

放射線による Ehrlich 腹水癌細胞の細胞分裂遅延に およぼすグルタチオンの効果 (II)

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 (II).

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.

1. Glutathione (30 mg/mouse) was administered intraperitoneally 30 minutes, 3 hours and 6 hours before irradiation with 400 rad. Glutathione accelerated the recovery of mitosis after irradiation. The action was most intense when it was administered 30 minutes before irradiation, followed by the administration 3 and 6 hours before irradiation.

2. Thirty minutes, 3 hours, 6 hours and 9 hours after irradiation with 400 rad, glutathione (30 mg/mouse) was administered intraperitoneally. When glutathione was administered after irradiation, the reappearance of mitotic cells was inhibited. Such inhibition was most intense when it was given 3 hours after irradiation.

3. Changes of mitotic index after administration of glutathione (0, 5, 10, 20, 30 and 40 mg/mouse) alone were observed. The mitotic index in the groups with the administration 20 to 40 mg of glutathione showed a slight decrease until 6 hours after administration, and then showed a marked increase 12 to 15 hours after administration.

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

緒 言

増殖している細胞集団に放射線を照射すれば、核分裂像が一時的に消失し、再び現われてくる、その上、SH化合物の投与により造血及び腸管組

織では核分裂像は、早くから回復を示す¹⁾²⁾。

先に、著者は、還元型グルタチオン (以下GSHと略す) を投与することにより、Ehrlich 腹水癌細胞の核分裂遅延が、軽減することを報告し

た³⁾。即ち、回復速度は、小線量 (100, 200 rad) では、GSHの投与でほとんど変化はないが、線量を増加 (400, 600 rad) させると、GSHの効果が見られる。その上、いずれの線量によっても、照射後12時間には、GSH投与群の核分裂指数が高くなる。また、GSH単独投与の場合にも、投与後約12時間に、核分裂指数の増加が認められた。このことから、GSHの細胞分裂への薬理学的作用も考えられる。

一方、細胞分裂遅延の現象から、SH化合物の投与時期と放射線防護効果に関する報告は少なく、従来、動物及び細胞の致死率からの検索が多い⁴⁾。SH化合物の投与を、放射線の照射の前後で行なうことにより、核分裂の回復過程の変化、及びSH化合物の効果を観察することは、放射線による核分裂遅延機構及びGSH化合物の放射線防護機構を解明するための重要な手がかりになると考えられる。

著者らは、この点から、GSHの投与時期をかえた場合の核分裂の回復へのGSHの効果及び各種濃度のGSHの核分裂への作用を、Ehrlich 腹水癌細胞を使用して検討した。

材料及び方法

詳細については前述した³⁾。

実験動物は、dd 雌性マウス、週令8~10週、体重20~25グラムのものを使用した。使用した放射線は、200kVp X線、17.8mA、フィルター 1.0 mmCu + 1.0mmAl、半価層1.55mmCu、F.S.D. 50 cm、20R/min. である。照射線量は400 rad であつた。マウス腹腔内に Ehrlich 腹水癌細胞を移植 (200万細胞/匹) 後、7日目に、各実験に使用した。染色はギムザ染色法を使用した。SH化合物は、還元型グルタチオン (GSH) で、生理的食塩水 0.2ml 当りに各種濃度のものを溶解し、照射前30分、3、6時間前、及び照射後、30分、3、6、9時間に、マウスの腹腔内に注射した。GSHの濃度は、5、10、20、30、40mg/匹であつた。

結 果

1) GSHの照射前投与の効果

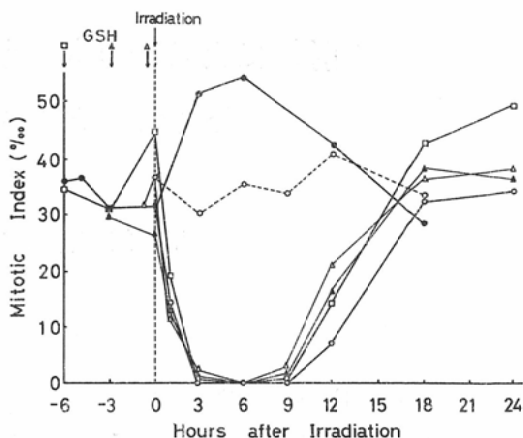


Fig. 1. Effects of GSH (30 mg/mouse) on the recovery phase of radiation-induced mitotic delay. The GSH was injected intraperitoneally at 30 minutes, 3 hours and 6 hours before irradiation with 400 rad of X-ray, and then the mitotic index was determined at intervals.

-○ control
- GSH treatment (without irradiation)
- 400 rad
- △——△ GSH (30 minutes before irradiation) + 400 rad
- ▲——▲ GSH (3 hours before irradiation) + 400 rad
- GSH (6 hours before irradiation) + 400 rad

放射線照射 (400 rad) 前、30分、3、6時間に、GSH (30mg/匹) を腹腔内に投与し、その後の核分裂指数の変化を Fig 1 に示す。

対照群 (非GSH, 非照射) は、30~40%の間を増減している。GSH単独群は、投与後、わずかな減少を示し、投与6時間頃から増加し、9、12時間には50%以上の核分裂指数を示す。その後減少して、24時間後には、対照値とほとんど変わらない。400 rad 照射群は照射後3時間で、核分裂像は消失する。その後、9時間までは、核分裂像は認められないが、12時間後にわずかな核分裂像が現われ、18時間後には、対照値に回復する。照射30分前投与群は、照射後9時間までは、400 rad 照射群と、ほとんど変わらないが、12時間後には21%と回復が早い。照射3時間前投与群は、照射後9時間までは、400 rad 群とほぼ同様であるが、

12時間後には、17%となり、照射30分前投与群よりは、回復は遅いが、400 rad 群よりは早い。照射6時間前投与群は、照射時すでにGSHによる分裂促進がある程度認められるが、照射により急激な低下を示す。照射後12時間に、14%となり、わずかな、GSHの効果が認められた。

GSH単独で、投与後9～12時間に、核分裂指数の増加が観察されるが、放射線照射により分裂消失からの再出現に対するGSHの核分裂回復を促進させる効果は、照射前30分が一番強く、次いで3、6時間の順である。

2) GSHの照射後投与の効果

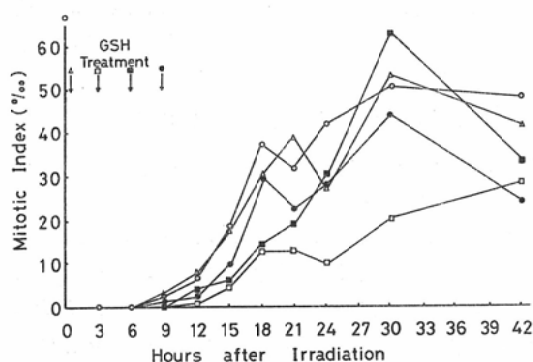


Fig. 2. Effects of GSH (30 mg/mouse) on the recovery phase of radiation-induced mitotic delay. The tumor-bearing mice were irradiated with 400 rad of X-rays, and the GSH was injected intraperitoneally at 30 minutes, 3 hours, 6 hours and 9 hours after irradiation, and then the mitotic index determined at intervals.

- 400 rad
- △—△ 400 rad + GSH (immediately)
- 400 rad + GSH (after 3 hours)
- 400 rad + GSH (after 6 hours)
- 400 rad + GSH (after 9 hours)

放射線 (400 rad) 照射後GSH (30mg/匹) を、30分、3、6、9時間に腹腔内投与した場合の核分裂指数の変化を Fig. 2 に示す。400 rad 照射群は、Fig. 1、と同様に、照射後9時間頃から核分裂像の出現がみられる。照射30分後投与群は、400 rad 群とほぼ同様の曲線を描き、GSHの作用は認められない。照射後3時間投与群では、核分裂指数の回復が非常に遅く、15時間後によ

く、10.0%に回復する。GSHにより、核分裂回復が抑制される。照射後6時間投与群では、照射後18時間までは、3時間後投与群と同様の傾向を示す。しかし、その後核分裂指数は増加し、24時間後には、30.4%となり、30時間後には、62.6%と非常に多くの核分裂像がみられる。この場合も、GSHにより核分裂の回復が抑制される。照射後9時間投与群は、照射後12時間から核分裂像がみられ、400 rad 群と同様の曲線を示すが、GSHによる分裂の回復は、わずかに抑制される。

3) GSHの各種投与量による核分裂指数の変化

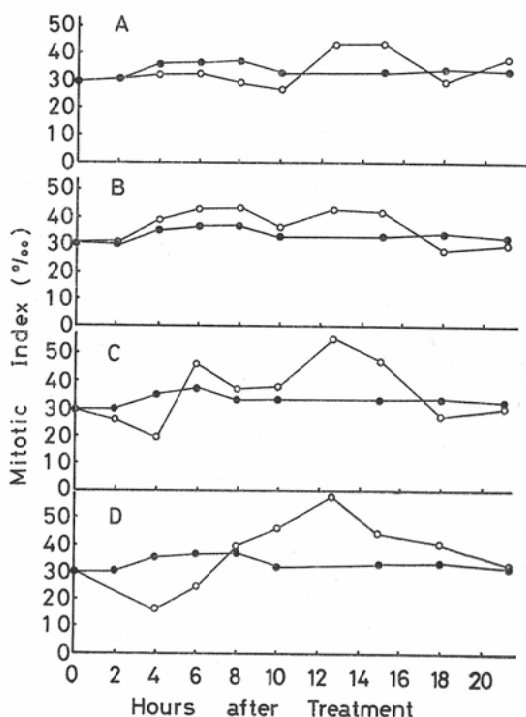


Fig. 3. Effects of GSH on mitotic activity of random population in Ehrlich ascites tumor cells. Administration dose of GSH was 5 mg/mouse (A), 10 mg/mouse (B), 20 mg/mouse (C) and 40 mg/mouse (D). The mitotic index was determined at intervals after treatment of GSH.

- control
- GSH treatment

GSHの投与量を5, 10, 20, 40mg/匹と変えた場合の核分裂指数の変化を Fig. 3 に示す. 5 mg/匹投与では, 投与後13~15時間に, 対照値に比較して, わずかに多い核分裂指数を示す. 10mg/匹投与では, 4~8時間と, 13~15時間に2つのピークが認められる. 20mg/匹投与では, 投与後4時間までは, 核分裂指数が減少し, 続いて漸増し, 13時間後に大きな, ピークが観察される. 40mg/匹投与では, 核分裂指数の減少が, 投与後6時間までみられ, その後増加し, 13時間後に大きなピークが認められた.

これらのことから, GSHの投与量を増加すると, 投与後8時間までにあらわれる細胞集団は, GSHにより, 低濃度では核分裂の促進が, 高濃度では抑制がみられる. しかし, GSHの投与後, 12~15時間に観察される核分裂の増加は, いずれの濃度でも認められた.

考 察

前報³⁾に述べた如く, GSH処理群の核分裂指数は, 放射線照射12時間以後には, 対照に比較して高く, 回復が早い. これは, GSHの核分裂促進作用 (GSH単独処理 (30mg/匹) によつても, 核分裂が, 処理後12時間以後に多くなる) によるものでないかと考えられた. そこで, 我々は, GSHの投与時期を変えることにより, 核分裂遅延が生存率の場合と同様に, 左右されるかどうかを検討した. GSHの投与時間をかえて, 照射前にあらかじめ核分裂を促進させてから, 照射 (400 rad) を行なうと, Fig. 1 に示すように, 核分裂の回復は, 照射前30分に投与したものが一番早く, 次いで, 3, 6時間であつた. このことから, 放射線による核分裂遅延は, GSHによる核分裂の促進とは別であり, GSHによる細胞の核分裂の促進も, 放射線による分裂遅延作用を受ける. また, *in vivo* の場合, 癌細胞へのGSHの効果は, GSH投与後時間の経過と共に弱くなるが, 6時間後でも, その効果はわずかに存在する. これは, 細胞分裂遅延現象も, 生存率の場合と同様に⁴⁾, 照射時にGSHが存在するほど阻害をうけにくいことを示している.

一方, GSHの細胞分裂への作用を検討するた

めに, GSHの投与量を変えてその効果を観察した. Fig. 3 の如く, 20~40mgのGSHの投与により投与後しばらくの間, GSHは, 核分裂を抑制し (~6時間後), その後, 核分裂が増加をきたす.

また, 放射線照射後にGSHを投与すると, 核分裂の回復の促進ではなく抑制が認められる (Fig. 2). これは, 放射線の細胞分裂抑制作用に, GSHの分裂を抑制する作用が加わつて, その効果が相加されたものと考えられる. 放射線による障害の上にGSH投与により, 分裂前6時間までの細胞が抑制されるが, 時間の経過とともにGSHの細胞内濃度が低くなり, GSHによる細胞代謝の抑制がなくなり, その結果, 分裂周期の流れが再び始まるのではないかと考えられる. この場合も, *in vivo* であるため, GSHの癌細胞への効果が, GSH投与後, 比較的長い間続いていると考えられる.

一方, 培養細胞で, 新しく移植すると, 細胞内の非蛋白質SH(NP SH)が増加し, 移植後日数が経過するとNP SHが低下する. また, FUDRでDNA合成を抑制すると, 細胞内のNP SHが増加する⁵⁾. これは, cysteamine で処理すると, S期に強い阻害が起ることが報告されている⁶⁾. 著者のGSH投与で, 投与後6時間までは, 分裂抑制がみられ, 12~15時間後に核分裂指数の増加が認められる. この分裂抑制は, *in vivo* でのGSH投与では, 比較的長い間細胞内に取込まれるが, *in vitro* では, SH化合物の処理後の洗滌によつて細胞内のNP SH量が, 比較的早く低下すると思われる. GSH投与により, 細胞内のNP SHの増加が起り, 細胞の活性化あるいは, S期の抑制により, 細胞の蓄積が起り, 核分裂指数の増加が起ることも考えられる.

放射線による細胞分裂遅延へのGSHの効果は, GSHの細胞分裂への薬理学的作用と共に観察されるので, これらを分別して解明する必要がある. また, GSH処理による細胞内のNP SHの増加による“細胞状態の変化”に関しては今後の興味ある問題のひとつである.

総 括

Ehrlich 腹水癌細胞を使用し、放射線により惹起される核分裂遅延へのGSHの作用を検討した。

1, 放射線照射 (400 rad) 前30分, 3, 6 時間にGSH (30mg/匹) をマウス腹腔内に投与すると, 核分裂指数の回復は, 照射前30分, 3, 6 時間の順に早い。

2, 放射線照射 (400 rad) 後30分, 3, 6, 9 時間にGSH (30mg/匹) を投与すると, 核分裂指数の回復は抑制される。その抑制の度合は, 3 時間後がもつとも強く, 次いで, 6, 9 時間, 30分の順である。

3, GSH単独投与で (0, 5, 10, 20, 30, 40mg/匹) の核分裂指数の変化を観察した。20~40mg投与で核分裂指数は, 投与後6時間までは抑制されるが, その後回復し, 12~15時間には著しい増加がみられた。

以上のことからGSHの放射線防護作用について若干の考察を加えた。

Reference

- 1) Maisin, J.R., et al: Chemical protection of the alimentary tract of whole body X-irradiated mice. *Int. Rad. Biol.*, 2, 281—293, 1960.
- 2) Maisin, J.R., et al: Comparative chemical protection to the intestinal and hematopoietic systems of whole body X-irradiated mice. *Rad. Res.*, 19, 474—484, 1963.
- 3) 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 (I), 日本医放会誌, 33, 6号, 57—62, 1973.
- 4) Kawasaki, S.: Radioprotective action of SH compounds (I). *Bull. Yamaguchi Univ. Med. Sch.*, in press.
- 5) Sparkes, B.G. and Walker, I.G.: Acid soluble sulfhydryl compound in L-cells during various conditions of growth. *Canadian J. Biochem.*, 44, 1159—1169, 1966.
- 6) 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.