Adriamycin の Ehrlich 腫瘍細胞内濃度に対する薬物の影響

佐塚泰之・岩崎綾乃・宮城島惇夫・野澤靖夫・広田貞雄*

Effect of drugs on intracellular concentration of adriamycin in Ehrlich ascites carcinoma

We studied the effects of test drugs on the influx and efflux of adriamycin in Ehrlich ascites carcinoma cells, by rapid and simple determinations of intracellular concentrations of adriamycin. Caffeine induced an increase in adriamycin accumulation and inhibited efflux. Biochemical modulators, aminobenzamide, ketoprofen and dipyridamole were also found to have inhibitory effect on adriamycin efflux.

These test drugs had no effect on adriamycin influx from tumor cells. Caffeine amplified the inhibition of DNA biosynthesis induced by adriamycin under the efflux condition *in vitro*. Furthermore, caffeine significantly enhanced adriamycin concentration in the tumor *in vivo*. Thus, the combination of caffeine with adriamycin increased the antitumor activity of adriamycin. Therefore, the effect of caffeine on adriamycin concentration *in vivo* is consistent with that *in vitro*.

These results suggest that caffeine is effective as biochemical modulator and our method *in vitro* is useful as the screening method of biochemical modulator.

Yasuyuki Sadzuka・Ayano Iwazaki・
Atsuo Miyagishima・Yasuo Nozawa・
Sadao Hirota*

key words : biochemical modulation, adriamycin,
Ehrlich ascites carcinoma, efflux,
caffeine

薬物の治療効率を増大させ、現有する医薬品の有効利用をはかる手段として、現在までに種々の試みがなされており、特に、制癌剤を effector とした場合において、その有効性が明らかにされてきている¹⁻⁶⁾。このような目的を果たすための方法は、大別すると、① 医薬品の作用メカニズムに関

与して治療効率を増加させる方法、② 医薬品の分布性を变化させ、目的部位への分布を増加させる (targeting) 方法、の二つにわけられる。② の代表的なものがリポソーム化であり、剤形を工夫することによる targeting が成果を上げてきている⁴⁻⁶⁾。

これとは別に、①、② いずれにも通じる手段として、biochemical modulation がある。この分野の研究は、effector として、5-FU や cisplatin を用いる例^{1,2)}がほとんどであり、これは上記 ① に分類される。したがって、この際使用される modulator は、制癌剤特異性を有し、他の制癌剤と組み合わせても効果増強を示さない。

これに対し、② に分類される薬物は、耐性細胞に対しても有効であり、腫瘍細胞の薬物に対する交差耐性が存在する以上、細胞において、同じメカニズムにより、influx, efflux される複数の制癌剤に対し活性を有する可能性がある。よって、① に分類される薬物ほど制癌剤特異性を示さない。

このような targeting、ここでは腫瘍への制癌剤の分布を増加させる作用を有する薬物は、P-glycoprotein の inhibitor である verapamil などが報告されており⁷⁾、その有用性が示されている。しかしながら、このような観点から新規 modulator を検索する場合 *in vivo* では数週間、*in culture* でも数日間かかり、modulator と effector との組み合わせなど複数の factor を考えた場合、容易なことではない。

そこで筆者らは、Ehrlich ascites carcinoma を用い、制癌剤 adriamycin (ADR) の influx, efflux を検討することにより、modulator として可能性のある薬物を短時間で検索できる方法をみいだすとともに、DNA 修復阻害剤として modulator の作用を示すと言われている caffeine⁸⁾ の腫瘍中 ADR 濃度に対する影響についても検討したので報告する。

* School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka 422, Japan 静岡県立大学薬学部

図1 Determination of adriamycin influx or efflux on Ehrlich ascites carcinoma cells

材料と方法

(1) 試薬

アドリアシン® 注(注射用塩酸ドキソルビン) 10 mg(力価)/バイアルおよび Eagle's MEM (Ca²⁺-Free)培地は、協和発酵(株)および日水製薬(株)より購入した。カフェイン-水和物および [2-¹⁴C]thymidine (1.85 MBq/ml) は、和光純薬工業(株)およびアマシャム・ジャパン(株)より購入した。

(2) Ehrlich 細胞中 Adriamycin 濃度測定法

図1に示す手順で実験を行った。adriamycin の influx に対する薬物の影響を調べる場合は、Eagle's MEM 培地にて Ehrlich ascites carcinoma を 1.0×10^7 cells/ml とした細胞懸濁液に、adriamycin 18 nmol + 被検薬 $0.1 \mu\text{M}$ を添加し、37°Cで60分間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞浮遊液 0.5 ml を採取、氷冷し、150 g、3分間遠心分離して上清を除き、細胞をリン酸緩衝液(pH 7.8)で1回洗浄したあと、リン酸緩衝液(pH 7.8) 1.0 ml に再懸濁した。これにクロロホルム:メタノール(4:1)混液 5.0 ml を加え、混和し、1,200 g で15分間遠心分離後、下層の有機層 3.0 ml を分取した。細胞内の adriamycin 濃度は、分光蛍光光度計を用い励起波長 470 nm、蛍光波長 585 nm での蛍光強度より測定した。

adriamycin の efflux に対する薬物の影響を調べる場合は、同様の細胞懸濁液に adriamycin 18 nmol/ml を添加し、37°Cで1時間インキュベーションし、細胞に adriamycin を取り込ませたあ

と、氷冷し、150 g、3分間遠心分離して上清を取り除き、細胞を Eagle's MEM 培地で1回洗浄したあと、再懸濁し、被検薬 $0.1 \mu\text{M}$ を添加し、37°Cでさらに180分間までインキュベーションした。以後、同様にして adriamycin 濃度を測定した。

(3) adriamycin による Ehrlich 細胞における核酸合成阻害に対する caffeine 併用実験
前述と同様に調製した細胞懸濁液 0.5 ml に、adriamycin influx と同様の実験系では蒸留水を、adriamycin efflux と同様の実験系では adriamycin 18 nmol/ml を添加し、培地 0.5 ml を加え、37°Cで10分間プレインキュベートした。プレインキュベーション後、thymidine 水溶液 $20 \mu\text{l}$ を加え、混和し、さらに30分間インキュベートした。インキュベーション後、氷冷し、150 g、3分間遠心分離して上清を除き、細胞を Eagle's MEM 培地で1回洗浄したあと、再懸濁して全量 0.5 ml とし、adriamycin influx 系では、adriamycin 18 nmol/ml + caffeine $0.01 \mu\text{M}$ を、adriamycin efflux 系では caffeine $0.01 \mu\text{M}$ を添加し、培地 0.5 ml を加え、37°Cで10分間プレインキュベートした。プレインキュベーション後、[2-¹⁴C]thymidine 水溶液 $20 \mu\text{l}$ を加え、混和し、さらに30分間インキュベートした。その後、常法⁹⁾により DNA 分画を抽出し、その放射活性を測定した。

(4) 実験動物

CDF₁ 系雄性マウス(5週齢、体重 20~25 g)は、日本 SLC(株)より購入したものを使用した。動物は、室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ にて飼育し、標準実験飼料と水は自由に与えた。

Ehrlich ascites carcinoma 5×10^5 cells/animal を各マウスの背部皮下に移植し、移植10日後、腫瘍の大きさより腫瘍重量を換算¹⁰⁾し、大きさの揃ったものを選出し、移植10、12、14、16日目に adriamycin $2.0 \text{ mg/kg/day} \times 4 \text{ days}$ を、移植11、13、15、17日目に caffeine $100 \text{ mg/kg/day} \times 4 \text{ days}$ を投与した。投与最終日の翌日、動物を頸椎脱臼にて屠殺し、背部の固形癌を摘出、生理食塩水にて洗浄後、湿重量を測定するとともに、腫瘍中の adriamycin 濃度を前述と同様に測定した。

図2 Effect of caffeine on the time course of adriamycin concentration in Ehrlich ascites carcinoma cells

Significant differences from the level of adriamycin only are indicated by * $P < 0.001$.

結果

(1) Ehrlich 細胞中 adriamycin 濃度に対する被検薬の影響

Ehrlich 腫瘍細胞内における adriamycin influx, efflux に対する caffeine の影響を図2に示す。adriamycin influx 系において、Ehrlich 腹水癌細胞を adriamycin に接触させた場合、adriamycin の細胞内濃度は経時的に上昇した。caffeine 存在下でも類似の経時変化を示したが、若干ながら adriamycin の細胞内取り込みを抑制する傾向が認められた。

一方、adriamycin efflux 系では、adriamycin 除去後、細胞内 adriamycin 濃度の経時的な低下が認められた。これに対し、caffeine 存在下では、caffeine 接触開始後 180 分間にわたり、細胞内 adriamycin 濃度は大きな低下を示さず、caffeine

図3 Effect of drugs on the time course of adriamycin concentration in Ehrlich ascites carcinoma cells (efflux)

Significant differences from the level of adriamycin only are indicated by * $P < 0.01$ and ** $P < 0.001$.

図4 Effect of caffeine on the inhibition of DNA biosynthesis induced by adriamycin in Ehrlich ascites carcinoma cells

非存在時に対し、19.4%の有意に高い濃度を示した。

つぎに、aminobenzamide, ketoprofen, dipyridamole の結果を図3に示す。adriamycin efflux に関し、aminobenzamide, ketoprofen, dipyridamole は、それぞれ 16.4%, 25.2%, 31.9% の有意に高い濃度を示し、流出を抑制する作用を持つことが明らかになった。しかし、図には示さなかったが、influx については caffeine と同様に有意な作用はなかった。

(2) adriamycin による Ehrlich 細胞における核酸合成阻害に対する caffeine の影響
adriamycin influx および efflux 実験系における adriamycin による Ehrlich 腫瘍細胞中での DNA 合成阻害に対する caffeine の作用を図4に示す。adriamycin influx 系においては、caffeine 非存在下でみられた adriamycin による若

図5 Effect of caffeine on adriamycin concentration in mice tumors and the change of tumor weight induced by adriamycin

Significant differences from the level of control are indicated by * $P < 0.001$. Significant differences from the level of adriamycin only are indicated by ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

干の DNA 生合成阻害はまったく認められず, caffeine 同時存在により, adriamycin による作用が減弱していることが確認された。

これに対し, adriamycin 処理後, 細胞外の adriamycin をすべて取り除き, caffeine 接触を行う adriamycin efflux 系では, adriamycin 処理のみでみられた DNA 生合成阻害の 1.5 倍の DNA 生合成阻害増強が認められ, caffeine 接触により adriamycin による作用が増強されていることが確認された。

(3) Ehrlich 担癌マウスにおける adriamycin 腫瘍縮小効果に対する caffeine の作用 (*in vivo*)

Ehrlich 担癌マウスへの adriamycin の抗腫瘍効果に対する caffeine の作用, および腫瘍中 adriamycin 濃度を図 5 に示す。コントロール群の

腫瘍重量を 100 とした場合, adriamycin 単独投与により腫瘍重量は 69.4% にまで減少したが, これに caffeine を併用することにより, adriamycin の抗腫瘍効果は, 1.9 倍にまで増強され, 腫瘍重量は 43.4% にまで低下した。caffeine 単独投与群ではコントロール群に比較して縮小効果を示すことはなかった。

また, この場合の腫瘍中の adriamycin 濃度は, caffeine 併用群では投与開始 8 日後有意に上昇し, adriamycin 単独投与群の 2.1 倍を示した。

考 察

現有する制癌剤による癌治療を考えた場合, 有効な手段の一つとなりうる biochemical modulation は, 近年, cisplatin, 5-FU を effector として盛んに行われており, いくつかの modulator が発見されてきている¹⁻³⁾。しかし, effector として用いられる制癌剤は, 前述の 2 薬物がほとんどであるため, 今回, 筆者らは, 現在もっとも繁用されている制癌剤である adriamycin を用い, 簡便に modulator をスクリーニングできる一つの方法を見出すとともに, 本方法と *in vivo* での modulation 作用の関連について検討した。

Ehrlich 腹水癌細胞においては, 細胞内への adriamycin influx の経時的増加を caffeine は若干ながら阻害する傾向を示した。本作用は, adriamycin による DNA 生合成阻害が, caffeine を共存させることにより低下したことともよく相関していた。一方, adriamycin を取り込ませた細胞からの adriamycin efflux により細胞内 adriamycin 濃度は経時的に低下していたが, caffeine の接触はこの低下を有意に抑制しており, これにより, adriamycin 処理後の一定時間に Ehrlich 腫瘍細胞において認められた DNA 生合成阻害が, caffeine より, 1.5 倍にまで増強されたと思われる。

以上の検討により, caffeine は, なんらかのメカニズムにより細胞からの adriamycin 流出を抑制する作用があることが明らかとなった。

caffeine は, 染色体への adriamycin の結合能をかえ, DNA から adriamycin を離脱させる作用があるとの報告¹¹⁾がある。これに対し, caffeine は adriamycin と結合体を形成し, これにより

adriamycin の膜透過性を低下させるとの報告¹²⁾もある。これらの報告から、caffeine が細胞内に取り込まれた adriamycin の細胞外流出抑制効果を有する可能性が考えられるが、これらの知見のみからでは、本結果を十分に説明することはできない。

したがって、さらに詳細な検討が必要であると思われるが、adriamycin の細胞における取り込みおよび流出に関して、caffeine がなんらかの作用を有することが示唆され、また細胞内における adriamycin 濃度への caffeine による影響が、細胞損傷にそのまま反映されたことより、caffeine の biochemical modulator としての重要性が示唆された。

そこでつぎに、本方法により、抗腫瘍効果増強作用が報告されている dipyrindamole¹³⁾, keto-profen¹⁴⁾, aminobenzamide¹⁵⁾ においても caffeine と同様の検討を行ったところ、いずれも adriamycin influx に対しては作用は示さなかったが、adriamycin efflux を抑制した。したがって、本法は、biochemical modulator の検索法として適切であり、また従来、培養系で数日間かかったものが短時間で検索できるという利点を有している有効な方法であることが明らかとなった。

また、*in vitro* で adriamycin の細胞内濃度低下を有意に抑制した caffeine は、*in vivo* において、adriamycin の抗腫瘍効果を有意に上昇させた。caffeine 単独では抗腫瘍作用を示さないことは明らかであり、したがって、本作用は、caffeine による腫瘍中 adriamycin 濃度の上昇に起因すると考えられた。なお、このような現象は、腫瘍中においてのみ認められており、正常組織への adriamycin 集積や副作用増加といった caffeine 併用によるマイナスの因子は一切認められないことを筆者らは別に報告している¹⁶⁾。

以上より、本方法は、adriamycin を effector とした場合の biochemical modulator のスクリーニング法としてはじめて有用性が認められた方法であり、本方法により、異なった作用に起因すると考えられる複数の modulator を検索できることが明らかとなった。また、caffeine による *in vivo* での有効性は、本方法により検索される被検薬の *in vivo* での可能性を示唆するものであり、

今後、本スクリーニング法により、いくつかの biochemical modulator が確認され、癌治療に役立つことが期待できる。

文 献

- 1) 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.
- 2) Hidalgo, O. F., Gonzalez, F., Gil, A., Campbell, W., Barrajon, E., Lacave, A. J. : 120 hours simultaneous infusion of cisplatin and fluorouracil in metastatic breast cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* 12 : 397-401, 1989.
- 3) Budd, G. T., Fleming, R. M., Bukowski, R. M., McCracken, J. D., Rivkin, S. E. : 5-Fluorouracil and folinic acid in the treatment of advanced colorectal cancer : A randomized comparison. A Southwest Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* 5 : 272-277, 1987.
- 4) Storm, G., Bloois, L., Steerenberg, P. A., Etten, E., Groot, G., Crommelin, J. D. A. : Liposome encapsulation of doxorubicin : pharmaceutical and therapeutic aspects. *J. Controlled Release* 9 : 215-229, 1989.
- 5) Ahmad, I., Longenecker, M., Samuel, J., Allen, T. M. : Antibody-targeted delivery of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes can eradicate lung cancer in mice. *Cancer Res.* 53 : 1484-1488, 1993.
- 6) 畠崎 栄, 丸山一雄, 石田 理, 岩鶴素治, 高橋則行 : ドキソルビシン封入ガングリオシド GM1 修飾温度感受性リポソームの調製と生体内動態. *DDS* 8 : 169-174, 1993.
- 7) Harker, W. G., Bauer, D., Etiz, B. B., Newman, R. A., Sikic, B. I. : Verapamil-mediated sensitization of doxorubicin-selected pleiotropic resistance in human sarcoma cells : selectivity for drugs which produce DNA scission. *Cancer Res.* 46 : 2369-2373, 1986.
- 8) 土屋弘行, 富田勝郎, 安竹秀俊, 森下 肇, 森川精二, 大野賢郎, 土田敏典, 高木泰孝 : Cisplatin と caffeine の動注が著効を示した再発性悪性線維性組織球腫の 1 例. *癌と化学療法* 17 : 681-684, 1990.
- 9) Schneider, W. S. : Phosphorus compounds in animal tissues. *J. Biol. Chem.* 164 : 747-751, 1946.
- 10) Ovejera, A. A., Houchens, D. P. : Selection of potential anticancer agents using human tumor xenografts in athymic nude mice. *Contract NO1-CM-67099-NCI*.
- 11) 藤村 務, 古沢 忍, 川内廣明, 佐々木健一 : マウス P 388 白血病細胞における adriamycin と pirarubicin の取り込みの差異. *応用薬理* 38 : 321-325, 1989.
- 12) Traganos, F., Kapuscinski, J., Darzynkiewicz, Z. : Caffeine modulator the effects of DNA-intercalating drugs *in vitro* : A flow cytometric and spectro-

- photometric analysis of caffeine interaction with novantrone, adriamycin, ellipticine and AD198. *Cancer Res.* 51 : 3682-3689, 1991.
- 13) Jekunen, A., Vick, J., Sanga, R., Chan, T.C.K., Howell, S.B. : Synergism between dipyridamole and cisplatin in human ovarian carcinoma cells *in vitro*. *Cancer Res.* 52 : 3566-3571, 1992.
- 14) Niitu, Y., Ishigaki, S., Takahashi, Y., Hirata, Y., Saito, T., Arisato, N., Hosoda, K., Watanabe, N., Kohgo, Y. : GST- π assay for serodiagnosis of malignancy. Glutathione S-transferase and Drug Resistance. (ed. Hayes, J. D., Pickett, L. B., Mantle, T. J.), Taylor Francis, London, 1990, p 409-417.
- 15) Moses, K., Harris, A. L., Durkacz, B. W. : Synergistic enhancement of 6-thioguanine cytotoxicity by ADP-ribosyl-transferase inhibitor. *Cancer Res.* 48 : 5650-5654, 1988.
- 16) Sadzuka, Y., Mochizuki, E., Takino, Y. : Caffeine modulates the antitumor activity and toxic side effects of adriamycin. *Jpn. J. Cancer Res.* 84 : 348-353, 1993.