

経口投与による 5-fluorouracil の抗腫瘍効果

—ヌードマウス移植ヒト胃癌株を用いた検討—

花谷 勇治・小平 進・浅越 辰男・三吉 博・長岡 信彦

帝京大学医学部第一外科*

(平成 7 年 9 月 21 日受付・平成 7 年 11 月 30 日受理)

5-fluorouracil (5-FU) に高感受性のヌードマウス移植ヒト胃癌株 (皮下移植腫瘍) を用い、5-FU 20 mg/kg 連日経口投与 (20 mg/kg p. o.) と 10 mg/kg 連日腹腔内投与 (10 mg/kg i. p.) の抗腫瘍効果を比較検討した。また、腫瘍内 DNA に対する作用の指標として thymidylate synthase (TS) 結合能を、RNA に対する作用の指標として RNA 中に取込まれた 5-FU (F-RNA) 濃度を測定した。治療による体重減少率には両群間に有意差を認めなかったが、20 mg/kg p. o. 群は 10 mg/kg i. p. 群に比べ、実験の全期間を通じて有意に強い腫瘍増殖抑制効果を示した ($P < 0.05$)。相対腫瘍重量における T/C 比の最小値は 20 mg/kg p. o. 群では 9.97%，10 mg/kg i. p. 群では 48.1% であった。5-FU 単回投与による TS および F-RNA に対する作用は一過性であったが、20 mg/kg p. o. 群と 10 mg/kg i. p. 群の成績には差を認めなかった。一方、5-FU 連続投与では TS 阻害率および F-RNA 値は治療日数が長くなるほど増大する傾向を認めたが、やはり 20 mg/kg p. o. 群と 10 mg/kg i. p. 群の成績には差を認めなかった。以上より、5-FU の経口投与は投与量を 2 倍程度増加することにより、腹腔内投与に匹敵する効果を期待し得ると考えられた。

Key words: 5-fluorouracil, 経口投与, 胃癌, ヌードマウス

5-fluorouracil (5-FU) は代表的な代謝拮抗薬であり、その効果は *in vitro* の検討では、薬剤濃度よりも、有効濃度以上の薬剤との接触時間に依存すると考えられている¹⁾。また、臨床では投与時間を長くするほど副作用が軽減すると報告されている²⁾。したがって、5-FU の投与方法としては持続点滴静注や持続動注などの持続投与方法が推奨されているが、このためには入院または特殊な処置を必要とする。一方、5-FU は消化管からある程度の吸収が期待でき、外来通院で長期間にわたる治療が可能であることから、我が国では経口投与による治療が許可され普及している。

我々は 5-FU に高感受性を示すヌードマウス移植ヒト胃癌株 (皮下移植腫瘍) に対し、5-FU を経口および腹腔内投与し、*in vivo* における腫瘍増殖抑制効果とともに、腫瘍内の DNA および RNA に対する作用を比較検討したので報告する。

I. 材料と方法

動物は三共ラボサービス (株) から購入した BALB/c ヌードマウス (体重 20~25 g の雄) を用いた。薬剤は協和発酵工業 (株) より供与された注射用 5-FU を使用した。腹腔内投与では 10 mg/kg を、経口投与では 20 mg/kg を 1 日 1 回、連日投与した。腫瘍は名古屋大学医学部で樹立され、5-FU に高感受性のヒト胃癌株、SC-1-NU (低分化型腺癌) を用いた。3 mm 角に細切した腫瘍ブロック 1 個をマウスの両側背部に皮下移植

した。腫瘍移植後は週 3 回、腫瘍の長径 (L) と短径 (W) を mm 単位で計測し、推定腫瘍重量 ($L \times W^2/2$, mg) を算出した。

治療実験は推定腫瘍重量が 100~300 mg に達した時点で開始した。治療開始後は対照群および各治療群について相対腫瘍重量、すなわち各測定時の推定腫瘍重量 (W_i) と治療開始時の推定腫瘍重量 (W_0) との比 (W_i/W_0) を求めた。また、各測定時の実測体重から推定腫瘍重量を引いて推定体重 (BW_i) を算出し、治療開始時の推定体重 (BW_0) に対する比 (相対体重, BW_i/BW_0) を求めた。推計学的検定には *t* 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

腫瘍内の DNA および RNA に対する作用を知るために、5-FU 単回投与後 0.5, 1, 2 および 4 日後に腫瘍を摘出した。また、治療実験途中の 8, 16 および 24 日目にも腫瘍を摘出した。各時点で摘出した腫瘍はただちに凍結し、測定時まで -80°C で保存した。

DNA に対する作用の指標として、Spears ら³⁾ の方法に準じて thymidylate synthase (TS) 活性を測定した。腫瘍組織ホモジネートを超音波処理し、高速遠心分離によりサイトゾル画分を採取した。これを二分し、一方はそのまま (TS free)、他は pH 8.1 の重炭酸アンモニウムバッファー (300 mM NH_4HCO_3 , 100 mM 2-mercaptoethanol, 100 mM NaF, 15 mM cytidy-

late) と等量混和し、25℃で3時間インキュベートした後 (TS total), ^3H ラベルした 5-fluorodeoxyuridine monophosphate (^3H -FdUMP) および 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10- CH_2FH_4) と反応させ、生ずる ternary complex の放射活性を測定した。TS total に対する TS complex (TS total-TS free) の百分率を求め、TS 阻害率とした。

RNA に対する作用の指標として、RNA 中に取り込まれた 5-FU 濃度 (F-RNA) を測定した。Schmidt-Thanhauser-Schneider 法⁶⁾により腫瘍組織ホモジネートより RNA を抽出した。これを塩酸で加水分解した後、5-FU を抽出・精製し、キャピラリーガスクロマトグラフマスマスペクトロメトリー (GC-MS) により測定した⁶⁾。

II. 成績

1. 腫瘍増殖抑制効果と副作用

5-FU の SC-1-NU に対する腫瘍増殖抑制効果を相対腫瘍重量における T/C 比の推移で示した (Fig. 1)。腫瘍内 DNA および RNA に対する作用の検討用にマウスを屠殺したため、腫瘍数が経時的に減少している。10 mg/kg 腹腔内投与群 (10 mg/kg i. p. 群) では治療開始後 8 日目まで、20 mg/kg 経口投与群 (20 mg/kg p. o. 群) では 12 日目まで T/C 比の急速な低下を認め、各々 58.7%、18.1% に達した。以後、T/C 比は緩やかに低下し、実験終了時 (24 日目) には各々 48.1%、9.97% に達した。治療群間の比較では、20 mg/kg p. o. 群は 10 mg/kg i. p. 群に比べ、治療実験の全期間中を通じて有意に良好な増殖抑制効果を示した ($P < 0.05$)。さらに、両群の成績の比を縦軸に、治療期間を横軸にとると、両者の間には有意の正の相関関係を認めた (Fig. 2, $r = 0.989$, $P < 0.001$)。

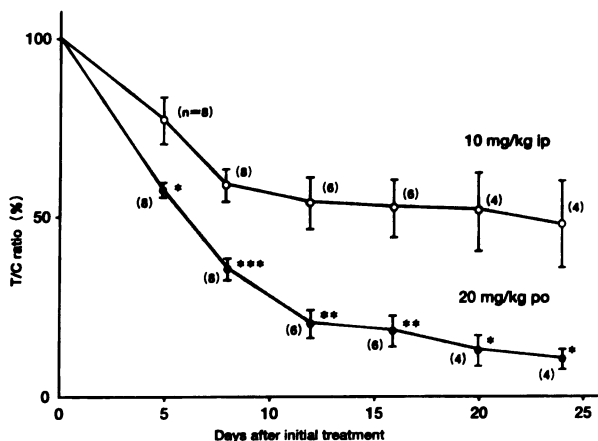


Fig. 1. Antitumor effect of 5-fluorouracil by oral and intraperitoneal administration. Each point shows mean \pm standard error. The number of samples decreased with time for measurement of TS and F-RNA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

相対体重の推移を Fig. 3 に示した。治療開始後 5 日目と 8 日目において、20 mg/kg p. o. 群の相対体重は 10 mg/kg i. p. 群のそれに比べ低い傾向を示した ($P < 0.10$) が、それ以後は両群間に差を認めなかった。相対体重の最小値は、10 mg/kg i. p. 群では 0.793、20 mg/kg p. o. 群では 0.820 であった。

2. 腫瘍内 TS に対する作用

今回検討した SC-1-NU の無処置対照群 ($n=5$) の TS total は 51.9 ± 5.41 pmol/g-tissue であった。

5-FU 単回投与後の TS の変化を Fig. 4 に示した。TS total は 5-FU 投与後 1 日目から 2 日目にかけて高値を示し、4 日目に対照群のレベルに復した。TS free は 5-FU 投与後 0.5 日目には低値を示したが、1 日目には対照群のレベルに復した。TS complex は 5-FU 投与後 1 日目までは 20~25 pmol/g-tissue を維持していたが、以後急速に減少した。TS 阻害率は 5-FU 投与後 0.5 日目では 40% 前後、1 日目では 30% 以上を呈したが、以後急速に低下した。

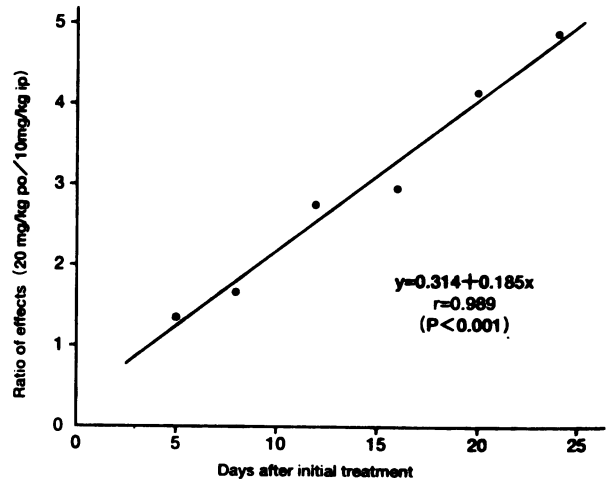


Fig. 2. Correlation between the duration of treatment and the ratio of effects by 20 mg/kg p. o. to those by 10 mg/kg i. p..

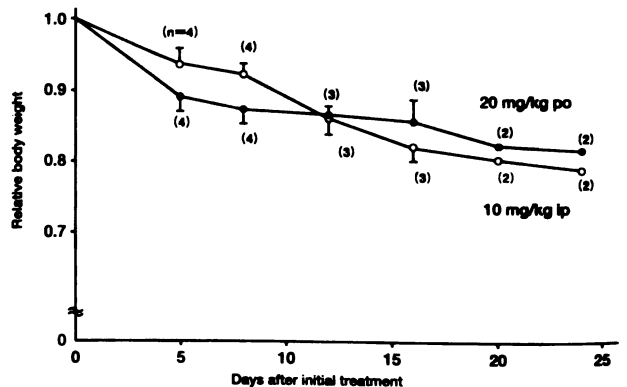


Fig. 3. Changes in relative body weight after treatment. Each point shows mean \pm standard error. The number of mice decreased with time for measurement of TS and F-RNA.

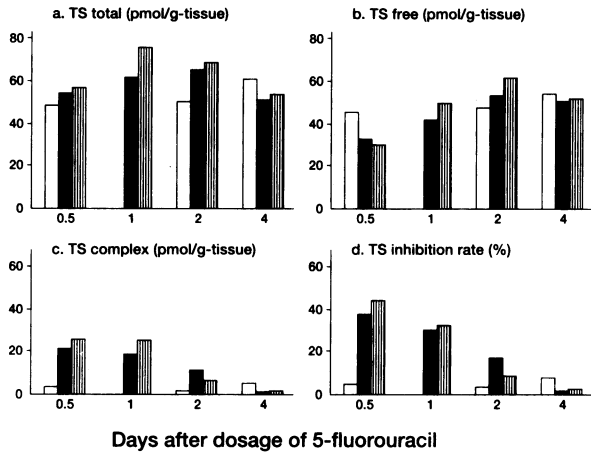


Fig. 4. Timely change of thymidylate synthase after single dosage of 5-fluorouracil.

□ control, ■ 10 mg/kg i. p., ▨ 20 mg/kg p. o..

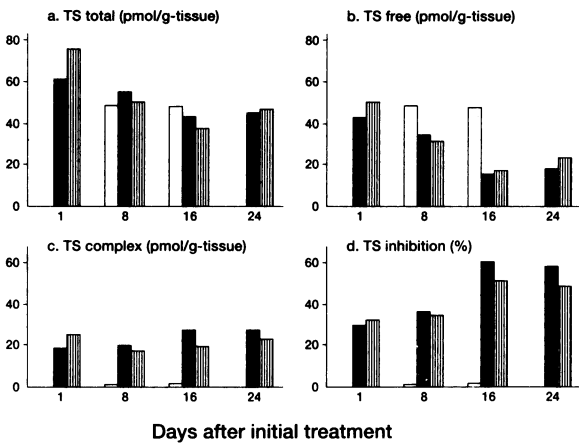


Fig. 5. Timely change of thymidylate synthase after successive dosage of 5-fluorouracil.

□ control, ■ 10 mg/kg i. p., ▨ 20 mg/kg p. o..

5-FU 連続投与後の TS の変化を Fig. 5 に示した。TS total, TS free はともに徐々に減少する傾向を認めしたが、TS complex は 20 pmol/g-tissue 前後で、ほぼ一定したレベルを保っていた。このため、TS 阻害率は次第に上昇し、16 日目以降は 50~60% の高値に達した。以上の変化は 10 mg/kg i. p. 群と 20 mg/kg p. o. 群に共通してみられ、両群の成績には差を認めなかった。

3. 腫瘍内 F-RNA に対する作用

5-FU 投与による F-RNA の変化を Fig. 6 に示した。5-FU 単回投与後の F-RNA は 0.5 日目から 1 日目にかけて 20 ng/mg-RNA 前後のピークを示し、2 日目まで高値を維持していた。5-FU 連続投与後の F-RNA は投与日数が増すほど高値となり、24 日目には 90 ng/mg-RNA 以上に達した。TS と同様に、10 mg/kg i. p. 群と 20 mg/kg p. o. 群の成績はほぼ同等で、明らかな差を認めなかった。

III. 考 察

抗癌化学療法を成功させるためには、強力な寛解導入

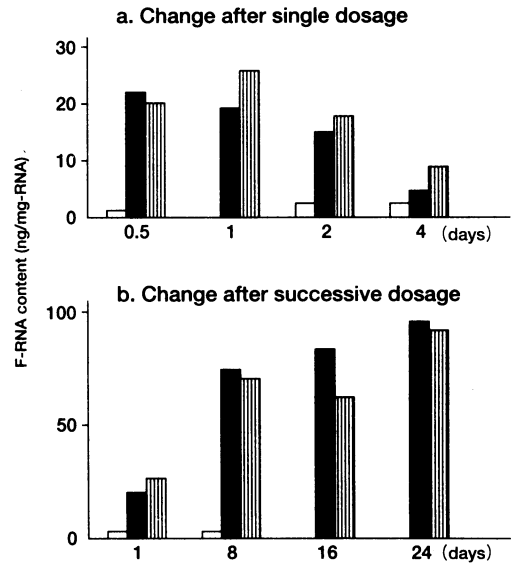


Fig. 6. Timely change of F-RNA after single and successive dosage of 5-fluorouracil.

□ control, ■ 10 mg/kg i. p., ▨ 20 mg/kg p. o..

療法だけでなく、有効な寛解維持療法も不可欠と思われる。5-FU は代表的な代謝拮抗薬の一つであり、胃癌をはじめとする消化器癌に対する多剤併用療法や biochemical modulation の key drug として使用されている。一方、5-FU には重篤な副作用が少なく、長期投与が可能であることから寛解維持療法に、また外科領域では根治手術後の adjuvant chemotherapy に広く使用されている。

5-FU は消化管からある程度の吸収が期待できること、また低濃度であっても長時間にわたって血中濃度が維持できれば、理論的には効果が期待できることから、我が国では 1975 年に経口投与による治療が承認された。一方、消化管から吸収された 5-FU は門脈血中では高濃度を示すが、肝臓に達すると dihydropyrimidine dehydrogenase により分解されるため、5-FU の全身血中濃度は上がらないとの指摘もある⁶⁾。

そこで、我々は 5-FU に高感受性のヌードマウス移植ヒト胃癌株を用い、5-FU 経口投与の抗腫瘍効果を再検討した。穴田ら⁷⁾は、マウスを用いた基礎的検討で、5-FU 経口投与時の血中および腫瘍内 5-FU 濃度は静脈内投与時の約 1/2 に相当し、投与量を増加させることにより静脈内投与時に匹敵する抗腫瘍効果が得られたと報告している。この成績を参考にして、今回は経口投与の投与量を腹腔内投与の 2 倍に設定した。

この結果、治療による体重減少率には両群間に有意差を認めなかったが、20 mg/kg p. o. 群は治療実験の全期間を通じて 10 mg/kg i. p. 群よりも有意に強い抗腫瘍効果を示した。別時点での実験⁸⁾だが、20 mg/kg を連日腹腔内投与した際の T/C 比は、3 日目 79.3%、5 日目 49.4%、7 日目 30.5%、10 日目 14.6%、14 日目

8.44%, 19日目5.17%, 24日目3.70%, 28日目3.46%であり、今回の20 mg/kg p. o. 群の成績はこれに匹敵する成績と思われた。なお、20 mg/kg p. o. 群と10 mg/kg i. p. 群の成績の差は、治療日数が長くなるほど大きくなっており、5-FUの投与方法による成績の差を検出するためには、従来の治療実験プロトコル⁹⁾よりも長期にわたる投与および観察が必要と考えられた。

5-FU投与後のTSおよびF-RNAの変化は、投与後速やかに発現するが、一過性であるとされている^{3, 6)}。今回の検討では5-FU投与直後の測定は行っていないが、TSに対する作用は、投与からもっとも近い0.5あるいは1日目に最大で、それ以降急激に低下しており、従来の報告と矛盾しないと考えられた。5-FUの血中消失半減期は10~20分と短く、有効血中濃度を維持するために持続点滴静注投与が推奨されている。しかし、bolusで投与した5-FUの作用は一過性とはいうものの、1日程度は持続しており、また、連日投与ではTS阻害率およびF-RNA値が次第に増大する傾向を認めたことから、1日1回の間歇投与でも効果を期待しうると考えられた。

いずれにしても、腫瘍内TSおよびF-RNAに対する作用には、20 mg/kg p. o. 群と10 mg/kg i. p. 群の間で差を認めなかったことより、5-FUは経口投与でも2倍程度投与量を増すことにより、腹腔内投与に匹敵する作用が期待できると考えられた。なお、両群の腫瘍内TSおよびF-RNAに対する作用が同等でありながら、*in vivo*における抗腫瘍効果に有意差が生じた理由は不明であり、今後さらに検討を加える必要があると思われる。

経口投与による治療は、外来通院による寛解維持療法を可能とすることから、癌患者にとって大きなメリットとなろう。今後、投与方法の工夫により、5-FUの経口投与が静脈内投与に匹敵する抗腫瘍効果をもたらすことが期待される。

稿を終るにあたり、TSおよびF-RNAの測定にご協力いただいた協和発酵工業(株)に感謝します。また、動物の飼育管理にご協力いただいた本学中央動物施設の田村 弘助教授および職員各位に感謝します。

文 献

- 1) 下山正徳, 木村頼代二: 各種抗がん剤の *in vitro* における殺細胞作用について— L-1210 細胞を中心に—. 最新医 28: 1024~1040, 1973
- 2) Lokich J, Bothe A, Fine N, Perri J: Phase I study of protracted venous infusion of 5-fluorouracil. *Cancer* 48: 2565~2568, 1981
- 3) Spears C P, Shahinian A H, Moran R G, Heiderberger C, Corbett T H: *In vivo* kinetics of thymidylate synthetase inhibition in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant murine colon adenocarcinomas. *Cancer Res.* 42: 450~456, 1982
- 4) Schneider W C: Phosphorus compounds in animal tissues. III. A comparison of methods for the estimation of nucleic acids. *J Biol Chem* 221: 747~751, 1946
- 5) 内田淳二, 梅野幸彦, 武田節夫: フッ化ピリミジン系抗癌剤投与後の腫瘍内 RNA 中の 5-fluorouracil 量と抗腫瘍効果との関連性についての基礎検討。癌と化療 19: 677~683, 1992
- 6) Inada T, Ogata Y, Kubota T, Ozawa I, Hishinuma S, Shimizu H, Kotake K, Ikeda T, Koyama Y: A pharmacodynamic and pharmacokinetic study of fluoro-pyrimidines in a nude mouse system and in postoperative patients with gastric cancer. *Jpn J Surg* 23: 687~692, 1993
- 7) 穴田久雄, 芦沢 忠, 中村信雄: 5-fluorouracil の経口投与による抗腫瘍効果。Chemotherapy 22: 1074~1079, 1974
- 8) 花谷勇治, 小平 進, 浅越辰男, 三吉 博, 蓮見直彦, 長岡信彦: 投与スケジュールによる 5-fluorouracil の抗腫瘍効果—ヌードマウス移植ヒト胃癌株を用いた検討—。Chemotherapy 42: 1015~1020, 1994
- 9) Ovejera A A, Houchens D P, Barker A D: Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. *Ann Clin Lab Sci* 8: 50~56, 1978

An experimental study on the effect of oral administration of 5-fluorouracil,
using a human stomach cancer xenograft in nude mice

Yuji Hanatani, Susumu Kodaira, Tatsuo Asagoe,
Hiroshi Miyoshi and Nobuhiko Nagaoka

First Department of Surgery, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan

We examined the antitumor effect of 5-fluorouracil (5-FU) by daily oral (p. o.) administration of 20 mg/kg compared with that by daily intraperitoneal (i. p.) administration of 10 mg/kg. A 5-FU-sensitive human stomach cancer xenograft (SC-1-NU) was used for the experiment. We also measured the binding capacity of thymidylate synthase (TS) and 5-FU incorporated into RNA (F-RNA) for the effect on DNA and RNA, respectively. Antitumor effects of 5-FU by 20 mg/kg p. o. were significantly stronger than those by 10 mg/kg i. p., throughout the experimental period ($P < 0.05$). The minimum T/C ratios were 9.97% for 20 mg/kg p. o. and 48.1% for 10 mg/kg i. p.. The effects of a single dose of 5-FU on TS and F-RNA were transient, whereas the TS inhibition rate and F-RNA content were gradually increased after successive doses of 5-FU. In both cases, no differences were seen between the effects of 20 mg/kg p. o. and 10 mg/kg i. p.. It was considered that the effect of a large dose of 5-FU given orally could be equivalent to that given intraperitoneally.