



Title	Cysteine の放射線防護作用機序に就て
Author(s)	上條, 寿郎
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1959, 19(3), p. 548-555
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/16277">https://hdl.handle.net/11094/16277</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

# Cysteine の放射線防護作用機序に就て

昭和医科大学放射線医学教室（主任 氣駕正己教授）

助手 上 條 寿 郎

(昭和34年3月6日受付)

(本研究は文部省科学研究費の補助を受けた；記して謝意を表する)

## 目 次

- 1) 緒論
- 2) 実験目標
- 3) 実験方法
- 4) 実験結果
- 5) 考按
- 6) 結論
- 7) Summary
- 8) 文献

## 緒論

cysteine の放射線防護の可能性及びその発展は次の三つに帰することが出来る。

1) 放射線の生物的作用は従来考えられていた如き、直接に重要分子がイオン化されることだけが第一次的変化の全部ではなく、水分子のイオン化及びそれによって出来る遊離基によって、重要分子が酸化されることを、第一次的変化とする部分が、大きな役割をえんずることが明らかなる事実である<sup>1)2)3)4)5)6)</sup>。そしてその場合少くとも *in vitro* の水溶液系に於ては放射線があたかも強力な酸化剤として作用する<sup>7)8)</sup>。

2) SH化合物は酸化され易く disulfide をつくる。そして又生理的にも細胞内に含有される。

3) 代謝に重要な役割をもつ多くの種類の酵素がSH酵素であるか、又はSH化合物を必要とする。

これ等のことから cysteine とか cysteamine が酸化の competition として理論的考按及び実験が多数<sup>9)10)11)12)</sup>なされた。併し放射線生物作用に対する酸素効果<sup>13)14)15)16)</sup>が明らかになるにつれ

cysteine が一義的に酸化の competition のみでは説明出来なくなり、酸化のみに関しても細胞内の酸素圧がSHの還元作用によって低下することも関係するらしい。

直接作用が第一次的変化なら化学<sup>17)</sup>の防護は不可能と考えられていたが、不可逆的変化が起る前に、不安定な中間生成物質が出来ると考えれば、これをSH化合物が“repair”することもあり得る。

当教室に於てアミノ酸の防護効果<sup>17)</sup>の研究があり、cysteine はアミノ酸の一員として蛋白合成に關係することが障害軽減作用として役立つことも考え得るし又アミノ基の作用も無視出来ない。

Patte<sup>9)</sup> 等が cysteine をマウスに照射前投与することにより、放射線障害を軽減し死亡率を低下せし得ることを発表しており、その他の多くの追試も同様の結果であり、当教室では皮膚に塗布して照射線量を増加し得た<sup>18)</sup>。

Bacq<sup>10)</sup> によれば cysteine よりも、それに相当するアミンであるところの cysteamine の方がマウスでは防護力が大でカルボキシル基がない方がよいとされ、二三の人により<sup>19)</sup>カルボキシル基のない為に NH<sub>2</sub> の basity が増加し、SHがより reactive になると云われ又 resonance-stabilized ring<sup>20)21)</sup>を考える人もある。これよりMEA ( $\beta$ -mercaptopropylamine) AEG (mercaptoethylguanidin) AET (aminoethyl isothiuronium) 及び ethyl が butyl になったMPA, MPG, ATP 等が論ぜられている。MEA

の disulfide である cysteamine に防護力のあることから還元のみを防護の作用機序とする根拠は奪われる。又 cysteine とMEAは構造上の違いはカルボキシル基の有無のみであるが代謝関係で同一視出来ない点も多い。以上の如く cysteine の一つに関しても防護作用機序は幾つかの可能性が存在するが、生物種類及び状態により、何れかの作用機序の重みが増すであろう。

### 実験目標

1) competition であるか否か？眞の又は狭い意味での拮抗、即ち遊離基の拮抗であるならば、照射時にSHが反応し得る状態で細胞内に存在することが必要である。従つてSH剤を与える時期に關係し、特に照射後では効力がないわけである。

2) 照射後にも効力があればSHの関係する再賦活であるか、又はアミノ酸として有効であるかの二つは放射線の障害軽減に対して比較的直接に因果関係がある。

3) 又これと全然別に細胞内に存在する硫黄化合物、窒素化合物の多寡と放射線感受性が違うか否か、又感受性が低いと云うことは個々の反応に対する防護作用が多いことが関係する。

以上の点に関して簡単な単細胞生物により分析を試みた。

### 実験方法

1) competition か否かを知る為に酵母細胞の培地に照射時より前後して、一定時間一定濃度の cysteine を投与してその感受性の変化を読みとる。

2) Hopkins 現象として知られる如く<sup>22)</sup>、SH反応剤に対して基質がSH化合物を防護することがあるが<sup>23)</sup>、マロン酸を作らせ照射後 cysteine を与えこれが、再賦活に關係するか否かを知る。

3) 窒素又は硫黄化合物と感受性にどんな關係があるかを知る。この為には下記の如く酵母細胞はその培地に窒素源とし NH<sub>4</sub>、硫黄源として SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>のみを含み、これにより蛋白を合成して生長分裂するので人為的にどちらかを欠除させ得る。

実験材料には酵母細胞(Saccharomyces Sake)を使いpH 7.0のNägeli 氏液中に28°Cで数代培養し、その後次に移植して4日目、試験管内で醸酵良好で増殖の最も盛んな時期にビペットで強く振盪攪拌し、細胞が各個バラバラになったものを0.1ccとり別の試験管にpHは同じ7.0のNägeli 氏液を入れたものを管壁につかぬ様に入れ約1時間更に28°Cに保存してからX線照射する。

cysteine は各実験濃度でこの最後の処置をする前に入れておき、最終pH 7.0に補生する。濃度はモル濃度である。

照射終了後直ちにNägeli 寒天培地(pH 7.0)に酵母細胞をバラバラにビペットで撒き、酵母細胞の移動してまわぬ様に余分の水分を拭く。

培養は28°C 20時間行うのであるが最初と数時間後及び最後に顕微鏡でその位置及び発育を調べ更に判定時間迄同一の細胞を追求出来る様に顕微鏡写真を撮しておく。これにより放射線又は薬物による細胞分裂の遅れ(delayed division)の見落しを防ぎ得るものである。

照射後に及ぼす cysteine の影響を知る目的には Nägeli 寒天培地に cysteine が各濃度になる様に入れておきpH 7.0とし、照射した細胞をこの上に撒く。

生死判定は培養直後のままで各個バラバラの細胞のままのもの及びその膨化したもの、更に膨化した二細胞まで止っているものが、死とし、二細胞一出芽細胞以上コロニーを作ったものを生とする(写真123)。

一実験に就き500個ずつ4群合計2000個の細胞に就て生死を数えることを2~4日くり返して総計4000~8000個に就て生存率を算出した。

尙各実験に就ては無処置非照射、対照射群及び各濃度の cysteine を入れた非照射対照群の上記標準による生存率は90±2.6%である。

更に20,000r 照射の対照もその都度とてその生存率をみた。

### 照射条件

60 K V. 3 mA nonfilter, 焦点間距離 4.5cm

その位置における空中線量1000r/min

寒天培地に於ける増殖経過（此の経過で2細胞以上分裂しないものを死とする）

写真 1 直 後

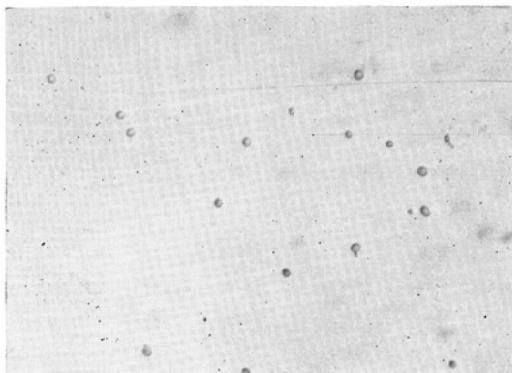


写真 2 8 時間後

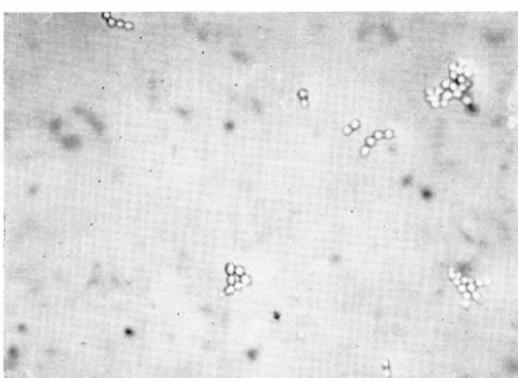
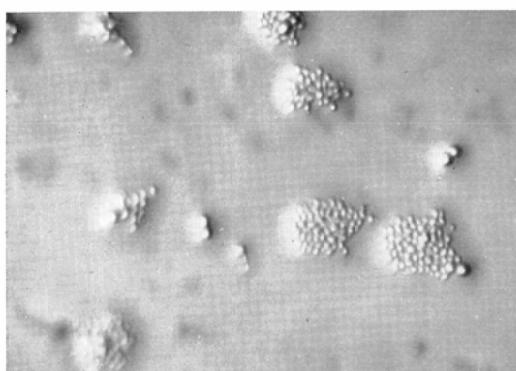


写真 3 24時間後

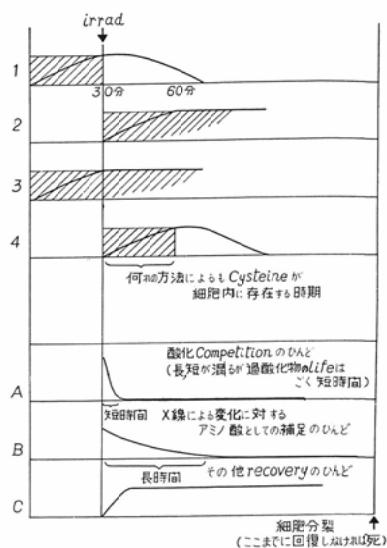


照射線量20,000r (20分)

Nägelei 氏培地の組成

葡萄糖	$C_6H_{12}O_6$	10.00 g
-----	----------------	---------

第 1 図



A : 1 , 3 > 2 , 4 = Kontrol

B : 1 = 3 及び 2 = 4

C : K < 1 , 3 < 2 , 4

実験値 Protection は 1~4 とも差がない： B であち

照射直後ある時間内に作用する

少くとも Competition でない

酒石酸アンモニウム  $(NH_4)_2C_4H_4O_6$  1.00 g

第二磷酸カリウム  $K_2HPO_4$  0.10 g

塩化カルシウム  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.01 g

硫酸マグネシウム  $MgSO_4$  0.02 g

蒸溜水 100cc

この組成だと芽麦エキスなどの如き不確実なものでなく、硫黄及び窒素化合物を加減する如き本実験には適當と思われる。

尙寒天は 2 % である。

使用する薬物の濃度は何れもそれ自身では本実験の生死の標準に影響を与えない濃度である。

そして又 60KV 程度の X 線を用いた場合イオン化又は遊離基の濃度はイオン化密度から計算すると  $10^{-6}M$  程度である。線強度が  $10^4 r/min$  以上とかであれば相隣する電子飛程のイオ化が距離的には overlap するので、この  $10^{-6}M$  より濃度が大である場合も考えられるが  $1000 r/min$  では、そのことは問題にならない線強度である。

又その程度の遊離基に拮抗されるには、この程

第1表 照射線量20,000r

投与物質及び濃度	照射前投与	照射後投与	照射前照射後投与
cysteine $10^{-3}M$	63.04 ± 1.12	65.40 ± 3.10	65.87 ± 2.93
cysteine $10^{-5}M$	66.03 ± 0.78	66.33 ± 2.28	68.52 ± 2.17
(20,000r) control	47.5 ± 1.30		

度の薬物濃度でよい。又空気中の酸素と平衡な水に溶けた酸素量は約 $10^{-4}M$ 程度である。

1) cysteine の作用する時間的関係を分析する目的で実験を行つてみた。照射30分前より照射中まで与えたもの、照射後に与えたもの、照射前後に与えたものは第1表の如く同じ効果が得られることが分つた。これを図解すると同一作用機序と假定すれば直後に効果がある。

更に直後を分析する目的で次の3つのグループに分けた。即ち第1のグループは照射後直ちに cysteine  $10^{-5}M$ の中に10分間入れておき、遠沈(3000回転1分)して酵母細胞を集め、これを2回繰返し、所謂細胞を洗滌し約20分間Nägeli氏液に入れておき、第2第3のグループも同様にして照射後10~20分、20~30分 cysteine  $10^{-5}M$ の中に入れておき、照射後30分して Nägeli 寒天培地(pH 7.0)にバラバラにピペットで撒き生存率を測定算出した。

2) 次に照射後であれば酵素の再賦活が考え易い、その目的でコハク酸酸化酵素系の放射線感受性が高いことが知られており SH酵素が関係することから Hopkins 現象の基質としてマロン酸を使用した。

照射前マロン酸の $10^{-3}M$ ,  $10^{-5}M$ を投与し照射後に cysteine  $10^{-3}M$ ,  $10^{-5}M$ を投与して生存率を算出した。

3) Nägeli 氏液中の窒素源としては酒石酸アンモニウムのみであるので、この代りに酒石酸ナトリウムで置き換えて照射して、窒素と放射線感受性を調べ、又照射後 cysteine を投与することによつて、回復効果が大になるかをも検査した。

又硫黄源としては硫酸マグネシウムのみであるので、塩化マグネシウムで置き換えて、放射線感

受性と硫黄との関係、又 cysteine との関係を調べた。

ここで無窒素源又は無硫黄源の培地で増殖可能か、又はどの程度かを知る為に、光電比色計を用い、混濁度によつて生長曲線を画いた。

光電比色計の混濁計測定用試験管の中にNägeli氏液10ccを入れ cysteine の濃度が $10^{-5}M$ になる様にしてpH 7.0に補正する。同様に Nägeli 氏液中の無窒素化合物液、無硫黄化合物液などを作り pH 7.0に補正する。酵母細胞の量は混濁度 1.5にする。1つの群には試験管3個づゝ使用した。培養は28°C50時間増殖曲線を観察した。

培養時間が経過するに従つて沈澱が大になつてくるので、測定時には震盪して均等にした。

#### 実験結果

##### 1) cysteine の投与時間の関係

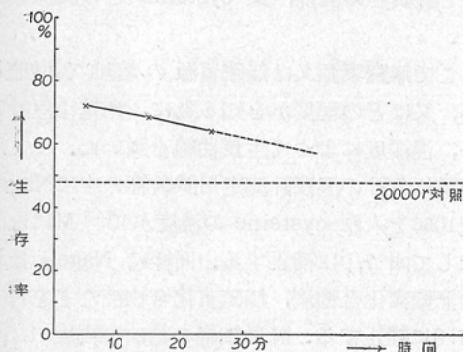
投与の時期を照射前のみ、照射後のみ、及び照射前及び後を通して3種類を比較すると第1表の如くなる。2種類の濃度においても3種類の間に有意の差がない。

細胞膜の透過性の変化等を無視すれば、そして cysteine の防護的作用機序が一定の重要な分子に關係するものであれば、照射前投与したものは competition で利き、照射後投与は repair で利き、照射前後共投与したものは competition 及び repair の両者が利く筈であるが実験の如く投与時期に関せず何れも障害軽減作用の効果に差がなく然も cysteine 2種類の濃度でそうあることは考えにくく前後に投与したものが効果がよいことが考え易いが、もしこの事が成り立つ(即ち competition で利いたものに repair が利かない)としても少くとも repair だけでも同程度に障害が軽減されると云われる。

第2表 照射線量 20,000r

照射後 Cysteine 10 <sup>-5</sup> M投与	
0~10分	72.58±0.42
10~20分	69.13±1.22
20~30分	63.70±2.16

第2図. Cysteine の投与時期と生存率



第3表 照射線量 20,000r

照射前投与物質	照射後投与物質	生存率
マロン酸 10 <sup>-5</sup> M	cysteine 10 <sup>-3</sup> M	82.42±1.93
マロン酸性 10 <sup>-5</sup> M	cystein 10 <sup>-3</sup> M	73.51±1.48
マロン酸 10 <sup>-5</sup> M		62.53±1.82

2) この repair の時期を知る為に照射後10分毎に投与してみると(第2表).

即ち直後が最もよく、段々に効果が減少する。これは cysteine 自身の影響がない濃度であるので照射のみの対照にまで下る筈であるが(第2図)、この実験では照射後長時間試験管に置くと、照射時单一の細胞が分裂し、寒天培地に撒く時に単細胞にすると誤差が生じるので、一様に照射30分後寒天培地に撒いて誤差を少くした。

寒天培地で10分間 cysteine を投与することは、本実験方法では出来ない。従つて実際的には少くとも照射中に与えることがよいと考えられる。

3) repair であれば SH関係酵素の再賦活が第一に考えられる。教室の研究である程度の濃度のマロン酸を照射前に与えると、防護する結果が

あるが、もし Hopkins 現象であれば、照射後これを SH剤で reactivate 出来る筈である。

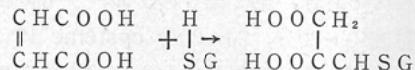
第3表の如く cysteine 単獨より障害の減少が著しい。更に高濃度の方が効果が大で cysteine のみでは10<sup>-3</sup>Mと10<sup>-5</sup>Mに差がない事を合わせて再賦活が暗示される。

4) マロン酸はコハク酸脱水素酵素系に特異であるが、これも含めて広範な SH阻害剤マレイン酸を用いて、同様の実験を行うと第4表の如くなる。

第4表 照射線量 20,000r

照射前投与	照射後投与	生存率
マレイン酸 10 <sup>-5</sup> M	cysteine 10 <sup>-3</sup> M	67.80±1.19
マレイン酸 10 <sup>-5</sup> M	cysteine 10 <sup>-5</sup> M	62.50±1.83
マレイン酸 10 <sup>-5</sup> M		57.20±1.84

マレイン酸は次の如く一般に SH基と反応するが、時にコハク酸脱水素酵素の阻害が強いとされている。

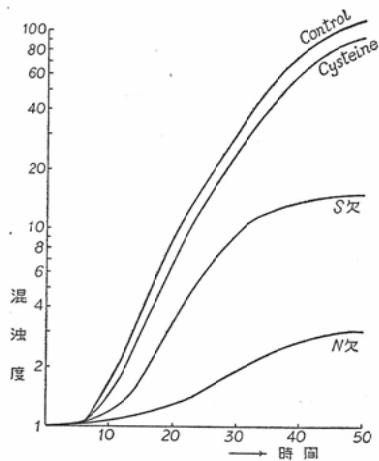


第4表の如く照射前にこの濃度でマレイン酸を投与しておくと、防護作用がある。これは照射後 cysteine を投与したものではマロン酸の場合とは異り、マレイン酸で前処置をして、照射後 cysteine を投与しても前処置をせず cysteine を投与したものとの間に有意の差がない。

マロン酸はコハク酸脱水素酵素に高度に特異であり、マレイン酸は他のSH化合物にも作用し複雑になるが、マレイン酸が離れ難い等の事があれば増強作用の要素も入ってくる。実験でマレイン酸を照射直後投与すると障害度が大である。マロン酸の如き基質とみなせない。マロン酸の防護作用は別の機会に譲る。

5) 酵母は硫黄源として SO<sub>4</sub>、窒素源として NH<sub>4</sub>のみを培地より得て、殆んどすべての必要な(必須の意味でない)アノミ酸を合成する。メチオニンの形で与えられてもよいであろう。

第3図 酵母細胞の増殖曲線



第5表 照射線量 20,000 r

照射前培養液中硫黄欠乏	照射前後培養液中硫黄欠乏
42.77±1.92	43.27±1.19
照射前培養液中窒素欠乏	照射前後培養液中窒素欠乏
47.03±1.02	46.03±2.28
対照	48.60±1.53

第6表 照射線量 20,000 r

照射後投与物質	生存率
照射前培養液中硫黄欠乏	cysteine $10^{-3}$ M 66.67±0.91
	cysteine $10^{-5}$ M 63.10±2.15
照射前後培養液中硫黄欠乏	cysteine $10^{-3}$ M 62.13±1.99
	cysteine $10^{-5}$ M 61.07±1.51
標準培地	cysteine $10^{-3}$ M 65.40±3.10
	cysteine $10^{-5}$ M 66.33±2.28

メチオニンの防護力がない事が知られているが酵母では cysteine にも GSH にも細胞内で変化し得るので全然硫黄を含まぬ如くした。

窒素、硫黄何れかが欠除した場合に果たして生長増殖が可能であるかを比色計で実験すると第3図の如くなる。僅かであるが何れも生長可能である。外見上形の変化は認められない。

そして硫黄とか窒素とかが本実験の培養では 1

第7表 照射線量 20,000 r

	照射後投与物質	生存率
照射前培養液中窒素欠乏	cysteine $10^{-3}$ M	58.93±0.83
	cysteine $10^{-5}$ M	56.77±2.58
照射前後培養液中窒素欠乏	cysteine $10^{-3}$ M	58.27±1.88
	cysteine $10^{-5}$ M	55.27±2.31
標準培地	cysteine $10^{-3}$ M	65.40±3.10
	cysteine $10^{-5}$ M	66.33±2.28

個体について生長のために余分があることが考えられた。唯し感受性はどう変化するかを実験したのが次の第5表である。

第6表の如く硫黄欠乏液で培養したものは感受性が高く（対照との間に有意の差がある）窒素欠乏液のものでは感受性の差がみられなかつた。

照射前に欠乏のものは照射後標準寒天培地に撒き、照射前後欠乏のものは寒天培地にも、硫黄又は窒素を含ませてないが、この両者間には差がみられない。それで直ちに SHとして、利用出来る様に、照射前硫黄又は窒素欠除して照射した直後 cysteine を与えると第6、7表の如くである。照射前及び照射後に硫黄が欠乏したものに cysteine を投与すると標準培地で照射し標準培地に撒いた対照と障害度に差がない。

この事は cysteine が少いために硫黄欠乏では感受性が高まり照射後 cysteine を投与すれば対照と同じに cysteine が利用されると考えられる。

窒素欠乏の場合に照射後 cysteine を投与したものと、標準培地のものに cysteine を投与したものとの間に差がある。窒素欠乏のものが照射後蛋白合成に cysteine を一部分利用すると考えればよいであろう。これ等のことは cysteine の照射後における役割を強調出来るデータである。

### 考 按

cysteine は放射線に対して “competitive protection” があることを起点として防護剤として、又は放射線の生物作用機序の解明に研究されている様であるが、グルタチオンとの類似性を考

えるとき、必ずしも照射時に存在しなくてもその還元作用で、照射直後に放射線障害の軽減として有効に作用することが期待出来る。

特にSH酵素の再賦活が考えられる。

本実験において照射直前に投与しても、直後に投与しても同程度の障害軽減作用がみられたが、照射中及び照射後における cysteine の作用機序が同一でないならば照射前及び後を通じて投与したもののが一番有効な訳である。殊に cysteine の濃度を変えても前後投与に対し同様の効果であることは次の2つが可能性がある。(1)照射直後のみ有効である。(2)cysteine の作用するものが照射中及び照射後共、同じ種類のものである。第2のものは假定を必要とする。即ち照射により生成され cysteine に反応するものの寿命が長いか、時間と共に変化し又は他に移行しても一対一であり、cysteine に対しても同率で反応する。数多くの研究者の報告を参考すれば(2)の方が可能性が多い。併し直後から時間が経過すると効果が減ずることから実際問題としては、照射前に投与すればよいと云える。

マロン酸を用いて Hopkins 現象と類似の結果が得られたが、マロン酸の放射線障害に対する作用機序はとに角 cysteine が再賦活に有効である様である。マレイン酸はマロン酸と同一視する訳にはいかない。何故なら阻害作用が広範な SH 基に対して行われるし、SH 阻害の再賦活に長期間を有する結合をなすものがあるとしただけでも説明出来ると考えられる。

窒素と硫黄の実験から SH 化合物の細胞内における減少が感受性を高める。云いかえれば正常に細胞内に存在する SH 化合物が障害軽減に役立っている様である。代謝が遅いことは Tribondeau-Bérgonié 法則の通りならば障害が減じてもよい筈であるが、代謝の平衡関係も別のものになるので比較出来ない。

窒素又は硫黄の欠乏のもとに培養し、照射して直後 cysteine を与えると硫黄欠乏の方が窒素欠乏のものより障害が減じているが、照射直後蛋白質の再合成が盛んになる様な研究もみられ、窒素

欠乏のものは cysteine をアミノ酸源として、硫黄欠乏の硫黄源として、より多く利用するであろうから、後者の方が遊離した状態で多く存在するために障害軽減度が多い事が暗示される。

### 結論

- 1) 合成した培地の酵母細胞の放射線障害に対する cysteine の作用は、照射直後でも障害軽減に有効であり時間の経過と共に無効になる。
- 2) cysteine は X 線を SH 阻害剤と考えれば、Hopkins 現象に類する SH 化合物の再賦活がみられる。(1)と合わせて cysteine は照射直後にある種の重要な分子に再賦活を行う様である。
- 3) 硫黄欠乏の細胞は放射線感受性が増加するが窒素欠乏では然らず、又 cysteine がその形で細胞内に存在することが障害軽減に役立つことが暗示された。

(本研究の要旨の一部は第 17 回日本医学放射線学会総会において報告した。稿を終るに臨み終始御懇意なる御指導と御校閲を賜つた恩師氣駕教授に深甚なる謝意を表する)。

### 文獻

- 1) Sea, D.E.: Action of Radiation on Living Cell, Combridge Pr 1946.
- 2) Groy, L.H.: J. Chem. phys. 1951, 18, 174.
- 3) Magee, J. L.: J. Chem. phys. 1952, 18, 555.
- 4) Dale, W.M.: Bio chem J. 1942, 36, 80.
- 5) Fricke H. Hart E.J. and Smith H.P.: chem phys 1938, 6, 299.
- 6) Bacq Z.M.: Alaxander P. Fundamental of Radiology. Acad press 1955.
- 7) Dainton F.S.: J. chem Soc 1952, P 1955.
- 8) 氣駕正己：原子力シンポジウム化学的放射線防護，1958, 12.
- 9) Patt H. M. Tyree E. B. et al.: Science 1949, 102, 13.
- 10) Bacq Z.M. and Heeve A.: Bull Acad méd Bly. 1952, 6 th Series 1713.
- 11) Samerton F.: Brit J. Radiol 1953, 26, 510, 568.
- 12) Bacq Z.M. et al.: Science 1953, 117, 633.
- 13) Hollander. A. Stophaton G.E. Martin F.L.: Nature 1951, 117, P 103.
- 14) Trowell O.A.: Brit J Radiol 1953, 26, 302.
- 15) Gray L.H. et al.: Brit J Radiol 1953, 29, 109.
- 16) Howard-Flanders P. Z.: Talper Rad Res 1957, 7, 518.
- 17) 佐藤昭三：日本医放誌，1957, 17, 9.
- 18) 村山陽一郎：日本医放誌，1957, 174.
- 19) Catsch, A.: Advance in Radiobiology 1957, P 181.
- 20) Do-

herty D.G. et al.: Rad pr 1957, 7, 13. -21)  
Shapira R et al.: ibid 1957, 7, 22. -22)  
Hopkins, Moryon et al.: Bio chem J 1938,  
22, 1829. -23) Segal & Boyer: J.B.C 1953,  
204, 265.

### On the Mechanism of Cysteine protecting Radiation Injury.

By

Toshiro Kamijo

Department of Radiology, Showa Medical Collage, Tokyo, Japan  
(Director: Prof. Masami Kiga)

- 1). Cysteine was able to reduce the radiation injury, though given immediately after irradiation, in the yeast cell experiment.
  - 2). The reactivation of SH compounds which resembles to the Hopkins' phenomena was suggested.
  - 3). Radiation sensitivity of the yeast cell was enhanced in sulphur deficient culture media, but was not in nitrogen deficient media. It was also suggested that cysteine must be existed in the cell in free state in the time of irradiation.
-