

Title	Cyclophosphamideの生体内活性化について
Author(s)	日下部, 博
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29536
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

【 2 】

氏名・(本籍)	日 下 部 博 <small>くさ か べ ひろし</small>
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 2 2 5 号
学位授与の日付	昭 和 4 2 年 4 月 2 8 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 生 理 系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文名	Cyclophosphamide の生体内活性化について
論文審査委員	(主査) 教 授 陣内伝之助 (副査) 教 授 須田 正巳 教 授 山村 雄一

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

制癌剤 cyclophosphamide (Endoxan) はそれ自体アルキル化能を示さず、生体内で活性化されてはじめてアルキル化能を発揮するものとして、Arnold 及び Brock によって開発され、臨床的にもかなりの効果があり、また比較的副作用が少なく、経口投与でも充分効果を示す等、アルキル化剤として特異な存在である。したがってその生体内活性化機構や、活性化物質を明らかにすることは、この薬剤の特性を知り、最も有効な投与法を確立するために必須の要件である。

現在までにもこれに関して幾つかの研究が行なわれているが、Endoxan 投与後生体内において混在する微量の少なくとも 2 つの物質 (Endoxan とその活性型) の化学的測定が容易でないことと、活性化された有効物質の細胞毒性を直接検知することが困難であるために、未だ明確でない点が多い。

著者は、組織培養細胞を用いて、微量の活性型 Endoxan の細胞毒性を検知する方法を考案し、この方法と、最近開発された化学的測定法とを併用して、Endoxan の生体内活性化機構を明確にするとともに、その活性型の性状をも究明せんとして研究を行なった。

〔方法ならびに成績〕

1) 活性型 Endoxan の生物学的定量法について

組織培養 HeLa 細胞を 25% 牛血清, 75% LE 培地で simplified replicate tissue culture method を用いて培養した。培地に Endoxan を加えてもほとんど細胞増殖抑制作用を示さないが、しかし Endoxan 投与後の人または犬血清を用いると、一定の高い、比較的安定した増殖抑制効果が得られる。その血清の示す細胞毒性を、in vitro における安定した増殖抑制作用を示す mitomycin C (MMC) の作用と比較し、それを基準として定量することができる。nitrogen mustard (nor-HN₂) は

血清や培地と37°Cに incubate することによって急速に非活性化され、一定の HeLa 細胞増殖抑制が得られず、それを指標に用いることができない。

2) Endoxan の生体内活性化について

a) 活性型 Endoxan の血中濃度：①上述の組織培養法では Endoxan は1 mg/ml 以上の高濃度で漸く HeLa 細胞の増殖抑制を示すが、Endoxan を犬に静脈内投与し一定時間後に採血し、その血清を培地に加えると、活性化されていない Endoxan そのものの作用に比べて10~100倍高い増殖抑制効果を示す。また、Friedman-森田法に従って NBP によるアルキル化能の比色定量を行なっても、Endoxan は元来直接アルキル化能を示さないのに、投与後血清には直接アルキル化能を有する物質が時間とともに一定のパターンで増加して行くことを知った。このことより Endoxan が生体内で活性化されることは明らかである。②犬に Endoxan 100mg/kg 1回 one-shot 静注後の血中活性型濃度を上記の生物学的測定法によって測定すると、投与直後より次第に上昇し1~2時間で最高値となり、3時間以後徐々に下降し、約12時間後まで持続する。化学的測定でも、その直接アルキル化能を示す物質はほぼ同様のパターンをとって消長する。このような長時間にわたる活性型の血中持続は他の制癌剤には見られない特色である。

b) 体内における Endoxan 活性化の部位：①肝血流遮断犬では Endoxan を投与しても、直接アルキル化能を有する物質はほとんど血中に現われず、②また犬の下半身灌流、人の四肢灌流で灌流血に Endoxan を混じっても非活性型のみ高く、直接アルキル化能を有する物質は現われない。③しかし犬に肝灌流を行ない、Endoxan を添加すると明らかにアルキル化能を示す物質が出現する。④また in vitro でラット肝、腎、脾、筋 slice 或は AH 130 腫瘍細胞に Endoxan を添加し O₂ 存在下に 37°C 1時間 incubate すると、肝 slice と incubate したときのみ著明に直接アルキル化能物質が増加する。以上の成績から Endoxan 生体内活性化には肝が非常に重要な役割を占めている。

c) 活性型 Endoxan について：① Endoxan 大量投与後、生物学的にも化学的にも活性型が充分あることを確かめた犬血清の透析外液を濃縮して薄層クロマトで展開すると、Endoxan 及び nor-HN₂ に対応するもの以外にこれらと明らかに異なる2つの spot が得られ、この2つはいずれも直接アルキル化能を示す。② nor-HN₂ 等の in vitro における牛血清、犬血清による37°Cにおける非活性化は急速に起こることを知ったが、同様条件での Endoxan 投与後血清に含まれる活性型の非活性化は至極緩慢である。この結果より活性型 Endoxan の少なくとも一部には nor-HN₂ と異なるものが含まれているものと考えられる。③犬に Endoxan 大量投与後経時的に採血し、各種時間における血中直接アルキル化能と間接アルキル化能の37°Cにおける減衰の経過を見ると、投与後の採血時間によって明らかに異なった傾向を示す。この結果から Endoxan の metabolite が2種類以上あって、それらの比率が投与後の時間によって異なっていることを示唆する。

〔総括〕

Endoxan 投与後血清中の活性型 Endoxan の濃度を、直接その細胞毒性をもって測定する方法を考案し、それと化学的定量法を併用して以下のことを明らかにした。① Endoxan は生体内で活性化されてはじめて抗腫瘍性を発揮し、しかも他のアルキル化剤と異なりその活性型は長時間にわたる血中持続を示す。② その活性化には肝が極めて重要な役割を占める。③ 活性化物質の一部には nor-HN₂

と異なるものが含まれることは明らかで、Endoxan の metabolite には2種以上のものが存在する
と考えられる。

論文の審査結果の要旨

Cyclophosphamide (Endoxan) はそれ自体抗腫瘍性をもたず、腫瘍組織で活性化されて制癌効果をあらわすものとして開発されたが、その後の *in vitro* における研究によって、肝で活性化の起こる可能性が指摘された。しかし現在のところ、Endoxan の生体内活性化機構の詳細については充分明らかでない。

本研究は、まず活性型 Endoxan の HeLa 細胞に対する増殖抑制効果を指標とする測定法を確立し、この生物学的測定法と最近完成された化学的定量法とを併用して Endoxan 生体内活性化機構の解明と、その活性型 Endoxan の分離をはかったものである。その結果、Endoxan 静注後血中にあらわれる活性型は投与後1~2時間で最高に達し、その後長時間にわたる持続を示すと云う、他のアルキル化剤には見られない特長を有することを明らかにした。

また、犬を用いての灌流実験及びラット各種臓器切片を用いて、Endoxan 生体内活性化の部位を検討し、活性化には肝が重要な役割を果たすことを確認した。

更に本研究では Endoxan 投与後の血清より Endoxan 並びにその活性型を抽出し、薄層クロマト法を用いて分離を試み、その活性型として nor-HN₂ と同じ Rf を示すものの他に、2種の有効物質が存在しこれが活性型の主体をなすことを明らかにした。

これらのことは、Endoxan の生体内活性化に関する重要な基礎的知見であるが、また臨床的に見られる Endoxan の制癌剤としての特質に密接に関係するものと考えられ、更には肝を経ない局所灌流に Endoxan を用いても効果を期待し得ないことを示すなど、示唆にとむ研究である。