

ニトロソウレア蔗糖誘導体, 6'-[[[(2-Chloroethyl) nitrosoamino] carbonyl] amino]-6'-deoxysucrose (NS-1D) に関する研究

II. マウス末梢血および骨髄に与える影響

田 納 晃¹⁾・枝 浪 謙 一²⁾・小 宮 山 寛 機³⁾
 梅 沢 巖³⁾・須 網 哲 夫³⁾

1) 日新製糖株式会社

2) 北里研究所制癌室

3) 慶応義塾大学理工学部応用化学科

(昭和60年5月27日受付)

新しいニトロソウレア誘導体 6'-[[[(2-chloroethyl) nitrosoamino] carbonyl] amino]-6'-deoxy-sucrose(NS-1D)の骨髄毒性について他のニトロソウレア誘導体(ACNU, クロゾトシンTA-077)と比較検討した。各薬剤のL1210 leukemiaに対する最適有効投与量を1回ip投与した場合、いずれの薬剤を投与した場合でも投与後3日後に末梢白血球数が最低値を示したが、この減少はNS-1Dとクロゾトシンでは軽度で無処置群の65%であり、その後、日数の経過とともに速やかに回復した。

薬剤投与後の骨髄細胞数、骨髄細胞のCFU-sおよびCFU-cについて検討した。

その結果、骨髄細胞数の最低値は、NS-1Dを投与した場合、1日後に現われたが、その後回復し始め、1週間後には正常値まで回復した。これに反し他の薬剤では最低値はやや遅れ3日後に現われた。その後の回復はNS-1D同様速やかであるが、薬剤によっては軽度の抑制が続いた。

一方CFU-cは骨髄細胞数とはほぼ同様の傾向を示したが、CFU-sはこれらとは異なりいずれの薬剤でも顕著な抑制がみられた。

以上示したように、新ニトロソウレア誘導体NS-1Dは骨髄毒性を示すものの既知のニトロソ系化合物と比較しその障害程度は低く、回復も速やかであった。

ニトロソウレア系制癌剤は、マウスあるいは人の腫瘍に対し優れた抗腫瘍効果を示すことが知られているが、これらのニトロソウレアは他のアルキル化剤と同様に、骨髄に遅延性および蓄積性の障害を与えることが臨床的に充分治療効果を発揮しえない原因になっている。

これまでに、この骨髄毒性を軽減させる目的で多くのニトロソウレア誘導体が合成されてきたが、臨床満足できる誘導体は見出されていない¹⁾。今回我々は新しい水溶性ニトロソウレア誘導体NS-1Dを合成し、種々のマウス腫瘍に対する効果を調べたところ既知のニトロソウレア誘導体と比較して優るとも劣らない効果を示した。そこで副作用特に骨髄毒性について検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 抗腫瘍作用

7週齢のCDF₁マウス(BALB/C×DBA/2)を静岡実験動物協同組合より購入し、一定の飼育を経て実験に

供した。L1210 leukemiaは、癌化学療法センターから入手し、DBA/2マウスで継代しているものを用いた。抗腫瘍活性は60日以上生存したマウスの数(60-day survivors)で評価した。

2. 薬剤

NS-1D, クロゾトシン(以下CZT)およびTA-077は慶応義塾大学理工学部応用化学科および日新製糖研究室で合成し、ACNUは市販品を使用した。これらは使用前に各々目的の投与量となるように、滅菌した生理食塩水に溶解し、マウスの体重10g当り0.1mlの割合で投与した。

3. 骨髄細胞懸濁液の調整

マウスの大腿骨を摘出し、この骨髄に1.0mlのイーグルMEM培養液を注入し骨髄細胞懸濁液を調製した。CFU-sおよびCFU-cの測定には、チュルク氏液で染色し血球計算板にて有核細胞を計測し使用した。

4. Colony Forming Unit in Spleen(CFU-s)の測定

Table 1 Effect of nitrosoureas on L1210 leukemia

System	Sample	Dose range (mg/kg)	Optimal dose (mg/kg)	60-day* survivors
ip-ip day 1	NS-1D	20-450	200	7/7
	ACNU	10-60	35	7/7
	CZT	5-50	25	5/7
	TA-077	20-400	150	6/7

L1210 cells (1×10^5 cells/mouse) were inoculated ip into CDF₁ (BALB/C \times DBA/2) mice. Drugs were dissolved in sterile physiological saline before use and administered ip at a volume of 0.1ml/10g body weight on day 1.

* 60-day survivors/treated mice.

マウス骨髄細胞の CFU-s の測定は transplant 法を用いた⁹⁾。1群5匹からなる8週齢の CDF₁ マウスに各薬剤を ip 投与した後、経時的にマウスを屠殺し大腿骨より骨髄細胞を調製した。次いで、あらかじめ 950 rad のコバルト 60 を全身照射した recipient CDF₁ マウス (5匹/群) の尾静脈に上述の方法で、 $0.5 \sim 1.0 \times 10^5$ cells/ml に調製した骨髄細胞懸濁液を 0.5 ml 注入し、8日後にマウスを屠殺し、脾臓を摘出しブアン液で固定後、脾表面に形成されている細胞のコロニーを数えた。

5. Colony Forming Unit in Culture (CFU-c) の測定

CFU-c の測定は *in vitro* 法に従い行なった⁹⁾。大腿骨より採取した骨髄有核細胞 1.0×10^5 個を含む 20% 仔牛血清、0.88% メチルセルロース、20% マウス L 細胞培養上清 (コロニー刺激因子) からなる α -培地 1.0 ml を 30 mm ペトリ皿に播き (3枚/群) 37°C で7日、間5% CO₂ 孵卵器でインキュベート後コロニーを顕鏡下で計測した。

6. 末梢白血球の計測

マウス尾静脈よりマイクロピペットで 5 μ l の末梢血を採取し、マイクロセルカウンター (TOA model CC-108) で白血球数を測定した。

II. 成績

1. L1210 leukemia に対する効果

NS-1D, ACNU, CZT および TA-077 の ip 移植した L1210 leukemia に対する効果を種々の薬量を用い ip 1回投与法で調べた。その結果、いずれの薬剤でも量的な違いはあるが L1210 leukemia に対し顕著な抗腫瘍効果を示した。その中で最も効果の見られた薬量を optimal dose とし Table 1 に示し、以後の骨髄毒性の実験はこの薬量を使用した。

2. 末梢白血球数および骨髄細胞数に対する作用

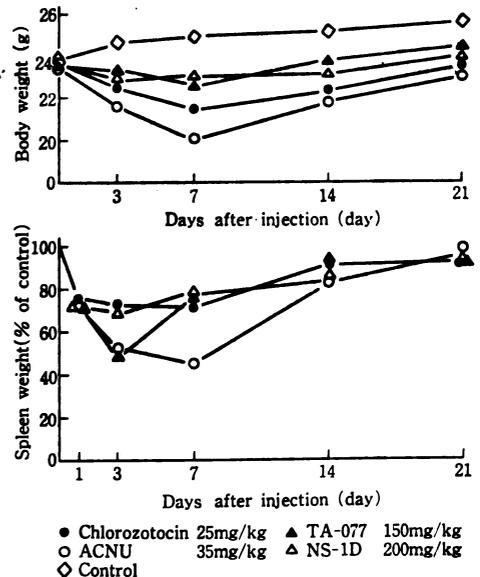
上述の実験で得られた各薬剤の optimal dose を用い白血球数および骨髄細胞数に与える影響を調べる目的

で、まず各薬剤をマウスの ip に1回投与して経時的に体重および脾臓重量の変化を調べた。その結果、Fig. 1 に示したように NS-1D 投与群の体重は3日後で、また他の薬剤では7日後で最も減少したが、NS-1D 投与群の減少度合は比較的軽微であった。

一方、脾臓重量は対照群と比較し1日後には既に減少がみられたが、NS-1D および CZT 投与群の減少度合は他の2剤に比較し軽微であった。

次に各ニトロソウレアの末梢白血球数および骨髄細胞に与える影響を調べた。Fig. 2 に示したように、ほとん

Fig. 1 Body weight and spleen weight changes after intraperitoneal injection



Drugs were injected ip into each group of five male CDF₁ mice at the optimal effective dose against L1210 leukemia.

Fig. 2 Effect of nitrosoureas on white blood cell (WBC) count and bone marrow cellularity after intraperitoneal injection

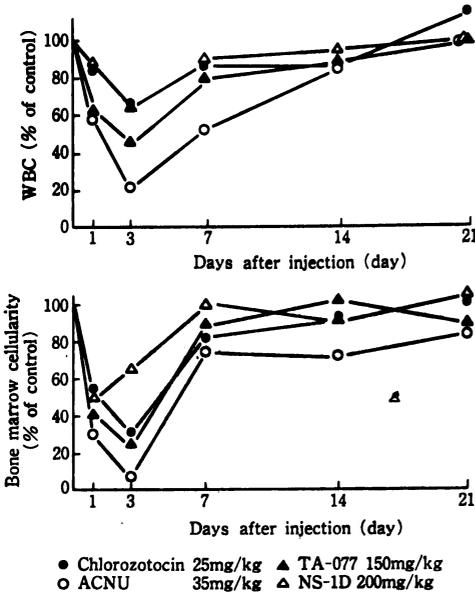
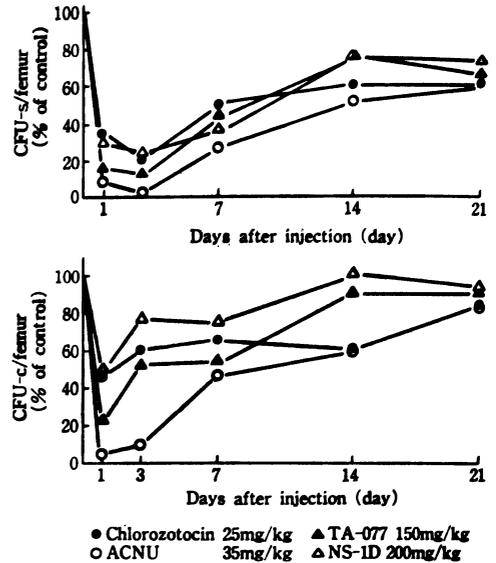


Fig. 3 Effect of nitrosoureas on bone marrow CFU-s and CFU-c after intraperitoneal injection



After injections of drugs at their optimal dose against L 1210 leukemia, mice were sacrificed on day 1, 3, 7, 14 and 21. Five μ l of blood was taken from the caudal vein and WBC were counted using Micro cell counter (TOA model CC-108). The bone marrow cells were prepared from the isolated femur by injection of 1.0 ml Eagle MEM medium and were counted with Türk solution microscopically.

どの薬剤で末梢白血球数および骨髄細胞の減少が投与した3日後に顕著に現われその後回復傾向を示した。興味あることに、NS-1 D 投与群では、骨髄細胞の減少は1日後が顕著であり、3日後には既に回復が始まり7日後では、ほぼ正常に回復した。

3. CFU-s および CFU-c に対する作用

次に各薬剤投与後の CFU-s および CFU-c に対する作用を調べ、Fig. 3 に示す結果を得た。CFU-s 値は各薬剤とも、顕著な影響を受け投与した3日後に最も低い値を示した。また、回復も緩徐であった。CFU-c に対する影響は、CFU-s に比べて速やかで、各薬剤とも投与した1日後に最も低い値を示したが、NS-1 D および CZT 投与による CFU-c 値の変化は中程度であった。

次に末梢白血球数、骨髄細胞数および CFU-s 値が最低値を示した投与の3日後において、各薬剤の投与量と骨髄細胞数の関係を調べる目的で種々の濃度の薬剤を CDF₁ マウスの腹腔へ1回投与し、投与した3日後の大

For the assay of CFU-s 0.5 ml of the bone marrow cell suspension ($0.5-1.0 \times 10^5$ cells/ml) prepared from the femur of donor CDF₁ mice were injected into the tail vein of the recipient CDF₁ mice at each group of five. The recipient mice were irradiated 950 rad (^{60}Co) prior to the injection. They were sacrificed eight days after injection and their splenic colonies were counted after Bouin staining. For the assay of CFU-c, one ml of α -medium containing 1.0×10^5 nucleate bone marrow cells, 20% calf serum, 0.88% methylcellulose and 20% mouse L cell conditioned medium (colony stimulating factor) was plated to triplicated 30 mm Petri dishes. After seven days incubation at 37°C, 5%-CO₂, the number of colonies were counted microscopically.

腿骨髄細胞数および CFU-s 値を測定した (Table 2)。

その結果、いずれの薬剤でも優れた効果を発揮する薬量では細胞減少が著しいが、NS-1 D を 100, 150 および 200 mg/kg 投与した場合、骨髄細胞数は対照群が 100×10^5 cells/femur であったのに対し各々 77, 57 および 52 ($\times 10^5$ cells/femur) と他の薬剤に比較するとその影響は小さかった。

CFU-s に対する NS-1 D の影響は、骨髄細胞に対する影響よりやや強いが、各薬剤の L 1210 leukemia に対する最適有効投与量と比較した場合、その影響は軽度であった。

III. 考 察

多くのアルケル化剤は、顕著な骨髄毒性を有し、これが臨床上の問題となっており、ニトロソウレア系薬剤も例外ではない^{4,5)}。

Pañasci⁶⁻⁹⁾ らは、グルコースのクロロエチルニトロソウレア誘導体が骨髄毒性の最も少ない投与領域で、L 1210 leukemia に対し、優れた抗腫瘍活性を示すことを報告している。また Schein¹⁰⁾ らは、マウスおよびヒト

の CFU-c を用いた研究結果で CZT が骨髄毒性の低い薬剤であることを報告している。

我々は、今回新しく合成した蔗糖のニトロソウレア誘導体 NS-1 D の骨髄毒性を調べる目的で、他のニトロソウレア系薬剤を対照として CDF₁ マウスにおける末梢白血球数、大腿骨骨髄細胞数、骨髄細胞 CFU-s および CFU-c を測定した。その結果、Table 3 に示したように、各薬剤を L 1210 leukemia の最適有効投与量で投与

Table 2 Effect of nitrosoureas on bone marrow cell

Sample	Dose (mg/kg)	Nucleated cell ($\times 10^5$ cells/femur)	CFU-s/femur		L1210* activity
			mean \pm sd	% of control	
Control	—	100	3,400 \pm 529	100.0	0/7
NS-1D	100	77	2,380 \pm 140	70.0	5/7
	150	57	1,750 \pm 250	51.5	6/7
	200	52	720 \pm 144	21.2	7/7
	300	23	450 \pm 92	13.2	3/7
ACNU	15	24	880 \pm 140	25.9	0/7
	20	16	400 \pm 160	11.8	3/7
	30	9	190 \pm 10	5.6	7/7
	40	7.5	53 \pm 8	1.6	7/7
CZT	15	41	1,530 \pm 150	45.0	4/7
	20	32	780 \pm 140	22.9	4/7
	30	29	595 \pm 60	17.5	4/7
	40	27	355 \pm 78	10.4	0/7
TA-077	100	24	960 \pm 80	28.2	3/7
	150	17	335 \pm 15	9.8	4/7
	200	14	276 \pm 4	8.1	6/7
	300	11	132 \pm 12	3.9	0/7

Drugs were given ip into CDF₁ mice at various doses.

The mice were sacrificed and bone marrow cellularity and CFU-s were investigated three days after administration.

* 60-day survivors/treated mice.

Table 3 Effect of nitrosoureas on peripheral WBC count, bone marrow cellularity, CFU-s and CFU-c at nadir.

Sample	Dose (mg/kg)	WBC count	(% of control)			L1210* activity
			Bone marrow cellularity	CFU-s/femur	CFU-c/femur	
NS-1D	200	63	51**	23	51	7/7
ACNU	35	22	7	3	6	7/7
CZT	25	67	31	22	48	5/7
TA-077	150	46	24	12	22	6/7

Drugs were given ip into CDF₁ mice. The nadir WBC count, bone marrow cellularity and CFU-s occurred three days, CFU-c occurred one day after administration. Mean WBC count, bone marrow cells/femur, CFU-s/femur and CFU-c/femur of control were 15,280 \pm 2,516/mm³, 98 \pm 8.3 ($\times 10^5$ cells/femur), 3,232 \pm 536/femur, 10,000 \pm 800/femur.

* No. of 60-day survivors/treated mice.

** The nadir bone marrow cellularity of NS-1D occurred one day after administration.

した場合、いずれの場合も1日後もしくは3日後に顕著な減少を示すが、NS-1Dの骨髄毒性は、同じニトロソウレア系薬剤であるACNUやTA-077よりも軽度であり、骨髄毒性が低いと報告されているCZTと優るとも劣らない成績が得られた。特に、NS-1D投与群においては、投与後の骨髄細胞数の減少が軽度でしかもその回復が速やかであり、遅延性毒性が少ないと考えられる。

対照として用いたCZTは、骨髄細胞クロマチンのヌクレオゾーム間の結合部位をアルキル化しやすく、また、CCNUやACNUのニトロソウレア剤は、ヌクレオゾームの核部位をアルキル化しやすく、さらにヌクレオゾーム間の結合部位のDNA障害は、核部位に比べてその修復が早いと考えられており、CZTの低毒性はヌクレオゾーム間部位へアルキル化しやすいという性質に関係があると報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。

おそらくNS-1Dの場合もsucrose残基がニトロソウレアの毒性を軽減するのに何らかの重要な役割を果たしていると思われるが、詳細は不明である。いままでには、ニトロソウレア剤で効果を減ずることなく骨髄毒性を減少させる方法として、主として単糖を結合させることが試みられてきたが、今回はsucroseを結合させて、より毒性を軽減させることができたので今後臨床応用への可能性を追求したい。

(謝辞) 終わりに、本研究で使用したサンプルを合成して下さいました日新製糖株式会社研究室の大木修一氏、青井正治氏、山下秀世氏に深謝致します。

文 献

- 1) 横山正和: Nitrosoureas. 癌と化学療法 8: 847~858, 1981
- 2) TILL, J. E. & E. A. MCCULLOCH: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Rad. Res. 14: 213~222, 1961
- 3) BRADLEY, T. R. & D. METCALF: The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44: 287~299, 1966
- 4) CARACASSONNE, Y.; J. A. GASTAUT & A. P. BLANC: Acute leukemia after prolonged immunosuppressive therapy for glomerulonephritis. Cancer Treat. Rep. 62: 1110~1111, 1978
- 5) MOERTEL, C. G.: Therapy of advanced gastrointestinal cancer with the nitrosourea. Cancer Chem. Rep. part 3, 4: 27~34, 1973

- 6) PANASCI, L. C.; D. GREEN, R. NAGOURNEY, P. FOX & P. S. SCHEIN: A structure-activity analysis of chemical and biological parameters of chloroethylnitrosoureas in mice. Cancer Res. 37: 2615~2618, 1977
- 7) ANDERSON, T.; M. G. MCMENAMIN & P. S. SCHEIN: Chlorozotocin, 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-D-glucopyranose, an anti-tumor agent with modified bone marrow toxicity. Cancer Res. 35: 761~765, 1975
- 8) SCHEIN, P. S.; L. PANASCI, P. V. WOOLLEY & T. ANDERSON: Pharmacology of chlorozotacin (NSC-178248), a new nitrosourea anti-tumor agent. Cancer Treat. Rep. 60: 6: 801~805, 1976
- 9) NAGOURNEY, R. A.; P. FOX & P. S. SCHEIN: A comparison of the biological and biochemical properties of 1-(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea and 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-D-glucopyranose. Cancer Res. 38: 65~68, 1978
- 10) SCHEIN, P. S.; J. M. BULL, D. DOUKAS & D. HOTH: Sensitivity of human and murine hematopoietic precursor cells to 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-D-glucopyranose and 1, 3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. Cancer Res. 38: 257~260, 1978
- 11) GREEN, D.; K. D. TEW & T. HISAMATSU, P. S. SCHEIN: Correlation of nitrosourea murine bone marrow toxicity with deoxyribonucleic acid alkylation and chromatin binding sites. Biochem. Pharm. 31, 9: 1671~1679, 1982
- 12) BYRNE, P.; K. TEW, J. JEMIONEK, Y. MACVITTIE, L. ERICKSON & P. SCHEIN: Cellular and molecular mechanisms of the bone marrow sparing effects of the glucose chloroethyl nitrosourea chlorozotocin. Blood, 63, 4: 759~767, 1984
- 13) BODELL, W. J. & M. R. BANERJEE: The influence of chromatin structure on the distribution of DNA repair synthesis studied by nuclease digestion. Nucleic Acids Res. 6: 359~370, 1979
- 14) RAMANATHAN, R.; S. RAJALAKSHMI, D. S. SARMA & E. FARBER: Non-random nature of *in vitro* methylation by dimethylnitrosoamine and the subsequent removal of methylated products from rat liver chromatin DNA. Cancer Res. 36: 2037~2079, 1976

STUDIES OF NITROSOUREA DERIVATIVE OF SUCROSE,
6'-[[[(2-CHLOROETHYL) NITROSOAMINO] CARBONYL]
AMINO-6'-DEOXSUCROSE (NS-1 D)

II. EFFECTS ON MURINE PERIPHERAL BLOOD AND BONE MARROW

AKIRA TANO¹⁾, KEN-ICHI EDANAMI²⁾, KANKI KOMIYAMA³⁾
IWAO UMEZAWA³⁾ and TETSUO SUAMI³⁾

- 1) Nissin Sugar MFG. Co., Ltd.
- 2) The Kitasato Institute
- 3) Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University

The bone marrow toxicity of a new derivative of nitrosourea, 6'-[[[(2-chloroethyl)nitrosoamino]carbonyl]amino]-6'-deoxysucrose (NS-1 D) was studied in comparison with other nitrosoureas (ACNU, chlorozotocin and TA-077). When the drugs were injected ip into CDF₁ mice at the optimal dose against L 1210 leukemia, the minimum counts of peripheral white blood cells (WBC) were observed three days after injection with all four drugs. The lowest WBC reductions were slight in mice treated by NS-1 D and chlorozotocin (about 65% of the control), and these counts rapidly recovered.

Bone marrow cellularity, bone marrow CFU-s and CFU-c were also investigated after injection of drugs. The bone marrow cellularity of NS-1 D showed the lowest level one day after injection, recovered immediately and reached the normal level one week after injection. On the other hand, the bone marrow cellularities of the other nitrosoureas showed a minimum on day 3 and they also recovered rapidly like that of NS-1 D, but one of them remained slightly depressed. Similar observations were obtained with CFU-c but CFU-s showed remarkable depression with all four nitrosoureas.

These results indicated that the bone marrow toxicity of NS-1 D was less and its recovery was more rapid than with other nitrosoureas.