シスプラチンとペプロマイシンの併用療法における 相乗効果発現の機序に関する研究

慶応義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：斎藤成司教授）

藤 井 正 人

FUNDAMENTAL STUDY ON THE COMBINATION THERAPY OF CISPLATIN AND PEPLAMYCIN

MASATO FUJII, M. D.

Department of Otolaryngology, School of Medicine, Keio University, Tokyo

Cisplatin (CDDP) and peplomycin (PEP) are effective new agents for chemotherapy of head and neck cancer. And the combination therapy of the two drugs is considered to have good synergistic effects. Despite the observances made in both basic experiments as well as in clinical trials, the mechanism of synergism, however, remains unknown. Experimental studies, therefore, were made to solve the mechanism of synergism.

First, combination therapy with CDDP and PEP was performed, using Ehrlich ascites carcinoma, in actual clinical dose schedule. CDDP was administered intra-peritoneally at day 0, and PEP 48 hours later (day 3). This combination therapy with CDDP and PEP proved to have good synergistic effects.

As for the mechanism of synergism, one of the hypotheses was as follows. It was thought that nonprotein-bound CDDP with anti-cancer activity might be released from protein-bound CDDP when PEP is administered in combination. But after the experiment in vitro, using dog plasma, my conclusion is that CDDP is bound to plasma protein irreversibly — thus denying this hypothesis.

The next study for the mechanism was to see the effects against cell cycle progression by flowcytometry process. It was found that at an early stage after single administration of CDDP, cell cycle progression was delayed in S phase and blocked in G2 phase thereafter. Forty-eight hours after administration of CDDP, cells accumulated in G2-M phase. This change, however, proved to be reversible because cells returned to normal progression pattern 96 hours after single administration of CDDP. As for PEP in single administration, cell cycle progression was blocked in G2-M phase at an early stage; it was also reversible. In the case of combination therapy, cell cycle progression pattern proved irreversible, and damaged cells (debris) appeared at low channels. It is, therefore, assumed that cells are seriously and irreversibly damaged in combination therapy.

As result of the foregoing studies, one of the mechanism of synergism is thought to be as follows:

After administration of CDDP, cells are accumulated in G2-M phase. PEP is administered 48 hours after CDDP treatment when cells are most accumulated in G2-M phase. This brings

about PEP's most efficient cytocydal effects since PEP has high sensitivity against cells in G2-M phase. This may explain one of the mechanism of synergism. And the high clinical response rate in combination therapy of CDDP and PEP — when the former is administered first and the latter 48 hours after CDDP treatment — may be due to this mechanism.

Key words: Cisplatin, Peplomycin, Mechanism of Synergism

A88—0512—00355

I はじめに

頭頸部癌の臨床治療上、これまでの手術療法や放射線療法に加え化学療法の占める割合が近年増大しつつある。頭頸部癌化学療法では、従来より bleomycin や methotrexate が第一選択とされてきた。近年わが国において、bleomycin の誘導体である peplomycin (以下 PEP) が開発され、bleomycin と同等あるいはそれ以上の評価がなされている。当教室でも頭頸部扁平上皮癌にたいして 58% の奏効率を得ている¹⁾。一方近年臨床研究が進められた白金化合物 cis-diamminedichloro platinum(II) (以下 CDDP) は新しいタイプの抗癌剤として注目されている。頭頸部癌に対する有効性については、1977 年の Wittes の報告²⁾ 以来数多くの報告がみられる。当教室においても 1978 年より臨床治験を開始し頭頸部扁平上皮癌にたいし 38% の奏効率を得た³⁾。

著者らは、この CDDP と PEP を用いた併用療法に注目し、臨床研究とともに基礎研究を行ってきた。基礎研究としては、当教室の増野らが Ehrlich 腹水癌やヌードマウスを用いた併用実験を行い、より優れた相乗効果の得られる投与方法、投与スケジュールを検討した⁴⁾⁵⁾。

その結果、CDDP を先行投与する新しい regimen を開発し、1981 年より臨床に導入し、78% という優れた奏効率を得た⁶⁾。この奏効率は両薬剤単独の奏効率を大きく上回り、基礎および臨床において共に相乗効果を示すことが確認された。

しかしながら、この 2 剤の併用療法が相乗効果を示す機序についてはまだ不明であり、今回その点に関して基礎的に検討した。多剤併用療法での相乗効果発現の機序については、様々な面から検討が可能である。本研究ではまず臨床に近い投与スケジュールで Ehrlich 腹水癌に対し CDDP と PEP 療法併用を施行し相乗効果を検討した(実験 1)。次に CDDP と PEP の薬物動態に注目して検討を行った。すなわち CDDP と血漿蛋白との結合に対する PEP の影響を検討した(実験 2)。次いで併用療法における細胞動態に注目した。すなわち実験 1

と同一の条件および投与スケジュールで CDDP と PEP の併用療法を施行し、細胞周期内進行に及ぼす作用と薬剤感受性の細胞周期依存性の観点から検討を加えた(実験 3)。

その結果、CDDP と PEP の作用機序に関して若干の知見を得たので、報告する。

II 材 料

1. 薬剤

CDDP (Lot No. 0120) および PEP (Lot No. u0101s) (共に日本化薬製) は使用時、生理食塩液に溶解し使用した。

2. 犬血漿

雄性ビーグル犬(日本化薬安全性研究所)より血液を採取し、ヘパリンを加えて 3000×g、10 分間遠心分離して血漿を得た。

3. マウス

ICR 系 6 週齢雄性マウスを使用し 1 群に対し 8 匹とした。

III 実験方法

〔実験 1〕 併用化学療法

マウスの腹腔内に Ehrlich 腹水癌細胞 5×10^6 個を day 0 に移植した。day 1 に CDDP 2, 4, 8mg/kg, 次いで day 3 に PEP 8, 16, 32mg/kg を腹腔内投与した。同スケジュール、同投与量で CDDP および PEP の単独投与群も設けた。対照群には同様に生理食塩液を投与した。その後 day 60 までマウスの生死を観察し、各群についての平均生存日数を求めた。併用群の ILS (increase in life span) が各薬剤の単独投与群の ILS の和を越えた時相乗効果があると判定した。

〔実験 2〕 犬血漿中での蛋白非結合型 CDDP 濃度の経時的变化

犬血漿 50ml に CDDP を $5 \mu\text{g/ml}$ となるように加え、37°C にてインキュベートした。そして経時的に血

Sampling Schedule of Tumor Cells after Treatment with CDDP and PEP

図 1 CDDP, PEP の投与スケジュール, および Ehrlich 腹水癌細胞採取のスケジュール

漿を採取し, 蛋白非結合型 CDDP の濃度を測定した。また, CDDP を同様の条件で添加し, さらに PEP を $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加した場合についても同様に検討した。

次に CDDP を持続的に添加 (最終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$) した場合について, CDDP 単独および PEP 併用での蛋白非結合型 CDDP 濃度の経時的な変化を検討した。

なお蛋白非結合型 CDDP の分離および定量は次のような方法で行った。採取した試料は, ただちに Amicon Micro Partition System MPS-1 ($1000 \times \text{g}$ 5分) で限外濾過を行い, その濾液を蛋白非結合型 CDDP とした。各試料中の白金濃度は, フレームレス日立原子吸光度計 170-50A型を用いて測定した。検量線は CDDP を生理食塩液に溶解したものをを用いて作成し測定値はすべて CDDP 量に換算して表示した。

〔実験 3〕 CDDP および PEP 投与後における細胞周期内進行の経時的変化

CDDP, PEP および 両者の 併用療法が細胞周期内進

Method of Flowcytometry Analysis

図 2 Flowcytometry による DNA 分布パターン解析までの資料作成法

行に及ぼす影響を見るため, 図 2 に示す方法で DNA を染色し flowcytometry による細胞内 DNA パターンの解析を行った。まず, 実験 1 と同一条件で Ehrlich 腹水癌の移植および薬剤の投与を行った。次に図 1 に示すスケジュールで腹腔より Ehrlich 腹水癌細胞を採取し, まずコールターカウンター (ZBI 型) を用いて細胞数を測定した。さらに -20°C に冷却した 50%メタノールで一夜固定し, 次いで 0.2 M リン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.2$) にて 2 回遠心洗浄した。これに RNase ($1 \text{ mg}/\text{ml}$ 0.2 M リン酸緩衝液, $\text{pH } 7.2$) を 10^6 細胞あたり 0.2 ml 加え, 37°C で 30 分間処理した。その後 0.2 M リン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.2$) で洗浄後, 冷却した propidium iodide 溶液 ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 1.12% クエン酸ナトリウム溶液) を 10 ml 加え, 冷蔵庫中で 2 時間 DNA を染色した。そして cytofluorograph A-4800 (Biophysics 社) で DNA 分布を測定した。

IV 結 果

〔実験 1〕 併用化学療法

CDDP および PEP 併用群の ILS は, CDDP $8 \text{ mg}/\text{kg}$ および PEP $8 \text{ mg}/\text{kg}$ 投与の場合を除き, 各々の単独投与の場合の ILS の和と比較していずれも高値を示しており, 相乗効果が認められた (図 3)。

〔実験 2〕 犬血漿中での蛋白非結合型 CDDP 濃度の

Combination Chemotherapy of CDDP with PEP Against Ehrlich Ascites Carcinoma in Mice

Ehrlich
Cells CDDP PEP
day 0 1 3

Drug mg/kg		PEP i.p. (day 3)			
		0	8	16	32
CDDP i.p. (day 1)	0	0*	-4	11	1
	2	1	5	32	49
	4	30	70	71	73
	8	51	46	96	71

* ILS (Increase in Life Span)

図 3 CDDP と PEP の併用化学療法

図 4 犬血漿中に CDDP, PEP 添加後の蛋白非結合型 CDDP の濃度変化

経時的変化

図 4 に示すように血漿中の蛋白非結合型 CDDP 濃度は、インキュベーション開始後約 2 時間まで速やかに、またその後は緩やかに減少した。この蛋白非結合型

Filtrated CDDP concentration in dog plasma

図 5 犬血漿中に PEP を添加し、CDDP を 2 時間にわたり持続的に添加した場合の蛋白非結合型 CDDP の濃度変化

CDDP の濃度の減少に対して、PEP は影響を及ぼさなかった。また図 5 に示すように CDDP を持続的に添加（最終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）した場合においても蛋白非結合型 CDDP 濃度は PEP の存在により影響を受けなかった。

〔実験 3〕 CDDP および PEP 投与後における細胞周期内進行の経時的変化

まず細胞数の変化を、図 6, 7, 8 に示す。CDDP 単独投与の場合対照群に比べて、細胞数は一時的に減少するが、その後再び増加しており、その増加の割合は対照群と同様であった。また CDDP の投与量による顕著な差は認められなかった（図 6）。PEP 単独投与の場合も、投与後細胞数の減少を認めるものの、ほぼ対照群と同様に増加した（図 7）。

一方、CDDP と PEP の併用群では著明な細胞数の減少が認められた。この減少の程度は CDDP と PEP の投与量が高い組み合わせほど強く認められた（図 8）。

次に Flowcytometry により、細胞内 DNA 分布パターンの経時的な変化について解析した。CDDP を投与すると 12 時間後に S 期の細胞数の増加が見られ、その後は G2-M 期に細胞の蓄積が起り始めた。投与 48 時間後には G2-M 期への細胞蓄積が著明となった。

図 6 CDDP 投与後の Ehrlich 腹水癌細胞数の変化

PEP 単独投与の場合は、投与の12時間後で G2-M 期の細胞蓄積が著明となった。CDDP および PEP の単独投与の場合、G2-M 期へ蓄積した細胞は時間の経過と共に再び周期内進行を開始し、CDDP では投与後 96時間、また PEP では投与後 48時間には、ほぼ投与前の DNA 分布パターンにもどっていた。これに対し CDDP と PEP の併用群では、併用後 G2-M 期への細胞蓄積が著明であるが、その後の回復は見られず時間経過と共に G2-M 期の細胞は減少し、G1 期に相当する DNA 量よりも更に低チャンネルに破壊細胞 (debris) によると思われるパターンの出現をみた (図 9)。

V 考 察

1. CDDP と PEP の Ehrlich 腹水癌に対する併用効果

CDDP と PEP の併用療法において、当教室では CDDP 投与の後、腎障害の軽減を目的として hydration を施行するため、PEP の投与は 1 日あけて行っている。実験 I では、このような臨床の併用 regimen にあわせ

図 7 PEP 投与後の Ehrlich 腹水癌細胞数の変化

て、CDDP と PEP の併用効果を Ehrlich 腹水癌を用いて検討し、相乗効果を認めた。

増野らは、CDDP と PEP の投与順序について基礎的に研究し⁴⁾⁵⁾、同時併用および PEP の 1 日前先行投与と比較して、CDDP の 1 日前先行投与の方が相乗効果が高く、また毒性も低いと報告している。本実験の臨床に添った regimen においても増野らの報告と同様に優れた相乗効果が認められた。

そこで前述の CDDP の先行投与による PEP との併用療法における相乗効果発現の機序について実験 2、実験 3 で検討した。

2. CDDP と血漿蛋白との結合に対する PEP の影響

CDDP の生体内動態については多くの報告がなされている。すなわち CDDP の投与後、蛋白非結合型 CDDP は速やかに消失するが、蛋白結合型 CDDP は長く血中に留まることが報告されている。Holdener ら¹⁰⁾、Gormley ら¹¹⁾ および 著者¹²⁾ は、人血漿と CDDP を混和させると CDDP の殺細胞性が減少する事を見出し、このことから蛋白結合型 CDDP の活性は非常に低く、蛋白非結合型 CDDP が抗腫瘍活性を持つと

藤井論文付図

DNA distribution pattern of Ehrlich ascites carcinoma cells after i.p. injection of CDDP and PEP.

図9 CDDP 及び PEP 投与後のDNA分布パターンの経時的変化。

Cell Number after i.p. Injection of CDDP and PEP

図8 CDDP と PEP 併用後の Ehrlich 腹水癌細胞数の変化

推定される。この投与後長く血中に留まる蛋白結合型 CDDP から、何らかの機構により再び蛋白非結合型 CDDP を遊離出来れば、抗腫瘍活性はさらに高められると考えられる。そこで実験 2. では、CDDP と PEP との併用効果発現の機序の一つとしてこのような蛋白結合型 CDDP からの CDDP の遊離が PEP の存在により起こるか否かを検討した。

その結果 CDDP と PEP を同時に添加した場合、および CDDP を持続的に添加した場合において、蛋白非結合型 CDDP 濃度の変化は PEP により影響されなかった。すなわち PEP の併用により蛋白結合型 CDDP から活性のある CDDP が遊離されるという可能性は否定されると考えられる。Vermoken¹³⁾, Cole¹⁴⁾, Gonias¹⁵⁾ は CDDP と血漿蛋白の結合は非可逆的であるとしているが、このことは本結論を支持するものであろう。

3. Ehrlich 腹水癌の細胞周期内進行に対する作用

前述のように薬物動態からは CDDP と PEP との併用の機序を説明し得なかったため、次に併用療法におけ

る細胞動態、特に細胞周期内進行に及ぼす作用の観点から併用の機序を検討した。実験 3 における細胞数の変化と、実験 1 での ILS を指標とした併用効果の判定結果を考え合わせると、併用療法では強い細胞障害の結果相乗効果が現れていることが推察される。

次に Flowcytometry により解析した細胞内 DNA 分布パターンの経時的な変化から CDDP と PEP およびそれらの併用が細胞周期内進行に及ぼす影響を検討した。CDDP を投与するとまず S 期の細胞数の増加が見られ、その後 G₂-M 期に細胞の蓄積が起り始める。投与 48 時間後には G₂-M 期への細胞蓄積が著明となる。PEP 単独の場合は、投与の 12 時間後で G₂-M 期の細胞蓄積が著明になる。以上の変化から、CDDP は S 期の延長および G₂ ブロックを、PEP は G₂ ブロックをひき起こすと考えられ、これまでの報告とよく一致している¹⁶⁾⁻²⁰⁾。これに対し CDDP と PEP の併用群では、併用後 G₂-M 期への細胞蓄積が著明であるが、その後の回復は見られず時間経過と共に G₂-M 期の細胞は減少し、破損細胞 (debris) が多く出現している。CDDP および PEP 単独投与の場合 DNA パターンの変化から、その細胞障害は可逆的であると考えられるのに対し、併用の場合は非可逆的な強い細胞障害が起ることと考えられた。

さて、薬剤感受性の細胞周期依存性に関して、bleomycin は G₂ 期および M 期の細胞に対して相対的に強い殺細胞作用を示すことが報告されている²¹⁾²²⁾。bleomycin の誘導体である PEP に対しても同様の細胞周期依存性を示すと考えられる。この事と CDDP の細胞周期内進行に対する作用から、次のような併用機序が考えられる。すなわち、CDDP 投与で G₂-M 期に細胞蓄積が見られたことより細胞は G₂ 期に部分同調化すると考えられる。そこへ、その期に高い殺細胞作用を示す PEP を投与することにより効率的な細胞致死効果が発現されるものと考えられる。このような併用機序は、寺島ら²³⁾ が報告した、G₂ ブロックを引き起こす X 線 type の薬剤と G₂-M 期に高い殺細胞作用を持つ薬剤との sequential combination の併用機序に相当するものであり、強い相乗効果が得られるとされている。

従って、CDDP 投与により G₂-M 期への細胞蓄積が最も著明となる CDDP 投与 48 時間後に PEP を投与する本併用スケジュールは併用機序の観点で最適なものと考えられる。CDDP 先行投与により認められた優れた臨床効果の発現においても、本機序が関与しているもの

と考えられる。

ま と め

1. CDDP を先行投与しその48時間後に PEP を投与する臨床投与スケジュールに基づき, Ehrlich 腹水癌を使用し CDDP と PEP の併用療法を施行し明らかな相乗効果を得た。

2. CDDP と PEP の併用療法での相乗効果発現の機序として, PEP の併用により蛋白結合型 CDDP から活性を有する蛋白非結合型 CDDP が遊離されるか否か, の観点から *in vitro* において検討した。その結果 CDDP と血漿蛋白との結合は非可逆的で, この様な併用の機序は認められなかった。

3. 細胞周期内進行に対する作用から併用機序を検討した。

CDDP の投与で細胞はまず S 期に蓄積された。その後48時間経過すると G2-M 期に蓄積されてくるが, これは可逆的であり96時間後にはもとのパターンにもどった。PEP の単独投与では投与後 G2-M 期への細胞蓄積が見られたが, 同様に可逆的であり投与48時間後にはもとのパターンにもどっていた。これに対し CDDP と PEP の併用では DNA パターンは非可逆的な反応を示し, 破損細胞 (debris) の出現や細胞数の減少などから強い細胞障害が引き起こされると考えられた。

CDDP により G2-M 期への細胞蓄積が投与後48時間で最も著明となり, そこへ G2-M 期の細胞に対して高い殺細胞作用を示す PEP が投与されることにより効果的な細胞致死効果が発現されることが, 併用機序の一つとして考えられた。CDDP の先行投与による優れた臨床効果の発現においても, 本機序が関与しているものと考えられる。

参 考 文 献

- 1) 犬山征夫 他: 頭頸部悪性腫瘍に対する NK-631 (Peplomycin) の効果について 耳鼻臨床 71: 1517-1527; 1978.
- 2) Wittes et al: cis-diamminedichloroplatinum (II) (DDP) in the treatment of epidermoid carcinoma of the head and neck. Cancer Treat Rep 61: 359-366, 1977.
- 3) 犬山征夫 他: 頭頸部癌に対する NK-801 (Cis-platin) の効果について 耳鼻臨床 74: 2701-2711, 1981.
- 4) 増野精二 他: Ehrlich 腹水癌に対する Cisplatin と Peplomycin の併用効果について 日癌治 16: 314, 1981.
- 5) 増野精二 他: ノードマウス可移植性ヒト扁平上皮癌に対する CPDD と Peplomycin の併用効果について 第6回日本頭頸部腫瘍学会予稿集, p. 153, 1982.
- 6) 犬山征夫 他: 頭頸部癌に対する Cisplatin と Peplomycin による併用療法の検討 癌と化学療法 10: 97-193, 1983.
- 7) Litterst CL et al: Distribution and disposition of platinum following intravenous administration of cis-diamminedichloroplatinum (II) (NSC 119875) to dogs. Cancer Res 36: 2340-2344, 1976.
- 8) 堀内正敏 他: Cis-dichlorodiammineplatinum(II) の体内動態 癌と化学療法 9: 632-637, 1982.
- 9) 入江 毅 他: イヌ及びラットにおけるシスプラチンの吸収・排泄・分布 医薬品研究 14: 384-410, 1983.
- 10) Holdener EE et al: Effect of mannitol and plasma on the cytotoxicity of cisplatin. Cancer clin Oncol 19: 515-518, 1983.
- 11) Gormley PE et al: Kinetics of cis-dichlorodiammineplatinum. Cline Pharmacol Thr 25: 351-357, 1979.
- 12) 藤井正人 他: ヒト血漿中でのシスプラチンの抗腫瘍活性について 癌と化学療法 11: 1875-1876, 1984.
- 13) Vermorken JB et al: Pharmacokinetics of free and total platinum species after short-term infusion of cisplatin. Cancer Treat Rep 68: 505-513, 1984.
- 14) Cole WC et al: Preparation and metabolism of a cisplatin/serum protein complex. Chem Biol Interactions 30: 223-235, 1980.
- 15) Gonias SL et al: Complexes of serum albumin and cis-dichlorodiammineplatinum (II). J Biol Chem 258: 5764-5769, 1983.
- 16) Bergerat JP et al: In vitro cytotoxic response of human colon cancer cells to cis-dichlorodiammineplatinum (II). Cancer Res 39: 4356-4363, 1979.

- 17) 高橋克俊 他: Cis-dichlorodiammineplatinum(II) の抗腫瘍効果および細胞周期内進行に及ぼす作用 癌と化学療法 9: 624-631, 1982.
- 18) Barranco SC et al: Bleomycin as a possible synchronizing agent for human tumor cells in vivo. Cancer Res 33: 882-887, 1973.
- 19) 島田真路 他: 悪性黒色腫の Phase-synchronization に関する基礎的研究 日皮会誌 90: 825-831, 1980.
- 20) 高本 滋 他: 抗癌性抗生物質の細胞回転におよぼす影響 — Flow microfluorometry 分析による —. 癌と化学療法 6: 59-69, 1979.
- 21) Drewinko B et al: The response of synchronized human lymphoma cells to bleomycin and 1, 3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. Cancer Res 33: 2732-2736, 1983.
- 22) Barranco SC et al: The effects of bleomycin on survival and cell progression in chinese hamster cells in vitro. Cancer Res 31: 1218-1223, 1971.
- 23) 寺島東洋三 他: 細胞周期依存的感受性変動にもとづいた腫瘍治療の考え方 癌と化学療法 1: 553-541, 1974.

稿を終わるに臨み、御校閲を賜った慶応義塾大学斎藤成司教授に深甚なる謝意を捧げます。また、終始暖かい御指導を賜りました犬山征夫講師に深謝いたします。そして、実験に際し、その研究施設を快く供与して頂き、また直接御指導を賜りました日本化薬医薬事業本部総合研究所生物研究室室長、高橋克俊氏ならびに同研究室研究員、西川清広氏に衷心より感謝いたします。

なお本論文の要旨は、第7回日本頭頸部腫瘍学会、第21回日本癌治療学会、並びに第22回日本癌治療学会において発表した。本研究は昭和58年度文部省科学研究費(No. 5877116)の援助によるものである。

(原稿受付 昭和59. 12. 20日急載)

別刷請求先 〒160 東京都新宿区信濃町 35

慶応義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室 藤井正人