

Title	60Co- $\gamma$ 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, 鐵男
Citation	大阪大学, 1967, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/29119">https://hdl.handle.net/11094/29119</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。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【 16 】

氏名・(本籍)	蒲 生 鐵 男 がも う てつ お
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 1 5 1 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	<sup>60</sup> Co- $\gamma$ 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
論文審査委員	(主査) 教 授 立 入 弘 (副査) 教 授 坂 本 幸 哉 教 授 近 藤 宗 平

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

Endoxan は in vitro では不活性であるが、生体内では活性化され、抗癌性を発現する。Endoxan を水解すると in vitro に於いても活性化し、細胞増殖抑制効果を示すことはすでに Arnold 等により報告されている。Endoxan 水溶液に放射線照射を行なうと、同様に活性化が起こるが、この活性化は水解とは異なる機作によることはすでに当教室の吉村が報告している。私は今回結晶状 Endoxan に対し、真空条件下で <sup>60</sup>Co $\gamma$  線を大量照射したところ活性化が起こることを見出したので、その物質の性状特に悪性腫瘍治療への応用の可能性を検討した。

〔方法ならびに成績〕

Endoxan をガラス管中に真空封入し、線量率  $2 \times 10^6$  R/h にて <sup>60</sup>Co $\gamma$  線を照射した。10<sup>9</sup>R 照射した Endoxan を培養 HeLa 細胞に作用させた場合に継代培養を不能にする最小濃度 (M.S.D.) は 100  $\gamma$ /ml の値を得た。照射していない Endoxan では M.S.D. 値は  $>1,000$   $\gamma$ /ml の大量であるので照射 Endoxan の強い活性が認められた。照射 Endoxan の M.S.D. 値は Nitromin の 25  $\gamma$ /ml よりは多いが Thio-TEPA の 100  $\gamma$ /ml, nor HN<sub>2</sub> の 200  $\gamma$ /ml と同程度である。この照射 Endoxan の活性物質の検討を行なった。10<sup>9</sup>R 照射 Endoxan 及び 10<sup>8</sup>R 照射 Endoxan をアセトン、クロロホルム 2 : 1 の展開液にてシリカ薄層クロマトグラフィーを行なって展開し、ヨードにて発色させると、原点及び原点から Rf 0.3 迄の連続的なスポット及び Rf 0.45, Rf 0.8 の 4 種のスポットを見た。この薄層クロマトグラフィーで展開後、原点及びその他の部分を 10 等分した 11 の部分に分画した。各分画の  $\gamma$  (p-nitrobenzyl) pyridine (NBP) に対する態度及び各分画を培養液で抽出して培養 HeLa 細胞に作用させて検討した細胞増殖抑制効果の 2 つの点から、いずれの分画に照射 Endoxan の活性物質が含まれるかを検討した。その結果、Rf 0.8 の物質は NBP 試薬に対し直接反応陽性、間接反応陰性、HeLa 細胞増殖抑制効果 (+) で、nor HN<sub>2</sub>

と態度が同じであり、Rf 値においても一致するので norHN<sub>2</sub> と同定された。Rf 0.45 の物質は同様に Endoxan と態度が全く同様で未分解の Endoxan と同定された。Rf 0.3 から原点迄につらなるスポットは NBP 反応上直接、間接の両反応ともに陽性であるが、HeLa 細胞に対する増殖抑制効果は Rf 0.3 から Rf 0.1 迄は弱く、Rf 0.1 から原点迄は最も強い。原点は比較的強い抑制を示すに止まる。したがって、照射 Endoxan の活性物質は Rf 0.1 から原点迄に含まれるものが主要なものであり、一部 norHN<sub>2</sub> 及び原点に止まる物質及び Rf 0.1 から 0.3 迄の物質が加わっていると考えられる。さらに Rf 0.1 から原点迄に含まれる活性物質の抽出を試み、有機溶媒に対する溶解性を利用して分離を行なった。その結果、メタノール及びエタノール難溶の物質は作用弱く、メタノール及びエタノール易溶性物質中のアセトン難溶性物質は M.S.D. 50  $\mu$ /ml で最も強く、照射 Endoxan の活性物質中 Rf 0.1 から原点迄のものがこの抽出物に含まれると考えられる。さらに照射 Endoxan の抗癌性の検討の為、M.S.D./LD<sub>50</sub> 値を検討した。in vitro では不活性な Endoxan とは比較出来ないで Nitromin と比較した。50 $\pm$ 5 g  $\delta$  Wistar-King 系白ネズミに対する LD<sub>50</sub> は腹腔内投与 21 日後では照射 Endoxan は 775 mg/Kg、Nitromin は 81 mg/Kg であって、照射 Endoxan の毒性は少ない。そして 10<sup>9</sup>R 照射 Endoxan では M.S.D./LD<sub>50</sub> 値は 0.13 であり、Nitromin では M.S.D./LD<sub>50</sub> 値は 0.31 となり、10<sup>9</sup>R 照射 Endoxan の方が低値である。さらに吉田肉腫細胞を使用し in vitro-in vivo 法を行ない照射 Endoxan の効果を認め得た。したがって照射 Endoxan の抗癌性が期待された。以上の結果より動物移植腫瘍に対する照射 Endoxan の抗癌性を期待し、吉田肉腫腹腔内移植 24 時間後に腹腔内投与してその延命効果を見たが、アセトン洗滌照射 Endoxan の延命効果は非照射 Endoxan の延命効果よりむしろ劣っていた。さらにマウス Ehrlich 腹水腫瘍に対する延命効果を見ると非照射 Endoxan は無効、アセトン洗滌照射 Endoxan も有意の効果を認めなかった。in vitro では低い M.S.D. 値を示すのであるから灌流治療を行なえばある程度の効果が期待出来ないかと考え、ウサギ VX2 癌腫を両側腓腹筋に移植し、一側を対照とし反対側に灌流治療を行ない、灌流後 20 日前後で腫瘍の体積を比較した。Endoxan の場合にはほとんど無効であるに反しアセトン洗滌照射 Endoxan では平均 56% の発育に止って居り、照射 Endoxan は灌流治療に使用した場合有効であると考えられる。

#### 〔総括〕

- 1) Endoxan 結晶に真空条件下で <sup>60</sup>Co $\gamma$  線を大量照射すると、in vitro に於て活性を示す様になった。この活性は Endoxan の水解で生じる norHN<sub>2</sub> によるものではなく、norHN<sub>2</sub> よりも活性が強い。
- 2) 薄層クロマトグラフィーで展開すると照射 Endoxan 中の活性物質は原点及び原点から Rf 0.3 迄の連続したスポットとして出てくる物質及び norHN<sub>2</sub> が見られる。この中で最も活性が強いのは原点から Rf 0.1 に含まれる物質である。
- 3) Rf 0.1 から原点迄の活性物質は照射 Endoxan のアルコール抽出物中アセトン難溶性物質中に含まれる。
- 4) 10<sup>9</sup>R 照射 Endoxan の M.S.D./LD<sub>50</sub> 値は Nitromin のそれよりも低値を示し抗癌性が期待された。しかし、吉田肉腫に対する延命効果では照射 Endoxan は非照射 Endoxan よりも劣っていた。
- 5) 照射 Endoxan を VX2 癌腫の灌流治療に使用した場合、発育を一定程度抑制することが出来た。Endoxan の場合にはほとんど影響を認めなかった。

6) in vitro screening で効果を認め得ない Endoxan とは異なって照射 Endoxan は in vitro screening では良好な成績を挙げたが吉田肉腫に対する延命効果は弱かった。しかし, Endoxan 及び照射 Endoxan の in vitro screening の成績と灌流治療の成績とは同様の傾向を示した。

### 論文の審査結果の要旨

Endoxan の結晶に対して  $^{60}\text{Co}\gamma$  線を照射すると Endoxan が活性化されることを見出し, この活性物質について種々検討を行なって次の結果を得ている。

1.  $10^9\text{R}$  照射 Endoxan は in vitro において  $\text{norHN}_2$  の活性より強い。
2. 薄層クロマトグラフィーによる分析で  $\text{norHN}_2$ , 未分解 Endoxan 及び Rf 0 から Rf 0.3 に連続的に出現する物質を含んでいる。
3. in vitro screening method 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 癌腫の灌流治療を行なって有効であった。
6. 照射 Endoxan の活性は牛血清により急速に不活性化される。

さらに 2, 3 の抗腫瘍性アルキル化剤及び非抗腫瘍性アルキル化剤を比較することにより, 非抗腫瘍性アルキル化剤は血清による不活性化が急速であることを見出した。すなわち, 本実験に関するかぎり, 抗癌剤少なくともアルキル化剤のスクリーニングには血清中での安定性試験を加えることが必要であると結論される。

これに反して, 局所灌流治療または動脈注入治療の場合には第 1 に漏出した薬剤の急速な失活, 第 2 に Endoxan の様に肝臓によって活性化されなくとも, 活性である性質を必要とする。現在は全身投与で有効な薬剤をたゞ局所濃度を高める為にだけ灌流又は注入に使われているが, 局所灌流又は注入の為に薬剤はこれらの性質をスクリーニングする方法で探す必要がある。照射 Endoxan は VX2 癌腫の灌流に有効であり,  $\text{LD}_{50}$  値低く, 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であろう。

以上本論文は放射線照射 Endoxan について新知見を得たものであり, 学位論文として推奨するに足ると考えられる。