

総 説

水溶性フェノキサジンの生物活性作用 Bioactivities of water-soluble phenoxazines

友 田 燁 夫¹⁾²⁾

¹⁾東京医科大学生化学講座

²⁾東京医科大学難治性免疫疾患研究センター

はじめに

フェノキサジン化合物 (phenoxazine) は、1940 年代に発見され癌の化学療法剤として応用されたアクチノマイシン D¹⁾ の骨格成分である (図 1)。アクチノマイシン D とその誘導体化合物の化学構造については、ドイツの Brockmann らが精力的に検討した^{2,3)}。しかしながら、アクチノマイシン D とその誘導体は抗癌作用は強いが副作用も強いことから現在では臨床的にはほとんど用いられておらず、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼの特異的阻害剤として名をとどめているに過ぎない⁴⁾。また化学合成した種々のフェノキサジン化合物がほとんど生物活性を示さないことから^{5,6)}、フェノキサジンは医学の領域では忘れ去られていた感がある。筆者は種々の酸化剤によるヘモグロビンの酸化還元反応を調べていたときに偶然、3-ヒドロキシアントラニル酸がヘモグロビンによってシンナバリン酸というフェノキサジン化合物に代謝されることを見出した⁷⁾。これが発端となって、種々の芳香族化合物、とくにオルトアミノフェノール誘導体のフェノキサジンへの代謝反応が筆者らにより発見された⁸⁻¹¹⁾。これらの反応で合成されるフェノキサジン化合物は比較的水溶性であり、しかも抗腫瘍作用など多彩な生物活性をもつことが明らかとなってきた¹²⁻²²⁾。梅毒の特効薬として化学療法の嚆矢となった秦と Ehrlich によるサルバルサン (Salvarsan) がオルトアミノフェ

ノールの砒素化合物であったことを想起するならば、また本年 9 月には Ehrlich 生誕 150 年記念の国際学会 (World Conference of Dosing of Antiinfectives) がニュールンベグで開催されたことから、オルトアミノフェノールを出発物質として合成される水溶性フェノキサジンの生物活性について retrospective あるいは perspective な見地から見直して良いのでないかと思われる。

本論文では筆者らが見出した水溶性フェノキサジンの生物活性について仮説を織り交ぜながら以下の点について解説したい。

I. シンナバリン酸の生合成と生物活性、II. キサントマチンについて、III. オルトアミノフェノールによるヘモグロビンの酸化還元反応と 2-アミノフェノキサジン-3-オンの生成、IV. 抗腫瘍活性をもつ水溶性フェノキサジン、V. 水溶性フェノキサジン Phx-1、Phx-2、Phx-3 の種々の抗微生物活性、VI. Phx-1 および Phx-2 の活性型リンパ球に対する抑制作用、VII. 水溶性フェノキサジン化学構造のもつ意義について。

I. シンナバリン酸の生合成と生物活性

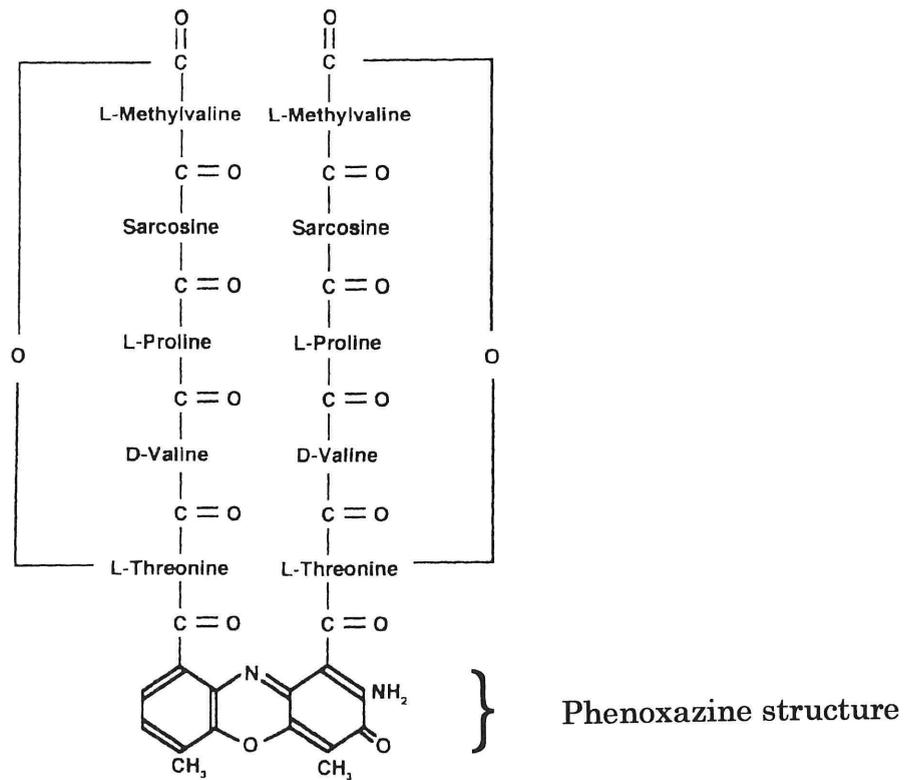
シンナバリン酸 (cinnabarinic acid) は筆者らの水溶性フェノキサジン化合物の発見の糸口となったことから、この化合物から解説を行う。

私達はオルトアミノフェノール誘導体であり、生体内物質である 3-ヒドロキシアントラニル酸 (3-

2004 年 8 月 25 日受付、2004 年 9 月 21 日受理

キーワード: Water-soluble phenoxazines, bioactivities

(別冊請求先: 〒 160-8402 東京都新宿区新宿 6-1-1 東京医科大学生化学講座 友田燁夫)



Actinomycin D

Fig. 1 Chemical structure of actinomycin D

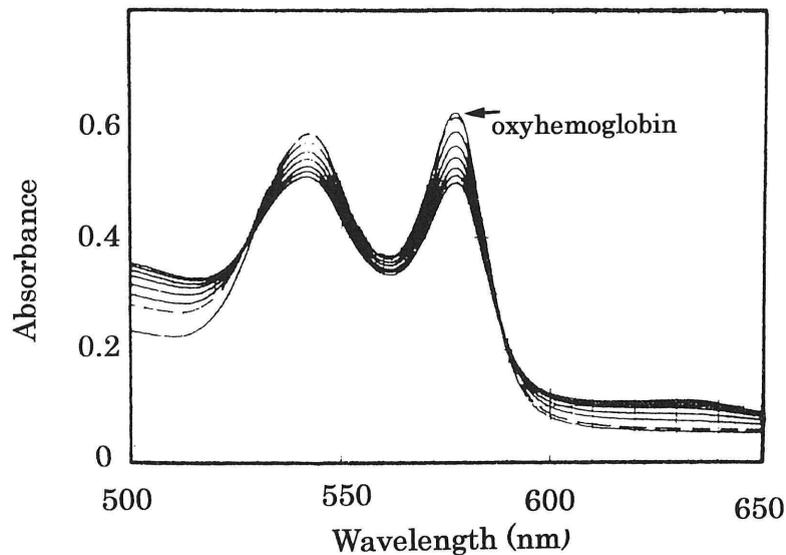


Fig. 2 Changes in absorption spectra of oxyhemoglobin caused by the addition of 3-hydroxyanthralinic acid. Final concentration of 500 μ M 3-hydroxyanthralinic acid was added to oxyhemoglobin solution (100 μ M in heme), and the reaction was performed at 25°C for 30 min. The changes in absorption spectra of oxyhemoglobin were pursued between 500 nm and 650 nm. The increase in absorbance at 630 nm and decrease in absorbance at 578 nm are characteristic for the oxidation of oxyhemoglobin.

Table 1 Rates of oxidation of oxyhemoglobin and those of reduction of methemoglobin by 3-hydroxyanthralinic acid (3-HAT) and 3-hydroxykynurenine (3-HKN).

Oxidation rates of oxyhemoglobin ($\mu\text{M}/\text{min}$)		Reduction rates of methemoglobin ($\mu\text{M}/\text{min}$)	
(+) 3-HAT	(+) 3-HKN	(+) 3-HAT	(+) 3-HKN
0.52	0.52	1.75	0.31

hydroxyanthranilic acid, 3-HAT) を赤血球浮遊液に添加したところ、見る見るうちに赤血球の鮮紅色は褐色へと変化した⁷⁾。このことは3-ヒドロキシアントラニル酸が赤血球内のヘモグロビンを酸化していることに他ならない。そこで精製したヘモグロビンを用いて3-ヒドロキシアントラニル酸によるヘモグロビンの酸化還元反応を調べた。その結果、図2に示すように、オキシヘモグロビンは3-ヒドロキシアントラニル酸により容易に酸化されることが示された。また酸化型ヘモグロビンであるメトヘモグロビンに3-ヒドロキシアントラニル酸を添加すると、メトヘモグロビンは還元されることが示された(表1)。さらに、オキシヘモグロビンと3-ヒドロキシアントラニル酸の反応液をセファデックス G-25 (fine) カラムにのせ、溶出すると、ヘモグロビン以外に鮮やかなオレンジ色の化合物が存在することが明らかとなった。図3は赤血球浮遊液に3-ヒドロキシアントラニル酸を添加し、一定時間ごとに上清を回収して吸収スペクトルを得た結果を示す。時間とともに、450 nm に特徴的なピークをもつ吸収スペクトルが得られた。この化合物を種々の物理化学的方法により同定すると、3-ヒドロキシアントラニル酸が2分子縮合したシンナバリン酸であることが分かった。シンナバリン酸の合成反応とその化学構造式を図4に示す。3-ヒドロキシアントラニル酸は生体ではトリプトファンから3-ヒドロキシキヌレニンを経て、合成される。最終的には3-ヒドロキシアントラニル酸はNADに代謝されるが、シンナバリン酸へ

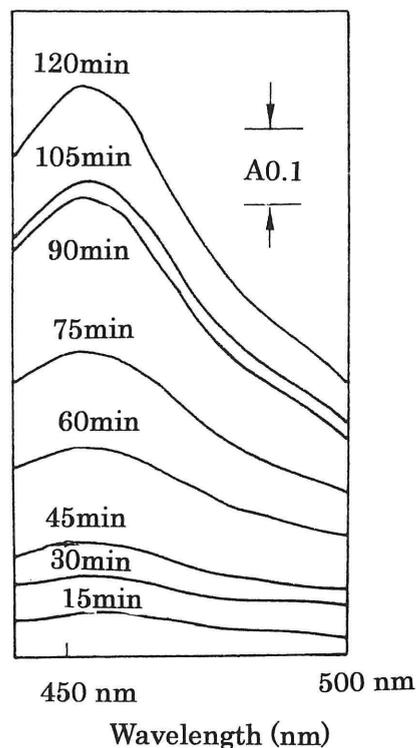


Fig. 3 Time course of cinnabarinic acid formation during incubation of human erythrocytes with 3-hydroxyanthralinic acid (3-HAT). Absorption spectra of the samples obtained by the reaction mixture of human erythrocytes and 3-HAT. The erythrocytes were incubated with 3-HAT at 37°C for 2 hours. The samples were taken out at intervals for analysis. The hemolysates were passed through a column of Sephadex G-25 (fine grade). The orange-colored portions of the effluent were collected and measured spectrophotometrically between 440 nm and 500 nm.

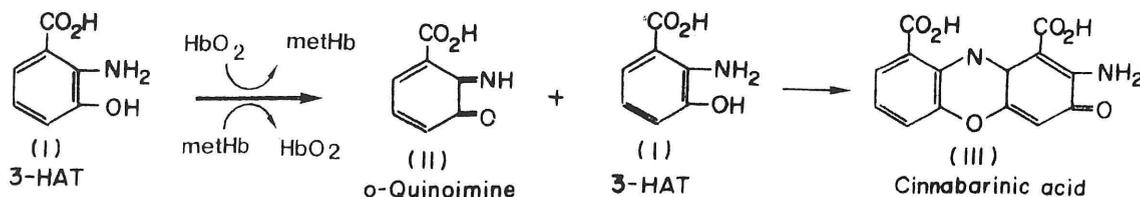


Fig. 4 Process of cinnabarinic acid formation during the oxido-reductive reactions of hemoglobin with 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAT). 3-HAT is oxidized by oxyhemoglobin or methemoglobin, while oxyhemoglobin is oxidized by 3-HAT or methemoglobin is reduced by 3-HAT. *o*-Quinoimine is an oxidized form of 3-HAT

の合成経路は知られていなかった。赤血球内では3-ヒドロキシアントラニル酸 (3-HAT) はまずヘモグロビンとの反応でキノイミン型に酸化され、さらに3-ヒドロキシアントラニル酸 (3-HAT) と2分子縮合し、シンナバリン酸になる。この反応にはベンゼン環に水酸基とアミノ基とが隣り合せの位置、すなわちオルトの位置にあることが必要であり、フェノキサジンの生合成反応に共通する特徴である。ヘモグロビン以外にはカタラーゼ、チトクローム C のようなヘム蛋白質が2-ヒドロキシアントラニル酸を酸化縮合し、シンナバリン酸を生成させることが報告されている²³⁾。また、シンナバリン酸はある種の真菌類で合成され²⁴⁾、それが抗生物質作用をもつこと、ミトコンドリアの呼吸系酵素の作用を抑制することなどが報告されている²⁵⁾。

II. キサントマチンについて

3-ヒドロキシアントラニル酸の前駆体物質でありオルトアミノフェノール骨格をもつ3-ヒドロキシキヌレニン (3-HKN) とヘモグロビンとの反応で生成される化合物について検討をおこなった⁹⁾。その結果、3-ヒドロキシキヌレニンはオキシヘモグロビンを酸化するとともにメトヘモグロビンを還元する作用をもつこと、また3-ヒドロキシキヌレニンはこれらの反応過程でキサントマチン (xanthommatin) という褐色のフェノキサジン化合物に変化すること、などが明らかとなった (図5)。3-ヒドロキシキヌレニンもベンゼン環に水酸基とアミノ基とが隣り合わせにあるオルトアミノフェノールの誘導体である。図5に示すよう

に、3-ヒドロキシキヌレニンはヘモグロビンとの反応によりキノイミン型に酸化され、さらに2分子縮合し、キサントマチンへと代謝される。これまでキサントマチンは生体物質としては知られていないが、この反応は生体でもキサントマチンが生合成されうるといふ1例である。

キサントマチンは Butenandt ら^{26,27)} が精力的に研究したフェノキサジン化合物であり、多くの昆虫の眼の光センサー色素として、また特定の昆虫の羽根の成分として位置づけられている。一方、褐色白内障の患者の水晶体は暗褐色であり、視覚的にはキサントマチンの色に類似している。従来より、褐色白内障の水晶体の褐色物質の本体は多くの研究者が分析したものの、不明であった。しかしながら、老人性白内障の水晶体の褐色物質は水晶体蛋白質であるクリスタリンに形成されている、水晶体には3-ヒドロキシキヌレニンが一定濃度溶解している²⁸⁾、褐色物質の生成に関してキノイド説 (芳香族化合物、例えばキノン誘導体による白内障生成説) が荻野により提示されていた²⁹⁾、太陽紫外線による酸化反応が褐色物質の生成に関与する^{30,31)}、などの有力なデータがあった。筆者らは褐色物質の本体は3-ヒドロキシキヌレニンの酸化によって生成されたキサントマチンでないかと考え、1988年より金沢大学医学部眼科教室と協力して老人性白内障 (=褐色白内障) の水晶体について分析を行った^{32,33)}。図6は軽症 (Pirie I型) と重症 (Pirie IV型) の老人性白内障水晶体を示す。軽症の水晶体は薄黄緑色で半透明で柔らかい。一方、重症のいわゆる褐色白内障水

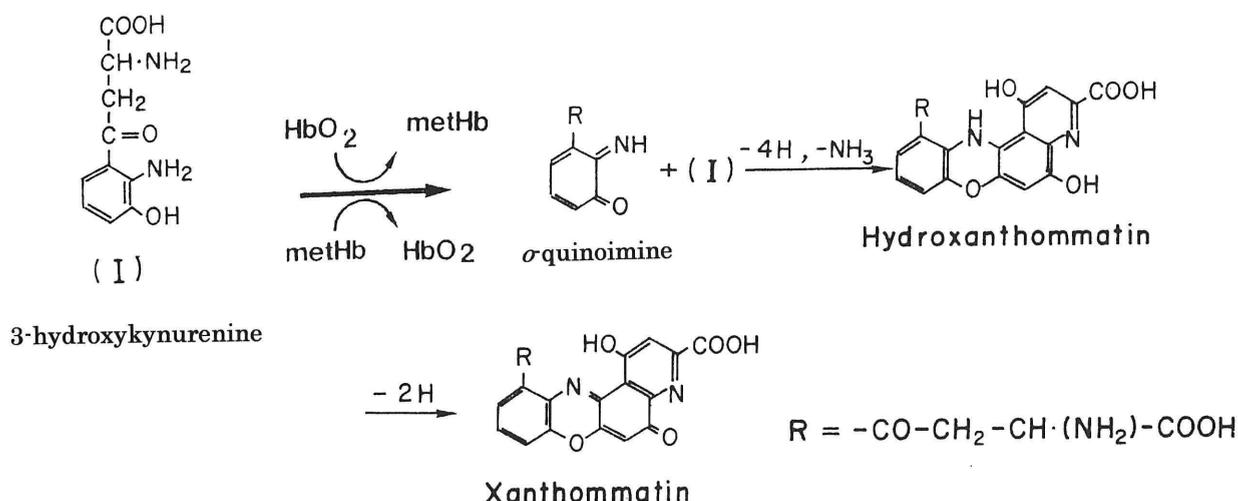


Fig. 5 Process of xanthommatin formation during the oxido-reductive reactions of hemoglobin with 3-hydroxykynurenine (3-HKN). 3-HKN is oxidized by oxyhemoglobin or methemoglobin, while oxyhemoglobin is oxidized by 3-HKN or methemoglobin is reduced by 3-HKN. *o*-Quinonimine is an oxidized form of 3-HKN.

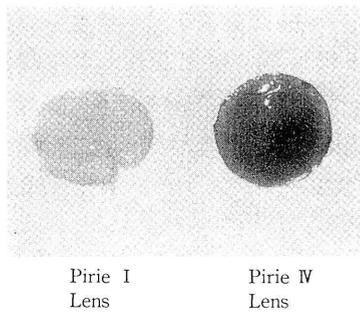


Fig. 6 Samples of Pirie I and Pirie IV lenses.

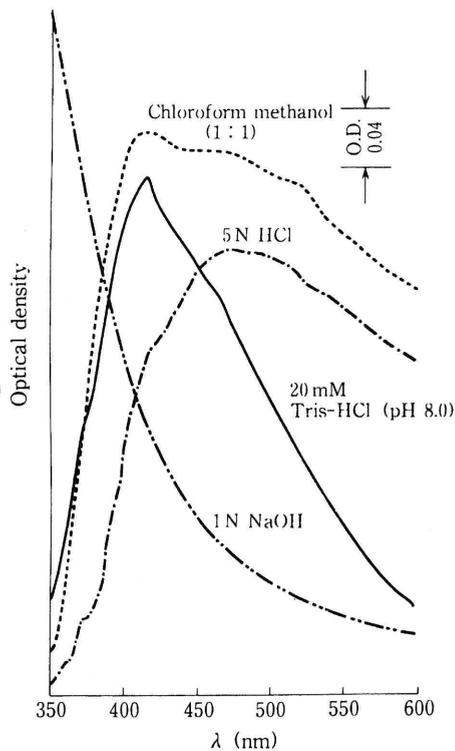


Fig. 7 Absorption spectra of the homogenates of brunescant cataractous lenses with high pigmentation under different conditions. The absorption spectra were measured at different pHs and in 1:1 chloroform/methanol solution.

晶体は暗褐色で、不透明で非常に硬い。この褐色物質は蛋白質成分からの抽出が難しく、私達はクリスタリン内部に褐色物質が形成されていると推測せざるを得なかった。そこで、私達は重症と軽症の老人性白内障患者から得た水晶体蛋白質について吸収スペクトルの測定を行った。その結果、重症白内障水晶体の褐色物質の吸収スペクトルは種々の条件でキサントマチンと良く一致することが明らかとなった (図7)。この結果から、私達は老人性白内障水晶体の褐色化について図8のようなメカニズムを提唱した。まず水晶体蛋白質のクリスタリンを構成するアミノ酸であるト

リプトファンが太陽紫外線によりクリスタリン内部で3-ヒドロキシキヌレニンへと代謝される。次いでクリスタリン中に生成した3-ヒドロキシキヌレニンは太陽紫外線の酸化作用により水晶体の細胞質部分に溶解している3-ヒドロキシキヌレニンと縮合反応をおこし、クリスタリンの中にキサントマチンあるいはその類似物質が形成されるという考えである。クリスタリンから褐色物質の抽出が難しいのは共有結合で蛋白質内部に存在しているためであろうと考えられる。蛋白質の中に低分子化合物が形成される特異な例として、サイログロブリン中に形成されるサイロキシンがある。しかしながら、水晶体の不溶性クリスタリンから褐色物質を抽出して化学構造の決定がなされていないことから、老人性白内障水晶体の褐色物質の本体については未解決である。なお、1950年代に大阪大学の荻野周三博士が開発し、眼科領域で白内障予防薬として広く使用されているカタリン³⁴⁾の本体は化学合成されたキサントマチンであること、昆虫の眼の光感受性物質や赤蚕の赤褐色色素もキサントマチンであることも、褐色白内障水晶体と関連して興味深い。

III. オルトアミノフェノールによるヘモグロビンの酸化還元反応と2-アミノフェノキサジン-3-オン (Phx-3) の生成について

オルトアミノフェノールは3-ヒドロキシアントラニル酸や3-ヒドロキシキヌレニン同様、ベンゼン環のオルトの位置に水酸基とアミノ基をもつ単純な化合物である。オルトアミノフェノールは従来よりメトヘモグロビン血症を引き起こす物質^{35,36)}として知られているが、メタアミノフェノールやパラアミノフェノールと異なり腎毒性がほとんどない³⁶⁾。これは図9に示すようにオルトアミノフェノールが毒性のない2-アミノフェノキサジン-3-オン (Phx-3) に迅速に代謝されるためと考えられる^{8,37)}。私達はオルトアミノフェノールがオキシヘモグロビンを酸化するとともに、メトヘモグロビンを還元する作用もあること、またこの反応過程でPhx-3が生成されることを明らかにした。これらの反応は赤血球レベルでも起こる⁸⁾。

VI. 抗腫瘍活性をもつ水溶性フェノキサジン

筆者らはオルトアミノフェノール型の芳香族化合物がヘモグロビンの酸化還元作用をもつとともに、同時に自分自身はその反応によりフェノキサジン化合

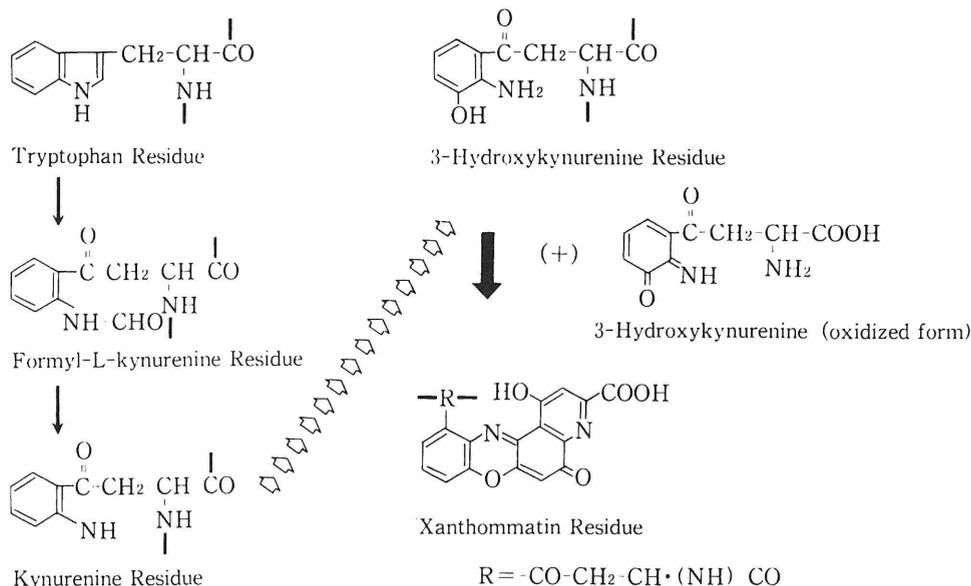


Fig. 8 Mechanism of xanthommatin formation in crystalline of the lens.

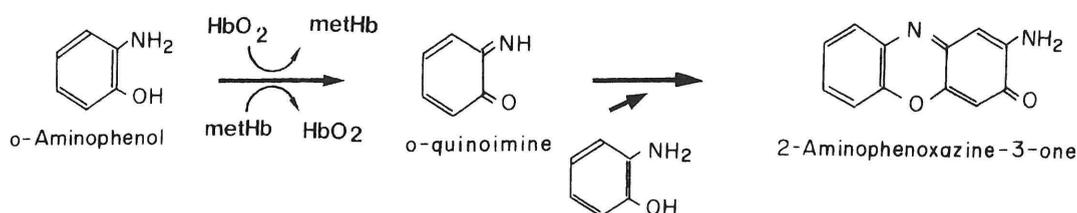


Fig. 9 Process of 2-aminophenoxazine-3-one (Phx-3) formation during the oxido-reductive reactions of hemoglobin with *o*-aminophenol. *o*-Aminophenol was oxidized by oxyhemoglobin or methemoglobin, while oxyhemoglobin is oxidized by *o*-aminophenol or methemoglobin. *o*-Quinonimine is an oxidized form of *o*-aminophenol. mRNA expressions of IL-8, MCP-1 and RANTES, detected by RT-PCR, in HDMEC 8 h after treatment with neurotransmitters or TNF- α . SP: substance P (10^{-4} M), NA: noradrenaline (10 ng/ml), CGRP: calcitonin gene-related peptide (10^{-6} M), TNF- α : tumor necrosis factor- α (500 U/ml).

物に代謝されることを見出した。フェノキサジンは癌の化学療法剤として発見されたアクチノマイシン D (図 1) の骨格をなしているが、このことはフェノキサジン自身が抗腫瘍作用を示す可能性があることを示唆する。しかしながら、アクチノマイシン D と数多くのアクチノマイシン D 誘導体の抗癌作用について 1950 年代に縦断的に検討がなされたが、アクチノマイシン D を越える化合物が発見されなかったことから、フェノキサジン化合物の抗癌作用については顧みられることはなかった。1991 年には化学合成したフェノキサジン化合物には抗癌作用はほとんどないことを Motohashi らが報告しているほどである⁵⁾。

1985 年より筆者は金沢大学医学部癌研究所の越村三郎博士とともに、種々のオルトアミノフェノール誘導体とヘモグロビンとの反応で生合成される水溶性フェノキサジン化合物を分離し、それらの化合物の抗

腫瘍作用について検討を開始した。図 10 にヘモグロビンとの反応で種々の水溶性フェノキサジン合成に使用されたオルトアミノフェノール誘導体を示す。これらの化合物のうち、2-アミノ-5-メチルフェノール、2-アミノ-4-メチルフェノール、およびオルトアミノフェノールから合成される Phx-1、Phx-2、Phx-3 はマウスを用いた癌細胞株の移植実験で強い抗腫瘍作用を示すとともに、副作用も非常に少ないことが初期の段階で明らかとなった^{38,39)}。しかしながら、2-アミノ-3-メチルフェノール、2-アミノ-6-メチルフェノール、2-アミノ-3-カルボキシ-6-メチルフェノールから合成される水溶性フェノキサジン、Phx-4 Phx-5 Phx-6 はマウスに対して副作用が強く、マウスの死亡例が多かったことから以後の抗腫瘍作用の実験には使用しなかった。またシンナバリン酸およびキサントマチンも水溶性フェノキサジンに含まれるが抗腫瘍作用は少なかっ

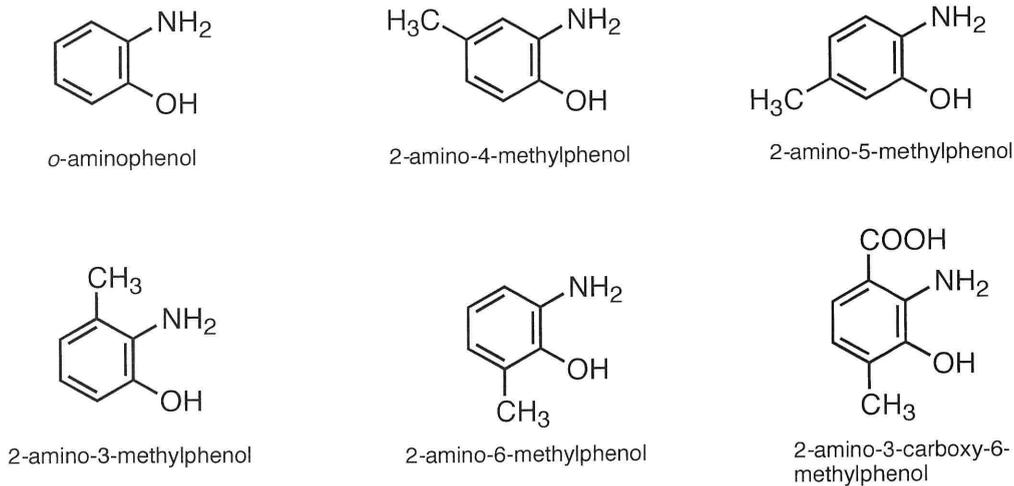


Fig. 10 Chemical structures of various *o*-aminophenol derivatives used for the biosynthesis of water-soluble phenoxazines during the oxido-reductive reactions of hemoglobin.

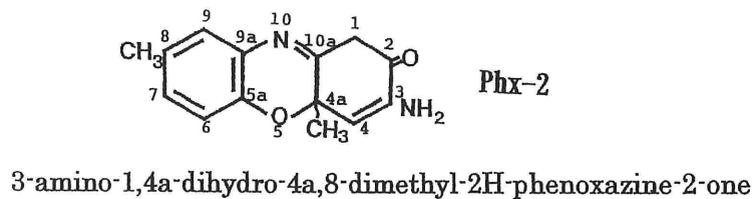
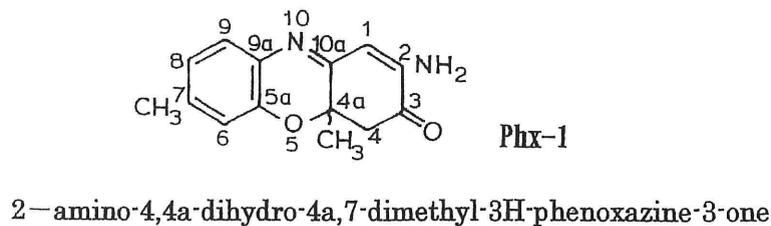


Fig. 11 Chemical structures of Phx-1, Phx-2 and Phx-3. These water-soluble phenoxazines were biosynthesized by the oxido-reductive reactions of bovine hemoglobin.

たので本研究からは除外した。

図 11 はヘモグロビンとの反応で生合成された Phx-1 Phx-2 Phx-3 の化学構造を示す (これらの構造決定には 1985 年以降、数年を要した)。筆者と共同研究者らはこれらの水溶性フェノキサジンのうち、Phx-1 を

中心に抗腫瘍作用を詳しく検討した。それらの結果を表 2 にまとめる。すなわち、Phx-1 は Meth A carcinoma cells¹³⁾, KB cells¹²⁾, human leukemia cells (K562, HL-60, HAL-02)¹⁴⁾, human lung adenocarcinoma (A549, H226)²⁰⁾, Burkitt lymphoma (P3HR-1)¹⁵⁾,

Table 2 Inhibitory effects of Phx-1 on various carcinoma cell lines

	Dose to cause 50% inhibition of cell or tumor growth	
	μM	mg/kg*
Meth A carcinoma cells	—	5
KB cells (human epidermoid cell carcinoma)	20	—
Human leukemia cells (K562, HL-60, HAL-02)	5	2
Human lung adenocarcinoma cells (A549, H226)	50-70	—
Burkitt lymphoma (P3HR-1)	20	—
Human T cell lymphoblastoid cells (Molt-49)	40	—
Human endometrial adenocarcinoma cells (EN, KLE)	50-100	—
Glioma cells (rat C6)	2	0.02**

* Phx-1 was administered to mice, subaxillarily, once a day for 2 weeks.

** Rat C6 glioma cells were transplanted in nude mice, and Phx-1 was administered subaxillarily, once a day for 2 weeks.

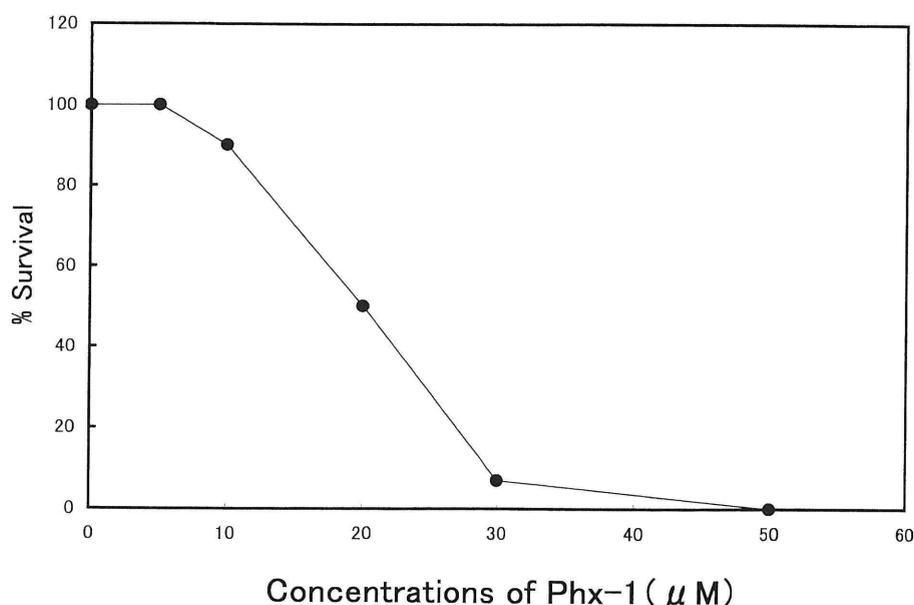


Fig. 12 Anti-proliferative effects of Phx-1 on human epidermal carcinoma cell line, KB cells at various concentrations.

human T cell lymphoblastoid cells (molt-4)¹⁵⁾、human endometrial adenocarcinoma cells (EN, KLE)¹⁹⁾ および glioma cells (rat C6)⁴⁰⁾ などの癌細胞株に対して、in vitro および in vivo の実験系で抗腫瘍作用を示した。Phx-1 は in vitro では 2~100 μM 濃度の範囲で抗腫瘍作用を示し、in vivo ではマウスの実験で 0.02~5 mg/kg の投与量で癌細胞の増殖を抑制した。Phx-2 および Phx-3 も Phx-1 と同様に抗腫瘍作用を示すが、細胞株によって作用の強さは異なっている。

図 12 は KB cells (ヒト類上皮細胞癌) に対する Phx-1 の典型的な増殖抑制作用を示す。KB cells は 30 μM 以上の濃度でほぼ 100% 増殖が抑制された。そこ

で、in vivo での Phx-1 の癌細胞増殖抑制作用をマウスを用いて調べた (図 13)。この場合、比較のために強い抗癌剤である 5-FU を用いた。その結果、マウスに移植された Meth A carcinoma cells は 5 mg/kg の投与量で腫瘍サイズが約 40% 縮小した。一方、5-FU を投与した場合は 7.8 mg/kg の投与量で腫瘍サイズが約 50% 縮小した。図 14 と図 15 はマウスに対する Phx-1 の副作用を 5-FU と比較して検討したものである。図 14 に示すように、15.6 mg/kg の 5-FU 投与ではマウスの体重は投与 10 日後に極端に減少し、死亡した。一方、Phx-1 投与群では 20 mg/kg 以内では体重減少もなく、死亡例もなかった。図 15 は Phx-1 と 5-FU の血液細胞

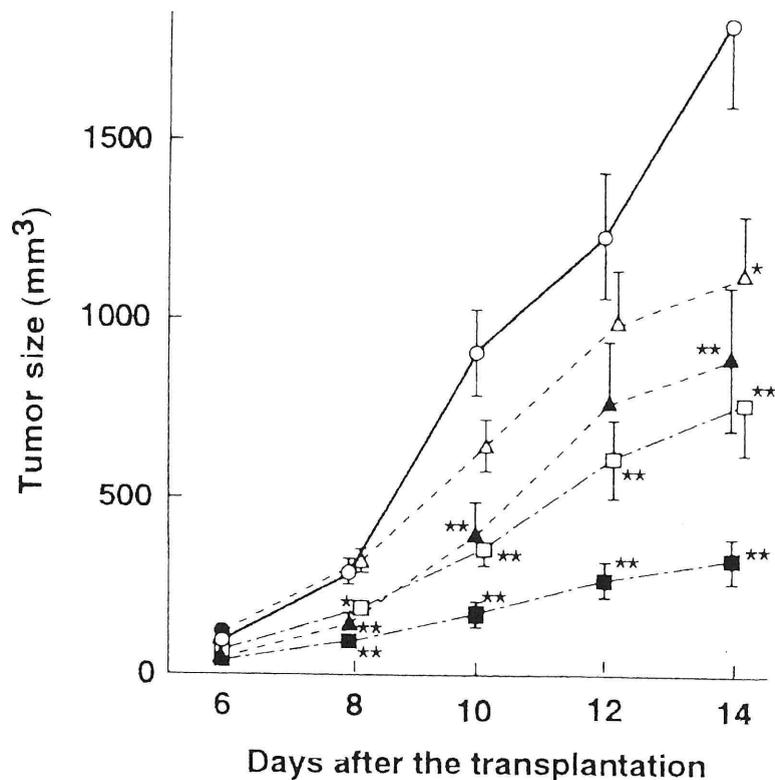


Fig. 13 Effect of Phx-1 and 5-FU on Meth A tumor growth in mice. BALB/c female mice, 8 weeks old, were transplanted s. c. with 10^6 Meth A cells on day 0 and then daily given the compounds i.p. for 14 consecutive days starting with the day of transplantation. ○, Control; △, Phx-1 1 mg/kg; ▲, Phx-1 5 mg/kg; □, 5-FU 7.8 mg/kg; ■, 5-FU 15.6 mg/kg. Each group included 10 mice except for the group dosed with Phx-1 5 mg/kg (nine mice). Data represent the means \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ versus control.

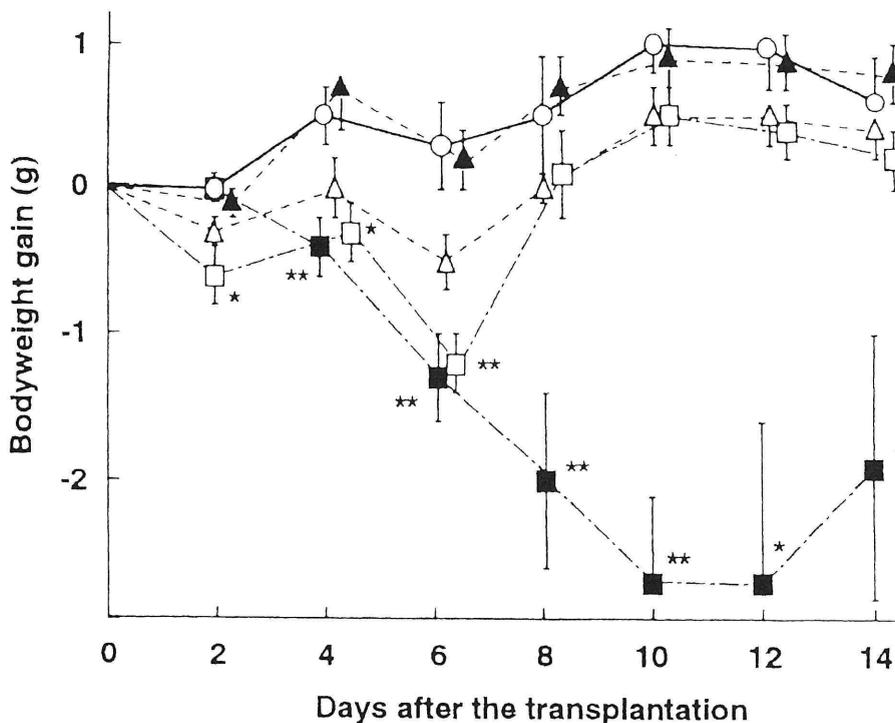


Fig. 14 Effect of Phx-1 and 5-FU on body weight of mice. See legend to Fig. 12 for the experimental protocol. The initial body weight of the mice was 19.2 ± 0.13 on day 0. ○, Control; ▲, Phx-1 10 mg/kg; △, Phx-1 20 mg/kg; □, 5-FU 7.8 mg/kg; ■, 5-FU 15.6 mg/kg. Data represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ versus control.

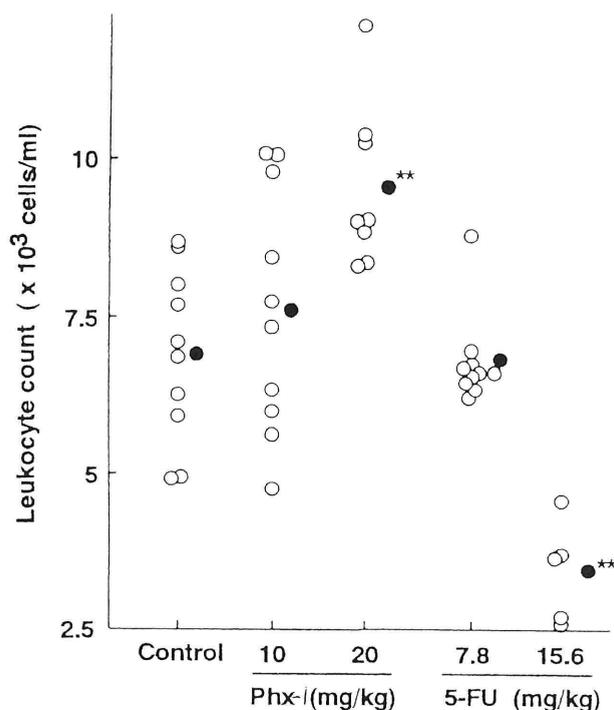


Fig. 15 Effect of Phx-1 and 5-FU on leukocyte count in blood of mice. BALB/c Female mice, 8 weeks old, were daily given Phx-1 at doses of 10 and 20 mg/kg or 5-FU at doses of 7.8 and 15.6 mg/kg i.p. for 14 consecutive days. The leukocyte counts in blood were measured the day after the final treatment with the compounds. Each group consisted of 10 mice except for eight in the Phx-1 20 mg/kg and nine in the 5-FU 7.8 mg/kg groups at the beginning. Five of 10 mice died by the day of the final treatment with 15.6 mg/kg of 5-FU. Open circles represent individual mice and closed circles represent the means. ** $p < 0.01$ versus control.

に対する作用を調べたものである。Phx-1 投与では血液中の白血球数はほとんど減少しないのに対して、5-FU 投与では極端に減少した。これらの結果は Phx-1 はマウスに対してほとんど副作用を示さないことを示唆している。Phx-1 による癌細胞増殖のメカニズムとしては Phx-1 によるアポトーシス誘導が示されているが^{12,15,19,20}、その詳しい経路については未だ十分な説明が出来ていない。

V. 水溶性フェノキサジン Phx-1、Phx-2、Phx-3 の種々の抗微生物活性

昭和 20 年前後、金沢大学医学部結核研究所の越村らはオルトアミノフェノールが抗結核作用を持つことを *in vitro* で示し、さらに結核患者の治療にも有効性があることを明らかにした⁴¹。この発見は PAS (パラアミノサリチル酸) が結核の化学療法剤として使用される前になされたものであり、結核の化学療法剤に関しては先駆的な研究であった。しかしながら、戦中、戦後の混乱期であったことと邦文で報告されていたため、残念ながら海外での評価は得られなかった。1950 年になり安西らは東京都国立市の土壌の微生物

よりケスチオマイシン A と B を分離し、これらが抗結核作用を示すことを *in vitro* の実験系で証明した⁴²。このケスチオマイシン A と B の本体はオルトアミノフェノールとそれから合成される 2-アミノフェノキサジン-3-オンであった。しかしながら、ケスチオマイシン (question+mycin) の名前が影響したためかその作用についての具体的な研究はその後になされていない。

オルトアミノフェノールとヘモグロビンとの反応で得られた Phx-3 はこのケスチオマイシン B と同一物質であった^{8,22}。また、オルトアミノフェノールの抗結核作用に関する越村の報告から約 40 年を経て同博士と Phx-3 を含む水溶性フェノキサジンの抗腫瘍作用を検討することになったが、その成果は前項で述べた。本項では Phx-1、Phx-2、Phx-3 の抗微生物作用について得られた研究結果を述べる^{18,22}。

図 16 に示すように、Phx-1 を予め Vero 細胞と 1 時間ほど混和放置したのち、ポリオウイルスを接種すると、ポリオウイルスの増殖は強く抑制された¹⁸。Phx-2 についても同様な結果が得られた。しかしながら、Phx-1 あるいは Phx-2 とポリオウイルスを同時に

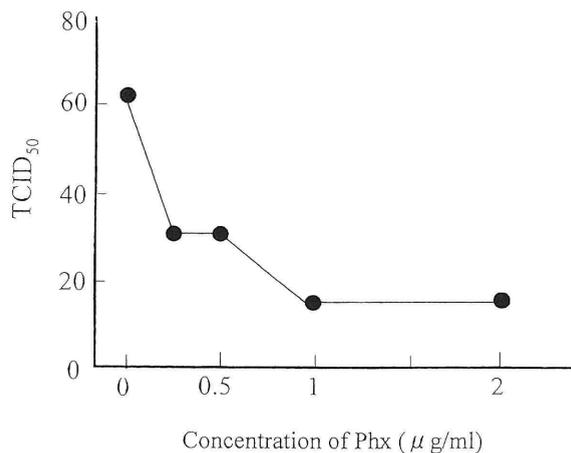


Fig. 16 Antiviral effects of Phx-1 on poliovirus. Vero cells were seeded in a 96-well microplate at a density of 2×10^5 to 3×10^5 cells per well in culture medium, and cultured at 37°C , for 2 days. Then, Phx-1 solution (20 mM) in DMSO diluted with α -MEM, was added to the cells in each well, to be a final concentration of $0 \mu\text{g/ml}$ (DMSO alone), $0.25 \mu\text{g/ml}$, $0.5 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$ and $2 \mu\text{g/ml}$. After 1 hour incubation at 37°C , the supernatant was removed from the well by an aspirator. At this time, poliovirus suspensions, which had been serially diluted with α -MEM to obtain a 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀), defined as dilution ratio of the virus to generate 50% disruption of the cells, were inoculated into Vero cells in each well. Cells were then incubated at 37°C , for 1 hour. After the supernatant was removed by an aspirator, various concentrations of Phx-1 solution were added to the cells in each well, and the cells were incubated at 37°C , for 2 days. After 2 days, the disruption of Vero cells was determined.

Table 3 Inhibitory effects of Phx-1, Phx-2 and Phx-3 on poliovirus, bovine parvovirus, *Helicobacter pylori*, mycobacteria and *Escherichia coli*

	Minimum inhibitory concentrations ($\mu\text{g/ml}$)		
	Phx-1	Phx-2	Phx-3
Poliovirus	2	2	—
Bovine parvovirus	1	2	—
<i>Helicobacter pylori</i>	—	—	0.78
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	2.8	1.4	2.8
<i>Mycobacterium kansasii</i>	22.5	11.3	>45
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	>45	>45	>45
<i>Escherichia coli</i>	>45	>45	>45

Vero 細胞に添加するとポリオウイルスの増殖は全く抑制されなかった。これらの結果は、Vero 細胞を予め Phx-1 や Phx-2 で処理すると、細胞内にポリオウイルスに対する増殖抑制メカニズムが発現することを強く示唆している。

種々の代表的なウイルス (SV-40 virus, human herpes virus, Sindbis virus, vesicular stomatitis virus) についても水溶性フェノキサジン Phx-1 および Phx-2 の作用を同様に検討したが、現在のところ、ポリオウイルスとブタパルボウイルス (porcine parvovirus) 以外のウイルスに対しては抗ウイルス作用は示さなかった (表 3)。

結核菌 (*mycobacterium tuberculosis*) に対する Phx-1、Phx-2、Phx-3 の作用について検討したが²²⁾、いずれの

フェノキサジン化合物も増殖抑制作用はなかった (表 3)。越村や安西らの結果と異なった理由としては、結核菌が変異している可能性、当時の培養系と異なっていること、などが考えられるが十分な説明はできていない。また、非結核性マイコバクテリウム菌については作用の程度は異なるが、Phx-1、Phx-2、Phx-3 は *mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium intracellulare* などに対して増殖抑制作用があることが示された。これら水溶性フェノキサジンは大腸菌などの一般細菌に対してほとんど抑制作用を示さなかった。また、*Helicobacter pylori* は近年胃潰瘍や胃癌の原因菌として注目を集めているが、クラリスロマイシン以外には特効薬がない状況である。表 3 に示すように Phx-3 は

Helicobacter pylori に対して強い抗菌作用を示した⁴³⁾。水溶性フェノキサジンは特定のウイルスや細菌に対して増殖抑制作用を示すこと、また宿主となる細胞に作用して抗ウイルス作用を示すことから、抗微生物剤として利用できる可能性がある。

VI. Phx-1 および Phx-2 の活性型リンパ球に対する抑制作用

Phx-1 および Phx-2 は赤血球凝集素のフィトヘマグルチニンで活性化したヒト T 細胞や B 細胞受容体に対する抗体で活性化したヒト B 細胞の増殖能を抑制した¹⁶⁾。そこで、B 細胞に対する Phx-1 の作用について検討した。図 17 は培養系における DT40 細胞 (ニワトリ B 細胞) の増殖に対する Phx-1 の作用を示す。50 μM 濃度の Phx-1 では、細胞の増殖はほとんど影響されない。さらに、この濃度の Phx-1 を添加した DT40 細胞について、抗原受容体によるシグナル伝達を調べたところ、つよく抑制されていることが明らかとなった¹⁷⁾。これは DT40 細胞においてユビキチン依存性プロテアソームが Phx-1 により活性化された結果、合成された B 細胞受容体である IgM が分解されていくために、細胞膜に IgM の発現量が低下していることに

よって起こることが示された (図 18)。これらの結果は、Phx-1 は自己免疫疾患のように活性化されたリンパ球が病因となっている疾患の治療薬として応用できる可能性があることを示唆している。さらに、Phx-1 は Gab2 と Akt の系を介するシグナル伝達系を抑制し、抗原刺激による脱顆粒反応を強く抑制することも明らかとなった (図 19)²¹⁾。このことは、Phx-1 は急性アレルギーに対する抑制作用をもっていることを示唆する。

VII. 水溶性フェノキサジン化学構造のもつ意義について

化学合成したフェノキサジン化合物は水に難溶性であり、生物活性もほとんどない。一方、ヘモグロビンとの長時間の反応 (1 週間) で合成されるフェノキサジンは比較的水溶性であり、多彩な生物活性を示すことが明らかとなってきた。生物活性を示すにはその特異な化学構造が影響していると考えられる。アクチノマイシン D は DNA にインターカレート (intercalate) することが知られているが、水溶性フェノキサジンはインターカレートはしない¹²⁾。

Phx-1 の化学構造はビタミン B₂ [=フラビン] の骨

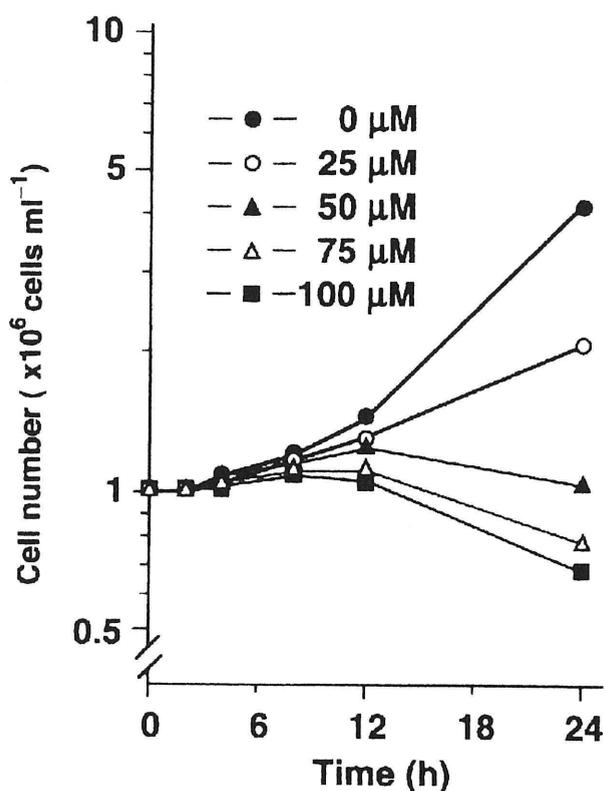


Fig. 17 Effect of Phx-1 on cell growth in DT40 cells. Cells were seeded at 10^6 cells/ml and were cultured for 24 hours in the presence of the indicated concentration of Phx-1. Cell numbers were counted with a Coulter counter.

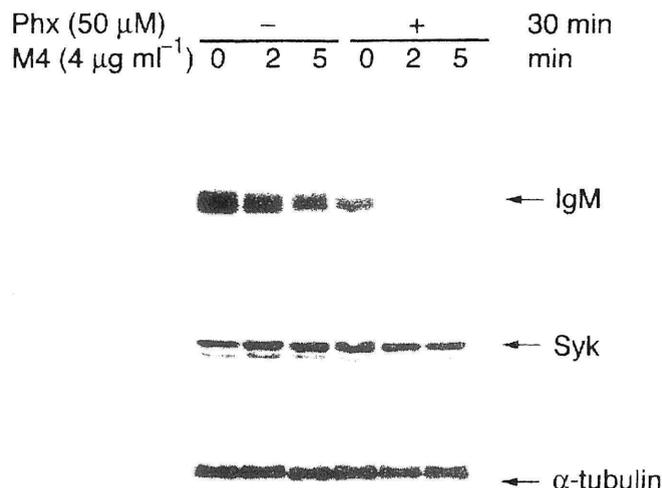


Fig. 18 Effect of Phx-1 on IgM expression on B cell membrane following BCR (B cell receptor) stimulation. DT40 B cells were pretreated with the indicated concentrations of Phx-1 for 12 hours and then stimulated with M4 for 2 min. Cell lysates were stripped and re-probed with an anti-IgM, anti-Syk or anti- α -tubulin antibody.

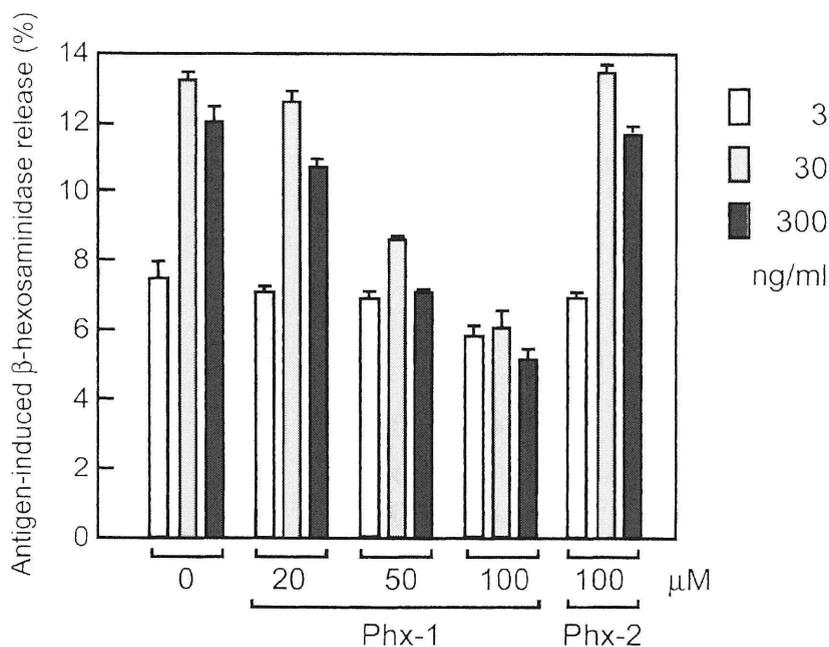


Fig. 19 Phx-1 suppresses the antigen-induced degranulation from RBL-2h3 mast cells. Treatment of RBL-2H3 cells with Phx-1 suppresses the release of β -hexosaminidase from RBL-2H3 cells. Treatment of RBL-2H3 cells with Phx-1 suppresses the release of β -hexosaminidase from RBL-2H3 cells. Cells were maintained as monolayer cultures. The cell monolayers were cultured in the presence of either solvent (1% ethanol), compound Phx-1, or Phx-2 at the indicated concentrations for 12 hours. Cells were washed once with Tyrode-hepes buffer and then stimulated with either the antigen 2, 4-dinitrophenylated bovine serum albumin at the indicated concentrations (0, 30, 300 ng/ml) for 1 hour. Prior to the antigen stimulation, cells were primed with mouse monoclonal anti-dinitrophenyl IgE mAb at 1 : 5000. The released β -hexosaminidase was recovered from the cultured medium.

格であるフェナジン (図 20) の化学構造に類似している。直観的には、水溶性フェノキサジンがビタミン B₂ の構造と類似していることが副作用が少ない理由であると考えられる。水溶性フェノキサジンの化学構造は emodin⁴⁴⁾ やアドリアマイシンに類似している

が、それらとは異なりセミキノンの構造をとっていないので活性酸素の放出はないことから細胞毒性は低いと考えられる。また、副作用が非常に少ないのは水溶性であり投与量を少なく抑えられることによっても考えられる。化学構造と作用・副作用との相関性に

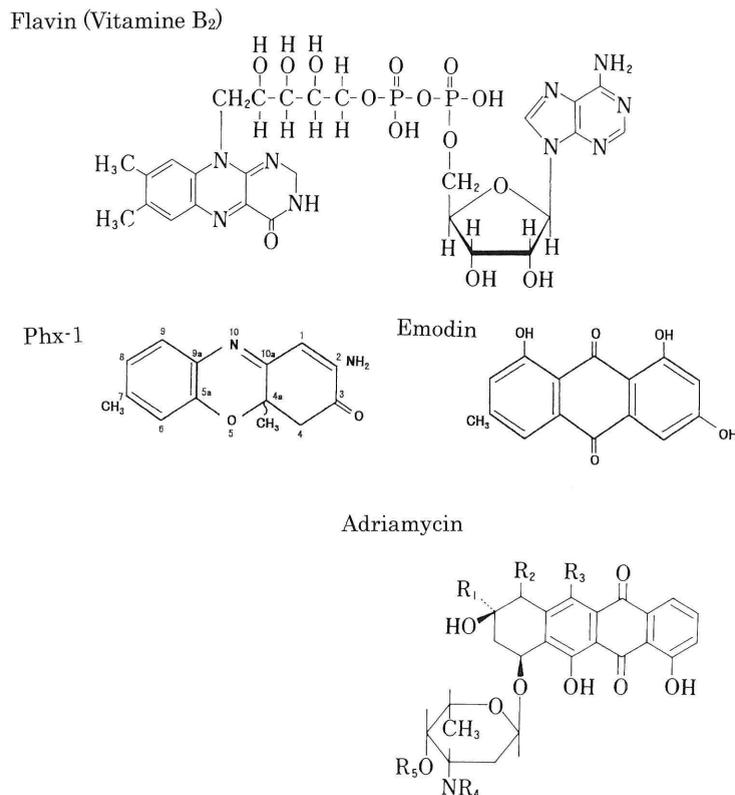


Fig. 20 Chemical structure of vitamine B₂ (flavin), in comparison with Phx-1, emodin and adriamycin.

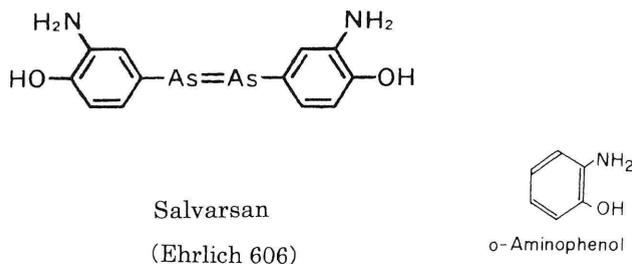


Fig. 21 Chemical structure of salvarsan, in comparison with *o*-aminophenol.

については今後の解明に待たれる。

おわりに

フェノキサジン化合物は1950年代にドイツの Butenandt 学派や Brockman 学派によって、多くの誘導体化合物の合成、化学構造の決定がなされたが結局抗癌剤としては思うような成果が得られなかった。1910年代に秦と Ehrlich によって発見され、梅毒の治療に有効なことから化学療法剤開発のきっかけともなったサルバルサン (salvarsan、Ehrlich's compound 606) の化学構造はオルトアミノフェノールに砒素が結合し、それが砒素の部分で2分子結合したものである (図 21)。サルバルサンは血液中に入るとまず、(有

名なプロントジルが生体内でスルファニルアミドに分解されて抗菌作用を示すように) 2分子に解離し、それが赤血球に吸収されるとヘモグロビンと反応し、砒素結合型のフェノキサジンに代謝されている可能性がある。サルバルサン投与では肝臓毒性は少ないものの黄疸などの副作用がみられることが知られている⁴⁵⁾。しかしながら、治療を受けた患者がメトヘモグロビン血症をおこしたかどうかは報告がない。サルバルサン投与では肝臓機能には影響せず黄疸がおこることから、赤血球内ヘモグロビンの酸化と変性を引き起こして、溶血性黄疸が誘発されていたことが考えられる。メトヘモグロビン血症も併発していた可能性があり、同時に砒素結合型の水溶性フェノキサジン

が合成され、それが梅毒に対して作用していたのでないかという図式が成り立つ。サルバルサンについては臨床的応用が先行し、そのうちペニシリンと置き換わってしまったために、作用機序の解明は十分になされなかった。サルバルサンは大正時代に三共製薬や万有製薬の設立のきっかけとなった薬であるが、現在では製造中止となっており、筆者の考えが正しいかどうかの証明は今のところ難しい。筆者は水溶性フェノキサジンがサルバルサンと類縁の化合物であったことは1990年代半ばになって初めて気がついた。副作用が少なく、種々の生物活性をもつ水溶性フェノキサジンが臨床的応用に耐えうるかどうかは、今後の作用メカニズムの解明や正常細胞に対する詳しい生物活性の検討を待たなければならない。

謝 辞

本論文の執筆の機会を与えてくださった東京医科大学学長・伊東洋先生に心より感謝いたします。また、本論文は故 米山良昌名誉教授（金沢大学）、越村三郎名誉教授（金沢大学）を始め、東京医科大学内外の多くの研究者との共同研究の成果をまとめたものである。本論文をこれらの方々へ献呈し、深甚の感謝の意を表します。

文 献

- 1) Goldberg HI, Friedman PA: Antibiotics and nucleic acids. *Annu Rev Biochem*
- 2) Brockmann H, Bohnsack G, Franck B, Grone H, Muxfeldt H, Suling C: Zur Konstitution der Actinomycine. *Angew Chem* **68**: 70-71, 1956
- 3) Brockmann H, Seela F: 4-6-Didesmethyl-actinomycin C und dessen 4,6-dimethoxy-4,6-diethyl- und 4,6-di-tert-, -butyl-derivat. *Chem Ber* **104**: 2751-2771, 1971
- 4) Hollstein U: Actinomycin, chemistry and mechanism of action. *Chem Letts* 293-296, 1974
- 5) Motohashi N, Nitscher LA, Meyer R: Potential antitumor phenoxazines. *MedRes Rev* **11**: 239-294, 1991
- 6) Gerber N, Lechevalier M: Phenazines and phenoxazines from *Waksmania aerata* sp. Nov. and *Pseudomonas iodinas*. *Biochem* **3**: 598-602, 1964
- 7) Tomoda A, Shirasawa E, Nagao S, Minami M, Yoneyama Y: Involvement of oxidoreductive reactions of intracellular haemoglobin in the metabolism of 3-hydroxyanthranilic acid in human erythrocytes. *Biochem J* **222**: 755-760, 1984
- 8) Tomoda A, Yamaguchi J, Kojima H, Amemiya H, Yoneyama Y: Mechanism of *o*-aminophenol

- metabolism in human erythrocytes. *FEBS Letts* **196**: 44-48, 1986
- 9) Tomoda A, Shirasawa E, Yoneyama Y: Reactions of oxyhemoglobin and methemoglobin with tryptophan metabolites, 3-hydroxyanthranilic acid and 3-hydroxykynurenine. *Hemoglobin* **10**: 33-49, 1986
 - 10) Tomoda A, Arisawa M, Koshimura S: Oxidative condensation of 2-amino-4-methylphenol to dihydrophenoxazinone compound by human hemoglobin. *J Biochem* **110**: 1004-1007, 2001
 - 11) Tomoda A, Hamashima H, Arisawa M, Kikuchi T, Tezuka Y, Koshimura S: Phenoxazinone synthesis by human hemoglobin. *Biochim Biophys Acta* **1117**: 306-314, 1992
 - 12) Ishida R, Yamanaka S, Kawai H, Ito Y, Tomoda A: Antitumor activity of a novel phenoxazine derivative 2-amino-4, 4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one, produced by the reaction of 2-amino-5-methylphenol with bovine hemolysate. *Anti-Cancer Drugs* **7**: 591-595, 1996
 - 13) Mori H, Honda, K, Ishida R, Nohira T, Tomoda A: Antitumor activity of 2-amino-4, 4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one against Meth A tumor transplanted into BALB/c mice. *Anti-Cancer Drugs* **11**: 653-657, 2000
 - 14) Shimamoto T, Tomoda A, Ishida R, Ohyashiki K: Antitumor effects of a novel phenoxazine derivative on human leukemia cell lines in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* **7**: 704-708, 2001
 - 15) Koshibu-Koizumi J, Akazawa M, Iwamoto T, Takasaki M, Mizuno F, Kobayashi R, Abe A, Tomoda A, Hamatake M, Ishida R: Antitumor activity of a phenoxazine compound, 2-amino-4, 4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one against human B cell and T cell lymphoblastoid cell line. Induction of mixed types of cell death, apoptosis and necrosis. *J Cancer Res Clin Oncol* **128**: 363-368, 2002
 - 16) Akazawa M, Koshibu-Koizumi J, Iwamoto T, Takasaki M, Nakamura M, Tomoda A: Effects of novel phenoxazine compounds, 2-amino-4, 4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one and 3-amino-1, 4 α -dihydro-4 α -8-dimethyl-2H-phenoxazine-2-one on proliferation of phytohemagglutinin- or anti-human IgM-activated human peripheral blood mononuclear cells. *Tohoku J Exp Med* **196**: 185-192, 2002
 - 17) Gao S, Takano T, Sada K, He J, Noda C, Hori-Tamura N, Tomoda A, Yamamura H: A novel phenoxazine derivative suppresses surface IgM expression in DT40 B cell line. *Br J Pharmacol* **137**: 749-755, 2002
 - 18) Iwata A, Yamaguchi T, Sato K, Izumi R, Tomoda A: Antiviral activity of 2-amino-4, 4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one on poliovirus.

- Tohoku J Exp Med **200**: 161-165, 2003
- 19) Nakada T, Isaka K, Nishi H, Osakabe Y, Shimamoto T, Ohyashiki K, Tomoda A, Takayama M: A novel phenoxazine derivative suppresses proliferation of human endometrial adenocarcinoma cell lines, inducing G2M accumulation and apoptosis. *Oncol Reports* **10**: 1171-1176, 2003
- 20) Abe A, Yamane M, Tomoda A: Prevention of growth of human lung carcinoma cells and induction of apoptosis by a novel phenoxazine, 2-amino-4,4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one. *Anti-Cancer Drugs* **12**: 377-382, 2001
- 21) Enoki E, Sada K, Qu X, Kyo S, Shahjahan Miah SM, Hatani T, Tomoda A, Yamamura H: The phenoxazine derivative Phx-1 suppresses IgE-mediated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. *J Pharmacol Sci* **94**: 329-333 (2004)
- 22) Shimizu S, Suzuki M, Tomoda A, Arai S, Taguchi H, Hanawa T, Kamiya S: Phenoxazine compounds produced by the reactions with bovine hemoglobin show antimicrobial activity against non-tuberculosis mycobacteria. *Tohoku J Exp Med* **203**: 47-52, 2004
- 23) Nagasawa HT, Gutmann HR, Morgan MA: The oxidation of o-aminophenols by cytochrome c and cytochrome oxidase. II. Synthesis and identification of oxidation products. *J Biol Chem* **234**: 1600-1604, 1959
- 24) Gripenberg J: Fungus pigments. XIII. Tramesanguin, the pigment of trametes cinnabarina var. sanguinea (L.) Pilat. *Acta Chemica Scandinavica* **17**: 703-708, 1963
- 25) Zollner H: Effects of cinnabarinic acid on mitochondrial respiration. *Biochem Pharmacol* **25**: 6433-3648, 1976
- 26) Butenandt A: Wirkstoffe des Insektenreiches. *Naturwissenschaften* **15**: 461-471, 1959
- 27) Butenandt A: Uber Ommochrome, eine Klasse natürlicher Phenoxazonfarbstoffe. *Angew Chem* **69**: 16-23, 1957
- 28) Bando M, Nakajima A: Spectrophotometric estimation of 3-OH L-kynurenine O- β -glucoside in human lens. *J biochem* **89**: 103-109, 1981
- 29) Ogino S, Yasukura K: Biochemical studies on cataract. IV. Production of cataracts in guinea pigs with dinitrophenol. *Am J Ophthal* **72**: 936-946, 1957
- 30) Van Heynigen R: Fluorescent glucoside in human lens. *Nature* **230**: 393-394, 1971
- 31) Pirie A: Photo-oxidation of proteins and comparison of photo-oxidized proteins with those of the cataractous human lens. *Isr J Med Sci* **8**: 1567-1573, 1972
- 32) 友田燁夫、山口照英、白尾悦子、河崎一夫：積分球を用いた老人性白内障水晶体の着色物質の吸収スペクトルの測定について。あたらしい眼科 **6**: 1577-1583, 1989
- 33) Tomoda A, Yoneyama Y, Yamaguchi T, Shirao E, Kawasaki K: Mechanism of coloration of human lenses induced by near-ultraviolet-photo-oxidized 3-hydroxykynurenine. *Ophthal Res* **22**: 152-159, 1990
- 34) 荻野周三：白内障の成因とその薬物治療。日本医事新報 **1732**: 12-22, 1956
- 35) Kiese M, Rachor M: The reaction of several aminophenols with hemoglobin and oxygen in vitro and in vivo. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Exp Path Parmak* **249**: 225-236, 1964
- 36) Eckert KG, Eyer P: Differences in the reactions of isometric ortho- and para-aminophenols with hemoglobin. *Biochem Pharmacol* **32**: 1019-1111027, 1983
- 37) Akazawa M, Takasaki M, Tomoda A: Oscillatory oxido-reductive reaction of intracellular hemoglobin in human erythrocyte incubated with o-aminophenol. *Tohoku J Exp Med* **192**: 301-312, 2001
- 38) Tomoda A, Yoneyama Y, Yamaguchi N, Koshimura S: Production of water-soluble antitumor compounds from aminophenols by human erythrocytes. *Proceedings of the Japanese Cancer Association* p606, 1988
- 39) Nagayama M, Moteki K, Kodaira K, Koshimura S, Tomoda A: Anti-tumor effect of phenoxazine compounds produced by human erythrocytes with aminophenols on squamous cell carcinoma in mouse. *Proceedings of the Japanses Cancer Association* p379, 1989
- 40) 山中成人：東京医科大学雑誌 **55**: 649-656, 1997
- 41) 越村三郎、林 栄一：結核化学療法の基礎的研究(第8報)：o-aminophenol, sulfanilamide並びに4,4'-dioxydiphenylsulfon型誘導体の結核菌に対する試験管内消毒作用に就いての検索。金沢結研年報 **4**: 95-102, 1945
- 42) Anzai K, Isono K, Okuma K, Suzuki S: The new antibiotics, Questiomycin A and B. *J Antibiotics Ser. A XIII*: 125-131, 1959
- 43) 花輪智子、大崎敬子、山口博之、田口晴彦、神谷茂：フェノキサジン化合物 Phx-1、Phx-2、Phx-3の一般細菌および抗酸菌の増殖に及ぼす効果。第52回日本感染症学会東日本地方会講演抄録集 p152, 2003
- 44) Huang HC, Chu SH, Chao PDL: Vasorelaxants from Chinese herbs, emodin and scoparone possess immunosuppressive properties. *Eur J Pharmacol* **198**: 2111-213, 1991
- 45) 奥田邦雄、渡辺英介：サルバルサン黄疸。内科 **6**: 747-751, 1965

Biological activities of water-soluble phenoxazines

Akio TOMODA

¹⁾Department of Biochemistry, Tokyo Medical University

²⁾Division of Intractable Immune System Disease Research Center, Tokyo Medical University

Abstract

Phenoxazines are known as an elemental component of actinomycin D, which was discovered in the 1940s, and was developed as an anti-cancer reagent. However, as actinomycin D has strong anti-cancer activity and adverse effects, and synthetic actinomycin D derivatives could not overcome such adverse effects, the investigation for phenoxazines seems to have been ceased. Actinomycin D is recognized to be a strong inhibitor of DNA dependent RNA polymerase, intercalating DNA. Chemically synthesized phenoxazines exhibited little biological activity, due to their insolubility to water. Tomoda et al. found, by chance, that 3-hydroxyanthranilic acid was converted quickly to cinnabarinic acid, a kind of water-soluble phenoxazine, during the oxido-reductive reactions of hemoglobin. Furthermore, they discovered that *o*-aminophenol derivatives are converted to water-soluble phenoxazines via oxido-reductive reactions of hemoglobin, or by erythrocytes. These water-soluble phenoxazines were demonstrated to exert various biological activities such as anti-cancer effects, immunosuppressive effects on the activated lymphocytes, and anti-microbial effects, with little adverse effects in mice. Since salvarsan discovered by Hata and Ehrlich about 100 years ago to treat syphilis is an arsenic compound of *o*-aminophenol, and the World Conference of Dosing of Antiinfectives was held this year and celebrated the 150th birthday of Dr. Ehrlich, it is a good opportunity to describe the recent research progress of water-soluble phenoxazines. The present manuscript includes several sections: 1) biosynthesis of cinnabarinic acid and its bioactivity, 2) xanthommatin, 3) oxido-reductive reactions of hemoglobin by *o*-aminophenol and the production of 2-aminophenoxazine-3-one, 4) water-soluble phenoxazines which exert anti-cancer effects. 5) anti-microbial effects of water-soluble phenoxazines, 6) immunosuppressive effects of water-soluble phenoxazines, and 7) significance of the chemical structure of water-soluble phenoxazines.

〈Key words〉 Water-soluble phenoxazines, bioactivities
