脂溶性ビタミンB₂ (riboflavin tetrabutryate) の
p-dimethylaminoazobenzene (DAB) 発癌
ないし障害白鼠肝に対する作用
とくに抽出粗酸化脂質のESRスペクトルと
数種酵素活性の変動の面から

弘前大学医学部松永内科教室 (指導 松永藤雄教授)

石 渡 淳 一

STUDIES ON THE RIBOFLAVIN TETRABUTYRATE (B₂-BUT) AND ITS EFFECTS
ON THE P-DIMETHYLAMINOAZOBENZENE (DAB) INDUCED HEPATOMA OR
DEGENERATED LIVER OF THE RAT; ESR SPECTRA OF THE SUBFRACTION
OF THE LIPOPEROXIDE EXTRACTED FROM THE LIVER AND
SEVERAL ENZYME ACTIVITY OF THE SAME TISSUE

Junichi ISHIWATA

The First Department of Internal Medicine, Hirosaki University School of Medicine
(Director: Prof. Fujio Matsunaga)

概要 わたくしは癌組織においては、変性組織と明らかに異なる電子構造の異常が存在し、少なくともその一部が細胞顆粒に存在する磷脂質を含む機能リポ蛋白 (または活性錯化合物複合体) における radical の trap, または spin relaxation が正常のそれと異なることに依存するという実験成績をえた。そして量子生物学的にみて、これが癌組織内過酸化物質に生ずる cis-trans 共軛 methylene diene にその源を求め、この常磁性の変化が癌特有の酵素活性の変動を招くものと推論した。B₂-But は DAB 変性肝における ESR スペクトルの強度を減ずるが、発癌肝における特異な ESR のシグナル ($g=2.035$) には影響はおよばなかつた。同様のことは、mitomycin C 投与白鼠肝においても見られ、この種の特異的变化に対する薬物の開発は、今後の研究に俟たれることとなつた。しかしいづれにせよこれらの変化は未だ推測の領域をでず、その本質的説明は今後行なわれる幾多のモデル実験を総合した上でえられることはいうまでもない。

I. 緒 言

生体内における不対電子の出現は、すでに1936年 Michaelis によつて、酵素的酸化還元反応において予測されており、近年生体組織内不対電子が実測できるようになつて、この方面の研究も新しい実験手段をもつにいたつている。すなわち強い

磁場の中におかれた不対電子によるマイクロ波の吸収の検出を原理とする電子スピン共鳴吸収法 (ESR) や、分子内の磁場の測定を原理とする核磁気共鳴吸収法 (NMR) がそれである。

発癌の原因を癌原性物質が生体内で代謝を受ける際に安定な free radical に変化することに求める

説があるが、このfree radicalと発癌との関係は、近時発癌過程を規定する有力なものとして次第に注目されて来ている。とくにO. Schmidt¹⁾が縮合核炭化水素の電子密度を計算し、発癌物質の反応性をその電子状態に結びつけてからは、生物物理の面からの癌の追求が各方面から行なわれるようになった。

Pullman²⁾, Daudel³⁾らは分子軌道法を用いて発癌物質の作用中心を追求し、Schmidtのmeso位置中心説を否定するとともに、phenanthreneの二重結合(K領域)の全電荷が発癌作用と並行関係にあり、逆にL領域の電荷はこれに阻止的に働くことを見出している。また、分子反応性を論ずる量としてWheland⁴⁾は局在化エネルギーをあげ、芳香族化合物の置換反応における遷移状態に活性錯化合物を仮定し、活性錯化合物の全 π エネルギーから原系のそれをさしひいた量、すなわち局在化エネルギーが最小のものに反応が起こるとした。そしてMiller⁵⁾やHeiderberger⁶⁾らは、実験的に発癌物質のK領域が生体蛋白と化学結合することが、癌発生の第一歩であることを示し、この結合の結果生ずる電子移動複合体としての活性錯化合物が癌特有の代謝を規定するという興味深い問題を提起している⁷⁾。

一方、これら発癌物質と制癌性物質が類似の構造を有し、わずかの構造の差で制癌性の有無が決定づけられることはよく知られている。この構造上のわずかな差は、制癌剤の電子構造との関連が大きく、この方面からの追求が進んでくるにつれて、制癌作用にradical機構が関与していることを示唆する報告もでてきている⁸⁾。しかし、このようなradical反応によつて発癌するというradical説は、free radicalのtrapされる構造が未だ発見されず、このために有力な仮説という段階にとどまってきたといわねばならない。

わたくしは、癌細胞の特性として古来挙げられてきた性質、すなわち細胞呼吸に対する嫌気解糖の優勢・性、年齢、器官に関係なく一様の酵素pattern(tumor pattern)の成立・正常細胞と異な

る特異細胞成分の保有(deletion hypothesis)を通覧し、共通な性質を発現するための構造として、正常組織にみられる酸化還元系を阻害するにたる電子構造の変化、すなわちかなり大きい常磁性が、正常組織と異なるなんらかの方法で出現するのではないかと考えた。そしてこの常磁性は酸化還元反応のいずれかの状態に偏つて生ずるという可能性もあることを考慮しなくてはならない。従来の実験で、肝細胞の全homogenateではradicalが検出されるにもかかわらず、分離抽出・純化を反復した蛋白や脂質に安定したradicalが検出されなかったという事実を考え合わせると、この可能性がますます強いものとなる。すなわち、肝細胞から脂質を分離する際に、溶媒中で蛋白と解離して生ずるradicalと従来あるradicalが再結合を起こし、この結果radicalは消失するのではなからうか。これを防止するためには、何らかの処置が必要であり、わたくしはその第一歩としてまず実験を酸化脂質を抽出し、しかも未だ粗標品の段階からはじめることにした。実験には、教室で以前から取り扱ってきたp-dimethylaminoazobenzene (DAB)発癌白鼠肝を選び、その酵素的酸化還元系の変化を知るために、不對電子の挙動のよく知られたflavin助酵素群の主体であるriboflavinの誘導体を負荷してその影響を検討した。riboflavinの反応中心は、いうまでもなくalloxazineまたはisoalloxazineのsemiquinone構造に依存している。わたくしは同じquinone類の作用を知る目的からhydroquinone核を分子に内蔵する抗癌剤mitomycin C (MMC)をも併用して、生体組織の酵素活性の変動とESRスペクトルの関連をも検討した。その結果、教室で十数年来行なってきたDAB発癌機構における細胞顆粒内の機能lipo蛋白(あるいは磷脂質)の役割が、実は生体酸化還元反応の過程に生ずるradicalのtrapあるいはspin relaxationのあり方を規定するものではないかと思わせる成績を得た。この作用は、あたかも物理化学実験におけるtetrahydrofuranのradical安定化作用を思わせるものである。

以下これにかんする実験とその成績について述べる。

II. 実験対象ならびに方法

実験対象： 重量 150 g 前後のWistar系の白鼠を使用し、I) 対照群、II) Riboflavin tetrabutryate (以後B₂-Butと略す) 投与群、III) B₂-But+MMC投与群、IV) DAB飼育群、V) DAB+B₂-But投与群、VI) DAB+MMC+B₂-But投与群の6群に分けて比較検討した。DABは180日間0.06%の割合で食餌に混合して投与する従来の方法⁹⁾に従った。対照群にはDABを含まぬ食餌で飼育した180日目の白鼠を用いている。

B₂-Butは白鼠体重 150 g について 1,000 μ gを経口投与し、投与後3時間でdry-ice acetone中で屠殺し、直ちに肝を摘出し実験を行なった。またMMCはB₂-But投与36時間前に 0.5mg/kgの割合で腹腔内に注入している。

実験項目： 上記各群の白鼠から摘出した肝の一部を、直ちに10%ホルマリンで固定し、病理組織学的検索に供した。

次に実験に供した全白鼠の肝組織総ビタミンB₂量ならびにB₂各型の分別定量を行なった。同時に、肝flavokinase, FAD synthetase, glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), malic dehydrogenase(MDH)およびlactic dehydrogenase(LDH)の活性を測定した。とくにGOTおよびMDHについてはisozymeの変動を含めて検討した。ビタミンB₂量は肝湿重量1mg当りの μ gで表わし、酵素活性はすべて肝蛋白量1mg当りで表現している。

また、残余肝から磷脂質を含む粗酸化脂質を抽出し、このものについてESRスペクトル、赤外分光吸収スペクトル(I R S)を測定した。

実験方法：

(1) 試料の調製： 肝組織定量には、秤量した組織を細切し、20倍容(vol%)の割合にAq. restを加え、0—4℃でhomogenateした。酵素測定試料は、凍結したままの肝に20倍容(vol%)の0.025M tris-buffer(pH 7.4)を加えてhomogenateとし、これに10 KC 20分間sonicationを加

えて、3,000rpm10分遠心してその上清を酵素測定に供した。

脂質抽出には凍結肝に10倍容(vol%)のacetoneを加えて磨砕し、fat-freeの濾紙で濾過し、残渣にさらに10倍容のacetoneを加えて洗浄した。洗浄操作は濾液が完全に透明になるまで反復する。この残渣を乾固し、chloroform-methanol(3:1)でSoxhlet抽出器を用い大気中で抽出した。この抽出物を粗酸化脂質とした。なお一部の肝組織から加藤の方法¹⁰⁾にしたがつて磷脂質を抽出し、I R S測定を行なった。

(2) 測定方法： 肝組織ビタミンB₂量は八木のlumiflavin蛍光法¹¹⁾を用いた。またB₂各型の分別定量には、lumiflavin法にpartition paper chromatographyを併用する八木の方法にしたがつた。蛍光定量にはFarrand社製fluorospectrophotometerを使用している。flavokinaseはKearney¹²⁾に準じ(表1)、FAD synthetaseはKornberg¹³⁾の方法を一部改変し(表2)、前者はFMN、後者はFADの生成量(μ g)を測定することより活性を求めた。GOT、MDHの活性は生成oxalo醋酸をdiazonium塩で発色して定量する勝沼の簡易定量

表1. The assaying method of flavokinase activity.

Reaction mixture	
homogenate	2ml
0.375M Tris-Buffer(pH8.2)	"
5 $\times 10^{-4}$ M Riboflavin	"
5 $\times 10^{-4}$ M ATP	"
15 $\times 10^{-4}$ M MgSO ₄	"
↓	
final pH8.0, 30℃	
incubation(1hour. at 37℃ in a dark place)	
↓	
+17.5% TCA 4ml(to stop the reaction)	
↓	
boil 10min.	
↓	
cool	
↓	
filtrate	
↓	
supernatant+2.5ml of 2.4M·K ₂ HPO ₄	
↓	
5ml of filtrate+12.5ml of Benzylalcohol(neutralized)	
↓	
shaking and centrifuged	
↓	
supernatant(4ml)+n-NaOH(4ml)	
↓	
photolysis for 30min.	
↓	
fluorometry	

表2. The assaying method of FAD synthetase.

法¹⁴⁾を用いた。LDH活性はWroblewskiの変法¹⁵⁾にしたがい、単位は蛋白1mgが反応1分当り吸収度0.001減少する活性を1単位として表わした¹⁵⁾。GOT, MDHのisozymeの分離定量は、水解処理後の澱粉を用いてstarch gel zone electrophoresisにより分離する方法を用いた¹⁵⁾。

III. 実験成績

病理組織学的変化は表3に示す如く、細胞変性はDAB群に最も強く、ついでDAB+MMC+B₂-But群であり、DAB+B₂-But群では前2者に比し明らかに軽度であつた。細胞壊死の程度は細胞変性と平行してみられた。再生はDAB群中、悪性

表3. Pathological changes in liver.

groups		DAB	Normal + B ₂ -But.	DAB + B ₂ -But.	Normal MMC + B ₂ -But.	DAB + MMC + B ₂ -But.
changes						
Liver cells	degeneration	+++	-	++	-	+++
	necrosis	++	-	+	-	+++
	regeneration	+	-	+	-	±
	disarrangement of liver cells	+	-	+	-	±
	deposition of bile pigment	+	-	-	-	-
Glisson's capsule	inflammatory cell infiltration	+	-	±	-	±
	proliferation of connective tissue	+	-	±	-	±
	new formation of bile duct	-	-	-	-	-

表4. DAB投与白鼠肝内B₂量に及ぼすB₂-ButおよびMMCの影響.

	総B ₂ 量(μg)	FAD量(μg)	FMN量(μg)
正常対照群 (7)	36.7±4.4	36.1	15.7
正常+B ₂ -But群 (7)	37.7±4.1	41.7	19.5
正常+MMC+B ₂ -But群 (7)	26.1±2.9	21.3	12.4
DAB群 (6)	34.5±3.2	42.8	14.8
DAB+B ₂ -But群 (6)	22.4±4.1	24.5	10.9
DAB+MMC+B ₂ -But群 (6)	23.7±3.3	21.5	11.8

()内数字は白鼠数を表わす。

総B₂量はFRとして表示する。

化(発癌)を示したものに最も強く、発癌しないDAB群でも中等度に認められた。DAB+B₂-But群でも再生は同程度で、とくに強いという所見は得られなかつた。DAB+MMC+B₂-But群での再生は前二者に比し軽度である。肝細胞素の乱れはDAB群に最も著明であつた。また肝細胞内胆汁色素沈着は、悪性化した白鼠のみに認められている。

肝内総B₂量では、正常群(平均36.7μg/g)とDAB群(平均37.7μg/g)の間に有意の差はみられない。しかしMMC投与を受けると、正常およびDAB投与群のいずれでも明らかに減少し、これはB₂-But経口投与にもかゝらず対照の70%程度の値となる。分別定量してみると、一般にFADの減少がFMNの減少より著明であつた(表4)。

Flavokinase活性は正常群(平均0.117μg/mg・

	Flavokinase	FAD synthetase	Flavokinase 生成FAD μg/mg・protein				FAD synthetase 生成FMN μg/mg・protein			
			0.05	0.1	0.2	0.4	0.2	0.4	0.6	0.8
正常対照群 (7)	0.117	2.74								
正常+B ₂ -But群 (7)	0.080	3.74								
正常+MMC+B ₂ -But群 (7)	0.280	5.06								
DAB群 (6)	0.062	4.31								
DAB+B ₂ -But群 (6)	0.093	5.11								
DAB+MMC+B ₂ -But群 (6)	0.361	4.83								

(注) はDAB投与白鼠 は正常対照白鼠を表わす

()内数字は白鼠数を示す。

図1. DAB投与白鼠肝flavokinaseおよびFAD synthetaseに及ぼすB₂-ButおよびMMCの影響.

図2. DAB投与白鼠肝LDH活性に及ぼすB₂-ButおよびMMCの影響.

prot)に比し, DAB群(平均 0.062 μ g/mg $\cdot$ prot)では50%に減弱している. MMC注入白鼠では, 正常白鼠, DAB投与白鼠のいずれでも, 活性は2倍以上に増強した. B₂-But単独投与は, 正常肝の活性をむしろ低下せしめたのに対し, DAB投与群では逆に回復の傾向を示した(図1).

FAD synthetase活性は, DAB投与群では正常白鼠肝の活性(平均7.74 μ g/mg $\cdot$ prot)の60~70%に減弱する. この活性減弱はMMC注入およびB₂-But投与でもほとんど影響を受けなかつた(図1). しかし, 正常白鼠ではB₂-But投与でFAD synthetase 活性は低下してくる.

LDH活性はDAB群(平均 7,169単位/mg $\cdot$ prot)で正常対照群(平均 9,876単位/mg $\cdot$ prot)より低下する. しかし, B₂-ButをDAB飼育白鼠に添加すると, 活性は正常範囲に回復している. この傾向はMMCで予め処理した白鼠により著明であつた. これに反し正常白鼠にB₂-Butを投与すると活性はむしろ減弱して正常下界となり, MMC投与は正常白鼠にほとんど影響を与えないものごとくであつた(図2).

GOT活性は, 正常白鼠(平均 62.5単位/mg $\cdot$ prot)に比しDAB投与群では, やや低下の傾向にある. B₂-But投与を受けると, GOT活性は約50%程度に減弱した. しかし, MMCで予め処理しておくと, B₂-Butのこの作用は軽減する. すなわち, ここでもB₂-ButとMMCは拮抗的作用を示すことがわかる. この総肝GOT活性に及ぼす

図3a. DAB投与白鼠肝GOTならびにMDH活性に及ぼすB₂-ButおよびMMCの影響—くにisozymeの変動—

図3b. 殿粉ゾーン電気泳動で得られたisozyme活性値.

B₂-ButとMMCの拮抗作用は, 正常肝でもDAB投与肝でも同様にみられた.

MDH活性もDAB群では正常対照群に比し低下の傾向がある. B₂-ButはMDHの活性を増強し, MMCで処理された白鼠ではさらに活性が高まつていた(図3a).このように, B₂-ButおよびMMCは, 一見したところ正常でもDAB投与群でも同じ作用機転をもっているようにみえる. しかしGOTおよびMDH isozymeの活性をみると, 正常対照群とDAB投与群の間に, 活性変動の面で著しい差の存することが明らかになつた. すなわち, DAB投与群での肝GOT活性の減弱は, 主としてmitochondrial GOT (GOTm)の活性低下を反映するものであり, B₂-ButやMMC投与で活性が変動しても, それは主としてsoluble GOT (GOTs)の変動に由来するものであつた. これに対し, 正常対照群での変化は主としてGOTmの変動を反映しているものである(図3b). MDH

図4. 正常対照白兎肝から抽出した粗酸化脂質のESRスペクトル (9355MC).

正常対照肝と同じ条件であるが、吸収強度はS/N比からみて正常肝より明らかに減弱している。

図5. B₂-But投与正常白兎肝から抽出した粗酸化脂質のESRスペクトル (液体窒素温 9342.2 MC).

でもこのことは同様で、B₂-But投与による活性の変動は、正常対照群ではmitochondriaでの活性変化に由来するのに、DAB群ではsoluble fractionの変化を反映するものごとくである。しかし、MMCの投与ではGOTと異なる態度を示した。すなわち、正常白兎ではMMC投与でMDHmの活性はむしろ減じ、MDHsが著明な活性増強を示すにいたっている。また、GOTs・MDHsともに、DAB投与群では正常対照群を上回る活性を示している (図3a, b)。

ESRスペクトル:

図6. MMC+B₂-But群白兎肝から抽出した粗酸化脂質のESRスペクトル (液体窒素温 9350 MC, Time const. 1.0sec.)

$g = 2.035$ に新しいsharpな吸収帯がみられる。

図7. DAB発癌白兎肝から抽出した粗酸化脂質のESRスペクトル (液体窒素温 9346MC, Time const. 0.3sec.)

正常肝から抽出した粗脂質分画のESRスペクトルをみると (図4)、弱い非対称性の幅広い下向きの吸収を示す。B₂-But投与群の肝から抽出した同一の分画では、この吸収がS/N比からみて明らかに減弱している (図5)。しかしMMCで予め処置した群では、むしろ吸収強度は増大している (図6)。

DAB発癌肝から同一処理で抽出した標品では、正常肝からのそれに見られた幅広い吸収の強度が増強し、一部に分離の傾向がみられたほかに

正常対照肝からのそれに比し、吸収強度は増大している。

図8. DAB変性白鼠肝から抽出した粗酸化脂質のESRスペクトル(液体窒素温 9352MC, Time const. 0.3 sec.)

図9. MMC+B₂-Butを負荷したDAB投与白鼠変性肝から抽出した粗酸化脂質のESRスペクトル(液体窒素温 9334MC, Time const. 0.3 sec.)

$g = 2.035$ にsharpな吸収スペクトルが新たに出現している(図7)。この吸収スペクトルは室温ではほとんど認められないので、混在する金属などのfree radicalとは考えられず、むしろ分子内の立体構造の変化によつて生ずるものと考えたい。DAB変性肝から同一処理で得られた標品では、ESRスペクトルの幅広い部分の吸収強度が増強しただけで、sharpな吸収スペクトルは決して出現せず、これは発癌肝に特異的に見られる所見であ

図10. MMC+B₂-Butを負荷したDAB投与白鼠発癌肝から抽出した粗酸化脂質のESRスペクトル(液体窒素温 9335MC, Time const. 1 sec.)

つた(図8)。

またDAB投与白鼠肝に及ぼすB₂-ButおよびMMCの影響を、ESRスペクトルでみても正常肝のそれとほとんど同様であつた。しかし、発癌肝のsharpな吸収スペクトルに対しては、B₂-Butは全く変化を及ぼさず、MMCは軽度ながらその強度を減ずるようであつた(図9, 10)。なお、これら標品中のP含量は、156~207μgの範囲内にあるように調製している。

IRS; ESRスペクトルを観察した直後に同一標品から得られたIRSをみると、DAB発癌肝から抽出した粗脂質標品では、C=C(1,640 cm⁻¹)およびC-O-CならびにP-O-C結合(1,010~1,080 cm⁻¹)の吸収強度が、正常肝からのそれに比し著しく減弱していることが目につく。また、1,380~1,420 cm⁻¹および1,086~1,170 cm⁻¹部の吸収帯に強度の減弱や吸収帯の移動、増数が観察される(図11, 12)。

C=Cの振動エネルギーの減少は、DAB変性肝から抽出した標品にも見られたが、C-O-CおよびP-O-Cの変化は発癌肝に最も著明に出現した。一方、B₂-Butを負荷するとC=Cの吸収強度が増強する傾向にある(図13a, b)。

以上を総括すると、DAB発癌白鼠肝には正常

(注) $2400\text{cm}^{-1}\sim 3600\text{cm}^{-1}$ の深い吸収は大量の水の混入を示す。

図11. 正常白鼠肝から抽出した粗酸化脂質の赤外分光吸収スペクトル

図12. DAB発癌白鼠肝から抽出した粗酸化脂質の赤外分光吸収スペクトル

肝に存在しない立体構造上の変化が出現することが類推できると思う。一方、変性肝では二重結合の減少または分子内移動に伴ない、何らかの機序で分子内にradicalが増加するが、この変化は大部分が可逆的であり、 $\text{B}_2\text{-But}$ などの抗酸化薬によりかなり正常化の方向に向かうことを思わせる。しかしいかに大量の $\text{B}_2\text{-But}$ といえども、1回のみの投与ではsoluble fractionでの変化が中心で

あり、細胞顆粒内の変化に対しては反復投与が必要であることがisozyme活性の変化から明らかにされた。また、 $\text{B}_2\text{-But}$ 投与によりGOT活性が低下するとともにMDH活性が上昇する事実から、酸化還元 (TCA cycle) 系酵素の賦活化によつてglutamin酸からのoxalo醋酸産生が低下し、生体の正常の姿 (いわばhomeostasisともいふべきもの) が維持されていることを知った。

図13a. DAB変性白鼠肝から抽出した粗酸化脂質の赤外分光吸収スペクトル

図13b. B₂-But投与正常白鼠肝から抽出した粗酸化脂質の赤外分光吸収スペクトル

IV. 考 案

DAB白鼠肝発癌過程におけるbenzoquinone, semiquinone, hydroquinoneの作用と、これにかんする生体酸化還元系の反応については、従来から種々検討されてきている。

たとえば福井¹⁶⁾は、フロンティア電子の考え方を用いて、アゾ結合は蛋白質との結合にあずからず、分解過程で非発癌性のアミンに変化する時の反応位置に発癌性を求め、この位置のフロンティア

電子密度が小さいほど発癌性は小さくなるとしている。またDAB肝発癌に、セレンや、semi-quinoneを有するビタミンB₂の投与が防止的に働くことはよく知られている。

教室でもこれを実験的に証明し、さらにビタミンB₂欠乏下でDAB発癌実験を行ない、その最初の構造上の変化が細胞顆粒の燐脂質に起こること；さらにこの異常獲得形質はlipo蛋白→RNAまたはRNA核蛋白→DNA核蛋白の経路を経

て、transformateされる可能性を赤外分光吸収スペクトルの変化と肝細胞酵素系の変化を併せて説明した⁹⁾。これらの研究をさらに進展せしめるために、本稿の実験では、DAB発癌過程におよぼすquinone類の作用を、肝lipo蛋白（あるいは磷脂質—蛋白複合体）の立体構造および機能の変化の面から追究した。

まず機能面の変化をみるに、DAB (benzoquinone核含有)はFR→FMNの過程 (flavokinase) およびFMN→FADの過程 (FAD synthetase) のいずれをも阻害した。すなわち free riboflavin が正常量含まれていても、生物学的活性を有する flavin蛋白の低下をきたすことが予想された。この活性錯化合物の形をとる semiquinone の radical 反応量の減少は、当然酵素的酸化還元系全体の活性を減弱せしめるであろう。一方、B₂-Butの形で活性B₂を負荷すると、正常肝ではFAD、FMNの増量をきたすとともにflavokinase、FAD synthetaseの活性の減弱を招いた。このことはB₂-Butがfree riboflavin (FR)よりはるかに容易に活性錯化合物を形成し、酵素的酸化還元系に参加して radical中和作用を現わすことを推測せしめる。そしてこの際のFMN・FAD合成酵素活性減弱は、DABにおける活性減弱とは本質的に異なるもので一種のfeedback機構に由来するものではないかと考えている。この考えは、DAB投与肝においてB₂-But負荷後にflavokinase活性が一部回復することからも支持されており、このB₂-Butの作用の特性をわたくしはこの物質の脂溶性に求めたいと思う。次にhydroquinone核を有する制癌剤(MMC)は、肝内FAD、FMN含量を減じて、flavokinase活性を増強せしめた。このFMN合成促進も一種のfeed back機構を介してenzyme inductionが soluble fractionに生ずる結果で、以前わたくしがGOTs inductionで観察したものと類似の機構による変化と考えている。しかし、DAB投与群肝FAD synthetaseがB₂-ButおよびMMCの負荷にほとんど影響されず、正常白鼠肝の60%前後の活性に留まつたことは、この酵素産生系に正常と異なる

電子構造の変化が生じたことを類推せしめ、この方面からの今後の検討が俟たれるものである。

以上のごとく、benzoquinone、semiquinoneおよびhydroquinoneは生体におのおの異なる作用をもたらす。とくにsemiquinoneとhydroquinoneはしばしば拮抗的現象を提示したが、この現象は肝LDH、MDHおよびGOTの活性においても観察された。また、DABによつて惹起された一部の酵素活性の変動が、semiquinone、hydroquinoneの作用を受け難い状態にまで変化することも知られた。すなわち肝LDH活性はflavokinaseと平行して変動したのに対し、DAB投与肝のmitochondrial GOTおよびMDHはB₂-ButおよびMMCの負荷にもかかわらず、全く変化せずまたDAB投与白鼠肝と同程度の活性減弱を維持した。また全肝のGOTとMDH活性が丁度逆比例的に変動し、しかも正常肝ではこれがmitochondriaを中心に起こるのに対し、DAB投与肝ではほとんどがsoluble fractionで変動していることはきわめて興味深い現象といわねばならない。このような細胞顆粒酵素活性の負荷物質に対する態度の相異が、その部の機能lipo蛋白（あるいは活性錯化合物複合体）の物理化学的性状の変化に由来するであろうことはいまさらいうまでもない。この種の活性錯化合物複合体としての酵素蛋白の変性を、過酸化脂質と蛋白の結合に求める説が近年有力になってきている¹⁷⁾。そして変性蛋白は主としてSH酵素であり、その他の酵素蛋白は実験的にはほとんど影響を受けないことも知られてきた。この過酸化脂質と疾病との関連は動脈硬化症発生の機構で主として研究されてきたが¹⁸⁾、福住らは最近ヒト癌組織中にtrans-trans diene hydroperoxideおよびcistrans diene hydroperoxideを検出して、過酸化脂質の存在による酵素蛋白の変性を示唆している。これら過酸化脂質が癌の本態であるか否かの論は別としても、酵素蛋白の変性あるいは癌特有の酵素パターンの形成を導くenzyme forming systemにおける常磁性の発生に、少なくともその一端を

担っているのではないであろうか。わたくしは、従来の実験で癌組織から抽出した磷脂質の赤外分光吸収スペクトルには、脂肪変性組織からのそれに似た変化が起こり、正常のそれとは明らかに異なることから、磷脂質分画の電子構造に何らかの変化が生ずると考えていた。そこで、まず加藤の方法にしたがつて分離抽出した磷脂質でESRを測定したが、これではradicalは検出されず、質量分析およびNMRで多くの脂肪酸が存在することが知られたに留まつた。これらの詳細については稿を改めて述べることにするが、この実験中に興味深い事実遭遇した。その一は、担癌患者では悪液質が極度に進行するにつれ、神経組織を除く肝・脂肪組織、その他の構成脂酸(とりわけ磷脂質中の脂酸)が次第に不飽和度の少ないものになり、かつ類似の構成百分比をもつにいたることであり、ほかには生化学的方法で抽出した純化脂質では成立しない癌特有の免疫が、粗抽出酸化脂質ではわずかながら成立するという事実である。この事実を含めて考えた結果、わたくしは生体の反応系を生化学的に純化を繰り返した磷脂質よりは、むしろ粗標品中に混在する活性錯化合物複合体に求めるべきものと考え、前記のacetone不溶、chloroform-methanol可溶でかつether難溶の粗酸化脂質分画について、ESRスペクトルを測定した。この結果、正常肝で見られる吸収は、B₂-But 負荷白鼠肝ではその強度の減弱を、またDAB変性肝では吸収強度の増大を伴なっていることが知られた。そして特記すべき変化としてDAB発癌肝のそれに $g = 2.035 \pm 0.003$ のきわめてrelaxationの少ないradicalが別に存在することが明らかになった。この特異な一見free radicalにも見える吸収は、実にヒト胃癌組織でも証明され、そして同じ胃の残存正常粘膜からは決して検出できなかった。

人体にビタミンF(必須脂酸)としてlinol酸が不可欠であり、この欠乏が酸化還元の低下、脂肪変性を招くことはよく知られている。この種必須脂酸は末端メチル基から数えて、C₆とC₇の間に二重結合を有し、-COOH残基の近傍にmethylene

dieneをもつ多価不飽和脂肪酸であり、しかもおのおの二重結合がcis-cis methylene共軛二重結合であることが不可欠の条件であるといわれている。この種の多価不飽和脂肪酸は磷脂質の構成脂酸として知られているが、このような高度の不飽和脂酸およびこれを含む化合物が空气中に放置される時は、O₂を吸収して自動酸化を起こし、ついには黒褐色に変ずる。この過程はradical反応の結果、過酸化radicalを生じて、無限に連鎖しうるradicalおよび過酸化物の生成を導くことが大野¹⁹⁾によつて明らかにされた。しかし、細胞顆粒では豊富な多価不飽和脂肪酸を含み、しかも活発に酸素利用を行なっているにかゝらず、このような自動酸化は決して起こらないのである。わたくしはこの生体内での驚異的な酸化還元反応の特性を、細胞顆粒での磷脂質-蛋白複合体の活性に求め、NADH→NADの過程のHとelectronのtransferがまずここに起こると考えた。このHとelectronの1個がradical的にsemiquinoneに移り、さらに残余のelectronがまずcytochrome系にtransferされるのではなからうか。そしてこの両者が最後にradical中和的に再結合する場がHOにいたる過程であり、この間のcharge transferにおいて失れる振動エネルギーが、生体の活動源たるエネルギーを産生するものではないかと考えている。そしてFeその他の金属を内蔵するポルフィリン環に見られるフィトールの構造が、Förster²⁰⁾のmodelにおけるweak couplingの場合の励起エネルギー移動の距離 r を規定して一定の割合でこれを行なわしめるのではないかと考える。この酸化反応がlipoxidase反応のごとく、linol酸のC₁₁で起こると仮定すると、大野¹⁹⁾の述べるように

または

なる形を考え、これが

なる $\text{C}_9 \sim \text{C}_{12}$ に butadiene 的構造を有する hydroperoxide を生ずる。この存在はあるいは I R S における $1,380\text{cm}^{-1}$ 附近の吸収と一致するかも知れず、この吸収が発癌肝からの抽出粗脂質で、吸収強度の減弱または吸収帯の移動を示したことは何らかの構造上の変貌を想像させる。この hydroperoxide が O_2 あるいは $\cdot\text{O}_2\text{H}$ + 金属ポルフィリン

になる反応を想定した。しかし同一平面内で回転せずにこれを生ずることは、大きいアルキル基を両側に有する点で無理のように思う。そこで現在では

体の存在下で $-\text{C}=\text{C}-\text{C}-$ と重合して

に変化し、これから ketoenol 生成の場合のように、

が加わつて

なる環状化合物を生じたと仮定すると、正常の cis-cis 共軛 methylene diene が trans-cis 型または transtrans 型に変化する可能性が生ずる。すなわち $-\text{C}-\text{O}-\text{O}-\text{C}-$ の $-\text{O}-\text{O}-$ がきわめて不安定なことからまず第一に互変異性的解離平衡をとることが考えられる。

ここで生じた radical が共鳴形に入ることが考えられるが、もしこうであると、わたくしの考え方では、この H^+ が $\text{FAD} \rightarrow \text{FADH}$ に入るとしているため、これはイオンのため、semiquinone の radical 的 transfer には不適合のように思われる。そこで第二に

の構造に変化する過程を想定している。この回転はあるいは cis 型共軛 methylene diene を trans 型に変えることも考えられ、また回転が加わらぬ時はケトンの生成のために、radical の spin relaxation をかなり減ずるので、わたくしの得たスペクトル出現には都合のよい構造になる。しかし、このような考え方は、あくまでも ESR スペクトルと I R S の変化を併せた推測にすぎず、その是非は今後の各方面からの検討によつて決せらるべきものであることはいうまでもない。

最後にわたくしの抽出した分画で脂質ないしリポ蛋白が主たる成分であるか否かの論議があるが、この点については先述のごとく、質量分析で C_{25} を最大とし、 C_{28} , C_{20} , C_{18} , C_{16} , C_{14} と各種の脂酸を大量に含み、かつこれを完全に乾固し、chloroform に再抽出した標品の NMR で、ほとんど

methyleneのみといえる位のスペクトルであつた点からも問題ではないと思う。しかし、紫外部の吸収が468m μ に相当強く出現したことは、リポ蛋白の混入があり、かつ自働酸化類似の過程を経た酸化脂質が存在することを思わせる。そしてこの中には共軛二重結合ケトンの産生も推定できる。また、この抽出物が励起光468m μ で516m μ の蛍光を發し、きわめて短時間で特有の茶褐色の着色を失ない、水様透明なものに変化したことは、radicalの重合による不對電子消失が割に容易に起こりうることを示唆するもので、charge transferを考える上からもきわめて興味深いことと考える。

V. 総 括

B₂-ButのDAB発癌ないし障害白鼠肝への作用を、諸種酵素活性の変動と燐脂質を含む粗抽出酸化脂質のESRスペクトルおよび赤外分光吸収スペクトルの変化の面から検討した。すなわち、B₂-Butが生体酸化還元系の反応中にとり、生体組織（とくに多価不飽和脂酸）の有する不對電子との関係を明らかにせんとし、生体から抽出されるESRスペクトル出現を伴う物質を追究し、粗酸化脂質抽出物にこれを求め、この変化から検討の第一歩を始めた。

実験は正常対照白鼠群、B₂-But投与群、B₂-But+MMC投与群、DAB群、DAB+B₂-But投与群、DAB+B₂-But+MMC投与群の6群に分けて行なわれた。この各群について、病理組織学的変化、肝組織ビタミンB₂定量ならびに肝flavokinase、FAD synthetase、LDH、GOTおよびMDH活性を測定し、GOT、MDHについてはisozymeを分離定量した。また各群より、acetone不溶、chloroform-methanol可溶の粗脂質をSoxhlet抽出器を用いて、大気中で抽出した。抽出物はそれぞれ、ESRスペクトルおよび赤外分光吸収スペクトル測定が行なわれた。

1) 肝B₂量は正常群とDAB群に有意の差はみられなかつたが、MMC投与群では減少した。後者の減少はFADにとくに著明であつた。

2) Flavokinase活性はDAB群で正常群より低い。B₂-Butは正常群の活性を減ずるが、DAB群ではむしろ活性が回復の傾向にある。MMC投与はこの活性の著増を招いた。

3) FAD synthetase活性も、DAB群で正常群より明らかに減弱する。正常白鼠にB₂-Butを負荷するとこの活性は低下する。この低下はMMCの前処理で軽減した。しかし、DAB群での低活性には、B₂-ButおよびMMCいずれの負荷でもほとんど影響がなかつた。このことはDABが肝soluble fractionの酵素蛋白に変化を生じていることを意味するものと考えられる。

4) LDH活性はDAB群で有意の低下をみた。この活性低下はB₂-But投与で回復したが、この傾向はMMCの負荷を加えたものでより著明に現われた。

5) GOTおよびMDH活性はDAB群で減弱の傾向にある。全肝homogenateのGOT活性はB₂-But投与で低下し、MMC前処理はこの低下傾向を軽減せしめる。全肝homogenateのMDH活性はB₂-But投与で増強した。GOTとMDH活性のこの変化は、oxalo-acetate産生に対する経路の変化を示すものとして興味深いことである。

一方、isozymeの変動をみると、GOT、MDHともに、正常群ではB₂-Butがmitochondriaでの活性変化をきたすのに対し、DAB群ではsoluble fractionの変化が主であることが知られた。すなわち、DAB群での酵素活性の変動は、soluble fractionでの代償的酵素誘導に基づくことが明らかになった。MMC+B₂-But投与は正常群でもDAB群でも、soluble fractionのMDH活性を増加せしめた。これはMMC前処理でmitochondriaに何らかの変貌が生ずることを暗示する。

要するに、DAB群ではmitochondriaでの酵素蛋白に何らかの変化が起こり、この状態にB₂-Butを加えて酵素活性の回復が起こつても、回復は主としてsoluble fraction levelでの代償的活性上昇にすぎないことが知られた。

つぎにmitochondriaでの機能リポ蛋白の変化を

電子構造の変化に求め、抽出粗酸化脂質でのESRスペクトルを測定した結果を要約する。

6) 正常白鼠肝から抽出した粗酸化脂質のESRスペクトルでは、常温で検出困難であるが、液体窒素温で幅広い下向きの吸収帯が得られた。B₂-But投与により、この吸収帯の強度は明らかに減弱した。DAB変性肝では吸収強度が増強するが、新しい吸収の出現は得られない。しかし、発癌肝からの抽出物では、この幅広い下向きの吸収帯に加えて、新しく $g = 2.035 \pm 0.003$ のsharpな、一見free radicalを思わせる吸収帯が現われた。これは発癌肝に特異的に出現し、ヒト胃癌組織からの抽出物にも認められるきわめて特異的な所見である。また、この新しい吸収帯は上下対称的であることも知られた。

7) 赤外線吸収スペクトル上では、上記のsharpな吸収帯の出現に一致して、C=CおよびC—O—C、P—O—Cの吸収スペクトルの減弱、移動が明らかにされた。

以上の結果から、わたくしは癌組織においては電子構造の異常が存在し、少なくともその一部は細胞顆粒に存在する磷脂質を含む機能リポ蛋白（または活性錯化合物複合体）におけるradicalのtrapまたはspin relaxationが正常のそれと異なるものと推測した。そして、量子生物学的にみて、これが癌組織内過酸化物に生ずるcis-trans共軛methylene dieneにその源を求め、この常磁性の

変化が癌特有の酵素活性の変動を招くものと推論した。しかしこれらの変化は、未だ推測の領域を出ず、その本質的解明は今後行なわれる幾多のモデル実験を総合した上で得られることはいうまでもない。

文 献

- 1) O. Schmidt: Physik. Chem., 39: 59, 1938, 42: 88, 1939, 43: 185, 1939. — 2) A. Pullman: J. Chem. Phys., 18: 257, 1950. — 3) P. Daudel, et al.: Chemical carcinogenesis and molecular biology, Wiley, New York, 1966. — 4) G.W. Wheland: J. Amer. Chem. Soc., 63: 2025, 1941. — 5) E.C. Miller, et al.: Cancer Res., 7: 468, 1947, 9: 336, 1949. — 6) C. Heiderberger, et al.: J. Amer. Chem. Soc., 7: 2877, 1955. — 7) R. Mason: Brit. J. Cancer, 12: 469, 1958, Nature, 181: 820, 1958. — 8) E. Boyland: Yale J. Biol. Med., 20: 321, 1948. — 9) 下山孝: 日消誌, 62: 701, 1965. — 10) 加藤久太: 生化学, 28: 714, 1956. — 11) 八木国夫: ビタミン, 6: 528, 1953. — 12) E.B. Kearney, et al.: J.B.C., 193: 821, 1951. — 13) A. Kornberg, et al.: J.B.C., 182: 795, 1950. — 14) 勝沼信彦, ほか: ビタミン, 29: 161, 1964. — 15) 勝沼信彦: 臨床酵素学必携, 山村雄一, 勝沼信彦, 藤井節郎編集, 南山堂, 389頁, 1966. — 16) K. Fukui, et al.: Cancer Res., 15: 233, 1955, GANN, 46: 346, 1955. — 17) T. Nishida, et al.: J. Lipid. Res., 1: 450, 1960. — 18) 福住一雄: 油化学, 14: 119, 1965. — 19) 大野公吉: “脂肪代謝” 中外医学双書, 1965. — 20) Th. Förster: Discussion Farady Soc., 27: 7, 1957.