
原 著

頭頸部癌に対するスラミンの抗腫瘍効果

近 藤 昭 男

徳島大学耳鼻咽喉科学教室 (主任: 小池靖夫教授)

(平成10年9月2日受付)

スラミンは、アフリカトリパノソーマ症の治療剤として開発されたが、最近、副腎癌や前立腺癌などの悪性腫瘍に対して抗腫瘍効果を持つことが判明した。しかし、頭頸部領域の癌に対してはスラミンの抗腫瘍効果は知られていない。この研究は頭頸部領域の癌に対するスラミンの抗腫瘍効果を調査するために行った。

悪性細胞として扁平上皮癌細胞、甲状腺未分化癌細胞を使用し、正常細胞としてマウス皮下組織細胞を使用した。それぞれの細胞は各種濃度 (0, 50, 100, 200, 300, 500, 1000 μ M) のスラミンを添加し、37 $^{\circ}$ C, 72時間培養し、パパニコロウ染色を行った。

扁平上皮癌細胞は100 μ M以上で、甲状腺未分化癌細胞は50 μ M以上で細胞増殖抑制効果を認めた。マウス皮下組織細胞は300 μ M以上という高濃度で細胞増殖抑制効果を認めた。形態的には、スラミンは扁平上皮癌細胞、甲状腺未分化癌細胞の分化度を向上させた。しかし、マウス皮下組織細胞では形態変化を認めなかった。

スラミンは、頭頸部領域の癌に対して抗腫瘍剤となりうる可能性が示唆された。

スラミンは、元来、アフリカトリパノソーマ症の治療剤として使用されてきた¹⁾。1979年に De Clercq²⁾が、スラミンがRNA腫瘍ウイルスに関係する reverse transcriptase 活性を抑制することを発見してから、多数の研究が行われるようになった。そこで、スラミンについて、現在まで報告されていることを以下にまとめた。

1. 歴史

スラミンは、1904年に抗寄生虫活性が初めて報告され、1916年に化学合成された。1920年代初期に、アフリカにてヒトリパノソーマ症の治療薬として臨床試験が

行われた^{1,3)}。1930年代初期に、薬剤投与後の副作用として副腎皮質障害の発生率が増加したことが報告された⁴⁾。1979年に De Clercq は、低濃度のスラミンがRNA腫瘍ウイルスの reverse transcriptase 活性を抑制することを観察した²⁾。1984年に、Mitsuya らが HIV に対してのスラミン効果を研究し、in vitro において HIV の感染性や細胞変性がスラミンにより阻止されることを証明した⁵⁾。1984年に、AIDS 及び AIDS-related complex の10人の患者に試験的に使用され、4人に in vivo においてウイルスに対して効果があったが、臨床的及び免疫的改善はなかった⁶⁾。1985年に、Levine らは、AIDS や B-cell lymphoma の日和見感染の12人にスラミンを投与したが、誰も免疫改善を示さなかった⁷⁾。1980年代は AIDS に対して数多く研究されたが、AIDS の治療剤とはなりえなかった。その研究過程において、副腎癌、前立腺癌に対して、抗腫瘍効果があることがわかってきた。最近10年間で、多くの特性が調べられ、ある細胞ラインの増殖を刺激する能力が報告されている⁸⁻¹⁰⁾。Spigelman ら¹¹⁾はリンパ細胞に対し、Guo ら¹²⁾は神経細胞の増殖抑制の効果、Dorfinger ら¹³⁾は上皮細胞の増殖抑制の効果を報告した。

2. 作用機序

スラミンが抗腫瘍効果を発揮する作用機序は、第一に、スラミンが epidermal growth factor (EGF) という腫瘍成長因子と結合し、腫瘍成長因子がそのレセプターに結合するのを阻止する働きがある¹⁴⁻¹⁷⁾。また、他の成長因子として platelet-derived growth factor (PDGF)^{14, 18-22)}、tumor growth factor-beta (TGF- β)¹⁵⁾ と結合することで腫瘍成長因子がそのレセプターに結合するのを阻止すると報告されている。第二に、glycosaminoglycan を血中に増加させる。glycosaminoglycan は腫瘍細胞の成長に必要な脈管形成を阻止し、結果として腫瘍成長を阻止す

る働きがあると報告されている²³⁻²⁶⁾。第三に、腫瘍成長の促進や分泌などに必要な protein kinase C を抑制することで、腫瘍細胞の成長を阻止すると報告されている^{10,27)}。第四に、DNA 合成の抑制することで、腫瘍細胞の成長を阻止すると報告されている²⁸⁾。以上のことが、複数に絡み合っただ腫瘍細胞に作用している可能性があり、結果としてスラミンが抗腫瘍効果を持つと推測される。

3. 基礎実験及び臨床試験

上記の抗腫瘍効果の作用に基づいての基礎実験や臨床試験は以下のことが報告されている。in vitro での培養細胞を用いたスラミンの抗腫瘍効果の基礎的な実験において、前立腺癌細胞^{29,30)}、副腎癌細胞^{13,31-33)}、大腸癌細胞^{8,9)}、神経系の悪性細胞^{10,12,34)}、リンパ系の悪性細胞¹¹⁾が報告されている。いずれにおいても、スラミンが腫瘍細胞の増殖を阻止すると報告されている。臨床面からの報告としては、スラミンが RNA 腫瘍ウイルスに関係する reverse transcriptase 活性を抑制することを発見されたのを契機に²⁾、1984年に in vitro で HIV の複製を抑制することが報告された⁵⁾。よって、臨床的研究はまず AIDS から始まった。1985年より AIDS 患者の治療に使用された^{6,35,36)}。しかし、1986年に AIDS ウイルス血症は抑制するが、患者の副作用の問題があったり、免疫機能の改善を認めなかった報告があり⁷⁾、1987年には AIDS に対して無効であると結論付けられた³⁷⁾。しかし、その研究過程で、抗癌剤としての可能性があるとの期待が生じた³⁸⁾。そして、抗癌剤としての臨床使用は、1989年に副腎癌^{31,39-42)}に使用された。1990年からは前立腺癌^{43,44)}にも使用された。そして、いずれにおいても、抗腫瘍効果があると報告されている。しかし、一方では、1995年に結腸癌に対して臨床試験が施行されたが、効果がなかったという報告もある⁴⁵⁾。

4. 有効濃度

スラミンが作用するために有効な濃度は、in vitro での培養実験では以下のごとくである。前立腺癌細胞では 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上で細胞増殖を抑制するという報告²⁹⁾があり、また 300 $\mu\text{g/ml}$ 以上で細胞増殖を抑制するという報告³⁰⁾もある。副腎癌細胞では 150 $\mu\text{g/ml}$ あるいは 350 $\mu\text{g/ml}$ 以上で細胞増殖を抑制するという報告³¹⁾である。大腸癌細胞では 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上で細胞増殖を抑制するという報告⁸⁾である。神経系の悪性細胞では 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上で細胞増殖を抑制するという報告¹²⁾である。そして、リンパ系の悪性細胞では 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上で細胞増殖を抑制

するという報告¹¹⁾である。概して、in vitro での培養実験では 100 から 350 $\mu\text{g/ml}$ で細胞増殖を抑制するようである。一方、臨床的に使用される有効血中濃度は、副腎癌において、200 $\mu\text{g/ml}$ ~300 $\mu\text{g/ml}$ ³⁹⁾ で使用するべきとか、300 $\mu\text{g/ml}$ 以下³¹⁾ で維持されるべきであると報告されている。前立腺癌では、200 $\mu\text{g/ml}$ まで⁴³⁾、あるいは 300 $\mu\text{g/ml}$ まで⁴⁴⁾ 血中濃度が維持されるようにと報告されている。このように臨床的に血中濃度に上限が決められているのは、次に述べる副作用の問題が大きな地位を占めるためと思われる。

5. 副作用

スラミンが人体に及ぼす影響は多数報告されている。一般的な副作用は、発赤、発熱、全身倦怠感、吐き気などが挙げられる^{6,7,22,31,35,39,43,44,46)}。そして、重篤あるいは重要な副作用として、腎障害^{6,7,31,35,38,41,44,46)}、肝障害^{6,31,35,38,44)}、角膜炎^{31,38,39,47-49)}、副腎障害^{7,13,32,38,46,50)}、凝固障害^{31,39,41,44,51-53)}、白血球減少^{38,44)}、血小板減少³⁸⁾、多発性神経障害^{7,31,38,39,44,54,55)}などが報告されている。上記の副作用の中で、具体的な血中濃度を述べると、副腎障害は 300 μM (428.7 $\mu\text{g/ml}$) 以上で発生すると報告されている¹³⁾。凝固障害は 250 $\mu\text{g/ml}$ までは影響を受けないと報告されている⁵¹⁾。多発性神経障害は 350 $\mu\text{g/ml}$ 以上で 40% が発生すると報告⁵⁴⁾され、別の報告で、300 $\mu\text{g/ml}$ 以下では発生を認めなかったという報告⁵⁵⁾もある。以上より、人体に対して、副作用などの障害を起こすのが 250 あるいは 300 $\mu\text{g/ml}$ 以上の血中濃度であると思われる。

以上より、現在、スラミンは臨床的に副腎癌、前立腺癌に対し有益な効果が観察されている。しかし、頭頸部領域の悪性腫瘍細胞に関して、スラミンの抗腫瘍効果の報告は現在までない。今回、頭頸部領域の扁平上皮癌細胞および甲状腺未分化癌に対してスラミンの細胞増殖抑制効果、組織学的変化を研究し、考察したので報告する。

方 法

1. 細胞株

使用細胞株は、悪性細胞として、ヒト舌癌細胞 (以下 SCC-25細胞と略す)、ヒト甲状腺未分化癌細胞 (以下 FRO細胞と略す) を使用した。対照とした正常細胞は、マウス皮下組織細胞 (以下 L細胞と略す) を使用した。SCC-25細胞は AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION 社のものを用いた。FRO細胞は山下俊一教授 (長崎大

学医学部附属原爆後障害医療研究施設発症予防部門)より提供を受けた。L細胞は桑野信彦教授(当時大分医大, 現在九州大学)より提供を受けた。

2. 薬剤

スラミンは, Calbiochem社のものを用いた。スラミンの構造式を図1に示す。分子量は1429である。

3. 検査法

MTT assayはCHEMICON社のMTT-CELL GROWTH ASSAY キットを用いた。培養細胞にMTT(3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyl tetrazolium bromide)の5mg/ml溶液を0.05ml加え, 4時間培養後, Isopropanol/0.04N HClを0.5ml加えた。これにより, 平底24wellプレートの底に黒いけばだった結晶が形成される。これをよく混ぜて, 結晶をはいだところで, 570 nmの吸光度をELISA reader (Sj eia AUTO READER, 三光純薬)により測定した。MTT assayでは, 各濃度の細胞から細胞を含まない吸光度を差し引いたものをoptical density (以下ODと略す)として示した。

実験1: 培養細胞数の決定

平底24wellプレートにSCC-25細胞を 1.0×10^4 /ml/well, 2.0×10^4 /ml/well, 4.0×10^4 /ml/wellずつ播き, 24, 48, 72, 96, 120時間後にMTT assayを行い, 細胞数を調べ, それぞれの細胞増殖曲線を調査した。同様にFRO細胞, L細胞を 0.25×10^4 /ml/well, 0.5×10^4 /ml/well, 1.0×10^4 /ml/wellずつ播き, 24, 48, 72, 96, 120時間後にMTT assayを行い, 細胞数を調べ, それぞれの細胞増殖曲線を調査した。それぞれの細胞増殖曲線は, 横軸に時間, 縦軸にMTT assayで得られたODを対数表示し, 各細胞の増殖状態をグラフにした。

実験2: 有効スラミン濃度の決定

1. 平底24wellプレートに, 実験1で得られた結果に基づいて, SCC-25細胞は, 2×10^4 /ml/wellずつ,

- FRO細胞は 0.5×10^4 /ml/wellずつ, L細胞は 0.5×10^4 /ml/wellずつの細胞を播いた。
- 24時間, 37°C, 5%CO₂でincubateし, 細胞が平底24wellプレートに付着したところへ, 0, 50, 100, 200, 300, 500, 1000μMのスラミンを1mlそれぞれ添加した。なお, スラミンの濃度は培地中に溶解し調整した。
 - 72時間スラミンを接触させた後, MTT assayを施行した。MTT assayで得られたODのうち, 0μMのスラミンで得られたODを対照とした。そして50, 100, 200, 300, 500, 1000μMのスラミンを添加して得られたODを対照のODで割り, 百分率で表した値を生存率とした。
 - 統計的検定: 有意差の検定には, 多群の組み合わせの検定(Scheffé's F)を用いた。

実験3: 形態学的変化の観察

- Chamber スライドに, 実験1で得られた結果に基づいて, SCC-25細胞は, 2×10^4 /ml/wellずつ, FRO細胞は 0.5×10^4 /ml/wellずつ, L細胞は 0.5×10^4 /ml/wellずつの細胞を播いた。
- 24時間, 37°C, 5%CO₂でincubateし細胞がChamber スライドに付着したところへ, 0, 100, 300, 1000 μMのスラミンを1mlそれぞれ添加した。なお, スラミンの濃度は培地中に溶解し調整した。
- 72時間スラミンを接触させた後, 各細胞の形態変化を観察するために, パパニコロウ染色を施行した。

結 果

実験1: 培養細胞数の決定

SCC-25細胞(図2)では 2×10^4 /ml/well, 4×10^4 /ml/wellで96時間以上で細胞増殖に頭打ちが見られる。そして, 24時間から96時間まで安定して細胞が増殖し, ある程度のODが得られるのが, 2×10^4 /ml/wellで見られる。そこで, 実験2, 3を施行するに当たり, 1well当たり 2×10^4 /mlの細胞を植え込むことにした。同じようにFRO細胞, L細胞では, 安定して細胞の増殖が見られる 0.5×10^4 /ml/wellを実験2, 3に用いることにした。

実験2: 有効スラミン濃度の決定

L細胞に対するスラミン濃度と細胞増殖抑制の結果を図3に示す。スラミン濃度0μMと比較して, 生存率に

図1: スラミンの構造式

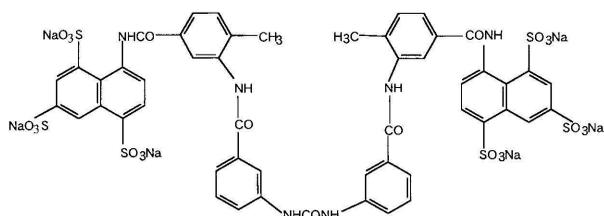


図2：SCC-25細胞の増殖曲線

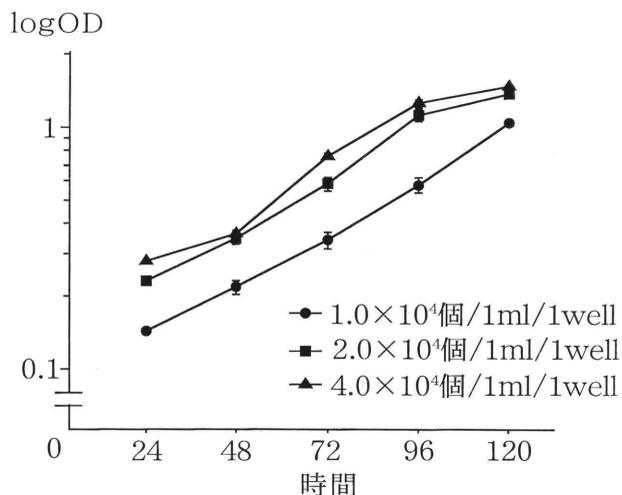
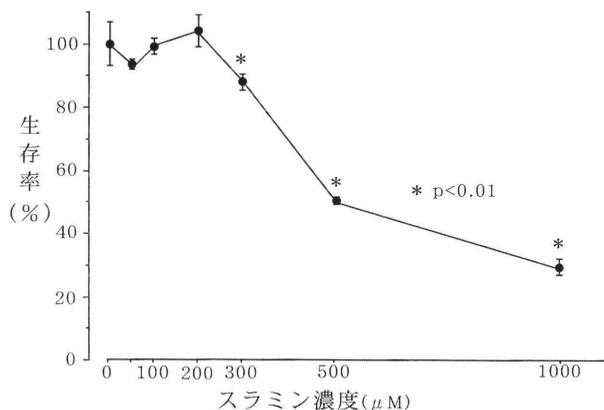
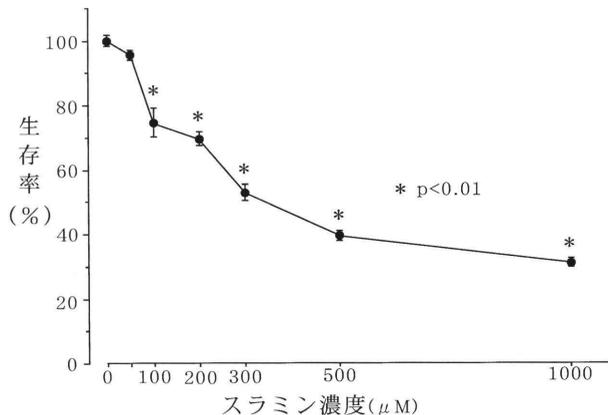


図3：L細胞の生存曲線



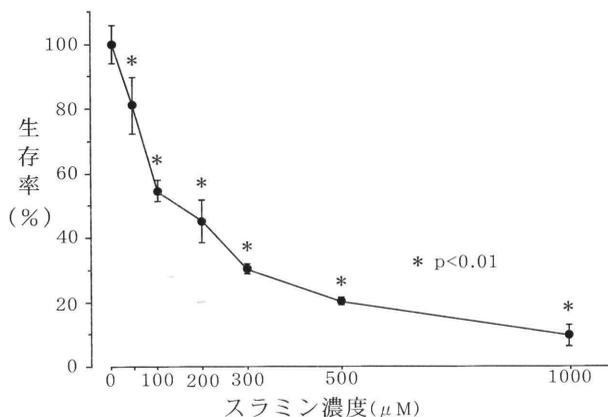
*：スラミン濃度 0 μM に対して、スラミン濃度 300, 500, 1000 μM で生存率に有意差がある (p < 0.01)

図4：SCC-25細胞の生存曲線



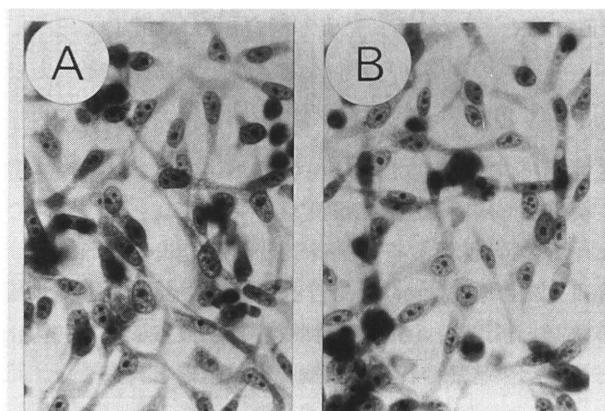
*：スラミン濃度 0 μM に対して、スラミン濃度 100, 200, 300, 500, 1000 μM で生存率に有意差がある (p < 0.01)

図5：FRO細胞の生存曲線



*：スラミン濃度 0 μM に対して、スラミン濃度 50, 100, 200, 300, 500, 1000 μM で生存率に有意差がある (p < 0.01)

図6：L細胞のパパニコロウ染色 (×200倍)



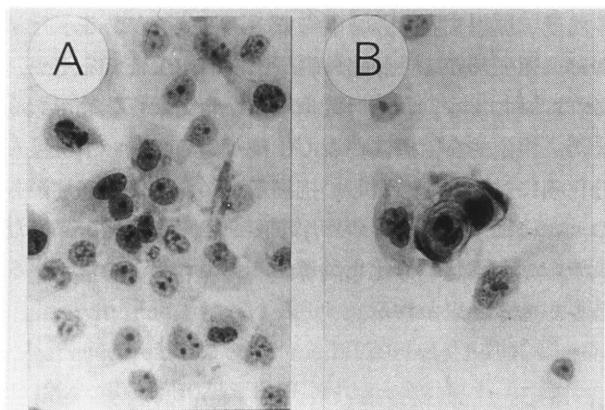
A：スラミン濃度 0 μM, B：スラミン濃度 300 μM

統計学的有意差が見られるのがスラミン濃度 300 μM 以上である (p < 0.01)。SCC-25細胞に対するスラミン濃度と細胞増殖抑制の結果を図4に示す。スラミン濃度 0 μM と比較して、生存率に統計学的有意差が見られるのがスラミン濃度 100 μM 以上である (p < 0.01)。FRO細胞に対するスラミン濃度と細胞増殖抑制の結果を図5に示す。スラミン濃度 0 μM と比較して、生存率に統計学的有意差が見られるのがスラミン濃度 50 μM 以上である (p < 0.01)。

実験3：形態学的変化の観察

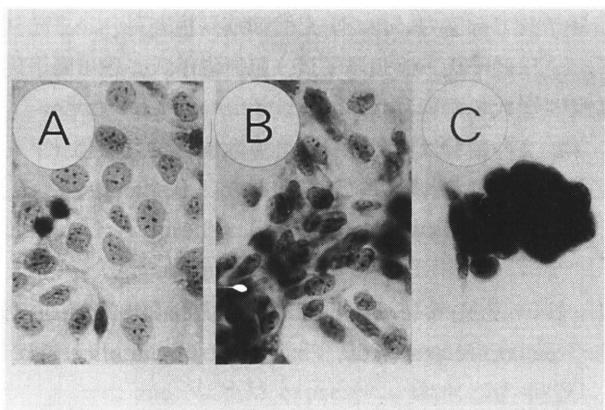
L細胞のスラミン濃度 0 μM と 300 μM のパパニコロウ染色 (200倍) を図6に示した。スラミン濃度 300 μM の場合には、0 μM と比べ核分裂像が若干減少しているが、

図7：SCC-25細胞のパパニコロウ染色（×200倍）



A：スラミン濃度0μM，B：スラミン濃度100μM

図8：FRO細胞のパパニコロウ染色（×200倍）



A：スラミン濃度0μM，B：スラミン濃度100μM，C：スラミン濃度300μM

特徴的な形態変化は見られなかった。スラミン濃度100μMでも特徴的な形態変化は見られなかった。なお、スラミン濃度1000μMでは細胞がほとんど認められないため、観察不可能であった。SCC-25細胞のスラミン濃度0μMと100μMのパパニコロウ染色（200倍）を図7に示した。スラミン濃度100μMの場合では、0μMと比べ核が濃縮し、角化傾向が見られ、癌真珠が見られた。スラミン濃度300μMでも細胞密度は低いものの、癌真珠が認められた。なお、スラミン濃度1000μMでは細胞がほとんど認められないため、観察不可能であった。FRO細胞のスラミン濃度0μM、100μM、300μMのパパニコロウ染色（200倍）を図8に示した。スラミン濃度100μMでは、クラスターを形成しつつあり、300μMではクラスターを完全に形成していた。なお、スラミン

濃度1000μMでは細胞がほとんど認められないため、観察不可能であった。

考 察

今回の実験にて、スラミンが頭頸部領域の悪性細胞に対して、抗腫瘍効果があり、その作用として悪性細胞の分化度を向上させることが示唆された。

1. 本実験について

今回、実験するにあたり、MTT assayを用いた理由は以下のとおりである。酵素活性を利用する制癌剤感受性決定法として、Succinic dehydrogenase inhibition test (SDI test) が、Kondoらにより報告された⁵⁶⁾。SDIとはコハク酸脱水素酵素抑制 (succinic dehydrogenase inhibition) の略で、succinic dehydrogenaseはsuccinic acidの水素分子を受容体に移して、fumaric acidに酸化させることを触媒する酵素である。受容体としてTTC (2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride), MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyl tetrazolium bromide), 最近ではXTT [2, 3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide]などのtetrazolium塩が用いられる。これらの水素分子を受けると有色のformazanを形成するので、このformazanの吸光度を光電比色計で測定する。癌細胞のコハク酸脱水素酵素活性の低下率と癌細胞の生存性の低下率が相関することを利用した方法である。新しいtetrazolium塩としてMTTが合成されると、MTTを用い、薬剤接触時間は72時間で行われるようになった。そして、欧米でも幅広くMTT assayとして使用されている⁵⁷⁻⁵⁹⁾。以上より、今回の実験においては、スラミンの効果判定として、スラミンの接触時間を72時間とし、MTT assayを用いて、抗腫瘍効果を判定した。

対数増殖期の細胞に対する効果を見るために、実験1にて各細胞の増殖状態を確認した。すなわち、実験2, 3で使用する培養細胞を植える適切な濃度を実験1で決定した。癌細胞は互いに重なり合い、増殖していき、接触阻止現象の損失があると言われているが⁶⁰⁾、実際は、実験1の結果のとおり、正常細胞あるいは悪性細胞に関わらず、高濃度の培養細胞を植え込むと、96時間以上の培養で対数増殖の直線性がなくなる。従って、図2で直線的に増殖する濃度を選んだ。

実験2において、正常細胞のL細胞では、スラミン

が300 μ M以上でないと、細胞増殖の抑制効果がないことが分かった。一方、悪性細胞のSCC-25細胞では100 μ M以上で細胞増殖の抑制効果を認め、さらにFRO細胞では50 μ M以上という低濃度から細胞増殖の抑制効果を認めた。スラミンの100 μ Mは142.9 μ g/mlに相当する。臨床的に使用される最適な濃度は前述したように、副腎癌においては200 μ g \sim 300 μ g/ml^{31,39)}であり、前立腺癌では、200 μ g/mlまで⁴³⁾、あるいは300 μ g/mlまで⁴⁴⁾血中濃度が維持されるようにと報告されている。よって、SCC-25細胞やFRO細胞では過去の報告されている濃度より、低濃度で抗腫瘍効果が発揮できると予想される。正常細胞の生存率に影響を及ぼすのは300 μ M以上、すなわち428.7 μ g/ml以上ということなので、スラミンは安全な血中濃度で頭頸部領域の悪性細胞に使用できる可能性がある。

実験3の意義は、次のように考えられる。正常細胞のL細胞ではスラミン濃度0 μ Mと300 μ Mを比較しても特徴的な形態変化がないことが分かった。これは、先ほど述べたとおり、スラミン濃度300 μ Mでも、正常細胞に対しては、形態変化を起こさせないことが示唆され、これ以下の濃度では、人体に対し、正常細胞の形態変化を起こさせないという意味で、安全であると考えられる。一方、SCC-25細胞ではスラミン濃度100 μ Mで癌真珠が見られ、高分化の方向に形態変化していると考えられる。FRO細胞ではスラミン濃度100 μ M以上でクラスターを形成し、また、細胞の形も紡錘形から円形になっており、あたかも、未分化癌が乳頭癌に分化したようにも見える。また、文献的にもHenesyら¹⁰⁾は、スラミン100 μ M、48時間薬剤接触で、神経芽細胞の形態を未分化な球形から分化を示す軸索を有する形態に分化させたと報告した。Fantiniら^{8,9)}は、スラミン100 μ g/ml、96時間薬剤接触で、大腸癌細胞を未分化な形態から分化形態に変化させたと報告している。このことより、スラミンは今回使用した悪性細胞にも、分化を誘導し、分化度を向上させる役割があることが示唆される。しかし、分化を起こすメカニズムは、解明できていないし、Henesyら、Fantiniらも解明できていない。だが、スラミンは悪性細胞を高分化な方向に形態変化させることより、ネクローシスを起こすだけでなく、悪性細胞自身を変化させる、すなわちアポトーシスを誘導する可能性があると考えられる。

2. 今後の展望

スラミンは副腎癌、前立腺癌のみでなく、頭頸部領域

の悪性腫瘍に使用できる可能性が示唆された。安全な血中濃度で腫瘍細胞のみを制御できる可能性がある。とりわけ、頭頸部の悪性腫瘍は扁平上皮癌が主流であるが、これに対しても、新しい抗癌剤となりえる可能性がある。また、決定的な治療法がなく予後が極めて悪い甲状腺未分化癌に対しても、新しい抗癌剤となりえる可能性がある。今後は、スラミンの作用機序をさらに研究し、また、スラミンが細胞の分化を誘導するメカニズムを解明する必要があると思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇篤なる御指導、御校閲を賜った小池靖夫教授に深謝致します。また、直接御指導、御教示をいただいた野口病院 野口志郎院長、具体的な実験手技で御協力いただいた野口病院検査科 足立光男氏、丸田純子氏、渡辺陽子氏、脇屋滋子氏、谷川陽子氏、佐藤真里氏に深謝致します。

本論文の要旨は第99回日本耳鼻咽喉科学会総会（平成10年5月21日、札幌）にて発表した。

文 献

1. Hawking, F.: Suramin: With special reference to onchocerciasis. *Adv. Pharmacol. Chemother.*, 15: 289-322, 1978
2. De Clercq, E.: Suramin: A potent inhibitor of the reverse transcriptase of RNA tumor viruses. *Cancer Lett.*, 8: 9-22, 1979
3. Gibson, D.W., Duke, B.O., and Connor, D.H.: Histopathological studies on suramin toxicity in a chimpanzee. *Tropenmed Parasit.*, 28: 387-405, 1977
4. Wells, H.G., and Humphreys, E.M.: Significance of the increased frequency of selective cortisol necrosis of adrenal as a cause of Addison's disease. *J. Am. Med. Assoc.*, 109: 490-493, 1937
5. Mitsuya, H., Popovic, M., Yarchoan, R., Matsushita, S., et al.: Suramin protection of T cells in vitro against infectivity and cytopathic effect of HTLV-III. *Science*, 226: 172-174, 1984
6. Broder, S., Yarchoan, R., Collins, J.M., Lane, H.C., et al.: Effects of suramin on HTLV-III-LAV infection presenting as Kaposi's sarcoma or AIDS related complex: clinical pharmacology and suppression of

- virus replication in vitro. *Lancet*, Sep. 21 : 627-630, 1985
7. Levine, A.M., Gill, P.S., Cohen, J., Hawkins, J.G., et al. : Suramin antiviral therapy in the acquired immunodeficiency syndrome : Clinical, immunological, and virologic results. *Ann. Intern. Med.*, 105 : 32-37, 1986
 8. Fantini, J., Rognoni, J.B., Roccabianca, M., Pommier, G., et al. : Suramin inhibits cell growth and glycolytic activity and triggers differentiation of human colic adenocarcinoma cell clone HT29-D 4 . *J. Biol. Chem.*, 264 : 10282-10286, 1989
 9. Fantini, J., Verrier, B., Rovert, C., Pic, P., et al. : Suramin-induced differentiation of the human colic adenocarcinoma cell clone HT29-D 4 in serum free medium. *Exp. Cell Res.*, 189 : 109-117, 1990
 10. Hensey, C.E., Boscoboinik, D., and Azzi, A. : Suramin, an anti-cancer drug, inhibits protein kinase C and induces defferentiation in neuroblastoma cell clone NB2A. *FEBS Lett.*, 258 : 156-158, 1989
 11. Spigelman, Z., Dowers, A., Kennedy, S., DiSorbo, D., et al. : Antiproliferative effects of suramin on lymphoid cells. *Cancer Res.*, 47 : 4694-4698, 1987
 12. Guo, X.J., Fantini, J., Roubin, R., Marvaldi, J., et al. : Evaluation of the effect suramin on neural cell growth and N-CAM expression. *Cancer Res.*, 30 : 5164-5170, 1990
 13. Dorfinger, K., Vierhapper, H., Wilfing, A., Czernin, S., et al. : The effects of suramin on human adrenocortical cells in vitro : Suramin inhibits cortisol secretion and adrenocortical cell growth. *Metabolism*, 40 : 1020-1024, 1991
 14. Betsholtz, C., Johnsson, A., Heldin, C.H., and Westermark, B. : Efficient reversion of simian sarcoma virus-transformation and inhibition of growth factor-induced mitogenesis by suramin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 6440-6444, 1986
 15. Coffey, R.J., Leof, E.B., Shipley, G.D., and Moses, H.L. : Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in AKR- 2 B cells. *J. Cell. Physiol.*, 132 : 143-148, 1987
 16. Kopp, R., and Pfeiffer, A. : Suramin alters phosphoinositide synthesis and inhibits growth factor receptor binding in HT-29 cells. *Cancer Res.*, 50 : 6490-6496, 1990
 17. Zhang, H.X., Sozzani, S., D'alessandro, F., Luini, W., et al. : Modulation by suramin of NK and monocytic cell-mediated cytotoxicity in human and murine cells. *Int. J. Immunopharmac.*, 10 : 695-707, 1988
 18. Huang, S.S., and Huang, J.S. : Rapid turnover of the platelet-derived growth factor receptor in *sis*-transformed cells and reversal by suramin. *J. Biol. Chem.*, 263 : 12608-12618, 1988
 19. Williams, L.T., Tremble, P.A., Lavin, M.F., and Sunday, M.E. : Platelet-derived growth factor receptors form a high affinity state in membrane preparations. *J. Biol. Chem.*, 259 : 5287-5294, 1984
 20. Garrett, J., Coughlin, S., and Niman, H. : Blocade of autocrine stimulation in simian sarcoma virus transformed cells reverses down-regulation of platelet-derived growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 : 7466-7470, 1984
 21. Hosang, M. : Suramin binds to platelet-derived growth factor and inhibits its biological activity. *J. Cell Biochem.*, 29 : 265-273, 1985
 22. Sjölund, M., and Thyberg, J. : Suramin inhibits binding and degradation of platelet-derived growth factor in arterial smooth muscle cells but does not interfere with autocrine stimulation of DNA synthesis. *Cell. Tissue Res.*, 256 : 35-43, 1989
 23. Fujita, M., Spray, D.C., Choi, H., Saez, J.C., et al. : Glycosaminoglycans and proteoglycans induce gap junction expression and restore transcription of tissue-specific mRNAs in primary liver cultures. *Hepatology*, 7 : 1 S-9S, 1987
 24. Folkman, J., and Klagsburn, M. : Angiogenic factors. *Science*, 235 : 442-447, 1987
 25. Constantopoulos, G., Rees, S., Cragg, B.G., Barranger, J.A., et al. : Experimental animal model for mucopolysaccharidosis : Suramin-induced glycosaminoglycan and sphingolipid accumulation in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 : 3700-3704, 1980
 26. Constantopoulos, G., Rees, S., Cragg, B.G., Barranger, J.A., et al. : Effect of suramin on the activities of degradative enzymes of sphingolipids in rats. *Res. Commun. Cheml. Pathol. Pharmacol.*, 32 : 87-97, 1981
 27. Mahoney, C.W., Azzi, A., and Huang, K.P. : Effects of suramin, an anti-human immunodeficiency virus

- reverse transcriptase agent, on protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 265 : 5424-5428, 1990
28. Jindal, H.K., Anderson, C.W., Davis, R.G., and Vishwanatha, J.K. : Suramin affects DNA synthesis in HeLa cells by inhibition of DNA polymerases. *Cancer Res.*, 50 : 7754-7757, 1990
 29. Berns, M.J.J., Schuurmans, A.L.G., Bolt, J., Lamb, D.J., et al. : Antiproliferative effects of suramin on androgen responsive tumour cells. *Eur. J. Cancer*, 26 : 470-474, 1990
 30. LaRocca, R.V., Danesi, R., Cooper, M.R., Jamis-Dow, C. A., et al. : Effect of suramin on human prostate cancer cells in vitro. *J. Urol.*, 145 : 393-398, 1991
 31. LaRocca, R.V., Stein, C.A., Danesi, R., Jamis-Dow, C. A., et al. : Suramin in adrenal cancer : Modulation of steroid hormone production, cytotoxicity in vitro, and clinical antitumor effect. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 71 : 497-504, 1990
 32. Ashby, H., DiMattina, M., Linehan, W.M., Robertson, C.N., et al. : The inhibition of human adrenal steroidogenic enzyme activities by suramin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 68 : 505-508, 1989
 33. Marzouk, H., Zuyderwijk, J., Uitterlinden, P., de Jong, F., et al. : Suramin prevents ACTH-stimulated corticosterone release by dispersed adrenocortical cells. *Endocrinology*, 126 : 666-668, 1990
 34. Fantini, J., Guo, X.J., Marvaldi, J., and Rougon, G. : Suramin inhibits proliferation of rat glioma cells and alters N-CAM cell surface expression. *Int. J. Cancer*, 45 : 554-561, 1990
 35. Busch, W., Brodt, R., Ganser, A., Helm, E.B., et al. : Suramin treatment for AIDS. *Lancet*, Nov. 30 : 1247, 1985
 36. Rouvroy, D., Bogaerts, J., Habyarimana, J.B., Nzaramba, D., et al. : Short-term results with suramin for AIDS related conditions. *Lancet*, Apr. 13 : 878-879, 1985
 37. Kaplan, L.D., Wolfe, P.R., Volberding, P.A., Feorino, P., et al. : Lack of response to suramin in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Am. J. Med.*, 82 : 615-620, 1987
 38. Cheson, B.D., Levine, A.M., Mildvan, D., Kaplan, L.D., et al. : Suramin therapy in AIDS and related disorders. Report of the US suramin working group. *JAMA*, 258 : 1347-1351, 1987
 39. Stein, C.A., LaRocca, R.V., Thomas, R., McAtee, N., et al. : Suramin : An anticancer drug with a unique mechanism of action. *J. Clin. Oncol.*, 7 : 499-508, 1989
 40. Vierhapper, H., Nowotny, P., Mostbeck, G., and Waldhausl, W. : Effect of suramin in a patient with adrenocortical carcinoma. *Lancet*, May 27 : 1207-1208, 1989
 41. Allolio, B., Jaursch-Hncke, C., Reincke, M., Arlt, W., et al. : Treatment of metastasizing adrenal carcinoma with suramin. *Dtsch. Med. Wschr.*, 114 : 381-384, 1989
 42. Allolio, B., Reincke, M., Arlt, W., Deuss, U., et al. : Suramin for treatment of adrenocortical carcinoma. *Lancet*, Jul. 29 : 277, 1989
 43. Van Oosterom, A.T., De Smedt, E.A., Denis, L., de Bruijn, E.A., et al. : Suramin for prostatic cancer : a phase I / II study in advanced extensively pretreated disease. *Eur. J. Cancer*, 26 : 422, 1990
 44. Myers, C., Cooper, M., Stein, C.A., LaRocca, R.V., et al. : Suramin : A novel growth factor antagonist with activity in hormone-refractory metastatic prostate cancer. *J. Clin. Oncol.*, 10 : 881-889, 1992
 45. Falcone, A., Pfanner, E., Cianci, C., Danesi, R., et al. : Suramin in patients with metastatic colorectal cancer pretreated with fluoropyrimidine-based chemotherapy. A phase II study. *Cancer*, 75 : 440-443, 1995
 46. Stein, C.A., Saville, W., Yarchoan, R., Broder, S., et al. : Suramin and function of the adrenal cortex. *Ann. Intern. Med.*, 104 : 286-287, 1986
 47. Holland, E.J., Stein, C.A., Palestine, A.G., LaRocca, R. V., et al. : Suramin keratopathy. *Am. J. Ophthal.*, 106 : 216-221, 1988
 48. Teich, S.A., Handwerker, S., Mathur-Wagh, U., Yancovitz, S., et al. : Toxic keratopathy associated with suramin therapy. *New. Engl. J. Med.*, 314 : 1455-1456, 1986
 49. Hemady, R.K., Sinibaldi, V.J., and Eisenberger, M.A. : Ocular symptoms and signs associated with suramin sodium treatment for metastatic cancer of the prostate. *Am. J. Ophtha.*, 121 : 291-296, 1996
 50. Feuillan, P., Raffeld, M., Stein, C.A., Lipford, N., et al. : Effects of suramin on the function and structure of the adrenal cortex in the cynomolgus monkey. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 65 : 153-158, 1987

51. Horn, M.K., Stein, C.A., LaRocca, R.V., and Myers, C. E. : Circulating glycosaminoglycan anticoagulants associated with suramin treatment. *Blood*, 71 : 273-279, 1988
52. Collins, J.M., Klecker, R.W., Yarchoan, R., Lane, H.C., et al. : Clinical pharmacokinetics of suramin in patients with HTLV-III/LAV infection. *J. Clin. Pharmacol.*, 26 : 22-26, 1986
53. Cole, D.J., Ettinghausen, S.E., Pass, H.I., Danforth, D. N., et al. : Postoperative complications in patients receiving suramin therapy. *Surgery*, 116 : 90-95, 1994
54. LaRocca, R.V., Meer, J., Gilliatt, R.W., Stein, C.A., et al. : Suramin-induced polyneuropathy. *Neurology*, 40 : 954-960, 1990
55. Cooper, M., LaRocca, R.V., Stein, C.A., and Myers, C. : Pharmacokinetic monitoring is necessary for the safe use of suramin as an anticancer drug. *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.*, 30 : 242, 1989
56. Kondo, T, Imamura, T., and Ichihashi, H. : In vitro test for sensitivity of tumor to carcinostatic agents. *Gann*, 57 : 113-121, 1966
57. 斎藤和子, 佐々田裕子, 夏野徹也, 三橋進 : 制癌剤感受性テストSDIの改良法. *癌と化学療法*, 7 : 1952-1958, 1980
58. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Imm. Methods.*, 65 : 55-63, 1983
59. Shimoyama, Y., Kubota, T., Watanabe, M., and Ishibiki, K. : Predictability of in vivo chemosensitivity by in vitro MTT assay with reference to the clonogenic assay. *J. Surg. Oncol.*, 41 : 12-18, 1989
60. 中村俊夫 : Guide to Cancer Care. *がん細胞の特徴* (古江尚 監修), Churchill Livingstone Japan, 東京, 1993, pp. 10-12

The antitumor effect of suramin to the head and neck cancer

Akio Kondo

Department of Otorhinolaryngology, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima

(Director : Prof. Yasuo Koike)

SUMMARY

Suramin was originally developed as an antiparasitic drug for African trypanosomiasis. Subsequently, it has been found to have antitumor effects to various neoplasmas such as adrenal cancer and prostate cancer. However, its effect on the head and neck cancer is unknown. This study was performed to investigate the effects of suramin on the head and neck cancer.

SCC-25 cells and FRO cells were used as a representative of malignant cell, and L cells were used as a representative of normal cell in this study. Each cell line was cultured together with suramin solution at various concentration (0, 50, 100, 200, 300, 500, 1000 μM) at 37°C for 72 hours and was stained by Papanicolaou method.

The proliferation of SCC-25 cells and FRO cells was inhibited by suramin solution at more than 100 μM and 50 μM concentration respectively. However, The proliferation of L cells was not inhibited until 300 μM concentration. Morphologically, suramin induced the differentiation of SCC-25 cells and FRO cells. But the morphology of L cells were not changed by suramin.

It is concluded that suramin can be an effective antitumor drug for the head and neck cancer.

Key words : suramin, antitumor effect, head and neck cancer, cell proliferation, cell differentiation