

新しい真菌由来物質による角膜新生血管の抑制 第2報

仁井 誠治¹⁾, 出井 健之¹⁾, 寺野 紘²⁾, 真島 行彦¹⁾

¹⁾慶應義塾大学医学部眼科学教室, ²⁾藤沢薬品工業株式会社

要 約

目的:糸状菌 *Scolecobasidium arenarium* 産生物質誘導体 FR 118487 による角膜新生血管抑制効果を実験した。

対象と方法:日本白色ウサギの輪部近くの角膜実質中に Wister ラット角膜片を挿入し新生血管を誘発した角膜移植モデルで, FR 118487 全身投与(10 mg/day)と軟膏(10, 3, 1%)の局所投与を行い, 角膜新生血管抑制効果を検討した。

結果:2週後の最大血管長で対照 3.4 ± 0.3 (平均値 \pm 標準偏差) mm に対して, 全身投与群では 0.1 ± 0.0

mm ($p < 0.01$), 10% 群では 0.1 ± 0.1 mm ($p < 0.001$), 3% 群では 1.0 ± 0.2 mm ($p < 0.001$), 1% 群では 0.9 ± 0.9 mm ($p < 0.02$) と, 有意に角膜新生血管を抑制した。

結論:FR 118487 は血管新生抑制薬として有用と考えられた。(日眼会誌 103:12-17, 1999)

キーワード:FR 118487 局所投与, *Scolecobasidium arenarium* 産生物質, 角膜新生血管抑制, 角膜移植, 軟膏

Inhibition of Corneal Neovascularization

—The Possibility of Inhibition by Drug Administration—

Seiji Nii¹⁾, Takeshi Idei¹⁾, Hiroshi Terano²⁾ and Yukihiko Mashima¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University, ²⁾Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

Abstract

Purpose: The anti-angiogenic activity of FR 118487, a new synthetic analog of *Scolecobasidium arenarium* products, was examined in Japanese white rabbit cornea.

Methods: We studied both systemic and locally administered FR 118487 (ointment) in a keratoplasty model consisting of corneal neovascularization after implantation of a Wister rat cornea into a rabbit cornea.

Results: Two weeks after the implantation, the maximum length of neovascularization was 3.4 ± 0.3 mm in control corneas, 0.1 ± 0.0 mm with systemic FR 118487 administration (10 mg/day) ($p < 0.01$), 0.1

± 0.1 mm with 10% FR118487 ointment ($p < 0.001$), 1.0 ± 0.2 mm with 3% FR 118487 ointment ($p < 0.001$), and 0.9 ± 0.9 mm with 1% FR 118487 ointment ($p < 0.02$).

Conclusion: FR 118487 had a significant effect on inhibition of corneal neovascularization. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 12-17, 1999)

Key words: Locally administered FR 118487, *Scolecobasidium arenarium* products, Inhibition of corneal neovascularization, Keratoplasty, Ointment

I 緒 言

角膜新生血管は角膜移植後の拒絶反応に対するリスクファクターとなっているが, 未だその抑制物質は眼科の分野において臨床応用に至っていない。我々は CuCl_2 誘発ウサギ角膜新生血管モデルおよび角膜移植モデルを用いて, 土壤糸状菌 *Scolecobasidium arenarium* の 1 系列である F-2015 が産生する FR 111142 の誘導体 FR

118487 の角膜新生血管抑制効果につき hydon ペレットによる局所投与について報告¹⁾したが, 今回ミニ浸透圧ポンプによる全身投与および軟膏による局所投与において検討したので報告する。

II 対象と方法

実験 1: ミニ浸透圧ポンプによる全身投与

対象として, 体重 2 kg 前後の雌の日本白色ウサギを各

別刷請求先: 160-8582 東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部眼科学教室 仁井 誠治

(平成 9 年 12 月 26 日受付, 平成 10 年 7 月 13 日改訂受理)

Reprint requests to: Seiji Nii, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

(Received December 26, 1997 and accepted in revised form July 13, 1998)

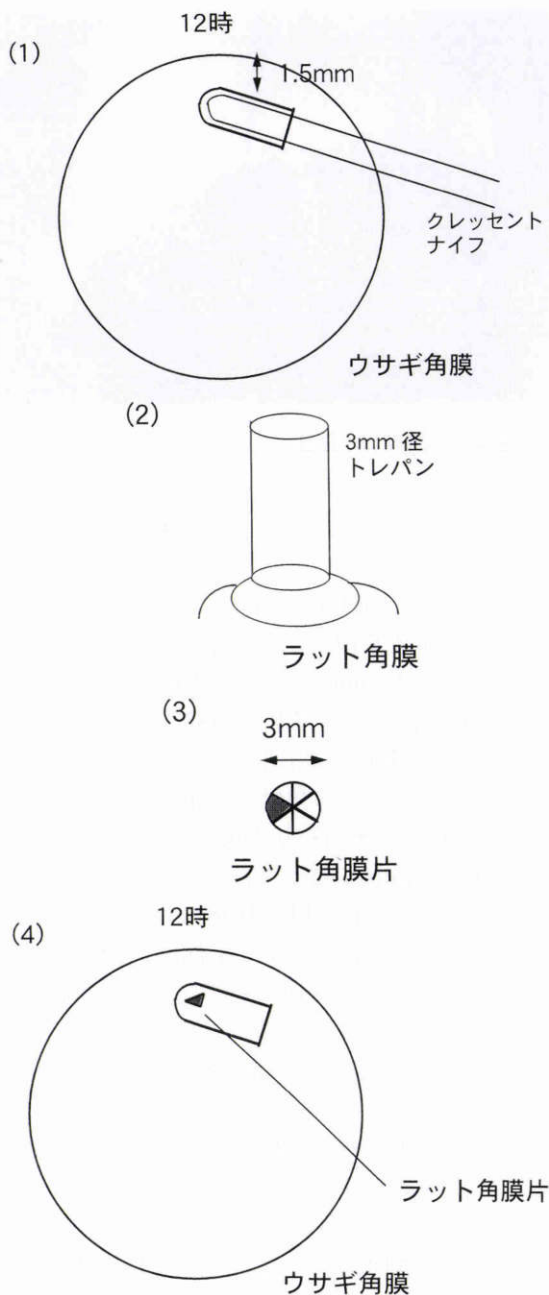


図 1 角膜移植モデル。

- (1) ウサギ角膜にクレセントナイフで 12 時の輪部から 1.5 mm の位置で終わるトンネルを作製する。
- (2) ラット角膜中央を 3 mm 径のトレパンで抜く。
- (3) 得られたラット角膜片を 6 分割する。
- (4) 6 分割したうちの 1 片のラット角膜片をウサギ角膜トンネル内に挿入する。

群 4 匹ずつ用いた。ウサギ角膜にクレセントナイフで図 1 に示すようにポケットを作製した。その後、12 時の輪部から 1.5 mm の位置に Wister ラット角膜片を図 1 のごとく、このポケットに挿入した。これらを角膜移植モデルとした。Wister ラット角膜片は、ラット角膜中央を 3 mm のトレパンで打ち抜いたものを 6 分割した 1 片を用いた。同時にウサギ背部皮下にミニ浸透圧ポンプ(アルザ社)を植え込み、10 mg/day で FR 118487 を全身投与し

たものを FR 118487 群とした。ミニ浸透圧ポンプの植え込みをしないものを対照とした。2 週間観察し、角膜新生血管の形成を各群で比較した。その時点で輪部から最も伸びていた新生血管の長さを最大血管長とし、これをスケールとともに撮影した写真上で測定し、各群で比較した。有意差検定には student t test を用いた。併せてウサギ体重も測定し、各群で比較した。

実験 2: FR 118487 軟膏による局所投与

対象として、体重 2 kg 前後の雌の日本白色ウサギを各群 6 匹ずつ用いた。実験 1 と同様に角膜移植モデルを作製した。その後 2 週間にわたり、10, 3, 1% の FR 118487 軟膏を投与したものを FR 118487 群とした。使用した FR 118487 は、軟膏はヒドロカーボゲル軟膏基剤を用いた懸濁型軟膏である。対照は、基剤を 2 週間投与したものとした。3 週間観察し、角膜新生血管の形成を各群で比較した。その時点で輪部から最も伸びていた新生血管の長さを最大血管長とし、これを実験 1 と同様に測定し、各群で比較した。有意差検定には student t test を用いた。併せてウサギ体重も測定し、各群で比較した。

III 結 果

実験 1: ミニ浸透圧ポンプによる全身投与

2 週後の FR 118487 群と対照群の前眼部写真を図 2 に示す。FR 118487 群では角膜新生血管をほとんど認めないのに対して、対照群ではラット角膜片を取り囲むように角膜新生血管が生じている。なお、移植したラット角膜片は対照群では強く白濁しているが、FR 118487 群ではほぼ透明性を保っていた。

角膜移植モデル角膜新生血管に対する FR 118487 の抑制効果を縦軸に、その時点で輪部から最も伸びていた新生血管の長さをもってグラフにしたものが図 3 である。実験 2 週後の最大血管長は対照群 3.6 ± 0.4 (平均値 \pm 標準偏差) mm に対して、FR 118487 群は 0.1 ± 0.0 mm ($p < 0.01$) と有意に角膜新生血管を抑制していた。

実験期間中のウサギ体重の変化を図 4 に示す。2 週後の対照群が 3.20 ± 0.22 (平均値 \pm 標準偏差) kg と体重が増加しているのに対して、FR 118487 群では 2.55 ± 0.20 kg と体重が減少しており、両者の間に $p < 0.05$ で有意差があった。

実験 2: FR 118487 軟膏による局所投与

2 週後の FR 118487 群と対照群の前眼部写真を図 5 に示す。FR 118487 群では角膜新生血管をほとんど認めないのに対して、対照群ではラット角膜片を取り囲むように角膜新生血管が生じている。なお、移植したラット角膜片は対照群では強く白濁しているが、FR 118487 (1%) 群と FR 118487 (3%) 群では軽度白濁し、FR 118487 (10%) 群ではほぼ透明性を保っていた。

角膜移植モデル角膜新生血管に対する FR 118487 の抑制効果を縦軸に、その時点で輪部から最も伸びていた

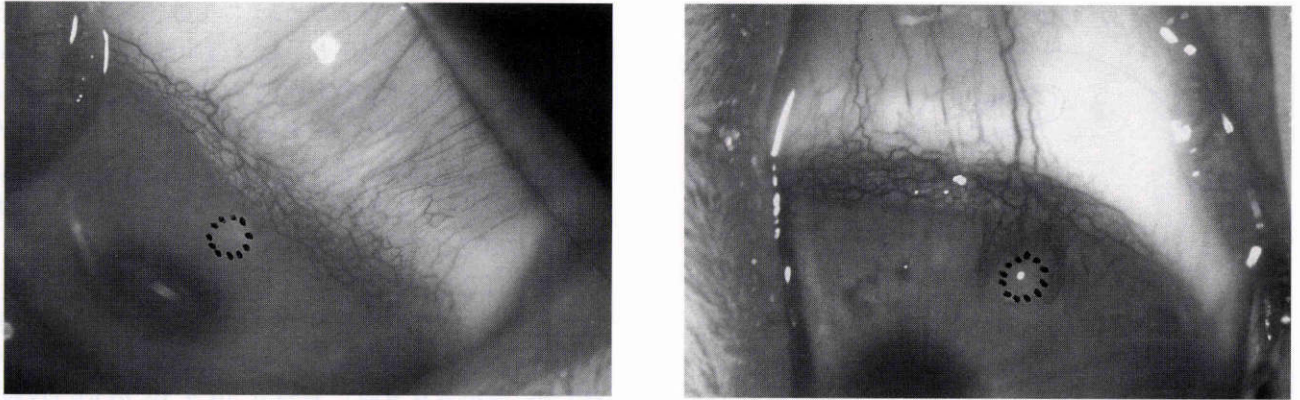


図2 実験1：ミニ浸透圧ポンプによる全身投与の前眼部(14日目)。
左：FR 118487 群 右：対照群
点線で囲まれた部分は埋め込まれたラット角膜片を示す。

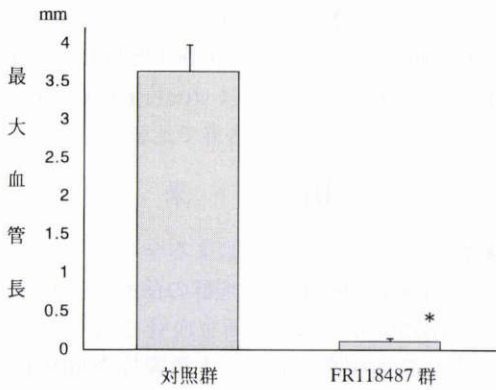


図3 角膜移植モデル角膜新生血管に対する全身投与FR 118487の抑制効果(14日目)。
n=4, *p<0.01

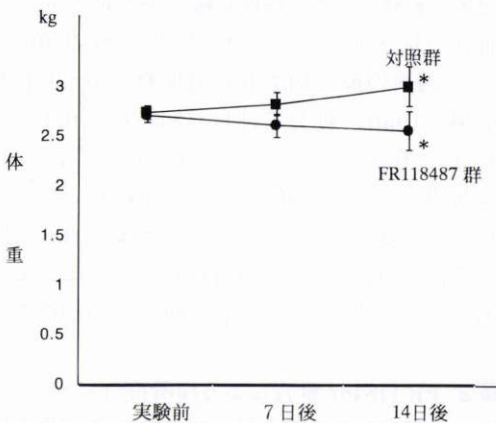


図4 FR 118487 全身投与によるウサギの体重変化(経時変化)。
n=4, *p<0.05

新生血管の長さをとってグラフにしたものが図6である。7日目の最大血管長は対照群 3.2±0.3 mm に対して、FR 118487 (10%) 群は角膜新生血管を認めず (p<0.01), FR 118487 (3%) 群は 0.4±0.5 mm (p<0.01), FR

118487 (1%) 群は 0.6±0.6 mm (p<0.01) と、いずれも有意に角膜新生血管を抑制していた。14日目の最大血管長は対照群 3.4±0.3 mm に対して、FR 118487 (10%) 群は 0.1±0.1 mm (p<0.01), FR 118487 (3%) 群は 1.0±0.2 mm (p<0.001), FR 118487 (1%) 群は 0.9±0.9 mm (p<0.02) と、いずれも有意に角膜新生血管を抑制していた。21日目、FR 118487 軟膏投与中止7日目の最大血管長は対照群 4.0±0.4 mm に対して、FR 118487 (10%) 群は 1.3±0.2 mm (p<0.001), FR 118487 (3%) 群は 2.9±1.1 mm (有意差なし), FR 118487 (1%) 群は 2.7±1.2 mm (有意差なし) と、FR 118487 (10%) 群のみ有意に角膜新生血管を抑制していた。

14日目のFR 118487 (10%) 群の輪部から周辺角膜の組織像(ヘマトキシリン・エオジン染色)を図7に示す。ウサギ角膜実質層間に埋め込まれたラット角膜片は硝子様に変性しており、その周囲に炎症細胞の集簇がある。輪部からラット角膜片に向かって新生血管が伸びているが、未だ角膜片には到達していない。10% FR 118487 軟膏投与による角膜上皮、その他の組織学的障害はなかった。

実験期間中のウサギ体重の変化を図8に示す。各群間に有意差はなく、FR 118487 投与による体重の減少はなかった。

IV 考 按

新生血管は、血管新生刺激が血管に及ぶと、血管基底膜の融解、血管内皮細胞の遊走・分裂、管腔・基底膜形成が起こり形成される。新生血管抑制物質は、この過程を抑制するもので、種々の物質が知られている。

今回検討したFR 118487は、土壌糸状菌 *Scolecobasidium arenarium* の1系列であるF-2015が産生するFR 111142の誘導体であり²⁾、類似したものとしては *Aspergillus fumigatus* から抽出されたフマジリンやその誘導体 AGM-1470 (angiostatin) がある³⁾⁴⁾。FR 118487は、血管内皮細胞培養系を用いた研究によって、血管内皮細胞

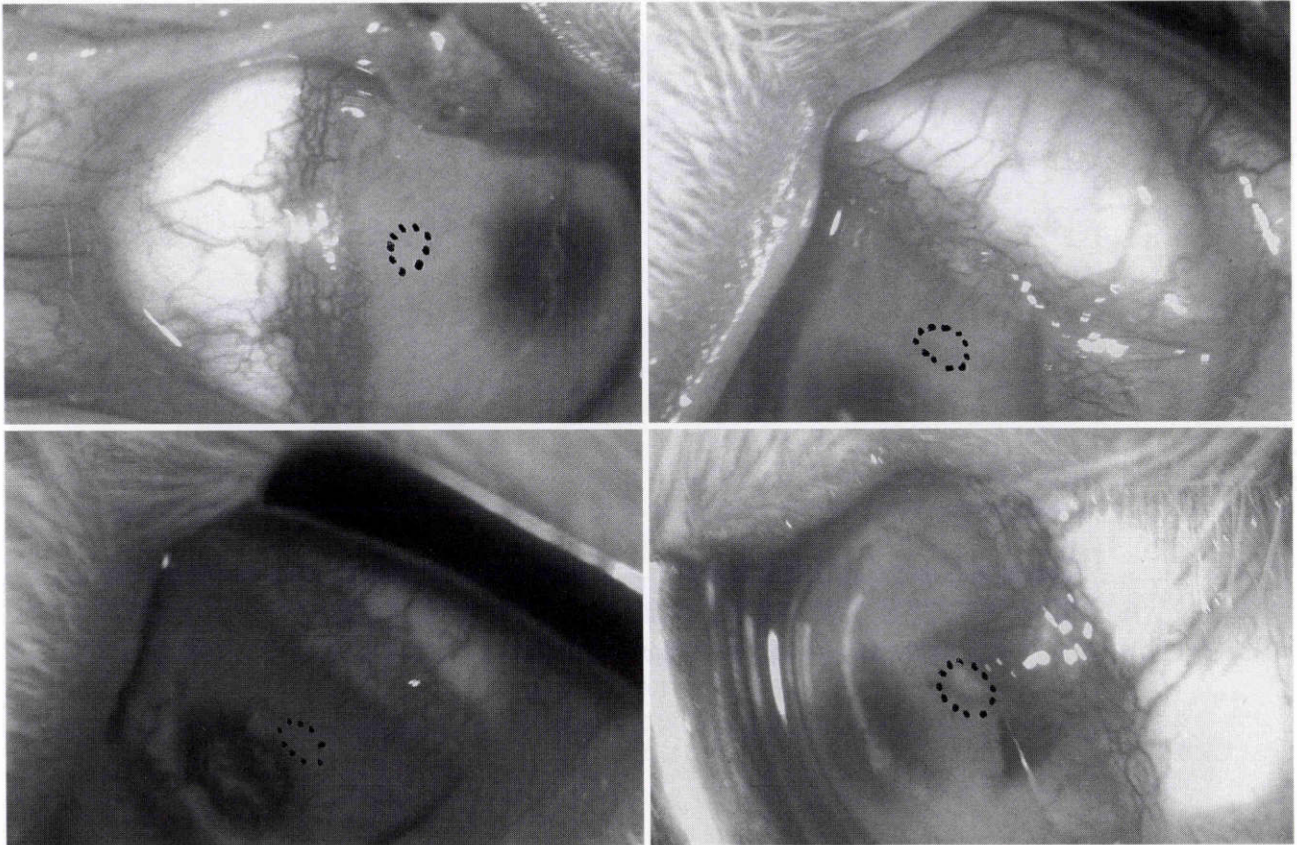


図5 実験2：FR 118487 軟膏による局所投与の前眼部(14日目)。

左上：FR 118487 (10%) 群, 右上：FR 118487 (3%) 群, 左下：FR 118487 (1%) 群, 右下：対照群
点線で囲まれた部分は埋め込まれたラット角膜片を示す。

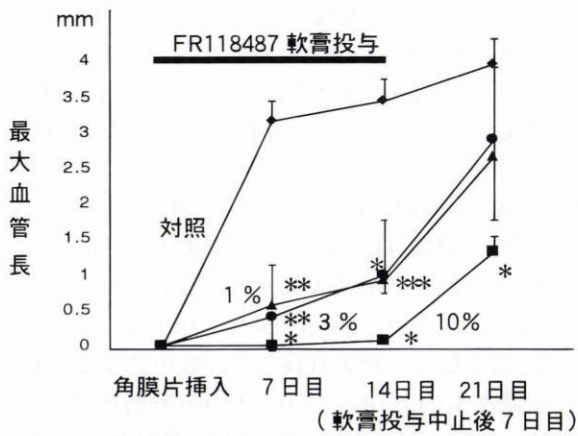


図6 角膜移植モデル角膜新生血管に対するFR118487 軟膏の抑制効果(経時変化)。

n=6, 同時点の対照に対して*: p<0.001, **: p<0.01, ***: p<0.02 ◆: 対照, ▲: 1%, ●: 3%, ■: 10%

に対して, 比較的特異的な増殖抑制効果をもち⁵⁾, その抑制能は cytostatic な作用であること⁶⁾, 塩基性線維芽細胞増殖因子や血管内皮細胞増殖因子に対して増殖阻害作用を示すこと⁷⁾, 細胞周期の G1 期で抑制していること⁷⁾, 原抽出物である FR 111142 よりも合成誘導体である FR 118487 の方がはるかに増殖抑制効果が高いこと²⁾がわ

かっている. 鶏胚尿漿膜法(CAM法)を用いた研究では 0.5~320 μg/pellet の濃度で用量依存的に血管を抑制するが, 胚の成長には影響しないことが確認されている⁷⁾. CuCl₂ の硝子体内移植で誘発した有色ウサギ硝子体内新生血管モデルでは, FR 118487 の全身投与あるいは点眼投与で有意な抑制効果を示している⁸⁾. ウサギ角膜を用いたポケット法においても, FR 118487 はベレットによる局所投与もしくは皮下投与で, 血管内皮増殖因子およびヘパリン, 塩基性線維芽細胞増殖因子または colon 26 マウス結腸癌細胞などの血管新生誘発に抑制的に働くことが知られている⁷⁾. 固定腫瘍の増殖や転移には血管新生が必要であり, これを抑えることによる FR 118487 の抗腫瘍活性も, マウス colon 26 結腸癌, colon 38 結腸癌, ルイス肺癌, M 5076 細網細胞肉腫, ラット肝癌, ヒト腫瘍 MX-1 などの実験動物腫瘍系で皮下投与や経口投与で認められている⁷⁾.

角膜新生血管に関して, 前回, 我々はウサギ角膜を用いたポケット法において, CuCl₂ や Wister ラット角膜片の血管新生誘発に対して FR 118487 が hydron ベレットによる局所投与により抑制的に働くことを報告¹⁾した. しかし, この投与法では投与に手術を要し, 異物としてのベレットの問題もあり臨床的には使いにくい. そこで, 臨床的に使いやすい投与法として全身投与(皮下注射)と局所投

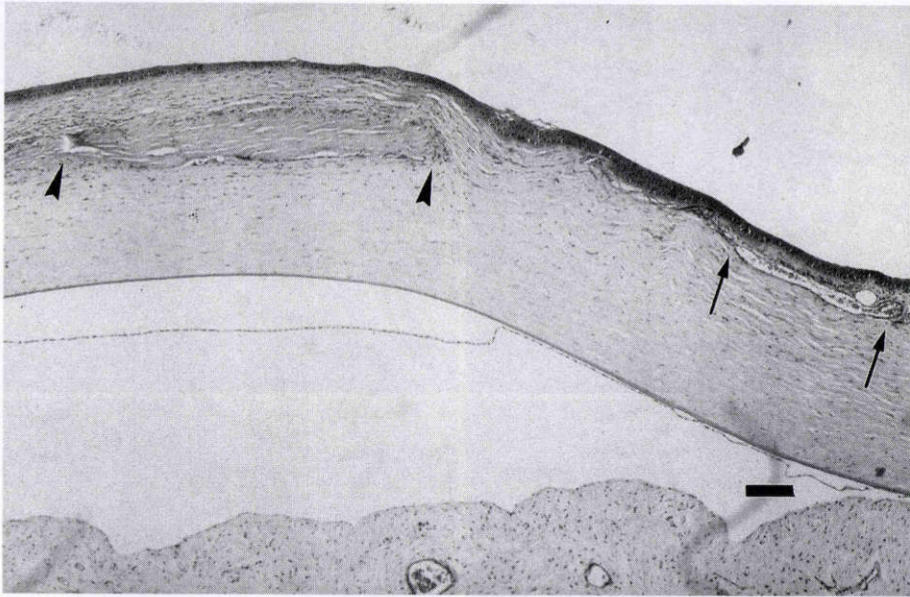


図7 角膜移植モデル角膜新生血管のヘマトキシリン・エオジン染色像。

FR 118487 (10%) 群, 14 日目

ウサギ角膜実質層間に埋め込まれたラット角膜片(矢じり)は硝子様に変性しており, その周囲に炎症細胞の集簇が認められる。輪部からラット角膜片に向かって新生血管が伸びているが(矢印), 未だラット角膜片には到達していない。バーは 50 μ

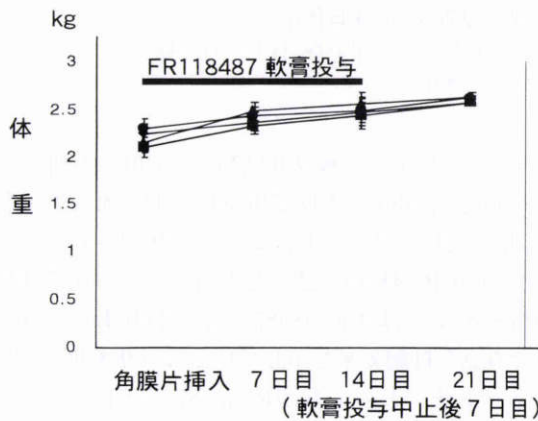


図8 FR 118487 軟膏投与によるウサギの体重変化(経時変化)。

n=6, ◆: 対照, ▲: 1%, ●: 3%, ■: 10%

与(眼軟膏)を考え, そのモデルとして今回の実験系で検討した。その結果, Wister ラット角膜片を挿入した角膜移植モデルにおいて, ミニ浸透圧ポンプによる全身投与および軟膏による局所投与のいずれにおいても, 投与期間中は対照に比べ有意に角膜新生血管を抑制しており, FR 118487 軟膏の角膜新生血管抑制効果は, 10, 3, 1% と濃度依存性に対照群と有意差が明らかになる形で表れている。また, 投与中止後 1 週で 3% および 1% FR 118487 軟膏では, 対照群に角膜新生血管が追い付いており, 10% FR 118487 軟膏においても対照群と有意差は認められるものの, 角膜新生血管の伸長傾向を認めた。この FR 118487

軟膏による角膜新生血管抑制効果は投与中に限られ, 投与中止後も血管新生刺激が続く場合には角膜新生血管が追い付いて伸長してくるものと考えられ, その抑制能が cytostatic であることを反映していると思われた。

真菌由来血管新生抑制物質の問題点として組織毒性の強さがあるが^{33,4)}, FR 118487 はフマジリンに比べ毒性の点では優れているものの, 全身投与においては実験 2のごとく高用量投与によって体重減少が認められている。FR 118487 の組織移行については, 全身投与(皮下 10 mg/day)で血中濃度 93.4 ng/g, 房水中濃度 4.9 ng/g(いずれも投与 5 日目)であるのに対して, 10% 眼軟膏投与では血中濃度 45.2 ng/g, 房水中濃度 150.4 ng/g(いずれも投与 6 時間後), 1% 眼軟膏投与では血中濃度 2.3 ng/g, 房水中濃度 4.9 ng/g(いずれも投与 6 時間後)であることが知られている⁸⁾。この点から今回の軟膏による局所投与で検討したのであるが, 今回の実験期間中は体重減少を認めず, 角膜の組織学的障害も認めなかった。なお, 高用量全身投与によって起こった体重減少は休薬により回復する¹⁾。

以上, 投与方法, 投与期間, 対象疾患, 副作用など今後引き続き検討の余地があるものの, FR 118487 は血管新生抑制薬として臨床応用につながる可能性があると考えられた。

稿を終えるに当たり, ご校閲を賜りました慶應義塾大学医学部眼科学教室小口芳久教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 仁井誠治, 出井健之, 寺野 紘, 真島行彦: 新しい真菌由来物質による角膜新生血管の抑制. 日眼会誌 101: 465—469, 1997.
- 2) Otsuka T, Shibata T, Tsurumi Y, Takase S, Okuhara M, Terano H, et al: A new potent angiogenesis inhibitor, FR 118487. J Antibiotics 45: 348—354, 1992.
- 3) Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, et al: Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. Nature 348: 555—557, 1990.
- 4) Kusaka M, Sudo K, Fujita T, Maruis S, Itoh F, Ingber D, et al: Potent antiangiogenic action of AGM-1470: Comparison to the fumagillin parent. Biochem Biophys Res 174: 1070—1076, 1991.
- 5) Otsuka T, Okawa T, Shibata T, Oku T, Okuhara M, Terano H, et al: A new potent angiogenesis inhibitor, FR 118487. J Microbio Biotechnol 1: 163—168, 1991.
- 6) 柴田敏裕, 寺野 紘: 血管内皮細胞を用いた増殖阻害剤の研究. 現代医療 26: 1919—1923, 1994.
- 7) 寺野 紘: 新規血管新生阻害剤 FR 118487. 炎症と免疫 4: 357—362, 1996.
- 8) 堀 貞夫, 小関義行, 寺野 紘, 柴田敏裕: 硝子体内血管新生の抑制—薬剤による抑制の可能性—。あたらしい眼科 9: 1187—1195, 1992.