

システアミン塩酸塩とビタミンCの放射線防護効果と 放射線損傷に関する研究

安田俊文²⁾, 安隋麻耶¹⁾, 荻野真甫¹⁾, 安藤聡志²⁾, 天野守計²⁾, 暮木実智弘²⁾,
小林龍徳²⁾, 宮田勝行²⁾, 黒崎貴己¹⁾, 鈴木健太郎¹⁾, 杉本賢吾¹⁾, 前中俊宏²⁾,
具 然和¹⁾²⁾, 高橋 徹³⁾, 長谷川武夫¹⁾²⁾

¹⁾ 鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部 放射線技術科学科

²⁾ 鈴鹿医療科学大学 大学院 保健衛生学研究科

³⁾ 関西医科大学 放射性同位元素実験施設

キーワード: シスプラチン, アスコルビン酸, 放射線障害, 抗酸化作用, 放射線防護

はじめに

今日、放射線治療において、腫瘍が根治するために必要な放射線の線量が、正常組織に影響を与えない線量（耐容線量）を上回ったとき等に、放射線による副作用が発生する。そのために、正常組織への放射線の影響をいかに減らすかが大きな課題となっている。この副作用を軽減するには、正常組織の放射線感受性を低下させ、腫瘍組織の放射線感受性を高めればより効果的な治療が期待できる。正常組織は血流が保たれ、栄養・酸素分圧等が高く、そのため放射線感受性が高く、放射線があたると大きなダメージを受ける¹⁾²⁾。それに対して癌組織は血管系が少なく中央部の壊死部周辺では低酸素細胞領域を含むため、放射線の効きが低下し放射線抵抗性となる¹⁾²⁾。組織内の酸素分圧は血管から150 μm から180 μm ほど離れるに従って低下し、低酸素細胞領域となり、更に血管から離れると壊死領

域が発生する³⁾。治療効果比を上げるためには、正常細胞は防護しつつ、癌組織に対する放射線の効果をあげなければならない。その方法のひとつとして、我々は放射線の酸素効果に着目した。酸素の存在下では無酸素の時より生物的效果は大きくなり、低LET放射線（単位距離通過する間に周囲に放出するエネルギーの低い放射線）では2.5～3倍増感される⁴⁾。正常組織の酸素分圧が抗酸化作用物質により酸素分圧が低下すれば、放射線感受性が低くなるため、放射線防護効果が期待できる。正常組織は腫瘍組織より高血流のため、薬剤は正常組織に多く流入し、正常組織を防護できる可能性がある。そのためには毒性の低い有効な放射線防護剤や放射線増感剤の開発が重要となる。Cysteamine は放射線防護剤として知られているが副作用がある。しかし、VitaminC は抗酸化剤として知られ、副作用が無いためにVitaminC を放射線防護剤としての利用できるかを本研究は調べた。VitaminC による

放射線防護に関する報告は少ない。本研究では薬剤の抗酸化作用を利用した放射線防護を目的に Cysteamine と Vitamin C の放射線防護効果を動物実験によって確認した。

目的

システアミン塩酸塩は抗酸化作用をもち、放射線防護剤としての効果が既に報告されている¹⁾⁵⁾。また、ビタミン C (以下、L-アスコルビン酸と呼ぶ) は、酸化防止剤として食品に用いられ、副作用の無い事が知られている⁶⁾。しかし、L-アスコルビン酸が放射線防護として作用するとの報告は少ない。これら両薬剤の持つ抗酸化作用を利用して、放射線に対して防護効果がどの程度示されるかを動物実験によって調べる事を目的とした。本研究によって副作用の無い放射線防護剤の可能性が期待できる。

実験材料および実験方法

実験材料

今回の研究では以下の装置及び実験動物等を使用した。本研究に用いた実験動物は C3H マウス (♂, 7 週令) であり、放射線の照射には X 線照射装置 (管電圧 = 200KV, 管電流 = 9mA, フィルター = 0.2mmCu + 1mmAl: Philips MG226/4.5) からの X 線を用いた。実験動物の大腿部皮下に SCC-Ⅶ腫瘍 (1×10^6 個 / 0.05ml) を移植した。実験の期間中は定期的に血球数測定器 (MEK-6318: 日本光電) 及び体重計 (Libron EB-3300SW; 島津) を用いて、血球数変化と体重変化を測定した。放射線防護剤としてシステアミン塩酸塩 (100mg/kg, 和光純薬工業) 及び L-アスコルビン酸 (100mg/kg, 和光純薬工業) を X 線照射と併用投与した。

マウスへの腫瘍細胞移植

本実験には腫瘍細胞として C3H マウス自然発生の SCC-Ⅶ腫瘍を用いて、C3H マウスの右大腿部にツベルクリン針によって 1×10^6 個 / 0.05ml を皮下移植した。SCC-Ⅶ腫瘍に付いては既に詳しい報告がある²¹⁾。

SCC-Ⅶ腫瘍は移植後、約 1 週間で 3 ~ 4mm 径に腫瘍は成長した。

腫瘍体積の測定法

各マウスの右大腿部の腫瘍体積変化は次式より求めた。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = (\text{腫瘍長径}) \times (\text{腫瘍短径})^2 \times \left(\frac{\pi}{6}\right)$$

腫瘍容積変化は処理開始時の腫瘍容積を 1 とし、毎日測定した容積との相対体積が 2 倍から 10 倍になる日数 (成長遅延日数) を指標として抗腫瘍効果を評価した。

X 線の照射法

大腿部に腫瘍を移植した 9 週齢マウス (C3H/He Slc) 44 匹を、1 群: Control 群, 2 群: 照射単独群, 3 群: システアミン塩酸塩 + X 線照射群, 4 群: L-アスコルビン酸 + X 線照射群の 4 群 (1 群あたり 11 匹のマウス) に分けた。

各 4 処理群には 11 匹ずつのマウスを用い、各マウスは識別できるように体表の毛を一部除去し個体マークを付けた。X 線 (16Gy) 局所照射の 20 分前に、担癌マウスに対してシステアミン塩酸塩投与群では、100mg/kg を生理食塩水に溶かし、腹腔内投与した。L-アスコルビン酸投与群では 100mg/kg を生理食塩水に溶かし、腹腔内投与した。投与薬剤がマウスの全身に分布するよう、20 分間の時間において、固定具に粘着テープでマウスを固定し、照射容器に設置 (全身を遮蔽し、腫瘍部のみ照射野に露出) して、各 X 線照射マウス群の腫瘍部分に 16Gy の X 線を一回局所照射した。X 線の照射条件は管電圧を 200kV, 管電流を 9mA, 照射距離を 0.38m, フィルターを 0.2mmCu, 1mmAl を用いて、線量率は 1.158Gy/min で腫瘍部に 16Gy を一回照射した。照射した日から、毎日腫瘍体積の変化をノギスで測定した。

血球数変化の意義

末梢血液中にある成熟血球は一般に放射線感受性が

低い、リンパ球だけは例外である⁷⁾。リンパ球は成熟しても感受性が高いため、骨髄が照射されなくても末梢血液が照射されるとリンパ球減少があらわれる⁷⁾。リンパ球は照射直後から減少するため、放射線被曝の指標としても用いられている。多能性幹細胞の放射線感受性はきわめて高く⁷⁾、骨髄が照射され、多能性幹細胞が死滅するほどの障害では、すべての種類の血球が減少する汎血球減少がおこる（これを再生不良貧血という）⁷⁾。再生不良貧血になると血小板の減少による出血、白血球の減少による感染症、赤血球の減少による貧血など重篤な症状があらわれる⁷⁾。リンパ球（LY）には、Bリンパ球とTリンパ球がある⁸⁾。Bリンパ球は体液性免疫に関係していて、Tリンパ球は細胞性免疫および、Bリンパ球の機能調節に関係している⁸⁾。Tリンパ球は末梢血リンパ球の70～80%を占めていて、様々な機能をもつTリンパ球に分担されている⁸⁾。その中でもキラーT細胞はウイルス感染を受けた細胞や腫瘍細胞に作用して、それを破壊する働きがある⁸⁾。顆粒白血球の好中球は白血球の中で最も数が多く、活発な運動能と貪食能があり、生体防御に重要な役割をはたしている⁸⁾。特に、炎症反応として血液中の顆粒球数は増加する⁸⁾。

血球測定の手順

各群5匹ずつマウスの尾静脈を注射針（20G×70）で刺して出血させた。出血した静脈血を微量採血用ピペットで10μl吸い上げ採血した。採取した10μlの血液を希釈して、血球計にて、総白血球数（WBC）、リンパ球数（LY）、単球数（MO）、顆粒球数（GR）を測定した。血球数の測定は、照射前日、3時間後、24時間後、3日後、7日後、15日後と経時的に測定した。

生存率による放射線防護効果の測定

マウスの全身照射

9週齢のマウス（C3H/He Slc）44匹を、1群：Control群、2群：照射単独群、3群：システアミン塩酸塩＋X線照射群、4群：L-アスコルビン酸＋X線照射群の4群（1群あたり11匹のマウス）に分けた。

各4処理群には11匹のマウスを使用し、各々のマウスは個体識別のために体表の毛を一部除去した。X線（6Gy）全身照射20分前に、システアミン塩酸塩投与群には、システアミン塩酸塩100mg/kgを生理食塩水に溶かし、腹腔内投与した。L-アスコルビン酸投与群にはL-アスコルビン酸100mg/kgを生理食塩水に溶かし、腹腔内投与した。投与薬剤がマウスの全身に分布するよう、20分間の時間をおいて、マウスを放射線吸収の少ない厚紙で製作した照射容器に入れ、各X線照射マウス群に6GyのX線を1回全身照射した。X線の照射条件は管電圧を200kV、管電流を9mA、照射距離を0.38m、フィルターを0.2mmCu＋1mmAlとし、線量率が1.158Gy/minのX線を6Gy一回全身照射した。照射した日から、毎日各処理群のマウスの体重変化を調べ、それと並行して生存率も調べた。

全身照射マウスの血球数測定

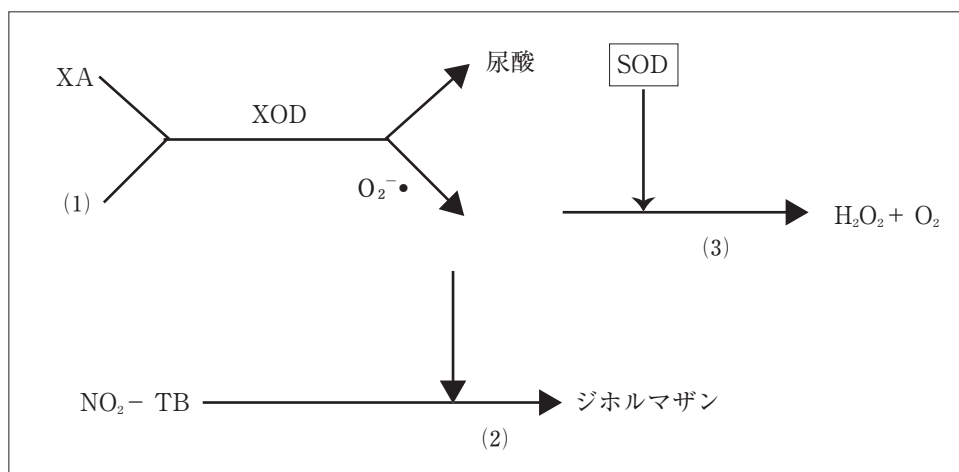
各処理群から5匹を選別し、そのマウスの尾静脈から10μl採血した。

血球計にて、総白血球数（WBC）、リンパ球数（LY）、単球数（MO）、顆粒球（GR）を測定した。血球数の測定は、照射前日、3時間後、24時間後、3日後、7日後、15日後と経時的に測定した。

SOD活性値の測定

SODは、活性酸素の一つであるスーパーオキシドアニオン（ $O_2^{\cdot-}$ ）を基質として $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ の反応を触媒する酵素である。以下にSOD活性値の測定原理を示す。

共に反応試薬である、キサンチン（XA）にキサンチンオキシダーゼ（XOD）が作用すると $O_2^{\cdot-}$ が生成する(1)。生成した $O_2^{\cdot-}$ は共存する NO_2^- -TBを還元し、ジホルマザンを形成する(2)が、反応液中にSODが存在すると $O_2^{\cdot-}$ の一部は H_2O_2 と O_2 に不均化され(3)、ジホルマザンの生成が減少する。したがって、 $O_2^{\cdot-}$ と NO_2^- -TBとの反応に基づくジホルマザン形成の減少（ $O_2^{\cdot-}$ ）



による還元呈色の程度を阻害率として求めることにより、試料中の SOD 活性値を求めることができた。

SOD 実験法

8 週齢・C3H マウスを各処理群 7 匹とし、1 群：薬剤のみ群 (in vitro)、2 群：薬剤のみ群 (in vivo)、3 群：X-ray alone、4 群：薬剤投与 + X-ray の四群に分けた。なお 1 群の薬剤濃度は、システアミン塩酸塩で 5, 10, 15mg/ml の三種類とし、2, 4 群では薬剤濃度を 100mg/kg とした。L-アスコルビン酸においては反応妨害物質であるため測定値に誤差を与えない範囲とし、0.05, 0.1, 0.15mg/ml の三種類に分けた。2, 4 群ではシステアミン塩酸塩と同様に 100mg/kg とした。SOD 活性値を測定するため、マウスの血液を眼底より採取した。マウスを使用する群 (2, 3, 4 群) においては、各々のマウスがもつ SOD 活性値を測定するため、全処置前にあらかじめ血液を採取した。薬剤がマウス体内に十分に浸透するよう、2 群：薬剤のみ群 (in vivo) においては薬剤投与から約 20 分後、3 群：X-ray alone においては X 線照射の約 20 分後、4 群：薬剤投与 + X-ray においては薬剤投与から約 20 分後に X 線照射し、照射よりさらに 20 分後に再び眼底採血により血液を採取した。反応妨害物質である L-アスコルビン酸の 1 群：薬剤のみ (in vitro) の測定では測定値に影響を与えないため^{9)~12)}に、発色試薬添加後、10 分間 37℃ に加温した後、酵素液を加えて測定を行った。SOD 活性の測定結果に基づき、次の計算法

によって SOD 活性値 (阻害率) [%] を求めた。

$$\text{SOD 活性値} [\%] = \frac{(E_{BI} - E_{BI-BI}) - (E_S - E_{S-BI})}{(E_{BI} - E_{BI-BI})} \times 100$$

E_S : 本検・検体 (S) の吸光度
 E_{BI} : 本検・盲検 (BI) の吸光度
 E_{S-BI} : 盲検・検体盲検 (S-BI) の吸光度
 E_{BI-BI} : 盲検・試薬盲検 (BI-BI) の吸光度

結果

腫瘍径測定による放射線防護効果の測定

腫瘍変化

相対腫瘍体積と X 線照射後経過日数の関係を図 1 に示した。照射開始直前の腫瘍容積を 1 にし、相対体積が 2 ~ 10 倍になるまでの日数を表 1 に示した。腫瘍成長曲線から判ることは、X-ray 単独処理群と比較して、腫瘍成長遅延が認められると放射線による障害によって腫瘍成長が抑制されていることになり、その場合は放射線感受性を示す事になる。逆に腫瘍成長促進が認められると放射線の影響を受けずに腫瘍は成長を続けることになり、この場合は放射線防護を示すことになる。

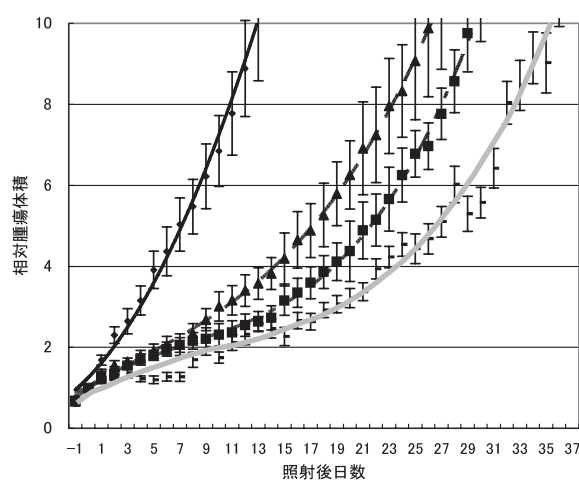


図1 腫瘍体積推移

◆ 1 群：Control, ■ 2 群：X-Ray 単独群, ▲ 3 群：システアミン塩酸塩 + XRay 併用群, — 4 群：アスコルビン酸 + X-Ray 併用群の相対腫瘍容積変化を示した。

表1 相対体積推移

相対 体積	日数 [days]			
	1 群：コントロール	2 群：X-ray	3 群：システアミン塩酸塩 + X-ray	4 群：アスコルビン酸 + X-ray
2.0	3.94	8.50	7.40	11.33
3.0	5.97	15.52	12.12	19.07
4.0	7.66	19.55	15.62	23.35
5.0	9.15	22.27	18.34	26.29
6.0	10.48	24.35	20.56	28.58
7.0	11.71	26.07	22.44	30.49
8.0	12.84	27.55	24.09	32.13
9.0	13.91	28.85	25.56	33.58
10.0	14.92	30.02	26.89	34.89

1 群：control に対して、他のいずれの群とも t 検定において明らかな有意差があった。また、2 群：X-ray alone, 3 群：システアミン塩酸塩 + X-ray, 4 群：L-アスコルビン酸 + X-ray の三群間には多重比較による最小有意差法 (LSD 法：2 way ANOVA with repeated measures, SPSS 12.0J) によって、F 値 = 1.33, 自由度 1 = 56, 自由度 2 = 2450 で有意確率 (Significance probability) $P < 0.05$ が認められた。システアミン塩酸塩 + X-ray ではシステアミン塩酸塩は放射線防護に、アスコルビン酸 + X-ray は放射線増感に作

用する事が示された (図 1)。

球数の変化

担癌マウスの各処理群における血球測定の結果を図 2 ~ 5 図に示す。測定時期は X 線照射 1 日前 (-1d), 3 時間後 (3h), 24 時間後 (24h), 3 日後 (3d), 7 日後 (7d), 15 日後 (15d) の 6 回である。なお、1 群：Control (担癌) については X 線照射をせず、他群と同時期に測定をしたため、グラフの横軸は X 線照射群

と合わせた。

1 群：Control では白血球数の大きな減少はみられなかった。処理後 (3h), 24 時間後 (24h), 3 日後 (3d), 7 日後 (7d), 15 日後 (15d) の 6 回に渡って血球測定を行った。無処理コントロール群では腫瘍が大きく成長し、腫瘍内部の壊死領域の拡大に伴う白血球数 ($120 \times 10^2/\mu\text{l}$ から $325 \times 10^2/\mu\text{l}$) の増加傾向が見られるが統計学的には有意差は認められなかった。他の血球数には変化はなかった。なお、1 群：Control の測定時期は、他群と同時期に行ったため、X 線照射群の測定時期に合わせてある (図 2)。

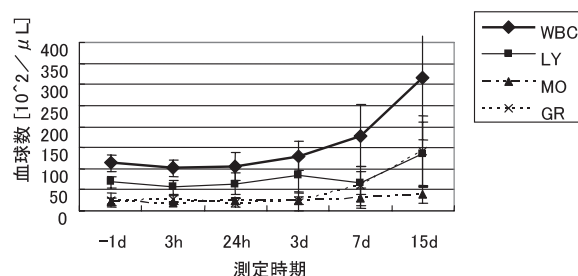


図 2 Control の血球数変化

2 群：X-ray alone では、照射部位が腫瘍部に局限しているため、照射 3 時間後から 15 日間にかけて、白血球数には有意な変化は認められなかった (図 3)。

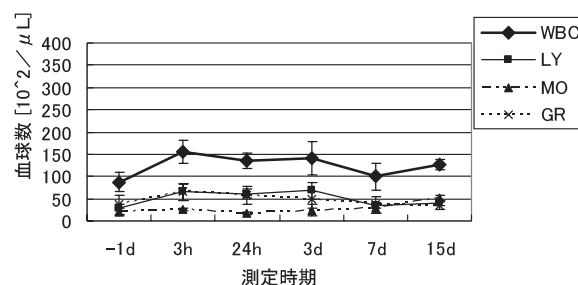


図 3 2 群：X-ray alone 血球数

3 群：システアミン塩酸塩 + X-ray では、ばらつきは有るが照射後 15 日間の白血球とリンパ球数に統計学的有意差のある変化は認められなかった (図 4)。

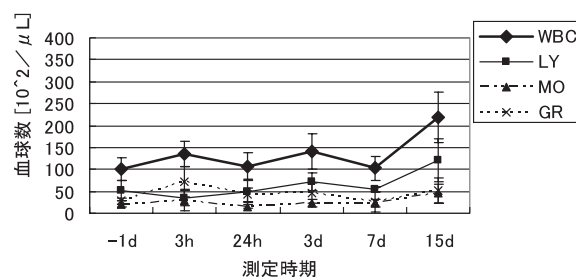


図 4 3 群：システアミン塩酸塩 + X-ray 血球数

4 群：L-アスコルビン酸 + X-ray では、照射 24 時間後に最も白血球が減少した ($150 \times 10^2/\mu\text{l}$ から $50 \times 10^2/\mu\text{l}$ へ減少, $* P < 0.01$), それ以降、徐々に回復を認めた。X 線照射群では、一過性に低下した白血球数は 24 時間以後、回復を示した (図 5)。

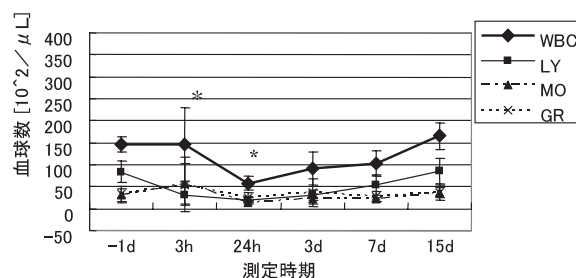


図 5 4 群：L-アスコルビン酸 + X-ray 血球数

生存率

各処理群における生存率と経過日数の関係を図 6 に示す。照射後 5, 10, 15, 20, 30 日における各群の生存率を表 3 に示す。

各処理後の生存日数は無処理コントロールを除外して観測すると、システアミン塩酸塩 + X-Ray 併用群は照射後 19 日に 10% の死亡が発生したが、X-Ray 単独群では照射後 14 日には 100% が死亡し、アスコルビン酸 + X-Ray 併用群では照射後 15 日目に 100% が死亡した。X 線全身照射後の生存日数からはアスコルビン酸の放射線防護効果は認められなかった (図 6)。

X 線照射後、5 日間隔で生存日数を調べると、シス

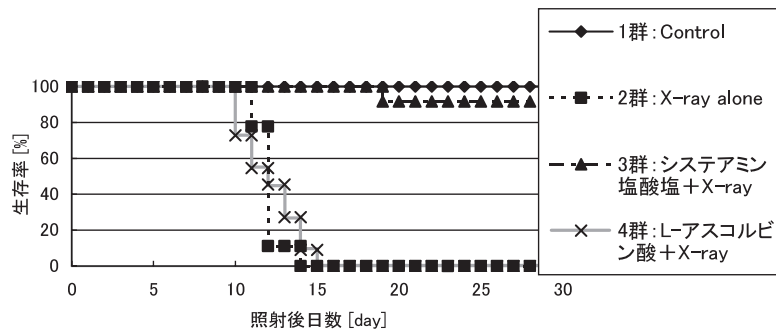


図6 生存率推移

表3 生存率

群	生存率 [%]				
	照射後: 5day	10day	15day	20day	30day
1 群: Control	100	100	100	100	100
2 群: X-ray alone	100	100	0	0	0
3 群: システアミン塩酸塩 + X-ray	100	100	100	91.7	91.7
4 群: アスコルビン酸 + X-ray	100	100	9.1	0	0

テアミン塩酸塩投与群は半致死線量の X 線を照射しても 90%以上の生存率を維持した。一方, L-アスコルビン酸投与群においては X-ray alone 群と変わらず, X 線照射の 16 日後には 0 %の生存率であった。これより, システアミン塩酸塩は高い放射線防護効果をもつが, L-アスコルビン酸には放射線防護効果が認められなかった (表3),

無担癌マウスの血球数変化

各群における血球測定の結果を図7-10に示す。測定時期は X 線照射 1 日前 (-1d), 3 時間後 (3h), 24 時間後 (24h), 3 日後 (3d), 7 日後 (7d), 15 日後 (15d) の 6 回である。なお, 1 群: Control については X 線照射をせず, 他群と同時期に測定をしたため, グラフの横軸は X 線照射群と合わせた。

1 群: Control においては全くの無処置であるが, 24h, 3d での測定において白血球数が ($160 \times 10^2/\mu\text{l}$ から $210 \times 10^2/\mu\text{l}$) 増加し, その後, 徐々に減少した。図2の担癌マウスと比べて, 担癌マウスは 15 日後に白血球数の増加が見られるが, 生存率のコントロールマ

ウスには大きな変化が見られなかった。その他の点では大きな違いは認められなかった (図7)。

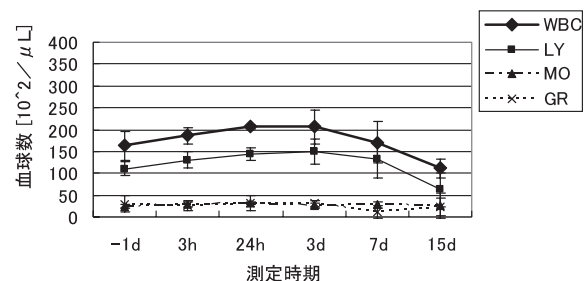


図7 1 群: Control 血球数 (無担がんマウス)

X 線照射群では, 照射直後 (3d) から 24 時間後にかけて白血球数の大幅な減少 ($140 \times 10^2/\mu\text{l}$ から $20 \times 10^2/\mu\text{l}$) が見られた。照射 3 日後には放射線損傷による血球減少によって血球測定ができないマウスも発生した。白血球はほとんど再生されず, 血球減少の一途をたどった。図3の担癌マウスと比べて, 生存率のマウスは全身照射を行っているため, 白血球数, リンパ球数ともに著しい ($140 \times 10^2/\mu\text{l}$ から $20 \times 10^2/\mu\text{l}$) の減

少がみられた。担癌マウスは局部照射のため、血球数の変化が小さい（図8）。

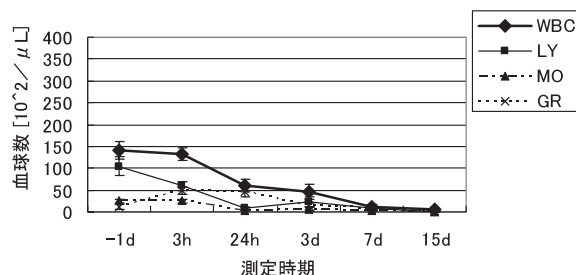


図8 2群：X-ray alone 血球数（無担がんマウス）

3群：システアミン塩酸塩 + X-ray 処理群では白血球，リンパ球は $125 \times 10^2/\mu\text{L}$ から $15 \times 10^2/\mu\text{L}$ に低下したが，好中球，単球数は一過性の増加（ $20 \times 10^2/\mu\text{L}$ から $50 \times 10^2/\mu\text{L}$ に増加）を示した。照射したX線線量が大き過ぎたために，全ての血球数は低下を示した。図4の担癌マウスと比べて，生存率のマウスは全身照射を行っているため，白血球数，リンパ球数ともに著しい減少がみられた。担癌マウスは局部照射のため，血球数の変化が小さいことがわかった（図9）。

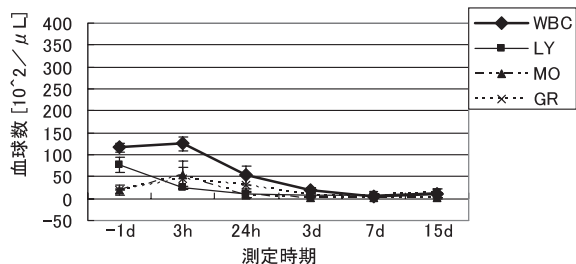


図9 3群：システアミン塩酸塩 + X-ray 血球数（無担がんマウス）

4群：L-アスコルビン酸 + X-ray では照射3日後には血球数低下が激しく血球測定のできないマウスもあり，白血球はほとんど再生されていないと考えられた。図5の担癌マウスの血球数変化と比べて，図10の生存マウスは全身照射を行っているため，白血球数，リンパ球数ともに著しい減少（ $125 \times 10^2/\mu\text{L}$ から $5 \times 10^2/\mu\text{L}$ ）がみられた。担癌マウスは局部照射のため，

血球数の変化が小さい（図10）。

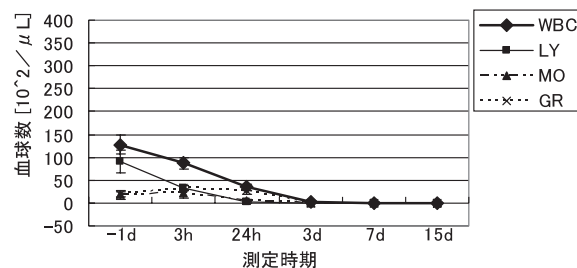


図10 4群：L-アスコルビン酸 + X-ray 血球数（無担がんマウス）

SOD 活性値（阻害率）^{9)~12)} の測定

システアミン塩酸塩（5, 10, 15mg/ml）と L-アスコルビン酸（0.05, 0.10, 0.15mg/ml）の in vitro おける SOD 活性値 [%] を濃度別に測定した。

システアミン塩酸塩では 25% 以下，L-アスコルビン酸においては 15% 以下の阻害率であった。測定値のばらつき（SD）から，L-アスコルビン酸の方が安定して作用すると考えられた（表4）。システアミン塩酸塩の SOD 活性値の測定結果を表5，図11に示す。L-アスコルビン酸の SOD 活性値の測定結果を表6，図12に示す。

表4 薬剤の抗酸化作用（in vitro）

薬剤	濃度 [mg/ml]	SOD 活性値 [%]	SD
システアミン塩酸塩	5	4.3	6.7
	10	25.0	30.0
	15	23.8	27.6
L-アスコルビン酸	0.05	1.7	1.2
	0.10	9.1	2.5
	0.15	11.6	8.0

2群：システアミン塩酸塩のみ（in vivo）の結果から，システアミン塩酸塩（100mg/kg）はマウス生体内においても抗酸化作用をもつことがわかった。3群：システアミン塩酸塩 + X-ray の SOD 活性値が X 線照射前後で変化がなかったのは，照射によってラジカルが

表5 SOD 活性：システアミン塩酸塩

薬 剤 濃 度 [mg/kg]	群	測定時期	SOD 活 性 値 [%]	SD	有意差 (T 検定結果)
100	2 群：システアミンのみ (in vivo)	直前	17.9	5.5	あり
		直後	22.5	3.2	
100	3 群：システアミン塩酸 塩 + X-ray	直前	30.7	7.6	なし
		直後	27.8	4.7	
100	腫瘍群（システアミン塩 酸塩投与）	直前	23.0	2.8	なし
		直後	24.6	4.1	

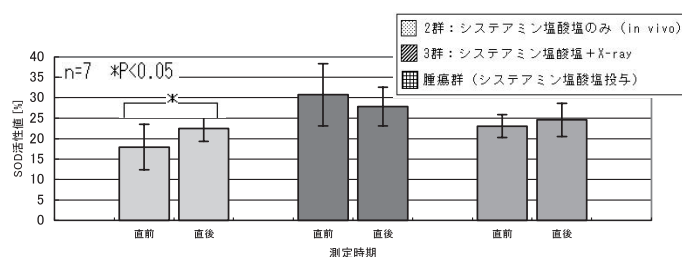


図 11 システアミン塩酸塩の SOD 活性値 (in vivo)

表6 SOD 活性：L-アスコルビン酸

薬 剤 濃 度 [mg/kg]	群	測定時期	SOD 活 性 値 [%]	SD	有意差 (T 検定結果)
100	2 群：L-アスコルビン 酸のみ (in vivo)	直前	19.4	3.9	あり
		直後	24.6	3.2	
100	3 群：L-アスコルビン 酸 + X-ray	直前	26.1	3.3	なし
		直後	29.8	4.8	

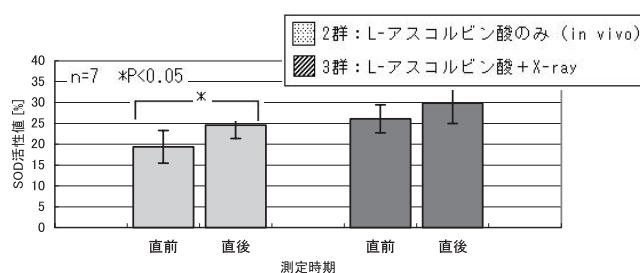


図 12 L-アスコルビン酸の SOD 活性値 (in vivo)

大量に発生したものであり、抗酸化作用がないとは考えられない。また、腫瘍群においてもシステアミン塩酸塩投与の前後において SOD 活性値の変化が見られなかった。2 群と腫瘍群は担癌の有無のみの違いであるので、2 群と比較することにより、腫瘍組織にはシ

ステアミン塩酸塩が作用していないと考えられた（表 5，図 11）。

2 群：L-アスコルビン酸のみ (in vivo) の結果から、L-アスコルビン酸 (100mg/kg) はマウス生体内にお

いても抗酸化作用を持つことがわかった。システアミン塩酸塩と同様、3群：L-アスコルビン酸+X-rayのSOD活性値がX線照射前後で変化がなかったのは、照射によってラジカルが大量に発生したためであり、抗酸化作用がないとは考えられない（表6、図12）。

考察

腫瘍径の測定

システアミン塩酸塩は放射線防護剤としての効果が証明されている薬剤である¹⁾²⁾。また、L-アスコルビン酸（ビタミンC）は酸化防止剤として有名である¹³⁾。放射線防護作用は薬剤の持つ抗酸化作用によるものであると考えられている。システアミン塩酸塩及びL-アスコルビン酸の作用機序に違いはあるものの、システアミン塩酸塩もL-アスコルビン酸も共に抗酸化作用をもつことは証明されている¹⁾²⁾¹³⁾。しかし、本実験では両薬剤の抗酸化作用は確認できたが、腫瘍組織においてはL-アスコルビン酸には放射線防護効果を示さず、放射線増強効果として作用した。この原因について、①使用した薬剤は抗酸化能力を有していたか、②薬剤の投与量は適当であったか、③X線照射群においては照射前に薬剤がマウス体内に十分浸透していたか、④薬剤が腫瘍細胞に作用していたか、の4点より考察を行った。

① 使用した薬剤の抗酸化能力

薬剤の抗酸化能力を調べるために、SOD活性値をin vitroにおいて測定することにより確認をした。本研究の結果からはシステアミン塩酸塩では薬剤濃度10mg/mlで約25.0%の酸化阻害率を示した。また、L-アスコルビン酸もまた酸化阻害物質であり、抗酸化の測定値にL-アスコルビン酸自体が影響するため、薬剤濃度を20mg/dlまでとして測定した。アスコルビン酸においては5, 10, 15mg/dl (0.05, 0.10, 0.15mg/ml) 濃度の濃度で測定を行った。酸化阻害率は濃度と共に上昇し、0.15mg/mlの濃度では11.6%であった。L-アスコルビン酸は過剰摂取をしても排泄され、副作用が無いため、多量投与が可能な薬剤で

ある。濃度の上昇とともにラジカル除去能力も上昇すると考えられた。さらに、マウス生体内（in vivo）では100mg/kg濃度において、システアミン塩酸塩で22.5%、L-アスコルビン酸では24.6%のSOD活性値であった。なお、L-アスコルビン酸はマウス体内では血液や体液によって濃度が薄まり20mg/dl以下の濃度になっていると考えられるため、in vivo測定での薬剤濃度はシステアミン塩酸塩と同様の100mg/kgを投与量とした。

② 薬剤の投与量について

両薬剤の投与量は100mg/kgとした³⁾。アスコルビン酸の投与量は、比較となるシステアミン塩酸塩と同様の濃度とした。測定の結果、生体内におけるSOD活性値がシステアミン塩酸塩とほぼ同率であることから、L-アスコルビン酸の投与量は適当であったと考えた。システアミン塩酸塩は強い毒性を有するため、高濃度では投与できないとされている⁴⁾。

③ 薬剤の体内分布

先行実験によって、腹腔内投与薬剤の血中濃度、腫瘍内濃度又は薬剤効果の作用時間は薬剤投与の約20分後に有意な作用増加が確認されているので、本実験に付いても、薬剤投与後20分から照射を行った³⁾¹⁴⁾。実験の簡便化のため、薬剤の投与法は腹腔内投与とした。静注による投与が望ましいが、薬剤が高濃度を保ったまま作用するため、副作用が増強することもあると考慮した¹⁵⁾。また、静注では注入速度によりショック状態を引き起こすこと、急速に大量の液を投与することで循環液量の増大による心臓への負担が大きくなり、投与量をできるかぎり少なくする必要があること¹⁵⁾なども考慮し腹腔内投与とした。腹腔内投与は投与量を多く、高濃度とすることができる上、腸腹膜から吸収されることにより薬剤の迅速な吸収・拡散が期待できた¹⁴⁾。SOD活性の測定においても、処置直後の測定は薬剤投与後、約20分で行った。その結果、システアミン塩酸塩、L-アスコルビン酸ともに投与直後にSOD活性値の上昇が見られた。以上結果より、投与

後20分で薬剤は体内に十分浸透していたと考えた。

④ 薬剤の腫瘍細胞への効果

前述のように両薬剤の抗酸化能力が証明されても、L-アスコルビン酸においては腫瘍組織で放射線増感効果が観測された。多重比較による最小有意差法(LSD法, 2 way ANOVA with repited measues, SPSS 12.0J)で有意差が示され、放射線増感作用がある事を確認した。そこで、正常マウスと担癌マウス(SCC-Ⅶ, $1 \times 10^6/0.05\text{ml}$, 皮下移植)を用いSOD活性の測定を行った。システアミン塩酸塩 100mg/kg を投与し20分後測定をした。その結果、正常マウスではSOD活性値の上昇が見られたが、担癌マウスでは変化は見られなかった。このことは、システアミン塩酸塩(SH化合物)は酸素を組織から除去する作用があるため、酸素存在下でより効果が発揮されと考えられており⁴⁾、低酸素化する腫瘍よりも正常組織で効果が大きいと期待されている⁴⁾。腫瘍組織においては腫瘍壊死部では血流が少なく、システアミン塩酸塩の到達量が少なく、システアミン塩酸塩の抗酸化作用がみられないことも説明できた。

L-アスコルビン酸には抗酸化作用だけでなく抗腫瘍効果、免疫能増強など多くの作用あると考えられている¹⁾。薬剤のin vitro, in vivoにおける抗酸化能力はSOD活性の測定によって確認できた。薬剤投与し放射線照射前後のSOD活性値を調べると放射線を照射してもSOD活性量に変化しなかった事はX線照射によって発生したラジカル($\text{O}_2^{\cdot-}$)を除去した事による腫瘍組織への放射線防護が考えられ、L-アスコルビン酸の抗酸化作用によるものと示唆できた。このことは、生体で過剰に生成されるフリーラジカル障害から生体を防護する働きがある⁴⁾、と考えられていることから説明できる。しかしながら、L-アスコルビン酸が有するラジカル除去能(抗酸化力)に対し、X線照射によるラジカルの発生量が非常に大きいため、除去できるラジカル量は相対的に小さくなる。抗酸化作用は有していても、その除去能力よりはるかに多量

のラジカルが発生すれば、除去されないラジカルが増え、放射線防護とはならないと考えられた。腫瘍組織においても放射線防護効果は確認できなかったが、腫瘍組織は低酸素で血流に乏しいことから、薬剤到達能低下に伴う放射線効果の低下が考えられた。また、L-アスコルビン酸の作用の一つとされる抗腫瘍効果も腫瘍成長速度から放射線効果増強の形で確認された。L-アスコルビン酸については腫瘍細胞には毒性を示し、更に投与量の大小によって制ガン剤の効果が異なるとの報告もあり¹⁶⁾、また、アスコルビン酸のような酸化防止剤は血管内皮細胞に作用し血管内皮細胞増殖因子(VEGF)によって血管内皮の透過性が増加し、コラーゲン生成を促進する事で腫瘍の発育や浸潤に抵抗性になるとの報告もある¹⁷⁾。また、アスコルビン酸には腫瘍の転移や浸潤を抑制する作用のある事も報告されている¹⁸⁾。また、放射線照射によってアポトーシスが誘導されるが、アスコルビン酸存在下では細胞内にペルオキシダーゼが生成され、Bcl-2やTNFRSF6の発現を促進し、抗腫瘍効果が現われるとの報告もある¹⁹⁾。以上のような報告は本実験によるアスコルビン酸の抗腫瘍効果と一致しており、抗酸化作用のみで放射線防護を論じる事に問題がある事を示している。

血球測定結果

血球測定の結果については、1群:Controlの白血球数は日数が経過するほど増加しているのは、顆粒球の増加のためと考えた。顆粒球に属する好中球は生体防御に重要な働きをし、炎症があるときには、これに反応して増加する⁹⁾。また、1群:Controlは担癌状態であり、日を追うごとに癌組織が成長し、腫瘍組織中央部に壊死領域が発生し、炎症を誘発したため好中球が増加したと考えた。4群:L-アスコルビン酸+X線照射群は照射後に一過性のリンパ球の減少がみられた。リンパ球の放射線感受性はきわめて高く、骨髓が照射されなくても末梢血液が照射されるとリンパ球減少がみられることがあり⁹⁾、4群:L-アスコルビン酸+X線照射群のリンパ球減少もX線照射による減少と考えられた。

以上の結果は、12Gyの局所照射（右後足のみ）においては、骨髓の造血機構に障害をきたすほどの放射線影響は見られないと考えられた²²⁾。

生存率

本研究で示した様にシステアミン塩酸塩は高い放射線防護能力をもつが、L-アスコルビン酸には放射線防護効果は示されなかった。SOD活性の測定結果を見ると、正常組織における両薬剤投与＋X線照射後のSOD活性値はほぼ同じであった。それにも関わらず、L-アスコルビン酸には放射線防護効果が見られなかった。しかし、L-アスコルビン酸は腫瘍に対しては放射線増感作用が現われた。放射線が照射されたときに最初に誘起される化学変化は、生物体の約80%を占める水の放射線分解種としてのラジカル： $\text{OH}\cdot$ （G値＝2.7）、 $\text{H}\cdot$ （G値＝0.55）と水和電子： e^-_{aq} （G値＝2.7）が主である。SOD活性は先に述べたとおり $\text{O}_2^-\cdot$ （スーパーオキシド）を検出することで抗酸化能力を測定する方法であるので、生体内において重要な作用をする $\text{OH}\cdot$ 、 H_2O_2 、 $^1\text{O}_2$ などの活性酸素の阻害率を直接測定することはできないと考えられた。

システアミン塩酸塩はその作用機序により多くの種類のラジカルを除去できると考えられ、 $\text{O}_2^-\cdot$ だけを検出するSOD活性値の測定だけではその抗酸化作用を測ることはできないと考えられた。よって、実際にはSOD活性の結果以上の抗酸化作用があったと期待できた。一方、L-アスコルビン酸にはSODと同様、 $\text{O}_2^-\cdot$ を除去する作用があるとされているが、その反応速度は4～5桁低いという報告がある⁴⁾。最も反応性の高い $\text{OH}\cdot$ とはすみやかに反応するが、 $\text{OH}\cdot$ は蛋白質や脂質など多くのものとも同様に速い反応を示すため、 $\text{OH}\cdot$ の消去にL-アスコルビン酸が特異的な役割を果たすことは考えられていない。また、SOD活性において、阻害対象である $\text{O}_2^-\cdot$ は酸素存在下で e^-_{aq} 、 $\text{OH}\cdot$ 、 $\text{H}\cdot$ のどのラジカルからでも生成するが、酸素分子は水よりも無極性溶媒に溶けやすく、生体の中では、例えば生体膜中の脂質部分に非常によく解ける性質をも

つ²⁰⁾。したがって、 $\text{O}_2^-\cdot$ の発生確率は脂質部分でかなり高いと考えられた。最も反応性の高い $\text{OH}\cdot$ も、脂質において特に強い酸化力をもつとされているが、水溶性のアスコルビン酸は疎水性である脂質層のラジカルを捕捉することは出来ない。よって、L-アスコルビン酸にはそれらの活性酸素を消去する能力は弱く、特異的に消去されるのは、主に水層に発生し、捕捉可能な少量の活性酸素だけであると考えられた。

以上の結果から、100mg/kg濃度において、SOD活性の測定では測り知れないシステアミン塩酸塩の抗酸化能力に比較して、L-アスコルビン酸の抗酸化能力は非常に小さいく、また、L-アスコルビン酸が水溶性であり、作用部位が限られることに起因している事も考えられた。共に $\text{O}_2^-\cdot$ に対して高い反応性をもち、抗酸化という作用は同じでありながら、両薬剤にこれほどの放射線防護能力の差がでたことはここに起因していると考えられた。

血球数測定

血球測定の結果より、全身照射をした2群：X-ray alone、3群：システアミン塩酸塩＋X-ray、4群：L-アスコルビン酸＋X-rayは、照射直後からリンパ球の減少がみられ、放射線感受性の高いリンパ球がX線照射によって障害を受けたと考えられた。システアミン併用群が他の処理群よりリンパ球減少を抑制したことから骨髓の造血細胞にも防護効果が考えられ、システアミン塩酸塩の放射線防護効果が示唆された²²⁾。

結語

システアミン塩酸塩は抗酸化能力をもち、正常組織において強い放射線防護効果を示した。L-アスコルビン酸は、薬剤自体は抗酸化能力をもつが、マウスの生体内において放射線防護効果は見られなかった。この事は抗酸化作用のみで放射線防護を論じる事は出来ない事を示している。

参考文献

- 1) Eric J. Hall: Chapter-6, The Oxygen Effect and Reoxygenation. Radiology for the Radiologist, Fifth Edition, Edited by Eric J. Hall, Lippincott Williams&Wilkins, 91-111, 2000
- 2) 長谷川武夫, 具然和, 伊芸直樹他: 放射線防護剤および放射線増感剤に関する研究, 鈴鹿医療科学大学紀要, No. 9, 87-95, 2002
- 3) Harold E. Johns and John R. Cunningham: Chapter-17, Radiobiology, The Physics of Radiology, Fourth Edition, Edited by Harold E. Johns & John R. Cunningham, Charles C Thomas Publisher, 670-718, 1983
- 4) Lukashin BP: Comparative study of the radiation-protective effectiveness of low doses of cysteamine, heparin, and naphthizine in experiments on mice [Radiats Biol Radioecol; 41 (3), 310-312, 2001
- 5) 植木厚: 9章 アスコルビン酸(ビタミンC)「ビタミン学Ⅱ」[東京化学同人] 567-599, 1982
- 6) 糸川嘉則, 松倉茂, 清野裕: Ⅱ章 栄養素の過不足による障害, Ⅲ章 疾病と栄養「患者指導のための病気と栄養」[南山堂] p. 127-128, 354-355 1995
- 7) 山口彦之, 吉野達治: 放射線生物学 [裳華房], 172-174, 1995
- 8) 牛木辰夫: 第8章 血液と骨髄, 入門組織学, 南江堂, 91-100, 1989
- 9) 花田寿郎, 茂手木皓喜: 臨床検査機器・試薬 8, 629-635, 1985
- 10) McCord, J. M. and Fridovich, I.: J. Biol. Chem 244, 6049-6055, 1969
- 11) 篠原力雄: 臨床検査 29, 1447-1452, 1985
- 12) 茂手木皓喜: 臨床検査機器・試薬 9, 1071-1080, 1986
- 13) 石橋源次, 伊藤順子, 奥恒行他: 3. 生体の機能を調節しているものは何か。生化学, 南江堂, 編集奥恒行, 高橋正佑。127-185, 1998
- 14) Takeo Hasegawa Yoshimasa Tanaka, Chang W. Song: Increase of Oxygen Tension and Potentiation of Radiation Effects Using Pentoxifylline. Research Reports of Suzuka University of Med. Sci., No2, 27-32, 1995
- 15) Casciari J. J, Riordan N. H., Schmidt T. L. et al: Cytotoxicity of ascorbate, lipoic acid, and other antioxidants in hollow fibre in vitro tumours. Br. J. Cancer, 84(11), 1544-1550, 2001
- 16) Ashino H, Shimamura M. Nakajima H, et al: Novel function of ascorbic acid as an angiostatic factor. Angiogenesis, 6(4), 259-269, 2003
- 17) Nagao N, Nakayama T, Etoh T, et al: Tumor invasion is inhibited by phosphorylated ascorbate via enrichment of intracellular vitamin C and decreasing of oxidative stress., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 126(9), 511-518, 2000
- 18) Witenberg B, Kletter Y, Kalir H. H. et al: Ascorbic acid inhibits apoptosis induced by X irradiation in HL60 myeloid leukemia cells., Radiat. Res. 152(5), 468-478, 1999
- 19) 社団法人 日本アイソトープ協会: 6章 動物の取り扱い「ラジオアイソトープ薬物代謝実験法」[丸善株式会社], 248-253, 1981
- 20) 中野稔, 浅田浩二, 大柳善彦: 第I部 活性酸素の生成, 第II部 活性酸素の消去「活性酸素—生物での生成・消去・作用の分子機構」[共立出版株式会社], 160-165, 322-326, 1993
- 21) Shibamoto Y, Takahashi M, Ono K et al: Recovery from potentially lethal damage after X-irradiation in three experimental tumors in mice. Jpn. J. Cancer Res. (Gann), 76, 278-283, 1985
- 22) Doughty H. A.: Medical management of the haemopoietic syndrome in acute radiation sickness., J. R. Army Med Corps. 150, (Suppl-1), 11-16, 2004

Research on radioprotective consequence of Cysteamine hydrochloride and Vitamin C for radiation effects

Toshihumi YASUDA²⁾, Maya ANZUI¹⁾, Maho OGINO¹⁾, Satoshi ANDO²⁾,
Morikazu AMANO²⁾, Michihiro KUREKI²⁾, Tatsunori KOBAYASHI²⁾,
Katsuyuki MIYATA²⁾, Tatsuki KUROSAKI¹⁾, Kentarou SUZUKI¹⁾,
Kengo SUGIMOTO¹⁾, Toshihiro MAENAKA²⁾, Yeunhwa GU¹⁾²⁾,
Tohru TAKAHASHI³⁾, Takeo HASEGAWA¹⁾²⁾

¹⁾Department of Radiological Technology. Suzuka University of Medical Science.

²⁾Department of Health Science. Graduate School of Suzuka University of Medical Science

³⁾Department of Radioisotope center, Kansai Medical University.

Key Words: Cysteamine, L-ascorbic acid, Radiation damage, antioxidant, Radioprotection

Abstract

All antioxidant drugs don't provide protection from radiation as evidenced by their SOD activity. Vitamin C, a well known antioxidant, provides little or no protection from radiation sickness or damage, whereas, Cysteamine hydrochloride provides significant protection. An SCC-VII tumor of C3H mice were used. They were given a 6Gy irradiation to the mice with Cysteamine or Vitamin C. We checked the intestinal tissues damage and survival fraction of mice after X-ray irradiation combined with Cysteamine or Vitamin C. Unfortunately, Cysteamine produces heavy side-effects such as vomiting, fever and general physical discomfort. Vitamin C has no such side effects, and though both are antioxidants, Vitamin C was not effective in protecting mice from radiation. In animal trials where radiation was administered (6Gy), Cysteamine protection (400mg/kg) was such that after two years 90% of these mice are living without cancer or disease. Whereas all the mice protected with only Vitamin C (400mg/kg) died after one radiation application (6Gy) after only two weeks. Four hundred mg/kg of Vitamin C and Cysteamine provide nearly the same antioxidant protection. Antioxidants alone seem unable to provide protection from radiation.