

<原著>X線照射によりHBs抗体ヒト血漿から発生するフリーラジカルの研究

著者名(日)	堀川 孝明
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	20
号	1
ページ	33-45
発行年	2001-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008581/

〔原 著〕

X線照射によりHBs抗体ヒト血漿から発生する
フリーラジカルの研究

堀川 孝明

北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座

(主任：金子 昌幸教授)

A study of free radicals generated by radiation of
human plasma contains anti-HBs antibody

Takaaki HORIKAWA

Department of Dental Radiology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

(Chief : Prof. Masayuki KANEKO)

Abstract

This report studied the most effective natural radical scavenger of hydroxyl radicals generated by human plasma.

The study consisted of 98 healthy volunteers recruited from the Health Sciences University of Hokkaido (67 males, 31 females), average age 24.5 years (range 22 to 36 years), all gave informed consent to participate in the study. Concentrations of total cholesterol, neutral fat, total protein, albumin, and anti-HBs antibody in the plasma were measured, and aliquots of plasma were exposed to X-rays. The ESR spectra of hydroxyl radicals were obtained from the irradiated plasma, and the signal heights were normalized to the relative signal intensities (RSI) against the standard signal of the manganese oxide marker.

Multivariate analysis did not show a relationship between RSI and the concentrations of total cholesterol, neutral fat, total protein, of albumin. However, the signal intensities decreased markedly in the plasma taken from anti-HBs antibody carriers ($P < 0.05$). It suggests that anti-HBs antibody is the most important factor in scavenging hydroxyl radicals among the proteins analyzed in this study. The radical scavenging activity disappeared by the agglutination of

第17回東日本歯学会 平成11年2月20日

受付：平成13年3月31日

anti-HBs antibody when hepatitis B vaccine was added to plasma containing the antibody. It is concluded that the anti-HBs antibody in human plasma has a significant effect upon the quantity of radicals.

Key words : X ray, free radical, anti-HBs antibody.

I. 緒 言

単純X線撮影, CT, シンチグラフィによる画像検査ならびに悪性腫瘍に対する放射線治療など, 放射線や放射性医薬品は現代の医療には欠くことのできないものである。しかし, 放射線は組織に対して障害を引き起こすのは周知の通りである^{1,2)}。この傷害には放射線による直接的な電離作用とラジカルによる間接的な作用の2種類がある。X線は間接作用を示し, 生体の水分子のイオン化や水和電子との反応や水分子の解離によりOHならびにHラジカルを生成する³⁾。OHラジカルは強い酸化作用を有しDNAに障害を与える^{4,5)}。また, 他のラジカルは溶血などの酸化傷害を引き起こす⁶⁾。血液は末梢組織への酸素や栄養分の補給ならびに炭酸ガスや代謝廃棄物の搬出, さらに生体の防御や恒常性維持に大きな役割を果たしている。血漿は溶解するタンパク質, 脂質, 無機電解質などで構成される⁷⁾。血漿には種々の酸化反応, 酵素反応および放射線により発生するフリーラジカルを消去する各種の抗酸化物質が存在する。既知のものとしてはアルブミン, 尿酸, アスコルビン酸(ビタミンC), トコフェロール(ビタミンE), カタラーゼなどがあり, また, これ以外に未知の抗酸化物質が存在するという報告もある⁸⁻¹⁰⁾。従って, 血漿はX線照射によるラジカル発生源であると同時に種々の抗酸化物質が存在するのでラジカルの消去能を有すると考えられる。

今回, 著者は, X線照射によりヒト血漿から発生するフリーラジカルについて, 発生するラ

ジカル量と血漿成分との関係について検討した。

II. 材料と方法

1. 対象

対象は事前に本研究に対して同意の得られた98名(男性67名/女性31名)のボランティアで, 年齢は22歳から35歳までであった(平均24.5歳)。また, 問診により, ビタミン剤などの薬物の長期投与者ならびにB型肝炎ウイルスのキャリアは研究対象から除外した。

2. 試料の採取

血液は静脈よりバキュティナ[®]採血管(日本ベクトン・ディッキンソン社製)にて採取し, 採血後, 速やかに遠心分離器により×1,600g, 5分の条件で血漿成分と血球成分を分離した。分離した血漿は速やかに実験に供したが, 保存する場合は-80度で凍結保存した。

3. 血漿成分の測定

血漿成分として総コレステロール, 中性脂肪, 総タンパク質, そしてアルブミン濃度を測定した。測定は, 総コレステロールはデタミナー[®]LTC試薬(協和メデックス, 東京), 中性脂肪はデタミナー[®]LTC試薬(協和メデックス, 東京), 総タンパク質はランピアTP試薬(極東製薬, 東京), アルブミンはランピアALB試薬(極東製薬, 東京)を用い, Automatic Analyzer 7150(日立社製)にて測定した。

4. 試料の作製

X線照射に先立ち, PBS(Na-リン酸塩緩衝溶液)50 μ l, 鉄キレート剤であるDETAPACK(diethylenetriaminepentaacetic acid

chelate) 35 μ lを血漿100 μ lに加え、X線照射直前にラジカル補足剤であるDMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide) (Labotec社, New York City, NY) 15 μ lを加えて攪拌し試料を調整した。

5. X線照射条件

X線照射は軟X線発生装置 (SOKEN SOFRON BST1505CX) を用い、管電圧80kVp、管電流5mA、付加フィルター1.0mmAl、照射距離30cm、線量率16Gy/hrとした。X線照射は4Gy15分照射、8Gy30分照射、12Gy45分照射の3種の条件で行った。

6. フリーラジカルの測定

X線照射により血漿内で発生したフリーラジカルは、電子スピン共鳴法によるESR装置JES FR-80 (日本電子社製) を用い、ESRスピントラップ法にて測定した。測定条件は、周波数: 9.475GHz, 出力: 4.0mW, 中心地場: 334.5mT, 掃引幅: ± 10 mT, 変調幅: 5×0.1 mT, 感度: 0.4×100 , 時間定数: 0.1秒, 掃引時間: 2.0分, 測定温度: 室温とした。発生したラジカルは超微細結合定数からラジカル種を同定し、ラジカル量は標準試料のMnOラジカルとの相対信号強度 {以下, RSI (relative signal intensity)} で求めた。また、測定は個々の試料について2回行い平均値で示した。

7. 多変量解析によるラジカル発生を検討

X線照射により発生するラジカル量に対して、血漿成分の中で影響を及ぼす度合を評価するために多変量解析で検討した。また、解析に先立ち各血漿成分が独立変数であることを確認するため偏相関分析を行った。

8. HBs抗体陽性血漿のラジカル消去能の検討

HBs抗体陽性血漿のラジカル発生量を検討するため、以下の三つの実験を行った。

1) 抗原-抗体反応による抗体の失活

5名のHBs抗体陽性血漿400 μ lに、酵母由来の組織組み替え沈降B型肝炎ワクチンである

ビームゲン[®] (藤沢薬品工業, 大阪) 10 μ lを添加した。ワクチン添加直後ならびに肉眼的に凝集を認めた28時間後に上清を100 μ l採取し、X線4Gy照射して発生するラジカル量を測定した。

2) 抗HBs人免疫グロブリンの消去能

5名のHBs抗体陰性者の血漿を用い、Cohnの低温エタノール分画法により分離精製されたグロブリン製剤であるヘパセーラ[®] (藤沢薬品工業, 大阪) を添加した。添加量は抗体陰性血漿85 μ lにグロブリン製剤15 μ l, あるいは血漿65 μ lに製剤35 μ lを添加して総量を100 μ lとした。そして、前述の方法に従いX線4Gy照射して発生するラジカル量を観察した。

3) ワクチン接種による抗体獲得までの観察

B型肝炎ワクチンを接種した1名について、ワクチン接種期間中の血漿から発生するOHラジカル量を測定した。血液の採取はワクチン接種前、1回目のワクチン接種1カ月後、その2回目接種6カ月後、そして、その3回目接種1カ月後の4回行った。採血後速やかに血漿を分離し、前述の方法に従いX線を4Gy照射して発生するラジカル量を観察した。

III. 結 果

1. X線照射で発生するラジカル種の同定

X線照射によりヒト血漿から発生するフリーラジカルは、DMPOで補足されたESRスペクトルの超微細結合定数から $a^N = a^H = 1.50$ mTを示すDMPO-OHと $a^N = 1.64$, $a^H = 2.25$ mTを示すDMPO-Hの2種類であった (図1-a)。また、各対象者の試料から発生するラジカル波形を図1-bに示す。各スペクトルの中には矢印に示すように最上段のX線未照射のスペクトルに近い平坦な波形を認めた。

また、以後の実験で発生するラジカル量は生体への障害が強いOHラジカルについてのみ取り扱った。

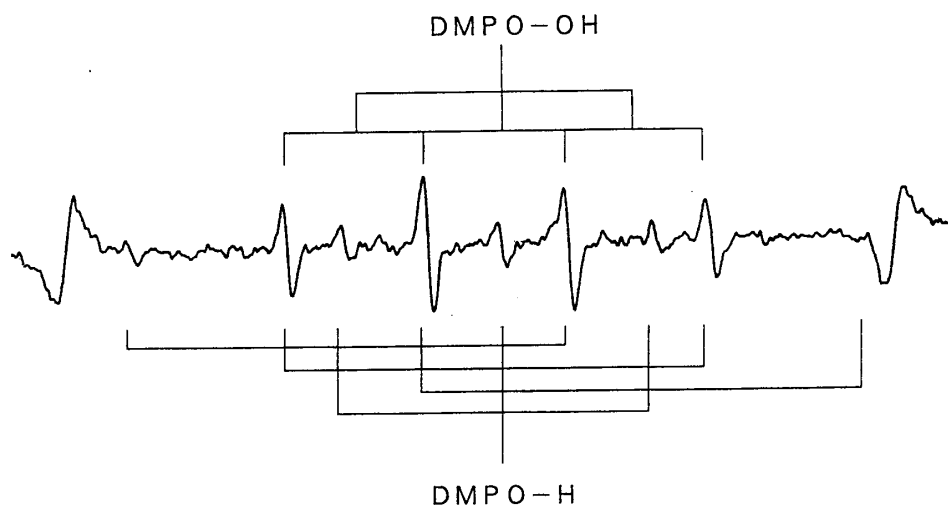


図 1-a ヒト血漿へのX線照射により発生するラジカルのESRスペクトル

両端の波形は標準試料のMnOラジカル，その内側に認めるのがDMPOで補足されたラジカルである。超微細結合定数が $a^N = a^H = 1.50\text{mT}$ のDMPO-OHと $a^N = 1.64$ ， $a^H = 2.25\text{mT}$ のDMPO-Hの2種類のラジカルを認める。

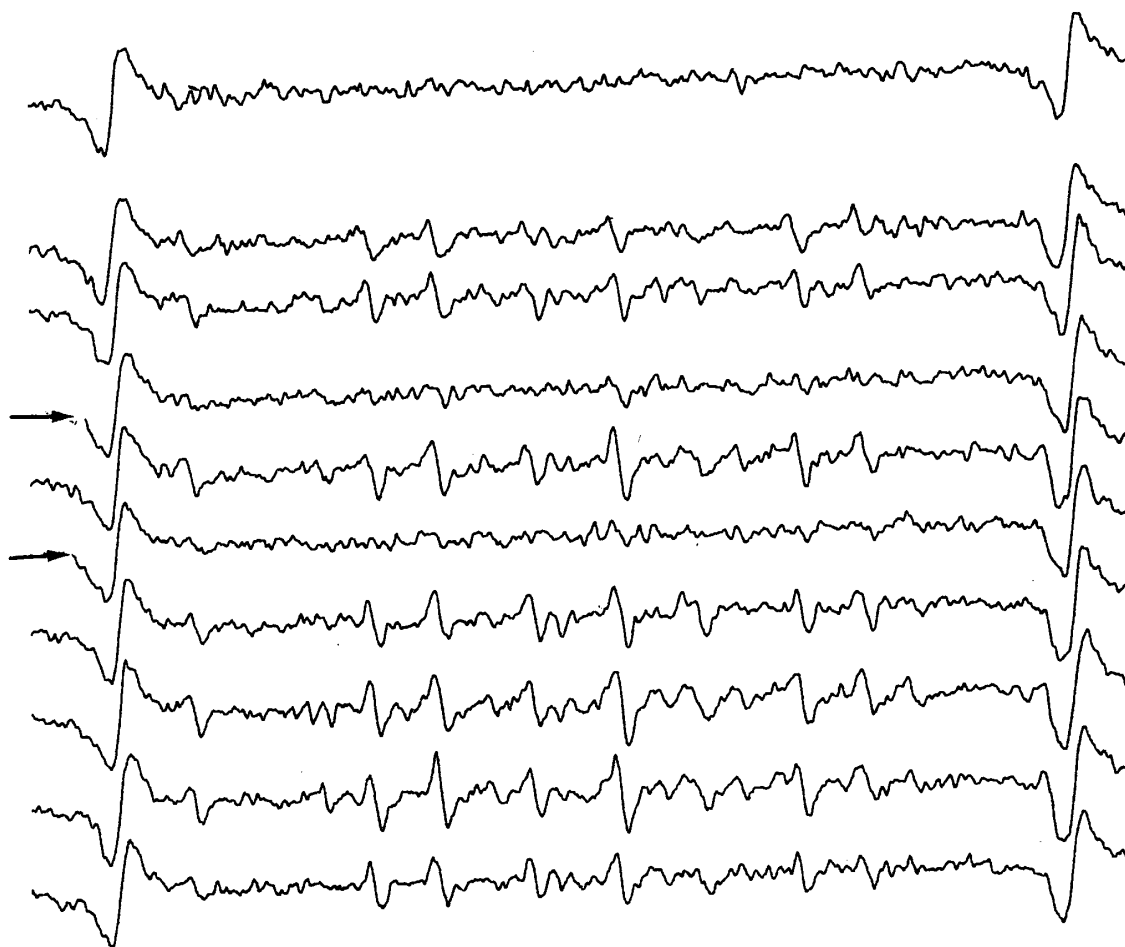


図 1-b 各試料から発生するラジカルのESRスペクトル

最上段はX線未照射のスペクトルでOH，Hラジカルの波形は認めない。下はX線4 Gy照射における各対象者のもので，矢印(→)で示したスペクトルからはOH，Hラジカルの波形をほとんど認めない。

2. X線照射線量とラジカル量との関係

各照射線量におけるOHラジカル量は、4 Gy照射ではRSI=0.31±0.12, 8 Gy照射ではRSI=0.43±0.13, 12Gy照射ではRSI=0.49±0.14であり、X線線量に比例する直線的なラジカルの増加を認めた(図2)。

3. 血漿成分とラジカル発生量との関係

X線4 Gy照射における血漿成分濃度とラジ

カル発生量との相関係数はそれぞれ総コレステロールでは $r^2=0.008$, 中性脂肪では $r^2=0.010$, 総タンパク質では $r^2=0.010$, アルブミンでは $r^2=0.003$, アルブミン/グロブリン比では $r^2=0.003$ を示し、いずれもラジカル発生量との間に相関は認めなかった(図3-a, b, c, d, e)。また、X線照射8ならびに12Gyにおいてもラジカル発生量との間に相関は認めなかった。

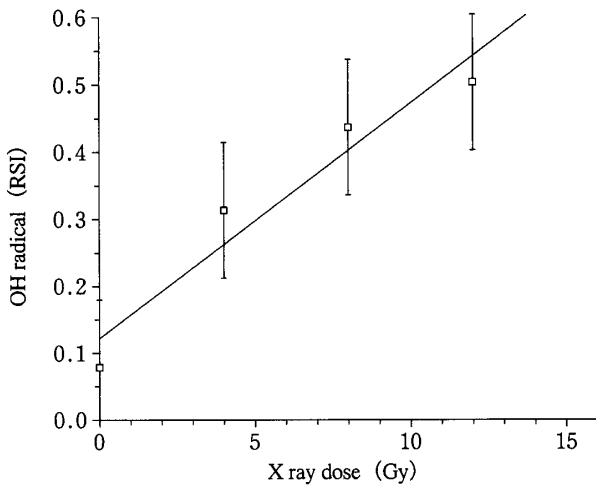


図2 X線4, 8, 12Gy照射によりヒト血漿から発生するOHラジカル量の変化
線量の増加に比例($r^2=0.935$)してラジカル量も増加した。(RSI=relative signal intensity)

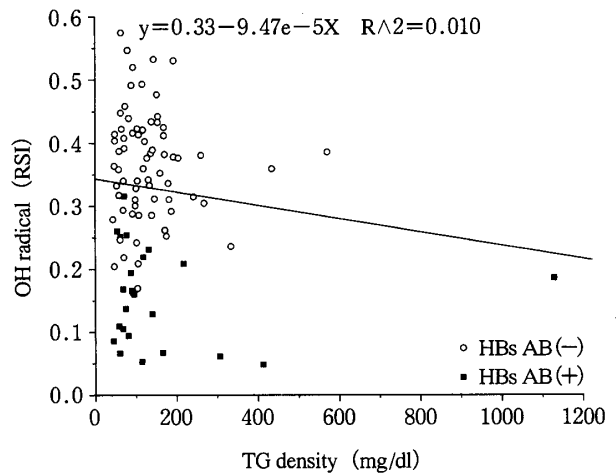


図3-b 中性脂肪濃度とOHラジカル量との関係
X線4 Gy照射における中性脂肪濃度とOHラジカル量との間には相関は認めなかった($r^2=0.010$)。この結果はX線8, 12Gy照射でも同様であった。

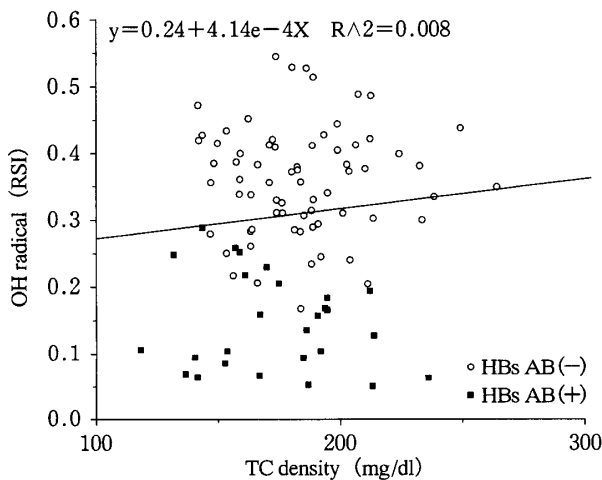


図3-a コレステロール濃度とOHラジカル量との関係
X線4 Gy照射におけるコレステロール濃度とOHラジカル量との間には相関は認めなかった($r^2=0.008$)。この結果はX線8ならびに12Gy照射でも同様であった。

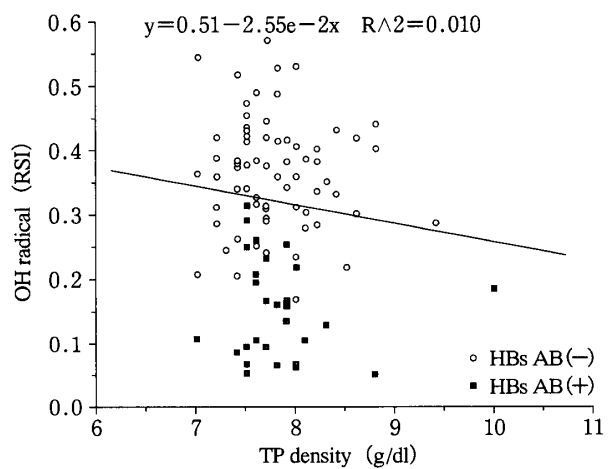


図3-c 総タンパク質濃度とOHラジカル量との関係
X線4 Gy照射における総タンパク質濃度とOHラジカル量との間には相関は認めなかった($r^2=0.010$)。この結果はX線8, 12Gy照射でも同様であった。

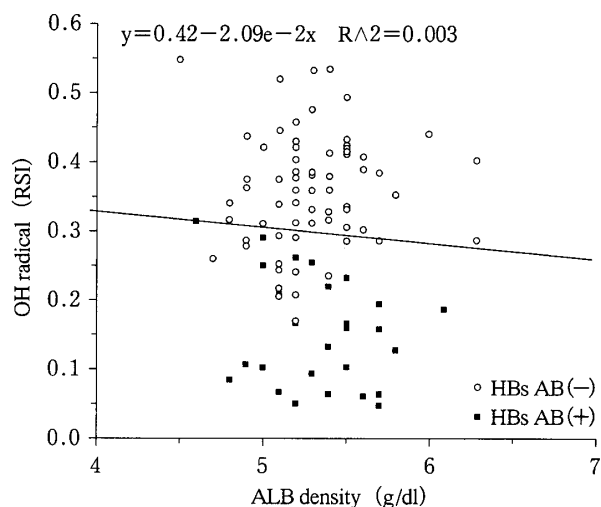


図 3-d アルブミン濃度とOHラジカル量との関係
X線 4 Gy照射におけるアルブミン濃度とOHラジカル量との間には相関は認めなかった($r^2=0.003$)。この結果はX線 8, 12Gy照射でも同様であった。

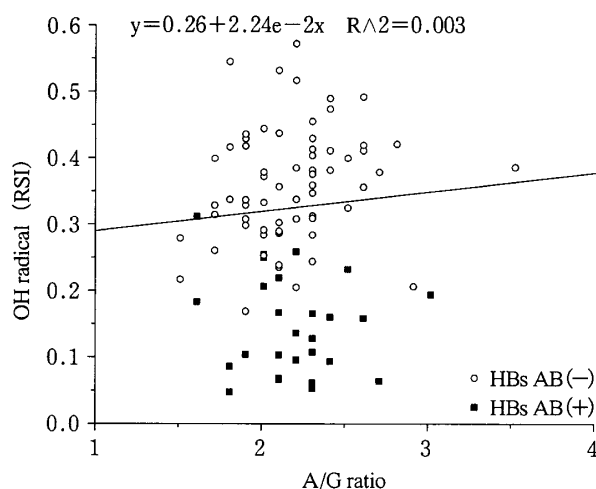


図 3-e アルブミン/グロブリン比とOHラジカル量との関係
X線 4 Gy照射におけるアルブミン/グロブリン比とOHラジカル量との間には相関は認めなかった($r^2=0.003$)。この結果はX線 8, 12Gy照射でも同様であった。

4. 多変量解析によるラジカル発生を検討

X線 4 Gy照射の条件での、偏相関分析では総タンパク質とアルブミンは偏相関係数が0.7159

を示し、両者は独立でないと判断された(表 1-a)。従って、多変量解析では独立変数である総タンパク質とアルブミンは分けて分析した。

表 1-a ヒト血漿の各溶質成分とHBs抗体の有無における偏相関分析

X線 4 Gy照射の条件での、偏相関分析で総タンパク質(TP)とアルブミン(ALB)は偏相関係数が0.7159を示し両者は独立でないと判断された。

Controlling for...	PARTIAL CORRELATION COEFFICIENTS					
	OH4GY					
	TC	TG	TP	ALB	AG	HBS
TC	1.0000 (0) P=.	.2931 (95) P= .004	.3699 (95) P= .000	.4493 (95) P= .000	.0655 (95) P= .524	-.1325 (95) P= .196
TG	.2931 (95) P= .004	1.0000 (0) P=.	.5004 (95) P= .000	.3566 (95) P= .000	-.1379 (95) P= .178	.0017 (95) P= .987
TP	.3699 (95) P= .000	.5004 (95) P= .000	1.0000 (0) P=.	.7159 (95) P= .000	-.3728 (95) P= .000	-.0445 (95) P= .665
ALB	.4493 (95) P= .000	.3566 (95) P= .000	.7159 (95) P= .000	1.0000 (0) P=.	.3584 (95) P= .000	.0275 (95) P= .789
AG	.0655 (95) P= .524	-.1379 (95) P= .178	-.3728 (95) P= .000	.3584 (95) P= .000	1.0000 (0) P=.	.0825 (95) P= .422
HBS	-.1325 (95) P= .196	.0017 (95) P= .987	-.0445 (95) P= .665	.0275 (95) P= .789	.0825 (95) P= .422	1.0000 (0) P=.

表 1-b ヒト血漿へのX線照射で発生するラジカルにおける多変量解析

解析は独立変数(Variable)である総タンパク質(TP)(上段)とアルブミン(ALB)(下段)を分けて行った。標準化回帰係数(Beta)はHBs抗体の有無(HBS)が-0.753568と-0.753504と最も大きな値を示し、コレステロール(TC)、中性脂肪(TG)、総タンパク質、アルブミン、アルブミン/グロブリン比(A/G)よりOHラジカルの発生に大きな影響を与えると判断された。

Variables in the Equation					
Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
TC	-4.73354E-06	3.6332E-04	-.001007	-.013	.9896
TG	-1.17993E-05	7.5976E-05	-.012355	-.155	.8769
TP	-.008438	.023290	-.032332	-.362	.7180
AG	.020672	.029780	.052541	.694	.4893
HBS	-.210742	.019539	-.753568	-10.786	.0000
(Constant)	.386325	.198830		1.943	.0551

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
TC	-9.02303E-06	3.7053E-04	-.001919	-.024	.9806
TG	-1.59381E-05	7.3855E-05	-.016688	-.216	.8296
ALB	-.009720	.034634	-.024593	-.281	.7796
AG	.028669	.030110	.072866	.952	.3435
HBS	-.210724	.019597	-.753504	-10.753	.0000
(Constant)	.356059	.150248		2.370	.0199

その結果、標準化回帰係数は表 1-b に示すように HBs抗体の有無が0.754と一番高く、血漿から発生するラジカルは血漿コレステロール、中性脂肪、総タンパク質、アルブミンの各血漿成分濃度、HBs抗体の有無の中で、HBs抗体の有無が最も強い影響を与えているのを認めた。また、この多変量解析の結果、X線 8 Gyならびに 12Gy照射でも標準化回帰係数はHBs抗体の有無が一番大きかった。

5. HBs抗体陽性血漿のラジカル発生量の検討

本研究対象者98名の中でHBs抗体陽性者は28名であった。図 1-b の矢印のESRスペクトルは抗体陽性者であった。これらHBs抗体陽性群と陰性群のX線 4, 8, 12Gy照射におけるOHラジカル量を図 4 に示す。両群共に比例的なOHラジカル量の増加を認めるが、HBs抗体陽性群は陰性群に比べて発生するOHラジカル量は有意に低かった (p<0.01)。

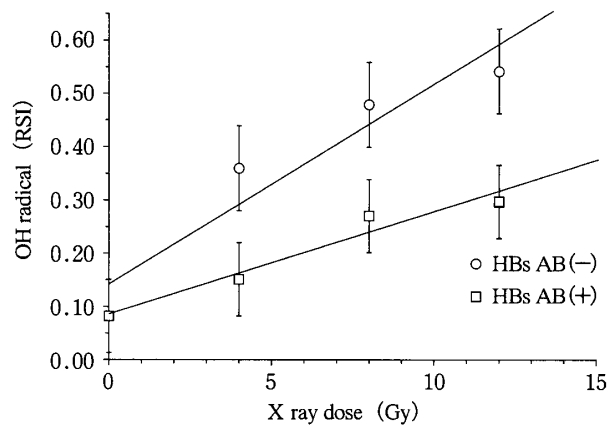


図 4 HBs抗体陰性群と陽性群への各X線照射によりヒト血漿から発生するOHラジカル量の変化
両群は共に線量の増加に比例してOHラジカル量も増加するが、HBs抗体陰性群と陽性群とでラジカル量に差を認める。(RSI=relative signal intensity)

6. HBs抗体陽性血漿のラジカル消去能の検討

1) 抗原-抗体反応による抗体の失活

HBs抗体陽性血漿のラジカル消去能に対するワクチン添加の影響を調べた。HBs抗体陰性血漿のX線 4 Gy照射により発生するOHラジカル量はRSI=0.36±0.1であるが、ワクチン添加直後の陽性血漿から発生するOHラジカル量は

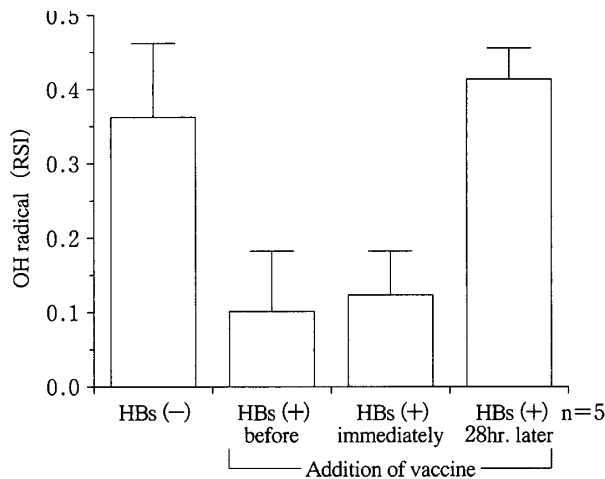


図5 HBs抗体陽性血漿にB型肝炎ワクチン添加により発生するOHラジカルの変化
 結果はX線4 Gy照射により発生するOHラジカルを観察したもので、ワクチン添加直後(immediately)では添加前(before)と同等のラジカル量を認めるが、28時間後(28hr. later)では抗体陰性血漿(HBs(-))と同等のラジカルの発生を認める。

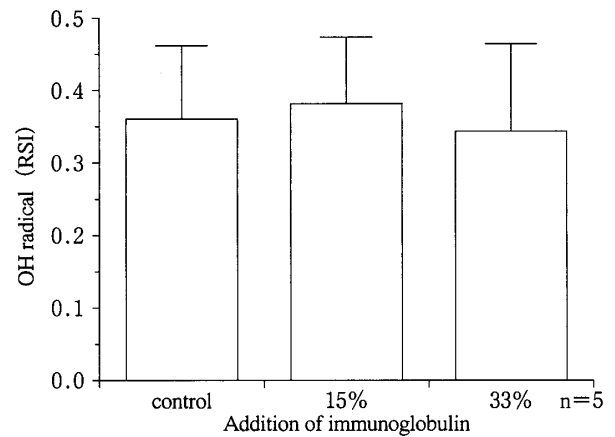


図6 HBs抗体陰性血漿に抗HBs人免疫グロブリン製剤添加により発生するOHラジカルの変化
 結果はX線4 Gy照射により発生するOHラジカルで、対照はHBs抗体陰性血漿のラジカル量である。HBs抗体陰性血漿にグロブリン製剤を15ならびに35μl加え、総量100μlの試料である。グロブリン製剤15ならびに35μl添加のいずれも対照と同等のラジカルの発生を認める。

RSI=0.12±0.06であり、添加前のRSI=0.10±0.08と同等であった。しかし、28時間後に肉眼的に凝集を認めたあとの上清では照射によるOHラジカル量はRSI=0.41±0.04を示し、抗体陰性と同等のラジカル発生であった(図5)。

2) 抗HBs人免疫グロブリンの消去能

HBs抗体陰性血漿に人免疫グロブリン製剤を添加することによりラジカル消去能が変化するか否か調べた。製剤15μlを添加した血漿ではX線4 Gy照射で発生するOHラジカル量はRSI=0.38±0.09であった。さらに、35μl添加におけるOHラジカル量はRSI=0.34±0.12を示し、両群とも対照である免疫グロブリン無添加のHBs抗体陰性血漿から発生するラジカル量と同等であった(図6)。

3) ワクチン接種による抗体獲得までの観察

HBs抗体陰性の被検者1名にB型肝炎ワクチンを接種し、経日的なOHラジカル量の変化を観察した。ワクチン接種前の被検者の血漿へのX線4 Gy照射により発生するOHラジカル量はRSI=0.31±0.03であった。1回目のワクチ

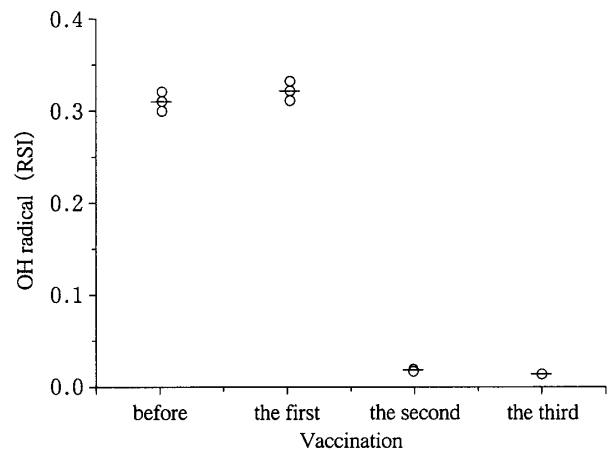


図7 肝炎予防ワクチン接種者の血漿OHラジカルの変化
 結果は1名の被検者のX線4 Gy照射により発生するOHラジカルを観察したもので、ワクチン接種前(before)と接種1回目の1カ月後(the first)ではOHラジカルの発生を認めるが、2回目接種6カ月後(the second)と3回目接種1カ月後(the third)ではラジカルの発生は認めない。(各々3回測定)

ン接種1カ月後におけるOHラジカル量はRSI=0.32±0.03で接種前と変化を認めなかった。しかし、2回目接種から6カ月後のOHラジカル量はRSI=0.02±0.01、そして、3回目接種から1カ月後のOHラジカル量はRSI=0.01±0.01と著しく減少した(図7)。また、最後に採

取した血液の生化学的な検査ではHBs抗体陽性が確認された。

IV. 考 察

本研究では血球成分は除外し血漿から発生するフリーラジカルについて検討を行った。その理由として、血球成分から発生するフリーラジカルは主として白血球細胞の破壊により生じるが^{11,12)}、X線照射では細胞を破壊することなく細胞内で直接ラジカルが発生すると考えられる。しかし、今回ラジカルの捕足剤として用いたDMPOは膜透過性が低く細胞内で発生したラジカルを充分捕足できない可能性が考えられたためである¹³⁾。

1. X線照射で発生するフリーラジカルについて

生体が放射線を受けたときに起こる変化は大きく初期過程、中間過程、最終過程に分けられ、発生するラジカルは初期過程と中間過程におけるX線と水分子との反応で生じる³⁾。ヒト血漿は種々の成分を含んでいるが多くは水分子からなる。従って、X線照射によって生じるのはOHならびにHラジカルである¹⁴⁾。今回の実験でラジカルの検出はESRスピントラップ法で行った。ラジカル捕足剤であるDMPOはO₂、OH、Hなどのラジカル種を捕足することが知られている^{15,16)}。本実験で得られたESRスペクトルの超微細結合定数の値はa^N=a^H=1.50mTを示すDMPO-OHとa^N=1.64, a^H=2.25mTを示すDMPO-Hの2種類のラジカル種であり上記の定説と矛盾しない。また、X線量の増加にともない発生するラジカル量は比例的に増加するのが認められた。今回、照射に用いたX線は制動X線で連続スペクトルを示す。スペクトルが変わるとX線の血漿に対する線エネルギー付与(LET)が異なってくるが、本実験では管電圧を一定にし、線量調整は照射時間の増減で行ったのでX線スペクトルは変化していない¹⁷⁾。従って、ラジカル量の変化は照射時間の増減に

依存した。

2. 血漿成分濃度とラジカル発生量について

血漿中には脂質としてコレステロール、中性脂肪、リン脂質、そして遊離脂肪酸がある。今回の実験では総コレステロール濃度および中性脂肪濃度とラジカル量を比較した。ラジカルにより低比重リポタンパクが酸化されて血管壁に吸着し動脈硬化症などの原因になるという報告はあるが¹⁸⁻²¹⁾、フリーラジカルの消去能との関係を示した報告はない。本研究では総コレステロールおよび中性脂肪濃度とラジカル発生量との間に相関は認めなかった。血漿中のタンパク質については総タンパク質濃度およびアルブミン濃度とラジカル発生量との関係について検討した。アルブミンにはフリーラジカルの消去作用を有することが知られており^{9,10,22-24)}、一部臨床では抗酸化能を上げる目的で敗血症患者へアルブミンを投与し、治療への試みもなされている²⁵⁾。本実験ではアルブミン濃度の高い者がラジカルの消去傾向を示す可能生が考えられたが、実際にはアルブミン濃度4.5~6.5g/dlの範囲では両者の間に相関は認めなかった。アルブミンは高い抗酸化作用が示される一方で、ラット摘出心臓の筋膜や脂質の膜酸化反応に対しては低い抗酸化作用が報告されており^{26,27)}、アルブミンの抗酸化作用は実験条件により差がある。また、本実験ではラジカルの発生にX線を用いたが、Daviesら²⁸⁾は⁶⁰Coガンマ線照射によるフリーラジカルによるタンパク質への影響として、ウシ血漿アルブミンはポリペプチド中のチロシン、システイン、ヒスチジンの各残基がラジカルに弱いことを示した。従って、本実験ではアルブミンがX線により変化し消去能が失われた可能性がある。一方、総タンパク質濃度においてもラジカル発生量との間には相関は認めなかった。タンパク質にはフリーラジカル消去能を示す様々なものがある。血清タンパクであるセルロプラスミンは銅含有タンパク質で

鉄イオンを酸化させることで、抗酸化作用を有している^{27,29)}。また、肝臓に存在するシスチンを多く含むメタロチオネインはアルブミンに比較して効果的にOHならびにO₂ラジカルを消去することが知られている^{30,31)}。また、ヒト以外では仔ウシの血液抽出物質であるソルコセルルは活性酸素消去能があり自然発症高血圧ラットの抗浮腫作用が報告されている³²⁾。このようにある種のタンパク質はラジカル消去能が示されているが、今回の研究では総タンパク質とラジカル量とに相関は認めなかった。

3. ラジカル発生因子について

今回の実験ではX線4 Gy照射においてHならびにOHラジカルのスペクトル波形をほとんど認めないものが観察された。これらについて過去の血液検査の資料と照合したところ、B型肝炎抗体であるHBs抗体を保有していることが判明した。X線で発生するラジカル量に対して、血漿成分の中でラジカル発生に影響を与える度合を明らかにするために多変量解析を行った。その結果、4, 8, 12GyのすべてのX線照射で発生するラジカル量はHBs抗体の有無が最も強い影響を与えているのが認められた。本研究の被検者98名の中でHBs抗体陽性者は28名であった。HBs抗体陰性群と陽性群におけるOHラジカル発生量を比較すると、抗体陽性群から発生するラジカル量は有意に低かった。また、X線量に対するラジカル発生量の増加の割合は両群で違いがみられ、照射線量が大きくなるほど両者の差は大きくなった。特に、X線4 Gy照射では未照射と同じESRスペクトルを示すことから発生するラジカルを完全に消去していると考えられる(図1-b)。頭頸部の悪性腫瘍に対する放射線治療の外部照射では1回に照射する線量は2 Gy前後である。従って、HBs抗体陽性血漿は放射線治療をはじめ、それより線量の低い一般のX線撮影により血漿内で発生するラジカルを完全に消去していると考えられ

る。

著者が知る限りではHBs抗体がラジカル消去能を有しているという報告は認めないことから、本実験結果はHBs抗体のラジカル消去能を示した初めての報告であるといえる。そこで以下の3つの検討を行ったので、これらについて考察する。

1) 抗原-抗体反応による抗体の失活

本研究で得られたHBs抗体陽性血漿におけるラジカルの消去能がHBs抗体自身によるものか抗体が何らかの消去物質を誘導しているのか不明である。そこで、HBs抗体陽性血漿にB型肝炎ワクチンを添加して抗原-抗体反応による影響について観察した。その結果、ワクチン添加による抗体凝集後の血漿ではラジカルの消去能の消失を認めた。

2) 抗HBs人免疫グロブリンの消去能

次に、市販されている抗HBs人免疫グロブリンをHBs抗体陰性者の血漿に添加しラジカル発生に対する影響を観察した。結果は免疫グロブリン添加においてもラジカルの消去能は認められなかった。これは、本製剤はCohnの低温エタノール法により分離精製されており、抽出時の有機溶媒による抗体の微妙な性質の変化や製剤に含まれているグリシン、チメロサルなどの添加物の影響が考えられる。

3) ワクチン接種による抗体獲得までの観察

HBs抗体陰性ではラジカルの消去能は認めないが抗体陽性では消去能が出現する。そこで、B型肝炎予防のためワクチンを接種したときの経日的なラジカル発生の変化を観察した。ワクチンを接種し抗体の獲得が血液検査で確認された3回目接種1カ月後の時点では明らかにラジカルの消去能を認めた。一般に、このようなワクチン接種では有効な抗体の出現は3回目の接種後であるが³³⁾、本研究では2回目の接種から6カ月後の時点においてもラジカルの消去を認めている。この時には血液検査による確認はし

ていないが、被験者はこの時点ですでに抗体を獲得していた可能性が考えられる。しかし、本研究の被験者は1名であり、今後検体数を増やして観察する必要がある。

また、血漿内に含まれるHBs抗体量とOHラジカル消去能との関係は非常に興味深いが、本実験で得られた28名のHBs抗体陽性者の血液検査結果は抗体価を示したものではないので抗体価とラジカル量を比較することは出来なかった。

HBs抗体が如何なるメカニズムでラジカルを消去しているかを現時点では不明であるが、そのメカニズムを多面的に追求する必要があるだろう。また、老化、癌、動脈硬化、炎症、リウマチ、糖尿病などフリーラジカルに起因すると考えられている疾患³⁴⁾とHBs抗体保有との疫学的関連を調査し、今回見いだされたHBs抗体陽性血漿の機能を裏付けることが今後の興味深い検討課題と思われる。

V. 結 論

1. X線照射によりヒト血漿から発生するフリーラジカル種はHならびにOHラジカルで、照射線量に比例してラジカル量も増加した。
2. X線照射によりヒト血漿から発生するOHラジカル量と血漿内の総コレステロール、中性脂肪、総タンパク質、アルブミンの各成分濃度との間には相関は認めなかった。
3. 血漿成分の中でHBs抗体の有無がX線により発生するラジカル量に大きな影響を与え、HBs抗体陽性血漿のラジカル消去能は陰性血漿より有意に大きかった。
4. B型肝炎ワクチン添加によるHBs抗体の中和でラジカル消去能は減少した。
5. 市販のグロブリン製剤にはラジカル消去能は認めなかった。
6. ワクチン接種者では抗体の獲得によりラジ

カルの消去能が増強した。

以上の結果より、HBs抗体陽性血漿によるラジカルの消去に抗体自身が関与している可能性が強く示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の御指導、御校閲を頂いた北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座金子昌幸教授、御校閲を賜りました北海道医療大学歯学部口腔生化学講座田隈泰信教授、北海道医療大学歯学部歯科薬理学講座東城庸介教授に深く感謝の意を表わします。また研究に協力して頂いた北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座の諸氏に厚くお礼申し上げます。

参 考 文 献

1. Niewald M, Barbie O, Schnabel K, et al : Risk factors and dose-effect relationship for osteoradiationecrosis after hyperfractionated and conventionally fractionated radiotherapy for oral cancer., *Br J Radiol*, **69** : 847-851, 1996.
2. Levendag PC, Visch LL and Driver N : A simple device to protect against osteoradiationecrosis induced by interstitial irradiation., *J Prosthet Dent*, **63** : 665-670, 1990.
3. 小沢俊彦 : 活性酸素, 第3版, 共立出版, 東京, 1993, 159-165.
4. Prasad KN : Radiobiology. 2nd ed., CRC, 1995, 1-7.
5. Schwart HA : Free radical generated by radiolysis of aqueous solutions., *J Chemical Educatio*, **58** : 101-105, 1981.
6. 二木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃 真 : 抗酸化物質—フリーラジカルと生体防御, 第2版, 学会出版センター, 東京, 1995, 5-11.
7. 藤田道也, 澁谷正史, 小島 至 : 標準分子医化学, 第1版, 医学書院, 東京, 1997, 609.
8. Armstrong JS, Rajasekaran M, Hellsterom WJ, et al : Antioxidant potential of human serum albumin, Role in the recovery of high quality human spermatozoa for assisted reproductive technology., *J Andrology*, **19** : 412-419, 1998.

9. 山本順寛：アルブミン，ビリルビン，*J Act Oxyg Free Rad*, **2** : 247-253, 1991.
10. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, et al : The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma., *Biochimica et Biophysica Acta*, **924** : 408-419, 1987.
11. Ueno I, Kohno M, Mitsuta K, et al : Reevaluation of the spin-trapped adduct formed from 5, 5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide during the respiratory burst in neutrophils., *J Biochem*, **105** : 905-910, 1989.
12. Kleinhans FW and Barefoot ST : Spin trap determination of free radical burst kinetics in stimulated neutrophils., *J Biol Chem*, **262** : 12452-12457, 1987.
13. Pou S, Hasset DJ, Britigen BE, et al : Problems association with spin trapping oxygen centered free radicals in biological systems., *Analytical Biochemistry*, **177** : 1-6, 1989.
14. 吉井義一：放射線生物学概論，第2版，北海道大学図書刊行会，北海道，1986.
15. Kohno M, Yamada M, Mitsuta K, et al : Spin-trapping studies on the reaction of ion complexes with peroxides and the effects of water-soluble antioxidants., *Bull Chem Soc Jpn*, **64** : 1447-1453, 1991.
16. Makino K, Hagiwara T, Hagi A, et al : Cautionary note for DMPO spin trapping in the presence of iron ion., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **172** : 1073-1080, 1990.
17. 岡島俊三：医学放射線物理，第1版，南山堂，東京，1980，141-154.
18. Panasenko OM, Sharov VS, Briviba K. et al : Interaction of peroxynitrate with carotenoids human low density lipoproteins., *Arch Biochem Biophys*, **373** : 302-305, 2000.
19. Sevanian A, Asatryan L and Ziouzenkova O : Low density lipoprotein modification: basic concepts and relationship to atherosclerosis., *Blood Purif*, **17** : 66-78, 1999.
20. Patel RP and Darley-Usmar VM : Molecular mechanism of the copper dependent oxidation of low-density lipoprotein., *Free Radic Res*, **30** : 1-9, 1999.
21. Cominacini L, Garbin U, Pasini AF, et al : Oxidized low-density lipoprotein increases the production of intercellular oxygen species in endothelial cells, inhibitory effect lacidipin., *J Hypertens*, **16** : 1913-1919, 1998.
22. Iglesias J, Elizabeth A, Wang Z, et al : Albumin is a major serum survival factor renal tubular cells and macrophages through scavenging of ROS., *Am J Physiol*, **197** : 711-722, 1999.
23. Soriani M, Pietraforte D and Minetti M : Antioxidant protein of anaerobic human plasma, Role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals., *Archives of Biochemical and Biophysics*, **312** : 180-188, 1994.
24. Davies KJA, Delsignore ME and Lin SW : Protein damage and degradation by oxygen radicals, II. Modification of amino acids., *J Biol Chem*, **262** : 9902-9907, 1987.
25. Quinlan GM, Margaron MP, Mumby S, et al : Administration of albumin to patients with sepsis syndrome, a possible beneficial role in plasma thiol repletion., *Clinical Science*, **95** : 459-465, 1998.
26. Dumoulin MJ, Chahine R, Atanasiu R, et al : Comparative antioxidant and cardioprotective effects of ceruloplasmin, superoxide dismutase and albumin., *Arzneim-Forsch/ Drug Res*, **46** : 855-861, 1996.
27. Gutteridge JMC, Richmond R and Halliwell B : Oxygen free radicals and lipid peroxidation, Inhibition by the protein ceruloplasmin., *FEBS Lett*, **112** : 269-272, 1980.
28. Davies KJA : Protein damage and degradation by oxygen radicals, . . General aspects., *J Biol Chem*, **262** : 9895-9901, 1987.
29. Yamashoji S and Kajimoto G : Antioxidant effect of ceruloplasmin on microsomal lipid peroxidation., *FEBS Lett*, **152** : 168-170, 1983.
30. 小島 豊：メタロチオネイン，最新医学，**45** : 788-794, 1990.
31. Thornalley PJ and Vasak M : Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress, Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals., *Biochimica et Biophysica Acta*,

- 827 : 36-44, 1985.
32. 伊藤 亨, 川上正夫, 吉田誠一郎, 他 : 虚血SHRの再灌流時のエネルギー代謝およびMDAに及ぼす影響. 医学と薬学, 17 : 1590-, 1987.
33. 神山 健 : 医療機関内におけるHBV感染経路と予防, 日本臨床増刊, 下巻362-370, 1995.
34. 菊川清見, 桜井 弘 : フリーラジカルとくすり, 第1版, 廣川書店, 東京, 1991, 37-40.