

原 著

卵巣明細胞腺癌培養細胞株に対する塩酸イリノテカン (CPT-11) および他剤との併用による抗腫瘍効果についての検討

東京女子医科大学 産婦人科学教室 (主任: 武田佳彦教授)

石 巻 静 代

(受付 平成9年8月2日)

Growth-Inhibitory Effect of CPT-11 in Combination with Other Anti-Cancer Agents Against Ovarian Clear Cell Carcinoma *in vitro*

Shizuyo ISHIMAKI

Department of Obstetrics and Gynecology (Director: Prof. Yoshihiko TAKEDA)
Tokyo Women's Medical College

In this study, the antitumor efficacy of CPT-11 (7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin) was evaluated, using two kinds of ovarian clear cell carcinoma cell line, RMG-II and OVAS-21.

The growth-inhibition test by sulforhodamine B (SRB) assay was performed using CPT-11, SN-38 (active substance of CPT-11 *in vivo*), CDDP, ADM, MMC and VP-16. The growth-inhibitory effect of SN-38 combined with CDDP, ADM or MMC was evaluated by isobologram. Then the effect of SN-38/CDDP on cell cycle was analyzed by flow cytometry. In addition, the cytotoxic activity was analyzed by colony-forming assay.

Since SN-38 revealed the lowest GI_{50} value among the anti-cancer agents tested in this study, SN-38 was presumed to possess the strongest growth-inhibitory effect. Isobologram analysis indicated additive interaction of SN-38 in combination with CDDP and either of the other drugs for two cell lines. SN-38 mainly contributed to the inhibitory effect of DNA synthesis and cell cycle progression. On the other hand, CDDP contributed to the cytotoxic effect. These two drugs may act on different points in cell kinetics, therefore may have showed the additive effect in isobologram analysis.

The present study suggests that combination therapy with CPT-11 and CDDP is potentially useful in the treatment of ovarian clear cell carcinoma.

緒 言

卵巣癌は、化学療法が有効な癌種の一つとされ、近年シスプラチンを中心とした多剤併用療法により、その予後は改善されてきた^{1)~4)}。しかし多彩な組織型を示す卵巣癌の中で、明細胞腺癌 (clear cell carcinoma) は化学療法に対する感受性が低く、他の組織型に比較し予後が不良であることが指摘され^{3)~5)}、それに対する有効な化学療法の開

発およびその薬剤耐性の機序の解明が待たれるところである。

近年開発された塩酸イリノテカン⁶⁾⁷⁾ (CPT-11; 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin) は消化器癌⁸⁾⁹⁾や女性性器癌 (特に卵巣癌)¹⁰⁾を中心に新しい併用療法の一翼を担うものとして臨床的検討が進められている。中でも既存の化学療法に感受性が低いとされ

る卵巣明細胞腺癌に対する有効例も報告され¹⁰⁾¹¹⁾, その抗腫瘍効果が期待されている。しかし, 卵巣明細胞腺癌細胞株を用いた CPT-11 の薬剤感受性や他の薬剤との併用効果についての基礎的研究は少ない。

そこで今回, 卵巣明細胞腺癌培養細胞株を用い, CPT-11 を中心とした抗癌剤感受性試験および他剤との併用効果を検討し, またその作用機構をフローサイトメトリーを用いて細胞動態学的に検討した。

方 法

1. 細胞株

細胞株は卵巣明細胞腺癌由来培養細胞株 OVAS-21¹²⁾, および RMG-II¹³⁾ を用いた。OVAS-21 は北里大学蔵本博行博士, RMG-II は慶応大学野澤志朗博士のご好意により提供して頂いた。細胞は 10% ウシ胎仔血清を含む Dulbecco's modified Eagle medium により 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。

2. 細胞増殖阻害試験

各薬剤の増殖阻害試験は sulforhodamine B (SRB) アッセイ¹⁴⁾¹⁵⁾により行った。

対数増殖期にある各細胞を OVAS-21 は 1,200 cells/100 μ l/well, RMG-II は 5,000 cells/100 μ l/well ずつ 96well マイクロプレートに植え込み 24 時間培養後 (Day 1), 6 種類の抗癌剤, すなわち, ① CPT-11, ② CPT-11 の生体内活性化体である SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin, ヤクルト中央研究所より提供), ③ cisplatin (CDDP, 日本化薬), ④ doxorubicin hydrochloride (ADM, 協和醗酵), ⑤ mitomycin C (MMC, 協和醗酵), ⑥ etoposide (VP-16, 日本化薬) を含む培養液を加え 96 時間培養した。次に 50% trichloroacetic acid (TCA) で細胞を固定し, 0.4% SRB/1% 酢酸溶液で細胞を染色後, 1% 酢酸溶液で十分洗浄し, 10mM Tris 塩基溶液で SRB を溶解後, 525nm における吸光度 (OD) を測定した。

増殖阻害率 (GI) は薬剤未処理の Day 5 における OD をコントロールとし, 薬剤投与時 (Day 1) の OD を差し引いて真の増殖阻害率を求めた。50% 増殖阻害濃度 (GI₅₀) は濃度-増殖阻害曲線よ

り算出した。

3. 薬剤併用増殖阻害効果

SN-38 と CDDP, MMC および ADM との併用による増殖阻害効果を isobologram を用いて解析した。

2 \times 10⁴個の各細胞を直径 3cm のプラスチックシャーレに植え込み, 24 時間培養後, 至適濃度に希釈した SN-38 (OVAS-21 では 0, 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05ng/ml, RMG-II では 0, 0.6, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3, 0.36, 0.42ng/ml) と CDDP (OVAS-21 では 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 ng/ml, RMG-II では 0, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280ng/ml), SN-38 と ADM (OVAS-21 では 0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5, 9.0, 10.5ng/ml, RMG-II では 0, 1.2, 2.4, 3.6, 4.8, 6.0, 7.2, 8.4ng/ml) および SN-38 と MMC (OVAS-21 では 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5ng/ml, RMG-II では 0, 1.8, 3.6, 5.4, 7.2, 9.0, 10.8, 12.6ng/ml) を同時に投与し, 96 時間培養した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後 0.25% トリプシン EDTA で細胞を浮遊させ coulter counter で細胞数を計算した。

単剤投与時の濃度-増殖率曲線より 50% 増殖阻害濃度 (GI₅₀) を基準として加納ら¹⁶⁾の方法により isobologram を作製し, その併用効果を判定した。すなわち SN-38 のある濃度 (A1) において, GI₅₀ を得るのに必要な残りの増殖阻害効果を併用薬剤が独立して担うと考えた場合の濃度 (B1) より mode I を, 等付加的に担うと考えた場合の濃度 (B2) より mode IIa を, さらに併用薬剤側より同様に mode IIb を求め, isobologram を作製し, 併用時のデータポイントが mode I と mode II に囲まれた部分 (envelope of additivity) にある場合を相加効果 (additive), envelope of additivity の左下にある場合を相乗効果 (supra-additive) とし, envelope of additivity の右上にある場合を拮抗作用 (sub-additive および protection) とした。

さらに OVAS-21 株においては SN-38 と CDDP の同時投与以外に, SN-38 投与 24 時間後の CDDP 投与および CDDP 投与 24 時間後の SN-38 投与による時間差投与についても併用効果を検討した。

4. 細胞周期進行阻害効果

SN-38とCDDPの併用投与が細胞周期進行に与える影響について、propidium iodide (PI, SIGMA Chemical) および anti-bromodeoxyuridine (BrdU) -fluorescein isothiocyanate (FITC, Becton Deckinson Monoclonal Center, Inc)による二重染色法でフローサイトメトリーを用いて解析した¹⁷⁾.

1×10^5 個の細胞を直径6cmのプラスチックシャーレに植え込み48時間培養し、対数増殖期の細胞 3×10^5 個/シャーレを得た。これに両薬剤の48時間単剤処理でほぼ100%の増殖阻害効果を示す濃度(SN-38はOVAS-21で180ng/ml, RMG-IIで100ng/ml, CDDPはOVAS-21で1,000ng/ml, RMG-IIで5,500ng/ml)を基準に、6種類の濃度の組み合わせを設定し(表1), 両薬剤の混合培養液で培養, 12時間ごとに48時間まで経時的にサンプリングした。

サンプリングは以下のように行った。10 μ MになるようにBrdUを加え37°Cで30分間培養した後, PBSで細胞を洗浄し, ペプシンで細胞を裸核化した。続いて氷冷した70%エタノールを加え30分間静置し, 細胞核を固定した。さらに遠沈後(1,000rpm, 10分間), 培養液を吸引し新たに70%エタノールに再浮遊させ, -20°Cで測定時まで保存した。

測定はanti-BrdU-FITC抗体とpropidium iodideで二重染色を行い, Epics Elite ESPセルソーター(Coulter Electrics)によりDNA量およびBrdUの取り込み量を測定し, DNA-BrdUヒ

表1 細胞周期進行阻害効果検討時のSN-38(S), CDDP(C)の濃度の組み合わせ

	OVAS-21		RMG-II	
	SN-38 (ng/ml)	CDDP (ng/ml)	SN-38 (ng/ml)	CDDP (ng/ml)
Control	0	0	0	0
S4	180	0	100	0
S3+C1	135	250	75	1,375
S2+C2	90	500	50	2,750
S1+C3	45	750	25	4,125
C4	0	1,000	0	5,500

ストグラムおよびスキャッターグラムを得た。また12時間ごとのサンプリング時には同時に各シャーレごとの細胞数を計算し, SN-38およびCDDP単独または併用投与による細胞の増殖阻害効果も検討した。

5. 殺細胞効果

SN-38とCDDPの併用投与による殺細胞効果を, コロニー形成法により解析した¹⁸⁾。すなわち細胞周期阻害効果検討時と同様に6cmのプラスチックシャーレで48時間前培養して得た対数増殖期の細胞 3×10^5 個/シャーレに, 両薬剤の48時間単剤処理でほぼ100%の増殖阻害効果を示す濃度を基準に設定した6種類の濃度の組み合わせ(表1)により培養した。12時間ごとに48時間まで経時的に細胞をPBSで洗浄後, 至適数を直径6cmのプラスチックシャーレに新たに植え込み, 薬剤を含まない培養液でさらに2週間培養後, ギムザ染色を行いコロニー数を計測し, 薬剤未処理細胞によ

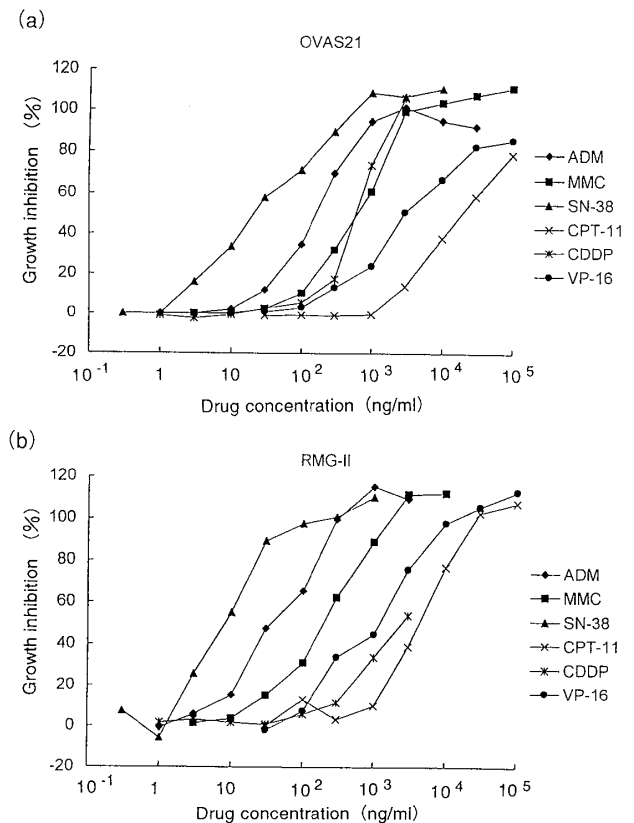


図1 各種抗癌剤投与による細胞増殖阻害効果 (a) OVAS-21, (b) RMG-II.

両細胞株ともに各3回の実験の平均値により濃度-増殖阻害曲線を作製した。

るコロニー形成率を対照としてサンプリング時点での生残率を計算し、各薬剤投与時の殺細胞効果を判定した。

結 果

1. 種々の抗癌剤（単剤）による細胞増殖阻害効果（図1）

OVAS-21における GI_{50} を比較すると、SN-38が22ng/mlと最も低い値を示した。続いてADMが230ng/ml、次にMMCとCDDPがほぼ同濃度で600ng/mlおよび610ng/ml、VP-16は6,630ng/mlであり、SN-38による増殖阻害効果が最も高かった。一方SN-38の prodrug であるCPT-11の GI_{50} は30,100ng/mlと非常に高く、*in vitro*の実験系ではその増殖阻害効果は低いことが示された。

次にRMG-IIにおいてもやはりSN-38の GI_{50} が8ng/mlと最も低く、続いてADMが35ng/ml、MMCが210ng/mlとOVAS-21と同様にSN-38が最も低い濃度で増殖阻害効果を示した。

2. SN-38と他剤併用による増殖阻害効果

OVAS-21, RMG-II 両株についてSN-38とCDDP, ADM, あるいはMMCとの2剤併用投与時の dose response curve より求めた50%増殖阻害作用における isobologram (図2)をみると、両細胞株ともにSN-38はCDDP, ADM, あるいはMMCのいずれの薬剤との併用においてもデータポイントが mode I と mode II に囲まれた envelope of additivity 内にあり、相加効果を認めると判断された。しかしながらOVAS-21におけるSN-38とCDDPとの併用(図2a)では envelope of additivity の左下に近いデータポイントが多くみられ、相乗効果に近い効果が示された。

そこでOVAS-21においてはSN-38とCDDPを24時間の時間差をもって投与し、その併用効果の増減をさらに検討した結果(図3), SN-38の先行投与の場合, CDDPの先行投与の場合の両者いずれにおいても、併用時のデータポイントは envelope of additivity 内にあり、同時投与時と同

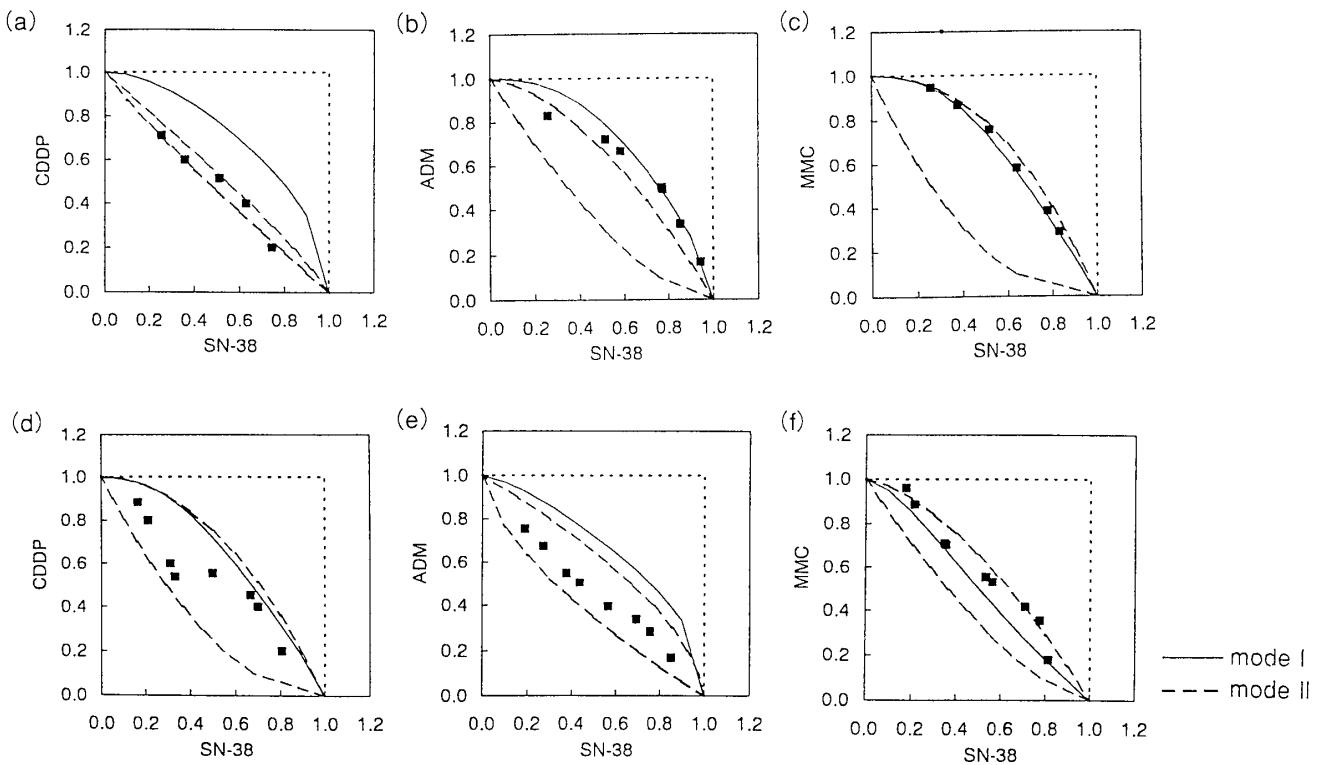


図2 2種の細胞株におけるSN-38とCDDP, ADM, MMC併用時のisobologram (a)~(c)はOVAS-21におけるSN-38と、(a) CDDP, (b) ADM, (c) MMC併用時、(d)~(f)はRMG-IIにおけるSN-38と、(d) CDDP, (e) ADM, (f) MMC併用時、いずれも3回の実験の平均値によりisobologramを作製した。

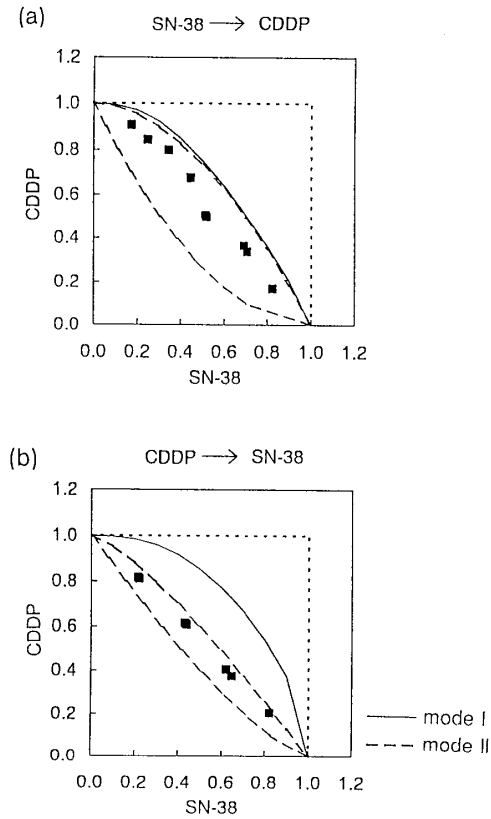


図3 OVAS-21におけるSN-38とCDDPの24時間差投与時のisobologram
(a) SN-38投与24時間後CDDP投与, (b) CDDP投与24時間後SN-38投与。それぞれ2回の実験の平均値によりisobologramを作製した。

様相加効果がありと判断され、24時間の時間差投与による増殖阻害効果の増強、減弱は認められなかった。

3. 細胞周期進行阻害効果

SN-38とCDDP同時投与によるOVAS-21およびRMG-IIの細胞周期に及ぼす影響について二重染色フローサイトメトリーにより検討を行った。まず48時間単剤処理で100%増殖阻害を来す濃度を基準にその濃度の組み合わせ(表1)で処理した場合の細胞増殖曲線(図4)において、SN-38およびCDDPの単剤処理(S4およびC4)ではいずれも48時間でほぼ100%の増殖阻害率を呈したが、両薬剤を種々の濃度に組み合わせた場合(S3+C1, S2+C2, S1+C3)の細胞数は、単剤処理時に比べ減少する傾向が認められ、SN-38とCDDPの併用投与による作用の増強が示唆された。

また、これらの各時点における細胞周期進行へ

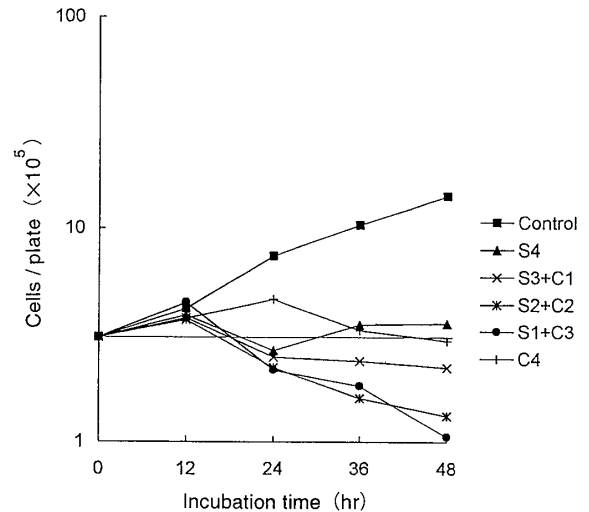


図4 RMG-IIにおけるSN-38とCDDP同時投与時の増殖曲線
SN-38単剤投与(S4), CDDP単剤投与(C4)では48時間でほぼ100%の増殖阻害率を示すが、併用投与(S3+C1, S2+C2, S1+C3)では単剤投与に比して細胞数の減少を認める。
実験は2回行いその平均値により増殖曲線を作製した。

の影響を知るために、フローサイトメトリーにより得られたDNAヒストグラムおよびスキッターグラムにより検索したところ、OVAS-21のDNAヒストグラムおよびスキッターグラムはRMG-IIの場合とほぼ同形を示した(図5)。すなわちSN-38の単剤投与(S4)では投与後12時間より既にBrdUの取込みは全くみられず、ほぼ完全にDNA合成阻害、細胞周期進行阻害を生じており、48時間経過後も同様のDNAヒストグラムを示した。

さらにSN-38の投与量を3/4量, 1/2量, 1/4量に漸減するとともにCDDPの投与量を漸増して併用投与を行った場合(S3+C1, S2+C2, S1+C3)もほぼ同様に、両薬剤投与後12時間後よりスキッターグラム上BrdUの取り込みは認められず、48時間後までDNAヒストグラムにも変化がみられなかったことより、SN-38投与によりDNA合成の抑制と細胞周期進行阻害が引き起こされていることが示された。

一方CDDP単独投与(C4)では投与後48時間まで弱いながらBrdUの取り込みが認められ、DNA合成は阻害されてはいるものの完全な合成阻害で

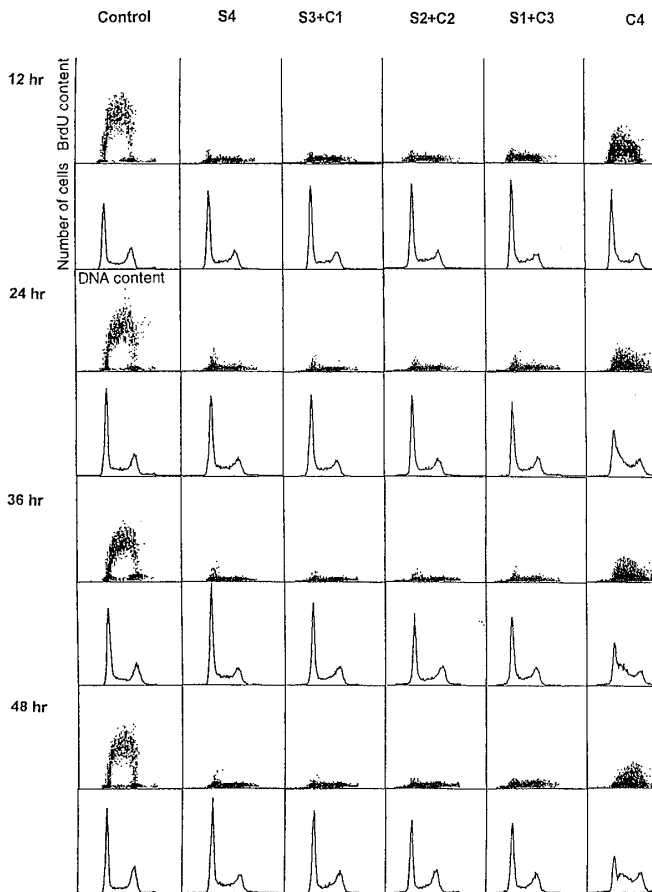


図5 RMG-IIにおけるSN-38とCDDP同時投与時のDNAスカッターグラムおよびヒストグラム
上段スカッターグラムの縦軸はBrdU取り込み量を、下段ヒストグラムの縦軸は細胞数を表す。横軸は両者ともDNA量を表す。

SN-38単剤(S4)、およびCDDPとの併用(S3+C1, S2+C2, S1+C3)においては薬剤投与後12時間よりBrdUの取り込みはほとんどみられず、DNA合成阻害、細胞周期進行阻害を生じていることが示される。CDDP単剤(C4)においては薬剤投与後48時間までBrdUの取り込みはみられており、S期から次第にG₂-M期への細胞集積を生じ、またG₁期の細胞の減少を認める。

実験は2回行いほぼ同様のDNAスカッターグラムおよびヒストグラムを得た。

はなく、DNAヒストグラム上24時間でG₁からS期前期、48時間でS期後期からG₂-M期への細胞集積を認め、経時的にG₁期の細胞の減少がみられたことよりG₂-M期からG₁期への移行が阻害されていると考えられた。

4. 殺細胞効果

RMG-IIにおけるSN-38, CDDP単独および併用投与時のコロニー形成法による細胞生残率から

表2 RMG-IIにおけるSN-38(S)とCDDP(C)同時投与時の殺細胞効果

Treatment	Survival rate(%)			
	12	24	36	48(hr)
S4	56.1	33.8	18.5	21.8
S3+C1	0.2	0.3	0.2	<0.1
S2+C2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
S1+C3	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

殺細胞効果について検討した(表2)。SN-38単独処理細胞(S4)において、生残率は12時間後56.1%、24時間後33.8%、36時間後18.5%と経時的に減少してはいるが、48時間後においても21.8%の生残率を保持していた。一方、CDDP単独処理細胞(C4)においては12時間後に既に生残率は0.1%以下となり、そのほとんどの細胞が増殖能力を失いコロニー形成を認めなかった。

SN-38とCDDPの併用投与では、SN-38 3/4量とCDDP 1/4量の組み合わせ(S3+C1)において、12時間後0.2%、24時間後0.3%、36時間後0.2%とわずかな生残率を示したが、その他の併用投与(S2+C2, S1+C3)においてはCDDP単剤投与(C4)と同様12時間以内に生残率は0.1%以下となり、CDDPが投与されることでコロニー形成はほとんど抑制されており、CDDPが殺細胞的に作用していることが示された。

考 察

CDDPを含む多剤併用療法により、卵巣癌の予後は大きく改善されたが、特に進行癌の予後は頭打ちの感がある^{1)~4)}。その原因の一つに組織型による抗癌剤の感受性の相違が認められ、特に卵巣明細胞腺癌が他の組織型に比較して薬剤感受性が低く、その予後が著しく不良であることが挙げられる^{3)~5)}。本腫瘍はこれまでその発生頻度が低く、相対的にI期の占める割合が比較的多い⁵⁾¹⁹⁾ことにより、化学療法に対する感受性の問題があまり着目されていなかったが、近年徐々にその症例数が増加する傾向にあり、本腫瘍に有効な化学療法の検討が急務となっている。

カンプトテシン(camptothecin, CPT)の半合成誘導体である塩酸イリノテカン(CPT-11)は、

DNA topoisomerase Iを阻害することによりDNA合成を阻害し、抗腫瘍活性を示すという新しい作用機序を有する抗癌剤として注目されている。CPT-11は生体内、主に肝臓のカルボキシルエステラーゼにより活性代謝物SN-38に加水分解され、抗腫瘍効果を示すとされている²⁰⁾²¹⁾。CPT-11は婦人科領域悪性腫瘍(卵巣癌および子宮頸癌)に対する後期第II相臨床試験¹⁰⁾において、卵巣癌の奏効率が23.6%と、その有効性が期待された。さらに既存の抗癌剤に感受性が低いとされる卵巣明細胞腺癌症例においても、CPT-11の有効性が示唆される報告が散見されるようになり¹⁰⁾¹¹⁾、新たな化学療法レジメンの一翼を担う薬剤として注目されている。

卵巣明細胞腺癌細胞株に対する抗癌剤感受性試験として今回用いたCPT-11およびその生体内活性体であるSN-38、CDDP、ADM、MMC、VP-16のGI₅₀は、OVAS-21、RMG-II両株において、SN-38がそれぞれ22, 8ng/mlと最も低く、SN-38は他剤に比し低濃度で強い細胞増殖阻害効果を示し、次いで両株ともADM、MMCの順に増殖阻害作用を示した。

清水ら²²⁾²³⁾は同様な卵巣明細胞腺癌細胞株であるHAC-2、KKの2株を用いて薬剤感受性試験を行い、やはりSN-38の抗腫瘍効果が最も高く、次いでHAC-2ではMMCが、KKではADMが有効であると報告しており、今回の結果も清水らの報告とほぼ同様の傾向を示した。一方西田²⁴⁾は卵巣明細胞腺癌株4株(HAC-2、KK、OVAS-21、RMG-I)を用いて既存の23種類の抗癌剤(SN-38は含まれていない)による感受性試験でCDDP、Actinomycin-D(Act-D)、Nedaplatinの3剤が有効で、ADM、MMCは無効と判定しており、用いた卵巣明細胞腺癌株により、また抗癌剤感受性試験の方法によりその成績は必ずしも一致していない。しかしSN-38はHAC-2、KK、OVAS-21、RMG-IIの4株で有効性が示され、卵巣明細胞腺癌に対して有効な薬剤となりうる可能性が示唆された。

次に単剤で最も強い抗腫瘍効果を示したSN-38と他剤との併用効果を検討した。併用薬剤とし

ては現在卵巣癌化学療法のkey drugであるCDDP、および単剤投与でSN-38に次いで低いGI₅₀を示したADM、MMCを選択した。今回抗癌剤併用投与時の抗腫瘍効果判定に用いたisobologramは、放射線療法と抗癌剤の併用効果をみるためにSteelら²⁵⁾により考案された方法で、加納ら¹⁶⁾により抗癌剤併用投与時の併用効果の分析に応用されたものである。本実験ではOVAS-21、RMG-IIの両者ともにSN-38とCDDP、ADMあるいはMMCとのいずれの併用投与においても相加効果は認められたものの、相乗効果の得られた組み合わせはなかったが、OVAS-21においてはSN-38とCDDPの併用投与時に、相乗効果に近いデータポイントが得られたことは、この両者の組み合わせによる併用投与の有効性を示唆させるものと考えられた。

卵巣明細胞腺癌細胞株を用いたSN-38と他剤の併用効果を検討した報告はないが、他の細胞株を用いた検討では相乗効果を指摘したものも散見される。中でも比較的多くの抗癌剤に対して高い感受性を示す白血病や悪性リンパ腫の細胞株を用いた実験において、SN-38と他剤の相乗効果が顕著であり、阿久津ら²⁶⁾はパーキットリンパ腫細胞株においてSN-38はCDDP、MMC、carboplatin(CBDCA)、cytosine arabinoside(Ara-C)と相乗効果を認め、加納ら¹⁶⁾はリンパ性白血病細胞株でSN-38がCDDP、MMCと相乗効果を示したと報告している。さらに、Minagawaら²⁷⁾はCDDP耐性のHela細胞に対し、CDDPとSN-38を併用投与しisobologramによる検討を行った結果、相乗効果が認められたと報告していることより、CDDPに低感受性の癌種にもCPT-11との併用投与により抗腫瘍効果の増強が期待されるものと考えられる。これらの結果より卵巣明細胞腺癌においても、卵巣癌治療のkey drugであるCDDPと新たに開発されたCPT-11の併用療法の有用性が期待される。

次にこの両者の併用投与における細胞周期進行阻害効果および殺細胞効果について検討を行った。SN-38では、48時間単剤処理にてほぼ100%の増殖阻害効果を示す濃度(S4)の薬剤を投与12時

間後より DNA スキャッターグラム上、既に BrdU の取り込みがほとんど消失していた。さらに SN-38 の量を CDDP との比率で 3:1 (S3+C1), 1:1 (S2+C2), 1:3 (S1+C3) と変えたいずれの投与量においても同様に 12 時間後より BrdU の取り込みはほとんどみられず、SN-38 により DNA 合成阻害および細胞周期進行阻害が強く生じていることが考えられた。しかし、同濃度の投与方法で行ったコロニー形成法による殺細胞効果の検討結果では、SN-38 単独処理細胞 (S4) はほぼ完全に DNA 合成が阻害されていたにもかかわらず、薬剤投与後 48 時間後においても 21.8% の生残率を示し、増殖能力をまだ保持していることが示された。

一方 CDDP による単剤処理 (C4) では、DNA スキャッターグラム上、薬剤投与 48 時間後まで弱いながら BrdU の取り込みが認められ、細胞周期進行上 S 期の延長と G₂-M 期から G₁ 期への移行の阻害が示された。しかし殺細胞効果については、CDDP 単剤処理 (C4) では 12 時間以内においてそのほとんどの細胞が増殖能力を失いコロニー形成がなされず、これは SN-38 との併用において CDDP の量を漸減しても同様にコロニー形成はほとんどみられなかった。これらの結果より、細胞周期進行阻害効果については SN-38 の方が CDDP よりも優位に働き、一方殺細胞効果に関しては CDDP が SN-38 よりも強く作用していることが示唆された。

CDDP の主な細胞傷害作用は、2 本鎖 DNA の間に架橋形成を生じ、cross-links を生じるためであるとされている。CDDP 投与による細胞周期進行阻害の検討では、投与初期に S 期を延長させた後、次第に G₂-M 期に細胞集積を来すことが報告^{28)~31)}されており、今回の結果はこれにほぼ一致している。さらに CDDP の G₂-M 期への細胞集積は、低濃度では一時的な集積である delay として作用し、高濃度では持続的な集積である block として作用することが指摘されており³⁰⁾、今回の検討では G₂-M 期に block が生じたために致死的な細胞傷害効果を来したと考えられた。

一方 SN-38 は DNA 複製の際、DNA の一本鎖

の一時的な切断、再結合に作用する DNA topoisomerase I と複合体を形成することにより DNA の再結合が阻害され、その結果 DNA 合成が阻害されて抗腫瘍活性を発現する。この作用機序により SN-38 は DNA 合成期である S 期に特異的に強い抗腫瘍活性を示し、細胞周期進行へ与える影響の検討においても、S 期での DNA 合成阻害作用により細胞周期進行を遅延し、S 期後期または G₂ 期で周期進行を停止し細胞増殖阻害効果を生じると考えられているが³¹⁾、今回の実験では 2 株とも SN-38 投与により、CDDP と併用下でも完全な周期進行の停止を認めた。

今回は薬剤の周期進行阻害の特徴がよく現れると考えられる 48 時間処理で 100% 増殖阻害を示す濃度を基準として薬剤投与量を設定したが、さらに種々の濃度での検討が必要と考えられた。しかし、今回の結果により卵巣明細胞腺癌に対し SN-38 と CDDP が細胞レベルではそれぞれほぼ独立して抗癌作用を発揮することが期待され、臨床において CPT-11 と CDDP の併用療法が有効となりうることが示唆された。

結 論

卵巣明細胞腺癌に対する有効な化学療法の基礎的検討を目的とし、卵巣明細胞腺癌由来の OVAS-21 細胞、RMG-II 細胞 2 株を用いて、塩酸イリノテカン (CPT-11) の生体内活性化体である SN-38 を中心とした抗癌剤感受性試験および他剤との併用効果を検討した。さらに併用効果の期待された SN-38 と CDDP の併用投与において、細胞周期進行へ与える影響および殺細胞効果を検討した。

(1) 細胞増殖阻害試験において OVAS-21, RMG-II 両細胞株ともに SN-38 は他剤に比し最も低い GI₅₀ を呈し、*in vitro* で強い細胞増殖抑制作用を持つことが示された。

(2) SN-38 と CDDP, ADM あるいは MMC との併用効果を isobologram により検討した結果、いずれも相加効果があることが判明した。中でも OVAS-21 においては SN-38 と CDDP の併用投与で相乗効果に近い結果が得られ、この両薬剤の併用投与による有効性が示唆された。

(3) SN-38とCDDPの併用投与における作用機序の解析において、DNA合成阻害と細胞周期進行阻害についてはSN-38が、殺細胞効果についてはCDDPが主として働いていることが示され、両者が細胞レベルにおいてほぼ独立した抗癌作用を示すことが示唆された。

以上の結果は卵巣明細胞腺癌において、CPT-11とCDDPの併用療法の有効性を裏付けるデータであると考えられた。

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました武田佳彦教授に深甚なる謝意を表します。また直接本研究に御指導、御協力を頂いた矢島正純講師、ならびにヤクルト本社中央研究所の横倉輝男博士、永田洋博士に心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Gershenson DM, Wharton JT, Herson J et al: Single agent cisplatin therapy for advanced ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 58: 487-496, 1981
- 2) 寺島芳輝, 佐々木寛, 横山志郎ほか: 21施設による進行卵巣癌の治療成績—とくに治療法の相違による生存率の差異を中心に—. *日産婦会誌* 45: 363-370, 1993
- 3) 須川 侑, 梅咲直彦, 矢嶋 聡ほか: 卵巣癌の予後と化学療法の効果—多施設による共同研究—. *日産婦会誌* 44: 1135-1141, 1992
- 4) Omura GA, Brady MF, Homesley HD et al: Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: The Gynecologic Oncology Group Experience. *J Clin Oncol* 7: 1138-1150, 1991
- 5) 郭 宗正, 平井康夫, 増淵一正ほか: 卵巣 clear cell carcinoma の臨床病理学的研究. *日産婦会誌* 41: 875-880, 1989
- 6) 横倉輝男: 抗癌剤塩酸イリノカテン(CPT-11)の開発研究. *アインケミカル* 23: 74-83, 1994
- 7) 根来俊一, 福岡正博: 新規カンプトテシン誘導体. *癌の臨* 40: 20-25, 1994
- 8) Shimada Y, Yoshino M, Wakui A et al: Phase II study of CPT-11, a new camptothecin derivative in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 11: 909-913, 1993
- 9) Kambe M, Wakui A, Nakao I et al: A late phase II study of irinotecan (CPT-11) in patients with advanced gastric cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 12: 198, 1993
- 10) 竹内正七, 土橋一慶, 藤本征一郎ほか: 子宮頸癌および卵巣癌に対するCPT-11の後期第II相臨床試験. *癌と化療* 18: 1681-1689, 1991
- 11) 竹島信宏, 平井康夫, 清水敬生ほか: CPT-11投与により著効を得た腹腔内再発卵巣 clear cell adenocarcinoma の1例. *日癌治療会誌* 30: 705-711, 1995
- 12) 森澤孝行, 蔵本博行, 下田隆夫ほか: CA125産生性卵巣明細胞腺癌株(OVAS-21)の樹立経過とその諸性格. *Hum Cell* 1: 347-348, 1988
- 13) 矢島正純: 卵巣類中腎癌培養細胞株(RMG-II)の樹立と同株に対するモノクローナル抗体の作成. *慶應医* 66: 817-826, 1989
- 14) Skehan P, Storeng R, Scudiero D et al: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82: 1107-1118, 1990
- 15) Monks A, Scudiero D, Skehan P et al: Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 83: 757-766, 1991
- 16) Kano Y, Suzuki K, Akutsu M et al: Effects of CPT-11 in combination with other anticancer agents in culture. *Int J Cancer* 50: 604-610, 1992
- 17) 赤木 清, 山本博昭, 佐々木功典: Cell kinetics の解析法. 「フローサイトメトリー入門」(河本圭司, 赤木 清編), pp87-100, 医学書院, 東京(1989)
- 18) Salmon SE, Hamburger AW, Soehnlen B et al: Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N Engl J Med* 298: 1321-1327, 1978
- 19) 薬師寺道明, 田崎民和, 大橋尚文: 卵巣 clear cell carcinoma の予後と, その改善への対策. *産婦の実際* 41: 1173-1179, 1992
- 20) Kaneda N, Nagata H, Furuta T et al: Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue CPT-11 in the mouse. *Cancer Res* 51: 1715-1720, 1990
- 21) Kawata Y, Aonuma M, Hirota Y et al: Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res* 51: 4187-4191, 1991
- 22) 清水敬生, 梅沢 聡, 荷見勝彦: 卵巣明細胞腺癌に対する薬剤感受性試験の成績. *癌と化療* 23: 945-947, 1996
- 23) Umezawa S, Shimizu Y, Hasumi K: Chemotherapy for ovarian clear cell adenocarcinoma with irinotecan hydrochloride and mitomycin C. *Int J Clin Oncol* 1: 157-162, 1996
- 24) 西田正人: 難治性卵巣癌, 特に卵巣 clear cell carcinoma に対する新しい多剤併用化学療法の確立

- に関する研究. *Oncol Chemother* 8:128-136, 1992
- 25) **Steel GG, Peckham MJ**: Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: The concept of additivity. *Radiat Oncol Biol Phys* 5: 85-91, 1979
- 26) 阿久津美百生, 鈴木兼一, 角田三郎ほか: イリノテカン(CPT-11)と他抗癌剤の併用効果について: B-リンパ系腫瘍株化細胞における検討. *癌と化療* 21:1607-1611, 1994
- 27) **Minagawa Y, Kigawa J, Ishihara H et al**: Synergistic enhancement of cisplatin cytotoxicity by SN-38, an active metabolite of CPT-11, for cisplatin-resistant Hela cells. *Jpn J Cancer Res* 85: 966-971, 1994
- 28) 高橋克俊, 海老原和雄, 本田恭成ほか: 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. *癌と化療* 9: 624-631, 1982
- 29) 善積昇, 藤原純, 西谷巖ほか: ヒト卵巣癌培養細胞に対する carboplatin および cisplatin の細胞増殖動態に及ぼす効果. *Hum Cell* 1: 301-307, 1988
- 30) **Bergerat JP, Barlogie B, Göhde W et al**: In vitro cytokinetic response of human colon cancer cells to cis-dichlorodiammineplatinum (II). *Cancer Res* 39: 4356-4363, 1979
- 31) 永田洋: フローサイトメトリーによる抗腫瘍性アルカロイド・カンプトテシンの細胞周期進行に対する影響の解析. *愛知医大医会誌* 15: 683-699, 1987