

ブレオマイシンの体内における銅キレート化

金尾昌明・富田 慈・石原貞尚

村上 旭・岡田弘二

京都府立医科大学産婦人科学教室 (主任: 岡田弘二教授)

(昭和 48 年 5 月 29 日受付)

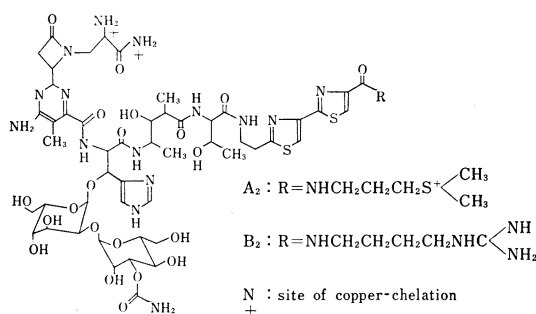
概 要

Bleomycin (BLM) が他の化学療法剤と同様に *in vivo* において銅をキレートすることを明らかにした¹⁾。すなわちラット血清と脱銅 BLM complex (以下、ブレオと略) を 37°C 30 分間 incubate しカラムクロマトグラフィーを行なうと 290 m μ における Optical density (OD) の pattern は BLM の溶出 pattern とほぼ一致し、また各分画における銅の含量はほぼ OD と平行関係にあった。このことからブレオが血清中の銅をキレートしたと考えられた。次にブレオ静注後のラット血清を採取し、カラムクロマトグラフィーを行なうと、同様に OD と銅の溶出 pattern は一致し、しかも血清中の銅の総量は、生理的に存在する血清中の銅以上の量を含有していた。このことから BLM は臓器の銅をもキレートすることが判明した。ブレオ筋注後の尿を採取しカラムクロマトグラフィーを行なうと、血清の場合と同様に 290 m μ の OD の pattern と一致して銅が溶出された。ブレオ筋注後に採取した尿を薄層クロマトグラフィー (TLC) で展開すると脱銅ブレオの R_f に一致した部分に銅の含量は多く存在した。BLM が体内において銅をキレートすることは制癌効果発現機構の面から興味ある事実である。また BLM が臓器において銅をキレートするので銅の組織化学的な局在性から間接的に BLM の局在性を推定できるようになった²⁾。

緒 言

多くの抗菌性物質や、制癌作用を有する化合物は少数例を除いて金属キレートを形成する^{3,12)}。これらの抗菌あるいは抗腫瘍効果発現機構は金属とキレートすることと密接に関係するものがある¹³⁾。BLM は最初含銅 BLM としてまず登場し、後に脱銅 BLM の complex “ブレオ” として製品化された。中山^{4,12)}等は脱銅 BLM-A₂ または -B₂ をマウスに筋注し、1 時間および 3 時間後に採取した尿を TLC にかけるルベア酸で発色させたが、BLM -A₂ または -B₂ の R_f に相当する位置に銅の青色反応を認めなかったと報告した。したがって脱銅 BLM は体内の銅をキレートすることなく排泄され、また含銅 BLM の銅は BLM から離れることなく排泄されると説明されていた^{4,12)}。しかしわれわれの検討では、ルベア

Fig. 1. Chemical structure of bleomycin (R : terminal amine)



第 115 回日本抗生物質学術協議会，滝田，梅沢等 (S. 47. 9. 22)

ン酸は遊離形の銅は呈色するが、キレートした銅は呈色しなかった。*In vitro* で銅とキレートする BLM は *in vivo* でも銅とキレートする筈であり、したがってこれらの理由からさらに検討する必要がある。従来微量の銅を測定することは手技が煩雑で困難であったが、最近原子吸光分析装置を用いて比較的簡単に測定が可能になった⁷⁾ので、われわれはこの方法を用いて検討を行なった。

実験材料および実験方法

1) “ブレオ”の組成

われわれが実験に用いたブレオは、現在臨床に供されているもので、塩酸 BLM -A₂ を 53%，塩酸 BLM -B₂ を 19.9%，塩酸 BLM -B₄ を 3% 以下、塩酸 BLM -B 群総量を 35% 以下とした脱銅品で、その 1 mg (重量) の力価は約 1.5 mg (力価) である。主成分の BLM -A₂、-B₂ の構造式は、滝田，梅沢等によると Fig. 1 のとおりである。なお最近、銅をキレートする場所も判明した。以下、ブレオとは現在臨床に使用されている脱銅 BLM complex，含銅ブレオとは含銅 BLM complex をさす。

2) カラムクロマトグラフィーおよび TLC の条件

CM Sephadex C-25 を管径 8 mm，カラム高 19 cm になるようにガラス管に詰め、展開溶媒は 0.1 M 酢酸

アンモンを用い、フラクシヨコレクターで 5 ml ずつに分画して採取した。TLC は Merck 社の Silica Gel plate DC -Fertigplatter Kieselgel 20×20 cm を使用し、展開溶媒にはメタノール:10, 10% 酢酸アンモン:9, 10% アンモニア水:1 の割合に混合した液を用い、10 cm 以上展開した。BLM の spot の検出は過マンガン酸カリ反応および PAULY 反応にて呈色させることにより行なつた。

3) プレオと血清との incubation

体重約 200 g のウィスター系成熟雌ラットの血清 2 ml とプレオ 10 mg (力価) を 37°C 30 分間 incubate した試料を前述のカラムクロマトグラフィーで展開し分画採取した。フラクシヨコレクターを用いて 5 ml ずつに分けて、各々検体の OD を EPU -2 A 型日立分光光度計にて測定した。また並行して銅の含量を日本ジャーナルアッシュ社製 AA-I 型原子吸光分析装置により測定した。

4) プレオ静注後の血清の分析

約 200 g のウィスター系成熟雌ラットに 60 mg (力価) のプレオを股静脈から静注し、約 2 分後に反対側の股静脈から採血した。3,000 回転 5 分間遠沈して分離した血清 2 ml をカラムクロマトグラフィーにて展開し、OD と銅の含量を 3) の条件にて測定した。

5) プレオ筋注後の尿のカラムクロマトグラフィー

約 200 g のウィスター系成熟雌ラットに 15 mg (力価) のプレオ筋注後の 4 時間尿をプラスチック製の代謝ケージを用いて採取し、その 2 ml をカラムクロマトグラフィーにて展開し、OD と銅の含量を測定した。

6) プレオ筋注後の尿の TLC

5) の検体約 1 ml を TLC に吸着し展開した。展開したプレートを乾燥後 1 cm 間隔に分けて剥ぎ取り、各分画を 4 ml の再蒸溜水で溶解し、遠沈した上清を含銅量の測定のため原子吸光分析を行なつた。

7) BLM -A₂ の尿中代謝産物の検討

約 20 g の ICR 系成熟雌マウスに ¹⁴C-BLM -A₂ 0.5 μCi 筋注後の 2 時間尿を膀胱穿刺により採取し、カラムクロマトグラフィーにて溶出し、各フラクシヨンの一部をとり、試料に dioxane scintillator (toluene, dioxane, ethyleneglycol-monomethyl ether 等量混合液に、DPO 4 g/L, POPOP 0.1 g/L, naphthalene 75 g/L を加えた液) 10 ml を加え、その放射能をパッカード社製モデル 3375 液体シンチレーションカウンターにて測定した。

実験成績

1) 含銅および脱銅プレオの吸収 peak の検討

プレオ 120 μg (重量) を 4 ml の生理的食塩水で溶解

Fig. 2. U-V absorption spectrum of "Bleo" (commercial BLM)

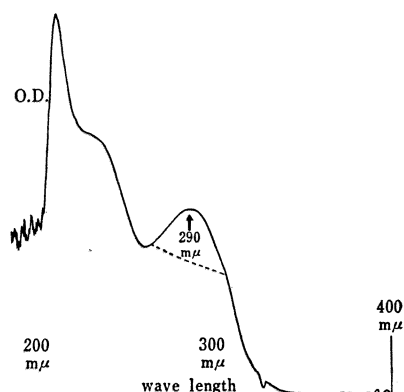
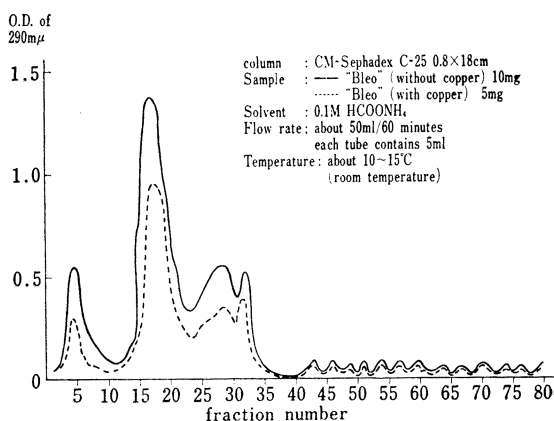


Fig. 3. Separation of "Bleo"



後、124 型日立ダブルビーム分光光度計にて測定し、Fig. 2 のとおり 250 mμ の材近は shoulder で、290 mμ に吸収の peak があることを認めた。したがって以下の実験は全て波長 290 mμ にて測定した。なおプレオ 5 mg (力価) と含銅プレオ 10 mg (力価) をカラムクロマトグラフィーで展開すると、Fig. 3 のようにプレオは脱銅品も含銅品も同様の溶出 pattern を示した。

2) TLC におけるプレオの spot 検出法の検討⁸⁾

BLM -A₂ を 50% 以上含むプレオの TLC における spot の検出にはどの反応が適切かを知るために、アミノ酸、ペプチドの検出定量に用いられる以下の方法について検討した。なお、陽性所見をはつきりさせるための対照として BLM -A₅、グリシンおよびシスチンを用いた。

① ニンヒドリン反応

0.84% ニンヒドリンアルコール溶液を TLC プレートに均一に噴霧すると、A₅、グリシンは紫色を呈して陽性であつた。プレオ、シスチンは陰性であつた。

② 塩素ヨードカリデンブレン反応

KMnO₄ と塩酸で発生させた塩素ガスを充満させたガラス容器に TLC プレートに 5~10 分間入れ、取り出してから過剰の塩素を除き、これにデンプン-KI 溶液を噴霧した。ブレオは薄褐色を呈し、弱陽性を示した。

③ オルシノール反応

TLC プレートに 0.1% オルシノール、エタノール溶液(硫酸を 0.004 N に含む)を噴霧し、110~120°C で 30 分間加熱したところ、ブレオは陰性であった。

④ 過マンガン酸カリ反応

0.3 N の硫酸で酸性にした 0.15 M KMnO₄ 水溶液を TLC プレートに薄く吹きつけると、ブレオは赤紫色の中に黄色の明瞭な spot を生じたが、1 時間以上経過すると不明瞭となり、1 晩放置すると全く spot は消失した。したがってこの反応は結果を保存するには不適當であるが、即時反応として適していると思われる。

⑤ 紫外線照射

マツダの殺菌灯に corning NO 9863 filter を装置したもので照射すると、濾紙ではブレオは blue spot として検出されたが、TLC プレートでは認められなかった。

⑥ PAULY 反応

(a) スルファニル酸 9 g, conc. HCl 90 ml, H₂O 910 ml 1 容

5%(w/v) 亜硝酸ナトリウム(NaNO₂) 水溶液 1 容

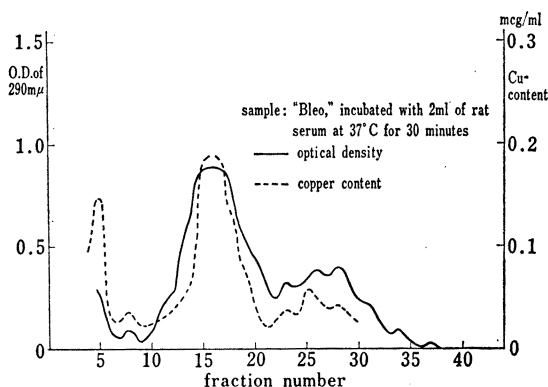
(b) 10%(w/v) 無水炭酸ソーダ水溶液 2 容

必要に応じて(a)の2種の試薬を混合し、室温で4~5分間放置し、TLC プレートに噴霧し、続いて(b)を噴霧した。短時間でははっきりしないが、15分間くらい経つと、ブレオは赤褐色の明瞭な spot として検出され、いちばん適した方法と思われる。しかもこの反応は1晩置いててもそのままの状態で保存され、安定な反応と言える。

⑦ 坂口反応

(a) 0.1%(w/v) オキシシ(8-オキシキノリン)アセトン水溶液, 100 ml, 尿素 0.1 g(H₂O 0.2 ml)

Fig. 4. Chromatographic elution pattern of "Bleo"



(b) Br₂ 0.3 ml, 5 N-NaOH 100 ml

まず(a)を噴霧し、風乾して完全にアセトンを除き、次いで(b)を噴霧したところ、ブレオは陰性であった。

3) ブレオと血清との incubation 実験

Fig. 4 のとおり、ブレオと血清とを incubate した試料は CM-sephadex chromatography で2つの peak を示し、その各々に一致して銅の含量も同様の溶出 pattern を示し、ブレオが血清中の銅をキレートしたことを示唆している。

4) ブレオ静注後の血清の分析

Fig. 5 のとおり、3) と同様に、ブレオ 60 mg をラットの股静脈に静注し、2 分後に反対側の股静脈から採血分離した血清は2つの peak を示し、銅の含量の peak もそれに一致して、ブレオが銅をキレートしたことを示す。しかも BLM の OD は低いにも拘わらず銅の含量は3)の実験よりも多いことを示している。血清中の銅の含量は約 1 ppm であるから、これはブレオが血清中の銅以上の銅、すなわち臓器中の銅をもキレートしていることを示している。これはきわめて重大なことを示唆しているため、この実験は前後5回行なわれ、2 ml の血清中に 3 ppm から 5 ppm と多少のばらつきはあるが、常に正常血清中の銅の含量以上という成績を示した。

5) ブレオ筋注後の尿のカラムクロマトグラフィー

Fig. 6 のとおり、ラットに 15 mg のブレオを筋注し、その4時間尿を CM-sephadex-chromatography にて展開すると、290 mμ の OD の peak に一致して銅の peak があり、体内でキレートされた銅が尿中にも排泄されたことを示している。

6) ブレオ筋注後の尿の TLC

5) と同じ試料を 2 ml, TLC に吸着させ展開した。また同時にブレオを pilot として展開すると、Fig. 7 のとおり、R_f=4.1, R_f=7.0 の2個の spot に分かれ、その spot に一致して銅の含量の peak が認められた。

Fig. 5. Chromatographic elution pattern of "Bleo" in rat serum

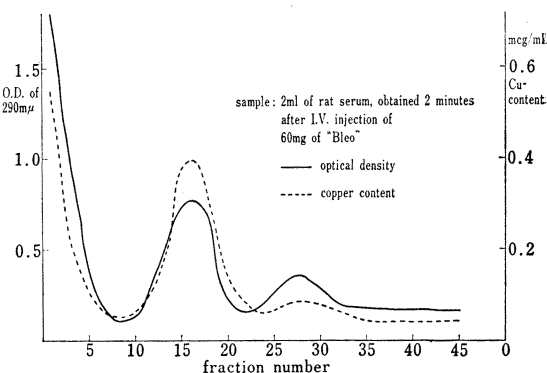


Fig. 6. Chromatographic elution pattern of "Bleo" in rat serum

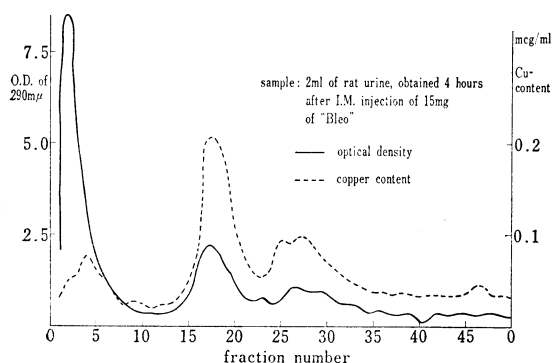


Fig. 7. "Bleo" and Cu in rat urine on TLC

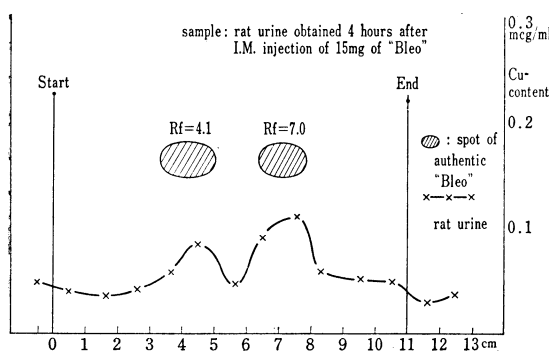
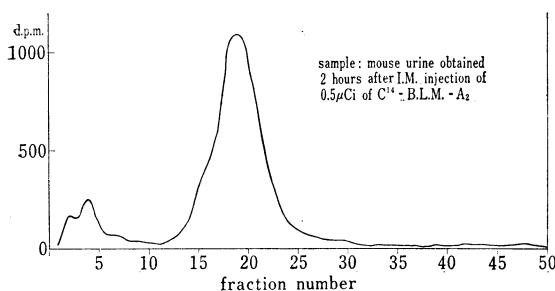


Fig. 8. Elution pattern BLM in mouse urine from Sephadex column



しかも Rf の大きい peak のほうが小さい peak より銅の含量が多く、5) の結果とも矛盾していない。

7) BLM-A₂ の尿中代謝産物の検討

Fig. 8 のとおり、明瞭に単一の peak を描き、またその位置も含銅 BLM-A₂ を単独でカラムクロマトグラフィーにて展開した際の位置と一致した。この事実は BLM-A₂ は体内で代謝されることなく尿中に排泄されることを示唆している。

考 案

医薬品を投与すると、ARIENS⁹⁾ (1962) によれば投薬後、吸収、移動、生化学変化、排泄の過程を経る。これらの薬物が生体相 (biophase) と呼ばれる受容体の直接周辺部に集中され、初めて医薬品受容体反応が起こり、その薬物効果があらわれるものと考えられる。また、医薬品と受容体との相互作用はある生物学的効果をもたらすが、この効果は存在する医薬品-受容体錯化合物の量に比例すると考えられている。BLM の作用機構は DNA の合成阻害、特に切断された DNA を修復する DNA-ligase の阻害によるとみなされている¹⁰⁾ が、これも作用の本質と言うよりはその結果であるかもしれない。一般に酵素は金属をキレートして活性を保っている事実から、BLM が培地中の銅をキレートする性質にわれわれは早くから強い興味を有していた。しかし、従来脱銅 BLM はマウス体内の銅をキレートすることなく排泄されると説明されていた^{4,11)}。これに従うと BLM は培地中 (*in vitro*) では銅をキレートするが、体内 (*in vivo*) では影響を受けないことになる。含銅 BLM と脱銅 BLM は毒性を除いては両者に生物学的効果に差が無いと一般に信じられていた。しかしその後、鈴木等¹⁴⁾ の詳細な検討等、良く調べてみると、両者の差を指摘したデータも散見される。すなわち、エールリッヒ腹水癌に対する延命効果、抗菌力では共にその最少有効量に差は無いが、BLM-A₂、BLM-B₂、および臨床用のブレオでは銅をキレートしない場合のほうが尿中への排泄は速やかであると言う。生理食塩水中の安定性の検討では *in vitro* においても BLM の力価が低下するのに要する時間は 79.6 時間で、脱銅 BLM が 39.2 時間であるのに対して、含銅 BLM では 131 時間とされている。また、鈴木等¹⁴⁾ によると、BLM のキレート能は BLM が作用するために必要であり、BLM は他の化学療法剤と同様に *in vitro* (Eagle medium 中) で Zn²⁺、Co²⁺、Cu²⁺ の配位子となりキレート化合物を形成するとしている。BLM が体内で Cu²⁺ をキレートするだけでなく、その能力が作用の本質と結びつくすれば、脱銅 BLM は含銅 BLM よりも副作用の面だけでなく、効力の面でも有利に作用する可能性があるものと思われる。われわれは含銅 BLM とラット血清との incubation から、含銅 BLM は殆んどキレートする能力を有しないことを認めている。⁵⁷Co-BLM、^{99m}Tc-BLM、⁵¹Cr-BLM は BLM としての生物活性が著るしく弱くなる¹⁴⁾ のに反して、銅だけが BLM の生物活性を殆んど弱めないどころかむしろ強める場合もあるということは、銅とキレートすることが BLM の抗癌効果と密に結びついていることを示唆している。従来 BLM が *in vivo* で銅をキレートしな

いといわれていたが、われわれはこの点に疑問をいだき検討を始めた。その結果、Fig. 4, 5, 6 のように、カラムクロマトグラフィーによる分析で、生体に投与した BLM が血清中および尿中でいずれも明らかに銅とキレートしており、また血清との incubation でも同様の結果を得た。また、TLC を用いて尿中の BLM についても検討した結果、原子吸光分析を行なうことにより、Fig. 7 のように、銅とキレートして排泄されることを証明した。われわれは含銅 BLM 投与時の各種臓器におけるブレオの局在性を銅を組織化学的に証明することにより検討したが、ルベアン酸で直接染色した場合には銅は染色されなかつた。そこで各臓器で BLM が銅とキレートしているものと考え、硫化水素ガスで処理してキレートをはずしたら染色可能となつた¹⁵⁾。この方法の原理はブレオの製造過程で培養液から陽イオン交換樹脂法、CM-sephadex 等の処理で製造した BLM が 0.08~3% の銅を含有しているので、この含銅 BLM を精製して脱銅とする工程と全く同一である。われわれは先に含銅 BLM の組織化学的証明法を試みるに際して、ルベアン水素酸銅検出法、パラジメチルアミノペンチリデンロダニン法、ジフェニールカルバチッド法^{5,6)}を用いたが、原法のままでは染色できなかつた。この原因はこれらの方法では Cu^{2+} は証明できるが、キレートした銅はそのままではもはやキレート化合物を作り得ないので証明不能であることを示唆している。われわれは既に含銅 BLM を 20-methyl cholantrane で発癌させた子宮頸癌マウスに投与して、BLM は腫瘍細胞そのものよりもその直下の結合組織細胞に高濃度に入ることを明らかにして発表した²⁰⁾。また脱銅 BLM を投与しても含銅 BLM の場合と同様に体内でキレートした銅が褐色の顆粒として証明された。これはいわば BLM が銅を体内でキレートすることを示している。従来、扁平上皮癌に著効を呈する理由として扁平上皮癌組織に BLM が高濃度に存在し、またそこで不活性化を受け難いためと説明されている¹⁷⁾。その他に BLM は癌組織の間質を侵し、これによつて癌細胞の栄養を block するとも言われている¹⁶⁾。BLM は治療量で結合織に明らかな変化、特にその重要構成成分である酸性ムコ多糖類の代謝に影響をおよぼすという報告がある。このことは治療効果というより副作用の本体であると解釈されるが、さらに検討を要すると考える。最近 BLM の作用機構をキレートの面から検討した論文¹⁸⁾も発表されている。ブレオが体内で銅とキレートすることが抗癌効果と密接に結びついているとすれば、この点をさらに検討してより有効な抗癌作用のあるものが見出せるかも知れない。また銅とキレートすることを応用して組織化学的に銅を染色して間接的に BLM

の局在性を証明することも可能である。

結 論

- 1) ブレオは血清中の銅とキレートする。
- 2) ブレオは臓器中の銅ともキレートする。
- 3) ブレオは尿中へキレートした形で排泄される。
- 4) 以上の結果を利用して BLM の臓器における局在性を組織化学的に証明することが可能である。

謝 辞

銅の原子吸光分析に御協力下さった関西医学検査センター所長 安住義人博士、矢盛、坂口両技師、ならびにブレオ、含銅ブレオおよび ^{14}C -BLM- A_2 、含銅 BLM- A_2 、含銅 BLM- B_2 を提供して下さいた日本化薬 KK に感謝致します。

この論文の一部は第 20 回日本化学療法学会総会ならびに第 46 回近畿産婦人科学会のシンポジウムにおいて発表した。

参 考 文 献

- 1) 金尾昌明：ブレオマイシンをめぐる 1, 2 の新発見。産婦人科の進歩 24, 5, 84, 1972
- 2) TOMITA, S. *et al.*: Histochemical demonstration of bleomycin. *Chemotherapy* 21, 1, 63, 1973
- 3) 坂口武一、上野景平編：金属キレート(Ⅲ), 177, 第 11 章 医薬品と金属キレート, 南江堂 1967
- 4) 梅沢浜夫, 市川篤二監修：ブレオマイシン概要, 51 頁, 日本化薬 KK
- 5) OKAMOTO, K. *et al.*: *Acta Scholae Med. Kioto* 20, 573, 1938
- 6) OKAMOTO, K. *et al.*: *Acta Scholae Med. Kioto* 22, 335 & 348, 1939
- 7) 武内次夫, 鈴木正巳：原子吸光分析, 南江堂, 1972
- 8) 成田耕造, 村上孝夫：クロマトグラフィーの実際, 1, 52, 第 2 章, 第 3 節, アミノ酸, ペプチドの検出定量, 広川書店, 1970
- 9) 佐々木正：医薬品の開発——合成医薬品研究指針, 32, 南江堂, 1971
- 10) 田中信男：抗生物質の作用メカニズム, 26, 東京大学出版会, 1972
- 11) 抗腫瘍性抗生物質ブレオ——注射用塩酸ブレオマイシン：ブレオ(脱銅 BLM)と含銅 BLM の代謝, 30, 日本化薬 KK
- 12) 山辺 茂：医薬品物理学, 143, 第 5 章, 金属キレートと薬理作用, 朝倉書店, 1966
- 13) FURST, A.: 大木幸介, 森川幸雄訳：癌のキレート化学。化学の領域 19, 830, 1965
- 14) SUZUKI, H. *et al.*: On the mechanism of action of bleomycin, strand scission of DNA caused by bleomycin and its binding to DNA *in vitro*. *J. Antibiotics* 23, 473, 1973
- 15) UMEZAWA, H. *et al.*: Purification of bleomycin. *J. Antibiotics* 19, 210, 1966
- 16) 岡本 堯他：実験的ブレオマイシン肺線維症。医学と生物学 80, 6: 299, 1970
- 17) 藤田 浩：制癌剤の血中濃度, 不活性化, 毒性に

- 及ぼすグルタチオンの影響, Glutathione in Medicine, 170 頁, 山之内製薬 KK
- 18) MÜLLER, W. *et al.*: Action of bleomycin on DNA and RNA. Eur. J. Biochem. 31 : 518, 1972
- 19) 久田欣一他: シンポジウムⅢ, 悪性腫瘍の RI 診断。核医学 9, 1972 (第 12 回日本核医学会総会抄録集)
- 20) 富田 慈他: プレオマイシンの扁平上皮癌ならびに腺癌に対する親和性の相違に関する検討: 第 48 回近畿産科婦人科学会学術講演会内容抄録集 8

CHELATION OF BLEOMYCIN WITH COPPER *IN VIVO*

MASAAKI KANAO, SHIGERU TOMITA, SADANAO ISHIHARA,

AKIRA MURAKAMI and HIROJI OKADA

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University of Medicine

(Director : Prof. H. OKADA)

Abstract

In vivo chelation of bleomycin (BLM) with copper was investigated. Column chromatographic analysis of rat serum incubated with copper-free BLM *in vitro* showed coincidental elution of copper with BLM. Rat serum obtained after the intravenous injection of copper-free BLM was also analysed with the same system and concurrent elution of BLM with copper was demonstrated. Moreover, the amount of copper chelated was far more higher than that expected from serum copper level. Analysis of rat urine, obtained after the intramuscular injection of copper-free BLM also showed that BLM chelated copper *in vivo*. Thin layer chromatographic analysis of rat urine excreted after the intramuscular injection of copper-free BLM also showed high copper content at the spot of BLM. The significance of chelation of BLM with copper *in vivo* was discussed.