The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Xanthine-Xanthine Oxidase反応により生成したSuperoxideによるL-5細胞の細胞分裂遅延とGSH, MEAの防護作用
Author(s)	川崎, 祥二; 橋本, 紘行
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1978, 38(7), p. 697-701
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/16852
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Xanthine-Xanthine Oxidase 反応により生成した Superoxide による L-5 細胞の細胞分裂遅延と GSH, MEA の防護作用

山口大学医学部放射線医学教室（主任：中西　敬教授）
川　崎　祥　二　　橋　本　紘　行

（昭和53年1月17日受付）
（昭和53年2月23日最終原稿受付）

Protective Effect of GSH and MEA on Mitotic Delay Induced by Treatment with Superoxide Generated by Xanthine-Xanthine Oxidase System

Shoji Kawasaki and Hiroyuki Hashimoto
Department of Radiology, Yamaguchi University School of Medicine, 1144, Ube 755, Japan
(Director: Prof. Dr. Takashi Nakanishi)

Research Code No.: *408*
Key Words: *Radiation protection, Superoxide, SH compounds, Mitotic delay*

The effect of superoxide generated by xanthine-xanthine oxidase reaction on mitosis in cultured L-5 cells was studied. Superoxide was generated in cultured medium of Eagle's MEM containing 20 per cent fetal calf serum by the reaction of xanthine-xanthine oxidase. The enzyme-generated superoxide induced a mitotic delay in growing population of L-5 cells, and the delay was protected by GSH (20 mM) and MEA (5 mM).

From these data, mechanisms of radioprotective effect of GSH and MEA were discussed.

緒　言

放射線照射に伴う，生体内ラジカル生成は放射線障害の一因と考えられている．放射線照射によりいろいろな種類のラジカルが生成されるが[1]，酸素分圧の上昇により，放射線作用が増強されることから，酸素が放射線障害の発生過程で，重要な役割をはたしていることは，疑う余地もない[2)3)]．

一方，生体内で生成される superoxide（以下 SO）は，生体に強い毒性を示す．その毒性から生体を防護するために生体内酵素 superoxide dismutase（以下 SOD）が誘導されることが，明らかにされてきた[4)5)6)]．また，放射線照射1時間前に SOD をマウスに静注することにより，生存率が増加することや幹細胞障害の防護効果が示されること，更には，この酵素が赤血球内に多量存在することが明らかにされている[7)8)9)]．また，放射線防護効果のある SH 化合物は，その反応が酸素ラジカルと OH ラジカルで違うことが指摘され[10)] SH 化合物でも，GSH と MEA の放

射線防護機序が，異ることが報告されている[11]．

ここでは，放射線照射の場合と異なり Xanthine-xanthine oxidase（以下X-Xo）反応を利用し $^{\cdot}O_2^-$ ラジカルのみを生成し，$^{\cdot}O_2^-$ ラジカルが，細胞分裂遅延を惹起するかどうか，また，$^{\cdot}O_2^-$ ラジカルによる細胞障害に対する MEA, GSH の効果を検討し，放射線による細胞分裂障害，並びに，SH 化合物の防護機序を明らかにすることを目的として，実験観察を行つた．

材料及び方法

細胞並びに培養方法

細胞には，L-5細胞を使用し，培養液は20%牛胎児血清を含む，イーグル MEM を用いた．試験管にカバースリップ（10×23mm）を入れそれに細胞を含む培養液（3×10^4細胞/ml）を3ml 分注した後，37℃で40時間培養し各実験に使用した．この条件下で，細胞は，指数函数的に増殖した．

実験は，50mM X を含む，新しい培養液と交換した後，5分間37℃で，インキュベート後 XO（4×10^{-3} unit/ml）を添加し，更に15分間あるいは20分間インキュベート後，新しい培養液で，3回洗滌した．最後に，20%牛胎児血清を含む新しい培養液と交換した．その後，経時的にカバースリップを取りだした．これらの操作は，37℃恒温槽中で行つた．

核分裂指数

取りだした細胞を，乾燥後メタノールで5分間固定し，ギムザ染色を行い，細胞を顕微鏡（15×100倍）で観察した．核分裂指数は，2,000細胞を観察し，1,000細胞当りの分裂細胞に計算し表示した．

X-XO 反応による $^{\cdot}O_2^-$ ラジカル生成[12]

50mM X，20%牛胎児血清を含むイーグル MEM に，nitrobluetetrazolium（以下 NBT）XO を加え，最終濃度を各々0.9%，4×10^{-3} unit/ml で行つた．全反応液量は，3.0ml である．NBT の発色は，560nm の吸光度（日立 EPS-3T 分光光度計）で測定した．反応温度は25℃である．

化合物

使用された GSH は，還元型グルタチオン（田辺製薬），MEA（東京化成）である．X, XO, SOD, NBT は Sigma 製品を使用した．

結果および考察

1．Eagle's MEM 培養液中での $^{\cdot}O_2^-$ ラジカル形成

50mM X，20%牛胎児血清を含む培養液2.7ml（pH 7.2）に NBT（0.1ml）を加え，25℃でインキュベートしても，吸光度560nm の増加は認められない．XO（0.1ml）を加えると吸光度560 nm は，ほぼ直線的に増加する．NBT の発色が増加中に SOD（0.1ml, 3390 units/ml）を加えると増加の抑制が観察された（Fig. 1）．このことから，他の反応系で報告されていると同様に[12]，ここで示した Eagle's MEM 培養液中で X-XO 反応が進行し，反応液中に，$^{\cdot}O_2^-$ ラジカルが生成されていることを認めた．

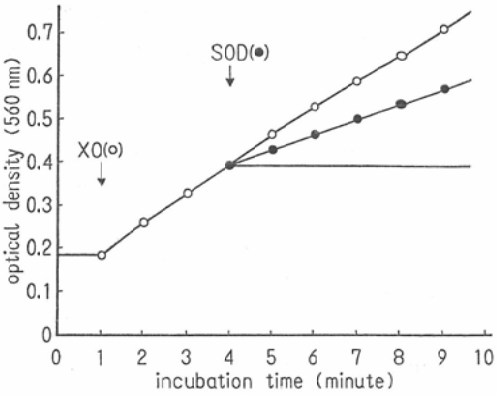

Fig. 1 Rate of reduction of NBT by xanthine-xanthine oxidase reaction. Reaction mixture contained 0.9 per cent NBT, 50mM xanthine and 20 per cent fetal calf serum in Eagle's MEM. Xanthine oxidase (XO) of 4×10^{-3} unit and superoxide dismutase (SOD) of 350 unit were added in final volume of 3.0ml at 25℃. Rate of reduction of NBT was followed by the changes of optical density at 560 nm.

2．核分裂指数に対する $^{\cdot}O_2^-$ ラジカルの作用

移植後40時間，指数函数的に増殖中の L-5細胞の培養液を50mM X を含む新しい培養液と交換した5分後 XO を加え，生成される $^{\cdot}O_2^-$ ラ

ジカルの細胞分裂に対する効果を観察した．

増殖中の細胞では，核分裂指数5.2%を示す．Xを含む培養液と交換することにより，処理後1，2時間にかなりの核分裂指数の低下がみられるが，処理後3時間には，正常値に恢復する．これは添加Xの効果で，細胞内に取り込まれたXが細胞内の内在性 XO と反応した結果と考えられる (Fig. 2)．

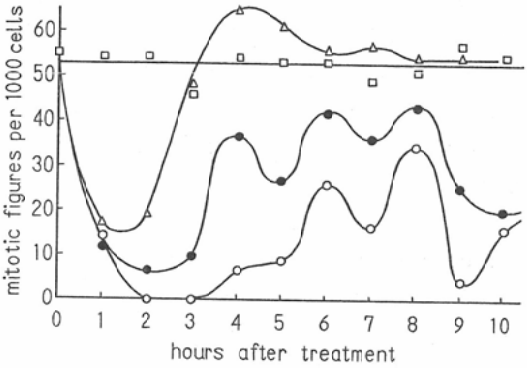

Fig. 2 Changes in mitotic activity of L-5 cells after exposure to $^{\cdot}O_2^-$ generated by xanthine-xanthine oxidase reaction for 15 and 20 min.

△—△ Treatment for 20min. with 50mM xanthine.
●→● Treatment for 15min. with superoxide generated by xanthine-xanthine oxidase reaction.
○—○ Treatment for 20min. with superoxide generated by xanthine-xanthine oxidase reactiou.
□—□ Without treatment.

Xを含む培養液で交換後，5分間インキュベートした後，ただちに，XO を添加し，15分間反応させた．そして，ただちに，新しい培養液で洗滌後，20%牛胎児血清を含む培養液と交換した．核分裂指数は，Fig. 2に示す如く処理後2時間まで，著しい低下がみられ，その後，増減をくりかえしながら回復する．しかし，処理10時間後でも，正常値に回復しない．

X-XO 反応を20分間行なわせると，処理後2，3時間には，細胞分裂像はまつたく観察されない．その後，徐々に回復するが，処理後10時間でも正常値に回復しない．20分間処理の場合，核分裂指数の回復は，15分間処理よりも遅い(Fig. 2)．

これらのことから，X-XO 反応により，生成される $^{\cdot}O_2^-$ ラジカルによつて，細胞分裂遅延が誘起される．処理時間が長い程その作用が大きくなることを認めた．これは，放射線照射により生じるラジカルのうち，酸素ラジカルによつても，細胞分裂遅延が，ひき起こされることを示している．しかし，その機構については，例えば peroxide によつても，細胞分裂遅延が，ひき起こされる報告があり[13]，$^{\cdot}O_2^-$ ラジカルによる peroxide の形成，それに伴う障害といつたことが考えられる．何れにしても，放射線障害の発現過程で，酸素の介在が，大きな役割を持つている事を示すものである．

3. $^{\cdot}O_2^-$ ラジカル作用に対する GSH，MEA の作用

放射線に対する防護剤と考えられている GSH, MEA を使用し，X-XO 反応による細胞分裂遅延に対する効果を観察した．Fig. 3に示すように X-XO 反応によつて惹起される細胞分裂遅延は，GSH (20mM)，MEA (5mM) の添加により，ほぼ完全に防護される．これは，X-XO 反応により生成される $^{\cdot}O_2^-$ ラジカルと GSH, MEA が反応し，$^{\cdot}O_2^-$ ラジカルを細胞分裂障害を起こさせない状態に変化させたものと思われる．in

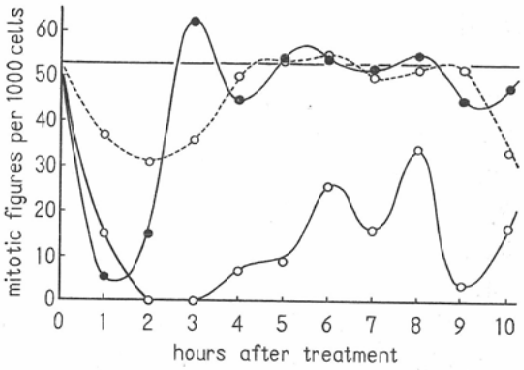

Fig. 3 Effect of GSH (20mM) and MEA (5mM) on the mitotic delay induced by the treatment with superoxide for 20min. Conditions were as in Fig. 2.

○—○ Control : Cells were exposed to superoxide generated by xanthine-xanthine oxidase reaction for 20min.
○…○ +20mM GSH treatment.
●—● +5mM MEA treatment.

vitroでの，$^{\cdot}O_2^-$ ラジカルと GSH, cysteine との反応について，

$$^{\cdot}O_2^- + GSH \rightarrow H_2O_2 + GSSG$$

$$^{\cdot}O_2^- + cysteine \rightarrow H_2O_2 + cystine$$

の如く，GSH, cysteine が酸化型グルタチオン，シスチンになることが報告されており[4]，本実験で使用した，GSH, MEA は $^{\cdot}O_2^-$ ラジカルと反応し，酸化型グルタチオン，シスタミンになるものと考えられる．

我々は，先に，GSH と MEA の間に，放射線防護作用の違いがあることを明らかにした[14)15)]．この違いの理由として，放射線により生じる酸素ラジカルと GSH, MEA との反応性の違い[10]，あるいは，酸素ラジカルとの反応速度の違い[4)16)]の可能性を指摘したが，本実験の結果は，$^{\cdot}O_2^-$ ラジカルによつて惹起される細胞分裂障害に対し，GSH, MEA 共に防護作用を示し，両者の間に差異がないことを示している．

このことから，X-XO 反応による $^{\cdot}O_2^-$ ラジカル生成と放射線によるラジカル生成の間に差があることが考えられる．その差違の可能性として，次のことが考えられる．

1. X-XO 反応により生じる $^{\cdot}O_2^-$ ラジカルは，中間段階に，その分解や他物質との反応といつた複雑な過程が含まれる．

2. X-XO 反応は細胞外で反応し，$^{\cdot}O_2^-$ ラジカルが細胞の外で生成される．

3. 放射線によるラジカル生成は，光量子が細胞内分子と直接反応し，ラジカルが細胞内に生成する．

4. X-XO反応では，$^{\cdot}O_2^-$ ラジカルだけが生成されるが，放射線では，他ラジカルも生成される．

この為に，GSH, MEA は共に，反応中間段階で作用するか，先に述べた如く[4]，ラジカスカベンジャーとして，細胞外で作用して，$^{\cdot}O_2^-$ ラジカルの作用をなくしたものと思われる．

しかし放射線照射により惹起される細胞分裂遅延に対する GSH の防護効果と MEA の防護効果には，違いが存在する．それにもかかわらず X-XO 反応により生成される $^{\cdot}O_2^-$ ラジカルとの反応には，GSH, MEA の間に放護効果の違いがないことから，放射線による細胞分裂遅延に対する GSH と MEA の防護効果の違いが何であるかという問題がのこる．このことについての原因として，MEA で処理した細胞では，処理濃度を高くすることにより，細胞内 SH 量が増加し，これが放射線防護効果の増加と比例することが報告されている[17]．しかし，グルタチオンの場合，酸化型グルタチオンの膜の透過性は，非常に小さいこと[18]，並びに GSH のレセプターは，細胞膜表層にあること[19]から，GSH の細胞膜透過性が，GSH と MEA の放射線防護効果の違いの原因として，明らかにされなければならない問題として，残されている．

総　括

Xanthine-Xanthine Oxidase (X-XO) 反応により，$^{\cdot}O_2^-$ ラジカルを生成し，細胞分裂に対する $^{\cdot}O_2^-$ ラジカルの作用を検討した．

Eagle's MEM培養液中でも，X-XO反応は進行し，$^{\cdot}O_2^-$ ラジカルを生じる．$^{\cdot}O_2^-$ ラジカルは細胞分裂遅延を惹起する．GSH (20mM), MEA (5mM) は，共に，$^{\cdot}O_2^-$ ラジカルによる細胞分裂遅延を防護する．

以上のことから，GSH, MEA の防護機構について若干の考察を加えた．

稿を終るに臨み，御指導，御校閲いたゞいた，山口大学，医学部中西敬教授，岡山大学癌源研究施設内海耕造助教授に感謝の意を表します．

この研究は，文部省科研費，癌特別研究（001033）の援助を受けた．こゝに感謝の意を表する．

文　献

1) Lea, D.E. 著，西脇　安 訳：放射線生物物理学，1962，岩波書店
2) Sapozink, M.D.: Oxygen enhancement rations in synchronous Hela cells exposed to low-LET radiation. Radiat. Res., 69: 27—39, 1977
3) 田中敬正：放射線増感作用，放射線細胞生物学，224—256，1968，朝倉書店
4) 浅田浩二：スーパーオキサイドディスムターゼ，蛋白質，核酸，酵素，76，373—378，1975
5) Fridovich, I.: Superoxide dismutase, Adv. Enzymol., 41: 35—97, 1974

6) Utsumi, K., Yoshioka, T., Yamanaka, N. and Nakazawa, T.: Increase in superoxide dismutase activity concomitant with a decrease in lipid peroxidation of liver during post pertum development. FEBS letter, 79: 1—3, 1977
7) Petkau, A., Chelack, W.S., Pleskach, S.D., Meeker, B.E. and Brady, C.M.: Radioprotection of mice by superoxide dismutase. Biochem. Biophys. Res. Comm., 65: 886—893, 1975
8) Petkau, A. and Chelack, W.S.: Radioprotective effect of superoxide dismutase on model phospholipid membrane. Biochem. Biophys. Acta, 443: 445—456, 1976
9) Petkau, A.: Radioprotection of bone marrow stem cells by superoxide dismutase. Biochem. Biophys. Res. Comm., 67: 1167—1174, 1975
10) Antoku, S.: Chemical protection of bacteria and mammalian cells by sulfer-containing compounds. J. Radiat. Res., 16: 28—36, 1975
11) Kawasaki, S.: Protective effect of various thiol compounds in mammalian cells (L-5), Int. J. Radiat. Biol., 32: 577—581, 1977
12) Nishikimi, M.: Oxidation of ascorbic acid superoxide anion generated by the xanthine-xanthineoxidase system. Biochem. Biophys. Res. Comm., 63: 463—468, 1975
13) Watkins, E.B., Willhott, D.G. and Clement, J.D.: The combined effect of hydrogen peroxide and -radiation on the mitotic activity of Ehrlich ascites tumor cells. Radiat. Res., 69: 379—384, 1977
14) 川崎祥二，小林光昭，沖田　功，未富一臣，桜井　孝：放射線による細胞分裂遅延に及ぼすSH化合物の影響（3）．日本医放会誌，34, 814—819, 1974
15) 小林光昭：細胞分裂遅延に対するGlutathione, Cysteamineの放射線防護機構につい．山口医学，24, 243—254, 1975
16) 村田　晃：アスコルビン酸のウイルス不活性化作用—フリーラジカルによる核酸鎖切断—，蛋白質，核酸，酵素，20, 573—601, 1975
17) Révétz, L. and Bergstrand, H.: Radiation protection by cysteamine and cellular sulphydryl levels. Nature, 200: 594—595, 1962
18) Srivastava, S.K. and Beutler, E.: The transport of oxidized glutathione from human erythrocytes. J. Biol. Chem., 244: 9—16, 1969
19) 井上正康，堀内正松：細胞膜タンパク質のアフィニティーラベリング—γ-Glutanyl transpeptidaseを中心にして—．第2回癌の細胞生物学シンポジウム（愛知，1977）．