

【原著・基礎】

乳癌に対する 5-fluorouracil 系経口抗癌薬 S-1 と cisplatin による
実験的併用化学療法頓宮 美樹¹⁾・山田 高也²⁾・橋本 麻子²⁾・平久 治⁴⁾・氏原 淳¹⁾³⁾・町田 充¹⁾³⁾
厚田幸一郎¹⁾³⁾・鈴木 達夫²⁾・鈴木 幸男²⁾・浅沼 史樹⁵⁾・山田 好則⁵⁾¹⁾北里大学薬学部病院薬局部門*, ²⁾北里研究所病院研究部, ³⁾同 薬剤部,⁴⁾北里研究所実験動物管理センター, ⁵⁾北里研究所病院外科

(平成 16 年 1 月 8 日受付・平成 16 年 2 月 12 日受理)

5-fluorouracil (5-FU) 系経口抗癌薬である S-1 (tegafur, gimestat, otastat potassium の合剤) と cisplatin (CDDP) の、可移植性ヒト乳癌株 MX-1 および R-27, MCF-7 に対する抗腫瘍効果を、*in vivo* のヌードマウス移植法および *in vitro* の SDI 法を用いて検討した。ヌードマウスに腫瘍株を移植し、腫瘍が 100~300 mg に達した時点で S-1 は 10 mg/kg を週 5 日 3 週間経口投与、CDDP は 3 mg/kg を 4 日ごとに 3 回腹腔内投与した。併用療法は両薬剤を組み合わせ実施し、効果判定は T/C 値 (推定腫瘍体積の対照群に対する治療群の比) により行った。*In vitro* では、SDI 法により 5-FU, CDDP 併用効果を検討した。また、併用の順序が抗腫瘍効果におよぼす影響についても検討した。*In vivo* の検討において、MX-1 では S-1, CDDP それぞれの単独治療群に比べ併用群の T/C が低く、腫瘍も完全に消失し、併用することによる腫瘍抑制効果の増強がみられた。R-27, MCF-7 においては、各単独治療群、併用群いずれも効果が得られず、併用による効果の増強は認められなかった。一方、*in vitro* の SDI test を用いた検討においても両薬剤併用時に腫瘍抑制効果の増強が見られ、特に MX-1, R-27 では単剤接触で抗腫瘍効果の得られなかった濃度でも、併用することにより 50% 以上の I.I. 値が得られた。さらに MCF-7 において、IC₅₀ 値を用いた classical isobologram により薬剤の接触順序を検討した結果、CDDP 接触後に 5-FU を接触させる方が、5-FU を接触後に CDDP を接触させるよりも、より高い効果の増強が認められた。これらの結果より、乳癌に対する新たな治療戦略のひとつとして、5-FU と CDDP の併用療法、とりわけ S-1 と CDDP の併用が有用である可能性が示された。

Key words: breast cancer, combination chemotherapy, succinic dehydrogenase inhibition test, nude mouse, biochemical modulation

われわれは、1978 年にヌードマウスが導入されて以来、*in vivo* におけるヒト癌のヌードマウス移植による抗癌薬感受性試験の基礎的検討、ならびに臨床応用を目的とした手術時摘出腫瘍の移植と、これに対する *in vivo*, *in vitro* の抗癌薬感受性試験を行ってきた¹⁻⁹⁾。乳癌株においても、おもに estrogen receptor 陽性ヒト乳癌継代株を用いて実験的化学・内分泌療法を行い、anthracycline, taxane, estrogen 拮抗薬などにおいてその有用性についての知見が得られている¹⁰⁻¹⁶⁾。乳癌は他の固形腫瘍、特に消化器癌に比して予後が良好であり、化学療法に対する感受性も高い反面、術後長期間を経て再発する症例も多い。これらの症例に対しては、しばしば長期間にわたる化学療法あるいは内分泌療法が必要とされる。乳癌に対しては、現在数多くの抗癌薬が使用されているが、単剤での効果には限界があるため、作用機序の異なった抗癌薬を併用して治療成績の向上が図られている。

5-fluorouracil (5-FU) は、進行再発乳癌治療において、既治療例に対しても静脈内持続投与により 30% 程度の奏効

率を示すことが報告されている¹⁷⁾。5-FU にはおもに 2 つの作用機序が知られている。第一の機序は 5-FU から生成される FdUMP が生体内メチレンテトラヒドロ葉酸 (CH₂FH₄) とともに、チミジル酸合成酵素 (TS) と強固な ternary complex を形成することにより TS を不活化し、DNA 合成を阻害するものである。第二には、リン酸化された FUTP が RNA に取り込まれて RNA 代謝異常を引き起こすことにより、殺細胞効果を発揮する機序が考えられている¹⁸⁾。

S-1 は 5-FU の biochemical modulation による効果増強を企図したフッ化ピリミジン系抗癌薬で、tegafur (FT) : gimestat : 5-chloro-2,4-dihydroxypyridine (CDHP) : otastat potassium : monopotassium-1,2,3,4-tetrahydro-2,4-dioxo-1,3,5-triazine-6-carboxylate (Oxo) を 1 : 0.4 : 1 のモル比に配合した内服薬である。進行再発胃癌に対して単剤で画期的な治療効果を示した S-1 は、cisplatin (CDDP) と併用することにより、さらに高い臨床効果が得られることが明らかになりつつある¹⁹⁻²²⁾。

5-FU と CDDP による併用療法は、FP 療法として消化器癌に対して広く用いられている。特に5-FU と少量の CDDP を用いる少量 FP 療法は、副作用の発生頻度が少ないことなどにより長期治療が可能で、わが国においては胃癌などにおいて良好な治療成績が報告されている²³⁻²⁵⁾。

本研究では、乳癌に対して一定の抗腫瘍効果が期待される CDDP と S-1 の併用効果についてマウスを用いた検討を行った。続いて *in vitro* において CDDP および S-1 の体内作用物質である 5-FU との併用実験を行った。このことにより、近年患者数の増加の著しい乳癌に対する新たな治療手段をもたらす手がかりが得られることが期待される。

I. 材料および方法

1. 腫瘍

当施設においてヌードマウスに継代移植されているヒト乳癌株の MX-1, R-27, MCF-7 を使用した。R-27, MCF-7 については、estrogen receptor 陽性の腫瘍を新たにヌードマウスに継代移植した後、estradiol (E₂) (EP ホルモンデポ、帝国臓器) 0.1 mL (5 mg/kg) を、移植直後に 1 回後肢に筋注した。また MCF-7 については、移植 3 週間目にも追加筋注した。

2. 使用薬剤

S-1 (大鵬薬品工業)、注射用 5-FU (協和発酵)、CDDP (プリストルマイヤーズ) を使用した。

3. 実験動物

Specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育した BALB/c ヌードマウス雌 (日本クレア) 6~8 週齢を用いて実験を行った。

4. *In vivo* の検討

無菌的に採取した腫瘍を 3 mm 角に細切し、トロカー針を用いてマウスの両側背部皮下に移植した。推定腫瘍重量が 100~300 mg となった時点で、1 群 5~7 匹にて治療試験を開始した。推定腫瘍重量 (tumor weight = TW) の算出は、皮下に移植された腫瘍の長径 (L) と短径 (W) をノギスで実測し、以下の式から算出した。

$$TW = (L \times W^2) / 2$$

5-FU は 60 mg/kg を 4 日おきに 3 回腹腔内投与、S-1 は、10 mg/kg または 20 mg/kg を 5 日投与 2 日休業で 3 週間経口投与、CDDP は、3 mg/kg または 6 mg/kg を 4 日おきに 3 回腹腔内投与した。併用群は、S-1 10 mg/kg と CDDP 3 mg/kg を同様のスケジュールで投与した。

治療効果の判定は、治療開始後、治療群 (T) と対照群 (C) についてそれぞれ測定を行い、その各時点における各群の推定平均腫瘍重量を求め、さらにそれぞれの測定日ごとに治療開始日の推定平均腫瘍重量に対する推定重量比 (相対腫瘍重量; T_{RW} および C_{RW}) を算出した。うえ、相対腫瘍重量比 (T_{RW}/C_{RW}) の値によって行った。すなわち、治療開始後より実験終了までの期間における最小の T_{RW}/C_{RW} (T/C) (%) をもって抗腫瘍効果とした。

有効のめやすとして T/C のカットオフを 50% とし、50% 以下を有効と判定した。

5. SDI 法による *in vitro* の抗腫瘍効果の検討

SDI 法は既報⁵⁻⁸⁾の方法に準じて行った。すなわち、腫瘍組織をヌードマウスより無菌的に取り出した後、眼科用鉗で細切し、HBSS (Hanks' balanced solution salt, GIBCO) を用い静置洗浄を 3~5 回行った後、10 mL の酵素混合液 (0.5 mg/mL pronase E, 科研製薬, 0.2 mg/mL collagenase type I, Sigma, 0.2 mg/mL DNase I, Sigma) に浮遊させ 37°C, 30 分反応させた後、金属メッシュで濾過し遊離細胞浮遊液を得た。細胞は 20% 牛胎仔血清添加培地 (RPMI 1640, GIBCO) に浮遊させ、96 穴平底マイクロプレート (Corning Inc., NY) に生細胞 1×10⁵ cells/0.1 mL/well となるように調製分注した。また、MCF-7 に関しては、*in vitro* の培養細胞を、10% 牛胎仔血清添加培地を用いて 7.5×10³ cells/0.1 mL/well に調製分注し操作を行った。接触薬剤は CDDP および 5-FU を使用した。5-FU の単剤接触では接触濃度が 1, 10, 25, 50 および 100 μg/mL, CDDP の単剤接触では 0.1, 1, 5, 10, 25, 50 μg/mL となるように 100 μL ずつの薬液を添加した。併用群は各濃度を組み合わせ、両薬剤を 48 時間同時接触させた。培養終了後 PBS 200 μL にて 1 回洗浄し、MTT 試薬 (0.4% MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) 10 μL と 0.1 M コハク酸 Na 六水和物 (di-sodium succinate hexahydrate, 関東化学) 10 μL を添加した。4 時間後、生成した formazan を DMSO (Dimethyl Sulfoxide, 関東化学) 150 μL にて溶解し、測定波長 540 nm, 補正波長 630 nm における吸光度, Optical Density (OD) を、プレートリーダー (ELx 800 Universal Microplate Reader, BIO-TEK INSTRUMENTS, INC.) を用いて測定した。治療効果の判定は、細胞のみの well をブランク (a), 細胞+MTT 試薬を対照群 (b), 細胞+抗癌薬+MTT 試薬を試験群 (c) とし、以下の式により求めた I.I. (%) にて行った。

$$I.I. (\text{Inhibition Index}) (\%) = (c - b) / (b - a) \times 100$$

有効のめやすとして I.I. のカットオフを 50% とし、50% 以上を有効と判定した。

次に、薬剤接触順序による抗腫瘍効果の違いを検討するため、MCF-7 を用いて以下の実験を行った。同時接触と同様に細胞を分注したプレートを 2 枚作成し、一方のプレートでは 5-FU を 24 時間接触させた後 10% 牛胎仔血清添加培地 200 μL で 1 回洗浄し、続いて 24 時間 CDDP を接触させた。もう一方のプレートでは逆に CDDP を 24 時間接触させた後洗浄し、続いて 5-FU を 24 時間接触させた。各薬剤の接触濃度は同時接触の場合と同様である。それぞれの濃度に対する IC₅₀ 値を算出し、classical isobologram を用いて効果判定を行っ

た。

II. 結 果

1. *In vivo* における併用効果

MX-1 に対する S-1 10 mg/kg と CDDP 3 mg/kg の併用群においては、治療開始後から腫瘍の増殖が抑制され、7日目には実験開始時よりも縮小を示し、18日目には腫瘍が完全に消失し、明らかに S-1 および CDDP 単剤投与群に比べ効果の増強が認められた (Fig. 1)。

MX-1, R-27, MCF-7 に対する 5-FU, S-1, CDDP の単剤, および S-1 と CDDP の併用投与における、実験期間中の最小の T/C (%) を表に示した (Table 1)。MX-1 に対し S-1 と CDDP の併用群の T/C は 0% と、5-FU を含む単剤投与に比して効果の増強が認められた。R-27, MCF-7 に対しては、併用による明らかな抗腫瘍効果の増強は認められなかった。

また、どの腫瘍株に対しても 5-FU 単剤投与に比べ S

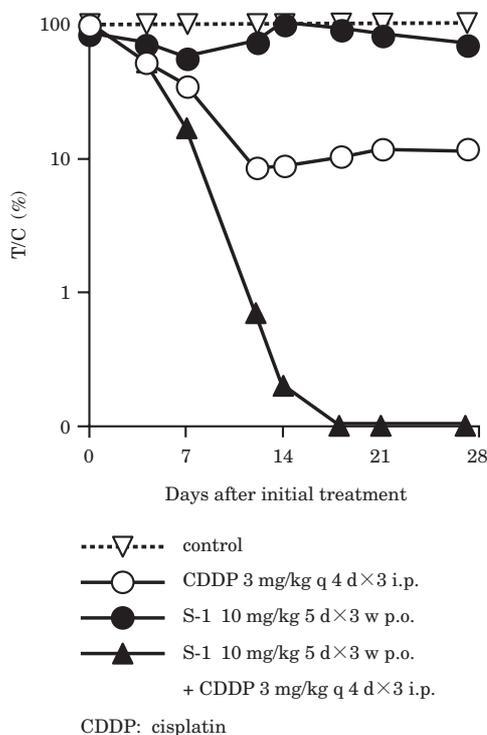


Fig. 1. Effect of combination therapy of S-1 and cisplatin against MX-1.

Table 1. Activities of some anticancer agents against human breast carcinoma xenografts in athymic nude mice

| Tumor (mg/kg) | 5-FU ^{a)} (60) | S-1 ^{b)} (10) | S-1 ^{b)} (20) | CDDP ^{a)} (3) | CDDP ^{a)} (6) | S-1 ^{b)} (10) CDDP ^{a)} (3) |
|---------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---|
| MX-1 | 53.3 ^{c)} | 56.1 | 50.1 | 8.0 | 0.2 | 0.0 |
| R-27 | 80.4 | 57.9 | 60.0 | 50.0 | 55.1 | 64.0 |
| MCF-7 | 68.6 | 69.9 | 49.0 | 55.1 | 64.1 | 54.8 |

^{a)} q 4 dx3, i. p., ^{b)} 5 dx3 w, p. o., ^{c)} Data is shown as T/C (%) of relative mean tumor weight during the experiment
5-FU: 5-fluorouracil, CDDP: cisplatin

-1 単剤投与の方が T/C が低かった。

2. *In vitro* における併用効果

1) SDI 法による検討

MX-1 に対する 5-FU と CDDP の 48 時間同時接触による SDI test において、5-FU 単剤では 100 μ g/mL までのいずれの濃度においても感受性が認められなかった。一方、CDDP 単剤では 5 μ g/mL 以上の濃度において 50% 以上の I.I. 値が得られた。両薬剤を併用すると、単剤接触では効果がなかった 5-FU 100 μ g/mL, CDDP 1 μ g/mL の組み合わせで I.I. 値が 52.4% となり、抗腫瘍効果を得ることができた。単剤接触時に感受性の認められなかった、その他の濃度の組み合わせにおいても、併用により I.I. 値が上昇した (Table 2)。R-27 における 5-FU 単剤接触は 100 μ g/mL までの濃度では、MX-1 と同様、感受性は認められなかった。また CDDP 単剤接触は、25 μ g/mL 以上で感受性が認められた (Table 3)。両薬剤を併用すると、単剤では効果がなかった 5-FU 50 μ g/mL と CDDP 10 μ g/mL, 5-FU 100 μ g/mL と CDDP 5 および 10 μ g/mL の組み合わせにおいて I.I. 値が 50% を超え、抗腫瘍効果が得られた。その他の濃度の組み合わせについても、併用による I.I. 値の上昇が認められた。MCF-7 については、5-FU 単剤では 10 μ g/

Table 2. *In vitro* effect of 5-fluorouracil and cisplatin on MX-1

| CDDP (μ g/mL) | 5-FU (μ g/mL) | | | | | |
|--------------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | (-) | 1 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| (-) | — | 22.5 | 32.4 | 34.5 | 36.5 | 38.3 |
| 0.1 | 14.4 | 29.9 | 27.7 | 30.8 | 33.4 | 43.2 |
| 1 | 30.4 | 37.7 | 37.3 | 39.5 | 46.0 | <u>52.4</u> |
| 5 | <u>65.9</u> | <u>71.2</u> | <u>69.9</u> | <u>71.0</u> | <u>69.0</u> | <u>68.0</u> |
| 10 | <u>79.4</u> | <u>79.1</u> | <u>75.4</u> | <u>75.5</u> | <u>74.0</u> | <u>75.5</u> |
| 25 | <u>82.8</u> | <u>82.5</u> | <u>82.2</u> | <u>79.9</u> | <u>81.0</u> | <u>83.0</u> |
| 50 | <u>88.5</u> | <u>88.0</u> | <u>88.2</u> | <u>87.4</u> | <u>87.2</u> | <u>88.9</u> |

^{a)} Data are shown as the mean inhibition index (%) from 3 experiments

^{b)} Numbers in squares are greater or equal to 50
5-FU: 5-fluorouracil, CDDP: cisplatin

Table 3. *In vitro* effect of 5-fluorouracil and cisplatin on R-27

| CDDP (μ g/mL) | 5-FU (μ g/mL) | | | | | |
|--------------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | (-) | 1 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| (-) | — | 10.5 | 21.1 | 29.7 | 37.3 | 47.4 |
| 0.1 | 2.4 | 22.6 | 19.6 | 29.2 | 34.2 | 42.8 |
| 1 | 19.1 | 22.1 | 26.1 | 34.2 | 28.7 | 49.9 |
| 5 | 34.2 | 34.7 | 37.3 | 41.3 | 49.9 | <u>63.1</u> |
| 10 | 43.8 | 45.4 | 45.4 | 48.9 | <u>51.9</u> | <u>68.1</u> |
| 25 | <u>51.9</u> | <u>51.9</u> | <u>56.0</u> | <u>60.5</u> | <u>61.6</u> | <u>64.1</u> |
| 50 | <u>59.5</u> | <u>63.6</u> | <u>63.6</u> | <u>65.6</u> | <u>68.1</u> | <u>73.7</u> |

^{a)} Data are shown as the mean inhibition index (%) from 3 experiments

^{b)} Numbers in squares are greater or equal to 50
5-FU: 5-fluorouracil, CDDP: cisplatin

mL以上、CDDP単剤では5 μ g/mL以上で抗腫瘍効果が認められた。他の腫瘍株と同様、両薬剤を併用するとI.I.値が上昇する傾向にあった。この傾向は、CDDPが低濃度であるほど強かった (Table 4)。

さらに、薬剤の接触順序による効果の違いを検討する目的でMCF-7を24時間5-FUと接触させた後、洗浄により薬剤を除去し、次に24時間CDDPを接触させたSDI testの結果と、同様にCDDPを24時間接触させ、その後24時間5-FUを接触させた結果を、各濃度別にIC₅₀を求め、classical isobologramとした (Fig. 2)。各薬剤の単剤接触時におけるIC₅₀は5-FUで72.0 μ g/mL、CDDPで26.1 μ g/mLであった。どちらの群も、単剤でのIC₅₀を結んだ直線より低濃度側に分布し、併用による相乗効果が認められた。しかし、CDDPを先に、5-FUを後に接触させた場合の方が、5-FUの後にCDDPの場合より低いIC₅₀が得られ、CDDP先行の方が抗腫瘍効果を得ることができた。この傾向は、特に低

濃度において顕著であった。

III. 考 察

わが国における乳癌の罹患率は欧米諸国に比し小さい。しかし近年、明らかに増加の傾向が認められてきている。われわれは、1975年以来消化器癌患者の新鮮手術材料をヌードマウスに移植し、可移植率向上の実験ならびに*in vivo*ヌードマウス移植法による抗癌薬感受性試験を行ってきた⁹⁻¹⁶⁾。今回はS-1の効果増強を目的に、CDDPを用い、可移植性ヒト乳癌株に対する併用効果を基礎的に検討した。S-1, CDDPのいずれも、これまでの臨床試験などにおいて、乳癌に対し一定の効果が認められている薬剤である²⁶⁻²⁸⁾。

*In vivo*の検討は、これまでの実験結果から得られたヌードマウスに対する最大耐用量 (maximum tolerated dose, MTD)である、S-1 20 mg/kg, CDDP 9 mg/kgをもとに、S-1 10 mg/kg, CDDP 3 mg/kgと、半量もしくはそれ以下の用量で行った。その結果、特にMX-1について併用による効果の増強が認められ、腫瘍が消失するほどの高い効果を示した。R-27, MCF-7では併用による効果の増強は認められなかった。われわれがこれまでに得た結果より、乳癌の化学療法薬として頻用されるanthracycline系のadriamycin (ADM)のMTDによるR-27に対するT/Cは70.5%であり、同様にMCF-7に対するT/Cは64.5%である。また、taxane系のpaclitaxel (TXT)についてはそれぞれ66.1%, 11.6%であった¹⁴⁾。今回行ったS-1とCDDPの併用療法は、それら薬剤に匹敵する抗腫瘍効果を有していると考えられる。

今回*in vitro*の検討に用いたMTT試薬によるSDI testは、*in vitro*の抗癌薬感受性試験として、われわれを含む多くの施設で広く用いられ、結果の再現性や臨床効果の予測などにおいて評価の定まった試験法である⁵⁻⁸⁾。このSDI testによる検討においても、MX-1, R-27, MCF-7に対し、併用による効果の増強が認められた。さらに薬剤の接触順序の検討から、5-FUの後CDDPの順に接触させるよりもCDDPの後5-FUを接触させる方が、腫瘍抑制効果が増強された。5-FUの抗腫瘍効果は、細胞内において5-FUの活性体であるFdUMP、チミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase, TS)、およびメチレンテトラヒドロ葉酸がternary complexを形成し、TS活性を阻害することで発現する。CDDPの前投与はTS阻害率を有意に上昇させることが報告されている²⁹⁾。したがって今回の薬剤入れ替えの実験で得られた結果は、CDDPがDNAへの直接障害作用とは別に、癌細胞の膜上Na⁺, K⁺-ATPaseを阻害し、必須アミノ酸であるメチオニンの癌細胞内への取り込みを抑制することにより、癌細胞内のメチレンテトラヒドロ葉酸量を増加させ、5-FU由来のFdUMPの作用を増強させたことによると思われる²⁹⁻³²⁾。その効果は、低濃

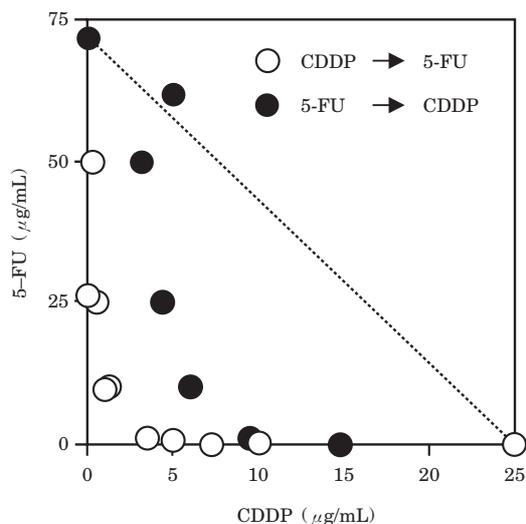
Table 4. *In vitro* effect of 5-fluorouracil and cisplatin on MCF-7

| | | 5-FU (μ g/mL) | | | | | |
|--------------------|-----|--------------------|------|------|------|------|------|
| | | (-) | 1 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| CDDP (μ g/mL) | (-) | — | 30.1 | 54.1 | 56.0 | 58.9 | 67.1 |
| | 0.1 | 17.4 | 34.2 | 51.4 | 58.9 | 60.4 | 68.9 |
| | 1 | 20.7 | 40.8 | 54.9 | 56.0 | 62.0 | 69.2 |
| | 5 | 53.4 | 61.2 | 65.3 | 66.4 | 70.6 | 80.1 |
| | 10 | 75.4 | 79.6 | 82.1 | 83.9 | 86.3 | 89.2 |
| | 25 | 91.2 | 93.3 | 93.2 | 93.3 | 92.1 | 93.9 |
| | 50 | 97.0 | 97.0 | 96.9 | 96.9 | 97.2 | 96.9 |

^{a)}Data are shown as the mean inhibition index (%) from 3 experiments

^{b)}Numbers in squares are greater or equal to 50

5-FU: 5-fluorouracil, CDDP: cisplatin



5-FU: 5-fluorouracil, CDDP: cisplatin

Fig. 2. IC₅₀ for 5-fluorouracil, cisplatin, and their combination on MCF-7.

度で顕著であったことから、今回、低用量を用いた *in vivo* の検討で併用効果が得られた要因のひとつに、この機作が関与している可能性が考えられた。今回行った SDI test の薬剤併用実験において、薬剤を入れ替えて行った報告はわれわれの知る限りでは存在しない。今後さらに検討を加え、他の薬剤による併用療法、さらには手術材料にも応用できるように検討を加えていきたい。

S-1 は、*in vivo* の実験において、MX-1, R-27 および MCF-7 の腫瘍に対して、5-FU のヌードマウスに対する最大耐用量 60 mg/kg よりも、強い腫瘍抑制効果を示した。S-1 は 5-FU の biochemical modulation をベースにしたフッ化ピリジミン系抗癌薬である。CDHP は uracil よりも 180 倍高い dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) 阻害活性を有していることが報告されている³³⁾。したがって、FT と CDHP の併用により、血中において長時間にわたり高い 5-FU 濃度を維持され、抗腫瘍効果が増強されると考えられる。

以上より S-1 は、CDDP との併用により、現在臨床的にその有用性が明らかになりつつある胃癌に加え、乳癌に対しても有用な治療方法となることが示唆された。すなわち、近年増加が著しく、2nd line, 3rd line の新たな治療法が求められている進行再発乳癌に対する新たな治療戦略となる可能性が考えられた。

文 献

- 1) Kawamura E, Suzuki T, Kubota T, et al.: Transplantability of human carcinomas into nude mice. *Immune-deficient Animals* (ed Sordat B), Karger, Basel, p.276~282, 1984
- 2) Yamada T, Kubota T, Kawamura E, et al.: Human tumor cell clonogenic assay with reference to the clinical effect of chemotherapy. *Surg Res Comm* 4: 41~51, 1988
- 3) 河村栄二, 鈴木達夫, 山田好則: SDI test の基礎的検討と各種感受性試験との比較および臨床応用の検討。制癌剤適応決定の基礎と臨床 (近藤達平 編), p.81~96, 癌と化学療法社, 東京, 1987
- 4) Yamada Y, Kubota T, Asanuma F, et al.: Comparison of characteristics between tumors transplantable into nude mice and those with ability to form clones *in vitro* clonogenic assay. *Immune-deficient Animals in Experimental Medicine* (ed Wu B-q, Zheng J), Karger, Basel, p.170~174, 1989
- 5) Yamada T, Fujinaga S, Suzuki T, et al.: Antitumor activity of chemotherapeutic drugs against human carcinomas as assayed on nude mouse system and by *in vitro*, clonogenic, ATP and MTT assays. *Immune-deficient Animals in Experimental Medicine* (ed Wu B-q, Zheng J), Karger, Basel, p.295~300, 1989
- 6) 久保田哲朗, 首藤昭彦, 石引久弥, 他: 手術材料を対象とした SDI 抗癌剤感受性試験 (MTT アッセイ)。癌と化学療法 17: 2025~2030, 1990
- 7) 浅沼史樹, 山田好則, 河村栄二, 他: 固形腫瘍の抗癌剤感受性試験としての SDI 法 (succinic dehydrogenase inhibition test) の検討—酵素処理と抗癌剤の濃度反応曲線の意義—。日本癌治療学会雑誌 26: 1095~1103, 1991
- 8) 浅沼史樹, 山田好則, 河村栄二, 他: 固形腫瘍の抗癌剤感受性試験としての SDI 法 (succinic dehydrogenase inhibition test) の検討—抗癌剤の 50% 抑制濃度と臨床効果との比較—。癌と化学療法 19: 95~101, 1992
- 9) 山田好則, 山田高也, 浅沼史樹, 他: ヌードマウス可移植性ヒト癌株を用いた抗癌剤感受性試験の基礎的検討。HUMAN CELL 8: 179~184, 1995
- 10) Yamada T, Yamada Y, Asanuma F, et al.: Clinical Aspects of Transplantability of Human Gastric and Colorectal Carcinomas in Nude Mice. *Folia Microbiol* 43: 551~552, 1998
- 11) 山田好則: 乳癌内分泌療法のスクリーニング。KARKINOS 3: 65~72, 1990
- 12) 久保田哲朗, 如水和也, 石引久弥, 他: ヌードマウス可移植性ヒト乳癌株に対する実験的・化学・内分泌療法—UFT と TAMOXIFEN の併用効果—。日本癌治療学会雑誌 25: 2767~2773, 1990
- 13) Koh J, Kubota T, Asanuma F, et al.: Antitumor effect of triphenylethylene derivative (TAT-59) against human breast carcinoma xenografts in nude mice. *J Surg Oncol* 51: 254~258, 1992
- 14) Kubota T, Matsuzaki S W, Hoshiya Y, et al.: Antitumor activity of paclitaxel against human breast carcinoma xenografts serially transplanted into nude mice. *J Surg Oncol* 64: 115~121, 1997
- 15) Asanuma F, Yamada Y, Kawamura E, et al.: Antitumor activity of paclitaxel and epirubicin in human breast carcinoma, R-27. *Folia Microbiol* 43: 473~474, 1998
- 16) 山田高也, 山田好則, 浅沼史樹, 他: 可移植性ヒト乳癌株を用いた UFT と Docetaxel 併用療法の基礎的検討。癌と化学療法 27: 1725~1730, 2000
- 17) Cameron D A, Gabra H, Leonard R C: Continuous 5-fluorouracil in the treatment of breast cancer. *Br J Cancer* 70: 120~124, 1994
- 18) 白坂哲彦, 島本雄司, 木下英之, 他: 5-FU 系抗癌剤とシスプラチンの併用による抗腫瘍効果増強とその作用機序—5-FU の Biochemical Modulation の立場から—。癌と化学療法 18: 403~409, 1991
- 19) 山田好則, 宮川 健, 豊田 元, 他: TS-1 投与により CR を 30 週以上継続中の胃癌リンパ節再発の 1 例。癌と化学療法 27: 2139~2143, 2000
- 20) 鎌田 徹, 林 泰生, 湊屋 剛, 他: 進行胃癌に対する Low-Dose TS-1 + CDDP 併用療法の Pilot 的検討。癌と化学療法 28: 1419~1422, 2001
- 21) 五味 隆, 大歳雅洋, 玉置信行, 他: TS-1 と少量 CDDP 併用が有効であった進行再発胃癌の 3 症例。癌と化学療法 29: 301~304, 2002
- 22) 岩瀬弘明, 島田昌明, 中村元典, 他: 進行胃癌に対する TS-1/CDDP の併用第 I/II 相試験 (速報)。癌と化学療法 25: 1575~1582, 2002
- 23) 近藤 建, 村瀬正治, 横山泰久, 他: 高度進行胃癌に対する術前化学療法としての 5-fluorouracil (5-FU) 持続静注と Cisplatin (CDDP) 少量連日投与併用化学療法。癌と化学療法 23: 1299~1303, 1996
- 24) 榎原啓之, 大谷 透, 岩永 剛, 他: 切除不能進行胃癌に対する Cisplatin (CDDP) 少量分割投与方法と 5-

- fluorouracil (5-FU) 持続静注併用化学療法共同研究。癌と化学療法 25: 1021~1026, 1998
- 25) 佐藤裕二, 宇根良衛, 藤沢純爾, 他: 胃癌・大腸癌再発および進行例に対する5-FU持続注入と少量CDDP連日投与の検討。癌と化学療法 22: 87~92, 1995
- 26) 田口鉄男, 森本 健, 堀越 昇, 他: 進行・再発乳癌患者に対するS-1の前期臨床第II相試験。癌と化学療法 25: 1035~1043, 1998
- 27) Jurga L, Misurova E, Kovac V, et al.: The role of cisplatin in chemotherapy of advanced breast cancer. Neoplasma. 41: 347~352, 1994
- 28) Bitran J D, Kozloff M F, Desser R K: Platino (CDDP) and continuous intravenous infusion 5-fluorouracil in refractory stage IV breast cancer: a phase II study. Cancer Invest. 8: 335~338, 1990
- 29) 山田高也, 鈴木達夫, 河村榮二: フッ化ピリミジンとCDDPの併用効果。PHYSICIANS' THERAPY MANUAL Vol. 5, 6 (5) JUN., 1992
- 30) 大家真治, 岡部博之, 武田節夫, 他: CDDPによる効果増強メカニズムの解明—Biochemical Modulationの見地から—。癌と化学療法 17: 1321~1326, 1990
- 31) Araki H, Fukushima M, Kamiyama Y, et al.: Effect of consecutive lower-dose cisplatin in enhancement of 5-fluorouracil cytotoxicity in experimental tumor cells *in vivo*. Cancer Letters 160: 185~191, 2000
- 32) Shirasaka T, Shimamoto Y, Ohshimo H, et al.: Metabolic basis of the synergistic antitumor models *in vivo*. Cancer Chemother. Pharmacol. 32: 167~172, 1993
- 33) Tatsumi K, Fukushima M, Shirasaka T, et al.: Inhibitory effects of pyrimidine, barbituric acid and pyridine derivatives on 5-fluorouracil degradation in rat liver extracts. Jpn J Cancer Res 78: 748~755, 1987

Combination therapy of S-1 and cisplatin in human breast carcinoma

Miki Tongu¹⁾, Takaya Yamada²⁾, Asako Hashimoto²⁾, Osamu Hiraku⁴⁾,
Atsushi Ujihara¹⁾³⁾, Mitsuru Machida¹⁾³⁾, Koichiro Atsuda¹⁾³⁾, Tatsuo Suzuki²⁾,
Yukio Suzuki²⁾, Fumiki Asanuma⁵⁾ and Yoshinori Yamada⁵⁾

¹⁾College of Pharmacy, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo, Japan

²⁾Biomedical Laboratory, Kitasato Insutitute Hospital, Kitasato Institute

³⁾Department of Pharmacy, Kitasato Insutitute Hospital, Kitasato Institute

⁴⁾Laboratory Animal Center, Center for Basic Research, Kitasato Institute

⁵⁾Department of Surgery, Kitasato Insutitute Hospital, Kitasato Institute

The antitumor effect against the cell line of human breast carcinoma, MX-1, R-27, and MCF-7, of the combination therapy, 5-fluorouracil (5-FU) and cisplatin (CDDP), or S-1 and CDDP, were tested *in vivo* and *in vitro*. *In vivo*, S-1 (10 mg/kg) and CDDP (3 mg/kg) were administered to nude mice 5 times a week for 3 weeks orally and every 4 days for a total of 3 times intraperitoneally, after a subcutaneously inoculated tumor started exponential growth. The treated/control ratio (T/C) of relative mean tumor weight was calculated and values under 50% were determined to be effective. T/C with the combination for MX-1 was 0%, which was lower than that of S-1 and that of CDDP, enhanced the antitumor effect. For R-27 and MCF-7, T/C was not under 50% in all treated groups. *In vitro*, the SDI test showed an increased inhibition index (%) especially for MX-1, R-27. Therefore, the antitumor effect was enhanced when the 2 drugs were administered simultaneously. We also examined the sequence dependence of anticancer activity of this combination therapy using the SDI test, suggesting CDDP followed by 5-FU was more effective than 5-FU followed by CDDP in classical isobolography. This combination therapy, thus appears to be useful in the treatment with breast cancer.