放射線障害防護薬剤に関する研究 (第4報¹⁾) ビタミン E および
その誘導体の放射線障害防護効力について²⁾

篠田雅人, 高木良成, 玉置文一, 赤星三弥³⁾

放射線医学総合研究所薬学研究部³⁾

Pharmacological Studies on Chemical Protectors against Radiation. IV.¹⁾
Studies on Radioprotective Effects of Vitamin E
and its Derivatives²⁾

MASATO SHINODA, YOSHINARI TAKAGI, BUN-ICHI

TAMAOKI, and SANYA AKABOSHI³⁾

Department of Pharmaceutical Science, National Institute
of Radiological Sciences³⁾

(Received July 24, 1967)

This experiment was undertaken to determine the radioprotective activity of vitamin E and its esterified derivatives, using survival time and body weight changes in X-irradiated mice as the pharmacological indices. Male mice of ddY strain, 5 to 6 weeks old, were used in this experiment. Each group consisting of 10 mice was exposed to 700 R whole body X-irradiation, which caused 100% mortality of the mice without medication within 2 weeks after X-irradiation under the condition adopted for this experiment. The test preparations such as vitamin E, and its acetate, ferulate, caffeate, and succinate were dissolved in sesame oil or cottonseed oil, or suspended in 5% Tween 80 aqueous solution, and administered intraperitoneally 24 or 3 hr. before the irradiation or 5 min after irradiation; 1 mmole/kg of vitamin E, acetate or ferulate, 0.5 mmole/kg of the caffeate, or 0.25 mmole/kg of the succinate. The potency of radioprotective effect of each preparation was evaluated, based on the elongation of survival time up to 30 days and increase in body weight two weeks after irradiation, comparing with the control. Tween 80, used as the detergent to emulsify the preparation, did not show any influence on survival time and body weight. Sesame oil was slightly radioprotective on survival time and body weight. Cottonseed oil caused decrease in body weight under a certain circumstance. Under the condition of this experiment, vitamin E was little effective, while the acetate was slightly effective, and the other esters were significantly effective, and it was found that radioprotective effect was increased by esterification of vitamin E. It was also found that estimates of the effect based on survival time and on body weight were agreement. Radioprotective effect of the preparations seemed to depend the solvent used and the time of administration.

Vitamin E (α -tocopherol) の放射線障害に対する予防ならびに治療効果については, 1949 年 Bacq, Herve^{4),5)} によって報告されて以来, 多くの研究が行なわれているが, その効果については一定の評価のない現状である. そこで, vitamin E およびそのエステル誘導体数種について, 種々の溶媒を用い, X 線照射によるマウスの死亡および体重減少に対する防護効力を検討した.

実 験 の 部

実験方法

実験動物: 船橋農場より購入した生後約 4 週令 (生月日のバラツキ ± 1 日) の ddY 雄マウスを用いた. 実験

1) 第3報: 薬誌, 88, 271 (1968).

2) 日本薬学会第 85 年年会にて発表, 徳島, 1965 年 10 月.

3) Location: Anagawa, Chiba-shi.

4) Z.M. Bacq, A. Herve, *J. Physiol.*, 41, 124A (1949).

5) A. Herve, Z.M. Bacq, *C.R. Soc. Biol.*, 143, 1158 (1949).

前 1 週間の予備飼育を行なったのち、体重をでき得る限りそろえて実験に使用した。飼料は繁殖に用いたものと同じマウス用固型飼料（船橋農場製）を用い、飲料水は給水ビンにより自由に与えた。実験は 1 群 10 匹で行なった。

X 線照射： X 線 200 kVp, 20 mA, フィルター 0.5 mm Cu+0.5 mmAl, 距離 50 cm, 線量率 96 R/min などの条件で、ルサイト製のマウス 12 匹照射用の固定器に 1 群 10 匹ずつ入れ、700 R を背部から全身照射した。線量の測定にはラドコン線量計を使用した。ddY 雄マウスにこの条件で X 線 700 R 照射すると通常、照射後約 2 週間以内にマウスの全部が死亡する。

試料の調製および投与： この実験には vitamin E とその acetate, ferulate, caffeate および succinate の 5 種の試料⁶⁾を用いた。これらの試料はいずれも脂溶性であるために、溶液を 5% Tween 80 水溶液によるエマルジョン（以後“エマルジョン”と略記する）、ゴマ油溶液および綿実油溶液の三種類とした。試料はその投与量がマウス体重 20 g 当り 0.2 ml になるようにあらかじめ調製し、投与はすべて腹腔内注射によった。

防護効力試験： 試料投与および X 線照射を行なったのち、照射後 30 日間観察し、次式に従って生存防護効力および体重防護効力を規定し、算出した。なお、照射後 2 週間以内に死亡した場合は死亡時の体重を測定し、体重防護効力の測定に加算した。

$$\text{生存防護効力} = \frac{(\text{X 線照射+薬剤投与}) \text{群 30日間平均生存日数}}{(\text{X 線照射+溶媒投与}) \text{群 30日間平均生存日数}}$$

$$\text{体重防護効力} = \frac{(\text{X 線照射+薬剤投与}) \text{群 2週間後体重変動率}}{(\text{X 線照射+溶媒投与}) \text{群 2週間後体重変動率}}$$

実験結果

I. **溶媒の影響** 各化合物の調製用溶媒として使用した 5% Tween 80 水溶液、ゴマ油および綿実油について、投与量が 0.2 ml/20 g の場合の放射線防護効力試験におよぼす影響を観察した (Table I)。

TABLE I. Effects of Several Solvents on Survival Time and Body Weight of 700R X-Irradiated Mice

Solvents ^{a)}	Administration time	Survival effect ^{b)}	Body weight effect ^{c)}
5% Tween 80	24 hr before irradi.	0.90	0.98
	3 hr before irradi.	0.97	0.98
	5 min after irradi.	0.99	1.02
Sesame oil	24 hr before irradi.	1.34	1.04
	3 hr before irradi.	1.07	1.05
	5 min after irradi.	1.17	1.03
Cottonseed oil	24 hr before irradi.	1.12	0.96
	3 hr before irradi.	1.01	0.98
	5 min after irradi.	1.16	1.01

a) Dose: 0.2 ml/20 g, Intraperitoneal injection

b) The ratio of mean survival time for 30 days after irradiation in a treated group to that of the control.

c) The ratio of mean value of body weight change in a treated group to that of the control on the second week after irradiation.

この実験条件の範囲では、生存防護効力に対しては、いずれの溶媒もほとんど影響をおよぼさず、体重防護効力に対しては、ゴマ油がわずかに有効であり、綿実油に効力を低下させる場合のあることを認めた。

II. **Vitamin E およびその誘導体の放射線障害防護効力** Vitamin E およびそのエステル誘導体の放射線障害防護効力を、これらの薬剤の投与時期が X 線照射前 24 時間と前 3 時間、および照射直後の三種類について測定し、Table II の結果を得た。

(1) **Vitamin E** ゴマ油溶液と綿実油溶液はともに、投与量が 1 mmole/kg (430 mg/kg) では、生存防護効力、体重防護効力ともに明らかな効果を認めることはできなかった。vitamin E のエマルジョンは 5% Tween 80 水溶液と均一に混和せず、調製できなかった。

(2) **Vitamin E-acetate** 投与量 1 mmole/kg (472 mg/kg) で効力試験を行ない、明らかな生存防護効力を認めたが、溶媒の種類によって効力発現の傾向が異なり、エマルジョンでは照射前 24 時間が有効であるのに対して、ゴマ油溶液と綿実油溶液では照射直後がもっとも有効であり、有効投与時期に差が見られた。体重防護効力も生存防護効力とほぼ同様の傾向を示した。

6) vitamin E の ferulate と caffeate は藤沢薬工中央研究所において合成したサンプルを用い、他の試料はいずれも市販品である。

TABLE II. Radioprotective Effects of Vitamin E and its Derivatives

Compounds ^{a)}	Dose (mmole/kg)	Solvents	Administration time	Survival effect ^{b)}	Body weight effect ^{c)}
Vitamin E	1	Sesame oil	24 hr before irradi.	1.00	1.01
			3 hr before irradi.	1.25	1.05
			5 min after irradi.	1.24	1.01
		Cottonseed oil	24 hr before irradi.	1.10	0.99
			3 hr before irradi.	1.15	1.01
			5 min after irradi.	0.96	0.99
V. E-acetate	1	5% Tween 80	24 hr before irradi.	1.56	1.08
			3 hr before irradi.	1.03	1.04
			5 min after irradi.	0.87	0.99
		Sesame oil	24 hr before irradi.	0.97	0.97
			3 hr before irradi.	1.10	0.99
			5 min after irradi.	1.38	1.07
V. E-ferulate	1	Cottonseed oil	24 hr before irradi.	1.32	0.99
			3 hr before irradi.	1.06	0.99
			5 min after irradi.	1.51	1.04
		5% Tween 80	24 hr before irradi.	1.42	1.09
			3 hr before irradi.	2.39	1.14
			5 min after irradi.	1.38	1.08
V. E-cafeate	1/2	Sesame oil	24 hr before irradi.	0.67	0.95
			3 hr before irradi.	1.52	1.08
			5 min after irradi.	1.16	1.04
		Cottonseed oil	24 hr before irradi.	1.76	1.18
			3 hr before irradi.	2.58	1.11
			5 min after irradi.	1.85	0.97
V. E-succinate	1/4	5% Tween 80	24 hr before irradi.	1.05	1.08
			3 hr before irradi.	0.84	1.03
			5 min after irradi.	0.80	1.06
		Sesame oil	24 hr before irradi.	0.99	1.04
			3 hr before irradi.	0.95	1.15
			5 min after irradi.	0.98	1.10
		Cottonseed oil	24 hr before irradi.	1.27	1.14
			3 hr before irradi.	1.71	1.19
			5 min after irradi.	2.10	1.22
		5% Tween 80	24 hr before irradi.	0.93	0.98
			3 hr before irradi.	0.88	1.02
			5 min after irradi.	1.00	1.01
		Sesame oil	24 hr before irradi.	1.57	1.19
			3 hr before irradi.	1.44	1.14
			5 min after irradi.	1.34	1.14
		Cottonseed oil	24 hr before irradi.	1.60	1.08
			3 hr before irradi.	2.04	1.16
			5 min after irradi.	1.60	0.99

a) Intraperitoneal injection

b) The ratio of mean survival time for 30 days after irradiation in a treated group to that of the control of solvent only.

c) The ratio of mean value of body weight change in a treated group to that of the control of solvent only on the second week after irradiation.

(3) **Vitamin E-ferulate** 投与量 1 mmole/kg (606 mg/kg) では、特にエマルジョンと綿実油溶液の場合に強い防護効力が認められたが、いずれの溶液の場合にも生存防護効力は照射前 3 時間投与がもっとも有効であった。体重防護効力も生存防護効力と類似した傾向を示した。なお、ゴマ油溶液の場合に悪化した例が認められた。

(4) **Vitamin E-cafeate** 投与量が 1/2 mmole/kg (296 mg/kg) の場合に、綿実油溶液では生存防護効力と体重防護効力がともに強く認められ、特に照射直後投与がもっとも良い結果を示した。これに対して、エマルジョンおよびゴマ油溶液では体重防護効力のみ示し、生存防護効力はまったく認められなかった。なお、投与量が 1 mmole/kg (592 mg/kg) の場合には防護効果が著しく減退した。

(5) **Vitamin E-succinate** vitamin E-succinate は他の化合物と比較して毒性が強く、エマルジョンおよび綿実油溶液ではいずれも LD₅₀ が 1—1/2 mmole/kg の範囲を示したので、防護効力試験は 1/4 mmole/kg (132 mg/kg) 以下で行なった。生存防護効力と体重防護効力はこの場合にも同様の傾向を示したが、ゴマ油溶液では

照射前 24 hr が、また、綿実油溶液では照射前 3 hr がもっとも有効であった。これに反して、エマルジョンでは効果が認められなかった。

考 察

Vitamin E は生殖に必要な因子として重要であるばかりでなく、酸化されやすい化合物であるために試験管内ではもとより、生体内においても抗酸化剤としての種々の作用が認められている。⁷⁻⁹⁾ また、不飽和脂肪酸の酸化に関係する lipoxidase を抑制し、さらに、種々の呼吸酵素系に対する作用が報告されている。¹⁰⁾ 一方、放射線障害の原因が体成分、とくに水分の分解によって生成する free radical または過酸化物に基因するものと考えられるならば、vitamin E あるいはその関連化合物による放射線障害の予防あるいは治療効果が十分に期待できるものである。

放射線照射による致死作用に対する vitamin E の延命効果に関して、Bacq, Herve^{4,5)} は X 線 400 R あるいは 650 R 照射した C₅₇BL マウスあるいは AK/a マウスに、照射前 24 時間間隔で 2 回、 α -tocopherol 1mg あるいは 10 mg を腹腔内注射すると、生存率が上昇し、脂肪過酸化物の生成を阻止する作用を認めた。さらに、X 線 700 R 照射したマウスに 1 日 10 mg を照射前 5 日間あるいは照射後 5 日間投与して生存期間の延長を認めている。¹¹⁾ これらに対して、Haley¹²⁾ によれば X 線 550 R 照射した CF₁ マウスに対して水溶性の tocopherol を、照射前から照射後マウスの 90—100% が死亡するまで毎日投与したが、1 日の投与量が 0.5—1.0 mg では生存期間に変化なく、2.0—3.18 mg では短縮したと報告している。また、Ershoff, Steers¹³⁾ は X 線 200 R を 8 回照射した Webster マウスに照射前から照射後にかけて、vitamin E-acetate を経口的に投与したが延命効果を認めず、Fritz-Niggli¹⁴⁾ は X 線 800 R 照射マウスに *dl*- α -tocopheryl acetate を経口的に照射前 5 日間毎日 10 mg を投与したが、この場合にも 30 日間の生存率は変化しなかったといっている。以上の結果から、vitamin E の放射線に対する延命効果は、照射線量、投与方法などの実験条件によって結果が著しく左右されることを示している。とくに経口的に投与した場合に効果が認められていないが、Simon 等¹⁵⁾ によると投与方法によって吸収される vitamin E 量が異なり、ウサギに対する α -tocopheryl succinate の実験で、皮下注射と静脈注射は吸収速度は異なるけれども吸収される量はよく似ているのに対して、経口投与では 10% 以下しか吸収されないことを推定しているので、経口投与では防護効果の認められないのはこの点に原因が含まれているとも考えられる。

本報においては、投与はすべて腹腔内注射 1 回のみとし、吸収速度を考慮して投与する時期を照射前 24 時間と同じく 3 時間および照射直後の三種を行ない効力を比較した。また、放射線障害の防護効力の指標として、Kaluszyner¹⁶⁾ 等が対照群と薬剤投与群の 30 日間の平均生存日数の比を求め防護効力 (PCR) を定めているが、著者等も ddY マウスの照射後 30 日間の平均生存日数が防護効力試験の指標として有効であることを認めているので、¹⁷⁾ この PCR に準じて生存防護効力を規定し、また、照射 2 週間後の体重変動率も放射線防護効力試験の指標として適当していることをすでに報告したが、¹⁸⁾ この結果に基づいて体重防護効力を設定した。

Table II に示すように、この実験条件では、遊離の vitamin E には生存防護効力も体重防護効力もほとんど認められないのに対して、エステル誘導体はいずれも明らかな防護効力を示した。これは、Harris, Ludwig¹⁹⁾ により vitamin E の生物学的活性は一般に遊離型よりもエステル型の方が強いと報告されているが、この結果と同

7) H.C. Olcott, H. A. Mattill, *J. Biol. Chem.*, **93**, 59 (1931).

8) P.I. Pavcek, G.M. Schnell, *J. Biol. Chem.*, **146**, 351 (1942).

9) Q.E. Crider, P. Alanpovic, B.C. Johnson, *J. Nutr.*, **63**, 64 (1961).

10) 森下宗司, ビタミン学の進歩, **VI**, 99 (1963).

11) Z.M. Bacq, A. Herve, *Brit. J. Radiol.*, **24**, 617 (1951).

12) T.J. Haley, E.F. McCulloh, W.G. McCormick, *Science*, **119**, 126 (1954).

13) B.H. Ershoff, C.W. Streets Jr., *Proc. Soc. Exptl. Biol. (N.Y.)*, **104**, 274 (1960).

14) H. Fritz-Niggli, *Munch. med. Wschr.*, **103**, 2191 (1961).

15) E.J. Simon, S.C. Gross, A.T. Milhorat, *Fed. Proc.*, **13**, 406(1954); *ibid.*, **14**, 281 (1955); *J. Biol. Chem.*, **221**, 797 (1956).

16) A. Kaluszyner, P. Czerniak, E.D. Bergmann, *Radiation Res.*, **14**, 23 (1961).

17) 篠田雅人, 岡 孝己, 玉置文一, 赤星三弥, 薬誌, **87**, 654 (1967).

18) 篠田雅人, 後藤百子, 岡 孝己, 岩田京子, 玉置文一, 赤星三弥, 薬誌, **87**, 658 (1967).

19) P.L. Harris, M.I. Ludwig, *J. Biol. Chem.*, **180**, 611 (1949).

じ傾向を示している。しかし、化合物により使用した溶媒の種類が異なることによる防護効力の差が著しくまた有効投与時期も異なっていた。これはおそらく吸収速度に差があるためと考えられる。これらの化合物の吸収速度は明らかではないが、いずれの場合にも、照射直後投与群にも防護効力の認められることから、ビタミン E 関連化合物には放射線障害に対して予防効果のみでなく、治療効果もあることが証明された。

総 括

X 線 700 R 照射した雄 ddY マウスの生存期間ならびに体重減少に対する vitamin E およびその acetate, ferulate, caffeate, succinate などを腹腔内投与して、これらの化合物の防護効力を測定した。投与の時期を照射 24 時間前、3 時間前および照射直後の三種について、1 回投与による効力を比較した。その結果、遊離の vitamin E にはほとんど防護効力がみられないのに対して、このエステル誘導体はいずれも強い効力を示し、vitamin E はエステル型にすることにより防護効力の増強することが認められた。しかし、エステル化の際の対応する有機酸の種類、および、投与する場合の溶媒の種類によって、放射線障害防護効力の強弱あるいは有効投与時期が著しく異なることが判明した。