Osaka University Knowledge Archive

Title	プルマイシンの抗腫瘍性に関する研究
Author(s)	大久保, 修司
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32422
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【7】

氏名・(本籍)	大久保　修　司（おおくぼ　しゅうじ）
学位の種類	薬　学　博　士
学位記番号	第　4847　号
学位授与の日付	昭和55年3月15日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**プルマイシンの抗腫瘍性に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 上原喜八郎
	(副査) 教授 青沼　繁　教授 岩田平太郎　教授 近藤　雅臣

論文内容の要旨

緒　言

プルマイシンは1971年Hataら[1]により，*Streptomyces sp.* strain No.F 1028培養ろ液中に発見された抗生物質であり，その構造は1974年Ōmuraら[2]によりFig. 1に示すような4-N-D-alanyl-2,4-diamino-2,4-dideoxy-L-arabinoseであることが明らかにされている。上記構造からプルマイシンは，カナマイシンやゲンタミシンなどの，いわゆるアミノ配糖体抗生物質の一つとみなすことができる。本物質の抗菌活性は多くのバクテリアに対して極めて弱いが，*Botrytis fabae*などの植物病因性のかびの生育を阻害することが知られている[3]。J. L. Schwartzら[4]は^{14}C標識チミジン，ウリジンおよびロイシンの菌への取込みに対する影響および無細胞蛋白合成系に対する影響を検討し，プルマイシンの作用機作は蛋白合成阻害であろうと報告している。

上記の如く，プルマイシンの構造と微生物に対する作用は明らかにされているが，高等動物および腫瘍に対する作用についてはほとんど検討されていなかった。そこで，プルマイシンの腫瘍に対する効果および高等動物に対する作用について，既存のアミノ配糖体抗生物質および抗癌性抗生物質と比較検討した。

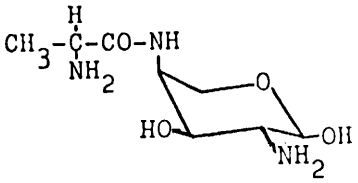


Fig. 1 Structure of Prumycin

本　論

第一章　プルマイシンの急性毒性，副作用および組織障害作用

プルマイシンをマウス，ラットおよび犬に投与し，LD_{50}および病理組織について調べた。また，副作用としての症状を観察した。Table 1に示すように，本抗生物質のマウスにおけるLD_{50}はi.p.，i.v.共に約150mg/kgであり，ラットおよび犬では，それぞれ約70mg/kg（i.p.）および50mg/kg（i.v.）であった。LD_{50}以上投与されたマウスおよびラットでは，投与約7日後に明らかな脱毛が観察されたが，投与約1ケ月後には回復した。犬では脱毛は観察されなかったが，10mg/kg以上の投与群に嘔吐が認められた。しかし，末梢白血球数や血中尿素体窒素（BUN）に変化は認められなかった。

マウスの組織所見では，皮膚における毛包の萎縮が認められたが，他の主要臓器，なかでも多くの抗癌剤が障害を与えやすい骨髄や，マミノ配糖体抗生物質が障害を起しやすい腎臓においても，特に異常は認められなかった。

Table 1 Toxicity and side effects of prumycin

	LD_{50} mg/kg			Side effects
Animals	i.p.	i.v.	p.o.	Symptoms
Mouse	155	144	750	alopecia
Rat	68	60		alopecia
Dog		50		vomiting

第二章　プルマイシンの抗腫瘍作用

Table 2に示すように，プルマイシンはsarcoma-180固型腫瘍の増殖を抑制する効果を有していることが見い出された。この効果は，抗癌性抗生物質マイトマイシンCに比較し，やや弱いものであったが，マイトマイシンCで顕著に認められた白血球減少はプルマイシンでは認められなかった。白血病細胞P-388を移植されたCDF_1マウスに対しても明らかな延命効果を示した。さらに，Fig. 2に示すように，C3H/Heマウスに自然発生した乳癌を同系マウスに移植後，腫瘍が約500mm^3の大きさとなった時にプルマイシンを½LD_{50}腹腔内投与したところ，急激な腫瘍の退縮が認められた。この効果は，マイトマイシンCやアドリアマイシンおよびクロモマイシンA_3などの既存の抗癌性抗生物質よりも強いものであった。また，マウスのLewis肺癌およびラット肝癌AH-130固型腫瘍に対しても，増殖抑制効果を有していることが認められた。

第三章　プルマイシンの培養HeLa細胞に対する増殖抑制作用およびその作用機作

プルマイシンは培養HeLa細胞の増殖を抑制する作用を示した。50%阻害濃度（IC_{50}）は約3 μg/mℓであり，この阻害活性は，既存の抗癌性抗生物質（例えばマイトマイシンCおよびアドリアマイシンなど）に比較すると弱いものであったが，カナマイシンおよびゲンタミシンなどに比較すると極めて強い活性であった。

^{3}H-チミジン，^{3}H-ウリジンおよび^{3}H-L-ロイシンのHeLa細胞DNA，RNAおよび蛋白合成への取

Table 2 Effect on Sarcoma 180 (sc-ip)

Compounds	Dose (mg/kg/day)	Treatment[a] schedule	Tumor volume[b] (mm^3) (Mean±SD)	T/C[e] (Day 7)	Body wt.[c] change (g)	WBC[d] ($/mm^3$)
Control	None	—	749±371	—	+4.1	8300*
						12900**
Prumycin	150	Day 1	313±126	0.42	+0.9	8800*
	100	Day 1	353±110	0.47	+0.5	8800*
	75	Day 1	366± 99	0.49	+1.3	8000*
	50	Day 1	661±265	0.88	+3.6	—
Mitomycin C	5.6	Day 1	179± 87	0.24	+0.1	2800*
	4.2	Day 1	313±132	0.42	+3.3	3600*
Prumycin	20	Day 1-6	286± 94	0.38	−3.6	11100**
	10	Day 1-6	457±134	0.61	+0.4	—
	5	Day 1-6	621±164	0.83	+2.3	—

a) Sarcoma 180 (5×10^6 cells) were inoculated subcutaneously into ddY mice on Day O.
b) Mean tumor volume on Day 7.
c) Body weight change shows the difference of the body weight measured on Days 1 and 7
d) White blood cell (WBC) counts on Days 4 (*) and 7 (**).
e) T/C: Tumor volume of treated group / Tumor volume of control group

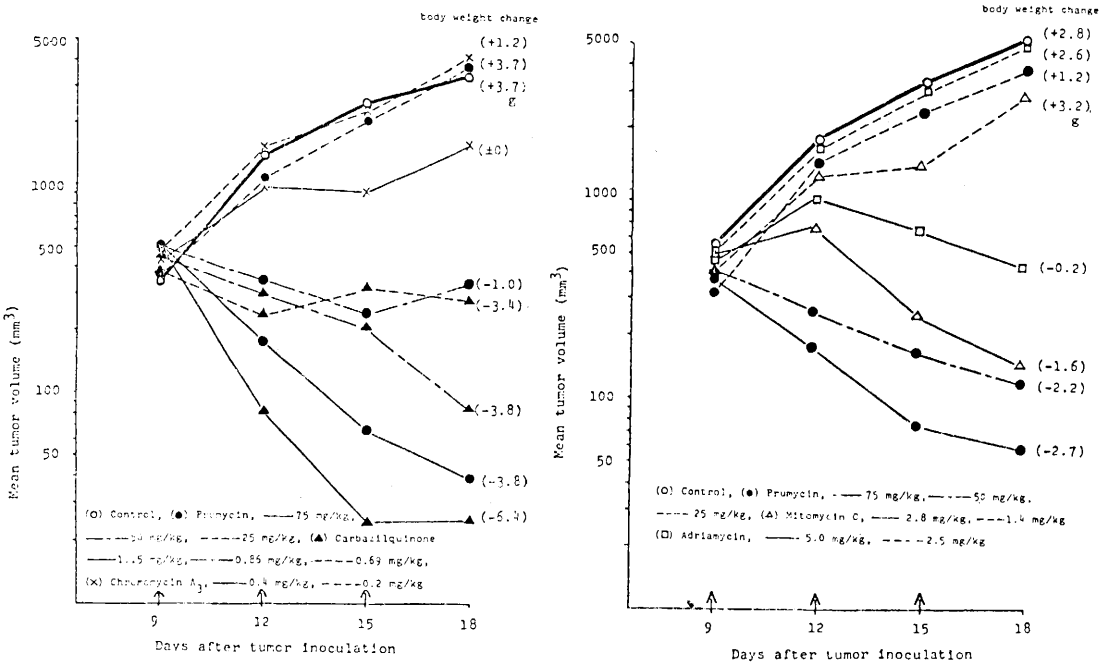


Fig. 2 Effect of prumycin on mouse mammary tumor (KSP-1)

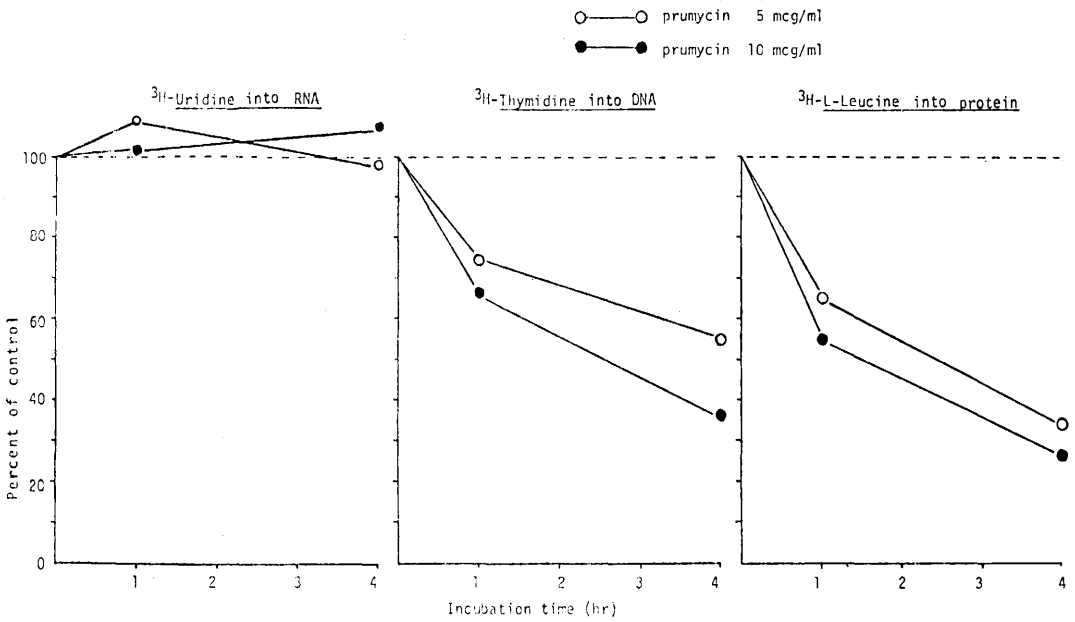


Fig. 3 Effect of prumycin on incorporation of labelled precursors into DNA, RNA and protein of HeLa cells

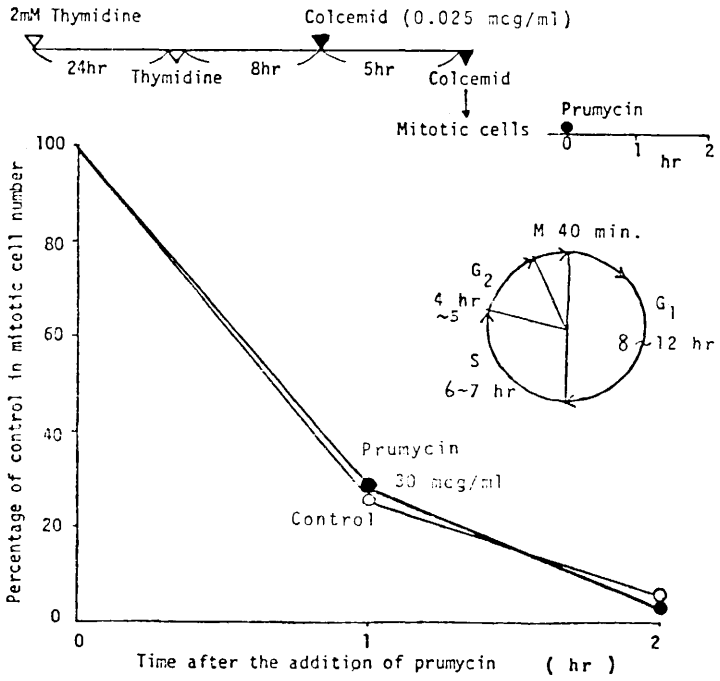


Fig. 4 Effect of prumycin on the transition of synchronized HeLa S-3 cells from M phase to G_1 phase

込みに対するプルマイシンの影響について検討した結果，Fig. 3に示すように，プルマイシンは^{3}H-ウリジンのRNAへの取り込みをほとんど抑制せず，^{3}H-L-ロイシンの蛋白への取り込みを強く抑制すると共に，^{3}H-チミジンのDNAへの取り込みも著明に抑制することを認めた。従って，プルマイシンのHeLa細胞に対する作用機作は蛋白合成阻害およびDNA合成阻害であると推察された。

HaLa細胞の細胞回転に対するプルマイシンの影響を，同調および非同調培養細胞を用いて検討した。プルマイシン30μg/mlは，Fig. 4に示すように，分裂期（M期）からDNA合成前期（C_1期）への細胞回転を阻害しなかった。しかし，Fig. 5に示すように，非同調培養細胞にプルマイシンを同じ濃度添加したところ，集積されるM期の細胞は完全に抑制されたことから，プルマイシンはDNA合成後期（G_2期）からM期への細胞回転を強く阻害することが明らかとなった。

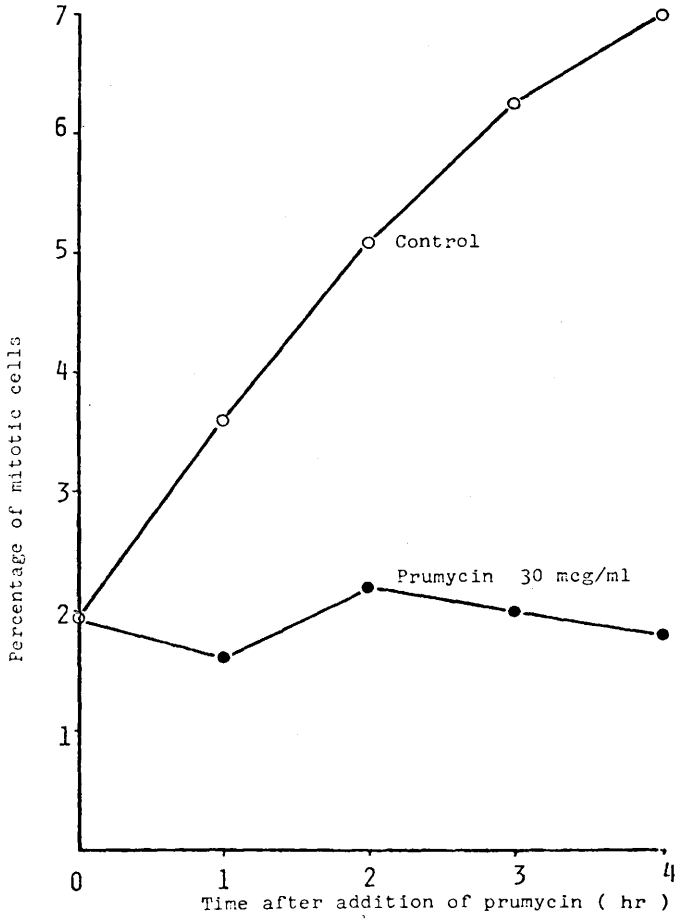


Fig. 5 Effect of prumycin on the transition of HeLa S-3 cells from G_2 phase to M phase
Colcemid (0.025mcg/ml) was added to logarithmically growing HeLa S-3 cells with or without prumycin (30 mcg/ml), therafter mitotic cells were counted at indicated time.

第四章　プルマイシンの生体内分布，代謝および排泄

プルマイシンLD_{50}をマウスに静脈内投与した後，バイオアッセイ法により生体内分布を検索した

結果，Table 3 に示すように腎臓，皮膚，子宮，骨，肝臓，肺臓および胃に高濃度分布することが明らかとなった。心臓，脳，脾臓および睾丸では投与5分後においても検出されなかった。腎臓を除く全ての臓器では投与2時間後には検出できなくなったが，腎臓では投与24時間後にも検出され蓄積が認められた。しかし72時間後には検出されなかった。また，高い皮膚内濃度は，プルマイシンのマウスおよびラットにおける脱毛作用と関連しているのではないかと推定された。

一方，Fig. 6 に示すように静脈内投与24時間後のラット尿中には，投与量の約70%のプルマイシンが回収されたが，糞中および投与24時間以後の尿中にはほとんど検出されなかった。従って，プルマイシンは他のアミノ配糖体抗生物質と同様，生体の代謝を受け難く，大部分は未変体のまま尿中に排泄されることが明らかとなった。

Table 3 Tissue distribution of prumycin

Tissues	Time after the administration							
	5 min.	10 min.	30 min.	1 hr	2 hr	4 hr	24 hr	72 hr
Serum	210[a]	144	60	13	—	—	—	—
Kidney	368[b]	203	110	60	53	42	11	—
Skin	104	53	28	<17				
Uterus	94	52	<47					
Bone	84	51	40					
Liver	81	74	41	<19				
Lung	78	40	<40					
Stomach	64	25	<24					
S. Intestine	36	22	<18					
Peritoneum	35	28	<22					
Brain	<24							
Heart	<30							
Spleen	<27							
Testis	<27							

Prumycin was administered intravenously into normal mice at the dose of 144mg/kg.
a) mcg/ml b) mcg/g

第五章　プルマイシンのマウス免疫系におよぼす影響

ヒツジ赤血球（SRBC）を抗原としてマウスを感作し，4日後の脾臓に出現する抗体産生細胞（PFC）に対するプルマイシンとマイトマイシンCの影響を比較した。Table 4 に示すように，マイトマイシンC，4.2mg/kg（½LD_{50}）の投与は，PFCを著明に減少させたが，プルマイシン，75mg/kg（½LD_{50}）は感作3日後に投与した場合の軽度な抑制を除き，PFCの出現を殆んど抑制しなかった。しかし，感作マウス脾細胞を *in vitro* でプルマイシンまたはマイトマイシンCと37℃60分間インキュベートしたところ，細胞の生活力（viability）に影響を与えない濃度で，プルマイシンはマイトマイシンCに比較し著しくＰＦＣを減少させた。第三章で述べた如く，プルマイシンは強い蛋白合成阻害作

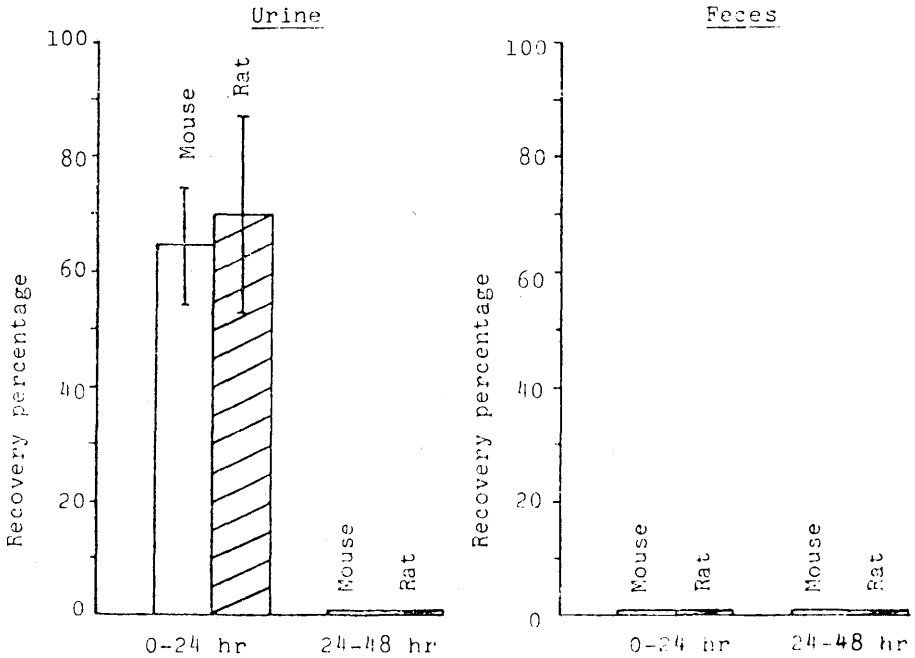


Fig. 6 Excretion of prumycin into urine and feces in mice and rats. Prumycin was intravenously injected into mice and rats at the dose of 72 mg/kg and 30 mg/kg, respectively.

用を有しているので，この場合のＰＦＣの減少は，細胞の抗体蛋白の合成が阻害されたことによる可能性が考えられる。次に，細胞性免疫反応である遅延型過敏症反応（DTH）におよぼすプルマイシンの影響を検討した。即ち，少数のSRBCを静脈内投与してマウスを感作し，４日後に同じくSRBCを惹起反応のために足蹠部に投与して，その24時間後に投与部位の腫張を測定した。その結果はTable５に示すように，マイトマイシンC½LD_{50}はどの時期に投与しても，DTHを明らかに抑制したのに対し，プルマイシン½LD_{50}は，惹起日またはその前日に投与した場合DTHを約50%抑制したが，その他の時期に投与した場合は殆んど抑制しなかった。

従って，プルマイシンの免疫抑制作用は，マイトマイシンCに比較し弱いものと考えられた。

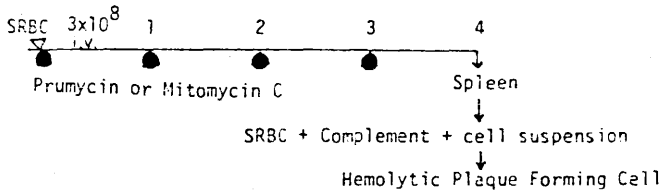
結　論

抗かび性抗生物質であるプルマイシンが抗腫瘍活性を有していることを明らかにした。その作用機作として，蛋白合成阻害とＤＮＡ合成阻害が考えられることを示した。また，HeLa細胞の，少なくともDNA合成後期（G_2期）から分裂期（M期）への細胞回転を阻害することを明らかにした。

プルマイシンのマウス，ラットおよび犬に対するLD_{50}(i. v.) はそれぞれ約150mg/kg，60mg/kg および50mg/kgであり，マウスおよびラットには脱毛を惹起し，犬には嘔吐を起させる作用が認められた。しかし骨髄および腎臓に対する明らかな障害は認められず，生体の免疫系に対する抑制作用も比較的弱いことを明らかにした。

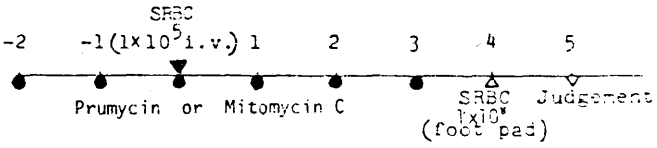
また，プルマイシンは生体の代謝をうけ難く，未変化体のまま腎臓を経て大部分尿中に排泄される

Table 4 Effect of prumycin on antibody forming cells in mouse spleen



Drugs	Treatment Time	PFC/10^6 spleen cells	%
(control)	-	1775 ± 195	100
Prumycin	Day 0	1552 ± 202	87
75 mg/kg	Day 1	1818 ± 251	102
i.p.	Day 2	1751 ± 171	99
	Day 3	1155 ± 301	65
Mitomycin C			
4.2 mg/kg	Day 2	110 ± 30	6
i.p.			

Table 5 Effect of prumycin on mouse delayed hypersensicivity reaction



Treatment	Dose mg/kg	Time (Day)	Foot pad swelling (1/100 mm)	%
Control			96 ± 10	100
Prumycin	10	-2 to + 3	102 ± 2	106
i.p.	75	-1	76 ± 8	79
	75	0	96 ± 10	100
	75	+1	80 ± 22	83
	75	+3	61 ± 8	64
	75	+4	48 ± 12	50
Mitomycin C	1	-2 to + 3	77 ± 13	80
i.p.	4.2	-1	30 ± 19	31
	4.2	0	59 ± 19	62
	4.2	+1	56 ± 22	58
	4.2	+3	19 ± 9	25
	4.2	+4	48 ± 10	50
Cyclophosphamide	150	+1	14 ± 3	15

ことを明らかにした。

引用文献

1) HATA, T.; S.OMURA, M.KATAGIRIK. ATSUMI, J.AWAYA, S.HIGASHIKAWA, K. YASUI, H.TERADA and S.KUYAMA: J.Antibiotics **24**, 900-901, 1971

2) OMURA, S.; M.KATAGIRI, J.AWAYA, K.ATSUMI, R.OIWA, T.HATA, S.HIGASHIKAWA, K.YASUI, H.TERADA and S.KUYAMA: Agr. Biol. Chem. **37**, 2805-2812, 1973

3) OMURA, S.; M.KATAGIRI, K.ATSUMI, T.HARA, A.A.JAKUBOWSKI, E.B.SPRINGS and M.TISHLER: J.Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1974 1627-1631, 1974

4) SCHWARTZ, J.L.; M.KATAGIRI, S.OMURA and M.TISHLER: J.Antibiotics **27**, 379-385, 1974

論文の審査結果の要旨

抗かび性抗生物質であるプルマイシンが抗腫瘍性活性を有していることを発見し，さらに本物質は

(1) HeLa細胞の蛋白質の合成とDNAの合成を阻害する。

(2) HeLa細胞のDNA合成後期から分裂期への細胞回転を阻害する。

(3) 生体の代謝を受け難く，未変化のまま腎臓を経て大部分排泄される。

(4) 生体の免疫系に対する抑制作用も比較的弱い。

などの諸事実を明らかにした。

プルマイシンの抗腫瘍性活性を発見し，それに関連する諸事実を明らかにした本研究業績は薬学博士を授与するに値するものと判定した。