

Experimental Studies on the Antitumor Activity of d-Morphinan Derivatives

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7831

d-モルヒナン誘導体の抗腫瘍作用に関する実験的研究

金沢大学医学部薬理学教室 (主任: 正印 達教授)

小久保 護

(昭和60年10月26日受付)

デキストロメトルファンから新たに合成された *d*-モルヒナン誘導体について、エールリッヒ腹水がん細胞および sarcoma-180 細胞に対する作用を *in vitro* または *in vivo* で検討した。実験に使用した化合物は、*d*-3-(5-phenyl-2,4-pentadienyloxy)-N-methylmorphinan (DM 75), *d*-3-(3,3-diphenyl-2-propenyloxy)-N-methylmorphinan (DM 80), *d*-2-bromo-3-(3,3-diphenyl-2-propenyloxy)-N-methylmorphinan (DM 83) および *d*-3-(7-phenyl-3-methyl-2,6-heptadienyloxy)-N-methylmorphinan (DM 96) など 14 である。これらの化合物は 5% の HCO-60 (可溶性剤) を含む生理食塩水に溶解し、腫瘍細胞は 2% 牛血清アルブミン加ハanks平衡塩類溶液 (pH 7.4) に浮遊した。化合物の腫瘍細胞に対する障害作用は、腫瘍細胞浮遊液 (10^6 cells/ml) に被験化合物液を 0.01-1.0 mM 加えて、37°C で 120 分間インキュベートしたのち、生存細胞数をトリパンブルー色素排除能テストによって調べた。エールリッヒがん細胞および sarcoma-180 細胞を 0.1 mM の DM 75, DM 80, DM 83 または DM 96 と共にインキュベートすると、生存細胞の割合は 1% 以下に減少し、エールリッヒがん細胞を位相差顕微鏡下で観察すると、0.1 mM の DM 83 と共に 60 分間インキュベートした腫瘍細胞では、細胞の膨潤、細胞質の空胞化などの変性が観察された。化合物を加えずにインキュベートしたがん細胞では、生存細胞の割合は 80% 以上であった。つぎに、エールリッヒがん細胞または sarcoma-180 細胞 (2.0×10^6 viable cells/mouse) を腹腔内に移植した担がんマウスに対する延命効果は、マウスの腹腔内に被験化合物 10-40 mg/kg の用量で 1 日 1 回、連続 5 日間投与し、延命率 (ILS (%)) = $(T-C)/C \times 100$; T, 被験化合物投与群の平均生存日数; C, 非処置対照群の平均生存日数) によって評価した。エールリッヒ腹水がん担がんマウスでは 20 mg/kg の用量で DM 83 は 153%, 40 mg/kg の用量では DM 96 で 116%, DM 75 では 104%, また、DM 80 では 70% の延命率を示し、sarcoma-180 担がんマウスでは 40 mg/kg の用量で、DM 83 は 222%, DM 96 は 206%, DM 80 では 119%, また、DM 75 では 85% の延命率をそれぞれ示した。これらの成績から、DM 75, DM 80, DM 83 および DM 96 は、エールリッヒがん細胞や sarcoma-180 細胞に対して直接障害作用を示すとともに、担がんマウスに対しても延命効果のあることが認められた。

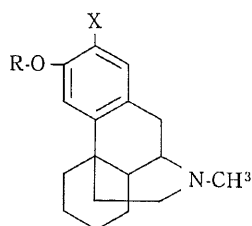
Key words *d*-N-methylmorphinans, antitumor activity, ascites tumor, structure-activity relationship.

モルヒナン系化合物の薬理作用としては鎮痛作用、鎮咳作用、呼吸抑制作用、平滑筋興奮作用などが良く知られているが、近年モルヒナン系、あるいはその類似化合物の中には抗腫瘍作用を有しているものがあることが指摘されている。すなわち、Zagon と McLoughlin²⁻⁴⁾ はヘロイン (heroin), ナロキソン (naloxone) およびナルトレキソン (naltrexone) がマウス神経芽

細胞腫の増殖を抑制することを、Aylsworth ら⁵⁾ はナロキソンおよびナルトレキソンがマウスの乳がんの増殖を抑制することを示唆し、Iijima ら⁶⁾ はマウス自然発生乳癌および皮下に移植された MH 134 に対するナロキソンが腫瘍増殖抑制効果に有効であると報告している。また、Kigoshi⁷⁾ は非麻薬性鎮痛薬ペンタゾシン (pentazocine) が腹腔内に移植されたエールリッヒ

Abbreviations: DM 16, *d*-3-allyloxy-N-methylmorphinan; DM 34, *d*-3-cinnamyloxy-N-methylmorphinan; DM 43, *d*-3-(butenyloxy)-N-methylmorphinan; DM 48, *d*-3-(4-bromo-2-butenyl)oxy-N-methylmorphinan; DM 62, *d*-3-(benzhydryloxy)-N-methylmorphinan; DM 72, *d*-3-(2,4-pentadienyloxy)-N-methylmorphinan; DM 75, *d*-3-(5-phenyl-2,4-pentadienyloxy)-

Table 1. Structures of dextromethorphan and its analogues



Groups of compounds	Compounds	R	X
Group A	<i>d</i> -3-methoxy- <i>N</i> -methylmorphinan (dextromethorphan)	CH ₃ -	H
	<i>d</i> -3-allyloxy- <i>N</i> -methylmorphinan (DM 16)	CH ₃ CH=CH ₂ -	H
	<i>d</i> -3-(butenyloxy)- <i>N</i> -methylmorphinan (DM 43)	CH ₃ CH=CHCH ₂ -	H
	<i>d</i> -3-(4-bromo-2-butenyloxy)- <i>N</i> -methylmorphinan (DM 48)	BrCH ₂ CH=CHCH ₂ -	H
	<i>d</i> -3-(2,4-pentadienyloxy)- <i>N</i> -methylmorphinan (DM 72)	CH ₂ =CHCH=CHCH ₂ -	H
Group B	<i>d</i> -3-cinnamyloxy- <i>N</i> -methylmorphinan (DM 34)		H
	<i>d</i> -3-(5-phenyl-2,4-pentadienyloxy)- <i>N</i> -methylmorphinan (DM 75)		H
	<i>d</i> -3-(7-phenyl-3-methyl-2,6-heptadienyloxy)- <i>N</i> -methylmorphinan (DM 96)		H
	<i>d</i> -3-(9-phenyl-3-methyl-2,6,8-nona-trienyloxy)- <i>N</i> -methylmorphinan (DM 97)		H
Group C	<i>d</i> -3-(benzhydryloxy)- <i>N</i> -methylmorphinan (DM 62)		H
	<i>d</i> -3-(3,3-diphenyl-2-propenyloxy)- <i>N</i> -methylmorphinan (DM 80)		H
Group D	<i>d</i> -2-bromo-3-(cinnamyloxy)- <i>N</i> -methylmorphinan (DM 82)		Br
	<i>d</i> -2-bromo-3-(3,3-diphenyl-2-propenyloxy)- <i>N</i> -methylmorphinan (DM 83)		Br
	<i>d</i> -2-bromo-3-(5-phenyl-2,4-pentadienyloxy)- <i>N</i> -methylmorphinan (DM 84)		Br

がんおよび sarcoma-180 に対して増殖抑制効果を示し、マウスの生存日数を延長することを指摘している。さらに Kigoshi ら⁹⁾は非麻薬性鎮咳剤デキストロメトルファン (dextromethorphan) およびジメモルファン (dimemorfan) についても同様の作用が認められることを報告している。また、川尻¹⁰⁾は *d*-3-cinnamyloxy-*N*-methylmorphinan (DM 34) が、エールリツヒ腹水がんおよび sarcoma-180 を移植したマウスの平均生存日数を延長し、腫瘍の増殖を抑制することを明らかにし、その作用機序について検討をおこなっている。

これらのことから、本論文では *d*-モルヒナン骨格を持つ一連の新規化合物を合成し、マウス同種移植がんに対する抗腫瘍効果を指標として、これらの新規化合物の構造活性相関^{10)~14)}について検討を行った。

材料および方法

I. 実験動物

実験には体重 25-30 g, 7-8 週令の ddY 雌性マウスを用いた。

II. 被験化合物

実験に用いた化合物は *d* 体の *N*-メチルモルヒナン (*d*-*N*-methylmorphinan) 骨格を有する化合物で、図

1 に示したようにデキストロメトルファン (Dextromethorphan, 臭化水素酸デキストロメトルファン, 日本ロシユ) を原料とし、モルヒナン骨格の 3 位に種々の置換基を導入して合成した一連の化合物である^{15)~17)}。これらの化合物の化学名、略名および構造式を表 1 に示した。なおこれらの化合物は薄層クロマトグラフィー (Dc-Alufolien Kieselgel 60F₂₅₄, 50×200 mm, Merk) で単一物質であることを確認した後に、赤外分光光度計 (JASCO A-202 Infrared Spectrophotometer, 日本分光), 核磁気共鳴装置 (JEOL JNM-PMX60 NMR Spectrophotometer, 日本電子), 質量分析装置 (JEOL D-300 Gas chromatograph mass spectrometer, 日本電子) および元素分析等によって構造を確認した。表 1 に示したように、本研究に使用した化合物は、モルヒナン骨格の 3 位の側鎖が異なっているが、側鎖におけるベンゼン環の有無、ベンゼン環の数、およびモルヒナン骨格の 2 位のブロムの有無によって、4 群に分類した。すなわち、モルヒナン骨格の 3 位の側鎖にベンゼン環が存在しないものを A 群とし、ベンゼン環が 1 個存在するものを B 群、2 個存在するものを C 群とした。また、モルヒナン骨格の 2 位にブロムの入ったものを D 群とした。

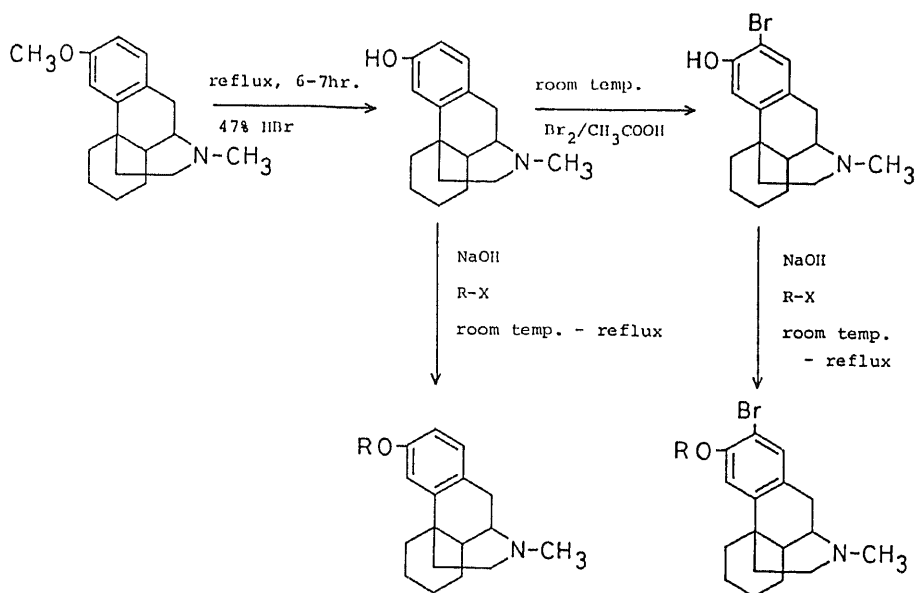


Fig. 1. Synthetic procedure for *d*-*N*-methylmorphinan derivatives.

N-methylmorphinan; DM 80, *d*-3-(3,3-diphenyl-2-propenyloxy)-*N*-methylmorphinan; DM 82, *d*-2-bromo-3-(cinnamyloxy)-*N*-methylmorphinan; DM 83, *d*-2-bromo-3-(3,3-diphenyl-2-propenyloxy)-*N*-methylmorphinan; DM 84, *d*-2-bromo-3-(5-phenyl-2,4-pentadienyloxy)-*N*-

なお、デキストロメトर्फファン(マルコ製薬, 5 mg/ml 注射液), 5-フルオロウラシル (5-FU 協和, 協和酸酵), cyclophosphamide (注射用エンドキサン, 塩野義) およびマイトマイシン C (マイトマイシン協和 S, 協和酸酵) を対照薬として用いた。

III. 被験化合物溶液の調整

被験化合物は一部の化合物を除いて油状で, 非水溶性であった。したがって, マウスの腹腔内に投与するため, あるいは直接細胞障害作用を検討するために可溶化剤として HCO-60 (日光ケミカルズ)¹⁸⁾¹⁹⁾を用いた。すなわち被験化合物を加熱した HCO-60 に溶解したのち, あらかじめ 100°C に加熱しておいた生理的食塩水を加えて被験化合物溶液を作製した。続いて 120°C で 20 分間高圧滅菌した。なお投与化合物溶液中の HCO-60 の濃度は 5% 以下とした¹⁸⁾¹⁹⁾。

IV. 腫瘍細胞浮遊液の調整

腫瘍細胞浮遊液は, 速度沈降法 (Velocity sedimentation)^{20)~22)}によって調製した。すなわちエールリッヒがん細胞を腹腔内に移植して 9-10 日目のマウスまたは, sarcoma-180 細胞を腹腔内に移植して 7-8 日目のマウスより 10 ml の腹水を採取し, これに 40 ml のハンクス平衡塩類溶液 (pH 7.4, ハンクス液) を混和してから遠心分離 (200 g, 5 分間) した。得られた腫瘍細胞に 400 ml のハンクス液を加えて浮遊させたのち, 500 ml のマイヤーフラスコに入れた 2 層のショ糖溶液 (上層: フェノールレッドで着色した 1.0% ショ糖ハンクス液 150 ml, 下層: 1.5% ショ糖ハンクス液 300 ml) の上に静かに重層した。4°C で 90 分間静置したのち, フラスコの底に沈んだ腫瘍細胞を集めて洗浄し, 顕微鏡下で血球計算盤を用いて計数したのちハンクス液を加えて 10⁷個/ml の細胞浮遊液になるように調整した。トリパンブルー色素排除能テストで調べた腫瘍細胞の平均生存率はエールリッヒがん細胞ではほぼ 85%, sarcoma-180 細胞では 89% 前後であった。

V. 抗腫瘍実験

a) *in vitro* 実験

エールリッヒがん細胞あるいは sarcoma-180 細胞に対する障害作用を以下の方法によって検討した。すなわち, 4% 牛血清アルブミン フラクション V (Bovine serum albumin Fr. V, 和光純薬) を含むハンクス液に腫瘍細胞を浮遊させて腫瘍細胞が 4.0 × 10⁶個/ml となるように調整した。この細胞浮遊液に被

験化合物溶液を 1:1 の割合で加え, 被験化合物濃度が 0 (被験化合物溶液中と同量の HCO-60 を含む生理食塩水を添加), 0.01 mM, 0.1 mM または 1 mM となるようにし, 37°C で 120 分間振とうしながらインキュベートした。インキュベート後腫瘍細胞を遠心分離 (200 g, 5 分間) して集め, 10⁷個/ml となるようにハンクス液に再浮遊させ, 生存率を顕微鏡下でトリパンブルー色素排除能テストによって調べた。

b) *in vivo* 実験

腫瘍細胞としてエールリッヒがん細胞あるいは sarcoma-180 細胞を用いた。腫瘍細胞接種後それぞれ 9-10 日目あるいは 7-8 日目のマウスより腹水を採取し前述の如くにして腫瘍細胞浮遊液 (10⁷個/ml) を調整する。これらの腫瘍細胞 2.0 × 10⁶細胞/マウスを腹腔内に移植した ddY 雌性マウスを無作為に 1 群 10 匹ずつに分け, 腫瘍細胞移植 24 時間後から被験化合物溶液, 対照薬物あるいは HCO-60 加生理的食塩水を 1 日 1 回, 5 日間連続して腹腔内に投与した。腫瘍細胞移植後 7 日間と 10 日目, その後は定時的に体重を測定し, 腫瘍の有無を観察した。なお 60 日以上生存したマウスについては剖検によって腫瘍の有無を肉眼的に確かめた。抗腫瘍効果の判定は被験化合物溶液あるいは対照薬物処置群の平均生存日数 (T) と HCO-60 加生理的食塩水投与群の平均生存日数 (C) より延命率 (increase of life span, ILS(%) = (T - C)/C × 100) を求めて比較検討した。その際, 60 日以上生存したマウスの生存日数を 60 日として計算した。

VI. 光学顕微鏡による形態学的観察

DM 83 のエールリッヒ腹水がん細胞に対する障害作用について位相差顕微鏡を用いて検討した。すなわちハンクス液で 2.0 × 10⁶個/ml となるように調整したがん細胞浮遊液に 0.2 mM の DM 83/ハンクス液を 1:1 の割合で加えて室温に保ち, 倒立顕微鏡 (ニコン倒立顕微鏡 DIAPHOT-TMD, 日本光学) により観察した。また, この混液を室温でインキュベートし, 一定時間毎にその一部を取り出し生物顕微鏡 (オリンパス システム生物顕微鏡 Model BHS, オリンパス光学) を使用して観察した。

VII. マウスにおける 50% 致死量 (LD₅₀) の算出

LD₅₀ を算出するため, 1 群の 8 匹の ddY 雌性マウスの腹腔内に種々の濃度の被験化合物を 0.3 ml 投与し, その後 72 時間までマウスの生死を観察した。観察後, マウスの生存数および死亡数から Litchfield &

methylmorphinan; DM 96, *d*-3-(7-phenyl-3-methyl-2,6-heptadienyloxy)-N-methylmorphinan; DM 97, *d*-3-(9-phenyl-3-methyl-2,6,8-nona-trienyloxy)-N-methylmorphinan; ILS, increase of life span; ILS₅₀, 50% increase of life span; LD₅₀, 50% lethal dose; PS, physiological saline.

Wilcoxon 法²³⁾によって LD₅₀を求めた。

Ⅷ. マウスにおける 50%生存日数延長量 (ILS₅₀) の算出

in vivo の抗腫瘍実験でのそれぞれの化合物の投与量を方眼紙の X 軸に、延命率 ((T-C)/C×100) を Y 軸にとり、グラフより 50%延命効果を示す投与量を求め ILS₅₀とした。さらに LD₅₀および ILS₅₀より安全域 (safety margin=LD₅₀/ILS₅₀) を求めた。

Ⅸ. 統計的検定法

in vivo 実験の成績は mean±S.E.M. (n=10) で示し、対照群と被験化合物投与群の平均値間の有意差検定は有意水準 5%および 1%で Student's t-test を用いて行った。

成 績

I. エールリッヒ腹水がん細胞に対する *d*-モルヒナン化合物の細胞障害作用

エールリッヒ腹水がん細胞の浮遊液に種々の濃度 (0.01–1.0 mM) の *d*-モルヒナン化合物を加え 37°C で 2 時間インキュベートした後のがん細胞の生存率をトリパン・ブルー色素排除能テストによって検索し、その成績は表 2 に示した。B 群に属する DM 34, DM 75 および DM 96, C 群の DM 80 および D 群の DM 82 と DM 83 では、0.1 mM の濃度で、がん細胞の生存率は 0–5%と著しく低下していた。しかし DM 48 を除

く A 群の化合物は、0.1 mM の濃度では 35–83%の生存率を示しており生存率には著しい変化はみられなかった。

II. sarcoma-180 細胞に対する *d*-モルヒナン化合物の細胞障害作用

sarcoma-180 細胞の浮遊液に種々の濃度 (0.01–1.0 mM) の *d*-モルヒナン化合物を加え 37°C で 2 時間インキュベートした後の腫瘍細胞の生存率を表 3 に示した。エールリッヒ腹水がん細胞の場合と同様に、B 群に属する DM 34, DM 75 および DM 96 は、0.1 mM の濃度で sarcoma-180 細胞の生存率を 2%以下に著しく低下させた。また、C 群の DM 80, D 群の DM 83 と DM 84 も 0.1 mM の濃度で、sarcoma-180 細胞の生存率を 1%以下に著明に低下させた。これに対して DM 48 を除く A 群の化合物は、0.1 mM の濃度では、sarcoma-180 細胞の生存率は 66–90%を示し、ほとんど影響を及ぼさなかった。DM 84 の sarcoma-180 細胞に対する作用はエールリッヒがん細胞に対する作用と異なり、0.1 mM の濃度で、sarcoma-180 細胞では 0%であったのに対し、エールリッヒがん細胞では 58%であった。

III. エールリッヒ腹水がん担がんマウスに対する *d*-モルヒナン誘導体の抗腫瘍作用

エールリッヒがん細胞を移植したマウスにデキストロメトルファンおよび *d*-モルヒナン誘導体を投与し

Table 2. Viable proportion of Ehrlich carcinoma cells after incubation with the compounds

Groups of compounds	Compounds	Proportion of viable tumor cells (%)			
		Concentrations of compounds (mM)			
		1.0	0.1	0.01	0
Group A	Dextromethorphan	0.4±0.1	35.3±3.6	75.9±2.3	80.8±1.4
	DM 16	0.6±0.3	53.5±3.8	74.3±1.2	81.6±1.1
	DM 43	0.5±0.3	83.2±1.8	81.1±2.4	85.9±1.8
	DM 48	0.7±0.4	13.1±1.1	83.9±1.2	85.0±2.0
	DM 72	0.1±0.1	63.8±0.8	77.2±1.7	80.5±1.3
Group B	DM 34	0.3±0.1	1.4±0.6	86.2±2.7	86.6±2.9
	DM 75	0	0.1±0.1	83.5±2.9	86.0±2.5
	DM 96	0	1.1±0.5	94.7±0.2	95.5±0.7
Group C	DM 62	0.2±0.2	45.6±3.7	78.6±0.8	83.7±1.5
	DM 80	0	0	81.8±3.4	85.2±2.1
Group D	DM 82	0	4.6±3.3	79.3±2.2	82.4±2.3
	DM 83	0	0.5±0.2	81.0±1.3	84.6±2.1
	DM 84	0.5±0.3	58.1±3.3	82.4±1.2	83.9±1.9

Tumor cells were prepared by velocity sedimentation using Hanks balanced salt solution (pH 7.4) supplemented with 2% bovine serum albumin fraction V. Ten ml of tumor cell suspension (2.0×10^6 cells/ml) were incubated at 37°C for 120 min. in the presence or absence of the compounds. After incubation, the proportion of the viable tumor cells was examined by a trypan blue dye exclusion test. Each value represents mean±S.E.M. from 6 experiments.

Table 3. Viable proportion of sarcoma-180 cells after incubation with the compounds

Groups of compounds	Compounds	Proportion of viable tumor cells (%)			
		Concentrations of compounds (mM)			
		1.0	0.1	0.01	0
Group A	Dextromethorphan	23.8±2.9	73.6±2.2	79.1±1.1	82.4±0.9
	DM 16	4.7±0.6	90.4±0.7	89.1±1.3	90.8±1.7
	DM 43	1.2±0.9	89.7±1.7	91.2±0.7	88.5±2.1
	DM 48	0.7±0.4	21.3±1.4	85.6±2.1	91.6±1.4
	DM 72	0.6±0.3	66.4±1.2	84.3±2.3	87.2±1.0
Group B	DM 34	0	0.5±0.2	81.3±1.3	86.5±1.2
	DM 75	0	0.4±0.2	76.7±2.4	82.4±1.6
	DM 96	0	2.1±0.4	87.6±2.2	89.2±1.1
	DM 97	0	2.5±1.2	94.5±0.5	93.5±1.0
Group C	DM 62	0.4±0.1	50.9±1.8	91.2±1.0	90.7±1.9
	DM 80	0	0.9±0.4	90.6±0.6	92.7±0.8
Group D	DM 82	0.1±0.1	29.5±2.4	89.4±0.6	91.3±1.2
	DM 83	0	0.5±0.1	91.7±3.0	88.2±2.8
	DM 84	0	0	36.5±3.0	97.9±2.1

Experiment was carried out by the same procedure described in Table 2.

た時の生存日数を表4に示した。また、対照群(HCO-60加生理的食塩水投与群)の生存日数と処置群の生存日数より延命率を求め、表4および表5に示した。

A群では、デキストロメトルファン80mg/kg投与群で36%の延命効果がみられたが、40mg/kg以下の投与量では延命効果は認められなかった。DM16は何れの投与量でも効果は認められず、DM48は、*in vitro*では強い腫瘍細胞障害作用を示したが、*in vivo*では40mg/kgの用量で10日以内に全マウスが腫瘍の増殖の徴候がないまま死亡した。これは化合物の毒性のためと考えられた。

B群に属する化合物では比較的抗腫瘍効果が著明に現れており、DM34では20mg/kgおよび40mg/kg投与群で有意な($p < 0.05$ および $p < 0.01$)延命効果が認められた。また、DM75およびDM96ではさらに強い効果がみられ、DM75では40mg/kg、DM96では20mg/kgおよび40mg/kgの投与量で100%を超える延命率がみられた($p < 0.01$)。なお、DM96の10mg/kgの投与量でも59%と有意な($p < 0.01$)生存日数の延長が認められた。

C群の化合物ではDM80の40mg/kg投与群で67%の延命効果が認められた($p < 0.01$)他はあまり効果を示さず、DM62では表5に示した何れの投与量でも延命効果は示さなかった。

D群の化合物では、DM84は効果を示さなかったが、DM83には被験化合物中では最も強い延命効果が認められた。すなわち、40mg/kgの投与量でマウス10

匹中2匹が60日以上生存し延命率は145%以上、20mg/kgでは10匹中3匹が60日以上生存、延命率は153%以上を示した(いずれも $p < 0.01$)。また10mg/kg投与群でも43%の延命率が認められた($p < 0.05$)。

IV. sarcoma-180細胞移植マウスに対するd-モルヒナン誘導体の抗腫瘍作用

sarcoma-180細胞を移植したマウスにデキストロメトルファンおよびd-モルヒナン誘導体を投与した時の生存日数を表6に示した。また、対照群(HCO-60加生理的食塩水投与群)の生存日数と処置群の生存日数より延命率を求め、表6および表7に示した。

A群の化合物ではほとんど効果はみられず、デキストロメトルファンの40mg/kg投与群でわずかに37%の生存日数の延長が観察されたが有意差はなかった。

B群の化合物ではDM34が20mg/kgの投与群で効果を示さなかった以外はすべて40mg/kgおよび20mg/kg投与群で延命効果が認められた。特にDM96では強い延命効果が観察され、40mg/kg投与群で206%以上、20mg/kg投与群でも166%以上の平均生存日数延長を示し(いずれも $p < 0.01$)、40および20mg/kg投与群では、60日目に腫瘍が消失したものが10匹中に各々1匹ずつみられた。しかし10mg/kg以下の投与量では作用が認められず20%以下の延命率であった。

C群でも同様に10mg/kg以下の投与では延命効果を示さず、DM62の40mg/kg投与群で90%、DM80

Table 4. Effects of new compounds on survival days of Ehrlich carcinoma bearing mice

Compounds	Dose (mg/kg/day)	Mean survival days ^{a, b}	ILS (%) ^c	Survivors on 60th day
Dextromethorphan	80	25.3±2.3*	36	0/10
	40	18.5±2.2	0	0/10
	20	17.8±1.7	-4	0/10
	0	18.6±1.1	0	0/10
DM 16	40	20.1±2.1	10	0/10
	20	17.4±1.5	-4	0/10
	10	20.7±2.4	14	0/10
	0	18.2±2.1	0	0/10
DM 75	40	35.0±2.2**	104	0/10
	20	24.5±1.9**	42	0/10
	10	20.0±2.5	16	0/10
	0	17.2±1.0	0	0/10
DM 80	40	32.9±1.9**	67	0/10
	20	20.1±2.3	2	0/10
	10	18.6±1.1	-5	0/10
	0	19.7±0.7	0	0/10
DM 83	40	37.9±4.4**	145	2/10
	20	38.7±5.4**	153	3/10
	10	21.8±1.8*	43	0/10
	5	14.8±1.5	-3	0/10
	0	15.3±1.7	0	0/10

Female ddY mice, 7-8 weeks of age were used. Ehrlich carcinoma cells (2.0×10^6 cells/head) were inoculated i.p. into the mice on day 0. Compounds were injected 5 times from 1st day to 5th day. Compounds were suspended in 0.85% saline (PS) containing 4% HCO-60. The control mice were injected i.p. with 0.25ml/head of PS containing 4% HCO-60.

^a; Each value represent mean \pm S.E.M. of 10 mice.

^b; Survival days of the mouse which survived for 60 days after tumor inoculation were defined 60.

^c; Increase of life span (ILS(%)) was calculated as follows; ILS (%) = $(T-C)/C \times 100$; T, mean survival days of treated mice; C, mean survival days of control mice.

* and **; Significantly different from control group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (with the Student's t-test).

の40 mg/kg 投与群では119%, 20 mg/kg で84%の延命効果が認められた(それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.01$ および $p < 0.05$).

D群の化合物では, DM 84の40 mg/kg 投与群で105%の生存日数延長効果がみられた ($p < 0.01$). また, DM 83は *d*-モルヒナン誘導体の中では最も強い延命効果が認められ, 40 mg/kg の投与量では10匹中1例に完全治癒が有り延命率は222%以上, 20 mg/kg 投与群では, 85%であった(いずれも $p < 0.01$). また, 10 mg/kg の投与群でも42%の平均生存日数の延長 ($p < 0.05$) が観察され, 5 mg/kg では21%の延長であった.

V. 対照化学療法剤とDM 83の抗腫瘍効果の比較実験

表8にマウスのエーリッヒ腹水がんにも最も有効であったDM 83と化学療法剤5-フルオロウラシル,

cyclophosphamideおよびマイトマイシンCの比較治療成績を示した。5-フルオロウラシルは20 mg/kg 投与で生存日数を135%延長して最も高い治療効果を示し, 2.5 mg/kg 投与群でも有意な平均生存日数の延長を認めたが, 40 mg/kg では毒性が強く10例中1例に60日生存がみられたものの延命率は23%であった。cyclophosphamideはエーリッヒ腹水がんに対しては全く治療効果が認められず10-40 mg/kg 投与で平均生存日数の延長は-19-12%と無効であった。マイトマイシンCは1.0 mg/kg 投与で最も治療効果が高く延命率は162%以上で60日生存マウスは10匹中7匹であり, 0.1 mg/kg 投与群でも41%と有意な ($p < 0.05$) 生存日数の延長を示した。しかしこの薬剤投与群における60日生存例の中には, かなりの頻度で注射部位に固形腫瘍を認め, 同様のことは5-フルオロウラシルにも少数観察されたほか, 他の化学療法剤では認

Table 5. Effects of the compounds on Ehrlich carcinoma bearing mice

Groups of compounds	Compounds	ILS (%) ^a			
		Dose (mg/kg/day)			
		40	20	10	5
Group A	Dextromethorphan	0	-4		
	DM 16	10	-4	14	
	DM 48	-80	30	24	1
Group B	DM 34	67	32	8	
	DM 75	104	42	16	
	DM 96	116	108	59	6
Group C	DM 62	18	3	-10	
	DM 80	67	2	-5	
Group D	DM 83	145	153	43	-3
	DM 84	13	13	11	

Experiment was carried out by the same procedure described in Table 4.
; See Table 4^c.

Table 6. Effects of new compounds on survival days of sarcoma-180 bearing mice

Compounds	Dose (mg/kg/day)	Mean survival days ^{a, b}	ILS(%)	Survivors on 60th day
Dextromethorphan	80	14.3±0.7	4	0/10
	40	18.7±2.4	37	0/10
	20	12.9±1.2	-6	0/10
	0	13.7±0.8	0	0/10
DM 16	40	13.7±0.9	6	0/10
	20	13.7±1.2	6	0/10
	10	12.3±1.2	5	0/10
	0	12.9±0.8	0	0/10
DM 75	40	20.9±2.4 ^{**}	85	0/10
	20	14.8±1.9	31	0/10
	10	12.9±1.0	14	0/10
	0	11.3±0.8	0	0/10
DM 80	40	23.4±1.3 ^{**}	119	0/10
	20	19.7±3.4 [*]	84	0/10
	10	13.0±0.7	15	0/10
	0	12.1±1.4	0	0/10
DM 83	40	33.2±4.7 ^{**}	222	2/10
	20	19.1±1.1 ^{**}	85	0/10
	10	15.1±1.3 [*]	42	0/10
	5	12.9±1.5	21	0/10
	0	10.7±1.1	0	0/10

Experiment was carried out by the same procedure described in Table 4. However, sarcoma-180 cells (2×10^6 cells/head) were inoculated i.p. on day 0.

^{a, b, c, *} and ^{**}; See Table 4.

Table 7. Effects of the compounds on ascites sarcoma-180 bearing mice

Groups of compounds	Compounds	ILS (%) ^a			
		Dose (mg/kg/day)			
		40	20	10	5
Group A	Dextromethorphan	37	-6		
	DM 16	6	5	-5	
Group B	DM 34	66	2	5	
	DM 75	85	31	14	
	DM 96	206	166	9	15
Group C	DM 62	90	-3	1	
	DM 80	119	84	15	
Group D	DM 83	222	85	42	21
	DM 84	105	20	-4	

Experiment was carried out by the same procedure described in Table 4. However, sarcoma-180 cells (2×10^6 cells/head) were inoculated i.p. on day 0.
; See Table 4^c.

Table 8. Effects of DM 83 and antitumor drugs on Ehrlich carcinoma bearing mice

Drug	Dose (mg/kg/day)	Mean survival days ^{a,b}	ILS(%) ^c	Survivors on 60th day
DM 83	40	37.9±4.4**	145	2/10
	20	38.7±5.4**	153	3/10
	10	21.8±1.8*	43	0/10
	5	14.8±0.7	-3	0/10
	0	15.3±1.7	0	0/10
5-Fluorouracil	40	22.8±3.3**	23	1/10
	20	43.6±3.1**	135	6/10
	10	39.3±4.6**	113	4/10
	5	34.5±3.8**	85	3/10
	2.5	29.2±3.2*	57	1/10
	0	18.6±2.0	0	0/10
Cyclophosphamide	40	19.9±3.2	12	0/10
	20	14.4±1.4	-19	0/10
	10	14.3±1.3	-19	0/10
	0	17.7±2.0	0	0/10
Mitomycin C	4	5	-73	0/10
	2	29.7±5.6**	58	2/10
	1	49.2±3.8**	162	7/10
	0.5	47.7±5.0**	154	6/10
	0.25	43.5±4.7**	131	4/10
	0.1	26.4±2.4*	41	0/10
	0.05	20.0±1.8	10	0/10
	0	18.8±1.4	0	0/10

Experiment was carried out by the same procedure described in Table 4.

^{a,b,c}, * and **, See Table 4.

Table 9. Effects of DM 83 and antitumor drugs on ascites sarcoma-180 bearing mice

Drug	Dose (mg/kg/day)	Mean survival days ^{a,b}	ILS(%) ^c	Survivors on 60th day
DM 83	40	33.2±4.7**	222	2/10
	20	19.1±1.1**	85	0/10
	10	15.1±1.3*	42	0/10
	5	12.9±1.5	21	0/10
	0	10.7±1.1	0	0/10
5-Fluorouracil	40	31.2±4.4**	192	1/10
	20	45.3±4.3**	323	6/10
	10	46.5±4.0**	334	6/10
	5	17.2±1.7**	61	0/10
	2.5	14.6±2.2	36	0/10
	0	10.7±1.0	0	0/10
Cyclophosphamide	40	26.7±1.9**	150	0/10
	20	19.4±0.9**	81	0/10
	10	20.3±3.8*	90	0/10
	5	16.2±0.7**	52	0/10
	0	10.7±1.0	0	0/10
Mitomycin C	4	toxic		
	2	19.7±1.6*	54	0/10
	1	45.5±4.8**	255	4/10
	0.5	40.6±2.9**	217	1/10
	0.25	39.7±5.0**	210	3/10
	0.1	20.7±2.1*	62	0/10
	0.05	17.9±1.7	32	0/10
	0	12.8±1.8	0	0/10

Experiment was carried out by the same procedure described in Table 4. However, sarcoma-180 cells (2×10^6 cells/head) were inoculated i.p. on day 0.
a,b,c. *and**; See Table 4.

められなかった。また、マイトマイシン 2.0 mg/kg 以上の投与では毒性が現れはじめ、4.0 mg/kg 投与ではすべてのマウスが 1 週間以内に毒性死した。

同様な実験を sarcoma-180 細胞を用いて行い、その結果を表 9 に示した。5-フルオロウラシルは 5 mg/kg 以上の投与量で有意な ($p < 0.05$) 平均生存日数の延長がみられ、その効果は 10 mg/kg 投与群で最も顕著に現れ 343%の延命率となった。cyclophosphamide はエールリッヒ腹水がんには全く効果を示さなかったが、sarcoma-180 に対しては 5 mg/kg 以上の投与量で有意な ($p < 0.05$) 生存日数の増加が観察され、5 mg/kg の用量で延命率 52%を示した。しかし、いずれの投与群でも 60 日生存を示したマウスは認められなかった。マイトマイシン C は 0.1 mg/kg 以上の投与量で有意な ($p < 0.05$) 平均生存日数の延長が認められたが、2 mg/kg 以上では毒性が現れ、生存日数は逆に短くなっていた。

VI. 位相差顕微鏡による形態学的観察

DM 83 のエールリッヒ腹水がん細胞に与える形態学的な変化を顕微鏡下で観察した。はじめに倒立顕微鏡下で、HCO-60 を含む生理的食塩水中でがん細胞を 0, 30 および 60 分間インキュベートした対照群の細胞像を図 2 の 1-3 に示した。60 分インキュベートしてもがん細胞は形態的にはほとんど変化を示さず、時間が経過しても細胞破壊は認められなかった。また、トリパンブルーの色素排除能テストでも細胞の変化は観察されなかった。つぎに、DM 83 と共に 15, 30 および 60 分間インキュベートした時の細胞像を図 2 の 4-6 に示した。インキュベート開始後 15 分ですでに細胞の変化が現れ、この変化はインキュベート開始 30 分後、60 分後の細胞像では明白に認められ、細胞の腫大、膨潤が多く観察された。しかし、60 分間インキュベートしても細胞の崩壊像は観察されなかった。図 2 の 7 および 8 には 1,500 倍で観察した細胞像を示し

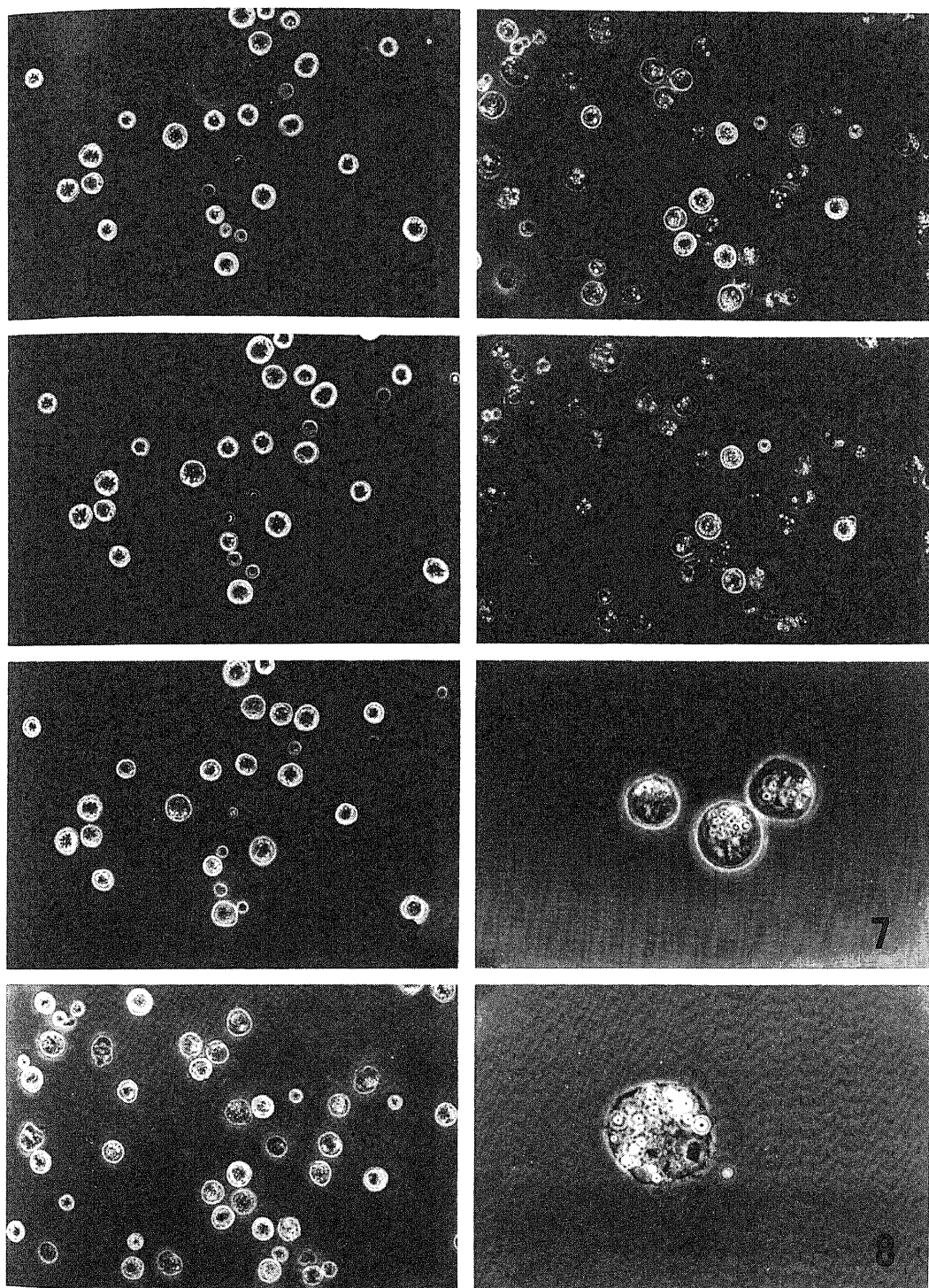


Fig. 2. Morphological changes in Ehrlich carcinoma cells incubated with and without DM 83. Number of tumor cells was 2.0×10^6 cells/ml. 1-3 and 7, Incubated with saline containing 4% HCO-60. 4-6 and 8, Incubated with 0.1 mM of DM 83. 1, Incubation time was 0 min. 2 and 5, Incubation time was 30 min. 3 and 6-8, Incubation time was 60 min.

Table 10. LD₅₀ and ILS₅₀ of several *d*-morphinans in mice

Compounds	LD ₅₀ (i.p.) ^a (mg/kg)	Ehrlich carcinoma cells		Sarcoma-180 cells	
		ILS ₅₀ ^b (mg/kg)	Safety margin ^c	ILS ₅₀ (mg/kg)	Safety margin
Dextro-methorphan	93.5				
DM 34	77.0	32	2.4	35	2.2
DM 75	106.0	23	4.6	27	3.9
DM 83	82.5	11	7.5	15	5.5
DM 96	87.5	8	11.0	17	5.1

^a; LD₅₀ was calculated by Litchfield and Wilcoxon method.

^b; ILS₅₀ was extrapolated from dose-effect relationship curve of chemicals, where X-axis is ILS(%) and Y-axis is log dose.

^c; Safety margin was calculated as follows, Safety margin=LD₅₀/ILS₅₀

た。図2の7は60分間インキュベートした対照群で図2の8はDM 83を加えて同様に処理したものである。この図では細胞の腫大に加えて細胞質内の空胞化も認められ、細胞表面に対照群と比較して多数のプレブス(blebs)が認められた。なお、この状態でのトリパンブルーテストでは色素の排除が阻害された。

VII. LD₅₀および ILS₅₀

検討を行った代表的な化合物について、マウス腹腔内投与によるLD₅₀を表10に示した。これらの化合物のLD₅₀は出発物質であるデキストロメトルファンと比べて大きな差は認められなかった。また、*in vitro*の実験結果よりILS₅₀(50%延命量)を求め、さらにこれらの値より安全域(ILS₅₀/LD₅₀)を算出し、共に表10に示した。エールリッヒ腹水がん担がんマウスではDM 96のILS₅₀は8 mg/kgであったが、sarcoma-180担がんマウスではDM 83が最も良い結果を示した。安全域はILS₅₀の値を反映し、エールリッヒ腹水がんに対するDM 96の値が11と最も高く、sarcoma-180に対してはDM 83とDM 96がほぼ同様の値を示した。

考 察

デキストロメトルファンを出発物質として合成されたモルヒナン誘導体は*in vitro*の実験においてエールリッヒ腹水がん細胞あるいはsarcoma-180細胞に対して著しい直接細胞障害作用を示し、37°C、2時間のインキュベーションで多くのがん細胞が死滅した。エールリッヒ腹水がん細胞あるいはsarcoma-180細胞に対する有効作用濃度は大半の化合物では1.0から0.1 mMで、0.01 mMではDM 83だけがsarcoma-180細胞に対して障害作用を示した。

エールリッヒ腹水がん細胞を用いた実験では、モルヒナン骨格3位の側鎖の末端にベンゼン環を有しないA群の化合物は作用が弱く、0.1 mMの濃度ではDM

48およびデキストロメトルファンにより細胞生存率をそれぞれ13.1%あるいは35.3%にまで減少させた以外は、いずれも50%以上の細胞生存率が認められた。側鎖にベンゼン環を1個有するB群の化合物は0.1 mMでも良く作用を示しており、生存細胞は2%以下を示した。側鎖にベンゼン環を2個持つC群の化合物では0.1 mMでDM 62が生存率45.6%、DM 80が0%であった。DM 62とDM 80は側鎖の炭素鎖の長さが異なりDM 62では炭素数が1個、DM 80では3個で、この違いが細胞生存率に関する差となって現れたと考えられる。D群の化合物はモルヒナン骨格の2位の位置に臭素を有する化合物で、DM 82、DM 83およびDM 84はそれぞれDM 34、DM 80およびDM 75に臭素を導入したものである。0.1 mMでは臭素を導入しない元の化合物では1%以下の細胞生存率しか認められないのに対し、臭素を導入したDM 84では58.1%と作用が著しく弱くなっており、DM 82でも4.6%となっていた。これらの事から、DM 80、DM 83、DM 84およびB群のDM 34、DM 75およびDM 96の3種類の化合物とA群の化合物とでは、エールリッヒ腹水がん細胞に対する作用点または作用機作に違いがあると考えられた。

sarcoma-180でもA群、B群およびC群ではエールリッヒ腹水がんとはほぼ同様の結果が得られたが、D群ではDM 82がほぼ30%の細胞生存率を示し、またエールリッヒ腹水がん細胞では58.1%の細胞生存率を示していたDM 84がsarcoma-180細胞では0.5%となっており、がん細胞によって作用点または作用機作の異なり、あるいは感受性の異なることが考えられた。これらの*in vitro*実験の成績から、少なくとも側鎖の末端にベンゼン環を有している化合物の方が腫瘍細胞に対する直接細胞障害作用が強いことが示唆された。

治療実験ではさらに構造活性相関が良く示されており、エールリッヒ腹水がん担がんマウスを用いた実験では、A 群の化合物は *in vitro* 実験の結果と同様、抗腫瘍効果が弱く、デキストロメトルファン、DM 16、DM 48 はいずれも平均生存日数を有意には延長しなかった。また、sarcoma-180 細胞を用いた実験でも同様な結果が示された。B 群の化合物を用いた実験ではエールリッヒ腹水がん細胞および sarcoma-180 細胞の双方に対して治療効果が認められそれぞれ有意に平均生存日数の延長が観察された。エールリッヒ腹水がんに対しては、40 mg/kg の投与群で DM 34、DM 75 および DM 96 は生存日数をそれぞれ 67%、104% および 116% 延長した。これらの B 群の化合物はいずれも側鎖の末端にベンゼン環を 1 個もっており、ベンゼン環を除いた側鎖を構成する炭素数は DM 34 が 3 個、DM 75 が 5 個、DM 96 は 8 個である。また二重結合をそれぞれ 1 個、2 個および 2 個もっている。エールリッヒ腹水がんでの結果は炭素数が増えるに従って作用が強くなる傾向がみられ、sarcoma-180 を移植したマウスでもこの順位は変わらず DM 34 の 40 mg/kg 投与群では 66%、DM 75 は 85% さらに DM 96 では 206% の延命率が認められ、これらの化合物の側鎖のベンゼン環を除いた部分の炭素数が抗腫瘍効果に重要な役割を果たしていることが立証された。

A 群の化合物の治療成績を B、C および D 群の治療成績と考え合わせると、末端のベンゼン環も重要であることが示された。DM 96 は 20 mg/kg 投与群でも著しい延命率を示しており、エールリッヒ腹水がんでは、10 mg/kg 投与群でも有意に生存日数を延長した。C 群の化合物でもベンゼン環を除いた側鎖の炭素数が 1 個の DM 62 より、3 個の DM 80 の方が抗腫瘍効果が強く認められた。但し、C 群では合成化合物数が少ない事から、さらに多くのものについて検討することが必要と考えられた。DM 62 の 40 mg/kg 投与群ではエールリッヒ腹水がんに対して無効であったが sarcoma-180 に対しては 90% と対照群のほぼ 2 倍の生存日数を示し、がん細胞に対して感受性の異なること、あるいは作用点が異なることが示された。同様の事は対照薬として使用した cyclophosphamide についても認められ、DM 62 と同様にエールリッヒ腹水がんでは作用が認められないが sarcoma-180 では有意な ($p < 0.05$) 平均生存日数の差が認められた。D 群の化合物では DM 83 および DM 84 を用いて、マウスに対する治療実験を行った。その結果、エールリッヒ腹水がんを用いた実験の 40 mg/kg 投与群では、臭素を持たない DM 80 および DM 75 はいずれも有意な延命効果が認められているのに対し、DM 80 及び DM 75 に臭素

を付加した DM 83 では作用が増強しているものの、DM 84 では全く作用が消滅していた。sarcoma-180 でも同様に DM 83 では作用が増強しているのに対し、DM 84 では有意な増強は認められなかった。これらの事実より、モルヒナン骨格 2 位への臭素の導入により抗腫瘍効果に影響は認められるものの、構造活性相関についてはさらに多くの化合物による検討が必要であろうと考えられた。

対照として用いた薬物のうち cyclophosphamide についてはすでに触れたが他の 2 剤についてはエールリッヒ腹水がんおよび sarcoma-180 の両方のがんに対して共に著しい延命効果が認められた。しかしマイトマイシン C では薬物を投与した部位に固形腫瘍が頻繁に認められた。同様のことは Kopf-Maier ら¹⁰⁾や Davidson ら²⁴⁾によっても報告されており、おそらく、腹腔内注射時に腫瘍細胞が注射針によってできた傷に持ち込まれたものであると考えられた。

一方、エールリッヒ腹水がん細胞に対する DM 83 の影響について位相差顕微鏡を用いて検討したところ、まず最初に細胞の表面にプレブスとみられる半円形の小さな膨らみが生じ、続いて細胞全体の膨化が認められた。この現象は DM 83 に限らず DM 34 や DM 96 などの他のモルヒナン誘導体にも認められた。続いて細胞内部の空胞化が著明に観察され、この時点でトリパンブルーテストで色素の排せつ障害が認められ、細胞は何らかの影響を受けているものと考えられた。

5-フルオロウラシルなど対照として用いた薬物で ED₅₀ の代わりに ILS₅₀ を用いて求めた安全域 (LD₅₀/ILS₅₀) は概算で 20-50 程度であった。今回検討を行ったモルヒナン誘導体では、DM 96 のエールリッヒ腹水がん担がんマウスに対する安全域が 11 となった以外はすべて 10 以下で、これらの誘導体の毒性が今後の検討課題となっている。

これらのモルヒナン誘導体のがん細胞に対する細胞障害作用および担がんマウスに対する抗腫瘍効果の作用機序に関しては現在不明であるが、Kigoshi らは中枢性鎮咳剤のがん細胞に対する影響について報告しており、そのなかで *l*-モルヒナン骨格を持つジヒドロコデインおよびオキシメタノールでは細胞障害作用および抗腫瘍作用が認められず *d*-モルヒナン骨格のジメモルファンやデキストロメトルファンで認められることを明らかにしている。*d*-モルヒナン誘導体の作用機序解明や、活性・構造相関に関しては更に多くの化合物を合成し検討することが必要と考えられた。

結 論

デキストロメトルファンより合成した *d*-モルヒナ

ン化合物の直接細胞障害作用および抗腫瘍効果, さらにそれらに対する構造活性相関について検討し, 以下の結果を得た.

I. エールリッヒ腹水がん細胞および sarcoma-180 細胞に対する直接細胞障害作用は 0.1 mM の濃度で, DM 34, DM 75, DM 80, DM 82, DM 83, DM 84, DM 96 および DM 97 に認められた.

II. 20 mg/kg の投与で DM 80, DM 83 および DM 96 はエールリッヒ腹水がん細胞および sarcoma-180 細胞を移植したマウスの生存期間を 50% 以上延長し, 腫瘍の増殖を抑制した.

III. マウスの抗腫瘍効果に対する構造活性相関はモルヒナン骨格 3-位の側鎖の炭素鎖の長さ, ベンゼン環の数および 2-位の臭素の有無に影響された.

IV. DM 83 の直接細胞障害作用を光学顕微鏡で観察した結果, 細胞の膨化, 屈折率の低下および細胞質の空胞化が認められた.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました正印達教授および福井医科大学薬理学木越茂教授に深い感謝の意を表します. なお, 本論文の要旨の一部は第 43 回日本癌学会総会 (1984 年, 福岡) にて発表した.

文 献

- 1) Jaffe, J. H. & Martin, W. R.: Opioid analgesics and antagonists. p494-534. *In* Gilman, A. G., Goodman, L. S. & Gilman, A. (ed.), *The pharmacological basis of therapeutics*, 6th ed. Macmillan Publishing Co. Inc., New York, 1980.
- 2) Zagon, I. S. & McLaughlin, P. J.: Naltrexone modulates tumor response in mice with neuroblastoma. *Science*, **221**, 671-673 (1983).
- 3) Zagon, I. S. & McLaughlin, P. J.: Naloxone prolongs the survival time of mice treated with neuroblastoma. *Life Science*, **28**, 1095-1102 (1981).
- 4) Zagon, I. S. & McLaughlin, P. J.: Heroin prolongs survival time and retards tumor growth in mice with neuroblastoma. *Brain Res. Bull.*, **7**, 25-32 (1981).
- 5) Aylsworth, C. F., Hodson, C. A. & Meites, J.: Opiate antagonists can inhibit mammary tumor growth in rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **161**, 18-20 (1979).
- 6) Iijima, N., Tunashima, K., & Tokugawa, H.: Antitumor effect of Naloxon. *Proceedings of the Japanese Cancer Association. The 40th Annual Meeting*. 392 (1981).
- 7) Kigoshi, S.: Effect of pentazocine on Ehrlich ascites tumor cells. *Jpn. J. Pharmacol.*, **31**, 781-785 (1981).
- 8) Kigoshi, S., Nishio, M. & Kokubo, M.: Effect of the centrally acting antitussives on ascites tumor cells. *Jpn. J. Pharmacol.*, **33**, 343-348 (1983).
- 9) 川尻博男: *d*-3-Cinnamyloxy-N-Methyl-morphinan の抗腫瘍作用について. *十全医誌*, **94**, 54-68 (1985).
- 10) Kopf-Meier, P., Hesse, B., & Koppf, H.: Tumorhemmung durch Metalloocene: Wirkung von Titanocen-, Zirconocen- und Hafnocen-dichlorid gegenüber Ehrlich-Aszites-Tumor der Maus. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **96**, 43-51 (1980).
- 11) Menkes, B., Vilgeanu, R., Nada, I., Oltea Prelipgeanu, Ghegiu, I. & Garban, Z.: Vital fluorochrome staining as means of studying the relationships between chemical structure and the cytotoxic effect of some alkylating agents. *Morphol. Embryol.*, **26**, 119-123 (1980).
- 12) Schreiber, D., Mendel, J. & Hederstadt, R.: Structure-activity relationships in experimental neuro-oncology. *Arch. Geschwulstforsch.*, **51**, 597-603 (1981).
- 13) Ikekawa, T., & Ikeda, Y.: Antitumor activity of 13-methyl-berberrubine derivatives. *J. Pharm. Dyn.*, **5**, 469-474 (1982).
- 14) Seidenberger, H., Wappes, B. & Schonenberger, H.: Relations between structure and activity of cis-dichloro-(bis (oligopeptide-ester)) platinum (II) complexes. *Arch. Pharm.* **316**, 121-131 (1983).
- 15) 沢 芳郎: 新規 N 位非置換モルフィナン誘導体の製造法. 特許公報 昭 40-5831.
- 16) 津田恭介・吉田 茂: 医薬品合成化学 上, 16 版, p93-99, 南江堂, 東京, 1975.
- 17) 津田恭介・野上 寿: 医薬品開発基礎講座 VI 新医薬品の合成法 (上), p113-123, 地人書館, 東京, 1972.
- 18) 美間博之・屋敷孝司・中谷弘実・新谷 茂・臼居敏仁: 製剤学的研究 (第 13 報) 非イオン性界面活性剤水性注射液の局所作用. *薬学雑誌*, **82**, 1171-1176 (1962).
- 19) 青木勝夫・藤沢 博・伊勢順子: 非イオン性界面活性剤の加水分解. *武田研究所年報*, **22**, 172-176 (1968).
- 20) Miller, R. G. & Phillips, R. A.: Separation of

cells by velocity sedimentation. *J. Cell. Physiol.* **73**, 191-202 (1969).

21) **Tulp, A. & Welagen, J. J. M. N.**: Fractionation of ascites tumor cells at lg: Separation of cells in specific stages of the life cycle. *Europ. J. Cancer*, **12**, 519-526 (1976).

22) **Kigoshi, S.**: Decrease of cholesterol and free fatty acid in cortisone-resistant lymphoid cells incubated with allogeneic tumor cells. *Experientia*,

35, 836-838 (1979).

23) **Litchfield, J. T. Jr. & Wilcoxon F.**: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **96**, 99-113 (1949).

24) **Davidson, J. P., Faber, P. J., Fischer, R. G., Mansy, S., Perside, H. J., Rosenberg, B. & Van Camp, L.**: "Platinum-pyrimidine blues" and related complexes: a new class of potent antitumor agents. *Cancer Chemother. Res.*, **59**, 287-300 (1975).

Experimental Studies on the Antitumor Activity of *d*-Morphinan Derivatives Mamoru Kokubo, Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - Juzen Med. Soc., **94**, 983-998 (1985)

Key Words: *d*-N-methylmorphinans, antitumor activity, ascites tumors, structure-activity relationship.

Abstract

Derivatives of *d*-morphinan, new compounds synthesized from dextromethorphan, were examined for their effect on Ehrlich carcinoma cells and sarcoma-180 cells in the *in vitro* or the *in vivo* system. Compounds used in the experiment numbered fourteen, such as *d*-3-(5-phenyl-2, 4-pentadienyloxy)-N-methylmorphinan (DM 75), *d*-3-(3, 3-diphenyl-2-propenyloxy)-N-methylmorphinan (DM 80), *d*-2-bromo-3-(3, 3-diphenyl-2-propenyloxy)-N-methylmorphinan (DM 83), *d*-3-(7-phenyl-3-methyl-2, 6-heptadienyloxy)-N-methylmorphinan (DM 96) and so forth. These compounds were dissolved in physiological saline containing 5% HCO-60, and the tumor cells were suspended in Hanks balanced salt solution (pH 7.4) supplemented with 2% bovine serum albumin. To examine the cytotoxicity of the compounds on tumor cells, the tumor cells suspension (10^7 cells/ml) were incubated at 37°C for 120 min. with 0.01-1.0mM of the compounds, and the proportion of viable tumor cells was examined thereafter with a trypan blue dye exclusion test. When Ehrlich carcinoma cells or sarcoma-180 cells were incubated for 120min. with 0.1mM of DM 75, DM 80, DM 83 or DM 96, the proportion of viable cells was markedly reduced (less than 1%). Phase contrast microscopic studies on Ehrlich carcinoma cells showed that degenerative change such as cell swelling and vacuolation cytoplasm were observed in the tumor cells incubated with 0.1mM of DM 83 for 60min. Whereas, the proportion of viable tumor cells was more than 80% after incubation without the compound. The antitumor effect of the compounds was then examined in mice inoculated i. p. with Ehrlich carcinoma cells or sarcoma-180 cells (2.0×10^6 cells/mouse). The mice were injected i. p. with the compounds (10-40 mg/kg) once a day for 5 successive days, and antitumor activity was assessed in term of increase of life span (ILS(%))= $(T-C)/C \times 100$: T, mean survival days of mice treated with the compounds; C, mean survival days of untreated control mice). ILS of mice bearing Ehrlich ascites carcinoma by 20mg/kg of DM 83 was 153%, and those by 40mg/kg of DM 96, DM 75

and DM 80 were 116, 104 and 70% respectively. ILSs of mice bearing sarcoma-180 by DM 83, DM96, DM 80 and DM 75 at a dose of 40mg/kg were 222, 206, 119, and 85%, respectively. These results clearly showed that DM 75, DM 80, DM 83 and DM 96 are cytotoxic to Ehrlich carcinoma cells and sarcoma-180 cells *in vitro*, and have antitumor activities against Ehrlich ascites carcinoma or ascites sarcoma-180 in mice.