

氏名・(本籍)	竹 林 義 人 (北海道)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	乙 第35号
学位授与の日付	平成10年 9 月25日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当 (論文博士)
学位論文題目	HL60 (ヒト前骨髄性白血病由来細胞) に対するアスコ ルビン酸と放射線の影響に関する研究
論文審査委員	主 査 教 授 金 子 昌 幸 副 査 教 授 矢 嶋 俊 彦 副 査 教 授 賀 来 亨

論 文 内 容 の 要 旨

目 的

アスコルビン酸は制癌作用のあることが知られており、臨床的に使用されることがある。一方、アスコルビン酸は、放射線の間接作用の主役と考えられているヒドロキシラジカルのラジカスカベンジャーであり、従って放射線治療中のアスコルビン酸の服用は放射線照射の効果を低下させる可能性がある。そこで演者はアスコルビン酸の効果およびアスコルビン酸添加時の放射線照射の影響を検討した。

材料と方法

細胞は、ヒト前骨髄性白血病由来細胞 (HL60) を使用した。RPMI-1640に10%仔牛血清を加え、湿度100%, 37°C, 5%CO₂, 95%airで培養維持した。実験に先立ち細胞を2~3日予備培養後、細胞数を5×10⁵cells/mlに再調整し、アスコルビン酸濃度ならびに照射線量を変えて実験を行い、以下の方法で検討を行った。

a) ESRによるラジカルの測定

培養液中に発生するラジカルはESRスピントラッピング法で測定した。培養液150μlにDETAPAC35μl, DMPO15μlを加え総量200μlの試料を十分混合し、放射線照射あるいはアスコルビン酸添加の後、日本電子社製ESR装置JES FR-80を用い、発生するラジカル量を測定した。

b) オートラジオグラフィー

アスコルビン酸が細胞内にとりこまれるのを確認するため、オートラジオグラフィーを行った。Ascorbic

Acid, L-[1-¹⁴C]-を10⁻⁴mol/l (3.7MBq/l) になるよう培養液に添加し、室温で30分放置した。800rpmで10分間遠心分離を行った後に、アスコルビン酸培養液で洗浄し、細胞をスライドグラスに塗沫、アルコール固定後、2%トリジンブルー染色し標本を作成した。この標本にdipping法で乳剤を塗布し、冷暗所に貯蔵した。3日後、標本の現像、定着を行い光学顕微鏡で観察した。

c) 生存細胞数の計測

細胞浮遊液と2%トリパンブルー溶液を等量混和した後、血球計算板に流し1分間静置後、生存細胞数 (非染色細胞数) を計測した。

d) 電顕的観察

HL60を培養液ごとに3000rpm10分間遠心分離し、上清をすてた後に2.5%グルタルアルデヒドで固定し、2%OsO₄で後固定した。アルコールで脱水、プロピレンオキシドで置換後、Epon812で包埋した。本標本から厚さ100nmの超薄切片を作成し、酢酸ウラン、クエン酸鉛染色を施しJEM-100CXで観察した。

e) DNA断片化の検出

1) DNA Ladder

インキュベートしたHL60を、4°C, 1000×gで5分間遠心分離し、上清を捨てた。これに、lysis buffer 20μlを加えて攪拌し、RNase A 1μlを加え、Water bathで50°C, 60分間インキュベートした。次にProteinase K 1μlを加え、さらに50°C120分間インキュベートした。遠心分離後2%アガロースゲルに移し、50V, TAE bufferで電気泳動し、トランスイルミネーターで観察した。マーカーは、Molecular weight marker Xを使用した。

2) ELISA

Cellular DNA Fragmentation ELISA Kit (Boehringer Mannheim, Germany)を使用した。実験前日からBrDUをHL60に標識し、実験後、インキュベートした細胞を攪拌し、培養液300 μ lをTritonX溶液 (TritonX0.05%, EDTA 5 mM/l)に加えて、4°C, 12000rpm, 30分で遠心分離し、上清100 μ lを抽出した。この試料を、予めBrDU抗体をコートしたマイクロタイタープレートに移し、TMB気質反応による発色を、光時計にて450nmの波長で計測した。

結 果

a) ESRによるラジカの測定

放射線照射時、培養液中にはヒドロキシラジカルが発生し、線量依存的に増加した。アスコルビン酸添加培養液では 10^{-3} mol/lからアスコルビン酸ラジカルが発生するのがみられ、濃度依存的にその量は増加した。アスコルビン酸添加培養液に放射線照射を行ったところ、アスコルビン酸濃度 10^{-5} mol/lからヒドロキシラジカルは減少し、 10^{-4} mol/l以上ではほぼ完全に消去された。しかし、 10^{-3} mol/l以上では放射線照射においてもアスコルビン酸ラジカルが発生した。

b) オートラジオグラフィー

14 Cで標識されたアスコルビン酸を、培養液中に添加したところ細胞内にホットスポットが観察された。

c) 生存細胞数の計測

放射線照射またはアスコルビン酸添加後24時間の培養を行い、その後の細胞数を検討した。その結果、4-20 Gyの照射では、線量の増加に伴い、生存率が低下した。また、アスコルビン酸濃度を 10^{-5} mol/lから 10^{-4} mol/lまで変化させたところ、 10^{-3} mol/l以上で細胞死が増加した。そこでアスコルビン酸濃度を 10^{-4} mol/lに調整して照射を行ったが、細胞死の減少は見られなかった。

d) 電顕的観察

対照群のHL60は分葉状の核をもち、良く発達した細胞小器官を持っていた。放射線照射およびアスコルビン酸濃度 10^{-3} mol/lでは核周囲にクロマチンの濃縮および、核の断裂を示した細胞が多く見られたが、細胞小器官は比較的たもたれていた。電顕観察に先立ち作成された準超薄切片にて上記のようなアポトーシス細胞の数を形態学的に計測したところ、放射線照射ならびにアスコルビン酸濃度 10^{-3} mol/lでは対照に比較して有意に多かった。

e) DNA断片化の検出

アガロースゲル電気泳動におけるDNA断片化の解析において、放射線照射およびアスコルビン酸濃度 10^{-3} mol/lでアポトーシスを示すladderが認められた。また、ELISAにおいても放射線照射およびアスコルビン酸濃度 10^{-3} mol/lではDNAの断片化を示す所見がみられた。しかし、アスコルビン酸濃度 10^{-4} mol/lでは断片化を示す所見は見られなかった。そこでアスコルビン酸濃度を 10^{-4} mol/lに調整し放射線照射を行い経時的にELISAで検討したところ、放射線単独より早い時期にDNA断片化を示す傾向があった。

結 論

アスコルビン酸は濃度 10^{-4} mol/l以上で放射線照射によって発生するヒドロキシラジカルを消去するが、一方、濃度 10^{-3} mol/l以上でアスコルビン酸ラジカルを発生させ、このラジカルがHL60の細胞死を引き起こすと考えられる。また、アスコルビン酸濃度 10^{-4} mol/lではアスコルビン酸ラジカルの発生はみられないが、この場合放射線照射を行っても、放射線照射単独より早期にDNA断片化をおこす傾向がみられた。以上より、HL60において、アスコルビン酸は放射線照射の効果を妨げないと考えられる。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

放射線の生物作用は間接作用と直接作用のあることが知られており、医療現場で使用頻度の高い電磁波においては、一般に間接作用の割合が高いとされている。この間接作用の担い手はヒドロキシラジカルであるとされており、従来から、この間接作用の算出はラジカルスカベンジャーである放射線防護剤を添加することにより行われてきた。しかし、この防護効果の生物学的作用機序については、不明な点が多い。

本研究はラジカルスカベンジャーとしてアスコルビン酸を用い、放射線防護剤の作用機序についてHL60を用

い検討を行った。アスコルビン酸添加培養液に放射線照射を行ったところ、アスコルビン酸濃度 10^{-5} Mからヒドロキシラジカルは減少し 10^{-4} Mではほぼ完全に消去された。しかし、 10^{-3} M以上では放射線照射においてもアスコルビン酸ラジカルが発生した。そこでアスコルビン酸濃度を 10^{-4} Mの調整して照射を行ったが、細胞死の減少は見られなかった。また、このときのDNA断片化をELISAで検討したところ、放射線単独より早い時期に断片化を示す傾向がみられた。以上の結果は、アスコルビン酸は濃度 10^{-4} M以上で、放射線照射によって発生するヒドロ

キシラジカルを消去するが、一方、濃度 10^{-3} M以上でアスコルビン酸ラジカルの発生はみられないが、細胞の生存率は向上せず、むしろ放射線照射においては、培養液中のヒドロキシラジカルの減少が細胞生存率向上に結びつかないことがあることを示している。

本論文はフリーラジカルの視点より放射線障害の作用機序を解明しており、歯学の発展に寄与するところが大である。以上より博士（歯学）の学位を授与するに値するものと判定する。