

放射線による細胞分裂遅延に及ぼす SH 化合物の影響

3. Cysteamine の放射線防護効果

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

未富 一臣 桜井 孝

(昭和49年6月21日 受付)

(昭和49年7月22日 最終原稿受付)

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

3. Protection by Cysteamine

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.: 408

Key Words: Chemical protection, Cysteamine, Mitotic delay, L-5 cell, Cell division

Effect of MEA on radiation-induced mitotic delay in cultured L-5 cells was studied by examination of changes in mitotic index after treatment with MEA (5, 10, 20, 30 and 40 mM) alone. With 5 mM MEA, no effect was found in the mitotic index but, with 20 mM MEA, mitotic index decreased 8 to 12 hr after the treatment, and with 30 or 40 mM MEA, strong inhibition on mitosis was observed. The cells treated with the agent (5, 10, 20 mM) during irradiation of 200 rads showed a faster recovery of the mitotic index than the control irradiated without the chemical treatment, and increase of their mitotic index began 2 hr after irradiation (shortening of mitotic delay time, viz., G_2 -block protection), but treatment with 40 mM of MEA showed no effect. MEA (5 mM) treatment was made 6 hr, 3 hr, and 30 min before and 30 min after irradiation with 200 rads. Post-treatment with the agent had no effect but pre-treatment with MEA resulted in an enhancement of recovery rate of mitotic index, though there was no effect on the mitotic delay time induced by X-irradiation.

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

緒 言

現在, 多くの SH 化合物の中で, 放射線防護効果が, 大きいと考えられている Cysteamine (以

下 MEA) は, Bacq ら²⁾によつて報告された. MEA の放射線防護作用は, マウスの生存率, 組織の障害, 細胞の生存率等により観察され, その

防護効果は著しい⁽³⁾⁽⁵⁾⁽¹³⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁷⁾⁽²⁰⁾。

著者らは、*in vivo*, *in vitro* で、放射線によって惹起される細胞分裂遅延に対する効果を、SH化合物の中の Glutathione (以下GSH) を用いて観察した⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾。細胞分裂遅延時間(放射線照射時から細胞分裂の始まるまでの時間)は、GSH処理を行っても変化しない(G₂-blockの短縮はない)。しかし、GSHは細胞分裂周期の一定時期の細胞に作用しているため、照射後細胞分裂が始まるまでの核分裂指数の増加は、GSH処理により早くなる。従つて、GSHの放射線照射前処理の場合にも、核分裂指数の増加の促進が観察される。そこで、GSHと同じSH化合物であるが、放射線防護効果の大きいMEAの作用が、GSHと同じ効果を示すかどうかを検討した。GSHとMEAの間の放射線防護効果の差を明らかにすることは、放射線による細胞分裂遅延機構、並びに、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となると考えられる。

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1.0mm+1.0mm Al, F.S.D. 40cm, 1分間線量 186radsである。線量測定には、細胞照射と同じ条件で、Frickeの化学線量計を使用した。

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化合物として、MEA(東京化成KK製)を使用した。試験管にcover glassを入れ、L-5細胞を移植し、36~40時間、37°Cで培養した後各々の実験に供した。MEA処理には、細胞を移植した上記培養液を、照射前10分に各種濃度のMEAを含む培養液と交換し、放射線照射後にGKN(0.1% glucose, 0.8% NaCl, 0.04% KCl)にて、2回洗浄した後、MEAを含まないMEM培養液と交換した。MEAの処理時間は30分である。照射前MEA処理(5mM)は照射前6、3時間から30分間処理し、照射前30分処理では、照射前30分から照射直前までの30分間、照射後30分処理では、照射直後から30分間MEA処理を行つ

た。全ての操作は、37°Cで行つた。

3) 分裂指数：標本は、放射線照射後、経時的に取出し、乾燥、メタノール固定後、ギムザ染色を行つた。核分裂指数は、各標本で3000細胞を数え算定した。

結 果

1) 細胞分裂へのMEAの各種濃度の影響(図1)

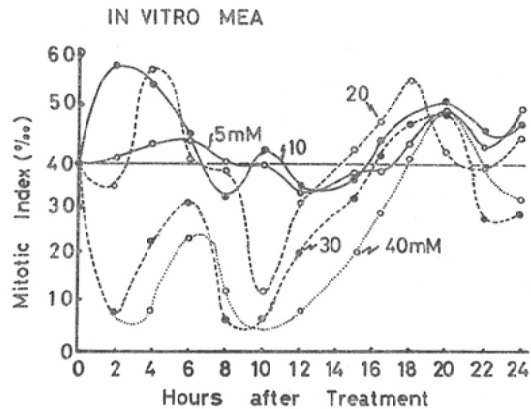


Fig. 1. Changes of mitotic index in cultured mammalian L-5 cells after treatment with various concentrations of MEA(5,10,20,30, and 40 mM)

MEAの処理濃度を5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mMと変化させて、細胞分裂への作用を観察した。5mM MEA処理では、control(非処理)とほとんど変わらない。10mM処理では、核分裂指数は、処理後2~4時間に一時増加の後減少し、controlとほぼ同じレベルを維持するが、処理後18~20時間には、再び核分裂指数は増加する。20mM MEA処理では、処理後4時間に核分裂指数の増加がみられるが、その後、減少し、処理後10時間には著しい減少がみられ、その後は、核分裂指数は増加し、処理後18時間にピークとなる。30mM, 40mMのMEA処理では、処理直後から核分裂指数の急激な減少がみられ、処理後6時間にわずかな増加が観察されるが、再び減少する。核分裂指数は、30mM MEA処理では、処理後16時間、40mM MEAでは、処理後18時間にcontrol値に回復する。40mM MEA

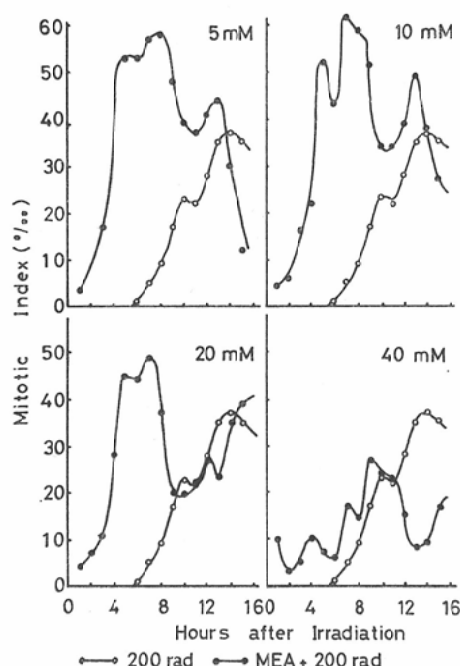


Fig. 2. Effect of MEA on mitotic delay induced by X-irradiation of 200 rads. Concentrations of MEA treatment were 5, 10, 20 and 40 mM.

は、30mM MEA に比較してより強い分裂抑制が観察される。

2) 200rads 放射線照射による細胞分裂遅延への各種濃度のMEAの効果(図2)

放射線照射中MEAの処理濃度を5mM, 10mM, 20mM, 40mMと変えて、その効果を観察した。200rads単独照射では、照射後6時間までは、分裂細胞がみられないが、照射後7時間からわずかな細胞分裂像があらわれ、その後漸増し、照射後14時間に核分裂指数はピークとなる。照射中のMEA処理が5mMの場合、核分裂指数は、照射後2時間には、回復が始り、照射後4時間には、controlより高くなる。その後、高い核分裂指数を維持するが、照射後7時間から減少が始る。照射後12時間に核分裂指数の小さなピークがあり、その後減少する。10mM MEA処理では、照射後2時間から、核分裂指数の回復が始まり、5mMの場合とほぼ同様の傾向を示す。20mM MEA処理では、核分裂指数の回復は、処理

後2時間から回復が始る。照射後4～6時間に、核分裂指数のピークが観察され、その後減少する。40mM MEA処理では、照射直後から、わずかな分裂細胞が認められるが、5mM, 10mM, 20mM MEAの処理で観察された核分裂指数の回復はなく、MEAの阻害効果が観察された。

3) 放射線照射とMEAの処理時間との関係(図3)

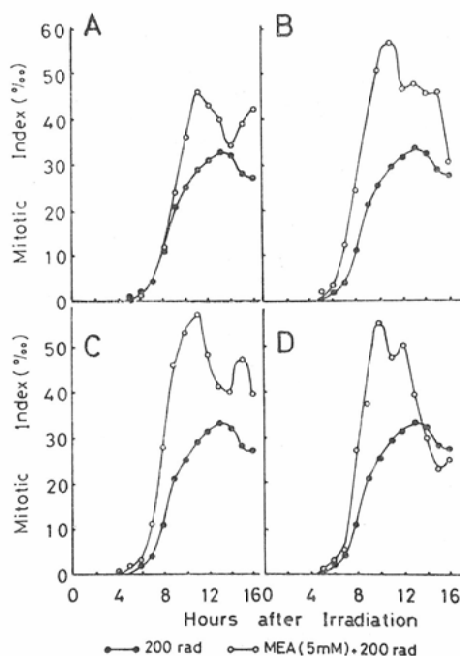


Fig. 3. Effect of MEA (5 mM) on mitotic delay induced by X-irradiation of 200 rads. Cells were treated with MEA 6 hr (D), 3 hr (C), and 30 min (B) before and 30 min (A) after irradiation.

MEA (5mM) 処理を、放射線照射(200 rads)の6時間前、3時間前、直前、直後に30分間行い、核分裂指数へのMEAの効果を観察した。MEA処理を、放射線照射前(照射6時間前、3時間前、直前)に行えば、核分裂像の再出現は200rads照射単独の場合と同じ時間から始まり、照射中にMEAが存在する場合に観察される照射2時間後からの核分裂指数の回復は、認めら

れない。しかし、MEAの照射前処理群では、核分裂指数の回復は早い。一方、放射線照射直後MEA処理を行うと、核分裂指数は、200rads照射単独とほぼ同じ回復を示す。

考 察

放射線により惹起される細胞分裂遅延は、細胞の周期により著しく放射線感受性を異にする¹²⁾。その上、比較的小線量の放射線照射によつてもひきおこされ、細胞分裂への放射線の作用機構に関しては多くの研究がみられる¹³⁾⁴⁾⁹⁾¹¹⁾¹⁴⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。特に、放射線に対し感受性の高い部分はG₂-blockとして現れ、G₂-blockは照射線量を大きくすると、それに比例して長くなる⁶⁾⁸⁾。また、他のG₁, S期で放射線照射を行つても、G₂期のなかの一部位(G₂-block)で遅延が現われる¹⁶⁾。

著者らは、放射線により惹起される細胞分裂遅延に対して、GSHは防護効果を示すことについて報告した。即ち、GSH処理を行うと、細胞分裂遅延時間は変わらないが、核分裂指数の増加速度が早くなることから、GSHはG₂期以外の期に作用していること示しており、また、³H-thymidineによりS期細胞を標識した実験から、GSHはS期細胞に作用していると思われる。

また、MEAは、マウスの生存率、細胞の生存率から示されるように、大きな放射線防護作用を現わす。そこで、同じSH化合物であるが、GSHと同じ作用機序であるかどうかを解明することは重要である。MEAは、使用する濃度により毒性があるといわれ、また、S期細胞の抑制即ちDNA合成の抑制があることが報告されている²¹⁾。著者らは、MEAの処理濃度を変えることにより、細胞分裂に対するMEAの濃度効果及び放射線に対する防護効果を観察した。図1でみられるように、各濃度でのMEAの効果を比較すると、MEA30mM, 40mMでは、処理後ただちにMEAの毒性が観察される。MEA20mMの場合には、S期の抑制があるものと考えられる。しかし、MEA5mM処理では、分裂細胞からの観察では、毒性は認められない。放射線による細胞分裂遅延に対する効果をMEA5, 10, 20, 40

mMの処理濃度で観察した。図2にみられるように、MEA5mM処理では、GSH処理でみられなかつた細胞分裂遅延時間の短縮(G₂-blockの短縮)が認められ、細胞分裂指数は照射後2時間から増加がみられる。MEA10mM処理の場合も5mM処理とほぼ同様の効果が観察される。しかし、20mM MEA処理では、照射後8~12時間に核分裂指数の減少があり、これはMEA単独処理後8~12時間に、分裂指数の低下が認められることから、その作用があらわれたのではないと思われる。また、MEA40mM処理では、図1から著しい毒性が認められることからMEAの効果も明らかでない。そこで、細胞分裂に対して毒性も少なく、また、防護効果も明らかにみられる5mM MEAについて、その効果も検討した。図3に示すように、MEAが照射中に存在する場合のみ、分裂遅延時間の短縮、即ちG₂-blockの軽減を示す。MEAの処理が照射前処理(照射6, 3時間, 直前処理)の場合、いずれの群でもG₂-blockの軽減は認められない。しかし、照射前処理(照射前6, 3時間, 直前)では、200rads照射群と同様な時間に分裂像の再出現が始つてから分裂指数の急激な増加が認められるが、この効果は、照射後処理ではみられない。照射前処理では、GSHと同様に細胞周期を進行させる促進作用があるのではないかと考えられる。

以上のことから、MEAの放射線防護作用は①GSHと同じ部位で作用していると共に、②MEAが照射中に培地に存在する場合のみG₂-blockの軽減を起し、これはradical scavengerとして、あるいはMixed disulfideを形成して、細胞分裂の標的を防護していると考えられる。放射線により惹起される細胞分裂遅延は、細胞周期で合成される放射線に感受性の高い物質(標的)の障害、これらの物質の合成系の調節機構の障害、あるいは、G₂-block部位で細胞の進行が止ることから、この部位で、細胞の分裂を進行させる機構の障害等が考えられる。MEAが、放射線による細胞分裂遅延を防護することから、MEAがどの

ような分子，代謝過程で関与しているのかという問題，並びに GSH と MEA の間の防護効果の差が，ここに示した作用機点の違いによるものかという問題は，SH 化合物の放射線防護機構を明らかにする上に，並びに放射線による細胞分裂遅延機構を明らかにするために，今後の問題である。

総 括

放射線照射により惹起される細胞分裂遅延に及ぼす MEA の効果を哺乳動物培養細胞 (L-5) を使用し観察した。

1. 細胞分裂への MEA の効果を処理濃度 5, 10, 20, 30, 40mM で観察すると，5 mM MEA では，ほとんど効果は認められない。しかし，20mM MEA では処理後 8～12 時間に抑制作用があり，30, 40mM MEA では強い毒性が観察された。

2. 200rads 照射で，照射中に 5, 10, 20, 40 mM MEA で処理すると，5, 10, 20mM MEA に防護効果 (G₂-block の短縮) が認められ，40 mM MEA では防護効果は明らかでない。

3. 200rads 照射で，照射前 6 時間，3 時間，直前，及び照射直後に 5 mM MEA 処理を行うと，照射中 MEA 処理のような分裂遅延時間の短縮は認められない。しかし，照射前 MEA 処理では，細胞分裂の回復の促進が認められた。

以上のことから，放射線による細胞分裂遅延での MEA の防護機構について若干の考察を加えた。

文 献

- 1) Bacchetti, S. and Sinclair, W.K.: The relation of protein synthesis to radiation-induced division delay in Chinese hamster cells, *Rad. Res.*, 44 (1970), 788—806.
- 2) Bacq, Z.M.: Protection against X-rays by mercaptoethylamine, *Arch. Int. Physiol.*, 59 (1951), 442—447.
- 3) Bose, P.A., and Bose, S.: Radioprotective efficacy of cysteamine with the mitotic index of rat bone marrow cells as reference system, *Acta Radiology*, 56 (1961), 393—398.
- 4) Djordjevic, B. and Kim, J.H.: Modifications of radiation response in synchronized HeLa cells by metabolic inhibitors; Effect of in-

hibitors of DNA and protein synthesis, *Rad. Res.*, 37 (1969), 435—450.

- 5) Kawasaki, S.: Radioprotective action of SH compounds (I), *Bull. Yamaguchi Univ. Med. Sch.*, 20 (1973), 17—31.
- 6) 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 (I), *日医放雑誌*, 33 (1973), 535—540.
- 7) 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.
- 8) 川崎祥二, 小林光昭, 沖田 功, 末富一臣, 桜井孝: 放射線による細胞分裂遅延に対する SH 化合物の影響 (I), *日医放雑誌*, 34 (1974), 444—448.
- 9) 川崎祥二, 小林光昭, 沖田功, 末富一臣, 桜井孝: 放射線による細胞分裂遅延に対する SH 化合物の影響 (II), *日医放雑誌*, 34 (1974), 599—604.
- 10) Kovacs, C.J. and Hof, J.V.: Changes in polysome activity related to radiation-induced mitotic delay in synchronized root meristem cells, *Rad. Res.*, 49 (1972), 530—542.
- 11) Lozzi, C.B.: Radiosensitivity of Ehrlich ascites tumor cells I. Variation in X-ray sensitivity during the cell cycle, *Int. J. Rad. Biol.*, 14 (1968), 133—148.
- 12) Mitchison, J.M.: *The Biology of the Cell Cycle*, p 201, Cambridge University press, 1971.
- 13) 中塚春夫, 越智宏暢, 藤村哲夫, 香川圭爾, 山下 彰, 安田晋之: X線照射による骨髄傷害に対する AET, MEA, serotonin および phenylephrine の防護効果に関する実験的研究, *日医放雑誌*, 29 (1966), 993—998.
- 14) Oleinick, N.: The radiation-sensitivity of mitosis and the synthesis of thymidine kinase in *Physarum polyccephalum*: A comparison to the sensitivity to Actinomycin D and Cycloheximide, *Rad. Res.*, 51 (1972), 638—653.
- 15) Prasad, K.N., Kollmorgen, G.M., Kent, T.H., and Osborne, J.W.: Protective effect of β -mercaptoethylamine and mesenteric vessel clamping on intestine-irradiated rats, *Int. J. Rad. Biol.*, 6 (1963), 257—269.
- 16) Terashima, T. and Tolmach, L.: Variation in several responses of HeLa cell to X-irradiation during the division cycle, *Biophys. J.*, 3 (1963), 11—33.
- 17) Vos, O., and Vergroesen, A.J.: Protection of tissue-culture cell against ionizing radiation I.

- The effect of biological amines, disulphide compounds and thiols, *Int. J. Rad. Biol.*, 5 (1962), 543—557.
- 18) Walter, R.A. and Petersen, D.F.: Radiosensitivity of mammalian cells I. Timing and dose-dependence of radiation-induced division delay, *Biophys. J.*, 8 (1968), 1475—1486.
- 19) Walter, R.A., Burchill, B.R., and Petersen, D.F.: Radiosensitivity of mammalian cells II. Effect of suboptimal growth temperatures on recovery from radiation-induced division delay, *Biophys. J.*, 9 (1969), 1323—1329.
- 20) Wang, R.I.H. and Hasegawa, A.T.: Radioprotective effect of a chemical mixture in rats, *Rad. Res.*, 40 (1969), 310—316.
- 21) 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 (1970), 357—371.
-