

抗腫瘍剤に関する研究 I

新規エチレンイミン系化合物の抗腫瘍作用

齊藤千春・稲葉茂穂

住友化学工業株式会社医薬事業部研究部

(昭和 42 年 10 月 18 日受付)

はじめに

合成抗腫瘍剤の研究はアルキル化剤を主流として発展してきたが、なかでも Nitrogen mustard 系化合物はその中心となつて広範な研究が展開されてきた¹⁾。一方 functional group としてエチレンイミノ基を有する化合物は副作用が比較的軽度であるといわれて注目されるようになった²⁾。

著者らはエチレンイミノ系化合物の探索が未だ比較的少ないこと、ならびにこれら化合物は概して強い抗腫瘍作用を有する事実に着目して、多数の新化合物を合成し検討を試みた^{3,4)}。本報ではそのなかでとくに注目された 2 種の化合物、N,N'-diethylene-N''-(5-methyl-1,3,4-thiadiazole-2-yl) phosphoramidate (S 261) および Bis-(β-ethyleniminopropionyl)piperazine (S 509) について、主として Triethylene thiophosphoramidate (TESPA) を対照として抗腫瘍作用、細胞毒作用ならびに毒性を検討したのでその結果を報告する。

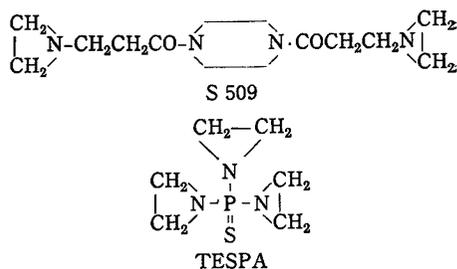
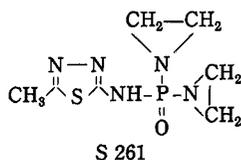
実験材料および実験方法

1. 実験材料

実験に使用した薬物はつぎのとおりである。

S 261 は mp. 143~145°C の無色、水に易溶の結晶で、用時生理食塩水に溶解して使用した。S 509 は mp. 106~108°C の無色、水に易溶の結晶でポリエチレン glycol 400 に 1% 濃度に溶解したものを用時生理食塩水で希釈して使用した。対照薬物として使用した TESPA は mp. 52~55°C の無色、水に易溶の鱗片状晶で用時、生理食塩水に溶解して使用した。その他マイトマイシン (マイトマイシン-協和-S-) も必要に応じて同様生理食塩水に溶解して使用した。

なお、薬液投与容量は抗腫瘍性実験には 0.2 ml/マウスまたはラット毒性実験にはマウスの場合 0.5 ml/10 g, ラットの場合 1.0 ml/100 g とし、適当に濃度調製を行なった。



2. 実験方法

1) 抗腫瘍性試験

1-1 エールリッヒ癌および肉腫 180 に対する抗腫瘍作用

腹水型についてはエールリッヒ癌の場合、ddN-JCL 雄性マウス (生後 6 週, 体重 21~24 g) を 7 匹 1 群として用い、肉腫 180 の場合は ICR-JCL 雄性マウス (生後 6 週, 体重 23~26 g) を同じく 7 匹 1 群とし、いずれの場合も腹水腫瘍細胞数 2×10^6 /マウスを腹腔内へ移植し、移植後 2 時間目から、1 日 1 回、7 日間にわたり薬液を腹腔内投与して、35 日間の体重変化ならびに延命作用を観察した。なお、薬液を尾部静脈内あるいは皮下投与した場合の抑制効果も検討した。延命率 (ILS) は下式により算出した。

$$ILS = \left(\frac{\text{treated mean longevity}}{\text{control mean longevity}} - 1 \right) \times 100$$

結節型については腹水型実験の場合と同様のマウスを同様の条件で使用し、腹水細胞数 2×10^6 /マウスを鼠径部皮下へ移植し、移植後 24 時間目から 1 日 1 回、7 日間薬液を投与して 9 日目にマウスを屠殺、腫瘤を取出して秤量し対照群との重量比を求めた。

1-2 エールリッヒ癌細胞の呼吸ならびに解糖に対する阻害作用

ワールブルグ氏検圧計を用い、KUN の方法⁵⁾に準じてエールリッヒ腹水癌細胞に対する S 261 および S 509 の作用を TESPA を対照として比較した。すなわち、腹水癌細胞をクレブスリンゲル磷酸緩衝液で 800 rpm, 5 分間の遠沈を 3 回行なつて洗滌し、血球成分を除去して細胞濃度 5×10^7 /ml の浮游液を調製した。また、薬物濃度は 10^{-8} g/ml を最高濃度となるように調製した。

1-3 エールリヒヒ腫瘍細胞に対する殺細胞作用
 エールリヒ腫瘍細胞を採取し、リンクス氏液で800 rpm, 5分間, 3回の遠沈により十分洗滌し, リンクス氏液で予め溶解調製した薬液と接触させた。薬液と細胞の接触後濃度は細胞濃度 $10^7/ml$, 薬物濃度 $50 \mu g/ml$ で $37^\circ C$ に静置して, 3, 5, 8 および 24 時間後における薬物の失活状態を NBP 法⁴⁾により検討するとともに, 殺細胞作用は試験管内接触細胞をリンクス氏液で洗滌後, マウス腹腔内へ細胞数 2×10^6 /マウスの戻し移植を行なうことにより検討した。なお, エールリヒ腫瘍 -ICR-JCL の系における細胞の可移植性を知るため細胞数を変えてマウスの腹腔内へ移植し, 45 日間の腫瘍増殖経過を観察した。

1-4 吉田肉腫および AH 130 肝癌に対する抗腫瘍作用

吉田肉腫細胞に対する作用

吉田らの方法^{5,6)}に準じ, 呑竜系雄性ラット(実中研, 体重 $80 \sim 100 g$)に吉田肉腫細胞 2×10^6 /ラットの腹腔内

移植を行ない, 5 日目薬物を腹腔内へ投与して 1, 3, 5, 8, 24, 48 および 72 時間目に腹水を採取し, 塗抹標本を作成してライト染色ののち腫瘍細胞の形態学的変化を観察した。

細胞効果の評価は腫瘍細胞 1,000 個中の変性細胞数を算定することにより行なつた。すなわち, 細胞の変性は染色体の切断, 散乱, bridge 形成, 多核細胞, 原形質の空胞化, 巨大細胞, 核融解等があるが, これらの変性を一括して以下の規準に従がつた。

| | |
|-----|--------------------------|
| - | 腫瘍細胞 1,000 個中変性細胞 20 個以下 |
| + | " 21~50 個 |
| ++ | " 51~100 個 |
| +++ | " 101 個以上 |

また, PAS 染色を行ない, PAS 顆粒の経時的変化をも観察した。

延命作用

吉田肉腫, AH 130 肝癌ともに同一の実験方法により行なつた。すなわち, 呑竜系雄性ラット(実中研, 体重

Table 1 The Anti-tumor Activities of S 261, S 509 and Other Compounds on Mouse Tumors (Ascitic Form)

Ehrlich Carcinoma

| Compd. | Doses (mg/kg/day) | Route | No. of deaths/ No. of animals | Viability* | Av. Longevity** (T/C) | IIS |
|-----------|-------------------|-------|----------------------------------|------------------------|--------------------------|------|
| S 261 | 2.5 | ip | 7/7 | 0/4 1/5 | 18.9/17.8 | 6.1 |
| | 5.0 | | 3/7 | | 31.3/17.8 | 75.6 |
| | 7.5 | | 1/6 | | 34.0/17.8 | 91.0 |
| | 10.0 | iv | 7/7 | 15.7/15.0 17.9/12.5 | 23.1/15.0 | 54.0 |
| | 10.0 | | 7/7 | | 15.7/15.0 | 4.8 |
| | 10.0 | | 7/7 | | 17.9/12.5 | 43.2 |
| S 509 | 0.25 | ip | 5/7 | 0/2 4/7 5/7 | 25.7/18.8 | 36.6 |
| | 0.5 | | 0/7 | | 35.0/19.3 | 81.2 |
| | 2.0 | | 0/7 | | 35.0/19.3 | 81.2 |
| | 2.0 | iv | 7/7 | 17.8/15.0 17.6/12.5 | 17.8/15.0 | 18.7 |
| | 2.0 | | 7/7 | | 17.6/12.5 | 40.8 |
| | 2.0 | | 7/7 | | | |
| TESPA | 2.0 | ip | 7/7 | | 13.4/11.4 | 17.0 |
| | 4.0 | | 7/7 | | 16.3/11.4 | 43.0 |
| | 6.0 | | 7/7 | | 15.1/11.4 | 32.0 |
| Mitomycin | 0.1 | ip | 7/7 | 1/4 | 17.9/17.7 | 1.0 |
| | 0.25 | | 3/7 | | 29.6/17.7 | 67.0 |
| | 0.5 | | 7/7 | | 21.3/15.7 | 36.0 |

S 180

| Compd. | Doses (mg/kg/day) | Route | No. of deaths/ No. of animals | Viability | Av. Longevity (T/C) | IIS |
|--------|-------------------|-------|----------------------------------|-----------|------------------------|-------|
| S 261 | 5.0 | ip | 7/7 | | 22.3/19.1 | 16.8 |
| | 10.0 | | 7/7 | | 21.8/19.1 | 14.0 |
| | 20.0 | | 7/7 | | 10.0/19.1 | -48.0 |
| S 509 | 0.5 | ip | 7/7 | | 23.8/19.1 | 24.6 |
| | 1.0 | | 7/7 | | 25.8/19.1 | 35.0 |
| | 2.0 | | 7/7 | | 25.0/19.1 | 30.9 |

* No. of no signs of metastase after 35 days/No. of survivals after 35 days

** Observation period is 35 days.

80~100 g) を7匹1群とし、腫瘍細胞 2×10^6 /ラットを腹腔内へ移植し、3日目から3日間薬液を腹腔内へ投与して、30日間の体重変化ならびに延命作用を観察した。

2) 毒性試験

2-1 急性毒性試験

dd 系体重 14~18 g の雄性マウスを5匹1群、ウイスター系体重 150~200 g の雄性ラットを3匹1群として使用し、薬液投与後10日間観察を行ない、LITCHFIELD & WILCOXON 法⁷⁾により LD₅₀ を算出した。

2-2 1週間連続投与毒性試験

ウイスター系体重 150~200 g の雄性ラットを3匹1群として、これに1日1回、7日間連続腹腔内へ薬液を投与し、のち8日間観察を行なつて LD₅₀ を算出した。なお、体重変化ならびに眼底静脈血中の白血球数の変動を経時的に測定記録するとともに1回投与毒性との比を求めて、蓄積毒性の傾向を知る参考とした。

実験成績

1) 抗腫瘍作用

1-1 エールリッヒ癌および肉腫 180 発育抑制作用
腹水型に対する作用

Table 1 および Fig.1 にみられるように、エールリッヒ癌に対しては腹腔内投与の場合、S 261, S 509 はともにきわめて良好な抑制作用を示した。すなわち、前者は 7.5 mg/kg/day, 後者は 0.5 mg/kg/day でいづれも体重減少をみることなく生存期間の著明な延長をきたすとともに、治癒経過を示すものが多くみられ、TESPA にまさる効果を示した。静脈内投与の場合は効果が期待できず、皮下投与では軽度の延命効果が認められるに過ぎなかつた。

肉腫 180 に対しては S 261, S 509 とともにほとんど延命効果が期待できなかつた。

結節型に対する作用

Table 2 および Table 3 にみられるように、エールリッヒ癌に対しては S 261, S 509 はそれぞれ 10~20 mg/kg/day, 5~10 mg/kg/day の非経口投与で 60~80% の腫瘍発育抑制がみられ、TESPA の 4~6 mg/kg/day の効果とほぼ同程度であつた。なお、経口投与の効果は比較的微弱であつた。

肉腫 180 に対しても S 261, S 509 はそれぞれ 20 mg/kg/day, 10 mg/kg/day の腹腔内治療できわめて有効であつた。

1-2 エールリッヒ癌細胞の呼吸ならびに嫌氣的解糖に対する阻害作用

エールリッヒ癌細胞の呼吸ならびに嫌氣的解糖作用に対して S 261, S 509 および TESPA はいづれも 10^{-8} g/ml で relative activity が、呼吸の場合それぞれ 90%, 92% および 94%, 解糖の場合それぞれ 94%, 90% および 90% でいづれの場合も特に強い阻害を示すことはなかつた。

1-3 エールリッヒ腹水癌細胞に対する殺細胞効果

エールリッヒ癌-ICR·JCL の系における腹腔内移植細胞数とマウスの生存日数との関係は Table 4 に示すようで、45日間の観察による結果では細胞数 10^4 /マウスの移植が 100% 腫瘍死を示す最少細胞数であつた。

腫瘍細胞の可移植性から S 261 および TESPA の殺細胞作用を検討した結果は Table 5 にみられるようであつた。In vitro における薬物接触細胞をマウスへ戻し移植した場合、対照(薬物無処置)は8時間後まで100%腫瘍死をみたが、TESPA の場合は8時間の接触で不十分な殺細胞作用を示し、24時間後ようやく細胞の死滅を推測させた。一方 S 261 では5時間の接触ですでに移植性の消失がみられた。

Fig.1 Effect of S261, S509 and other Compounds administered intraperitoneally on Ehrlich Carcinoma in mice (Ascitic Form)

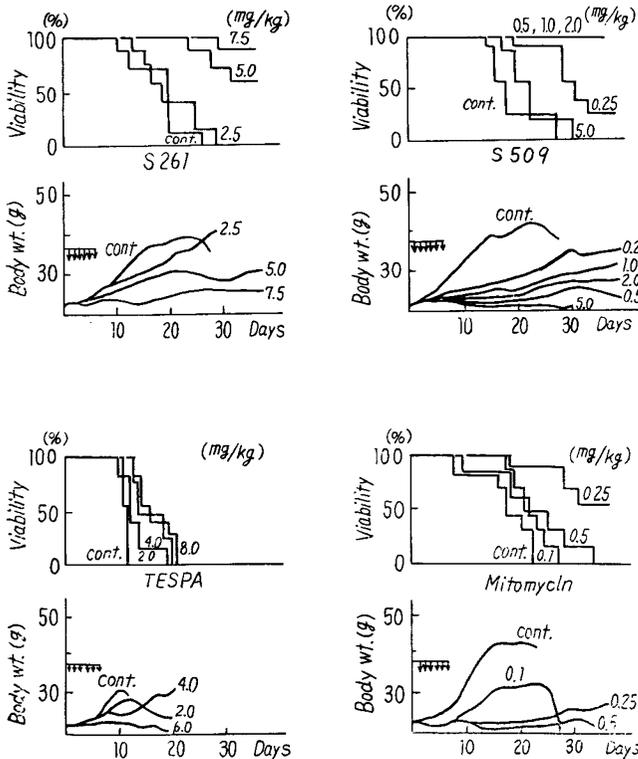


Table 2 The Anti-tumor Activities of S 261, S 509 and TESPA on Ehrlich Carcinoma in Mice (Solid Form)

| Compd. | Doses (mg/kg/day) | Route | No. of deaths/ No. of animals | Av. body wt. change (T/C) | Av. tumor wt. (g) (T/C) | Tumor wt. ratio |
|--------|-------------------|-------|----------------------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------|
| S 261 | 5.0 | ip | 0/7 | +1.7/+2.4 | 0.84/1.4 | 0.60 |
| | 10.0 | | 0/7 | -1.5/+2.4 | 0.96/2.06 | 0.47 |
| | 20.0 | | 0/7 | -4.4/+2.4 | 0.5 /2.06 | 0.25 |
| | 2.5 | sc | 0/7 | +3.4/+4.2 | 1.54/2.04 | 0.76 |
| | 5.0 | | 0/7 | +1.2/+4.2 | 1.06/2.04 | 0.52 |
| | 10.0 | | 0/7 | -1.2/+4.2 | 0.66/2.04 | 0.32 |
| | 40.0 | po | 0/7 | +4.8/+5.5 | 1.85/1.99 | 0.93 |
| | 80.0 | | 3/7 | +2.0/+4.4 | 1.06/2.14 | 0.50 |
| | S 509 | 5.0 | ip | 0/7 | +1.7/+5.0 | 1.08/2.17 |
| 5.0 | | 0/7 | | +0.5/+5.0 | 0.72/2.17 | 0.33 |
| 10.0 | | 0/7 | | -1.4/+5.0 | 0.41/2.17 | 0.19 |
| 1.0 | | sc | 0/7 | +0.4/+2.4 | 0.4 /1.05 | 0.38 |
| 2.0 | | | 0/7 | +0.8/+2.4 | 0.41/1.05 | 0.39 |
| 5.0 | | | 0/7 | -2.5/+2.4 | 0.27/1.05 | 0.36 |
| 40.0 | | po | 0/7 | +1.0/+3.7 | 0.99/1.59 | 0.62 |
| 80.0 | | | 0/7 | +3.3/+4.2 | 0.66/1.65 | 0.40 |
| TESPA | | 2.0 | ip | 0/7 | +0.6/+4.3 | 1.22/1.77 |
| | 4.0 | 0/7 | | +1.5/+4.3 | 1.04/1.77 | 0.59 |
| | 6.0 | 0/7 | | -2.4/+4.3 | 0.67/1.77 | 0.38 |
| | 4.0 | sc | 0/7 | -4.4/+2.3 | 0.75/2.49 | 0.30 |
| | 6.0 | | 0/7 | -6.0/+2.3 | 0.57/2.49 | 0.23 |
| | 20.0 | po | 0/7 | -2.7/+3.7 | 0.52/1.59 | 0.33 |
| | 40.0 | | 7/7 | | | |

Table 3 The Anti-tumor Activities of S 261, S 509 and TESPA on S 180 in Mice (Solid Form)

| Compd. | Doses (mg/kg/day) | Route | No. of deaths/ No. of animals | Av. body wt. change (T/C) | Av. tumor wt. (T/C) | Tumor wt. ratio |
|--------|-------------------|-------|----------------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------|
| S 261 | 5.0 | ip | 0/7 | +8.7/+8.3 | 2.18/2.45 | 0.89 |
| | 10.0 | | 0/7 | +4.0/+8.3 | 1.69/2.45 | 0.69 |
| | 20.0 | | 0/7 | +3.1/+8.3 | 0.44/2.45 | 0.18 |
| S 509 | 2.0 | ip | 0/7 | +7.1/+8.0 | 1.4 /2.22 | 0.63 |
| | 5.0 | | 0/7 | +5.9/+9.7 | 2.92/4.84 | 0.60 |
| | 10.0 | | 0/7 | -2.6/+5.7 | 0.47/1.77 | 0.27 |
| TESPA | 2.0 | ip | 0/7 | +8.2/+8.5 | 2.1 /2.46 | 0.85 |
| | 4.0 | | 0/7 | +6.0/+8.5 | 1.8 /2.46 | 0.73 |
| | 6.0 | | 0/7 | +1.4/+8.5 | 0.94/2.46 | 0.38 |

Table 4 Relationship between Number of Ehrlich Ascitic Cells incubated and mean Longevity in Mice

| Number of cells inoculated | Mortality | Av. longevity* (days) |
|----------------------------|-----------|-----------------------|
| 10 ² | 6/7 | 21.9 |
| 10 ³ | 6/7 | 23.4 |
| 10 ⁴ | 7/7 | 18.4 |
| 10 ⁵ | 7/7 | 18.1 |
| 10 ⁶ | 7/7 | 18.1 |
| 10 ⁷ | 7/7 | 10.6 |

* Observation period is 45 days.

なお、S 261 および TESPA を腫瘍細胞と 37°C で接触させた場合の薬物の失活状態を NBP 法で測定の結果、両者の間にはほとんど差異はなく、対照(無細胞液)とも異なる所はなく 24 時間後に約 40% の活性低下がみられた。

1-4 吉田肉腫および AH 130 肝癌に対する抗腫瘍作用

吉田肉腫細胞に対する作用

細胞変性作用は Table 6 にみられるようで、S 261 の作用は TESPA のそれと非常に類似しており、48 時間後 rhexis が顕著に出現し、その後急速に細胞は崩壊消失の経過をとるが、TESPA より作用の発現がすみやか

Table 5 Transplantation of Ehrlich Ascitic Cells contacted with TESPA and S 216 *in vitro*

| Con- tacted Comp. | Contacted Dose μg/ml | Hours incu- bated | Mor- tality | Av. Longevity* (days) |
|-------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------|--------------------------|
| S 261 | 500 | 3 | 4/5 | 26.2 |
| | | 5 | 0/5 | >45.0 survival |
| | | 8 | 0/5 | >45.0 survival |
| | | 24 | 0/5 | >45.0 survival |
| TESPA | 500 | 3 | 4/5 | 25.8 |
| | | 5 | 4/5 | 24.4 |
| | | 8 | 4/5 | 24.8 |
| | | 24 | 0/5 | >45.0 survival |
| Control | | 3 | 5/5 | 17.8 |
| | | 5 | 5/5 | 15.8 |
| | | 8 | 5/4 | 18.5 |
| | | 24 | 4/5 | 27.8 |

* Observation period is 45 days.

であった。S 509 は作用発現がさらにはやく 1 mg/kg では薬物投与 5 時間後にはすでに rhexis が出現し、8 時間後には崩壊細胞の核片の散乱した荒廃像がみられた。

PAS 染色の結果では、S 261 は 5 mg/kg で 8 時間後から徐々に PAS 顆粒が増加し、48 時間後にはすべての腫瘍細胞に顕著な PAS 顆粒の存在を認めた。S 509 でも 2.0 mg/kg で S 261 と比較的類似の所見が得られた。

Table 6 Cytological Effects of S 261, S 509 and TESPA on Yoshida Sarcoma Ascitic Cells

| Compd. | Doses (mg/kg) | Cytological Effects | | | | | | |
|--------|------------------|---------------------|---|----|----|-------|--------|----------|
| | | 1 | 3 | 5 | 8 | 24 | 48 | 72(Hrs.) |
| S 261 | 0.1 | — | — | — | — | — | — | — |
| | 0.5 | — | — | — | — | — | ++(++) | ++(##) |
| | 1.0 | — | — | — | — | — | ##(##) | ##(##) |
| | 2.5 | — | — | — | — | + | ##(##) | ##(##) |
| S 509 | 0.1 | — | — | — | — | — | — | — |
| | 0.5 | — | — | — | — | + | + | +(+) |
| | 1.0 | — | — | + | ++ | ++ | ++(++) | ++(##) |
| | 2.5 | — | — | ++ | ## | ##(+) | ##(##) | ##(##) |
| TESPA | 0.1 | — | — | — | — | — | — | — |
| | 0.25 | — | — | — | — | — | + | ##(##) |
| | 0.5 | — | — | — | — | — | + | ##(##) |

— : No effect—No. of degenerated tumor cells is 2% or below.

+

++ : Moderate inhibition—No. of degenerated tumors cells is 5.1–10%.

: Marked inhibition—No. of degenerated tumor cells is 10.1% or more.

(+): Slight decrease of cell counts.

(++): Moderate decrease of cell counts.

(##): Marked decrease of cell counts.

延命作用

S 261, S 509 のラット腫瘍(腹水型)に対する延命効果は Table 7 および 8 に示すようで、吉田肉腫に対しては S 261, S 509 とともにきわめて強い延命作用を示し、いずれも 30 日後の生存例中に肉眼的治癒例が高率にみられた。一方 AH 130 肝癌に対しては、S 261 がかなり良好な延命作用を示したのみで、S 509, TESPA はともに微弱な作用を示すに過ぎなかつた。

2) 毒性

2-1 急性毒性

マウスおよびラットに対する急性毒性は Table 9 にみられるとおりで、S 261 は非経口的には TESPA の約 1/3, 経口的には約 1/5 で、経口投与の場合 TESPA より不活性化の影響を大きく受けることが推定される。S 509 の毒性はマウスでは TESPA よりやや弱い、ラットに対してはかなり強い毒性が発現した。

これら薬物の中毒症状はいずれも TESPA の場合と比較的類似しており、投与後 4~5 日目から下痢、食慾不振、衰弱をきたして死亡するが、下痢の強さは S 261, S 509 とともに TESPA より軽度であつた。

2-2 1週間連続投与毒性試験

1週間連続投与の中等量における 19 日間生存ラットの体重ならびに白血球数の回復状態は、S 261, S 509 とともに TESPA と同程度で比較的好いであつた (Table 10)。

Table 7 The Anti-tumor Activities of S 261, S 509 and TESPA on Yoshida Sarcoma in Rats (Ascitic Form)

| Compd. | Doses (mg/kg/day) | No. of deaths (after 30 days) | Viability* | Av. longevity** (T/C) | IIS |
|--------|-------------------|-------------------------------|------------|-----------------------|-------|
| S 261 | 1.0 | 3/6 | 3/3 | 27.6/10.6 | 160.4 |
| | 5.0 | 1/7 | 6/6 | 28.7/10.5 | 173.3 |
| | 10.0 | 5/7 | 2/2 | 17.9/10.5 | 71.5 |
| S 509 | 0.1 | 7/7 | | 13.4/10.8 | 24.1 |
| | 1.0 | 1/9 | 6/8 | 29.0/10.2 | 184.3 |
| | 5.0 | 6/6 | | 7.8/11.7 | -33.0 |
| TESPA | 0.5 | 15/19 | 3/4 | 18.3/10.4 | 75.7 |
| | 1.0 | 18/37 | 17/19 | 24.3/11.1 | 119.5 |
| | 2.0 | 10/13 | 2/3 | 22.5/13.3 | 69.5 |

* No. of no signs of metastase after 30 days/No. of survivals after 30 days

** Observation period is 30 days.

Table 8 The Anti-tumor Activities of S 261, S 509 and TESPA on AH 130 Hepatoma in Rats (Ascitic Form)

| Compd. | Doses (mg/kg/day) | No. of deaths (after 30 days) | Viability* | Av. Longevity** (T/C) | IIS |
|--------|-------------------|-------------------------------|------------|-----------------------|-------|
| S 261 | 1.0 | 7/7 | | 14.0/13.6 | 3.0 |
| | 5.0 | 3/6 | 2/3 | 27.2/13.6 | 100.0 |
| | 10.0 | 0/5 | 5/5 | 30.0/13.6 | 120.6 |
| S 509 | 0.5 | 5/7 | 0/2 | 22.9/15.8 | 44.9 |
| | 1.0 | 4/6 | 1/2 | 18.5/13.0 | 42.3 |
| | 2.0 | 7/7 | | 9.5/15.8 | -39.6 |
| TESPA | 1.0 | 7/7 | | 16.8/13.6 | 23.5 |
| | 2.0 | 10/13 | 2/3 | 22.5/13.3 | 69.5 |
| | 5.0 | 5/6 | 1/1 | 24.6/17.9 | 37.4 |

* No. of no signs of metastase after 30 days/No. of survivals after 30 days

** Observation period is 30 days.

Table 9 Acute Toxicities (LD₅₀, mg/kg) of S 261, S 509 and TESPA

| | Route | S 261 | S 509 | TESPA |
|------|-------|-------|-------|-------|
| Mice | iv | 62.0 | 33.0 | 21.5 |
| | ip | 60.0 | 34.0 | 19.0 |
| | sc | 54.0 | 31.0 | 19.5 |
| | po | 160.0 | 122.0 | 31.0 |
| Rats | iv | 31.7 | 4.8 | |
| | ip | 35.0 | 5.7 | 10.4 |

また、ラットについての急性毒性 LD₅₀ と 1 週間連続投与 LD₅₀ との比は、S 261 では 3.23 で TESPA とほぼ同程度であり、S 509 は 1.49 でともに蓄積性は比較的軽微であった。

考 按

S 261 ならびに S 509 はそれぞれ多数の異項環 Diethylenephosphoramidate 系化合物および β-Ethyleniminopropionamide 系化合物の中から注目すべき化合物として選出されたものである^{8,9)}。

S 261 と類似構造を有する化合物は多数知られているが¹⁰⁻¹⁵⁾、とくに化学構造の類似している Azetepa の研究^{16,17)}が著者らの研究と並行して行なわれていたことがあとで判明した。その後 Azetepa は担癌マウスの骨髄抑制作用が TESPA より軽度で¹⁸⁾、経口または非経口投与で肉腫 180, 6C3 HED-Lymphosarcoma に著効を示す¹⁹⁾といわれており、S 261 と本質的には差異はないようであるが、著者らの検討した範囲ではエールリヒ癌腹水型に無効であった。

Table 10 Toxicities of S 261, S 509 and TESPA by Successive Intraperitoneal Administration for 7 Days in Rats.

| Compd. | Doses (mg/kg/day) | Before | | 3rd Day | | | 9th Day | | |
|--------|----------------------|----------|-------|---------|----------|------|---------|----------|------|
| | | Body wt. | WBC | Mor. | Body wt. | WBC | Mor. | Body wt. | WBC |
| S 261 | 5 | 191 | 9030 | 0/3 | 189 | 6560 | 0/3 | 177 | 3530 |
| | 10 | 185 | 7230 | 0/3 | 176 | 4100 | 0/3 | 146 | 266 |
| | 15 | 181 | 12100 | 0/3 | 168 | 6100 | 0/3 | 133 | 100 |
| S 509 | 2 | 134 | 9300 | 0/3 | 135 | 7430 | 0/3 | 133 | 3570 |
| | 3 | 142 | 7170 | 0/3 | 135 | 3170 | 0/3 | 108 | 1500 |
| | 4 | 144 | 6570 | 0/3 | 132 | 4930 | 3/3 | | |
| TESPA | 2 | 189 | 10160 | 0/3 | 186 | 4960 | 0/3 | 175 | 3160 |
| | 3 | 196 | 7650 | 0/3 | 180 | 3900 | 0/3 | 159 | 900 |
| | 4 | 188 | 9630 | 0/3 | 174 | 4360 | 1/3 | 144 | 800 |

| Compd. | Doses (mg/kg/day) | 15th Day | | | LD ₅₀ | LD ₅₀ (Single Inj.)/LD ₅₀ (Repeated Inj.) |
|--------|----------------------|----------|----------|-------|------------------|---|
| | | Mor. | Body wt. | WBC | | |
| S 261 | 5 | 0/3 | 202 | 6600 | 10.83 | 35.0/10.83=3.23 |
| | 10 | 1/3 | 160 | 3230 | | |
| | 15 | 3/3 | | | | |
| S 509 | 2 | 0/3 | 130 | 12470 | 3.15 | 5.7/3.15=1.49 |
| | 3 | 1/3 | 116 | 9700 | | |
| | 4 | | | | | |
| TESPA | 2 | 0/3 | 201 | 5790 | 3.17 | 10.4/3.17=3.28 |
| | 3 | 1/3 | 179 | 4450 | | |
| | 4 | 3/3 | | | | |

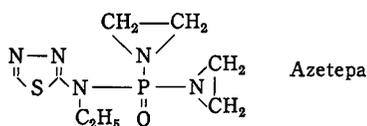
Mor. ; Mortality

WBC ; White blood cell

Table 11 Therapeutic Indices (TI) of S 261, S 509 and TESPA against Mouse Tumors (Solid Form)

| Compds. | LD ₁₀ (mg/kg/day) | Ehrlich Carcinoma | | S 180 | |
|---------|---------------------------------|-----------------------------|------|-----------------------------|------|
| | | MED(T/C=0.6) (mg/kg/day) | TI* | MED(T/C=0.4) (mg/kg/day) | TI |
| S 261 | 15.5 | 5.5 | 2.82 | 15.0 | 1.03 |
| S 509 | 8.0 | 1.8 | 4.45 | 7.5 | 1.07 |
| TESPA | 6.2 | 3.3 | 1.88 | 6.8 | 0.91 |

$$*TI = \frac{LD_{10}}{MED}$$



また、S 509 の類似化合物としては、N, N'-methylene bis-(β-ethylenimino)propamide²⁰⁾ およびこの関連化合

物²¹⁾がみられるが、エチレンイミノ基がアクリルアミド基で置換された類似化合物は多数知られており²²⁻²⁶⁾、これらの一部は抗腫瘍剤として臨床的にも有効なことが報告されている²⁷⁻³⁰⁾。

S 261, S 509 はいづれもマウスおよびラット腫瘍に奏効するが、S 261 の腹水型腫瘍に対する強い抑制作用

は *in vitro* の TESP A との比較実験で著者らが明らかにしたように S 261 の顕著な殺細胞作用にもとづくと考えられる。

S 261 および S 509 のマウス結節腫瘍に対する治療係数(TI) は Table 11 のようである。最少有効量(MED) は体重減少のみられない場合の腫瘍抑制効果を指標としたものであるが、Table 11 にみられるようにエールリッヒ癌に対しては S 509 はもつとも TI が大で、S 261 がこれに次いでいる。いつぼう、肉腫 180 に対しては良好な治療係数は得られなかつた。すなわち、腫瘍系の相違による薬物感受性の相違がかなり大きくみられた。

結 論

エチレンイミノ基を活性基とする新規アルキル化剤、N,N'-diethylene-N''-(5-methyl 1,3,4-thiadiazole-2-yl) phosphoramidate (S 261) および Bis-(β -ethyleniminopropionyl) piperazine (S 509) の抗腫瘍作用を検討した。

1. S 261, S 509 はともにエールリッヒ癌、肉腫 180 の結節型に対して強い抑制作用を有し、TESPA より大なる治療係数を示した。いつぼう、腹水型ではエールリッヒ癌の場合には満足すべき抑制作用を示したが、肉腫 180 の場合はほとんど効果を認めなかつた。

2. S 261, S 509 のエールリッヒ癌腹水細胞の呼吸および解糖阻害作用はともに TESP A と同程度であった。

3. S 261 の *in vitro* におけるエールリッヒ腹水癌細胞に対する殺細胞作用は TESP A よりすぐれたものがあつた。

4. S 261, S 509 はともに吉田肉腫腹水型に対して強い抑制作用を示し、生存期間の著明な延長ならびに高度の治癒効果がみられた。

5. S 261 は AH 130 肝癌に対しても顕著な延命効果を示した。

6. S 261, S 509 のマウス腹腔内投与による急性毒性はいづれも TESP A より弱く、ラット 1 週間投与による毒性の蓄積は S 261 が TESP A と同程度、S 509 はこれよりかなり弱かつた。

終りに本研究について御指導、御校閲を賜つた住友化学工業株式会社医薬事業部、山岡静三郎博士に深謝します。また、御助言を賜つた森山弘明博士、赤隆博士ならびに本研究に協力された谷田昭二氏に感謝します。

なお、本研究の一部は第 24 回日本癌学会総会において報告した。

文 献

1) 山本正, 山岡静三郎: 癌の化学療法剤。癌研究の進歩, p. 821~889, 医学書院 1960

- 2) WRIGHT, J. C., GOLOMB, F. M. & GUMPORT, S. L.: Summary of results with triethylene thiophosphoramidate. Ann. N. Y. Acad. Sci. 68: 937~966, 1958
- 3) KUN, E., TALALAY, P. & WILLIAMS-ASHMAN, H. G.: Studies on the Ehrlich ascites tumor. 1. The enzymic and metabolic activities of the ascitic cells and the ascitic plasma. Cancer Research 11: 855~863, 1951
- 4) 山岡静三郎, 斎藤千春: 抗癌剤の定量法—とくにアルキル化剤を中心として—。癌・化学療法, p. 66~72, 医歯薬出版社 1966
- 5) YOSHIDA, T.: Studies on an ascites (reticulo-endothelial cell?) sarcoma on the rat. J. Nat. Cancer Inst. 12: 947~969, 1952
- 6) 石館守三, 桜井欽夫, 吉田富三, 佐藤春郎, 佐藤博, 松井英一, 今村博: 吉田肉腫を用いた悪性腫瘍の化学療法に関する実験的研究(N)。Gann 44: 342~346, 1953
- 7) LITCHFIELD, J. T. & WILCOXON, F.: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. 96: 99~113, 1949
- 8) 稲葉茂穂, 斎藤千春: 未発表
- 9) 稲葉茂穂, 斎藤千春: 未発表
- 10) HEIDELBERGER, C. & BAUMAN, M. E.: Studies on OPSPA. 1. The effect of several phosphoramidates on transplanted tumours. Cancer Research 17: 277~283, 1957
- 11) MCLVER, F. A., CURRERI, A. R., RUSSO, F. R., HOGLE, G. S., SCHILLING, R. F. & JAESCHKE, W. H.: Oxapentamethylenediethylenethiophosphoramidate (OPSPA) in the treatment of human cancer. Ann. N. Y. Acad. Sci. 68: 1183~1196, 1958
- 12) CROSSLEY, M. L., ALLISON, J. B., PARKER, R. P., KUH, E. & SEEGER, D. R.: Chemotherapy of tumors in rats with certain ethylenephosphoramidates. Proc. Soc. Exptl. Biol. 83: 438~447, 1953
- 13) CROSSLEY, M. L., ALLISON, J. B., SEEGER, D. R. & KUH, E.: Chemotherapy of tumors in rats with piperazine-1,4-bis(N,N'-diethylenephosphoramidate). Proc. Soc. Exptl. Biol. 94: 388~391, 1957
- 14) CHERNOV, V. A., GRUSHINA, A. A. & LYTKINA, L. T.: Antitumor activity of phosphazine. Fed. Proc. 23: T 39~T 42, 1964
- 15) GOODMAN, L. E., TSON, K. C., KRAMER, S. P., ULFOHN, A., HOEGERLE, K., GABY, S. D., BAKAL, D., WEINBERG, T. & SELIGMAN, A. M.: Palliation of breast cancer with N-hexamethylene N',N''-diethylene thiophosphoramidate (KC-33). Proc. Amer. Assoc. Cancer Research 3: 229, 1961
- 16) Brit. P. No. 885,370 (ACC)
- 17) U. S. P. No. 3,134,784 (ACC)
- 18) VOGEL, A. W.: Tumor-marrow index: A means

- of laboratory evaluation of antineoplastic compounds. *Cancer Research* 21 : 1450~1454, 1961
- 19) SEEGER, D. R. & TOMCUFCIK, A. S. N,N'-Diethylene-N''-ethyl-N''-(1,3,4-thiadiazole-2-yl)phosphoramidate. *J. Org. Chem.* 26 : 3566, 1961
- 20) STOCK, C. C., CLARKE, D. A., PHILIPS, F. S. & BARCLAY, R. K. Sarcoma 180 inhibition screening data. *Cancer Research, Supplement No. 2* : 179~331, 1955
- 21) WILLIAMS, J. H. The effects of a series of ethylene amines against experimental cancer. *Cancer Research* 12 : 310, 1952
- 22) TOMCUFCIK, A. S., WILSON, S. D., VOGEL, A. W. & SLOBODA, A. : N,N'-Alkylene-bis(acrylamides), N-(acrylamidomethyl)-3-halopropionamides and related compounds : a new series of anti-tumor agents. *Nature* 191 : 611~612, 1961
- 23) Belg. P. No. 598, 856(ACC)
- 24) STEIN, R. J., CARBON, J., LANGDON, J. & RICHARDS, R. K. : The antitumor properties of N,N'-bis(3-bromopropionyl) and N,N'-bis(3-chloropropionyl) piperazine. *J. Lab. Clin. Med.* 56 : 949, 1960
- 25) DE PEYSTER, F. A., WIBIN, E. A., SCHMIDT, J. L. & GROVE, W. J. : Laboratory and clinical antitumor evaluation of N,N'-bis(3-bromopropionyl)(A-8103) and N,N'-bis(3-chloropropionyl)(A-20065) piperazine. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Research* 3 : 219, 1961
- 26) WASE, A. W. & STEIN, R. J. : Effects of anti-leukemic agents on cell permeability. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Research* 3 : 275, 1961
- 27) LOUIS, J., ROHN, R. J. & MONTA, R. W. : Treatment of chronic granulocytic leukemia with N,N'-bis(3-bromopropionyl) piperazine(A-8103). *Proc. Amer. Assoc. Cancer Research* 3 : 246, 1961
- 28) CREECH Jr., O., WREN, H., WRIGHT, R. M., RYAN, R. F. & KREMENTZ, E. T. : Clinical trial with A-8103(piperazine derivate) in treatment of solid tumors. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Research* 3 : 279, 1961
- 29) WILSON, H. E., HAGEN, P. S., AMICK, F., ISAACS, B. L., SCHWARTZ, S. O., TROBAUGH, F. E. & LOUIS, J. : Treatment of chronic granulocytic leukemia with N,N'-bis(3-methanesulfonyloxpropanoyl) piperazine (A-20968). *Proc. Amer. Assoc. Cancer Research* 3 : 372, 1961
- 30) MONTA, R. W., TENPAS, A., BATTLE, J. D., ROHN, R. J., LOUIS, J. & LOUIS, N. B. : A-8103 in polycythemia. *J. Amer. Med. Assoc.* 190 : 833~836, 1964

STUDIES ON ANTI-TUMOR AGENTS. I

Anti-tumor Activities of new Ethylenimino Derivatives

CHI HARU SAITO & SHIGEH O INABA

Research Department, Pharmaceuticals Division, Sumitomo Chemical Co., Ltd.

Anti-tumor activities of novel compounds, N,N'-diethylene-N''-(5-methyl-1,3,4-thiadiazole-2-yl) phosphoramidate (S 261) and Bis-(β -ethylenimino propionyl) piperazine (S 509) were investigated.

These compounds having ethylenimino radicals as functional groups showed potent anti-tumor activities against Ehrlich carcinoma, Sarcoma 180 in mice and Yoshida sarcoma, AH 130 hepatoma in rats, and their therapeutic indices against mouse tumors were greater than that of TESP A. Remarkable activities on mouse ascitic tumor of S 261 were found to be associated with direct marked cytotoxic activities on the tumor cells.