



Title	制癌剤Cyclophosphamide (Endoxan) の放射線による活性化に関する研究
Author(s)	吉村, 彰介
Citation	大阪大学, 1967, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/29113">https://hdl.handle.net/11094/29113</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	吉 村 彰 介 よし むら しょう すけ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 1 7 3 号
学位授与の日付	昭 和 42 年 3 月 28 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 内 科 系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	制癌剤 <b>Cyclophosphamide (Endoxan)</b> の放射線による活性化に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 立 入 弘 (副査) 教 授 近 藤 宗 平 教 授 坂 本 幸 哉

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔 緒 言 〕

Cyclophosphamide (Endoxan) は現在広く制癌剤として臨床的に用いられているが、その作用機序はよくわかっていない。研究の遅れている原因の一つは、Endoxan そのものは生物的に殆んど不活性であり、生体内で何らかの変化を受けて、はじめて活性が増強するためである。すなわち、Endoxan は高濃度で長時間、細胞に作用させないと効果をあらわさない。

本研究では、Endoxan 溶液 (Endoxan を純水あるいは適当な緩衝液に溶かしたもの) をあらかじめ、電離放射線照射することによって、Endoxan の活性 (細胞に対する致死効果) が著しく高められることを発見したので、それについて報告する。このように活性化された Endoxan および活性化機構そのものの研究は、今後の Endoxan 作用機序研究の促進に役立つものと信じる。(研究に使用したのは Asta 社製の NaCl を含まない純粋な Endoxan である)

### 〔方法ならびに成績〕

#### 1. HeLa 細胞に対する非照射および照射 Endoxan の増殖抑制効果

(a) Endoxan 水溶液 (20 mg/ml) に  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  線  $5 \times 10^3 \sim 10^5 \text{R}$  の種々の線量を照射したものを 0.5 mg/ml の濃度で、増殖中の HeLa 細胞に 48 時間投与し、洗滌除去後さらに 48 時間培養した時の細胞数で増殖抑制効果を比較した。 $10^4 \text{R}$  程度まで照射された Endoxan は増殖抑制効果をあまり示さないが、 $5 \times 10^4 \text{R}$  以上のものは著しく抑制効果を示した。

(b) Endoxan 水溶液、結晶 Endoxan、純水のそれぞれに  $\gamma$  線  $5 \times 10^4 \text{R}$  照射後、これらを細胞に投与し、(a) における実験と同様にして、それらの効果を比較した。ただし、投与濃度は Endoxan では照射区、非照射区ともに 0.25 mg/ml、照射純水は 0.025 ml/ml となるようにした。その結果、水溶液として照射された Endoxan 以外は、使用した条件下では細胞増殖抑制効果を示さなかった。

## 2. Escherichia coli による Endoxan 効果の検討

上記の実験結果についてさらに系統的に調べ、その活性化機構および作用機序を解明するために E. coli を用いて実験した。

(a) 予備実験として E. coli の照射および非照射 Endoxan に対する感受性を検討した。

紫外線高感受性株 ( $H_s$  30) と抵抗性株 (H/r 30) の定常期細胞を用いた。非照射 Endoxan は 10 mg/ml の濃度で 6 時間作用させても、わずかに致死効果がみられるにすぎないのに対して、照射 Endoxan (20 mg/ml of buffer で  $4 \times 10^5 R$  照射) は同じ投与濃度で、著しい致死効果をあらわした。

(b) 上記の結果を参考にして、Endoxan 照射時の濃度 (2.5~20.0 mg/ml of buffer) と照射線量 ( $1 \times 10^5 \sim 30 \times 10^5 R$ ) をかえた時の Endoxan の効果増強を定量的に検定した。使用した E. coli は感受性株 ( $H_s$  30) である。Endoxan 効果増強の定量的尺度としては、E. coli に対する 37% 量  $D_{37}$  (細胞の生存率を 37% にするに要する薬剤濃度) の逆数を用いた。

その結果、同一線量を照射した Endoxan でも、照射時の濃度が低い程、効果増強が著しいことを認めた。極端な場合として、結晶 Endoxan でも照射による活性化は認められたが、溶液の場合に比して極めて弱い。

(c) Endoxan 溶解に用いた緩衝液のみを (b) と同様に照射したところ、照射 Endoxan に比して極めて弱いが有意の致死効果を示した。

(d)  $30 \times 10^5 R$  照射緩衝液に非照射 Endoxan を溶解すると、その Endoxan に対して活性化せしめ得ることが認められた。しかし溶液 Endoxan を照射した場合の活性化よりは弱い。

以上の実験結果より次のことが結論される。

① 放射線照射をうけた Endoxan 溶液に細胞致死作用の効果増強があらわれるのは、主として Endoxan 自体が活性化されたものである。これに比べ溶液中に放射線によって生じた生成物の致死作用は著しく小さい。

② 放射線による Endoxan 活性化作用は直接作用によるものも無視できないが、主として間接作用による。

3. 次に照射 Endoxan の致死作用機序を推定するために、紫外線抵抗性株 (H/r 30) および高感受性株 ( $H_s$  30 および  $H_s$  30R) の照射 Endoxan に対する致死感受性を比較した。

(a) H/r 30 に比べ、 $H_s$  30 および  $H_s$  30R は 3 倍から 4 倍以上死に易く、定性的には紫外線の場合と類似の感受性差を示した。

(b) 照射 Endoxan による突然変異 (アルギニン要求性より非要求性への変異) の誘発は H/r 30 および  $H_s$  30R のいずれにも認められなかった。

以上は予備実験ではあるが、照射 Endoxan は DNA に作用し、突然変異を生じないような障害 (おそらくナイトロジェンマスタードのように分子鎖間架橋の生成) をもたらし、それが細胞致死をひき起こすことが示唆される。今後検討すべき課題である。

4. 照射 Endoxan の効果増強が何によるかを知るため、薄層クロマトグラフィーによる有効成分の分析を行なった。照射 Endoxan の有効成分は Rf 値ゼロ周辺に位置し、本来の Endoxan およびその加水分解生成物の有効成分のいずれの Rf 値とも異なった値を示した。

〔総括〕

1. 水溶液 Endoxan に放射線を照射することによって、Endoxan の細胞致死効果を増強せしめ得ることを発見した。
2. 照射時の Endoxan 濃度が稀薄である程、効果増強は著明である。すなわち、活性化は主に放射線の間接作用によることを確認した。
3. 照射によって生ずる有効物質は Endoxan の加水分解生成物とは異なったものであり、その作用は DNA におよぶものであると推定される。
4. 照射 Endoxan は非増殖状態においても細胞致死能力を発揮することを認めた。

### 論文の審査結果の要旨

本研究では、まず *in vitro* では不活性で、生体内で変化を受けて、はじめて抗腫瘍性をあらわす特性を有する Cyclophosphamide (Endoxan) が溶液状態で、数万 R 以上の電離放射線照射によっても、活性化される事実を発見した。それは培養人癌細胞および大腸菌におよぼす増殖抑制効果あるいは致死効果を指標とした実験によって認められたが、その結果、この活性化 Endoxan は増殖中の細胞のみでなく、増殖停止中の細胞にも作用し得ることが明らかにされた。この活性化には溶液 Endoxan の場合、主として放射線の間接作用が働いていること、すなわち、照射された水中に発生した遊離基あるいは分子状生成物の作用が重要な役割を有していることを見出した。さらに、その Endoxan 活性化作用には分子状生成物がかなり重要であること、および大線量照射された水溶液でも、ある条件下では一定期間、細胞に致死的な影響をおよぼすことが無視できないのを示唆している。

最後に活性化 Endoxan を分離し、それが単なる加水分解産物とは異なる未知物質であることを確認した。この研究の特異的な点は、一般には放射線によって物質が破壊、分解され、その化学結合に影響をうけてその物質本来の作用が弱化されるが、こゝでは逆に活性物質にかえられることを見出した点であり、これは、Endoxan が不活性化、中和あるいは弱毒化するはずの生体内肝臓作用によって活性化されると同様の現象が放射線によっても生じ得ることをしめしている。これら新事実の発見は今後の Endoxan の作用機序の研究に役立つと考えられ、さらに新しい抗腫瘍物質の開発の可能性を示唆するものと思われる。

したがって、本論文は学位を授与する価値あるものと認める。