細胞の *in Vitro* における放射線感受性におよぼす 5-Hydroxytryptophan の影響¹⁾

豊吉一美,^{2a)} 中村 弥, 江藤秀雄^{2b)}
岐阜薬科大学,^{2a)} 放射線医学総合研究所^{2b)}

Effect of 5-Hydroxytryptophan on Radiosensitivity of Cells *in Vitro*¹⁾

KAZUMI TOYOSHI,^{2a)} WATARU NAKAMURA, and HIDEO ETO^{2b)}
Gifu College of Pharmacy^{2a)} and National Institute of Radiological Sciences^{2b)}

(Received June 5, 1969)

Possible protective effect of 5-hydroxytryptophan against radiation damage was examined *in vitro*, using the ascites tumor type Furth's mastcytoma cells which have the ability to synthesize 5-hydroxytryptamine and Ehrlich ascites tumor cells not having such ability. Protective effect was judged by the amount of 5-hydroxyindole excreted in 24-hour urine of the host mice, (C57L×A)_F₁ female, in the case of Furth mastcytoma cells, and the body weight increase rate in ddN male mice in the case of Ehrlich ascites cells after transplantation of the cultured cells. Observations were made 8—10 days after transplantation of the cells. X-Ray irradiation of the cells was made in a dose of 1000 R, and the number of cells transplanted was 4×10^6 cells/0.5 ml in the case of Furth cells and 20×10^6 cells/0.5 ml in the case of Ehrlich cells. Protective effect of 5-hydroxytryptophan was seen in the case of Furth cells in a dose of 1 mole/25000 cells but not in the case of Ehrlich ascites tumor cells.

5-Hydroxytryptamine(5-HT) は有効な放射線防護薬剤の 1 つであるとされているが,³⁾ その 5-HT の代謝前駆物質である 5-hydroxytryptophan (5-HTP) については Thomson⁴⁾ によると特に注目すべき効果はないとされている。しかし小林, 中村, 江藤⁵⁾ はハツカネズミを用い 5-HTP の照射前投与により, 5-HT と同程度に有効であることを確かめたが, *in vivo* 系実験での血管の影響などを除外できるような *in vitro* 系での実験においても同様の効果があるかどうかに関してはまだ明らかにされていない。そこでわれわれは, 5-HT 合成能を有する腹水癌型肥胖細胞 (FM 細胞) と 5-HT 合成能を有しない Ehrlich 氏腹水癌細胞 (EAT 細胞) とについて検討し若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

実験方法 仔牛血清添加 TC 用 199 培地 (TC 用仔牛血清 10 ml+滅菌蒸留水 100 ml: TC 用 199 培地 10 倍濃縮液 10 ml: 20 万単位結晶ペニシリン G ナトリウム+滅菌蒸留水 5 ml の 0.25 ml: 硫酸ジヒドロストربتマイシン 1 g 力価+滅菌蒸留水 5 ml の 0.05 ml: 7.5% NaHCO₃ ザイツ加圧濾過器により濾過した 1 ml) pH 7.4 に浮遊したこれらの細胞を X 線照射するにさきだって 5-HTP を培地に加えておき, 放射線感受性にいかなる修飾をきたすかをしらべた。細胞の放射線感受性をみるための指標としては, 培養細胞移植後の宿主ハツカネズミの尿中排泄 5-hydroxyindole compounds (5-HIC) 量 (FM 細胞の場合) または体重変化 (EAT 細胞の場合) を用いた。

実験動物 FM 細胞使用ハツカネズミは F₁ (C-57L×A) ♀ の 10 週令, 体重 22 ± 4 g のものを, また EAT 細胞使用ハツカネズミは小糸農場より購入 14 週令の ddN ♂, 体重 28.5 ± 4.5 g のものを 1 群 3—10 匹とし, 空気調整装置のある飼育室で個別ゲージに入れ, 固形飼料を与え飲料水は給水管から自由に与え飼育した。

X 線照射条件 培養細胞の仔牛血清添加 TC 用 199 培地浮遊液は径 6 cm シャーレに入れ, 200 kvp, 20 mA, フィルター 0.3 mmCu+1.0 mmAl, 距離 50 cm, シールド型信愛-250 X 線照射機を使用し, Victoreen 線量計を用いた。

1) 第 11 回日本放射線影響学会で発表, 福岡, 1968 年 10 月。

2) Location: a) 492-36, Mitahora, Gifu; b) 4-9-1, Anagawa, Chiba.

3) H.J. Melching, *Current Topics in Radiation Research*, **1**, 93 (1965).

4) J.F. Thomson, "Radiation Protection in Mammals," (New York: Reinhold Publishing Co.) 1962, p. 124.

5) S. Kobayashi, W. Nakamura, H. Etô, *International Journal of Radiation Biology*, **11**, 505 (1966).

Fig. 3. Protective Effect of 5-HTP against 1000R X-Irradiation in Furth's Mastcytoma Cells *in Vitro*

cells $4 \times 10^6/0.5$ ml
 5-HTP none : x-----x
 mole/1000 : O
 mole/5000 : Δ
 mole/25000 : ●

Fig. 4. Protective Effect of 5-HTP against 1000R X-Irradiation in Furth's Mastcytoma Cells *in Vitro*

cells $4 \times 10^6/0.5$ ml 30 min incub.
 5-HTP none : x-----x
 mole/25000 : ●

III FM 細胞の *in Vitro* における放射線感受性におよぼす 5-HTP の影響

I, II 実験から設定した培養条件 37° , 5% CO_2 を含む空気気流下, 5 min または 30 min 孵置後 X 線照射し, 5-HTP 無添加と添加したものについて, 宿主ハツカネズミの 24 hr 尿中 5-HIC 量を Fig. 3, Fig. 4 に示す.

培養時間 30 min の場合 5-HTP mole/25000 添加処理群と対照群との間において, 腹腔内移植後 8 日目の宿主尿中 5-HTP 量についての平均値の差の t 検定においては Table I から $t=2.31$ となり, 危険率 5% で有意差を認めた.

TABLE I. Protective Effect of 5-HTP (mole/25000) at 8th day after 1000R X-irradiation in Furth's Mastcytoma Cells (4×10^6 cells/0.5 ml) *in Vitro* (Mouse=10)

		5-HIC in urine of mice for one day (μg)		t
		$\bar{x}$	s_e	
Addition of 5-HTP to cell suspension	—	48.0	16.7	2.31 ^{a)}
	+	65.2		

a) indicates significance at 5% level

TABLE II. Protective Effect of 5-HTP (mole/25000) against 1000R X-irradiation in Furth's Mastcytoma Cells (4×10^6 cells/0.5 ml) *in Vitro* (Mouse=10)

		5-HIC in urine of mice for one day (μg)					
		B ^{b)} : Time after X-irradiation (day)					
		B ₁ (8)		B ₂ (10)		B ₃ (12)	
		$\bar{x}$	s_1	$\bar{x}$	s_1	$\bar{x}$	s_1
A ^{a)} : Addition of 5-HTP to cell suspension	A ₁ —	48.0	13.3	89.7	35.1	181.2	67.2
	A ₂ +	65.2	19.2	111.7	41.5	214.7	42.7

a) indicates significance at 5% level

b) indicates significance at 1% level

Fig. 5. Protective Effect of 5-HTP against 1000R X-Irradiation in Ehrlich's Ascites Tumor Cells *in Vitro*

cells $20 \times 10^6/0.5 \text{ ml}$, $2 \times 10^6/0.5 \text{ ml}$
 5-HTP none, mole/25000, none, mole/25000, X-irr. none : ○—○, none : ●—●, 1000R : △—△, 1000R : ▲—▲

の変動の値がそれぞれ有意な程度の動きを経日間に示すか否かを観察する因子として経日因子を、尿中 5-HIC 量 μg 単位で F-検定するに 5-HTP 添加の影響においては危険率 5% で、また移植後経日の影響因子においては危険率 1% で有意差を Table II にみるように示した。

IV EAT 細胞の *in Vitro* における放射線感受性におよぼす 5-HTP の影響

I, II 実験から設定した培養条件にて 30 min 孵置後 X 線照射し、移植細胞数については、判定の指標としてハツカネズミの体重変化によることを考慮に入れ、 20×10^6 , 2×10^6 cells/0.5 ml を用い、5-HTP 添加量は mole/25000 とし、他は III と同様条件下に行ない Fig. 5 に示す結果を得た。

細胞数量 20×10^6 cells の場合においても、5-HTP 添加群と対照群との間のハツカネズミ体重増加率についての平均値の差の *t* 検定においては危険率 5% で有意差を認めなかった。また 5-HTP 添加有無の因子と腹腔内移植後 8, 10, 12 日目の経日因子をハツカネズミ体重増加率%単位で検定するに、5-HTP 添加の影響において有意差は認められなかったが、移植後の経日の影響因子においては危険率 1% で有意差を認めた。また一方宿主ハツカネズミの 24 hr 尿中 5-HIC 量については、Fig. 6 の結果からみられるように EAT 細胞の 5-HT 合成能なきため両宿主群の間に著しい差違もみられず、しかも低値にとどまった。

考察および結論

5-HTP mole/25000 添加した細胞群に X 線 1000R 照射し、これをハツカネズミに移植した場合、宿主ハツカネズミ 24 hr 排尿中の 5-HIC 量が腹腔内移植後 8 日目、FM 細胞では対照群に比し平均値の差の *t* 検定で有意に高くまた、5-HTP 添加有無の影響による因子間を F-検定するに危険率 5% で有意であったことは 5-HTP の X 線障害に対する防護効果の発現したことの肯定的結果と推定される。なお細胞の同調培養によらざる差違、ハツカネズミの個体差からくる変動を含んだ結果であるが、FM 細胞と EAT 細胞とでは、FM 細胞の場合は 5-HT 合成能を有することから当然 5-HTP 添加の場合と対照群との間に放射線防護効果の面で有意差の出ることが予想されるが、EAT の場合は 5-HT 合成能を有しないので 5-HTP 添加の場合と対照群との間で防護効果の面で有意差が出ないだろうとの予想に則して納得できる結果を得た。つぎに 5-HTP mole/1000, mole/5000 添加の場合は懸濁状、高濃度により細胞へのとり込み培養条件の場が良好でないため対照群との差違がなかったものと思われる。5-HIC 排泄量の変化が照射による細胞の増殖能によるものか、または 5-HIC 産性能の変化によるものかについては、現時点において判別していなくて両者の総合の値として計測している。また 5-HTP の効果最終判定段階において *in vivo* 系に移したことは本実験においては、放射線ならびに 5-HTP の癌細胞に

Fig. 6. Protective Effect of 5-HTP against 1000R X-Irradiation in Ehrlich's Ascites Tumor Cells *in Vitro*

5-HTP none, mole/25000, none, mole/25000, X-irr. none : ○—○, none : ●—●, 1000R : △—△, 1000R : ▲—▲

なお 5-HTP mole/25000 添加有無の因子ならびに同一シャーレから細胞浮遊液を注入したおのこのハツカネズミ尿中の 5-HIC 量の群としての経日変化は細胞増殖のみにより、また 5-HTP 添加効果により経日 8, 10, 12 日目ごとに変動はするがそ

対する影響のうち、主としてその移植性に注目して検討を加えたが、今後宿主との関係を除外した *in vitro* で終始する実験をも行ない解析する予定である。なお各種細胞数の FM 細胞を移植したハツカネズミの癌により死亡したものを剖検するに、癌細胞の攻撃部位に統一的傾向（肝、肺、脾、腎、胃、腸、卵巢など）示さず、個体差大なる所見を得た。

つぎに用いた指標と細胞増殖度との定量的関係、さらに広い線量域における 5-HTP の防護効果の有無、線量低減率、細胞にとり込まれた 5-HTP の運命などの追求を目下実施中である。また 5-HTP 添加細胞群ならびに対照群の DNA 合成抑制の有無に関しては thymidine-6-[T]-(n) のとり込み、これの鏡検についても検討中である。

謝辞 本研究の研究費の一部は昭和 43 年度日本学術振興会流動研究費によった。ここに記して謝意を表する。