HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	同種造血幹細胞移植におけるエトポシド/シクロホスファミド/全身放射線前処置レジメンの最適化に関する研究 : エトポシドのPK/PD解析による投与量の最適化および殺細胞効果を指標とした曝露順序の検討
Author(s)	田澤, 佑基
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第11418号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11418
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/63502
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Tazawa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

同種造血幹細胞移植における
エトポシド/シクロホスファミド/全身放射線前処置
レジメンの最適化に関する研究
～エトポシドの PK/PD 解析による投与量の最適化
および殺細胞効果を指標とした曝露順序の検討～

北海道大学大学院生命科学院

生命科学専攻　生命医薬科学コース

薬物動態解析学研究室

田澤　佑基

目次

略語表

序論 1
第一章　VP-16 の PK/PD 解析による投与量の最適化 3
第一節　緒言 3
第二節　実験材料と実験方法 4
第一項　実験材料 4
1）使用薬物 4
2）ブランク血漿 4
3）使用試薬 4
4）使用機器 4
5）使用動物 5
第二項　対象患者 5
第三項　患者への VP-16 投与及び採血方法 5
1）静脈内投与方法 5
2）採血方法 5
第四項　高脂肪食による肥満ラットの作製 5
第五項　ラットへの VP-16 投与方法と採血方法 6
1）静脈内投与方法 6
2）採血方法 6
第六項　血漿中 VP-16 濃度の測定法 6
第七項　患者情報の収集 7
1）患者基本情報および各種検査値の調査 7
2）有害事象情報の調査 7
第八項　データ解析法 7
第三節　実験結果 8
第一項　VP-16 の PK 解析 8
第二項　VP-16 の血中濃度と有害事象との関連性 9

第三項　ROC 解析を用いた目標血中濃度の算出 11
第四項　VP-16 血中濃度の変動要因の解明 12
第五項　ステップワイズ回帰分析法を用いた Vd 予測法の確立 15
第六項　肥満ラットにおける VP-16 の PK パラメーター変化 16
第七項　健常ラットを用いた VP-16 の PK 解析 18
第八項　ラットを用いた血中濃度補正に関する検討 20
第四節　考察 22
第五節　まとめ 25
第二章　VP-16 と CY の殺細胞効果を指標とした投与順序の最適化 26
第一節　緒言 26
第二節　実験材料と実験方法 27
第一項　実験材料 27
1) 使用薬物 27
2) 使用試薬 27
3) 使用機器 28
4) 使用細胞 28
第二項　細胞培養法 29
1) K-562、K-562/P-gp 細胞及び Jurkat 細胞の培養 29
2) HUVEC 細胞の培養 29
第三項　細胞生存率の測定 29
1) WST-8 assay 法 29
2) 数値処理 29
第四項　薬物曝露後の細胞周期解析 30
第五項　K-562 細胞における VP-16 と 4-HPC の殺細胞効果に及ぼす細胞周期依存性 31
1) チミジン 2 回同調法による G_1/S 期への同調 31
2) チミジン除去後の細胞周期変化 31
3) 細胞周期解析 31
4) 同調細胞に対する VP-16, 4-HPC の増殖抑制効果 31
第六項 VP-16 取り込み実験 32

第三節　実験結果 33
第一項　VP-16 と 4-HPC の曝露順序が殺細胞効果に及ぼす影響 [48] 33
第二項　4-HPC が VP-16 の殺細胞効果を増強する要因の解明 36
1) VP-16, 4-HPC の各細胞周期に対する殺細胞効果 36
2) 4-HPC 曝露後の細胞周期変化 38
第三項　VP-16 と 4-HPC の曝露順序による殺細胞効果の変化に及ぼす P-gp 発現の影響 39
1) K-562/P-gp 細胞の P-gp 機能の確認 39
2) VP-16 の殺細胞効果に与える P-gp の影響 40
3) VP-16 と 4-HPC の曝露順序が K-562/P-gp 細胞に対する殺細胞効果に及ぼす影響 41
4) K-562/P-gp 細胞に対する 4-HPC 曝露後の細胞周期変化 43
5) VP-16 の細胞内取り込みに及ぼす細胞周期変化の影響 43
第四項　VP-16 と 4-HPC 曝露順序が HUVEC 細胞に対する殺細胞効果に及ぼす影響 46
第五項 4-HPC 以外の薬物曝露による細胞周期変化が VP-16 の殺細胞効果に及ぼす影響 48
1) 細胞周期を同調させる薬物の探索 48
2) S 期の細胞数減少が VP-16 の殺細胞効果に与える影響 49
3) DOX、VP-16 前処理が VP-16 の細胞内取り込みに与える影響 52
第四節　考察 53
第五節　まとめ 56
総括 57
引用文献 59
謝辞 70

略語表

本論文中では以下の略語を用いた。

4-HPC	: 4-Hydroperoxy cyclophosphamide
5-FU	: 5-Fluorouracil
6-MP	: 6-Mercaptopurine
ABC	: ATP-binding cassette
ALL	: Acute lymphocytic leukemia
ALT	: Alanine aminotransferase
AST	: Aspartate aminotransferase
AUC	: Area under the blood concentration-time curve
Alb	: Serum Albumin
BMI	: Body mass index
BSA	: Bovine serum albumin
BUN	: Blood urea nitrogen
CL	: Clearance
CMV	: Cytomegalovirus
CY	: Cyclophosphamide
Ccr	: Creatinine clearance
C_{max}	: Maximum blood concentration
C_{min}	: Minium blood concentration
DEPC	: Diethylpyrocarbonate
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DNA	: Deoxyribonucleic acid
DOX	: Doxorubicin
DW	: Distilled water
EDTA	: Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FBS	: Fetal bovine serum
GVHD	: Graft-versus-host disease
GVL	: Graft versus leukemia

HEPES	: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
HLA	: Human leukocyte antiegen
HPLC	: High performance liquid chromatography
Ke	: Elimination rate constant
MDR1	: Multidrug resistance drug protein 1
NP40	: Nonidet P-40
P-gp	: P-glycoprotein
PBS	: Phosphate buffered saline
PCR	: Polymerase chain reaction
PD	: Pharmacodynamics
PK	: Pharmacokinetics
RMSE	: Root mean square error
RNA	: Ribonucleic acid
RNase	: Ribonuclease
ROC	: Receiver operating characteristic
RT	: Reverse transcription
S.D.	: Standard deviation
Scr	: Serum creatinine
T-bil	: Total bilirubin
T-pro	: Total protein
TBI	: Total body irradiation
TMA	: Thrombotic microangiopathy
TdR	: Thymine deoxyriboside
Tris	: Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	: Ultraviolet
VP-16	: Etoposide
Vd	: Volume of distribution
WST-8	:2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt
cDNA	: Complementary deoxyribonucleic acid
mRNA	: Messenger ribonucleic acid

γ-GT　　: γ-Glutamyltranspeptidase

序論

がんは我が国の死亡率第一位の疾患であり 2011 年のがんによる死亡者は 360,963 人（男:215,110 人, 女:145,853 人）と医療の進歩した現在においても社会的に問題となっている [1)]。血液のがんである白血病は 2011 年のデータで死亡者数が 7,900 人（男:4,779 人, 女:3,121 人）であり、がんによる死亡者全体の約 2.2%と比率は高くない [1)]。しかしながら、成人急性リンパ性白血病（ALL）では抗がん薬治療により多くの症例で完全寛解が得られるものの再発率が非常に高い。成人では小児の例と異なり予後が特に悪く、寛解導入に成功したとしても薬物療法だけでは寛解持続期間が短く長期生存は期待できない。白血病の治療概念は total cell kill であり、白血病を治癒に導くためにはすべての白血病細胞を死滅させる必要がある。したがって、白血病細胞がゼロになるまで徹底的に叩く、あるいは免疫機構で排除が可能なレベルまで白血病細胞を減少させる必要があると考えられている。そこで、寛解導入成功後にも寛解後療法が施行されるが、寛解後療法は、寛解導入療法と同程度の強力な治療である「地固め療法」と外来でも実施が可能な「維持・強化療法」に分類される。地固め療法として最も強力な治療法が造血幹細胞移植であり、大量の化学療法と全身放射線（TBI）によって白血病細胞を死滅させた後、一般的には HLA の一致した幹細胞が移植される。造血幹細胞移植のうち、同種移植は白血病に対し広く実施され、allo 抗原や腫瘍特異抗原を認識する T 細胞による免疫療法である GVL 効果も期待される。この造血幹細胞移植が現在 total cell kill を達成しうる最も可能性の高い治療法であるが、強力な前処置、移植片対宿主病（GVHD)、感染などによる移植関連死の頻度も高く、造血幹細胞移植を行う症例やタイミングなどの選択は慎重に検討すべきであると考えられる。

従来、成人 ALL に対する標準的同種移植の前処置として、シクロホスファミド（CY）と TBI を組み合わせた CY/TBI レジメンが開発され、現在でも標準的前処置として頻用されている。しかしながら、同種移植における長期生存率は 30-50%と充分な治療成績が得られていない [2-7)]。そこで、治療強度を増強するためにリンパ性悪性腫瘍に対する有効性が確認されているエトポシド（VP-16）を最大耐用量とされる 60 mg/kg の用量 [8-10)]で併用した前処置レジメンが開発された（中等量 VP-16/CY/TBI 前処置)。しかし、再発率の減少は認められるものの肝臓、呼吸器、出血などの合併症による死亡例が増加し、結果として生存率の向上は認められなかった [11-16)]。

北海道大学病院では 1993 年から 2007 年の間に 37 例の成人 ALL およびその類縁疾患に対し、中等量 VP-16/CY/TBI 前処置を用いた同種造血幹細胞移植を施行してきた。後方視的解析ではあるが、経過観察中央値 35.1 ヶ月で、3 年生存率は 89.2％と非常に良好な成績が得られている [17, 18]。北海道大学病院における VP-16 の投与量は計 30 mg/kg（15 mg/kg を 2 日間）であり、従来の VP-16 を用いた移植前処置における投与量（計 60 mg/kg）と比較して少ない投与量である。この投与量の違いが副作用を増加させず、再発率を減少させる上で重要なファクターだと考えられるが、この前処置を用いた治療プロトコールには明確なエビデンスはなく VP-16 の投与量の違いによる移植成績を検討した報告はほとんどない。ここまでの概略を図 1 に示した。

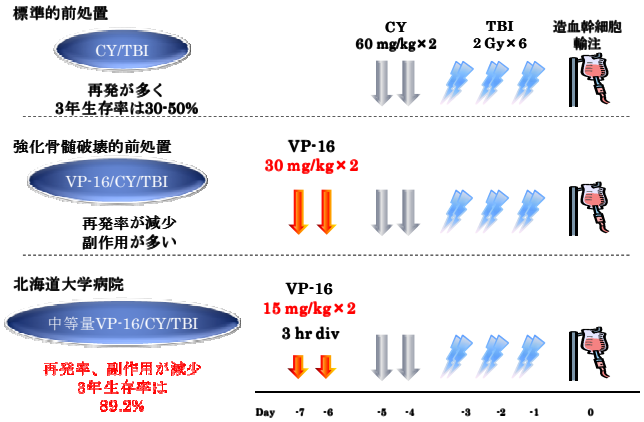


図 1. 造血幹細胞移植前処置レジメンの開発の経緯

また、抗がん薬の曝露順序や曝露スケジュールの違いによってがん細胞への殺細胞効果が変化することが知られているが [19-22]、本レジメンでの抗がん薬の投与順序による治療効果への影響については検討されていない。

そこで、本研究では中等量 VP-16/CY/TBI 前処置を用いた同種造血幹細胞移植における、VP-16 の体内動態（PK）と薬理作用（PD）を関連付けた投与量の最適化と VP-16 と CY の投与順序の最適化を目的とした。

第一章では、ヒトの血中 VP-16 濃度を定量し、PK パラメーターと有害事象との関連性を評価した。次に、患者の臨床検査値などのパラメーターを用いて血中濃度を予測できるか検討した。さらに、ヒトでの検討で VP-16 の血中濃度の変動要因であることが示唆された体重が VP-16 の PK パラメーターに与える影響をラットを用いて検討した。第二章では VP-16、CY の投与順序が標準化されていないことから、白血病由来の細胞を用いて、両薬剤の曝露順序による殺細胞効果の違いを検証した。

第一章　VP-16 の PK/PD 解析による投与量の最適化

第一節　緒言

抗がん薬は有効域と副作用域が極めて近接していることから、体内動態の個人差が治療成績と副作用発現に重要だと考えられる。患者の薬物血中濃度を測定し、PK と PD を関連付けて個々の患者に最適な投与量と投与方法を決定する手法として Therapeutic drug monitoring (TDM) がある。個別化投与設計として、TDM は抗菌薬、抗てんかん薬、免疫抑制薬などを対象としてすでに臨床で実施されている。しかしながら、抗がん薬に対する TDM の適応に関してはいくつかの問題点があり、臨床応用されている例は非常に少ない。その問題点として、化学療法のほとんどが多剤併用であり解析が複雑であること、抗がん薬の有効性が認められず、数回の投与で終了となることなどが挙げられる[23]。しかしながら、抗がん薬の血中濃度と抗腫瘍効果及び副作用との関連を解析することは重要であり、今後の課題であると考えられる。

VP-16 の投与量や血中濃度の違いによる有効性や安全性に関してはこれまでにもいくつか報告があるが[24-27]、造血幹細胞移植における検討は非常に少なく、中等量 VP-16/CY/TBI レジメンにおける報告はない。

そこで本章では、ヒトの VP-16 血中濃度から PK/PD 解析を行ない最適な投与量の検討と VP-16 の血中濃度の個体間変動の一つとして示唆された体重が VP-16 の体内動態に与える影響をラットを用いて検討したので詳述する。

第二節　実験材料と実験方法

第一項　実験材料

1) 使用薬物

Etoposide	Santa Cruz Biotechnology
Etoposide Intravenous Infusion	Sandoz
Diphenyl Hydantoin (DPH)	WAKO
Ketalar for Intravenous Injection (Ketamine)	Daiichi Sankyo
Midazolam Injection (Midazolam)	Sandoz

2) ブランク血漿

ヒト血漿	Hokkaido Red Cross BC

3) 使用試薬

Acetonitril (HPLC 用)	WAKO
Methanol (HPLC 用)	Kanto Chemical

上記以外の試薬は市販の特級品もしくは生化学用のものを用いた。

4) 使用機器

遠心分離機

himac CF 15RX	HITACHI
himac CT 15RE	HITACHI
himac CR 22	HITACHI

HPLC

L-7110 Pump	HITACHI
L-7300 Column Oven	HITACHI
L-7200 Autosampler	HITACHI
L-7420 UV-VIS Detector	HITACHI

D-2500 Integrator HITACHI

5) 使用動物

使用目的に合わせた週齢数の Wistar 系雄性ラットを（Hokudo Co., Ltd.）より購入し、1 週間馴化した後に用いた。飼育は 23±2°C、湿度 50±10%以内で管理された北海道大学薬学部動物舎で行なった。餌は Rodent Lab Diet EQ 5L37 (Japan SLC, Inc.）を水は新鮮水道水を自由摂食、飲水させて飼育した。

第二項　対象患者

2008 年から 2013 年の間に北海道大学病院血液内科、第二内科において中等量 VP-16/CY/TBI 前処置を用いて同種造血幹細胞移植を施行した患者で、インフォームドコンセントを取得した患者全 21 人を対象とした。なお、本研究は北海道大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会での承認を得て行なった。

第三項　患者への VP-16 投与及び採血方法

1) 静脈内投与方法

前処置開始 1 日目及び 2 日目にそれぞれ朝 10 時から VP-16 を 15 mg/kg の用量で 3 時間かけ点滴静注した。

2) 採血方法

末梢血を経時的に 13 点（投与前と 1 日目の投与から 1, 3, 6, 10, 24, 25, 27, 30, 34, 44, 68, 92 時間後)、1 回に約 3 mL を採取した。採取した血液は直ちに微量のヘパリンナトリウムと混和し、750×g, 10 分、4°C で遠心分離し、上清を分取して血漿サンプルとした。得られた血漿サンプルは測定まで-20°C で保存した。

第四項　高脂肪食による肥満ラットの作製

Wistar 系雄性ラット搬入後（6 週齢)、第一章　第二節　第一項　5)に従い 1 週間飼育した。その後、7 週齢から Rodent Lab Diet EQ 5L37 (Normal fat diet）と Quick Fat (High fat diet) の各摂食群に分け自由摂食、飲水で 16 週齢まで飼育した。1 週間毎に体重測定を行なった。また薬物の投与及び採血終了後にラットを安楽死させ精巣上体周囲脂肪、腎周囲脂肪、腸間膜脂肪を採取して重量を測定した。

第五項　ラットへの VP-16 投与方法と採血方法

1）静脈内投与方法

ラットをジエチルエーテルで予備麻酔し、ケタミン 6.25 mg/100g weight, ミダゾラム 375 μg/100 g weight を腹腔内投与して麻酔した後、頸部を切開して頸静脈を露出させた。VP-16 は注射製剤のエトポシドを使用し、15 mg/kg weight となるように生理食塩水で希釈して 0.5 mL とした溶液を 30 秒かけて静脈内投与した。

2）採血方法

投与前と投与後 0.017, 0.05, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 時間後に頸静脈から約 0.3 mL 採取した。採取した血液は直ちに微量のヘパリンナトリウムと混和し、750×g, 10 分、4 °C で遠心分離し、上清を分取して血漿サンプルとした。得られた血漿サンプルは測定まで-20°C で保存した。

第六項　血漿中 VP-16 濃度の測定法

患者血漿サンプル 200 μL に 50%メタノール 200 μL、蒸留水 1 mL を添加後、内部標準物質としてメタノールに溶解したフェニトイン 100 μg/mL を 20 μL 添加した。さらにジクロロメタン 4 mL を添加し、15 分間振盪後、750×g で 5 分間遠心し、アスピレーターで上清を除去したものを蒸発乾固させ、移動相 200 μL で再溶解したものを HPLC にて測定した。HPLC 条件を表 1 に示した。なお、ラットの血漿サンプルは 100 μL 使用し、その他の使用する溶媒、溶液の量はメタノール 100 μL、蒸留水 500 μL、フェニトイン溶液 20 μL、ジクロロメタン 2 mL として実験を行なった。

表 1　VP-16 の HPLC 条件

Column	ERC-ODS-1161 (Yokohamarika, Inc.)
Mobile phase	Methanol/Distilled water/Acetonitrile (42.7：55：2.3)
Column temperature	40°C
Flow rate	1.0 mL/min
Wave length	UV at 229 nm

第七項　患者情報の収集

1）患者基本情報および各種検査値の調査

北海道大学病院診療情報端末および院内カルテを参照し調査した。解析の対象とした患者基本情報と各種検査項目は、年齢、性別、体重、身長、体表面積、BMI、Alb、T-pro、BUN、Ccr、Scr、T-Bil、AST、ALT、γ-GT とした。

2）有害事象情報の調査

有害事象は口内炎、下痢の Grade とサイトメガロウイルス（CMV）感染および血栓性微小血管症（TMA）とした。情報は、北海道大学病院診療情報端末および北海道大学病院血液内科同種造血幹細胞移植後評価データベースを用いて収集した。

第八項　データ解析法

収集した患者データと血中濃度の相関関係の解析および変動要因の抽出、予測式の算出には、単変量解析、ステップワイズ回帰分析、最小 2 乗法を使用した。これらの解析には統計ソフトの JMP®6 (SAS Institute Inc.）を用いた。また、2 群の差の比較は F-検定を行ない、等分散の場合には Student の t-検定で、不等分散の場合には Cochran-Cox の検定で有意差の解析し、危険率 5%未満を有意とした。PK パラメーターの解析は Microsoft Office Excel ®2003 (Microsoft Corporation）を用いて 1-コンパートメントモデルで解析した。また $AUC_{0\text{-}24hr}$、$AUC_{24\text{-}44hr}$、$AUC_{0\text{-}92hr}$ は、各採血点における血中濃度から、台形法により算出した。

第三節　実験結果

第一項　VP-16 の PK 解析

はじめに、VP-16 の血中濃度推移の確認と PK パラメーター算出のために、血中濃度を経時的に測定した（図 2)。得られた PK パラメーターを表 2 に示した。その結果、VP-16 の血中濃度は患者間で大きく異なり、1 日目の C_{max} では最小値と最大値がそれぞれ 51.8 μg/mL、116.5 μg/mL となり最大 2.2 倍の差が認められた。薬物の総曝露量の指標である $AUC_{0\text{-}92hr}$ でも同様に最小値と最大値はそれぞれ 870 μg･hr/mL、2015 μg・hr/mL となり最大で 2.3 倍の差が認められた。その他、算出した PK パラメーターの Vd、Ke_{β} でそれぞれ約 2 倍、約 3 倍また CL で約 2 倍の差が認められ、VP-16 の体内動態は患者間で大きく異なることが明らかとなった（表 2)。

なお、1 日目と 2 日目の PK パラメーターはほぼ同じ値を示したので以後の検討では 1 日目の PK パラメーターを用いた。

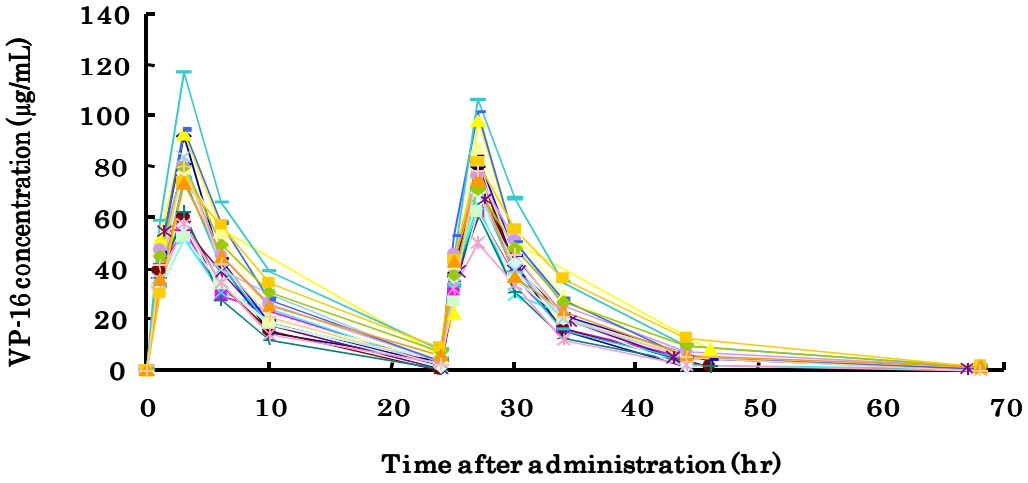


図 2　患者における VP-16 を 15 mg/kg で 24 時間毎に 2 回を 3 時間かけて静脈内投与した後の血中濃度推移（21 症例）

表 2　患者における VP-16 の PK パラメーター (21 症例)

Parameter	Day1			Day2		
	Mean ± S.D.	Median	Range	Mean ± S.D.	Median	Range
C_{max} (μg/mL)	74.1 ± 17.0	75.6	51.8 - 116.5	77.0 ± 13.5	76.6	50.2 - 106.0
C_{min} (μg/mL)	3.9 ± 2.4	3.6	0.2 - 9.1	6.0 ± 3.7	5.3	1.6 - 16.1
Vd (L)	13.5 ± 2.7	13.2	9.53 - 18.3	12.8 ± 2.4	12.3	9.3 - 19.1
ke_{β} (hr^{-1})	0.15 ± 0.04	0.13	0.10 - 0.29	0.15 ± 0.03	0.14	0.07 - 0.20
CL (mL/min)	26.7 ± 5.6	28.0	17.0 - 34.5	27.7 ± 5.8	27.6	17.5 - 41.7
$AUC_{0\text{-}24hr}$ or $AUC_{24\text{-}44hr}$ (μg・hr/mL)	626 ± 155	604	423 - 1021	601 ± 133	572	384 - 852
$AUC_{0\text{-}92hr}$ (μg・hr/mL)	1310 ± 323	1279	870 - 2015			

第二項　VP-16 の血中濃度と有害事象との関連性

VP-16 の血中濃度は患者間で大きく異なることが明らかになったことから VP-16 の血中濃度と有害事象との関連性を明らかにすることを目的として解析を行なった。C_{max} と $AUC_{0\text{-}92hr}$ を血中濃度の指標とし、口内炎と下痢の Grade、移植後の感染として問題となる CMV 感染、予後不良なため非常に重大な有害事象である TMA を解析項目として解析した。

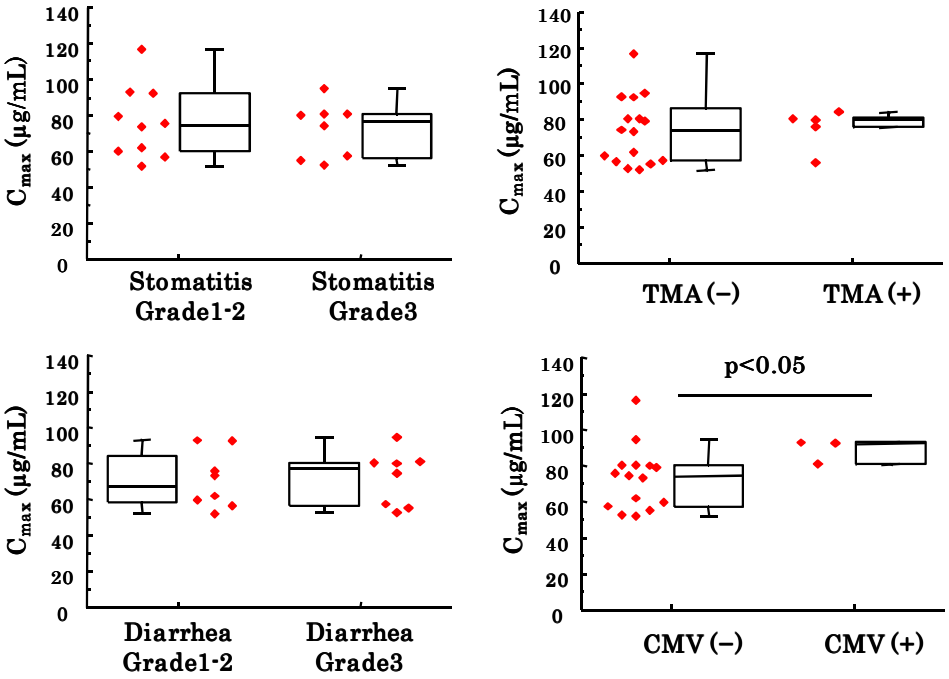


図３　患者における VP-16 の C_{max} と各有害事象発現の関連を示す散布図と箱ひげ図（21 症例）

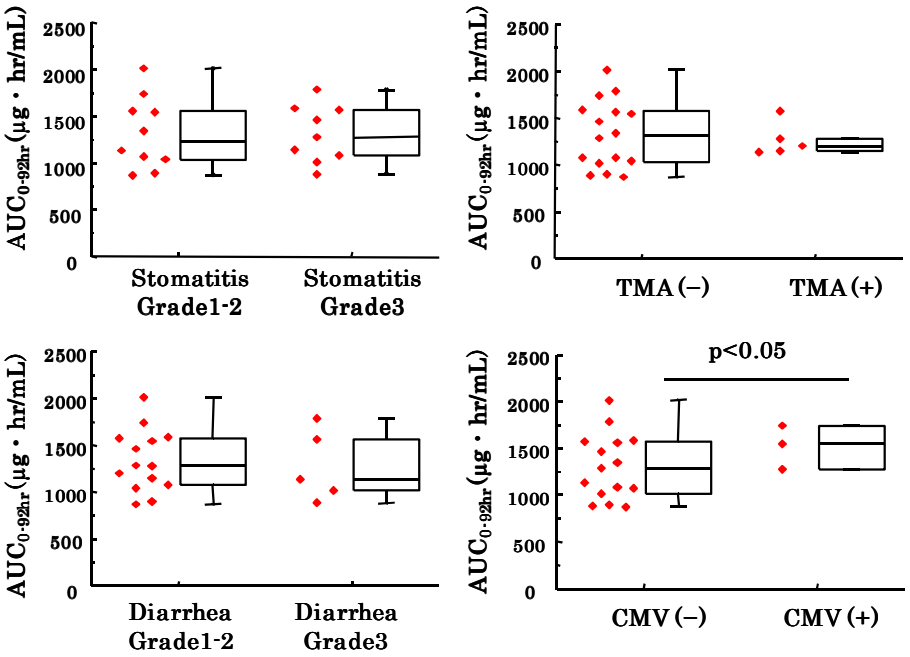
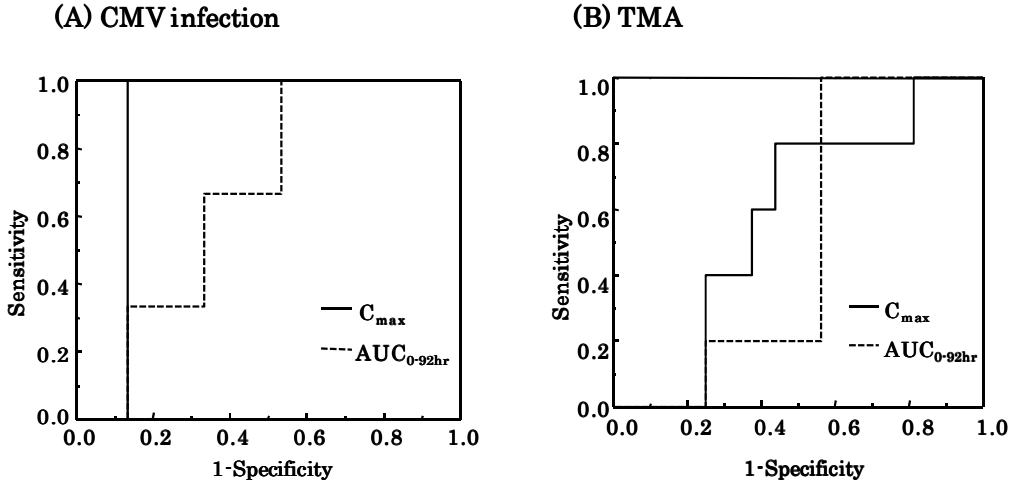


図４　患者における VP-16 の $AUC_{0\text{-}92hr}$ と各有害事象発現の関連を示す散布図と箱ひげ図（21 症例）

その結果、C_{max}と口内炎および下痢の Grade、TMA 発現の間に関連性は認められなかったが、C_{max}が高い患者では CMV 感染の発症患者が有意に多かった（図 3)。$AUC_{0\text{-}92hr}$と口内炎および下痢の Grade、TMA 発現の間にも関連性は認められなかったが、$AUC_{0\text{-}92hr}$が高い患者では CMV 感染の発症患者が有意に多かった（図 4)。

第三項　ROC 解析を用いた目標血中濃度の算出

続いて、最適な血中濃度を明らかにすることを目的として、血中濃度（C_{max}、$AUC_{0\text{-}92hr}$）と CMV 感染、TMA 発現の有無を分けるカットオフ値を ROC 曲線を用いて算出した。その結果、CMV 感染とC_{max}の間では Area under the ROC curve で 0.87、カットオフ値は 80.8 μg/mL となり$AUC_{0\text{-}92hr}$との間ではそれぞれ 0.67、1278.9 μg･hr/mL と算出された（図 5(A))。また TMA 発症とC_{max}との間には Area under the ROC curve で 0.58、カットオフ値は 75.6 μg/mL となり$AUC_{0\text{-}92hr}$との間ではそれぞれ 0.50、1278.9 μg・hr/mL と算出された（図 5(B))。CMV 感染と TMA 発症ともにC_{max}、$AUC_{0\text{-}92hr}$のカットオフ値はほぼ同じ値を示した。



	Area under the ROC curve	Cut off point
C_{max}	0.87	80.8
$AUC_{0\text{-}92hr}$	0.67	1278.9

	Area under the ROC curve	Cut off point
C_{max}	0.58	75.6
$AUC_{0\text{-}92hr}$	0.50	1278.9

図 5　患者における VP-16 の血中濃度（C_{max}、$AUC_{0\text{-}92hr}$）と CMV 感染（A）と TMA 発症（B）の ROC 曲線（21 症例）

第四項　VP-16 血中濃度の変動要因の解明

VP-16 は 1 日 1 回 15 mg/kg の投与量で投与しており、体重をもとに投与量を算出している。そこで体重と C_{max}、$AUC_{0\text{-}92hr}$ との関係を検討した。その結果、体重と C_{max}、$AUC_{0\text{-}92hr}$ の間には正の相関が認められた（図 6)。

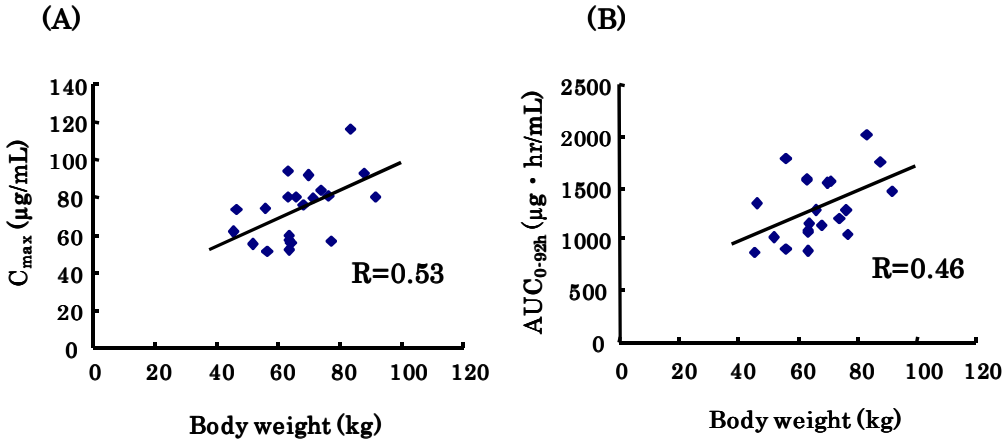


図 6　患者における体重と VP-16 の C_{max} (A), $AUC_{0\text{-}92hr}$ (B) との関係（21 症例）
各点は患者に 15 mg/kg の用量で VP-16 を静脈内投与した時の体重と C_{max} (A), $AUC_{0\text{-}92hr}$ (B) のデータを示している。
直線は 1 次回帰直線を示している。

次に、VP-16 の体内動態の変動が分布、消失のどの過程の影響を受けているのか明らかにするために、各採血点における血中濃度と $AUC_{0\text{-}92hr}$ の相関関係を比較した。各採血点と $AUC_{0\text{-}92hr}$ の相関係数を算出したところ、C_{3hr} (C_{max}), C_{6hr}, C_{27hr} (C_{max}), C_{30hr}, C_{34hr} のポイントで強い相関が認められ、C_{24hr} (C_{min}), C_{44hr} (C_{min}) では相関係数が低下した（表 3)。特に C_{3hr} (C_{max}), C_{6hr}, C_{27hr} (C_{max}), C_{30hr} のポイントは VP-16 投与終了後、3 時間までの早い時間帯の血中濃度であり、VP-16 の体内動態は分布過程の影響を最も大きく受けており、消失過程の影響は小さいと示唆された。そこで分布過程に影響を及ぼす因子の探索を行なった。

表 3　患者における VP-16 の $AUC_{0\text{-}92hr}$ と各採血点における濃度の相関関係（16-21 症例）

	C_{1hr}	C_{3hr} (C_{max})	C_{6hr}	C_{10hr}	C_{24hr} (C_{min})	C_{25hr}	C_{27hr} (C_{max})	C_{30hr}	C_{34hr}	C_{44hr} (C_{min})
correlation coefficient	0.69	0.85	0.95	0.81	0.78	0.37	0.83	0.92	0.96	0.71
p value	＜0.01	＜0.01	＜0.01	＜0.01	＜0.01	=0.13	＜0.01	＜0.01	＜0.01	＜0.01

先ず解析に必要な患者情報および各種検査項目を抽出した（表 4)。対象患者のなかにはASTとALTが高値で肝障害があると疑われる患者が数名存在した。腎機能に関してはScrとBUNで基準値（それぞれ0.5-1.0 mg/dL, 8-20 mg/dL）を上回る患者は存在しなかった。その他、検査データは極端に大きなばらつきはないものの患者間で差が認められた。

表 4　患者の検査データ（21 症例）

		Mean ± S.D.	Median	Range
Patients	21			
Age (year)		31.8±6.8	32	18-44
Sex	16 / 5 (male / female)			
Body weight (kg)		66.8±12.3	64	45.5-91.8
Body height (m)		1.7±0.1	1.7	1.6-1.8
Body surface area (m^2)		1.8±0.2	1.8	1.4-2.1
BMI (kg/m^2)		23.1±3.3	23	15.5-28.8
Alb (g/dL)		4.0±0.4	4	2.8-4.9
T-pro (g/dL)		6.0±0.4	6	5.4-7
BUN (mg/dL)		10.1±2.9	10	5-15
Ccr (mL/min)		157.4±40.5	153.6	80-246
Scr (mg/dL)		0.6±0.2	0.6	0.3-1.0
T-bil (mg/dL)		0.8±0.4	0.7	0.4-2.1
AST (IU/L)		35.5±30.9	21	9-125
ALT (IU/L)		46.1±53.3	33	5-251
γ-GT (IU/L)		51.3±42.0	29	17-138

続いて、VP-16 の Vd とそれに影響を及ぼす因子との相関を単回帰分析により解析を行なった。その結果、Alb 値で相関係数が-0.526、p 値が 0.014 と有意な相関が認められ、T-pro、BUN、Age で有意ではないが弱い相関関係が認められた（表 5)。

表 5　VP-16 の Vd と患者の検査データとの相関関係（21 症例）

	correlation coefficient	p value
Alb	-0.526	0.014
T-pro	-0.376	0.093
BUN	-0.357	0.112
Age	0.315	0.164
ALT	-0.254	0.266
Body weight	0.218	0.343
T-bil	0.217	0.345
Body surface area	0.212	0.356
AST	-0.209	0.363
BMI	0.203	0.376
Scr	0.187	0.417
Ccr	0.111	0.633
Body height	0.107	0.644
γ-GT	0.048	0.837

第五項　ステップワイズ回帰分析法を用いた Vd 予測法の確立

抽出された変動要因に性別のデータを加えてステップワイズ回帰分析法により Vd の予測を試みた。ステップワイズ分析法のステップダウン法で解析をおこなったところ、影響の大きな順に Alb, BUN, T-bil, 年齢が選択され相関係数は 0.79 となり比較的良好な相関を示した。また、前項で血中濃度の変動要因として体重が影響していると考えられたので、体重の値を因子として強制投入して再度ステップワイズ分析を行なった。その結果、影響の大きな順に Alb, BUN, T-Bil, 体重, 年齢が選択され相関係数は 0.80 となり解析を行なった中で最も強い相関を示した（図 7)。続いて、予測 Vd と投与量から予測 C_{max} を算出し、実測 C_{max} との相関を確認したところ、こちらも良好な相関を示した（図 8)。

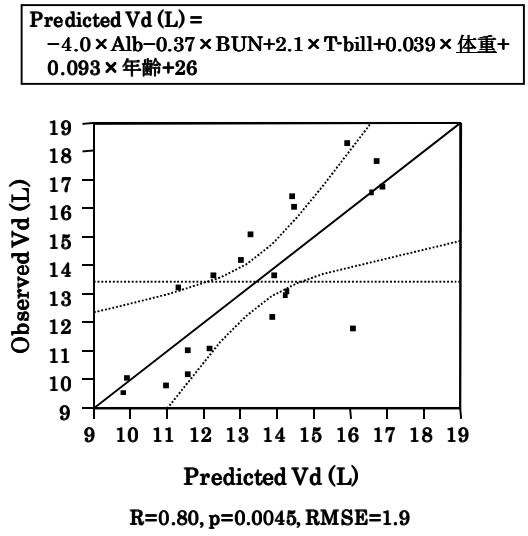


図 7　患者の予測 Vd と実測 Vd の相関（21 症例）

予測はステップワイズ回帰分析法により行なった。

RMSE：Root mean square error

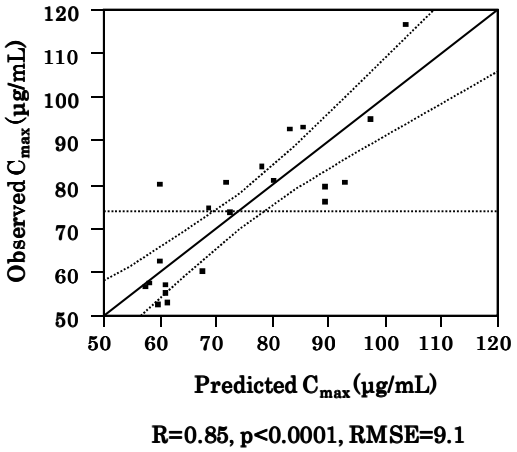


図 8　患者の予測 C_{max} と実測 C_{max} の相関（21 症例）

モデルのあてはめは最小 2 乗法で行なった。

第六項　肥満ラットにおける VP-16 の PK パラメーター変化

ヒトの検討結果から、VP-16 の血中濃度の個体差には Vd が影響していることが明らかとなった。VP-16 が脂溶性の薬物である[28]ことから、次に Vd に与える体脂肪率の影響に着目してラットを用いて検討した。まず、ラットを通常食群と高脂肪食群に分けて飼育し、内臓脂肪量の異なるラットを作製した。通常食群と高脂肪食群のラットの体重を 1 週間ごとに測定し、体重の推移をみたところ、通常食群と高脂肪食群の体重は 9 週齢から差が出始め 16 週齢あたりで体重差がほぼ一定になったことから、この時点で十分な体重差が得られていると考え実験に用いることとした（図 9)。また肥満状態であることを確認するため内臓脂肪量（精巣上体周囲脂肪、腎周囲脂肪、腸間膜脂肪）の重量を測定した。その結果、高脂肪食群ではどの部位でも体重あたりの脂肪量が通常食群の約 2 倍多かった（表 6)。以上より肥満ラットを作製できた。

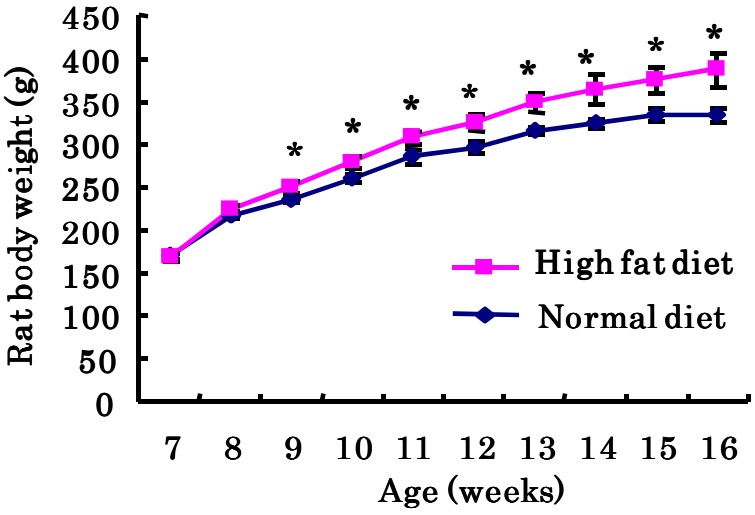


図 9　通常食と高脂肪食で飼育したラットの体重推移

各点は 4 回の実験の平均値 ± S.D.を示す。「*」は Student の *t*-検定により、通常食群に比較して有意差があることを示す（$p<0.05$)。

表 6 通常食と高脂肪食で飼育したラットの内臓脂肪量の比較

	Normal diet	High Fat diet
Rat body weight	324 - 344g	380 - 402g
Epididymal WAT (g/100g weight)	1.98 ± 0.20	3.37 ± 0.42*
Perirenal WAT (g/100g weight)	0.60 ± 0.16	1.15 ± 0.21*
Meseneric WAT (g/100g weight)	0.08 ± 0.06	1.52 ± 0.35*

実験には 16 週齢のラットを使用した。各値は 4 回の実験の平均値 ± S.D.を示す。
「*」は Student の *t*-検定により、通常食群に比較して有意差があることを示す ($p < 0.05$)。
WAT：white adipose tissues を表す。

作製した通常食群と高脂肪食群に 15 mg/kg の用量で VP-16 を投与した時の薬物動態パラメーターを算出した (表 7)。その結果、高脂肪食群の方が通常食群に比べ血中濃度が高い傾向が認められたが、AUC、C_{max} に有意な差は認められなかった。また Vd_{β} にも有意な差は認められなかったが、高脂肪食群では体重あたりの Vd が低下する傾向が認められた。

表 7　通常食と高脂肪食で飼育したラットに 15 mg/kg の用量で VP-16 を静脈内投与した時の PK パラメーターの比較

	Normal diet (16week)	High Fat diet (16 week)
Rat body weight	324 - 344g	380 - 402g
AUC (μg・hr/mL)	19.3 ± 5.8	25.4 ± 3.44
C_{max} (μg/mL)	68.3 ± 8.8	76.5 ± 7.32
$T_{1/2\beta}$ (hr)	0.49 ± 0.06	0.46 ± 0.06
CL (mL/hr/kg)	12.5 ± 3.72	9.98 ± 1.42
Vd_{β} (L/kg)	0.87 ± 0.21	0.58 ± 0.03

実験には 16 週齢のラットを使用した。各値は 4 回の実験の平均値 ± S.D.を示す。

第七項　健常ラットを用いた VP-16 の PK 解析

次に、ヒトでの検討では腎機能や肝機能を示すパラメーターが VP-16 の血中濃度に影響を与えていることが示されたため、健常ラットを用いることで腎機能や肝機能など他の要因を考慮せずに体重と Vd との関係を明確にできると考え、ヒトと同様に体重と VP-16 の血中濃度に相関があるか検討を行なった。具体的には週齢数を 5, 7, 10 週齢の群に分けて群間で体重差を生じさせたラットに 15 mg/kg の用量で VP-16 を静脈内投与し、PK パラメーターを算出した。その結果、体重が重い群の方が C_{max} と AUC が大きい値を示した（図 10, 表 8)。また、群間で体重の増加に伴い $T_{1/2\beta}$ 値に変化は認められなかったが、体重あたりの Vd_{β} は減少した（表 8)。これらの結果より、C_{max} と AUC の増大には消失過程は影響せず、Vd の違いが関係していることが示唆された。

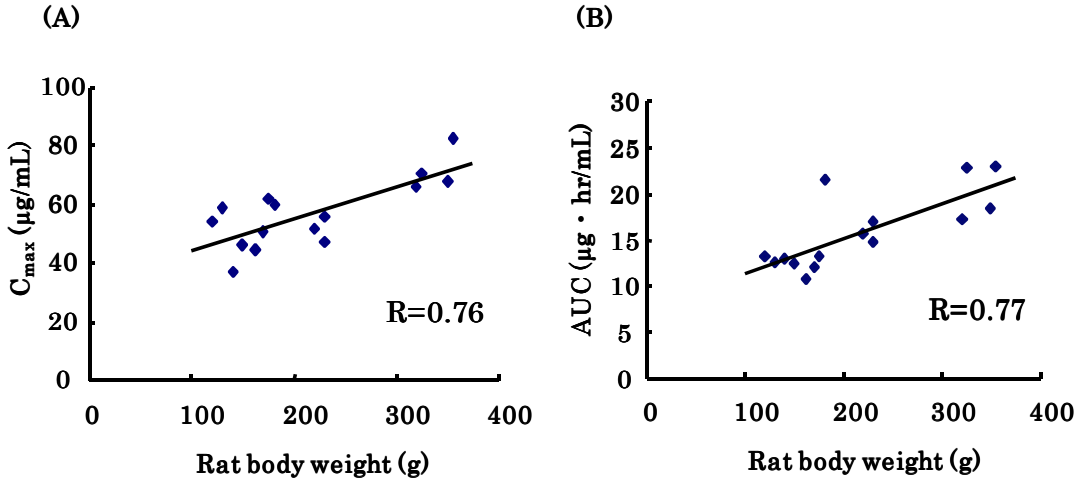


図 10　ラット体重と VP-16 の C_{max} (A), AUC (B) との相関関係

各点は 5, 7, 10 週齢のラットに 15 mg/kg の用量で VP-16 を静脈内投与した時の体重と C_{max} (A), AUC (B) のデータを示している（例数 15)。
直線は 1 次回帰直線を示している。

表 8　体重の異なるラットに 15 mg/kg の用量で VP-16 を静脈内投与した時の PK パラメーターの比較

	5 week (control)	7 week	10 week
Rat body weight	120-150g	220-230g	320-355g
AUC (μg・hr/mL)	12.8±0.33	15.8±1.21*	20.4±3.01*
C_{max} (μg/mL)	49.0±9.73	51.7±4.41	71.8±7.57*
$T_{1/2\beta}$ (hr)	0.41±0.06	0.39±0.02	0.39±0.08
CL (mL/hr/kg)	19.5±0.50	15.9±1.20*	12.8±2.20*
Vd_{β} (L/kg)	0.97±0.19	0.65±0.07*	0.56±0.08*

各値は 3-4 回の実験の平均値 ± S.D.を示す。

「*」は Student の *t*-検定により、5 週齢と比較して有意な差があることを示す ($p < 0.05$)。

第八項　ラットを用いた血中濃度補正に関する検討

はじめに、ラットの血中濃度の時間推移を片対数プロットすると、α相とβ相の2相性が認められた（データは示していない)。そこで、それぞれの過程における Vd を算出し、体重との相関をみたところ強い正の相関が認められた（図 11)。これらの結果よりラットの体重から Vd を予測し、血中濃度を補正できる可能性が示された。そこで、体重と実測 Vd の回帰式から予測 Vd を算出し、目標として設定した C_{max} (60 μg/mL）に合わせて投与量を算出し、静脈内投与した。算出した投与量の群と 15 mg/kg で投与した群で血中濃度を比較したところ、15 mg/kg で投与した群は体重の増加と共に血中濃度が上昇しているのに対し、投与量を補正した群では体重によらず血中濃度はほぼ一定となり、目標血中濃度である 60 μg/mL 付近の値を得ることができた（図 12)。

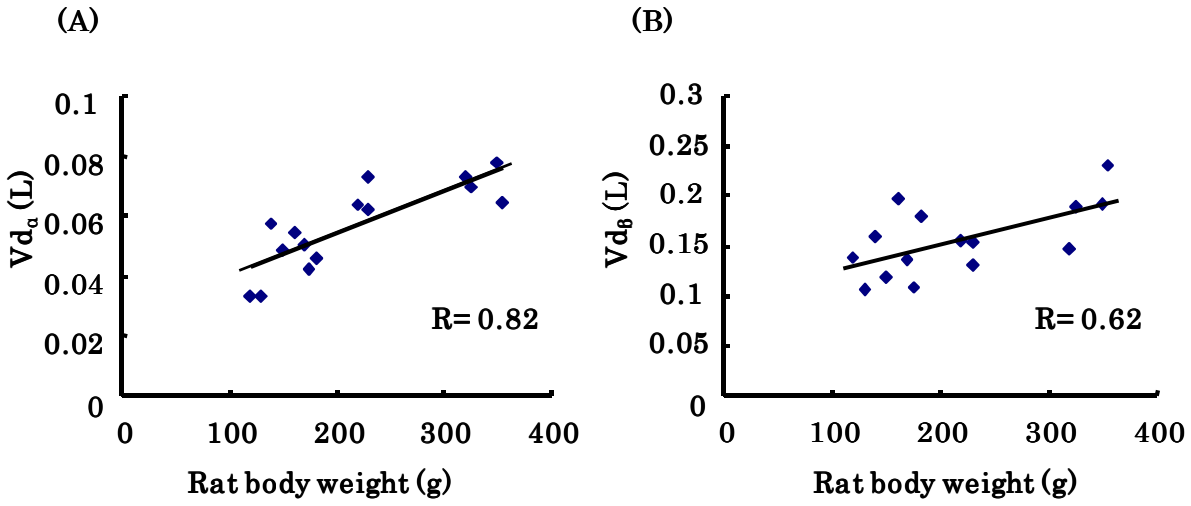


図 11　ラット体重と Vd_{α} (A), Vd_{β}（B）の相関

各点は 5, 7, 10 週齢のラットに 15 mg/kg の用量で VP-16 を静脈内投与した時の体重と Vd_{α} (A), Vd_{β} (B) のデータを示している（例数 15)。

直線は 1 次回帰直線を示している。

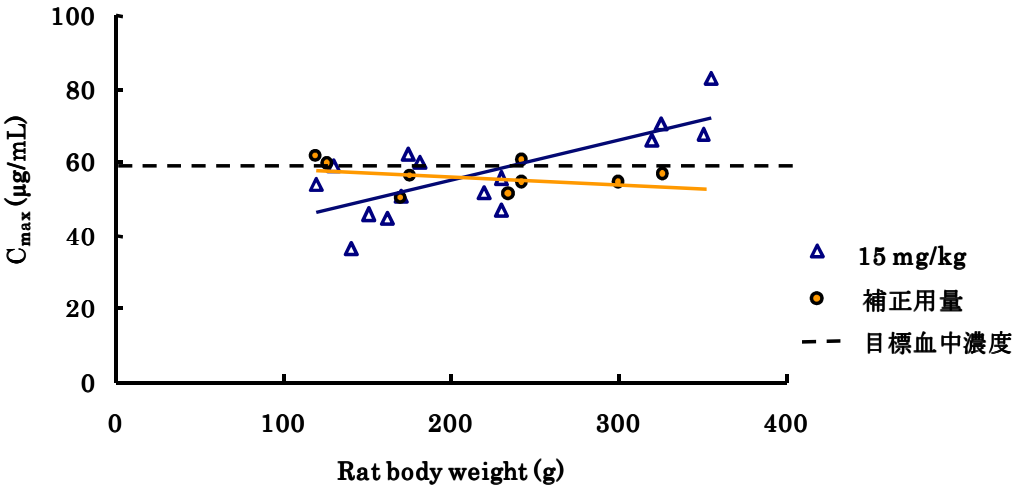


図 12　ラットに 15 mg/kg の VP-16 を静脈内投与した群(△)と補正用量で VP-16 を静脈内投与した群(●)の血中濃度の比較

週齢数が 5-17 のラットを使用した。15 mg/kg 投与群は 15 例、
補正用量の投与群は 9 例で実験を行なった。
直線は 1 次回帰直線を示している。

第四節　考察

本章では同種造血幹細胞移植患者を対象とし、VP-16 の PK/PD 解析を行ない、動態学的パラメーターと副作用発現の関連を解析し、投与量の最適化に向けた検討を行なった。またラットを用いて、体脂肪率と体重が Vd に与える影響を検討し、投与量の最適化に向けて詳細に検討した。

はじめに、同種造血幹細胞移植患者に VP-16 を 15 mg/kg で投与した時の血中濃度を測定し、PK パラメーターを算出した。その結果、血中濃度と PK パラメーターともに患者間で大きな差が認められ（表 2)、これらのパラメーターは過去の報告と一致していた[29-31]。また、C_{max}、$AUC_{0\text{-}92hr}$ を血中濃度の指標として VP-16 の副作用として発現頻度の高い口内炎、下痢、TMA、CMV 感染発現との関連性を解析した。その結果、血中濃度と口内炎、下痢、TMA の発現との間には有意な相関は認められなかったが、CMV 感染との間には有意な相関が認められた（図 3, 4)。VP-16 血中濃度と有害事象との関連性に関しては、VP-16 の定常状態の濃度や AUC が血液毒性と相関があるとこれまでにも報告されているが[32-34]、CMV 感染との相関に関しての報告はない。CMV 感染した患者すべてにおいて腸管障害が認められており、VP-16 の一部は静脈内投与後に胆汁により腸管へ排泄されることから[28]、VP-16 によって粘膜が障害され、腸へ易感染性となったことが要因として考えられる。粘膜障害の強い次に最適な血中濃度を明らかにすることを目的として、CMV 感染, TMA 発現を予測する C_{max}、$AUC_{0\text{-}92hr}$ のカットオフ値を ROC 曲線を用いて解析した。その結果、CMV 感染と TMA 発症ともに C_{max} と $AUC_{0\text{-}92hr}$ のカットオフ値はほぼ同じ値を示した（図 5)。ROC 曲線は臨床的予測指標の判定に用いられる手法で、カットオフ値として選択した因子、今回は C_{max} と $AUC_{0\text{-}92hr}$ が臨床的予測指標として優れているほど、左上に膨らんだ曲線となる。一般的に、曲線下面積である Are under the ROC curve が 0.7 以上で良い指標であり、0.85 以上で優れた予測指標とされている[35]。今回の検討では CMV 感染を予測するのに C_{max} が優れた指標であることが示された。続いて、VP-16 血中濃度の変動要因を明らかにすることを目的として患者パラメーターとの単変量解析を行なった。本来なら投与量は体重で補正されているため C_{max}、$AUC_{0\text{-}92hr}$ は体重によらずほぼ一定となるはずだが、体重と C_{max}、$AUC_{0\text{-}92hr}$ の間には正の相関が認められ（図 6)、体重が血中濃度の個体間変動の要因の一つであると示唆された。成人を対象とした報告はないが、小児を対象とした報告では今回の検討結果と同様に体重

と AUC が正の相関（r=0.529）があると報告されている[36]。したがって、VP-16 は体重と Vd が正比例しないことが明らかとなった。次に、各採血点における血中濃度と $AUC_{0\text{-}92hr}$ との相関を検討した。各採血点と $AUC_{0\text{-}92hr}$ の相関係数を算出したところ、投与終了直後から 3 時間までの早い時間帯の血中濃度と強い相関が認められ、消失過程を示す採血点では相関係数が低下した（表 3)。以上の結果より、VP-16 の体内動態は分布過程の影響を最も大きく受けており、消失過程の影響は小さいことが明らかとなった。そこで Vd に影響を及ぼす要因を探索するために Vd と臨床検査値などの患者パラメーターとの単回帰分析を行なった。その結果、Alb 値と有意な負の相関が認められた（表 5)。VP-16 はタンパク結合率が非常に高く、90%以上と報告されており、健常人よりもがん患者ではタンパク結合率に幅があることも報告されている[37-38]。このことから、Alb 値の変動による薬物の非遊離型分率の変動が Vd に影響していることが強く示唆された。続いて、ステップワイズ回帰分析法により患者パラメーターから Vd の予測を試みたところ、影響の大きな順に Alb, BUN, T-bil, 年齢が選択され相関係数は 0.79 となった。また、体重の値を強制投入したところ、影響の大きな順に Alb, BUN, T-bil, 体重, 年齢が選択され相関係数は 0.80 となり良好な相関を示した(図 7)。Vd が Alb と負の相関を示し、T-bil とは正の相関を示したことについては、Alb の低下により遊離型 VP-16 の割合が増加し、Vd が増加するためだと考えられる。一方、T-bil は Alb に結合するため、T-bil 濃度が増加した際には VP-16 と競合し、VP-16 の遊離型の割合が増加して Vd が増加するためだと考えられる[37, 39]。また、BUN と Vd は負の相関を示した。VP-16 は腎排泄型であり、BUN の増加は腎機能の悪化を意味し、VP-16 の血中濃度の増加へつながる。その結果、Vd の減少につながると考えられる。年齢については、一般に加齢に伴い体内の水分量は減少し、脂肪量が増加するため Vd の増大につながるものと考えられる。体重に関しても一般に、その増加に伴い Vd は増大するものと考えられる。続いて、予測 Vd と投与量から予測 C_{max} を算出し、実測 C_{max} との関係をみたところ、こちらも良好な相関を示した（図 8)。これらの結果より、ROC 曲線から算出した C_{max} のカットオフ値である 80.8 μg/mL を超えないように、予測 Vd を用いて投与量を補正することが可能であると示唆された。

ヒトでの検討において、VP-16 の血中濃度の個体差には Vd が影響していることが明らかとなったため、一般的に Vd に影響する体脂肪率の影響に着目してラットを用いて検討した。通常食群と高脂肪食群に分けて飼育し、作製した通常ラットと肥満ラ

ットに 15 mg/kg の用量で VP-16 を投与した時の薬物動態パラメーターを算出した。その結果、高脂肪食群の方が通常食群に比べ AUC、C_{max} で有意な差は認められなかったが高い傾向が認められ、Vd_{β} にも有意な差はないものの、高脂肪食群では体重あたりの Vd が低下する傾向が認められた（表 7)。このことより、体脂肪率が高い場合には投与量の補正が必要であると示唆された。次に、健常ラットを用い週齢により体重（体格差）を群別して、VP-16 の血中濃度の関連性が認められるか検討した。その結果、体重が重い群の方が C_{max} と AUC が大きい値を示した（図 10, 表 8)。また、群間で体重の増加に伴い $T_{1/2\beta}$ 値に変化は認められなかったが、体重あたりの Vd_{β} は減少した（表 8)。これらの結果より、C_{max} と AUC の増大には消失過程の影響は受けずに Vd の違いが関係していることが示唆された。ラットの単位体重あたりの Vd の減少は体脂肪率だけでなく、体格差が大きく影響しており、実際の患者の BMI が 15.5～28.8 であり、高度な肥満患者が存在しないことからもラットとヒトの検討結果は一致した。さらに、ラットの体重と Vd の関係をみたところ強い正の相関が認められたことからラットの体重から Vd を予測して、血中濃度を補正できる可能性が示された(図 11)。そこで、ラットの体重から Vd を予測し、目標に合わせて投与量を算出、投与したところ、投与量を補正した群では体重によらず血中濃度はほぼ一定となり、目標血中濃度である 60 μg/mL 付近の値を得ることができた（図 12)。これらの結果から、ラットでは体重が VP-16 の血中濃度の個体間変動に大きく影響を及ぼしていると考えられる。ヒトでは体重以外の患者データも VP-16 の血中濃度に影響していることから、今後はヒトの検討でステップワイズ回帰分析から算出した Vd 予測式を用いて、投与量を算出、投与し、血中濃度が予測できるか検証する必要があると考えられる。

第五節　まとめ

ヒトの VP-16 血中濃度の個体間変動は体重あたりの Vd の違いに起因するところが大きく、Vd には Alb 値が最も大きな影響を及ぼした。その他にも BUN, T-bil, 体重, 年齢が影響を及ぼしていることが明らかとなった。ラットを用いた検討では体重が最もよく Vd と相関し、体重のみで投与量の補正が可能であった。以上の結果より、患者の臨床検査値から Vd を予測し投与量を補正できる可能性が示された。

第二章　VP-16 と CY の殺細胞効果を指標とした投与順序の最適化

第一節　緒言

中等量 VP-16/CY/TBI 前処置における VP-16、CY の投与順序は経験から導き出されたものであり、明確なエビデンスが確立しておらず、本プロトコールにおける治療スケジュールの比較検討も未だ行われていないのが現状である。肺がんモデルのマウスでの検討において、CY を先に VP-16 を後に投与した群は、VP-16 先に CY を後に投与した群に比較して生存日数の延長することが報告されている[40]。そこで抗がん薬の投与順序の違いが治療成績に及ぼす影響に着目した。また、臨床においては薬剤耐性の形成など様々な因子が加わることにより、抗がん剤に対するがん細胞の感受性低下が治療上の問題となる。薬剤耐性の形成の要因のひとつに薬剤排出トランスポーターがあり、中でも ABC トランスポーターに属する P 糖タンパク質（P-gp）は VP-16 やドキソルビシンなど多くの抗がん剤を基質として認識し[41]、白血病の治療抵抗性に関与しているとの報告もあり問題となっている[42]。

そこで本章では、VP-16 と CY の投与順序の最適化に向け、白血病由来細胞を用いて VP-16 および CY の曝露順序による殺細胞効果の違いについて検討した。

第二節　実験材料と実験方法

第一項　実験材料

1) 使用薬物

第一章　第二節　第一項　1)で述べたものに関しては省略した。

4-Hydroperoxy cyclophosphamide (4-HPC)	Toronto Research Chemicals
5-Fluorouracil　(5-FU)	WAKO
6-Mercaptopurine Monohydrate　(6-MP)	WAKO
Doxorubicin Hydrochloride Salt	LC Laboratories
Paclitaxel	WAKO
Quinidine sulfate	ASTRA　JAPAN
Vinblastine sulfate	WAKO

CY は肝臓で主に CYP2B6 によって代謝を受けて活性代謝物である 4-ヒドロキシ CY となるプロドラッグであるが[43]、4-ヒドロキシ CY は不安定な化合物であるため、本研究ではその安定化体である 4-HPC を実験に用いた。

2) 使用試薬

第一章　第二節　第一項　3)で述べたものに関しては省略した。

2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid　(HEPES)	WAKO
Benzylpenicillin potassium	WAKO
Calcium chloride dehydrate	WAKO
Cell Counting Kit-8	DOJINDO
D-Glucose	WAKO
DMSO	WAKO
Ethanol	WAKO
FBS	Biosera

Magnesium sulfate heptahydrate	WAKO
Nonidet P-40　(NP-40)	Nacalai Tesque
Potassium chloride	Kanto Chemical
Potassium dihydrogenphosphate	WAKO
Propidium iodide	Nacalai Tesque
RPMI-1640 MEDIUM	SIGMA
Ribonuclease A from bovine pancreas　(RNase)	SIGMA
Sodium chloride	WAKO
Streptomycin	WAKO
Thymidine	WAKO
Tris(hydroxymethyl)aminomethane　(Tris)	WAKO

その他の試薬は市販の特級または生化学用のものを用いた。

3) 使用機器

第一章　第二節　第一項　4)で述べたものに関しては省略した。

マイクロプレートリーダー

Infinite M200	TECAN

フローサイトメーター

FACSCalibur Flow Cytometer	Becton, Dickinson

4) 使用細胞

ヒト慢性骨髄性白血病由来である K-562 細胞は理化学研究所より購入した。ヒト急性リンパ性白血病由来 Jurkat 細胞は北海道大学病院　血液内科　近藤健講師より御提供頂いたものを使用した。また、レトロウイルス感染法により P-gp をコードする MDR1 遺伝子を安定発現させた K-562/P-gp 細胞 [44]は鹿児島大学 古川龍彦教授、並びに慶應義塾大学 杉本芳一教授より御提供頂いたものを使用した。ヒト血管内皮細

胞である HUVEC 細胞は Takara Bio Inc.より購入した。

第二項　細胞培養法

1) K-562、K-562/P-gp 細胞及び Jurkat 細胞の培養

K-562、K-562/P-gp 細胞及び Jurkat 細胞は非働化した FBS を 10%、ペニシリンを 100 IU、ストレプトマイシンを 100 μg/mL 含む RPMI-1640 (SIGMA R0883) を培養液とした。細胞は CO_2 インキュベーターを用いて 37℃-5% CO_2-95% air 条件下で培養し、播種後 3-5 日目に継代した。

2) HUVEC 細胞の培養

培養液として EBM-2 Bullet Kit (LONZA CC-3162) を用い、CO_2 インキュベーター (37℃，5%CO_2) で培養した。培養液の交換を 1-2 日おきに行い、播種 4-5 日後に継代した。

第三項　細胞生存率の測定

1) WST-8 assay 法

WST-8 assay は Ishiyama らの方法に準拠した [45]。まず、細胞懸濁液を 2.0×10^4 cells/well に調整し、96 well 平底マイクロプレートに 50 μL/well ずつ播種した。培養液 48 μL を well に添加した後、終濃度に合わせて調製した薬液を 2 μL/well ずつ添加した。CO_2 インキュベーターにて一定時間薬液を培養細胞と接触させた後 Cell counting Kit-8 (WST-8) 溶液を 10 μL 添加し、3 時間発色させた。反応後、マイクロプレートリーダーにて 450 nm における吸光度を測定し、生成した WST-8 formazan を定量した。細胞生存率は薬物未処理群 (control) の吸光度に対する薬物処理群の吸光度の比 (% of control) で示した。VP-16 の薬物未処理群として DMSO 0.5%を含む培養液、4-HPC の薬物未処理群として培養液を添加した。

2) 数値処理

50%効果濃度 (EC_{50} 値) の算出には解析ソフト Origin® 9.0J (Light Stone Corporation) を用いた。WST-8 assay により得られた吸光度から算出した細胞生存率 (% of control) の値を y、薬液濃度を x とし、次の式にフィッティングさせた。

$$Y = (A_1 - A_2)/[1 + (x/x_0)^p] + A_2$$

A_1：初期値　　A_2：最終値　　x_0：EC_{50}値　　p：べき乗

なおEC_{50}はフィッティング曲線から生存率が50%となる時の薬物濃度とした。

第四項　薬物曝露後の細胞周期解析

細胞を1×10^6 cells/mLに調製し24 wellプレートに980 μLずつ加えた。薬物処理群に終濃度に合わせて調製した薬液を20 μL, コントロール群に培養液を20 μL加え24時間CO_2インキュベーターで培養した。回収した細胞懸濁液を1,000×g, 3分間, 4℃で遠心分離して上清を除去した後、氷冷したPBS (EDTA-free) で1回洗浄し、再び遠心分離して上清を除去した。氷冷したPBS (EDTA-free) 100 μLに懸濁した後、氷冷した100%EtOHを900 μL添加してよく攪拌し、-20℃で保存した。保存していたサンプルを1,200×g, 3分間, 4℃で遠心分離して上清を除去した後、氷冷したPBS (EDTA-free) で1回洗浄し、再び遠心分離して上清を除去した。Staining bufferを1サンプルあたり300 μL添加して37℃で20分間反応させた。反応後、目開き46 μmのメッシュを通してフローサイトメーターで細胞周期を解析した。Staining bufferの組成を表9に示した。

表9　Staining bufferの組成

Propidium iodide	20 μg/mL
NP 40	0.01%
RNase	1 mg/mL
PBS	

第五項　K-562 細胞における VP-16 と 4-HPC の殺細胞効果に及ぼす細胞周期依存性

1) チミジン 2 回同調法による G_1/S 期への同調

サブコンフルエントになった K-562 細胞に 2 mM TdR を含む培養液で 24 時間培養後、PBS (EDTA-free) で洗浄後し TdR-free 培地で 12 時間培養、さらに 2 mM TdR を含む培地で 14 時間培養し、2 回目のブロッキングを行ない同調を行なった。

2) チミジン除去後の細胞周期変化

G_1/S 期に同調させた細胞を PBS (EDTA-free) で洗浄後、TdR-free 培地で培養した。2, 4, 6, 8, 10 時間後に細胞数が 5×10^5～1×10^6cells になるように細胞懸濁液を回収した。

3) 細胞周期解析

第二章　第二節　第四項で述べた。

4) 同調細胞に対する VP-16, 4-HPC の増殖抑制効果

実験は Matsuda, Sasaki らの方法[46]を参考に行なった。24 well プレートに細胞培養液を 480 μL を加え、チミジン除去後 0, 2, 4, 6, 8 時間後および同調していない細胞懸濁液をそれぞれ 4×10^5 cells/mL に調製し 500 μL 加えた。さらに VP-16 (終濃度 5 μg/mL) , 4-HPC (終濃度 10μg/mL) を 20 μL ずつ添加し、90 分間薬物を曝露させた。VP-16 のコントロールには DMSO を終濃度 0.5%となるように加え、4-HPC のコントロールには培養液を加えた。細胞を回収し PBS (EDTA-free) で洗浄後、培養液に懸濁し、96 well プレートに 100 μL ずつ添加した。3 日間 CO_2 インキュベーター内で培養後、WST-8 assay 法で細胞生存率を算出した。

第六項 VP-16 取り込み実験

細胞を transport buffer に懸濁し、1.0×10^7 cells となるよう 1.5 mL の遠心チューブに分取した。37℃で 15 分間プレインキュベートした後、VP-16 (終濃度 25 μg/mL) を含む transport buffer を添加し、37℃で一定時間インキュベートした。その後、氷冷した transport buffer を 1 mL 添加し、210×g，5 分間，4℃で遠心分離して上清を除去し、さらに氷冷した transport buffer 1 mL で 2 回洗浄した。洗浄後、リン酸 buffer (10 mM Na_2HPO_4，10 mM KH_2PO_4，pH 7.0) を 200 μL 添加し、－80℃で 10 分間静置して細胞を破砕した。得られた細胞破砕液は取り込み量の定量用およびタンパク質量の定量用として 50 μL ずつ 1.5 mL の遠心チューブに分取した。取り込み量の定量用細胞破砕液にはアセトニトリル 50 μL を添加して激しく攪拌した後、21,500×g，10 分間，4℃で遠心分離して上清を HPLC サンプルとした。VP-16 の取り込み量はタンパク質量で補正して算出した。タンパク質の定量は BSA を標準タンパク質として Lowry 法に準拠して行った[47]。Transport buffer の組成を表 10 に示し、HPLC 条件は第一章　第二節　第六項と同様に行なった。

表 10　Transport buffer の組成

組成	濃度
NaCl	140 mM
KCl	5.4 mM
$CaCl_2$	1.8 mM
$MgSO_4$	0.8 mM
Glucose	5 mM
Tris/HEPES (pH7.5)	25 mM

第三節　実験結果

第一項　VP-16 と 4-HPC の曝露順序が殺細胞効果に及ぼす影響 [48)]

VP-16 と 4-HPC の曝露順序を変えて 2 つの薬物を併用する実験では、予め確認した細胞生存率への影響の小さい低濃度の VP-16 または 4-HPC を細胞に曝露し、24 時間後に種々の濃度の 4-HPC または VP-16 を曝露した（図 13)。細胞生存率を WST-8 assay 法により算出し、事前曝露した群としていない群で比較することでそれぞれの薬物の殺細胞効果が事前に曝露する薬物によって変化するのか検討した。

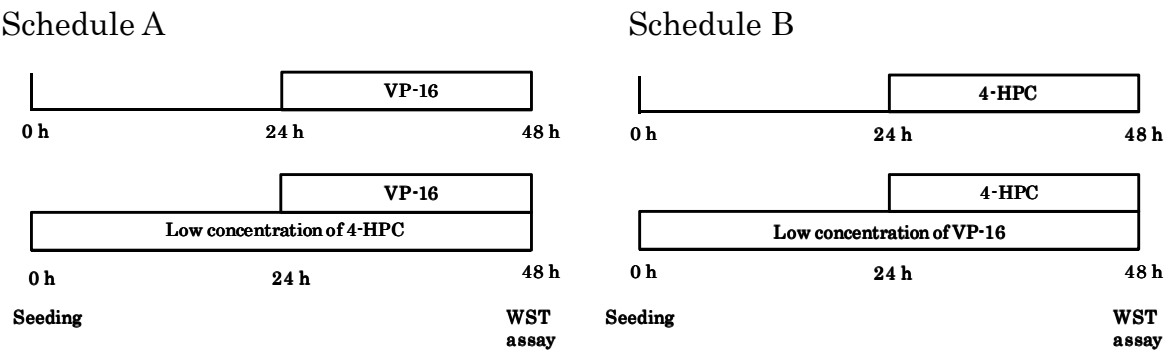
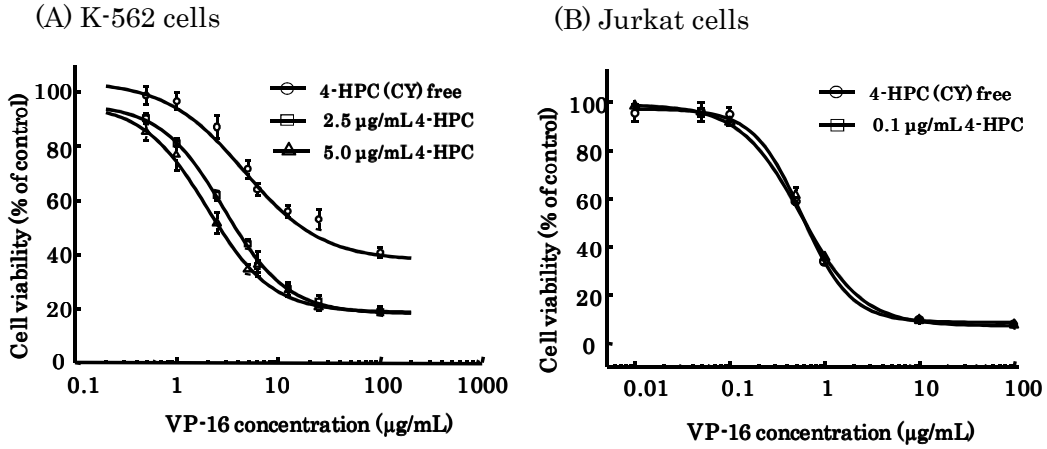


図 13　VP-16 と 4-HPC の曝露順序を変えて曝露する際の実験スケジュール

Schedule A では K-562 細胞に 4-HPC を曝露した群の生存曲線は 4-HPC を曝露していない群の生存曲線に対し、大きく左にシフトした（図 14 (A))。さらに EC_{50} においても 4-HPC を曝露した群では 4-HPC を曝露していない群と比較して有意に低下した(表 11 (A))。一方、Jurkat 細胞では 4-HPC 曝露による生存曲線と EC_{50} の変化は認められなかった（図 14 (B), 表 11 (A))。Schedule B では K-562 細胞と Jurkat 細胞の両細胞株で VP-16 を曝露した群の生存曲線と EC_{50} は VP-16 を曝露していない群と比較して変化は認められなかった（図 14 (C) (D), 表 11 (B))。これらの結果から K-562 細胞では 4-HPC の事前曝露によって VP-16 の殺細胞効果が増強することが明らかとなった。

Schedule A



Schedule B

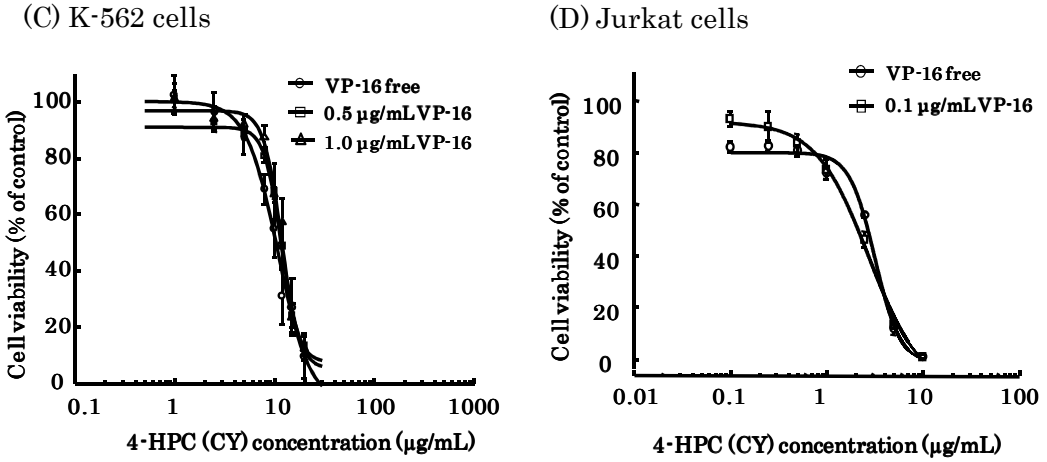


図 14　K-562 細胞と Jurkat 細胞における VP-16 と 4-HPC の曝露順序が殺細胞効果に与える影響

Schelede A は K-562 細胞(A)と Jurkat 細胞(B)にそれぞれ 2.5, 5.0 および 0.1 μg/mL の 4-HPC を事前に 24 時間曝露後に K-562 細胞(A)に 0.5-100 μg/mL、Jurkat 細胞(B)に 0.1-10 μg/mL の VP-16 を 24 時間曝露した群と 4-HPC を事前曝露していない群の生存曲線を示している。

Schedule B は K-562 細胞(C)と Jurkat 細胞(D)にそれぞれ 0.5, 1.0 および 0.1 μg/mL の VP-16 を事前に 24 時間曝露後に K-562 細胞(C)に 1.0-20 μg/mL、Jurkat 細胞(D)に 0.1-10 μg/mL の 4-HPC を 24 時間曝露した群と VP-16 を事前曝露していない群の生存曲線を示している。

細胞生存率は WST-8 assay 法で評価した。

各点は 3 回の実験の平均値 ± S.D.を示す。

表 11　K-562 細胞と Jurkat 細胞における VP-16 と 4-HPC の曝露順序の違いによる EC_{50} の変化

	EC_{50} value	
A：Low-concentration 4-HPC→VP-16	K-562 cells	Jurkat cells
Low-concentration 4-HPC free	19.8 ± 8.34	0.59±0.02
0.1 μg/mL	−	0.62±0.04
2.5 μg/mL	3.83±0.54*	−
5.0 μg/mL	2.74±0.41*	−
B：Low-concentration VP-16→4-HPC		
Low-concentration VP-16 free	10.13±3.72	3.41±1.05
0.1 μg/mL	−	3.18±0.05
0.5 μg/mL	12.39±3.11	−
1.0 μg/mL	12.22±1.34	−

細胞生存率は WST-8 assay 法で評価した。

各値は 3-6 回の実験の平均値 ± S.D.を示す。

「*」: Low-concentration 4-HPC free または Low-concentration VP-16 free と比較して有意に異なることを示す($p<0.05$)。

第二項　4-HPC が VP-16 の殺細胞効果を増強する要因の解明

1) VP-16, 4-HPC の各細胞周期に対する殺細胞効果

まず K-562 細胞をチミジン 2 回同調法を用いて G_1/S 期に細胞を同調させ、チミジンを除去し、同調から解放した後、2 時間間隔で細胞を採取し、S 期、G_2/M 期、G_1 期に相当する時間帯をフローサイトメーターを用いて確認した。その結果チミジン除去後、6 時間までは S 期、6-8 時間は G_2/M 期、8 時間からは G_1 期であることが確認された（図 15)。

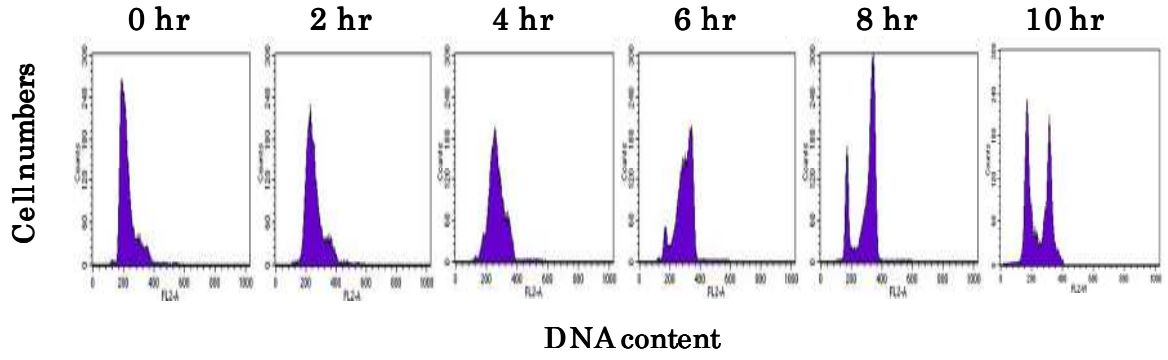


図 15　チミジン 2 回同調法から解放後 0, 2, 4, 6, 8, 10 時間後の細胞周期
チミジンによる同調からの解放は細胞を PBS (EDTA-free)で洗浄後、チミジンを含まない培養液に懸濁して行なった。

次に各周期の細胞に VP-16, 4-HPC を曝露し、細胞周期に対する殺細胞効果を確認した。その結果、VP-16 は early-S 期から mid-S 期の細胞に対して高い殺細胞効果を示し、G_2/M 期から G_1 期へサイクルが進むにつれて殺細胞効果が低下したが、4-HPC は細胞周期によらず殺細胞効果はほぼ一定であった（図 16)。以上のことから VP-16 は S 期に最も高い殺細胞効果を示す細胞周期依存的な薬剤であり、4-HPC は細胞周期非依存的な薬剤であることが示された。

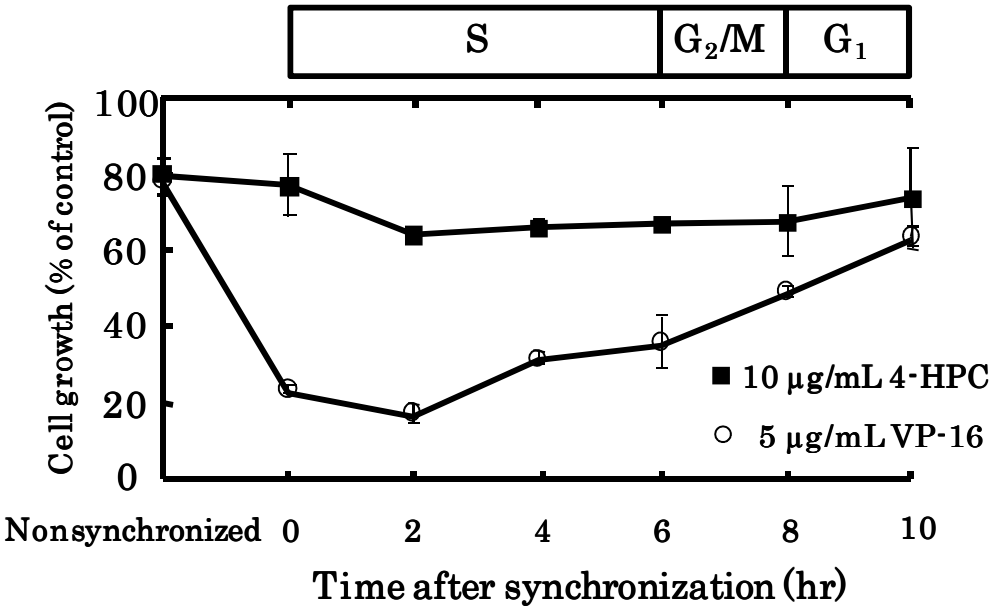


図 16　K-562 細胞を用いた各細胞周期に対する VP-16 と 4-HPC の殺細胞効果

(○)は VP-16 に対する、 (■)は 4-HPC に対する殺細胞効果を示している。

細胞生存率は WST-8 assay 法で評価した。

各点は 3 回の実験の平均値 ± S.D.を示す。

2) 4-HPC 曝露後の細胞周期変化

K-562 細胞と Jurkat 細胞に 4-HPC を 24 時間曝露後の細胞周期変化を確認した。K-562 細胞に 5.0 μg/mL の 4-HPC を曝露したところ VP-16 に感受性の低い G_1 期の細胞が減少し、感受性の高い S 期に細胞周期は停止したが、一方の Jurkat 細胞では 0.1 μg/mL の 4-HPC 曝露によって細胞周期変化は認められなかった（図 17)。

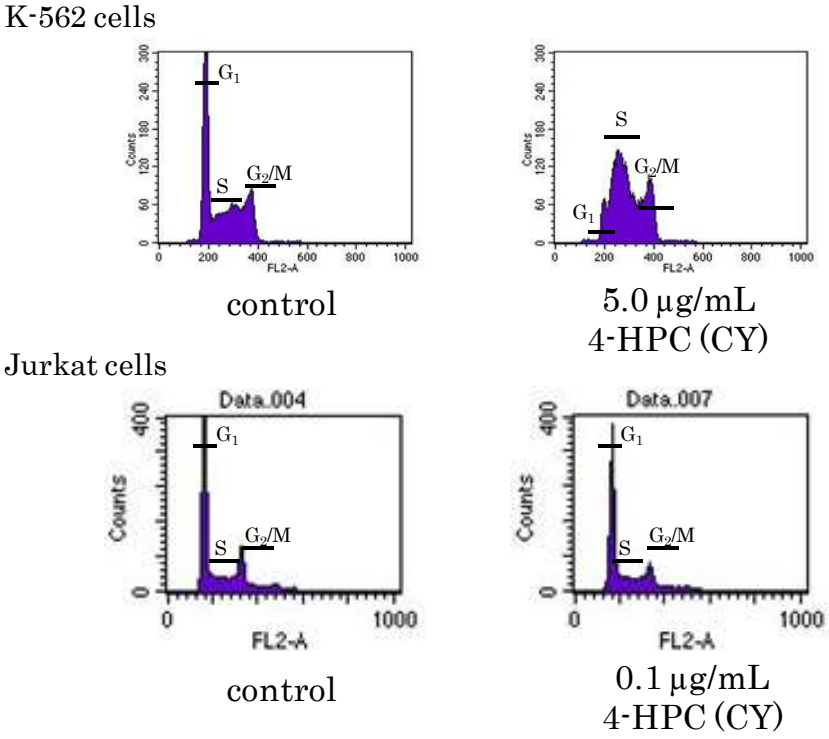


図 17　K-562 細胞と Jurkat 細胞における 4-HPC 曝露後の細胞周期変化

4-HPC は K-562 細胞に対して 5.0 μg/mL, Jurkat 細胞に対して 0.1 μg/mL で 24 時間曝露し、フローサイトメーターで細胞周期を解析した。

第三項　VP-16 と 4-HPC の曝露順序による殺細胞効果の変化に及ぼす P-gp 発現の影響

1) K-562/P-gp 細胞の P-gp 機能の確認

K-562/P-gp 細胞は P-gp をコードする MDR1 遺伝子を安定発現させた細胞である。そこで、K-562/P-gp 細胞の P-gp が機能しているか確認するために P-gp の基質として報告されている VP-16 の細胞内取り込みに与える P-gp 発現の影響を検討した。

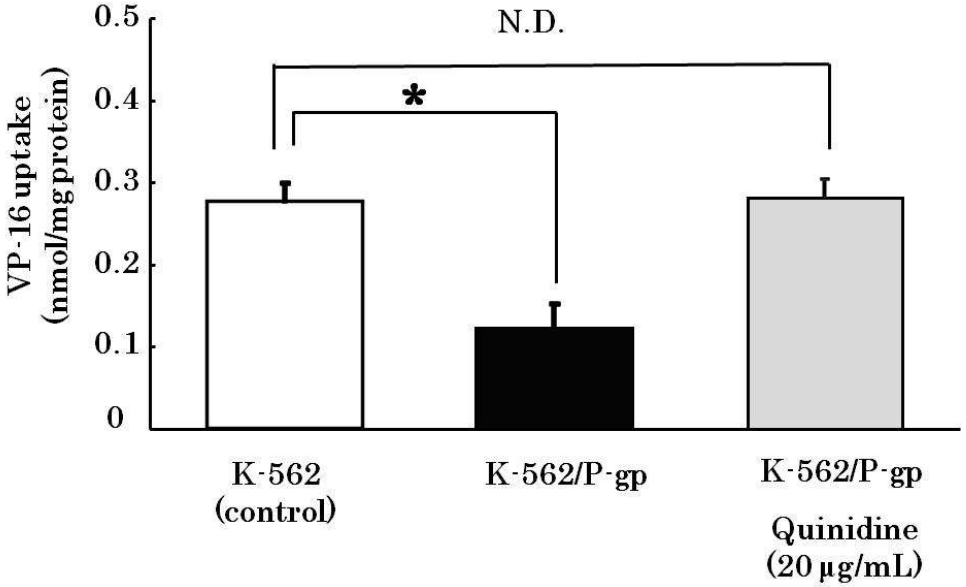


図 18　K-562 細胞と K-562/P-gp 細胞に対する VP-16 の取り込み量
取り込みは 37℃，pH 7.5 で行ない、VP-16 の濃度は 25 μg/mL とし、
取り込み時間は 60 分とした。P-gp 阻害剤のキニジンは 20 μg/mL の濃度で
24 時間プレインキュベーションしてから行なった。
(各バーは 3-6 回の実験の平均値 + S.D.を示す。
「*」: control と比較して有意に異なることを示す（$p<0.05$)。

VP-16 の 60 分間の取り込み量を K-562 細胞と K-562/P-gp 細胞で比較したところ、P-gp 発現細胞への VP-16 の取り込み量はコントロールと比較して有意に低下し、この取り込み量の低下は P-gp の阻害剤であるキニジンを共存させることでコントロールと同程度まで回復した（図 18)。これらの結果より、用いた P-gp 安定発現細胞の P-gp が機能していることが示された。

2) VP-16 の殺細胞効果に与える P-gp の影響

K-562/P-gp 細胞の P-gp が機能していることが明らかとなったことから次に、K-562 細胞と K-562/P-gp 細胞に対する VP-16 の殺細胞効果を比較した。

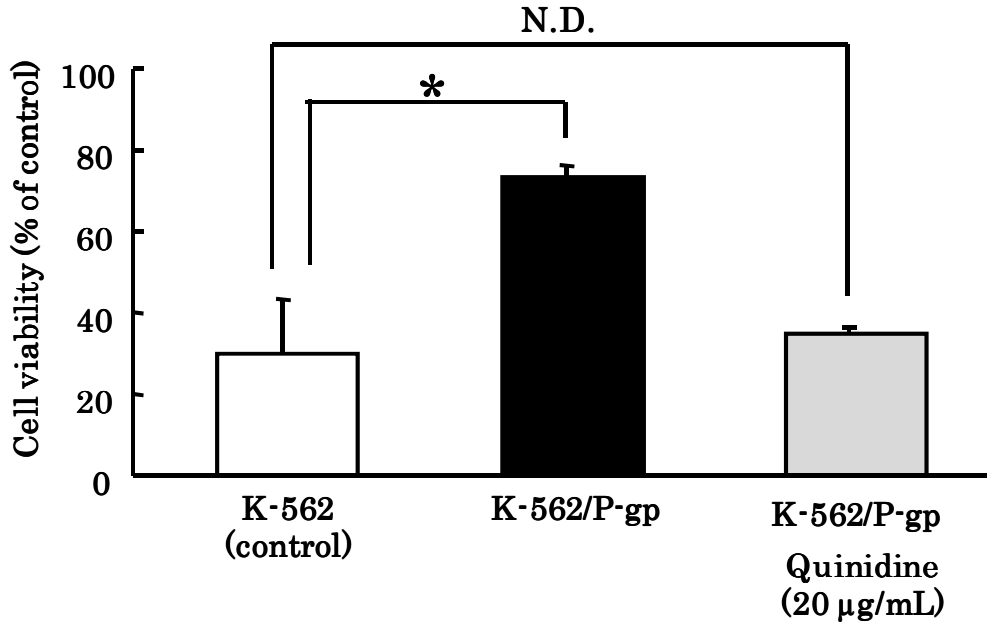


図 19　K-562 細胞と K-562/P-gp 細胞に対する VP-16 の殺細胞効果

VP-16 を 25 μg/mL で 24 時間曝露した。P-gp 阻害剤のキニジンは 20 μg/mL の濃度で 30 分プレインキュベーションした。

細胞生存率は WST-8 assay 法で評価した。

各バーは 3 回の実験の平均値 + S.D.を示す。

「*」: control と有意に異なることを示す ($p < 0.05$)。

その結果、VP-16 の殺細胞効果は P-gp の発現によって減弱し、予めキニジンを添加した K-562/P-gp 細胞では殺細胞効果がコントロールと同程度まで回復した（図 19)。

3) VP-16 と 4-HPC の曝露順序が K-562/P-gp 細胞に対する殺細胞効果に及ぼす影響

第二章　第三節　第一項の検討で得られた 4-HPC が VP-16 の殺細胞効果を増強する結果が K-562/P-gp 細胞においても同様に得られるのか検討した。

なお、VP-16 および 4-HPC を前処理で用いる濃度は、予備検討からそれぞれ 1.0, 5.0 μg/mL とした。曝露スケジュールは図 13 に従い行なった。

Schedule A　　Schedule B

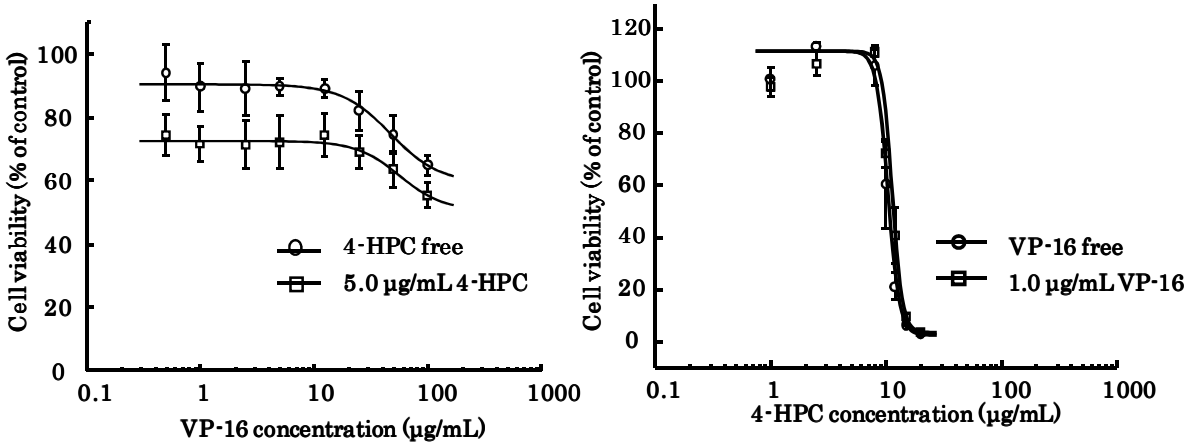


図 20　K-562/P-gp 細胞に対する VP-16 と 4-HPC の曝露順序の殺細胞効果に与える影響

Schelede A は 5.0 μg/mL の 4-HPC を事前に 24 時間曝露後に 0.5-100 μg/mL の VP-16 を 24 時間曝露した群と 4-HPC を事前曝露していない群の生存曲線を示している。

Schedule B は 1.0 μg/mL の VP-16 を事前に 24 時間曝露後に 1-20 μg/mL の 4-HPC を 24 時間曝露した群と VP-16 を事前曝露していない群の生存曲線を示している。

細胞生存率は WST-8 assay 法で評価した。

各点は 3 回の実験の平均値 ± S.D.を示す。

表 12　K-562/P-gp 細胞に対する VP-16 と 4-HPC の曝露順序の違いによる EC_{50} の変化

A：Low-concentration VP-16 → 4-HPC	EC_{50} value
Low-concentration VP-16 free	10.1±0.52
1.0. μg/mL	11.1±0.30
B：Low-concentration 4-HPC → VP-16	
Low-concentration 4-HPC free	N.D
5.0 μg/mL	N.D

細胞生存率は WST-8 assay 法で評価した。
各値は 3 回の実験の平均値 ± S.D.を示す。

その結果、4-HPC を事前曝露していない群に対し、4-HPC を事前曝露した群の生存曲線は下にシフトし、殺細胞効果の増強が認められた（図 20 (Schedule A)）。なお、細胞生存率が 50%を下回らなかったため、EC_{50} 値は算出できなかった（表 12 (B)）。一方、VP-16 の事前曝露の有無による生存曲線の変化は認められず、EC_{50} 値もほぼ同値であった（図 20 (Schedule B), 表 12 (A)）。これらの結果から、P-gp が発現している K-562/P-gp 細胞においても VP-16 の事前曝露は 4-HPC の殺細胞効果に影響を及ぼさないが、4-HPC 事前曝露は VP-16 の殺細胞効果を増強させることが示された。

4) K-562/P-gp 細胞に対する 4-HPC 曝露後の細胞周期変化

K-562/P-gp 細胞においても 4-HPC 事前曝露により VP-16 の殺細胞効果が増強したことから、4-HPC 曝露による K-562/P-gp 細胞の細胞周期変化を測定した。その結果、コントロールに比べて 4-HPC を 24 時間曝露後では S 期の細胞の増加が認められた（図 21)。

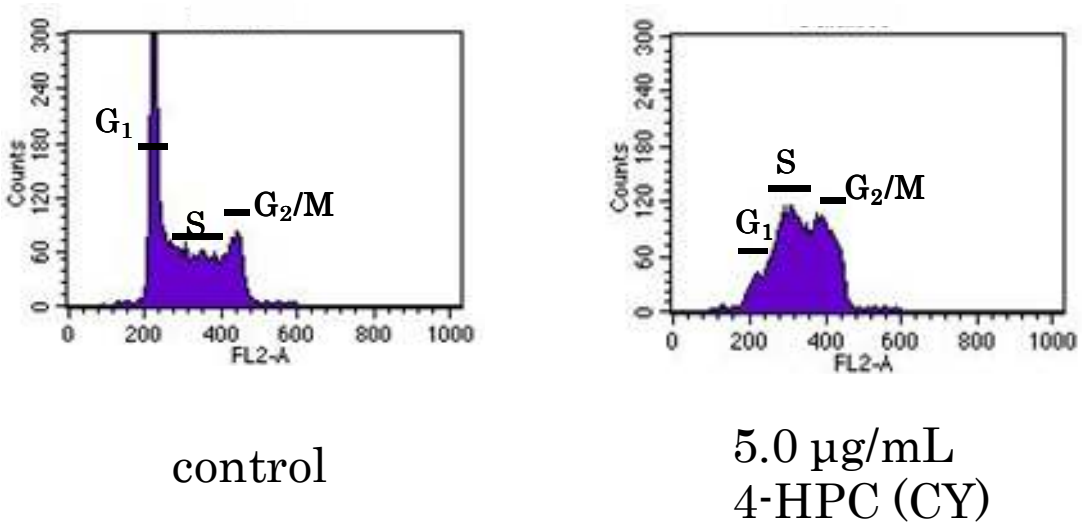


図 21　K-562/P-gp 細胞における 4-HPC 曝露後の細胞周期変化
5.0 µg/mL の 4-HPC を 24 時間曝露し、細胞周期を解析した。
細胞周期はフローサイトメーターで解析した。

5) VP-16 の細胞内取り込みに及ぼす細胞周期変化の影響

VP-16 の細胞周期依存的な殺細胞効果には細胞内への薬物取り込み量の変化による影響も考えられるため、同調細胞を用いて VP-16 取り込み実験を行い、殺細胞効果と細胞内取り込み量との関係を検討した。なお、同調する周期は G_1/S 期，S 期，G_2/M 期の 3 点とし、K-562 細胞は図 15 よりチミジン除去後 1 hr, 4 hr, 8 hr とし、K-562/P-gp 細胞はチミジン除去後 1 hr, 6 hr, 10 hr が各周期に該当することを予め解析して確認した（図 22)。

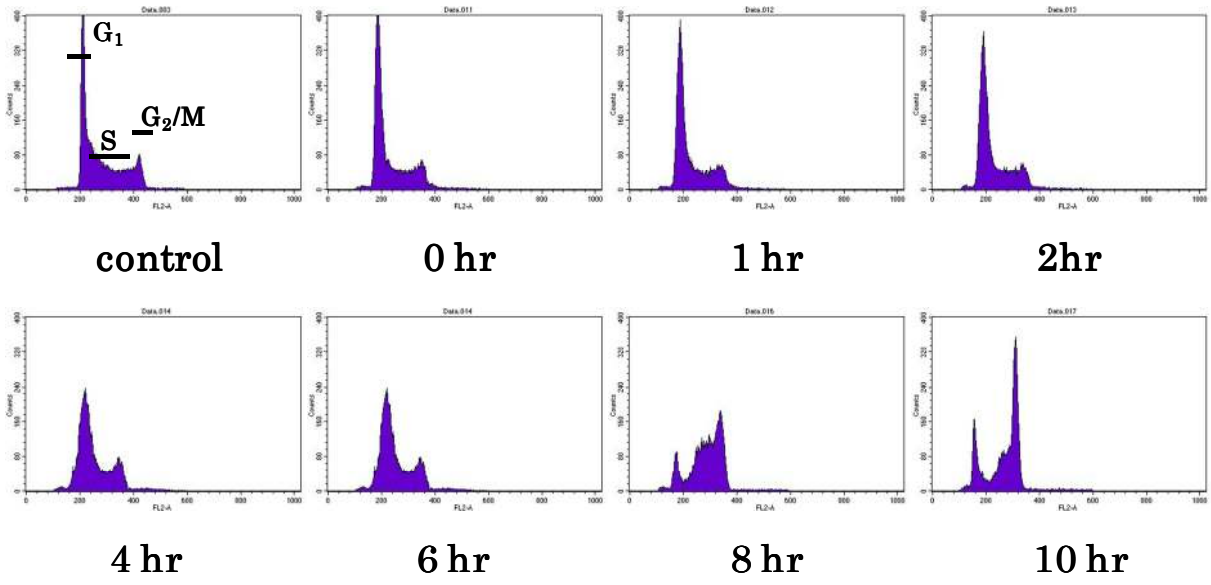


図 22　チミジン除去後の各時間における細胞周期
K-562/P-gp 細胞のチミジン除去は PBS (EDTA-free)で洗浄し、
培養液に置換して行なった。

これらの時間帯の細胞で VP-16 の取り込み量を比較したところ、どちらの細胞株でもコントロール群と比べて取り込み量に有意な差が認められる周期は認められなかった（図 23)。これらの結果から、細胞周期変化は VP-16 の細胞内取り込みに影響を及ぼさないことが示され、VP-16 の細胞周期依存的な殺細胞効果の変化は細胞内取り込み量の変化に起因するものではないことが明らかとなった。

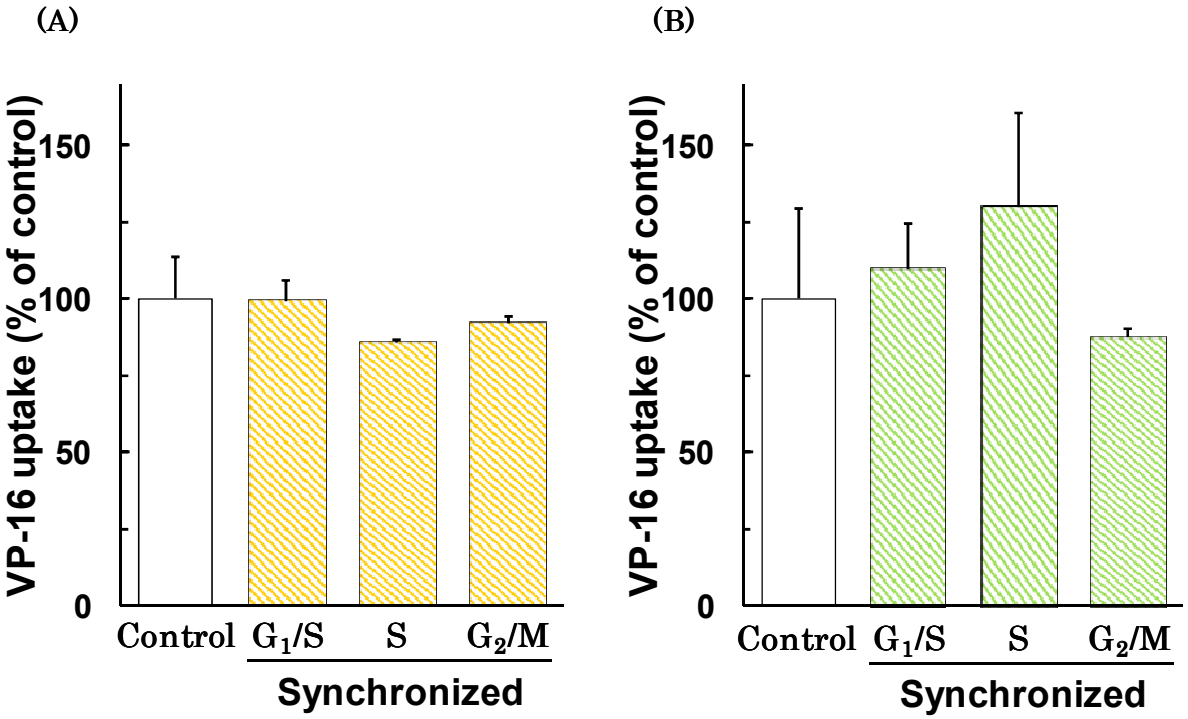


図 23　各細胞周期における VP-16 の取り込み量

(A)K-562 細胞, (B)K-562/P-gp 細胞

取り込みは 37℃，pH 7.5 で行ない、VP-16 の濃度は 25 μg/mL とし、

取り込み時間は 60 分とした。

各バーは 3 回の実験の平均値 + S.D.を示す。

第四項　VP-16 と 4-HPC 曝露順序が HUVEC 細胞に対する殺細胞効果に及ぼす影響

第二章　第三節　第一項の検討では K-562 細胞に対し、4-HPC が VP-16 の殺細胞効果を増強する結果が得られたが、移植前処置が TMA 発症の原因の一つと考えられており、血管内皮細胞の障害によって惹起される微小血管内血栓を伴う致死率の高い合併症である。そこで安全性も考慮したレジメンの最適化を目的としてヒト血管内皮細胞由来の HUVEC 細胞を用いて前述と同じ方法で VP-16 と 4-HPC の曝露順序が殺細胞効果に与える影響を検討した。

なお、VP-16 および 4-HPC を前処理で用いる濃度は、予備検討からそれぞれ 0.5, 5.0 μg/mL とした。曝露スケジュールは図 13 に従い行なった。

Schedule A　　Schedule B

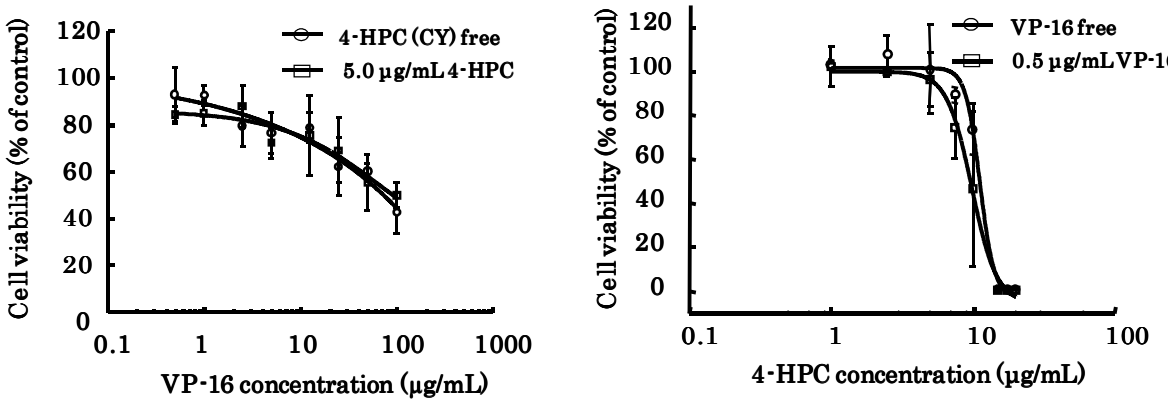


図 24　VP-16 と 4-HPC の曝露順序が HUVEC 細胞に対する殺細胞効果に与える影響

Schelede A は 5.0 μg/mL の 4-HPC を事前に 24 時間曝露後に 0.5-100 μg/mL の VP-16 を 24 時間曝露した群と 4-HPC を事前曝露していない群の生存曲線を示している。

Schedule B は 0.5 μg/mL の VP-16 を事前に 24 時間曝露後に 1-20 μg/mL の 4-HPC を 24 時間曝露した群と VP-16 を事前曝露していない群の生存曲線を示している。

細胞生存率は WST-8 assay 法で評価した。

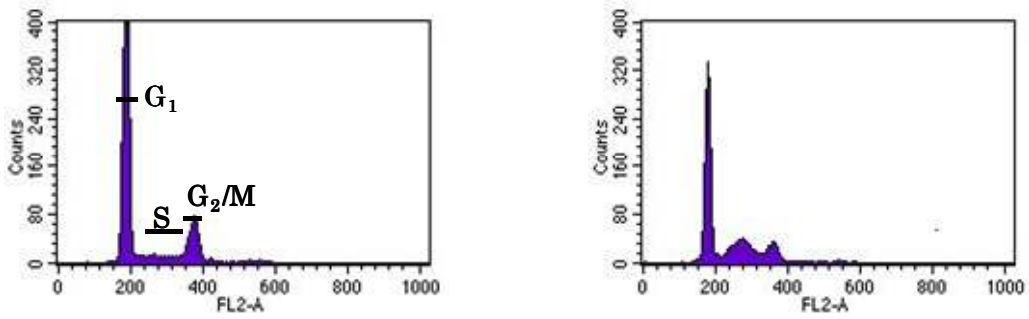
各点は 3 回の実験の平均値 ± S.D.を示す。

表 13　HUVEC 細胞に対する VP-16 と 4-HPC の
曝露順序の違いによる EC_{50} の変化

A：Low-concentration VP-16 → 4-HPC	EC_{50} value
Low-concentration VP-16 free	16.7±0.78
0.5 μg/mL	16.4±0.93
B：Low-concentration 4-HPC → VP-16	
Low-concentration 4-HPC free	N.D
5.0 μg/mL	N.D

細胞生存率は WST-8 assay 法で評価した。
各値は 3 回の実験の平均値 ± S.D.を示す。

その結果、先に低濃度の 4-HPC に曝露してから VP-16 に曝露しても VP-16 の殺細胞効果に変化は認められず、逆に低濃度の VP-16 に曝露してから 4-HPC に曝露しても 4-HPC の殺細胞効果に変化は認められなかった（図 24，表 13)。



control　　5 μg/mL 4-HPC（CY）

図 25　HUVEC 細胞における 4-HPC 曝露後の細胞周期変化
5.0 μg/mL の 4-HPC を 24 時間曝露し、細胞周期を解析した。
細胞周期はフローサイトメーターで解析した。

4-HPC 曝露後の細胞周期解析でもコントロールの細胞と比較して大きな変化は認められなかった（図 25)。

第五項 4-HPC 以外の薬物曝露による細胞周期変化が VP-16 の殺細胞効果に及ぼす影響

1）細胞周期を同調させる薬物の探索

薬物曝露による細胞周期変化が VP-16 の殺細胞効果に与える影響が他の抗がん薬の組み合わせでもみられるのか検討した。まず、細胞周期を同調させる薬物を探索した。事前に曝露する薬物は添加後 48 時間曝露することになるため、48 時間曝露後の細胞生存率に影響を与えない濃度で細胞周期を測定した。候補薬物として、細胞周期を G_1/S 期や G_2/M 期に変化させることが報告されているものを選択した[49-53]。各薬物を K-562 細胞に 24 時間曝露後の細胞周期を解析したところ、DOX と VP-16 を曝露させた場合は G_0/G_1 期と S 期の細胞数が減少し、G_2/M 期細胞数が増加した。その他の薬物を曝露した場合は細胞周期に変化は認められなかった（図 26)。また、K-562 細胞で細胞周期変化の認められた DOX と VP-16 を Jurkat 細胞に曝露したところ K-562 細胞と同様に
G_0/G_1 期と S 期の細胞数が減少し、G_2/M 期細胞数が増加した（図 26)。

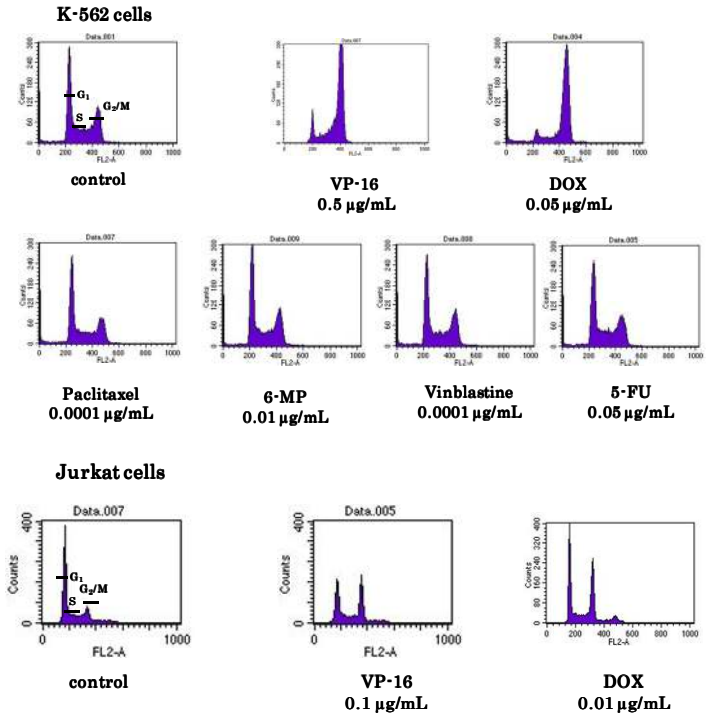


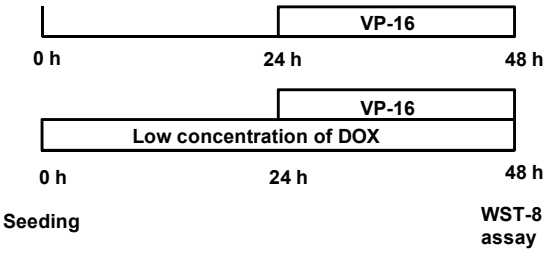
図 26　各薬物を単独で曝露した後の細胞周期変化

K-562 細胞と Jurkat 細胞に各薬物を 24 時間曝露し、細胞周期を解析した。
細胞周期はフローサイトメーターで解析した。

2) S 期の細胞数減少が VP-16 の殺細胞効果に与える影響

次に、VP-16 と DOX を曝露した後に、種々の濃度の VP-16 を曝露した時の影響を検討した。実験のスケジュールは図 27 に示した。

Schedule C



Schedule D

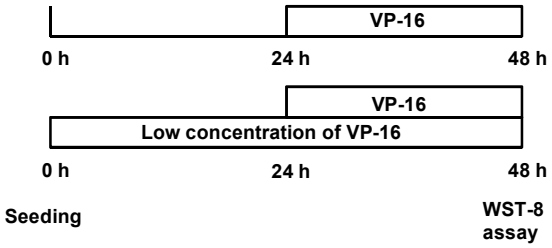
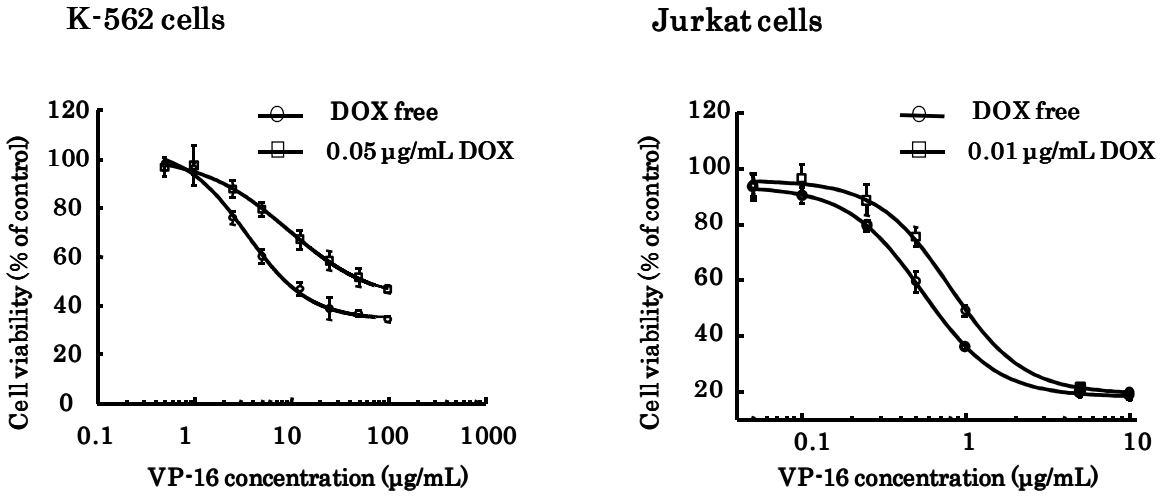


図 27　DOX, VP-16 を事前曝露する際の実験スケジュール

Schedule C



Schedule D

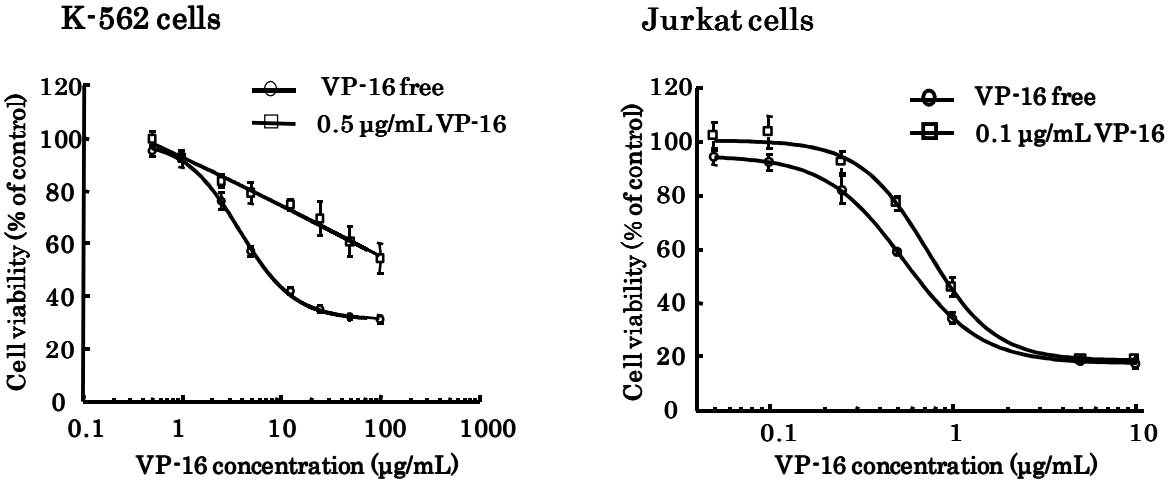


図 28　K-562 細胞、Jurkat 細胞に対する DOX, VP-16 の事前曝露が VP-16 の殺細胞効果に与える影響

Schelede C は K-562 細胞と Jurkat 細胞にそれぞれ 0.05 および 0.01 μg/mL の DOX を 24 時間曝露後に K-562 細胞に 0.5-100 μg/mL、Jurkat 細胞に 0.1-10 μg/mL の VP-16 を 24 時間曝露した群と DOX, VP-16 を事前曝露していない群の生存曲線を示している。

Schedule D は K-562 細胞と Jurkat 細胞にそれぞれ 0.5, 0.1 μg/mL の VP-16 を 24 時間曝露後に K-562 細胞に 0.5-100 μg/mL、Jurkat 細胞に 0.1-10 μg/mL の VP-16 を 24 時間曝露した群と VP-16 を事前曝露していない群の生存曲線を示している。

細胞生存率は WST-8 assay 法で評価した。

各点は 3 回の実験の平均値 ± S.D.を示す。

表 14. K-562 細胞と Jurkat 細胞に対する DOX, VP-16 の
事前曝露による EC_{50} の変化

	EC_{50} value	
C：Low-concentration DOX→VP-16	K-562 cells	Jurkat cells
Low-concentration DOX free	8.97±1.74	0.64±0.05
0.01 μg/mL	—	0.97±0.03*
0.05 μg/mL	58.1±17.9*	—
D：Low-concentration VP-16→VP-16		
Low-concentration VP-16 free	14.7±4.59	0.63±0.03
0.1 μg/mL	—	0.91±0.08*
0.5 μg/mL	N.D.	—

細胞生存率は WST-8 assay 法で評価した。
各値は 3 回の実験の平均値 ± S.D.を示す。
「*」: Low-concentration DOX free または Low-concentration VP-16 free と比較して有意に異なることを示す ($p<0.05$)。

Schedule C に従って K-562 細胞と Jurkat 細胞に低濃度の DOX を曝露し、24 時間後に種々の濃度の VP-16 を曝露した時には、DOX を事前曝露した群の生存曲線は DOX を事前曝露していない群の生存曲線と比較して、高濃度側にシフトした（図 28 (Schedule C)）。また、EC_{50} においても DOX の事前曝露群ではその値が有意に増加した（表 14 (C)）。一方、Schedule D に従って低濃度の VP-16 を曝露し、24 時間後に種々の濃度の VP-16 を曝露させた場合においても同様に両細胞株で単独曝露時と比較して生存曲線が右上にシフトした（図 28 (Schedule D)）。EC_{50} においても VP-16 の事前曝露ではその値が有意に増加した（表 14 (D)）。K-562 細胞では 0.5 μg/mL の VP-16 に事前曝露し、種々の濃度の VP-16 を曝露させた場合は生存率が 50%を下回らなかったため、EC_{50} を算出できなかった。

3) DOX、VP-16 前処理が VP-16 の細胞内取り込みに与える影響

VP-16 あるいは DOX を低濃度で 24 時間曝露後に VP-16 を曝露した際に殺細胞効果が減弱した。VP-16 は排出トランスポーターの P-gp により細胞外に排出されるが、DOX や VP-16 曝露により P-gp の発現が誘導されることが報告されている[54]。そこで、前処理による殺細胞効果の減弱に、排出トランスポーターによる細胞内 VP-16 濃度の低下が関与しているか明らかにするため、低濃度の VP-16 あるいは DOX で 24 時間前処理した後に VP-16 を添加することで、前処理しない場合と比較して細胞内取り込み量に変化が認められるか検討した。

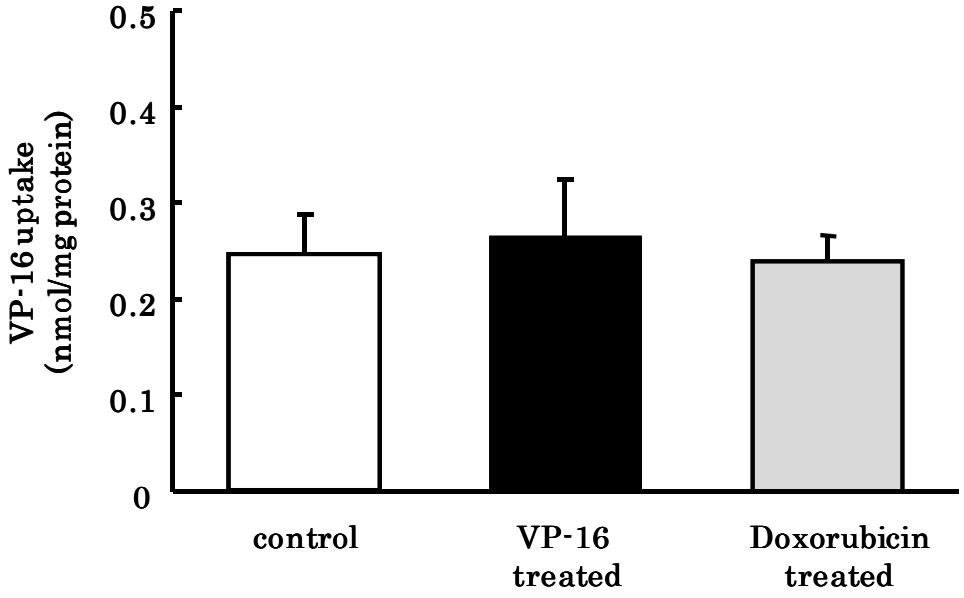


図 29. K-562 細胞に対する DOX、VP-16 の事前曝露が VP-16 の取り込み量に与える影響

DOX と VP-16 の事前曝露群はそれぞれ 0.05 μg/mL, 0.5 μg/mL の濃度で 24 時間曝露した。
取り込みは 37℃，pH 7.5 で行ない、VP-16 の濃度は 25 μg/mL とし、
取り込み時間は 60 分とした。
各バーは 6 回の実験の平均値 + S.D.を示す。

その結果、DOX、VP-16 のいずれの薬物で前処理した場合にも、前処理しなかったコントロールと比較して VP-16 の細胞内取り込み量に有意な違いは認められなかった (図 29)。

第四節　考察

中等量 VP-16/CY/TBI 前処置を用いた同種造血幹細胞移植の治療プロトコールでは VP-16, CY の投与順序が確立されていない。そこで薬物の投与順序の違いが白血病細胞に与える影響を明らかにするため、ヒト慢性白血病由来 K-562 細胞とヒト急性 T リンパ性白血病由来の Jurkat 細胞を用いて VP-16 と CY の曝露順序による殺細胞効果への影響を細胞生存曲線及び、EC_{50} によって評価した。その結果、K-562 細胞では 4-HPC を事前に曝露した後に VP-16 を曝露すると VP-16 の殺細胞効果が増強することが示された（図 14, 表 11)。Jurkat 細胞では 4-HPC の事前曝露により VP-16 の殺細胞効果が増強しなかったことに関して、用いた 4-HPC の濃度が K-562 に対しては 5.0 μg/mL であったのに対し、Jurkat 細胞に対しては 0.1 μg/mL と非常に低濃度であったことが要因として考えられる（Jurkat 細胞を用いた予備検討で 4-HPC を 48 時間単独で曝露した時に濃度が 0.1 μg/mL を超えると細胞生存率が急激に低下するため 0.1 μg/mL より高い濃度では検討できなかった)。一方、VP-16 を事前に曝露した後に CY の活性代謝物の安定化体である 4-HPC を曝露しても両細胞株で殺細胞効果に変化は認められなかった（図 14, 表 11)。次に、細胞周期に着目し、同調細胞を用いて各周期に対する感受性を比較したところ K-562 細胞において、VP-16 は細胞周期の S 期に対し最も高い殺細胞効果を示し、G_1 期では効果が低いことが示された（図 16)。この細胞周期依存的な作用は HeLa 細胞で報告されている結果とも一致した [55]。また 4-HPC は細胞周期非依存的であることが示された（図 16)。この細胞周期の違いによる抗がん薬に対する感受性の違いが曝露順序による殺細胞効果に影響を与えた可能性が考えられたため 4-HPC を K-562 細胞に曝露させた後の細胞周期変化をフローサイトメトリーで解析した。その結果、4-HPC は G_0/G_1 期の細胞を減少させ S 期に細胞周期を停止させることが示された（図 17)。これらの結果から 4-HPC を事前に曝露した後に VP-16 を曝露すると殺細胞効果が上昇したのは 4-HPC が VP-16 への感受性の高い S 期の細胞を増加させ感受性の低い G_0/G_1 期の細胞を減少させたためであることが強く示唆された。

K-562/P-gp 細胞においても K-562 細胞と同様、VP-16 前処理は 4-HPC の殺細胞効果に影響を及ぼさないが、4-HPC 前処理は VP-16 の殺細胞効果を増強させることが明らかとなった(図 20, 表 12)。また、4-HPC を 24 時間曝露した後では S 期の細胞が増加し(図 21)、このとき VP-16 の細胞内取り込み量に変化は認められなかった

ことから（図 23)、4-HPC 前処理による VP-16 の殺細胞効果の増強は、4-HPC 前処理によって細胞周期が S 期に停止し、VP-16 に対する感受性が上昇することが要因であることが示された。

続いて、安全性も考慮したレジメンの最適化を目的としてヒト血管内皮細胞由来の HUVEC 細胞を用いて前述と同じ方法で VP-16 と 4-HPC の曝露順序が殺細胞効果に与える影響を検討した。その結果、先に低濃度の 4-HPC に曝露させても VP-16 の殺細胞効果の増強は認められず、細胞周期の変化もほとんど認められなかった（図 24, 表 13)。前述の VP-16 と CY の曝露順序の検討結果を考慮すると、VP-16 の殺細胞効果の増強には薬物曝露による細胞周期の S 期への同調が必要であると考えられる。今回の検討では 4-HPC による S 期への細胞周期停止は K-562 細胞においてのみ認められた。抗がん薬や TBI による細胞障害時に細胞周期を停止させるタンパク質として p53 があり、細胞周期を G_1 期あるいは G_2 期に細胞周期を停止させる [56]。K-562 細胞にはこの p53 タンパク質が発現していないことが報告されており [57]、4-HPC によって K-562 細胞のみで S 期の同調が起こった要因の一つと考えられる。したがって、4-HPC による VP-16 の殺細胞効果の増強には細胞による差があり、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

薬物曝露による細胞周期変化が細胞周期依存的な抗がん薬である VP-16 の殺細胞効果に与える影響についてさらに検討した。はじめに、細胞周期を同調させる薬物の探索を行なったところ、候補薬物のうち DOX と VP-16 が低濃度の単独曝露によりに K-562 細胞と Jurkat 細胞の S 期の細胞数を減少させ、G_2/M 期の細胞数を増加させたため（図 26)、これらの薬物による前処理が細胞周期依存性の VP-16 の殺細胞効果に与える影響を評価した。その結果、DOX あるいは VP-16 前処理後に VP-16 を曝露させたところ、いずれの薬物で前処理した場合においても VP-16 単独曝露群と比較して前処理群の細胞生存曲線が上にシフトし、殺細胞効果の減弱が示された（図 28, 表 14)。これらの結果より、DOX あるいは VP-16 曝露による S 期の細胞数減少は、細胞周期依存的に作用する VP-16 の殺細胞効果を変化させることが明らかとなった。

本章の検討では VP-16 と 4-HPC の曝露スケジュールに着目して検討を行なってきた。しかしながら、中等量 VP-16/CY/TBI レジメンには TBI も含まれている。放射線は細胞周期依存的な活性を示し、G_1 期と G_2 期に最も作用が強く、S 期では逆に最も作用が弱いことが報告されている [58]。ドセタキセルの前処理は S 期の細胞を増加させ、放射線の殺細胞効果を減弱させたとの報告もある [59]。 K-562 細胞に対して、

VP-16 は細胞周期を G_2/M 期に、4-HPC は細胞周期を S 期に同調させたことから TBI の殺細胞効果にも影響を及ぼすことが予想される。今後、TBI による殺細胞効果の影響も検討することで中等量 VP-16/CY/TBI レジメンの最適化ができると考えられる。

第五節　まとめ

K-562 細胞で 4-HPC を事前曝露することで細胞周期の S 期の同調を介して、VP-16 の殺細胞効果が増強することが明らかとなった。またこの作用は P-gp を発現した K-562/P-gp 細胞でも認められたが、正常細胞の HUVEC 細胞では認められなかった。以上の結果より、抗がん薬の曝露スケジュールが臨床の治療効果に影響を及ぼす可能性がある。

総括

本研究により得られた知見を以下に記す。

第一章では本章では同種造血幹細胞移植患者を対象とし、VP-16 の PK/PD 解析から投与量の最適化に向けた検討を行なった。またラットを用いて、投与量の最適化に向けて詳細に検討した。VP-16 の血中濃度と PK パラメーターともに患者間で大きな差が認められ、血中濃度が高い患者では CMV 感染者が多く認められた。ROC 分析より、CMV 感染を予測するのに C_{max} が優れた指標であることが示され、算出したカットオフ値を超えないように投与量を補正することで有害事象の発現を減少できると考えられる。VP-16 の体内動態の個体間変動には分布過程の影響が大きく、特に Alb 値の変動による薬物の非遊離型分率の変動が Vd に影響していることが示された。ステップワイズ回帰分析では Alb, BUN, T-Bill, 体重, 年齢のパラメーターを用いることで Vd を予測し、目標血中濃度に合わせた投与量を算出できると考えられる。

ラットを用いた検討から体脂肪率が高い場合と体重が重い場合には投与量の補正が必要であると示された。ラットでは体重と Vd が強い正の相関を示し、体重から Vd を予測し、目標に合わせて投与量を算出して、投与したところ、投与量を補正した群では血中濃度は体重によらずラット間でほぼ一定となり、目標血中濃度の値を得ることができた。今後はヒトの検討で算出した Vd 予測式から投与量を算出、投与し血中濃度が予測できるか検証する必要があると考えられる。

第二章では中等量 VP-16/CY/TBI 前処置レジメンでは VP-16, CY の投与順序が確立されていないことから VP-16 と CY の曝露順序による殺細胞効果への影響を検討した。K-562 細胞では 4-HPC を事前に曝露した後に VP-16 を曝露すると VP-16 の殺細胞効果が増強することが示された。細胞周期に対する感受性の検討から VP-16 は細胞周期の S 期に対し最も高い感受性を示し、G_1 期では感受性が低い抗がん薬であることが示された。さらに、4-HPC 曝露により G_0/G_1 期の細胞が減少し、S 期に細胞周期を停止させることが示された。これらのことから 4-HPC を事前に曝露した後に VP-16 を曝露すると殺細胞効果が上昇したのは、4-HPC が VP-16 の感受性の高い S 期の細胞を増加させ VP-16 の感受性の低い G_0/G_1 期の細胞を減少させたためであることが示唆された。

K-562/P-gp 細胞においても K-562 細胞と同様、VP-16 前処理は 4-HPC の殺細胞効果に影響を及ぼさないが、4-HPC 前処理は VP-16 の殺細胞効果を増強させること

が明らかとなった。ヒト血管内皮細胞由来の HUVEC 細胞を用いた検討では先に低濃度の 4-HPC に曝露させても VP-16 の殺細胞効果の増強は認められず、細胞周期の変化もほとんど認められなかった。これらのことから、VP-16 の殺細胞効果の増強には薬物曝露による細胞周期の S 期への同調が必要であることが示唆された。しかしながら、4-HPC による VP-16 の殺細胞効果の増強には細胞種による差が認めることから、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

薬物曝露による細胞周期変化が細胞周期依存的な抗がん薬の殺細胞効果に与える影響が他の薬物でも同様に得られるか検討したところ DOX あるいは VP-16 前処理後に VP-16 を曝露させた場合、いずれの薬物で前処理した場合においても VP-16 単独曝露群と比較して前処理群の細胞生存曲線が上にシフトし、殺細胞効果の減弱が示された。これらの結果より、DOX あるいは VP-16 曝露による S 期の細胞数減少は、細胞周期依存的に作用する VP-16 の殺細胞効果を変化させることが明らかとなった。

本研究結果より、患者の VP-16 血中濃度の変動要因に Vd の個体差が大きく影響していること、および臨床検査値から Vd を予測し投与量を補正できる可能性が示された。また、白血病細胞を用いた検討から、細胞周期を同調させる薬物を事前に投与することにより抗がん薬の効果を増強できる可能性が見出された。

本研究で得られた知見が抗がん薬治療のさらなる向上に貢献できることを期待する。

引用文献

1) 厚生労働省大臣官房統計情報部 人口動態統計 (2013).

2) Sebban C, Lepage E, Vernant JP, Gluckman E, Attal M, Reiffers J, Sutton L, Racadot E, Michallet M and Maraninchi D. Allogeneic bone marrow transplantation in adult acute lymphoblastic leukemia in first complete remission: a comparative study. French Group of Therapy of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. J Clin Oncol. 12: 2580-2587. (1994).

3) Horowitz MM, Messerer D, Hoelzer D, Gale RP, Neiss A, Atkinson K, John Barrett A, Büchner T, Freund M, Heil G, Hiddemann W, Kolb HJ, Löffler H, Marmont AM, Maschmeyer G, Rimm AA, Rozman C, Sobocinski KA, Speck B, Thiel E, Weisdorf DJ, Zwaan FE, Bortin MM. Chemotherapy Compared with Bone Marrow Transplantation for Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia in First Remission. Ann Intern Med. 115: 13-18. (1991).

4) Hahn T, Wall D, Camitta B, Davies S, Dillon H, Gaynon P, Larson RA, Parsons S, Seidenfeld J, Weisdorf D, McCarthy PL Jr. The role of cytotoxic therapy with hematopoietic stem cell transplantation in the therapy of acute lymphoblastic leukemia in adults: an evidence-based review. Biol Blood Marrow Transplant. 12: 1-30. (2006).

5) Thomas X, Boiron JM, Huguet F, Dombret H, Bradstock K, Vey N, Kovacsovics T, Delannoy A, Fegueux N, Fenaux P, Stamatoullas A, Vernant JP, Tournilhac O, Buzyn A, Reman O, Charrin C, Boucheix C, Gabert J, Lhéritier V, Fiere D. Outcome of treatment in adults with acute lymphoblastic leukemia: analysis of the LALA-94 trial. J Clin Oncol. 22: 4075-4086. (2004).

6) Hunault M, Harousseau JL, Delain M, Truchan-Graczyk M, Cahn JY, Witz F, Lamy T, Pignon B, Jouet JP, Garidi R, Caillot D, Berthou C, Guyotat D,

Sadoun A, Sotto JJ, Lioure B, Casassus P, Solal-Celigny P, Stalnikiewicz L, Audhuy B, Blanchet O, Baranger L, Béné MC, Ifrah N; GOELAMS (Groupe Ouest-Est des Leucémies Airguës et Maladies du Sang) Group. Better outcome of adult acute lymphoblastic leukemia after early genoidentical allogeneic bone marrow transplantation (BMT) than after late high-dose therapy and autologous BMT: a GOELAMS trial. Blood. 104: 3028-3037. (2004).

7) Attal M, Blaise D, Marit G, Payen C, Michallet M, Vernant JP, Sauvage C, Troussard X, Nedellec G, Pico J, Huguet FG, Stoppa AM, Broustet A, Sotto JJ, Pris J, Maraninchi D and Reiffers J for the BGMT Group. Consolidation treatment of adult acute lymphoblastic leukemia: a prospective, randomized trial comparing allogeneic versus autologous bone marrow transplantation and testing the impact of recombinant interleukin-2 after autologous bone marrow transplantation. BGMT Group. Blood. 86: 1619-1628. (1995).

8) Henwood JM, Brogden RN. Etoposide: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in combination chemotherapy of cancer. Drugs. 39: 438-490. (1990).

9) Stadtmauer EA, Cassileth PA, Gale RP. Etoposide in leukemia, lymphoma and bone marrow transplantation. Leuk Res. 13: 639-650. (1989).

10) Wolff SN, Fer MF, McKay CM, Hande KR, Hainsworth JD, Greco FA. High-dose VP-16-213 and autologous bone marrow transplantation for refractory malignancies: a phase I study. J Clin Oncol. 1: 701-705. (1983).

11) Bostrom B, Weisdorf DJ, Kim T, Kersey JH, Ramsay NK. Bone marrow transplantation for advanced acute leukemia: a pilot study of high-energy total body irradiation, cyclophosphamide and continuous infusion etoposide. Bone Marrow Transplant. 5: 83-89. (1990).

12) Giralt SA, LeMaistre CF, Vriesendorp HM, Andersson BS, Dimopoulos M, Gajewski J, Besien KV, Mehra R, Przepiorka D and Khouri I. Etoposide, cyclophosphamide, total-body irradiation, and allogeneic bone marrow transplantation for hematologic malignancies. J Clin Oncol. 12: 1923-1930. (1994).

13) Petersen FB, Buckner CD, Appelbaum FR, Sanders JE, Bensinger WI, Storb R, Deeg HJ, Witherspoon RP, Sullivan KM, Clift RA. Etoposide, cyclophosphamide and fractionated total body irradiation as a preparative regimen for marrow transplantation in patients with advanced hematological malignancies: a phase I study. Bone Marrow Transplant. 10: 83-88. (1992).

14) Yau JC, LeMaistre CF, Andersson BS, Huan SD, Wallerstein RO, Woo SY, Spitzer G, Spinolo JA, Spencer V, Brunner LJ. Allogeneic bone marrow transplantation for hematological malignancies following etoposide, cyclophosphamide, and fractionated total body irradiation. Am J Hematol. 41: 40-44. (1992).

15) Brown RA, Wolff SN, Fay JW, Pineiro L, Collins RH Jr, Lynch JP, Stevens D, Greer J, Herzig RH, Herzig GP. High-dose etoposide, cyclophosphamide, and total body irradiation with allogeneic bone marrow transplantation for patients with acute myeloid leukemia in untreated first relapse: a study by the North American Marrow Transplant Group. Blood. 85: 1391-1395. (1995).

16) Brown RA, Wolff SN, Fay JW, Pineiro L, Collins RH Jr, Lynch JP, Stevens D, Greer J, Herzig RH, Herzig GP. High-dose etoposide, cyclophosphamide and total body irradiation with allogeneic bone marrow transplantation for resistant acute myeloid leukemia: a study by the North American Marrow Transplant Group. Leuk Lymphoma. 22: 271-277. (1996).

17) Toubai T, Tanaka J, Mori A, Hashino S, Kobayashi S, Ota S, Miura Y, Kato N, Kahata K, Izumiyama K, Yonezumi M, Chiba K, Kondo T, Toyoshima N, Asaka M, Imamura M. Efficacy of etoposide, cyclophosphamide, and total body irradiation in allogeneic bone marrow transplantation for adult patients with hematological malignancies. Clin Transplant. 18: 552-557. (2004).

18) Shigematsu A, Kondo T, Yamamoto S, Sugita J, Onozawa M, Kahata K, Endo T, Shiratori S, Ota S, Obara M, Wakasa K, Takahata M, Takeda Y, Tanaka J, Hashino S, Nishio M, Koike T, Asaka M, Imamura M. Excellent outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using a conditioning regimen with medium-dose VP-16, cyclophosphamide and total-body irradiation for adult patients with acute lymphoblastic leukemia. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 14: 568-575. (2008).

19) Van Iersel LB, Koudijs TM, Hoekman EJ, Janssen-van Rhijn CM, Vahrmeijer AL, Nortier JW, van de Velde CJ, Gelderblom H, Kuppen PJ. In vitro schedule-dependent interaction between melphalan and oxaliplatin in human colorectal cancer cell lines. J Surg Res. 167: 273-278. (2011).

20) Jekunen AP, Christen RD, Shalinsky DR, Howell SB. Synergistic interaction between cisplatin and taxol in human ovarian carcinoma cells in vitro. Br J Cancer. 69: 299-306. (1994).

21) Oliveras-Ferraros C, Vazquez-Martin A, Colomer R, De Llorens R, Brunet J, Menendez JA. Sequence-dependent synergism and antagonism between

paclitaxel and gemcitabine in breast cancer cells: the importance of scheduling. Int J Oncol. 32: 113-20. (2008).

22) Xiong X, Sui M, Fan W, Kraft AS. Cell cycle dependent antagonistic interactions between paclitaxel and carboplatin in combination therapy. Cancer Biol Ther. 6: 1067-1073. (2007).

23) Hon YY, Evans WE. Making TDM work to optimize cancer chemotherapy: a multidisciplinary team approach. Clin Chem. 44: 388-400. (1998).

24) Kröger N, Zabelina T, Sonnenberg S, Krüger W, Renges H, Stute N, Finkenstein F, Mayer U, Holstein K, Fiedler W, Colberg H, Sonnen R, Kuse R, Braumann D, Metzner B, del Valle F, Erttmann R, Kabisch H, Zander AR. Dose-dependent effect of etoposide in combination with busulfan plus cyclophosphamide as conditioning for stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia. Bone Marrow Transplant. 26: 711-716. (2000).

25) Hunault M, Harousseau JL, Delain M, Truchan-Graczyk M, Cahn JY, Witz F, Lamy T, Pignon B, Jouet JP, Garidi R, Caillot D, Berthou C, Guyotat D, Sadoun A, Sotto JJ, Lioure B, Casassus P, Solal-Celigny P, Stalnikiewicz L, Audhuy B, Blanchet O, Baranger L, Béné MC, Ifrah N; GOELAMS (Groupe Ouest-Est des Leucémies Airguës et Maladies du Sang) GroupBetter outcome of adult acute lymphoblastic leukemia after early genoidentical allogeneic bone marrow transplantation (BMT) than after late high-dose therapy and autologous BMT: a GOELAMS trial. Blood. 104: 3028-3037. (2004).

26) Spitzer TR, Peters C, Ortlieb M, Tefft MC, Torrisi J, Cahill R, Gadner H, Urban C, Deeg HJ. Etoposide in combination with cyclophosphamide and total body irradiation or busulfan as conditioning for marrow transplantation in adults and children. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 29: 39-44. (1994).

27) Duerst RE, Horan JT, Liesveld JL, Abboud CN, Zwetsch LM, Senf ES, Constine LS, Raubertas RF, Passarell JA, DiPersio JF. Allogeneic bone marrow transplantation for children with acute leukemia: cytoreduction with fractionated total body irradiation, high-dose etoposide and cyclophosphamide. Bone Marrow Transplant. 25: 489-494. (2000).

28) 注射用ラステット　インタビューフォーム. 日本化薬. (2012).

29) Mross K, Reifke J, Bewermeier P, Kruger W, Hossfeld DK, Zander A. The pharmacokinetics and toxicity of two application schedules with high-dose VP-16 in patients receiving an allogeneic bone marrow transplantation. Ann Oncol. 7: 83-88. (1996).

30) Köhl P, Köppler H, Schmidt L, Fritsch HW, Holz J, Pflüger KH, Jungclas H Pharmacokinetics of high-dose etoposide after short-term infusion. Cancer Chemother Pharmacol. 29: 316-320. (1992).

31) Cunningham D, Cummings J, Blackie RB, McTaggart L, Banham SW, Kaye SB, Soukop M. The pharmacokinetics of high dose cyclophosphamide and high dose etoposide. Med Oncol Tumor Pharmacother. 5: 117-123. (1988).

32) Bennett CL, Sinkule JA, Schilsky RL, Senekjian E, Choi KE. PhaseI clinical

and pharmacological study of 72-hour continuous infusion of etoposide in patients with advanced cancer. Cancer Res. 47: 1952–1956. (1987).

33) Miller AA, Stewart CF, Tolley EA. Clinical pharmacodynamics of continuous-infusion etoposide. Cancer Chemother Pharmacol. 25: 361–366. (1990).

34) Relling MV, McLeod HL, Bowman LC, Santana VM. Etoposide pharmacokinetics and pharmacodynamics after acute and chronic exposure to cisplatin. Clin Pharmacol Ther. 56: 503–511. (1994).

35) Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. Science. 240: 1285-1293. (1988).

36) Chrzanowska M, Sobiak J, Grund G, Wachowiak J. Pharmacokinetics of high-dose etoposide administered in combination with fractionated total-body irradiation as conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Transplant. 15: 96-102. (2011).

37) Stewart CF, Pieper JA, Arbuck SG, Evans WE. Altered protein binding of etoposide in patients with cancer. Clin Pharmacol Ther. 45: 49-55. (1989).

38) Schwinghammer TL, Fleming RA, Rosenfeld CS, Przepiorka D, Shadduck RK, Bloom EJ, Stewart CF. Disposition of total and unbound etoposide following high-dose therapy. Cancer Chemother Pharmacol. 32: 273-278. (1993).

39) Stewart CF, Arbuck SG, Fleming RA, Evans WE. Changes in the clearance of total and unbound etoposide in patients with liver dysfunction. 8: 1874-1879. (1990).

40) 内田智子. マウス Lewis 肺癌に対する etoposide と cisplatin または cyclophosphamide との併用効果. 癌と化学療法. 1: 75-79. (1986).

41) Kim RB. Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. Drug Metab Rev. 34: 47-54. (2002).

42) Vitale A, Guarini A, Ariola C, Mancini M, Mecucci C, Cuneo A, Pane F, Saglio G, Cimino G, Tafuri A, Meloni G, Fabbiano F, Recchia A, Kropp MG, Krampera M, Cascavilla N, Ferrara F, Romano A, Mazza P, Fozza C, Paoloni F, Vignetti M, Foa R. Adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: biological profile at presentation and correlation with response to induction treatment in patients enrolled in the GIMEMA LAL 0496 protocol. Blood. 107: 473-479. (2006).

43) 注射用エンドキサン　インタビューフォーム. 塩野義製薬. (2013).

44) Mukai M, Che XF, Furukawa T, Sumizawa T, Aoki S, Ren XQ, Haraguchi M, Sugimoto Y, Kobayashi M, Takamatsu H, Akiyama S. Reversal of the resistance to STI571 in human chronic myelogenous leukemia K562 cells. Cancer Sci, 94: 557-563. (2003).

45) Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A highly water soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. Talanta, 44: 1299-1305. (1997).

46) Kazuno H, Shimamoto Y, Tsujimoto H, Fukushima M, Matsuda A, Sasaki T. Mechanism of action of a new antitumor ribonucleoside, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd, TAS-106), differs from that of 5-fluorouracil. oncology reports. 17: 1453-1460. (2007).

47) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 193: 265-275 (1951).

48) Tazawa Y, Matsumura K, Takekuma Y, Sugawara M. Schedule-dependent cytotoxicity of etoposide (VP-16) and cyclophosphamide in leukemia cell line K-562. Biol Pharm Bull. 35: 1132-6 (2012).

49) Ijichi K, Adachi M, Hasegawa Y, Ogawa T, Nakamura H, Kudoh A, Yasui Y, Murakami S, Ishizaki K. Pretreatment with 5-FU enhances cisplatin cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma cells. Cancer Chemother Pharmacol. 62: 745-52. (2008).

50) Czyz M, Szulawska A, Bednarek AK, Düchler M. Effects of anthracycline derivatives on human leukemia K562 cell growth and differentiation. Biochem Pharmacol. 70: 1431-1442. (2005).

51) Holstein SA, Hohl RJ. Synergistic interaction of lovastatin and paclitaxel in

human cancer cells. Mol Cancer Ther. 1: 141-149. (2001).

52) Tashiro E, Simizu S, Takada M, Umezawa K, Imoto M. Caspase-3 activation is not responsible for vinblastine-induced Bcl-2 phosphorylation and G2/M arrest in human small cell lung carcinoma Ms-1 cells. Jpn J Cancer Res. 89: 940-946. (1998).

53) Schroll S, Sarlette A, Ahrens K, Manns MP, Göke M. Effects of azathioprine and its metabolites on repair mechanisms of the intestinal epithelium in vitro. Regul Pept. 131: 1-11. (2005).

54) Chen Y, Zhao Y, Wang C, Xiao X, Zhou X, Xu G. Inhibition of p38 MAPK diminishes doxorubicin-induced drug resistance associated with P-glycoprotein in human leukemia K562 cells. Med Sci Monit. 18: 383-388. (2012).

55) Reis C, Giocanti N, Hennequin C, Mégnin-Chanet F, Fernet M, Filomenko R, Bettaieb A, Solary E, Favaudon V. A role for PKCzeta in potentiation of the topoisomerase II activity and etoposide cytotoxicity by wortmannin. Mol Cancer Ther. 4: 1457-1464. (2005).

56) Natalia S. Pellegata, Ronald J. Antoniono, J. Leslie Redpath, Eric J. Stanbridge. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: A reevaluation Proc Natl Acad Sci U S A. 93: 15209–15214. (1996).

57) Durland-Busbice S, Reisman D. Lack of p53 expression in human myeloid leukemias is not due to mutations in transcriptional regulatory regions of the gene. Leukemia. 16: 2165-2167. (2002).

58) Terasima T, Tolmach LJ. Variations in several responses of HeLa cells to x-irradiation during the division cycle. Biophys J. 3: 11-33. (1963).

59) Furuse S, Adachi M, Ijichi K, Ohta S, Torigoe S, Nakazawa M, Miura S, Mitsudo K, Tohnai I. Pre-radiation enhances the cytotoxicity of docetaxel in head and neck squamous cell carcinoma cells. Oncol Rep. 23: 1339-1343. (2010).

謝辞

本論文の作成にあたり終始変わらぬ御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院　薬物動態解析学研究室　菅原　満　教授に厚く御礼申し上げます。

また、本論文の副査として御審査ならびに御指導を賜りました北海道大学大学院薬学研究院　臨床薬剤学研究室　井関　健　教授、同研究室　山口　浩明　准教授ならびに同大学薬学研究院　薬物動態解析学研究室　武隈　洋　准教授に深く感謝致します。

本研究にあたり多くの有益な御助言、御指導を頂きました北海道大学病院　薬剤部　山田　武宏　准教授、笠師　久美子　副薬剤部長 ならびに北海道大学大学院　医学研究科医学専攻　内科学講座　血液内科学分野　重松　明男　助教に厚く御礼申し上げます。また、本研究にあたり、温かい励ましの言葉を頂きました北海道大学大学院薬学研究院　薬物動態解析学研究室　鷲見　正人　助教、佐藤　夕紀　助教に心より感謝致します。

本研究の実施にあたり、K-562/P-gp 細胞を御提供して頂いた鹿児島大学大学院医歯学総合研究科　分子腫瘍学分野　古川　龍彦　教授、慶応義塾大学大学院薬学研究科　化学療法学講座　杉本　芳一　教授、北海道大学大学院薬学研究院　臨床薬学教育研究センター　柴山 良彦　准教授ならびに Jurkat 細胞を御提供して頂いた北海道大学大学院　医学研究科医学専攻　内科学講座　血液内科学分野　近藤　健　講師に厚くお礼申しあげます。

本研究の種々の検討において御協力いただきました臼窪　一平　氏、吉岡 美咲氏に厚く感謝致します。

また、平素の研究のみならず、公私において苦楽を共にし、支えて頂いた薬物動態学研究室の皆さまに心から感謝申し上げます。

最後に、長きにわたる学生生活において精神的かつ経済的な面で支え、常時激励してくれた両親、家族に心より感謝致します。

2014 年 3 月

田澤　佑基