マウス Ehrlich 固型ガンの増殖ならびに Hydrochloromethiazide
系化合物の抗ガン性におよぼす生理食塩水と Ringer-
Phosphate-Bicarbonate 溶液の影響

林 誠,¹⁾ 小野寺邦介,^{1a)} 千葉剛久,^{1b)} 宮木高明¹⁾

千葉大学腐敗研究所¹⁾

Effect of Physiological Saline and Ringer-Phosphate-Bicarbonate Solution on
the Growth of Solid Ehrlich Tumor in Mice and on Antitumor
Activities of Hydrochloromethiazides

MAKOTO HAYASHI,¹⁾ KUNIKATSU ONODERA,^{1a)} TAKEHISA

CHIBA,^{1b)} and KOMEI MIYAKI¹⁾

Institute of Food Microbiology, Chiba University¹⁾

(Received January 20, 1968)

The intraperitoneal administration of 0.15M NaCl, 0.15M KCl or Ringer-phosphate-bicarbonate solution in a dose of 0.1 ml/day/mouse for 10 days stimulated the growth of solid Ehrlich tumor, in the order: NaCl, KCl and Ringer-phosphate-bicarbonate. The anti-tumor effects of some hydrochloromethiazides on solid Ehrlich tumor disappeared when Ringer-phosphate-bicarbonate solution was used in lieu of physiological saline as solvent, for the antitumor test of these compounds.

現在まで系統的によく研究されている合成抗ガン剤はアルキル化剤や代謝拮抗剤であり、いずれもその作用機作は主として核酸代謝阻害によるものであった。著者等は再生肝細胞や多くの腫瘍細胞のように増殖の盛んな細胞では周囲の正常細胞にくらべ、細胞内 K^+ 含量は非常に大であること²⁻⁵⁾ や, sarcoma 180 や mammary adenocarcinoma の増殖は K^+ 欠乏食マウスでは正常食マウスより抑制されていたが, ガン細胞内の K^+ 含量は変らなかったということ⁶⁾ などより, 直接的な核酸, 蛋白合成阻害による抗ガン作用機作とは異なる様式の抗ガン剤の可能性を考えてみた。たとえば, すでに抗ガン性の認められている corticoid の作用機作の 1 つの可能性として cation unbalance によるものではないかと考えた。そこで, cation, anion の平衡調節機構に關与する炭酸脱水酵素の阻害を利尿作用機作とする市販利尿剤類について, 予試験的にマウス Ehrlich 固型ガンにより抗ガン・スクリーニングテストを行なったところ, hydrochloromethiazide 系降圧利尿剤中に抗ガン作用を示すものを見出したので, 市販品を含め 19 の hydrochloromethiazide 系化合物について抗ガン性を検討した。

しかし, 炭酸脱水酵素阻害剤である hydrochloromethiazide 系利尿剤は, 長期あるいは大量投与により K^+ 欠乏症をひきおこす副作用⁷⁾ を有することが報告されているので, かかる薬物をたとえわずかな液量とはいえ, 生理食塩水で懸濁して連日投与することはその K^+ 欠乏を促進するのではないかという疑問をもった。

よって, 本報においては, マウス Ehrlich 固型ガン増殖におよぼす生理食塩水と無機塩組成が動物血清のそれと類似している Ringer-phosphate-bicarbonate 溶液の連日投与の影響ならびに hydrochloromethiazide 系化

- 1) Location: Izumi-cho, Narashino-shi, Chiba-ken; Present address: a) Banyu Pharmaceutical Co., Ltd., Shimoméguro, Meguro-ku, Tokyo; b) Santen Pharmaceutical Co., Ltd., Shimoshinjo-cho, Higashi-yodogawa-ku, Osaka.
- 2) S.P. Beebe, *Am. J. Physiol.*, **12**, 167 (1905).
- 3) G.L. Rohdenburg, O.F. Krehbiel, *J. Cancer Res.*, **7**, 471 (1922).
- 4) R.P. DeLong, D.R. Coman, I. Zeidman, *Cancer, N.Y.*, **3**, 718 (1950).
- 5) A. Reinberg, *Arch. Soc. franc. Biol. Med.*, **31**, 237 (1955).
- 6) E.W. Humphrey, *Cancer Res.*, **23**, 1121 (1963).
- 7) R.W. Wilkins, *Ann. Intern. Med.*, **50**, 1 (1959).

合物について生理食塩水使用時と Ringer-phosphate-bicarbonate 溶液使用時の抗ガン効果の比較について報告する。

実験方法

供試化合物 実験に用いた hydrochloromethiazide 系化合物は Table I に示した。Sample No. 1—16 は住友化学工業株式会社医薬研究部より分与されたもので、No. 17—19 は市販降圧利尿剤より抽出、精製したものである。

抗ガン試験 (1) 使用したマウス すべて船橋農場（千葉県船橋市）より購入した dd 系雄マウス（6—8 週令、体重 18—21 g）を用い、購入後少なくとも 1 週間以上、当所において飼育後実験に供した。

(2) 抗ガン試験 Ehrlich 腹水ガン細胞 $2-4 \times 10^6$ 個をマウス腹腔内に移植、7 日後の腹水を取り出し、汚過無菌 Ringer-phosphate-bicarbonate 溶液（以後 Ringer 液とす）でガン細胞 $2-4 \times 10^7$ 個/ml に希釈し、その 0.1 ml をマウス後肢鼠蹊部皮下に移植した。1 群を 10 匹として、移植の翌日より被験物を生理食塩水または Ringer 液で細く懸濁したものを 0.1 ml ずつ、1 日 1 回 10 日間腹腔内に投与、15 日目に犠殺、固型ガン重量を対照群（生理食塩水または Ringer 液 0.1 ml 投与群）のそれと比較し、Student T test により有意差を検定した。なお、スクリーニングテストにおいてはすべて生理食塩水を用いた。また、スクリーニングテストを除き、3 回以上の繰返し実験を行ない、同一傾向の結果を得ているので、本報においてはおのおの一例ずつのデータを示した。

結果と考察

Hydrochloromethiazide 系化合物の抗ガン・スクリーニングテスト

Hydrochloromethiazide 系化合物の抗ガン・スクリーニングテストは Ehrlich 腹水ガン細胞の皮下移植の翌日より、生理食塩水に懸濁したそれぞれの被験物の 1 mg を液量 0.1 ml の割で、1 日 1 回 10 日間腹腔内に投与し、15 日目に固型ガン重量を比較するという方法で実施した。その結果は Table I に示したごとく、被験化合物 19 中有効なものは 5 であった。

Ehrlich 固型ガン増殖におよぼす 0.15 M NaCl（生理食塩水）、0.15 M KCl および Ringer 液の連日腹腔内投与の影響

従来、マウスを用いた薬物の動物実験においても、習慣的に生理食塩水を溶解、懸濁液として使用してきたが、そのことについての弊害はほとんど認識されていなかった。しかし、前にも述べたごとく、 K^+ 欠乏症をひきおこす副作用を有する、あるいはその可能性のある hydrochloromethiazide 系化合物の抗ガン性を本報においては扱っている、とくに生理食塩水の使用には考慮をはらわねばならなかった。そこで、まず、生理食塩水（0.15 M NaCl）、0.15 M KCl と Ringer 液について、それぞれの 0.1 ml 1 日 1 回 10 日間腹腔内投与の Ehrlich 固型ガン増殖におよぼす影響をしらべた。その結果は Table II に示したが、NaCl 投与群にくらべ KCl 投与群では有意差は認められなかったが、つねにガン増殖は促進されており、Ringer 投与群では顕著に促進されていた。すなわち、体液に類似した組成の塩溶液投与時のガン増殖にくらべ、NaCl 投与は明らかに抑制的に作用した。このようにきわめて微量の K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} の添加の有無により、ガン増殖に差を与えるということは、マウスを用いる動物実験において習慣的な生理食塩水使用の危険性を示唆しているように考えられた。また、Tyrode 液などの組織培養液についても Ringer 液とまったく同じ結果を得ている。なお、0.15 M の濃度の KCl 溶液を用いたのは、単に生理食塩水に濃度を合せただけで、特別な意味をもつものではないが、この溶液の 0.1 ml という投与量で、投与開始 1—2 日では認められなかった注射直後の一過性後肢けいれんが 3 日目頃から認められたことは興味あることであった。すなわち、わずかな投与量であるので 1—2 回の投与では肉眼的に観察されなかった作用が、連日投与すれば認められるようになり、決して微量であるからということで、連日投与の場合には無視することはできないということとがわかった。

生理食塩水使用時と Ringer 液使用時の Hydrochloromethiazide 系化合物の抗ガン性の比較

生理食塩水のみで連日投与でも Ringer 液投与にくらべ、Ehrlich 固型ガン増殖はかなり抑制されることがわかった。抗ガン・スクリーニングテストで有効であった 5 つの hydrochloromethiazide 系化合物につき、生理食塩水と Ringer 液で懸濁し、その抗ガン性を比較した。その結果は Table III に示したごとく、生理食塩水使用時に認められた抗ガン性は Ringer 液使用時には著しく減弱し、有意差は認められなかった。

このような現象はなぜ起るかということを考察するに、つぎのような可能性が考えられた。その 1 つは生理食

TABLE I. Antitumor Screening Test of Hydrochloromethiazide Derivatives

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	mp (°C)	Antitumor effect
1	H	Cl	H	H	(CH ₂) ₂ CH ₃	245—246	+
2	H	Cl	H	H	CH(C ₂ H ₅)(CH ₂) ₂ CH ₃	180—181	+
3	H	Cl	H	H		206—208	—
4	H	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₂ -	198—199	+
5	H	Cl	CH ₂	CH ₃	COCH ₃	221—222	—
6	H	Cl	CH ₃	CH ₃		200—203	—
7	H	Cl	CH ₃	CH ₃		227—228	—
8	CH ₃	Cl	H	H	(CH ₂) ₆ CH ₃	237—239	—
9	CH ₃	Cl	H	H	(CH ₂) ₇ CH ₃	234—236	—
10	CH ₃	Cl	H	H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	232—234	—
11	CH ₃	Cl	H	H	CH ₂ -	282—283	—
12	CH ₃	Cl	H	H	(CH ₂) ₂ -	240—241	—
13	CH ₃	Cl	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	221—222	—
14	CH ₃	Cl	CH ₃	CH ₃	COCH ₃	197—199	—
15	CH ₃	Cl	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H	150—151	—
16	CH ₃	Cl			H	235—237	+
17	H	Cl	H	H	CHCl ₂	242—244	+
18	H	Cl	H	H	CH ₂ -	247—250	—
19	H	CF ₃	H	H	H	271—272	—

All compounds were suspended in physiological saline and injected intraperitoneally in a dose of 1 mg/day/mouse for 10 days. The tumor weight of mouse in experimental groups was compared with that in control group injected with 0.1 ml of physiological saline.

+: $P < 0.05$, -: $P > 0.05$

塩水のみの連日投与では Ringer 液投与にくらべ、Ehrlich 固型ガン増殖は抑制されている。すなわち、ガン増殖に対し生理食塩水の連日投与は決して好影響をもたらしていないので、生理食塩水投与時には被験物によるガン細胞の損傷は受けやすいので、生理食塩水使用時には抗ガン性が認められ、Ringer 液使用時には抗ガン性は消滅するのではないかとというきわめて素朴な考え方に基くものである。しかしこの可能性については、他の 2—3 の抗ガン物質は生理食塩水使用時でも Ringer 液使用時でもその抗ガン性に変化はなかったということより、否定し得るのではないかと考えた。

第 2 の可能性としてはつぎのような推論を提起したい。Hydrochloromethiazide 系降圧利尿剤は長期または大量投与により K⁺ 欠乏症や糖代謝異常をひきおこす副作用を有する⁷⁾ ということはすでに述べたが、このような性質をもつ物質をマウスに投与する際、生理食塩水とともに与えるならば、Ringer 液で与えるときより、投与の都度、軽微であろうが、一時的に体液の cation unbalance がおこることが考えられ、Na⁺ 過剰から K⁺ 欠乏症

TABLE II. The Effect of Consecutive Application of 0.15 M NaCl, 0.15 M KCl and Ringer-Phosphate-Bicarbonate Solution, on the Growth of Solid Ehrlich Tumor in Mice

	Tumor weight (g)	Significance (P)
0.15 M NaCl	0.31±0.06 ^{a)}	—
0.15 M KCl	0.41±0.09	>0.05
Ringer-phosphate-bicarbonate	0.53±0.11	<0.001

a) mean±S.D.

The cells (3×10^6) of Ehrlich ascites tumor were suspended in Ringer-phosphate-bicarbonate solution and implanted subcutaneously into the inguinal region of the hind leg of dd-strain mice (male, 18–21 g body weight, 6–8 week age). From the following day, 0.1 ml of 0.15 M NaCl, 0.15 M KCl or Ringer-phosphate-bicarbonate solution was injected intraperitoneally to each group of mice consisting of 10 animals, once daily for 10 days, and the mice were autopsied on the 15th day. Each tumor was weighed and the effect of these solutions was determined from statistical significance.

TABLE III. The Different Effect of Physiological Saline and Ringer-Phosphate-Bicarbonate Solution, as Solvent, on the Antitumor Activities of Hydrochloromethiazides

Sample No.	Dose (mg/day/mouse)	Saline		Ringer-phosphate-bicarbonate	
		Tumor (g)	Significance (P)	Tumor (g)	Significance (P)
1	0	0.31±0.09 ^{a)}		0.52±0.10	
	0.1	0.25±0.07	>0.1	0.48±0.12	>0.5
	0.25	0.21±0.08	<0.05	0.49±0.11	>0.6
	0.5	0.18±0.08	<0.02	0.46±0.10	>0.2
	1.0	0.17±0.07	<0.01	0.47±0.09	>0.2
2	0	0.35±0.06		0.51±0.09	
	0.1	0.26±0.06	<0.05	0.48±0.10	>0.5
	0.25	0.22±0.05	<0.01	0.47±0.12	>0.5
	0.5	0.19±0.04	<0.001	0.47±0.08	>0.4
	1.0	0.17±0.05	<0.001	0.44±0.09	>0.1
4	0	0.29±0.08		0.49±0.12	
	0.1	0.26±0.10	>0.6	0.47±0.11	>0.7
	0.3	0.22±0.06	>0.05	0.45±0.11	>0.5
	1.0	0.18±0.06	<0.02	0.42±0.13	>0.2
16	0	0.36±0.09		0.50±0.11	
	0.1	0.32±0.10	>0.4	0.47±0.11	>0.5
	0.3	0.28±0.08	>0.05	0.46±0.09	>0.4
	1.0	0.24±0.08	<0.02	0.43±0.12	>0.3
17	0	0.31±0.04		0.55±0.10	
	0.1	0.30±0.10	>0.8	0.52±0.07	>0.5
	0.3	0.21±0.08	<0.02	0.49±0.08	>0.2
	1.0	0.20±0.03	<0.01	0.48±0.07	>0.1

a) mean±S.D.

Samples were suspended in physiological saline or Ringer-phosphate-bicarbonate solution and then 0.1 ml each of the respective suspension was injected intraperitoneally once daily for 10 days from next day after implantation of tumor cells ($2-4 \times 10^6$). The mice were autopsied on the 15th day and each tumor was weighed. The antitumor effect of hydrochloromethiazides was determined from statistical significance.

を促進し、そのためガン細胞の増殖を抑制し、他方動物血清の塩組成と類似の Ringer 液使用時には K^+ 欠乏がある程度発現しがたく、ひいては抗ガン性が認められなくなるという推論である。もともと、本研究は被験物の

利尿性はまったく無視し、一定の投与量 (0.1—1 mg) で行なった研究である。そして、Table I の No. 17—19 は市販降圧利尿剤であり、その常用量は著しく異なっている。それから比較すると、スクリーニングテストで有効であった No. 17 は無効な No. 18, 19 に比べ、大量投与していることになり、 K^+ 欠乏症をひきおこす可能性は大であった。そこで、各対照群と各投与群についての血中 K^+ 濃度の測定を試みた。しかし、採取したマウス血清はつねにある程度の溶血を伴い、対照群の K^+ 値は 9.8—14.2 meq. という値を得たが、溶血の程度により、 K^+ 値は変動した。

このため、いくつかの hydrochloromethiazide 系化合物の生理食塩水使用時認められたマウスの Ehrlich 固型ガンに対する抗ガン性が Ringer 液使用時に認められなくなったという事実の理論的解明は推定のみで実証し得なかった。

結 論

マウス Ehrlich 固型ガンの増殖は生理食塩水およびそれと等濃度 (0.15 M) 塩化カリ液と組織培養液である Ringer-phosphate-bicarbonate 溶液の 0.1 ml 1 日 1 回 10 日間腹腔内投与、15 日目の固型ガン重量で比較されたとき、生理食塩水投与群にくらべ、塩化カリ投与群では有意差はなかったが、つねに促進され、Ringer-phosphate-bicarbonate 溶液投与群は顕著な有意差をもって促進された。このことから、Ehrlich 固型ガンに対する抗ガン・スクリーニングテストにおいて有効であった 5 つの hydrochloromethiazide 系化合物を生理食塩水と Ringer-phosphate-bicarbonate 溶液でそれぞれ懸濁、投与し、その抗ガン性を比較したところ、Ringer-phosphate-bicarbonate 溶液使用時すべての抗ガン性は認められなくなった。

以上のことは、マウス-hydrochloromethiazide 系化合物の組合せによるものとも思われるが、生理食塩水の使用は、ことマウスに関しては一考を要するものと考えられた。

謝辞 本研究は文部省科学研究費 (ガン特別研究抗癌剤研究班) の一部によったものであることを付記し、また hydrochloromethiazide 系化合物を分与していただいた住友化学工業株式会社医薬研究部に感謝する。