



| | |
|--------------|---|
| Title | 60Co γ 線照射endoxan(cyclophosphamide)の性状とその悪性腫瘍治療への応用の可能性について |
| Author(s) | 蒲生, 鉄男 |
| Citation | 日本医学放射線学会雑誌. 1967, 27(8), p. 1072-1082 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/19226 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

^{60}Co γ 線照射 Endoxan (cyclophosphamide)の性状 とその悪性腫瘍治療への応用の可能性について

大阪大学医学部放射線医学教室 (指導教授 立入弘)

蒲 生 鉄 男

(昭和42年3月4日受付)

Pharmacological Characteristics of ^{60}Co - γ -irradiated Cyclophosphamide (Endoxan)
and Possibility of Its Application to Cancer Treatment

By

Tetuo Gamo

Department of Radiology, School of Medicine, Osaka University

(Director: Prof. H. Tachiiri, M.D.)

It has been well known that Endoxan itself is originally inactive *in vitro*. However, the author observed that the massively ^{60}Co - γ -irradiated Endoxan (in crystal) becomes active even *in vitro*. In the present paper, the pharmacological characteristics of this irradiated Endoxan and possibility of its application to cancer therapy are reported.

Irradiation Procedure

Endoxan was irradiated in vacuum at the dose rate of 2×10^6 R/h. Two samples were irradiated with total irradiation dose of 10^8 R and 10^9 R for each. [Temperature during irradiation was not so strictly controlled but kept below 45°C by immersing the samples in water.

Results

- 1) 1×10^9 R irradiated Endoxan (REX) inhibited the growth of HeLa cells more heavily than norHN_2 .
- 2) REX contained norHN_2 (1.9%), non-degraded Endoxan (1.2%) and substances of (Rf 0) to (Rf 0.3) in the silica thin layer chromatograph (the developer: acetone, chloroform 2:1).
- 3) REX gave positive data by means of the *in vitro* screening methods (ED_{50} , M.S.D./ LD_{50} and the *in vitro-in vivo* method).
- 4) REX was less effective than Endoxan itself in the cancerocidal influence upon Yoshida ascites sarcoma.
- 5) REX was effective in the perfusion treatment for VX2 carcinoma.
- 6) REX was rapidly inactivated by serum (bovine serum).

Discussion

Applying the *in vitro* screening methods, REX gave positive data. However, it was less effective than Endoxan in the curative effect on Yoshida ascites sarcoma. It is considered that this fact can be partly

explained by the instability of REX in bovine serum, since the tumor inhibitory alkylating agents (TSPA and $\text{HN}_2\text{-O}$) were stable in bovine serum and on the contrary the tumor non-inhibitory alkylating agent (HN_2) was instable. Therefore it might be necessary that the stability test should be included in *in vitro* screening.

In regional perfusion and selective regional arterial infusion, the agent should be required to have the pharmacological characteristics that leaked agent can be inactivated rapidly and that the agent has antitumor activity independently upon the liver or other metabolic functions. At present the effective agents for whole body administration are used for perfusion and infusion, especially in cases of selective regional use, however the indication of agents should be more precisely examined and more severely discussed in selection. Hence, it may be promising that the massively irradiated Endoxan can be one of the suitable agents for local perfusion and selective regional infusion.

I 緒 言

Endoxan は1958年 Arnold らによつて合成され¹⁾²⁾, 実験動物腫瘍に有効なことが発表された¹⁾²⁾³⁾⁶⁾⁷⁾. この薬剤はアルキル化剤系の抗癌剤に属するが, *in vitro* では不活性であつて, *in vivo* で活性化され抗腫瘍性を発揮する特異な性質を有している⁶⁾. その活性化は主として腫瘍細胞内で norHN_2 となることによると考えられたが, その後諸家の報告は Endoxan の活性化は主に肝によつて行なわれ⁸⁾¹³⁾³¹⁾, 水解とは異なる分解を受けていることを示唆している.

一方, 吉村³²⁾は Endoxan 水溶液が放射線照射により活性化を起すことを見出し, この活性化が水解とは異なる機作により行なわれていることを報告している. この活性化が水解とは異なることは生体内代謝が同様に水解とは異なることから考え, 活性物質の抗腫瘍性を期待させる.

今回, 著者は Endoxan の結晶に対し ^{60}Co γ 線を大量に照射したところ, *in vitro* においても活性となることを見出したので, この活性物質について種々検討を加え, 2, 3の知見を得てここに報告する.

II 実験方法ならびに成績

A) Endoxan 照射方法

Endoxan の結晶を内径約 1 cm, 長さ 25 cm のガラス管につめ, 照射中産生気体により爆発する危険を考へて真空ポンプで 10^{-2} mmHg 程度の真空とした後に溶封した. この真空封入 Endoxan に対し

て線量率 $2.0 \times 10^6 \text{R/h}$ で ^{60}Co γ 線を $1 \times 10^8 \text{R}$ 及び $6 \times 10^8 \text{R}$ 照射した. 特に照射中の温度は一定とはしなかつた. ガラス管を水中に入れて温度上昇をおさえたために約 45°C 前後である.

この照射した Endoxan の水溶液は酸性を呈する. したがつて, 試料はすべて使用直前に NaOH により pH 7.2~7.6 (東洋濾紙製 B.T.B. pH 試験紙にて) に調整して使用した.

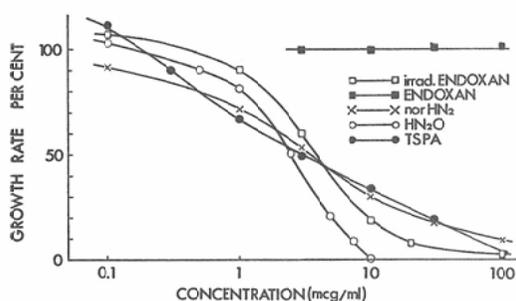
B) 照射 Endoxan の *in vitro* の性状

(1) 細胞増殖抑制効果

方法) Eagle, Foley の方法⁹⁾¹⁰⁾に準じた. 細胞株に HeLa 胞細¹⁵⁾ (阪大医学部附属癌研究施設より分与されたもの) を用いて, 培養液に $3 \times 10^4/\text{ml}$ の浮遊液として, 各 1.5 ml づつを短試験管に分注し, 約 10° 傾斜させて静置培養を行なつた. 48時間目に各薬剤を種々濃度に溶解した培養液 1.5 ml と交換した. 72時間目に正常の培養液と交換した. その後 2 日培養を続けた後, 0.05% クリスタルバイオレットを加えた 2% クエン酸液で染色して, 血球計算板で細胞数を数え, 対照と比較して増殖率を求めた. この結果より濃度—増殖率曲線を得て, このグラフ上で 50% 増殖抑制濃度 (ED_{50})¹⁶⁾ を求めた. なお, 培養液は $\text{LE}^{11)}$ 液に対して 15% 牛血清を加えたものを使用している.

成績) Fig. 1 及び Table 1 に示す通りである. 1 mg/ml の薬剤濃度でも全く無作用である Endoxan を除いて, 各薬剤の濃度—増殖率曲線はそれ

Fig. 1 Effect of the agents on the growth of HeLa cells

Table 1 ED₅₀ and M.S.D. of the agents

| Name of the agents | IC ₅₀ (γ/ml) | M.S.D. (γ/ml) |
|---|-------------------------|---------------|
| 10 ⁹ R irradiated cyclophosphamide | 4 | 100 |
| cyclophosphamide | >1,000 | >1,000 |
| nor-HN ₂ | 3.5 | 200 |
| HN ₂ -O | 2.5 | 25 |
| TSPA | 3.0 | 100 |

ED₅₀: Concentration necessary to cause a 50 per cent inhibition of growth.

M.S.D.: minimum dose which induced no propagation in subculture test.

それぞれ特徴のあるS字状曲線をとる。10⁹R照射 Endoxan の曲線は Nitromin の曲線と近似している。ED₅₀で比較すると norHN₂ 3.5γ/ml, HN₂-O 2.5γ/ml, TSPA 3.0γ/ml に対し10⁹R照射 Endoxanは 4.0γ/ml であつて、おのおのED₅₀はほとんど同値である。しかし Endoxan は 1mg/ml の濃度においても HeLa 細胞の増殖にほとんど影響を与えなかつた。

(2) 最小死滅量 (M.S.D.)²⁰⁾

方法) HeLa 細胞を 1×10⁵ cells/ml にて小角短試にそれぞれ 0.9ml づつ分注して培養を初め、48時間目に生理食塩水で倍数希釈を行なつた各薬剤のそれぞれ 0.1ml を加えた。

72時間目にトリプシン処理をし、新しい小角短試に継代培養を行なつた。それぞれをその後4~5日観察を続け、細胞の生存及び増殖能をしらべ、さらに不確実な場合には再び継代培養をくり返し、継代培養を不能にする最小薬剤濃度を求め

た。なお培地は前回の実験同様15%牛血清添加LE液を用いた。

成績) Table 1に示す通り、Endoxan は 1,000γ/ml の高濃度においても HeLa 細胞の継代培養に影響を与えないが、照射 Endoxan は 100γ/ml の濃度で HeLa 細胞の継代培養を不能にした。この値は HN₂-O の 25γ/ml より多いが、TSPA の 100γ/ml, norHN₂ の 200γ/ml とほぼ同程度である。

(3) in vitro-in vivo 法

方法) 佐藤法²⁶⁾に従つた。吉田肉腫細胞を使用した。吉田肉腫細胞(塩野義研究所より分与されたもの)100万個を腹腔内移植し4日後の腹水を採取した。細胞数を 10×10⁷/ml に生理食塩水で調整した。この 1ml と生理食塩水を用いて倍数移殖した薬剤の 1ml とを混ぜ、恒温槽中で 37°C に 30 分間保つた。後、2ml 全量をそれぞれのラットの腹腔内に移植して 24, 48 及び 72 時間目に腹水塗抹標本を作成し、ギムザ染色下に検鏡した。

成績) この際にも照射 Endoxan は 25γ/ml の濃度では空胞変性、核の染色性低下及び核破砕等の明瞭な変性所見を示した (Fig. 2)。しかし、同濃度の Endoxan は吉田肉腫細胞に無作用であつた。

C) 照射 Endoxan の活性物質

(1) 薄層クロマトグラフィーによる分析

方法) 10⁹R照射 Endoxan と 10⁹R照射 Endoxan とのシリカ薄層クロマトグラフィー(展開液はアセトン、クロロホルム、2:1)を行なつた。展開後ヨードで発色させた。

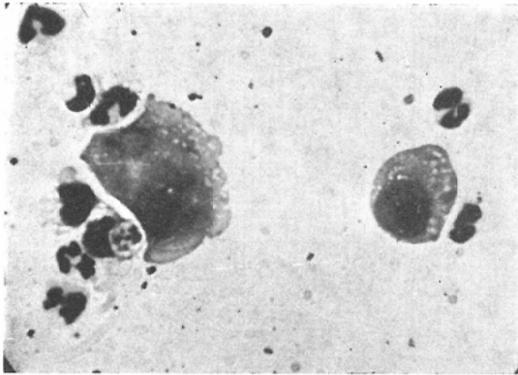
成績) 原点及び原点から Rf 0.3迄の連続したスポット及び Rf 0.45, Rf 0.8の4種のスポットを得た。norHN₂ 及び Endoxan を同時に展開した場合、Rf 値において Rf 0.8の物質は norHN₂ と Rf 0.45の物質は Endoxan とそれぞれ一致していた。

(2) 薄層クロマトグラフ分画のNBP反応

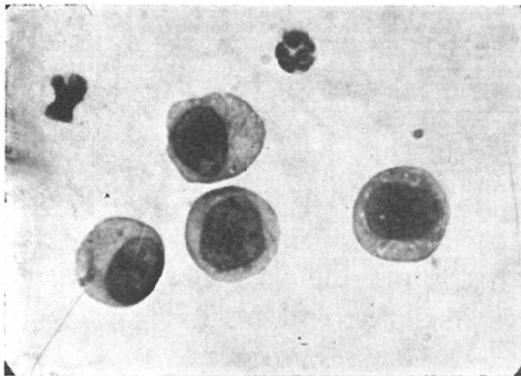
薄層クロマトグラフ各分画について γ(p-nitrobenzyl)pyridine (NBP)¹²⁾¹⁴⁾ を使用するアルキル化剤の定量法を行ない、薄層クロマトグラフ上

Fig. 2 In vitro-in vivo Method (Sato). 2 days after transplantation of Yoshida sarcoma cells treated with 10^9 R irradiated Endoxan (25mcg/cc) and physiological saline (control).

a) Cells treated with irradiated Endoxan



b) Cells treated with physiological saline (control)



の各スポットのNBPに対する性状を調べ、かつ定量を行なった。

方法) シリカ薄層クロマトグラフを原点及びその他の部分を10等分した11の分画に分け、それぞれを蒸留水3mlにて抽出し、その2mlを使用してNBP反応を行なった。著者が行なった方法をTable 2に示す。

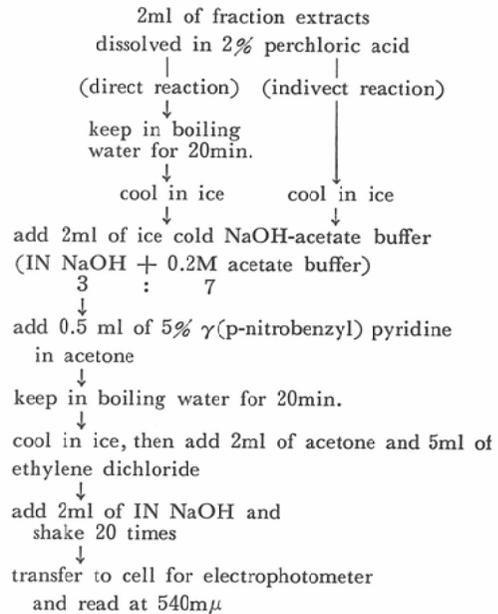
成績) Fig. 3に示す様に Rf 0.8の物質はNBP反応上 direct NBP 反応陽性, indirect NBP 反応陰性であつて、この性質は norHN₂ と全く同様である。また Rf でも norHN₂ に一致しているので Rf 0.8の物質は norHN₂ と同定された。

Rf 0.45の物質は direct NBP 反応陰性, indirect

NBP 反応陽性であつて、かつ Rf 値においても Endoxan に一致するので未分解の Endoxan と同定した。

さらに一定量の試料を micropipet を使用して定量的にクロマトグラフを実施し、NBP 定量値から 10^9 R 照射 Endoxan 中に含まれる未分解 Endoxan 及び norHN₂ の量を求めた。その結果、 10^9 R 照射 Endoxan 1 mg 中には未分解 Endoxan を12%, norHN₂ を19%含有している。すなわち、 10^9 R を照射した場合、Endoxan はほぼ99%が分解されている。また、Endoxan より低い Rf 値を示すものはほぼ全体の97%を占めていると考えられる。

Table 2 method of NBP Reaction



(3) クロマトグラフ各分画の細胞増殖抑制効果

方法) 10^9 R 照射 Endoxan をクロマトグラフに展開後NBP反応の場合と同様に11の分画に分けた各分画に対して培養液を5ml 加え、充分攪拌してから遠沈し、上清をとり、細胞増殖抑制効果の実験と同様に培養 HeLa 細胞に作用させて、どの分画に細胞増殖抑制物質が含まれるかを検討した。

Fig. 3 NBP reaction of fractions of thin layer chromatograph

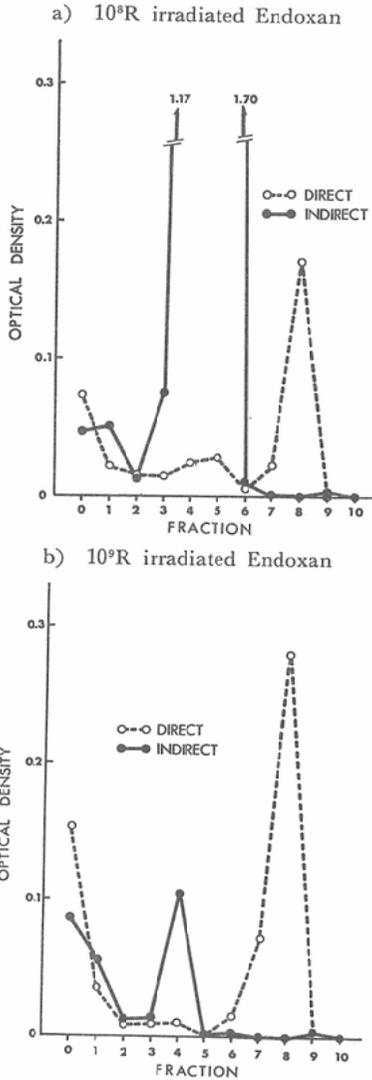
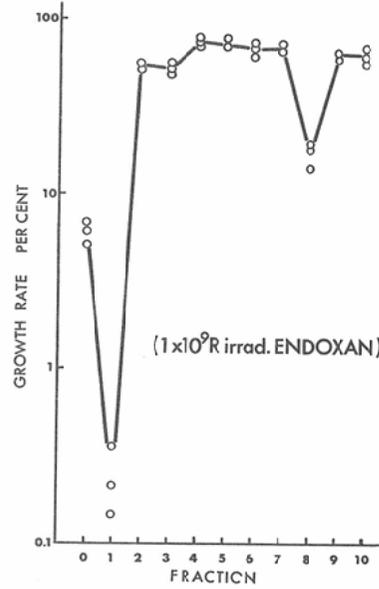


Fig. 4 Effect of fraction extracts of thin layer chromatograph on the growth of HeLa cells



の細胞増殖抑制効果を示す主要なものであることは薄層クロマトグラフ各分画抽出物を HeLa 細胞に作用させることにより明らかとなった。しかし、NBP 反応で明らかになった様に 10^9 R 照射 Endoxan の 97% がこの分画を含めた低 Rf 分画に存在している。したがって、Endoxan より Rf の低い分画抽出物は濃度が濃いと考えられる。そこで、同濃度での活性を比較するために以下の抽出を行なった。

方法) 10^9 R 照射 Endoxan の 活性物質を有機溶媒に対する溶解性を利用して分離することを試みた。 10^9 R 照射 Endoxan の 200mg に対して各溶媒 10ml を使用し、Table 3 に示す操作で難溶性物質と易溶性物質とに分けた。

成績) 各分画の含量、M.S.D. 値及び主なる Rf 値を Table 4 に示す。すなわち、メタノール及びエタノール難溶の物質は作用は弱く、アルコール易溶性物質中アセトン難溶性物質が M.S.D. 50 γ /ml で最も活性が強い。norHN₂ の大部分を含むアセトン易溶性物質は M.S.D. 100 γ /ml で比較的弱い。分離物の Rf より、照射 Endoxan の示す活性物質のうち、原点から Rf 0.1 迄のもの

成績) Fig. 4 に示す通りである。すなわち、原点及び Rf 0.1 迄の分画は Rf 0.8 の norHN₂ の分画より強い細胞増殖抑制効果を示している。Rf 0.1 より Rf 0.3 迄に含まれるものによる HeLa 細胞増殖抑制効果は比較的弱い。すなわち、照射 Endoxan の示す細胞増殖抑制効果の主要なものは norHN₂ によるものではなく、Rf 0.1 より原点迄の物質によるものであると思われる。

(4) 抽出

原点より Rf 0.1 迄の物質が 10^9 R 照射 Endoxan

Table 3 Analysis of Irradiated Endoxan

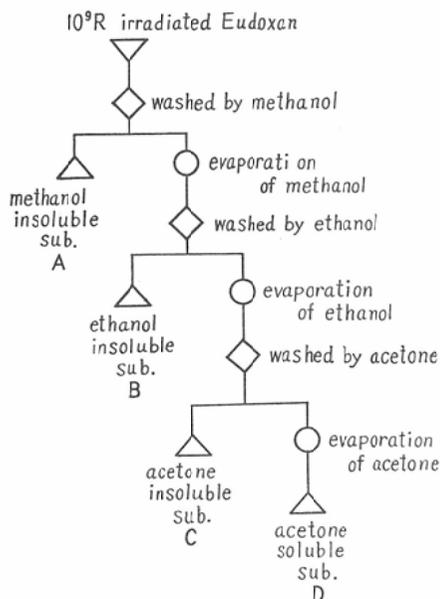


Table 4 Content, Rf and M.S.D. of Isolated Fractions of 10⁹R irradiated Endoxan

| | Content (%) | Rf | M.S.D. (γ/ml) |
|---|-------------|------|---------------|
| A | 20.5 | — | > 1,000 |
| B | 16.7 | 0.00 | 500 |
| C | 39.2 | 0.18 | 50 |
| | | 0.04 | |
| | | 0.02 | |
| | | 0.00 | |
| D | 23.6 | 0.80 | 100 |
| | | 0.45 | |
| | | 0.17 | |
| | | 0.04 | |
| | | 0.00 | |

は大部分アセトン難溶物質中に含まれると考えられる。すなわち、この分画は norHN₂ の M.S.D. 値 200γ/ml に比べ4倍の強い活性を示している。

D) 照射 Endoxan の in vitro screening

照射 Endoxan の活性が他の抗癌性アルキル化剤と同程度の活性を示すことから照射 Endoxan の抗癌性が期待される¹⁸⁾。そこでまず in vitro screening を行なった。

方法) 新田法²⁰⁾に準じ M.S.D./LD₅₀ 値の検討

を行なった。LD₅₀ 値は50±5 g ♂ Wistar 系ラットに腹腔内投与21日後、Van der Waerden 法に従って計算した。

成績) Table 5 に示す通りである。10⁹R 照射 Endoxan は LD₅₀ 値が Endoxan 及び Nitromin に比し、約9倍と高く、したがって毒性が少ないと考えられる。照射 Endoxan の HeLa 細胞に対する M.S.D. は 100γ/ml であつて、結局 M.S.D./LD₅₀ 値では0.13となつた。この値は Endoxan の 11.8以上、norHN₂ の 2.0及び Nitromin の 0.31 のいずれよりも低値であり、したがって新田法での in vitro screening において、照射 Endoxan の抗癌性が期待された。

Table 5 In vitro Screening Data

| | M.S.D. γ/ml | LD ₅₀ mg/kg | M.S.D./LD ₅₀ |
|--------------------------------------|-------------|------------------------|-------------------------|
| 10 ⁹ R irradiated Endoxan | 100 | 775 | 0.13 |
| norHN ₂ | 200 | 100 | 2.0 |
| Endoxan | >1,000 | 84 | >11.8 |
| Nitromin | 25 | 81 | 0.31 |

LD₅₀: at 21 days after one i.p. injection in rat (50±5 g, ♂, strain Wistar)

M.S.D.: minimum dose which induced no propagation in subculture test.

E) 照射 Endoxan の抗腫瘍性

以上 in vitro の成績はいずれも照射 Endoxan の抗腫瘍性を期待させるものである。そこで、腹水型腫瘍に対する延命効果及び V X 2 癌²⁸⁾の灌流治療を行ない、照射 Endoxan の抗腫瘍性について検討した。

(1) 腹水型腫瘍に対する延命効果

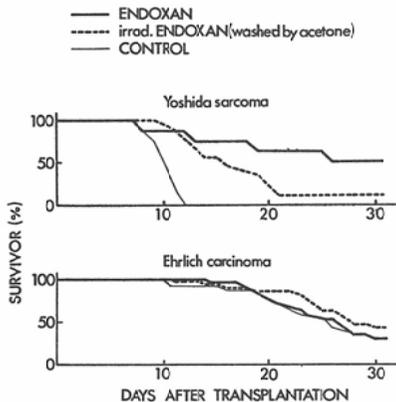
Endoxan に感受性の高い吉田肉腫及び感受性の低い Ehrlich 癌を選び、腹水型腫瘍に対する延命効果を検討した。

方法) 50±5 g, Wistar 系 ♂ ラット及び 20±2 g, dd 系マウスにそれぞれ吉田肉腫及び Ehrlich 癌細胞を約 100万個ずつ腹腔内に移植し、24時間後に Endoxan 及び照射 Endoxan の各 1/4 LD₅₀ を腹腔内1回投与して、対照群(生食塩水のみ)と比較した。10⁹R 照射 Endoxan はそれに含まれる norHN₂ 及び微量の Endoxan の

影響を除くために試料 100mg について 10ml のアセトンで 2 回洗滌した。吉田肉腫 ラツテの一群は 10 匹を、Ehrlich マウスの一団は 22 匹を使用した。

成績) 吉田肉腫に対する成績は Fig. 5 に示す通り、Endoxan, 照射 Endoxan 共に延命効果は見られるが、照射 Endoxan の延命効果は Endoxan の延命効果よりも劣っている。すなわち、50% 生存日数で比較すると、対照群の 10 日に対し、Endoxan 群 26 日、照射 Endoxan 群 16 日である。さらに Ehrlich 癌の場合には両者共に有意の延命効果は見られなかった (Fig. 5)。

Fig. 5 Percent survivor diagrams of ascites tumors treated with cyclophosphamide and irradiated cyclophosphamide
Administration: one i.p. injection of $1/4$ LD₅₀ at 24 hrs. after transplantation



(2) VX 2 癌の灌流治療¹⁹⁾

方法) 腫瘍移植: 家兎腎筋に継代移植している VX 2²² 癌 (愛知ガンセンター研究所より分与されたもの) を無菌的に摘出し、細切後約 0.5mm のステンレス金網でこして、生理食塩水にて約 20 V/V % の浮遊液を作成した。この細胞浮遊液の 0.1ml を体重 2kg ~ 2.5kg の家兎両側腓腹筋に移植した。

灌流装置: 小型の気泡型人工肺をガラス管を用いて作成し、フードポンプを使って流量約 2 ml/min で灌流した。温度は動脈回路を 40°C の恒温槽につけて動脈血を約 38°C に保った。この装置に要した全回路血液量は約 25ml である。

灌流法: 腫瘍移植約 10 日後、両側移植部にほぼ同大の腫瘍を触れるようになってから灌流を行なった。ラボナール静注で麻酔した後、大腿動脈及び大腿静脈を露出した。それぞれに小切開を加え、小ポリエチレンカテーテル (PE10) を挿入し、あらかじめ他のウサギのヘパリン加血液を充たした上記灌流装置に接続した。大腿動脈へのカテーテル挿入部位は腹壁動脈枝の約 1cm 末梢側である。全身への漏出を少なくするために灌流肢はカテーテル挿入後、挿入部より中枢側でゴムチューブを用いて縛った。人工心肺を動かして回路が安定してから、それぞれの薬剤を 5ml の生理食塩水に溶解し、回路の動脈側に約 5 分をかけて注入した。薬剤注入開始後 30 分間の灌流を行なった。血管が細く、灌流終了後血行を再開させるのが困難なために、灌流終了後は動静脈を結紮した。なお対照例は治療側への灌流開始直前に動静脈を結紮している。この結紮による腫瘍への影響は一時的であることはすでに報告されており¹⁹⁾、著者が腫瘍の体積を指標として結紮した場合と無処置の場合との腫瘍の発育を比較して見たが何ら影響を認めなかった。なお灌流終了後の wash-out は行っていない。

薬剤使用量: 薬剤使用量の決定の為、無処置家兎に種々濃度の薬剤を灌流しその影響を調べた。10⁹R 照射 Endoxan の場合はその局所に対する障害 (皮膚糜爛、壊死等) が 250mg/kg 程度からは全例に、200mg/kg では約半数に生じる。また Endoxan は 5ml の生理食塩水溶液とした場合には、そのほぼ飽和に近い濃度で灌流を行なっても何らの障害を示さなかった。したがって、灌流治療には、10⁹R 照射 Endoxan の場合では 220 mg/kg 以下、Endoxan ではそのほぼ飽和量を用いた。灌流治療の時にも照射 Endoxan は腹水型腫瘍の延命効果の際と同様にアセトン洗滌を行なっている。

判定: 灌流約 20 日後治療側及び対照のそれぞれ腫瘍体積を比較した。腫瘍体積は触診により腫瘍の縦 (p)、横 (q)、高さ (r) を知り計算式 (体積 = $\pi/6$ pqr) に従って計算した。

Table 6 Ratio of treated tumor (VX2) to control tumor after perfusion without drug and with Endoxan and irradiated Endoxan

| At perfusion | | | After Perfusion | | |
|---|------------------|------------------------|---------------------|--------------------|---------|
| Dosage (mg/kg) | Tumor Age (Days) | Tumor Volume Ratio T/C | Days of Measurement | Tumor Volume Ratio | |
| | | | | T/C | % |
| Endoxan | | | | | |
| 70 | 18 | 4/4 | 21 | 47/50 | 94 |
| 70 | 18 | 1/1 | 20 | 40/43 | 93 |
| 100 | 9 | 1/1 | 19 | 40/44 | 90 |
| | | | | | Ave. 92 |
| 10⁹R irradiated Endoxan (washed by acetone) | | | | | |
| 130 | 11 | 1/1 | 20 | 25/42 | 60 |
| 170 | 16 | 4/3 | 15 | 45/63 | 71 |
| 180 | 10 | 1/1 | 27 | 25/60 | 42 |
| 200 | 12 | 1/1 | 19 | 18/36 | 50 |
| 220 | 9 | 1/1 | 25 | N/75 | — |
| | | | | | Ave. 56 |
| Control (physiological saline) | | | | | |
| | 18 | 3/2 | 19 | 48/53 | 91 |
| | 14 | 1/1 | 20 | 44/40 | 110 |
| | 14 | 1/1 | 23 | 47/50 | 94 |
| | | | | | Ave. 98 |

N: necrosis T: treated tumor C: control tumor

結果) Table 6 に示す. すなわち非照射 Endoxan の場合は平均92%の発育を示し, ほとんど効果の見られないのに対して, 照射 Endoxan では平均56%の発育に抑制されている. 腫瘍の発育抑制率が使用薬剤量に比例していないが, このことは家兎の体重に従って灌流回路の血液量を変えることが出来なかつた以外に, 家兎の灌流肢の体重に占める割合が一定でないことにもよると考えられる.

F) 牛血清に対する安定性

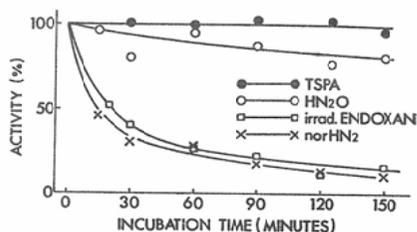
灌流治療と全身投与を行なつた場合とで, その効果が逆転することは興味深い. 灌流治療と全身投与とでは肝その他による代謝の有無, 腫瘍迄の距離の点で相違があるわけであるが, まずその説明の一助として血清中での安定性について検討してみた.

方法) HeLa 細胞を 3×10^4 /ml の細胞浮遊液として各 1.4ml を短試験管に分注し静置培養を行なつた. 2 日目に各薬剤を牛血清中に溶解し,

一定時間恒温槽中で37°Cに保つた後それぞれ 0.1 ml づつを取り, 培養 HeLa 細胞に加える. 3 日目に正常の培養液と交換し, さらにその後 2 日間培養を続け, 細胞数を数えて増殖率と各薬剤を溶解直後に作用させた場合の濃度—増殖率曲線から活性を算出した. 牛血清との作用時の各薬剤濃度は次のとおりである.

- T S P A 160γ/ml
- Nitromin 80γ/ml
- norHN₂ 160γ/ml
- 10⁹R 照射 Endoxan 300γ/ml

Fig. 6 Loss of cytotoxic activity in bovine serum at 37°C



成績) 照射 Endoxan と norHN₂ とは牛血清に溶解した場合、非常に不安定で急速にその活性を減じて行き、活性半減期間はそれぞれ約21分及び15分である。これに反して、Nitromin 及び TSPA では非常に安定で 150分間作用させてもそれぞれの活性は初期の80%以上を保っていた (Fig. 6)。

III 考 按

照射 Endoxan の活性物質には norHN₂ の他に原点から Rf 0.3 にわたる範囲に連続的な未知物質の出現が認められたが、これらのうち、Endoxan の活性を代表とするものは原点より Rf 0.1 に含まれる物質であった。また、このものは同濃度にて比較した場合にも norHN₂ の細胞増殖抑制効果を示した。たゞ照射 Endoxan の活性物質の量の割には NBP 反応値の低いのが問題であるが、照射 Endoxan が酸性を示す点から、一部には活性の Cl が遊離して不活性になっているとも考えられる。したがって逆に考えればこの様な不活性な物質を除外すれば in vitro における活性はさらに強くなるものと推定される。

生体内代謝の結果として産生される活性物質は同じ条件の薄層クロマトグラフィーで norHN₂ の他に Endoxan より低い Rf 値を有する領域に認められている³¹⁾。照射 Endoxan の場合にも norHN₂ 以外の活性物質は全て Endoxan より低い Rf 値をもっている。たゞ照射 Endoxan が原点から Rf 0.3 にわたって連続したスポットを示すことは ⁶⁰Co γ線による分解の各過程のものが多種類含まれていることを示唆している。その上に、一部には cross linking による重合物も含まれるであろう。

活性物質が強い細胞増殖抑制効果を示し、M.S.D. 値も低いことから、¹⁰⁹R照射 Endoxan の抗腫瘍性が期待される⁹⁾¹⁰⁾¹⁸⁾²⁰⁾。吉田肉腫を使って行なった in vitro-in vivo 法では抗腫瘍性を期待させるものであった。新田のスクリーニング法でも良好な成績をあげている。しかし吉田肉腫に対する延命効果では Endoxan より弱く、また Ehrlich 癌に対しては両者共有の効果を認めなかつた。

この in vitro では活性が高い物質が in vivo では抗腫瘍性の劣ることについては血清による急速な不活性化が一因子と考えられる。すなわち著者が行なった牛血清に対する安全性では現在抗腫瘍剤として用いられている TSPA, Nitromin は 2° 30' 後においてもほとんど初期の活性を維持しているのに対して、照射 Endoxan と norHN₂ とは急速な不活性化を起している。norHN₂ の抗腫瘍性は非常に弱いことはよく知られている³⁾。in vivo で抗腫瘍性の弱いことはこの牛血清に対する安定性から予測され得る様である。したがって、この実験の範囲からは全身投与により抗腫瘍性を期待する抗癌剤の in vitro screening には牛血清との安定性試験を加えることも有用な一手段と考えられる。

しかし、局所灌流治療の場合、さらに動脈注入治療の場合には、まず局所より全身に漏出した薬剤は急速に失活してくれることが望ましいわけである。すなわち全身投与の場合の抗癌剤と局所投与の抗癌剤とは第1にこの点で性質の大きく異なるものが要求される。さらに局所に使用した場合には肝その他の臓器内の代謝は関係しないことになり、肝により活性化される Endoxan³⁾¹³⁾³¹⁾等は灌流治療には不適となる。すなわち、第2に肝その他の臓器で活性化されなくともそのまま腫瘍細胞に有効な薬剤が必要となる。したがって、現在は全身投与で有効な抗癌剤をたゞ局所濃度を高めるためにだけ局所灌流、動脈注入に使われているが、今後は局所灌流、動脈注入に適した条件を備える薬剤を求める努力が必要と思われる。この意味で照射 Endoxan は in vitro で活性が強く、VX2 癌の灌流治療に有効であり、LD₅₀ 値高く血清による失活が急速である点で灌流治療に適した薬剤と考えられる。

IV 総 括

⁶⁰Co γ線照射 Endoxan について種々検討を行ない次の結果を得た。

1) ¹⁰⁹R照射 Endoxan は norHN₂ 及びシリカ薄層クロマトグラフィーにて原点及び Rf 0 から 0.3 迄につらなる連続した物質を含んでいた。

2) 培養 HeLa 細胞に対して強い活性を示した。この活性は norHN₂ より強い。

3) in vitro screening 法で抗癌剤として良好な成績を得た。

4) 吉田肉腫ラットの延命効果では Endoxan に劣った。

5) VX2 癌の灌流治療を行なつて有効であった。

6) 照射 Endoxan の活性は牛血清により急速に不活性化される。

これらの結果より 10⁹R 照射 Endoxan は灌流治療に適した薬剤と考える。

さらに in vitro の成績と治療効果に関して考察した。

稿を終るに臨み、終始御指導と御校閲を賜つた立入弘教授、吉井義一講師および種々の御助言をいたゞいた近藤宗平教授、成人病センター外科 神前五郎部長に謹んで感謝の意を表する。又、御協力いたゞいた阪大産業科学研究所 川西政治教授、沢井富一先生、塩野義研究所 峰下鏡雄博士、羽野義博博士、山口健二博士、岩田豪氏及び当教室の諸先生に深謝する。使用した Endoxan は塩野義製薬の御好意によつて提供されたものである。ここに謝意を表する。

文 献

- 1) Arnold, H., Bourseaux, F. und Brock, N.: Neuartige Krebs-Chemotherapeutika aus der Gruppe der zyklischen N-Lost-Phosphamidester. *Naturwiss.*, 45, 64, 1958.
- 2) Arnold, H. und Bourseaux, F.: Synthese und Abbau cytostatisch wirksamer cyclischer N-Phosphamidester des Bis-(β-chloräthyl)-amins.: *Angew. Chemie*, 70, 539, 1958.
- 3) Arnold, H., Bourseaux, F. und Brock, N.: Über Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und cancerotoxischer Wirkung in der Reihe der Phosphamidester des Bis-(β-chloräthyl)-amins. *Arzneim.-Forsch.*, 11, 143, 1961.
- 4) Arnold, H. und Klose, H.: Über dem hydrolytischen Abbau des hexacyclischen N-Lost-Phosphamidesters B518 unter physiologischen Bedingungen. *Arzneim.-Forsch.*, 11, 159, 1961.
- 5) Bolt, W., Ritzl, F. und Nahrman, H.: Untersuchungen mit einem tritium-markierten N-Lost-Derivat (Cyclophosphamid) in der Karzinombehandlung. *Nucl. Med.*, 2, 250, 1962.
- 6) Brock, N.: Zum pharmakologischen Charakterisierung zyklischen N-Lost-Phosphamidester als Krebs-Chemotherapeutika. *Arzneim.-Forsch.*, 8, 1, 1958.
- 7) Brock, N. und Wilmans, H.: Wirkung eines zyklischen N-Lost-Phosphamidesters auf experimentell erzeugte Tumoren der Ratte. *Dtsch. med. Wschr.*, 83, 453, 1958.
- 8) Brock, N. und Hohorst, H.J.: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vitro und in vivo. *Arzneim.-Forsch.*, 13, 1021, 1963.
- 9) Eagle, H. and Foley, G.E.: Cytotoxic action of carcinogenic agents in tissue culture. *Am. J. Med.*, 21, 739, 1956.
- 10) Eagle, H. and Foley, G.E.: Cytotoxicity in human cell cultures as primary screen for detection of anti-tumor agents. *Cancer Res.*, 18, 1017, 1958.
- 11) Earle, W.R., Straus, N.P., Brown, M.F. and Shelton, E.: Production of malignancy in vitro. IV The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, 4, 165, 1943.
- 12) Epstein, J., Rosenthal, R.W. and Ess, R.J.: Use of 2-(4-nitrobenzyl)pyridine as analytical reagent for ethylenimines and alkylating agents. *Anal. Chem.*, 27, 1435, 1955.
- 13) Foley, G.E., Friedman, O.M. and Drolet, B.P.: Studies on the mechanism of action of cytoxan. *Cancer Res.*, 21, 57, 1961.
- 14) Friedman, O.M. and Boger, E.: Colorimetric estimation of nitrogen mustards in aqueous media. *Anal. Chem.*, 33, 906, 1961.
- 15) Gey, G.O., Coffman, W.D. and Kubicek, M.T.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, 12, 264, 1952.
- 16) Hohorst, H.J., Ziemann, A. und Brock, N.: Alkylierende Substanzen in Serum und Urin nach Injektion von Cyclophosphamid. *Arzneim.-Forsch.*, 15, 432, 1965.
- 17) 石館守三, 桜井欽夫, 吉田富三, 佐藤博, 今村博: 吉田肉腫を用いた悪性腫瘍の化学療法に関する実験的研究 V) 被検物質の治療的效果の比較判定について, *Gann*, 45, 484, 1954. XV) 佳外最少有効量 *Ibid.*, 47, 382, 1956.
- 18) Leiter, J., Bourke, A.R., Fitzgerald, D.B., Macdonald, M.M., Shepartz, S.A. and Wodinsky, I.: Screeing data from the cancer chemotherapy national service center screening laboratories. XI *Cancer Res. (Suppl.)*, 22, 919, 1962.

- 19) Mori, S., Clarkson, B., Masle, E.T. and Lawrence, W.: An experimental perfusion system using the rabbit VX2 carcinoma. *J. Surg. Res.*, 2, 268, 1962.
- 20) Nitta, K.: Studies on the effects of actinomycetes products on the culture of human carcinoma cells (strain HeLa). I The effect of known antibiotics having or slight tumor-inhibitory activity HeLa cells. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 10, 277, 1957. III) Comparative studies on anti-HeLa-cells effects of known synthetic antitumor substances. *Ibid.*, 10, 419, 1957.
- 21) Rauen, H.M., Reisch, A. und Schrierer, H.: Zum biochemischen Wirkungsmechanismus von Cyclophosphamid. *Arzneim.-Forsch.*, 14, 176, 1964.
- 22) Rauen, H.M., Norpoth, K. and Kramer, K.P.: Das Schicksal von freiem Bis (β -chloräthyl)-amin in Blutserum. *Arzneim. Forsch.*, 15, 1048, 1965.
- 23) Ritzel, F., Bolt, W. and Nahrman, H.: Untersuchungen über Abbau, Verteilung und Ausscheidung von tritium-markiertem Cyclophosphamid im menschlichen Organismus. I) Verteilung und Ausscheidung des an verschiedenen Stellen im Molekül markierten Cytostaticums. *Klin. Wschr.*, 40, 834, 1962. II) Umbau des Cytostaticums in vivo. *Ibid.*, 40, 837, 1962.
- 24) Ryan, R.F.: Dosage of chemotherapeutic agents for use with perfusion technics. *Cancer Chemothera. Rep.*, 10, 47, 1960.
- 25) 桜井欽夫, 佐藤博: Endoxan の基礎的研究及び考察, *最新医学*, 16, 1729, 1961.
- 26) Satoh, H.: Determination of minimum effective dose of nitroimin and other compounds in vitro test.: *Gann*, 47, 382, 1956.
- 27) Schmähl, D. and Druckrey, H.: Beiträge zum Wirkungsmechanismus von N-Oxyd-Lost, *Naturwiss.*, 43, 199, 1956.
- 28) Shope, R.E.: Infectious papillomatosis of rabbits. *J. Exper. Med.*, 58, 607, 1933.
- 29) Smith, C.G., Lummis, W.L. and Gray, J.: An improved tissue culture assay. I) Methodology and cytotoxicity of antitumor agents. *Cancer Res.*, 19, 843, 1959. II) Cytotoxicity studies with antibiotics, chemicals and solvents. *Ibid.*, 19, 847, 1959.
- 30) Smith, C.G., Gray, J.E. and Kupiecki, F.P.: Blood and urin levels of antitumor agents determined with cell culture methods. *Cancer Res.*, 25, 241, 1965.
- 31) 羽野義博, 岩田豪, 峰下鉄雄: Endoxan の代謝に関する研究 (第2報) Endoxan の生体内活性化について, *日薬理誌*, 62, 152, 1966.
- 32) 吉村彰介: 制癌剤 cyclophosphamide (Endoxan) の放射線による活性化に関する研究, *日本医放会誌*, 28, 1064, 1967.