

ハロゲノフェニルグルコシド類の放射線増感に関する研究

— *m*-ヨードフェニルグルコシドの放射線増感効果
 に対するラジカル捕捉剤の影響 —

小宮 孝志・山田 哲也・奈良 省三・樋廻 博重*

Radiosensitization of Halogenophenyl β -D-Glucosides

— Effects of Radical Scavengers on Radiosensitization
 of *m*-Iodophenyl β -D-Glucoside —

Takashi KOMIYA, Tetsuya YAMADA, Shozo NARA
 and Hiroshige HIBASAMI

I. 緒 言

筆者らは既にハロゲノフェニルグルコシド類のうち、ブロムフェニルグルコシド化合物を微生物細胞 (*E. coli* B) と共に放射線照射すると、微生物細胞の致死作用が好気的あるいは嫌気的条件下で増強されることを見出した。¹⁾ 今回はハロゲノフェニルグルコシド類の放射線増感効果に対するハロゲン置換基の種類による影響をみたところ、ハロゲンの塩基、臭素およびヨウ素のうちヨウ素置換体が最も強い効果を与えた。これらの増感効果の誘起は薬剤と水の放射線分解物である水和電子 (e_{aq}^-)、OH ラジカルあるいは H ラジカルなどの活性種との反応によるものと考えられる。そこで特に最も効果の大きい *m*-ヨードフェニルグルコシド (*m*-IPG) の放射線増感効果の作用機作を明らかにするために、活性種のラジカル捕捉剤を照射時に添加したときの *m*-IPG の増感効果の影響をコロニー計数法および [6 - 3 H]-thymidine の取り込みによって調べたので報告する次第である。

II. 実験材料および実験方法

1. *E. coli* B 懸濁液の調製

微生物は *E. coli* B を用い、Table 1²⁾ に示す合成培地で培養後、1/15M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に懸濁させ、これをガラスフィルター (G-2) に通したものを 9000

Table 1. Medium for shaking culture.

Na ₂ HPO ₄	18 g	NH ₄ Cl	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g	Glucose	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.005 g		
in 1 L distilled water (pH 7.4)			

rpm で5分間 5°C で遠心分離した。沈殿した菌体を上のリン酸緩衝液に懸濁させ、上と同様に遠心分離を行い、この洗浄操作を更に繰り返した後、リン酸緩衝液により菌濃度 10⁶~10⁷ cells/ml に調製した。

2. 各種試薬の調製

p-クロロフェニルグルコシド (*p*-CPG), *p*-ブロムフェニルグルコシド (*p*-BPG) および *m*-IPG は Koenigs-Knorr 法³⁾ により合成し、メタノールで再結し、結晶を得て、それぞれガスクロマトグラフィー¹⁾ により単一であることを確認した。薬剤溶液の調製にイオン交換水を2回蒸留したものをを用いた。その他の薬品はすべて特級試薬を用いた。[6 - 3 H]-thymidine は New England Nuclear Co. より購入した。

3. 照射条件

E. coli B 懸濁液と 5 mM *m*-IPG にラジカル捕捉剤が入った溶液をそれぞれ 1 ml ずつ 2 ml ガラス製アンブル管に入れて窒素ガスを通気し管を封じた。N₂O の効果をみる場合は窒素ガス通気後 N₂O ガスを30秒間通気して管を封じた。これらの試料は氷冷しながら東芝

EXS-300-2 型 X 線照射装置により 400 rad/min で照射した。線量は Fricke の鉄線量計の方法⁴⁾ により測定した。

4. 薬剤の放射線増感効果の評定

(i) コロニー計数法による方法

X 線照射した薬剤添加あるいは無添加の菌懸濁液を 1/15M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で 10 倍希釈を繰り返し行い、希釈液 1 ml を Table 2⁵⁾ に示す寒天培地に移し、これを 30°C で約 18 時間培養した後 1 ml 当りのコロニー数を測定した。未照射の菌数 N_0 、照射した菌数 N_t とし、グラフの縦軸に $\log N_t/N_0$ 、横軸に線量をとると、生存曲線はほぼ直線となったので、薬剤の放射線増感効果を直線の傾き k の大小で評定し、さらに薬剤無添加の直線の傾きを k_0 、薬剤添加したものを k とし、薬剤自身による増感効果を k/k_0 で評定した。

Table 2. Medium for colony count.

Meat extract	10 g	NH ₄ Cl	5 g
Peptone	10 g	NaCl	5 g
Agar	12 g		
in 1 L distilled water (pH 7.0)			

(ii) [6-³H]-Thymidine の取り込みによる方法

セル培養器 (400 μ l) に Table 1 に示した合成培地 80 μ l, [6-³H]-thymidine 20 μ l (0.5 μ Ci), X 線照射直後の菌懸濁液 80 μ l を加え 37°C で 50 分間培養した。培養後 5% トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液 100 μ l を培養液に加えて [6-³H]-thymidine の取り込みを停止させた。次にこの培養液中の菌体を Sartorius の membrane filter (pore size 0.1 μ m) で濾集し、続いて 5% TCA 溶液 100 μ l で 2 回洗浄し、さらにこの membrane filter を 5% TCA 溶液 500 μ l で 3 回洗浄した。この membrane filter を 20 ml 容バイアルビンに入れ、トルエンシンチラント 3 ml を加えて一夜放置し、液体シンチレーションカウンターで酸不溶性画分に取り込まれた放射能を測定した。照射した薬剤無添加のものの放射能の計数を 100% とし、薬剤添加したものの放射能を表わした。

III. 結果および考察

1. ハロゲンフェニルグルコシド類の放射線増感効果

Fig. 1 に示すように、*p*-CPG、*p*-BPG および *m*-IPG の *E. coli* B に対する X 線による致死作用をみたところ、

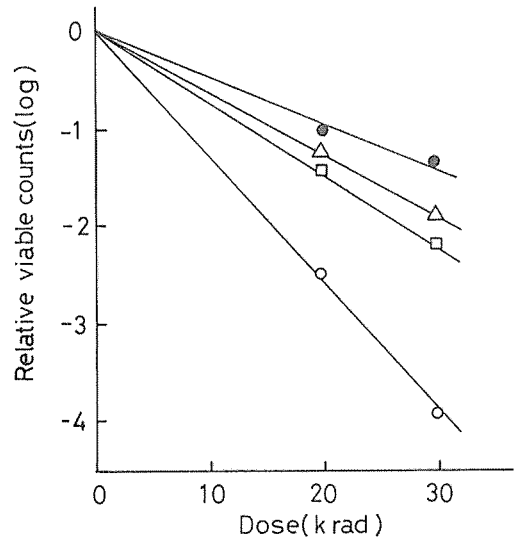


Fig. 1. Effects of Monohalogenophenyl β -D-Glucosides on Radiation Inactivation of *E. coli* B.

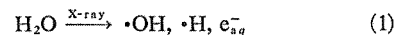
Irradiation Source; X-ray apparatus (Toshiba EXS-300-2 type).

Dose rate; 400 rad/min.

The suspensions of *E. coli* B with or without the additives were irradiated in N₂ by X-ray.

k_0 and k expressed the survival slopes for no additive and additive, respectively. ●— no additive; Δ — *p*-CPG (5 mM), $k/k_0=1.19$; \square — *p*-BPG (5 mM), $k/k_0=1.31$; \circ — *m*-IPG (2.5 mM), $k/k_0=2.67$.

嫌気的条件下において残存菌数はいずれも線量の増加に伴ってほぼ直線的に減少した。しかも薬剤添加したものは無添加のものに比べて直線の傾きは大きく現われた。このことはこれらの化合物は *E. coli* B の致死作用に対して放射線増感効果を示したと考えられる。次にハロゲン置換基による増感効果の大きさは k/k_0 値でみると、5 mM *p*-CPG、5 mM *p*-BPG および 2.5 mM *m*-IPG ではそれぞれ 1.19、1.31 および 2.63 であることから m -IPG \gg *p*-BPG $>$ *p*-CPG の順で、特にヨウ素置換体の増感効果が他のものに比べて著しく大きいことが明らかにされた。これは松山らによるハロゲンフェノールの場合⁶⁾ と類似した傾向を示した。



このようにハロゲンフェニルグルコシド類の放射線増感効果は薬剤と (1) 式に示す水の放射線分解物である $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{H}$ 、 e_{aq}^- などの活性種との反応により生成する短寿命ラジカルが関与しているものと考えられる。このよ

うな放射線増感効果の分子メカニズムを推定するために、ハロゲンフェニルグルコシド類のうち特に増感効果の最も大きかった *m*-IPG について各種ラジカル捕捉剤の添加による影響を調べた結果を III-2 の (i), (ii), (iii) において後述した。

2. *m*-IPG の放射線増感効果に対するラジカル捕捉剤の影響

(i) KSCN の添加効果

m-IPG に OH ラジカル捕捉剤である KSCN を共存したものの *E. coli* B に対する X 線による致死作用の影響を調べ、コロニー計数法による結果を Fig. 2 に示した。KSCN のみの添加では薬剤無添加に比べてわずかに *E. coli* B の致死作用は強く、*m*-IPG に KSCN が共存するとこの作用は k/k_0 値で 3.79 となり、*m*-IPG のみ ($k/k_0=2.67$) に比べて大きく増強した。

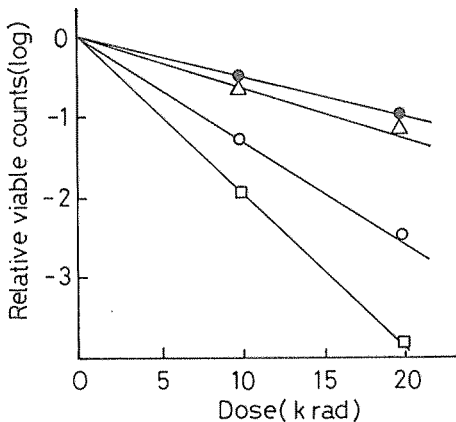


Fig. 2. Effect of KSCN on Radiation Inactivation of *E. coli* B by *m*-IPG

●— no additive; △— KSCN (2.5 mM), $k/k_0=1.30$;
○— *m*-IPG (2.5 mM), $k/k_0=2.67$; □— *m*-IPG (2.5 mM)+KSCN (2.5 mM), $k/k_0=3.79$.

次に照射後の *E. coli* B の核酸合成の影響を [$6\text{-}^3\text{H}$]-thymidine の取り込みによって調べた結果を Table 3 に示した。薬剤無添加の取り込みを100%としたとき、2.5 mM *m*-IPG のみの添加の取り込みは39%となったことから、*E. coli* B 懸濁液と 2.5 mM *m*-IPG と共に X 線照射すると、*m*-IPG が照射後の *E. coli* B の核酸合成に大きな阻害効果を与えることが明らかとなった。

次に KSCN の添加効果についてみると、2.5 mM KSCN のみの添加での ^3H -thymidine の取り込みは薬剤無添加の場合に比べてわずかに減少したが、KSCN の

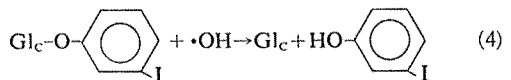
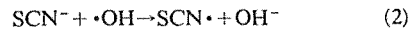
Table 3. Effect of KSCN on radiation inactivation of DNA synthesis in *E. coli* B by *m*-IPG

Additives	^3H -Thymidine incorporation	
	CPM	%
None	10794	100
<i>m</i> -IPG (2.5 mM)	4305	39
KSCN (2.5 mM)	9391	87
KSCN (5 mM)	432	4
<i>m</i> -IPG (2.5 mM) + KSCN (2.5 mM)	3239	30
<i>m</i> -IPG (2.5 mM) + KSCN (5 mM)	2267	21

Irradiation: X-ray irradiation, Dose: 10 k rad.

濃度を 5 mM にして添加した場合の取り込みは大きく減少した。さらに、2.5 mM *m*-IPG に KSCN が共存した場合の取り込みをみると、2.5 mM KSCN では *m*-IPG のみでの場合に比べてわずかに減少したが、5 mM KSCN では、5 mM KSCN のみの添加に比べて逆に大きく減少した。

以上の結果、*m*-IPG の放射増感効果が KSCN の共存により増強され、又 KSCN の濃度が高まると、それ自身により特に核酸合成に大きな阻害効果が与えられた。これはおそらく (2), (3) 式により生成するチオシアンラジカルアニオン, $(\text{SCN})_2^-$ が種々のアミノ酸, 蛋白質あるいは酵素, 特にリボスクレアーゼなどの反応⁷⁻¹⁰⁾ が知られていることから $(\text{SCN})_2^-$ が大きく関与しているものと考えられる。又 *m*-IPG に特に 5 mM KSCN が共存した際の照射後の *E. coli* B の ^3H -thymidine の取り込みが 5 mM KSCN のみの場合に比べて大きく回復したことは、*m*-IPG が $\cdot\text{OH}$ と BPG との反応¹⁾ にみられたように、(4) の反応により $\cdot\text{OH}$ が *m*-IPG に捕捉され $(\text{SCN})_2^-$ の生成濃度が減少したためと考えられる。



(ii) HCOONa の添加効果

KSCN について OH ラジカル捕捉剤である HCOONa

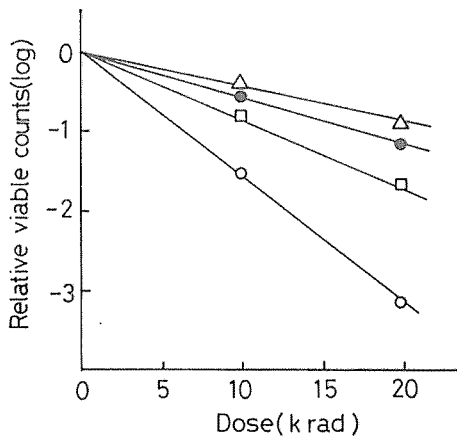


Fig. 3. Effect of HCOONa on Radiation Inactivation of *E. coli* B by *m*-IPG

●— no additive; △— HCOONa (2.5 mM), $k/k_0=0.79$; ○— *m*-IPG (2.5 mM), $k/k_0=2.67$; □— *m*-IPG (2.5 mM)+HCOONa (2.5 mM), $k/k_0=1.19$.

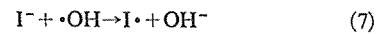
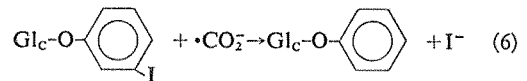
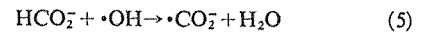
の添加効果をコロニー計数法で調べた結果を Fig. 3 に示した。HCOONa のみの添加では薬剤無添加に比べて *E. coli* B の X 線による致死作用はわずかに弱く、又 *m*-IPG に HCOONa が共存すると、この作用は k/k_0 値で 1.19 となり、*m*-IPG のみ ($k/k_0=2.67$) に比べて大きく抑制された。次に *m*-IPG の放射線増感効果に対する HCOONa の添加効果を照射後の *E. coli* B の ^3H -thymidine 取り込みによって調べた結果を Table 4 に示した。HCOONa のみの添加の取り込みは 5 mM あるいは 50 mM の濃度では薬剤無添加の場合に比べてわず

Table 4. Effect of HCOONa on radiation inactivation of DNA synthesis in *E. coli* B by *m*-IPG

Additives	^3H -Thymidine incorporation	
	CPM	%
None	10794	100
<i>m</i> -IPG(2.5 mM)	4305	39
HCOONa(5 mM)	8839	82
HCOONa(50 mM)	10307	95
<i>m</i> -IPG(2.5 mM) + HCOONa(5 mM)	9788	91
<i>m</i> -IPG(2.5 mM) + HCOONa(50 mM)	4953	46

Irradiation: X-ray irradiation, Dose: 10 k rad.

かに減少しているが大きな変化はみられなかった。*m*-IPG に HCOONa が共存した場合は、5 mM HCOONa の添加により取り込みは 91% となり、薬剤無添加に近い値となった。さらに HCOONa の濃度を 50 mM に高めに添加した場合の取り込みをみると 46% となり、5 mM 濃度の添加の場合に比べて大きく減少した。



以上の結果により、*m*-IPG の放射線増感効果が低濃度の HCOONa の添加により大きく抑制されたのは OH ラジカルは DNA 不活性化の主役となることが知られており、¹¹⁾ (5) の反応により OH ラジカルが保護されたものと考えられる。HCOONa の添加量を高濃度の 50 mM にしたとき、 ^3H -thymidine 取り込みが大きく減少したのは、おそらく (5) の反応で生成した 2 酸化炭素ラジカルアニオン、 $\cdot\text{CO}_2^-$ の濃度が高くなり、続いて (6) の反応による連鎖反応¹²⁾ によりヨードイオン (I^-) を生成する。この I^- が (7)、(8) および (9) の反応¹³⁾ により生成する I_3^- がいくつかのアミノ酸や蛋白質と反応することが知られており、¹⁴⁾ このような反応が *E. coli* B の X 線による核酸合成阻害効果を増強したのと考えられる。

(iii) N_2O の添加効果

m-IPG の放射線増感効果に対する e_{aq}^- の捕捉剤である N_2O の添加効果についてコロニー計数法で調べた結果を Fig. 4 に示した。 N_2O のみの添加により、*E. coli* B の X 線による致死作用は k/k_0 値で 3.19 となり、2.5 mM *m*-IPG のみによる効果 ($k/k_0=1.64$) に比べて著しく増強された。2.5 mM *m*-IPG に N_2O を添加すると k/k_0 値で 3.59 となり、 N_2O のみによる作用よりもわずかに増強された。

次に *m*-IPG の放射線増感効果に対する N_2O の添加効果の照射後の *E. coli* B の ^3H -thymidine 取り込みによって調べた結果を Table 5 に示した。 N_2O のみの場合の取り込みは 2.5 mM *m*-IPG の場合の取り込みに比べて大きく減少した。この N_2O による *E. coli* B の

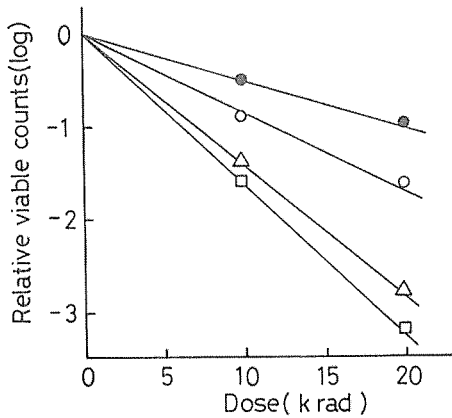


Fig. 4. Effect of N₂O on Radiation Inactivation of *E. coli* B by *m*-IPG

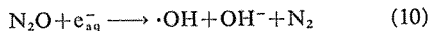
●— no additive; △— N₂O, $k/k_0=3.19$; ○— *m*-IPG (2.5 mM), $k/k_0=1.67$; □— *m*-IPG (2.5 mM) + N₂O, $k/k_0=3.59$.

Table 5. Effect of N₂O on radiation inactivation of DNA synthesis in *E. coli* B by *m*-IPG

Additives	³ H-Thymidine incorporation	
	CPM	%
None	10794	100
<i>m</i> -IPG(2.5 mM)	4305	39
N ₂ O	2159	20
<i>m</i> -IPG(2.5 mM) + N ₂ O	8205	76

Irradiation: X-ray irradiation, Dos: 10 k rad.

³H-thymidine 取り込みの大きな阻害効果は *m*-IPG の共存により大きく抑制された。



以上の結果により、N₂O は e_{aq}⁻ を (10) の反応により OH ラジカルに変換し、それにより反応系は $\cdot OH$ 濃度が増大し、(ii) で前述したように OH ラジカルが DNA の不活性化に大きく寄与することが考えられるので、N₂O のみの添加により *E. coli* B の X 線による致死作用が著しく増強されたものと考えられる。又 *m*-IPG に N₂O が共存した場合、³H-thymidine の取り込みが著しく回復したのは、KSCN の添加効果の場合にもみられたように、(4) の反応により OH ラジカルが *m*-IPG

に捕捉されたことによるものと考えられる。

要 旨

放射線照射により *p*-CPG, *p*-BPG および *m*-IPG 化合物が微生物細胞 *E. coli* B に対する致死作用を増強し、それらの増感効果の大きさは $m\text{-IPG} \gg p\text{-BPG} > p\text{-CPG}$ の順であった。そのうち特に *m*-IPG の放射線増感効果の分子メカニズムを明らかにするため、KSCN, HCOONa および N₂O のラジカル捕捉剤添加効果をコロニー計数法と ³H-thymidine 取り込み法により調べた。OH ラジカル捕捉剤である KSCN の添加効果では、KSCN の共存により *m*-IPG の *E. coli* B に対する X 線による致死作用は大きく増強された。³H-thymidine 取り込み法では、5 mM KSCN のみの添加により X 線による *E. coli* B の核酸合成阻害効果は大きく増強された。この作用は SCN⁻ と $\cdot OH$ との反応により生成する (SCN)₂ の微生物細胞内のある酵素蛋白質への攻撃によるものと考えられる。しかしながら、この効果は *m*-IPG の共存により大きく抑制された。HCOONa の添加効果については、低濃度の添加により *m*-IPG の *E. coli* B に対する X 線による致死作用および核酸合成阻害効果が共に抑制され、高濃度添加により同様の核酸合成阻害効果は *m*-IPG のみによる効果に近いレベルとなった。これは *m*-IPG と $\cdot CO_2^-$ との連鎖反応により生成する I₃⁻ が関与したものと考えられる。N₂O の添加効果については、N₂O のみの添加により X 線による *E. coli* B の致死作用および核酸合成阻害効果はともに増強された。これは N₂O が e_{aq}⁻ との反応により $\cdot OH$ に変換され、 $\cdot OH$ 濃度が増大したことによるものと考えられる。しかしながら、*m*-IPG の共存により N₂O による強い *E. coli* B の核酸合成阻害効果は大きく抑制された。

本研究の概要は昭和55, 57年度日本農芸化学大会で発表した。又本研究の一部は昭和54年度文部省科学研究費補助費(一般研究, D)の助成により行った。

文 献

- 1) 小宮孝志, 山田哲也, 奈良省三, 川岸舜朗, 並木満夫: 農化, 57, 543 (1983).
- 2) 微生物研究法懇談会編: 「微生物学実験法」, 講談社, 東京, 1977, p. 434.
- 3) KOENIGS, W. and E. KNORR: Ber, 34, 957 (1901).
- 4) 日本放射線同位元素協会編: 「アイソトープ便覧」,

- 丸善, 東京, 1962, p. 567.
- 5) NAMIKI, M., Y. WATANABE, J. OKUMURA and S. KAWAKISHI: *Agric. Biol. Chem.*, 37, 990 (1973).
 - 6) MATSUYAMA, A., M. NAMIKI, Y. OKAZAWA and I. KANEKO: *Agric. Biol. Chem.*, 27, 349 (1963).
 - 7) ADAMS, G. E., R. H. BISBY, R. B. CUNDALL, J. L. REDPATH and R. L. WILLSON: *Radiation Research*, 49, 278 (1972).
 - 8) BISBY, R. H., R. B. CUNDALL, G. E. ADAMS and J. L. REDPATH: *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, 70, 2210 (1974).
 - 9) BISBY, R. H., R. B. CUNDALL, G. E. ADAMS and J. L. REDPATH: *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, 72, 51 (1976).
 - 10) ADAMS, G. E., R. H. BISBY, R. B. CUNDALL, J. L. REDPATH and R. L. WILLSON: *Radiation Research*, 49, 290 (1972).
 - 11) 近藤宗平: 分子放射線生物学, 東京大学出版会, 1972, p. 156.
 - 12) KOMIYA, T., T. YAMADA, S. NARA, S. KAWAKISHI and M. NAMIKI: *Agric. Biol. Chem.*, in press.
 - 13) *Advances in Chemical Radiationsensitization*, International Atomic Energy Agency, Vienna, 1974; QUINTILIAN, M.: *Molecular Mechanism of Radiosensitization by Iodine-Containing Compounds*, p. 94.
 - 14) CUNNINGHAM, L. W. and B. J. NUENKE: *J. Biol. Chem.*, 234, 1447 (1959).
 - 15) HART, E. J. and M. ANBAR: "The Hydrated Electron", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1970, p. 80.

Summary

Radiosensitization with *p*-CPG, *p*-BPG and *m*-IPG was examined in *E. coli* B when the bacterial suspension and sensitizers were X-ray irradiated under anaerobic condition. The radiosensitizing lethal effect increased in the order of *m*-IPG \gg *p*-BPG $>$ *p*-CPG. To elucidate the molecular mechanism of the radiosensitizing activity of *m*-IPG, the radiosensitizing lethal effect by addition of the radical scavengers such as KSCN, HCOONa and N₂O and (6-³H)-thymidine incorporation into DNA of *E. coli* B after irradiation was examined. Only the addition of KSCN enhanced greatly the inhibition effect on DNA synthesis of *E. coli* B by X-ray irradiation. This effect may be attributed to the reaction of (SCN)₂⁻ with some enzymic protein, but it was inhibited in the coexistence of *m*-IPG. The addition of low concentration of HCOONa inhibited greatly the radiosensitizing lethal effect and the inhibiting effect of ³H-thymidine incorporation with *m*-IPG. However, the addition of high concentration of HCOONa raised the level of the inhibiting effect of ³H-thymidine incorporation to that of the case where only *m*-IPG is added. This may be attributed to I₃⁻ resulting from the chain reaction of *m*-IPG and \cdot CO₂⁻. By the addition of only N₂O, a great radiosensitizing lethal effect and a large inhibiting effect on DNA synthesis of *E. coli* B by X-ray irradiation appeared. However, the latter effect was largely inhibited by the existence of *m*-IPG.