

電子スピン共鳴を用いた放射線防護剤としての

ラジカルスカベンジャーの基礎的検討

課題番号：10670844

平成 10 年度～12 年度科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））研究成果報告書

平成 14 年 3 月

邵 啓全（滋賀医科大学医学部助手）

滋賀医科大学附属図書館



2001015525

# は し が き

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 10 年度	800	0	800
平成 11 年度	700	0	700
平成 12 年度	500	0	500
総計	2,000	0	2,000

はじめに

放射線治療において、がんの治癒線量が正常組織の耐容線量よりも少なければ治癒に導くことはなんら問題ないのだが、実際にはがんの治癒線量よりも少ない耐容線量の重要臓器が周辺に存在することが多く、重篤な障害を出さずに治癒に導くことを困難にしている。もし放射線障害に対する有効な予防法や治療法が存在すれば、より多くの線量を照射することが可能となり治癒率の向上が図れるのだが、残念ながら放射線障害に対する予防法や治療法のほとんどは対症的なものであり、より多くの線量を照射することを可能にするほどのものはないのが現状である。現在、フリーラジカルは非常に多くの病態、疾患との関連で注目されており、いろいろな研究、報告がなされている。フリーラジカルと放射線障害との関連においても同様である。放射線照射により生体内に生じる $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^-$ 、 $\text{e}_{\text{aq}}^-$ 等のフリーラジカルの多くは反応性が高く

$10^{-12}\sim 10^{-6}$  秒と短寿命である。このため生体内に生じた $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^-$ 等のフリーラジカルを直接測定することは困難であった。最近、周波数1.2GHz付近のマイクロ波を用いたL-バンド ESR が開発され、動物体内のラジカルを体外から直接検出することが可能になった。しかし、その感度は気体ラジカルや体内で発生した活性酸素を検出するには十分ではなく、その使用は外から投与したニトロキシドラジカルの検出に限られている。一方、ニトロキシドラジカルは最近の研究において生体内酸化還元系や活性酸素産生のモニターとしての可能性が強く示唆されている。これらのことを利用して、マウス肺内にニトロキシドラジカルを還元する系が存在することがL-バンド ESR を用いて近年明らかにされた。この還元系はホモジナイズにより容易に失活するため、その測定は無傷の肺のままで測定可能なL-バンド ESR のみに限られる。そこで今回は、L-バンド ESR を用いて放射線照射によってマウス肺

内でのニトロキシドラジカルの還元能がどのように変化するのか、またそれが照射線量とどのように関係するのかを明らかにし検討を加えた。また、ラジカルスカベンジャーとしてのアスコルビン酸による還元能への影響についても検討したので合わせて報告する。

## 実験材料および方法

### 1 実験動物

雌ICRマウスを7週齢で入手し、飼育用ケージにて5匹までで飼育した。また、実験に使用したマウスは各群とも8週齢、5～7匹である。

### 2 放射線照射

照射は日立メディコ（株）製X線照射装置MBR-1520Rを用い、焦点動物間距離50cm、管電圧150kV、管電流20mA、線量率90Gy/minで照射した。照射に際し、マウスに苦痛を与えないためにネンプタール30mg/kg腹腔内投与にて麻酔し、50mlディスポーザルシリン

ジ内にマウスを1匹ずつ入れ、胸郭以外を2 mm 厚鉛板で遮蔽し一度に5匹以下で照射した。

### 3 ESR 測定

#### ( 1 ) 試薬

ニトロキシドラジカルを有する化合物としては、4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (以下 hydroxy-TEMPO) を Sigma 社より購入した。これを 5 mM になるように等張リン酸緩衝液 (0.6% 塩化ナトリウムを含む 50mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH7.4) に溶解した。

#### ( 2 ) マウス肺内へのニトロキシドラジカル溶液の注入

マウスに苦痛を与えないために頸椎脱臼により屠殺したマウスをテフロン板に固定し、頸部を切開して気管内に挿入した 20 ゲージ径ポリエチレンチューブから、胸郭を圧迫して肺内の空気を押し出した後、hydroxy-TEMPO 等張リン

酸緩衝液を 0.9ml 注入した。その後、液が漏れないように気管を結紮し、直ちに胸部の ESR スペクトルを測定した。

### ( 3 ) ESR 測定

L-バンド ESR 装置は、日本電子（株）製 JES-TE300（L-バンド ESR ユニット ES-LB2A を装備）を用い、共振器として水平型ループ・ギャップ共振器（感度は内径 33mm、長さ 24mm の共振器内で均一）を用いた。測定条件はマイクロ波周波数 1.1GHz、出力 1mW、磁場変調 100kHz、変調幅 0.2mT で行った。

## 4 実験

コントロール群 非照射のマウス 7 匹について ESR によるニトロキシドラジカル消失速度定数の測定を行った。

### ( 1 ) 放射線照射線量とラジカル還元能

1 回照射線量とマウス肺のラジカル還元能との関係を観るため、照射線量を 1Gy、2Gy、3Gy、5Gy、7.5Gy、

10Gy と 6 段 階 に 分 け 放 射 線 照 射 を 行  
い、直後より ESR 測定を行った。

( 2 ) ラジカルスカベンジャーとしてのア  
スコルビン酸投与量による効果の差異  
アスコルビン酸投与量とマウス肺の  
ラジカル還元能との関係を観るため、  
蒸留水 0.02ml のみ ( 基準群 ) 、アスコ  
ルビン酸投与量が 10mg/kg 、 50mg/kg 、  
250mg/kg 、 750mg/kg 、 1,250mg/kg と なる よ う  
に蒸留水で希釈した溶液 0.02ml をそれ  
ぞれマウス尾静脈より静注し、その 15  
分後に 5Gy 照射した直後より ESR 測定  
を行った。

## 結 果

マウス肺内に注入した hydroxy-TEMPO の ESR ス  
ペクトルは L-バンド ESR 装置にて窒素原子核  
による超微細構造を持つニトロキシドラジカ  
ルに特有な 3 本のピークを持つスペクトルと  
して捕らえられた。この 3 本のピークはいず



れも同高で、それぞれ同様に経時的に減少し、線幅に変化はなく、新たなシグナルの出現もなかった。すなわち、このピーク高の減少が投与されたニトロキシドラジカル量の相対的な減少を表している。また、この3本のピーク高は同高であるため、低磁場側のピークのみを利用することとし、相対的ピーク値として経時的に測定した。このニトロキシドラジカルの反応は1次の指数関数として低下するため、それぞれの測定結果より各1次反応消失速度定数を求め、この値がニトロキシドラジカル還元能を示すものとし、検討を行った。なお、コントロール群の1次反応消失速度定数は  $0.113 \pm 0.012/\text{min}$  ( $n=7$ ) であった。

#### ( 1 ) 放射線照射線量とラジカル還元能

1次反応消失速度定数は、照射線量が1Gy から 5Gy までは、照射線量の増加とともに有意 ( $p < 0.05$ ) な減少を示したが、5Gy で速度定数  $0.064 \pm 0.009/\text{min}$  ( $n=7$ ) の値に達した後、7.5Gy と 10Gy では 5Gy に

比 べ 有 意 な 変 化 は 示 さ な か っ た 。

( 2 ) ラ ジ カ ル ス カ ベ ン ジ ャ ー と し て の ア ス  
コ ル ビ ン 酸 投 与 量 に よ る 効 果 の 差 異

1 次 反 応 消 失 速 度 定 数 は 、 ア ス コ ル ビ  
ン 酸 非 投 与 で 5Gy 照 射 し た 基 準 群 と ア ス  
コ ル ビ ン 酸 10mg/kg お よ び 50mg/kg 投 与 群 と  
の 間 に 有 意 差 は な か っ た 。 し か し 、 さ ら  
に ア ス コ ル ビ ン 酸 投 与 の 増 量 に 従 い 1 次  
反 応 消 失 速 度 定 数 は 直 線 的 に 増 加 し 基 準  
群 を 有 意 (  $p < 0.05$  ) に 上 回 っ た 。 ま  
た 、 750mg/kg 以 上 の 投 与 群 で は 非 照 射 の コ  
ン ト ロ ー ル 群 を も 有 意 ( (  $p < 0.01$  ) に  
上 回 り 、 1,250mg/kg 投 与 群 で は  $0.151 \pm$   
 $0.016/\text{min}$  の 高 値 を 示 し た 。

## 考 察

マ ウ ス に 苦 痛 を 与 え な い た め に 頸 椎 脱 臼 に  
よ り 屠 殺 し た マ ウ ス 肺 内 に 注 入 し た hydroxy-  
TEMPO の シ グ ナ ル は 1 次 反 応 に 従 っ て 、 す な  
わ ち 指 数 関 数 的 に 消 失 す る が 、 血 流 へ の 移 行

による消失はほとんどなく、また肺胞上皮細胞内および肺胞表面液層に存在するアスコルビン酸によって還元され消失するのは1割程度であり、大部分が肺胞上皮細胞内で1電子還元されヒドロキシルアミンの形になってその常磁性を失ったものであることが知られている。このように肺胞上皮細胞内にはニトロキシドラジカルを還元する系が存在するが、この還元系はホモジナイズにより容易に失活するため、in vivoでの測定が可能なL-バンド ESR を用いて、はじめてその存在が明らかにされ、また動態解析も可能となる。

放射線照射直後のマウス肺内ラジカル還元能は1Gyから照射線量の増加に従い線量反応的に減少し、5Gyで低値に達した後は10Gyまで有意な変化はなかった。放射線照射により肺内に生じる $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}^2$ 等のフリーラジカルによって抗酸化的防御機構は様々な影響を受けることが予想される。これには、アスコルビン酸やグルタチオンなどの細胞内外の抗酸化

物質の消費、SOD（superoxide dismutase）やカタラーゼなどの抗酸化酵素系アミノ酸の酸化的修飾による酵素不活性化、ミトコンドリアなどの細胞内小器官の生体膜障害によるラジカル還元能低下などがある。しかし、これら抗酸化防御機構が放射線照射により受ける影響の程度はそれぞれ異なるものとみられ、このことが5Gy以上の線量でニトロキシドラジカル還元能の低下に差が生じなかった理由と考えられる。つまり、放射線照射により発生したフリーラジカルを直ちに消去するために消費される細胞内外に存在する抗酸化物質もしくはその抗酸化能が放射線量に比例し短時間に障害を受ける機序と、少ない線量では障害を受けないか、または障害発生までに比較的時間を必要とする機序が存在すると推測される。前者としてはアスコルビン酸やグルタチオンなどの低分子物質が発生したフリーラジカルと反応し速やかに不活性化する機序が、後者としては少量の放射線照射によってかえ

って活性化する SOD の酵素系や少量の放射線照射では活性が低下しにくい酵素系などによる機序が考えられる。

さて、放射線照射により発生するフリーラジカルによる障害の対策としてラジカルスカベンジャーの投与が容易に考えられる。今回は、生理的なラジカルスカベンジャーとして重要であり、体外から容易に投与できる副作用の少ない低分子物質で、かつ多彩なフリーラジカルを処理することができるアスコルビン酸の効果を検討した。ニトロキシドラジカル消失反応速度定数はアスコルビン酸投与量依存性にほぼ直線的に増加し、750mg/kg と

1,250mg/kg 投与群では非照射のコントロール群さえも上回る値を示した。このことは肺組織内のアスコルビン酸濃度が投与量に比例して増加することを示しており、アスコルビン酸の代謝や排泄の前に、つまり放射線照射直前にアスコルビン酸を大量投与すれば放射線照射による肺の抗酸化能低下を阻止し、さらに

は肺障害を防止できる可能性が示唆された。

## 結 論

( 1 ) マウス肺の抗酸化能には放射線照射の影響を受ける系と受けない系の少なくとも2つの系が存在することが推測された。

( 2 ) 放射線照射直前にアスコルビン酸750mg/kg以上をマウスに投与すると、その投与量に依存して肺のニトロキシドラジカル還元能は非照射のコントロール群をも上回るほどに増加した。このことより、アスコルビン酸投与によって放射線照射によるニトロキシドラジカル還元能の低下を阻止し、さらには肺障害を防止できる可能性が示唆された。