



Title	照射による実験腫瘍内のラジカル測定-ESRを用いたマウス内アスコルビン酸ラジカル生成の検出-
Author(s)	磯田, 裕義; 赤木, 清; 長谷川, 武夫 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1995, 55(11), p. 769-773
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/18613
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

照射による実験腫瘍内のラジカル測定 —ESRを用いたマウス内アスコルビン酸ラジカル生成の検出—

磯田 裕義¹⁾ 赤木 清¹⁾ 長谷川武夫²⁾
田中 敬正¹⁾ 酒多 茂³⁾ 池田 正人³⁾

1) 関西医科大学放射線科学教室 2) 鈴鹿医療技術大学
3) 塩野義製薬研究所神崎川分室

Measurement of Radical in Irradiated Experimental Tumor : Direct Detection of Ascorbate Radical in Mice Using ESR

Hiroyoshi Isoda¹⁾, Kiyoshi Akagi¹⁾, Takeo Hasegawa²⁾,
Yoshimasa Tanaka¹⁾, Shigeru Sakata³⁾ and Masato Ikeda³⁾

We measured ascorbate radical (AR) produced by the reaction of ascorbic acid (Asc) with hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) or superoxide (O_2^-) after irradiation in normal muscle and SCC-VII tumor of C3H/He mice. AR can be measured using electron spin resonance (ESR) equipment and the dialysis method. The tube for collecting AR was inserted such that the dialysis membrane was in contact with the normal thigh or the center of the tumor lesion. The AR in the interstitial fluid around the membrane was collected through the dialysis membrane. After irradiation with 10 Gy, AR increased in both the normal muscle and tumor tissue; the percent increase was 53.1% for normal muscle tissue and 33.8% for tumor tissue. The maximum percent increases in AR in the normal muscle and the tumor tissue were 11.7 and 9.5% for 2.5 Gy, 28.5 and 18.5% for 5 Gy, 53.1 and 33.8% for 10 Gy, and 88.5 and 44.8% for 15 Gy, respectively. The amount of AR increased to maximums of 144.3% and 160.1% after treatment with H_2O_2 and FeCl_2 , respectively, while it decreased to minimums of 65.3% and 81.3% after treatment with superoxide dismutase (SOD) and catalase, respectively. These results suggest that the amount of $\cdot\text{OH}$ and O_2^- is reflected in the amount of AR production. This method is useful for the following reasons. First, no special treatment, such as freezing of the samples, and no administration of noxious agents are necessary. Second, irradiation using a dose of only several Gy shows an increase in the production of AR. Third, this method is less invasive. In this method, it is possible to estimate the amount of $\cdot\text{OH}$ and O_2^- produced by irradiation.

Research Code No. : 401.1

Key words : Ascorbate radical, Irradiation, ESR

Received Mar. 1, 1994; revision accepted Sep. 21, 1994

- 1) Department of Radiology, Kansai Medical University
2) The Suzuka University of Medical Science and Technology
3) Kanzakigawa Laboratory, Shionogi Research Laboratories,
Shionogi and Co., Ltd.

緒 言

放射線照射により生体内に生じる $\cdot\text{OH}$, O_2^- , 水和電子等のfree radicalの多くは反応性が高く, 10^{-12} – 10^{-6} 秒と短寿命である。そのため直接的な測定は困難であった。従来は, methionine等の物質とラジカルとの反応により生じた ethylene等の生成物を測定する方法^{1), 2)}, 試料を凍結乾燥し, 分子の運動を阻止して, ラジカルの存在寿命を長くして測定する方法^{3), 4)}, スピントラップ剤を用いて, 捕捉した安定なラジカルを測定する方法等で, 生成したfree radical量を測定する方法が報告してきた⁵⁾⁻⁷⁾。しかし, 生体組織内での測定は, 生化学的方法では, radicalを検出するには数 KGyが必要であり, methionineによる方法は, $\cdot\text{OH}$ だけではなく, 種々の有機ペルオキシラジカルにより酸化されて ethyleneを生じる等, 特異性が低い⁸⁾ため測定精度に問題があり, 未だ生体内のradical測定法が確立していないのが現状である。

そこでわれわれは元来生体内に存在するアスコルビン酸(Asc)を用いて, 照射後生体内に生ずる $\cdot\text{OH}$ や O_2^- と反応し生じたアスコルビン酸ラジカル(AR)を測定することを試みた。このARは血清中では室温でも電子スピン共鳴装置(Electron Spin Resonance: 以下ESR)で測定可能であり, 凍結状態では一週間安定であると報告されている⁹⁾。反応性の高いfree radicalが組織内のアスコルビン酸と反応した結果, 2次的に生成されたARを収集し, ESRで測定することで照射後生じたradical生成量が測定できる。この方法を用いて照射後の正常筋組織および腫瘍組織でのAR生成量の差異, 照射後のAR生成量の経時的変化および照射線量によるAR生成量の差異について検討した。またARによるradical測定が, 照射により生じたradicalであることを証明するため, ラジカル反応を制御する薬剤である H_2O_2 , FeCl_2 , superoxide dismutase(以下SOD), catalaseを用いてAR生成量の増減についても検討した。

実験材料および方法

1. 実験動物および腫瘍

実験腫瘍は、C3H/Heマウス(雄 6 週齢: 静岡実験動物(株))に移植可能なSCC-VIIを用いた。SCC-VII腫瘍は扁平上皮癌由来のもので皮下移植で継代されている。SCC-VII腫瘍は腫瘍塊を継代動物より切除し、リン酸緩衝液(PBS)内で細切して単一浮遊細胞化する。この腫瘍細胞濃度を $5-8 \times 10^5$ 個/0.05mlに調整し、それをマウス右大腿部皮下に0.05ml注入移植した。実験には腫瘍径が8±1mmに成長したもの用いた。

2. 放射線照射方法

$^{60}\text{Co}\gamma$ 線を使用し、SSDは55cmで、2.5-15Gyを線量率1.6Gy/minにて照射した。正常筋組織および腫瘍部には照射野 $2 \times 2\text{cm}$ での局所照射を行った。

3. AR捕集方法

Fig.1にラジカルの測定法を示す。透析膜(長さ6mm、内径0.2mm)の両端にチューブ(外径0.15mm、内径0.075mm)を接続した1本の透析チューブを作製し、透析膜の部分をマウスの健常大腿部および大腿に移植した実験腫瘍部の照射部位の中央に刺入した。リンゲル液(K^+ 4mM, Na^+ 147mM, Ca^{++} 3.1mM, Cl^- 157.2mM)を窒素ガスにより置換し、脱酸素化する。このリンゲル液でチューブ内を $1\mu\text{l}/\text{min}$ の流量で灌流し、透析膜を介してその周囲の組織に存在する間質液中のARをチューブ内に収集する。灌流液を15分間、計 $15\mu\text{l}$ を毛細管に捕集した。このARの捕集は室温下で行った。また、照射時およびサンプル収集間、マウスは固定器具にて四肢を固定し、無麻酔下にて行った。

4. ESR装置およびAR量の測定方法

ESR装置は日本電子社製(JES-RE1X)を使用した。測定条件はx band 9.5GHZ, microwave power = 20mW, Modulation Width = 0.1mTを行った。ARのg値は2.0054, hfcは1.70 gaussである⁹⁾。ARの信号強度を比較する際にはマンガン

(Mn)マーカーを基準とした。

5. AR量の測定

チューブ刺入設置後1時間よりARの収集を開始した。本測定法を用いて以下の項目について検討した。

(1)正常組織および腫瘍組織でのARの生成量の差異について

正常組織として腫瘍移植部位の反対側の健常大腿部を用いた。腫瘍組織部は腫瘍径8mmの中心部、皮下3-4mmの部位で測定した。

(2)照射線量によるARの生成量および生成量の経時的变化について

ARの収集はチューブ刺入、設置後、15分ごとに行った。照射前3回、45分間を非照射の対照群とし、次に2.5, 5, 10, 15Gyを照射し、照射中(1回)および照射後15分ごとに計6回、90分、ARを収集した。

(3) ·OH, O_2^- 量を増減させる薬剤である H_2O_2 , FeCl_2 , SOD, catalase投与によるARの生成量の変化について

Fig.2に今回の実験に関連のある活性酸素種とAscとの反応および活性酸素種自身の生成、消失の反応系を示す。照射等により生成された ·OH, O_2^- は水素引き抜き反応、二重結合、芳香核への付加反応、電子移動反応等の多くのラジカル反応を起こす。ARはAscとの電子移動反応により生じる^{10), 11)}。 H_2O_2 , FeCl_2 を加えると、Fenton反応が進み ·OH生成が増加する¹²⁾のに対し、SODを加えると、 O_2^- の不均化反応により O_2^- は減少し、catalaseを加えると、ペルオキダーゼ反応等のため H_2O_2 は減少し結果的に ·OH生成は減少すると考えられる。

対照群として、薬剤処理前に15分ごとに3回、45分間ARを収集する。その後 ·OHを増加させる薬剤として H_2O_2 (0.3%, 10 μl), FeCl_2 (2mM, 10 μl)を、 ·OH, O_2^- を減少させる薬剤としてSOD(350unit), catalase(450unit)をそれぞれ

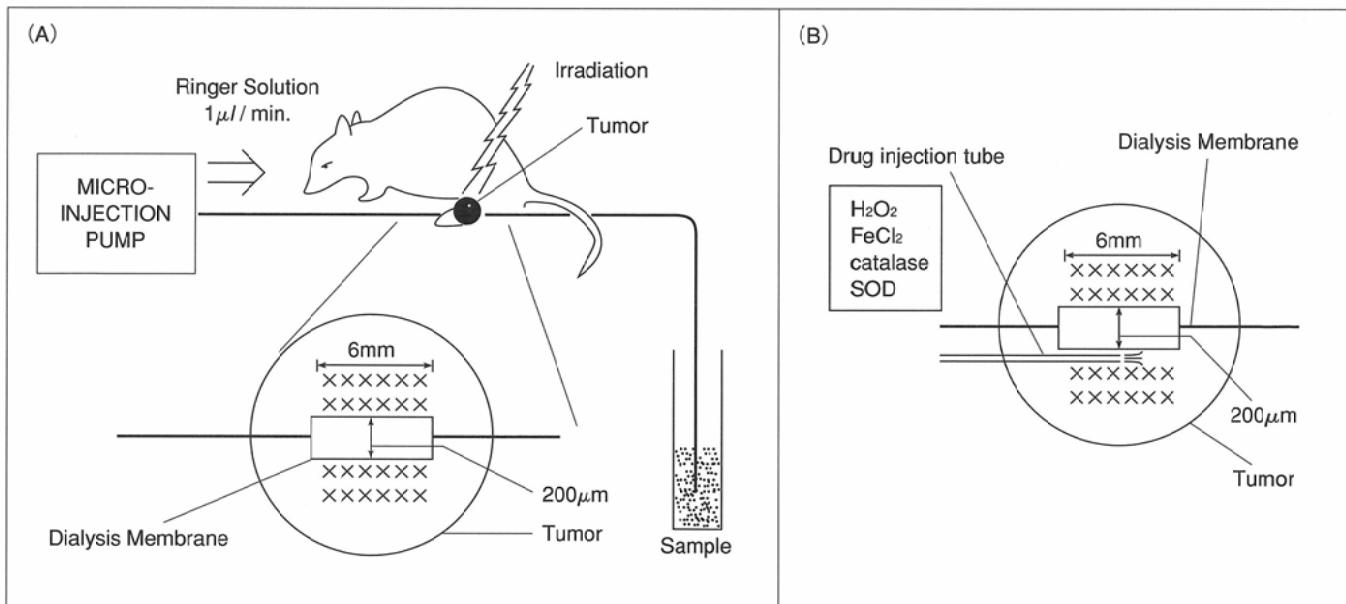


Fig.1(A) A Scheme of Method for Collection of AR

Fig.1(B) A Scheme of Method for Infusing of Agents (H_2O_2 0.3%, 10 μl ; FeCl_2 2mM, 10 μl ; SOD 350 unit; catalase 450 unit)

もう 1 本のチューブより $10\mu\text{l}/\text{min}$ にて局所に注入し (Fig.1 (B)), 注入直後より 15 分ごとに 6 回, 90 分間 AR を収集した。

結 果

(1) 10Gy 照射前後の正常筋組織および腫瘍組織内の AR 生成量の変化について

Fig.3 は正常筋組織および腫瘍組織での、 10Gy 照射前後の AR 生成量の経時的变化を示す。照射前 3 回の AR 量の平均値を 100% とした比率で表示した。10Gy 照射後、正常筋組織、腫瘍部ともに AR 生成量は増加し、その増加率は正常筋組織では 53.1% の、腫瘍部では 33.8% の増大を認めた。照射後の経時的变化では AR 量が最大値を示すのは両方とも照射後 45-60 分であった。

(2) 照射線量と AR 生成量との関連について

Fig.4 は照射前の対照群の AR 量を 100% とし、2.5, 5, 10, 15Gy の線量での AR 量の増加率を示す。各線量照射後、増加率の最も大きかった測定値の AR 量(%)で示している。正常筋組織、腫瘍部とともに、線量の増加に伴って AR 量は増加し、正常筋組織、腫瘍組織での AR 量の最大増加率は、2.5Gy ではそれぞれ 11.7, 9.7%, 5Gy では 28.5, 18.5%, 10Gy では 53.1, 33.8%, 15Gy では 88.5, 44.8% と各線量いずれも正常筋組織での増加率の方が大きかった。

(3) $\cdot\text{OH}$, O_2^- 量と AR 生成量との関連について

Fig.5 は透析膜近傍に、 H_2O_2 , FeCl_2 , SOD, catalase を処理したときの正常筋組織の AR 量の経時的变化を示す。AR 量は H_2O_2 , FeCl_2 处理後、最大 144.3%, 160.1% に増加したのに対し、SOD, catalase 負荷後はそれぞれ 65.3%, 81.9% にまで減少を認めた。また AR 量の増加、減少の最大または最小値は薬剤処理後 30-45 分であった。

考 察

X 線、 γ 線のような電離密度の低い放射線による細胞障害の主因は照射直後に細胞内に生じる free radical が細胞核のデオキシリボ核酸(DNA) に切断、架橋等の修復不能な損傷を引き起こす間接作用による細胞死であり¹³⁾⁻¹⁵⁾、この障害に直接係わる free radical として $\cdot\text{OH}$ や O_2^- が報告されている¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。これらを生体組織内で測定できれば、放射線照射から細胞障害に至る過程を生化学的に解明する上で極めて重要である。従来より、主に生化学的に *in vitro* で ESR を用いた直接的な方法で $\cdot\text{OH}$, O_2^- の測定が行われてきた。そして、照射により生じる $\cdot\text{OH}$ や O_2^- はその高い反応性を有し、細胞中では、 $\cdot\text{OH}$ は拡散律速($10^9\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$)に等しい反応性をもち、生じた場所ですぐ生体物質と反応して消去するので、直接検出るのは困難であった。特に生体内では、 O_2^- の不均化反応を著しく促進する SOD も存在するため、生体内で

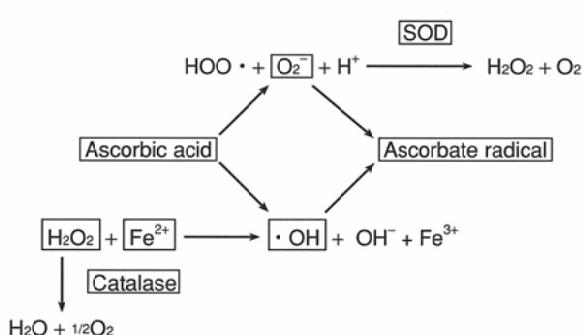


Fig.2 Correlation Table between Asc, AR and Active Oxygen Species

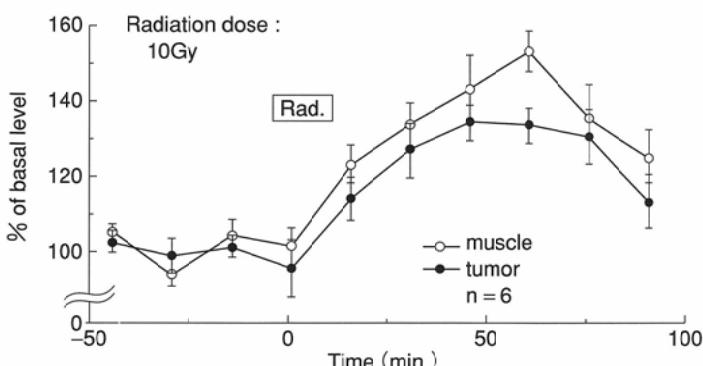


Fig.3 Change in the amount of AR production before and after irradiation (10 Gy) in muscle (open circle) and tumor tissue (closed circle). Each bar represents the mean of six independent experiments \pm SE

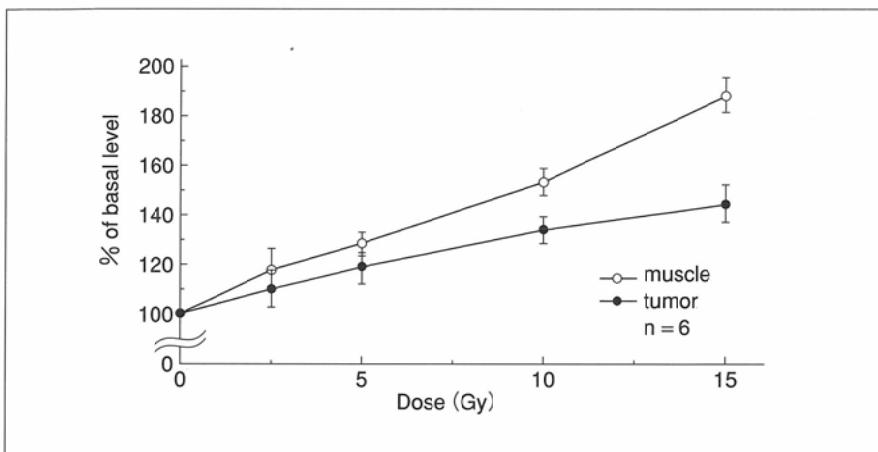


Fig.4 Relationship between radiation dose and AR production after irradiation in muscle (open circle) and tumor tissue (closed circle). Each bar represents the mean of six independent experiments \pm SE

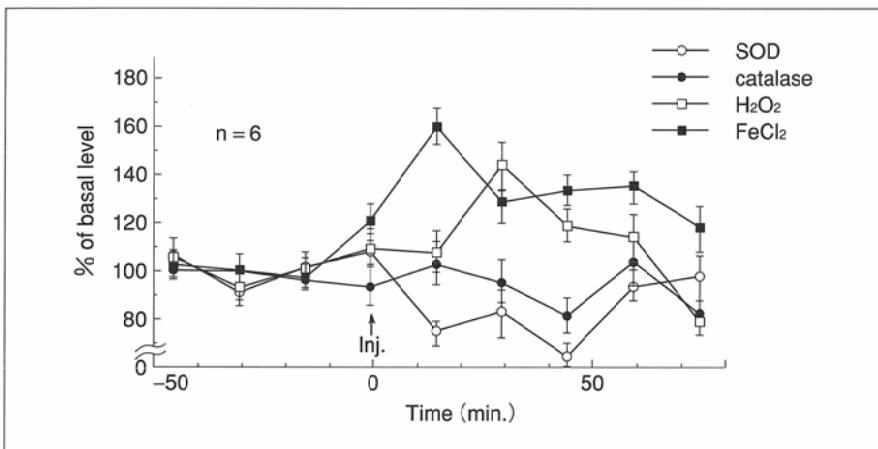


Fig.5 Change in the amount of AR production before and after treatment with SOD (open circle), catalase (closed circle), H₂O₂ (open square) and FeCl₂ (closed square) in muscle tissue. Each bar represents the mean of six independent experiments \pm SE

の・OHやO₂⁻を直接検出することは不可能であった。

そこで、反応性の高いfree radicalを、ある種のラジカル反応により生じた生成物として測定したり^{1), 2)}、free radicalが他の反応に移行する前に試料を凍結、凍結乾燥する^{3), 4)}か、スピントラップ法を用いる⁵⁾⁻⁷⁾ことで、安定なラジカルに変換することで、free radical量を推定する報告が数多い。

しかし、このスピントラップ法は、in vitroでは、現在最も信頼できる方法であるが、in vivoではこの方法を応用することは不可能である。

生体内で照射により生じたradicalを測定した報告は少なく、・OHやO₂⁻が、phenylalanine, methionine等の物質と反応した結果生じたo-Tyrosine(o-Tyr), ethyleneといった物質を生化学的方法で測定する報告^{1), 19)}や、照射直後に凍結、凍結乾燥した試料内の安定なラジカルを測定するという報告だけである。

Karamらは鳥の胸肉の細片を照射し、・OHとphenylalanineとの反応の結果生じたo-Tyrを、ガスクロマトグラフィーの一種であるselective ion monitoring (SIM) techniqueを用いて測定し、o-Tyrが照射線量に比例して増加したと報告している¹⁹⁾。しかしこの方法は細片を粉状にする手技や0.05-8.0Mradの大線量の照射が必要である。

Galeyらはmethionineが・OHと反応して生じたethyleneをガスクロマトグラフィーで定量することにより、・OHを測

定でき、非侵襲的なので人の皮膚でも応用できると報告している¹⁾。しかし、この方法では、ethyleneが、・OH以外のラジカルとmethionineとの反応からも生じる。したがってこのethyleneが照射単独のみにより生じたradicalであるとする特異性がない⁸⁾。

われわれの測定したAR生成量が照射線量と高い相関関係を認めたことは、AR量が照射により生じた生体内の・OH, O₂⁻の生成量を反映することを示唆した。

各線量において、腫瘍組織よりも正常筋組織で、照射後のAR量の増加が大きいことが認められた。この原因は、酸素濃度が高い状態では、細胞小器官、細胞さらに臓器におけるO₂⁻とH₂O₂の生成を促進するためと考える²⁰⁾⁻²²⁾。腫瘍組織よりも正常筋組織の方が酸素分圧が高いため、ラジカル生成が多いと考えられる。

われわれの実験で、H₂O₂, FeCl₂を加えるとAR量が増加し、SOD, catalaseを加えるとAR量が減少を示すことになり、・OH, O₂⁻の増減が、これらのradicalとAscとの反応により生じたARの量として反映できることが認められる。

照射により生じたfree radicalは反応性が高いため、周囲の物質と反応しすぐ消失する^{23), 24)}。したがってARの増加のピークも照射直後になると考えられるが、われわれの実験では、AR生成量の増加の最大値が照射後の45-60分と遅延を認めた。また、FeCl₂等の処理によるARの増減の最大値も投与

後30-45分と遅延を認めた。この生成量ピーク遅延の機序についての報告はなく、われわれは以下のように考えた。1) 間質液中のARが透析膜を介して毛細管に捕集されるまで時間を要するという実験手技に起因する。2) $\cdot\text{OH}$, O_2^- のような反応性の高いfree radicalは、ラジカル連鎖反応を開始させる。まず、これらの反応の中でいくつかの反応の生成物としてARが生じるものと考えられる。またARが生じる反応の途中で、中程度の寿命をもつラジカルが中間生成物として存在するため、最終の生成物であるARが生成されるまで時間を要すると考えている。

照射により生じたfree radicalの生体内測定についての従来の生化学的方法やESRを用いたラジカル測定法では以下のようないくつかの欠点がある。第1は照射直後に試料を凍結、凍結乾燥させる必要があり、侵襲性が高い。第2にradicalを検出するには高線量(数KGY)の照射を必要とする。今回われわれ

が用いた方法は以下の利点がある。第1に、測定したARは室温にて比較的安定なため、試料を凍結する等の処置が不要である。第2に、ARは $\cdot\text{OH}$, O_2^- と生体組織内に元来存在するAscとの反応により生じるため、生体に体外からの薬剤の投与の必要がない。第3に、数Gyの照射でもAR生成量の増加が見られ、放射線治療で用いられる線量での照射でも測定が可能である。第4に、腫瘍部に0.15mmの径の透析膜を刺入するだけで測定可能なので、侵襲も少ない等である。

本法を用いることで、照射により生じた $\cdot\text{OH}$, O_2^- の量を、生体内に元来存在するAscと反応し生じたAR量の増減から推測することが可能であった。また本法は、照射によるradical生成ばかりでなく、ストレス、炎症、radical生成を制御する酵素反応等のradical生成による生体内局所の $\cdot\text{OH}$, O_2^- の増減の測定への応用が期待できる。

文 献

- 1) Galey JB, Millecamp F, Nguyen QL : Ethylene formation from methionine as a method to evaluate oxygen free radical scavenging and metal inactivation by cosmetics. *Int J of Cosmetic Science* 13 : 65-78, 1991
- 2) Wolf B, Christa M, Manfred S : On the of Biochemically Generated Hydroxy Radicals. *Eur J Biochem* 95 : 621-627, 1979
- 3) Inanami O, Kuwabara M, Endoh D, et al : OH-induced free radicals in uridine studied by a method combining ESR, spin-trapping, and liquid chromatography. *Radiat Res* 108 : 1-11, 1986
- 4) Ward JF, Blakely WF, Joner EI : Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radicals from hydrogen peroxide. *Radiat Res* 103 : 383-392, 1985
- 5) Frederick PS, Edward MG : Spin trapping of radicals formed during radiolysis of aqueous solution. *Can J Chem Soc* 54 : 275-279, 1976
- 6) Edward GJ, Dale EN Jr., Edward R, et al : On spin trapping hydroxyl and hydroperoxyl radicals. *Can J Chem* 56 : 2237-2242, 1978
- 7) Huttermann J, Schaefer A : Heavy-ion-induced free radical formation in solid DNA-constituents. *Appl Radiat Isot* 40 : 915-921, 1989
- 8) William AP, Robert HT : Ethylene formation from methionine. *Biochem Biophys Res Com* 81 : 498-503, 1978
- 9) Sasaki R, Kurokawa T, Kubota S : Nature of serum ascorbate radical and its quantitative estimation. *Tohoku J exp Med* 136 : 113-119, 1982
- 10) Ricard CR : Ascorbic acid metabolism in protection against free radical. A radiation model. *Biochem Biophys Res Com* 169 : 430-436, 1990
- 11) Morimitsu N : Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochem Biophys Res Com* 53 : 463-468, 1975
- 12) Walling C : Fentons reagent revisited. *Acc Chem Res* 8 : 125-131, 1975
- 13) Johansen I, Howard-Flanders P : Macromolecular repair and free radical scavenging in the protection of bacteria against X-rays. *Radiat Res* 24 : 184-200, 1965
- 14) Billen D : DNA polymerase is crucial for the repair potentially lethal damage caused by the indirect effects of X irradiation in *Escherichia coli*. *Radiat Res* 103 : 163-169, 1985
- 15) Chapman JD, Gillespie CJ : Radiation-induced events and their time scales in mammalian cells. *Adv Radiat Res* 9 : 143-198, 1981
- 16) Gillies NE : Effects of radiations on cells. *Br Med J* 295 : 1390-1391, 1987
- 17) Barry H, Okezie IA : DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS* 09577 281 : 9-19, 1991
- 18) Hagen U : Biochemical aspects of radiation biology. *Experientia* 45 : 7-12, 1989
- 19) Karam LR, Simic MG : Mechanism of free radical chemistry and biochemistry of benzene. *Envir Health Perspectives* 82 : 37-41, 1989
- 20) Freeman BA, Crapo JD : Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem* 256 : 10986-10992, 1981
- 21) Turrens JF, Freeman BA, Levitt JG, et al : The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 217 : 401-410, 1982
- 22) Yusa T, Crapo JD, Freeman BA : Hyperoxia enhances lung and liver nuclear superoxide generation. *Biochem Biophys Acta* 798 : 167-174, 1984
- 23) Zs-Nagy I, Floyd RA : Hydroxyl free radical reactions with amino acids and proteins studied by electron spin resonance spectroscopy and spin trapping. *Biochem Biophys Acta* 790 : 238-250, 1984
- 24) Richter RW, Waddell WH : Mechanism of the oxidation of dopamine by the hydroxyl radical in aqueous solution. *J Am Chem Soc* 105 : 5434-5440, 1983