

# 新規マイトマイシン C-エストラジオール結合体の 抗癌特性

一色 信行



## 目 次

緒 論 .....	1
第 1 章    マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの 新規結合体の合成と各種 pH 溶液中での MMC への変換特性について .....	5
第 1 節    緒言 .....	5
第 2 節    マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオール との新規結合体の合成 .....	6
第 1 項        安息香酸エストラジオール-グルタル酸結合体 (EB-glu) の合成 .....	8
第 2 項        安息香酸エストラジオール-グルタル酸-マイトマイシン C 結合体 (EB-glu-MMC) の合成 .....	8
第 3 項        エストラジオール-グルタル酸結合体 (E-glu) の合成 .....	9
第 4 項        エストラジオール-グルタル酸-マイトマイシン C 結合体 (E-glu-MMC) の合成 .....	10
第 3 節    各種 pH 溶液中での MMC への変換特性 .....	11
第 4 節    速度論的解析 .....	15
第 5 節    小括 .....	20
第 2 章    マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの 新規結合体の生物学的特性：生体成分中での安定性とエストロゲンレセプターと の結合能 .....	21
第 1 節    緒言 .....	21
第 2 節    生体試料中における安定性と MMC 放出特性 .....	21

第 1 項	10%血漿添加液中での安定性と MMC 放出特性.....	21
第 2 項	5%肝ホモジネート添加液中での安定性.....	22
第 3 項	速度論的解析.....	23
第 3 節	エストロゲンレセプターへの結合能.....	28
第 1 項	エストロゲンレセプター.....	28
第 2 項	エストラジオールに対する相対結合能.....	31
第 4 節	小括.....	35
第 3 章	マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの 新規結合体に関する in vivo 特性：溶液製剤での薬物動態特性と P388 白血病細胞 と Sarcoma 180 固形肉腫に対する抗癌効果 .....	36
第 1 節	緒言.....	36
第 2 節	腹腔内投与後の血漿中薬物濃度推移（溶液製剤） .....	37
第 3 節	腹水 P388 白血病細胞に対する腹腔内投与後の抗癌効果（溶液製剤） .....	41
第 4 節	皮下移植 Sarcoma 180 固形肉腫に対する腹腔内投与後の抗腫瘍効果 （溶液製剤） .....	45
第 5 節	小括.....	46
第 4 章	マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの 新規結合体に関する in vivo 特性：懸濁液製剤での P388 白血病細胞と Sarcoma 180 固形肉腫に対する抗癌効果 .....	50
第 1 節	緒言.....	50
第 2 節	腹水 P388 白血病細胞に対する腹腔内投与後の抗癌効果（懸濁液製剤） .....	50

第3節	皮下移植 Sarcoma 180 固形肉腫に対する腹腔内投与後の抗腫瘍効果 (懸濁液製剤) .....	51
第4節	懸濁状態での MMC の放出特性 .....	56
第5節	小括 .....	57
第5章	マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの 新規結合体に関する抗癌効果と副作用の評価 .....	60
第1節	緒言 .....	60
第2節	皮下移植 Sarcoma 180 固形肉腫に対する溶液製剤腹腔内投与後の抗腫 瘍効果, 体重変化, 白血球数の減少 .....	61
第3節	皮下移植 Sarcoma 180 固形肉腫に対する懸濁液製剤腹腔内投与後の抗 腫瘍効果, 体重変化, 白血球数の減少 .....	65
第4節	正常マウスに対する溶液製剤投与後の白血球数及び体重の変化 .....	69
第5節	Sarcoma 180 固形肉腫皮下移植マウスにおける EB-glu-MMC 懸濁液製 剤投与後の体内分布 .....	72
第6節	小括 .....	74
第6章	総括及び考察 .....	78
謝辞	.....	83
実験の部	.....	84
第1章の実験	.....	84
第2章の実験	.....	86
第3章の実験	.....	91

第 4 章の実験 .....	94
第 5 章の実験 .....	97
引用文献 .....	101

## 論文リスト

N. Ishiki, H. Onishi, Y. Machida, Conversion Characteristics of the Conjugates of Mitomycin C with Estradiol and Estradiol Benzoate in Various pH Media, Chem. Pharm. Bull., 45(8) 1345-1349 (1997) : 第 1 章

N. Ishiki, H. Onishi, Y. Machida, Biological Properties of Conjugates of Mitomycin C with Estradiol Benzoate and Estradiol: Their Stability Characteristics in Biological Media and Their Binding Abilities to Estrogen Receptor, Biol. Pharm. Bull., 20(10) 1096-1102 (1997) : 第 2 章

N. Ishiki, H. Onishi, Y. Machida, In vivo Properties of the Conjugates of Mitomycin C with Estradiol Benzoate and Estradiol: Pharmacokinetics and Antitumor Characteristics against P388 Leukemia and Sarcoma 180, Biol. Pharm. Bull., 21(11) 1180-1186 (1998) : 第 3 章

N. Ishiki, H. Onishi, Y. Machida, Antitumor Activities of Conjugates of Mitomycin C with Estradiol Benzoate and Estradiol via Glutaric Acid in Suspension Dosage Form, Biol. Pharm. Bull., 25(10) 1373-1377 (2002) : 第 4 章

N. Ishiki, H. Onishi, Y. Machida, Evaluation of Antitumor and Toxic Side Effects of Mitomycin C-Estradiol Conjugates, Int. J. Pharm., 279(1-2) 81-93 (2004) : 第 5 章

## 本論文中で用いる主な略語

・ MMC	マイトマイシン C
・ EB-glu-MMC	安息香酸エストラジオール-グルタル酸-マイトマイシン C 結合体
・ E-glu-MMC	エストラジオール-グルタル酸-マイトマイシン C 結合体
・ EB-glu	安息香酸エストラジオール-グルタル酸結合体
・ E-glu	エストラジオール-グルタル酸結合体
・ glu-MMC	グルタル酸-マイトマイシン C 結合体
・ EB	安息香酸エストラジオール
・ PG	プロピレングリコール
・ ILS	延命率
・ eq. MMC/kg	遊離の MMC 量に換算した体重 (kg) あたりの投与量
・ C <sub>max</sub>	最高血中濃度
・ T <sub>max</sub>	最高血中濃度到達時間
・ AUC	薬物血中濃度-時間曲線下面積
・ MRT	平均滞留時間
・ VRT	血中滞留時間の分散
・ PK	薬物動態
・ NMR	核磁気共鳴
・ FAB-MS	高速原子衝撃質量分析
・ i.p.	腹腔内投与
・ i.v.	静脈内投与
・ s.c.	皮下投与

## 緒論

近年様々な抗癌剤が開発されている。多くの抗癌剤は癌選択性に乏しいため、治療効果の達成には高用量の投与が必要とされる。しかしながら、高投与量による治療はしばしば副作用を引き起こし、抗癌剤の使用が制限される。癌やその周辺組織への抗癌剤のターゲティングはその欠点を克服する 1 つの手段である。マイトマイシン C (MMC) は強力な抗癌作用を示すことで知られている。しかしながら、副作用として重度の骨髄抑制や消化管障害がある<sup>1)</sup>。MMC の薬物動態学的、薬力学的改善のため脂溶性プロドラッグ<sup>2-7)</sup>や高分子プロドラッグ<sup>8-14)</sup>などが開発され、抗癌活性の向上が試みられている。それらの特性は脂溶性や分子量に依存し、体内分布や生体内滞留性を変化させることができる点にある。それらのうちいくつかは受動的ターゲティング能を有しており<sup>12,15,16)</sup>、また標的部位に特異的結合を示す分子を用いて能動的ターゲティング能を示すものも報告されている<sup>17-19)</sup>。

能動的ターゲティングの方法の 1 つとして薬物-ホルモン結合体を用いる方法が知られている<sup>20)</sup>。ホルモン依存性の癌はホルモンレセプターを持っており、抗ホルモン剤や薬物-ホルモン結合体が治療のため開発されている。エストラジオールはエストロゲンレセプターに対して特異的結合能を有する。エストラジオールの類縁物質は乳癌に対する抗エストロゲン剤としてすでに臨床使用されている抗ホルモン剤の 1 つであり、その抗エストロゲン効果はエストロゲンレセプターへの効果として知られている<sup>21-29)</sup>。つまり抗エストロゲン剤はエストロゲンレセプターに結合し、乳癌に対して作用を示す。したがって、エストロゲンレセプターはターゲットサイトとして有用である。さらに、エストロゲンレセプターに高親和性を示すエストラジオール誘導体は肝臓、腎臓、脾臓などの非標的部位よりも子宮、卵巢のような標的部位に対してより局在化する<sup>30,31)</sup>。また、それらは標的部位に長時間留まり、非標的部位においては速やかに代謝される傾向がある<sup>32)</sup>。この現象について

はエストロゲンレセプターが重要な役割を果たしていると考えられる<sup>30-32)</sup>。

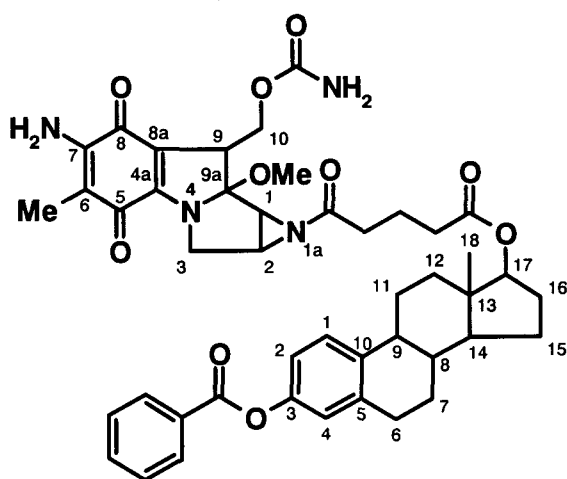
薬物-ホルモン結合体の基本的なコンセプトは“ホルモンレセプターに対するリガンドの特異的結合によるホルモン依存性癌への特異的な送達”ということである。ホーミングリガンドとしてのステロイドホルモンの利用は活発に研究されている。例えば estramustine phosphate disodium はエストラサイトとしてすでに発売されている。本薬剤は nitrogen mustard と estradiol-17 $\beta$ -phosphate の結合体で, estramustine 結合タンパクに特異的に結合し前立腺癌へ特異的に送達され, 高い治療効果を上げている<sup>33,34)</sup>。

さらに, エストラジオールやエストラジオール誘導体と抗癌剤との結合体は, 抗癌剤である親化合物よりも優れた効果を発揮することが報告されている<sup>34-39)</sup>。例えば bestrabucil は chlorambucil と安息香酸エストラジオールとの結合体として開発された<sup>38)</sup>。本結合体はエストロゲンレセプターとある程度の親和性を示したが<sup>40)</sup>, 興味深いことにエストロゲンレセプター陽性癌ではない Walker256, Sarcoma 180 等の多くの固形癌に対して強力な親和性と抗癌効果を示した<sup>38)</sup>。さらに親化合物である chlorambucil よりも高い効果と低い毒性を示した<sup>38)</sup>。これは bestrabucil が chlorambucil よりも様々な癌に対して高い親和性を示し, 他の組織には比較的分布しないためであった。エストラジオールやエストラジオール誘導体と抗癌剤との結合体はレセプター指向性局在化以外のメカニズムの可能性も提案されている<sup>36,38,39)</sup>。このようにエストラジオール及びその類縁物質はホルモンレセプターへのホーミングリガンドとしてだけでなく, 癌選択的なホーミングリガンドとしての可能性も考えられる。

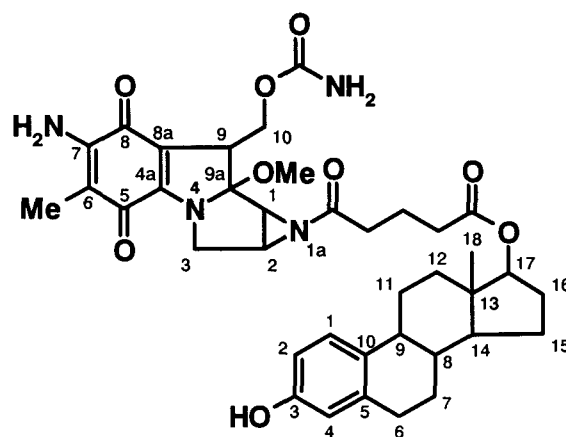
以上を考えると, MMC は非常に強力な抗癌剤であるため, エストラジオールやその誘導体と MMC との結合体は抗癌効果の向上に有効であると考えられる。また, 親化合物である MMC の抗癌活性を向上する薬剤として, もしくは副作用を低減する薬剤として有用である可能性がある。現在までに

多くの MMC の脂溶性プロドラッグが調製され、評価されているが、エストラジオール及び安息香酸エストラジオールとのプロドラッグは報告されていない。そこで、MMC と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとがグルタル酸を介して結合した MMC のプロドラッグである安息香酸エストラジオール-グルタル酸-マイトマイシン C 結合体 (EB-glu-MMC) 及びエストラジオール-グルタル酸-マイトマイシン C 結合体 (E-glu-MMC) を MMC の新規結合体として合成し、その物理化学的、生化学的特性及び *in vivo* における抗癌効果、副作用について評価した。

今回合成した両プロドラッグと estramustine 及び bestrabucil とはその構造的特長が異なる。つまり、EB-glu-MMC、E-glu-MMC 両結合体は MMC の抗癌活性部位がマスクされたプロドラッグであるのに対して、estramustine 及び bestrabucil は抗癌活性部位がそのまま保持されている。また、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の特性を評価することによってエストラジオールというホーミングリガンドの可能性についても評価できると考えられる。



A : EB-glu-MMC



B : E-glu-MMC

まず、新規 MMC 結合体として EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC を合成した (第 1 章)。さらに両結合体の緩衝液中での MMC 放出特性及び分解特性を調べ (第 1 章)、生体成分中での MMC 放出特性を調べることにより両結合体が MMC のプロドラッグとして機能しうることを確認した (第 2 章)。また両結合体のエストロゲンレセプターへの親和性を調べ、エストロゲンレセプター指向性プロドラッグとしての可能性を *in vitro* で検証した (第 2 章)。

また、*in vivo* において汎用される二種類の癌細胞、すなわち P388 白血病細胞と Sarcoma 180 固形肉腫細胞による移植癌への抗癌効果を調べた。P388 腹水癌に対する抗癌効果は投与部位と標的部位が同じである *i.p.-i.p.* システムである。また、Sarcoma 180 固形肉腫に対する抗腫瘍効果は投与部位と標的部位が離れた場所に存在する *s.c.-i.p.* システムである。両結合体は非常に難水溶性であるという物理化学的性質から、投与形態によって抗癌効果や副作用の発現程度に違いが見られてくると考えられた。両結合体の投与形態としてプロピレングリコール (PG) に溶解した溶液製剤 (第 3 章)、10%PG 含有生理食塩水に懸濁した懸濁液製剤 (第 4 章) について抗癌活性及び副作用の評価を行い、投与形態の違いによる作用メカニズムの解析を行った。

第 5 章ではそれまでに得られた *in vivo* 抗癌活性と副作用発現に関する結果をより詳細に検証した。MMC の主要な副作用として骨髓抑制や白血球減少症が知られており、それまで行っていた体重変化による副作用評価に加え末梢血中の白血球数の推移による副作用評価を試みた。また正常マウス群でも同様の試験を行い体重変化及び白血球推移を担癌マウス群と比較し、より詳細に副作用を評価した。さらに抗癌活性と副作用の関係をより詳細に明らかにするために Sarcoma 180 固形肉腫皮下移植マウスにおける組織分布特性を調べた。

以下の各章にわたり本研究の経緯及び結果について詳述する。

# 第1章 マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの新規結合体の合成と各種 pH 溶液中での MMC への変換特性について

## 第1節 緒言

マイトマイシン C (MMC) は、強力で広い抗癌スペクトルをもつ抗癌剤である。薬物動態学的、薬力学的改善のため多くの脂溶性<sup>2-7)</sup>、高分子誘導体<sup>8-14)</sup>が研究されており、それらは MMC を放出するプロドラッグとして機能する。さらにそれらのうちいくつかは受動的ターゲティング能を有している<sup>12,15,16)</sup>。また標的部位に特異的結合を示す分子を用いて能動的ターゲティングを示すものも報告されている<sup>17-19)</sup>。能動的ターゲティングの方法のひとつとして薬物-ホルモン結合体を用いる方法が知られている<sup>20)</sup>。エストラジオールはエストロゲンレセプター特異性を有する物質であり、エストラジオールの類縁物質は乳癌に対して抗エストロゲン剤として効果が認められている<sup>21,22)</sup>。抗エストロゲン剤の効果はエストロゲンレセプターへの効果として知られている。さらにエストラジオールやエストラジオール誘導体と抗癌剤との結合体は親化合物の抗癌剤よりも優れた効果を発揮することが報告されている<sup>38,40)</sup>。例えば bestabucil は chlorambucil と安息香酸エストラジオールとの結合体で、様々な癌に対して強い親和性を示し、強力な抗癌作用を示す<sup>38)</sup>。MMC は強力な抗癌剤であるため、エストラジオールやその誘導体と MMC との結合体は抗癌効果の向上やエストロゲンレセプター陽性癌への特異的移行を実現するのに有効であると考えられる。本章では安息香酸エストラジオール及びエストラジオールと MMC との結合体を合成し、溶液中での安定性について評価した。

## 第2節 マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの新規結合体の合成

MMC と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールの結合体 (EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC) の合成法を Fig.1 に示す。まず、グルタル酸を安息香酸エストラジオールの 17β 位の水酸基に導入し、グルタル酸エステルである 4-[3-benzoyloxy-1,3,5(10)-estratrien-17β-yloxy-carbonyl]butyric acid (EB-glu) を合成した。得られた EB-glu は EB-glu-MMC の合成に用いた。EB-glu のベンゾイルエステルを加水分解することによりエストラジオールの 17β 位の水酸基にグルタル酸が縮合した 4-[3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17β-yloxy-carbonyl] butyric acid (E-glu) を合成した。この E-glu は E-glu-MMC の合成に用いた。次に、EB-glu-MMC は EB-glu のカルボキシル基に MMC の 1a-N 位を縮合することによって合成した。同様に E-glu-MMC もまた E-glu と MMC を縮合することによって合成した。

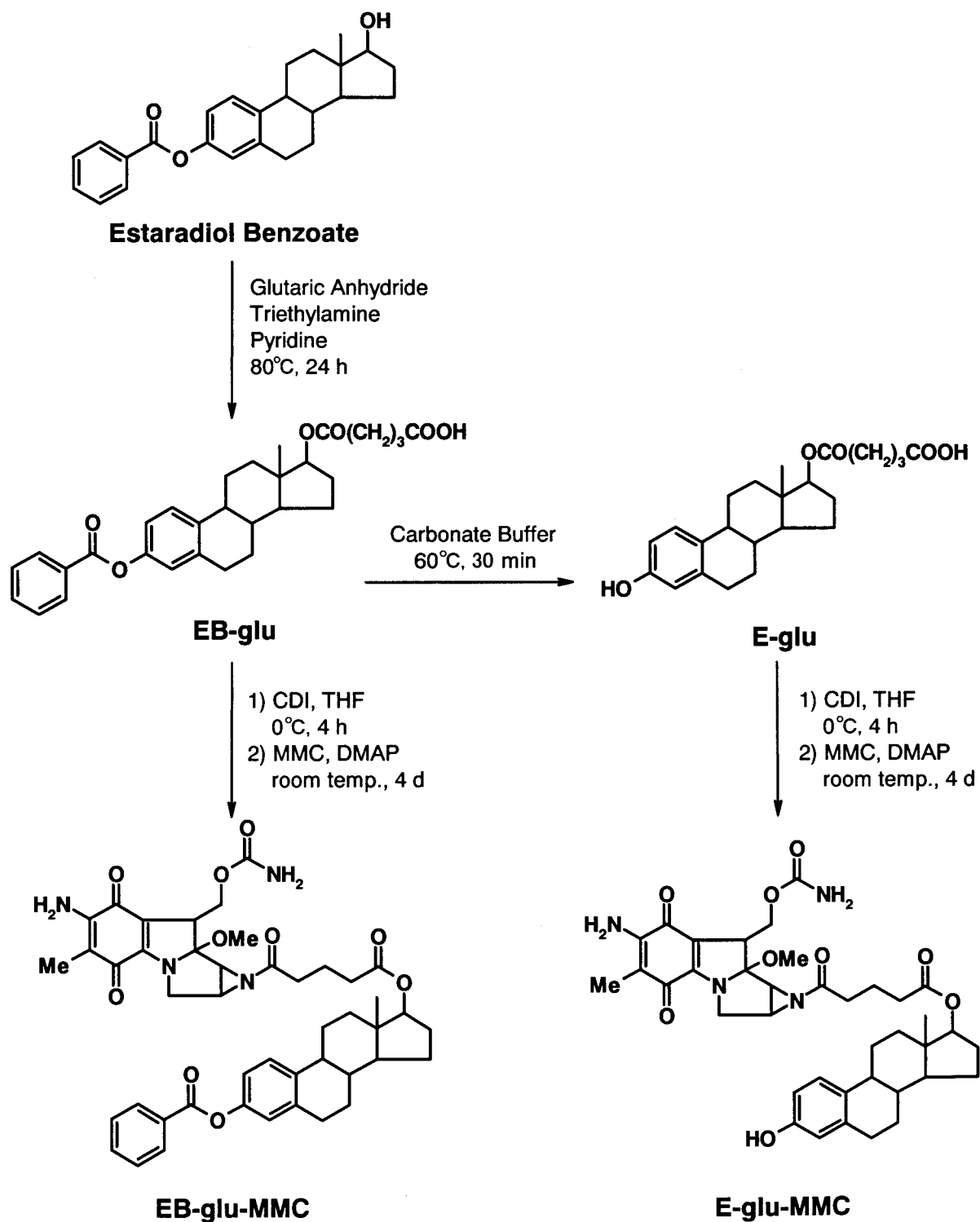


Fig. 1. Synthetic Procedures of EB-glu-MMC and E-glu-MMC

## 第 1 項 安息香酸エストラジオール-グルタル酸結合体 (EB-glu) の合成

乾燥したピリジン (20 mL) に安息香酸エストラジオール (EB; 5.0 g, 13.3 mmol), 無水グルタル酸 (7.6 g, 66.6 mmol), トリエチルアミン (4.9 mL) を加え 80℃で 24 時間攪拌した。溶媒を留去した後, 水を加えクロロホルムで抽出した。クロロホルム相を硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した。残渣をメタノールに溶解後再結晶し, 3.79 g (収率 58.1%) の EB-glu を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.19 (2H, d,  $J=7.9$  Hz, 2-, 6-H of benzoyl), 7.61 (1H, t,  $J=7.9$  Hz, 4-H of benzoyl), 7.50 (2H, dd,  $J=7.9, 7.9$  Hz, 3-, 5-H of benzoyl), 7.33 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, 1-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 6.92-7.00 (2H, m, 2-, 4-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 4.72 (1H, dd,  $J=9.5, 9.5$  Hz, 17-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 2.84-2.92 (2H, m, 6-H<sub>2</sub> of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 1.24-2.49 (19H, m, -COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-, 8-, 9-, 14-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl, 7-, 11-, 12-, 15-, 16-H<sub>2</sub> of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 0.84 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub> of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl). EI-MS  $m/z$ : 490 ( $\text{M}^+$ ).

## 第 2 項 安息香酸エストラジオール-グルタル酸-マイトマイシン C 結合体 (EB-glu-MMC) の合成

EB-glu (734 mg, 1.5 mmol) にカルボニルジイミダゾール (CDI) (243 mg, 1.5 mmol) を加え乾燥した THF (10 mL) 中 0℃で 4 時間攪拌した。これに MMC (100 mg, 0.3 mmol) 及びジメチルアミノピリジン (DMAP) (5 mg) を加え, 室温で 4 日間攪拌した。溶媒を留去した後クロロホルムで抽出し, 次いでクロロホルム相を水洗し硫酸ナトリウムで乾燥後乾固した。残渣を少量のクロロホルムに溶解し, シリカゲルカラム (2.5×25 cm; メルク社製シリカゲル 230-400 mesh) でクロロホルム-メタノール混液にて分離, 精製し,

84.1 mg (収率 34.8%) の EB-glu-MMC を得た。

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) nm (log  $\epsilon$ ) : 356 (4.33).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 8.19 (2H, d,  $J=7.3$  Hz, 2-, 6-H of benzoyl), 7.63 (1H, t,  $J=7.3$  Hz, 4-H of benzoyl), 7.50 (2H, dd,  $J=7.3$ , 7.3 Hz, 3-, 5-H of benzoyl), 7.33 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, 1-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 6.92-6.99 (2H, m, 2-, 4-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 4.86-5.05 (3H, m, 10'-H of MMC,  $-\text{NH}_2$ ), 4.68 (1H, dd,  $J=8.2$ , 8.2 Hz, 17-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 4.46 (1H, d,  $J=13.4$  Hz, 3-H of MMC), 4.05 (1H, dd,  $J=11.0$ , 11.0 Hz, 10-H of MMC), 3.70 (1H, dd,  $J=4.9$ , 11.0 Hz, 9-H of MMC), 3.50-3.57 (2H, m, 1-, 3'-H of MMC), 3.28 (1H, dd,  $J=1.8$ , 4.5 Hz, 2-H of MMC), 3.20 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ), 2.80-2.94 (2H, m, 6-H<sub>2</sub> of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 1.26-2.63 (22H, m,  $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ , 8-, 9-, 14-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl, 7-, 11-, 12-, 15-, 16-H<sub>2</sub> of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl, 6-CH<sub>3</sub> of MMC), 0.81 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub> of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl). FAB-MS  $m/z$ : 808 ( $M+2$ ).

### 第 3 項 エストラジオール-グルタル酸結合体 (E-glu) の合成

EB-glu (1.0 g) を pH 10 の炭酸バッファー／メタノール混液中に加え 60℃で 30 分間攪拌した。溶媒を留去後、水を加えエーテルで抽出した。エーテル相を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣を少量のクロロホルムで溶解し、シリカゲルカラム (2.5×25 cm; メルク社製シリカゲル 230-400 mesh) でクロロホルム-メタノール混液にて分離、精製し、0.45 g (収率 57.1%) の E-glu を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 7.12 (1H, d,  $J=8.2$  Hz, 1-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 6.62 (1H, d,  $J=8.2$  Hz, 2H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 6.56 (1H, s, 4-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 4.69 (1H, dd,  $J=7.9$ , 7.9 Hz, 17-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 2.72-2.90 (m, 2H, 6-H<sub>2</sub> of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 1.27-2.44 (19H, m,  $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ , 8-, 9-, 14-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl, 7-,

11-, 12-, 15-, 16-H<sub>2</sub> of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 0.84 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub> of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl). EI-MS m/z: 386 (M<sup>+</sup>).

#### 第4項 エストラジオール-グルタル酸-マイトマイシン C 結合体 (E-glu-MMC) の合成

E-glu (578 mg, 1.5 mmol) にカルボニルジイミダゾール (CDI) (242.5 mg, 1.5 mmol) を加え乾燥した THF (10 mL) 中 0℃で4時間攪拌した。これに MMC (100 mg, 0.3 mmol) 及びジメチルアミノピリジン (DMAP) (5 mg) を加え、室温で4日間攪拌した。溶媒を留去した後クロロホルムで抽出し、次いでクロロホルム相を水洗し硫酸ナトリウムで乾燥後乾固した。残渣を少量のクロロホルムに溶解し、シリカゲルカラム (2.5×25 cm; メルク社製シリカゲル 230-400 mesh) でクロロホルム-メタノール混液にて分離、精製し、58.7 mg (収率 27.9%) の E-glu-MMC を得た。

UV  $\lambda$  max (MeOH) nm (log  $\epsilon$ ) : 356 (4.28). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 7.33 (1H, d, J=8.2 Hz, 1-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 6.63 (1H, d, J=8.2 Hz, 2-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 6.57 (1H, s, 4-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 4.85-4.92 (3H, m, 10'-H of MMC, -NH<sub>2</sub>), 4.66 (1H, dd, J=8.2, 8.2 Hz, 17-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 4.45 (1H, d, J=13.4 Hz, 3-H of MMC), 4.06 (1H, dd, J=11.0, 11.0 Hz, 10-H of MMC), 3.71 (1H, dd, J=5.2, 11.0 Hz, 9-H of MMC), 3.49-3.57 (2H, m, 1-, 3'-H of MMC), 3.27 (1H, dd, J=1.8, 4.3 Hz, 2-H of MMC), 3.20 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 2.76-2.84 (2H, m, 6-H<sub>2</sub> of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl), 1.25-2.60 (22H, m, -COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-, 8-, 9-, 14-H of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl, 7-, 11-, 12-, 15-, 16-H<sub>2</sub> of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl, 6-CH<sub>3</sub> of MMC), 0.79 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub> of 1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -yl). FAB-MS m/z: 704 (M+2).

### 第3節 各種 pH 溶液中での MMC への変換特性

EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC はほとんど水に溶解しないが、50% (v/v) PG 含有水溶液 (50%PG) に比較的よく溶解する。したがって各化合物の安定性試験及び MMC の生成は 50%PG 溶液中で試験した。Fig.2 に MMC の種々の pH における分解プロファイルを示す。また、Fig.3, 4 に E-glu-MMC 及び EB-glu-MMC の分解プロファイル、さらに各化合物からの MMC の生成プロファイルを示す。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は擬一次速度式に従って分解し、主分解物は MMC であった。しかしながら EB-glu-MMC はいくつかの pH 条件下では E-glu-MMC を生成した。これはインキュベーション中に安息香酸エストラジオールのベンゾイルエステルが加水分解されたためと考えられた。さらに HPLC によってグルタル酸-マイトマイシン C 結合体 (glu-MMC) は生成しないことを確認した。これより MMC は EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC から直接放出されると考えられた。MMC は pH 4.0 及び pH 11.0 を除いた他の条件下では安定であった。

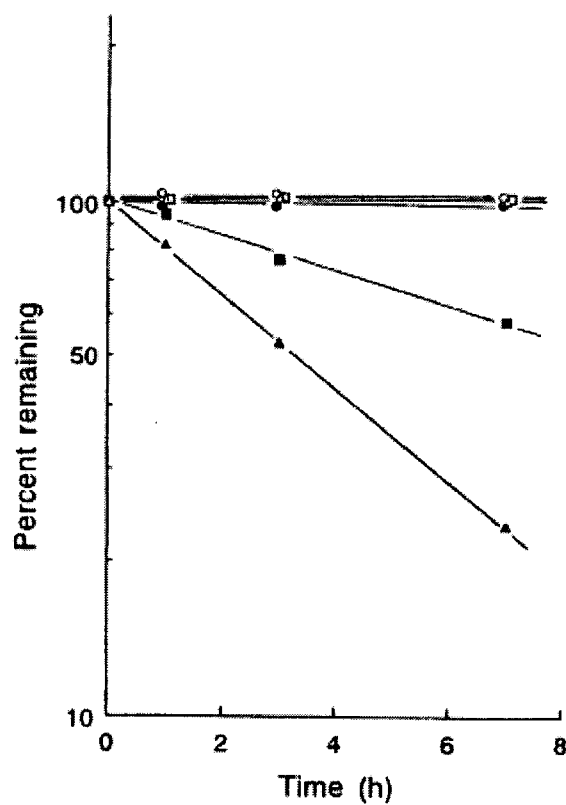


Fig. 2. Semi-logarithmic Plots for the Conversion of MMC during the Incubation of MMC in a Mixture of 1/15 M Phosate Buffer of Various pH ( $\mu=0.3$ ) – PG(1:1, v/v) at 37°C

pH 4(▲), pH 6(△), pH 7(○), pH 7.4(□), pH 9(●), pH 11(■).

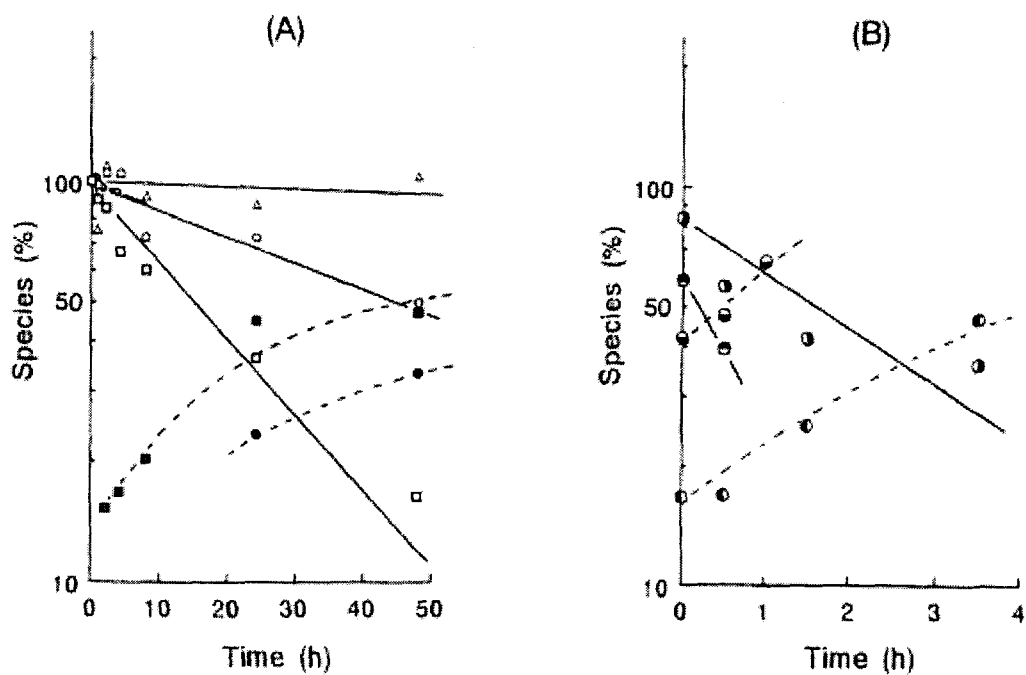


Fig. 3. Semi-logarithmic Plots for the Conversion of E-glu-MMC (—) and MMC (---) during the Incubation of E-glu-MMC in a Mixture of 1/15 M Phosphate Buffer of Various pH ( $\mu=0.3$ ) – PG (1:1, v/v) at 37°C

(A) E-glu-MMC, pH 4( $\diamond$ ), pH 6( $\triangle$ ), pH 7( $\circ$ ), pH 7.4( $\square$ ); MMC, pH 7( $\bullet$ ), pH 7.4( $\blacksquare$ ).

(B) E-glu-MMC, pH 9( $\bullet$ ), pH 11( $\bullet$ ); MMC, pH 9( $\bullet$ ), pH 11( $\bullet$ ).

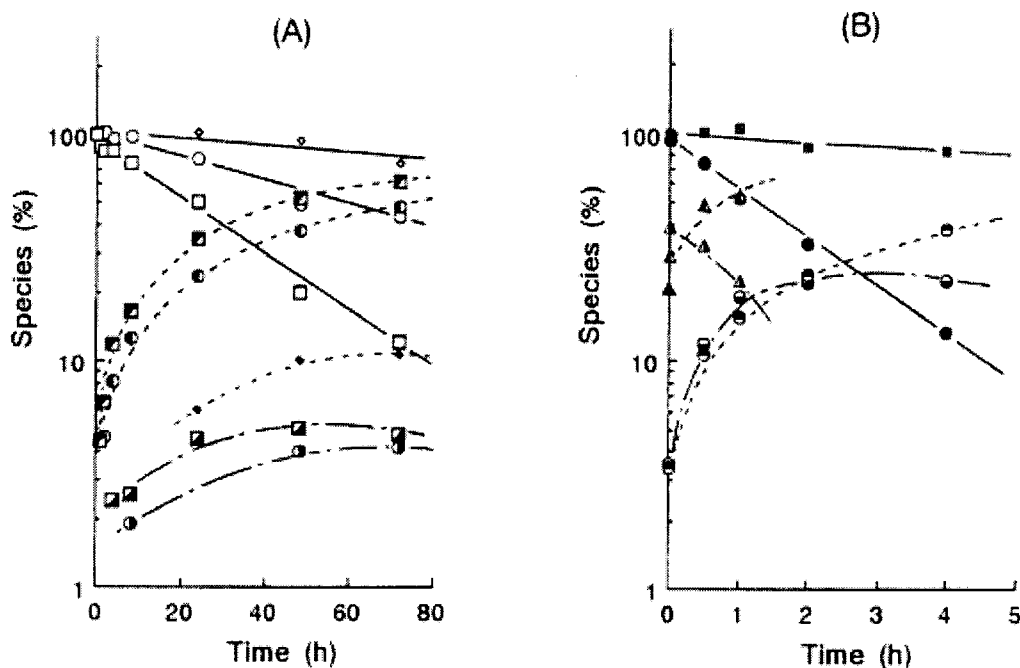


Fig. 4. Semi-logarithmic Plots for the Conversion of EB-glu-MMC (—), E-glu-MMC (— · —) and MMC (— — —) during the Incubation of EB-glu-MMC in a Mixture of 1/15 M Phosphate Buffer of Various pH ( $\mu=0.3$ ) – PG (1:1, v/v) at 37°C

(A) EB-glu-MMC, pH 6( $\diamond$ ), pH 7( $\circ$ ), pH 7.4( $\square$ ); E-glu-MMC, pH 7( $\bullet$ ), pH 7.4( $\blacksquare$ ); MMC, pH 6( $\blacklozenge$ ), pH 7( $\bullet$ ), pH 7.4( $\blacksquare$ ).

(B) EB-glu-MMC, pH 4( $\boxplus$ ), pH 9( $\bullet$ ), pH 11( $\blacktriangle$ ); E-glu-MMC, pH 9( $\bullet$ ), pH 11( $\blacktriangle$ ); MMC, pH 9( $\bullet$ ), pH 11( $\blacktriangle$ ).

#### 第 4 節 速度論的解析

上述した EB-glu-MMC, E-glu-MMC 及び MMC の分解は擬一次式に従うことが認められた。検出された分解物より推察した分解及び変換スキームを Fig.5 に示す。また、擬一次速度定数  $k_1$ - $k_6$  を用いた速度式を以下に示す。

$$dM_a/dt = -k_1M_a \quad (1)$$

これはスキーム A に従った速度式で、 $M_a$  は MMC の濃度、 $t$  は MMC のインキュベーション時間を表す。

$$d(EGM_b)/dt = -(k_2+k_3)(EGM_b) \quad (2)$$

$$dM_b/dt = k_2 \times (EGM_b) - k_1M_b \quad (3)$$

これはスキーム B に従った速度式で、 $EGM_b$  と  $M_b$  はそれぞれ E-glu-MMC と MMC の濃度、 $t$  は E-glu-MMC のインキュベーション時間を表す。

$$d(EBGM_c)/dt = -(k_4+k_5+k_6)(EBGM_c) \quad (4)$$

$$d(EGM_c)/dt = k_5 \times (EBGM_c) - (k_2+k_3)(EGM_c) \quad (5)$$

$$dM_c/dt = k_4 \times (EBGM_c) + k_2 \times (EGM_c) - k_1M_c \quad (6)$$

これはスキーム C に従った速度式で、 $EBGM_c$ ,  $EGM_c$ ,  $M_c$  はそれぞれ EB-glu-MMC, E-glu-MMC 及び MMC の濃度、 $t$  は EB-glu-MMC のインキュベーション時間を表す。上記速度式を解き MMC, E-glu-MMC 及び EB-glu-MMC の時間-濃度式を導いた。その式を Table 1 に示す。

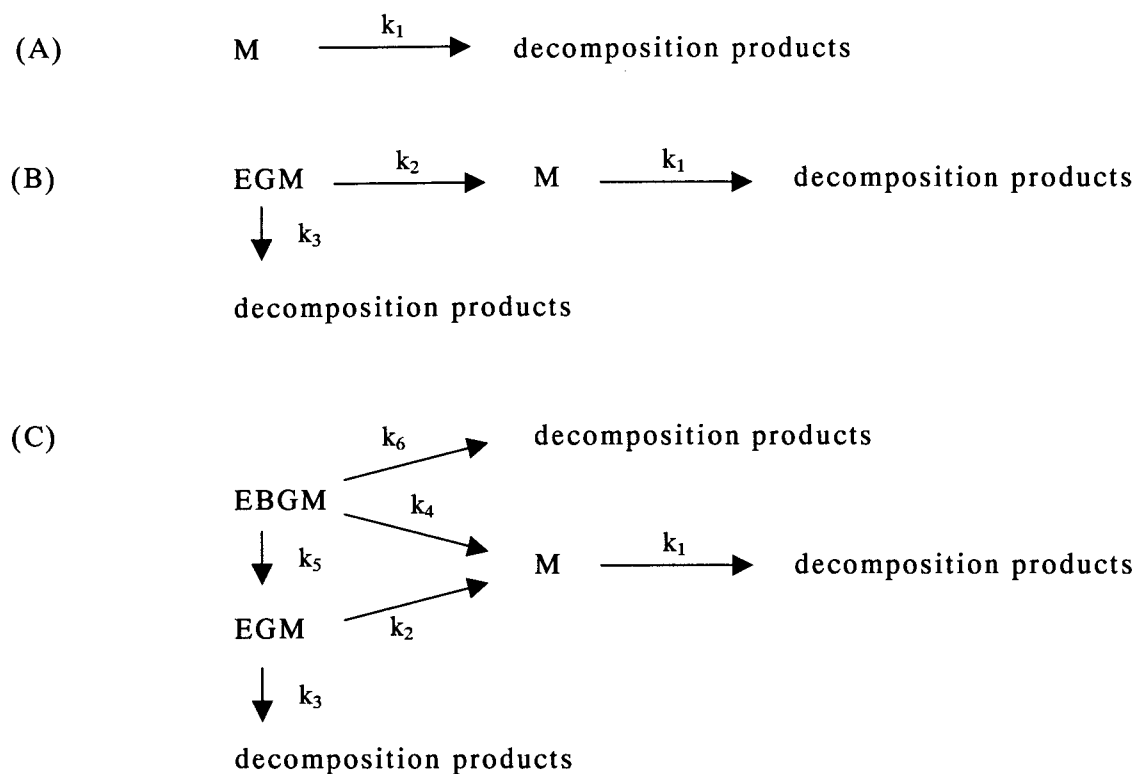


Fig. 5. Conversion Schemes for MMC (A), E-glu-MMC (B), and EB-glu-MMC (C)

M, MMC; EGM, E-glu-MMC; EBGM, EB-glu-MMC.  $k_1$ - $k_6$  are pseudo-first order rate constants for the depicted reactions.

速度定数は非線形最小二乗法プログラム MULTI<sup>41)</sup>を用い Table 1 に示す式から観測結果に基づいて計算したフィッティングプロファイルによって求めた。まず、 $k_1$  値は MMC のインキュベーション中での MMC の分解プロファイルから最小二乗法により求めた。得られた  $k_1$  値は E-glu-MMC の速度解析に用いた。次に、 $k_2$ ,  $k_3$  値は E-glu-MMC のインキュベーション中での E-glu-MMC の分解と MMC の生成プロファイルから最小二乗法によって求めた。得られた  $k_2$ ,  $k_3$  値は  $k_1$  値同様 EB-glu-MMC の速度解析に用いた。さらに  $k_4$ ,  $k_5$ ,  $k_6$  値は EB-glu-MMC のインキュベーション中での E-glu-MMC 及び MMC への変換と EB-glu-MMC の分解プロファイルから最小二乗法によって求めた。Fig.6 に上記方法に従って求めた各 pH における  $k_1$ - $k_6$  値を示す。MMC は pH 4.0 で瞬時に分解するが、一方 EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は MMC よりも非常に遅い速度で、MMC に変換することなく直接分解した。本試験条件下では EB-glu-MMC からの MMC の放出速度定数である  $k_4$  は E-glu-MMC からの MMC の放出速度定数である  $k_2$  とほぼ等しかった。すべての速度定数は弱酸から中性付近では非常に小さく、つまりこの pH 領域では各々の化合物は非常に安定であった。この pH-速度定数プロファイルから、弱酸から中性付近では EB-glu-MMC から E-glu-MMC への変換速度における pH の影響は、両化合物から MMC の生成速度における pH の影響よりも大きい傾向があることが示唆された。

Table 1. Concentration Equations of MMC, E-glu-MMC and EB-glu-MMC Based on the Kinetic Models

Model <sup>a)</sup>	Equation <sup>b)</sup>
A	$M_a(t) = M_a(0) \times \exp(-k_1 t)$
B	$EGM_b(t) = EGM_b(0) \times \exp(-(k_2+k_3)t)$ $M_b(t) = (EGM_b(0) \times k_2 / (k_1 - (k_2+k_3))) \times (\exp(-(k_2+k_3)t) - \exp(-k_1 t)) + M_b(0) \times \exp(-k_1 t)$
C	$EBGM_c(t) = EBGM_c(0) \times \exp(-(k_4+k_5+k_6)t)$ $EGM_c(t) = (EBGM_c(0) \times k_5 / ((k_2+k_3) - (k_4+k_5+k_6))) \times (\exp(-(k_4+k_5+k_6)t) - \exp(-(k_2+k_3)t))$ $+ EGM_c(0) \times \exp(-(k_2+k_3)t)$ $M_c(t) = h_1 \times (\exp(-(k_4+k_5+k_6)t) - \exp(-k_1 t)) - h_2 \times (\exp(-(k_2+k_3)t) - \exp(-k_1 t))$ $+ h_3 \times (\exp(-(k_2+k_3)t) - \exp(-k_1 t)) + h_4 \times (\exp(-(k_4+k_5+k_6)t) - \exp(-k_1 t))$ $+ M_c(0) \times \exp(-k_1 t)$

a) A, B and C correspond to the conversion models, A, B and C in Fig. 5, respectively. b)  $M_a(t)$  means the concentration of MMC at time, t, for model A.  $EGM_b(t)$  and  $M_b(t)$  represent the concentrations of E-glu-MMC and MMC, respectively, at time, t, for model B.  $EBGM_c(t)$ ,  $EGM_c(t)$  and  $M_c(t)$  mean the concentrations of EB-glu-MMC, E-glu-MMC and MMC, respectively, at time, t, for model C.  $h_1 = EBGM_c(0) \times k_2 \times k_5 / (((k_2+k_3) - (k_4+k_5+k_6)) (k_1 - (k_4+k_5+k_6)))$ ;  $h_2 = EBGM_c(0) \times k_2 \times k_5 / (((k_2+k_3) - (k_4+k_5+k_6)) (k_1 - (k_2+k_3)))$ ;  $h_3 = EGM_c(0) \times k_2 / (k_1 - (k_2+k_3))$ ;  $h_4 = EBGM_c(0) \times k_4 / (k_1 - (k_4+k_5+k_6))$ .

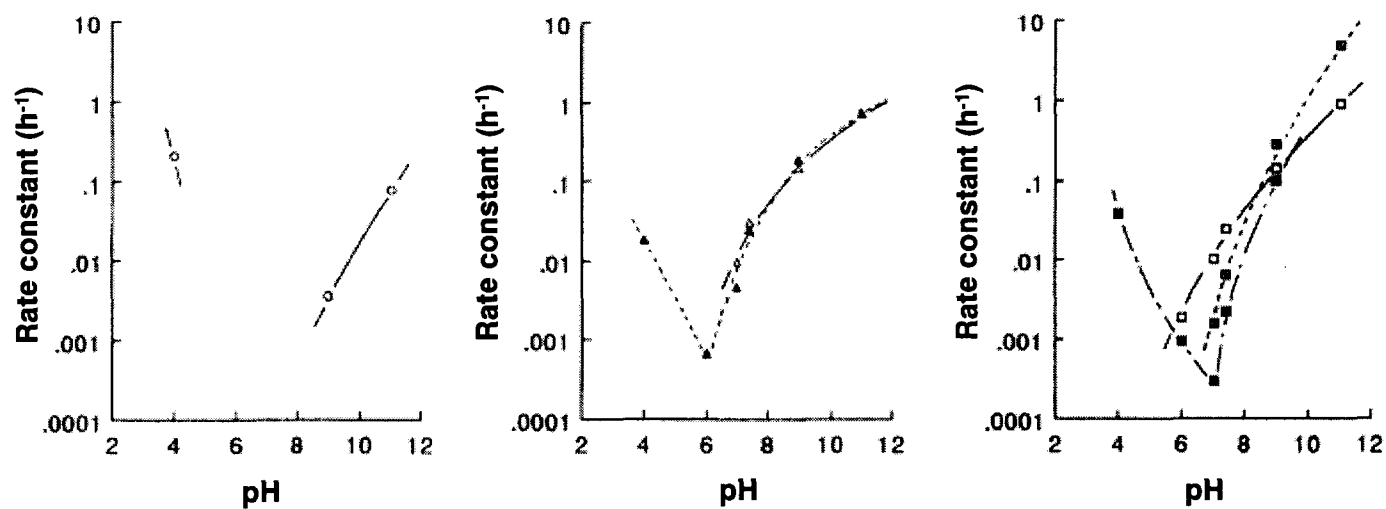


Fig. 6. pH Profiles of Rate Constants,  $k_1$ - $k_6$

$k_1$ - $k_6$  are the same as shown in Fig. 5.  $k_1$ (○),  $k_2$ (△),  $k_3$ (▲),  $k_4$ (□),

$k_5$ (◻),  $k_6$ (■)

## 第 5 節 小括

本実験では溶液状態の EB-glu-MMC, E-glu-MMC の安定性プロファイルを様々な pH に調整した 50%PG 溶液中で明らかにした。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は水にほとんど溶解しないため、溶液状態で投与するには PG を 50%含有する緩衝液等を用いて溶解する必要がある。今回の *in vitro* 安定性試験では EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は中性付近の 50%PG 溶液中では非常に安定であることが示された。本化合物の体内での薬物放出特性及び溶解性は抗癌効果に影響すると考えられる。

## 第2章 マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの新規結合体の生物学的特性：生体成分中での安定性とエストロゲンレセプターとの結合能

### 第1節 緒言

前章において、新規な MMC-ホルモン結合体である EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC を合成し、各種 pH 溶液中での MMC への変換特性について明らかにした。生体内には様々な酵素が存在し、それらは薬物の生体内運命に大きく影響する。そこで、両結合体が生体中で MMC のプロドラッグとして如何に機能しうるかについての検討が必要である。また、薬物-ホルモン結合体はアクティブターゲティングシステムとして有用であることが知られており<sup>20)</sup>、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC についてもアクティブターゲティングシステムとしての可能性が考えられる。そこで本章では両結合体の生体試料中での安定性について評価した。また、両結合体のエストロゲンレセプターへの結合能についても調べた。

### 第2節 生体試料中における安定性と MMC 放出特性

#### 第1項 10%血漿添加液中での安定性と MMC 放出特性

Fig.7 に 10% (v/v) 血漿添加液中で MMC をインキュベーションした結果を示す。MMC は 10%血漿添加液中では安定であった。また、両結合体の 10%血漿添加液中でのインキュベーションの結果を Fig.8 に示す。EB-glu-MMC は徐々に E-glu-MMC に変換された。安息香酸エストラジオール部分の 3 位のエステル結合は、血漿中のエステラーゼによって酵素的に切断されたと考えられた。E-glu-MMC においては、E-glu-MMC の分解速度及び E-glu-MMC からの MMC の放出速度は前章で示した 50%PG 含有水溶液 (50%PG)

中よりも緩やかであった。EB-glu や E-glu と MMC の結合は血漿中の酵素に対して非常に安定であると考えられた。10%血漿添加溶液中での MMC の放出は、そのゆっくりとした放出から主に非酵素的加水分解によるものと考えられ、血漿成分との相互作用により E-glu と MMC の結合部位の加水分解を受けにくくなっている可能性が考えられた。さらにそれぞれの化合物の構造をみると 17B 位のエステル結合が切断される可能性がある。これについてはグルタル酸-マイトマイシン C 結合体 (glu-MMC)の生成を観察することによって検証することができる。これは MMC と同様の分析条件で確認することができたが、glu-MMC の生成は確認されなかった。したがって EB-glu-MMC が血漿中へ溶解すると、MMC よりむしろ E-glu-MMC に変換されることが予想され、結果として EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC 共に血液循環中に徐々に MMC に変換されることが示唆された。

## 第 2 項 5%肝ホモジネート添加液中での安定性

MMC は 5% (v/v) 肝ホモジネート添加液に加えた直後に速やかな分解が認められたが、その後は安定であった (Fig.7)。これはホモジネート中の酵素が MMC 添加後に速やかに不活性化されたためと考えられた。同様の現象は以前にも報告されている<sup>42)</sup>。つまり 20%肝ホモジネート添加液中での MMC の安定性では、初期に非常にすばやく分解しその後ゆっくりとした分解が起こっている<sup>42)</sup>。Schwartz と Philips らは MMC の酵素的分解は好気的条件下で抑制されることを報告しており<sup>43)</sup>、このことがホモジネート中の酵素の不活化状態に影響したと考えられた。

EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の 5%肝ホモジネート添加液中でのインキュベーションの結果を Fig.9 に示す。EB-glu-MMC は速やかに E-glu-MMC に変換された。一方 E-glu-MMC の分解速度は前章で報告した 50%PG 溶液中での分解速度とほぼ同等であった。E-glu-MMC からの MMC の放出率は E-glu-

MMC の分解率から期待されたものよりも少なかった。MMC もしくは E-glu-MMC は肝ホモジネート液中で酵素的に分解されている可能性がある。さらにインキュベーション中、glu-MMC の生成は認められなかった。したがって、本条件下では MMC は EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC から直接放出されたと考えられた。以上より、EB-glu-MMC が肝細胞中もしくは他の細胞中へ溶解した場合、エステラーゼによって E-glu-MMC へ変換されることが予想された。また、肝ホモジネート添加液中において EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC からの MMC の放出がほとんど促進されなかったことから、細胞中での MMC の放出は徐々に起こると考えられた。

### 第 3 項 速度論的解析

MMC, EB-glu-MMC, E-glu-MMC の生体試料中における分解速度を擬 1 次式に当てはめ分解速度定数 ( $k$ ) を計算した。その結果を Table 2 に示す。先にも述べたように E-glu-MMC は生体成分中での酵素的加水分解に対して比較的安定であり、E-glu-MMC が存在する限り体内で MMC が徐々に生成することが示唆された。一方、EB-glu-MMC は生体中で比較的速やかに E-glu-MMC に変換され、結果として生体内では E-glu-MMC もしくは EB-glu-MMC と E-glu-MMC の混合物として機能することが示唆された。さらに E-glu-MMC が標的部位に到達するにはある程度の時間がかかることを考慮すれば、生体もしくは細胞内で MMC が徐々に生成することは、両結合体の体内動態特性が薬効に大きく影響することを示唆している。

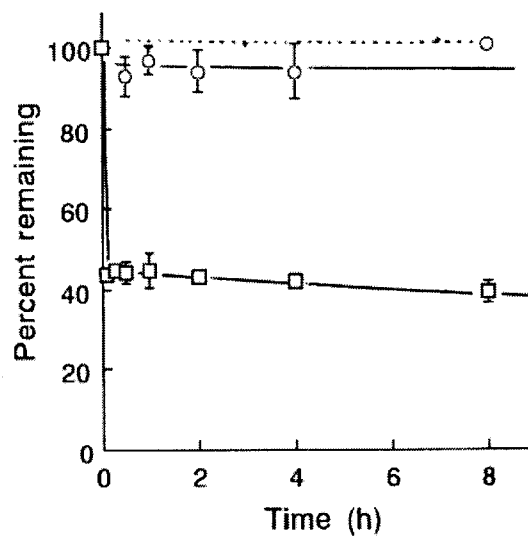


Fig. 7. Stability of MMC in the Mixture of 1/15 M Phosphate Buffer, pH 7.4 ( $\mu=0.3$ ), PG and Rat Plasma (4:5:1, v/v/v) ( $\circ$ ) or in the Mixture of 1/15 M Phosphate Buffer, pH 7.4 ( $\mu=0.3$ ), PG and Rat Liver Homogenate (9:10:1, v/v/w) ( $\square$ ) at 37°C

The results are shown by the mean  $\pm$  S.D. (n=3). The broken line ( $\cdot \cdot + \cdot \cdot$ ) shows the conversion in only 50% PG at 37°C reported in section 1.

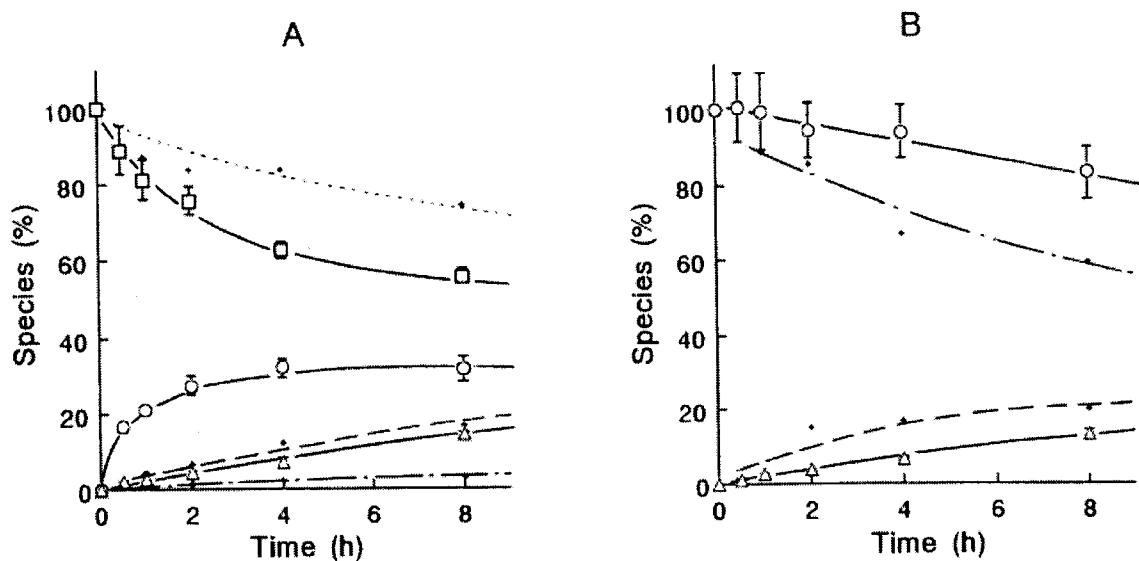


Fig. 8. Conversion Profiles during the Incubation of EB-glu-MMC (A) and E-glu-MMC (B) in the Mixture of 1/15 M Phosphate Buffer, pH 7.4 ( $\mu=0.3$ ), PG and Rat Plasma (4:5:1, v/v/v) at 37°C

□, EB-glu-MMC; ○, E-glu-MMC; △, MMC. The results are shown by the mean  $\pm$  S.D. (n=3). The broken lines show the conversion in only 50% PG at 37°C reported in section 1; that is, EB-glu-MMC ( $\cdot \cdot + \cdot \cdot$ ), E-glu-MMC ( $\cdot - + \cdot -$ ) and MMC ( $- - + - -$ ) during the incubation in only 50%PG at 37°C are described at the same time.

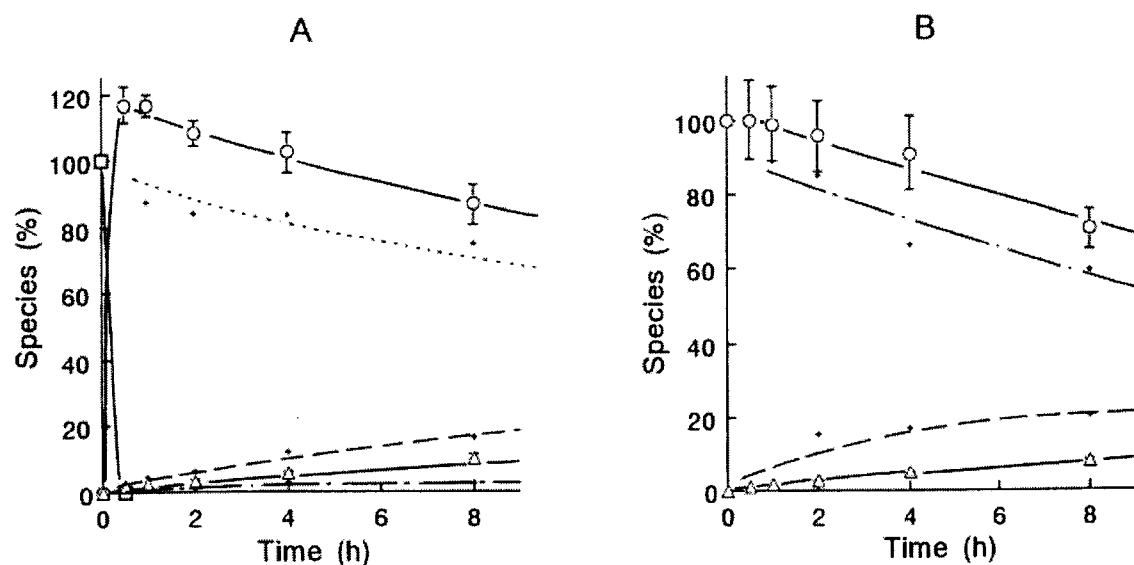


Fig. 9. Conversion Profiles during the Incubation of EB-glu-MMC (A) and E-glu-MMC (B) in the Mixture of 1/15 M Phosphate Buffer, pH 7.4 ( $\mu=0.3$ ), PG and Rat Liver Homogenate (9:10:1, v/v/w) at 37°C

□, EB-glu-MMC; ○, E-glu-MMC; △, MMC. The results are shown by the mean  $\pm$  S.D. (n=3). The broken lines show the conversion in only 50% PG at 37°C reported in section 1; that is, EB-glu-MMC ( $\cdot \cdot + \cdot \cdot$ ), E-glu-MMC ( $\cdot - + \cdot -$ ) and MMC ( $- - + - -$ ) during the incubation in only 50%PG at 37°C are described at the same time.

Table 2. Degradation Rate Constants (k) of MMC, EB-glu-MMC and E-glu-MMC in the Mixture of 1/15 M Phosphate Buffer, pH 7.4 ( $\mu=0.3$ ), PG (1:1, v/v) and the Mixture Containing 10% (v/v) Rat Plasma or 5% (w/v) Rat Liver Homogenate at 37°C

Compound	k (h <sup>-1</sup> )		
	Mixture of the buffer and PG <sup>a)</sup>	10% (v/v) plasma	5% (w/v) liver homogenate
MMC	0.000	0.000	*** <sup>b)</sup>
EB-glu-MMC	0.030	0.068	> 9
E-glu-MMC	0.065	0.023	0.044

a) For this medium, the rate constants were calculated based on the results in section 1.

b) The symbol (\*\*\*) means the following values:  $k > 9 \text{ h}^{-1}$  at the initial stage (0 – 5 min),  $k = 0.016 \text{ h}^{-1}$  at the latter stage (after 5 min).

### 第 3 節 エストロゲンレセプターへの結合能

#### 第 1 項 エストロゲンレセプター

幼若ラットの子宮から得たサイトゾール画分中のエストロゲンレセプターに対するエストラジオールの結合能を DDC 法によって測定した。サイトゾール画分への  $^3\text{H}$ -エストラジオールの結合プロファイルを Fig.10 に示す。特異的結合量は  $^3\text{H}$ -エストラジオールの総結合量から非特異的結合量（過剰量のエストラジオール（非標識体）を添加したときの  $^3\text{H}$ -エストラジオールの結合量）を差し引いて求めた。特異的結合の Scatchard plot を Fig.11 に示す。その傾きから求めた結合定数（K）は  $1.23 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  であった。結合部位数（N）は  $^3\text{H}$ -エストラジオールの最大結合量（134 fmol/mL）とタンパク質濃度（0.45 mg/mL）から求めた。その結果、結合部位数（N）はタンパク質あたり 298 fmol/mg であった。これらの結果は以前報告されているものとよく一致した<sup>40)</sup>。

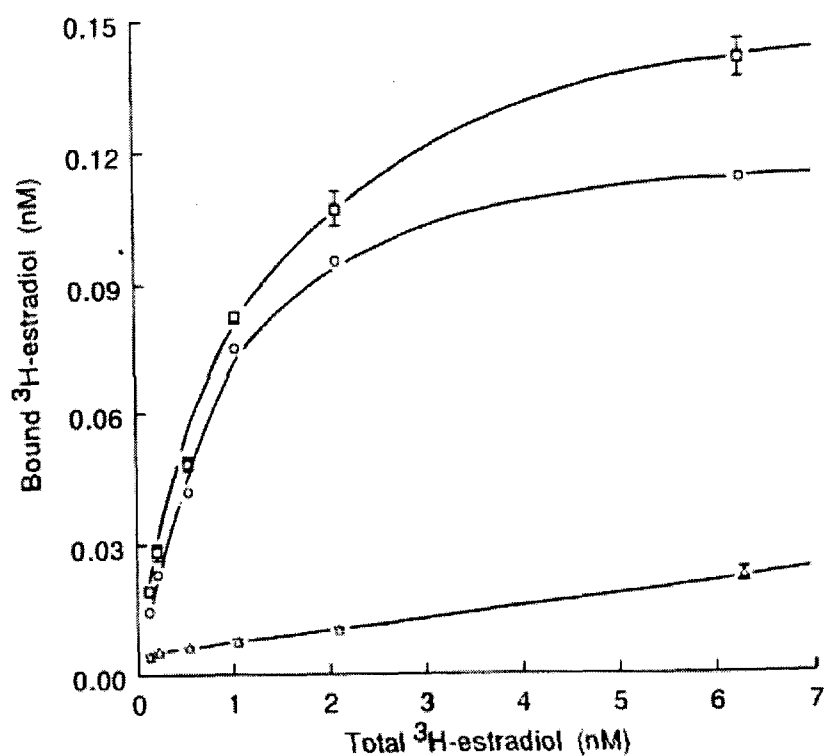


Fig. 10. Binding Profiles of  $^3\text{H}$ -Estradiol to the Estrogen Receptor in the Rat Uterine Cytosol

□, Concentration of bound  $^3\text{H}$ -Estradiol without non-radio labeled Estradiol (concentration of  $^3\text{H}$ -Estradiol bound totally); △, concentration of bound  $^3\text{H}$ -Estradiol with excess non-radio labeled Estradiol (concentration of  $^3\text{H}$ -Estradiol bound non-specifically): The results are shown by the mean  $\pm$  S.D. (n=3). ○, Specific binding calculated from the difference between the mean concentration of  $^3\text{H}$ -Estradiol bound totally and that of  $^3\text{H}$ -Estradiol bound non-specifically.

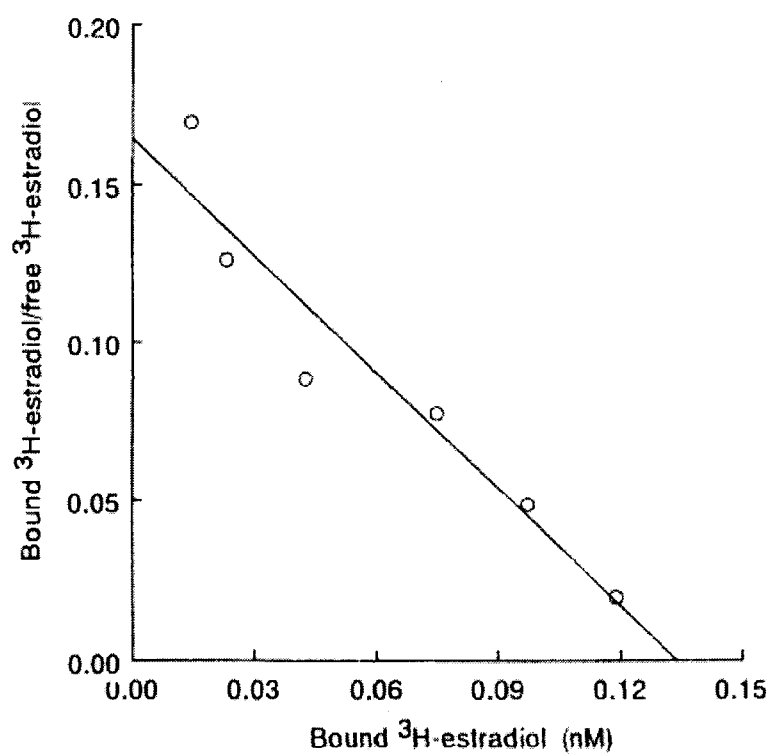


Fig. 11. Scatchard Plots for the Specific Binding Curve  
The correlation coefficient ( $r$ ) = 0.96 to the linear fitting curve.  
The data are based on the specific binding plots shown in Fig. 10.

## 第2項 エストラジオールに対する相対結合能

前項のサイトゾール画分中のエストロゲンレセプターに対する EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の結合能を評価した。エストロゲンレセプターに結合する  $^3\text{H}$ -エストラジオール量に対する共存化合物の影響を Table 3 に示す。また、エストロゲンレセプター特異的結合における  $^3\text{H}$ -エストラジオールとエストラジオール（非標識体）、EB-glu-MMC、E-glu-MMC 及び MMC の競合結合についての結果を Fig.12 に示す。エストロゲンレセプターに対する  $^3\text{H}$ -エストラジオールの特異的結合を 50%阻害する各化合物の濃度を Table 4 に示したが、その値とエストラジオール（非標識体）の示す値との比を求め、相対結合能として評価した<sup>40)</sup>。

E-glu-MMC の相対結合能はエストラジオールに対して 0.81%であった。EB-glu-MMC 及び MMC はエストロゲンレセプターに対する親和性を示さなかった。エストロゲンレセプターに対するエストラジオール誘導体の親和性は、3-OH 基もしくは D 環の修飾によって大きく影響することが知られている<sup>44)</sup>。EB-glu-MMC はエストラジオールの 3 位及び 17B 位が置換されているため、エストロゲンレセプターへの親和性がほぼ完全に消失したと考えられた。一方、E-glu-MMC は 17B 位のみが置換されているためエストロゲンレセプターに対するある程度の親和性が認められたと考えられた。同様の結果が bestrabucil でも報告されており<sup>40)</sup>、その場合には bestrabucil からベンゾイル基を取り除いた化合物の相対結合能はエストラジオールに対して 6%であった。また、同様の構造でエストラジオールの 17-hemisuccinate 体はエストラジオールに対して 0.3%の相対結合率を示すことが報告されている<sup>44)</sup>。したがって、エストラジオールの 17 位の変換によるエストロゲンレセプターへの親和性は変換した置換基の分子サイズや電気的性質に影響されると考えられた。エストロゲンレセプターに対するエストラジオールの結合定数は血漿アルブミンの結合定数より  $10^4$  倍以上大きい<sup>44)</sup>。E-glu-MMC の親和性

はエストラジオールに対して 0.81%であり，エストロゲンレセプターに対して比較的強い親和性があると評価できる。すなわち，E-glu-MMC はエストロゲンレセプターに対して特異的結合性を有する化合物であると評価できた。

Table 3. Effect of the Competitors on the Concentration of  $^3\text{H}$ -Estradiol Bound to the Estrogen Receptor

Competitor	Concentration of the total competitor (nM)	Concentration of bound $^3\text{H}$ -Estradiol <sup>a)</sup> (mean $\pm$ S.D.) (nM)
Estradiol	0.016667	0.09864 $\pm$ 0.00752
	0.16667	0.09802 $\pm$ 0.00528
	1.6667	0.07213 $\pm$ 0.00082
	16.667	0.02504 $\pm$ 0.00211
	166.67	0.01147 $\pm$ 0.00006
E-glu-MMC	1.6667	0.11831 $\pm$ 0.00216
	16.667	0.11188 $\pm$ 0.00220
	166.67	0.07730 $\pm$ 0.00213
	1666.7	0.02780 $\pm$ 0.00049
	16667	0.01795 $\pm$ 0.00054
EB-glu-MMC	1.6667	0.11204 $\pm$ 0.00152
	16.667	0.10400 $\pm$ 0.00487
	166.67	0.10310 $\pm$ 0.00163
	1666.7	0.08366 $\pm$ 0.00242
MMC	1.6667	0.10839 $\pm$ 0.00411
	16.667	0.09837 $\pm$ 0.00359
	166.67	0.10521 $\pm$ 0.00372
	1666.7	0.08908 $\pm$ 0.00167
	16667	0.10751 $\pm$ 0.00205

a) n = 3 for each point.

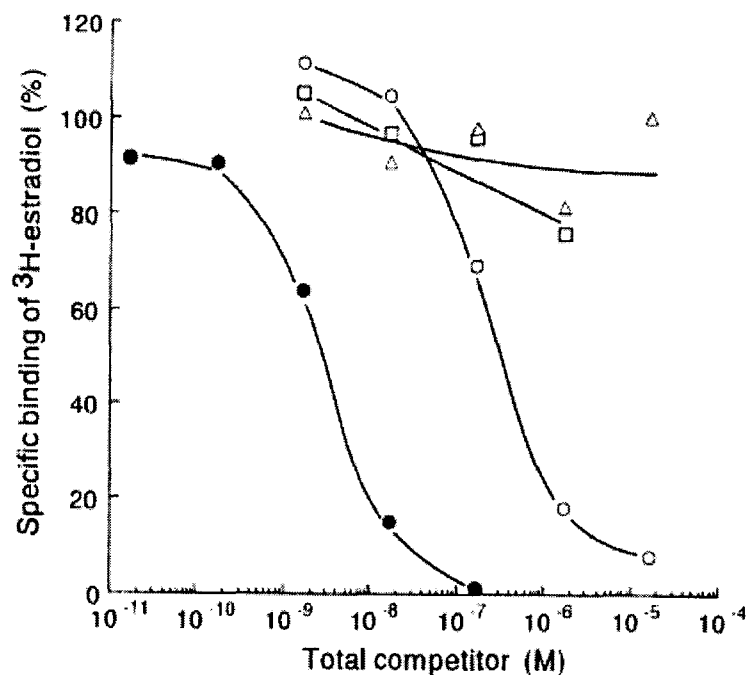


Fig. 12. Competitive Binding Profiles of Estradiol (●), MMC (△), EB-glu-MMC (□) and E-glu-MMC (○) with  $^3\text{H}$ -Estradiol for the Estrogen Receptor in the Rat Uterine Cytosol

The result is based on the data in Table 3. The percentage of the  $^3\text{H}$ -estradiol bound specifically is shown by the ratio (%) of the mean concentration of  $^3\text{H}$ -estradiol bound specifically in the presence of a competitor to that in the absence of a competitor.

Table 4. Relative Binding Affinities of MMC, EB-glu-MMC, E-glu-MMC and Estradiol Based on the Their Concentrations Inhibiting the Specific Receptor Binding of <sup>3</sup>H-Estaradiol by 50%

Compound	Concentration inhibiting the specific binding of <sup>3</sup> H-estradiol by 50%	Relative binding affinity
	(M)	(%)
MMC	N.D. <sup>a)</sup>	–
EB-glu-MMC	N.D. <sup>a)</sup>	–
E-glu-MMC	$3.98 \times 10^{-7}$	0.81
Estradiol	$3.23 \times 10^{-9}$	100.0

a) N.D. means non detection.

#### 第4節 小括

本章では EB-glu-MMC, E-glu-MMC の *in vitro* における生体成分中での安定性及びエストロゲンレセプターへの結合能について解明した。実験結果より EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は生体成分存在下でも徐々に MMC を放出する薬物-ホルモン結合体であり、生体内で MMC のプロドラッグとして機能しうることが示唆された。さらに E-glu-MMC はエストロゲンレセプター結合能を有することが示された。

EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC のより詳細な特徴は *in vivo* における研究によって明らかになるであろう。また、その際には投与形態による薬物作用の違いについても調べる必要がある。すなわち、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は水溶性が非常に低いため、薬物放出や薬効の程度が投与形態によって影響されるはずである。例えば、溶液としての投与では懸濁液投与と比較して速い薬物放出とそれに伴う強い薬効が期待される。したがって、どのような投与形態が EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の薬物放出と薬効に影響するかについても調べる必要がある。

### 第3章 マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの新規結合体に関する in vivo 特性： 溶液製剤での薬物動態特性と P388 白血病細胞と Sarcoma 180 固形肉腫に対する抗癌効果

#### 第1節 緒言

これまでに MMC と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの誘導体である EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC をそれぞれ合成し、親化合物である MMC への変換速度とレセプター結合特性を in vitro において評価した。両結合体は生体成分を添加した系においても MMC へ変換され、MMC のプロドラッグとして機能しうることが示された。レセプター結合能実験において、E-glu-MMC はエストロゲンレセプターに対して高い親和性 ( $K \approx 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) を示し、エストロゲンレセプター陽性癌細胞に対してアクティブターゲティングシステムとして機能する可能性が示唆された。

エストラジオールやその類縁物質と抗癌剤の結合体はエストロゲンレセプターを持たない様々な癌に対しても高い親和性を示すことが知られている。bestrabucil はエストロゲンレセプター陽性癌へのターゲティングを目的として開発されたが、様々な癌に対して高い親和性を示し、十分な効果を発揮する。したがって、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC もまた様々な癌へ親和性と活性を示す可能性が高い。

本章では薬物動態特性と汎用される二種類の癌細胞、すなわち P388 白血病細胞と Sarcoma 180 固形肉腫細胞による移植癌への抗癌効果を試験した。両結合体は低分子であるが非常に水溶性が低いため、それらの薬物動態特性や抗癌効果を in vivo で評価することは詳細な薬物作用の評価にとって重要である。投与形態によって両結合体の生体内運命は大きく影響されることが考えられる。本試験では、投与形態として PG を用いて溶解した溶液製剤とした。

薬物動態特性は EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の溶液製剤をラット腹腔内に投与し評価した。抗癌効果と副作用の評価は P388 白血病細胞を腹腔内に移植したマウスもしくは Sarcoma 180 固形肉腫細胞を皮下に移植したマウスを用いて、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の溶液製剤を腹腔内投与して評価した。

## 第 2 節 腹腔内投与後の血漿中薬物濃度推移（溶液製剤）

PG に溶解した EB-glu-MMC の溶液製剤を 5 mg eq. MMC/kg でラット腹腔内投与後に経時的に採血し、MMC、E-glu-MMC 及び EB-glu-MMC の血漿中薬物濃度を測定した。そのときの血漿中薬物濃度-時間プロファイルを図 13A に示す。EB-glu-MMC は血漿中に投与後短時間のみ、しかも低濃度で観察された。E-glu-MMC 及び MMC は血漿中に長時間観察された。E-glu-MMC は投与 6 時間後には検出されなかったが、MMC は投与 11 時間後まで検出された。Table 5 にこのときの PK パラメータを示す。EB-glu-MMC は AUC, MRT, VRT とともに非常に小さな値を示したが、E-glu-MMC 及び MMC は非常に大きな値を示した。E-glu-MMC と MMC の AUC は EB-glu-MMC の AUC と比較してそれぞれ 10 倍及び 30 倍以上大きかった。このときの MMC の AUC は  $0.974 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  で、雄性ラットに遊離 MMC を i.p.投与した後の AUC の約 1/4 であった<sup>45)</sup>。これは血液循環中で EB-glu-MMC が MMC に比較的効率よく変換されているということを示している。E-glu-MMC 及び MMC の MRT は EB-glu-MMC の MRT と比較してそれぞれ 4 倍及び 10 倍以上大きかった。E-glu-MMC 及び MMC の VRT の値は血漿中に長時間滞留していることを表している。以上の結果より、EB-glu-MMC は in vivo では薬物を徐放化することが示された。

次に、E-glu-MMC の溶液製剤を 5 mg eq. MMC/kg でラット腹腔内投与後に経時的に採血し、MMC 及び E-glu-MMC の血漿中薬物濃度を測定した。そ

のときの血漿中薬物濃度-時間プロファイルを Fig.13B に示す。E-glu-MMC 及び MMC は血漿中に長時間観察された。Table 5 にこのときの PK パラメータを示す。E-glu-MMC は投与 2 時間後まで検出され、MMC は 7 時間後まで検出された。E-glu-MMC は高い  $C_{max}$  と速い  $T_{max}$  を示し、EB-glu-MMC と比較して速やかに代謝された。MMC もまた同様に血漿への出現と代謝が速いことが確認された。つまり、EB-glu-MMC の投与と比較して MMC の血中滞留性が短い傾向があったが、有意なものではなかった。しかしながら E-glu-MMC の AUC は EB-glu-MMC 投与時とほぼ同じであり、MMC の AUC は  $0.771 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  で、EB-glu-MMC 投与時よりも小さかった。MRT と VRT の値は *in vivo* で血漿中に長時間滞留していることを表しているが、EB-glu-MMC 投与時よりも小さかった。すなわち E-glu-MMC は EB-glu-MMC よりも血中滞留性が低かった。前章までの研究で、両結合体を PG と pH 7.4, 1/15 M リン酸緩衝の混液 (1:1,v/v) へ溶解したときの両結合体からの MMC の放出速度は同じであった。したがって溶解状態においては EB-glu-MMC から E-glu-MMC への変換は EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC からの MMC の総放出量には影響しない。したがって *in vivo* において E-glu-MMC よりも EB-glu-MMC において MMC の消失が緩やかであるのは、緩衝液中での両結合体の分解様式とは別の理由によるものと考えられた。次節で考察するように、結合体溶液を注入した後、体液によって PG が希釈されるために注入部位周辺で析出が起きている可能性がある。実際に両結合体の PG 溶液に pH 7.4 の緩衝液を添加すると容易に析出した。つまり、そのような析出物もしくは懸濁状態が投与後腹腔内で生じ、*in vivo* での薬物放出特性に影響したのではないかと考えられた。

これらの結果は、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の溶液製剤を腹腔内投与することにより、循環血を介して MMC や E-glu-MMC が様々な臓器に運ばれうるということを示している。E-glu-MMC はエストロゲンレセプターへ

の結合能を有しているので、エストロゲンレセプター陽性癌へと誘導される可能性が示唆された。さらに、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の溶液製剤の腹腔内投与により *in vivo* で MMC が徐々に放出されることが示された。

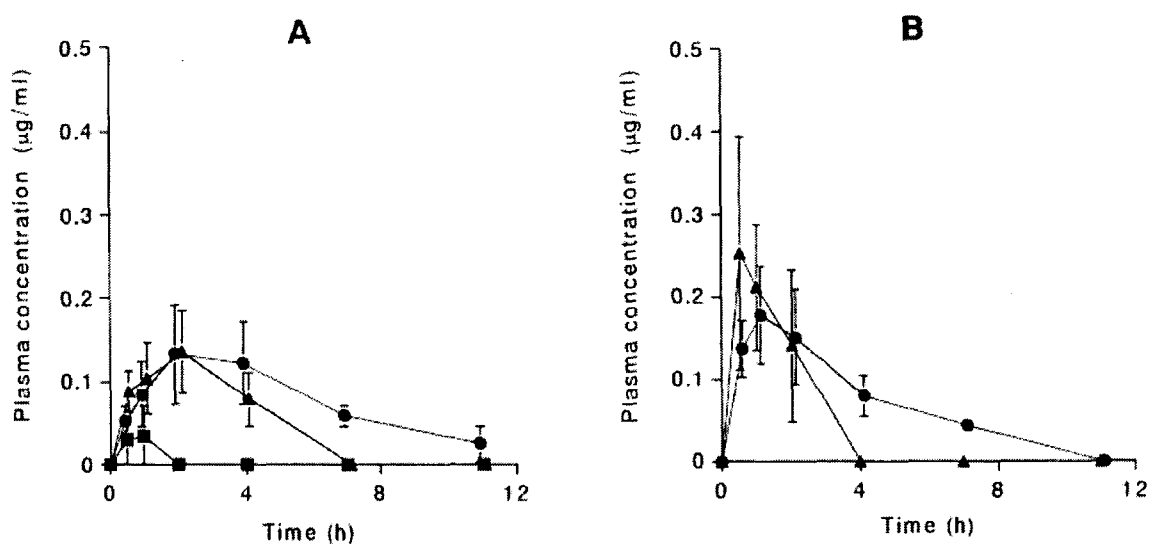


Fig. 13. Plasma Concentration-Time Profiles of MMC (●), E-glu-MMC (▲) and EB-glu-MMC (■) after I.P. Administration of EB-glu-MMC (A) and E-glu-MMC (B) to Rats

Each point represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$  for EB-glu-MMC,  $n=5$  for E-glu-MMC).

Table 5. Pharmacokinetic Parameters of MMC, E-glu-MMC and EB-glu-MMC after I.P. Administration of EB-glu-MMC and E-glu-MMC

Compound Species in plasma	C <sub>max</sub> (µg/mL) (mean ± S.D.)	T <sub>max</sub> (h) (mean ± S.D.)	AUC <sub>0-∞</sub> (µg·h/mL) (mean ± S.D.)	MRT <sub>0-∞</sub> (h) (mean ± S.D.)	VRT <sub>0-∞</sub> (h <sup>2</sup> ) (mean ± S.D.)
<b>EB-glu-MMC</b>					
EB-glu-MMC	0.033±0.036	0.917±0.144	0.039±0.041	0.542±0.470	0.039±0.034
E-glu-MMC	0.135±0.050	2.333±0.577	0.521±0.170	2.469±0.262	1.567±0.159
MMC	0.137±0.057	2.667±1.155	0.974±0.369	5.680±1.996	22.91±19.50
<b>E-glu-MMC</b>					
E-glu-MMC	0.255±0.141	0.650±0.224	0.494±0.260	1.220±0.239	0.396±0.332
MMC	0.177±0.059	1.100±0.224	0.771±0.200	3.231±0.352	5.409±4.910
<b>MMC (i.v.)<sup>a)</sup></b>					
MMC	6.223±0.674 <sup>b)</sup>	0.000±0.000 <sup>b)</sup>	2.867±0.647	0.410±0.146	0.224±0.132
<b>MMC (i.p.)<sup>a)</sup></b>					
MMC	3.357±0.949	0.250±0.000	3.917±1.316	1.077±0.283	0.954±0.589

When the concentration was above zero at 11 h after administration, the concentration curve was extrapolated to the infinite by monoexponential decline best fitted. a) These are based on the results in male rats at the dose of 5 mg/kg, previously reported (Sato et al.<sup>45)</sup>). b) These are the values calculated from the linear decline curves best fitted to the log(plasma concentration)-time plots.

### 第3節 腹水 P388 白血病細胞に対する腹腔内投与後の抗癌効果（溶液製剤）

P388 白血病細胞を腹腔内に移植し 24 時間後に MMC, EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC を単回腹腔内投与した。投与形態は PG に溶解した溶液製剤とし、腹腔内中の癌細胞に対する腹腔内薬物投与、つまり i.p.-i.p.システムの評価として行った。それらの用量依存的効果を Table 6 に示す。MMC の 5 mg/kg 投与群は、コントロール群に対して有意な延命効果を示し、最も高い延命率 (ILS) を示したが、10 mg/kg 投与群において致死的な副作用が観察され、何匹かはコントロール群よりも早期に死亡した。しかしながら E-glu-MMC は 5 mg eq. MMC/kg 投与群においてコントロール群と比較して有意な延命効果は示さなかったが、10-20 mg eq. MMC/kg 投与群においては有意な延命効果を示した。E-glu-MMC は MMC のプロドラッグとして機能することが示されたが、低用量では十分な効果は得られなかった。

一方、高投与量においては比較的高い効果が得られ、効果的に薬物が癌に供給されたものと考えられた。副作用の指標として体重推移を測定した (Fig.14)。MMC は 10 mg/kg 投与群において著しい体重減少を示し、移植 6 日後から死亡例が観察され始めた。E-glu-MMC では 10-15 mg eq. MMC/kg 投与群において、初期にわずかに体重減少が観察されたが、その後体重は増加した。E-glu-MMC の 20 mg eq. MMC/kg 投与群においては多少の体重減少は観察されたが、投与後 4 日目から体重が増加した。E-glu-MMC が MMC よりも毒性が低かった理由は、先に示した PK プロファイルから推察できるように MMC の生成が低濃度で持続的に起こるためであると考えられた。

一方、EB-glu-MMC は 10 mg eq. MMC/kg 投与群においてのみ、有意な延命効果を示した。したがって、低用量では十分な量の薬物を癌に暴露することができなかったと考えられたが、15-20 mg eq. MMC/kg 投与群においても有意な効果を示さなかった。これは EB-glu-MMC の投与液の濃度が異なるた

めではないかと推測された。今回の投与においては、抗癌効果における PG の影響を回避するために高濃度の薬物溶液を用い、5-10 mg eq. MMC/kg 投与群では 2 mg/mL、15-20 mg eq. MMC/kg 投与群では 5 mg/mL 溶液を投与した。EB-glu-MMC の水への溶解度は非常に低いため、投与後に体液によって PG が希釈され、EB-glu-MMC は速やかに腹腔内もしくは周囲の組織中で析出する可能性がある。例えば、50%PG 含有 pH 7.4 リン酸緩衝液中に溶解した状態での両結合体からの MMC の放出速度はほぼ同じであるが、10%PG 含有 pH 7.4 リン酸緩衝液中に懸濁した状態では E-glu-MMC は EB-glu-MMC と比較して 10 倍速く MMC を放出した（次章に示す）。E-glu-MMC はその比較的高い溶解度のため 10%PG 懸濁液で比較的良好な薬物放出特性を示すことが示唆された。

水への溶解性を考慮すると EB-glu-MMC は低濃度の投与液からよりも高濃度の溶液からのほうが、より容易に多くの析出物を生じるはずである。薬物放出速度は析出により非常に低くなるはずであり、非常に遅い薬物放出は薬物作用の低下を引き起こす。実際、次章で示すように懸濁液製剤では薬物放出速度がはるかに低下し、低い ILS を示している。また、癌の種類は異なるが Ehrlich 腹水癌の i.p.処置において MMC の総投与量が大きい場合、連続的な投与は、断続的な投与と比較して効果が弱くなると報告されている<sup>46)</sup>。したがって、投与溶液の濃度が影響したため、5 mg/mL で投与した EB-glu-MMC (15-20 mg eq. MMC/kg) では有意な効果が見られなかったものと推察された。さらに EB-glu-MMC の 15-20 mg eq. MMC/kg 投与群において、体重変化はわずかであり、著しい副作用を示していなかったことから、15-20 mg eq. MMC/kg 投与群において ILS が増加しなかった理由は、副作用の影響ではないと考えられた。

Table 6. Effect of MMC, E-glu-MMC and EB-glu-MMC on the Survival Time of Mice Bearing P388 Leukemia Intraperitoneally

Compound	Dose (mg eq. MMC/kg)	Survival days of treated mice (mean $\pm$ S.D.)	Survival days of control mice (mean $\pm$ S.D.)	ILS (%)
MMC	2.5	19.3 $\pm$ 2.9 ***	8.5 $\pm$ 2.4	126.47
	5	24.3 $\pm$ 2.8 ***	8.5 $\pm$ 2.4	185.29
	10	11.5 $\pm$ 8.4	8.5 $\pm$ 2.4	35.29
EB-glu-MMC	5	10.8 $\pm$ 1.0	10.0 $\pm$ 0.0	7.50
	10	14.3 $\pm$ 1.7 *	10.0 $\pm$ 0.0	42.50
	15	13.0 $\pm$ 2.2	10.0 $\pm$ 0.0	30.00
	20	12.5 $\pm$ 2.7	10.0 $\pm$ 0.0	25.00
E-glu-MMC	5	11.3 $\pm$ 1.0	8.5 $\pm$ 2.4	32.52
	10	12.8 $\pm$ 1.0 *	8.5 $\pm$ 2.4	50.00
	15	15.8 $\pm$ 3.4 *	8.5 $\pm$ 2.4	85.29
	20	16.0 $\pm$ 2.2 **	8.5 $\pm$ 2.4	88.24

The survival time of each group is determined with n=4. \* p<0.05 vs. control; \*\* p<0.01 vs. control; \*\*\* p<0.001 vs. control; by Student's t-test.

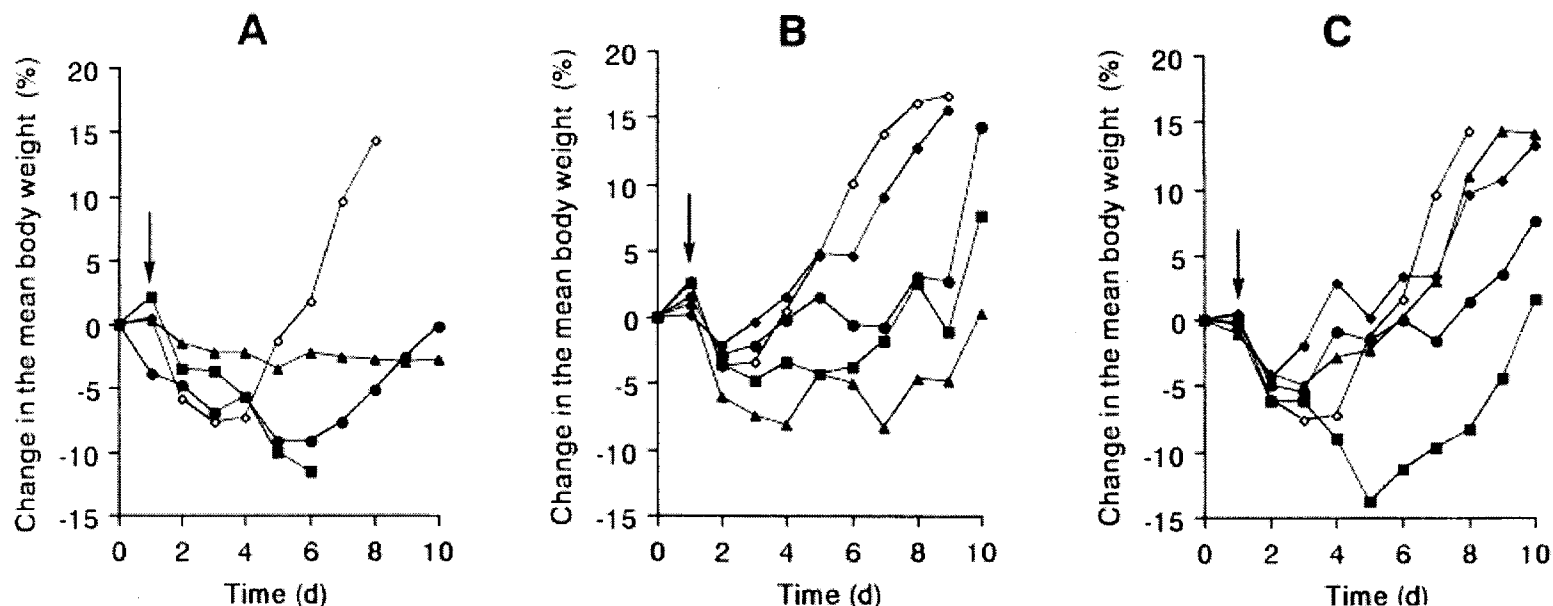


Fig. 14. Change in Mean Body Weight of Mice Bearing P388 Leukemia Intraperitoneally after I.P. Administration of MMC (A), EB-glu-MMC (B) and E-glu-MMC (C)

(A) MMC control ( $\diamond$ ), 2.5 mg/kg ( $\blacktriangle$ ), 5 mg/kg ( $\bullet$ ), 10 mg/kg ( $\blacksquare$ ); (B) EB-glu-MMC control ( $\diamond$ ), 5 mg eq. MMC/kg ( $\blacklozenge$ ), 10 mg eq. MMC/kg ( $\blacktriangle$ ), 15 mg eq. MMC/kg ( $\bullet$ ), 20 mg eq. MMC/kg ( $\blacksquare$ ); (C) E-glu-MMC control ( $\diamond$ ), 5 mg eq. MMC/kg ( $\blacklozenge$ ), 10 mg eq. MMC/kg ( $\blacktriangle$ ), 15 mg eq. MMC/kg ( $\bullet$ ), 20 mg eq. MMC/kg ( $\blacksquare$ ). The horizontal axis is time (d) after inoculation. Administration was executed at 24 h after inoculation as indicated by arrows. The initial body weight means the weight measured immediately after inoculation. Each point represents the mean value ( $n=3-4$ ).

#### 第4節 皮下移植 Sarcoma 180 固形肉腫に対する腹腔内投与後の抗腫瘍効果（溶液製剤）

Sarcoma 180 固形肉腫細胞を皮下に移植した4日後に MMC, EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC を単回腹腔内投与した。投与形態は PG に溶解した溶液製剤とし、皮下移植した癌細胞に対する腹腔内投与、つまり s.c.-i.p.システムの評価として行った。本システムでは標的部位と薬物投与部位が離れていることが特徴である。

それらの投与後の腫瘍体積変化を Fig.15 に示す。MMC は 5 mg/kg 投与群において著しい抗腫瘍効果を示した。しかしながら 10 mg/kg 投与群では大きな抑制効果は見られず、P388 白血病細胞を移植したマウスで観察されたような致死的な副作用が観察された。この副作用は体重減少からも理解できた (Fig.16)。

E-glu-MMC の効果は投与量の増加にしたがって増加した。特に、30 mg eq. MMC/kg 投与群において MMC の 5 mg/kg 投与群と同等以上の抗腫瘍効果を示した。E-glu-MMC は高投与量において非常に高い効果を示し、体重変化を指標とした副作用は観察されなかった。先に示したように、E-glu-MMC の腹腔内投与では E-glu-MMC と MMC の血漿中濃度が持続的かつ比較的高く得られる。E-glu-MMC の高投与量では非常に高い抗腫瘍効果を示していることから、投与部位とは離れた Sarcoma 180 固形肉腫局部にも十分に MMC が供給されていると考えられる。つまり、血中滞留性の向上により腫瘍への薬物送達が持続的に起こり、高い抗腫瘍効果を示したものと考えられる。

結合体の滞留効果が有効性にどの程度影響しているかを説明するのは容易ではない。癌の種類は異なるが、Ehrlich 腹水癌と Ehrlich 固形癌の報告によると、連続的な投与は断続的な投与と比較して効果が弱くなると報告されている<sup>46)</sup>。したがって、薬物作用を明らかにするためには結合体の脂溶性や

癌への局在性のような薬物放出特性以外の性質についても考慮しなければならない。投与した薬液濃度の抗腫瘍効果に与える影響は次のように考えられる。P388 白血病細胞を用いた実験において観察されたように、E-glu-MMC の投与液濃度の影響は EB-glu-MMC と比較すると影響は少ないと考えられる。したがって、E-glu-MMC の投与サンプルの薬物濃度は投与量間で異なるが、抗腫瘍効果における濃度の影響は著しいものではないと考えられる。

EB-glu-MMC ではすべての投与量において同じ濃度の PG 溶液を用いた。これは P388 白血病細胞を用いた実験で観察された抗癌効果への薬物濃度の影響を回避するためである。EB-glu-MMC の腫瘍増殖抑制プロファイルは E-glu-MMC と同等であった。30 mg eq. MMC/kg 投与群では、EB-glu-MMC は E-glu-MMC よりも優れた結果を示しており、投与 10 日後から腫瘍体積が減少している。30 mg eq. MMC/kg 投与群では腹腔内やその周辺組織中に EB-glu-MMC が多量に存在することにより、長期に渡って薬物が供給されていると考えられた。そのため、EB-glu-MMC は投薬部位から離れた腫瘍に対して高い抑制効果を示したと考えられる。これは、PK 試験結果からも支持される。持続的な薬物供給が Sarcoma 180 固形肉腫に対する高い効果の大きな要因と考えられるが、腫瘍への薬物分布についても考慮しなければならない。副作用に関してはわずかな体重変化が確認されただけである。

以上のことより、EB-glu-MMC は Sarcoma 180 固形肉腫に対して強い抗腫瘍効果を示すものと考えられた。

## 第 5 節 小括

上記 i.p.投与において、Sarcoma 180 固形肉腫に対しては、P388 白血病細胞に対する効果と比較して高い効果が得られた。つまり、i.p.-i.p.システムよりも投与部位と作用部位が離れている s.c.-i.p.システムにおいて効果が高かった。両結合体は高投与量で Sarcoma 180 固形肉腫に対して良好な効果を

示した。このとき MMC の AUC を考慮すると、MMC の AUC の増加が Sarcoma 180 固形肉腫に対する抗腫瘍効果において重要な役割を果たしているようである。例えば、MMC のクリアランスは投与量依存性であるということが知られているが<sup>47)</sup>、Table 1 に基づいて単純に計算すると遊離の MMC の i.p.投与と等しい AUC を得るためには結合体としては数倍の投与量が必要となるはずである。実際には Sarcoma 180 抗腫瘍実験における投与条件は PK 試験のときとは異なっているが、6 倍の投与量である 30 eq. MMC/kg 投与群において MMC の 5 mg/kg 投与と同等以上の効果を示した。しかしながらより詳細に効果を評価するためには、組織分布などの要因についてさらに試験しなければならないと考えられる。

溶液製剤での i.p.投与によって、E-glu-MMC 及び EB-glu-MMC が十分量循環血中に移行し、一般的な移植癌に対して有効であることが示された。特に s.c.-i.p システムにおいて、投与部位から離れて存在する Sarcoma 180 固形肉腫に対して有効であった。両結合体の良好な血中滞留性は、水への低い溶解度と高い脂溶性によるものではないかと考えられた。両結合体の体循環への良好な移行と持続的な供給は Sarcoma 180 固形肉腫に対する高い効果と関係していると考えられた。

本章において、両結合体が汎用される移植癌、特に固形腫瘍に対して効果的に機能することが示された。固形腫瘍に対する効果の詳細なメカニズム解明のためには、両結合体の組織分布や局在特性を明らかにすることが重要である。

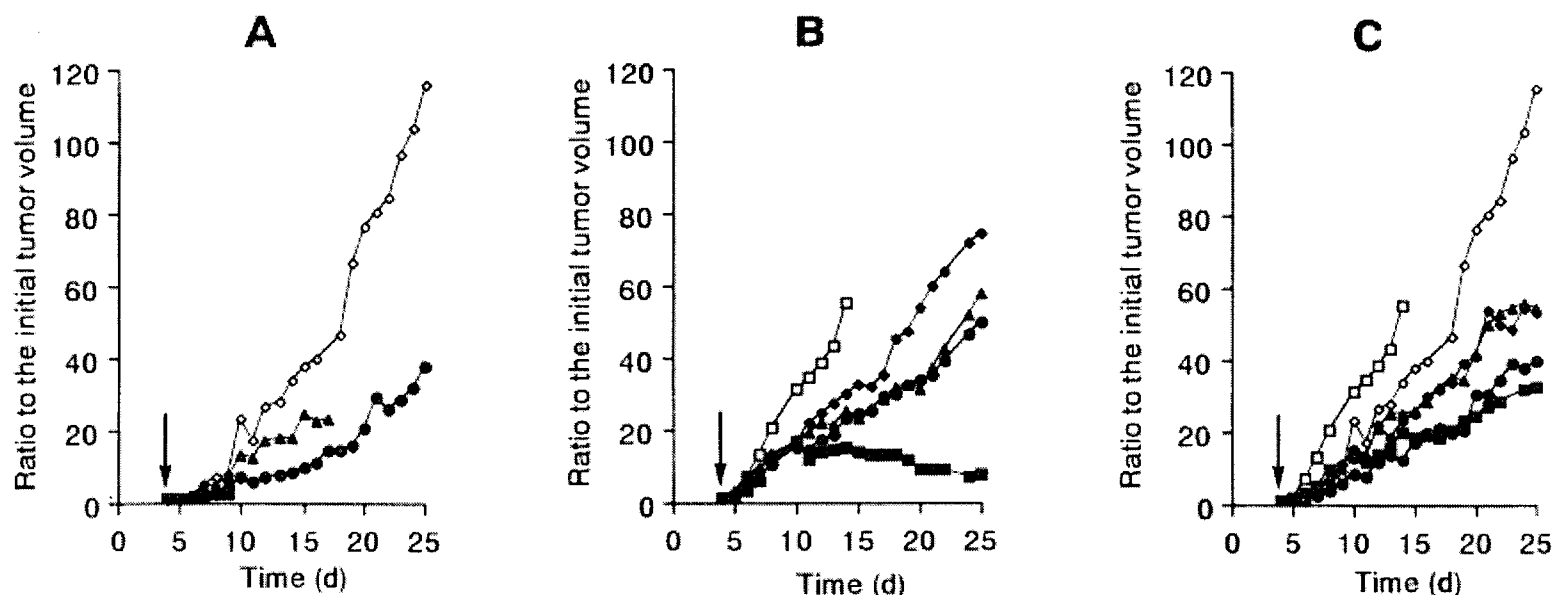


Fig. 15. Growth Inhibitory Effect on Sarcoma 180 Solid Tumor Implanted Subcutaneously after I.P. Administration of MMC (A), EB-glu-MMC (B) and E-glu-MMC (C)

(A) MMC control ( $\diamond$ ), 2.5 mg/kg ( $\blacktriangle$ ), 5 mg/kg( $\bullet$ ), 10 mg/kg( $\blacksquare$ ); (B) EB-glu-MMC control ( $\square$ ), 5 mg eq. MMC/kg ( $\blacklozenge$ ), 10 mg eq. MMC/kg ( $\blacktriangle$ ), 20 mg eq. MMC/kg ( $\bullet$ ), 30 mg eq. MMC/kg ( $\blacksquare$ ); (C) E-glu-MMC control for 5-20 mg eq. MMC/kg ( $\diamond$ ), control for 30 mg eq. MMC/kg ( $\square$ ), 5 mg eq. MMC/kg ( $\blacklozenge$ ), 10 mg eq. MMC/kg ( $\blacktriangle$ ), 20 mg eq. MMC/kg ( $\bullet$ ), 30 mg eq. MMC/kg ( $\blacksquare$ ). The horizontal axis is time (d) after inoculation. Administration was executed at 4 d after inoculation as indicated by arrows. The initial tumor volume means the volume measured just before administration. Each point represents the mean of the ratio to the initial volume (n=3-4).

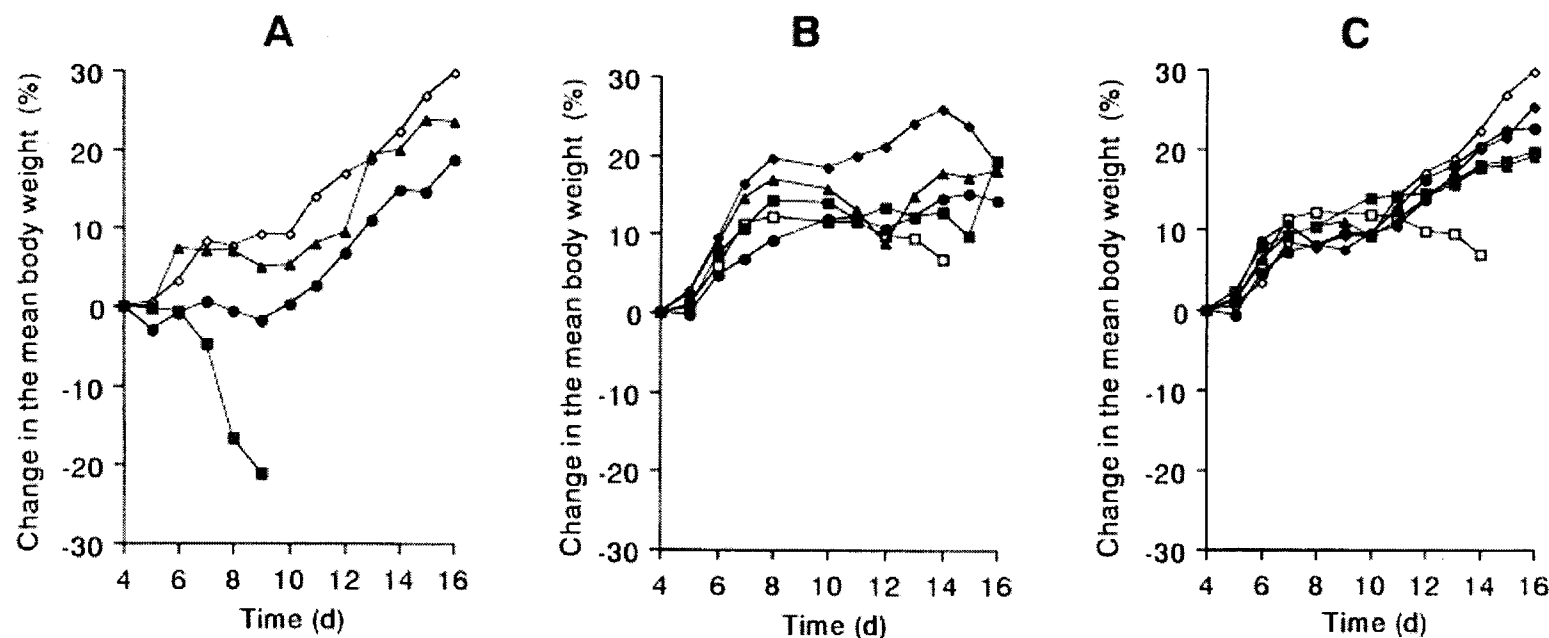


Fig. 16. Change in Mean Body Weight of Mice Bearing Sarcoma 180 Solid Tumor Subcutaneously after I.P. Administration of MMC (A), EB-glu-MMC (B) and E-glu-MMC (C)

(A) MMC control (◇), 2.5 mg/kg (▲), 5 mg/kg (●), 10 mg/kg (■); (B) EB-glu-MMC control (□), 5 mg eq. MMC/kg (◆), 10 mg eq. MMC/kg (▲), 20 mg eq. MMC/kg (●), 30 mg eq. MMC/kg (■); (C) E-glu-MMC control (◇) for 5-20 mg eq. MMC/kg (◇), control for 30 mg eq. MMC/kg (□), 5 mg eq. MMC/kg (◆), 10 mg eq. MMC/kg (▲), 20 mg eq. MMC/kg (●), 30 mg eq. MMC/kg (■). The horizontal axis is time (d) after inoculation. The initial body weight means the weight measured just before administration. Each point represents the mean value (n=3-4).

## 第4章 マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの新規結合体に関する in vivo 特性： 懸濁液製剤での P388 白血病細胞と Sarcoma 180 固形肉腫に対する抗癌効果

### 第1節 緒言

前章までに MMC と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの誘導体である EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC を MMC の新規結合体として調製し、その物理化学的、生化学的特性及び抗癌効果について評価した。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は主として生体及び非生体溶媒中で MMC の 1a-N 位のアミド結合が非酵素的に開裂することによって直接 MMC を放出した。E-glu-MMC はエストロゲンレセプターとある程度親和性を示したが、興味深いことに両結合体はエストロゲンレセプター陽性癌ではない癌に対して特徴的な抗癌効果を示した。つまり EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC を PG に溶解した溶液製剤として投与した場合、MMC と比較して P388 白血病細胞に対してはあまり効果を示さなかったが、Sarcoma 180 固形肉腫に対しては同等以上の効果を示した。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は水への溶解性が低いため、その投与形態によって生体内運命が大きく左右されと考えられ、当然抗癌効果や副作用発現に対しても大きく影響するはずである。両結合体の懸濁液を調製しその懸濁液製剤を投与した場合、低い溶解度のため、より緩やかに MMC を供給することが期待される。本章では懸濁液製剤での EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の抗癌特性を評価した。

### 第2節 腹水 P388 白血病細胞に対する腹腔内投与後の抗癌効果 (懸濁液製剤)

P388 白血病細胞を移植したマウスに対する MMC, EB-glu-MMC, E-glu-MMC の効果を、腹腔内投与により、延命率 (ILS) を用いて評価した。投与

形態は 10%PG 含有生理食塩水液に懸濁した懸濁液製剤とし、腹腔内の癌細胞に対する腹腔内薬物投与、つまり i.p.-i.p.システムの評価として行った。注入量を 0.3-0.4 mL と各投与量でほぼ同量とし、癌細胞に対する PG の影響を極力抑えた。その結果を Table 7 に示す。MMC は 5 mg/kg 投与群で最も高い ILS を示した。EB-glu-MMC は 10-75 mg eq. MMC/kg 投与群であまり ILS の延長は認められなかったが、E-glu-MMC は 50-75 mg eq. MMC/kg 投与群においてコントロール群に対して有意な ILS の延長が認められた。MMC は 10 mg/kg で著しい体重減少を示し、致死的な副作用が認められた (Table 7)。EB-glu-MMC では体重減少は確認されなかったが、E-glu-MMC は 75 mg eq. MMC/kg で体重減少が観察された (Table 7)。

### 第 3 節 皮下移植 Sarcoma 180 固形肉腫に対する腹腔内投与後の抗腫瘍効果 (懸濁液製剤)

Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウスにおける MMC, EB-glu-MMC, E-glu-MMC の抗腫瘍効果について試験した。投与形態は 10%PG 含有生理食塩水液に懸濁した懸濁液製剤とし、皮下移植した癌細胞に対する腹腔内薬物投与、つまり s.c.-i.p.システムの評価として行った。本システムは標的部位と薬物投与部位が離れていることが特徴である。それぞれの化合物は各投与量で同様の濃度で投与した。10%PG 生食液を用いて、MMC は 2 mg/mL, EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は 10 mg/mL の濃度とした。したがって、10%PG 生食液の注入量は投与量間で異なっている。この結果を Table 8 に示す。また、Fig.17 には各化合物において 21 日目の腫瘍増殖抑制率が最も高かった投与量における腫瘍増殖率を示す (MMC : 5 mg/kg, EB-glu-MMC : 50 mg eq. MMC/kg, E-glu-MMC : 50 mg eq. MMC/kg)。腫瘍増殖抑制率は移植後 3 週間にあたって比較した。

両結合体とも高投与量で MMC と同等あるいはそれ以上の抗腫瘍効果を示

した。EB-glu-MMC は観察後期において、より明らかな腫瘍増殖抑制を示した。E-glu-MMC は 50-75 mg eq. MMC/kg で最も高い腫瘍増殖抑制作用を示したが、著しい体重減少を引き起こし、75 mg eq. MMC/kg では致死的な副作用が観察された。

Table 7. Effect of MMC, EB-glu-MMC and E-glu-MMC on the Survival Time of Mice Bearing P388 Leukemia Intraperitoneally

Compound	Dose (mg eq. MMC/kg)	Survival days of treated mice (mean $\pm$ S.D.)	Survival days of control mice (mean $\pm$ S.D.)	ILS (%)	Change in mean body weight (%)	
					4 d - 0 d <sup>a)</sup>	7 d - 0 d <sup>b)</sup>
MMC	2.5	19.5 $\pm$ 3.1 **	10.3 $\pm$ 0.5	89.3	+0.7	+3.0
	5	24.5 $\pm$ 3.8 ***	10.3 $\pm$ 0.5	137.9	-6.5	+0.5
	10	12.4 $\pm$ 7.0	9.8 $\pm$ 1.3	26.5	-3.8	-11.0 <sup>c)</sup>
EB-glu-MMC	10	10.0 $\pm$ 1.4	9.8 $\pm$ 1.3	2.0	-4.8	+18.7
	25	10.8 $\pm$ 1.5	9.5 $\pm$ 1.0	13.7	+2.8	+26.6
	50	11.0 $\pm$ 2.5	9.5 $\pm$ 1.0	15.8	-7.4	+6.6
	75	11.5 $\pm$ 1.0	10.5 $\pm$ 0.6	9.5	+8.0	+26.4
E-glu-MMC	10	10.0 $\pm$ 1.7	9.8 $\pm$ 1.3	2.0	-2.1	+22.2 <sup>c)</sup>
	25	11.3 $\pm$ 1.3	9.5 $\pm$ 1.0	18.9	+1.9	+13.8
	50	12.8 $\pm$ 1.0 ***	9.5 $\pm$ 1.0	34.7	-8.2	+6.6
	75	14.0 $\pm$ 1.4 ***	10.5 $\pm$ 0.6	33.3	-5.5	-2.2

The survival days are determined with n=4-5. \*\* p<0.01 vs. control; \*\*\* p<0.001 vs. control.

a) Change ratio of mean body weight at 4 d post-inoculation to that immediately before inoculation.

b) Change ratio of mean body weight at 7 d post-inoculation to that immediately before inoculation.

c) One mouse died before 7 d post-inoculation.

Table 8. Growth Inhibitory Effect of MMC, EB-glu-MMC and E-glu-MMC on Sarcoma 180 Solid Tumor Inoculated Subcutaneously to Mice

Compound	Dose (mg eq. MMC/kg)	Tumor volume (cm <sup>3</sup> ) <sup>a)</sup>			Growth inhibition at 21 d (%)	Change in mean body weight (%)	
		4 d after inoculation	14 d after inoculation	21 d after inoculation		8 d - 4 d <sup>c)</sup>	11 d - 4 d <sup>d)</sup>
control	0	0.13±0.03	4.56±1.42	7.27±0.59	0.0	+8.1	+9.1
MMC	2.5	0.22±0.08	3.71±1.05	5.64±1.34	54.2	+4.9	+5.2
	5	0.18±0.09	1.70±0.79 *	3.85±1.02 **	61.8	+7.5	+6.0
EB-glu-MMC	25	0.17±0.09	3.90±1.29	— <sup>b)</sup>	— <sup>b)</sup>	+17.5	+19.8
	50	0.18±0.08	2.89±0.61	2.26±0.30 ***	77.5	+10.2	+12.1
	75	0.20±0.08	2.78±0.87	3.28±0.40 ***	70.7	+7.8	+8.4
E-glu-MMC	25	0.12±0.01	3.26±0.76	5.52±2.81	17.7	+12.9	+14.1
	50	0.12±0.03	1.20±0.84 **	0.74±0.32 ***	89.0	-7.5	-11.5
	75	0.15±0.06	— <sup>b)</sup>	— <sup>b)</sup>	— <sup>b)</sup>	-8.9	— <sup>e)</sup>

The preparations were administered intraperitoneally at 4 d post-inoculation.

a) The tumor volume at 4, 14 and 21 d post-inoculation are shown as described under the line. The results are expressed as the mean ± S.D. (n=3-4). \* p<0.05 vs. control; \*\* p<0.01 vs. control; \*\*\* p<0.001 vs. control. b) The number of remaining mice <3. c) Change ratio of mean body weight at 8 d post-inoculation to that immediately before administration. d) Change ratio of mean body weight at 11 d post-inoculation to that immediately before administration. e) One mouse died before 11 d post-inoculation.

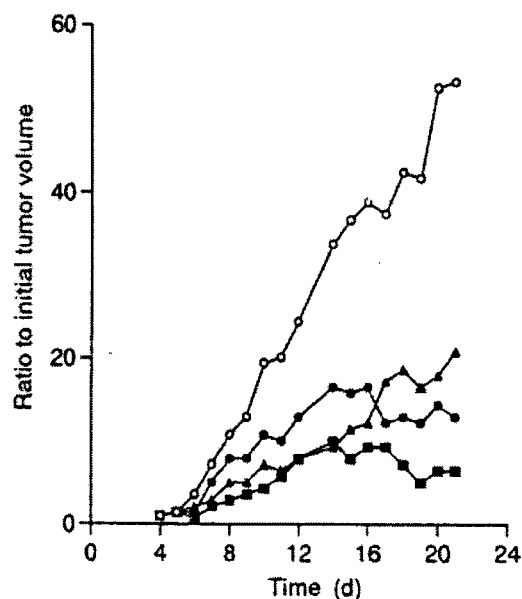


Fig. 17. Growth Inhibitory Effect on Sarcoma 180 Solid Tumor Implanted Subcutaneously after I.P. Administration of MMC, EB-glu-MMC and E-glu-MMC

control (○), MMC 5 mg/kg (▲), EB-glu-MMC 50 mg eq. MMC/kg (●), E-glu-MMC 50 mg eq. MMC/kg (■). The horizontal axis is time (d) after inoculation. Administration was executed at 4 d after inoculation. Each compound was mixed in 10% PG saline and injected. The initial tumor volume means the volume measured just before administration. Each point represents the mean of the ratio to the initial volume (n=3-4).

#### 第4節 懸濁状態での MMC の放出特性

9 mL の 1/15 M リン酸緩衝液 (pH7.4,  $\mu=0.3$ ) に, PG に溶解した EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC (20  $\mu\text{g/mL}$ ) を 1 mL 添加し, 均一な懸濁液を調製した。両化合物の懸濁液をメンブランフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ ) によってろ過して溶解度を測定したが, リン酸緩衝液・PG 混液 (9:1, v/v) にはほとんど溶けていなかった。Fig.18 には 37°C におけるこの懸濁液からの MMC の放出プロファイルを示す。各化合物からの MMC の 48 時間後の放出率は EB-glu-MMC が 2.7%, E-glu-MMC が 35%であり, 溶液時に比べて放出速度は低下した。特に, EB-glu-MMC においてその影響は顕著であった。

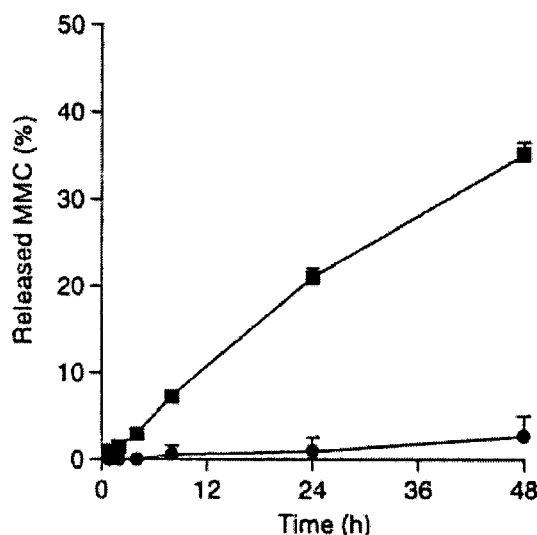


Fig. 18. Release of MMC from EB-glu-MMC (●) and E-glu-MMC (■) in the Mixture of 1/15 M Phosphate Buffer, pH 7.4 ( $\mu=0.3$ ), and PG (9:1, v/v) at 37°C  
Each point represents the mean  $\pm$  S.D. (n=3).

## 第 5 節 小括

EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は水に対する溶解度が非常に低いため、前章の溶液製剤と比較すると抗癌効果と副作用の発現の仕方が大きく異なった。また懸濁液製剤においても投与-治療システムの違い、つまり投与部位と治療部位が同一である i.p.-i.p.システムと、投与部位と治療部位が離れている s.c.-i.p.システムで薬効の発現が大きく異なった。

P388 白血病細胞を移植したマウスに対する懸濁液製剤投与では、EB-glu-MMC はコントロール群に比較して有意な ILS の増加は見られなかったが、E-glu-MMC は高投与量で有意な ILS の延長が確認された (Table 7)。前章で示した溶液製剤と比較すると両化合物が示す ILS は小さかった。例えば、E-glu-MMC は溶液製剤では 15 mg eq. MMC/kg 投与群で 80%以上の ILS を示したが、懸濁液製剤では 50-75 mg eq. MMC/kg 投与群でさえ 35%以下であった。In vitro における懸濁状態での MMC の放出率は溶液状態と比較して非常に緩やかであり、この放出特性は懸濁液製剤投与における低い ILS と関係していると考えられた。つまり MMC の遅い放出は腹腔内における MMC の濃度を低下させ、P388 白血病細胞に対する MMC の供給を減少させると考えられた。特に EB-glu-MMC 懸濁液からの MMC の放出は著しく減少しており、ほとんど抗癌効果を示さなかった。MMC は 10 mg/kg 投与群で致死的な副作用を示した。体重が減少し回復せず、1 匹は移植 5 日後で死亡した (Table 7)。E-glu-MMC の 10 mg eq. MMC/kg 投与群では移植 7 日後に 1 匹が死亡したが、体重減少を伴っていないため、死因は薬物によるものではないと考えられる。E-glu-MMC の 75 mg eq. MMC/kg 投与群で体重減少が観察され (Table 7)、E-glu-MMC は EB-glu-MMC よりも毒性が高いと考えられた。

Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウスに対する懸濁液製剤投与では、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は 50-75 mg eq. MMC/kg 投与群で著しく腫瘍増殖を抑制した。溶液製剤と比較すると、懸濁液製剤では良好な腫瘍増殖抑制

効果を得るには高い投与量が必要であった。このことは放出試験結果から、懸濁液製剤からの MMC の放出が緩やかで低く抑制されることが大きな要因として考えられた。EB-glu-MMC は P388 白血病細胞に対して有意な効果を示さなかったが、Sarcoma 180 固形肉腫に対しては特に後半で著しい腫瘍増殖抑制を示した。MMC は Sarcoma 180 固形肉腫と同様に腹水の P388 白血病細胞に対しても高い抗癌効果を示すことが知られており<sup>48,49)</sup>、その効果は薬物分布に深く依存している。MMC の癌への良好な局在化と滞留性がより高い癌増殖抑制効果を可能にすることが報告されている<sup>15)</sup>。その際、生体内分布の効果は移植後後期においてより高い癌増殖抑制効果につながるものが観察されている<sup>15,18)</sup>。これらの事実は MMC の癌への分布が癌増殖の長期的な抑制に重要であることを示している。報告されている高分子化合物の生体内分布は、低分子である EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC とは異なると考えられる<sup>15,18)</sup>。bestrabucil はそれ自身の組織移行性によって癌へ分布する<sup>37,38)</sup>。この薬物特性を考慮すると、両結合体は MMC のプロドラッグとして機能しているだけでなく、Sarcoma 180 固形肉腫の増殖抑制に際し、それぞれに特有の組織分布特性を示している可能性が考えられる。実際、両結合体は MMC とは非常に異なる PK プロファイルを示しており、両結合体と MMC では組織分布特性が異なると考えられる。組織分布特性に関しては次章で検討する。

E-glu-MMC は 50 mg eq. MMC/kg 投与群で、移植 21 日後に 90%近い抑制率を示し、最も高い腫瘍増殖抑制効果を示した (Table 8)。一方、75 mg eq. MMC/kg 投与群では著しい体重減少を伴って死亡した。E-glu-MMC は EB-glu-MMC と比較してより大きな体重減少が観察された。したがって、E-glu-MMC の方が EB-glu-MMC よりも毒性が高いと考えられるが、溶解度の違いによる MMC の放出速度への影響が大きな要因となっている可能性が考えられた。また体重変化測定に加え、遅延した薬物毒性を確認する

ために異なる副作用評価を行う必要があると考えられる。

本章では EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の懸濁液製剤に関する *in vivo* 評価を行った。懸濁液製剤では Sarcoma 180 固形肉腫の治療において高投与量が適しているようである。E-glu-MMC は最も高い腫瘍増殖抑制効果を示したが、EB-glu-MMC よりも毒性が高かった。EB-glu-MMC は溶解度が低く、MMC への変換速度が非常に遅いため、毒性が低かったと考えられた。

## 第5章 マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの新規結合体に関する抗癌効果と副作用の評価

### 第1節 緒言

EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は MMC のプロドラッグとして機能し、E-glu-MMC はエストロゲンレセプターに対してある程度の結合能を示した。E-glu-MMC は P388 腹水癌に対する i.p.-i.p.システムにおいて高い抗癌効果を示したが、EB-glu-MMC は非常に弱い抗癌効果しか示さなかった。この原因として、EB-glu-MMC は水溶性が低く、腹水中での EB-glu-MMC から MMC への変換が非常に緩慢であったためであると考えられた。一方、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は Sarcoma 180 固形肉腫に対する s.c.-i.p.システムにおいて高い抗腫瘍効果を示し、これは両結合体の薬物動態特性に起因していると考えられた。また、両結合体の脂溶性が固形癌の治療に適している可能性もある。

両結合体の抗癌効果に関わる要因をより詳細に考察するには、組織分布特性を調べ明らかにする必要がある。また、両結合体の前章までの試験において、抗癌効果と副作用の関係が必ずしも明らかにされていない。特に副作用の評価は体重の減少のみに基づいて評価してきた。しかし、より詳細な副作用評価のためには白血球数の調査のような他の方法が必要である。骨髄抑制や白血球過少症は MMC の主要な副作用として知られている<sup>50,51)</sup>。そこで本章では抗癌効果と副作用の関係をより詳細に評価した。Sarcoma 180 固形肉腫に対する抗腫瘍効果を溶液製剤及び懸濁液製剤で評価し、それと同時に副作用を体重変化と末梢血中の白血球数の減少に基づき評価した。また正常マウスにおける体重と白血球数の変化を、両結合体の溶液製剤の i.p.投与後に観察した。さらに Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウスに対して

EB-glu-MMC を i.p.投与した後に組織分布特性を調べた。

## 第2節 皮下移植 Sarcoma 180 固形肉腫に対する溶液製剤腹腔内投与後の抗腫瘍効果，体重変化，白血球数の減少

Table 9 に溶液製剤 i.p.投与後の腫瘍増殖抑制率を示す。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は用量依存的に腫瘍増殖を抑制し，30 mg eq. MMC/kg の投与量でそれぞれ 67，56%の腫瘍増殖抑制効果を示した。MMC は 5 mg/kg で 64%の腫瘍増殖抑制効果を示し，10 mg/kg では移植 14 日後までにすべてのマウスが死亡するという致死的な副作用を示した。これらの結果は前章までに行った結果とよく一致した。しかしながらいずれの薬物もコントロール群に対して有意な抗腫瘍効果は認められなかった。

このときの体重と白血球数の変化を Fig.19, 20 に示す。体重変化については EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の 10 及び 30 mg eq. MMC/kg 投与群において，コントロール群と比較してほとんど差が認められなかった。しかしながら EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の 30 mg eq. MMC/kg 投与群において，コントロール群と比較して有意な白血球数の減少が観察された。MMC の 5 mg/kg 群では移植 9-11 日後にコントロール群と比較して有意な体重減少が観察されたが，その後は観察されなかった。白血球数はコントロール群と MMC の 5 mg/kg 投与群との間には有意な差は観察されなかった。MMC の 10 mg/kg 投与群では，移植 2 日後から死亡するまで有意で急激な体重減少が観察され，移植 7 日後に 1 匹だけ生き残ったマウスの白血球数はわずかに 1600 cell/ $\mu$ L であった。

Table 9. Tumor Growth Ratio and Inhibition of Solution of EB-glu-MMC, E-glu-MMC and MMC in 100% PG in Sarcoma 180 Solid Tumor Bearing Mice

Compound	Dose (mg eq. MMC/kg)	Tumor growth ratio after inoculation <sup>a)</sup> (mean $\pm$ S.E.)			Growth inhibition at 18 d (%)
		4 d <sup>b)</sup>	11 d	18 d	
control	0	1 $\pm$ 0	17.2 $\pm$ 4.9	46.9 $\pm$ 13.0	0.0
EB-glu-MMC	10	1 $\pm$ 0	23.1 $\pm$ 8.1	35.1 $\pm$ 14.4	25.0
	30	1 $\pm$ 0	10.8 $\pm$ 1.5	15.6 $\pm$ 2.6	66.8
E-glu-MMC	10	1 $\pm$ 0	18.9 $\pm$ 5.4	42.9 $\pm$ 12.6	8.4
	30	1 $\pm$ 0	10.7 $\pm$ 2.2	20.5 $\pm$ 1.7	56.2
MMC	5	1 $\pm$ 0	7.3 $\pm$ 1.6	17.0 $\pm$ 2.2	63.4
	10	1 $\pm$ 0	7.4 $\pm$ 2.9	—	—

a) n=4 for 4, 11 and 18 days except for MMC (10 mg/kg) at 18 days.

b) As this is an initial day, the tumor growth ratio is 1.

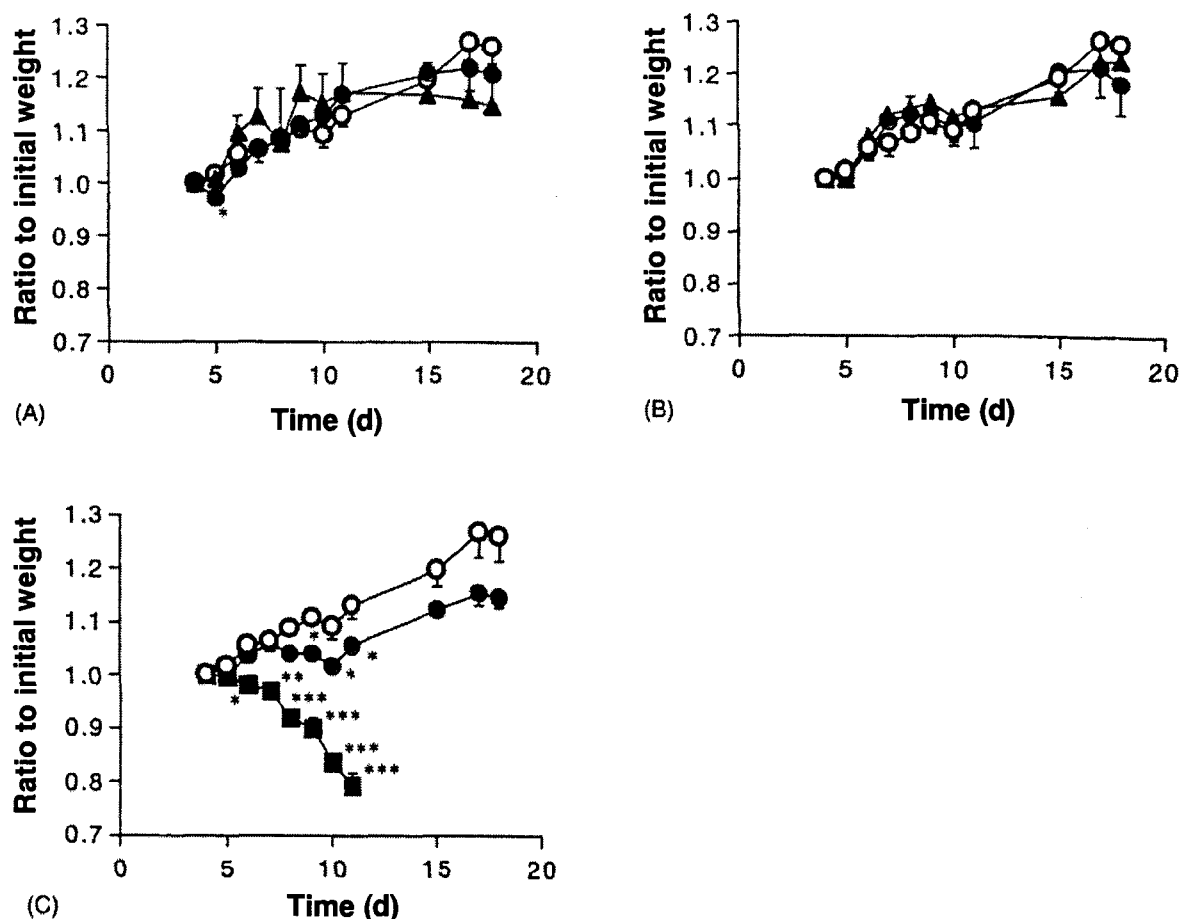


Fig. 19. Change in Mean Body Weight of Mice Bearing Sarcoma 180 Solid Tumor Subcutaneously after I.P. Administration of Solution Dosage Forms of EB-glu-MMC (A), E-glu-MMC (B) and MMC (C)

(A) EB-glu-MMC; control (○), 10 mg eq. MMC/kg (▲), 30 mg eq. MMC/kg (●). (B) E-glu-MMC; control (○), 10 mg eq. MMC/kg (▲), 30 mg eq. MMC/kg (●). (C) MMC; control (○), 5 mg/kg(●), 10 mg/kg(■). The horizontal axis is time (d) after inoculation. The initial body weight was measured just before administration. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3-4). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 and \*\*\* $P$  < 0.001 vs. control.

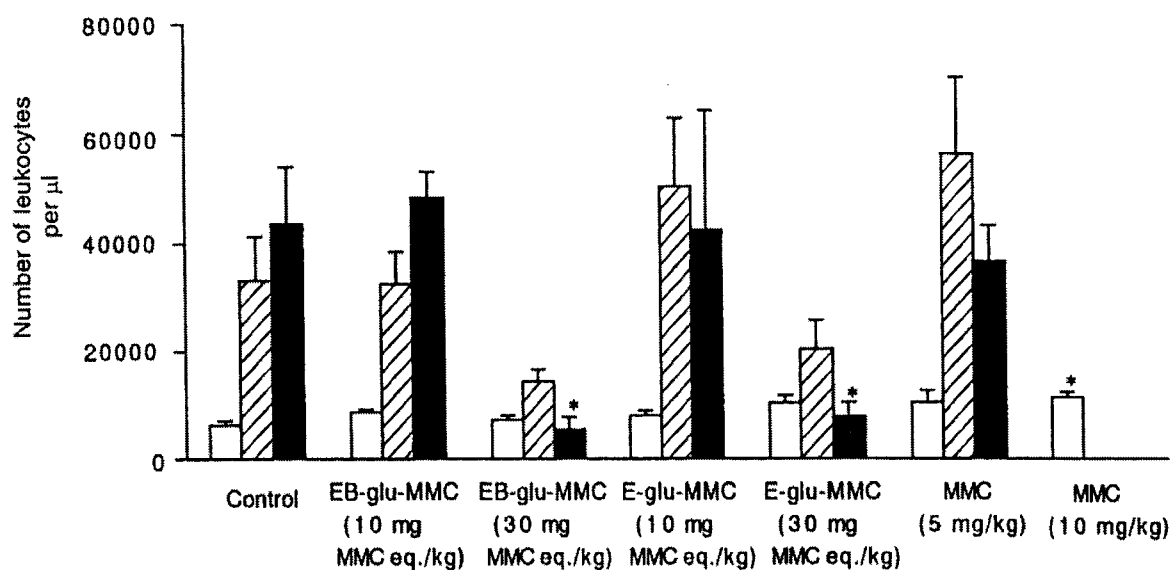


Fig. 20. Number of Leukocytes in Sarcoma 180 Solid Tumor Bearing Mice after I.P. Administration of Solution Dosage Forms of EB-glu-MMC, E-glu-MMC and MMC

Open, hatched and closed columns show the values at 4, 11 and 18 days post-inoculation, respectively (0, 7 and 14 days post-administration, respectively). Each column represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3-4). \* $P < 0.05$  vs. control.

### 第3節 皮下移植 Sarcoma 180 固形肉腫に対する懸濁液製剤腹腔内投与後の抗腫瘍効果，体重変化，白血球数の減少

Table 10 に懸濁液製剤 i.p.投与後の腫瘍増殖抑制率を示す。EB-glu-MMC はそれぞれの投与量でコントロール群に対して有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。E-glu-MMC も移植 18 日後の 25 mg eq. MMC/kg 投与群を除いて有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。MMC は 2.5, 5 mg/kg 投与群で有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。移植 18 日後の EB-glu-MMC による腫瘍増殖抑制率は 50 mg eq. MMC/kg 投与群で 76%，75 mg eq. MMC/kg 投与群で 70%であった。E-glu-MMC の 50 mg eq. MMC/kg 投与群は移植 18 日後において最も高い腫瘍増殖抑制率である 88%を示した。MMC の腫瘍増殖抑制率は移植 18 日後に 2.5 mg/kg 投与群で 52%，5 mg/kg 投与群で 61%であった。

このときの体重及び白血球数の変化を Fig.21, 22 に示す。EB-glu-MMC は 50, 75 mg eq. MMC/kg 投与群において試験後半（移植 17-18 日後）で有意な体重減少が観察された。EB-glu-MMC の 25 mg eq. MMC/kg 投与群ではコントロール群より高く体重が推移した。EB-glu-MMC の 50, 75 mg eq. MMC/kg 投与群で白血球数の減少が観察された。E-glu-MMC の 25 mg eq. MMC/kg 投与群では有意な体重変化は観察されなかったが，50, 75 mg eq. MMC/kg 投与群では試験期間中の全てにわたり有意な体重減少が観察された。E-glu-MMC の 25 mg eq. MMC/kg 投与群において移植 18 日後に有意な白血球数の減少が観察された。MMC は 2.5, 5 mg/kg 投与群のいずれにおいても有意な白血球数の減少は観察されなかった。

Table 10. Tumor Growth Ratio and Inhibition of Suspension of EB-glu-MMC, E-glu-MMC and MMC in 10% Aqueous PG in Sarcoma 180 Solid Tumor Bearing Mice

Compound	Dose (mg eq. MMC/kg)	Tumor growth ratio after inoculation <sup>a)</sup> (mean $\pm$ S.E.)			Growth inhibition at 18 d (%)
		4 d <sup>b)</sup>	11 d	18 d	
control	0	1 $\pm$ 0	20.3 $\pm$ 1.1	42.6 $\pm$ 4.9	0.0
EB-glu-MMC	25	1 $\pm$ 0	14.4 $\pm$ 1.7 *	—	—
	50	1 $\pm$ 0	10.7 $\pm$ 1.1 ***	13.3 $\pm$ 0.8 **	76.2
	75	1 $\pm$ 0	10.2 $\pm$ 1.3 **	12.4 $\pm$ 1.1 ***	69.6
E-glu-MMC	25	1 $\pm$ 0	15.9 $\pm$ 0.5 *	41.4 $\pm$ 20.3	16.3
	50	1 $\pm$ 0	6.2 $\pm$ 0.7 ***	7.2 $\pm$ 1.4 ***	88.4
	75	1 $\pm$ 0	6.1 $\pm$ 0.8 ***	—	—
MMC	2.5	1 $\pm$ 0	11.6 $\pm$ 1.8 **	22.7 $\pm$ 1.8 **	52.0
	5	1 $\pm$ 0	6.8 $\pm$ 1.2 ***	19.2 $\pm$ 4.5 *	61.1

a) n=4 for 4 and 11 days except for E-glu-MMC at 75 mg eq. MMC/kg (n=3). At 18 days, n=4 except for E-glu-MMC at 50 and 75 mg eq. MMC/kg (n=3) and EB-glu-MMC at 50 mg eq. MMC/kg (n=3). b) As this is an initial day, the tumor growth ratio is 1.

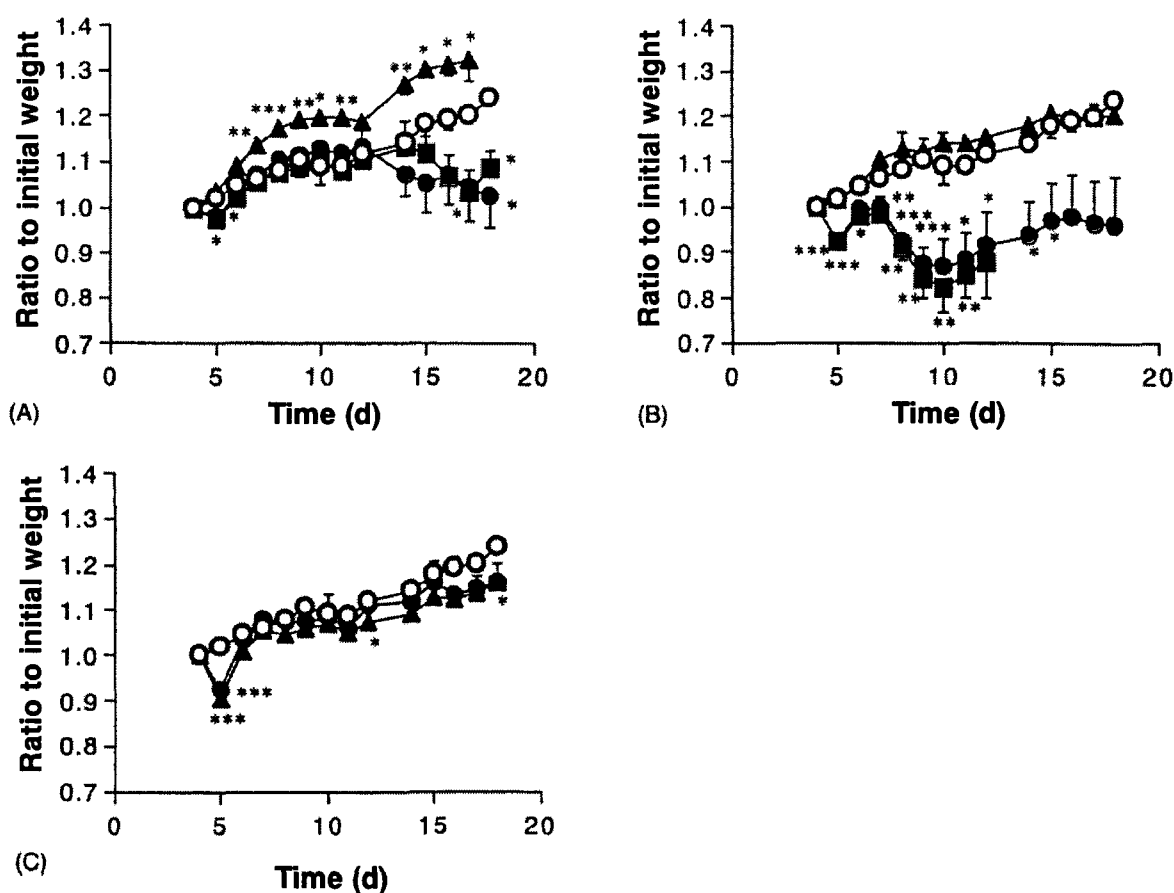


Fig. 21. Change in Mean Body Weight of Mice Bearing Sarcoma 180 Solid Tumor Subcutaneously after I.P. Administration of Suspension Dosage Forms of EB-glu-MMC (A), E-glu-MMC (B) and MMC (C)

(A) EB-glu-MMC; control (○), 25 mg eq. MMC/kg (▲), 50 mg eq. MMC/kg (●), 75 mg eq. MMC/kg (■). (B) E-glu-MMC; control (○), 25 mg eq. MMC/kg (▲), 50 mg eq. MMC/kg (●), 75 mg eq. MMC/kg (■). (C) MMC; control (○), 2.5 mg/kg (▲), 5 mg/kg (●). The horizontal axis is time (d) after inoculation. The initial body weight was measured just before administration. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3-4). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  vs. control.

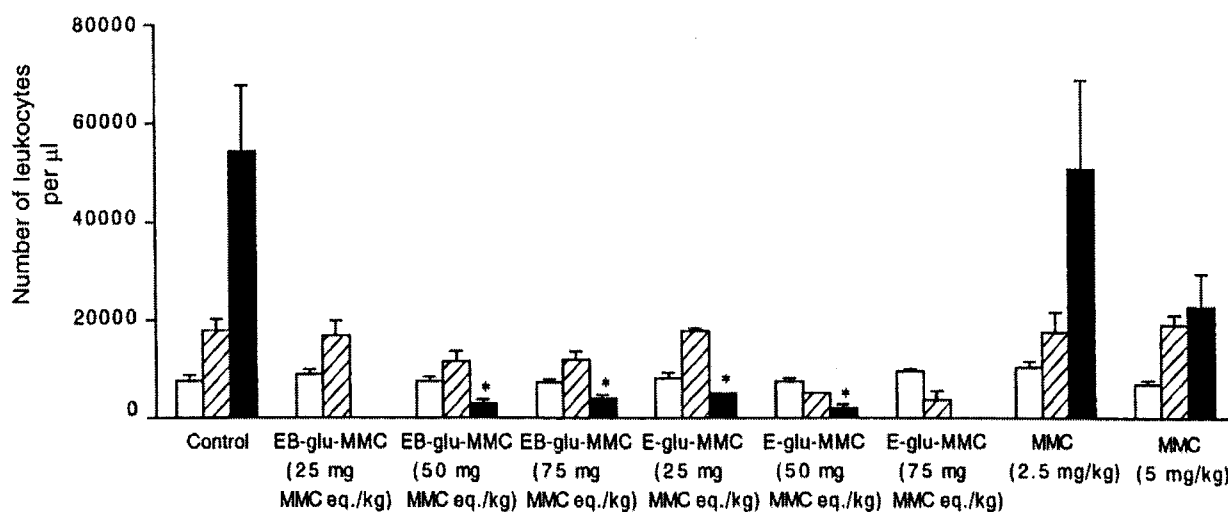


Fig. 22. Number of Leukocytes in Sarcoma 180 Solid Tumor Bearing Mice after I.P. Administration of Suspension Dosage Forms of EB-glu-MMC, E-glu-MMC and MMC

Open, hatched and closed columns show the values at 4, 11 and 18 days post-inoculation, respectively (0, 7 and 14 days post-administration, respectively). Each column represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3-4). \* $P < 0.05$  vs. control.

#### 第4節 正常マウスに対する溶液製剤投与後の白血球数及び体重の変化

EB-glu-MMC, E-glu-MMC, MMC の副作用を正常マウスで検討した。Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウスと同様に溶液製剤を i.p.投与後に白血球数の推移及び体重変化を観察した。その結果を Fig.23, 24 に示す。コントロール群では体重は徐々に増加し、白血球数は観察期間中有意な変化は認められなかった。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC ではそれぞれの投与量で体重の減少を示さず、むしろ EB-glu-MMC 投与群では増加し E-glu-MMC の低投与量群でも同様に増加した。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は、投与7日後ではそれぞれの投与量で有意な白血球数の変化を示さなかったが、30 mg eq. MMC/kg 投与群では両結合体ともに投与14日後に有意な白血球数の減少が観察された。MMC の 5 mg/kg 投与群では体重減少は見られなかったが、10 mg/kg 投与群では投与4日後から著しい体重減少が観察された。MMC の 10 mg/kg 投与群では4匹の内3匹のマウスが投与後11日までに死亡したが、MMC の 5 mg/kg 投与群では白血球数の有意な減少は観察されなかった。致死的な副作用を示した 10 mg/kg 投与群では投与7日後に1匹だけ生存し、そのマウスの白血球数はわずかに 980 cell/ $\mu$ L であった。MMC の 10 mg/kg 投与群を除いたその他すべてのマウスは投与後26日後まで生存した。

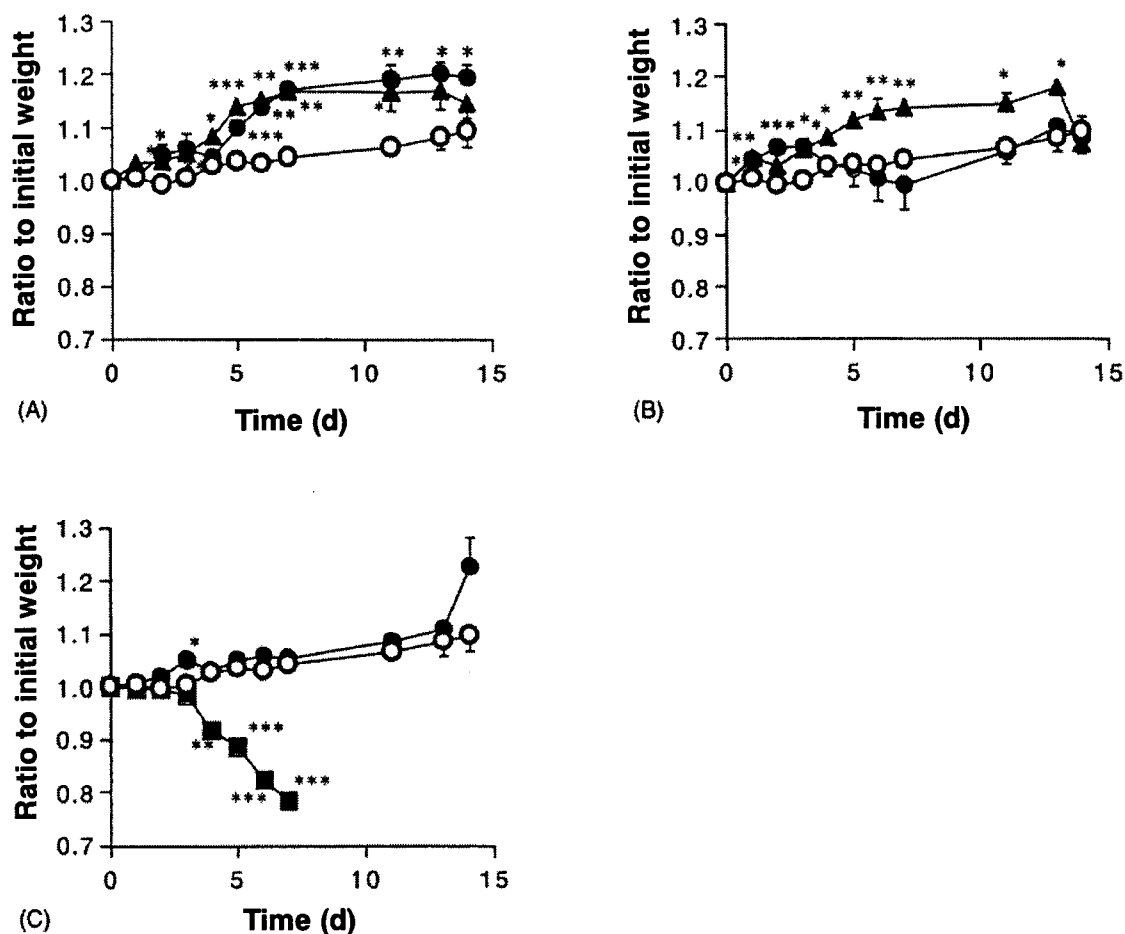


Fig. 23. Change in Mean Body Weight of Normal Mice after I.P. Administration of Solution Dosage Forms of EB-glu-MMC (A), E-glu-MMC (B) and MMC (C)

(A) EB-glu-MMC; control (○), 10 mg eq. MMC/kg (▲), 30 mg eq. MMC/kg (●). (B) E-glu-MMC; control (○), 10 mg eq. MMC/kg (▲), 30 mg eq. MMC/kg (●). (C) MMC; control (○), 5 mg/kg(●), 10 mg/kg(■). The initial body weight was measured just before administration. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3-4). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 and \*\*\* $P$  < 0.001 vs. control.

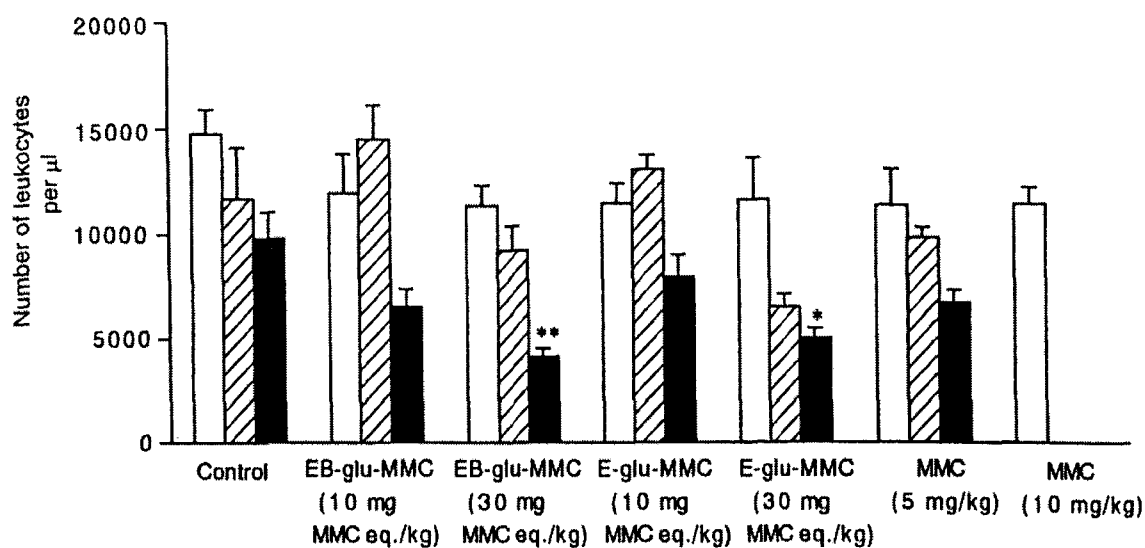


Fig. 24. Number of Leukocytes in Normal Mice after I.P. Administration of Solution Dosage Forms of EB-glu-MMC, E-glu-MMC and MMC

Open, hatched and closed columns show the values at 0, 7 and 14 days post-administration, respectively. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3-4). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  vs. control.

## 第5節 Sarcoma 180 固形肉腫皮下移植マウスにおける EB-glu-MMC 懸濁液製剤投与後の体内分布

EB-glu-MMC 懸濁液製剤 (10 mg eq. MMC/kg) を i.p.投与後の EB-glu-MMC, E-glu-MMC, MMC の体内分布を Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウスにおいて調べた。その結果, 血漿中薬物濃度は非常に低く, EB-glu-MMC の最高血中濃度は投与 3 時間後において  $0.04 \mu\text{g/mL}$  で, E-glu-MMC 及び MMC の血漿中濃度は投与 1 時間後にそれぞれ  $0.01 \mu\text{g/mL}$ ,  $0.04 \mu\text{g/mL}$  であった。Fig.25 に投与 1, 3, 6 時間後の各化合物の組織分布結果を示す。EB-glu-MMC は投与 3 時間後に最も多く検出され, 特に脾臓, 肺, 胸腺, 子宮, 腎臓に数  $\mu\text{g}$  から  $10 \mu\text{g/g}$  と高濃度に検出された。また, 肝臓, 心臓, 癌, 卵巣への分布はわずかであった。本実験では MMC は脾臓に最も高濃度で検出された。

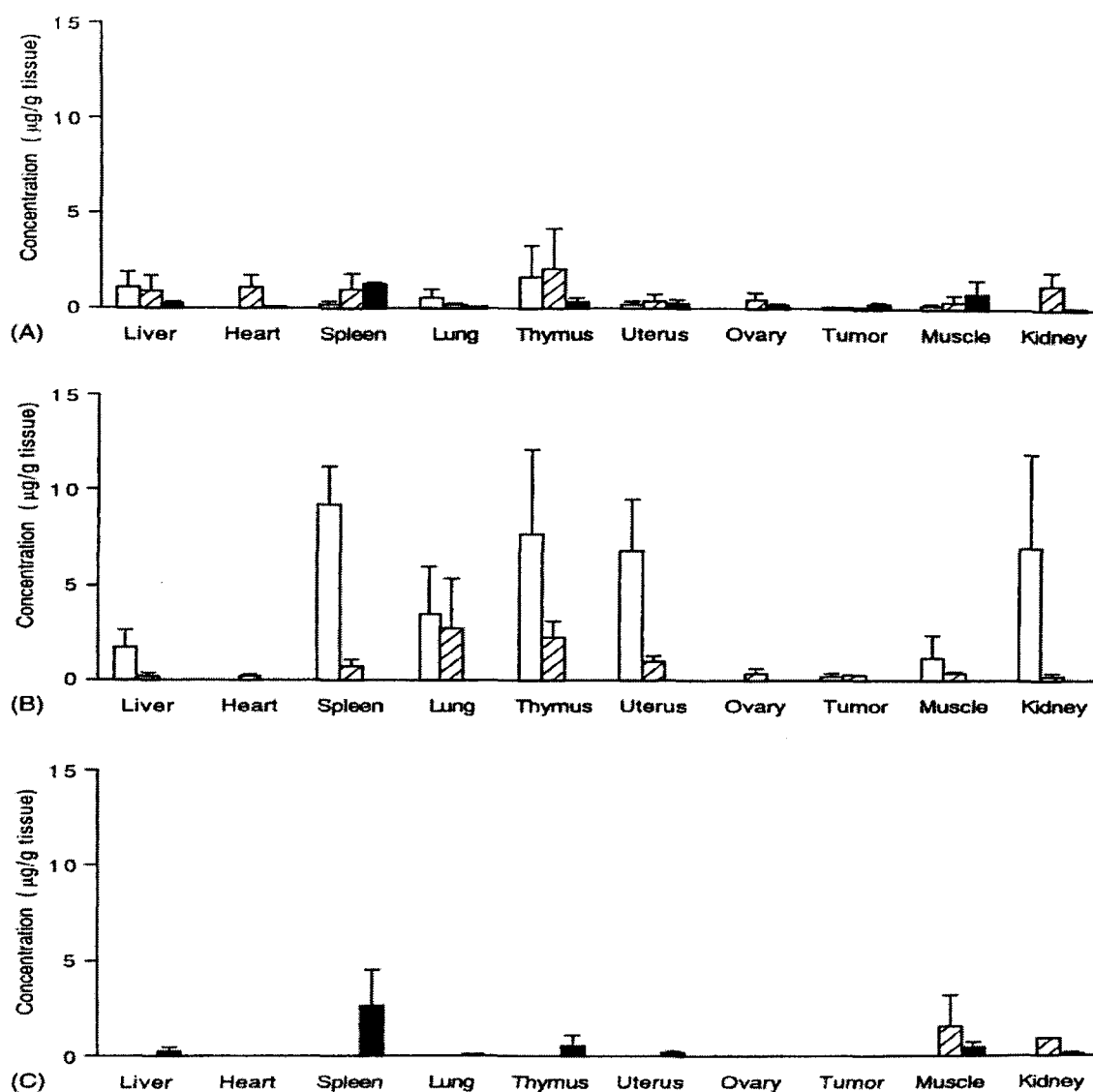


Fig. 25. Tissue Distribution at 1 h (A), 3 h (B) and 6 h (C) after I.P. Administration of EB-glu-MMC Suspension to Sarcoma 180 Solid Tumor Bearing Mice

Administration was performed at 10 days post-inoculation. Open, hatched and closed columns show the concentrations of EB-glu-MMC, E-glu-MMC and MMC, respectively. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3-4) except for EB-glu-MMC in kidney (n=2) in (A), and for EB-glu-MMC and E-glu-MMC in uterus (n=2), ovary (n=2), muscle (n=2) and kidney (n=1) in (C). The results are expressed as the mean  $\pm$  difference /2 when n=2, and the result of one point is shown when n=1.

## 第 6 節 小括

EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の 30 mg eq. MMC/kg 投与群（溶液製剤）において MMC の 5 mg/kg 投与群と同程度の腫瘍増殖抑制効果が認められた。しかしながら、その効果はすべての薬物群においてコントロール群と比較して有意なものではなかった。これはコントロール群の腫瘍増殖率に大きなばらつきがあったためと考えられた（Table 9）。試験後半では、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は、コントロール群と比較して明らかな体重増加を示さない傾向があった（Fig.19）。MMC では 5 mg/kg 投与群において移植後 9-11 日後に有意な体重の減少が観察された。腫瘍増殖率と体重変化から EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は 30 mg eq. MMC/kg 投与群で MMC の 5 mg/kg 投与群とほぼ同等の抗腫瘍効果と副作用を示したものと考えられた。一方、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC では 30 mg eq. MMC/kg 投与群で移植 18 日後に白血球数の有意な減少が観察されたが、MMC では 5 mg/kg において白血球数の有意な減少は観察されなかった（Fig.20）。以上の結果より、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の 30 mg eq. MMC/kg 投与群と MMC の 5 mg/kg を比較した場合、体重による全体的な副作用に関して差は認められなかったが、白血球数を指標とした副作用から考えると、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の 30 mg eq. MMC/kg 投与群のほうが MMC の 5 mg/kg 投与群より副作用が強いことが示唆された。

懸濁液製剤において、EB-glu-MMC、E-glu-MMC、MMC は有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。溶液製剤投与では有意差は認められなかったが、懸濁液製剤では有意差が認められた。これはコントロール群における腫瘍増殖率のばらつきが懸濁液製剤を用いた試験のときは小さかったためと考えられた（Table 9, 10）。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は 50 mg eq. MMC/kg 投与群において MMC の 5 mg/kg 投与群よりも高い腫瘍増殖抑制効果を示し、さらに E-glu-MMC は EB-glu-MMC よりも高い効果を示した。EB-glu-MMC は

25 mg eq. MMC/kg 投与群で体重減少は見られなかったが、むしろ増加しており、50, 75 mg eq. MMC/kg 投与群では試験後半で体重の減少が確認された (Fig.21)。E-glu-MMC は 25 mg eq. MMC/kg 投与群で体重に変化は認められなかったが、50, 75 mg eq. MMC/kg 投与群において著しい体重減少が確認された (Fig.21)。この体重変化は E-glu-MMC の懸濁液製剤が EB-glu-MMC の懸濁液製剤より強い毒性を有することを示唆している。実際、E-glu-MMC の 75 mg eq. MMC/kg 投与群では、投与 12 日後で 4 匹中 3 匹のマウスが死亡した。前章までに述べたように、E-glu-MMC のほうが EB-glu-MMC よりも水への溶解性が高いために、懸濁液中での MMC の放出速度は E-glu-MMC のほうが EB-glu-MMC よりも速い。この現象が E-glu-MMC のより著明な副作用と関連していると考えられた。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は 50, 75 mg eq. MMC/kg 投与群で白血球数の減少が観察され (Fig.22), E-glu-MMC のほうが EB-glu-MMC よりも減少の度合いは高かった。MMC の 2.5, 5 mg/kg 投与群では投与直後に有意な体重減少が観察されたが、すぐにコントロールのレベルまで回復した。MMC は白血球数の有意な減少を引き起こさなかった。したがって、全処置群を通じて体重の減少は白血球数の減少とほぼ一致した。しかしながら、E-glu-MMC の 25 mg eq. MMC/kg 投与群では有意な体重減少は観察されなかったが、移植 18 日後の白血球数は有意に減少していた。これより白血球数が体重の変化より高感度な副作用の指標であることが考えられた。

正常マウス群において、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の溶液製剤では 10, 30 mg eq. MMC/kg 投与群で有意な体重減少は観察されなかった (Fig.23)。MMC では 5 mg/kg 投与群において有意な体重減少は観察されなかったが、10 mg/kg では有意な体重減少が認められた。白血球数は MMC の 10 mg/kg 投与群を除いて、投与 7 日後では有意な減少は観察されなかった (Fig.24)。投与 14 日後では、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の

30 mg eq. MMC/kg 投与群において有意な白血球数の減少が観察された。MMC では 5 mg/kg 投与群において有意な白血球数の減少は観察されなかった。これらの結果は Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウスで得られた結果と同じであった。

薬物の体内分布は薬理効果と副作用を議論する上で非常に重要である。前章までに述べたように、EB-glu-MMC は溶液製剤で正常ラットに対して i.p. 投与 (5 mg eq. MMC/kg) したとき、EB-glu-MMC, E-glu-MMC, MMC の最高血中濃度はそれぞれ 0.3  $\mu\text{g/mL}$  (0.9 hr), 0.14  $\mu\text{g/mL}$  (2.3 hr), 0.14  $\mu\text{g/mL}$  (2.7 hr) であった。この結果と比較して、今回の EB-glu-MMC の懸濁液製剤での Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウスに対する i.p. 投与 (10 mg eq. MMC/kg) ではより低い結果となった。この低い血漿中薬物濃度は、懸濁液製剤の比較的低い副作用と関係している可能性がある。しかしながら、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は脾臓、肺、胸腺、子宮、腎臓中に数  $\mu\text{g/g}$  から 10  $\mu\text{g/g}$  の濃度で検出された (Fig.25)。Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウスに対する i.v. 投与後の MMC の体内分布は、藤田らによって報告されている<sup>52)</sup>。その結果、8 mg/kg で i.v. 投与後、MMC はすばやく排泄され、投与 1 時間後ではわずかに血漿及び組織中に残っているだけで、より高い分布を示した肺と腎臓でさえ 0.3  $\mu\text{g/mL}$  以下であった。したがって、その結果と比較したとき、EB-glu-MMC (もしくは E-glu-MMC) は脾臓、肺、胸腺、子宮、腎臓中、特にリンパ組織系に MMC を集中させることができると考えられた。しかしながら、それぞれの組織中濃度が投与 6 時間後では非常に低く、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の組織中からの消失は比較的速いようである。EB-glu-MMC はその脂溶性のために比較的容易に組織へ移行し、組織中で E-glu-MMC や MMC へと変換される。EB-glu-MMC が子宮中に高濃度で検出されたのは、レセプター指向性による取り込みではないと考えられる。これは第 2 章で述べたように EB-glu-MMC はエストロゲンレセプターに

対してほとんど結合能がないことから明らかである。EB-glu-MMC は E-glu-MMC 及び MMC に変換される。EB-glu-MMC にはレセプター指向性はないものの、子宮癌に対して MMC を集積させるのに有用である可能性が示唆された。さらに、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC が脾臓、胸腺のようなりんぱ組織系中に高濃度で観察されていることは、白血球数を指標とした EB-glu-MMC の比較的強い副作用と一致していた。

本章では EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の抗癌効果と副作用についてより詳細に試験した。副作用は Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウス及び正常マウスを用い、体重の変化と白血球数の減少を基に評価した。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の懸濁液製剤は 50 mg eq. MMC/kg 投与群において非常に高い効果を示し、MMC の 5 mg/kg 投与群よりも高い腫瘍増殖抑制効果を示した。しかしながら、両結合体は懸濁液製剤の高投与量 (50, 75 mg eq. MMC/kg) で比較的強い副作用を示した。担癌マウス、正常マウスの両方において、白血球数の減少は体重の減少より高感度な副作用の指標と考えられた。薬物処置群とコントロール群間での体重と白血球数変化の比較に基づいた副作用は、Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウスと正常マウスでほぼ同じであった。つまり、腫瘍の増殖は体重変化に影響し、腫瘍自体の存在は免疫反応によって白血球数を増加させたが、コントロールとの比較において、腫瘍の有無は体重及び白血球数の減少による副作用の評価を妨げないことが示唆された。

## 第 6 章 総括及び考察

癌化学療法において、癌細胞を標的とし、これに選択的に働く薬物があれば理想的である。薬物-ステロイドホルモン結合体はステロイドホルモン依存性癌への特異的送達だけでなく、ホルモンレセプターを持たない多くの固形癌に対しても高い親和性を示すことが知られている<sup>38)</sup>。さらに親化合物である抗癌剤よりも副作用を低減しうることが知られている<sup>38)</sup>。これは親化合物である抗癌剤にホルモンを結合して得られる新規抗癌剤とすることで、体内動態特性が大きく変化することが大きな要因と考えられる。

本研究では強力な抗癌剤である MMC の抗癌効果のさらなる向上と副作用の低減を目的として、MMC と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの新規結合体である EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC を合成した。さらに両結合体の物理化学的、生化学的特性を解明し、*in vivo* における抗癌効果と副作用について評価した。以下に本研究で得られた知見について総括する。

### 1. マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの新規結合体の合成と各種 pH 溶液中での MMC への変換特性 (第 1 章)

EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC を MMC の新規薬物-ホルモン結合体として合成した。さらに緩衝液中での両結合体の分解及び MMC の生成速度を調べた。EB-glu は安息香酸エストラジオールと無水グルタル酸から合成し、EB-glu-MMC は CDI により EB-glu と MMC を縮合することにより合成した。E-glu は EB-glu をアルカリ加水分解することにより合成した。E-glu-MMC は CDI により E-glu と MMC を縮合することにより合成した。安定性試験は両結合体を緩衝液 (pH 4, 6, 7, 7.4, 9, 11) と PG の混液 (1:1, v/v) に溶解し、37℃にて行った。両結合体は pH 4.0 で分解し、さらに塩基性条件下ではより速く分解した。MMC は pH の上昇に従いより速やかに生成した

が、pH 4.0 では MMC の生成は見られなかった。両結合体は中性付近の 50%PG 溶液中では非常に安定であることが示された。さらに擬一次速度式に従い化合物の変換速度を解析した結果、EB-glu-MMC からの MMC の放出速度は E-glu-MMC からの MMC の放出速度とほぼ等しかった。

## 2. マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの新規結合体の生物学的特性：生体成分中での安定性とエストロゲンレセプターとの結合能（第 2 章）

EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の *in vitro* における安定性、生体試料中での MMC 放出特性、エストロゲンレセプターに対する結合能を調べた。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC を 10%血漿添加液、5%肝ホモジネート添加液に添加し 37℃でインキュベートした。10%血漿添加液において EB-glu-MMC から E-glu-MMC への酵素的変換が促進されたが、E-glu-MMC の分解には影響しなかった。5%肝ホモジネート添加液において、EB-glu-MMC から E-glu-MMC へ瞬時に変換されたのに対し、E-glu-MMC の分解はほとんど起こらなかった。E-glu-MMC は生体試料中の酵素に対し比較的安定であると考えられた。ラット子宮を用いたエストロゲンレセプターへの結合能実験において E-glu-MMC はエストラジオールに対して 0.81%の結合能を示したが、EB-glu-MMC はほとんど結合能を示さなかった。E-glu-MMC はエストロゲンレセプターに結合能がある薬物-ホルモン結合体と考えられた。E-glu-MMC は生体内で徐々に MMC を放出することにより抗癌効果を発揮する。また、エストロゲンレセプター陽性の癌細胞に対してレセプターが介在する作用を起こす可能性も示唆された。

## 3. マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの新規結合体に関する *in vivo* 特性：溶液製剤での薬物動態特性と P388 白血病細胞と Sarcoma 180 固形肉腫に対する抗癌効果（第 3 章）

EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC に関して、その薬物動態及び二種類の汎用される移植癌である P388 白血病細胞と Sarcoma 180 固形肉腫への抗癌効果を評価した。両結合体は PG に溶解した溶液製剤として用いた。それらの溶液をラット腹腔内に投与して血漿中薬物濃度-時間プロファイルを、また担癌マウスの腹腔内に投与して抗癌効果をそれぞれ調べた。EB-glu-MMC 投与後において、EB-glu-MMC は投与初期において血漿中にわずかに検出されたが E-glu-MMC 及び MMC は長時間血漿中に観察された。E-glu-MMC 投与後においても同様の現象が観察されたが、血中滞留性は EB-glu-MMC よりも低かった。P388 白血病細胞への抗癌効果実験において、E-glu-MMC は EB-glu-MMC よりも比較的高い延命効果を示したが、両結合体ともに MMC の抗癌効果を上回らなかった。毒性は両結合体ともに低減した。Sarcoma 180 固形肉腫に対する抗腫瘍効果実験においては、両結合体ともに良好な結果を示し、副作用も低減した。特に EB-glu-MMC の 30 mg eq. MMC/kg 投与群において腫瘍体積の減少が試験後期に観察された。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は血中滞留性を向上させ、Sarcoma 180 固形肉腫に対して in vivo において良好な結果を示した。

#### 4. マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの新規結合体に関する in vivo 特性：懸濁液製剤での P388 白血病細胞と Sarcoma 180 固形肉腫に対する抗癌効果（第 4 章）

EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC に関して二種類の汎用される移植癌細胞である P388 白血病細胞と Sarcoma 180 固形肉腫への抗癌効果を評価した。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は 10%PG 含有生理食塩水中に懸濁した懸濁液製剤として用い、P388 白血病細胞もしくは Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウスの腹腔内に投与した。P388 白血病細胞に対する抗癌効果は MMC > E-glu-MMC > EB-glu-MMC の順に強く、MMC 及び E-glu-MMC のみに延命率の増加が認められた。一方、EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は高投与量で

MMC と同等以上の Sarcoma 180 腫瘍増殖抑制を示した。pH 7.4 の 1/15 M リン酸緩衝液と PG の混液 (9:1, v/v) 中, 37℃での MMC の放出は E-glu-MMC 懸濁液からの放出よりも EB-glu-MMC からの放出のほうがより緩やかであった。Sarcoma 180 固形肉腫に対する効果の検討において, 両結合体はゆっくりと MMC を供給し, 高投与量で高い薬効を示した。

#### 5. マイトマイシン C と安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの新規結合体に関する抗癌効果と副作用の評価 (第 5 章)

EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の副作用と抗癌効果の関係をより詳細に調べた。副作用の指標として白血球数の変化と体重の変化を観察した。Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウス群には溶液製剤及び懸濁液製剤を投与し比較した。また正常マウス群に溶液製剤を投与し腫瘍細胞を移植したマウス群と比較した。溶液製剤では両化合物は MMC の 5 mg/kg と同様の抗腫瘍効果を示した。両結合体について 30 mg eq./kg 投与群で大きな体重減少は観察されなかったが白血球数の減少が観察された。MMC は 10 mg/kg 投与群で致死的な副作用を示し, 著しい体重減少と白血球数の減少が観察された。懸濁液製剤では両結合体ともに 50mg eq./kg 投与群で MMC の 5 mg/kg 群より高い腫瘍増殖抑制効果を示し, EB-glu-MMC よりも E-glu-MMC において, 体重と白血球数の減少が観察された。副作用を評価する際, 腫瘍自体の存在が体重と白血球数の変化に影響した。しかしながら, 体重変化と白血球数の変化から評価した副作用については, 腫瘍細胞を移植したマウス群と正常マウス群の間ではほぼ同一程度に評価することが可能であった。

以上, 新規薬物-ホルモン結合体である EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の有用性を評価した。estramustine 及び bestabucil の研究においてこれらの薬剤がエストロゲンレセプター陽性癌ではない固形癌に対して強力な抗癌作用を示し, エストラジオール及びその誘導体が様々な固形癌に対する有効なホー

ミングリガンドとして機能する可能性が示されている。しかしながら、bestrabucil は chlorambucil と安息香酸エストラジオールとの結合体であるが、chlorambucil の抗癌活性部位はマスクされた形をとっていない。つまり、bestrabucil 自体が活性体ということである。本研究で合成した両結合体は MMC の抗癌活性部位はマスクされており、pH 依存的に MMC を放出するプロドラッグである。bestrabucil と EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC を比較した場合、その体内動態、組織移行性は異なっていた<sup>39)</sup>。bestrabucil はそれ自体が癌に集積することが示されている。これに対して EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は各組織に比較的高い親和性を示し、pH 依存的な放出特性によって体内で持続的に MMC を供給することにより、固形癌に対して有効性を示し、MMC の毒性を低減したと考えられる。

今日、エストラジオール及びその類縁物質と抗癌剤との結合体に関する多くの研究が行われている<sup>53-56)</sup>。これらの多くはエストロゲンレセプター陽性癌へのターゲティングを目的としている。例えばダウノマイシンと非ステロイド性エストロゲンとの結合体はエストロゲンレセプターに対する相対結合能が 0.85%であり、この結合体はエストロゲンレセプター陰性の癌よりもエストロゲンレセプター陽性癌である MCF-7 細胞に対して、より高い細胞毒性を示している。同実験でエストロゲンレセプターへの相対結合能がより低い化合物（相対結合能：0.079%）ではエストロゲンレセプター陽性癌と陰性癌に対する細胞毒性に差は認められなかった。今回合成した E-glu-MMC の相対結合能は 0.81%であり、ダウノマイシン-エストロゲン結合体の値に近い。E-glu-MMC もエストロゲンレセプター陽性癌へ特異的に結合することが期待されるが、詳細は今後の課題である。

本研究で得られた結果は、癌薬物治療の最適化に関する基礎的研究の一部として有意義な知見となるものである。

## 謝 辞

本研究に際し，終始御指導，御鞭撻を賜りました星薬科大学 医療薬剤学教室 町田良治教授，大西 啓助教授に深く感謝致します。

また，多大なるご支援をいただきました，キッセイ薬品工業株式会社 代表取締役 神澤陸雄 社長，取締役 岩垂正矩 副社長，取締役 赤羽増夫 研究本部長，製薬研究部長 百瀬傳一博士，研究企画部長 伊佐治正幸博士，製剤研究所長 大内清久修士に深く感謝致します。

本研究において御助言，御協力をいただきました星薬科大学 医療薬剤学教室の諸氏に感謝致します。

また，本研究の遂行にあたり御協力いただきました星薬科大学医療薬剤学教室 香取哲哉氏，山崎美佳氏，松崎 努氏ならびに後藤真弓氏に感謝致します。

## 実験の部

### 第 1 章の実験

#### 1. 材料

MMC は協和発酵株式会社より供されたもの、もしくは協和発酵社製マイトマイシン協和 S (NaCl と MMC のみを含有) を用いた。安息香酸エストラジオール及びエストラジオールは和光純薬製のものを用いた。その他の試薬はすべて特級品を使用した。

#### 2. 一般試験方法

UV スペクトルは BeckmanDU 分光機を使用して測定した。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルは JEOL JNM-GX270 によりテトラメチルシラン (TMS) を基準物質として測定した。EI-マススペクトルは JEOL JMS-D300 を、FAB-マススペクトルは JEOL JMS-SX102 を用いて測定した。薄層クロマトグラフィーはメルク社製 Art.5715 (シリカゲル 60F<sub>254</sub>) を用いた。

#### 3. 安定性試験溶液の調製

pH 4.0 の 1/15 M 酢酸緩衝液, pH 6.0, 7.0, 7.4 の 1/15 M リン酸緩衝液, pH 9.0, 11.0 の 1/15 M 炭酸緩衝液を調製し, イオン強度 ( $\mu$ ) を NaCl によって 0.3 に調整したものを安定性試験溶液として用いた。

#### 4. 安定性試験

EB-glu-MMC (2 mg) 及び E-glu-MMC (2 mg) を 10 mL の PG に溶解し, さらに PG で 40  $\mu$ g/mL になるように希釈した。この溶液 5 mL に緩衝液 ( $\mu=0.3$ ) 5 mL を添加し, さらにメンブランフィルター (0.45  $\mu$ m) でろ過した。このろ液 5 mL に 50% (v/v) PG 含有緩衝液 2 mL を添加し, 37℃でイン

キュベートした。経時的にサンプリングし HPLC により MMC, E-glu-MMC, EB-glu-MMC を分析した。

## 5. HPLC 分析

MMC, E-glu-MMC, EB-glu-MMC のそれぞれのサンプルを HPLC に直接注入し分析した。

### HPLC 条件

検出器：SPD-6A（島津製作所）

測定波長：364 nm

ポンプ：LC-6A（島津製作所）

流速：MMC；0.6 mL/min，EB-glu-MMC；0.9 mL/min，E-glu-MMC；  
0.7 mL/min

移動相：10 mM リン酸緩衝液（pH 6.0）：メタノール混液（v/v）

MMC；13：7，EB-glu-MMC；1：9，E-glu-MMC；1：3

カラム：SUMIPAX Nucleosil 5C18 (4 mm i.d. x 250 mm)

ガードカラム：Applied Biosystems RP-18NEW GUARD 7 micron  
(3.2 mm i.d. x 15 mm)

カラム温度：室温

## 第 2 章の実験

### 1. 試薬

[6,7-<sup>3</sup>H]エストラジオール (53 Ci/mmol) は Amersham International plc 製のものを、また液体シンチレーション用カクテル剤は PACKARD 社製、ピコフロー40 をそれぞれ購入して使用した。BCA Protein Assay kit は PIERCE 社製、Dextran T70 は Pharmacia Biotech 社製、また活性炭は SIGMA 社製のものをそれぞれ購入して使用した。その他の試薬はすべて特級品を用いた。

### 2. 動物

体重 200 g の雌性 Wistar ラット (6 週齢) 及び 3 週齢の雌性 SD ラットを埼玉実験動物より購入して使用した。なお、動物実験は星薬科大学動物実験ガイドラインに基づいて行った。

### 3. 安定性試験用試験液の調製

イオン強度 ( $\mu$ ) を塩化ナトリウムで 0.3 に調整した 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を緩衝液として用いた。雌性ラットからエーテル麻酔下で頸静脈より採血し、さらに肝臓を摘出した。血液は遠心分離し血漿を得た。血漿添加試験液 (10%血漿) は 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4,  $\mu=0.3$ ) /PG/ラット血漿 (4 : 5 : 1, v/v/v) の混液を用いた。また、摘出した肝臓 2 g に 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4,  $\mu=0.3$ ) を 2 mL 添加しテフロン製ホモジナイザーにより氷冷下でホモジネートした。肝ホモジネート添加試験液 (5%肝ホモジネート) は 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4,  $\mu=0.3$ ) /PG/肝ホモジネート (9 : 10 : 1, v/v/w) の混液を用いた。

### 4. 溶液中での安定性試験

EB-glu-MMC (2 mg) もしくは E-glu-MMC (2 mg) を 10 mL の PG に溶解

した。それぞれの溶液 4 mL に PG 16 mL さらに 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4,  $\mu=0.3$ ) を 20 mL 加え混和した後、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターによりろ過した。

#### (1) 10% (v/v) 血漿添加液中での安定性

上記 EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC のろ液 4 mL にラット血漿と PG の混液 (1 : 1, v/v) 1 mL を添加し、37℃ の水浴中でインキュベートした。MMC は 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4,  $\mu=0.3$ ) /PG/ラット血漿 (4 : 5 : 1, v/v/v) に 20  $\mu\text{g/mL}$  になるよう溶解し、同様にインキュベートした。各試験 3 例ずつ行い、それぞれ経時的にサンプリングし試験した。

#### (2) 5% (w/v) 肝ホモジネート液中での安定性

上記 EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC のろ液 4 mL に 50% (w/v) 肝ホモジネート溶液と PG の混液 (1 : 1, v/v) 1 mL を添加し、37℃ の水浴中でインキュベートした。MMC は 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4,  $\mu=0.3$ ) /PG/肝ホモジネート溶液 (9 : 10 : 1, v/v/w) に 20  $\mu\text{g/mL}$  になるよう溶解し、同様にインキュベートした。各試験 3 例ずつ行い、それぞれ経時的にサンプリングし試験した。

### 5. HPLC 分析

サンプリングした試料に同量のアセトニトリルを加えることにより除蛋白を行い、3000 rpm で 10 分間遠心分離した後、上清を試料溶液とし下記条件により絶対検量線法によって定量した。

#### HPLC 条件

検出器 : SPD-6A (島津製作所)

測定波長 : 364 nm

ポンプ : LC-6A (島津製作所)

流速：MMC；0.6 mL/min，EB-glu-MMC；0.9 mL/min，E-glu-MMC；

0.7 mL/min

移動相：10 mM リン酸緩衝液（pH 6.0）：メタノール混液（v/v）

MMC；13：7，EB-glu-MMC；1：9，E-glu-MMC；1：3

カラム：SUMIPAX Nucleosil 5C18 (4 mm i.d. x 250 mm)

ガードカラム：Applied Biosystems RP-18NEW GUARD 7 micron

(3.2 mm i.d. x 15 mm)

カラム温度：室温

## 6. エストロゲンレセプターに対する結合能

エストロゲンレセプター（ER）の調製は Toko ら<sup>21)</sup>，Agarwal ら<sup>22)</sup>の方法に従って行った。3 週齢の雌性 SD ラットを断頭後，子宮を摘出し，44 の子宮に 6 mL の TEGT 緩衝液（20 mM Tris-HCl 緩衝液，1.5 mM EDTA，5%（v/v）グリセロール，12  $\mu$ M モノチオグリセロール；pH 7.8）を加え，テフロン製ホモジナイザーにより氷冷下でホモジネートした。さらに TEGT 緩衝液で 2 子宮/mL になるように希釈後，遠心分離（105000 x g，75 分，2℃）し，サイトゾール画分（上清）を得た。サイトゾール画分中の総蛋白質量を BCA プロテインアッセイキットを用い測定した（n=3）。<sup>3</sup>H-エストラジオールは 10%DMF 含有 TEGT 緩衝液に溶解し ER 結合能実験に用いた。MMC，EB-glu-MMC，E-glu-MMC，エストラジオール（非標識体）は 20%DMF 含有 TEGT 緩衝液に溶解し <sup>3</sup>H-エストラジオールとの競合実験に用いた。

### （1）レセプターアッセイ

サイトゾール画分中のエストロゲンレセプターに対する <sup>3</sup>H-エストラジオールの結合定数及びサイト数を dextran-coated charcoal（DCC）法<sup>21,22)</sup>によ

って測定した。段階的に希釈した  $^3\text{H}$ -エストラジオール 50  $\mu\text{L}$  をサイトゾール画分 200  $\mu\text{L}$  に添加した。さらに 20% (v/v) DMF 含有 TEGT 緩衝液もしくは 100 倍過剰量のエストラジオール (非標識体) 200  $\mu\text{L}$  を添加し、2℃で 20 時間インキュベートした。その後 DCC スラリー (1% (w/v) Norit, 0.1% (w/v) Dextran70 含有 TEGT 緩衝液) を 300  $\mu\text{L}$  添加し、さらに 2℃で 30 分インキュベートした。遠心分離 (3000 rpm, 2℃, 10 分) 後上清を分取し、上清 300  $\mu\text{L}$  をシンチレーションカクテル 4 mL に添加し 2℃で一晩放置した。サンプルの放射活性を測定することによりエストロゲンレセプターに対する  $^3\text{H}$ -エストラジオールの結合量を測定した。 $^3\text{H}$ -エストラジオールの結合定数と結合サイト数は、総結合量から非特異的結合量を差し引くことによって特異的結合を求め、サイトゾール画分中のタンパク質濃度で補正した。この特異的結合について、サイトゾール画分中のエストロゲンレセプターの結合定数及び結合サイト数を Scatchard の方法によって次式に従い求めた。

$$[\text{Bound } ^3\text{H-estradiol}] / [\text{Free } ^3\text{H-estradiol}] = K \times (N - [\text{Bound } ^3\text{H-estradiol}])$$

ここで  $[\text{Bound } ^3\text{H-estradiol}]$  は結合したものの、 $[\text{Free } ^3\text{H-estradiol}]$  は遊離の  $^3\text{H}$ -エストラジオールの濃度で、 $K$  は結合定数、 $N$  は総結合サイト数である。

## (2) 競合結合試験

サイトゾール画分中のエストロゲンレセプターに対する  $^3\text{H}$ -エストラジオールと各化合物との競合結合実験を上記と同様に行った。12.6 nM の  $^3\text{H}$ -エストラジオール 50  $\mu\text{L}$  をサイトゾール画分 200  $\mu\text{L}$  に添加した。この溶液に競合物質として段階的に調製したそれぞれの薬物 50  $\mu\text{L}$  を添加し、2℃で 20 時間インキュベートした。レセプターアッセイと同様に DCC 法によりエストロゲンレセプターに結合した  $^3\text{H}$ -エストラジオールの量を測定した。それぞれの化合物が  $^3\text{H}$ -エストラジオールの特異的結合を 50% 阻害する濃度を算出した。また、エストラジオール (非標識体) の 50% 阻害濃度に対する各

化合物の 50%阻害濃度を相対結合能として算出した。

### 第3章の実験

#### 1. 動物

体重 200 g の雌性 Wistar ラット, 6 週齢, 体重 26-29 g の雌性及び雄性 ddY マウスを埼玉実験動物より購入して使用した。雄性 DBA/2 マウス及び 6 週齢, 体重 19-23 g の雌性 BDF1 マウスを日本クレアより購入して使用した。なお, 動物実験は星薬科大学動物実験ガイドラインに基づいて行った。

#### 2. 癌

P388 白血病細胞は  $1 \times 10^6$  細胞を 0.1 mL のハンクス液に懸濁させたものを雄性 DBA/2 マウスの腹腔内に移植して継代したものをを用いた。In vivo 抗癌作用実験においては, この P388 白血病細胞を  $1 \times 10^6$  細胞を 0.1 mL のハンクス液に懸濁させたものを雌性 BDF1 マウスの腹腔内に移植した。Sarcoma 180 固形肉腫細胞は  $1 \times 10^6$  細胞を 0.1 mL のハンクス液に懸濁させたものを雄性 ddY マウスの腹腔内に移植して継代したものをを用いた。In vivo 抗腫瘍効果実験においては, この Sarcoma 180 固形肉腫細胞  $1 \times 10^7$  細胞を 0.1 mL のハンクス液に懸濁させたものを雌性 ddY マウスの腋窩部の皮下に移植した。

#### 3. 腹腔内投与後の薬物動態特性

Wistar ラットは 25% (W/V) のウレタン-生理食塩水溶液を 1 g ウレタン/kg で腹腔内に投与し麻酔した。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は 2 mg/mL となるように PG 溶液に溶解した。それぞれの溶液を 5 mg eq. MMC/kg の投与量で腹腔内投与した。投与後, 0.5, 1, 2, 4, 7, 11 hr 後に頸静脈より 0.5 mL ずつ血液をサンプリングした。採取後すぐに 3000 rpm で 10 分間遠心分離し血漿を得た。その後血漿 0.2 mL に 2 mL のクロロホルム/2-プロパノール混液 (1:1, v/v) を添加し, 十分に攪拌後遠心して上清を得た。上清全量をガ

ラスチューブに移し、窒素気流下 40℃で乾固させた。この残渣を 100  $\mu$ L のメタノールで溶解し、この 20  $\mu$ L を HPLC によって分析し、EB-glu-MMC, E-glu-MMC 及び MMC を分析した。添加回収試験によりこれら化合物の回収率は 80%以上であった。薬物動態パラメータは MULTI<sup>41)</sup>を用いて計算した。

#### 4. HPLC 分析

MMC, E-glu-MMC, EB-glu-MMC のそれぞれのサンプルを HPLC に直接注入し分析した。

##### HPLC 条件

検出器：SPD-6A（島津製作所）

測定波長：364 nm

ポンプ：LC-6A（島津製作所）

流速：MMC；0.6 mL/min, EB-glu-MMC；0.9 mL/min, E-glu-MMC；  
0.7 mL/min

移動相：10 mM リン酸緩衝液（pH 6.0）：メタノール混液（v/v）

MMC；13：7, EB-glu-MMC；1：9, E-glu-MMC；1：3

カラム：SUMIPAX Nucleosil 5C18 (4 mm i.d. x 250 mm)

ガードカラム：Applied Biosystems RP-18NEW GUARD 7 micron  
(3.2 mm i.d. x 15 mm)

カラム温度：室温

#### 5. P388 白血病細胞に対する抗癌作用

移植 24 時間後に MMC, EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC を PG に溶解した溶液製剤として P388 白血病細胞を移植したマウスの腹腔内に投与した。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は 5, 10 mg eq. MMC/kg 投与群においては 2 mg/mL 溶液として、また 15, 20 mg eq. MMC/kg 投与群においては 5 mg/mL 溶液を用いた。コントロール群には薬物投与群の溶媒の平均投与量

の PG を投与した。すべてのマウスの移植後の生存時間を 2 ヶ月間観察した。薬物処置群の平均生存時間をコントロール群の平均生存時間と比較して、延命率 (ILS) を下記の式により算出して抗癌効果の指標とした<sup>57)</sup>。

$$\text{ILS (\%)} = (\text{T/C}-1) \times 100$$

T: 薬物投与群の平均生存日数

C: コントロール群の平均生存日数

また、各群のマウスの体重を測定し、その減少度を調べて副作用の指標とした。

#### 6. Sarcoma 180 固形肉腫細胞に対する抗腫瘍効果

移植 4 日後に MMC, EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC を PG に溶解した溶液製剤として Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウスの腹腔内に投与した。EB-glu-MMC は 5, 10, 20, 30 mg eq. MMC/kg 投与群においては 20 mg/mL 溶液として、E-glu-MMC は 5 mg eq. MMC/kg 投与群においては 5 mg/mL 溶液として、10, 20 mg eq. MMC/kg 投与群においては 10 mg/mL 溶液として、30 mg eq. MMC/kg 投与群においては 20 mg/mL 溶液としてそれぞれ用いた。コントロール群にはほぼ同量の PG を投与した。すべてのマウスの腫瘍体積を測定した。腫瘍の長径 (L: cm) と短径 (W: cm) をノギスで測定し、腫瘍体積 (V: cm<sup>3</sup>) を計算した<sup>15)</sup>。

$$V=L \times W^2/2$$

L: 腫瘍の長径 (cm)

W: 腫瘍の短径 (cm)

また、各群のマウスの体重を測定し、その減少度を調べて副作用の指標とした。

## 第 4 章の実験

### 1. 癌

P388 白血病細胞は  $1 \times 10^6$  細胞を 0.1 mL のハンクス液に懸濁させたものを雄性 DBA/2 マウスの腹腔内に移植して継代したものを用いた。In vivo 抗癌作用実験においては、この P388 白血病細胞を  $1 \times 10^6$  細胞を 0.1 mL のハンクス液に懸濁させたものを雌性 BDF1 マウスの腹腔内に移植した。Sarcoma 180 固形肉腫細胞は  $1 \times 10^6$  細胞を 0.1 mL のハンクス液に懸濁させたものを雄性 ddY マウスの腹腔内に移植して継代したものを用いた。In vivo 抗腫瘍効果実験においては、この Sarcoma 180 固形肉腫細胞  $1 \times 10^7$  細胞を 0.1 mL のハンクス液に懸濁させたものを雌性 ddY マウスの腋窩部の皮下に移植した。なお、動物実験は星薬科大学動物実験ガイドラインに基づいて行った。

### 2. P388 白血病細胞に対する抗癌作用

移植 24 時間後に MMC, EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC を懸濁液製剤として P388 白血病細胞を移植したマウスの腹腔内に投与した。MMC は生理食塩水と PG との混液 (9:1, v/v) (10%PG 生食液) に溶解し、移植 24 時間後に 2.5, 5, 10 mg/kg (0.1 mL/マウス) を投与した。コントロール群は移植 24 時間後に同量の 10%PG 生食液を投与した。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は 10%PG 生食液にガラス製ホモジナイザーを用いて懸濁し、懸濁液製剤を調製した。EB-glu-MMC の懸濁液製剤を移植 24 時間後に 10, 25, 50 mg eq. MMC/kg (0.4 mL/マウス) 及び 75 mg eq. MMC/kg (0.35 mL/マウス) で投与した。コントロール群は移植 24 時間後に同量の 10%PG 生食液を投与した。E-glu-MMC の懸濁液製剤を移植 24 時間後に 10, 25, 50 mg eq. MMC/kg (0.35 mL/マウス) 及び 75 mg eq. MMC/kg (0.3 mL/マウス) で投与した。コントロール群は移植 24 時間後に同量の 10%PG 生食液を投与した。すべてのマウスにつき移植後の生存時間を 2 ヶ月間観察した。薬

物処置群の平均生存時間をコントロール群の平均生存時間を比較して、延命率（ILS）を下記の式により算出して抗癌効果の指標とした<sup>57)</sup>。

$$\text{ILS (\%)} = (\text{T/C}-1) \times 100$$

T：薬物投与群の平均生存日数

C：コントロール群の平均生存日数

また、各群のマウスの体重を測定し、その減少度を調べて副作用の指標とした。体重は移植直前の値を体重の初期値とした。

### 3. Sarcoma 180 固形肉腫細胞に対する抗腫瘍効果

移植 4 日後にそれぞれの化合物の懸濁液製剤を Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウスの腹腔内に投与した。MMC は 10%PG 生食液に 2 mg/mL で溶解し、2.5, 5, 10 mg/kg を投与した。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は 10%PG 生食液に 10 mg/mL で懸濁し、25, 50, 70 mg eq. MMC/kg を投与した。これらの懸濁液製剤は投与直前にガラス製ホモジナイザーでホモジナイズした。コントロール群は各個体に 0.22 mL の 10%PG 生食液を投与した。すべてのマウスの腫瘍体積を測定した。腫瘍の長径（L：cm）と短径（W：cm）をノギスで測定し、腫瘍体積（V：cm<sup>3</sup>）を計算した<sup>15)</sup>。

$$V=L \times W^2/2$$

L：腫瘍の長径（cm）

W：腫瘍の短径（cm）

投与直前の腫瘍体積を腫瘍体積の初期値とした。腫瘍増殖率は腫瘍体積の初期値に対する比として計算し、増殖抑制率（growth inhibition (%)）を下記の式に従い算出して抗腫瘍効果の指標とした。

$$\text{growth inhibition (\%)} = \{1 - G(T) / G(C)\} \times 100$$

G (C)：コントロール群の癌増殖率

G (T)：薬物処置群の癌増殖率

また、各群のマウスの体重を測定し、その減少度を調べて副作用の指標とした。体重は投与直前（移植後 4 日）の値を体重の初期値とした。

#### 4. MMC 放出試験

EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC を PG に 20  $\mu\text{g/mL}$  となるように溶解した。その液 1 mL に pH 7.4, 1/15 M リン酸緩衝液 ( $\mu=0.3$ ) を 9 mL 添加して懸濁液とした。この懸濁液を 37℃ でインキュベートし、十分攪拌した後、経時的に 200  $\mu\text{L}$  サンプリングした。このサンプル 20  $\mu\text{L}$  を直接 HPLC に注入し分析した。

##### HPLC 条件

検出器：SPD-6A（島津製作所）

測定波長：364 nm

ポンプ：LC-6A（島津製作所）

流速：0.6 mL/min

移動相：10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)：メタノール混液（13：7）

カラム：SUMIPAX Nucleosil 5C18 (4 mm i.d. x 250 mm)

ガードカラム：Applied Biosystems RP-18NEW GUARD 7 micron  
(3.2 mm i.d. x 15 mm)

カラム温度：室温

## 第 5 章の実験

### 1. 動物

6 週齢，体重 26-29 g の雌性及び雄性 ddY マウスを埼玉実験動物より購入して使用した。動物は  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ， $60\pm 5\%\text{RH}$  環境下でオリエンタル酵母社製 MF を給餌，水は自由摂取させ飼育した。本実験プロトコールは星薬科大学動物実験委員会によって承認され，動物実験は星薬科大学実験動物の処置及び使用に関する要綱にしたがって行った。

### 2. 癌

Sarcoma 180 固形肉腫細胞 ( $1\times 10^6$  cells) をハンクス 緩衝液に懸濁し (0.1 mL)，一週間毎に 6 週齢の ddY 系雄性マウスの腹腔内で継代したものをを用いた。in vivo 抗腫瘍効果実験では継代した Sarcoma 180 固形肉腫細胞 ( $1\times 10^7$  cells) をハンクス 緩衝液に懸濁し (0.1 mL)，6 週齢の ddY 系雌性マウスの腋窩部に移植した。正常マウスは同様に 6 週齢の ddY 系雌性マウスを用いた。すべての抗腫瘍効果及び副作用評価実験において雌性マウスを用いた。

### 3. 投与液の調製

#### (1) 溶液製剤

MMC は 5 mg/mL となるように PG に溶解した。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は 20 mg/mL となるように PG に溶解した。MMC の PG 溶液を 5, 10 mg/kg となるように腹腔内に投与した。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の PG 溶液を 10, 30 mg eq. MMC/kg となるように腹腔内に投与した。コントロールには同様に PG を用い，30 mg eq. MMC /kg 薬物投与群の平均投与量 0.1 mL を腹腔内に投与した。

## (2) 懸濁液製剤

MMC は 2 mg/mL となるように 10%PG 含有生理食塩水に溶解し、投与量として 2.5, 5 mg/kg となるように腹腔内に投与した。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は 10%PG 含有生理食塩水に 10 mg/mL となるように加え、ガラス製ホモジナイザーを用い懸濁した。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC の 10%PG 懸濁液を 25, 50, 75 mg eq. MMC/kg となるように腹腔内に投与した。コントロールには同様に 10%PG 含有生理食塩水用い、0.22 mL を腹腔内に投与した。

### 4. Sarcoma 180 固形肉腫細胞に対する抗腫瘍効果

Sarcoma 180 細胞移植後 4 日目に薬物を腹腔内投与した。腫瘍体積 (V, cm<sup>3</sup>) は腫瘍部の長径 (L, cm), 短径 (W, cm) を測定し下記の式より算出した<sup>15)</sup>。

$$V = L \times W^2 / 2$$

腫瘍体積は薬物投与直前の値を初期腫瘍体積値として用いた。腫瘍増殖率は移植後 4 日目の腫瘍体積に対する比として算出した。増殖抑制率はコントロール群の腫瘍増殖率 (G (C)) と薬物処置群の腫瘍増殖率 (G (T)) を下記の式より算出した<sup>7)</sup>。

$$\text{growth inhibition (\%)} = \{1 - G(T) / G(C)\} \times 100$$

### 5. Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウス群における副作用の指標とした白血球数及び体重の変化

経時的に白血球数を算定することにより副作用の指標として観察した。体重は薬物投与直前の値を初期値として用い、体重変化は初期体重値に対する比として計算した。Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植後 4, 11, 18 日目 (薬物投与後 0, 7, 14 日目) に尾静脈より経時的に採血 (10 µL) した。血液を

Türk 液により 10 倍に希釈し，血球計算盤の 0.1  $\mu\text{L}$  の区画を 4 箇所測定しその平均値を 100 倍することにより 1  $\mu\text{L}$  中の白血球数を算定した。

#### 6. 正常マウス群における副作用の指標とした白血球数及び体重の変化

正常マウス群に溶液製剤の薬物を投与した後，経時的に白血球数及び体重を観察した。体重は薬物投与直前の値を初期値として用い，体重変化は初期体重値に対する比として計算した。Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウス群と同様に薬物投与後 0, 7, 14 日目に尾静脈より経時的に採血した。血液は Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウスと同様に処理し白血球を算定した。

#### 7. Sarcoma 180 固形肉腫細胞を移植したマウス群における EB-glu-MMC の体内分布

抗腫瘍効果の項と同様に雌性マウスに移植した。Sarcoma 180 固形肉腫細胞移植後 10～14 日目に，懸濁液製剤の EB-glu-MMC を MMC 量として 10 mg/kg 腹腔内投与した。薬物投与後 1, 3, 6 時間後に断頭し，血液と各臓器（肝臓，心臓，脾臓，肺，胸腺，卵巣，子宮，癌，腎臓）を採取した。各臓器の重量を量り，胸腺は重量の 10 倍量，肝臓は 1/2 倍量，他の臓器は 3 倍量の 1/15 M リン酸緩衝液（pH 7.4）を加えた後，ホモジネートした。また，血液は遠心分離（3000 rpm, 10 min）し血漿を得た。ホモジネート及び血漿 100  $\mu\text{L}$  に 0.1 M リン酸緩衝液（pH 9.0）を 400  $\mu\text{L}$  及びクロロホルム／イソプロパノール混液（1:1,w/w）5 mL を加えて振とう混和した後，遠心分離して上清を採取した。この上清を乾固して得られた残渣にメタノール 100  $\mu\text{L}$  を加えて試料溶液とし，HPLC により定量した。それぞれの組織からの回収率は一定量の MMC, EB-glu-MMC, E-glu-MMC を未処置マウスから調製した血漿及びホモジネートした各組織に添加し，上記試験方法と同様に

試験した。その結果 MMC, EB-glu-MMC, E-glu-MMC はほぼ完全に回収されることが確認された。

#### 8. HPLC 分析

島津 LC-6A を用い, UV 波長 364 nm (SPD-6A) にて分析した。カラムは SUMIPAX Nucleosil 5C18 (4 mm i.d.X250 mm)を用い, ガードカラムとして Applied Biosystems RP-18 NEW GUARD 7micron (3.2 mm i.d.X15 mm)を用いた。10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) メタノール混液を移動相として用い, それぞれ MMC は 13:7 (v/v), EB-glu-MMC は 1 : 9 (v/v), E-glu-MMC は 1 : 4 (v/v) の比で分析した。MMC, EB-glu-MMC および E-glu-MMC における流速はそれぞれ 0.6 mL/min, 0.9 mL/min および 0.7 mL/min とした。

## 引用文献

1. Carter S. K., Crooke S. T. (eds), Mitomycin C: Current status and new developments," Academic Press, New York, 1979.
2. Sasaki H., Mukai E., Hashida M., Kimura T., Sezaki H., Development of lipophilic prodrugs of mitomycin C. I . Synthesis and antitumor activity of 1a-N-substituted derivatives with aromatic pro-moiety, *Int. J. Pharmaceut.*, **15**, 49-59 (1983).
3. Sasaki H., Mukai E., Hashida M., Kimura T., Sezaki H., Development of lipophilic prodrugs of mitomycin C. II . Synthesis and bioactivation of 1a-N-substituted derivatives with aromatic pro-moiety, *Int. J. Pharmaceut.*, **15**, 61-71 (1983).
4. Sasaki H., Fukumoto M., Hashida M., Kimura T., Sezaki H., Development of lipophilic prodrugs of mitomycin C. III . Physicochemical and biological properties of newly synthesized alkoxycarbonyl derivatives, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 4083-4090 (1983).
5. Tokunaga Y., Iwasa T., Fujisaki J., Sawai S., Kagayama A., Liposomal sustained-release delivery systems for intravenous injection. I . Physicochemical and biological properties of newly synthesized lipophilic derivatives of mitomycin C, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3060-3069 (1988).
6. Tokunaga Y., Iwasa T., Fujisaki J., Sawai S., Kagayama A., Liposomal sustained-release delivery systems for intravenous injection. II . Design of liposome carriers and blood disposition of lipophilic mitomycin C prodrug-bearing liposomes, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3557-3564 (1988).
7. Tokunaga Y., Iwasa T., Fujisaki J., Sawai S., Kagayama A., Liposomal sustained-release delivery systems for intravenous injection. III . Antitumor

- activity of lipophilic mitomycin C prodrug-bearing liposomes, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3565-3573 (1988).
8. Kato A., Takakura Y., Hashida M., Kimura T., Sezaki H., Physico-chemical and antitumor characteristics of high molecular weight prodrugs of mitomycin C, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2951-2957 (1982).
  9. Hashida M., Takakura Y., Matsumoto S., Sasaki, H., Kato A., Kojima T., Muranishi S., Sezaki H., Regeneration characteristics of mitomycin C-dextran conjugate in relation to its activity, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2055-2063 (1983).
  10. Matsumoto S., Arase Y., Takakura Y., Hashida M., Sezaki H., Plasma disposition and in vivo and in vitro antitumor activities of mitomycin C-dextran conjugate in relation to the mode of action, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2941-2947 (1985).
  11. Kaneo Y., Tanaka T., Iguchi S., Preparation and properties of a mitomycin C-albumin conjugate, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2614-2616 (1990).
  12. Tanaka T., Kaneo Y., Iguchi S., Properties of mitomycin C-albumin conjugates in vitro and in vivo, *Bioconjugate Chem.*, **2**, 261-269 (1991).
  13. Song Y., Onishi H., Nagai T., Synthesis and drug-release characteristics of the conjugates of mitomycin C with N-succinyl-chitosan and carboxymethyl-chitin, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2822-2825 (1992).
  14. Sato M., Onishi H., Kitano M., Machida Y., Nagai T., Preparation and drug release characteristics of the conjugates of mitomycin C with glycol-chitosan and N-succinyl-chitosan, *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 241-245 (1996).
  15. Takakura Y., Fujita T., Hashida M., Sezaki H., Disposition and tumor localization of mitomycin C-dextran conjugates in mice, *Pharm Res.*, **4**, 293-300 (1987).

16. Takakura Y., Fujita T., Hashida M., Sezaki H., Disposition characteristics of macromolecules in tumor-bearing mice, *Pharm Res.*, **7**, 339-346 (1990).
17. Kato Y., Tsukada Y., Hara T., Hirai H., Enhanced antitumor activity of mitomycin C conjugated with anti- $\alpha$ -fetoprotein antibody by novel method of conjugation, *J. Appl. Biochem.*, **5**, 313-319 (1983).
18. Noguchi A., Takahashi T., Yamaguchi T., Kitamura K., Takakura Y., Hashida M., Sezaki H., Tumor localization and in vivo antitumor activity of the immunoconjugate composed of anti-human colon cancer monoclonal antibody and mitomycin C-dextran conjugate, *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 219-226 (1991).
19. Akima K., Ito H., Iwata Y., Matsuo K., Watari N., Yanagi M., Hagi H., Oshima K., Yagita A., Atomi Y., Takekawa I., Evaluation of antitumor activities of hyaluronate binding antitumor drugs: synthesis, characterization and antitumor activity, *J. Drug Targeting*, **4**, 1-8 (1996).
20. Varga J.M., "Methods in Enzymology," Vol.112, ed. by Widder K.J., Green R., Academic Press, Inc., Orlando, 1963, p.259-269.
21. Toko T., Sugimoto Y., Matsuo K., Yamasaki R., Takeda S., Wierzbka K., Asao T., Yamada T., TAT-59, a new triphenylethylene derivative with antitumor activity against hormone-dependent tumors, *Eur. J. Cancer*, **26**, 397-404 (1990).
22. Agarwal A.K., Bindal R.D., Estrogen receptor-binding affinity of tamoxifen analogs with various side chains and their biologic profile in immature rat uterus, *Steroids*, **56**, 486-489 (1991).
23. Sutherland R.L., Murphy L.C., Foo M.S., Green M.D., Whybourne M., Krozowski Z.S., High-affinity anti-oestrogen binding site distinct from the oestrogen receptor, *Nature*, **288**, 273-275 (1980).

24. Benz C., Cadman E., Gwin J., Wu T., Amara J., Eisenfeld A., Daaies, P.,  
Tamoxifen and 5-fluorouracil in breast cancer: cytotoxic synergism in vitro,  
*Cancer Res.*, **43**, 5298-5303 (1983).
25. Malet C., Gompel A., Spritzer P., Bricout N., Yaneva H., Mowszowicz I.,  
Kuttenn F., Mauvais-Jarvis P., Tamoxifen and hydroxytamoxifen isomers  
versus Estradiol effects on normal human breast cell in culture, *Cancer Res.*,  
**48**, 7193-7199 (1988).
26. Buzdar A.U., Hortobagyi G.N., Tamoxifen and toremifene in breast cancer:  
comparison of safety and efficacy, *J. Clin. Oncol.*, **16**, 348-353 (1998).
27. Ellmen J., Werner D., Hakulinen P., Keiling R., Fargeot P., Falkson G.,  
Bezвода W.R., Dose-dependent hormonal effects of toremifene in  
postmenopausal breast cancer patients, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **45**,  
402-408 (2000).
28. Brigger I., Chaminade P., Marsaud V., Apple M., Besnard M., Gurny R.,  
Renoir M., Couvreur P., Tamoxifen encapsulation within polyethylene  
glycol-coated nanospheres. A new antiestrogen formulation, *Int. J. Pharm.*,  
**214**, 37-42 (2001).
29. Chawla J.S., Amiji M.M., Biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles  
for tumor-targeted delivery of tamoxifen, *Int. J. Pharm.*, **249**, 127-138  
(2002).
30. Kieseewetter D.O., Kilbourn M.R., Landvatter S.W., Heiman D.F.,  
Katzenellenbogen J.A., Welch M.J., Radiochemistry and  
radiopharmaceuticals, *J. Nucl. Med.*, **25**, 1212-1221 (1984).
31. Spelsberg T.C., Graham M.L., Berg N.J., Umehara T., Riel E., Coulam C.B.,  
Ingle J.N., A nuclear binding assay to assess the biological activity of  
steroid receptors in isolated animal and human tissues, *Endocrinology*, **121**,

- 631-644 (1987).
32. Jensen E.V., DeSombre E.R., Estrogen-receptor interaction, *Science*, **182**, 126-134 (1973).
  33. Mittelman A., Shukla S.K., Murphy G.P., Extended therapy of stage D carcinoma of the prostate with oral estramustine phosphate, *J. Urol.*, **115**, 409-412 (1976).
  34. Ozaki M., Matsuda M., Muramatsu S., Antitumor effect of estramustine phosphate disodium (EMP) in mice, *Jpn. Pharmacol. Ther.*, **8**, 3707-3710 (1980).
  35. Yamanaka H., Shida K., The pharmacology and metabolism of a new therapeutic drug for prostatic cancer "ESTRACYT", *Jpn.J. Cancer Chemother.*, **11**, 537-544 (1984).
  36. Yamanaka H., Imai K., Suzuki T., Yuasa H., Takahashi E., Estracyt (estradiol-nitrogen mustard complex)-estramustine binding protein and its specificity, *Jpn. J. Cancer Chemother.*, **11**, 2106-2114 (1984).
  37. Masui O., Sakauchi K., Tamura H., Suzuki F., Wada N., Asano K., Enomoto S., Hotta T., Ohsawa N., Proceedings of the Japanese Cancer Association 45<sup>th</sup> Annual Meeting, Sapporo, 1986, p.379.
  38. Tamura H., Sakauchi K., Asano K., Enomoto S., Hotta T., Fujita H., Concentration of KM2210 (bestrabucil) in plasma, tumor and other tissues in tumor-bearing mice – concentration in plasma and tissues and antitumor characteristics in Walker 256-bearing mice, and their correlation to number of peripheral white blood cells, *Clin. Rep.*, **20**, 1835-1846 (1986).
  39. Concentration of <sup>14</sup>C-KM2210 in plasma and other tissues in tumor-bearing mice, Tamura H., Sakauchi K., Masui O., Asano K., Enomoto S., Hotta T., Fujita H., *Clin. Rep.*, **20** 1847-1863 (1986).

40. Wada T., Asano K., Enomoto S., Hotta T., Binding characteristics of KM2210 (bestrabucil) and its metabolites to the estrogen receptor, *Clin Rep.*, **20**, 1985-1988 (1986).
41. Yamaoka K., Tanigawa T., Nakagawa T., Uno T., A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **4**, 879-885 (1981).
42. Song Y., Onishi H., Machida Y., Nagai T., Drug release and antitumor characteristics of N-succinyl-chitosan mitomycin C as an implant, *J. Control. Release*, **42**, 93-100 (1996).
43. Schwartz H.S., Philips F.S., Pharmacology of mitomycin C II. Renal excretion and metabolism by tissue homogenates, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **133**, 335-342 (1961).
44. Sica V., Parikh I., Nola E., Puca G.A., Cuatrecasas P., Affinity chromatography and the purification of estrogen receptors, *J. Biol. Chem.*, **248**, 6543-6558 (1973).
45. Sato M., Onishi H., Takahara J., Machida Y., Nagai T., In vivo drug release and Antitumor characteristics of water-soluble conjugates of mitomycin C with glycol-chitosan and N-succinyl-chitosan, *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1170-1177 (1996)
46. Hatta T., Hossenlopp C., Takita H., Studies on mitomycin C especially method of administration, *Cancer Chemother. Rep.*, **13**, 67-77 (1961).
47. Hashida M., Kato A., Takakura Y., Sezaki H., Disposition and pharmacokinetics of a polymeric prodrug of mitomycin C, mitomycin C-dextran conjugate, in the rat, *Drug Metab. Dispos.*, **12**, 492-499 (1984).
48. Imai R., Morimoto M., Marumo H., Kobayashi T., Tsuruo T., Inaba M., Tsukagoshi S., Sakurai T., Antitumor activity of 7-N-(p-hydroxyphenyl)-

- mitomycin C in experimental tumor systems, *Gann*, **72**, 944-949 (1981).
49. Imai R., Morimoto M., Comparative antitumor activities of 7-*N*-(*p*-hydroxyphenyl) mitomycin C (M-83) and mitomycin C, *J. Antibiot.*, **36**, 559-565 (1983).
  50. Kobayashi T., Inaba M., Tsukagoshi S., Sakurai Y., Imai R., Morimoto M., Comparison of the hematologic toxicity of 7-*N*-(*p*-hydroxyphenyl)-mitomycin C and mitomycin C, *Gann*, **72**, 950-954 (1981).
  51. Futamura Y., Matsumoto K., Characteristics of peripheral blood monocytes and bone marrow macrophages from rats treated with mitomycin C, 5-fluorouracil or phenylhydrazine, *J. Toxicol. Sci.*, **20**, 1-7 (1995).
  52. Fujita H., Pharmacokinetics of mitomycin C and its derivative KW-2083, *Jap. J. Cancer Chemother.*, **9**, 1362-1373 (1982).
  53. Devraj R., Barret J. F., Fernandez J. A., Katzenellenbogen J. A., Cushman M., Design, synthesis, and biological evaluation of ellipticine-estradiol conjugates, *J. Med. Chem.*, **39**, 3367-3374 (1996).
  54. Kuduk S. D., Zheng F. F., Sepp-Lorenzino L., Rosen N., Daishefsky S. J., Synthesis and evaluation of geldanamycin-estradiol hybrids, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1233-1238 (1999).
  55. Kasiotis K. M., Magiatis P., Pratsinis H., Skaltsounis A-L., Abadji V., Charalambous A., Moutsatsou P., Haroutounian S. A., Synthesis and biological evaluation of novel daunorubicin-estrogen conjugates, *Steroids*, **66**, 785-791 (2001).
  56. Liu C., Strobl J. S., Bane S., Schilling J. K., McCracken M., Chatterjee S. K., Rahim-Bata R., Kingston D. G. I., Design, synthesis, and bioactivities of steroid-linked taxol analogues as potential targeted drug for prostate and breast cancer, *J. Nat. Prod.*, **67**, 152-159 (2004).

57. Hashida M., Kato A., Kojima T., Muranishi S., Sezaki H., Tanigawa N., Satomura K., Hikasa Y., Antitumor activity of mitomycin C-dextran conjugate against various murine tumors, *Gann*, **72**, 226-234 (1981).