放射線障害防護薬剤に関する研究 (第5報¹⁾) マウスによる
放射線障害防護薬剤の効力試験法の検討

篠田雅人, 清水節子, 玉置文一, 赤星三彌
放射線医学総合研究所薬学研究部²⁾

Pharmacological Studies on Chemical Protectors against Radiation. V.¹⁾
Establishment of Bioassay for Radio-Protector

MASATO SHINODA, SETSUKO SHIMIZU, BUN-ICHI TAMAOKI,
and SANYA AKABOSHI

Department of Pharmaceutical Science, National
Institute of Radiological Sciences²⁾

(Received January 23, 1967)

Examinations were made on the potency test method for chemical radio-protectors using the life-prolongation effect on X-irradiated mice as the indicator. Standards used for this test were AET and MEA. Male ddY mice were irradiated with 600—900 R of X-rays and the animals were observed for the next 90 days to find optimal conditions for the potency tests.

1) When the survival rate of irradiated mice is to be used as the indicator for potency tests of radio-protectors, the mice should be irradiated with a dose of X-rays (700—900 R) by which all the control mice will be dead about 2 weeks after the irradiation and the survival rate of the mice in experimental group should be measured at the time when the survival rate of the control mice becomes 0%.

2) When the survival time of irradiated mice is to be used as the indicator for potency tests of radio-protectors, the mice should be irradiated with a dose of X-rays (700—800 R) by which the mean survival time of the control mice becomes about 10 days, mean survival time of the experimental group is measured 30 days after the irradiation, and protective potency is calculated by comparison of the mean survival time with that of the control group.

3) Comparison of the minimum effective doses of AET and MEA indicated that there is a difference in the molar potency of the two compounds and AET was found to be 2—8 times stronger than MEA.

放射線障害防護薬剤の効力試験に関する研究は、従来から数多く行なわれており、実験動物あるいは実験材料としては、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、サル、ニワトリ、またはその組織、各種の水生動物、微生物、などが用いられている。また、指標とする生物反応として、生存率、体重、臓器重量、赤血球数、白血球数、血液成分、造血機能、内分泌機能、皮膚、などの変化が採用されており、これらの実験動物の種と生物反応の種々の組合せが報告されている。³⁻⁵⁾ そのなかで、防護薬剤のスクリーニング・テストとしては、マウスの延命効果を指標としたものがもっとも広範に使用されている。

効力試験の基礎となるマウスの放射線感受性については、すでに第1報⁶⁾において、マウスの系統、生後週令などが放射線感受性を左右する重要な因子であることを認め、さらに雄 ddY マウスが防護薬剤の効力試験に適

1) 第4報：篠田雅人, 高木良成, 玉置文一, 赤星三彌, 薬誌, 88, 278 (1968).

2) Location: No. 4-9-1, Anagawa, Chiba-shi.

3) R. Huber, E. Spode, "Biologisch-Chemischer Strahlenschutz," Eine Übersicht in Tabellen I, II, III, IV, Akademie-Verlag, Berlin, (1961, 1963).

4) C. Sablayrolles, Y. Robbe, "Effects Radioprotecteurs de Substances Minérales et Organiques", I, II, (1965); Y. Robbe, M. Randon, "ibid", III, 1966, IV, (1967).

5) Z. M. Bacq, "Chemical Protection against Ionizing Radiation," Charles C Thomas Pub., (1965).

6) 篠田雅人, 岡孝己, 玉置文一, 赤星三彌, 薬誌, 87, 654 (1967).

していることを報告した。また、第3報⁷⁾において、現在のところ代表的な放射線防護薬剤と考えられる AET (S,2-aminoethyl isothiuronium bromide hydrobromide) および MEA (2-mercaptoethylamine hydrochloride) の ddY マウスに対する放射線防護効果を観察し、防護薬剤の効力試験の標準物質として AET と MEA がともに適当であることを認めた。そこで、これらの結果に基づいて、雄 ddY マウスを用い、放射線照射に対する AET と MEA の防護効果を照射後 90 日間観察し、照射線量と防護効果の関係を比較し、防護薬剤の効力試験に適する測定条件を検討した。

実 験 方 法

実験動物 船橋農場より購入した生後 4 週令の雄 ddY マウスを 10 日間予備飼育し、体重が 20 ± 2 g の範囲のものを選んで実験に使用した。マウスは空気調整装置のある飼育室で、5 匹を 1 ケージに入れ、繁殖用の固型飼料(船橋農場)を与え、飲料水は給水ビンから自由に与えて飼育観察した。

X 線照射条件 マウスを 12 匹用のルサイト製照射用固定器に入れ、X 線 200kVp, 20 mA, フィルター 0.5 mmCu+0.5 mmAl, 距離 50 cm, 線量率 96 R/min などの条件で、背部から全身照射した。線量測定にはラドコン線量計を使用した。

試料の調製 AET は日野等⁸⁾により合成された 2HBr 塩の結晶を用い、MEA は NBC 社の HCl 塩の結晶を用いた。試料の濃度は投与液量がマウス体重 20 g 当たり 0.1—0.4 ml になるように蒸留水に溶解した。これらの試料は投与前 15 min 以内に調製し、使用した。

防護効力試験 マウスを 1 群 10 匹とし、試料は照射前 5 min に腹腔内に注射した。また、対照群には生理食塩水を同様に注射した。X 線照射後 90 日間観察して、種々の時期における生存率と平均生存日数を測定した。

TABLE I. Relation between Survival Rates of X-Irradiated Mice and Administered Dosage of AET or MEA

X ray (R)	Time after irrad. (day)	Survival rate (%)											
		Without AET or MEA	AET (mmole/kg)					MEA (mmole/kg)					
			0.12	0.25	0.5	1.0	Linearity ^{c)}	0.12	0.25	0.5	1.0	2.0	Linearity ^{c)}
600	21 ^{a)}	50	30	80	90	90	—	50	80	100	90	90	—
	22 ^{b)}	40	30	80	90	90	—	50	80	100	90	90	—
	30	40	30	80	90	90	—	50	70	90	90	90	+
	60	40	30	70	70	80	+	40	60	90	90	90	+
	90	40	30	70	70	80	+	40	60	80	80	90	+
700	11 ^{a)}	50	70	80	70	90	+	40	50	90	90	100	+
	19 ^{b)}	0	20	40	50	60	+	10	0	50	70	90	+
	30	0	10	10	30	40	+	10	0	10	50	80	+
	60	0	0	10	30	30	+	0	0	10	30	60	+
	90	0	0	10	30	30	+	0	0	10	30	60	+
800	9 ^{a)}	40	80	90	100	90	—	40	50	60	70	100	+
	11 ^{b)}	0	50	70	90	90	+	20	30	40	70	100	+
	30	0	0	20	50	60	—	0	0	10	20	70	—
	60	0	0	20	30	30	+	0	0	0	10	70	—
	90	0	0	20	20	30	+	0	0	0	10	70	—
900	8 ^{a)}	30	80	80	100	100	—	40	50	60	90	90	+
	11 ^{b)}	0	40	30	80	90	+	10	10	10	90	90	+
	30	0	0	0	0	20	—	0	0	0	0	20	—
	60	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	10	—
	90	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	10	—

a) at time of median survival of control group

b) at time of minimum survival of control group

c) linearity test of regression line, +: $P > 0.01$, —: $P > 0.05$

7) 篠田雅人, 岡孝己, 後藤百子, 篠原直美, 玉置文一, 赤星三弥, 薬誌, **88**, 271 (1968).

8) T. Hino, K. Tanaami, K. Yamada, S. Akaboshi, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **14**, 1193 (1966).

結 果

X 線 600, 700, 800 および 900R の全身照射を行なったマウスに対して, 照射前 5 分に, AET は 0.12—1 mmole/kg (35—280 mg/kg) の範囲で, また, MEA は 0.12—2 mmole/kg (14—228 mg/kg) の範囲について 4 または 5 用量の腹腔内投与を行ない, 各照射線量における AET と MEA の防護効果を照射後 90 日間観察した. 600R 照射では, 生理食塩水を投与した対照群は照射後 7—22 日に死亡が起り, 以後は 90 日後まで死亡が見られず, 40% の生存率を示した. また, 700R 照射では照射後 9—19 日で, 800R 照射では照射後 5—11 日で, 900R 照射では照射後 4—11 日で, いずれの場合も対照群は全動物が死亡した. したがって, この実験条件では照射による死亡は照射後 30 日以内に起ることを認めた. これに対して, 薬剤投与群では生存率が上昇し, 生存期間の延長が認められた. 換言すれば, 死亡する時期が遅延し, 照射後 30—60 日でもなお相当数の死亡例が認められるようになる. そこで, 種々の観察期間における薬剤の効果を検討した.

TABLE II. Statistical Significance Tests of Protective Activities of AET and MEA against X-Irradiated Mice

X-Ray (R)	Time after irrad. (day)	AET (mmole/kg)				MEA (mmole/kg)				
		0.12	0.25	0.5	1.0	0.12	0.25	0.5	1.0	2.0
600	21 ^{a)}	—	—	—	—	—	—	+	—	—
	22 ^{b)}	—	—	+	+	—	—	++	+	+
	30	—	—	+	+	—	—	+	+	+
	60	—	—	—	—	—	—	+	+	+
	90	—	—	—	—	—	—	—	—	+
700	11 ^{a)}	—	—	—	—	—	—	—	—	+
	19 ^{b)}	—	+	+	++	—	—	+	++	++
	30	—	—	—	+	—	—	—	+	++
	60	—	—	—	—	—	—	—	—	++
	90	—	—	—	—	—	—	—	—	++
800	9 ^{a)}	—	+	++	+	—	—	—	—	++
	11 ^{b)}	+	++	++	++	—	—	+	++	++
	30	—	—	+	++	—	—	—	—	++
	60	—	—	—	—	—	—	—	—	++
	90	—	—	—	—	—	—	—	—	++
900	8 ^{a)}	+	+	++	++	—	—	—	++	++
	11 ^{b)}	+	—	++	++	—	—	—	++	++
	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	60	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	90	—	—	—	—	—	—	—	—	—

++: $P < 0.01$, +: $P < 0.05$, -: $P > 0.05$

a) at time of median survival of control group

b) at time of minimum survival of control group

TABLE III. ED_{50} of AET and MEA at Time of Minimum Survival of Control Group

X-Ray (R)	Time after irrad. (day)	ED_{50} : mmole/kg	
		AET	MEA
600	22	—	—
700	19	0.72 (0.35—1.51) ^{a)}	0.65 (0.38—1.11) ^{a)}
800	11	0.10 (0.05—0.21)	0.57 (0.45—0.71)
900	11	0.47 (0.34—0.66)	1.02 (0.56—1.86)

a) fiducial limits ($P=0.05$)

TABLE IV. Relation between Survival Times of X-Irradiated Mice and Administered Dosage of AET or MEA

X-Ray (R)	Observation period after irrad. (day)	Survival times; mean $\pm$ S.E. (day)						Significance ^{c)}
		Without AET or MEA	AET (mmole/kg)					
			0.12	0.25	0.5	1.0		
600	21 ^{a)}	18.5 $\pm$ 1.4	15.5 $\pm$ 1.3	19.7 $\pm$ 1.0	20.0 $\pm$ 1.0	19.4 $\pm$ 1.6	+	
	22 ^{b)}	19.0 $\pm$ 1.5	15.8 $\pm$ 1.5	20.5 $\pm$ 1.1	20.9 $\pm$ 1.0	20.3 $\pm$ 1.7	+	
	30	22.2 $\pm$ 2.4	18.2 $\pm$ 2.6	26.5 $\pm$ 2.1	27.7 $\pm$ 1.9	27.7 $\pm$ 2.5	+	
	60	34.2 $\pm$ 7.1	27.2 $\pm$ 7.1	50.1 $\pm$ 6.0	49.8 $\pm$ 5.3	52.1 $\pm$ 5.5	+	
	90	46.2 $\pm$ 11.7	36.2 $\pm$ 11.7	70.3 $\pm$ 10.1	71.1 $\pm$ 9.7	75.4 $\pm$ 9.2	+	
700	11 ^{a)}	10.6 $\pm$ 0.2	10.8 $\pm$ 0.2	11.0 $\pm$ 0.0	10.8 $\pm$ 0.2	10.7 $\pm$ 0.2	—	
	19 ^{b)}	12.5 $\pm$ 0.9	15.6 $\pm$ 1.2	15.1 $\pm$ 1.0	16.9 $\pm$ 1.3	16.6 $\pm$ 1.2	—	
	30	12.5 $\pm$ 0.9	17.3 $\pm$ 2.0	19.0 $\pm$ 2.3	20.6 $\pm$ 2.7	21.2 $\pm$ 2.6	+	
	60	12.5 $\pm$ 0.9	19.4 $\pm$ 3.8	23.6 $\pm$ 4.5	28.0 $\pm$ 7.0	31.1 $\pm$ 6.8	+	
	90	12.5 $\pm$ 0.9	19.4 $\pm$ 3.8	26.6 $\pm$ 7.3	37.0 $\pm$ 11.6	40.0 $\pm$ 11.1	+	
800	9 ^{a)}	8.4 $\pm$ 0.4	9.0 $\pm$ 0.0	9.0 $\pm$ 0.0	9.0 $\pm$ 0.0	8.8 $\pm$ 0.2	—	
	11 ^{b)}	9.2 $\pm$ 0.6	10.6 $\pm$ 0.2	10.8 $\pm$ 0.2	11.0 $\pm$ 0.0	10.6 $\pm$ 0.2	—	
	30	9.2 $\pm$ 0.6	12.9 $\pm$ 1.0	15.8 $\pm$ 2.4	23.0 $\pm$ 2.5	24.0 $\pm$ 2.7	+	
	60	9.2 $\pm$ 0.6	12.9 $\pm$ 1.0	21.8 $\pm$ 4.3	35.8 $\pm$ 6.5	36.2 $\pm$ 6.7	+	
	90	9.2 $\pm$ 0.6	12.9 $\pm$ 1.0	27.8 $\pm$ 10.3	42.5 $\pm$ 9.8	45.2 $\pm$ 10.5	+	
900	8 ^{a)}	7.0 $\pm$ 0.4	7.7 $\pm$ 0.3	7.7 $\pm$ 0.3	8.0 $\pm$ 0.0	8.0 $\pm$ 0.0	—	
	11 ^{b)}	7.7 $\pm$ 0.7	10.1 $\pm$ 0.6	10.1 $\pm$ 0.6	11.0 $\pm$ 0.0	11.0 $\pm$ 0.0	—	
	30	7.7 $\pm$ 0.7	10.7 $\pm$ 0.7	12.0 $\pm$ 1.3	16.5 $\pm$ 1.6	18.3 $\pm$ 2.0	+	
	60	7.7 $\pm$ 0.7	10.7 $\pm$ 0.7	12.0 $\pm$ 1.3	16.5 $\pm$ 1.6	21.6 $\pm$ 4.6	+	
	90	7.7 $\pm$ 0.7	10.7 $\pm$ 0.7	12.0 $\pm$ 1.3	16.5 $\pm$ 1.3	23.2 $\pm$ 6.1	+	

X-Ray (R)	Observation period after irrad. (day)	Survival times; mean $\pm$ S.E. (day)					Significance ^{c)}
		MEA (mmole/kg)					
		0.12	0.25	0.5	1.0	2.0	
600	21 ^{a)}	15.9 $\pm$ 1.8	19.5 $\pm$ 1.0	21.0 $\pm$ 0.0	19.9 $\pm$ 1.1	19.4 $\pm$ 1.6	—
	22 ^{b)}	16.4 $\pm$ 1.9	20.3 $\pm$ 1.1	22.0 $\pm$ 0.0	20.8 $\pm$ 1.2	20.3 $\pm$ 1.7	+
	30	20.4 $\pm$ 3.2	26.4 $\pm$ 2.2	29.9 $\pm$ 0.3	28.0 $\pm$ 1.0	27.5 $\pm$ 2.5	+
	60	34.0 $\pm$ 7.8	44.6 $\pm$ 6.5	56.9 $\pm$ 3.1	55.0 $\pm$ 5.0	54.5 $\pm$ 5.5	+
	90	46.0 $\pm$ 12.4	62.6 $\pm$ 11.3	81.3 $\pm$ 6.3	80.3 $\pm$ 7.9	82.2 $\pm$ 12.7	+
700	11 ^{a)}	9.8 $\pm$ 0.4	10.8 $\pm$ 0.2	11.0 $\pm$ 0.0	11.0 $\pm$ 0.0	11.0 $\pm$ 0.0	—
	19 ^{b)}	11.2 $\pm$ 1.1	12.0 $\pm$ 0.5	17.2 $\pm$ 0.9	18.1 $\pm$ 0.7	18.5 $\pm$ 0.5	—
	30	12.3 $\pm$ 2.0	12.0 $\pm$ 0.5	19.5 $\pm$ 1.7	24.9 $\pm$ 2.2	27.5 $\pm$ 1.7	+
	60	13.9 $\pm$ 3.6	12.0 $\pm$ 0.5	22.5 $\pm$ 4.3	35.0 $\pm$ 6.0	48.5 $\pm$ 5.5	+
	90	13.9 $\pm$ 3.6	12.0 $\pm$ 0.5	25.5 $\pm$ 7.2	44.0 $\pm$ 10.3	66.5 $\pm$ 10.0	+
800	9 ^{a)}	8.6 $\pm$ 0.4	8.6 $\pm$ 0.4	8.4 $\pm$ 0.3	8.8 $\pm$ 0.2	9.0 $\pm$ 0.0	—
	11 ^{b)}	9.4 $\pm$ 0.5	9.6 $\pm$ 0.6	9.6 $\pm$ 0.6	10.2 $\pm$ 0.4	11.0 $\pm$ 0.0	+
	30	10.0 $\pm$ 0.8	10.9 $\pm$ 1.1	14.8 $\pm$ 2.8	15.3 $\pm$ 2.5	26.4 $\pm$ 1.9	+
	60	10.0 $\pm$ 0.8	10.9 $\pm$ 1.1	17.0 $\pm$ 3.7	18.3 $\pm$ 5.0	47.4 $\pm$ 6.4	+
	90	10.0 $\pm$ 0.8	10.9 $\pm$ 1.1	17.0 $\pm$ 3.7	21.3 $\pm$ 7.8	68.4 $\pm$ 11.0	+
900	8 ^{a)}	7.3 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 0.3	7.3 $\pm$ 0.2	7.8 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 0.0	+
	11 ^{b)}	8.5 $\pm$ 0.6	8.5 $\pm$ 0.7	8.4 $\pm$ 0.6	10.5 $\pm$ 0.1	10.5 $\pm$ 0.3	+
	30	8.5 $\pm$ 0.6	8.5 $\pm$ 0.7	8.4 $\pm$ 0.6	13.3 $\pm$ 1.0	17.5 $\pm$ 2.6	+
	60	8.5 $\pm$ 0.6	8.5 $\pm$ 0.7	8.4 $\pm$ 0.6	13.3 $\pm$ 1.0	20.9 $\pm$ 4.9	+
	90	8.5 $\pm$ 0.6	8.5 $\pm$ 0.7	8.4 $\pm$ 0.6	13.3 $\pm$ 1.0	23.9 $\pm$ 7.7	+

a) at time of median survival of control group b) at time of minimum survival of control group

c) significance test of regression coefficients, +: $P < 0.05$, -: $P > 0.05$

I. 生存率を指標とする効力試験 生理食塩水を投与した対照群の生存率が、50% 以下になった時期と、最低値を示した時期、および、照射後 30, 60, 90 日における各群の生存率を測定すると Table I のようになる。

いずれの照射線量においても、薬剤の投与量の増加に伴って生存率が増加しているが、各観察時期における用量と生存率の直線性を検定すると、700R 以上の各群において対照群の生存率が最低値 (0%) を示す時期の反応がいずれも直線関係にあることを認めた。また、600R では照射後 30 または 60 日以降にならないと反応の直線性が認められず、900R では逆に照射後 30 日以降では直線関係を示さないようになる。これらの結果について無相関検定法^{9,10)}により薬剤投与と効果の相関を検定すると、Table II に示すように、照射線量を比較するならば AET は 800 および 900R が、MEA は 600—800R が鋭敏な防護効果を示しており、また、観察期間を比較するならば、いずれの照射線量の場合にも対照群の生存率が最低値を示す時期に効果がもっとも鋭敏となり、それ以後は観察期間の延長に伴って効果が減退することを認めた。

防護効果のもっとも鋭敏に認められる対照群の生存率が最低値 (0%) となる時期における AET および MEA の ED_{50} をプロビット法^{11,12)}により求めると Table III に示すようになり、800 R 照射の場合がもっとも鋭敏であることを示している。なお、600R 照射では対照群の生存率が 0% に至らず、用量プロビットの関係に直線性が認められなかったので ED_{50} の算出は省略した。

II. 生存日数を指標とする効力試験 対照群の生存率が 50% 以下になるまでの期間と、最低値を示すまでの期間、および、照射後 30, 60, 90 日間の各観察期間における各群の生存日数を測定し、600—900 R 照射における AET ならびに MEA の防護効力をこれらの投与量と生存期間との関係から検討した。

TABLE V. Statistical Significance Tests of Protective Activities of AET and MEA against Survival Time of X-Irradiated Mice

X-Ray (R)	Observation period after irrad. (day)	AET (mmole/kg)				MEA (mmole/kg)				
		0.12	0.25	0.5	1.0	0.12	0.25	0.5	1.0	2.0
600	21 ^{a)}	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	22 ^{b)}	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	30	—	—	—	—	—	—	+	—	—
	60	—	—	—	—	—	—	+	+	+
	90	—	—	—	—	—	—	+	+	+
700	11 ^{a)}	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	19 ^{b)}	—	—	++	+	—	—	++	++	++
	30	—	++	++	++	—	—	++	++	++
	60	++	++	++	++	—	—	++	++	++
	90	++	++	++	++	—	—	++	++	++
800	9 ^{a)}	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	11 ^{b)}	—	+	+	+	—	—	—	—	+
	30	++	++	++	++	—	+	++	++	++
	60	++	++	++	++	—	+	++	++	++
	90	++	++	++	++	—	+	++	++	++
900	8 ^{a)}	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	11 ^{b)}	+	+	++	++	—	—	—	++	++
	30	++	++	++	++	—	—	—	++	++
	60	++	++	++	++	—	—	—	++	++
	90	++	++	++	++	—	—	—	++	++

++: $P < 0.01$, +: $P < 0.05$, —: $P > 0.05$

a) at time of median survival of control group

b) at time of minimum survival of control group

9) R. A. Fisher, "Statistical Methods for Research Workers," Oliver and Boyd, 1950 [遠藤, 鍋谷訳, "研究者のための統計的方法," 荘文社, 1952].

10) 佐藤良一郎, "無相関検定法," 改訂増補版, 中文館, 1949.

11) D. J. Finney, "Probit Analysis," Cambridge University Press., London, 1952.

12) 玉置文一, "Bioassay と推計学," 化学の領域, 増刊, 11, 南江堂 1953, P. 9.

それぞれの観察期間における各群の平均生存日数を測定し、Table IV に示すような結果を得た。一般に、薬剤投与量の増加に伴って生存日数が増加し、一方では、照射線量の増加に伴って生存日数は短縮することを示している。ここに得られた結果について、薬剤の投与量に対する平均生存日数の直線性および回帰係数の有意性の検定¹³⁾を行なったところ、照射後 30 日間の測定で、いずれの照射線量の場合にも有意性が認められたが、観察期間が 30 日より少ない場合には反応の直線性あるいは回帰係数の有意性が認められない場合が多い、ただし、900R 照射 MEA 投与例において薬剤投与量の少ない 2 群 (0.12 および 0.25 mmole/kg) の結果は計算から除外した。

Table IV の結果から、多くの実験条件において生存日数を指標とする反応と用量との直線性が認められたので、さらに、各測定値をそれぞれの対照群と比較して、反応の有意性を平均値の差の検定により検討すると、Table V に示すようになった。AET 投与例では 800 および 900R 照射の反応が鋭敏であり、MEA 投与例では 800R 照射がもっとも鋭敏であることを示している。600R 照射では MEA 投与例の一部が照射後 60 日以降になって有意性を示すのみであり、AET 投与例はすべて無効であった。また、観察期間は 700R 以上の照射において 30 日以上が有効であることを認めた。

考 察

生物が大量の放射線を浴びると種々の放射線障害が起こり、遂には死に至る。一般の哺乳動物において、致死量の放射線を被曝した場合に死因となる障害の種類はその被曝線量の程度によってつぎの 4 種に分類されている。¹³⁾ すなわち、(1) 30,000R 以上の被曝により中枢神経が破壊され数時間で死亡する中枢神経障害死。(2) 30000—10000R の被曝で消化管に著しい出血が起こり、3—5 日で死亡する消化管死。(3) 1000—200R の被曝では骨髓その他の造血組織が機能を失ない、10—20 日で死亡する骨髓死。(4) 200R 以下の被曝でも、悪性腫瘍や白血病の発生、寿命の短縮などの二次的疾患により 20—160 週後に死亡する遅発性障害などである。一方、放射線防護薬剤の開発を目的とする効力試験には、マウスに対する延命効果を指標としたものが多い。照射線量は 400—1000R の範囲であり、また、その観察期間は主として 30 日であるが、これは習慣的に踏襲されており、実験条件としての妥当性が証明されていない。この他に、14, 28, 60, 90 日などもあり一定していない。³⁾ しかしこれらの測定条件はいずれも骨髓死を目標としてその防護効力を測定していることになる。この骨髓死を起こすような実験条件の範囲内においても、防護薬剤を投与するとその延命効果により死亡時期の遅延が起こる。Table I の結果も照射後 30 日以後において相当数の死亡を示しており、したがって、観察期間の長短は防護効果の判定に重大な影響を与えることもあり得る。このように、防護薬剤の効力試験法の基本的条件を確立するために、効力試験に適した照射線量と観察期間との関係を検討しておくことが必要である。そこで、本報においては、防護効力試験の標準品としてその有効性の確認されている AET および MEA を用いマウスに対する延命効果を指標とした場合の各種照射線量と薬剤の効果判定に適する観察期間との関係、および、薬剤の投与量と効果の直線性あるいは有意性などを検討した。マウスによる防護効果を、計数的な反応として生存率から、また、計量的な反応として生存日数から測定した。

生存率を指標とする効力試験法として、Doherty¹⁴⁾ は照射後 30 日に 50% の生存率を示す照射線量で効力を比較し、また、Bacq, *et al.*¹⁵⁾ は薬剤投与群と、これと同一の生存曲線あるいは生存率を示す対照群との線量の比を示す dose reduction factor (DRF) を用いた。しかし、これらの方法は照射条件により依存性があるといわれ、⁵⁾ また、動物数を多く必要とするために薬剤のスクリーニングを目的とする方法には不適當である。Kimball, *et al.*¹⁶⁾ は一群 5 匹または 6 匹のマウスを用い、対照群の半数 (3 匹) が死亡する時期における投与群の生存数を測定し、統計的に有効か無効かの判定がつくまで実験を繰返す方法を報告している。この方法により観察期間が著しく短縮され、多数の検体をあつかうスクリーニング・テストとしては有利な方法であるが、計算上、薬剤投与群が全例生存するほど有効であっても測定を 2 回以上繰返さなければならない欠点がある。本報においては、

13) E.P. Cronkite, G.Brecher, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **59**, 815 (1955).

14) D.G. Doherty, "Radiation Protection and Recovery," ed. A. Hollaender, Pergamon Press, 1960, p.45.

15) Z.M. Bacq, G. Dechamps, P. Fischer, A. Herve, H. Le Bihan, J. Lecomte M. Pirotte, P. Rayet, *Science*, **117**, 633 (1953).

16) A.W. Kimball, W.T. Burnett, Jr., D.G. Doherty, *Radiation Res.*, **7**, 1 (1957).

照射後 30, 60, 90 日および、前述の Kimball, *et al.* の方法に準じて、対照群の生存率が 50% 以下になった時期と、最低値を示した時期、などにおける生存率を指標として効果を比較したが Table I に示すように、測定は 700R 以上のいずれの線量の照射においても対照群の生存率が最低値 (0%) を示す時期が薬剤の投与量と反応が直線性を示し、有効であることを認めた。照射線量は Table II および Table III の結果から 800R の場合に薬剤の効果がもっとも鋭敏に示されることが明らかとなった。したがって、マウスの生存率を指標として防護薬剤の効力試験を行なうには、照射後 2 週間付近でマウスの全部が死亡する線量 (700—900R) を照射し、対照群の生存率が 0% になった時期における薬剤投与群の生存率を測定することが望ましいと考える。

一方、生存期間を指標とする効力試験法としては、Doull, *et al.*¹⁷⁾ は照射後 30 日間の平均生存日数を測定し、これを ST_{50} (median survival time) で表わし、薬剤投与群と対照群の差を示している。また、Kaluszyner, *et al.*¹⁸⁾ は照射後 30 日間の生存日数を測定し、対照群との比を PCR (protective coefficients against radiation injury) で示している。生存期間を指標とする場合には、本来ならば全動物が死亡するまで観察することが望ましいが、スクリーニング・テストの目的からは観察期間を限定する必要がある。本報においては、AET と MEA の投与量と生存日数が直線性を示し、かつ、その反応の回帰係数が有意となる条件を検討したが、Table IV に示すように、いずれの照射線量においても照射後 30 日間で有効であることが証明できた。したがって、一般に広く適用されている照射後 30 日間の観察は妥当であるといえる。このように、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が認められたので、この 30 日間の測定結果について、Kaluszyner, *et al.* の PCR に準じて、

$$\text{防護効力 (protective potency)} = \frac{(\text{X線照射+薬剤投与群 30日間平均生存日数})}{\text{X線照射対照群 30日間平均生存日数}}$$

と定義し、600—900R 照射の場合の効力を Table IV の結果から回帰直線として求め、比較すると Fig. 1 に示すようになり、AET は 800 および 900R 照射が、また、MEA は 700—900R 照射が類似した効果を示した。

Fig. 2. Correlation between Survival Rate at Time of Minimum Survival of Control Group and Protective Potency for 30 days of Protectors

○ AET △ MEA

さらに、この防護効力と、Table I の結果から直線性の認められた対照群が最低値を示す時期における生存率との相関関係をみると、Fig. 2 に示すように、AET と MEA はよく一致した傾向を示しており、各照射群とも危険率 1% 以下で有意な相関関係を示した。したがって、この防護効力は防護薬剤の延命効果を示す factor として有効であると考えられる。

また、薬剤投与群の生存日数を対照群と比較して効果の有意性を検定すると、Table V に示すように、700R 以上の照射群において有効性が認められ、MEA の結果から 800R 照射がもっとも鋭敏であることを認めた。こ

17) J. Doull, V. Plzak, S. J. Brois, "A Survey of Compounds for Radiation Protection," Univ. Chicago, USAF Radiation Laboratory, 1962.

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

Fig. 1. Protective Potencies of various Doses X-Irradiated Mice with AET or MEA

$$\text{protective potency} = \frac{\text{mean survival time of treated group for 30 days}}{\text{mean survival time of control group for 30 days}}$$

----- 600R ———— 800R
 700R - · - · - 900R

よりも強力であることを示している。第3報⁷⁾においても同様の傾向のある結果を報告したが、これは AET と MEA の薬理作用に幾分差のあることを示すものと考えられる。

総 括

X 線照射マウスに対する延命効果による放射線障害防護薬剤の効力試験法を検討した。効力試験の標準品として AET および MEA を用い、ddY 雄マウスに対して X 線 600—900R 照射して、照射後 90 日間観察し、効力試験に適する測定条件を検索し、つぎの結果を得た。

(1) マウスの生存率を指標として防護薬剤の効力試験を行なうには、照射後約 2 週間で対照群のマウスの全部が死亡する線量 (700—900R) を照射し、対照群の生存率が 0% になった時期における薬剤投与群の生存率を測定することが適している。

(2) マウスの生存期間を指標として防護薬剤の効力試験を行なうには、対照群の平均生存日数が約 10 日を示す線量 (700—800R) を照射し、照射後 30 日間の平均生存日数を測定し、対照群と比較して防護効力を算出することが適当である。

(3) AET と MEA の最少有効量を比較することにより、両薬剤の分子量当りの効力に差が認められ、AET の方が MEA よりも 2—8 倍強力であることを認めた。

謝辞 この研究に使用した AET を提供された放医研・薬学研究部 (現在 千葉大薬学部) の日野亨博士、および、実験に協力した篠崎良枝氏に感謝する。

これらの結果から、マウスの生存期間を指標として防護薬剤の効力試験を行なうには、照射後の平均生存日数が約 10 日を示す線量 (700—800R) を照射し、照射後 30 日間の平均生存日数を測定することが適している。また、この結果から、ddY マウスを用いて防護薬剤の効力試験を行なう場合に、700—800R 照射すれば、生存率に対する効果と生存期間に対する効果とを同時に測定することが可能である。

AET と MEA の効力を比較すると、Table II と Table V の結果から対応する AET と MEA の最少有効量を比較することにより、両薬剤の分子量当りの効力に差があることが認められる。さらに、この効力の差は照射線量の増加に伴って拡大している傾向にあり、600R ではほとんど差がないが、700R では約 2 倍、800R では約 4 倍、900R では約 8 倍、いずれも AET の方が MEA