

放射線防護および増感に関する研究 その3

— L-Cysteine および 5-Propylthiomethylhydantoin

投与マウスの γ 線照射後の赤血球数および白血球数の動向について—

川崎医療短期大学 臨床検査科*, 川崎医療短期大学 放射線技術科**

佐藤彰一*・西村明久**・永瀬澄香*

紺野勝信**・上田 智*・西下創一**

(昭和63年10月13日受理)

Studies of Radioprotection and Radiosensitizing Effects Part III
Effects of L-Cysteine and 5-Propylthiomethylhydantoin
on red blood cells and white blood cells of γ -irradiated mice.

Shoichi SATO*, **Akihisa NISHIMURA****, **Sumika NAGASE***,
Katzunobu KONNO**, **Satoshi UEDA***, **Soichi NISHISHITA****

Department of Medical Technology, Radiological Technology**,*

Kawasaki College of Allied Health Professions

Kurashiki, 701-01, Japan

(Received on Oct. 13, 1988)

概 要

L-Cysteine, Glutathione などの放射線防護効果は発見されて以来、これらの化合物を用い多くの研究がなされている。我々はこの L-Cysteine より合成した 5-Propylthiomethylhydantoin の防護増感効果を C57BL マウスを用い、 γ 線照射後の体重、ヘマトクリット値、赤血球数および白血球数の変化を経日的に観測することにより検討した。5週齢の雄のマウス腹腔内に 0.75mmol/kg の L-Cysteine および 5-Propylthiomethylhydantoin を投与し、 ^{60}Co による γ 線照射を 5.0-7.0Gy の照射線量で行った。5-Propylthiomethylhydantoin 投与マウスは L-Cysteine 投与マウスと比較して体重、ヘマトクリット値、赤血球数および白血球数のいずれも回復が始まる時期には差がなかった。しかし、正常な状態への回復は 5-Propylthiomethylhydantoin のほうが早かった。すなわち、5-Propylthiomethylhydantoin のほうが L-Cysteine よりも放射線防護効果が大きいことが判明した。

Abstract

Since the discovery of the radioprotective effects of L-Cysteine and Glutathione, these agents have been tested for their radioprotective action on various biological systems. Protection of C57BL mice from ^{60}Co γ -rays provided by 5-Propylthiomethylhydantoin synthesized from L-Cysteine was examined. Five-week-old male mice were exposed to 5.0-7.0Gy of γ rays after a single intraperitoneal injection of 0.75mmol/kg body weight of

L-Cysteine and 5-Propylthiomethylhydantoin. The recovery times for body weight, hematocrit, red blood cells and white blood cells after γ -ray irradiation did not significantly differ between L-Cysteine and 5-Propylthiomethylhydantoin. However, 5-Propylthiomethylhydantoin afforded more effective recovery than L-Cysteine. It was thus indicated that 5-Propylthiomethylhydantoin was much more radioprotective than L-Cysteine.

はじめに

L-Cysteine, Glutathione などの含硫化合物は放射線防護効果を持つことはよく知られている^{1,2)}。そこで我々は L-Cysteine に着目し、Dakin の合成法³⁾ および Tahara らの合成法⁴⁾ を検討し、種々の Cysteine 誘導体を合成してきた⁵⁾。また、西村らは Cysteine 誘導体の大腸菌およびマウスに対する放射線防護効果を検討^{6,7,8)}している。それによると 5-Allylthiomethyl-5-methylhydantoin および 5-Propylthiomethylhydantoin を加えた培養液の大腸菌は γ 線照射後の生存数が多く、また、これらふたつの化合物を投与したマウスは DRF 値が高い。そこで我々は 5-Propylthiomethylhydantoin に着目し、マウスに腹腔内投与し、 γ 線照射後の体重、ヘマトクリット値、赤血球数および白血球数の経日変化を観測し、若干の知見を得たので報告する。

試 薬

- 1) L-Cysteine 塩酸塩：和光純薬 KK 特級を用いた。
- 2) 5-Propylthiomethylhydantoin: L-Cysteine 17.5g をナトリウムエチラートエタノール液に加え、1-Bromopropane 12.3g を滴下した。この反応液に Ammonium Bromide を加え中和し、減圧乾固後固形物を得た。これを少量の水で懸濁させ、吸引濾過を行い、S-Propylcysteine の粗結晶 14.1g を得た。再結晶はエタノール水溶液で行った。この S-Propylcysteine 16.3g をシアン酸カリウム 9.7g が溶解している水溶液に加え、攪拌した。これに 10% 塩酸約 150ml を加え、吸引濾過を行い、N-Carbamyl-S-propylcysteine を得た。ついでこの結晶を 10% 塩酸に溶解し、90°C、20 分間加温した。反応液を氷冷し、結晶を吸引濾過し、5-Propylthiomethylhydantoin の粗結晶 14.9g を得た。再結晶にはエタノール水溶液を用いた。

MS スペクトルを示すと図 1 のようになる。分子イオンピークは m/z 188、最大ピークは m/z 89 となった。また、重水中で測定した NMR においては 0.93ppm に 3H 分の triplet ($J=7.4\text{Hz}$)、1.58ppm に 2H 分の sextet ($J=7.4\text{Hz}$)、2.61ppm に 2H 分の triplet ($J=7.4\text{Hz}$)、2.96ppm に 1H 分の d.d. ($J=4.8, 14.5\text{Hz}$)、3.08ppm に 1H 分の d.d. ($J=4.2, 14.5\text{Hz}$)、4.53ppm に 1H 分の d.d. ($J=4.28, 4.8\text{Hz}$) が観測され 5-Propylthiomethylhydantoin の構造を確認した。

実験方法

用いたマウスは川崎医療短期大学動物飼育室で繁殖させた C57BL マウスの 5 週齢の雄で体重 $20 \pm 3\text{g}$ ($n=5$) のものを用いた。投与においては生理食塩水、60mM L-Cysteine 生食溶液お

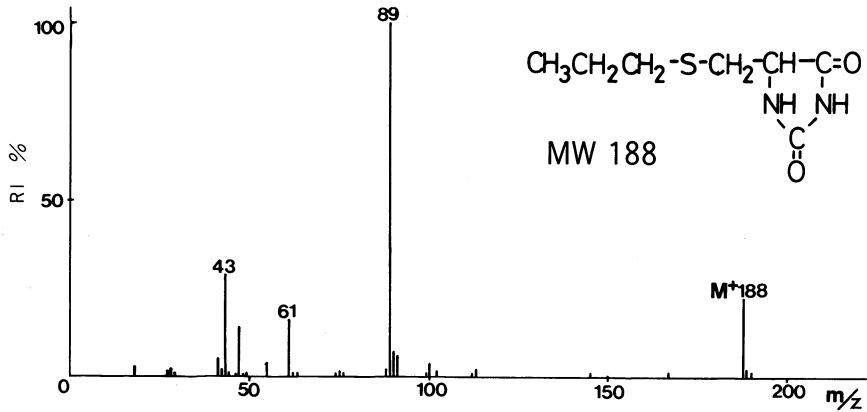


Fig.1 MS spectrum of 5-Propylthiomethylhydantoin

および 60mM 5-Propylthiomethylhydantoin 生食溶液を各々0.5mlづつマウス腹腔内に注射した。注射して30分後⁶⁰C₀によるγ線の全身照射を行った。照射後1日目, 7日目, 14日目, 21日目および28日目の計5回にわたり, 体重, ヘマトクリット値, 赤血球数および白血球数の経日変化を観測した。

観測はまず体重測定を行い, ついでマウスを固定し, 尾静脈をメスで切り浸出してくる血液をヘパリン処理したヘマトクリット用毛細管を用い採血した。この血液を用いヘマトクリット値, 赤血球数および白血球数の観測を行った。

ヘマトクリット値: 上記毛細管をヘマトクリット用高速遠心器で12,000r.p.m. 5分間遠心後計測板を用い%を読んだ。

赤血球数算定法: 100倍希釈用メランジュール, 希釈液としてはHayem液を用い希釈した。その後Bürker-Türk型計算板を用いて視算法で算定した。

白血球数算定法: 10倍希釈用メランジュール, 希釈液としてTürk液を用い希釈した。その後Bürker-Türk型計算板を用いて視算法で算定した。

結果および考察

γ線非照射群は非投与群, 生食投与群, L-Cysteine 投与群および5-Propylthiomethylhydantoin 投与群間において体重, ヘマトクリット値, 赤血球数および白血球数の変化に有意差は認められなかった。

(1) γ線照射後の体重変化 (図2)

γ線照射による影響は体重変化で見ると生食投与マウス群では5,6,7Gyと照射線量がふえるにともない体重増加が抑制されている。これと比較してL-Cysteine 投与マウス群および5-Propylthiomethylhydantoin 投与マウス群では5,6,7Gy照射のいずれの場合も体重増加は順調であった。

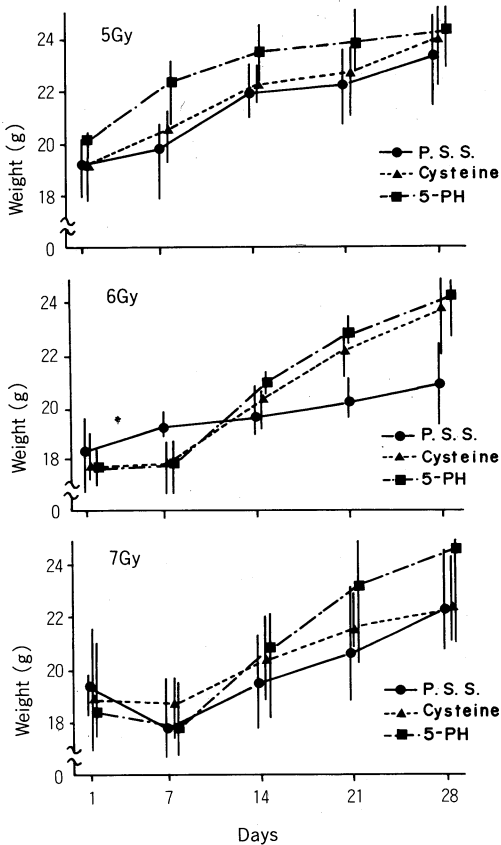


Fig. 2 The weight change of γ -irradiated Mice

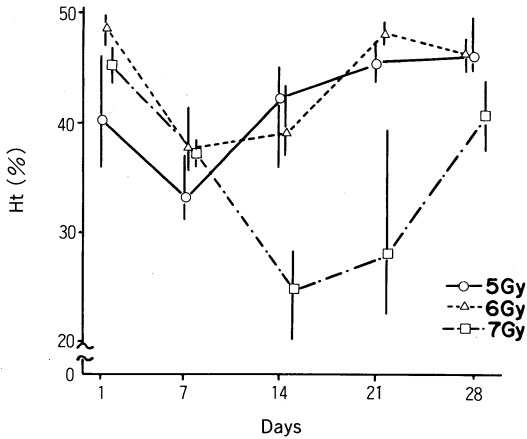
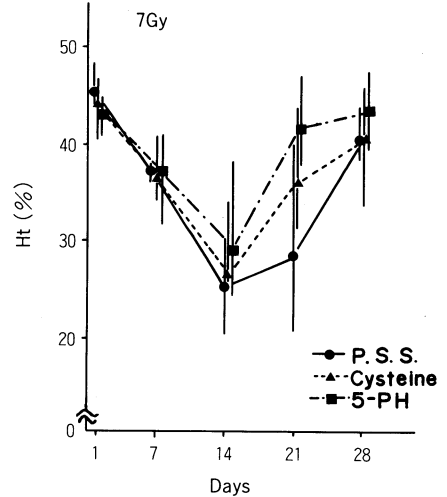
また、照射線量が5Gyの場合は生食、L-Cysteine および5-Propylthiomethylhydantoin 投与マウス群とも順調な増加を示しているが、6Gyの場合は生食投与マウス群は体重増加がL-Cysteine および5-Propylthiomethylhydantoin 投与マウス群に比べ抑制されている。これは5Gy照射では全身状態に大きな影響はないが、6Gy照射ではかなりおおきな障害を受けることを表わしている。さらにその障害はL-Cysteine および5-Propylthiomethylhydantoin 投与により軽減されること、つまり、L-Cysteine および5-Propylthiomethylhydantoin には放射線防護効果があることを示している。7Gy照射の場合もほぼ同様の傾向が確認できた。その放射線防護効果はL-Cysteine より5-Propylthiomethylhydantoin のほうが大きいことも確認できた。

(2) γ 線照射後のヘマトクリット値変化

通常50%前後あるヘマトクリット値は γ 線照射を行うことにより減少する。これは放射線による造血機能障害によるものであることはよく知られている。

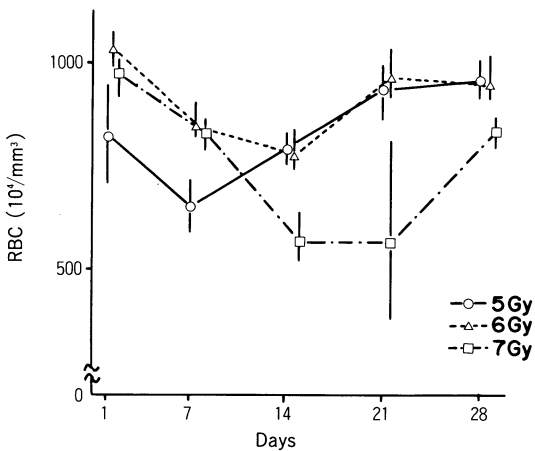
生食のみを投与したマウス群に γ 線照射を行いヘマトクリット値の経日変化を観測したのが図3である。これによると5,6Gy照射では7日目から14日目でヘマトクリット値が34~38%にまで減少しているが以後は回復し、28日目にはほぼ正常域まで回復してきた。しかし、7Gy照射では14日目まで減少傾向が続き、26%まで低下した。以後の回復も遅く28日目でも43%と正常域まで回復しない。そこでL-Cysteine および5-Propylthiomethylhydantoin の放射線障害に対する防護効果を検討するために7Gyを照射してヘマトクリット値の経日変化を観測することとした。

その結果、生食、L-Cysteine および5-Propylthiomethylhydantoin 投与のマウス群とも14日目が最低のヘマトクリット値を示した。しかし、14日目においてはわずかながら生食、L-Cysteine、5-Propylthiomethylhydantoin 投与マウス群の順でヘマトクリット値が高くなっている。また、21日目および28日目の回復期においては5-Propylthiomethylhydantoin 投与マウス群およびL-Cysteine 投与マウス群の回復が早かった。L-Cysteine と5-Propylthiomethyl-

Fig. 3 The Ht change of γ -irradiated MiceFig. 4 The Ht change of 7Gy γ -irradiated Mice

hydantoin を比較すると明らかに 5-Propylthiomethylhydantoin のほうが回復が早く、より大きな放射線防護効果があることがわかった。

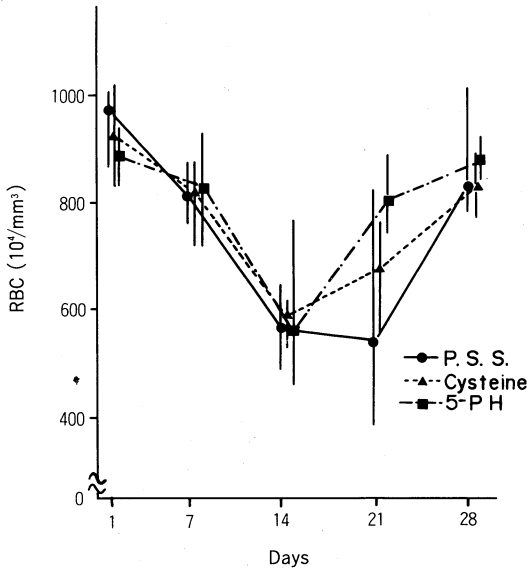
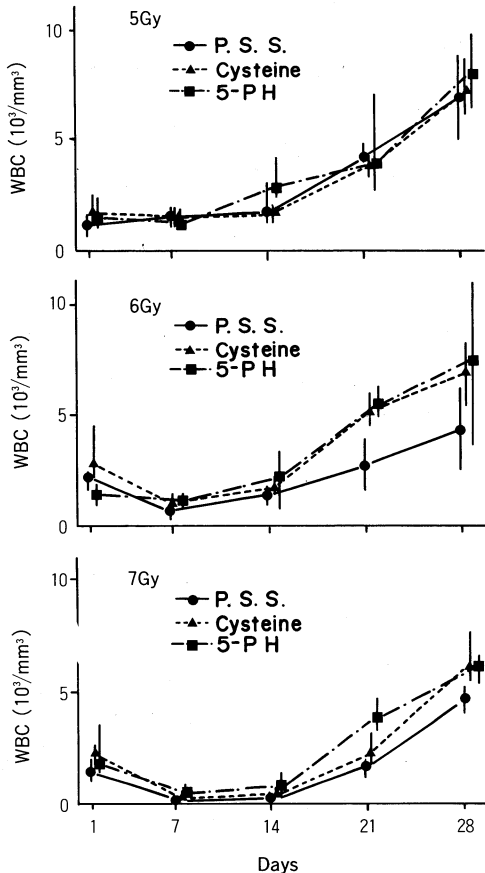
(3) γ 線照射後の赤血球数変化

Fig. 5 The RBC change of γ -irradiated Mice

急激に回復してきている。したがって、ヘマトクリット値の場合と同様 7Gy 照射後の赤血球数変化を観測することとした。

その結果、赤血球数が減少していく14日目までは生食、L-Cysteine および 5-Propylthiomethylhydantoin 投与マウス群間ではほとんど差異は認められなかった。21日目では L-Cysteine 投与マウス群はかなり回復してくる。その回復傾向は 5-Propylthiomethylhydantoin 投与マウス群のほうがさらに大きい。なお、28日目には生食、L-Cysteine および 5-Propylthiomethylhydantoin 投与マウス群とも正常な状態近くまで回復してきている。

今回用いたマウスの末梢血液中の赤血球数は通常 $9.4 \times 10^4 / \text{mm}^3$ で5週齢から9週齢の間大きな変化はない。しかし、 γ 線照射を行うと顕著な減少が見られる。生食投与マウス群において γ 線照射の放射線障害の程度を検討してみたところ 5Gy 照射においては7日目まで減少傾向があるが14日目からは増加し、回復する傾向を示した。6Gy 照射の場合は 5Gy の場合とほぼ同じ傾向を示した。7Gy 照射では 5,6Gy の場合とかなり異なり、21日目まで減少傾向、28日目には

Fig. 6 The RBC change of 7Gy γ -irradiated MiceFig. 7 The WBC change of γ -irradiated Mice(4) γ 線照射後の白血球数変化

末梢血中の白血球数は正常マウスでは $8.0 \times 10^3/\text{mm}^3$ 程度であるが γ 線照射後急激な減少が見られた。5, 6, 7Gy 照射の場合とも照射後1日目で正常の21~34%と大きな減少が観測された。5Gy 照射の場合は生食, L-Cysteine および 5-Propylthiomethylhydantoin 投与マウス群とも7日目から回復して行き28日目にはほぼ正常まで回復し, 各投与物質間に有意差は認められなかった。6Gy 照射では3群とも7日目まで若干の減少があり, 14日目以降回復している。しかし, 生食投与マウス群では28日目で $4.6 \times 10^3/\text{mm}^3$ と正常の58%程度までしか回復しない。L-Cysteine および 5-Propylthiomethylhydantoin 投与マウス群では各々 $7.0 \times 10^3/\text{mm}^3$, $7.7 \times 10^3/\text{mm}^3$ と正常の90%以上までの回復が認められた。

さらに, 7Gy 照射では7日目で生食投与マウス群で $0.1 \times 10^3/\text{mm}^3$, L-Cysteine 投与マウス群で $0.1 \times 10^3/\text{mm}^3$, 5-Propylthiomethylhydantoin 投与マウス群で $0.3 \times 10^3/\text{mm}^3$ と極端に低い値となった。その後の回復も遅れ28日目で生食投与マウス群で $4.8 \times 10^3/\text{mm}^3$, L-Cysteine 投与マウス群で $6.1 \times 10^3/\text{mm}^3$, 5-Propylthiomethylhydantoin 投与マウス群で $6.1 \times 10^3/\text{mm}^3$ となり, 生食で60%, L-Cysteine, 5-Propylthiomethylhydantoin で76%までしか回復しない。

しかし, L-Cysteine および 5-Propylthiomethylhydantoin 投与マウス群の回復は生食投与マウス群に比べ, わずかではあるが早いことがわかった。また,

L-Cysteine と 5-Propylthiomethylhydantoin を比較するとその効果は 5-Propylthiomethylhydantoin のほうが大きいことが判明した。

ま と め

放射線防護作用のある L-Cysteine および、それをもとに合成した 5-Propylthiomethylhydantoin をマウス腹腔内に投与し、その γ 線照射を行い経日的に体重、ヘマトクリット値、赤血球数および白血球数を観測した。その結果 5,6 および 7Gy 照射した場合とも L-Cysteine および 5-Propylthiomethylhydantoin とともに生食のみを投与したマウス群に比べ体重増加が速やかであった。また、L-Cysteine と 5-Propylthiomethylhydantoin を比較すると 5-Propylthiomethylhydantoin の方がわずかながら良好な体重増加が見られ、放射線防護効果がより大きいことを示した。

また、生食投与マウスでは、ヘマトクリット値においては、5,6Gy 照射と 7Gy 照射では、回復時期に大きな差がみられる。7Gy では体重増加は 14 日目までに起きているにもかかわらずヘマトクリット値は減少しており、増血機能の回復はかなり遅れていることを示した。7Gy 照射において比較してみると、正常への回復は生食、L-Cysteine、5-Propylthiomethylhydantoin の順で早くなっているが、14 日目まではほとんど変わらない。

さらに、白血球数においては照射後 1 日目でいずれの場合も極端な低下がみられ、放射線の影響を強く受けることがわかった。白血球数の場合も赤血球数の場合と同様、回復期において L-Cysteine、5-Propylthiomethylhydantoin の方が良好な回復を示すことがわかった。また L-Cysteine と 5-Propylthiomethylhydantoin を比較すれば 5-Propylthiomethylhydantoin 投与マウスの方が良好な回復をしめした。

以上のように、5-Propylthiomethylhydantoin は L-Cysteine 同様、 γ 線に対する防護効果を照射マウスの体重、ヘマトクリット値、赤血球数および白血球数の経日変化において示すことを確認した。さらに、L-Cysteine と 5-Propylthiomethylhydantoin の防護効果を比較すると体重、ヘマトクリット値、赤血球数および白血球数の場合のいずれでも 5-Propylthiomethylhydantoin の方が大きな効果を示すことが判明した。

謝 辞

この研究にあたり終始適切な御助言をいただいた北海道東海大学工学部生物工学科の西村弘行教授に深く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Patt. H. M., Tyree, E. B., Straube, R. L. and Smith, D. E.: Cystine protection against x-irradiation. Science, 110, 213-214, 1949.
- 2) Cronkite, E. P., Brecher, G. and Chapman, W. H.: Mechanism of protective action of glutathione against whole body irradiation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76, 396-398, 1951.

- 3) Dakin, H. D.: The catalytic racemization of optical active Hydantoin derivatives and of related substances as the result of tautomeric change. *Am. Chem. J.* 44, 48-51, 1910.
- 4) S. Tahara and Y. Obata: Studies of α -Alkyl-L-amino Acids. Part I Synthesis of S-Alkylmethyl-D, L-cysteines. *Arg. Biol. Chem.*, 35(1), 53-57, 1971.
- 5) 佐藤彰一, 西村明久, 下田健治, 小郷正則, 紺野勝信, 上田 智: 放射線防護および増感に関する研究 その1 S-Alkylcysteine およびその Hydantoin 誘導体の合成について 川崎医療短大紀要, 3, 1-6, 1983
- 6) Nishimura, A., Hashimoto, M., Konno, K., Ohta, Y., Tahara, S. and Nishimura, H.: Radioprotective and radiosensitizing effects of sulfur-containing amino acid derivatives on mice. *Z. Naturforsch.* 35C, 726-728, 1980
- 7) 西村明久: 大腸菌並びにマウスの γ 線照射に対する含硫アミノ酸誘導体の防護・増感効果に関する研究 岡山医学会雑誌, 98, 827-850, 1986
- 8) Nishimura, A. and Aono, K.: Radioprotective Effects of Thiomethyl Hydantoin Derivatives on the Survival of Irradiated E. Coli and Mice. *Acta Med. Okayama* 41(2), 1987.