



## 論 文 内 容 要 旨

一般にニトロソ尿素誘導体〔RNHCON(NO)R'〕はDNAに対して強い親和性を有する化合物群で、R'が2-chloroethyl基である1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea誘導体〔RNHCON(NO)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl〕の中にはmouse lymphoid leukemia L1210の担癌動物に対して著しい延命効果を示すものがあることが知られている。これらの抗腫瘍性ニトロソ尿素類の中には、ヒトの白血病、悪性リンパ腫、脳腫瘍、胃癌などの治療に使用されているものがある。また、これらのニトロソ尿素系抗腫瘍剤の多くは不安定で水に溶けず、主要な副作用として骨髄に対して遅延毒性を示すため、臨床場においては使用法が難しい薬剤とされている。しかしながら、ニトロソ尿素系抗腫瘍剤は脳血管関門を通過しうる数少ない化合物群であるので、ヒトの脳腫瘍に対する化学療法剤として特によく用いられている。

著者は、より有効でしかも副作用の少ないまた安定性の高い抗腫瘍性ニトロソ尿素誘導体を得る目的で、当合成化学研究部で合成された多数の誘導体についてrat ascites hepatoma AH13およびmouse lymphoid leukemia L1210腫瘍細胞を使って動物の腹腔内(ip)移植-ip投与の系でスクリーニングを行った。その結果、基本骨格のニトロソ尿素におけるN<sup>1</sup>およびN<sup>3</sup>の置換基の構造の差異がこの2系の実験腫瘍に対する抗腫瘍スペクトルの差異に大きく影響していることがわかった。そこで、各化合物群の中から三種の代表する化合物を選び、細胞レベルでの効果および数種の生体成分モデル化合物との化学反応を検討することによって各化合物の2系腫瘍細胞に対するそれぞれの作用機作を推定した。

### 〔I〕 化学構造と抗腫瘍作用

検討した化合物を化学構造により分類し、それらのAH13とL1210細胞移植動物に対する延命効果をTable IIに示す。Table Iには延命効果検討のための評価方法と基準を示す。その結果、つぎのような構造と活性の相関がみられた。

I群 AH13とL1210の両系に有効

II群 AH13の系にのみ有効

III群 L1210の系にのみ有効

IV群 両系に有効なものと、AH13の系にのみ有効なものがあった。

V群 その他の二化合物であり、特に傾向はなかった。

上記のように、有効な腫瘍系に相違のあるI、II、III群の化合物の中から、延命効果の著しい、つぎの三化合物を代表として選び、それらの抗腫瘍スペクトルに影響を及ぼす因子について、生物学的ならびに化学的な比較検討を行った。

Test System with AH13 Ascites Hepatma Cells

Animals: Donryu rat, 6 rats/group, 2-3 groups

Inoculation:  $10^6$  cells/rat, ip

Evaluation: Life prolongation effect on tumor bearing animals (60 days survivors)

Control: Mean survival time 7-9 days

Criteria: Criteria 60 Days Survivors

-	0/6
±*	0/6 - 1/6
+	2/6 - 3/6
++	4/6 - 6/6

\* The treated groups, in which no animals survived for 60 days but survival time elongated more than twice that of the control, was classified as ±.

Test system with L1210 Leukemia Cells

Animals: CDF mouse, 3 mice/group, 3-4 groups

Inoculation:  $10^{51}$  cells/mouse, ip

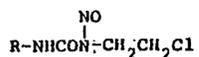
Treatment: Days 2 and 6, ip

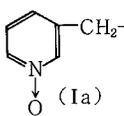
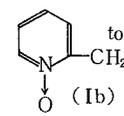
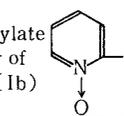
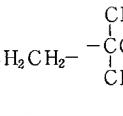
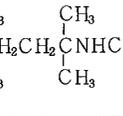
Evaluation: T (mean survival time of treated animals) / C (mean survival time of control animals) %

Criteria:	<u>Criteria</u>	<u>Max. T/C %</u>
	-	<120
	±	121 - 124
	+	125 - 199
	++	>200

Table I

(I) 1-(2-Chloroethyl)-1-nitrosourea 類



	R:					ACNU	BCNU
	 (Ia)	 (Ib)	 (Ic)	 (Ic)	 (Ic)		
AH13	+	++	+	+	+	+	±
L1210	++	++	++	++	++	++	++

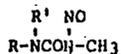
(II) 1,3-Diaryl-1-nitrosourea 類

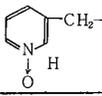
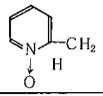
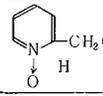


	X:	H	Cl	CH <sub>3</sub> O	CH <sub>3</sub>	H	Cl	Cl
	Y:	H	Cl	CH <sub>3</sub> O	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> O	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> O
	(IIa)							
AH13	+	+	+	+	+	+	±	-
L1210	-	-	-	-	+	±	-	-

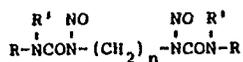
Table II-1

(III) 1-Methyl-1-nitrosourea類



	MNU (IIIa)	$\text{R}'_1$ H	$\text{CH}_3-\overset{\text{NO}}{\text{NCONH}}(\text{CH}_2)_2-$	$\text{CH}_3-\overset{\text{NO}}{\text{NCON}}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ CH <sub>3</sub>	$\text{CH}_3-\overset{\text{NO}}{\text{NCONH}}(\text{CH}_2)_6-$ H	$\text{CH}_3-\overset{\text{NO}}{\text{NCONH}}-\text{C}_6\text{H}_{10}-$ H	
AH13	-	-	-	-	-	-	
L1210	++	+	+	+	+	+	
	R: R':		$\text{CH}_3-\overset{\text{NO}}{\text{NCONH}}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$	$\text{CH}_3-\overset{\text{NO}}{\text{NCONH}}-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}\text{CH}_2-$	$\text{CH}_3-\overset{\text{NO}}{\text{NCONH}}(\text{CH}_2)_3\overset{\text{CH}_3}{\text{N}}(\text{CH}_2)_3-$		
AH13	-	-	-	-	-	-	
L1210	+	+	+	+	+	+	
	R: R':		$\text{CH}_3-\overset{\text{NO}}{\text{NCONH}}-\text{CH}_2\overset{\text{OH}}{\text{C}}\text{HCH}_2-$	$\text{CH}_3-\overset{\text{NO}}{\text{NCONH}}-\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}\text{CH}_2\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}-$ H CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>			
AH13	-	-	-	-	-	-	-
L1210	+	-	-	+	+	+	+

(IV) 1,1'-Polymethylene-bis-(1-nitrosourea)類



1) R=R'=H

n=	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
AH13	+	+	++	+	+	++	+	±	±	+
L1210	++	+	++	+	+	+	+	+	-	-

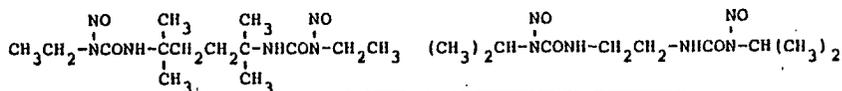
2) R'=H

R:	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$	$-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$		$-\text{C}(\text{CH}_3)_3$	
n=	2	6	6			
AH13	-	+	++	+	-	-
L1210	++	-	-	±	-	-

3)   $\overset{\text{NO}}{\text{NCON}}-(\text{CH}_2)_6-\overset{\text{NO}}{\text{NCON}}$  

AH13	-
L1210	-

(V) その他



AH13	++
L1210	+

Table II-2

I 群 1-(2-chloroethyl)-1-nitroso-3-(3-pyridylmethyl) urea N-oxide (Ia)

II 群 1,3-diphenyl-1-nitrosourea (IIa)

III 群 1-methyl-1-nitrosourea (IIIa)

## 〔II〕 ニトロソ尿素誘導体の細胞レベルにおける作用様式

### 1) 殺細胞効果の検討

上記三化合物のAH13とL1210に対する殺細胞効果を in vivo で検討した。腫瘍細胞移植動物に各化合物を投与し、各時間後に腹水の一部を採取してトリパンブルー染色で殺細胞性を検討した。結果はTable IIIに示した。

Cytostatic Activity of Compounds in vivo

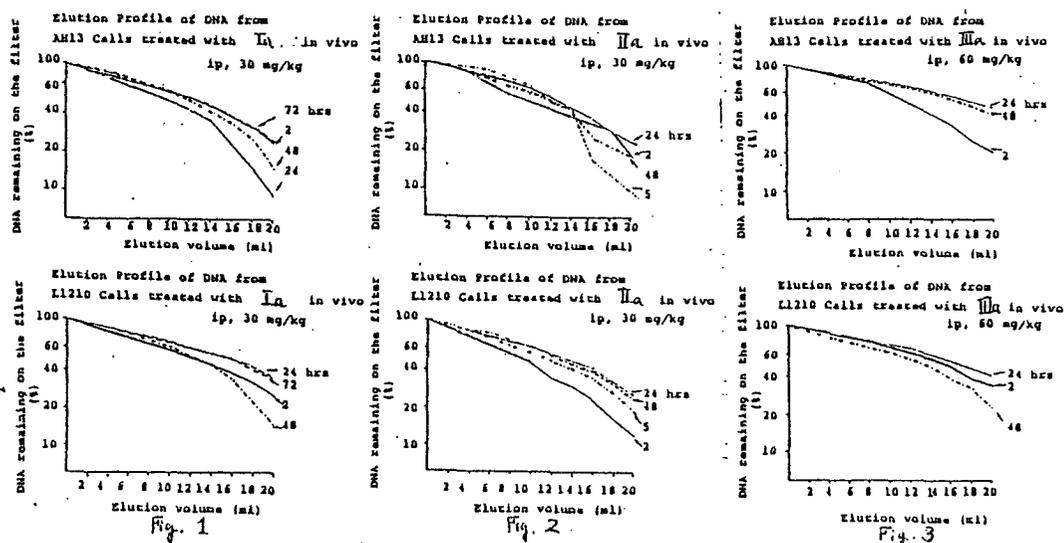
treatment			died cell ratio (%)	
compd.	dose. (mg/kg)	time (h) after injection	AH13	L1210
CNPYUO	30	2	3	5
		24	4	22
		48	4	3
		72	11	11
DPhNU	30	2	58	51
		5	75	17
		24	8	3
		48	4	1
MNU	60	2	4	6
		24	3	2
		48	2	6

Table III

IaはAH13に対して投与72時間後に殺細胞効果を発揮し、L1210には24と72時間後の二相性に効果を発揮した。IIaはAH13で5時間後、L1210で2時間後に殺細胞効果のピークを示したが回復時間にも差がみられた。IIIaはAH13には殺細胞効果を示さず、L1210には同量投与で6%の殺細胞効果を発揮し、延命効果との関連がみられた。

### 2) 腫瘍細胞DNAへの障害性の比較検討

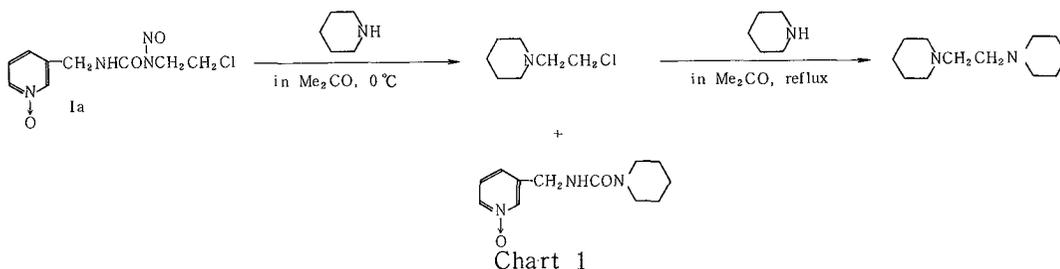
〔II〕-1)と同処置細胞群の一部を使って、そのDNA障害をアルカリエリユージョン法により測定した。Parodiらの改良法を用いてDNAのsinglestrand scissionのみを解析した。Ia投与24時間後にはAH13の、48時間後にはL1210のDNA鎖分断が観察された。IIaではAH13で5時間後、L1210で2時間後にDNA分断が多くみられた。IIIaではAH13で2時間後、L1210で48時間後にDNAの分断が観察された。(Fig. 1, 2, 3)



### 〔Ⅲ〕 ニトロソ尿素誘導体と生体成分モデル化合物との化学反応

#### 1) 化合物 Ia と核酸塩基およびタンパク質のモデル化合物との反応

アルキル化活性の推定のために NBP 試薬<sup>\*</sup>〔4-(4-nitrobenzyl) pyridine〕と Ia を反応させ、弱アルカリ条件下紫色の呈色を示したので、Ia はアルキル化活性を有する。さらに核酸塩基の窒素に対する反応のモデル化合物として piperidine と Ia との反応を行い、Chart 1 に示す結果を得た。



つぎにタンパク質のモデル化合物として活性残基のある lysine のかわりに N<sub>2</sub>-acetyl-L-lysine, cysteine のかわりに N-acetyl-DL-penicillamine を使って、Ia との反応を検討し、Chart 2 の結果を得た。

\* NBP 試薬 C1=CC=C(C=C1)CC2=CC=CC=C2[N+](=O)[O-]

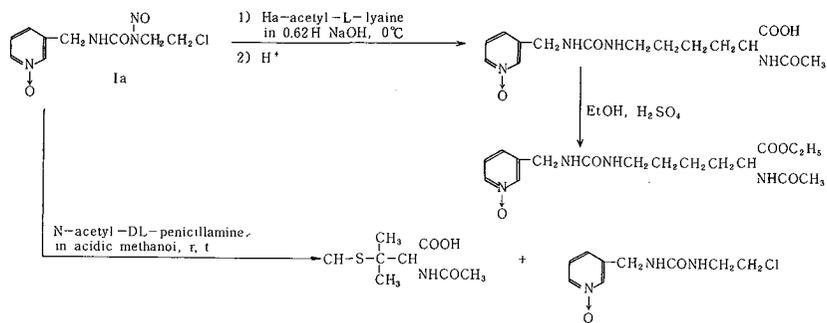


Chart 2

2) 化合物 IIa と核酸塩基やタンパク質のモデル化合物との反応

IIa と NBP 試薬とは反応しなかった。つぎに adenine や guanine と弱アルカリ条件下で反応させたところ、Chart 4 に示す生成物が得られた。

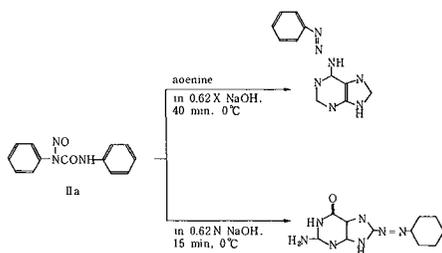


Chart 4

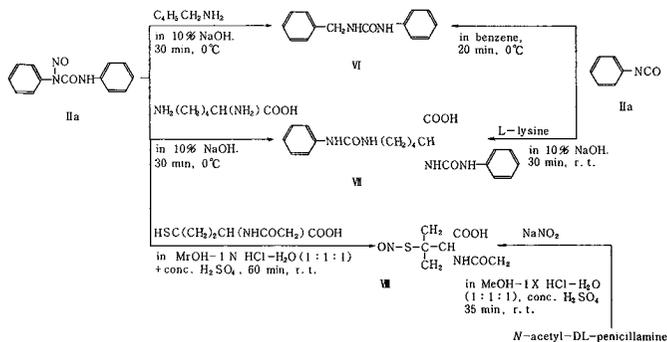


Chart 5

また、IIa と L-lysine や N-acetyl-DL-penicillamine を反応させると、Chart 5 に示す生成物が得られた。

3) 活性中間体の抗腫瘍作用

IIa の活性中間体と考えられる  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-N=N}^+$  と  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-NCO}$  などにつき、その単独あるいは併

用投与での in vivo の抗腫瘍作用を検討し、Table IV の結果を得た。isocyanate 投与で

$\text{X-C}_6\text{H}_4\text{-N=N}^+$  の作用増強を示した。

Compd. No.	Dose (mg/kg) <sup>a)</sup>	60-d survivors	T/C%
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-N=N}^+$ (I)	10	0/6	123
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-NCO}$ (II)	20	0/6	117
(I) + (II)	10 + 20	1/6	> 194
ON-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -N=N <sup>+</sup> (III)	50	0/6	132
C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> -N=N <sup>+</sup> (IV)	10	0/6	135
C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> -N=N <sup>+</sup> (V)	50 + 10	1/6	> 186

\* Cyclohexyl isocyanate  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{-NCO}$

予想される活性中間体の併用投与実験

Table IV

## 〔Ⅱ〕 考 察

以上のデータおよびⅢaの文献での報告から三群化合物のAH13とL1210に対する抗腫瘍作用機作をChart 7に示すように推定した。いずれの化合物もDNAと結合してDNA分断を起すがその後の障害の進行や修復のされ方により細胞集団が死滅するか、あるいは増加にむかうかが決ってくるようである。

I, II, III群化合物の抗腫瘍作用機作

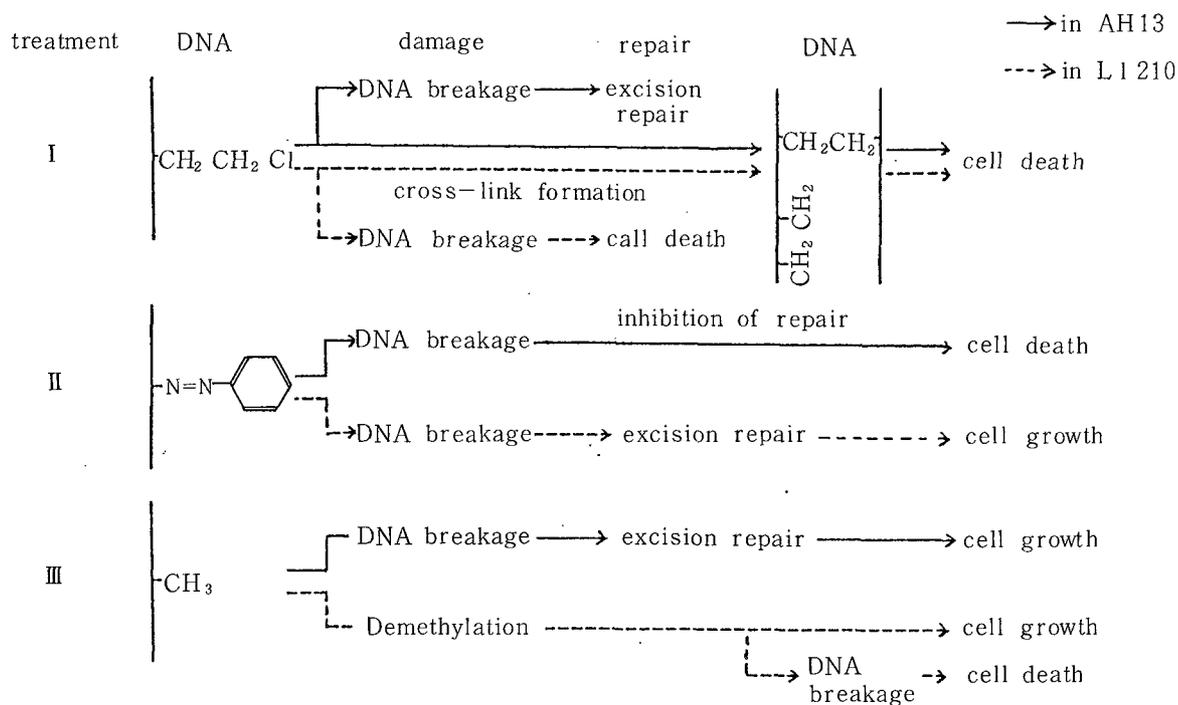


Chart 7

これらの研究は、今後合成される新誘導体の評価に役立つものと思われる。

## 審査結果の要旨

ニトロソ尿素誘導体はDNAに対して親和性が強く、これら化合物の一部は抗腫瘍剤として白血病などの治療に使用されている。しかし現在利用されている薬物は化学的には安定性が低く、骨髄に対する毒性も認められるため、より有効な薬物が求められている。

本研究はこれらニトロソ尿素誘導体の抗腫瘍作用を明らかにすることを目的とし、種々の化合物を合成して化学構造と活性との相関性を調べ、これら化合物間に於ける生体成分との反応の特徴を検討するものである。先ず化学構造の異なる5群の化合物を合成し、それぞれの化合物の白血病細胞系に対する作用をみると、化合物の種類によって、細胞系に対する反応性がそれぞれ異なり、これは反応機構を解明するための有力な手掛りを与えるものと考えられる結果が得られた。すなわち白血病細胞AH13とL1210油系に有効な化合物として1-(2-chloroethyl)-1-nitroso-3-(3-Pyridylmethyl) urea N-oxide (I)、AH13系のみにも有効な化合物として1,3-diphenyl-1-nitrosourea (II)、L1210系のみにも有効な化合物として1-methyl-1-nitrosourea (III) が得られたので、これらにつき生化学的な反応性の差異を検討した。

先ず細胞レベルでの作用を比較すると、殺細胞効果の時間経過に差が認められ、これは各化合物のDNA障害の経時変化と関連のあるものと考えられた。このような実験結果は従来の研究では明らかにされていないものであり、制がん剤の作用機構が単純な反応では解釈出来ないことを示している。

次に各ニトロソ尿素の生体成分との反応性をみると、それぞれの化合物によってDNAやタンパク質に対する作用に大きな差があり、DNAとの結合や分断のほかに、DNA修復の阻害反応も細胞障害に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。この阻害反応は主として修復酵素タンパクとの反応と考えられ、障害の場を解析するための重要な知見である。

以上本研究は、がんの化学療法の基礎を提供するものであり、特に細胞障害の起る条件を示した点に特色がある。今後の制がん剤の開発に当たっても本研究の成果は利用性が高く、学位論文として価値あるものと認める。