

ラット肝転移モデルを用いた血管新生阻害剤 TNP-470 の 抗腫瘍効果の検討

只 友 秀 樹 伊 藤 伸 一

東京医科大学外科学第三講座

(指導：小柳泰久主任教授)

【要旨】 血管新生阻害剤 TNP-470 の血管内投与による肝転移抑制効果、延命効果をラットを用いた実験モデルにより検討した。まず TNP-470 の静注のための溶解法を HP- β -CyD を用い試みた。さらに液体クロマトグラフィーを用い溶解液の化学的安定性を検討した。F344 ラット雄、ラット大腸癌腫瘍株 ACL-15 を用い、脾臓に腫瘍細胞を移植し肝転移させ、TNP-470 溶液の静注による抗腫瘍効果を肝表面転移個数、生存期間を指標とし投与法、投与時期より検討した。投与法は連日 5 日間静注群、連日 7 日間持続静注群（経内頸静脈投与群と経門脈系投与群）とし、TNP-470 投与開始時期は脾注後それぞれ 7、14、21 日目とした。また UFT との併用増強効果の有無について検討した。さらにチャンパー法、第 VIII 因子関連免疫染色により、TNP-470 の抗腫瘍効果の血管新生への関与につき検討した。TNP-470 静注による抗腫瘍効果は経門脈系持続静注群で脾注後早期よりの投与で最も効果が高く、転移初期で血管新生が十分発達していない時期に投与を開始することが重要と考えられた。チャンパー法および病理学的検討では TNP-470、UFT いずれにおいても血管新生阻害作用がみられた。TNP-470 と UFT 併用群はそれぞれの単独投与群より高い抗腫瘍効果が認められ、UFT による増強効果が証明された。

はじめに

抗癌剤は手術で対処できない微小転移に対しても有効で、systemic な治療が可能のため癌治療における役割は大きい。しかし、多くの抗癌剤は正常細胞にも直接作用し殺細胞作用をもたらすため副作用の出現により治療の中断、あるいは投与量・投与期間の縮少を余儀なくされ、十分な抗腫瘍効果が得られないことも多い。そこで当然のことながら副作用が少なく、抗腫瘍効果の高い治療薬の開発が求られている。血管新生阻害剤は、血管新生における一過程あるいは複数の過程を阻むことで腫瘍内血管新生を阻害し、腫瘍増大抑制、転移抑制に働くものである。今回使用した TNP-470 は血管内皮細胞にのみ特異的に作用し内皮細胞の増殖を抑制することで血管新生阻害作用を発揮する^{1, 2)}。このため抗癌

剤で問題になる副作用の発現は少ないと考えられる。TNP-470 は難溶性物質のため溶解が困難であり、血管内投与のための確立した溶解法がなく、TNP-470 に関する実験報告の多くは皮下投与法によるものであった。そこで我々は独自に TNP-470 の溶解液として HP- β -CyD (hydroxypropyl- β -cyclodextrin) を使用することで臨床応用に向けた血管内投与法を考案し、ラットを用い 7 日間持続投与可能な動物実験モデルを新たに確立した。また肝転移モデルに対し TNP-470 の持続静脈内注射（以下持続静注と略す）および持続経門脈系静注をおこなった。これにより、TNP-470 の至適投与法、投与経路、投与時期、さらに臨床応用を前提とした抗癌剤の併用効果についても検討した。

2000 年 1 月 7 日受付, 2000 年 1 月 25 日受理

キーワード：TNP-470, Angiogenesis inhibitor, HP- β -CyD, UFT

(別刷請求先：〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学外科学第三講座 只友秀樹)

研究材料および方法

1. 実験動物および腫瘍

使用動物は300g前後のFisher系ラットF344の雄を用いた。ACL-15³⁾は脾臓注入後(以後脾注と略す)、肝転移したものを取り出し無菌的にRPMI Medium 1640溶液(GIBCO BRL製)に10%となるようにFetal Bovine Serum(GIBCO BRL製)を加えて培養液とし、38°Cの保温器にて培養、維持した。すべての実験は東京医科大学動物実験指針および動物実験委員会承認に基きエーテル麻酔下に行った。

2. 薬剤および溶解法

血管新生阻害剤としてTNP-470(AGM-1470)(武田薬品工業株より供与)、抗癌剤としてUFT(モル比;テガフル:ウラシル=1:4,大鵬薬品工業株より供与)を使用した。

TNP-470は常温下に極少量の無水エタノールを加えて溶かし、あらかじめ注射用蒸留水で溶解調整した40%HP-β-CyD(Aldrich社製)溶液を必要量加え充分攪拌して作製した。UFTは、0.5%HPMC(信越化学工業社製)溶液を溶媒として加え総量3mlとなるように作製した。

3. 溶媒40%HP-β-CyDの安全性

単回投与試験として、HP-β-CyD 500mgを3mlの注射用蒸留水に溶解し静注した。反復投与試験として、HP-β-CyD 100mgを1回量とし、1mlの注射用蒸留水に溶解し連日7日間静注した。いずれも対照は注射用蒸留水投与群とした。

4. TNP-470溶液の安定性

TNP-470溶液に対し以下の条件で液体クロマトグラフィーによる定量をおこなった。

Column: Shim-pack CLC-ODS (6.0 × 150 mm), Mobile phase: 50% Aceto-nitrile/50% water, Flow rate: 1.2 ml/min, Injection volume: 80 μl, Detection: 210 nm

室温(22~25°C)、冷所(4°C)および37°C子牛血清中におけるTNP-470溶液の濃度を経時的に測定し、TNP-470溶液の安定性を残存率より検討した。またTNP-470溶液(100mg/kg/2ml)をラットに静注し15分、30分後における血清中TNP-470濃度を測定し、TNP-470溶液の安定性をin vivoにて検討した。

5. TNP-470溶液の副作用

TNP-470溶液を尾静脈より隔日5回静注し、100日生存率、体重減少、下痢などの副作用について検討した。総投与量により以下に群別し、対照は生理食塩液投与群とした。(各群n=4)

A群: 30 mg/kg, B群: 50 mg/kg

C群: 100 mg/kg, D群: 200 mg/kg

6. 実験動物モデルの作製とモデルの評価

(1) 肝転移モデルの作製: エーテル麻酔下にラットを開腹し、1×10⁶個/0.5mlに調整したACL-15細胞浮遊液を27G針にて脾臓に注入し、肝転移モデルを作製した。

(2) 中心静脈持続静注モデルの作製: 4Frのアトムチューブ先端にポリエチレンチューブ(SP10(株)夏目製作所製)を接続し接続部をナイロン糸にてしばりカテーテルを作製した。右内頸静脈よりカットダウンにてカテーテルを挿入し、先端を上大静脈内に留置し固定した。薬剤を注入した浸透圧微注ポンプ(ALZET社, model 2ML1)にカテーテルを接続し作製した。同ポンプは浸透圧勾配により7日間持続注入が可能である。カテーテル、アトムチューブ、ポンプはすべてラット背部皮下に埋め込み、体動、かみつきによる損傷を防止した。

(3) 経門脈系持続静注モデルの作製: ラットを開腹し、回結腸静脈末梢枝より上記カテーテルを挿入固定した。薬剤を注入した浸透圧微注ポンプにカテーテルを接続した。カテーテル先端は上腸間膜静脈内に入らないように注意した。カテーテル、アトムチューブ、ポンプはすべてラット背部皮下に埋め込み、体動、かみつきによる損傷を防止した。

(4) 実験モデルの評価: 浸透圧微注ポンプに生理食塩液2mlを注入した中心静脈持続静注モデル、および経門脈系持続静注モデルの100日生存率を検討し、対照群と比較した。(各群n=6)

7. 実験群の作製と実験方法

各実験ともすべてTNP-470総量は30mg/kgとし、対照は生理食塩液投与群とした。

実験(1): TNP-470の投与方法

脾注後14日目より、以下の方法に従いTNP-470を投与した。(各群n=8)

① I.C.V. (intra caudal vein) 群: 脾注後14日目より、TNP-470溶液(6.0mg/kg/2.0ml/回)を連日5日間尾静脈よりone shot静注した。

② C.J.V. (continuous trans juglar vein) 群: 脾注

Table 2 Results of experiments

	Liver metastasis		Weight	Survival time (Days)	
	Number of Liver metastasis (mean \pm SD)	%	Weight loss (%) (mean \pm SD)	Survival time (mean \pm SD)	Survival rate (%)
Control	34.5 \pm 4.11	—	18.7 \pm 1.84	49.9 \pm 4.39	—
I.C.V.day14	31.0 \pm 3.90	90.0	18.3 \pm 2.09	49.6 \pm 3.85	99.4
C.J.V.day7	24.6 \pm 3.33	71.3	11.5 \pm 1.67	58.5 \pm 2.73	117.2
C.J.V.day14	26.0 \pm 3.46	75.4	12.4 \pm 2.22	56.3 \pm 3.01	112.8
C.J.V.day21	30.6 \pm 3.02	88.7	16.0 \pm 2.12	52.4 \pm 3.81	105.0
C.I.V.day7	20.3 \pm 2.71	58.8	9.5 \pm 1.84	63.3 \pm 2.71	126.9
C.I.V.day14	21.4 \pm 2.72	62.0	9.7 \pm 2.24	61.5 \pm 2.83	123.2
C.I.V.day21	26.1 \pm 3.23	75.7	13.5 \pm 2.48	53.9 \pm 3.27	108.0
UFT	24.8 \pm 2.96	71.9	10.9 \pm 2.44	59.1 \pm 3.02	118.4
UFT + C.I.V.day7	16.3 \pm 3.06	47.2	9.6 \pm 2.51	70.3 \pm 2.96	140.9
UFT + C.I.V.day14	16.8 \pm 3.20	48.7	9.7 \pm 2.52	69.9 \pm 2.85	140.1

後 14 日目に中心静脈持続静注モデルを作製し、TNP-470 溶液を 7 日間持続投与した。

③ C.I.V. (continuous trans iliocecal vein) 群：脾注後 14 日目に経門脈系持続静注モデルを作製し、TNP-470 溶液を 7 日間持続投与した。

実験 (2)：TNP-470 の投与開始時期

C.J.V. 群と C.I.V. 群の 2 群に対し、それぞれ以下の如く TNP-470 投与開始時期を変更し 7 日間持続投与を行った。(各群 n = 8)

day 7 群：脾注後 7 日目より 7 日間持続投与

day 14 群：脾注後 14 日目より 7 日間持続投与

day 21 群：脾注後 21 日目より 7 日間持続投与

実験 (3)：UFT の併用

UFT 単独投与：肝転移モデルに対し UFT 25 mg/kg/ 日を脾注後 7 日目より 20 日間連日投与した。UFT は経口ゾンテにて投与した。(n = 8)

TNP-470 および UFT 併用 (以下併用群と略す)：実験 (2) の結果より、最も抗腫瘍効果の高かった C.I.V. 法と UFT の併用実験をおこなった。

UFT + C.I.V. day 7 群：脾注後 7 日目より UFT 25 mg/kg/ 日で 20 日間連日投与と、TNP-470 の経門脈系持続静注 7 日間行った。(n = 8)

UFT + C.I.V. day 14 群：脾注後 7 日目より UFT 25 mg/kg/ 日で 20 日間連日投与と、脾注後 14 日目より TNP-470 の経門脈系持続静注 7 日間行った。(n = 8)

8. 効果判定および統計処理

効果判定は各実験ともすべて ACL-15 脾注後 28 日目の肝表面転移個数および体重減少率、さらに生存日数をもって評価した。結果は平均 \pm 標準偏差で

表わし、統計処理は実験 (1) および実験 (2) は投与法、投与時期について 2 因子の分散分析、実験 (3) は TNP-470 投与開始時期、UFT 併用についての 2 因子の分散分析でおこない $P < 0.05$ を有意とした。

9. チャンバー法

TNP-470 の抗腫瘍効果に血管新生が関与していることの確認としてチャンバー法^{4, 5)}を行った。

チャンバーの作製：ディフュージョンチャンバーリング (ミリポア社製) の両面に、メンブレンフィルター (ミリポア社製) を張り付け固定し、ガス滅菌した。1 \times 10⁶ 個/0.15 ml に調整した ACL-15 細胞浮遊液をチャンバー内に充填封入した。

チャンバーの移植および薬剤投与：ラット背部皮下にチャンバーを移植し、移植日より TNP-470 および UFT (30 mg/kg/日) の投与を開始した。

I.C.V. 群：TNP-470 溶液を 5 日間連日 one shot 静注した。

C.J.V. 群：TNP-470 溶液の中心静脈持続静注を 7 日間行った。

UFT 群：UFT 単独 7 日間経口投与した。

C.J.V. + UFT 群：UFT と TNP-470 溶液の中心静脈持続静注をいずれも 7 日間行った。

各群 n = 6 とし対照は薬剤無投与群とした。判定はチャンバー移植より 7 日目に実体顕微鏡を使用し新生血管数を計測した。新生血管は蛇行を示し、長さが 5 mm 以上のものと定義した。統計処理は t 検定をもって行い $P < 0.05$ を有意とした。

10. 病理組織学的検討

肝転移巣における血管の検出として、第 VIII 因子関連免疫染色を行った。免疫組織染色法は SAB 法

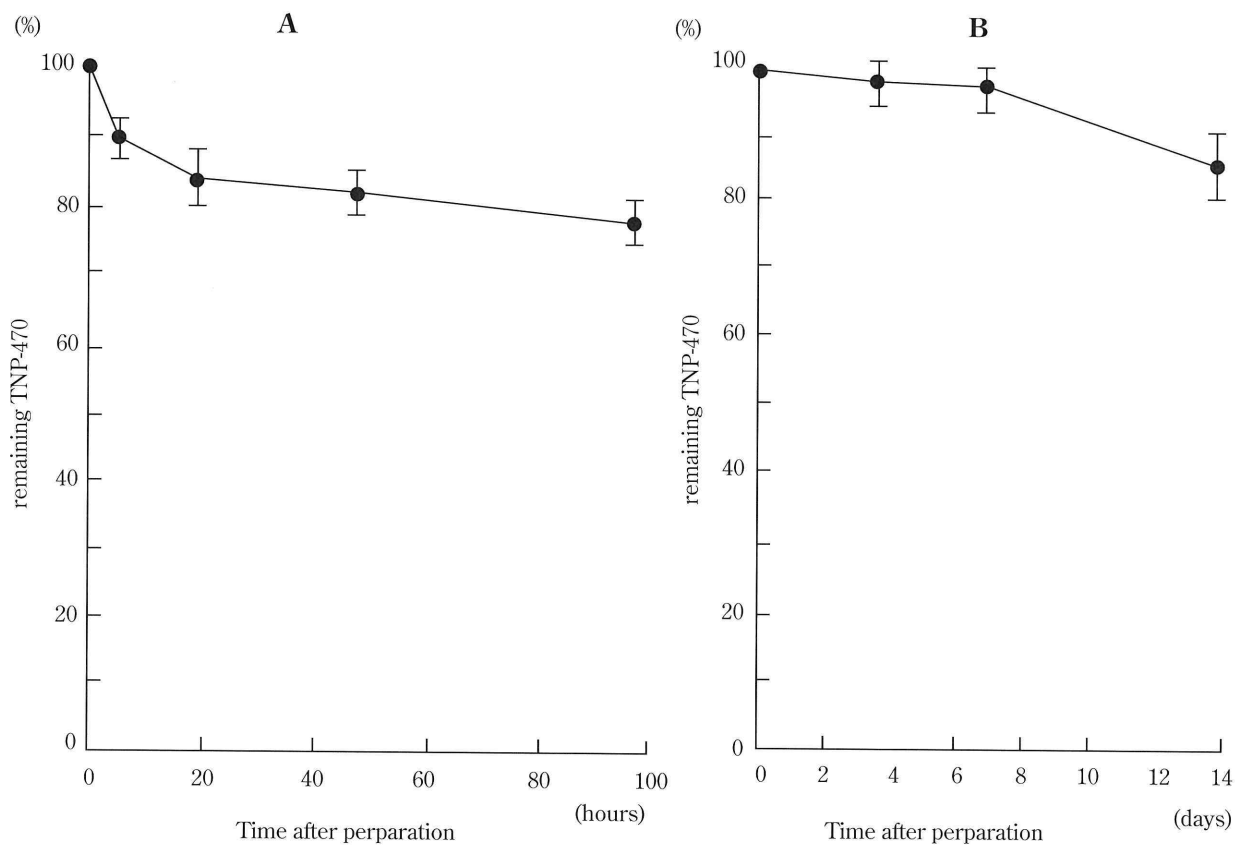


Fig. 1 A: Stability of TNP-470 solution kept in darkness at 4°C.
B: Stability of TNP-470 solution in the room environment.

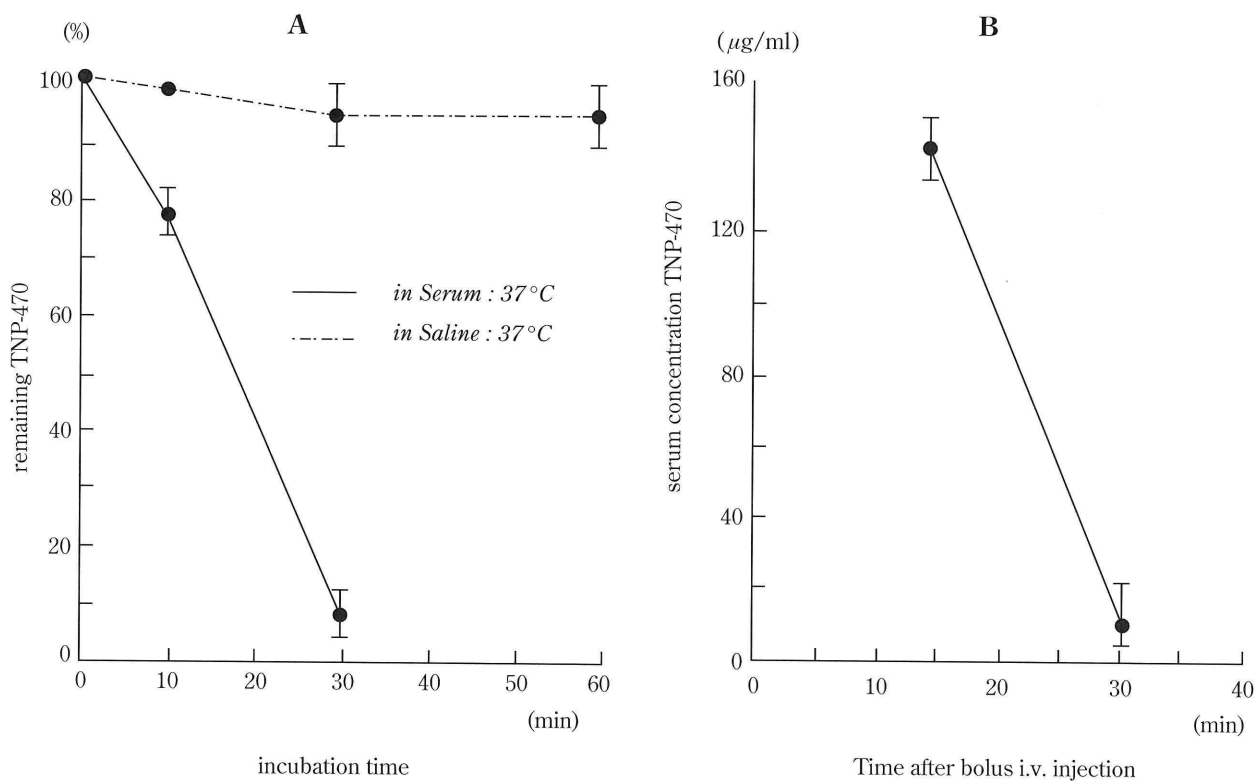


Fig. 2 A: Change in serum concentration of TNP-470 in rats after bolus i.v. injection of TNP-470 solution at a 100 mg/Kg.
B: Comparison of the stability of TNP-470 in serum and in saline at 37°C, in terms of remaining TNP-470.

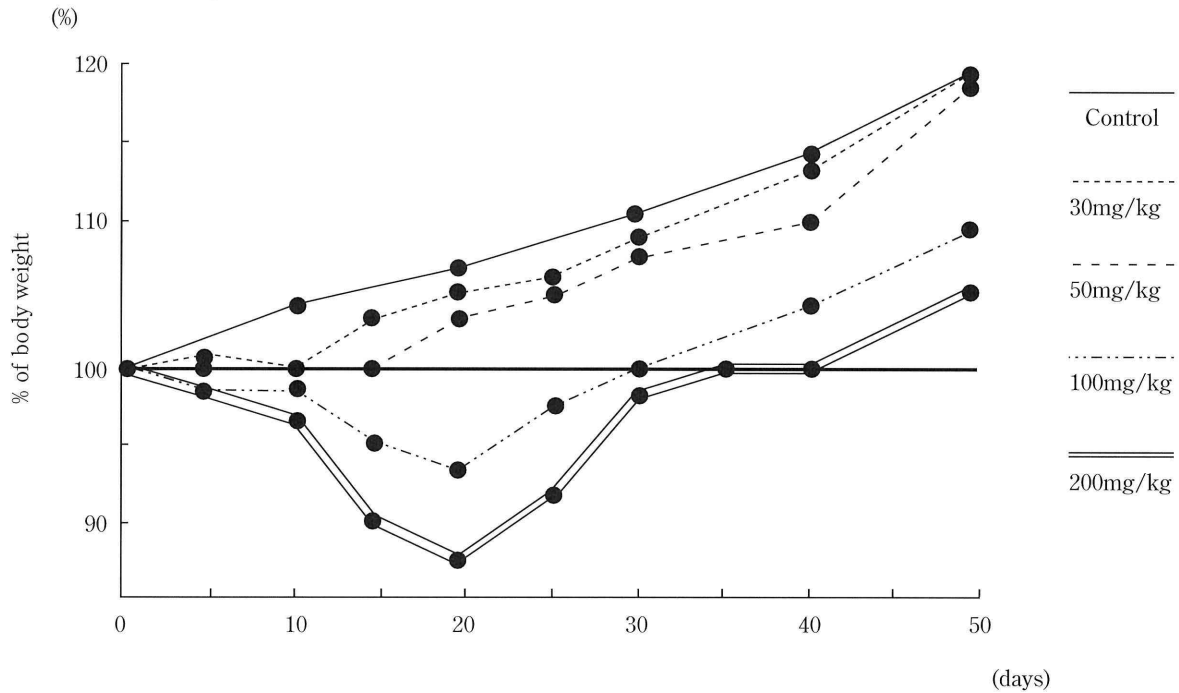


Fig. 3 Change in body weight after bolus i.v. injection of TNP-470 solution five times every other day at a total dose of 30, 50, 100, 200 mg/Kg.

を用い、トリプシン処理 (37°C, 30分) による抗原賦活処理を加えた。一次抗体は von willebrand factor ポリクローナル抗体 (Dako 社) を用い 2000 倍希釈とし、4°C, over night で反応させた。この他、陰性コントロールとして一次抗体を加えない標本を別に作製した。100 倍率 1 視野における血管数を計測し、各群 5 カ所における平均値を算出し比較検討した。対照は肝転移自然経過モデルとした。統計処理は t 検定を用い P < 0.05 を有意とした。

結 果

1. 溶媒 40%HP-β-CyD の安全性

単回投与試験、反復投与試験とも体重減少、活動性の低下は認めず溶媒 40%HP-β-CyD 溶液のラットへの影響はないと考えられた。

2. TNP-470 溶液の安定性

室温における残存率は溶液調整後 2 時間内で約 90%、この後徐々に減少し 20 時間までに 85%であった。20 時間以降は 80%前後で安定していた (Fig. 1A)。冷所 (4°C) では常温に比して安定性が高く残存率は 7 日間 95%以上であった (Fig. 1B)。また 37°C 子牛血清中残存率は、10 分で 80%弱、30 分後には 10% 前後まで低下した (Fig. 2A)。in vivo において TNP-470 溶液静注 30 分後では測定可能下

限であり、血清中 TNP-470 は投与後約 30 分でほぼ分解されることが示された (Fig. 2B)。これは in vitro での実験結果とほぼ一致した。

3. TNP-470 溶液の副作用

100 日生存率はすべての群で 100%であった。C 群、D 群で TNP-470 投与前体重を最大でそれぞれ $6.2 \pm 1.0\%$ 、 $13.1 \pm 1.3\%$ 下回った (Fig. 3)。A 群と B 群間で、体重減少に有意差はみられなかった。下痢は B 群、C 群、D 群でみられ、持続期間は B 群で 1.1 ± 0.9 日、C 群で 4.6 ± 1.2 日、D 群で 7.7 ± 2.3 日であった。TNP-470 投与量の増加に従い下痢持続期間の延長がみられ、TNP-470 静注による体重減少は消化器障害による下痢が関与している可能性が考えられた。

4. 実験動物モデル

100 日生存は中心静脈持続静注モデル 6 例 (100%)、経門脈系持続静注モデル 5 例 (83.3%) であった。経門脈系持続静注モデルの死亡例は術後 3 日目、術中出血過多によると考えられた。対照と比較して有意差はなく実験動物モデルとして確立されたと考えられた。

5. TNP-470 による抗腫瘍効果

1) ACL-15 脾注肝転移モデルの自然経過

肝表面転移個数は 1 週目 0 個、2 週目 8.2 ± 2.0 個、

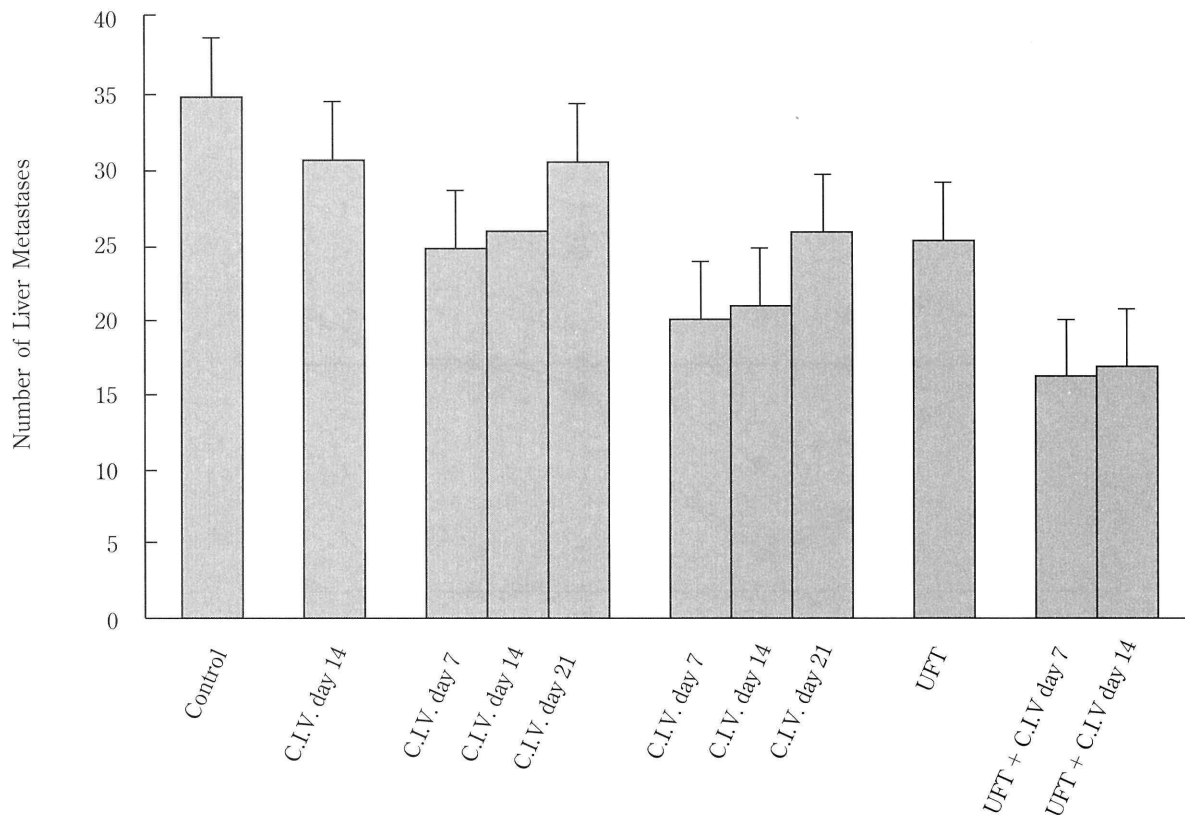


Fig. 4 The total number of metastases on the surface of the liver, 4 weeks after transplantation of ACL-15 ($1 \times 10^6/0.5$ ml) into the spleen.

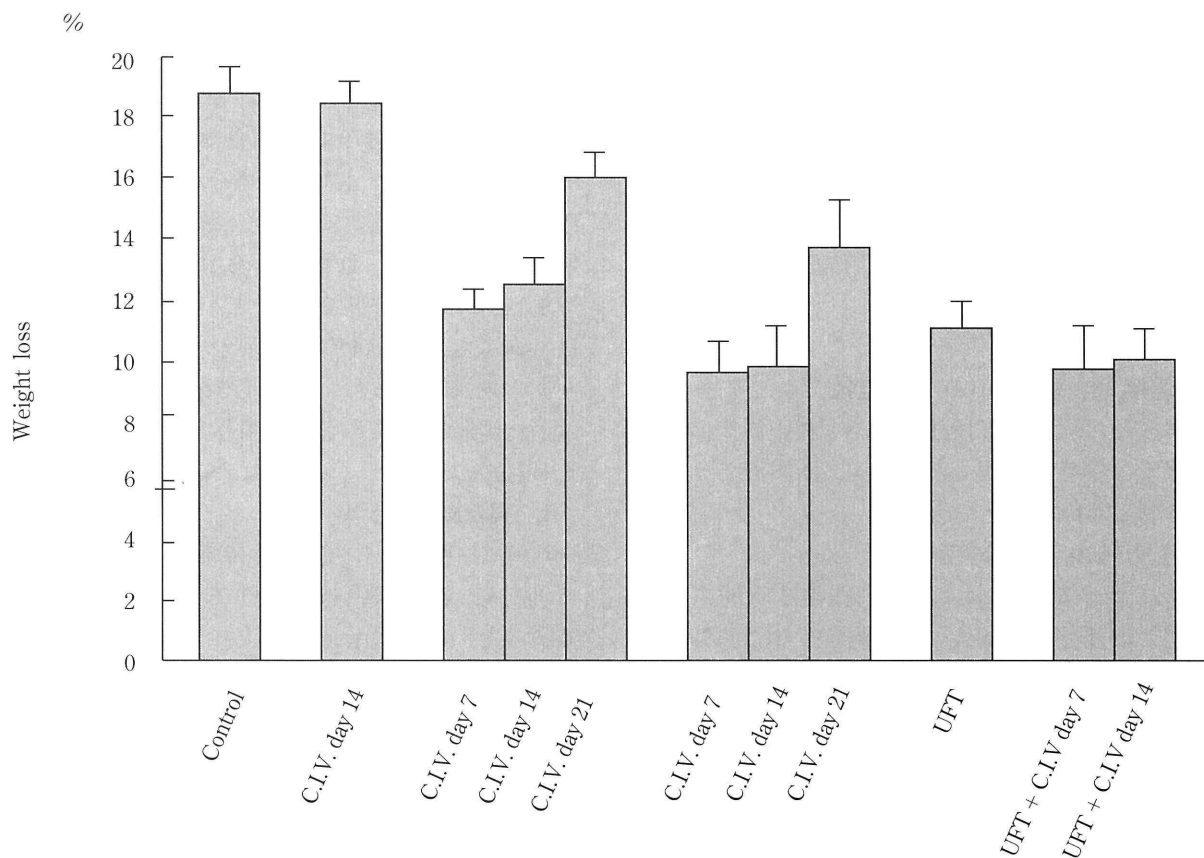


Fig. 5 Change in % of decrease in the body weight of rats treated by i.v. injection of TNP-470 solution and UFT.

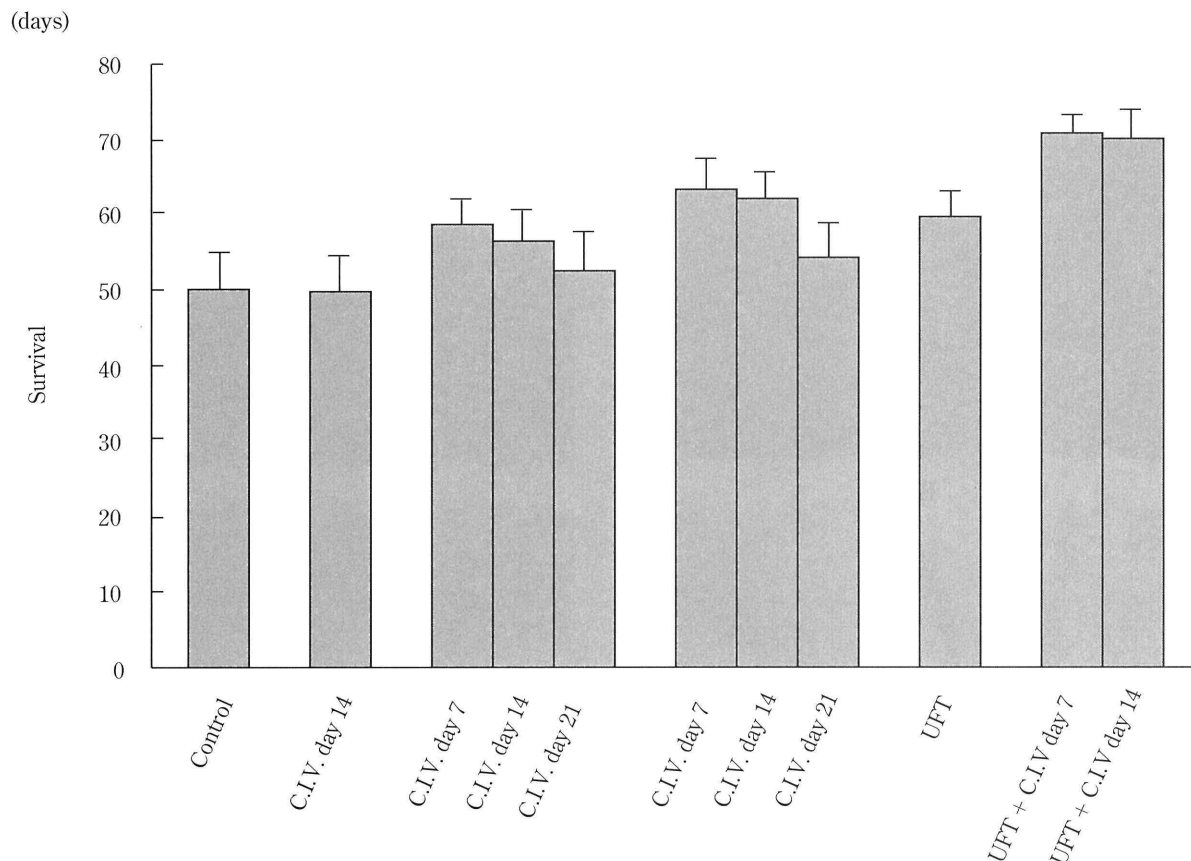


Fig. 6 Survival of rats treated by i.v. injection of TNP-470 solution

3週目 20.2 ± 3.3 個, 4週目 34.5 ± 4.1 個であった。体重減少は1週目 $0.8 \pm 1.4\%$, 2週目 $3.3 \pm 1.9\%$, 3週目 $10.3 \pm 2.1\%$, 4週目 $19.7 \pm 1.8\%$ であった。生存日数の平均値は 49.9 ± 4.3 日であった。

2) 肝表面転移個数

TNP-470投与方法では, I.C.V. 群は 31.0 ± 3.9 個, C.J.V. 群は 26.0 ± 3.5 個, C.I.V. 群は 21.4 ± 2.7 個であった。I.C.V. 群は対照群と比較して肝転移個数に有意差は認められなかったが C.J.V. 群, C.I.V. 群は対照群と比較して有意に肝転移が抑制されていた ($P < 0.001$)。TNP-470投与時期で比較すると (Table 1), C.J.V. 法, C.I.V. 法とも day7群と day14群の間には有意差はみられなかったが, day7群, day14群と day21群の比較で明らかな有意差がみられ ($P < 0.05$)。TNP-470による肝転移抑制効果は投与時期による因子が関与していると考えられた。C.I.V. 法の day21群と C.J.V. 法の day7群, day14群がほぼ同程度であり, C.J.V. 法で脾注後21日目よりの TNP-470投与群は C.J.V. 法で脾注後14日以内よりの TNP-470投与群とほぼ同程度の肝転移抑制効果

を示した。最も肝転移抑制効果のみられたものは C.I.V. day7群であった。

併用群でみると (Table 1), UFT 単独群は, C.J.V. day7群とほぼ同程度の肝転移抑制効果を示した。TNP-470および UFT それぞれの単独群と併用群の比較では有意な肝転移抑制効果がみられた ($P = 0.05$)。UFT + C.I.V. day7群と UFT + C.I.V. day14群のあいだには有意差はみられなかった ($P < 0.05$) (Fig. 4)。

3) 体重減少率

TNP-470投与方法では, I.C.V. 群は $18.3 \pm 2.1\%$, C.J.V. 群は $12.4 \pm 2.2\%$, C.I.V. 群は $9.7 \pm 2.2\%$ であった。TNP-470投与時期で比較すると (Table 1), C.J.V. day21群を除き全ての群において有意差がみられた ($P < 0.05$)。C.I.V. 法で早期 (脾注後1, 2週目) よりの TNP-470投与で体重減少が少なかった。

併用群でみると (Table 1), 併用群は C.I.V. day7群, C.I.V. day14群とほぼ同様の体重減少率を示した。UFT + C.I.V. day7群と UFT + C.I.V. day14群に有意差はみられなかった (Fig. 5)。

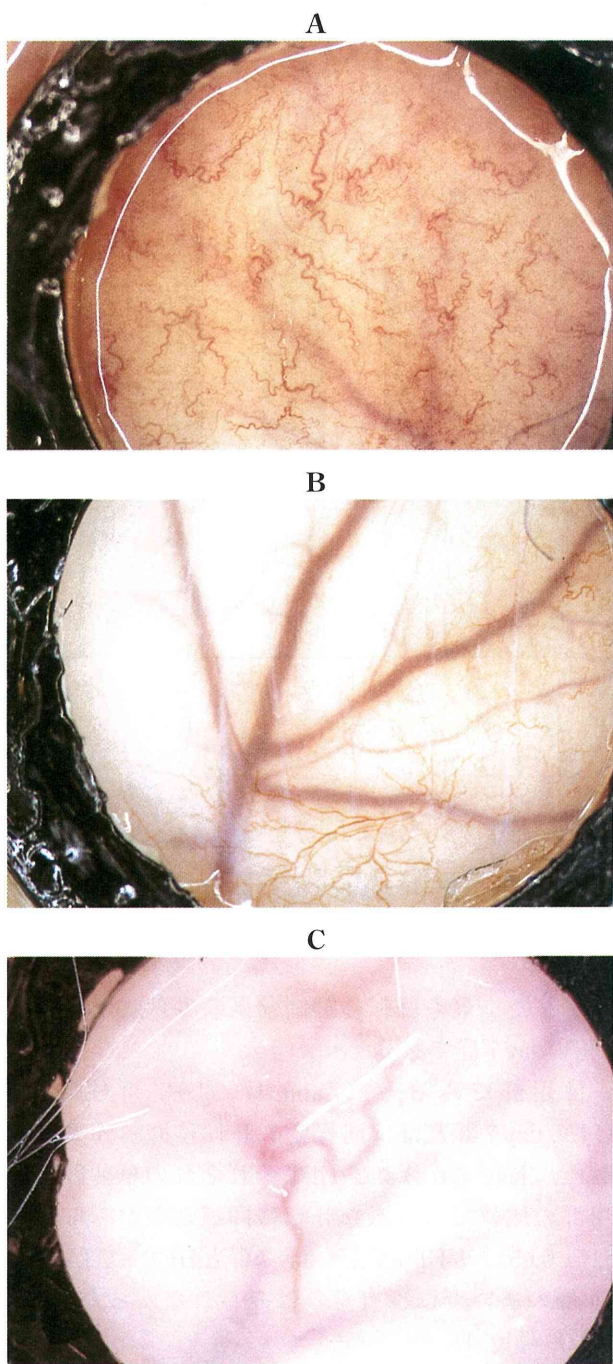


Fig. 7 Chambermethod

- A: control
- B: continuous (1 week) i.v. injection of TNP-470 solution
- C: continuous (1 week) i.v. injection of TNP-470 solution in combination with UFT

4) 生存日数

TNP-470 投与方法では、I.C.V. 群では 49.6 ± 3.9 日、C.J.V. 群では 58.5 ± 3.0 日、C.I.V. 群では 61.5 ± 2.8 日であった。対照群との比較で C.J.V. 群、C.I.V. 群は生存日数の延長がみられた ($P < 0.05$)。TNP-470

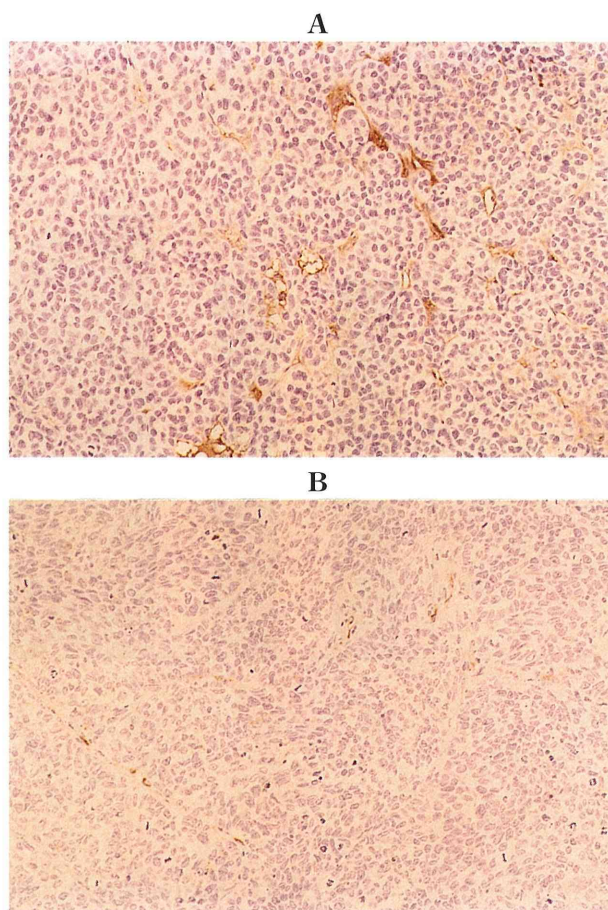


Fig. 8

- A: control
- B: Continuous (1 week) i.v. injection of TNP-470 solution into the peripheral of iliocecal vein in combination with UFT
Histopathological findings with factor VIII related antigen staining showed significantly fewer microvessels in the treated group.

投与時期で比較すると (Table 1), 対照群との比較では C.J.V. 法および C.I.V. 法の day 7 群, day 14 群において生存日数の延長がみられた ($P < 0.05$)。C.J.V. 法, C.I.V. 法のいずれも day 7 群, day 14 群間と day 21 群の間で生存日数の延長がみられ ($P < 0.05$)、生存日数に TNP-470 の投与時期が関与していると考えられた。

併用群でみると (Table 1), UFT 単独群は C.J.V. day 7 群と同程度の生存日数の延長がみられた。TNP-470 および UFT それぞれの単独群と併用群の比較では、生存日数に有意差はみられたが、UFT + C.I.V. day 7 群と UFT + C.I.V. day 14 群のあいだには有意差はみられなかった (Fig. 6)。

6. チャンバー法

新生血管数は対照群では 10.7 ± 2.2 本, I.C.V. 群では 9.8 ± 2.02 本, C.J.V. 群では 4.5 ± 2.1 本, UFT 群では 7.8 ± 2.2 本, UFT \pm C.J.V. 群では 3.8 ± 2.2 本であった. I.C.V. 群では血管新生抑制はみられなかったが, TNP-470 の持続静注群では血管新生抑制がみられた ($P < 0.05$). UFT は C.J.V. 群程ではないが, 血管新生抑制効果を示し, 抗腫瘍効果の作用機序として関与している可能性が示された. 血管新生抑制効果と抗腫瘍効果は比例しており, TNP-470 の抗腫瘍効果は血管新生阻害によることが示された (Fig. 7).

7. 病理組織学的検討

各群 5 ケ所における平均血管数は I.C.V. 群では 28.2 ± 2.5 本, C.J.V. day 7 群では 16.3 ± 1.9 本, C.I.V. day 7 群では 11.8 ± 2.1 本, UFT 単独群では 19.1 ± 1.4 本, UFT \pm C.I.V. day 7 群では 6.6 ± 1.0 本, 対照群では 30.1 ± 3.0 本であった. TNP-470 および UFT 投与による肝転移抑制効果, 延命効果が高い群ほど血管数が少なく, TNP-470 の抗腫瘍効果発現に血管新生阻害が大きな役割を果たしていることが裏付けられた (Fig. 8).

考 察

多くの腫瘍細胞は b-FGF, VEGF などの血管新生促進因子と抑制因子を産生分泌しており, これらのバランスが保たれているときは血管新生が生じないため腫瘍は微小なままで増大をおこさない⁶⁾. しかし両者のバランスが崩れると, 血管新生促進因子は活発に血管内皮細胞の増殖に働き, 周囲の既存血管より腫瘍内に新生血管を誘導して腫瘍内血管密度を増し, さらなる酸素や栄養分の補給を可能にして腫瘍は増大を始める. また血管新生促進因子で活性化された血管内皮細胞は PDGF-BB, HB-EGF, IL-6 などを産生し腫瘍細胞を刺激し, 腫瘍を増大させる⁷⁾. さらに腫瘍の増大と共に新生血管は転移路としての役割をも担うようになる. つまり癌は血管新生促進因子の増産により血管新生能を獲得し, 腫瘍内血管密度を増すことで悪性度が高くなると考えられる. 実際多くの癌において血管新生促進因子や腫瘍内血管密度の増大が, 悪性度および予後と相関関係にあることが確認されている^{8, 9)}. また原発巣と同様に転移巣における腫瘍の発育にも血管新生は不可欠であり, 転移先でも血管新生が生じなければ転移が成

立しないか, 転移巣は微小のまままでとどまることになる. 我々が実験に用いた TNP-470 は糸状菌 *aspergillus fumigatus* から精製されたフマギリンの誘導体であり, 強力な血管新生阻害作用を有する. その作用は血管内皮細胞を特異的に抑制することが *in vitro*¹⁰⁾, *in vivo*¹¹⁾ で示されている. 動物実験において腫瘍縮小, 転移抑制効果, 生存期間の延長がみられ, さらに抗癌剤の併用¹²⁻¹⁸⁾ およびサイトカインの併用^{19, 20)} により転移抑制, 生存期間の延長が増大することが報告されている.

1. TNP-470 の溶解法, 溶解液の特性

TNP-470 は難溶性物質であり動物実験における血管内投与のための溶解法が確立されていない. 蒸留水²¹⁻²³⁾ あるいは 5% glucose^{12, 24)} にて溶解し静注をおこなった報告があるが, 我々の検討では単独でほとんど溶解しなかった. これ以上の詳細な溶解法の記載がなく, また溶解液の安定性, 生体への影響も不明なため我々はまず TNP-470 の溶解法について検討をおこなった. HP- β -CyD は β -CyD の誘導体であり, その形成する空洞内部は疎水性, 空洞開口部は親水性を示し難溶性物質を取り込むいわゆる包接化が可能である²⁵⁾. この特徴に着目し, 難溶性物質である TNP-470 を蒸留水に溶かして調節した 40% HP- β -CyD 溶液にて包接化をおこない水溶性複合体として溶解を試みた. HP- β -CyD は CyD 類のなかでも毒性が低く医薬品, 食品添加物に使用されている²⁵⁾. 今回副作用実験によりラットに対する安全性が確認された. また液体クロマトグラフィーを用いた TNP-470 の化学的安定性実験, 血中停滞率実験より血清中の TNP-470 溶液の残存率は *in vivo*, *in vitro* いずれにおいても低く, 血中 (血清中) での分解が速いことが推察された. 40% HP- β -CyD 溶液を用いた溶解法は安全性, 溶解性については克服でき, 臨床応用への可能性も示された. さらに TNP-470 は血中 (血清中) での分解が速く, 薬効を十分発揮させるには血中濃度を一定に保てる持続投与が必要と考えられた.

2. TNP-470 投与方法について

TNP-470 溶液は血中での分解速度が速く, one-shot 静注では有効血中濃度の維持が困難であり, 対照群と比較しても I.C.V. 群は有意差がなく投与方法としては不適当であると考えられた. Yamaoka²⁴⁾, William²⁶⁾ らも TNP-470 溶液の静脈内投与は one-shot 静注よりも持続静注において高い抗腫瘍効果

が得られたと報告しており、TNP-470の有効な静注法としては血中での一定濃度が維持しやすい持続静注がよいと考えられた。さらに持続静注のなかでも肝転移巣周囲の毛細血管内 TNP-470 濃度を持続的に維持することができる C.I.V. 注がより有効であると考えられた。

3. TNP-470 投与開始時期について

肝転移モデルの自然経過において肝表面転移個数は、脾注後2週目を境に著増がみられた。これは脾注後2週目頃から内因性血管新生促進因子の刺激により、転移巣周囲毛細血管の内皮細胞の活性化がおり血管新生が増生を始め、この新生血管により肝転移が急速に増加したためと考えられる。

TNP-470 投与時期による肝転移抑制効果は脾注後2週目を境にして有意差が認められた ($P < 0.05$)。この結果より、転移巣周囲毛細血管の内皮細胞の活性化がおり、発育、増大に必要な血管新生が十分発達し、肝転移巣の著増した3週目以降よりの TNP-470 投与では効果が少ないと考えられた²¹⁾。これは血管新生促進因子の刺激で血管内皮細胞の活性が高値になると、血管内皮細胞に直接作用する TNP-470 の薬効が充分発揮できないことによると考えられる。

Yamaoka²⁴⁾らは、TNP-470の投与開始時期からの検討は行っていないが、持続静注にて腫瘍の縮小による生存期間延長率が183%になったと報告している。我々の実験においても、TNP-470の早期(脾注後1, 2週目)からの持続静注により対照群と比較して生存日数の延長がみられ、特に肝転移抑制の高い C.I.V. day 7, day 14 群において延命効果が高かった。肝転移抑制効果と延命効果に比例関係がみられ、血管新生阻害による肝転移抑制が生存日数の延長につながったと考えられた。

4. TNP-470と UFT 併用効果について

宇根、小川らは colon 26細胞を用い、*in vitro*において TNP-470の直接的な腫瘍増殖抑制作用を示唆している^{15, 16)}が、TNP-470の主作用は血管内皮細胞増殖抑制であり抗癌剤のごとく直接細胞に作用することは少ないと考えられる。このため抗癌剤と比較して(1)副作用が少ない。(2)薬剤耐性が生じにくい²⁸⁾、という利点がある。反面、腫瘍細胞に直接作用するのではないため転移巣、原発巣の増殖抑制はある程度可能でも根治性は期待できない。ゆえに抗癌剤、あるいはサイトカイン^{19, 20)}との併用

による抗腫瘍効果増強について検討がおこなわれている。TNP-470は血管新生を阻害し腫瘍への血流を減じることで抗腫瘍効果を発揮する。このため併用投与の場合、抗癌剤の腫瘍内移行の低下をきたす可能性がある。宇根らはこの点について TNP-470と抗癌剤の投与時期から検討をおこなっており、抗癌剤投与後に TNP-470 投与した群で最大抗腫瘍効果が得られ、同時あるいは TNP-470 投与後に抗癌剤投与した群では血管新生抑制により抗癌剤の組織内移行が減じたため抗腫瘍効果が低値であったと報告している¹⁵⁾。今回使用した UFT は、Shibata らによれば単独投与で腫瘍縮小効果、延命効果だけでなく血管新生抑制作用を持つことが報告されている²⁷⁾。UFT 併用群は、TNP-470 および UFT 単独群と比較して肝表面転移個数の減少、生存日数の延長がみられ併用増強効果が認められた。しかし UFT 先行投与 (UFT + C.I.V. day 14 群) と同時投与 (UFT + C.I.V. day 7 群) 間に有意差はみられなかった。TNP-470は血管内皮細胞の増殖を抑制することで新生血管の発達、出現を抑制することは可能でも、転移巣形成の初期の段階で腫瘍細胞の生着に必要なであった既存の血管に対しては効果を持たないと考えられる¹⁵⁾。転移巣の血管新生が極度に発達し増大している場合には抗癌剤先行投与後に TNP-470 を投与しないと既存の血管のみでは増大した腫瘍内に十分に抗癌剤分布がおこなわれず、宇根らのごとく抗腫瘍効果が低値となる可能性が高い。しかし転移形成初期の段階で転移巣が小さく血管新生が十分発達していない状況では、投与された抗癌剤は既存の血管によって腫瘍内に分布される可能性が高い。ゆえにこの段階では投与順序は抗腫瘍効果に影響はあたえる因子ではないと推測された。UFT + C.I.V. day 7 群と UFT + C.I.V. day 14 群の間に有意差は認めなかったことは、両群とも転移形成初期の段階で薬剤投与を開始したためと考えられた。TNP-470と抗癌剤の併用により、抗癌剤のみと同効果を得るのに抗癌剤総投与量を減じることができ、これにより副作用の出現を軽減できる可能性を秘めている。このことは QOL の立場からみても重要であると考えられる。

5. チャンバー法および病理組織学的検討

TNP-470による抗腫瘍効果が血管新生阻害に関与していることをチャンバー法および病理組織学的所見により検討した。その結果、TNP-470による抗腫

瘍効果が大きい群ほど血管新生抑制作用が強いことが、チャンパー法および病理組織所見にて証明し得た。以上より TNP-470 の抗腫瘍効果発現は血管新生阻害作用が大きく関与していると考えられた。また UFT は対照群と比較して血管新生抑制がみられ、抗腫瘍効果の作用機序に関与していると考えられた²⁸⁾。TNP-470 と UFT の併用群で最も高い抗腫瘍効果が得られたことは、両剤による血管新生阻害の相乗効果による可能性が高いことも病理組織学的に示唆された。

結 語

1) TNP-470 の血管内投与における溶解法を検討し、HP- β -CyD を用いることで臨床応用の可能性のある溶解法を確立した。

2) 血管内留置用カテーテルと浸透圧微注ポンプを用いて、ラットにおいて持続静注および経門脈系持続静注が可能な動物実験モデルを作製した。

3) TNP-470 の血中分解速度は早く、TNP-470 の血管内投与においてより高い抗腫瘍効果を得るには持続静注が必要と考えられた。

4) TNP-470 の投与方法、投与時期は抗腫瘍効果に影響を与える因子であり、経門脈系持続静注で脾注後14日以内の早期からの投与で最も抗腫瘍効果が高かった。

5) 抗癌剤併用により抗腫瘍効果の増強がみられた。

6) チャンパー法および病理組織学的検討により TNP-470 の抗腫瘍効果は血管新生阻害作用によることが証明された。また TNP-470 と UFT の併用による抗腫瘍効果の増強は各剤による血管新生阻害相乗効果による可能性が示唆された。

尚、本研究は平成 11 年度東京医科大学研究助成金の援助によった。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導、御高閲を賜りました東京医科大学外科学第三講座小柳泰久主任教授ならびに終始御助言を賜りました伊藤伸一講師に深甚な謝意を表します。また御協力頂きました当教室員、関係各位の皆様方には心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Ingber D, Fujita T, Kishimoto S : Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature*. **348** : 555~557, 1990
- 2) Kusaka M, Sudo K, Folkman J : Potent anti-angiogenic action of AGM-1470 : comparison to the fumagillin parent. *Biochem Biophys Res Commun*. **174** : 1070~1076, 1991
- 3) Kashima Y : ラット結腸癌細胞系 ACL-15 の確立、及びその転移特性の解析. *Biologica*. **39** : 75~81, 1991
- 4) 古井倫士, 福島雅典, 加藤竹俊, 景山直樹, 太田和雄 : 腫瘍血管新生因子のバイオアッセイ. *医学のあゆみ*. **125** : 759~771, 1983
- 5) 岩花倫生, 田中紀子 : 背部皮下法による血管新生測定法 : 癌の浸潤・転移研究マニュアル (癌転移研究会編集) 172~176 金芳堂 1994
- 6) Hanahan D, Folkman J : Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. **86** : 353~364, 1996
- 7) 漆崎一朗 : E-Tcell compartment model からみた癌化学療法と抗血管新生療法の併用. *癌治療と宿主*. **9** : 83~91, 1997
- 8) Porter J, Lippman K : Overview of the biologic markers of breast cancer. *Hematol. Oncol. Clin*. **8** : 73~100, 1994
- 9) Fujimoto K, Ichimori Y, Kakizoe T : Increased serum levels of basic fibroblastic growth factor in patients with renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. **180** : 386~392, 1991
- 10) Kusaka M, Sudo K, Matsutani E : Cytostatic inhibition of endothelial cell growth by the angiogenesis inhibitor TNP-470 (AGM-1470). *Brj Cancer*. **69** : 212~216, 1994
- 11) Yamamoto T, Sudo K, Fujita T : Significant inhibition of endothelial cell growth in tumor vasculature by an angiogenesis inhibitor, TNP-470 (AGM-1470). *Anticancer Res*. **14** : 1~4, 1994
- 12) Yamaoka M, Yamamoto T, Ikeyama S, Fujita T : Angiogenesis inhibitor, TNP-470 (AGM-1470) potently inhibits the tumor growth of hormone independent human breast and prostate carcinoma cell lines. *Cancer Res*. **53** : 5233~5236, 1993
- 13) Kato T, Sato K, Kakinuma H, Matsuda Y : Enhanced suppression of tumor growth by combination of angiogenesis inhibitor 0-(chloroacetylcrbamoyl) fumagillol (TNP-470) and cytotoxic agents in mice. *Cancer res*. **54** : 5143~5147, 1994
- 14) Teicher BA, Holden SA, Ara G : Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and

- with other anti-angiogenic agents. *Int J Cancer*. **57** : 920~925, 1994
- 15) 宇根良衛, 佐藤裕二, 近藤正男, 松岡伸一: BRMとしての血管新生阻害剤の意義. *癌治療と宿主*. **8** : 45~58, 1996
 - 16) 小川秀彰, 佐藤裕二, 宇根良衛: 血管新生阻害剤 TNP-470 と抗癌剤の併用. *癌治療と宿主*. **10** : 95~103, 1998
 - 17) 穴戸隆之, 伝野隆一, 八十島孝博, 向谷充宏, 山口浩司, 浦英樹, 佐藤昇志, 平田公一: 血管新生阻害剤による消化器癌肝転移抑制効果. *消化器癌の発生と進展*. **9** : 451~454, 1997
 - 18) Shishido T, Yaoshita T, Denno R, Mukaiya M, Sato N: Inhibition of liver metastasis of human pancreatic carcinoma by angiogenesis inhibitor TNP-470 in combination with cisplatin. *Jpn J Cancer Res*. **89** : 963~969, 1998
 - 19) 糸島崇博, 寺田信国, 山本均, 目片英治, 藤田益嗣, 西村彰一, 村田聡, 小玉正智: 血管新生阻害剤 TNP-470 の抗腫瘍効果についての検討. *Biotherapy*. **12** : 643~645, 1998
 - 20) Voest E E, Kenyon B M, O'Reilly: Angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J Natl Cancer Inst*. **87** : 581~586, 1995
 - 21) 高田 敦: 血管新生阻害剤 TNP-470 とカルボプチンの併用投与による肝転移抑制に関する実験的研究. *京府医大誌* **106** (9) : 823~830, 1997
 - 22) 東田 武: 血管新生阻害剤 TNP-470 による肝転移治療に関する実験的研究. *京府医大誌* **106** (12) : 1241~1248, 1997
 - 23) 菅沼 泰: 血管新生阻害剤による肝転移抑制に関する実験的研究. *京府医大誌* **105** (8) : 891~897, 1996
 - 24) Yamaoka M, Yamamoto T, Masaki T, Ikayama S, Sudo K, Fujita T: Inhibition of tumor growth and metastasis of rodent tumors by the angiogenesis inhibitor 0-fumagillol (TNP-470; AGM-1470). *Cancer Res*. **53** : 4262~4267, 1993
 - 25) 上田晴久: 製剤開発におけるシクロデキストリン類の有用性. *Proc Hoshi Univ*. **34** : 1~12, 1992
 - 26) William DF, James M, Richard M: The pharmacokinetics of TNP-470, a new angiogenesis inhibitor. *Pharmacotherapy*. **17** : 91~97, 1997
 - 27) Shibata J, Murakami K, Abe M, Hashimoto A, Utsugi T: Life prolonging effect of antitumor agents on postoperative adjuvant therapy in the lung spontaneous metastasis model in mice. *Antitumor Research*. **18** : 1203~1210, 1998
 - 28) 池山 崇, 須藤勝一: 血管新生阻害作用に基づく転移阻害剤の開発. **12** : 202~206, 1994

Antitumor effects of angiogenesis inhibitor TNP-470 on liver metastasis in rats.

Hideki TADATOMO, Shiniti ITOH

(Director: Prof. Yasuhisa KOYANAGI)

Third Department of Surgery, Tokyo Medical University

ABSTRACT

We examined the inhibition of liver metastasis and life prolonging effect by administrating of TNP-470 in a liver metastasis model, which was induced by infection of ACL-15 cells into the spleen. TNP-470 was dissolved in 40% HP- β -CyD solution and its stability was examined by liquid chromatography. TNP-470 was cleared rapidly from the circulation after i.v. injection. TNP-470 solution (total dose: 30 mg/kg) was given by one of three ways, bolus i.v. injection every 5 days, continuous injection in to the jugular vein for 7 days, and continuous injection into the iliocecal vein for 7 days. We started the administration of TNP-470 solution 7, 14 or 21 days after the injection of ACL-15 cells into the spleen. The antitumor effects combination with UFT was also examined. The effects were evaluated by numbers of metastatic colonies on the surface of the liver 4 weeks after transplantation, and also by the life prolonging effect. The method of continuous injection of TNP-470 solution in to the iliocecal vein in the early stage in combination with UFT was most effective. The chamber method and histopathological findings with factor VIII related antigen staining showed significantly fewer microvessels in the group of continuous injection of TNP-470 solution into the iliocecal vein in the early stage in combination with UFT. These results suggest that the administration of TNP-470 at an early stage, when the angiogenesis is not developed in the liver metastasis is important.

〈Key words〉 TNP-470, Angiogenesis inhibitor, HP- β -CyD, UFT
