

〔原 著〕

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

竹林義人

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)

The effect of ascorbic acid when exposed to X-rays in HL60 cells

Yoshito TAKEBAYASHI

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

(Chief Masayuki KANEKO)

Abstract

This study examined the effect of ascorbic acid (AsA) which acts as a hydroxyl radical scavenger when exposed to X-rays. The X-ray irradiation produced hydroxyl radicals in the medium and the amount of hydroxyl radicals increased markedly with increases in the X-ray dose. Apoptotic changes of HL60 cells were observed with the irradiation. When the concentration of AsA was above 0.1mM, the AsA scavenged the hydroxyl radicals which were formed in the medium. However, 1mM AsA generated ascorbate radicals and induced apoptosis of HL60 cells without radiation. With 0.1mM AsA, hydroxyl radicals were scavenged and did not induce cell death. However, DNA fragmentation of HL60 cells with X-ray irradiation in 0.1mM AsA was observed to be faster than in the non-treated medium. These findings suggest that AsA did not influence the effect of radiation.

Key words Ascorbic acid, X-ray, Apoptosis, Radical

緒 言

放射線が人体に有害であるとの発見は古く、Rontogen教授がX線を発見した翌年1896年に、DanielがX線によると思われる脱毛を、またSteevensenが皮膚の異常を既に報告している¹⁾。20世紀初頭の医療現場における放射線の利用は、この障害との戦いであったともいえる。それは特に診断機器の放射線の活用において重大な問題であった。しかし、一方で放射線はその細胞致死効果を利用し、悪性腫瘍の治療すなわち放射線治療として利用されている。特に放射線感受性の高い、悪性リンパ腫や白血病などでは、化学療法とならんで、放射線治療は現在もなくてはならない治療法のひとつである²⁻⁵⁾。放射線による生物作用は、一般に決定ターゲットであるDNAに対する障害に基づいているとされており、その作用機序は直接作用と間接作用の2種類あることが知られている。直接作用は放射線照射による電離が直接的にDNAに作用し障害を与える。間接作用は放射線が細胞内の水と作用し、フリーラジカルを発生し、それがDNAに到達し障害を与えるとされている⁶⁾。

一方、アスコルビン酸は抗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。しかしアスコルビン酸は、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ル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治療効果すなわち局所制御率の低下を招く可能性が生じる。また逆に、アスコルビン酸の服用が放射線障害を低減させるのであれば、毒性の低いアスコルビン酸を放射線防護剤として有効利用することが考えられる。

本研究はヒト前骨髄性白血病由来細胞(HL60)を使用し、アスコルビン酸の制癌作用および放射線照射の影響について解明するため

に行われた。

材料と方法

1. 細胞と培養条件

細胞は、ヒト前骨髄性白血病由来細胞(HL60)を使用した。RPMI-1640 (GIBCO, Grand Island, NY) に10%仔牛血清 (FBS, Cansera, Montreal) を加え、湿度100%, 37°C, 5%CO₂, の条件で培養維持した。

2. アスコルビン酸の調整

アスコルビン酸はL (+) Ascorbic acid (関東化学, 東京) を使用した。アスコルビン酸は上記培養液に0.01m, 0.1m, 1m, 10m, 100mの濃度を溶解の後, NaOH (関東化学, 東京) でpH7.4に調整した。その後0.2μl polysulfone menbrance (関東化学, 東京) で濾過し使用した。実験は基本的にアスコルビン酸添加後, 細胞を30分室温 (22~25°C) に放置し, その後インキュベーションを行った。

3. 放射線照射

細胞は2-3日予備培養後, 細胞数を5×10⁵ cells/mlに再調整し, 35mm培養シャーレ (岩城硝子, 千葉) に2ml分注しX線を照射した。放射線はSofron BST 1501 (綜研, 東京) を使用し, 管電圧: 80kVp, 管電流: 5mA, 距離: 30cm, 遮蔽: 1mm Al, 線量率: 16Gy/h, 照射温度: 室温 (22~25°C) の条件で, 4~20Gy照射した。なお, アスコルビン酸添加した場合は, アスコルビン酸を培養液に添加後30分室温に放置し, その後, 照射を行った。

4. 実験方法

1) ESRによるラジカルの測定

培養液中に発生するラジカルをESRスピントラッピング法で測定した。試料作成においてはキレート剤としてのデータパック

(DETAPAC) (和光純薬, 大阪) スピントラップ剤としての diethylenetriamine-N, N-dimethylpyrrolidine-1-oxide (DMPO) (Labotec社, New York City, NY) を使用した。培養液150 μ lにDETAPAC35 μ l, DMPO15 μ lを加え総量200 μ l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。ラジカル量は DMPO とラジカルが結合した DMPO アダクトの信号強度を測定し, 標準として用いた MoO ラジカルの信号強度の比, すなわち相対信号強度 (RSI) として求めた。ESR の測定条件は, 周波数: 9.04 GHz, 中心磁場: 334.5 mT, 出力: 8 mW, 掃引幅: ± 7.5 mT, 変調幅: 0.2×0.1 mT, 感度: 2×100 , 時定数: 0.1 秒, 掃引時間: 2 分, 測定温度: 室温とした。

2) 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。試薬は Ascorbic Acid, L-[1- 14 C]- (DuPont, Boston) を使用した。細胞を 2~3 日予備培養後, 細胞数を 5×10^5 cells/ml に再調整し, Ascorbic Acid, L-[1- 14 C]- を 0.1 mM (3.7 MBq/l) になるよう添加し, 室温で 30 分放置した。その後, 800 rpm で 10 分遠心後, アスコルビン酸 1 mM 添加培養液で洗浄し, 細胞をスライドグラスに塗抹, アルコール固定後, 2% トルイジンブルーで染色し標本を作成した。この標本に dipping 法で乳剤 (コニカ, 東京) 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。

3) 生細胞数の計測

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, 生細胞数 (非染色細胞数) を計測した。

4) 形態学的観察

HL60 を培養液ごと 3000 rpm 10 分間遠心し, 上

清をすて 2.5% グルタルアルデヒドで固定し, OsO₄ で後固定した。アルコールで脱水, プロピレンオキサイドで置換後, Epon 812 (TAAB, London) で包埋した。その試料から厚さ 1 μ m 準超薄切片を作成し, トルイジンブルーで染色し, 光学顕微鏡で観察した。また, その中の細胞からランダムに 100 個を選び, アポトーシス様細胞の数を計測した。アポトーシス様細胞の基準としては, (1) 核膜周囲に偏在するクロマチンの凝集がみられる, (2) 濃縮した核の断片化がみられる, のいずれかの所見がみられるものとした。

5) DNA断片化の検出

(1) DNA ladder

インキュベートした細胞を, 4°C, 1000 \times g, 5 分遠心し上清を捨てた。これに, lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM EDTA \cdot Na, 0.5% w/v sodium α -N-lauroylsarcosinate) (和光純薬, 大阪) 20 μ l を加え攪拌し, RNase A (Sigma, St. Louis, Mo) 1 μ l を加え, Water bath で 50°C, 60 分インキュベートした。次に Proteinase K (Sigma) 1 μ l を加え, さらに 50°C 120 分インキュベートした。遠心後 2% アガロースゲル (0.01% ethidium bromide; 和光純薬, 大阪) に移し, 50V, TAE buffer で電気泳動し, トランスイルミネーター (コスモバイオ, 東京) で観察した。マーカーは, Molecular weight marker X (0.07~12.2 kbp, Boehringer Mannheim, Mannheim, BY) を使用した。

(2) ELISA

Cellular DNA Fragmentation ELISA Kit (Boehringer Mannheim) を使用した。実験前日から bromodeoxyuridine (BrDU) を HL60 に標識させた。放射線照射またはアスコルビン酸処理後, インキュベートした細胞を攪拌し, 培養液 300 μ l を 1.2 ml の PBS-Triton \times 溶液 (Triton \times 0.05%, EDTA 5 mM/l) に加え 4°C, 30 分で静置後, 4°C, 12000 rpm, 30 分で

遠心し、上清100 μ lを抽出した。この試料を、予め抗BrDU抗体をコートしたマイクロタイタープレート (FALCON, Trenton, NJ) に移し、TMB基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

1. 放射線照射単独の変化およびアスコルビン酸単独の変化について

1) 培養液に発生するラジカルについて

4 Gy照射時およびアスコルビン酸濃度 1

mMに調整した条件で得られたESRスペクトルを図1に示す。放射線照射下ではヒドロキシラジカルを示す4本のピークを、また、アスコルビン酸添加時においてはアスコルビン酸ラジカルによる中央2本のピークを示した。線量ならびにアスコルビン酸濃度の変化による信号強度の変化を図2、図3に示す。放射線の線量が増加するに従い、培養液中に発生するヒドロキシラジカルは増加し、また、アスコルビン酸の濃度が増加するに従い、培養液中に発生するアスコルビン酸ラジカルは増加した。

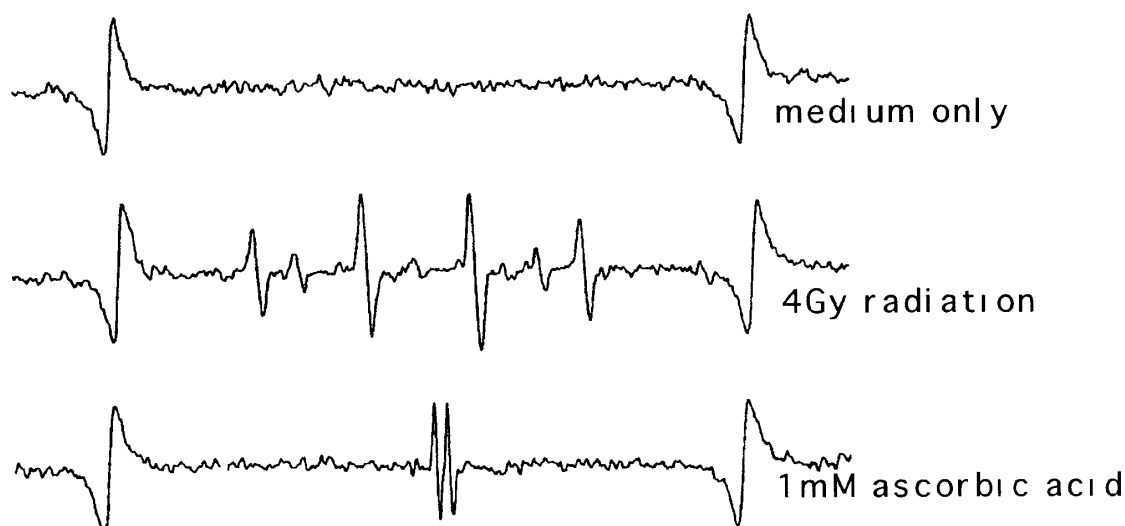


図1 ESRスペクトル

放射線照射ではヒドロキシラジカルを示す波形が、アスコルビン酸添加ではアスコルビン酸ラジカルを示す波形を示している。

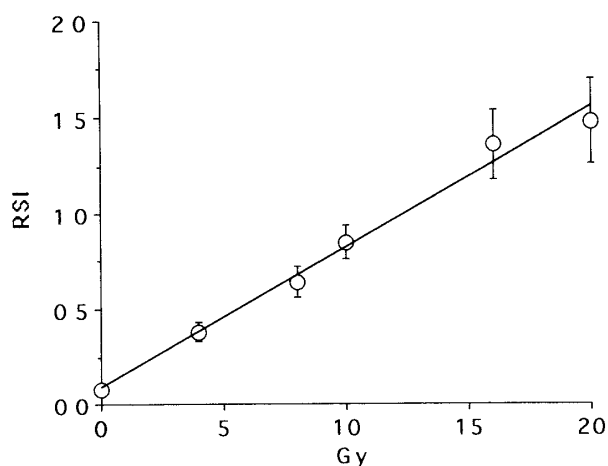


図2 放射線照射時発生するヒドロキシラジカルの変化

吸収線量が増加するにしたがい、ヒドロキシラジカルが増加している。(RSI=relative signal intensity)

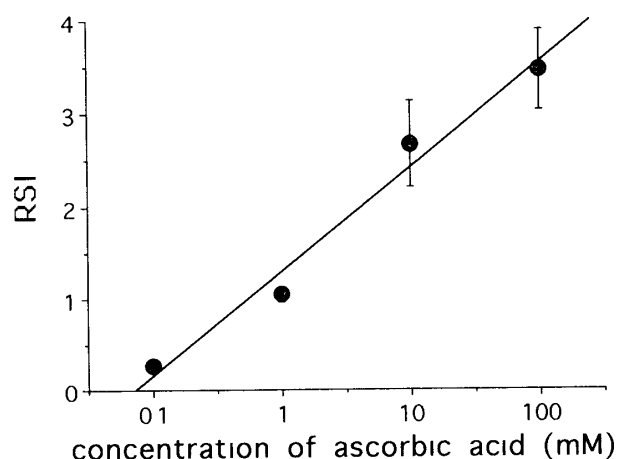


図3 アスコルビン酸添加時発生するアスコルビン酸ラジカルの変化

濃度が増加するにつれ、アスコルビン酸ラジカルは増加している。(RSI=relative signal intensity)

2) 放射線照射およびアスコルビン酸添加時の細胞数の変化

放射線を4 Gy, 8 Gy, 12Gy, 16Gy, 20Gy照射し, 24時間後のHL60細胞数を計測した結果を図4に示す。放射線照射した場合, 線量が増加するに従い細胞数が減少する傾向がみられた。次に, 培養液にアスコルビン酸を添加したときの, アスコルビン酸濃度と24時間後のHL60細胞数の関係を図5に示す。対照群と比較してアスコルビン酸濃度1 mMから細胞は減少し, アスコルビン酸濃度が増加するとともに細胞数は減少した。

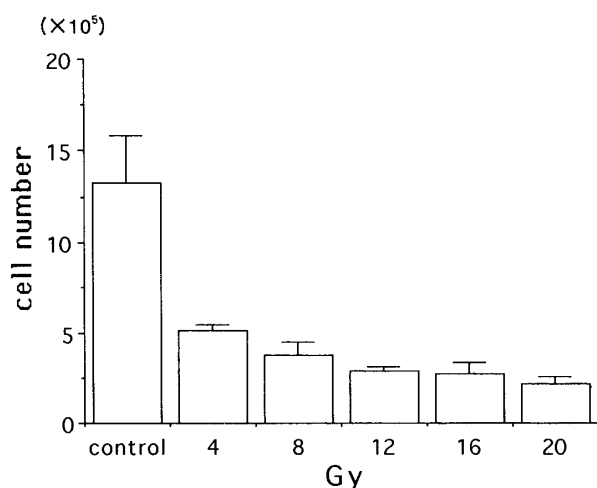


図4 放射線照射後の細胞数
放射線照射後, 線量の高いもので細胞数は減少する傾向がみられる。

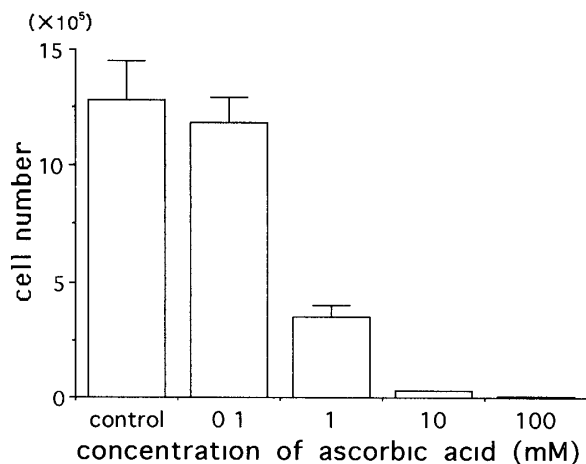


図5 アスコルビン酸添加後の細胞数
アスコルビン酸添加後, アスコルビン酸濃度1 mM以上で細胞数は減少する傾向がみられる。

3) 放射線照射およびアスコルビン酸添加時の形態学的変化

対照の形態学的所見を図6に示す。形態学的にHL60は細胞質がトルイジンブルーにより染まり周囲と明瞭に境され, 核は分葉状を示した。20Gy照射を行ったHL60の形態学的所見を図7に示す。照射後6時間経過すると, 細胞の収縮がみられ, クロマチンの核周囲への凝集が見られる細胞および, 濃縮した核の断片化の見られる細胞が多く存在した。しかし細胞の輪郭は比較的明瞭であった。20Gy以下の線量では, 線量の低下とともに上記の所見を示す細胞が減少する傾向がみられたが, 基本的な変化は20Gyの時と同じだった。

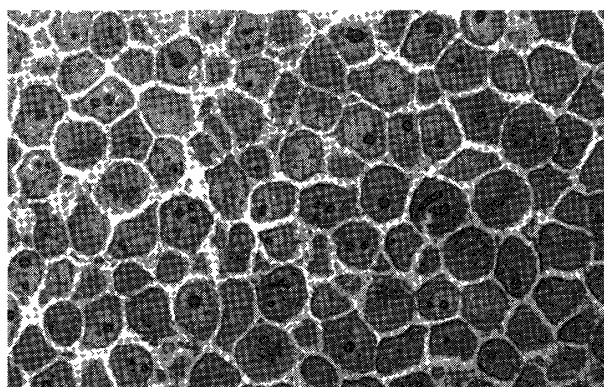


図6 HL60 対照 (トルイジンブルー染色×400)
HL60は類円形をしており, 核が濃染した。

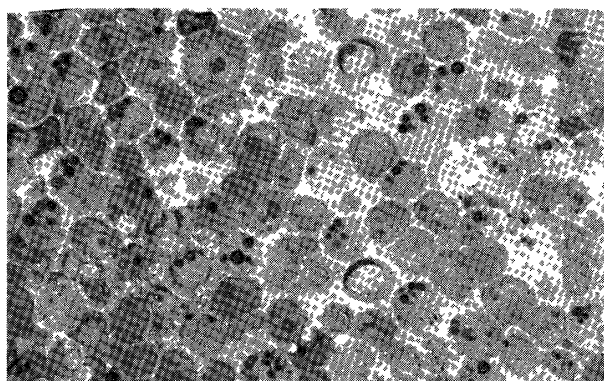


図7 HL60 20Gy照射 (トルイジンブルー染色×400)

放射線照射群では, 核周囲にクロマチンの凝集のみられる細胞や核の断片化のみられる細胞が多く存在した。

アスコルビン酸濃度0.1mMに調整後、6時間経過した形態学的所見を図8に示す。一部の細胞にミトコンドリアの軽度の拡張を示した細胞がみられたが、総じて対照群と形態学的にはほぼ同様で、特異な所見を示した細胞は少なかった。

アスコルビン酸濃度1mMに調整後、6時間経過した形態学的所見を図9に示す。アスコルビン酸濃度1mMで放射線照射と同様に、アポトーシスの形態学的所見を示す細胞が見られた。すなわち、細胞は縮小し、核膜辺縁部にクロマチンの凝集や核の断片化がみられた。

アスコルビン酸濃度10mMに調整後、6時間

経過した形態学的所見を図10に示す。アスコルビン酸濃度10mMでは、細胞周囲の境界が不明瞭で、細胞内ではミトコンドリアの膨化と思われる空胞がみられた。

4) 準超薄切片によるアポトーシス様細胞の計測

準超薄切片によるアポトーシス様細胞の計測結果を図11に示す。アスコルビン酸濃度10mMならびにアスコルビン酸濃度0.1mMに比較して、放射線20Gy照射およびアスコルビン酸濃度1mMでアポトーシス様細胞が多く、t検定($p < 5\%$)で有意な差を認めた。

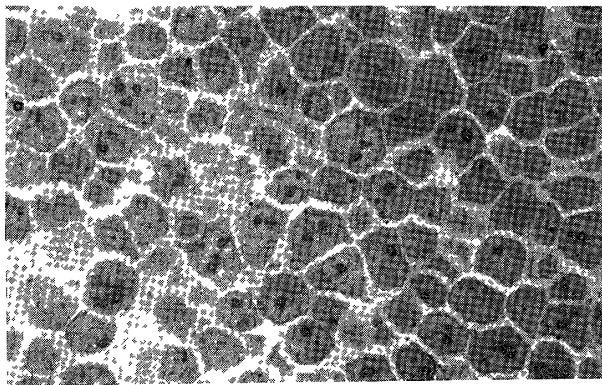


図8 HL60 アスコルビン酸0.1mM (トルイジンブルー染色×400)

アスコルビン酸0.1mM群では形態学的に、大きな変化は認められなかった。

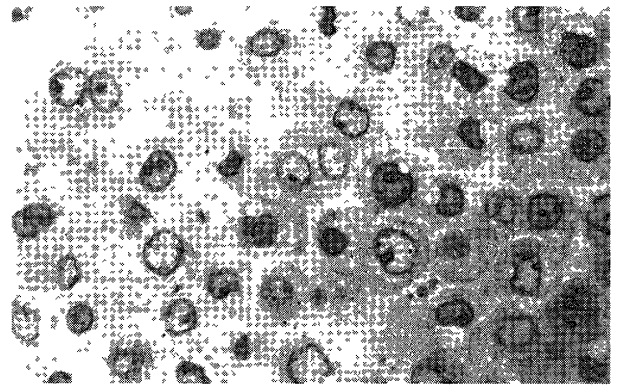


図10 HL60 アスコルビン酸10mM (トルイジンブルー染色×400)

ミトコンドリアの膨化と思われる空胞が多く、細胞にみられた。

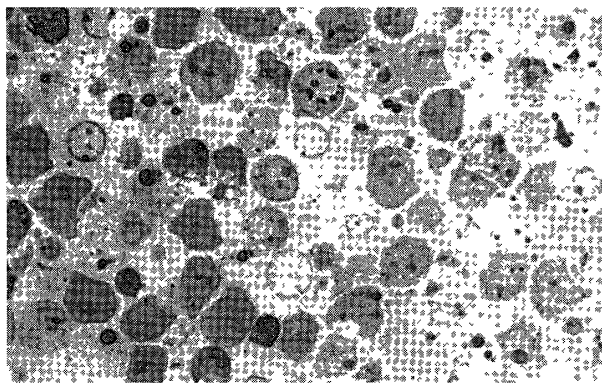


図9 HL60 アスコルビン酸1mM (トルイジンブルー染色×400)

放射線照射群と同様に、核周囲にクロマチンの凝集のみられる細胞や核の断片化のみられる細胞が多く存在した。

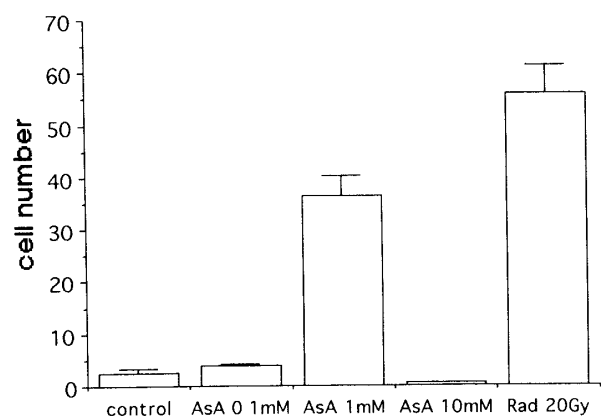


図11 アポトーシス様細胞の計測結果

アポトーシス様細胞はアスコルビン酸0.1mMと放射線照射に多くみられた。

(AsA=アスコルビン酸, Rad=放射線照射)

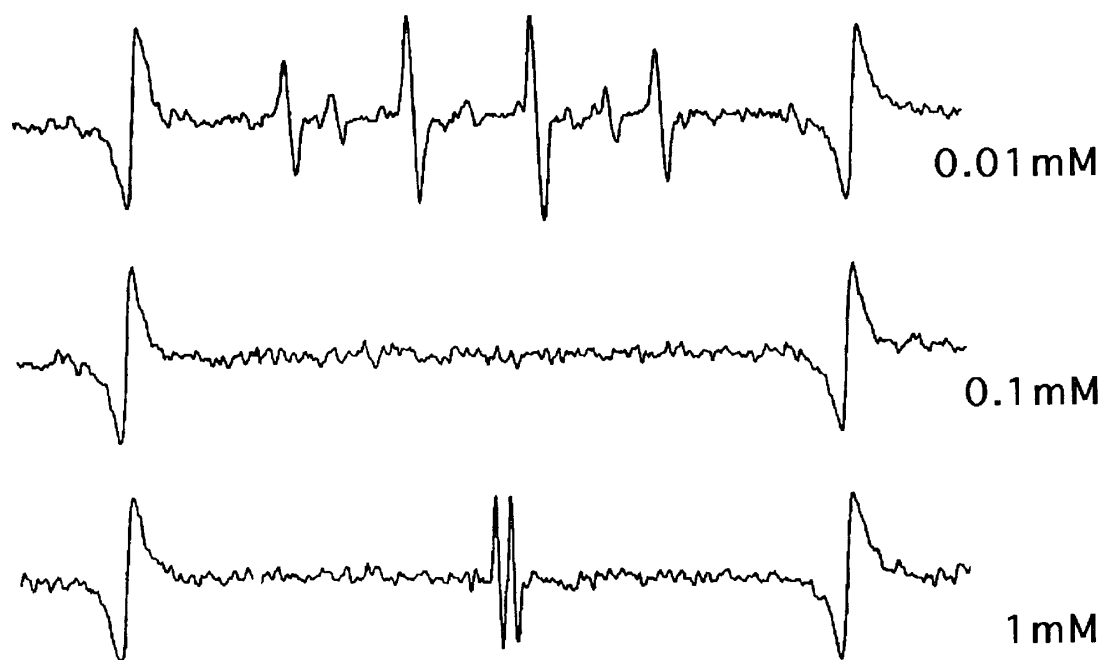


図12 アスコルビン酸添加および4 Gy放射線照射によるESRスペクトル

アスコルビン酸0.1mM以上ではヒドロキシラジカルは消去されるが、アスコルビン酸1mMではアスコルビン酸ラジカルの発生がみられた。

2. アスコルビン酸添加時における放射線照射の影響について

1) 培養液に発生するラジカルについて

培養液にアスコルビン酸を添加し放射線照射(4 Gy)した場合に得られるESRスペクトルを図12に示す。図12に示すごとく、アスコルビン酸濃度の変化に伴い発生するラジカルは変化した。アスコルビン酸濃度0.01mMでは放射線照射によるヒドロキシラジカルがみられたが、アスコルビン酸濃度0.1mMではヒドロキシラジカルはほぼ消去された。このアスコルビン酸濃度0.1mMでは20Gyまでヒドロキシラジカルの発生はみられなかった。さらにアスコルビン酸濃度1mMではヒドロキシラジカルは消去されたが、アスコルビン酸ラジカルが発生した。

2) オートラジオグラフィーの所見

オートラジオグラフィーの所見を図13に示す。アスコルビン酸濃度0.1mM (3.7MBq/l) になるよう添加し、室温で30分放置した場合、 ^{14}C で標識されたアスコルビン酸が細胞内に

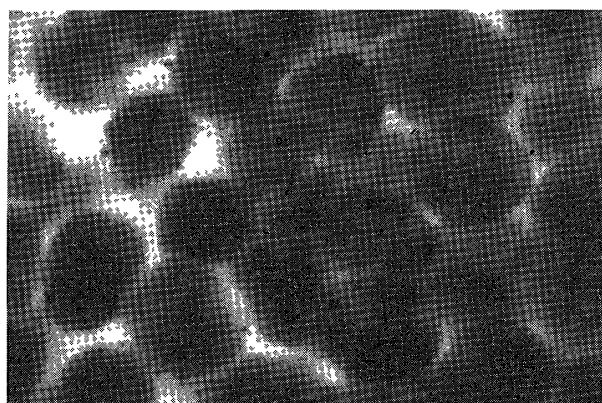


図13 HL60 オートラジオグラフィー(^{14}C -アスコルビン酸×600)

アスコルビン酸を示すホットスポットが細胞内にみられた。

ホットスポットとして観察された。

3) HL60のDNA断片化の測定について

アガロースゲル電気泳動の結果を図14に示す。アスコルビン酸単独(濃度1mM)、放射線単独(20Gy)ではアポトーシスを示すladder patternがみられた。また、アスコルビン酸濃度0.1mMにおいて放射線20Gyを照射しても同様

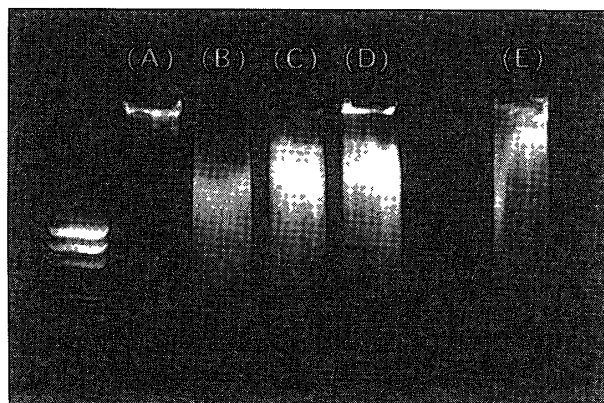


図14 アガロースゲル電気泳動の結果

(A) 対照 (B) アスコルビン酸 1 mM
(C) アスコルビン酸 0.1 mM + 20 Gy 照射
(D) 20 Gy 照射 (E) アスコルビン酸 10 mM
(B)(C)(D)にはアポトーシスを示す, ladder patternがみられたが(E)にはみられない。

のladder patternがみられた。しかしアスコルビン酸単独(濃度10mM)においてはアポトーシスを示すladder patternはみられなかった。

次にELISAによる放射線20Gy照射4時間後のDNA断片化の測定結果を図15に示す。アスコルビン酸(濃度0.1mM)を添加した場合,放射線照射単独に比較して断片化の多い傾向がみられた。

4) HL60の経時的細胞生存率の変化について

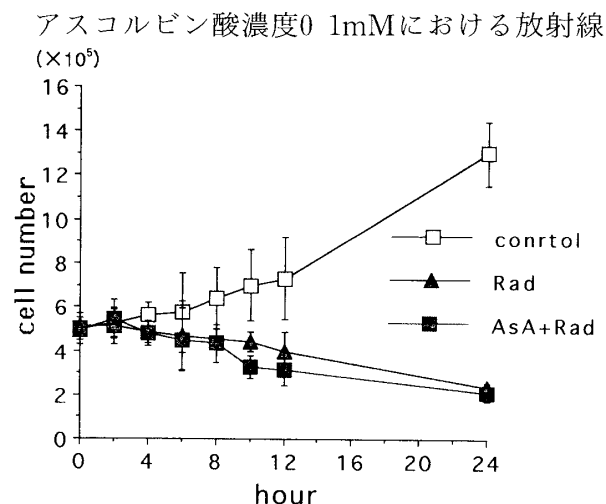


図15 ELISAによるDNA断片化の結果

アスコルビン酸0.1mM(AsA)単独ではDNA断片化を起こしていなかったが,アスコルビン酸0.1mMを添加して放射線を照射(AsA+Rad)すると,放射線照射単独(Rad)よりDNA断片化が多くみられた。

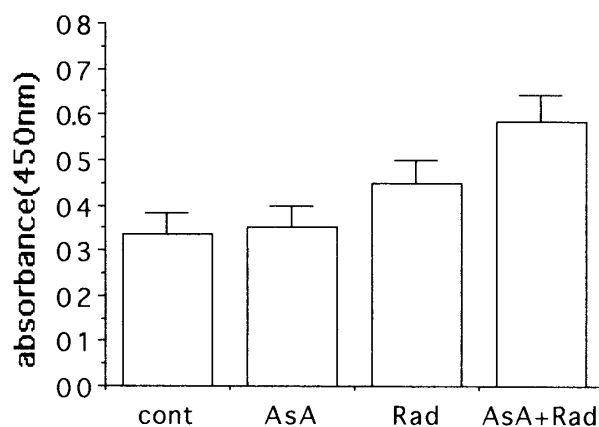


図16 細胞数の経時的推移

アスコルビン酸0.1mMを添加して放射線を照射(AsA+Rad)しても,放射線照射単独(Rad)に比較して細胞は増加しなかった。

20Gy照射時の細胞数の変化を図16に示す。放射線照射単独に比較して生存率は向上していなかった。特に照射後10時間では,放射線単独よりもアスコルビン酸添加群で細胞数の減少する傾向がみられた。また,アスコルビン酸濃度を1mM, 10mM, 100mMに調整し,放射線照射24時間後の細胞数も検討したが,生存率の向上はみられなかった。

考 察

1. 放射線照射による影響について

間接作用による放射線と水の反応過程は複雑で,どのラジカルがDNAに作用をおよぼすかに関しては未だ議論がある^{7,8)}。一般には,ヒドロキシラジカルによる反応が生物学的障害に最も大きく影響しているとするのが有力である⁹⁻¹¹⁾。直接作用と間接作用の割合は,線質によって異なり,一般に粒子線を主とする高LET放射線では直接作用の割合が高く,電磁波では間接作用の割合が高いとされる¹²⁾。従って本研究で使用した低エネルギー放射線によるHL60に対する影響は,間接作用による生物学的作用が大きいと考えられる。また,使用した電磁放射線は細胞膜透過性で,培養液で測定されたヒ

ドロキシラジカルが細胞内でも同様に発生すると考えられる。今回の実験では、発生するヒドロキシラジカル量が生存率と逆相関する傾向を示し、従ってこの結果は上記の定説と矛盾しない。

また、20Gyの放射線照射後6時間で、HL60にアポトーシスを示す結果が得られた。形態学的には典型的な形態学的所見が多くの細胞にみられた。すなわち、細胞の萎縮、細胞表面の単純化、核膜へ接着した明瞭なクロマチンの凝集、さらに濃縮した核の断片化がみられた^{13,14)}。また、DNAの断片化を示す結果として、アガロースゲル電気泳動によりアポトーシスを示すDNA ladder patternが、さらにELISAは放射線照射後、DNAの断片化は増加することを示していた。この点についてはHopciaら¹⁵⁾がHL60を使用し、放射線照射に対する酸素効果とアポトーシスの関係について検討している¹⁵⁾。彼等の結果によれば照射後6時間のHL60のDNAの断片化は40Gyまで線量依存性に増加していた。放射線照射においては線量が増加すると細胞死はアポトーシスからネクローシスに移行することが知られている。山田らは胸腺細胞では50Gy以上の線量ではアポトーシスはみられずネクローシスに移行すると報告している¹⁶⁾。今回検討した線量は20Gy以下であり、今回の実験による放射線による細胞死は上記の結果よりアポトーシスによると考えられた。

2. アスコルビン酸による影響について

今回の実験系ではアスコルビン酸ラジカルがHL60の細胞死と関係していることが示唆された。すなわちESRでアスコルビン酸ラジカルの発生が確認されるアスコルビン酸濃度1mMから細胞死がみられた。また、アスコルビン酸ラジカルが測定されないアスコルビン酸濃度0.1mMでは細胞の減少および細胞個々の形態学的変化がみられなかった。さらに、アスコルビン

酸ラジカルの増加とともに細胞の生存率は減少する傾向を示した。アスコルビン酸ラジカルはアスコルビン酸の酸化過程において中間体として生成されるもので、ヒドロキシル化反応をはじめいくつかの生体反応に関与しており、重要な生理的、薬理的意義を有している¹⁷⁾。アスコルビン酸ラジカルの生体に対する反応速度は低いと考えられているが、細胞内にはアスコルビン酸還元酵素が存在する¹⁸⁾。このことは、アスコルビン酸ラジカルが細胞にとって好ましくないことを示しており、培養細胞に対するアスコルビン酸の毒性はこのラジカルによるためであるとされている¹⁹⁾。このことを裏付ける研究として、Sakagamiら²⁰⁾がアスコルビン酸によるHL60の細胞死について検討し、L-ascorbic acidの濃度1mMでアスコルビン酸ラジカルが発生し、HL60の細胞死がはじまると述べており、この報告はわれわれの実験結果と良く一致している。

また、今回の実験ではアスコルビン酸濃度によりHL60に形態学的な違いがみられた。すなわちアスコルビン酸濃度1mMでは核膜周囲に偏在した明瞭なクロマチンの凝集、さらに濃縮した核の断片化がみられたのに対し、アスコルビン酸濃度10mMでは細胞膜が不明瞭になり、ミトコンドリアまたは粗面小胞体の膨化とおもわれる空胞が多くみられた。また、準超薄切片による定量的計測においても、アスコルビン酸濃度1mMでアポトーシス様細胞が多く見られたのに対し、アスコルビン酸濃度10mMではあまり見られなかった。また、アガロースゲル電気泳動でアスコルビン酸濃度1mMではアポトーシスを示す特有のladder patternがみられた。以上の所見は、HL60がアスコルビン酸濃度1mMではアポトーシスが、そしてアスコルビン酸濃度10mM以上ではネクローシスが引き起こされることを、示唆するものと考えられる^{13,14)}。放射線にかぎらず、アポトーシスをおこ

す条件よりさらに厳しい環境では、ネクローシスが観察されることが報告されている¹⁶⁾。Sandovalらは小腸細胞またはマクロファージにperoxynitriteを加えると、75 μ M未満ではアポトーシスを、75 μ M以上ではネクローシスを起こすと報告している²¹⁾。また、MayerはHL60にaclarubicinを添加すると75nM以上での濃度でネクローシスがおこると述べている²²⁾。しかし一般に悪性腫瘍の治療において、生理的な環境を保全する意味から腫瘍細胞の細胞死はアポトーシスが好ましいとされている²³⁾。FujinagaはHL60ならびに人正常リンパ球、単球、多形核白血球に対するアスコルビン酸の効果を検討している。そしてアガロースゲル電気泳動の結果、HL60はアスコルビン酸濃度1 mMでアポトーシスを示すladder patternがみられたのに対し、ヒト正常リンパ球、単球、多形核白血球ではみられなかったと報告している²⁴⁾。以上より推察すると、悪性腫瘍の細胞は正常組織細胞より低いアスコルビン酸濃度でアポトーシスを示し、その至適濃度は1 mM程度であると考えられる。アスコルビン酸の経口大量投与による抗癌作用を認めるか否かについては議論があるが²⁵⁻²⁷⁾、今回の研究結果から判断すると、アスコルビン酸の血中濃度を1 mM程度に上昇させないと抗癌作用は期待できないと考えられた。

3. アスコルビン酸存在下における放射線照射の影響について

今回の研究では、ヒドロキシラジカルを消去するアスコルビン酸を用い実験を行ったが、HL60の生存率向上はみられなかった。予備実験としてアスコルビン酸が放射線照射前にHL60に存在するのが確認され、アスコルビン酸単独で細胞死がみられなかった濃度を使用したのにもかかわらず、放射線単独に比較してHL60の生存率は上昇しなかった。

一般に培養液にラジカル発生薬剤を加えると

細胞死がおこり、ラジカルスカベンジャーを加えると細胞死の抑制がみられる²⁸⁾。これはラジカル発生源が細胞外にあり、細胞外でラジカルスカベンジャーがラジカルを消去するため、その効果の判定は比較的容易であると推測される。しかし放射線照射の防護の場合、ラジカルは細胞内に直接発生するため、現在も不明な点が多い。アスコルビン酸を放射線防護剤として行った実験も過去にいくつか存在するが、結果は一定していない²⁹⁻³³⁾。しかし、これら過去の文献的考察を要約すると、アスコルビン酸は放射線照射に対して正常組織、とくにin vivoでは防護効果が得られるが、腫瘍細胞では効果がみられないというのが妥当であると考えられる。

しかし、以上の結果から考察すると、ラジカル消去による防護効果という説明には欠陥が存在する。すなわち、ラジカル消去により防護効果が得られるとすると腫瘍細胞でも生存率は向上するはずである。従って、他に理由を求めなくてはならないが、放射線の防護効果を説明する、その他の仮説として、①障害分子修復説②低酸素状態説などがある³⁴⁾。この中で今回の実験結果を裏付けるものとして、障害分子修復説を挙げたい。これは損傷をうけたDNAを防護剤が化学的に修復するという説で、グルタチオンにおいてこの効果は証明されている³⁴⁾。本研究において放射線照射をした場合、アスコルビン酸を添加した群では、ELISAにおいてDNA断片化を早期に起こす傾向がみられた。また、それに伴い照射10時間後ではアスコルビン酸添加群で生存率の低い傾向がみられた。これはDNAになんらかの異常がある場合、アスコルビン酸は修復ではなく断片化を起こすことを示唆していると思われる。従って、ラジカルスカベンジャーであるアスコルビン酸が防護効果をもたないのは、アスコルビン酸がDNAの化学的修復作用をもたないためであると推察される。また、DNAに異常がある場合、アスコルビン酸が断片

化を起こすとする、アスコルビン酸の抗癌作用の機序も説明可能である。

しかし、ラジカルスカベンジャーが一般に放射線防護効果を示すことが多いのも事実で、放射線防護剤の作用機序がすべて障害分子修復説で解決されるとも思われない。また、ラジカル消去効果ならびに障害分子修復効果が、防護効果に対しどのくらいの影響を持つかなど、未解決のままである。さかのぼって放射線生物学における直接作用と間接作用の割合の算出は、防護剤によるラジカル消去という概念から導きだされており³⁵⁾、今後、解決すべき問題点は多いと考えられた。

結 論

アスコルビン酸の作用と放射線照射の影響をHL60を用いて検討した。

1. アスコルビン酸は培養液添加30分で、細胞内に存在しているのが確認された。
2. アスコルビン酸濃度 1 mM以上で、アスコルビン酸ラジカルの発生がみられた。
3. アスコルビン酸濃度 1 mMでアポトーシス、アスコルビン酸濃度10mMでネクローシスの所見がHL60にみられた。
4. アスコルビン酸濃度0.1mMで、放射線照射により発生するヒドロキシラジカルは消去されたが、この時、HL60の生存率向上はみられなかった。
5. 放射線照射を行ったアスコルビン酸濃度0.1mMでは放射線単独に比較して、DNAの断片化が早期に起こる傾向がみられた。

以上より、アスコルビン酸は放射線照射時においても、HL60の細胞死を妨げないと考えられた。

謝 辞

本稿を終わるにあたり、本研究の機会を与えて下さり懇切なる御指導、御稿閲を賜わりました

た北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座の金子昌幸教授に感謝の意を表します。また貴重な御助言および御援助を賜いました、北海道医療大学歯学部解剖学第一講座の矢嶋俊彦教授ならびに北海道医療大学歯学部口腔病理学講座の賀来 享教授に深謝致します。また、本研究に御協力下さいました、歯科放射線学講座および口腔病理学講座の各位、ならびに電顕機器室の伊藤亜男様に感謝致します。

文 献

1. 山口彦之：放射線と生物，第2版，啓学出版，1981，1-9.
2. Rosenberg SA The low-grade non-Hodgkin's lymphoma challenges and opportunities *J Clin Oncol*, **3** : 299-310, 1985.
3. Portlock CS Good risk of non-Hodgkin's lymphomas Approach to management *Semin Hematol*, **25** : 25-34, 1988.
4. Quast U Physical treatment planning of total-body irradiation patient translation and beam-zone method *Med Phys*, **12** : 567-574, 1985.
5. Queen JJ Bone marrow transportation in the management of childhood cancer *Pediatric Clin North Am*, **32** : 811-833, 1985.
6. Prasad KN Radiobiology 2nd ed, CRC, 1995, 1-7.
7. Minotti G, Aust SD The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide *J Biol Chem* **262** : 1098-1104, 1987.
8. Yamamoto K, Kawanishi S Hydroxyl free radical is not the main active species in site-specific DNA induced (II) ion and hydrogen peroxide *J Biol Chem*, **264** : 15435-15440, 1989.
9. Brown K, Fridovich I DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals *Arch Biochem Biophys*, **206** : 414-419, 1981.
10. Coggle JE Some properties of ionizing radiation, Biological effects of radiation 2nd ed, Taylor & Francis ltd, 1983, 1-28.
11. Sonntag CV Targets in radiation biology, The chemical basis of radiation biology 1st ed, Taylor & Francis ltd, 1987, 94-115.

12. Prasad KN Cellular radiation damage, Radiobiology 2nd ed, CRC, 1995, 49-60.
13. Uchiyama Y Apoptosis the history and trends of its studies *Arch Histol Cytol*, **58** 127-137, 1995.
14. Wyllie AH, Morris RG, Smith AI, et al Chromatin cleavage in apoptosis association with condensed chromatin morphology and dependence of macromolecular synthesis *J Pathol*, **142** 67-77, 1984.
15. Hopcia KL, McCarey YL, Sylvester FC, et al Radiation-induced apoptosis in HL60 cells oxygen effect, relationship between apoptosis and loss of clonogenicity, and dependence time to apoptosis of radiation dose *Radiat Res*, **145** 315-323, 1996.
16. 山田 武, 大山ハルミ アポトーシス概論, アポトーシス, 日経サイエンス社, 1995, 9-63.
17. Bielski BH, Richer HW, Chan PC Some properties of the ascorbate free radical *Ann NY Acad Sci*, **258** 231-237, 1975.
18. Zepp RG, Wolfe NL, Baughman GL, et al Single oxygen in natural waters *Nature*, **267** 421-423, 1977.
19. 浅田啓二 活性酸素の生成, 二木国夫, 島崎弘幸編, 活性酸素, 医歯薬出版, 1994, 33-63.
20. Sakagami H, Satoh K, Ohata H, et al Relationship between ascorbyl radical intensity and apoptosis-inducing activity *Anticancer Res*, **16** 2635-2644, 1996.
21. Sandoval M, Zhang XJ, Liu X, et al Peroxynitrite-induced apoptosis in T84 and RAW 264.7 cells attenuation by L-ascorbic acid *Free Radic Biol Med*, **22** 489-495, 1997.
22. Mayer P, Gorisse MC, Carpentier Y, et al Effects of aclarubicin on growth differentiation and apoptosis of tumor cells in vitro *Bull Cancer*, **81** 670-676, 1994.
23. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, et al Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14,18) chromosome translocation *Science*, **226** 1097-1099, 1984.
24. Fujinaga S, Sakagami H, Kuribayashi N, et al Possible role of hydrogen peroxide in apoptosis induction by ascorbic acid in human myelogenous leukemic cell lines *Showa Univ J Med Sci*, **6** 135-144, 1994.
25. Creagan FT, Moertel CG, O'Fallon JR, et al Vitamin C therapy to benefit patients with advanced cancer *New Eng J Med*, **301** 687-690, 1979.
26. Pauling L Vitamin C therapy of advanced cancer *New Eng J Med*, **302** 694, 1980.
27. Moertel C, Fleming, Creagan FT, et al High-dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy *New Eng J Med*, **312** 137-141, 1985.
28. Forrest VJ, Kang YH, McClain DE, et al Oxidative stress-induced apoptosis prevented by trolox *Free Radical Biol Med*, **16** 675-684, 1994.
29. Narra VR, Howell RW, Sastry KSR, et al Vitamin C as a radioprotector against iodine-131 in vivo *J Nucl Med*, **34** 637-640, 1993.
30. Narra VR, Harapanhalli RS, Howell RW, et al Vitamins as radioprotectors in vitro I Protection by vitamin C against internal radionuclides in mouse testes implications to the mechanism caused by the auger effect *Radiat Res*, **137** 394-399, 1994.
31. Harapanhalli RS, Yaghamai V, Giuliani D, et al Antioxidant effect of vitamin C in mice following X-irradiation *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **94** 271-287, 1996.
32. Okuniff P Interactions between ascorbic acid and the radiation of bone marrow skin, and tumor *Am J Clin Nutr*, **54** 1281S-1283S, 1991.
33. O'Connor MK, Malone JF, Moriarty M, et al A radioprotective effect of vitamin C observed in Chinese hamster ovary cells *Br J Radiol*, **50** 587-591, 1977.
34. Sonntag CV Protection sensitization and the oxygen effect, The Chemical Basis of Radiation Biology 1st ed, Taylor & Francis Ltd 1987, 295-352.
35. Hall EJ (浦野宗保) Radiation biology for the Radiologist (放射線科医のための放射線生物学, 篠原出版, 1995, 213-222) 1994.