

悪性リンパ腫の化学療法に関する研究

第 1 編

マウス自然発生リンパ肉腫(LS-1)をモデルとした悪性リンパ腫 の化学療法に関する検討

岡山大学医学部第2内科学教室（主任：木村郁郎教授）

西 原 龍 司

（昭和60年5月20日受稿）

Key words：マウス悪性リンパ腫
化学療法
多剤併用療法

緒 言

ヒト悪性リンパ腫の化学療法感受性は高く、多くの抗腫瘍剤が高い活性を示すことが知られている。しかし、単剤による治療では奏効率も低く、腫瘍の完全消失、すなわち完全寛解はきわめて例外的である。近年、悪性リンパ腫の治療成績は飛躍的な発展を遂げつつあるが、これは活性の高い新抗腫瘍剤の開発とそれらを導入した多剤併用療法に負う所が大きい。

従来、新抗腫瘍剤の活性をスクリーニングするための腫瘍としては、L1210 leukemia, P388 leukemia, B16 melanoma, CD8F₁ mammary tumor, Colon38 carcinoma, Lewis lung carcinoma などが広く用いられているが^{1),2)}、この段階で被検薬剤がどのようなヒト腫瘍に活性を示すかを知ることは困難である。また、臨床の場における多剤併用療法は、いくつかの試行錯誤を通して得られた経験的な情報に立脚したものであり、信頼性のあるモデルシステムが望まれるところである。

今回著者は、DBA/2 マウスリンパ節に自然発症したリンパ肉腫 LS-1 をモデルとして、従来ヒト悪性リンパ腫の治療に用いられてきた薬剤、あるいはヒト悪性リンパ腫に対する活性が明らかにされつつある薬剤の効果を検討すると

ともに、このシステムによって、多剤併用療法の中で効果増強の得られる薬剤の組合わせをスクリーニングすることが可能であるか否かを検討した。

実 験 方 法

1. 実験動物および腫瘍

腫瘍細胞の継代および実験には、岡山大学マウスコロニーから供給を受けた6—8週令体重20g前後の雄性DBA/2マウスを用いた。各実験とも、原則として1群5匹を用い、一部を除いては2回の実験を繰り返してそれを総合した成績とした。

実験にはマウスリンパ肉腫 (LS-1) を用いたが、この腫瘍は1968年、三共製薬株式会社中央研究所においてDBA/2マウス腋窩リンパ節に自然発症したものである。当初は同系マウス皮下に継代されていたが、122代目に腹水化され、それ以後は腹水腫瘍として継代されていたものを供与された。

腫瘍細胞は、形態学的には幼若リンパ球に類似し、核にはconvolutionが認められた。予備実験として、本腫瘍の10⁵個をDBA/2マウス尾静脈内に移植し、7日後に屠殺剖検して組織標本にて各臓器への分布状況を見ると、主として肝、脾、骨髄、リンパ節への侵潤が認められた。臓

器侵潤を確認するために、bioassayとしてこれら各臓器を細切して健常マウス腹腔内に移植したところ、すべてのマウスが腫瘍死した。

LS-1 がリンパ球由来の腫瘍であることを明確にするため、EA, EAC³⁾, surface immunoglobulin, θ 抗原⁴⁾(広島大学原医研横路謙二郎教授に御検索をいただいた), マウス胸腺細胞抗原などの検索を加えたが、表1に示すようにいずれも陰性であり、これらの方法ではLS-1 がリンパ系腫瘍であることを characterize することはできなかった。

表1. LS-1の免疫学的特性の検討

項 目	結 果
EA	21.5% (+)
EAC	(-)
FITC 標識抗マウス IgG	(-)
// IgM	(-)
// IgA	(-)
θ 抗原	(-)
マウス胸腺細胞抗原	(-)
ペルオキシダーゼ反応	(-)

2. 実験方法

1) 静脈内移植—腹腔内薬剤投与方法 (iv-ip)

LS-1 を腹腔内に移植後5—6日目に腹水を採取し、滅菌 phosphate buffered saline (PBS, pH=7.4) にて洗滌後、細胞密度 5×10^5 / ml の腫瘍細胞浮遊液を作製した。この細胞浮遊液 0.2 ml (LS-1 細胞 10^5 個) を、各実験 1 群

5 匹のマウスの尾静脈内に移植した (day 0)。3 日後 (day 3) に、生理食塩水または蒸留水にて目的とする投与量に相当するよう調製された薬剤溶解液 0.2 ml を腹腔内に投与し、生存期間の観察を行なった。対照群には生理食塩水 0.2 ml を投与した。

薬剤効果の判定は、対照群マウスの生存期間中央値に対する治療群マウスの生存期間中央値延長率 (percent increase in life span: % ILS) を下記の式で求め、それによって表わした。

$$\% ILS = \frac{\text{MST of treated mice}}{\text{MST of control mice}} \times 100 - 100$$

MST: median survival time (生存期間中央値)

治療群マウスが100日以上生存した場合には治癒とみなし、% ILS は死亡したマウスの生存期間より算定した。

2. 腹腔内移植—腹腔内薬剤投与方法 (ip-ip)

上述の iv-ip の場合と同様に腹水を採取し、細胞密度 5×10^6 個/ml の腫瘍細胞浮遊液を作製、その 0.2 ml (LS-1 細胞 10^6 個) を腹腔内移植した。各薬剤は iv-ip の場合と同様に day 3 に投与し、薬剤効果の判定も同じ基準にて行なった。

成 績

1. iv-ip 法による各種抗腫瘍剤の効果

ヒト悪性リンパ腫の治療に用いられている各種抗腫瘍剤の LS-1 に対する効果を、iv-ip 法により検討した成績を表2に示す。この場合薬剤

表2. LS-1に対する各種抗腫瘍剤の抗腫瘍効果(iv-ip)

Drug tested	Dose (mg/kg) administered	% ILS
Cyclophosphamide	200	77.8
Ifosfamide	300	100.0
Adriamycin	6	85.7
Mitoxantrone	5	100.0
Acclarubicin	15	44.4
ACNU	30	20.0
BCNU	50	20.0
Vincristine	1.5	50.0
Vindesine	2.0	41.7
Bleomycin	50	0.0
Methotrexate	50	40.0
L-asparaginase	2.5×10^4 ku/kg	254 (2/5 cured)

投与量は、50% lethal dose (LD₅₀) が極端に高い一部の薬剤を除き、ほぼ1/2 LD₅₀に相当する投与量で検討した^{9)~15)}。対照群マウスの生存期間は、9-11日(中央値10日)であり、いずれの実験においても再現性は良好であった。最も高い抗腫瘍効果が得られたのはL-asparaginase (L-ASP)であり、2.5×10⁴KU/kg(およそ1/100 LD₅₀)の投与により5匹中2匹が100日以上生存し、% ILSは254以上であった。その他、ifosfamide(IFO), mitoxantrone(MIT)の% ILSはそれぞれ100, adriamycin(ADM)のそれは85.7, cyclophosphamide(CPA)は77.8, であり有効性は明らかであった。aclarubicin(ACR), vincristine(VCR), vindesine(VDS), methotrexate(MTX)などでは40ないし50の% ILSが得られ、やや有効と判定された。ACNU, BCNU

などのnitrosourea剤, bleomycinには明らかな効果は認められなかった。

2. 至適投与量の設定と治療効果

1) iv-ip 法による検討

前述の実験で、1/2 LD₅₀の薬剤投与により有効と判定された各薬剤について、数段階にわたる薬剤投与量を設定し至適投与量を検討した。その結果、図1に示すように、CPA, IFO, ADM, MIT, ACRの各薬剤については至適投与量は明確に設定可能であり、至適投与量およびそれを投与した時の% ILSは、それぞれ、CPA400 mg/kg, 110, IFO400mg/kg, 125, ADM10mg/kg, 95, MIT20mg/kg, 178, ACR20mg/kg, 50であった。VCRの至適投与量は1-2 mg/kgで、% ILS44, VDSではそれぞれ2 mg/kg, 42であった(図1)。MTXの至適投与量は

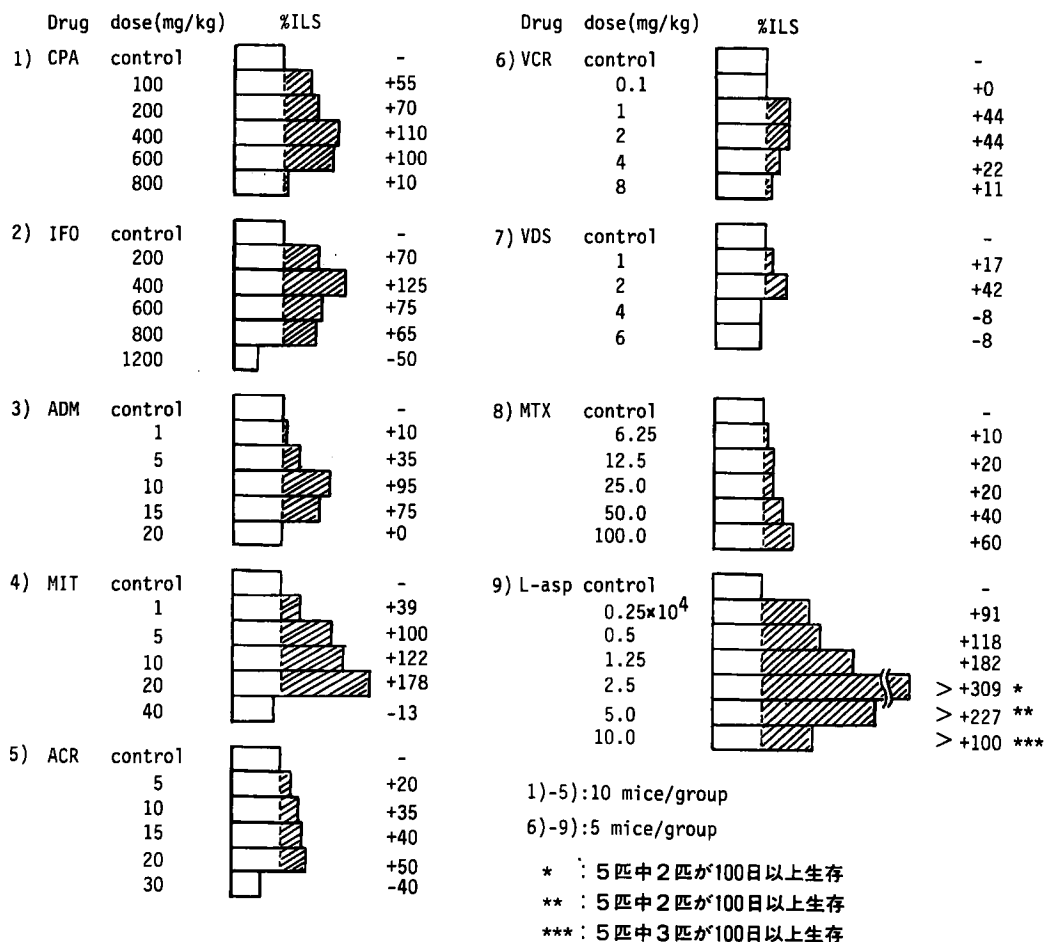


図1. 至適投与量の検討 (iv-ip)

表3. iv-ip法, ip-ip法における各薬剤の至適投与量と生存期間延長率(%ILS)

	iv-ip		ip-ip	
	optimal dose (mg/kg)	%ILS	optimal dose (mg/kg)	%ILS
Cyclophosphamide	400	110	400	100
Ifosfamide	400	125	800	82
Adriamycin	10	95	15	135
Mitoxantrone	20	178	10	139
Acclarubicin	20	50	20	33

50~100mg/kgあたりと思われたが、今回の実験ではそれを明確にし得なかった。またL-ASPは 2.5×10^4 KU/kg以上の投与群においては、100日以上生存するマウスが得られたが、 2.5×10^4 KU/kgの% ILSが最も高く、この量が至適投与量と考えられた。

2) ip-ip法による検討

iv-ip法において有効性が認められ、至適投与量を明確に設定し得たCPA, IFO, ADM, MIT, ACRの5剤について、ip-ipの場合の至適投与量を検討した。その結果、図2および表3に示すように各薬剤の至適投与量およびそれを投与した時の% ILSはそれぞれ、CPA400mg/kg, 100, IFO800mg/kg, 82, ADM15mg/kg, 135, MIT10mg/kg, 139, ACR20mg/kg, 33であった。

3. 併用化学療法に関する検討

iv-ip法は、静脈内移植により肝、脾、骨髄、リンパ節に形成された腫瘍病巣に対し、腹腔内に薬剤を投与するところから、ip-ip法に比べて臨床により近似した優れた実験系と思われた。しかし、LS-1の場合には表3に総括することく、至適投与量およびその量を投与した時の% ILSは両法において差がみられなかったため、以下の実験においては操作のより簡便なip-ip法を用いた。

併用療法の実験には、LS-1に活性の認められた薬剤の中から、アルキル化剤としてCPA, IFOを、anthracycline-anthraquinone系薬剤としてADM, MIT, ACRを選び、これら2系統の薬剤の併用効果について検討を加えた。薬剤投与量は、ip-ip法における至適投与量を基準として、至適投与量の併用投与、至適投与量の

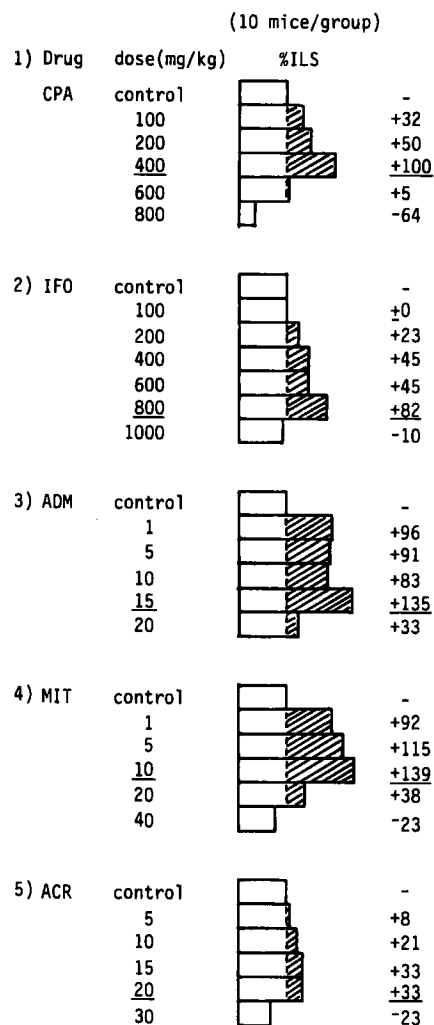


図2. 至適投与量の検討 (ip-ip)

1/2量の併用投与、至適投与量の1/2量の併用投与とした(図3、図4)。

CPAとADMの併用の場合、それぞれの至適投与量の1/2量の併用では% ILSは100で、各薬

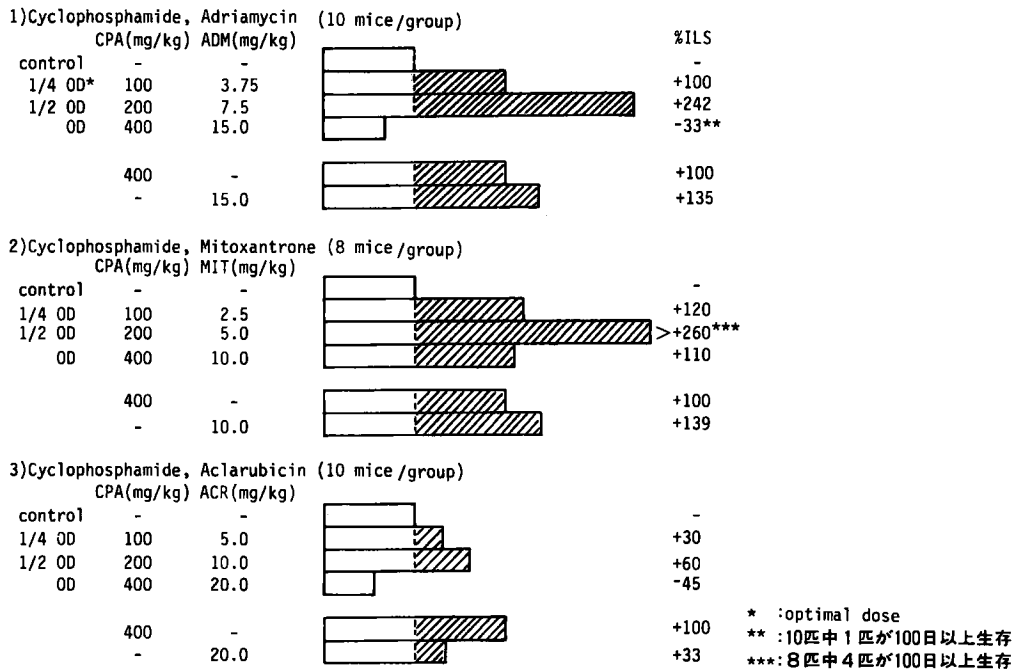


図 3. 2 剤併用療法の検討(1) (ip-ip)

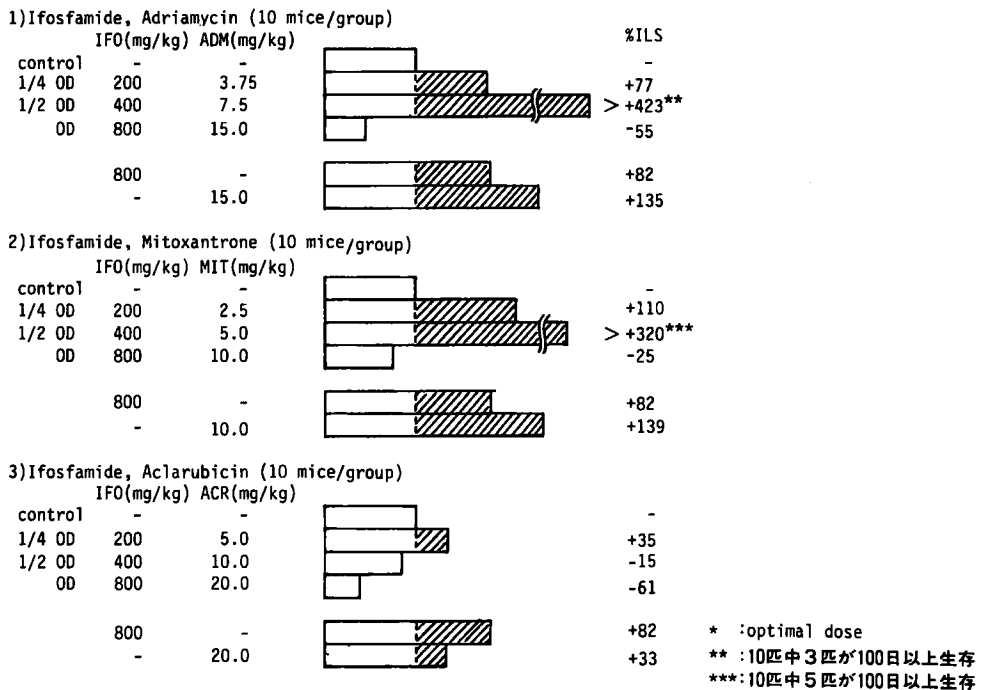


図 4. 2 剤併用療法の検討(2) (ip-ip)

剤の至適投与量を単独投与した時の% ILS とほぼ等しい成績であったが、 $\frac{1}{2}$ 量ずつの併用投与では% ILS242と明らかな効果増強が示され

た(図3)。また、至適投与量をそれぞれ併用した時には、10匹中1匹が100日以上生存したが、毒性が強く現われ% ILSは-33にとどまった。

CPA と MIT の併用の場合にも前述の CPA・ADM 併用の場合と同様に、至適投与量の $\frac{1}{4}$ 量ずつの併用では% ILS は120にとどまり2剤併用の効果は得られなかったが、至適投与量の $\frac{1}{2}$ 量を併用した時には260以上の% ILS が得られ、8匹中4匹のマウスが100日以上生存し、著明な効果増強が認められた(図3)。しかし、CPA と ACR の併用の場合には、至適投与量の $\frac{1}{2}$ 量の併用でたかだか60という% ILS が得られたのみで、CPA 単独投与時の% ILS100にはおよばなかった(図3)。

CPA の誘導体のひとつである IFO と ADM の併用では、それぞれの至適投与量の $\frac{1}{2}$ 量ずつの併用により423以上の% ILS が得られ、また10匹中3匹のマウスが100日以上生存しており、CPA, ADM 併用の場合よりもさらに優れた併用効果が示された(図4)。至適投与量の $\frac{1}{4}$ 量ずつの併用では併用効果は明らかでなく、至適投与量をそれぞれ併用投与した場合には毒性が強く現われた。つぎに IFO と MIT の併用についてみると、至適投与量の $\frac{1}{2}$ 量をそれぞれ併用することにより320以上の% ILS が得られ、また10匹中5匹のマウスが100日以上生存した(図4)。この成績は CPA, MIT 併用の場合に認められた併用効果とほぼ等しいものであった。しかし、IFO と ACR の併用についてみると、至適投与量の $\frac{1}{2}$ 量ずつの併用で毒性が強く現われ(% ILS: -15)、 $\frac{1}{4}$ 量をそれぞれ併用した場合にも% ILS は35で、IFO 単独投与の効果には及ばなかった。

つぎに、相互間にいくつかの興味深い干渉^{16)~21)}が観察されている MTX と L-ASP の併用について検討を加えた。LS-1 に対する L-ASP の効果が著明であったので、今回の実験では L-ASP の投与量は至適投与量の $\frac{1}{2}$ 量 (1.25×10^4 KU/kg) とし、MTX の投与量は至適投与量と思われる 50 mg/kg に設定した。腫瘍移植、薬剤投与経路は iv-ip とした。L-ASP と MTX の投与順序、間隔は、L-ASP の6時間前に MTX 投与、3時間前に MTX 投与、L-ASP, MTX 同時投与、L-ASP の3時間後に MTX 投与、6時間後に MTX 投与の5通りとし、それぞれの治療効果を比較した。その結果は図5に

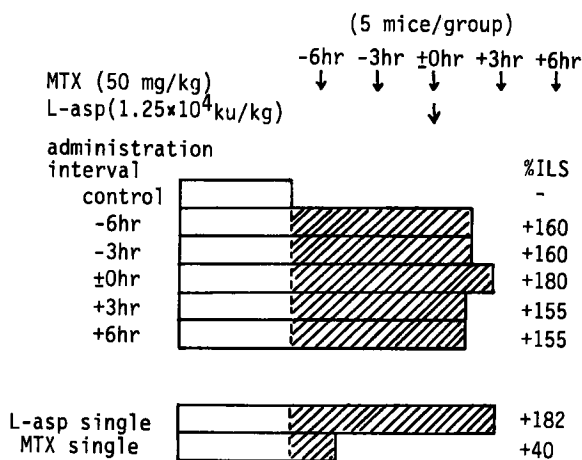


図5. L-ASP・MTX 併用療法の検討 (iv-ip)

示されるように、2剤を sequential に投与することによる効果増強は全く認められず、% ILS は2剤同時併用の場合の180が最も高いという成績であった。また、L-ASP 単独投与 (1.25×10^4 KU/kg) と比較した場合、2剤を併用することによる効果増強はいずれの条件においても認められなかった。

考 案

実験に用いた LS-1 は、その病理組織所見よりリンパ肉腫とされているが、著者はこれを使用するに先だち予備実験として本腫瘍の characterization を試みた。腹水化された LS-1 の塗抹 May-Giemsa 染色標本をみると、明らかに lymphoid の形態を呈しており、尾静脈内に移植された腫瘍の分布状況(肝、脾、骨髄、リンパ節)などから血液細胞に由来する腫瘍と考えられた。EA, EAC, 膜表面免疫グロブリンなどの B-marker, θ 抗原、胸腺細胞抗原などの T-marker を検出することはできなかったが、その理由として、ひとつには長期継代の間にそのような形質を失った可能性、いまひとつは、このような形質を表現する前段階において transform した腫瘍と考えることができよう。しかし、L-ASP はヒトリンパ系腫瘍の中でも common ALL antigen (CALLA) のみ表現されているような ALL, あるいは T_1 抗原が検出される悪性リンパ腫 (lymphoblastic lymphoma) のみにその有効性が知られており²²⁾、LS-1 が

L-ASP に対し著しく高感受性であるという所見は、本腫瘍がそのような未分化リンパ球由来の腫瘍である可能性を強く支持している。

腫瘍細胞を静脈内に移植することにより、肝、脾、骨髓、リンパ節などにおいて増殖する腫瘍に対して、薬剤を腹腔内に投与する治療方式 (iv-ip 法) は臨床に近似した実験モデルと思われた。L1210 の場合には腫瘍移植部位によって各薬剤の効果が若干異なることが知られているが²³⁾、LS-1 については、この方法で得られた成績と、ip-ip 法による成績を比較してみるとほとんど差が認められなかったので、著者は大部分の実験を ip-ip 法で行なった。また、腫瘍移植と、薬剤投与の間隔、投与回数についてもいくつかの予備的検討を行なってみたが、iv-ip 法、ip-ip 法ともに、day 1 (24時間後) の投与では薬剤効果が強く現われすぎ、day 5 の投与ではすでに腫瘍が進展しすぎているためか効果が乏しすぎたので、最も安定した成績が得られた day 3 (72時間後) の投与に統一して実験を行なった。

ヒト悪性リンパ腫に対して有効性の知られた薬剤の中より代表的な12薬剤を選び、iv-ip 法にて検討した LS-1 に対する抗腫瘍効果を総括してみると、CPA、IFO などのアルキル化剤、anthracycline 系の ADM、新しい anthraquinone 系薬剤である MIT、および L-ASP に最も強い効果が示され、anthracycline 系の ACR、vinca-alkaloids (VCR, VDS)、MTX では中等度の抗腫瘍効果が得られた。nitrosourea の効果は乏しく、BLM は全く無効であった。この所見をマウスリンパ性白血病である L1210 によって得られた成績と比較してみると、CPA¹⁾、IFO¹⁾、ADM、MIT²⁴⁾ が強い活性を示し、MTX¹⁾ が中等度の活性を示すことの2点はよく一致していたが、nitrosourea¹⁾ が L1210 に非常に強い活性を示すのに対し、LS-1 に対しては活性が乏しいことが大きな相違点であった。また L-ASP が LS-1 に著しい活性を示したこと、vinca-alkaloids²⁵⁾ がやはり LS-1 に中等度の活性を示したことも、L1210 との相違点であった。ヒト悪性リンパ腫の治療において、ADM、CPA、VCR は最上ランクの薬剤であること²⁶⁾、

MIT、IFO、MTX もそれに続くべき薬剤であること^{26)~28)}、nitrosourea 剤はヒト non-Hodgkin's lymphoma の治療の中では有用性に乏しいこと、などを考慮するとき、LS-1 はヒト悪性リンパ腫の薬剤感受性により近い腫瘍であり、ヒト悪性リンパ腫のモデル腫瘍としての有用性を示しているものと考えられた。

至適投与量による治療が行なわれたときの CPA と IFO、ADM と ACR、および近縁の MIT の LS-1 に対する効果を比較してみると、CPA と IFO は iv-ip 法、ip-ip 法のいずれにおいてもほぼ同等の活性が示され、anthracycline-anthraquinone 系薬剤の LS-1 に対する効果は、いずれの治療様式においても MIT、ADM、ACR の順に高かった。L 1210 に対しては IFO は CPA に比べて高い活性を示すことが知られているが¹⁾、anthracycline-anthraquinone 系薬剤の効果については L1210 と LS-1 はよく一致していた²⁹⁾。ヒト悪性リンパ腫に対する CPA と IFO の効果を比較することは必ずしも容易ではないが、単剤治療による historical な比較²⁸⁾、AVIP (ADM, VCR, IFO, prednisolone 併用)³⁰⁾ と CHOP (ADM, VCR, CPA, prednisolone 併用)³¹⁾ の比較において両者はほぼ同等の活性を有すると考えられており、LS-1 において得られたこれら2剤の成績は、この点において臨床成績とよく一致していた。ACR と MIT は新しい薬剤に属するが、さきにも述べたように LS-1 の系では、ACR は ADM に劣り、MIT は ADM より優れていた。ヒト悪性腫瘍の臨床治療において ACR が ADM に比べて優れているという成績はなく、この点においてもよく相関していた。また MIT については最近悪性リンパ腫に対する有効性が広く認められつつあり³²⁾、LS-1 によって得られた成績が裏づけられつつあるように思われる。

ヒト悪性リンパ腫の治療において、多剤併用療法は単剤治療に比べて明らかに効果的ではあるが、併用により効果増強の得られる薬剤の組み合わせをスクリーニングし、同時に毒性をも評価するための信頼度の高い実験系はきわめて乏しいと言わざるを得ない。DCM (P) (daunomycin, cytosine arabinoside, 6-

mercaptopurine 併用) は L1210 において相乗的な効果増強が示された 3 剤併用療法として、急性非リンパ性白血病に対し、本邦において広く用いられている^{33),34)}。しかし、DCM(P)と DC (daunomycin, cytosine arabinoside 併用) の治療成績には差はなく、6-mercaptopurine を併用することの意義が疑問視されている³⁵⁾。3 剤併用による増強効果をこのような実験系でスクリーニングすることは著しく困難と思われたので、著者は単独投与によって LS-1 に高い活性が認められた CPA あるいは IFO と、anthracycline-anthraquinone 系の 3 薬剤 (ADM, ACR, MIT) の併用による効果増強について検討を加えた。その結果をみると、CPA と anthracycline-anthraquinone の組み合わせの中では CPA と MIT の併用効果が最も高く、単独投与では得られなかった治癒が半数のマウスにもたらされた。同様に CPA と ADM の併用も効果的であったが、CPA と ACR の併用では効果増強は全く認められなかった。IFO と anthracycline-anthraquinone 系薬剤の併用においても全く同じ成績が得られているところから、ヒト悪性リンパ腫の治療における CPA あるいは IFO と、MIT の併用の有用性が強く示唆された。現存、ADM, CPA, VCR, prednisolone 併用療法と、ADM を MIT に置換した MIT, CPA, VCR, prednisolone 併用療法の無作為化比較試験が進行中であるので、LS-1 について得られた所見と臨床成績の相関性の有無が、近い将来明らかにされるものと思われる。

L-ASP と MTX の間には興味深いいくつかの干渉があることが観察されている。すなわち、L-ASP の蛋白合成阻害作用を介して MTX の膜移送が阻害されること²¹⁾、MTX によって招来され細胞死の原因と考えられている unbalanced growth が L-ASP によって抑制されること¹⁶⁾、などにより MTX と L-ASP は antagonistic に作用し得ると考えられるが、一方においてこのことは、MTX による宿主に対する毒性を L-ASP が軽減させることとなり²⁰⁾、結果的に大量の MTX 投与を可能とし両薬剤の synergism を生み出すこととなる¹⁹⁾。また、両薬剤の投与順序を変えることによる抗腫瘍効

果の変動も報告されている^{18),19)}。著者はこのような報告に注目し、LS-1 を用いて検討を加えたが、MTX と L-ASP の併用による効果増強はどのような sequence においても認めることはできなかった。彼我の実験結果に差異が生じた理由として、効果増強の認められた L5178Y という腫瘍には MTX と L-ASP はほぼ同等の活性を有しており MTX と L-ASP の間の干渉を観察するのに適していたのに対し、著者が用いた LS-1 には MTX の活性が低く、L-ASP が著しく高い活性を示したため、L-ASP の効果のみが表現されたためと思われる。MTX と L-ASP の併用による効果増強はヒト急性リンパ性白血病の一部に認められており³⁶⁾、実験腫瘍で得られた成績がこのように臨床の場合においても再現されつつある。同様に、LS-1 を用いて得られたいくつかの知見、たとえばアルキル化剤と ADM, MIT などの併用効果はヒト悪性リンパ腫の治療においても再現性が高いもののように思われる。

結 語

自然発生のマウスリンパ肉腫 LS-1 を用いて悪性リンパ腫の化学療法に関する検討を行ない、以下の成績を得た。

1. LS-1 を静脈内移植することにより、肝、脾、骨髄、リンパ節などに病巣が形成され、悪性リンパ腫の化学療法モデルに適した腫瘍と考えられた。しかし、静脈内移植—腹腔内薬剤投与 (iv-ip 法) と腹腔内移植—腹腔内薬剤投与 (ip-ip 法) を各薬剤について検討してみると、両方の治療成績はよく一致しており、この腫瘍に関しては操作の簡便な ip-ip 法で実験を進めることが可能であった。

2. LS-1 の薬剤感受性をみると、CPA, IFO などのアルキル化剤、ADM, ACR, MIT などの anthracycline-anthraquinone 系薬剤、VCR, VDS などの vinca-alkaloids, L-ASP, MTX などに感受性を示した。LS-1 が L-ASP に著しく高い感受性を示したことを除いては、ヒト悪性リンパ腫の薬剤感受性とよく関連した。

3. LS-1 に対する CPA と IFO の活性はほ

ほ等しく、ADMはACRに比べて明らかに高い活性を示したことは、すでに得られているヒト悪性リンパ腫に対する各薬剤の効果とよく一致していた。また、新しいanthraquinone系薬剤であるMITはLS-1に対しADM以上の活性を示しており、臨床におけるその有用性を予言するものであった。

4. 多剤併用療法に関する検討では、CPAとMIT、IFOとMITの併用効果が最も高く、ついでIFOとADM、CPAとADMの併用が効果的であった。CPAとADM、IFOとADMの併用はヒト悪性リンパ腫において有効性の高い薬剤の組み合わせとして多剤併用療法の中で用いられているが、CPAとMIT、IFOとMITの併用

はさらに効果的な治療法であると考えられた。現在、この点に関して臨床無作為比較試験が進行中であり、臨床相関の有無が明確にされるものと思われる。

5. 相互間に興味深い干渉が観察されているMTXとL-ASPの併用に関しては、いずれの実験条件においても効果増強は得られなかった。

本論文を撰筆するにあたり、御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表します。また、終始御懇篤なる御指導を賜った大熨泰亮助教授に深謝します。

なお本論文の要旨は第32回日本化学療法学会西日本支部会（昭和59年岡山）において発表した。

文 献

1. Venditti, J.M.: The national cancer institute drug discovery program, current and future perspective: a commentary. *Cancer Treat. Rep.* 67, 767-772, 1983.
2. Goldin, A. and Karter, S.K.: Screening and evaluation of antitumor agents. In *Cancer Medicine* ed. J.F. Holland and E. Frei III eds, Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 633-663, 1982.
3. 矢田純一, 橋 武彦: ヒトリンパ球 (subpopulation) の分別. ヒト赤血球結合性リンパ球と補体結合性リンパ球の証明法. 免疫実験操作法. 日本免疫学会編, 金沢, pp. 451-454, 1972.
4. Raff, M.C.: Theta isoantigen as a marker of thymus-derived lymphocytes in mice. *Nature* 224, 378-379, 1969.
5. 村岡義博, 杉村彰一, 矢原 功, 伊藤文男, 渡辺 弘, 森茂栄一, 宇野 攻, 原田喜男: Ifosfamide (Z4942) の急性毒性試験. 基礎と臨床, 16, 431-438, 1982.
6. 大黒友路: adriamycin-HClの安全性に関する研究 (第1報) 急性毒性実験. 基礎と臨床, 7, 1052-1062, 1973.
7. American Cyanamid Company. Investigator's Brochure: CL232,315 (NSC301739) 1,4-dihydroxy-5,8-bis[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]-ethyl]amino]9,10-anthracenedione dihydrochloride. March, 1979.
8. 白井正孝, 大森健太郎, 平野伸一, 井口博史, 堀 千之, 佐藤 博: Aclacinomycin Aのマウス, ラットおよびイヌにおける急性毒性試験. *Jpn. J. Antibiot.* 33, 138-149, 1980.
9. 増田 裕, 木村邦男, 岡田忠彦, 松沼尚史, 真板敬三, 河久保正夫: CS-439 (ACNU)の毒性試験. 三共研究所年報, 29, 118-137, 1977.
10. Broder, L.E. and Carter, S.K.: 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU), NSC-409962, *Clinical Brochure*. National Cancer Institute Chemotherapy, September, 1970.
11. 峰下鏡雄, 村岡義博, 古川 仁: Vincristine sulfateのマウスおよびラットに対する急性毒性. 塩野義製薬株式会社研究所社内資料.
12. 梅村孝司, 風間幹生, 西川 哲, 三枝 雅, 佐野正樹, 奈良間功, 原田喜男: Vindesine Sulfateのラットおよびマウスによる急性毒性試験. 基礎と臨床, 17, 1549-1555, 1983.

13. 日本化薬株式会社社内資料.
14. Ferguson, F.C., Thiersch, J.B. and Philips, F.S.: The action of 4-amino-N¹⁰-methyl-pteroyl glutamic acid in mice, rats, and dogs. *J. Pharm. Exp. Ther.* **98**, 293—299, 1950.
15. 大黒友路, 今村 敏, 小山 薫, 原 卓司, 宮川 晃, 波多野宗利, 神田貴世雄: L-asparaginase に関する研究 (第5報) L-asparaginase の毒性実験. *山口医学*, **18**, 271—292, 1969.
16. Capizzi, R.L., Summers, W.P. and Bertino, J.R.: L-asparaginase induced alteration of methotrexate activity in mouse leukemia L5178Y. *Ann N.Y. Acad. Sci.* **186**, 302—311, 1971.
17. Capizzi, R.L.: Schedule-dependent synergism and antagonism between methotrexate and asparaginase. *Biochem. Pharmacol.* (Suppl. 2.) **23**, 151, 1974.
18. Connors, T.A. and Jones, M.: Antagonism of the anti-tumour effects of asparaginase by methotrexate. *Biochem. Pharmacol.* **19**, 2927—2929, 1970.
19. Capizzi, R.L.: Improvement in the therapeutic index of methotrexate (NSC-740) by L-Asparaginase (NSC-109229). *Cancer Chemother. Rep.* **6**, 37—41, 1975.
20. Mashburn, L.T.: Combination chemotherapy with L-Asparaginase (EC-2) using P1798 lymphosarcoma. *Cancer* **28**, 1321—1328, 1971.
21. Nahas, A. and Capizzi, R.L.: Effect of in vivo treatment with L-asparaginase on the in vitro uptake and phosphorylation of some antileukemic agents. *Cancer Res* **34**, 2689—2693, 1974.
22. Capizzi, R.L. and Handschumacher, R.E.: Asparaginase. In *Cancer Medicine*, ed. J.F. Holland and E. Frei III eds, Lea and Febiger, Philadelphia, pp.920—933, 1982.
23. Wodinsky, I., Merker, P.C. and Venditti, J.M.: Responsiveness to chemotherapy of mice with L1210 lymphoid leukemia implanted in various anatomic sites. *J. Natl. Cancer Inst.* **59**, 405—408, 1977.
24. Wallace, R.E., Murdock, K.C., Angier, R.B. and Durr, F.E.: Activity of a novel anthracenedione, 1,4-dihydroxy-5,8-bis[2-(2-hydroxyethyl)amino]-9,10-anthracenedione dihydrochloride, against experimental tumors in mice. *Cancer Res.* **39**, 1570—1574, 1979.
25. Johnson, I.S.: Plant alkaloids. In *Cancer Medicine*, ed. J.F. Holland and E. Frei III Lea and Febiger, Philadelphia, pp.910—920, 1982.
26. 堀越 昇, 小川一誠: 造血器腫瘍の化学療法. 悪性リンパ腫. 癌と化学療法, **9**, 1903—1910, 1982.
27. Gams, R.A., Steinberg, J. and Posner, L.: Mitoxantrone in malignant lymphoma. *Semin Oncol.* (Suppl 1), **6**, 47—49, 1984.
28. Rodriguez, V., McCredie, K.B., Keating, M.J., Valdivieso, M., Bodey, G.P. and Freireich, E.J.: Isophosphamide therapy for hematologic malignancies in patients refractory to prior treatment. *Cancer Treat. Rep.* **62**, 493—497, 1978.
29. Hori, S., Shirai, M., Hirano, S., Oki, T., Inui, T., Tsukagoshi, S., Ishizuka, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: Antitumor activity of new anthracycline antibiotics, aclacinomycin-A and its analogs, and toxicity. *Gann* **68**, 685—690, 1977.
30. 上岡 博, 三道康弘, 安岡正敏, 西原龍司, 佐藤方春, 林 恭一, 岡 瞭, 大熨泰亮, 木村郁郎: 非ホジキンリンパ腫に対する adriamycin, vincristine, ifosfamide, prednisolone (AVIP) 併用療法. 癌と化学療法, **8**, 1925—1931, 1981.
31. Mckelvey, E.M., Gottlieb, J.A., Wilson, H.E., Haut, A., Talley, R.W., Stephens, R., Lane, M., Gamble, J.F., Jones, S.E., Grozea, P.N., Gutterman, J., Coltman C. and Moon, T.E.: Hydroxyldaunomycin (adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma. *Cancer* **38**, 1484—1493, 1976.

32. 上岡 博, 上野邦夫, 山根俊樹, 豊田莞爾, 遠藤 裕, 西原龍司, 高橋 功, 大熨泰亮, 喜多嶋康一, 木村郁郎: 造血器腫瘍に対する Mitoxantrone の Phase II study. 癌と化学療法, 10, 2399—2402, 1983.
33. 星野 章: 癌および白血病における実験的化学療法の予言性. 医学のあめみ, 85, 121—128, 1973.
34. 星野 章: 急性白血病の多剤併用療法と寛解導入. 内科シリーズ (南江堂) No 6, pp. 252—265, 1972.
35. 高橋 功, 原 雅道, 大本英次郎, 小田康弘, 遠藤 裕, 藤本修逸, 内田耕三郎, 高岡和子, 渡辺清一郎, 頼 敏裕, 厚井文一, 喜多嶋康一, 木村郁郎, 真田 浩, 時岡正明, 足立富郎, 依光聖一: 急性非リンパ性白血病寛解導入における Daunorubicin, Cytosine arabinoside 併用療法ならびに Aclarubicin, Cytosine arabinoside 併用療法の比較検討. 癌と化学療法, 9, 1617—1622, 1982.
36. Lobel, J.S., O'Brien, R.T., McIntosh, S., Aspnes, G.T. and Capizzi, R.L.: Methotrexate and asparaginase combination chemotherapy in refractory acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Cancer* 43, 1089—1094, 1979.

Studies on combination chemotherapy for malignant lymphoma
Part I. Drug screening and combination chemotherapy using
a murine lymphosarcoma, LS-1, as a model of
malignant lymphoma in man.

Ryuji NISHIHARA

Second Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. I. Kimura)

A murine lymphosarcoma(LS-1) which originated spontaneously in a DBA/2 mouse, was evaluated as a model of malignant lymphoma for drug screening and combination chemotherapy. Antitumor activity was distinct in the order of L-asparaginase(LASP), mitoxantrone, a new anthraquinone analogue(MIT), ifosfamide(IFO), cyclophosphamide(CPA), adriamycin(ADM), and aclarubicin, a new ADM analogue(ACR), when measured as increased life span of mice intravenously implanted with LS-1 and intraperitoneously treated with antitumor agents at an optimal dose. Methotrexate(MTX), vincristine(VCR), and vindesine(VDS) were marginally active against LS-1. Nitrosourea compounds, such as BCNU and ACNU, and bleomycin were inactive against the tumor. The murine lymphosarcoma, LS-1, appeared to provide a drug activity spectrum closely analogous to malignant lymphoma in man except for LASP. The combination of IFO and MIT was the most effective among six 2-drug combinations. CPA and MIT, IFO and ADM, and CPA and ADM were also effective combination. ACR, however, appeared antagonistic to IFO and CPA, since in combination with these agents, ACR did not prolong the life-span at any dose, as compared to the optimal dose of IFO or CPA alone. The murine experimental system using LS-1 should be usefull as a chemotherapy model of malignant lymphoma in man.