マウスに対する含硫アミノ酸誘導体の放射線防護効果（第１報）

川崎医療短期大学　放射線技術科　臨床検査科*
玉島協同病院　放射線科**
北海道東海大学　工学部生物工学科***

紺野　勝信　西村　明久　板谷　道信　井上　博和**
佐藤　彰一*　北山　　彰　西下　創一　西村　弘行***

（平成６年８月22日受理）

Radioprotective Effects of Sulfur-Containing Amino Acid Derivatives on Mice

Katunobu KONNO, Akihisa NISHIMURA, Michinobu ITAYA
Hirokazu INOUE**, Shoichi SATO*, Akira KITAYAMA
Soichi NISHISHITA and Hiroyuki NISHIMURA***

Department of Radiological Technology
*Department of Medical Technology**
Kawasaki College of Allied Health Professions
Kurashiki, Okayama 701-01, Japan
Department of Radiology,
*Tamashima Kyodo Hospital***
Kurashiki, Okayama 713, Japan
Department of Bioscience and Technology,
School of Engineering,
*Hokkaido Tokai University****
Sapporo, Hokkaido 005, Japan
(Received on Aug. 22, 1994)

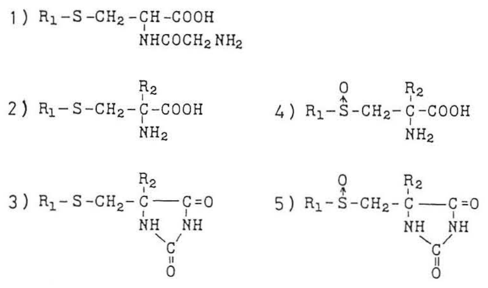
Key words：放射線防護剤，含硫アミノ酸誘導体，ヒダントイン誘導体

概　　要

S-Alkyl-thiomethylhydantoin 誘導体，３種類と L-cysteine，Cysteamine を C57BL マウス腹腔内に投与することにより，その放射線防護効果を調べた。各供試化合物の投与量はマウス体重当たり，1.5mmole/kgにした。Hydantoin 誘導体は L-cysteine より防護効果が高かった。Cysteamine は今回の実験条件では放射線増感効果が認められた。DL-5-Propylthiomethyl-5-methyl-hydantoin の D. R. F. は1.26と３種類の Hydantoin 誘導体のなかで最も防護効果が大きかった。同様に，DL-5-Methylthiomethyl-5-methyl-hydantoin と DL-5-Ethylthiomethyl-5-methyl-hydantoin 各々の D. R. F. は1.22と1.17であった。薬剤の放射線防護効果を説明するため，水溶液における Thiomethylhydantoin 誘導体の放射線分解機構について議論した。

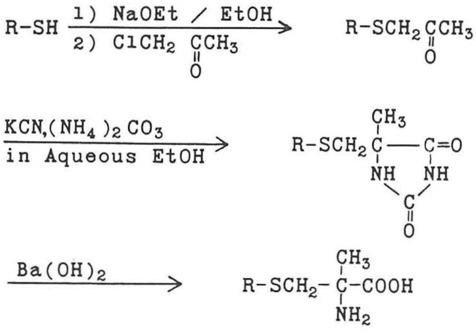
緒　　言

放射線防護剤（Radioprotective agent）は放射線による障害を化学的に防ぐ薬剤である。この薬剤として含硫アミノ酸の一種である Cysteine が，Patt ら[1]によって報告されて以来，いくつ



R_1 : $CH_3CH_2CH_2$-, CH_2=$CHCH_2$-, R_2: H- , CH_3-
CH_3CH_2- , CH_3-

Fig. 1　General formulas of radioprotective and radiosensitizing sulfur containing amino acid derivatives.



R: CH_2=$CHCH_2$- , $CH_3CH_2CH_2$-
CH_3CH_2 , CH_3-

Fig. 2　Scheme of the syntheses of DL-5-alkylthiomethyl-5-methylhydantoins.

かの SH 基を含む含硫化合物が放射線防護剤として開発された。例えば, Cysteamine や Glutathione は強力な放射線防護効果を持つ興味ある化合物[2)3)]である。しかしながら，これ等の SH 化合物は哺乳動物に対して毒性を示す点で問題となっている。

われわれはこれまで，Fig. 1 に示した含硫アミノ酸誘導体を合成し，マウスや大腸菌に対する放射線防護効果ならびに放射線増感効果を検討してきた[4)5)]。図中，S-alkyl-L-cysteine (No. 2) とそのペプチド (No. 1) では，Cysteine とほぼ同程度かそれ以下の防護効果であったが，ヒダントイン誘導体 (No. 3) にすると防護効果の向上がみられ，その毒性はほとんどない。一方，No. 2 と No. 3 のスルホキシドである No. 4 と No. 5 は増感効果が見出だされた。

今回，より効果的な放射線防護剤の開発を目指し，ヒダントイン誘導体に着目して，3 種類の DL-5-Alkylthiomethyl-5-methylhydantoins を合成し，マウスに対する放射線防護効果と毒性を検討したので報告する。

実験材料および方法

1．DL-5-Alkylthiomethyl-5-methylhydantoins の合成 (Fig. 2)

1－1．Alkylthiopropanones の合成

Thiourea 法[6)7)]により調整した Alkyl mercaptan 1 当量を金属ナトリウム溶解の無水エタノール中に入れ，攪拌しながら1.1当量のモノクロルアセトンを滴下した。室温で一夜攪拌後，氷水を加え，引き続きエーテル抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後，減圧蒸留によって目的物を得た。n-Propyl-thiopropanone：bp 80 ℃ (22mmHg)，さらにこの化合物を 2, 4-dinitrophenylhydrazone とした。元素分析—実験値 (%)：C：47.76；H，6.95；S，15.71. $C_{12}H_{16}N_4O_4S$ として計算値 (%)：C，47.51；H，6.98；S，15.85.

1－2．DL-5-Alkylthiomethyl-5-methylhydantoins の合成

DL-5-Propylthiomethyl-5-methyl-hydantoin について以下に述べる。n-Propyl-thiopropanone (0.4 mole, 53 g) を500 mℓ の70～80 % のエタノールに溶解し，0.5 mole のシアン化カリウムと1.5 mole の炭酸アンモニウムを加え60～65 ℃ で 4～5 時間攪拌した。さらに，85 ℃ で 1 時間加熱しエタノールを濃縮した。冷却すると78 g (87 % 収率) の粗結晶を得，エタノールと水の溶媒系から再結を行った。DL-5-Ethylthiomethyl-5-methyl-hydantoin と DL-5-Methylthiomethyl-5-methyl-hydantoin も同様の方法で合成した。

DL-5-Propylthiomethyl-5-methylhydantoin：mp119～121 ℃．元素分析—実測値 (%)：C，47.76；H，6.95；S，15.71. $C_8H_{14}N_2O_2S$ として計算値 (%)：C，47.51；H，6.98；S，15.85.

DL-5-Ethylthiomethyl-5-methylhydantoin：mp109～111 ℃．元素分析—実測値 (%)：C，44.61；H，6.42；S，17.21. C_7H_{12}

N_2O_2S として計算値（%）：C，44.68；H，6.38；S，17.02.

DL-5-Methylthiomethyl-5-methyl-hydantoin：mp138～140℃. 元素分析—実測値（%）：C，41.25；H，5.86；S，18.65. $C_6H_{10}N_2O_2S$ として計算値（%）：C，41.37；H，5.79；S，18.40.

2．実験方法

実験動物は，川崎医療短大動物室で繁殖した5週齢の雄，C57BL マウスで体重（20 ± 3）g のものを用いた。各供試化合物はマウス体重当たり，1.5m mole/kg で腹腔内に注射し，1群各20匹を使用した。対照群には生理的食塩水を投与した。注射して30分後に ^{60}Co からの γ 線（線量率0.464 Gy/min）を全身照射して，30日目の生存率を求めた。

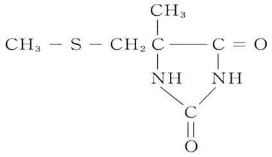
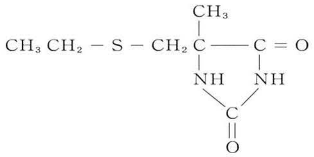
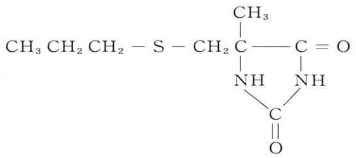
結果及び考察

放射線防護効果を調べるために，防護効果係数 dose reduction factor（D. R. F.）を算出した。D. R. F. は，防護物質を添加したときと添加しないときの LD_{50}（50％致死率放射線線量）の比をとって表し，縦軸に注射後30日間の致死率，横軸に γ 線の線量のグラフより求める。

DL-5-Alkylthiomethyl-5-methyl-hydantoins の D. R. F. は以下の方法により算出した。生理的食塩水を投与した対照群マウスの LD_{50} は6.70 Gy であった。DL-5-Propylthiomethyl-5-methyl-hydantoin の LD_{50} は8.45 Gy であり，D. R. F. は1.26と3種類のヒダントイン誘導体なかで最も防護効果が大きかった。同様に，S-Methyl と S-Ethyl 各々の D. R. F. は1.22と1.17であった。

一方，化合物投与30分後，総線量7.5 Gy（対照群マウスの LD_{80} に相当）を全身照射し，照射後30日目における生存率，経時的生存率から求めた平均生存日数について各化合物ごとに算出した。その結果を Table 1にまとめた。表中，カッコ内の数値は無添加で照射した群を1.00とし

Table 1　Effects of sulfur-containing amino acids and these derivatives on survivors of γ-irradiated mice

Compounds	7.5Gy γ-irradiated Mice survived（Ratio）30 days	M. S.	D. R. F.
1. 	18（6.00）	28.1（1.53）	1.22
2. 	16（5.33）	24.9（1.36）	1.17
3. 	19（6.33）	29.9（1.63）	1.26
4. $HS-CH_2CHCOOH$ NH_2	6（2.00）	15.2（0.831）	1.08
5. $HS-CH_2CH_2NH_2$	0（0.00）	5.3（0.285）	——
6. No added	3（1.00）	18.3（1.00）	1.00
7. No irradiated	20（——）	30.0（——）	——

M. S.：Mean Survival（day）　D. R. F.：Dose Reduction Factor

た時の比率を示している。同時実験したシステインとシステアミンの値をNo 4とNo 5に示し，各化合物のD. R. F. も記入した。

われわれの今までの研究では，システイン及びその誘導体の放射線防護効果については，以下の知見を得ている。すなわち，SH基をもつシステインに対し，S-アルキル置換体では防護効果が減少し，それらのペプチドでも大きな差が見られなかったが，ヒダントイン誘導体（5-mercaptomethyl-hydantoin）にすると防護効果が増加した[4,5]。

本実験では，3種類のヒダントイン誘導体とシステイン，システアミンの放射線防護効果を比較検討した。その結果，30日目の生存率，平均生存日数およびD. R. F. のいずれのデータからも，これらヒダントイン誘導体はシステインより防護効果が増加した。なお，システアミンについては，今回の実験条件で行ったところ，放射線増感効果を示した。更に，ヒダントイン誘導体のS-置換基の差異による防護効果は，プロピルキ基＞メチル基＞エチル基の順であった。しかしながら，なぜこの様な順序になるかという理由は，現在のところ説明できない。また，防護効果のあったヒダントイン誘導体について，投与量300～330㎎/kg mouseでは30日間にわたり毒性を調べた結果，全てのマウスが生存した。

ヒダントイン誘導体の防護効果を説明するため，水溶液における化合物の放射線分解機構を調べた。Alkythiomethylhydantoinの放射線分解機構をFig. 3に示した[5]。放射線分解生成物の同定は，標準化合物との比較から行った。N_2O（e^-_{aq}の捕捉剤），KBr（・OHの捕捉剤）及びNaCN（・Hの捕捉剤）の共存下で放射線照射して，放射線分解機構を解明した。その結果，ヒダントイン誘導体（Sulfide hydantoins）は，水の放射線分解によって生じるOHラジカル（酸化種）およびe^-_{aq}（水和電子，還元種）との反応が速く，活性化学種が細胞内の標的に到達する前に反応し，分解されることによって生体を防護するものと考えられる。

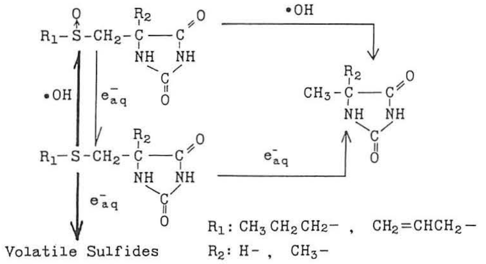


Fig. 3　Possible degradation mechanism of hydantoin derivatives by ^{60}Co irradiation in oxygen-free aqueous solutions. Majar routes are indicated by thick lines.

以上の結果より，今回のS-Alkyl-thiomethyl-hydantoin誘導体は，システインに比べ防護効果が高いことを示した。しかし，より防護効果の高い化合物の開発のために，ヒダントイン誘導体のS-置換基を更に変化させた化合物を合成し，防護実験を行う必要がある。同時に，ヒダントイン誘導体のS-置換基の差異による防護効果機構を解明することは，今後に残された課題の一つである。

謝　　辞

稿を終えるにあたり，始終ご指導頂きました川崎医科大学放射線医学（治療）教室・今城吉成教授ならびに同付属病院中央放射線部・沼口健治主任技師に深謝の意を表します。また，有益なご助言を頂いた本学放射線技術科松宮　昭助教授に深く感謝致します。

文　　献

1）PATT, H. M., Tyree, E. B., Straube, R. L. and Smith, D. E.: Cysteine protection against X-irradiation. Science **110**, 213—214, 1949
2）Eker, P. and Phil, A.: Studies on the growth-inhibiting and radioprotective effect of cystamine, cysteamine and AET on mammalian cells in tissue culture. Radiat. Res. **21**, 165—179, 1964
3）Mori, T., Horikawa, H., Nikaido, O. and Sugihara, T.: Comparative studies on protective effect of various sulfhydrl compounds against cell death and DNA Strand breaks induced by X-rays in cultured mouse L cell death. Radat. Res. **19**, 319—335, 1978
4）Nishimura, A., Hashimoto, M., Konno, K., Ohta, Y., Tahara, S. and Nishimura, H.: Radio-protective and radiosensitizing effect of sulfur-containing amino acid derivatives on mouse. Z.

Naturforsch. **35C**，726—728，1980
5）西村明久．：大腸菌並びにマウスのγ線照射に対する含硫アミノ酸誘導体の防護，増感効果に関する研究，岡山医学会雑誌，**98**，827—850，1986
6）Reid, E. E.: Organic Chemistry of Bivalent Sulfur. Chem. Publishing **1**，32—35，1958
7）Frank, R. L. and Smith, P. V.: The preparation of mercaptans from alcohol. J. Am. Chem. Soc. **68**，2103—2104，1946