

血管新生阻害剤の抗腫瘍効果に関する実験的研究

東京医科大学外科学教室 (指導: 小柳泰久主任教授)

橋本 聖 青木 達哉

【要旨】 近年, 固形腫瘍の発育, 進展および転移に至る一連の過程に血管新生が不可欠であることから, その新生抑制による癌治療が報告されてきている. 本研究に用いた FR118487 は, *in vitro*, *in vivo* において血管新生抑制作用を有することが既に報告されているが, 腫瘍を対象とした研究は少なく, いまだその至適投与量や投与法は確立されていない.

本研究では本薬剤の実験腫瘍に対する増殖抑制効果を検索すると共に, 血管新生の抑制効果を microangiography による画像解析および特殊免疫染色による病理組織所見から検索した. その結果, 治療群では対照群に対し優位に腫瘍増殖抑制を認めた. 画像解析では流入血管数, 腫瘍周囲血管密度が治療群で有意に抑制され, 病理組織所見では微小血管数が治療群で有意に少なかった. 副作用としては高用量において高度の体重減少と下痢を認めた.

緒 言

腫瘍細胞は正常細胞と様々な点で異なる性格を有するが, そのひとつとして腫瘍細胞の異常増殖性があげられる. 固形腫瘍は発生当初は無血管の状態で緩徐に増殖するが, その後周囲より血管導入が活性化される. 腫瘍はこの血管網を介した栄養供給を受け急速に増大する. 増大した腫瘍は血管網を介した転移を生じやすく, 転移巣における増殖もまた血管新生が関与すると報告されている¹⁾. このことは腫瘍の増殖に血管新生が大きく関与することを示唆している. 一方, 成人の生理的状態では生殖臓器を除くと通常血管新生は認められないのに対し, 腫瘍血管の内皮細胞ではその turn over は著しく短縮し, 血管新生の活性化が認められる²⁾. 以上の点より, 血管新生を阻害することにより腫瘍の増殖, 転移を抑制することが可能であり, 血管新生阻害剤は腫瘍特異性が高く, 副作用の少ない癌治療薬となる可能性が示唆されている.

近年, 血管新生誘導メカニズムの解明が進むと共に, 各種血管新生阻害物質投与に関する効果が報告されてきている. 本研究はカビ産生物質に属し, 土

壤微生物 *Scolecobasidium arenarium* の産生物質 FR111142 の誘導物質 FR118487 (藤沢薬品 (株) より供与) を用いて抗腫瘍効果の解析を行った. 本薬剤は *in vitro*, *in vivo* において血管新生を阻害することが報告されている^{3)~5)} が, まだその抗腫瘍効果に関する基礎的な解析を行った報告は少なく, 至適投与量や投与法は確立されていない. 本研究では FR118487 を担癌ラットに投与した際の, 血管新生阻害効果を画像的, 病理組織学的に解析すると共に, 抗腫瘍効果について対照群と比較検討した.

対象と方法

1. 実験動物および腫瘍

動物種は 4~6 週齢の Sprague-Dawley 系ラット (チャールズ・リバー社) を用いた. すべての処置は東京医科大学動物実験指針⁶⁾ および動物実験委員会承認に基づき, エーテルまたはネンプタル麻酔下でおこなった. 移植腫瘍株としてはラット腹水肝癌 AH60C (筑波 ARL より供与) を使用した. AH60C は約 1 週毎に血性腹水として採取された細胞浮遊液を次代の腹腔内に継代, 維持した.

1996 年 2 月 5 日受付, 1996 年 2 月 15 日受理

キーワード: 血管新生阻害剤, AH 60 C, microangiography, 第 VIII 因子関連抗原染色.

(別刷請求先: 〒160 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学外科学教室 橋本 聖)

2. 実験群の作製

第 3～第 6 継代の AH60C 細胞浮遊液を 1×10^7 個/0.1 ml に調整し、ラット下腹部皮下に 0.1 ml を注入、皮下腫瘍を作製した。

FR118487 の投与は腫瘍細胞の移植直後より開始した。投与方法としては、浸透圧ポンプ (Alzet 社製, Model 2001) にプロピレングリコール 0.2 ml に溶解した FR118487 を充填し、これをラット背部皮下に埋没することにより皮下持続投与とした。投与量により 0.5 mg/kg/day 群, 2.0 mg/kg/day 群, 5.0 mg/kg/day 群を設定し (以下 0.5 mg 群, 2 mg 群, 5 mg 群), プロピレングリコールのみ投与した群を対照群とした。浸透圧ポンプは 1 週毎に交換し, 3 週間持続投与した。各群共 15 例ずつ作製し, 5 例を腫瘍径および体重の測定, 5 例を microangiography, 5 例を病理組織採取に用いた。

3. 推定腫瘍重量の測定

抗腫瘍効果の判定には推定腫瘍重量の比較を行った。週に 2 回ノギスにて腫瘍の長径, 短径を測定し, 推定腫瘍重量を (直径) \times (短径)² \times 0.5 の式より求めた。統計学的処理は t 検定を用い, 危険率 5% 以下を有意差ありとした。

4. microangiography

(a) 造影剤の作製

造影剤としてはゼラチン加バリウム溶液を用いた。すなわち蒸留水を温水浴中で過熱しながら 6% ゼラチン溶液を再度沸騰水浴中で溶解し, 胃腸造影用バリウム (バリトッパ 120, カイゲン (株)) をゼラチン液: バリウム = 2:1 の割合で混合, 均質とし, 40% バリウム 4% ゼラチン溶液を作製した。

(b) microangiography

ラットをネブプタール過量投与にて犠牲死させ, 直ちに開胸し, 左心室および右心房を 22 G エラストー針にて穿刺した。左心室よりヘパリン加生食水を約 150 cm H₂O の圧にて注入, 右心房より脱血し, 血液成分の流出がみられなくなるまで灌流を続けた。造影剤を 40～50°C に温め, 灌流後に手動的に注入了。注入量は 15～25 ml を目安とし, 造影剤の流出が認められた時点で注入を完了した。造影剤注入後は 1 時間以上冷蔵庫中に保存し, ゼラチンを固形化させた後腫瘍を周囲組織と共に切除, 10% ホルマリン液にて固定した。撮影装置は Softex type E40, フィルムは Kodak X-Omat を使用し, 20 KVp, 20 mA, 30～60 sec の条件で撮影した。

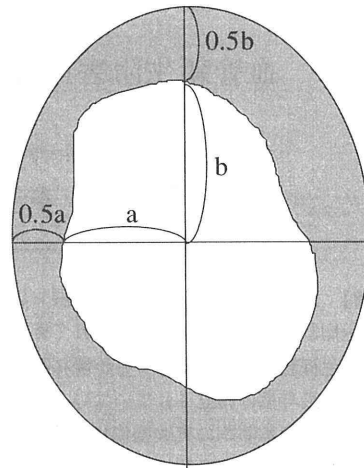


Fig. 1 腫瘍周囲血管密度の測定

■内の造影部の比率を画像解析システムを用いて測定した。

(c) microangiography における血管新生の評価
microangiography における血管新生の評価として①腫瘍への流入血管数②腫瘍周囲の血管密度③腫瘍内の血管密度を測定した。流入血管数は, 腫瘍正面像で腫瘍辺縁と交差する血管数を求めた。腫瘍周囲の血管密度は, 図 1 のごとく腫瘍の重心よりその長径, 短径の各々 1.5 倍を径とする楕円を描き, 楕円内の非腫瘍部における造影部の割合を測定した。腫瘍内の血管密度は, 剖面像での腫瘍内造影部の割合を測定した。血管密度の測定には画像処理システム OLYMPUS SP500F を用いた。

5. 特殊免疫染色による病理学的検討

腫瘍細胞移植後 7 日目, 21 日目に腫瘍を摘出し, 10% ホルマリン液にて固定後パラフィン包埋した。組織切片を作製し, 第 VIII 因子関連抗原染色 (以下第 VIII 因子染色) を DAKO Anti-Human von Willebrand Factor を一次抗体として用い PAP 法にて行った。血管新生の判定は第 VIII 因子染色標本を光顕的に観察し, 内皮細胞が褐色に染色された毛細血管と細静脈を微小血管と同定した。200 倍視野の中心に腫瘍辺縁部を位置させ全周性に鏡検, 微小血管の多数点を 5 カ所計測し, その平均値を平均微小血管数とした。

6. 体重変動

副作用の検討として, 体重を薬剤投与と後週 2 回測定した。測定値から推定腫瘍重量を差し引き, 治療前との体重比を求め対照群と治療群とを比較した。

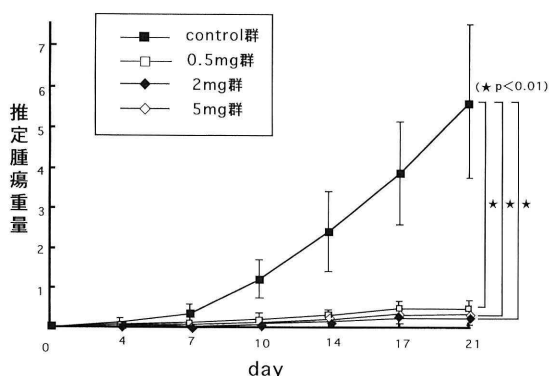


Fig. 2 推定腫瘍重量の推移

治療群では有意に腫瘍増殖が抑制された。治療群間には有意差を認めなかった。

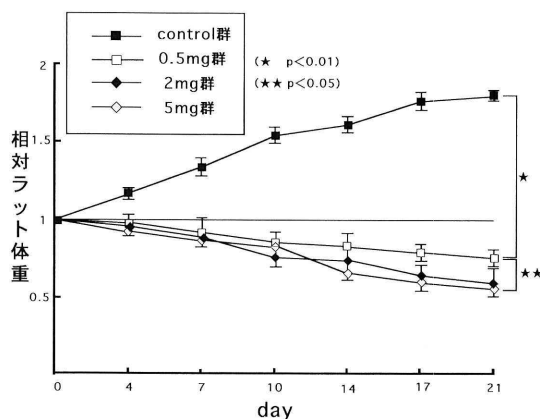


Fig. 3 ラット体重の推移

治療群では用量依存的に体重減少を認めた。

結 果

1. AH60C 皮下腫瘍の自然経過

AH60Cの皮下生着率は初代細胞では約50%であったが、3継代以降では100%となった。腫瘍は、移植後約3日にて皮下硬結として存在が確認された。7日目には腫瘍径 9.2 ± 1.9 mmとなり、剖面は均一な白色を呈する充実性腫瘍であった。14日目には腫瘍径 21.0 ± 5.3 mm、剖面では中心壊死を認めた。21日目では腫瘍径 26.8 ± 4.3 mm、表層数mmを残し内部は壊死性物質で占められていた(各群n=5)。経過観察中に他臓器、リンパ節への転移は認められなかった。

2. 推定腫瘍重量

各群の推定腫瘍重量の推移を図2に示す。対照群の推定腫瘍重量は、7日目で 327.0 ± 192.9 mg、14日目で $242.2 \pm 1,379.9$ mg、21日目で $5,982.3 \pm 2,877.2$ mgであった。治療群では0.5 mg群の7日目で 11.7 ± 6.2 、14日目で 290.5 ± 143.0 、21日目で 460.7 ± 109.6 、2 mg群の7日目で 34.8 ± 11.3 mg、14日目で 175.0 ± 62.9 mg、21日目で 264.4 ± 109.6 mg、5 mg群の7日目で 35.1 ± 30.3 mg、14日目で 192.0 ± 172.7 mg、21日目で 349.7 ± 292.7 mgであった。

21日目の推定腫瘍重量の比較では、治療群は対照群に対して有意に腫瘍の増殖が抑制された($p < 0.01$)。一方、治療群では各群間に有意差は認められなかった。

3. 副作用

対照群では体重は緩やかな増加傾向を示した。これに対し、治療群ではほぼ全例に体重減少を認めた(図3)。FR118487投与後21日目における投与前との体重比は、対照群 1.81 ± 0.04 、0.5 mg群 0.76 ± 0.07 、2 mg群 0.67 ± 0.15 、5 mg群 0.56 ± 0.04 と対照群と治療群では有意差を認め($p < 0.01$)、治療群では用量依存的に体重減少が著しい傾向にあった(0.5 mg群 vs 5 mg群, $p < 0.05$)。体重の減少度と抗腫瘍効果の間には相関を認めなかった。また治療群では45例中20例に下痢を認めた。特に5 mg群では15例中12例に高度の下痢を認め、21日目前後に全例死亡した。

4. microangiography 所見

対照群に対し腫瘍移植後2、4、7、14、21日目にmicroangiographyを施行し、以下の所見を得た(図4)。移植後2日目では腫瘍の存在は確認されず、腹壁の血管構造が数条の直線的な主血管と微細な分枝血管という形態で観察された。移植後4日目では腫瘍の存在が確認され、その周囲には腹壁血管からの微小血管の新生が認められた。移植後7日目には腫瘍の増大と共に、既存血管の圧排・屈曲および血管新生が著明となり、非腫瘍部には認められない密な血管網が形成されていた。さらに移植後14日目、21日目と腫瘍の増大および腫瘍周囲の血管網の発達はより著明であった。

剖面の所見では、移植後7日目では腫瘍血管は腫瘍周囲の皮下および腹膜側から発達し、腫瘍周囲の被膜に分布していた。血管の一部は腫瘍内への直接

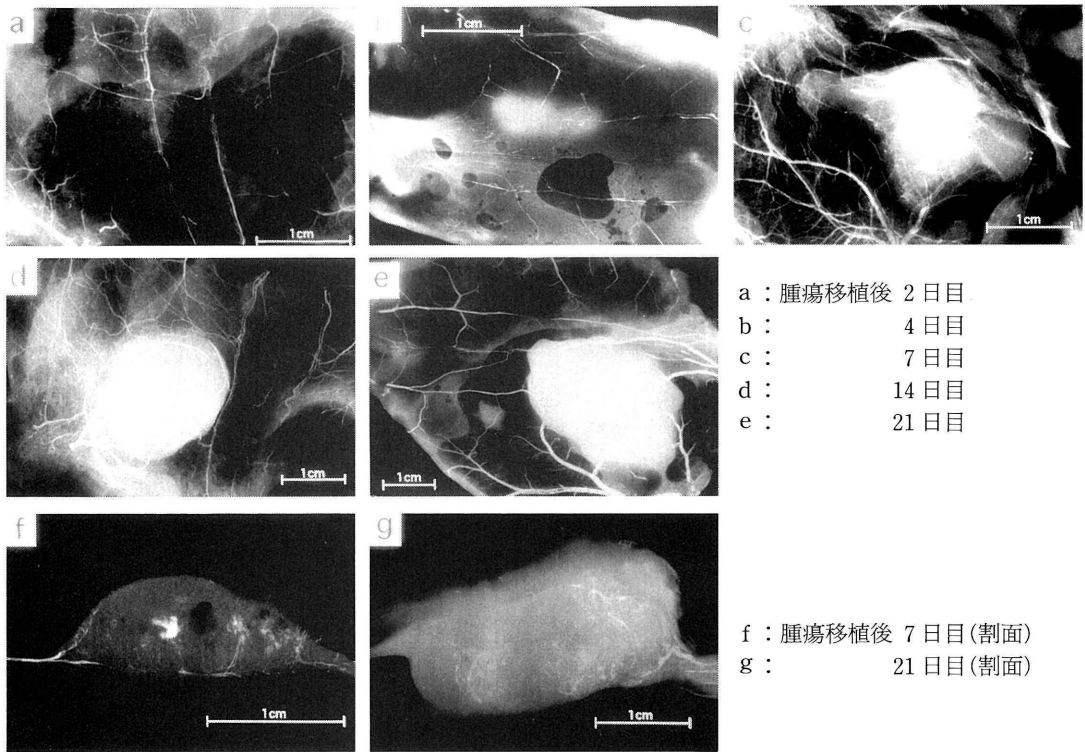


Fig. 4 microangiography 対照群

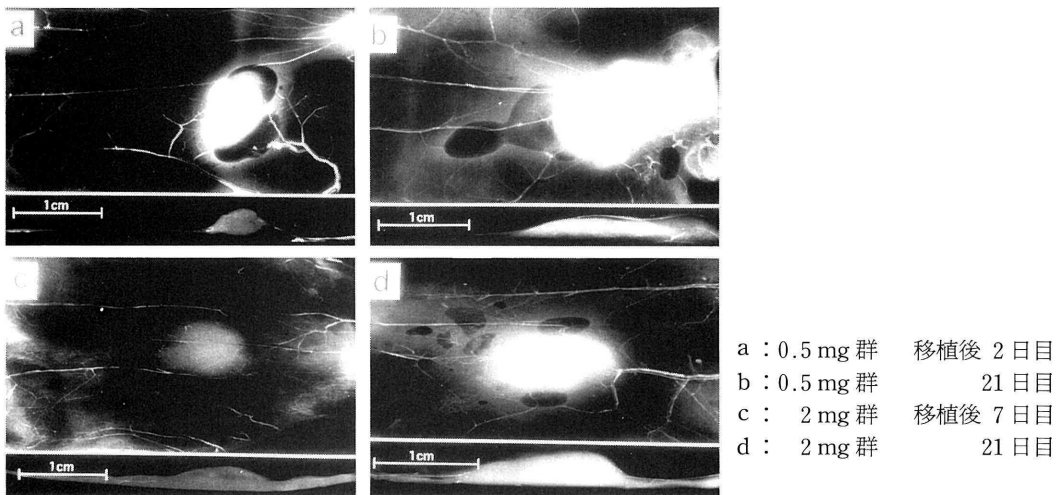


Fig. 5 microangiography 治療群

的侵入を認めたが、総じて腫瘍内は乏血管性であった。21 日目では腫瘍被膜に分布する血管網の発達を認めたが、腫瘍中心部にはほとんど血流は認められなかった。以上の結果をふまえ、血管新生が明らかとなる腫瘍移植後 7 日目と FR118487 投与終了した

21 日目に治療群の microangiography を施行した(図 5)。5 mg 群では死亡例が多かったため microangiography は施行できなかった。0.5 mg 群および 2 mg 群の 7 日目の所見では、対照群と比べ新生血管は繊細かつ散在性であった。また 21 日目においても

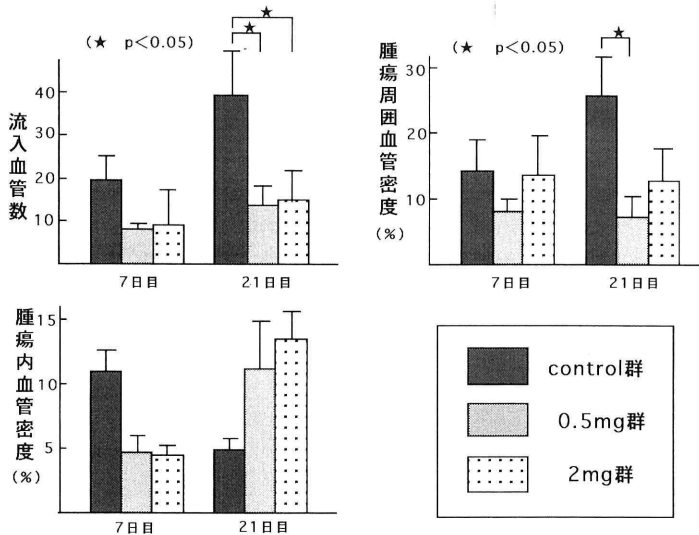


Fig. 6 microangiography の画像解析システムによる血管新生の評価
流入血管数は治療群で有意に少なかった。腫瘍周囲血管密度は0.5mg群で有意に低かった。腫瘍内血管密度は、21日目では対照群の方が低かった。

同様の所見であり、対照群のような密な血管網の形成はみられなかった。0.5mg群と2mg群との間には明らかな差異は認めなかった。

画像解析装置によるmicroangiographyの解析結果では(図6)、腫瘍に向かって分布する流入血管数はcontrol群7日目 19.8 ± 5.4 、21日目 34.8 ± 10.8 に対し0.5mg群7日目 8.5 ± 1.7 、21日目 14.0 ± 4.6 、2mg群7日目 9.5 ± 8.8 、21日目 14.5 ± 7.5 と21日目において両治療群で有意に抑制されていた($p < 0.05$)。腫瘍周囲の血管密度は対照群の7日目 14.4 ± 4.8 、21日目 23.0 ± 6.7 であるのに対し、0.5mg群では7日目 7.7 ± 2.3 、21日目 7.1 ± 3.2 、2mg群では7日目 13.6 ± 6.7 、21日目 12.6 ± 4.7 と治療群で低い傾向にあり、0.5mg群の21日目では有意に減少していた($p < 0.05$)。腫瘍内の血管密度は7日目では対照群 11.0 ± 1.7 、0.5mg群 4.8 ± 1.2 、2mg群 4.4 ± 0.8 と治療群が低いが、21日目では対照群 4.9 ± 0.8 に対し、0.5mg群では 11.2 ± 3.8 、2mg群では 13.4 ± 2.4 とcontrol群が低かった。

5. 病理組織学的所見

第VIII因子染色の所見(図7)では、血管内皮細胞が褐色に染色され、血管の同定は容易であった。血管は腫瘍辺縁の腫瘍細胞巣内と腫瘍周囲の間質内に密に分布する傾向にあり、腫瘍内部での血管増生はほとんど認められなかった。血管の分布密度は症例間では大きな差はなかったが、同一腫瘍内で血管が密に分布する部位と粗に分布する部位があった。

治療群では対照群と同様に血管は腫瘍辺縁に分布する傾向があった。総じて血管の分布は粗であったが、症例間の差は大きい傾向にあった。200倍視野による平均微小血管数は(図8)対照群の7日目 69.7 ± 9.3 、21日目 75.6 ± 11.5 となるのに対し0.5mg群では7日目 25.2 ± 18.7 、21日目 20.3 ± 7.0 、2mg群では7日目 17.1 ± 2.7 、21日目 13.1 ± 1.0 と7日目、21日目のいずれにおいても治療群で優位に抑制されていた($p < 0.05$)。

考 察

血管新生 angiogenesis は既存の血管から新しい血管網が形成される過程であり、胚の初期発生における血管形成 vasculogenesis とは異なる概念で用いられる。血管新生は性周期、妊娠時の胎盤形成や創傷治癒過程においてみられる以外に、リウマチ性関節症、糖尿病性網膜症など各種疾患にも認められる。

1970年代にFolkman¹⁾は固形腫瘍の増殖と血管新生の関性に注目し、腫瘍血管新生阻害による癌治療の可能性を示唆した。その後、血管新生過程の解明が進むと共に各種の誘導物質、阻害物質の特定が試みられてきた。血管新生誘導物質としてはFGF²⁾(Fibroblast growth factor)、VEGF³⁾(Vascular endothelial growth factor)、Interleukin-4⁹⁾などが報告され、VEGFは胃癌、乳癌等の臨床材料でもその発現が確認されており、腫瘍自身がこれらの誘導物質を分泌する可能性が示唆されている。

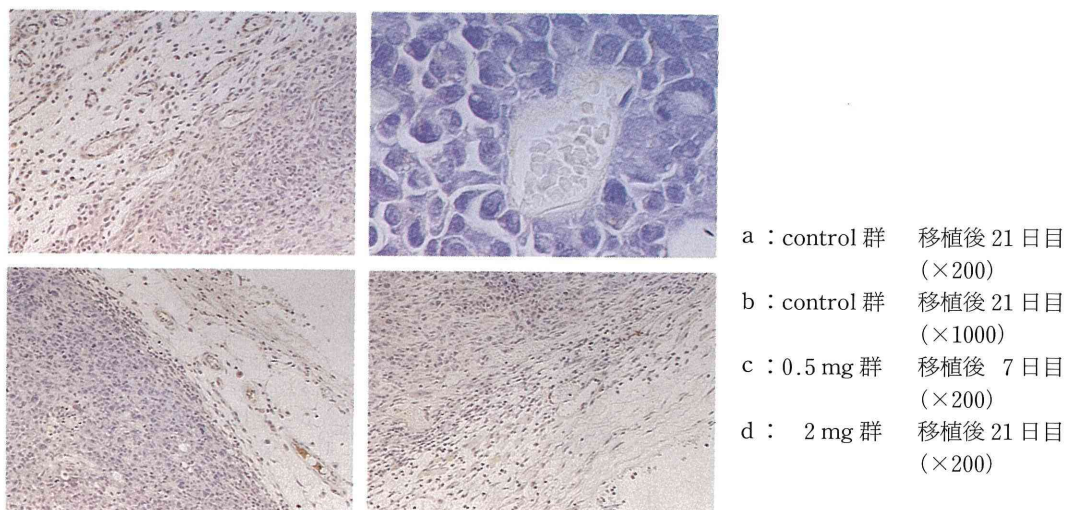


Fig. 7 第 VIII 因子関連抗原染色. 血管内皮細胞が褐色に染色されている.

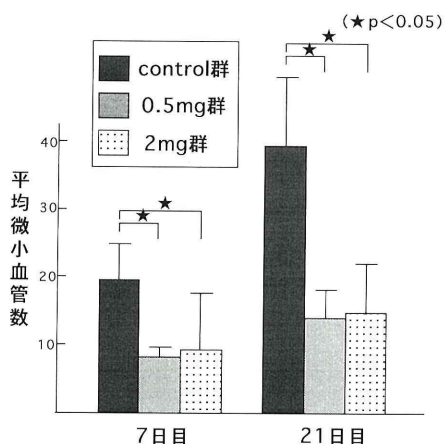


Fig. 8 第 VIII 因子関連抗原染色における平均微小血管数
治療群で微小血管数は有意に少なかった.

血管新生は①休止期にある血管内皮細胞の活性化, ②プロテアーゼ活性を発現した内皮細胞による基底膜の消化, ③内皮細胞の遊走・増殖, ④分化による内皮細胞の管腔化という一連の過程によっておこる.

したがってこれらの各過程のいずれかを抑制する因子は血管新生を阻害すると考えられ, これまで血管新生抑制因子として軟骨抽出物質¹⁰⁾, プロタミン¹¹⁾, 各種サイトカイン^{12,13)}, プロテアーゼインヒビター¹⁴⁾, ステロイド剤¹⁵⁾, 抗生剤¹⁶⁾等が実験的に報告されている.

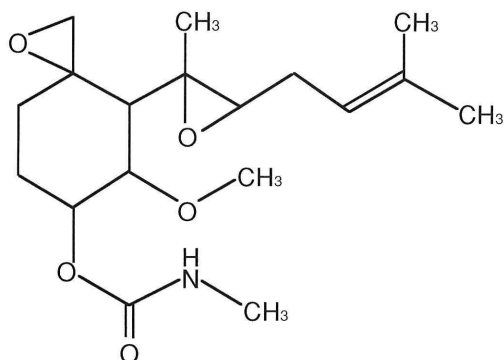


Fig. 9 FR 118487 の構造

最近報告されたカビ産生物質は内皮細胞の増殖, 管腔化を特異的に阻害するものとして注目されている. *Scolecobasidium arenarium* の産生物質 FR11142 の誘導物質 FR118487 (図 9) は, 血管内皮細胞増殖抑制, 血管新生抑制作用を持ち, その抑制能は原抽出物よりも高いことが確認されている^{3,4,5,17)}が, 腫瘍増殖抑制に関する報告はごく最近になり散見されるようになった¹⁸⁻²⁰⁾. 本研究では FR118487 の実験腫瘍に対する増殖抑制効果を検討すると共に, その効果発現機序としての血管新生の抑制状態を microangiography の画像解析, 第 VIII 因子染色による病理組織所見から検討した.

1. 抗腫瘍効果に関する検討

FR118487 の至適投与量や投与方法に関してはいまだ確立されていない. 堀ら²¹⁾は, 硝子体の血管新生

に対し10 mg/kg/dayの浸透圧ポンプによる全身投与で100%の抑制が可能であったと報告している。秋山ら¹⁹⁾のColon26腫瘍を用いた報告では10 mg/kg、1週間の皮下反復投与で腫瘍増殖が抑制されるが、投与中止後、抑制効果は減弱したとしている。今回の実験では、0.5 mg/kg/day~5 mg/kg/dayの用量域を設定し、安定した血中濃度を維持するため浸透圧ポンプによる少量持続投与を行った。これは皮下や腹腔内に埋設し、体液との浸透圧勾配により一定量を1週間持続排出するものであり、全身の血液中に広い濃度分布を示すことが確認されている²¹⁾。本研究では、治療群で有意な腫瘍増殖抑制作用がみられたが、その作用に用量依存性を認めなかった。すなわち今回の用量域では0.5 mg/kg/dayが至適であった。

2. 副作用に関する検討

FR118487と同じカビ産生物質であるAGM-1470を用いた報告例では、高用量での著明な体重減少が指摘されており²²⁾、治療域での体重減少の報告も多い。今回の実験では、FR118487でも用量依存的に体重減少が認められた。また高用量では高度の下痢を呈し、その全例が投与終了前後で死亡した。FR118487の高用量での強い毒性を示唆するものであり、臨床応用に際しては治療域の慎重な検討を要することが示唆された。

3. microangiography 所見の検討

control群のmicroangiography所見では、移植後2日目では血管新生は明らかでなく、4日目に腫瘍周囲の放射状に流入する微細な新生血管を認めた。ヌードマウスの皮下に移植された腫瘍は、移植後4日目頃より宿主から血管を誘導し、血行を有するようになるといわれている²³⁾が、今回の実験ではmicroangiography上で血行が確認されるのは、移植後3~4日目であることが判明した。その後時間の経過とともに腫瘍の増大傾向が明らかとなり、同時に腫瘍周囲に活発に新生血管が導入されていく様子が観察された。これに対し、FR118487投与群では、同様に血管新生が認められるものの、対象群と比較するとその血管は繊細かつ散在性で、明らかに血管新生が抑制されていた。また腫瘍の剖面像の観察では各群とも腫瘍内部は乏血管傾向があり、腫瘍の増大に伴い中心壊死のため血管の分布が粗となっていた。

これらの所見を客観的に解析するため、画像解析

システムによる分析を行った結果、流入血管数は治療群で有意に少なかった。また腫瘍周囲血管密度は治療群で低い傾向があり、0.5 mg群では有意差を認めた。以上のように、治療群で血管新生抑制が確認されたが、腫瘍内血管密度は腫瘍の増大に伴う中心壊死傾向が強く、血管新生の評価には不適と考えられた。

4. 第 VIII 因子染色所見の検討

microangiographyによる血管新生の評価は、造影剤の注入や、血液成分の除去に固体差があったことは否定できず、また画像解析システムでは非常に微細な血管は解析が困難であるという欠点があった。このため第 VIII 因子染色をおこない、病理組織的な血管新生の検討を加えた。

従来、腫瘍内の血管同定にはVictoria blueなどの弾性線維染色が用いられてきたが、この方法では毛細血管や細静脈のような弾性線維を欠く微細な血管は同定できなかった。一方第 VIII 因子染色では血管内皮が直接染色されるため、微小血管での染色性に優れているとされ²⁴⁾、本研究においても微小血管の同定には有用であった。

血管の分布をみると、そのほとんどが腫瘍辺縁及び周囲間質内に分布していた。加藤ら²⁵⁾の乳癌切除症例を対象とした報告でも微小血管の多数点はほとんどが腫瘍辺縁部であり、辺縁部の微小血管数が予後因子として重要であるとしている。

本研究では治療群で微小血管数が有意に減少しており、FR118487の血管新生抑制作用によるものと考えられた。本薬剤には直接の殺癌作用はないとされており³⁾、本研究における抗腫瘍効果はこの血管新生阻害作用によるものと結論づけられた。

以上よりFR118487の血管新生抑制による抗腫瘍効果が確認され、血管新生阻害剤の癌治療への有用性が示唆された。また血管新生が腫瘍自体が産生する物質によって促進されるとすれば、腫瘍自体を標的とする抗癌剤等の併用によって促進因子が除去されることになり、治療効果がさらに増強するものと考えられる。

結 語

1. 浸透圧ポンプを用いたFR118487の皮下持続投与法で有意な腫瘍の増殖抑制作用を認めた。0.5 mg/kg/day~5 mg/kg/dayの用量域では用量依存性は認められなかった。

2. 高用量では高度の体重減少と下痢が出現し、高用量での強い毒性が認められた。

3. microangiography および第 VIII 因子染色の分析より、血管新生阻害によりもたらされた腫瘍の増殖抑制は流入血管数および腫瘍周囲血管密度の減少、腫瘍辺縁の微小血管数の減少によることが確認された。

謝辞 稿を終わるに臨み、ご指導、ご校閲賜りました恩師小柳泰久教授に深甚なる謝意を表すとともに、本研究に当たりご指導、ご教授を頂きました日馬幹弘講師、多大なご協力を頂きました井上敬一郎先生はじめ東京医科大学外科学第三講座教員各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Fokman J: Anti-angiogenesis: New concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* **175**: 409~416, 1972.
- 2) Risau W: Vasculogenesis, angiogenesis and endothelial cell differentiation during embryonic development. The development of the vascular system. Feinberg RN, Sherer K and Auerbach R (eds), Karger, Basal, 1991, pp. 58~68.
- 3) Otsuka T, Okamura T, Shibata T, Oku T, Okuhara M, Terano H, Kohsaka M and Imanaka H: A new potent angiogenesis inhibitor, FR118487. *J Antibiotics* **45**: 348~354, 1992.
- 4) Terano H, Shibata T and Otsuka T: Angiogenesis inhibitors of microbial origin. *Drugs Fut* **18**: 239~247, 1993.
- 5) 柴田敏裕, 寺野紘: 血管内皮細胞を用いた増殖阻害剤の研究. *現代医療*. **26**: 1919~1923, 1994.
- 6) 動物実験委員会: 東京医科大学動物実験指針. *東医大誌*, **52**: 1994.
- 7) Folkman J and Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science* **235**: 442~447, 1987.
- 8) Ferrara N and Henzel WJ: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **161**: 851~858, 1989.
- 9) Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U, Drexler H, Wernstedt C, Hagiwara K, Usuki K, Takaku F, Risau W and Helden C: Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* **338**: 557~562, 1989.
- 10) Langer R, Brem H, Falterman K, Klein M and Folkman J: Isolation of cartilage factor that inhibits tumor neovascularization. *Science* **193**: 70~72, 1976.
- 11) Taylor S and Folkman J: Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* **297**: 307~312, 1982.
- 12) Baird A and Durkin T: Inhibition of endothelial cell proliferation by type β -transforming growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* **138**: 476~482, 1986.
- 13) Friesel R, Komiyama A and Mciag T: Inhibition of endothelial cell proliferation by Gamma-interferon. *J Cell Biol* **104**: 689~696, 1989.
- 14) Moses MA, Sudhalter J and Langer R: Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* **248**: 1408~1410, 1990.
- 15) Folkman J, Langer R, Lindhardt RJ, Haudenschild C and Taylor S: Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by Heparin Fragment in the presence of Cortisone. *Science* **221**: 719~725, 1983.
- 16) Tamargo RJ, Bok RA and Brem H: Angiogenesis inhibition by Minocycline. *Cancer Res* **51**: 672~675, 1991.
- 17) Kusaka M, Sudo K, Fujita T, Marui S, Itoh F, Ingber D and Folkman J: Potent anti-angiogenic action of AGM-1470: *Biochem Biophys Res Commun* **174**: 1070~1076, 1991.
- 18) 千葉井基泰, 千葉秀昭, 高橋宣暉, 秋山俊晃, 一志公夫, 黒田徹, 吉田忍: FR118487 の colon-26 移植腫瘍の血管新生及び増殖に及ぼす影響. *日本癌学会第 52 回総会記事*, 1993, p487.
- 19) 秋山俊晃, 千葉秀昭, 石川隆志, 千葉井基泰, 一志公夫, 柵山年和, 黒田徹, 吉田忍, 高橋宣暉: 血管新生阻害剤 FR118487 のマウス colon-26 腫瘍, 局所再発および創傷治癒に対する影響. *日癌治*, **29**: 1462, 1994.
- 20) 万田利孝, 西垣扶佐子, 中島秀典, 寺野紘, 下村恭一: FR118487 の血管新生阻害作用と抗腫瘍作用. *日本癌学会第 52 回総会記事*, 1993, p615.
- 21) 堀貞夫, 小関義行, 寺野紘, 柴田俊裕: 硝子体内血管新生の抑制—薬剤による抑制の可能性—. *あたらしい眼科*. **9**: 1187~1195, 1992.
- 22) Toi M, Yamamoto Y, Imazawa T: Antitumor effect of the angiogenesis inhibitor AGM-1470 and its combination effect with tamoxifen in DMBA induced mammary tumors in rats. *Int J Clinical Oncology* **3**: 525~528, 1993.
- 23) Mayer PA: Metabolism of lipids: II. Role of the tissues, Harper's review of biochemistry, p232, 20th Ed, Cap 18, by Martin DW et al., Maruzen Co. LTD. Tokyo, Japan, 1985.
- 24) 斉藤修, 笠原健弘, 三田村美紀子: 第 VIII 因子関連抗原の病理診断への応用とその問題点. *臨床検査* **28**: 1011~1018, 1984.

- 25) 加藤孝男, 木村垣人, 村木博, 神尾孝子, 藤井昭芳, 山本和子, 浜野恭一: 乳癌の血管新生についての臨床病理学的検討. 日外会誌 96: 709~717, 1995.

Experimental Study of the Anti-tumor Effects of Angiogenesis Inhibitor

Takashi HASHIMOTO and Tatsuya AOKI

Department of Surgery, Tokyo Medical College
(Director: Prof. Yasuhisa KOYANAGI)

Recent studies have reported cancer treatment by angiogenesis inhibitor because angiogenesis is essential in the development, progress, and metastasis of solid tumors. FR118487 has been reported to inhibit angiogenesis. However, few studies have focused on the ability of this drug to inhibit tumor proliferation. Furthermore, its optimal dose and administration route have not yet been established. This study was conducted to examine the inhibitory effect of FR118487 on the proliferation of AH60C in rats. This study also microangiographically and histopathologically examined its inhibitory effect on angiogenesis. The results showed that proliferation of AH60C was significantly inhibited in the treated group compared to the control group. The microangiographic analysis showed that the number of feeding blood vessels and the vascular density around the tumor were significantly lower in the treated group. Histopathological findings with factor VIII related antigen staining showed significantly fewer microvessels in the treated group. This drug, at high doses, produced adverse effects including cachexia and diarrhea.

<Key words> Angiogenesis Inhibitor, AH60C, Microangiography, Factor VIII relative antigen staining.
