

ニトロ放射線増感剤の作用機構

Action Mechanism of Nitro-Radiosensitizers

和田 武

序 論

1970年の国際放射線学会において、Adams らは p-nitroacetophenone が放射線増感剤として有効であることを発表⁽¹⁾した。この物質は低酸素条件下でのバクテリアや哺乳動物の細胞に対しても放射線増感能を示したが、難水溶性であり薬学的に問題があったために、in vivo での研究は進展しなかった。しかし、この研究はニトロ化合物の放射線増感能を初めて明らかにし、その後の放射線増感剤の開発研究においてニトロ化合物が主役を演じる契機を与えたという点で極めて重要な意味をもっている。

その後、数多くのニトロ芳香族化合物やニトロ複素環状化合物の低酸素性細胞に対する放射線増感作用が発見され、癌の放射線治療用薬剤として注目を浴びてきた⁽²⁾。これらの化合物は低酸素性あるいは無酸素性細胞のみの放射線感受性を選択的に高め、酸素性細胞には影響を及ぼさないので、正常な酸素性細胞よりも放射線抵抗性が高い低(あるいは無)酸素性細胞を多く含む癌組織を放射線で効率よく致死させるのに有効に作用する。

これらの増感剤の作用機構を解明すべく生体関連物質とニトロ化合物に関する放射線化学的研究がなされてきたが、今日までに分子論的作用機構の定説は確立されるに至っていない。この機構解明がなされるならば、より有効な新規増感剤開発の指針を与える上で重要な意味がある。著者らは、最近、水溶液中での DNA 関連化合物とニトロ放射線増感剤の放射線化学⁽³⁾研究を通じて、増感作用機構に関して興味あるいくつかの知見を得た。本稿では著者らの研究結果を中心にニトロ化合物の放射線増感作用の分子論的機構について論じる。

第1章では、無酸素水溶液と酸素含有水溶液の放射線化学反応の基本的な相違についてまず明らかにする。これは無酸素性細胞と酸素性細胞が放射線照射

された場合の増感剤の作用の相違をどのような観点で把握、どのような研究を行なえばよいかの指針を与える。第2章では、DNA 関連物質の放射線分解率がニトロ化合物によって増大するのか、あるいは減少するのかを実験的に検討した結果について述べる。第3章から第5章にかけて、ニトロ化合物の放射線増感作用機構と関連した反応論的考察を行なう。これらの章の検討内容は、第1章で明らかにした無酸素水溶液と酸素含有水溶液の基本的な相違点が、ニトロ化合物と DNA 関連物質や生体分子の放射線化学反応に対してどのように特徴的にあらわれるかが明らかにされる。第6章では第1～5章のまとめとしてニトロ化合物の放射線増感作用機構を包括的に論じる。

1. 酸素の有無と水溶液の放射線化学

作用機構を論じるに当たって、水溶液系の放射線化学に対する酸素の影響について触れておく必要がある。なぜなら、ニトロ化合物の放射線増感作用は低(無)酸素性細胞に対して選択的に起こる現象であり、酸素性細胞に対しては起こらないからである。すなわち、反応論的に述べれば、酸素が存在しない条件下で選択的に起こる放射線化学反応が放射線増感において重要な役割を演じていると考えられるからである。

通常の細胞の含水率は高い(75~90%)ので、生体系に放射線を照射した場合、その初期反応として主に次のような水分子の分解が起こる。



上記の初期反応によって生成する三種の水ラジカル、すなわち、ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$)、水素原子 ($\cdot\text{H}$) および水和電子 (e^-_{aq}) は活性種として生体分子と反応し、その分子に損傷を与え、結果として細胞に異常をもたらす可能性をもっている。なお、これらの活性種の生成のG値は、 $\cdot\text{OH}$ が 2.7, e^-_{aq} が 2.7, $\cdot\text{H}$ が 0.55 である。

水溶液中に酸素が含まれている場合、 $\cdot\text{H}$ と e^-_{aq} は容易に酸素と反応し、ハ

イドロパーオキシラジカル ($\cdot\text{OOH}$) またはスーパーオキサイドアニオンラジカル (O_2^-) となる。これらそのものは生体分子には損傷を起こさない。



したがって、酸素存在下では水ラジカルのうち $\cdot\text{OH}$ のみが活性種として生体分子と反応しうる。すなわち、酸素の有無による反応系の相違として、酸素のない系では、酸素のある系で起こらない e^-_{aq} や $\cdot\text{H}$ による反応が起こることがまず挙げられる。このことは、酸素のない系では生体分子の還元反応が選択的に起こることを示している。

$\cdot\text{OH}$ による反応は酸素の有無にかかわらず起こるけれども、その反応の内容は酸素の有無によって違ってくる。 $\cdot\text{OH}$ は生体分子に付加したり、水素引き抜きによって中性ラジカルを生じさせるが、こうして生成した中性ラジカルの後続反応は、酸素がない場合は中性ラジカル同士の反応 (8) や (9) によって生成物となるのに対し、酸素がある場合には、中性ラジカルに酸素が付加反応 (10) を起こしてパーオキシラジカルが生成したのち後続反応によって生成物となる。



したがって、 $\cdot\text{OH}$ との反応においても酸素のない系でのみ起こる反応が増感作用に一定の役割を演じる可能性がある。以下に、DNA 関連物質と増感剤の放射線化学研究結果に基づいて、増感作用機構について考察する。

2. 脱気水溶液中での DNA 関連物質の放射線分解収率に対するニトロ化合物の影響

ニトロ化合物が細胞の放射線感受性を高める分子機構として、生体物質、とりわけ放射線作用の標的物質と考えられる DNA の放射線分解反応に関与して、その分解収率を高めるのではないかとすることがまず考えられる。Greenstock⁽⁴⁾ はこのような考えに基づいて、脱気水溶液中での thymine の放射線分解収

率や deoxyuridine-5'-monophosphate の放射線分解に伴って起こるリン酸脱離取率に対してニトロフラン誘導体が及ぼす影響について検討し、これらの分解取率がニトロフラン誘導体の添加によって増大することが見出された。

これらの反応結果は、Adams らが N-ethylmaleimide の放射線増感作用に対して最初に提案した機構に代わるものとして示した直接作用機構⁽⁶⁾や、Greenstock と Dunlop がパルスラジオリンス 研究に基づいて提案した間接作用機構⁽⁷⁾によって説明された。これらの機構は放射線の直接作用や間接作用により生体分子中に生成したラジカルから親電子性のニトロ化合物に電子移動反応が起こり、それによって生体分子の損傷が固定化されるというものである。

その後、Raleigh⁽⁸⁾ らは種々のスクレオチドの放射線分解についてニトロ化合物系放射線増感剤の影響について研究した。その結果は Greenstock⁽⁴⁾ らの場合のように単純ではなく、放射線増感剤の添加によって分解取率が増加するものとしなないものがあることが明らかにされた。この事実は、ニトロ化合物が単に DNA の放射線分解を促進することによって増感を起こしているという仮説と矛盾している。

われわれも、種々の DNA 関連物質の脱気水溶液中での放射線分解に対する Misonidazole の添加の影響について検討した。これらの水溶液は真空ラインを使用して完全に酸素除去がなされ、pH はリン酸塩により 7.0 に保持され、反応条件が厳密に一定になるように設定された。反応結果に基づいて得られた DNA 関連物質の放射線分解の G 値に対する Misonidazole 添加の影響を調べた。その結果を Table 1 に示す。DNA 塩基、スクレオンド、スクレオチドのいずれについても、Misonidazole の添加によって放射線分解の G 値の増大は認められなかった。むしろ、G 値は Misonidazole 添加によって低下することがわかった。

Table 1 に見られる結果は、Misonidazole による放射線増感が単なる DNA 分子の分解率の増大によるものではないことを示している。また、DNA 分子中の塩基部分の分解も、DNA 鎖切断に相当するスクレオチド等からのリン酸脱離反応も、Misonidazole の添加によってむしろ抑制されることがわかる。これらの事実と今日までに報告されてきた研究結果を総合的に判断すれば、

Table 1. Effects of Misonidazole on the radiolysis yields of DNA related compounds in the deaerated aqueous solutions. Radiolysis conditions: [DRC] *¹=1mM, [Mis]=0 or 1mM. γ -Irradiation; dose rate 38 krad/hr, time 0.5-5 hrs.

DNA related compds.	G(-DRC) ⁰ * ²	G(-DRC) ^{Mis} * ³
Thymine	1.3	1.1
Cytosine	1.1	1.0
Adenine	0.4	0.3
Thymidine	3.9	1.6
5'-Thymidilic acid	4.7	1.5
5'-Thymidilic acid	(0.15) * ⁴	(0.13) * ⁴

*1 Concentration of DNA related compounds.

*2 G-Value for the degradation of DNA related compounds in the absence of Misonidazole.

*3 G-Value for the degradation of DNA related compounds in the presence of Misonidazole.

*4 G-Value for i-PO₄ release from 5'-thymidilic acid.

Misonidazole などのニトロ放射線増感剤の増感作用が単なる DNA 分子の分解率の増大によるものではないことを示している。

第1章で述べたように、無酸素水溶液中では $\cdot\text{OH}$, e^-_{aq} および $\cdot\text{H}$ の三種の活性種が DNA の損傷反応に参与する。塩基成分の損傷に対しては三種の活性種すべてが参与し、鎖切断反応の原因となる糖部分の反応には $\cdot\text{OH}$ が参与する。ところが、後に述べるようにニトロ放射線増感剤はこれらの活性種のいずれとも容易に反応するので、放射線増感剤と DNA が共存する系では、活性種はこれら二物質と競争的に反応することになる。その結果 DNA 損傷の G 値は放射線増感剤を添加することによりむしろ低下するという結果を与えるのである。

したがって、ニトロ放射線増感剤の分子論的作用機構を明らかにするには、損傷の量的な問題としてでなく、損傷の質的な問題として把えてゆく必要がある。そのために、各活性種と DNA 関連物質あるいは放射線増感剤との反応によっていかなる生成物がいかなる比率で生成するかを明らかにすることが重要である。

3. ニトロ化合物による DNA 関連物質の放射線酸化分解の促進

酸素存在下の生体分子の損傷は、 $\cdot\text{OH}$ との反応によって惹起されることは第 2 章で述べた通りである。 $\cdot\text{OH}$ との反応で生成した生体分子ラジカルは、酸素が存在すると直ちに酸素と反応して生体分子の酸化的損傷をもたらす。

一方、無酸素下においては、生体分子と反応する活性種は三種の水ラジカルであり、したがって $\cdot\text{OH}$ との反応に基づく酸化的損傷と e^-_{aq} や $\cdot\text{H}$ による還元的損傷が生じる。DNA やその関連物質の放射線分解の G 値が、酸素存在下の方が無酸素下より必ずしも大きくないにもかかわらず、生体系の放射線感受性は確実に酸素存在下の方が大きいという事実は、酸化的損傷の方が還元的損傷よりも生体系に及ぼす影響が大きいことを示唆している。

ここで、無酸素下における DNA 関連物質の放射線分解によって生ずる酸化生成物と還元生成物の生成量に対してニトロ放射線増感剤がいかなる影響を与えるかを検討する必要が生じる。著者らは、チミン水溶液の放射線分解における生成物に対するニトロ化合物添加の影響について研究した。

無酸素水溶液として脱気水溶液と N_2O 飽和水溶液、酸素含有水溶液として空気飽和水溶液と $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$ (4/1 体積比) 飽和水溶液が用いられ、これらのチミン水溶液 ($[\text{Thymine}] = 1 \text{ mM}$) の γ 線による分解に対する Misonidazole 添加 ($[\text{Misonidazole}] = 0.1 \text{ mM}$) の影響が調べられた。すでに述べたように脱気水溶液中で生成する活性種は $\cdot\text{OH}$ ($G = 2.7$)、 e^-_{aq} (2.7)、 $\cdot\text{H}$ (0.55) であり、空気飽和水溶液では $\cdot\text{OH}$ (2.7) のみがチミンと反応する活性種である。 N_2O が存在すると、反応 (11) により e^-_{aq} から $\cdot\text{OH}$ が生成するので、活性種は $\cdot\text{OH}$ ($G =$



5.4) と $\cdot\text{H}$ (0.55) で、 $\cdot\text{OH}$ が $\cdot\text{H}$ の約 10 倍量生成するため、この系ではチミンは主として $\cdot\text{OH}$ との反応によって分解される。 $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$ 飽和溶液中では $\cdot\text{H}$ は不活性化されるので $\cdot\text{OH}$ (5.4) のみがチミンと反応する。

$\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$ 飽和水溶液と空気飽和水溶液中でのチミンの分解は、 $\cdot\text{OH}$ とチミンの反応とこれらの反応で生成した各種チミンラジカルに対する酸素の付加反応によって、チミンの酸化生成物である thymine glycol, 5-hydroxy-5-methyl

barbituric acid, N¹-formyl-N²-pyruvylurea などが主として生成する。これらの系に Misonidazole を加えるとチミンの放射線分解のG値はチミン単独の

Table 2. G-Values for the formation of major products, G(Pi), and for the degradation of thymine G(-Thy), and the ratio G(Pi)/G(-Thy) in the irradiation of thymine in oxygenated aqueous solutions in the absence and the presence of Misonidazole. Radiolysis conditions: Solutions; N₂O/O₂ (4/1 volume ratio)-saturated and aerated solutions of [Thy]=1.0 mM and [Mis]=0 or 0.1mM at pH 7.0. γ-Irradiation; dose rate 38krad/hr, time 2.0hrs.

Peak No.	Products	N ₂ O/O ₂ -saturated solution				Aerated solution			
		Thy.		Thy. + Mis.		Thy.		Thy. + Mis.	
		$\frac{G(Pi)}{G(-Thy)}$	$\frac{G(Pi)}{G(-Thy)}$	$\frac{G(Pi)}{G(-Thy)}$	$\frac{G(Pi)}{G(-Thy)}$	$\frac{G(Pi)}{G(-Thy)}$	$\frac{G(Pi)}{G(-Thy)}$	$\frac{G(Pi)}{G(-Thy)}$	$\frac{G(Pi)}{G(-Thy)}$
(1)	Thymine glycol	1.98	0.43	1.56	0.41	1.00	0.42	0.86	0.44
(2)	Barbituric acids*	0.42	0.09	0.31	0.08	0.26	0.11	0.19	0.10
(3)	5-Hydroxymethyluracil	0.05	0.01	0.05	0.01	0.03	0.01	0.03	0.02
(4)	6-Hydroxy-5,6-dihydrothymine	0.17	0.04	0.09	0.02	0.02	0.01	0.04	0.02
(5)	N ¹ -formyl-N ² -pyruvylurea	0.84	0.18	0.66	0.17	0.58	0.24	0.49	0.25
	Total compounds (1)-(5)	3.46	0.76	2.67	0.70	1.89	0.79	1.61	0.82
(9)	-Thymine	4.57		3.84		2.40		1.97	

*Mixture of 5-methyl barbituric acid and 5-hydroxy-5-methyl barbituric acid

場合の80%程度に低下し、分解生成物のG値も同様に低下した。この結果は酸素含有水溶液中では Misonidazole は $\cdot\text{OH}$ に対してチミンと競争的に反応す

Table 3. G-Values for the formation of major products, G(Pi), and for the degradation of thymine, G(-Thy), and the ratio G(Pi)/G(-Thy) in the irradiation of thymine in deoxygenated aqueous solutions in the absence and the presence of Misonidazole. Radiolysis conditions: Solutions: N₂O-saturated and deaerated solutions of [Thy]=1.0 mM and [Mis]=0 or 0.1 mM at pH 7.0. γ -Irradiation; dose rate 38 krad/hr, time 2.0hrs.

Peak No.	Products	N ₂ O-saturated solution				Deaerated solution			
		Thy.		Thy. + Mis.		Thy.		Thy. + Mis.	
		$\frac{\text{G(Pi)}}{\text{G(-Thy)}}$	$\frac{\text{G(Pi)}}{\text{G(-Thy)}}$	$\frac{\text{G(Pi)}}{\text{G(-Thy)}}$	$\frac{\text{G(Pi)}}{\text{G(-Thy)}}$	$\frac{\text{G(Pi)}}{\text{G(-Thy)}}$	$\frac{\text{G(Pi)}}{\text{G(-Thy)}}$	$\frac{\text{G(Pi)}}{\text{G(-Thy)}}$	$\frac{\text{G(Pi)}}{\text{G(-Thy)}}$
(1)	Thymine glycol	0.28	0.09	1.76	0.59	0.13	0.07	0.82	0.52
(2)	5-Methyl barbituric acid	0.08	0.03	0.08	0.03	0.09	0.05	0.10	0.06
(3)	5-Hydroxymethyluracil	0.49	0.15	0.17	0.06	0.14	0.08	0.08	0.05
(4)	6-Hydroxy-5, 6-dihydrothymine	0.12	0.04	0.07	0.02	0.08	0.04	0.04	0.03
(5)	N ¹ -formyl-N ² -pyruvylurea	0.08	0.03	0.16	0.05	0.11	0.06	0.14	0.09
(6)	5-Hydroxy-5, 6-dihydrothymine	0.18	0.06	0	0	0.07	0.04	0	0
(8)	5, 6-Dihydrothymine	0.07	0.02	0.05	0.02	0.28	0.15	0.13	0.08
	Total compounds (1)-(6) & (8)	1.30	0.41	2.29	0.77	0.83	0.44	1.31	0.82
(9)	-Thymine	3.17		2.97		1.81		1.59	

るだけの効果を有することを示している (Table 2)。

一方、酸素が存在しない水溶液中では、Misonidazole の添加によってチミンの分解生成物の相対収量が著しい変化を起こすことが明らかとなった。N₂O 飽和水溶液および脱気水溶液中でのチミンの放射線分解の G 値は、いずれも Misonidazole 添加により無添加の場合の約 90% に低下するが、分解生成物の収率は酸素存在下のように一様に低下しない。thymine glycol や N¹-formyl-N²-pyruvylurea のような酸化分解物の収率は、Misonidazole の添加によってむしろ増大し、酸素存在下には生成しない 5, 6-dihydrothymine のような還元分解生成物やその他の分解生成物の収率はいずれも低下した (Table 3)。この表からわかるように、Misonidazole の添加により特に thymine glycol の生成収率が著しく増大し、全分解生成物の 5 割以上を占める。

Misonidazole のこのような添加効果と同様な効果は、Fig. 1 に示すような他のニトロ芳香族やニトロイミダゾール誘導体、ニトロフラン誘導体の添加によっても観察された。しかも、これらニトロ化合物添加による thymine glycol の生成収率の増大は、ニトロ化合物の親電子性が高いものほど著しくなる傾

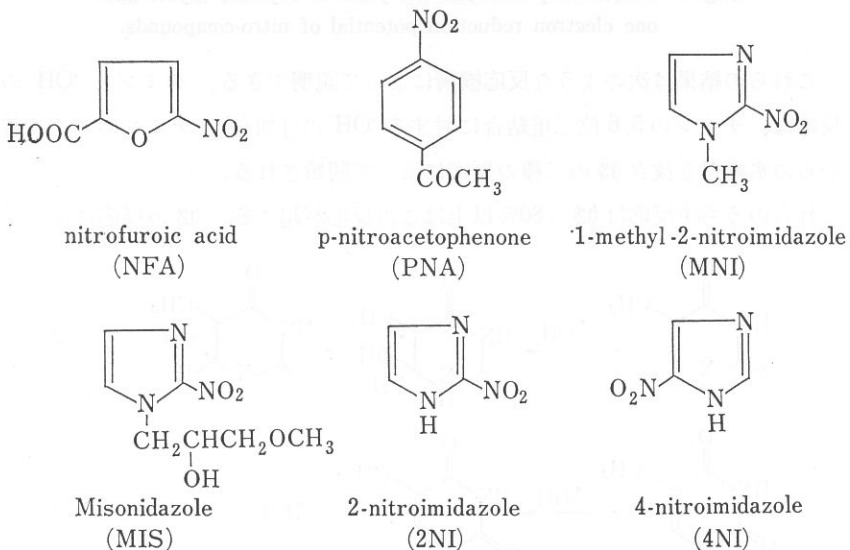


Fig. 1 Nitro-compounds used in the present work

向を示した (Fig. 2)。nitrofuroic acid や p-nitroacetophenone などの場合には、thymine glycol の生成収率は全分解生成物の約80%にも達した。

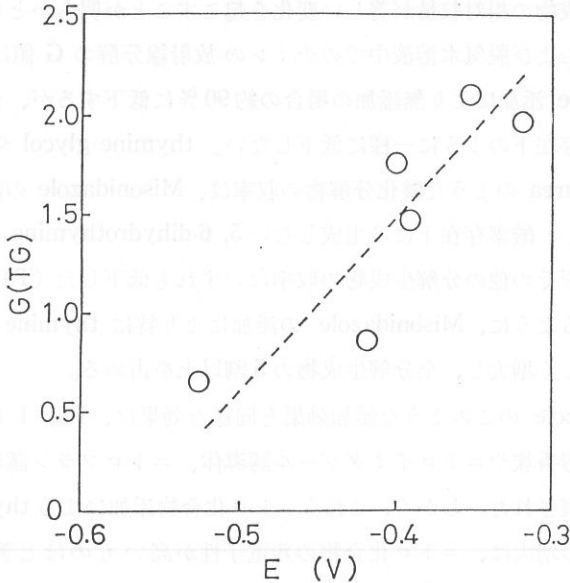
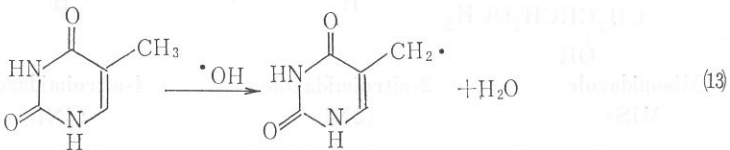
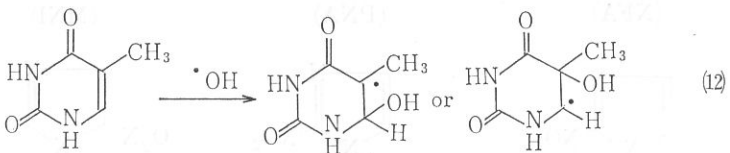


Fig. 2 Relationship between the yield of thymine glycol and one electron reduction potential of nitro-compounds.

これらの結果は次のような反応機構によって説明できる。チミンと $\cdot\text{OH}$ の反応は、チミンの5,6位二重結合に対する $\cdot\text{OH}$ の付加 (12) とチミンのメチル基からの水素引き抜き (13) の二種の反応によって開始される。

これらのうち主反応は (12) で80%以上はこの反応が起こる。(12) の反応によって



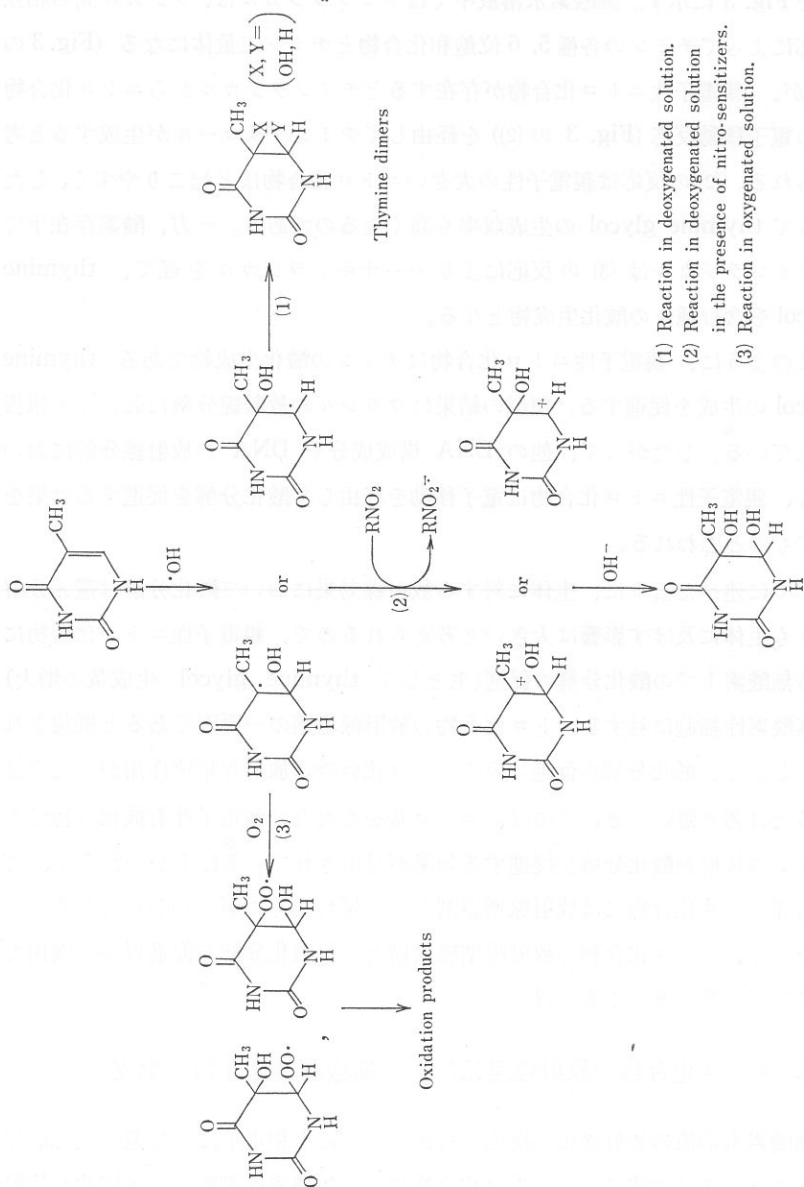
生成したチミンラジカルは後続反応によって分解生成物となるが、その反応機構を Fig. 3 に示す。無酸素水溶液中ではチミンラジカルは、ラジカル間の相互反応によってチミンの各種 5, 6 位飽和化合物とチミン二量体になる (Fig. 3 の (1)) が、親電子性ニトロ化合物が存在するとチミンラジカルからニトロ化合物への電子移動反応 (Fig. 3 の (2)) を經由してチミングリコールが生成すると考えられる。(2) の反応は親電子性の大きいニトロ化合物ほど起こりやすく、したがって thymine glycol の生成収率も高くなるのである。一方、酸素存在下ではチミンラジカルは (3) の反応によりパーオキシラジカルを経て、thymine glycol を含む種々の酸化生成物となる。

このように、親電子性ニトロ化合物はチミンの酸化生成物である thymine glycol の生成を促進する。類似の結果はウラシルの放射線分解においても報告されている。したがって、他の DNA 構成成分や DNA の放射線分解においても、親電子性ニトロ化合物は電子移動を經由して酸化分解を促進する効果を示すものと思われる。

すでに述べたように、生体に対する放射線効果において酸化分解は還元分解よりも生体に及ぼす影響は大きいと考えられるので、親電子性ニトロ化合物による無酸素下での酸化分解の促進(主として thymine glycol 生成量の増大)は無酸素性細胞に対するニトロ化合物の放射線増感の一要因であると推論される。しかし、酸化分解の促進のみでニトロ化合物の放射線増感作用がもたらされるとは考え難い。というのは、ニトロ基をもたない親電子性有機化合物でもチミンの放射線酸化分解を促進する効果が見出されているにもかかわらず、これら非ニトロ化合物には放射線増感剤として優れたものがないからである。したがって、ニトロ化合物の放射線増感機構として酸化分解の促進以外の機構も関与していると考えざるを得ない。

4. ニトロ化合物の放射線還元による細胞毒性化合物の生成

無酸素水溶液の放射線化学反応の特徴の一つに水和電子による還元反応が起こることはすでに述べた。ニトロ化合物による無酸素性細胞への選択的な放射線増感作用は、その放射線増感機構に還元反応が関与しているかも知れないと

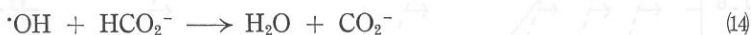


- (1) Reaction in deoxygenated solution.
- (2) Reaction in deoxygenated solution in the presence of nitro-sensitizers.
- (3) Reaction in oxygenated solution.

Fig. 3 Mechanism of reaction of thymine with ·OH.

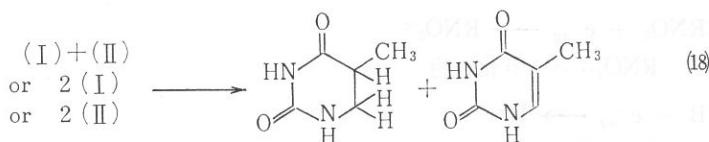
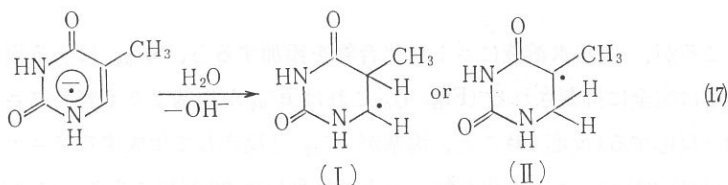
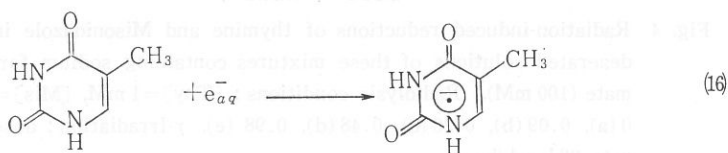
いう考えを呼び起こす。

著者らは、このような観点から、無酸素水溶液中で DNA 関連物質や放射線増感剤として有効なニトロ化合物が水和電子 (e^-_{aq}) によっていかなる反応を起すかを検討した。 e^-_{aq} による反応は脱気水溶液中でも起こるけれども、同時に $\cdot\text{OH}$ による反応も起こり複雑になるので、 $\cdot\text{OH}$ の反応を抑制し還元反応のみが起こる系として蟻酸ソーダを含有する水溶液中で DNA 関連物質とニトロ化合物の放射線化学反応を行なった。この水溶液中では、 $\cdot\text{OH}$ と $\cdot\text{H}$ は蟻酸ソーダと反応して水と CO_2^- を生成する。



CO_2^- は e^-_{aq} と同様に還元剤として作用するので、この反応系では還元反応のみが起こる。

DNA の主鎖を構成するリン酸基や糖部分は e^-_{aq} と反応しないが、塩基は水和電子により還元分解を受ける。例えば、チミンの場合、 e^-_{aq} との反応によって主生成物として dihydro-thymine が得られる。他の塩基の場合も、同様に還元分解が起こる。



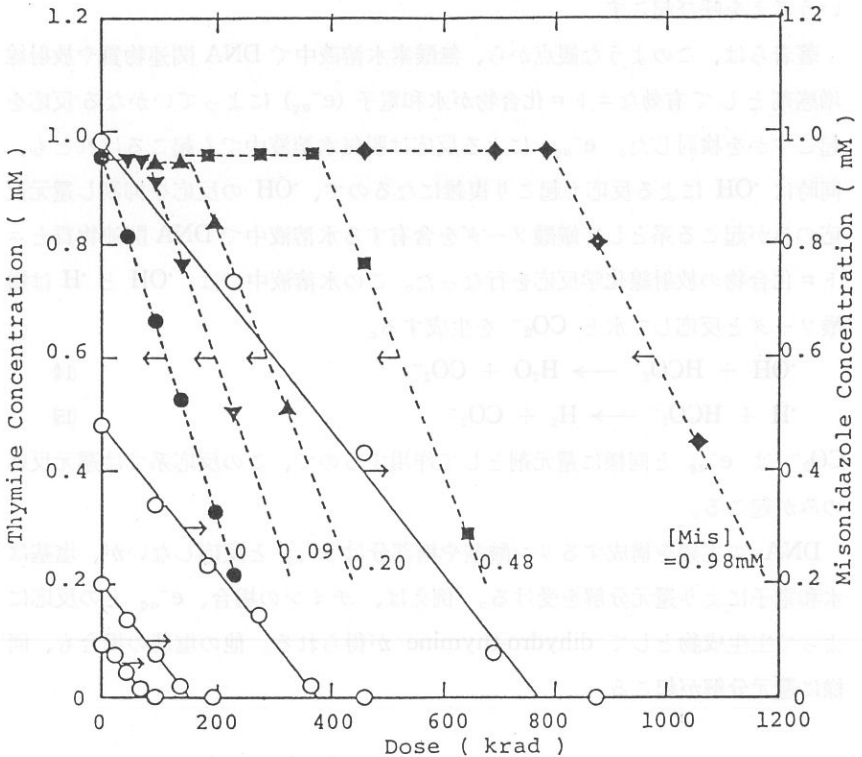


Fig. 4 Radiation-induced reductions of thymine and Misonidazole in deaerated solutions of these mixtures containing sodium formate (100 mM). Radiolysis conditions: [Thy]=1 mM, [Mis]=0 (a), 0.09 (b), 0.20 (c), 0.48 (d), 0.98 (e). γ -Irradiation; dose rate 38 krad/hr.

ところが、塩基水溶液にニトロ化合物を添加すると、 e^-_{aq} による塩基の還元分解は完全に抑制される (Fig. 4)。これは e^-_{aq} が塩基よりも容易にニトロ化合物と反応する (反応 (19)) こと、塩基が e^-_{aq} と反応して生成するアニオンラジカル (反応 (20)) からニトロ化合物への電子移動反応 (21) が起こることによる。



RNO_2 : ニトロ化合物

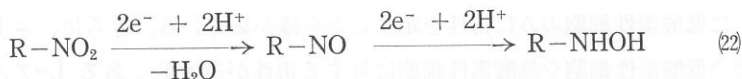


B: 塩基



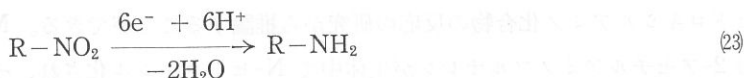
これはニトロ化合物の方が塩基よりも親電子性が大きいためである。

かくして、酸素が存在しない条件では、 e^-_{aq} は DNA と反応せず、ニトロ化合物と選択的に反応することが明らかとなったが、ニトロ化合物は e^-_{aq} と反応してどのような還元分解を起こすのであろうか。著者らは、蟻酸ソーダを含有する無酸素水溶液中で、つまり放射線照射によって生成する活性種として e^-_{aq} と $CO_2^{\cdot-}$ の還元種のみが存在する系で、種々のニトロ化合物の放射線還元反応を行ない、その還元分解生成物を調べた。その結果、放射線増感剤として有効性が立証されている Metronidazole や Misonidazole などの N-アルキル置換ニトロイミダゾール誘導体は四電子還元されることが明らかとなった。通常、ニトロ化合物が四電子還元された場合、反応 (22) に示すように、ニトロソ化合物を経由してヒドロキシルアミノ化合物を生成する。しかし、現時点で



は N-アルキル置換ニトロイミダゾールの四電子還元生成物の同定には成功していない。

一方、N-無置換ニトロイミダゾール誘導体を含む多くの他のニトロ化合物は、放射線還元を行なうと六電子還元を受け、(22) のニトロソ化合物、ヒドロキシルアミノ化合物を経由してアミノ化合物を生成するのである。

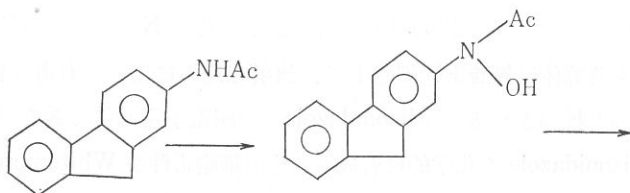


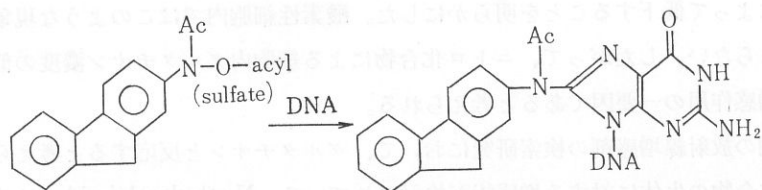
このように放射線増感剤として有効なニトロ化合物が、放射線還元によって六電子還元されずに四電子還元で留まることはどんな意味をもつのであろうか。通常、アミノ化合物に比べてヒドロキシルアミノ化合物やニトロソ化合物の細胞毒性が高い。つまり、放射線増感剤として有効な N-アルキル置換ニトロイミダゾール誘導体は無酸素性細胞中で、放射線還元によって有毒な化合物に変化するものと推論される。Misonidazole の四電子還元体である hydroxyl-amino-Misonidazole⁽¹⁾ を化学的に合成し、その細胞毒性が Whitemore⁽²⁾ や母里らによってしらべられた。その結果、この物質が高い毒性を有することが報告さ

れている。すなわち、ニトロ放射線増感剤は無酸素性細胞中で放射線還元によって毒性化合物となり、これによる細胞の致死が放射線増感の一要因であると考えられる。このような e^-_{aq} による還元分解生成物が毒性化合物であるのは、四電子還元されるニトロ化合物特有のもと考えられ、このことと現在最も有効な放射線増感剤の多くが N-アルキル置換ニトロイミダゾール誘導体である事実とはよく一致しているのである。

ニトロ化合物の還元分解による放射線増感機構は、ニトロ化合物の非放射線照射下の生体毒性の現象と関連づけて考察することができる。Ings⁽¹³⁾ は無酸素性細胞中で Metronidazole が DNA の複製を禁止することを見出し、これは Metronidazole の生体内還元生成物であるヒドロキシルアミノ化合物が DNA に結合したためと報告している。さらに、Hall⁽¹⁴⁾ や Mohindra⁽¹⁵⁾ は、それぞれ Misonidazole と Metronidazole が酸素性細胞に対しては無毒であるのに低酸素性細胞のみに毒性を示すことを確かめている。さらに、ニトロ化合物の低酸素性細胞や無酸素性細胞に対する毒性が還元剤である L-アスコルビン酸によって高まることが明らかにされている。以上のように、ニトロ化合物が低または無酸素下で生体内還元によって毒性化合物に変化することは間違いのない事実である。そしてこのような還元は酸素性細胞中では起こらず、その結果酸素性細胞に対してニトロ化合物は毒性を示さない。

ヒドロキシルアミノ化合物がなぜ細胞毒性を有するのかという問題は、DNA とヒドロキシルアミノ化合物の反応の研究から推論することができる。Miller⁽¹⁶⁾ は 2-アセチルアミノフルオレンが生体中で N-ヒドロキシル化され、その水酸基が硫酸エステル化されたのち DNA のグアニン塩基の 8 位炭素に付加することを報告している。



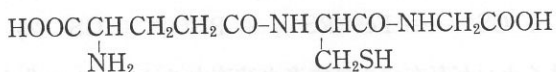


(24)

還元された Metronidazole が DNA のグアニンとシトシンに共有結合的に付加することは、La Russo¹⁹ らも報告しており、Miller の結果と考え合わせるとニトロ化合物の還元生成物が DNA と結合して毒性を発現している可能性は大きいと考えてよいだろう。

5. ニトロ化合物による生体の放射線防護能の低下

生体には放射線から自らを防護する一定の能力がある。この生体の放射線防護機能を担っている最も重要な化合物はグルタチオンである。グルタチオンは cystein を含む三種のアミノ酸からなるオリゴペプチドであるが、この分子中



グルタチオン (glutathione)

の SH 基が放射線防護剤として重要な役割を果たすものと考えられている。これは生体内分子中に放射線作用によって生成したラジカルにグルタチオン (GSH と略称) が反応してラジカルを安定化 (反応 (25)) し、自らは (26) によって酸化型グルタチオン (GSSG) に変化することに基づく。



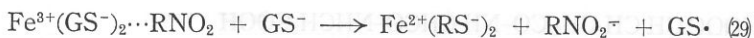
したがって、生体内のグルタチオン濃度はその放射線防護能を左右するものである。もし何らかの作用でグルタチオン濃度が低下すれば、その細胞の放射線感受性は高められる。最近、ニトロ化合物がグルタチオン濃度を低下させる効果を有することが報告されている。

Brown¹⁹ らは、低酸素性細胞内のグルタチオン濃度がニトロ放射線増感剤の

作用によって低下することを明らかにした。酸素性細胞内ではこのような現象は起こらない。したがって、ニトロ化合物による細胞内グルタチオン濃度の低下も増感作用の一要因であると考えられる。

初期の放射線増感剤の検索研究において、グルタチオンと反応すると考えられる化合物の生体に対する増感能が検討されている。N-ethylmaleimide はそのような化合物と考えられるが、実際の条件下ではグルタチオンとの反応速度は遅くその効果は期待できなかった。

ニトロ化合物についてもグルタチオンとの反応が検討された。しかし、水溶液中でこれらの物質間の反応は起こらなかった。では、なぜ生体内でニトロ化合物がグルタチオン濃度を低下せしめる効果を発揮するのか。その理由として、Willson らが行なった研究が重要な示唆を与える。彼らは、硫酸鉄と cystein を含む水溶液中に Metronidazole を加えた場合、酸素不在下では急速に cystein 濃度が低下することを見出した。この反応機構は次のように考えられた。



すなわち、還元型の鉄イオンが存在する無酸素水溶液中では、ニトロ化合物は SH 化合物と反応して SH 化合物は酸化分解される。生体内にも鉄イオンが存在するから、生体内のグルタチオンとニトロ化合物の間で同様な反応が起こり生体内グルタチオン濃度が低下している可能性が大きい。

酸素存在下では、酸素との反応により(28)のコンプレックス形成が阻害されるので、酸素性細胞中ではニトロ化合物がグルタチオン濃度を低下させる効果をもたない。

鉄イオン以外の金属イオンでは、銅イオンが鉄類似の触媒作用を示すが、鉄に比して反応速度は非常に低い。したがって、鉄イオンとニトロ化合物の系が無酸素性細胞中のグルタチオン濃度を低下せしめているものと思われ、その結果、細胞の放射線防護能が低下し放射線感受性が高まるものと考えられる。

6. ニトロ化合物の放射線増感機構

以上に述べてきたことから、ニトロ化合物による低酸素性細胞に対する放射線増感作用の分子論的機構として三つの要因が考えられる。

その一つは、第3章で述べたように DNA などの生体内物質の放射線分解において、ニトロ化合物が DNA の酸化的分解を促進することである。DNA の酸化的分解は細胞の致死効果に重要な役割を果たすものと思われる。

第二に、第4章で述べたニトロ化合物の放射線還元による毒性化合物の生成が挙げられる。この放射線還元は、増感能の高いニトロ化合物の場合は四電子還元によって進行し、ヒドロキシルアミノ化合物などが生成するが、ヒドロキシルアミノ化合物は DNA に結合して毒性を発現するものと考えられる。

第三は、第5章でふれたニトロ化合物による生体内グルタチオン濃度の低下に基づく機構である。鉄イオン存在下で、ニトロ化合物は SH 化合物と速やかに反応する。グルタチオンは生体内放射線防護物質であるので、グルタチオン濃度の低下は放射線感受性の増大をもたらす。

以上に記した機構を図式化すると Fig. 5 のようになる。

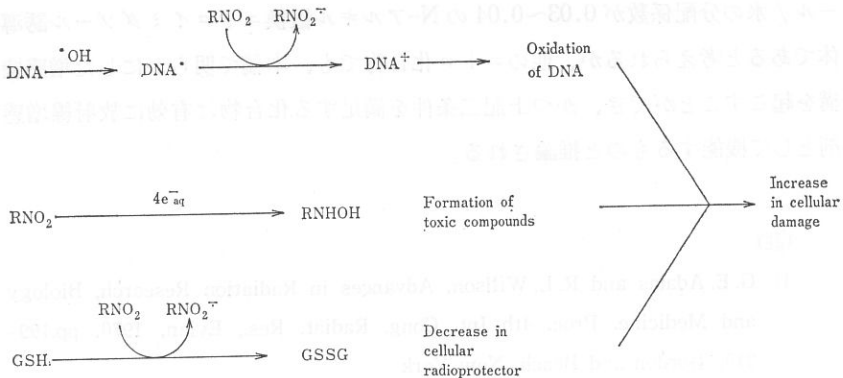


Fig. 5 Mechanism of radiosensitization of hypoxic cells by nitro-compounds.

ここに記した三つの機構は、いずれも酸素が存在しない条件下で起こる反応に基づくもので、酸素存在下では起こらないものである。したがって、ニトロ化合物が無酸素性細胞にのみ選択的に放射線増感するという事実はこれらの機

構によって説明することができる。現在の研究段階では、これらの増感機構のすべてがからみ合って低酸素性細胞増感をもたらしっていると考えられ、これらの三つの相対的な重要性については未だ明確ではない。

これらの機構に基づけば、優れた放射線増感剤とは、親電子性が大きくニトロ基を有する化合物であることが必須条件であると思われる。しかも、そのニトロ化合物が放射線還元を受ける場合に四電子還元されるものであることが好ましい。N-アルキル置換ニトロイミダゾール誘導体はこれらの条件を兼ね備えたものである。

放射線増感剤が癌治療に応用されるには、さらに二つの条件が重要である。その一つは増感剤が細胞中に侵入しやすいものであるということであるが、これは親油性と親水性との関連で検討されている⁽¹⁾。他の一つは、正常細胞に対する毒性が低いという条件である。従来の増感剤には神経毒性の高いものが多くこの点を改良しないと実用的に問題が生じる。これら二つの条件を満足する方向として、オクタノール/水の分配係数が0.03~0.04のニトロ化合物が好ましいことをBrown⁽²⁾らは述べている。

したがって、現在までの知見からは、最も好ましい放射線増感剤はオクタノール/水の分配係数が0.03~0.04のN-アルキル置換ニトロイミダゾール誘導体であると考えられるが、他のニトロ化合物でも、本稿で明らかにした増感機構を起こすことができ、かつ上記二条件を満足する化合物は有効に放射線増感剤として機能するものと推論される。

(註)

- (1) G. E. Adams and R. L. Willson, *Advances in Radiation Research, Biology and Medicine. Proc. 4th Int. Cong. Radiat. Res., Evian, 1970*, pp.199-215, Gordon and Beach, New York
- (2) 例えば, J. D. Chapman et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, **21** 475(1972), G. E. Adams et al., *Nature (London)*, **239** 23(1972), J. L. Foster and R. L. Willson, *Brit. J. Radiol.*, **46** 234(1974), J. A. Raleigh et al., *Radiat. Res.*, **59** 453(1974), J. C. Asquith et al., *Radiat. Res.*, **60** 108(1974)など。

なお、和田「放射線増感剤研究開発史」、大阪経済法科大学論集、第14号、p. 71(1981)に詳細にまとめられている。

- (3) 和田ら、日本化学会第41春季年会、2E13および2E14(1980, 4, 大阪)
和田、放射線生物研究セミナー(1980, 7, 京都)
和田ら、文部省がん特別研究I菅原班班会(1980, 2, 東京)
和田ら、文部省がん特別研究I小野山班班会(1980, 8, 大阪)
和田ら、放射線影響学会第23回大会、12-p-C-4, 12-p-C-5, 12-p-C-6, 12-p-A-11(1980, 10, 長崎)
和田ら、日本化学会第43春季年会(1981, 3, 東京)
和田ら、文部省がん特別研究小野山班班会(1981, 1, 大阪)
T. Wada et al., IAEA Seminar on Prospective Methods of Radiation Therapy in Developing Countries, (from 31 August to 4 September 1981, Kyoto)
和田ら、放射線影響学会第24回大会(1981, 9, 神奈川)
和田ら、文部省がん特別研究小野山班班会(1982, 2, 大阪)
T. Wada et al., *J. Radiat. Res.*, **22** 23, 60(1981)
- (4) C. L. Greenstock et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, **22** 401(1972)
- (5) G. E. Adams and D. L. Dewey, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12** 473 (1963)
- (6) G. E. Adams and M. S. Cooke, *Int. J. Radiat. Biol.*, **15** 457(1969)
- (7) C. L. Greenstock and I. Dunlop, *Radiat. Res.*, **56** 428(1973)
- (8) J. A. Raleigh et al., *Radiat. Res.*, **59** 453(1974)
- (9) A. J. Varghese, *Int. J. Radiat. Biol.*, **28** 477(1975)
- (10) P. S. Rao and E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.*, **97** 2986(1975)
- (11) G. F. Whitemore et al., *Br. J. Cancer*, **37** suppl III 115(1978)
- (12) 母里ら、文部省がん特別研究小野山班班会(1982, 2, 大阪)
- (13) R. M. J. Ings et al., *Biochem. Pharm.*, **23** 1421(1974)
- (14) E. J. Hall et al., *Radiology*, **117** 453(1975)
- (15) J. K. Mohindra and R. W. Rauth, *Cancer Res.*, **36** 930(1976)
- (16) P. D. Josephy et al., *Nature*, **271** 370(1978)
C. J. Koch et al., *Br. J. Cancer*, **39** 321(1979)
B. A. Moore et al., *Radiat. Res.*, **67** 459(1976)
- (17) J. A. Miller, *Cancer Res.*, **30** 559(1970)

- (18) N. F. La Russo et al., *Mol. Pharm.*, **13** 872(1977)
- (19) J. M. Brown, Seminar on Prospective Methods of Radiation Therapy in Developing Countries (31Aug.-4 Sept. 1981, Kyoto)
- (20) R. L. Willson and A. J. F. Searle, *Nature*, **255** 498(1975)
- (21) J. M. Brown and P. Warkman, *Radiat. Res.*, **82** 171(1980)