

Title	多環式キノン類の発癌スクリーニング
Sub Title	On the screening experiment for the carcinogenesis of polycyclic quinones.
Author	多田, 敬三(Tada, Keizo) 小田島, 成和(Odashima, Shigeyoshi) 石館, 基(Ishidate, Motoi)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1966
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.11 (1966.) ,p.63- 68
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000011-0063

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

多環式キノン類の発癌スクリーニング

多田 敬三, 小田島成和*¹, 石館 基*²

On the Screening Experiment for the Carcinogenesis of Polycyclic Quinones.

Keizo Tada, Narikazu Odashima, Motoi Ishidate

Together with 1,4-naphthoquinone, 9,10-phenanthrenequinone and 9,10-anthraquinone, *para* and *ortho* quinones of benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene (DBA) were screened for their carcinogenic activity by hypodermic injection and application methods. For each quinone, a group of 30 (male 15, female 15) mice was tested using DBA or 20-methylcoranthrene [MC] as the positive control.

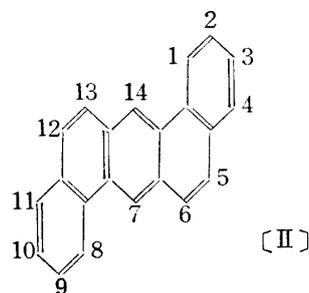
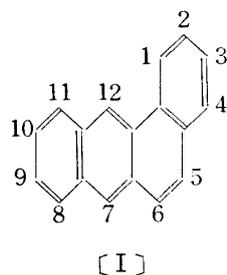
In addition to these experiments, two meso substituted (7-bromo and 7-nitro) benz[a]anthra-5,6-quinones were also investigated by using DBA and benz[a]anthra-5,6-quinone as the controls. A group of 50 male mice was tested for each compound and some histological observation followed.

All quinone tested were found to be noncarcinogenic in spite of the powerful carcinogenic activity on mice of DBA and MC.

Only the negative data were obtained, but were summarized in Tables and the results were discussed a little.

石館, 多田らは多環式炭化水素とくに benz[a]anthracene [I] (以下 BA と略す), dibenz[a,h]anthracene [II] (以下 DBA と略す) の発癌過程において, それらのキノイド型が中間体として重要な役割を演じているのではないかとの仮説をたて, これにもとづき数年来それら関連キノン類の合成¹⁾, ポーラログラフィー²⁾, 分離分析^{3,4)} 等を行ないつつ, 佐々木研究所の協力のもとに, マウスによるこれらキノン類の発癌スクリーニングを行なってきた。

キノン類は, 比較的ベンゼン環の少ない典型的なキノン類を含む, BA および DBA のパラキノン系とオルトキノン系に関するものと, [I] のメソ位 (7, 12 位) に置換基を有するオルトキノ

*¹ 財団法人 佐々木研究所.*² 財団法人 癌研究所.

1) Pharm. Bull: 投稿中 (薬学大会口頭発表).

2) Pharm. Bull: **2**, 266, 270, 272 (1954). **3**, 309 (1955). **6**, 426 (1958).3) 分析化学: **15**, 581 (1966).4) 本年報: No. **10**, 20 (1965).

ン (5, 6 キノン) 類に関するものである。

実験方法はキノン類によって多少異なったが、置換基のないキノン系列については、皮下注射法と塗布法を大体併用し、置換基を有するキノン類については、皮内注射を行なった。

実 験 の 部

I 化合物

1. パラキノン系列： 1,4-naphthoquinone (*p*-NQ) 試薬特級. m.p. 121~123°C; 9,10-anthraquinone (*p*-AQ) 市販 1 級品 (m.p. 249°C) を昇華法により精製. m.p. 269.5°C, benz[*a*]anthra-7,12-quinone (*p*-BAQ) 市販 BA を常法によりクロム酸塩—氷酢酸で酸化, アルミナクロマトにより精製後, キシレンで再結. m.p. 168°C; dibenz[*a, h*]anthra-7,14-quinone (*p*-DBAQ) 市販 DBA より *p*-BAQ と同様に合成, 精製, m.p. 265.5°C.

2. オルトキノン系列： 9,10-phenanthrenequinone (ph-Q) 市販 phenanthrene を常法によりクロム酸塩—硫酸で酸化後, NaHSO₃ で抽出, 希 HCl で分解後, EtOH で再結. m.p. 207°C; benz[*a*]anthra-5,6-quinone (*o*-BAQ), BA を OsO₄-ピリジンでジヒドロジオールとなし, 無水クロム酸—氷酢酸で酸化, キシレンで再結, m.p. 262~264°C, dibenz[*a, h*]anthra-5,6-quinone (*o*-DBAQ). DBA より, *o*-BAQ と同様に合成, 精製, m.p. 300°C 以上; 7-bromobenz[*a*]anthra-5,6-quinone (Br-BAQ)¹⁾ m.p. 298~300°C; 7-nitrobenz[*a*]anthra-5,6-quinone (NO₂-BAQ)¹⁾ m.p. 267~275°C.

II 実験動物 実験操作

(A) 皮下注射法 (Br-BAQ, NO₂-BAQ を除く上記キノン類).

被検物質および Control (DBA) は水にほとんど不溶であるので, 0.1% 生理食塩水のけん濁液を Tween 80 を用いて調製し, 15 分間滅菌したものを注射液とした. 各化合物について C₃H×ddF₁ マウス (1 群 3 匹) の背部両肩胛骨間の皮膚に, 最高 500 γ~1000 γ までの 7 段階に分けた量を 1 回注射して, 1 カ月間観察した. 生存率および解剖所見より, 各化合物の最大耐量を決定したが, Q-NQ は 250 γ/0.25 ml, *o*-BAQ, *o*-DBAQ は 1000 γ/1.0 ml, その他は 500 γ/0.5 ml を発癌実験に用いることを得た. なお鏡検の結果は, 脾臓の縮小, 肺臓の充血等若干の異常を認めたものが *p*-DBAQ の場合に数例あっただけで, 異常はほとんどなく, 化合物の吸収も, *p*-DBAQ を除いて比較的早かった. 本試験では, 各化合物について ♂, ♀ 各 15 匹ずつ 30 匹 1 群とした C₃H×ddF₁(*o*-DBAQ については ddN) マウスに, 毒性試験と同様に 1 回皮下注射し 10 カ月間観察後, 解剖した.

(B) 塗布法 (*o*-DBAQ, Br-BAQ, NO₂-BAQ を除く上記キノン類)

パラキノン類と phQ については DBA を Control とし, 各化合物につき C₃H×ddF₁ マウス ♀, ♂ 各 15 匹ずつ 30 匹を 1 群として用い, *o*-BAQ については, 20-methyl-colanthrene (MC) を Control とし, ddF₁ マウス ♀ 30 匹を用いた. 化合物は, 0.2~0.3% のベンゼン溶液を, あらかじめ脱毛させた背部両肩胛骨間の皮膚に, 週 2 回 (1 回約 1/20 ml) 滴下, 10 カ月間滴下と観察を継続した.

(C) 皮内注射 (Br-BAQ, NO₂-BAQ)

Positive Control として DBA を, negative Control として *o*-BAQ とオリーブ油を用いた. それぞれ, (A) において述べた方法で毒性試験を行なった後, 上記物質の 5 mg/ml の濃度のオリーブ油けん濁液を注射液とし, 各化合物について 0.4 ml (2 mg 担当) を, ♂ 50 匹を 1 群とする dd/大沢マウスの背部両肩胛骨間の皮膚に, 皮内注射を 1 回行ない, 12 カ月間観察した. その間, 体重測定の変化を 2 週間に 1 回記録し, 各群の平均体重曲線を作製した. 途中死亡したもので, 剖検時異常を認めたものは, 組織標本作製し, 12 カ月生存したのものについては, 全部解剖後, 組織標本作製し, それぞれ組織学的検索を行なった.

実験結果

(A), (B) の実験結果は Table I に, (C) の実験結果は Table II に総括した.

Table I. Results on screening of carcinogenesis by hypodermic injection [I] and application methods [A] for *ortho* and *para* quinones of benz[a]anthracene, DBA and some typical aromatic hydrocarbons.

	Compounds	Methods	Number of tested mice (NO)		Number of mice accidentally died (NA)		Number of tumor mice (NT)		ratio of tumor-mice (%) (NT/NO-NA) × 100	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
para quinones	DBA (Control)	I	15	15	2	2	6	4	46	31
		A	15	15	3	1	9	6	75	43
	<i>p</i> -NQ	I	15	15	8	12	0	0	0	0
	<i>p</i> -AQ	I	15	15	3	4	0	1	0	9
		A	15	15	2	6	0	0	0	0
	<i>p</i> -BAQ	I	16	14	0	1	0	0	0	0
		A	16	15	2	5	1	0	7	0
	<i>p</i> -DBAQ	I	15	15	2	7	0	0	0	0
A		14	16	3	4	0	1	0	8	
ortho quinones	<i>ph</i> -Q	I	15	15	0	1	0	0	0	0
		A	15	15	4	1	0	0	0	0
	<i>o</i> -BAQ	I	11	18	3	4	0	0	0	0
		A		30		11		0		0
	<i>o</i> -DBAQ	I	15	14	6	11	0	1	0	33
	MC (control)	A		30		12		17		94

Table I でわかる通り、Control の DBA と MC を除いてほとんどの化合物の腫瘍発生率は皮下注射においても、塗布法においてもゼロであった。

ただ、*p*-AQ が皮下注射で 1 例 (♀)、*p*-BAQ が塗布で 1 例 (♂)、*p*-DBAQ が塗布で 1 例 (♀)、*o*-pBAQ が皮下注射で 1 例 (♀) あるがいずれも偶発的なものと思われる。腫瘍発生はなかったが、*p*-NQ、*p*-AQ、*p*-BAQ の塗布実験に際して白毛化の数例があり、また *o*-DBAQ の皮下注射の場合局所壊瘍形成をかなり生じた。

つぎに Br-BAQ、NO₂-BAQ はメソ位に置換基を有する *o*-BAQ の誘導体の発癌性を検するために、その一環として行なったものであるが、Table II に示すごとく、腫瘍発生率は完全にゼロであった。なおこの実験で、*o*-BAQ は皮内注射 (オリーブ油) という前と異なった条件でも発癌性のないことが確かめられた。Positive control である DBA は、これに対してこの条件では、皮下注射 (生理食塩水) および塗布によるよりもはるかに高い発癌率を示すことがわかった。

なお、発癌率に直接関係がなかったが、それぞれの群につき、2 週間毎に体重を測定し、各飼育箱別 (1 箱のマウス 10 匹、事故死があれば減少する) の平均体重を曲線にした。NO₂-BAQ

群のみ注射後、5カ月目より体重が減少し、9カ月後に復帰した。その他のものはほぼ正常な体重増加を示した。Fig 1に NO₂-BAQ 群の体重変化曲線を示す。

Table II. Results on screening of carcinogenesis by intracutaneous injection for meso substituted benz[a]anthra-5,6-quinones.

Compounds	Number of tested mice (NO)	Number of mice accidentally died (NA)	Number of tumor mice (NT)	Ratio of tumor-mice (%) (NT/NO-NA) × 100
Olive oil (control)	♂ 50	31	0	0
DBA (control)	♂ 50	12	12	90
<i>o</i> -BAQ (control)	♂ 50	32	0	0
Br-BAQ	♂ 50	13	0	0
NO ₂ -BAQ	♂ 50	15	0	0

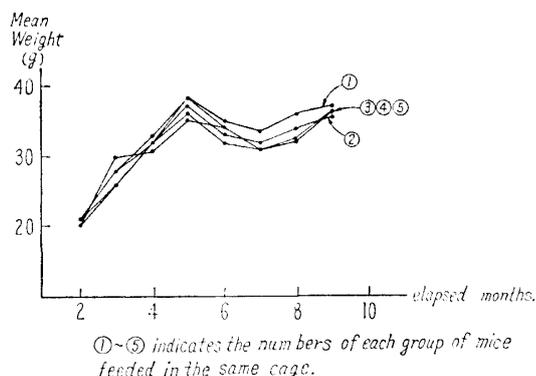


Fig. I Change of Mean Weight for each group of Mice treated with NO₂-BAQ

以上の発癌結果はすべて肉眼的所見によったものであるが、これをさらに組織学的に検索を行なった。すなわち実験期間中に死亡した動物のうち、剖見所見の際とくに異常を認めた例、および実験終了後生存した全例について、注射部位の皮膚、肺、肝臓、脾臓、小腸、腎臓および肥大淋巴節を10%ホルマリン溶液で固定後、パラフィン組織切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色を行なった。Table IIIにこれらの組織学的検査の結果の概要を総括する。

Table IIIに示すごとく、組織学的検査の結果も、DBA以外のものはすべて腫瘍の発生がなかったことを明らかにした。なお、NO₂-BAQ群の腎臓組織はDBA群のそれによく近似して老化現象著しい上に、膿瘍形成を伴う炎症性細胞浸潤や尿毒症などの腎臓障害を起こした点は体重変化の異常とともに、何等かの作用があったことを示している。

討 論

Heiderberger等はC¹⁴を含むDBAと蛋白との結合実験⁵⁾において、その30%が5,6位すなわち“K領域”で組織蛋白と結合することを示し、酸アミドを取り出した。その酸アミド形成の中間体として、5,6位の炭素と蛋白部のNとSchiff-base型に結合すること、その前提と

5) C. Heiderberger et al., : J. Am. Chem. Soc, **77**, 2877 (1955).

Table III. Results on Histological Investigation for mice treated with meso substituted benz[a]anthra-5,6-quinones.

Organs Compounds	Liver	Spleen	Lung	Kidney	Tissue Skin injected
Olive Oil	S 10/25 I 5/17	H ‡	Ad 2/17		
DBA	S, H + I ‡ P + M 6/20	H ‡	Ad 5/8	Ag ‡ M 3/9	T
BAQ	S 11/23 I ‡			Ag +	
Br-BAQ	H 5/14 S, I +	H 6/12	I +	I +	
NO ₂ -BAQ	S 10/27 H 6/27 I 11/27	H 11/12 I ‡	Ad 1/8	Ag 7/17 I ‡	

H: Hyalin like degeneration.

S: Swelling of parenchymatous cells accompanied with fatty degeneration.

I: Infiltration of inflammatory cells.

Ad: Adenoma (Partly).

T: Tumor (almostly fibrosarcoma, partly spindle cell sarcoma).

M: Hematogenous metastasis of tumor cells.

P: Proliferation of parenchymatous cells like adenoma.

Ag: Aged phenomena.

して DBA が 5,6-キノイド型を取ることを予想した。しかるにその後の同氏の C¹⁴ を含む DBA 誘導体および類似炭化水素類と蛋白との一連の結合研究⁶⁾ において、*o*-DBAQ は結合性が非常に乏しいこと、そして発癌性もないことを示した。一方われわれは、蛋白との結合実験を追化した訳ではないが、発癌実験によって、前述のごとく、パラおよびオルトキノノン系ともに、BA, DBA までのベンゼン環類の範囲内では、発癌性が±である BA はメソ位に置換基を入れると大なり小なり発癌性を生じるが、臭素、ニトロ基に関する限り、これらの置換基を有する BA のオルトキノノンも発癌性をかえって消失することを明らかにした。

Heiderberger 等は、蛋白との結合性が強いかわいかわいということが、発癌性を示す必要条件(充分条件ではないが)であると提唱⁶⁾ している。蛋白の NH₂ 部 (S ではない) との結合が、炭化水素と直接か、そのままで結合するのか、キノイド型あるいはその他の酸化中間型⁷⁾ で結合するのか不明である現在、化学的常識からみて、結合し易い形であるキノイド型を持ったキノン類を最初から与えればかえって発癌性を消失し、かつ *o*-DBAQ だけについてであるが蛋白結合性もほとんど消失するという事実は非常に注目すべきであろう。しかしこの事実だけでは生体内において中間体にこれらキノン類ないし酸化中間体が生じ、これらがある役割を演じているという

6) C. Heiderberger et al., : Cancer Research, **13**, 246, 250, 255 (1953); **16**, 442 (1956); **18**, 1094 (1958).

7) Boylland et al., : Biochem. J. **97**, 7~16 (1965).

可能性を完全に否定する訳にはいかないであろう。

今後の方針としては、この中間酸化物およびキノン類と蛋白結合度の問題に焦点を合わせていく方針である。

本研究は、文部省科学研究“癌特定研究班”の一つである化学物質による発癌性研究班の一員として、本研究室が、財団法人佐々木研究所の協力を得て、数年にわたって行なって来たものである。合成および分離分析研究は今なお続行中であるが、動物実験に一応区切りをつけた機会に、当初の期待に反する negative な結果に終わったが、発癌研究という大きな目標に向ってのその一つの参考資料になり得れば幸いと思って、敢えて発表した次第である。

終りに終始御指導をいただいた恩師石館守三先生に深い謝意を表するとともに、本研空の動物実験に長期にわたり引き継ぎ協力を得た本学薬学士（当時学生）岩下靖子、工藤恵子、矢田久子、武川澄子、清水 緑、宮 光江、高橋千代、田丸央子、三浦まり子、山崎節子、森下桂子、渡辺綾与、中村比呂子、山口典子の諸氏の御協力に厚くお礼申し上げます。なお新化合物の合成は未発表であるが、本研究室員 滝谷玲子、中込浩子、岩崎紀和子が行なったものであり、IR, UV に関しては本学石原研究室の、また元素分析については慶大医学部元素分析室の援助をそれぞれいただいたことを感謝の意とともに附記します。