放射線障害防護薬剤に関する研究 (第 6 報¹⁾) 放射線によるマウスの
体重変化を指標とする放射線障害防護薬剤の効力試験法の検討²⁾

篠田雅人, 清水節子,^{3a)} 高木良成, 赤星三弥^{3b)}
星薬科大学,^{3a)} 放射線医学総合研究所薬学研究部^{3b)}

Pharmacological Studies on Chemical Protectors against Radiation. VI.¹⁾
Bioassay of Radio-protector by Change of Body
Weight of X-Irradiated Mice²⁾

MASATO SHINODA, SETSUKO SHIMIZU,^{3a)} YOSHINARI TAKAGI and SANYA AKABOSHI^{3b)}
*Hoshi College of Pharmacy^{3a)} and Department of Pharmaceutical Science,
National Institute of Radiological Sciences^{3b)}*

(Received September 9, 1971)

Examinations were made on the method of potency test for radiation protective agents, using S-(2-aminoethyl)isothiuronium bromide hydrobromide and 2-mercaptoethylamine, with decrease in body weight of mice by X-ray irradiation as an indicator. The effective method was found to be the use of ddY male mice as the experimental animal, with a X-ray dose of 400—600 R, and measuring variation in body weight during two weeks after irradiation, by which significant protective effect was found against body weight decrease.

生物が多量の放射線の照射を受けると、種々の障害が起こり、遂には死に至るが、これらの障害が発現する初期の段階において、著しい体重減少の起こることが古くから知られている。著者らも第 2 報⁴⁾でこの現象を認め、雄 ddY マウスの場合に、X 線照射に対して生存率の変化よりも、体重変化のほうがより鋭敏な反応を示し、さらに X 線 300—700R の範囲では照射 2 週間後の体重変動率が照射線量と直線的な関係にあることを報告した。そこで、このマウスの体重変化を指標として、代表的な放射線防護物質と考えられる S-(2-aminoethyl)isothiuronium bromide hydrobromide (AET) および 2-mercaptoethylamine (MEA) を用い、放射線防護薬剤の効力試験法を検討した。

実 験 の 部

実験方法

実験動物 船橋農場より購入した生後 4 週令の ddY 雄マウスを 10 日間予備飼育し、体重の変動が 20 g ± 1 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 (船橋農場製) 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 200 kVp, 20 mA, フィルター 0.5 mmCu + 0.5 mmAl, 距離 50 cm, 線量率 88—92 R/min の条件で、背部より全身照射した。線量測定にはラドン線量計を使用した。

試料の調製 AET は日野ら⁵⁾により合成された 2HBr 塩の結晶を用い、蒸留水に溶解し、0.1 N NaOH で pH 7.0 に補正した。MEA は Nathan Bogert⁶⁾の方法にしたがい ethylene imine から合成した free base の結晶を用い、蒸留水に溶解したのち、0.1 N HCl で pH 7.0 に補正して試料とした。これらの試料の濃度は投与量がマウス体重 20 g 当り 0.2 ml になるように定め、投与前 15 min 以内に溶解し、使用した。対照群には

1) 第 5 報: 篠田雅人, 清水節子, 玉置文一, 赤星三弥, 薬誌, **88**, 1031 (1968).

2) 日本薬学会第 87 年年会で発表, 京都, 1967 年 4 月.

3) Location: a) 2-4-41, Ebura, Shinagawa-ku, Tokyo; b) 4-9-1, Anagawa, Chiba.

4) 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).

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

6) A.H. Nathan, M.T. Bogert, *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 2361 (1941).

生理食塩水を同様に投与した。

防護効力試験 マウスを1群10匹とし、試料は腹腔内に注射した。照射後（非照射の場合は薬物投与後）4, 7, 14, 21, および30日の午前中（11時頃）に体重を測定し、照射前の体重に対する変動率を算出した。また、第4報⁷⁾に準じて体重防護効力 (Weight effect) を算定した。

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

また、照射後30日間の生存率と平均生存日数を求め、第5報¹⁾の方法により対照群に対する効果の有意性を検定し、また、第3報⁸⁾に準じて生存防護効力 (Survival effect) を算定した。

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

結 果

I. マウスの体重におよぼす AET および MEA の影響

X線を照射しない正常のマウスに対して、AETは350 mg/kg、を、また、MEAは250 mg/kgを腹腔内に投与し、生理食塩水を同様に投与した対照群と比較して体重に対する影響を調べたが、両薬剤群とも対照群と差のないことを確かめた。

II. X線照射による体重変動と AET および MEA の効果

X線100—1100Rの範囲の各種線量を照射したマウスの体重変化に対して、AET 350 mg/kgを照射前30

Fig. 1. Body Weight Change after X-irradiation in protected and Non-protected Mice. The Chemical was given Intraperitoneally 30 min. prior to Irradiation

— : irradiation only
— — — : AET 350 mg/kg + irradiation

Fig. 2. Body Weight Change after X-irradiation in protected and Non-protected Mice. The Chemical was given Intraperitoneally 30 min prior to Irradiation

— : irradiation only
— — — : MEA 250 mg/kg + irradiation

7) 篠田雅人, 高木良成, 玉置文一, 赤星三弥, 薬誌, 88, 278 (1968).

8) 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).

min に腹腔内に投与した場合の効果を、生理食塩水を投与した対照群と比較すると、Fig. 1 に示すごとく、100 R と 200R 照射では差が認められないが、300R 照射では 2 週間以降で、400R 照射では 1 週間以降で、また、500R 照射では 2 週間以降で、いずれも薬物の有意な効果が認められるようになり、700R 以上の照射では対照群の死亡数が増加するため、薬物の効果が見られなくなることを認めた。

同様に、MEA 250 mg/kg を照射前 30 min に腹腔内に投与した場合の体重変化に対する効果を検討すると Fig. 2 に示すごとく、100—300R 照射の範囲では薬物の効果が認められないが、400R および 500R 照射の場合にいずれも 1 週間以降で有意な効果が認められた。また、700R 以上の照射では効果が見られなかった。

III. AET および MEA の防護効果と照射線量の関係

X 線 100—1100R の範囲の照射における AET 350 mg/kg あるいは MEA 250 mg/kg 投与の効果を、照射 2 週間後における体重変動率と照射 30 日後における生存率について測定し、対照群と比較して効果の有意性を検討すると Table I に示すようになった。照射 30 日後の生存率を指標とした場合には AET と MEA はともに 600—800R を照射した場合に有意な防護効果を示すのに対して、照射 14 日後の体重変動率の場合には、AET は 300—600R、MEA は 400—600R の範囲で有意な防護効果が認められた。

TABLE I. Statistical Significance of Protective Effect of AET and MEA in 30-days Survival and 14-days Body Weight Change Tests in X-Irradiated Mice

X-Ray (R)	AET (350 mg/kg) ^{a)}		MEA (250 mg/kg) ^{a)}	
	Survival test	Body weight change test	Survival test	Body weight change test
100	—	—	—	—
200	—	—	—	—
300	—	+	—	—
400	—	+	—	+
500	—	+	—	+
600	+	+	+	+
700	+	—	+	—
800	+	—	+	—
900	—	—	—	—
1000	—	—	—	—
1100	—	—	—	—

+ : $P < 0.05$, — : $P > 0.05$

a) intraperitoneal injection 30 minutes before X-irradiation

IV. AET および MEA の投与量と照射 2 週間後の体重変動率との関係

X 線 600R 照射マウスに対して、照射前 30 min に、AET 50—400 mg/kg あるいは MEA 31—250 mg/kg を腹腔内注射し、薬物の投与量と照射 2 週間後の体重変動率との関係を測定し、Fig. 3 に示す結果を得た。AET と MEA のいずれの場合にも投与量と反応との間に直線関係が認められた。なお、これらの回帰係数の有意性も認めている。

V. 防護効力と投与時期の関係

X 線 600R 照射したマウスに対して、AET 350 mg/kg を照射前あるいは照射後の種々の時期に投与して、照射 2 週間後の体重変動率と、30 日間の平均生存日数を測定し、薬物の投与時期と防護効力との関係を調べ、Fig. 4 に示すような結果を得た。600R 照射の場合には体重防護効力は生存防護効力の変化と同様の傾向を示しており、AET 350 mg/kg の投与量では照射前 5—30

Fig. 3. Correlation between Dose of Chemicals and Body Weight Change of Mice in 14 Days after X-Irradiation (600R) The Chemical was injected 30 Minutes before X-Irradiation

Fig. 4. Injection-Irradiation Interval and the Effect of AET and MEA on Survival Days and Body Weight Change of X-Irradiated (600R) Mice

intraperitoneal injection

$$\text{survival effect} = \frac{\text{mean survival days of treated group}}{\text{mean survival days of control group}}$$

$$\text{weight effect} = \frac{\text{mean body weight changes of treated group}}{\text{mean body weight changes of control group}}$$

■ : AET 350 mg/kg

□ : MEA 250 mg/kg

障害による摂取量の減退も体重減少に強く影響を及ぼすものと考えられる。なお、マウスは飼料を主として夜間に摂取するので摂取後の体重の変化をなるべく一定にするため、体重測定を午前 11 時頃におこない、日内変動による誤差を少なくするようにした。

本報において主として用いた AET 350 mg/kg, および MEA 250 mg/kg の投与量は、第 3 報⁹⁾において十分に生存防護効果を示す用量であることが確かめられているが、これらの薬物の LD₅₀ が AET 635.3 mg/kg, MEA 400 mg/kg であり、前記の用量では毒性の発現する懸念があるので、X 線を照射しない正常のマウスに投与して体重に対する影響を測定したが、この用量の 1 回投与では投与後 30 日間に著しい変化は認められず、体重変化を指標とする測定にも差支えないことを確かめた。

Fig. 1 および Fig. 2 に示す結果から、X 線 200R 以下の低線量の照射の場合にも照射直後 (4 日後) に一時的な体重減少を示しているが、これは X 線照射にともなうショックによるものと考えられ、薬物投与群でも同様に認められる。照射線量の増加にともなって体重減少も強化されるが、700R 以上の線量になると対照群は照射後 2 週間以内で大部分が死亡するため、薬物の効果を体重変動によって検定することは困難であり、Table I に示す結果からも、400—600R の照射線量が薬物の効力検定に適当であることを認めた。なお、700R および 800R の照射の場合に、AET および MEA が生存率に関しては有意な防護効果を示すにもかかわらず、2 週間後の体重変化には有意な効果を示さないことは、これらの薬剤の体重減少を防止する効果と、延命効果とが異なった機序にもとづくものとも考えられるし、さらに、照射線量の多少により惹起される体重変化に質的な差が生ずるためであるとも考えられる。また、500R 以下の低線量で生存防護効力に有意差の認められないのは、照射のみの対照群でも動物の大部分あるいは全部が生き残るためである。

600R 照射時における体重変動を指標として、AET と MEA の投与量と効力との関係をまとめたものが Fig. 3 であるが、両薬剤が非常によく似た勾配の直線関係を示しており、これらの薬物の作用機序の類似性を示したものと考えられる。なお、この実験で有意な直線関係を示した投与量の範囲は、700R あるいは 800R 照射時に

min が最適投与時期であることを認めた。また、照射後に投与した場合はいずれも無効であった。MEA (250 mg/kg) についても AET の場合とほぼ同様にして測定し、投与時期と防護効力の関係を測定したが、この場合にも体重防護効力と生存防護効力の変化が同様の傾向を示すことを認めた。

考 察

放射線照射によって起こる体重減少は著しく鋭敏な反応であるが、特に LD₅₀₍₃₀₎ 付近の線量の場合に照射後 1—4 日と 9—14 日頃に急激に起こることが Chapman, *et al.*^{9,10)} により認められており、著者らもこの事実を確かめ、照射 2 週間後の体重変動が放射線に対する biological dosimeter として致死効果よりもより鋭敏であることを報告した。⁴⁾ しかし、この体重変動はマウスの生後日数あるいは照射前の体重の大小によって感受性が変化することも認められたので、本報では反応がもっとも鋭敏である生後 5.5 週令で体重 20 g の雄マウスを使用し、体重のバラツキ (±1 g) にも留意した。放射線照射によって体重減少の起こる機構はまだ十分には解明されていないが、粘膜組織の損傷にともなう体液の漏出が大きな原因と考えられる。本報では飼料および飲料水は自由に与えたが、口腔粘膜の

9) W.H. Chapman, E.P. Cronkite, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **75**, 318 (1950).

10) W.H. Chapman, E.A. Jerome, *Radiation Res.*, **4**, 519 (1956).

生存防護効力を指標として有意な直線関係を示すことがすでに確かめてあり、¹⁾ さらに、Fig. 4 の結果から、薬剤の投与時期と効果との関係を比較したが、体重防護効力は生存防護効力と同様の傾向を示し、照射前 5—60 min が最良投与時期であることを示した。また、AET と MEA はいずれも放射線障害に対する予防的な薬剤であることから、照射後に投与しては無効であることもよく一致しており、放射線障害防護薬剤の効力を検定する場合の指標として、体重防護効力が一般的に適用されている生存防護効力と同程度の感度で有効であることを認めた。さらに、この場合には生存防護効力試験と比較して X 線照射線量が少量であり、観察期間が短縮されているので、多数の薬物のスクリーニング・テストとして好適であると考えられる。

結 論

AET および MEA を用いて、X 線照射による体重減少を指標とする放射線障害防護薬剤の効力試験法を検討した結果、ddY 雄マウスを用い、X 線照射線量が 400—600R の範囲で、照射後 2 週間の体重変動率を測定することにより、体重減少に対する有意な防護効果が認められ、効力試験法として有効であることを確かめた。