

核 酸 関 連 化 合 物 の 抗 腫 瘍 性 の 研 究 (I)

6-Mercaptopurine-ribose (Thio-inosine) の Rauscher Leukemia virus 及び Leukemia 1210 細胞に対する抑制効果

藤 田 晴 久・豊 島 滋

慶応大学医学部薬化学研究所・2 研

(昭和 44 年 12 月 22 日受付)

6-Mercaptopurine (以下、6-MP と略す) の抗白血病ウイルス性及び抗腫瘍性については既に多くの報告のあるところであるが¹⁾、より毒性が低く且つ効果の適確な抗白血病性化学療法剤の検索が望まれている。

6-Mercaptopurine-ribose (以下、6-MPR と略す) は 6-MP の riboside に相応し、今日まで、PIERCE ら²⁾、BROCKMAN^{3,5)}、JEANETTE ら⁴⁾、SIDWELL^{6,7)} ら及び GOLDIN ら⁸⁾ によつてその抗白血病性及び抗腫瘍性が報告されているが、その詳細な治療効果についての系統的な検討は殆んど報告をみていない。

私共は核酸関連化合物の抗腫瘍性の検索研究の一部として、6-MPR の murine leukemia virus に対する抑制効果と Leukemia 1210 細胞 (以下、L-1210 と略す) 増殖に対する抑制効果について検討を行なつたので、これの実験の結果について記述する。

実験材料及び方法

薬剤：6-MP は Merck 製のものを使用し、また 6-MPR は森下製薬から提供を受けた。6-MP も 6-MPR も共にアルカリ溶液として加温により溶解し、次いで HCl で pH を 8.2~8.4 に補正して使用した。

動物：Rauscher Leukemia virus (以下、RLV) の実験には生後 4~5 週令の ICR-JCL 系マウスを使用した。また L-1210 の実験には体重 18~20 g の BDF₁ マウスを使用した。

使用ウイルス及び細胞：今回使用したマウス白血病ウイルスは RLV で京大ウイルス研の松本教授から、また L-1210 は癌研究所の桜井博士から分与されたもので当研究所で継代維持されているものである。

ウイルス、L-1210 細胞及び薬物の投与：ウイルス、L-1210 細胞及び薬物の投与は腹腔内投与により行なつた。

ウイルス接種後の脾臓重量の測定：ウイルスの腹腔内接種後一定日数を経たのち、マウスを頸動脈切断で放血死させ、開腹して脾臓を剔出し、その重量を測定した。また脾臓に於けるウイルス含量は、その脾臓の homogenate を調整し、これをマウスに接種して Focus For-

ming Unit (FFU) を測定することにより定量した。

Focus Forming Unit の測定：FFU の測定は PLUZNIK 及び SACHS⁹⁾ の方法によつた。即ち被検 homogenate の適当な稀釈液を生後 5 週令のマウスに尾静脈内注射し、5~7 日後放血死亡させ、脾臓を剔出し下記の処方固定液に加えて形成された病変発現 cell-colony 数を算えて FFU を算定する。固定液の処方は 70% エタノール 91：氷酢酸 4.5：40% ホルムアルデヒド 4.5 である。

L-1210 細胞増殖：10⁶/ml の L-1210 細胞の 0.1 ml を腹腔内接種し、薬物投与は細胞接種 24 時間後から死亡するまで 1 日 1 回投与した。

L-1210 細胞の薬物耐性獲得：L-1210 細胞の薬物耐性獲得には最小有効量の薬物を 1 日 1 回腹腔内に連続投与し、細胞継代は細胞接種後 5~6 日目に行ない、4 代継代後に、その L-1210 細胞に対する薬物の最小有効量を測定し漸次投与量を増加していった。耐性形成係数は

$$\frac{\text{所定の継代後の細胞に対する最小有効量 (mg/kg/day)}}{\text{感受性株に対する最小有効量 (mg/kg/day)}}$$

で現わした。

推計学的処理：得られた実験結果の有意性の算定には、まず得られた結果を SMIRNOFF の棄却法により整理したのち、標本平均、標本分散、標準偏差を求め F 分布により 5% 及び 1% の危険率に於ける有意差を検討した。

実験結果

1：6-Mercaptopurine と 6-Mercaptopurine Riboside の急性毒性

まず 6-MP と 6-MPR のマウス腹腔内投与に於ける急性毒性を観察した。6-MP の LD₅₀ は 380 mg/kg、6-MPR の LD₅₀ は 2.5 g/kg であつた。これからみると 6-MPR は 6-MP より遙かに毒性が低く、約 1/7 の毒性であるといえる。

2：使用した RLV の力価の測定

使用した RLV を 0.1 ml/10 g に腹腔内接種し、28

表 1 Rauscher Leukemia ウイルスの力価の測定

接種したウイルス希釈液 (0.1 ml/10 g)	感染陽性マウス/ 全使用マウス
10 ⁻¹	6/6
10 ⁻²	6/6
10 ⁻³	6/6
10 ⁻⁴	4/6
10 ⁻⁵	0/6
10 ⁻⁶	0/6
10 ⁻⁷	0/6
10 ⁻⁸	0/6
感染量 (MID ₅₀ /ml)*	10 ^{-5.2}

*Mice Infective Dosis₅₀

表 2 Focus Forming Unit による力価の測定

FFU 測定日 (ウイルス接種後日数)	FFU/ml
5 日	4.5×10 ⁴
6 日	4.92×10 ⁴
7 日	1.07×10 ⁵
8 日	判定困難

日後に脾重量を測定し各ウイルス希釈液接種マウスの中で有意の脾重量の増加を示したマウスを感染陽性と判定して、50% マウス感染量 (MID₅₀) を測定した。対照として intact mice 13 匹の脾重量を求めると 0.15 g ± 0.02 であった。実験の結果は表 1 に示す。

また同一のウイルス材料の感染価を FFU の測定により検討した。その結果を表 2 に示す。

Focus はウイルス接種後 8 日目になるとある部分では重複し正確な Focus 数を算定することが不確実となる。ウイルス接種後 7 日目の値が最も脾重量法と一致するので以下 FFU の測定に当ってはウイルス接種後 7 日目に判定を行なうこととした。

3: 6-Mercaptopurine と 6-Mercaptopurine Riboside を初期投与した場合の Rauscher virus 抑制効果

RLV はウイルス接種後脾臓中に 3 日目位から現われ 10~14 日で最大量に対し以後恒久的に維持されるので 6-MPR をウイルス接種後初期に投与した場合、中期に投与した場合、更に後期に投与した場合について検討した。まず初期に投与した場合、50 MID₅₀ の RLV を 0.1 ml/10 g 腹腔内接種し、接種後 30 分、1 日後、2 日後、3 日後及び 4 日後の 5 回に亘り 1 日 1 回薬物を腹腔内に投与しウイルス接種後 25 日目に脾重量を測定した。実験の結果を表 3 に示す。

表 3 に見られるとおり、6-MPR の効果は 312 mg, 624 mg 及び 936 mg/kg/day のいずれの投与量に於いても認められるので、更に最小有効量の決定のため 6-

表 3 初期投与に於ける 6-mercaptopurine と 6-mercaptopurine-riboside の抗 Rauscher Leukemia ウイルス効果

群 別	使用マウス数	脾重量の阻止 パーセント (%)*
ウイルスを接種しないマウス	13匹	
ウイルス接種マウス	5	
6-mercaptopurine-riboside	312 mg/kg/day	77.9
	624	58.4
	936	100
6-mercaptopurine	100	62.3

$$* \left\{ \frac{\begin{array}{l} (\text{ウイルス接種コントロール群の脾重量}) \\ - (\text{薬物投与群の脾重量}) \end{array}}{\begin{array}{l} (\text{ウイルス接種コントロール群の脾重量}) \\ - (\text{ウイルスを接種しない群の脾重量}) \end{array}} \right\}$$

表 4 初期投与に於ける 6-mercaptopurine riboside の最小有効量

群 別	使用マウス数	脾重量の阻止 パーセント (%)
ウイルスを接種しないマウス	5 匹	
ウイルス対照コントロール	5	
6-mercaptopurine-riboside	125 mg/kg/day	22.0*
	250	44.0*

* P>0.05

MPR の投与量を少量にして行なってみた。実験の結果を表 4 に示す。

以上の結果からみて、6-MPR の最小有効量は 312 mg/kg/day の腹腔内連続投与である。

4: 6-Mercaptopurine Riboside を中期投与した場合の Rauscher virus 抑制効果

次にウイルス接種後 3 日目から 5 日間 6-MPR を投与した場合の RLV に対する抑制効果について検討した。実験の結果を表 5 に示す。

表 5 に見られるとおり、6-MPR も 6-MP も共に RLV に対し抑制的效果を示すがウイルスの接種量を 100 MID₅₀ の範囲に留めた場合に著明であり、且つ連続投与での最小有効量は 6-MP では 1 回量 100 mg/kg/day、6-MPR では 300 mg/kg/day である。

5: 6-Mercaptopurine-Riboside を後期投与した場合の Rauscher virus 抑制効果

6-MPR の投与をウイルス接種後 16 日目から開始し投与期間を 7 日間とし、観察期間を 150 日とする後期投与実験を行なった。またこれまでの 6-MPR による巨大脾形成の抑制が 6-MPR によるウイルス増殖の抑制を第 1 義的機作としているのか、あるいはウイルス増殖に起因する組織の病変現象の抑制を主要作用部位とするものか

表 5 中期投与に於ける 6-mercaptopurine riboside の効果

実験番号	接種ウイルス量	使用化合物	1回投与量 (mg/kg/day)	脾重量 (gm)	阻止率 (%)
実験 I	100 MID ₅₀	ウイルスを接種しないマウス ウイルスコントロール		0.116 0.383	
		6-mercaptopurine riboside	312	0.125	96.6
			625	0.150	87.2
			937.5	0.150	87.2
6-mercaptopurine	100	0.133	93.6		
実験 II	100 MID ₅₀	ウイルスを接種しないマウス ウイルスコントロール		0.170 0.340	
		6-mercaptopurine riboside	300	0.240	59
			6-mercaptopurine	100	0.235
		6-mercaptopurine riboside	312	0.480	48
6-mercaptopurine	100	0.430	51		
実験 III*	500 MID ₅₀	ウイルスを接種しないマウス ウイルスコントロール		0.280 0.666	
		6-mercaptopurine riboside	312	0.480	48
			6-mercaptopurine	100	0.430
		6-mercaptopurine riboside	250	0.210	44.4**
6-mercaptopurine	60	0.23	22.2**		

* 12 週令のマウスを使用

** P>0.05

表 6 後期投与による 6-mercaptopurine riboside と 6-mercaptopurine の効果

接種ウイルス量	投与化合物	1回投与量 (mg/kg/day)	投与期間 (ウイルス 接種後の日 数)	巨大脾形 成抑制率 (%)	脾内ウイルス量	
					FFU/ml	抑制率 (%)
100 MID ₅₀	6-mercaptopurine riboside	312	16~22	76.2	2739/5916*	53.7
	6-mercaptopurine	100	"	74.8	2744/5916	53.6
MID ₅₀	6-mercaptopurine riboside	312	16~22	85.0	189/1806	89.5
	6-mercaptopurine	100	"	87.8	201/1806	88.8
$\frac{1}{10}$ MID ₅₀	6-mercaptopurine riboside	312	16~22	93.9	52/932	94.3
	6-mercaptopurine	100	"	96.2	45/932	95.1

* 薬物処理マウスの脾内ウイルス量
薬物を投与しないマウスの脾内ウイルス量

を明らかにするため脾内ウイルス量を FFU により測定した。結果を表 6 に示す。

表 6 に示すとおり、6-MPR も 6-MP も共に RLV による巨大脾形成と脾内ウイルス量に対し抑制効果を示している。このことは 6-MPR と 6-MP の巨大脾形成の抑制効果が脾内ウイルス増殖の抑制に起因するものであることを示している。

6 : L-1210 細胞増殖に対する 6-Mercaptopurine、6-Mercaptopurine-Riboside の効果

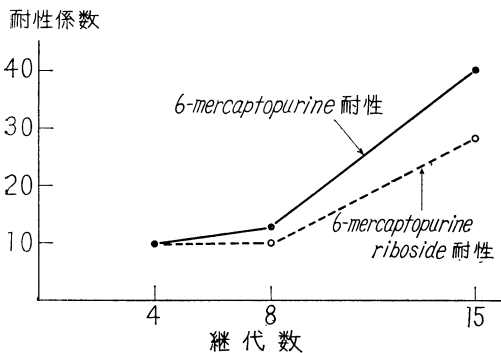
以上の実験の結果 6-MPR が Murine Leukemia ウイルスに抑制的效果を示すことが明らかにされたので次にマウス Leukemia 1210 細胞に対する 6-MP と 6-MPR の効果について検討した。実験の結果を表 7 に示す。

表 7 から明らかとなっており、L-1210 に対する最小有効量は 1 日 1 回連続投与した場合 6-MP では 7.5 mg/kg/

表7 L-1210 細胞増殖に対する 6-mercaptopurine と 6-mercaptopurine riboside の効果

使用化合物	投与量 (mg/kg/day)	平均生存 日数 (日)	life-span の増加率 (%)	Pr
6-mercaptopurine	15	10.7	53	P < 0.01
	7.5	10.7	53	P < 0.01
	3.5	8.7	24	
	1.8	8.3	18	
6-mercaptopurine riboside	75	11.0	57	P < 0.01
	37.5	11.0	57	P < 0.01
	18.5	10.3	47	
	9.2	9.3	32	
無処置対照群		7.0		

図1 薬剤耐性 L-1210 cells の形成の時間経過



day, 6-MPR では 18.5 mg/kg/day である。

7: L-1210 の 6-Mercaptopurine 及び 6-Mercaptopurine-Riboside 耐性獲得の時間経過

抗腫瘍性薬物の評価にとって1つの問題点は薬剤耐性細胞の出現の難易である。この点を明らかにするため 6-MP と 6-MPR に対する L-1210 の耐性発現の時間経過を検討した。最小有効量の 6-MP または 6-MPR を 1日1回連続投与し、投与されたマウスの死亡前に L-1210 細胞を次の無処置マウスに移し、更にこれに薬物

を投与する。このようにして耐性発現の時間経過を追ってゆくと、図1に示すようになる。

図1に示されるとおり、6-MPR に対する L-1210 細胞の耐性の獲得は 6-MP に対する耐性獲得より遅く、しかも形成された耐性度は 6-MPR のほうが 6-MP より低いようである。

8: 6-Mercaptopurine 耐性 L-1210 細胞と 6-Mercaptopurine 耐性 L-1210 細胞に於ける交叉耐性

前節で記述したとおり形成された 6-MP 耐性 L-1210 細胞と 6-MPR 耐性 L-1210 細胞の間に於ける交叉耐性について検討を行なった。PIERCE ら²⁾及び初期の BROCKMAN ら³⁾及び SKIPPERS ら⁴⁾は 6-MPR は急速に 6-MP に開裂し、作用するものであり、したがって 6-MP と 6-MPR との間には完全な交叉抵抗が成立すると報告している。その後 BROCKMAN⁵⁾は耐性 Hep No.2 細胞に於ける Formylglycinamide ribonucleotide 合成を指標として、6-MP と 6-MPR と 6-Mercaptopurine ribonucleotide の作用を検討しているが、6-MP と 6-Mercaptopurine ribonucleotide の間に完全な交叉耐性が成立するが、6-MP と 6-MPR の間にはこのような十分な交叉耐性は見出せなかつたと報告している。このように交叉耐性の問題はなお充分解明されていないといえるのでこの点についての検討を行なった。実験の結果を表8に示す。

表8に見られるとおり、6-MP 耐性 L-1210 細胞には 6-MP 及び 6-MPR は共に抑制効果は示さず、同時に 6-MPR 耐性 L-1210 細胞に対しては 6-MPR も 6-MP も共に抑制効果を示さない。即ちこの点に於いて、6-MP 耐性細胞と 6-MPR 耐性細胞の間には交叉耐性の成立が認められる。

考察及び要約

6-MP と 6-MPR の Rauscher Leukemia virus と L-1210 細胞に対する効果について検討した。6-MPR のマウス腹腔内投与に於ける LD₅₀ は 2.5 g/kg、これに対して 6-MP のそれは 380 mg/kg で約 1/7 である。

表8 6-mercaptopurine 耐性 L-1210 細胞と 6-mercaptopurine riboside 耐性 L-1210 細胞に於ける交叉耐性

耐性 L-1210 細胞の種類	化合物	投与量 (mg/kg/day)	平均生存日数	
			無処置対照群	処置群
6-mercaptopurine-Sensitive-L-1210	6-mercaptopurine	7.5	7.0	10.7
6-mercaptopurine-Resistant-L-1210	6-mercaptopurine	300	8.0	8.0
6-mercaptopurine-Resistant-L-1210	6-mercaptopurine riboside	1500	7.8	7.2
6-mercaptopurine riboside-Sensitive-L-1210	6-mercaptopurine riboside	37.5	7.0	11.0
6-mercaptopurine riboside-Resistant-L-1210	6-mercaptopurine riboside	500	8.0	7.6
6-mercaptopurine riboside-Resistant-L-1210	6-mercaptopurine	225	8.2	8.2

Rauscher Leukemia virus に対する 6-MPR と 6-MP を 1 日 1 回 5 日間投与した場合の最小有効量は 6-MPR で 300~312 mg/kg, 6-MP で 100 mg/kg であった。

この有効量で十分な抑制を得るための接種ウイルス量の限界は 100 MID₅₀ までであり、それ以上の接種ウイルス量を用いた場合には、6-MPR も 6-MP も共にその効果は必ずしも判然としなない。この LD₅₀ と最小有効量より治療係数を算出すると、6-MPR では 2500/300=8.3 であるのに対し、6-MP では 380/100=3.8 で 6-MPR が約 2 倍大であった。6-MP と 6-MPR の巨大脾形成の抑制効果はウイルス接種直後にこれらの化合物を投与しても、3 日後から投与しても、ウイルス接種 16 日後から投与を始めても認められるものであった。このような 6-MP と 6-MPR の巨大脾形成の抑制はウイルスの増殖の抑制に起因しているものと考えられる。6-MP と 6-MPR は L-1210 細胞接種後の平均生存日数を延長する。この点に於ける 6-MPR の最小有効量は 18.5 mg/kg であり、これに対し 6-MP のそれは 7.5 mg/kg でこれから算出した係数は 6-MPR で B 5 であるに対し 6-MP で 51 であった。

6-MP と 6-MPR に対する耐性発現に要する日数は 6-MPR のほうが 6-MP よりもいくぶん遅いようであり、且つ形成された耐性度も低いようである。しかし 6-MP に耐性の L-1210 細胞は 6-MPR にも交叉耐性を示し、また 6-MPR 耐性 L-1210 細胞は 6-MP にも耐性を示す。このことは生体内で 6-MPR は脱リボースされて 6-MP となりこれが phosphoribosyltransferase により 6-MP riboside となつて作用するものであることを示唆している。しかしその反面、6-MPR は 6-MP にくらべ著しく毒性は低く、しかもその Rauscher ウィルスと L-1210 に対する含有量を 6-MP の有効量とく

らべた場合、必ずしも毒性の低下ほどには効果の低下は来していない。換言すれば、6-MPR の治療係数は Rauscher ウィルスに対しても L-1210 細胞に対しても 6-MP より大である。このことは 6-MPR の総てが 6-MP に転換されないことに起因しているとも考えられるし、生体内でそのような転換の部位に到達し滲入する効率の問題とも関連するかも知れない。これらの点は今後の検討により解明される問題であろう。

文 献

- 1) MILA PIERCE, JUDITH HALL & NATIVID OZOA: Cancer Chemotherapy Report **14**, 121~128 (1961)
- 2) R. W. BROCKMAN: Cancer Chemotherapy Report **18**, 137~138 (1962)
- 3) JOHN A. MONTGOMERY, GLON J. DIXON, ELIZABETH A. DULMAGE, H. JEANETTE, THOMAS, R. WALLACE BROCKMAN & HOWARD E. SKIPPER: Nature **199**, 769~772 (1963)
- 4) R. W. BROCKMAN: Cancer Res. **25**, 1596~1605 (1965)
- 5) ROBERT W. SIDWELL, GALEN J. DIXON, SARA M. SELLERS & FRANK M. SCHABEL, Jr.: Cancer Chemotherapy Report **50**, 299~312 (1966)
- 6) ROBERT W. SIDWELL, SARA M. SELLERS, GALEN J. DIXON & FRANK M. SCHABEL, Jr.: Cancer Res. **28**, 35~40 (1968)
- 7) ABRAHAM GOLDIN, HARRY B. WOOD, Jr. & ROBERT R. ENGLE: Cancer Chemotherapy Report **1**, 1~29 (1968)
- 8) D. H. PLUZNICK & L. SACHS: J. Nat. Cancer Inst. **33**(3), 535~546 (1963)
- 9) H. E. SKIPPER, J. A. MONTGOMERY, J. R. THOMSON & F. M. SCHABEL: Cancer Res. **19**, 425~437 (1959)

ANTITUMOR EFFECT OF NUCLEIC ACID ANALOGUES (I)

HARUHISA FUJITA and SHIGESHI TOYOSHIMA

Pharmaceutical Institute, School of Medicine, Keio University

The inhibitory activity of 6-mercaptopurine and 6-mercaptopurine riboside against Rauscher Leukemia Virus and Leukemia 1210 cells was studied. LD₅₀ of 6-mercaptopurine riboside was 2.5 g/kg in mice by intraperitoneal injection and that of 6-mercaptopurine was 380 mg/kg.

6-Mercaptopurine and 6-mercaptopurine-riboside were effective against Rauscher Leukemia Virus. The therapeutic index of 6-mercaptopurine-riboside was 8.3 and that of 6-mercaptopurine was 3.8. These drugs were effective against Leukemia L-1210 cells too, and the therapeutic index of 6-mercaptopurine-riboside was 135, and that of 6-mercaptopurine was 51. From these results, it may be said that 6-mercaptopurine riboside was effective twice than 6-mercaptopurine.

The development of the resistance of L-1210 cells to 6-mercaptopurine riboside was slower and a little weaker than that of 6-mercaptopurine resistance.

The clear cross-resistance between 6-mercaptopurine resistant cells and 6-mercaptopurine-riboside resistant ones, was observed.