



| | |
|--------------|---|
| Title | In vitro X線照射に対する肥肝細胞腫細胞内5-HTPおよび5-HTの防護効果 |
| Author(s) | 佐藤, 登紀子; 中村, 弥 |
| Citation | 日本医学放射線学会雑誌. 1981, 41(9), p. 868-872 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/19954 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

In vitro X線照射に対する肥胖細胞腫細胞内 5-HTP および 5-HT の防護効果

愛知がんセンター研究所放射線部

佐藤 登紀子 中村 弥

(昭和56年1月14日受付)

(昭和56年2月25日最終原稿受付)

Radioprotective Effect of 5-hydroxytryptophan and 5-hydroxytryptamine in Mastocytoma Cells against Irradiation in vitro

Tokiko Sato and Wataru Nakamura

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

Research Code No.: 303.1

Key Words: 5-HTP, 5-HT, Mastocytoma cells,
Radioprotection, Survival fraction

The radioprotective effect in vitro of 5-hydroxytryptophan (5-HTP) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) was studied with cultured mastocytoma cells of cell line P815A. Pre-incubation of the cells for 30 min in a 5-HTP-containing medium resulted in a great accumulation of 5-HTP which reached the level 80 times higher than in control. In these cells, no appreciable amount of 5-HT was detected, and their radiosensitivity remained unchanged. Whereas, pre-incubation of the cells for 30 min in a 5-HT-containing medium induced a considerable elevation of the 5-HT content concomitantly with an increase in the radioresistance of cells. Thus, it was clearly evidenced that the 5-HTP *per se* in cells was inactive to modify the radiosensitivity of the cells, although it acted as a potent radioprotector in the cells which had the capacity to convert it into 5-HT. By chemical analysis, it was indicated that the principal amount of 5-HTP in P815A cells and that of 5-HT in FMA cells was distributed in cytoplasm.

1. 緒言

5-hydroxytryptophan (5-HTP) の放射線防護効果はマウスを用いた *in vivo* 実験¹⁾ および哺乳動物由来の培養細胞を用いた *in vitro* 実験²⁾ で確認された。5-hydroxytryptamine (5-HT) 合成能を有する Furth氏肥胖細胞腫 (FMA) 細胞を 5-HTP を添加した培養液で培養すると細胞の5-HT含量は上昇し、それと同時に細胞の放射線抵抗

性も上昇し、1%の生残率レベルで算出される DRF_{0.01} は最高1.8に達することが知られている。一方、マウスの乳癌由来の FM3A や、マウスメラノーマ由来の B16C2W のように 5-HT 合成能を有しない細胞では 5-HTP 添加による 5-HT 含量の上昇も放射線抵抗性の誘導も観察されない。これらの事実は細胞内の 5-HT が細胞の放射線障害を軽減するうえで重要な役割を演じている

ことを示唆している。しかしながら細胞内の 5-HTP そのものの放射線防護効果に関する報告はまだ見あたらない。前述の FMA 細胞にあってはとり込まれた 5-HTP は瞬時に 5-HT に変化するので、5-HTP の蓄積としては観察されない。

小林、中村ら³⁾ はマウス脳ホモジェネートでみられる脂質過酸化生成が 5-HT のみならず 5-HTP の添加によっても阻止されることを観察した。放射線によって生成されるフリーラジカルが細胞膜脂質の過酸化反応を介して障害発現に寄与する可能性も考えられているので⁴⁾ 細胞内 5-HTP そのものに放射線防護作用があるかどうかを明らかにすることはきわめて重要であると考えられる。

本研究では、培養液中のトリプトファンをとりこんで 5-HTP は合成するが、それを更に 5-HT にする能力を欠除した細胞を用いて、この問題を検討した。

2. 材料と方法

(1) 細胞、P-815A は Dunn-Potter⁵⁾ の肥胖細胞腫細胞を培養系に移し、クローン化した細胞で、培養には 10% 馬血清と抗生物質入りの F12 液を用いた。Furth-Hagen-Hirsch⁶⁾ の肥胖細胞腫細胞を培養系に移しクローン化したものが FMA 細胞である⁷⁾。

(2) 試薬、5-HTP と 5-HT クレアチニン硫酸は Sigma 社の製品を用いた。両者は 25mM の水溶液とし、ミリポアフィルターでろ過滅菌したものを母液とし、使用に際しては細胞浮遊液に 1/10 量を加えて 5-HTP および遊離の 5-HT の最終濃度を 2.5mM とした。

(3) 細胞の調製と X 線照射、指数関数的な増殖状態にある細胞を用意し、数回のピペッチングにより 1 ケ 1 ケ 遊離した細胞とする。5-HTP、および 5-HT を上記の濃度に加えて 30 分間培養したものについて 5-HTP と 5-HT の定量と X 線感受性の実験を行った。対照には無添加培養細胞を用いた。X 線照射は室温下 (28°C) で培養液の交換を行わずに行った。X 線の発生には東芝製深部治療装置を用い、照射条件は 200kVp, 15mA.

0.5mm アルミニウムと 0.5mm 銅のフィルターを用いた。線量率は 113rads/分、照射距離は 40cm である。

(4) 細胞生残率、コロニー計算に適する数の細胞を 0.6% の Seaplaque agar (米国 Marine Colloid 社製) を含む軟寒天培地に植え込み、10 日後に 50 コ以上の細胞より成る集団を 1 コのコロニーとして数えた。生残率曲線を求める上での各点はそれぞれ三ケのシャーレの平均値をとり対照に対する百分率で示した。生残率の直線部分は 5 ケの測定点に対する回帰直線として求めた。

(5) DRF, 5-HTP および 5-HT 前処理による X 線防護効果を検討する為に生残率曲線から 1% の生残率レベルで算出される $DRF_{0.01}$ を求めた。

(6) 細胞内 5-HTP, 5-HT の定量、5-HTP および 5-HT を加えて培養した後、細胞浮遊液を遠心 (1000g, 5 分, 4°C) し、さらに Hanks 氏液で二回遠心洗滌後、5-HTP および 5-HT の定量を行った。5-HTP および 5-HT の定量はそれぞれ Udenfriend, Weissbach および Bogdanski ら⁸⁾ の方法、Bogdanski, Pletscher, Brodie および Udenfriend ら⁹⁾ の方法を用いた。

(7) DNA の定量、細胞を遠心 (1000・g, 5 分, 4°C) により集めた後 Potter のホモゲナイザーにかけ、Hanks 氏液を加えて再び遠心した。(1000・g, 10 分, 4°C) 上清画分と沈澱画分について Kissane および Robin ら¹⁰⁾ の方法を用いて DNA の定量を行った。

3. 結果

(1) 細胞の 5-HTP, 5-HT 含量に及ぼす 5-HTP, 5-HT 添加培養の効果、30 分間の培養後、培養液に添加した 5-HTP, および 5-HT を如何なる程度にとり込むか、又とり込んだ 5-HTP を 5-HT にするかを P-815 細胞と FMA 細胞について調べた。結果は Table 1 に示す。FMA 細胞では、5-HT はわずかしかりとり込まれないが、5-HTP はかなりの量がとり込まれ速かに 5-HT に変えられる事がわかった。一方 P-815A 細胞では 5-HTP は大量に細胞内にとり込まれ、5-HT

Table 1 5-HTP and 5-HT contents of P815A and FMA cells incubated both with and without 5-HTP or 5-HT

| Cell line | Pre-incubation* | 5-HTP content $\mu\text{g}/10^7$ cells | 5-HT content $\mu\text{g}/10^7$ cells | DRF (1%) |
|-----------|-----------------|--|---------------------------------------|----------|
| P815A | 5-HTP | 241.10 μg | <0.18 μg | 0.99 |
| | 5-HT | 1.95 μg | 0.58 μg | 1.29 |
| | control | 2.83 μg | <0.18 μg | 1.00 |
| FMA | 5-HTP | <0.18 μg | 70.83 μg | 1.81 |
| | 5-HT | <0.18 μg | 13.24 μg | 1.22 |
| | control | <0.18 μg | 12.35 μg | 1.00 |

*: The final concentration of 5-HTP and 5-HT was 2.5 mM, and the incubation time was 30 min. Before chemical analysis, the cells were washed twice with Hanks' solution by centrifugation.

に変化する事なく細胞内にとどまることが示された。5-HT は FMA 細胞の場合と同様にわずかしかとり込まれなかった。

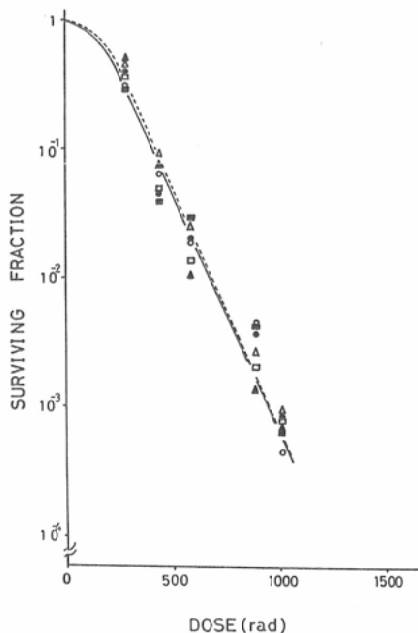


Fig. 1 Radiosensitivity of P815A cells pre-incubated in the culture medium supplemented with 5-HTP. The cells were irradiated 30 min after the start of pre-incubation. Data of three separate experiments were plotted. Solid symbol: Groups of cells treated with 5-HTP. Open symbol: Groups of control cells.

(2) 5-HTP, 5-HT 処理による P-815A 細胞の X 線感受性の変化, 5-HTP 処理による P-815A 細胞の X 線感受性の変化は Fig. 1 に示す。DRF_{0.01} は 0.99 であり大量の 5-HTP が細胞内にとり込まれたにもかかわらず, X 線感受性は変わらなかった。5-HT 処理の場合は Fig. 2 に示すとおりであるが, DRF_{0.01} は 1.29 となり防護作用がわずかながらみられた。FMA においては 5-HTP から 5-HT が合成されることに伴って X 線感受性の低下が起ることは前の論文に示した通りである²⁾。

(3) 細胞内における 5-HTP, 5-HT の分布, 材料と方法の項で述べた通り, 2つの画分に分け DNA を大量に含有する核画分とほとんど含まぬ細胞質画分について, 5-HTP, および 5-HT の定量を行った。結果を Table 2 に示す。

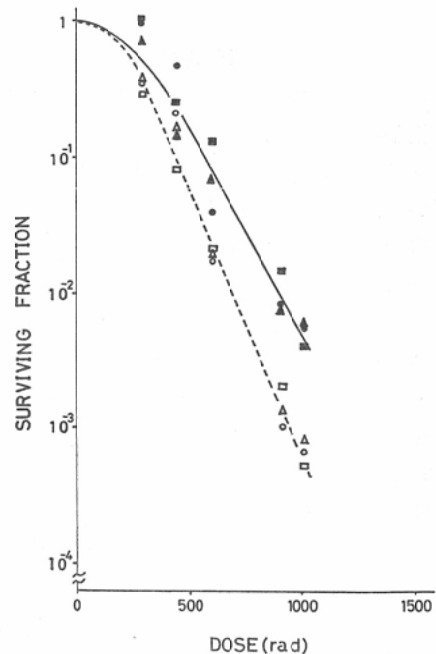


Fig. 2 Radiosensitivity of P815A cells pre-incubated in the culture medium supplemented with 5-HT. The cells were irradiated 30 min after the start of pre-incubation. Data of three separate experiments were plotted. Solid symbol: Groups of cells treated with 5-HTP. Open symbol: Groups of control cells.

Table 2 Intracellular distribution of 5-HTP in P815A cells and 5-HT in FMA cells

| Cell line | Substance | I fraction | II fraction |
|-----------|--------------------------------------|------------|-------------|
| P815A | 5-HTP | 99.4% | 0.6% |
| | DNA | 16.5% | 83.5% |
| | (5-HTP/DNA) | (6.02) | (0.00719) |
| | (5-HTP/DNA) I / (5-HTP/DNA) II = 837 | | |
| FMA | 5-HT | 99.6% | 0.4% |
| | DNA | 14.7% | 85.3% |
| | (5-HT/DNA) | (6.78) | (0.00469) |
| | (5-HT/DNA) I / (5-HT/DNA) II = 1446 | | |

Cells were washed twice with Hanks' solution and centrifuged for 10 min at 1000g to separate to I fraction (cytoplasmic) and II fraction (nuclear).

これから明らかな様に 5-HTP, 5-HT は DNA をほとんど含まない細胞質画分に存在している。

4. 考 察

Table 1 にみる通り P-815A 細胞は本実験での培養条件下では 5-HT をほとんど含んでいない。そして 5-HTP を 2.5mM になる様に培養液に加えて30分間培養しても、5-HTP の含量は大きく上昇するが 5-HT 量の変化にはつながらなかった。そして X 線感受性も変わらなかった。FMA では前に発表した様に²⁾、5-HTP 添加により X 線感受性の著明な低下と 5-HT 量の増加が観察された。以上の事実は 5-HTP は細胞内にとり込まれても、5-HTP の形で存在する限りは X 線防護効果を発揮せず、5-HT に変化した場合のみ防護作用を持つようになることを示している。5-HT クレアチニン硫酸の添加培養により P815A 細胞の 5-HT 含量は多少上昇し、それと共に X 線感受性のわずかな低下も観察された。もともと 5-HT を含有する FMA 細胞でも、5-HT 含量はわずかに上昇し、また X 線感受性の変化がみられた。

細胞の核と細胞質の分離の為我々が今回用いた方法は不十分なものではあるが、Table 2 に示したとおり、P-815A 細胞の 5-HTP と FMA 細胞の 5-HT とは細胞質に存在することを示している。この観察は Tanaka, Giarman, Bensch および Felsenfeld ら¹¹⁾のデータとも一致している。

彼らの観察によると、5-HT は細胞内顆粒が形成される初期段階ではヘパリンとは結合せず、未成熟な顆粒内にある。もしも放射線防護作用を發揮するためには、5-HT は遊離状態になければならないものであれば、成熟した顆粒内に結合した状態で存在する 5-HT は新しく細胞内にとりこまれたり、あるいは合成された 5-HT とは作用の点で異なる可能性があろう。生体内には 5-HTP や 5-HT の合成能、保有能、とりこみ等の上で種々異なる細胞が存在するので、上記の可能性を検討することは重要と考える。細胞内 5-HT の放射線防護作用の機序に関しては標的となる物質が特定できない現在、全く不明である。放射線によって生ずるフリーラジカルとの反応を介するルートがまず検討されるべきであろう。

5. ま と め

肥胖細胞腫細胞を用いて in vitro で 5-HTP, 5-HT 処理による X 線防護効果を検討した。

P-815A 細胞において 5-HTP 処理後細胞内に急速に 5-HTP がとりこまれ、無処理の細胞の 80 倍余りの 5-HTP 量となったが X 線感受性は変化しなかった。一方 5-HT 処理によっては 5-HT のかなりのとりこみが見られ、X 線防護効果もわずかながらみられた。これらの結果から言えることは、5-HTP の形で細胞内に存在しても、細胞の X 線感受性は変わらず、X 線防護効果が発現する為には細胞内に 5-HT の形で存在することが必要である。なお、2種類 (P-815A, FMA) の肥胖細胞腫細胞の 5-HTP, 5-HT は細胞質内に含まれている。

(P-815A 細胞のもととなった Dunn-Potter の肥胖細胞腫細胞を提供し、かつ助言をいたごいた愛知県がんセンター研究所第一病理部長細田峻博士に深く感謝します。なお本研究には文部省科学研究費の助成を受けた)

文 献

- 1) Kobayashi, S., Nakamura, W. and Eto, H.: Protectective effect of 5-hydroxytryptophan against lethal doses of x-radiation in mice. *Int. J. Radiat. Biol.*, 11: 505—508, 1966
- 2) Nakayama, T. and Nakamura, W.: Radioprotective effect of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan on mammalian cells irra-

- diated in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.*, 34 : 81—90, 1978
- 3) 小林定善, 中村 弥, 鹿島正俊, 松岡 理, 江藤秀雄: 5-HT と 5-HTP. 放射線生物研究, 14: 107—126, 1969
 - 4) Feinstein, R.N.: Implications of organic peroxides in Radiobiology. *Radiat. Res.*, Supplement 3 : 1—304, 1963
 - 5) Dunn, T.B. and Potter, M.: Transplantable mast-cell neoplasm. *J. Natl. Cancer Inst.*, 18: 587—595, 1957
 - 6) Furth, J., Hagen, P. and Hirsch, E.: Transplantable mastocytoma in the mouse containing histamine, heparin and 5-hydroxytryptamine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 95 : 824—828, 1957
 - 7) Nakamura, W., Fujii, R, Nakayama, T. and Nishimoto, Y.: Caractéristiques d' une lignée cellulaire de mastocytoma adaptée à la oculture in vitro. *C.R. Séanc. Soc. Biol.*, 170 : 491—495, 1976
 - 8) Udenfriend, S., Weissbach, H. and Bogdanski, D.F.: Increase in tissue serotonin following administration of its precursor 5-hydroxytryptophan. *J. Biol. Chem.*, 224 : 803—810, 1957
 - 9) Bogdanski, D.F., Pletscher, A., Brodie, B.B. and Udenfriend, S. Identification and assay of serotonin in brain. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 117 : 82—88, 1956
 - 10) Kissane, J.M. and Robins, E.: The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system. *J. Biol. Chem.*, 233 : 184—188, 1958
 - 11) Tanaka, C., Giarman, N.J., Bensch, K. and Felsenfeld, H.: The biochemical and morphological maturation of murine neoplastic mast cell granules. *Biochem. Pharmacol.*, 19: 963—971, 1970
-