

# 放射線誘発 G<sub>2</sub> 阻害に対する外因性 SH 化合物の影響と細胞内 SH 量

土井田 幸 郎

滋賀医科大学生物学教室

## 序

SH を含む化合物は細胞内に広く存在し、膜の輸送、タンパク質や核酸の合成、生体内での酸化還元など多くの細胞代謝に関係している。

SH 化合物は、電離放射線照射によって細胞内に生じたフリーラジカルと反応することにより、生体内にある重要な分子や細胞成分への影響をへらすことによって放射線障害を防護する。細胞内に含まれる非タンパク SH (NPSH) 量は細胞の状態<sup>1),2)</sup>や生物の年齢などによって変化することが報告されている<sup>2),4)</sup>。また NPSH 量の変化が、放射線感受性の変化と関係することが報告されている<sup>1),2),4)</sup>。

細胞の放射線感受性は外部からの要因によって影響される。Sinclair<sup>12)</sup>は培養細胞の放射線感受性の細胞周期内の変化がシステアミン (MEA) の投与によって修飾され、細胞の生存率が高められることを報告している。L-ブチオニン-S・R-スルフォキシミン (BSO) は細胞内のグルタチオン (GSH) を正常細胞の 5% 位に減少させ、結果として細胞の放射線感受性が著しく高められることが多くの研究者によって報告されている<sup>3),9)</sup>。

指数的増殖をしている細胞に電離放射線を照射すると一過性に分裂細胞がみられなくなる。これは細胞周期の進行が G<sub>2</sub> 中期の細胞で特異的にとめられるからで、G<sub>2</sub> 阻害とよばれる<sup>5)</sup>。G<sub>2</sub> 期にとめられる時間は照射線量に依存する。

本報では、SH 化合物を投与することによって、G<sub>2</sub> 阻害がどのように影響されるか、また、電離放射線によって G<sub>2</sub> 阻害が誘起されている間の細胞内 NPSH 量がどのように変動するかを調べたので、その結果を報告する。

---

SH 化合物 : Sulfhydryl compound  
NPSH : Non-protein SH  
BSO : L-Buthionine-S・R-sulfoximine  
GSH : Glutathione  
MEA : Mercaptoethanolamine, Cysteamine

## 材 料 と 方 法

細胞：実験には指数増殖しているマウス L5178Y 細胞を用いた。細胞は10%牛血清を含む Fischer 培地中で培養した。

X線照射：3～5×10<sup>5</sup>細胞/mlの細胞浮遊液を50ml遠沈管に10～20ml加えX線を照射した。X線は東芝 KXC-18型深部治療用照射装置を用いた。照射条件は200KVp, 25mA, 2.0mm Al フィルターを用いた。照射距離は60cm, 線量率は0.6～0.65Gy/分で、2, 5, 10Gy 照射した。

SH 処理：MEA の最適処理濃度を定めるため、X線照射、非照射細胞を MEA で処理した。MEA は X線照射終了1時間前に投与した。X線照射後も MEA を除去せず、一定時間後、細胞を1%エオジンY溶液で染め生存率を調べた。

他方、G<sub>2</sub>阻害に対する MEA の影響を調べる場合には、X線照射終了1時間前に最終濃度 5 mM の MEA を加えた。照射終了後、直ちに細胞を遠沈し、MEA を除去した。細胞を1回10%牛血清を含む Fischer 培地で洗ったあと、前以って37°Cに保温した10%牛血清添加 Fischer 培地中で培養した。

NPSH の定量：細胞あたりの NPSH 量は Ellman の方法によって測定した<sup>6)</sup>。

タンパク質の定量：細胞あたりのタンパク質量は Biuret 法で測定した<sup>10)</sup>。

細胞分裂頻度の測定：細胞の増殖状態を知るため、細胞は各処理終了後、検ロキャップ付短試験管に5mlずつ分注の上、培養した。一定時間ごとに細胞を遠沈、採集し、アルコール・氷酢酸(3:1)混液で固定した。細胞は一回固定液を交換したあと、細胞懸濁液をつくり、氷冷したアルコールに浸したスライドガラスの上に数滴滴下したあと、火焰乾燥法で標本を作成した。標本を2%ギムザ液で染色したあと、乾燥、バルサムに封入、検鏡した。標本あたり約1,000個の細胞を観察し、分裂細胞の頻度を求めた。

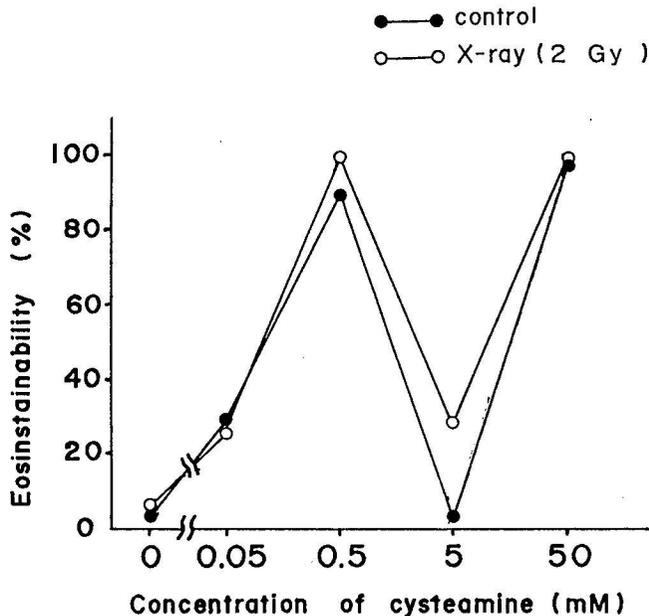


図1 MEAの細胞に対する影響。死細胞の割合をエオジンY染色性で調べた。

## 結 果

MEAの細胞毒性：MEAの使用濃度を定めるため、細胞を0.05, 0.5, 5, 50mMのMEAで処理した。MEA投与後、一定時間ごとに細胞を採集し、エオジンY染色性で生存率を調べた。染色性を指標

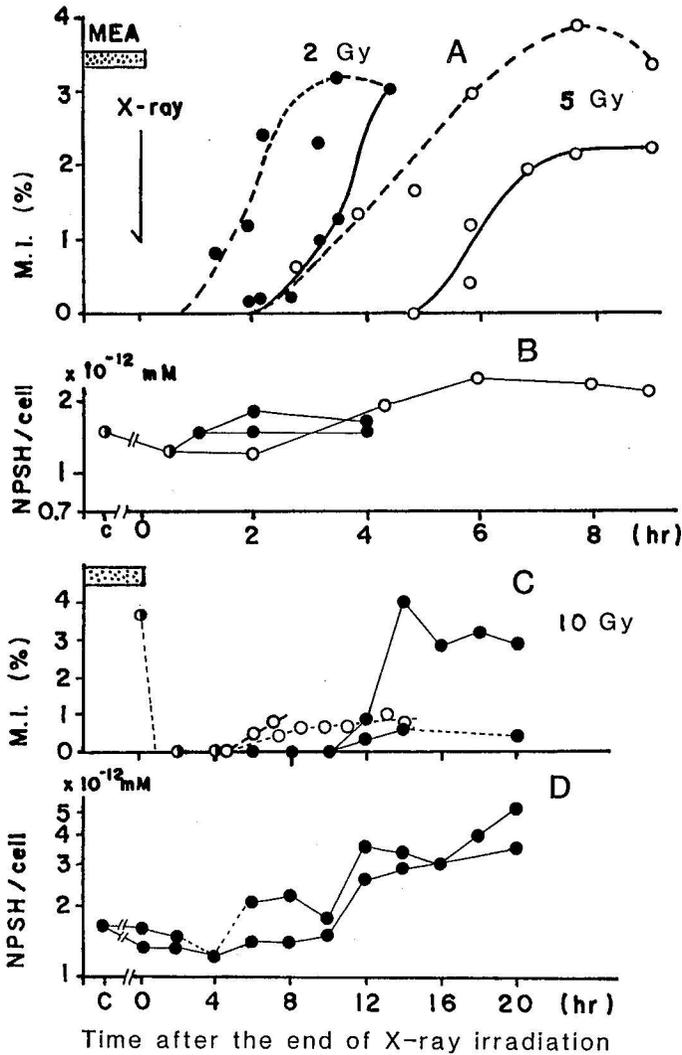


図2 X線照射後観察された分裂細胞頻度の推移と細胞あたりの非タンパクSH量の変化。図Aは2および5 Gy照射された細胞の分裂頻度の推移で、実線はMEA非処理細胞、破線はMEA処理群である。●は2 Gy, ○は5 Gy照射群。図Bは2および5 Gy照射された細胞あたりのNPSH含量の変動。●は2 Gy, ○は5 Gy照射群。図Cは10 Gy照射された細胞の分裂頻度の推移。●は非MEA処理群, ○はMEA処理群。図Dは10 Gy照射された細胞あたりのNPSH度の変動。2回の実験結果を示す。横軸はX線照射後の時間。MEA処理時間はA, C図上に示してある。

として調べた MEA の毒性は、各濃度とも 7 時間でピークに達し、以後 20 時間まで同じ値を示した。MEA 投与 7 時間後のエオジン染色性細胞の割合が第 1 図に示されている。X 線照射時、非照射時とも 2 相性の毒性を示す。この結果から以後の実験では 5 mM の MEA を用いた。

**X 線による G<sub>2</sub> 阻害と MEA による回復：**2, 5, 10Gy の X 線照射によって誘起される分裂阻害と、阻害からの回復過程に対する MEA の影響が図 2 A, C に示されている。MEA 処理された細胞では分裂阻害から回復までの時間が短縮された。

**X 線被照射細胞あたりのタンパク質量：**X 線照射後、いろいろな時間で細胞を採集し、Biuret 法で細胞あたりのタンパク質量を調べた。2, 5, 10Gy 照射後、いずれの場合にもタンパク質量は増加する。タンパク質量の増加は分裂が回復するまでつづき、その後減少する。しかし 10Gy 照射時には、タンパク質量の減少はみられなかった。これは 10Gy 照射された場合には、分裂細胞で染色体異常や多極分裂などの異常が起り、正常な細胞質分裂の阻害が起るためと思われる。図 3 にタンパク質の変動の経過が示されている。

**細胞あたりの NPSH 量の X 線照射後の変動：**NPSH 量は X 線照射後、一過性の減少を示すが、その後、細胞分裂が再開するまで増加する。2, 5 Gy 照射時には、その後再び減少する。10Gy 照射時には、タンパク質の場合と同様に減少しなかった (図 2 B, D)。

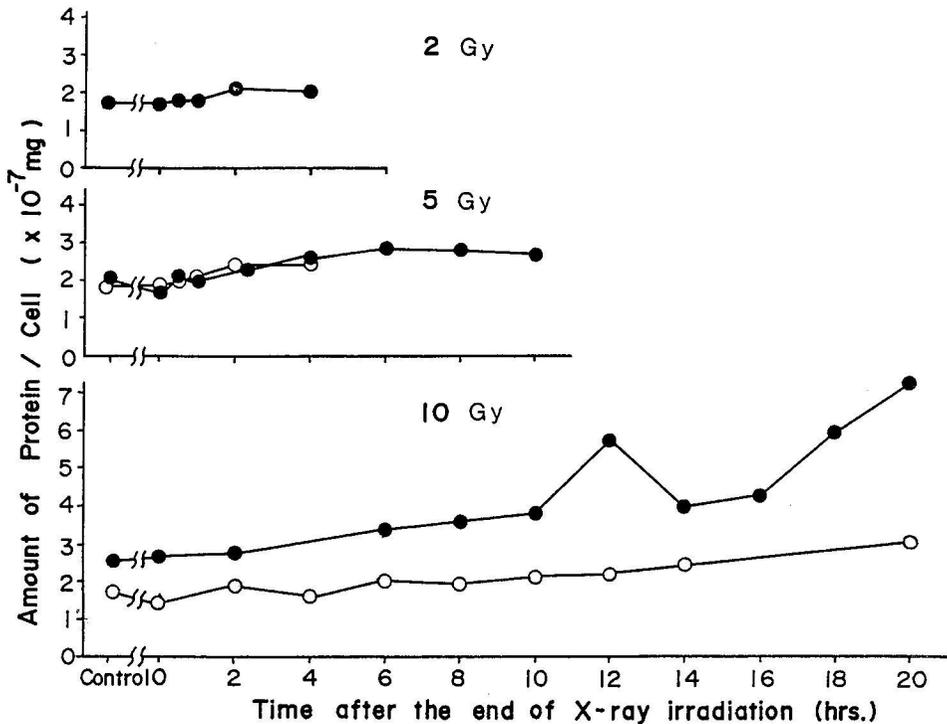


図 3 X 線照射後の細胞あたりのタンパク質量の変化

## 論 議

細胞周期の進行に対する X 線の影響や、細胞周期各期の X 線感受性の差などについて多くの研究が

なされてきた<sup>7,8)</sup>。X線による細胞周期の進行は、G<sub>2</sub>中期で特に強く阻害される<sup>9)</sup>。G<sub>2</sub>阻害と呼ばれる由縁である。

G<sub>2</sub>阻害の起る時期がG<sub>2</sub>期細胞がM期に移行するのに必要なタンパク合成の終了の時期と一致することから、G<sub>2</sub>阻害とタンパク質合成との関係が示唆されている<sup>9)</sup>。

X線照射によってひき起こされる生物作用は、いろいろな要因によって修飾される。それらは、種々の要因によって生物への傷害が増幅されるとき、傷害の量が減少させられる場合とに分けられる。

SH含有化合物は電離放射線照射の前に投与することによって、生物体や細胞にあたえられる傷害の量を減らすことができる。これは電離放射線によって生じたイオンやラジカルとSH化合物が反応し、DNAやタンパク質のような生体を構成する主要成分に対するイオンやラジカルの影響を減少させるためであると考えられている。

一方、細胞内に存在するグルタチオンを含むいろいろなSH含有化合物量が細胞の放射線感受性と相関することが多くの研究者によって示されてきた。たとえば、Dethlefsenら<sup>4)</sup>はマウス乳癌由来の2細胞株を用いて、細胞増殖期、栄養分欠乏に伴う静止期、養分再添加4および12時間目の細胞の含有する内因性の各種SH量の変動を調べた。SH量と放射線感受性の間に一定の関係は認められなかったが、SH量の極端な減少は放射線感受性の増大に結びつくことを認めた。放射線照射に伴うSH量の減少はBiaglowら<sup>2)</sup>、Sutherlandら<sup>13)</sup>によっても報告されている。BSOは細胞内のGSH合成を抑制し、正常値の5%位に低下させる。このような細胞では放射線感受性が著るしく高められることが報告されている<sup>2),3),9)</sup>。

放射線感受性が細胞周期の各時期の間で変動することは、よく知られている<sup>7),8),12)</sup>。放射線感受性の細胞周期内変動がMEAの投与によってなくなり、感受性を低下させたという報告は、SH化合物量と放射線感受性の間に強い相関を示すものである。

放射線作用のMEAによる防護効果はDNA鎖切断、染色体異常、細胞生存率など多くの面で認められている。Vosら<sup>15)</sup>は4 mM MEA処理した細胞に400RのX線を照射し、G<sub>2</sub>阻害への影響を調べた。しかし彼らは防護効果を認めなかった。

筆者はL5178Y細胞を用いて、X線照射によって誘起されるG<sub>2</sub>阻害が、外部からSH含有化合物を投与したとき、どのように修飾されるか、またその間に細胞内NPSH量がどのように変化したか調べた。その結果、MEAをX線照射後投与したときはG<sub>2</sub>阻害期間は短縮できず(未発表)、MEAの照射前投与によってのみ短縮された。なお、GSHは照射前後投与のいずれの場合にも無影響であった(未発表)。このことはMEAは電離放射線の分裂活性に対して防護的に作用することを示唆するもので、この作用はMEAがイオンやラジカルと反応することによって生ずるものと考えられる。細胞内のタンパク質量はX線照射後も持続的に増加するが、細胞あたりのNPSHは、X線照射直後一過性の減少を示すことは、NPSHがイオンやラジカルと反応する可能性を示すものであり、細胞内のNPSH量が放射線の作用と直接関係のあることを示す。これまでの研究成果と一致するものである<sup>1~4),11),13),14)</sup>。

G<sub>2</sub>阻害時間のMEAによって短縮される割合は、試みた全線量域にわたって大略等しかったが、コロニー形成法によって調べた細胞の生残率に対するMEAの防護効果はX線の線量によって異なる。2GyまではMEAは防護効果を示さないが、それ以上の線量域ではMEAは、細胞の生残率を高める(未発表)。このことはG<sub>2</sub>阻害の標的が、細胞死に対するX線の標的とは異なっていることを示すものである。

## Summary

Effects of exogenous and endogenous SH compounds on radiation-induced G<sub>2</sub> block of L5178Y cells have been studied.

Exogenous SH compound, cysteamine, added prior to X-ray irradiation, shortened the inhibition time of G<sub>2</sub> block.

The amount of endogenous non-protein SH per cell decreased after X-ray irradiation slightly, then increased. Its amount reached maximum value at the time of resumption of mitosis, then decreased again.

Temporal decrease of the amount of protein per cell was not observed. Its amount gradually increased after X-ray irradiation.

The relationship between SH compounds and radiation sensitivity has been discussed.

## References

- 1) Archer, J.F. & E.D. Wills, *Intern. J. Radiat. Biol.* 23, 571-581, 1973.
- 2) Biaglow, J.E., E.P. Clark, E.R. Epp, M. Morse-Gaudio, M.E. Varnes & J.B. Mitchell, *Intern. J. Radiat. Biol.* 44, 489-495, 1983.
- 3) Clark, E.P., E.R. Epp, J.E. Biaglow, M. Morse-Gaudio & E. Zachgo, *Radiat. Res.* 98, 370-380, 1984.
- 4) Dethlefsen, L.A., J.E. Biaglow, V.M. Peck & D.N. Ridinger, *J. Cell. Physiol.* 132, 149-154, 1987.
- 5) Doida, Y. & S. Okada, *Radiat. Res.* 38, 513-529, 1969.
- 6) Ellman, G.L., *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77, 1959.
- 7) Harris, J.W., R.B. Painter & G.M. Hahn, *Intern. J. Radiat. Biol.* 15, 289-292, 1969.
- 8) Harris, J.W., S.S. Teng, *J. Cell. Physiol.* 81, 91-96, 1973.
- 9) Hodglsias, R.J. & R.W. Middleton, *Intern. J. Radiat. Biol.* 43, 179-183, 1983.
- 10) Layne, E., *Method. Enzymol.* 3, 447-454, 1957.
- 11) Revesz, L., H. Bergstrand & H. Modig, *Nature* 198, 1275-1277, 1963.
- 12) Sinclair, W.K. *Science* 159, 442-444, 1968.
- 13) Sutherland, R.M., J.N. Stannard & R.I. Weed, *Intern. J. Radiat. Biol.* 12, 551-564, 1967.
- 14) Sutherland, R.M. & A. Pihl, *Radiat. Res.* 34, 300-314, 1968.
- 15) Vos, O.G. & M.C.A.C. Kaalen, *Intern. J. Radiat. Biol.* 14, 107-118, 1968.

### Figure Legend

Figure 1. Schematic illustrations of distributions of  $^{12}\text{C}$  and  $^{13}\text{C}$  in the pyridyl and methyl groups of the product : (a) at fraction  $f$  of reaction, (b) at 100% ;  $x$  and  $y$  are fractions of  $^{12}\text{C}$  in the methyl group of the product at fraction  $f$  and at 100%, respectively.  $z$  is an average fraction of  $^{12}\text{C}$  per one carbon atom of the starting substituted pyridines and is constant independent of the fraction of reaction.