

膀胱腫瘍に対する 4'-epi-adriamycin の 膀胱腔内注入療法に関する基礎的研究

岡山大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 大森弘之教授)

津 島 知 靖

FUNDAMENTAL STUDIES ON INTRAVESICAL INSTILLATION OF 4'-EPI-ADRIAMYCIN FOR TREATMENT OF BLADDER CANCER

Tomoyasu TsUSHIMA

From the Department of Urology, Okayama University Medical School

(Director: Prof. H. Ohmori)

4'-Epi-adriamycin (EPI) is a new derivative of adriamycin (ADM). The cytotoxic effect of EPI on the T24 cell line, an established cell line from human urinary bladder carcinoma, the distribution of the drug in blood, urine and tissues of various organs and histopathological change in the bladder mucosa in dogs following intravesical instillation of the drug, were studied.

The cytotoxicity of EPI on the cultured T24 cells was examined by a colony formation method. After 2 hours exposure, EPI was slightly less cytotoxic than ADM, but showed higher cytotoxicity than mitomycin C or aclacinomycin A.

The drug levels in blood, urine and tissues were measured by HPLC following bladder instillation in Beagle dogs with bilateral cutaneous ureterostomy. They were elevated in proportion to the drug concentration instilled intravesically. After 50 mg of EPI dissolved in 10 ml of physiological saline was instilled intravesically, the blood levels of EPI were not elevated significantly and reached the maximum levels of only 0.222 $\mu\text{g/ml}$. The total amount of EPI excreted into the urine during the 10 hours after instillation was 389 μg which was equivalent to 0.78% of instilled EPI. The tissue levels of 50 mg of EPI after 6 hours retention were $1216 \pm 1094 \mu\text{g/g}$ in the bladder mucosa, $259 \pm 250 \mu\text{g/g}$ in the bladder muscular layer, $7.65 \pm 1.19 \mu\text{g/g}$ in the iliac node, $22.1 \pm 4.8 \mu\text{g/g}$ in the cortex of kidney, $15.1 \pm 3.8 \mu\text{g/g}$ in the medulla of kidney, $11.3 \pm 1.0 \mu\text{g/g}$ in liver and $5.80 \pm 1.20 \mu\text{g/g}$ in the heart. To examine the effect of the drug on the bladder mucosa, 50 mg of EPI was instilled intravesically. After 6 hours retention, bladder mucosa was observed through a microscope and a scanning electron microscope. Only exfoliation in the mucosa was observed sporadically and no histological change was observed in the submucosal layer.

The above results suggest that EPI is a suitable drug for intravesical chemotherapy to bladder cancers.

Key words: 4'-epi-adriamycin, Intravesical chemotherapy, Fundamental study, T24, Beagle

緒 言

制癌剤の膀胱腔内注入療法は表在性膀胱腫瘍に対するもっとも効果的な治療法のひとつである。岡山大学では Adriamycin (以下 ADM と略す) が本療法に適した薬剤と考え基礎的、臨床的に検討してきた¹⁻⁴⁾。ADM 注入療法ではすでに高い有効率が得られているが、副作用として注入濃度に応じて正常膀胱粘膜が障害され膀胱刺激症状を起こす。したがって、ADM と同等の抗腫瘍効果を有し、副作用の少ない誘導体が膀胱腔内注入療法に導入されれば、本療法の成績はより優れたものになると考えられる。

4'-epi-adriamycin (以下 EPI と略す) はファルミタリア カルロエルバ社研究所 (イタリア, Milan) で開発された ADM の誘導体^{5,6)}であり、基礎的および全身投与による臨床的検討では抗腫瘍効果は ADM とほぼ同等であり、副作用の頻度および程度は ADM より軽度である⁷⁻⁹⁾。以上の点から、著者は EPI を膀胱腔内注入療法に使用すれば、低頻度の副作用で ADM と同等以上の有効率を得ることが可能ではないかと考え基礎的検討を開始した。まず、人膀胱癌培養細胞株 T 24 に対する殺細胞効果を colony formation method にて検討した。さらに、ビーグル犬を用いて EPI の膀胱腔内注入における体内動態および正常膀胱粘膜に与える影響について検討したので報告する。

材料と方法

I. 人膀胱癌培養細胞株 T 24 に対する EPI の殺細胞効果

T 24 細胞はよく知られた膀胱癌培養細胞株であり、1979年12月に日本医科大学附属第1病院泌尿器科 中神義三助教授より岡山大学に提供された。岡山大学での培養方法は20% bovine serum 添加 Eagle's MEM を用い、kanamycin 60 $\mu\text{g/ml}$ を培養液中に添加した。pH は NaHCO_3 を加え 7.2~7.4 となるように調節した。培養はプラスチックシャーレ (3,002 dish, Falcon Co. USA) を用い開放系とし、37°C, 5% CO_2 下で静置培養をおこなった。継代は 0.2% trypsin および 0.04% EDTA の等量混合液にて週1回おこなっている。

制癌剤感受性試験は colony formation method を用いた。Dish 内に semiconfluent monolayer に発育している T 24 細胞を前述のごとく剝離、分散し、 10^5 個/ml の細胞浮遊液を 3 ml ずつ Falcon 3,002 dish に inoculate し、48時間培養をおこなっ

た。ついで、0.2% trypsin および 0.04% EDTA の等量混合液を加え、pipetting をおこない single cell suspension とした。これを前述の培養液にて稀釈し、生細胞数 100個/ml の細胞浮遊液を作成した。あらかじめ 3,002 dish 内に培養液 2 ml を入れておき、前述の細胞浮遊液を 1 ml ずつ分注し、100個/dish とした。37°C, 5% CO_2 下で24時間培養の後、培養液をすて、各種濃度の薬剤を含む培養液で2時間あるいは24時間、同様に incubate し薬剤に接触させた。その後、再び薬剤を含む培養液を除去し、Hanks 液にて2回洗浄し、新鮮な培養液を 3 ml 加えた。10日から14日後にメチルアルコールにて固定しギムザ液にて染色後、細胞数20個以上より成るコロニー数を計算した。実験は各薬剤、各濃度あたり3枚のシャーレを用い、平均値を求めた。また、この実験を3回繰り返しておこなった。

制癌剤としては EPI (注射用製剤、ファルミタリア カルロエルバ株式会社) に加え、mother compound である ADM (アドリアン[®]注、協和発酵工業株式会社)、同じ anthracycline 系制癌剤の Aclacinomycin A (以下 ACR と略す、アクランソン[®]注射用、三栄オーシャン株式会社)、さらに、現在膀胱腔内注入療法に広く用いられている mitomycin C (以下 MMC と略す、マイトマイシン[®]協和S、協和発酵工業株式会社) を用いた。薬剤を滅菌蒸留水にて溶解した後、培養液で稀釈し $1.8 \times 10^{-6}\text{M}$ より5段階3倍稀釈をおこなった。なお、薬剤の調製は exposure 当日におこなった。

II. ビーグル犬を用いた膀胱注後の血中、尿中移行、臓器内濃度および正常膀胱粘膜に与える影響について

生後7ないし10カ月、体重7~13 kg の雌性ビーグル犬 (富士アニマルファームより購入) を用いた。ケタラル (5~10 mg/kg) 筋肉内麻酔およびネプター (2.0~3.0 mg/kg) 静脈内麻酔下に、仰臥位に固定した後、経腹膜的に両側尿管を露出、尿管カテーテルを挿入し尿管皮膚瘻を作製した。ついで、膀胱および尿道を露出し、尿道に切開を加えネラトンカテーテルを膀胱まで挿入し、生理食塩水 (以下生塩水と略す) または薬剤を注入し膀胱頸部を結紮した。血中、尿中移行および臓器内濃度の検討には合計21頭のビーグル犬を使用し、6群に分けて生塩水または薬剤を膀胱腔内に注入した。第1群は EPI 20 mg を生塩水 10 ml に溶解 (2,000 $\mu\text{g/ml}$)、第2群は EPI 50 mg を生塩水 10 ml に溶解 (5,000 $\mu\text{g/ml}$)、第3群は EPI 100 mg を生塩水 10 ml に溶解 (10,000 $\mu\text{g/ml}$)、第4群は ADM 50 mg を生塩水 10 ml に溶解

Table 1. Experimental method using dogs.

Group	Drug Concentration of Bladder Instillation	Retained Time (hrs.)	Time of Sacrifice	No. of Dogs
1	EPI 2000 μ g/ml	3	3	1
		6	6	1
		10	10	1
2	EPI 5000 μ g/ml	2	2	3
		6	6	3
		10	10	3
3	EPI 10000 μ g/ml	6	10	1
4	ADM 5000 μ g/ml	2	2	1
		6	6	1
		10	10	1
5	ACR 1000 μ g/ml	2	2	1
		6	6	1
		10	10	1
6	0.9% NaCl	10	10	1

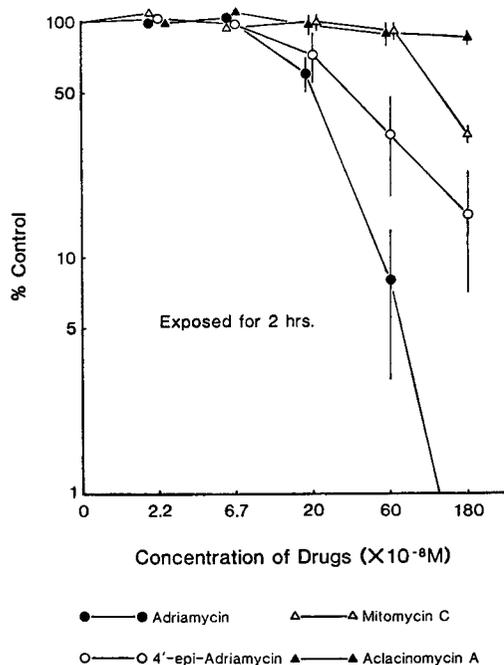


Fig. 1. Effect of various anticancer drugs on the plating efficiency of T24 cells. Bars indicate mean \pm SD.

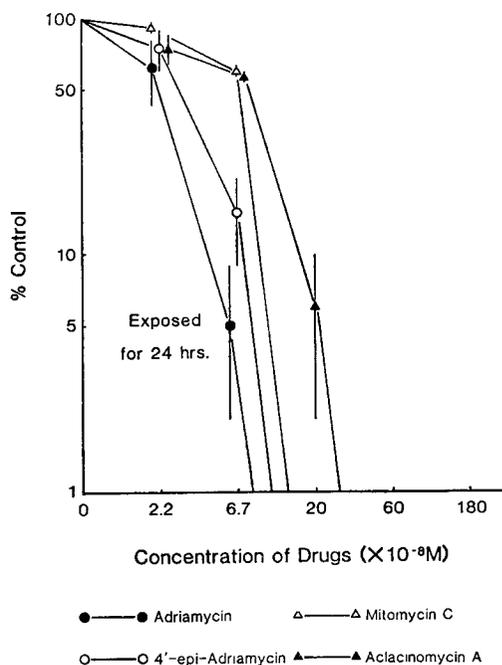


Fig. 2. Effect of various anticancer drugs on the plating efficiency of T24 cells. Bars indicate mean \pm SD.

(5,000 μ g/ml), 第5群は ACR 10 mg を生塩水 10 ml に溶解 (1,000 μ g/ml) し膀胱腔内に注入した。第6群は対照として生塩水 10 ml を膀胱腔内に注入した。薬剤の保持時間および注入後屠殺までの時間は Table 1 に示した。血中濃度については注入前、注入後 1, 2 時間および以後屠殺まで 2 時間ごとにヘパ

リン採血し、血漿を分離し $-20^{\circ}C$ にて凍結保存の後、測定に供した。尿中濃度については注入後 2 時間ごとの尿を左右別に採取し同様に $-20^{\circ}C$ にて凍結保存の後、測定に供した。また、薬剤の尿中排泄量は尿中濃度および尿量より計算した。臓器内濃度は膀胱 (三角部、後壁、側壁の粘膜および筋層)、腸骨リンパ節、

腎(皮質および髄質), 肝, 心について測定した. 各臓器はビーグル犬を屠殺後, 速やかに摘出し, 生塩水にて付着した薬剤および血液を洗浄除去した後, -20°Cにて凍結保存の後, 測定に供した. 血中および尿中濃度は $\mu\text{g/ml}$, 臓器内濃度は $\mu\text{g/g tissue}$ にて示した. なお, 測定はファルミタリア カルロエルパ株式会社試験室に委託し, HPLC 法にておこなった.

正常膀胱粘膜に対する EPI の影響については9頭のビーグル犬を用いて検討した. 薬剤は生塩水 10 ml に溶解し, 前述の方法で膀胱腔内に注入した. EPI 20 mg を1頭に, 50 mg を3頭に, 100 mg を1頭に注入した. 他に, ADM 50 mg を1頭に, ACR 10 mg を1頭に注入した. また, 2頭を control としてそれぞれ生塩水注入および無処置とした. 薬剤注入の6時間後にビーグル犬を屠殺, 膀胱を摘出し光顕的および走査電顕的に検討した.

結 果

I. 人膀胱癌培養細胞株 T24に対する EPI の殺細胞効果

結果は Fig. 1, 2 に示されるごとくである. 2時間薬剤を添加した場合の ED_{50} 値は ADM 0.13 $\mu\text{g/ml}$, EPI 0.20 $\mu\text{g/ml}$, MMC 0.30 $\mu\text{g/ml}$, ACR >1.46 $\mu\text{g/ml}$ であった. 24時間薬剤を添加した場合の ED_{50} 値は ADM 0.014 $\mu\text{g/ml}$, EPI 0.017 $\mu\text{g/ml}$, MMC 0.023 $\mu\text{g/ml}$, ACR 0.058 $\mu\text{g/ml}$ であった. この結果をもとに, ADM と EPI について 0.13 $\mu\text{g/ml}$ (ADM を2時間添加した場合の ED_{50} 値) の濃度で, colony formation method により各時間ごとの殺細胞効果をみたのが Fig. 3 である. ADM と EPI では著明な差は認められなかった.

II. ビーグル犬を用いた膀胱注後の血中, 尿中移行, 臓器内濃度および正常膀胱粘膜に与える影響について

1. 血中濃度

各群の血中濃度の平均値を Table 2 に示した. 注入前, 注入後1, 2時間目の血中濃度は2, 6, 10時間後に屠殺したビーグル犬より採血し測定した濃度の平均値であり, 注入後4, 6時間目の血中濃度は6, 10時間後に屠殺したビーグル犬より採血し測定した濃度の平均値であり, 注入後8, 10時間目の血中濃度は10時間後に屠殺したビーグル犬より採血し測定した濃度の平均値である. EPI の血中濃度は膀胱腔内に注入した薬剤の濃度に依存して上昇しており, 最高血圧

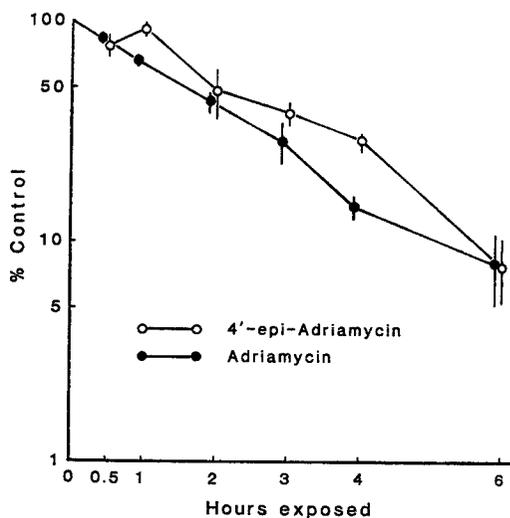


Fig. 3. Effect of 4'-epi-adriamycin and adriamycin on the plating efficiency of T24 cells as a function of exposure time. Bars indicate mean \pm SD.

Table 2. Plasma levels of 4'-epi-adriamycin, adriamycin and aclacinomycin A in dogs.

Drug Dose*	(ug/ml)				
	EPI 20mg (n=3)	EPI 50mg (n=9)	EPI 100mg (n=1)	ADM 50mg (n=3)	ACR 10mg (n=3)
Before	ND**	ND	ND	ND	ND
1 hr.	0.030 \pm 0.030	0.082 \pm 0.053	0.334	0.058 \pm 0.029	ND
2	0.042 \pm 0.024	0.114 \pm 0.052	0.215	0.127 \pm 0.026	ND
4	0.078 \pm 0.040	0.187 \pm 0.150	0.398	0.105 \pm 0.040	ND
6	0.035 \pm 0.016	0.190 \pm 0.131	0.286	0.119 \pm 0.006	ND
8	0.021	0.222 \pm 0.101	0.093	0.132	ND
10	0.025	0.112 \pm 0.049	0.067	0.062	ND

* Drugs were dissolved in 10ml of physiological saline.

**ND: Not detected

Table 3. Urinary levels of 4'-epi-adriamycin, adriamycin and aclacinomycin A in dogs.

Drug Dose*	(µg/ml)				
	EPI 20mg (n=3)	EPI 50mg (n=9)	EPI 100mg (n=1)	ADM 50mg (n=3)	ACR 10mg (n=3)
0-2 hrs.	3.447	3.558	10.418	4.209	0.023
2-4	7.647	16.410	25.319	15.575	0.044
4-6	8.190	16.550	25.322	14.840	0.080
6-8	5.768	10.869	17.171	21.467	0.266
8-10	5.698	8.959	7.463	19.809	0.290

*Drugs were dissolved in 10ml of physiological saline.

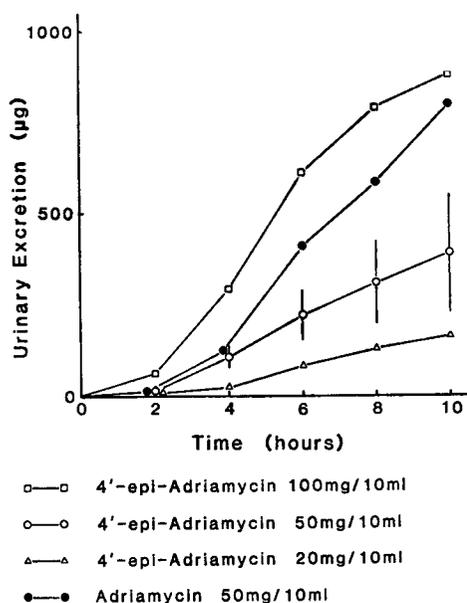


Fig. 4. Cumulative urinary excretion of 4'-epi-adriamycin and adriamycin in dogs. Bars indicate mean \pm SD.

濃度は EPI 20 mg 群 $0.078 \pm 0.040 \mu\text{g/ml}$, 50 mg 群 $0.222 \pm 0.101 \mu\text{g/ml}$, 100 mg 群 $0.398 \mu\text{g/ml}$, ADM 50 mg 群 $0.132 \mu\text{g/ml}$ であった。ACR は他の薬剤と比較して注入濃度が低かったためか測定限界以下であった。

2. 尿中濃度

各群の尿中濃度の平均値を Table 3 に示した。各ビーグル犬について左右分腎尿の単位時間あたりの濃度と尿量から尿中排泄量を計算し、尿中排泄量の総和を尿量の総和で除して該当する単位時間における尿中濃度とした。血中濃度と同様に、尿中濃度も膀胱腔内に注入した薬剤の濃度に依存して上昇していた。ま

た、EPI と ADM の比較ではほぼ同等の値を示した。さらに、10時間目に屠殺したビーグル犬の単位時間あたりの尿量および尿中濃度から尿中排泄量を計算した (Fig. 4)。注入開始後10時間までの総排泄量は、EPI 20 mg では $162 \mu\text{g}$, 50 mg 群では $389 \pm 162 \mu\text{g}$, 100 mg では $882 \mu\text{g}$ であり、また、ADM 50 mg では $799 \mu\text{g}$, ACR 10 mg では $6.78 \mu\text{g}$ であった。したがって、注入量に対する尿中排泄量の割合はそれぞれ0.81%, 0.78%, 0.88%, 1.60%, 0.07%となる。

3. 組織内濃度

薬剤を膀胱腔内に注入後2 (EPI 20 mg は3時間後に屠殺)、6および10時間後にビーグル犬を屠殺し、測定した組織内濃度を Table 4~6 に示した (腎および腸骨リンパ節の濃度は左右の平均値である)。膀胱壁は三角部、後壁および側壁に分割して検討したが、部位別の濃度はばらつきが大きく一定の傾向は認められなかった。6時間注入群の膀胱全体としての濃度の平均値は EPI 20 mg では粘膜 $983 \pm 127 \mu\text{g/g}$, 筋層 $247 \pm 114 \mu\text{g/g}$, EPI 50 mg 群では粘膜 $1,216 \pm 1,094 \mu\text{g/g}$, 筋層 $259 \pm 250 \mu\text{g/g}$, ADM 50 mg では粘膜 $1,431 \pm 630 \mu\text{g/g}$, 筋層 $143 \pm 72 \mu\text{g/g}$, ACR 10 mg では粘膜 $165 \pm 29 \mu\text{g/g}$, 筋層 $16.3 \pm 8.6 \mu\text{g/g}$ であった。他の組織も含めて EPI 50 mg 群と ADM 50 mg 群の比較ではほぼ同等の値であった。ACR は血中濃度、尿中濃度と同様に低値であった。

4. 膀胱粘膜に対する影響

病理組織学的な所見は Table 7 に示されるごとくである。EPI 20 mg/生塩水 10 ml の注入では粘膜および粘膜下層に変化は認められなかった。EPI 50 mg および ADM 50 mg では粘膜の剝離が散在性に認められたが、やはり、粘膜下層に影響はおよんでいなかった (Fig. 5)。EPI 100 mg では粘膜下層に浮腫お

Table 4. Tissue levels of 4³-epi-adriamycin, adriamycin and aclacinomycin A in dogs killed after 2 hours retention of drugs.

Drug Dose*		(ug/g)			
		EPI 20mg**	EPI 50mg	ADM 50mg	ACR 10mg
Bladder					
trigone	mucosa	830	668±356	1480	64.7
	muscle	150	124±33	137	22.8
lateral	mucosa	494	708±144	835	78.4
	muscle	91.2	75.9±6.7	66	9.56
posterior	mucosa	924	530±137	690	75.2
	muscle	138	103±57	123	9.14
Iliac node		2.62	1.35±0.48	1.19	0.34
Kidney	cortex	4.54	7.73±3.31	5.96	0.09
	medulla	1.79	4.25±1.99	6.04	0.05
Liver		0.96	3.08±1.03	0.84	ND***
Heart		0.19	2.26±0.54	2.13	0.12

* Drugs were dissolved in 10ml of physiological saline.

** Dog was sacrificed after 3 hours retention of drug.

***ND: Not detected

Table 5. Tissue levels of 4³-epi-adriamycin, adriamycin and aclacinomycin A in dogs killed after 6 hours retention of drugs.

Drug Dose*		(ug/g)				
		EPI 20mg	EPI 50mg	EPI 100mg**	ADM 50mg	ACR 10mg
Bladder						
trigone	mucosa	990	2043±1426	5150	2000	156
	muscle	356	537±247	517	243	28.5
lateral	mucosa	824	1033±539	570	1740	204
	muscle	90.4	97.1±17.0	68.5	107	11.1
posterior	mucosa	1135	572±368	585	553	136
	muscle	296	142±98	49.3	78.7	9.39
Iliac node		4.84	7.65±1.19	14.3	9.74	0.29
Kidney	cortex	12.1	22.1±4.8	14.0	27.6	ND***
	medulla	9.12	15.1±3.8	19.4	14.3	ND
Liver		2.66	11.3±1.0	10.3	10.1	ND
Heart		2.48	5.80±1.20	8.04	6.75	ND

* Drugs were dissolved in 10ml of physiological saline.

** Dog was sacrificed 10 hours after drug instillation.

***ND: Not detected

よび細胞浸潤が認められた。ACR では粘膜の軽度の剝離が認められたのみであった。

走査電顕的には EPI 20 mg では microridge の不鮮明化が認められた。EPI 50 mg では luminal cell の脱落および出血が軽度認められ、残存する luminal cell は microridge が不鮮明となり microvilli, bleb の出現が認められた (Fig. 6)。ADM 50 mg では EPI 50 mg とほぼ同等の所見であった。EPI 100 mg では luminal cell の脱落が中等度となった。ACR 10 mg では luminal cell の脱落はほと

んどなく、配列も整っている。しかし、表面には多数の bleb が認められた。

考 察

膀胱腫瘍に対する制癌剤の膀胱腔内注入療法は Semple¹⁰⁾ が podophyllin を使用したのが最初であり、その後、thio-TEPA¹¹⁾、Ethoglucid¹²⁾、BCG¹³⁾、MMC¹⁴⁾、carboquone (以下 CQ と略す)¹⁵⁾、ACR¹⁶⁾、bleomycin¹⁷⁾ などが検討されている。尾崎²⁾ は本療法に適した薬剤の条件として次の4点をあげて

Table 6. Tissue levels of 4'-epi-adriamycin, adriamycin and aclacinomycin A in dogs killed after 10 hours retention of drugs.

Drug Dose*		(ug/g)			
		EPI 20mg	EPI 50mg	ADM 50mg	ACR 10mg
Bladder trigone	mucosa	368	1754±727	1040	192
	muscle	41.6	225±149	170	56.1
lateral	mucosa	318	1297±642	735	215
	muscle	40.6	111±62	118	14.5
posterior	mucosa	508	755±398	585	137
	muscle	209	85.9±53.8	91.6	6.71
Iliac node		4.27	22.6±12.3	14.1	1.17
Kidney	cortex	5.26	25.4±1.6	28.7	ND**
	medulla	3.63	18.0±4.6	37.2	ND
Liver		2.78	12.3±3.3	8.70	ND
Heart		1.40	6.55±0.38	8.10	0.24

* Drugs were dissolved in 10ml of physiological saline.
**ND: Not detected

Table 7. Histological findings

Drug*		Mucosa		Submucosa		
		Exfoliation	Necrosis	Edema	Inflammation	Necrosis
EPI	20mg	-	-			-
	50mg	+	±			
	100mg	++	+	+	+	
ADM	50mg	+	-			
ACR	10mg	±	-			

*Drugs were dissolved in 10ml of physiological saline.
Drugs were retained for 6 hours.

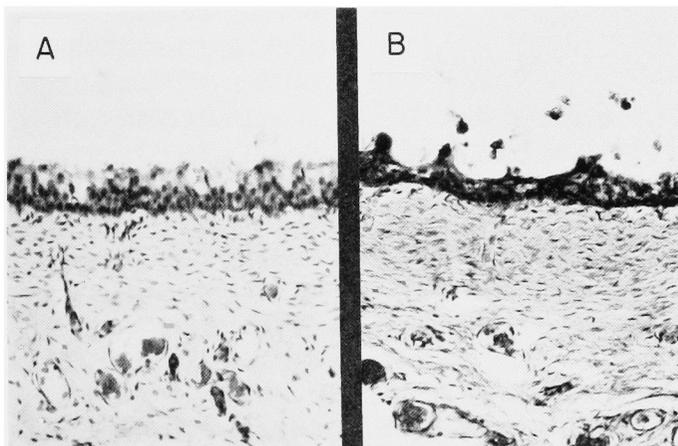


Fig. 5. Light microscopic view of the bladder treated with A) 4'-epi-adriamycin and B) adriamycin for 6 hours.

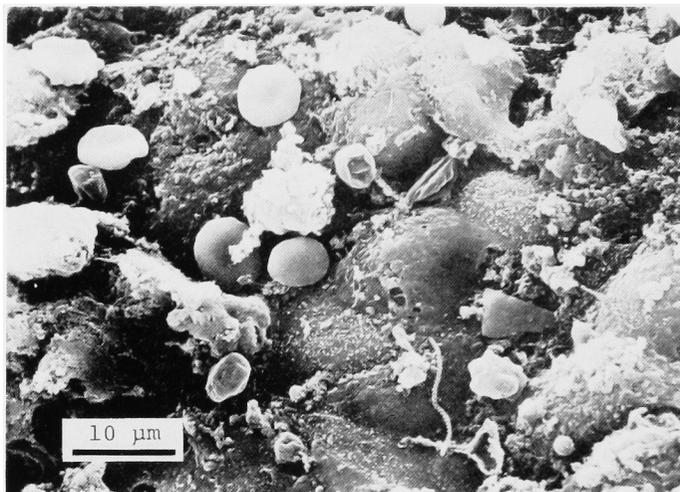
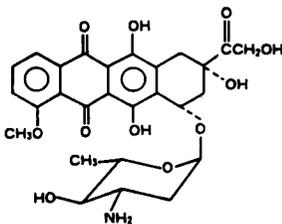
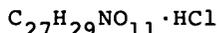


Fig. 6. Scanning electron microscopic view of the bladder treated with 4'-epi-adriamycin for 6 hours.

Structural formula



Chemical formula



Molecular weight

579.98

Fig. 7. Chemical structure of 4'-epi-adriamycin.

いる。すなわち、1) 移行上皮癌に感受性があること、2) 比較的短時間の接触でも、殺細胞効果を有すること、3) 正常膀胱粘膜への刺激性がないこと、4) 血中への移行が低率であること、以上の4点である。ADMは以上の点をほぼ満たす薬剤と考えられ、臨床的にもすでに高い有効率が得られている^{1,2,4)}。しかし、注入濃度に応じて正常膀胱粘膜にも影響を与え膀胱刺激症状を起こす。EPIはフェルミタリア カルロエルバ社研究所で開発された ADM の誘導体であり、その構造式は Fig. 7 に示される。すなわち EPI は ADM の 4' 位の OH 基が axial 位より equatorial 位に変換されたもので、主たる作用機序は

ADM と同じく DNA 合成阻害である。基礎的および臨床的検討（全身投与）では EPI の抗腫瘍効果は ADM とほぼ同等であるが、副作用の頻度および程度は ADM より軽度と報告されている⁷⁻⁹⁾。著者は EPI を膀胱腔内注入療法に使用すれば、低頻度の副作用で ADM と同等以上の効果を得ることが可能ではないかと考え検討を開始した。

まず、EPI の *in vitro* における殺細胞効果については、Arcamone ら⁶⁾、Di Marco ら¹⁸⁾ が HeLa 細胞を用いて colony formation method で EPI の殺細胞効果を検討し、EPI は ADM と比較してやや劣ると報告しているが、Salmon ら¹⁹⁾ は、7 種の人腺癌細胞を用いて EPI および ADM の殺細胞効果を stem cell assay にて比較検討し両者はほぼ同等の成績であると報告した。また、人膀胱癌培養細胞に対する制癌剤の殺細胞効果については、加藤ら²⁰⁾、関口²¹⁾、打林²²⁾の報告があり、ADM, CQ, MMC などに高度の殺細胞効果を認めている。しかし、現在まで、EPI の膀胱癌培養細胞に対する感受性を検討した報告はないため、著者は膀胱癌培養細胞株 T24 を用いて colony formation method にて EPI の殺細胞効果を検討した。colony formation method は薬剤に暴露されたあとでも、真に増殖能力を有する腫瘍細胞の数をほぼ正確に把握できる方法として、現在もっともすぐれた *in vitro* 薬剤感受性試験とされている。T24 細胞は今回の実験時において、single cell rate は95%以上、また、100個/dishの細胞を植えこんだ場合の plating efficiency は95%以上であり、colony formation method に適合した細胞株で

ある。今回の実験においては打林²²⁾の報告を参考にし、薬剤添加時間は2時間および24時間としたが、2時間薬剤を添加した場合のED₅₀値はADM 0.13 μg/ml, EPI 0.20 μg/ml, MMC 0.30 μg/ml, AGR >1.46 μg/mlであった。以前報告した予備的検討²³⁾ではED₅₀値はADM 0.04 μg/ml, EPI 0.06 μg/mlであり、今回の検討ではED₅₀値が若干高い値となっている。これは、T24細胞の培養条件が閉鎖系より開放系に変更されており、さらに、実験時の薬剤の濃度が10倍稀釈から3倍稀釈に細分化されているためと考えられる。また、24時間薬剤を添加した場合のED₅₀値は2時間薬剤を添加した場合のその約10分の1を示したこと、および、Fig. 3の結果からEPIのT24細胞に対する殺細胞作用は濃度依存性と時間依存性を有するものと考えられた。EPIはADMと比較してやや低い殺細胞効果を有していたが、現在注入療法に用いられているMMC, AGRと比較して高い殺細胞効果を示した。Holmesら²⁴⁾は、薬剤の細胞に対する効果と臨床効果の平行関係を主張しており、今回の実験結果は、EPIが膀胱癌治療に有用であることを示唆するものであると考える。

ついで、膀胱腔内注入における副作用を検討する目的で尾崎³⁾の方法を参考にしてビーグル犬を用いEPIを両側尿管皮膚瘻を施行し空置した膀胱腔内に注入し、血中、尿中移行、臓器内濃度および膀胱粘膜に与える影響について検討した。

まず、膀胱壁からの薬剤の吸収についてであるが、動物実験あるいは臨床的な検討が種々の薬剤でなされている。Jonesら²⁵⁾は、膀胱腔内に注入されたthio-TEPAは3時間で約1/3が吸収されると報告した。都田ら²⁶⁾によれば、FT-207と5-FUを膀胱腔内に注入し吸収効率を検討したところ、FT-207は5-FUの23倍であり、この差は薬剤の脂溶性によると述べている。前述のthio-TEPAは脂溶性の優れた制癌剤である。他方、水と脂質の分配係数が低いとされる5-FU, MMC, ADMなどでは吸収効率が低い。また、薬剤の分子量に関しては、Yeates²⁷⁾は200以下の物質は経膀胱的に吸収されるとしている。EPIの分子量はADMのそれと同じ579.98であり、また、水にはやや溶けにくく、エタノールにはほとんど溶けない。以上の点から考えて、EPIは膀胱壁より吸収されにくい薬剤であると推察される。著者の検討では、EPIの血中濃度は注入濃度に応じて上昇している。しかしながら、EPI 50 mgを生塩水 10 mlに溶解(5,000 μg/ml)し、注入した場合の最高血中濃度は0.222 μg/mlであり低濃度を示した。

さて、最高血中濃度が得られたのはEPI 20 mg群、50 mg群、100 mg群ではそれぞれ注入後4, 8, 4時間後である(Table 2)。Brogginiら²⁸⁾、藤田ら²⁹⁾は静脈内に投与されたEPIは血中より速やかに組織に移行し、組織中に高濃度に保持されると報告した。著者の検討において血中濃度が注入後4, 8, 4時間目以降やや下降しているのはEPIの経膀胱的吸収が一定ではないことを示唆している。すなわち、吸収されたEPIが速やかに組織に移行し、経膀胱的吸収が一定でないために血中濃度に変動をきたしたと考えられる。しかしながら、EPIの経膀胱的吸収が一定でないことが何に起因するのかわかり不明である。EPI 100 mgで血中および尿中濃度が6時間目以降において下降しているのは、薬剤を6時間で膀胱腔内より除去したためである。

尿中濃度は、血中濃度の約100倍の高濃度を示しており、尿中濃度と尿量から尿中排泄量を計算し検討してみると、10時間目に屠殺したビーグル犬ではEPIを膀胱腔内に注入してから10時間までの尿中排泄量は20 mg群 162 μg, 50 mg群 389 μg, 100 mg群 882 μgであり、注入されたEPIのそれぞれ0.81%, 0.78%, 0.88%にあたる。これは永田³⁰⁾のラットを用いた³H-ADMの膀胱腔内注入における12時間までの尿中回収率0.7%とほぼ同等の成績であった。著者の実験系では尿中に検出されるEPIは、膀胱腔内に注入されたEPIが血行性であれリンパ行性であれ膀胱壁より吸収され血中に移行し、その後腎より尿中に排泄されたものと考えられる。したがって、EPIの経膀胱的吸収量は尿中排泄量が等しくなるようなEPIの静脈内投与量と同じであると見なされる。Weenenら³¹⁾は人体での静脈内投与によるpharmacokineticsを検討し、尿中へのEPIの排泄は投与後48時間までに11%であると報告した。この結果は人体における薬物動態であるため著者のビーグル犬における検討と直接に比較することはできないが、膀胱腔内に注入されたEPIの膀胱壁よりの吸収量は10分の1以下の少量であると考えられる。また、ADM 50 mg/生塩水 10 mlを注入した場合の血中濃度は同濃度のEPIのそれより若干低値を示したが、注入後10時間までの尿中排泄量は799 μgであり、注入されたADMの1.60%であった。静注後の尿中排泄を含む体内動態はEPIとADMでほとんど同じであるが細かい点では相違性を示すと言われている^{28,29)}。今回の実験では10時間までADMを把持したビーグル犬が1頭と少数であったため断定的なことは言えないが、EPIの同様の濃度での10時間までの尿中排泄量

は0.78%であったため、EPIの膀胱腔内注入後の経膀胱的吸収はADMのそれと比較して同等ないしそれ以下と考えられる。

つぎに、臓器内濃度についてであるが、尾崎³⁾はADMを空置した膀胱腔内に注入し膀胱粘膜は筋層の3ないし20倍の濃度であったと報告している。著者の成績 (Table 4~6) では膀胱粘膜は筋層の4ないし10倍の高濃度を示しており、ADMとはほぼ同等の成績でありEPIの組織吸着性の強さをうかがわせた。また、膀胱の部位別の濃度については土居ら³²⁾はADMを用いた犬の検討において3頭中1頭で後壁および側壁の組織内濃度が三角部のそれより高く、水圧を加えた場合では組織内濃度は上昇し、やはり後壁および側壁の組織内濃度が三角部のそれより高かったと報告した。中田ら³³⁾は臨床例でADMを膀胱注し組織内濃度を検討し、三角部、底部、側壁および頂部の非腫瘍部粘膜では濃度に有意差はないと報告した。著者は膀胱を三角部、後壁および側壁に分割して組織内濃度を検討したが、各部位の比較では一定の傾向は認められなかった。

さて、腸骨リンパ節におけるEPIの濃度は腎のそれと比較して低く、10時間薬剤を把持させた群において肝よりやや高値を示したにすぎない。したがって、EPIのリンパ行性の吸収は短時間の注入では少ないのではないかと考えられた。その他の臓器では腎皮質、髄質、肝、心の順に濃度が高かった。EPIの静脈内投与における臓器分布について、Brogginiら²⁸⁾はLewis lung carcinomaを移植したマウスおよびラットを用いて臓器内濃度を検討し腎がもっとも高く、ついで肝、心の順であり、また、EPIとADMの比較では肝、腎、心では同等の成績であったが脾および腫瘍でEPIはADMより低濃度と報告した。藤田ら²⁹⁾はsarcoma 180を移植したマウスを用いた臓器内濃度の検討では肝、腎がもっとも高濃度で、ついで脾、肺、心、消化管が比較的高値であり、また、EPIとADMの比較では心、肺、脾でEPIの濃度が低かったと報告した。つまり、静脈内投与における臓器分布はEPIとADMで多くの類似点を有しているが、細かな点で相違性を示している。著者のビーグル犬を用いた膀胱腔内注入における臓器分布ではEPIとADMで各時間、各臓器で一定の傾向は見いだせず両者はほぼ同等の成績であった (Table 4~6)。

最後に膀胱腔内に注入された制癌剤の膀胱粘膜に対する影響についてであるが、MMC³⁴⁾、ADM³⁾、CQ³⁵⁾、cis-diamminedichloroplatinum (II)³⁶⁾な

どで動物実験あるいは臨床例で検討されている。EPIのmother compoundであるADMについては尾崎³⁾が雑種成犬を用いて検討しており、20 mg/生塩水10 ml (2,000 μg/ml)を空置した膀胱腔内に注入し2時間把持例では粘膜下出血が、6時間把持例では著明な浮腫、上皮の脱落、好中球の浸潤が認められ、10時間把持例でもほぼ同程度の所見であったと報告した。著者は単回注入 (6時間把持)におけるEPIの正常膀胱粘膜に与える影響についてビーグル犬を用いて検討したが、20 mg/生塩水10 ml (2,000 μg/ml)の注入では膀胱粘膜上皮および粘膜下層に変化は認められず、直接に比較はできないが、尾崎³⁾のADMの結果より軽度の変化と推察された。EPI 5,000 μg/mlの注入においても、粘膜の剝離が散在性に認められたのみであり軽度の変化であった。また、著者のEPI 5,000 μg/mlとADM 5,000 μg/mlの比較では光頭的にも走査電顕的にもほぼ同程度の所見を示した。ADM注入療法⁴⁾においては萎縮膀胱などの重篤な局所的副作用は認められていないため、著者の実験結果はEPIの臨床への導入が可能であることを示唆するものと考えられた。

結 語

Adriamycin (ADM)の誘導体である4'-epi-adriamycin (EPI)を膀胱腔内注入療法に導入する目的で基礎的に検討し、以下の結果を得た。

1) 人膀胱癌培養細胞株T24に対するEPIの殺細胞効果をcolony formation methodにて検討した。EPIはADMと比較してやや低い殺細胞効果を有していたが、mitomycin Cおよびaclacinomycin Aと比較して高い殺細胞効果を示した。

2) ビーグル犬を用い両側尿管皮膚瘻を施行し空置した膀胱腔内にEPIを注入し血中、尿中および臓器内濃度をHPLC法にて測定した結果、EPIの膀胱壁よりの吸収量は少量であった。

3) 正常膀胱粘膜に対する影響について検討したが、薬剤を6時間把持した場合、EPI 20 mg/生塩水10 mlではまったく変化は認められず、EPI 50 mg/生塩水10 mlでは、粘膜の剝離が散在性に認められたのみであり、EPI 100 mg/生塩水10 mlでは粘膜下層に影響がおよんだ。

4) 以上の結果からEPIは膀胱腔内注入療法に適した性質を有しており、臨床への導入が可能であると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師大森弘之教授に深謝いたします。さらに、直接本実験を御指導くださいました松村陽右助教授、尾崎雄治郎講師、公文裕己講師ならびに本学癌源研究施設病理学部門 佐藤二郎教授、常盤孝義講師に深謝いたします。

最後に、T24細胞を御提供くださいました日本医科大学付属第1病院泌尿器科、中神義三助教授ならびに実験助手をつとめられた小坂民、守谷由美子嬢に謝意を表します。

本論文の要旨は、第21回日本癌治療学会総会、第72回日本泌尿器科学会総会および第32回日本化学療法学会総会にて報告した。

文 献

- 1) 新島端夫・松村陽右・近藤捷嘉・片山泰弘・尾崎雄治郎：膀胱腫瘍に対する Adriamycin の膀胱腔内注入療法（予報）。泌尿紀要 **21**：233～241, 1975
- 2) 尾崎雄治郎：膀胱腫瘍に対する Adriamycin の膀胱腔内注入療法 その1。主として臨床成績の検討。日泌尿会誌 **68**：934～944, 1977
- 3) 尾崎雄治郎：膀胱腫瘍に対する Adriamycin の膀胱腔内注入療法 その2。実験的研究。日泌尿会誌 **69**：817～827, 1978
- 4) Matsumura Y, Ozaki Y, Ohmori H and Okayama Urological Cancer Collaborative Group (OUCCG): Intravesical Adriamycin chemotherapy in bladder cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **11** (Suppl): S69～S73, 1983
- 5) Arcamone F, Penco S and Vigevani A: Adriamycin (NSC-123127): New chemical developments and analogs. *Cancer Chemother Rep Part* **36**: 123～129, 1975
- 6) Arcamone F, Penco S, Vigevani A, Redaelli S and Franchi G: Synthesis and antitumor properties of new glycosides of daunomycinone and adriamycinone. *J Med Chem* **18**: 703～707, 1975
- 7) Giuliani FC, Coirin AK, Rice MR and Kaplan NO: Effect of 4'-Doxorubicin analogs on heterotransplantation of human tumors in congenitally athymic mice. *Cancer Treat Rep* **65**: 1063～1075, 1981
- 8) Bonfante V, Villani F and Bonadonna G: Toxic and therapeutic activity of 4'-epi-Doxorubicin. *Tumori* **68** 105～111, 1982
- 9) Ganzina F 4'-epi-doxorubicin, a new analogue of doxorubicin: A preliminary overview of preclinical and clinical data. *Cancer Treat Rev* **10**: 1～22, 1983
- 10) Semple JE Papillomata of bladder treated with podophyllin. Preliminary report. *Brit Med J* **1**: 1235～1237, 1948
- 11) Veenema RJ, Dean AL Jr, Roberts M, Fingerhut B, Chowhury BK and Tarassoly H: Bladder carcinoma treated by direct instillation of thio-TEPA. *J Urol* **88**: 60～63, 1962
- 12) Abbassian A and Wallace DM: Intracavitary chemotherapy of diffuse non-infiltrating papillary carcinoma of the bladder. *J Urol* **96**: 461～465, 1966
- 13) Morales A, Ottenhof P and Emerson L: Treatment of residual, non-infiltrating bladder cancer with bacillus Calmette-Guerin. *J Urol* **125**: 649～651, 1981
- 14) 志田圭三・洞口龍夫・篠崎忠利・佐藤 仁・高橋薄朋・田谷元佑・加藤宣雄・浦野悦郎・大越正秋・田崎 寛・尾関全彦・松永重昂・矢島暎夫・永田正夫・北村俊一・川井 博・小川秀彌・中神義三・中村雄一：膀胱腫瘍に対するマイトマイシンCの腔内注入療法（第1報）。新薬試験 **21**：1057～1058, 1967
- 15) 土田正義・熊谷郁太郎：膀胱腫瘍に対する Carboquone の膀胱内注入療法。泌尿紀要 **22**：263～272, 1976
- 16) 高井修道・西村隆一・執印太郎・宮島栄治・近藤猪一郎・岩崎孝史・吉邑貞夫・福島修司：Aclacinomycin 膀胱内注入による膀胱腫瘍の治療。新薬と臨床 **29**：21～25, 1980
- 17) 窪田吉信・西村隆一・高井修道・福島修司：膀胱癌の Hyperthermia 療法：Bleomycin および放射線との併用について。日癌治 **13**：394～405, 1978
- 18) Di Marco A, Casazza AM, Dasdia T, Neco A, Pratesi G, Rivolta P, Velcich A, Zaccara A and Zunino F: Changes of activity of daunorubicin, adriamycin and stereoisomers following the introduction or removal of hydroxyl groups in the amino sugar moiety. *Chem-Biol Interact* **19**: 291～302, 1977
- 19) Salmon SE, Liu RM and Casazza AM:

- Evaluation of new anthracycline analogs with the human tumor stem cell assay. *Cancer Chemother Pharmacol* **6**: 103~110, 1981
- 20) 加藤哲郎・熊谷郁太郎・三浦邦夫・根本良介・西本 正: 膀胱癌細胞株 (T 24) を用いた制癌剤スクリーニング試験とその応用. *日泌尿会誌* **69**: 1308~1313, 1978
- 21) 関口 浩: 培養ヒト膀胱癌細胞株による制癌剤感受性試験. *日泌尿会誌* **74**: 25~31, 1983
- 22) 打林忠雄: ヒト膀胱癌由来培養細胞株 KK-47, KW-103 および HeLa 細胞における各種抗癌剤の殺細胞効果について. *日泌尿会誌* **74**: 1606~1620, 1983
- 23) 津島知晴・松村陽右・尾崎雄治郎・吉本 純・小浜常昭・赤木隆文・那須保友・大森弘之: 表在性膀胱腫瘍に対する 4'-Epi-Adriamycin 膀胱腔内注入療法. *癌と化学療法* **11**: 2502~2505, 1984
- 24) Holmes HL and Little JM Tissue-culture microtest for predicting response of human cancer to chemotherapy. *Lancet* (No. 7887): 985~987, 1974
- 25) Jones HC and Swinney J: Thiotepa in the treatment of tumors of the bladder. *Lancet* **2**: 615~618, 1961
- 26) 都田慶一・三品輝男: FT-207 と 5-FU の経膀胱吸収に関する比較. *泌尿紀要* **28**: 949~952, 1982
- 27) Yeates WK: 文献 25) より引用
- 28) Broggin M, Colombo T, Martini A and Donelli MG: Studies on the comparative distribution and biliary excretion of doxorubicin and 4'-epi-doxorubicin in mice and rats. *Cancer Treat Rep* **64**: 897~904, 1980
- 29) 藤田 浩・小川 カツイ・高尾 亜由子: 4'-Epi-Adriamycin と 4'-O-Tetrahydropyranyl-Adriamycin の生体内動態について. *日癌治* **19**: 146~147, 1984
- 30) 永田一夫: 抗癌剤の経膀胱的吸収に関する研究—膀胱内注入療法の基礎—第 2 報: ^3H -Adriamycin の経膀胱的吸収, 体内分布, 排泄について. *泌尿紀要* **25**: 891~895, 1979
- 31) Weenen H, Lankelma J, Penders PGM, McVie JG, Ten Bokkel Huinink WW, de Planque MM and Pinedo HM: Pharmacokinetics of 4'-epi-doxorubicin in man. *Invest New Drugs* **1**: 59~64, 1983
- 32) 土居 淳・山際健司・線崎教哉・山田陽弘・田中美治・大川順正: 水圧効果を利用した Adriamycin 膀胱内注入療法の臨床的並びに実験的検討. *日泌尿会誌* **69**: 1068~1078, 1978
- 33) 中田瑛浩・秋谷 徹・嘉川宗秀・片山 喬: 膀胱腫瘍患者に対する膀胱腔内注入 Adriamycin の腫瘍内濃度. *日泌尿会誌* **74**: 1015~1022, 1983
- 34) 小川秀彌・平岡保紀・川井 博: 膀胱腫瘍に対する抗腫瘍剤の膀胱腔内注入療法. 第 5 報 Mitomycin C の正常膀胱と膀胱腫瘍とに対する作用の相違 (基礎的・臨床的研究). *日泌尿会誌* **74**: 596~607, 1983
- 35) 岡島英五郎・伊集院真澄・平松 侃・貴宝院邦彦・平尾佳彦・小原壮一・脇岡 隆・馬場谷勝広・塩見 努・三馬省二・窪田一男・駒田佐多男・佐々木憲二・吉田克法・岡村 清: 膀胱腫瘍に対する Carboquone の膀胱内注入療法に関する基礎的研究—正常 Beagle 犬に対する Carboquone の膀胱内注入による影響について—. *泌尿紀要* **29**: 1061~1074, 1983
- 36) 平尾佳彦・岩井哲郎・吉江 貫・守屋 昭・松木尚・吉田克法・三馬省二・窪田一男・小原壮一・馬場谷勝廣・岡島英五郎・平松 侃・佐々木憲二: 膀胱腫瘍に対する cis-Diamminedichloroplatinum (II) の膀胱内注入療法に関する基礎的研究 I: 正常 Beagle 犬に対する cis-Diamminedichloroplatinum (II) の膀胱内注入による影響について. *泌尿紀要* **31**: 31~38, 1985

(1985年 5月24日迅速掲載受付)