ヒト胃癌,大腸癌細胞株におけるシスプラチンの細胞内へのメチオニン輸送に関する基礎的研究

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/2297/9449

金沢大学十全医学会雑誌　第108巻　第5号　592－601（1999）

ヒト胃癌，大腸癌細胞株におけるシスプラチンの細胞内へのメチオニン輸送阻害に関する基礎的研究

金沢大学医学部医学科外科学第一講座（主任：渡辺洋宇教授）
川　西　　勝

最近，5-フロロウラシル (5-fluorouracil, 5-FU) の補助薬剤として低量のシスプラチン (cis-diammine dichloroplatinum [Ⅱ], CDDP) を反復投与する化学療法が注目され，胃癌や大腸癌に対する高い奏効率が報告されている．CDDPが発揮する5-FUの抗腫瘍効果増強作用は，メチオニン (methionine, Met) の細胞膜における能動輸送を阻害することに端を発する一連の反応で腫瘍細胞内葉酸濃度が上昇することによると説明されている．しかし，胃癌・大腸癌に対する本療法の基礎的研究は全くなされていない．本研究では，ヒト胃癌・大腸癌由来の継代細胞株を用いてCDDPがMetの腫瘍細胞内取り込みに及ぼす影響を観察した．細胞株にはヒト胃癌由来細胞株MKN-28とMKN-45，およびヒト大腸癌由来細胞株SW-48，HCT-15を用いた．72時間持続接触によるCDDPのIC_{50}はMKN-28，MKN-45，SW-48，HCT-15でそれぞれ10.3μM，1.3μM，1.6μM，3.7μMであった．細胞を浮遊状態においた場合，いずれの細胞株も2時間のCDDP暴露では，Metの取り込み阻害を受けなかった．また，4時間のCDDP暴露では100μMのCDDPでのみMKN-28，MKN-45に有意なMetの取り込み量低下を認めた（$p<0.05$）．さらに，接着状態のMKN-45とHCT-15をCDDPに暴露し，その後浮遊状態に環境を変化させてMetの取り込みを観察したが，かかる条件下ではMetの取り込み阻害はみられなかった．しかし，腫瘍細胞を終始接着状態においた場合，CDDPによる有意なMetの取り込み阻害が観察された．また，この条件下でみられる取り込み阻害は，12時間の暴露時間と比較して24時間でより顕著であった．さらに，MKN-45，SW-48といったCDDPの固有の細胞毒性に高い感受性の細胞株ほど，より強いMetの取り込み阻害を受けた．接着状態のMKN-45で観察されたCDDP暴露後のMet取り込み量は，同時に低下がみられたチミジンの取り込み量と比較しても有意に低値であった（$p<0.05$）．以上の結果から，ヒト胃癌・大腸癌由来継代細胞株へのMet取り込み阻害は，接着状態にある細胞で，薬理学的濃度のCDDPにのみ認められることが判明した．したがって，低濃度のCDDPによる細胞内葉酸濃度上昇作用には，Met取り込み阻害以外の機序が関与すると考えられた．

Key words　biochemical modulation, methionine, 5-fluorouracil, cis-diammine dichloroplatinum [Ⅱ], amino acid transporter

固形癌の最も確実な治療法は，物理的な腫瘍細胞の除去，すなわち手術であることに異論はない．胃癌，大腸癌を中心とする消化管由来の悪性腫瘍に対する根治療法では，一貫して手術がその中心的地位を占めてきた．その治療戦略によって癌の治療成績も向上し，なかでも胃癌の訂正死亡率は減少に転じてきている[1]．しかし，これら消化器固形癌の治療成績の向上は，主として診断機器の発達による早期癌の増加に依存するところが大きい．永きにわたり試みられてきたリンパ節郭清を主とした拡大手術も，いまだに進行癌治療におけるその有効性を科学的に証明されるに至っていない[2]．切除範囲を拡大させた手術も局所療法の域を出ていないのである．実際，消化器癌の術後再発死亡のほとんどは肝，肺，脳などの重要臓器転移や腹膜転移によるものである．腹膜への播種性転移では，その存在が認識可能となった時点で既に同様の病巣が無数に形成されていることがほとんどである．そのため，物理的にそれらを完全に除去することは事実上不可能である．したがって，癌化学療法の進歩が，かかる転移形式の治療成績向上に寄与する可能性は極めて高い[3)~5)]．一方，血行性転移も進行・再発癌の予後を規定する重要な因子である．なかでも肝転移巣や肺転移巣は，播種性転移と比較して病巣数が少ないため，しばしば切除の対象とされてきた[6)7)]．しかし，外科的療法により完治に導ける遠隔転移再発症例は極めて限られていることは厳然とした事実である．ここでも，癌化学療法は多くを期待されている[8)]．従来の癌化学療法では，腫瘍の由来臓器や組織型によって薬剤やその投与法が選択されてきた．しかし，抗癌剤作用機序の解明とともに，抗癌剤がその効果を発揮するには腫瘍細胞内環境が重要であることが認識され始めた．

1957年にDuschinskyら[9)]によって発見された5-フロロウラシル (5-fluorouracil, 5-FU) は，生体内での代謝と標的酵素が明らかになっており，現在作用薬剤として最も期待される基本的薬

平成11年9月6日受付，平成11年11月1日受理

Abbreviations：ABC, ATP binding cassette; CDDP, cis-diammine dichloroplatinum [Ⅱ]; dThd, Thymidine; dUMP, deoxyuridine 5'-monophosphate; FBS, fetal bovine serum; FdUMP, 5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate; FPGS, folyl poly-glutamate synthetase; 5-FU, 5-fluorouracil; IC_{50}, 50% inhibitory concentration of cell

剤である．一方1960年代にRosenbergら[10)11)]の一連の研究によって開発されたシスプラチン (cis-diammine dichloroplatinum [Ⅱ]，CDDP) は，固形癌の化学療法において重要な薬剤であるが，最近，5-FUの補助薬剤としてCDDPの低量反復投与を併施する化学療法が注目され，胃癌や結腸・直腸癌などに対する本療法の高い奏効率が報告されている[12)13)]．ここでCDDPは，腫瘍細胞内の葉酸濃度を上昇させる調節因子 (modulator) として用いられている．その機序は，CDDPが中性アミノ酸の一つであるメチオニン (methionine，Met) の細胞膜における能動輸送を阻害することに端を発する一連の反応で説明されている[14)]．

しかし，本療法が胃癌・大腸癌に高い奏効率を呈する反面，これらの癌腫を用いた本療法の基礎研究が全くなされなかったことも現実である．以上の観点から，本研究ではヒト胃癌・大腸癌由来の継代細胞株を用いて，CDDPがMetの腫瘍細胞内への取り込みに及ぼす影響を観察した．

材料および方法

Ⅰ．実験に用いた培養細胞株

ヒト胃癌由来細胞株MKN-28とMKN-45，およびヒト大腸癌由来細胞株SW-48，HCT-15の計4種類 (金沢大学がん研究所，化学療法部，佐々木琢磨教授より供与，いずれも接着細胞) を用いた．組織培養液には10％非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum，FBS) (Gibco，Grand Island，USA) を含むRPMI-1640培地 (大日本製薬，大阪) を用い，各細胞は5％CO_2存在下，湿潤37℃で継代培養した．

Ⅱ．薬剤および試薬

1．CDDP

CDDP製剤としてブリプラチン (ブリストルマイヤーズ，Princeton，USA) を使用した．

2．10μM L-Met (185kBq/mlのmethyl-^{14}C-L-Met含有) の調製

methyl-^{14}C-L-Met (2.1GBq/mmol，3.7MBq/ml，アマシャム・ジャパン，東京) 1ml，1mM L-Met 0.2mlに蒸留水を加え全量を20mlとして調製した．

3．20μMチミジン (Thymidine，dThd) (740kBq/mlの6-^{3}H-dThd含有) の調製

6-^{3}H-dThd (888GBq/mmol，3.7MBq/ml，アマシャム・ジャパン，東京) 1ml，1mM dThd 0.1mlに蒸留水を加え全量を5mlとして調製した．

Ⅲ．各細胞株の増殖曲線の作成

6穴平底プレート (Corning) の1穴あたりに各細胞を1×10^5個/2ml，2×10^5個/2ml植え込み，その24，48，72，96，120時間培養後に自動細胞計算機 (Sysmex，F-300，東亜医用電子，東京) を用いて細胞数を計測し増殖曲線を求めた．

Ⅳ．CDDPに対する各細胞株感受性

1．CDDP72時間持続接触による増殖抑制

6穴平底プレートの1穴あたりに各細胞を1×10^5個/1.8ml植え込み，充分に接着した24時間後に各種濃度のCDDP (0，0.1～1000μM) 0.2mlを加え，その後72時間培養し持続接触させた．培養終了後，自動細胞計算機を用いて細胞数を計測し，50％増殖抑制濃度 (50％ inhibitory concentration of cell growth，IC_{50}) を求めた．

2．CDDP12時間または24時間持続接触後，48時間非接触による増殖抑制

6穴平底プレートの1穴あたりに各細胞を1×10^5個/1.8ml植え込み，24時間後に各種濃度のCDDP (0，0.1～1000μM) 0.2mlを加え，その後12，24時間培養し持続接触させ，さらにその後CDDPを含まない培養液に交換し48時間培養した．培養終了後，72時間持続接触の場合と同様にしてIC_{50}を求めた．

Ⅴ．各細胞株の細胞内へのMetの取り込み

FBSを含まないRPMI-1640培地を用い5×10^6個/mlに調製した各細胞浮遊液0.9ml，10μM L-Met (185kBq/mlの^{14}C-L-Met含有) 0.1mlを試験管にいれ，5％CO_2ガス封入後，37℃ウオーターバスで振盪，2，5，15，30，60分間ずつ反応させた．その後0℃ PBS 3.5mlを加え，ミキサーで攪拌後1000回転，3分間遠心分離し上清を捨てた．同じ洗浄行程をもう一度繰り返し，残った沈渣に0℃，5％トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid，TCA) 1mlを加え攪拌後10分間0℃で静置．その後2000回転，5分間遠心分離，上清の0.2mlをバイアルに入れ，ACS-Ⅱシンチレーター (アマシャム・ジャパン，東京) 10mlを加え，液体シンチレーションカウンター (アロカLSC-1000，東京) にて放射活性を測定し，酸可溶画分 (Acid soluble) のMet取り込みを測定した．一方残りの上清を捨てた後，残った沈渣に5％TCA 2mlを加え攪拌，2000回転，5分間遠心分離，上清を捨てた後，99％蟻酸1mlを加え攪拌し溶解した．0.2mlをバイアルに入れ上記と同様に放射活性を測定し，酸不可溶画分 (Acid insoluble) のMet取り込みを測定した．酸可溶画分と酸不可溶画分の合計を細胞内へのMetの取り込みの総量とした．

Ⅵ．CDDP暴露下における各細胞株の細胞内へのMetの取り込み

1．浮遊状態におけるMetの細胞内取り込みに及ぼすCDDPの影響

FBSを含まないRPMI-1640培地を用い5×10^6個/mlに調整した各細胞浮遊液0.8ml，種々濃度のCDDP (0，10，100，1000μM) 0.1mlを試験管に入れ，5％CO_2ガス封入後，37℃ウオーターバスで振盪，2，4時間前処置をおこなった．その後10μM L-Met (185kBq/mlの^{14}C-L-Met含有) 0.1mlを加え，同様に30分間反応させた．次いで，Ⅴの実験と同様にして細胞内へのMetの取り込みを測定した．

2．接着状態から浮遊状態に環境を変化させた場合のMetの細胞内取り込みに及ぼすCDDPの影響

150cm^{2}培養フラスコ (Corning) 内で通常培養状態で対数増殖期にある細胞を，2種の濃度のCDDP (0，10μM) を含有したFBSを含まないRPMI-1640培地に培地交換をし，12，24時間培養した後細胞をはがし，FBSを含まないRPMI-1640培地で5×10^6個/mlの細胞浮遊液を調製した．この細胞浮遊液0.8ml，10μM L-Met (185kBq/mlの^{14}C-L-Met含有) 0.1ml，2種の濃度のCDDP (0，100μM) 0.1mlを試験管に入れ，5％CO_2ガス封入後，37℃ウオーターバスで振盪，30分間反応させた．次いで，

growth; LV, leucovorin calcium; Met, methionine; 5,10-methylene THF, 5,10-methylenetetrahydrofolate; MRP, multidrug resistance related protein; TC, inactive ternary complex; TCA, trichloroacetic acid; THF, tetrahydrofolate; TS, thymidilate synthase

Vの実験と同様にして細胞内へのMetの取り込みを測定した．なお，本実験はMKN-45，HCT-15の2種の細胞株に施行した．

3．接着状態におけるMetの細胞内取り込みに及ぼすCDDPの影響

12穴平底プレート (Corning) の1穴あたりに各細胞を5×10^5

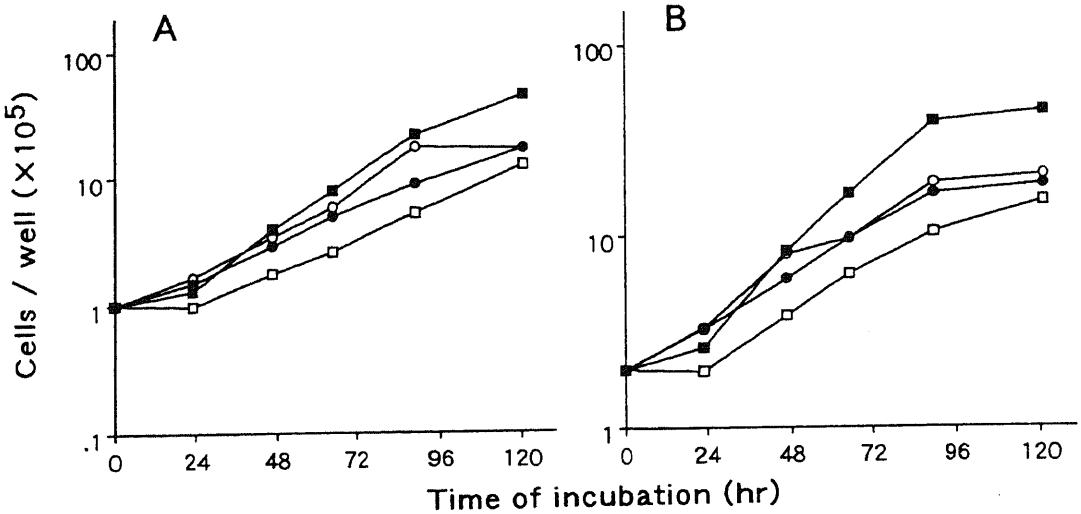

Fig. 1. Growth curves of each cell line. (A) 1×10^5 cells in 0 hr. (B) 2×10^5 cells in 0 hr. ○, MKN-28; ●, MKN-45; □, SW-48; ■, HCT-15.

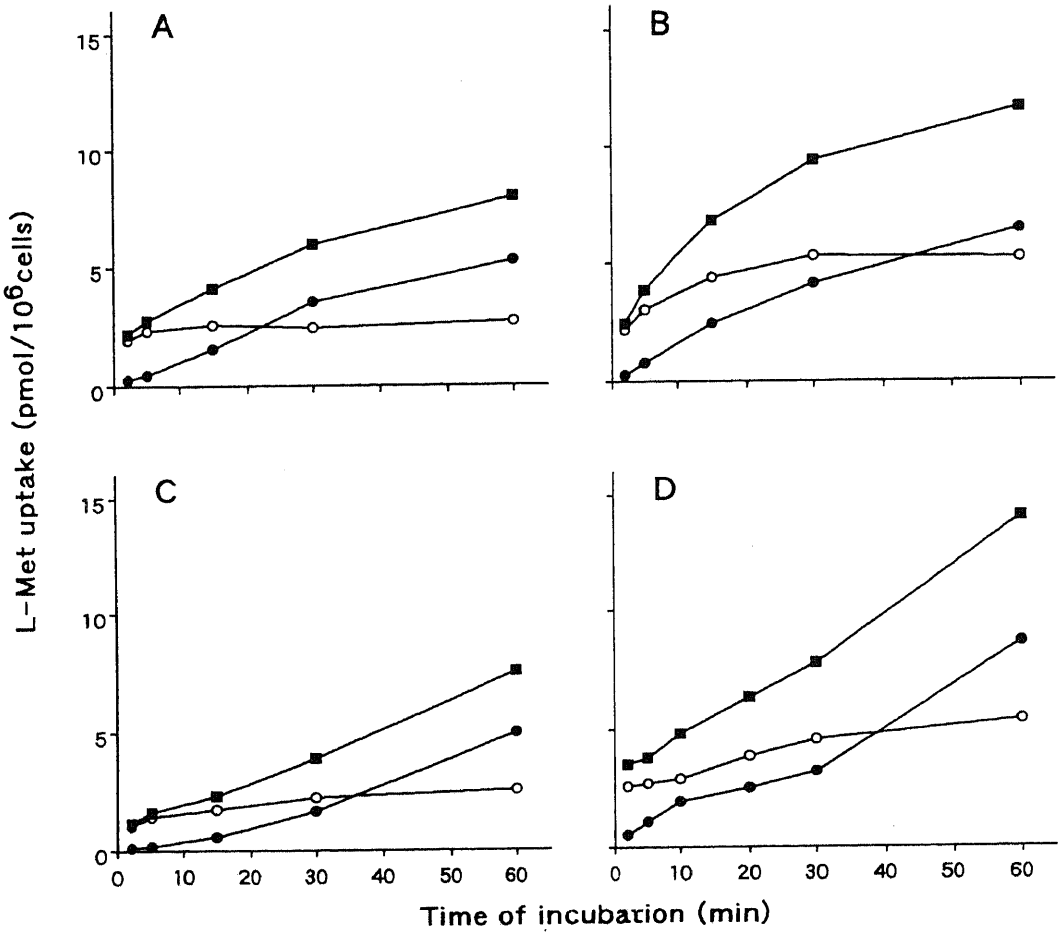

Fig. 2. Uptake of L-Met by time course of each cell line. Tumor cells were suspended in RPMI-1640 without FBS and were incubated with 1μM L-Met (18.5kBq) at 37℃. Then uptake of L-Met was measured. (A) MKN-28. (B) MKN-45. (C) SW-48. (D) HCT-15. ○, acid soluble; ●, acid insoluble; ■, total.

個/1ml植え込み，24時間培養して細胞を通常の培養状態，すなわちプレートに接着した状態に導いた．種々の濃度のCDDP (0, 1, 5, 10, 25, 50μM) を含有したFBSを含まないRPMI-1640培地0.9mlで培地交換を行い，12，24時間培養後にプレートの1枚を用いて細胞数の補正用に細胞数を数えた．次いで，残りのプレートに10μM L-Met (185kBq/mlの^{14}C-L-Met含有) 0.1mlを加え5％CO_2存在下，湿潤37℃で30分間培養，その後0℃ PBS 1mlを加え上清を吸引，これを3回繰り返した後，99％蟻酸0.5mlを加え細胞をすべて溶解，全量をバイアルに入れ，Vの実験と同様にして細胞内へのMetの取り込みの総量を測定した．また同じ実験系でL-Metのかわりに，20μM dThd (740kBq/mlの6-^{3}H-dThd含有) を反応させ細胞内へのdThdの取り込みを測定することによって，細胞の活動性の指標とした．

Ⅶ．統計学的処理

対照群と薬剤投与群との差の検定には，Studentのt検定，多群の薬剤投与群の有意差検定には，一元配置分散分析法 (one-factor ANOVA) を行ったうえで，有意差が認められた場合，多重比較検定法を用いて検討を行った．いずれも危険率5％未満を有意差ありと判定した．

成　　績

Ⅰ．各細胞株の増殖曲線

各細胞株をプレートの1穴あたりに1×10^{5}個/2ml植え込んだときの増殖曲線を図1Aに，2×10^{5}個/2ml植え込んだときの増殖曲線を図1Bに示す．4種の細胞株の中では，HCT-15の増殖が最も早く，一方でSW-48の増殖が最も遅かった．培養開始後24時間から96時間にわたって4種全ての細胞株において指数関数的な増殖を認めた．

Ⅱ．CDDPに対する各細胞株感受性

CDDPに対する各細胞株感受性 (IC_{50}) を表1に示した．

CDDP72時間持続接触によるCDDPのIC_{50}より，MKN-45およびSW-48はCDDPに対する感受性が高く，一方でMKN-28とHCT-15の感受性は低いと考えられた．CDDPに12時間接触させた後，48時間CDDP非存在下に培養した場合のCDDPのIC_{50}は，MKN-28，MKN-45，SW-48，HCT-15でそれぞれ14.5μM，2.4μM，3.1μM，4.6μMであった．さらに，CDDPに24時間接触させた後に同様の処理を行った場合のCDDPのIC_{50}は，MKN-28，MKN-45，SW-48，HCT-15でそれぞれ8.0μM，1.1μM，1.2μM，4.0μMであった．すなわち，各細胞を12時間もしくは24時間CDDPに接触させ，その後CDDPの非存在下に培養を行った場合でも，CDDPの細胞増殖に及ぼす影響は72時間持続的に接触させたときと同様であった．

Ⅲ．各細胞株の細胞内へのMetの取り込み

遊離アミノ酸として細胞内に残存するメチオニンを酸可溶画分，蛋白合成に供されたMetを酸不可溶画分とし，その総和を細胞内への総取り込み量と判定した．各細胞株ともに，細胞内に取り込まれて存在する遊離Met量は，30分でほぼ定常量に達していたが，その後は徐々に蛋白合成の基質として消費されるため時間経過とともに総メチオニン取り込み量は増加した．また，培養開始後の同時点で比較すると，MKN-45のMet取り込みが最も多く，一方でSW-48が最も少なかった (図2)．

Ⅳ．CDDP暴露下における各細胞株の細胞内へのMetの取り込み

1．浮遊状態におけるMetの細胞内取り込み

各細胞株とも2時間の曝露では，いずれの濃度のCDDPによってもMetの取り込み阻害を受けなかった．一方，4時間曝露では100μMのCDDPでのみ，MKN-28で16.9％，MKN-45で21.8％，SW-48で13.3％，HCT-15で20.1％と軽度のMet取り込み阻害が認められた．これらのうちMKN-28，MKN-45で，コントロール値と比較して有意にMetの取り込み量が低下していた ($p<0.05$) (図3)．

2．接着状態から浮遊状態に環境を変化させた場合のMetの細胞内取り込み

MKN-45，HCT-15において，フラスコ内でCDDPを12，24時間と長時間暴露させ細胞を直ちに浮遊状態にした場合，Metの取り込みはほとんど阻害されなかった (表2，表3)．

3．接着状態におけるMetの細胞内取り込み

腫瘍細胞を接着状態においた場合，Metの取り込みはCDDPによって最も顕著に阻害された．その阻害作用は，12時間の曝露時間と比較して24時間でより強くみられた．また，MKN-45，SW-48といったCDDPの固有の細胞毒性に高い感受性の細胞株ほど，より強くMetの取り込み阻害を受けた．すなわち，MKN-45を24時間CDDPに暴露した場合，CDDP 1μMで3.9％，5μMで23.2％，10μMで70.6％，25μMで93.7％，50μMで90.5％とMet取り込み阻害がみられた．かかる条件下では，発

Table 1. Sensitivity of each cell line to CDDP

Cell lines	CDDP IC_{50} (μM) 72hr[a)]	12hr[b)]	24hr[b)]
MKN-28	10.3±1.6	14.5±1.4	8.0±2.3
MKN-45	1.3±0.2	2.4±0.4	1.1±0.3
SW-48	1.6±0.3	3.1±0.8	1.2±0.4
HCT-15	3.7±0.6	4.6±0.8	4.0±0.9

IC_{50}, 50% inhibitory concentration of cell growth.
Each value shows $\bar{x}\pm$SD.
[a)] 72hr continuous exposure to CDDP.
[b)] After 12hr or 24hr exposure to CDDP, cell lines were cultured without CDDP for 48hr.

Table 2. L-Met uptake of MKN-45 in flask

Preincubation (hr)	CDDP (μM)	L-Met uptake ($\bar{x}\pm$SD, pmol/10^{6} cells)	%control
12	0	9.01±1.90	100.0
12	10	9.34±1.06	103.6
24	0	7.70±0.31	100.0
24	10	7.10±0.72	92.2

Table 3. L-Met uptake of HCT-15 in flask

Preincubation (hr)	CDDP (μM)	L-Met uptake ($\bar{x}\pm$SD, pmol/10^{6} cells)	%control
12	0	4.97±0.32	100.0
12	10	5.11±0.75	102.8
24	0	4.47±0.51	100.0
24	10	4.85±0.99	108.6

現濃度に差を認めるものの，4種全ての細胞株でCDDPによるMetの取り込み阻害がみられた (図4)．一方，dThdの取り込み阻害も同時に認められ，12時間より24時間，CDDPが高濃度であるほど顕著であった．しかし，MKN-45で観察されたCDDPによるMetの取り込み阻害はdThdの取り込み量の低下を超えていた．さらにMKN-45では，Metの取り込み量はdThdの取り込み量と比較して有意に低下していた ($p < 0.05$) (表4，表5)．

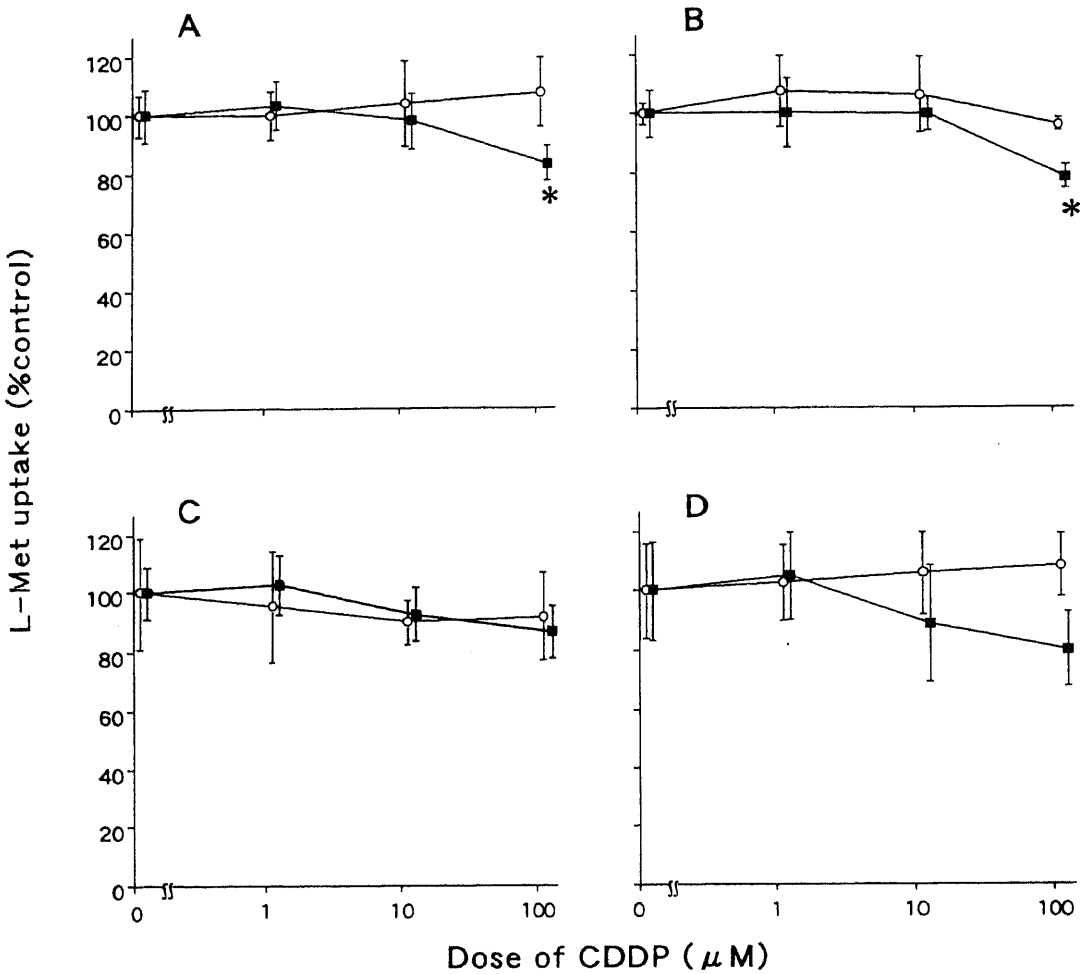

Fig. 3. Effect of exposure to CDDP on L-Met uptake of each cell line in tube. Tumor cells were suspended in RPMI-1640 without FBS and were preincubated with each concentration of CDDP at 37℃ for 2 hr (○) or 4 hr (■). They were then incubated with 1μM L-Met (18.5kBq) for 30 min and uptake of L-Met was measured. (A) MKN-28. (B) MKN-45. (C) SW-48. (D) HCT-15. Each value shows $\bar{x} \pm$ SD. * $p<0.05$ versus control by one-factor ANOVA.

Table 4. Effect of 12hr exposure to CDDP of each cell line in plate

Cell lines	CDDP (μM)	Growth (%inhibition)	L-Met uptake (%inhibition)	dThd uptake (%inhibition)
MKN-28	10	27.3±18.8	23.2±19.4	−1.5±10.4
	50	37.9±26.0	35.8±9.3	40.2±18.5
MKN-45	10	17.1±2.9	48.4±20.8	19.5±6.9 *
	50	48.5±6.8	78.6±5.2	51.0±3.4 **
SW-48	10	16.2±6.4	−1.1±15.3	−3.4±10.5
	50	12.3±6.6	31.2±22.0	30.7±8.9
HCT-15	10	−4.7±6.4	16.9±21.6	−7.9±12.9
	50	15.5±4.3	25.0±13.7	28.7±7.6

Each value shows $\bar{x}$±SD.
*$p<0.05$. **$p<0.01$ vs. L-Met uptake by the Student's t test.

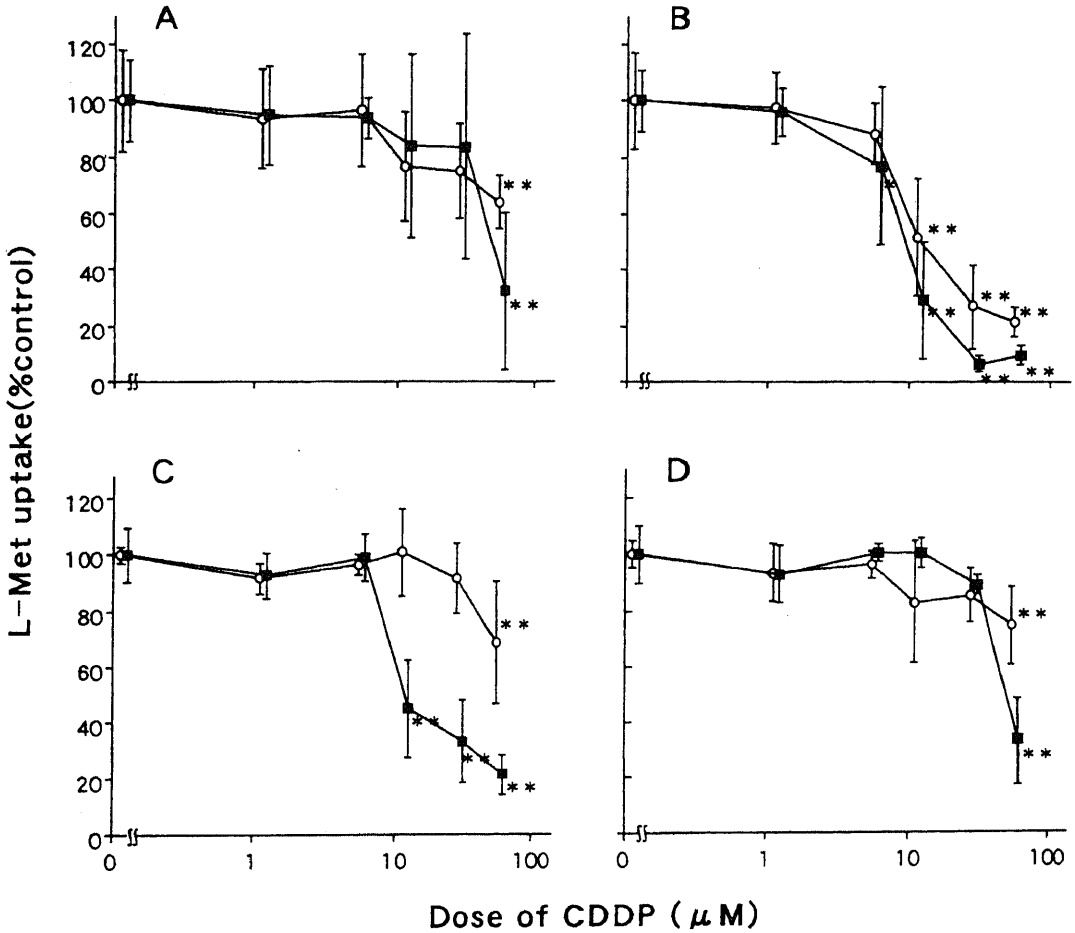

Fig. 4. Effect of exposure to CDDP on L-Met uptake of each cell line in plate. Tumor cells were attached in RPMI-1640 without FBS and were preincubated with each concentration of CDDP at 37℃ for 12 hr (○) or 24 hr (■). They were then incubated with 1μM L-Met (18.5kBq) for 30 min and uptake of L-Met was measured. (A) MKN-28. (B) MKN-45. (C) SW-48. (D) HCT-15. Each value shows $\bar{x}$ ± SD. * p<0.05, ** p<0.01 versus control by one-factor ANOVA.

Table 5. Effect of 24hr exposure to CDDP of each cell line in plate

Cell lines	CDDP (μM)	Growth (%inhibition)	L-Met uptake (%inhibition)	dThd uptake (%inhibition)
MKN-28	10	18.1±15.2	15.9±32.2	28.5±11.5
	50	45.4±11.9	67.5±28.3	60.5±20.8
MKN-45	10	54.4±17.9	70.6±20.9	35.4±13.1 *
	50	55.1±18.2	90.5±3.3	73.7±6.4 **
SW-48	10	15.9±6.2	54.7±17.5	20.2±28.4
	50	27.8±14.5	78.6±7.3	77.9±9.5
HCT-15	10	20.2±15.0	−0.7±5.3	0.5±4.8
	50	33.2±25.9	67.0±16.1	60.5±10.7

Each value shows $\bar{x}$±SD.
*p<0.05. **p<0.01 vs. L-Met uptake by the Student's t test.

考　　察

腫瘍細胞に損傷を与える薬剤や放射線，紫外線などは全て正常細胞にもストレスとなる．かかる環境下で細胞は，自己の防御機構を活性化させる[15]．その中心に位置するのがATP結合カセット (ATP binding cassette, ABC) スーパーファミリーで，多剤耐性遺伝子にコードされているP糖蛋白や多剤耐性関連蛋白 (multi-drug resistance related protein, MRP) ファミリーがこれに含まれる[16)17)]．ABCスーパーファミリーは膜貫通型蛋白であり，細胞毒性物質を能動的に細胞外へ排出もしくは細胞質内の小胞体に封入し，細胞障害を回避する役割を果たす．これらに認識される物質には天然産物が多く，ヒトの進化過程にお

いて接触した経験を有する細胞毒に対し，解毒機構を有する蛋白が随時発現すると解釈される．天然産物由来の抗癌剤には，新規薬剤として期待されているものも多い[18)19)]．しかし，これらの薬剤はABCスーパーファミリーの発現に伴う耐性出現から免れ難い．重金属化合物であるCDDPもMRPに認識され，その抗腫瘍効果を発揮する核内への到達が障害を受ける．一方，代謝拮抗剤としてその合成が報告されてから40年余が経過した5-FUは，投与によりABCスーパーファミリーの誘導が認められるものの，それ自身の薬理作用には影響を受けない．一方，5-FUの抗腫瘍効果には種々の細胞内環境が影響を及ぼす[20)]．第一に，薬剤の活性化や分解に関与する酵素活性が挙げられる．前者にはリボヌクレオチド還元酵素などが含まれ，後者はジヒドロピリミジン脱水素酵素にあたる[21)]．また，5-FUが薬理作用を発揮するために必要な補助因子の濃度も極めて重要である．5-FUの標的酵素であるチミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase, TS) は，デオキシウリジン一燐酸 (deoxyuridine 5'-monophosphate, dUMP) を還元的メチル化によってデオキシチミジン一燐酸に変換するピリミジンヌクレオチドの新たな合成系律速酵素である[22)]．この反応では，メチレンテトラヒドロ葉酸 (5,10-methylenetetrahydrofolate, 5,10-methyleneTHF) がメチル基の供与体となる．5-FUの活性型であるフッ化デオキシ一燐酸 (5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate, FdUMP) は，メチル化されるべきウラシルの五位にフッ素が結合しているためメチル化を受けず，TS本来の基質であるdUMPと比較してはるかに高い親和性をもって5,10-methyleneTHFとともにTSに結合し，不活性三者結合体 (inactive ternary complex, TC) を形成する[23)]．したがって，TSが本来触媒する反応の補因子である5,10-methyleneTHFは，5-FUによるTS阻害においても必須な物質と考えられている．Dohdenら[24)]は，ヒト新鮮胃癌組織を用いた検討で，腫瘍組織内の5,10-methyleneTHFとその前駆体であるテトラヒドロ葉酸 (tetrahydrofolate, THF) 濃度がTSの形成率のみならずその安定性にも深く関与していることを明らかにした．またOmuraら[25)]は，細胞死を誘導しない程度のTS阻害はTS mRNAからTS蛋白への翻訳を持続させ，腫瘍細胞内のTS蛋白量を有意に増加させることを報告した．すなわち，5-FUを使用する際には，5-FUがその抗腫瘍効果を必要かつ十分に発揮できるよう細胞内環境を整えることが極めて重要である[26)]．

5-FUを中心薬剤とした化学療法は，微小管阻害やトポイソメラーゼ阻害など他の作用機序を有する抗癌剤が開発・臨床応用されても，消化器癌に対する第一選択の地位を保っている．その背景には，消化器癌に対する5-FUを中心薬剤とした化学療法の著しい成績の向上がある[8)12)13)]．これは，前述した5-FUの抗腫瘍効果に影響を及ぼす細胞内環境を調節することによって5-FUの抗腫瘍効果の増強を図る生化学的調節 (biochemical modulation) の理念に基づく多剤併用療法によってもたらされた．5-FUの調節因子として欧米ではロイコボリンカルシウム (leucovorin calcium, LV) の有用性が広く認められ，特に結腸・直腸癌では10年以上前から標準的化学療法となっている[27)~30)]．LVはそれ自体が葉酸であり，モノグルタメート型で細胞内に移行する．細胞内の還元型葉酸5,10-methyleneTHFのグルタミン数は，5,10-methyleneTHFとTSおよびFdUMPが形成するTCの安定性に深く関与すると考えられる．すなわち，methyleneTHFに結合しているグルタミン酸数の増加に伴ってTCの安定性は飛躍的に上昇するのである[31)32)]．フォリン酸ポリグルタメート合成酵素 (folyl poly-glutamate synthetase, FPGS) の活性低下の報告は稀であり，また生体内のグルタミン酸供給量は極めて大である．したがって，LV投与に引き続いて細胞内に移行したフォリン酸は，FPGSによって速やかにポリグルタメート型に代謝されると考えられる．Omuraら[25)]は，LV投与に伴う腫瘍細胞内の還元型葉酸濃度の上昇はLVの投与量に依存して上昇することを動物実験で明らかにした．細胞を死に誘導するTS阻害を得るためには，TS蛋白量と比較して十分量のFdUMPとともに同じく十分量のLVを用いる必要がある．

しかし，我が国では5-FUの調節因子 (modulator) としてLVを用いる5-FU/LV療法は大腸癌の化学療法として広く使用されるに至っていない．その理由として，我が国では葉酸代謝拮抗剤であるメトトレキセートの副作用軽減のためにLVが市販されており，1バイアルに3mgを含有するにすぎないことが挙げられる．LVの大量投与には，通常200～300mg/m^{2}が用いられる．したがって，100ないし150バイアルのLVが必要となる．その結果，薬液量が膨大になるのみならず労力，経費の面にも問題が多く，現実性に乏しい化学療法であった．このような背景をもとにして，LVに代わる5-FUの調節因子としてCDDPが注目されるに至った．Scanlonら[33)]は，ラット白血病細胞L1210を用いた試験管内の実験で，CDDPが細胞内へのMetの取り込みを抑制すると報告した．さらにScanlonら[34)]は，ヒト卵巣癌由来の継代細胞株を用いた実験より，CDDPとの接触は腫瘍細胞内の5,10-methyleneTHF，THF濃度上昇をもたらすと報告している．これら一連の研究結果より，CDDPが有する5-FUの抗腫瘍効果増強作用は，その葉酸代謝修飾に起因すると解釈されるに至っている．橋本[35)]は担癌ラットを用いた生体内の実験で，CDDP投与に引き続いて腫瘍内の還元型葉酸濃度が速やかに2倍以上に上昇することを報告した．さらに橋本は，CDDPの投与に引き続く葉酸濃度上昇は一過性で，8時間後に葉酸値は投与前と同じレベルに復すること，CDDPの葉酸濃度上昇作用は，その固有の抗腫瘍効果が発揮されるより遥かに低量で出現することをあわせて報告している．橋本の実験結果に基づけば，CDDPを5-FUの調節因子として用いる際は，通常量の十分の一程度を連日投与することが必要と考えられる．この知見を根拠とした低量反復CDDPと5-FUの併用療法は，現在胃癌・大腸癌に最も高い奏効率を示す化学療法として多くの期待を集めている[4)12)]．

当初低量反復CDDPと5-FUの併用療法は，高い奏効率を示す一方，副作用として相当の消化管毒性と骨髄抑制を認めることが報告された．初期に採用されたCDDPの投与法は，1日あたり10mgを1～2時間かけて点滴静注し，これを一週間に5回，すなわち5日投与2日休みで行うものであった．この場合，4週目には有意なプラチナの蓄積を認めることが判明している．以来，CDDPの投与量を減ずる方向で投与法の変更が行われている．現在では，1日あたり5～7mgの投与が一般的であり，3mgを推奨する施設さえある．しかし，いたずらなCDDPの減量は，化学療法の効果を著しく損ねることになりかねない．CDDPが有する5-FUの効果増強作用がMetの能動輸送阻害に起因するとすれば，輸送担体数に見合ったプラチナを必要とするはずである．さらに，低濃度のCDDPでは十分なMet能動輸送阻害がなされないとすれば，CDDPの持つ5-FUに対す

る抗腫瘍効果増強作用に他の理論的根拠を求めなければならない．

今回の研究結果から，接着状態にある細胞株に対し，CDDPはMetの取り込み阻害作用を有することが判明した．また，かかる作用はCDDPの固有の抗腫瘍性に感受性が高い株ほど顕著にみられた．しかし，これまで報告されている試験管内の実験と異なり，培養液中に浮遊している腫瘍細胞にはCDDPのMetの取り込み阻害作用は発揮されなかった．浮遊細胞においてわずかにMetの取り込み阻害が認められたCDDP濃度100μMは，薬理学的血中濃度を遥かに超えるものである．なお本研究では，Metの取り込み阻害作用が接着細胞にのみ認められるという事象に関し，繰り返し実験を施行してその再現性を確認した．腫瘍細胞が接着状態にあるか否かがCDDPによるMetの取り込み阻害に影響を及ぼすことには，いくつかの機序が考えられる．まず，浮遊状態にある細胞では極めて多数のアミノ酸輸送担体が発現し，CDDPの相対的欠乏によって輸送阻害が成立しない可能性が考えられる．

本研究では，接着状態でCDDPに暴露，その後ただちに浮遊状態に環境を変化させCDDPのMetの取り込み阻害作用を観察する実験も行った．その結果，最終的に浮遊状態に導いた細胞ではCDDPによるMetの腫瘍細胞内への取り込み阻害は認められなかった．すなわち，CDDP曝露時に接触状態においた細胞をMetとの反応時に浮遊状態にした場合は実験当初より浮遊状態においた細胞と同じ結果が得られた．したがって，CDDPによるMetの能動輸送阻害に対する抵抗性をアミノ酸輸送担体の圧倒的多数に求めるとしたら，CDDP曝露後浮遊状態にした操作時間内にその絶対量が増加したことになる．蛋白質であるアミノ酸輸送担体が，このような短時間に大量に発現する可能性は少ない．しかし，アミノ酸輸送担体が細胞質内に他の蛋白などと結合して不活性体として存在し，細胞の浮遊化に伴い解離して膜に移動，機能を発揮する可能性は否定できない．次に，細胞の孤立状態が膜蛋白であるアミノ酸輸送担体の構造を変化させ，その結果CDDPに対する親和性が低下する可能性が考えられる．しかし，CDDPに対する親和性を大きく変化させるアミノ酸輸送担体の構造変化，もしくは荷電状態の変化などが細胞の接着状態の変化のみで惹起される可能性は少ない．細胞の固定状態がCDDPのアミノ酸輸送に及ぼす影響の機序は，今後明らかにされるべきものと考えられた．

橋本[35]はラットを用いた実験で，0.9μMの血中プラチナ濃度により腫瘍細胞内の葉酸濃度の上昇がもたらされると結論づけた．今回24時間接着状態のMKN-45において，Metの取り込みを70.6％阻害したCDDP濃度，すなわち10μMはその約10倍に及ぶ．さらにその濃度は，24時間CDDP暴露でのMKN-45のIC_{50} 1.1μMと比較してもおよそ9倍の濃度であった．つまり，高濃度のCDDPでのみMet能動輸送阻害が観察されたことになる．さらにMKN-45以外の細胞ではMet取り込み阻害はdThdと比べ有意な差を認めなかった．したがって，MKN-45以外の細胞でみられたMetの取り込み阻害は，CDDP固有の抗腫瘍効果による蛋白合成阻害に由来するみかけ上のものとも考えられる．それゆえに，CDDPによる腫瘍内還元型葉酸濃度上昇作用には，CDDPによる細胞膜の中性アミノ酸輸送担体阻害以外の機序も関与しているものと考えられた．

以上，本研究によって接着状態にある胃癌および大腸癌由来の細胞株において，CDDPによるMetの細胞内への取り込み阻害作用が発揮されることが明らかになった．また，その阻害作用はCDDPの抗腫瘍効果に対する感受性とよく相関していた．dThdの取り込みを用いた補正を行った結果，MKN-45においてはCDDPによるMetの細胞内への取り込み阻害は，CDDP固有の細胞毒性を考慮しても有意なものと考えられた．さらに，低量反復CDDPと5-FU併用療法におけるCDDPの5-FUに対する抗腫瘍効果増強作用には，Metの細胞内取り込み阻害以外の機序も関与している可能性が考えられた．CDDPは，5-FUの抗腫瘍効果を増強させる調節因子として極めて期待されている薬剤である．CDDPのMet能動輸送に及ぼす影響や，葉酸代謝修飾の機序をさらに明確にすることは，より有効な癌化学療法の開発に寄与するものと期待される．

結　　論

ヒト胃癌由来細胞株MKN-28とMKN-45，およびヒト大腸癌由来細胞株SW-48，HCT-15を用い，種々の条件下でCDDPがMetの細胞内取り込みに及ぼす影響について検討を行い，以下の結論を得た．

1．MKN-28，MKN-45，SW-48およびHCT-15は，10％非働化ウシ胎児血清を含むRPMI-1640培地内で培養開始24時間後以降，96時間までは全て指数関数的に増殖した．

2．72時間持続接触によるCDDPのIC_{50}は，MKN-28，MKN-45，SW-48，HCT-15においてそれぞれ10.3μM，1.3μM，1.6μM，3.7μMであった．

3．薬剤非添加で培養した場合，全ての細胞株で細胞内に取り込まれて存在する遊離Met量は，30分でほぼ定常量に達していた．

4．蛋白合成の基質として消費されるMet量を反映し，総メチオニン取り込み量は30分経過後も徐々に増加した．

5．細胞を浮遊状態においた場合，いずれの細胞株も2時間のCDDP曝露では，Metの取り込み阻害を受けなかった．また，4時間のCDDP曝露では100μMのCDDPでのみ，MKN-28，MKN-45に有意なMetの取り込み量低下を認めた（$p<0.05$）．

6．MKN-45とHCT-15において，接着状態でCDDPに暴露，その後浮遊状態に環境を変化させてMet取り込みを観察したが，かかる条件下ではMetの取り込み阻害はみられなかった．

7．腫瘍細胞を接着状態においた場合，Metの取り込みはCDDPによって有意に阻害され，12時間の曝露時間と比較して24時間でより顕著であった．また，MKN-45，SW-48といったCDDPの固有の細胞毒性に高い感受性の細胞株ほど，より強くMetの取り込み阻害を受けた．

8．接着状態のMKN-45で観察されたCDDPによるMet取り込み量の低下は，dThdの取り込み量と比較しても有意に低値であった（$p<0.05$）．

以上より，ヒト胃癌・大腸癌由来継代細胞株へのMet取り込み阻害は，接着状態にある細胞で，高濃度のCDDPにのみ認められることが判明した．したがって，低濃度のCDDPによる細胞内葉酸濃度上昇作用には，Met取り込み阻害以外の機序が関与すると考えられた．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を表します．さらに，本研究遂行に際し終始御指導を賜りました大村健二講師をはじめ金沢大学医学部第一外科学講座の諸先生方に深く感謝いたします．

なお，本論文の要旨は第55回日本癌学会総会 (1996年，横浜) において発表した．

文　献

1) 国民衛生の動向・厚生の指標　臨時増刊，第45巻第9号，厚生統計協会，東京，1998

2) Bonenkamp JJ, Hermans J, Sasako M, van de Velde CJH. Extended lymph-node dissection for gastric cancer. Dutch Gastric Cancer Group. N Engl J Med 340: 908-914, 1999

3) Schilsky RL, Choi KE, Grayhack J, Grimmer D, Guarnieri C, and Fullem L. Phase I Clinical and pharmacological study on intraperitoneal cisplatin and fluorouracil in patients with advanced intraabdominal cancer. J Clin Oncol 8: 2054-2061, 1990

4) 大村健二．進行胃癌に対する5-FU+CDDP療法ーその理論と実際ー．進行胃癌に対する治療戦略ー遺伝子診断から集学的治療までー (宮崎逸夫，米村　豊編)，第1版，124-130頁，ソフトサイエンス社，東京，1995

5) Brenner DE. Intraperitoneal chemotherapy: A review. J Clin Oncol 4: 1135-1147, 1986

6) Robinson BJ, Rice TW, Strong SA, Rybicki LA, Blackstone EH. Is resection of plumonary and hepatic metastases warranted in patients with colorectal cancer? J Thorac Cardiovasc Surg 117: 66-76, 1999

7) Miyazaki M, Itoh H, Nakagawa K, Ambiru s, Shimizu H, Togawa A, Shiobara M, Ohtsuka M, Sasada K, Shimizu Y, Yoshioka S, Nakajima N, Suwa T, Kimura F. Heparic resection of liver metastases from gastric carcinoma. Am J Gastroenterol 92: 490-493, 1997

8) 石田文生，大村健二，金平永二，橋本琢生，渡辺　透，平野勝康，渡邊俊一，渡邊洋宇．大腸癌肝転移に対する 5-FU＋CDDP療法の検討．日本大腸肛門病会誌 47: 461-465, 1994

9) Duschinsky R, Pleven E, and Heidelberger C. The synthesis of 5-fluoropyrimidines. J Am Chem Soc 79: 4559-4560, 1957

10) Rosenberg B, Van Camp L, and Krigas T. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. Nature 205: 698-699, 1965

11) Rosenberg B, Van Camp L, Trasko JE, and Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent anti-tumor agents. Nature 222: 385-386, 1969

12) 橋本琢生，大村健二，石田文生，渡邊洋宇．進行・再発消化器癌に対するCDDP・5-FU (UFT) 併用療法の臨床効果．癌と化学療法 20: 1333-1338, 1993

13) 佐治重豊，相羽恵介，荒木　浩，佐々木一晃，白坂哲彦，曽和融生，田中正俊，鄭　容錫，峠　哲哉，平田公一，安元公正，山光　進，和田洋巳．低用量CDDP・5-FU療法の現況についてー全国アンケートを中心としてー．癌と化学療法 24: 1892-1900, 1997

14) Shirasaka T, Shimamoto Y, Ohshimo H, Saito H, and Fukushima M. Metabolic basis of the synergistic antitumor activities of 5-fluorouracil and cisplatin in roden tumor models in vivo. Cancer Chemother Pharmacol 32: 167-172, 1993

15) Izquierdo MA, Neefjes JJ, Mathari AE, Flens MJ, Scheffer GL, and Scheper RJ. Overexpression of the ABC transporter TAP in multidrug-resistant human cancer cell lines. Br J Cancer 74: 1961-1967, 1996

16) Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from mutidrug-resistance human cells. Cell 47: 381-389, 1986

17) Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kuruz EU, Duncan AMV, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in mutidrugresistant human lung cancer cell line. Science 258: 1650-1654, 1992

18) Saijo N. Clinical trial of irinotecan hydrochloride (CPT, campto injection, topotecin injection) in Japan. Ann N Y Acad Sci 803: 292-305, 1996

19) 田口鐵男，坂田 優，金丸龍之介，栗原　稔，住永雅司，太田　潤，平林直樹．進行・再発胃癌に対するRP56976 (Docetaxel) 後期第二相臨床試験多施設共同研究 (Aグループ)．癌と化学療法 25: 1915-1924, 1998

20) Spears CP, Hayes AA, Shahinian AH, Danenberg PV. Deoxyuridylate effects on thymidylate synthase-5-fluorodeoxyuridylate-folate ternary complex formation. Biochem Pharmacol 38: 2985-2993, 1989

21) Etienne MC, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Dassonville O, Renee N, Schneider M, Thyss A, Demard F, Milano G. Response to fluorouracil therapy in cancer patients: The role of tumoral dihydropyridine dehydrogenase activity. J Clin Oncol 13: 1663-1670, 1995

22) Danenberg PV. Thymidylate synthetase-a target enzyme in cancer chemotherapy. Biochem Biophys Acta 473: 73-92, 1977

23) Matthews DA, Appelt K, Oatley SJ, Xoung NH. Crystal structure of Escherichia coli thymidylate synthase containing bound 5-fluoro-2'-deoxyuridylate and 10-propargyl-5,8-dideazafolate. J Mol Biol 214: 923-936, 1990

24) Dohden K, Omura K, Watanabe Y. Ternary complex formation and reduced folate in surgical specimens of human adenocarcinoma tissues. Cancer 71: 471-480, 1993

25) Omura K, Misaki T, Hashimoto T, Kanehira E, Watanabe T, Ishida F, Watanabe Y, Shirasaka T. Changes in folate concentration in Yoshida sarcoma after administration of leucovorin or cisplatin. Cancer Chemother Pharmacol 35: 183-187, 1995

26) Kemeny N, Lokichi JJ, Anderson N, Ahlgren D. Recent advances in the treatment of advanced colorectal cancer. Cancer 71: 9-18, 1993

27) Doroshow JH, Multhauf P, Leong L, Margolin K, Litchfield T, Akman S, Carr B, Bertrand M, Goldberg D, Blayney D, Odujinrin O, Delap R, Shuster J, Newman E. Prospective randomized comparison of fluorouracil versus fluorouracil and high-dose continuous infusion leucovorin calcium for the treatment of advanced measurable colorectal cancer in patients previously unexposed to chemotherapy. J Clin Oncol 8: 491-501, 1990

28) Rustum YM, Trave F, Zakrzewski SF, Petrelli N, Herrera L, Mittelman A, Arbuck SG, Creaven PJ. Biochemical and pharmacologic basis for potentiation of 5-fluorouracil action by

leucovorin. NCI Monogr 5: 165-170, 1987
29) Valone FH, Friedman MA, Wittlinger PS, Drakes T, Eisenberg PD, Malec M, Hannigan JF, Brown Jr BW. Treatment of patients with advanced colorectal carcinomas with fluorouracil alone, high-dose leucovorin plus fluorouracil, or sequential methotrexate, fluorouracil, and leucovorin: A randomized trial of the Northern California Oncology Group. J Clin Oncol 7: 1427-1436, 1989
30) Laufman LR, Brenckman Jr WD, Stydnicki KA, Morgan ED, Collier M, Knick VB, Duch DS, Mullin R, Ferone R. Clinical experience with leucovorin and 5-fluorouracil. Cancer 63: 1031-1035, 1989
31) Allegra CJ, Chabner BA, Drake JC, Lutz R, Rodbard D, Jolivet J. Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates. J Biol Chem 260: 9720-9726, 1985
32) Radparvar S, Houghton PJ, and Houghton JA. Effect of polyglutamylation of 5,10-methylenetetrahydrofolate on the binding of 5-fluoro-2'-deoxyuridylate to thymidylate synthase purified from a human colon adenocarcinoma xenograft. Biochem Pharmacol 38: 335-342, 1989
33) Scanlon KJ, Safirstein RL, Thies H, Gross RB, Waxman S, Guttenplan JB. Inhibition of amino acid transport by cis-diamminedichloroplatinum (II) derivatives in L1210 murine leukemia cells. Cancer Res 43: 4211-4215, 1983
34) Scanlon KJ, Newman EM, Lu Y, Priest DG. Biochemical basis for cisplatin and 5-fluorouracil synergism in human ovarian carcinoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 83: 8923-8925, 1986
35) 橋本琢生. フッ化ピリミジン系抗がん剤の抗腫瘍効果増強に関する基礎的研究. 十全医会誌 102: 658-670, 1993

Inhibition of Methionine Transport by cis-Diammine dichloroplatinum [II] (CDDP) in Human Gastric and Colorectal Cancer Cells

Masaru Kawanishi, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **108,** 592 — 601 (1999)

Key words biochemical modulation, methionine, 5-fluorouracil, cis-diammine dichloroplatinum[II], amino acid transporter

Abstract

Recently, chemotherapy by repeated administration of cisplatin (cis-diammine dichloroplatinum [II], CDDP) at low doses as a modulatory drug for 5-fluorouracil (5-FU) has been attracting attention, and a high efficacy has been reported for gastric and colorectal cancers. The effect of CDDP on enhancing the antitumor effects of 5-FU has been explained as due to an elevation of the intracellular folate concentration caused by a series of reactions starting with the inhibition of active transport of methionine (Met) at the cell membrane. However, basic research of this therapy for gastric or colorectal cancers has not yet been performed. In this study, using cell lines derived from human gastric and colorectal cancers, the effect of CDDP on Met uptake into tumor cells was investigated. Human gastric cancer-derived cell lines MKN-28 and MKN-45, and cell lines derived from human colorectal cancers, SW-48 and HCT-15, were used. The IC_{50} of CDDP by continuous exposure for 72 hours was 10.3, 1.3, 1.6 and 3.7μM in MKN-28, MKN-45, SW-48, and HCT-15, respectively. When cells were maintained in suspension, Met uptake was not inhibited at two hours of exposure to CDDP in any of the cell lines. At four hours of exposure to CDDP, Met uptake was significantly decreased in MKN-28 and MKN-45 at 100μM ($p < 0.05$). When adherent MKN-45 and HCT-15 were exposed to CDDP, and then the culture environment was changed to suspension, inhibition of Met uptake was not detected. However, when tumor cells were kept adherent throughout, Met uptake was significantly inhibited by CDDP. The inhibition of uptake observed under these conditions was more marked after 24 hours of exposure than after 12 hours. Furthermore, inhibition of Met uptake was greater in MKN-45 and SW-48 cell lines, which are highly senstitive to the proper cytotoxicity of CDDP. The amount of Met uptake after exposure to CDDP in adherent MKN-45 was significantly decreased compared to that in thymidine uptake, which was also simultaneously decreased after exposure to CDDP ($p < 0.05$). These findings show that inhibition of Met uptake by CDDP in human gastric and colorectal cancer-derived cell lines was only detected in adherent cells at a pharmacological CDDP concentration. Therefore, a mechanism other than inhibition of Met uptake may be involved in the elevation of intracellular folate concentrations caused by low concentrations of CDDP.