

Effects of High Dose ACNU Chemotherapy with Syngeneic Bone Marrow Transplantation on Experimental Brain Tumors in Rats

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/2297/8216

ラット実験的脳腫瘍における自家骨髄移植を併用した 抗癌剤大量療法に関する基礎的研究

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

蘇 馬 真理子

(平成2年7月31日受付)

ニトロソウレア系抗癌剤 3-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl]-1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea hydrochloride (ACNU) の抗腫瘍効果は投与量に依存するが、その最大の副作用である骨髄抑制により投与量が制限されている。その骨髄抑制を自家骨髄移植によって克服し、抗癌剤大量投与により抗腫瘍効果を高めることができるか否かを Fischer ラットにおいて検討した。ラットに大量の ACNU (20mg/kg, 25mg/kg, 30mg/kg, 各群10匹) を静注し、2日後に $1.6-6.6 \times 10^7$ の近交系ラットの骨髄細胞または脾細胞を移植した後、骨髄移植群と非移植群間で末梢白血球数の回復を比較した。非移植群と比較して骨髄移植群ではそれぞれの投与群で10, 45, 11日目より有意な白血球数の増加が認められた。長期経過観察における死因は極度の骨髄抑制であり、これによる死亡数は骨髄移植群で少数であった。次に、ACNU に感受性のある9Lラットグリオーマ (1×10^5 個) を定位脳手術的にラット脳内に移植し、7日後に ACNU 2mg/kg, 10mg/kg, 25mg/kg を各10匹3群に投与し、生存期間を検討した。25mg/kg 群においてはさらに骨髄移植群 (10匹) を設けた。生存期間中央値 (median survival time, MST) は、2mg/kg, 10mg/kg, 25mg/kg の非移植群、および25mg/kg の移植群で、それぞれ15.6日、20.7日、75.1日、92.6日で、投与量依存的に生存期間の延長を認めた。骨髄移植群は非移植群と比較して白血球数の回復が速やかであった。以上より、自家骨髄移植を併用した抗癌剤大量療法を行えば、骨髄抑制を緩和し、抗腫瘍効果を高めることができるものと期待される。

Key words high dose chemotherapy, ACNU, autologous bone marrow transplantation, gliomas

悪性グリオーマは、外科的治療のみでは完全治癒が期待できない。手術に加えて放射線療法、化学療法、免疫学的療法を含む集学的療法が行なわれているが、その長期的治療成績はきわめて悪いのが現状である。中でも最も悪性度の高い多形性膠芽腫の median survival time (MST) については、ほぼ8.7~20.9カ月¹⁻³⁾と報告されている。わが国の統計では、診断確定後の MST はおよそ12カ月であり、治療5年後の生存率は10%以下である⁴⁵⁾。

悪性グリオーマの予後を決定する因子のうちで最も

重要なものは、1) 年齢、2) 組織学的悪性度、3) 外科的摘出程度、4) 放射線治療の有無である。放射線療法に関しては、現在用いられている標準的な外照射には一定の評価は与えられている⁶⁾が、その効果には限界がある。化学療法においては多種の抗癌剤が試みられているが、いまだに満足すべき成果は得られていない。しかしその中であって悪性グリオーマに最も有効なのはニトロソウレア系の抗癌剤であるといわれている¹⁷⁾。さらに良好な効果を得るためには、感受性のある症例に対して、副作用を克服して出来るかぎり

Abbreviations: ACNU, 3-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl]-1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea hydrochloride; BCNU, 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea; BMT, bone marrow transplantation; MST, median survival time; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; WBC, white blood cell

高濃度の薬剤を腫瘍に到達させるということが必要である。すなわち、薬剤のより適切な投与経路の選択と、より大量の薬剤を投与する方法の開発という2点が主な課題である。前者の例として、動脈内投与⁸⁹⁾、と局所投与がある。後者の例として、従来の化学療法の最大の制限因子であった骨髄抑制を自家骨髄移植によって緩和し、通常量をはるかに上まわる薬剤量を投与する大量化学療法があげられる。

悪性グリオーマに対する自家骨髄移植併用大量療法の最初の報告は、1980年の Hildebrand⁹⁰⁾ らによるものであるが、本当の意味で“大量”の抗癌剤を使用して本療法を行なったと思われるのは1981年の Hochberg⁹¹⁾ の 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) を使用した報告である。以来、いくつかの臨床報告があるが、手術、放射線療法、大量療法の薬剤量および施行時期の相違があり、その効果は一定していない¹²⁻¹⁷⁾。これらの報告では抗癌剤として BCNU、または 3-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl]-1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea hydrochloride (ACNU) が使用されているが、個々の症例の抗癌剤に対する感受性も明確にされていない。また、これまでに動物における大量療法の効果に関する研究はなされていない。今回著者は、抗癌剤に対する腫瘍の感受性、抗癌剤の腫瘍組織への到達度、抗癌剤大量療法と自家骨髄移植との併用による、骨髄抑制の克服、およびそれによる抗腫瘍効果の向上の可能性についてラットを用いて検討した。

材料および方法

I. 実験動物、および抗癌剤

実験動物は、近交系の Fischer 雌ラット (日本エスエルシー、浜松市)、10~12週齢、体重154~172g を使用した。

抗癌剤には、日本において悪性グリオーマの治療に広く利用されている水溶性ニトロソウレア系の薬剤である ACNU (三共、東京) を使用した。

II. 骨髄移植の効果判定

ラットに ACNU の1回尾静脈内投与を行ない、2ヵ月間の死亡率を求めた。ACNU は1匹あたりの静注量が、ほぼ0.5~1.0ml となるように生理食塩水に溶解し、ただちに使用した。ACNU 各投与量における2ヵ月間の死亡率は、体重あたり24mg/kg、25mg/kg、26mg/kg、30mg/kg、34mg/kg、40mg/kg でそれぞれ0、10、60、70、80、100%であった。これらの死亡率を Probit 変換し、 $LD_{50}=28.09\text{mg/kg}$ を得た。

これに基づいて、ACNU 20mg/kg 投与群、25mg/kg

投与群、30mg/kg 投与群の3群を設け、各群を、骨髄移植群 (bone marrow transplantation group, BMT 群)、非移植群 (non-BMT 群) 各10匹ずつに分けた。ACNU 静注後、48時間後に骨髄移植を施行した。別に準備しておいた近交系 Fischer ラットの大腿骨、上腕骨より骨髄細胞を、脾臓より脾細胞を採取し1匹あたり $1.6-6.6 \times 10^7$ の骨髄細胞または脾細胞を移植した。以後2ヵ月間末梢白血球数を測定し、各投与量において non-BMT 群と比較した。

この期間の死亡例においては、死後可及的に早く、肺、肝、脾、腎、消化管、心臓、および骨髄組織として大腿骨を摘出し、HE 染色を行ない死因を検索した。

III. ACNU 大量投与の抗腫瘍効果判定

1. 移植腫瘍および感受性試験

培養フラスコ内で継代培養した 9L, T9, C6 の3種のラット悪性グリオーマを以下の方法にて感受性試験を行なった。

1) MTT 法 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay)¹⁸⁾

96穴マイクロプレートに腫瘍細胞浮遊液を各穴180 μl ずつ分注し、接触濃度の10倍濃度に調整した20 μl の ACNU 水溶液を加え、200 μl とした。腫瘍細胞は1穴あたり 1×10^4 となるようにした。腫瘍と接触させる濃度は5~6段階設定した。これを72時間培養後、リン酸緩衝液に溶解させた MTT (シグマ社、セントルイス、米国) 溶解液 (2mg/ml) 25 μl を加えた。これをさらに37°C、4時間培養後上清を捨て、dimethylsulfoxide (DMSO) 200 μl 添加後540nm における吸光度を測定した。各濃度における吸光度より、細胞成長抑制率を求め感受性を検討した。

2) 鶏卵法¹⁹⁾

孵化10~11日目の鶏卵の漿尿膜上に各 1×10^6 の腫瘍細胞を移植し、移植3日後 ACNU を漿尿膜上の血管内に投与した。ACNU 投与量は、50 $\mu\text{g/egg}$ 、100 $\mu\text{g/egg}$ 、200 $\mu\text{g/egg}$ 、それぞれ10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg に相当する3段階、各投与量について8~10個とした。さらに4日後に腫瘍重量を測定し、腫瘍形成能 (tumorigenicity) を判定した。

9L グリオーマは MTT 法においては図1-Aのごとく ACNU 濃度の対数に比例して細胞成長抑制率が上昇しており、鶏卵法でも図1-Bのように投与量に比例して成長抑制率の上昇が認められ、ACNU に感受性ありと判定し、移植腫瘍として選択した。

2. 移植腫瘍に対する抗腫瘍効果の判定

ラットをケタラールで麻酔後、冠状縫合上で、矢状

縫合より右に 3mm の位置に直径約 1.5mm の穿頭を行ない、脳表より 5mm の深さ、すなわち右尾状核被殻部に 1×10^5 の腫瘍細胞を定位脳手術的に移植した。腫瘍は 0.5% の寒天を含む培地で 1×10^7 /ml に調整し、 $10 \mu\text{l}$ を同部に注入した。腫瘍移植後 7 日目に

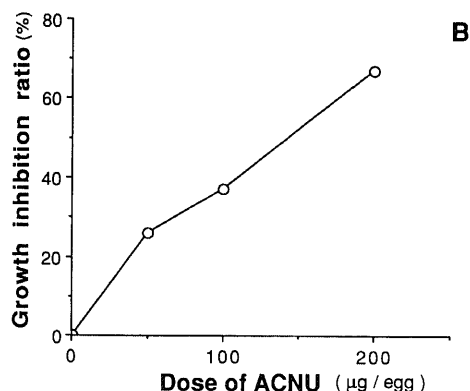
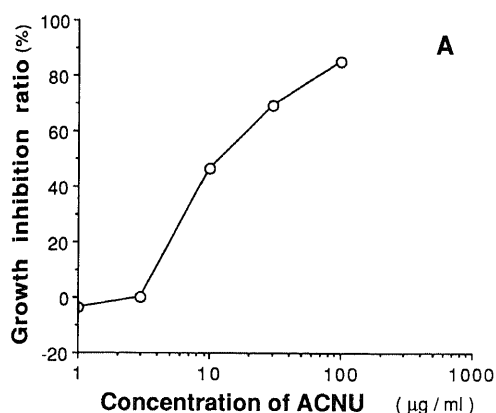


Fig. 1. Effects of ACNU on rat 9L glioma cells (A) Dose response curve for 9L glioma cells of MTT assay: $180 \mu\text{l}$ of 9L glioma cells ($10^4/200 \mu\text{l}$) were inoculated into each well followed by addition of $20 \mu\text{l}$ of $10 \times$ concentration of ACNU and incubated for 72 hours. Values are mean from a single experiment calculated from quadruplicate wells subtracting background. (B) Dose response curve for 9L glioma cells of chick embryo assay: ACNU was administered 3 days after tumor inoculation (10^6 cells) and tumors were excised and weighed after 4 days incubation. Values are mean calculated from 8 to 10 tumor weight.

ACNU を投与した。ACNU 2mg/kg, 10mg/kg, 25 mg/kg 投与群 (non-BMT 群), 25mg/kg 投与 2 日後に骨髓移植を施行した群 (BMT 群), および ACNU 非投与の対照群の 5 群を設定し、各群 10 匹とした。これら 5 群の生存率および末梢血白血球数の推移を比較検討した。

3. 腫瘍内 ACNU 濃度の比較

大量投与により腫瘍内 ACNU 濃度が通常量投与より上昇しているか否かを、通常量投与群 (2mg/kg), 大量投与群 (25mg/kg) 各 10 匹において比較した。腫瘍移植後 11 日目のラットを ACNU 静注後 25 分後にエーテルにて麻酔後、心臓採血し、ただちに断頭開頭し腫瘍を摘出した。腫瘍は重量測定後ただちに凍結保存し、後で高速液体クロマトグラフィー法²⁰⁾より各腫瘍内の ACNU 濃度を測定した。

IV. 大量投与による副作用の検討

白血球数が ACNU 投与前値に回復した後、長期経過観察における BMT 群, non-BMT 群間の生存率を比較検討した。また全例において、肺、肝、脾、腎、消化管、心臓、および骨髓組織として大腿骨を摘出し、ホルマリン固定後 HE 染色し、組織学的検査を行った。

V. 統計学的検定

測定結果は、外れ値を山内法²¹⁾にて棄却検定したうえ、すべて平均値の 95% 信頼区間で示した。ACNU 各投与量における白血球数の BMT 群および non-BMT 群の平均値の差の検定は、2 元配置分散分析の後、Student の t 検定を行った。ACNU 濃度の通常量投与群、大量投与群間の検定も同様に行なった。ACNU 大量投与後の BMT 群, non-BMT 群間の骨髓移植後 60 日目の生存率の比較は Kaplan-Meier 法により行ない、60 日以降の生存率の比較は、Fisher の直接確率計算法により検定した。MST は各測定時期における生存率を Probit 変換して求め、その群間比較は Student の t 検定を用いた。すべて $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

I. 骨髓移植の効果

ACNU 20mg/kg 投与群において、骨髓移植 10 日目より BMT 群で non-BMT 群に比較して末梢血白血球数が有意に増加した。ACNU 投与前値に回復したのは BMT 群で 24 日, non-BMT 群では 73 日であった (図 2-A)。

25mg/kg 投与群では、2 元配置分散分析において、BMT 群, non-BMT 群の 2 群間に有意差があり、骨

腫瘍移植後45日目、65日目に有意差が認められた。また23日目よりBMT群がnon-BMT群より高値を示す傾向がみられた(図2-B)。2カ月後の生存数はnon-BMT群において10匹中8匹、BMT群では10匹で $p=0.02$ と有意差が認められた。死因は全例出血傾向であった。

30mg/kg投与群においては、骨髄移植後11日目よりBMT群がnon-BMT群に比較して有意に白血球数の増加を示し、34日目にはほぼ前値に回復した(図2-C)が、non-BMT群では2カ月後もACNU投与前値には回復しなかった。60日間の生存数は、BMT群において10匹中1匹、non-BMT群では3匹と有意差は認められなかった。死因は25mg/kg群と同様全例出血傾向であった。

腫瘍移植群においてACNU 25mg/kg投与群で、腫瘍移植後、7日目後にACNU投与さらに2日後に骨髄移植を施行した。末梢血白血球数を腫瘍による死亡例が現れるまで測定した。2元配置分散分析で、両群間に有意差が認められ、骨髄移植後17日目、35日目にBMT群において抹消血白血球数がnon-BMT群に対して有意に上昇していた(図2-D)。

II. 大量投与の抗腫瘍効果

1. 移植腫瘍に対する抗腫瘍効果

ACNUの投与量を増加させるにしたがって、生存日数の延長が認められた(図3-A)。MSTは対照群12.8日に対して、通常量投与群(2mg/kg)で15.6日で有意差はなかった。10mg/kg投与群では20.7日で前2群と比較して有意差を認め、さらに大量投与群(25

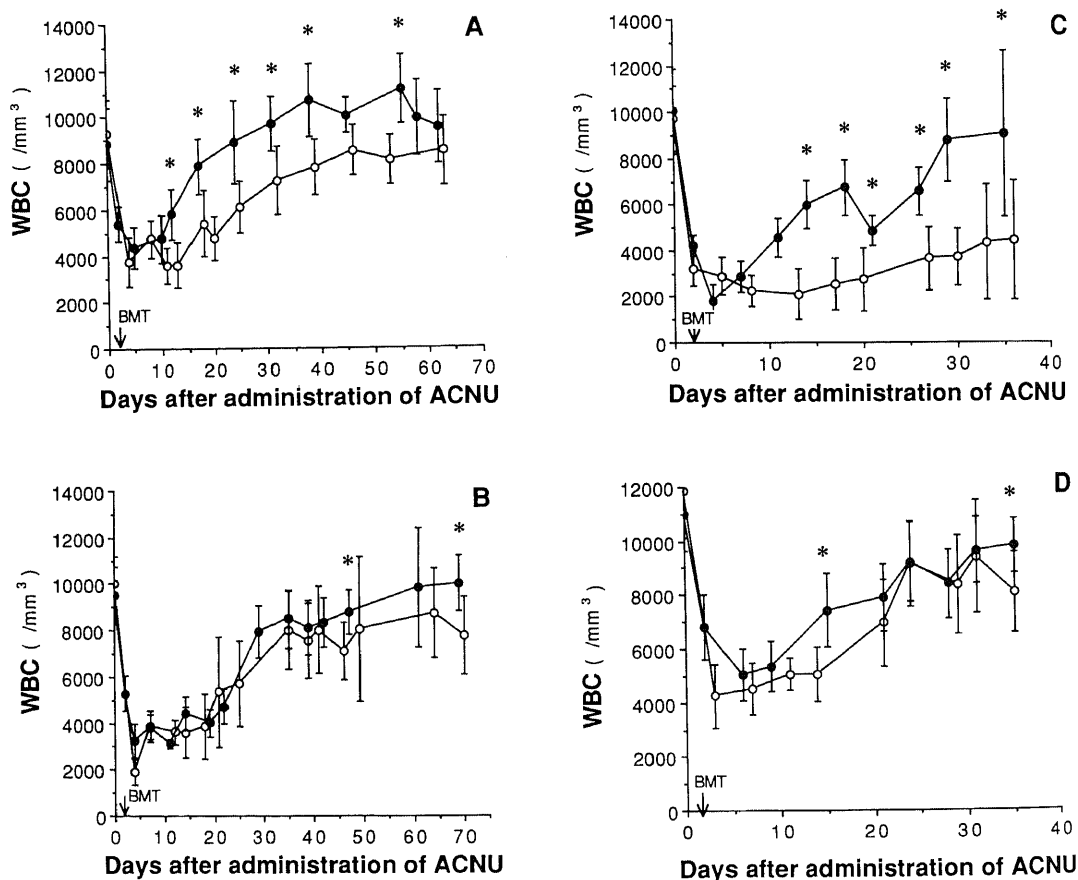


Fig. 2. Recovery of peripheral blood WBC after administration of ACNU. The dose of ACNU is (A) 20mg/kg per body weight (B) 25mg/kg, (C) 30mg/kg in the groups without tumor inoculation and (D) 25mg/kg in the groups with tumor inoculation. ●, with BMT; ○, without BMT. Values are mean and 95% confidence limit (n=10). *, $p<0.05$ by 2-way analysis of variance with Student's t-test.

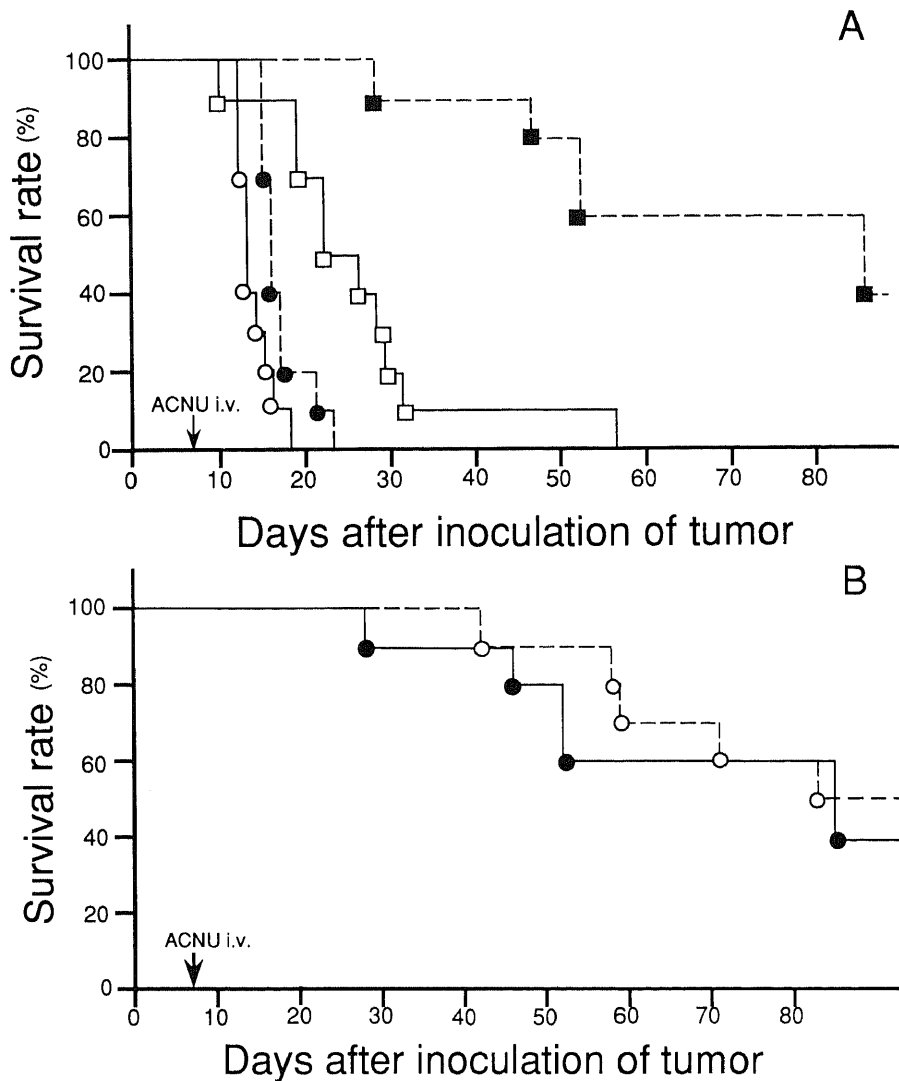


Fig. 3. Survival rates of animals after administration of ACNU.

(A) Group without BMT. Doses of ACNU administered.

■, 25mg/kg per body weight; □, 10mg/kg; ●, 2mg/kg; ○, no ACNU.

(B) Group of high dose of ACNU (25mg/kg).

○, with BMT; ●, without BMT. The numbers of animals is 10 in each group.

Table 1. Number of surviving rats after administration of ACNU (chronic stage)

dose of ACNU months	20 mg/kg		25 mg/kg			30 mg/kg 7M
	8M	10M	3M	4M	5M	
BMT (-)	3	1	7	6	4	0
BMT (+)	6	6*	10	10*	9*	1

The number of rats is 10 in each group

*, $p < 0.05$ by Fisher's exact probability test

mg/kg) では75.1日と著明な延長を認めた。大量投与群ではさらに骨髓移植を行なった BMT 群を設けたが、MST は BMT 群92.6日で、non-BMT 群の75.1日に対して有意差は認めなかった(図3-B)。死後の解剖により、全例腫瘍死であることを確認した。

2. 腫瘍内 ACNU 濃度の比較

ACNU の腫瘍内濃度は通常量投与群 (2mg/kg) で $0.247 \pm 0.102 \mu\text{g}/50\text{mg}$ に対して大量投与群 (25mg/kg) は $3.911 \pm 0.586 \mu\text{g}/50\text{mg}$ であり、 $p < 0.01$ で有意に上昇していた。

III. 大量投与後長期経過観察における生存率および副作用

20mg/kg 群で ACNU 投与後10カ月の時点において、生存数が non-BMT 群で10匹中1匹、BMT 群10匹中6匹で有意差を認めた。non-BMT 群の生存例1匹も極度の体重減少をきたし衰弱しており、まもなく死亡すると考えられた時点で組織学的検査のため屠殺した。25mg/kg 群においては、4カ月目で BMT 群が全例生存していたのに対し、non-BMT 群では生存数が10匹中6匹で有意差を認め、5カ月目では BMT 群に1匹死亡を認めたが、依然として有意差がみられた。non-BMT 群の生存例4匹中3匹は20mg/kg 群と同様体重減少をきたし、衰弱していた。30mg/kg では、76日以内に出血傾向にて、non-BMT 群では10匹全例、BMT 群では10匹中9匹が死亡した。7カ月後では、BMT 群でその1匹が生存していたが non-BMT 群と有意差はなく、その1匹も極度の体重減少をきたし衰弱し、まもなく死亡すると予測された(表1)。

全例における組織学的所見では、死亡例および死亡直前のものは、骨髓が脂肪に置換されており、中には骨髓内出血を認めるものもあり、死因は極度の骨髓抑制と考えられた。体重減少を示さず衰弱を認めないものでは、骨髓抑制は認められなかった。間質性肺炎等の他臓器の変化は検索した限りでは1例も認められなかった。

考 察

悪性腫瘍の治療の副作用による骨髓抑制を自家骨髓移植で救うという概念は1958年、Kurnick ら²⁹⁾より初めて報告された。彼らは、臨床例において放射線療法後の骨髓抑制を自家骨髓移植によって代償することを試みている。その後の数年間、他施設においても放射線治療や化学療法による骨髓抑制の緩和のため、この方法が試みられたが、満足すべき効果は得られなかった^{29)~27)}。その原因として本療法によっても避けられな

い一過性骨髓機能抑制期間中の患者支持療法が不十分であったこと、また骨髓採取、分離、保存の方法にも技術的な問題があったこと、またそれ以上に抗癌剤の投与量が不十分であったことが指摘されている²⁹⁾。これらの問題点を踏まえ、骨髓処理方法や患者支持療法の進歩に支えられ、さらには白血病における他家骨髓移植の目覚ましい治療成果にも刺激されて、再び本療法が脚光を浴びている。

自家骨髓移植を併用した抗癌剤大量療法を行なう際の必要条件として以下の4つがあげられる。

1. 腫瘍が使用しようとする抗癌剤に対して感受性を有している。
2. 薬剤の抗腫瘍効果が用量依存的である。
3. 最大の副作用である骨髓抑制が自家骨髓移植により緩和できる。
4. 他の副作用は対処可能である。

本療法は、脳神経外科領域以外では、肺小細胞癌、乳癌、神経芽細胞腫、悪性黒色腫、泌尿生殖器癌、骨肉腫等の再発例、または地固め療法的に施行されているが、これは本来化学療法に感受性をもつ腫瘍が多く、生存率の有意な延長は認められていないが、奏効率は上昇している^{29)~34)}。田島ら³⁵⁾は、9年間に173例256回本療法を施行しているが、奏効率は、乳癌で67.9%、肺癌で50.0%、それに対して脾、胆嚢癌18.2%と本来感受性のないものは不良であり、治療対象となる個々の腫瘍の、使用する個々の抗癌剤に対する感受性は重要であるといえる。今回の実験においても実験腫瘍として ACNU に感受性をもつ9Lグリオーマを選択した。文献上の大量化学療法^{29)~35)}は個々の腫瘍における感受性については言及されていないが、比較的簡便な感受性試験は試してみる価値が十分にあると考えられる。この実験では効果判定に要する期間が3日間と比較的短かいMTT法と、さらに多剤効果も判定できて効果判定期間が7日間の鶏卵法を使用した。

効果的な薬剤を許容最大限度まで用いようとする大量化学療法は以下の仮設を基礎においている。すなわち、ある腫瘍が特定の薬剤に対して感受性があるならば、用量-反応曲線は直線に近くなり、薬剤が腫瘍に対して感受性が高くなればなるほど、直線の傾きは急峻となる³⁶⁾。実際、単位期間で抗腫瘍剤の投与量を安全に倍量にできれば、感受性のある腫瘍では、抗腫瘍剤の倍量投与が2倍以上の抗腫瘍効果をもたらすことが実験動物においても確認されている³⁷⁾³⁸⁾。本実験の9Lラット実験腫瘍においても、MTT法、鶏卵法で理想的な用量-反応関係が得られている。また実際に

ラットの生体内において腫瘍が ACNU 投与量が多いほど、高濃度の薬剤に暴露されていたことは、生体内においても MTT 法等の生体外での用量依存性を再現できることを示しているといえる。生体外で得られた用量依存性の結果は生体内でも忠実に抗腫瘍効果に反映され、投与量に比例して MST の延長が認められた。これに対し、実際の悪性グリオーマでは必ずしも投与量と抗腫瘍効果は相関しない。腫瘍細胞に性状の多様性 (heterogeneity) があり、個々の腫瘍で薬剤に対する感受性に差異が見られ^{40,41)}、かつ薬剤の腫瘍内分布が一樣とならないからである⁴¹⁾。実験腫瘍は継代されており、多様性は少なくなっているため、比較的均一な腫瘍内濃度が得られ、それが忠実に生存率に反映された可能性がある。しかし、一方で抵抗性を示す腫瘍が高閾値抵抗性であり、ある量を超えたところで感受性を示す場合もあり大量投与によりこれらの問題は多少なりとも解決される可能性がある³⁹⁾。

固形癌に対する本療法は、白血病のように全身照射および化学療法により骨髄機能を全廃させることが目的ではなく、抗癌剤の投与量も骨髄機能を全廃するほどの超大量という範疇には入らない。したがって化学療法に生体内で耐えた骨髄幹細胞が骨髄機能回復に参加している可能性は否定できず、自家骨髄移植であるので移植生着したものが骨髄機能再構築の早期回復の大部分をなしているかを証明する手段もない。BCNU の投与量の増量は骨髄抑制をより高度で長期化させる⁴²⁾が、末梢血白血球数回復は薬剤投与量によらず移植した骨髄幹細胞数、それらのコロニー形成能に相関することから間接的に骨髄移植が効果的であるといわれているが¹²⁾、確証はない。さらに臨床例では対照群を設けて比較することは困難である。しかしながら本実験においては 20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg 群、3 群ともに白血球数の有意な早期回復を認めたという事実は骨髄移植の効果を示すものであり、ヒトにおける骨髄移植の有用性を示唆するものである。また白血球数が一旦回復したにもかかわらず慢性期における死亡原因が骨髄抑制であり、この骨髄抑制による死亡率が BMT 群において有意に低かった。このことより ACNU 大量投与後は、一旦白血球数が回復しても、抗腫瘍効果が得られ長期生存した場合、骨髄移植施行の有無が生存率に反映され则认为られる。

BMT 群においても non-BMT 群においても、骨髄機能回復期間中約 2 カ月の死因は全例出血傾向であった。これは血小板減少によると考えられる。これは、ヒトでは血小板輸血にて対処可能である。臨床例、本実験のラットにおいてもわかるように、自家骨髄移植

を併用しても骨髄機能抑制は完全に回避されず、白血球数の最低値も変わらず、骨髄抑制期間を安全な患者管理が可能にまで短縮できるに過ぎない。しかし、これゆえに抗癌剤を安全に増量できるのである。さらに最近では本療法の支持療法として、骨髄細胞の増殖、分化を促進する各種造血因子の cDNA のクローニングがなされ、recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rGM-CSF) などの臨床面での応用が可能となっている⁴³⁾。

自家骨髄移植を併用した大量化学療法では、最大耐用量のみならず、骨髄抑制を克服した次に来る副作用も重要な問題となる。ニトロソウレア系抗癌剤の副作用としては、肺障害、肝障害、腎障害、胃腸障害、脳障害等があげられるが¹²⁾、最も重要なものは肺障害である。その発生率は BCNU では 1.3~15% であり、間質性肺炎等の拘束性疾患である^{44~46)}。水島ら⁴⁷⁾は Sprague-Dawley ラットで大量 ACNU 投与後間質性肺炎を認めているが、本実験では肺病変は認めなかった。その理由として 1) 出血傾向により死亡したため肺病変を起こすにいたらなかった、2) Fischer ラットが肺病変を生じにくい、3) ACNU そのものが肺病変を起こしにくい、などが考えられるが断定はできない。ラットでの反応は参考に過ぎず、ACNU においても肺毒性の報告^{48,49)}がみられていることより注意を払う必要がある。また肝毒性にも注意すべきで、肝炎による死亡例も認められている。脳障害は、肺や肝の許容量以上の投与でのみ出現しており、その他の臓器へは影響は少なく、骨髄抑制を克服した場合、投与量は肺毒性、肝毒性によって制限されると思われる。

以上のように未解決の問題も多いが、自家骨髄移植を併用した抗癌剤大量投与は、悪性グリオーマの治療として有用である可能性がある。悪性グリオーマは 1) 完全摘出が不可能であること、2) 中枢神経系以外へ転移しないため、採取自家骨髄への腫瘍細胞の混入の危険がないこと、3) 感受性をもつ抗癌剤があること⁵⁰⁾、などの理由により本来この自家骨髄移植を併用した大量化学療法に適した腫瘍である。よって、再発例や従来治療に抵抗性となり他に有効な治療がない症例ばかりでなく、初回治療例においても薬剤感受性が明確な場合には、本療法を適用することにより、治療成績の改善が期待できる。

結 論

悪性グリオーマに対して、自家骨髄移植を併用した大量化学療法が効果的か否かを、Fischer ラットにおいて検討した。ラットに大量 ACNU を投与後の末梢

血白血球の回復を同系ラット骨髓移植群、非移植群間で比較し、さらに9 L グリオーマ移植ラットにACNUを大量投与し、MSTを求め、通常量投与群と比較し以下の結論を得た。

1. ACNU 大量投与後、骨髓移植群において非移植群に比較して有意な早期末梢血白血球数の回復を認めた。

2. 長期経過観察における死因は骨髓抑制であり、骨髓移植群において、有意に多数の長期生存例が認められた。

3. 腫瘍移植ラットにおいて、ACNUの投与量が増加するに従って生存期間の有意な延長を認めた。

4. 副作用は組織学的検査より、出血傾向と骨髓抑制であり、他臓器に病変を認めなかった。

以上より、自家骨髓移植を併用した抗癌剤大量療法は、骨髓抑制を緩和し、より大きな抗腫瘍効果をもたらすことが期待される。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師山下純宏教授に深甚なる謝意を表します。また終始御指導頂きました正印克夫助手、ならびに本研究の遂行に際し、多大なる御協力を頂きました当教室の諸先生方に深謝致します。さらに薬剤感受性試験等について御指導を頂きました金沢大学癌研究所化学療法部、佐々木琢磨教授、田中基裕助手、統計学的処理について御指導頂きました金沢大学衛生学、橋本和夫教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) Kornblith, P. L. & Walker, M.: Chemotherapy for malignant gliomas. *J. Neurosurg.*, 68, 1-17 (1988).
- 2) Anderson, J., Christensen, L. & Kongsholm, H.: Phase II trial of prednimustine in glioblastoma multiforme. *Cancer. Treat. Rep.*, 68, 795-797 (1984).
- 3) Garbino, C. E. & Gordon-Firing, S.: Ajuvant chemotherapy with VM26 in glioblastoma multiforme. *Am. Soc. Clin. Oncol.*, 3, C-997 (1984).
- 4) 脳腫瘍全国統計委員会: 脳腫瘍全国集計調査報告. 6, 90-97 (1987).
- 5) 山下純宏: グリオーマの放射線治療—その効果と副作用—. *Neurosurgeons*, 2, 49-61 (1983).
- 6) Walker, M. D., Alexander, Jr. E., Hunt, W. E., MacCarty, C. S., Mahley, Jr. M. S., Mealey, Jr. J., Norrell, H. A., Owens, G., Ransohoff, J., Wilson, C. B., Gehan, E. A. & Strike, T. A.:

Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. *J. Neurosurg.*, 49, 333-343 (1978).

7) EORTG brain tumor group: Effect of CCNU on survival, rate of objective remission and duration of free interval in patient with malignant brain glioma-First evaluation. *Eur. J. Cancer*, 12, 41-45 (1976).

8) Greenberg, H. S., Ensminger, W. D., Seeger, J. F., Kindt, G. W., Chandler, W. F., Doan, K. & Dakhil, S. R.: Intra-arterial BCNU chemotherapy for treatment of malignant gliomas of the central nervous systems. A preliminary report. *Cancer Treat. Rep.*, 65, 803-810 (1981).

9) Yamashita, J., Handa, H., Tokuriki, Y., Young, S. H., Otsuka, S., Suda, K. & Taki, W.: Intra-arterial ACNU therapy for malignant brain tumors. *J. Neurosurg.*, 59, 424-430 (1983).

10) Hildebrand, J., Badjou, R., Collard-Ronge, A., Delforge, A., Malarme, M., Spiro, T., Sztern, B., Vandensteene, A. & Stryckmans, P. A.: Treatment of brain gliomas with high dose CCNU and autologous bone marrow transplantation. *Biomedicine*, 32, 71-75 (1980).

11) Hochberg, F. H., Parkar, L. M., Takvorian, T., Canellos, G. P. & Zervas, N. T.: High-dose BCNU with autologous bone marrow rescue for recurrent glioblastoma multiforme. *J. Neurosurg.*, 54, 455-460 (1981).

12) Takvorian, T., Parker, L. M., Hochberg, F. H. & Canellos, G. P.: Autologous bone-marrow transplantation: Host effects of high-dose BCNU. *J. Clin. Oncol.*, 1, 610-620 (1983).

13) Johnson, D. B., Thompson, J. M., Corwin, J. A., Mosley, K. R., Smith, M. T., De los Reyes, R. A., Daly, M. B., Petty, A. M., Lamaster, D., Pierson, W. P., Ruxer, R. L., Leff, Jr. R. S. & Messerschmidt, G. L.: Prolongation of survival for high-grade malignant gliomas with ajuvant high-dose BCNU and autologous bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol.*, 5, 783-789 (1987).

14) 中川秀光, 村澤 明, 瀧 琢有, 中島 伸, 新山 一秀, 古田義博, 中村博行, 柴田弘俊, 正岡 徹: 悪性腫瘍に対する自家骨髓移植を併用した超大量 ACNU の選択的動注療法—2 症例について—. 癌と

化学療法, 15, 3153-3157 (1988).

15) Wolff, S. N., Philips, G. L. & Herzing, G. P.: High-dose Carmustine with autologous bone marrow transplantation for the adjuvant treatment of high-grade gliomas of central nervous system. *Cancer Treat. Rep.*, 71, 183-185 (1987).

16) Mbidde, E. K., Selby, P. J., Perren, T. J., Dearnaley, D. P., Whitton, A., Ashley, S., Workman, P., Bloom, H. J. G. & McElwain, T. J.: High dose BCNU chemotherapy with autologous bone marrow transplantation and full dose radiotherapy for grade IV astrocytoma. *Br. Cancer*, 58, 779-782 (1988).

17) 桑村圭一, 殻内 隆, 金澤泰久, 山田 正: 自家骨髓移植を併用した大量抗癌剤投与方法. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, 22, 353-359 (1982).

18) Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. & Boyd, M. R.: Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.*, 48, 4827-4833 (1988).

19) 中村 治, 松谷雅生, 佐々木琢磨, 田中基裕, 遠藤良夫, 高倉公朋: ヒトグリオーマに対する薬剤感受性テスト・ヌードマウス移植法, 孵化鶏卵漿尿膜移植法における検討. *脳神経*, 40, 913-917 (1988).

20) Nakamura, K., Asami, M., Kawada, K. & Sasahara, K.: Quantitative determination of ACNU (3-[4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl]-1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea hydrochloride), a new water-soluble anti-tumor nitrosourea, in biological fluids and tissues of patients by high performance liquid chromatography. I. Analytical method and pharmacokinetics. *Annu. Rep. Sankyo Res. Lab.*, 29, 66-74 (1977).

21) 山内次郎: 統計数値表, 第1版, 90頁, 日本企画協会, 東京, 1972.

22) Kurnick, N. B., Montano, A., Gerdes, J. C. & Feder, B. H.: Preliminary observations on the treatment of postirradiation hematopoietic depression in man by the infusion of stored autogenous bone marrow. *Ann. Intern. Med.*, 49, 973-986 (1958).

23) McFarland, W., Granville, N. B. & Dameshek, W.: Autologous bone marrow infusion

as an adjunct in therapy of malignant disease. *Blood*, 14, 503-521 (1959).

24) McGovern, Jr. J. J., Russell, P. S., Atkins, L. & Webster, E. W.: Treatment of terminal leukemic relapse by total-body irradiation and intravenous infusion of stored autologous bone marrow obtained during remission. *N. Eng. J. Med.*, 260, 675-683 (1959).

25) Newton, K. A., Humble, J. G., Wilson, C. W., Pegg, D. E. & Skinner, M. E. G.: Total thoracic supervoltage irradiation followed by the intravenous infusion of stored autologous marrow. *Br. Med. J.*, 1, 531-535 (1959).

26) Clifford, P., Clift, R. A. & Duff, J. K.: Nitrogen mustard therapy combined with autologous bone marrow infusion. *Lancet*, 1, 687-690 (1961).

27) Kurnick, N. B.: Autologous and isologous bone marrow storage and infusion in the treatment of myelo-suppression. *Transfusion*, 2, 178-187 (1962).

28) Kessinger, A.: High dose chemotherapy with autologous bone marrow rescue for high grade gliomas of the brain: A potential for improvement in therapeutic results. *Neurosurgery*, 15, 747-750 (1984).

29) Humblet, Y., Symann, M., Basley, A., Delaunois, L., Francis, C., Machiels, J., Beauduin, M., Doyon, C., Weynants, P., Longueville, J. & Prignol, J.: Late intensification chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in selected small cell carcinoma of the lung: a randomized study. *J. Clin. Oncol.*, 5, 1864-1873 (1987).

30) Eder, J. P., Antman, K., Peters, W., Henner, D., Elias, A., Shea, T., Schryber, S., Anderson, J., Come, S., Schnipper, L. & Frei, E.: High-dose combination alkylating agent chemotherapy with autologous bone marrow support for metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 4, 1592-1597 (1986).

31) August, C. S., Serota, F. T., Koch, P. A., Burkey, E., Schlesinger, H., Elkins, W. L., Evans, A. E. & D'Angia, G. J.: Treatment of advanced neuroblastoma with supralethal chemotherapy, radiation, and allogenic or autologous

marrow reconstitution. *J. Clin. Oncol.*, **2**, 609-616 (1984).

32) Thatcher, N., Lind, M., Morgenstern, G., Carr, T., Chadwick, G., Jones, R. & Craig, P.: High-dose, double alkylating agent chemotherapy with DTIC, melphalan, or ifosfamide and marrow rescue for metastatic malignant melanoma, *Cancer*, **63**, 1296-1302 (1989).

33) Mulder, P. O. M., De Vries, E. G. E., Koops, H. S., Splinter, T., Maas, A., Van der Geest, S., Mulder, N. H. & Sleijfer, D. T.: Chemotherapy with maximally tolerable doses of VP 16-213 and cyclophosphamide followed by autologous bone marrow transplantation for treatment of relapsed or refractory germ cell tumors. *Eur. J. Cancer & Clin. Oncol.*, **24**, 675-679 (1988).

34) 大平睦郎, 高山 順, 花田 基, 足立尚登, 福岡久俊: 骨肉腫に対する自家骨髄移植の効果. 癌と化学療法, **14**, 1438-1443 (1987).

35) 田島知郎, 徳田 裕, 太田正敏, 奥村 輝, 則久洋子, 久保田光博, 野登 隆, 藤本隆夫, 中崎久雄, 横山清七, 三富利夫, 村上 優, 篠塚孝男, 藤井明和, 中村嘉彦, 渡辺克仁: がん化学療法の骨髓毒性に対する対策—自家骨髄移植の併用. 癌と化学療法, **16**, 1085-1093 (1989).

36) Frei, E. & Canellos, G. P.: Dose: A critical factor in cancer chemotherapy. *Am. J. Med.*, **69**, 585-594 (1980).

37) Bruce, W. R., Meeker, B. E. & Valeriote, F. A.: Comparison of the normal hematopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic agents administered in vivo. *J. Nat. Cancer Inst.*, **37**, 233-245 (1966).

38) Bruce, W. R., Valeriote, F. A. & Meeker, B. E.: Survival of mice bearing a transplanted syngeneic lymphoma following treatment with cyclophosphamide, 5-fluorouracil, or 1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea, *J. Nat. Cancer Inst.*, **39**, 257-266 (1967).

39) Shapiro, J. R., Yung, W. A. & Shapiro, W. R.: Isolation, karyotype, and clonal growth of heterogenous subpopulations of human malignant gliomas. *Cancer Res.*, **41**, 2349-2357 (1981).

40) Yung, W. A., Shapiro, J. R. & Shapiro, W. R.: Heterogenous chemosensitivities of subpopula-

tions of human glioma cells in culture. *Cancer Res.*, **42**, 992-998 (1982).

41) Rosenbult, M. L., Wheeler, K. T., Wilson, C. B., Barker, M. & Knebel, K. D.: In vitro evaluation of in vivo brain tumor chemotherapy with 1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res.*, **35**, 1387-1391 (1975).

42) Wasserman, T. H.: The nitrosoureas: An outline of clinical schedules and toxic effects. *Cancer Treat. Rep.*, **60**, 709-711 (1976).

43) Brandt, S. J., Peters, W. P., Atwater, S. K., Kurtzberg, J., Borowitz, M. J., Jones, R. B., Shpall, E. J., Bast, R. C., Gilbert, C. J. & Oette, D. H.: Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on hematopoietic reconstitution after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *N. Eng. J. Med.*, **318**, 869-876 (1988).

44) Durant, J. R., Norgard, M. J., Murad, T. M., Bartolucci, A. A., & Langford, K. H.: Pulmonary toxicity associated with bis chloroethylnitrosourea (BCNU). *Ann. Intern. Med.*, **90**, 191-194 (1979).

45) Selker, R. G., Jacobs, S. A. & Moore, P.: Interstitial pulmonary fibrosis as a complication of 1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) therapy. *Am. Soc. Clin. Oncol.*, **19**, 333 (1978).

46) Aroin, P. A., Mahaley, Jr. M. S., Rudnick, S. A., Dudka, L., Donohue, J. F., Selker, R. G. & Moore, P.: Prediction of BCNU pulmonary toxicity in patients in malignant gliomas. *N. Eng. J. Med.*, **303**, 183-188 (1980).

47) 水島 豊, 森蔭俊彦, 佐々木孝逸, 矢野三郎: 骨髄移植大量化学療法に適する抗癌剤とその投与法に関する実験的検討. 癌と化学療法, **16**, 59-66 (1989).

48) 渋谷壮一郎, 渡辺 卓, 三木啓全, 野村和弘, 大平睦郎: 自家骨髄移植を併用した大量化学療法による悪性脳腫瘍の治療. 脳外, **11**, 723-729 (1983).

49) 松本真人, 山下純宏, 岡本新一郎, 半田 肇, 沢田 仁, 阿部光幸: 小脳髄芽腫に対する大量 ACNU・放射線・自家骨髄移植併用療法の経験. 脳外, **12**, 731-736 (1984).

50) Kornblith, P. L. & Szytko, P. L.: Variation in response of human brain tumors to BCNU in vitro. *J. Neurosurg.*, **48**, 580-586 (1978).

Effects of High Dose ACNU Chemotherapy with Syngeneic Bone Marrow Transplantation on Experimental Brain Tumors in Rats Mariko Soma, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med. Soc., 99, 765—775 (1990)

Key words high dose chemotherapy, ACNU, autologous bone marrow transplantation, gliomas

Abstract

The clinical dose of ACNU is limited because of its side effect of bone marrow suppression. This study was performed to clarify whether syngeneic bone marrow transplantation (BMT) in combination with a high dose of ACNU could alleviate marrow toxicity and achieve greater anti-tumor effects in Fischer rats. High doses of ACNU (20mg/kg, 25mg/kg and 30mg/kg, 10 rats in each group) were administered intravenously on day 1, followed by the injection of syngeneic bone marrow cells ($1.6-6.6 \times 10^7$, i.v.) on day 3 (BMT group) and the patterns of recovery or the peripheral WBC counts were compared between the BMT group and non-BMT group (with high dose ACNU alone). There was a significant benefit to the rats in the BMT group in the recovery of their peripheral WBC counts. The animals usually died due to bone marrow suppression over the long term observation period, but more animals survived in the BMT group. In a second study, 9L glioma (1×10^5) sensitive to ACNU was transplanted stereotactically into the right caudate nucleus of Fischer rats. Seven days later, the rats were divided into 3 groups, in which ACNU 2mg/kg, 10mg/kg and 25mg/kg was intravenously administered, respectively. It was found that the larger the ACNU dose, the longer the survival time. The median survival time was 15.6 days for 2mg/kg, 20.7 days for 10mg/kg, 75.1 days for 25mg/kg, without BMT and 92.6 days with BMT. In the group with ACNU 25mg/kg, BMT was effective in promoting WBC recovery. These findings suggest that high dose ACNU chemotherapy with autologous bone marrow transplantation could achieve greater anti-tumor effects with milder bone marrow suppression.