

Title	ON A MECHANISM OF NITROMIN ACTION
Author(s)	ISHIGAMI, K ICHI
Citation	日本外科宝函 (1954), 23(5): 516-521
Issue Date	1954-09-01
URL	http://hdl.handle.net/2433/206120
Right	
Type	Departmental Bulletin Paper
Textversion	publisher

 臨 床

ナイトロミンの一作用点について

京都大学医学部外科学第2講座 (青柳安誠教授指導)

石 上 浩 一

[原稿受付 昭和29年8月13日]

ON A MECHANISM OF NITROMIN ACTION

by

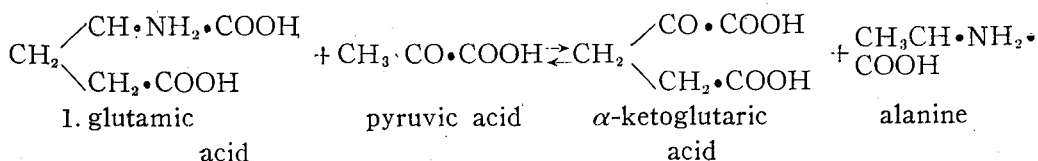
KŌICHI ISHIGAMI

From the 2nd Surgical Division, Kyoto University Medical School

(Director : Prof. Dr. Yasumasa Aoyagi)

It has been observed that the therapeutic administration of Nitromin (N.M.O.) resulted in many histological changes of neoplastic cells, especially in the midst of cell division, for example, the increase of polymorphism, the alternation and the enlargement of nucleus and the diminution of the figure of cell division.^{9, 11, 18)} BOYLAND, E., W. E. HESTON etc. have made clear that after the intravenous injection of Nitrogen Mustard (N.M.) there were increasing development of tumor of the lung and lymphosarcoma in a mouse of definite strain.^{4, 10)} It was also substantiated by GJESSING, A. C., S. TANAKA etc. that the effect of N. M. and N. M. O. caused the decreased viscosity of the DNA solution.^{7, 11, 17)} According to the results of tracer experiment by means of isotopes, N. M. also disturbs the DNA metabolism concerned with the cell division.⁶⁾ However, it is not yet obvious that N. M. O. acts either directly upon the chromosome, i. e. the DNA metabolism, or indirectly upon the same through the medium of enzymic system. The fact that the differed species of neoplasma exerts an influence upon the effect of antineoplastic drugs is attributed to the differed mode of DNA metabolism which is varied with the species of neoplastic cells, but more probably to the inhibitory action of these antineoplastic agents on the general metabolism which relates to the multiplication of tumor cell.

When such drugs as vitamin B₆, methionine, restamine, glucuronic acid and cystine etc. were given simultaneously or somewhat later from the time of injection of N. M. or N. M. O., there was remarkable reduction of harmful by-effects.^{18, 21)} Especially, when the administration of N. M. was followed by an injection of vitamin B₆ within 10-15 minutes, its antineoplastic action has been no more or only a little observed. The present paper records the effect of N. M. O. on transaminase activity which has most close relation to amino acid or protein metabolism among the enzymes including vitamin B₆, pyridoxine, as the coenzyme. This enzyme is able to accelerate the transamination as follows;^{1, 2, 3, 16, 20)}



Consequently it plays a considerable role in the synthesis of C-N union, further in the protein synthesis.

Experiment and its Results

I used such a final reaction mixture; 1) Enzyme buffer solution (tissue homogenate 1:5) 1.0 ml., 2) Phosphate buffer solution (SØRENSEN) (pH 7,6) 3,5 ml., 3) 0,2 M Sodium pyruvate solution 1,0 ml., 4) 0,2 M Sodium glutamate solution 1.0 ml., 5) Nitromin (YOSHITOMI) solution (0,1~0,5 mg/ml/vial) or Aq. dist. 0,5 ml. and 6) Toluene 0,5 ml. Incubated this for 12 hours at 37°C and measured the amount of decomposed pyruvic acid. The analytical procedure was based on the modification by SHIMAZONO and SHIMIZU of the FRIEDMANN and HAUGEN method.¹⁹ All enzyme sources were the fresh neoplastic tissues removed operatively from the patients in our clinic.

The results obtained were as shown in Table 1. N.M.O. exhibited the remarkable inhibition upon the transaminase activity which was contained in the neoplastic tissues. The higher the concentration of N. M. O. solution was given, the larger the

Table 1. Inhibitory effects of N. M. O. upon the decomposition of pyruvic acid

No.	Enzyme Sources	decomposed pyruvic acid			Vit. B ₆	Inhibition o/o
		N. M. O.		concentration mg/ml		
		none	added			
1	rabbit liver	0,5	2,335	2,368		- 1,4
2	guinea pig liver	0,5	4,228	3,766		10,9
3	lymphosarcoma	0,5	3,567	0,378		89,4
4	gastric cancer (cylinder cell carcinoma)	0,5	7,669	-0,858		111,2
5	fibrosarcoma (left upper leg)	0,5	9,632	2,898	added	69,9
		0,1	9,632	6,762		
6	endothelioma cylindromatosum (right arm)	0,5	10,448	-1,425	added	113,6
		0,5	10,448	-1,197		
7	carcinoma mammae (adenocarcinoma)	0,5	9,863	-1,428	added	114,5
		0,1	9,863	3,560		
8	gastric cancer (cylinder cell carcinoma)	0,2	14,564	5,964	added	59,0
		0,2	14,564	6,234		

Table 2. Inhibitory effects of N.M.O. upon the transaminase activity

Enzyme (gastric cancer)	N. M. O. 0,2 mg/ml/vial		Inhibition o/o
	none	added	
Transaminase + pyruvic acid oxidase etc.	14,564	5,964	59,0
Transaminase alone	8,526	2,811	67,0
Pyruvic acid oxidase etc.	6,038	3,153	47,6

inhibitory action became. But it had no inhibitory action upon the transaminase activity of the normal liver tissue. No antagonistic action has been observed in adding vitamin B₆ to this reaction mixture. The coenzyme of transaminase is not vitamin B₆, pyridoxine, itself, but it is pyridoxal phosphoric acid which derived from it.¹⁶⁾ So that, if the neoplastic cell is unable to synthesize pyridoxal, further pyridoxamine from pyridoxine in the above-mentioned experimental conditions, we have naturally acquired such results.

I could not obtain α -ketoglutaric acid and used the unpure tumor cell itself as the enzyme source. Therefore I determined the transaminase activity by the amount of decomposed pyruvic acid. But, in such cases, the amounts of pyruvic acid decomposed by pyruvic acid oxidase etc. without the addition of sodium glutamate solution into the reaction mixture were also determined. The remarkable inhibitory effect of N. M. O. upon the transaminase activity alone has been also proved as shown in Table 2.

Discussion

After their wide systematic biochemical researches at National Cancer Institute Dr. GREENSTEIN, J. P. etc.⁹⁾ have concluded the following enzymic figures of neoplastic cell; (1) tumor have qualitatively the same enzymes as normal tissues, (2) the enzymatic pattern of a tumor is largely independent of its age, of its growth rate and of the strain of animal in which it is grown, (3) tumors possess a more uniform and less diverse chemical pattern than normal tissues. (4) when a normal tissue become neoplastic, many of the specific functional activities markedly decrease or are lost altogether. (5) the range of values for the tumors is usually between the extremes of the corresponding values for normal tissues. (6) tumor tend to converge, enzymatically, to a common type of tissue. Therefore, only from the enzymatical viewpoint, so far as the antineoplastic drugs, such as N. M. O., act only upon the enzyme system related to the autonomic atypic multiplication of the neoplasma, we cannot expect its effective antineoplastic action without any severe by-effects on the systematic administration. Otherwise, we might be hoped that if a therapeutic procedure is applicable for one voluntary neoplasma, it would be available to some extent for the whole neoplasma.

CASPERSSON, T. O. has divided the cell of human neoplasma into two groups.^{5,8,12)} There is no doubt that the inhibitory effect of N. M. O. on transaminase activity or its disturbing action on DNA metabolism are expected for the cell of group A which has a great majority of cellular nucleic acid and consists of the pattern that is situated outside of cell nest of tumor, around the blood vessels and is infiltrated in the adjacent tissues. The administration of N. M. O. should be also prescribed by this relation.

There are the antagonistic action in the vital body between pyridoxine and N. M. or N. M. O.. It results from the inhibitory effect of N. M. O. on the transaminase activity which needs the modified pyridoxine, pyridoxal phosphoric acid, as the coenzyme. It is quite interesting that N. M. compounds which contain the pyridoxine

structure, such as SK 1424 (Methoxypridoxyl-N. M.) and SK 2032 (Desoxypridoxyl-N. M.), exhibit the powerful antineoplastic action.¹²⁾

Summary

Experimental evidence has been presented to indicate the inhibitory effect of N. M. O. on transaminase activity of the neoplastic tissue removed operatively. Its standardized mode of administration and the origin of the antagonistic phenomenon between N. M. O. and pyridoxine have been discussed. It should be emphasized that N. M. O. acts not only as a pure mitosis inhibitor or mutagenic agent, but also indirectly through the protein metabolism on the DNA metabolism of tumor cell.

References

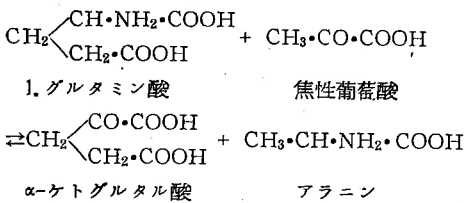
- 1) Altman, K. I. & A. L. Douce : Non-oxidative, nonproteolytic enzymes; Transaminase. *Ann. Rev. Biochem.*, **21**, 51~53, 1952. 2) Ames, S.R., P. S. Sarma & C. A. Elvehjem : Transaminase and pyridoxine deficiency. *J. Biol. Chem.*, **167**, 1, 135~141, 1947. 3) Awapara, J. & B. Seabe : Distribution of transaminase in rat organs. *J. Biol. Chem.*, **194**, 2, 497~502, 1952. *4) Boyland, E. & E. S. Horning : The induction of tumors with nitrogen mustards. *Brit. J. Cancer*, **3**, 118~123, 1949. 5) Caspersson, T. & L. Santesson : Studies on protein metabolism in the cells of epithelial tumours. *Acta Radiol. Suppl. XLVI* 1942. 6) Goldthwait, D.A. : Effect of Nitrogen Mustard on nucleic acid metabolism. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, **80**, 2, 503~504, 1952. *7) Gjessing, A. C. & Chanutin: The effect of Nitrogen Mustard on the viscosity of the mononucleate. *Cancer Res.* **6**, 593~598, 1946. 8) Greenstein, J. P.: *Biochemistry of Cancer*, 1947, Academic Press Inc., New York. 9) Hasegawa, T. & N. Kawai : The clinical effects of Nitrogen Mustard N-oxide on the cancer of the uterus and chorionepithelioma malignum. *Nihonrinshō*, **10**, 11, 43~45 (931~933), 1952. *10) Heston, W. E. : Induction of pulmonary tumors in strain A mice with methyl-bis (β -chloroethyl)amine hydrochloride. *J. Nat. Cancer Inst.* **10**, 125~130, 1950. 11) Katsunuma, S. : Clinical experiments of Nitrogen Mustard N-oxide. *Nihonrinshō*, **10**, 5, 1~4 (377~380), 1952. 12) Kawashima, S. : The present aspect of chemotherapy on the malignant tumors. *Rinshō*, **5**, 9, 20~25, 1952. 13) Miyaji, T.: *Researches of nucleic acid in tumors. Advances in medicine (Japanese)*, **7**, 1~74, 1951. 14) Shimazono, N. : Vitamin B group and vitamin B₁. *Nihonigakuzasshi-kabushikikaisha*, 1950, Tokyo. 15) Stang, H. A. : The Schwartzman phenomenon. I. Inhibitory action of Nitrogen Mustard (HN₂). *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, **74**, 749~751, 1950. 16) Suda, M. : On the enzyme system concerned with vitamin B₆. *Advances in Enzymology (Japanese)*, No. **1**, 172~216 1949. 17) Tanaka, S. et al : Influences of Nitrogen Mustard N-oxide on various enzymes and DNA. *Sōgōigaku*, **10**, 10, 762~765, 1953. 18) Tasaka, S. : Clinical evaluation of Nitrogen Mustard. *Saishinigaku*, **5**, 1, 34~52, 1950. 19) Tashiro, S. : Treatment of the neoplastic disease by means of Nitrogen Mustard. *Geka*, **12**, 6, 317~325, 1950. 20) Umbreit, W. W., D. J. O'kane & I. C. Gunsalus : Function of the vitamin B₆ group; mechanism of transamination. *J. Biol. Chem.*, **176**, 2, 629~637, 1948. 21) Weisberger, A. S., R. W. Heinle & B. Levine : The effect of l-cystine on Nitrogen Mustard therapy. *Amer. J. Med. Sc.*, **224**, 2, 201~211, 1952. *unable to obtain journals.

ナイトロミン (N. M. O.) を治療の目的で投与すると、腫瘍細胞、特に分裂中の細胞に対して、多形性の

増加、核の変性肥大、細胞分裂像の減少等の多くの組織学的変化を招来することが観察された。^{9,11,18)} Boyland,

E., W. E. Hoston 等はナイトロゼン・マスタード (N. M.) を一定系のハツカネズミに静脈内注射すると、肺腫瘍、淋巴肉腫の発生率を高めることを明らかにした。^{4, 10)} 又 Gjessing, A. C., S. Tanaka 等によつて、N. M. 及び N. M. O. は DNA 溶液の粘度を低下せしめることが確認された。同位元素による追跡試験の成績を見ても、N. M. は細胞分裂に関係した DNA 代謝を攪乱するのである。⁶⁾ しかし N. M. O. が直接クロムゾームなり、DNA 代謝なりに作用しているのか、あるいは酵素系を介してクロムゾームに作用しているのかは明白にされてはいない。抗腫瘍剤の作用効果が腫瘍の種類に若干左右される点は、腫瘍細胞の種類によつて DNA 代謝の形式が異なる為とも考えられるが、もつと妥当な考え方として、これらの抗腫瘍剤が腫瘍細胞の増殖に関係をもつた一般新陳代謝系に対して抑制作用を発揮するのではないかという事が考えられる。

N. M., N. M. O. と共に、ビタミン B₆, メチオニン, レスタミン, グルクロン酸, シスチン等を同時又は少しおくれて注射すると副作用がいちじるしく軽減する。^{18, 21)} 特にビタミン B₆ の注射が N. M. O. の注射後 10~15 分以内に行われると、その抗腫瘍作用をいちじるしく減弱せしめる、又は全く無効ならしめる事実が観察せられている。この報告はビタミン B₆, ピリドキシンを補酵素として含む酵素の中、アミノ酸、蛋白の代謝に特に関係が深いトランスアミナーゼ能に対する N. M. O. の影響を記載している。本酵素は次の如きアミノ基転位反応を触媒することが出来る。^{1-3, 16, 20)}



したがつて C-N 結合の合成、ひいては蛋白の合成に重大な役割を演じている。

実験及び成績

私は次の如き終末反応組成を使用した。すなわち、

- 1) 酵素緩衝液溶液 (組織碎液 1:5) 1.0cc., 2) 磷酸塩緩衝液 (Sørensen) (pH 7.6 3.5cc., 3) 0.2M 焦性葡萄糖酸ソーダ溶液 1.0cc., 4) 0.2M グルタミン酸ソーダ溶液 1.0cc., 5) ナイトロミン (吉富) 溶液 (0.1~0.5mg/cc/vial.) 又は蒸留水 0.5cc. 及び 6) トルオール. 0.5

cc. これを 37°C に 12 時間解置し、焦性葡萄糖酸の分解量を測定した。定量法は島蘭、清水両氏による Friedmann 及び Haugen 氏法変法に準じた。¹⁴⁾ 酵素源はすべて我々のクリニツク患者から外科手術により採取した新鮮腫瘍組織であつた。

実験成績は第 1 表に示す如くであつた。N. M. O. は各種腫瘍組織中に含有せられているトランスアミナーゼ能に対して著明な抑制作用を発揮した。しかもその抑制作用は N. M. O. 溶液の濃度の異なる程大であつた。しかしながら正常動物肝臓組織のトランスアミナーゼ能に対する抑制作用はなかつた。反応組成にビタミン B₆ を添加しても、この抑制作用に対する拮抗作用は認められなかつた。トランスアミナーゼの補酵素はビタミン B₆, ピリドキシンのものではなく、これから誘導されるピリドキサール燐酸である。したがつて上述の実験条件で腫瘍細胞にピリドキシニンからピリドキサール、更にはピリドキサミンを合成する能力がなければ、上述の結果は当然と考えられる。

α -ケトグルタル酸の入手が不可能であつたし、又腫瘍細胞自身を不純なままに酵素源として使用した。したがつて私は焦性葡萄糖酸の分解量によつてトランスアミナーゼ能を測定した。しかしかかる場合には、反応組成中にグルタミン酸ソーダ溶液を加えなくとも、焦性葡萄糖酸々化酵素等によつて分解される焦性葡萄糖酸の量をもあわせ測定している訳である。第 2 表に示す如く、トランスアミナーゼ能のみに対しても N. M. O. は著明な抑制作用を発揮することが分つた。

討 論

Greenstein, J. P. 博士等の National Cancer Institute における広汎な系統的生化学的研究によつて次の様な腫瘍細胞の酵素像が結論された。すなわち 1) 腫瘍は質的には正常組織と同じ酵素をもっている。2) 腫瘍の酵素像は腫瘍発生後の日数、成長速度、動物の系には大体無関係である。3) 腫瘍は正常組織よりはより均一な、変異の少い化学的特性をもっている。4) 正常組織が腫瘍化する時には多くの特殊な機能的作用はいちじるしく減少し、あるいは全くなくなつて了。5) 正常組織が腫瘍化して、その組織の酵素活性度が高くなつたり低くなつたりしても、正常組織のその酵素の最高値又は最低値をこえる事はない。6) 腫瘍は酵素学的には各組織共通な型に集約される傾向がある。以上の点より酵素化学的観点のみから考えると、N. M. O. の如き抗腫瘍剤が腫瘍の自律的異型的増殖に関係し

ている酵素系のみならず作用しない限りは、重篤な副作用を伴わずして、それらの全身性投与の際の有効な抗腫瘍作用を期待することは容易であるとは考えられぬ。又他方、ある任意の腫瘍に対して適用される有効な治療手段が、すくなくともある程度迄は全般の腫瘍にもあてはまるであろうという希望をもつことが出来るのである。

Caspersson T. O. は人の腫瘍を 2 群に分けた。N. M. O. のトランスアミナーゼ能抑制といい、又 DNA 代謝の攪乱作用といい、その作用を特に期待出来るのは、細胞内核酸量の多い、癌細胞巢の外部、血管のまわりの細胞、更には隣接組織に侵入している細胞よりなる A 群のそれに対してであることは疑の余地がない。この点からも N. M. O. の投与が規定されるべきであろう。

ピリドキシンと N. M. O. 又は N. M. O. との間には生体内で拮抗作用がある。これは恐らくは補酵素として変形したピリドキシン、すなわちピリドキサル磷酸を必要とするトランスアミナーゼ能に対する N. M. O. の抑制作用に帰因するものである。N. M. O. 属中において特に抗腫瘍作用が強力といわれる SK1424, SK2032 の如きものがピリドキシン構造を有することは大いに興味深い。

結 論

私は外科手術によつて除去された腫瘍組織のトランスアミナーゼ能に対する N. M. O. の抑制作用を実証した。そしてその使用基準及び N. M. O. とピリドキシンの間の拮抗現象のよつて来る所を討論した。N. M. O. は腫瘍細胞の DNA 代謝に対して純粋の Mitosis Inhibitor 又は Mutagenic Agent として作用するばかりでなく、蛋白代謝を介して間接的にも作用するということは強調せらるべきものである。

参 考 文 献

1) Altman, K. I. & A. L. Dounce : Non-oxidative, nonproteolytic enzymes; Transaminase. *Ann. Rev. Biochem.* **21**, 51~53, 1952. 2) Ames, S.R., P.S. Sarma & C.A. Elvehjem : Transaminase and pyridoxine deficiency. *J. Biol. Chem.*, **167**, 1, 135~141, 1947. 3) Awapara, J. & B. Scabe : Distribution of transaminase in rat organs. *J. Biol. Chem.*, **194**, 2, 497~502, 1952. *4) Boyland, E. & E. S. Horning : The induction of tumors with nitrogen mustard. *Brit. J. Cancer.* **3**, 118~123, 19

49. *5) Caspersson, T. & L. Santesson : Studies on protein metabolism in the cells of epithelial tumours. *Acta Radiol. Suppl.* XLVI, 1942. 6) Goldthwait, D. A. : Effect of nitrogen mustard on nucleic acid metabolism. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **80**, 2, 503~504, 1952. *7) Gjessing, A. C. & Chanutin : The effect of nitrogen mustard on the viscosity of thymonucleate. *Cancer Res.*, **6**, 593~598, 1946. 8) Greenstein, J. P. : *Biochemistry of Cancer*, 1947, Academic Press Inc., New York. 9) 長谷川敏雄, 河合信秀 : 子宮癌ならびに絨毛上皮腫に対するナイトロロゼンマスタード・N-Oxide の臨牀効果, *日本臨牀*, **10**, 11, 43~45, 1952. *10) Heston, W. E. : Induction of pulmonary tumors in strain A mice with methyl-bis (β -chloroethyl) amine hydrochloride. *J. Nat. Cancer Inst.*, **10**, 125~130, 1950. 11) 勝沼精藏 : ナイトロロゼンマスタード・N-Oxide の臨牀実験, *日本臨牀*, **10**, 5, 1~4 (377~380), 1952. 12) 川島震一 : 悪性腫瘍の化学療法の現況, *臨牀*, **5**, 9, 20~25, 1952. 13) 宮地徹 : 腫瘍における核酸の研究, *医学の進歩*, 第 7 集, 1~74, 1951. 14) 島置順雄 : ビタミン B 群とビタミン B₁, *日本医学雑誌株式会社*, 東京, 1950. 15) Stang, H. A. : The Schwartzman phenomenon. I. Inhibitory action of Nitrogen Mustard (HN₂). *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, **74**, 749~751, 1950. 16) 須田正己 : ビタミン B₆ の関与する酵素系について, *酵素化学の進歩*, 第 1 集, 172~216, 1949. 17) 田中伸一他 : Nitrogen Mustard N-Oxide の 2, 3 酵素及び DNA に対する態度について, *総合医学*, **10**, 10, 762~765, 1953. 18) 田坂定孝 : ナイトロロゼン・マスタードの臨牀, *最新医学*, **5**, 1, 34~52, 1950. 19) 山代勝州 : ナイトロロゼン・マスタードによる腫瘍療法, *外科*, **12**, 6, 317~325, 1950. 20) Umbreit, W. W., D. J. O'Kane & I. C. Gunsalus : Function of the Vitamin B₆ group; mechanism of transamination. *J. Biol. Chem.*, **17** **6**, 2, 629~637, 1948. 21) Weisberger, A. S., R. W. Heinle & B. Levine : The effect of l-cystine on nitrogen mustard therapy. *Amer. J. Med. Sc.*, **22** **4**, 2, 201~211, 1952. *雑誌を入手し得ず。