

# 悪性腫瘍の自家移植におよぼす抗癌剤とウ ロキナーゼの併用効果に関する実験的研究

岡山大学医学部第二外科教室主任：砂田輝武教授

中 嶋 健 博

(昭和51年2月25日受稿)

## 緒 言

癌組織周辺および癌組織内には fibrin の沈着が多いことが、<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I fibrinogen の静注法、抗 fibrin 抗体を用いる蛍光抗体法によってあきらかにされており、<sup>1)~5)8)9)</sup> その局在も蛍光抗体法や macroradioautography によって癌塊中心部にはむしろすくなく、癌塊周辺部とくに癌先進部に多いことが認められている。<sup>3)4)10)</sup>

そしてこの癌組織周辺の fibrin の沈着は、担癌体の線維素溶解（以下線溶）活性を増加させることによって減少し、逆に抗線溶療法によって増加することも判明している。<sup>2)3)10)20)</sup>

癌の化学療法を行う場合、これらの癌塊周辺部に沈着する fibrin は薬剤の癌塊内への到達性を阻止すると考えられ、この barrier を取り除くひとつの手段として線維素溶解酵素剤である urokinase や dextran sulfate のような heparinoid を利用する方法が考えられ、<sup>10)21)22)</sup> <sup>125</sup>I fibrinogen の腫瘍組織へのとりこみが urokinase の投与によってすくなくなることを macroradioautography によって証明され、<sup>3)4)</sup> また <sup>3</sup>H-5 fluorouracil の腫瘍組織内へのとりこみは urokinase の静脈内投与によって増加することが報告されている。<sup>7)</sup>

また lysosome 顆粒中の自己融解酵素である酸性水解酵素の遊離を促進することによって抗癌剤の殺細胞効果が高められ、Vit. A, trypsin, chymotrypsin, dextran sulfate, plasmin 等にその作用があることが知られてきたが、近年 plasminogen を plasmin に活性化作用のある urokinase にもその作用があることが知られ、その併用によって抗癌剤の効果が増強され、癌化学療法上有意義であることが

報告されている。<sup>7)28)31)49)51)~53)</sup>

一方癌細胞の転移形成に関する線溶系の役割については、一般に線溶活性の亢進は癌細胞の遊離を促進するが、<sup>34)35)</sup> 一方では標的臓器への着床を抑制するといわれ、<sup>17)~18)36)~38)</sup> heparin, plasmin の投与により実験的肺転移の形成が抑制されることが報告され、最近では urokinase にも同様の効果があることが報告されている。<sup>10)12)</sup>

以上のごとく、諸家の研究を通じてあきらかにされてきた urokinase と抗癌剤の併用による制癌効果の増強と、urokinase 投与による転移頻度の抑制は、悪性腫瘍の治癒をはばむ術後の転移性再発とくに手術侵襲を契機として発生する転移の防止を目的とした癌化学療法にも有効であると考えられるが、これを実施するについては、従来報告されている再発癌、進行癌に対する本法の応用とは異なる立場からの基礎的検討が必要である。

著者は悪性腫瘍細胞の転移成立の最終的機序である腫瘍細胞の着床と増殖におよぼす抗癌剤と urokinase の併用効果について、マウス自家腫瘍の自家移植法により、併用する抗癌剤と urokinase の量的関係、投与の時期および併用方法、その効果などについて実験的研究をおこない、このような目的で使用するにあたってその効果を期待するための条件について若干の知見を得たので報告する。

## 実験材料

1. 実験動物としては、岡山大学医学部実験動物室マウスコロニーから供与された Strong A 系マウスで、20ないし30gの体重を有するものを用い、雌雄別に大型飼育箱に入れ、水および固型飼料（オリエンタル酵母社製）で飼育し、腫瘍移植後は小型飼育

箱に1匹づつ収容して観察した。

2. 実験腫瘍としては methylcholanthrene によってこれらのマウスに誘発した肉腫を使用した。すなわちマウス1匹あたりオリーブ油 0.1 ml に懸濁した 20-methylcholanthrene 1 mg をツベルクリン用注射器を用いて右大腿部筋肉内に注射し、その部に発生した腫瘤の長径が約 2 cm 大になったものを実験に供した。

3. 移植腫瘍細胞は癌手術に模して上記の担腫瘍マウスの右大腿切断をおこない、腫瘍組織を採取し、市販のカミソリで剪切り、泥状とし、試験管内に移し、これに trypsin 12 mg (1 mg = 2500 H. U. M 持田製薬) を含む phosphate buffer (PH 7.2) 5 ml を加え、37°C の恒温槽内で 30 分間攪拌したのち、さらに phosphate buffer 5 ml を加え 3 枚重ねのガーゼで濾過した。この濾液を 2000 r. p. m で 15 分間遠沈し、得られた沈渣を生理的食塩水に再浮遊させた。その細胞数を血球用計算板を用いて算定すると共に 2% trypan blue による細胞染色性を調べ、青染されたものを死細胞として全細胞中の生細胞の割合を求め、生理的食塩水 1 ml 中に腫瘍細胞  $10^7$  個が含まれるように調整し腫瘍細胞浮遊液とした。調整後は 37°C の恒温槽内に保存した。

4. urokinase は持田製薬のウロナーゼ (以下 UK とする) を用い稀釈には生理的食塩水を用いた。なお現在用いられている国際単位の 6000 単位は、この実験に用いた UK の 5000 単位に相当する。

5. 抗癌剤としては協和醸造の Mitomycin-C (以下 MMC とする) を用い稀釈には生理的食塩水を用いた。

6. fibrin 平板はあらかじめ充分冷却した fibrinogen 溶液と thrombin 溶液をすばやく混合し、水平板上に静置した 80 X 200 mm の大きさの平板容器に流しこむことにより約 2.6 mm の厚さのものを作製した。

fibrinogen 溶液は、牛フィブリノーゲン (Armor 社) 160 mg を 20 ml の phosphate buffer (PH 7.2) に溶解して作製し、thrombin 溶液は、牛トロンビン (持田製薬) 1000 単位を 10 ml の蒸留水に溶解しその 2 ml に phosphate buffer 20 ml を加えて作製した。

### 実験方法

1. 試験管内作用実験では、腫瘍細胞浮遊液から腫瘍細胞  $10^6$  個、所定量の MMC、あるいは UK、またその両者が生理的食塩水 1 ml 中に含まれるように細胞浮遊液を調整し 37°C の恒温槽内に所定時間保

たのち、その 0.1 ml (細胞数  $10^6$  個) を同じマウスの背部皮下に自家移植 (もどし移植) した。

2. 腹腔内投与実験では、腫瘍細胞浮遊液からその 0.1 ml が腫瘍細胞  $10^6$  個あるいは  $10^5$  個を含むように生理的食塩水浮遊液を調整し、これを同じマウスの背部皮下に自家移植 (もどし移植) したのち、体重 1 g につき MMC 1 mcg あるいは UK 10 単位、またその両者を腹腔内に連日 10 日間投与した。すなわち生理的食塩水 1 ml 中に MMC 100 mcg, UK 1000 単位、あるいはその両者を溶解したものを体重 1 g につき 0.01 ml を投与した。

3. 腫瘍自家移植後は該部への腫瘤発現と、その増殖を観察したが、腫瘤長径が 3 mm に達したものを "take" されたものとし take の率、take までの期間を調べた。またそれ以後の大きさは  $\sqrt{\text{長径} \times \text{短径}}$  を腫瘤の径として mm であらわし定期的に観察した。

4. マウスの腫瘍組織および各臓器の線溶活性測定実験では、前記の fibrin 平板上に約 3 mm 立方の組織塊をおくかまたは 0.01 ml の抽出液をおき、この平板を 37°C に 16 時間静置したのち fibrin 溶解窓の長短径を計測し、その積を線溶活性として表現した。

抽出液の作製は腫瘍あるいは臓器を 10 倍量の 2 M-KCL 溶液中に浸し、ガラスホモジナイザーで磨砕し 4°C にて 2 時間放置したのち 3000 r. p. m で 10 分間遠沈して上清を得た。

この実験での UK 投与は体重 1 g につき 10 単位の割合で尾静脈に注入し、10 分後に脱血せしめて被検材料を採取した。またある場合にはマウスは生存のまま経時的に腫瘍の一部を切除して用いた。

### 実験成績

1. 腫瘍自家移植におよぼす MMC と UK の併用効果 (試験管内作用実験)

1. 腫瘍細胞の保存時間が自家移植におよぼす影響について

腫瘍細胞浮遊液 1 ml (細胞数  $10^6$  個) を 37°C の恒温槽内で 0, 10, 20, 30 および 40 分間保存したのち、その 0.1 ml (細胞数  $10^6$  個) を背部皮下に自家移植した 5 群について調べた。

a. 移植後の各時期における take の率および take までの期間 (表 1, 図 6)

1) 非保存群では移植後 1 週間まで 4 匹全例に take はなく、10 日で 4 匹中 1 匹、2 週間で 3 匹、3 週間で 4 匹全例に take を認め、take までの平均日数は 13.5 (9~21 日) であった。

表1. 腫瘍自家移植におよぼす腫瘍細胞浮遊液の保存時間の影響：移植後の各時期における take の率. (in vitro, 37°C.)

保存時間	10 <sup>5</sup> 個細胞移植後日数						
	3	7	10	14	21	28	28以上
0	0/4	0/4	1/4	3/4	4/4	4/4	4/4
10分	0/4	0/4	1/4	3/4	4/4	4/4	4/4
20分	0/4	0/4	1/4	2/4	3/4	3/4	3/4
30分	0/4	0/4	0/4	1/4	3/4	3/4	4/4
40分	0/4	0/4	0/4	1/4	2/4	2/4	2/4

図1. 腫瘍細胞10<sup>6</sup> 個自家移植後の腫瘍増殖曲線 (生食水0.01ml/g(体重). 移植当日より連日10日間腹腔内投与)

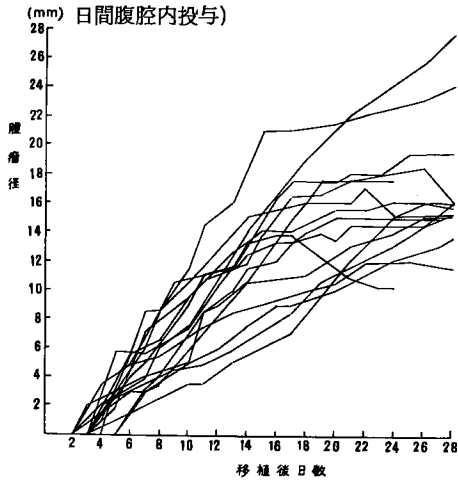


図2. 腫瘍細胞10<sup>5</sup> 個自家移植後の腫瘍増殖曲線 (生食水0.01ml/g(体重). 移植当日より連日10日間腹腔内投与)

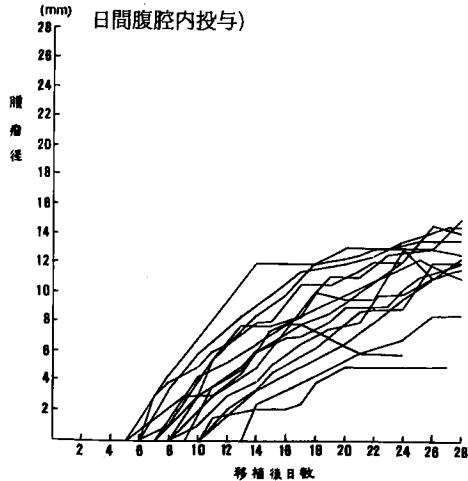


図3. 腫瘍自家移植 (10<sup>6</sup> 個細胞) におよぼすUKの影響：移植後の増殖曲線 (UK10単位/g(体重). 移植当日より連日10日間腹腔内投与)

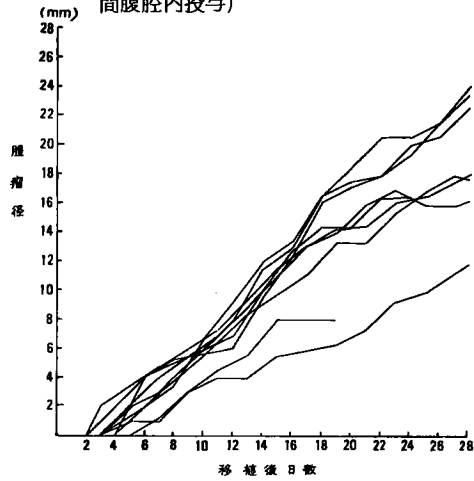
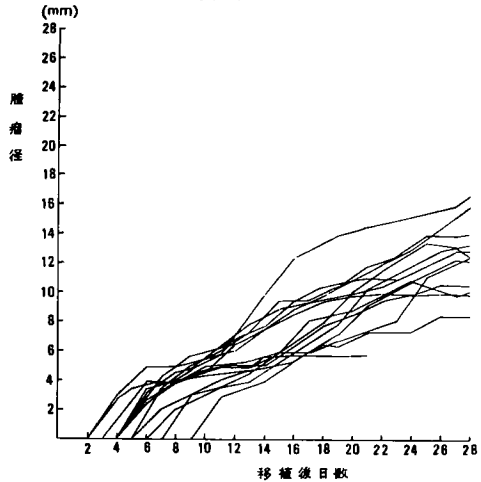


図4. 腫瘍自家移植 (10<sup>6</sup> 個細胞) におよぼすMMCの影響：移植後の増殖曲線 (MMC 1 μg/g(体重). 移植当日より連日10日間腹腔内投与)



2) 10分間保存群4匹では各時期とも非保存群と同じ take の率を示し, takeまでの平均日数は13日(9~18日)であった。

3) 20分間保存群では1週間まで4匹全例に take はなく, 10日で4匹中1匹, 2週間で2匹, 3週間で3匹に take を認めた. 残りの1匹では4週間以後も take は認められず, take のみられた3匹での take までの平均日数は13日(9~18日)であった。

4) 30分間保存群では10日まで4匹全例に take はな

図5. 腫瘍自家移植 (10<sup>6</sup> 個細胞) におよぼすMMC とUK の同時的併用の効果: 移植後の増殖曲線 (MMC 1 μg/g(体重) UK10単位/g(体重). 移植 当日より連日10日間腹腔内投与)

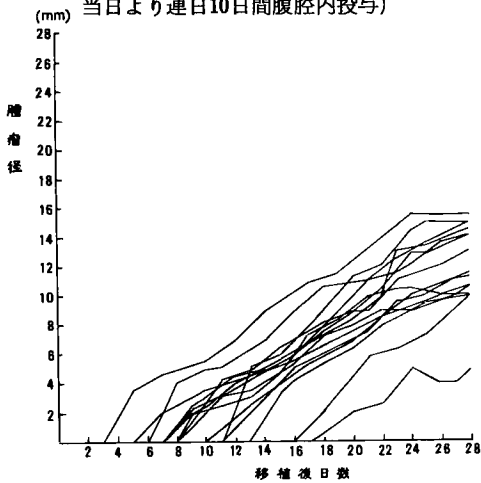
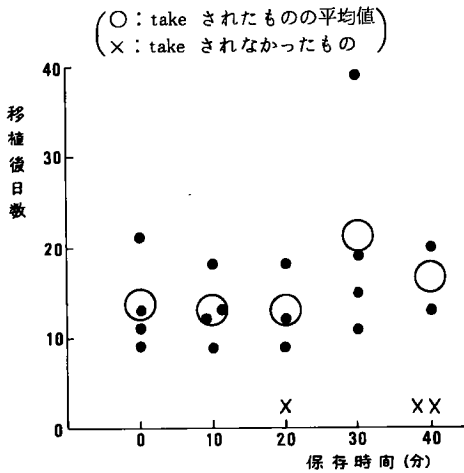


図6. 腫瘍自家移植におよぼす腫瘍細胞浮遊液の 保存時間の影響: 移植からtake までの期間. (in vitro , 37°C , 10分)



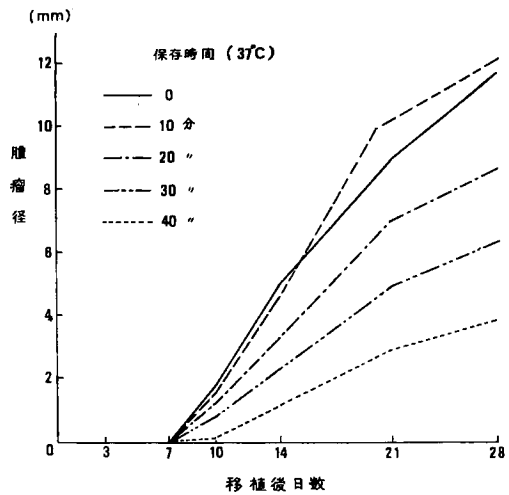
く、2週間で4匹中1匹、3週間で3匹、4週間以後になって4匹全例にtakeを認め、takeまでの平均日数は21日(11~39日)であった。

5) 40分間保存群では10日まで4匹全例にtakeはなく、2週間で4匹中1匹、3週間で2匹にtakeを認めた。残りの2匹では4週間以後もtakeは認められず、takeのみられた2匹でのtakeまでの日数は13日と20日であった。

b. take後の増殖 (図7)

移植後3, 7, 10, 14, 21, 28日の腫瘍平均径は非保

図7. 腫瘍自家移植におよぼす腫瘍細胞浮遊液の 保存時間の影響: 移植後の平均増殖曲線. (in vitro , 37°C , 10分)



存群ではそれぞれ0, 0, 1.8, 4.9, 9.0, 11.8mmであり、10分間保存群では0, 0, 1.6, 4.8, 9.9, 12.2mm, 20分間保存群では0, 0, 1.3, 3.3, 7.0, 8.7mm, 30分間保存群では0, 0, 0.8, 2.3, 4.9, 6.4mm, 40分間保存群では0, 0, 0.1, 1.1, 2.9, 3.9mmであった。小括: 腫瘍細胞浮遊液の調整後37°Cにおける10分間の保存ではtakeの率、takeまでの期間およびその後の増殖傾向には保存による影響は認められないが、20分以上保存することによりtakeの率が低下しtakeまでの期間が延長しtake後の増殖も抑制される。

2. MMCの濃度が腫瘍自家移植におよぼす影響について

腫瘍細胞10<sup>6</sup>個とMMCの0, 1, 5, 10, 20 mcgを生理的食塩水1 ml中で37°C10分間作用せしめたのち背部皮下に自家移植した5群について調べた。

a. 移植後の各時期におけるtakeの率およびtakeまでの期間 (表2, 図8)

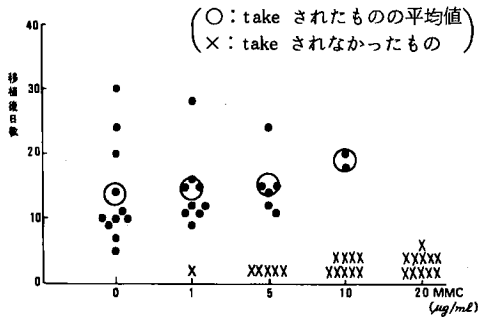
1) MMCを作用せしめない群では移植後3日まで11匹全例にtakeはなく、1週間で11匹中1匹、10日で6匹、2週間で8匹、3週間で9匹、4週間で10匹、4週間以後になって11匹全例にtakeを認め、takeまでの平均日数は13.6日(5~30日)であった。

2) MMC 1 mcg/mlを作用せしめた群では1週間まで10匹全例にtakeはなく、10日で10匹中1匹、2週間で5匹、3週間で8匹、4週間で9匹にtakeを認

表2. 腫瘍自家移植におよぼす MMC 濃度の影響：移植後の各時期における take の率. (in vitro, 37°C, 10分)

MMC (μg/ml)	10 <sup>6</sup> 個細胞移植後日数						
	3	7	10	14	21	28	28以上
0	0/11	1/11	6/11	8/11	9/11	10/11	11/11
1	0/10	0/10	1/10	5/10	8/10	9/10	9/10
5	0/11	0/11	0/11	3/11	5/11	6/11	6/11
10	0/11	0/11	0/11	0/11	2/11	2/11	2/11
20	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11

図8. 腫瘍自家移植におよぼす MMC 濃度の影響：移植からtake までの期間. (in vitro, 37°C, 10分)



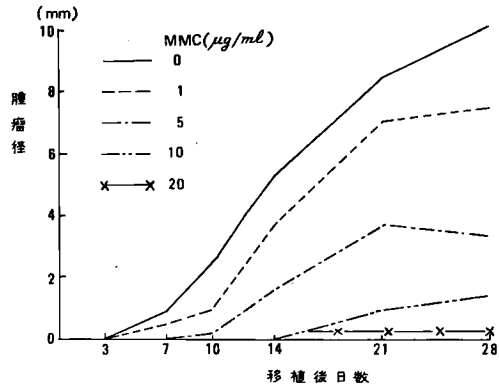
めた. 残りの 1 匹では 4 週間以後も take は認められず, take のみられた 9 匹での take までの平均日数は 14.3 日 (9~28 日) であった.

3) MMC 5 mcg/ml を作用せしめた群では 10 日まで 11 匹全例に take はなく, 2 週間で 11 匹中 3 匹, 3 週間で 5 匹, 4 週間で 6 匹に take を認めた. 残りの 5 匹では 4 週間以後も take は認められず, take のみられた 6 匹での take までの平均日数は 15.2 日 (11~24 日) であった.

4) MMC 10 mcg/ml を作用せしめた群では 2 週間まで 11 匹全例に take はなく, 3 週間で 11 匹中 2 匹に take を認めた. 残りの 9 匹のうち 6 匹は 4 週間以後も take は認められず, 3 匹は 3 週間以後 4 週間までに死亡したがこの間に take は認められなかった. take のみられた 2 匹での take までの日数は 18 日と 20 日であった.

5) MMC 20 mcg/ml を作用せしめた群では 11 匹中 3 匹が 3 週間以後 4 週間までに死亡し, 他の 8 匹はいずれも 4 週間以上生存したがこの間いずれの時期に

図9. 腫瘍自家移植におよぼす MMC 濃度の影響：移植後の平均増殖曲線. (in vitro, 37°C 10分)



も全例に take は認められなかった.

b. take 後の増殖 (図 9)

移植後 3, 7, 10, 14, 21, 28 日の腫瘍平均径は MMC 非作用群ではそれぞれ 0, 0.9, 2.5, 5.3, 8.4, 10.1 mm であり, MMC 1 mcg/ml 作用群では 0, 0.5, 1.0, 3.7, 7.0, 7.4 mm, MMC 5 mcg/ml 作用群では 0, 0, 0.2, 1.6, 3.7, 3.3 mm, MMC 10 mcg/ml 作用群では 0, 0, 0, 0, 0.9, 1.4 mm, MMC 20 mcg/ml 作用群ではいずれの時期にも腫瘍は触知されなかった.

小括: MMC 1 mcg/ml を 10 分間作用せしめることにより take の率の低下, take までの期間の延長およびその後の増殖に軽度の抑制効果が認められたが, MMC を 5 mcg/ml, 10 mcg/ml と増量することによってこれらに対する抑制効果は段階的に増強し 20 mcg/ml を作用せしめた群ではほぼ完全に抑制された.

3. UK が腫瘍自家移植におよぼす影響について

腫瘍細胞 10<sup>6</sup> 個と UK 0, 20, 40 単位を生理的食塩水 1 ml 中で 37°C 10 分間作用せしめたのち背部皮下に自家移植した 3 群について調べた.

a. 移植後の各時期における take の率および take までの期間 (表 3, 図 10)

1) UK を作用せしめない群では移植後 1 週間まで 4 匹全例に take はなく, 10 日で 4 匹中 1 匹, 2 週間で 3 匹に take を認めた. 残りの 1 匹では 4 週間以後も take は認められず, take のみられた 3 匹での take までの平均日数は 10.7 日 (9~12 日) であった.

2) UK 20 単位/ml を作用せしめた群では移植後の各時期において非作用群と同じ take の率を示した.

表3. 腫瘍自家移植におよぼす UK の影響：移植後の各時期における take の率. (in vitro, 37°C, 10分)

U K (単位/ml)	10 <sup>5</sup> 個細胞移植後日数						
	3	7	10	14	21	28	28以上
0	0/4	0/4	1/4	3/4	3/4	3/4	3/4
20	0/4	0/4	1/4	3/4	3/4	3/4	3/4
40	0/4	0/4	1/4	3/4	4/4	4/4	4/4

表4. 腫瘍自家移植におよぼす MMC と UK の併用効果：移植後の各時期における take の率. (in vitro, 37°C, 10分)

MMC (μg/ml)	U K (単位/ml)	10 <sup>5</sup> 個細胞移植後日数						
		3	7	10	14	21	28	28以上
0	0	0/10	0/10	4/10	8/10	9/10	10/10	10/10
		0/8	0/8	0/8	6/8	7/8	7/8	8/8
2.5	0	0/4	0/4	0/4	2/4	4/4	4/4	4/4
		0/8	0/8	0/8	2/8	6/8	7/8	7/8
2.5	10	0/4	0/4	0/4	2/4	4/4	4/4	4/4
		0/8	0/8	2/8	6/8	7/8	7/8	7/8
2.5	20	0/4	0/4	0/4	3/4	4/4	4/4	4/4
		0/8	0/8	0/8	3/8	4/8	4/8	4/8
2.5	30	0/4	0/4	0/4	4/4	4/4	4/4	4/4
		0/8	0/8	0/8	3/8	6/8	6/8	6/8
2.5	40	0/8	0/8	0/8	3/8	6/8	6/8	6/8
		0/8	0/8	0/8	3/8	6/8	6/8	6/8

図10. 腫瘍自家移植におよぼすUK の影響：移植からtake までの期間. (in vitro, 37°C, 10分)

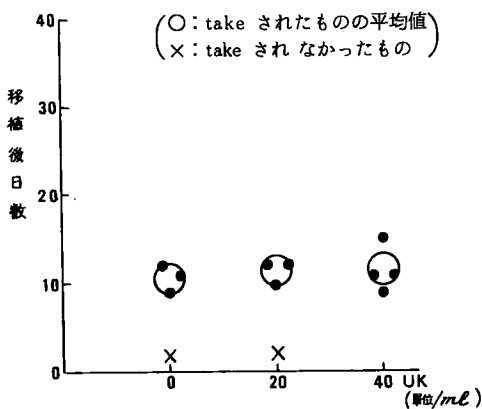


図11. 腫瘍自家移植におよぼすUK の影響：移植後の平均増殖曲線. (in vitro, 37°C, 10分)

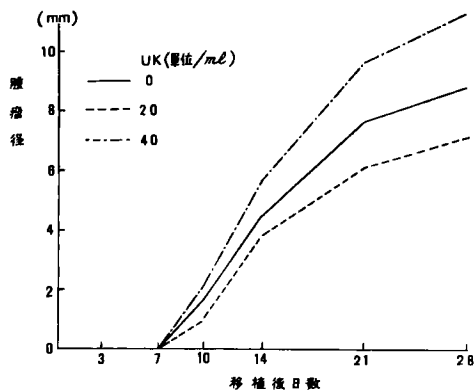


図12. 腫瘍自家移植におよぼすMMC と UK の併用効果：移植後の各時期における take の率. (in vitro, 37°C, 10分)

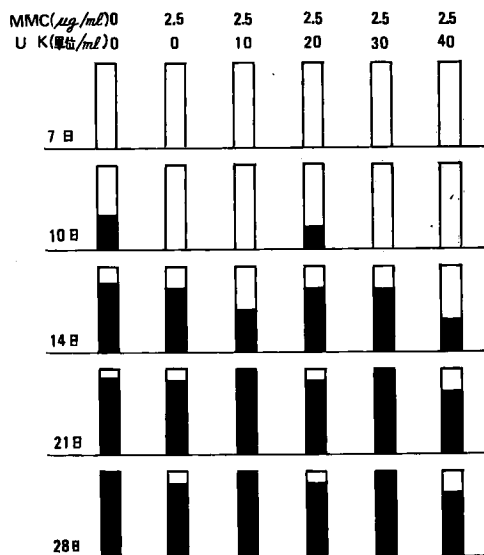
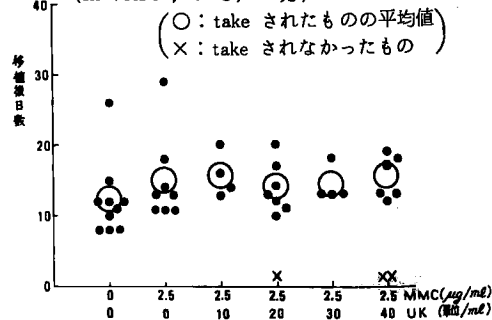


図13. 腫瘍自家移植におよぼすMMC と UK の併用効果：移植からtake までの期間. (in vitro, 37°C, 10分)



takeのみられた3匹でのtakeまでの平均日数は11.3日(10~12日)であった。

3) UK 40単位/mlを作用せしめた群では1週間まで4匹全例にtakeはなく、2週間で4匹中3匹、3週間で4匹全例にtakeを認めtakeまでの平均日数は11.5日(9~15日)であった。

b. take後の増殖(図11)

移植後3, 7, 10, 14, 21, 28日の腫瘍平均径はUK非作用群ではそれぞれ0, 0, 1.6, 4.4, 7.6, 8.8mmであり、UK 20単位/ml作用群では0, 0, 0.9, 3.8, 6.1, 7.1mm, UK 40単位/ml作用群では0, 0, 2.0, 5.6, 9.6, mmであった。

小括: 腫瘍細胞の自家移植におよぼすUK 20単位/mlおよび40単位/mlの試験管内作用の影響は認められなかった。

4. MMCとUKの併用が腫瘍自家移植におよぼす影響について

a. MMC 2.5 mcg/mlとUKの併用効果

腫瘍細胞 $10^6$ 個にMMC 2.5 mcgとUK 10, 20, 30, 40単位を加えて、生理的食塩水1ml中で37°C 10分間作用せしめたのち背部皮下に自家移植した4群を、無処置、MMC単独作用後に同様に自家移植した2群を対照として調べた。

1) 移植後の各時期におけるtakeの率およびtakeまでの期間(表4, 図12, 13)

a) MMCおよびUKをとともに作用せしめなかった無処置対照群では移植後1週間まで10匹全例にtakeはなく、10日で10匹中4匹、2週間で8匹、3週間で9匹、4週間で10匹全例にtakeを認め、takeまでの平均日数は12.2日(8~26日)であった。

b) MMCのみを作用せしめた対照群では10日まで8匹全例にtakeはなく、2週間で8匹中6匹、3週間で7匹、4週間以後になって8匹全例にtakeを認め、takeまでの平均日数は15日(11~29日)であった。

c) MMCとUK 10単位/mlを作用せしめた群では10日まで4匹全例にtakeはなく、2週間で4匹中2匹、3週間で4匹全例にtakeを認め、takeまでの平均日数は15.8日(13~20日)であった。

d) MMCとUK 20単位/mlを作用せしめた群では1週間まで8匹全例にtakeはなく、10日で8匹中2匹、2週間で6匹、3週間で7匹にtakeを認めた。残りの1匹では4週間以後もtakeは認められず、takeのみられた7匹でのtakeまでの平均日数は13.9日(10~20日)であった。

e) MMCとUK 30単位/mlを作用せしめた群では10日まで4匹全例にtakeはなく、2週間で4匹中3匹、3週間で4匹全例にtakeを認め、takeまでの平均日数は14.3日(13~18日)であった。

f) MMCとUK 40単位/mlを作用せしめた群では10日まで8匹全例にtakeはなく、2週間で8匹中3匹、3週間で6匹にtakeを認めた。残りの2匹では4週間以後もtakeは認められず、takeのみられた6匹でのtakeまでの平均日数は15.3日(12~19日)であった。

2) take後の増殖(表5, 図14)

移植後2週間目の腫瘍平均径はMMCを作用せしめなかった群では5.7mmであるのに対し、MMCを作用させた各群では1.8mmから3.9mm(平均2.9mm)の間にあり、UK併用の有無を問わず腫瘍の増殖抑制がみられる。MMCと併せてUKを作用せしめた群ではUK 40単位/mlを併用した群の増殖が最も抑制さ

図14. 腫瘍自家移植におよぼすMMCとUKの併用効果: 移植後の平均増殖曲線。(in vitro, 37°C, 10分)

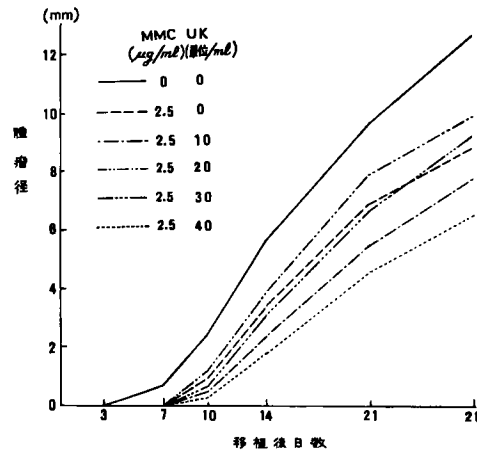


表5. 腫瘍自家移植におよぼすMMCとUKの併用効果: 移植後の各時期における腫瘍の大きさ—平均値—(mm) (in vitro, 37°C, 10分)

MMC ( $\mu$ g/ml)	K (単位/ml)	$10^5$ 個細胞移植後日数					
		3	7	10	14	21	28
0	0	0	0.7	2.5	5.7	9.7	12.7
2.5	0	0	0	0.9	3.4	6.9	8.7
2.5	10	0	0	0.5	2.4	5.5	7.8
2.5	20	0	0	1.2	3.9	7.9	9.9
2.5	30	0	0	0.7	3.1	6.7	9.2
2.5	40	0	0	0.3	1.8	4.6	6.5

表 6. 腫瘍自家移植におよぼす MMC と UK の併用効果：移植後の各時期における take の率. (in vitro, 37°C, 10分)

MMC (μg/ml)	U K (単位/ml)	10 <sup>5</sup> 個細胞移植後日数					
		3	7	10	14	21	28 以上
0	0	0/10	0/10	4/10	8/10	9/10	10/10
5	0	0/6	0/6	0/6	1/6	3/6	4/6
5	10	0/12	0/12	1/12	3/12	4/12	8/12
5	20	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	2/6

図15. 腫瘍自家移植におよぼすMMC とUK の併用効果：移植後の各時間における take の率. (in vitro, 37°C, 10分)

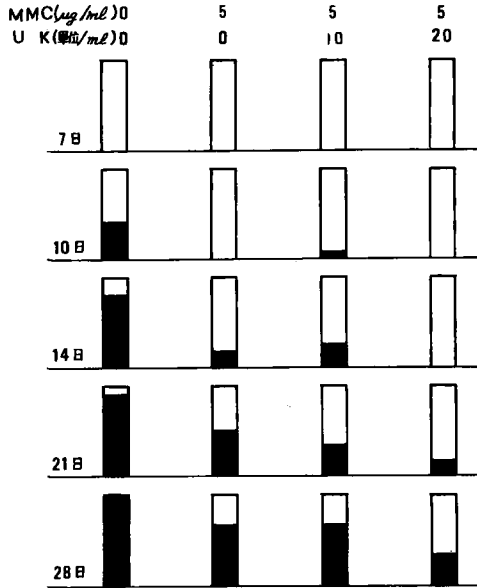
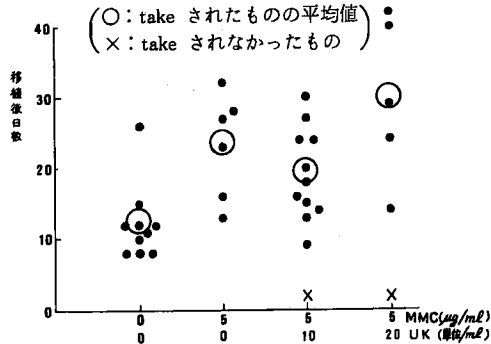


図16. 腫瘍自家移植におよぼすMMC とUK の併用効果：移植からtake までの期間. (in vitro, 37°C, 10分)



れたが、MMC 単独群や UK 10, 20, 30 単位併用群との間に顕著な差は認められなかった。

小括：MMC 2.5 mcg/ml を作用させた群では作用せしめなかった群に比して take の率には差がなく、take までの期間の延長と腫瘍の増殖傾向に軽度の抑制効果はみられたが、これに 10, 20, 30, 40 単位/ml の濃度を UK を併せて作用せしめても MMC の抗腫瘍効果の増強はみられなかった。

b. MMC 5 mcg/ml と UK の併用効果.

腫瘍細胞 10<sup>5</sup> 個に MMC 5 mcg と UK 10, 20 単位を加えて生理的食塩水 1 ml 中に 37°C 10 分間作用せしめたのち背部皮下に自家移植した 3 群を、無処置、MMC 単独作用後に同様に自家移植した 2 群を対照として調べた。

1) 移植後の各時期における take の率および take までの期間 (表 6, 図 15, 16)

a) MMC のみを作用せしめた群では 10 日まで 6 匹全例に take はなく、2 週間で 6 匹中 1 匹、3 週間で 3 匹、4 週間で 4 匹、4 週間以後になって 6 匹全例に take を認め、take までの平均日数は 23.2 日 (13~32 日) であった。

b) MMC と UK 10 単位/ml を作用せしめた群では 1 週間まで 12 匹全例に take はなく、10 日で 12 匹中 1 匹、2 週間で 3 匹、3 週間で 4 匹、4 週間で 8 匹、4 週間以後になって 11 匹に take を認めた。残りの 1 匹では take は認められず、take のみられた 11 匹での take までの平均日数は 19.2 日 (9~30 日) であった。

c) MMC と UK 20 単位/ml を作用せしめた群では 2 週間まで 6 匹全例に take はなく、3 週間で 6 匹中 1 匹、4 週間で 2 匹、4 週間以後になって 5 匹に take を認めた。残りの 1 匹では take は認められず、take のみられた 5 匹での take までの平均日数は 29.8 日 (14~42 日) であった。

2) take 後の増殖 (表 7, 図 17)

移植後 2 週間目の腫瘍平均径は MMC を作用せしめなかった群では 5.7 mm であるのに対し、MMC を作用させた各群では 0.4 mm から 1.6 mm (平均 1.1 mm) の間にあり、UK 併用の有無を問わず腫瘍の著明な増殖抑制がみられた。MMC と併せて UK を作用せしめた群では UK 10 単位/ml の併用では 1.6 mm であり、MMC 単独群の 1.4 mm と比較して差は認めないが、UK 20 単位/ml の併用群では 0.4 mm であり、前者と比べて腫瘍の増殖抑制がみられ、その後の増殖曲線においてもこれを認めることができた。

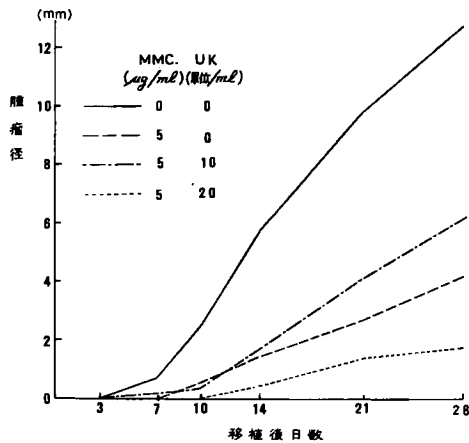
小括：MMC 5 mcg/ml に UK 10, 20 単位/ml を併用



表7. 腫瘍自家移植におよぼす MMC と UK の併用効果: 移植後の各時期における腫瘍の大きさ—平均値—(mm) (in vitro, 37°C, 10分)

MMC ( $\mu\text{g/ml}$ )	U K (単位/ml)	10 <sup>6</sup> 個細胞移植後日数					
		3	7	10	14	21	28
0	0	0	0.7	2.5	5.7	9.7	12.7
5	0	0	0	0.5	1.4	2.6	4.1
5	10	0	0.1	0.4	1.6	4.0	6.1
5	20	0	0	0	0.4	1.3	1.7

図17. 腫瘍自家移植におよぼす MMC と UK の併用効果: 移植後の平均増殖曲線. (in vitro, 37°C, 10分)



したが、UK 20単位/mlを併用したときのみ MMC の抗腫瘍効果におよぼす UK の併用効果が認められ、take の率および take までの期間に抑制がみられたが、take されたものについてみれば take 後の増殖に対する抑制効果は明らかではなかった。

II. 腫瘍自家移植におよぼす MMC と UK の併用効果 (腹腔内投与実験)

A. urokinase 投与による各種臓器および腫瘍の線維素溶解活性の変動。

1. 腫瘍および臓器の線維素溶解活性について (表8)

a. UK 非投与群の線溶活性: 腫瘍抽出液の線溶活性は3匹中2匹に認められおのおの9, 36であった。肝では5匹中1匹に認められ46, 腎では5匹中1匹に認められ56, 脾では3匹ともに線溶活性は認められず、肺では5匹全例に認められその平均値は34.2 (30~42) であった。

b. UK 投与後の線溶活性: UK 静注後10分では腫瘍抽出液の線溶活性は5匹中4匹に認められ、活性を認めた4匹での平均値は54.3 (24~87) であった。肝では5匹全例に線溶活性は認められず、腎では5匹中3匹に認められ、活性を認めた3匹での平均値は174.3 (86~272) であった。肺では5匹全例に認められその平均値は106.6 (25~282) であった。

小括: 腫瘍組織では UK の投与、非投与にかかわらず8匹中6匹に線溶活性が認められたが、UK 静注後はその活性がやや増大した。

肝では UK の投与、非投与にかかわらず線溶活性を認めたのは10匹中1匹であり、UK 投与による影響は認められなかった。腎では線溶活性を認めたのは UK 非投与群で5匹中1匹であったのに対し、投与群では5匹中3匹に認めその活性値も増大した。脾では UK の投与、非投与にかかわらず活性は認められなかった。肺では UK の投与、非投与にかかわらず10匹全例に活性を認め、UK 投与後にその活性値は増大した。

2. 腫瘍組織線維素溶解活性の UK 投与後の時間的推移。

a. 組織塊による測定 (表9)

1) 生理的食塩水静注群では静注前の線溶活性は6匹の平均値で125.2 (54~196) であり、静注10分後では140.3 (68~175), 20分後では121.7 (72~165), 30分後では120.0 (68~175), 45分後では111.0 (56~189), 60分後では120.5 (64~156) であった。

2) UK 静注群では静注前の線溶活性は4匹の平均

表8. UK 静注後の腫瘍および臓器抽出液の線溶活性の推移

フィブリン平板法 (長径×短径mm)

臓器	無処置					UK 10単位静注10分後				
	1	2	3	4	5 (平均)	1	2	3	4	5 (平均)
腫瘍	9	36			0 (15.0)	0	24	81	87	25 (43.4)
肝	0	0	0	0	46 (9.2)	0	0	0	0	0 (0)
腎	0	0	0	0	56 (11.2)	0	0	165	86	272 (104.6)
脾			0	0	(0)					0 (0)
肺	33	30	42	33	33 (34.2)	25	36	90	282	100 (106.6)

表9. UK 静注後の腫瘍組織塊の線溶活性の時間的推移. フィブリン平板法 (長径×短径mm)

マウス No	無 処 置						UK 10単位静注			
	1	2	3	4	5	6 (平均)	1	2	3	4 (平均)
静注前	95	100	196	54	156	150 (125.2)	144	100	196	189 (157.3)
10分後	155	138	150	68	175	156 (140.3)	176	149	233	156 (178.5)
20 " "	111	94	165	72	125	163 (121.7)	110	167	264	270 (202.8)
30 " "	83	68	121	175	110	163 (120.0)	131	81	240	(150.7)
45 " "	79	144	189	56	90	108 (111.0)	80	160	224	(154.7)
60 " "	64	95	144	126	156	138 (120.5)	95	173	156	(141.3)

表10. UK 静注後の腫瘍抽出液の線溶活性の時間的推移. フィブリン平板法 (長径×短径mm)

マウス No	UK 10単位静注				
	1	2	3	4	(平均)
静注前	27.4	96.5	93.0	109.4	(81.6)
5分後	69.0	67.2	99.4	65.4	(75.3)
10 " "		104.5	142.0	95.0	(113.8)
15 " "			100.0	139.0	(119.5)
20 " "	55.1	84.5			(69.8)

値で157.3 (100~196)であり, 静注10分後では178.5 (149~233), 20分後では202.8 (110~270), 30分後では150.7 (81~240), 45分後では154.7 (80~224), 60分後では141.3 (95~173)であった.

#### b. 抽出液による測定 (表10)

UK 静注前の線溶活性は4匹の平均値で81.6 (27.4~109.4)であり, 静注5分後では75.3 (65.4~99.4), 10分後では113.8 (95.0~142.0), 15分後では100.0, 139.0, 20分後では55.1, 84.5であった.

小括: 腫瘍組織の線溶活性は組織塊による測定ではUK 静注後10分から20分にかけて増強した. 抽出液による測定でもほぼ同様の傾向を示した.

#### B. 同時的併用の効果

##### 1. 腫瘍自家移植当日から開始した併用投与の効果

##### a. 腫瘍細胞 $10^8$ 個移植に対する効果について

1) 移植後の各時期における take の率および take までの期間 (表11, 図18, 19)

a) 生理的食塩水投与群では移植後3日までに15匹中1匹, 1週間で14匹, 10日で15匹全例に take を認め, take までの平均日数は5.6日 (3~9日)であった.

b) UK 投与群では3日までに10匹全例に take はなく, 1週間で10匹中6匹, 10日で9匹に take を認めた. 残りの1匹では4週間以後も take は認められず, take のみられた9匹での take までの平均日数は6.6日 (4~9日)であった.

表11. 腫瘍自家移植におよぼす MMC と UK の同時的併用の効果: 移植後の各時期における take の率.

(MMC $1\mu\text{g/g}$  (体重) UK 10単位/g (体重) 移植当日より連日10日間腹腔内投与)

実験群	$10^8$ 個細胞移植後日数					
	3	7	10	14	21	28
生食水	$\frac{1}{15}$	$\frac{14}{15}$	$\frac{15}{15}$	$\frac{15}{15}$	$\frac{15}{15}$	$\frac{15}{15}$
U K	$\frac{0}{10}$	$\frac{6}{10}$	$\frac{9}{10}$	$\frac{9}{10}$	$\frac{9}{10}$	$\frac{9}{10}$
M M C	$\frac{0}{15}$	$\frac{10}{15}$	$\frac{14}{15}$	$\frac{15}{15}$	$\frac{15}{15}$	$\frac{15}{15}$
MMC+UK	$\frac{0}{15}$	$\frac{2}{15}$	$\frac{5}{15}$	$\frac{12}{15}$	$\frac{14}{15}$	$\frac{15}{15}$

c) MMC 投与群では3日まで15匹全例に take はなく, 1週間で15匹中10匹, 10日で14匹, 2週間で15匹全例に take を認め, take までの平均日数は6.7日 (4~11日)であった.

d) MMC, UK 併用投与群では3日まで15匹全例に take はなく, 1週間で15匹中2匹, 10日で5匹, 2週間で12匹, 3週間で14匹, 4週間で15匹全例に take を認め, take までの平均日数は12.2日 (4~23日)であった.

##### 2) take 後の増殖 (図1, 3, 4, 5, 20)

a) 移植後3, 7, 10, 14, 21, 28日の腫瘍平均径は生理的食塩水投与群15匹ではそれぞれ0.3, 4.7, 7.6, 11.5, 15.1, 16.8mmであり, UK 投与群10匹では0.2, 2.8, 5.0, 8.4, 13.4, 16.7mm, MMC 投与群15匹では0.2, 2.9, 4.4, 6.3, 9.7, 12.3mm, MMC, UK 併用投与群15匹では0, 0.6, 1.9, 4.2, 8.7, 12.0mmであった.

b) take から10mmの腫瘍径になるまでに要した平均日数は生理的食塩水投与群15匹では7.7日 (4~15日)でありUK 投与群10匹では take しなかった1匹と take したが10mm 径にいたらなかった1匹を除く8匹の平均で9.1日 (6~10日), MMC 投与群15匹では take したが10mm 径にいたらなかった2匹を除く13

図18. 腫瘍自家移植 ( $10^6$  個細胞) におよぼすMMC とUK の同時的併用の効果：移植後の各時期におけるtake の率。(MMC  $1 \mu\text{g/g}$ (体重), UK10単位/g(体重). 移植当日より連日10日間腹腔内投与)

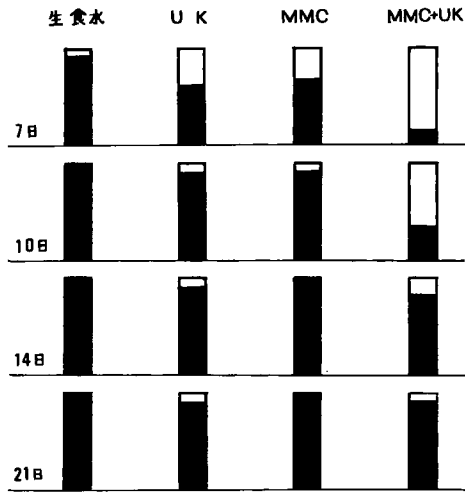
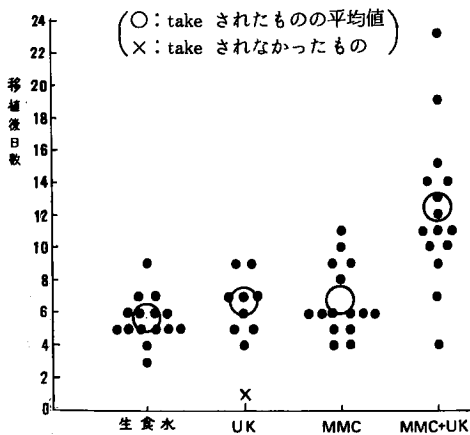
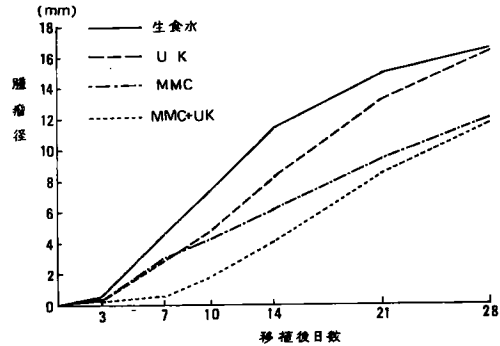


図19. 腫瘍自家移植 ( $10^6$  個細胞) におよぼすMMC とUK の同時的併用の効果：移植からtake までの期間。(MMC  $1 \mu\text{g/g}$ (体重), UK10単位/g(体重). 移植当日より連日10日間腹腔内投与)



匹の平均で14.5日 (12~18日), MMC, UK 併用投与群15匹では take したが10mm径にいたらなかった1匹を除く14匹の平均で11.5日 (7~18日) であった。  
c) take 後1週間目の腫瘍平均径は生理的食塩水投与群15匹では10.0mm (5.9~12.8mm) であり, UK

図20. 腫瘍自家移植 ( $10^6$  個細胞) におよぼすMMC とUK の同時的併用の効果：移植後の平均増殖曲線。(MMC  $1 \mu\text{g/g}$ (体重), UK10単位/g(体重). 移植当日より連日10日間腹腔内投与)



投与群10匹では take しなかった1匹を除く9匹については8.4mm (5.7~12.0mm), MMC 投与群15匹では6.2mm (4.5~8.5mm), MMC, UK 併用投与群15匹では7.4mm (6.0~10.1mm) であった。

小括：UK 単独投与群では生理的食塩水投与群に比べて take までの期間に多少の遅れを認めるが, take 後は9匹中7匹までが生理的食塩水投与群に劣らぬ増殖を示した。

MMC 単独投与群では生理的食塩水投与群に比べて take までの期間に多少の遅れを認めるのみならず, take 後の増殖にも抑制が認められた。

MMC, UK 併用投与群では MMC 単独投与群に比べて take までの期間に著明な延長を認め, MMC 単独投与群で最も遅く take したのもより更に take の遅れたものが15匹中7匹にみられ平均値で約2倍の日数を要しており, UK 併用による MMC の効果増強作用が認められた。

表12. 腫瘍自家移植におよぼすMMC とUK の同時的併用の効果：移植後の各時期における take の率。

(MMC  $1 \mu\text{g/g}$  (体重) UK 10単位/g (体重) 移植当日より連日10日間腹腔内投与)

実験群	10 <sup>6</sup> 個細胞移植後日数					
	3	7	10	14	21	28
生理食水	0/15	2/15	9/15	13/15	15/15	15/15
U K	0/10	0/10	0/10	5/10	6/10	6/10
M M C	0/15	0/15	1/15	7/15	13/15	15/15
MMC+UK	0/15	0/15	0/15	3/15	9/15	13/15

図21. 腫瘍自家移植 ( $10^5$  個細胞) におよぼすMMCとUKの同時的併用の効果: 移植後の各時期におけるtakeの率. (MMC  $1 \mu\text{g}/\text{g}$ (体重). UK 10単位/ $\text{g}$ (体重). 移植当日より連日10日間腹腔内投与)

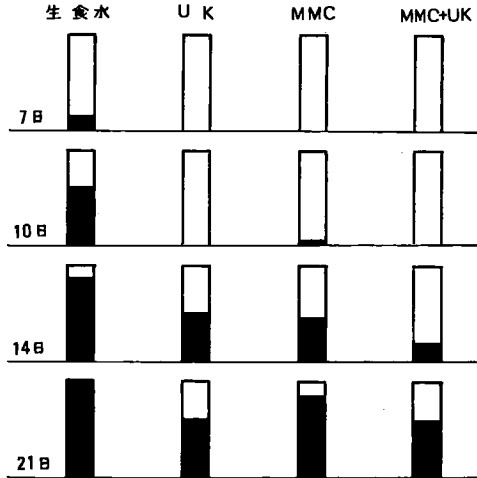
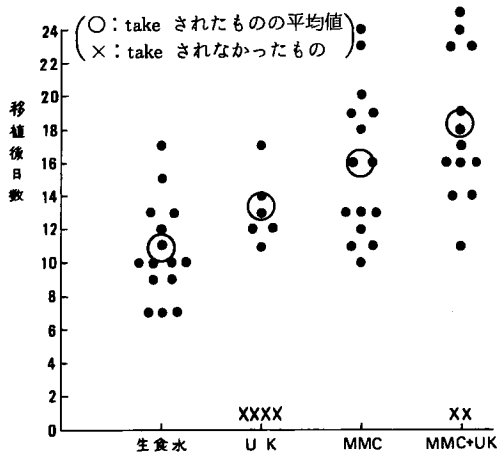


図22. 腫瘍自家移植 ( $10^5$  個細胞) におよぼすMMCとUKの同時的併用の効果: 移植からtakeまでの期間. (MMC  $1 \mu\text{g}/\text{g}$ (体重). UK 10単位/ $\text{g}$ (体重). 移植当日より連日10日間腹腔内投与)



take後の増殖は生理的食塩水投与群, UK単独投与群と比べて抑制されるがMMC単独投与群より軽度であった.

b. 腫瘍細胞 $10^5$ 個移植に対する効果について

1) 移植後の各時期におけるtakeの率およびtakeまでの期間 (表12, 図21, 22)

a) 生理的食塩水投与群では移植後3日まで15匹全

例にtakeはなく, 1週間で15匹中2匹, 10日で9匹, 2週間で13匹, 3週間で15匹全例にtakeを認め, takeまでの平均日数は10.7日(7~17日)であった.

b) UK投与群では10日まで10匹全例にtakeはなく, 2週間で10匹中5匹, 3週間で6匹にtakeを認めた. 残りの4匹では4週間以後もtakeは認められず, takeのみられた6匹でのtakeまでの平均日数は13.2日(11~17日)であった.

c) MMC投与群では1週間まで15匹全例にtakeはなく, 10日で15匹中1匹, 2週間で7匹, 3週間で13匹, 4週間で15匹全例にtakeを認め, takeまでの平均日数は15.9日(10~24日)であった.

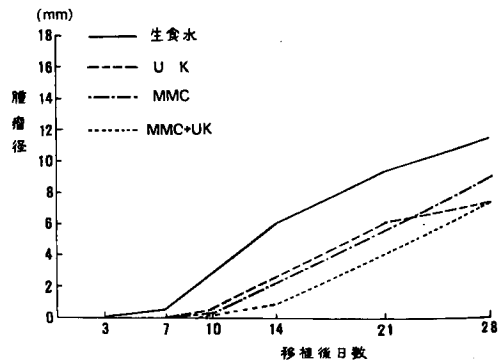
d) MMC, UK併用投与群では10日まで15匹全例にtakeはなく, 2週間で15匹中3匹, 3週間で9匹, 4週間で13匹にtakeを認めた. 残りの2匹では4週間以後もtakeは認められず, takeのみられた13匹でのtakeまでの平均日数は18.2日(11~25日)であった.

2) take後の増殖 (図2, 23)

a) 移植後3, 7, 10, 14, 21, 28日の腫瘍平均径は生理的食塩水投与群15匹ではそれぞれ0, 0.5, 2.7, 6.0, 9.3, 11.7mmであり, UK投与群10匹では0, 0, 0.5, 2.5, 6.0, 7.3mm, MMC投与群15匹では0, 0, 0.4, 2.4, 5.9, 8.9mm, MMC, UK併用投与群15匹では0, 0, 0.1, 0.9, 4.0, 7.4mmであった.

b) takeから10mmの腫瘍径になるまでに要した平均日数は生理的食塩水投与群15匹ではtakeしたが10mm径にいたらなかった3匹を除く12匹の平均で10.2日(5~15日)であり, UK投与群10匹ではtakeしな

図23. 腫瘍自家移植 ( $10^5$  個細胞) におよぼすMMCとUKの同時的併用の効果: 移植後の平均増殖曲線. (MMC  $1 \mu\text{g}/\text{g}$ (体重). UK 10単位/ $\text{g}$ (体重). 移植後当日より連日10日間腹腔内投与)



かった4匹とtakeしたが10mm径にいたらなかった1匹を除く5匹の平均で8.6日(6~12日), MMC投与群15匹ではtakeしたが10mm径にいたらなかった10匹を除く5匹の平均で11.4日(7~18日), MMC, UK併用投与群15匹ではtakeしなかった2匹とtakeしたが10mm径にいたらなかった5匹を除く8匹の平均で10.6日(7~14日)であった。

c). take後1週間目の腫瘍平均径は生理的食塩水投与群15匹では8.2mm(5.0~12.0mm)であり, UK投与群10匹ではtakeしなかった4匹を除く6匹については8.5mm(5.0~11.4mm), MMC投与群15匹では6.6mm(3.5~9.9mm), MMC, UK併用投与群15匹ではtakeしなかった2匹を除く13匹については7.5mm(5.3~9.2mm)であった。

小括:生理的食塩水投与群15匹に全例takeを認めたのに対し, UK単独投与群では10匹中4匹にtakeを認めずtakeしたものについてもtakeまでの期間に多少の遅れが認められた。しかしtake後の増殖はほとんど抑制されなかった。

MMC単独投与群では生理的食塩水投与群に比べてtakeまでの期間の延長とtake後の増殖に抑制効果がみられた。

MMC, UK併用投与群ではMMC単独投与群に比べてtakeまでの期間に延長を認めるが,  $10^6$ 個細胞移植群にみられた如き著明な延長は認められず, UK併用によるMMCの効果増強作用は軽度であった。take後の増殖については生理的食塩水投与群およびUK単独投与群に比べて抑制されるがMMC単独投与群より軽度であった。

2. 腫瘍自家移植1週間後から開始した併用投与の効果

a. 腫瘍細胞 $10^6$ 個移植に対する効果について

1) 移植後の各時期におけるtakeの率およびtake

表13. 腫瘍自家移植におよぼすMMCとUKの同時的併用の効果:移植後の各時期におけるtakeの率。  
(MMC $1\mu\text{g/g}$ (体重) UK10単位/g(体重) 移植後1週間目より連日10日間腹腔内投与)

実験群	$10^6$ 個細胞移植後日数					
	3	7	10	14	21	28
生食水	$\frac{1}{15}$	$\frac{14}{15}$	$\frac{15}{15}$	$\frac{15}{15}$	$\frac{15}{15}$	$\frac{15}{15}$
MMC	$\frac{1}{10}$	$\frac{6}{10}$	$\frac{10}{10}$	$\frac{10}{10}$	$\frac{10}{10}$	$\frac{10}{10}$
MMC+UK	$\frac{0}{15}$	$\frac{12}{15}$	$\frac{14}{15}$	$\frac{14}{15}$	$\frac{14}{15}$	$\frac{15}{15}$

図24. 腫瘍自家移植( $10^6$ 個細胞)におよぼすMMCとUKの同時的併用の効果:移植後の各時期におけるtakeの率。(MMC $1\mu\text{g/g}$ (体重). UK10単位/g(体重). 移植後1週間目より連日10日間腹腔内投与)

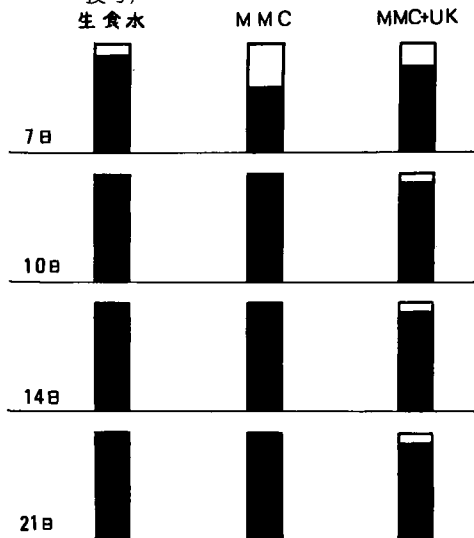
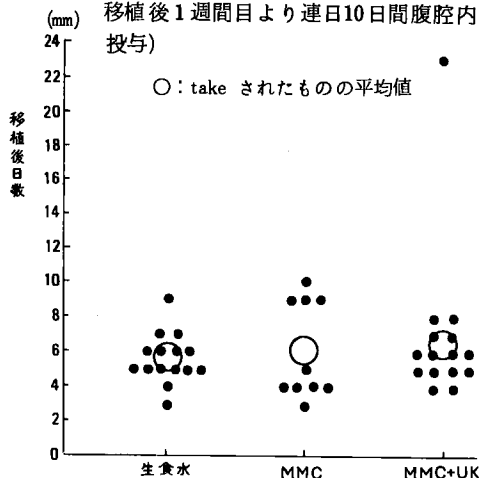


図25. 腫瘍自家移植( $10^6$ 個細胞)におよぼすMMCとUKの同時的併用の効果:移植からtakeまでの期間。(MMC $1\mu\text{g/g}$ (体重). UK10単位/g(体重). 移植後1週間目より連日10日間腹腔内投与)

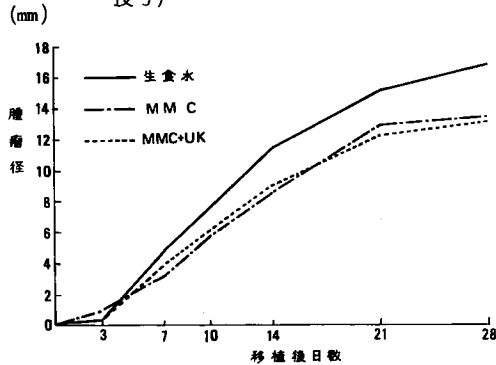


までの期間(表13, 図24, 25)

a) MMC投与群10匹では移植後3日までに10匹中1匹, 1週間で6匹, 10日で10匹全例にtakeを認め, takeまでの平均日数は6.1日(3~10日)であった。

b) MMC, UK併用投与群では3日までに15匹全例にtakeはなく, 1週間で15匹中12匹, 10日で14匹, 4週間で15匹全例にtakeを認め, takeまでの平均日

図26. 腫瘍自家移植 ( $10^6$  個細胞) におよぼすMMC とUK の同時的併用の効果：移植後の平均増殖曲線。(MMC  $1 \mu\text{g/g}$ (体重), UK10単位/g(体重). 移植後1週間目より連日10日間腹腔内投与)



数は7.0日 (4~23日) であった。

2) take 後の増殖 (図26)

a) 移植後 3, 7, 10, 14, 21, 28日の腫瘍平均径はMMC投与群10匹ではそれぞれ1.0, 3.3, 5.8, 8.5, 12.8, 13.3mmであり, MMC, UK併用投与群15匹では0.3, 3.8, 5.9, 8.9, 12.3, 13.4mmであった。

b) take から10mmの腫瘍径になるまでに要した平均日数はMMC投与群10匹ではtakeしたが10mm径にいたらなかった2匹を除く8匹の平均で10日 (5~15日) であり, MMC, UK併用投与群15匹ではtakeしたが10mm径にいたらなかった2匹を除く13匹の平均で9.2日 (6~15日) であった。

c) take 後1週間目の腫瘍平均径はMMC投与群10匹では7.8mm (4.5~12.6mm) であり, MMC, UK併用投与群15匹では8.4mm (5.5~11.6mm) であった。

小括: MMC, UK併用投与群ではMMC単独群に比べてtakeの率, takeまでの期間およびtake後の増殖にほとんど差がなく, UK併用によるMMCの効果増強作用は認められなかった。

b. 腫瘍細胞 $10^5$ 個移植に対する効果について

1) 移植後の各時期におけるtakeの率およびtakeまでの期間 (表14, 図27, 28)

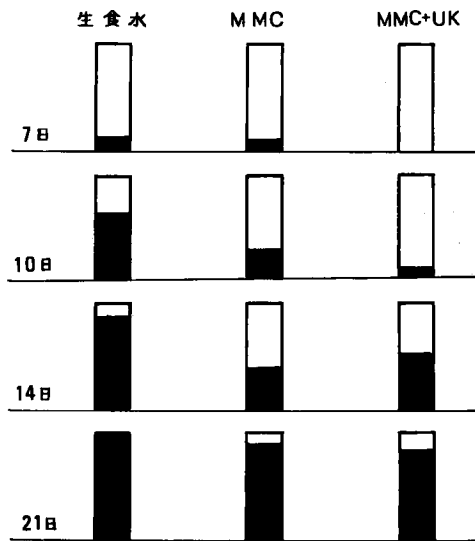
a) MMC投与群では3日まで10匹全例にtakeはなく, 1週間で10匹中1匹, 10日で3匹, 2週間で4匹, 3週間で9匹にtakeを認めた. 残りの1匹では4週間以後もtakeは認められず, takeのみられた9匹でのtakeまでの平均日数は13.7日 (7~21日) であった。

表14. 腫瘍自家移植におよぼすMMCとUKの同時的併用の効果: 移植後の各時期におけるtakeの率.

(MMC  $1 \mu\text{g/g}$ (体重) UK10単位/g(体重) 移植後1週間目より連日10日間腹腔内投与)

実験群	$10^5$ 個細胞移植後日数					
	3	7	10	14	21	28
生食水	0/15	2/15	9/15	13/15	15/15	15/15
MMC	0/10	1/10	3/10	4/10	9/10	9/10
MMC+UK	0/15	0/15	2/15	8/15	13/15	15/15

図27. 腫瘍自家移植 ( $10^5$  個細胞) におよぼすMMC とUK の同時的併用の効果: 移植後の各時期におけるtakeの率。(MMC  $1 \mu\text{g/g}$ (体重), UK10単位/g(体重). 移植後1週間目より連日10日間腹腔内投与)



b) MMC, UK併用投与群では1週間まで15匹全例にtakeはなく, 10日で15匹中2匹, 2週間で8匹, 3週間で13匹, 4週間で15匹全例にtakeを認め, takeまでの平均日数は14.9日 (10~26日) であった。

2) take 後の増殖 (図29)

a) 移植後 3, 7, 10, 14, 21, 28日の腫瘍平均径はMMC投与群10匹ではそれぞれ0, 0.6, 1.4, 3.5, 7.5, 8.5mmであり, MMC, UK併用投与群15匹では0, 0, 1.8, 3.4, 6.9, 9.3mmであった。

b) takeから10mmの腫瘍径になるまでに要した平均日数はMMC投与群10匹ではtakeしなかった1匹と

図28. 腫瘍自家移植 ( $10^5$  個細胞) におよぼすMMC とUK の同時的併用の効果: 移植からtake までの期間. (MMC  $1 \mu\text{g/g}$ (体重). UK10単位/g(体重). 移植後1週間目より連日10日間腹腔内投与)

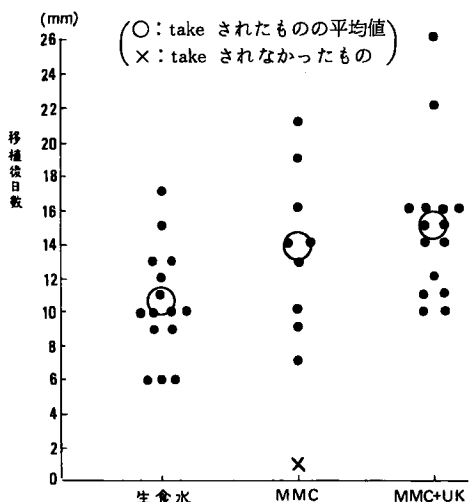
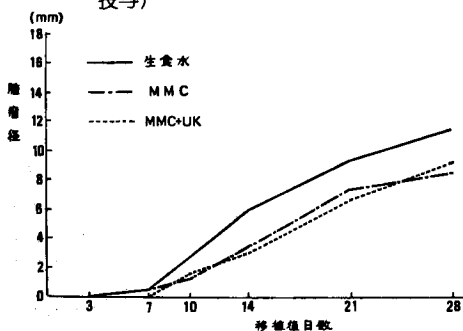


図29. 腫瘍自家移植 ( $10^5$  個細胞) におよぼすMMC とUK の同時的併用の効果: 移植後の平均増殖曲線. (MMC  $1 \mu\text{g/g}$ (体重). UK10単位/g(体重). 移植後1週間目より連日10日間腹腔内投与)



takeしたが10mm径にいたらなかった3匹を除く6匹の平均で12日(9~19日)であり, MMC, UK併用投与群15匹ではtakeしたが10mm径にいたらなかった6匹を除く9匹の平均で9.4日(6~12日)であった. c) take後1週間目の腫瘍平均径はMMC投与群10匹ではtakeしなかった1匹を除く9匹については7.0mm(4.5~8.9mm)であり, MMC, UK併用投与群15匹では7.2mm(4.5~10.5mm)であった. 小括: MMC, UK併用投与群ではMMC単独投与群に比べてtakeまでの期間に多少の延長を認めるが,

takeの率およびtake後の増殖にはほとんど差がなく, UK併用によるMMCの効果増強作用はほとんど認められなかった.

### 総括ならびに考案

著者の実験では methylcholanthrene によって個々のマウスに誘発された肉腫を用い, これをおのこのマウスにもどし移植する自家移植法をおこなったので, 移植された腫瘍細胞の移植成立 (take) やその後の増殖におよぼす移植免疫の影響は除外してよい.

また既述の方法で調整され移植された腫瘍細胞の移植性, とくにtakeの率とtakeまでの期間は, 試験管内実験における無処置細胞移植群, 腹腔内投与実験における生理的食塩水投与群にみられたように, 移植細胞数にしたがってほぼ一定した傾向を示し著明なばらつきはなく,  $10^6$ 個細胞の移植性についてみれば, takeの率は移植後7日で93%, 10日で100%であり, takeまでの日数は80%のものが5日から7日の間にあった.  $10^6$ 個細胞移植では $10^5$ 個細胞移植に比べてこれらのばらつきがやや多かったが, takeの率はほぼ一定であった. しかし $10^6$ 個,  $10^5$ 個細胞移植ともにtake後の増殖には各個体によるばらつきが認められたので, 著者はtakeの率とtakeまでの期間を主たる示標として効果の判定をおこない, 動物の個体差による移植性の変化を各種の処置の効果と誤認することを避けた.

さらに腫瘍細胞浮遊液調整後の保存時間の移植性への影響も実験的に検討し, その結果にもとづいて薬剤の試験管内作用も10分とし, その後可及的すみやかに移植したので効果の判定にあたって保存時間の影響も除外してよからう.

したがって実験成績にあらわされた移植性の変動は, 試験管内腫瘍細胞あるいは腫瘍細胞移植動物に加えられた処置の効果を表現するものと考えてよい.

なおヒトのUKを異種動物に投与する際には, 酵素学的あるいは免疫学的な変化をうけることが考えられるが, Celandierら<sup>39)40)</sup>は各種哺乳動物のUKは他種動物の plasminogen をも活性化すること, またヒトのUKを家兎に静注し何ら性質が変らぬまま尿中に排泄されたことを報告している. 著者のおこなった静脈内投与実験によれば, 投与後に腫瘍, 肺, 腎で線溶活性が亢進し15分ないし20分間持続することが判明しているが, このことはマウスに投与されたヒトのUKがそれぞれの臓器, 組織で plasmino-

gen 賦活性を維持していることを示すものであり、以後の MMC との併用投与実験では連日10日間投与という技術的な問題のために UK は腹腔内に投与されたが、著者の企図した腫瘍自家移植マウスでの MMC と UK の共働の可能性を示すものであり、UK 併用による移植性の変化は UK 併用効果と考えてよからう。

試験管内作用実験では $10^6$ 個細胞/mlの腫瘍細胞に5 mcg/mlの濃度の MMC を $37^\circ\text{C}$ で10分間作用せしめることにより、移植性の低下をきたすことを知り、はじめその1/2の濃度である2.5 mcg/mlの MMC と、10単位から40単位/mlにいたる濃度の UK を同様に試験管内で作用させたが、移植後の各時期における take の率と take までの期間には、MMC 単独、MMC、UK 併用群との間に認むべき差違はなかった。また take 後の増殖にも MMC による抑制効果が軽度認められたが、UK 併用による効果は認められなかった。もちろんここに用いた濃度の UK 自体による抗移植性の変化は認められていない。

つぎに5 mcg/mlの濃度の MMC と各種の濃度の UK を併せて同様に試験管内で作用させた場合にも、MMC の単独作用による移植性の低下は顕著であったが、UK の併用が MMC の効果におよぼす影響は著明ではなく、UK 20単位/mlを併用した群で移植後2週間における take の率の軽度の低下があり、少数例に take までの期間の延長が認められたのみであった。UK 10単位/ml併用群では MMC 単独作用群との間にすべてにおいて差はなかった。また take 後の増大傾向にも UK 併用による影響は認められなかった。

以上の結果は、試験管内における腫瘍細胞への直接作用によっては UK は単独では抗腫瘍作用を示さないのみならず、MMC の抗腫瘍作用も増強せしめないことを示すものとみてよからう。

腹腔内投与実験についてみれば、腫瘍自家移植マウスの腹腔内に腫瘍自家移植当日から MMC と UK の併用投与を開始した場合には、 $10^6$ 個細胞移植群で MMC の抗移植性におよぼす UK 併用の影響がみられた。すなわち $10^6$ 個細胞移植群で MMC 単独投与の効果は、移植後1週間における take の率の低下にとどまったが、UK を併用することにより移植後2週間までの take の率も低下し、また take までの期間にあきらかな延長がみられた。すなわち MMC 単独群では移植後1週間、10日、2週間の take の率が66%、93%、100%で、take までの平均日数は6.7日であったのに対し、UK 併用群ではそれぞれ13%、33

%、80%および12.2日であった。この値は $10^6$ 個細胞移植実験における無処置群の移植後1週間、10日、2週間の take の率および take までの平均日数の13%、60%、87%、および10.7日にはほぼ一致する。

MMC 単独投与群、UK 単独投与群の移植性は、移植後1週間における移植率の低下をのぞき生理的食塩水投与群の移植性とほぼ同じであるから、MMC、UK 併用投与群における移植性の低下は、UK を併用することにより MMC の抗腫瘍効果が $10^6$ 個細胞の移植性を $10^6$ 個細胞の移植性にまで低下せしめるのと同程度に増強されたことを示すものである。

また $10^6$ 個細胞移植でも、UK 併用群では MMC 単独投与群に比較して移植後2週間までの take の率が低く、take したのものについてみれば take までの期間の長いものが多い。

しかし $10^6$ 個、 $10^6$ 個細胞移植ともに take されたあとの腫瘍の増大傾向には UK 併用の効果は認められず、MMC 単独投与の場合と同様の傾向を示した。

一方腫瘍移植後1週間を経過してから MMC と UK の併用投与を開始した場合では MMC 単独投与による抗腫瘍効果は、さきの移植当日からの投与群におけると同様に認められた ( $10^6$ 個細胞移植で移植後10日の take の率は100%、take までの平均日数は6.1日)が、これにおよぼす UK 併用の影響は認められていない。

この実験で移植材料とした自家腫瘍細胞の take の率は、 $10^6$ 個細胞では移植後1週間で93%、10日で100%を示すが、ここにいう“take”とは腫瘍径が3 mmに達した場合と規定しているので、移植後1週間ではほぼ全例ですでに移植された腫瘍細胞は着床し増殖を開始しているものとみなして良い。したがって移植後1週間から併用投与を開始して UK の併用効果が認められなかったということは、換言すれば移植細胞がすでに着床して増殖し、腫瘍を形成した時期からの UK の併用は、MMC の効果増強に対して無効であることを意味するものである。このことは移植当日からの併用でも take 後の増殖に対しては UK の併用効果が認められなかったことと一致する。

したがって UK の併用が MMC の抗腫瘍性を高める機序は、移植された腫瘍細胞が着床して増殖を開始するまでの過程に働くものと考えられる。

担癌生体では病期の進行に応じて血液中の fibrinogen が増量し<sup>4)5)20)33)41)42)</sup>、また癌塊周辺部および癌塊内には fibrin の沈着が多い<sup>8)10)11)</sup>ことが知られている。また静脈内に投与された fibrinogen は癌周辺



部に集まる<sup>11-14)</sup>こと、静注された抗 fibrin 抗体もかなり特異的に腫瘍組織への局在を示す<sup>21)10)</sup>ことなどから、血液中に増量した fibrinogen が癌組織へと動員され、fibrin として沈着している<sup>43)44)</sup>ものと考えられている。

癌の化学療法をおこなう場合、癌組織およびその周辺部におけるこのような fibrin の沈着は、投与された抗癌剤の癌細胞への到達を阻止するものと考えられ、線維素溶解誘発療法(線溶療法)によってこれらの fibrin を除去し、抗癌剤の癌細胞への到達を容易にしようとする試みがなされてきた。

実際に線溶療法によって fibrinogen の癌組織への動員が抑制され<sup>23)10)</sup>沈着した fibrinogen の量が減少する<sup>20)</sup>といわれ、山本、永松ら<sup>27)</sup>は線維素溶解亢進作用のある UK を吉田肉腫を移植したラットの静脈内に投与することにより 5-fluorouracil (5-FU) の腫瘍組織への取り込みが 2~2.5 倍に亢進したと報告している。また fibrin は癌の転移が成立する最終的機序である癌細胞の着床に關与するひとつの因子であることを示唆する多くの実験があり<sup>10)37)45)46)</sup> Clifton & Agostino ら<sup>13)14)16)19)</sup>は線溶剤である plasmin を投与することにより実験的肺転移が減少し、heparin, warfarin でも同様の効果があり、また線溶抑制剤である  $\epsilon$ -aminocaproic acid (EACA) や Bayer 128 (Trasylol) を投与することによって肺転移が促進されたと報告している。

近年 lysosome 顆粒中に含まれる各種の酸性水解酵素 (acid D-Nase,  $\beta$ -glucuronidase, acid phosphatase など) が X 線照射や抗癌剤投与による細胞障害時に逸脱し、自身の構成成分の分解にあずかることが判明し<sup>22)~24)26)32)</sup>これらの酵素の遊離を促進する薬剤 (lysosome labilizer) のひとつとして、Brandes ら<sup>22)~25)</sup>はビタミン A をとりあげ cyclophosphamide や X 線照射との併用により、ハツカネズミの乳癌に対する制癌効果が増強されたとのべている。さらに線維素溶解(線溶)活性を亢進する trypsin や chymotrypsin にも lysosome labilizer としての作用がある<sup>27)</sup>ことから、木村、仁井谷ら<sup>30)31)</sup>は同じく線溶亢進作用をもつ plasmin に注目し、これを吉田肉腫移植ラットに投与することにより、腫瘍ホモジネート中に acid D-Nase,  $\beta$ -glucuronidase, acid phosphatase などの酸性水解酵素が増加することを認め、plasmin に lysosome labilizer としての作用があることを証明した。山本ら<sup>31)</sup>は plasminogen を活性化して plasmin にかえる UK を投与す

ることにより腫瘍細胞中の lysosome 顆粒の出現と、その大きさおよび数の増大を認め、仁井谷ら<sup>29)31)</sup>は UK の併用により MMC の効果が増強されることを報告し、橋本<sup>47)48)</sup>、寺松ら<sup>49)</sup>、岩森ら<sup>50)</sup>によっても同様の結果が報告されている。

1952年 Sobel ら<sup>51)</sup>の命名になる urokinase は、ほとんどすべての哺乳動物の尿中に存在する plasminogen activator であり plasminogen を plasmin に活性化することにより、fibrin を特異的に分解する蛋白分解酵素であるが、近年癌との関連においてあきらかとされた薬物学的作用は上述の如く、1) 癌細胞への抗癌剤の接触の容易化、2) lysosome labilizer としての抗癌剤の効果増強、3) 遊離癌細胞の着床の抑制であって、いずれも plasmin を介しての線溶活性の亢進にもとづくと考えられるものである。

根治手術後の癌化学療法は、主として術前に形成されていると仮定される潜在転移と、手術操作によって撒布される癌細胞の転移に対してなされるものであるから、癌細胞群あるいは微小癌巣を標的としたものであり、著者はこれに倣してこの実験をおこない、UK の併用効果を検討した。

試験管内作用実験では、別の基礎実験において腫瘍組織に線溶活性があることが判明しているので、この試験管内反応にも plasminogen は関与しているものと推定されるが、単独で有効である濃度の MMC と併用した場合に、ごく軽度の抗移植性の増加がみられたのみであり、これより低濃度の MMC と併用することにより、MMC の効果が増強されるとする結果は得られなかった。また腫瘍細胞の移植性におよぼす UK の直接作用の効果は認められなかった。このことは UK が lysosome labilizer として作用しうするためには、ひとつの条件として MMC によって腫瘍細胞が障害されていることが必要であることを示し、UK 併用療法においてもその lysosome labilizer としての効果を期待するためには、最低有効濃度の MMC 投与が必要であることが示唆された。

腹腔内投与実験では、その効果は移植性にばらつきが少ない $10^6$ 個細胞移植で主として判定されたが、併用投与が移植当日、すなわち着床以前から開始された群では、take の率と take までの期間にあきらかな UK 併用効果があったのに反し、生食水対照群の約 90% に移植成立がみられた移植後 1 週間から開始された群では、その後の腫瘍の増殖におよぼす UK の併用効果はまったくみられなかった。換言すれば

UKの併用は、移植された腫瘍細胞が着床し移植が成立するまでの過程でのみ有効であった。その機序については、この濃度のUKの投与による諸臓器ならびに腫瘍組織の線溶活性の亢進とMMCによる抗腫瘍作用が認められているので、前述の3つの作用が関与することが考えられ、このことは $10^5$ 個細胞移植のtakeの率がUK単独投与によって抑制されたこと(表12, 図21)によっても示唆されるが個々についてはあきらかでない。反面、移植が成立し腫瘤が一定の大きさ(この実験では長径3mm)に達した時期以後の併用では、着床抑制作用以外の他の作用も関与し得ないものと考えられる。

なおこの実験結果は、前述の目的のために本法を臨床応用し、UKの併用効果を期待するためには、術後可及的早期に開始されるべきであること、線溶活性の亢進を得るに必要なUKを併用すること、UKを併用しても抗癌剤の投与量を減少すべきではなく、単独有効量の抗癌剤投与がなされるべきであることを示唆するものである。

### 結 語

マウス自家腫瘍の自家移植方法を用い、癌根治手術後の転移性再発防止のための癌化学療法におけるurokinaseの併用効果について、実験的研究をおこない、下記の結果を得た。

1. 試験管内実験ではUK自体が自家移植された腫瘍細胞の移植性におよぼす効果はみられなかったが、腹腔内投与と実験では少数細胞( $10^5$ 個)移植で移植当日から投与した場合に、移植初期における移植率の低下がみられた。

2. 試験管内実験では $37^{\circ}\text{C}$ 10分間の作用で、単独で腫瘍細胞の移植性を抑制しうる濃度のMMCを、静脈内投与で肺、腎、腫瘍組織の線溶活性亢進をきたす量のUKと共に、試験管内で腫瘍細胞に作用せしめることにより、MMC単独作用にくらべて腫瘍細胞の移植率の軽度の低下がみられたが、移植後からtakeまでの期間や、その後の腫瘍の増殖にUKの併用による効果はみられなかった。またそれ以下の濃

度のMMCと同量のUKを併用してもMMCの効果増強はみられなかった。

3. MMCとUKの腹腔内併用投与と実験では、単独投与で自家移植腫瘍細胞のtakeの率を抑制する量のMMCと、静脈内投与で腫瘍組織の線溶活性の亢進をきたす量のUKの同時併用を腫瘍移植当日から開始した場合には、MMC単独投与と比較してあきらかな腫瘍のtakeの率の抑制とtakeまでの期間の延長が認められた。この際に認められる移植抑制に対するUKの併用効果は、 $10^5$ 個細胞の移植性を $10^6$ 個細胞の移植性にまで低下せしめる効果に相当した。しかしtake後の腫瘍の増殖にはUK併用による効果は認められなかった。

4. 上記の併用投与が移植された腫瘍細胞のほとんどがtakeを示す時期である移植後1週間から開始された場合には、UKの併用効果は認められずtakeされた腫瘍の増殖傾向は、MMC単独投与群と同様であった。

5. 以上のことから、腫瘍細胞の自家移植における抗癌剤、UK併用投与の抗腫瘍効果増強の機序は、移植された腫瘍細胞の着床からtakeまでの期間に働くもので、主としてUKの線溶活性亢進作用による腫瘍細胞の着床の抑制にあるものと推定されるが、本法を癌根治手術後の転移性再発防止のために応用するにあたっては、単独で抗腫瘍効果の認められる量のMMCと、線溶活性を亢進せしめる量のUKとの併用投与を、術後可及的早期に開始することによってのみUKの併用効果を期待し得るものであることが示唆された。

稿を終るにあたり、終始ご指導、ご校閲を賜った恩師砂田輝武教授に深甚なる感謝の意を捧げるとともに、本研究の実施にあたり終始絶大なるご指導、ご鞭撻を賜った田中聰助教授に深謝する。あわせて、本研究に際し、終始絶大なるご援助を賜った岡山大学第二外科教室癌研究グループの諸兄に深謝する。

なお、本論文の要旨は、昭和50年4月、第75回日本外科学会総会において発表した。

### 文 献

- 1) Back, N., Shields, R. R., DeWitt, G., Branshaw, R. H. and Ambrus, C. M.: Uptake of fibrinogen and fibrinolytic enzymes by neoplastic tissue. *J. Nat. Cancer Inst.*, **36**: 171, 1966.

- 2) Peterson, H.-I., Appelgren, K.L. and Rosengren, B.H.O.: Fibrinogen metabolism in experimental tumors. *Europ. J. Cancer*, **5**: 535, 1969.
- 3) 山本政勝: 癌増殖におよぼす間質と抗癌剤の到達性, *癌と化学療法*, **2**: 575, 1975.
- 4) 山本政勝, 日置紘士郎, 篠原良洋, 穴戸晃一, 永松正字, 畑野武彦, 中野繁則, 山村学: 担癌体における fibrinogen の代謝異常に関する研究, *最新医学*, **28**: 2032, 1973.
- 5) 山本政勝: 癌治療と凝固-線溶系, *最新医学*, **26**: 365, 1971.
- 6) Yamamoto, M., Yamada, T., Fukunaga, K., Nagashima, A., Nagamatsu, S. and Hioki, K.: Methods to potentiate the effect of anti-tumor drugs: Meanings of urokinase combination. *Medical Postgraduates*, **9**: 285, 1971.
- 7) 永松正字: 抗癌剤の効果増強策に関する実験的研究, *関西医大誌*, **25**: 51, 1973.
- 8) Hiramoto, R., Berneky, J., Jurandowski, J. and Pressman, D.: Fibrin in human tumors. *Cancer Res.*, **20**: 592, 1960.
- 9) Bale, W., Spar, I.L. and Goodland, R.L.: Experimental radiation therapy of tumors with I<sup>131</sup>-carrying antibodies to fibrin. *Cancer Res.*, **20**: 1488, 1960.
- 10) 田中健蔵: がんと線溶, *癌と化学療法*, **2**: 545, 1975.
- 11) 田中健蔵: 癌と線溶, *東京医科大学雑誌*, **26**: 571, 1968.
- 12) 田中健蔵: 癌と線溶, *Medical Postgraduates*, **13**: 669, 1975.
- 13) Agostino, D., Grossi, C.E. and Clifton, E.E.: Effect of heparin on circulating Walker carcinosarcoma 256 cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, **27**: 17, 1961.
- 14) Agostino, D. and Clifton, E.E.: Anticoagulants and the development of pulmonary metastases. *Arch. Surg.*, **84**: 449, 1962.
- 15) Agostino, D. and Clifton, E.E.: Decrease in pulmonary metastases: Potentiation of nitrogen mustard effect by heparin and fibrinolysin. *Ann. Surg.*, **157**: 400, 1963.
- 16) Grossi, C.E., Agostino, D. and Clifton, E.E.: The effect of human fibrinolysin on pulmonary metastases of Walker 256 carcinosarcoma. *Cancer Res.*, **20**: 605, 1960.
- 17) Agostino, D. and Clifton, E.E.: Decrease of metastases of carcinosarcoma Walker 256 with irradiation and heparin or fibrinolytic agents. *Radiology*, **79**: 848, 1962.
- 18) Clifton, E.E. and Agostino, D.: Irradiation and anticoagulant therapy to prevent pulmonary metastases of the V2 carcinoma in rabbits. *Radiology*, **80**: 236, 1963.
- 19) Clifton, E.E. and Agostino, D.: Effect of inhibitors of fibrinolytic enzymes on development of pulmonary metastases. *J. Nat. Cancer Inst.*, **33**: 753, 1964.
- 20) 菊地金男: 癌疾患の線溶動態と蛋白分解酵素, *J. Med. Enzymolog.*, **1**: 202, 1974.
- 21) 末舛恵一, 宮沢慶江, 石川七郎: 悪性腫瘍の血行性転移の抑制に関する研究, *最新医学*, **24**: 2182, 1969.
- 22) Anton, E. and Brandes, D.: Lysosomes in mice mammary tumors treated with cyclophosphamide. *Cancer*, **21**: 483, 1965.
- 23) Brandes, D., Sloan, K.W., Anton, E. and Bloedorn, F.: The effect of X-irradiation on the lysosomes of mouse mammary gland carcinomas. *Cancer Res.*, **27**: 731, 1967.
- 24) Paris, J.E. and Brandes, D.: Effect of X-irradiation on the functional status of lysosomal enzymes of mouse mammary gland carcinomas. *Cancer Res.*, **31**: 392, 1971.
- 25) Brandes, D., Anton, E., Schofield, B. and Barnard, S.: Role of lysosomal labilizers in treatment of mammary gland carcinomas with cyclophosphamide (NSC-26271) -preliminary report. *Cancer Chemother. Rep.*, **50**: 47, 1966.
- 26) de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F.: Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.*, **60**: 604, 1955.

- 27) Beaufay, H. and de Duve, C.: Tissue fractionation studies. 9. Enzymic release of bound hydrolases. *Biochem. J.*, **73**: 604, 1959.
- 28) 仁井谷久暢, 鈴木明, 近田千尋, 谷口猛, 稲垣治郎, 木村禧代二: lysosome labilizer と抗癌剤の併用効果— Plasmin による Mitomycin C の効果増強について, *最新医学*, **23**: 2168, 1968.
- 29) 仁井谷久暢: リソゾーム・ラビライザーによる制癌剤の効果増強, *癌の臨床*, **19**: 657, 1973.
- 30) 下山正徳, 仁井谷久暢, 谷口猛, 稲垣治郎, 木村禧代二: Lysosome と癌化学療法, III, Lysosome labilizer としての Plasmin と Mitomycin C の併用効果, *医学のあゆみ*, **65**: 349, 1968.
- 31) 仁井谷久暢: 抗がん剤と lysosome labilizer の併用, *最新医学*, **28**: 912, 1973.
- 32) 仁井谷久暢, 下山正徳, 谷口猛, 木村禧代二: lysosome と癌化学療法, I. 吉田肉腫細胞の lysosomal enzyme, *医学のあゆみ*, **62**: 130, 1967.
- 33) 近田千尋, 木村禧代二, 成毛詔夫: フィブリノーゲン値について, *日本血液学会雑誌*, **35**: 159, 1972.
- 34) Hagmar, B.: Tumor growth and spontaneous metastasis spread in two syngeneic system. *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, **78**: 131, 1970.
- 35) Salsbury, A. J., White, C., Tsolakidis, P., McKinna, J. A. and Griffiths, J. D.: Fibrinolysis and circulating malignant cells. *Surgery Gynec. Obstetrics.*, **136**: 733, 1973.
- 36) Hoover, H. C. and Ketcham, A. S.: Techniques for inhibiting tumor metastases. *Cancer*, **35**: 5, 1975.
- 37) Koike, A.: Mechanism of blood-borne metastases. I. Some factors affecting lodgment and growth of tumor cells in lungs. *Cancer*, **17**: 450, 1964.
- 38) Fisher, B. and Fisher, E. R.: Experimental studies of factors which influence hepatic metastases. VIII. Effect of anticoagulant. *Surgery*, **50**: 240, 1961.
- 39) Mohler, S. R., Celander, D. R. and Guest, M. M.: Distribution of urokinase among the common mammals. *Am. J. Physiol.*, **192**: 186, 1958.
- 40) Celander, D. R. and Guest, M. M.: The biochemistry and physiology of urokinase. *Am. J. Cardiol.*, **6**: 409, 1960.
- 41) Mider, G. B., Alling, E. L. and Morton, J. J.: The effect of neoplastic and allied diseases on the concentrations of the plasma proteins. *Cancer*, **3**: 56, 1950.
- 42) Soong, B. C. F. and Miller, S. P.: Coagulation disorders in cancer. III. Fibrinolysis and inhibitors. *Cancer*, **25**: 867, 1970.
- 43) 小倉剛, 山村雄一: 癌と凝固線溶系—特に Fibrinogen を中心に, *J. Med. Enzymolog.*, **1**: 153, 1974.
- 44) 小倉剛, 平尾文男, 山村雄一: 癌の増殖進展にともなう Fibrinogen の動態について, *J. Med. Enzymolog.*, **1**: 164, 1974.
- 45) Jones, D. S., Wallace, A. C. and Fraser, E. E.: Sequence of events in experimental metastases of Walker 256 tumor: Light immunofluorescent and electron microscopic observations. *J. Nat. Cancer Inst.*, **46**: 493, 1971.
- 46) Warren, B. A.: Tumor metastasis and thrombosis. *Thrombosis Diath. Haemorrh.*, **59**: 139, 1974.
- 47) 橋本勇, 小玉正智, 弘中武, 田中承男, 久保雄治: 制癌剤とウロキナーゼ併用投与に関する基礎的研究, *Medical Postgraduates*, **8**: 468, 1970.
- 48) 弘中武, 橋本勇, 小玉正智, 久保雄治: 悪性腫瘍に対する化学療法の検討, *Chemotherapy*, **21**: 1265, 1973.
- 49) 寺松孝, 伊藤元彦: 制癌剤とウロキナーゼとの併用時におけるリゾゾーム酵素の組織化学的研究, *ウロナーゼ文献全集*, 第三巻, 癌化学療法, 持田製薬, 1972.
- 50) 岩森茂, 新本稔, 石井毅: 制癌剤化学療法の補助剤としてのウロナーゼ使用意義, *ウロナーゼ文献集*, 第二集, 持田製薬, 1971.
- 51) Saito, T., Wakui, A., Yokoyama, M., Kobayashi, Y., Kikkawa, J., Sugawara, K., Irinoda, Y., Yakahashi, K. and Ishigaki, H.: Experimental study on combined therapy with anticancer drugs

- and urokinase. *Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ. -C.*, **19**:138, 1972.
- 52) 斉藤達雄, 涌井昭, 菅原一布, 高橋健一, : 癌と化学療法における線溶酵素剤 urokinase 併用の臨床成績, *Chemotherapy*, **21**:627, 1973.
- 53) 斉藤達雄, 涌井昭, 横山正和, 小林泰, 吉川順一, 菅原一布, 入野田侑宏, 高橋健一, 石垣春夫: 癌化学療法における線溶酵素剤 (urokinase) 併用の実験的研究, *Chemotherapy*, **22**:94, 1974.
- 54) Sobel, G. W., Mohler, S. R., Jones, N. W., Dowdy, A. B. C. and Guest, M. M.: Urokinase: an activator of plasma profibrinolysin extracted from urine. *Am. J. Physiol.*, **171**:768, 1952.

**Experimental study on the combined effect of anticancer agent  
and urokinase in the autotransplantation  
of autochthonous tumor of mice**

**Takehiro NAKAJIMA**

The 2nd Surgical Department, Okayama University Medical School

(Director : Professor Terutake Sunada)

The tumor, induced by intramuscular inoculation of methylcholanthrene in the thigh of mice, was removed by amputation of the leg and the cell was isolated by mincing and trypsinizing the tumor fragment, and suspended in isotonic saline in counted number after viability was tested by trypan blue dye staining. Mitomycin C (MMC) and Urokinase (UK) was administered either in vitro or in vivo and an effect was evaluated in the transplantability of the tumor cell which was inoculated in the subcutaneous tissue of the back of their own hosts. The results were summarized as follows:

1) Only when the tumor cell was inoculated with MMC, the concentration of which was minimally enough to lower the transplantability by itself, the addition of UK suppressed the take of the tumor, slightly more than that in MMC treatment. No evidence was obtained that the concentration of MMC below the above gained cytostatic effect by the addition of UK in vitro.

2) Definite suppression of take of the transplanted tumor cell and marked prolongation of interval between the transplantation and take were observed, when the combined intraperitoneal administration of MMC and UK was started in the day of the transplantation, compared with that in mice MMC alone was samely given. The growth of the tumor was retarded in accordance with this suppression in the tumor take. It was also observed that the take of the tumor cell was diminished to some extent even in mice treated with UK alone.

However, when the treatment was started 10 days after the transplantation, the growth of established tumors was not affected by the combined application of UK.

It was concluded that adjuvant effect of UK in anticancer chemotherapy for prevention of tumor metastasis could be expected and an assumption was made that the mechanism lie in interruption of tumor cell lodgement through fibrinolysis caused by UK administration.