

# ヌードマウス可移植性ヒト胃癌および食道癌株における 血管新生阻害剤 TNP-470 の抗腫瘍効果に関する研究

奈良県立医科大学第1外科学教室

棚瀬 真宏

## EFFECT OF ANTI-ANGIOGENETIC COMPOUND (TNP-470) ON HUMAN GASTRIC AND ESOPHAGEAL CANCER TRANSPLANTED INTO NUDE MICE

MASAHIRO TANASE

First Department of Surgery, Nara Medical University

Received November 29, 1995

*Abstract*: Recently angiogenesis is thought to be necessary for the growth and metastasis of solid tumors. Several anti-angiogenetic compounds which suppress the growth and metastasis of solid tumors have been developed. TNP-470 (o-chloroacetyl-carbamoyl fumagillol), an anti-angiogenetic compound, strongly suppresses the growth of epithelial cells. We determined the effects of TNP-470 alone and in combination with hyperthermia, CDDP or radiation on human gastric and esophageal cancer subcutaneously inoculated into nude mice. In addition, we investigated the effect of TNP-470 on an experimental liver metastasis model using human gastric cancer transplanted into nude mice. The results of experiments using human gastric and esophageal cancer subcutaneously inoculated into nude mice are as follows: 1) TNP-470 alone suppressed the growth of both gastric and esophageal cancer, 2) combination treatment of TNP-470 with hyperthermia suppressed the growth of both gastric and esophageal cancer more strongly than either alone, and 3) it was more effective than the combination treatment of TNP-470 with CDDP or radiation. This study of experimental liver metastasis model demonstrated that TNP-470 alone did not suppress liver metastasis.

### Index Terms

anti-angiogenetic compound, hyperthermia

### 結 言

現在のところ進行した消化器癌に対し、切除可能例には積極的な外科的切除に加え化学療法を中心とした補助療法が行われ、切除不能例には、化学療法、放射線療法、温熱療法などの集学的治療が行われている。しかし、これらの抗癌療法の成績はいまだ満足できるものではなく、より効果的な治療法すなわち血管新生阻害などの腫瘍のもつ特性を利用した治療法の確立が望まれる。

血管新生に関する研究の歴史は1939年、まずIdeら<sup>1)</sup>

がウサギ外耳に epithelioma を移植し周囲への血管新生を確認したことにさかのぼる。1980年代に入り抗腫瘍を目的とした血管新生阻害剤の研究が進みコラゲナーゼ阻害活性を示す軟骨組織抽出物<sup>2)</sup>、プロタミン<sup>3)</sup>、ヘパリン存在下に血管新生阻害をおこす angiostatic ステロイドと呼ばれる物質など<sup>4)</sup>が相次いで報告されるようになった。1990年には Ingber ら<sup>5)</sup>が、アスペルギルス糸状菌より抽出したフマギリンが血管内皮細胞の増殖を抑制することを発見し、マウスの腫瘍に対しても腫瘍増殖が抑制されることを報告したが、強い毒性のため長期投与が不

可能で、抗腫瘍効果も不十分であった。そこでフマガリンをアルカリ加水分解して作製した誘導体のなかから血管内皮細胞に対しより強い増殖抑制作用を有し、かつ毒性の弱い O-(chloroacetyl-carbamoyl)fumagillol (TNP-470) (以下 TNP) が合成された。本剤は目下、アメリカにおいてヒトのコポジ肉腫に対する臨床試験薬としての検討がおこなわれているが<sup>9)</sup>、これ以外のヒト悪性腫瘍に対する治療効果については、いまだ検討されていない。また TNP と他の抗癌療法との併用効果や転移巣に対する抗腫瘍効果に関する報告も少なく、基礎的検討が必要である。

さらに腫瘍の転移の過程、すなわち腫瘍の原発巣の発育<sup>7)</sup>や原発巣から腫瘍細胞が逸脱する際<sup>8)</sup>にも血管新生の重要性が報告されており血管新生阻害剤の転移抑制効果についても期待されるところである。

本研究では、ヌードマウス可移植性ヒト胃癌および食道癌株を用い、1) TNP の腫瘍増殖抑制効果およびその副作用、2) TNP と温熱処置、放射線照射および化学療法剤などとの併用による抗腫瘍効果、3) 実験的肝転移モデルにおける TNP の転移抑制効果などに関し基礎的研究を行い、臨床応用の可能性について検討した。

### 実験材料および方法

#### A. 実験動物

動物はヌードマウス、BALB/cAJcl-nu(日本クレア、

大阪)、6-8 週齢、雄を用いた。

#### B. 移植腫瘍

腫瘍は教室で皮下継代しているヌードマウス可移植性ヒト胃癌株(NSC-8、NSC-28)および食道癌株(ESO-2)を用いた。NSC-8は、67歳女性に発生した Borrmann 3 型の進行胃癌の原発巣より採取し、ヌードマウス皮下継代移植により樹立した低分化腺癌株で、今回は皮下継代 51 代と 55 代の腫瘍を用いた。NSC-28 は、62 歳男性に発生した Borrmann 2 型の進行胃癌の肝転移巣より採取し、ヌードマウス皮下継代移植により樹立した低分化腺癌株で、今回は皮下継代 28 代の腫瘍を用いた。ESO-2 は、62 歳男性に発生した進行食道癌の原発巣より採取し、ヌードマウス皮下継代移植により樹立した中分化扁平上皮癌株で、今回は皮下継代 25 代と 33 代の腫瘍を用いた。

#### C. 血管新生害剤

TNP は Fig. 1 に示すような構造式を呈し、武田薬品生物研究所より供与されたものを使用した。投与方法は、99%エタノールで溶解後、攪拌しながら生理食塩水で希釈し、この溶液を移植腫瘍より離れたヌードマウスの背部皮下に皮下投与した。

#### D. 皮下移植方法

皮下移植は腫瘍を Eagle の最小必須培地(minimal essential medium: MEM)(阪大微生物研究所、大阪)に浸漬し、2-3 mm 角に細切後、2-3 個の細片を移植針を用いてマウス背部または大腿部皮下に移植した。移植腫瘍

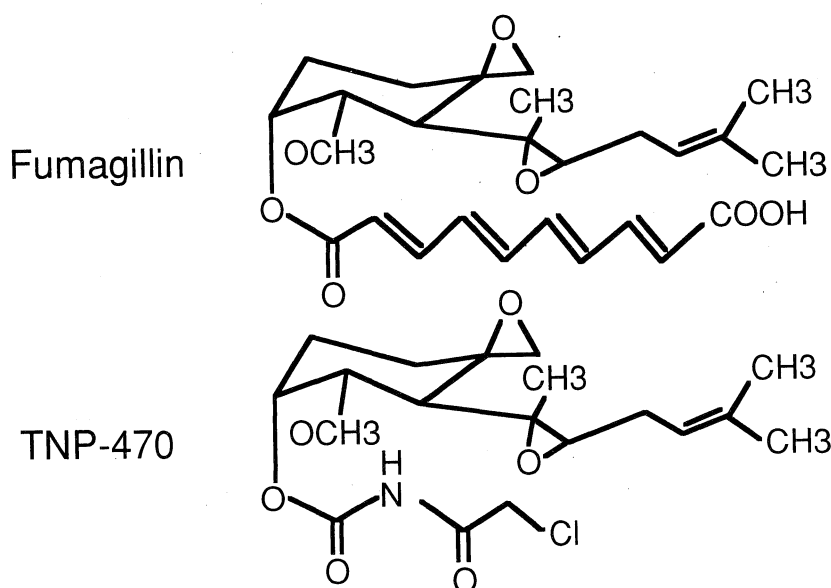


Fig. 1. Structure of fumagillin and o-(chloroacetyl-carbamoyl) fumagillol (TNP-470).

の大きさは、週に2回ノギスを用いて長径(mm)と短径(mm)を計測し、腫瘍の長径が7-8mmになった時点で実験を開始した。

E. 腫瘍の計測および評価方法

計測した長径(mm)と短径(mm)より、推定腫瘍重量を  $W = (a \times b^2) / 2$  (W:重量, a:長径, b:短径)の式を用いて概算し、相対腫瘍重量を  $R_n = W_n / W_0$  (W<sub>0</sub>:実験

開始日の腫瘍重量, W<sub>n</sub>:実験開始 n 日後の腫瘍重量)の式より求めた。T/C は、実験群の平均腫瘍重量/コントロール群の平均腫瘍重量の式より求めた。統計学的有意差の検定には Student's t 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意とした。

F. 脾臓内移植による実験的肝転移の作製および転移の検索

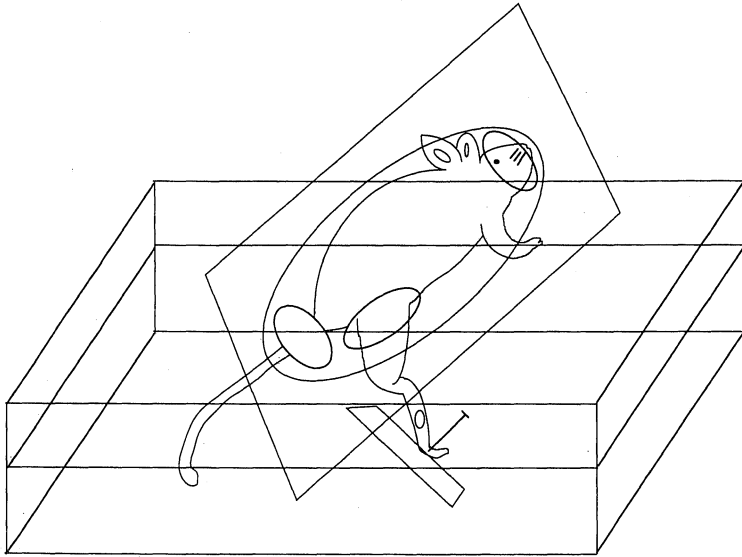
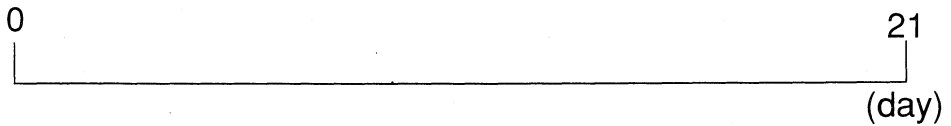


Fig. 2. Schema of Hyperthermia.

Control group<sup>1)</sup>



TNP-470 group<sup>2)</sup>

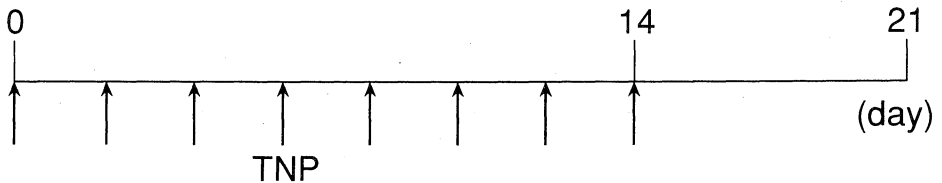


Fig. 3. Effect of TNP-470 on subcutaneously (s.c.) heterotransplanted tumor in nude mice.

1): No treatment.

2): TNP-470 (30 mg/kg) is s.c. injected three times a week for two weeks.

皮下移植腫瘍を摘出し、MEM 中でメスにて細切後、0.25% (W/V) トリプシン溶液(阪大微生物研究所, 大阪)内で 37℃ にて 15 分間消化し、この溶液を 1000 rpm で 5 分間遠沈後、10% 仔牛血清加 MEM にてトリプシンを除去してメッシュ (100 mesh/cm<sup>2</sup>) を通し、MEM で洗浄して腫瘍細胞浮遊液を作製した。浮遊液中の癌細胞は、トリパンブルー色素排除テストにて 90% 以上生存していることを確認した。腫瘍細胞数は白血球算定板を用いて算出し 5×10<sup>6</sup> 個/ml に調製した。

脾臓内移植は、エーテル麻酔下にヌードマウスの左側腹部に約 1 cm の小切開を加えて開腹し、脾臓を露出させて直視下に脾下極より 0.2 ml (1×10<sup>6</sup> 個の細胞) の腫瘍細胞浮遊液を 21 ゲージ針で注射して行った。約 1 分後脾臓を摘出し、腹壁および皮膚を縫合閉鎖した。

G. 温熱処置

Fig. 2 に示すように、ヌードマウスをわれわれの考案したプラスチック製の容器に入れ、ヌードマウスの右下腿をピンで固定し、43℃ の温水槽に 30 分間右大腿部まで十分につけて行った。

H. 放射線照射

温熱療法と同じ装置を用いてヌードマウスを固定し、体動でずれないように特製の発泡スチロール板で完全固定し、腫瘍部のみに医療用 Liniac を用い 10 Gray の線量を照射した。

I. 組織学的検討

実験摘出標本より腫瘍部を採取し、H. E. 染色および新生血管の指標として血管内皮細胞が染色されるマウス CD 31 に対するラットモノクローナル抗体<sup>10)</sup>を用いて免疫組織学的染色を行い顕微鏡下に検討した。免疫組織学的染色方法は、腫瘍を O. C. T. compound (Miles 社, USA)

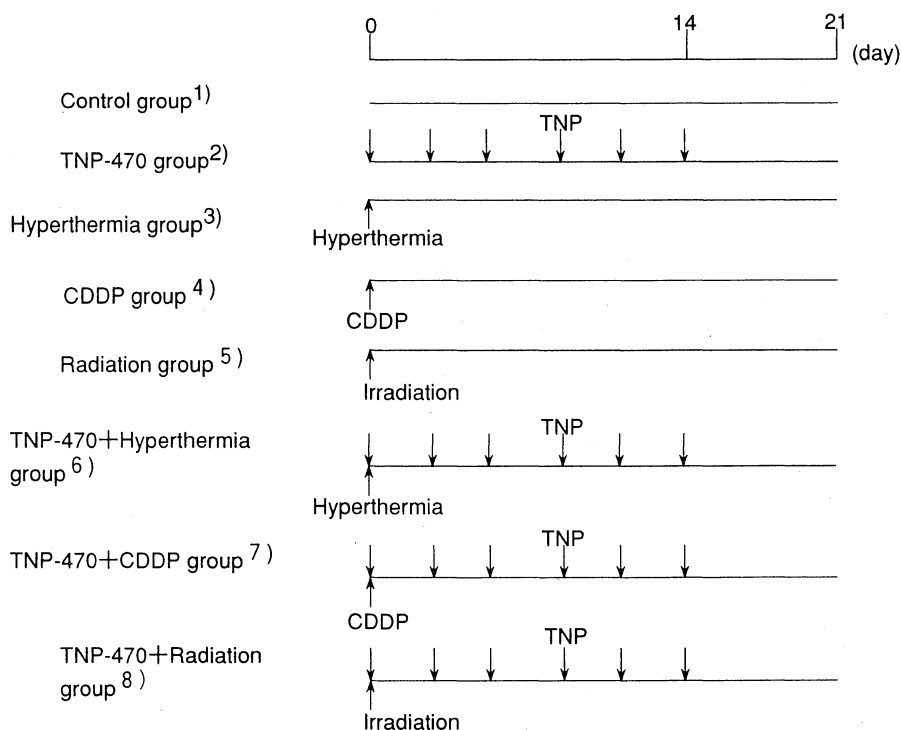


Fig. 4. Effect of TNP-470 with hyperthermia, radiation and CDDP on s.c. tumor.  
1) : No treatment. 2) : TNP-470 30 mg/kg is s.c. injected three times a week for two weeks. 3) : Hyperthermia is done by 43 °C water bath method for 30 min. 4) : CDDP (8 mg/kg) is intraperitoneally (i.p.) injected at one time. 5) : irradiation of Linia (15 gray). 6) : TNP-470 30 mg/kg is s.c. injected three times a week for two weeks after hyperthermia. 7) : TNP-470 30 mg/kg is s. c. injected three times a week for two weeks after i.p. injection of CDDP. 8) : TNP-470 (30 mg/kg) is s.c. injected three times a week for two weeks after irradiation.

にて包埋, 液体窒素で迅速凍結し, クライオスタットで  $6\ \mu\text{m}$  に薄切後, poly-L-lysine コーティングスライドに接着させ風乾した. アセトン固定の後, Avidine-Biotin-Complex(ABC)法にて以下のごとく施行した. すなわち, まず phosphate buffered saline(PBS)にて洗浄し, 内因子ペルオキシターゼの除去操作の後, 非特異的反應をブロックするため正常ウサギ血清にて 20 分間反應させた. 一次抗体としてマウス CD 31(Vector 社, USA) に対するラットモノクローナル抗体を用いて室温湿室内で 2 時間反應させた. PBS にて洗浄後, 二次抗体としてビオチン化抗ラット IgG ウサギ血清(Vector 社)にて 30 分間反應させ, さらに洗浄後, ABC complex(Vector, USA)にて 2 時間反應させた. 最後に 3, 3-diaminobenzidine にて発色させ, Mayer Hematoxylin で核染色し, 封入の後, 光顕下に観察した.

#### J. 実験

1) TNP 単独投与による抗腫瘍効果および副作用の検討

NSC-8, NSC-28, ESO-2 の皮下腫瘍を用い Fig. 3 に示すように各々, コントロール群, TNP 投与群(TNP 群)の 2 群を作製した. NSC-8, ESO-2 株の匹数は各々 10 匹とし, NSC-28 株は各々 5 匹とした. コントロール群は無処置, TNP 群は  $30\ \text{mg}/\text{kg}$  の濃度の TNP を週 3 回, 2 週間にわたり皮下投与し, 観察期間は 3 週間とした. 同時に副作用の指標としてマウスの体重も週 2 回計測し, TNP 投与による影響についても検討した.

2) TNP と各種抗癌処置との併用効果

下記のいずれの併用実験においてもコントロール群や TNP 単独投与群(TNP 群)の実験デザインは同一のため Fig. 4 としてまとめた. なお, 各実験に用いたマウスの匹数は成績の欄に図示する.

A) 温熱処置との併用効果

右大腿部に移植した NSC-8, ESO-2 の皮下腫瘍を用い, コントロール群, TNP 単独投与群(TNP 群), 温熱処置単独群(温熱群), TNP と温熱処置併用群(併用群)の 4 群を作製し, コントロール群は無処置, 温熱群は温熱処置を実験開始日に 1 回のみ施行, TNP 群は TNP  $30\ \text{mg}/\text{kg}$  を週 3 回, 2 週間皮下投与し, 併用群は温熱処置施行後 TNP を同量, 同期間投与した. いずれの群も観察期間は 3 週間とし, 実験終了時にマウスを屠殺し腫瘍を摘出し組織学的検討を行った.

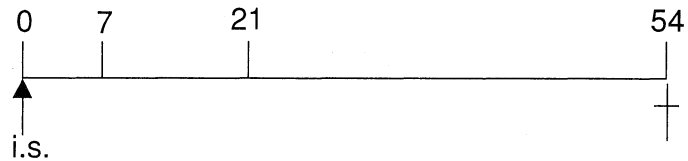
B) 化学療法との併用効果の検討

腫瘍は NSC-8 を用い温熱処置併用実験と同様に 4 群を作製し, TNP と cis-diamminedichloroplatinum (CDDP)併用による抗腫瘍効果を検討した. CDDP 単独投与群は CDDP(日本化薬, 東京)  $8\ \text{mg}/\text{kg}$  を実験開始日に 1 回のみ腹腔内投与した. 併用投与群は各単独群と同様に各薬剤を投与した.

C) 放射線照射との併用効果

腫瘍は ESO-2 を用い, 温熱処置併用実験と同様に 4 群を作製し TNP と放射線照射による抗腫瘍効果を検討した. 放射線照射単独群は実験開始日に 1 回のみ照射し,

#### Control group<sup>1)</sup>



#### TNP-470 group<sup>2)</sup>

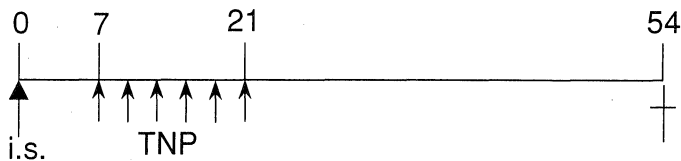


Fig. 5. Effect of TNP-470 on experimental liver metastasis model (NSC-28).

1): No treatment.

2): TNP-470 ( $30\ \text{mg}/\text{kg}$ ) is s.c. injected three times a week for two weeks.

併用群は照射後、同様に TNP を投与した。

週 3 回、2 週間皮下投与し、脾臓内移植 54 日後に肝転移  
結節数を計測した。

3) 実験的肝転移モデルにおける TNP の影響

NSC-28 を用い、Fig. 5 に示すようにコントロール  
群、TNP 群の 2 群を作製し、コントロール群は無処置、  
TNP 群は脾臓内移植 1 週間後より TNP 30 mg/kg を

成 績

1) TNP 単独投与による抗腫瘍効果

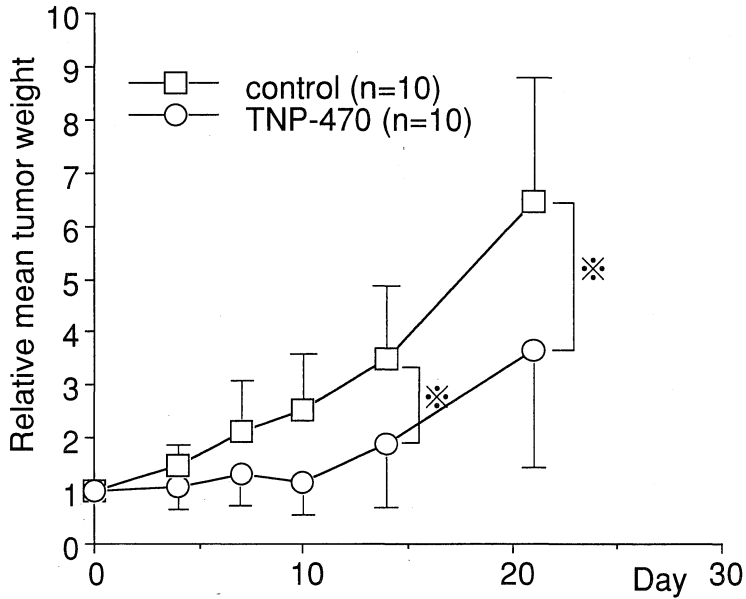


Fig. 6. Effect of TNP-470 on s.c. tumor growth (NSC-8).

※ :  $p < 0.05$

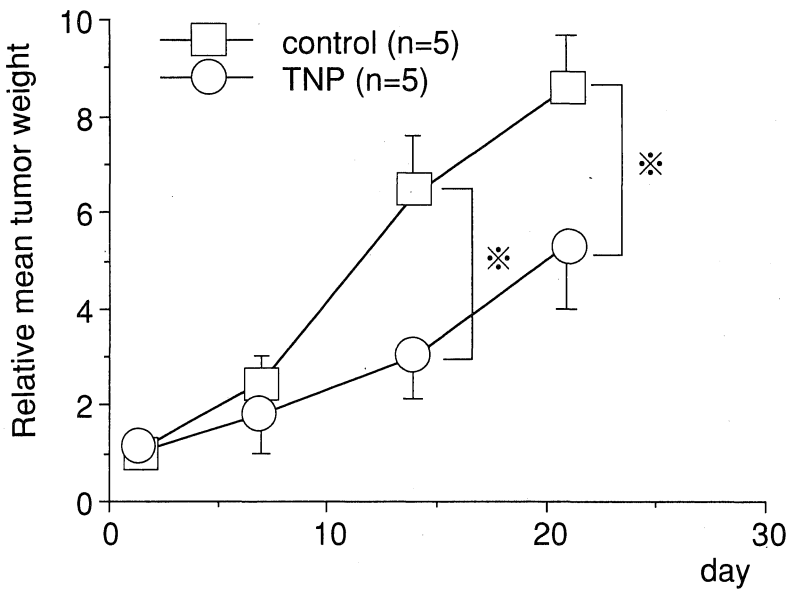


Fig. 7. Effect of TNP-470 on s.c. tumor growth (NSC-28).

※ :  $p < 0.05$

NSC-8においては、Fig. 6に示すようにTNP投与開始10日目までは腫瘍増殖は抑制され、投与終了時の14日目および21日目の相対腫瘍重量はそれぞれ、コントロール群：3.49±1.43, TNP群：1.90±1.48, コントロール群：6.48±2.44, TNP群：3.64±2.48とともに有意に抗腫瘍効果を認めた(p<0.05). NSC-28においては、Fig. 7に示すように投与終了時の14日目および21日目の相対腫瘍重量はそれぞれ、コントロール群：

6.39±2.50, TNP群：2.99±0.96, コントロール群：8.59±1.23, TNP群：5.34±1.30とともに有意に抗腫瘍効果を認めた(p<0.05). ESO-2においてもFig. 8に示すように14日目, 21日目でコントロール群：2.92±0.5, TNP群：2.15±0.66, コントロール群：4.12±0.94, TNP群：2.58±1.52とそれぞれ有意に抗腫瘍効果を認めた(p<0.05). また, TNPの毒性の一指標として観察したマウスの体重変動はFig. 9に示すように

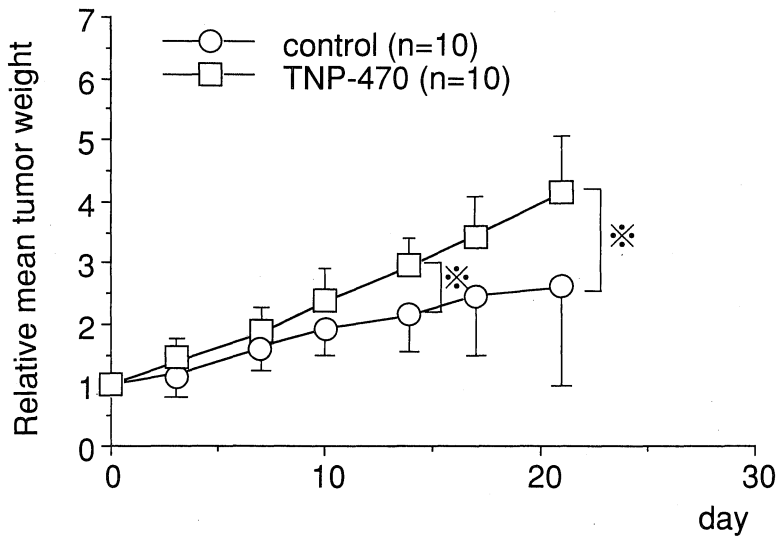


Fig. 8. Effect of TNP-470 on s.c. tumor growth (ESO-2).  
\*: p<0.05

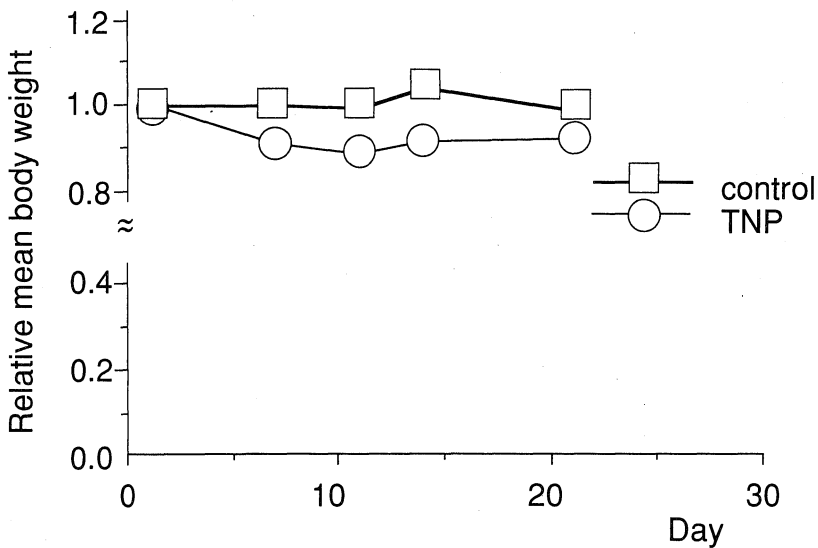


Fig. 9. Change of body weight.

TNP 投与により実験開始 11 日後には最大 12% の減少を認めたが、投与終了により回復し致死的なものは見られず、経過を通じてコントロール群との有意な差は認めなかった。

2) TNP と各種抗癌処置との併用効果

A) 温熱処置との併用効果

NSC-8 においては Fig. 10 に示すように、TNP 投与終了時の 14 日目での相対平均腫瘍重量はコントロール

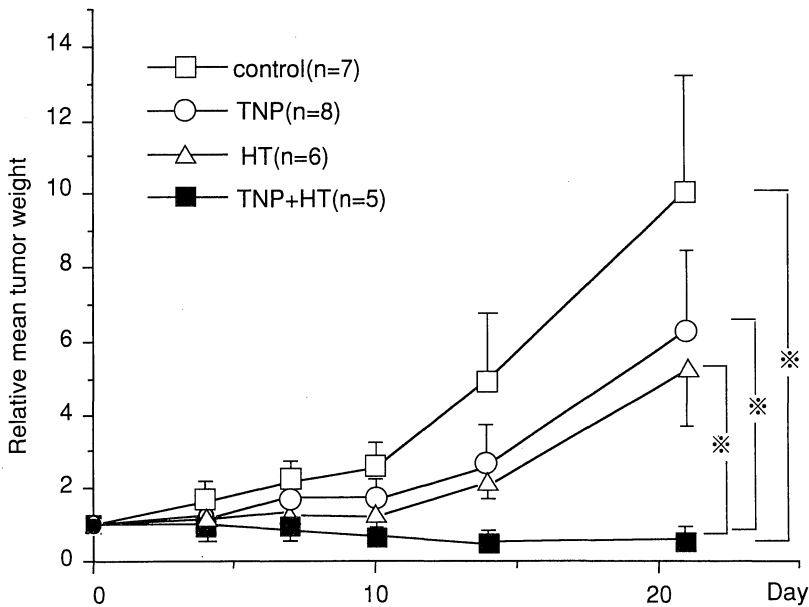


Fig. 10. Effect of TNP-470 + hyperthermia on s.c. tumor in nude mice (NSC-8). (\*:  $p < 0.05$ )

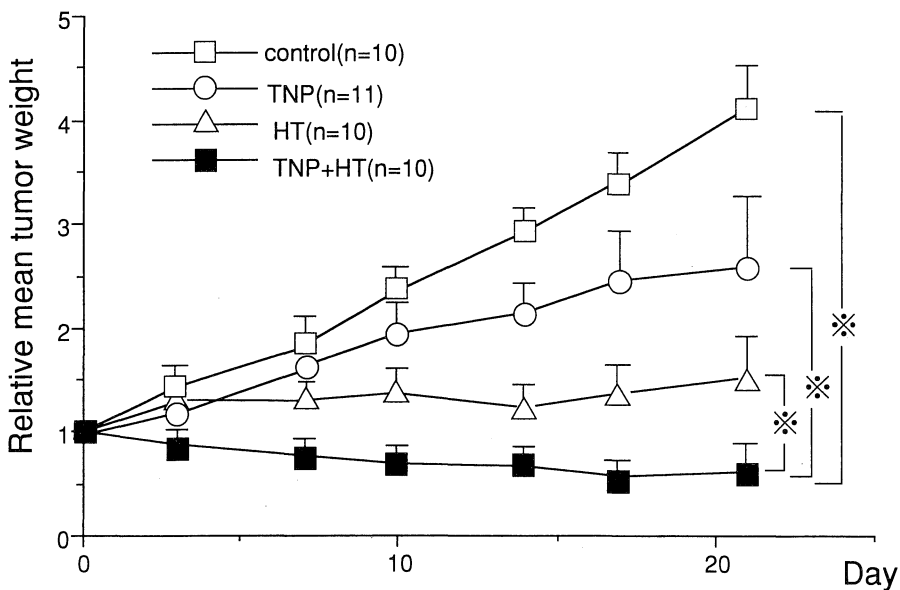


Fig. 11. Effect of TNP-470 + hyperthermia on s.c. tumor in nude mice (ESO-2). (\*:  $p < 0.05$ )



群： $4.99 \pm 3.43$ , TNP 群： $2.50 \pm 1.80$ , 温熱群： $2.35 \pm 1.50$ , 併用群： $0.58 \pm 0.28$  であり併用群と他の 3 群の間に有意差を認めた。21 日目では, コントロール群： $10.11 \pm 6.67$ , TNP 群： $6.33 \pm 5.16$ , 温熱群： $5.27 \pm 3.70$ , 併

用群： $0.61 \pm 0.34$  であり併用群と他の 3 群の間に有意差を認めた。また併用群の相対平均腫瘍重量は 1.0 以下と実験開始前より腫瘍が縮小しており, 中には腫瘍が完全に消失したのもみられた。ESO-2 においては Fig.

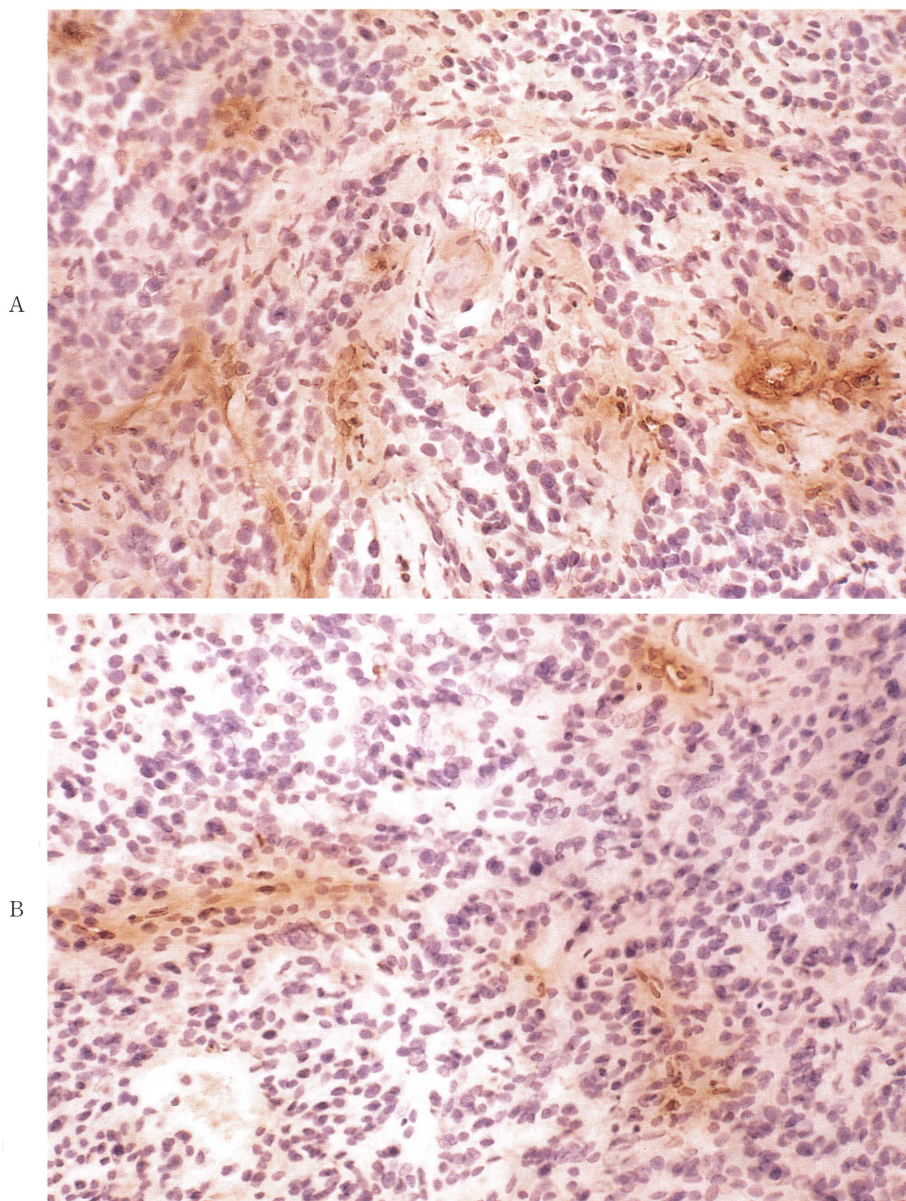


Fig. 12. Microscopic section of ESO-2. (CD-31 stain).

A : control

B : combination group (TNP-470 and hyperthermia)

Brown staining profiles endothelial cells and small vessels.

Angiogenesis strongly suppressed in the combination group.

( $\times 400$ )

11 に示すように、14 日目での相対平均腫瘍重量はコントロール群：2.92±0.50, TNP 群：2.15±0.66, 温熱群：1.25±0.49, 併用群：0.67±0.34 と併用群と他の 3 群の間に有意差を認めた。21 日目では、コントロール群：4.12±0.94, TNP 群：2.58±1.52, 温熱群：1.53±0.85, 併用群：0.62±0.34 であり併用群と他の 3 群の間に有意差を認めた。ESO-2 も NSC-8 と同様に併用群において相対平均腫瘍重量が 1.0 以下と実験開始前より腫瘍が縮小していた。組織学的には、H. E. 染色像では、コントロール群に比べ、各処置群では腫瘍中心部に壊死が多く認められ、また併用群では腫瘍辺縁部に円型細胞浸潤や腫瘍細胞の不規則な小さな細胞巣の形成が多く認められた。一方、免疫組織染色像では Fig. 12 に示すように、コントロール群が腫瘍細胞の増生に加え血管も豊富に見られるのに対し、併用群では明らかに血管数の減少が認められた。しかし、腫瘍細胞の形態や組織構築には差がみられなかった。

B) 化学療法および C) 放射線療法との併用効果  
TNP と他の抗腫瘍療法の併用による実験開始 3 週後の T/C(%) を Table 1 に示す。NSC-8 においては温熱処置との併用における T/C は 6.0 に対し、CDDP との併用における T/C は 32.7 とこの dose においては温熱処置との併用の方が抗腫瘍効果が強かった。また ESO-2 においても温熱処置との併用における T/C は 15.0 に対し、放射線照射との併用における T/C は 29.1 とこの線量においては温熱処置との併用の方が抗腫瘍効果が強かった。

### 3) 実験的肝転移モデルにおける TNP の影響

Table 2 に示すように、両群とも 100% に肝転移を認め、その結節数の中央値はコントロール群：21(18-31), TNP 群：19(10-100) と両者に差はなく TNP の転移抑制効果を認めなかった。

Table 1. T/C of TNP-470 with various cancer therapy

	Hyperthermia	Radiation	CDDP
ESO-2	15.0	29.1	—
NSC-8	6.0	—	32.7

All data represent T/C (%) at 21 days

Table 2. Effect of TNP-470 on metastatic potential of NSC-28 after i.s. transplantation in nude mice

Group	No. of mice with metastatic nodules in the liver/no. of treated mice (%)	Median number of metastatic nodules in the liver/mouse(range)
Control	5/5 (100)	21 (18-31)
TNP-470	4/4 (100)	19 (10-100)

## 考 察

血管新生は、一般的に胚、胎児、生殖臓器など発生や生殖に関連した増殖の盛んな正常組織に観察されるものであるが、糖尿病性網膜症、リウマチ、創傷後の治癒過程や腫瘍などの病態時にも認められる<sup>8)</sup>。Tannock の腫瘍細胞の Thymidine labeling index は血管に近接した細胞ほど高くなるという報告<sup>11)</sup>や、Gimbrone のウサギ前眼房に浮遊した腫瘍細胞は虹彩に付着し、新生血管の供給をうけた後に急速に増殖するという報告<sup>12)</sup>は、血管新生の腫瘍増殖過程における重要性を示唆するものである。

腫瘍増殖のメカニズムとして、一般に固形腫瘍は 1-2 mm<sup>3</sup> くらいの大きさに至るまでは自律増殖するが、さらに増殖を続けるためには腫瘍組織内に血管網を新生し、これを介して生体から栄養源や酸素を摂取し、腫瘍組織に生じた代謝老廃物を排泄することが必要となると考えられている。この血管新生の過程として、血管増殖因子による内皮細胞の活性化、それに続く基底膜破壊、内皮細胞の遊走・増殖、管腔・血管網の形成へとマルチステップが想定されている<sup>7)13)14)</sup>。血管新生阻害剤はこの内皮細胞の増殖過程を抑制することにより間接的に腫瘍増殖を抑制するという、従来の化学療法剤とは全く異なったタイプの薬剤で、須藤<sup>15)</sup>は直接、腫瘍細胞にダメージを与える従来の化学療法剤が動的とすれば、血管新生阻害剤は静的に腫瘍増殖を抑制する薬剤であると表現している。

現在までに報告されている血管新生阻害物質のうち実際に腫瘍増殖の抑制が示されたものは少ない<sup>4)15)20)</sup>が、その中でも強い腫瘍増殖抑制作用をもつ TNP は、1990 年 Ingber らにより報告された物質で、血管内皮細胞の増殖を特異的に抑制することが確認されている<sup>5)</sup>。このことは、須藤が *in vitro* で TNP に対する感受性をラット腫瘍 Walker 256, マウス腫瘍 M 5076 およびヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVE を用いて調べた結果、HUVE すなわち血管内皮細胞の感受性が最も高かったと報告している<sup>15)</sup>。また、ニワトリ胚発生に伴う漿尿膜やラット角膜での塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)により誘導される血管新生を阻害したとも報告されている<sup>21)</sup>。一方、*in vivo* における腫瘍に対する TNP の感受性はマウスの

ルイス肺癌, B 16 黒色腫や M 5076 で報告されており<sup>5)</sup>, ヒトの腫瘍では卵巣癌や子宮癌<sup>22)</sup>, ホルモン非依存性前立腺癌や乳癌など<sup>23)</sup>において抗腫瘍効果が報告されている。これらの報告における TNP の投与方法はすべて皮下投与であるが, 投与方法の変ったところでは TNP をマイクロスフィア型化学塞栓剤とし, VX-2 担癌家兎に投与し有効であったという報告<sup>24)</sup>もある。

今回, ヌードマウス可移植性ヒト胃癌株および食道癌株を用いて検討した結果, TNP 単剤で抗腫瘍効果を認めた。胃癌や食道癌における TNP の有効性に関しては今回の報告が最初であると思われる。

一方, TNP の毒性に関しては Ingber らが, マウスに 30 mg/kg の TNP を 1 日毎に 100 日以上皮下投与しても, 脱毛や消化器障害, 感染を認めず体重減少も認めなかったと報告している<sup>9)</sup>が, 今回の実験において軽度マウスの体重減少を認めたが致死的な副作用は認めなかった。

今回の実験により, ヒト胃癌や食道癌に対する TNP 単剤での抗腫瘍効果が示されたが, 臨床応用が可能となった際には, 他の抗癌療法との併用療法により効果増強が得られるか否かに関して興味を持たれるところである。そこで今回, 胃癌, 食道癌に対する代表的な抗癌療法である温熱療法, 放射線療法, 化学療法との併用について基礎的検討を試みた。まず TNP と温熱処置の併用効果を NSC-8(胃癌株)および ESO-2(食道癌株)を用いて検討した結果, 腫瘍が実験開始当初よりも縮小するといった著明な抗腫瘍効果が得られた。従来より腫瘍の血管床は正常組織に比べ, 温熱傷害性が高く, その機序としては血管の内皮細胞が薄い一層の配列から成り, しかも神経支配やレセプターの欠如により, 正常血管のように温熱など種々のストレスに対する反応が欠落しているためと考えられている<sup>25)</sup>。しかし, すべての腫瘍細胞が温熱により死に至るわけではなく, 辺縁部に残存した腫瘍細胞が時間の経過とともに血管新生を誘導し再増殖すると推測される。この過程で TNP による血管内皮細胞の増殖抑制が生じたため著明な抗腫瘍効果が得られたと考えられる。このことは組織学的に処置群の腫瘍中心部に壊死が多くみられ, 腫瘍辺縁部細胞の浸潤が認められたこと, 血管数の定量化は困難であったが, 血管内皮細胞が染色される CD 31 を用いた免疫組織学的染色で TNP と温熱療法併用群において明らかに血管内皮細胞の染色率が低下し血管の減少が見られたことよりも示唆された。

次に温熱療法と TNP の併用効果と比較検討するため, 近年胃癌に関しても有用性が報告されている CDDP, 従来より食道癌に対して有効であると言われている放射線

療法と TNP の併用効果を検討した結果, いずれの併用においても腫瘍増殖抑制を認めたが, 温熱療法ほどの併用効果は認めなかった。その原因の一つとして, 温熱療法は他の抗癌療法に比べ血管系に与えるダメージが大きいということが考えられる。Crile<sup>26)</sup>は, 大きな腫瘍は小さな腫瘍に比べ放射線よりも温熱に対し感受性が高いと報告しており, 腫瘍の成長には新生血管を必要とするという点を考えると, 温熱療法は血管系に大きなダメージを与えると考えられる。また各抗癌療法を細胞周期の面より考えると, 一般に温熱療法は DNA 合成期の S 期後半と G 2-M 期で感受性が高く, 放射線抵抗性を示す低酸素状態にある腫瘍組織に対しても有効であると言われている。それに対し CDDP や放射線は, 細胞分裂期の M 期で感受性が高いと言われている<sup>27,28)</sup>。この細胞周期における作用時期の差異も併用効果の差異の原因になっていると考えられる。TNP と他の併用療法に関して Yamaoka ら<sup>29)</sup>はヒト前立腺癌株において CDDP との併用による相加効果を報告しているがそれ以外の報告はみられない。

新生血管の基底膜は未熟であり, 内皮細胞の gap junction 形成が不十分であるため, 腫瘍細胞の血中への移行が容易である<sup>30)</sup>という特徴から, 癌の転移過程における血管新生の重要性に関する報告が増加しつつある。Weinder ら<sup>31)</sup>は乳癌患者の腫瘍血管数は転移や再発とよく相関し, 他のいずれの臨床病理学的因子より転移との相関が高かったと報告している。また Wellstein ら<sup>32)</sup>は, 悪性度の高いホルモン非依存性乳癌細胞 MDA-MD 231 が分泌するプライオトロピンが血管内皮細胞の増殖や血管新生作用を持つことを報告している。また Nakamoto ら<sup>33)</sup>はホルモン非依存性前立腺癌株の中で, 高転移株では血管新生因子の一つである線維芽細胞増殖因子(bFGF)の発現量が多く, 低転移性株ではその発現量が少ないと報告している。TNP の転移抑制に関する報告としてはマウス腫瘍 M 5076 を用いた自然肝転移モデルや B 16 BL 黒色腫を用いた実験的肺転移モデルにおいて転移を抑制したと報告されている<sup>30)</sup>。しかし, 今回 NSC-28 を用いた実験的肝転移モデルにおいては転移抑制効果を認めなかった。今回の実験ではヒト胃癌細胞の脾臓内移植 1 週後より TNP を投与したが, この時期にはすでに肝転移巣は確立されており, 一定以上の大きさに成長した腫瘍に対しては, TNP の効果は認めなかったと考えられる。実際, Yamaoka らの報告では腫瘍細胞移植 6 時間前より TNP を投与し, 転移抑制効果を認めており, TNP の投与時期を考慮すれば転移を抑制できる可能性を示唆している。TNP の投与時期に関して

は今後さらに検討する必要があると考えられる。

## 結 語

ヌードマウス可移植性ヒト胃癌および食道癌株において

1) TNP-470 単剤により、腫瘍の増殖を有意に抑制した。

2) TNP-470 と温熱処置との併用により、抗腫瘍効果の増強を認めた。CD-31 染色により血管数の減少が認められたことより、TNP-470 が血管新生を阻害し、腫瘍細胞の増殖を抑制したことが示唆された。

3) TNP-470 と温熱、放射線および化学療法との併用では各群に併用効果を認めたが、温熱療法との併用が最も効果的であった。

4) 胃癌細胞の脾臓内移植による実験的肝転移モデルにおいて TNP-470 単剤では肝転移抑制効果を認めなかった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った奈良県立医科大学第1外科学教室中野博重教授に深甚なる感謝の意を表するとともに、直接御指導、御助言をいただいた奈良県立医科大学第1外科渡辺明彦博士、澤田秀智博士に心から謝意を表します。また研究に御協力をいただいた奈良県立医科大学第1外科学教室の諸兄に感謝いたします。

なお、本稿の要旨は第93回日本外科学会、第44回日本消化器外科学会、第52回日本癌学会、第31、32回日本癌治療学会において発表した。

## 文 献

- 1) Ide, A. G., Baker, N. H. and Warren, S. L. : Vascularization of the brown-pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am. J. Roentgenol.* **42** : 891-899, 1939.
- 2) Lee, A. and Langer, R. : Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science* **221** : 1185-1187, 1983.
- 3) Taylor, S. and Folkman, J. : Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* **297** : 307-313, 1982.
- 4) Folkman, J., Langer, R., Linhardt, R. J., Haudenschild, C. and Taylor, S. : Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by hepar-

in or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* **221** : 719-725, 1983.

- 5) Ingber, D., Futjita, T., Kishimoto, S., Sudo, K., Kanamaru, T., Brem, H. and Folkman, J. : Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature* **348** : 555-557, 1990.
- 6) Pluda, J. M. : A phase 1 trial administering the angiostatin TNP-470 (AGM-1470) to patients with HIV-associated Kaposi's sarcoma. *Annu. meeting of the tumor cell biology.* Sep. 25-Oct. 1, 1994.
- 7) Folkman, J. : How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res.* **46** : 467-473, 1986.
- 8) Folkman, J. : Tumor angiogenesis. *Advances in Cancer Res.* **43** : 175-203, 1985.
- 9) Liotta, L. A., Kleinerman, J. and Saidle, G. M. : Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res.* **34** : 997-1004, 1974.
- 10) Albelda, S. M., Mullar, W. A., Buck, C. and Newman, P. J. : Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31) : A novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* **114** : 1059-1068, 1991.
- 11) Tannock, I. F. : The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumor. *Br. J. Cancer* **22** : 258-273, 1968.
- 12) Gimbrone, M. A. JR., Leapman, S. B., Cotran, R. S. and Folkman, J. : Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J. Experimental Medicine* **136** : 261-276, 1972.
- 13) Liotta, L. A., Steeg, P. S. and Stetler-Stevenson, W. G. : Cancer metastasis and angiogenesis—an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* **64** : 327-336, 1991.
- 14) Blood, C. H. and Zetter, B. R. : Tumor interactions with the vasculature—angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim. Biophys. Acta* **1032** : 89-118, 1990.
- 15) 須藤勝一 : 血管新生阻害剤 TNP-470 による転移抑制. *Oncologia* **26** : 32-37, 1993.

- 16) **Tanaka, N., Sakamoto, N., Inoue, K., Korenaga, H., Kadoya, S., Ogawa, H. and Okada, Y.** : Antitumor effect of an antian-giogenic polysaccharide from an arthrobacter species with or without a steroid. *Cancer Res.* **49** : 6727-6730, 1989.
- 17) **Oikawa, T., Hasegawa, M., Shimura, M., Ashino, H., Murota, S. and Moria, I.** : Eponemycin a novel antibiotic is a highly powerful angiogenesis inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181** : 1070-1076, 1991.
- 18) **Sauer, G., Amtmann, E. and Hofmann, W.** : Systemic treatment of a human epidermoid non-small cell lung carcinoma xenograft with a xanthate compound causes extensive intratumoral necrosis. *Cancer Letters* **53** : 97-102, 1990.
- 19) **Pesenti, E., Sola, F., Mongelli, N., Grandi, M. and Spreafico, F.** : Suramin prevents neovascularisation and tumor growth through blocking of basic fibroblast growth factor activity. *Br. J. Cancer* **66** : 367-372, 1992.
- 20) **Missirlis, E., Karakioulakis, G. and Maragoudakis, E.** : Antitumor effect of GPA1734 in rat Walker 256 carcinoma. *Investigational New Drugs* **8** : 145-147, 1990.
- 21) **Kusaka, M., Sudo, K., Fujita, T., Marui, S., Itoh, F., Ingber, D. and Folkman, J.** : Potent anti-angiogenic action of AGM-1470: comparison to the fumagillin parent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174** : 1070-1076, 1991.
- 22) **Yanase, T., Tamura, M., Fujita, K., Kodama, S. and Tanaka, K.** : Inhibitory effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on tumor growth and metastasis of human cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **53** : 2566-2570, 1993.
- 23) **Yamaoka, M., Yamamoto, T., Ikeyama, S., Sudo, K. and 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.
- 24) **岡田弘晃, 亀井 茂, 吉岡敏夫, 井上弥生, 小川泰亮, 戸口 始** : 血管新生阻害剤 TNP-470 マイクロスフィアの化学塞栓による VX-2 担癌家兔における制癌効果. *Drug delivery System* **7** : 97-102, 1992.
- 25) **Storm, F. K.** : Normal tissue and solid tumor effects of hyperthermia in animal models and clinical trials. *Cancer Res.* **39** : 2245-2251, 1979.
- 26) **Crile, G. Jr.** : The Effects of heat and radiation on cancers implanted on the feet of mice. *Cancer Res.* **23** : 372-380, 1963.
- 27) **辻井博彦** : 放射線治療の現状と将来. *癌の臨床* **39** : 1207-1212, 1993.
- 28) **加藤永一, 山崎有子, 林 幸子, 張 珊文, 河原謙一, 大坪俊雄** : 温熱化学療法の生物学的基礎. *癌と化学療法* **20** : 583-594, 1993.
- 29) **Yamaoka, M., Yamamoto, T., Masaki, T., Ikeyama, S., Sudo, K. and Fujita, T.** : Inhibition of tumor growth and metastasis of rodent tumors by the angiogenesis inhibitor O-(Chloroacetyl-carbamoyl) fumagillo 1 (TNP-470; AGM-1470). *Cancer Res.* **53** : 4262-4267, 1993.
- 30) **Folkman, J.** : The vascularization of tumors. *Sci. Am.* **234** : 59-73, 1976.
- 31) **Weinder, N., Semple, J. P., Welch, W. R. and Folkman, J.** : Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *New Eng. J. of Medicine* **324** : 1-8, 1991.
- 32) **Wellstein, A., Fang, W., Khatri, A., Lu, Y., Swain, S. S., Dickson, R. B., Sasse, J., Riegel, A. T. and Lippman, M. E.** : A heparin-binding growth factor secreted from breast cancer cells homologues to a developmentally regulated cytokine. *J. Biol. Chem.* **267** : 2582-2587, 1992.
- 33) **Nakamoto, T., Chang, C., Li, A. and Chodak, G. W.** : Basic fibroblast growth factor in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **52** : 571-577, 1992.