薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
88 (3) 271 — 277 (1968)

UDC 615.849-035.4 : 547.269.1

放射線障害防護薬剤に関する研究 (第3報¹⁾) AET および
MEA の放射線障害防護効力について²⁾

篠田雅人, 岡 孝己, 後藤百子, 篠原直美, 玉置文一, 赤星三弥

放射線医学総合研究所薬学研究部³⁾

Pharmacological Studies on Chemical Protectors against Radiation. III.¹⁾
Radio-Protective Activities of AET and MEA
against X-Irradiation²⁾

MASATO SHINODA, TAKAMI OKA, MOMOKO GOTO, NAOMI SHINOHARA,
BUN-ICHI TAMAOKI, and SANYA AKABOSHI

Department of Pharmaceutical Science, National Institute
of Radiological Sciences³⁾

(Received July 24 1967)

Potential effect of chemical radio-protectors, S-2-aminoethylisothiuronium bromide hydrobromide (AET) and 2-mercaptoethylamine (MEA), was tested by survival of ddY mice irradiated with a lethal dose of X-rays, and characteristics of these compounds were comparatively examined.

Both AET and MEA show comparatively acute toxicity and intraperitoneal injection of their lethal dose to mice results in their death within 24 hr. Comparison of the toxicity of AET and MEA, with consideration on their molecular weight, shows that the toxicity of AET is about twice stronger. Optimal period of the administration of AET and MEA for effective appearance of their protective power is 5–30 minutes before irradiation, and both were ineffective if given after irradiation. Toxicity and protective action of AET do not change if it is converted to mercaptoethylguanidine (MEG) by adjusting its moleous solution to pH 7.0 with sodium hydroxide. Protective effect of AET per aquecule is 2–4 times stronger than that of MEA.

It was found that the protection of AET and MEA is not only effective against lethal action of X-ray irradiation but also markedly effective in protecting against weight loss.

1949年, Patt 等⁴⁾により, 哺乳動物の放射線障害に対する cysteine の防護効果が発見されてより現在に至るまで著しく多数の含イオウ化合物について放射線障害に対する防護効果が検討されている⁵⁾. 1954年, Bacq^{6,7)}は各種のアミノ酸とそれに対応するアミンについて防護効力を比較検討し, cysteine に対応するアミンであり, また, co-enzyme A の一構成部分でもある MEA (2-mercaptoethylamine) にすぐれた効力のあることを見出した. 一方, 1955年に Doherty, Burnett⁸⁾は MEA の SH 基をイソチウロニウム基で置換した AET (S-2-aminoethylisothiuronium bromide hydrobromide) にも MEA に劣らぬ優れた防護作用のあることを報告した.

1) 第2報: 薬誌, **87**, 658 (1967).

2) 日本薬学会第84年年会で一部発表, 東京, 1964年4月.

3) Location: Anagawa, Chiba-shi.

4) H.M. Patt, E.B. Tyree, R.L. Straube, D.E. Smith, *Science*, **110**, 213 (1949); *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **73**, 18, 198 (1950); *ibid.*, **80**, 92 (1952).

5) A. Pihl, L. Eldjarn, *Pharmacol. Rev.*, **10**, 437 (1958); R.L. Straube, H.M. Patt, *Annual Review of Pharmacol.*, **3**, 293 (1963); R. Huber, E. Spode, "Biologisch-Chemischer Strahlenschutz," Eine Übersicht in Tabellen I, II, III, IV. Akademie-Verlag, Berlin (1961, 1963); 赤星三弥, 薬誌, **83**, 1005 (1963).

6) Z.M. Bacq, *Acta Radiologica*, **41**, 47 (1954).

7) Z.M. Bacq, *Strahlentherapie*, **95**, 215 (1954).

8) D.G. Doherty, W.T. Burnett, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **89**, 312 (1955).

その後、Langendorff 一派⁹⁻¹¹⁾ Doherty 一派¹²⁾ により、MEA あるいは AET の数多くの誘導体について防護効力が検討されたが、MEA あるいは AET にまさる化合物は認められず、現在なお、ヨーロッパにおいては MEA が、また、アメリカにおいては AET が代表的な防護薬剤効力比較の標準品として、またその作用機序についても研究されているが、この両者の防護効力を同一の実験方法により同時に比較してその優劣を論じた報告はほとんどない。

著者等は、第 1 報¹³⁾において、放射線障害防護薬剤の効力試験に関する基礎実験として、各種のマウスの放射線に対する感受性を測定し、実験動物の種類、週令、照射条件などの差が放射線感受性に著しい影響をおよぼすことを認めたので、ddY マウスを用いて、致死量あるいは準致死量の X 線照射に対する AET および MEA の放射線防護効力を延命効果を指標として測定し、これらの薬剤の特性を比較検討した。

実験方法

実験動物：船橋農場より購入した生後 4 週令の ddY 雄マウスを 10 日間予備飼育し、体重の変動が 20 ± 2 g の範囲のものを選んで実験に使用した。マウスは空気調整装置のある飼育室で 4 または 5 匹を 1 ケージに入れ、繁殖用の固型資料（船橋農場製）を与え、飲料水は給水ビンから自由に与えて飼育観察した。

X 線照射条件：マウスを 12 匹用のルサイト製照射用固定器に入れ、X 線 200 kVp, 20 mA, フィルター 0.5 mm Cu+0.5 mm Al, 距離 50 cm, 線量率 92 R/min の条件で、背部より全身照射した。線量測定にはラドコン線量計を使用した。

試料の調製：AET は日野等¹⁴⁾の方法により合成した HBr 塩の結晶を用い、蒸留水に溶解し、0.1 N NaOH で pH 7.0 に補正した。AET 型のままで投与する場合には pH の補正は省略した。また、MEA は Nathan, Bogert¹⁵⁾の方法にしたがい ethylene imine から合成した free base の結晶を用い、蒸留水に溶解したのち 0.1 N HCl で pH 7.0 に補正して試料とした。これらの試料の濃度は、投与液量がマウス体重 20 g 当り 0.2 ml になるように定め、投与前 15 min 以内に溶解し、使用した。

毒性試験：試料を 1 群 10—12 匹のマウスの腹腔内に注射し、30 日間の生存率を測定した。この結果から Probit 法¹⁶⁾により LD₅₀ を算出した。

防護効力試験：マウスを 1 群 10 匹とし、試料は毒性試験の場合と同様に腹腔内に注射した。X 線照射後 30 日間の生存率と平均生存日数を求め、Kaluszyner¹⁷⁾の方法に準じて防護効力を規定して検定した。

$$\text{防護効力} = \frac{(\text{X 線照射} + \text{薬剤投与}) \text{群 30 日間平均生存日数}}{\text{X 線照射群 30 日間平均生存日数}}$$

また週 2 回体重を測定し、体重変動率を算出した。

実験結果

I. 毒性 (LD₅₀) AET の水溶液は酸性を示すが、NaOH で pH 7.0 付近に補正すると、その化学構造が MEG (mercaptoethylguanidine) に変化するので、¹⁸⁾ X 線照射をしないで、この投与時の液性の差による化学構造上の変化が毒性におよぼす影響を測定した。

AET または MEG の毒性による死亡は急性であり、ほとんどが投与後 24 hr 以内に認められた。Table I に示すごとく AET の毒性は、溶液の pH を補正しない AET 型の場合と、pH を補正した MEG 型の場合とを比較して、有意な差のないことを認めた。

MEA の毒性も AET の場合と同様に急性であり、死亡例はほとんど投与後 24 hr 以内に認められ、以後には見当らなかった。

AET と MEA の毒性をそれらの化合物の分子量にもとづいて比較すると、AET の方が MEA より約 2 倍毒性が強いことが示された。

II. AET と MEA の放射線防護効果

X 線 600R 照射マウスに対して AET の放射線防護効果を観察する

- 9) H. Langendorff, *Strahlentherapie*, **93**, 281 (1954).
- 10) H. Langendorff, R. Koch, *Strahlentherapie*, **94**, 411 (1954); *ibid.*, **95**, 535 (1954); **98**, 245 (1955); **99**, 567 (1956).
- 11) H. Langendorff, R. Koch, U. Hagen, *Strahlentherapie*, **95**, 238 (1954); **100**, 137 (1956).
- 12) D.G. Doherty, W. T. Burnett, R. Shapira, *Radiation Res.*, **7**, 13, 22 (1957).
- 13) 第 1 報, 篠田雅人, 岡 孝己, 玉置文一, 赤星三弥, 薬誌, **87**, 654 (1967).
- 14) T. Hino, K. Tanaami, K. Yamada, S. Akaboshi, *Chem. Pharm. Bull.*, (Tokyo), **14**, 1193 (1966).
- 15) A.H. Nathan, M.T. Bogert, *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 2361 (1941).
- 16) D.J. Finney, "Probit Analysis," Cambridge University press, London 1952; 玉置文一, 化学の領域, 増刊 11, "Bioassay と推計学," 9, 南江堂 1953.
- 17) A. Kaluszyner, P. Czerniak, E.D. Bergmann, *Radiation Res.*, **14**, 23 (1961).
- 18) D.G. Doherty, R. Shapira, W.T. Burnett, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5667 (1957).

TABLE I. Toxicities of AET and MEA

Sample M.W.			LD ₅₀ ^{a)}	
			(mg/kg)	(mmole/kg)
AET	281.04	AET type ^{b)}	657.3 (626.0—690.3)	2.33
		MEG type ^{c)}	635.3 (610.9—662.2)	2.26
MEA ^{d)}	77.15		400.9 (380.1—422.8)	5.19

a) Intraperitoneal injection.

b) AET dissolved in distilled water.

c) AET dissolved in distilled water and adjusted with NaOH to pH 7.0.

d) MEA dissolved in distilled water and adjusted with HCl to pH 7.0.

Fig. 1. Survival Rate of 600R X-Irradiated Mice with and without AET Injection at 30 Minutes before X-Irradiation

Fig. 2. Body Weight Change of 600R X-Irradiated Mice with and without AET Injection at 30 Minutes before X-Irradiation

と、Fig. 1 および Fig. 2 に示すように、生存率を指標として著明な効力が認められ、また、放射線照射によって起こる急激な体重減少作用をも防護することが認められた。

MEA についても、AET の場合と同様に、生存率および体重の変動に対して著明な防護効果が認められた。(Fig. 3 および Fig. 4).

Fig. 3. Survival Rate of 600R X-Irradiated Mice with and without MEA Injection at 5 Minutes before X-Irradiation

Fig. 4. Body Weight Change of 600R X-Irradiated Mice with and without MEA Injection at 5 Minutes before X-Irradiation

Fig. 5. Effect of Administration Time on Protective Activities of AET (350 mg/kg) and MEA (250 mg/kg) against 600R X-Irradiated Mice

$$\text{Protective potency} = \frac{\text{Mean survival days of treated group}}{\text{Mean survival days of control group}}$$

○ AET (MEG type) △ MEA

Fig. 6. Comparison of the Protective Activity of AET and that of MEG against 700R X-Irradiation

Time of administration: 5 minutes before X-irradiation

○—○ AET type ⊙—⊙ MEG type

III. 投与時期と防護効力の関係 X線 600R 照射マウスに対して、AET (MEG 型) 350 mg/kg を照射前 24 hr から照射後 30 min までについて、投与時期と防護効力との関係を測定すると Fig. 5 に示すように、照射 5—30 min 前に投与した場合にもっとも効力が強くあらわれ、投与する時期が照射の時期と隔たるにしたがって効力が低下している。また、照射後に投与した場合にはまったく効果が見られなかった。

MEA 250 mg/kg について、照射前 2 hr から照射後 5 min までを比較したが、照射 5—60 min 前に投与した場合が効力が著しく、照射後に投与した場合には、AET の場合と同様にほとんど無効であった。

IV. 照射線量と防護効力の関係 AET (MEG 型として投与) 350 mg/kg および MEA 250 mg/kg 投与による防護効力を、X 線 500—1100 R の範囲の各種の線量について測定し、照射線量と防護効力との関係を検討した。この場合の薬剤の投与は、前述の実験結果を考慮して、すべて照射前 30 min に腹腔内に行なった。

Table II に示すように、いずれの照射線量においても、AET と MEA はともに強い防護効果を示しているが、防護効力 (protective potency) で比較するならば、AET においては 700—900 R が、また、MEA においては 900 R 付近がもっとも高く示されている。

V. AET と MEG の防護効力の比較 AET の投与時における化学構造の変化が防護効力におよぼす影響を検討するために、AET 水溶液の pH 補正を行なわない AET 型と、pH を補正した MEG 型とについて、同時

TABLE II. Effect of X-Irradiation Doses on Protective Activities of AET and MEA

X-Irradiation (R)	Survival rate for 30 days (%)			Mean survival time for 30 days (days)			Protective potency	
	Without sample	With AET	With MEA	Without sample	With AET	With MEA	AET	MEA
500	30	80	80	20.0	26.9	25.2	1.35	1.26
700	0	40	40	9.0	19.7	18.4	2.19	2.04
900	0	0	30	4.2	8.9	18.7	2.12	4.45
1100	0	0	0	4.0	5.3	9.7	1.33	2.43

Dose of AET: 350 mg/kg Dose of MEA: 250 mg/kg
Time of administration: 30 minutes before X-irradiation.

Fig. 7. Comparison of the Protective Activity of AET and that of MEA against 700R X-Irradiation

Time of administration: 5 minutes before X-irradiation

○—○ AET (MEG type) △—△ MEA

Fig. 8. Comparison of the Protective Activity of AET and that of MEA against 800R X-Irradiation

Time of administration: 5 minutes before X-irradiation

○—○ AET △—△ MEA

に測定を行なった。投与量 0.1—0.8 mmole/kg を X 線 700 R 照射マウスに対して、照射前 5 分に投与し、Fig. 6 に示す結果を得た。

AET 型と MEG 型はともに投与量と防護効力とがほぼ直線的関係を示し、両者には差が認められなかった。

VI. AET と MEA の防護効力の比較 AET と MEA の防護効力を同時に測定して、両薬剤の防護効力の強弱を直接比較した。測定には X 線 700 R および 800 R 照射マウスを用い、いずれも照射前 5 min に投与した。

Fig. 7 に 700 R 照射、Fig. 8 に 800 R 照射の場合の結果を示したが、投与量と効力とを比較して、AET の方が MEA よりも分子量当りの効力が 2—4 倍強力であることを認めた。

考 察

AET および MEA の放射線障害防護効力については、すでに多数の報告が発表されており、⁵⁻⁸⁾ その有効性が確められているが、動物の放射線に対する感受性は実験条件によって著しく左右されるため、マウスによる測定でもその系統が異なれば効果も差を示す場合がある。放射線障害防護薬剤の効力試験を行なう場合には使用する動物の放射線に対する感受性を測定しておくと同時に、薬剤の効力発現にもっとも適した条件を検索しておくことが必要となる。わが国でもっとも広く実験に使用されているマウスの系統は dd 系であるが、この系統はさらに数種の亜系に細別されており、これらの亜系相互にも放射線感受性に差のあることが認められている。¹⁹⁾ 第 1 報¹³⁾ において、dd 系の 1 種である ddY マウスが放射線障害防護薬剤の効力試験に適していることを認めたので、さらに、ddY マウスによる防護薬剤の効力試験に AET あるいは MEA が標準品として使用し得る可能性を検討した。なお、ddN を主とした他の dd 系マウスを用いて AET あるいは MEA の効力試験を行なった報告はあるが、²⁰⁻²³⁾ ddY マウスによる結果は報告されていない。

AET の化学的性質は Doherty¹⁸⁾ により研究され、その水溶液は 0.2 N HCl 酸性では安定でイソチウロニウム塩の構造を保持するが、pH 2.5 では閉環、脱 NH₃ の変化が起こり、2-aminothiazoline (2AT) となり、pH 7 ではグアニジン転位が起こり 2-mercaptoethylguanidine (MEG) に変化し、さらに酸化を受けて guanidino-

19) 尾上正明, 日医放誌, 19, 2380 (1959).

20) 勝原 良, 日医放誌, 19, 73 (1959).

21) 橋本哲明, 日医放誌, 19, 1569 (1959).

22) 安徳重敏, 日医放誌, 23, 221, 666, 698 (1963).

23) 渡辺博恭, 井手明雄, 杉本典夫, 野口祐三, 石田柳一, 甲和良夫, 薬誌, 83, 1118 (1963).

Chart 1.

ethyldisulfide(GED)となる。また、AETは強アルカリによりMEAに分解するといわれている(Chart 1 参照)。花木等²⁴⁾は水溶液中でAETからMEGへの変化をアルカリ滴定により定量的に測定し、この変化の急速に進行することを確認した。

AETの毒性および防護効力を、水溶液のpHを補正しないAET型とpH 7.0に補正したMEG型とについて比較したが、LD₅₀(Table I), 防護効力(Fig. 6)ともに差が認められず、したがって生体内に投与されたAETもただちにMEGに変化して効力発現に関与するものと考えられる。

Fig. 9. Correlation between Protective Activities and Toxicities of AET and MEA (see also Fig. 7 and 8)

○—○ AET ◐—◐ AET (MEG type)
△—△ MEA

AETとMEAを比較すると、毒性はmg/kgではAETの方が少ないが、分子量を考慮してmmole/kgで比較するならばMEAの方が低いことを示し(Table I), 防護効力は700 R照射と800 R照射とで程度に幾分の差があるが、分子量当りの効力はいずれもAETの方が強いことを認めた(Fig. 7およびFig. 8)。そこで、これらの毒性試験と効力試験の結果から投与量をLD₅₀に対する割合であらわして、防護効力と毒性との関係を比較すると、Fig. 9に示すように、両薬剤には大差ないことがわかる。

AETとMEAはともに投与量(log dose)と防護効力(protective potency)との間に直線的な関係を示し、

また、投与時期が照射前5—30分の範囲では効力に大差ないことから、薬剤投与に要する時間の変動による誤差を無視することができる、などの利点があり、防護効力試験の際の標準品として有効な薬剤といえる。しかし、化学的に不安定な化合物であるために、常に一定の調製法にしたがうことが重要であり、さらに、Fig. 6—8に見られるように、同一薬剤でも実験日を異にすることにより効果に変動のある場合があり、防護薬剤のスクリーニング・テストの際の標準品として同時に2—4用量による測定を併用することが必要である。

Fig. 1—4において、AETおよびMEAは、放射線照射による致死の防護に有効であるのみでなく、照射によって起こる急激な体重減少に対しても顕著な防護効果が認められることから、この体重減少に対する防護効力を指標とした生物検定法も可能であろうと考えられる。

総 括

AETとMEAはともに比較的急性の毒性があり、これらの薬剤の致死量をマウスの腹腔内に投与すると、死

24) A. Hanaki, T. Hanaki, K. Ōya, A. Andou, T. Hino, S. Akaboshi, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **14**, 108 (1966).

亡はほとんどが 24 時間以内に起こる。

AET と MEA の毒性を分子量を考慮して比較すると、AET の方が MEA より約 2 倍強い。

AET と MEA の放射線防護効力の発現にもっとも有効な投与時期は照射前 5—30 分であり、照射後に投与しても無効であった。

AET はその水溶液を NaOH で pH 7.0 に補正して MEG 型に変化させても、毒性 (LD_{50}) および放射線防護効力は変化しない。

AET と MEA はともに、その投与量 (log dose) と放射線防護効力との間に直線関係がみられるが、投与量を mmole/kg で比較すると、両薬剤の効力は AET の方が MEA よりも 2—4 倍強力である。しかし、両薬剤の防護効力と毒性との関係は大差を示さない。

AET と MEA は、放射線照射による死亡現象の防護のみでなく、体重減少に対しても顕著な防護効力のあることを認めた。

謝辞 AET および MEA を提供された 放医研・薬学研究部第 1 研究室 日野 亨、魚路和子、常岡和子の諸氏、および、効力試験に協力された岩田京子氏に厚く感謝する。