シスプラチンの耳毒性軽減に関する実験的研究

斎藤 武久・斎藤 等・斎藤 憲治
大坪 俊雄・藤枝 重治・真鍋 恭弘
津田 豪太・本多 徳行・坂下 勤武

The Reduction of Ototoxicity of Cisplatin in Guinea Pigs

Takehisa Saito, Hitoshi Saito, Kenji Saito, Toshio Otsubo,
Shigeharu Fujieda, Yasuhiro Manabe, Gota Tsuda,
Noriyuki Honda and Tsutomu Sakashita

(Fukui Medical School)

The protective effect of sodium thiosulfate (STS) against ototoxicity of cisplatin (CDDP) was studied in the guinea pig.

CDDP at a dose of 7.5 mg/kg/day was intramuscularly given 3 times a day on every 5th day. The animals in Group 1 were intraperitoneally given 1060 mg/kg STS, 5 minutes and 1 hour after each administration of CDDP, and those in group 2 were given STS, 3 and 6 hours after each CDDP administration. According to the number of surviving hairs of the outer hair cell (OHC) observed by scanning electron microscopy, OHC damage in the animals in group 1 was very slight compared with that of those given CDDP alone. The protective effect of STS in group 2, was lower than that in group 1. Therefore, two-channel chemotherapy is clinically useful for the protection of CDDP ototoxicity.

The detoxicant effect of STS through the round window was examined. CDDP of 5 mg/kg/day was intramuscularly given for 3 consecutive days, and 0.1 ml of 10% STS was applied into the tympanic cavity through a silicon tube inserted into a hole on the bulla, soon and 30 minutes and 1 hour after the injection of CDDP. OHC damage in the right ear with STS infusion was slight, compared with that in the left ear which had not been infused STS. Intratympanic application of STS may be a means of reducing CDDP ototoxicity.

Key words: cisplatin, sodium thiosulfate, reduction of ototoxicity, intratympanic application

緒 言

Cisplatin (CDDP) は分子量 300.16 の白金化合物で、DNA 合成障害によって抗腫瘍性を発揮する。最近では、婦人科領域¹⁾²⁾、泌尿器科領域³⁾をはじめ、肝癌⁴⁾や癌性胸膜炎¹⁾³⁾、頭頸部腫瘍⁵⁾⁶⁾にも広く用いられるようになり、

その有効性が数多く報告されている。しかし、CDDP は腎毒性、聴器毒性、嘔吐などの消化器症状、骨髄抑制などの副作用をもっているため、注意しながら使用する必要がある。このCDDPの副作用を軽減するためには、制吐剤や利尿剤の投与やhydrationが一般的に行なわれ

ているが⁷⁾, CDDP そのものの解毒を目的としてチオ硫酸ナトリウム Sodium Thiosulfate (STS) が臨床面に応用されている^{1)~6)}.

今回我々は, STS が CDDP の耳毒性を軽減することが可能であるかどうかを, モルモットを用いて実験を行った.

実験方法

300~400 g のハートレイ系白色モルモットを用いた.

(1)CDDP 投与後の血中濃度測定

モルモットに CDDP 12.5 mg/kg を腹腔内投与し, 30分, 1, 2, 3, 6, 9時間後にそれぞれ3~4匹ずつ全麻下に開胸を行い, 心腔内より血液を採取し, 原子吸光分析法によって血中の free CDDP 量と free + 蛋白結合型 CDDP (total CDDP) 量を測定した.

(2)STS 全身投与による CDDP 耳毒性の軽減実験

モルモットに CDDP 7.5 mg/kg を5日ごとに3回, 計 22.5 mg/kg 筋注する群(6匹)と, STS 1060 mg/kg を CDDP 投与直後と1時間後の2回投与する群(7匹), 3時間後と6時間後の2回投与する群(6匹)の3群に分けた. 最終投与7日後に断頭し, 内耳を摘出して 2.5%グルタルアルデヒド, 1%オスミウム酸にて二重固定, 脱水後に臨界点乾燥を行い, 金蒸着して HITACHI S-400 走査型電子顕微鏡(SEM)にてコルチ器表面の観察を行った. 基底~第4回転の各回転中央部で, 外有毛細胞各列50個計150個における聴毛残存数をカウントし, その聴毛残存率を各回転ごとに求め, cochleogram を作製, 上記3群間の比較を行った. すなわち, CDDP の耳毒性が STS 投与によって軽減されるかどうか, また STS 投与のタイミングによって CDDP 耳毒性の軽減度に差があるかどうかを検討した.

(3)STS 鼓室内注入による CDDP 耳毒性の軽減実験

モルモット6匹を使用した. ペントバルビタールで全身麻酔を行い, さらに右耳介後部皮下

に1%キシロカインで局麻を追加し, 耳介付着部やや後方に皮切を加えた. 中耳骨胞を露出し, ダイヤモンドバーにて小孔を穿った. この小孔に $\phi 1$ mm のシリコンチューブを鼓室内に数 mm 入れ, デンタルセメントにてチューブ挿入部を密閉固定し, 薬液注入時にチューブ周囲から薬液が漏れ出ないようにした. CDDP 5 mg/kg を筋注し, その直後, 30分, 1時間後にシリコンチューブより10% STS 溶液 0.1 ml を鼓室内に注入した. 終了後, チューブは皮下に埋没し, 皮膚切開創を縫合した. 翌日と翌々日, 皮下に埋没されたチューブを縫合糸の間から引き出し, CDDP 5 mg/kg 筋注の後, 直後, 30分, 1時間後に STS 0.1 ml をチューブから注入した. CDDP 3回投与終了後5日目に断頭し, 両側内耳を摘出. SEM による cochleogram を左右それぞれ各回転ごとに作製した. すなわち, STS を注入した右耳と注入していない左耳との比較を行うことにより, CDDP 耳毒性が STS 鼓室内投与によって軽減できるかどうかを検討した.

実験結果

(1)CDDP 投与後の血中濃度の推移

free CDDP と total CDDP の推移を図1に示す. free CDDP は投与30分後にピークをもち, 以後急速に濃度が減少していく. これに対して total CDDP は, 同じく30分後にピークをもち, 徐々に減少していくが, 投与9時間後でも血中に残留する傾向が認められた.

(2)STS 全身投与による CDDP 耳毒性の軽減

3群の外有毛細胞の聴毛残存率を各回転別にグラフ化した cochleogram を図2に示す. CDDP 単独投与群では基底回転で外有毛細胞はほとんど消失し, 第2回転から上方回転にいくにしたがってその障害は軽度になっていった. 図3は CDDP 単独投与群の基底回転後半であるが, 聴毛が残存しているのはごくわずかで, 外有毛細胞は支持細胞に置き換わりつつあり, 聴毛の消失したクチクラが内リンパ腔側へ押し上げられているもの, 完全に支持細胞に置

図1 CDDP 投与後の血中濃度の推移

図2 CDDP および CDDP+STS 投与による聴毛残存率

換されているものなど, 種々の程度の障害像がみられた. しかし, 内有毛細胞聴毛は正常であった.

STS を CDDP 投与直後と1時間後の2回投与した群では, 基底回転, 第2回転, 第3回転でほとんど外有毛細胞聴毛に障害はなく, いず

図3 CDDP 単独投与群の基底回転後半

図4 CDDP 投与直後, 1時間後に STS を投与した群の第2回転前半

図5 CDDP 投与3時間, 6時間後に STS を投与した群の基底回転後半

図6 STS 鼓室内投与による CDDP 耳毒性の軽減

れも t 検定で 0.1% 以下の危険率で有意差を認めた. 図 4 に 2 回転前半のコルチ器表面像を示す. STS を CDDP 投与 3 時間, 6 時間後の 2 回投与した群では, CDDP 単独投与群と比較すると, 基底～第 3 回転まで障害は軽度となったが, 有意差がみられたのは基底回転と第 2 回転のみであった ($p < 0.01$). 図 5 は基底回転後半の像であるが, その障害は高度であり, STS による軽減効果は認められるものの, 決して充分とはいえなかった.

(3) STS 鼓室内注入による CDDP 耳毒性の軽減

STS を鼓室内に注入した右耳と, 注入しなかった左耳の各回転の cochleogram を図 6 に示す. STS 非注入耳における聴毛残存率は, 基底回転で $74 \pm 19.5\%$, 第 2 回転で $88 \pm 7.7\%$ であった. これは連続 3 日間 CDDP を投与し, しかもその後 7 日間生存させるための 1 日量としては 5 mg/kg 程度が限度であり, その結果投与総量を多くできないために実験 (2) に示したような強い障害にはならなかったと考えられる. 一方, STS 注入耳は基底回転で $93.3 \pm 6.1\%$, 第 2 回転で $96.7 \pm 2.9\%$ となり, 非注入耳に比して残存率は高かった. しかし, 有意差検定における危険率は 5% と 10% の間であった.

考 察

1. CDDP 耳毒性の検討

CDDP の内耳障害に関しては, 形態学的, 電気生理学的に多くの動物実験が行われてきたが, 今回と同じモルモットを用いた報告をまとめると次のようになる. すなわち, Nakai ら⁸⁾ は蝸牛障害には量的依存性があり, しかも 1 回投与量が多ければ障害も強くなること, また第 2 回転に障害が強く, 外有毛細胞では 1 列目の障害が強いこと, 血管条の変化は軽度であったことを報告している. また投与量が多くなれば, ABR で閾値が回復した例もあるという. 森田ら⁹⁾ も形態学的に第 1, 2 回転の外有毛細胞に障害が強く, 量的依存性があり, ABR で可逆性変化の認められたものがあったと報告して

いる. このように, 形態学的には量的依存性のあることが証明されているが, Tange ら¹⁰⁾ は蝸电图によって聴力障害が必ずしも投与量とは相関しないとしている. また Komune ら¹¹⁾ は, 光顕レベルで基底回転を中心とした外有毛細胞障害の他に, 低回転のライスネル膜の collapse がみられ, 電気生理学的には EP, CM の低下を認めている. そして EP の発生源は血管条が考えられているが, 形態学的には障害が少ないことから, 有毛細胞障害や内リンパイオン組成の変化も EP の変化に関与しているのではないかと推測している. さらに Schweitzer ら¹²⁾ によって CDDP と KM の併用投与, Komune ら¹³⁾ によってループ利尿剤との併用により, コルチ器障害が増強されることも報告されており注意を要する.

今回は 5 日ごとに 7.5 mg/kg ずつを 3 回, 計 22.5 mg/kg 投与し, きわめて強い障害を生じさせたが, やはり低回転ほど障害が強く認められた. この外有毛細胞の列別の障害では, 第 1 列に強いものや第 2～3 列に強いものなど, 一定の傾向は認められなかった.

臨床的な CDDP による聴力障害の報告では, 齋藤ら⁷⁾ によれば 25 dB 以上の低下は 13% (6/46) で, 投与量が多いほど聴力障害発生率は増加するが可逆性の症例もあったとされ, 中西ら¹⁴⁾ の報告では 20 dB 以上の低下は 26.1%, 25 dB 以上の低下は 17.4% であった. また安齋¹⁵⁾ によれば 42% (10/24) に障害が生じ, Vermorken ら¹⁶⁾ はオーディオグラム上変化のあったものは 64.6% と報告しており, 報告者によって著しい差がある. これは, 1 回投与量, 投与回数, 投与間隔が一定していないためで, 一律に評価できないのはやむをえないであろう.

2. CDDP 毒性の軽減

CDDP の毒性軽減に関して利用されているものには, STS の他に Fosfomycin (FOM) 静注や亜セレン酸などがある. FOM は大谷ら¹⁷⁾ や安齋¹⁵⁾ によれば, 腎尿細管上皮のライソゾーム膜の安定化作用をもっており, CDDP の腎へ

図7 チオ硫酸ナトリウムとシスプラチンの反応

の蓄積が抑制され腎毒性は軽減されるが抗腫瘍性は低下しないという。また亜セレン酸ナトリウム¹⁸⁾では、実験的に Ehrlich 腹水癌における CDDP 投与に対して、副作用が顕著に軽減し抗腫瘍効果も低下しなかったと報告されている。

STS はかつては腎機能検査に利用され、利尿効果ももっているのではないかとされている²⁾。分子量は 248 で $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ の分子式をもち、CDDP と反応することによって $\text{Pt}[(\text{S}_2\text{O}_3)_4]^{6-}$ と推定される反応物になる⁵⁾ (図7)。そしてこの STS は細胞内に取り込まれにくく、細胞外液や流血中で free の CDDP と反応し、水溶性が高くなって腎から排泄されやすくなると考えられている⁵⁾。これを裏づけるデータとしては、CDDP 静注直後に 100 倍モル比の STS を静注すると、腫瘍細胞への Pt の取り込みは 1/3 になったという報告¹⁹⁾や、同様に CDDP 投与直後に 200 倍モル比の STS を投与すると、5 分後には 90% 以上の free CDDP が不活化され、尿中へ排泄される結果、腎・内耳などに移行する free CDDP も減少するという報告³⁾がある。今回の実験からもわかるように (図1), free CDDP はすみやかに血中から消失していく一方で、蛋白結合型は血中に長く残留し、投与後 2~3 日を経ても残留しているという報告²⁰⁾もあるので、CDDP の毒性を軽減させるためには、CDDP 投与後 STS 投与までの時間が短かければ短いほどよいことがわかる。しかし、蛋白結合型 CDDP は腎毒性などの毒性がなくなる²¹⁾一方で、抗腫瘍性も低下してしまうとされている⁵⁾。また CDDP は、一旦

血中蛋白と結合すると再び遊離させるのは困難で、遊離させるには大量の STS が必要とされる。In vitro の実験では、1000 倍モル比の STS 投与で 10% 程度遊離させることができるという⁵⁾。

今回は CDDP 7.5 mg/kg に対し、STS をモル比で 240 倍の 1060 mg/kg 投与したが、STS を直後と 1 時間後の 2 回全身投与することによって、モルモットの体重減少は少なく、下痢などの副作用も少なくなった。しかし、3, 6 時間後投与では体重減少はかなり認められ、耳毒性の軽減効果も充分ではなかった。これは、CDDP 投与後 3 時間以上経過していれば、CDDP が血中蛋白とかなり結合しているため、今回の STS 投与量では結合を解離させることは困難であること、またすでに内耳組織内へ CDDP が入り込んで STS と反応できなくなっていることが考えられる。よって、CDDP の耳毒性を軽減するためには、STS を早期にしかも大量に投与する必要があると考えられる。また STS の血中からのクリアランスは早いので、さらに STS の効果を高めるためには、今回のような複数回投与あるいは連続投与が有効と思われた。しかしながら、CDDP と STS の結合物は抗腫瘍性がなくなってしまうため、臨床的には CDDP の動注や胸腔内、腹腔内投与に、STS 全身投与 (静注) を行う two channel chemotherapy において STS の毒性軽減作用は意義をもつものと考えられる。

Two channel chemotherapy は、CDDP の局所濃度を高め、より高濃度で大量の薬剤投与が可能である一方、腎、骨髄、肝などに対する毒性が軽減できるということから、実験的にはラット肝転移癌³⁾²²⁾、臨床的には原発性および転移性肝癌⁴⁾や、膀胱癌³⁾、頭頸部腫瘍 (舌癌や上顎癌など)⁵⁾⁶⁾のように CDDP を動注したり、癌性腹膜炎³⁾や卵巣癌¹⁾²⁾のように腹腔内に投与したり、癌性胸膜炎¹⁾³⁾のように胸腔内に投与し、STS を全身投与する two channel の治療が行われ良好な成績が挙げられている。以

上, STS の投与は two channel chemotherapy のような方法において意味をもつことが明らかにされたが, 次に, CDDP の耳毒性のみを軽減できないかという目的で, STS の鼓室内投与実験を行った。

薬剤の鼓室内投与は, 今までに耳毒性を調べる一手段として実験的に用いられてきた。これは, 臨床的に使用されている点耳薬の中に耳毒性をもつものが多いことにもよるが, ネオマイシン²³⁾²⁴⁾²⁵⁾, コリマイシン²⁵⁾, ポリミキシン B²⁴⁾²⁵⁾などでの報告がみられる。我々もKMの鼓室内投与でコルチ器に強い障害が生じることを確認しているが, その障害様式は基底回転に強い障害のみられるものや, 2回転が強いものの, 3~4回転が強いものなど, 個体差が大きい²³⁾²⁵⁾とされている。これらの薬剤による耳毒性は, 鼓室内に注入された薬剤が正円窓膜を透過することによって発現するわけであるが, ネオマイシン (分子量 909) や, デキサメサゾン (同 516), セフメタゾール (同 494) は, 正円窓膜を透過することが高速液クロマトグラフィーによって確認されており²⁶⁾, さらに分子量 40,000の HRP も通過するとされている。よって, 今回トレーサー実験や外リンパ液中濃度の測定はしていないが, 分子量248の STS は容易に正円窓膜を通過することができると推測される。一方, CDDP 投与による内耳組織内濃度は^{195mPt}を用いた実験¹²⁾で, 投与2時間後に腎では血中の20~35%の濃度であるのに対し, 蝸牛では0.1%, 血管条はコルチ器の2~3倍であると報告され, また外リンパ液中の濃度は10 mg/kg 1回投与24時間後に81 ng/ml と非常に微量であり¹⁵⁾, コルチ器の易傷性の強いことがうかがわれる。よって, STS が内耳局所へ多く達すれば, 蝸牛内でSTSとCDDPの反応が起こり, 耳毒性のみを軽減することも可能であると考えた。このようなSTSとCDDPが反応する場所としては, (1)外リンパ, 内リンパ液中での結合, (2)コルチ器の細胞外液中で結合し, 有毛細胞内へ入らない, の2通りが考えられる。

今回の実験では, STS 注入耳の方がCDDPによる有毛細胞障害が少ない傾向があった(0.05 < p < 0.10) ことから, STS の鼓室内注入をCDDP 耳毒性軽減に結びつけることができる可能性があると考えられた。

まとめ

STS によって CDDP の耳毒性を軽減することができないかを, モルモットを用いて検討した。

(1)CDDP 筋注に対して, STS を腹腔内投与した場合, CDDP 投与直後と1時間後に STS を投与すると, コルチ器障害はごく軽度であったが, 3, 6時間後に STS を投与すると, CDDP によるコルチ器障害は軽減されるものの充分ではなかった。よって, STS を全身投与する場合には, CDDP を動注などで局所投与する two channel chemotherapy において意味をもつと考えられた。

(2)CDDP 全身投与に対して STS を鼓室内に注入すると, STS 非注入耳に比してコルチ器障害は軽減される傾向にあった。よって, STS 鼓室内注入は CDDP 耳毒性軽減に結びつく可能性があると考えられた。

シスプラチンの薬剤提供およびシスプラチン血中濃度の測定には, 日本化薬 K. K. の御協力をいただいた。ここに深く感謝いたします。

本論文の要旨は第34回日本基礎耳科学会シンポジウムにおいて口演した。

参考文献

- 1) 波多江正紀, 手塚弘毅, 牛木信之, 他: Cisplatinum (DDP) の胸・腹腔内投与と Sodium thiosulfate (STS) の併用療法—Two Channel Chemotherapy. 癌と化学療法 11: 433~439, 1984.
- 2) 波多江正紀: ヒト及び mongrel dog による intraperitoneal two channel chemotherapy (ip TCC) における Cis-platinum 及び sodium thiosulfate の薬理動態. 日癌治 21: 609~620, 1986.
- 3) 黒岩俊郎, 馬場恒男: 制癌剤 Cis-Diammine dichloroplatinum (II) と中和剤 Sodium Thiosulfate を用いた二経路化学療法. 癌と化学療法 14:

- 1011~1017, 1987.
- 4) 木場文男, 辻 秀男, 安部良二, 他: 肝癌(原発性および転移性)に対する2経路注入方式動注化学療法の試み. 癌と化学療法 10: 1684~1690, 1983.
 - 5) 早田 聡, 等 泰三, 清川兼輔, 他: Cisplatinの体内動態とチオ硫酸ナトリウムの影響. 癌と化学療法 11: 2356~2361, 1984.
 - 6) 古川 侶, 滝元 徹, 加勢 満, 他: 頭頸部癌に対するシスプラチンとその拮抗剤による2経路注入方式動注療法の試み. 耳展 27: 609~614, 1984.
 - 7) 斎藤 等, 他: シスプラチンの聴力障害. 耳鼻臨床 77: 1387~1393, 1984.
 - 8) Nakai Y, Konishi K, Chang KC, et al: Ototoxicity of the antitumor drug Cisplatin. Acta Otolaryngol 93: 227~232, 1982.
 - 9) 森田一郎, 細川 智, 平出文久, 他: Cisplatinの聴器毒性について. 耳鼻臨床 78: 561~568, 1985.
 - 10) Tange RA, Goniijn EAJG and Zeijl LGPM: The cortitoxic effects of Cis-Platinum in the guinea pig. Arch Otolaryngol 237: 17~26, 1982.
 - 11) Komune S, Asakuma S and Snow JB: Pathophysiology of the ototoxicity of Cis-Diamminedichloroplatinum. Otolaryngol Head Neck Surg 89: 275~282, 1981.
 - 12) Schweitzer VG, Hawkins JE, Lilly DJ, et al: Ototoxic and nephrotoxic effect of combined treatment with cis-diamminedichloroplatinum and Kanamycin in the guinea pig. Otolaryngol Head Neck Surg 92: 38~49, 1984.
 - 13) Komune S and Snow JB: Potentiating effect of cisplatin and ethacrynic acid in ototoxicity. Arch Otolaryngol 107: 594~597, 1981.
 - 14) 中西 弘, 榎本雅夫, 岩橋大介, 他: Cisplatinによる聴力障害について. 耳展 30: 61~67, 1987.
 - 15) 安斎友博: Cisplatinの副作用に対するFosfomycinの軽減効果に関する実験的・臨床的研究. 耳鼻臨床 補10: 1~24, 1987.
 - 16) Vermorken JB, Kapteijn TS, Hart AAM, et al: Ototoxicity of cis-diamminedichloroplatinum (II); influence of dose, schedule and mode of administration. Eur J Cancer Clin Oncol 19: 53~58, 1983.
 - 17) 大谷 巖, 大槻好正, 相川 通, 他: 抗悪性腫瘍剤 Cisplatinの聴器毒性に対するFosfomycinの軽減作用に関する実験的研究. 日耳鼻 87: 833~840, 1984.
 - 18) 井村伸正: セレンの生理機能, 代謝 20: 635~644, 1983.
 - 19) Uozumi J, Ishizawa M, Iwamoto Y, et al: Sodium thiosulfate inhibits cis-diamminedichloroplatinum (II) activity. Cancer Chemother Pharmacol 13: 82~85, 1984.
 - 20) 李 漢榮, 沢村正之, 石橋 晃, 他: Sodium Thiosulfate Rescue がシスプラチンの抗腫瘍効果へ及ぼす影響. 日癌治 21: 601~608, 1986.
 - 21) Cole WC and Wolf W: Renal toxicity studies of Protein-bound platinum. Chem.-Biol. Interactions 35: 341~348, 1981.
 - 22) Uozumi J, Sagiyama K, Aoki K, et al: Effectiveness of "two-route chemotherapy" using cisplatin and its antidote, sodium thiosulfate, on lifespan of rats bearing metastatic liver tumors. Cancer Treatment Reports 67: 1067~1074, 1983.
 - 23) 原田勇彦: 蝸牛窓膜の透過性と経蝸牛窓膜聴器毒性の実験的研究. 日耳鼻 89: 559~571, 1986.
 - 24) Brummett RE, Harris RF and Lindgren JA: Detection of ototoxicity from drugs applied topically to the middle ear space. Laryngoscope 86: 1177~1187, 1976.
 - 25) Kohonen A and Tarkkanen J: Cochlear damage from ototoxic antibiotics by intratympanic application. Acta Oto-laryngologica 68: 90~97, 1969.
 - 26) 野村恭也: 蝸牛窓膜. 蝸牛窓. 57~63頁, 東京大学医学部耳鼻咽喉科学教室編, 東京, 1982.
- 別刷請求先: 斎藤武久
〒910-11 福井県吉田郡松岡町下合月23
福井医科大学耳鼻咽喉科学教室