

ヌードマウス移植ヒト前立腺癌に対する3種制癌剤の
抗腫瘍効果およびその生体内動態

日本医科大学泌尿器科学教室

秋 元 成 太・坪 井 成 美

川 村 直 樹・中 島 均

由 井 康 雄・吉 田 和 弘

西 村 泰 司・川 井 博

THE TUMOR GROWTH REGRESSIVE EFFECT OF THREE
TYPES OF ANTITUMOR DRUG ON HUMAN PROSTATIC
CARCINOMA TRANSPLANTED IN NUDE MICE,
AND THEIR *IN VIVO* MOVEMENT

Masao AKIMOTO, Narumi Tsuboi, Naoki KAWAMURA,

Hitoshi NAKAJIMA, Yasuo YUI, Kazuhiro YOSHIDA,

Taiji NISHIMURA and Hiroshi KAWAI

From the Department of Urology, Nippon Medical School

The growth regressive effect of NK631, MMC and 5FU on human prostatic carcinoma transplanted in nude mice, and their distribution in the tumor, kidney, and skin and subcutaneous tissue were examined.

The results were as follows:

- (1) NK631 showed the growth regressive effect in 15 mg/kg (2 x/w, i.p.) administered group and distributed in the kidney, tumor and skin and subcutaneous tissue in high concentration.
- (2) MMC showed the growth regressive effect in 2 mg/kg (1 x/w, i.p.) administered group and distributed in the kidney and tumor in relatively high concentration and in the skin and subcutaneous tissue in low concentration.
- (3) 5FU showed the growth regressive effect in 30 mg/kg (2 x/w, i.p.) administered group and distributed in the kidney and tumor in high concentration and in the skin and subcutaneous tissue in moderate concentration.
- (4) In therapeutic experiment of anticancer drug on human tumor transplanted in nude mice, care must be taken at the judgement of the growth regressive effect of the drug which distributes in the skin and subcutaneous tissue in high concentration whenever the tumor was transplanted in subcutaneous tissue.

Key words: Nude mouse, Antitumor drug, *In vivo* movement of anticancer drug

緒 言

ヒト悪性腫瘍研究上、ヌードマウスの出現は、腫瘍の継代移植を容易ならしめる点で、*In vivo* の系とし

て高い評価がなされているといってもよいであろう。さらに Povlsen¹⁾ が、ヒト悪性腫瘍の制癌剤感受性は、ヒトにおけるヌードマウス継代移植中でも、とくに相違がみられず、その感受性がヌードマウス移植腫

瘍にも保たれているという報告をおこない、その後数多くの追試も、ほとんどこの特性を認めている。

近年、泌尿器科領域においても、ヌードマウス移植ヒト泌尿生殖器腫瘍株成立の報告は決してすくないものではない。

われわれも、膀胱癌株 (NM-B-1, 未分化型移行上皮癌)、腎細胞癌 2 株 (NM-R-1, mixed type; NM-R-2, clear cell type)、ウィルムス腫瘍株 (NM-W-1) のほか、国立癌センター病理より提供をうけた前立腺癌株 (Pro-1, anaplastic prostatic carcinoma, 国立癌センターですでに 13 代継代された) を継代維持している。

今回われわれは、上記の 5 株のうち、ヌードマウス移植ヒト前立腺癌株を対象に、3 種の制癌剤の腫瘍増殖抑制効果とともに、その薬剤の生体内動態を 2, 3 の臓器で追究したので報告する。

対象とした臓器は、腫瘍のほか、通常固型腫瘍 (solid tumor) の移植部位である背部皮下、皮膚組織、ならびに主たる排泄臓器と考えられる腎を中心に検討した。

とくに、ヌードマウス移植腫瘍の移植部位として、皮下が選ばれておこなわれることが多いので、「制癌剤の分布特性がヌードマウス移植腫瘍におよぼす影響」について検索をおこなった。

材料および方法

使用したヌードマウスは、SPF (specific pathogen free) 条件下で飼育されている BALB/c nu/nu マウスで、平均体重 22 g 前後の 6 ~ 8 週雄を用いた。

使用したヌードマウス移植ヒト前立腺癌は、国立癌センター病理より提供をうけたもので、起源腫瘍の組織像 (Fig. 1) は、clear な大型細胞とやや dark な小

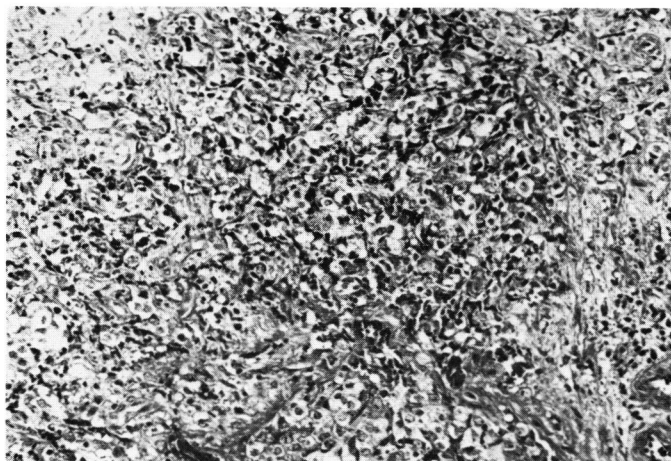


Fig. 1. Histology of the original tumor (HE staining, 200×)

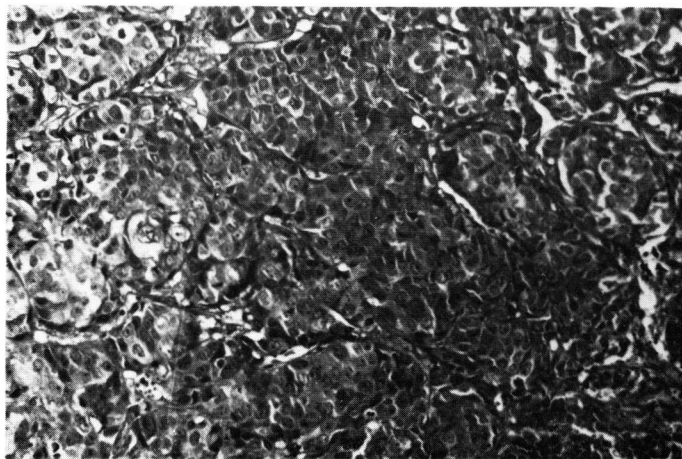


Fig. 2. Histology (HE, 200×) of an anaplastic prostatic carcinoma in nude mouse

型細胞と間質とから構成されており、腺管構造のきわめてすくない anaplastic な形態を示し、一部に壊死巣を認める。第 27 代目のヌードマウス移植組織像 (Fig. 2) は、腫瘍周辺部では小型の dark な細胞が多く、中心部は大型でやや clear な細胞が比較的多く認められ、起源腫瘍と同様、anaplastic type を示し、組織学的には、起源腫瘍と同様な性格をうけついでいるものと考えている。

この株の腫瘍増殖状態を知るために、腫瘍増殖曲線を求めたが、つぎの方法によった。すなわち、腫瘍片は 2 mm 角とし、ヌードマウス右背部皮下に移植後、週 1 回、腫瘍の長径、短径、高さを測定し、この積の対数値を算出し、腫瘍増殖曲線を描く。なお 1 群を最低 5 匹とし、平均値±標準偏差 ($M \pm SD$) を求めた。

ほかに、抗腫瘍効果判定には、対照群との間に、統計学的有意差を知るために、student-t-test をおこない、検討した。

Fig. 3 にヌードマウス移植 20 代目より 23 代目にかけての腫瘍増殖曲線を示すが、ほぼ一定の増殖状態であることがわかる。

さらに、この前立腺癌株について、

- 1) 生着率はほぼ 100% である。
- 2) ホルモン依存性はみられない。
- 3) 制癌剤感受性は、継代移植しても変化は認められない。

との結果がえられているが、すでに報告している²⁾。

使用した制癌剤は、NK631, MMC, 5FU の 3 種で

あるが、それぞれ腎、皮膚・皮下組織、腫瘍の 3 臓器について、経時的に臓器内分布を測定した。ただし、腫瘍については、その最大径が平均 1.5 cm で、腫瘍増殖がやや遅い時点の腫瘍を選んだが、測定には、中心の壊死部は除いて検索した。

〔測定方法〕

(1) NK631: 検定は bioassay 法でおこなった。すなわち、腹腔内に NK631 を 15 mg/kg 注入後、経時的 (30分, 60分, 120分, 180分, 24時間) に、脱血死させたヌードマウスより腫瘍、腎、皮膚・皮下組織を採取し、安部ら³⁾の方法により、菌株は *Bacillus subtilis* PC1219 を用いる濾紙 disk 法により NK631 濃度を測定した。

なお、一群は最低 5 匹として、平均値±標準偏差を算出した。

(2) MMC (mitomycin-C): bioassay 法として、宮村法⁴⁾により測定したが、菌株として、*E. coli* ATCC-11303 を使用した。(1)と同様、ヌードマウスを脱血死させ、経時的に腫瘍、腎、皮膚・皮下組織を採取して MMC 濃度を測定し、平均値±標準偏差を算出した。

(3) 5FU (5-fluorouracil): この場合も、bioassay 法により、宮村法⁴⁾にしたがい測定したが、菌株として、*Micrococcus flavus* ATCC-11303 株を使用した。(1)と同様、腫瘍、腎、皮膚・皮下組織腫瘍中の 5FU 濃度を経時的に測定し、平均値±標準偏差を求めた。

研究結果

1) NK631 投与群の腫瘍増殖曲線と体内分布：ヌ

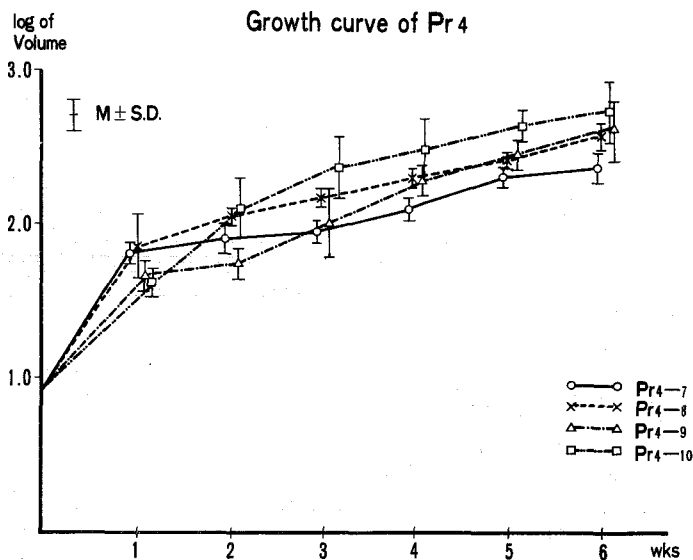


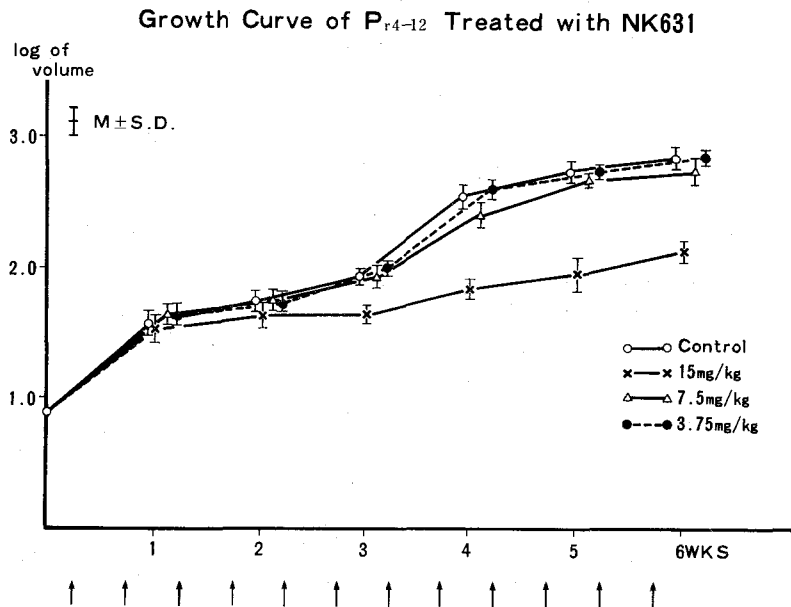
Fig. 3

ードマウス移植腫瘍に対する制癌剤の投与方法は、NK631のほか、5FU, MMC もすべて腹腔内投与でおこなっている。

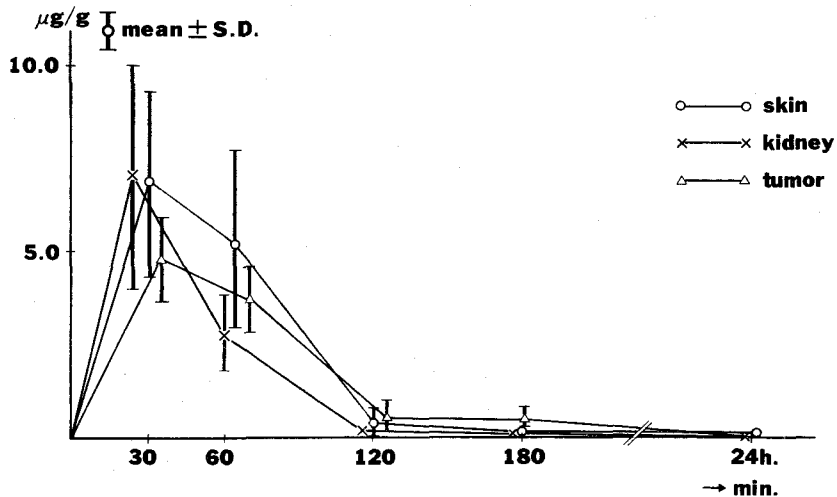
投与量の決定は、人体使用量が判明しているときには、われわれは、通常、人体への最大投与量と考えられる量をヌードマウスへの最小投与量とし、その2倍量, 4倍量で治療実験をおこなうのを原則としている。

臨床的に NK631 の人体最大投与量と考えられている 0.75 mg/kg, および 1.5 mg/kg (2×/w) 群では、増殖抑制効果は認められなかった。したがって 3.75 mg/kg, 7.5 mg/kg, 15 mg/kg の3群で実験をこころみた。

Fig. 4 に示すごとく、3.75 mg/kg, 7.5 mg/kg (2×/w) 投与群では、いずれも腫瘍増殖抑制効果は認められなかった。ただし、15 mg/kg 投与群のみに、3,



**Distribution of NK631 in nude mice
after intraperitoneal injection (15mg/kg)
— skin, kidney, tumor —**



4, 5, 6 週の各時点で、対照群との間に $p < 0.05$ 以上の有意差がみられている。つぎに 15 mg/kg 投与時の腫瘍、腎、皮膚・皮下組織における NK631 濃度の経時的推移を Fig. 5 に示す。すなわち、腎では 30 分で最高値を示し、 $7.28 \pm 3.91 \mu\text{g/g}$ 、皮膚・皮下組織も 30 分で $6.96 \pm 2.93 \mu\text{g/g}$ となっており、排泄臓器である腎に多く分布しているほか、ほぼ同量が、皮下組織を含む皮膚組織に分布していることがわかる。腫瘍への到達量は、30 分値が最高で $4.9 \pm 1.1 \mu\text{g/g}$ であり、ついで 60 分値が $3.8 \pm 0.9 \mu\text{g/g}$ となっており、たしかに皮膚・皮下組織への分布は高濃度に認められる。

2) MMC 投与群の腫瘍増殖曲線と体内分布：MMC 投与量は 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg ($1 \times 3/w$) の 3 群のうち、0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 投与群では、腫瘍増殖抑制効果はみられなかった。

2.0 mg/kg 群では、3, 4, 5, 6 週の各時点で、対象群との間に、 $p < 0.05$ 以上の有意差がみられた (Fig. 6)。

つぎに、2.0 mg/kg 投与時の腫瘍、腎、皮膚・皮下組織における MMC 濃度の経時的推移を Fig. 7 に示す。

腫瘍への分布は、60 分値 $1.28 \pm 0.68 \mu\text{g/g}$ 、120 分値 $1.29 \pm 0.69 \mu\text{g/g}$ と高値を示した。腎では、60 分値が $0.53 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$ 、120 分値 $0.69 \pm 0.12 \mu\text{g/g}$ と、腫瘍よりややすくない分布を示していた。しかし、皮膚・皮下組織では、最高値でも 30 分値 $0.35 \pm 0.12 \mu\text{g/g}$

にすぎず、全体としてきわめて低値であった。

3) 5FU 投与群の腫瘍増殖曲線と体内分布：(Fig. 8 に示すごとく、5FU 投与量は 7.5 mg/kg, 15 mg/kg, 30 mg/kg ($2 \times w$) でこころみだが、7.5 mg/kg 投与群では、腫瘍増殖抑制効果は認められなかった。15 mg/kg 投与群では、4 週の時点のみに、対照群との間に $p < 0.05$ 以上の有意差がみられたものの、ほかの時点では有意差は認められなかった。30 mg/kg では、3, 4, 5, 6 週の時点で、対照群との間に有意差が認められ、増殖抑制効果があるものと判定された。

つぎに、30 mg/kg 投与時の腫瘍、腎、皮膚・皮下組織の 5FU の分布状態を Fig. 9 に示す。以上の 3 臓器とも、長時間にわたって高い濃度を維持しているのが特長である。すなわち、腫瘍への分布は、30 分値 $1.21 \pm 0.34 \mu\text{g/g}$ 、60 分値 $0.9 \pm 0.28 \mu\text{g/g}$ で、120 分値でも、 0.96 ± 0.21 、180 分値 0.90 ± 0.1 と比較的高値がつづく。腎でもほぼ同様な傾向を示し、30 分値 $1.12 \pm 0.21 \mu\text{g/g}$ 、60 分値 $1.08 \pm 0.17 \mu\text{g/g}$ と漸減傾向を示すが、高濃度が維持されている。皮膚・皮下組織でも、30 分値 0.79 ± 0.12 、60 分値で 0.96 ± 0.33 と高値を示し、以後漸減傾向が認められた。

考 察

ヌードマウス移植腫瘍のうち、固型腫瘍 (solid tumor) は、大部分が皮下に移植されており、われわ

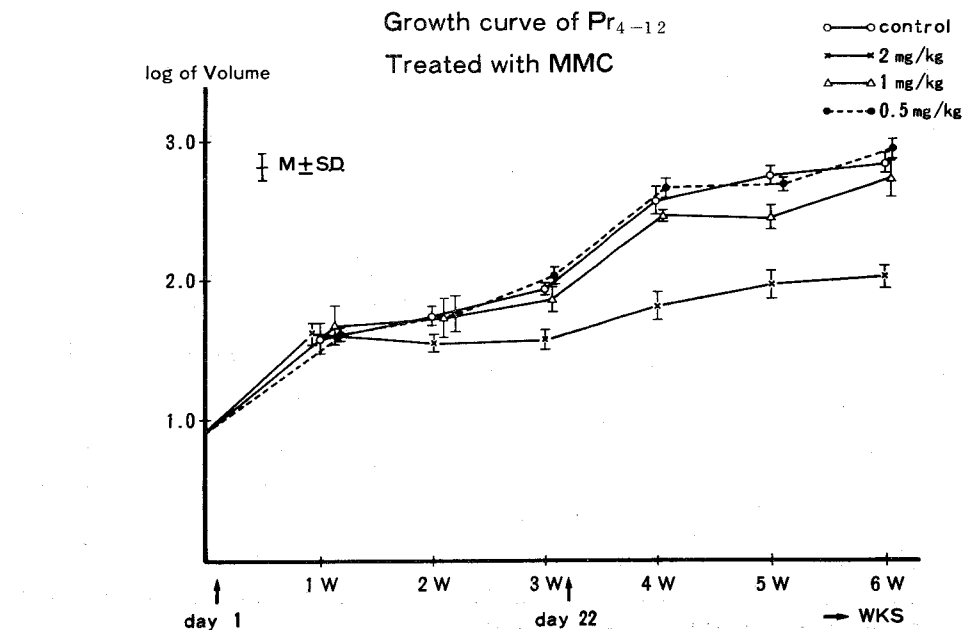


Fig. 6

**Distribution of MMC in nude mice
after intraperitoneal injection (2mg/kg)
— skin, tumor, kidney —**

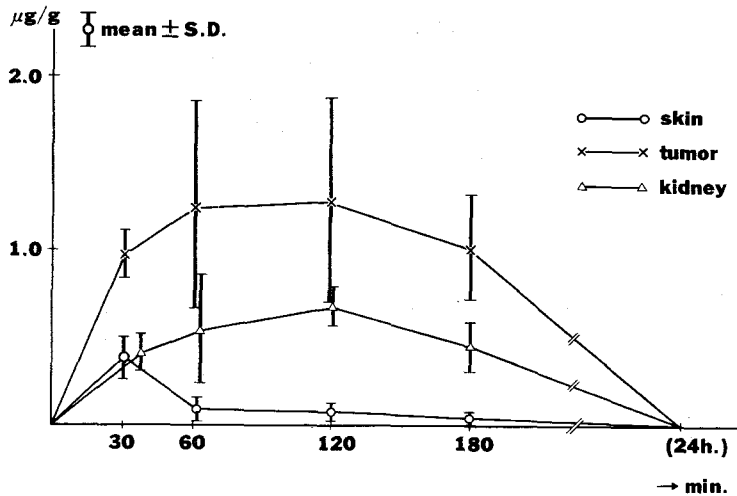


Fig. 7

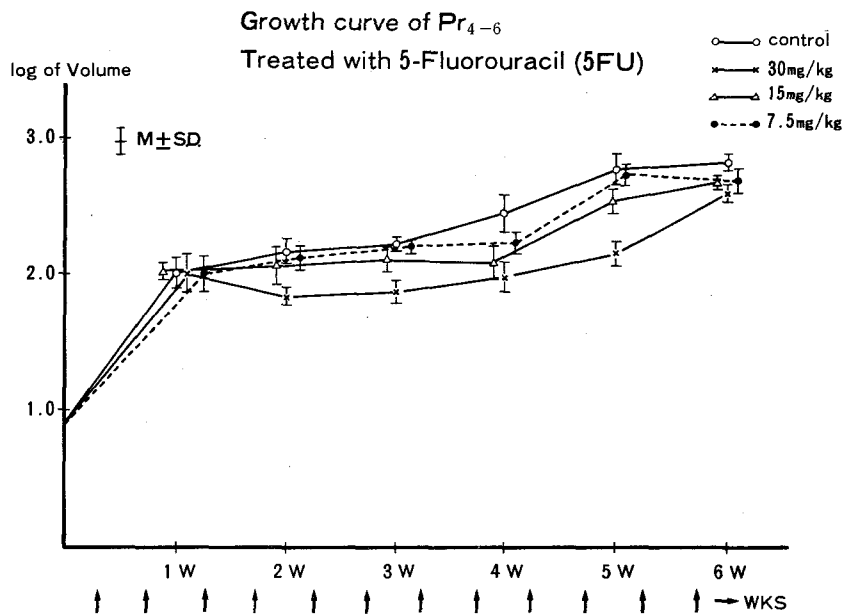


Fig. 8

れも同様の手技を用いている。

ヌードマウス移植腫瘍を使用して、制癌剤スクリーニングをおこなう際には、皮膚・皮下に高濃度分布する薬剤には注意を払う必要があることは、すでに吉岡ら¹⁰⁾が指摘するところである。すなわち、BLMの分布を全身オートラジオグラフィーで検索した結果、6時間後には、BLMの癌組織内の放射活性は消失す

るが、周辺の間質および皮膚にはなおBLMの残存が認められており、皮下移植腫瘍ではその間質や皮膚の影響をうける点に注意すべきであると報告している。

とくに、ヌードマウス移植腫瘍について、化学療法の効果とその臨床応用に関する有効性を論ずるときには問題となろう。

おもな制癌剤についての体内分布および生体内動態

Distribution of 5FU in nude mice after intraperitoneal injection (30mg/kg) — tumor, skin, kidney —

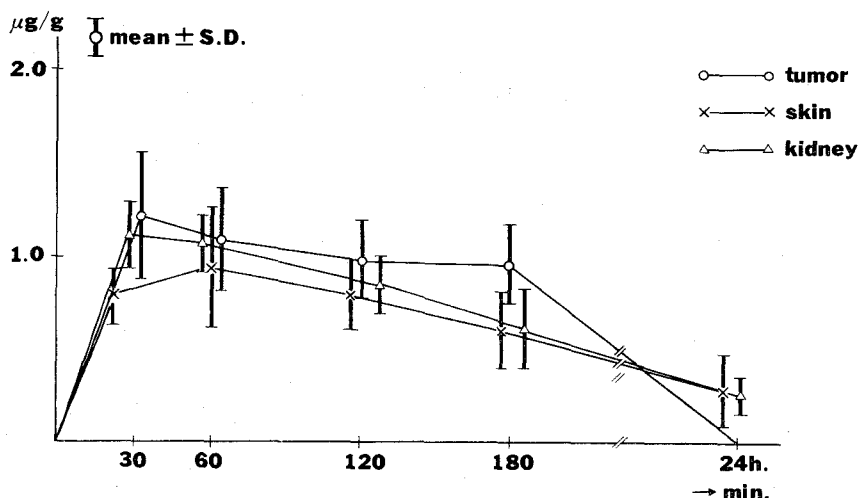


Fig. 9

については、すでに藤田⁶⁻⁹⁾による詳細な報告がある。われわれもすでに ADM と BLM について、ヌードマウスにおける生体内動態について腫瘍ならびに主要臓器での経時的維持を報告した^{10,11)}。われわれが今回こころみたのはいずれも bioassay 法であり、抗癌剤の抗菌作用を利用したものである。この方法は、制癌剤にある抗菌性を利用したもので、不活性化産物や異化産物により陽性にすることがなく、生体の各成分により妨害をうけにくいことや、比較的鋭敏である、という特長がある。一方、抗菌作用は抗腫瘍作用そのものではなく、あくまで抗菌作用と抗腫瘍作用が平行であるという前提が必要である。

結局、今回は腫瘍を中心にして、制癌剤のおもな排泄臓器の1つである腎、移植部位である皮膚・皮下組織の組織内濃度を検索したが、NK631 は、bleomycin 同様、腫瘍、腎に比し、比較的高濃度で、皮膚・皮下組織に分布することがわかった。

MMC では、60分、120分値であきかなように、腫瘍、腎には多く、皮膚・皮下組織にはわずかし分布していないことが認められた。5FU では、NK631 とほぼ同じ傾向、すなわち、皮膚・皮下組織中には比較的高濃度に認められるほか、NK631、MMC と相違して、いずれも長時間組織内濃度が維持されていることが指摘できる。

NK631 は、BLM の誘導体として、制癌性、制癌スペクトル、肺線維症などを指標にして改良された型

の制癌剤である。われわれの維持しているヒト前立腺癌株 (Pro-1) に対しては、NK631 は人体投与最大量と考えられる量の10倍でようやく抑制効果が認められたように、感受性は低かった。しかし、皮膚・皮下組織、腎、腫瘍に比較的高濃度に分布していた点、BLM と同様、ヌードマウス移植腫瘍の治療実験においてとくに留意する必要がある。藤田ら¹²⁾によれば、S180 担癌マウスでは、NK631 の皮膚への分布は高濃度に見られ、BLM に比較しても、その1.5倍に達し、腎においても高濃度でしかも長時間持続したとのべている。

MMC は、組織内濃度は低く、かつ持続時間も短かいことは知られているが、腫瘍、腎での組織内濃度は比較的高い。ただし、MMC は不活性化により消失する薬剤であり、主として肝、脾などで不活性化される。われわれも、肝での MMC 値は経時的推移をみてきわめて低値であったことを確認している。

5FU の生体内動態は、すみやかに血中より組織に移行するが、腫瘍や腎に比較的高濃度に分布することが知られている。しかも、腫瘍組織では同化作用を、肝、腎組織では異化作用をうけるという。われわれの検索では、皮膚・皮下組織への分布は、NK631 よりすくないが、MMC より高濃度に見られ、その中間に位置するものと考えている。

さらに、これらの制癌剤濃度は、腫瘍ならびに臓器

でうける「不活性化」をぬきにしては考えられない。すなわち、腫瘍に到達した制癌剤がどの程度有効に作用するかを検討する必要がある、今後併用化学療法を考える際にも重要な課題となろう。

結 語

ヌードマウス移植 ヒト前立腺癌について、NK631, MMC, 5FU の腫瘍増殖抑制効果および腫瘍、腎、皮膚・皮下組織への分布を検討した。

1) NK631 は、15 mg/kg (週2回、腹腔内) の高濃度で腫瘍増殖抑制効果を認めた。生体内分布では、腎、腫瘍、皮膚・皮下に高濃度に存在した。

2) MMC は、2 mg/kg (3週に1回、腹腔内) で、腫瘍増殖抑制効果を認めた。生体内分布では、腎、腫瘍には比較的高濃度にみられたが、皮膚・皮下組織には低濃度であった。

3) 5FU では、30 mg/kg (週2回、腹腔内) で腫瘍増殖抑制効果を認めた。生体内分布では、腎、腫瘍に高濃度にみられたほか、皮膚・皮下組織には中等度にみられた。

4) ヌードマウス移植腫瘍に対する制癌剤の治療実験の際に、皮下移植腫瘍の場合には、皮膚・皮下組織に高濃度に分布する薬剤についての効果判定には注意をはらう必要がある。

5FU, MMC の臓器内濃度測定にご協力いただいた協和薬研 KK, および NK631 の測定にご協力いただいた日本化薬 KK に感謝します。

文 献

- 1) Povlsen CO: The laboratory animals in drug testing, ed. by Spiegel A, p.63, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 1973
- 2) 秋元成太・坪井成美・川村直樹・中島 均・由井康雄・吉田和弘・西村泰司・富田 勝・川井 博: ヒト泌尿生殖器悪性腫瘍の異種移植に関する研究

—第3報, ヌードマウス移植ヒト前立腺癌株の基礎的検討ならびに数種プラチナ化合物の治療実験. 日泌尿会誌 83: in press, 1982

- 3) 安部史紀・吉岡 修・海老原和雄・小結明子・鈴木 肇・井上 博・小高 章・松田 明: 硫酸ペプレオマイシン (NK631) の生体内分布および吸収排泄に関する研究. Jap J Antibiotics 31: 886~894, 1978
- 4) 宮村定男・庭山清八郎・重野直也: Mitomycin C の体液中濃度測定. J Antibiot Ser B (Tokyo) 14: 251~260, 1961
- 5) 吉岡 修・山口志保子・松田 明・梅沢浜夫: 癌化学療法剤研究におけるヌードマウスの役割. 癌の臨床 22: 707~713, 1976
- 6) 藤田 浩: 制癌剤の体内分布—測定法 (第1部). 癌と化学療法 1: 497~503, 1974
- 7) 藤田 浩・島山和壮: 制癌剤の体内分布, 測定法 (第2部). 癌と化学療法 1: 683~691, 1974
- 8) 藤田 浩: 制癌剤の生体内動態からみた癌化学療法. 癌と化学療法 3: 1082~1092, 1976
- 9) 藤田 浩: 抗癌剤の生体内動態とその臨床応用. 泌尿紀要 24: 245~248, 1978
- 10) Akimoto M, Nakajima H, Yui Y, Kawamura, N and Kawai H: Therapeutical effects of Adriamycin to transplantable human bladder cancer and its tissue distribution in nude mice. Proceedings of the First Conference on Treatment of Urinary Tract Tumors with Adriamycin, pp. 206~209, 1979
- 11) 秋元成太・川井 博: ヌードマウスにおけるBLM の体内分布. 第6回尿路悪性腫瘍研究会記録. p.74, 1980
- 12) 藤田 浩・島田 徹・小川カツイ・木村禧代二: Pepleomycin (NK631) の生体内動態について. Jap J Antibiotics 31: 40~47, 1978

(1981年8月24日迅速掲載受付)