

Dibromohexitol の抗腫瘍効果と作用機序

The Antitumor Effects of Dibromohexitol and its Mechanisms

長谷川嘉成, 石川信雄

YOSHINARI HASEGAWA and NOBUO ISHIKAWA

(Hoshi College of Pharmacy)

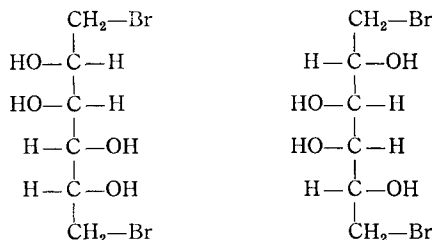
はじめに

細胞効果を有する最初の糖 alcohol は, Vargha¹⁾ により mannitol 骨格に nitrogen mustard (HN 2) の活性基を結合させて作られた degranol である. ついで Vargha と Kuszmann²⁾, Haddow ら³⁾ がほとんど同時に mannitol に myleran (buslfan) の活性基を結合させた mannitol-myle-
ran (MM) を作り, Kellner と Németh^{4, 5)} によりこの化合物の細胞効果が証明された.

先の研究者達とは別に, Institoris と Horváth⁶⁾ は細胞毒活性を持つ官能基を分子中に取り込ませるという従来の考え方ではなく, MM から反応性, 極在性, 分子の大きさなどを関係づけて, α , ω -置換-糖 alcohol 誘導体の新しい抗腫瘍剤を作り出そうとした. 彼等は mesyloxy 基の代りに, 分子中に関連官能基を入れて細胞効果が残存していれば, この方法で MM の阻害効果による分子の性質に関する情報が得られるものと考えた. 重い halogen 置換体と mesyloxy 基の性質が似ていることと, 脂肪親和性の炭素-halogen および親水性の alcohol 残基の存在で, これらの化合物が生物体での移動に適することを見込んで, 糖 alcohol に臭素および沃素を結合させた. かくして抗腫瘍活性を有する dibromomannitol (DBM) の合成が 1961 年に完成され, ついで 1967 年に DBM の立体異性体である dibromodulcitol (DB-

D) も合成された⁷⁾.

著者らはこれら薬剤の抗腫瘍作用を総括して紹介し, 作用機序に関する綜説を試みることにする.



1, 6-dibromo-1, 6-dideoxy- 1, 6-dibromo-1, 6-dideoxy-
D-mannitol (DBM) Dulcitol (DBD)

1. 実験腫瘍に対する効果

DBM は吉田肉腫の皮下移植に対して 1/20 LD₅₀ の投与量 (po, ip) で増殖抑制作用を示し, また移植 12~14 日後に 150 mg/kg を投与する場合でも著明な抑制作用を示している⁸⁾. しかし他の腫瘍に対する効果は弱く, Walker 256 癌肉腫に対する有効量は 1 回投与 118 mg/kg (ip) であり治療係数は 8 以下となる⁹⁾. リンパ性腫瘍の NK/Ly lymphoma に対しては全く効果を示さないが, このことは DBM が骨髄向性であることを示唆するものである. 著者ら¹⁰⁾ はラット腹水腫瘍の内, 吉田肉腫のほかに腹水肝癌 AH-13 で細胞効果を認めたので, さらに DBM による延命効果を mito-

mycin C (MT-C) と比較して求めた。その結果 AH-13 に対して DBM は MT-C よりも効果は高く、 po で 9/10 匹が60日間生存するという好成績が得られた。

DBD の実験腫瘍に対する効果は DBM よりも広範囲のスペクトラムを示している^{11,12)}。高感受性の吉田, Walker, Shay 腫瘍に対しては、10~30 mg/kg, 1 回投与で著効を示し、耐性腫瘍に対しては100~200 mg/kg, 6~10回投与で効果を示す。DBM と異なり DBD が L-1210 に効果を示すことも注目すべき点であろう¹³⁾。

2. 血行性転移阻止効果

Csányi¹⁴⁾ は種々の腹水型移植腫瘍を動物の尾静脈内に移入し、腫瘍性異細胞血症を起させるという方法で DBM の転移阻止効果をしらべた。DBM 200 mg/kg (ip) を移植15分前に行なった場合、動物の80%を吉田肉腫の転移から阻止出来た。移植24時間後の場合は100 mg/kg \times 4 の治療で4/9 匹に効果を認めている。同様に、Walker, Ehrlich 腫瘍の場合も効果が得られ、特に後者の腹腔内移植腫瘍に対する治療効果が弱いことを考えあわせると興味深い。

DBD 処置後に Walker 256 癌肉腫を移植した動物では、検出可能な循環細胞は1~3時間後の初期に減少する。経時的に見て腫瘍細胞が完全に血中から除かれることはないが、対照群よりもずっと少なくなっている。さらに治療動物群では転移は認められない^{12,15)}。

3. In Vitro での効果

吉田肉腫細胞に DBM を接触させた後の移植性に関しては、阻害効果は37°C, 2時間孵置する場合10~20 μ g/ml である。これは4°C よりも37°C に於ける場合の方が約30倍も強いことから温度依存性であると言える¹⁶⁾。

HeLa 細胞を培養して細胞形態学への影響を検討した場合、DBM の細胞毒性効果は強いとは言えない¹⁷⁾。

24時間処理で細胞に障害を与える最小濃度は25 μ g/ml であり、完全に破壊せしめる濃度は1000 μ g/ml である。前者の低濃度では有糸分裂の減少が明らかであり、異常ポリプロイド分裂が行なわれ、多核巨細胞も大量に出現している。異常不規則性細胞としては極性染色体、3極中期分裂体、星状中期分裂体、染色体破壊および橋状体形成等がみられる。DBM, DBD 処理後のエオジン好性体は核酸代謝阻害によるいくつかの空胞として認められ、食作用は薬剤量に関係なく48時間処理後に始まる。しかしその後の研究¹⁸⁾で悪性細胞の食作用が薬剤量と時間に依存することを観察している。Kellner ら¹⁹⁾は培養細胞の形態学によるスクリーニング方法にかけ、DBM, DBD が HeLa 細胞に対して明らかな効果を示すことを確かめている。

4. 腫瘍細胞の限外構造に与える影響

Lapis と Benedeczy²⁰⁾ は Shay 緑色白血病細胞を新生児に移植して、6~7日後に hexitol 誘導体を投与した。細胞構造の変化は1時間から168時間まで観察し、DBM の1回大量投与時には核および核小体に変化が起こるが、少量分割投与では核よりも細胞質に変化を多く認めている。DBM 投与3~12時間後に mitochondria で著変が見られ、続いて ribosome の集積をとめない、粗面小胞体の空胞化に至る。さらに脂肪滴、自己食作用による空胞および myelin 体の増加が見られる。

DBD の大量1回投与では、Shay 緑色腫に短時間のうちに激しい傷害が起り、核の電子密度が低下する。Chromatin は核膜に沿うか核形質中で塊状に固まる。一方少量分割投与では lysosome の変性が最も特徴的なもので、これは糖 alcohol 誘導体以外の他のどんな薬剤でも起こっていない変化である。

薬剤由来の強酸(臭化水素酸)の放出により pH が変化し、lysosome 酵素は至適 pH に達し、細胞器官を構築している生体高分子物質の状態、

機能および細胞内膜の透過性に変化を与える。そして mitochondria の膨化を惹起するものと推察されている。これらの変化が dibromohexitol の作用機作に関して最も重要なものと考えられる。

5. 交叉耐性

Dibromohexitol と数種のアシル化剤の間には交叉耐性が存在する。DBM は degranol 耐性 NK/Ly および Eerlich 腹水腫瘍に対して^{21, 22)}、また HN 2 耐性吉田肉腫に対して²³⁾交叉耐性を示す。DBM で作った吉田肉腫耐性株細胞は骨髄向性薬剤の myleran, MM, DBD, リンパ向性薬剤の degranol, trismustard 等のアシル化剤と交叉耐性を示したが、代謝拮抗剤の methotrexate やアルカロイドの vinbrastine に感受性を残している²⁴⁾。この成績から、DBM はアシル化剤としての作用を発揮して細胞毒効果を有することがわかれる。DBD 獲得耐性吉田肉腫を用いた実験でも vinbrastine が交叉耐性を示していない²⁵⁾。またこの耐性株に対して myleran も感受性を示すが、MM は交叉耐性を示すことから、交叉耐性は糖分子の関与を示唆している。Gáti ら²⁶⁾は上記実験をさらに進めて移動分子の役割を追求し、6 炭素鎖を含んだ化合物による耐性株は他の関連 6 炭素化合物に対して交叉耐性を示すものとした。HN 2 耐性腫瘍に対して細胞毒活性 hexitol 体の中では、DBD だけにわずかながら増殖抑制作用が見られた。

6. 造血系におよぼす影響

ラット骨髄形成に対する DBM の抑制作用は選択的なものであり、リンパ球、赤血球および血小板形成には影響を与えない^{8, 28)}。ラットとウサギを用いた末梢血液および骨髄造血に対する DBD の単一大量投与では、経時的变化が 3 期に区別出来るといふ²⁹⁾。第 1 期は刺戟期で、投与後 24 時間続き最初リンパ球、後で顆粒球による末梢白血球の増加がある。第 2 期の主な特徴は、末梢と骨髄の損傷であり、末梢では顆粒球減少症、骨髄では

細胞形成阻害と有核細胞数の減少を来し、骨髄の完全な空胞化と細胞破壊を示す。これは 3 日目で最も著明である。第 3 期は 7 日以後の回復期であり、骨髄および末梢血液像の緩徐な正常化、骨髄の再生が進行中である。事実上の正常化は 21 日から 40 日になる。

7. 免疫効果

犬の腎移植に対する拒絶反応の抑制剤として DBM は使用不可能である³⁰⁾。著者ら¹⁰⁾の実験でも、羊赤血球で感作したマウス脾の抗体産生細胞に対する DBM の抑制作用が特に強いものであるとは言い難い。DBD は DBM よりも免疫抑制効果は強いと言われている³¹⁾。

通常免疫能を抑制する抗癌剤でも、用量、投与後の時間、動物種など条件が変わることによって免疫活性を高める場合がある。Börzsönyi ら³²⁾は DBD の作用機構を研究し、抗原感作直後に異種赤血球と BSA を供給すると、マウス血液中の抗体量を低下させる作用のあることを認めた。ところが感作 3 日前に DBD を投与すると、抑制作用はなく逆に免疫能を高めることになった。これは薬剤により強力な免疫担当細胞の分離を促進するためと考えられる。

8. 核酸および蛋白質合成におよぼす影響

Hidvégi ら³³⁾は in vitro で骨髄細胞および HeLa 細胞の核酸、蛋白質合成におよぼす dibromohexitol の影響をしらべている。DBM 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、150 分間の孵置でウサギ骨髄中の DNA 合成阻害は著明であり、また阻害度は、DNA, RNA, 蛋白質の順に現われている。DBD においても DNA 合成阻害がもっともはっきりしている。HeLa 細胞の DBM に対する感受性はウサギ骨髄細胞に対する場合よりもずっと弱く、骨髄で効果の得られる量で孵置 6 時間では生体高分子合成に変化を与えていない。ただし孵置を 20 時間に延長すると阻害効果が現われ、この場合は RNA 合成が障害を受け、特に DBM は 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の少量でも効果が

明らかである。蛋白質合成の減少は薬剤が蛋白質合成系への直接作用ではなく、DNA, RNA 合成阻害に伴って起こったものであろう。DBD 250 mg/kg 投与によりラット骨髄の DNA は2日目に60% 減少するが、核酸量は3~4日目には対照群と同量になり可逆的である³⁴⁾。一方感受性吉田肉腫では、RNA 分画で著変が認められている。また HN2 耐性吉田肉腫では、投与3日後に lipid-P と DNA-P の両分画の増加による総リン酸が高濃度になり、ほとんど影響がないと言える。DBD の DNA 代謝に対するオートラジオグラフィ法を用いた検索によると³⁵⁾、腫瘍細胞の G₁ 期から S 期の細胞の一部が急速に破壊され、S 期の他の細胞では一定期間生合成が止まり G₀ 期に入るものと推測される。

他の制癌剤との比較は行っていないが、DBM 投与により、吉田肉腫担癌ラットで低下している肝カタラーゼ活性の回復は著明なものである³⁶⁾。

9. 構造活性相関

α, ω -置換-alkane および polyol 系列における細胞毒活性と化学構造との相関々係については、吉田肉腫に対する効力でくわしく検討されている⁷⁾。Dimesyl ester の細胞毒活性に匹敵する強力な活性は、dibromo 誘導体だけに認められるが、沃素置換体では阻害効果も弱く副作用も付随している。Dibromoalkane は不活性であり、臭素と mesyl 系列間の細胞毒活性の構造条件は類似していないことになる。Kuszmán と Vargha³⁷⁾ は多くの糖誘導体を合成し、1-bromo-6-X-1,6-dideoxy-D-mannitol (X=Cl, I, SO₃CH₃) にも強い抑制効果のあることを報告している。

Dibromohexitol 関連化合物について、Institóris ら^{6, 7)} は次のように述べている。(1) 実験化合物の系列では in vitro でアルキル化能と細胞毒効果は直接に相関々係がない。例えば DBM よりも反応性に富む diiodomannitol は細胞効果が見られないし、myleran よりもアルキル

化能の高い dibromobutane や dibromohexane でも効果は得られていない。(2) 糖 alcohol 水酸基の存在は臭化物の細胞毒効果として本質的なものである。その立体配置は臭化物と mesyl ester 系列とではちがった効果を示す³⁸⁾。すなわち mannitol 誘導体では DBM, MM 両者に活性があるのに反し、dulcitol では臭化物 (DBD) で効果を示し、mesylester 体 (dimesyl dulcitol) では細胞効果を示さない¹¹⁾。

10. 作用機序

Dibromohexitol は化学構造上アルキル化剤であるが、生物学的にアルキル化の性質を示す確実な証明はなされていない^{6, 7, 38~41)}。DBM のアルキル化能を求核試薬の thiosulfate に対する測定で行なうと、MM のアルキル化能と同程度であるが、HN2 と比較すると非常に劣るものである。Davis と Ross⁴²⁾ は MM の細胞効果は弱アルカリ性 (pH 7.5) 培地中で出来た 1,2:5,6-dianhydro-D-mannitol (diepoxide) によると述べているが、この場合は強力なアルキル化剤となり得る。化学的見地から Dávid ら⁴³⁾ の反論もあるが、DBM や DBD も同様に epoxide 形成の可能性がある。事実 Jarman と Ross⁴⁴⁾ によって in vitro で diepoxide の分離がなされている。彼等は⁴⁵⁾ さらに dibromohexitol の作用機序を解明する目的で epoxide を合成し、これらの化合物が血液におよぼす動態を比較検討した。Institóris らは in vivo における DBM の作用機序に、epoxide 形成は重要な役割を果すものでないと主張したが^{38, 43)}、その後 epoxide 生成の可能性と役割を全面的には否定し得ないという立場をとっている⁴⁶⁾。Dibromohexitol で治療したラットの血清および腹水中において、アルキル化代謝産物と共に 1,2:5,6-dianhydrohexitol を見出したとも言われている²⁶⁾。

脂肪親和性の炭素-臭素結合部位と親水性の水酸基は、あまり水に溶けない dibromohexitol の吸収を容易にさせて細胞内への輸送を確実にしている。すなわちこれらの基は、核酸、蛋白質、リ

ポ蛋白質などを生体高分子の適当な極性、非極性に薬剤が速やかに近づくのを助けている。リポ蛋白の膜、核蛋白、酵素により吸収された分子の極性効果は、生体高分子の電子系に歪みをひきおこすだろう。この様な方法で、反応を引き起こす前でも細胞機能に影響をおよぼすことが出来る。Dibromohexitol のアルキル化作用あるいは加水分解が強酸の放出にともなって起こる可能性については、すでに項目 4. で論じた。この様に一時的な pH の変動がアルキル化あるいは生物学的に活性な高分子系周辺の変動などをひき起こす。すなわち pH の変動は順々に起こり、アルキル化によって起こるものと非常に良く似た高分子の電荷の変化をひき起こしているらしい。細胞の核内および小器官での化合物の極性効果や臭化水素酸の放出は、酵素の機能等に影響し、核酸合成における塩基対をそこない。細胞膜の透過性を変えて細胞毒効果に非常な寄与をすることになるだろう。

そのほか dibromohexitol は生物学的アルキル化剤であると言われてはいるが、臭素含有代謝産物が代謝拮抗様の活性を現わす可能性もある⁵⁵⁾という点に留意しなければならない。

おわりに

Dibromohexitol は主として Hungary の研究陣によって最近の10数年間に研究されて来た。その抗腫瘍性は臨床的にも有効性が確かめられている。すなわち DBM が慢性骨髄性白血病 (CML) に著効を示すことは最初 Eckhardt ら⁴⁷⁾により、また真性多血症に対する効果は Szentkláray ら⁴⁸⁾により見出された。そこでこの薬剤は CML に対して少なくとも myleran と同程度の効果を有し、myleran および放射線治療耐性患者にも有効であるという特徴を有するものである。DBD に関しては CML だけでなく、Hodgkin 病や固型癌にもその効果のおよぶことが確かめられている^{18, 49)}。これら 2 者の効力の差が組織への分布あるいは蓄積の差⁵⁰⁾によるものなのか、さらにその原因として血中 albumin への結合比率の差⁵¹⁾が関与しているのか、あるいはその他の問題であるか今のところ定かでない。動物に対する毒性が DBM よりも DBD でより強いことも、制癌スペクトラムの差に関係があるだろう。

わが国でも臨床への応用がなされている現在^{52~54)}、未解決の作用機序が解明され、新しい癌化学療法剤として発展することを期待したい。

文 献

- 1) Vargha, L.: *Naturwissenschaften* **42**: 582, 1955.
- 2) Vargha, L. & Kuzsmann, J.: *ibid.* **46**: 84, 1959.
- 3) Haddow, A. *et al.*: *Nature* **182**: 1164, 1958.
- 4) Kellner, B. & Nemeth, L.: *Z. Krebsforsch.* **61**: 165, 1956.
- 5) *Idem*: *Brit. J. Cancer* **14**: 139, 1960.
- 6) Institóris, L. & Horváth, I. P.: *Arzneim.-Forsch.* **14**: 668, 1964.
- 7) Institóris, L. *et al.*: *ibid.* **17**: 145, 1967.
- 8) Csányi, E. *et al.*: *ibid.* **14**: 670, 1964.
- 9) Everett, J. L.: *Cancer Res.* **26** (Pt. 2): 942, 1969.
- 10) Irikura, T. *et al.*: *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **18**: 394, 1970.
- 11) Kellner, B. *et al.*: *Nature* **213**: 402, 1967.
- 12) Kellner, B. *et al.*: *Arzneim.-Forsch.* **17**: 1037, 1967.
- 13) Sellei, C. *et al.*: *Cancer Chemotherapy reports* **53**: 377, 1969.
- 14) Csányi, E.: *Neoplasma* **13**: 371, 1966.
- 15) Döbrössy, L.: *Europ. J. Cancer* **3**: 531, 1968.
- 16) Csányi, E.: *Magyar Onkológia (Hung. Oncology)* **11**: 37, 1967.
- 17) Pályi, I.: *Neoplasma* **14**: 159, 1967.

- 18) Idem: Archiv. Geshwulstforsch. **33**:345, 1969.
- 19) Kellner, B. *et al.*: GANN Monograph **2**:105, 1968.
- 20) Lapis, K. & Benedeczky, I.: Cancer Res. **28**:1256, 1968.
- 21) Gáti, É.: Z. Krebsforsch. **66**:460, 1965.
- 22) Idem: *ibid.* **68**:184, 1966.
- 23) Ujházy, V. & Winkler, A.: Neoplasma **12**:11, 1965.
- 24) Csányi, E. & Halász, M.: Brit. J. Cancer **21**:353, 1967.
- 25) Gáti, É.: Int. J. Cancer **3**:260, 1968.
- 26) Gáti, É. & Horváth, I. P.: Europ. J. Cancer **5**:553, 1969.
- 27) Jeney (jun.), A. *et al.*: Neoplasma **15**:231, 1968.
- 28) Csányi, E.: Arzneimittel.-Forsch. **15**:198, 1965.
- 29) Döbrössy, L. & Németh, L. Jr.: Neoplasma **16**:33, 1969.
- 30) Németh, A. *et al.*: Orvosi Hetilap (Medical Weekly) **108**:1257, 1967.
- 31) Elek, G. *et al.*: Acta Microbiol. Academ. Sci. Hung. **16**:63, 1969.
- 32) Börzsönyi, M. *et al.*: Neoplasma **16**:392, 1969.
- 33) Hidvégi, E. J. *et al.*: Biochem. Pharmacol. **16**:2143, 1967.
- 34) Vályi-Nagy, T. *et al.*: Europ. J. Cancer **5**:403, 1969.
- 35) Börzsönyi, M. *et al.*: Arzneimittel.-Forsch. **19**:669, 1969.
- 36) 長谷川嘉成, ほか: 基礎と臨床 **6**:18, 1972.
- 37) Kuszmann, J. & Vargha, L.: Carbohyd. Res. **17**:309, 1971.
- 38) Horváth, I. P. & Institóris, L.: Arzneimittel.-Forsch. **17**:149, 1967.
- 39) Institóris, L. *et al.*: *ibid.* **16**:45, 1966.
- 40) Institóris, L. *et al.*: III Internat. Kongress f. Chemotherapie, Stuttgart 1963, Verhandlungen pp. 1051~54 (G. Thieme).
- 41) Institóris, L. *et al.*: Cancer Chemotherapy reports **51**:261, 1967
- 42) Davis, W. & Ross, W.C.J.: Biochem. Pharmacol. **12**:915, 1963.
- 43) Dávid, A. *et al.*: Experimentia **23**:512, 1967.
- 44) Jarman, M. & Ross, W.C.J.: Chemistry and Industry Oct. 21, 1967.
- 45) Elsov, L. A. *et al.*: Europ. J. Cancer **4**:617, 1968.
- 46) Institóris, L. *et al.*: Neoplasma **17**:15, 1970.
- 47) Eckhardt, S. *et al.*: Cancer Chemotherapy reports **33**:57, 1963.
- 48) Szentkláray, J. *et al.*: Therapia Hungarica **14**:143, 1966.
- 49) Andrews, N. C. *et al.*: *ibid.* **55**:61, 1971.
- 50) Institóris, L. *et al.*: Z. Krebsforsch. **75**:133, 1971.
- 51) Institóris, E. & Holczinger, L.: Biochem. Pharmacol. **20**:1183, 1971.
- 52) 正岡徹, ほか: 癌の臨床 **19**:715, 1973.
- 53) 川島康平, ほか: 臨床血液 **14**:931, 1973.
- 54) 星野 章, ほか: 第22回日本化学療法学会総会(東京)抄録集:77, 1974.

(Received Nov. 11. 1974)