

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



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

# 目次

総論	1
略語	4
第1章 Etoposide 及び ara-C 単独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	5
第2章 Etoposide と ara-C 併用時の作用機序	
第1節 Etoposide 単独投与時の DNA 鎖切断と修復	11
第2節 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リボヌクレオチドプールへの影響	13
第3節 Etoposide 投与による ara-C 膜輸送と細胞内蓄積への影響	18
第4節 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	30
第5節 Etoposide 投与による ara-C 代謝の律速酵素である deoxycytidine kinase への影響	38
第3章 総括	42
謝辞	46
実験の部	47
引用文献	56

## 緒 論

小児癌の死亡原因の約半数を占める白血病は、造血器の悪性腫瘍であり、何らかの原因で血液幹細胞の一つのクローンが、無制限に増殖し、その結果、末梢血液中に未熟な白血球が出現する疾患である。白血病は増殖した白血球が骨髄由来の骨髄性白血病及びリンパ系由来のリンパ性白血病に大別され、さらに、それぞれ急性及び慢性に分類される。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。従って、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な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二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、相加も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が検討されてきた<sup>(1,2,3)</sup>。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。両剤の併用による白血病治療の試みは臨床的にも行なわれ、その効果に期待が寄せられてはいたものの両剤の併用時の投与条件の確立には至っていなかった。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。

本論文では、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詳細に調べた結果を第 1 章で扱った。また、第 2 章では、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明らかにすることを目的として、etoposide による DNA 鎖切断と修復の時間経過、両薬剤投与に時間差を設けた場合の ara-C の細胞内取り込み、代謝及び DNA への取り込みへの影響などを in vivo 及び in vitro の細胞について調べた結果を扱った。さらに、第 3 章では本研究の結果を総括し、白血病治療における etoposide 及び ara-C の時間差投与の有効性を考察した。

## 略 語 ( Abbreviations )

ara-C, cytosine arabinoside ; ATP, adenosine triphosphate ;

CTP, cytidine triphosphate ; dck, deoxycytidine kinase ;

dATP, deoxyadenosine triphosphate ; dCTP, deoxycytidine triphosphate ;

dGTP, deoxyguanosine triphosphate ; dTTP, deoxythymidine triphosphate ;

GTP, guanosine triphosphate ; PBS, phosphate buffered saline ;

RPMI, Roswell Park Memorial Institute ; topo II, topoisomerase II ;

UTP, uridine triphosphate ;

# 第 1 章

## Etoposide 及び ara-C 単独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<sup>(4)</sup>

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 (Fig.1)<sup>(5,6)</sup>。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と考えられている<sup>(7,8,9,10,11)</sup>。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。

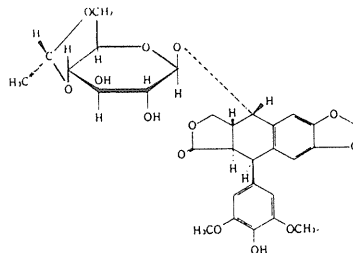


Fig.1. Structure of etoposide



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 ( Fig.2 )、1961年、Evansらにより L1210細胞、Ehrlich細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが報告された<sup>(12)</sup>。1963年、臨床応用が開始されたが、ara-Cは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薬剤にない特性が見いだされ、白血病に対しても効果が認められ現在に至っている。

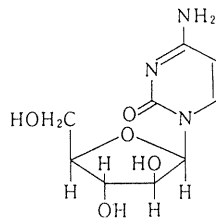


Fig.2. Structure of ara-C

Chart-1 に示すように、ara-C は ara-CTP への活性化と ara-U への不活性化の二つの経路で代謝される<sup>(13)</sup>。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<sup>(14)</sup>。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<sup>(15)</sup>。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だされているため、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<sup>(16)</sup>。

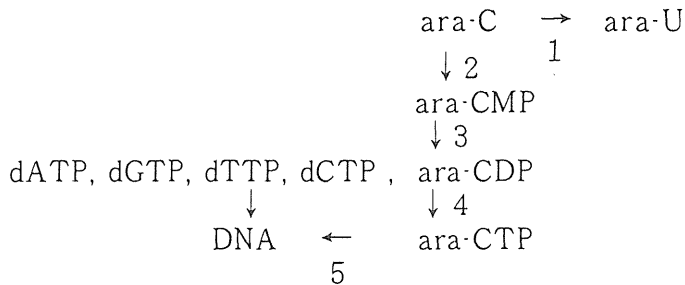


Chart-1. Metabolism of ara-C by tumor cells

1:cytidine deaminase 2:deoxycytidine kinase 3:deoxycytidylate kinase (dck) 4:nucleoside diphosphate kinase 5:DNA polymerase

本研究では、まずはじめに、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、時間差投与を行ない、抗腫瘍効果を比較した。

薬剤投与量は etoposide 7.5 及び 15mg/kg, ara-C 25 及び 500mg/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 18mg/kg, ara-C 単剤で 1200mg/kg とする Rivera らの報告に基づいたものである<sup>(1)</sup>。Fig.3 に示すように、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 7.5mg/kg 及び 15mg/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 25mg/kg 及び 500mg/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。

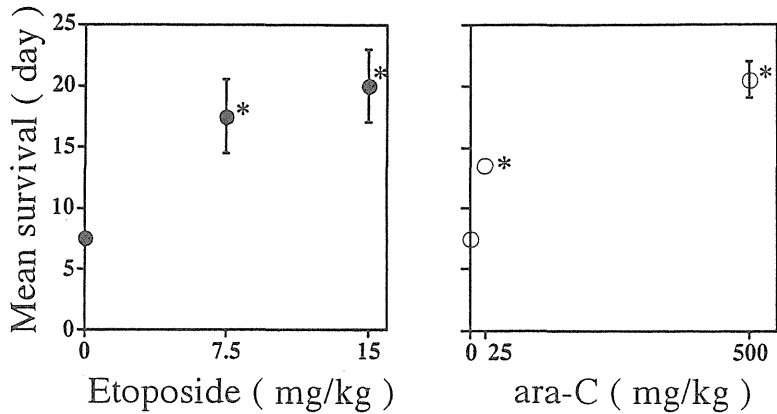


Fig.3. Effect of administration of etoposide and ara-C on survival of mice inoculated with L1210 leukemia. Groups of 10 mice were inoculated i.p with  $10^6$  L1210 cells 24h before treatment. \*  $P < 0.01$  as compared with the control by Student's t-test.

次に、Fig.3 と同様の薬用量で両薬剤の併用実験を行なった。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、担癌マウスの延命ばかりでなく治癒も観察され、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.4 )。Etoposide と ara-C の同時投与では ( Fig.4 C ), ara-C 25mg/kg のときは全く治癒が認められなかったが、ara-C 500mg/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<sup>(1)</sup> と一致した。両薬剤の投与に時間差を設けた実験では、etoposide の先行投与で ( Fig.4 A 及び B )、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 500mg/kg，etoposide 15mg/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 ( Fig.4 D 及び E )，ara-C の投与量が少ないとき ( 25mg/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 ( 500mg/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。

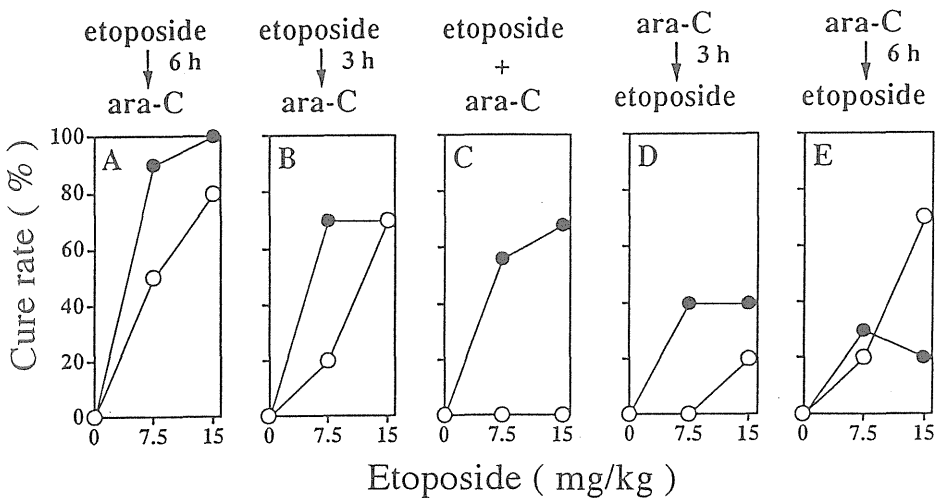


Fig.4. Effect of timing of administration of etoposide in relationship to ara-C on cure rate. Groups of 10 mice were inoculated i.p with  $10^6$  L1210 cells 24h before treatment.

○: ara-C 25mg/kg      ●: ara-C 500mg/kg

このように本章で示した L1210 担癌 BDF1 マウスを用いた in vivo 実験系は、etoposide と ara-C 併用時の抗腫瘍効果は時間差を設けた投与スケジュールに依存し、etoposide 6 時間先行投与が最高の抗腫瘍効果を

示すことが明らかになった。

## 第 2 章

### Etoposide と ara-C 併用時の作用機序

#### 第 1 節 Etoposide 単独投与時の DNA 鎖切断と修復<sup>(17)</sup>

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<sup>(7,8,9,10,11)</sup>、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 15mg/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 5 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<sup>(18)</sup>。  
 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。

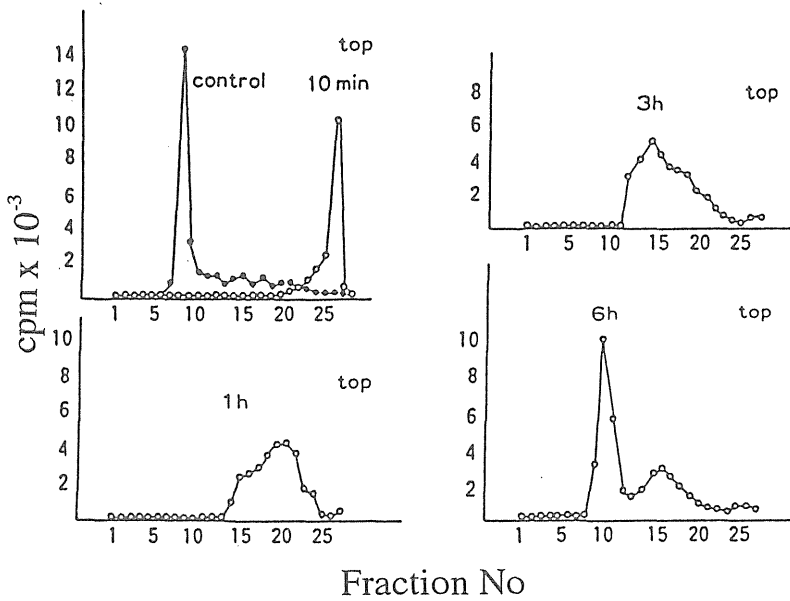


Fig.5. Sedimentation of DNA from L1210 cells at 10min, 1, 3 and 6h after administration of 15mg/kg of etoposide.

## 第 2 節 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<sup>(17,19)</sup>

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<sup>(20,21,22)</sup>。従って、ara-C を多剤投与の併用薬として用いる場合、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。本節では L1210 細胞を移植後 3 日経過した BDF1 マウスに etoposide 15mg/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 (Fig.6)。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<sup>(23,24,25)</sup>。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<sup>(19)</sup>。



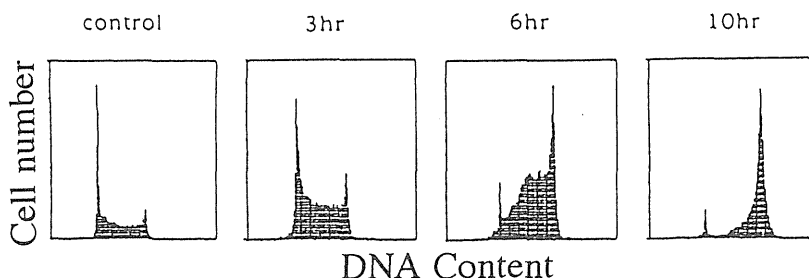


Fig.6. DNA histograms of L1210 ascites tumor after administration of etoposide.

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。Fig.7 に示したように、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かわらなかったが、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、Fig.8 に示したように、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。

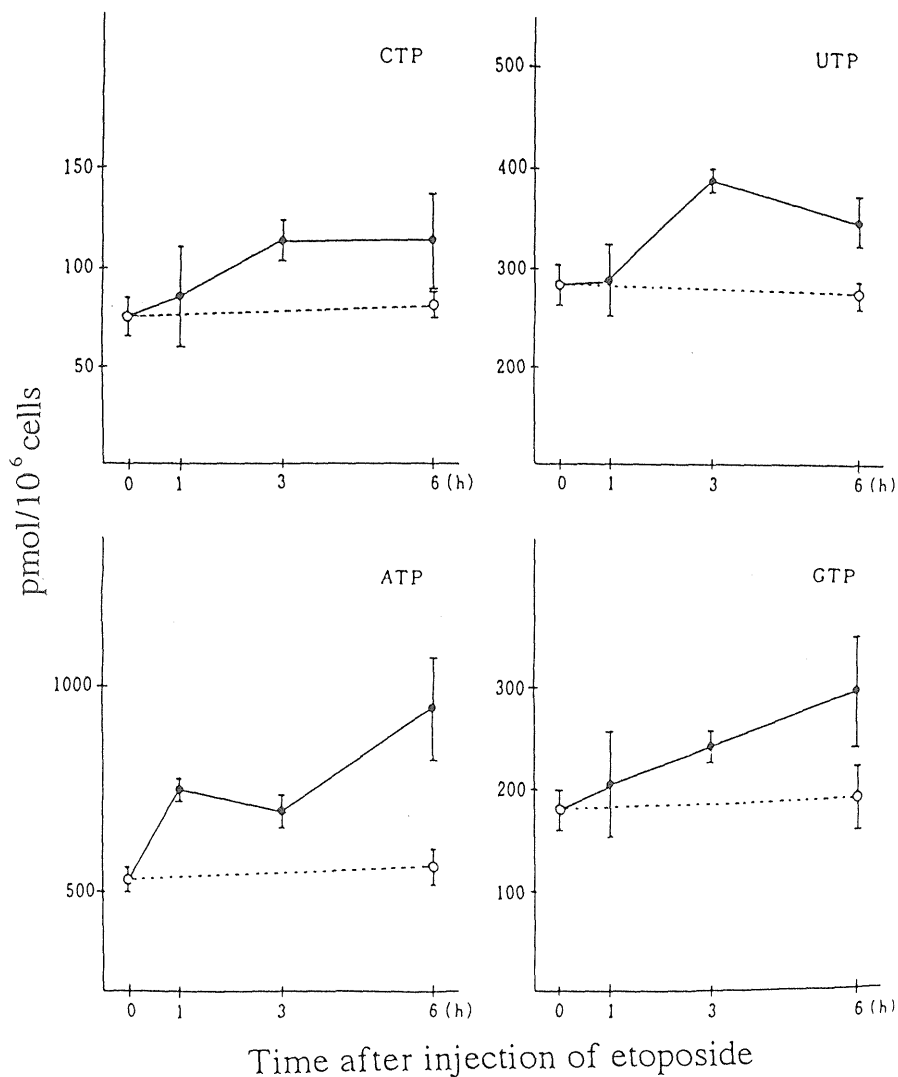


Fig.7. Effect of etoposide on ribonucleotide pools

○control : ●etoposide 15mg/kg

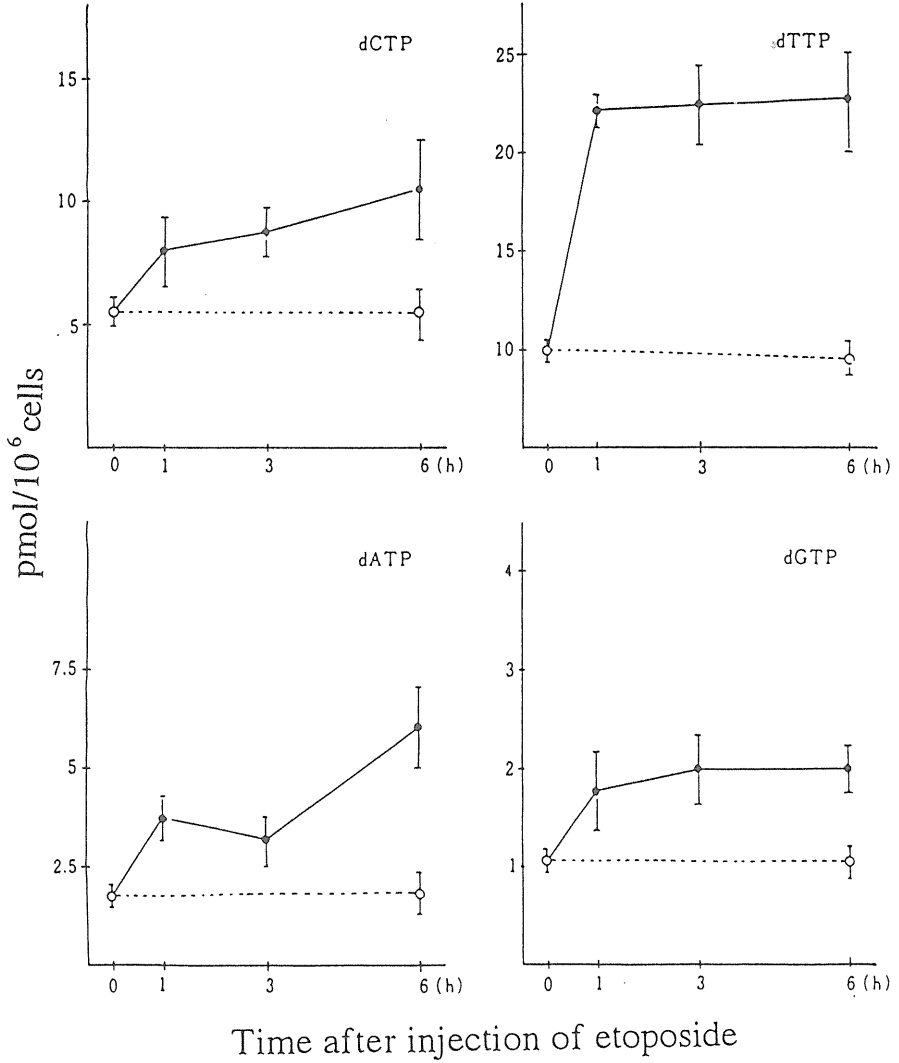


Fig.8. Effect of etoposide on deoxyribonucleotide pools  
 ○ control ● etoposide 15mg/kg

本節で検討した 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<sup>(26,27)</sup>。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という第 1 章で観察した現象の説明が可能となった。

### 第3節 Etoposide 投与による ara-C 膜輸送と細胞内蓄積への影響 <sup>(28,29)</sup>

ara-C は投与後能動的膜輸送により細胞内に取り込まれると、ara-CTP にまでリン酸化されて薬効を発現する<sup>(30,31,32,33)</sup>。一方、etoposide は細胞膜におけるチミジンの膜輸送と細胞内蓄積を抑制することが知られているので<sup>(34,35)</sup>、ara-C の influx は etoposide によって影響されることが予想される。従って、etoposide と ara-C 併用による抗腫瘍効果の増強に対して理論的根拠を与えるためには、ara-C の細胞膜輸送の面からも etoposide の作用について検討を加える必要がある。本節では、マウス白血病細胞と患者より採取した白血病細胞を用いて、ara-C のこれらの細胞における influx、efflux 及び細胞内蓄積に対する etoposide の影響について検討した。

はじめにマウス白血病細胞株の一つである P388 細胞 (P388) と deoxycytidine kinase (dck) 欠損株である P388 ara-C 耐性細胞 (P388/ara-C<sup>r</sup>) における細胞内への ara-C 取り込み量を検討した (Fig.9)。Influx 量を可能な限り正確に評価しうる時間を決定するために、ara-C のリン酸化能が欠失している P388/ara-C<sup>r</sup> と P388 を用いて比較した。実験開始より 30 秒までは、ara-C の細胞内への取り込みに両細胞間に差は見られないが、30 秒以後耐性細胞での ara-C の取り込みは鈍化した。さらに 120 秒後では P388 は耐性細胞に比して 1.8 倍の取り込みを示した。従って、30 秒までは P388 の dck 存在の有無による ara-C の細胞内への取り込みの差は無視できると考え、以後の実験では、30 秒間の ara-C 取り込み量を influx とすることとした。

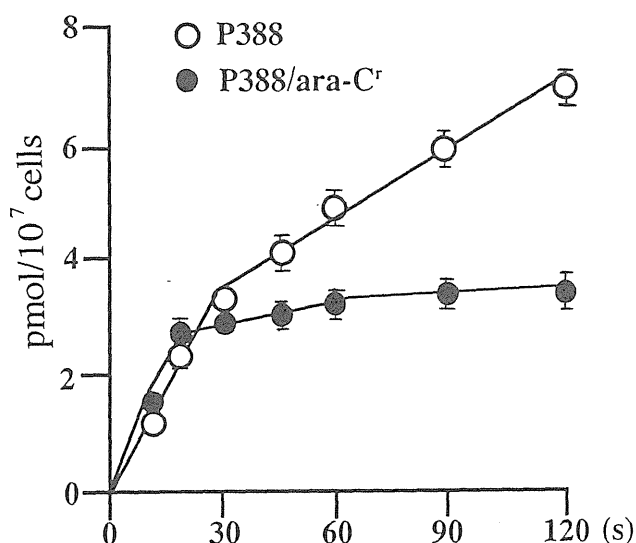


Fig.9 Time course of ara-C uptake by P388 and P388/ara-C<sup>r</sup> cells. Each data point is the mean of three separate experiments. All values show the means  $\pm$  SD.

P388 etoposide<sup>r</sup>は、P-グリコプロテイン陽性で細胞内 etoposide の effluxを亢進させる性質を有しているが、その機構が influx に対して影響を及ぼすか否かについては調べられていない。そこで、P388 と P388 etoposide 耐性細胞 ( P388/etoposide<sup>r</sup> ) における 1  $\mu$  M ara-C の influx に対する etoposide の影響を検討した ( Fig.10 )。Etoposide の濃度に依存して ara-C の influx が抑制されたが、etoposide 500  $\mu$  M 以上の高濃度で抑制はプラトーとなった。このことは etoposide に対して 5% の非感受性経路が存在することを示唆している。また、P388、P388/etoposide<sup>r</sup> の両細胞間では etoposide による ara-C の influx に対する作用に差は認められなかった。

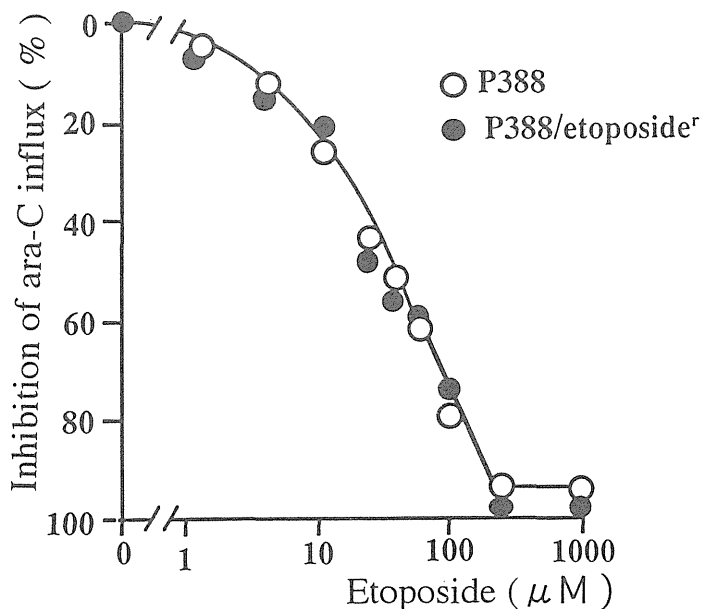


Fig.10 Etoposide-induced inhibition of 1  $\mu$  M ara-C influx in P388 cells sensitive or resistant to etoposide. Each data point is the mean of three separate experiments : SD < 10%

Fig.11 は etoposide によって引き起こされた ara-C influx 抑制の解除の速さについて検討した結果を示したものである。P388 に etoposide を  $10\mu\text{M}$  あるいは  $100\mu\text{M}$  加えて 1 時間培養し、洗浄後新しい培地に再浮遊させ、0、5、30、60 分後に ara-C の influx を測定した。洗浄直後では、etoposide  $10\mu\text{M}$  で約 25%、 $100\mu\text{M}$  で約 75% の influx 抑制効果が認められた。しかし、洗浄後 5 分では、etoposide  $10\mu\text{M}$  で既に抑制効果は消失し、etoposide  $100\mu\text{M}$  でも抑制効果は 18% にまで減少した。洗浄後 60 分ではほとんど抑制効果は認められなかった。

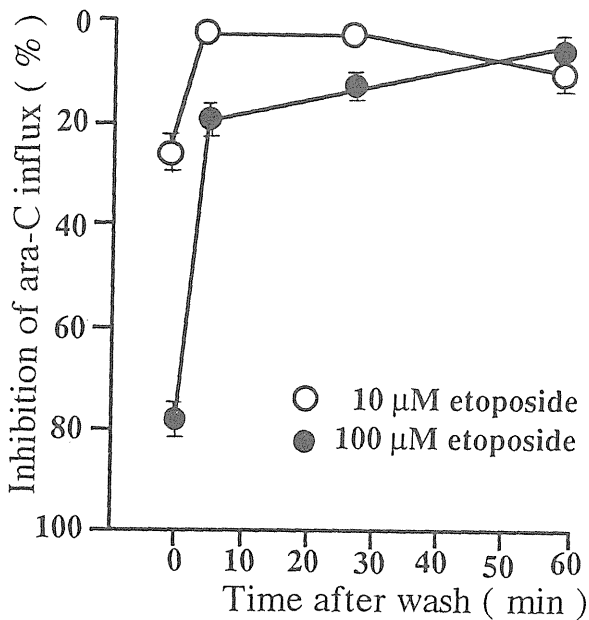


Fig.11. Disappearance of etoposide induced inhibition of  $1\mu\text{M}$  ara-C influx. Each data point is the mean of three separate experiments.

All values show the means  $\pm$ SD.



Fig.12 では P388 における ara-C  $1\mu\text{M}$  及び  $100\mu\text{M}$  の influx と細胞内蓄積に対する etoposide の影響を示した。Etoposide は ara-C  $1\mu\text{M}$  及び  $100\mu\text{M}$  に対して共に濃度依存的に ara-C influx を抑制した。一方で ara-C  $1\mu\text{M}$  の場合の細胞内蓄積は、etoposide  $10\mu\text{M}$  ではコントロールと変わらず、etoposide  $100\mu\text{M}$  で 32%、etoposide  $1000\mu\text{M}$  で 77% の抑制が認められた。また、ara-C  $100\mu\text{M}$  においては、etoposide  $100\mu\text{M}$  で ara-C の influx が 35% にまで抑制されたが、細胞内蓄積には、全く抑制が認められなかった。このことは etoposide が ara-C の influx を抑制し、かつ、ara-C の細胞内蓄積も抑制する一方で、ara-C の濃度が上昇した場合、ara-C のリン酸化よりも influx が過剰になるため、influx の抑制効果が機能しているにもかかわらず、細胞内蓄積の抑制は受けにくくなっていることを示しているものと考えられる。

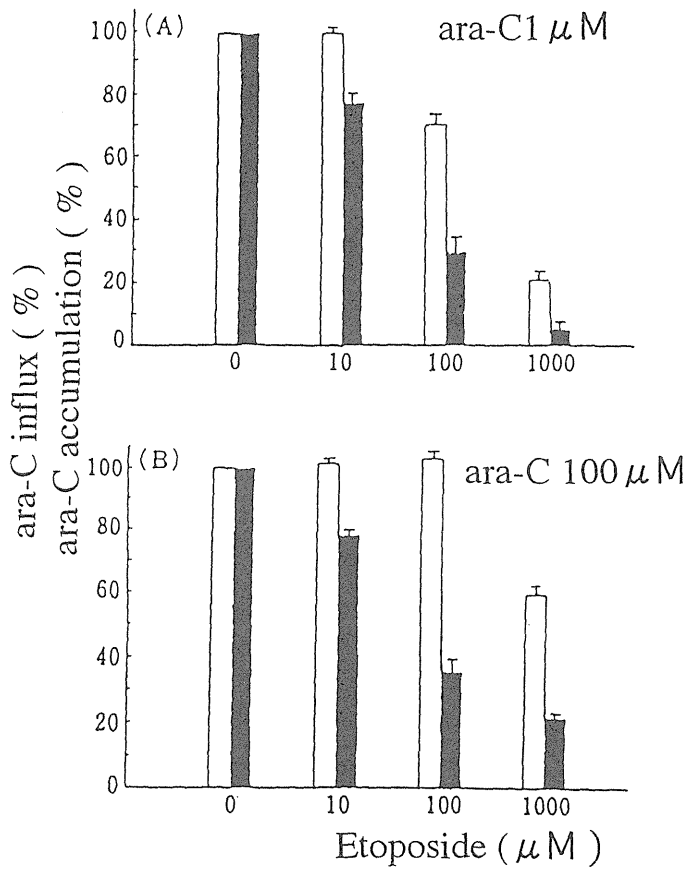


Fig.12 Effect of etoposide on ara-C influx and intracellular accumulation. P388 cells were incubated with 1 μM [<sup>3</sup>H]ara-C and 0,10,100,1000 μM etoposide for 30sec or 30min. Each data bar is the mean of three separate experiments : SD<10%  
 □ accumulation : ■ influx

樹立白血病細胞株及び患者白血病細胞を用いて ara-C 1  $\mu$ M での influx と細胞内蓄積に対する etoposide の影響を検討した結果を Fig.13 に示した。10 種の各種細胞株と、4 種の患者白血病細胞を用いて検討を行ない、その効果を、etoposide の 50% 抑制濃度 (IC<sub>50</sub>, concentration of inhibitor required for 50% inhibition) で示した。患者白血病細胞では etoposide による ara-C influx 抑制濃度と同程度の濃度において細胞内蓄積も抑制された。しかしながら、MOLT4 を除く樹立白血病細胞株では、IC<sub>50</sub> は influx よりも細胞内蓄積の抑制にははるかに高い濃度の etoposide を要した。

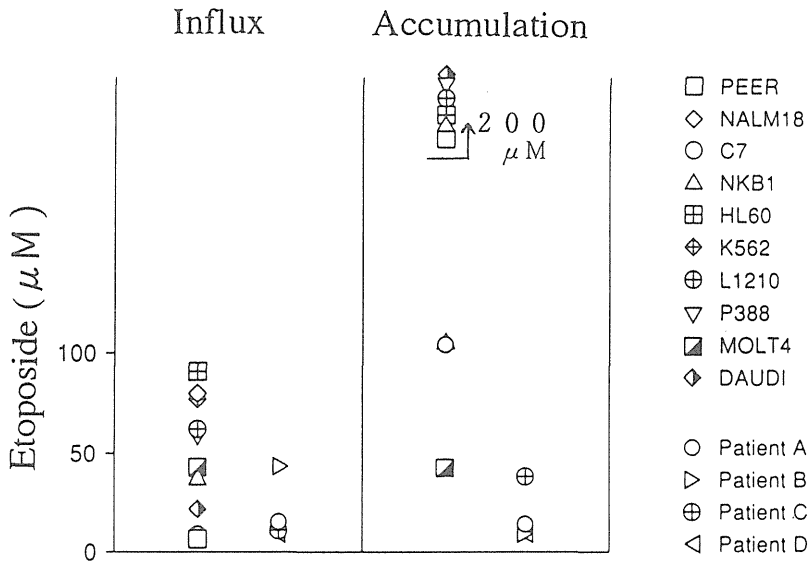


Fig.13. IC<sub>50</sub> of etoposide on ara-C influx and accumulation in established murine and human leukemic cell lines and human peripheral leukemic cells.

次に、ara-C の efflux に対する etoposide の影響を ara-C 代謝産物を産出しない dck 欠損株である P388 ara-C 耐性細胞を用いて検討した (Fig.14)。 $[^3\text{H}]$  ara-C と 1 分間培養した細胞を  $0^\circ\text{C}$  で洗浄した後、再び  $37^\circ\text{C}$  の培養液に入れたときの細胞中に残る  $[^3\text{H}]$  ara-C 量を測定した。ara-C 洗浄後 45 秒では、etoposide 無処理で細胞内 ara-C は 88% efflux されるのに対して、etoposide  $100\ \mu\text{M}$  存在下では 58% の ara-C が細胞内に存在し、ara-C の efflux に対する抑制効果が認められた。

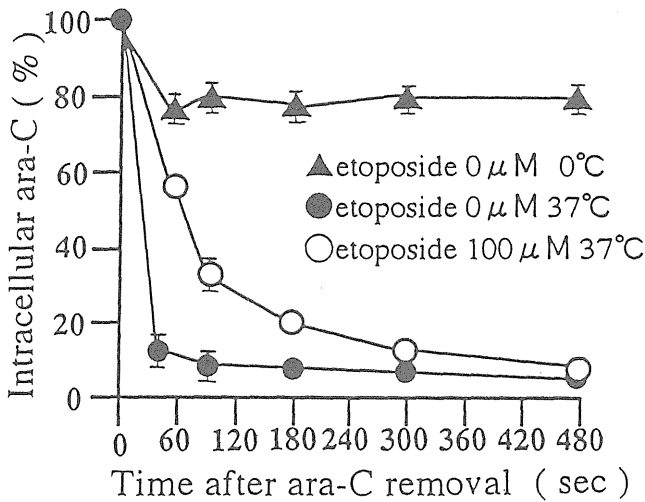


Fig.14 Effect of etoposide on ara-C efflux by P388/ara-C<sup>r</sup> cells. P388/ara-C<sup>r</sup> cells were incubated with  $1\ \mu\text{M}$   $[^3\text{H}]$ ara-C for 1min. After wash at  $0^\circ\text{C}$ , cells were reincubated with or without  $100\ \mu\text{M}$  etoposide. Each data point is the mean of three separate experiments. All values show the means  $\pm$ SD.

しかし、8 分後では、etoposide  $100\ \mu\text{M}$  存在下でも細胞内 ara-C の存在の割合は 5% にまで減少し etoposide 無処理との間に差異は認められ

なかった。また、0℃では、etoposide 非存在下でも細胞内 ara-C の efflux は少なく約 80% に維持され、この排出機構はエネルギー依存的であることが示唆された。Fig.15 ではさらに ara-C と etoposide の相方に対する耐性細胞を用いて ara-C の efflux に対する etoposide の影響を検討した。Fig.14 において ara-C 耐性細胞では、etoposide により ara-C の efflux が抑制されることが確認できたが、さらに etoposide 耐性を併せもった細胞で ara-C の efflux がどう変わるかを調べた。その結果、etoposide による ara-C の efflux 抑制効果は 前頁の ara-C 耐性細胞の場合と同じであった。

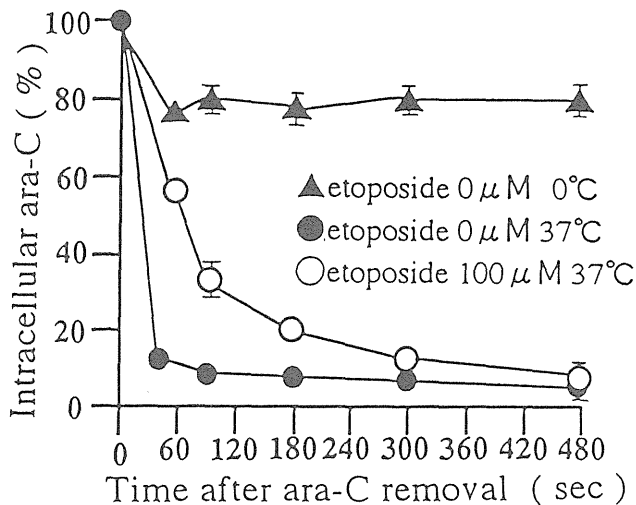


Fig.15 Effect of etoposide on ara-C efflux by P388/ara-C<sup>r</sup>.etoposide<sup>r</sup> cells. P388/ara-C<sup>r</sup>.etoposide<sup>r</sup> cells were incubated with 1 μM [<sup>3</sup>H]ara-C for 1min. After wash at 0℃, cells were reincubated with or without 100 μM etoposide. Each data point is the mean of three separate experiments. All values show the means ± SD.

Fig.16 には、P388 細胞及び P388 etoposide 耐性細胞を ara-C  $1\mu\text{M}$  と 1 時間培養後洗浄し、etoposide 1、10、100 及び  $1000\mu\text{M}$  存在下で 1 時間培養後の細胞内に保持される ara-C 量を示した。Etoposide  $1\mu\text{M}$  と  $10\mu\text{M}$  では差はみられないが、 $100\mu\text{M}$  では P388 細胞でコントロールの 1.3 倍、耐性細胞で 1.6 倍の細胞内 ara-C 保持の増加が認められた。

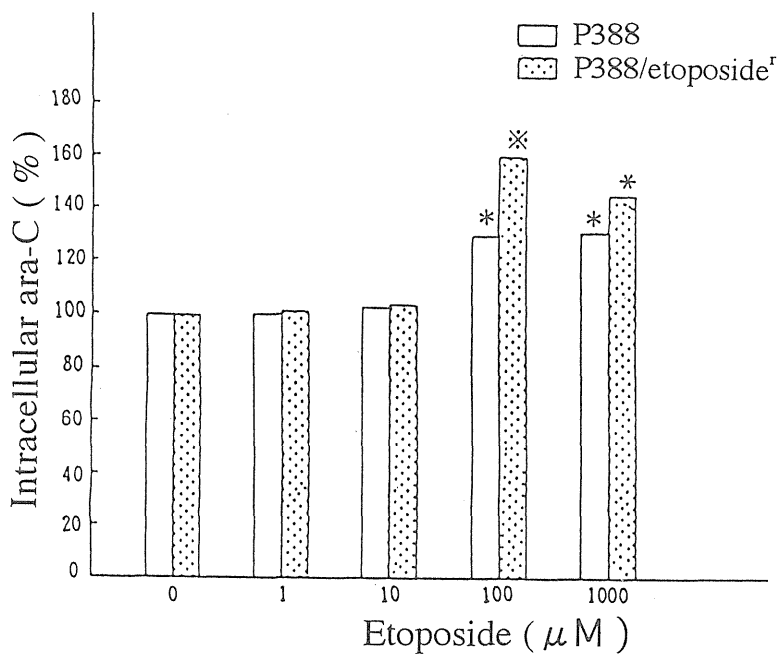


Fig.16 Effect of etoposide on intracellular ara-C retention P388 and P388/etoposide<sup>r</sup> cells were incubated with  $1\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]ara-C for 1hr, after removal of ara-C, cells were reincubated with or without  $100\mu\text{M}$  etoposide. Intracellular ara-C retention was measured at 1hr. Each data bar is the mean of three separate experiments : SD<10% \* P<0.05, compared with control treated group. ※P<0.01, compared with control treated group.

本節で得られた知見を総括すると次のようになる。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かとなった。さらに、etoposide は ara-C の細胞内蓄積も抑制したが、 $IC_{50}$  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。一方、患者白血病細胞では、etoposide による ara-C の influx の抑制と細胞内蓄積の抑制は同程度の  $IC_{50}$  であったことから、influx が ara-C 蓄積の律速段階であると推察された。この知見は、実際に白血病患者に対して両薬剤を同時投与した時に抗腫瘍効果が減弱される可能性を示唆している。さらに、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があるが、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。

本節では、etoposide が ara-C の influx 及び efflux を可逆的に抑制することを明らかにした。従って、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<sup>(36)</sup>、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。



#### 第 4 節 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<sup>(37)</sup>

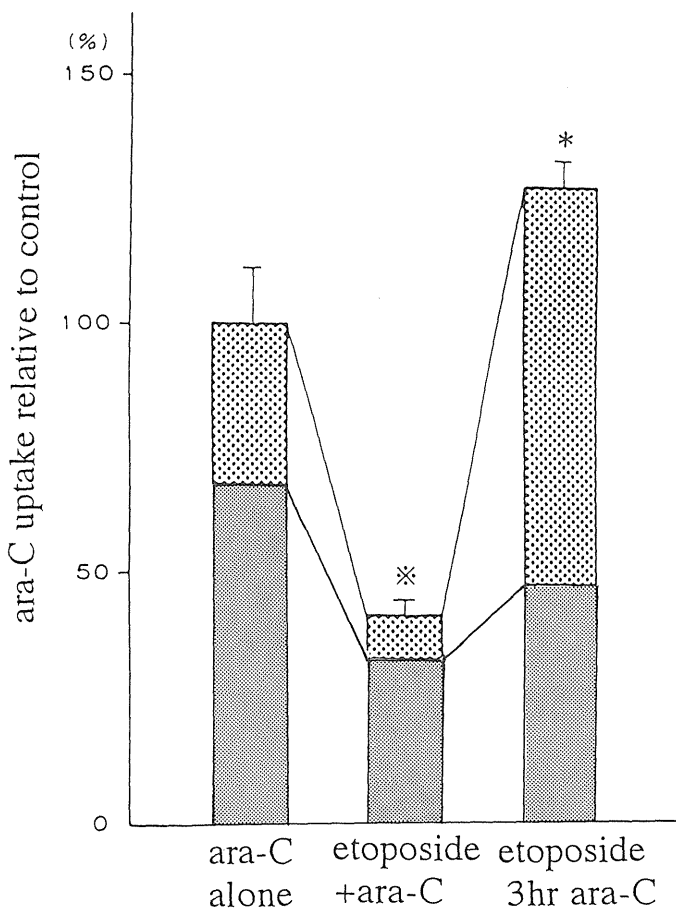
第 1 節～第 3 節における検討によって etoposide 投与後 3～6 時間の間接的に切断された DNA 鎖が修復に至り、この時期に S 期細胞が著明に増加するため、etoposide 先行投与で S 期特異的である ara-C の殺細胞効果がより有効に引き出されている可能性が明かとなった。さらに、etoposide は ara-C の influx を抑制するため、両薬剤が細胞に対して共存する同時投与では抗腫瘍効果の増強がみられず、ara-C 投与時にはすでに etoposide の薬剤濃度が低下している etoposide 先行投与により高い殺細胞効果が期待できる。これらの可能性を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。

本節では、L1210 細胞を腹腔内移植した BDF1 マウスに [<sup>3</sup>H] ara-C と etoposide を腹腔内投与し、etoposide の投与タイミングによって ara-C の DNA への組み込み量がどのように変化するかを検討した。

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 [<sup>3</sup>H] ara-C 量にどのように影響するかを検討した。Etoposide と [<sup>3</sup>H] 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.17)。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 [<sup>3</sup>H] 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、[<sup>3</sup>H] 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.18)。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 [ $^3\text{H}$ ] ara-C の DNA への組み込み量に対する ara-C と etoposide 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 ( Fig.19 )。Etoposide 3 時間先行投与で、投与量を 1、5 及び 15mg/kg と変化させたところ、etoposide 1mg/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 15mg/kg でもほぼ同じ組み込みがみられた ( Fig.20 )。



Schedule of administration

Fig.17 Effect of etoposide on ara-C metabolism. On day 3 after tumor inoculation, 15mg/kg of etoposide was injected intraperitoneally either simultaneously or 3hr 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.

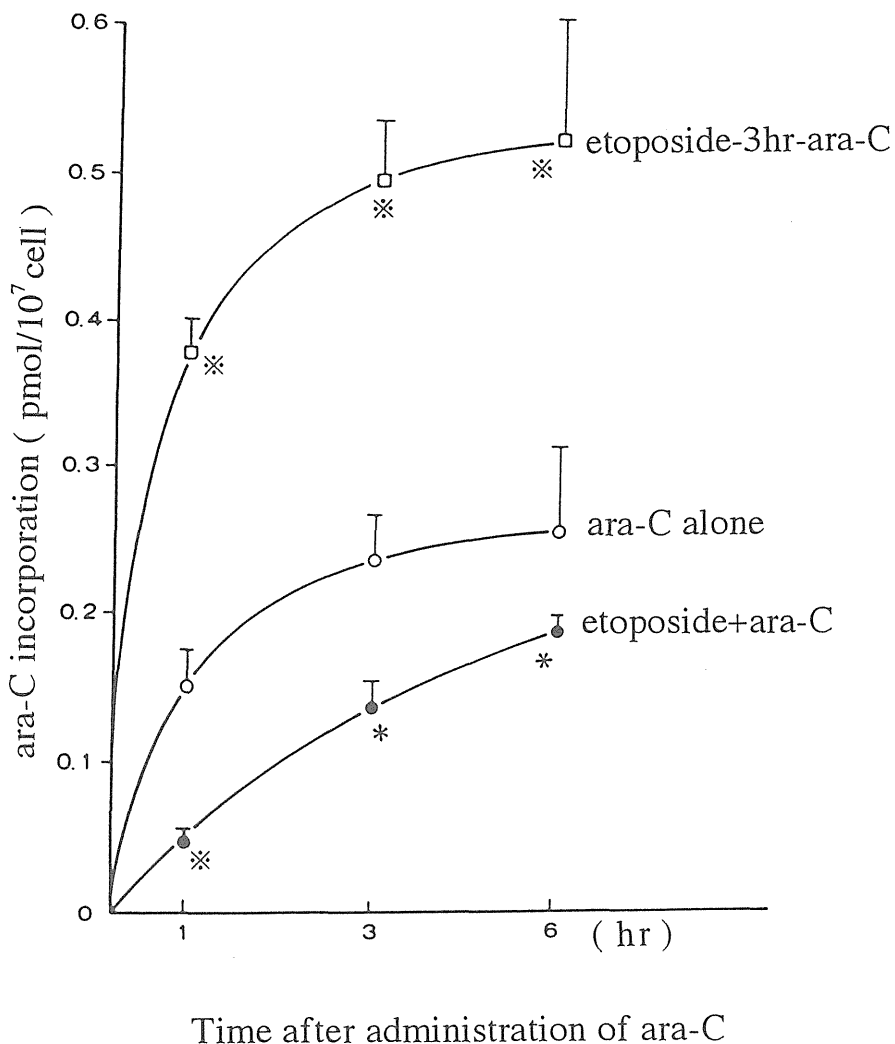


Fig.18. Effect of pretreatment of etoposide on ara-C incorporation into DNA. On day 3 after intraperitoneal inoculation of  $1 \times 10^6$  L1210 cells,  $1 \mu$  Ci of [ $^3$ H]ara-C and 15mg/kg of etoposide was injected intraperitoneally. Incorporation of ara-C was quantified by determining the radioactivity from [ $^3$ H]ara-C incorporated into acid-insoluble fraction of  $1 \times 10^7$  cells. All values show the means  $\pm$  SD.  
 \*  $P < 0.05$ , compared with ara-C alone.  
 \*\*  $P < 0.01$ , compared with ara-C alone.

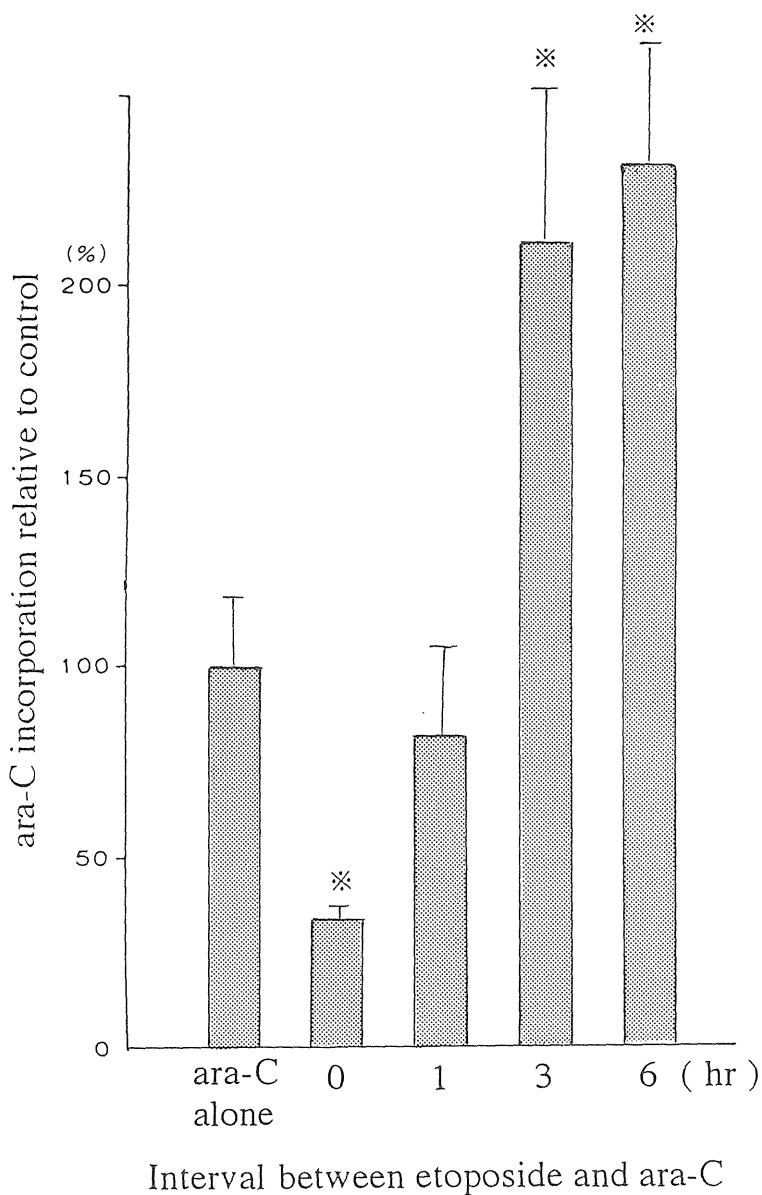


Fig.19 Effect of length of interval between etoposide and ara-C on ara-C incorporation into DNA. On day 3 after intraperitoneal tumor inoculation, 15mg/kg of etoposide was injected intraperitoneally 0,1,3,6 h before treatment with ara-C. Incorporation of ara-C into acid-insoluble fraction was quantified by determining the radioactivity from incorporated [ $^3\text{H}$ ]ara-C/ $1 \times 10^7$  L1210 cells. All values show the means  $\pm$ SD. \* $P < 0.01$ , compared with ara-C alone.

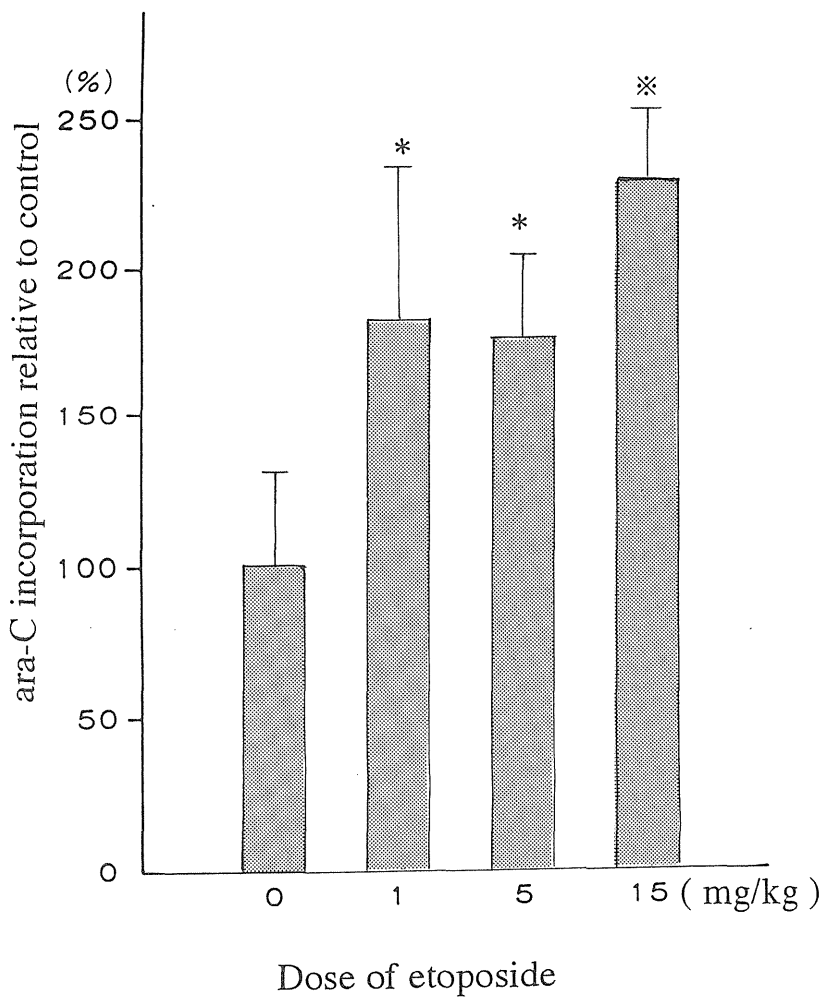


Fig.20 Dose dependency of etoposide on ara-C incorporation into DNA. On day 3 after tumor inoculation, 1, 5 and 15 mg/kg of etoposide was injected intraperitoneally 3hr before treatment with ara-C.  
 \*P<0.05, compared with control treated group.  
 ※P<0.01, compared with control treated group.

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、前節で示したように同時に処理した 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 単剤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かとなった。



## 第 5 節 Etoposide 投与による ara-C 代謝の律速酵素である

---

### deoxycytidine kinase への影響<sup>(38)</sup>

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<sup>(39,40)</sup>。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<sup>(30,31,41)</sup>。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<sup>(42)</sup>、dck はこの過程を担う酵素である。dck 活性の低下が ara-C 耐性化の一つの機構として、知られており<sup>(28)</sup>、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。本節では、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  $\mu$ M 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.21 )。Etoposide の濃度に依存して dck 活性は上昇し、100  $\mu$ M の処理によってコントロールの 216% に達した。

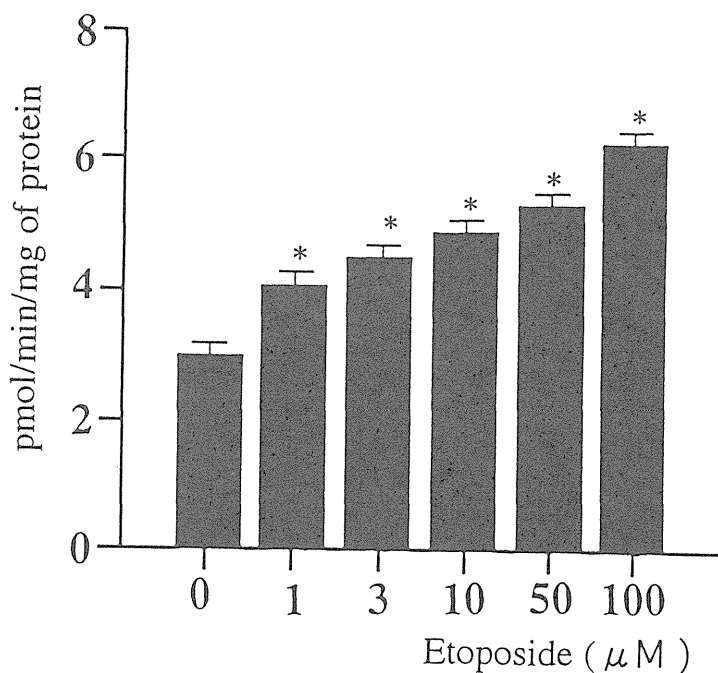


Fig.21. Effect of etoposide on dck activity in L1210 cells.  
L1210 cells were incubated with etoposide for 1hr.  
All values show the means  $\pm$ SD.  
\*  $P < 0.01$  as compared with control treated group.

次に、etoposide 1 または  $10\mu\text{M}$  の存在下での dck 活性の経時的変動を検討した ( Fig.22 )。処理後 20 分において、dck 活性は etoposide  $1\mu\text{M}$  では処理前のものと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。

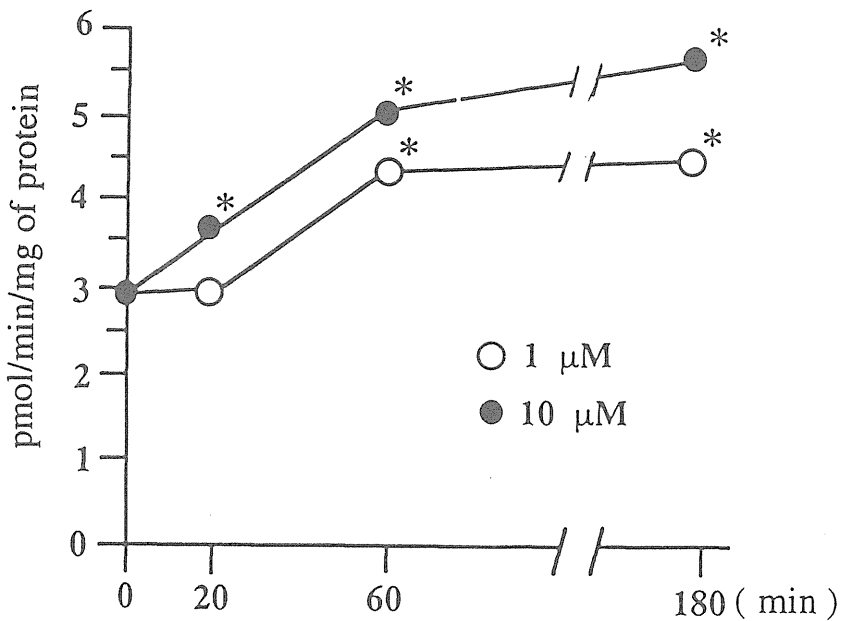


Fig.22. Effect of continuous incubation of etoposide on dck activity in L1210 cells. L1210 cells were incubated with etoposide for 20, 60 or 180min.

All values show the means  $\pm$  SD.

\*  $P < 0.01$  as compared with control treated group.

本節での検討によって、dck 活性は etoposide 処理後 20 分ですでに、上昇することが明かとなった。また、この効果は濃度依存的であり、1  $\mu$ 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、前節での 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一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、本節で明らかにした 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ている。

## 第 3 章 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 時間先行投与の治癒率が最も高く、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) ara-C の細胞内蓄積に対する etoposide の抑制効果は、樹立白血病細胞より患者白血病細胞においてより著明であった。

5) 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、如何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 投与の三つの投与方法についてまとめると以下のようになる。

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、不確定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なった結果、劇的な治療効果を生みだした。

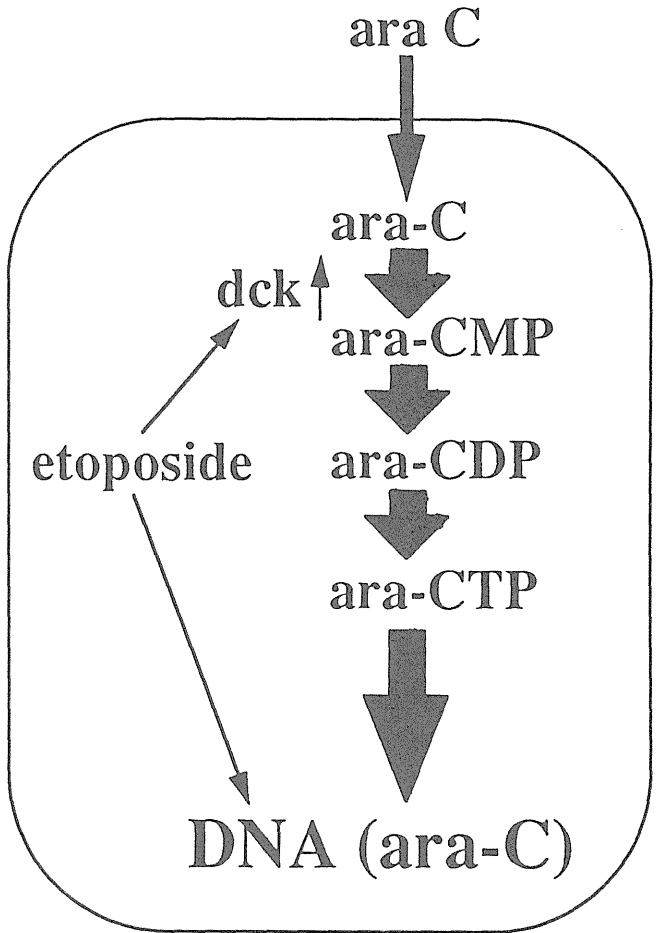
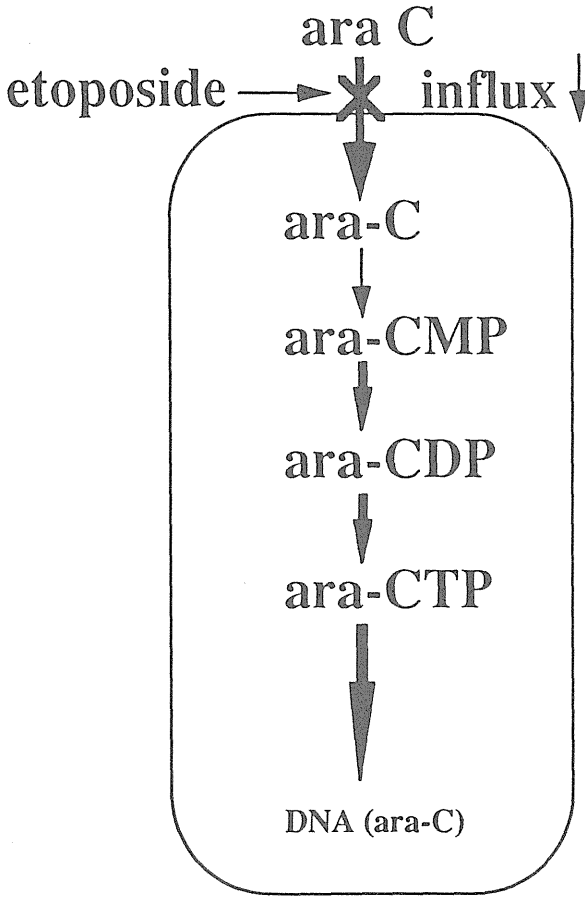
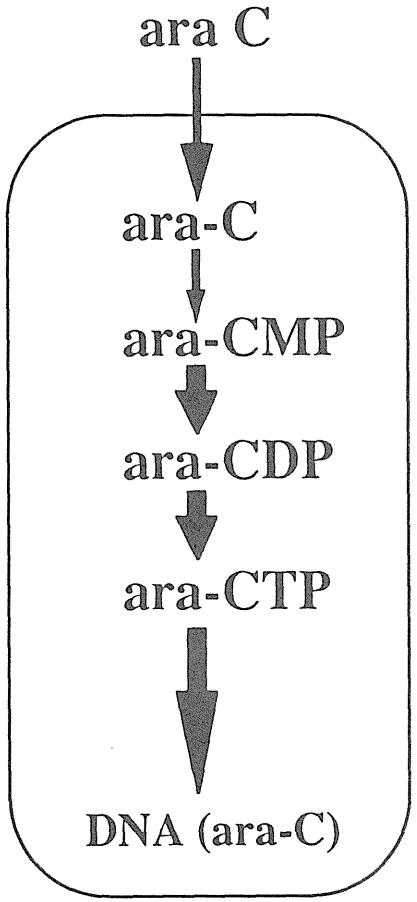
本研究で得られた成果は、臨床の常識に一考をもたらし、白血病に対する治療に科学的な根拠を与えたものであると考えている。

これらの研究成果は、三重大学医学部小児科において 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<sup>(43)</sup>。

ara-C

etoposide + ara-C

etoposide → ara-C





## 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教授 櫻井實先生に深謝の意を表します。

本研究を行なうにあたり、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 大久保俊樹先生、東川正宗先生、川崎肇先生に深謝致します。

また、本研究を行ないかつ学位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教授 森本雍憲先生、城西大学薬学部教授 川嶋洋一先生、城西大学薬学部助教授 白幡晶先生に深謝致します。

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助手 沼尻幸彦先生及び教室員の諸氏、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。

## 実験の部

### 第 1 章 実験材料及び方法

細胞：L1210 細胞は塩野義製薬研究所（大阪）より供与を受け、三重大学動物センターにて、BDF1 マウスの腹腔内移植により継代したものをを用いた。

動物：L1210 細胞  $1 \times 10^6$  個を腹腔内移植したオスの BDF1 マウス（体重 20～22g）を用いた。飼育は、三重大学動物センターにて動物実験用固形飼料と水道水を自由に摂取させ、温度 23℃ 明暗サイクル 12 時間で行なった。

薬剤：Etoposide は ブリストルマイヤーズ 株式会社及び日本化薬株式会社、ara-C は日本新薬株式会社より供与を受けたものをを用いた。両薬剤は投与直前に、生理食塩水で希釈した。

薬剤投与方法：L1210 細胞移植後、1、4、7 日目に、etoposide, ara-C を単剤、同時又は各投与スケジュールに従って希釈した薬剤 0.2ml を腹腔内投与した。またコントロール群にも生理食塩水 0.2ml を同様の投与スケジュールで腹腔内投与した。

薬剤投与量：Etoposide 7.5 及び 15mg/kg, ara-C 25 及び 500mg/kg と設定した。

抗腫瘍効果の評価：腫瘍細胞移植後 120 日以上生存は治癒とみなした。また腫瘍細胞移植日及び移植後 7 日目にマウスの体重を測定し、急性毒性の評価を行なった。

## 第 2 章 実験材料及び方法

### 第 1 節

アルカリシヨ糖密度勾配遠心法は、Friedman らの方法に準じて行なった<sup>(44)</sup>。L1210 細胞を腹腔内移植した 3 日目の BDF1 マウスに、 $[^3\text{H}]$ thymidine ( Thd ) 1.48MBq を腹腔内投与し、さらに 12 時間後、etoposide 15mg/kg を腹腔内投与した。Etoposide 投与後 10 分、1,3,6 時間に細胞をマウス腹腔内より採取し、氷冷した PBS ( phosphate buffered saline) で洗浄後、 $5 \times 10^5$  cells/ml となるように同液に浮遊させた。次に、30ml 超遠心管に、60% のシヨ糖液 ( 0.1M 水酸化ナトリウム, 0.9M 塩化ナトリウム 及び 0.01M エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムの混液 ) 5ml を入れた後、5 ~ 20% のシヨ糖勾配液 ( 0.1M 水酸化ナトリウム, 0.9M 塩化ナトリウム 及び 0.01M エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムの混液 ) 20ml とその上に 0.45M 水酸化ナトリウム, 0.55M 塩化ナトリウム 及び 0.11M エチレンジアミン四酢酸のアルカリ溶液を 1ml のせ、 $5 \times 10^5$  個の細胞を静かに重層した。2 時間 4°C にて保冷後、Beckman SW 27 rotor で 4°C 80,000xg にて 2 時間超遠心し、底から 1 分画を 1ml とし、合計 27 分画に分取した。各画分には、1N 塩酸 60%トリクロロ酢酸混液 100 $\mu$ l を加え、20分間氷冷後、遠心分離したDNA に、5% トリクロロ酢酸混液 200 $\mu$ l を加え、15 分間沸騰水中にて溶解した。そして、各々の放射活性を LKB 1219 液体シンチレーションカウンターにて測定し、DNA 鎖切断と修復について検討を行なった。

## 第 2 節

細胞、動物及び薬剤は第 1 章で述べた同じ条件のものを用いた。

### ヌクレオチドプールの測定

#### 1) リボヌクレオチドプールの抽出及び分析

$1 \times 10^6$  個の L1210 細胞を腹腔内移植した BDF1 マウス 3 日目に、etoposide 15mg/kg を腹腔内投与し、投与後 1、3、6 時間に細胞を採取した。腹腔内からの細胞採取は、トリスアミノメタン：塩化アンモニウムの 1:9 の混液により行なった。採取した  $2 \times 10^7$  個の細胞は、氷冷した PBS にて 2 回洗浄後、1.5ml のマイクロテストチューブに移し、0.6N トリクロロ酢酸  $200 \mu\text{l}$  を加えて、 $4^\circ\text{C}$  で 10 分間攪拌振盪した。さらに 180xg, 1 分間の遠心分離後、その上清を別のマイクロテストチューブに移し、フレオン：オクチルアミンの 7.8:2.2 の混液を  $300 \mu\text{l}$  加えて、 $4^\circ\text{C}$  で 5 分間攪拌振盪した。180xg, 1 分間の遠心分離後、その上層 (細胞内酸可溶性分画) が pH7 になっていることを確認し、その 50~ $60 \mu\text{l}$  をリボヌクレオチドプール用とした。

#### 2) デオキシリボヌクレオチドプールの抽出及び分析

この分析は、Khyme, Santi の変法により行なった<sup>(45,46)</sup>。デオキシリボヌクレオチドプール分析用として、上述の酸可溶性分画  $100 \mu\text{l}$  を別のマイクロテストチューブに移した。リボヌクレオチドプールを除くためにまず 0.2M 過ヨウ素酸  $20 \mu\text{l}$  を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 2 分間反応後、1M ラ

ムノース  $2\mu\text{l}$ 、並びにリン酸で pH7 に調整した 0.4M メチルアミン  $30\mu\text{l}$  を加えて、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間反応後、分析まで  $-20^\circ\text{C}$  で保存した。

分析と定量は、次で述べる高速液体クロマトグラフィー法によって行なった。

### 3) 高速液体クロマトグラフィー

細胞内ヌクレオチドプールの分析には、ウォーターズ社 ALC/GPC 204 型高速液体クロマトグラフ装置を用い、Partisil 10-SAX カラムを使用した。分離は流速  $1.0\text{ ml/min}$  で行ない、溶出液には、A液 0.05M リン酸二カリウム (pH 3.35M)、B液 0.5M リン酸二カリウム (pH 4.7M) を用い、A 液は 100% から開始し、linear gradient で 20 分後に A 液 25%、B 液 75% としその状態を 40 分続けた。検出は、波長  $254\text{nm}$  で行ない、記録は島津社製の CR-2A を用いた。定量は、標品により作成した検量線を用いた。細胞内デオキシリボヌクレオチドプールの分析には、TSK gel DEAE-2SW カラムを使用した。分離は流速  $0.7\text{ml/min}$  で行ない溶出液には、0.06M リン酸一ナトリウム (pH 6.6 with 20% アセトニトリル) を用いた。検出は波長  $254\text{nm}$  で行なった。定量は、標品により作成した検量線を用いて検討した。

### 細胞周期の測定

$1 \times 10^6$  個の L1210 細胞を腹腔内移植後 3 日経過した BDF1 マウスに etoposide  $15\text{mg/kg}$  を腹腔内投与した。細胞は etoposide 投与後、

3,6,10 時間にトリスアミノメタン：塩化アンモニウムの 1:9 の混液によって腹腔内から採取した。さらに細胞を 70% エタノールで固定後、プロピディウムアイオダイドで DNA を染色し、EPICS-C フローサイトメーターを用いて測定した。DNA のヒストグラムは、矩形法により解析した (23,24,25,47,48,49)。

### 第 3 節

細胞：マウス白血病細胞株 ( P388, L1210 ) 及び 樹立ヒト白血病細胞株 ( HL60, K562, Dandi, NALM18, C7, PEER, NKBI, MOLT-4 ) は、10% 胎児牛血清, 20  $\mu$  M 2-メルカプトエタノールを加えた RPMI ( Roswell Park Memorial Institute ) 1640 培地中で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 95% 空気存在下で継代培養したものである。各耐性細胞[P388 ara-C 耐性 ( P388/ara-C<sup>r</sup> ), P388 etoposide 耐性( P388/etoposide<sup>r</sup> ), P388 ara-C etoposide 耐性(P388/ara-C<sup>r</sup>,etoposide<sup>r</sup>)] は、三重大学医学部小児科学講座研究室にて in vitro で薬剤濃度を段階的に上げることで樹立した<sup>(28)</sup>。P388/ara-C<sup>r</sup> は、deoxycytidine kinase 欠損、P388/etoposide<sup>r</sup> は P-グリコプロテイン陽性により、P388/ara-C<sup>r</sup>,etoposide<sup>r</sup> は両者の性質を有する変異細胞である。患者白血病細胞は、急性リンパ性白血病であり初発で未治療の白血病細胞を用いた。

薬剤：[<sup>3</sup>H] ara-C ( 30Ci/mmol ) は Amersham Japan 社より購入したものをを用いた。

## ara-C 膜輸送及び細胞内蓄積量の測定

1) influx: RPMI 培養液に浮遊させた  $1 \times 10^7$  個の P388 と [ $^3\text{H}$ ]ara-C  $1 \mu\text{M}$  と  $100 \mu\text{M}$  ( $1 \mu\text{Ci/ml}$ ) との反応液をシリコンオイル (シリコン : 流動パラフィン = 42:8) に重層して 30 秒間接触後、 $4^\circ\text{C}$   $18,000 \times g$  にて 1 分間遠沈した。この操作により細胞成分は管底に沈殿を形成した。次いで注意深く培養液を除去し、生理食塩水で管壁を 5 回洗浄した後、オイルを吸引除去し、細胞成分を分離した。さらに細胞に  $0.4\text{N}$  水酸化カリウムを加えて、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間保存し溶解した後、 $1\text{N}$  塩酸で中和し、アクアゾール  $5\text{ml}$  を加え、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。またシリコンオイル上で細胞と [ $^3\text{H}$ ]ara-C とを接触直後に遠沈した群のカウントを細胞表面及び細胞間の培養液中の [ $^3\text{H}$ ]ara-C によるカウントとして全ての測定値から差し引いて補正を行なった。

2) 細胞内蓄積 : RPMI 培養液中に浮遊させた  $1 \times 10^7$  個の P388 に [ $^3\text{H}$ ]ara-C  $1 \mu\text{M}$  及び  $100 \mu\text{M}$  ( $1 \mu\text{Ci/ml}$ ) と etoposide 0、10、100、 $1000 \mu\text{M}$  をそれぞれ同時に添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間培養した。培養後、反応液をシリコンオイルに重層して、 $4^\circ\text{C}$   $18,000 \times g$  にて 1 分間遠沈し、上述と同様の操作で放射活性を測定した。また患者白血病細胞は、白血病細胞が白血球細胞が白血球数の 95% 以上である患者末梢血をフィコールコンレイに重層して、 $180 \times g$  にて 30 分間遠沈した後、白血球画分を洗浄することにより得た。

3) efflux : RPMI 培養液中に浮遊させた  $1 \times 10^7$  個の P388/ara-C<sup>r</sup> と

[<sup>3</sup>H]ara-C 1 μM (1 μCi/ml) を 37 °C で 1 分間培養した液、0 °C 180xg で 5 分間遠沈した。上清を除去し、細胞成分を氷上で分離し、etoposide (0,100 μM) 存在下で 37°C で新鮮な RPMI 培養液に再浮遊させた。再浮遊 0、45、90 秒、3、5、8 分後に反応液をシリコンオイルに重層して、0 °C 18,000xg にて 1 分間遠沈し、上述と同様の操作で放射活性を測定した。

#### 第 4 節

細胞及び動物は、第 1 章で述べた同じ条件のものを用いた。薬物は、前節と同じものを用い、投与直前に生理食塩水に溶解して使用した。

[<sup>3</sup>H]ara-C 1 μCi と etoposide 15mg/kg は各投与スケジュールで腹腔内投与した。

#### 酸可溶性及び酸不溶性分画の定量

細胞はマウス腹腔から氷冷した PBS によって採取した。次に  $1 \times 10^7$  個の細胞をマイクロテストチューブに取り、0.6N トリクロロ酢酸 500 μl を加え、4 °C で 10 分間攪拌振盪した。1 分間 180xg での遠沈によって上清 (酸可溶性分画) と沈殿物 (酸不溶性分画) に分離した。さらに沈殿物は、0.6N トリクロロ酢酸で 2 回洗浄し、0.4N 水酸化カリウムを 0.5ml 加え、37 °C で 12 時間放置し溶解した。ara-C の DNA への組み込み量は、酸不溶性分画の [<sup>3</sup>H]ara-C の放射活性を測定することにより定量した。放射活性は、LKB 1219 液体シンチレーションカウンターで



測定した。

## 第 5 節

細胞：第 1 章で述べた同じ条件のものを用いた。

薬剤：Etoposide は日本化薬株式会社、 $[^3\text{H}]$  デオキシシチジンは Amersham Japan 社より購入したのものを用いた。他の試薬はすべてシグマ社より購入したのものを用いた。

### dck 活性の測定

dck 活性の測定は Cheng らの変法により行なった<sup>(38)</sup>。まず薬剤処理した L1210 細胞を採取し、1500xg 10 分で遠沈し培養液である上清を除去した。次にマイクロテストチューブに細胞を移し、生理食塩水 1ml を加えて 5000xg 1 分で遠沈した。上清の生理食塩水除去後、下記の緩衝液 A 200  $\mu\text{l}$  に再浮遊させた。

#### 「緩衝液 A」

トリス塩酸 (pH7.6) 50mM, ジチオスレイトール 2mM, 20% グリセロール, 塩化フェニルメタンスルホニル 0.5mM を順次加え精製水にて全量とする。

続いて凍結及び解凍を 3 回繰り返した後、14,000xg で 5 分遠沈した。その上清はマイクロテストチューブに移し、次の測定段階まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

マイクロテストチューブに保存した細胞 20  $\mu\text{l}$  と下記の緩衝液 B 30

$\mu\text{l}$  を氷上で加え、よく振盪した後、 $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分 放置した。その後、 $50\mu\text{l}$  の溶液はWhatman DE-81 フィルター上に静かにのせて、約 15 分 放置した。次に乾いたフィルターを 1  $\ell$  の水が入った容器に入れ、30 分 で 3 回洗浄した。そしてフィルターを充分乾燥させた後、放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。また 25% ヒト血清アルブミンを用いてタンパクの補正を行ない、その結果は、 $\text{pmol of dCMP/min per mg of protein}$  で示した。

「緩衝液 B」

デオキシシチジン  $10\mu\text{M}$ , ATP  $10\text{mM}$ , 塩化マグネシウム $10\text{mM}$ , トリス塩酸( pH 7.5 )  $50\text{mM}$ , フッ化ナトリウム $15\text{mM}$ , ジチオスレイトール $10\text{mM}$ , シチジン  $1\text{mM}$  を順次加え精製水にて全量とする。

## 引用文献

- 1) Rivera,G., Avery,T. and Roberts,D.: Eur J Cancer,11,639-647 ( 1975 ).
- 2) Dombernowsky,P. and Nissen,N.I.: Eur J Cancer,12,181-188 ( 1976 ).
- 3) koza,I., Balazova,E. and Ujhazy,V.: Neoplasma,27,691-696 ( 1980 ).
- 4) 大井一弥,大久保俊樹,川崎肇ほか：薬学雑誌,109,11,865-868 ( 1989 ).
- 5) Issell,B.F. and Crooke,S.T.: Cancer Treatment Reviews,6,107-124  
( 1979 ).
- 6) Schmoll,H.: Cancer Treatment Reviews,9,21-30 ( 1982 ).
- 7) Wozniak,A.J. and Ross,W.E.: Cancer Res,43,120-124 ( 1983 ).
- 8) Long,B.H., Musial,S.T. and Brattain,M.G.: Biochemistry,23,1183-1188  
(1984 ).
- 9) Ross,W., Rowe,T. and Liu,L.et al.: Cancer Res,44,5857-5860 ( 1984 ).
- 10) Long,B.H., Musial,S.T. and Brattain,M.G.: Cancer Res,45,3106-3112  
( 1985 ).
- 11) Pommier,Y., Schwartz,R.E. and kohn,K.W.: Cancer Res,46,611-616  
( 1986 ).
- 12) Evan,J.S.,Musser,E.A. and Mengel,G.D.et al.: CancerRes,24,1285-1293,  
( 1964 )
- 13) Finklestein,J.Z.,Scher,J.and Karon,M.: Cancer Chemotherapy,54,1,35-39,  
( 1970 ).
- 14) Furth,J.J. and Cohen,S.S.: Cancer Res,28,2061-2067 ( 1968 ).

- 15) Major,P.P.,Egan,E.M. and Kufe,D.W.et al.: Biochem Pharmacol,31, 2937-2940 ( 1982 ).
- 16) Kufe,D.,Spriggs,D. and Munroe,D.et al.: Blood,64,1,54-58 ( 1984 ).
- 17) 大井一弥,大久保俊樹,川崎肇ほか：薬学雑誌,110,9,673-677 ( 1990 )
- 18) Roberts,D.,Hilliard,S. and Peck, C.: Cancer Res,40,4225-4231( 1980 ).
- 19) Ooi,K.,Ohkubo,T. and Sakurai.M. et al.: Jpn.J.Hosp.Pharm,22,2142-144 ( 1996 ).
- 20) Karon,M. and Shirakawa,S.: Cancer Res,29,687-696 ( 1969 ).
- 21) Bhuyan,B.K., Fraser,T.J. and Neil, G.L. et al.: Cancer Res,33,888-894 ( 1973 ).
- 22) Fietkau,R.,Friede,H.: Cancer Res,44,1105-1113 ( 1984 ).
- 23) Fried,J. and Mandel,M.: Comput.Prog.Biomed,10,218-230 ( 1979 ).
- 24) Waggoner,A.S.:Wilry-Liss,New York, 445-467 ( 1990 ).
- 25) 徳橋和子：日皮会誌.,99,6,673-682 ( 1989 ).
- 26) Krishan,A., Paika,K. and Frei,E.: J.Cell Biol,66,521-530 ( 1975 ).
- 27) Kalwinsky,D.K. and Fridland,A.: Cancer Res,43,1592-1597 (1983).
- 28) 大井一弥,大久保俊樹,東川正宗ほか：薬学雑誌,112,11,832-836 ( 1992 ).
- 29) Ooi,K.,Ohkubo,T. and Sakurai.M. et al.: Jpn.J.Clin.Pharmacol Ther., 27, 3, 569-573 ( 1996 ).
- 30) Wiley,J.S., Jones,S.P. and Sawyer,W.H.: Eur J Cancer Clin Oncol,19,8,

- 1067-1074 ( 1983 ).
- 31) Jamieson,G.P., Snook,M.B. and Wiley,J.S.et al.: Cancer Res,49,309-313 ( 1989 ).
- 32) Major,P.P., Minden,M.D. and Kufe,D.W.et al.: Medical Sciences,78,5, 3235-3239 ( 1981 ).
- 33) Cohen,S.S.: Cancer ,40,509-518 ( 1977 ).
- 34) Loike,J.D. and Horwitz,S.B.: Biochemistry,15,25,5435-5442 ( 1976).
- 35) Yalowich,J.C. and Goldman,I.D.: Cancer Res,44,984-989 ( 1984 ).
- 36) 藤井雅志,田中隆,西満正ほか : Oncologia,24,6,67-72 ( 1991 )
- 37) Ooi,K.,Ohkubo,T. and Sakurai,M.et al.: Cancer Investigation,11,4, 388-392 ( 1993 )
- 38) Ooi,K.,Ohkubo,T. and Sakurai,M.et al.: Biol.Pharm.Bull,19,10, 1382-1383 ( 1996 ).
- 39) Momparler,R.L. and Fischer,G.A.: J Biol Chem,243,16,4298-4304 ( 1968 ).
- 40) Durham,J.P. and Ives,D.H.: J Biol Chem,245,9,2276-2284 ( 1970 ).
- 41) Kufe,D.W., Major,P.P. and Beardsley,G.P.et al.: J Biol Chem, 19,255,8997-9000 ( 1980 ).
- 42) Wang,L.M.,Kucera,G.L. and Capizzi,R.L.et al.: Biochim Biophys Acta, 1202,309-316 ( 1993 ).
- 43) 東海小児ガン研究グループプロトコール (1991)

- 44) Friedman,C.A., Kohn,K.W. and Erickson,L.C.: *Biochemistry*,14,18,  
4018-4023 ( 1975 )
- 45) Khym,J.X.: *Clinical Chemistry*,21,9,1245-1252 ( 1975 )
- 46) Alfonso,L., Pogolotti,Jr. and Santi,D.V.: *Analytical Biochemistry*,126,  
335-345 ( 1982 )
- 47) 井上勝一ほか：日臨細胞誌,21,1-7 ( 1981 ).
- 48) 高本滋、太田和雄：蟹書房,450-467 ( 1988 ).
- 49) 井上勝一：Oncologia,23,12-20 ( 1990 ).
- 50) Cheng,Y.C., Domin,B. and Lee,L.S.: *Biochem Biophys  
Acta*,481,481-492 ( 1977 ).