

ハロゲン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ポリアミンの影響——

小宮 孝志・山田 哲也・升井 洋至*・樋廻 博重**

Radiosensitization of Halogenophenyl β -D-Glucosides
——Effects of Polyamines on Radiosensitization of
m-Iodophenyl β -D-Glucoside——

Takashi KOMIYA, Tetsuya YAMADA, Hironori MASUI
and Hiroshige HIBASAMI

I. 緒 言

放射線増感に関する基礎研究として、*p*-nitroacetophenone 類縁化合物¹⁻³⁾、ニトロフラン誘導体⁴⁾、*di-t*-butylnitroxide 類縁化合物⁵⁾などの親電子性化合物が微生物に対して嫌気的条件下で放射線増感効果を与えることが知られている。著者らはこれまでにモノハロゲンフェニルグルコシド類の放射線増感に関する研究を行い、ヨード化合物が最も強い放射線増感効果を示すことを明らかにし⁶⁾、更にそれらの化合物の放射線増感の作用機作と放射線分解反応との関係について考察を加えた^{7,8)}。今回は微生物細胞の増殖効果⁹⁾と耐熱効果¹⁰⁾を与えることが知られているポリアミン類 (putrescine, spermidine および spermine) による *m*-ヨードフェニルグルコシド (*m*-IPG) の放射線増感効果に与える影響につい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 懸濁液の調整

微生物細胞として *E. coli* B を用い、無機培地¹¹⁾で培養後、1/15 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に懸濁し、9000 rpm で5分間の遠心分離により菌体を洗浄した。この

洗浄操作を2回繰返した後、1/15 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) により菌濃度を約 10^7 cells/ml に調整した。

2. バクテリオファージ ϕ X174 懸濁液の調整

バクテリオファージとしてその宿主菌、*E. coli* C_N (野生株) を持つバクテリオファージ ϕ X174 を用いた。寒天重層法¹²⁾により得られたバクテリオファージ ϕ X174 のブランク1割を0.05 M ホウ酸緩衝液に入れてすりつぶしたものをL-培地 (Table 1) に移し、3時間 37°C で通気培養する。透明になった菌液を10,000 rpm で15分間 4°C で冷却遠心分離を行う。得られた沈殿を0.05 M ホウ酸緩衝液に懸濁させる。更にファージ濃度を高めるため再び同じようにして冷却遠心分離を行う。その結果、 1×10^8 p.f.u./ml のバクテリオファージ ϕ X174 を得、以後の実験に供した。

Table 1. L-Medium

polypeptone	10.0 g
Yeast Extract	5.0 g
NaCl	5.0 g
glucose	1.0 g
1.0 M CaCl ₂	0.1 ml
in 1 L distilled water	

3. 試 薬

m-IPG は Koenigs-Knoer 法¹³⁾により合成した。薬剤

昭和60年10月15日 受理

* 本学大学院学生

** 三重大学医学部

溶液の調整には2回蒸留水を用いた。 $[6-^3\text{H}]\text{-thymidine}$ はNew England Nuclear Co.より購入した。ポリアミン類 (putrescine, spermidine および spermine)、その他の無機試薬はすべて特級品を用いた。

4. 照射条件

E. coli B 懸濁液 (pH 6.0) と 5 mM *m*-IPG にポリアミンが入った溶液をそれぞれ 1 ml ずつ 2 ml ガラス製アンプル管に入れて窒素ガスを通気し、管を封じた。バクテリオファージ ϕX174 懸濁液 (pH 7.0) 0.1 ml と *m*-IPG 水溶液 0.9 ml を 2 ml のアンプル管に入れ、窒素置換を行い管を封じた。これらの試料は氷冷しながら、線源は東芝 EXS-300-2 型 X 線照射装置を用い、線量率 400 rad/min で照射した。線量は Fricke の鉄線量計の方法¹³⁾により測定した。

5. *E. coli* B に対する *m*-IPG の放射線増感効果の評価

(i) コロニー計数法による方法

X 線照射菌懸濁液を 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で10倍希釈を繰返し行い、希釈液の 0.5 ml を 4.5 ml の寒天培地¹⁴⁾を入れた試験管に移し、操作した後、1 ml のピペットで吸い取った。これを 30°C 約18時間培養した後 1 ml 当たりのコロニー数を測定した。ポリアミンの添加による *m*-IPG の放射線増感効果の影響に対する評価は照射した薬剤無添加の菌数を100%としてすべて表した。

(ii) $[6-^3\text{H}]\text{-Thymidine}$ の取り込みによる方法

シャーレ (内径 2 cm, 深さ 1 cm) に無機培地¹⁵⁾ 0.5 ml, $[6-^3\text{H}]\text{-thymidine}$ 0.02 ml (1 μCi)、X 線照射直後の菌懸濁液 0.5 ml を加え 37°C で30分間培養した。培養後 5%トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液 1.0 ml を培養液に加えて ^3H -thymidine の取り込みを停止させた。次にこのシャーレ中の菌懸濁混合液 1 ml を Sartorius membrane filter (pore size 0.1 μm) で濾集し、続いて 5% TCA 溶液 1 ml 出 5 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 を加えた後、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線を測定した。未照射の菌懸濁液の ^3H -thymidine 取り込みの放射能の係数を N_0 。照射した菌懸濁液の放射能の係数を N_1 として、グラフの縦軸に $\log N_1/N_0$ 横軸に線量を取り、X 線照射に伴う

得る *m*-IPG による *E. coli* B の ^3H -thymidine 取り込みの変化をみた。更にポリアミンの共存した場合の *m*-IPG による照射後の *E. coli* B の ^3H -thymidine 取り込みの効果は照射した薬剤無添加のものの放射能の計数を100%として薬剤添加したものの放射能を表わした。

6. バクテリオファージ ϕX174 に対する *m*-IPG の放射線作用の評価

バクテリオファージ ϕX174 (約 10^8 p.f.u./ml) ホウ酸緩衝液 (0.05 M, pH 7.0) 0.1 ml と *m*-IPG 水溶液 0.9 ml を 2 ml のアンプル管に入れ、窒素置換後 X 線照射を行った。照射試料 0.1 ml と 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 0.9 ml を加え、10倍希釈を繰返した。*E. coli* C_N 株を指示菌とした寒天重層法¹²⁾によりプラーク数を算出した。

III. 結果および考察

1. *m*-IPG の放射線増感効果

Fig. 1 は嫌気的条件下における *E. coli* B に対する X 線の照射線量による致死効果を *m*-IPG の添加したものについてコロニー係数法によりみたものである。残存菌数はいずれも線量の増加とともにほぼ直線的

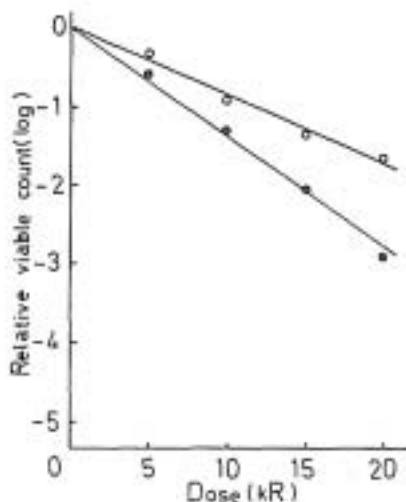


Fig. 1. Effect of *m*-IPG on Radiation Inactivation of *E. coli* B.

Irradiation source; X-ray apparatus (Toshiba EXS-300-2 type). Dose rate; 400 rad/min. The suspensions of *E. coli* B with or without *m*-IPG were irradiated in N_2 by X-ray.

○ — no additive, ● — *m*-IPG (2.5 mM)

に減少した。更に、*m*-IPG を添加したものの方が無添加のものより残存菌数が少ないことから、放射線照射の際、*m*-IPG により *E. coli* B の致死作用が増強されることが明らかとなった。*m*-IPG の放射線増感効果は微生物細胞中の核酸合成の阻害¹⁴⁾ が一つの原因と考えられるので、Fig. 2 に ³H-thymidine の取り込みの線量による効果を *m*-IPG 添加したものしないものについて示した。この結果より、前述の *E. coli* B の細胞致死作用の場合にみられたように、*m*-IPG 添加したものの方が添加しないものに比べて ³H-thymidine の取り込みの阻害効果が大きくあらわれた。即ち、照射中に *m*-IPG が *E. coli* B の核酸合成に大きな阻害効果を与えることを示したものである。

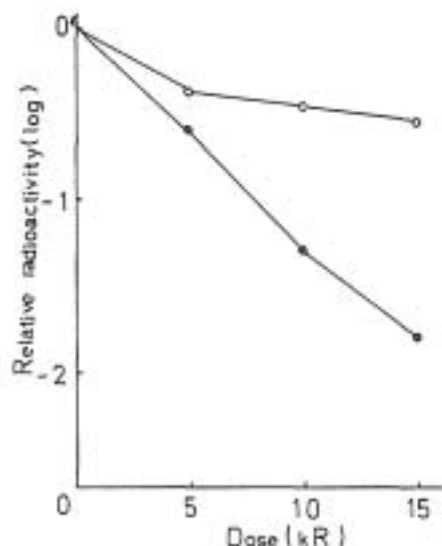


Fig. 2. Effect of *m*-IPG on Radiation Inactivation on DNA synthesis in *E. coli* B.
Irradiation; X-ray irradiated at 400 rad/min of dose rate in N_2 .

○—no additive, ●—*m*-IPG (2mM)

2. 照射中の *m*-IPG によるバクテリオファージ ϕ X174 に対する影響

III・1 で述べたように、*m*-IPG が照射による *E. coli* B の核酸合成阻害効果を増強した。このことは *m*-IPG 水溶液における放射線分解により生成すると考えられる短寿命生成物が一部生体中の核酸に作用したものと考えられる。それ故、そのモデル系として照射中の *m*-IPG によるバクテリオファージ ϕ X174 に対する不活化を調

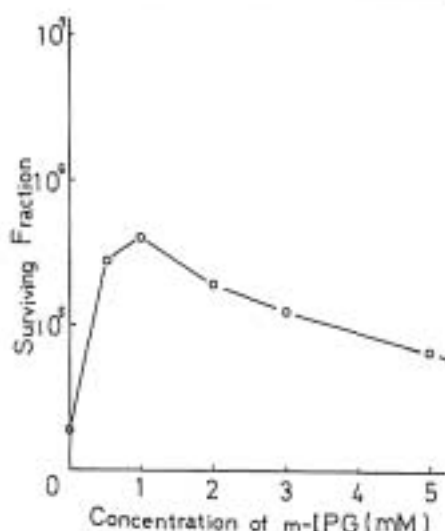


Fig. 3. Effect of *m*-IPG on Radiation Inactivation of Bacteriophage ϕ X174.

Irradiation; X-ray, irradiated at 400 rad/min of dose rate in N_2 .

べた。Fig. 3 に示すように、*m*-IPG の添加濃度 1 mM までは無添加に比べ放射線によるバクテリオファージ ϕ X174 の不活化が大きく抑制された。更に *m*-IPG の添加濃度を増していくと、遂に徐々にファージの不活化が増大する傾向を示した。この結果、放射線によるバクテリオファージ ϕ X174 の不活化が *m*-IPG の低濃度の添加により保護されることが明らかとなった。これは III・1 で述べた微生物細胞 *E. coli* B に対する *m*-IPG による放射線増感効果とは著しく異なる現象である。このことはおそらくバクテリオファージ ϕ X174 では核酸が蛋白質によりコートされているので、水の放射線分解物の活性種 $\cdot OH$ とその蛋白質中の SH アミノ酸残基と反応速度 ($\cdot OH + \text{cystein}$, $k = 4.0 \times 10^{10}$)³⁵⁾ が極めて早く反応すると考えられる。又 $\cdot OH$ と *m*-IPG とも極めて反応速度が速いと考えられるので、1 mM の *m*-IPG の添加により $\cdot OH$ と蛋白質中のアミノ酸残基との反応を捕獲したものと考えられる。更に *m*-IPG の添加量を 5 mM まで増加していくと放射線によるファージの不活化がコントロール（薬剤無添加）へと回復に向かった。



これは上式⁹⁾に示すように、(1)式で $e^{-}nq$ と m -IPG との反応により生成する $I^{\cdot-}$ が(2)式で $\cdot OH$ と反応し I^{\cdot} を生成し、更に(3)、(4)式のように反応して生成する I_2^{\cdot} がいくつかのアミノ酸や蛋白質と反応¹⁰⁾ することによりバクテリオファージ $\phi X174$ を不活化したものと考えられる。

3. m -IPG の放射線増感効果に対するポリアミンの添加効果

III・1において m -IPG が *E. coli* B の放射線による致死作用を増強することを明らかにした。ここでは微生物細胞の増殖効果¹¹⁾ をもつことが知られているポリアミンである putrescine, spermidine および spermine を照射中にそれぞれ添加した際、 m -IPG の放射線増感効果にどのような影響をあたえるかを調べた。その結果、Table 2 に示すように、putrescine および spermidine のみの添加では薬剤無添加に比べて菌数残存率に大きな差異が見られず、spermine に比べて菌数残存率75%となり、それ自身にわずかな致死作用の増強効果がみられた。次に m -IPG とポリアミンとの共存効果をみると、putrescine, spermidine および spermine の添加により、いずれも m -IPG のみの添加における菌数残存率よりも比較的高い値をしめした。

Table 2. Effects of Polyamines on Radiosensitization of *E. coli* B by m -IPG

Additives	Survival (%)
(a) none	100
m -IPG (2.5 mM)	40
putrescine (1 mM)	105
m -IPG (2.5 mM)+putrescine (1 mM)	55
(b) none	100
m -IPG (2.5 mM)	54
spermidine (1 mM)	89
m -IPG (2.5 mM)+spermidine (1 mM)	71
(c) none	100
m -IPG (2.5 mM)	21
spermine (1 mM)	75
m -IPG (2.5 mM)+spermine (1 mM)	47

Survival(%) expressed the relative viable counts of X-ray irradiated *E. coli* B with and without the additives and 100% survival means the counts for no additive. Irradiation dose: 15 krad.

以上の結果により、 m -IPG による *E. coli* B の放射線による致死作用の増強効果を3つのポリアミン、putrescine, spermidine および spermine がいずれも抑制する効果を示した。

4. 放射線照射中における m -IPG による *E. coli* B の核酸合成阻害作用に与えるポリアミンの影響

照射中に m -IPG により *E. coli* B の核酸合成に大きな阻害効果を与えることを III・1 で明らかにしたが、ここでは照射中に m -IPG とポリアミンとを共存した際の m -IPG による *E. coli* B の核酸合成阻害効果に与える影響を調べた。Table 3 に示すように、1 mM の put-

Table 3. Effects of Polyamines on Inhibition of DNA Synthesis of *E. coli* B by m -IPG during X-Ray Irradiation

Additives	³ H-Thymidine Incorporation (%)
none	100
m -IPG (2.5 mM)	13
putrescine (1 mM)	93
spermidine (1 mM)	105
spermine (1 mM)	61
m -IPG (2.5 mM)+putrescine (1 mM)	37
m -IPG (2.5 mM)+spermidine (1 mM)	65
m -IPG (2.5 mM)+spermine (1 mM)	57

E. coli B cell suspensions were irradiated with or without the additives with dose of 7 krad from X-ray under N_2 .

rescine および 1 mM の spermidine のみの添加と薬剤無添加との間には放射線による *E. coli* B の核酸合成阻害効果の割合は殆ど差異がみられなかったのに対して、spermine はそれ自身で放射線による *E. coli* B の核酸合成阻害効果をかなり増強した。これは III・3 で述べたように、放射線による *E. coli* B の致死作用においても現われた。これは spermine 水溶液における放射線分解物が *E. coli* B の致死作用に関与したものと思われる。次に、照射中にポリアミンが共存した際の m -IPG による *E. coli* B の核酸合成阻害作用の増強効果への影響をみると、putrescine, spermidine および spermine はいずれも m -IPG のみの添加の核酸合成阻害効果よりもかなり低下することが明らかとなった。この結果は III・3 で述べたポリアミンによる m -IPG の放射線増感作用の

抑制効果と相応するものである。しかるに、放射線による微生物細胞の致死作用の原因の1つに細胞膜損傷がある¹⁴⁾。又1 mMの spermidine あるいは spermine が浸透圧的作用あるいは音波処理に対して微生物細胞、*S. faecalis* の細胞膜を安定化させることが知られている¹⁷⁾。このようにポリアミンが *m*-IPG の放射線増感効果を抑制する作用機作は単なる保護効果ではなく、おそらくポリアミンにより *E. coli* B の細胞膜を安定化させることによって *m*-IPG の放射線増感作用を抑制したのではないかと考えられる。

要 旨

嫌気的条件下での放射線照射において *m*-IPG により *E. coli* B の致死作用および核酸合成障害作用が共に増強された。照射によるバクテリオファージ ϕ X174 の不活化の *m*-IPG 添加効果をみると、1 mM *m*-IPG の添加により放射線によるファージ不活化を大きく抑制した。更に、*m*-IPG の濃度を増すと徐々に無添加の効果に近づいた。*m*-IPG の放射線増感作用に対するポリアミン (putrescine, spermidine および spermine) の添加効果を調べた結果、いずれのポリアミンも *E. coli* B に対する照射中の *m*-IPG による致死作用および核酸合成障害作用の増感効果を抑制した。この効果はポリアミンにより *E. coli* B の細胞膜が安定したことによるものと思われる。

本研究の実施にあたりバクテリオファージ ϕ X174 を提供し、且つファージ実験を御指導下さいました三重大学助教授、柏村直樹博士に深く感謝いたします。本研究の概要は昭和57年度日本農芸化学大会で発表した。

Summary

Both lethal and inhibition effects of *E. coli* B were sensitized by *m*-IPG in the anaerobic condition during X-ray irradiation. The additional effect of *m*-IPG on radiation inactivation of bacteriophage ϕ X174 was examined. It was found that the radiation inactivation was reduced greatly by addition of 1 mM of *m*-IPG. Then, with increase of concentration of *m*-IPG more than 1 mM, the radiosensitization effect reached the level of no additive.

Effects of polyamines such as putrescine, spermidine, and spermine on the radiosensitization of *m*-IPG were examined.

All the polyamines reduced radiosensitizing effect on the lethality and inhibition of DNA synthesis of *E. coli* B by *m*-IPG. This effect may be considered to be due to stabilizing of the cell membrane of *E. coli* B.

文 献

- ADAMS, G. E., J. C. ASQUITH, D. L. DEWEY, J. L. FOSTER, B. D. MICHAEL and R. L. WILSON: Int. J. Radiat. Biol., **19**, 575 (1971).
- CHAPMAN, J. D., J. G. WEBB and J. BORSA: Int. J. Radiat. Biol., **19**, 561 (1971).
- ADAMS, G. E., J. C. ASQUITH, M. E. WATTS and C. E. SMITHEN: Nature-New Biol., **239**, 23 (1972).
- REUVERS, A. P., J. D. CHAPMAN and J. BORSA: Nature, **237**, 403 (1972).
- EMMERSON, P. T. and P. HOWARD-FLANDERS: Nature, **204**, 1005 (1964).
- 小宮孝志, 山田哲也, 奈良省三, 樋野勝重: 三重大学農学報, 第68号, 65 (1984).
- 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).
- KOMIYA, T., T. YAMADA, S. NARA, S. KAWAKISHI and M. NAMEKI: Agric. Biol. Chem., **48**, 817 (1984).
- 山崎泰英, 市原 明: 医学のあゆみ, **93**, p. 50, p. 611, (1975).
- 微生物生態研究会編: 「微生物の生態 8」, 学会出版センター, 東京, 1980, p. 10.
- KOENIGS, W. and E. KNORR: Ber., **34**, 957 (1901).
- KASHIMURA, N., J. MORITA and T. KOMANO: Carbohydr. Res., **70**, C3, 1979.
- 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.
- 本城市次郎, 崔 英治: 基礎放射線生物学, 南江堂, 京都, 1966, p. 209, p. 295.
- 山本 修: 放射線障害の機構, 学会出版センター, 東京, 1982, p. 382.
- CUNNINGHAM, L. W. and B. J. NUNKE: J. Biol. Chem., **234**, 1447 (1959).
- COHEN, S. S.: Introduction to the Polyamines, by Prentice-Hall, Inc., New Jersey, 1971, p. 111.