

一酸化窒素を遊離する *N*-ニトロソ化合物の研究末吉 祥子・丹野 雅幸[#]・宮田 直樹Study of *N*-Nitroso Compounds which have NO-Release AbilityShoko Sueyoshi, Masayuki Tanno[#] and Naoki Miyata

Nitric oxide (NO), which plays an important role in the vital functions of organisms, is gaseous and labile molecule. Much attention has been paid to the stability and easily handling of NO donors, for careful handling of NO is required during experimental work. We synthesized a series of aromatic *N*-nitrosoareas and *N*-nitrosamides which efficiently liberates NO at room temperature. Generation of NO from the aromatic *N*-nitroso compounds was chemically confirmed by the trapping of NO as a nitrosyl complex of tetraphenylporphyrinatocobalt (II) and spectrophotometrically quantified by means of the Griess reaction using a newly designed test apparatus. 3,3-Dibenzyl-1-(4-tolyl)-1-nitrosoarene showed the greatest NO-generating ability among the synthesized *N*-nitroso compounds. Further, the NO-generating ability was related to the reciprocal of the ID_{50} value for growth inhibition of cultured L-5178Y cell by the aromatic *N*-nitroso compounds.

Keywords : nitric oxide, nitrosoarene, cytotoxicity, tetraphenylporphyrin, *N*-acetyl-*S*-nitroso-DL-penicillamine

(Received May 30, 1997)

1. はじめに

1987年に血管内皮由来弛緩因子 (EDRF) の本体が一酸化窒素 (NO) であるとする報告¹⁾が発端となり、今や、NO 関連の論文は膨大な数にのぼっている。フリーラジカル分子である NO は生体内で酵素により合成され、血管、神経、免疫等の各系で重要な役割を演じている。特に、NO は細胞内あるいは細胞間を自由に移行することが可能であり、シグナル伝達のメッセンジャーとして働くことが明らかになった²⁾。このように多様な生理作用を示す NO は、ここ数年来、生理医学、薬学分野でのみならず、化学系分野でも超高感度分析法³⁾を巡って注目をあびている物質である。NO の前駆体は生体に豊富に存在する L-アルギニンであり、そのグアニジノ基の末端窒素の酵素的酸化により NO が生成することが 1988年に報告された⁴⁾。この酸化反応に関与する酵素は NO 合成酵素 (NOS) と呼ばれ、現在までに constitutive NOS (c NOS), inducible NOS (i NOS) の存在が明らかにされている。また、c NOS は神経系と内皮系でそれぞれ neuronal NOS (n NOS), endothelial NOS (e NOS) に分類されている。NOS に関しては、脳、マクロファージ、血管内皮細胞などにおける分布や酵素学的な解析や構造的解析等の多くの知見⁵⁾が得られている。最近では、発酵工学技術によってこれら 3 種類の NOS に対応する

NOS 欠損マウス (NOS ノックアウトマウス) の樹立に成功して⁶⁾更に生理的役割の解明も進んでいる。

一方、NO は大気汚染の元凶の一つといわれている NO_x に属し、その化学的性質は古くから研究されてきた⁷⁾。最近、NO が活性酸素種であるスーパーオキシドアニオンラジカル (O₂⁻) と反応してパーオキシナイトライト (ONOO⁻) を生成し、この化合物が生体にとって有害に作用するという報告もあり、ONOO⁻に関する論文も増加の傾向にある⁸⁾。そのために NO 消去剤の研究も盛んで、有用な生理作用とあわせて NO の二面性が論じられている⁹⁾。このような状況下、NO 関連の研究者の間では生理的条件下で NO を発生する NO 供与剤 (NO donor) と呼ばれる NO 代替品の合成研究に関心が集まっている¹⁰⁾。それは、NO を用いた研究において、ボンベで供給される NO 自身の取扱いが容易ではないからである。NO の半減期は 2-3 秒でラジカルとしては比較的安定な性質を持つといわれているが、通常、NO が気体であるうえに、ラジカルである酸素と反応して二酸化窒素 (NO₂) に変わりやすい。このため NO 自身を正確に秤量したり、希釈するのは大変困難である。NO の多様な作用が明らかになるにつれて、論文によっては NO の作用について全く逆の結果が報告される例¹¹⁾があり、厳密な実験系の確立が望まれていることから、NO を遊離する化合物 (NO donor) の開発が期待されている。

著者らは、芳香族 *N*-ニトロソ尿素類を溶媒に溶かし室

[#] To whom correspondence should be addressed: Masayuki Tanno; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158, Japan; Tel: +81-3-3700-1141 ext. 223; Fax: +81-3-3707-6950; E-mail: tanno@nihs.go.jp

温に放置すると NO が生成することを見出した¹²⁾。通常、*N*-NO 基のラジカル分解は光または高温で起こると報告されていた¹³⁾ので、本反応のように照射なしで中性溶液中、室温放置という比較的温和な条件下での NO 脱離反応は新規な知見であった。そこで、*N*-ニトロソ化合物の NO donor としての機能性やこれらの化合物を用いた生理活性についても検討した。その結果、脂肪族 *N*-ニトロソ尿素類の生理活性の発現は、通常 DNA に対するアルキル化やカルバモイル化が主反応であるとする定説に対して¹⁴⁾、芳香族 *N*-ニトロソ尿素では NO 遊離による作用が期待出来ることがわかった¹⁵⁾。

本文では、NO donor として新規に合成した芳香族 *N*-ニトロソ化合物の構造化学的特徴を述べるとともにそれらの化合物から遊離する NO の量を新たに考案した測定装置を用いて測定した結果を述べる。さらに、NO の発生能と生物活性との関係も検討し、芳香族 *N*-ニトロソ化合物の NO donor としての有用性を考察する。

2. *N*-ニトロソ化合物の合成

一般に、*N*-ニトロソ化合物は、相当するアミン類をニトロソ化することにより得られる。ニトロソ化の方法には数種類の方法が知られ、相当する塩基（アミン、尿素類）を塩酸酸性条件下で亜硝酸ナトリウムの水溶液でニトロソ化する方法¹⁶⁾、酸性下で亜硝酸エステルでニトロソ化する方法¹⁷⁾、 N_2O_4 や N_2O_3 のような窒素酸化物や NOCl のようなニトロソ化剤でニトロソ化する方法¹⁸⁾が一般的である。

芳香族 *N*-ニトロソ化合物 (Fig. 1, 1-4) の合成を塩酸酸性条件下亜硝酸ナトリウムの方法で行うと、目的のニトロソ体が得られない場合が多いことがわかった。そこで、99% 硝酸中で亜硝酸ナトリウムの粉末を加えてニトロソ化し、クロロホルムで抽出する方法^{12, 19)}、またはクロロホルム溶液中で亜硝酸イソアミルによる酸を用いないニトロソ化法²⁰⁾を採用した。この方法でも、生成する芳香族ニトロソ化合物 (1-3) が熱分解しやすいので、冷却管を

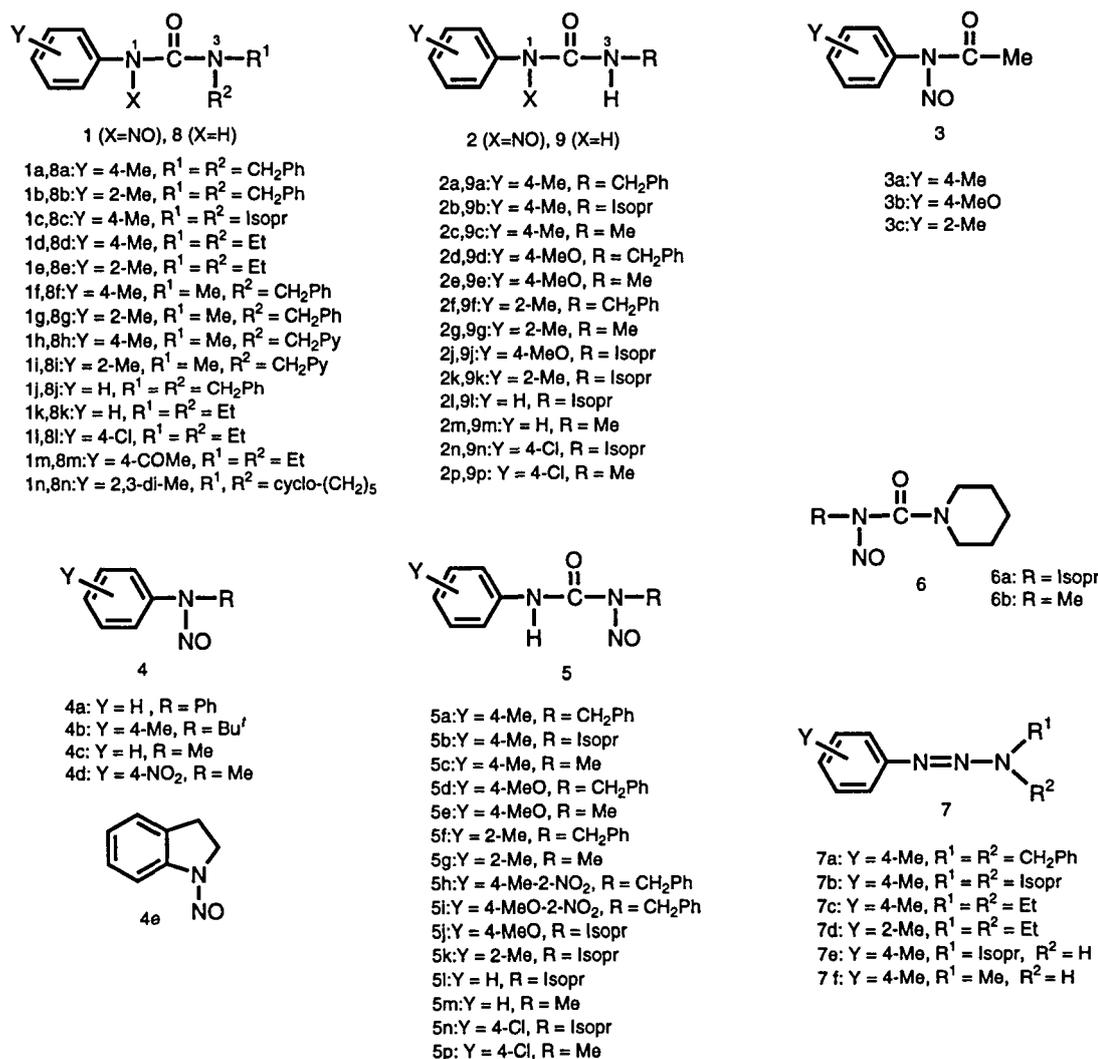


Fig. 1. Structure of *N*-Nitroso Compounds and Related Derivatives

利用したカラム管を用いて低温でクロマトグラフィーを行い、目的のニトロソ体を単離した。再結晶は予め氷冷した少量の *n*-ヘキサン-エーテル混液に化合物を溶かし、冷蔵庫中で再び結晶化させる方法を用いた。また、構造決定のための X 線構造解析実験も低温下で行った²¹⁾。合成した三置換ニトロソ尿素 (1 a-n) 及び二置換ニトロソ尿素 (2 a-p) の単離収率を Table 1 と Table 2 にそれぞれ記載した。

ギ酸中、亜硝酸ナトリウムの粉末を用いる方法で尿素類 (8) をニトロソ化する際、脱アルキル化を伴うという興味深い反応が見られた。この脱アルキル的ニトロソ化反応は N³ 位にベンジル基を持つ尿素類 (8 a,f) でのみ起こる。尿素類 (8 a,f) をニトロソ化すると、N¹ 位がニトロソ化された 1 a,f の他に、N³ 位に脱アルキル的ニトロソ化の起きた二置換ニトロソ尿素 (5 a) を副生した²²⁾。ジエチル基やジイソプロピル基ではこの反応は起こらないので、この点では高温で脱アルキル化するジアルキルアニリン類とは異なる。二置換尿素誘導体 (9) のニトロソ化では、N¹-ニトロソ体 (2) 及び N³-ニトロソ体 (5) の 2 種類のニトロソ異性体を与える¹⁹⁾ (Table 2)。アルキル基とアリール基を有する二置換尿素 (9) のニトロソ化反応で酸を用いた場合、反応の初期ではアリール側のニトロソ体 (2) が生成していても酸触媒によりニトロソ基の 1,3-転位反応が起こり、結果として熱力学的に安定なアルキル側の N³-ニトロソ体 (5) のみが生じる。また、有機溶媒中亜硝酸イソアミルのニトロソ化については、カルバミン酸イソアミル誘導体の副生を避けるために反応を室温以下で行うは

Table 1. Nitrosation of Ureas (8) by Various Methods

Urea ^{a)}	Method ^{b)}	Yield (%) of Nitrosourea (1)	
8 a	4-Tol-NHCON (Bn) ₂	B	42
8 b	2-Tol-NHCON (Bn) ₂	B	30
8 c	4-Tol-NHCON (Isopr) ₂	B	20
8 d	4-Tol-NHCON (Et) ₂	B	53
8 e	2-Tol-NHCON (Et) ₂	B	44
8 f	4-Tol-NHCON (Bn)Me	B	60
8 g	2-Tol-NHCON (Bn)Me	B	30
8 h	4-Tol-NHCON (Py)Me	A	46
8 i	2-Tol-NHCON (Py)Me	A	44
8 j	Ph-NHCON (Bn) ₂	B	30
8 k	Ph-NHCON (Et) ₂	B	35
8 l	4-Cl-Ph-NHCON (Et) ₂	B	67
8 m	4-MeCO-Ph-NHCON (Et) ₂	C	13
8 n	2,3-diMe-Ph-NHCO-Pip	B	10

a) Tol = methylphenyl, Bn = benzyl, Ph = phenyl, Py = pyridyl, Pip = piperidino

b) A: 10% HCl-NaNO₂, B: 99% HCO₂H-NaNO₂, C: *iso*-Amyl Nitrite-CHCl₃

Table 2. Nitrosation of Ureas (9) by Various Methods

Urea ^{a)}	Method ^{b)}	Yield (%) of Nitrosourea		
		N ¹ -nitroso (2)	N ³ -nitroso (5)	
9 a	4-Tol-NHCONH (Bn)	C	10	80
9 b	4-Tol-NHCONH (Isopr)	B	15	37
		C	56	9
9 c	4-Tol-NHCONH (Me)	B	—	97
		C	2	95
9 d	4-MeO-Ph-NHCONH (Bn)	C	10	65
9 e	4-MeO-Ph-NHCONH (Me)	B	—	92
		C	77	10
9 f	2-Tol-NHCONH (Bn)	C	12	70
9 g	2-Tol-NHCONH (Me)	B	1	90
		C	2	87
9 j	4-MeO-Ph-NHCONH (Isopr)	B	26	27
		C	57	1
9 k	2-Tol-NHCONH (Isopr)	B	65	18
		C	76	15
9 l	Ph-NHCONH (Isopr)	B	—	78
		C	36	17
9 m	Ph-NHCONH (Me)	B	—	95
		C	1	85
9 n	4-Cl-Ph-NHCONH (Isopr)	B	—	40
		C	27	2
9 p	4-Cl-Ph-NHCONH (Me)	B	—	95
		C	1	93

a) Tol = methylphenyl, Bn = benzyl, Ph = phenyl.

b) B: 99% HCO₂H = NaNO₂, C: *iso*-Amyl Nitrite-CHCl₃

うがよい。例えば、二置換尿素 (9 b) の亜硝酸イソアミルによるニトロソ化を 5-10°C で行くと 2 b 及び 5 b が生成する。一方、この反応を室温で行った場合には亜硝酸イソアミルの分解で生じたイソアミルアルコールと 5 b が反応して生じた 4-トリルカルバミン酸イソアミルが主生成物である。この副反応は反応温度を 10°C 以下に保つことにより抑制できる。

3. NO 生成の確認^{22a,b)}

3,3-ジエチル-1-(4-トリル)-1-ニトロソ尿素 (1 d) を各種の有機溶媒に溶かすと、脱ニトロソ体 (8 d) が生成しベンゼン環がニトロ化された 3,3-ジエチル-1-(2-ニトロ-4-トリル)尿素が生成する。また、3,3-ジベンジル誘導体 (1 a) と *N,N'*-エチレンビス (サリシリデンイミナト) 鉄を反応させると NO₃-錯体 (黒紫色粉末, Mass *m/z* 338 M: C₁₄H₁₄FeN₃O₅) が単離される^{19,23)}。この錯体は、*N,N'*-エチレンビス (サリシリデンイミナト) 鉄と NO ガスの反応により得られた化合物と一致した。熱分解による

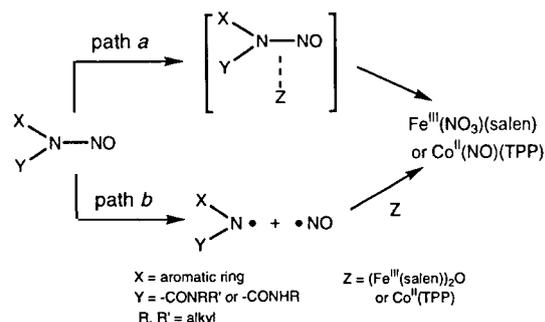


Chart 1. Possible Pathways for Production of NO⁻ or NO₃⁻ Complex by the Reaction of Aromatic *N*-Nitrosourea with Metal Complex in Chloroform.

ニトロ体の生成と、鉄錯体による NO₃⁻錯体の生成は、*N*-ニトロソ化合物から NO が遊離することを示している。しかし、これらは反応液中で NO を捕捉して得た結果なので Chart 1 の path a を経由して錯体が生成した可能性も否定できない²²⁾。そこで、発生した NO はアルゴン雰囲気下でガス導入管を通して反応系外のポルフィリンコバルト液に導き、ポルフィリンコバルト-ニトロシル錯体とすることによって確認した。単離した錯体は、C₄₄H₂₈CoN₅O の組成をもつ暗紫色の粉末で、赤外吸収スペクトルで 1685cm⁻¹ に、可視部吸収スペクトルで 414 および 538 nm に特徴的な吸収を示した。なお、アルゴン雰囲気下で市販の NO ガスをポルフィリンコバルトのクロロホルム溶液に通じて反応させ、ニトロシル錯体標品を別途に合成した。別途合成したニトロシル錯体と *N*-ニトロソ化合物より得られた錯体の分光学的データは一致²⁴⁾し、*N*-ニトロソ化合物から NO が生成する (path b) ことが証明された。

4. *N*-ニトロソ化合物から生じた NO 発生量の評価^{15,22)}

4.1 簡易型 NO 測定装置の試作^{22a, b)}

NO を検出し、定量する方法としては ESR 法^{3a)}、オゾンやルミノール/過酸化水素系による酸化反応を利用した化学発光法^{3b)}のような比較的高価な装置を利用する方法が知られている。また、水系溶媒に限定されるものとして、特殊な電極を用いた電気化学測定法やグリース法^{3c)}等がある。グリース法は、NO_x から生じた NO₂⁻ にスルファニル酸とナフチルアミンを反応させてアゾ色素にし、520 nm 付近の吸光度を測定して NO₂⁻ を定量する方法である。上記に挙げた他の測定法に比べ感度の点でやや劣るものの比較的簡単な方法であり、この方法を改良したザルツマン法が環境化学における大気中の窒素酸化物の測定に用いられている。これらの方法はいずれも特殊な機器を必要とするかまたは溶媒を限定するものである。さらに、多種の化合物からの NO 遊離量を同時に測定するにはいずれも不適當であった。そこで、著者らは有機溶媒や水系溶媒の両方で使用可能で、しかも比較的簡単に NO 遊離量を測定できる

ように Fig.2 に示したような装置を考案した²²⁾。この装置の原理はグリース法を応用したものである。NO 遊離化合

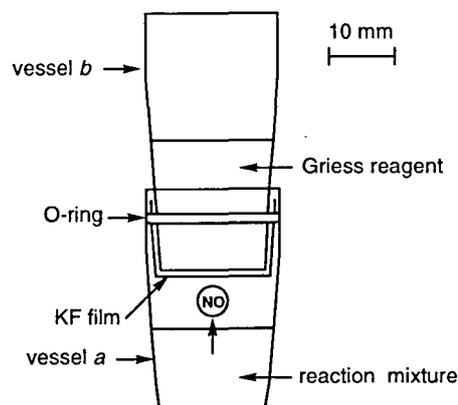


Fig. 2. Apparatus Used for the Evaluation of NO-Generating Ability

物から発生した NO を大気中の酸素により酸化して NO₂ とした後、NO₂ をグリース試薬に導くと、試薬中の水と反応して NO₂⁻ になる。そこで、生成した NO₂⁻ をグリース試薬により呈色させるものである。装置は vessel a (反応系) と vessel b (検出系) からなり、両 vessel 間に気体のみを通す薄膜 (呉羽化学製 KF-film, 孔径 0.2 μ) を有する。装置の vessel a において化合物の熱分解で生じた NO は、vessel a の気相中の酸素で NO₂ に酸化され、グリース試薬 (4-アミノベンゼンスルホン酸および *N*-ナフチルエチレンジアミンの希酢酸溶液) を入れた vessel b に導かれる。続いて NO₂ は vessel b 中の溶媒である水と反応して NO₂⁻ になる。さらに NO₂⁻ はグリース試薬と反応し発色する。生成したジアゾ化合物の 546 nm における吸光度測定により NO₂⁻ が算出されるが、この NO₂⁻ 量にザルツマン係数を掛けることによって NO 量が計算できる。

4.2 NO の発生量の測定

簡易型 NO 測定装置 (Fig.2) を用いて各種の *N*-ニトロソ化合物 (1-4) 及び NO donor として市販されている *S*-ニトロソ-*N*-アセチル-DL-ペニシラミン (SNAP) から生成する NO 量を測定した。各化合物のクロロホルム溶液を測定装置の vessel a に入れ 37°C で放置した後、グリース試薬を入れた vessel b の液について吸光度を測定した。37°C、2時間反応後に検出される NO₂⁻ の量を著者らは化合物の NO 発生能 (NO Generating Ability) とした。一般に、NO donor から生成する NO または NO₂⁻ 量は NO donor の 100mM 当りで示される例が多いので、本研究でも NO₂⁻ 量は化合物の 100 mM 当りの発生量に換算し、さらに、SNAP から生成する NO₂⁻ 量を標準にした。すなわち、SNAP に対する比をとることで同一条件下で発生した量を比較しやすくした。結果は Table 3 に示してある。

化合物により NO 発生量に差が見られ、芳香族 *N*-ニトロソ尿素 (1,2), 芳香族 *N*-ニトロソアミド (3) 類は比較的 NO を放出するが、芳香族 *N*-ニトロソアミン (4) では低い発生量であった。脂肪族 *N*-ニトロソ化合物 (5, 6)

Table 3. NO-Generating Ability of *N*-Nitroso Compounds

Compd. ^{b)}	NO-Generating Ability ^{a)}
1 a	4-Tol-N (NO)CON (Bn) ₂ 4.79 (8.63)
1 b	2-Tol-N (NO)CON (Bn) ₂ 2.12 (3.85)
1 c	4-Tol-N (NO)CON (Isopr) ₂ 0.60 (1.09)
1 d	4-Tol-N (NO)CON (Et) ₂ 0.35 (0.63)
1 e	2-Tol-N (NO)CON (Et) ₂ 0.22 (0.39) ^{d)}
2 a	4-Tol-N (NO)CONHBn 1.06 (1.92)
2 c	4-Tol-N (NO)CONHMe 1.07 (1.93)
2 f	4-MeO-Ph-N (NO)CONHMe 2.52 (4.55)
3 a	4-Tol-N (NO)COMe 0.87 (1.56)
3 b	4-MeO-Ph-N (NO)COMe 0.75 (1.36)
3 c	2-Tol-N (NO)COMe 0.07 (0.12)
4 a	Ph-N (NO)-Ph 0.02 (0.03)
4 b	4-Tol-N (NO)-Bu ^t 0.00 (0.00)
4 c	Ph-N(NO)-Me 0.01 (0.02) ^{d)}
4 d	4-NO ₂ -Ph-N (NO)-Me 0.11 (0.20) ^{d)}
4 e	<i>N</i> -Nitrosoindoline 0.03 (0.05) ^{d)}
5 a-i	Alkyl-N (NO)CONH-Aryl 0.00 (0.00) ^{d)}
6 a	Isopr-N (NO)CON (CH ₂) ₅ 0.00 (0.00) ^{d)}
6 b	Me-N (NO)CON (CH ₂) ₅ 0.00 (0.00) ^{d)}
SNAP	0.55 (1.00)

a) Concentration of each *N*-nitroso compound and SNAP for thermal decomposition in chloroform solution was $1-10 \times 10^{-3}$ M. Reactions were carried out at 37°C for 2 h. The values are amounts (mM) of NO₂⁻ generated *via* NO from the 100 mM chloroform solution of the compound, and those in parenthesis are the ratio to SNAP.

b) Tol = methylphenyl, Bn = benzyl. c) Reacted for 4 h. d) Reacted for 7 h.

類は、37°C, 2時間の反応条件では NO を遊離しなかった。また、芳香族 *N*-ニトロソ尿素 (1,2) 及び芳香族 *N*-ニトロソアミド (3) は、ジエチル尿素誘導体 (1 d 及び 1 e) を除いて、SNAP と同等もしくは同等以上の NO 発生能を有し、特に、ジベンジル基を有する芳香族三置換尿素 (1 a) は、SNAP の約 8.6 倍で NO を発生することが明らかになった。さらに、化合物のパラ置換体 (1 a, 1 d, 3 a) と相当するオルト置換体 (1 b, 1 e, 3 c) をそれぞれ比較したとき、パラ置換体はオルト置換体よりも NO 量が多い。これは、オルト置換体ではニトロソ基に対するオルト置換基の立体障害のため、パラ置換体に比べ芳香環の π 系と N-NO の π 系がねじれた関係にある。言い換えれば、芳香環と N-NO 基が同一平面を取りやすいパラ置換体では、N¹-窒素は環の π 電子と共役し、非局在化することにより N¹-NO 結合が不安定になるのに対し、オルト置換体の N¹-窒

素上の電子は局在化してニトロソ基との結合が安定しているためと考えられる。また、ともにパラ置換体である三置換体 (1 a) と二置換体 (2 a) を比較したときは、N³ 位の置換基によるニトロソ基のまわりの立体障害のために 1 a の N-NO 結合が 2 a のそれよりも切れやすくなり NO の生成も増加したと推定した。

結局、著者らが合成した一連の *N*-ニトロソ化合物のなかで、単位時間当りの NO 発生量が最も大きいのは三置換 *N*-ニトロソ尿素体 (1 a) であることが判明した。

4.3 NO donor の比較²²⁾

N-ニトロソ化合物群の中で最も NO の発生能が優れていた芳香族三置換 *N*-ニトロソ尿素 (1 a) と一般に使用されている数種の NO donor (NOC-18, SNAP, SIN-1, NOR-4, SNP) について、37°C, 2時間の条件下での NO 遊離量を前述した簡易型 NO 測定装置を用いて比較した。NO donor の構造は Fig. 3 に示してある。

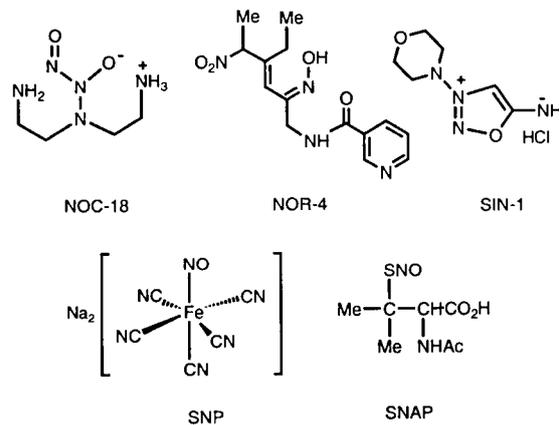


Fig. 3. Structure of NO Donors

Table 4. NO-Generating Ability of Aromatic *N*-Nitrosourea (1a) and Usual NO Donors

NO Donor	NO-Generating Ability ^{a)}
1a ^{b)}	0.45 (0.90)
NOC-18	0.95 (1.90)
NOR-4 ^{b)}	0.11 (0.22) ^{d)}
SIN-1	0.38 (0.76)
SNP	0.04 (0.08)
SNP ^{c)}	0.71 (1.42)
SNAP ^{b)}	0.50 (1.00)

a) Each compound (1.6×10^{-3} M) was reacted in Krebs buffer (pH 7.4) at 37°C for 2 h and NO was detected as NO₂⁻ using the Griess method. The values are amounts (mM) of NO₂⁻ generated from 100 mM of 1a or NO donors, and those in parenthesis are the ratio to SNAP.

b) Reaction in the mixture of DMSO-Krebs buffer (1:9). c) Reaction in H₂O (pH 6.4). d) Data for 3 h.

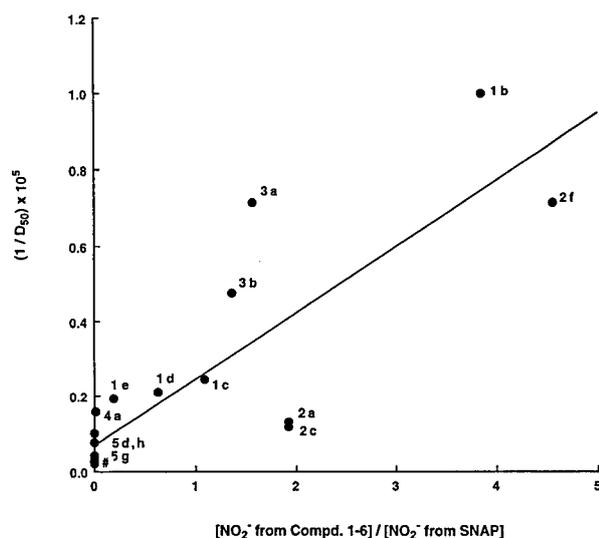


Fig. 4. Relationship between NO Generation and Cytotoxic Activity
The figure shows the NO-generating ability per 2 h and $1/ID_{50}$ from Tables 1 and 2, except for the data for 1 a. The NO-generating abilities of 1e and 4a were converted into values per 2h. The symbol # in the figure shows the data for 4 b, 5 a-c, e, f, i and 6 a, b.

本研究における *N*-ニトロソ化合物は水に難溶性であるため、最初に少量の DMSO に溶かした後、pH 7.4 の Krebs 緩衝液を加えて希釈して水溶液とした。NOR-4 および

SNAP も 10% DMSO を含む pH 7.4 の Krebs 緩衝液に溶かし、他は pH 7.4 の Krebs 緩衝液に溶解した。結果は Table 4 に示した。6 種の化合物について、NO の発生能を比較すると $NOC-18 > SNAP > 1a > SIN-1 > NOR-4 > SNP$ の順であり、NOC-18 は NO 基を 2 個有しているため、1a や SNAP の約 2 倍の発生量を示した。SNP は、溶液の液性が酸性の場合に NO を遊離しやすいことがわかった。*N*-ニトロソ尿素 (1 a) は水系でも SNAP と同程度の NO を遊離したが、厳密には SNAP や 1 a は 10% の DMSO を含む水系で調べている。これらの化合物を化学修飾して水溶性を増加させれば、生物活性を調べる目的の NO 供与化合物として有用性が増すと考えられる。

5. *N*-ニトロソ化合物の細胞増殖阻害作用¹⁵⁾

細胞増殖阻害作用は、腫瘍細胞である L-5178Y 培養細胞を用いて、その生育を阻害する効果を調べる方法で行った。*N*-ニトロソ化合物は、10% DMSO を含有する PBS 緩衝液に溶かして試験し、増殖を 50% 阻害する濃度 (ID_{50}) を求めた。Table 5 に記載したように、芳香族三置換 *N*-ニトロソ尿素 (1 a-e) 及び芳香族二置換 *N*-ニトロソ尿素 (2 a-g) の ID_{50} は約 10^{-5} M であり、芳香族 *N*-ニトロソアミド (3 a,b) も同程度の値を示した。一方、脂肪族 *N*-ニトロソ尿素 (5 a-i, 6a,b) では、いずれの誘導体も ID_{50}

Table 5. Cytotoxic Activity Against L-5178 Y Cell Line^{a)} of *N*-Nitroso and Relative Compounds

Compd. ^{b)}	ID_{50}		Compd. ^{b)}	ID_{50}	
	$\mu\text{g/ml}$	$\times 10^{-5}$ M		$\mu\text{g/ml}$	$\times 10^{-5}$ M
1 a 4-Tol-N(NO)CON(Bn) ₂	6.3	1.8	5 b Isopr-N(NO)CONH(4-Tol)	75.0	33.9
1 b 2-Tol-N(NO)CON(Bn) ₂	3.6	1.0	5 c Me-N(NO)CONH(4-Tol)	57.0	29.3
1 c 4-Tol-N(NO)CON(Isopr) ₂	1.0	4.1	5 d Bn-N(NO)CONH(4-MeO-Ph)	29.0	10.0
1 d 4-Tol-N(NO)CON(Et) ₂	11.0	4.8	5 e Me-N(NO)CONH(4-MeO-Ph)	51.0	24.5
1 e 2-Tol-N(NO)CON(Et) ₂	12.0	5.2	5 f Bn-N(NO)CONH(2-Tol)	>100.0	>37.1
2 a 4-Tol-N(NO)CONHBn	20.0	7.6	5 g Me-N(NO)CONH(2-Tol)	25.0	13.0
2 b 4-Tol-N(NO)CONH(Isopr)	15.0	6.6	5 h Bn-N(NO)CONH(2-NO ₂ -4-Tol)	>100.0	>10.0
2 c 4-Tol-N(NO)CONHMe	17.0	8.6	5 i Bn-N(NO)CONH(2-NO ₂ -4-MeO-Ph)	>100.0	>30.3
2 d 4-MeO-Ph-N(NO)CONHBn	17.0	6.0	6 a Isopr-N(NO)CON(CH ₂) ₅	>100.0	>50.2
2 e 4-MeO-Ph-N(NO)CONH(Isopr)	4.0	1.6	6 b Me-N(NO)CON(CH ₂) ₅	71.0	42.3
2 f 4-MeO-Ph-N(NO)CONHMe	3.0	1.4	7 a 4-Tol-N=N-N(Bn) ₂	>100.0	>37.1
2 g 2-Tol-N(NO)CONHBn	16.0	6.1	7 b 4-Tol-N=N-N(Isopr) ₂	21.0	9.5
3 a 4-Tol-N(NO)COMe	2.4	1.4	7 c 4-Tol-N=N-N(Et) ₂	5.0	2.6
3 b 4-MeO-Ph-N(NO)COMe	4.0	2.1	7 d 2-Tol-N=N-N(Et) ₂	>100.0	>18.2
4 a (Ph) ₂ NNO	2.5	6.3	7 e 4-Tol-N=N-NH(Isopr)	31.0	17.7
4 b 4-Tol-N(NO)-Bu ^r	70.5	36.7	7 f 4-Tol-N=N-NHMe	27.0	18.2
5 a Bn-N(NO)CONH(4-Tol)	>100.0	>37.1			

a) L-5178 Y Leukemia cells were cultured in a stoppered tube in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C.

The growth inhibitory effect was determined as the ratio of cell numbers, which were counted visually with a microscope in treated and control groups (% treated/control) after incubation of 10^5 cells/ml for 48 h with various concentrations of each sample. To express the results, the ID_{50} (50% inhibiting) value was calculated by a probit diagramming analysis.

b) Tol=methylphenyl, Bn=benzyl.

値は 10^{-4} M以上であり活性は低下した。芳香族 *N*-ニトロソアミン (4a, b) 類の中では、*N*-ニトロソジフェニルアミン (4a) が活性が高く、*N*-ニトロソ-*t*-ブチルフェニルアミン (4b) の約6倍であった。これらの結果は、各種の *N*-ニトロソ化合物が生物活性を強く示すためには、それらの構造において芳香環に直結した N-NO 基を有することが必要であるということを示している。芳香族三置換 (1) と芳香族二置換 *N*-ニトロソ尿素 (2) 間では、三置換体が活性であり、三置換体の中ではジベンジル基を有する誘導体 (1a, b) の方がジエチル基やジイソプロピル基を有する誘導体 (1c-e) より強い活性を示した。また、三置換ニトロソ尿素体のジアゾ転位により生じるトリアゼン類は、ジエチル誘導体 (7c) を除いていずれも活性が低かった。

ニトロソ化合物における NO の発生のしやすさと培養細胞に対する増殖抑制作用の関係については、NO₂⁻ の遊離量 (Table 3 では 1a を除く) と ID₅₀ 値 (Table 5) との間に相関係数 0.713 で直線的な相関性があることが明らかになった (Fig. 4)。従来、脂肪族 *N*-ニトロソ尿素類は、代謝によりジアゾアルカンに分解し、さらに非酵素的にアルキルカチオンに分解したのち DNA をアルキル化して活性を発現すると考えられてきた¹⁴⁾が、以上の結果は、ニトロソ化合物から発生した NO または NO 由来の化合物が作用の活性種である可能性を示している。

化合物 1a については、直線上からはずれた。これは、1a の分解速度が非常に大きいため、細胞に対し活性を示す前に過剰の NO が失われる結果、作用効率が低下すると推定された。この結果は、生物作用を検討する際、場合によっては徐々に NO を遊離する化合物が有効であることを示唆しているものと思われる。最近、NO donor による NO の徐放機能を考慮した化合物の合成や徐放機構に重点をおいた化合物の評価法が検討されている²⁵⁾。

8. まとめ

N-アルキルまたは *N*-アリーールニトロソアミン (4) の化学的性質に基づいて、室温付近で効率よく NO を遊離する化合物の構造設計から、芳香族 *N*-ニトロソ尿素誘導体 (1, 2) 及び芳香族 *N*-ニトロソアミド誘導体 (3) が得られた。NO を遊離しやすい *N*-ニトロソ化合物の構造は、芳香環と隣接する共役した N-NO 基を有するものである。N⁺-窒素上の電子が芳香環の π 電子と共役し非局在化するとき N-NO 結合がホモリティックに開裂しやすい。さらに、N-NO 基にカルボニル基が隣接すると、カルボニルの酸素とニトロソ基の酸素間の静電的反発により N-NO 結合は不安定性を増し切れやすくなる。尿素誘導体においては、ウレイドの N³ 位の置換基の立体効果が N-NO 結合の安定性に影響し、立体障害の大きい芳香族三置換誘導体

(1) が効率よく NO を遊離する。NO donor として知られる SNAP²²⁾ と NO 発生量を比較すると、1a は SNAP の約 8.6 倍の NO 発生能を示した。さらに、置換基の位置や性質で NO の発生の起きやすさを制御できることが明らかになった。固体であるこれらの化合物は、常温で気体である NO に代わる簡便な NO 遊離化合物として利用が可能であると考えられる。

NO donor から遊離する NO 量を測定する簡易型 NO 測定装置を考案したが、この装置の利点は、有機溶媒や水系溶媒を問わず、多種の化合物からの NO 発生量を同条件下測定し比較することができることである。ただ、NO を反応系から検出系へ導く過程で損失が生じ、発生した NO の全量を定量できないという欠点がある。特に、水系溶媒中では NO が NO₂⁻ になりやすく、有機溶媒の場合より検出量が低下するので、さらに改良が必要である。

NO は、ラジカル種であるために生体成分との反応性は高いと推測される。DNA に対しては核酸塩基の脱アミノ化²⁶⁾に関与し、また、サルモネラ菌やヒトのリンパ芽球細胞に対して変異原性を示す。細胞の増殖に関与する種々の酵素は活性中心に非ヘム鉄やチオール基を有するので、NO はそれらと反応して酵素活性を失活させて細胞死を引き起こすと報告されている²⁷⁾。NO 遊離化合物としての *N*-ニトロソ化合物の細胞毒性についての報告は著者らの例以外にはない。NO 遊離能と細胞増殖抑制作用との間に直線関係があることが明らかになったので、*N*-ニトロソ化合物の生物に対する作用機構に NO または NO 由来の活性種による作用発現機構を加えることができると考えている。

なお、NO donor に関する研究は始まったばかりであり、さらにより NO donor を得るために研究中である。

謝辞 本研究は、北陸大学中川重雄博士、静岡県立大学梅原 薫博士、及び千葉大学山口健太郎博士との協同で行いました。ここに感謝し、御礼申し上げます。また、NO 測定装置を考案するに当り KF film をご提供いただいた呉羽化学の久住信之博士と目黒和広博士に感謝致します。なお、本研究の一部は国立機関公害防止等試験研究費 (環境庁) によって行ったものです。ここに謝意を表します。

文 献

- 1) Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. and Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature*, **327**, 524~526 (1987)
- 2) 大島寛史:一酸化窒素とがん, Modification of Cellular Substances by Nitric Oxide: Especially from the Viewpoint of Carcinogenesis. *Cancer Research and Clinics*, 中山書店, 東京, pp. 794~800 (1993)
- 3) a) Pronai, L., Ichimori, K., Nozaki, H., Nakazawa, H., Okino, H., Carmichael, A. J. and Arroyo C. M.: Investi-

- gation of the existence and biological role of L-arginine / nitric oxide pathway in human platelets by spin trapping / EPR studies. *Eur. J. Biochem.*, **202**, 923~930 (1991)
- b) Kikuchi, K., Nagano, T., Hayakawa, H., Hirata, Y. and Hirobe M.: Detection of nitric oxide production from a perfused organ by a luminol H₂O₂ system. *Anal. Chem.*, **65**, 1794~1799 (1993)
- c) Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannernbaum S. R.: Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, **126**, 131~138 (1992)
- d) Ishida, Y., Hashimoto, M., Fukushima, S., Masumura, S., Sasaki, T., Nakayama, K., Tamura, K., Murakami, E., Isokawa, S. and Momose, K.: A Nitric Oxide-Sensitive Electrode: Requirement of Lower Oxygen Concentration for Detecting Nitric Oxide From the Tissue. *J. P. M.*, **35**, 19~24 (1995)
- e) Saltzman, B. E. and Mendenhall, A. L. Jr.: Design Parameters and Performance of a Miniaturized Colorimetric Recording Air Analyzer. *Anal. Chem.*, **36**, 1300~1304 (1964).
- 4) a) Leaf, C. et al.: Endogenous incorporation of nitric oxide from L-arginine into *N*-nitrosomorpholine stimulated by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in the rat. *Carcinogenesis*, **12**, 537~539 (1991) b) Liu, R. H. et al.: Elevated formation of nitrate and *N*-nitrosodimethylamine in woodchucks (*Marmota monax*) associated with chronic woodchuck hepatitis virus infection. *Cancer Res.*, **51**, 3925~3929 (1991)
- 5) 浜中信行, 小林 馨: 合成酵素阻害薬, 別冊・医学の歩み NO のすべて (平田結喜緒・編), 医歯医薬出版, pp.41~47 (1996)
- 6) 大柳善彦: NOS の構造と機能. NO ラジカルの医学, 羊土社, pp.29~41 (1996)
- 7) 吉村哲彦: NO と化学特性と生物学的ポテンシャル, -臓器特性と分子病態-. NO とスーパーオキシド (井上正康・他編), 日本アクセルシュプリンガー出版, pp.10~18 (1995)
- 8) a) DeMaster, E. G. et al.: Reaction of nitric oxide with the free sulfhydryl group of human serum albumin yields a sulfenic acid and nitrous oxide. *Biochemistry*, **34**, 11494~11499 (1995) b) Kharitonov, V. G. et al.: Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. *J. Biol. Chem.*, **270**, 28158~28164 (1995)
- 9) Akaike, T., Yoshida, M. and Miyamoto, Y.: Antagonistic action of imidazolineoxyl *N*-oxides against endothelium-derived relaxing factor / NO through a radical reaction. *Biochemistry*, **32**, 827~832 (1993)
- 10) a) 丹野雅幸, 末吉祥子, 宮田直樹: NO 産生化合物. 化学総説・NO-化学と生物 (大倉一郎・他編), 学会出版センター, pp.53~62 (1996) b) Wang, Y. X., Zhou, T. and Pang, C. C. Y.: A comparison of the inhibitory effects of sodium nitroprusside, pinacidil and nifedipine on pressor response to *N*^ω-nitro-L-arginine. *Br. J. Pharmacol.*, **108**, 398~404 (1993) c) Campbell, J. M., McCrae, F., Reglinski, J., Wilson, R., Smith, W. E. and Sturrock, R. D.: The interaction of sodium nitroprusside with peripheral white blood cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1156**, 327~333 (1993) d) Stowe, D. F., Baban, M. and Kampine, J. P.: Reperfusion with adenosine and nitroprusside improves preservation of isolated guinea pig hearts after 22 hours of cold perfusion with 2, 3-butanedione monoxime. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **21**, 578~586 (1993) e) Salvemini, D., Mollace, A. and Pistelli, A.: Metabolism of glyceryl trinitrate to nitric oxide by endothelial cells and smooth muscle cells and its induction by lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 982~986 (1992) f) Noack, E. and Feelisch, M.: Molecular aspects underlying the vasodilator action of molsidomine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **14** (Suppl. 11), S 1~S 5 (1989) g) Ivanova, K., Schaefer, M., Drummer, C. and Gerzer, R.: Effects of nitric oxide-containing compounds on increases in cytosolic ionized Ca²⁺ and on aggregation of human platelets. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.*, **244**, 37~47 (1993) h) Maragos, C. M., Morley, D., Wink, D. A., Dunams, T. M., Saavedra, J. E., Hoffman, A., Bove, A. A., Isaac, L., Hrabie, J. A. and Keefer L. K.: Complexes of NO with Nucleophiles as Agents for the Controlled Biological Release of Nitric Oxide. Vasorelaxant Effects. *J. Med. Chem.*, **34**, 3242~3247 (1991)
- 11) a) Moncada, C., Lekieffre, D., Arvin, B. and Meldrum, B.: Effect of nitric oxide synthase inhibition on NMDA- and ischemia-induced hippocampal lesions. *NeuroReports*, **3**, 530~532 (1992) b) Siegfried, M. R., Erhardt, J., Rider, T., Ma. X. L. and Lefer, A. M.: Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **260**, 668~675 (1992) c) Woditsch, I., Strobach, H. and Schroer, K.: Oral cicaprost protects from hypercholesterolemia-induced impairment of coronary vasodilation. *Agents Actions Suppl.*, **37**, 297~304, (1992)
- 12) Sueyoshi, S. and Tanno, M.: Preparation and properties of 3,3-dialkyl-1-arylnitrosoureas and related Compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 488~491 (1985)
- 13) a) Tam, J. N., Yip, R. W. and Chow, Y. L.: Chemistry of Amido Radicals. Flash Photolysis of *N*-Nitroso-*N*-Alkyl-lacetamides. *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 4543~4554 (1974) b) Welzel, P.: Die thermische Spaltung einiger Diarylnitrosamine und-nitramine. *Chem. Ber.*, **104**, 808~821 (1971)
- 14) Gnewuch, C. T. and Sosnovsky, G.: A Critical Appraisal of the Evolution of *N*-Nitrosoureas as Anticancer Drugs. *Chem. Rev.*, **97**, 829~1013 (1997)
- 15) Tanno, M., Sueyoshi, S., Miyata, N. and Umehara K.: Characterization of the Cytotoxic Activity of Nitric Oxide Generating *N*-Nitroso Compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 595~598 (1997)
- 16) Hatt, H. H.: *Org. Synth.*, II, 211 (1943)
- 17) Semon, W. L. and Damerell, V. R.: *Org. Synth.*, II, 204 (1943)
- 18) Challis, B. C. and Kyrtopoulos, S. A.: The Chemistry of Nitroso Compounds. Part 12. The Mechanism of Nitrosation and Nitration of Aqueous Piperidine by Gaseous Dinitrogen Tetraoxide and Dinitrogen Trioxide in Aqueous Alkaline Solutions. Evidence for the Existence of Molecular Isomers of Dinitrogen Tetraoxide and Dinitrogen Trioxide. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II*, 1978, 1296~1302
- 19) Tanno, M. S., Sueyoshi, S. and Kamiya, S.: Thermolysis of *N*-Aryl-*N*-nitrosoureas to Afford Aryl Isocyanates and Nitrosamines via *O*-Nitrosoisourea Intermediates. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2644~2649 (1990)
- 20) a) Tanno, M. and Sueyoshi, S.: Preparation and Prop-

- erties of 3-Alkyl-1-arylnitrosoureas and Related Compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 1360-1371 (1987) b) Tanno, M., Sueyoshi, S. and Kamiya, S.: 1, 3-Nitroso Rearrangement and Transnitrosation of 1-Aryl-3-benzyl-1-nitrosoureas which Decompose to Liberate Nitrosyl Radical under Mild Conditions. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 49~54 (1990)
- 21) Yamaguchi, K., Matsumura, G., Tanno, M., Sueyoshi, S. and Miyata, N.: Structure of *N*-Aryl-*N*-nitrosoureas. *Acta Cryst.*, **C48**, 1051~1054 (1992)
- 22) a) Tanno, M., Sueyoshi, S. and Miyata, N.: Nitric oxide generation from aromatic *N*-nitrosoureas at ambient temperature. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 1849~1852 (1996) b) 丹野雅幸, 末吉祥子, 宮田直樹, 梅原薫, : 一酸化窒素 (NO) 発生剤の研究 (I) 自発発生化合物の開発と NO 検出法産生化合物, 磁気共鳴と医学, **7**, 227~229 (1996)
- 23) Croisy, A. F., Fanning, J. C., Keefer, L. K., Slavin, B. W. and Uhm, S. -J.: Metal complexes as promoters of *N*-nitrosation reaction. *IARC. Sci. Publ.*, **31**, 83~93 (1980)
- 24) a) Scheidt, W. R. and Hoard, J. L.: Stereochemistry of Low-Spin Cobalt Porphyrins. I. Structure and Bonding in a Nitrosylcobalt Porphyrin and Their Bearing on One Rational Model for the Oxygenated Protoheme. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 8281~8288 (1973) b) Wayland, B. B., Minkiewicz, J. V. and Abd-Elmageed, M. E.: Reactions of Nitric Oxide with Cobalt(II)Tetraphenylporphyrin: A Unique Bis Nitric Oxide Complex. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1976, 1015~1016
- 25) Ramamurthi, A. and Lewis, R. S.: Measurement and modeling of nitric oxide release rates for nitric oxide donors. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 408~413 (1997)
- 26) deRojas-Walker, T., Tamir, S., Ji, H., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R.: Nitric Oxide Induces Oxidative Damage in Addition to Deamination in Macrophage DNA. *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 473~477 (1995)
- 27) Kellerl, R., Bassetti, S., Keistl, R., Mulsch, A. and Klauser, S.: Induction of Nitric Oxide Synthase is a Necessary Precondition for Expression of Tumor Necrosis Factor-Independent Tumoricidal Activity by Activated Macrophages. *Biochem. & Biophys. Res. Commun.*, **184**, 1364~1371 (1992)