



Title	放射線による細胞分裂遅延に及ぼすSH化合物の影響 1. グルタチオンの放射線防護効果
Author(s)	川崎, 祥二; 小林, 光昭; 沖田, 功 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1974, 34(6), p. 444-448
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/16265">https://hdl.handle.net/11094/16265</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 放射線による細胞分裂遅延に及ぼす SH 化合物の影響

### 1. グルタチオンの放射線防護効果

山口大学医学部放射線医学教室（主任 桜井 孝教授）

川崎 祥二 小林 光昭 沖田 功

未富 一臣 桜井 孝

(昭和49年3月11日受付)

(昭和49年4月25日最終原稿受付)

### Protective Effect of SH Compounds on the Radiation-induced Mitotic Delay.

#### 1. Protection by Glutathione

Shoji Kawasaki, Mitsuaki Kobayashi, Isao Okita, Kazuomi Suetomi  
and Koh Sakurai

Department of Radiology, Yamaguchi University School of Medicine, 1144 Ube, Japan

(Director: Prof. Dr. Koh Sakurai)

*Research Code No.: 408*

*Key Words: Chemical protection, Glutathione, Mitotic delay, L-5 cells, Cell division*

Protective effect of glutathione 5 and 20 mM on radiation-induced mitotic delay in cultured L-5 cells was studied. When the dose-response curve of mitotic delay was plotted on a logarithmic scale, the curve was linear. The groups treated with glutathione during irradiation of 100 and 200 rads showed a faster recovery of the mitotic index than the control irradiated without chemical treatment. The recovery rate of mitotic index after X-irradiation was facilitated by treatment with glutathione during irradiation of 100 and 200 rads, but glutathione had no effect on the mitotic delay time. The effect of glutathione became greater by increasing concentration of glutathione.

On the basis of these data, the mechanisms of the radioprotective action of glutathione were discussed.

#### 緒 言

先に, *in vivo* にて, SH化合物のなかで, glutathione (以下 GSH), cysteamine(以下MEA), 2-mercaptopropionyl glycine, aminoethylisothiuronium Br·HBr (AET)を使用し, 放射線により惹起される Ehrlich 腹水癌細胞の核分裂遅延への効果を検討し, SH化合物は, 細胞分裂遅延を軽減させ, その作用は, 細胞分裂周期に関連している

のではないかと報告した<sup>3)4)5)</sup>. 即ち, 100, 200rads の低線量の場合, 核分裂遅延時間, 及び, 核分裂像の再出現からの核分裂指数の増加に, GSHの効果はない. しかしながら, 放射線照射後, ある一定時間(約12時間)になると, GSH処理群の核分裂指数は, 放射線照射単独に比較して高い. 400rads, 600rads と線量が増加すると, 核分裂像の再出現は, 照射後12時間以後となり, この

場合は、GSH処理群の方が核分裂指数の増加は、早くなる。一方、MEAでは、200rads, 400rads共に、MEA処理群が、核分裂再出現からの核分裂指数の増加が早くなり、MEA量を増加させると、その効果が著しい。しかし、200radsより400radsの方が、その効果は、顕著である。また、Maisinら<sup>7</sup>は、放射線照射により生ずる腸管障害の核分裂の回復は、AET, 5-HTの投与により、照射線量が少線量の場合(225R)では、その効果は、明らかでなく、高線量(900R, 1500R)では、明らかになることを観察している。

一方、SH化合物の放射線防護機構に関して、多くの仮説がだされている。しかし、細胞分裂遅延に対し、異なるSH化合物の放射線防護の違いが、SH化合物の作用機序の相違によるものであるかどうか明らかでない。

そこで、著者らは、細胞分裂遅延に対する、SH化合物の中で特にGSHの放射線防護機構を解明するために、in vivoでは、実験系が複雑であるため、in vitroで、哺乳動物培養細胞を使用し、検討を加えた。

#### 研究方法及び材料

1) 照射方法：使用した放射線は、250kVp, X線、フィルタ1.0mm Cu + 1.0mm Al, F.S.D. 40cmであつた。線量測定は、細胞照射と同じ条件下、Frickeの化学線量計を使用した。線量率は、186rads/分で、照射時の温度は、37°Cであつた。

2) 培養細胞：細胞は、L-5細胞を使用した。この細胞は、九州大学医学部放射線基礎医学教室(主任：吉永春馬教授)から供与を受けた。試験管に、カバーグラスを入れ、それにL-5細胞を移植後、36~40時間培養後、実験に使用した。培養液は、Eagle's MEMと20%成牛血清である。SH化合物としては、GSH(還元型グルタチオン)を使用した。GSH処理は、照射前10分に各種濃度のGSHを含む培養液と交換し、放射線照射後、GKN(8%NaCl, 0.4%KCl, 1.0%Glucose)にて、2回洗滌後、MEM培養液と交換した。GSHの処理時間は、30分間であつた。全ての操作は、37°C中で行つた。

3) 分裂指数：標本は、放射線照射後、経時的に取出し、乾燥し、メタノール固定後、ギムザ染色を行つた。核分裂指数は、各標本で3000細胞を数え、算定した。同様の実験を2回繰返した。

#### 結果

##### 1) 照射した線量と細胞分裂遅延との関係

線量50, 100, 150, 200, 250radsを照射した後、核分裂指数の変動を観察した。非照射、非処理群は、平均39前後の核分裂指数を維持する。GSH処理単独では、5mM, 20mM共に、処理後2時間及び6~8時間に、高い核分裂指数のピークが認められ、GSH処理による。分裂抑制はない。放射線照射により、分裂細胞が消失し、その後、核分裂像が、再出現し、その後、一定値まで増加し、増減を繰返す。線量が増加すると、分裂遅延時間(放射線を照射してから、核分裂像の再出現までの時間)が長くなり、核分裂指数の回復曲線の勾配がゆるくなる(図1)。250rad照射で

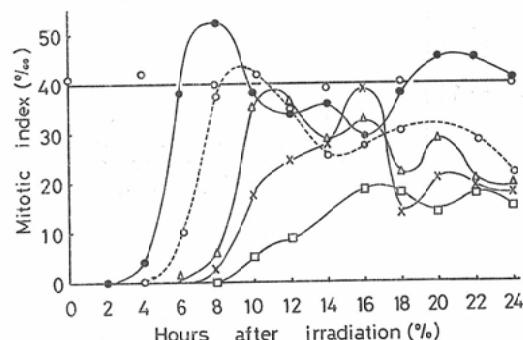


Fig. 1. Changes in the mitotic index after 50 rads (●), 100 rads (○), 150 rads (△), 200 rads (×), and 250 rads (□) of X-rays. The mitotic inhibition was released at 2, 4, 5, 6, and 8 hrs after 50, 100, 150, 200, and 250 rads, respectively. Solid line with open circles shows the control value.

は、照射後24時間までに、対照値まで回復しない。照射線量を横軸に、分裂遅延時間を縦軸に、それぞれ対数でとると、図2のように直線となる。

2) 100rads照射での細胞分裂遅延へのGSHの効果。

照射線量を100radsと一定にして、GSH処理

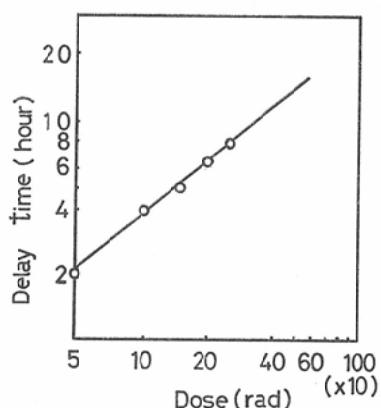


Fig. 2. Extent mitotic inhibition as a function of X-ray dose. The data were obtained from Fig. 1.

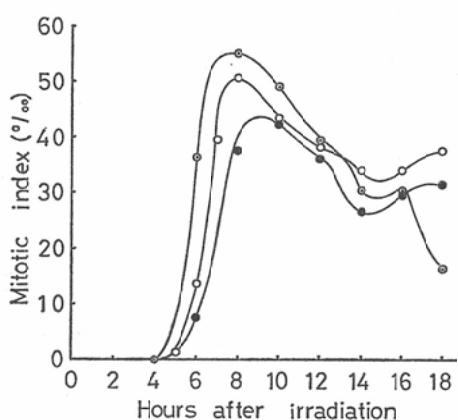


Fig. 3. Effect of glutathione on the rate of recovery of mitotic index after 100 rads  
 ●—● 100 rads  
 ○—○ glutathione (5mM)+100 rads  
 ◎—◎ glutathione (20mM)+100 rads

濃度を 5 mM, 20 mM と変化させ、その効果を観察した(図3)。GSH 5 mM, 20 mM 处理を行つても、核分裂遅延時間は、照射単独の場合とほとんど変わらない。しかしながら、GSH処理によつて、核分裂像の再出現が始まってから後の、核分裂指数の増加(核分裂指数の回復)は、早くなる。放射線照射後、観察される核分裂指数の回復曲線は、100 rads 照射後 8~10 時間にピークがある。GSH の処理により、核分裂指数のピークは、大きくなり、回復曲線の勾配が、急になる。即ち、GSH 処理により、核分裂指数の回復が促進される。

### 3) 200 rads 照射での細胞分裂遅延への GSH の効果

照射線量 200 rads と一定にして、GSH 处理濃度を 5 mM, 20 mM と変化させて、その効果を観察した(図4)。線量 200 rads 照射すると、照射後 8 時間から、わずかな分裂像が観察され、その後、漸増し、照射後 12 時間に小さなピークが観察され、その後、再び核分裂指数は増加し、照射後 16 時間に大きなピークがみられる。5 mM GSH 处理では、核分裂指数は、照射後 9 時間までは、照射単独群と同様の回復を示すが、その後、回復

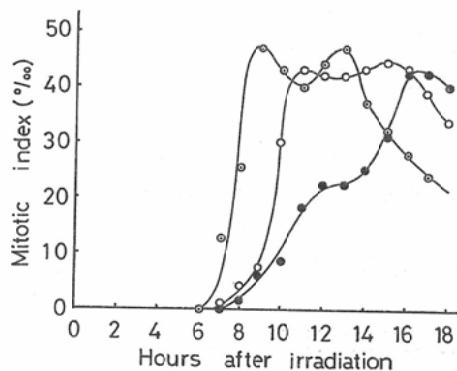


Fig. 4. Effect of glutathione on the rate of recovery of mitotic index after 200 rads  
 ●—● 200 rads  
 ○—○ glutathione (5mM)+200 rads  
 ◎—◎ glutathione (20mM)+200 rads

が早く、照射後 11 時間にピークとなる。その後、照射後 16 時間までの間、核分裂指数のピークが続く。20 mM GSH 处理の場合、照射後 6 時間まで、核分裂像は、観察されないが、照射後 7 時間には、核分裂像があらわれ、その後、急激な核分裂指数の増加がみられる。照射後 9 時間には、核分裂指数は、ピークになり、その後、わずかな減少の後、増加し、照射後 13 時間に、再び、核分裂指数のピークがある。照射 13 時間以後は、漸減する(図4)。核分裂遅延時間は、100 rads の場合と同様に、GSH の処理(5 mM, 20 mM) によつて影響されない。しかしながら、照射後始める核分裂像の再出現からの回復は、GSH 处理により、

防護効果がみられ、5 mM GSH によつても、促進されるが、20mM GSH 处理では著しく促進される。

### 考 察

哺乳動物培養細胞の細胞分裂は、放射線照射により、分裂遅延を起す。ただ、放射線照射を行う場合、方法で述べたように、カバーガラスの上に、細胞を培養するため、細胞への正確な照射線量を測定できない。化学線量計での測定では、照射放射線と共に、ガラスの散乱線を均一した線量として測定したことになる。著者らが、*in vivo* の Ehrlich 腹水癌細胞で観察したもの<sup>3)</sup>と比較すると、同一効果（分裂遅延時間8時間）を起させる線量の比較では、*in vivo* の実験では、*in vitro* の線量の約1.3倍の線量が必要である。この理由として、*in vivo* と *in vitro* の線量測定、細胞の種類の違い等も考えねばならないが、同一と考えれば、*in vitro* では、それだけ多い散乱線線量が細胞に、照射されたと考えられる。このことについては、細胞の生存率等で観察された値とほぼ一致している<sup>2)6)9)</sup>。

放射線照射により、細胞は、G<sub>2</sub>-block をうける。低線量では、G<sub>2</sub>-block による分裂阻害が大きくあらわれるが、線量が増加すれば、S期阻害、G<sub>1</sub>期阻害もあらわれるため、図1にみられるように、線量が増加すれば、核分裂指数の回復曲線がゆるやかになると思われる。

一方、細胞分裂遅延に対するGSHの効果を観察すれば、同濃度のGSH処理では、200rads 照射の場合のGSHの効果は、100radsでのGSHの効果よりも著明となる。また、同一線量で、GSH濃度の比較（5 mM, 20 mM）をすれば、5 mMよりは、20 mMの効果が著明である。この結果から、GSHの放射線防護作用は、細胞周期のある一定期間で、はたらいていることが考えられる。即ち、図5に示すように、ランダム細胞集団に100rads 照射すると、G<sub>2</sub>-block がかかり、その時間は、ある一定時間（約4時間）である。その間に、GSHにより防護された（修飾された）細胞が、細胞周期を進行し、G<sub>2</sub>-block 部位に蓄積す

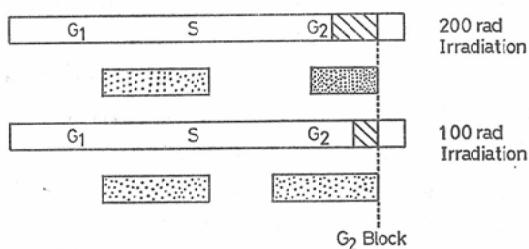


Fig. 5. A possible model to explain the effect of glutathione on the radiation-induced mitotic delay in cultured mammalian cells. Left stripped areas shown L-5 cells affected with glutathione during X-irradiation of 100 and 200 rads. The cells accumulated to G<sub>2</sub>-block point (hatched area) after irradiation (right stripped area). As the mitotic delay time (G<sub>2</sub>-block time) is related to irradiation dose, so these accumulated cells after 200 rads must be more than the cells after 100 rads. Thereafter, the cells affected by glutathione progress to mitosis same as release of mitotic inhibition with X-ray. Therefore, the recovery of mitotic index in glutathione-treated groups is faster than that in the groups given irradiation alone. However, the stage protected by glutathione in cell cycle is obscure.

る。G<sub>2</sub>-block 解除と共に蓄積された。細胞が一度に分裂期に入るため、GSH処理群の分裂指数の回復（増加）の勾配が大きくなる。また、200 rads 照射すると、100 rads 照射の場合より、強い（長い時間）G<sub>2</sub>-block となる。その間に、GSHにより防護された細胞が進み、G<sub>2</sub>-block 部位に蓄積する。G<sub>2</sub>-block の時間が長いため、より高密度に細胞が蓄積する。G<sub>2</sub>-block の解除と共に蓄積された細胞が一度に分裂期に入るものと考えられる。それ故、GSH処理群は照射単独よりも、核分裂指数の増加の勾配が大きい。また、GSHの濃度を高めると、GSHの作用が大きくなるものと考えられる。故にGSHは細胞の分裂遅延時間には、ほとんど作用しない（G<sub>2</sub>-block の防護はない）が、細胞周期のある一定部位を防護すると考えられる。Yu and Sinclair<sup>10)</sup>は、MEA(50mM)の細胞分裂遅延に対する効果を、同調培養細胞で、G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, 期の各々の細胞で観察し、いずれの時期でもMEAの防護効果があると報告してい

る。このことは、GSHとMEAの作用機構が異なるのではないかと考えられる。

一方、GSHの防護効果は、*in vivo*, *in vitro* の間で、線量及び時間の違いがある。これは、GSH処理量（投与量）、GSHの処理方法（投与方法）、細胞の種類の相違等によるものと考えられる。しかし、*in vivo*, *in vitro* 共にGSHは細胞周期に関連して作用していると思われる。GSHの放射線防護は、細胞周期のどのような時期で、どのような機序で作用しているか、また、他のSH化合物（特にMEA）との作用の差は、何であるかについては、今後の興味ある問題である。

### 総括

哺乳動物培養細胞（L-5）の放射線による細胞分裂遅延へのGSH（5 mM, 20mM）の効果を検討した。

1) 放射線照射線量と核分裂遅延時間の関係は、両対数グラフで直線となつた。

2) 100rads照射で、GSHの処理濃度を5, 20mMと変化させると、核分裂遅延時間は変わらないが、核分裂指数の増加の割合（回復）は促進する。20mM GSH処理では、5mMに比較して、その効果は大きい。

3) 200rads照射でGSHの処理濃度を5mM, 20mMと変化させると、100radsの場合と同様の現象が観察される。しかし、GSHの効果は、より著明となる。

以上のことから、細胞分裂遅延に対する、GSHの放射線防護効果について若干の考察を加えた。

### 文 献

- 1) Doida, Y. and Okada, S.: Radiation-induced mitotic delay in cultured mammalian cells (L-5178Y). *Rad. Res.*, 38 (1969), 513—529.
- 2) Feldmen, A. and Morkovin, D.: Cell dosimetry, *Radiology*, 74 (1960), 112—113.
- 3) 川崎祥二、桜井 孝：放射線による Ehrlich 腹水癌細胞の細胞分裂遅延に及ぼすグルタチオンの効果（I），日医放雑誌，33 (1973)，535—540。
- 4) 川崎祥二、桜井 孝：放射線による Ehrlich 腹水癌細胞の細胞分裂遅延に及ぼすグルタチオンの効果（II），日医放雑誌，33 (1973)，541—545。
- 5) Kawasaki, S.: Radioprotective action of SH compounds (III). *Bull. Yamaguchi Univ. Med. Sch.*, in press.
- 6) Masuda, K.: Determination of absorbed dose of HeLa S-3 cells cultured on plastic and glass dishes following exposure to X-ray. *Nippon Acta Radiologica*, 28 (1968), 98—101.
- 7) Maisin, J.R., Novelli, G.D., Doherty, D.G., and Congdon, C.C.: Chemical protection of the alimentary tract of whole body X-irradiated mice. I. Changes weight, histroy and cell division in related to nucleic acid and protein synthesis. *Int. J. Rad. Biol.* 2 (1960), 281—293.
- 8) 寺島東洋三：細胞の増殖周期と放射線感受性、放射線細胞生物学, p. 216, 朝倉書店, 1968.
- 9) Yamada, M. and Puck, T.T.: Action of radiation on mammalian cells. IV. Reversible mitotic lag in the S-3 HeLa cell produced by low doses of X-rays., *Proc. Nat. Acad. Soc.*, 47 (1961), 1181—1191.
- 10) Yu, C.K. and Sinclair, W.K.: Protection by cysteamine against mitotic delay and chromosomal aberrations induced by X-rays in synchronized Chinese hamster cells., *Rad. Res.*, 43 (1970), 357—371.