

Title	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)
Author(s)	川崎, 祥二; 桜井, 孝
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1973, 33(6), p. 535-540
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/18816
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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)

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 桜井 孝

(昭和48年4月12日受付)

Effects of Glutathione against Mitotic Delay induced by X-Irradiation in Ehrlich Ascites Tumor Cells (I).

Shoji Kawasaki and Ko Sakurai

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

(Director: Prof. Dr. Ko Sakurai)

Research Code No.: 408

Key Words: Radioprotection, Mitosis, Glutathione

The radioprotective action of GSH was studied at the cytological level using the mitotic index of Ehrlich ascites tumor cells. After irradiation with 100 and 200 rad, the rate of recovery of mitotic index in the group treated with 30 mg GSH was similar to that in the control group. But 12 hours after irradiation and on, the mitotic index increased more than the value of the control. With 400 and 600 rad, the recovery of the mitotic index was accelerated by the pretreatment with 30 mg GSH. Treatment with GSH alone induced a slight decrease in the mitotic index and later a marked increase at 9 to 12 hours. These data might suggest that the action of GSH is related with the cell cycle.

緒 言

S H化合物の放射線防護機構に関し、化学的生物学の見地から、多くの検討がなされ、作用機序についての仮説もあり、S H基を含有する分子が、放射線の標的物質のなかのひとつとして考えられている¹⁾。また、S H化合物の放射線防護効果は、S H化合物により細胞内S H量の増加が報告され、細胞内S H基の増加量と防護効果の間に密接な関係があることが指摘されている²⁾¹³⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。これらS H化合物のなかで、グルタチオン(以下GSHと略す)は、生体内に多量存在し、幾多の物質代謝に関与しているし、放射線防護作用を示すことが報告されている⁷⁾⁸⁾。

一方、細胞が分裂する際、紡錘体や、細胞膜の形成に-SHあるいは-S-S-が重要な役割を果して¹⁴⁾。細胞分裂、核分裂は、放射線により抑制されるし、この現象は、比較的低線量の放射線で惹起される⁹⁾。しかしながら、この作用機構は、未だ明らかでない。

著者らは、放射線によつて惹起される、核分裂遅延に対するGSHの作用を検討し、その防護作用を、細胞学的に明らかにしようとするものである。

材料及び方法

1) 実験動物: dd系雌性マウス 週齢8~10週 体重20~25gのものを使用した。一群3~4匹

で、同様の実験を2回繰返した。

2) 照射方法：使用した放射線は、200kVp X線17.8mA, フィルター 1.0mmCu + 1.0mmAl, 半価層1.55mmCu, 皮膚焦点間距離50cm, 30R/分で照射した。照射線量は、100, 200, 400, 600 radであつた。R-Rad 換算係数は0.95である。線量測定は、Victoreen Probe 602を使用した。

3) 分裂指数：エールリッヒ腹水癌細胞をマウス腹腔内に移植（200万細胞/匹）7日後に、放射線全身照射を行い、経時的に癌細胞をとりだした。染色は、ギムザ染色であつた。各時間の核分裂指数は、6000~8000個の細胞を観察し、それから1000個当りの割合を算出した。

4) SH化合物：SH化合物としては、還元型グルタチオン(GSH)で、30mg/匹を腹腔内に注射した。注射時間は、放射線照射前30分であつた。

結 果

1) 放射線量によるエールリッヒ腹水癌細胞の核分裂の変化

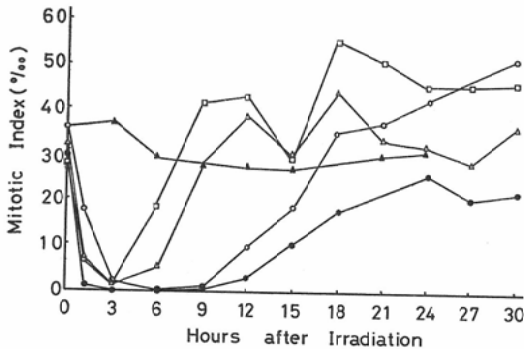


Fig. 1. Changes in the mitotic index after 100 rad (□), 200 rad (Δ), 400 rad (○) and 600 rad (●) of X-rays. The mitotic inhibition was released at 3, 6, 9, and 12 hours after 100, 200, 400 and 600 rad irradiation, respectively. Solid triangle is control (without irradiation).

Fig. 1に示す如く、マウスに100, 200, 400, 600 rad照射し、照射後エールリッヒ腹水癌細胞の核分裂指数を検討した。対照値は30~40%の間を上下している。100 rad照射では、照射直後から核分裂の消失がみられ、照射後3時間では、ほ

とんどみられない。しかしながら、その後核分裂が出現しはじめ、照射後9~12時間では、照射値より高い値を示す。その後一度ある程度の減少を示すが、再び増加し、50%近い核分裂指数値を示し、照射後30時間まで続く。200 rad照射では、100 rad照射群よりも、急激な減少を示し、照射後3時間で、核分裂は消失する。6時間後には、わずかな核分裂像が観察され、9時間後には、対照値に回復する。

400 rad照射では、100, 200 radより早い核分裂の消失がみられ、その後9時間後まで、核分裂像は観察されない。照射12時間後には、再び核分裂細胞が現われ、照射後18時間には、対照値となり、その後増加を続ける。600 rad照射では、照射後1時間に、ほとんど分裂は消失し、9時間後まで観察されない。照射後12時間にわずかに分裂像が認められ、その後漸増するが24時間後にもまだ、対照値にも回復しない。

これら100, 200, 400, 600 radと照射線量が増加すると、核分裂像の消失する速度は早くなり、核分裂像の再出現までの時間が長くなる。放射線照射時から核分裂像の再出現までの時間を、その線量の核分裂遅延時間として、線量との関係を求めると、Fig. 2に示すように、両対数グラフで直線となつた。

2) 100, 200 rad照射時のGSHの効果

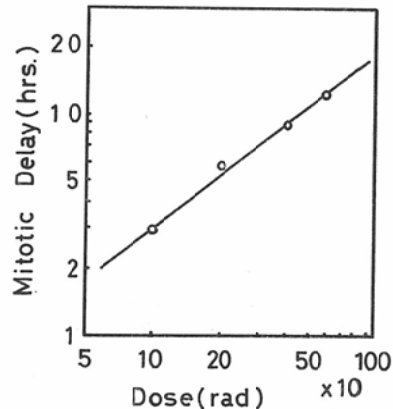


Fig. 2. Effects of X-irradiation on extent of mitotic inhibition. Scale are logarithmic. Mitotic delay time obtained from Fig. 1.

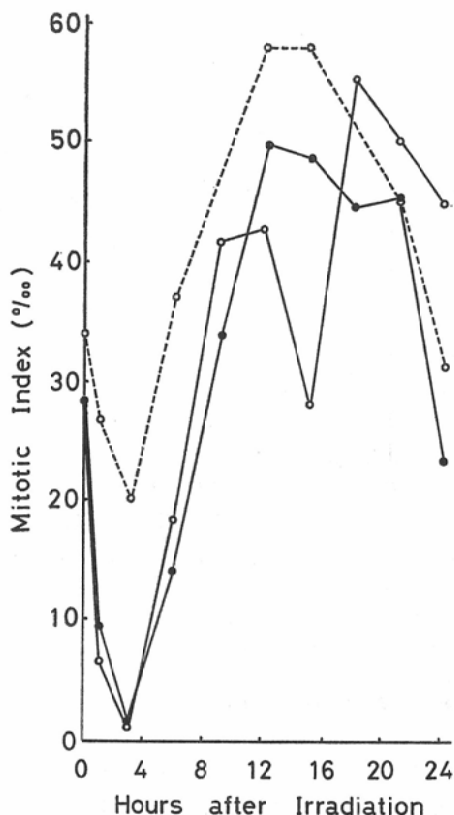


Fig. 3. Effects of GSH (30 mg/mouse) on the recovery phase of mitotic delay induced by X-irradiation. The GSH was injected at 30 minutes before irradiation, and tumor-bearing mice were irradiated with 100 rad of X-rays, and then the mitotic index was determined at intervals.

-○ GSH (without irradiation)
- 100 rad
- GSH + 100 rad.

Fig. 3 は 100 rad 照射後の核分裂指数の変化を示す。(GSH+100) rad 群は、核分裂像の消失する速度は遅くなる。また、照射後3時間から再出現する分裂像の回復は、100 rad 照射とほとんど変わらないか、むしろ遅い。しかしながら、放射線照射12時間以後は、100 rad 群よりは、(GSH+100 rad) 群は、高い核分裂指数を保つ。

Fig. 4 は 200 rad 照射後の核分裂指数の変化を示す。(GSH+200 rad) 群は、100 rad 照射の場合と同様に、照射後1時間の核分裂指数は高

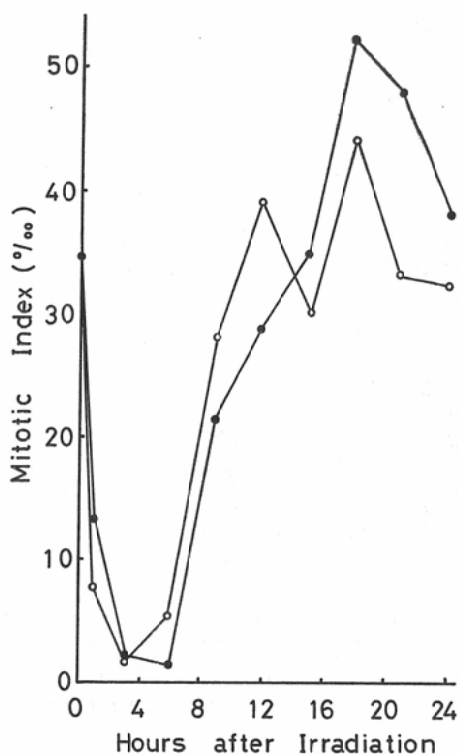


Fig. 4. Effects of GSH (30 mg/mouse) on the recovery phase of mitotic delay induced by irradiation with 200 rad. Other conditions were the same as in Fig. 3.

- 200 rad
- GSH + 200 rad

く、核分裂像の消失する割合が遅いことを示している。照射後6時間では、(GSH+200 rad) 群の核分裂指数は低くなり、照射後12時間まで続く。照射12時間以後は、200 rad 群より、多くの核分裂像が観察された。

以上、100、200 rad 照射の場合、核分裂の消失の割合は、GSHによって遅くなる。しかし、核分裂の回復の始る時間及び速度では、GSHによる効果は認められない。しかしながら、核分裂の出現開始後9時間頃から、核分裂指数では、(GSH+200 rad) 群が200 rad 群に比較して、高くなる。

3) 400、600 rad 照射時のGSHの効果

Fig. 5 は、400 rad 照射時の分裂指数の変化を

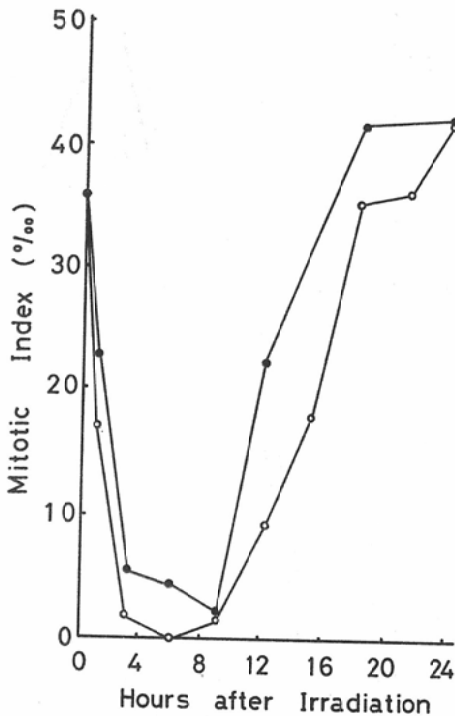


Fig. 5. Effects of GSH (30 mg/mouse) on the recovery phase of mitotic delay induced by irradiation with 400 rad. Other conditions were the same as in Fig. 3.

○—○ 400 rad
●—● GSH + 400 rad

示す。(GSH + 400 rad) 群は、照射後1時間では、400 rad 群より高く、核分裂指数の減少する速度が遅いことは、100, 200 rad の場合と同様である。照射後9時間には、400 rad 群の、核分裂が始り、(GSH + 400 rad) 群も核分裂像が現われる。照射後12時間には、(GSH + 400 rad) 群の核分裂指数は400 rad 群よりもはるかに早い回復を示し、照射後18時間以後は、照射前値よりも、はるかに高い値を示す。Fig. 6は、600 rad 照射時の核分裂指数の変化を示す。(GSH + 600 rad) 群の核分裂指数は、照射後12時間までは、600 rad 群とほとんど変わらないが、それ以後では、核分裂指数の回復は(GSH + 600 rad) 群が早い。

以上のことから、400 rad では、照射以後分裂

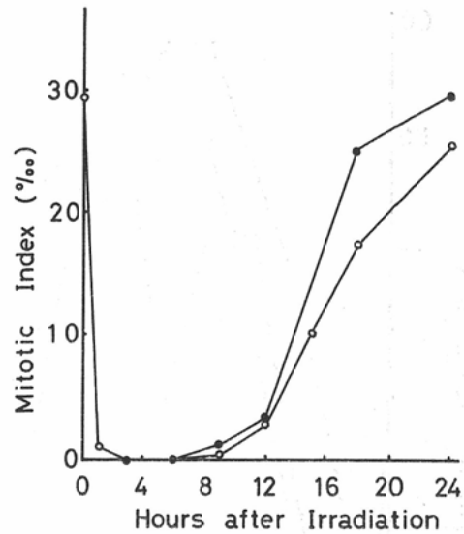


Fig. 6. Effects of GSH (30 mg/mouse) on the recovery phase of mitotic delay induced by irradiation with 600 rad. Other conditions were the same as in Fig. 3.

○—○ 600 rad
●—● GSH + 600 rad

像の消失する速度は、100, 200 rad の場合と同様に遅くなる。しかしながら、回復する過程で、400, 600 rad とともに、GSH 処理群が早く、GSH の作用と考えられる。

考 察

GSH の腹腔内注射により Ehrlich 腹水癌細胞の中に GSH が取り込まれたかどうかに関しては、正常マウス及び担癌マウスに、 ^{35}S -GSH の腹腔内注射を行うと、GSH が、癌組織肝、脾に取り込まれることが報告されており⁹⁾、我々の実験で、GSH が Ehrlich 細胞中に取り込まれたものと考えられる。

放射線の障害の防護に関する報告は、数多くみられる。著者らは、SH 化合物の放射線防護作用機構を明らかにするために、放射線によつて惹起される核分裂遅延への GSH の作用を検討した。核分裂遅延時間は、放射線の照射線量にほぼ直線的に増加している (Fig. 2)⁷⁾。GSH の投与により、この直線が平行して、移動し、核分裂遅延時間が短くなると考えられた。しかしながら、

100, 200 rad 照射では, GSH処理群の核分裂の回復は, 非処理群とだいたい同じ時間に始まる.

400, 600 rad 照射の場合には, GSH処理群が早く回復する. 同様に Maisin⁹⁻¹¹⁾は, 放射線照射により生ずるマウスの腸管障害の回復(核分裂の回復)は, AET及び5-HTの投与により著るしく早くなる. しかしながら, 照射線量が少線量(225R)では, その効果は, 明らかでなく, 高線量(900, 1500R)になると明らかになることを述べている. 著者らの結果では, 100, 200 rad 照射の場合は, 照射9~12時間以後から, GSH処理群の核分裂指数が, 非処理群よりも高くなり, 400, 600 rad 照射の場合には, 核分裂の回復が非処理に比較して早い. すなわち, 100, 200, 400, 600 rad 照射共に, GSH処理の効果は, 12時間以後に観察される. このことから, GSHの放射線防護作用は, 細胞分裂周期によつて異なるか, あるいは, GSHが細胞内にある一定時間蓄積し, その作用が, あらわれていると考えられる.

放射線により惹起される核分裂遅延の現象は, 細胞分裂周期で, 放射線感受性が異なる⁸⁾¹⁵⁾¹⁹⁾²⁰⁾. Telashima と Tolmach¹⁵⁾は, HeLa S₃細胞を使用し, in vitro 300R照射すると, S₂ G₂ M 期に作用が強くあらわれることを報告している. 著者らの結果から, Ehrlich 腹水癌細胞の核分裂遅延へのGSH(30mg)の効果は, 核分裂遅延時間は, ほとんど変化しないが, 照射後(GSH投与後約12時間)12時間以後にGSH処理群の核分裂指数が高いことから, 核分裂の始る12時間前の細胞周期は, G₁期の終りかS期になると考えられる. GSH単独処理の場合にも, 処理後12~14時間に核分裂像が多い⁶⁾ことは, G₁期の終りからS期にGSHが作用していることを示唆している. しかしながら, 照射による, 細胞分裂遅延時間が, 分裂の各期によつて異なり¹⁹⁾, それらの効果も考える必要があり, また, in vivo 系であるため, GSH処理後, 細胞内に蓄積しているため, その作用⁶⁾も考える必要がある. また, Kawasaki⁵⁾は, Ehrlich 腹水癌細胞を使用し, 放射線により,

惹起されるSH化合物の効果を観察し, 同様の効果があることを報告している.

以上のことから, SH化合物は, 共通した様式で, 核分裂遅延を軽減する作用を持っていることを暗示している.

総括

GSHの放射線防護作用を, Ehrlich 腹水癌細胞の分裂指数から検討を加えた. 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る. GSH処理(30mg)により, 100, 200 radの小線量では, その効果は著明でないが, 400, 600 radと線量を増加すると, 核分裂の回復が早い. また, 照射後12時間以後はどの線量でも, GSH処理群の核分裂指数が, たかくなる. 以上のことから若干の考察を加えた.

Reference

- 1) Chapman, W.H., et al.: Sulfhydryl-containing agents and the effects of ionizing radiations I Beneficial effect of glutathione injection on X-ray induced mortality rate and weight loss in mice. *Radiology*, 55, 865—873, 1950.
- 2) Cronkite, E.P., et al.: Mechanism of protective action of glutathione against whole body irradiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 76, 396—397, 1951.
- 3) Doida, Y. and Okada S.: Radiation-induced mitotic delay in culture mammalian cells (L 5178 Y). *Rad. Res.*, 38, 513—529, 1969.
- 4) Eldjarn, L.: Sulfhydryl-disulfide protection mechanisms and the isolated of a possible target structure from mammalian cell nuclei, *Cellular Radiation Biology*, 305—325, Baltimore, Williams and Wilkins Company, 1965.
- 5) Kawasaki, S.: Radioprotective action of SH compounds (3). *Bull. Yamaguchi Uni. Med. Sch.*, in press.
- 6) 川崎祥二, 桜井 孝: 放射線によるエールリッヒ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), *日本医放雑誌*, 33, 6号, 63—67, 1973.
- 7) Kim, J. and Evans, T.C.: Effects of X-irradiation on the mitotic cycle of Ehrlich ascites tumor cells. *Rad. Res.*, 21, 129—143, 1964.
- 8) Liberson, L. and Jena, M.: Uptake of glutathione by serum albumin of normal and tumor-bearing mice *Cancer Res.*, 27, 1196—1201, 1967.

- 9) Maisin, J.R., et al.: Chemical protection of the alimentary tract of whole body X-irradiated mice. I. Changes weight, history, and cell division in related to nucleic acid and protein synthesis. *Int. J. Rad. Biol.*, 2, 281—293, 1960.
 - 10) Maisin, J.R. and Doherty, D.G.: Comparative chemical protection to the intestinal and hematopoietic systems of whole body X-irradiated mice. *Rad. Res.*, 19 474—484, 1963.
 - 11) Maisin, J.R.: Influence of a mixture of chemical protection on the lymphoietic and hematopoietic system of mice irradiated with a dose of 2000 R X-rays. *Experimtia*. 24, 230—231, 1968.
 - 12) Révész, L. and Bergstrand, H.: Radiation protection by cysteamine and cellular sulfhydryl levels., *Nature*, 200, 594—595, 1963.
 - 13) Révész, L. and Modig, H.: Cysteamine-induced increase of cellular glutathione level; A new hypothesis of the radioprotective mechanism. *Nature*. 207, 430—431, 1965.
 - 14) Sakai, H.: Studies on sulfhydryl groups during cell division of sea urchin egg. *Biochem. Biophys. Acta.*, 102, 235—248, 1965.
 - 15) Terashima, T. and Tolmach, L.: Variation in several response of HeLa cells to X-irradiation during the division cycle.
 - 16) 上野陽里 菅原 努: 生体細胞非蛋白質部分 S H 物質と放射線感受性との関係について, 日本医放雑誌, 25巻, 370~373, 1965.
 - 17) Ueno, Y. and Vacek, A.: On the change in amount of sulfhydryl compounds in the organ during radioprotection., *Rad. Biol. Res. Comm.*, 2, 34—39, 1967.
 - 18) Vos, O., et al: Protection of tissue-culture cells against ionizing radiation. I. The effect of biological amines, disulhyde compounds and thiols. *Int. J. Rad. Biol.*, 5, 543—557, 1962.
 - 19) Whitmore, G.F. et al.: Radiation-induced mitotic delay in L cells. *Rad. Res.*, 30, 155—174, 1967.
 - 20) 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, 357—371, 1970.
-