The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Glutathioneの照射マウスに及ぼす回復効果の検討
Author(s)	服部, 行麗
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1976, 36(1), p. 56-62
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/17722
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Glutathione の照射マウスに及ぼす回復効果の検討

鹿児島市立病院放射線科（部長上川路睦博）
服　部　行　麗

（昭和50年8月4日受付）
（昭和50年9月16日最終原稿受付）

Protecting effect of glutathione on irradiated mice

by

Yukiyoshi Hattori
Department of Radiology, Kagoshima City Hospital
(Director: Yoshihiro Kamikawaji)

Research Field Code: 408

Key Words: Glutathione, Survival rate, Proteting effect

Effect of glutathione on irradiated mice was examined.

DD strain female mice, exposed to X-irradiation, given a dose of 600 rads in a single exposure were injected with glutathione subcutaneously 20–30 min after irradiation and injected daily during a period of 7 days after irradiation.

Two separate studies were carried out according to the dose of administration, 100–5,000 mg/kg of glutathione in the first experiment and 2.5–40.0 mg/kg in the second experiment. No appereciable effect of glutathione was observed in the first experiment. On the other hand, injection of 40.0 mg/kg of glutathione daily for 7 days after irradiation significantly raised the survival rate and prolonged the mean survival days of irradiated mice, compared with the irradiated and unmedicated mice ($P<0.05$). Results of these experiments suggest that this proctecting effect depends on the dose of glutathione administered.

I. はじめに

照射動物の死亡率が種々の薬物により影響をうけることはよく知られているが，その影響を投与薬物量から検討した報告は少ない．

著者は現在まで致死線量の放射線を照射したマウスに薬物を投与し，その効果を投与薬物量との関係から検討して来たが[7)8)9)]，今回 glutathione の回復効果について検討したので報告する．

放射線障害に対する防護という概念には防禦と回復の両方の概念を同時に含んで使用されている．

本論文では動物に致死線量の放射線を照射し，薬物を照射前に投与して死亡率を減らすのに有効であればそれを防護剤，照射後に投与して有効であれば回復剤と定義して用いることにした[24)]．

動物は放射線障害に対して自然の回復力を持つているが，ここではこれ以上の効果を示す場合に回復効果があるとした．

化学的物質でその構造式内にーSH基を有するAETや cysteine などが放射線障害に対して防護効果を有することは知られているが[5)21)18)], glutathione も1950年 Chapman[2)] らにより同様な効果のあることが報告され，以後これについての細胞レベルあるいは個体レベルでの多数の報告がなされている[1),3),25)]．これらの報告で還元型 glutathione（以下GSHと略）は照射前に投与して防護効果があることが知られているが，GSHには代謝の面から回復効果のある可能性が考えられる．永田[20)]らや松岡[19)]らの報告でも動物実験で回復効果のあることが示唆されている．しかしGSHを照射後に投与して回復効果を検討した報告は少ない．またGSHを照射後連続投与して回復効果を詳細に論じた報告はまだ見当らない．

著者はGSHの回復効果を知るため，致死線量の放射線を照射したマウスに照射後GSHを連続投与し，その効果を生存率と生存日数とを指標として検討した．また投与薬物量と関連づけて回復効果の有無を検討するため，投与薬物量を種々の段階にかえて実験を行なつた．

II. 実験方法

実験はGSHの投与量の違いにより実験Ⅰと実験Ⅱとに分けて行つた．

実験動物

dd 系雌マウス，体重20g前後，照射時6週令のものを用い，これら140匹を，1群10匹ずつ実験Ⅰは8群，実験Ⅱは6群に無作為に分けた．

マウスはマウスゲージ内で1週間飼育し，順調な発育を確認したのち実験に供した．飼育は鹿児島大学医学部医動物学教室の飼育室で行ない，飼料は固型飼料（オリエンタル酵母工業，MF）を用い，水と共に常時与えた．

照射方法

6 MeV リニアックX線で 600rads（線量率 200 R/分）全身1回照射を行なつた．照射時には build up を考慮してマウスの背部に15mmのアクリル板を置き，背部で 600rads 照射という条件にし

Table 1. Survival Time of Mice treated with Glutathione given Subcutaneously after a Whole-Body Single X-Irradiation

Group of No.*	Dose of Irradiation (rads)	Dose of Glutathione (mg/kg in of solvent 0.1ml)	Survival Rate after 30 Days (per cent)	Average Survival Days**
1st Experiment				
1	600	(—)	0	12.1 ± 4.2
2	600	100	0	15.7 ± 5.8
3	600	200	10	16.0 ± 1.4
4	600	1,000	0	12.9 ± 1.2
5	600	2,000	0	11.7 ± 1.6
6	600	5,000	0	8.0 ± 1.3
7	(—)	100	90	27.5 ± 7.9
8	(—)	5,000	100	30.0
2nd Expdriment				
9	600	(—)	20	14.7 ± 8.8
10	600	2.5	30	16.6 ± 10.6
11	600	5.0	50	19.2 ± 11.5
12	600	10.0	20	14.4 ± 8.7
13	600	20.0	60	21.1 ± 11.5
14	600	40.0	90***	29.5 ± 1.6***

* : 10 mice were used per group
** : Mean ± standard deviation
*** : Statiscally significant from control ($P<0.05$)
Glutathione was injected daily for 7 days after irradiation.

た．

投与薬物

ＧＳＨはタチオン注射液（山之内製薬株式会社）を使用し，これを表にしめすＧＳＨの投与量が 0.1ml 中に含有されるように添加の溶解液で調整した（表１）．

実験群

実験Ⅰ

第１群は対照として無処置のまま照射のみ行なつた（対照群）．

第２群～第６群：照射後20—30分に各濃度のＧＳＨ 0.1ml をマウスの背部皮下に投与し，以後は同一時間に同様に毎日１回，７日間連続投与した（薬物投与群）．

第７，第８群：照射は行なわずＧＳＨ投与の影響を検討した．表１にしめすＧＳＨの量を照射群と同様に背部皮下に７日間連続投与した（非照射群）．

実験Ⅱ

第９群：対照群

第10群～第14群（薬物投与群）：実験Ⅰと同様に，照射後各濃度のＧＳＨ 0.1ml を背部皮下に７日間連続投与した．

以上の各群について，30日間毎日一定時間に生存率と体重の変化について観察を行なつた．

III. 実験結果

a．30日生存率

実験Ⅰ

対照群は19日目に全数死亡した．50％生存日は13日と14日の間であつた．

薬物投与群では第３群（200mg/kg）が10％でもつとも良く，他の群はすべて０％であつた．

非照射群では第７群（100mg/kg）が90％，第８群（5,000mg/kg）が 100％であつた．

実験Ⅱ

対照群の30日生存率は20％で，50％生存日は12日であつた．

薬物投与群では第14群が90％，次いで第13群が60％であつた．他の群はこれ以下であつた．

これら実験Ⅰ及びⅡ群の30日間生存曲線を図１

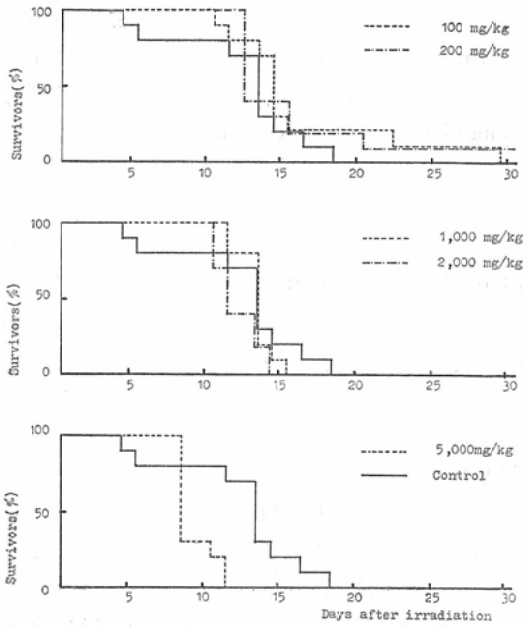

Fig. 1. First Experiment. Effect of the dose of glutathione on mice whole-body X-irradiated with 600 rads (10 mice were used per group)

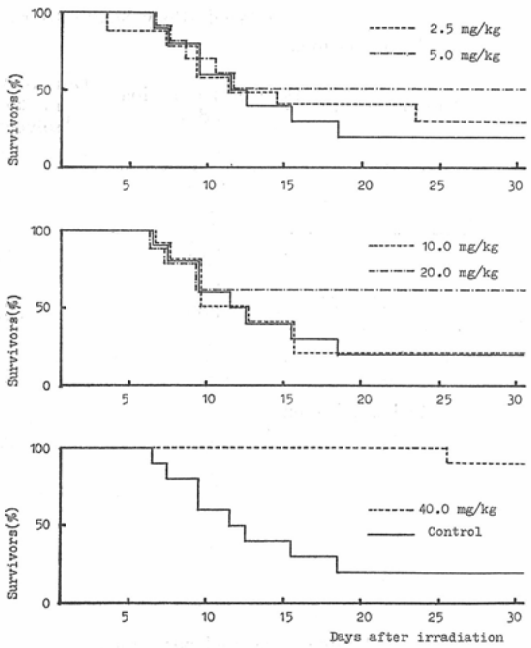

Fig. 2. Second Experiment. Effect of the dose of glutathione on mice whole-body X-irradiated with 600rads (10 mice were used per group)

及び2にしめす.

b．平均生存日数

実験Ⅰ

対照群は12.4± 4.1日であつた（平均値±標準偏差).

薬物投与群では第3群が16.0± 1.4日でもつとも長かつた.

非照射群では第7群が27.5± 7.9日及び第8群が30日であつた.

実験Ⅱ

対照群が14.7± 8.8日であつた.

薬物投与群では第14群が29.5± 1.6日でもつとも長かつた.

効果判定

生存率の検定は Fisher の直接確率法を用い，生存日数はこれが正規分布及び等分散性をしめさないことより，non parametric な手法である Kruskal Wallis のH検定を用いた．これで各群間の有意差が認められた場合は，Dunnett の方法で対照群と各群間との比較を行なつた[23].

結果は，実験Ⅰでは30日生存率及び平均生存日数とも対照群との間に有意差は認められなかつた（$P>0.05$).そして，第6群の生存日数は対照群より有意差をもつて劣るという結果が得られた（$P<0.05$).

実験Ⅱでは，第14群の生存率及び生存日数が対照群との間に有意差をもつて向上及び延長が認められた．（$P>0.05$）

c．体重

実験Ⅰ，Ⅱとも照射群は対照群をも含めてすべて照射前の値には回復しなかつた.

非照射群は両群とも照射前の値より増加をしめした.

Ⅳ. 考　案

放射線障害に対するＧＳＨの効果について，現在までの個体レベルでの検討では主として防護効果で論じられており，回復効果について論じたものは少ない.

今回のＧＳＨの回復効果を検討するにあたり，投与薬物量として現在まで防護効果で検討されている範囲の量（実験Ⅰ）と，次いでほとんどその検討がなされていない40mg/kg以下の量（実験Ⅱ）をとつた．そして投与薬物量と回復効果との関係を検討した.

結果は実験Ⅰでは有効性は認められず，5,000 mg/kgの投与では生存率及び生存日数とも対照群より劣り，投与量が増すにつれて効果は低下する傾向がみられた．この量は急性毒性にほぼ近い量である（急性毒性は表2にしめす[22)31)]）．すなわち，照射後ＧＳＨの大量連続投与では回復効果はみられなかつた．非照射マウスではこの投与量で特別な影響は認められなかつたことより，照射マウスの耐薬性の低下によるものと考えられた.

Table 2. Acute Toxity (LD_{50}) of Glutathione

Reporter	Route of Administration	Dose (mg/kg)
Yasukochi[31)]	i.p.	over 6,400
Sakamoto[22)]	s.c., p.o.	over 5,000
	i.p.	4,020
	i.v.	2,530

実験Ⅱでは40mg/kg投与で対照との間に生存率及び生存日数で有意差をもつて有効性がみられた．この量は防護効果を示すと報告されている諸家の1回投与量よりはるかに少量であつた.

以上のことより，ＧＳＨは照射後連続投与で投与薬物量が適当であれば回復効果を示すといえる．この場合の薬物量を至適薬物量とすると，600rads全身1回照射したマウスに対し，ＧＳＨの連続投与で回復効果を示す量は40mg/kgであつた.

放射線照射後ＧＳＨ1回投与の報告について検討してみると，川瀬は[14)]マウスに全身 200kVp X線 600R 1回照射し，その直後にＧＳＨ10mg/kg及び100mg/kgの静注を行ない，その生存率を検討しているが効果は認められていない．堀内ら[11)]はラットの眼に200kVp X線 1,500Rを1回照射し，水晶体重量の変化，白内障発生率及びその他に及ぼすＧＳＨの効果を検討しているが，照射後30分3,000mg/kg腹腔内投与で効果は認められていな

い．一方松岡ら[19]はマウスに全身160kVp X線800R 1回照射後，10分以内にGSH 1,500mg/kgを腹腔内に投与し生存率を検討しているが，30日生存率は対照群の0％に対し，GSH投与群は45％と向上し，50％生存日数は対照群の10日に対し22日と延長が認められている．

分割照射での検討では永田[20]らや川崎[13]らの報告がある．永田らはマウスに ^{60}CO γ線 365Rを週1回照射し，照射前GSH 1,250mg/kg腹腔内1回投与群と，照射前1回，照射後3日及び5日目に同量のGSHを投与した群とについて無処置の対照群と生存日数で比較している．結果はGSH投与の2群は対照群との間に有意の差がみられたが，GSH投与の2群間には有意差は認められなかつたと報告している．川崎らはマウスに 200kVp X線 600R 2分割照射（1回 300R）を行ない，GSH 1,500mg/kgの照射前30分投与群，照射前3時間投与群，照射前6時間投与群と，照射後30分投与群，照射後3時間投与群，照射後6時間投与群及び照射後24時間投与群とで平均生存日数での検討を行なつている．その結果，照射前30分投与群と照射前3時間投与群が有効であり，照射後投与群では効果は認められなかつたと報告している．しかしながらその報告を詳細にみると，対照群の平均生存日数の18.4± 2.4に対し，30分前投与群は28.0± 2.6日で，30分後投与群は22.7± 1.5日で，照射後投与群でも延長がみられている．

以上の松岡ら，永田ら及び川崎らの成績では照射後投与でも有効であることが示唆され，さらに永田らや松岡らは回復効果に及ぼす影響について検討の余地があることを述べている．

GSHの防護効果に関しては照射前30分以内，しかも照射直前に投与する方が効果は大であると報告されている[31]．これらの報告で検討されている投与量は10—4,000mg/kgの間であるが，主として400mg/kg以上である．これらの報告での共通点は，同一報告者の場合は照射量が同じであれば，その防護効果は投与量が多くなるほど大になるという点である[29]．しかし報告者別にみると投与量と効果との間には一定の傾向はみられず，これら実験結果の差は実験条件が各々により異なることによると考えざるを得ない．

これらの報告で今一つ問題にしたいのはGSHの代謝面からの検討がほとんどなされていないことである．すなわち，GSH投与後の生体内の分布について Cronkite ら[4]は犬，マウス及びラットへのGSH投与による血中クリアランス，全身からの消失及び組織への分布を検討している．この報告によると犬に静注した時の血中クリアランスは早くて30分以内であり，マウスに皮下投与（5,000mg/kg）時のGSHの全身からの消失は3時間以上であるとし，組織内分布ではマウスに5,000mg/kg皮下投与後45分の血中の値は，対照の1.13倍であり，ラットのそれは30分後で1.17倍及び小腸では同量としている．

一方 ^{35}S-GSH を用いての高橋の[27]臓器内濃度の検討では，400μg 静注時で胃粘膜及び腸粘膜と筋層とは投与6時間後まで最高の活性をしめすと報告されている．また同様に ^{35}S-GSH の体内分布を検討した塩原ら[26]の報告では，消化管の濃度は投与後5時間まで持続しているとされている．

GSHの half life は，^{35}S-GSH を用いた検討でラットの小腸で3時間以内とされている[12]．

以上消化管での代謝について主として述べたが，これらの報告より照射前30分以内に投与されたGSHが照射直後にただちに消失するとは考えられない．今回の実験でGSHに回復効果があると思われるので，現在までの報告は防護効果のみでなく，一部回復効果をも含めて検討されていると考えられる．

今回の 600rads 全身1回照射は，一般的にマウスの造血器死の指標とされている $LD_{50/30}$ の線量よりその致死効果は大であり，本実験でのマウスの死因は造血器死と消化管死との混合であると思われる．

造血器系に対するGSHの作用について Cronkite ら[3]はマウスに照射前に10％GSH溶液を4,000mg/kg皮下投与し，X線で 750R又は 820R全身1回照射を行ない，対照と比べて組織学的

な検索では放射線による組織破壊に差は認められなかつたが，造血臓器の再生率には明らかな差が認められたと報告している．但し照射後投与については検討してない．

また，放射線障害とやや異なるが，制癌剤による造血器障害に対して筒井[28]は，Nitromin を3日間連続投与した骨髄障害家兎に，直ちにＧＳＨ50mg/kgを静脈内に10日間連続投与し，これと非投与群とで，白血球像と骨髄組織所見とについて検討している．結果は白血球，とくに好中球の増生にＧＳＨは促進的に作用し，リンパ球にはさほど影響は与えないとしている．骨髄組織所見ではＧＳＨ投与群の正常像への回復度は著明であつたと報告している．

放射線照射後のＧＳＨ量の変化について北村は[16]，血液グルタチオンの減少度は照射線量に比例して大になり，かつ減少の割合は肝臓及び筋肉グルタチオンの減少より大である報告し，これは造血組織へのＸ線による影響や組織再生に要するＳＨの供給源として血液グルタチオンの消費が関与しているのではないかと述べ，また照射後７日目でもＧＳＨの減少がみられると報告している．

以上の報告を参考にするとＧＳＨは造血臓器の障害に対して回復的に作用し，かつ，照射後の組織・臓器の回復に関与する点では連続投与は意義があると思われる．

消化管系に対するＧＳＨの作用はワッエック[30]らはマウスに 900ＲＸ線で全身照射し，照射前15分にＧＳＨ50mg/kgを腹腔内に投与し，３日目の腸乾燥重量を対照と比較しＧＳＨが腸管を防護する作用があると報告している．照射ラットの小腸重量について Kay ら[15]は，小腸重量と粘膜内蛋白量及びＤＮＡ量は平行関係にあると報告している．

その他ＧＳＨの作用は多岐にわたつているので一元的には論じ難いが，まず酵素系からみるとこれの放射線感受性は高く，また多くの酵素はＳＨ基をその活性維持に必要としているので，これが照射により酸化されると酵素活性は失われるが，ＧＳＨの投与でその全活性が回復することが知られている[6]．

ＧＳＨの生体内での作用は酸化還元反応への関与，抱合反応への関与，補酵素作用及び蛋白・酵素の保護作用などがあるとされている[10]．

今回これら造血器系，腸管系及び代謝系へのＧＳＨの作用が互に組合されて発揮され，その投与量が至適であれば，結果として回復効果がみられたと思われる．

ＧＳＨの体重の経時的変動に及ぼす影響については，照射による体重減少を抑制するとの報告があるが[17]，今回の実験ではこの効果は認められなかつた．

（本文中の投与量は比較検討のためmg/kgに換算した）．

V. 結　論

dd 系雌マウス（体重20ｇ前後，照射時６週令）に６MeV リニアックＸ線で 600rads 全身１回照射を行ない，照射後ＧＳＨを７日間連続皮下投与した．そして30日観察による生存率及び生存日数を指標としてその効果を推計学的に検討した．

ＧＳＨを 100，200，1,000，2,000及び 5,000 mg/kg投与の検討では回復効果は認められず，逆に 5,000mg/kg投与群の成績は対照より劣つた（$P<0.05$）．

ＧＳＨの投与量を 2.5，5.0，10.0，20.0及び40.0mg/kgとし，これを同様に投与した群では40.0mg/kg投与群で対照との間に生存率及び生存日数で有意の差で効果が認められた（$P<0.05$）．

この結果ＧＳＨは照射後連続投与で回復効果を有し，この回復効果には至適投与量のあることが推察された．

非照射マウスへの 5,000mg/kg投与は特別な影響は認められなかつた．

照射マウスの体重については，回復的には作用しなかつた．

（稿を終るにあたり鹿児島市立病院放射線科上川路睦博部長の指導ならびに校閲に対して感謝する．

実験動物の飼育管理について鹿児島大学医学部医動物学教室に謝意を表する．

薬剤の提供など山之内製薬株式会社の協力に感謝す

る.

本論文の要旨は第79回日本医学放射線学会九州地方会で報告した).

参考文献

1) Cividalli, G.: Radiation Res. 20 (1963,) 564—576.
2) Chapman, W.H. and Cronkite, E.P.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 75 (1950), 318—322.
3) Cronkite, E.P., Brecher, G. and Chapman, W.H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76 (1951), 396—398.
4) Cronkite, E.P., Chapman, W.H. and Brecher, G.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76 (1951), 456—459.
5) Eker, P. and Pihl, A.: Radiation Res. 21 (1964), 165—179.
6) Harper, H.A. (三浦義監訳)：ハーパー生化学. (1974), P. 139, 丸善株式会社 (東京).
7) 服部行麗：日本医放会誌, 31：1971, 17—24.
8) 服部行麗, 上川路睦博：血液と脈管, 6：1975, 145—148.
9) 服部行麗：臨床と研究, 52：1975, 2482—2487.
10) 平井秀松, 坂元幸哉編：Glutathione in Medicine (1972), 1—24, 診断と治療社 (東京).
11) 堀内淳一, 金子勝一：日本医放会誌, 27：1967, 265—271.
12) Jocelyn, P.C.: Biochemistry of the SH group (1972), p. 177 Academic Press (London and New York)
13) 川崎祥二, 桜井孝：日本医放会誌, 33：1973, 689—692.
14) 川瀬悦郎：岡山医会誌, 79：1967, 417—424.
15) Kay, R.E. and Entenman, C.: Amer. J. Physiol. 197 (1959), 13—18.
16) 北村　裕：日本医放会誌, 19：1960, 2606—2638.
17) 小松　茂：慈恵医誌, 76：1961, 2381—2407,
18) Maisin, J.R.: Nature. 204 (1964), 196—197.
19) 松岡昭治, 戸田　宏, 杉山丈夫：診療と新薬, 8：1971, 2013—2015.
20) 永田弘治, 西田寿男, 菅原　努, 田中富蔵：日本医放会誌, 26：1966, 975—978.
21) Patt, H.M., Tyree, E.B., Straube, R.L. and Smith, D.E.: Science. 110 (1949), 213—214.
22) 坂本浩二：バナロン文献集, 1970, 1—23 (大日本製薬株式会社).
23) 佐久間昭著：生物検定法 (1973), P, 40, P. 236, 東京大学出版会 (東京).
24) 菅原　努, 山田正篤, 江上信雄, 堀川正克編集：放射線細胞生物学 (1968), 232—233, 朝倉書店 (東京).
25) Shapiro, B., Kollmann, G. and Asnen, J.: Radiation Res. 27 (1966), 139—158.
26) 塩原有一, 岡崎雅彦, 佐々木弘一：Glutathione in Medicine (1972), 93—105, 診断と治療社 (東京).
27) 高橋忠男, 佐藤善重：Radioisotopes. 17, 1968, 9—16.
28) 筒井博雄：診療, 23：1970, 2119—2122.
29) 浦野宗保, 田中紀己, 衛藤忠敏：日本医放会誌, 32：1972, 234—236.
30) ワッエック. A., 菅原　努, 上野陽里：日本医放会誌, 27：1967, 1088—1092.
31) 安河内浩, 飯野　祐, 渡辺哲敏：日本医放会誌, 27：1967, 691—696.