

前立腺癌および睾丸腫瘍の化学療法

—より有効な治療法を目指した *in vitro* および *in vivo* 実験での検討—

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 吉田 修教授)

岡田謙一郎*, 金丸 洋史, 吉貴 達寛

橋村 孝幸, 西村 一男, 飛田 収一

西尾 恭規, 大石 賢二, 吉田 修

癌研究会付属病院泌尿器科 (部長 : 河合恒雄)

山 内 民 男

CHEMOTHERAPY OF CARCINOMA OF THE PROSTATE AND TESTIS: EXPERIMENTAL STUDY *IN VIVO* AND *IN VITRO*

Kenichiro OKADA*, Hiroshi KANAMARU, Tatsuhiko YOSHIKI,
Takayuki HASHIMURA, Kazuo NISHIMURA, Shuichi HIDA,
Yasunori NISHIO, Kenji OISHI and Osamu YOSHIDA

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director : Prof. O. Yoshida)

Tamio YAMAUCHI

From the Department of Urology, Cancer Institute Hospital
(Chief: Dr. T. Kawai)

Prostate cancer: Considering the stagnation in chemotherapy of prostate cancer in recent years, the following experiments were carried out to determine their clinical value. Surgical specimens from 6 patients, 2 permanent cell lines (EB 33 and PC 93) originated from human prostate cancer and a tumor line serially transplanted in nude mice (PC-NCC) were subjected to chemosensitivity tests such as human tumor cloning assay (HTCA) and/or *in vivo* tumor growth curve experiments using nude mice. The possible chemosensitive drugs screened by using surgical specimens and PC-NCC tumor were cisplatin (CDDP), bleomycin (BLM), 5-FU, vincristine (VCR), adriamycin (ADM) and methotrexate (MTX). Most of these drugs were also judged as "effective" by HTCA using a permanent cell line. The minimal discrepancy among them may lead to the conclusion that an *in vitro* assay using a cell line can substitute for the assay using surgical specimens which can not be obtained frequently. Partly based on the data obtained a chemotherapy regimen, VPM-CisCF, consisting of VCR, peplomycin, MTX, CDDP, cytosine arabinoside (Ara-C) and 5-FU, was designed. The effectiveness of this regimen was demonstrated experimentally.

Testis cancer: Two different lines of experiments were performed. A human testicular cancer serially transplanted in nude mice was repeatedly exposed to CDDP *in vivo* to obtain hyposensitivity to this drug. The synergistic effect of CDDP and VP-16 was demonstrated in the tumor thus obtained. One of its mechanisms has been suggested by partial accumulation of cancer cells in the G₁-S and G₂-M phase in which CDDP exerts its potential effect. Through the serial experiments testing 4 cisplatin-analogues, we came to the conclusion that JM-8 and 254-S may only replace the role of CDDP. Less side effects and the compatible anti-tumor effect of JM-8 + VCR + BLM with the original PVB regimen was also demonstrated experimentally.

(Acta Urol. Jpn. 34: 1911-1916, 1988)

Key words: Prostate cancer, Testicular tumor, Chemotherapy, HTCA, Nude mouse

* 現 : 福井医科大学泌尿器科学教室

緒 言

前立腺癌の化学療法は、内外でのさまざまな試みにかかわらず、現在までのところ停滞したままである。このまま従来の方法を踏襲しても進歩はみられそうもない。活路を開くためこの際視点を変えて次の二つの問題を提起し、それがはたして妥当かどうか実験的に検討してみた。

前立腺癌化学療法において障害の一つは、有効薬剤をスクリーニングする機会に乏しいことである。培養細胞を用い、しかも *in vitro* で薬剤選択が可能かどうかをまず検討してみた。

次に、前立腺癌の特性から、副作用の少ない静細胞 (cytostatic) 効果を主眼とした化学療法の方がベターであろうとの考えに基づき、薬理作用を考慮し配剤した多剤併用療法の有効性を検討した。

いっぽう睾丸腫瘍については、化学療法はほぼ確立された感があるが、cisplatin を核とする化学療法の再燃例にいかに対処するかが残された問題の一つである。この点につき実験的に検討した。

また、cisplatin の副作用を軽減したといわれる誘導体がいくつか開発されているが、はたしてこれが臨床上有効かどうかについても実験を行った。

1. 前立腺癌

1. 「*In vitro* 培養細胞を用いた assay は可能か」

1) 実験方法

対象とした実験材料、およびそれらを用い薬剤をスクリーニングした方法を Table に一括した (Table 1)。

手術標本は HTCA に、ヌードマウス継代ヒト前立腺癌である PC-NCC¹⁾ および培養細胞株 PC 93²⁾ は HTCA ならびにヌードマウス移植系で、同じくヒ

ト前立腺癌由来の培養細胞株 EB 33³⁾ は *in vivo* スードマウスでのみ用いた。

個々の実験方法については、すでに別に詳述したのでここでは概要のみ述べる⁴⁻⁷⁾。

手術標本による HTCA では、有効判定の閾値を下げるため血中最高濃度 (PPC) に 2 週間接触させ、対照群に比べ 50% 以上の増殖抑制のあるものを有効とした。移植腫瘍、培養細胞については、従来どうり 70% 以上を有効とした。

ヌードマウスを用いた *in vivo* assay では、1 群 5 匹として上記細胞を背部皮下に接種、生じた腫瘍が 0.3~0.5 cm³ に達すると、原則として 1/20 × LD₅₀ 濃度の各薬剤を連続 5 日間腹腔内投与した。隔日に腫瘍を計測して増殖曲線を得、対照群のそれと比較し効果を検討した。

2) 結果と結論

手術標本を用いた HTCA では、1987 年 10 月末までに施行した 14 症例のうち、assay 可能であった 6 人の原発ないしは転移巣について、結果を Table にまとめた (Table 2)。

50% 以上のコロニー形成阻止を示した薬剤に下線を

Table 1. Materials and methods for screening chemotherapeutic agents for prostatic cancer

材 料	起 源	assay 法	関連文献
手術標本		HTCA	4)
PC-NCC	ヌードマウス 継代移植	HTCA in vivo	6)
PC 93	培養細胞株	"	7)
EB 33	"	in vivo	5)

HTCA : human tumor cloning assay

Table 2. Human tumor cloning assay (HTCA) for prostate cancer

# tumor	tested drugs (μg/ml)								
	CDDP (2)	JM-8 (20)	VCR (5)	VLB (5)	BLM (2)	CPM (*)	5-FU (10)	ADM (0.4)	MMC (2)
1130	48			9	0	0	0	0	6
1202	34				85	9	0		
1272	7				30	29	0		
3096	20	64	59		26	36			
3103	54				41	62	61		
3147	54					24			

* Either melphalan 1.0 μg/ml or 40487 S 3.0 μg/ml is used.

Table 3. Effectiveness of the drugs evaluated more than 4 times in HTCA

薬剤	有効率* (%)	平均コロニー阻止率** (%)
CDDP	33.3	36.2
BLM	20.0	36.4
CPM	16.7	26.7
5-FU	20.0	15.3

* 50%以上コロニー形成阻止例/検討例

** コロニー形成阻止率の和/検討例

附したが, 組織量が少なく検定薬剤の数は制限され, 4回以上試行されたのは4薬剤に過ぎなかった。これらの有効率および平均コロニー阻止率は Table に示したが (Table 3), 従来の報告⁶⁾ とうり有効と明言できる薬剤はなかったが, cisplatin (CDDP), bleomycin (BLM), cyclophosphamide (CPM), 5-FU, そして単回の assay ではあるが carboplatin (JM-8), vincristine (VCR) などは, 多少とも増殖抑制効果を持つことが示唆された。

いっぽう, PC-NCC 腫瘍, PC 93 および EB 33 培養細胞を用いての HTCA, ならびにヌードマウス実験の結果についてはすでに詳しく述べたが⁵⁻⁷⁾, 対象が同一である限り, 二つの実験系での薬剤感受性にはほとんど差がなかった⁷⁾。有効性が認められた薬剤 (破線印), および示唆されたものは次の通りであった。
PC-NCC...5-FU, methotrexate (MTX), cytosine arabinoside (Ara-C), adriamycin (ADM), bleomycin (BLM), vincristine (VCR), cisplatin (CDDP)

PC 93...MTX, VCR, BLM

EB 33...FT-207, CPM, ADM, VCR, CDDP

以上の結果のうち, 現在最も臨床でのレスポンスに近い答えを出すと思われる臨床材料を用いた HTCA では, 検体の不足で明確な結論は得られなかった。しかしこれらの三つの対象から得られた有効ないしはそれ示唆された薬剤は, 検討薬剤に対象間で若干相違があるにもかかわらずよく相似していた。

検体不足に悩む現状から, 培養細胞による薬剤スクリーニングは前立腺癌化学療法においては次善策と考える。

2. 「Cytostatic chemotherapy は有効か」

1) 実験方法

上記の実験結果を参考に, 前立腺癌に有効性の示唆された各薬剤の作用メカニズム, 副作用などを考慮し, われわれは尿路上皮癌にも有効な多剤併用レジメ

Table 4. Administrated schedule of VPM-CisCF regimen

vincristine	: 0.6 mg/m ² ×	days 1 and 5.
peplomycin	: 3 mg/m ² ×	days 1 - 4.
methotrexate	: 3 mg/m ² ×	days 2 and 3.
CDDP	: 35 mg/m ² ×	day 4.
Ara-C	: 20 mg/m ² ×	days 4 and 7.
5-FU	: 200 mg/m ² ×	days 5 and 6.

* (adjustment formula) = $\{80 / (40 + \text{Age})\}^2 + (Kp/100)^2$
Kp: Karnofsky's performance status (%)

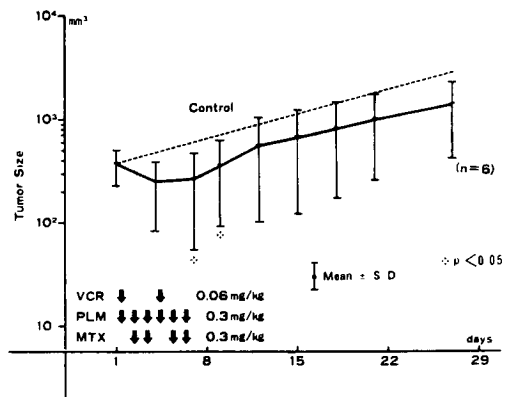


Fig. 1. Growth inhibition by administration of VPM to PC-NCC (NCI) tumor transplanted in nude mice

を考案し, 臨床にも応用してきた^{6,8,10)}

この治療法は, vincristine (VCR), peplomycin (PLM), methotrexate (MTX), cisplatin (CDDP), cytosine arabinoside (Ara-C), 5-fluorouracil (5-FU) の6剤からなるが (VPM-CisCF 療法), VPM で殺細胞を図りつつ G₁-S および G₂-M 期に同調し, 続いて投与される CDDP および時間依存性薬剤である Ara-C, 5-FU の殺細胞効果の増強をねらったものである^{6,10,11)}。Table 4 にその臨床における投与法を示す。

この治療法を前述のヌードマウス移植前立腺癌 PC-NCC (PC-NCI) を対象として腫瘍増殖曲線を求め, 抗腫瘍効果を検討した。

2) 結果と結論

Fig. に示す投与法にて, VPM-CisCF による腫瘍増殖曲線を得たが, Fig. 1,2 に見るように VPM, CisCF 投与群ともに対照群に比べ有意の増殖抑制を見た (Fig. 1, 2)。また副作用の指標としたマウス体重減少も軽微であった。

なお VPM-CisCF と続けたほうが, VPM およ

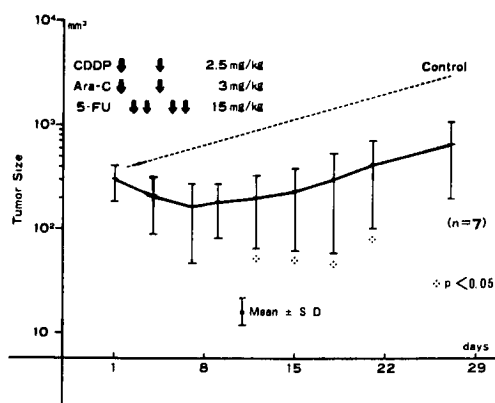


Fig. 2. Growth inhibition by administration of CisCF to PC-NCC (NCI) tumor transplanted in nude mice

び CisCF をそれぞれ単独で2回続けるよりも抗腫瘍効果は大きいこと¹⁰⁾, FCM 解析により, VPM 投与は *in vivo* にて部分的ながら G₂-M 期に同調させることなどは, すでに明らかにしたとうりである¹¹⁾

VPM-CisCF レジメは, 1987年9月までに8例の再燃前立腺癌患者に投与し, 6例(75%)に臨床効果(PR+MR)を得ている。

このレジメは抗腫瘍効果もさることながら, 各薬剤量が少なく骨髄抑制などの副作用が軽微なことが特色である。高齢者でかつ骨髄予備能の低い進行癌の化学療法に推奨すべきレジメの一つと考えられる。

II. 睾丸腫瘍

1. 「Cisplatin 耐性腫瘍にいかに対処するか」

Cisplatin を核とする化学療法後に再燃した腫瘍は, 再度の化学療法に対する反応性が低下していることが臨床的に知られる。また動物実験腫瘍でも, cisplatin 耐性腫瘍が存在し耐性化メカニズムが研究されている。このような cisplatin 低感受性腫瘍に対し, 臨床的に次のような方策が考えられる。

- ① cisplatin を含みぬ化学療法
 - ② cisplatin の副作用を減ずる対策のもとにより大量に使用する
 - ③ cisplatin の抗腫瘍効果を増強するような併用治療
 - ④ cisplatin 誘導体の使用—非交差耐性を期待
- これらのうち, ④は現在まで開発された5種の誘導体はいずれも cisplatin と交差耐性を有し, 現在のところ不可能である。

①については, われわれも actinomycin D+I-fosphamide+VP-16 (AIV)¹²⁾ を実験的, 臨床的に

検討したがみるべき効果はなく, 知る限りでは cisplatin の再使用に勝るものはまだない。

②については現在濃厚食塩水への溶解, チオ硫酸ソーダや次硝酸ビスマスとの併用が臨床的にも盛んに検討されている。

紙数の関係から, ③の検討とくに VP-16 との併用にのみ限って結果を略述する。

1) 実験方法

Cisplatin の反復使用によって腫瘍の本薬剤感受性が低下することを確かめるため, スードマウス移植ヒト睾丸腫瘍 HT-10¹³⁾ (胎児性癌+奇形腫) に対し, 腫瘍の完全退縮を来さない 1 mg/kg の cisplatin を連日5日間腹腔内投与し, 腫瘍増殖抑制の最も顕著な day 9 の体積を算出, 対照群との比から増殖抑制率 $\{1 - (T/C)\}$ を求めた。再増殖した腫瘍を別のマウスに移植し, 同様の実験を行った。

10回繰り返したものでは, 原腫瘍に比べ感受性がやや低下したので(約10%), これを仮に cisplatin 低感受性腫瘍とし, cisplatin+VP-16 の効果を実験的に検討した。HT-10 担癌スードマウスを3群に分け(1群平均5匹), a) cisplatin 1.5 mg/kg, b) VP-16 3 mg/kg, c) cisplatin 1.5 mg/kg+VP-16 3 mg/kg としそれぞれ連日5日間腹腔内投与し, 腫瘍増殖曲線を求めた。また VP-16 と cisplatin の synergism を検索する目的で, 既述の方法¹⁰⁾により HT-10 担癌スードマウスに VP-16 5日間投与後(6 mg/kg/day),

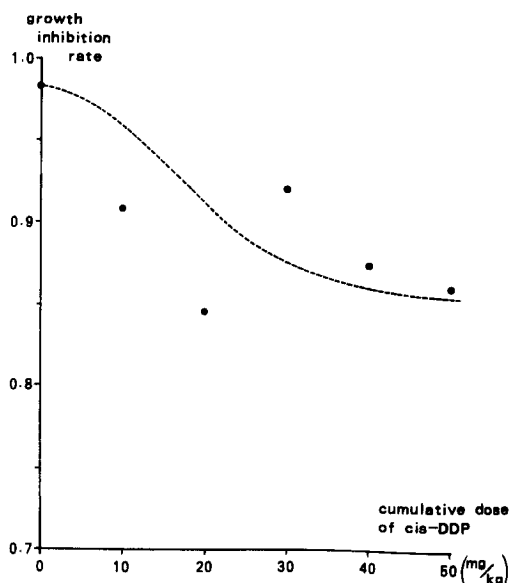


Fig. 3. Reduced susceptibility of HT-10 tumor to cisplatin according to its accumulated dose

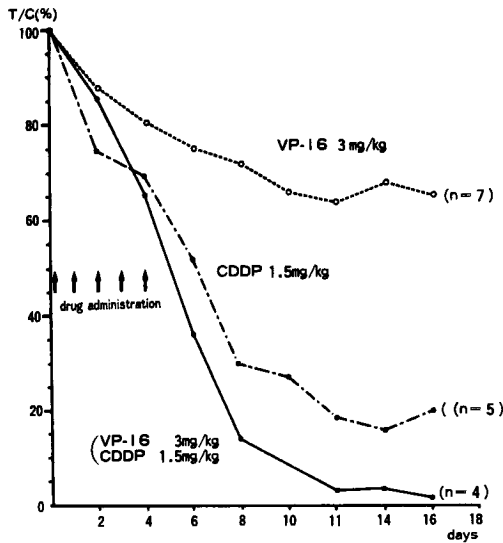


Fig. 4. Synergistic effect of cisplatin and VP-16 on cisplatin insensitive HT-10 tumor

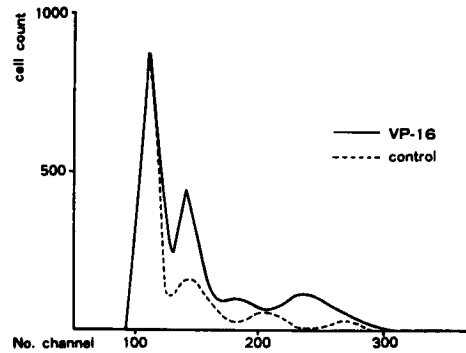


Fig. 5. Flow cytometrogram (FCM) of HT-10 in nude mice on 6th day after administration of VP-16 (6 mg/kg/day $\times$ 5)

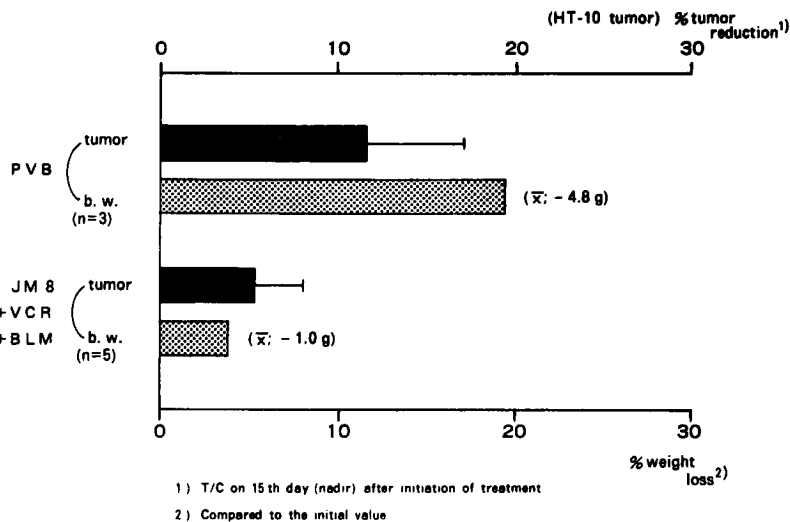


Fig. 6. Comparison of effect of JM-8+VCR+BLM with PVB on HT-10 tumor in nude mice

第6日目に FCM を行った。

2) 結果と結論

まず cisplatin の反復投与により, HT-10 の本剤に対する感受性低下は予想よりも軽微であったが, Fig. のごとく, cisplatin の累積濃度にしたがって抗腫瘍効果は徐々に低下した。累積濃度 50 mg/kg (10 回繰り返しの) の腫瘍は, 始めに比べ cisplatin に対し約10%の感受性低下がみられた (Fig. 3)。

感受性の低下した腫瘍に対して cisplatin に VP-16 を併用したところ, 顕著な協調効果がみられ腫瘍は痕跡状となった (Fig. 4)。

両剤にこのような協調効果がみられる理由の一つは, VP-16 連日投与後の FCM にて Fig. に示すように, 対照群に比べ G₁-S および G₂-M 期への腫瘍細胞の集積がみられた。すなわち cisplatin の作用機転であるこれら phase への集積をもたらすことが両者

の協同作用の由来であろうと推察された (Fig. 5).

現時点では, cisplatin 化学療法後再燃に対しても, 許される限り cisplatin の効果を高めつつ使用するのがベストであり, VP-16 との併用は一法と考えられる.

2. 「Cisplatin 誘導体を用いた化学療法ははたして有用か」

現時点で臨床試験に供されている cisplatin 誘導体は5種にのぼる. 詳細は省略するがヌードマウス移植率丸腫瘍 HT-10 を対象とする予備試験では, 副作用とのバランスで cisplatin に匹敵しうる抗腫瘍効果の認められたのは carboplatin (JM-8) および 254-S の2種であった. とくに JM-8 は, 重量当りの抗腫瘍効果は cisplatin の 1/8~1/10 であったが, 10倍量使用しても副作用は cisplatin に比べ低かった¹⁴⁾ そこで cisplatin を中心とする多剤併用療法において, JM-8 に置換したレジメの効果, マウス体重減少の程度を比較検討した.

1) 実験方法

HT-10 腫瘍担癌ヌードマウス8匹を2群に分け, 次のレジメを投与し, 対照群の腫瘍増殖曲線との比 (T/C) で増殖抑制効果を, また平均体重減少を副作用の指標として, それぞれ投与開始15日目において両群を比較した.

a) PVB

cisplatin	1 mg/kg	day 1~5
vinblastine (VBL)	0.6 mg/kg	day 1, 2
bleomycin (BLM)	3 mg/kg	day 1, 8, 15

b) JM-8+vincristine (VCR)+BLM

JM-8	10 mg/kg	day 1~5
VCR	0.1 mg/kg	day 1, 2
BLM	3 mg/kg	day 1, 8, 15

2) 結果と結論

上記レジメ b) は PVB 療法の, cisplatin を JM-8 に, VBL を VCR に置換したものである. 両群の抗腫瘍効果を比較してみると, b) 群のほうが効果がやや優れ, また明らかに体重減少は軽かった (Fig. 6).

JM-8 未発売のため臨床例での経験は未だないが, われわれはかつて PVcrB レジメにより白血球減少が軽微で, PVB に匹敵する効果を得ており, 機会をみて施行の予定である.

文 献

1) Shimozato Y, Kameya T, Nagai K, Hiro-

hashi S, Koide T, Hayashi H and Nomura T: Transplantation of human tumors in nude mice. J Natl Cancer Inst 56: 1251-1260, 1976

- 2) Claas FHJ and Steenbrugge GJ: Expression of HLA-like structures on a permanent human tumor line PC 93. Tissue Antigens 21: 227-232, 1983
- 3) Okada K and Schroeder FH: Human prostatic carcinoma in cell culture preliminary report on the development and characterization of an epithelial cell line (EB 33). Urol Res 2: 111-121, 1974
- 4) Hashimura T, Tanigawa N, Okada K and Yoshida O: Clonogenic assay for urologic malignancies. Gann 75: 724-728, 1981
- 5) 岡田謙一郎, 吉田 修: スードマウスを用いた非ホルモン性抗癌剤による前立腺癌化学療法に関する研究. 泌尿紀要 25: 993-1007, 1979
- 6) Okada K, Yamauchi T, Oishi K and Yoshida O: Evaluation of chemotherapy of prostatic cancer in nude mice. Prostate (Suppl) 1: 85-93, 1981
- 7) 岡田謙一郎, 橋村孝幸, 金丸洋史, 吉田 修, 池田達夫: 化学療法剤の適応. 泌尿器がん化学療法の進歩と問題点. 吉田 修, 阿曾佳郎, 友吉唯夫, 岡島英五郎, 小幡浩司, 片山 喬, 岡田謙一郎, 古武敏彦編, pp. 227-234, 蟹書房, 東京, 1986
- 8) Sarosdy MF, Lamm DM, Radwin HM and von Hoff DD: Clonogenic assay and *in vitro* chemosensitivity testing of human urologic malignancies. Cancer 50: 1332-1338, 1982
- 9) 山内民男, 飛田収一, 大石賢二, 岡田謙一郎, 吉田 修: 進行尿路上皮癌に対する vincristine, peplomycin, methotrexate, cis-diamminedichloroplatinum (II), cytosine arabinoside, 5-FU からなる6者併用化学療法 (VPM-CisCF). 泌尿紀要 31: 1093-1104, 1985
- 10) 山内民男, 岡田謙一郎, 吉田 修: スードマウス継代ヒト膀胱癌を用いた cis-Diamminedichloroplatinum (II) を主剤とする非交差耐性同調多剤併用化学療法の研究. 泌尿紀要 32: 1781-1797, 1986
- 11) 岡田謙一郎: 尿路性器癌化学療法の研究 —実験的アプローチと臨床への応用—. 日泌尿会誌 76: 1640-1642, 1985
- 12) Cavalli F: VP-16 研究会記録, 東京, 1983
- 13) 岡田謙一郎, 吉田 修: 尿路性器悪性腫瘍のヌードマウス異種移植の研究 —移植成績と移植組織片の性状. 泌尿紀要 30: 1749-1767, 1984
- 14) 橋村孝幸, 岡田謙一郎, 吉田 修: 率丸腫瘍に対する JM-8 (cisplatin アナログ) の *in vitro*, *in vivo* における抗腫瘍効果の検討. 癌と化療 12: 1137-1142, 1985

(1988年7月27日受付)