LY-80 に対する biochemical modulation の効果と
昇圧化学療法による増殖抑制佐藤春彦・石塚圭一^{*1)}, 星 正彦²⁾, 漆山昌伸^{*3)}, 杉山克郎^{*4)}

Cytodegenerative and growth-inhibitory effects on LY-80 cells by methotrexate and 5-fluorouracil in combination with angiotensin II induced hypertension chemotherapy (IHC)

IHC which is an application of characteristics of tumor microcirculation for drug delivery, makes possible to increase chemotherapeutic effects. To examine a role of selective enhancement of drug delivery in biochemical modulation (BCM), cytodegenerative and growth inhibitory effects of methotrexate (MTX) and 5-fluorouracil (5-FU) on LY-80 hepatoma cells were investigated. A combination of MTX: 2 mg/kg + 5-FU: 20 mg/kg of 5-consecutive-days-administration (day 3~7 after inoculation) showed the highest cytodegenerative effects on intraperitoneal LY-80 cells, comparing with the other MTX/5-FU and 5-FU/leucovolin (LV) combination. Time interval effect was not obviously defined in this system. Growth inhibitory effect of MTX 2 mg/kg + 5-FU 20 mg/kg on subcutaneous tumor which 5×10^5 of LY-80 were transplanted, was significantly enhanced by IHC, comparing with that of non-IHC in both day 7, 9, 11 and 9, 12, 15 administration groups. LV rescue which 5 mg/kg was administered 1 hour after MTX/5-FU, had prevented inhibitory effect on tumor as well as had reduced weight loss of rats.

According to this preliminary results, it showed that enhancement of drug delivery had an important role for chemotherapy using BCM.

Haruhiko Sato・Keiichi Ishizuka^{*1)},
Masahiko Hoshi^{*2)}, Masanobu Urushiyama^{*3)},
Katsuo Sugiyama^{*4)}

key words: angiotensin II,
induced hypertension chemotherapy,
drug delivery, biochemical modulation

癌の化学療法における効果増強に関与する大きな因子として、癌細胞の薬剤感受性がある。癌組織を構築する実質としての癌細胞集団の薬剤感受性は同じ発生母組織であっても感受性の高いものから抵抗性のものまで大きな偏位を示し癌細胞の“個性”として認識されてきた。さらに一度感受性を示しても薬剤との接触を繰り返すことにより抵抗性となる“薬剤耐性”の問題も化学療法の効果を低下させる要因として考慮しなければならない。

この薬剤耐性は、臨床的には元々癌細胞集団の中における heterogenous な感受性集団が選択淘汰されて抵抗性のものが多数を示すようになったのか、あるいは homogenous な集団であってもしだいに抵抗性を獲得するようになったのかを、それぞれに決定することは困難である。実際的には、細胞集団への殺細胞効果を上げるために、① 多剤の組み合わせ併用とする、② 作用機序や細胞周期の特徴に基づいて投与順序を工夫する、③ いくつかの薬剤を交互に投与するなどの方法が提唱されて実践されてきた。

一方、腫瘍組織を構築する間質成分としての腫瘍血管は薬剤の到達性の担い手として注目されてきた。腫瘍血管の機能特性に関する研究から、抗癌剤の腫瘍組織への選択的到達性の亢進が angiotensin II (以下 A II) の持続静脈内投与により得られるという実験結果に基づき^{1~4)} 昇圧化学療法が基礎的臨床的に開発されてきた^{5,6)}。実験的に感受性を有する腫瘍では著明な化学療法効果の増強を得ることが示され^{1~3)}、臨床でも進行胃癌を対象とした無作為化比較試験から有意に直接効果が増強することを報告してきた⁶⁾。

このことは薬剤感受性と到達性が常にいかなる場合でも考慮されねばならないことを意味してお

^{*1)} Department of Clinical Cancer Chemotherapy, The Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University 東北大学抗酸菌病研究所臨床癌化学療法部門

^{*2)} Miyagi Kenkohoken Hospital 宮城健康保険病院

^{*3)} Sendai Kousei Hospital 仙台厚生病院

^{*4)} Kesennuma General Hospital 公立気仙沼総合病院

り、効果を少しでも増強することが臨床医の任務である点に立脚すれば、薬剤の選択とその効果判定を吟味していくと同時に化学療法の実施運用に際して選択的到達性の増強は必須のものと認識しなければならないといえよう。

近年いわゆる biochemical modulation (生化学的修飾; 以下 BCM) という併用療法が報告されている⁷⁻¹³⁾。癌細胞の生化学的反応経路を阻害して抗癌剤の殺細胞効率を上げようとする併用療法であり臨床的には良好な成績の報告も多い⁹⁻¹²⁾。

この方法は、癌細胞集団の薬剤感受性を結果的に上昇させるものであり、この感受性因子に加えて薬剤到達性を亢進することで、さらに抗腫瘍効果が増強されるものと推論できる。今回は、この目的で行った BCM と昇圧化学療法の初期的実験結果を報告する。

材料と方法

実験腫瘍: LY-80 (継代数 302-319G; 吉田肉腫の変異株)

動物: 雄 Donryuu rats Crj (Chales River Co, Japan) 100~150 g を水分固形飼料自由摂取下に飼育した。

薬剤: 5-Fluorouracil (5-FU), 1-Leucovorin (LV) [協和醗酵(株)], methotrexate (MTX) [日本レダリー(株)] MTX は 2 と 5 mg/kg (0.2 ml/100 g 以下同溶液量), 5-FU は 20 mg/kg に生理食塩液で, LV は 1 (低用量群) と 10 (高用量群) mg/kg に蒸留水で使用前に調製した。

抗癌剤投与は下記に従った。angiotensin II (A II) には angiotensin II human [トーアエイヨー(株)] を生理食塩液にて 2.5 µg/ml に調製し、持続静脈内注入にて平均動脈血圧を 146.7±12.7~159.8±6.6 mmHg に昇圧し化学療法を行った。昇圧時間は、抗癌剤投与後 7 分とした。

化学療法実験時、ラットは 30 mg/kg pento-barbital 皮下投与および適宜 ether 吸入麻酔下においた。

(1) 腹腔内移植-腹腔内投与 (i. p-i. p) 化学療法実験

LY-80 2×10^6 個を i. p 移植後 3 日目のチェックで純培養状態に増殖しているラットのみを実験に使用した (各群 5 頭)。3~7 日目まで 5 日間連

日薬剤を i. p 投与した。MTX 前投与後 1 時間で 5-FU を投与した。MTX/5-FU+LV 救済群では、LV は MTX/5-FU 投与後 1 時間に 5-FU+LV 群では同時に投与した。

その後の腹水腫瘍細胞の形態変化および反応細胞の状況について検索し生存日数や剖検所見と対比した。

(2) 皮下移植-静脈内投与 (s. c-i. v) 化学療法実験

LY-80 5×10^6 個を皮下移植して、移植後 7, 9, 11 日目投与群 (各群 5 頭) および 9, 12, 15 日目投与群 (各群 7 頭) において、MTX, 5-FU をそれぞれの実験計画に従って平圧下または AII 昇圧下に投与した。各個体の長径×短径を測定しその積を求め治療開始時の測定値を [1] として生育増加率を計算した。なお LV 救済投与は各化学療法終了 1 時間後 10 mg/kg 腹腔内へ投与した。

結果

① i. p-i. p 実験 (表 1, 2)

5-FU+LV 群では 5-FU 単独群にくらべ LV の投与量で 10 mg/kg で ($P < 0.10$), 1 mg/kg で ($P < 0.05$) の延命効果を得た。しかし 5-FU/MTX 同時投与群や MTX→5-FU 群では無処置対照群よりも延命せず MTX 2 mg/kg+FU 群が僅かに延命したに過ぎなかった (NS)。体重変化でも対照群 FU 単独群 FU+LV 群が増加するのに対して、MTX 単独 MTX+FU 併用群が約 20% の減少を示した。さらに、MTX 2 mg/kg 群では最低値に達した後に体重が回復するが、MTX 5 mg/kg 単独および FU 併用群では回復せずに死亡した。剖検では、腸管壁菲薄透亮・脾臓萎縮・肺炎などを呈し病理組織学的にも腸管粘膜の脱落や脾臓・腸管・リンパ節のリンパ球の著明な減少喪失の所見から毒性死を示唆していた。

一方、腹腔内増殖腫瘍細胞学的変化は FU 単独群でも軽微に認められたが、MTX 投与群に著明であった。すなわち (表 2) MTX 投与群では投与開始 4~5 日後には LY-80 細胞は塗抹標本上細胞膨化融解・核濃縮のいちじるしい変性を示し、それに反応してその 1~2 日後にマクロファージが出現し、ついで小型のリンパ球が増加してきた。この腫瘍細胞の変性度は、MTX 5 mg/kg 群が 2

表 1 LY-80 細胞 2×10^6 個ドシリウラット腹腔内移植および腹腔内薬剤投与時の生存日数と体重変化

	投与量(mg/kg)		生存日数 ^{*1)}	体重変化 ^{*2)}
	MTX 5-FU			
① 対照	—	—	14.0±2.3	1.24(12)
② 5-FU	—	20	16.0±1.4	1.30(11)
③ MTX	5	—	11.3±4.0	0.85(7)
④ MTX	2	—	12.2±4.3	0.92(9 ^{*3)})
⑤ MTX→5 FU ^{*4)}	5	20	9.8±1.3	0.76(8)
⑥ MTX+5-FU	5	20	9.0±1.2	0.81(8)
⑦ MTX+5-FU	2	20	15.7±5.2	0.81(9 ^{*3)})
⑧ 5-FU+LV	10	20	19.0±2.5	1.37(17)
⑨ 5FU+LV	1	20	18.8±1.6	1.38(17)

*1) : 移植後 3 日目に純培養状態を確認して化学療法を開始
3～7 日連日 i. p 投与

*2) : 化学療法開始時を 1 とした比率。() 内は最低値または
は定常期に達した日

*3) : 以後の回復ありを示す

*4) : MTX と 5-FU 投与間隔は 1 時間

① : ② NS. ② : ⑦ NS. ② : ⑧ P<0.10. ② : ⑨ P<0.05

mg/kg 群より強く用量依存的であった。しかし、MTX/FU 群に 1 時間後の LV 救授投与をすると変性度はいちじるしく抑制された。

FU+LV 群では、胞体膨化や核濃縮などの細胞変性度は目立たないが、細胞の大小不同はいちじるしく、対照群に比較して血性腹水になるのが遅れ細胞数の増加が抑制されている印象があった。

生存日数では、MTX/5-FU 群の中で MTX 5 mg/kg+LV 救済群が非救済群より有意に MTX 2 mg/kg 群がその+救済群より有意ではないが数値的に延命した。5-FU+LV 群では対照群より延命(P<0.05)したが、MTX 2 mg/5-FU 20 mg/kg 群と同様であった。

以上から、LY-80 に対して MTX+FU 併用は 5-FU 単独よりも細胞学的効果を示すが宿主への毒性の点で MTX 用量を考慮すべしと結論された。

時間差投与の効果は明らかではなかった。

② s.c-i.v 実験

① の結果に基づいて、MTX 2 mg/kg と FU 20 mg/kg を同時投与した。9, 12, 15 日投与実験では、昇圧群における投与後の増殖抑制(図 1)は、対照および非昇圧群にくらべ大きい。また生存期間も対照群 20.4 ± 2.5 日、非昇圧群 19.9 ± 6.5 日に対して昇圧群 26.2 ± 5.3 日と有意(P<0.05)に延長した。

表 2 LY-80 細胞 2×10^6 個ドシリウラット腹腔内移植および腹腔内薬剤投与時の生存日数と細胞学的変化

	投与量(mg/kg)			生存日数 ^{*1)}	細胞学的変化 ^{*2)}			
	MTX 5-FU LV				Tdeg	Mφ	Ly	RBC
① 対照	—	—	—	14.3±0.6	—	—	—	2+
② M/F	2	20	—	18.8±3.1	2+	+	2+	+
③ M/F+L	2	20	10	15.8±2.2	—	—	—	+
④ M/F	5	20	—	10.0±2.0	3+	—	+	—
⑤ M/F+L	5	20	10	16.0±1.6	+	+	—	—
⑥ F+L	—	20	1	17.8±2.3	+	+	—	+

*1) : 移植後 3 日目に純培養増殖を確認して化学療法を開始
移植後 3～7 日連日 i. p 投与。

*2) : 治療終了 1～7 日の総合所見。

Tdeg: tumor cell degeneration. Mφ: macrophages.

LY: lymphocytes. RBC: red blood cells

① : ② P<0.10. ② : ③ NS. ④ : ⑤ P<0.01. ① : ⑥ P<0.05.

② : ⑥ NS

図 1 LY-80 5×10^6 個皮下移植後腫瘍に対する MTX 2 mg/kg+5-FU 20 mg/kg の化学療法後の増殖抑制効果

治療開始時の長径×短径値を[1]として相対増殖比で表示した。↓: 投与日。□—□: 対照群。▲—▲: non-IHC(平圧)投与群。●—●: IHC 群

7, 9, 11 日投与実験でも、腫瘍増殖抑制は同様に昇圧群で他群に有意に大きかった(図 2)。

しかし、LV 救済を行った場合、増殖抑制効果の減弱が認められた。

この群において移植後 20 日目に腫瘍摘出し湿重量を測定した。増殖抑制は、昇圧群 25.5 ± 7.8 g>昇圧救済 39.7 ± 5.5 g=非昇圧群 33.0 ± 5.6 g>非昇圧救済群 36.7 ± 5.0 g>対照群 56.0 ± 6.0 g の

図2 LY-80 5×10^6 個皮下移植後腫瘍に対する MTX 2 mg/kg+5-FU 20 mg/kg の化学療法後の増殖抑制効果

LV rescue は MTX+5-FU 投与1時間後に 5 mg/kg を腹腔内投与した。治療開始時の長径×短径値を[1]として相対増殖比で表示した。↓：投与日。□-□：対照群。△-△：non-IHC+rescue 群。▲-▲：non-IHC 群。○-○：IHC+rescue 群。●-●：IHC 群

順で大きかった。

各実験群の体重減少変化は、昇圧非救済群と非昇圧救済群に有意($P < 0.05$)であった以外各治療群に差がなかった。

考 察

5-FU/MTX や 5-FU/LV の併用に細胞毒性を増強するという実験的研究が多いが、それらは生化学的過程や増殖抑制効果を解析したものが大部分であり⁷⁻⁹⁾、細胞学的変化を報告したものは意外に見当らなかった。今回の実験では LY-80 に対して i.p-i.p 系で、5-FU 単独よりも MTX 単独あるいは併用投与群に細胞学的変性が強かった。これは LY-80 が、5-FU よりも MTX により感受性が高かったことで殺細胞効果を高めたものの宿主毒性も大きかったと判断される。

MTX は、マウスの LD50 が i.p 単回 94±9 mg/kg という報告に加えて Bertino らの S180 の結果⁷⁾でも 14~84 mg/kg の1回投与で用量依存的に体重減少が示されているように、投与方法が吟味されねばならない。筆者らの今回の結果では、ラットで 2~5 mg/kg 5回連日投与であったため体重減少が約 20%となってしまう。MTX は連日投与により毒性が増強される一方投与間隔

が長くなると LD50 値が上昇するという報告があり、MTX の 2~5 mg/kg は腹腔内の細胞学的変化を追跡する上では妥当でも抗腫瘍効果をみるうえでは毒性が強くなると懸念されたため、s.c-i.v 実験では 2 mg/kg を1回投与量として2~3日間隔とした。

Bertino ら⁷⁾は、MTX を1~4時間先行投与することでより延命効果を高めたと報告しているが、今回細胞学的変化と生存日数を指標に観察した結果からは LY-80 においては有意差を見出すことは出来なかった。時間間隔をあけたほうが効果の差を得られたかもしれない。また 5-FU+LV も1および 10 mg/kg 投与の両群で細胞学的変性に乏しかったため、5-FU/MTX を同時投与する方法を先ず s.c-i.p 実験に採用した。しかし LY-80 が、i.p-i.p 実験で示したように、MTX/5-FU に対して延命効果が大きくなかったことや、治療開始時期が7~9日目と移植後中、後期であったこと、投与間隔日数をもう少しあけて毒性軽減を計ることなどが反省させられる。

腫瘍細胞に生化学的な修飾がおき殺細胞効果が増強するということは、細胞側の薬剤感受性をたかめることに繋がる方策で、各種の多剤併用計画と広義で同じである。両者の相違点は生化学的修飾が癌細胞集団個々の細胞内代謝経路を目標に対応しているのに対して、多剤併用が集団内の heterogeneous な感受性におもに対応していることであろう。この点で、cell synchronization の考えかたも生化学的修飾の範疇に入れるべきことと考えている¹⁴⁻¹⁶⁾。

胃癌の無作為化比較試験において 5-FU/MTX 交代療法が 5-FU 単独にくらべて有意に奏効率が高かったとする報告があり、併用効果が認められている¹⁰⁾一方、両者同時投与との比較がなされておらず、5-FU/LV の研究で、5-FU の高用量と比較されていないという意見¹⁷⁾と同義的側面を持つ、少なくとも腫瘍細胞内で、これら2剤が代謝経路阻害に効率よく作用するためには、まずそこへ到達させる工夫が必須であろう。

s.c-i.v 実験で、A II 昇圧群で腫瘍増殖抑制が得られたが、一方、昇圧・非昇圧それぞれの群で、LV 投与群の腫瘍増殖抑制が減弱する結果が示された。これは LV の投与量や timing など薬動力

学的にも解析が必要であろうが^{18,19)}、正常組織にも腫瘍にも救済がなされたとみるべきなのかもしれない。

1-leucovolin は細胞生物学的な活性型で、d, 1-LV にくらべ血中半減期が短いとの報告²⁰⁾に従えば、昇圧後に平圧に戻っても血中を循環する 1-LV がある程度の殺細胞効果の減弱をきたしたのかもしれない。いずれにしても LV 救済が正常組織に選択的に影響するのではないということを示唆している。

これら薬剤の最適投与方法には議論があるが¹⁸⁻²⁰⁾まず腫瘍組織への到達性の亢進を指向することが第一歩と考える。

bolus 投与の場合、A II 昇圧下の投与がもっとも有効であったこの実験結果から示されたように、BCM 投与にも昇圧化学療法がその役割を担うものといえる。

ともあれ、生化学的修飾を作用増強の機序と考えるこれら抗癌剤の併用において、A II 昇圧下投与群が増殖抑制効果を増大したという点が示されたことで、化学療法の効果増強因子としての組織到達性亢進の意義、昇圧化学療法の応用範囲の拡大が示唆されたといえよう。

トーアイエイヨー(株)および日本レダリー(株)に謝意を表します、

文 献

- 鈴木磨郎, 堀 勝義, 阿部郁夫, 斎藤祥子, 佐藤春郎: 腫瘍内循環の特性と化学療法. 癌と化学療法 5 (suppl.): 77-80, 1978.
- Suzuki, M. et al.: A new approach to cancer chemotherapy. Selective enhancement of tumor blood flow with angiotensin II. JNCI 67: 663-669, 1981.
- Suzuki, M. et al.: Functional characterization of microcirculation in tumors. Cancer Metastasis Rev. 3: 115-126, 1984.
- 堀 勝義・他: 腫瘍血管の構築とその循環特性. 癌と化学療法 17(part II): 554-563, 1990.
- 佐藤春彦, 涌井 昭: 腫瘍血管の機能特性に基づく化学療法: 昇圧化学療法(IHC). current review 癌化学療法 1990-91.(鶴尾 隆, 西條長宏・編), 中外医学社, 東京, 1990, p220-226.
- 佐藤春彦, 涌井 昭, 星 正彦, 栗原 稔, 横山正和・他: 進行胃癌に対する angiotensin II human(TY-10721)を用いた昇圧化学療法(IHC)の他施設共同による無作為化比較試験(TY-10621昇圧化学療法研究会報告). 癌と化学療法 18: 451-460, 1991.
- Bertino, J. R., Sawicki, W. L., Lindquist, C. A., Gupta, V. S.: Schedule dependent antitumor effects of methotrexate and 5-fluorouracil. Cancer Res. 37: 327-328, 1977.
- 金丸龍之介, 角田英樹, 佐藤利秋, 石岡千加史, 小西ゆかり・他: 癌化学療法に於けるメソトレキセート及び 5-FU の併用投与(sequential chemotherapy)―その理論的背景―. 抗酸菌病研究所雑誌 37: 133-139, 1985.
- 赤沢修吾: 既知抗癌剤の新しい投与方法の進歩. メソトレキセート/5-フルオロウラシル時間差投与方法の理論と臨床成績. 蛋核酵 31: 1-8, 1986.
- 佐々木常雄, 太田和雄, 井林 淳, 坂田 優, 松岡富男・他: 胃癌に対するメソトレキセート・5-FU 交代療法と 5-FU 単独療法の比較試験―メソトレキセート・5-FU 交代療法共同研究 Phase Study―. 癌と化学療法 16(Part I): 2545-2555, 1989.
- Budd, G. T., Fleming, R. M., Bukowski, R. M., McCracken, J. D., Rivkin, S. E. et al.: 5-Fluorouracil and folinic acid in the treatment of metastatic colorectal cancer: A randomized comparison. A Southwest Oncology Group Study. J. Clin. Oncol. 5: 272-277, 1987.
- O'Connell, M. J.: A phase III trial of 5-fluorouracil and leucovolin in the treatment of advanced colorectal cancer. A Mayo Clinic/North Central Cancer Treatment Group Study. Cancer 63: 1026-1030, 1988.
- Bleyer, W. A.: New vistas for leucovorin in cancer chemotherapy. Cancer 63: 995-1007, 1989.
- 朝村光雄, 齊藤達雄: 細胞同調と癌の化学療法. 癌と化学療法 5: 737-746, 1978.
- Camplejohn, R. S.: A critical review of the use of vincristine(VCR) as a tumor cell synchronization agent in cancer chemotherapy. Cell Tissue Kinet. 13: 327-335, 1980.
- 塚越 茂: Biochemical modulation―その歴史的背景―. 癌と化学療法 19: 941-945, 1992.
- Martin, D. S., Stoltz, R. L., Colofore, J. R.: Failure of high dose leucovorin to improve therapy with maximally tolerated dose of 5-fluorouracil. A murine study with clinical relevance. J. Natl. Cancer Inst. 80: 496-501, 1988.
- 田口博國: Methotrexate 大量療法における Leucovorin の投与方法. 臨床血液 22: 1687-1699, 1981.
- Jolivet, J.: Rescue therapy in methotrexate treatment. An overview: In Leucovorin: An expanding role in chemotherapy.(ed. Erlichman, C.), PharmaLibri, Montreal, 1988, p15-32.
- Trave, F., Rustum, Y. M., Petrelli, N. J., Herrera, L., Mittelman, A. et al.: Plasma and tumor tissue pharmacology of high dose intravenous leucovorin calcium in combination with fluorouracil in patients with advanced colorectal carcinoma. J. Clin. Oncol. 6: 1184-1191, 1988.