

## R-74 と Cyclophosphamide の抗腫瘍性に関する比較研究

村瀬潤一・守野豊彦・山本 宏

東洋醸造株式会社研究開発本部

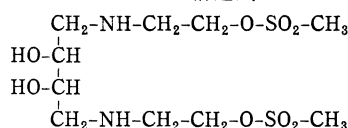
小宮山寛機・梅沢 巖

北里研究所

(昭和 52 年 2 月 17 日受付)

HORVÁTH & VARGHA<sup>1)</sup> により合成された 1,4-di (2-methylsulphonyloxy-ethylamino)-1,4-dideoxyerythritol-dimethylsulphonate (以下, R-74) は, 下図に示す構造をもったアルキル化剤である。

R-74 の構造式



図から明らかなように, 本品は活性基である methyloxy ethyl が担体である amino-glucoalcohol と結合したもので, この構造から多くの興味ある推測を懷かせた。すなわち, 1965 年 MERZABANI & SAKURAI<sup>2,3)</sup> は AH-7974 および AH-66 等 naturally resistant experimental tumor に有効なアルキル化剤の開発として aminoglycol の methane sulfonic acid ester に着目して, その合成を手がけ, 多くの誘導体の中から N-methyl-bis (3-mesyloxy-propyl) amine HCl (No. 838) および bis (3-mesyloxy-propyl) amine HCl (No. 864) が強い制癌作用のあることを明らかにした。両者の構造上の差異は僅かに中心の窒素原子が置換基 (この場合メチル基) を有するか否かであるが, 先に述べた naturally resistant experimental tumor に対する効果に対して明らかな相違が認められた。

R-74 はこの窒素原子にさらに大きな担体である 4 単糖が置換したものであることから, 本物質の制癌性に着目し, とくに代表的なアルキル化剤である cyclophosphamide (CTX) と比較実験を行なったので報告する。

## 実験材料および方法

## 1. 使用薬剤

試験検体 R-74 はハンガリーの Gedeo Richter 社から分与された白色無臭の結晶性粉末で, 水に極めて溶けやすく, 実験時に無菌蒸留水に溶解して試験した。CTX (塩野義製薬社製) は市販品を購入した。

## 2. 実験動物および腫瘍

いずれの腫瘍も当研究室で継代保存中の腫瘍を使用し

た。

(a) 白血病 L-1210 および P-388 は東大医科研動物繁殖室から定期的に分与を受けた体重 20~22g の CDF<sub>1</sub> マウス (BALB/CXDBA) の腹腔にそれぞれ  $1 \times 10^5$  個の細胞を移植した。

(b) EHRlich 腹水癌細胞は静岡実験動物組合から入手した体重 20g 前後の ddy マウスを用いて試験した。

(c) Sarcoma 180 および NF sarcoma 固型腫瘍は無菌的に摘出した 10 日目の腫瘍を小片とし, trocar を用いて ddy マウスの腋窩皮下に移植し実験に供した。

## 実験成績

## (1) 白血病 P-388 に対する効果

(a) 1 群 7 匹の CDF<sub>1</sub> マウスに P-388 細胞を移植し, 24 時間後から 1 日 1 回連日 10 日間腹腔注射したところ, Table 1 に示すとおり 10 mg/kg を投与した場合, 最も優れた効果を發揮し, 7 匹すべてが完全に治癒した。次いで 7.2 mg/kg 投与群の Increase life span (ILS) は 275% 以上であり, 7 匹中 3 匹が治癒した。

これに対し, CTX 投与群では 27.6 mg/kg 投与群が最も優れた効果を示し, ILS は 400% 以上で 7 匹中 4 匹が完全治癒した。

(b) 次に白血病 P-388 に対し, 総量を一定にし種類のスケジュールで治療を行ない, その効果をしらべたところ, Table 2 に示すとおり 10 mg/kg を連日 4 日間投与した場合が最も効果的であった。

## (2) 白血病 L-1210 に対する効果

L-1210 細胞を CDF<sub>1</sub> マウスの腹腔に移植し, 1 群 7 匹として 24 時間後から各薬量で治療を行なった。Table 3 に示すとおり, 14.4 mg/kg を連日 10 日間腹腔注射したところ ILS は 111% であり 1 匹が 60 日以上延命した。また対照として用いた, CTX 治療群では 55.2 mg/kg を分割した場合, 最も優れた効果が認められ, R-74 と同様 ILS は 111% であった。

次に総投与量を一定にして投与スケジュールを変えて R-74 の治療効果をしらべたところ, Table 4 に示すと

Table 1 Antitumor activity on leukemia P-388

Drug	Dose* <sup>1</sup> (mg/kg/ day)	MDS* <sup>2</sup>	ILS%* <sup>3</sup>	60-day survivors
control	saline	12	0	0
R-74	14.4	19	58	0
	10.0	>60	>500	7
	7.2	45	>275	3
	4.8	26	117	0
	2.4	19	58	0
	1.2	15	25	0
CTX	55.2	16	33	0
	41.3	>22	>83	1
	27.6	>60	>400	4
	13.8	>24	>100	1
	6.9	22	83	0

\*<sup>1</sup>: Treatment was given i. p. from Day 1 to Day 9.

\*<sup>2</sup>: Median survival day.

\*<sup>3</sup>: Increased life span.

Table 2 Effect of R-74 on leukemia P-388

Dose (mg/kg/ day)	Treatment schedule	MDS* <sup>1</sup>	ILS* <sup>2</sup>	60-day survivors
control		10	0	0
5.7	Day 1—7	20	100	0
2.9		15.5	55	0
control		12.0	0	0
10	Day 1—4	31.5	>163	2
5		23.0	92	0
10	Day 1, 3, 5, 7	25.5	113	0
5		21.0	75	0

\*<sup>1</sup>: Median survival day.

\*<sup>2</sup>: Increased life span.

おり 1, 3, 5 および 7 日の隔日投与群より 7 日間連日投与群のほうがすぐれた治療成績が得られた。

### (3) EHRLICH 腹水癌に対する効果

継代 7 日目の腹水癌細胞  $1 \times 10^7$  個を ddy マウスの腹腔に移殖 24 時間後から腹腔投与法で治療を開始し、延命効果をしらべたところ 7.2 mg/kg を連日 10 日間投与した場合 ILS は 275% 以上で 7 匹中 4 匹が完全に治癒し、4.8 mg/kg 投与群でも 2 匹が治癒した。一方、CTX 投与群の場合、55.2 mg/kg 投与群の ILS が 188% 以上、41.3 mg/kg 投与で 163% 以上の ILS が得られ、それぞれ 3 および 2 匹が完全に治癒した (Table 5)。

Table 3 Antitumor activity on leukemia L-1210

Drug	Dose* <sup>1</sup> (mg/kg/ day)	MDS* <sup>2</sup>	ILS%* <sup>3</sup>	60-day survivors
control	saline	9	0	0
R-74	20.0	19	111	0
	14.4	>19	>111	1
	10.0	16	78	0
	7.2	15	67	0
	4.8	14	55	0
	2.4	13	44	0
	1.2	11	22	0
CTX	55.2	19	111	0
	41.3	16	78	0
	27.6	15	67	0
	13.8	10	11	0
	6.9	10	11	0

\*<sup>1</sup>: Treatment was given i. p. from Day 1 to Day 9.

\*<sup>2</sup>: Median survival day.

\*<sup>3</sup>: Increased life span.

Table 4 Effect of R-74 on leukemia L-1210

Dose (mg/kg/ day)	Treatment schedule	MDS* <sup>1</sup>	ILS* <sup>2</sup>	60-day survivors
control		8	0	0
5.7	Day 1—7	13.5	69	0
2.9		13.0	63	0
control		10	0	0
10	Day 1—4	16	60	0
5		14	40	0
10	Day 1, 3, 5, 7	14.5	45	0
5		13	30	0

\*<sup>1</sup>: Median survival day.

\*<sup>2</sup>: Increased life span.

### (4) 固型腫瘍に対する効果

#### (a) Sarcoma 180 固型腫瘍

前述の方法で Sarcoma 180 の小片を移植、24 時間後から R-74 を 1 日 1 回連日 7 日間腹腔注射し、移植 10 日目にマウスを屠殺して腫瘍を摘出し、対照群との重量比から制癌効果をしらべた。

その結果、Table 6 に示すとおり、5.7 mg/kg 投与群で 80% の阻止率が得られた。

#### (b) NF sarcoma 固型腫瘍

Sarcoma 180 固型腫瘍の場合と同じ方法で移植治療したところ、Table 7 のとおり、sarcoma 180 に対する効

Table 5 Antitumor activity on EHRlich ascites carcinoma

Drug	Dose* <sup>1</sup> (mg/kg/ day)	MSD* <sup>2</sup>	ILS* <sup>3</sup>	60-day survivors
control	saline	16	0	0
R-74	10.0	42	>186	1
	7.2	>60	>275	4
	4.8	26	>63	2
	2.4	23	44	0
	1.2	19	19	0
CTX	55.2	46	>188	3
	41.3	42	163	1
	27.5	26	63	0
	13.7	16	0	0
	6.9	16	0	0

\*<sup>1</sup>: Treatment was given i. p. from Day 1 to Day 9.

\*<sup>2</sup>: Median survival day.

\*<sup>3</sup>: Increased life span.

Table 6 Effect of R-74 on sarcoma 180

Dose* <sup>1</sup> (mg/kg/ day)	Mean tumor* <sup>2</sup> weight(g)	Inhibi- tion (%)	Body weight on Day 7 (g)	Mean spleen weight (mg)
saline	0.840±0.31	0	24.4±2.07	192.2±44.3
5.7	0.164±0.16	80	19.4±1.61	34.4±6.90
2.85	0.681±0.41	19	22.5±1.68	103.1±36.4
1.43	0.810±0.50	13	24.5±0.99	149.2±38.2

\*<sup>1</sup>: Treatment was given from Day 1 to Day 7.

\*<sup>2</sup>: Mice were sacrificed on 10th day after inoculation of tumor.

Table 7 Effect of R-74 on NF sarcoma

Dose* <sup>1</sup> (mg/kg/ day)	Mean tumor* <sup>2</sup> weight (g)	Inhibi- tion (%)	Body weight on Day 7 (g)	Mean spleen weight (mg)
saline	0.623±0.14	0	26.0±1.76	196.8±43.9
5.7	0.088±0.07	86	17.7±2.49	25.1±10.3
2.85	0.354±0.213	43	23.2±1.58	65.5±22.5
1.43	0.564±0.11	9	24.1±1.66	122.4±33.9

\*<sup>1</sup>: Treatment was given i. p. from Day 1 to Day 7.

\*<sup>2</sup>: Mice were sacrificed on 10th day after inoculation of tumor.

果より若干劣るが、5.7 mg/kg 投与で 86% の阻止率が得られた。

以上のとおり、R-74 物質は腹水腫瘍だけでなく固型腫瘍に対しても有効であった。

### (5) 体重および脾臓重量

宿主に対する毒性の指標として体重および脾臓の重量についてしらべた。すなわち、Table 6, 7 に S-180 および NF-sarcoma を治療した群での 7 日目（投与終了時）の体重、および 10 日目（屠殺時）の脾臓重量を示すが、いずれの場合も著明な腫瘍の増殖阻止効果が認められる薬量では宿主に対する毒性も強く現われ、著しい体重減少および脾臓の萎縮が観察された。

### 考 察

癌化学療法分野で、CTX, BCNU, Me-CCNU 等アルキル化剤が使用される割合は決して少なくない。さらに制癌抗生物質 Mitomycin C もその制癌性はアルキル化作用によるものであるのは衆知のことである。

新たに合成された R-74 物質は SANDBERG & GOLDIN<sup>4)</sup> および我々の実験から各種実験腫瘍に対して強い抗腫瘍性を有することが示された。我々の実験でとくに腹水型腫瘍に対しては対照として用いた CTX に比べ優るとも劣らない成績が得られた。

マウス白血病 L-1210 および P-388 に対する効果は毎日分割して投与した場合、かなり大量に投与することができ、しかも優れた延命効果が得られている。因みに R-74 のマウスにおける毒性 (LD<sub>50</sub>) は約 200 mg/kg (静脈) および 60 mg/kg (腹腔) であった。

次に 40 mg/kg を一定量として、投与スケジュールを変えて投与したところ P-388 に対しては移植 1 日目から連日 4 日間投与した場合、最も良い効果が認められており、また、L-1210 に対しては連日 7 日間投与の延命率が優れていた。効果的な投与方法は細胞の種類によっていくぶん異なるが SANDBERG 等<sup>4)</sup> の報告でも R-74 はスケジュール依存性が認められており、それらの成績と合わせ考えるならば R-74 物質は初期に比較的大量投与を行ない、以後分割投与する組合せによってはさらに優れた治療効果が期待されよう。また、桜井等<sup>2,3,5)</sup> によれば No. 838 および No. 864 が L-1210 だけでなく腹水肝癌、AH-7974、および AH 66 等に有効であることから、これらに近似している R-74 物質も各種腹水肝癌に対する効果も期待出来る。

さらに Sarcoma 180 および NF-sarcoma に対する治療実験成績にみられるように R-74 物質は固型腫瘍に対しても有効である。今回は 1 投与方法で行なった成績であるが、投与スケジュールを変えることによって、さらに優れた効果を挙げ得ることも考えられる。しかし今回の治療成績からみると優れた効果を得る薬量では体重減少が認められており、従来の cytotoxic に作用すると考えられている制癌剤と同様宿主に対する毒性も危惧される。我々の実験で腫瘍摘出時に脾臓を取り出して、そ

の重量を測定したところ明らかに萎縮がみられた。

HINDY 等<sup>6)</sup>によると R-74 は慢性リンパ性白血病に有効であるが、同時に免疫抑制作用もあることが報告されており、ZSEBÖK 等<sup>7)</sup>および BENCZUN 等<sup>8)</sup>はマウスを用いた羊赤血球に対する 19S および 7S 抗体の産生をしらべたところ強い免疫抑制作用を有することを認めている。一般にアルキル化剤、とくに CTX は強い免疫抑制作用を有すること<sup>9,10)</sup>が知られているが、本物質も詳細な実験成績を待たなければならないとしても充分注意しなければならないであろう。

本物質は DNA 合成阻害として考えられているが、今後作用機序をはじめ効果増強、或いは交叉耐性の有無および副作用等について詳細にしらべ、臨床への適応性について検討する予定である。

#### 文 献

- 1) HORVATH, T. & L. VARGHA : New alkylphonyl acid esters with cytostatic activity. *Acta Un. Int. Cancer* 20 : 71, 1964
- 2) EL-MERZABANI, M. M. & Y. SAKURAI : Inhibition of tumor growth by new sulfonic acid esters of aminoglycols. *Gann* 56 : 575~587, 1965
- 3) EL-MERZABANI, M. M. & Y. SAKURAI : A new alkylating antitumor agent effective on experimental tumors resistant to nitrogen mustard. *Gann* 56 : 589~598, 1965
- 4) SANDBERG, J. & A. GOLDIN : Antileukemic action of new sugar derivative dimethanesulfonate (NSC-122402) and related compound in mice. *Cancer Chemo. Rept. Part 1*. 53 : 367~376, 1969
- 5) EL-MERZABANI, M. M. & Y. SAKURAI : Anticancer activities of methanesulfonic acid esters of aminoglycols against mouse leukemia L-1210. *Gann* 58 : 199~201, 1967
- 6) HINDY, I. ; C. SELLEI, S. FCKHARDT, J. SZENTKLARAY & F. HARTAI : Investigations with 1,4-bis-(2-mesyloxyethylamino)-1,4-dideoxy-meso-erythritol (R-74). *Neoplasma* 18 : 277~282, 1971
- 7) ZSEBOK, Z. ; G. PETRANYI, P. ALFOLDY, M. BENCZUR & L. KOVACS : The immuno-suppressive effect of R-74. *The 5th Hung. Conf. Pharm. Thera.* 266, 1968
- 8) BENCZUN, M. : The selective effects of immunosuppressive treatment on the humoral immunoresponses. Personal communication
- 9) SANTOS, G. W. & A. H. OWENS : A comparison of the effects of selected cytotoxic agents on the primary agglutinin response in rats injected with sheep erythrocytes. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 114 : 384~401, 1964
- 10) UMEZAWA, I. ; K. KOMIYAMA, M. KASAMATSU & T. HATA : A study of immunosuppressive effect of antitumor agents. *Kitasato Arch. Exp. Med.* : 35~45, 1972

## COMPARATIVE INVESTIGATION OF THE ANTITUMOR ACTIVITY OF R-74 AND CYCLOPHOSPHAMIDE

JUN'ICHI MURASE, TOYOHICO MORINO and HIROSHI YAMAMOTO  
Department of Research and Development, Toyo Jozo Co., Ltd.

KANKI KOMIYAMA and IWAO UMEZAWA  
Department of Cancer and Pathology, Kitasato Institute

R-74, 1,4-di(2-methyl sulphonyloxy-ethylamino)-1,4-dideoxyerythrite-dimethylsulphonate, is an alkylating agent whose antitumor properties were originally determined by tests against transplanted tumors. In the present study attention has been focused primarily to compare the antitumor effect between R-74 and typical alkylating agent cyclophosphamide (CTX). Mouse leukemia P-388 and L-1210, EHRLICH ascites carcinoma, sarcoma-180 and NF sarcoma solid tumor, responded to treatment with R-74, and some schedule dependency was observed. R-74 was intraperitoneally injected every day for 10 days from 24 hours after the intraperitoneal injection of leukemia P-388 into CDF<sub>1</sub> mice, all treated animals survived more than 60 days at a dose of 10 mg/kg/day. CTX was most effective on leukemia P-388 with a dose of 27.6 mg/kg producing an increase in median survival time of >400%, and 4 out of 7 mice survived over 60 days. The effects of R-74 on leukemia L-1210 and EHRLICH ascites carcinoma were almost equally effective with that of CTX. The effects of three therapeutic schedules (daily for 7 days, daily for 4 days, and every other day for 7 days) with R-74 were evaluated on mouse leukemia L-1210 and P-388. It was found that daily treatment for 4 days was most effective

against leukemia P-388, but no remarkable schedule dependency was observed on leukemia L-1210. R-74 was intraperitoneally injected every day for 7 days from 24 hours after the subcutaneous transplantation of small piece of sarcoma-180 or NF sarcoma solid tumor by a trocar, and the agent was found to be equally effective in the treatment of sarcoma-180 and NF sarcoma solid tumor. The toxicities of R-74 were evaluated by comparing the weight of spleen and thymus between treated and untreated mice. It was observed that the weights were decreased according to the increasing of dosage. Thus, R-74 was equally or more effective with CTX but lymphatic toxicities must be considered.