

【原著・基礎】

Vinorelbine のヒト乳癌株に対する抗腫瘍効果

山田 好則¹⁾・浅沼 史樹¹⁾・山田 高也²⁾・鈴木 達夫²⁾
平久 治³⁾・堤 大基³⁾・林 正彦³⁾

¹⁾社団法人北里研究所北里研究所病院外科*, ²⁾同 研究部,

³⁾社団法人北里研究所基礎研究所動物実験センター

(平成 15 年 1 月 6 日受付・平成 15 年 1 月 27 日受理)

新規の vinca alkaloid 系抗癌薬である vinorelbine について、乳癌に対する抗腫瘍効果の実験的検討を、estrogen receptor 陽性のヒト乳癌株である MCF-7 および R-27 を用いて行った。*In vivo* の検討では、腫瘍株を移植されたヌードマウスに対し、vinorelbine を含む各種抗癌薬の最大耐用量を全身投与して、実験終了時の薬剤投与群の対照群に対する相対腫瘍重量の比 (T/C 値) により比較した。Vinorelbine は MCF-7 に対し、26.7%、R-27 に対し 44.1% という高い T/C 値を示した。これは比較した他の薬剤である、5-fluorouracil (5-FU), docetaxel, cisplatin (CDDP), CPT-11, tamoxifen のうち、docetaxel に匹敵する高い抗腫瘍効果であった。*In vitro* の検討は MTT 試薬を用いた succinate dehydrogenase inhibition (SDI) 法を用いて行った。Vinorelbine の 50% 抑制濃度 (IC₅₀) は MCF-7 に対し 2.4 μg/mL, R-27 に対し 3.0 μg/mL であり、他の vinca alkaloids である vindesin (VDS) および vincristine (VCR) の IC₅₀ の 10% 以下と優れていた。次に、培養液中の 5-FU または CDDP にそれぞれ vinorelbine を添加して腫瘍増殖抑制を観察することにより併用実験を行った。5-FU との併用で、単独では抑制効果を示さない 0.01 μg/mL という vinorelbine 濃度でも 5-FU の増殖抑制を著しく高めることが示された。以上により、vinorelbine は従来の first line, second line の対乳癌治療薬に加え、新たな治療戦略を提供できる薬剤であることが示唆された。

Key words: vinorelbine, 乳癌, ヌードマウス, SDI 法, 併用療法

わが国は欧米諸国に比し乳癌の罹患率は非常に小さいが、近年になり明らかに増加の傾向が認められてきている。乳癌は他の固形癌に比し、一般的に予後が良好な上、化学療法、内分泌療法、放射線療法さらには分子標的薬に対する感受性が比較的良好で、転移・再発に対して first line, second line の治療に耐性になったあとも、さらに third line 以降の治療手段が必要とされることも珍しくない。乳癌に対する化学療法薬としては、anthracycline 系, taxane 系抗癌薬が中心的な位置を占め、このほかおもに併用薬として cyclophosphamide, methotrexate あるいは 5-FU 系薬剤も使用されるが、上記の理由でさらに新たな薬剤が治療戦略のレパートリーに加えられることが求められている。

Vinorelbine はフランスで開発された半合成の vinca alkaloid 系抗癌薬で、tubulin 重合による微小管形成の阻害により、抗腫瘍効果が発揮されるものと考えられている¹⁻³⁾。本薬は、わが国ではすでに上市されているものの、非小細胞性肺癌に対してのみ保険適応が認められている。

本研究では vinorelbine の乳癌に対する抗腫瘍効果を *in vivo*, *in vitro* において、他剤との比較検討を中心に行い、さらには他の乳癌化学療法剤と同様、治療戦略のなかで重要になると考えられる併用療法の基礎的検討を行った。

I. 材料と方法

1. 腫瘍

当施設においてヌードマウスに継代移植されている、ヒト由来の乳癌株 MCF-7 と R-27 を用いた。両株とも estrogen receptor 陽性である。腫瘍が新たにヌードマウスに継代移植された後、マウスに対し estradiol (E₂) (EP ホルモンデポ、帝国臓器) が筋肉内に投与される。E₂ の投与量は、MCF-7 では移植直後および 2 週間後の 2 回それぞれ 0.1 mg (総量約 10 mg/kg) であり、R-27 では移植直後に 0.1 mg が 1 回 (約 5 mg/kg) である⁴⁾。

2. 薬剤

Vinorelbine は協和発酵(株)より提供を受けた。比較および併用療法の検討に用いられた他の薬剤は以下の通りである。5-fluorouracil (5-FU, 協和発酵), docetaxel (アベンティス), cisplatin (CDDP, ブリストルマイヤーズスクイブ), CPT-11 (ヤクルト), tamoxifen (アストラゼネカ), vindesin (VDS, 塩野義), vincristine (VCR, 塩野義)。

3. *In vivo* の検討

実験動物として、specific pathogen free (SPF) 環境

*東京都港区白金 5-9-1

下で飼育された BALB/c スードマウス雌 (日本クレア) を用いた。実験開始時の週齢は 4~8 週とした。無菌下に細切された腫瘍を、マウスの両側背部皮下にトラカール針を用いて移植し、腫瘍の推定重量が 100~300 mg となった時点でマウスを治療群と対照群の 2 群に分け、治療実験を開始した。腫瘍の推定重量 (tumor volume = TV) の算出は、皮下に移植された腫瘍の長径 (L) と短径 (W) の実測値から、以下の式によった。

$$TV = (L \times W^2) / 2$$

治療、対照各群のマウスの匹数は、4~7 匹とした。治療群には、予備実験の結果から導かれた最大耐用量 (maximum tolerated dose, MTD) が、それぞれの薬剤に最適の投与経路とスケジュールで投与された。Vinorelbine については、16 mg/kg が 1 回静脈内投与された。

治療効果の判定は治療開始後の各時点で治療群 (T) および対照群 (C) おのこの推定腫瘍重量を求め、おのこの治療開始日の推定腫瘍重量との比 (相対腫瘍重量; T_{RW} および C_{RW}) を算出したうえ、相対腫瘍重量比 (T_{RW}/C_{RW}) の値により行った。すなわち、治療開始後より実験終了までの期間における最小の T_{RW}/C_{RW} (T/C) 値をもってその薬剤の抗腫瘍効果とした⁴⁾。有効性のめやすとして T/C 値のカットオフを 50% とし、50% 以下を有効と判定した。

4. *In vitro* の検討

In vitro の抗腫瘍効果の評価は、無血清培地を使用した細胞培養下で、MTT 試薬 (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma) を用いた succinate dehydrogenase inhibition (SDI) 法により行った。方法の詳細は既報の通りであるが、腫瘍を細切、酵素処理した細胞浮遊液を、96 穴マイクロプレート (Costar) に生細胞 10^5 cells/0.1 mL/well となるよう調整分注した上、薬剤添加 (対照は薬剤非添加) 後 48 時間培養し、MTT 試薬を添加して生細胞量の測定を行った⁵⁾。対照との比較から、薬剤添加による増殖抑制率 (inhibition index) を算出し、薬剤濃度と増殖抑制率による濃度反応曲線を描き、さらに 50% 抑制濃度 (50% inhibitory concentration; IC_{50}) を求めた。

併用効果の検討では、MCF-7 浮遊液に 5-FU または CDDP を各濃度で接触させる培養液内に、vinorelbine を一定濃度で添加し、5-FU または CDDP 単独による増殖抑制率に与える vinorelbine の影響を試験した。

II. 結 果

1. *In vivo* における vinorelbine の抗腫瘍効果

1) MCF-7 に対する効果

Vinorelbine を静脈内に 16 mg/kg 単回投与すると、数日後より増殖が抑制され、14 日目には、実験開始時よりも縮小を示したが、その後緩徐な増殖を示した (Fig. 1)。実験期間における最小の相対推定重量比 (T/C 値)

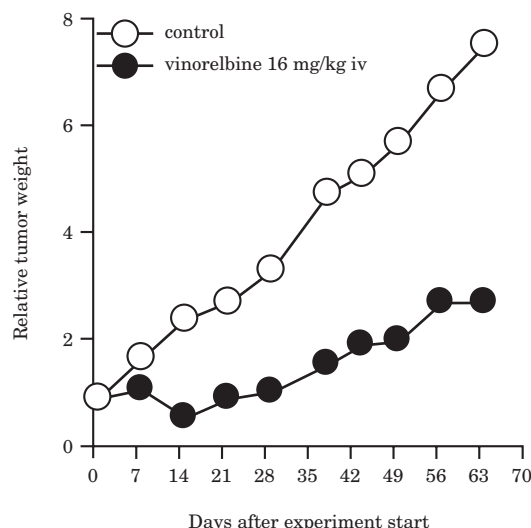


Fig. 1. Antitumor effect of vinorelbine against MCF-7 *in vivo*.

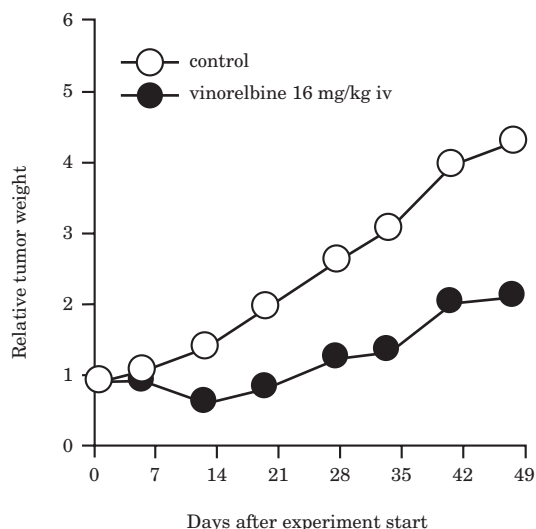


Fig. 2. Antitumor effect of vinorelbine against R-27 *in vivo*.

は 26.7% であった。

2) R-27 に対する効果

MCF-7 と同様、投与数日後より増殖抑制が見られ、12 日目には退縮を認めたがその後緩徐に増殖した (Fig. 2)。T/C 値は 44.1% であった。

3) 他の薬剤との比較

最大耐用量投与下での vinorelbine と他の薬剤との比較を行った。MCF-7 に対しては、vinorelbine のほか docetaxel, CPT-11, tamoxifen が有効と判定されたが、T/C 値では vinorelbine は docetaxel に次いで高い抗腫瘍効果を示した (Table 1)。一方、R-27 に対して有効と判定されたのは、vinorelbine と docetaxel のみであった。

2. *In vitro* における検討

1) 他の vinca alkaloids との比較

Table 1. Antitumor activity of some anticancer agents against human breast carcinoma xenografts

Anticancer agent	Dose, schedule, route ^{a)}	MCF-7 (%)	R-27 (%)
Vinorelbine	16 mg/kg qd×1, iv ^{b)}	26.7 ^{c)}	44.1
5-fluorouracil	60 mg/kg q 4 d×3, ip ^{c)}	69.6	75.6
Docetaxel	10 mg/kg q 4 d×3, ip	21.3	28.9
Cisplatin	6 mg/kg q 4 d×3, ip	64.1	55.1
CPT-11	70 mg/kg q 4 d×3, iv	41.4	51.9
Tamoxifen	5 mg/kg qd×18, po ^{d)}	44.8	63.8

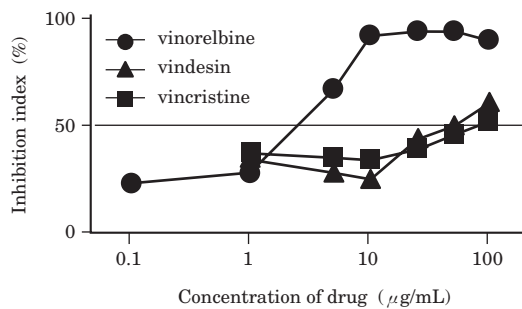
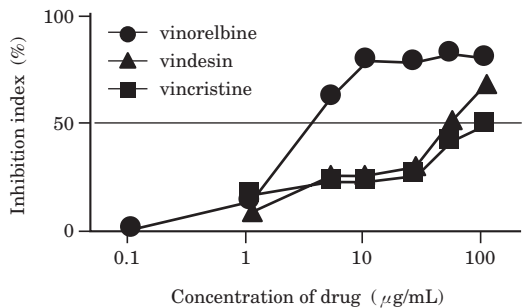
^{a)}Dose, schedule and route of administration were based on experiments determining maximum tolerated doses.

^{b)}Intravenous administration.

^{c)}Intraperitoneal administration.

^{d)}Oral administration.

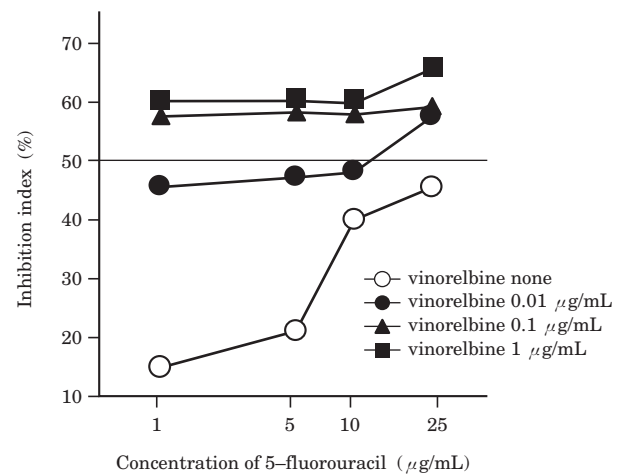
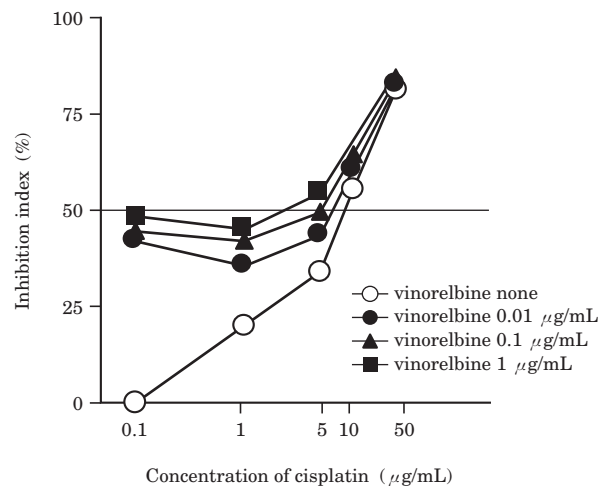
^{e)}Data are shown as T/C of relative mean tumor weight during the experiment.

Fig. 3. *In vitro* antitumor activity of vinca alkaloids against MCF-7.Fig. 4. *In vitro* antitumor activity of vinca alkaloids against R-27.

SDI 法による増殖抑制実験において、MCF-7、R-27 のいずれに対しても vinorelbine は VDS、VCR に比し明らかに優れた inhibition index を示した (Figs. 3, 4)。IC₅₀ 値で見ると、MCF-7 に対しては vinorelbine が 2.4 μg/mL で、VDS の 40.7 μg/mL、VCR の 63.1 μg/mL を大きく上回っていた。R-27 に対しては、vinorelbine が 3.0 μg/mL、VDS が 45.7 μg/mL、VCR が 75.9 μg/mL であり、MCF-7 と同様、vinorelbine の IC₅₀ 値が優れていた。

2) 併用効果の検討

MCF-7 を用いて vinorelbine の付加が、5-FU ないし CDDP の増殖抑制効果におよぼす影響をみると、5-FU に対しては、vinorelbine の 1 μg/mL、0.1 μg/mL、

Fig. 5. *In vitro* combination of vinorelbine and 5-fluorouracil against MCF-7.Fig. 6. *In vitro* combination of vinorelbine and cisplatin against MCF-7.

0.01 μg/mL いずれの濃度の添加でも、vinorelbine 濃度に応じて 5-FU の増殖抑制効果を高め、25 μg/mL までの薬剤濃度では 50% を超えなかった inhibition index が著しく増加した (Fig. 5)。一方、CDDP との

併用では, vinorelbine 濃度に応じた inhibition index の増加は認められたが, その程度は小さかった (Fig. 6)。

III. 考 察

Vinorelbine は *in vivo* ならびに *in vitro* の実験系で, ヒト由来の乳癌に対し高い抗腫瘍効果を示した。

In vivo のヌードマウス移植腫瘍実験で, vinorelbine は MCF-7, R-27 の両腫瘍に対し, 治療開始後 2 週目前後の一時的退縮 (相対腫瘍重量が 1.0 以下になる) を含む高い効果を示した。当院では, 1978 年にヌードマウスが導入されて以来, *in vivo* におけるヒト癌のヌードマウス移植による抗癌薬感受性判定実験が, 手術時摘出腫瘍の移植と, これに対する抗癌薬投与実験として行われてきた⁶⁾。乳癌については, おもに estrogen receptor 陽性のヒト乳癌継代株を用い, 実験的・化学・内分泌療法を行い, anthracyclines, taxanes, anti-estrogens などについての知見が得られている⁷⁻¹⁰⁾。これまでの研究結果によれば, 今回の実験では用いられなかったが, 乳癌の化学療法薬として頻用される anthracycline 系の adriamycin の T/C 値は, MCF-7 に対して 64.5%, R-27 に対しては 70.5% であり, また taxane 系の paclitaxel はそれぞれ 11.6%, 66.1%, さらに cyclophosphamide はそれぞれ 36.3%, 36.3% であった⁹⁾。T/C 値からみて, vinorelbine は, 今回比較された他の薬剤と同等あるいはそれ以上の抗腫瘍活性を有していると考えられた。

In vitro の検討に用いた MTT 試薬による SDI 法は, *in vitro* の抗癌薬感受性検査として, われわれを含む多くの施設で広く用いられ, 結果の再現性や臨床効果の予測などにおいて評価の定まった検査法である¹¹⁻¹³⁾。Vinorelbine は他の vinca alkaloids に比し, IC₅₀ 値が 1/10 以下と, はるかに高い抗腫瘍効果をもつことが示された。R-27 に対する IC₅₀ 値 3.0 μg/mL は, これまでのわれわれの報告にある anthracycline 系 epirubicin の 22.4 μg/mL, taxane 系 paclitaxel の 36.9 μg/mL を凌ぐ抗腫瘍活性を有すると認められる¹⁴⁾。

Second line 以降の乳癌治療薬としての期待がある vinorelbine は, 単剤としてばかりでなく, 他剤との併用効果が良好であることが, 乳癌の標準治療薬として位置付けられるための重要な要素である。先行して使用される可能性の高い, 現行の標準薬剤 anthracyclines, taxanes 以外の薬剤で, 乳癌に対し抗腫瘍活性をもつ薬剤である 5-FU と CDDP を併用相手として選択し, *in vitro* における併用効果の検討を行った。代謝拮抗薬である 5-FU については, 48 時間培養による SDI 法では抗腫瘍活性が十分認められず, 設定した濃度の範囲では, inhibition index が 50% 以下にとどまり, IC₅₀ 値を算出できなかった。代謝拮抗薬と vinorelbine のような cytotoxic な薬剤との併用効果を観察する方法として, 今回行ったような併用実験が有用と思われた。

Vinorelbine の 0.01 μg/mL とした IC₅₀ 値をはるかに下回る低濃度の添加でも, 5-FU による inhibition index が著しく高められ, 併用効果が示された。一方, CDDP に対しては, そのような併用効果は必ずしも明らかではなかった。海外ではすでに臨床試験が行われている領域でもあり, 今後さらなる検討が待たれるところである^{15,16)}。

Vinorelbine は乳癌の治療戦略に新たな手段を提供できると考えられる。

文 献

- 1) Maral R, Bourut C, Chenu E, et al.: Experimental antitumor activity of 5'-nor-anhydrovinblastine navelbine. *Cancer Letters* 22: 49-54, 1984
- 2) Cros S, Wright M, Morimoto M, et al.: Experimental antitumor activity of navelbine. *Semin Oncol* 16: 15-20, 1989
- 3) 芦沢 忠, 三好勝則, 浅田政男, 他: 新規 Vinca Alkaloid 誘導体 Navelbine (Vinorelbine Ditartrate) の抗腫瘍性。癌と化学療法 20: 59-66, 1993
- 4) 山田好則: 乳癌内分泌療法のスクリーニング。KARKINOS 3: 65-72, 1990
- 5) 浅沼史樹, 山田好則, 河村栄二, 他: 固形腫瘍の抗癌剤感受性試験としての SDI 法 (succinic dehydrogenase inhibition test) の検討—酵素処理と抗癌剤の濃度反応曲線の意義—。日本癌治療学会雑誌 26: 1095-1103, 1991
- 6) 山田好則, 山田高也, 浅沼史樹, 他: ヌードマウス可移植性ヒト癌株を用いた抗癌剤感受性試験の基礎的検討。HUMAN CELL 8: 179-184, 1995
- 7) 久保田哲朗, 如水和也, 石引久弥, 他: ヌードマウス可移植性ヒト乳癌株に対する実験的・化学・内分泌療法—UFT と TAMOXIFEN の併用効果—。日本癌治療学会雑誌 25: 2767-2773, 1990
- 8) Koh J, Kubota T, Asanuma F, et al.: Antitumor effect of triphenylethylene derivative (TAT-59) against human breast carcinoma xenografts in nude mice. *J Surg Oncol* 51: 254-258, 1992
- 9) Kubota T, Matsuzaki S W, Hoshiya Y, et al.: Antitumor activity of paclitaxel against human breast carcinoma xenografts serially transplanted into nude mice. *J Surg Oncol* 64: 115-121, 1997
- 10) 山田高也, 山田好則, 浅沼史樹, 他: 可移植性ヒト乳癌株を用いた UFT と Docetaxel 併用療法の基礎的検討。癌と化学療法 27: 1725-1730, 2000
- 11) 久保田哲朗, 首藤昭彦, 石引久弥, 他: 手術材料を対象とした SDI 抗癌剤感受性試験 (MTT アッセイ)。癌と化学療法 17: 2025-2030, 1990
- 12) 浅沼史樹, 山田好則, 河村栄二, 他: 固形腫瘍の抗癌剤感受性試験としての SDI 法 (succinic dehydrogenase inhibition test) の検討—抗癌剤の 50% 抑制濃度と臨床効果との比較—。癌と化学療法 19: 95-101, 1992
- 13) 河村栄二, 鈴木達夫, 山田好則: SDI test の基礎的検討と各種感受性試験との比較および臨床応用の検討。制癌剤適応決定の基礎と臨床 (近藤達平 編), p.81-96, 癌と化学療法社, 東京, 1987
- 14) Asanuma F, Yamada Y, Kawamura E, et al.: Antitumor activity of paclitaxel and epirubicin in

- human breast carcinoma, R-27. *Folia Microbiol* 43: 473~474, 1998
- 15) Nole F, Braud F, Aapro M, et al.: Phase I - II study of vinorelbine in combination with 5-fluorouracil and folinic acid as first-line chemotherapy in metastatic breast cancer: A regimen with a low subjective toxic burden. *Ann Oncol* 8: 865~870, 1997
- 16) Ray-Coquard I, Biron P, Bachelot T, et al.: Vinorelbine and cisplatin (CIVIC regimen) for the treatment of metastatic breast carcinoma after failure of anthracycline- and/or paclitaxel-containing regimens. *Cancer* 82: 134~140, 1998

Antitumor activity of vinorelbine against human breast carcinomas

Yoshinori Yamada¹⁾, Fumiki Asanuma¹⁾, Takaya Yamada²⁾, Tatsuo Suzuki²⁾,
Osamu Hiraku³⁾, Daiki Tsutsumi³⁾ and Masahiko Hayashi³⁾

¹⁾Department of Surgery, Kitasato Institute Hospital, the Kitasato Institute, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8642, Japan

²⁾Biomedical Laboratory, Kitasato Institute Hospital, the Kitasato Institute

³⁾Laboratory Animal Center, Center for Basic Research, the Kitasato Institute

We tested antitumoral activity of vinorelbine, a semisynthetic vinca alkaloid anticancer agent, against human breast carcinoma, *in vivo* and *in vitro*. The MCF-7 and R-27 tumors were positive for estrogen receptors and serially transplanted in female nude mice. The maximum tolerated dose of 16 mg/kg vinorelbine was administered intravenously to nude mice after a subcutaneously inoculated tumor started exponential growth. The treated/control (T/C) ratio of relative mean tumor weight was 26.7% for MCF-7 and 44.1% for R-27, showing that vinorelbine was equivalent or superior to other agents commonly used to treat breast cancer. An *in vitro* study using succinate dehydrogenase inhibition (SDI) showed that the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of vinorelbine was 2.4 µg/mL for MCF-7 and 3.0 µg/mL for R-27, much lower than for other vinca alkaloids, vindesine or vincristine. The combination chemotherapy experiment using SDI showed that adding 0.01 µg/mL of vinorelbine greatly enhanced antitumor activity of 5-fluorouracil (5-FU), suggesting drug synergy. Vinorelbine thus appears to be a powerful second- or third-line chemotherapy agent for patients with advanced or metastatic breast cancer.