

ガマ毒 bufadienolide の構造とヒト肝癌由来細胞 PLC/PRF/5  
に対する殺細胞活性<sup>1) 2)</sup>

(神奈川大・理) 釜野徳明・小竹文乃・張恵平  
(東亜合成つくば研) 瀬川俊章・幸田綾子

Structures of the Toad Poison Bufadienolides and Cytotoxicities  
against Cell Line of Human Liver Cancer PLC/PRF/5

Yoshiaki Kamano, Ayano Kotake, Huiping Zhang  
(Faculty of Science, Kanagawa university)  
Toshiaki Segawa, and Ayako Yukita  
(Tsukuba Institute, Toagousei Chemical Industry Co.)

S u m m a r y

The toad poison bufadienolides having novel steroidal A/B cis and C/D cis structure exhibit a variety of biological activities. To carry out systematic studies on the biological activities of the chinese traditional crude drug "Senso" (Ch'an Su), we investigated its cytotoxicities against cell line of human liver cancer PLC/PRF/5.

Our research was extended to studies on relationship the bufadienolide structures and PLC/PRF/5 activities, since the extracts of Ch'an Su and the major bufadienolide showed strong activity for PLC/PRF/5. Natural bufadienolide exhibited a potent cytotoxicity against PLC cell than their isomers and related compounds. Hellebrigenin was most active ( $IC_{50}$   $1.6 \times 10^{-4} \mu g/ml$ ). Other compound at  $10^{-4} \mu g/ml$  level were bufalin-3-acetate, gamabufotalin, bufalin, sillarenin, bufotalin, telocinobufagin, bufalin-3-succinate-tert-butylcarbazate, cinobufagin, bufalin-3-suberate, desacetyl-bufotalin and digitoxigenin. The  $14\beta$ -hydroxy derivatives showed the higher activities than  $14\beta$ ,  $15\beta$ -epoxy,  $14\alpha$ ,  $15\alpha$ -epoxy and  $\alpha$ -pyrone ring opening compounds (Table 2). We discussed about (1) activities for the colchicine-treated cells (Table 2), (2) dependence of activity with concentration of compounds (Fig. 1) and (3) characterization of activity on classification of compounds (Fig. 2). On the other hand, the bufadienolides and related compounds were classified into the five groups, A~E. Relationship between structure and activity on each group was discussed in section III. Importance of both D ring structures and 3-substituent structures was found.

As a summary, on the relationship between structures and activities, the effects of substitution to the model compounds, e.g. bufalin and resibufogenin were discussed and the results were shown in Table 9 and 10. The most important factors were found to be the  $\alpha$ -pyrone ring,  $14\beta$ -OH or  $14\beta$ ,  $15\beta$ -epoxy,  $19$ -CHO,  $11\alpha$ -OH and  $16\beta$ -OAc groups. Activities of cardenolides were more weak than those of bufadienolide. In general, the C/D cis compounds showed higher activity than the C/D trans ones.

Finally, we discuss about the antineoplastic activities of bufadienolides such as cell line of the KB and HeLa-S3, and the P388 and L1210 lymphocytic leukemia, in the comparison with PLC/PRF/5 activities, in Section IV (Table 11). A tendency of results was similar to those of the anaesthetic action<sup>3)</sup> and antiviral activity<sup>4)</sup>.

## 序 論

漢薬センソ” Ch'an Su” (蟾酥) は、中国産ヒキガエル *Bufo bufo gargarizan* CANTOR と *B. melanostictus* SCHNEIDER の sebaceous gland (皮脂腺) および parotid gland (耳下腺) からの分泌物を集め乾燥させ、固形にしたものである。センソは、古くから利尿、強心剤、鎮痛剤として使用されている。センソ中に含まれる主成分であるガマ毒 bufadienolide はステロイド骨格の 17 $\beta$  位に  $\alpha$ -pyrone 環を有し、A/B cis、C/D cis の特異な立体構造をとっており、強心、呼吸興奮、血圧上昇、局所麻酔作用などの様々な生理作用を示すことが知られている。その中の一つ resibufogenin は、強心・呼吸興奮剤 レスピゴンとして開発されている。また著者の一人釜野らによって bufalin がコカインの数十倍もの強い局所知覚麻酔作用を有し<sup>3)</sup>、ガマ毒 bufadienolide がアデノウイルスやポリオウイルスに有意な抗ウイルス作用を示す<sup>4)</sup> ことが報告されている。最近、bufalin に白血病細胞に対する分化誘導作用があり<sup>5)</sup>、抗癌剤への可能性が論じられているが、このような活性の存在は、ガマ毒 bufadienolide がヒト上皮細胞 KB 細胞、HeLa 細胞および白血病細胞 L1210 に対し、強い活性を有することが報告されていることから明かで、釜野らも数種の bufadienolide の白血病細胞 P388 に対する活性を報告している。しかし、これらの研究は断片的であり、ガマ毒 bufadienolide に対して系統的ではなく、構造と活性相関の検討まで至っていない。

著者らは、漢薬センソ Ch'an Su とその成分 bufadienolide の生理活性に関する系統的な研究の一環として、今回ヒト肝癌由来細胞 PLC/PRF/5 細胞 (以下 PLC 細胞と略す) およびそのコルヒチン耐性細胞に対する殺細胞活性を調べる機会を得た。

最初にセンソを順次、ヘキサン、エーテル、塩化メチレン、酢酸エチル、メタノールで抽出し、各々の抽出エキスの PLC 細胞に対する殺細胞活性を調べた。ヘキサン抽出エキスを除いて、非常に強い殺細胞作用を示したので、エキス中に含有する bufadienolide に対して活性を検討したところ、bufadienolide そのものが、作用本体であることが分かった。そこで、可能な全ての構造と化学修飾に対する活性評価を行うことを目的に、天然型 bufadienolide とそれらの誘導体・異性体および側鎖  $\alpha$ -pyrone 環の開裂した開裂体および cardenolide などの化合物 87 種について PLC 細胞に対する活性を調べた。その結果、活性の非常に強い ( $10^{-4} \sim 10^{-8}$   $\mu$ g/ml) 17 種の化合物が発見され、しかも活性の強弱と構造の間に相関関係が存在するという興味ある知見が得られた。すなわち、これらの成果は、ガマ毒 bufadienolide の抗癌剤開発への可能性を示唆している。

## 実 験

### 材料：

試薬、溶剤は、すべて特級を用いた。センソは板状センソを用いた。bufalin、bufotalin、resibufogenin、cinobufagin、cinobufotalin、telocinobufagin、desacetyl-cinobufagin、desacetyl-cinobufotalin、gamabufotalin、hellebrigenin は、センソより分離した。その他の bufadienolide とその誘導体および関連化合物は合成した。digitoxigenin は、市販のものを用い、その誘導体はすべて合成した。periplogenin は、保

存の天然物標品を用いた。

センソの各溶媒による抽出：

粉末にした板状センソを2～3倍量の各溶媒、ヘキサン、エーテル、ジクロロメタン、酢酸エチルおよび最後にメタノールでそれぞれ3回抽出（各3日間）し、常法に従って抽出物を得た。

Bioassay：

PLC細胞をMEM+10%CS培地で単層培養した。培地より0.05%トリプシン・0.02% EDTAを用い細胞を単離させ、細胞数 $2.5 \times 10^4$  cells/mlの細胞浮遊液として用意した。検体1mgをメタノール0.5mlに溶解させ原液とした。原液5 $\mu$ lをとり、細胞浮遊液 195 $\mu$ l中に加えた。この溶液の濃度を1として、一定量に希釈した。細胞を均一に分散させ、湿度100%、炭酸ガス5%、pH 6.8～7.0の恒温器内で3日間培養させた後、各ウェルに10 $\mu$ lのMTT溶液を添加し、37℃、4時間インキュベーションし、ついで塩酸-イソプロパノール100 $\mu$ lを各ウェルに加えて良く攪拌した。これをマイクロプレート用比色計を用い、test波長 570nm、reference波長630nmで測定した。吸光度の差O.D. 570-630を求め（MTT法）、細胞の生存率を求めた。細胞の生存率から IC<sub>50</sub>値を算出した。また、同時に同様の操作によってコルヒチン耐性細胞を準備し、この細胞に対する活性を検討した。

## 結果と考察

### I. センソの各溶媒抽出物のPLC活性

PLC細胞（Pと略）およびそのコルヒチン耐性細胞（Rと略）における各検体濃度での生存する細胞をパーセント（%）で算出し、結果をTable 1に示す。エーテル、塩化メチレンおよび酢酸エチル各抽出物に強い殺細胞活性が認められた。ほとんどの bufadienolideがゲニン体として、これらの抽出物中に含有することから活性本体は bufadienolideであると推定した。 Table 1 Cytotoxicities of Ch'an Su extracts for PLC/PRF/5.

extracts	rate of survived cell (%)					
	P			R		
	×1	50 $\mu$ g/ml ×6 <sup>2</sup>	×6 <sup>3</sup>	×1	50 $\mu$ g/ml ×6 <sup>2</sup>	×6 <sup>3</sup>
hexane	0	44	101	8	90	94
ether	0	0	0	0	0	0
dichloromethane	0	0	0	1	0	0
ethyl acetate	0	0	0	0	0	0
methanol	1	0	0	3	1	2

### II. 全bufadienolideのPLC活性

#### (1) PLC活性の評価：

天然型bufadienolideとその誘導体およびcardenolideを含めた数種の化合物について、ヒト肝癌由来細胞PLC/PRF/5における殺細胞活性を検討した。全化合物の活性結果をIC<sub>50</sub>値（ $\mu$ g/ml）で表示し、Table 2に示す。総体的に、センソ中に含有する天然型bufadienolideは、その各種誘導体や異性体に比べ、IC<sub>50</sub>値が低く活性が強い。中でも、hellebrige-

ninは最も強い殺細胞活性を示し、 $IC_{50}$ 値 $1.6 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$ 、次いでbufalin-3-acetate  $2.0 \times 10^{-4}$ 、gamabufotalin  $2.3 \times 10^{-4}$ 、bufalin  $2.8 \times 10^{-4}$ 、sillarenin  $3.1 \times 10^{-4}$ 、bufotalin  $3.4 \times 10^{-4}$ 、telocinobufagin  $3.5 \times 10^{-4}$ 、bufalin-3-succinate-tert-butylcarbazate  $6.2 \times 10^{-4}$ 、cinobufagin  $7.4 \times 10^{-4}$ 、bufalin-3-suberate  $7.5 \times 10^{-4}$ 、desacetyl-bufotalin  $7.8 \times 10^{-4}$ 、digitoxigenin  $8.7 \times 10^{-4}$ の順に12種の化合物が $10^{-4}$ オーダーの活性を示した。次いで cinobufotalin、a mixture of 42 and 43-bufalin、resibufagin、bufalin-3-suberate methylester、3-keto-bufalinなどの5種の化合物が、この順序に $10^{-3}$ オーダーの活性を示した。 $10^{-2}$ オーダーの活性を示した化合物とその順位は、cinobufagin-3-suberate、cinobufagin-3-acetate、3-keto-cinobufagin、 $OCOC(CH_3)=CH_2$  ester of bufalin、gamabufotalin-3-acetate、periplogenin、bufalin-3-succinate、 $\beta$ -chlorohydrin、 $3\alpha$ -hydroxy-bufalin、resibufogenin、15-oxo-bufalin-3-acetate、 $3\alpha$ -hydroxy-cinobufagin、desacetyl-cinobufagin-3-acetateであった。構造上、特に14位にOH基を有する化合物は、14, 15位にepoxy基を有するものよりも活性が強く、この結果はbufadienolideの表面麻酔作用<sup>3)</sup>と抗ウイルス作用<sup>4)</sup>の結果とほぼ一致している。またbufadienolideは、cardenolideよりも強い活性を示した。さらに、興味あることには、17位- $\alpha$ -pyrone環の開裂した化合物が活性の低下をきたすもそれぞれ弱い活性を示したことであり、 $\alpha$ -pyrone環の存在は活性発現に対する必須条件ではないことが分かった。さらに、bufadienolideおよびcardenolide両者において、一般に $14\beta$ -OH体は $14\beta$ ,  $15\beta$ -epoxy体およびその異性体である $14\alpha$ ,  $15\alpha$ -epoxy体よりも強い活性を示している。また、各種3位誘導体の活性も置換基により、かなり大きな違いを示していることが分かる。すなわち、これらD環構造や3位置換基構造の違い、その他化学修飾の結果がPLC細胞における殺細胞活性に大きく寄与していることが予想される。

コルヒチン耐性細胞に対しては、ほとんどの化合物が活性を減少させた。しかし、 $10^{-4} \mu\text{g/ml}$ レベルのbufalin、sillareninおよびcinobufaginは強い同等の活性を示し、 $10^{-2} \mu\text{g/ml}$ レベルの $3\alpha$ -hydroxy-bufalinとresibufogeninも同等の活性を示した。一方、 $10^{-3} \mu\text{g/ml}$ レベルの15-oxo-bufalin-3-acetateおよびdesacetyl-cinobufagin-3-acetateは、いずれも二段階のレベルまで活性を減少させた。

## (2) PLC活性の濃度依存性：

上述のようにPLC活性はすべて $IC_{50}$ 値で評価したが、化合物に対するPLC活性の濃度依存性の存在が推定される。さらに、化合物の活性に対する感受性も考えられる。そこで、活性の1位から30位 ( $10^{-2} \mu\text{g/ml}$ ) までの化合物の中から $14\beta$ -OH体 7種[Fig. 1(a)]、 $14\beta$ ,  $15\beta$ -epoxy体 6種[Fig. 1(b)]を選び、それぞれの化合物の濃度による活性値のグラフを作成した。グラフでみる限り、ほとんどの化合物は類似の曲線を与え、濃度の増加に平行に活性の増強が観察された。しかし、cinobufagin(No. 13)と3-keto-cinobufagin(No. 20)は、濃度と活性の関係がほぼ直線を示した。一方、 $14\beta$ -OH体では、活性は強いが曲線の傾きがややなだらかなる。特に、bufalin-3-acetate(No. 2)はその傾向が強く、濃度が高くなるにつれ、活性の現れは弱くなることが分かり興味を持たれる。

Table 2  $IC_{50}$  of Bufadienolide and Cardenolide for PLC/PRF/5.

compound	$IC_{50}(\mu g/ml)$		compound	$IC_{50}(\mu g/ml)$	
	P	R		P	R
1. Hellebrigenin	$1.6 \times 10^{-4}$	$5.3 \times 10^{-4}$	48. Cinobufagin-3-succinate	$8.5 \times 10^{-1}$	$9.6 \times 10^{-1}$
2. Bufalin-3-acetate	$2.0 \times 10^{-4}$	$9.0 \times 10^{-3}$	49. 3,16-Diketo-cinobufagin	$8.5 \times 10^{-1}$	5.6
3. Gamabufotalin	$2.3 \times 10^{-4}$	$8.0 \times 10^{-4}$	50. Acetyl-arenobufagin	$8.7 \times 10^{-1}$	6.8
4. Bufalin	$2.8 \times 10^{-4}$	$2.8 \times 10^{-4}$	51. Desacetyl-14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxy cinobufagin-3-acetate	$8.8 \times 10^{-1}$	1.0
5. Scillarenin	$3.1 \times 10^{-4}$	$3.2 \times 10^{-4}$	52. 16-Keto-cinobufagin- 3-acetate	2.4	7.6
6. Bufotalin	$3.4 \times 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-3}$	53. $\Delta$ 1-3-keto-resibufogenin	2.6	7.8
7. Telocinobufagin	$3.5 \times 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-3}$	54. 3-Epi-14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxy resibufogenin	4.7	6.4
8. Bufalin-3-succinate-tert- butylcarbazate	$6.2 \times 10^{-4}$	$5.6 \times 10^{-3}$	55. 3-Epi-14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxy resibufogenin-3acetate	4.7	43
9. Cinobufagin	$7.4 \times 10^{-4}$	$9.2 \times 10^{-4}$	56. $\Delta$ 14-3-Keto-bufalin	4.9	7.8
10. Bufalin-3-suberate	$7.5 \times 10^{-4}$	$3.6 \times 10^{-3}$	57. $\Delta$ 14-Bufotalin-3-acetate	5.0	7.3
11. Desacetyl-bufotalin	$7.8 \times 10^{-4}$	$8.0 \times 10^{-3}$	58. Digitoxigenin-3-suberate	5.2	8.6
12. Digitoxigenin	$8.7 \times 10^{-4}$	$9.2 \times 10^{-3}$	59. 3-Keto-resibufogenin	5.8	9.7
13. Cinobufotalin	$1.0 \times 10^{-3}$	$8.0 \times 10^{-3}$	60. 14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxy resibufogenin -3-acetate	5.9	7.3
14. A mixture of $\Delta$ 2 and $\Delta$ 3-bufalin	$8.0 \times 10^{-3}$	$9.8 \times 10^{-2}$	61. Bufatrienolide-15-0 -nitrobenzoate <sup>3)</sup>	6.2	21
15. Resibufagin	$8.9 \times 10^{-3}$	$7.5 \times 10^{-2}$	62. Cinobufagin-3-cinnamate	6.4	9.8
16. Bufalin-3-suberate methylester	$9.0 \times 10^{-3}$	$9.4 \times 10^{-2}$	63. Isobufalin ethylester -3-acetate	6.4	41
17. 3-Keto-bufalin	$9.3 \times 10^{-3}$	$6.1 \times 10^{-1}$	64. Isobufalin methylester -3-acetate	6.6	41
18. Cinobufagin-3-suberate	$1.0 \times 10^{-2}$	$6.0 \times 10^{-1}$	65. 16 $\alpha$ -Hydroxy-resibufogenin -3-acetate	8.7	7.5
19. Cinobufagin-3-acetate	$4.0 \times 10^{-2}$	$9.2 \times 10^{-2}$	66. $\Delta$ 1,4-3-keto-resibufogenin	8.7	10
20. 3-Keto-cinobufagin	$5.6 \times 10^{-2}$	$7.7 \times 10^{-1}$	67. 3-keto-14 $\alpha$ -artebufogenin	7.0	10
21. OCOC(CH <sub>3</sub> )=CH <sub>2</sub> ester Bufalin	$5.9 \times 10^{-2}$	$9.7 \times 10^{-2}$	68. Isobufalin ethylester	7.5	9.5
22. Gamabufotalin-3-acetate	$6.0 \times 10^{-2}$	$6.6 \times 10^{-1}$	69. 14 $\alpha$ -Hydroxy-bufalin- 3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diacetate	7.5	21
23. Periplogenin	$6.1 \times 10^{-2}$	$7.5 \times 10^{-1}$	70. 7-Oxo-bufatrienolide-15-0 -nitrobenzoate <sup>4)</sup>	8.0	30
24. Bufalin-3-succinate	$6.6 \times 10^{-2}$	$5.0 \times 10^{-1}$	71. 14 $\alpha$ -Artebufogenin	8.2	12
25. $\beta$ -Chlorohydrin	$7.0 \times 10^{-2}$	$8.2 \times 10^{-1}$	72. 3-Epi-resibufogenin	8.3	43
26. 3 $\alpha$ -Hydroxy-bufalin	$7.6 \times 10^{-2}$	$7.7 \times 10^{-2}$	73. 14 $\beta$ -Arte-MK <sup>1)</sup>	8.4	>50
27. Resibufogenin	$7.7 \times 10^{-2}$	$7.6 \times 10^{-2}$	74. 3-Keto-14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxy- resibufogenin	8.7	43
28. 15-Oxo-bufalin-3-acetate	$7.7 \times 10^{-2}$	6.4	75. Isobufalin methylester	9.1	45
29. 3 $\alpha$ -Hydroxy-cinobufagin	$9.8 \times 10^{-2}$	$9.0 \times 10^{-1}$	76. CMKA <sup>5)</sup>	9.5	>50
30. Desacetyl cinobufagin- 3-acetate	$9.8 \times 10^{-2}$	3.4	77. Isogamabufotalin-methylester -3,11-diacetate	9.7	20
31. Resibufagin-19-oxime	$1.0 \times 10^{-1}$	$9.0 \times 10^{-1}$	78. 20,21-epoxy-resibufogenin	9.7	30
32. 3-keto-sillarenin	$1.9 \times 10^{-1}$	$8.2 \times 10^{-1}$	79. Isobufalin	10	>50
33. Resibufogenin-3-acetate	$3.2 \times 10^{-1}$	$9.5 \times 10^{-1}$	80. 14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -Epoxy-resibufogenin	20	26
34. Resibufogenin-3-formate	$3.4 \times 10^{-1}$	3.6	81. 14 $\beta$ -Arte-Et-K-Ac <sup>2)</sup>	22	33
35. $\Delta$ 14-Digitoxigenin	$3.6 \times 10^{-1}$	$7.3 \times 10^{-1}$	82. CMKB <sup>6)</sup>	26	>50
36. Marinobufagin	$5.2 \times 10^{-1}$	$4.9 \times 10^{-1}$	83. 15 $\alpha$ -Hydroxy-bufalin	35	30
37. Desacetyl-cinobufagin	$5.2 \times 10^{-1}$	4.8	84. Desacetyl-cinobufagin-3- acetate-20,21-epoxide	44	>50
38. Digitoxigenin-3-methyl -suberate	$5.3 \times 10^{-1}$	$9.8 \times 10^{-1}$	85. Isobufotalin methylester -3-acetate	49	50
39. 14 $\beta$ -Artebufogenin- 3-acetate	$5.5 \times 10^{-1}$	1.8	86. Desacetyl-cinobufagin-3- acetate-16-succinate	50	>50
40. Digitoxigenin-3-acetate	$5.5 \times 10^{-1}$	$5.0 \times 10^{-1}$	87. RRA-1 <sup>7)</sup>	>50	>50
41. Resibufaginol	$6.1 \times 10^{-1}$	8.2			
42. Desacetyl-cinobufotalin	$6.7 \times 10^{-1}$	$6.4 \times 10^{-1}$			
43. 15 $\alpha$ -Hydroxy-bufalin- 3-acetate	$7.1 \times 10^{-1}$	5.6			
44. Cinobufagin-3,5- dinitrobenzoate	$7.8 \times 10^{-1}$	9.6			
45. 3-Keto-gamabufotalin- 11-acetate	$7.9 \times 10^{-1}$	5.60			
46. 14 $\beta$ -Artebufogenin	$8.2 \times 10^{-1}$	12			
47. $\Delta$ 14-Bufalin	$8.3 \times 10^{-1}$	$9.0 \times 10^{-1}$			

1) 14 $\beta$ -arte-MK: Methyl(Z)-3 $\beta$ -hydroxy-15,21-dioxo-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -chol-20(22)-enoate

2) 14 $\beta$ -arte-Et-K-Ac: Ethyl(z)-3 $\beta$ -acetoxyl5,21-dioxo-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -chol-20(22)-enoate

3) Bufatrienolide-15-0-nitrobenzoate: 3 $\beta$ ,15 $\xi$ -Dehydroxy-5 $\beta$ ,14 $\xi$ -bufa-8,20,22-trienolide-3-acetate-15-ortho-nitrobenzoate

4) 7-Oxo-bufatrienolide-15-0-nitrobenzoate:  
3 $\beta$ ,15 $\xi$ -Dehydroxy-7-oxo-5 $\beta$ ,14 $\xi$ -bufa-8,20,22-trienolide-3-acetate-15-ortho-nitrobenzoate

5) CMKA: Methyl-3 $\beta$ -hydroxy-14 $\beta$ ,15 $\beta$ ,16 $\beta$ ,22 $\xi$ -diepoxy-21-nor-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -cholanoate

6) CMKB: Methyl(E)-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -dihydroxy-14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxy-21-nor-chol-20(22)-enoate

7) RRA-1: 14 $\beta$ ,15 $\beta$ -Epoxy-5 $\beta$ -chol-20(22)-en-3 $\beta$ ,21-24-triol



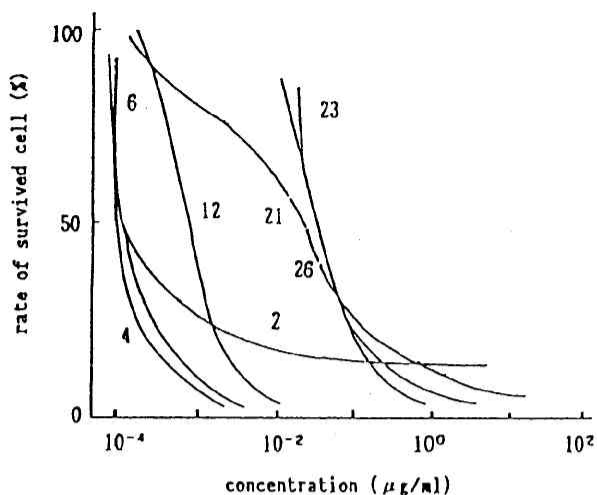


Fig. 1(a)

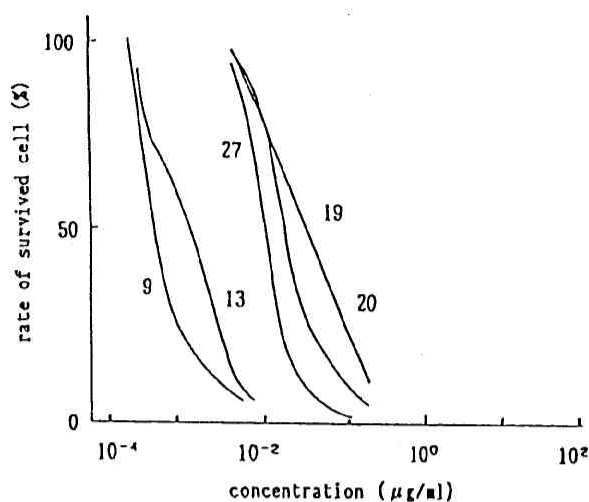
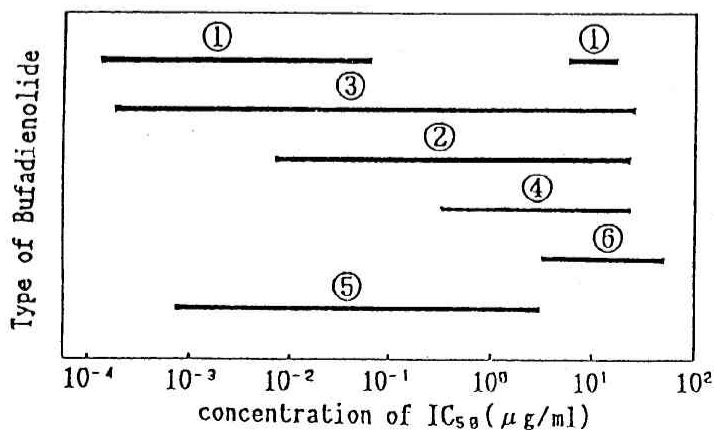


Fig. 1(b)

### (3) 化合物の種類によるPLC活性の特徴：

次に、数の多いデータのそろっている化合物とその誘導体が与える活性を濃度によって棒グラフに表したところ、Fig. 2に示すような結果が得られた。このグラフを検討すると全体的に、(1) bufalin、bufotalinとその誘導体での $IC_{50}$ 値は、 $10^{-4} \sim 10^{-1} \mu g/ml$ の比較的低濃度に集中し、強い活性を示している。(2)  $\alpha$ -pyrone開裂体は活性が著しく減少し、 $IC_{50}$ 値は $10^0 \sim 10^2 \mu g/ml$ と非常に高濃度に集中している。ついで、(3) ①、②、③、④、⑥の順に活性は低下し、この順に活性の範囲が狭まっている。これに対し、(4)  $14\beta$ ,  $15\beta$ -epoxy基と $16\beta$ -OAc基を有するcinobufagin、cinobufotalinとその誘導体は、ほとんど $10^{-4} \mu g/ml$ から $10 \mu g/ml$ の幅広い範囲で活性を示している。また、(5) cardenolideとその誘導体も比較的広範囲で中程度の活性を示している。(6) ①には、極端に活性が低下し、グループからずれている一群がある。これらは、 $14$ -dehydro体 ( $\Delta 14$ )、 $14\alpha$ -OH体および $15\alpha$ -OH体 ( $15\alpha$ -hydroxybufalin) である。この結果は、活性発現に $14\beta$ -OH基の存在が重要な因子となっていることを知り、 $14\alpha$ -OH基の存在や $15\alpha$ -OH基の存在が活性を激減させることが分かった。(7)  $IC_{50}$ 値 ( $\mu g/ml$ ) が $10^{-4}$ オーダーの化合物は、cinobufaginを除いて、すべて $14\beta$ -OH体であった。cinobufaginの効果は、 $16\beta$ -OAc基にかなり依存していると考えられる。しかし、cinobufaginは他のグループと異なり、広範囲濃度で殺細胞活性を示し、化学修飾による効果が広い範囲で期待できる。すなわち、cinobufaginは適切な活性を有する化合物を見いだす上で重要な化合物である。



#### Type of compounds

- ① Bufalin and bufotalin derivatives
- ② Resibufogenin and derivatives
- ③ Cinobufagin and derivatives
- ④ Artebufogenin and derivatives
- ⑤ Cardenolide and derivatives
- ⑥  $\alpha$ -pyrone ring opening compounds

Fig. 2

### Ⅲ. bufadienolide構造とPLC活性の相関

#### (1) 構造—活性相関：

構造と活性との相関関係を明かとするために、天然型bufadienolideを基本として全化合物を構造別に次のgroup A～Eに分類し、議論する。

- A. bufalin、bufotalinとそれらの誘導体（14β-OH基を有する化合物・異性体・誘導体）
- B. resibufogenin、cinobufaginとそれらの誘導体（14β,15β-epoxy基、14α,15α-epoxy基を有する化合物・異性体・誘導体）
- C. cardenolideとその誘導体
- D. 14位に酸素が結合していないbufadienolideとcardenolide（A, B, C以外のbufadienolideとcardenolide）
- E. α-pyrone開裂体

[ Group A ] 14β-OH体であるbufalin、bufotalinなどのIC<sub>50</sub>値をTable 3に要約した。

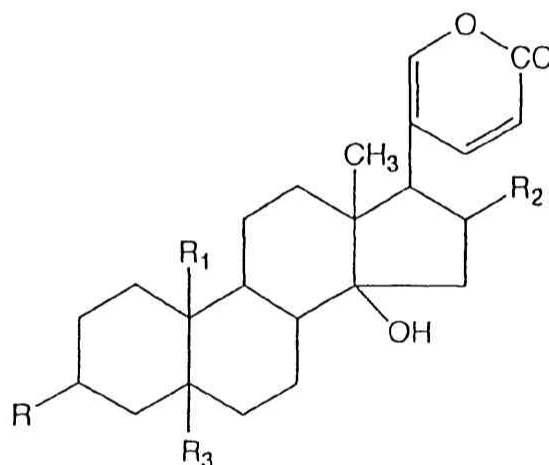
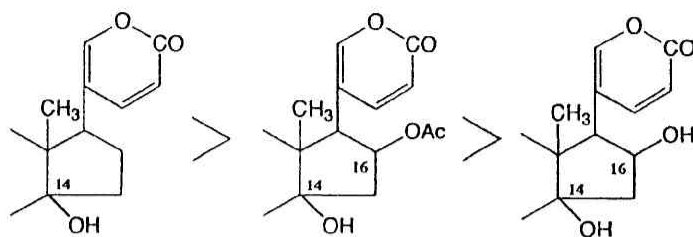


Table 3 PLC/PRF/5 Activities of 14β-Hydroxy Bufadienolides(A)

No	compounds	substitution	Inhibitory activities IC <sub>50</sub> (μg/ml)	Ratio of activities
1	Hellebrigenin	R=OH, R1=CHO, R2=H, R3=OH	1.6×10 <sup>-4</sup>	1.0
2	Bufalin-3-acetate	R=OAc, R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H	2.0×10 <sup>-4</sup>	8.0×10 <sup>-1</sup>
3	Gamabufotalin	R=OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H, 11α-OH	2.3×10 <sup>-4</sup>	7.0×10 <sup>-1</sup>
4	Bufalin	R=OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H	2.8×10 <sup>-4</sup>	5.7×10 <sup>-1</sup>
5	Scillarenin	R=OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H, Δ4	3.1×10 <sup>-4</sup>	5.2×10 <sup>-1</sup>
6	Bufotalin	R=OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OAc, R3=H	3.4×10 <sup>-4</sup>	4.7×10 <sup>-1</sup>
7	Telocinobufagin	R=OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=H, R3=OH	3.5×10 <sup>-4</sup>	4.6×10 <sup>-1</sup>
8	Bufalin-3-succinate-tert-butylcarbazate	R=COO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONHCH <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub> , R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H	6.2×10 <sup>-4</sup>	2.6×10 <sup>-1</sup>
10	Bufalin-3-suberate	R=COO(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H	7.5×10 <sup>-4</sup>	2.1×10 <sup>-1</sup>
11	Desacetyl-bufotalin	R=OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OH, R3=H	7.8×10 <sup>-4</sup>	2.1×10 <sup>-1</sup>
14	A mixture of Δ2 and Δ3-bufalin	Δ2 and Δ3	8.0×10 <sup>-3</sup>	2.0×10 <sup>-2</sup>
16	Bufalin-3-suberate methylester	R=COO(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOCH <sub>3</sub> , R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H	9.0×10 <sup>-3</sup>	1.8×10 <sup>-2</sup>
17	3-Keto-bufalin	R=CO, R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H	9.3×10 <sup>-3</sup>	1.7×10 <sup>-2</sup>
21	OCOC(CH <sub>3</sub> )=CH <sub>2</sub> ester of Bufalin	R=OCOC(CH <sub>3</sub> )=CH <sub>2</sub> , R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H	5.9×10 <sup>-2</sup>	2.7×10 <sup>-3</sup>
22	Gamabufotalin-3-acetate	R=OAc, R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H, 11α-OH	6.0×10 <sup>-2</sup>	2.7×10 <sup>-3</sup>
24	Bufalin-3-succinate	R=OCOC(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H	6.6×10 <sup>-2</sup>	2.4×10 <sup>-3</sup>
26	3α-Hydroxy-bufalin	R=α-OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H	7.6×10 <sup>-2</sup>	2.1×10 <sup>-3</sup>
28	15-Oxo-bufalin-3-acetate	R=OAc, R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H, 15-ketone	7.7×10 <sup>-2</sup>	2.1×10 <sup>-3</sup>
32	3-Keto-sillarenin	R=CO, R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H, Δ4	1.9×10 <sup>-1</sup>	8.4×10 <sup>-4</sup>
43	15α-Hydroxy-bufalin-3-acetate	R=OAc, R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H, 15α-OH	7.1×10 <sup>-1</sup>	2.3×10 <sup>-4</sup>
45	3-Keto-gamabufotalin-11-acetate	R=CO, R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H, 11-OAc	7.9×10 <sup>-1</sup>	2.0×10 <sup>-4</sup>
50	Acetyl-arenobufagin	R=OAc, R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H, 11α-OH, 12-ketone	8.7×10 <sup>-1</sup>	1.8×10 <sup>-4</sup>
56	3-Keto-14-dehydrobufalin	R=CO, R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H, Δ14	4.9	3.3×10 <sup>-5</sup>
68	14α-Hydroxybufalin-3β,16β-diacetate	R=OAc, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OAc, R3=H, 14α-OH	7.5	2.1×10 <sup>-5</sup>
83	15α-Hydroxybufalin	R=OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=R3=H, 15α-OH	35	4.6×10 <sup>-6</sup>

bufalinを基本構造と考えると、19位CHO基の導入、11 $\alpha$ -OHの導入は活性を高めるが、16 $\beta$ -OAc、5 $\beta$ -OH、16 $\beta$ -OHの導入は活性を低下させ、特に15 $\alpha$ -OH基の導入は著しく活性を低下させることが分かった。16 $\beta$ -OH基はacetateよりもさらに値が低い。



scheme 1

$\Delta 4$ の導入は、ほとんど同じ活性を示し、 $\Delta 2/\Delta 3$ の導入は活性を低下させる。3位OHのoxo化(keto)は活性を低下させ、従って、 $\Delta 4$ の場合も $\Delta 4$ -3-keto体の活性は低下している。3 $\alpha$ -OH化も14 $\alpha$ -OH化も活性を低下させる。

3位については、まずOHのacetyl化は活性を高めるが、他のesterはすべて活性を低下させた。そのesterの種類と順位は3-succinate-tert-butylcarbazoate > 3-suberate > 3-suberate methylester > 3-succinateであった。succinateよりもtert-butylcarbazoateの方が活性が上昇している点注目に値する。

[ Group B ] 14 $\beta$ , 15 $\beta$ -epoxy体であるresibufogenin、cinobufaginなどのIC<sub>50</sub>値をTable 4および5に要約した。

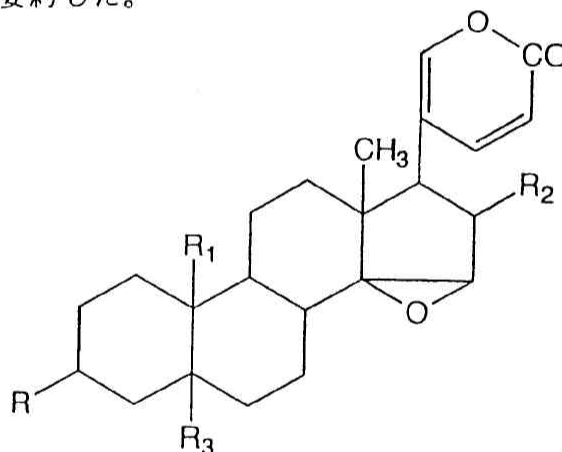


Table 4 PLC/PRF/5 Activities of 14 $\beta$ , 15 $\beta$ -Epoxy Bufadienolides(B-1)

No	compounds	substitution	Inhibitory activities IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	Ratio of activities
15	Resibufagin	R=OH, R1=CHO, R2=H, R3=H	$8.9 \times 10^{-3}$	1.0
27	Resibufogenin	R=OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=H, R3=H	$7.7 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-1}$
33	Resibufogenin-3-acetate	R=OAc, R1=CH <sub>3</sub> , R2=H, R3=H	$3.2 \times 10^{-1}$	$2.8 \times 10^{-2}$
34	Resibufogenin-3-formate	R=OCHO, R1=CH <sub>3</sub> , R2=H, R3=H	$3.4 \times 10^{-1}$	$2.6 \times 10^{-2}$
36	Marinobufagin	R=OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=H, R3=OH	$5.2 \times 10^{-1}$	$1.7 \times 10^{-2}$
41	Resibufaginol	R=OH, R1=CH <sub>2</sub> OH, R2=H, R3=H	$6.1 \times 10^{-1}$	$1.5 \times 10^{-2}$
53	$\Delta 1$ -3-Keto-resibufogenin	R=CO, R1=CH <sub>3</sub> , R2=H, R3=H, $\Delta 1$	2.6	$3.4 \times 10^{-3}$
54	3-Epi-14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -epoxy-resibufogenin	R= $\alpha$ OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=H, R3=H, 14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -epoxy	4.7	$1.9 \times 10^{-3}$
55	3-Epi-14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -epoxy-resibufogenin 3-acetate	R= $\alpha$ OAc, R1=CH <sub>3</sub> , R2=H, R3=H, 14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -epoxy	4.7	$1.9 \times 10^{-3}$
59	3-Keto-resibufogenin	R=CO, R1=CH <sub>3</sub> , R2=H, R3=H	5.8	$1.5 \times 10^{-3}$
60	14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -epoxy-resibufogenin 3-acetate	R=OAc, R1=CH <sub>3</sub> , R2=H, R3=H, 14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -epoxy	5.9	$1.5 \times 10^{-3}$
65	16 $\alpha$ -Hydroxy-resibufogenin-3-acetate	R=OAc, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OH, R3=H	6.7	$1.3 \times 10^{-3}$
66	$\Delta 1, 4$ -3-Keto-resibufogenin	R=CO, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OAc, R3=H, $\Delta 1, 4$	6.7	$1.3 \times 10^{-3}$
72	3-Epi-resibufogenin	R= $\alpha$ OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=H, R3=H	8.3	$1.1 \times 10^{-3}$
74	3-Keto-14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -epoxy-resibufogenin	R=CO, R1=CH <sub>3</sub> , R2=H, R3=H, 14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -epoxy	8.7	$1.0 \times 10^{-3}$
80	14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -Epoxy-resibufogenin	R=OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=H, R3=H, 14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -epoxy	20	$4.5 \times 10^{-4}$



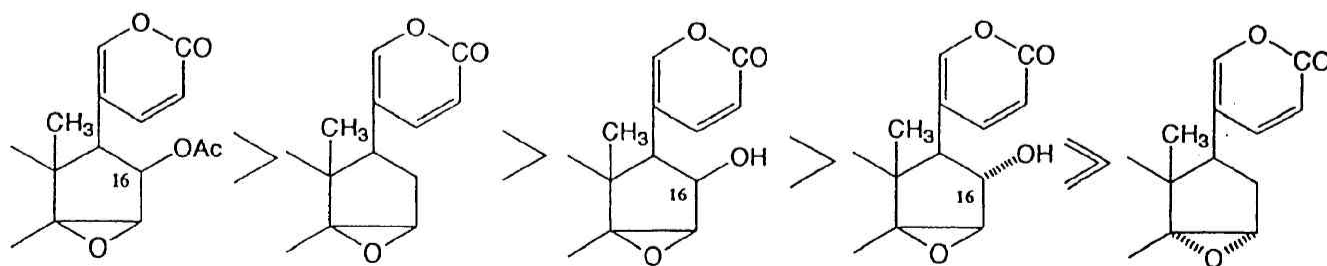
Table 5 PLC/PRF/5 Activities of 14 $\beta$ , 15 $\beta$ -Epoxy-16 $\beta$ -Acetoxy  
Bufadienolides(B-2)

No	compounds	substitution	Inhibitory activities IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	Ratio of activities
9	Cinobufagin	R=OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OAc, R3=H	$7.4 \times 10^{-4}$	1.0
13	Cinobufotalin	R=OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OAc, R3=OH	$1.0 \times 10^{-3}$	$7.4 \times 10^{-1}$
18	Cinobufagin-3-suberate	R=COO(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OAc, R3=H	$1.0 \times 10^{-2}$	$7.4 \times 10^{-2}$
19	Cinobufagin-3-acetate	R=OAc, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OAc, R3=H	$4.0 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-2}$
20	3-Keto-cinobufagin	R=CO, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OAc, R3=H	$5.6 \times 10^{-2}$	$1.3 \times 10^{-2}$
29	3 $\alpha$ -Hydroxy-cinobufagin	R= $\alpha$ OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OAc, R3=H	$9.8 \times 10^{-2}$	$7.6 \times 10^{-3}$
30	Desacetyl-cinobufagin-3-acetate	R=OAc, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OH, R3=H	$9.8 \times 10^{-2}$	$7.6 \times 10^{-3}$
37	Desacetyl-cinobufagin	R=OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OH, R3=H	$5.2 \times 10^{-1}$	$1.4 \times 10^{-3}$
42	Desacetyl-cinobufotalin	R=OH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OH, R3=OH	$6.7 \times 10^{-1}$	$1.1 \times 10^{-3}$
44	Cinobufagin-3,5-dinitrobenzoate	R=OCOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> , R1=CH <sub>3</sub> , R2=OAc, R3=H	$7.8 \times 10^{-1}$	$9.5 \times 10^{-4}$
48	Cinobufagin-3-succinate	R=OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OAc, R3=H	$8.5 \times 10^{-1}$	$8.7 \times 10^{-4}$
49	3,16-Diketocinobufagin	R=CO, R1=CH <sub>3</sub> , R2=CO, R3=H	$8.5 \times 10^{-1}$	$8.7 \times 10^{-4}$
51	Desacetyl-14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -epoxy-cinobufagin 3-acetate	R=OAc, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OAc, R3=H, 14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -epoxy	$8.8 \times 10^{-1}$	$8.4 \times 10^{-4}$
52	16-Keto-cinobufagin-3-acetate	R=OAc, R1=CH <sub>3</sub> , R2=CO, R3=H	2.4	$3.1 \times 10^{-4}$
62	Cinobufagin-3-cinnamate	R=OCOCH=CHC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> , R1=CH <sub>3</sub> , R2=OAc, R3=H	6.4	$1.2 \times 10^{-4}$
86	Desacetyl-cinobufagin-3-acetate -16-succinate	R=OAc, R1=CH <sub>3</sub> , R2=OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH, R3=H	50	$1.4 \times 10^{-5}$

resibufogeninを基本構造と考えると、前述の14 $\beta$ -OH体の場合と同じく、19位CHO基の導入は活性を高めるが、それをoxime化したり-CH<sub>2</sub>OH基にするとCH<sub>3</sub>基よりもやや活性を低下させる。その順位は次の通りであった。19-CHO > 19-CH<sub>3</sub> > 19-CH=N-OH > 19-CH<sub>2</sub>OH

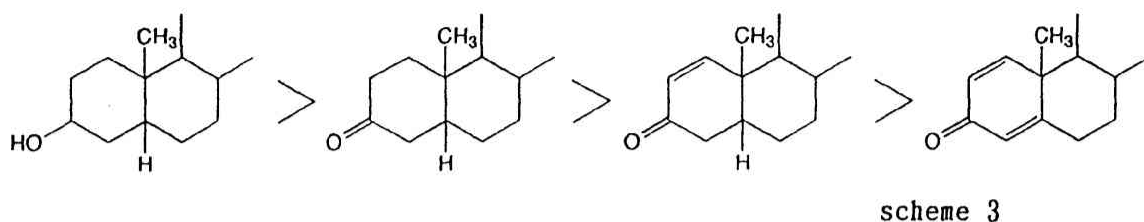
水酸基の導入については、特に16 $\beta$ -OAc基の導入は、著しく活性を高める。すなわち、resibufogeninに対するcinobufagin、marinobufaginに対するcinobufotalinがそれである。しかし、16 $\beta$ -OH基および16 $\alpha$ -OH基の導入は活性を減少させることが分かり (scheme 2)、前述の14 $\beta$ -OH体 (Group A) の場合と異なる興味ある結果を得た。一方、resibufogenin-3-acetate、cinobufagin-3-acetateおよびdesacetyl-cinobufagin-3-acetateのように、3位にOAc基を有する化合物は16 $\beta$ -OH基の導入により活性が増大してる。この結果は、3 $\beta$ -OH体のそれと逆である。また、異性体3 $\alpha$ -OH体の場合、天然型の14 $\beta$ , 15 $\beta$ -epoxy体より14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -epoxy異性体の方がやや強い活性を示している点興味ある知見である。以上のことから、3位および16位置換基が、立体的にしかも相互に活性に影響を与えているものと思われる。

5 $\beta$ -OH基の導入は、いずれの構造においても活性を減少させ (resibufogenin > marinobufagin; cinobufagin > cinobufotalin)、また3位水酸基の異性体 ( $\alpha$ 体) およびepoxy異性体 (14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -epoxy体 (scheme 2)) はいずれも活性が著しく低下している。

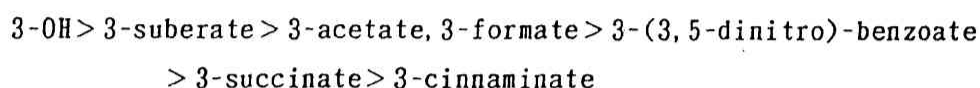


scheme 2

3位OHのケトン化は、いずれも活性を減じ、その3-Keto体における $\Delta 1$ の導入、 $\Delta 1,4$ の導入は、次の順位で活性が低下した (scheme 3)。



3位水酸基のエステル化は、いずれも活性を低下させた (scheme 4)。



scheme 4

また、異性体  $14\alpha$ ,  $15\alpha$ -epoxy-resibufogenin と  $16\alpha$ -O-succinate が最も低い活性を示したことに注目したい。

[ Group C ] cardenolide とその誘導体の  $IC_{50}$  値を Table 6 に要約した。

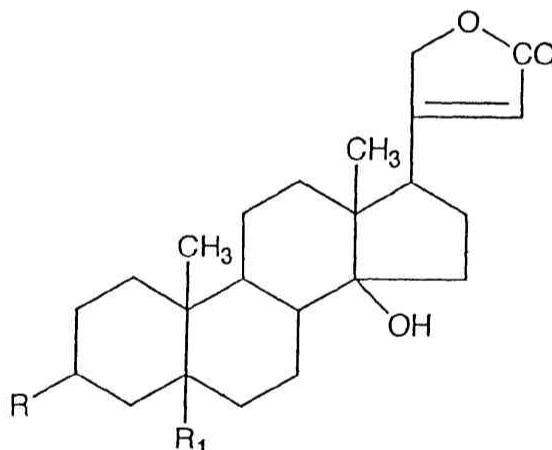


Table 6 PLC/PRF/5 Activities of Cardenolides

No	compounds	substitution	Inhibitory activities $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Ratio of activities
12	Digitoxigenin	$R=\text{OH}, R_1=\text{H}$	$8.7 \times 10^{-4}$	1.0
23	Periplogenin	$R=\text{OH}, R_1=\text{OH}$	$6.1 \times 10^{-2}$	$1.4 \times 10^{-2}$
38	Digitoxigenin-3-methylsuberate	$R=\text{OCO}(\text{CH}_2)_6\text{COOCH}_3, R_1=\text{H}$	$5.3 \times 10^{-1}$	$1.6 \times 10^{-3}$
40	Digitoxigenin-3-acetate	$R=\text{OAc}, R_1=\text{H}$	$5.5 \times 10^{-1}$	$1.6 \times 10^{-3}$
58	Digitoxigenin-3-suberate	$R=\text{OCO}(\text{CH}_2)_6\text{COOH}, R_1=\text{H}$	5.2	$1.7 \times 10^{-4}$

cardenolide は同じステロイド骨格を持つ bufadienolide より活性は弱い。Group A、B と同じく、 $5\beta$ -OH 基の導入は活性を減じ、3位エステルは更に活性を低下させる。エステルのうち、3-suberate よりも 3-methylsuberate の方が活性が高く、興味深い。

[ Group D ]  $14\text{-OH}$  体と  $14,15\text{-epoxy}$  体を除いた Group A~C に入らない bufadienolide と cardenolide の  $IC_{50}$  値を Table 7 に要約した。

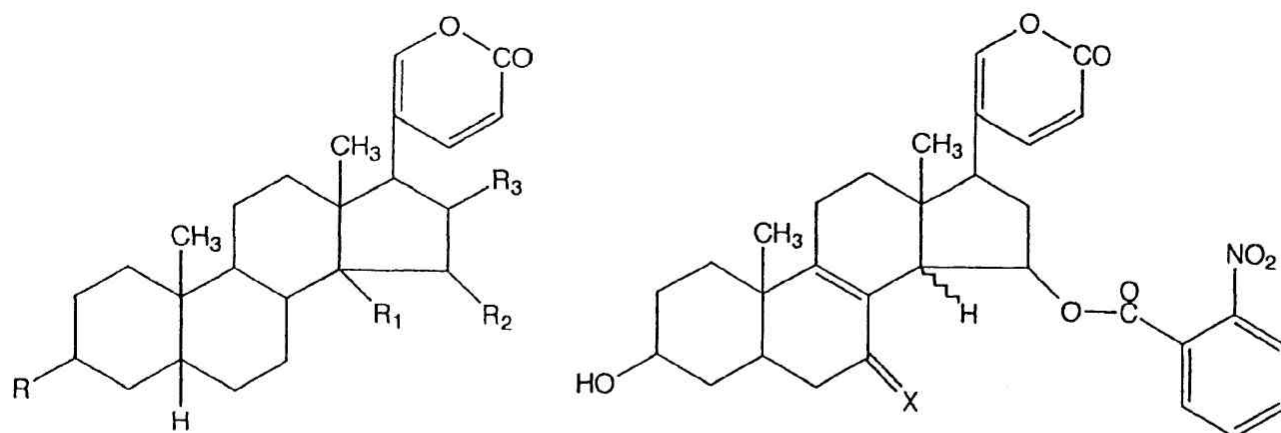


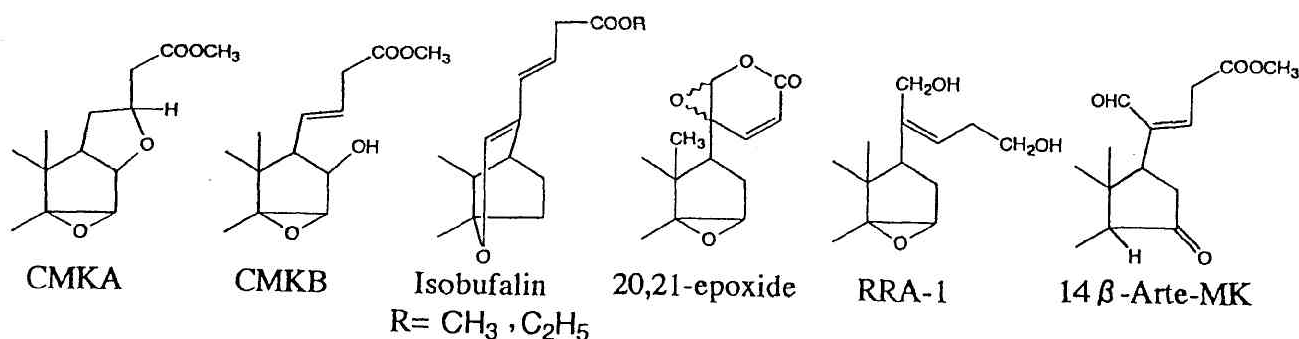
Table 7 PLC/PRF/5 Activities of 14-Non-Oxygen Bufadienolides

No	compounds	substitution	Inhibitory activities IC <sub>50</sub> (μg/ml)	Ratio of activities
25	β-Chlorohydrin <sup>1)</sup>	R=OH, R1=βCl, R2=αOH, R3=H	7.0×10 <sup>-2</sup>	1.0
35	Δ14-Digitoxigenin	R=OH, R1=R2=Δ14, cardenolide	3.6×10 <sup>-1</sup>	1.9×10 <sup>-1</sup>
39	14β-Artebufogenin-3-acetate	R=OAc, R1=βH, R2=CO, R3=H	5.5×10 <sup>-1</sup>	1.3×10 <sup>-1</sup>
46	14β-Artebufogenin	R=OH, R1=βH, R2=CO, R3=H	8.2×10 <sup>-1</sup>	8.5×10 <sup>-2</sup>
47	Δ14-Bufalin	R=OH, R1=R2=Δ14, R3=H	8.3×10 <sup>-1</sup>	8.4×10 <sup>-2</sup>
56	Δ14-3-Keto-bufalin	R=CO, R1=R2=Δ14, R3=H	4.9	1.4×10 <sup>-2</sup>
57	Δ14-Bufotalin-3-acetate	R=OAc, R1=R2=Δ14, R3=βOAc	5.0	1.4×10 <sup>-2</sup>
61	Bufatrienolide-15-O-nitrobenzoate	R=OH, X=H <sub>2</sub> , Δ7(14)	6.2	1.1×10 <sup>-2</sup>
67	3-Keto-14α-artebufogenin	R=CO, R1=αH, R2=CO, R3=H	7.0	1.0×10 <sup>-2</sup>
70	7-Oxo-bufatrienolide-15-O-nitrobenzoate	R=OH, X=CO, Δ7(14)	8.0	8.8×10 <sup>-3</sup>
71	14α-Artebufogenin	R=OH, R1=αH, R2=CO, R3=H	8.2	8.5×10 <sup>-3</sup>

1) 3β, 15α-Dihydroxy, 14β-chloro-bufa-5βH, 20, 22-dienolide (14βCl, 15αOH体)

β-chlorohydrine (14β-Cl, 15α-OH) が  $7.0 \times 10^{-2}$  という resibufogenin のそれ ( $7.7 \times 10^{-2}$ ) よりも強い活性を示し、さらに 14β-H, 15-oxo 体と Δ14 体が  $10^{-1}$  オーダーの活性を示したことから、活性の発現に必ずしも 14 位に酸素が結合していなくても良いことが分かった。Δ14 体において、cardenolide が bufadienolide より強い活性を与えたことも興味を持つ。また、14β-H, 15-oxo 体 (14β-artebufogenin) は、その異性体 14α-H, 15-oxo 体 (14α-artebufogenin) よりも活性が強い。この異性体における関係は Group A (14-OH 体)、Group B (14, 15-epoxy 体) においても同じであり、これらの結果から、C/D 環 cis が trans より常に強い活性を与えるように思われる。さらに、3-OAc 体の方が、3-OH 体よりもやや活性が強い。14α-H 体では、3 位 ketone の導入で活性の増加を示した。ketone 基の導入で活性が増大したのは、この例があるのみであった。

[ Group E ] α-pyrone 環を epoxy 化し、共役系を変えた化合物と α-pyrone 環を開裂した化合物の全てを Table 8 に要約した。



scheme 5

Table 8 PLC/PRF/5 Activities of the Epoxy  $\alpha$ -Pyrone and  $\alpha$ -Pyrone Opening Compounds

No	compound	Inhibitory activities IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	Ratio of activities
63	Isobufalin ethylester-3-acetate	6.4	1.0
64	Isobufalin methylester-3-axetate	6.6	$9.7 \times 10^{-1}$
68	Isobufalin ethylester	7.5	$8.5 \times 10^{-1}$
73	14 $\beta$ -Arte-MK <sup>1)</sup>	8.4	$7.6 \times 10^{-1}$
75	Isobufalin methylester	9.1	$7.0 \times 10^{-1}$
76	CMKA <sup>2)</sup>	9.5	$6.7 \times 10^{-1}$
77	Isogamabufotalin-methylester- 3,11-diacetate	9.7	$6.6 \times 10^{-1}$
78	20,21-epoxy-resibufogenin	9.7	$6.6 \times 10^{-1}$
79	Isobufalin	10	$6.4 \times 10^{-1}$
81	14 $\beta$ -Arte-Et-K-Ac <sup>3)</sup>	22	$2.9 \times 10^{-1}$
82	CMKB <sup>4)</sup>	26	$2.5 \times 10^{-1}$
84	Desacetyl-cinobufagin-3-acetate 20,21-epoxide	44	$1.5 \times 10^{-1}$
85	Isobufaotalin methylester- 3-acetate	49	$1.3 \times 10^{-1}$
87	RRA-1 <sup>5)</sup>	>50	$<1.3 \times 10^{-1}$

1) 14  $\beta$ -arte-MK: Methyl(Z)-3  $\beta$ -hydroxy-15,21-dioxo-5  $\beta$ ,14  $\beta$ -chol-20(22)-enoate

2) CMKA: Methyl-3  $\beta$ -hydroxy-14  $\beta$ ,15  $\beta$ ;16  $\beta$ ,22  $\xi$ -diepoxy-21-nor-5  $\beta$ ,14  $\beta$ -cholanoate

3) 14  $\beta$ -Arte-Et-K-Ac: Ethyl(z)-3  $\beta$ -acetoxy-15,21-dioxo-5  $\beta$ ,14  $\beta$ -chol-20(22)-enoate

4) CMKB: Methyl(E)-3  $\beta$ ,16  $\beta$ -dihydroxy-14  $\beta$ ,15  $\beta$ -epoxy-21-nor-chol-20(22)-enoate

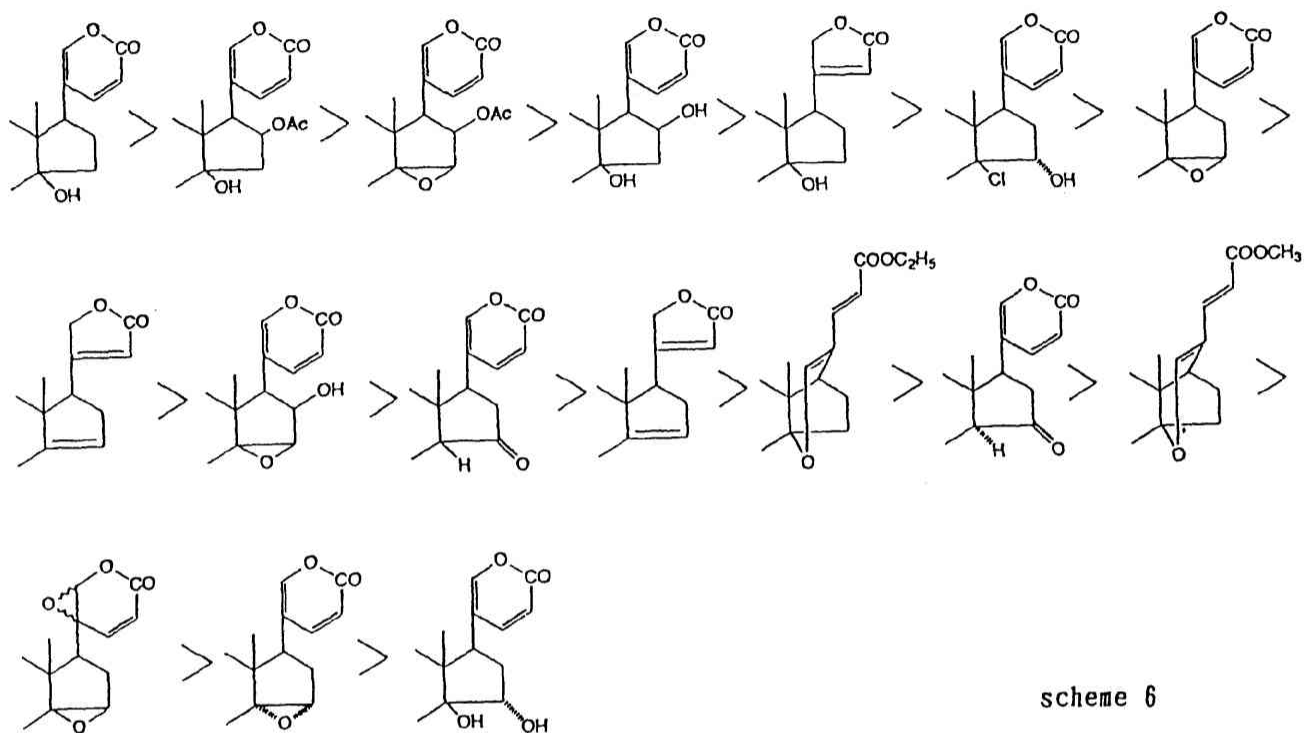
5) RRA-1: 14  $\beta$ ,15  $\beta$ -Epoxy-5  $\beta$ -chol-20(22)-en-3  $\beta$ ,21,24-triol

各構造をscheme 5に示した。20,21-epoxy-resibufogeninの活性は、resibufogeninのそれよりも著しく弱く、他の $\alpha$ -pyrone環開裂体のすべてが、ほとんど同じレベルで活性を著しく低下させている。しかし、弱いながらも活性を保持した点、 $\alpha$ -pyrone環の存在は、活性増強の重要な因子であるが、活性発現のすべてではないことを示唆している。

(2) D環部分構造と活性相関：

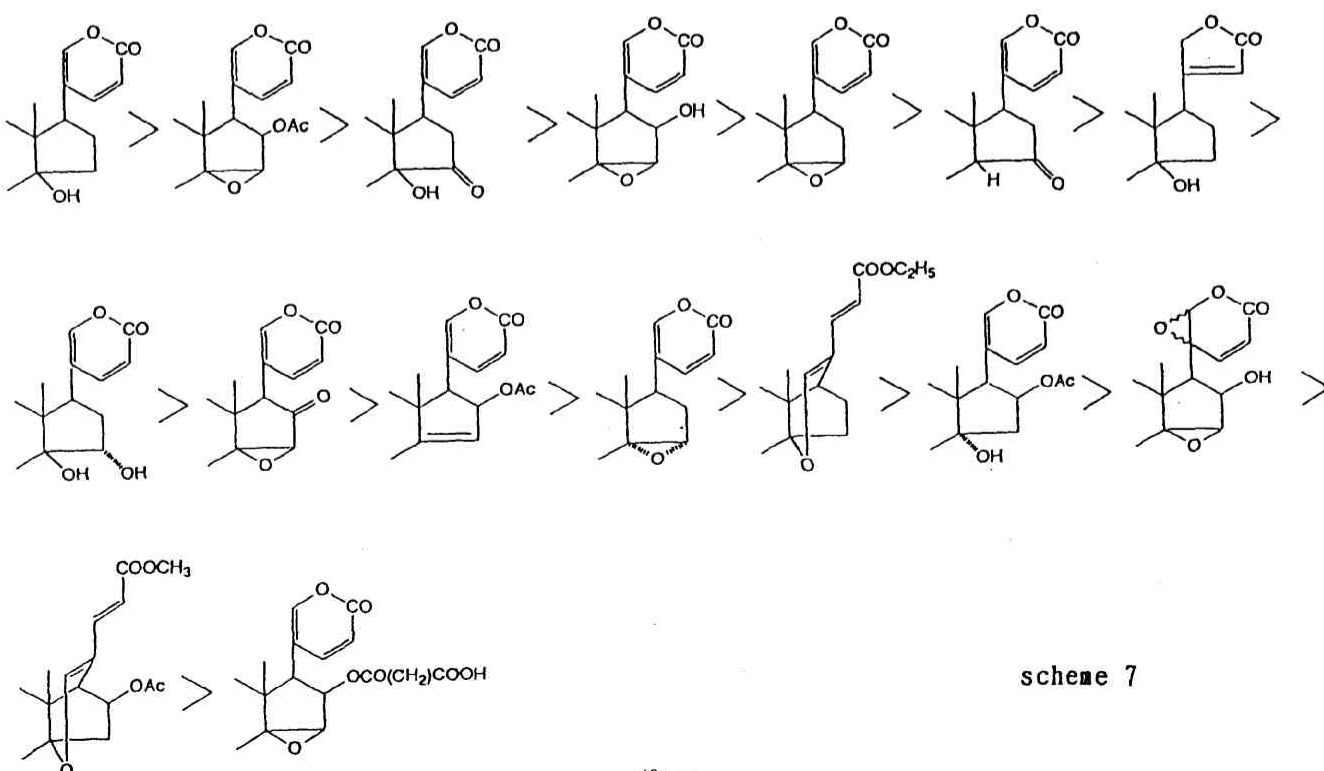
以上の各Groupを総合的に検討すると、 $\alpha$ -pyrone環が存在するD環構造が大きく活性に影響を与えていることが分かる。そこで、D環部分構造を $3\beta$ -OH体、 $3\beta$ -OAc体および3-Keto体のそれぞれについて活性の強い順位で示した。

[  $3\beta$ -OH体 ]



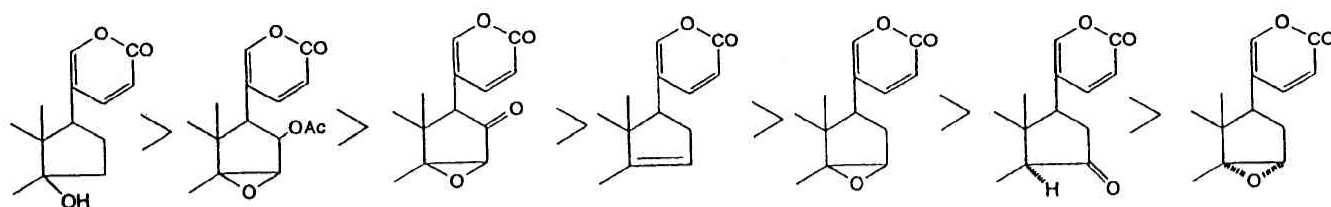
scheme 6

[  $3\beta$ -OAc体 ]



scheme 7





scheme 8

その結果、次のような知見が得られた。すなわち、(1)  $\alpha$ -pyrone環の系を変えると(例えば、epoxy化や開裂)著しく活性が減少する。(2) C/D cis 体は、C/D trans 体よりも、常に活性は高い(例えば、 $14\alpha$ -OH、 $14\alpha$ -Hおよび $14\alpha, 15\alpha$ -epoxyなど)。(3) 14位に酸素が結合していなくても(例えば、 $14\alpha/14\beta$ -artebugeninおよび $\Delta 14$ 体)活性が保持される。特に(4)  $14\beta$ -OH基が $14\beta$ -Cl基になった化合物( $14\beta$ -Cl、 $15\alpha$ -OH体)は活性が高い。(5)  $15\alpha$ -OH基の導入は、活性を著しく減少させ、ケトンにすると活性は上昇する。(6) 1例であるが、 $16\beta$ -OHを大きなエステル(succinate)にすると活性は著しく減少する、などのことが分かった。

### (3) 3位置換基(A環)と活性相関:

各Groupにおける3位置換基が活性に与える影響を検討した。3位置換基が与える活性を、活性の強い順に並べると次のようになった。

C/D cis	$14\beta$ -OH体 : $3\beta$ -OAc > $3\beta$ -OH > 3-Keto > $3\alpha$ -OH
	$14\beta$ -H体 : $3\beta$ -OAc > $3\beta$ -OH
	$14\beta, 15\beta$ -epoxy体 : $3\beta$ -OH > $3\beta$ -OAc > 3-Keto > $3\alpha$ -OH
C/D trans	$14\alpha$ -H体 : 3-Keto > $3\beta$ -OH
	$14\alpha, 15\alpha$ -epoxy体 : $3\alpha$ -OH > $3\beta$ -OAc > 3-Keto > $3\beta$ -OH

すなわち、①C/D cisの場合、 $3\beta$ -OHは $3\alpha$ -OHよりもはるかに活性が強く、C/D transの場合、 $3\alpha$ -OHが $3\beta$ -OHよりも活性が強く、互いに逆になっている。② $14$ -OH体と $14$ -H体の場合、常に $3\beta$ -OAcの方が $3\beta$ -OHよりも活性が強く、 $14, 15$ -epoxy体の場合、epoxy  $\alpha/\beta$ により $3$ -OHと $3$ -OAc導入による活性が変動するという興味ある知見が得られた。

3位エステルについては、bufalinのエステルについて既に前述した。その順位を他のGroupのそれと比較し、次のような知見が得られた。

$14\beta$ -OH体 (bufalin)	$3$ -OAc > $3$ -succinate-tert-butylcarbazate > $3$ -suberate > $3$ -suberate-methylester > $3$ -succinate
$14\beta, 15\beta$ -epoxy体 (cinobufagin)	$3$ -suberate > $3$ -OAc > $3, 5$ -dinitrobenzoate > $3$ -succinate > $3$ -cinnamate

C/D trans体のデータはないが、(1)  $14\beta$ -OH体の場合、 $3$ -OAcが $3$ -suberateよりも活性が強く、 $14\beta, 15\beta$ -epoxy体の場合、その逆の結果が得られ、一方(2)  $3$ -succinateは、いづれも活性は強いが、(3) その誘導体 $3$ -succinate-tert-butylcarbazateに強い活性があり有意な知見が得られた。

(4) 置換基効果：

構造-活性相関の一つとして、代表的な化合物を中心にその置換基相対効果を検討した。その結果をTable 9 (bufalinを基本中心) とTable 10 (resibufogeninを基本中心) に示す。

すなわち、bufalinへの5 $\beta$ -OH/19-CHO (hellebrigenin) の導入、11 $\alpha$ -OH (gamabufotalin) の導入、3位水酸基のacetyl化は活性を増強させ、それ以外はすべて活性を減少させ、特に15 $\alpha$ -OHの導入は活性が激減した。また、resibufogeninの場合同様に、19-CHOの導入は活性を上昇、特に16 $\beta$ -OAc (cinobufagin) と5 $\beta$ -OH/16 $\beta$ -OAcの導入は強い活性の上昇が見られた。3-suberate/16 $\beta$ -OAc活性も強い。さらに、3 $\beta$ -OAc体、3 $\alpha$ -OH体、5 $\beta$ -OH体、16 $\beta$ -OAc体、16 $\beta$ -OH体、3-keto体およびcardenolide体について相対的に議論した。cardenolideは、相当するbufadienolideより活性が低いことも明らかとなった。

Table 9 Relationship between Structures of 14 $\beta$ -Hydroxy Bufadienolides and PLC Activity.

substitution		relative activity		
Bufalin		1.0		
	5 $\beta$ -OH, 19-CHO	1.8		2.3
	3 $\beta$ -OAc	1.4	1.0	
	11 $\alpha$ -OH	1.2		
	$\Delta$ 4	$9.0 \times 10^{-1}$		
	16 $\beta$ -OAc	$8.2 \times 10^{-1}$		1.0
	5 $\beta$ -OH	$8.0 \times 10^{-1}$		1.0
	3-succinate-tert-butylcarbazate	$4.5 \times 10^{-1}$		
	3-suberate	$3.8 \times 10^{-1}$		
	16 $\beta$ -OH	$3.6 \times 10^{-1}$		$4.3 \times 10^{-1}$
	$\Delta$ 2/ $\Delta$ 3	$3.5 \times 10^{-2}$		
	3-methylsuberate	$3.1 \times 10^{-2}$		
	3-keto	$3.0 \times 10^{-2}$		1.0
	OCOC(CH <sub>3</sub> )=CH <sub>2</sub> ester	$4.7 \times 10^{-3}$		
	3 $\beta$ -OAc, 11 $\alpha$ -OH	$4.7 \times 10^{-3}$	$3.4 \times 10^{-3}$	
	3-succinate	$4.2 \times 10^{-3}$		
	14 $\alpha$ -OH, 15 $\beta$ -Cl	$3.9 \times 10^{-3}$		
	3 $\alpha$ -OH	$3.7 \times 10^{-3}$		
	3 $\beta$ -OAc, 15-ketone	$3.7 \times 10^{-3}$	$2.6 \times 10^{-3}$	
	$\Delta$ 4, 3-keto	$1.5 \times 10^{-3}$		$5.0 \times 10^{-2}$
	3 $\beta$ -OAc, 14 $\beta$ -H, 15-ketone	$5.1 \times 10^{-4}$	$3.6 \times 10^{-4}$	
	3 $\beta$ -OAc, 15 $\alpha$ -OH	$3.9 \times 10^{-4}$	$2.8 \times 10^{-4}$	
	3-keto, 11 $\alpha$ -OAc	$3.5 \times 10^{-4}$		$1.2 \times 10^{-2}$
	3 $\beta$ -OAc, 11 $\alpha$ -OH, 12-keto	$3.2 \times 10^{-4}$	$2.3 \times 10^{-4}$	
	$\Delta$ 14	$5.7 \times 10^{-5}$		
	3-ketone, $\Delta$ 14	$5.7 \times 10^{-5}$		$1.9 \times 10^{-3}$
	3 $\beta$ -OAc, 16 $\beta$ -OAc, $\Delta$ 14	$5.7 \times 10^{-5}$	$4.1 \times 10^{-5}$	$7.0 \times 10^{-5}$
	14 $\beta$ -H, 15-ketone	$5.7 \times 10^{-5}$		
	3-ketone, 14 $\alpha$ -H, 15-ketone	$4.0 \times 10^{-5}$		$1.3 \times 10^{-3}$
	14 $\alpha$ -OH, 3 $\beta$ , 16 $\beta$ -OAc	$3.7 \times 10^{-5}$	$2.5 \times 10^{-5}$	$4.5 \times 10^{-5}$
	14 $\alpha$ -H, 15-ketone	$3.4 \times 10^{-5}$		
	15 $\alpha$ -OH	$8.0 \times 10^{-6}$		
cardenolide		$1.0 \times 10^{-2}$	1.0	
	5 $\beta$ -OH	$4.6 \times 10^{-3}$	$1.4 \times 10^{-2}$	$5.8 \times 10^{-3}$
	$\Delta$ 14	$7.8 \times 10^{-4}$	$2.4 \times 10^{-3}$	
	3-methylsuberate	$5.3 \times 10^{-4}$	$1.6 \times 10^{-3}$	
	3 $\beta$ -OAc	$5.3 \times 10^{-4}$	$1.6 \times 10^{-3}$	$3.8 \times 10^{-4}$
	3-suberate	$5.4 \times 10^{-5}$	$1.7 \times 10^{-4}$	

Table 10 Relationship between Structures of 14,15-Epoxy  
Bufadienolides and PLC Activity.

substitution		relative activity			
resibufofenin		1.0			
	19-CHO	8.3			
	3 $\beta$ -OAc	$2.3 \times 10^{-1}$	1.0		
	3-formate	$2.2 \times 10^{-1}$			
	5 $\beta$ -OH	$1.4 \times 10^{-1}$		1.0	
	19-CH <sub>2</sub> OH	$1.3 \times 10^{-1}$			
	$\Delta$ 1,3-keto	$2.8 \times 10^{-2}$			
	3 $\alpha$ -OH, 14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxy	$1.6 \times 10^{-2}$		1.7	4.2
	3 $\alpha$ -OAc, 14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxy	$1.6 \times 10^{-2}$		1.7	4.2
	3-ketone	$1.3 \times 10^{-2}$			
	3 $\beta$ -OAc, 14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxy	$1.3 \times 10^{-2}$	$5.7 \times 10^{-2}$		3.2
	3 $\beta$ -OAc, 16 $\alpha$ -OH	$1.1 \times 10^{-2}$	$4.8 \times 10^{-2}$		
	3 $\alpha$ -OH	$9.2 \times 10^{-3}$		1.0	
	3-ketone, 14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxy	$8.3 \times 10^{-3}$			2.2
	14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxy	$3.8 \times 10^{-3}$			1.0
cinobufagin	16 $\beta$ -OAc	23	1.0		
	5 $\beta$ -OH, 16 $\beta$ -OAc	12	$7.4 \times 10^{-1}$		86
	3-succinate, 16 $\beta$ -OAc	1.2	$7.4 \times 10^{-2}$		
	3 $\beta$ -OAc, 16 $\beta$ -OAc	$3.1 \times 10^{-1}$	$1.9 \times 10^{-2}$	1.3	
	3-ketone, 16 $\beta$ -OAc	$2.1 \times 10^{-1}$	$1.3 \times 10^{-2}$		
	3 $\alpha$ -OH, 16 $\beta$ -OAc	$1.2 \times 10^{-1}$	$7.6 \times 10^{-3}$		13
	3 $\beta$ -OAc, 16 $\beta$ -OH	$1.2 \times 10^{-1}$	$7.6 \times 10^{-3}$	$5.2 \times 10^{-1}$	5.5
	16 $\beta$ -OH	$2.2 \times 10^{-2}$	$1.4 \times 10^{-3}$		1.0
	5 $\beta$ -OH, 16 $\beta$ -OH	$1.7 \times 10^{-2}$	$1.1 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-1}$	$1.2 \times 10^{-1}$
	3-succinate	$1.3 \times 10^{-2}$	$8.7 \times 10^{-4}$		$7.7 \times 10^{-1}$
	3,16-diketone	$1.3 \times 10^{-2}$	$8.7 \times 10^{-4}$		
	3 $\beta$ -OAc, 16 $\beta$ -OH	$1.2 \times 10^{-2}$	$8.4 \times 10^{-4}$	$5.2 \times 10^{-2}$	3.2
	14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxy				$5.5 \times 10^{-1}$
	3 $\beta$ -OAc, 16-ketone	$4.4 \times 10^{-3}$	$3.1 \times 10^{-4}$	$1.9 \times 10^{-2}$	
	3-cinnamate	$1.7 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-4}$		
	3 $\beta$ -OAc, 16-O-succinate	$1.0 \times 10^{-4}$	$1.4 \times 10^{-5}$	$4.3 \times 10^{-4}$	

#### IV. bufadienolideの抗腫瘍性

bufadienolideのPLC活性を、他の抗腫瘍活性と比較した。ガマ毒bufadienolideに対して今まで報告されているのは、ヒト上皮KB細胞、HeLa細胞および白血病細胞のP388とL1210についてである。P388とL1210については、共同研究として釜野がthe US National Cancer Institute( NIH )で行った値である。しかし、白血病細胞に対する活性は弱い。一方、KB細胞とHeLa-S3細胞の活性は、概してPLC活性と類似している。KB細胞に対して強い活性を示した( $10^{-3}$ のオーダー)のは、hellebrigenin、scillaeninであり、HeLa-S3に対して強い活性( $10^{-4}$ オーダー)を示したのはbufalinであった。これらの化合物はいずれもPLC活性が強い( $10^{-4}$ オーダー)。一方、P388に対しては、resibufofeninと $\Delta$ 14-bufalinが一番強い活性を示した点興味深い知見である。以上の考察から、PLC活性は一般の抗腫瘍活性の指針として使用できる。

Table 11 IC<sub>50</sub> values of Bufadienolide and on PLC/PRF/5, KB, Hela-S3, P388 and L1210 cell

compound	IC <sub>50</sub> (μg/ml)				
	PLC/PRF/5	KB cell <sup>1), 2)</sup>	Hela-S3 <sup>3)</sup>	P388 <sup>1)</sup>	L1210 <sup>1)</sup>
Hellebrigenin	1.6×10 <sup>-4</sup>	1.0×10 <sup>-3</sup>	1.4×10 <sup>-2</sup>		
Bufalin-acetate	2.0×10 <sup>-4</sup>	2.0×10 <sup>-2</sup>		38	
Gamabufotalin	2.3×10 <sup>-4</sup>	2.2×10 <sup>-2</sup> ~6.3×10 <sup>-1</sup>	1.4×10 <sup>-2</sup>	41	
Bufalin	2.8×10 <sup>-4</sup>	1.0×10 <sup>-2</sup> ~1.0×10 <sup>-1</sup>	6.2×10 <sup>-4</sup>	20	42
Scillarenin	3.1×10 <sup>-4</sup>	1.0×10 <sup>-3</sup>			
Bufotalin	3.4×10 <sup>-4</sup>	2.6×10 <sup>-2</sup>	2.0×10 <sup>-2</sup>		
Telocinobufagin	3.5×10 <sup>-4</sup>	3.0×10 <sup>-2</sup>	3.7×10 <sup>-2</sup>		
Cinobufagin	7.4×10 <sup>-4</sup>	1.0×10 <sup>-2</sup>	2.1×10 <sup>-2</sup>		
Cinobufotalin	1.0×10 <sup>-3</sup>	2.4×10 <sup>-1</sup>	1.1×10 <sup>-1</sup>		
Resibufagin	8.9×10 <sup>-3</sup>	6.3×10 <sup>-1</sup>	5.5×10 <sup>-1</sup>		
3-Keto-bufalin	9.3×10 <sup>-3</sup>	1.9			
α-Hydroxy-bufalin	7.6×10 <sup>-2</sup>	2.4			
15-Oxo-bufalin-3-acetate	7.7×10 <sup>-2</sup>	33		100>	
Resibufogenin	7.7×10 <sup>-2</sup>	3.4×10 <sup>-1</sup>		15	38
Marinobufagin	5.2×10 <sup>-1</sup>	8.6×10 <sup>-2</sup> ~2.5		29	43
Desacetyl-cinobufagin	5.2×10 <sup>-1</sup>	1.0×10 <sup>-1</sup>	2.5×10 <sup>-2</sup>	22	24
14β-artebufogenin-3-acetate	5.5×10 <sup>-1</sup>	4.5			
Δ14-Bufalin	8.3×10 <sup>-1</sup>	28		16	

1)The data of Cancer Research Institute, Arizona State University(USA), which evaluated by the US National Cancer Institute.

2)Toshiro Suga, "An extra edition of Taisha(metabolic)" March, p.100(1973).

3)Chem. Pharm. Bull. 39(8)2135-2137(1991).

## 総括

漢薬センソCh'an Suのヘキサンを除く、エーテル、塩化メチレン、酢酸エチル、メタノールなどの抽出物に、ヒト肝癌由来細胞PLC/PRF/5に強い活性を認め、その本体がガマ毒bufadienolideであることを知った。薬物の開発と生理活性の解明の一環として、bufadienolide構造とPLC活性の相関を試み、以下各項目に見られるような結果を得た。

1. テストを行ったのは87種であり、このうち5種の cardenolideと13種の α-pyrone環開裂体が含まれている。化合物のうち、12種が10<sup>-4</sup> μg/mlオーダー、5種が10<sup>-3</sup> μg/mlオーダー、13種が 10<sup>-2</sup> μg/mlオーダーの強い活性を示した。最も強い化合物はhellebrigenin 1.6×10<sup>-4</sup> μg/mlであり、次いでbufalin-3-acetate 2.0×10<sup>-4</sup>、gamabufotalin 2.3×10<sup>-4</sup>、bufalin 2.8×10<sup>-4</sup>であった。他の化合物は、Table 2に記載した。また、同時にコルヒチン耐性細胞についても検討し、いずれも多少活性を弱めるが有意な活性を示した。

2. 全体として、bufadienolide、cardenolide、α-pyrone環開裂体の順序で活性の減少が見られた。α-pyrone環開裂体も、弱いながらも活性を有していることからα-pyrone環の存在が活性発現上の必須条件ではないことが分かった。比較的、天然型 bufadienolideは、その誘導体より活性が強い。

3. 総体的に $14\beta$ -OH体は活性が強く、 $14\beta, 15\beta$ -epoxy体、cardenolide、14位に酸素を結合していない $14\beta$ -arte体、 $14\alpha, 15\alpha$ -epoxy体、 $14\alpha$ -arte体、 $\alpha$ -pyrone環開裂体の順で活性が低下する傾向にあった。この結果は、表面麻酔作用<sup>3)</sup>および抗ウイルス作用<sup>4)</sup>の結果と類似している。

4. PLC活性の濃度依存性を検討した。 $14\beta$ -OH体と $14\beta, 15\beta$ -epoxy体では弱冠の違いが見られ、 $14\beta, 15\beta$ -epoxy体は濃度による活性変化が比較的急激であり、活性に対する感受性が強いと思われる。一方、 $14\beta$ -OH体は、高濃度になるにつれ、活性変化がゆるやかとなる傾向が認められた。特に、bufalin-3-acetateは、この傾向が著しく、興味ある結果である。(Fig. 1(a), (b))

5. 化合物の種類による活性発現の違いを検討した。 $14\beta$ -OHを有するbufalin、bufotalinとその誘導体の $IC_{50}$ 値は $10^{-4} \mu\text{g/ml}$ の比較的低濃度に集中している一方、 $\alpha$ -pyrone環開裂体は $10^0 \sim 10^2 \mu\text{g/ml}$ の高濃度に集中していた。cinobufaginおよびその誘導体の $IC_{50}$ 値は広範囲濃度を示し、化学修飾による効果が広い範囲で期待できることが分かった (Fig. 2)。

6. 「構造-活性相関」の一つとして、化合物をGroupごとに分け、活性に与える規則性を検討した。各groupの強い化合物の活性を1として、他の化合物の相対活性を各Tableに併記した。

[ Group A ]:  $14\beta$ -OH基を有する化合物、異性体、誘導体 (Table 3)

①19-CHO、 $11\alpha$ -OH、3-OAcの導入は活性を低下させた。② $16\beta$ -OAc、 $16\beta$ -OH、 $15\alpha$ -OH、 $14\alpha$ -OHの導入は活性を低下させた。③ $\Delta 2/\Delta 3$ の導入は、 $\Delta 4$ の導入よりも活性を低下させた。さらに、3位へのketone体、ester体は活性を減少させ、特に3-succinate-tert-butylcarbazate>3-suberate>3-suberate methylester>3-succinateの順に活性は低くなった。

[ Group B ]:  $14\beta, 15\beta$ -epoxy基、 $14\alpha, 15\alpha$ -epoxy基を有する化合物、異性体、誘導体 (Table 4, 5)

①19-CHO>19-CH<sub>3</sub>>19-CH=N-OH>19-CH<sub>2</sub>OHの順に活性は低下した。②3-OH体では、 $16\beta$ -OAcの導入で活性は増加したが、 $16\alpha$ -OH、 $16\beta$ -OH、16-esterの導入で活性は低下した。 $14\alpha, 15\alpha$ -epoxy体は $\beta$ 体よりもはるかに低い活性を示した。3-OAc体では、逆に $16$ -OHの導入により活性は増加した。 $3\alpha$ -OH体では、 $14\alpha, 15\alpha$ -epoxy体の方が $14\beta, 15\beta$ -epoxy体よりも強い活性を示した。このように、3位および16位置換による活性との相互関係が存在することが明らかとなった。③ $5\beta$ -OHの導入は活性を減少させた。④A環への2重結合 ( $\Delta 1, \Delta 4$ ) は活性を減少させ、さらに3位へのketone、ester化の導入も活性を低下させた。3-suberate>3-acetate, 3-formate>3-(3, 5-dinitro)-benzoate>3-succinate>3-cinnamateの順に活性の低下が見られた。

[ Group C ]: cardenolideとその誘導体 (Table 6)

① $5\beta$ -OHの導入は、bufadienolideと同様に活性を低下させた。②3位のester化は活性を減少させ、suberateはmethylsuberateよりも活性が低い。



[ Group D ]: 14位に酸素が結合していないbufadienolideとcardenolide (Table 7)

14 $\beta$ -Clを有する $\beta$ -chlorohydrinは、比較的強い活性を示したことから、C/D cis体が、C/D trans体よりもはるかに強い活性を示すことが分かった。

[ Group E ]:  $\alpha$ -pyrone環開裂体 (Table 8)

$\alpha$ -pyrone環が開裂した異なる共役系を有するものも弱いながら活性を示した。

7. 「構造－活性相関」の一つとして、D環および3位置換基構造が活性に与える影響を検討した。その結果をscheme 6、7、8に示した。3位置換では、C/D cisの場合、3 $\beta$ -OHは3 $\alpha$ -OHよりも活性が強く、C/D transの場合、3 $\alpha$ -OHが3 $\beta$ -OHよりも活性が強かった。

8. 「構造－活性相関」の一つとして、化合物ごとの置換基効果を検討した (Table 9, 10)。14 $\beta$ -OH体の bufalinと14 $\beta$ , 15 $\beta$ -epoxy体のresibufogeninを基本として、相対活性 (効果) を求めた。さらに、3 $\beta$ -OAc体、5 $\beta$ -OH体、16 $\beta$ -OH体、16 $\beta$ -OAc体、3-keto体、3 $\alpha$ -OH体、14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -epoxy体およびcardenolideを基準にした相対活性も同時に求め、上で議論した結果を数値で示し実証した。

## 文 献

1). 釜野徳明、小竹文乃、張 恵平、吉田基幸、瀬川俊章、幸田綾子

「ガマ毒bufadienolideの構造とヒト肝癌由来細胞PLC/PRF/5に対する殺細胞活性」

日本化学会第65春季年会、講演予稿集Ⅱ、p.504, No. 2 H1 12(1993).

2). 釜野徳明、小竹文乃、張 恵平、瀬川俊章、幸田綾子

「ガマ毒bufadienolideの構造とヒト肝癌由来細胞PLC/PRF/5に対する殺細胞活性 (2)」

日本化学会第67春季年会、講演予稿集Ⅱ、p.848, No. 2 E1 16(1994).

3). Siichiro Yoshida, Yoshiaki Kamano and Takeshi Sakai, Chem. Pharm. Bull., 24(8) 1714-1717(1976).

4). Yoshiaki Kamano, Norio Satoh, Hiroshi Nakayoshi, George R. Pettit and Cecil R. Smith, Chem. Pharm. Bull., 36(1)326-332(1988).

5). 篠木正明、沼澤 聡、吉田武美、黒岩幸夫、第36回日本薬学会関東支部大会講演要旨集、P.79、1993.