

●原 著

高気圧酸素併用による抗癌剤の効果増強に関する実験的研究

平川 亘* 門田 紘輝* 朝倉 哲彦*
 平野 宏文* 八代 一孝* 横山 俊一*
 有川 和宏**

高気圧酸素療法 (HBO) 併用による抗癌剤の効果増強について、ラット皮下腫瘍モデルを用いて、腫瘍増大率と腫瘍内抗癌剤濃度より検討した。使用した抗癌剤は、ACNU, CDDP, ADMである。その結果対照群に比し、ACNUとHBOの併用群で2.76倍の腫瘍増大率の抑制 ($P < 0.01$) を、またCDDPとHBOの併用群でも1.58倍の抑制 ($P < 0.05$) を認めた。またCDDPとHBOの併用群では、腫瘍内CDDP濃度が1.75倍上昇していた ($P < 0.05$)。しかしACNUとHBOの併用群、ADMとHBOの併用群においては腫瘍内濃度の有意な上昇を認めなかった。

抗癌剤の種類によりHBOとの併用効果に違いがあることは興味深い点であり、抗癌剤の種類によっては、HBOとの併用効果が有効と考えられた。

キーワード：高気圧酸素療法，抗癌剤，化学療法，脳腫瘍

Enhancement of the Cytotoxicity of the Anticancer Drug when Combined with Hyperbaric Oxygen Therapy

Wataru Hirakawa* Koki Kadota* Tetsuhiko Asakura* Hirofumi Hirano* Kazutaka Yatsusiro* Shunichi Yokoyama* Kazuhiro Arikawa**

*Department of Neurosurgery, Kagoshima University

**Department of Emergency Care, Kagoshima University

The enhancement of the cytotoxicity of the anticancer drug, assisted by hyperbaric oxygen therapy (HBO), was investigated in male Fisher rats bearing 9L-gliosarcoma. To evaluate the cytotoxicity, we observed tumor growth rates and the accumulation of anticancer agents in tumor tissue. The anticancer drugs used in this study were ACNU, CDDP, and ADM. Tumor growth ratio was inhibited in the ACNU + HBO group ($p < 0.01$) and also in the CDDP + HBO group

($p < 0.05$). The ratio of inhibition was 2.76-times and 1.58-times, respectively. However, the ADM + HBO group showed no significant difference in tumor growth from the ADM group. The accumulation of CDDP in tumor tissue at 4hrs after CDDP-ip + HBO was 1.75-times more than that after CDDP-ip alone ($p < 0.05$), though there was no significant increase in the ACNU-ip + HBO or ADM-ip + HBO groups. It is interesting that the effect of HBO to tumor growth varied with the type of anticancer agent. The improved response to the combination of some anticancer drugs with HBO suggested a potential benefit in clinical application.

Keywords :

hyperbaric oxygen therapy
 anticancer drug
 chemotherapy
 brain tumor

はじめに

高気圧酸素療法 (HBO) の抗腫瘍効果¹⁾²⁾, ある

*鹿児島大学医学部脳神経外科

**鹿児島大学医学部救急部

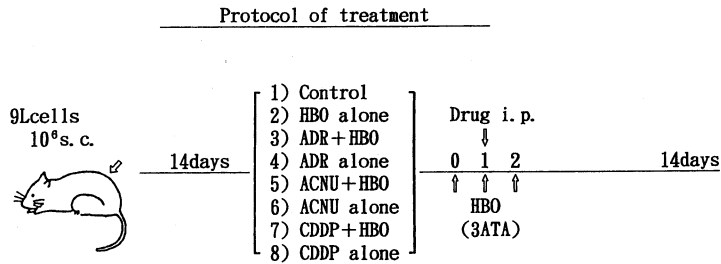


Fig.1 ラット腫瘍モデルの治療プロトコール

いは抗癌剤との併用効果^{3)~7)}についてはこれまでも多くの報告がみられる。しかし臨床的にはいまだその有用性についての評価が定まっていない。これまでの様々な報告で、活性酸素の抗腫瘍効果については語られているが⁸⁾、抗癌剤の効果増強についてのメカニズムはいまだ不明な点が多い。

抗癌剤が腫瘍細胞に対して働く機序は様々である。細胞内に到達する経路も薬剤により異なり、抗癌剤によりそれぞれ異なった機序で細胞、DNAに作用して殺細胞効果を発揮する。また細胞外への排泄、あるいは細胞内での解毒代謝の機構も抗癌剤により異なっている。化学療法とHBOとの併用効果およびその効果発現機序を検討するにあたっては、それぞれの薬剤のこの特性の違いが併用効果のメカニズムを知るきっかけになる可能性がある。そこで我々は、Doxorubicin (ADM), Nimustine (ACNU), Cisplatin (CDDP) という全く異なる系統の抗癌剤を用い、ラット腫瘍モデルを使ってHBOとの併用治療を行った。そしてその抗腫瘍効果と抗癌剤の腫瘍内濃度を求めることで、HBOによる抗癌剤の効果増強のメカニズムについての検討を行った。

材料および方法

Fisher系ラット(7週令100g雄)を入手後1週間飼育し、実験脳腫瘍である9L gliosarcoma細胞(10⁶個)をラットの背部皮下に注入移植し、皮下腫瘍を作成した。腫瘍細胞移植14日後に径1.2cm前後の腫瘍を形成したところで実験に供した。

高気圧酸素療法(HBO)は、第2種高気圧酸素

療法装置を用い、酸素投与下にて3絶対気圧(3ATA)の加圧を加減圧の時間を含めて90分間行った。

ラットは、45×35×20cmの専用ケースに入れ、換気用の窓を設けた。このケースに酸素チューブを配管して、ケース内の酸素濃度が80%以上となるように毎分8-10ℓの酸素を送った。

抗癌剤投与は1回のみ行った。使用した抗癌剤および投与量はLD₅₀の1/3を目安とし、ADM5.3mg/kg, ACNU15.9mg/kg, CDDP4.2mg/kgとした。薬剤はいずれも生理食塩水にて1mlとなるように調整し、HBOの直前に腹腔内投与した。コントロール群には同量の生理食塩水を投与した。

1. 実験1

HBOによる抗癌剤の抗腫瘍効果増強作用を検討する目的で、ラットを以下の群に分けて治療を行った(Fig.1)。

①コントロール群(n=7), ②HBO群(n=5), ③ADM+HBO併用群(n=5), ④ADM群(n=5), ⑤ACNU+HBO併用群(n=9), ⑥ACNU群(n=8), ⑦CDDP+HBO併用群(n=5), ⑧CDDP群(n=5)。

HBOは投与前日、投与日(薬剤投与直後)、投与翌日の計3回行った。

評価は治療後14日間観察し、腫瘍増大率(Rn)で検討した。Rnは以下の式にて治療開始時の腫瘍の体積(V₀)に対するn日目腫瘍体積(V_n)の体積比より算出した。

$$Rn = V_n / V_0$$

$$= \text{長径 } n \times (\text{短径 } n)^2 / \text{長径 } 0 \times (\text{短径 } 0)^2$$

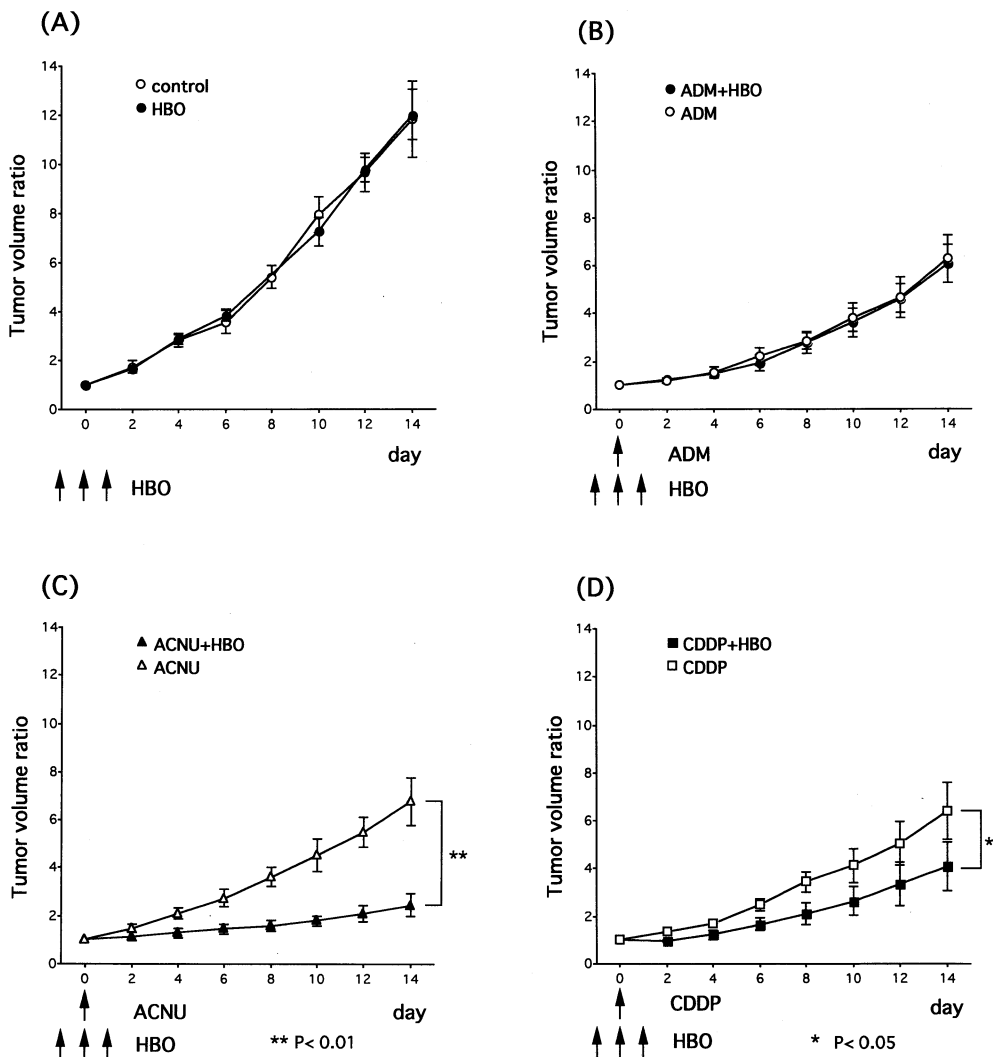


Fig.2 抗癌剤とHBOの併用効果
治療後14日間の腫瘍増大率

また同時に治療の副作用をみる目的で14日目に
おけるラットの体重を測定し、治療開始時に対す
る体重増加率を求めて比較した。

2. 実験2

抗癌剤の腫瘍内残存濃度に対するHBOの効果
を検討する目的で、上記の薬剤投与6群を別に設
けて実験を行った(各群n=5)。HBOは投与前日、
投与日(薬剤投与直後)の計2回行い、薬剤投与
後4時間後にラットを屠殺、腫瘍を摘出してただ
ちに凍結保存した。

各薬剤の腫瘍内濃度は、ADMとACNUが
HPLC法を用いて、またCDDPでは原子吸光分
光光度計を用いて測定した。

有意差検定にはStudent t-testを用い、危険率
P<0.05をもって有意と判定した。

結 果

1. 実験1

治療後14日目の腫瘍増大率R₁₄は、コントロ
ール群11.82±1.54(mean±S.D.)、HBO群12.01±

Table 1 ラット腫瘍モデルにおける治療成績

治療後14日目における体重増加率 (mean±S.D.)
腫瘍増大率 (mean±S.D.) および治療比 (T/C)

Treatment	No.	Body weight (ratio) mean±S.D.	Tumor growth (ratio) mean ±S.D.	T/C(%)
Control	7	1.22±0.06	11.82±1.54	100
HBO	5	1.19±0.02	12.01±1.03	102
ADM+HBO	5	1.11±0.03	6.07±0.78	51
ADM	5	1.02±0.06	6.27±0.48	53
ACNU+HBO	9	1.07±0.09	2.46±0.47	21 ^{**}
ACNU	8	1.11±0.08	6.78±0.98	57 []]
CDDP+HBO	5	1.02±0.13	4.06±1.03	34 [*]
CDDP	5	1.07±0.02	6.40±1.18	54 []]

**P<0.01 *P<0.05

T/C: Comparison between treated and control

1.03, ADM+HBO 併用群6.07±0.78, ADM 群6.27±0.48, ACNU+HBO 併用群2.46±0.47, ACNU 群6.78±0.98, CDDP+HBO 併用群4.06±1.03, CDDP 群6.40±1.18であった (Fig. 2 A-D)。

14日目においてコントロール群と HBO 群との間に有意差はなく, HBO 単独治療による腫瘍増大の抑制効果は認めなかった。また ADM+HBO 併用群は, ADM 単独群に対して抑制効果を認めなかった。しかし ACNU+HBO 併用群および CDDP+HBO 併用群においては, それぞれの単独投与群に対して2.76倍, 1.58倍という強い腫瘍増大抑制効果を認めた (P<0.01, P<0.05) (Table 1)。

副作用をみる目的で行ったラットの体重増加率の検討では, 治療後14日目における体重増減において, コントロール群に対して各治療群で体重増加が抑制される傾向をみた。しかし抗癌剤と HBO の併用治療群と, 抗癌剤単独治療群との間に有意差は認めなかった。

2. 実験 2

薬剤投与 4 時間後の腫瘍内濃度は, ADM+HBO 併用群1.03±0.70μg/g (mean±S.D.), ADM 単独群1.00±0.34μg/g, ACNU+HBO 併用群0.10±0.06μg/g, ACNU 群0.05±0.02μg/g, CDDP+HBO 併用群1.31±0.39mcg/g, CDDP

群0.75±0.37mcg/g であった。ADM+HBO 併用群は ADM 単独群に対して有意差がなく, また ACNU+HBO 併用群は ACNU 単独群に対して, 有意差はないが ACNU の腫瘍内濃度は高い傾向にあった。CDDP+HBO 併用群では, CDDP 単独群に対して1.75倍の有意な腫瘍内濃度の上昇を示していた (P<0.05) (Fig. 3 A-C)。

考 案

抗癌剤に対する HBO の併用効果についての報告は少ない。

貝原ら³⁾は, エールリッヒ腹水癌細胞を用いたマウスの実験で HBO と MMC 投与を併用して明らかな効果を認めたとしている。また永山ら⁴⁾は, BLM と HBO との併用効果をラットで確認し, 更に子宮頸癌に対する併用効果を報告している。また秋谷ら⁵⁾は, 実験的膀胱腫瘍に対する ACNU と HBO の併用が adjuvant therapy として有用であったとしている。

一方, HBO そのものにも抗腫瘍作用がある¹⁾²⁾という報告も多い。酸素は生体内で活性化され活性酸素となることが知られており, HBO の抗腫瘍効果は, この活性酸素の作用によるとの意見は多い。特に HBO 下における組織の酸素分圧は, 正常組織より腫瘍組織でより高くなるといわれ⁹⁾, 田中ら¹⁰⁾は, 腫瘍組織における PO₂値は HBO3絶

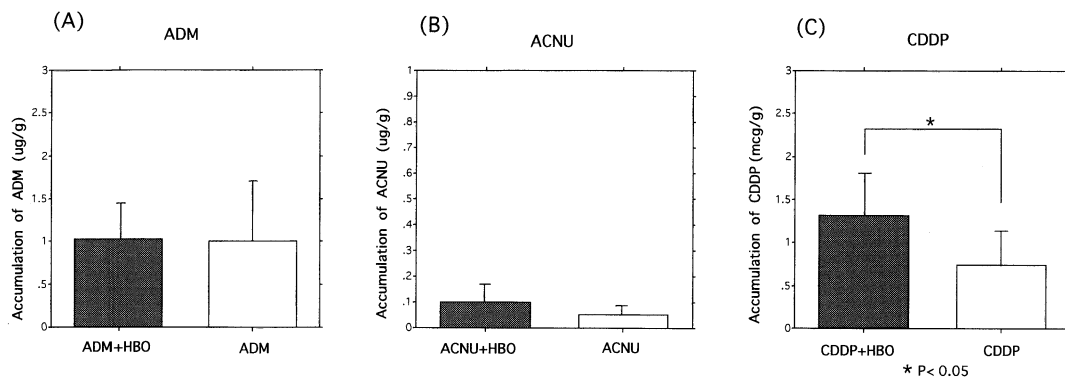


Fig. 3 HBO 下における投与後 4 時間後の ADM, ACNU, CDDP の腫瘍内濃度 (mean ± S.D. 各 n=5)

対気圧 (3ATA) 下で room air の約11倍に上昇していたと報告している。

またフリーラジカルスカベンジャーである Superoxide dismutase (SOD) は、腫瘍細胞においては正常細胞より少なく¹¹⁾、これにより HBO の抗腫瘍効果が発揮されるのではないかと⁸⁾といった報告もみられる。

これまでにも HBO 単独治療で抗腫瘍効果がみられたとの報告はあるが、今回の我々の検討では、HBO 単独のみではコントロール群との間に腫瘍増大率の差を認めなかった。このことは活性酸素の産生が不十分なためかもしれないが、少なくとも 3 回程度の治療では HBO に抗腫瘍効果はないものと思われた。

さて、ある種の抗癌剤は活性酸素を利用して制癌作用を発揮することが知られており、ADM, BLM, MMC などの抗癌剤は、その薬剤自体が体内でフリーラジカルに変化したり、金属などと複合体を造りフリーラジカルを発生させたりして腫瘍細胞を攻撃していることが知られている¹²⁾。ADM は、DNA と結合し毒性を発揮するが、これとは別に細胞内で酸素と反応して活性酸素をつくり、この活性酸素が細胞膜や DNA に障害を与える¹³⁾。これに対して CDDP と ACNU は、DNA に直接作用して DNA の複製を阻害する薬剤である。フリーラジカルの関与は不明で、いまのところ直接的な関係は証明されていない。

今回の我々の検討においては、CDDP, ACNU

と HBO との併用群において、明らかな抗腫瘍効果の増強を認めた。特に ACNU と HBO との併用群においてその効果は著明で、治療開始後より強い腫瘍の抑制効果を認めた。しかし ADM と HBO との併用群においては全く併用効果を認めなかった。

これを裏付けるように、腫瘍内濃度は CDDP と HBO の併用群で 1.75 倍と有意に上昇しており、また生体内半減期が極端に短く、残存濃度の測定が困難な ACNU と HBO の併用群においても ACNU 濃度の上昇傾向を認めた。秋谷ら⁵⁾は、実験的膀胱腫瘍に対する HBO との併用治療のなかで、ADM よりも ACNU で強い併用効果を見たと報告しており、我々の結果と一致している。

CDDP と ACNU において HBO との併用効果がみられたということから、ここではこの両者に共通する薬理的特徴から考察してみたい。

抗癌剤の細胞内流入のメカニズムは薬剤により異なっているが、CDDP, ACNU においては受動的拡散と能動的拡散によって細胞膜を通過する¹⁴⁾。一方、細胞膜の脂質二重層はリン脂質などの不飽和脂肪酸で構成されているが、この脂質二重層はフリーラジカルによって過酸化反応を受けることが知られている¹²⁾。HBO によってフリーラジカルが産成し、細胞膜が酸化されることで膜構造に変化が起るといわれており、HBO 併用による抗癌剤の作用増強の機序のひとつとして、まず細胞膜の透過性が変わることで抗癌剤の細胞内

流入が増加している可能性⁷⁾が考えられる。本研究の結果のように、抗癌剤により HBO との併用効果に違いがみられるということは、あるいは薬剤の細胞内流入のメカニズムの違いに関係があるとも考えられる。

また、HBO の併用により抗癌剤の腫瘍内濃度が増えるということは、腫瘍細胞内への薬剤流入が増えること以外に、HBO が細胞内での薬剤代謝に影響を及ぼしている可能性も考えられる。

HBO により細胞内に生成した H_2O_2 は、グルタチオンペルオキシターゼの働きにより還元型グルタチオンを酸化し水となり、生成した酸化型グルタチオンはグルタチオン還元酵素により NADPH の酸化を伴って還元される¹⁵⁾¹⁶⁾。このように HBO 作用時にはグルタチオン代謝が促進していると考えられている。

CDDP は、細胞内でグルタチオン抱合を受けて解毒される薬剤である。また近年、ACNU などのアルキル化剤もグルタチオンで抱合されることが知られてきており¹³⁾、この両者に共通する細胞内代謝機構が HBO の併用効果に関係している可能性がある。つまり細胞内グルタチオンが HBO によって消費されれば、グルタチオン抱合によって代謝される抗癌剤は細胞内代謝が遅れることになる。ブチオニンスルホキシミン (BSO) はグルタチオン合成阻害剤であるが、この BSO でグルタチオンを枯渇させると CDDP の効果が増強されることが知られている¹³⁾。BSO はその副作用のために臨床では使用されていないが、HBO によってグルタチオンが消費され、細胞内の薬剤代謝が遅延しうるとすれば、CDDP や ACNU など、細胞内グルタチオンで解毒される薬剤は、HBO によって効果が増強されることになる。また最近では、CDDP など一部の抗癌剤の耐性細胞で細胞内グルタチオンの上昇が報告されており¹⁷⁾¹⁸⁾、HBO によるグルタチオン代謝への影響の具合によっては、抗癌剤の耐性克服にもつながるかもしれない。

臨床応用では副作用の増強も考えねばならないが、本実験では体重増加率の比較で、HBO 併用による体重抑制の有意な増強はみられず目立った副作用は見られなかった。

今回の研究はラット実験腫瘍における検討であるが、HBO による一部の抗癌剤の効果増強作用は明らかと思われる。また併用による副作用の増

強も特に認められないことにより、抗癌剤の選択によっては、化学療法時の HBO 併用は臨床においても有効と考えられる。

本論文の要旨は、第28回日本高気圧環境医学会総会(1993年11月、横浜)において発表した。

結 語

1) 9L グリオーマ移植ラット皮下腫瘍モデルを用い、HBO と ADM, ACNU, CDDP の併用効果について検討した。

2) ACNU と HBO 併用群、CDDP と HBO 併用群において、腫瘍増大抑制効果の増強を認めた。しかし、ADM と HBO 併用群では効果を認めなかった。

3) 腫瘍内濃度は、CDDP と HBO 併用群で、CDDP 濃度は単独群に比べ1.75倍の有意な上昇を示し、ACNU と HBO 併用群でも ACNU 濃度の上昇傾向を認めた。しかし ADM と HBO 併用群においては、ADM 濃度の上昇は認めなかった。

4) 抗癌剤と HBO の併用治療においては、ACNU と CDDP で HBO との併用効果が確かめられた。HBO 併用による副作用の増強は認めず、臨床における化学療法と HBO との併用治療の有用性が示唆された。

〔参 考 文 献〕

- 1) 杉山弘行, 池田彰宏, 久保俊朗, 他: 高圧酸素と制癌作用. 日高圧医誌 19(1): 141-143, 1984
- 2) Gendimenico, G.J., Schlesinger, H.R., Ritter, M.A. and Haugaard, N.: Inhibition of growth and decreased survival of B104 rat neuroblastoma cells after exposure to hyperbaric oxygen. *In Vitro*, 20: 385-390, 1984
- 3) 貝原信明, 他: 高圧酸素と制癌剤の併用効果について. 癌の臨床 15(8): 695-698, 1969
- 4) 永山 孝: プレオマイシンと高気圧酸素併用療法に関する基礎的臨床的研究. 医学研究 52(5): 33-42, 1982
- 5) 秋谷 徹: 実験的膀胱腫瘍に対する ACNU と高気圧酸素の抗腫瘍効果. 日泌尿会誌78(5): 899-906, 1987
- 6) Wheeler, R.H., Dirks, J.W., Lunardi, I. and Nemiroff, M.J.: Effect of hyperbaric oxygen on the cytotoxicity of adriamycin and nitrogen mustard in cultured Burkitt, s lymphoma cells. *Cancer Research*, 39: 370-375, 1979

- 7) 秋谷 徹, 中田瑛浩, 嘉川宗秀, 他: 実験膀胱腫瘍に対する化学療法と高圧酸素の治療効果. 日高压医誌 20(4): 245-250, 1985
- 8) Takenaka, S., Arimura, T., Higashi M., Nagayama, T. and Ito, E: Experimental study of bleomycin therapy in combination with hyperbaric oxygenation. J. Jap. Soc. Cancer Ther., 15: 864-875, 1980
- 9) Jamieson, D. and Van den Brenk, H.A.S.: Oxygen tension in human malignant disease under hyperbaric conditions, Brit. J. Cancer, 19: 139-150, 1965
- 10) 田中宣威, 恩田昌彦, 山下精彦 他: ヌードマウス可移植性ヒト胃癌に対する放射線・高圧酸素併用療法—とくに正常および腫瘍組織内酸素濃度について— 日高压医誌 22(4): 239-243, 1987
- 11) Yamanaka, N. and Deamer, D.: Superoxide dismutase activity in WI-38 cell cultures. Effects of age, trypsinization and SV-40 transformation. Phys., 6: 95-106, 1974
- 12) 吉川敏一, 内藤裕二, 近藤元治: 季刊化学総説 7: 163-175, 1990
- 13) 秋山伸一: 抗癌剤のはたらき —課題と展望— 未来の生物科学シリーズ22, 共立出版, 1991
- 14) Eastman A.,: Mechanisms of resistance to cis-platin. Molecular and clinical advances in Anticancer drug resistance. Ozols R.F. Boston, Kluwer Academic Publishers: 233-249, 1991
- 15) 住本英樹, 竹重公一郎, 水上茂樹: 顆粒球の機能と代謝 —スーパーオキシドアニオンの生成およびその調節機構について—. 炎症 5: 89-100, 1985
- 16) Rossi, F.: The O₂-forming NADPH oxidase of the phagocytes; nature, mechanisms of activation and function. Biochim. Biophys. Acta 853: 65-89, 1986
- 17) Nakagawa K, Saijo N, Tsuchida JH, et al: Glutathione-S-transferase π as a determinant of drug resistance in transfectant cell lines. J Biol chem 265-270: 4296-4301, 1990
- 18) Yang WZ, Behleiter A, Hohnston JB, et al: Role of glutathione and glutathione S-transferase in chlorambucil resistance. Mol Pharmacol 41: 625-630, 1992