

## マウス扁平上皮癌における シスプラチン誘導性アポトーシスの基礎的研究

長内 宏夫

岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任: 関山 三郎 教授)

(受付: 1998年2月16日)

(受理: 1998年4月6日)

**Abstract :** Recently, many studies have investigated the relevance of apoptosis in tumor inhibition and anticancer drugs. As a result, was demonstrated that apoptosis was induced by many anticancer drugs. Furthermore, differences in induction by cell type are reported. Various anticancer drugs are useful for squamous cell carcinoma in the oral region, but details *in vivo* have not been demonstrated. This study examined changes in apoptosis induction in murine squamous cell carcinoma cells. As a result, apoptosis was correlated with tumor inhibition by cisplatin in murine squamous cell carcinoma cells, and apoptosis induction increased in a dose-dependent manner. Furthermore, immunohistochemical analysis showed that the expression rate of P53 protein and Bcl-2 protein correlated with the apoptotic index. Bax protein expression appears, but no further change was observed.

In this study, it was confirmed that apoptosis was induced by cisplatin in squamous cell carcinoma cells, and it was indicated that P53 protein and Bcl-2 protein levels which correlated with induction.

**Key words :** apoptosis, cisplatin, P53, Bcl-2, Bax

### 緒 言

抗癌剤による細胞死はネクローシスにより生じると考えられてきたが、近年細胞株に対する抗癌剤の実験でアポトーシスが誘導されるといういくつかの報告がみられる<sup>1-3)</sup>。また、作用機序が異なる抗癌剤を用いた報告では、いずれの薬剤もヌクレオソーム単位の DNA 切断を生じて細胞が死滅することが確認されている<sup>4)</sup>。

一方、遺伝子領域の研究から、癌遺伝子や癌抑制遺伝子として検出されてきた遺伝子のアポトーシスへの関与が認められ<sup>5-8)</sup>、放射線<sup>9)</sup>ま

たは抗癌剤<sup>10)</sup>の抗腫瘍効果への遺伝子の関与が多数報告されてきた。アポトーシス関連遺伝子蛋白の発現は細胞の種類による違いのあることが判明したが<sup>11)</sup>、口腔癌の多くを占める扁平上皮癌に対するアポトーシス誘導量の生体内における変化に関する報告は見あたらない。

そこで本研究では、口腔領域の悪性腫瘍に大きな腫瘍抑制効果を示すシスプラチンを用い、マウス扁平上皮癌に対する腫瘍抑制効果とその過程におけるアポトーシス誘導量および p53 遺伝子蛋白 (以下 P53), bax 遺伝子蛋白 (以下 Bax), bcl-2 遺伝子蛋白 (以下 Bcl-2) の変化

Basic investigation of cisplatin-induced apoptosis of murine squamous cell carcinoma cells

Hiro OSANAI

(Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University, 020-8505 Japan)

について検討したので報告する。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

岩手医科大学歯学部口腔外科学第2講座にて兄妹交配により、近交系として維持しているWHT/Ht マウス<sup>12)</sup>の雄、8～12週齢(体重28～33 g)を1群あたり5匹とし、水と固形試料(オリエンタル酵母工業)は自由に摂取させた。

### 2. 腫瘍

WHT/Ht マウスに自然発生し、胸部皮下に継代移植している扁平上皮癌細胞を使用した。この腫瘍は、Tumorigenic dose rate 50 (TD 50) 値が14.4と極めて低免疫原性である<sup>13)</sup>。

### 3. 腫瘍浮遊液の調製

近交系WHT/Ht マウスに継代移植している腫瘍を無菌的に採取し、滅菌した少量のphosphate buffered saline (以下PBS)を加え剪刀にて細切し、#150白金meshで濾過した。これにPBSを加え細胞を洗浄し、回収した細胞浮遊液を800 rpmで3回遠心洗浄し、PBSに再浮遊させて使用した。生細胞数の算定は0.2%トリパンブルー染色で行い、細胞のviabilityは各ロットとも90%以上であった。浮遊液は、血球計算板上で生細胞数を算定した後PBSで $1 \times 10^6$ 個に調製し、1.0 ml注射器(Terumo)を用いて0.1 mlをマウス胸部皮下に移植した。

### 4. 薬剤濃度および投与方法

シスプラチン(CDDP)は日本化薬より供与された。使用する濃度は0.1 mg/kg, 1.0 mg/kg, 10.0 mg/kg, 25.0 mg/kgとし、生理食塩水を用いて調製した。

シスプラチンは腹腔内投与とし、移植した腫瘍の短径が7.0 mmに達した時点から投与を開始した。対照群は生理食塩水10.0 mg/kgを投与した。

### 5. シスプラチンによる腫瘍抑制効果の判定

腫瘍体積の測定は、薬剤投与後1日目、2日目、4日目、6日目に行った。腫瘍体積は腫瘍の長径および短径をノギスにて計測し、(長径

$\times$ (短径)<sup>2</sup> $\times$ 0.5の式から求めた。腫瘍抑制効果はinhibition ratio (以下IR)として、(1-シスプラチン投与群腫瘍体積/対照群の腫瘍体積) $\times$ 100の式<sup>14)</sup>から求めた。また体重を測定し(各投与群の平均体重/対照群の平均体重)、減少率を求め副作用の指標とした。

### 6. 分割投与

シスプラチンの総投与量は、予備実験において10.0 mg/kgと腫瘍抑制効果に有意差がなく、また分割投与の容易な9.0 mg/kgとした。実験1は、初日に1回で総投与量を投与する単回投与群、実験2は3.0 mg/kgを3日連続(0, 1, 2日目)で投与する連日投与群、実験3は3.0 mg/kgを1日おき(0, 2, 4日目)に投与する隔日投与群とし、いずれの群も6日目に腫瘍を摘出した。

### 7. アポトーシス細胞と関連蛋白の経日的測定

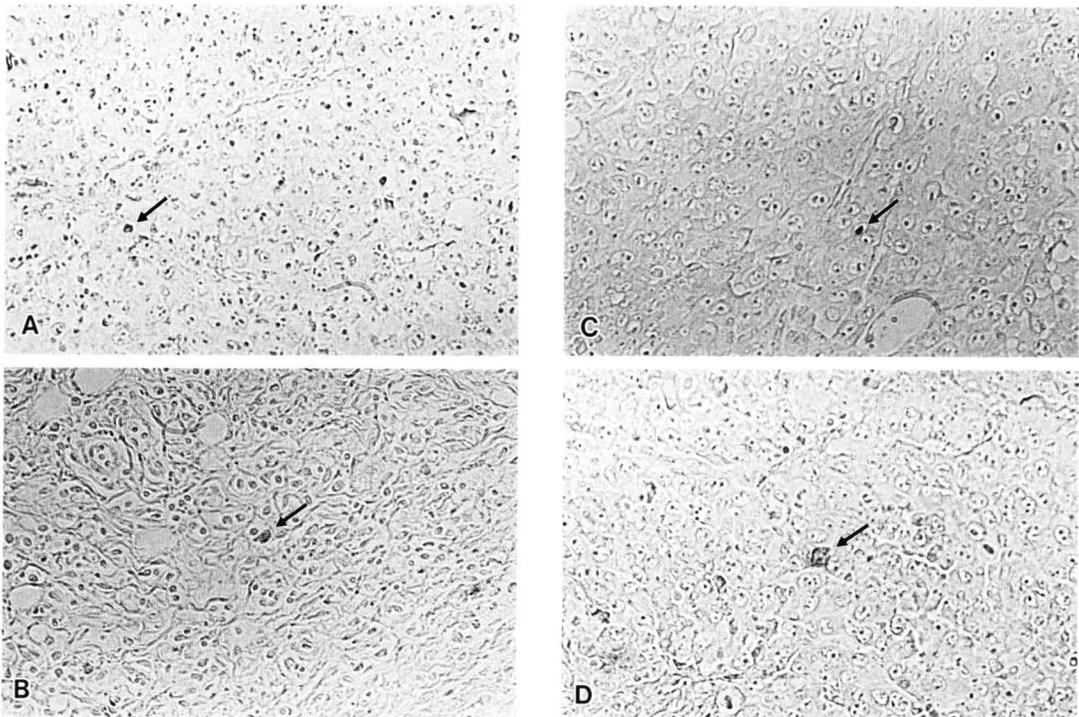
アポトーシス細胞と関連蛋白の経日的変化の測定は、予備実験より腫瘍抑制効果が最も著明であった10.0 mg/kgを単回投与し、1日目、2日目、4日目、6日目のそれぞれにおいて腫瘍を摘出し検索した。

### 8. 標本作製

各条件下で摘出した腫瘍は、直ちに10%ホルマリンで24時間固定した。腫瘍組織は通常に従いパラフィン包埋した後、ミクロトームで4.0  $\mu$ mに薄切し、組織切片として使用した。

### 9. アポトーシス細胞の検出

アポトーシス細胞の検出はTerminal deoxynucleotidyl-mediated dUTP-nick end labeling (以下TUNEL)法で行った。組織切片をProteinase K (TAKARA)で処理し、In Situ Apoptosis Detection Kit (TAKARA)を用いて標識した後、diaminobenzidine (以下DAB)で発色させた。対比染色は1%メチルグリーンを使用した。細胞数1000個(200 cells $\times$ 5視野)に対するTUNEL陽性細胞のパーセンテージをApototic Index (以下AI)として表した。negative controlとしてterminal deoxynucleotidyl transferaseの代わりに生理食塩水を使用した。



**Fig. 1.** TUNEL staining and immunohistochemical staining for P53, Bax and Bcl-2. (A) TUNEL staining ( $\times 400$ ). (B) P53 staining ( $\times 400$ ). (C) Bax staining ( $\times 400$ ). (D) Bcl-2 staining ( $\times 400$ ). Arrows indicate positive cells in murine squamous cell carcinoma cells.

## 10. 免疫組織化学的検索

組織切片は通法に従い脱パラフィンした後、3%  $H_2O_2$  で内因性ペルオキシダーゼをブロッキングした。抗 Bax ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 Bcl-2 ポリクローナル抗体 (PharMingen) を用い Pathostain ABC-POD (R) kit (WAKO) にて ABC 法で免疫組織化学的染色を行い、DAB で発色させた。同様に wild-type P53 を認識する抗 P53 モノクローナル抗体 (Calbiochem) を用いて ABC 法にて染色を行った。対比染色は 1% メチルグリーンを使用した。陽性細胞出現率は顕下 ( $100 \text{ cells} \times 5 \text{ 視野}$ ) に算定した。negative control として各免疫組織化学的染色に使用した一次抗体の代わりに、生理食塩水を用いて染色を行った (Fig. 1)。

## 11. 統計学的処理

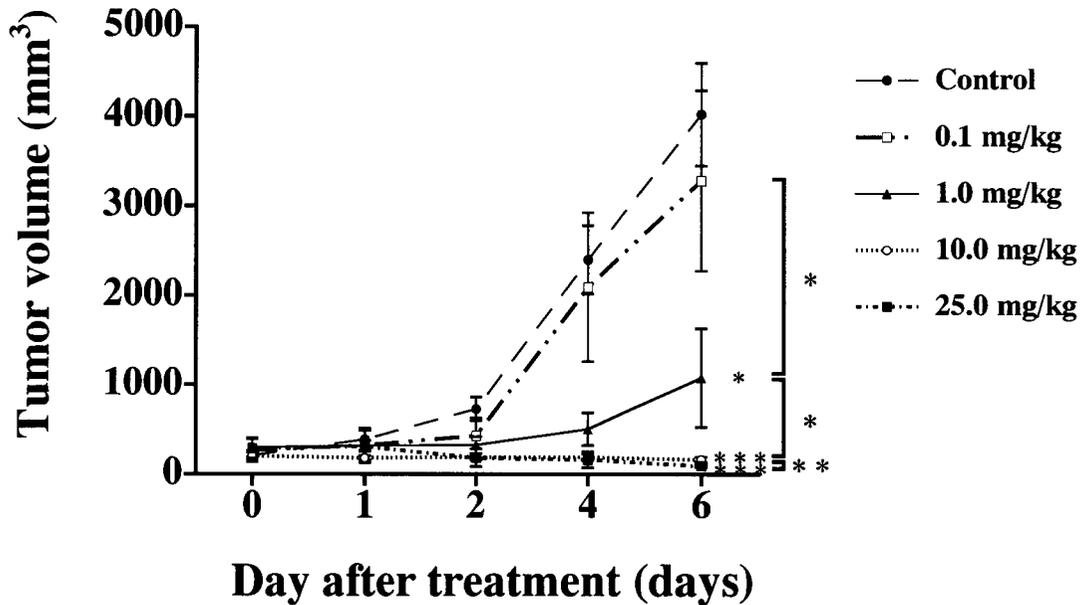
統計学的処理は Student's *t*-test で行い、 $p < 0.05$  を有意差とした。

## 結 果

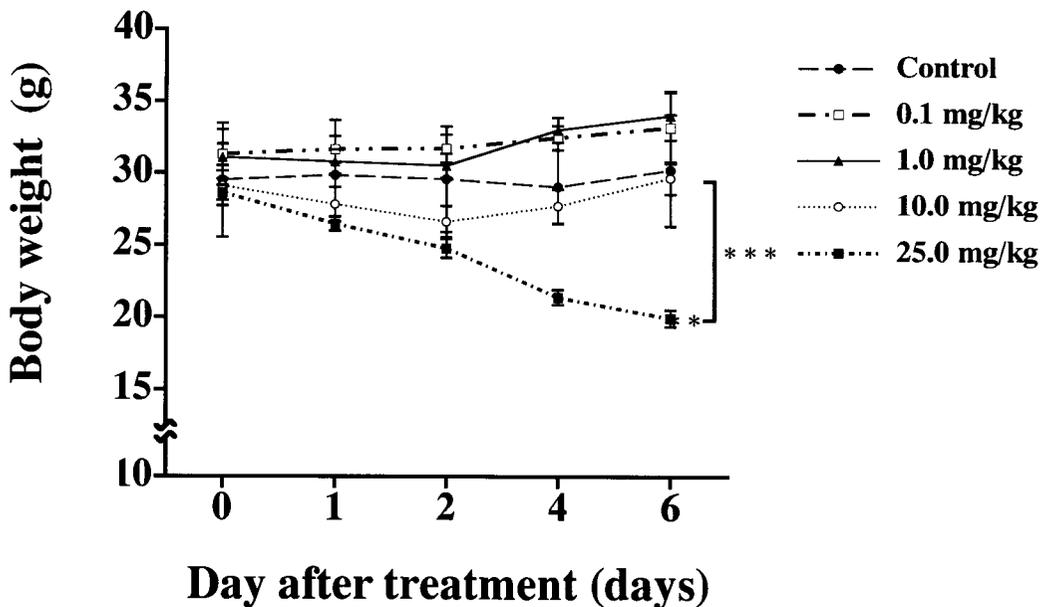
### 1. WHT/Ht マウス扁平上皮癌に対するシスプラチンの腫瘍抑制効果

シスプラチン投与後 6 日目の平均腫瘍体積 (mean  $\pm$  SD) は、対照群では  $4023.9 \pm 574.2 \text{ mm}^3$  であった。対照群とシスプラチン投与群との比較では、0.1 mg/kg 投与群は 6 日目に  $3282.2 \pm 1006.5 \text{ mm}^3$  (IR, 19.4%) となり有意差は認められなかったが、1.0 mg/kg 投与群、10.0 mg/kg 投与群および 25.0 mg/kg 投与群では 2 日目から腫瘍の増殖が有意に抑制され始め、6 日目にはそれぞれ  $1078.5 \pm 550.4 \text{ mm}^3$  (IR, 73.2%),  $164.6 \pm 28.6 \text{ mm}^3$  (IR, 96.0%),  $93.2 \pm 15.5 \text{ mm}^3$  (IR, 98.7%) と顕著な抑制効果が認められた (Fig. 2)。

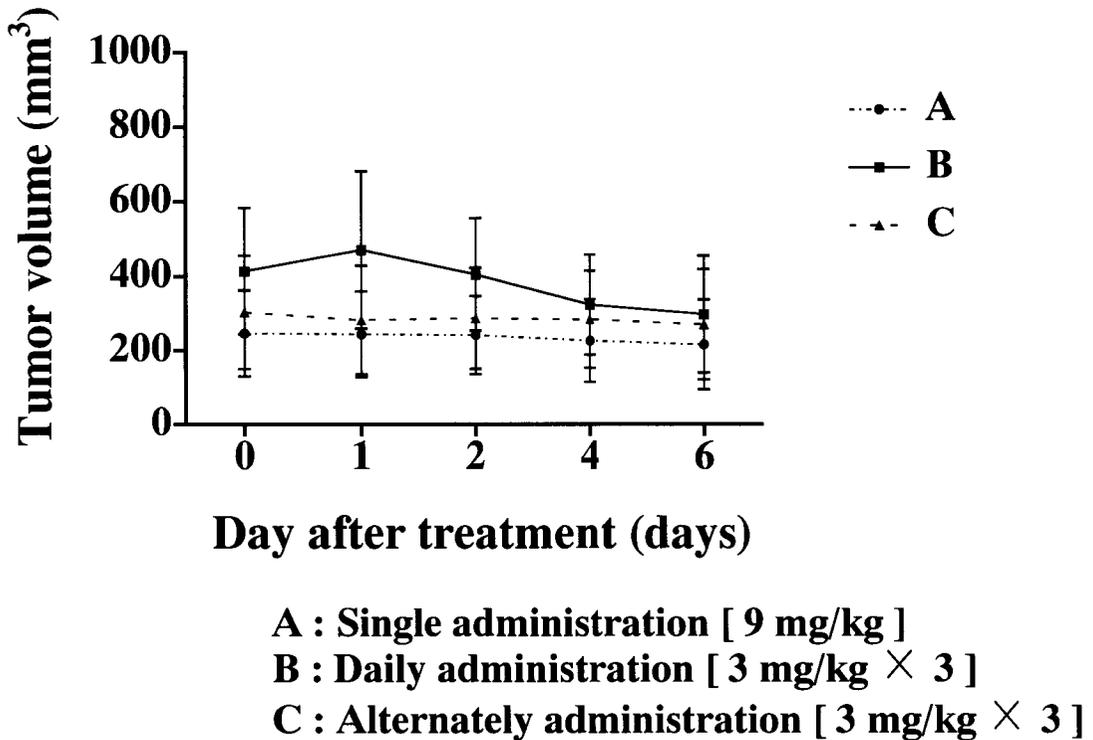
シスプラチン投与後のマウスの体重は、0.1 mg/kg 投与群では対照群とほぼ同様の変化を示し、両者間に差はなく、1.0 mg/kg と 10.0 mg/kg の両群では一時的な減少を認めたが 6 日目には



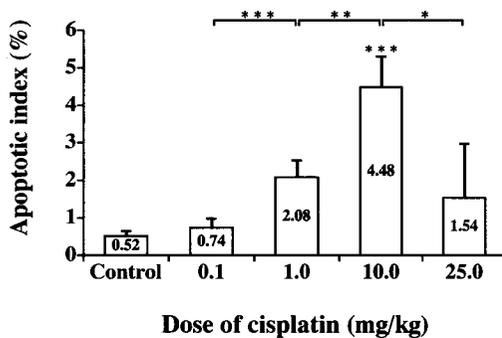
**Fig. 2.** Inhibition of tumor volume by cisplatin. Squamous cell carcinoma cells were subcutaneously injected into WHT/Ht mice. Cisplatin administration was initiated when the diameter of the inoculated tumor reached 7.0 mm. The 1.0, 10.0 and 25.0 mg/kg groups showed significant inhibition of tumor volume on the 6th day. Significance was determined by Student's *t*-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Bars, SD.



**Fig. 3.** Body weight of mice treated with cisplatin. The 25.0 mg/kg group showed significant decreases in body weight on the 6th day. Significance was determined by Student's *t*-test (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Bars, SD.



**Fig. 4.** Relationship between tumor volume and cisplatin administration methods. Mice were treated by each administration method. Significant differences were not observed among the A, B and C groups. Significance was determined by Student's *t*-test. Bars, SD.



**Fig. 5.** Relationship between dose of cisplatin and apoptotic index. Tumors treated with each dose of cisplatin were stained with the TUNEL method on the 6th day. Apoptotic Index increased dose dependently. Significance was determined by Student's *t*-test (\**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001). Bars, SD.

実験当日のレベルに回復した。これらの6日目における平均体重は、98.1～112.6%であった。しかし、25.0 mg/kg投与群では有意に体重が減少し、6日目の平均体重は66.1%であり回復の傾向は認められなかった (Fig. 3)。

分割投与による腫瘍抑制効果は単回投与群、連日投与群、隔日投与群の各群間に差は認められなかった (Fig. 4)。

## 2. シスプラチン濃度に対するAIとアポトーシス関連蛋白の発現率

シスプラチン投与後6日目のAIは、対照群では0.52 ± 0.13%であり、0.1 mg/kg投与群の0.74 ± 0.24%との間に差はなかった。しかし、1.0 mg/kg投与群では2.08 ± 0.44%、25.0 mg/kg投与群では1.54 ± 1.43%と有意に増加した。また、最高値は10.0 mg/kg投与群での4.48 ± 0.82%であった (Fig. 5)。

**Table 1.** Relation between dose of cisplatin and apoptosis associated protein at six days experiment

Dose (mg/kg)	Apoptosis associated protein (%) (mean±SD)		
	p53	Bax	Bcl-2
Control	5.64±0.52	23.97±2.49	30.63±2.26
0.1	5.72±1.08	24.88±4.31	27.07±4.58
1.0	7.16±1.77	25.37±4.74	20.13±2.66 ***
10.0	9.52±0.80 ***	25.15±3.63	18.40±2.70 ***
25.0	8.94±0.73 **	25.60±2.94	19.55±2.96 *

The statistical significance was determined by Student's *t*-test. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

シスプラチン投与量別に見た P 53 の発現率は、対照群では  $5.64 \pm 0.52\%$  であったのに対し、0.1 mg/kg 投与群では  $5.72 \pm 1.08\%$ 、1.0 mg/kg 投与群では  $7.16 \pm 1.77\%$ 、10.0 mg/kg 投与群では  $9.52 \pm 0.80\%$  であり、濃度依存的に増加傾向を示した。それに反し、Bcl-2 の発現率は 1.0 mg/kg 以上の濃度において有意に減少した。Bax の発現率は、大きな変化はみられなかった。各測定値間で大きな有意差を示したのは 10.0 mg/kg 投与群であった (Table 1)。

### 3. シスプラチン投与後の AI とアポトーシス関連蛋白の経日的変化

シスプラチン 10.0 mg/kg 投与群の AI の変化を経日的に観察した。AI は、生理食塩水 10.0 mg/kg を投与した 6 日後の対照群では  $0.52 \pm 0.13\%$  であったのに対し、シスプラチン投与後 1 日目では  $2.62 \pm 0.80\%$  であった。AI は、2 日目には  $3.60 \pm 0.56\%$  と有意に増加し、6 日目には  $4.48 \pm 0.82\%$  と増加を続けた (Fig. 6)。

P 53 の発現率は、対照群に比較して 2 日目から 4 日目に有意な増加が認められた。逆に Bcl-2 は、6 日目には減少傾向が認められた。Bax 発現には大きな変化は認められなかった (Table 2)。

### 4. シスプラチン分割投与による AI とアポトーシス関連蛋白の発現率

AI は、単回投与群では  $4.56 \pm 0.80\%$ 、連日投与群では  $5.42 \pm 1.45\%$ 、隔日投与群では  $4.74 \pm 0.79\%$  と連日投与群にわずかな増加が見られたが、有意差はなかった (Fig. 7)。

各分割投与法による P 53 および Bax の発現

率には差を認めず、Bcl-2 の発現率も隔日投与群においてわずかな変化が認められただけであった (Table 3)。

## 考 察

癌に対する化学療法は、ここ数十年の間に新たな抗癌剤の開発、およびその組み合わせにより進歩してきた。しかし、固形癌に対する縮小効果は、個体差によって大きく左右されるために、従来行われてきた投与方法では腫瘍の発生や経過の異なる症例すべてに対して効果を得ることは不十分であった。したがって、より効果的に抗腫瘍効果を導くためにも、抗癌剤に対する新たな選択基準および投与方法の検討が必要と考えられている。この様な理由から、抗癌剤によるアポトーシス誘導が注目されてきた<sup>15)</sup>。

今回使用したシスプラチンは Rosenberg ら<sup>16,17)</sup>によって腫瘍に対する有効性が見いだされ、その広い抗腫瘍スペクトルより臨床的に頭頸部癌にも使用されるようになった<sup>18)</sup>。現在、シスプラチンは口腔癌に対する主要な抗癌剤として様々な regimen が検討され<sup>19-21)</sup>、臨床的に広く使用されている。その作用機序は、細胞周期 G 2-M 期停止による DNA 合成阻害<sup>22,23)</sup>の後、ATP 活性の低下に伴うライソゾームの酵素群が働き、胞体の維持ができなくなることによってネクローシスを起こすためと考えられてきた<sup>24,25)</sup>。しかし、近年の研究から抗癌剤の腫瘍抑制効果は、アポトーシスの誘導に少なからず依存していることが示されている<sup>26)</sup>。

アポトーシスは 1972 年 Kerr ら<sup>27)</sup>によって形

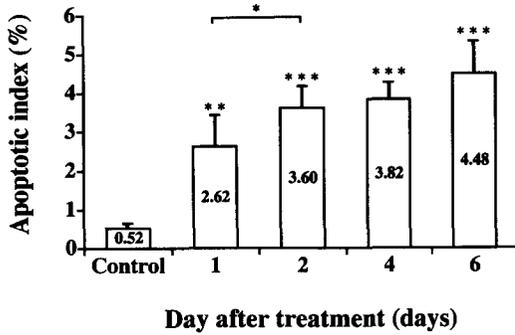


Fig. 6. Relationship between duration of administration and apoptotic index. The tumor was treated with 10.0 mg/kg of cisplatin, and stained with the TUNEL method. Apoptotic index increased time dependently. Significance was determined by Student's *t*-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Bars, SD.

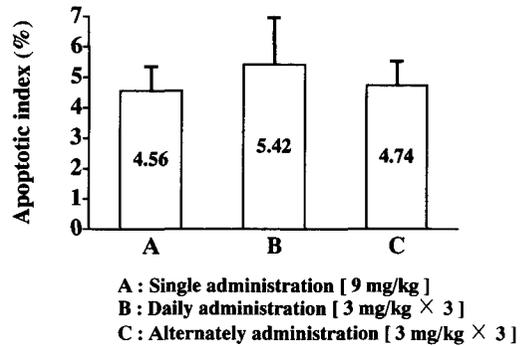


Fig. 7. Relationship between administration methods and apoptotic index. Significant differences were not observed among the A, B and C groups on the 6th day. Significance was determined by Student's *t*-test. Bars, SD.

Table 2. Relation between duration of administration and apoptosis associated protein

Day	Apoptosis associated protein (%) (mean ± SD)		
	p53	Bax	Bcl-2
Control	5.64 ± 0.52	23.97 ± 2.49	30.63 ± 2.26
1	5.40 ± 1.23	25.20 ± 5.09	34.37 ± 4.61
2	6.16 ± 0.84	26.93 ± 3.05	34.47 ± 5.94
4	7.56 ± 0.43 **	23.73 ± 3.08	30.47 ± 3.22
6	9.52 ± 0.80 ***	25.15 ± 3.63	18.40 ± 2.70 ***

The statistical significance was determined by Student's *t*-test. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

態的にネクロシスとは異なる現象として報告された。アポトーシスは細胞質や核クロマチンが濃縮し、クロマチンや細胞内小器官を含む小体(アポトーシス小体)に分断された後、周囲の貪食細胞によって処理される。そのためアポトーシスでは炎症反応はみられないとされている。

アポトーシス細胞の検出法には、DNA ラダーによる生化学的検出法<sup>28)</sup>、顕微鏡および電顕的観察による形態学的検出法<sup>27, 29)</sup>、フローサイトメトリーを用いた解析などがある<sup>30~32)</sup>。

1992年 Gavrieli ら<sup>33)</sup>によって報告された形態学的検出法の1つである TUNEL 法は、ヌクレオソーム単位に切断された DNA 3'-OH 末端に TdT がデオキシヌクレオチドを付加する

反応を利用したものである。この方法を利用すると、パラフィン切片上でも容易にアポトーシス細胞の検出が可能となり、顕微鏡的に把握できないアポトーシス初期細胞も可視化できる利点がある<sup>34)</sup>。

p53 遺伝子は、代表的な癌抑制遺伝子として知られ<sup>35, 36)</sup>、変異型が多く腫瘍細胞に見られることから<sup>37, 38)</sup>悪性腫瘍に深く関与していると考えられている。現在までに様々な追究がなされ p53 遺伝子の機能が次第に明らかになってきたが、その過程でアポトーシスにも関与することが報告された<sup>39)</sup>。

また、1984年に辻本ら<sup>40)</sup>によって癌遺伝子として発見された bcl-2 遺伝子は、遺伝子産物である Bcl-2 がそれ自身でホモダイマーを形成

**Table 3.** Relation between administration methods and apoptosis associated protein at six days experiment

Method	Apoptosis associated protein (%) (mean±SD)		
	p53	Bax	Bcl-2
A	8.08±0.71	31.58±2.41	24.37±4.55
B	7.72±1.19	32.43±3.84	24.00±1.95
C	7.96±1.62	32.73±4.39	23.10±4.23

The statistical significance was determined by Student's *t*-test.

したときアポトーシス抑制機能を持つことが判明した<sup>41)</sup>。さらに、bcl-2 homology domain と呼ばれる一部の配列が多数の遺伝子に共通して存在することが解明され、その配列を有する遺伝子群は bcl-2 ファミリーと呼ばれ、相互関係によってアポトーシスの調節に関与することが報告されている。bcl-2 homology domain は bcl-2 遺伝子塩基配列の中で現在までに 4 種類 (BH 1, BH 2, BH 3, BH 4) が発見されており、どの種類の domain を持つのかによっていくつかのサブファミリーに分類される。

bax 遺伝子は BH 1, BH 2, BH 3 を持つことから bax サブファミリーに属し、Oltvai ら<sup>42)</sup>によって発見された。遺伝子産物である Bax は Bcl-2 とヘテロダイマーを形成するか、それ自身でホモダイマーを形成することができる。Bax と Bcl-2 のヘテロダイマーの機能は Bcl-2 と Bax の比によって、Bcl-2 が過剰に発現した際はアポトーシス抑制に働き、Bax が過剰発現した際はアポトーシスを促進する方向に機能すると考えられている<sup>43)</sup>。

本研究では、腫瘍の抑制に伴う AI の増加を認め、それに対応するように P 53 の発現増加と Bcl-2 の発現減少が見られた。P 53 の量が増加したのは、DNA 損傷を認識することによって p 53 遺伝子が活性化され、遺伝子産物が過剰発現されたものと考えられる。P 53 の増加に伴って、AI が増加傾向を示していることから、P 53 がアポトーシスを誘導したことは明らかである。また、アポトーシスを抑制するとされる Bcl-2 の減少が P 53, AI の増加に伴って認められたことから、Bcl-2 はシスプラチン誘導性アポトーシスの抑制に関与し、P 53 にも関連

していると考えられた。P 53 は Bcl-2 の発現を間接的または直接的に抑制すると考えられるが<sup>44, 45)</sup>、その詳細は明かではない。

また、Bax はアポトーシス誘導経路において P 53 の下流に存在するため、P 53 の増加に対応した増加傾向を示すものと予想されたが、一定の発現量を示したものの大きな変化は見られなかった。Bax は組織特異性があまりなく、広く発現していることから<sup>42)</sup>、本研究では通常レベルの発現量を認識したものと考えられた。

p 53 遺伝子によるアポトーシス誘導は、ターゲット遺伝子としていくつかの遺伝子候補が存在し、bax 遺伝子の活性化のみでは説明できないことが判明している<sup>46)</sup>。本研究の結果は、p 53 遺伝子のアポトーシス誘導経路への他のアポトーシス関連因子の関与を示すものであった。

また、Bcl-2 の過剰発現は抗癌剤への耐性に関与するとの報告がなされており<sup>47)</sup>、本研究の結果は、腫瘍抑制効果を判定できるだけでなく、シスプラチンに対する耐性を投与後の早期に判定する指標となり得る可能性が考えられた。

本研究では、シスプラチン 1.0 mg/kg, 10.0 mg/kg, 25.0 mg/kg の各投与群では腫瘍体積の抑制と AI の増加とを認め、アポトーシス誘導が濃度依存性であることを示していた。

一方、シスプラチンの分割投与は腫瘍抑制効果、AI およびアポトーシス関連蛋白の発現に有意な差を示さなかった。シスプラチン投与のアポトーシス誘導効果が濃度依存性であることから、この結果はシスプラチンの単剤投与では総投与量が効果を左右し、分割投与は大きく影

響しないためと考えられた。

扁平上皮癌に対してアポトーシス誘導を積極的に治療に応用しようとするとき、本研究の結果は p53 遺伝子や bcl-2 遺伝子がターゲットに適することを示している。本研究では、アポトーシス誘導のピークを示標としたが、今後、抗癌剤の作用として考えられる G1 期ブロック、G2 期ブロックなど細胞周期との関連において解明されるならば、治療効果の改善という臨床の目標にも役立つことが期待される。

### 結 論

シスプラチン投与によって WHT/Ht マウスの扁平上皮癌細胞に誘導されるアポトーシス量(AI)とアポトーシス関連蛋白 P53, Bax, Bcl-2 の発現量を検討したところ、以下の結論を得た。

1. シスプラチンによって誘導発現された AI は経日的、および濃度依存的に増加した。
2. シスプラチンによる腫瘍体積の減少に伴う AI の増加は、アポトーシスによる腫瘍の増殖抑制効果を反映したものとみなされた。
3. シスプラチンによるアポトーシス誘導には、総投与量が影響していた。
4. 扁平上皮癌に対するシスプラチンのアポトーシス誘導経路には、P53 と Bcl-2 が関与することが示唆された。
5. Bax の発現量は、ほとんど変動がなかった。

稿を終えるにあたり、御懇篤な指導と校閲を賜りました恩師関山三郎教授に深甚なる謝意を捧げます。また、御懇切な助言を賜りました本学口腔病理学講座佐藤方信教授に衷心より謝意を捧げます。さらに、本研究の遂行に際し御親切な助言を頂きました当講座杉山芳樹助教授に深く感謝するとともに、口腔外科学第二講座医局員各位に心より謝意を表します。

本論文の要旨は、1997年10月23日、第42回口腔外科学会総会、第13回国際口腔顎顔面

外科学会総会において発表した。

### 文 献

- 1) Dyson, J. E., Simmons, D. M., Daniel, J., McLaughlin, J. M., Quirke, P., and Bird, C. C. : Kinetic and physical studies of cell death induced by chemotherapeutic agents or hyperthermia. *Cell & Tissue Kinetics* 19 : 311-324, 1986.
- 2) Lorico, A., Toffoli, G., Boiocchi, M., Erba, E., Broggin, M., Rappa, G., and D'Incalci, M. : Accumulation of DNA strand breaks in cells exposed to methotrexate or N 10 -propargyl- 5,8 -dideazafolic acid. *Cancer Research* 48 : 2036-2041, 1988.
- 3) Yoshioka, A., Tanaka, S., Hiraoka, O., Koyama, Y., Hirota, Y., Ayusawa, D., Seno, T., Garrett, C., and Wataya, Y. : Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-Fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *Journal of Biological Chemistry* 262 : 8235-8241, 1987.
- 4) Kaufmann, S. H. : Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Research* 49 : 5870-5878, 1989.
- 5) Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J. M. : Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335 : 440-442, 1988.
- 6) Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z., and Hancock, D. C. : Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69 : 119-128, 1992.
- 7) Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G., and Thompson, C. B. : bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74 : 597-608, 1993.
- 8) Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S. J. : Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80 : 285-291, 1995.
- 9) Mori, N., Okumoto, M., Morimoto, J., Imai, S., Matsuyama, T., Takamori, Y., and Yagasaki, O. : Genetic analysis of susceptibility to radiation-induced apoptosis of thymocytes in mice. *International Journal of Radiation Biology* 62 : 153-159, 1992.
- 10) Eastman, A. : Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells* 2 : 275-280, 1990.

- 11) Lennon, S. V., Martin, S. J., and Cotter, T. G. : Induction of apoptosis (programmed cell death) in tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Biochemical Society Transactions* 18 : 343-345, 1990.
- 12) Hewitt, H. B., and Sakamoto, K. : The comparative survival of clonogenic cells of a murine epithelioma after irradiation in mice breathing air, oxygen and carbon dioxide, or hyperbaric oxygen. *British Journal of Radiology* 44 : 457-463, 1971.
- 13) Hewitt, H. B., Blake, E. R., and Walder, A. S. : A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. *British Journal of Cancer* 33 : 241-259, 1976.
- 14) Povlsen, C. O., and Jacobsen, G. K. : Chemotherapy of a human malignant melanoma transplanted in the nude mouse. *Cancer Research* 35 : 2790-2796, 1975.
- 15) Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. : Cell death : the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 68 : 251-306, 1980.
- 16) Rosenberg, B., VanCamp, L., and Krigas, T. : Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205 : 698-699, 1965.
- 17) Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J. E., and Mansour, V. H. : Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 222 : 385-386, 1969.
- 18) Merrin, C. E. : Treatment of genitourinary tumours with cis-dichlorodiammineplatinum (II) : experience in 250 patients. *Cancer Treatment Reports* 63 : 1579-1584, 1979.
- 19) Ervin, T. J., Weichselbaum, R., Miller, D., Meshad, M., Posner, M., and Fabian, R. : Treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck with cisplatin, bleomycin, and methotrexate (PBM). *Cancer Treatment Reports* 65 : 787-791, 1981.
- 20) 高岡哲郎, 楠山敏行, 神尾尚彦, 大平達郎, 坂口良平, 大熊敦子, 井上泰宏, 酒向 司 : 頭頸部悪性腫瘍に対する Adriamycin 類, Cisplatin (CDDP), Peplomycin (PEP) による併用療法について 耳鼻と臨床 36 : 491-495, 1990.
- 21) 白幡雄一, 山崎司夫, 青木 基, 望月幸夫, 青柳裕 : 頭頸部癌に対する Cis-Diamminedichloroplatinum (CDDP) と 5-Fluorouracil (5-Fu) 併用化学療法 耳鼻展 31 : 647-653, 1988.
- 22) Sorenson, C. M., and Eastman, A. : Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum (II) -induced cytotoxicity : role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Research* 48 : 4484-4488, 1988.
- 23) Shinomiya, N., Tsuru, S., Katsura, Y., Sekiguchi, I., Suzuki, M., and Nomoto, K. : Increased mitochondrial uptake of rhodamine 123 by CDDP treatment. *Experimental Cell Research* 198 : 159-163, 1992.
- 24) Miller, R. C., Richards, M., Baird, C., Martin, S., and Hall, E. J. : Interaction of hyperthermia and chemotherapy agents; cell lethality and oncogenic potential. *International Journal of Hyperthermia* 10 : 89-99, 1994.
- 25) Zwelling, L. A., and Kohn, K. W. : Mechanism of action of cis-dichlorodiammineplatinum (II). *Cancer Treatment Reports* 63 : 1439-1444, 1979.
- 26) Barry, M. A., Behnke, C. A., and Eastman, A. : Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochemical Pharmacology* 40 : 2353-2362, 1990.
- 27) Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. : Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26 : 239-257, 1972.
- 28) Kerr, J. F. R., Harmon, B. V. Definition and incidence of apoptosis : A historical perspective. Cold spring harbor laboratory press, New York : 5-29, 1991.
- 29) Dini, L., Coppola, S., Ruzittu, M. T., Ghibelli, L. : Multiple pathways for apoptotic nuclear fragmentation. *Experimental Cell Research* 223 : 340-347, 1996.
- 30) Gold, R., Schmied, M., Giegerich, G., Breitschopf, H., Hartung, H. P., Toyka, K. V., Lassmann, H. : Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Laboratory Investigation* 71 : 219-225, 1994.
- 31) Swat, W., Ignatowicz, L., Kisielow, P. : Detection of apoptosis of immature CD4+8+ thymocytes by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 137 : 79-87, 1991.
- 32) Gorczyca, W., Melamed, M. R., Darzynkiewicz, Z. : Apoptosis of S-phase HL-60 cells induced by DNA topoisomerase inhibitors: detection of DNA strand breaks by flow cytometry using the in situ nick translation assay. *Toxicology Letters* 67 : 249-258, 1993.
- 33) Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A. : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology* 119 : 493-501, 1992.
- 34) Wijsman, J. H., Jonker, R. R., Keijzer, R., van de Velde, C. J., Cornelisse, C. J., and van Dierendonck, J. H. : A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 41 : 7-12, 1993.
- 35) Mercer, W. E., Shields, M. T., Amin, M., Sauve,

- G. J., Appella, E., Romano, J. W., and Ullrich, S. J. : Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 : 6166-6170, 1990.
- 36) Baker, S. J., Markowitz, S., Fearon, E. R., Wilson, J. K., and Vogelstein, B. : Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249 : 912-915, 1990.
- 37) Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S. H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., Glover, T., Collins, F. S., Weston, A., Modali, R., Harris, C. C., and Vogelstein, B. : Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342 : 705-708, 1989.
- 38) Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C. : p53 mutations in human cancers. *Science* 253 : 49-53, 1991.
- 39) Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M. : Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352 : 345-347, 1991.
- 40) Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C. M. : Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228 : 1440-1443, 1985.
- 41) Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S., Iwama, N., Boise, L. H., Thompson, C. B., Golemis, E., Fong, L., Wang, H. G., and Reed, J. C. : Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 : 9238-9242, 1994.
- 42) Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. : Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74 : 609-619, 1993.
- 43) Yin, X. M., Oltvai, Z. N., and Korsmeyer, S. J. : BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369 : 321-323, 1994.
- 44) Wang, Y., Szekely, L., Okan, I., Klein, G., Wiman, K. G. : Wild-type p53-triggered apoptosis is inhibited by bcl-2 in a v-myc-induced T-cell lymphoma line. *Oncogene* 8 : 3427-31, 1993.
- 45) Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., Reed, J. C. : Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9 : 1799-1805, 1994.
- 46) Knudson, C. M., Tung, K. S., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A., and Korsmeyer, S. J. : Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*. 270 : 96-99, 1995.
- 47) Fisher, T. C., Milner, A. E., Gregory, C. D., Jackman, A. L., Aherne, G. W., Hartley, J. A., Dive, C., and Hickman, J. A. : bcl-2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways. *Cancer Research*. 53 : 3321-3326, 1993.