

Enhancement of the Effect of Anticancer Agents by Combined Use of Caffeine

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8038

カフェインによる制癌剤の効果増強に関する研究

金沢大学医学部整形外科学講座 (主任: 野村 進教授)

土 屋 弘 行

(昭和63年4月15日受付)

化学療法の導入により悪性骨軟部腫瘍の治療成績は飛躍的に進歩したが、未だ満足すべき段階に達していない。微小転移巣と原発巣の両者の治療が可能である化学療法に寄せられる期待は大きく、何等かの方法で肉腫化学療法の有効性を高める必要がある。そこで本研究ではカフェインのDNA修復阻害作用に着目し、ヒト肉腫細胞を用いて種々の方法で制癌剤とカフェインの併用効果を検討した。human tumor clonogenic assay (HTCA) による実験では、カフェインは4種類のDNA合成阻害剤である、シスプラチン、マイトマイシンC、サイクロフォスファミド及びアドリアマイシンの作用を相乗的に増強した。特にシスプラチンとカフェインの併用は、ヒト肉腫新鮮材料において18検体中14検体(78%)に相乗効果を認め、最も有効であった。単層培養系を用いたシスプラチンとカフェインの併用効果の検討では、シスプラチン投与後よりカフェインを持続接触させた場合に腫瘍倍加時間を経過した時点から肉腫培養細胞に対する殺細胞効果が著明に増強し、細胞回転上の変動としてはS期及びG₂/M期の蓄積が解除された。また、効果増強が著明な場合には、細胞核の細片化(nuclear fragmentation)が高率に認められた。さらに、臨床と高い相関を有すると考えられる鶏卵法及びヌードマウス法においても、有意な脾臓重量や体重の変動を認めずにカフェインはシスプラチンのヒト肉腫に対する抗腫瘍効果を有意に増強した($p < 0.01$)。以上より、カフェインはDNA合成阻害作用を有する制癌剤の作用を相乗的に増強し、肉腫化学療法の限界を打破する有用な薬剤である可能性が示唆された。

Key words caffeine, anticancer agent, bone and soft-tissue sarcoma, drug sensitivity test, synergism

癌化学療法の進歩に伴い骨肉腫やユーイング肉腫をはじめとする悪性骨軟部腫瘍の治療成績も飛躍的に向上してきた^{1)~7)}が、未だ満足すべき段階には達していない。悪性度の高い骨軟部腫瘍においては初診時既に存在すると考えられる微小転移巣を制することができない限り、今以上の治療成績の向上すなわち生存率の上昇は望めない⁸⁾。従って集学的治療を遂行していく上で、微小転移巣と原発巣の両者の治療が可能である化学療法に寄せられる期待は極めて大きい。しかしながら、全ての肉腫細胞に有効な制癌剤は現段階では存在せず、さらに制癌剤の腫瘍細胞に対する自然及び後天耐性の問題が大きく立ちはだかっている。それゆえ

に、有効な制癌剤の開発や制癌剤の効果を増強するような薬剤の発見及び開発が必要となってくる。

制癌剤の多くは、一般にDNAに作用してその効果を発現する。しかし、DNAには外的因子によって障害を受けた際にそれを修復する機構が存在し、制癌剤の効果が発現しない場合がある。キサンチン類に属するカフェインが、紫外線やX線及びアルキル化剤など、細胞のDNAに障害を与える物質の作用を増強することが一部で報告されており、これは主としてカフェインのDNA修復阻害作用によると言われている^{9)~17)}。しかし、カフェインが果して腫瘍細胞に対して制癌剤の作用を増強するのか、あるいは実際の各種ヒト肉腫

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; FBS, fetal bovine serum; HTCA, human tumor clonogenic assay; OST, osteosarcoma Takase; RPMI-1640, Roswell Park Memorial Institute Media-1640; SPF, specific pathogen free.

細胞に対してカフェインによる制癌剤の効果増強の発現が可能なのは未だ研究されていない。今回著者は、カフェインと臨床上頻用されている各種制癌剤との併用によりどのような効果が発現するのかについて、ヒト肉腫培養細胞及び臨床材料を対象として *in vitro* 制癌剤感受性試験である human tumor clonogenic assay (HTCA) を用いて検討した。さらに、HTCA で最も有効であると考えられたシスプラチンとカフェインの併用については、フローサイトメトリーにより細胞周期の変動を解析するとともに、臨床応用への可能性を知る目的で鶏卵法及びヌードマウス法を用いて *in vivo* における抗腫瘍効果の発現に関しても検討を行った。

対象および方法

I. 対象

培養細胞は、当教室で継代培養されているヒト骨肉腫培養細胞 (OST 株)¹⁸⁾及びヒト線維肉腫培養細胞 (HT-1080 株)¹⁹⁾を用いた。生検及び手術時に得られたヒト骨軟部肉腫の新鮮材料は計 18 検体であり、骨肉腫 8 検体、悪性線維性組織球腫 3 検体、横紋筋肉腫 2 検

体、類上皮肉腫、間葉性軟骨肉腫、滑膜肉腫、平滑筋肉腫、悪性骨巨細胞腫各 1 検体を用いた。

II. 各種試験法によるカフェインと制癌剤の併用効果の判定

1. human tumor clonogenic assay (HTCA) による効果判定

HTCA は、原則として Hamburger らにより開発された二重軟寒天法に準じた²⁰⁾。ヒト肉腫新鮮材料において得られた浮遊細胞数が少ない場合には、Tomita らの HTCA 変法 (cultivated HTCA)²¹⁾に従い細胞を一旦 RPMI-1640 培養液 (15% 熱非動化胎児牛血清 + 1% ペニシリン・ストレプトマイシン [penicillin/streptomycin solution 10,000 units (PS, Gibco)]) を用いた単層培養系で増殖させてから実験を行った (図 1)。OST 株は 1 dish あたり 1×10^4 個、HT-1080 株では、1 dish あたり 5×10^4 個、さらにヒト肉腫新鮮材料では、1 dish あたり $1 - 5 \times 10^5$ 個の生細胞を播種した。培養は、37°C、7-7.5% CO₂、水蒸気飽和の状態で 10 日から 3 週間行い (培養細胞は 10 日から 2 週間、肉腫新鮮材料では 2 週間から 3 週間)、50 個以上よりなる細胞集塊をコロニーと定義し、30 コロニー/

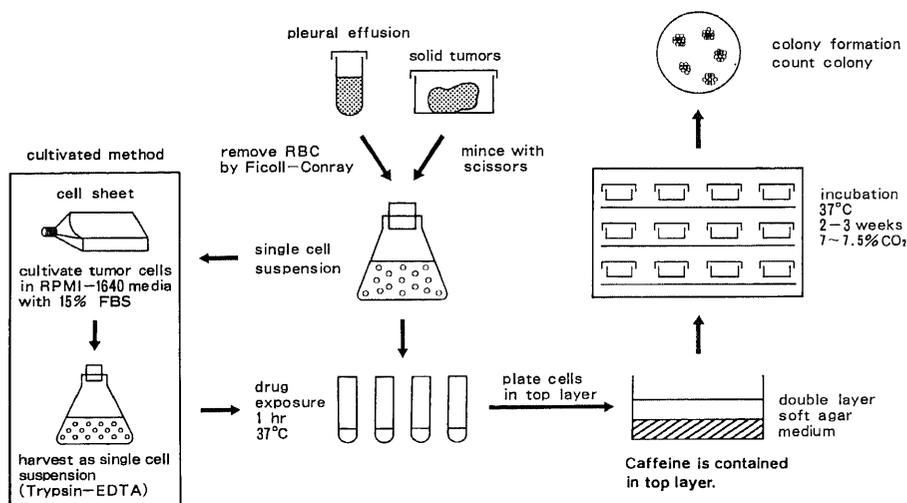


Fig. 1. Methods for human tumor clonogenic assay of fresh tumor specimens.

Fresh tumor material and malignant fluid were obtained from biopsy, surgery or needle aspiration. A single cell suspension was prepared by mechanical and enzymatic disruption of the tumor. If the number of the tumor cells was not enough, the tumor cells were cultured in RPMI-1640 medium with 15% fetal bovine serum until cell seat was formed in the bottle. The tumor cells were harvested as refined single cell suspension by trypsin and EDTA. The tumor cells were incubated in test tubes with drugs or control medium for 1 hour at 37°C. The tumor cells were washed and plated in soft agar in 35 mm Petri dishes. Caffeine (2 mM or 0.2 mM) was contained in the top layer of double soft agar. The dishes were incubated at 37°C in 7-7.5% CO₂-humidified air for 2-3 weeks. The number of colonies in each dish was counted under a microscope or with an automatic particle counter and the percent colony inhibition was calculated.

dish 以上のコロニー形成の認められたものを評価の対象として倒立顕微鏡及び自動コロニーカウンター (Handex CP-2000) でその数を算定した。

使用した制癌剤は、シスプラチン (cisplatin), マイトマイシン C (mitomycin C), サイクロフォスファミド (cyclophosphamide), アドリアマイシン (adriamycin), ビンクリスチン (vincristine), メソトレキセート (methotrexate) であり, masked compound であるサイクロフォスファミドは, 活性型である 4-hydroperoxy cyclophosphamide を用いた。制癌剤の濃度は, Von Hoff の方法に従いヒトに投与された場合の最高血中濃度の 10 分の 1 とし²³⁾, カフェインの濃度は, 2 mM と 0.2 mM を用いた。制癌剤の接触は 37°C, 1 時間接触とし, カフェインは制癌剤と同時に 1 時間接触させる場合 (培養細胞のみ) と制癌剤を 1 時間接触後より二重軟寒天培地の土層にカフェインを混入し 10 日から 3 週間持続接触させる場合とを設定した。

50% 以上のコロニー形成の抑制が認められた場合に感受性陽性とし, 相乗効果及び相加効果の判定には, Valeriotte らの定義²³⁾を参考とし, 薬剤の併用を行った場合の 1 - (コロニー抑制率) が各薬剤単独処置により得られた 1 - (コロニー抑制率) の積より小さい時に相乗効果があるとし, 同じ値の時は相加効果とした。また, 単剤と併用群の有意差検定には, コロニー数を用いて分散分析 (analysis of variance, ANOVA) の後 Scheffé の多変比較法を行い, $p < 0.05$ を有意とした。

2. フローサイトメトリーによる細胞周期の変動の解析

OST 株及び HT-1080 株を用い, 1×10^5 個の腫瘍細胞を RPMI-1640 培地に播種し, 37°C, 7-7.5% CO₂, 水蒸気飽和の状態 で 48 時間培養の後, シスプラチンを 1 時間接触させた。シスプラチンの濃度は, OST 株で 0.2 $\mu\text{g/ml}$ と 2.0 $\mu\text{g/ml}$, HT-1080 株では, 2.0 $\mu\text{g/ml}$ と 5.0 $\mu\text{g/ml}$ を用いた。カフェインは 2 mM の濃度を使用し, シスプラチン 1 時間接触直後あるいは 24 時間後より持続接触させた。腫瘍細胞数の算定は, シスプラチン投与後から 24 時間おきに自動血球測定器 (hemocytometer) にて行い, 増殖曲線を求めた。同時に, 細胞回転上の変化をフローサイトメトリーにより DNA ヒストグラムを求め解析した。染色法は, 腫瘍細胞を 4°C の 70% アルコールで 30 分以上固定し, 1000 rpm 5 分間遠沈の後, 500 ml の蒸留水にクロモマイシン A₃ 10 mg と MgCl₂ · 6H₂O 1.5 g を溶解した液を 2-3 ml 入れ 30 分間 4°C の冷蔵庫内に静置する方法を用いた。また, 標準試料としてはニワトリ

赤血球を用い, レーザー光は 457.9 nm (Argon laser) を用いた。上記染色法にて染色後, propidium iodide 1 ml を加える方法あるいはパバニコロー染色により顕微鏡下に細胞核の形態学的観察を行った。生細胞の判定は, トリパンブルーを用いた色素排除試験により行った。

3. 鶏卵法 (embryonated chick assay) による効果判定

本法は, 1912 年 Murphy により開発され²⁴⁾, 佐々木らにより制癌剤感受性試験, 抗腫瘍剤のスクリーニング, 転移能の検索などへの応用というように発展してきた²⁵⁾²⁶⁾。

孵卵 11 日目の鶏卵を candling (光にて透見) し, 漿尿膜上の血管の位置を定めて回転式のヤスリを用いて約 1 cm² の大きさに卵殻を開窓した。直下にある漿尿膜に傷をつけないように卵殻膜に傷をつけ, 気室中央の卵殻に小孔を開け, その小孔より気室の空気を弱く吸引して卵殻膜と漿尿膜とを分離した後, 卵殻膜を除去して人工気室を作成した。この露出した漿尿膜上の血管の発達したところに, 移植位置の保持と細胞の拡散を防止する目的で直径 8 mm のテフロンリングを置いて OST 株では 4×10^6 個, HT-1080 株では 5×10^5 個の細胞を移植した。腫瘍移植 3 日目に再び candling を行い血管の位置を定め卵殻膜を露出し, 流動パラフィンを塗布した。ここに 30 ゲージ針のついた注射器にてシスプラチン 5 μg (総量 0.1 ml) を投与した。その翌日から, 持続接触を意図してカフェイン 2.5 mg を卵黄内に 3 日間連日投与した。移植 7 日目に漿尿膜上に成育した腫瘍の重量を測定し, 対照群と比べて増殖阻止率を算出し評価した。なお, 一つの治療に対して原則として 10 個の受精鶏卵を使用し, 平均値を算出して評価した。また, 各群間の有意差検定には, 分散分析の後 Scheffé の多変比較法を用い, $p < 0.05$ を有意とした。

4. ヌードマウス法による効果判定

実験に用いたヌードマウスは, specific pathogen free (SPF) の条件下で飼育された BALB/C nu/nu であり, アイソレーター内の温度 25°C, 湿度 55% に保持して, 滅菌した水と飼料を与えた。体重約 20 g の 7-8 週令の雄ヌードマウスに 5×10^6 個 (0.3 cc の生理食塩水を含む) の OST 細胞を背部皮下に接種し,

$$1/2 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$$

で求めた推定腫瘍重量が 200 mm³ 前後になったところでシスプラチン 5 あるいは 10 mg/kg を腹腔内投与した。翌日 (24 時間後) より, カフェイン 1 mg の連日 7 日間腹腔内投与あるいはカフェイン 4 mg の連日 3 日間腹腔内投与を行った。治療開始 2 週後に Battelle

Columbus Laboratories Protocol に従い、すなわち上記式にて求めた推定腫瘍重量を対照群と治療群とで比較検討し効果判定を行った²⁷⁾²⁸⁾。なお1つの治療方法につき5-6匹のヌードマウスを使用し平均値を算出して評価した。さらに、腫瘍倍加時間と実測腫瘍重量でも効果判定を行い、脾臓重量と体重により毒性の検討も行った。各群間の有意差検定には分散分析の後 Scheffé の多変比較法を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

I. HTCA による各種制癌剤とカフェインの併用効果

1. ヒト肉腫培養細胞に対する各種制癌剤とカフェインの併用効果

各種制癌剤とカフェインを同時に1時間接触した場合には、いずれの併用にてても相乗効果を認めなかった。次に、制癌剤を1時間接触後カフェインを持続接触させた場合の結果について述べる。有糸分裂を阻害するビンクリスチンと葉酸代謝拮抗剤であるメソトレキセートではカフェインによる効果増強は認められな

かった。シスプラチン単独処置では、コロニー抑制率が OST 株で 11.8%、HT-1080 株で 0% であるのに対して、0.2 mM カフェインの併用で各々 61.2% と 13.9% にコロニー抑制率が上昇し OST 株では感受性陽性となる相乗効果を認めた。2 mM カフェインの併用では、さらに OST 株において 82.6% とコロニー抑制率が著明に上昇した。なお、HT-1080 株では 2 mM カフェインの投与でコロニー抑制率が 100% となり効果判定が不能であった。マイトマイシン C とカフェインの併用では、HT-1080 株が相乗効果を認めた。すなわち、マイトマイシン C 単独ではコロニー抑制率が 50.4% なのに対し 0.2 mM カフェインの併用で 80.4% となった。サイクロフォスファミド単独処置では、コロニー抑制率が OST 株で 14.2%、HT-1080 株で 8.5% であるのに対して、0.2 mM カフェインの併用で各々 27.8% と 56.2% にコロニー抑制率が上昇し HT-1080 株では感受性陽性となる相乗効果を認めた。2 mM カフェインの併用では、OST 株でコロニー抑制率 57.1% と感受性陽性となった。アドリアマイシンとカフェインの併用では、HT-1080 株が感受性陰性

Table 1. The combined effect of anticancer agents and caffeine on cultured sarcoma cells by human tumor clonogenic assay

Drugs	Colony inhibition rate (%)	
	OST	HT-1080
Caffeine, 0.2mM	9.2	12.5
Caffeine, 2.0mM	15.0	100.0
Adriamycin, 0.04 μ g/ml	2.6	6.2
+Caffeine, 0.2mM	3.9	50.6** ※
+Caffeine, 2.0mM	14.2	100.0
Cisplatin, 0.2 μ g/ml	11.8	0
+Caffeine, 0.2mM	61.2*** ※	13.9** ※
+Caffeine, 2.0mM	82.6*** ※	100.0
Cyclophosphamide, 3.0 μ g/ml	14.2	8.5
+Caffeine, 0.2mM	27.8* ※	56.2** ※
+Caffeine, 2.0mM	57.1*** ※	100.0
Mitomycin C, 0.1 μ g/ml	7.2	50.4
+Caffeine, 0.2mM	8.2	80.4** ※
+Caffeine, 2.0mM	8.8	100.0
Vincristine, 0.01 μ g/ml	2.8	92.9
+Caffeine, 0.2mM	6.4	95.6
+Caffeine, 2.0mM	12.1	100.0
Methotrexate, 30 μ g/ml	9.3	18.3
+Caffeine, 0.2mM	9.1	20.4
+Caffeine, 2.0mM	17.9	100.0

※ synergistic effect

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ vs without caffeine by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison

から陽性になる相乗効果を認めた。すなわち、アドリアマイシン単独ではコロニー抑制率が6.2%なのに対し0.2 mM カフェインの併用で50.6%となった。また、0.2 mM カフェインの単独処置ではOST株で9.2%, HT-1080株で12.5%のコロニー抑制率を認め、2 mM カフェインの単独処置では、OST株で15.0%, HT-1080株で100%のコロニー抑制率を認めた(表1)。

2. ヒト肉腫に対する各種制癌剤とカフェインの併用効果

ヒト肉腫培養細胞の場合と同様に、手術または生検で得られたヒト肉腫においてもビンクリスチンとメソトレキセートの効果はカフェインにより増強されなかった。シスプラチン単独処置では18検体中5検体が感受性陽性であったが、2 mM カフェインの併用により18検体中14検体(77.8%)に相乗効果を認め、うち13検体が感受性陽性となるコロニー抑制率を示した。また、0.2 mM カフェインの併用により相乗効果を4検体と相加効果を3検体に認めた(図2-A)。マイトマイシンCの単独処置では18検体中4検体が感受性陽性であったが、2 mM カフェインの併用により18検体中8検体(44.4%)に相乗効果を認め、1検体に相加効果を認め、うち8検体が感受性陽性となるコロニー抑制率を示した。0.2 mM カフェインの併用では3検体に相乗効果、2検体に相加効果を認めた(図2-B)。サイクロフォスファミドの単独処置では18検体中4検体が感受性陽性であったが、2 mM カフェインの併用により18検体中8検体(44.4%)に相乗効果を認め、1検体に相加効果を認め、うち7検体が感受性陽性となるコロニー抑制率を示した。0.2 mM カフェインの併用では4検体が相乗効果、1検体が相加効果を認めた(図2-C)。アドリアマイシンの単独処置では18検体中5検体が感受性陽性であったが、2 mM カフェインの併用により18検体中6検体(33.3%)が相乗効果を認め、新たに2検体が感受性陽性となるコロニー抑制率を示した。0.2 mM カフェインの併用では相乗効果と相加効果を2検体ずつ認めた(図2-D)。

II. シスプラチンとカフェインの併用による細胞周期の変動と増殖曲線

OST株は、シスプラチン及びカフェイン単独処置では増殖抑制効果を認めなかったが、両者の併用で著明な殺細胞効果及び増殖抑制効果を認めた。対数増殖期におけるOST細胞の腫瘍倍加時間は約30時間であるが、シスプラチンを1時間接触直後あるいは24時間後よりカフェインを持続接触させた場合に、48時間後より増殖抑制効果が著明になり、対照と比較して96時間後には0.2 μg/mlのシスプラチンと2 mM カフェ

インの併用で63%, 2.0 μg/mlのシスプラチンとカフェインの併用で91%の抑制効果を認め、さらにこの場合1週間後にはtotal cell killが達成された。細胞周期の変動は、カフェイン単独処置では変化なく、シスプラチン単独処置では0.2 μg/mlの場合24時間後、2.0 μg/mlの場合も24時間後にS期からG₂/M

A)

+2mM caf				+0.2mM caf			
CDDP	sensitive	non-sensitive	total	CDDP	sensitive	non-sensitive	total
sensitive	●●●● ○		5	sensitive	●○○○ ○		5
non-sensitive	●●●●●●●● ●	●○○○	13	non-sensitive	●●○ ●▲▲▲ ○○○	●▲▲▲ ○○○	13
total	14	4	18	total	8	10	18

B)

+2mM caf				+0.2mM caf			
MMC	sensitive	non-sensitive	total	MMC	sensitive	non-sensitive	total
sensitive	●●○○		4	sensitive	▲○○○		4
non-sensitive	●●●●●●●● ●●	○▲○○ ○○○○	14	non-sensitive	●●● ●▲○○ ○○○○ ○○○○	●▲○○ ○○○○ ○○○○	14
total	10	8	18	total	6	12	18

C)

+2mM caf				+0.2mM caf			
CPM	sensitive	non-sensitive	total	CPM	sensitive	non-sensitive	total
sensitive	●●○○		4	sensitive	●●○○		4
non-sensitive	●●●●●●●● ○○	●▲○○ ○○○○	14	non-sensitive	● ●▲○○ ○○○○ ○○○○ ○○○○	●▲○○ ○○○○ ○○○○	14
total	10	8	18	total	5	13	18

D)

+2mM caf				+0.2mM caf			
ADR	sensitive	non-sensitive	total	ADR	sensitive	non-sensitive	total
sensitive	●●●○ ○		5	sensitive	▲○○○ ○		5
non-sensitive	●● ●○○○ ○○○○ ○○○	●○○○ ○○○○ ○○○	13	non-sensitive	● ●▲○○ ○○○○ ○○○○	●▲○○ ○○○○ ○○○○	13
total	7	11	18	total	6	12	18

Fig. 2. The combined effect of anticancer agents with caffeine by human tumor clonogenic assay. A), effect of cisplatin with caffeine; B), effect of mitomycin C with caffeine; C), effect of cyclophosphamide with caffeine; D), effect of adriamycin with caffeine. With the addition of 2 mM caffeine, cisplatin (0.2 μg/ml) showed marked synergistic effect in 14 out of 18 specimens (78%), mitomycin C (0.1 μg/ml) in 8 out of 18 specimens (44%), cyclophosphamide (3.0 μg/ml) in 8 out of 18 specimens (44%), and adriamycin (0.04 μg/ml) in 6 out of 18 specimens (33%). Individual effects are illustrated by different symbols: ●, synergistic effect; ▲, additive effect.

期にかけての蓄積が認められた。シスプラチン1時間接触直後よりカフェインを持続接触させた場合に、このS期からG₂/M期にかけての蓄積が解除された(図3)。図4に96時間後の倒立位相差顕微鏡による細胞形態を示したが、シスプラチンとカフェインの併用で殺細胞効果及び増殖抑制効果は明らかであり残存細胞も変性所見を認めた。

HT-1080株では、カフェイン及び2.0 µg/mlシスプラチンの単独処置で増殖抑制効果を認めず、5.0 µg/mlシスプラチンの単独処置で96時間後に51%の抑制効果を認めた。HT-1080株でもOST株同様にシスプラチンとカフェインの併用で著明な殺細胞効果及び増殖抑制効果を認め、HT-1080細胞の倍加時間(27時間)を越えた48時間後より抑制効果が出現し始め、対照と比較して96時間後には2.0 µg/mlシスプラチンとカフェインの併用で61%、5.0 µg/mlシスプラチンとカフェインの併用で88%の抑制が認められた。細胞周期の変動は、2.0 µg/mlのシスプラチンでは部分的G₂ブロック、5.0 µg/mlのシスプラチンではS期

からG₂/M期にかけての蓄積が24,48時間後に認められたが、シスプラチン処置直後あるいは24時間後からのカフェインの持続接触によりこれらの蓄積が解除された(図5)。

このように殺細胞効果及び増殖抑制効果が明らかに認められた場合には、細胞核の細片化(nuclear fragmentation)が高率に認められた(図6)。

III. 鶏卵法によるシスプラチンとカフェインの併用効果

OST株では、シスプラチン単独投与で22.9%、カフェイン単独投与で2.6%の腫瘍増殖抑制効果を認めたが、両者の併用投与により抑制効果が56.6%とな

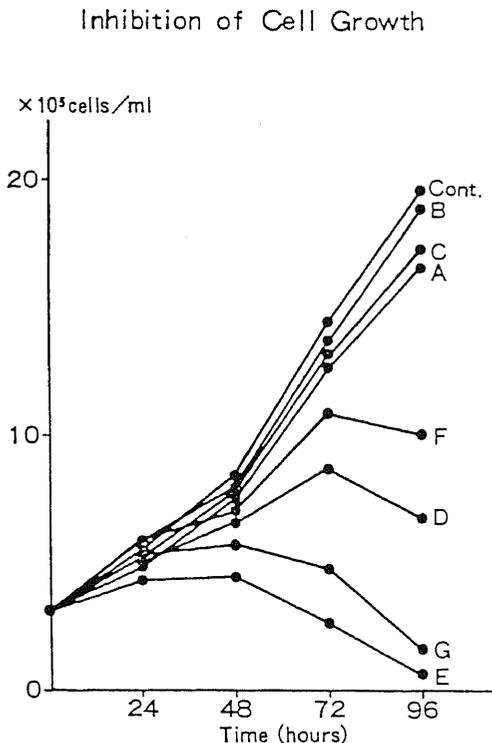
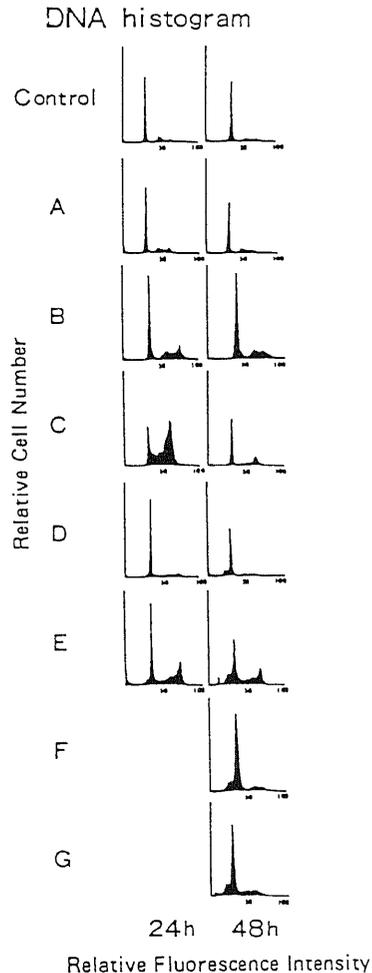
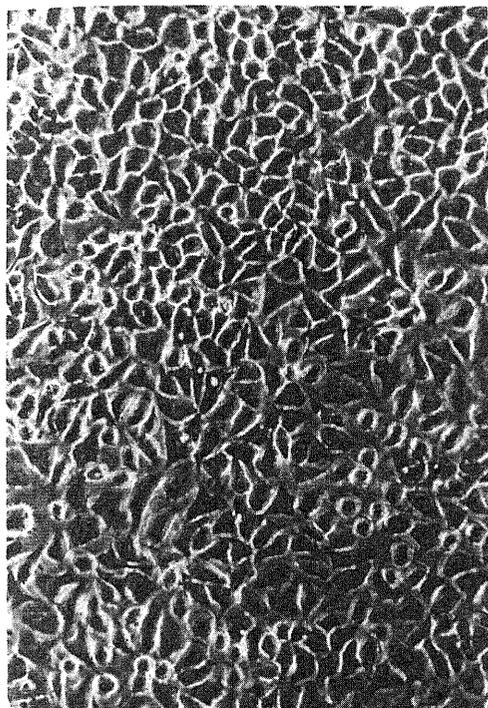
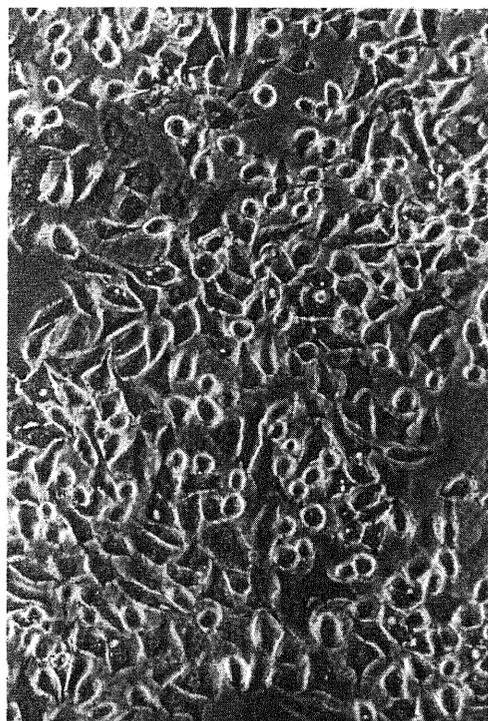


Fig. 3. The combined effect of cisplatin and caffeine on OST strain. Caffeine enhanced the effect of cisplatin when S and G₂/M accumulation was reduced on DNA histogram. A, caffeine (2 mM); B, cisplatin (0.2 µg/ml); C, cisplatin (2.0 µg/ml); D, cisplatin (0.2 µg/ml) + caffeine (2 mM); E, cisplatin (2.0 µg/ml) + caffeine (2 mM); F, cisplatin (0.2 µg/ml) + caffeine (2 mM) after 24 hr; G, cisplatin (2.0 µg/ml) + caffeine (2 mM) after 24 hr.





a

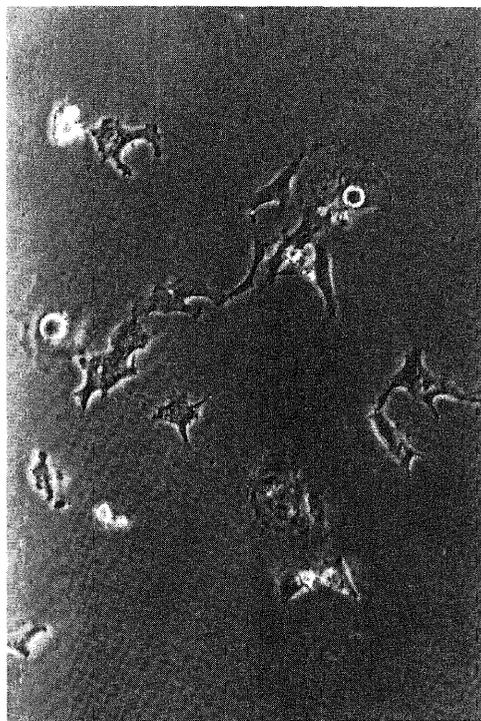


b

り、単剤に比べ有意に抑制率が上昇した ($p < 0.01$)。HT-1080 株でもシスプラチン単独投与で4.2%の抑制効果、カフェイン単独投与で27.4%の抑制効果を認めたが、両者の併用投与により抑制効果が58.4%となり有意に抑制率が上昇した ($p < 0.01$) (表2)。なお、治療経過中鶏卵胎児の体重変動はほとんどなく、死亡例も認めなかった。

IV. ノードマウス法によるシスプラチンとカフェインの併用効果

Battelle Columbus Laboratories Protocol に従った相対腫瘍重量比の検討では、シスプラチン5 mg/kgの単独投与では抗腫瘍効果が認められなかったが、シスプラチン投与後よりカフェイン4 mgを3日間連日腹腔内投与を行った場合相対腫瘍重量比が42.9%となった。また、シスプラチン10 mg/kgの単独投与でも相対腫瘍重量比25.8%であったが、カフェイン1 mg 7日間連日腹腔内投与の併用で12.0%、カフェイン4



c

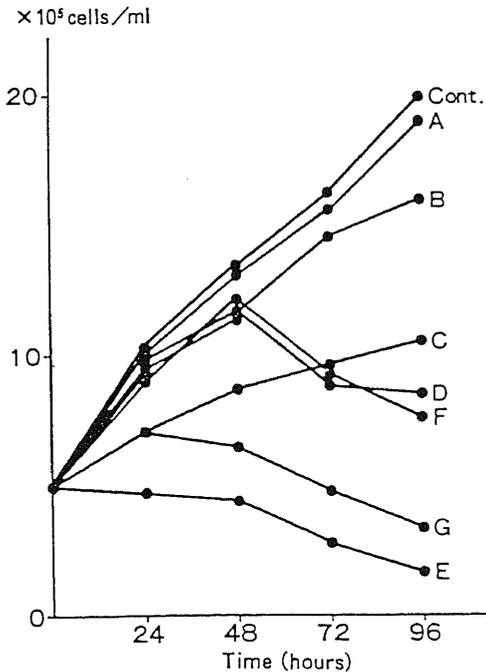
Fig. 4. The combined effect of cisplatin with caffeine on OST strain 96 hours after treatment. a, 2.0 μ g/ml cisplatin; b, 2 mM caffeine; c, 2.0 μ g/ml cisplatin+2 mM caffeine. There were degenerative changes in tumor cells by combined use of cisplatin with caffeine. ($\times 400$ by phase contrast microscope)

mg 3日間連日腹腔内投与の併用で7.6%となった。実測腫瘍重量及び腫瘍倍加時間の比較でも同様の結果であり、シスプラチン5 mg/kgの投与ではカフェイン4 mgを3日間連日腹腔内投与した場合に、シスプラチン10 mg/kgの投与ではカフェイン1 mgを7日間連日腹腔内投与及びカフェイン4 mgを3日間連日腹腔内投与した場合に有意に抗腫瘍効果が増強された ($p < 0.05$)。また、ここで問題となるのは毒性であるが、2週後の体重及び脾臓重量の変動は各治療群間でほとんど有意差が認められなかった(表3)。しかし、カフェイン投与中は、興奮作用のためヌードマウスの活動性が上昇し0-15%、平均11.8%の体重減少が認められた。

考 察

当教室では感受性のある薬剤の的確な投与と副作用の軽減を目的としてHamburgerとSalmonによって開発されたin vitro制癌剤感受性試験であるHTCA

Inhibition of Cell Growth



を悪性骨軟部腫瘍に対して応用し検討を重ねてきたが、予想以上に感受性のある薬剤の数は少なく、また個々の腫瘍の制癌剤感受性も大きく異なっていた²⁹⁾³⁰⁾。そこで、有効な制癌剤や制癌剤の効果を増強する物質の発見や開発をはじめとして、自然及び後天耐性を克服することが必要となってきた。紫外線やX線によりDNAに障害を受けた細胞は、カフェインの投与により死滅する。これはカフェインがDNA修復機構の内の複製後修復を阻害していることによると報告されている³¹⁾³²⁾。本研究では、このことに着目してDNA修復阻害作用を持つカフェインが各種制癌剤の

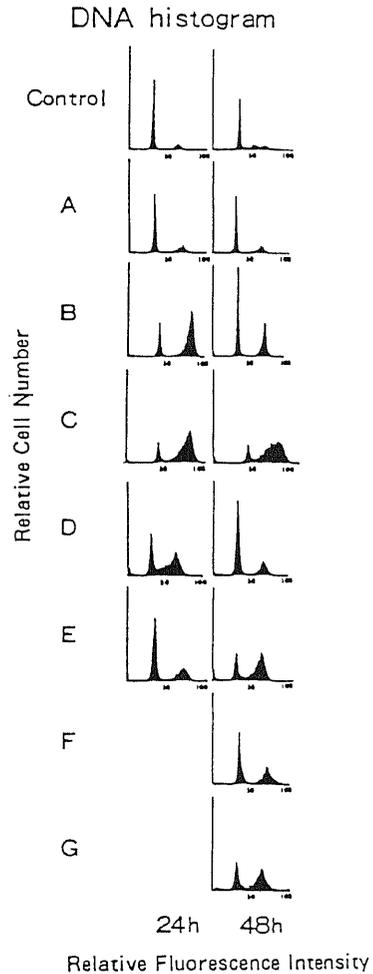


Fig. 5. The combined effect of cisplatin and caffeine on HT-1080 strain.

Caffeine enhanced the effect of cisplatin when G_2 accumulation or S and G_2 accumulation was reduced on DNA histogram.

A, caffeine (2 mM); B, cisplatin (2.0 μ g/ml); C, cisplatin (5.0 μ g/ml); D, cisplatin (2.0 μ g/ml)+caffeine (2 mM); E, cisplatin (5.0 μ g/ml)+caffeine (2 mM); F, cisplatin (2.0 μ g/ml)+caffeine (2 mM) after 24 hr; G, cisplatin (5.0 μ g/ml)+caffeine (2 mM) after 24 hr.

効果を増強するか否かについて検討を行った。HTCAを用いた実験では2種類のヒト肉腫培養細胞とヒト肉腫新鮮材料18検体においてDNA合成阻害剤であるシスプラチン、マイトマイシンC、サイクロフォスファミドとアドリアマイシンの作用がカフェインにより増強された。すなわち、OST株がシスプラチンとサイクロフォスファミド、HT-1080株がマイトマイシンC、サイクロフォスファミド及びアドリアマイシンとカフェインの併用により感受性陽性となる相乗効果を認め、ヒト肉腫材料においてはカフェインを併用することにより少なくとも1種類以上のDNA合成阻害作用を示す制癌剤と著明な相乗効果を認めた。3種類のDNA合成阻害作用を示す制癌剤と相乗効果を認め

たものは7検体、2種類のDNA合成阻害作用を示す制癌剤と相乗効果を認めたものは4検体、1種類のDNA合成阻害作用を示す制癌剤と相乗効果を認めたもの7検体であった。このことから、カフェインは種々のDNA合成阻害作用を示す制癌剤の効果を増強する可能性のあることが示唆された。特に、シスプラチンとカフェインの併用は有効であり、18検体中14検体(78%)に相乗効果を認めており最も有効な組合せであった。

また、既に感受性が陽性であったものはシスプラチン5検体、マイトマイシンC4検体、サイクロフォスファミド4検体、アドリアマイシン5検体であったが、そのうち2mMカフェインの併用によりシスプラ

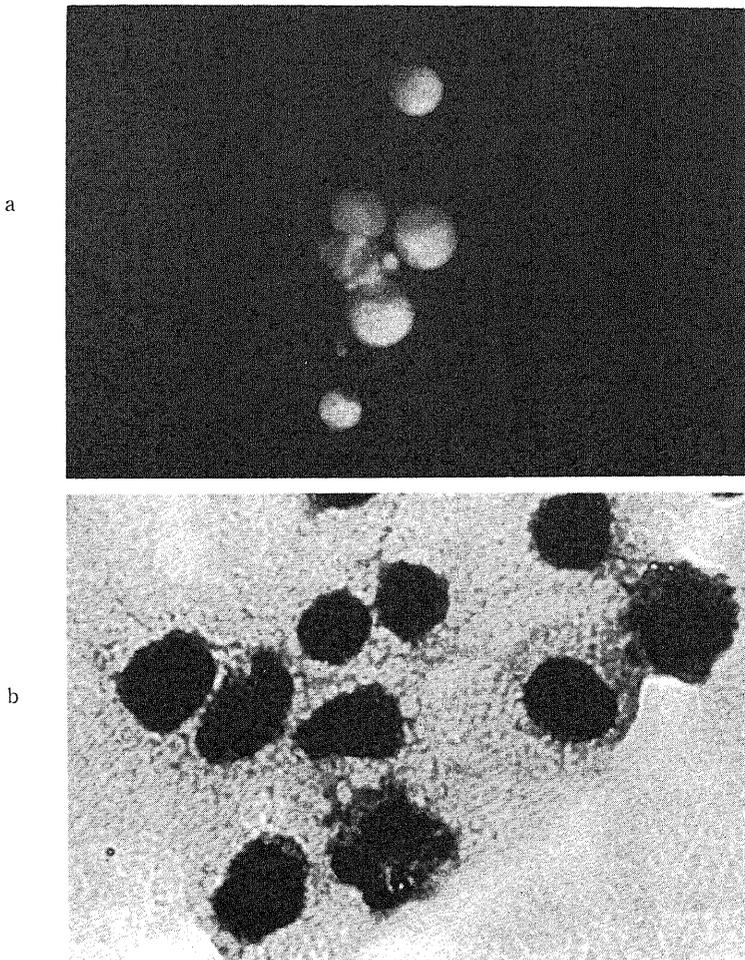


Fig. 6. Nuclear fragmentation of tumor cells (OST strain)
 a, chromomycin A₃+propidium iodide (×600); b, Papanicolaou stain (×1000)-Nuclear fragmentations of tumor cells were frequently observed when caffeine produced synergistic effect with cisplatin.

チン4検体, マイトマイシンC 2検体, サイクロフォスファミド3検体, アドリアマイシン3検体が相乗効果を認めた。さらに, HTCA にてもともと感受性のない薬剤が2mM カフェインの併用により感受性陽性となるコロニー抑制率を示した検体は, シスプラチンで9検体, マイトマイシンCで6検体, サイクロフォスファミドで6検体, アドリアマイシンで2検体であり, 自然耐性の克服にもカフェインが有用である可能性が示唆された。

現在までに制癌剤の作用を増強する薬剤として, 細胞膜の透過性を変化させることによりアドリアマイシンとビンクリスチンの作用を増強するカルシウム拮抗剤が最もよく知られている³³⁾が, ヒト骨肉腫培養細胞

ではアドリアマイシンとビンクリスチンの作用はカルシウム拮抗剤により増強されない³⁴⁾。一方カフェインは, 少なくとも今回用いた4種類のDNA合成阻害作用を示す制癌剤の作用を増強することや, ヒト肉腫培養細胞において薬剤の濃度を通常のHTCAに用いる濃度の1/10におとしても2mMカフェインの併用により感受性陽性となる相乗効果を認めた³⁵⁾ことから, 制癌剤の効果を増強する非常に有用なmodifierと考えられる。今回は, 制癌剤の多剤併用の場合や癌腫での検討は行わなかったが, DNA合成阻害作用を示す制癌剤を多剤併用投与し, さらにカフェインを併用する場合には著明な相乗効果の認められることが予想され, また, 癌腫においても肉腫と同様の効果が期待さ

Table 2. Antitumor effect by combination with cisplatin and caffeine using Chick Embryo¹⁾

	Human osteosarcoma (OST)		Human fibrosarcoma (HT-1080)	
	Tumor weight (mg, Mean±SD)	Inhibition rate (%)	Tumor weight (mg, Mean±SD)	Inhibition rate (%)
Control	49.8±24.9		77.7±40.4	
Cisplatin ²⁾	38.4±26.5	22.9	74.4±25.2	4.2
Caffeine ³⁾	48.5±38.4	2.6	56.4±26.3	27.4
Combination	21.6±11.9	56.6**	32.3±13.3	58.4**

1) Tumor cells (OST, 4×10^6 cells/egg; HT-1080, 5×10^5 cells/egg) were transplanted onto chorioallantoic membrane of 11 day-old chicken.

2) Cisplatin (5 μ g/egg) was injected to blood vessel on chorioallantoic membrane 3 days after tumor transplantation.

3) Caffeine (2.5mg/egg) was injected to yolk sac once a day for 3 continuous days after cisplatin injection.

***p* < 0.01 vs. without caffeine by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison.

Table 3. Antitumor effect by combination of cisplatin and caffeine using Athymic Mice¹⁾

	Tumor doubling time (day, mean±SD)	Tumor weight (mg, mean±SD)	Spleen weight (mg, mean±SD)	Body weight (g, mean±SD)	Relative tumor weight ratio (%) ⁵⁾
Control	2.74±0.029	1980±400	191±3.12	22.8±0.35	100.0
Caffeine, 1mg ²⁾	2.75±0.046	1850±100	173±7.62	24.2±1.04	95.9
Caffeine, 4mg ³⁾	2.84±0.035	1800±230	192±6.52	23.5±0.92	83.9
Cisplatin, 5mg ⁴⁾	2.64±0.038	1980±380	188±8.25	23.7±1.31	105.4
+ Caffeine, 1mg ²⁾	2.90±0.041	1468±292	180±4.62	23.6±0.49	91.8
+ Caffeine, 4mg ³⁾	3.10±0.062*	1320±365**	194±5.07	21.8±1.67	42.9
Cisplatin, 10mg ⁴⁾	6.65±0.041	550±40	183±3.02	22.6±0.60	25.8
+ Caffeine, 1mg ²⁾	—	285±35**	192±6.10	21.9±0.83	12.0
+ Caffeine, 4mg ³⁾	—	153±49**	189±5.72	21.2±0.98	7.6

1) Tumor cells (OST strain, 5×10^6 cells/mouse) were transplanted into the back subcutis of 7~8 week-old athymic mouse.

2) Caffeine (1mg/mouse) was injected into the peritoneal cavity once a day for 7 continuous days (after the cisplatin injection).

3) Caffeine (1mg/mouse) was injected into the peritoneal cavity once a day for 3 continuous days (after the cisplatin injection).

4) Cisplatin (5mg/kg or 10mg/kg) was injected into the peritoneal cavity.

5) According to Battelle Columbus Laboratories Protocol.

p* < 0.05; *p* < 0.01 vs without caffeine by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison.

れる。

カフェインの抗腫瘍効果について考察を加えてみると、高濃度のカフェインに突然変異を誘発する作用のあることは報告されている³⁶⁾が、カフェイン自体に制癌作用があるかどうかは不明である。Ishida らによればカフェインそのものに DNA 二重鎖を破壊する作用のあることが報告されている³⁷⁾。本実験での 2 mM カフェイン単独処置のものは、ヒト肉腫新鮮材料において 0.0% から 48.2% (平均 19.1%) のコロニー抑制率を認めたと、HTCA において感受性陽性とまで評価できるものはなかった。また、鶏卵法やヌードマウス法においてもカフェイン単独投与で有意な抗腫瘍効果を認めたものは存在しなかった。ただ、HT-1080 株では、HTCA で 2 mM カフェイン単独処置により 100% コロニー抑制率を認めたことから、カフェイン単独でも殺細胞効果の増強される場合のあることが示唆された。

次にカフェインによる制癌剤の効果増強のメカニズムについて検討を加える。細胞の DNA 合成に障害を及ぼす物質の作用が、カフェインにより増強されることは 1970 年代より報告されているが、そのメカニズムについて触れている報告は少ない。Pardee ら及び Lau らは、ナイトロジェンマスタードとカフェインの併用による殺細胞効果の増強を次のように報告している。すなわち、DNA を障害された細胞は、DNA を修復するために G₂ 期の延長を示すにいたるが、カフェインは DNA 合成を促進することにより G₂ 期を短縮させ、DNA を修復させずに細胞を分裂期に移行させるので殺細胞効果が増強されるとしている¹²⁾¹⁴⁾。また、Roberts らによれば、サルファマスタードあるいはシスプラチンとカフェインの併用による殺細胞効果の増強は、Pardee らとは逆に DNA 合成を阻害するために DNA 二重鎖が破壊されることによるとしている¹⁷⁾。また、細胞周期の点からは S 期に特異的に作用する薬剤では、カフェインが S 期の細胞に作用することにより殺細胞効果の増強が認められ¹⁰⁾¹¹⁾、紫外線やマイトマイシン C で DNA が障害された細胞では、カフェインが G₂ 期にいる細胞に作用する場合に殺細胞効果の増強が認められるという報告がなされている¹³⁾¹⁵⁾。カフェインによる制癌剤の効果増強のメカニズムは現段階においては未解明の点が多く、各制癌剤により耐性の機序が異なると考えられることからして効果増強のメカニズムも複雑多岐であることが予想される。Chinese hamster V79 細胞を用いた Iliakis らの実験では、カフェインはアドリアマイシンと併用した場合、細胞内のアドリアマイシンの濃度を減弱させると報告しており³⁸⁾、ヒト肉腫を用いた HTCA による実験で

もアドリアマイシンとカフェインの併用は最も低率な相乗効果を示した。腫瘍細胞の性質によっては、すなわち制癌剤に対する耐性機序が DNA 修復によるのか否かによってカフェインによる制癌剤の効果増強が認められる場合と認められない場合があると思われる。

本実験に限って言えば、HTCA では制癌剤とカフェインの 1 時間同時接触で相乗効果を認めず、制癌剤 1 時間接触後よりカフェインを持続接触させた場合に相乗効果を認め、単層培養を用いた実験では時間依存性にカフェインは腫瘍細胞の増殖を抑制した。このことは、カフェインが DNA 修復を阻害することにより制癌剤の効果を増強している可能性を示している。さらに、シスプラチンとカフェインを併用した場合の細胞周期の変動として S 期及び G₂/M 期の細胞の蓄積が解除されることや、増殖抑制効果及び殺細胞効果が著明な場合には、細胞核の細片化を高率に認めることから、腫瘍細胞は DNA を完全に修復できないまま分裂期に移行し死滅しているものと考えられた。すなわち、殺細胞効果の増強としては、interphase death のパターンよりはむしろ分裂期を経て死滅する reproductive death のパターンをとっていることが予想される。

最後に臨床応用への可能性を追求してみる。臨床と高い相関を示すと考えられる in vivo 制癌剤感受性試験である鶏卵法とヌードマウス法を用いて、シスプラチンの効果がカフェインにより増強されることを本実験で証明した。しかしながら、ヌードマウスの体重を約 20 g とした場合、ヌードマウスへの 4 mg のカフェインの投与は体重 60 kg のヒトにおいては約 12 g に相当し、これは、非常に強い毒性が予想される量であり、中枢神経系に重大な影響を及ぼすことが考えられる³⁹⁾。単層培養系を用いた実験では、シスプラチン投与直後からカフェインを持続接触させた場合に腫瘍細胞の倍加時間を経過した時点から抗腫瘍効果が著明になることや、シスプラチン投与 24 時間後からカフェインを投与しても 96 時間後には同等の効果を認めることから、投与時期の検討を行い、カフェインの減量投与が可能か否かを検討しなければならないと考えている。また、カフェインはキサンチン類に属する物質の 1 つであるが、カフェインと類似の分子構造を持つ物質でより毒性の少ないもので制癌剤の効果を増強しえるか否かを検討して行く必要があると思われる。さらに、腫瘍細胞が制癌剤の投与によりどのような細胞回転上の変化を認めた場合にカフェインを併用投与すれば相乗効果を認めるかの検討、あるいは制癌剤とカフェインの併用投与が有効な腫瘍と有効でない腫瘍の鑑別、治療効果の予測という点でフローサイトメト

リーによる細胞回転の変動の解析は重用である。

以上本実験において、カフェインは少なくとも4種類のDNA合成阻害作用を示す制癌剤の作用を増強し、特にシスプラチンとは著明な相乗効果を認めることが判明し、悪性骨軟部腫瘍における化学療法の限界を打破する有力な効果増強補助剤となりえる可能性が示唆された。

結 論

カフェインがDNA修復を阻害する作用を持つことに着目して、ヒト肉腫細胞を用いて制癌剤とカフェインの併用効果を種々の方法で検討し以下の結論を得た。

1. ヒト肉腫培養細胞を用いたHTCAにおいて、制癌剤とカフェインの1時間同時投与は相乗効果を認めず、制癌剤1時間投与後よりカフェインを持続接触とした場合に著明な相乗効果を認めた。

2. ヒト肉腫新鮮材料を用いたHTCAでは、シスプラチン、マイトマイシンC、サイクロフォスファミド及びアドリアマイシンの4種類のDNA合成阻害作用を示す制癌剤とカフェインが相乗効果を認め、特にシスプラチンとカフェインの併用は有効であった。

3. 単層培養系を用いたシスプラチンとカフェインの併用効果の検討では、腫瘍倍加時間を経過した時点から肉腫培養細胞に対する殺細胞効果あるいは増殖抑制効果が著明に増強し、かつ細胞回転上の変動としてS期及びG₂/M期の蓄積が解除された。

4. 鶏卵法及びヌードマウス法において、カフェインはシスプラチンの抗腫瘍効果を著明に増強し、かつ治療効果判定日における体重及び脾臓重量は、カフェインとシスプラチンの併用投与群と対照群との間に有意差を認めなかった。

5. カフェインは、DNA合成阻害作用を有する制癌剤の効果を増強することから肉腫に対する化学療法の限界を打破する有用な効果増強補助剤である可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終わるに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師野村進教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御指導御教授を戴いた富田勝郎助教授に心から感謝致します。

本研究の遂行に際し、多大の御教示と御援助を戴いたがん研究所化学療法部佐々木琢磨教授、並びに終始御協力を戴いた整形外科腫瘍班の諸先生方及びがん研究所化学療法部の先生方に感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨の一部は、第20回制癌剤適応研究会、第68回中部日本整形外科災害外科学会、第46回日本癌学会総会、及び第2回日本整形外科学会基礎学術集会において発表した。

本研究の一部は、昭和62年度文部省科学研究費補助金(C)62570680号の援助を受けたことを感謝致します。

文 献

- 1) 土屋弘行, 富田勝郎, 沼田仁成, 下崎英二, 南里泰弘, 青竹康雄, 杉原 信: 骨肉腫に対する集学的治療の検討. 整形外科, 38, 853-859 (1987).
- 2) 土屋弘行, 富田勝郎, 下崎英二, 横川明男, 野村進, 山田 浩, 赤崎外志也, 池本和彦, 松原藤継, 小田恵夫: 悪性線維性組織球腫9症例の経験. 整形外科, 36, 317-325 (1985).
- 3) 富田勝郎, 土屋弘行, 横川明男, 中西功夫: 骨の悪性線維性組織球腫-7症例の臨床・病理学的検討-. 整形外科, 37, 332-338 (1986).
- 4) Rosen, G.: Current management of Ewing's sarcoma. Prog. Clin. Cancer, 8, 267-282 (1982).
- 5) Link, M. P.: Adjuvant therapy in the treatment of osteosarcoma. In V. T. DeVita, S. Hellman & S. A. Rosenberg (eds), Important Advances in Oncology, 1st ed. p193-207, Lippincott, Philadelphia, 1986.
- 6) Gehan, E. A., Glover, F. N., Maurer, H. M., Sutow, W. W., Hays, D. W., Lawrence, W., Newton, W. A. & Soule, E. H.: Prognostic factors in children with rhabdomyosarcoma. Natl. Cancer Inst. Monogr., 56, 83-92 (1981).
- 7) 富田勝郎, 土屋弘行, 横川明男, 立石昭夫, 高田典彦, 八木知徳, 石井清一, 山脇慎也, 柿崎 寛, 千木良正機, 榎垣昇三, 川野 寿, 大幸俊三, 井上幸夫, 福島 博, 舘崎慎一郎, 新城 清, 武内章二, 内田淳正, 林 英紀, 遠藤寿男, 葉山 泉, 井上 治: 骨肉腫患肢温存の動向. 臨整外, 22, 1147-1153 (1987).
- 8) 土屋弘行, 富田勝郎: 骨肉腫に対する化学療法について. 臨整外, 1139-1146 (1987).
- 9) Van Den Berg, H. W. & Roberts, J. J.: Post-replication repair of DNA in Chinese hamster cells treated with cis-platinum (II) diammine dichloride, Enhancement of toxicity and chromosome damage by caffeine. Mutation Res., 33, 279-284 (1975).
- 10) Kihlman, B. A.: Caffeine and Chromosomes, 1st ed., p249-416, Elsevier, Amsterdam, 1977.
- 11) Roberts, J. J.: Repair of DNA modified by cytotoxic, mutagenic and carcinogenic chemicals. In Lett, J. T. & Adler, H. (eds), Advances in Radiation Biology, 7th ed. p211-436, Academic Press, New York, 1978.
- 12) Lau, C. C. & Pardee, A. B.: Mechanism by

- which caffeine potentiates lethality of nitrogen mustard. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **79**, 2942-2946 (1982).
- 13) **Palitti, F., Tanzarella, C., Degrassi, F., De Salvia, R., Fiore, M. & Natarajan, A. T.**: Formation of chromatid-type aberration in G2 stage of the cell cycle. *Mutation Res.*, **110**, 343-350 (1983).
- 14) **Pardee, A. B., Boorstein, R. J. & Lau, C. C.**: Interference with DNA repair mechanisms of mammalian cells: Cell cycle dependence. In M. Miwa (eds.), *ADP-ribosylation, DNA Repair and Cancer*, 1st ed. p287-294, Japan S.C.I. S.O.C. Press, Tokyo/V.N.U. Science Press, Utrecht, 1983.
- 15) **Hansson, K., Kihlman, B. A., Tanzarella, C. & Palitti, F.**: Influence of caffeine and 3-aminobenzamide in G2 on the frequency of chromosomal aberrations induced by thiotepa, mitomycin C and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in human lymphocytes. *Mutation Res.*, **126**, 251-258 (1984).
- 16) **Roberts, J. J.**: Mechanism of potentiation by caffeine of genotoxic damage induced by physical and chemical agents. In A. Collins, C. S. Downs & R. T. Johnson (eds.), *DNA Repair and Its Inhibition*, p193-215, I.R.L. Press, Oxford, 1984.
- 17) **Roberts, J. J. & Kotsaki-Kovatsi, V. P.**: Potentiation of sulphur mustard or cisplatin induced toxicity by caffeine in Chinese hamster cells correlates with formation of DNA double-strand breaks during replication on a damaged template. *Mutation Res.*, **165**, 207-220 (1986).
- 18) **山崎安朗**: ヒト骨肉腫由来細胞株の樹立とその形態学的観察. *十全医会誌*, **71**, 1-13 (1975).
- 19) **Rasheed, S., Nelson-Rees, W. A., Toth, E. M., Arnstein, P. & Gardner, M. B.**: Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer*, **33**, 1027-1033 (1974).
- 20) **Hamburger, A. W. & Salmon, S. E.**: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, **197**, 461-258 (1977).
- 21) **Tomita, K., Yokogawa, A. & Nomura, S.**: Human tumor clonogenic assay in osteosarcoma for evaluation of clinical efficacy of anti-cancer drugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **18**, 133-136 (1986).
- 22) **Von Hoff, D. D., Casper, J., Bradley, E., Sandbach, J., Jones, D. & Makuch, R.**: Association between human tumor colony forming assay result and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am. J. Med.*, **70**, 1027-1032 (1981).
- 23) **Veleriote, F. & Lin, S.**: Synergistic interaction of anticancer agents: A cellular perspective. *Cancer Chem. Rep.*, **59**, 895-900 (1975).
- 24) **Murphy, J. B.**: Transplantability of malignant tumors to embryos of a foreign species. *J. Am. Med. Assoc.*, **59**, 874-875 (1912).
- 25) **佐々木琢磨**: 鶏卵法による癌悪性度の判定と薬剤感受性試験. *ファルマシア*, **23**, 58-62 (1987).
- 26) **Uchida, H., Sasaki, T., Tanaka, M., Endo, Y., Nitta, K., Nishikawa, K., Chuman, H., Fukuma, H. & Mastumoto, K.**: Response to antitumor agents of murine transplantable tumors implanted onto chorioallantoic membrane of chick embryo. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **78**, 726-736 (1987).
- 27) **Ovejera, A. A., Houchens, D. P. & Barker, A. D.**: Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. *Ann. Clin. Labor. Sci.*, **8**, 50-56 (1978).
- 28) **花谷勇治, 久保田哲朗, 山田好則, 露木 建, 中田宗彦, 松本純夫, 熊井浩一朗, 吉野肇一, 石引久弥, 阿部令彦**: ヌードマウス可移植性ヒト胃・結腸癌5株を用いた実験的化学療法-Battelle Columbus Laboratories Protocolの評価を中心に. *日癌治*, **15**, 1114-1120 (1980).
- 29) **Tomita, K. & Yokogawa, A.**: Chemotherapy testing with tumor colony-forming assay for human osteosarcoma. *The Japanese Journal of Antibiotics*, **39**, 1228-1233 (1986).
- 30) **富田勝郎, 土屋弘行**: 骨肉腫に対するAdriamycinとVincristineを併用したMethotrexate大量療法の効果および制癌剤投与の検討. *整・災外*, **30**, 967-974 (1987).
- 31) **Rauth, A. M.**: Evidence for dark-reactivation of ultraviolet light damage in mouse L cells. *Radiation Res.*, **31**, 121-138 (1967).
- 32) **Waldren, C. A. & Rasko, I.**: Caffeine enhancement of X-ray killing in cultured human and rodent cells. *Radiation Res.*, **73**, 95-110 (1978).
- 33) **鶴尾 隆**: カルシウム拮抗剤による耐性の克服. *癌化学療法の進歩* (山村雄一, 杉村隆編), 図説臨床「癌」シリーズ No.1, 162-170 頁, メジカルビュー社, 東京, 1986.
- 34) **土屋弘行, 富田勝郎**: 肉腫細胞に対する制癌剤と

カフェイン及びカルシウム拮抗剤の併用効果についての検討—Clonogenic Assay 法を用いて—。日癌治, 22, 1003-1012 (1987).

35) 土屋弘行, 富田勝郎: 肉腫におけるカフェインと制癌剤との併用効果について—Clonogenic Assay を用いて—。癌と化学療法, 14, 2269-2275 (1987).

36) Timson, J.: Caffeine. Mutation Res., 47, 1-52 (1977).

37) Ishida, R., Kozaki, M. & Takahashi, T.: Caffeine alone causes DNA damage in Chinese

hamster ovary cells. Cell Structure and Function, 10, 405-409 (1985).

38) Iliakis, G. & Lazar, W.: Reduction by caffeine of adriamycin induced cell killing and DNA damage in Chinese hamster cells: Correlation with modulation in intracellular adriamycin content. Cancer Res., 47, 2224-2229 (1987).

39) Dalvi, R. R.: Acute and chronic toxicity of caffeine: A review. Vet. Hum. Toxicol., 28, 144-150 (1986).

Enhancement of the Effect of Anticancer Agents by Combined Use of Caffeine
Hiroyuki Tsuchiya, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 97, 543—556 (1988)

Key words: caffeine, anticancer agent, bone and soft-tissue sarcoma, drug sensitivity test, synergism

Abstract

The therapeutic results of treatment for malignant bone and soft tissue tumors have been remarkably improved in recent years. But the overall therapeutic results in treating sarcomas are still not satisfactory. The role of chemotherapy is important in treating both micrometastasis and primary tumor. Therefore, it is necessary to increase the effects of anticancer agents. There have been several reports that caffeine has a DNA repair-inhibiting effect and that it increases the effect of DNA-damaging agents. In this study the combined effect of anticancer agents and caffeine on human sarcomas was examined with various assay techniques. In human tumor clonogenic assay, the combined use of caffeine produced synergistic effects with four DNA-damaging anticancer agents (cisplatin, mitomycin C, cyclophosphamide and adriamycin). Particularly by the combination of cisplatin with caffeine, marked synergistic effects were observed in 14 out of 18 cases (78%) of fresh human tumor specimens. Caffeine markedly increased the cytotoxic effect of cisplatin following mitosis. At that time, the accumulation of S and G₂/M phase was reduced on the DNA histogram. Moreover, nuclear fragmentations of tumor cells were frequently observed. In assay using embryonated chicks or athymic mice, the combination of caffeine and cisplatin showed prominent antitumor effect without significant toxicity. These findings suggest the possibility that caffeine could be a useful drug capable of overcoming the limitation in chemotherapy of sarcoma, as caffeine enhanced the effect of DNA-damaging anticancer agents.