Cis-diammine-1, 1-cyclobutane dicarboxylate platinum (Ⅱ) を用いた 温熱化学療法に関する基礎的研究

水内 裕之・吉賀 浩二・桜井 和裕
津村 政則・高田 和彰

Fundamental study of thermochemotherapy combined with *cis*-diammine-1, 1-cyclobutane dicarboxylate platinum (Ⅱ) and hyperthermia

Hiroyuki MIZUUCHI・Koji YOSHIGA・Kazuhiro SAKURAI
Masanori TSUMURA・Kazuaki TAKADA

Abstract: We studied the optimal timing for the enhancement of the antitumor effects of the CDDP analogue *cis*-diammine-1, 1-cyclobutane dicarboxylate platinum (Ⅱ) (CBDCA) combined with hyperthermia against CD-1 mice bearing Ehrlich ascites tumor (EAT) cells *in vivo* and the effect of hyperthermia on drug influx and efflux *in vitro*. The tumor doubling time was prolonged when two modalities were combined. The longest tumor doubling time was obtained by the simultaneous use of CBDCA and hyperthermia. The findings indicated that the most effective treatment was the simultaneous use of CBDCA and hyperthermia. An increase in the intratumoral platinum concentration was obtained by simultaneous treatment with CBDCA and hyperthermia.

Ehrlich ascites tumor cells were used in cellular accumulation studies with a flameless atomic absorption spectrophotometer. The cells were incubated in the serum-free RD medium. After 1 hour of exposure to 40 μ g/ml CBDCA (final concentration), the influx at 42.5°C was approximately 2-fold higher than control (37.0°C incubation). After 1 hour of exposure to CBDCA at 37.0°C or 42.5°C, the rate of efflux in the 5% calf serum RD medium at 37.0°C or 42.5°C was measured after drug removal. There was a significant difference between the control group (uptake and efflux at 37.0°C) and the heated group (uptake and efflux at 42.5°C), but no significant difference between the control group and the treatment group (uptake at 42.5°C and efflux at 37.0°C). We concluded that hyperthermia increases the intracellular accumulation of CBDCA.

Key words: hyperthermia (温熱療法), CBDCA (カルボプラチン), thermochemotherapy (温熱化学療法)

緒 言

広島大学歯学部口腔外科学第一講座
(主任: 高田和彰教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery I
Hiroshima University School of Dentistry (Chief:
Prof. Kazuaki Takada)

受付日: 平成7年11月20日

現在、悪性腫瘍の治療は集学的治療が主体であり、その一つに温熱療法がある。これは、一般に悪性腫瘍細胞の温熱感受性が正常細胞よりも高いことを利用し、温熱療法を併用することにより放射線療法や化学療法による抗腫瘍効果をより増強する治療法である。

現在、頭頸部領域の悪性腫瘍に対して使用される化学療法剤のうち、白金錯化合物シスプラチンは重要な位置を占める。本剤は、単剤もしくは他剤との併用療法にて用いられ、化学療法剤としてきわめて評価の高い薬剤である。しかし、副作用として腎障害、悪心嘔吐、聴神経障害があり、特に腎障害は dose limiting factor となってきた。

一方、カルボプラチン (cis-diammine-1, 1-cyclobutane dicarboxylate platinum (II); CBDCA) はシスプラチンの誘導体でその副作用軽減の目的で開発された第二世代の白金錯化合物の一つである¹⁾。カルボプラチンはシスプラチンと同等の抗腫瘍活性をもつと言われ、多くの癌化学療法 (卵巣癌、肺小細胞癌、悪性リンパ腫、頭頸部腫瘍など) に広く利用されている^{1~3)}。しかし、カルボプラチンの生体内動態 (特に蛋白質との結合) や構造 (分子量) は、シスプラチンのそれとは異なっていることより、白金系抗癌剤の作用機序は種類により異なると考えられる^{4~6)}。

これまで、カルボプラチンについては温熱療法との併用効果の報告は少なく、特に *in vivo* における併用効果に関する研究、およびその作用機序に関する報告はきわめて少ない⁷⁾。また臨床応用に際して明らかにすべき併用時の薬剤投与時期に関する報告も未だみられない。そこで、本研究ではカルボプラチンを用い、温熱併用時の抗腫瘍効果増強の可能性と、その作用機序を明らかにすることを目的とし、可移植性マウス腫瘍系を用いて検討した。

材料ならびに方法

1. 実験動物

CD-1 マウス (日本チャールズリバー (株)), 5 週齢, 雄性, 体重 29~32g を用いた。実験期間中は固形飼料および水を自由に摂取させた。

2. 腫瘍細胞

当科において CD-1 マウス腹腔内にて継代しているエーリッヒ腹水癌細胞 (Ehrlich ascites tumor cell; EAT 細胞) を用いた。すなわち腹腔内より採取した EAT 細胞をリン酸緩衝液 (PBS (-); Dulbecco's Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free phosphate buffer saline) にて洗浄後以下の実験に使用した。

3. 温熱処置

CD-1 マウスをペントバルビタール (Nembutal Abbott Lab. 40-50mg/kg) 全身麻酔下に腫瘍接種部をクリップテクニック⁸⁾ にて温熱処置を行った。温熱処置は恒温循環槽 (Lauda, model S-1, Germany) を用いて局所温水加温を行った。また *in vitro* の実験においても、コニカルチューブを温水中に指定時間静置し加温した。なお、温度は±0.05℃の精度に保たれ、加温部位は5分以内に目的温度に達した。

4. *In vivo* における抗腫瘍効果の検討

1) 血漿中白金濃度の測定

カルボプラチン 100mg/kg を健常マウス腹腔内投与直後を0時間として15, 30, 45分, 1, 2, 4, 8, 16, 24時間後にペントバルビタール全身麻酔下にて開胸し、ヘパリナイズドシリンジにて右心房より心臓採血 (採血量約1ml/body) を行った。各群の個体数は3匹とした。得られた血液はただちに遠心 (400×g, 10min, 室温) し、上清の血漿を総白金 (total Pt) 濃度測定用のサンプルとした。血漿の一部をミリポアフィルター (MILLIPORE, ultra free C3-LTK) にて限外濾過 (5000×g, 30min, 4℃) し、得られた濾液を抗腫瘍活性をもつ遊離型白金 (free Pt) 濃度測定用のサンプルとした。そしてサンプルの白金濃度を原子吸光分光光度計 (日立, model 170-70 zeeman effect atomic absorption spectrophotometer) を用い直接法にて測定した。なお、検量線は原子吸光用白金標準溶液 (和光純薬, 1000ppm) を超純水にて段階希釈したものから作成した。これらのデータを基に血漿中白金薬理動態を非線形最小二乗法を用いて 2-compartment 解析^{9~13)} を行った。

2) 温熱併用時におけるカルボプラチンの至適投与時期についての検討

1×10⁷ cells/0.05ml PBS (-) に調整した細胞浮遊液をマウス右足足底部皮下に接種し、6日目に一群8匹にて腫瘍増殖抑制実験を開始した。温熱処置は42.5℃, 45分間局所加温、カルボプラチン投与量は100mg/kg 腹腔内投与とした¹⁴⁾。対照群は生理食塩液投与群、温熱処置併用群は温熱処置先行群 (温熱処置終了時を0とし、その後、経時的にカルボプラチンを投与した群) とカルボプラチン投与先行群 (カルボプラチン投与直後を0とし、その後、経時的に温熱処置を行う群) として同時併用群 (カルボプラチン投与直後、温熱処置を行う群) とした。なお、温熱処置とカルボプラチン投与との時間間隔は、血漿中において抗腫瘍活性をもつ遊離型白金 (free Pt) の濃度推移より0, 1, 2, 4, 8, 24時間を選択した。実験開始後、経日的にそれぞれのマウス体重 (g) と腫瘍体積 (V (mm³) = length×depth×width×π/6) の測定を、実験開始後15日まで行った。なお、実験開始15日を過ぎると、コントロール群の腫瘍接種部が壊死に陥り、組織の脱落がおり腫瘍体積の正確な測定が不可能となるため、腫瘍体積の計測は実験開始15日までとした。抗腫瘍効果の判定¹⁵⁾ は、処置時の腫瘍体積を1とした経日的な腫瘍体積比を算出し腫瘍増殖曲線を作成、腫瘍体積が2倍になるために必要な時間、腫瘍倍加時間にて抗腫瘍効果を判定した。

3) 腫瘍組織内白金濃度の測定

腫瘍移植後12日目のマウスにカルボプラチン100mg/kg 腹腔内投与し、経時的に腫瘍組織を摘出

した。実験群は、カルボプラチン単独投与群と最も抗腫瘍効果の高かったカルボプラチン温熱同時併用群とに分け、カルボプラチン単独投与群では腹腔内投与後15, 30, 45分, 1, 2, 4, 8, 16, 24時間後に腫瘍を摘出した。同時併用群ではカルボプラチン投与直後の温熱処置開始時間を0時間と同様に腫瘍を摘出した。摘出後、腫瘍組織よりDDTC-MIBK 有機溶媒抽出法^{9, 16)}により白金を抽出し、原子吸光分光光度計を用い直接法にて白金濃度を測定した。すなわち、摘出腫瘍組織からただちに腱組織、皮膚を除去し、軽く周囲の血液を拭い、腫瘍組織の湿重量を計測し、蓋付きガラス試験管の底に注意深く腫瘍組織を置き、濃硝酸3.0mlを注入し蓋を閉めた後、ウォーターバス中にて90.0℃以上、6.0hrs 静置加温し腫瘍組織を完全に融解した。融解後、試験管を水中にて冷却しながら、40.0%水酸化ナトリウム水溶液3.0ml, 25.0%炭酸ナトリウム水溶液2.5mlを注意深く加え、中和反応を行った(pH 7.0-9.0)。中和後、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム(DDTC) 300mgを加え、ウォーターバス中にて60.0℃, 2.0hrs 加温、DDTCを融解しキレート反応を行い、ただちに試験管内容物を遠心管に移した。次に、4-メチル-2-ペンタノン(MIBK) 4.0mlをその遠心管に注入し、室温にて10分間攪拌振盪し、その後ただちに遠心(2000rpm, 5min, 室温)、上清の有機溶媒層をパスツールピペットにて注意深く吸引採取し、ロータリーエバポレーター用フラスコに移した。そして、再度MIBK 4.0mlを遠心管に注入し、上記と同様の操作を4回行い、有機溶媒層をフラスコに分取した。分取した有機溶媒層を45℃温水下にロータリーエバポレーターにて減圧乾固の後、残渣をMIBK 0.5mlに再溶解し、その10 μ lをサンプルとして、原子吸光分光光度計にて白金濃度の測定を行った。

5. *In vitro*におけるカルボプラチンの膜透過性に関する検討

1) 平均生存日数(Mean survival time; MST)を指標とした殺細胞効果について

腹腔内より採取したEAT細胞をPBS(－)にて洗浄後15ml コニカルチューブ中に1 $\times 10^7$ cellsをpH 7.4に調整したprotein free RD medium(RPMI 1640, Dulbecco modified essential medium; DMEM, 極東社製, RPMI1640 : DMEM=1 : 1 mixture) 5.0mlに浮遊させ、*in vitro*にて種々の濃度のカルボプラチンと接触、あるいは温熱処理した。対照群は生理食塩液を、カルボプラチン処理群は終濃度10, 25, 40, 50 μ g/mlとなるよう添加し、恒温循環槽を用いて37.0℃, 1時間加温した。温熱処理群は、恒温循環槽を用いて対照群は37.0℃, 温熱群は42.0℃, 42.5℃, 43.0℃, 1時間加温した。その後、細胞を室温にて600rpm, 3min 遠心、カルボプラチン含有培地を除去し、PBS(－)にて洗浄後、1 $\times 10^7$ cellsをPBS

(－) 1.0mlに再浮遊させ、この0.1ml(1 $\times 10^6$ cellsを含む)をマウス腹腔内に移植し、一群7匹にてマウスの生存を毎日観察し、死亡するまでの日数を観察し、殺細胞効果を平均生存日数(Mean survival time; MST)にて判定した。

2) Influxに及ぼす温度の影響(細胞内外白金濃度の測定)

細胞浮遊液を4 $\times 10^7$ cells/5.0ml RD培地となるよう調整後、これにMSTにて殺細胞効果の認められなかったカルボプラチン40.0 μ g/mlを4.0℃(氷水中冷却群), 37.0℃(対照群), 42.5℃(温熱群)に分けて細胞を処理した。薬剤添加後1, 2, 4時間後に細胞を遠心(1200rpm, 1min, 室温)し、薬剤を含む上清培地を吸引除去、水冷した生理食塩液にて細胞を3回遠心(1200rpm, 1min, 室温)洗浄、細胞周囲の薬剤を除去した。その後、3-3)実験の項で述べたDDTC-MIBK 有機溶媒抽出法および原子吸光分光光度計にて細胞内白金の定量を行った。

細胞内外の白金濃度測定は、上記と同様に薬剤接触させ、経時的に上清培地の白金濃度をDDTC-MIBK 有機溶媒抽出法および原子吸光分光光度計にて細胞外の培地中の白金濃度の測定を行った。細胞内白金濃度の測定は、細胞100個の直径を顕微鏡にて測定し、その平均値より細胞1個あたりの体積を計算し、1mlあたりの細胞の白金量を計算した。

3) Effluxに及ぼす温度の影響

細胞浮遊液を4 $\times 10^7$ cells/5.0ml RD培地となるよう調整後、これにカルボプラチン(終濃度40.0 μ g/ml)を添加し37.0℃, 42.5℃(恒温循環槽中)にて1時間接触した。その後、細胞浮遊液を遠心(1200rpm, 1min, 室温)し、薬剤を含む上清を吸引除去後、残った細胞成分を5%血清添加RD培地に再浮遊させ37.0℃, 42.5℃に置き、細胞内よりの薬剤の放出を細胞内残存白金量を指標に経時的に計測した。1, 2, 4時間後に細胞を遠心回収、DDTC-MIBK 有機溶媒抽出法および、原子吸光分光光度計にて細胞内残存白金の定量を行った。実験は、対照群(37.0℃にて薬剤と接触し37.0℃で薬剤の放出をみる)、温熱群(42.5℃にて薬剤と接触し42.5℃で薬剤の放出をみる)、処置群(42.5℃にて薬剤と接触し37.0℃で薬剤の放出をみる)の3群について行った(表1)。

6. 原子吸光分光光度計(flameless atomic absorption spectrophotometry; FAAS)による分析

原子吸光分光光度計は、日立社製のmodel 170-70 zeeman effect atomic absorption spectrophotometerを使用し、キュベットはpyrolytic graphite cuvette(part No. 170-5101, 日立)を、ランプはHollow cathode lamp(HLA-4S, part No. 139-3601, 日立)を用いた。測定周波数は265.9nm, 記録計の測

表1 Efflux のスケジュール

	-1	0	1	2	3	4
	Drug uptake		Release			
Control	37.0℃		37.0℃			
Heat	42.5℃		42.5℃			
Treatment	42.5℃		37.0℃			

↓
Remove drugs

表2 血漿中白金の PK パラメーター

Parameter	Total Pt	Free Pt
AUC ($\mu\text{g} \times \text{hrs} / \text{ml}$) (0-24hrs)	75.49	62.13
C max ($\mu\text{g} / \text{ml}$) #	108.18 $\pm$ 26.52	96.76 $\pm$ 26.53
t max (mins)	15.0	15.0
t 1/2 α (mins)	11.35	11.90
t 1/2 β (hrs)	13.92	1.67

; NS

結 果

1. *In vivo* における抗腫瘍効果の検討

1) 血漿中白金濃度の測定 (図1, 表2)

総白金, 遊離型白金 (各時間, マウス 3 匹の平均 $\pm$ 標準偏差) とともに腹腔内投与 15 分後に最高血中濃度を示し, 投与 2 時間まで遊離型白金は総白金と同様に減少し, 以降遊離型白金は総白金と比較し減少することを認め, 16 時間後には最高血中濃度の 99% が消失, 24 時間後には血漿中から消失した。

これらのデータを基に血漿中白金薬理動態を非線形最小二乗法を用いて 2-compartment 解析を行った結果を表 2 に示す。

2) 併用時におけるカルボプラチンの至適投与時期についての検討 (図 2)

温熱後処置群において, カルボプラチン投与から温熱までの時間が 8 時間までは併用による抗腫瘍効果増強が認められた。しかし, 温熱先行処置群において抗腫瘍効果増強が認められるのは, 温熱処置からカルボプラチン投与までの時間が 2 時間までのみであった。また最も高い抗腫瘍効果が認められたのは, カルボプラチン投与直後に温熱処置を行う同時併用群であった。

3) 腫瘍組織内白金濃度の測定 (図 3)

カルボプラチン単独投与群において, 腹腔内投与 45 分後に最高組織内濃度を認め, 以降減少していくことを認めた。しかし, 同時併用群においては腹腔内投与 15 分後から有意に高い組織内白金濃度を認め, また腹腔内投与 30 分後に最高組織内濃度を認めた。その後の減少もカルボプラチン単独投与群と比較し緩やかで, 温熱処置終了後もカルボプラチン単独投与群と比較し高濃度を長時間維持していた。

2. *In vitro* におけるカルボプラチンの膜透過性に関する検討

1) 平均生存日数 (MST) を指標とした殺細胞効果について (図 4, 5)

50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度で有意の差をもって MST は延長した。また, 43.0℃ の温度で有意の差をもって MST は延長した。この結果から, 以下の実験において細胞障

(★; $p < 0.05$, ★★; $p < 0.01$, ★★★; $p < 0.001$ vs total Pt)

図1 血漿中白金濃度の経時的変化

定 Range は 10 あるいは 5 mV で, 直接法にて測定を行った。なお, 検量線は原子吸光分析用白金標準液 (1000ppm, 和光純薬) を用いて上記の試料と同様の方法により作成した。この方法による測定限界は 0.05 $\mu\text{g} / \text{ml}$ であった。

7. 試薬

カルボプラチンは Bristol-Myers Squibb 株式会社 (東京) より供与された。HNO₃, NaOH, Na₂CO₃, Sodium *N,N*-diethyldithiocarbamate trihydrate; DDTC, 4-methyl-2-pentanone; MIBK, 原子吸光分析用白金標準溶液は和光純薬工業株式会社より購入した。

8. 検定

有意差の検定には student's t-test を用いた。

図2 併用時の CBDCA 投与時期に対する抗腫瘍効果

図3 腫瘍組織内白金濃度の経時的変化

図4 温度変化に対する MST

害性の認められなかったカルボプラチン $40\mu\text{g/ml}$, 温熱処理 42.5°C を選択した。

2) Influx に及ぼす温度の影響 (細胞内外白金濃度の測定) (図 6, 7)

37.0°C 群と比較し, 42.5°C 群の細胞内白金の蓄積は有意の差をもって増加した。また, 接触 1 時間後の値と比較すると 42.5°C 温熱群は, 37.0°C 対照群の約 2 倍であった。 4.0°C 冷却群の白金の influx は, 37.0°C 対照群と比較し有意に低い値を示し, 4 時間接触後も 37.0°C 対照群の約 10% 程度の細胞内白金濃度であった。

細胞内外白金濃度の測定

細胞内外の白金濃度の比較を行うと, 薬剤接触 4 時間後において細胞内白金濃度は細胞外白金濃度と比較し高値であることが認められた。

3) Efflux に及ぼす温度の影響 (図 8, 9)

対照群に比較し, 温熱群は有意に低い細胞内白金濃度であった。しかし, 処置群において有意に高い細胞内白金濃度であった。また, 残存率で比較すると対照群と比較し温熱群は有意に低い残存率を認めたが, 処置群においては有意の差は認められなかった。

(★; p<0.05, ★★; p<0.01, ★★★; p<0.001 vs control)

図5 CBDCA 濃度変化に対する MST

(★; p<0.05, ★★; p<0.01, ★★★; p<0.001 vs control)

図8 細胞内残存白金の経時的変化

(★; p<0.05, ★★; p<0.01, ★★★; p<0.001 vs 37.0°C)

図6 Influx に及ぼす温度の影響

(★; p<0.05, ★★; p<0.01, ★★★; p<0.001 vs control)

図9 細胞内残存率の経時的変化

図7 細胞内外白金濃度の経時的変化

考 察

近年、頭頸部領域の悪性腫瘍の治療成績は向上してきた。しかし進行癌や再発癌においてはその治療成績は未だ十分ではない。現在、癌の治療は化学療法・放射線療法・手術療法により集学的に行われている。しかし、その効果は恒常的ではなく化学療法、放射線療法を強化する治療法が必要である。頭頸部領域においても局所温熱療法が徐々に導入されるようになってきた。そして現在は、化学療法、放射線療法と併用する治療法が主体である。

頭頸部領域における化学療法剤は種々あるが、近年特に白金系抗癌剤シスプラチンが広い抗腫瘍スペクトルの点から日常の臨床で頻用されその評価は高い。一方、カルボプラチンは、シスプラチンに次ぐ第二世代の白金系抗癌剤でシスプラチンの副作用を軽減する目

的で開発され、腎毒性が軽減されている点から、有用な薬剤と考えられる。

In vivo の実験結果においてカルボプラチンと温熱療法との併用において抗腫瘍効果が増強されることはすでに報告した。また、臨床応用に際して重要な問題となる併用時の薬剤至適投与時期に関しては、温熱後処置群においてカルボプラチン投与から温熱までの時間間隔が8時間までの群に、併用による効果増強を認め、それ以降では効果増強は認められなかった。薬動力学的には、表2の最高血漿中濃度 (C max), 最高血漿中濃度に達するまでの時間 (t max), 分布相 (α 相) 半減期 ($t_{1/2\alpha}$) より、薬物の分布相において血漿中に存在する白金のほとんどは抗腫瘍活性を有する遊離型白金であることが考えられた。また、排泄相 (β 相) 半減期 ($t_{1/2\beta}$) より血漿中に存在する白金は徐々に血漿中蛋白質 (主にアルブミンと考えられている) と結合し、ほとんどが不活性型の総白金となり遊離型白金の割合は減少していることが考えられる。しかし、血漿中蛋白質との結合速度がシスプラチンと比較して遅いことから、遊離型白金の濃度-時間曲線下面積 (Area under the curve; AUC) が $62.13 \mu\text{g} \times \text{hrs} / \text{ml}$ と比較的高値を示したと考えられた。これより、抗腫瘍活性を有する血漿中遊離型白金濃度が、投与8時間以降では最高血漿中濃度の約99%以上が排泄あるいは蛋白質と結合し不活化されて低下したため、温熱との併用効果を認めなかったと考えられた。また、温熱先行処置群においては、温熱処置からカルボプラチン投与までの時間間隔が2時間までと比較的短時間の群に併用による効果増強を認め、それ以降では効果増強は認められなかった。そして、温熱処置24時間後にカルボプラチンを投与すると、単独処置とほぼ同等の抗腫瘍効果の結果であり、効果増強は認められなかった。この結果を腫瘍血管の変化の面から考えると、エーリッヒ腹水癌を用いた Molla らの報告⁸⁾ では、マウス足底部皮下に移植後の腫瘍移植部の血流は、レーザードップラー法による測定において、43.5℃加温開始30分後に最大になるとされる。腹水肝癌 AH100B を用いた狩野らの報告¹⁷⁾ によると、ラット下腿皮下に移植後の腫瘍血管の血流は水素クリアランス法により測定すると、41.0-43.0℃加温中では加温開始後20-30分まで上昇しここでピークを示すとされる。また、その後加温を続けても血流は上昇せず、加温終了後には血流はより低下することを認めている¹⁷⁻²⁰⁾。すなわち加温による血流の低下は、併用抗癌剤の腫瘍到達性の低下を示唆し、このことが温熱先行処置群において併用効果増強の認められなかった一因であると考えられた。

以上より、カルボプラチンを先行投与後、温熱処置を行うことが抗腫瘍効果増強のための条件と考えられた。さらに、最も高い抗腫瘍効果増強はカルボプラチン投与直後に温熱処置を行う同時併用群に認められた。

この時の腫瘍倍加時間は15.45日と対照群の6.97日と比較し最も長い腫瘍倍加時間を示し、同時併用が抗腫瘍効果を高めるための最適な条件であることが明らかとなった。

次に、腫瘍組織内白金濃度を検討した結果、カルボプラチン単独投与群と比較し、カルボプラチンと温熱療法の同時併用群において薬剤投与後15分より有意の差をもって腫瘍組織内白金濃度の上昇と、加温終了後も長時間高濃度を維持していた。組織内白金濃度を最高値と比較すると、カルボプラチン単独投与群では、カルボプラチン投与後45分に $12.49 (\mu\text{g}/\text{g})$ を示し、同時併用群では投与後30分に $18.07 (\mu\text{g}/\text{g})$ と有意な差をもった最高組織内白金濃度の上昇を認めた。組織内白金濃度が最高値となるのに要する時間が併用群の方が早いのは、上記の腫瘍血管における血流の変化によるものと考えられた。また、薬剤投与24時間後において比較すると、カルボプラチン単独投与群 $1.68 (\mu\text{g}/\text{g})$ に対し、同時併用群は $3.75 (\mu\text{g}/\text{g})$ と有意に高かった。これは、温熱開始後、血流の増加に伴い腫瘍組織内の薬剤到達量が増加するが、その後の血流低下により腫瘍組織外への薬剤の排出が抑制され腫瘍組織に高濃度の薬剤が長時間残留するためと考えられた。これより組織内白金濃度の上昇と、高濃度を長時間維持することが抗腫瘍効果増強の一因と考えられた。

頭頸部領域の化学療法で頻用される他の薬剤には代謝拮抗剤 5-FU、抗癌抗生物質 Bleomycin, Peplomycin などがあるが、これまでこれら薬剤について *in vitro* における温熱療法の効果増強のメカニズムに関するいくつかの研究報告がなされている。

抗癌抗生物質 bleomycin は41.0℃ではほとんど併用効果の増強はなく、43.0℃では著しく抗腫瘍効果が増強される。しかし、放射線標識 bleomycin を用いた実験では43.0℃加温下、bleomycin の細胞内取り込み量は37.0℃対照群とあまり変わらないことが報告されている。また、bleomycin の細胞障害は薬剤を除去後には修復されることが認められたが、43.0℃加温した細胞ではこの修復活性が著しく低下していることが認められている²¹⁾。

代謝拮抗剤 5-FU は温熱による抗腫瘍効果増強は認められないが、その誘導体である HCFU (1-Hexyl-carbamoyl-5-fluorouracil) は温熱により細胞内への取り込みが増大し、抗腫瘍効果増強を認めている²²⁾。

白金抗癌剤シスプラチンの温熱による作用増強は温度上昇に伴い直線的に増加すると考えられている。そのメカニズムは、細胞内白金濃度の上昇により DNA 架橋が増加するためと考えられている。また、薬物代謝の変化も指摘されている²³⁻²⁵⁾。

現在、抗癌剤の細胞外排出機構に関しては、薬剤耐性と関連し盛んに研究されて明確にされつつある^{26, 27)} が、細胞内流入機構に関しては不明確な点が

多い^{28, 29)}。その中で、白金化合物の細胞膜を介した膜輸送機構には受動輸送 (passive diffusion) が主に考えられている³⁰⁾。しかし、エネルギー依存的な輸送機構、能動輸送 (active transport) の存在も示唆されてきている^{31~33)}。また、cAMP の増加に伴った輸送機構の変化も考えられている³⁴⁾。

今回の *in vitro* の実験系では、カルボプラチンと温熱療法を併用することで白金の取り込みの増大が認められた。また、この際、もし、細胞が薬剤を受動輸送で取り込みを行っているのであれば細胞外と細胞内の白金濃度は時間が経過すると等しくなると考えられる。しかし、今回の実験結果より細胞内白金濃度が細胞外より高くなること、低温により細胞内の代謝が抑制され ATP 産生が低下するためにカルボプラチンの取り込みの抑制が起こったことを考えると、カルボプラチンの取り込みに能動輸送が関与している可能性が考えられる。

また、efflux に関しては、薬剤除去後 4 時間における残存率は対照群 26.07% に対して温熱群は 10.49% と有意に低い値を示し、温熱処置により薬剤は放出されやすいことが考えられた。しかし、温熱処置後 37℃ におき、その時の残存率をみると、対照群 26.07% に対して処置群は 28.46% と、有意の差は認められず、温熱処置により取り込みが増加した細胞内の薬剤が、37℃ におくと細胞内により多く蓄積することが認められた。このことより温熱併用による効果増強の機序の一つとして薬剤の細胞内蓄積の増大が考えられた。

結 語

1) 血漿中白金濃度はマウス腹腔内投与後 15 分で総白金、遊離型白金ともに最高値に達し、遊離型白金は投与後 8 時間で最高値の約 99% が消失し、24 時間後には検出限界以下となった。

2) 温熱とカルボプラチン併用時、温熱処置先行群、カルボプラチン投与先行群と比較し、同時併用群に最も高い抗腫瘍効果増強が認められた。

3) 温熱とカルボプラチン併用群はカルボプラチン単独群と比較し、有意の差をもって腫瘍組織内白金濃度が上昇し、しかも長時間高濃度を維持することを認めた。

4) 細胞内薬剤取り込み能は、*in vitro* において温熱処置により有意の差をもって増大することを認めた。また、細胞内薬剤残存率は対照群と比較し、処置群において有意の差は認められなかった。また、細胞内外の白金濃度は経時的に細胞内白金濃度が細胞外と比較し高くなることを認めた。これより白金の取り込み機構に能動輸送の関与が示唆された。

引 用 文 献

- 1) Sorkin, E.M.: Drugs. Focus on Carboplatin, ADIS Drug Information Services, Auckland, New Zealand, 1989, p162-190.
- 2) Ohno, S., Siddik, Z.H., et al.: Effect of carboplatin combined with whole body hyperthermia on normal tissue and tumor in rats. *Cancer Res* 51: 2994-3000 1991.
- 3) Chu, G., Mantin, R., et al.: Massive cisplatin overdose by accidental substitution for carboplatin. *Cancer* 72: 3707-3714 1993.
- 4) Workman, P., and Graham, M.A.: Pharmacokinetics and cancer chemotherapy. *Eur J Cancer* 30A: 706-710 1994.
- 5) 佐々木康綱: プラチナ化合物における臨床薬理学. *癌と化学療法* 19: 456-462 1992.
- 6) 藤田 浩: 抗癌剤の臨床薬理 各論 1. アルキル化剤 2. 白金錯化合物. *癌と化学療法* 18: 2481-2487 1991.
- 7) Schem, B.-C., Mella, O., et al.: Thermochemotherapy with cisplatin or carboplatin in the BT 4 rat glioma in vitro and in vivo. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 23: 109-114 1992.
- 8) Molla, M.R., Yoshiga, K., et al.: Influence of methoxamine, 5-hydroxytryptamine and physically induced low pH on thermal sensitivity and thermotolerance. *Neoplasma* 34: 397-407 1987.
- 9) LeRoy, A.F., Lutz, R.J., et al.: Pharmacokinetics study of cis-diamminedichloroplatinum (II) (DDP) in the beagle dog: Thermodynamic and kinetic behavior of DDP in a biologic milieu. *Cancer Treatment Rep* 63: 59-71 1979.
- 10) Harland, S.J., Newell, D.R., et al.: Pharmacokinetics of cis-diammine-1, 1-cyclobutane dicarboxylate platinum (II) in patients with normal and impaired renal function. *Cancer Res* 44: 1693-1697 1984.
- 11) Douple, E.B., Totten, M.D., et al.: Platinum levels in murine tumor following intraperitoneal administration of cisplatin or paraplatin. *NCI Monogr* 6: 129-132 1988.
- 12) 粟津莊司: コンパートメントモデル. 粟津莊司, 小泉 保: 最新生物薬剤学. 南江堂, 東京, 1991, p213-225.
- 13) 杉山雄一, 澤田康文: 薬物体内動態のモデリングと解析法. 花野 学: ファーマコキネティクス—演習による理解—入門編. 南江堂, 東京,

- 1991, p113-164.
- 14) Mizuuchi, H., Aratani, Y., et al.: Antitumor effect of carboplatin combined with hyperthermia. *Igakunoayumi* 172: 249-250 1995.
- 15) Monge, O.R., Rofstad, E.K., et al.: Thermochemotherapy in vivo of a C3H mouse mammary carcinoma: Single fraction heat and drug treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol* 24: 1664-1669 1988.
- 16) 不破敬一郎: 溶媒抽出法. 不破敬一郎, 下村滋, 他: 最新原子吸光分析—原理と応用—I 総論. 広川書店, 東京, 1980, p250-282.
- 17) 狩野卓夫, 古賀成昌, 他: 温熱療法時の腫瘍内微小循環に関する基礎的検討—局所加温の血流量に及ぼす影響—癌と化学療法 11: 1877-1879 1984.
- 18) Reinhold, H.S. and Endrich, B.: Invited review Tumor microcirculation as a target for hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* 111-137 1986.
- 19) Ausmus, P.L., Wilke, A.V., et al.: Effects of hyperthermia on blood flow and *cis*-diamminedichloroplatinum (II) pharmacokinetics in murine mammary adenocarcinomas. *Cancer Res* 52: 4965-4968 1992.
- 20) 田中敬正: 温熱による腫瘍血流量の変化. 古賀成昌: 温熱による癌治療法. へるす出版, 東京, 1987, p79-92.
- 21) Braun, J. and Hahn, G.M.: Enhanced cell killing by bleomycin and 43 °C hyperthermia and the inhibition of recovery from potentially lethal damage. *Cancer Res* 35: 2921-2927 1975.
- 22) Tsumura, M., Yoshiga, K., et al.: Enhancement of antitumor effects of 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil combined with hyperthermia on Ehrlich ascites tumor in vivo and Nakahara-Fukuoka sarcoma cell in vitro. *Cancer Res* 48: 3977-3980 1988.
- 23) Miyahara, T., Ueda, K., et al.: Hyperthermic enhancement of cytotoxicity and increased uptake of *cis*-diamminedichloroplatinum (II) in cultured human esophageal cancer cells. *Jpn. J Cancer Res* 84: 336-340 1993.
- 24) Teicher, B.A., Herman, T.S., et al.: Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo. *Science* 247: 1457-1461 1990.
- 25) Lindegaard, J.c., Radacic, M., et al.: Cisplatin and hyperthermia treatment of a C3H mammary carcinoma in vivo Importance of sequence, interval, drug dose, and temperature. *Acta Oncologica* 31: 347-351 1992.
- 26) Ishikawa, T. and Ali-Osman, F.: Glutathione-associated *cis*-diamminedichloroplatinum (II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. *J Biol Chem* 268: 20116-20125 1993.
- 27) Willingham, M.C., Cornwell, M.M., et al.: Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrugresistant and -sensitive KB cells: Effects of verapamil and other drugs. *Cancer Res* 46: 5941-5946 1986.
- 28) Andrews, P.A., Mann, S.C., et al.: Role of the Na⁺, K⁺-adenosine triphosphate in the accumulation of *cis*-diamminedichloroplatinum (II) in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 51: 3677-3681 1991.
- 29) Schmidt, W. and Chaney, S.G.: Role of carrier ligand in platinum resistance of human carcinoma cell lines. *Cancer Res* 53: 799-805 1993.
- 30) 波多江正紀: シスプラチン耐性細胞における細胞膜とその修飾. 中村正徳: メビオ—癌の薬剤耐性—. メジカルビュー社, 東京, 1993, p87-94.
- 31) Chu, G.: Minireview Cellular responses to cisplatin. *J Biol Chem* 269: 787-790 1994.
- 32) Simon, S.M. and Schindler, M.: Review Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3497-3504 1994.
- 33) Scanlon, K.J., Safirstein, R.L., et al.: Inhibition of amino acid transport by *cis*-diamminedichloroplatinum (II) derivatives in L1210 murine leukemia cells. *Cancer Res* 43: 4211-4215 1983.
- 34) Kiang, J.G., WU, Y.Y., et al.: Heat treatment induces an increase in intracellular cyclic AMP content in human epidermoid A-431 cells. *Biochem. J* 276: 683-689 1991.