

Augmentation of the Antitumor Activity of Fluoropyrimidine 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/2297/8474

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

金沢大学医学部外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

橋 本 琢 生

フッ化ピリミジン系抗がん剤を作用薬剤とし、その生体内における物質代謝を補助薬剤の併用によって修飾し、抗腫瘍効果の増強を図る生化学的調節 (biochemical modulation) が注目されている。シスプラチン (cis-diamminedichloroplatinum [II], CDDP) とロイコボリン (leucovorin, LV) は腫瘍内の葉酸プールを増大せしめ、フロロデオキシウリジン-一リン酸、チミジル酸合成酵素およびメチレンテトラヒドロ葉酸間の強力な三重結合体を形成し、チミジル酸合成酵素の活性阻害を増強すると考えられている。本研究では、5-フロロウラシル (5-fluorouracil, 5-FU) の補助薬剤としての CDDP と LV について、これらの薬剤の至適投与法を開発するために、抗腫瘍効果と腫瘍内葉酸プールの変動を検討した。吉田肉腫を接種したラットに UFT (テガフルとウラシルのモル比 1:4 の複合製剤) をテガフル量で 20mg/kg ずつ連日経口投与し、CDDP の静脈内投与を第1日のみ併用すると、それぞれの単独投与と比較して併用効果が認められた。しかし、CDDP の併用量を 1, 2, 4mg/kg と増加しても、CDDP 固有の効果を差し引いた抗腫瘍効果の増強度に差はみられなかった。一方、UFT に LV を同様に併用投与すると、抗腫瘍効果は LV の投与量に相関して増強した。抗腫瘍効果において CDDP 1~4mg/kg の補助薬剤としての増強効果は LV では 40mg/kg に相当した。CDDP 4mg/kg の静脈内投与後の腫瘍内還元型葉酸プールの経時的変化をみると、1~2時間後で対照群の 2.0~1.6 倍に一過性に増大したが、その後減少し 24時間後には対照群以下になった。CDDP 1, 2, 4, 8mg/kg の静脈内投与 2時間後における腫瘍内還元型葉酸プールは、いずれも対照群の 1.5~2.0 倍に増大したが、同時に測定した血中および腫瘍内プラチナ濃度がいずれも CDDP 投与量と正の比例関係にあったにもかかわらず、各群の葉酸プールの増大程度に差はみられなかった。一方、LV 100mg/kg を静脈内投与すると腫瘍内還元型葉酸プールは投与 1~2時間後の早期で最大に増加し、また LV の静脈内投与 2時間後における葉酸プールは LV の投与量に相関して増大した。この腫瘍内の葉酸プールを増大させる効果は、CDDP 1~8mg/kg と LV 50mg/kg で同等と推察された。以上の成績から、CDDP あるいは LV の静脈内投与による 5-FU に対する生化学的修飾は、薬剤投与後の早期にみられる一過性の現象であり、また補助薬剤としての LV の効果は投与量の増加に伴って増強するが、CDDP の効果には一定の限界があることが示された。CDDP の必要最少量 (1mg/kg) と LV 40~50mg/kg は、5-FU の補助薬剤として同等の効果を発現すると推察された。

Key words biochemical modulation, fluoropyrimidine, cis-diamminedichloroplatinum [II], leucovorin, folate pool

がん化学療法の進歩は2つの方向、すなわち新薬の開発と有効な薬剤投与法の発見に依存している。臨床の場では、より広い抗腫瘍スペクトラムを包括する目的で、異なる作用機序を有する既存の薬剤を組み合わせる多剤併用療法がさかんに提唱されているが、いずれも広く受け入れられるに足る結果を残していない。一方、腫瘍細胞の抗がん剤に対する耐性獲得機序が判明し、これらを念頭においた理論的な薬剤の併用法が注目されている。生体内における物質代謝を修飾し、抗がん剤の作用増強を図る生化学的調節 (biochemical modulation) がそれである。多剤併用療法における抗がん剤は、この生化学的調節の概念によって固有の抗腫瘍効果を発揮する作用薬剤と、その作用を増強するように細胞内環境を修飾する補助薬剤に分類されている。1957年に Heidelberg ら¹⁾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剤である。

5-FU に対する補助薬剤として多数の薬剤が報告されている²⁾が、その中で腫瘍内の葉酸プールを増大せしめることによって 5-FU の標的酵素であるチミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase, TS) を阻害する 2種類の薬剤が注目された。その1つは、1960年代に Rosenberg らの一連の研究^{3,4)}によって開発されたシスプラチン (cis-diamminedichloroplatinum [II], CDDP) である。CDDP は固形がんの化学療法において重要な併用薬剤の一つであるが、最近では 5-FU の補助薬剤として注目されており、臨床的には頭頸部癌を中心に 5-FU 系抗がん剤と CDDP の併用療法で奏効率の向上が報告されている⁵⁻¹¹⁾。他

平成5年8月3日受付, 平成5年9月30日受理

Abbreviations: AUC, area under the curve; CDDP, cis-diamminedichloroplatinum [II]; CH₂ FH₄, 5, 10-methylenetetrahydrofolate; CH₃ FH₄, 5-methyltetrahydrofolate; 5CMP, cytidine 5'-mono-phosphate; DTT, dithiothreitol; ED₅₀, effective dose 50%; FdUMP, 5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate; FdUrd,

の1つは、外因性葉酸の一種であるロイコボリン (5-formyl-5, 6, 7, 8-tetrahydropteroyl-l-glutamic acid, folinic acid, leucovorin, LV) である。臨床的には、大腸癌に対する 5-FU 系抗がん剤と LV の併用療法に関する第Ⅱ相あるいは第Ⅲ相試験で、奏効率・生存率の向上が報告されている^{12)~15)}。

上述の様に臨床的有用性が報告され、また 5-FU に対する抗腫瘍効果増強の基礎的理論が確立されたにもかかわらず、補助薬剤としての CDDP あるいは LV の至適投与法 (投与量, 投与速度, 投与時期など) は未だ不明であり、各施設毎にまちまちの薬剤投与スケジュールが実施されているのが現状である。これは理論と臨床を結ぶ基礎的データ, すなわち補助薬剤の薬理動態と腫瘍内葉酸プールの変動を解析したデータの欠如による。

以上の観点から、本研究では CDDP あるいは LV による 5-FU 系抗がん剤の抗腫瘍増強効果および腫瘍内葉酸プールの変動を担がんラットを用いて観測し、この2剤の補助薬剤としての至適投与法について考察した。

材料および方法

I. 動物および腫瘍細胞

4週齢の雌性ドンリュウラットを日本 SLC (静岡) より購入し、1週間の馴化の後実験に用いた。なお、実験中のラットの栄養管理は原則的に自由経口摂取とした。また、吉田肉腫細胞を金沢大学がん研究所化学療法部より分与を受け、ドンリュウラットの腹腔内に 1×10^6 個を接種し、1週間毎に継代・維持した。

II. 薬剤および試薬

1. UFT

テガフル [1-(tetrahydro-2-furanyl)-5-fluorouracil, FT-207] を大鵬薬品 (東京) より購入し、これをウラシルとモル比で 1:4 に配合し、5% アラビアゴム水溶液に溶解し、UFT 溶液を調製した。なお、投与量は FT-207 の含量とした。

2. CDDP

ブリストルマイヤーズ (Princeton, USA) より購入した。

3. LV

シグマ (St. Louis, USA) より購入した。

4. 葉酸測定用緩衝液 A

20mM 2-メルカプトエタノール, 15mM シチジン 5 磷酸 (cytidine 5'-mono phosphate, 5CMP) および 0.1M フッ化ナトリウムを含む 0.2M Tris-HCl 溶液 (pH 7.4)。

5. 葉酸測定用緩衝液 B

0.2M 2-メルカプトエタノール, 15mM 5CMP および 0.1M フッ化ナトリウムを含む 0.6M 炭酸水素アンモニウム溶液 (pH 8.0)。

6. 補因子溶液 A

9mM ホルマリン, 20mM 2-メルカプトエタノール, 15mM 5CMP, 0.1M フッ化ナトリウム, 16mM アスコルビン酸塩, 2% 仔牛血清アルブミンを含む 50mM 磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)。

7. 補因子溶液 B

補因子溶液 A からホルマリンを除いた溶液。

8. トリチウムフロデオキシウリジン-5'-リン酸 (³H-5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate, ³H-FdUMP) の調製

吉田肉腫 2g に4倍量のチミジン磷酸化酵素 (thymidine kinase, TK) 用緩衝液 (0.25M 蔗糖, 5mM 塩化マグネシウム, 1mM ジチオスレイトール (dithiothreitol, DTT) を含む 50mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液) を加えホモジナイズし, 105,000G, 60分間遠心分離した。この上清を TK 用緩衝液にて一晚透析後, 10,000G, 20分間遠心分離し, 上清を TK 溶液とした。次に, トリチウムフロデオキシウリジン (³H-5-fluoro-2'-deoxyuridine, ³H-FdUrd) (17.9Ci/mmol, 1mCi/ml, NEN Research Products, Boston, USA) 500 μ Ci をロータリーエバポレーターにて減圧乾固し, TK 用補因子溶液 (0.1M 塩化マグネシウムを含む 0.5M Tris-HCl (pH8.0) 溶液 1 溶, 100mM ATP 溶液 1 溶, 120mM α -グリセロール磷酸溶液 1 溶) 0.2ml を加え溶解した。これに上記の TK 溶液 0.8ml を加え, 37 $^{\circ}$ C で1時間反応させた。その後, 0 $^{\circ}$ C に冷却し, 蒸留水 1ml, 20% トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid, TCA) 0.5ml を加え, 酸不溶画分を3000回転, 10分間遠心分離した。この上清に TCA 除去剤 (17.7% トリ-n-オクチラミンを含む 1, 1, 2-トリクロロトリフロロエタン溶液) 3ml を加え, 10分間振盪し, 3000回転, 5分間遠心分離した後, この上清 (水層) をセルロースプレート (Merck, Frankfurt, Deutschland) にスポットした。1M 酢酸と 1M 塩化リチウムの 1対1混液で展開し, FdUMP 画分を掻き取り, 0.2M 蟻酸アンモニウム (pH 5.0) 2ml を加え, 抽出, 遠心分離し³H-FdUMP を得た。これを比活性が約 3.7×10^6 dpm/ml (114pmol/ml) になるように蒸留水で希釈し, 葉酸測定に供した。

III. 抗腫瘍効果を評価するための実験計画

1. UFT 単剤による腫瘍増殖抑制 (実験 1)。

1群5匹のドンリュウラットの腹壁皮下に吉田肉腫細胞を 1×10^6 個接種し, 翌日 (第1日目) から第6日目まで UFT を1日1回経口ゾンデにて投与し, 第7日目に腫瘍を摘出して重量を測定した。UFT の投与量によって以下の5群に分類した。1) UFT 非投与群 (対照群), 2) UFT10mg/kg 投与群, 3) UFT20mg/kg 投与群, 4) UFT30mg/kg 投与群, 5) UFT40mg/kg 投与群。各群の平均腫瘍重量土標準偏差 (g) と, 対照群の平均腫瘍重量に対する UFT 投与群の平均腫瘍重量の比 (T/C) を求めた。

2. CDDP 単剤による腫瘍増殖抑制 (実験 2)。

1群5匹のドンリュウラットの腹壁皮下に吉田肉腫細胞を 1×10^6 個接種し, 第1日目に CDDP をラットの尾静脈から投与し, 7日目に腫瘍を摘出して重量を測定した。CDDP の投与量によって以下の5群に分類した。1) CDDP 非投与群 (対照群), 2) CDDP1mg/kg 投与群, 3) CDDP2mg/kg 投与群, 4) CDDP4mg/kg 投与群, 5) CDDP8mg/kg 投与群。各群の平均腫瘍重量土標準偏差 (g) と, 対照群の平均腫瘍重量に対する CDDP 投与群の平均腫瘍重量の比 (T/C) を求めた。

3. UFT と CDDP の併用による腫瘍増殖抑制 (実験 3)。

1群5匹のドンリュウラットの腹壁皮下に吉田肉腫細胞を 1×10^6 個接種し, 第1日目に CDDP をラットの尾静脈から投与した。さらに, 第1日目から第6日目までラットに UFT20

5-fluoro-2'-deoxyuridine; FH₄, tetrahydrofolate; FT-207, 1-[tetrahydro-2-furanyl]-5-fluorouracil; 5-FU, 5-fluorouracil; LV, leucovorin; TCA, trichloroacetic acid; TK, thymidine kinase; TS, thymidylate synthase

mg/kg を 1 日 1 回経口投与し、7 日目に腫瘍を摘出して重量を測定した。UFT の投与の有無および CDDP の投与量によって以下の 5 群に分類した。1) 薬剤非投与群 (対照群-1), 2) UFT20mg/kg+CDDP 非投与群 (対照群-2), 3) UFT20mg/kg+CDDP1mg/kg 投与群, 4) UFT20mg/kg+CDDP2mg/kg 投与群, 5) UFT20mg/kg+CDDP4mg/kg 投与群。各群の平均腫瘍重量土標準偏差 (g) と、対照群-1 の平均腫瘍重量に対する薬剤投与群の平均腫瘍重量の比 (T/C-1) および対照群-2 の平均腫瘍重量に対する UFT+CDDP 併用投与群の平均腫瘍重量の比 (T/C-2) を求めた。

4. UFT と LV の併用による腫瘍増殖抑制 (実験 4)

1 群 5 匹のドンリュウラットの腹壁皮下に吉田肉腫細胞を 1×10^6 個接種し、第 1 日目に LV をラットの尾静脈より投与した。さらに、第 1 日目から第 6 日目までラットに UFT20mg/kg を 1 日 1 回経口投与し、7 日目に腫瘍を摘出して重量を測定した。UFT の投与の有無および LV の投与量によって以下の 4 群に分類した。1) 薬剤非投与群 (対照群-1), 2) UFT20mg/kg+LV 非投与群 (対照群-2), 3) UFT20mg/kg+LV50mg/kg 投与群, 4) UFT20mg/kg+LV100mg/kg 投与群。各群の平均腫瘍重量土標準偏差 (g) と、対照群-1 の平均腫瘍重量に対する薬剤投与群の平均腫瘍重量の比 (T/C-1) および対照群-2 の平均腫瘍重量に対する UFT+LV 併用投与群の平均腫瘍重量の比 (T/C-2) を求めた。

また、腫瘍移植時と腫瘍摘出時のラットの体重を測定し、各群ごとにこの期間に増加した体重の平均を求め、薬剤非投与群の体重増加に対する各群の体重増加の比率を体重増加率とした。

IV. CDDP 投与後の薬理動態と腫瘍内還元型葉酸プールの変動を検討するための実験計画

1. 経時的変化 (実験 5)

1 群 4 匹のドンリュウラットの腹壁皮下に吉田肉腫細胞を 1×10^6 個接種し、第 6 日目より絶食とした。第 7 日目に尾静脈から CDDP4mg/kg を投与し、その 1, 2, 8, 24 時間後に腫瘍を摘出し、同時に後大静脈から採血を行った。また、CDDP 非投与群からも腫瘍を摘出し、これを対照群とした。

2. 投与量との相関 (実験 6)

1 群 5 匹のドンリュウラットの腹壁皮下に吉田肉腫細胞を 1×10^6 個接種し、第 6 日目より絶食とした。第 7 日目に尾静脈から CDDP を 1 群ごとにそれぞれ 1, 2, 4, 8mg/kg ずつ投与し、その 2 時間後に腫瘍を摘出し、同時に後大静脈から採血を行った。また、CDDP 非投与群からも腫瘍を摘出し、これを対照群とした。

V. LV 投与後の腫瘍内還元型葉酸プールの変動を検討するための実験計画

1. 経時的変化 (実験 7)

1 群 4 匹のドンリュウラットの腹壁皮下に吉田肉腫細胞を 1×10^6 個接種し、第 6 日目より絶食とした。第 7 日目に尾静脈から LV100mg/kg を投与し、その 1, 2, 8, 24 時間後に腫瘍を摘出した。また、LV 非投与群からも腫瘍を摘出し、これを対照群とした。

2. 投与量との相関 (実験 8)

1 群 4 匹のドンリュウラットの腹壁皮下に吉田肉腫細胞を 1×10^6 個移植し、第 6 日目より絶食とした。第 7 日目に尾静脈から LV を 1 群ごとにそれぞれ 25, 50, 100, 200mg/kg ずつ投

与し、その 2 時間後に腫瘍を摘出した。また、LV 非投与群からも腫瘍を摘出し、これを対照群とした。

VI. 腫瘍内還元型葉酸プールの測定¹⁶⁾

摘出した吉田肉腫 250mg に 4 倍量の葉酸測定用緩衝液 A を加えホモジナイズし、105,000G で 60 分間遠心分離し、その上清をサンプル溶液とした。この溶液 0.1ml に葉酸測定用緩衝液 B 0.1ml と 3H-FdUMP 0.1ml を加え、さらに補因子溶液 A 0.05ml あるいは補因子溶液 B 0.05ml を加え攪拌し、30℃ で 20 分間反応させ、TS, ³H-FdUMP, メチレンテトラヒドロ葉酸 (5, 10-methylenetetrahydrofolate, CH₂ FH₄) の三重結合体を形成させた。この反応液に 10% TCA 0.35ml を加え反応を停止させ、遠心分離した沈殿を 5% TCA 2ml で 2 回懸濁・遠心した。分離した沈殿に蟻酸 0.5ml を加え、全量をバイアルに入れ、ACS-II シンチレーター (アマジャムジャパン, 東京) 10ml を加え、シンチレーションカウンタ (アロカ LSC-1000, 東京) にて放射活性を測定し、葉酸量を定量した。補因子溶液 A を添加した場合の値を CH₂ FH₄ とテトラヒドロ葉酸 (tetrahydrofolate, FH₄) の総量 (CH₂ FH₄ + FH₄) とし、補因子溶液 B を添加した場合の値を CH₂ FH₄ の量とした。各群における葉酸量の平均値土標準偏差を求めた。

VII. 血中および腫瘍内プラチナ (Pt) 濃度の測定¹⁷⁾

1. 血中 Pt 濃度¹⁸⁾

採取した血液から血漿を遠心分離し、さらに MPS3 型フィルター (Amicon, Beverly, USA) にて総 Pt と蛋白非結合型 Pt 測定用の検体に分離した。この測定用検体 0.2ml に 0.2% トリトン X-100 溶液を 0.4ml 加え希釈し、この 5μl を加熱・原子化し、原子吸光分光光度計 (AA40, Varian Australia PPY, Australia) で波長 265.9nm の吸収を読み、原子吸光用 Pt1000ppm 標準液から作った標準曲線を参照し計算した。

2. 腫瘍内 Pt 濃度

採取した組織にガラスビーズ 2 個、70% 過塩素酸 2ml、硝酸 20ml を加え消化した後、乾燥し、10% 塩酸に溶かし、血中 Pt 濃度測定の場合と同様に原子吸光法にて測定した。

VIII. 統計学的処理

対照群と薬剤投与群との差の検定には、Student または Welch の t 検定を用い、危険率 5% 以下を有意差ありと判定した。

成 績

I. 抗腫瘍効果

1. UFT 単剤投与 (表 1)

UFT の投与量に相関して腫瘍増殖は抑制され、T/C は UFT10mg/kg 投与群では 0.86, UFT20mg/kg 投与群では 0.74, UFT30mg/kg 投与群では 0.40, UFT40mg/kg 投与群では 0.14 であった。また、UFT 投与群の体重増加は、UFT30mg/kg 以上の投与で対照群の体重増加に比し 50% 未満に抑制された。

2. CDDP 単剤投与 (表 2)

CDDP の投与量に相関して腫瘍増殖は抑制され、T/C は CDDP1mg/kg 投与群では 0.90, CDDP2mg/kg 投与群では 0.84, CDDP4mg/kg 投与群では 0.50, CDDP8mg/kg 投与群では 0.22 であった (図 1)。体重増加もまた CDDP の投与量に相関して抑制され、特に CDDP8mg/kg 投与群では体重減少がみられた。

3. UFT と CDDP の併用投与 (表 3)

薬剤非投与群に対する薬剤投与群の腫瘍重量の比 (T/C-1) は, UFT20mg/kg+CDDP 非投与群では 0.75, UFT20mg/kg+CDDP1mg/kg 投与群では 0.55, UFT20mg/kg+CDDP2mg/kg 投与群では 0.43, UFT20mg/kg+CDDP4mg/kg 投与群では 0.22 であった. また, UFT20mg/kg 単独投与群に対する UFT20mg/kg+CDDP 併用投与群の腫瘍重量の比 (T/C-2) は, UFT20mg/kg+CDDP1mg/kg 投与群では 0.74, UFT20

mg/kg+CDDP2mg/kg 投与群では 0.58, UFT20mg/kg+CD- DP4mg/kg 投与群では 0.29 であった (図 1). 体重増加もまた薬剤を併用投与すると単剤投与時よりも高度に抑制された.

4. UFT と LV の併用投与 (表 4)

薬剤非投与群に対する薬剤投与群の腫瘍重量の比 (T/C-1) は, UFT20mg/kg+LV 非投与群では 0.71, UFT20mg/kg+LV50mg/kg 投与群では 0.50, UFT20mg/kg+LV100mg/kg 投与群では 0.39 であった. また, UFT20mg/kg 単独投与群

Table 1. Antitumor effect of UFT on Yoshida sarcomas in rats

Group	UFT administered (mg/kg)	Number of rats used	Tumor weight (mean±SD, g)	T/C	Body weight change (% control)
(1)	0	5	3.43±0.81	1	100.0
(2)	10	5	2.95±0.53	0.86	86.2
(3)	20	5	2.52±0.45	0.74	92.3
(4)	30	5	1.36±0.51	0.40	46.2
(5)	40	5	0.48±0.21	0.14	27.7

Yoshida sarcoma cells (1×10^6) were inoculated into subepidermal tissue of abdominal wall of rats, and UFT was orally administered to rats for 6 consecutive days from day 1. On day 7, rats were sacrificed and tumors were removed and weighed. The antitumor activity of UFT was evaluated according to the following formula; T/C, where T was the mean tumor weight of the treated group and C was that of the control group.

Table 2. Antitumor effect of CDDP on Yoshida sarcomas in rats

Group	CDDP ^{a)} administered (mg/kg)	Number of rats used	Tumor weight (mean±SD, g)	T/C	Body weight change (% control)
(1)	0	5	3.31±0.96	1	100.0
(2)	1	5	2.99±0.68	0.90	88.2
(3)	2	5	2.79±0.71	0.84	76.5
(4)	4	5	1.66±0.20	0.50	51.5
(5)	8	5	0.73±0.20	0.22	-0.4

Yoshida sarcoma cells (1×10^6) were inoculated into subepidermal tissue of abdominal wall of rats, and CDDP was once injected intravenously to rats on day 1. On day 7, rats were sacrificed and tumors were removed and weighed. The antitumor activity of CDDP was evaluated according to the following formula; T/C, where T was the mean tumor weight of the treated group and C was that of the control group.

a) CDDP, cis-diamminedichloroplatinum [II].

Table 3. Antitumor effect of the combination of UFT and CDDP on Yoshida sarcomas in rats

Group	UFT administered (mg/kg)	CDDP ^{a)} administered (mg/kg)	Number of rats used	Tumor weight (mean±SD, g)	T/C-1	T/C-2	Body weight change (% control)
(1)	0	0	5	3.44±0.53	1		100.0
(2)	20	0	5	2.57±0.61	0.75	1	96.1
(3)	20	1	5	1.90±0.26	0.55	0.74	84.3
(4)	20	2	5	1.48±0.28	0.43	0.58	60.8
(5)	20	4	5	0.75±0.15	0.22	0.29	19.6

Yoshida sarcoma cells (1×10^6) were inoculated into subepidermal tissue of abdominal wall of rats, and CDDP was injected intravenously to rats on day 1 and UFT (20mg/kg) was orally administered to rats for 6 consecutive days from day 1. On day 7, rats were sacrificed and tumors were removed and weighed. The antitumor activity of the drugs was evaluated according to the following formula; T/C-1, where T was the mean tumor weight of the treated group and C was that of the control group with no treatment. T/C-2, where T was the mean tumor weight of the treated group with both of UFT and CDDP, and C was that of the control group treated with UFT alone.

a) CDDP, cis-diamminedichloroplatinum [II].

に対する UFT20mg/kg+LV 併用投与群の腫瘍重量の比 (T/C-2) は, UFT20mg/kg+LV50mg/kg 投与群では 0.70, UFT20mg/kg+LV100mg/kg 投与群では 0.55 であった (図 2). 体重増加は UFT に LV を併用投与しても UFT 単独投与に比し抑制されなかった.

II. CDDP 投与後の薬理動態と腫瘍内還元型葉酸プールの変動

1. CDDP 4mg/kg の静脈内投与時の経時的变化

1) 血中 Pt 濃度 (図 3)

総 Pt は投与 2 時間後に最高血中濃度 $844 \pm 65 \text{ ng/ml}$ を示し, 半減期 19 時間で減衰し, 曲線下面積 (area under the curve, AUC) は $25.7 \mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ であった. 一方, 蛋白非結合型 Pt は投与 1 時間後に最高血中濃度 $369 \pm 122 \text{ ng/ml}$ を示し, 半減期 17 分で減衰し, AUC は $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ であった.

2) 腫瘍内 Pt 濃度 (図 4)

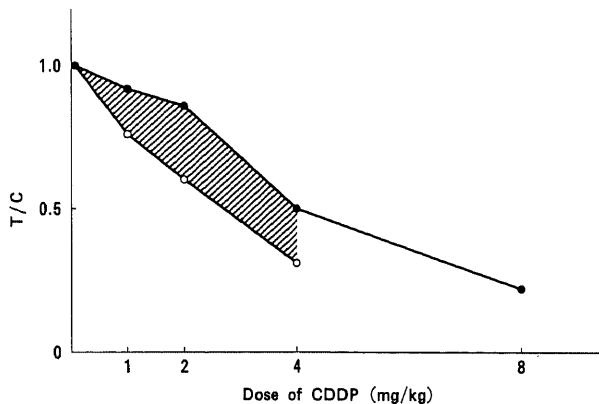


Fig. 1. Dose response curves of Yoshida sarcoma following administration of cis-diamminedichloroplatinum [II] (CDDP) with (O) or without (●) addition of UFT. Yoshida sarcoma cells (1×10^6) were inoculated into subepidermal tissue of abdominal wall of rats, and CDDP was injected intravenously to rats on day 1 and UFT (20 mg/kg) was orally administered to rats for 6 consecutive days from day 1. On day 7, rats were sacrificed and tumors were removed and weighed. The antitumor activity of the drugs was evaluated according to the following formula; T/C, where T was the mean tumor weight of the treated group with CDDP and C was that of the control group with (O) or without (●) addition of UFT. ▨ area shows in vivo potentiation of UFT by CDDP in Yoshida sarcoma.

腫瘍内 Pt 濃度は投与 1 時間後に最高値 $1.89 \pm 0.25 \mu\text{g/g}$ を示し, 2 相性に減衰した. 腫瘍内 Pt 濃度が急速に消失する α 相の半減期は 1.1 時間, 緩徐に減少する β 相の半減期は 64.2 時間であった. AUC は $111.2 \mu\text{g}\cdot\text{hr/g}$ であった.

3) 腫瘍内還元型葉酸プール (図 5)

腫瘍組織内の CH_2FH_4 と FH_4 の総量は, 対照群では $2.33 \pm 0.33 \text{ pmol/g}$ であったが, 1 時間後には $4.69 \pm 0.92 \text{ pmol/g}$, 2 時間後には $3.69 \pm 0.58 \text{ pmol/g}$ と 2.0~1.6 倍に増加していた. しかし, この増加は一過性で 8 時間後には $1.96 \pm 0.36 \text{ pmol/g}$, 24 時間後には $1.25 \pm 0.22 \text{ pmol/g}$ まで減少した. 腫瘍組織内 CH_2FH_4 量もまた同様に, 投与前には $1.40 \pm 0.13 \text{ pmol/g}$ であったが, 1 時間後には $2.93 \pm 0.56 \text{ pmol/g}$, 2 時間後には

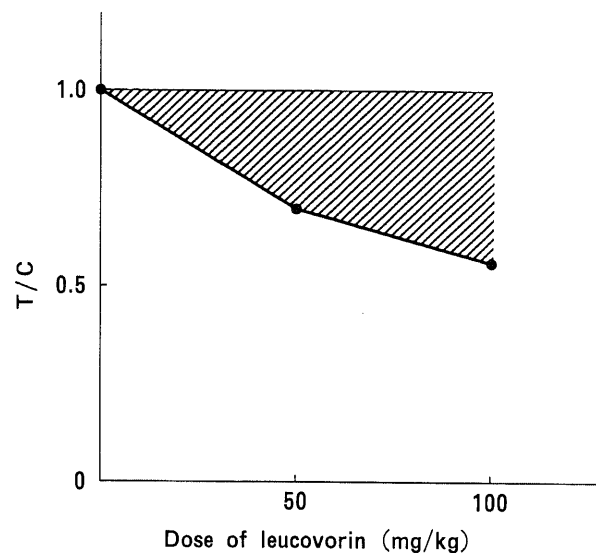


Fig. 2. Dose response curve of Yoshida sarcoma following administration of leucovorin (LV) with UFT. Yoshida sarcoma cells (1×10^6) were inoculated into subepidermal tissue of abdominal wall of rats, and LV was injected intravenously to rats on day 1 and UFT (20 mg/kg) was orally administered to rats for 6 consecutive days from day 1. On day 7, rats were sacrificed and tumors were removed and weighed. The antitumor activity of the drugs was evaluated according to the following formula; T/C, where T was the mean tumor weight of the treated group with LV in addition to UFT and C was that of the control group treated with UFT alone. ▨ area shows in vivo potentiation of UFT by LV in Yoshida sarcoma.

Table 4. Antitumor effect of the combination of UFT and LV on Yoshida sarcomas in rats

Group	UFT administered (mg/kg)	LV ^a administered (mg/kg)	Number of rats used	Tumor weight (mean \pm SD, g)	T/C-1	T/C-2	Body weight change (% control)
(1)	0	0	5	3.27 ± 0.78	1		100.0
(2)	20	0	5	2.33 ± 0.14	0.71	1	79.7
(3)	20	50	5	1.62 ± 0.09	0.50	0.70	82.6
(4)	20	100	5	1.29 ± 0.17	0.39	0.55	78.4

Yoshida sarcoma cells (1×10^6) were inoculated into subepidermal tissue of abdominal wall of rats, and LV was injected intravenously to rats on day 1 and UFT (20mg/kg) was orally administered to rats for 6 consecutive days from day 1. On day 7, rats were sacrificed and tumors were removed and weighed. The antitumor activity of the drugs was evaluated according to the following formula; T/C-1, where T was the mean tumor weight of the treated group and C was that of the non-treated group. T/C-2, where T was the mean tumor weight of the treated group with both of UFT and LV, and C was that of the control group treated with UFT alone.

a) LV, leucovorin.

2.29±0.46pmol/g と一過性に2.1~1.6倍に増加したが、8時間後には1.04±0.41pmol/g、24時間後には0.80±0.21pmol/gまで減少した。

2. CDDP 投与量との相関

1) 血中 Pt 濃度 (図6)

CDDP 投与2時間後の総Pt濃度は、CDDP1mg/kg投与群では170±75ng/ml、CDDP2mg/kg投与群では381±94ng/ml、CDDP4mg/kg投与群では679±61ng/ml、CDDP8mg/kg投与群では1140±184ng/mlであった。また、CDDP投与2時間後の蛋白非結合型Pt濃度は、CDDP1mg/kg投与群では25ng/ml未満、CDDP2mg/kg投与群では19±4ng/ml、CDDP4mg/kg投与群では40±14ng/ml、CDDP8mg/kg投与群では90±20ng/mlであった。いずれもCDDPの投与量に相関して

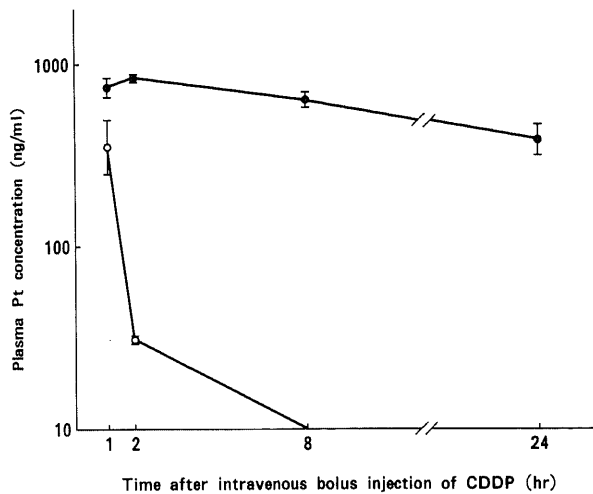


Fig.3. Change in plasma levels of total and filterable platinum following intravenous bolus injection of CDDP at a dose of 4 mg/kg. Values are expressed as mean±S.D. for 4 rats. ●, total platinum; ○, filterable platinum.

増加し、CDDP 投与量とほぼ正の比例関係にあった。

2) 腫瘍内 Pt 濃度 (図7)

CDDP 投与2時間後の腫瘍内Pt濃度は、CDDP1mg/kg投与群では0.24±0.06μg/g、CDDP2mg/kg投与群では0.53±0.11μg/g、CDDP4mg/kg投与群では1.05±0.15μg/g、CDDP8mg/kg投与群では2.85±0.85μg/gであった。腫瘍内Pt濃度もまたCDDPの投与量に相関して増加し、CDDP投与量とほぼ正の比例関係にあった。

3) 腫瘍内還元型葉酸プール (図8)

CDDP 投与2時間後における腫瘍組織内のCH₂FH₁とFH₁の総量は、対照群では2.69±0.58pmol/g、CDDP1mg/kg投与群では5.30±1.01pmol/g、CDDP2mg/kg投与群では4.15±0.63pmol/g、CDDP4mg/kg投与群では4.13±0.96pmol/g、CDDP8mg/kg投与群では4.24±0.95pmol/gであった。また、腫瘍組織内CH₂FH₁量は、対照群では1.58±0.36pmol/g、CDDP1mg/kg投与群では3.19±0.93pmol/g、CDDP2mg/kg投

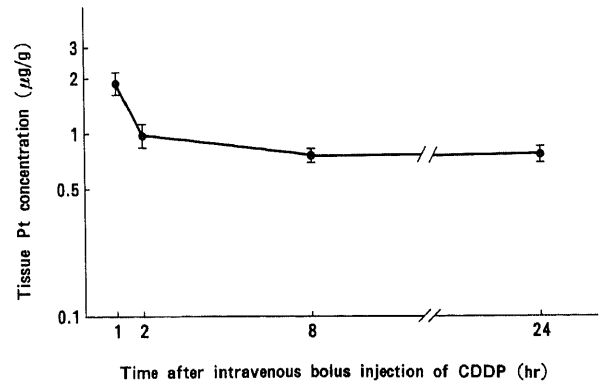


Fig.4. Change in concentrations of tissue platinum in Yoshida sarcoma following intravenous bolus injection of CDDP at a dose of 4 mg/kg. Values are expressed as mean±S.D. for 4 rats.

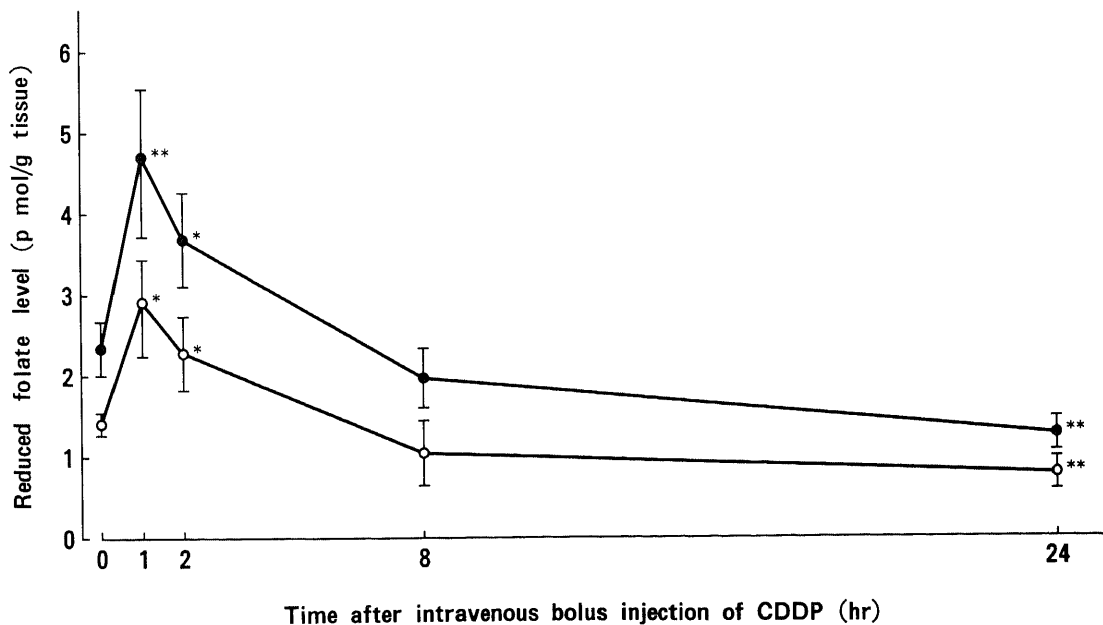


Fig.5. Change in reduced folate levels in the tumor tissue of Yoshida sarcoma-bearing rats following intravenous bolus injection of CDDP at a dose of 4 mg/kg. Values are expressed as mean±S.D. for 4 rats. ●, CH₂FH₁ + FH₁; ○, CH₂FH₁. * Significant by the Student's t test vs. control (p<0.05). ** Significant by the Student's t test vs. control (p<0.01).

与群では $2.48 \pm 0.36 \text{ pmol/g}$, CDDP4mg/kg 投与群では $2.67 \pm 0.87 \text{ pmol/g}$, CDDP8mg/kg 投与群では $2.74 \pm 0.53 \text{ pmol/g}$ であった。以上の様に、腫瘍内還元型葉酸プールは、CDDP1mg/kg から 8mg/kg までのいずれの投与群においても対照群の約 1.5~2 倍へと有意に増加していたが、その程度には各群間に差がみられなかった。

Ⅲ. LV 投与後の腫瘍内還元型葉酸プールの変動

1. LV 100mg/kg の静脈投与時の経時的変化 (図 9)

腫瘍組織内の CH_2FH_4 と FH_4 の総量は、対照群では $3.62 \pm 0.62 \text{ pmol/g}$ であったが、1 時間後には $7.83 \pm 1.84 \text{ pmol/g}$, 2 時間後には $8.01 \pm 2.05 \text{ pmol/g}$ といずれも約 2.2 倍に増加していた。これは 8 時間後には $5.92 \pm 0.88 \text{ pmol/g}$, 24 時間後には $5.07 \pm 0.65 \text{ pmol/g}$ まで減少したが、対照群よりも高値を維持した。腫瘍組織内 CH_2FH_4 量は、対照群では $2.45 \pm 0.27 \text{ pmol/g}$ であったが、1 時間後には $6.04 \pm 0.94 \text{ pmol/g}$, 2 時間後には $5.70 \pm 0.94 \text{ pmol/g}$ と 2.5~2.3 倍に増加した。これは 8 時間後には $3.83 \pm 0.44 \text{ pmol/g}$ と対照群の 1.6 倍まで、24 時間後には $2.63 \pm 0.32 \text{ pmol/g}$ とほぼ対照群の値まで減少した。

2. LV 投与量との相関 (図10)

LV 投与 2 時間後における腫瘍組織内の CH_2FH_4 と FH_4 の総量は、対照群では $2.56 \pm 0.32 \text{ pmol/g}$, LV25mg/kg 投与群では $3.64 \pm 0.15 \text{ pmol/g}$, LV50mg/kg 投与群では $4.28 \pm 0.85 \text{ pmol/g}$, LV100mg/kg 投与群では $5.11 \pm 0.08 \text{ pmol/g}$, LV200mg/kg 投与群では $5.50 \pm 0.92 \text{ pmol/g}$ であった。また、腫瘍組織内

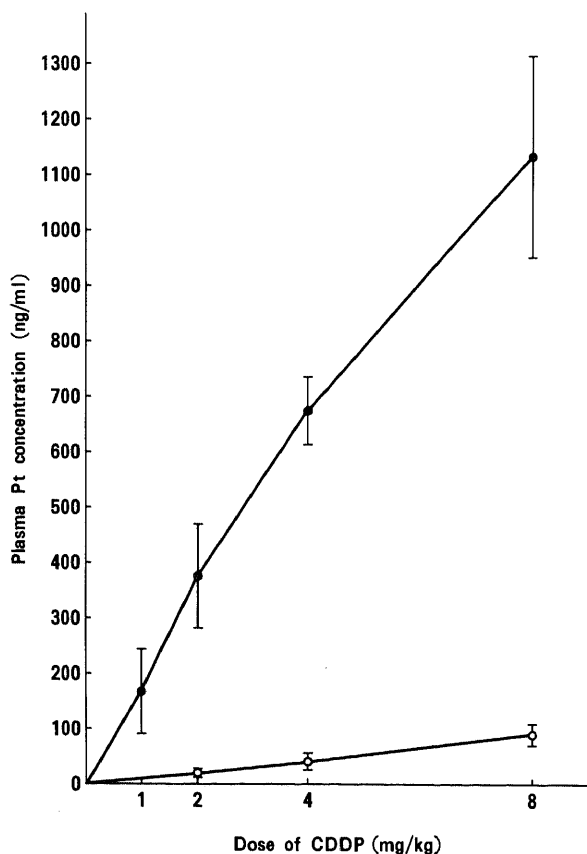


Fig. 6. Dose response curves of plasma levels of total and filterable platinum 2 hours after administration of CDDP. Values are expressed as mean \pm S.D. for 5 rats. ●, total platinum; ○, filterable platinum.

CH_2FH_4 量は、対照群では $1.71 \pm 0.28 \text{ pmol/g}$, LV25mg/kg 投与群では $2.42 \pm 0.16 \text{ pmol/g}$, LV50mg/kg 投与群では $2.68 \pm 0.51 \text{ pmol/g}$, LV100mg/kg 投与群では $3.16 \pm 0.58 \text{ pmol/g}$, LV200mg/kg 投与群では $3.55 \pm 0.46 \text{ pmol/g}$ であった。いずれも正の比例関係はみられなかったが、LV 投与量が増加すると腫瘍内還元型葉酸は増加する傾向にあった。

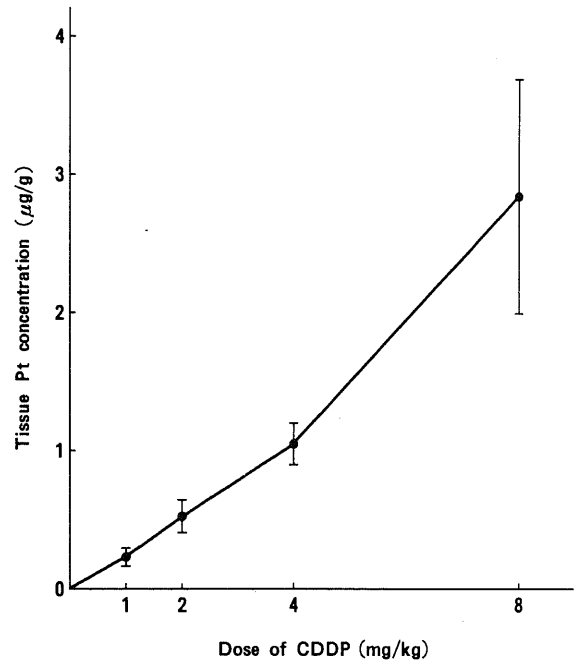


Fig. 7. Dose response curve of concentrations of tissue platinum in Yoshida sarcoma 2 hours after administration of CDDP. Values are expressed as mean \pm S.D. for 5 rats.

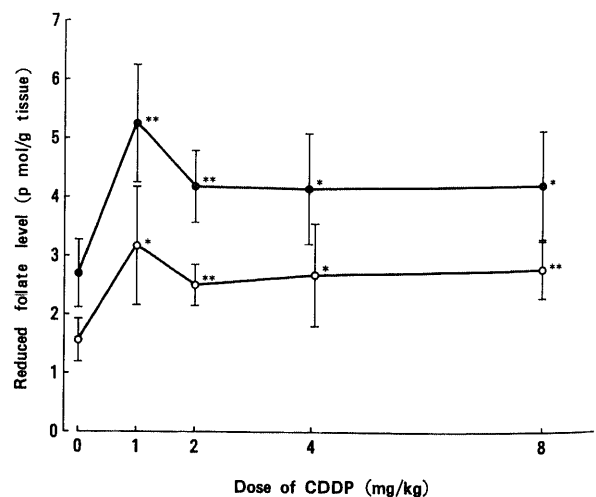


Fig. 8. Dose response curves of reduced folate levels in the tumor tissue of Yoshida sarcoma-bearing rats 2 hours after administration of CDDP. Values are expressed as mean \pm S.D. for 5 rats. ●, $\text{CH}_2\text{FH}_4 + \text{FH}_4$; ○, CH_2FH_4 . * Significant by the Student's t test vs. control ($p < 0.05$). ** Significant by the Student's t test vs. control ($p < 0.01$).

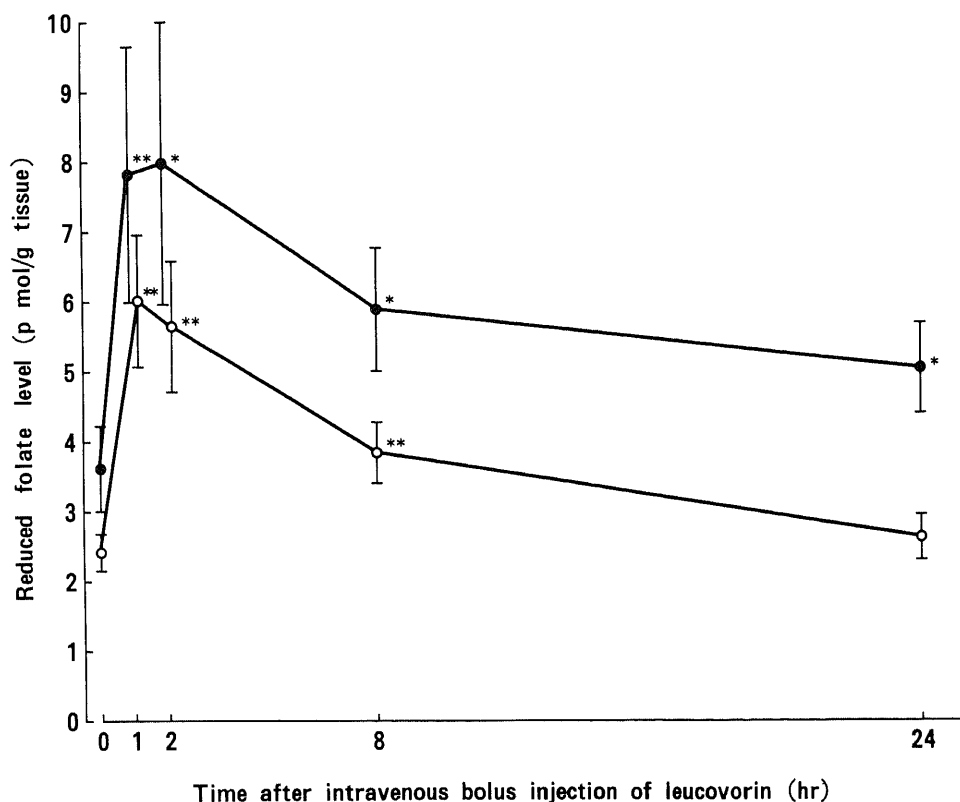


Fig. 9. Change in reduced folate levels in the tumor tissue of Yoshida sarcoma-bearing rats following intravenous bolus injection of LV at a dose of 100 mg/kg. Values are expressed as mean±S.D. for 4 rats. ●, CH₂ FH₄ + FH₄; ○, CH₂ FH₄. * Significant by the Student's t test vs. control (p<0.05). ** Significant by the Student's t test vs. control (p<0.01).

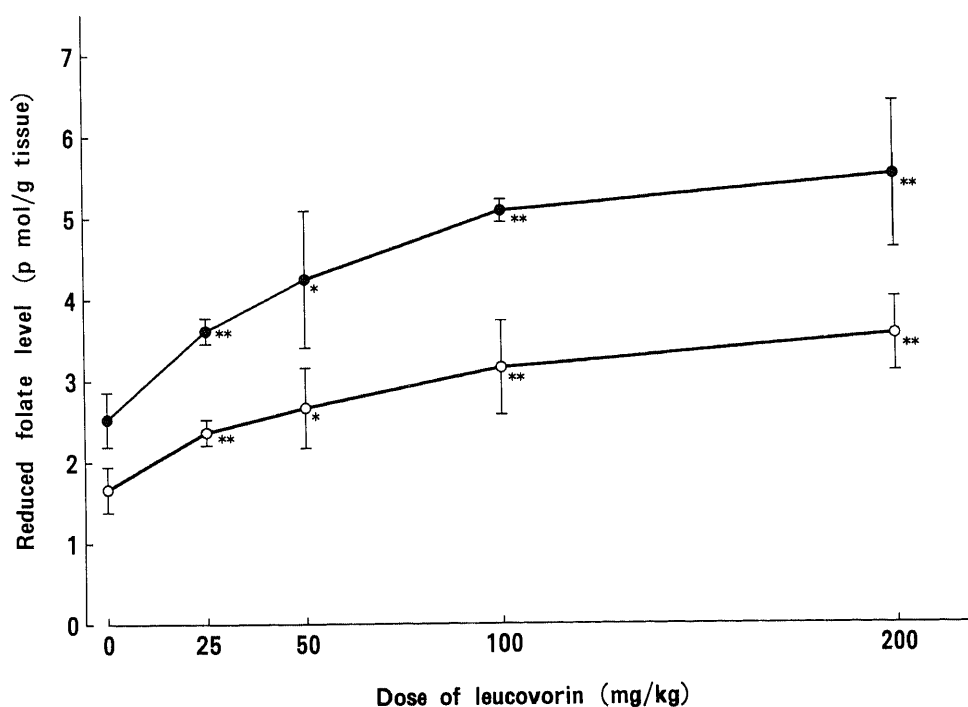


Fig. 10. Dose response curves of reduced folate levels in the tumor tissue of Yoshida sarcoma-bearing rats 2 hours after administration of LV. Values are expressed as mean±S.D. for 4 rats. ●, CH₂ FH₄ + FH₄; ○, CH₂ FH₄. * Significant by the Student's t test vs. control (p<0.05). ** Significant by the Student's t test vs. control (p<0.01).

考 察

固形がんに対する手術療法は現在なおその治療体系の中心であるが、進行癌に対して腫瘍を含めた原発臓器の切除、所属リンパ節の郭清、および隣接臓器の合併切除といった拡大手術を施行しても再発をきたす症例は稀ではない。手術療法の限界を克服するための補助療法の中で化学療法の占める比重は大きく、予後の向上に寄与する有効な化学療法の開発が望まれている。悪性腫瘍に対する多剤併用化学療法において、従来は抗腫瘍スペクトラムの相補効果を期待して薬剤が選択されていた。その結果、薬剤抵抗性の高いがん腫には3剤もしくは4剤併用の化学療法が導入され、治療効果が少ないにもかかわらず相加的な副作用による患者の負担のみが増加するという事態を招いた。最近、より効果的な化学療法を模索するうえで、生化学的調節の概念に基づいた理論的な薬剤の併用が提唱されており、腫瘍細胞の耐性打破や臨床効果の増強のみならず、副作用の軽減にもつながるものと期待されている。

本研究では、FT-207の活性体である5-FUを作用薬剤として用いた。5-FUは生体内での代謝、作用機序が判明している薬剤であり、また腫瘍細胞の耐性獲得機序も明らかにされている。しかし、5-FUは血中半減期が短いため、ここではその誘導体であるFT-207とともに、5-FUの不活化阻害を目的としてモル比で4倍量のウラシルを経口的に併用投与した^{19)~21)}。

CDDPは、抗がん剤であると同時に補助薬剤として作用することが判明し、現在最も注目、研究されている薬剤の一つであるといえる。CDDPによる5-FUの生化学的調節は以下の機構で発揮されると考えられている。すなわち、CDDPの投与によって、まず腫瘍細胞内へのメチオニンの輸送が阻害され、細胞内メチオニン量が欠乏する^{22)~24)}。このため細胞内でメチオニン合成が誘導され²⁵⁾、これとカップリングしてメチルテトラヒドロ葉酸(5-methyltetrahydrofolate, 5-CH₃ FH₄)からFH₄の生成、さらにはCH₂ FH₄の生成が高まる^{26)~28)}。CH₂ FH₄量の増加は、5-FUの代謝産物であるFdUMPと5-FUの標的酵素であるTSおよびCH₂ FH₄の3者が三重結合体を形成する段階で、三重結合体量の増加と安定化をもたらす²⁹⁾。その結果、TS阻害、すなわちDNAの合成阻害が亢進し²⁴⁾²⁸⁾、5-FUの抗腫瘍効果が増強されると考えられている。また、外因性葉酸としてLVを投与した場合にも、同様に細胞内のCH₂ FH₄量の増加を介して三重結合体量の増加と安定化がもたらされ、5-FUの抗腫瘍効果が増強される。

CDDPあるいはLVの投与によって影響される葉酸動態は、動物実験の場合、腫瘍細胞の移植部位や形態(固形型、腹水型)、あるいは薬剤投与経路などによって異なることが予想される。本実験では腹壁皮下に移植した固形腫瘍に対して薬剤を血中に投与するモデルを設定し、抗腫瘍効果と腫瘍内葉酸プールの変動を検討した。

UFT単剤投与の抗腫瘍効果(表1)およびCDDP単剤投与の抗腫瘍効果(表2)は、いずれも濃度依存性で、吉田肉腫におけるUFTの有効投与量(50% effective dose, ED₅₀値, T/Cで0.5が得られる投与量)は約27mg/kg、CDDPのED₅₀値は約4mg/kgであった。しかし、体重変化からみた毒性を考慮すると、ラットに対してはUFTでは20mg/kg、CDDPでは2mg/kgが1日投与量の限界と考えられた。今回作用薬剤として使用したUFTは20mg/kgの連日経口投与でT/Cが

0.70~0.75であり、この投与量ではラットの体重変化に及ぼす影響は軽度であった。生化学的調節の概念に基づいた化学療法の目的は抗腫瘍性の増強と副作用の軽減にあるため、補助薬剤との併用効果を検討する際のUFTの投与量は20mg/kgとした。また、薬剤投与計画は臨床で実際に行っている方法¹⁰⁾¹¹⁾に準じた。表3に示したように、UFTの連日経口投与に加えCDDPを第1日目のみ静脈内に投与した群では、それぞれの単独投与と比較して併用効果が認められ、いずれの投与量においても相乗的に作用したと考えられた。これは諸家の報告²⁸⁾³⁰⁾³¹⁾と一致するところであるが、この併用効果の増強度がCDDPの投与量に依存しているのか否かが至適投与量の決定上重要と考えられた。図1にUFT併用の有無別にCDDP投与量と抗腫瘍効果の関係を示した。UFTとCDDPを併用投与した場合、補助薬剤としてのCDDPの効果を検討するためにはUFTとCDDPの併用効果からCDDPの固有の抗がん効果を差し引いて考える必要がある。こうした観点から、斜線部分はCDDPの補助薬剤としての作用を表現していると考えられた。この部分をT/Cの差で表すと、CDDPの投与量が1, 2, 4mg/kgで、それぞれ0.16, 0.26, 0.21とほぼ一定であり、CDDP投与量と相関関係を認めなかった。すなわち、UFTとCDDPの併用時にCDDPの投与量の増加とともにみられた抗腫瘍効果の増強は、CDDPの固有の抗がん効果の増強によるものであって、補助薬剤としての併用効果は投与量を1mg/kgから増量しても増強せず一定であることが示唆された。

一方、CDDP投与後の薬理動態と腫瘍内葉酸プールの観察は、補助薬剤としての至適投与法を検討するために不可欠である。図3および図6で示した血中Ptの薬理動態は、諸家の報告^{32)~35)}とともに至適投与量の決定上重要な情報となりうる。また、腫瘍内Pt濃度は二相性に減衰し、投与後の時間が経過しても血中濃度に比し高値を維持した(図4)。これに対し、CDDP4mg/kgを静脈内投与した後の葉酸プールは、投与1~2時間後の早期に一過性に対照群の2~1.6倍に増大したが、その後減少し8時間後には対照群と同レベルへ、24時間後には対照群以下となった(図5)。つまり、CDDPの静脈内投与による葉酸プールの増大は、CDDP投与後早期にみられる一過性の現象であり、また血中総Pt濃度や腫瘍内Pt濃度よりも血中蛋白非結合型Pt濃度の変動に類似した変化と考えられた。次に、CDDPの静脈内投与2時間後における投与量と総Pt濃度、蛋白非結合型Pt濃度および腫瘍内Pt濃度の相関関係をみると、いずれも正の比例関係を呈していた(図6, 図7)。これに対し、CDDPの静脈内投与2時間後における投与量と腫瘍内葉酸プールの相関関係をみると、CDDP1, 2, 4, 8mg/kgの投与で葉酸プールはいずれも対照群の1.5~2倍に増大したが、それらの程度に差はみられなかった(図8)。血中および腫瘍内Pt濃度がCDDP投与量に相関していたことは異なり、CDDP投与後の葉酸プールの増大には一定の限界があると思われた。これはCDDPの有する補助薬剤効果が1mg/kg以上では投与量の増加に伴って増強しないことを示唆しており、抗腫瘍効果から検討した結果と一致した。

以上の成績から、CDDPを補助薬剤として最大限に作用させるには、5-FU系抗がん剤と同時に投与を開始するのが適しており、また単回大量投与よりも補助薬剤としての効果が得られる必要最小量を反復投与の方が適していると考えられた。本実験モデルにおけるこの必要最小量、すなわち補助薬剤として

の CDDP の至適投与量は、体重増加の抑制程度、抗腫瘍効果および葉酸動態のいずれの観点からも 1mg/kg と判定された。さらに、臨床例における CDDP の薬理動態を求め、ラットにおける成績と対比を行えば、臨床における至適投与量の算定が可能であると考えられた。CDDP は従来濃度依存的に抗腫瘍効果を発揮する薬剤と考えられてきたが、最近の実験的・臨床的検討では時間依存的な性格も有することが指摘されている^{36)~38)}。また、5-FU と CDDP の両者を持続点滴し有用性が認められた臨床報告¹⁰⁾¹¹⁾もあり、補助薬剤としての CDDP の至適投与速度に関する検討は今後の課題である。

LV もまた 5-FU の重要な補助薬剤であり、臨床的には主に至適投与量に関する検討がなされているが、CDDP の場合と同様にその至適投与法は未だに明らかでない。本研究では、CDDP で行った方法と同様に LV を UFT と併用した場合の抗腫瘍効果と腫瘍内葉酸プールを測定した。UFT の連日経口投与に加え、LV を第 1 日目のみ静脈内に投与した群では、UFT 単独投与群に比較して抗腫瘍効果の増強が認められた。LV 単独では抗がん活性を示さないため、この抗腫瘍効果の増強程度がそのまま LV の補助薬剤としての効果と判定され、図 2 の斜線部分で表現された。抗がん効果からみた LV の増強効果は、投与量に依存的な傾向がみられた。この結果を図 1 で示した CDDP での増強効果と比較すると、CDDP の補助薬剤としての効果は LV では約 40mg/kg に相当すると考えられた。一方、LV 100mg/kg 静脈内投与した場合の腫瘍内葉酸プールの経時的変化をみると、LV 投与 1~2 時間後の早期に一過性に高値を示し、以後漸減した(図 9)。葉酸プールが強く増大する投与 2 時間後における LV 投与量と腫瘍内葉酸プールの関係をみると、正の相関は認めないものの、CDDP とは異なり LV 投与量の増加にしたがって葉酸プールも増大する傾向にあった(図 10)。この結果を CDDP 投与後の葉酸変動と比較すると、CDDP 投与によって認められた葉酸プールの増大は、LV を約 50mg/kg 投与した場合と同等であると考えられた。

以上の成績から、LV を補助薬剤として最大限に作用させるには、5-FU 系抗がん剤と同時に投与を開始するのが適しており、また、投与量が多いほど補助薬剤としての効果は増大すると考えられた。また、抗腫瘍効果および葉酸変動の両面からの検討で、CDDP の 1mg/kg 投与と同等の補助薬剤効果を得るためには 40~50mg/kg の LV が必要であろうと推察された。体重増加の抑制程度からみても、UFT20mg/kg に CDDP1mg/kg を併用した場合と LV50mg/kg を併用した場合では、ほぼ同等であった(表 3, 表 4)。

本研究では動物の悪性腫瘍である吉田肉腫を材料として用いたが、臨床で化学療法の対象となる個々の腫瘍では TS 活性や腫瘍内葉酸プールが大きく異なっており⁴⁰⁾、この両者の比率が 5-FU に対する個々の腫瘍の感受性を決定する上で重要な因子となっていると思われる。すなわち、TS 活性の高い腫瘍では十分量の三重結合体を形成するために必要な葉酸や FdUMP が相対的に不足し、抗がん効果を発揮できるだけの TS 阻害が得られないため、5-FU に対する感受性は低いと考えられる^{41)~43)}。一方、腫瘍内の葉酸プールは三重結合体形成量とその安定性に関与し、5-FU に対する感受性に影響を与える⁴⁴⁾⁵⁾。教室の Dohden 氏³⁹⁾はヒトがん組織の TS を用いて、反応液中に含まれる葉酸の濃度が高いほど形成される三重結合体の安定性が増すことを報告した。また、同様に教室の川上⁴⁰⁾は手術前に

UFT を投与したヒト大腸がん組織を用いた研究で、腫瘍細胞に存在する内因性葉酸のみでは 5-FU による十分な TS 阻害を期待できず、腫瘍内の葉酸プールを増大させる補助薬剤の併用が必要であることを報告している。これらの臨床検体を用いた研究と本基礎的研究から、CDDP あるいは LV を補助薬剤として併用する生化学的調節を利用した化学療法は、作用薬剤である 5-FU 系抗がん剤に対する感受性を向上させ、抗腫瘍効果を増強する有意義な方法であることが明らかとなった。

結 論

吉田肉腫を接種したラットを用いて、CDDP および LV による 5-FU 系抗がん剤に対する生化学的調節を抗腫瘍効果および腫瘍内葉酸変動の両面から評価した。また、臨床への応用を意図してラット血中および腫瘍内における CDDP の薬理動態を求めた。さらに、補助薬剤としての効果を CDDP と LV の両者について比較検討した。得られた成績は以下のごとくであった。

1. UFT20mg/kg の連日経口投与(第 1~6 日)に CDDP を第 1 日目のみ静脈内投与を併用した群では、それぞれの単独投与に比較して併用効果が認められた。しかし、CDDP 単独投与群と CDDP+UFT 併用投与群における T/C の差、すなわち CDDP 固有の抗がん効果を差し引いた補助薬剤としての効果は、CDDP 投与量が 1, 2, 4mg/kg のいずれにおいても約 0.2 前後であり、投与量の増加にとまらぬ抗腫瘍効果の増強はみられなかった。

2. CDDP4mg/kg の静脈内投与時の血中総 Pt は投与 2 時間後に最高濃度 844±65ng/ml を示し、半減期 19 時間で減衰し、AUC は 25.7μg·hr/ml であった。血中蛋白非結合型 Pt は投与 1 時間後に最高濃度 369±122ng/ml を示し、半減期 17 分で減衰し、AUC は 0.4μg·hr/ml であった。腫瘍内 Pt は投与 1 時間後に最高濃度 1.89±0.25μg/g を示し、2 相性に減衰し、AUC は 111.2μg·hr/g であった。このような CDDP の薬理動態下で腫瘍内還元型葉酸プールの経時的変化をみると、1~2 時間後に対照群の 2~1.6 倍に一過性に増大したが、その後減少し 8 時間後には対照群と同レベルへ、24 時間後には対照群以下となった。

3. CDDP の静脈内投与 2 時間後における投与量と総 Pt 濃度、蛋白非結合型 Pt 濃度および腫瘍内 Pt 濃度の相関をみると、いずれも正の比例関係が認められた。これに対し、CDDP1, 2, 4, 8mg/kg の静脈内投与 2 時間後における腫瘍内還元型葉酸プールは、いずれも対照群の 1.5~2 倍に増大したが、それらの程度に差はみられなかった。

4. UFT20mg/kg を連日経口投与(第 1~6 日)した群を対照とすると、LV50mg/kg の静脈内投与を第 1 日目のみに併用した群の T/C は 0.70、LV100mg/kg を同様に併用した群の T/C は 0.55 であった。LV の投与量を増加すると併用効果も増強した。

5. LV100mg/kg の静脈内投与後の腫瘍内還元型葉酸プールは 1~2 時間後の早期に対照群の 2.2~2.5 倍に増大し、その後減少したが 8, 24 時間後においては CDDP の投与時よりも高値を維持した。LV の静脈内投与 2 時間後における腫瘍内還元型葉酸プールは、投与量の増加にしたがって増大した。

以上の成績から、CDDP あるいは LV の静脈内投与による腫瘍内葉酸プールの増大は、薬剤投与後早期にみられる一過性の

現象であることが判明した。また、補助薬剤としてのLVの効果は投与量の増加に伴って増強するが、CDDPでは一定の限界があることが示された。さらに、5-FU系抗がん剤の補助薬剤として、CDDPの必要最少量(1mg/kg)の投与で得られる増強効果はLV40~50mg/kgの投与で得られる効果と同等であると推察された。

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。また、本研究に際し御助言、御教示を賜りました金沢大学がん研究所化学療法部佐々木琢磨教授に深く感謝の意を表します。さらに、葉酸濃度の測定に御協力をいただいた大鵬薬品工業白坂哲彦部長、同病態化学研究所福島正和所長に感謝し、併せて本研究の遂行に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第一外科学講座の諸先生方に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨は第52回日本癌学会総会(1993年、仙台)において発表した。

文 献

- 1) Duschinsky, R., Plevin, E. & Heidelberger, C.: The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4559-4560 (1957).
- 2) 稲葉実: 5-FU の効果増強. 癌と化学療法, **15**, 380-391 (1988).
- 3) Rosenberg, B., Van Camp, L. & Krigas, T.: Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, **205**, 698-699, (1965).
- 4) Rosenberg, B., Van Camp, L., Trasko, J. E. & Mansour, V. H.: Platinum compounds: a new class of potent anti-tumor agents. *Nature*, **222**, 385-386 (1969).
- 5) Rooney, M., Kish, J., Jacobs, J., Kinzie, J., Weaver, A., Crissman, J. & Al-Sarraf, M.: Improved complete response rate and survival in advanced head and neck cancer after three-course induction therapy with 120-hour 5-FU infusion and cisplatin. *Cancer*, **55**, 1123-1128 (1985).
- 6) Cantrell, J. E., Hart, R. D., Taylor, R. F. & Harver, J. H.: Pilot trial of prolonged continuous-infusion 5-fluorouracil and weekly cisplatin in advanced colorectal cancer. *Cancer Treat. Rep.*, **71**, 615-618 (1987).
- 7) Greenberg, B., Ahmann, F., Garewal, H., Koopmann, C., Coulthard, S., Berzes, H., Alberts, D., & Slymen, D.: Neoadjuvant therapy for advanced head and neck cancer with allopurinolmodulated high dose 5-fluorouracil and cisplatin. *Cancer*, **59**, 1860-1865 (1987).
- 8) Thomas, G. D. & Paterson, C. M.: Response rates and survival in patients with head and neck cancer treated with a combination of cisplatin and 5-fluorouracil prior to radiotherapy. *Clin. Radiol.*, **39**, 551-554(1988).
- 9) Bernal, A. G., Cruz, J. J., Sanchez, P., Munoz, A., Nieto, A., Fonseca, E., Calle, R. & Gomez, J. L.: Four-day continuous infusion of cisplatin and 5-fluorouracil in head and neck cancer. *Cancer*, **63**, 1927-1930 (1989).
- 10) 橋本琢生, 大村健二, 石田文生, 渡辺洋宇: 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).

- 11) 橋本琢生, 大村健二, 石田文生, 川上和之, 松智彦, 渡辺洋宇: 術前5-FU(UFT)/CDDP療法にてStage Reductionが得られた胃癌の1例. 癌と化学療法, **19**, 2415-2419 (1992).
- 12) Poon, M. A., O'Connell, M. J., Moertel, C. G., Wieand, H. S., Cullinan, S. A., Everson, L. K., Krook, J. E., Mailliard, J. A., Laurie, J. A., Tschetter, L. K. & Wiesenfeld, M.: Biochemical modulation of fluorouracil: Evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, **7**, 1407-1417 (1989).
- 13) Erlichman, C., Fine, S., Wong, A. & Elhakim, T.: A randomized trial of fluorouracil and folinic acid in patients with metastatic colorectal carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, **6**, 469-475 (1988).
- 14) Petrelli, N., Herrera, L., Rustum, Y., Burke, P., Creaven, P., Stulc, J., Emrich, L. J. & Mittelman, A.: A prospective randomized trial of 5-fluorouracil vs 5-fluorouracil and high dose leucovorin + 5-fluorouracil and methotrexate in previously untreated patients with advanced colorectal carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, **5**, 1559-1565 (1987).
- 15) Machover, D., Goldschmidt, E., Chollet, P., Metzger, G., Zittoun, J., Marquet, J., Vandenbulcke, J. M., Misset, J. L., Schwarzenberg, L., Fourtillan, J. B., Gaget, H. & Mathe, G.: Treatment of advanced colorectal and gastric adenocarcinomas with 5-fluorouracil and high-dose folinic acid. *J. Clin. Oncol.*, **4**, 685-696 (1986).
- 16) Spears, C. P., Shahinian, A. H., Moran, R. G., Heidelberger, C. & Corbett, T. H.: In vivo kinetics of thymidylate synthetase inhibition in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant murine colon adenocarcinomas. *Cancer Res.*, **42**, 450-456 (1982).
- 17) Pera, M. F. & Harder, H. C.: Analysis for platinum in biological material by flameless atomic absorption spectrometer. *Clin. Chem.*, **23**, 1245-1249 (1977).
- 18) Himmelstein, K. J., Patton, T. F., Belt, R. J., Taylor, S., Repta, A. J. & Sternson, L. A.: Clinical kinetics of intact cisplatin and some related species. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **29**, 658-664 (1981).
- 19) Fujii, S., Ikenaka, K., Fukushima, M. & Shirasaka, T.: Effect of uracil and its derivatives on antitumor activity of 5-fluorouracil and 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil. *Gann*, **69**, 763-772 (1978).
- 20) Fujii, S., Kitano, S., Ikenaka, K. & Shirasaka, T.: Effect of coadministration of uracil or cytosine on the antitumor activity of clinical doses of 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil and level of 5-fluorouracil in rodents. *Gann*, **70**, 209-214 (1979).
- 21) Ikenaka, K., Shirasaka, T., Kitano, S. & Fujii, S.: Effect of uracil on metabolism of 5-fluorouracil in vitro. *Gann*, **70**, 353-359 (1979).
- 22) Scanlon, K. J., Safirstein, R. L., Thies, H., Gross, R. B., Waxman, S. & Guttenplan, J. B.: Inhibition of amino acid transport by cis-diamminedichloroplatinum (II)

- derivatives in L1210 murine leukemia cells. *Cancer Res.*, **43**, 4211-4215 (1983).
- 23) Shinoya, S., Lu, Y. & Scanlon, K.: Properties of amino acid transport systems in K562 cells sensitive and resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res.*, **43**, 4211-4215 (1986).
- 24) 白坂哲彦: 5-FU は DNA, RNA のいずれに作用するか. *臨床医*, **17**, 1480-1485 (1991).
- 25) Krebs, H. A., Hems, R. & Tyler, B.: The regulation of folate and methionine metabolism. *Biochem. J.*, **158**, 341-353 (1976).
- 26) Scanlon, K. J., Newman, E. M., Lu, Y. & Priest, D. G.: Biochemical basis for cisplatin and 5-fluorouracil synergism in human ovarian carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8923-8925 (1986).
- 27) 大家真治, 岡部博之, 武田節夫, 山田雄次: CDDP による UFT の効果増強メカニズムの解明— Biochemical modulation の見地から—. *癌と化学療法*, **17**, 1321-1326 (1990).
- 28) 白坂哲彦, 島本雄司, 大下英之, 大村彰男, 福島正和: 5-FU 系抗腫瘍剤とシスプラチンの併用による抗腫瘍効果増強とその作用機序— 5-FU の Biochemical Modulation の立場から—. *癌と化学療法*, **18**, 403-409 (1991).
- 29) Dohden, K., Ohmura, K. & Watanabe, Y.: Ternary complex formation and reduced folate in surgical specimens of human adenocarcinoma tissues. *Cancer*, **71**, 471-480 (1993).
- 30) Furukawa, M., Ohoka, H., Sakashita, H. & Umeda, R.: Synergistic antitumor activity of cisplatin and UFT in nude mice bearing transplantable nasopharyngeal hybridoma. *Auris-Nasus-Larynx*, **16**, 169-175 (1989).
- 31) 山田雄次, 斉藤等, 大塚真治, 武知貞士, 中野耕志, 武田節夫: UFT と Cisplatin の各種ヒト臓器腫瘍のヌードマウス移植系における併用効果の検討. *癌と化学療法*, **17**, 1327-1331 (1990).
- 32) Litterst, C. L., LeRoy, A. F. & Guarino, A. M.: Disposition and distribution of platinum following parenteral administration of cis-diamminedichloroplatinum (II) to animals. *Cancer Treat. Rep.*, **63**, 1485-1492 (1979).
- 33) Gullo, J. L., Litterst, C. L. & Maguire, P. J.: Pharmacokinetics and protein binding of cis-diamminedichloroplatinum (II) administered as a one hour or as a twenty hour infusion. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **5**, 21-26 (1980).
- 34) DeConti, R. C., Toftness, B. R., Lange, R. C. & Creasey, W. A.: Clinical and pharmacological studies with cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res.*, **33**, 1310-1315 (1973).
- 35) 北島恵子, 福岡正博, 小林貞, 楠洋子, 高田実, 根来俊一, 松井薫, 酒井直道, 劉震永, 滝藤伸英: Cisplatin 静注時の血中動態と副作用からみた至適投与法の検討. *癌と化学療法*, **14**, 2517-2523 (1987).
- 36) Belliveau, J. F., Posner, M. R., Ferrari, L., Crabtree, G. W., Cummings, F. J., Wiemann, M. C., O'Leary, G. P. Jr., Griffin, H., Phaneuf, M. A., O'Rourke, A. & Calabresi, P.: Cisplatin administered as a continuous 5-day infusion: Plasma platinum levels and urine platinum excretion. *Cancer Treat. Rep.*, **70**, 1215-1217 (1986).
- 37) Drewinko, B., Brown, B. W. & Gottlieb, J. A.: The effect of cis-diamminedichloroplatinum (II) on cultured human lymphoma cells and its therapeutic implications. *Cancer Res.*, **33**, 3091-3095 (1973).
- 38) Chen, J., Hirai, Y., Shimizu, Y., Hasumi, K. & Masubuchi, K.: New cisplatin schedule in combination with aclarubicin (ACR) with high response rate in recurrent gynecological adenocarcinomas. *Gynecol. Oncol.*, **38**, 1-5 (1990).
- 39) Jacobs, C., Bertino, J. R., Goffinet, D. R., Fee, W. E. & Goode R. L.: 24-hour infusion of cis-platinum in head and neck cancer. *Cancer*, **42**, 2135-2140 (1978).
- 40) 川上和之: ヒト大腸癌組織内チミジル酸合成酵素活性および葉酸プールの測定と UFT 投与によるその変動. *十全医会誌*, **101**, 975-986 (1992).
- 41) Spears, C. P., Gustavsson, B. G., Berne, M., Frosing, R., Bernstein, L. & Hayes, A. A.: Mechanisms of innate resistance to thymidylate synthase inhibition after 5-fluorouracil. *Cancer Res.*, **48**, 5894-5900 (1988).
- 42) Berger, S. H. & Hakala, M. T.: Relationship of dUMP and free FdUMP pools to inhibition of thymidylate synthase by 5-fluorouracil. *Mol. Pharmacol.*, **25**, 303-309 (1984).
- 43) 白坂哲彦, 福島正和: 5-FU 耐性に関与する遺伝子. *組織培養*, **16**, 250-256 (1990).
- 44) Keyomarsi, K. & Moran, R. G.: Folinic acid augmentation of the effects of fluoropyrimidines on murine and human leukemic cells. *Cancer Res.*, **46**, 5229-5235 (1986).
- 45) Houghton, P. J.: Biochemical determinants of responsiveness to 5-fluorouracil and its derivatives in xenografts of human colorectal adenocarcinomas in mice. *Cancer Res.*, **41**, 144-149 (1981).

Augmentation of the Antitumor Activity of Fluoropyrimidine in Rats Takuo Hashimoto, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **102**, 658—670 (1993)

Key words biochemical modulation, fluoropyrimidine, cis-diamminedichloroplatinum [II], leucovorin, folate pool

Abstract

Recently, biochemical modulation of 5-fluorouracil derivatives is a major concern in cancer chemotherapy. Cis-diamminedichloroplatinum [II] (CDDP) and leucovorin (LV) inhibit the enzymatic activity of thymidylate synthase through the increased formation of a tight ternary complex with the enzyme, 5-fluoro-2' deoxyuridine-5'-monophosphate and 5, 10-methylenetetrahydrofolate. In this study, the antitumor effect of combined administration of UFT with CDDP or LV was examined in Yoshida sarcoma-bearing rats. And the change in the concentration of reduced folates in tumor by two kinds of modulators was also investigated to determine the optimization of the schedule of these drugs. The combination of intravenous administration of CDDP on day 1 and 6 consecutive oral administrations of UFT (20 mg/kg) strongly enhanced the antitumor activity against Yoshida sarcoma solid type in rats as compared to each drug alone. However, the enhanced antitumor effect of this combination treatment was independent of the dose of CDDP (1,2,4 mg/kg). On the other hand, the enhanced antitumor effect of UFT with LV administered similarly to CDDP was dependent on the dose of LV. The modulatory effect of 1~4 mg/kg of CDDP was almost equal to that of 40 mg/kg of LV in antitumor activity. The reduced folate level in the tumor was temporarily increased 2.0~1.6 fold of the control level in Yoshida sarcoma at 1~2 hr after the intravenous administration of CDDP (4 mg/kg). However, it was lower than the control level at 24 hr after the injection. The folate level at 2 hr after the intravenous administration of 1,2,4,8 mg/kg of CDDP was increased to 1.5~2 fold of the control level. However, they were independent of the dose of CDDP, although the platinum levels in plasma and tumor were directly proportional to the dose of CDDP. On the other hand, the folate level in the tumor was increased 2.2~2.5 fold of the control level 1~2 hr after the intravenous administration of LV (100 mg/kg), and increased dose-dependently, 2 hr after administration. The modulatory effect of 1~8 mg/kg of CDDP on the reduced folate level in the tumor was almost equal to the effect of 50 mg/kg of LV. These findings suggest biochemical modulation through intravenous administration of CDDP or LV is transient in the early phase, and is not dose-dependent but limitative in CDDP in spite of dose-dependency on LV. The minimum dose of CDDP (1 mg/kg) and 40~50 mg/kg of LV were suspected to act equally as a modulator of 5-fluorouracil.