含窒素芳香族化合物のフッ素置換による抗発癌性構造修飾

佐伯 憲一

名古屋市立大学薬学部, 〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1

Anti-Carcinogenic Structural Modification by Fluorine-Substitution
in Aza-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Ken-ichi SAEKI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori,
Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

(Received August 28, 2000)

One of the major goals of a series of our studies is to explore the availability of a method for anti-genotoxic modification of carcinogens by fluorine-substitution. Quinoline, a hepatocarcinogen, mutates bacterial tester strains in the presence of rat liver microsomal enzymes and induces GST-P (placental glutathione S-transferase)-positive foci in a medium-term bioassay system for hepatocarcinogenesis. On the other hand, 3-fluorinated quinoline (3-FQ) was neither mutagenic nor carcinogenic in the same assay system, whereas 5-fluoroquinoline (5-FQ) was mutagenic and carcinogenic. Quinoline, 3-FQ, and 5-FQ were also tested in an *in vivo* mutagenicity assay system using a *lacZ*-transgenic mouse (MutaTMMouse). Mutation was induced by quinoline and 5-FQ only in the liver, the target organ of carcinogenesis by quinoline, but not in the other organs examined. 3-FQ was non-mutagenic in all of the organs. The results strongly indicate that fluorine-substitution at the position-3 of quinoline could be an anti-genotoxic structural modification of quinoline in a wide range of its genotoxic end-points. Additionally, seventeen mono- and di-fluorinated derivatives of 1,7-phenanthroline, 1,10-phenanthroline, benzo[*h*]quinoline, and benzo[*f*]quinoline were subjected to analysis of their structure-mutagenicity relationship. The results support that the enamine epoxide structure of the pyridine moiety, as well as the bay-region epoxide structure, is responsible for mutagenicity. These results suggest that the introduction of a fluorine atom to the molecule in question may be a useful tool to modify their mutagenic potency and to better understand the mechanism of mutation.

Key words—fluorine substitution; mutagenicity; metabolic activation; quinolines; carcinogenicity

1. はじめに

医薬品や農薬などの生理活性化合物の開発においては、薬効の増強や毒性の除去の目的でリード化合物からの化学修飾が盛んに行われる。近年特にフッ素置換構造修飾が、様々な分野において活発に展開されている。フッ素原子には 1) 非常に大きな電気陰性度, 2) 水素原子に近いファンデルワールス半径, 3) C-F 結合の大きな結合エネルギー, といった特異な性質が知られており, それらを利用してステロイドや抗生物質などの多くの医薬品にフッ素置換構造修飾が実用されている。

医薬品のみならず工業製品の開発では、遺伝子傷害性の有無が問題となるケースが多く見られ、最近では開発の早い段階で安全性の検討が行われている。現在医薬品開発の場における遺伝子傷害性試験としては、Ames 試験¹⁾に代表される細菌を用いた変異原性試験や、培養細胞系を用いた染色体異常試

験、並びに、齧歯類を用いた小核試験の 3 種の 1 次スクリーニングが主に用いられている。抗癌剤などを除き、これらの試験においていずれかが陽性となった化合物については、その後の開発段階へと進むのは非常に困難であると判断される。これらの試験で陽性を示す物質は、主に発癌イニシエーターと呼ばれるカテゴリーに属する遺伝子傷害性物質である。これらは一般に 2 つに分類でき、1 つは、アルキル化剤の一部に見られるようなそのもの自身が求電子活性を有し DNA と直接反応する化合物であり、もう一方は、そのもの自身には遺伝子傷害性がなく、生体内の酵素による代謝活性化を受けた後に DNA と反応する化合物であり、多くの発癌性物質は後者に属する。この生体内における代謝活性化は、P450 などの酸化酵素によるものが非常に多く知られている。フッ素置換基は、前述の性質を見れば明らかのように、その置換位置及び近傍部位における

Chart 1. Proposed Metabolic Activation Pathway of Quinoline (Enamine Epoxide Theory)

酸化代謝に対して抵抗性を発揮しうると考えられる。事実、芳香族炭化水素の環の水素原子をフッ素原子で置換することにより、その置換部位での酸化的代謝が抑制されることが知られている。²⁾ また、有機化合物の1ないし2個程度の水素原子をフッ素で置換しても、生体内においてもその化合物との見間違いが生じることもよく知られており、フッ素の疑似効果(ミミック効果)と呼ばれている。これらのフッ素置換基の効果を用いれば、ある遺伝子傷害性を有する生理活性物質の代謝活性化部位の水素原子をフッ素原子で置換することにより、有効な生理活性はそのまま維持しながら遺伝子傷害性のみを除去することも可能であると予想される。

川添らは、医薬品の基本骨格中にもよく見られるキノリンを用いて、そのフッ素置換部位と遺伝子傷害性について、Ames試験により*in vitro*での検討を行い、キノリンのベンゼン環部位へのモノフッ素置換ではいずれのフッ素置換体も変異原性が陽性であったのに対し、ピリジン環部位の3位をフッ素で置換した場合には変異原性の消失が見られることを明らかにしている。³⁾ さらに、キノリンと核酸との付加体を加水分解すると定量的に3位水酸化体が得られた⁸⁾という実験事実より、それまで明らかにされていなかったキノリンの代謝活性化機構として、エナミンエポキシド機構(Chart 1)を提唱している。³⁻⁵⁾

キノリンについては、1976年にラットに対する肝発癌性が伊東らにより報告され、⁶⁾翌年にはマウスに対する肝発癌性⁷⁾及びサルモネラ菌に対する変異原性⁸⁾が報告されたが、*in vivo*不定期DNA合成試験が陰性であったことからnon-genotoxic carcinogenであるとの報告もあり、⁹⁾*in vitro*における変異原性と齧歯類における肝発癌性を明確に結びつける実験事実が乏しかった。

本研究ではこれらの結果をもとに、キノリンにおけるフッ素置換による遺伝子傷害性の除去法についての*in vivo*試験系での検証、並びに、キノリン骨格を有する含窒素多環芳香族化合物の代謝活性化におけるエナミンエポキシド機構の一般性について検討を行った。

2. キノリンの*in vivo*遺伝子傷害性に及ぼすフッ素置換の影響

2-1. ラット中期肝発癌性試験による検討 現在医薬品などの探索及び開発の場において遺伝子傷害性の有無を予測する1次スクリーニング試験として、サルモネラ菌や大腸菌を用いたAmes試験やumuテストなどの*in vitro*における菌に対する突然変異誘発性試験が汎用されている。これらの試験菌株では、現在に至るまで検出感度を高める様々な工夫が施されてきているが、これらの試験における陽性や陰性を、そのまま発癌性の有無の予測へと結びつけることは難しい。そのため、*in vitro*において変異原性を有する化合物に化学修飾を施して、その変異原性を除去することができたとしても、それがすなわち、発癌性の除去につながるとは言えない面がある。

一方、発癌実験には多くの人手と1年以上にも及ぶ時間が必要とされ、このため、多くの中期発癌性試験法が開発されてきた。中でも、ラットの肝臓を用いた二段階発癌モデルは1970年代より盛んに研究がなされ発癌二段階説と共に大きく発展したと言える。

本研究においては、このラット中期肝発癌性試験の1つである、胎盤型グルタチオン-S-転移酵素陽性肝細胞巣を前癌病変の指標とした、本学医学部第一病理学教室の伊東信行元教授らにより開発された試験法(名市大伊東法)¹⁰⁾を用いて、フッ素置換構造修飾による発癌性除去の可能性について検討を行った。

ラットの肝癌発生過程については、先に述べた二段階発癌モデルによる検討により詳細に解析されており、早期には小増殖巣と呼ばれる変異肝細胞群の発生が見られ、これが、過形成結節(hyperplastic nodule)あるいは腫瘍性結節(neoplastic nodule)と呼ばれる前癌病変病巣に変化した後に癌化に至ることが知られている。今回用いた、ラット中期肝発癌性試験法(名市大伊東法)では、胎盤型グルタチオン-S-転移酵素の異常発現を伴う変異肝細胞群のうち、直径が0.2 mm以上の過形成結節を前癌病変の指標として用いており、約200種類もの発癌性及び非発癌性物質における検討結果より、この試験法においては、陽性物質のうちの90%は実際に発癌

実験における肝発癌性陽性物質であることが確認されている。このように、本試験法は発癌性との相関が非常に高く、さらに、発癌性のない物質はすべて陰性を示し false-positive の結果がないことも長所の1つである。

また、本試験法では検出感度を向上させる目的で、はじめにイニシエーターとして *N*-nitroso-diethylamine (NDEA) をすべての個体に投与しており、これによりいわゆる発癌プロモータも検出できる系である。さらに、被試験物質投与中に肝臓の増殖刺激を与える目的で試験開始3週間後に肝臓の部分切除 (partial hepatectomy) を全個体に施すことによって検出感度の向上を図っている。したがって、陰性対照群においても若干の前癌病変部位が検出されるが、被試験物質群と陰性対照群との統計処理により陽性・陰性の評価を行った。

用いた被試験物質は、キノリンと 3-fluoroquinoline (3-FQ) と 5-fluoroquinoline (5-FQ) であり、キノリンの3位へのフッ素置換による *in vitro* 変異原

性の除去が発癌性の除去としても有効であるかについての検討を行った。¹¹⁾

今回用いた名市大伊東法のプロトコルを Fig. 1 に示した。一群 16 匹の 6 週齢雄性 F344 ラットに試験開始時に NDEA を 200 mg/kg で腹腔内投与し、2 週間後よりキノリン、3-FQ、あるいは 5-FQ をそれぞれ 0.1% 又は 0.05% で粉末基礎飼料に加えたものを 6 週間持続投与した。なお、陰性対照群としては、試験期間中基礎粉末飼料のみを与えた。全個体に、試験開始後 3 週間目に肝臓の部分切除を施し、試験開始 8 週間後に肝臓切片を作成し、免疫組織学的手法により胎盤型グルタチオン-S-転移酵素陽性小増殖巣 (GST-P⁺ foci) を染色し、直径が 0.2 mm 以上の foci の数及び面積を算出し、肝臓切片の単位面積当たりの数値を求め、前癌病変誘発性の指標とした。

各群のラットの体重、肝重量及び腎重量の変化を Table 1 にまとめた。ラットの体重は、0.1% の 5-FQ 投与群において 19% 減少が見られ、0.1% の

Fig. 1. Experimental Protocol of the Medium-Term Bioassay for Hepatocarcinogenesis

Table 1. Body, Liver, and Kidney Weights at the End of Week 8

Group/Treatment	No. of rats	Body weight (g)	Liver weight		Kidney weight	
			Weight (g)	Relative to body weight (%)	Weight (g)	Relative to body weight (%)
1. Quinoline 0.1%	16	245.4 ± 16.2**	11.76 ± 1.27	4.78 ± 0.34***	1.80 ± 0.19	0.74 ± 0.08**
2. Quinoline 0.05%	16	255.9 ± 14.6	10.24 ± 0.87	4.00 ± 0.20***	1.79 ± 0.13	0.70 ± 0.04*
3. 3-FQ 0.1%	16	259.6 ± 8.7	8.83 ± 0.40	3.40 ± 0.11***	1.76 ± 0.09	0.68 ± 0.03
4. 3-FQ 0.05%	16	264.1 ± 9.9	8.59 ± 0.72	3.25 ± 0.20	1.72 ± 0.07	0.65 ± 0.03
5. 5-FQ 0.1%	13	216.1 ± 15.5***	11.95 ± 0.90	5.54 ± 0.21***	1.46 ± 0.11	0.68 ± 0.03
6. 5-FQ 0.05%	14	251.8 ± 14.5*	11.99 ± 1.07	4.76 ± 0.25***	1.70 ± 0.11	0.67 ± 0.02
7. None	14	266.1 ± 16.1	8.47 ± 0.60	3.18 ± 0.14	1.78 ± 0.13	0.67 ± 0.03

Data are means ± S.D. values. Significantly different from the control (group 7). * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$.

Table 2. Numbers and Areas of GST-P-Positive Liver Cell Foci in Rats

Group/Treatment	No. of rats	Number (No./cm ²)	Area (mm ² /cm ²)
1. Quinoline 0.1%	16	9.23 ± 3.43**	0.687 ± 0.352*
2. Quinoline 0.05%	16	6.57 ± 1.37**	0.432 ± 0.124
3. 3-FQ 0.1%	16	4.44 ± 1.67	0.302 ± 0.148
4. 3-FQ 0.05%	16	4.18 ± 2.62	0.304 ± 0.272
5. 5-FQ 0.1%	13	21.95 ± 5.23**	2.494 ± 0.688**
6. 5-FQ 0.05%	14	17.23 ± 5.53**	1.474 ± 0.578**
7. None	14	4.28 ± 1.61	0.332 ± 0.189

Data are means ± S.D. values. Significantly different from the control (group 7). * $p < 0.01$. ** $p < 0.001$.

キノリン投与群においても若干の減少が見られた。一方、肝重量及び体重あたりの肝重量は、キノリン及び5-FQの各投与群において増加が見られた。なお、体重あたりの腎重量に関しては、0.1%キノリン投与群において若干の増加が見られたものの大きな変化は見られなかった。

今回肝臓中に生じた前癌変部位の指標として用いた、GST-P⁺ fociの肝臓切片単位面積当たりの数並びに面積の結果をTable 2にまとめた。キノリン投与群では、0.1%の用量においてfociの数・面積ともに陰性対照群に比べて有意な増加が見られた。さらに、0.05%の低用量においてもfociの数に有意な増加が見られた。一方、5-FQ投与群では0.1%及び0.05%のいずれの用量においても、非常に著しいfociの増加が見られた。また、キノリン及び5-FQによるGST-P⁺ foci誘発性の増加にはいずれもdose-responseが見られた。これに対し、3-FQ投与群では両用量ともに陰性対照群と変化が見られなかった。

先に述べたように、今回用いた名市大伊東法は、発癌性との相関が非常に良いことで知られているラット中期肝発癌性試験法であり、様々な化合物の肝発癌性を予測する上で非常に有用であると考えられている。なお、キノリンについては伊東らの検討により同様の試験系において陽性結果が報告されている。¹⁰⁾ さらに、今回の結果においてもラットに対し肝発癌性を有するキノリンにおいて陰性対照群に比べ有意にGST-P⁺ foci誘発性の増加が見られたことから、この試験法がキノリン類の肝発癌性の有無を予測する系として有効であることが確認された。

キノリンの5位をフッ素で置換した5-FQにおいては、キノリンよりもさらに著しいGST-P⁺ foci誘発性の増加が見られたのに対し、キノリンの3位をフッ素で置換した3-FQにおいては、GST-P⁺ foci誘発性は認められず、これにより、キノリン核の3位へのフッ素置換により、変異原性が除去されたことと同様に、キノリンの肝発癌性が除去されることが示され、キノリンにおける抗発癌性構造修飾法として有用であることが示された。

また、このキノリンにおけるフッ素置換による発癌性の消失のメカニズムは、エナミンエポキシサイド生成に対するフッ素置換の影響で説明できる。すなわち、キノリンの3位へのフッ素置換は、エナミン構造からのP450によるエポキシサイド化を抑制し、その結果、遺伝子傷害性が消失し、それにより肝発癌性が除去されたと考えられる。

2-2. 遺伝子導入マウスによる検討 前述のようにラット中期肝発癌性試験は、発癌イニシエーターだけでなく、発癌プロモーターも検出できる系であり、エピジェネティックな肝発癌に対しても有効な試験系である。そこで、キノリン及び5-FQが、肝臓中でジェネティックな変化を誘発していることをさらに検証する目的で、遺伝子導入マウスを用いた*in vivo*変異原性試験を行った。

用いた試験系は*in vivo*遺伝子傷害性を短期間で簡便に検出できるトランスジェニックマウスとして近年開発されたMutaTMMouseの系である。MutaTMMouseは、大腸菌のβ-galactosidaseの構造遺伝子であるlacZ遺伝子が導入されており、商業レベルで入手可能なトランスジェニックマウスである。

まずはじめに、このMutaTMMouseの系において、キノリンが実際にマウスの生体内で遺伝子傷害を誘発するか否かについて検討を行った。¹²⁾ 一群6—8匹の6週齢雌MutaTMMouseにキノリンを50 mg/kg、陽性対照としてN-nitrosodimethylamine (NDMA) 1 mg/kgを、陰性対照群には溶媒 (olive oil) のみを4日間連続腹腔内投与した。最終投与後1日目に、各群の半数の個体に肝部分切除を施し、最終投与後14日目に、すべての個体から肝臓、肺、腎臓及び脾臓を摘出しDNAを抽出後lacZ遺伝子をλ packaging法により回収し、GalE⁻法によるpositive selectionにより変異頻度 (MF) を算出した。その結果、陽性対照のNDMA投与群では、肝臓、肺、脾臓でコントロール群に比べ変異頻度の上昇が見られたが、キノリン投与群では、肝臓でのみ変異頻度の上昇が見られた (Table 3 及び Fig. 2)。また、肝部分切除の影響については、キノリン

Table 3. *lacZ* Mutant Frequency in the Liver Induced by Quinoline and *N*-Nitrosodimethylamine

Chemical	Partial hepatectomy ^{a)}	Individual animal data			Mean ($\pm$ SD)
		Total population on titer plates	Mutants	MF (10^{-6})	MF (10^{-6})
Quinoline	—	22,050	2	91	173($\pm$ 73)
	—	84,600	22	260	
	—	42,500	6	142	
	—	29,754	6	202	
	+	47,797	18	377	343($\pm$ 74)
	+	31,950	9	282	
	+	28,350	8	282	
	+	44,100	19	430	
<i>N</i> -Nitrosodimethylamine	—	29,493	8	271	215($\pm$ 49)
	—	38,700	7	181	
	—	78,000	15	192	
	+	92,916	15	161	
	+	75,000	21	280	204($\pm$ 66)
	+	41,400	7	169	
	—	103,500	5	48	
	—	128,500	6	47	
Control (olive oil)	—	96,500	4	42	46($\pm$ 3.4)
	+	115,650	6	52	
	+	62,000	4	65	
	+	12,006	1	83	

DNA was extracted 14 days after the final i.p. injection of a chemical at a daily dose of 50 mg/kg for 4 consecutive days to female MutaTMMice. a) The mice underwent partial hepatectomy 1 day after the last i.p. injection.

Fig. 2. Mutant Frequencies Induced by Quinoline and *N*-Nitrosodimethylamine in the Kidney, Lung, and Spleen of MutaTMMice. DNA was extracted from the organs of the same mice as those treated for the liver preparation without partial hepatectomy.

投与群で肝部分切除により変異頻度の約2倍の上昇が見られたが、キノリン及びNDMAは、MutaTMMouseの系において肝部分切除を施さなくても変異誘発の増加が確認できることが明らかとなった。この結果より、キノリンは発癌標的臓器である肝臓において、遺伝子に傷害を与え変異を誘発している

ことが明らかとなり、これがキノリンによる肝発癌の直接の原因であることが強く示唆された。

次に、フッ素置換キノリンについても同様の検討を行った。¹³⁾ 一群5匹の9週令の雄MutaTMMouseに、キノリン、3-FQ、5-FQを50 mg/kgで4日間連続腹腔内投与し、最終投与後14日目に肝臓、骨

Table 4. *lacZ* Mutation in the Liver Induced by Quinoline and Fluorinated Derivatives

Chemical	Individual animal data			Mean ($\pm$ SD)
	Total population on titer plates	Mutants	MF (10^{-6})	MF (10^{-6})
Quinoline	169,500	20	118	225($\pm$ 72)
	292,000	55	188	
	69,500	19	273	
	132,000	33	250	
	85,000	25	294	
5-Fluoroquinoline	265,250	44	166	240($\pm$ 55)
	68,500	20	292	
	50,750	12	237	
	59,500	16	269	
3-Fluoroquinoline	246,000	12	49	52($\pm$ 11)
	174,750	10	57	
	98,750	4	41	
	71,750	5	70	
	65,750	3	46	
Control (olive oil)	169,000	8	47	51 ($\pm$ 7)
	82,750	4	48	
	82,500	5	61	
	75,250	4	53	
	45,500	2	44	

Table 5. *lacZ* Mutation in the Bone Marrow and Testis

Chemical	Averaged mutant frequency ^{a)} (10^{-6})($\pm$ SD)	
	Bone marrow	Testis
Quinoline	55.2 $\pm$ 7.3	38.6 $\pm$ 3.9
5-Fluoroquinoline	51.5 $\pm$ 5.9	45.5 $\pm$ 4.9
3-Fluoroquinoline	40.5 $\pm$ 2.8	46.4 $\pm$ 2.5
Control (olive oil)	36.3 $\pm$ 13	27.9 $\pm$ 3.2

a) Mutant frequencies were averages from three mice each.

髓、精巣について変異頻度の解析を行った。その結果、Table 4 及び Table 5 に示したように、5-FQ はキノリンと同様に肝臓でのみ変異頻度の上昇が見られたのに対し、3-FQ では検討したいずれの臓器においても変異頻度の上昇は見られなかった。この結果は、ラット中期肝発癌性試験で得られた結果を支持しており、キノリンの3位フッ素化による肝発癌性の除去は、イニシエーション過程での遺伝子傷害の抑制、すなわち、キノリンの肝臓における代謝活性種の生成抑制に起因していることを示している。

これらの2つの *in vivo* 試験系によるキノリン類の検討結果により、キノリンの *in vivo* 遺伝子傷害性の除去法として、3位へのフッ素置換構造修飾は有効であることが示され、キノリンのラット及びマウスに対する肝発癌性は、肝臓においてエナミンエ

ポキサイド機構による代謝活性化によって引き起こされる遺伝子傷害に起因しており、3位のフッ素置換基により、このような代謝活性化の進行が抑制されることにより遺伝子傷害性が消失し、肝発癌性が除去されることが示された。

3. キノリン骨格を有する多環芳香族類の変異原性に及ぼすフッ素置換の影響

3-1. 多フッ素置換による変異原性への影響
 これまでにも述べたように、芳香族化合物の水素原子をフッ素原子で置換すると、その置換部位並びに近傍部位における酸化的代謝が抑制されることが知られている。²⁾ 一方、有機化合物のすべての水素原子をフッ素原子で置換したパーフッ素化合物は、テフロンなどに代表されるように、水とも油とも親和性を持たないといった非常に特異な性質が知られている。ところが、有機分子内の数カ所をフッ素で置換した多フッ素化合物の性質については、これまであまり系統的な研究がなされていない。そこで、キノリンの変異原性に及ぼす多フッ素置換の影響について検討する目的で、12種のフッ素置換キノリン誘導体を合成し、そのサルモネラ菌 TA100 に対する変異原性をラット肝ホモジネート (ラット肝 S9) 存在下において調べた (Table 6)。¹⁴⁾ その結果、2個又は3個のフッ素置換基を有する化合物では、それぞれのフッ素の置換基効果はモノフッ素置換体で見られた効果に加成的である傾向が見られ、5位あるいは7位にフッ素置換基を有する場合は、キノリンよ

Table 6. Mutagenic Potency of Quinoline (Q) and Seventeen Fluoroquinolines (FQ's) toward *Salmonella typhimurium* TA100 in the Presence of S9 Mixture

Chemicals	Induced-revertants per nmol ^{a)}	Maximum induced-revertants per plate ^{b)}
quinoline (Q)	1.0	606
monofluoroquinolines ^{c)}		
3-FQ		negative
5-FQ	1.3	1788
6-FQ	0.2	250
7-FQ	1.5	1629
8-FQ	0.4	479
difluoroquinolines		
3,5-diFQ		negative
3,7-diFQ		negative
5,6-diFQ	3.0	395
5,7-diFQ	1.9	2298
5,8-diFQ	1.9	1313
6,7-diFQ	0.9	301
6,8-diFQ	0.4	136
7,8-diFQ	1.3	2060
trifluoroquinolines		
3,5,7-triFQ		negative
5,6,8-triFQ	2.3	369
6,7,8-triFQ	1.3	342
tetrafluoroquinoline		
5,6,7,8-tetraFQ	0.2	144

a) Calculated from the slope of the linear portion of each curve near the origin. b) The number indicated is subtracted by the number of spontaneous revertants and obtained from the assay up to 10 mmol/plate. In this study, the mean number of spontaneous revertants per plate was 130 with standard deviation of 55. The numbers indicate the means of at least 3 independent experiments. c) The data of 3-FQ, 5-FQ, 6-FQ, and 8-FQ are from previous report [3].

りもやや高い変異原性を示した。しかし、ベンゼン環部位を部分的にすべてフッ素原子で置換した 5,6,7,8-tetrafluoroquinoline では、5 位及び 7 位にフッ素置換基が存在するにもかかわらず非常に弱い変異原性しか示さず、他のフッ素置換誘導体とは異なる傾向が見られた。一方、3 位にフッ素置換基を有するすべての化合物で、変異原性の消失が見られた。すなわち、ベンゼン環部位フッ素置換キノリン誘導体もキノリン自身と同様に、ピリジン環部位での酸化的代謝により究極活性種へと変換され、変異原性を発現していることが示唆された。

3-2. 4-メチルキノリンにおけるフッ素置換による変異原性への影響 キノリンの 4 位メチル基置換体である 4-methylquinoline (4-MeQ) は、サルモネラ菌 TA100 に対しラット肝 S9 存在下でキノリンよりも強い変異原性を示し、さらに、メチルキノリン誘導体の中で最も強い変異原性を有している。³⁾ また、マウス皮膚における腫瘍形成能についてもキノリンよりも強いことが報告されている。¹⁵⁾

一方キノリンは、3-methylcholanthrene (3-MC) により誘導を受けたラット肝マイクロソームにより代謝されると、主代謝産物として 5,6-dihydroquinoline-5,6-*trans*-diol が生成し、副代謝産物とし

て quinoline *N*-oxide 及び 3-hydroxyquinoline が生成するが、^{5,16)} 4-MeQ では、4 位のメチル基の立体障害により 5,6 位における酸化的代謝が進行しないことが明らかになっている。¹⁷⁾ 4-MeQ のラット肝マイクロソームによる代謝では、主代謝産物として 4 位のメチル基の水酸化体が得られるほか、副代謝産物として 3 位の水酸化体が検出されている。¹⁷⁾ この主代謝産物である 4-hydroxymethylquinoline (4-HMeQ) を別途合成し、サルモネラ菌 TA100 に対する変異原性をラット肝 S9 存在下及び非存在下にて検討した結果、いずれの条件においても変異原性を示さなかったことから、4 位のメチル基の水酸化は解毒代謝経路であることが明らかとなった。¹⁷⁾ 一方、4-MeQ の代謝における 3 位の水酸化は、キノリンと同様にエナミンエポキシサイドを経由している可能性が考えられた。そこで、4-MeQ のフッ素置換誘導体 5 種 (Fig. 3) を合成し、その代謝経路及び変異原性に与える影響を検討した。¹⁸⁾ その結果、ベンゼン環部位の 6 位又は 7 位にフッ素原子を置換した場合には変異原性は 4-MeQ と同程度かやや弱いながらも認められたのに対し、ピリジン環部位の 2 位にフッ素原子を置換した 3 種の化合物 (2-F-4-MeQ, 2,6-diF-4-MeQ, 及び 2,7-diF-4-MeQ) では変

Fig. 3. List of 4-Methylquinolines Examined

Fig. 4. Mutagenicity of 4-Methylquinolines in *S. typhimurium* TA100 in the Presence of S9 Mixture
The symbols shown indicate the means of at least three independent experiments.

異原性は全く見られなかった (Fig. 4). さらに, 4-MeQ 及びそのモノフッ素置換体の 3-MC 誘導型ラット肝マイクロソームによる代謝産物を経時的に HPLC にて定量した結果, 原料の減少速度や主代謝産物である 4 位メチル基の水酸化体の生成速度は 3 種のモノフッ素置換体 (2-F, 6-F, 及び 7-F 体) において 4-MeQ 自身と大きな差は見られなかった. しかし, 6-F 体及び 7-F 体では 4-MeQ と同様に 3 位の水酸化体の生成が確認されたのに対し, 2-F 体では 3 位の水酸化体の生成は認められなかった (Fig. 5). この結果は, 4-MeQ の代謝活性化にはキノリンと同様にピリジン環部位でのエナミンエポキシサイドの生成が関与していることを示唆するものであり, 6 位又は 7 位へのフッ素置換では主たる解毒

代謝経路である 4 位メチル基の水酸化, 及び代謝活性化に関与しているピリジン環部位 3 位の水酸化のいずれにも大きな影響を与えないのに対し, 2 位へのフッ素置換では解毒代謝経路である 4 位メチル基の水酸化には影響を与えずに, 代謝活性化経路である 3 位の水酸化経路のみを抑制していることを強く示唆している (Fig. 6).

3-3. 三環性キノリン誘導体におけるフッ素置換による変異原性への影響 多環芳香族炭化水素の遺伝子傷害性発現機構については, benzo[a]pyrene を代表例として展開された bay-region 機構¹⁹⁾ (Chart 2) が良く知られており, その後 benzanthracene や dibenzanthracene などの四環性あるいは五環性芳香族炭化水素においても広く一般則として受

Fig. 5. Metabolism of 4-MeQ and Its Monofluorinated Derivatives in the Presence of the Microsomal Fraction

Fig. 6. Proposed Mutagenic Mechanism of 4-MeQ

け入れられてきた。これらの多環芳香族炭化水素においては、湾状構造 (bay 領域) に生じた bay-region diol epoxide が遺伝子傷害性発現における主たる究極活性体であり、これに対し、K-region と呼ばれる立体的に突き出た部位に生じたエポキシサイドは、生体内の epoxide hydrolase による加水分解や glutathion-S-transferase による抱合を受け易いために DNA との反応性が比較的低いことが知られて

いる。²⁰⁾ 二環性の芳香族炭化水素であるナフタレンに遺伝子傷害性がないのは、ナフタレン骨格には bay-region がないためであると考えられる。また、三環性芳香族炭化水素である phenanthrene はほとんど遺伝子傷害性を示さないが、この K-region を peri 位メチル基で保護すると遺伝子傷害性を発揮することが報告されており、²¹⁾ これは、phenanthrene の主代謝経路が K-region へのエポキシサイド化を経

Chart 2. Metabolic Activation Pathways of B[a]P (Bay-region Theory¹⁹⁾)

Fig. 7. Structures of N-Containing Aromatic Hydrocarbons

由した K-region diol であり,²²⁾ この部位の代謝をメチル基の立体障害によって抑制することにより相対的に bay-region diol epoxide の生成が増加したためであると考察される。

一方、キノリンには bay-region がないにもかかわらず発癌性を有し、その遺伝子傷害性発現にはピリジン環側のエナミンエポキサイドが関与していることは、既に述べた通りである。

そこで、このエナミンエポキサイド機構が、bay-region や K-region を有する三環性キノリン誘導体においても一般則として適用可能であるか否かについて検討することを目的とした。用いた化合物は、Fig. 7 に示したように benzo[h]quinoline (B[h]Q), benzo[f]quinoline (B[f]Q), 1,7-phenanthroline (Ph₁₋₇) 及び 1,10-phenanthroline (Ph₁₋₁₀) の 4 種のキノリン誘導体である。このうち、B[h]Q 及び B[f]Q は phenanthrene の一窒素含有誘導体であり、分子内に bay-region, K-region 及びピリジン環のエナミンエポキサイド関連部位を有し、一方、Ph₁₋₇ 及び Ph₁₋₁₀ は phenanthrene の二窒素含有誘導体であり、bay-region と呼ばれるベンゼン環部位はなく、K-region 及び 2 カ所のピリジン環のエナミンエポキサイド関連部位を有している。

これらの三環性キノリン誘導体の、予想される

酸化的代謝部位をそれぞれフッ素原子で置換した誘導体を合成し、²³⁾ その変異原性を調べることににより、代謝活性化機構の解明を目的とするとともに、キノリン骨格の環の窒素原子の β 位へのフッ素置換による遺伝子傷害性除去法の一般性・有用性について考察した。²⁴⁾

変異原性はサルモネラ菌 TA100 を用いてラット肝 S9 存在下にて行い、陰性対照群 (溶媒のみ) の 2 倍以上の復帰変異株 (revertants) を示し、dose-response を有するものを陽性とした。さらに、dose-response curve の直線部分の傾きから求めた nmol あたりの revertants を変異原活性の指標として用いた (Table 7)。

Ph₁₋₁₀ には変異原性が認められなかったが、K-region をフッ素置換基でブロックした 5-F-Ph₁₋₁₀ では変異原性の増強が見られた。同様に、Ph₁₋₇ の変異原性は、その K-region をフッ素置換基でブロックすることによって増強された。これらの結果は、Ph₁₋₁₀ 及び Ph₁₋₇ の両化合物において K-region は解毒代謝部位であることを示唆するものである。

一方、Ph₁₋₇ のピリジン環部位をフッ素置換基でブロックした化合物では、片側のピリジン環のみをフッ素置換基でブロックした 9-F-Ph₁₋₇ では変異原性は親化合物である Ph₁₋₇ と比較して変化は見られ

Table 7. Mutagenicity toward *Salmonella typhimurium* TA100 with S9 Mixture

Substituent	Location of Fluorine				Revertants per nmol*	Maximum revertants*
	β to N	β to N'	K-region	Bay-region		
quinolines (Q)						
none	H	/	/	/	0.6	703
3-F	3F	/	/	/	negative	136(BG)**
5-F	H	/	/	/	1.3	1888
3,5-diF	3F	/	/	/	negative	126(BG)
5,8-diF	H	/	/	/	1.9	1154
1,7-Phenanthrolines (Ph ₁₋₇)						
none	H	H	H	/	1.4	398
6-F	H	H	6F	/	6.7	323
9-F	9F	H	H	/	1.3	334
3,9-diF	3F	9F	H	/	negative	157(BG)
1,10-Phenanthrolines (Ph ₁₋₁₀)						
none	H	H	H	/	negative	151(BG)
5-F	H	H	5F	/	1.4	405
benzo[<i>h</i>]quinolines (B[<i>h</i>]Q)						
none	H	/	H	(H)***	negative	240(< BGx2)
3-F	3F	/	H	(H)	negative	238(< BGx2)
5-F	H	/	5F	(H)	3.0	317
6-F	H	/	6F	(H)	3.7	441
7-F	H	/	H	(7F)	2.4	834
9-F	H	/	H	(9F)	0.9	366
7,10-diF	H	/	H	(7F,10F)	0.7	278
3,6-diF	3F	/	6F	(H)	negative	184(< BGx2)
benzo[<i>f</i>]quinolines (B[<i>f</i>]Q)						
none	H	/	H	H	1.3	279
2-F	2F	/	H	H	5.0	1146
7-F	H	/	H	7F	4.1	420
10-F	H	/	H	10F	3.5	730
7,10-diF	H	/	H	7F,10F	8.0	692

* The numbers indicate the means of at least 3 independent experiments. ** BG indicates the number of revertants at the background level. *** Figures in the parentheses indicate that these positions may not be regarded as a bay-region because of the presence of an N atom in this location.

なかったのに対し、両方のピリジン環部位をフッ素置換基でブロックした 3,9-diF-Ph₁₋₇ では変異原性の消失が見られた。この結果より、Ph₁₋₇ においては、変異原性発現には両方のピリジン環部位が関与していることが示され、変異原性の除去にはこの両方の代謝活性化部位をフッ素置換基でブロックする必要があることが明らかとなった。

ベンゾキノリン類のうち、B[h]Q 自身には変異原性は認められなかったが、K-region をフッ素置換基でブロックした 5-F-B[h]Q 及び 6-F-B[h]Q では、有意な変異原性の増強が見られた。キノリンにおいて窒素原子の影響により peri 位である 7,8 位へのエポキシ化が進行しないことが知られているが、^{5,25)} これと同様に、B[h]Q においては 1 位の窒素原子に空間的に隣接している 9,10 位の二重結合へのエポキシ化は進行しづらいものと考えられ、このため、B[h]Q には bay-region に起因した

変異原性発現機構の関与はあまりないと考えられる。事実、bay-region あるいはその関連部位をフッ素置換基でブロックした 7-F-B[h]Q、9-F-B[h]Q、7,10-diF-B[h]Q では、いずれも変異原性は B[h]Q に比べて増加した。さらに、変異原性の増強が見られた 6-F-B[h]Q の 3 位をフッ素置換基でブロックした 3,6-diF-B[h]Q では変異原性の消失が見られ、この結果より、6-F-B[h]Q の変異原性発現には bay-region diol epoxide の関与はほとんどなく、ピリジン環側のエナミンエポキシ化の生成が主たる代謝活性化経路であることが示唆された。

B[f]Q のラット肝マイクロソームによる代謝産物中には K-region diol の生成は認められなかったという報告があり、²²⁾ そのため、5 位や 6 位をフッ素置換した化合物については検討を行わなかった。B[f]Q ではピリジン環側の 2 位をフッ素置換基でブロックした 2-F-B[f]Q において変異原性の著しい

増強が見られた。この結果は、ピリジン環側をフッ素置換基でブロックすることにより、相対的に bay-region に起因した変異原性発現機構が亢進された結果と考えられる。一方で、bay-region あるいはその関連部位をフッ素置換基でブロックした 7-F-B[*f*]Q, 10-F-B[*f*]Q, 7,10-diF-B[*f*]Q においても変異原性の除去は見られなかった。これらの結果より、B[*f*]Q においては、bay-region diol epoxide と同様にピリジン環部位のエナミンエポキサイドも変異原性発現に関与していると考えられる。

本節で得られた結果を考察すると、三環性キノリン誘導体であるフェナンスロリン及びベンゾキノリンに共通の代謝活性化機構の1つとして、エナミンエポキサイド機構が適用可能であることが示された。これにより、このエナミンエポキサイド機構が α , β , γ -free のピリジン環を有する含窒素多環芳香族化合物の代謝活性化機構の1つとして一般性を有していることが示唆された。

また、これらの化合物におけるピリジン環の β 位へのフッ素置換構造修飾は、遺伝子傷害性の除去法の1つとして有効であり、複数の代謝活性化部位を有する場合にはそのすべてをフッ素置換基でブロックする必要があることも明らかとなった。

4. おわりに

本研究では、川添らにより提唱されたキノリンの代謝活性化機構であるエナミンエポキサイド機構に基づき、含窒素芳香族化合物へのフッ素置換構造修飾による遺伝子傷害性除去法について一般性及び有用性を明らかにした。キノリン骨格を有する医薬品は、抗菌剤や抗マラリア剤などに多く見られ、これらの化合物の開発過程において本研究が基礎的知見として一助となれば幸いである。

最後に、本研究を行うにあたり終始ご指導いただいた名古屋市立大学薬学部川添 豊 元教授に心より感謝いたします。また、本研究を推進するにあたりご協力いただいた共同研究者の皆様に深く感謝いたします。

REFERENCES

- Ames B. N., McCann J., Yamazaki E., *Mutat. Res.*, **31**, 347-363 (1975).
- LaVoie E. J., Tulley-Freiler L., Bedenko V., Hoffmann D., *Mutat. Res.*, **116**, 91-102 (1983); Hecht S. S., LaVoie E. J., Bedenko V., Pingaro L., Katayama S., Hoffmann D., Sardella D. J., Boger E., Lehr R. E., *Cancer Res.*, **41**, 4341-4345 (1981); Hubenman E., Slaga T. J., *ibid.*, **39**, 411-414 (1979); Diamond L., Cherian K., Harvey R. G., DiGiovanni J., *Mutat. Res.*, **136**, 65-72 (1984).
- Takahashi K., Kamiya M., Sengoku Y., Kohda K., Kawazoe Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4630-4633 (1988); Kamiya M., Sengoku Y., Takahashi K., Kohda K., Kawazoe Y., "Antimutagenesis and Anticarcinogenesis" II, ed. by Kuroda Y., Shankel D. M., Waters M. D., Plenum Publishing Corp., New York, 1990, pp. 441-446.
- Tada M., Takahashi K., Kawazoe Y., *Chem.-Biol. Interactions*, **29**, 257-266 (1980).
- Tada M., Takahashi K., Kawazoe Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3834-3837 (1982).
- Hirao K., Shinohara Y., Tsuda H., Fukushima S., Takahashi M., Ito N., *Cancer Res.*, **36**, 329-335 (1976).
- Shinohara Y., Ogiso T., Hananouchi M., Nakanishi K., Yoshimura T., Ito N., *Jpn. J. Cancer Res.*, **68**, 785-796 (1977).
- Nagao M., Yahagi T., Seino Y., Sugimura T., Ito N., *Mutat. Res.*, **42**, 335-342 (1977).
- Ashby J., Mohammed R., Lefevre P. A., Bandara L., *Environ. Mol. Mutagen.*, **14**, 221-228 (1989); Lefevre P., Ashby J., *ibid.*, **20**, 39-43 (1992).
- Ito N., Imaida K., Hasegawa R., Tsuda H., *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **19**, 385-415 (1989).
- Saeki K., Kadoi M., Kawazoe Y., Futakuchi M., Twaweche D., Shirai T., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 40-43 (1997).
- Suzuki T., Miyata Y., Saeki K., Kawazoe Y., Hayashi M., Sofuni T., *Mutat. Res.*, **412**, 161-166 (1998).
- Miyata Y., Saeki K., Kawazoe Y., Hayashi M., Sofuni T., Suzuki T., *Mutat. Res.*, **414**, 165-169 (1998).
- Kato T., Saeki K., Kawazoe Y., Hakura A., *Mutat. Res.*, **439**, 149-157 (1999).
- LaVoie E. J., Shigematsu A., Adams E. A., Rigotty J., Hoffmann D., *Cancer Lett.*, **22**, 269-273 (1984).
- Saeki K., Takahashi K., Kawazoe Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 232-234 (1993).
- Saeki K., Takahashi K., Kawazoe Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 541-546 (1996).
- Kato T., Hakura A., Mizutani T., Saeki K., *Mutat. Res.*, **465**, 173-182 (2000).
- Jerina D. M., Yagi H., Lehr R. E., Thakker D. R., Schaefer-Ridder M., Karle J. M., Levin W., Wood A. W., Chang R. L., Conney A. H., "Polycyclic Hydrocarbons Cancer, Vol. 1," ed. by Gelboin H. V., Ts'o Paul O. P. Academic, New York, 1978, pp. 173-188.
- Bresnick E., "In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing," ed. by De Serres F. J.,

- Fouts J. R., Bend J. R., Philpot R. M., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1976, p. 83.
- 21) LaVoie E. J., Tulley-Freiler L., Bedenko V., Hoffmann D., *Cancer Res.*, **41**, 3441-3447 (1981); LaVoie E. J., Tulley-Freiler L., Bedenko V., Hoffmann D., *Mutat. Res.*, **116**, 91-102 (1983) .
- 22) LaVoie E. J., Adams E. A., Hoffmann D., *Carcinogenesis*, **4**, 1133-1138 (1983).
- 23) Saeki K., Tomomitsu M., Kawazoe Y., Momota K., Kimoto H., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 2254-2258 (1996).
- 24) Saeki K., Kawai H., Kawazoe Y., Hakura A., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 646-650 (1997).
- 25) Agarwal S. K., Boyd D. R., Porter H. P., Jennings W. B., Grossman S. J., Jerina D. M., *Tetrahedron Lett.*, **27**, 4253-4256 (1986).