ヌードマウス実験

ヌードマウス可移植性悪性黒色腫 (SK-14株)
に対する Liblomycin (NK313), Peplomycin
(PEP) の抗腫瘍効果

小松 輝夫^{1)*} 小出 勉^{1)*} 石原 和之^{2)*}

Summary

ヌードマウス可移植性ヒト悪性黒色腫 (SK-14株) に対する Liblomycin (NK313) と Peplomycin (PEP) の単独投与した成績を比較検討した。

その結果, NK313および PEP は共に腫瘍増殖を抑制し, 形態学的にも両者ともに同様の形態的变化を認めることができた。

腫瘍増殖抑制効果は, PEP よりも NK313の方がより著明であり, NK313が癌化学療法剤として臨床面で重要な役割を与えるものと考ええる。

緒 言

Peplomycin (NK-631, 以下 PEP) は梅沢らによって報告された Bleomycin (BLM)¹⁾ の誘導体で 3-[(S)-1'-phenyl-ethylamino]-propylamino bleomycin の構造²⁾ を持ち, その抗腫瘍効果は扁平上皮癌 (頭頸部腫瘍, 皮膚癌, 子宮頸癌), Lymphoma 等に対し高い奏功率を示すことが報告³⁾⁻⁷⁾ されている。しかし肺毒性については依然として臨床使用制限因子の一つとして問題にされている。この点を更に改善し, BLM の基本構造を有し, その末端アミンを置換した Liblomycin (以下 NK313) が第 3 世代として開発された。

図 1 に示すごとくこの構造および物理的, 化学的性質は BLM の類縁化合物であり, PEP に

比べ抗菌作用, 各種動物腫瘍に対する抗腫瘍効果が強く, 肺毒性も軽減化等, 臨床側要請に応じる新しい物質である。

本研究はヌードマウス可移植性悪性黒色腫 (SK-14株) に対し PEP と NK313 の単独投与を施行したのでその結果を報告する。

材料および方法

使用動物は, BALB/cA を遺伝的背景とした Specific Pathogen Free (S.P.F) 下で飼育された BALB/c ヌードマウス (BALB/c AnN CRJ-nu; 日本チャールス・リバー株式会社) の雌を用いた。マウスが 7 週齢, 体重 19~21g, 1 群 5 匹で開始した。実験に用いたヒト悪性黒色腫 (SK-14株) は, 35 歳男性の背部皮下転移巣より摘出してヌードマウスに継代移植されたもので, 組織学的には低色素性悪性黒色腫である。腫瘍は一定の構築を保ち, 生着率 100%, 増殖も安定している。観察期間中に遠隔転移やマウスの悪液質等による腫瘍死は見られていない。

^{1)*} Teruo KOMATSU: 国立がんセンター研究所 実験動物管理室

^{1)*} Tsutomu KOIDE: 同上

^{2)*} Kazuyuki ISHIHARA: 同病院・皮膚科

図1. 構造および物理的化学的性質

腫瘍の移植および効果の判定は、次のようにして行った。

腫瘍 SK-14株を 3 mm 角に細切し、トロカール針を用いてマウスの右背部皮下に移植し、径が $5 \times 5 \times 3$ mm になった時に実験を開始した。処置開始と同時にキャリパーを用い腫瘍の長径および短径の計測を開始し、3 日間隔で計測した。推定腫瘍増殖(長径 $\times$ 短径²/2 で近似した)曲線を描いた。効果判定は、腫瘍増殖曲線および投与終了後に摘出した腫瘍重量比(T/C=治療群の重量の平均/対照群の重量の平均)および病理組織学的検討により行った。

NK313および PEP は共に日本化薬株式会社より提供されたもので、NK313は18mg/kg/day, 9 mg/kg/day, 4.5mg/kg/day, PEPは6 mg/kg/day, 3 mg/kg/day, 1.5mg/kg/day をそれぞれ移植後19日目より静脈内(iv), 5日間連続投与をした。対照液は生理食塩水を用いた。

結 果

1) **NK313**: 対照群の腫瘍の増殖は、ほぼ直線的に急増殖している(図2, 写真1, 移植後39日目)。4.5mg 群は投与終了後2日目頃より

腫瘍効果の低下傾向を認めるが、緩慢で明らかな抗腫瘍抑制は認められない。しかし最終腫瘍重量比において中程度の抑制効果を認めた(% inhibition 57.9, 図2, 写真4)。18mg, 9 mg 群は、5日間連続投与4日目より腫瘍の増殖抑制は有意な差が観察された。すなわち腫瘍増殖抑制は、連続投与4日目より実験終了時まで持続的に強く抑制効果を示し、判定時の腫瘍重量比および容積比は、対照群との間の危険率0.06以下で、18mg 群88.2%, 9 mg 群で84.1%であった(図2, 表1, 写真2, 3)。また、マウスにおいて投与直後自発運動の抑制傾向が18 mg 群で特に強く、体重減少も顕著であった。

病理組織学的所見: 対照腫瘍細胞群の細胞は、円形または類円形、一部紡錘形のものも混じり多様形の像を示す。核は類円形で大きく、核小体も大型で濃縮像、核分裂像もかなり認められる。胞体のメラニン含有量は少ない。これらの細胞が密に集簇し、蜂窩状に形成増殖している(写真9・10)。

治療腫瘍細胞群の腫瘍塊の中心部は凝固壊死が著明である。残存腫瘍細胞は辺縁部のみで(写真11)、密に集簇していた胞体が著しく縮小し、間質の線維化、多数のメラノファージの出現が

図 2. Effect of NK313 on the Growth of Human Malignant Melanoma (SK-14) in Nude Mice

表 1. Antitumor effect of NK313 on the Growth of Human Malignant Melanoma (SK-14) in Nude Mice

No. of animals	Treatment			Tumor size on day 40		Tumor-free mice
	start on day	dose	route	(mg, mean±S.D.)	%Inhibition	Surviving
n = 5	day 20	18mg/kg/day	iv	135.8 ± 205.9	88.2 ^{*)1}	0 / 5
n = 5	day 20	9mg/kg/day	iv	181.9 ± 220.6	84.1 ^{*)2}	0 / 5
n = 5	day 20	4.5mg/kg/day	iv	558.1 ± 617.3	57.9 ^{*)3}	0 / 5
n = 5	day 20	0.9 % Nacl	iv	1529.2 ± 623.7		0 / 5

^{*)1} : p<0.058, ^{*)2} : p<0.065, ^{*)3} : p<0.192

写真 1.
対照群 (移植後39日目)

写真 2 .

18mg 群 (治療後16日目)

写真 3 .

9 mg 群 (治療後16日目)

写真 4 .

4.5mg 群 (治療後16日目)

著明である (写真12)。細胞間隙結合は乏しく、細胞胞体の巨大化、核の崩壊・消失および濃縮、細胞質内の膨化が顕著で虚脱傾向である (写真12, 13)。写真14のごとき軟化巣も顕著であった。

2) PEP: 1.5mg 群, 6 mg 群では, 対照群 (図3, 写真5)と同様直線的増殖を示し腫瘍抑制作用は弱く明らかな抗腫瘍効果は認められなかったが, 実験終了時の腫瘍重量比および容積比は, 1.5mg 群53.8%, 6 mg 群で68.9%と中等度の抑制効果を認めた (図3, 表2, 写真6, 8)。3 mg 群では, 治療開始より強く持続的に

抑制効果を示したが, 治療終了以降やや緩慢ながら増殖した (図3, 表2, 写真7)。6 mg 群において, 投与直後マウスの自発運動の抑制および体重減少が軽度 to 観察された。

病理組織学的所見: 対照腫瘍細胞群 (写真15) に対し, 核の崩壊・濃縮, 細胞質内の膨化が顕著である (写真16)。3 mg 群 (写真17) では, 6 mg 群に比べ細胞間隙結合が乏しく, 核の濃縮・消失, 細胞質内の巨大空胞化が顕著である。また腫瘍細胞の崩壊, 軟化, 凝固壊死像とメラノファージを認める (写真18)。

図3. Effect of PEP on the Growth of Human Malignant Melanoma (SK-14) in Nude Mice

表2. Antitumor effect of PEP on the Growth of Human Malignant Melanoma (SK-14) in Nude Mice

No. of animals	Treatment			Tumor size on day 40		Tumor-free mice
	start on day	dose	route	(mg, mean $\pm$ S.D.)	%Inhibition	Surviving
n=5	day 20	6mg/kg/day	iv	267.8 $\pm$ 258.8	68.9 ^{*1)}	0 / 5
n=5	day 20	3mg/kg/day	iv	151.8 $\pm$ 88.9	78.8 ^{*2)}	0 / 5
n=5	day 20	1.5mg/kg/day	iv	505.3 $\pm$ 539.2	53.8 ^{*3)}	0 / 5
n=5	day 20	0.9 % NaCl	iv	1063.8 $\pm$ 1281.6		0 / 5

^{*1)} : $p < 0.21$, ^{*2)} : $p < 0.151$, ^{*3)} : $p < 0.395$

写真 5 .

対照群 (移植後39日目)

写真 6 .

6 mg 群 (治療後16日目)

写真 7 .

3 mg 群 (治療後16日目)

写真 8 .

1.5mg 群 (治療後16日目)

写真 9 .

対照群の腫瘍 (移植後39日目,
×87.5HE 染色)

写真10.

写真 9 の拡大像 ×350

写真11.

18mg 群 (治療後16日目, $\times 175$)

写真12.

18mg 群 (治療後16日目, $\times 175$)

写真13.

9 mg 群 (治療後16日目, $\times 175$)

写真14.

4.5mg 群 (治療後16日目, $\times 175$)

写真15.

対照群 (移植後39日目, $\times 350$)

写真16.

6 mg 群 (治療後16日目, $\times 175$)

写真17.

3 mg 群 (治療後16日目, $\times 175$)

写真18.

1.5mg 群 (治療後16日目, $\times 87.5$)

考 案

1985年, 新しいBLMの類縁化合物の第3世代として開発されたNK313は, 動物実験等のスクリーニングにより, PEPよりすぐれた抗腫瘍効果を示し, かつスペクトルも広く, 肺毒性の発現がきわめて低いものとして, その有用性を報告⁸⁾されている。ヌードマウスに移植した人癌を用いた化学療法実験は, 1969年Rygaardら⁹⁾にはじまり, 各種悪性腫瘍の移植系が報告

されている⁹⁾⁻¹¹⁾。免疫不全状態のヌードマウスを用いて異種腫瘍に対する抗腫瘍剤の効果を検討することは必ずしも人体内と同様に論じられるとは限らないが, 現在 *in vivo* で人癌を継代し観察する実験系としてはヌードマウスが最も容易にして優れているものでありその意味は大きい。

我々はヌードマウス可移植性悪性黒色腫(SK-14株)を用いて, NK313およびPEPの抗腫瘍効果について検討したが, SK-14株は, 継代生着率100%, rapid growthであり, かつ均一に増殖

するので、きわめて有用な化学療法実験系の腫瘍であると思われる。

NK313およびPEPを5日間連日静脈内(i.v.)投与した。投与量は、ヌードマウスを用いた5日間連日i.v.投与の毒性実験において、NK313の18mg/kg/dayとPEPの6 mg/kg/dayがほぼ等毒性量のデータから、それらを最高用量とし公比2で3用量を設けた。NK313とPEPの両群間で有効率、副作用のスペクトラムと頻度に著差は認められないが、腫瘍発育曲線の上で見ると、NK313の方が、有効率でやや高く有効であった。一方、副作用においては、NK313の高用量群で、食餌不振に伴う消瘦、一過性であるが自発運動の抑制が認められたが軽度であった。すなわち、中用量群では、副作用の発現が認められず、また実験終了時における剖検所見では何ら著変は認められなかった。

病理組織所見では、腫瘍細胞核の消失・崩壊・濃縮、細胞質内の空胞化、腫瘍胞体巣の縮小、メラノファージの出現である。他臓器、特に肺線維症の所見は認められなかった。

BLMの作用機序は、DNAと結合し、DNAの構造に変化を与え、DNA鎖切断¹²⁾で、特にG₂-M期での阻害効果が大きい¹³⁾とされている。かかることは、NK313とPEPの細胞効果は、DNA合成阻害であり、我々の病理所見と一致するものである。

以上の諸成績からNK313は、PEPと同等あるいは、より優れた薬剤として臨床応用が期待される。

結 論

NK313およびPEPのヌードマウス可移植性ヒト悪性黒色腫(SK-14株)に及ぼす影響を、腫瘍増殖曲線、光顕レベルで比較検討を行った。その結果、

1. NK313は、PEPと同等あるいは、より優れた薬剤として癌化学療法の臨床に重要な示唆を与えるものと考えられる。

2. 病理組織学的に、腫瘍細胞の完全消失は認められないが、両群共に同様の変化を示し、DNA合成の抑制を示唆した。かかることは腫瘍の壊死化と縮小が必ずしも一致しないことにより、たとえ縮小しなくても病理組織学的検討を行い、最終決定することが必要と考える。

(試験期間：平成元年3月～平成元年10月)

文 献

- 1) Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T. et al: New antibiotics, bleomycin A and B. J. Antibiotics 19: 200—209, 1966.
- 2) Matsuda, A. Yoshioka, O. Yamashita, T. et al: Fundamental and Clinical Studies on New Bleomycin Analogs. Recent Results in Cancer Research, "Antitumor Antibiotics" 63: 191—210, 1979. Springer Verlag
- 3) 池田重雄：皮膚科領域における Pepleomycin の臨床治験. 癌の臨床, 25, (7): 677—687, 1979.
- 4) 木村禎代二・他：悪性リンパ腫に対する Peplomycin の phase II study. 癌と化学療法, 8 (11): 1701—1705, 1981.
- 5) 相羽恵介・他：悪性リンパ腫に対する Peplomycin の phase II study. 癌と化学療法, 8 (10): 1604—1610, 1981.
- 6) 古江 尚・他：Peplomycin の臨床経験. 癌と化学療法, 9 (5): 930—935, 1982.
- 7) 犬山征夫：ペブレオマイシン. 癌と化学療法, 7 (8): 1498—1504, 1980.
- 8) Umezawa, H., Takita, T., Saito, S. et al: New analogs and derivatives of Bleomycin. Bleomycin Chemistry edited by Sikic, B. I., Rosencweig, M. and Carter, S.K. Academic Press Inc. pp.289—301, 1985.
- 9) 下里幸雄, 久保哲朗：ヌードマウス移植人癌の化学療法. 癌と化学療法 5: 67—75, 1979.
- 10) 下里幸雄, 玉置憲一編：人癌とヌードマウス, 医歯薬出版, 1982.
- 11) 石原和之, 小出 勉, 小松輝夫：ヌードマウス可移植性ヒト悪性黒色腫 (SK-14株) に対する recombinant ヒト TNF (PT-050) の抗腫瘍効果. Skin Cancer, 4: 388—396, 1989.
- 12) Suzuki, H., Nagai, K., Akatsu, E. et al: On the Mechanism of Action Bleomycin: Strand Scission of DNA Caused by Bleomycin and its Hinding to DNA in vitro. J. Antibiotics, 23: 473

—486, 1970.

- 13) Barranco, S.C., and Humphrey, R.M.: The effect of bleomycin on survival and cell progression in chinese hamster cells *in vitro*. Cancer Res., 31: 1218—1223, 1971.