

エトポシドとシタラビン併用における抗腫瘍効果増強の機序に関する研究

大井一弥

The Mechanism of Synergistic Interaction between Etoposide and Cytarabine

Kazuya OOI

*Department of Pharmacy, Yokkaichi Social Insurance Hospital,
10-8 Hazuyama-cho, Yokkaichi, Mie 510-0016, Japan*

(Received March 28, 2002)

The sequence dependency of the antitumor effect of etoposide and cytarabine (ara-C) was investigated against the L1210 ascites tumor in BDF1 mice. Etoposide (7.5 mg/kg or 15 mg/kg) and ara-C (25 mg/kg or 500 mg/kg) were administered intraperitoneally on days 1, 4, and 7 after inoculation of L1210 cells with or without a time interval of 3 or 6 h. Simultaneous administration of etoposide and ara-C produced a 70% cure rate. At every dosage examined, pretreatment with etoposide given 6 h before ara-C was the most effective antitumor schedule in L1210 leukemia. At 1 h after injection of ara-C, 3 h and 6 h pretreatment with etoposide 15 mg/kg increased ara-C incorporation to more than 200% as compared with that of ara-C given alone. Simultaneous administration of etoposide, however, decreased ara-C incorporation to 33% of that of ara-C alone. Deoxycytidine kinase (dCK) is a rate-limiting enzyme for the activation of ara-C. We demonstrated that dCK activity was increased within 1 h after exposure to etoposide. Much more attention must be paid to the timing of the administration of etoposide in combination chemotherapy with etoposide and ara-C.

Key words—etoposide; ara-C; deoxycytidine kinase; sequential therapy

1. はじめに

白血病は全身的疾患として発症する癌であるため、外科的に腫瘍を切除するなどという局所的療法では治療できない。したがって、その治療は完全寛解を目標とし、次いで寛解維持療法を行って治癒を目指す化学療法が有効である。

白血病を含めた癌に対する抗腫瘍薬は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗腫瘍性抗生物質、植物アルカロイド、その他の抗癌物質に大別される。抗腫瘍薬による化学療法が導入された初期の治療法は、単一の薬剤による療法が主流であり、血中濃度を一定に維持するように投与することが目標であった。しかし、抗腫瘍薬の単剤投与では、投与量の増加に伴って正常細胞への毒性が増し、投与量に限界が生ずることから、2種以上の抗腫瘍薬による併用療法が試

された。これは、抗腫瘍薬の併用において作用機序の異なる一方の薬物に腫瘍細胞が抵抗性を示したとしても、他方の薬物には十分な感受性を持つのではないか、つまり腫瘍細胞の感受性がこの2つの薬物に対して同一でないという考えに基づいたものである。この併用療法は、1950年代後半に白血病に試みられ、のちに固形癌にも応用されるようになった。以後、抗腫瘍薬による化学療法は、相加若しくは相乗効果を期待した多剤併用が中心となり、現在に至っている。こうした背景から、白血病治療における多剤併用でも作用機序の異なる薬剤について、その有効性と毒性のバランスを詳細に検討し、複数の薬剤の組み合わせを選択するのが一般的となっている。シタラビン (ara-C) は以前から白血病治療に用いられてきた抗腫瘍薬である。一方、エトポシド (etoposide) はそれまで知られていた抗腫瘍薬とは異なる作用機序を有する新しい抗腫瘍薬として、本研究の開始時に、登場したものである。Etoposide と ara-C の併用は白血病における治療法として動物実験系で、1975年以降からその有効性

四日市社会保険病院薬剤部 (〒510-0016 四日市市羽津山町 10-8)

e-mail: ooi@mvc.biglobe.ne.jp

*本総説は、平成13年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

が検討されてきた。¹⁻³⁾しかし、これらの報告はそれぞれ単剤投与に対して、2剤同時投与の場合の抗腫瘍効果を評価しただけのものであり、また、併用の有効性に関しては、相反する結論を示すものであった。Etoposide と ara-C は共に DNA 合成阻害により細胞増殖を阻害するものとされているが、直接の作用点が異なるため、これらの薬剤の併用において時間差を設定することにより相乗的な効果を期待できる可能性がある。著者は、両薬剤の併用の有効性を動物実験において示し、その機序を解明して、両剤併用の臨床利用に対して理論的根拠を与えるために本研究に着手した。

本総説では、腹水系 L1210 担癌 BDF1 マウスを用いて etoposide と ara-C の投与量及び投与スケジュールと抗腫瘍効果との関係を説明し、次に、両薬剤の併用により増強される抗腫瘍効果の作用機序を解明し、最後に、白血病治療における etoposide 及び ara-C の時間差投与の有効性について述べることにする。

2. Etoposide 及び ara-C 単剤投与時と両薬剤併用時の投与スケジュールと抗腫瘍効果との関係⁴⁾

Etoposide はメギ科の多年草植物 *Podophyllum peltatum* の根茎から抽出した podophyllotoxin の半合成誘導体であり、本邦においては、治療薬として 1987 年 3 月に製造が許可された薬剤である。^{5,6)} その作用機序は topoisomerase II (topo II) の阻害を介した間接的な DNA 鎖切断の誘起である。⁷⁻¹¹⁾ Topo II は 2 量体酵素で DNA の 5'-末端に共有結合を生じ ATP 依存性に核内で DNA と結合し一過性の DNA 鎖切断を起こし、DNA 鎖のリンキング数を変化させ、DNA 構造を変えた後、切断された DNA を再結合することにより、その 3 次元構造に変化をもたらす。Etoposide は DNA 及び topo II との三者からなる cleavable complex をつくり、一過性に切断された DNA 鎖の再結合を阻害することにより、抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。一方、ara-C は 1959 年、Walwick らにより合成されたデオキシシチジン類似体であり、1963 年、臨床応用が開始され、他の抗癌剤との間に相乗的に抗腫瘍効果を増強するという従来の薬剤にない特性が見い出され、白血病に対しても効果が認められ現在に至っている。¹²⁾ さらに ara-C は ara-CTP への活性化と ara-U への不活性化の 2 つの経路で代謝され

る。¹³⁾ ara-CTP は DNA polymerase に対して dCTP (deoxycytidine triphosphate) と競合することによって DNA 合成を阻害する。¹⁴⁾ ara-CTP の一部は polymerase の作用により DNA 中に組み込まれ、その結果、DNA 鎖が不安定となり、DNA 鎖の複製が阻害される。¹⁵⁾ ara-C の DNA への組み込み量が多いほど殺細胞効果が強く、さらに、ara-C の DNA への組み込み量と抗腫瘍効果との間に相関性が見い出されているため、DNA への組み込みが ara-C の抗腫瘍作用には必須であると考えられている。¹⁶⁾

本研究では、まず、etoposide と ara-C との併用について、時間差投与の有効性を動物実験系で確立するために、L1210 細胞を移植した BDF1 マウスに etoposide と ara-C を単剤投与、同時投与、時間差投与を行い、抗腫瘍効果を比較した。薬剤投与量は etoposide 7.5 及び 15 mg/kg, ara-C 25 及び 500 mg/kg と設定した。これは、毒性を示さず最高の抗腫瘍効果を生む投与量が etoposide 単剤で 18 mg/kg, ara-C 単剤で 1200 mg/kg とする Rivera らの報告に基づいたものである。¹⁾ まず、薬剤を投与しない群 (コントロール群) のマウスの平均生存期間は 7.20 日であった。一方で、etoposide を 7.5 mg/kg 及び 15 mg/kg の用量で投与した群の平均生存期間はそれぞれ 17.50 日と 19.80 日であり薬用量の増加と共に延長された。ara-C 25 mg/kg 及び 500 mg/kg 投与群でも、マウスの生存期間は、それぞれ 13.55 日と 20.05 日に延長された。両薬剤共に単剤投与における腫瘍の治癒 (120 日以上生存) は認められなかった。

次に、同様の薬用量で両薬剤の併用実験を行った。なお etoposide の投与と ara-C との投与間隔は、ara-C に対して etoposide を 6 時間、3 時間前、同時投与及び 3 時間、6 時間後とした。その結果、両薬剤の併用により、担癌マウス延命及び治癒が認められ、その効果は極めて投与スケジュール依存的かつ投与量依存的であった (Fig. 1)。Etoposide と ara-C の同時投与では、ara-C 25 mg/kg のときは全く治癒が認められなかったが、ara-C 500 mg/kg の場合は、etoposide の用量に依存して高い治癒効果が認められ、etoposide との併用療法で ara-C の投与量を増すほど抗腫瘍効果が高まるとする Rivera らの報告と一致した。¹⁾ 両薬剤の投与に時間差を設

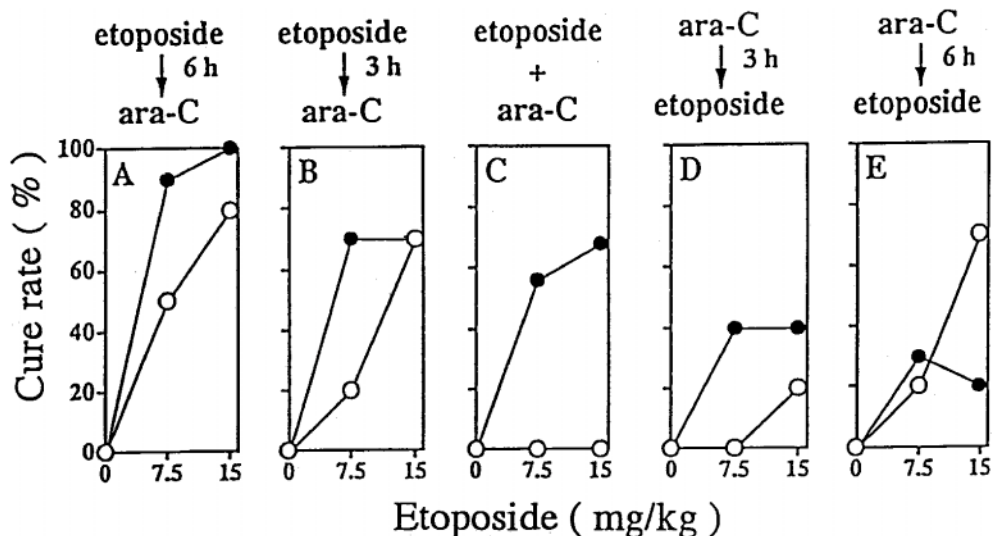


Fig. 1. Effect of Timing of Administration of Etoposide in Relationship to ara-C on Cure Rate
 Groups of 10 mice were inoculated intraperitoneally with 10^6 L1210 cells 24 h before treatment.
 ○: ara-C 25 mg/kg, ●: ara-C 500 mg/kg.

けた実験では、etoposideの先行投与で ara-Cの投与量に関係なく、高い治癒率が認められた。特に、ara-C 500 mg/kg, etoposide 15 mg/kgの組み合わせにおける etoposide 6時間先行投与では、100%の治癒となった。一方、ara-C先行投与群では、ara-Cの投与量が少ないとき (25 mg/kg) は、時間差を延ばすと治癒率が高まり、ara-Cの投与量が多い場合 (500 mg/kg) は、時間差の延長が治癒率を低下させる傾向が見られた。なお、いずれの実験群においてもマウスの体重の有意な変化は見られなかった。

3. Etoposide 単独投与時の DNA 鎖切断と修復¹⁷⁾

Etoposide は topo II の阻害を介した間接的な DNA 鎖切断を誘起すると考えられているので、⁷⁻¹¹⁾ etoposide 先行投与において最も抗腫瘍効果が高まるという機序解明の一端として、etoposide 投与後の DNA 鎖の状態と ara-C の投与時期との関係を知る必要がある。そこで、この機構を明確にするために、etoposide 15 mg/kg 単独投与後の DNA 鎖の切断から修復に至る変化を検討した。

Etoposide の DNA 鎖に対する影響はアルカリシヨ糖密度勾配遠心法で分析し、その結果を Fig. 2 に示した。薬剤無処理での L1210 細胞では、DNA 鎖はフラクション 8 に一峰性のピークとして分画されるのに対して、etoposide 投与後 10 分では、ピー

クは最上層のフラクション 25 に認められ既に DNA 鎖の切断が起きていることが明らかとなった。投与後 1 時間では、フラクション 20 になだらかなピークを認め、時間の経過と共に修復されることがわかった。投与後 3 時間を経過すると、ピークはフラクション 14 に移動した。投与後 6 時間ではフラクション 10 の主ピークとフラクション 16 の複ピークが認められ、主ピークの溶出位置から判断すると、DNA 鎖の状態はほぼ正常に回復したと考えられる。これらの結果は、Robert らが検討した etoposide の誘導体である teniposide での DNA 鎖の切断から修復に至る経過とほぼ一致した。¹⁸⁾ このように、etoposide 投与後 3-6 時間は切断された DNA 鎖はまさに修復過程にあり、この修復期に ara-C を作用させれば、ara-C の効果を有効に引き出せる可能性がある。

4. Etoposide 投与による細胞周期の変動とリボヌクレオチドプール及びデオキシリボヌクレオチドプールへの影響^{17,19)}

抗腫瘍薬には、細胞周期に特異的なものと非特異的なものがあり、その特異的な薬剤の投与によって細胞周期の遅延やブロックが引き起こされる。ara-C は細胞周期に特異的な薬剤で、S 期の細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが知られている。²⁰⁻²²⁾ したがって、ara-C を多剤投与の併用薬として用いる

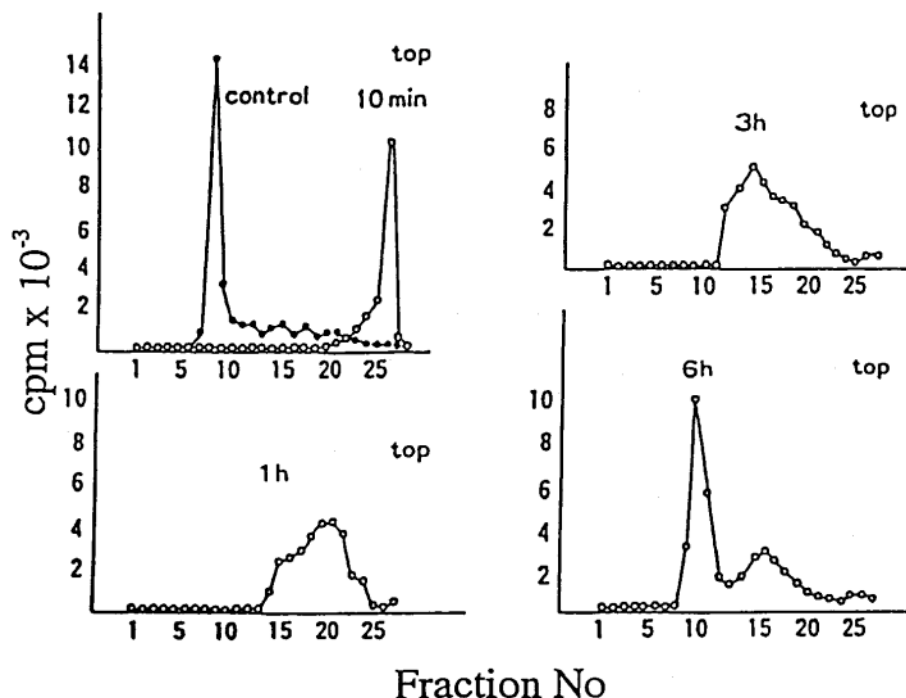


Fig. 2. Sedimentation of DNA from L1210 Cells at 10 min, 1, 3 and 6 h after Administration of 15 mg/kg of Etoposide

場合、その投与時期における細胞周期の動態を把握することは、ara-Cの効果を有効に引き出すためには必須である。本項ではL1210細胞を移植後3日経過したBDF1マウスにetoposide 15 mg/kgを腹腔内投与し、細胞を3, 6, 10時間後に採取して細胞周期の変動とヌクレオチドプールの変動を解析した。細胞のDNAを蛍光染色した後、各細胞の蛍光強度をフローサイトメーターを用いて測定し、細胞周期を解析した。G1期の画分はヒストグラムの立ち上がりピークの面積、G2M期の画分はヒストグラムの第二ピーク及びピークに至る面積及びその間の面積をDNAを合成する細胞群であるS期の画分とした。Etoposide投与後3時間ではS期全体がコントロールの45.6%から59.8%に増加した。投与後6時間までは、mid S期からlate S期が上昇しS期が61.3%に達した。また、G2⁺M期も30.5%と増加が認められた。投与後10時間では、細胞の蓄積はG2⁺M期に至り、S期は逆に31.3%に減少した。¹⁹⁾

次に、細胞のリボヌクレオチドプール及びデオキシリボヌクレオチドプールに対するetoposideの影響について、細胞内リボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドを高速液体クロマトグラフィー法

により測定することで検討した。腫瘍細胞内のcytidine triphosphate (CTP)あるいはuridine triphosphate (UTP)濃度は、etoposide投与後1時間ではコントロールとほとんど変化はなかったが、投与後3時間ではコントロールに比してこれらは共に1.4倍に増加した。Adenosine triphosphate (ATP)は、投与後1時間で1.5倍に増加し、6時間では2倍に増加した。Guanosine triphosphate (GTP)は、投与後時間の経過と共に増加した。一方、etoposide投与後の腫瘍細胞内のデオキシリボヌクレオチドプールは、リボヌクレオチドプールと同様に時間の経過と共に増加した。dCTPは、投与後1時間でコントロールに比して1.5倍に増加し、6時間で2倍となった。dATPは投与後1時間で2倍に増加し、さらに、6時間では3倍に増加した。dTTPとdGTPは、投与後1時間で各々2.2倍と1.8倍に増加し、その状態が6時間まで続いた。

本項で検討したetoposideの細胞周期への影響をみると、etoposide投与後3時間では、S期が59.8%、6時間ではmid Sからlate S期が上昇し61.3%に達した。この現象は、etoposide投与により間接的なDNA鎖の切断が起こったことで、通常のDNA鎖の分裂、複製というサイクルが遅延し、そ

のため S 期の通過時間が長くなり、結果として S 期全体の割合が増加したことを示すものである。さらに、etoposide 投与後 10 時間では S 期が減少し、G2+M 期が増加したが、これはヒトリンパ芽球性白血病で検討された場合と同様の傾向である。さらにこの時期に DNA 合成は低下しており、etoposide 投与で観察された全ヌクレオチドプールの上昇は DNA 合成抑制などによるデオキシリボヌクレオチドの利用障害が原因であると考えられる。Etoposide 投与後 3—6 時間に S 期の細胞が増加するが、この期間に ara-C を投与すると、ara-C の S 期特異的である特性を最大限に引き出すことが可能となり、両薬剤併用において抗腫瘍効果が高まる現象の説明が可能となった。

5. Etoposide 投与による ara-C 膜輸送と細胞内蓄積への影響^{23,24)}

Etoposide は同時に処理した ara-C の P388 細胞への influx を抑制したが、この作用は可逆的であり、すみやかに解除されるものであった。また、ara-C の influx は高濃度の etoposide で完全に抑制されることはなく、etoposide に対する非感受性経路の存在が明らかとなった。さらに、etoposide は ara-C の細胞内蓄積も抑制したが、IC₅₀ 値で比較すると、influx 抑制よりも、はるかに高い濃度を要した。この傾向は、マウス白血病 L1210 細胞をはじめとするほとんどの樹立白血病細胞株でみられた。また、etoposide は ara-C の efflux も抑制した。これは、抗腫瘍薬が ara-C の efflux を抑制することをはじめて明らかにしたものであるが、etoposide が ara-C の efflux をコントロールし細胞内含有量を高めることは ara-C の抗腫瘍効果を高めるうえで有利な性質であると思われる。

さらに、etoposide と ara-C の同時投与では ara-C influx が共存する etoposide によって抑制されるが、etoposide 先行投与では、ara-C 投与時に etoposide の薬剤濃度が生理的なクリアランスにより低下しているため、²⁵⁾ ara-C の influx は抑制されず、ara-C の殺細胞効果が効率よく発揮されるものと推察される。

6. Etoposide の投与タイミングによる ara-C の DNA への組み込み量の変化²⁶⁾

Etoposide 投与後 3—6 時間に間接的に切断された DNA 鎖が修復に至り、この時期に S 期細胞が著

明に増加するため、etoposide 先行投与で S 期特異的である ara-C の殺細胞効果がより有効に引き出されている可能性が明らかとなった。さらに、etoposide は ara-C の influx を抑制するため、両薬剤が細胞に対して共存する同時投与では抗腫瘍効果の増強がみられず、ara-C 投与時には既に etoposide の薬剤濃度が低下している etoposide 先行投与により高い殺細胞効果が期待できる。これらの可能性を実験的な事実をもって明確にするには、etoposide の先行投与が、ara-C の DNA への組み込みを増加させているか否かについて検討を加える必要がある。

まず、L1210 細胞担癌 BDF1 マウスに対する etoposide と ara-C の投与スケジュールが L1210 細胞の酸可溶性画分と酸不溶性画分へ取り込まれる [³H] ara-C 量にどのように影響するかを検討した。Etoposide と [³H] ara-C 同時投与では、酸可溶性画分及び酸不溶性画分に取り込まれる放射活性が共に ara-C 単独投与に比して減少し、総取り込み量も 41% に減少した。一方、etoposide 3 時間先行投与での酸不溶性画分に存在する放射活性は 110% の増加が認められ、酸可溶性画分の放射活性は ara-C 単独投与に比して 30% 減少し、総取り込み量の増加は 25% にとどまった (Fig. 3)。この結果は、etoposide 先行投与が ara-C の DNA への組み込み量を著しく増加させることを示している。

次に、etoposide 及び ara-C の投与スケジュールによる DNA への [³H] ara-C 組み込み量への影響を検討したところ、etoposide と ara-C の同時投与 1 時間後では、ara-C 単独投与に比して、[³H] ara-C の DNA への組み込み量は減少した。さらに、同時投与の場合には、DNA への組み込みがプラトーに到達するのに要する時間が ara-C 単独投与よりもかなり長い。このことは、etoposide が ara-C の influx を抑制するという *in vitro* で観察された現象が *in vivo* でも実際に生じている可能性を示唆するものと考えられる。一方、etoposide 3 時間先行投与群での ara-C の組み込み量は、ara-C 単独投与に比して約 2 倍の増加が認められた (Fig. 4)。これらの結果は、ara-C の DNA への組み込み量への etoposide の影響は極めて投与スケジュールに依存的事実であることを確認するものである。

さらに、ara-C 投与後 1 時間での [³H] ara-C の DNA への組み込み量に対する ara-C と etoposide

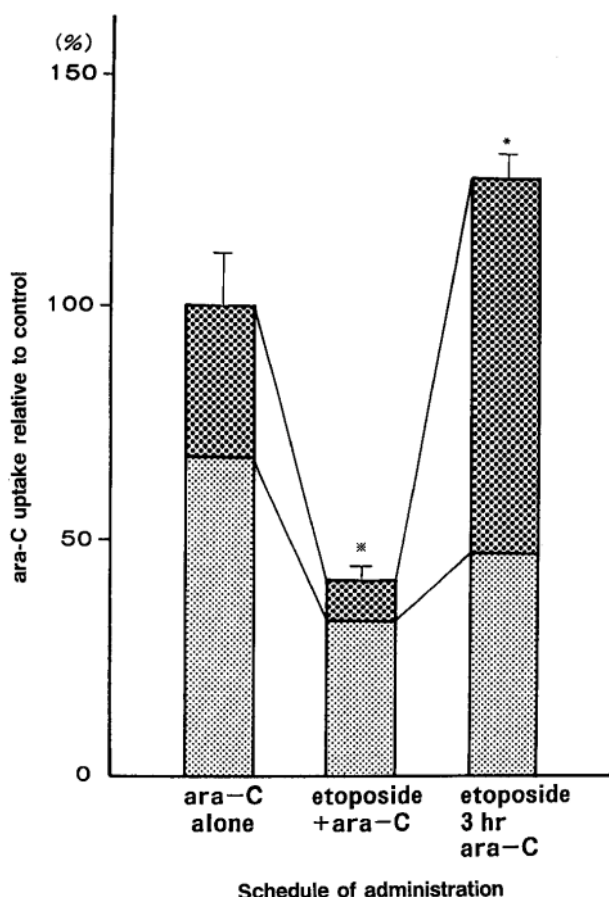


Fig. 3. Effect of Etoposide on ara-C Metabolism

On day 3 after tumor inoculation, 15 mg/kg of etoposide was injected intraperitoneally either simultaneously or 3 hr before treatment with ara-C.

All values show the means \pm SD. ara-C in acid-soluble fraction, ara-C in acid-insoluble fraction, * $p < 0.05$, compared with ara-C alone, ** $p < 0.01$, compared with ara-C alone.

の投与間隔及び etoposide の投与量の影響について検討した。Etoposide 1 時間先行投与では ara-C の DNA への組み込み量に、ara-C 単独投与との間に差異はないが、etoposide 3 及び 6 時間先行投与では組み込み量が約 2 倍に増加した。Etoposide 3 時間先行投与で、投与量を 1, 5 及び 15 mg/kg と変化させたところ、etoposide 1 mg/kg によって DNA への $[^3\text{H}]$ ara-C の組み込み量は、ara-C 単独投与に比し約 80% 増加し、etoposide 5 及び 15 mg/kg でもほぼ同じ組み込みがみられた。

ara-C 単剤投与では、能動的膜輸送により細胞内に取り込まれリン酸化を受けて ara-CTP となり DNA に組み込まれる。Etoposide と ara-C 併用において etoposide の投与スケジュールを変えると、ara-C の代謝や ara-C の DNA への組み込み量に変

化が見られた。まず、etoposide と ara-C を同時に投与した場合は、ara-C の代謝産物を示す酸可溶性画分及び DNA への組み込みを示す酸不溶性画分共に ara-C 単剤投与より減少し、取り込み速度の低下も示唆された。これは、同時に処理した etoposide が ara-C の influx を抑制したことが、影響しているものと考えられた。一方、etoposide 先行投与後 3 時間では、ara-C 単独投与に比して酸可溶性画分は減少したが、酸不溶性画分へは 110% の増加が認められた。このことは、ara-CTP の DNA への組み込みの効率が良いことを示しており、すでに示した etoposide 投与後 3—6 時間は DNA 鎖の修復過程にあることや、S 期細胞数が著明に増加することを合わせて考慮すると、この時期は ara-C の薬剤受巧期であると考えられた。さらに、etoposide 先行投与による ara-C の DNA への組み込みは、etoposide の投与量にあまり影響を受けずに増加することが明らかとなった。

7. Etoposide 投与による ara-C 代謝の律速酵素である Deoxycytidine Kinase への影響²⁷⁾

Deoxycytidine kinase (dCK) はピリミジン合成系のサルベージ経路を担い、デオキシシチジンやその誘導体をリン酸化する酵素である。^{28,29)} ara-C は、抗腫瘍効果を発揮する上で、リン酸化されて ara-CTP にならなければならない。³⁰⁾ ara-C のリン酸化においては ara-C から ara-CMP へのリン酸化が律速段階であり、³¹⁾ dCK はこの過程を担う酵素である。dCK 活性の低下が ara-C 耐性化の 1 つの機構として知られており、²³⁾ ara-C の抗腫瘍効果の発現は dCK によるリン酸化に大きく依存していると考えられている。本項では、etoposide 先行投与における DNA への ara-C の組み込み亢進は、etoposide が dCK 活性を変化させた結果生じたものか否かについて検討した。L1210 細胞を etoposide 1—100 μM 存在下で 1 時間培養し、無細胞系で dCK 活性を測定することによって、L1210 細胞の dCK 活性に及ぼす etoposide の影響を検討した (Fig. 5)。Etoposide の濃度に依存して dCK 活性は上昇し、100 μM の処理によってコントロールの 216% に達した。

次に、etoposide 1 又は 10 μM の存在下での dCK 活性の経時的変動を検討した (Fig. 6)。処理後 20 分において、dCK 活性は etoposide 1 μM では処理

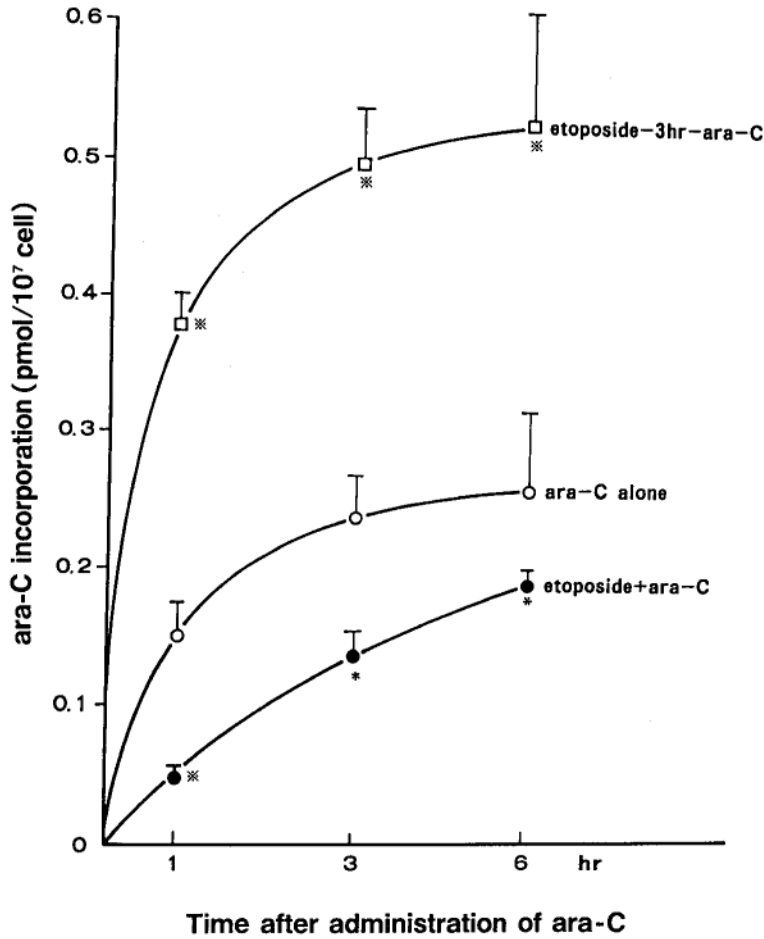


Fig. 4. Effect of Pretreatment of Etoposide on ara-C Incorporation into DNA

On day 3 after intraperitoneal inoculation of 1×10^6 L1210 cells, $1 \mu\text{Ci}$ of $[^3\text{H}]$ ara-C and 15 mg/kg of etoposide was injected intraperitoneally. Incorporation of ara-C was quantified by determining the radioactivity from $[^3\text{H}]$ ara-C incorporated into acid-insoluble fraction of 1×10^7 cells.

All values show the means \pm SD. * $p < 0.05$, compared with ara-C alone, ** $p < 0.01$, compared with ara-C alone.

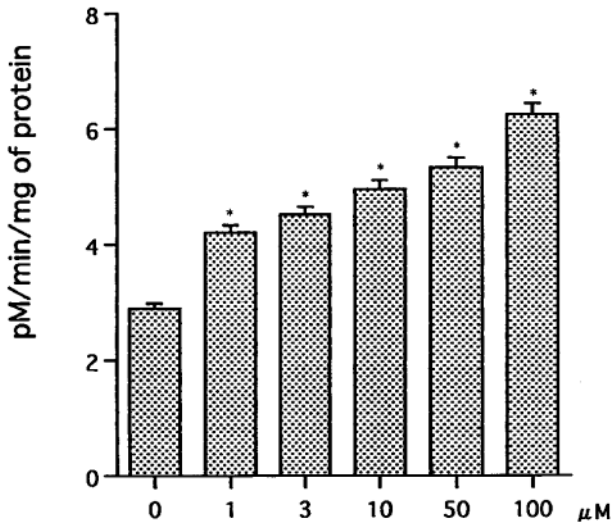


Fig. 5. Effect of Etoposide on dCK Activity in L1210 Cells

L1210 cells were incubated with etoposide for 1 hr. All values show the means \pm SD. * $p < 0.01$ as compared with control treated group.

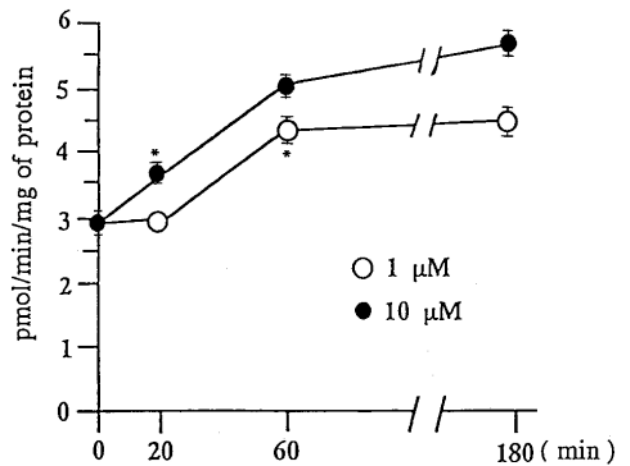


Fig. 6. Effect of Continuous Incubation of Etoposide on dCK Activity in L1210 Cells

L1210 cells were incubated with etoposide for 20, 60 or 180 min. All values show the means \pm SD. * $p < 0.01$ as compared with control treated group.

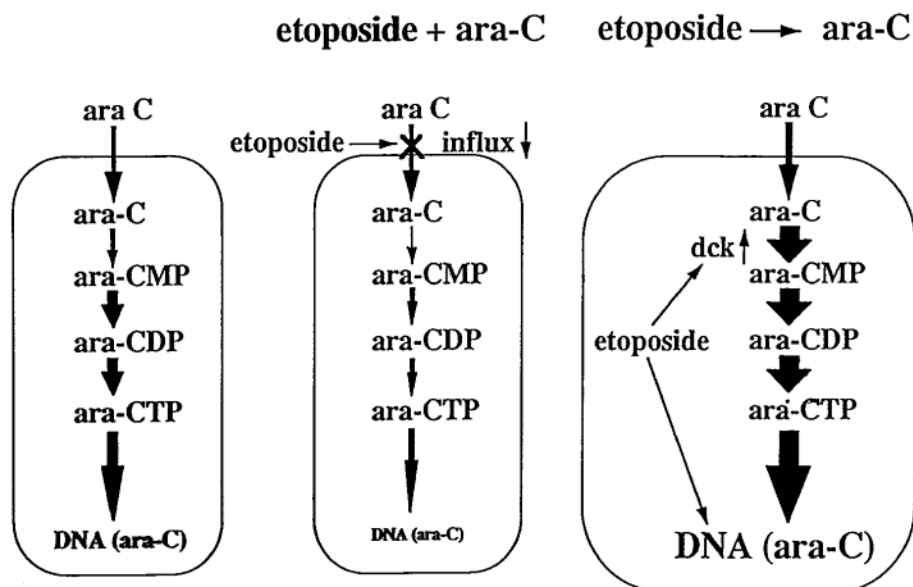


Fig. 7. The Timing of the Administration of Etoposide in the Combination Chemotherapy of Etoposide and ara-C

前のものほとんど変わらなかったが、 $10\ \mu\text{M}$ では125%に上昇した。1時間後では etoposide $1\ \mu\text{M}$ 及び $10\ \mu\text{M}$ のいずれでも dCK 活性が濃度依存的に上昇し、この上昇した活性は少なくとも3時間まで持続した。

本項での検討によって、dCK 活性は etoposide 処理後20分で既に、上昇することが明らかとなった。また、この効果は濃度依存的であり、 $1\ \mu\text{M}$ の etoposide でも dCK 活性の上昇が認められた。さらに、dCK 活性の上昇は20分後で認められてから少なくとも3時間まで持続した。これらのことから etoposide 投与後の dCK 活性の上昇は、etoposide 先行投与による ara-C の DNA への組み込み増加の主要因の1つであると考えられる。このように抗腫瘍薬が他の抗腫瘍薬の代謝に関与する酵素活性に影響を及ぼす例はそれほど多く知られているわけではない。特に、本項で明らかにした etoposide が ara-C 代謝の律速酵素である dCK の活性を上昇させることによって ara-C の DNA への組み込みを促進したという発見は、抗腫瘍薬併用による効果増強の機序を解明する上で重要な新知見であると考えられる。

8. 総括

本研究では、マウス白血病 L1210 細胞を取り上げ、これに対する etoposide と ara-C 併用時の抗腫

瘍効果と投与スケジュールとの関係を明らかにし、その作用機序の解明を試み、以下のような結果を得た。

- 1) Etoposide と ara-C 併用時の抗腫瘍効果は、極めて投与スケジュールに依存的であり、検討した投与条件の中では、etoposide 6時間先行投与の治療率が最も高く、画期的な治療効果が得られた。
- 2) Etoposide 投与後3—6時間はDNA鎖の修復過程であり、S期細胞も著明に上昇した。
- 3) Etoposide は同時に処理した ara-C の細胞内への influx を抑制したが、その効果は洗浄により解除された。
- 4) Etoposide 先行投与後の ara-C の DNA への組み込み量は、ara-C 単剤投与より著明に増加した。
- 6) Etoposide 投与後、ara-C 代謝の律速酵素である dCK の酵素活性が濃度依存的に上昇した。

癌化学併用療法の研究領域では、いかなる組み合わせで最高の治療効果を示すかに関して、動物実験で確認され、臨床応用されることが切望されている。しかし、ほとんどの癌化学療法の場合、治療域と毒性域は隣接し、投与量を増すと強い毒性が出現し、毒性の軽減のために投与量を下げると十分な効果が得られていない。本研究で見出した投与スケジュールにおいて、毒性が全くみられなかったことは強調すべき点である。

本研究で明らかになった結果から得られた考察をもとに、両薬剤併用時の作用機序を ara-C 単剤投与、etoposide と ara-C 同時投与、etoposide 先行投与後 ara-C 投与の 3 つの投与方法についてまとめると以下のようなになる (Fig. 7).

まず、単剤投与では、ara-C は能動的膜輸送により細胞内に取り込まれて ara-CTP となり一部が DNA に組み込まれて抗腫瘍効果を発揮する。次いで、etoposide を同時に投与する方法は、臨床で最もよくみられる。Etoposide は細胞外から作用して ara-C の influx を抑制するため、細胞内の ara-C 量は低下する。Etoposide の投与により発現する薬効は、ara-C 投与に対してより有利な性質を有しているが、同時投与では ara-C が influx されないという決定的な欠点が生じ、併用による効果増強に及ばないと考えられる。この効果は、ara-C 量が少ない場合により著明である。Etoposide 先行投与の場合は、その薬効が ara-C 投与までの期間に細胞内で ara-C が有効に作用できるような状況が作られる。つまり、切断された DNA 鎖は修復過程にあり、S 期細胞が特異的に上昇し、さらに、ara-C 代謝の律速酵素である dCK 活性が上昇している。また、etoposide による ara-C influx の抑制が解除されているため、ara-C は迅速に細胞内に取り込まれる。このことから、ara-C が抗腫瘍効果を発揮するために好条件となっており、両薬剤併用において抗腫瘍効果が増強するものと考えられた。臨床では、多剤併用イコール同時投与という考え方が根ざし、併用効果が見られない場合、それに追加投与されるのが一般的である。

本研究において、etoposide と ara-C 同時投与では、併用効果が ara-C の薬用量に依存するという観点からみると、臨床においてこの治療法は、不確実な治療効果しか望めない。そこに時間差を設けて投与を行った結果、劇的な治療効果を生みだした。本研究で得られた成果は、臨床の常識に一考をもたらし、白血病に対する治療に科学的な根拠を与えたものであると考えている。これらの研究成果は、etoposide 先行投与のプロトコール化として、臨床の場で活かされている。

謝辞 本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました三重大学医学部小児科学講座櫻井實教授

(現 鈴鹿回生総合病院顧問) に深謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始有益な御指導と御助言を賜りました三重大学医学部小児科学講座 大久保俊樹博士 (現 大久保クリニック院長) に深謝致します。また、本研究を行いかつ論文の完成に至るまで終始御指導を賜りました城西大学薬学部森本雅憲教授、城西大学薬学部川嶋洋一教授、城西大学薬学部白幡晶教授、三重大学医学部附属病院薬剤部小島康生教授に深謝致します。

さらに、本論文の作成に対し御協力を頂きました城西大学薬学部沼尻幸彦博士、城西大学薬学部上田秀雄博士及び教室員の諸氏、また発表の機会を与えて下さいました四日市社会保険病院の諸氏に感謝致します。

REFERENCES

- 1) Rivera G., Avery T., Roberts D., *Eur. J. Cancer*, **11**, 639-647 (1975).
- 2) Dombernowsky P., Nissen N. I., *Eur. J. Cancer*, **12**, 181-188 (1976).
- 3) Koza I., Balazova E., Ujhazy V., *Neoplasma*, **27**, 691-696 (1980).
- 4) Ooi K., Ohkubo T., Kawasaki H., Sakurai M., *Yakugaku Zasshi*, **109**, 865-868 (1989).
- 5) Issell B. F., Crooke S. T., *Cancer Treatment Reviews*, **6**, 107-124 (1979).
- 6) Schmoll H., *Cancer Treatment Reviews*, **9**, 21-30 (1982).
- 7) Wozniak A. J., Ross W. E., *Cancer Res.*, **43**, 120-124 (1983).
- 8) Long B. H., Musial S. T., Brattain M. G., *Biochemistry*, **23**, 1183-1188 (1984).
- 9) Ross W., Rowe T., Glisson B., Yalowich J., Liu L., *Cancer Res.*, **44**, 5857-5860 (1984).
- 10) Long B. H., Musial S. T., Brattain M. G., *Cancer Res.*, **45**, 3106-3112 (1985).
- 11) Pommier Y., Schwartz R. E., Zwelling L. A., Kerrigan D., Mattern M. R., Charcosset J. Y., Jacquemin-Sabion A., Kohn K. W., *Cancer Res.*, **46**, 611-616 (1986).
- 12) Evan J. S., Musser E. A., Bostwick L., Mengel G. D., *Cancer Res.*, **24**, 1285-1293 (1964).
- 13) Finklestein J. Z., Scher J., Karon M., *Cancer Chemotherapy*, **54**, 35-39 (1970).
- 14) Furth J. J., Cohen S. S., *Cancer Res.*, **28**, 2061

- 2067 (1968).
- 15) Major P. P., Egan E. M., Herrick D. J., Kufe D. W., *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 2937–2940 (1982).
 - 16) Kufe D., Spriggs D., Egan E. M., Munroe D., *Blood*, **64**, 54–58 (1984).
 - 17) Ooi K., Ohkubo T., Kawasaki H., Sakurai M., *Yakugaku Zasshi*, **110**, 673–677 (1990).
 - 18) Roberts D., Hilliard S., Peck C., *Cancer Res.*, **40**, 4225–4231 (1980).
 - 19) Ooi K., Ohkubo T., Taniguchi K., Higashigawa M., Kawasaki H., Sakurai M., Hamazaki Y., *Jpn. J. Hosp. Pharm.*, **22**, 142–144 (1996).
 - 20) Karon M., Shirakawa S., *Cancer Res.*, **29**, 687–696 (1969).
 - 21) Bhuyan B. K., Fraser T. J., Gray L. G., Kuentzel S. L., Neil G. L., *Cancer Res.*, **33**, 888–894 (1973).
 - 22) Fietkau R., Friede H., Maurer-Schultze B., *Cancer Res.*, **44**, 1105–1113 (1984).
 - 23) Ooi K., Ohkubo T., Kuwabara H., Higashigawa M., Sakurai M., *Yakugaku Zasshi*, **112**, 832–836 (1992).
 - 24) Ooi K., Ohkubo T., Higashigawa M., Kawasaki H., Sakurai M., *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **27**, 569–573 (1996).
 - 25) Wiley J. S., Jones S. P., Sawyer W. H., *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **19**, 1067–1074 (1983).
 - 26) Ooi K., Ohkubo T., Kuwabara H., Higashigawa M., Kawasaki H., Kakitoh H., Kagawa Y., Inagaki S., Sumida K., Sakurai M., *Cancer Invest.*, **11**, 388–392 (1993).
 - 27) Ooi K., Ohkubo T., Kuwabara H., Higashigawa M., Kawasaki H., Sakurai M., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1382–1383 (1996).
 - 28) Momparler R. L., Fischer G. A., *J. Biol. Chem.*, **243**, 4298–4304 (1968).
 - 29) Durham J. P., Ives D. H., *J. Biol. Chem.*, **245**, 2276–2284 (1970).
 - 30) Kufe D. W., Major P. P., Egan E. M., Beardsley G. P., *J. Biol. Chem.*, **255**, 8997–9000 (1980).
 - 31) Wang L. M., Kucera G. L., Capizzi R.L., *Biochim. Biophys. Acta*, **1202**, 309–316 (1993).