



Title	DNP処理による細胞内ATP量変化がX線照射細胞の生残率に与える影響
Author(s)	西沢, きみ子
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1979, 39(10), p. 1098-1104
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/19168">https://hdl.handle.net/11094/19168</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

# DNP 処理による細胞内 ATP 量変化が X 線 照射細胞の生残率に与える影響

愛知県がんセンター研究所放射線部  
西 沢 き み 子

(昭和54年2月7日受付)  
(昭和54年4月20日最終原稿受付)

## Alterations in the survival of X-irradiated cells by 2,4-dinitrophenol depending on ATP deprivation

Kimiko Nishizawa

Laboratory of Experimental Radiology, Aichi Cancer Center Research Institute,  
Chikusa-ku, Nagoya 464, Japan

Research Code No.: 404

Key Words: Dinitrophenol, ATP, Recovery, Radiation, Surviving fraction

The dose-survival curve of cultured melanoma cells was changed by post-irradiation treatment with 2,4-dinitrophenol (DNP). The parameters of the curves were  $D_0=147$  R,  $n=5.6$  for untreated cells;  $D_0=143$  R,  $n=7.9$ , and  $D_0=142$  R,  $n=2.0$  for the cells treated with  $10^{-5}$ M DNP and  $5 \times 10^{-5}$ M DNP in phosphate-buffered saline, respectively. The content of ATP in the cell decreased to 5% of control level after the treatment with either concentration of DNP. The recovery of ATP content was rapid and complete within 2 hr of incubation in culture medium after removal of  $10^{-5}$ M DNP, but was retarded and incomplete for 4 hr with  $5 \times 10^{-5}$ M DNP. Thus, prolonged ATP deprivation with a high concentration of DNP might result in the inhibition of recovery and reduction in  $n$  values.

### I. 緒 言

酸化的磷酸化の阻害剤である2,4-dinitrophenol (以下 DNP と略す) の, X線照射された細胞に対する影響については今までに次のような報告がある: 細胞周期を通じて phase に無関係に放射線に対する抵抗性を増大させる (5, 1). 定常状態にある細胞の放射線照射後の生残率を上昇させる (6, 11). あるいは Sublethal radiation damage からの回復を増大させる (2, 4) 等である. DNP は細胞内での ATP 合成を阻害するので, 放射線照射後の生残率の増大は, Cyclohexi-

mid 投与 (13) や低酸素圧での培養 (8) など代謝回転の低い状態の細胞にみられる回復現象と共通の原因に基づくものかもしれない. しかしながら極端な低酸素圧下では放射線による障害からの回復は阻害され, 回復がおこるためには細胞の酸化的代謝が必要 (10) とも言われている. そこで放射線障害からの回復と ATP 量との関連性を明らかにする必要がある.

従来報告では DNP の作用条件が一定しておらず相互の比較が困難である. 血清を含む培養液中での作用 (2, 11), グルコースを含まないハ

ノクス氏液での作用(12)があり、又使用濃度も  $5 \times 10^{-4}M$  から  $5 \times 10^{-5}M$  まで種々である。この実験では、まずはじめに最適な実験条件を求めるために 磷酸緩衝液に グルコースや 血清を 種々の濃度に加え、DNP の致死効果がそれらによってどう変化するかを調べた。さらに異なる濃度の DNP による細胞内 ATP 量の減少とその回復の経時的变化を調べた。そして、細胞内 ATP レベルの低下とその持続時間の違いが、被照射細胞の生残率をどのように修飾するかを明らかにしようと試みた。

## II. 実験材料と方法

### II-1, DNP 処理

マウス黒色腫由来 B16-C2W 細胞(3)を用い、10%牛胎児血清と0.005%カナマイシンを含むハム F12培養液(9)でガラスシャーレに単層培養した。指数増殖期の細胞のみを使用した。DNP 処理は  $Ca^{2+}$  と  $Mg^{2+}$  を含む Dulbecco の磷酸緩衝液〔以下 PBS (+) と略す〕で2回洗浄し、培養液中の血清成分を除いた後に行った。PBS (+) 又は血清やグルコースを含む PBS (+) に溶解させた DNP を加え、 $37^{\circ}C$  で培除法により培養後経時的に0.02% Trypan Blue を加え、色素細胞の生死を判定した。コロニー形成能の検出には PBS (+) 中で種々の濃度および時間で DNP を作用させた後、細胞をトリプシン処理ではがし、DNP を遠心により洗浄、除去後一定数の細胞を Falcon プラスチックシャーレにまいた。5%炭酸ガス培養器内で10~12日間培養後クリスタルバイオレット染色し、50細胞以上からなる集落を1つのコロニーと数えた。

### II-2, 細胞内 ATP 量の定量

微量の ATP により発光する Luciferin-Luciferase enzyme system (16) を用いて細胞内 ATP 量を定量した。この基質-酵素系は凍結乾燥させたホタル発光器官 (Sigma) 4個から40mM 硫酸マグネシウムを含む0.1M Sodium arsenate (pH 7.4) 2.5ml で抽出した。X線照射および PBS (+) 中で DNP 処理した細胞を1mM の EDTA を含む PBS (-) ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  を含まない) で

5分間培養してシャーレからはがした。 $10^6$ 個の細胞を2mlの蒸留水に浮遊し5分間煮沸して代謝を止めた。次にホモジネーナイザー (ultra-turrax) で20秒間細胞を破砕した。この細胞破砕液を0.01M 磷酸カリウム緩衝液(4mM 硫酸マグネシウムを含む)で5~10倍に希釈して1.5mlを液体シンチレーション用バイアルに入れた。50 $\mu$ lの Luciferin-Luciferase 液を加えその直後から12秒間ずつ2回、放出される光子数を液体シンチレーションカウンター (Beckman LS-133) で coincidence 回路をはずし、 $^3H$  ウィンドウを用いて測定した。シンチレーションカウントと ATP 標準液 ( $10^{-11}M \sim 10^{-9}M$ ) との間には直線関係が得られた。

### II-3 X線照射

X線照射は以下の条件で行った: 200kVp, 20 mA, filter 0.5mmAl +0.5mmCu, 距離50cm, 線量率100R/min, 室温。ガラスシャーレに指数関数的に増殖している細胞を培養液中で照射した。X線照射された細胞のコロニー形成能に対する DNP の効果を調べる実験では、照射直後 PBS (+) で2回洗浄後 PBS (+) 中で DNP を2時間 ( $10^{-5}M$ ) 又は1.5時間 ( $5 \times 10^{-5}M$ ) 作用させた後、トリプシン処理して一定数の細胞をプラスチックシャーレにまいた。X線照射だけのコントロール細胞も照射直後に PBS (+) で2回洗浄後、2時間 PBS (+) 中で培養した。

## III. 結果

### III-1, DNP の細胞生死に対する効果

PBS (+) に種々の濃度に溶解した DNP 中に細胞をおき、 $37^{\circ}C$  で培養し経時的に Trypan Blue に染色される死細胞の割合を調べた (Fig. 1)。 $5 \times 10^{-5}M$  以上では4時間後より急に死細胞の割合が増加し、8時間後では100%になった。一方  $10^{-5}M$  以下では死細胞は遅れて現われ8時間後に約40%であった。

Fig. 2は PBS (+) にグルコースや血清をわずかに加えることにより、 $5 \times 10^{-5}M$  DNP による細胞致死効果が著しく減弱されることを示している。グルコースを1%加えると8時間後の死細

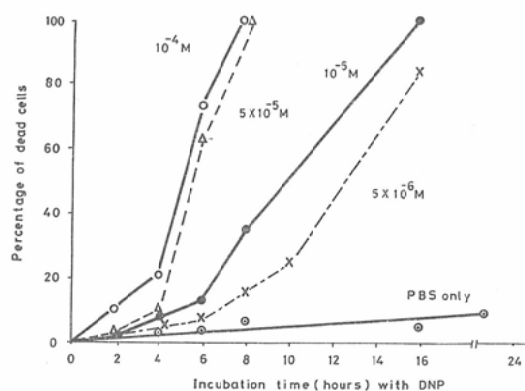


Fig. 1 Increase in the percentage of dead cells stained with Trypan Blue during incubation with various concentration of DNP in PBS (+). The values are the mean of three separate experiments.

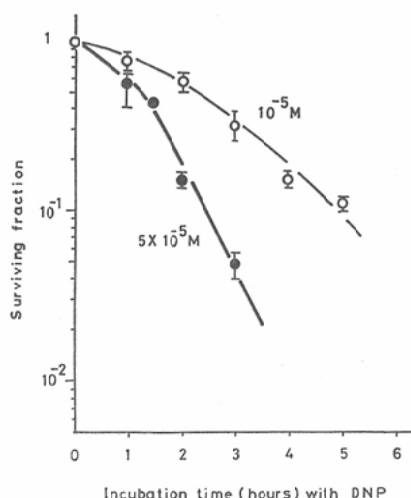


Fig. 3 Relationship between the duration of treatment with 10<sup>-5</sup> or 5 × 10<sup>-5</sup> M DNP and the surviving fraction detected by colony formation. The vertical lines represent one standard deviation for nine measurements in three separate experiments.

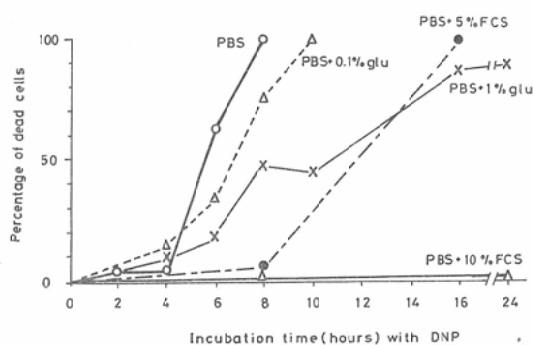


Fig. 2 Effect of glucose (glu) and fetal calf serum (FCS) on the appearance of dead cells with the period of treatment with 5 × 10<sup>-5</sup> M DNP. Dead cells were detected by the Trypan Blue exclusion test. The values are the mean of three separate experiments.

胞出現率が100%から50%に減少する。また牛胎児血清を10%加えることにより DNP の細胞致死効果は完全に阻止され、24時間後もほとんど細胞死はおこらない。なおグルコースや血清の他に pH も DNP の効果に大きく影響を与えるので (15)、すべての実験の DNP 溶液の pH は7.2~7.3の間に調製した。

III-2, DNP のコロニー形成能に対する影響

Fig. 3は PBS (+)中での2種類の濃度、10<sup>-5</sup>M および5 × 10<sup>-5</sup>M DNP の37°Cにおける処理時間とコロニー形成率との関係を示している。10<sup>-5</sup>M

DNP 処理を受けた細胞のコロニー形成率は処理時間の増加と共に徐々に減少し、4時間処理では未処理細胞に比べ約1/10に減少した。5 × 10<sup>-5</sup>M の場合は急激に変化し、わずか2時間の処理で1/10にまで減少した。

III-3 DNP の細胞内 ATP 量に対する影響

Fig. 4-a, b は2種類の濃度の DNP について、細胞内 ATP 量の経時的变化と、処理後 DNP を除去して新しい培養液で培養した場合の ATP 量の回復を示している。10<sup>-5</sup>M DNP 処理 (Fig. 4-a) では1~4時間まで処理時間の増加に伴い細胞内 ATP 量は徐々に減少し、未処理細胞の5%にまで達した。しかし DNP を除去後2時間以内に完全に ATP 量は回復した。5 × 10<sup>-5</sup>M 処理 (Fig. 4-b) では、2~3時間後に ATP 量は正常の5%にまで減少した。さらに ATP 量の回復は10<sup>-5</sup>M の場合に比べかなり遅れ、かつ不完全であった。5 × 10<sup>-5</sup>M 2時間処理後の細胞は、DNP 除去後24時間後も正常の30%にしか回復できなかった。

III-4, 細胞内 ATP 量とコロニー形成率との関係

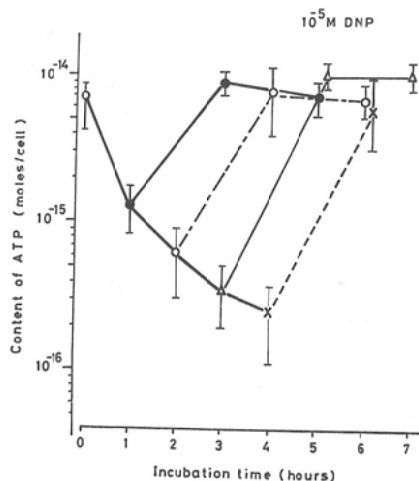


Fig. 4-a Decrease in the cellular content of ATP with period of incubation with  $10^{-5}$ M DNP in PBS (+), and its recovery during subsequent incubation in culture medium by the removal of DNP after 1 (●), 2 (○), 3 (Δ), or 4 (×) hr of treatment. The vertical lines represent one standard deviation for six to eight measurements.

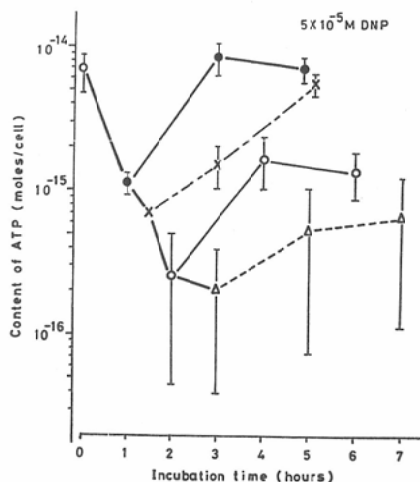


Fig. 4-b Decrease in the cellular content of ATP with period of incubation with  $5 \times 10^{-5}$ M DNP in PBS (+), and its recovery during subsequent incubation in culture medium by the removal of DNP after 1 (●), 1.5 (×), 2 (○), or 3 (Δ) hr of treatment. The vertical lines represent one standard deviation for six to eight measurements.

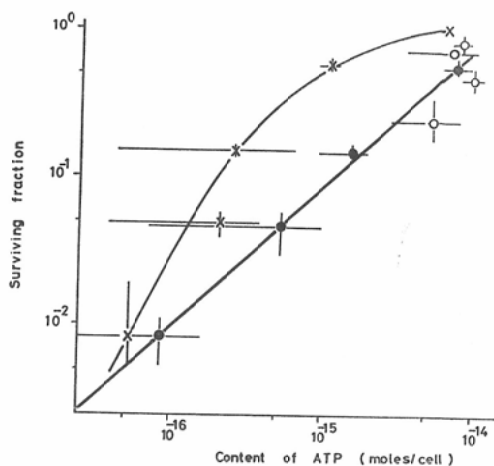


Fig. 5. Relationship between the cellular content of ATP and the surviving fraction. A linear relation was obtained between the cellular content of ATP measured at 2 hr after removal of DNP,  $10^{-5}$  (○) or  $5 \times 10^{-5}$ M (●), and their colony forming ability. The relation between the cellular content of ATP immediately after treatment with  $5 \times 10^{-5}$ M DNP (×) and the colony forming ability was not linear.

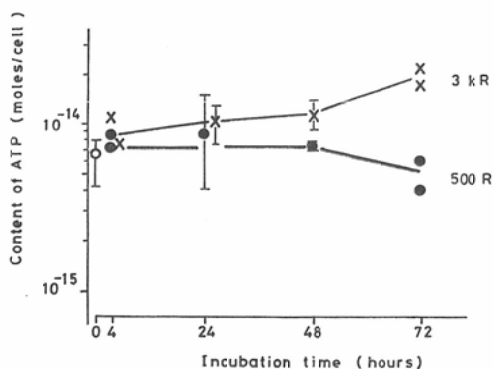


Fig. 6 Change in the cellular content of ATP with period of incubation in culture medium after x-irradiation: 500R (●) or 3 kR (×).

Fig. 3とFig. 4-a, bのグラフからDNPの各処理時間毎のATP量とコロニー形成率を両対数目盛グラフ上にプロットしたものがFig. 5で

ある。 $10^{-5}$ M DNP,  $5 \times 10^{-5}$ M DNP 各時間処理後DNPを除いて新鮮培養液で2時間培養後に測定した細胞内ATP量と、コロニー形成率との間に直線関係が得られた。 $5 \times 10^{-5}$ M DNP 処理直後に測定したATP量とコロニー形成率との間には直線関係は得られなかった。このグラフより細胞生残率(コロニー形成能の有無)に影響するのはATP量減少程度ではなく、DNP除去後短時間のATP

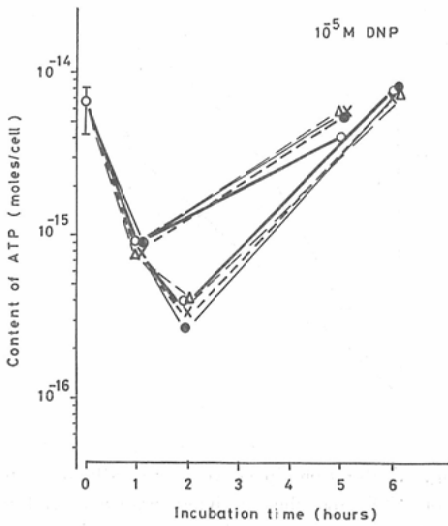


Fig. 7-a Decrease in the cellular content of ATP with period of incubation with  $10^{-5}$ M DNP in PBS (+) after 0 R (○), 300R (△), 500R (×), or 3 kR (●) of x-irradiation and its recovery by subsequent incubation in culture medium after the removal of DNP. The values are the mean of three separate experiments.

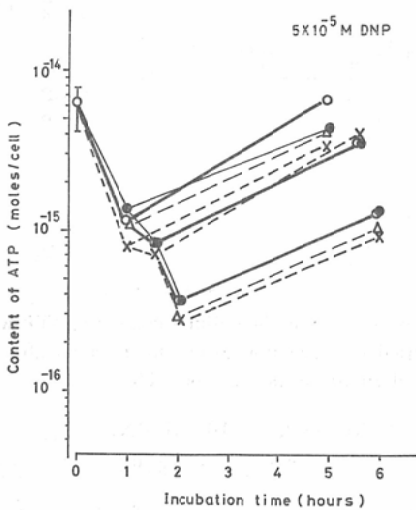


Fig. 7-b Decrease in the cellular content of ATP with period of incubation with  $5 \times 10^{-5}$ M DNP in PBS (+) after 0 R (○), 300R (△), 500R (×), or 3 kR (●) of x-irradiation and its recovery by subsequent incubation in culture medium after the removal of DNP. The values are the mean of three separate experiments.

量の回復の有無であることが示唆される。

III-5, 細胞内 ATP 量に対する X 線照射の影響

Fig. 6 は対数増殖をしている細胞に X 線照射を行い、4 時間～3 日間培養後細胞内 ATP 量を定量したものである。500R, 3KR 照射後 48 時間まで ATP 量は変化しなかった。3KR 照射を受けた細胞は 3 日後に細胞当りの ATP 量は増加しているが、これは照射後分裂できず巨大細胞になった細胞を測定したもので、ATP 量を蛋白量当りで計算すると全く変化をしていなかった。

III-6, X 線照射直後に DNP 処理された細胞の ATP 量変化

Fig. 4-a, b は DNP 処理だけによる ATP 量変化を調べたものであるが、Fig. 7-a, b は X 線照射直後に DNP 処理を行った場合の ATP 量変化を示している。0, 300, 500, 又は 3KR 照射にひきつづいて行った DNP 1～2 時間処理の直後、および DNP を除去 4 時間後に細胞内 ATP 量を測定した。グラフから明らかなように、X 線照射の有無に関係なく、両濃度の DNP 単独処理の場合と同様に ATP 量は減少し、除去後再び回復した。このことは、X 線照射は細胞内 ATP 量を減少させないばかりでなく、DNP による ATP 量減少や DNP 除去後の回復にも影響しないことを示唆している。

III-7, X 線照射後のコロニー形成率に対する DNP の修飾効果

Fig. 8 は X 線照射直後に DNP 処理を行い、DNP を除去後トリプシン処理で遊離させた細胞を一定数シャーレにまき、10～12 日後のコロニー形成率をみたものである。両濃度の処理時間は次の理由で選んだ。1)  $10^{-5}$ M 2 時間および  $5 \times 10^{-5}$ M 1.5 時間処理は、共に細胞のコロニー形成率が約 50% に減少した。2) この 2 種類の DNP 処理は同程度の ATP 量減少をひきおこすが、DNP 除去後の ATP 量回復に差があった。 $10^{-5}$ M DNP 処理によりコントロール ( $Do=147R$ ,  $n=5$ , 6) に比べわずかに生残率が上昇した ( $Do=143R$ ,  $n=7.9$ )。  $5 \times 10^{-5}$ M DNP 処理では著しく生残率

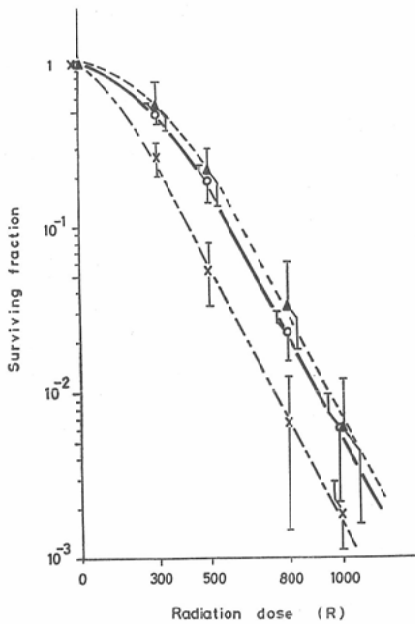


Fig. 8 Dose-survival relationship of untreated cells (—○—), cells treated with  $10^{-5}M$  DNP for 2 hr after irradiation (---▲---), and cells treated with  $5 \times 10^{-5}M$  DNP for 1.5 hr after irradiation (—×—). The vertical lines represent one standard deviation for nine measurements in three separate experiments.

が減少，特に  $n$  値の減少がみられた ( $D_0=142R$ ,  $n=2.0$ ).

#### IV. 考 察

放射線照射を受けた細胞の障害からの回復現象を解析するため種々の修飾因子の影響が調べられている(14). DNP に関しては障害からの回復を増大させるという報告のみが多く出されている. この実験では我々もまたX線照射後  $10^{-5}M$  DNP 2時間処理をすることにより照射単独よりわずかに生残率を上昇させるという結果を得たが，その差は有意ではない.  $10^{-5}M$  という低濃度では，細胞内 ATP 量は一時的に減少するが DNP 除去後2時間以内に完全に回復した. しかし  $5 \times 10^{-5}M$  の高濃度では1.5時間処理で減少した ATP 量が回復するのは更に2時間以上も遅れ，又，X線照射された細胞の生残率も著しく減少させる効果があった. この生残率減少効果は，DNP のみによ

る致死効果とX線単独の致死効果との和よりも大きく，相乗効果と考えられる.

両濃度の DNP 処理により ( $10^{-5}M$  2時間， $5 \times 10^{-5}M$  1.5時間) コロニー形成能は共に約50%減少し，又，細胞内 ATP 量はほぼ同程度に減少したが，その回復に著しい差があった. Fig. 5 に示した如く，DNP 処理直後の低下した細胞内 ATP レベルとコロニー形成率の間には平行関係はなく，DNP を除いて2時間培養後の ATP レベルとコロニー形成率の間に明瞭な平行関係が得られた. X線単独では ATP 量の減少はおこらず，DNP 処理とX線を併用した場合には，DNP 単独の場合と同じ ATP 量の減少と除去後の回復がみられた. X線照射直後の高濃度 DNP 処理が，ATP 量を低レベルに長時間維持し，又，生残率曲線の特に  $n$  値を減少せしめたことは，細胞内 ATP 量とコロニー形成能回復の関連を示唆して興味深い.

山田らの報告では(17)，ラット胸腺細胞で大線量照射後細胞内 ATP 量が減少している. 我々の実験でもマウス胸腺細胞を用いて，照射 ( $170 R \sim 1KR$ ) 後4時間から24時間で著しい ATP 量の減少を検出した. (未発表)しかし培養哺乳動物細胞では，C2W, FM3A, P3HR-1細胞のいずれを用いても照射後の ATP 量の減少はみられなかった. (未発表)

Darymple らの1967年の報告では， $5 \times 10^{-5}M$  DNP で被照射細胞(L-Cell)に対し防護効果が示されているが，DNP 処理前に充分細胞を洗浄していない. 細胞表面に付着している培養液中の血清成分が DNP の致死効果を減弱させた可能性がある. また DNP 処理後これを除去する場合でも，細胞がガラス面に付着した状態で洗浄すると，はがして遠心により洗浄する場合よりも，細胞のコロニー形成率も ATP 量の回復も著しく増大することを経験している. 我々の実験でも DNP 処理前に細胞を PBS (+) で2回洗浄し，また細胞をシャーレよりはがして遠心し DNP を除去しているため細胞の致死効果が大きく出た可能性があるが，照射単独の実験も同様な操作を行っ

た。

以上の結果より X 線照射直後 DNP 処理された細胞が、2 時間でその ATP 量を回復できるような条件では生残率がわずかだが増大し、ATP 量の回復が遅れるような DNP 処理では X 線障害からの回復も悪く、生残率も減少することが示唆された。

X 線照射細胞の Sublethal damage (7) や potentially lethal damage (13) からの回復も照射後 2～3 時間以内におこることが知られている。 $5 \times 10^{-5}M$  の DNP 処理は、 $D_0$  値はほとんど変えず  $n$  値を著明に減少させたので、sublethal radiation damage からの回復を DNP が阻害したのではないかと考えられる。この考えを確かめる為に分割照射の実験を計画している。細胞内 ATP 量を低レベルにおく時間が照射後 2 時間以上か否かで生残率が大きく変化することは興味のある点で、ATP がどのように障害回復機構に関係しているかを更に解明してゆきたい。

#### 文 献

- 1) Baker, M.L., Darymple, G.V., Sanders, J.L. and Moss, A.J.: *Radiat. Res.*, 42: 320—330, 1970
- 2) Berry, R.J.: *Br. J. Radiol.*, 39: 458—463, 1966
- 3) Claunch, C., Oikawa, A., Tchen, T.T. and Hu, F.: "Advances in Biology of Skin," Vol. 8, "The pigmentary System." ed. W.

Montgna, and F. Hu, Pergamon Press, Oxford, 479—488, 1967

- 4) Darlymple, G.V., Sanders, J.L., Baker, M.L. and Wilkinson, K.P.: *Radiat. Res.*, 37: 90—102, 1969
- 5) Darymple, G.V., Sanders, J.L. and Baker, M.L.: *Nature (London)*, 216: 708—709, 1967
- 6) Durand, R.E. and Biaglow, J.E.: *Int. J. Radiat. Biol.*, 26: 597—601, 1974
- 7) Elkind, M.M. and Sutton, H.: *Nature (London)*, 184: 1293—1295, 1959
- 8) Elkind, M.M., Sutton-Gilbert, H., Moses, W.B., Alesclo, T. and Swain, R.W.: *Radiat. Res.*, 25: 359—376, 1965
- 9) Ham, R.G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 53: 288—293, 1965
- 10) Littbrand, B. and Revesz, L.: *Br. J. Radiol.*, 42: 914—924, 1969
- 11) Little, J.B. and Williams, J.R.: *Radiat. Res.*, 66: 90—99, 1976
- 12) Moss, A.J., Darymple, G.V., Sanders, J.L., Wilkinson, K.P. and Nash, J.C.: *Biophys. J.*, 11: 158—174, 1971
- 13) Phillips, R.A. and Tolmach, L.J.: *Radiat. Res.*, 29: 413—432, 1966
- 14) Sawada, S. and Okada, S.: *Radiat. Res.*, 41: 145—162, 1970
- 15) Simon, E.W. and Beevers, H.: *New Phytol.*, 51: 163—197, 1952
- 16) Stanley, P.R. and Williams, S.G.: *Anal. Biochem.*, 29: 381—392, 1969
- 17) Yamada, T. and Ohyama, H.: *Int. J. Radiat. Biol.*, 14: 169—174, 1969