The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	放射線による細胞分裂遅延に及ぼすSH化合物の影響 2. GSHの作用機構に関する研究
Author(s)	川崎, 祥二; 小林, 光昭; 沖田, 功 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1974, 34(8), p. 599-604
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19967
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

放射線による細胞分裂遅延に及ぼすSH化合物の影響

2. グルタチオンの作用機構に関する研究

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　小林光昭　沖田　功
末富一臣　桜井　孝

（昭和49年4月15日受付）
（昭和49年5月16日最終原稿受付）

Protective Effect of SH Compounds on the Radiation-induced Mitotic Delay

2. Protective Mechanism of Glutathione

Shoji Kawasaki, Mitsuaki Kobayashi, Isao Okita, Kazuomi Suetomi and Koh Sakurai
Department of Radiology, Yamaguchi University School of Medicine, 1144, Ube, Japan
(Director: Prof. Dr. Koh Sakurai)

Research Code No.: 405
Key Words: Chemical protection, Gluatathione, Mitotic delay, L-5 cell, Cell division

Effect of glutathione on the mitotic delay induced by X-irradiation in cultured mammalian cells (L-5) was studied. When a random cell population was treated with various concentrations of glutathione 10, 20, 30 and 40 mM, mitotic index increased 5–8 hr. later and mitotic index decreased 10–14 hr. after the treatment. Glutathione (20 mM) was given at 6 hr., 3 hr. and 30 min. before and during irradiation of 200 rads. Its radioprotective effect was observed clearly when treatment was made at 3 hr. or 30 min. before and during irradiation, but treatment 6 hr. before exposure was not so effective. Post-treatment 6 hr., 3 hr. and 30 min. after irradiation with glutathione resulted in an enhancement of recovery rate of mitotic index but not a shortening of mitotic inhibition, but gave no effect on the mitotic delay time induced by X-irradiation.

On the basis of these data, the mechanisms of the radioprotective action of glutathione were discussed.

緒　言

ＳＨ化合物は，放射線照射前投与すると，防護効果を示す．なかでも，ＧＳＨは毒性が少いため，放射線防護効果についての数多くの報告がある[1)2)4)16)19)]．マウスでの観察によれば，ＧＳＨは投与後，早い時間に血中アルブミン等と結びつき[12)]マウス体内に分布する[18)]．しかし，マウスの生存率への防護効果は，投与後比較的早い時間に，その効果を失うことが，報告されている[7)15)17)20)]．この現象は，ＧＳＨのみならず，他のＳＨ化合物

でも観察されている[6)7)]．これらのことから，SH化合物の放射線防護作用のひとつには，放射線により生成するラジカルの scavenger として働らくと考えられている．しかし，SH化合物が，放射線による細胞分裂遅延に対し，radical scavenger として作用するとすれば，細胞周期のどの stage でも，SH化合物の効果が認められねばならない．

一方，in vivoに於て，放射線照射による細胞分裂遅延に対するSH化合物の防護効果は，Maisin ら[13)14)]，著者ら[9)10)]によつて，報告され，著者らは，GSHの防護効果は細胞の分裂周期と関連していることを報告した．さらに，前報[11)]のin vitro で，放射線照射により惹起される細胞分裂遅延に対してのGSHの効果は，G_2-block の短縮（分裂遅延時間の短縮）には作用しないで，G_2 期前の細胞周期のある一定 stage に作用していると報告した．このことから，GSHは単に radical scavenger として働らいているのではないことが推察される．そこで，GSHが一定 stage のみに作用するとすれば，照射前に，GSH処理を行つても，GSHの細胞分裂への効果が，認められることが考えられる．そこで，GSH処理を，放射線照射前後で行ない，GSHの細胞分裂遅延への効果を観察した．GSHの作用機構を明らかにすることは，SH化合物の放射線防護機構を解明する上に，重要な手掛りになると考え，本実験を行なつた．

研究方法及び材料

1）照射方法：使用した放射線は，250kVp，X線，フィルター 1.0mmCu＋1.0mmAl，F.S.D. 40cmである．線量測定は，細胞照射と同じ条件で，Fricke の化学線量計を用い測定した．1分間線量は，186 rads であつた．

2）培養細胞：細胞は，L-5 細胞を使用した．培養液は，Eagle's MEM と20%親牛血清である．SH化合物は，GSH（還元型グルチオン）を使用した．L-5 細胞をカバーグラス上に培養（36～40時間）し，各々の実験に使用した．GSH処理は，照射前10分に各種濃度のGSHを含む培養液と交換し，放射線照射後，GKN（0.1% glucose，0.8% NaCl，0.04% KCl）にて2回洗滌後，GSHを含まないMEM培養液と交換した．GSH処理時間は，30分間である．全ての操作は，37℃中で行なつた．

3）分裂指数：標本は，放射線照射後，ギムザ染色を行た．核分裂指数は，各標本で，3,000細胞を数え，算定した．各実験には，各々の対照群をつけた．

結　果

1）細胞分裂へのGSHの各種濃度の効果

GSHの各種濃度（10mM，20mM，30mM，40mM）の処理を行つて，細胞分裂へのGSHの効果を観察した．GSH処理を行なうと，いずれの濃度とも，処理後2時間に核分裂指数のピークがみられ，処理後3～4時間にわずかな，減少がみられるが，その後，増加する．GSH処理後5～8時間の間に，核分裂指数の大きなピークが観察されるが，その後減少する．GSH処理後10～14時間には，核分裂指数の減少がみられる．対照値（平均39）に比較して，低い核分裂指数を示す．GSHの処理濃度が，増加すれば，その効果は著明となる．すなわち，GSH処理により，分

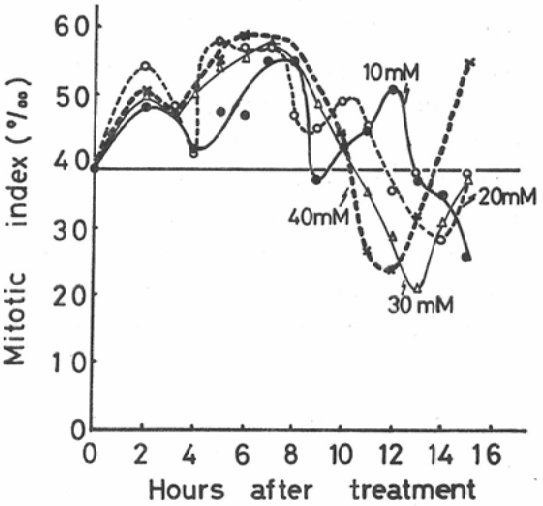

Fig. 1. Changes of mitotic index in mammalian cells L-5 after treatment with glutathione(●10mM, ○20mM, △30mM, ×40mM)

裂前5～8時間の細胞集団が増加し，分裂前10～14時間の細胞が減少する（図1）.

2）放射線照射（200rads）前での，GSH処理（20mM）時間との関係.

放射線照射（200rads）を行なう6時間前，3時間前，直前及び照射中に各々30分間GSH処理（20mM）を行ない，細胞分裂遅延への効果を観察した（図2）. 200rads照射すると，照射6時間迄は，核分裂像がみられないが，照射後7時間にわずかな核分裂像が観察される．その後，核分裂指数は増加し，照射後15時間にピークとなる．放射線照射中にGSH処理を行なうと，200rads照射単独と同様，照射後6時間まで核分裂像は観察されないが，照射後7時間には，ある程度の核分裂像がみられる．その後，核分裂指数の急激な増加が観察される．核分裂指数は，照射後9時間には，第1ピークがあり，その後，わずかな減少があり，再び増加し，照射後12時間に第2のピークが認められる．GSH処理が照射直前，3時間前の場合，両者共，ほぼ同様の傾向を示す．分裂細胞は，200rads照射単独とほぼ同じ時間に出現する．その上，核分裂指数の回復も早いが，照射中GSH処理の場合にみられた照射後9時間の第1のピークが小さい．しかし，第2のピークは，ほぼ同じに観察された．照射6時間前GSH処理では，照射後7～10時間には，200rads照射単独よりは，多い核分裂指数を示すが，その後は，200rads単独とほぼ同様である（図2）.

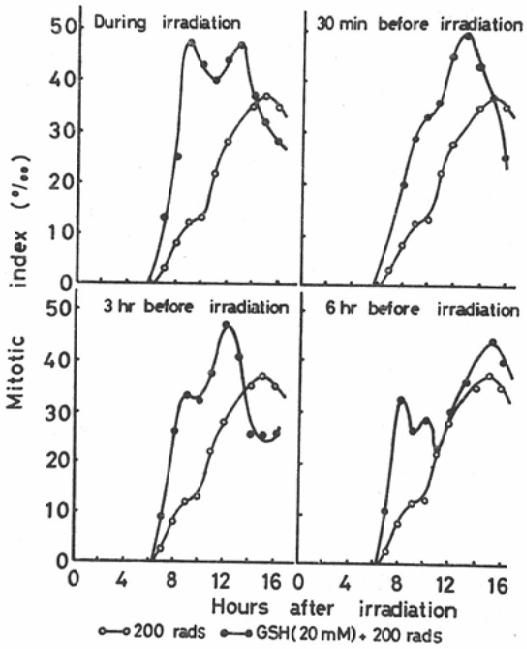

Fig. 2. Effect of glutathione 20mM on mitotic delay induced by X-irradiation of 200 rads. Cells were treated with glutathione 6 hr., 3 hr. and 30 min. before and during irradiation.

3）放射線照射（200rads）後でのGSH処理

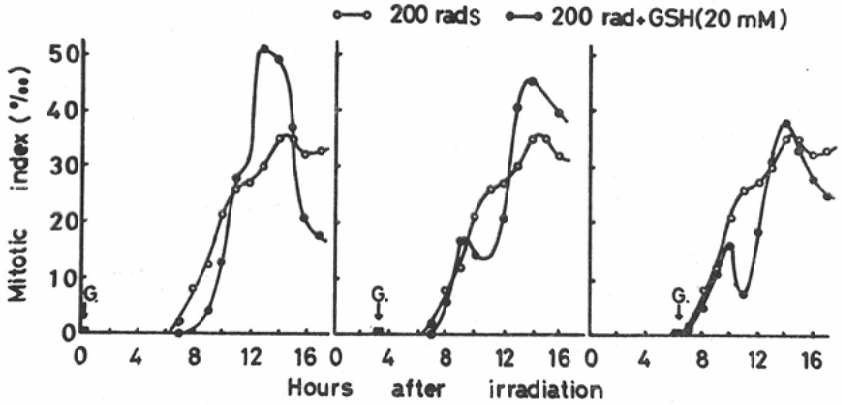

Fig. 3. Effect of glutathione 20 mM on mitotic delay induced by X-irradiation of 200 rads, Cells were treated with glutathione 6 hr., 3 hrr, and 30 min. after irradiation.

(20mM) 時間との関係 (図3).

放射線照射 (200rads) 直後, 3時間後及び6時間後にGSH処理 (20mM) を行ない, 細胞分裂遅延へのGSHの効果を観察した. 200rads 照射単独では, 照射後7時間にわずかな核分裂像が認められ, その後, 増加し, 照射後14〜15時間にピークがある. 照射直後GSH処理を行うと, 核分裂指数の回復が遅くなり, GSH処理による阻害が認められた. しかし, 照射後12時間には, 200rads 照射単独よりも, 高い核分裂指数のピークが認められ, その後, 減少する. 照射後3時間でのGSH処理では, 核分裂像は, 200rads 照射単独とほぼ同じ時間に始る. しかし, GSH処理により, 核分裂指数は, 核分裂像再出現後3〜4時間に, GSHによる阻害が, 認められた. 照射後6時間にGSH処理を行なうと, 200rads 照射単独と同じ時間に核分裂がはじまる. しかし, 核分裂像の再出現後3〜4時間に, GSH処理群に核分裂指数の低下があり, GSHによる阻害が認められた.

考　察

SH化合物の放射線防護効果は, 従来, マウス, 細胞等の生存率で観察され, SH化合物の投与時間と防護効果の関係が報告されている[7)15)17)20)]. これらのいずれもが, 照射前投与であり, また, 照射直前に投与する場合が, 防護効果が一番大きいとされている. SH化合物の放射線防護作用の機構についても, いくつかの仮説がだされ, 検討されてきた[3)]. 著者らは, SH化合物の放射線防護作用を検討してきた[4)~11)]. その中で, GSHは, 放射線照射による細胞分裂遅延で G_2-block の短縮には作用しないが, G_2 期前のある一定 stage に作用していることを報告した[9)~11)]. このことから, GSHは, 単に radical scavenger の作用だけでないことが考えられた. 一方, 放射線の細胞の致死効果や, 細胞分裂への効果は, 細胞周期のどの時期で, 放射線が照射されりかに大きく依存しているが, GSHの作用も, 細胞周期の一定 stage だけに働き, この細胞集団の分裂周期の促進に作用することから, GSHの処理を照

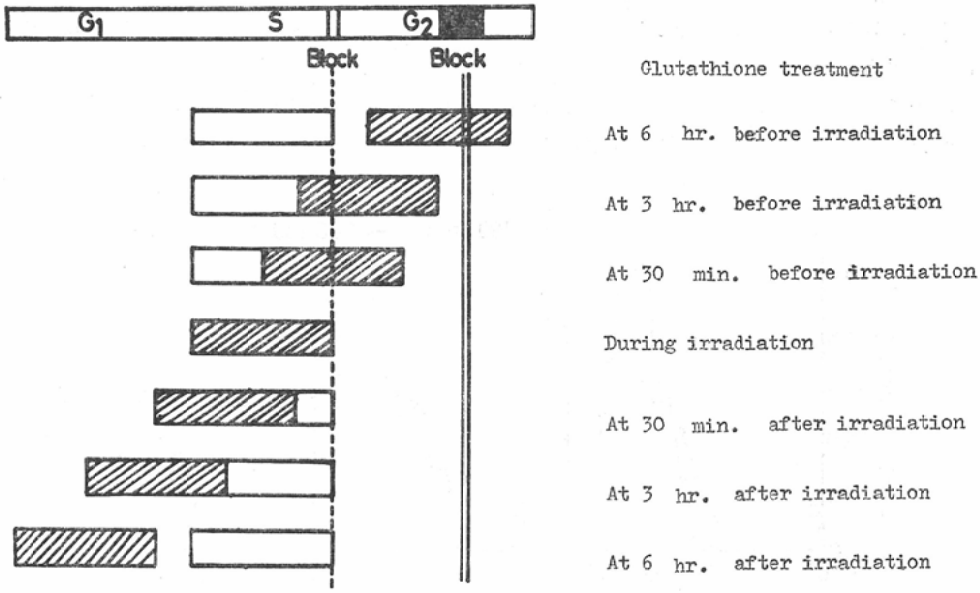

Fig. 4. A possible model to explain the effect of glutathione on the mitotic inhibition induced by X-irradiation, Hatched area show cell population affected with glutathione at X-irradiation of 200 rads. Open area show cell population affected with glutathione by glutathione treatment.

射前に行なつても，ＧＳＨの効果が現われることが考えられる．そこで，著者らは，放射線照射とＧＳＨ処理時間との関係を検討した．ここで得られた結果は，以上述べてきたことを支持している．ここで図４に示すような，ＧＳＨの作用機構を考えた．図４では，斜線枠が照射時ＧＳＨの作用うけた細胞集団で，白枠は，ＧＳＨ処理時に作用をうける細胞集団を示す．すなわち，図１からも示されるように，細胞分裂へのＧＳＨだけの効果では，ＧＳＨの処理後５～８時間に核分裂指数の増加がみられ，処理後10～14時間に減少している．このことは，ＧＳＨ処理により，分裂前10～14時間の細胞が，ＧＳＨの影響をうけ，細胞周期が短縮し，分裂前５～８時間の細胞集団が，増加する．それらの細胞がそのまま周期を進行すると考えられる．それ故，ＧＳＨ処理が，照射中，照射直前，３時間前の場合，ほぼ同じＧＳＨの効果が得られる．しかし，照射前６時間にＧＳＨの処理を行なうと，ＧＳＨの作用をうけた細胞集団が，照射時すでに G_2-block 部位を通過しつつあるため，ＧＳＨの効果をうけた細胞集団の中で，G_2-block 部位を未通過の細胞集団のみ G_2-block をうける．G_2-block 解徐と共に分裂期に入るため，照射６時間前でのＧＳＨ処理では，その効果は，照射前３時間処理ほど明らかにならないものと考えられる（図４）．しかし，ＧＳＨの照射中処理で認められる照射後９時間の核分裂指数の高いピークが，照射前ＧＳＨ処理では，いずれの場合も，観察されない．このことは，このピークは，ＧＳＨが照射中に存在するときにのみ作用する効果と考えられる．従つて，照射前ＧＳＨ処理の場合，細胞がＧＳＨにより細胞の分裂周期の進行の促進をうける．その上，ＧＳＨは，放射線の作用をうけにくい状態にする（例えば，細胞の酸素分圧の低下）．

一方，ＧＳＨ処理を照射後行なう場合は，照射前，ＧＳＨ処理のような効果は認められない．このことは，次のことが考えられる．① ＧＳＨは，放射線による細胞分裂遅延が起りにくい状態にする．② 放射線照射によつて，細胞分裂に関係した分子が，不活性化し，照射後，ＧＳＨ処理を行なつても，もとにかえらない．その結果，放射線照射によつて，細胞周期が長い状態になるため，ＧＳＨの作用をうける stage への細胞の流れが少くなる．また，放射線照射後ＧＳＨ処理では，ＧＳＨの作用をうける細胞集団は，照射しないでＧＳＨの作用をうける細胞集団よりは，分裂までの時間が長い．従つて，照射前ＧＳＨ処理でみられるような効果がない（図３）．照射直後，及び３時間後，ＧＳＨ処理を行なうと，分裂細胞が出現してからしばらく後に，200rads 照射単独よりは，高い核分裂指数を示していることからも，図４のＧＳＨの機構が考えられる．

また，放射線照射直後にＧＳＨ処理を行なつた場合に，核分裂の抑制及び，照射後３，６時間にＧＳＨ処理すると核分裂の出現後３～４時間に分裂抑制がみられることから，ＧＳＨは，G_2-block 前３～４時間の細胞周期の進行を阻害していると考えられる．これは，図１にみられるように，ＧＳＨ処理の効果で，処現後４時間に，わずかな抑制がみられることからも考えられる．しかし，ＧＳＨによるこの阻害は，ＧＳＨを取除くと容易に解徐するものと考えられる．

以上のことから，図４に示すように，放射線照射（200rads）による細胞分裂へのＧＳＨの効果は，ＧＳＨが，G_2-block に作用するのではなく，G_2 期前の一定 stage の細胞周期の進行に作用する．そのため，放射線により，細胞に G_2-block がひきおこされるが，ＧＳＨの作用により，細胞周期が進行するため，この部位への細胞の蓄積がＧＳＨ処理群に多くなる．それ故，G_2-block の解徐とともに，蓄積した細胞が，同時に分裂に入るため，ＧＳＨ処理群の核分裂指数の回復が，早くなるものと思われる．このことは，前報[11]に述べたことを支持していると考えられる．ＧＳＨの作用が，細胞周期のどの時点で作用し，他のＳＨ化合物も同様の作用機構であるかについては，今後に残された，興味ある問題である．

総　括

哺乳動物細胞（L-5）を使用し，放射線照射

（200rads）による細胞分裂遅延へのＧＳＨの効果を観察した．

① 細胞集団へのＧＳＨの作用は，10mM，20mM，30mM，40mM のＧＳＨ処理により，処理後５～８時間に細胞分裂指数の増加のピークがあり，処理後，10～14時間に減少する．

② ＧＳＨ処理（20mM）を照射中，直前，３時間前，６時間前に行なうと，照射中，直前，３時間前では，核分裂像の再出現してからの核分裂指数の回復が早い．照射６時間前にＧＳＨ処理を行なうと核分裂指数の回復が早いが，他のもの程大きくない．

③ 放射線照射（200rads）直後，３時間後，６時間後にＧＳＨ処理（20mM）を行なつた．照射中ＧＳＨ処理の場合にみられたＧＳＨによる回復の促進は認められなかつた．

以上のことから，ＧＳＨの放射線照射による細胞分裂遅延の防護機構について若干の考察を加えた．

文　献

1) Bacq, Z.M.: Mechanisms of action., Chemical Protection against Ionizing Radiations., 205—239, 1965, Charles C. Thomas.
2) Chapman, W.H. and Cronkite, E.P.: Further studies of the beneficial effect of glutathione on the X-irradiated mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 75 (1950), 320—322.
3) Eldjarn, L.: Sulfhydryl-disulfide protection mechanisms and the isolated of a possible target structure from mammalian cell nuclei., Cellular Radiation Biology, 305—325, 1965. Williams and Wilkins Co.
4) 川崎祥二，桜井　孝，中田太志，西村早苗，沖田功：グルタチオンの放射線防護効果，新薬と臨床，19（1969），119～122.
5) Kawasaki, S., Kobayashi, M., Okita, I., Suetomi, K. and Sakurai, K.: Protection of SH-compounds against mitotic delay induced by X-ray., J. Rad. Res. 14 (1972), 52.
6) 川崎祥二，桜井　孝：分割照射におけるグルタチオン，システアミン，ＡＥＴの放射線防護効果，日医放雑誌，33（1973），689～692.
7) Kawasaki, S.: Radioprotective action of SHcompounds (I). Bull. Yamaguchi Med. Sch., in press.
8) Kawasaki, S.: Radioprotective action of SHcompounds (III). Bull. Yamaguchi Med. Sch., in press.
9) 川崎祥二，桜井　孝：放射線による Ehrlich 腹水癌細胞分裂遅延に及ぼすグルタチオンの効果（Ｉ），日医放雑誌，33(1973)，535～540.
10) 川崎祥二，桜井孝：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（Ⅱ），日医放雑誌，33(1973)，541～545.
11) 川崎祥二，小林光昭，沖田功，未富一臣，桜井孝：放射線による細胞分裂遅延に及ぼすＳＨ化合物の影響（Ｉ），日医放雑誌，34，(1974)，
12) Liberson, L. and Jena, M.: Uptake of glutathione by serum albumin of normal and tumor bearing mice. Cancer Res., 27 (1967), 1196—1201.
13) Maisin, J.R., Novelli, G.D., Doherty, D.G. and Congdon, C.C.: Chemical pro.ection of the alimentary tract of whole body irradiated mice (I)., Int. J. Rad. Biol., 2 (1960), 231—243.
14) Maisin, J.R.: Influence of a mixture of chemical protection on the lymphopoietic and hematopoietic system of mice irradiated with a dose of 2000 R X-rays., Experimentia, (1968), 230—231.
15) 牟田信義，小祝聡一郎：ＭＥＧのエックス線防護効果について，日医放雑誌，20（1960），346～353.
16) 永田弘治，西田寿男，菅原努，田中富蔵：グルタチオンの放射線防護作用とその応用，日医放雑誌，26（1968），975～978.
17) 菅原　努，上野陽里：グルタチオンの放射線防護作用，グルタチオン研究の進歩，215～252，(1969)，診断と治療社.
18) 高橋忠男，佐藤善重：全身オートラジオグラフィーによる放射性化合物の生体内分布に関する研究（第11報），^{35}S-Glutathione のマウス体内分布，ラジオアイソトープ，17（1968），1～9.
19) 浦野宗保，田中紀元，衛藤忠敏：マウス腸管死に対するグルタチオンの放射線防護効果について，日医放雑誌，32（1972），234～236.
20) 安河内浩，飯野祐，渡辺哲敏：放射線の一指標としての50％生残平均日数について（グルタチオンの防禦効果），日医放雑誌，27（1967），691～696.