

1. 研究課題名：ストレスに対する生体応答の機構

—発がんの原因となる高分子有機ラジカル

2. 研究機関：長崎大学薬学部放射線生命科学教室、名古屋大学工学部

3. 研究者：渡邊正己

4. 研究協力者：小山真治、児玉靖司、鈴木啓司、宮崎哲郎（名古屋大）
松本拓郎（名古屋大）

5. 研究期間：平成8年度～平成10年度

6. 要約

放射線の遺伝的影響は、放射分解で生じたラジカルによる DNA 損傷が直接の原因であると考えられている。加えて、生体の 80%以上は水であるため、放射線の生物影響の主因となるラジカルは、水の放射分解によって生ずる OH あるいは H ラジカルであると推測されている。しかし、こうした推測は、放射線によって生じたラジカルを直接測定した結果をもとになされたものではなく、ラジカルエネルギーを化学物質で捕捉させ、その結果起こった化学反応の反応常数をもとにされたものであり、生体内における実際の姿を反映しているかは疑問である。そこで、我々は、放射線照射された細胞内で実際に起きているラジカル反応を直接捕え、突然変異や発がんなど生物学的影響の原因となるラジカルを特定する目的で、細胞内ラジカルを電子スピン共鳴法(ESR 法)を用いて測定することを試み、その測定に成功した。その結果、放射線による遺伝的影響の主因となるラジカルは、従来考えられていた様に OH あるいは H ラジカルに代表される反応性の高いラジカルではなく、常温で半減期が 20 時間を越える安定した高分子有機ラジカルであることを世界で始めて発見した。さらに、この長寿命ラジカルは、ビタミンCや没食子酸など植物の産生するストレス軽減物質の処理で効率良く捕捉され、これらの摂取によって生活習慣病の予防が可能である可能性を指摘した。

7. 研究目的

21 世紀の医療は、これまでの病気を治すことを目的とした対症医学から病気にならないことを目的とした予防医学へと大幅に転換する必要がある。それを実現するためには、病因となるストレスを如何に回避するかという技術開発が重要である。一方、最近、多くの病気が生体活動エネルギー源である生体ラジカルの処理機構の不調によって生ずることがわかってきた。もともと、生体反応は、OH や NO ラジカルなど活性の高いラジカルを介した化学反応であるが、こうしたラジカルは、DNA など生体成分を攻撃し傷つける性質を併せ持っている。従って、生体には、これらのラジカルの発生を抑えたり、除去したりして悪影響を防ぐ能力が備わっており、平常状態に生体が死など危機的状況に追い込まれることを回避していると思われる。しかし、放射線など外的ストレスをその処理能力を超えて過剰に被ったとき DNA や生体組織を傷つけ、その蓄積が老化や発癌の原因となる。従って、どのようなラジカルがこの原因であるかを突き止め、その悪影響を回避する技術を開発することは極めて重要である。最近、我々は、放射線照射された細胞に活性が高い短寿命のラジカルと活性が低い長寿命のラジカルが生じることを発見した。短寿命ラジカルは、DNA や染色体に傷を付け易く、細胞死の原因となる。しかし、長寿命ラジカルは、染色体異常や細胞死を招くような傷

を生じないが、突然変異や発癌の頻度を増加させることを発見した。さらに、ビタミン C が長寿命有機ラジカルを特異的に捕捉するとともに突然変異や発癌の頻度を減少させるので、放射線による突然変異や癌化の原因ラジカルは、これまで予想されていた活性の高い OH ラジカルや活性酸素種ではなく、細胞の生死に関与せず照射後長期間に渡って細胞内に存在し続ける反応性の低い有機ラジカルであると予想している。この長寿命ラジカルは、放射線に限らず、虚血、金属イオン処理、微生物による生体侵襲など様々な外来ストレスで誘導される。しからば、長寿命ラジカルの除去能の有無を指標にして、ビタミンCに類似したラジカルスクベンジャーを含む植物成分を探索し、食品化する試みは、予防医学的見地から重要であり、21世紀の予防医学の基盤となると期待できる。

こうした意味から、本研究は、長寿命ラジカルの生物効果発現の機構を詳細に調べ、ストレス回避法の開発研究基盤の創成を目的に実施した。

8. 実験方法と結果

8-1. X線照射された細胞内には常温で安定な有機物ラジカルができる

まず、細胞を通常の活性化エネルギーを介したラジカル反応が起こらない液体ヘリウム温度(4.2K)に凍結し、X照射によって生ずるラジカルを測定した。その結果、4.2Kで照射された細胞に、OHやHラジカルとともに有機物ラジカルの特徴である非対称スペクトラム構造を持つラジカルが生ずることがわかった¹⁾。4.2Kにおける照射によりSHE細胞内に直接生成した水素原子、OHラジカルおよび有機物ラジカルの割合は、12%、72%そして16%であった¹⁾。この細胞を、液体窒素温度(77K)、液体メタン温度(111K)へ順次昇温するにつれて、OHやHラジカルのような活性の高い低分子ラジカルは、自己再結合や周辺の物質との作用によって急激に消滅するが、常温(295K)まで昇温しても、安定して存在し続ける高分子有機ラジカルが存在することが判った。細胞を常温で照射しても同様に高分子有機ラジカルが生ずる(図1)。常温および77Kのいずれの温度においても、この有機物ラジカルの生成に係わるG値は2.005であり、どちらの温度においても同じラジカルが生じていると思われる。常温における生成量は、77Kのおよそ1/100であった¹⁾。有機ラジカルが非対称のスペクトラム構造を持っているので、酸素が関与した酸化ラジカルであることが予想される²⁾。この半減期は、OHラジカルや水素原子の常温における寿命(70ナノ秒~200マイクロ

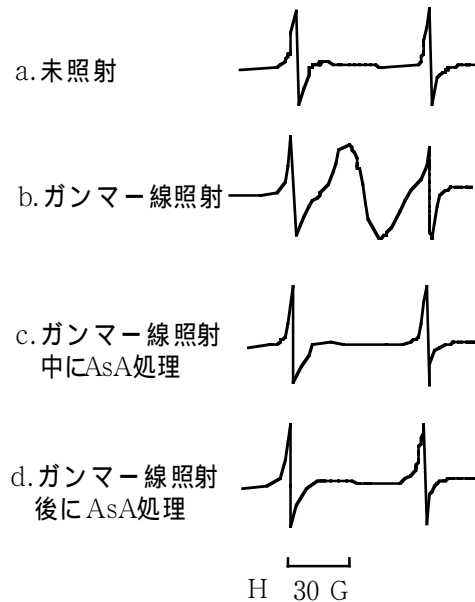


図1 ガンマー線照射(5kGy)されたハムスター細胞内に生じた長寿命ラジカルESRスペクトラムとビタミンC(5mM)による除去。

秒)と比較してはるかに長い。

従来、DNA やタンパクなど生体高分子に生ずるラジカルの多くは、OH ラジカルや水和ラジカルなど反応性の高い低分子ラジカルを介して間接的に生ずると考えられていた。しかし、我々の結果では、4.2K という極低温においても総ラジカルの 16%にもおよぶ有機ラジカルが生じていることになる。この温度では、如何に反応性の高い OH ラジカルといえども通常の化学反応を起こさないので、4.2K で生ずる有機物ラジカルの生成に OH ラジカルは寄与していないだろう。この凍結細胞を、徐々に昇温して 111K にすると OH ラジカルは、半減期 5 分程度で消失するが、その減少に見合った有機物ラジカルの増加は見られない³⁾。この結果も、OH ラジカルが高分子有機物ラジカル生成の原因ではないことを支持する。従って、今回注目している有機ラジカルは、放射線照射により直接生じたとするか、あるいは、なにか他の活性ラジカルの関与を考えねばならない。現時点まで、我々は、高分子有機ラジカルが放射線による一次生成ラジカルか二次生成ラジカルであるか特定できていない。しかし、一つの有力な候補は水素原子である。水素原子は、原子量が極めて小さく粒子性ととも波動性を持っている。そのため、トンネル効果によって活性化エネルギーの障壁を越えずにラジカル反応ができることはよく知られている¹⁾。そうであれば、4.2K という低温でも有機物ラジカルの誘導に関与できる。

これまで放射線生物学者は、OH ラジカルが放射線の生物影響の原因ラジカルであろうと考えていた。これは、生体の構成成分の 80%以上が水であるという事実と生体高分子は細胞内に均質に分布しているという仮定に基づいて作られた概念である。この概念に添って水溶液反応系でおこなったラジカルとラジカルスクベンジャーの反応から OH ラジカルの反応速度定数はおよそ $10^9 \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ である³⁾。この反応速度定数は、有機物ラジカルのそれ ($0.014 \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$) と比べて桁違いに大きい。こんなに反応性の低いラジカルが生体に重篤な影響を及ぼすのだろうか。これまでの生体ラジカルの常識からいって、今回、注目している有機ラジカルに生体効果を予想することは難しい。

しかし、違った視点から我々の結果を解釈すると全く新しい可能性が見えてくる。生体内において生体高分子は、細胞内に均質の水溶液として存在しているという仮定は正しいであろうか？ 答えは、否である。最近の研究結果は、ことごとく核や膜などは、かなり疎水性であることが指摘されているし、水も結晶水などの型で存在する可能性が高いと予想されている。こうした事実を考慮すれば、一転して核内遺伝物質や細胞膜に対する放射線の影響を考えると、OH ラジカルのような水由来の活性ラジカルが主要な役割を演じているかは大いに疑問である。事実、我々の結果は、高濃度アルブミン溶液内におけるラジカル反応は、その G 値から、疎水系における反応を考慮せずには説明できない³⁾。また、DMSO 溶液内における OH ラジカルの消長を ESR 法で観察すると、111K で生じた OH ラジカルは 5 分程度の半減期で減衰するにも関わらず、OH ラジカル消失に見合った DMSO ラジカルや高分子有機ラジカルの増加は見られない¹⁾。ところが、線照射した SHE 細胞の致死感受性は、DMSO の存在によって低下する⁴⁾。DMSO は、水溶液系で OH ラジカルを効率良くスカベンジできることはよく知られており、このことも、OH ラジカルが細胞死の原因でないことを間接的に示唆するものであろう¹⁾。放射線分解で生じた OH ラジカルは、その拡散距離が常

温でおよそ 20nm と考えられているので⁶⁾、細胞の直径が 10 - 30 μm (核 3 - 10 μm)であることを考えると、OH ラジカルの多くが産生される自由水で構成される部位では、OH ラジカルは、致死の原因となる細胞内標的(DNA)と出会うより前に、発生した場所近傍で自己再結合反応により消失すると考えるのが自然である。この再結合反応の反応速度定数は、均質の希薄水溶液中では $5.3 \times 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった⁵⁾。このように、我々の研究で得られた結果は、ことごとく OH ラジカルが放射線の生物影響の主因であるとする仮説に矛盾する。

8 - 2 . 高分子ラジカルは、ビタミン C で効率良くスクャベンジされる

それではどのようなラジカルが放射線の生物効果の原因であろうか？ 残念ながら、我々は、今、この疑問に正確に答える事は出来ない。しかし、我々は、これまで得られた結果から、今回、注目している有機物ラジカルを有力な一つの候補として考えている。活性が高く反応しやすいラジカルよりも、活性は低い細胞内でいつまでも存在し続けるラジカルは、細胞死への寄与は少ないが、遺伝的影響の原因となる可能性が高いのではないだろうか？ 少なくともこれまで報告されている実験結果は、OH ラジカルが遺伝子損傷を誘起していることを証明していない。あくまで反応速度論的に推測されているにすぎない。

この有機ラジカルは、ビタミン C 処理で効率良く消失することがわかった⁷⁾。X 線照射前から照射終了時までの間、アスコルビン酸(5mM)が存在すると細胞内における有機ラジカルの生成は顕著に抑えられる。さらに驚くことに、線照射 20 分後からアスコルビン酸処理を開始しても細胞内に生ずる有機物ラジカルの量は激減する。さらに、照射後、20 時間経ってからの処理でもスクャベンジ効果が観察される。もちろん、照射アルブミン溶液に生成するアルブミンラジカルについても同様の現象が観察された。こうしたことは、これまで一般に考えられているラジカルスクャベンジャーの作用機序に関する常識では予想されない。一方、DMSO 存在下で線照射された場合には、アスコルビン酸の場合と同様にアルブミンラジカルの生成が抑えられるが、照射後に処理を開始するとラジカルスクャベンジ効果は全く見られなかった。アルブミンラジカルの生成量は、ラジカルスクャベンジャーの濃度に依存して減少する。アスコルビン酸は、DMSO のおよそ 1/100 の濃度で有効であった¹⁾。

その後の我々の研究で、没食子酸やアントシアニンなどフラボノイド色素がアスコルビン酸と同様に長寿命ラジカルを捕捉できることが判明した。これらの物質は、植物が急激な温度変化、乾燥、過剰な光など様々な外来ストレスを受けたときに産生するストレス応答物質である。一方、長寿命ラジカルは、動物及び植物細胞で放射線、熱、化学物質、虚血、昆虫やバクテリアによる侵襲などの幅広いストレスで誘導される。従って、植物が産生するストレス防御物質による長寿命ラジカルの捕捉が、生物が幅広いストレスに対応し、その程度を軽減する有効な手段である可能性が高いといえる。

8 - 3 . 有機物ラジカルは、突然変異の原因ラジカルである

我々は、細胞内に生じた高分子ラジカルとビタミン C の反応速度定数($0.014 \text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$)は、この反応が水溶液中で起きていると仮定した場合に予想される反応速度定数($10^6 - 10^{10} \text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$)に比べ極端に小さい⁸⁾ので、このラジカルは、DNA、タンパクなど高分子成分

に富んだ比較的、疎水性細胞成分内に生じていると予想している。この予想が妥当であれば、我々が注目している有機ラジカルは、主としてタンパクや DNA など生体重要高分子に存在し、放射線の遺伝的影響に関与している可能性は高いであろう。こうした観点から、我々は有機ラジカルの生物効果を知るために、ヒト初代培養細胞を用いて、放射線照射に伴って誘導されたラジカル量のビタミン C 処理による消長と細胞致死、染色体異常、突然変異誘発および細胞がん化誘発など放射線生物効果の発現動態との相関を調べた。

ESR で観察される高分子有機ラジカルの生成を 85%抑える濃度(5mM)⁷⁾のビタミン C で照射前から照射終了時まで 2 時間処理された細胞の生存率と染色体異常誘発頻度は、未処理群のそれと変わらず、致死および染色体異常の原因を起こすラジカルに対する防護効果は認められなかったが、ハイポキサンチン・グアニン・フォスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子座における突然変異頻度を著しく減少させた。さらに、驚くべきことは、ビタミン C 処理を照射 20 分後、あるいは、20 時間後から開始しても顕著な突然変異頻度抑制効果が観察されたことである(図 2)。同様にビタミン C 処理は、マウス m5s 細胞の放射線誘導細胞がん化を抑制する(図 3)。同様の実験を DMSO で行なうと、ビタミン C の場合と同様に、照射前から照射終了時までの処理では、生存率、染色体異常および突然変異のすべての効果を軽減させるものの、後処理では全く効果が見られないことが判った⁹⁾。

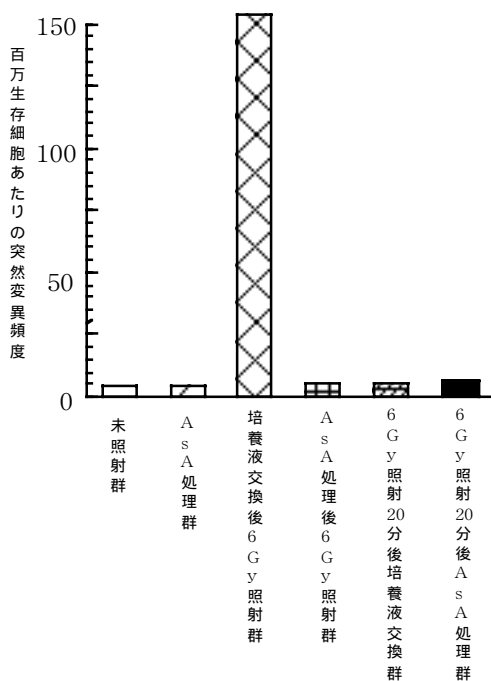


図2 ビタミンC処理による放射線誘発突然変異頻度の軽減。ビタミンC処理は、5mMで2時間行った。突然変異は、ヒト胎児由来正常細胞を用いて6チオグアニン抵抗性を指標に測定した。

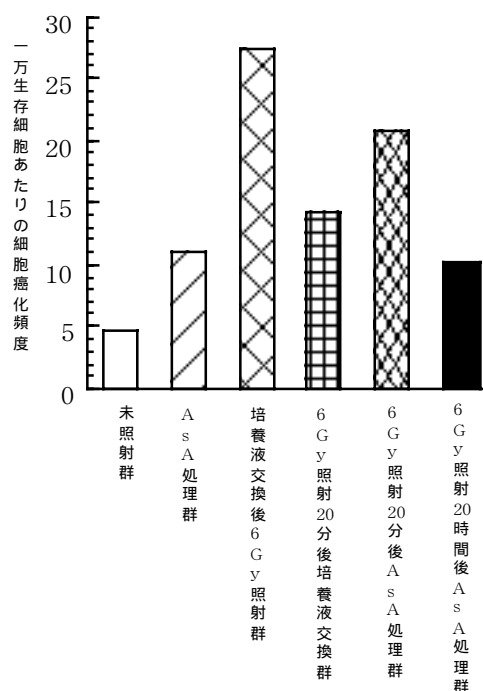


図3 ビタミンC処理による放射線誘発細胞癌化頻度の軽減。ビタミンC処理は、5mMで2時間行った。細胞癌化は、マウスm5s細胞を用いてフォーカス形成法で算定した。

これらの結果は、ビタミン C で特異的にスクャベンジされる高分子有機ラジカルは、細胞の生死に関与しないが、照射後長期間に渡って存在し突然変異や細胞がん化の原因となるこ

とを意味している。ビタミン C は、この高分子有機ラジカルを効率良くスクャベンジする能力を持つ。

これまでの ESR のシグナルを解析すると、本研究で注目するラジカルは、非対称の型などの特徴からその生成に酸素が関与する過酸化ラジカルと予想できる。このことは、細胞膜で発生した活性酸素ラジカルが放射線応答現象に関連する遺伝子発現のシグナルとなるという報告とともに、突然変異の原因となる細胞損傷が活性酸素を介して生ずる可能性を示唆する。

これらの結果を総合すると、放射線による突然変異の主因となるラジカルは、これまで考えられていたように反応性の高い(短半減期の)OH や H ラジカルではなく、今回、注目している高分子有機ラジカルであると予想できる^{4,10)}。この高分子有機ラジカルの生成には、酸素は直接関与していないだろう。ビタミン C 処理によってマウス m5s 細胞の細胞がん化も抑えられる。これらの結果を踏まえて、我々は、“長寿命有機ラジカルは、致死の原因とならないため生体内に安定に存在し続け突然変異や発がんの主因となる”と予想している⁹⁾。

9. 考察

近年、放射線発癌、ウィルス発癌、化学発癌の発癌機構が遺伝子レベルで理解されるようになって、フリーラジカルが遺伝子に突然変異を起こすことが発癌の主因であると考えられるようになった。もし、本稿で指摘する高分子有機物ラジカルが突然変異の主因であれば、それは致命的でないのかえって発癌を助長する可能性が高い。これらの仮定が正しいとすれば、ビタミン C は、高分子有機ラジカルの発生を抑えるばかりか、細胞内に既に安定して存在するこのラジカルも効率的にスクャベンジできるので、発癌抑制において重要な役割を演ずる可能性は高い。事実、放射線発癌に対するビタミン C の投与は、細胞癌化実験でも動物発癌実験でも発癌のプロモーション過程を抑えることによって発癌抑制効果を現すと予想されている¹¹⁻¹⁴⁾。ビタミン C は X 線ばかりでなく 3-メチルコラントレンなど化学物質による発癌も抑制する¹⁵⁾。また、紫外線によるマウス皮膚腫瘍の発生率を抑制する^{16,17)}。しかし、一方では、ビタミン C は必ずしも癌や突然変異に対して抑制的、または生体防衛的に働くわけではないことも指摘されている。例えば、ヒトと違って生体内でのアスコルビン酸の生合成可能なラットに多量のビタミン C を投与するとかえって過酸化脂質の生成の亢進が見られる。さらに、90%酸素濃度に曝されたハムスター細胞では、通常酸素濃度(20%)より染色体異常頻度が増加し、細胞生存率が低下するが、その原因は、高い酸素濃度のために起きる酸化ダメージの増加がその原因と考えられている。この仮定が正しいければ、抗酸化剤であるビタミン C の処理によって染色体異常頻度の低下と生存率の改善が期待されるが、かえって染色体異常の増加、致死効果の増強が見られたという^{18,19)}。このように、ビタミン C は、生体内において抗酸化作用を持つと同時に酸化促進作用を持つなど、相反する作用をもっている²⁰⁾。我々も、マウス m5s 細胞を用いた細胞癌化実験系を用いた実験で、低濃度(0.05mM 程度の長時間処理)のビタミン C 処理は細胞癌化頻度を低下させるが、高濃度(5mM 程度の短時間処理)処理はかえって細胞癌化を促進するというビタミン C の作用の二面性を観察している⁹⁾。発癌機構の全容が不明であり、またビタミン C の生体内での作用は多岐に渡っていると思われるので、実際にどのようなメカニズムで放射線発癌の抑制が行なわ

れているかは分からないが早急に解明したい疑問である。

少なくとも、ビタミン C のラジカルスカベンジ機構は、DMSO と全く異なる。ビタミン C がスカベンジできるラジカルが有機ラジカルだけであって、ビタミン C が影響を及ぼす(軽減できる)ことができる生物効果は、どのような処理条件においても突然変異だけであること、それも、放射線照射して 20 時間以上経てからでも効果があるという事実は、興味深い。もちろん、DMSO は、X線照射に先だって処理すれば、染色体異常、致死効果および突然変異のいずれも抑制することが出来るが、照射後処理では全く影響を及ぼさなかった。ビタミン C は、生死をさまよう細胞をむやみに助けることなく、遺伝的影響だけを抑えることができるという虫のいい物質である。放射線治療後の遺伝的障害を軽減するために、“放射線治療終了時に、一個のレモンを患者に食べさせる”と、二次発がんが抑えられ、治療成績が上がるのではないだろうか。我々の研究結果では、植物が温度変化、乾燥、放射線や光など様々な外来ストレスを受けたときに産生する没食子酸やフラボノイド(アントシアニン)などストレス応答物質が、長寿命ラジカルを効率良く補足できることを示している。このことは、多彩なストレスが原因となる多くの生活習慣病の予防に食品が効果を持つことを示唆し、この分野での応用研究の展開の必要性が感じられる。

ここで注目している高分子有機物ラジカルが細胞死の原因となることはありそうもない。加えて、前述したように、細胞死を引き起こすラジカルが OH ラジカルである可能性も低い。従って、細胞死に関与するラジカルは何かという疑問は依然として残ったままであるが、X線照射 20 分後から DMSO 処理しても生存率は上昇しないので、少なくとも常温で照射後 20 分以内(ラジカルスカベンジャーの後処理の開始までにかけた時間内)に消失する活性の高い水素原子、ホールあるいは電子などが候補としてあげられる¹⁾。窒素雰囲気下において、スカベンジャー未処理細胞の生存率が有意に上昇するので²¹⁻²⁵⁾、細胞死に活性酸素種(ROS)が関与していることはほぼ間違いない。DMSO は、これら反応性の高いラジカルを効果的に捕捉することによって染色体異常やそれに伴う細胞死を抑制しているに違いない。しかし、ビタミン C は、反応性の高いラジカルをスカベンジできず致死性損傷の生成を抑えられない。反応性の高いラジカルの多くは、致死性の損傷を起こすが、その損傷が生じた細胞は死んでしまうので遺伝的影響という意味ではあまり重要ではないだろう。DMSO 前処理による突然変異誘発の抑制は、高反応性ラジカルを素早くスカベンジすることによって突然変異の原因となる高分子有機ラジカルの生成を抑制することができるためであろう。反応性の高いラジカルの一部は、細胞内の高分子有機物と反応して活性が低い有機ラジカルを生成する。この有機ラジカルは、反応性が低く細胞を致死に導くことはない。しかし、その損傷は、細胞の生化学的反応に異常を来し重篤な遺伝的变化につながってゆくのではないか。

いずれにせよ、我々の結果では、細胞の致死と染色体異常を起こす損傷と突然変異を起こす損傷は全く異なると結論せざるを得ない。細胞死や染色体異常のように重篤な損傷と、突然変異のような細胞の生死に大きく影響しないような損傷を想定せねばならない。前者の生成には、高反応性のラジカルが関与し、後者の生成には、長寿命の有機物ラジカルが関与する。

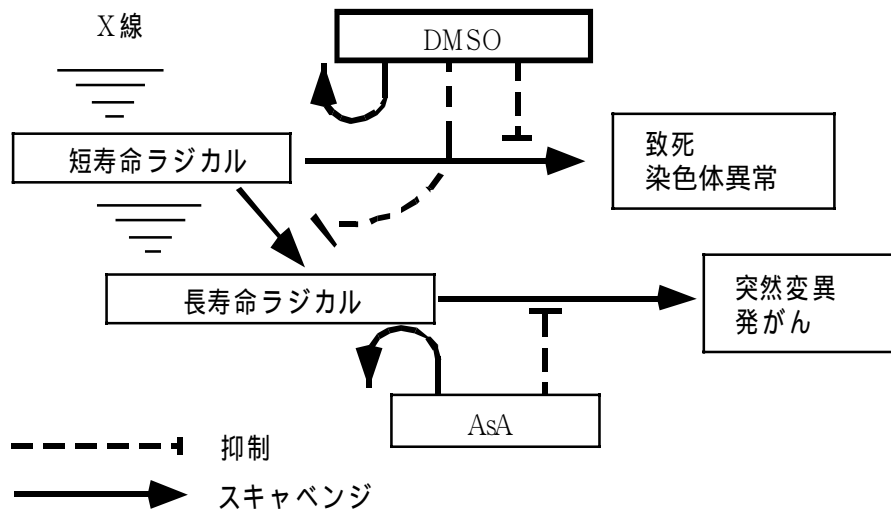


図4 考えられる放射線誘導ラジカルの生物効果の発現メカニズム。

本研究で得られた結果から、我々は、図4に示すような仮説を提案する⁹⁾。細胞に致死的な障害を与えるラジカル（活性が高い短寿命のラジカル）と突然変異を引き起こすラジカル（活性が低い長寿命の有機物ラジカル）が存在する。前者は、DNAに多くの切断を起こす。巧く修復できなかったDNA切断は染色体異常を招き、さらには細胞死を迎える。後者は、DNAに致死的不是な比較的小規模の傷（全くの仮定）を起こす。それらの傷は、巧く修復されなくても染色体異常を起こし細胞死を招くような異常を生じない。恐らく、DNA複製異常を介して突然変異頻度を増加させる。ビタミンCは、有機物ラジカルを特異的に捕捉するので突然変異の頻度を減少させる。これら一連の仮説が正しければ、ビタミンC処理後に生き残る突然変異細胞のDNAに残る変化は大規模な欠失型が多いことが予想される。現在、ビタミンC投与により抑制される突然変異のDNAレベルに残る変化に特異性があるのか、またどのようなタイプの突然変異が癌などの疾病を引き起こすのかを検討中である。

10. 今後の展開

21世紀の医療は、これまでの病気を治すことを目的とした対症医学から病気にならないことを目的とした予防医学へと大幅に転換する必要がある。それを実現するためには、病因となるストレスを如何に回避するかという技術開発が重要である。本研究では、従来の常識を破り、活性が低い長寿命ラジカルが突然変異や発癌の原因ラジカルであること、さらに、ビタミンCや没食子酸など植物の産生するストレス応答物質がこの長寿命有機ラジカルを特異的に捕捉するとともに突然変異や発癌の頻度を減少させることを発見した。しからば、長寿命ラジカルの除去能の有無を指標にして、ビタミンCに類似したラジカルスキャベンジャーを含む植物成分を探索し、食品化する試みは、予防医学的見地から重要であり、21世紀の予防医学の基盤となると期待できる。

11 . 参考文献

- 1) T. Miyazaki, Y. Hayakawa, K. Suzuki & M. Watanabe, Radioprotective effects of dimethyl sulfoxide in golden hamster embryo cells exposed to γ rays at 77K I. Radical formation as studied by electron spin resonance. *Radiat. Res.* 124, 66-72 (1990).
- 2) T. Miyazaki, T. Yoshimura, K. Mita, K. Suzuki, and M. Watanabe, Rate constant for reaction of vitamin C with protein radicals in γ -irradiated aqueous albumin solution at 295K. *Radiat. Phys. Chem.*, 45, 199-202 (1995).
- 3) T. Yoshimura, T. Miyazaki, S. Mochizuki, K. Suzuki & M. Watanabe, Do OH radicals react with organic substances in gamma-irradiated frozen cells of golden hamster embryo?. *Radiat. Phys. Chem.*, 40, 45-48 (1992).
- 4) M. Watanabe, M. Suzuki, K. Suzuki, Y. Hayakawa & T. Miyazaki, Radioprotective Effects of dimethyl sulfoxide in golden hamster embryo cells exposed to γ rays at 77K II. Protection from lethal, chromosomal, and DNA damage. *Radiat. Res.* 124, 73-78 (1990).
- 5) L. E. Gerweck, B. Richards & Maureen Jennings, The influence of variable oxygen concentration on the response of cells to heat or X irradiation. *Radiat. Res.* 85, 314-20 (1981).
- 6) 二木鋭雄、島崎弘幸、美濃真、抗酸化物質 —フリーラジカルと生体防御— 学会出版センター (1994)
- 7) T. Yoshimura, K. Matsuno, T. Miyazaki, K. Suzuki & M. Watanabe, Electron spin resonance study of free radicals in gamma-irradiated golden hamster embryo cells: Radical formation at 77 and 295 K, and radioprotective effects of vitamin C at 295 K. *Radiat. Res.* 136, 361-65 (1993).
- 8) T. Miyazaki, S. Nagasaka, I. Maeda, T. Matsumoto, S. Koyama, S. Kodama, and M. Watanabe, Radiation-induced emission from goldem hamster embryo cells. *Radiat. Phys. Chem.*, in press (1995).
- 9) S. Koyama, S. Kodama, K. Suzuki, T. Matsumoto, T. Miyazaki, M. Watanabe: Radiation-induced long-lived radicals which cause mutation and transformation, *Mutation Res.*, 421, 45-54 (1998).
- 10) T. Miyazaki, T. Yoshimura, K. Suzuki, and M. Watanabe, Free radicals with long lifetime in gamma-irradiated golden hamster embryo cells and their model system at 295 K. Radical decay and reaction with vitamin C. *Magnetic Resonance in Med.*, 6, 346-348 (1994).
- 11) M. Yasukawa, T. Terasima & M. Seki, Radiation-induced neoplastic transformation of C3H10T1/2 cells is suppressed by ascorbic acid. *Radiat. Res.* 120, 456-467 (1989).
- 12) H. Tauchi & S. Sawada, Suppression of gamma- and neutron-induced neoplastic transformation by ascorbic acid in Balb/c 3T3 cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 63, 369-374

- (1993).
- 13) J. F. Dorgan & A. Schatzkin, Antioxidant micronutrients in cancer prevention. *Nutrition & Cancer* 5, 43-68 (1991).
 - 14) Howerde E. Sauberlich, Pharmacology of vitamin C. *Annu. Rev. Nutr.* 14, 371-91 (1994).
 - 15) W. F. Benedict, W. L. Wheatley & P. A. Jones, Inhibition of chemically induced morphological transformation and reversion of the transformed phenotype by ascorbic acid in C3H/10T1/2 cells. *Cancer Res.* 40, 2796-2801 (1980).
 - 16) W. B. Dunham, E. Zuckerkandl, R. Reynolds, R. Willoughby, R. Marcuson, R. Barth & L. Pauling, Effects of intake of L-ascorbic acid on the incidence of dermal neoplasms induced in mice by ultraviolet light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7532-6 (1982).
 - 17) L. Pauling, R. Willoughby, R. Reynolds, B. E. Blaisdell & S. Lawson, Incidence of squamous cell carcinoma in hairless mice irradiated with ultraviolet light in relation to intake of ascorbic acid (vitamin C) and of D, L-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E). *Int. J. Vit. Nutr. Res.- Suppelment* 23, 53-82 (1982).
 - 18) S. A. Weitzman & T. P. Stossel, Effects of oxygen radical scavengers and antioxidants on phagocyte-induced mutagenesis. *J. Immunol.* 128, 2770-72 (1982).
 - 19) A. Lupulescu, The Role of vitamin A, β -carotene, E and C in cancer cell biology. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 63, 3-14 (1993).
 - 20) B. Frei, L. England & B. N. Ames, Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6377-6381 (1989).
 - 21) T. Lialiaris, D. Mourelatos & J. Dozi-Vassiliades, Enhancement and attenuation of cytogenetic damage by vitamin C in cultured human lymphocytes exposed to Thiotepa or L-ethionine. *Cytogenet. Cell Genet.* 44, 209-214 (1987).
 - 22) H. B. Michaels, E. C. Peterson & E. D. Epp, Effects of modifiers of the hydroxyl radicals on the radiosensitivity of mammalian cells at ultrahigh dose rates. *Radiat. Res.* 95, 620-36 (1983).
 - 23) C. M. L. West & R. M. Sutherland, The radiation response of a human colon adenocarcinoma grown in monolayer, as spheroids, and in nude mice. *Radiat. Res.* 112, 105-15 (1987).
 - 24) D. J. Grdina, B. Nagy, C. K. Hill & C. P. Sigdestad, Protection against radiation-induced mutagenesis in V79 cells by 2-[(aminopropyl)amino]ethanethiol under conditions of acute hypoxia. *Radiat. Res.* 117, 251-58 (1989).
 - 25) D. Ewing & H. L. Walton, Radiation Protection of in vitro mammalian cells: Effects of hydroxyl radical scavengers on the slopes and shoulders of survival curves. *Radiat. Res.* 126, 187-97 (1991).

12. 研究業績

12-1. 原著論文

- 1) Nagasaka, I. Maeda, T. Matsumoto, S. Koyama, S. Kodama, M. Watanabe: Radiation-induced emission from golden hamster embryo cells, *Radiat. Phys. Chem.*, 47, 817-819 (1996).
- 2) T. Matsumoto, T. Miyazaki, Y. Kosugi, T. Kumada, S. Koyama, S. Kodama, M. Watanabe: Reaction of long-lived radicals and vitamin C in γ -irradiated mammalian cells and their model system at 259K. Tunneling reaction in biological system, *Radiat. Phys. Chem.*, 49, 547-551 (1997).
- 3) Y. Kitamura, T. Yabiku, M. Shigehiro, H. Miura, M. Watanabe, T. Ikenaga: Atropine and scopolamine movement by various tissues of *Duboisia leichhardtii*, *J. Plant Physiol.*, 151, 216-220 (1997).
- 4) N. Matsuda, K. Yokoyama, S. Takeshita, M. Watanabe: Role of epidermal growth factor and its receptors in mechanical stress-induced osteoblastic differentiation of human periodontal ligament cells, *Archs. Oral Biol.*, 43, 987-997 (1998).
- 5) S. Koyama, S. Kodama, K. Suzuki, T. Matsumoto, T. Miyazaki, M. Watanabe: Radiation-induced long-lived radicals which cause mutation and transformation, *Mutation Res.*, 421, 45-54 (1998).
- 6) H. Tominaga, M. Ishiyama, F. Ohseto, K. Sakamoto, T. Hamamoto, K. Suzuki, and M. Watanabe: A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay, *Anal. Commun.*, 36, 47-50 (1999).

12-2. 総説など

- 1) 渡邊正己, 小山真治, 児玉靖司, 鈴木啓司, 宮崎哲郎: 突然変異の原因となる放射線誘導ラジカル, 132-140 (小澤俊彦, 湯川修身: “活性酸素・フリーラジカル研究の新展開—基礎から臨床まで—”, 放射線医学総合研究所, 千葉) (1996)
- 2) 渡邊正己: 放射線による突然変異と発がんの原因となる長寿命ラジカル, *放射線化学*, 66, 9-17 (1998).
- 3) 渡邊正己: 発がんと突然変異の原因となる放射線誘導ラジカル, *Dojin News*, 86, 3-8 (1998).
- 4) 科学技術振興事業団、地域共同研究支援プロジェクト(共同研究推進委員長、渡邊正己) “細胞ストレス応答”平成8年度研究成果報告書、平成9年3月。
- 5) 科学技術振興事業団、地域共同研究支援プロジェクト(共同研究推進委員長、渡邊正己) “細胞ストレス応答”平成9年度研究成果報告書、平成10年3月。
- 6) 科学技術振興事業団、地域共同研究支援プロジェクト(共同研究推進委員長、渡邊正己) “細胞ストレス応答”平成10年度研究成果報告書、平成11年3月。

12-3 . 国際学会発表 なし

12-4 . 国内学会発表

- 1) 渡邊正己：細胞中の長寿命ラジカルのトンネル反応と生物効果、第 2 回低温化学セミナー—トンネル反応と生物効果—、平成 8 年 8 月 22 日-23 日、東海市。
- 2) 渡邊正己：生物と放射線の密接な係り、日本薬学会第 117 年会、平成 9 年 3 月 26 日-3 月 28 日、東京。
- 3) 渡邊正己、児玉靖司、鈴木啓司：放射線による遅延型影響と適応応答、日本放射線影響学会第 40 回大会シンポジウム、“放射線適応応答の機構”、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、京都。
- 4) 渡邊正己、児玉靖司、鈴木啓司：発がん突然変異の原因となる放射線誘導ラジカル、日本放射線影響学会第 42 回大会ワークショップ、“活性ラジカル”、平成 11 年 11 月 5 日-7 日、広島。

12-5 . 新聞など なし。

12-6 . 特許 なし。

13 . Mechanism of Stress Response of Cell — Radiation-induced long-lived radicals which cause mutation and transformation

Shinji Koyama, Seiji Kodama, Keiji Suzuki, Takuro Matsumoto, Tetsuro Miyazaki, and Masami Watanabe

Radiation and Life Science, School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University ,14-1 Bunkyo-machi, Nagasaki 852, Japan (S.K., S.K., K.S., and M.W.), and Department of Engineering, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-01, Japan (T.M., and T.M.) (e-mail address: nabe@net.nagasaki-u.ac.jp)

Abstract

Using electronic spin resonance (ESR), we found a new type of radicals with a long lifetime in cells ($T_{1/2} > 20$ h) and which may play a more important role in the induction of mutation and transformation than either the active-short-lived, H, or OH radicals. When cells were treated with dimethyl sulfoxide (DMSO) and L-ascorbic acid (AsA) just before irradiation, the short-lived radicals were well scavenged. On the other hand, if cells were treated with the scavengers 20 min after irradiation, then AsA scavenged the long-lived radicals, but DMSO did not. AsA treatment 20 min after the start of irradiation drastically reduced both the mutation frequency at the hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) locus in human cells and the morphological

transformation in mouse m5S cells, but DMSO treatment did not. In addition, AsA treatment 20 h after irradiation also reduced the mutation frequency in human cells. These results suggested that mutations and morphological transformation are probably caused by the presence of long-lived radicals in the cells, rather than by short lived radicals, and that AsA reacts efficiently with long-lived radicals, resulting in a decrease of the mutations and transformations induced.