assay and *in vitro* chemosensitivity testing of human urologic malignancies. *Cancer* 50: 1332~1338, 1982
- 17) Hashimura T, Tanigawa N, Okada K and Yoshida O: Clonogenic assay for urologic malignancies. *Gann* 75: 724~728, 1984
- 18) 安富祖久明: 膀胱腫瘍に対する制癌剤の連日投与法の有効性に関する実験的研究. *日泌尿会誌* 75: 1244~1251, 1984
- 19) 太田和雄・高本 滋・御供泰治: DNA 瞬間自動測定装置. *癌と化学療法* 4: 175~185, 1977
- 20) Höehn W and Schroeder FH: Renal cell carcinoma: Two new cell lines and a serially transplantable nude mouse tumor (NC 65). *Invest Urol* 16: 106~112, 1978
- 21) Baisch H, Göhde W and Linden WA: Analysis of PCP-data to determine the fraction of cells in the various phases of cell cycle. *Rad. and Environm. Biophys* 12: 31~39, 1975
- 22) Skipper HE, Schabel FM Jr, Mellet LB, Montgomery JA, Welkoff LJ, Lloyd HH and Brockman RW: Implications of biochemical, cytokinetic, pharmacologic, and toxicologic relationships in the design of optimal therapeutic schedules. *Cancer Chemother Rep* 54: 431~450, 1970
- 23) 斉藤達雄・朝村光雄・加藤昭彦・佐藤春彦・杉本元信・渡辺紀子子: 細胞分率と癌の化学療法. *最新医学* 28: 1635~1638, 1973
- 24) 斉藤達雄・朝村光雄・涌井 昭: 多剤併用化学療法の基礎 (1). *臨床化学* 16: 1478~1486, 1980
- 25) 小川一誠: 細胞回転と癌化学療法. *癌と化学療法* 3: 1093~1100, 1973
- 26) Barlogie B, Raber MN, Schumann J, Johnson TS, Drewinko B, Swartzendruber DE, Göhde W, Andreeff M and Freireich EJ: Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 43: 3982~3997, 1983
- 27) Barlogie B and Drewinko B: Cell cycle stage-dependent induction of G2 phase arrest by different antitumor agents. *Europ J Cancer* 14: 741~745, 1978
- 28) Fried J, Perez AG and Clarkson B: Quantitative analysis of cell cycle progression of synchronous cells by flow cytometry. *Exp Cell Res* 126: 63~74, 1980
- 29) Krishan A and Frei E III: Effect of adriamycin on the cell cycle traverse and kine-

- tics of cultured human lymphoblasts. *Cancer Res* **36**: 143~150, 1976
- 30) 高本 滋・太田和雄：FMF による細胞回転と癌の化学療法. *癌と化学療法* **5**: 727~736, 1978
 - 31) 高本 滋・太田和雄：FMF による制癌剤の作用機序に関する研究. 第6報—代謝拮抗剤. フルカロイドを中心に—, *日血会誌* **41**: 298, 1978
 - 32) 高本 滋・太田和雄：抗癌性抗生物質の細胞回転におよぼす影響—Flow micro-fluorometry 分析をよる—. *癌と化学療法* **6**: 59~70, 1979
 - 33) Barlogie B, Drewinko B, Johnston DA and Freireich EJ: The effect of adriamycin on the cell cycle traverse of a human lymphoid cell line. *Cancer Res* **36**: 1975~1979, 1976
 - 34) Bhuyan BK, Fraster TJ and Day KJ: Cell proliferation kinetics and drug sensitivity of exponential and stationary populations of cultured L1210 cells. *Cancer Res* **37**: 1057~1063, 1977
 - 35) Barranco SC and Novak JK: Survival responses of dividing and nondividing mammalian cells after treatment with hydroxyurea, arabinosylcytosine, or adriamycin. *Cancer Res* **34**: 1616~1618, 1974
 - 36) Barranco SC, May JT, Boerwinkle W, Nichols S, Hokanson KM, Schumann J, Göhde W, Bryant J and Guseman LF: Enhanced cell killing through the use of cell kinetics-directed treatment schedules for two-drug combinations *in vitro*. *Cancer Res* **42**: 2894~2898, 1982
 - 37) 本山悌一・鈴木利光：人癌培養細胞の *in vitro* 薬剤感受性試験 第3報 各種測定法の吟味とその評価. *Chemotherapy* **28**: 154~159, 1980
 - 38) Puck TT and Marcus PI: A rapid method for viable cell titration and clone production with Hela cells in tissue culture: The use of x-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc Nat Acad Sci US* **41**: 432~437, 1955
 - 39) 朝村光雄・金丸龍之介・佐藤春彦・斉藤達雄：映画法による制癌剤処理の培養細胞の阻害動態. *最新医学* **33**: 1499~1502, 1978
 - 40) Hurwitz C and Tolmach LJ: Time lapse cinemicrographic studies of X-irradiated Hela S cells. 1, Cell progression and cell disintegration. *Biophys J* **9**: 607~633, 1969
 - 41) 長瀬千秋・伊藤元彦・北野司久・笹田昌孝・中村徹：1. マイクロプレートを用いる制癌剤感受性検査法—マイクロコロニー形成阻止試験による制癌効果の判定. *最新医学* **31**: 1611~1617, 1976
 - 42) 長瀬千秋・青木 稔・伊藤元彦・寺松 孝・高嶋義光・北野司久：培養人癌細胞を用いての制癌剤感受性試験の開発とその将来における臨床応用の可能性について. *最新医学* **33**: 2214~2220, 1978
 - 43) 北野司久・長瀬千秋：培養人癌細胞を用いた感受性テスト—Microcolonies Inhibition Test を中心に一. *癌と化学療法*, **9**: 590~598, 1982
 - 44) 久住治男・中嶋和喜・黒田恭一：VP-16のヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47, KW103 PT4 およびヒト腎癌由来培養細胞 KN-41に対する *in vitro* の殺細胞効果. *泌尿紀要* **27**: 771~774, 1981
 - 45) 久住治男：泌尿器科領域の組織培養, 特に癌をめぐる線溶系とその臨床的応用. *泌尿紀要* **27**: 829~841, 1981
 - 46) 小泉久志・スードマウスにおける膀胱癌由来培養細胞 KK-47 および腎癌由来培養細胞 KN-41 移植腫瘍の抗癌剤感受性の検討. *日泌尿会誌* **74**: 704~718, 1983
 - 47) Hrushesky WJ and Murphy GP: Current status of the therapy of advanced renal carcinoma. *J Surg Oncol* **9**: 277~288, 1977
 - 48) Ishmal DR, Burpo LJ and Bottomley RH: Combined therapy of advanced hypernephroma with medroxyprogesterone, B.C.G., adriamycin and vincristine. *Abstract Proc Amer Soc Clin Oncol* **19**: 407, 1978
 - 49) Dana BW and Albert DS: Combination chemioimmunotherapy for advanced renal carcinoma with adriamycin, bleomycin, vincristine, cyclophosphamide, plus BCG. *Cancer Clin Trials* **4**: 205~207, 1981
 - 50) Katakhar SB and Franks CR: Chemo-hormonal therapy for metastatic renal cell carcinoma with adriamycin, hydroxyurea, vinblastine, and medroxyprogesterone acetate. *Cancer Treat Rep* **62**: 1379~1380, 1978
 - 51) 星野 章：動物実験からみた併用療法の意義. *最新医学* **28**: 844~849, 1973
 - 52) Rabes HM, Carl P, Meister P and Pattenhuber U: Analysis of proliferative compart-

- ments in human tumors, 1. Renal adenocarcinoma. *Cancer* **44**: 799~813, 1979
- 53) Chin JL, Pontes E and Frankfurt OS: Flow cytometric deoxyribonucleic acid analysis of primary and metastatic human renal cell carcinoma. *J Urol* **133**: 582~585, 1985
- 54) Otto U, Baisch H, Huland H and Kloppel G: Tumor cell deoxyribonucleic acid content and prognosis in human renal cell carcinoma. *J Urol* **132**: 237~239, 1984
- (1986年9月3日迅速掲載受付)