

γ 線照射を受けたニルティラピア *Oreochromis niloticus* における HydroFerrate 液、MRN-100 の致死および造血組織損傷に対する防護効果

(受付日: 2012年9月14日、修正日: 2013年2月5日、受理日: 2013年3月5日)

2価および3価の鉄酸塩から得られる鉄系化合物である HydroFerrate 液 MRN-100 は強力な抗酸化化合物である。したがって、本研究では供試魚を用いて γ 線照射誘発性致死および造血組織への損傷に対する MRN-100 の防護効果を調べた。計 216 尾のニルティラピア (*Oreochromis niloticus*) を無作為に 4 群に分けた。第 1 群は対照群とし、放射線照射および MRN-100 投与は行わなかった。第 2 群には γ 線照射 (15 Gy) のみを行った。第 3 群および第 4 群には 1 mL/L または 3 mL/L のいずれかの用量の MRN-100 を含む水溶液による前処置を 1 週間行った後、MRN-100 投与を 27 日間継続しながら放射線照射を行った。放射線照射から 1 週間後および 4 週間後に、これらの異なる投与群について生存率を測定し、造血組織の生化学的分析および組織病理学的分析を行った。放射線への曝露により生存率が 27.7% へ低下したが、MRN-100 を投与した場合、生存率は 87.2% に維持された。さらに、 γ 線照射を 1 週間受けた供試魚では総白血球数および赤血球系に著明な減少が認められた。しかし、放射線照射を受けた供試魚に比較した場合、MRN-100 の投与により総白血球数および赤血球系の減少が防止された。さらに、放射線照射を受けた供試魚の肝臓、脾臓、鰓において著明な組織学的病変が認められた。しかし、MRN-100 を投与することによりさまざまな臓器が組織の病的変化から防護された。MRN-100 は供試魚における放射線防護剤であり、放射線曝露に関連する有害副作用の中和を目的としたアジュバント療法として有用な可能性があるかと判断する。

キーワード: HydroFerrate 液、放射線、生存率、ニルティラピア (*Oreochromis niloticus*)

序論

電離放射線が細胞巨大分子に対する酸化損傷や造血系の破壊など一連の有害副作用を引き起こす可能性があることはよく知られている[1-3]。こうしたことから電離放射線により生じるフリーラジカルの損傷作用を十分に予防または最小限に抑制できる効果的な放射線防護治療の発見に研究を向けてきた研究者もいる。

合成剤アミホスチンおよびエチオホス[4]や、数種類の栄養補助食品など、これまでにいくつかの製剤がなんらかの予防作用を示すことがわかっている。こういった製剤は放射線の副作用を緩和するのに役立つが、その合成化合物自体に若干の毒性のあることが示されている[4]。

アラビノキシラン米糠 (MGN-3/Biohbran) [5]、ゲニステイン[6]、ベルノキの葉 (*Aegle marmelos*) [7]、オタネニンジン (*Panax ginseng*) [8]、海藻類のエコール[9]など栄養剤の放射線防護的役割についても研究が行われている。さらに、過去の研究においてビタミン C やビタミン E のような抗酸化剤が有効な放射線防護剤として役立つ可能性があることが示されている[10-12]。2 価および 3 価の鉄酸塩から得られる鉄系化合物である MRN-100 (HydroFerrate 液) には、フリーラジカルの産生を阻止することによる酸化防止剤としての有効性が認められている[13]。したがって、供試魚のナイルティラピア (*Oreochromis niloticus*) を用いて、 γ 線照射に対する放射線防護剤として作用する MRN-100 の能力を調べることは特に興味深い。

われわれの研究において、また他者の研究においても、放射線が寿命および造血組織に及ぼす影響を調べるのに魚類は優れたモデルであることがわかっている。メダカ (*Oryzias latipes*) [14-16]、ミノカサゴ[17]、アトランティックサーモン[18]、ティラピア (*Tilapia mossambica*) [19] などさまざまな種類の魚類が使用されてきた。われわれが行った最近の研究では、高齢ラットに MRN-100 を毎日補給したところ、加齢による活性酸素種 (ROS) の回復が生じた[13]。さらに、*in vitro* にて MRN-100 によりリンパ球の H_2O_2 誘発性アポトーシスに対する防護作用が得られたことがわかった[20]。生きている細胞に対する電離放射線の有害作用は ROS の産生増加によってもたらされることが多いことから、 γ 線照射による致死および造血組織への損傷に対する MRN-100 の放射線防護効果を調べるため本研究を行った。

材料および方法

MRN-100

MRN-100 は Fe^{2+} 鉄および Fe^{3+} 鉄の濃度を約 2×10^{-12} mol/L とし、蒸留水で調製した。MRN-100 はファイトシンから生成されるが、ファイトシンは鉄分および中性脂肪化合物を含む植物抽出物であり、コメ、コムギ、ハツカダイコン種子に認められる。まず始めに、1 単位のファイトシンを 100 mL の蒸留水に分散させ、塩化第二鉄を $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ として添加する。分液漏斗を用いて液液抽出により脂肪化合物を除去する。残った液体を 5 番の濾過紙で濾過し、濾液を水浴で蒸発濃縮させる。MRN-100 を生成するため、得られた鉄化合物に対し 2 価鉄酸塩と 3 価鉄酸塩について分別定量を行う[13, 21]。簡潔に述べると、 α -フェナントロリン法を用いてサンプルの $Fe(II)$ の量を測定する。ヒドロキシルアミン-HCl 10% 溶液をサンプル液に添加し、事前に $Fe(III)$ を $Fe(II)$ に還元する。その後、すべての鉄酸塩の量を測定してから、 $Fe(III)$ の量を測定する。かくして、その結果、得られた鉄化合物は 2 価および 3 価の鉄酸塩であることがわかった。MRN-100 は株式会社エイ・シー・エム (日本) が提供した。

放射線照射のスケジュール

放射線照射は 4 mCi ^{137}Cs の γ 線源を用いて行った (マンスーラ大学放射線科、エジプト)。全身放射線照射では被照射物との距離を 27 cm、照射線量率を 200 R/分として、15 Gy の単回照射を行った。放射線照射中、2 L の古い水を入れた小型の長楕円形ガラス容器に各群を保管した。放射線照射直後、供試魚を大型の 200 L タンクに移し、実験終了まで毎日、水の 10% を交換した。放射線照射後 27 日間にわたり、供試魚の生存を朝夕毎日 2 回観察した。

ナイルティラピア (*Oreochromis niloticus*)

ナイルティラピア (*Oreochromis niloticus*, 6~8 週齢、体重: $\sim 50 \pm 15$ g、体長: $\sim 16.5 \pm 10$ cm) をティラピア専門の養殖場から購入し (Iman Farm、エジプト、カフル・アッシュアイフ)、実験前の 1 週間順応させた。供試魚をタンクに収容し (タンク当たり 54 尾)、各タンクには 200 L の古い脱塩素水道水を入れた。本研究で用いた 1 L あたりの供試魚数は別の発表研究の数と近似していた[22]。供試魚は実験期間中、野外に保管した。いずれの水槽の水も継続的に通気し、水温は $\sim 22 \pm 2^\circ C$ に維持した。供試魚には標準実験用浮き餌を 1 日 2 回与えた (午前 8 時と午後 1 時)。

実験期間中、溶存酸素 ($6 \sim 8$ mg/L)、pH (7.3~8.6)、 CO_2 (10 mg/L)、 NH_3 (0.02 mg/L)、アルカリ性 (150 mg/L)、硬度 (180 mg/L)、 NO_2 (0.01 mg/L)、 NO_3 (0.4 mg/L) など水のパラメータは一定に保った。

実験プロトコール

計 216 尾のナイルティラピア (*Oreochromis niloticus*) を 1 群 54 尾からなる 4 群 (第 1 群~第 4 群) に無作為に割り付けた。これらのうち、各群の 47 尾について、放射線照射後の生存率を毎日記録した (1 週間後、各群の 5~7 尾について血液学的検査および組織学的検査を行った。4 週間後、生存試験の最終日に各群の 5~7 尾についてフォローアップ血液学的検査を行った)。第 1 群は対照群とし、MRN-100 投与および放射線照射を行わなかった。第 2 群には全身 γ 線照射のみを行った。第 3 群と第 4 群にはそれぞれ、水 1 L あたり 1 mL、3 mL の MRN-100 を 1 週間投与した後、放射線照射を行う一方で、MRN-100 を 27 日間継続的に投与した。4 群で死亡した供試魚を 27 日間にわたって記録することにより、放射線照射および MRN-100 が供試魚の生存率に与える影響を調べた。その一方、 γ 線照射から 1 週間後および 4 週間後、生存している供試魚において生化学的・組織病理学的分析を行った。

Radioprotection by MRN-

サンプルの回収

生化学的検査において、放射線照射から1週間後および4週間後に各群から供試魚を5~7尾回収し、チョウジ油とアルコールの混合液で2~3分間処置した。各供試魚を清潔なタオルの上に置き、EDTAを含む注射器を用いて尾静脈から1~2 mLの血液を採取した。血液が凝固しないよう、試験管を十分に振とうし、血液分析に用いた。検査では白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数を調べた。血液分析は分析機器製造者が提供する手順書に従い実施した。さらに、各供試魚から採取した血液1 mLを放置して凝固させた後、分析機器製造者が提供する手順書に従い、遠心分離後、血清を回収し血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(SGPT)濃度を評価した。

組織病理学的分析

γ 線照射から1週間後、各群の肝臓、脾臓、鰓などさまざまな臓器において組織病理学的変化を調べた。臓器は10%ホルマリン溶液で固定、薄切した後、容器内で一晩固定した。パラフィン包埋組織をマイクロトームを用いて厚さ4 μ mに薄切し、ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色後、顕微鏡下で観察した。

統計解析

数値は各群の供試魚5~7尾の平均 \pm SD(標準偏差)として報告した。また、異なる条件下における供試魚の平均値の差の有意性について、一元配置分散分析とニューマン・クルス多重比較検定の併用により評価を行った。 $P < 0.05$ を有意とみなした。

結果

MRN-100投与の有無で放射線照射を受けた供試魚においていくつかのパラメータを調べた。これらのパラメータは生存率、血液学的検査、生化学的因子、組織病理学的検査であった。

生存率

MRN-100が γ 線照射の生存率に与える影響を図1に示す。第2群では γ 線照射により27日以内に72.3%が死亡した。一方、供試魚をMRN-100で前処置した場合(第3群で1 mL/L、第4群で3 mL/L)、供試魚の生存率に著明な改善が認められた。両群の供試魚において実験終了時に死亡していたのは12.8%のみであった。 γ 線照射群と γ 線照射+MRN-100投与群の間で4日目の死亡率に有意差が認められた($P < 0.02$)。対照群(第1群)とMRN-100投与群(第3群および第4群)の間に有意差は認められなかった。

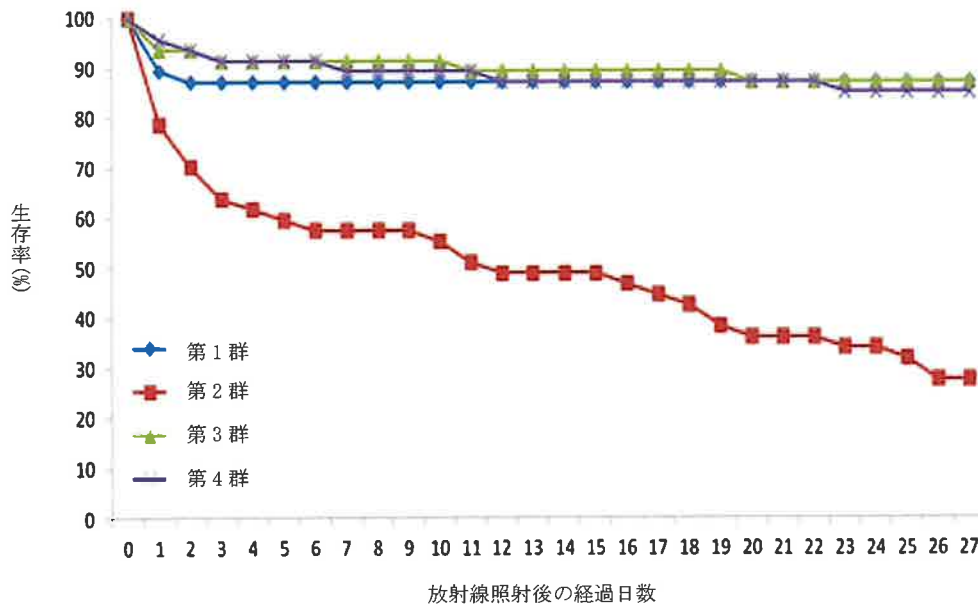


図1. MRN-100が γ 線照射を受けたニルティラピア (*Oreochromis niloticus*)の生存率に与える影響。供試魚を各群47尾からなる均等な4群に分けた(第1群~第4群)。放射線照射後27日間毎日、4群における供試魚の死亡を記録した。

血液学的検査

γ 線照射から 1 週間後および 4 週間後、MRN-100 投与の有無で供試魚の血液学的検査パラメータをいくつか調べた。

白血球数

図2に示すように、放射線照射のみを行った供試魚（第2群）において1週間後、白血球数の非常に有意な減少が認められた。その白血球数は $16 \times 10^3/\text{mm}^3$ であったのに対し、対照の第1群では $238 \times 10^3/\text{mm}^3$ であった ($P < 0.01$)。しかし、第3群と第4群のMRN-100による前処置群では白血球数がそれぞれ $256 \times 10^3/\text{mm}^3$ 、 $223 \times 10^3/\text{mm}^3$ に維持され、(93%) その変化は第1群と比較して有意ではなかった。4週間後、4群の白血球数に有意差は認められなかった。

赤血球系

放射線照射から 1 週間後および 4 週間後、放射線および MRN-100 投与が赤血球系に与える影響を調べた。調べたパラメータは赤血球数、HGB、HCT、MCV、MCH、MCHC であった。図 3 に示すように、1 週間後、放射線照射のみを行った群の供試魚（第 2 群）において、対照群と比較した場合、赤血球数、HGB 量、HCT 値、MCH 量、MCHC に有意な減少が認められた ($P < 0.01$ および $P < 0.05$)。一方、放射線照射前に MRN-100 投与を行った群（第 3 群および第 4 群）では、前記パラメータが防護され、その後、非処置対照群の水準内に入った（第 1 群）。第 2 群と第 3 群または第 2 群と第 4 群を比較した統計解析では、MCV を除くすべてのパラメータで有意な変化が認められた。4 週間後、4 群間でこれらの数値に有意差は認められなかった。

本研究では実験条件により、赤血球および HCT の数値が低くなった。いずれの実験も冬季に野外で実施した。

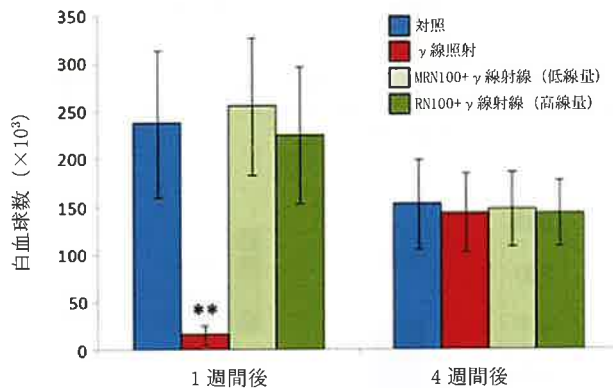


図 2. MRN-100 が γ 線照射を受けたニルティラピア (*Oreochromis niloticus*) の白血球数に与える影響。放射線照射から 1 週間後および 4 週間後に尾静脈から白血球を分離し計数した。データは非処置対照群と比較した各群の供試魚 5~7 尾の平均±SD を示す。** $P < 0.01$ 。

供試魚の血液学的検査パラメータに対する季節的影響については十分確立されている。これまでにさまざまな種類の魚類において、赤血球および HCT の数値が夏季よりも冬季で有意に低いことがいくつかの研究により示されている。これらの魚類にはニルティラピア (*O. niloticus*) [23]、タイ (*Sparus aurata*) [24]、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) [25]、シーバス (*Dicentrarchus labrax*) [26]などが含まれる。このような現象の原因は冷たい水ほど酸素の溶解度が高いこと、そして冬季には魚類の代謝が低下することにある[27]。温度に加え、光周期、水の化学的性質、産卵活動などその他の環境要因も、魚類の血液学的検査パラメータに対する季節的影響の寄与因子として考慮する必要がある。

血小板数

γ 線照射を受けた供試魚において、1 週間後、有意な変化は認められなかった。同様に、MRN-100 投与群でも対照群と比較して血小板数に変化は生じなかった。4 週間後にも同様な結果が認められた (図 4)。

生化学的分析 (肝機能)

図 5 に MRN-100 投与の有無で γ 線照射が血清 SGPT 値に与える影響に関するデータを示す。なお、検査は放射線照射から 1 週間後および 4 週間後に行った。 γ 線照射を受けた供試魚（第 2 群）において 1 週間後、対照群 (171.3 U/L) に比較し SGPT 値が 3.2 倍上昇した (397.8 U/L、 $P < 0.001$)。MRN-100 による前処置により用量依存性に SGPT 値が低下し、投与量 1 mL/L では 210.0 U/L となり、投与量 3 mL/L ではさらに 176.0 U/L まで低下した。4 週間後、4 群間に有意差は認められなかった。

組織病理学的分析

MRN-100 投与の有無で γ 線照射から 1 週間後に、供試魚のさまざまな組織において組織病理学的分析を行った。

肝臓

図 6 に対照群の供試魚から採取した肝臓部分内の脾臓組織を示す。酵素原顆粒が認められる。放射線曝露によって肝臓に劇的な変化が生じた。脾臓壊死、重度変性肝細胞、酵素原顆粒の消失など、いくつかの組織病理学的病変が認められた。供試魚を MRN-100 で前処置した場合（第 3 群）、組織病理学的病変は認められず、肝臓組織は対照群の供試魚のものと差がなかった。

脾臓

γ 線照射を受けた供試魚の脾臓において、メラニン色素の欠如、メラノマクロファージの増殖、空胞形成量の増加が認められた (図 7)。放射線照射に先立ち、供試魚に MRN-100 を投与した場合（第 3 群）、脾臓組織に組織病理学的病変は認められず、脾臓の性状は対照群のものと類似しており、メラニンの増加が認められた。

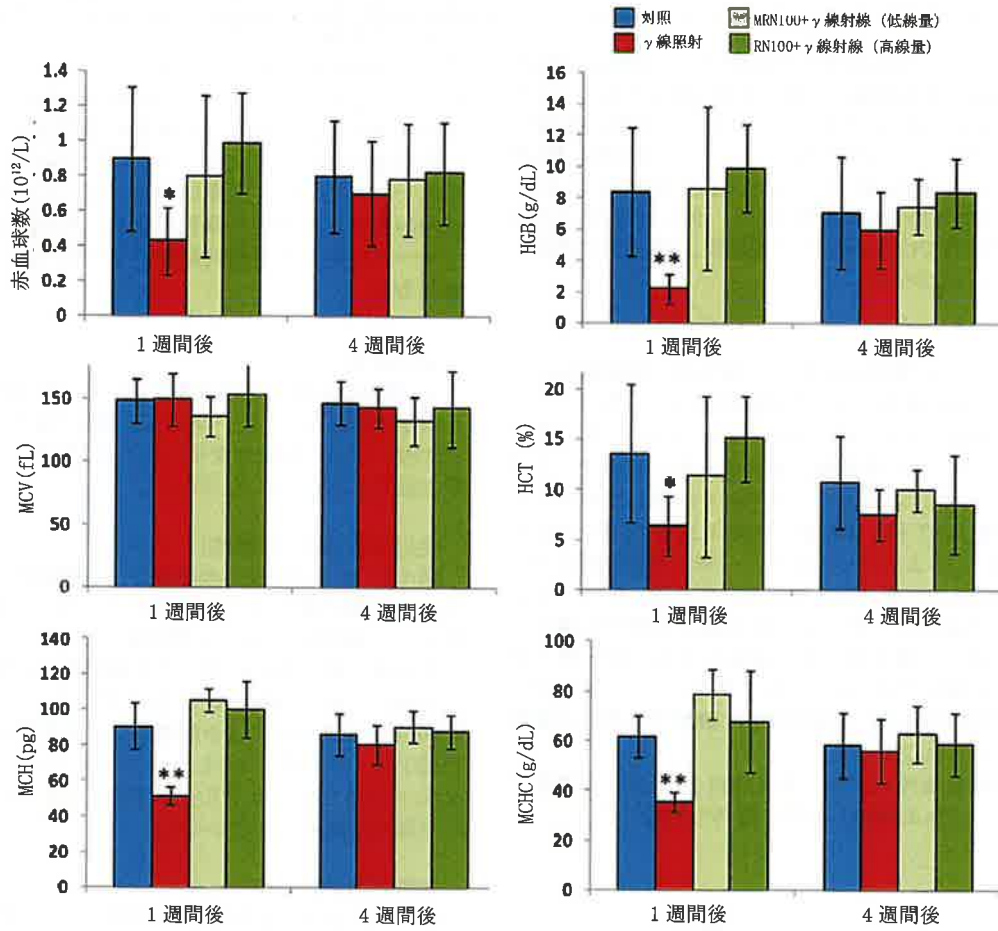


図 3. γ 線照射および MRN-100 投与を受けたニルティラピア (*Oreochromis niloticus*) の赤血球系に MRN-100 が与える影響。赤血球系には赤血球数、HGB、HCT、MCV、MCH、MCHC を含む。放射線照射から 1 週間後および 4 週間後にこれらのパラメータを調べた。データは非処置対照群と比較した各群の供試魚 5~7 尾の平均±SD を示す。* $P < 0.01$ 、** $P < 0.05$ 。

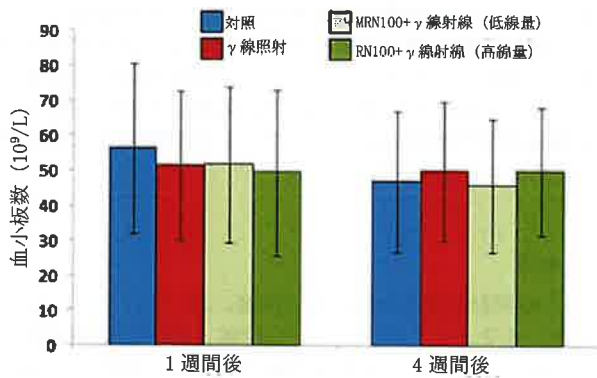


図 4. γ 線照射および MRN-100 投与を受けたニルティラピア (*Oreochromis niloticus*) の血小板数に MRN-100 が与える影響。血小板数の検査は放射線照射から 1 週間後および 4 週間後に行った。データは非処置対照群と比較した各群の供試魚 5~7 尾の平均±SD を示す。

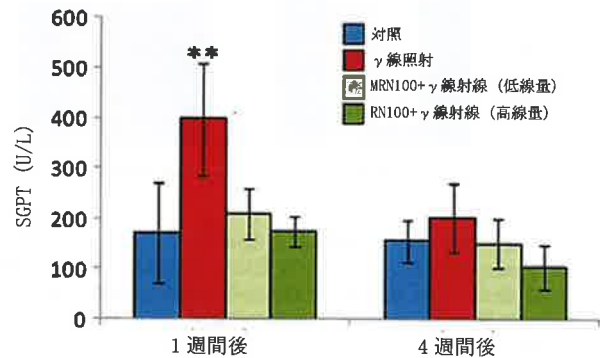


図 5. γ 線照射を受けたニルティラピア (*Oreochromis niloticus*) の SGPT 値に MRN-100 が与える影響。SGPT 値の検査は放射線照射から 1 週間後および 4 週間後に行った。データは各群の供試魚 5~7 尾の平均±SD を示す。第 2 群は非処置対照群と比較して統計的に有意であった。** $P < 0.001$

Radioprotection by MRN-

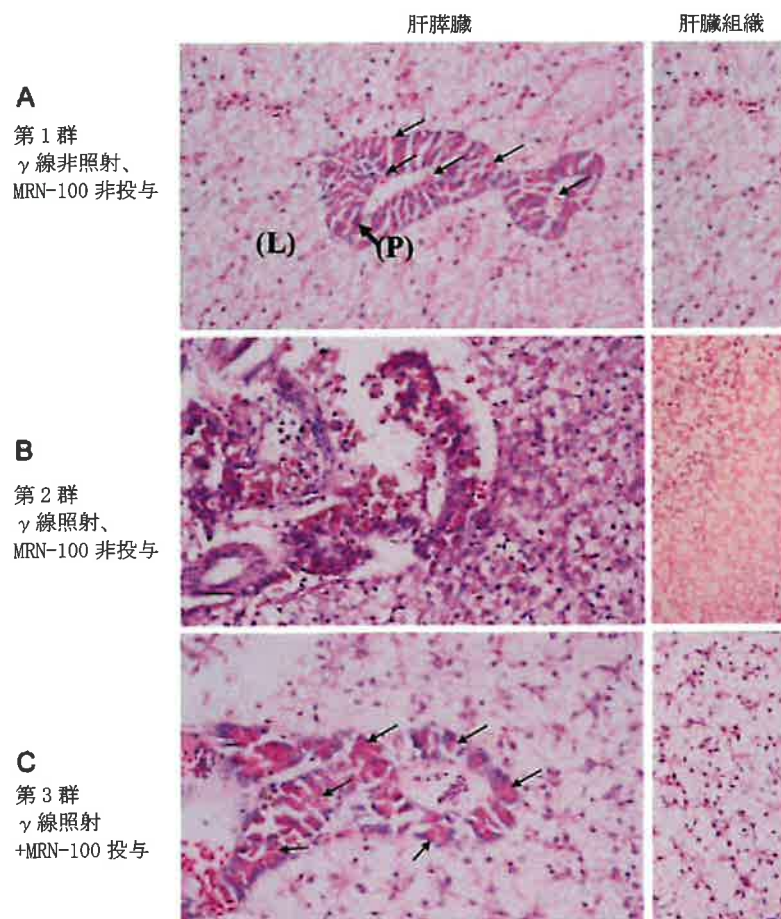


図6. 放射線照射から1週間後のナイルティラピア (*Oreochromis niloticus*) の肝膵臓組織切片

(A) 組織学的に正常な対照群の肝膵臓。肝臓 (L) は膵臓組織 (P) と解剖学的に結合している。酵素原顆粒の存在に注目する (矢印)。(B) 放射線照射を受けた肝膵臓では膵臓壊死の拡大および肝臓部分における重度変性肝細胞数の増加が認められる。(C) MRN-100 投与および放射線照射を受けた肝膵臓。膵臓および肝臓の組織は正常であり、酵素原顆粒 (矢印) が存在することに注目する。(40倍、HE染色)

鰓

鰓は一連の弓状組織から構成され、そこから鰓糸を放射状に出している（一次鰓弁）。図 8A に対照群の供試魚から採取した 2 本の鰓糸を示す。それらの側方で突出しているのは二次鰓弁である。鰓糸は重層扁平上皮組織で覆われていることに注目する。 γ 線照射のみを受けた供試魚の鰓において、軟骨支柱の肥厚や上皮組織の増殖など、いくつかの組織病理学的病変が認められた（図 8B）。

さらに、二次鰓弁は短縮したか、鰓糸の表面から完全に消失し、腫瘤を形成する鰓弁の融合も認められた。放射線照射に先立ち、供試魚に MRN-100 を投与した場合（第 3 群）、鰓および鰓糸に組織病理学的病変はなんら認められなかった。さらに、二次鰓弁の性状は正常であり、上皮組織の幅は対照群のものと同様であった（図 8C）。

考察

MRN-100 は γ 線照射による致死および造血組織への損傷に対するその防護能力によって実証されるように、放射線防護剤として使用できる可能性があることが本研究の結果から明らかになった。

Radioprotection by MRN-

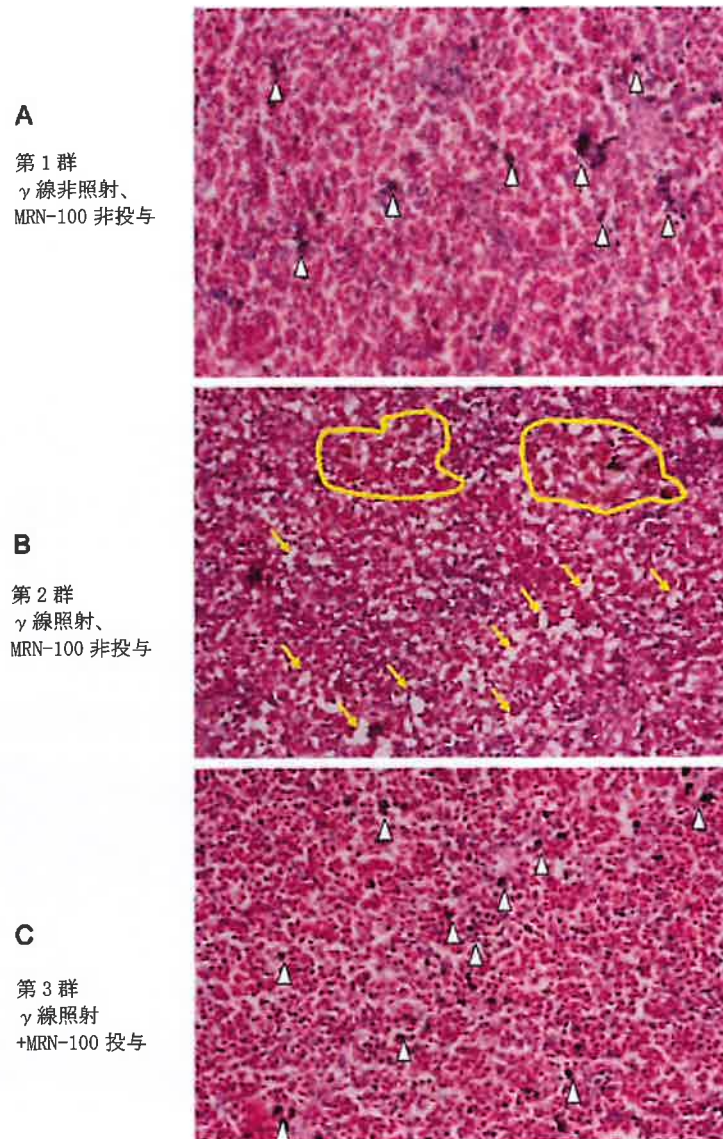


図7. 放射線照射から1週間後におけるニルティラピア (*Oreochromis niloticus*) の脾臓組織切片。(A) 対照群の脾臓は組織学的に正常であり、メラニン色素の存在が認められる(白の矢印)。(B) 放射線照射を受けた脾臓。メラニン色素の欠如、メラノマクロファージの増殖(黄で囲った円)、空胞形成量の増加(黄の矢印)に注目する。(C) MRN-100投与および放射線照射を受けた脾臓。濃いメラニン細胞に注目する(白の矢印)。(40倍、HE染色)

動物に電離放射線を照射することにより、急性放射線症候群として知られる一連の生理学的変化が生じ[28]、造血系への重度損傷により1 Gyを超える線量で死にいたる場合もある[5, 29]。電離放射線はROSの産生により酸化ストレスを誘発し、その結果細胞内で酸化促進物質と抗酸化物質の状態に不均衡をもたらすことがわかっている[30, 31]。 $\cdot O_2^-$ 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 、 $\cdot NO_2$ のようなROSは脂質過酸化反応、タンパク質修飾、DNA損傷、細胞死を誘発することにより、細胞損傷においてきわめて重要な役割を果たしている[3, 32]。

MRN-100が魚類を放射線誘発性死亡から防護する機序は完全には理解されていないものの、MRN-100が(i)強力な抗酸化剤として、また(ii)放射線損傷からの鰓防護剤として作用する能力に起因する可能性がある。抗酸化性に関して、われわれが過去に行った研究において、ラットにMRN-100を投与したところ、加齢によるROSの回復が認められた。MRN-100は脂質過酸化反応および血中フリーラジカル濃度の低下を伴うグルタチオン(GSH)濃度および抗酸化酵素の上昇に有効であることが証明されている[13]。

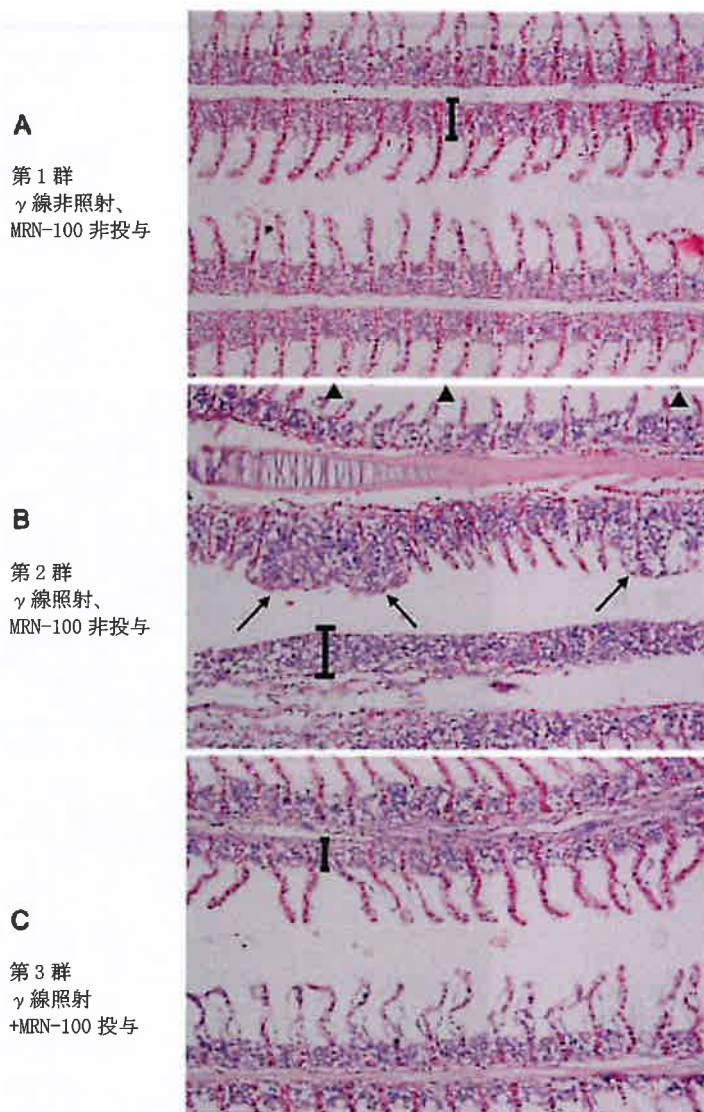


図8. 放射線照射から1週間後におけるナイルティラピア (*Oreochromis niloticus*) の鰓長軸切片

(A) 対照群の鰓糸および鰓弁。上皮組織の幅をカッコにより示す。(B) 放射線照射を受けた鰓糸。軟骨支柱の厚みの増加に注目する。上皮組織の増殖をカッコにより示す。下の鰓糸で認められるように二次鰓弁は短縮したか(矢印)、鰓糸の表面から完全に消失した。腫瘤を形成する鰓弁の融合にも注目する(矢印)。(C) MRN-100 投与および放射線照射を受けた鰓糸の性状は正常であり、上皮組織の増殖は認められない。(40倍、HE染色)

この知見は、放射線照射を受けたマウスにおける生存率上昇との関連が認められたビタミン C やビタミン E など他の抗酸化剤に関する研究に一致している[10-12]。さらに、 γ 線照射を受けた供試魚における死亡率上昇は鰓への著しい損傷が原因となった可能性がある。そういった損傷は鰓糸および二次鰓弁の大規模な破壊などであり、これによって全身への酸素供給が大幅に低下する。一方、放射線照射に先立ち、MRN-100 を投与することにより、鰓、鰓糸、二次鰓弁における組織病理学的病変が認められなくなった。

これは MRN-100 投与により鰓が放射線照射による損傷から防護されたことを示すものであった。

造血系に対する損傷は急性放射線症候群に続き、死亡の重要な要因である[29]。われわれの研究や他の研究でも、魚類および哺乳類において、放射線照射後の数日間に造血組織の萎縮、白血球数の減少、免疫機能不全が認められた[5, 14, 15, 33-35]。

Radioprotection by MRN-

本研究において、1週間にわたり γ 線照射を受けた供試魚で総白血球数の著明な減少が認められた。MRN-100がその防護作用を発揮する機序はリンパ球における酸化ストレスを緩和する能力に起因する可能性がある。MRN-100は抗アポトーシス分子 Bcl-2 の H_2O_2 誘発性ダウンレギュレーションを抑制し、アポトーシス促進分子 Bax をアップレギュレーションすることにより、アポトーシス H_2O_2 誘発性シグナル伝達経路を阻害する[20]。さらに、MRN-100の経口投与によりナチュラルキラー（NK）細胞の活性が著しく増強される[36-38]。このような生来の免疫細胞はウイルスに感染した細胞や癌細胞を破壊することができる[39, 40]。この特性はMRN-100投与が放射線誘発性免疫機能不全に対する防護となりえることを示唆している。さらに、MRN-100は放射線により誘発される脾臓のメラニン色素破壊から供試魚を防護した。メラニン色素が疾患や組織損傷に対する防御機序に関与している可能性もあることから、これは特に興味深い[41]。本研究の結果はMRN-100の投与により白血球およびメラニン色素が防護されることを示している。

急性放射線症候群の患者では貧血が認められることが多く、その結果、赤血球数および赤血球パラメータが減少する[42, 43]。本研究のデータは放射線照射により赤血球数、HGB、HCT、MCH、MCHCが著明に減少し、脾臓組織に組織病理学的病変が形成されることを示している。しかし、放射線照射に先立ち、MRN-100を投与した供試魚では、放射線により誘発される赤血球系パラメータへのダメージが阻止され、脾臓組織の組織病理学的病変の発生が予防された。このMRN-100の作用の根底にある機序については完全に理解されていないが、細胞中の遊離鉄濃度を調節すると考えられている[13]。

鉄は電子の容易な受け渡しが可能であることから、多くの酸素運搬タンパク質および酵素の重要な触媒部位である。この特性により鉄はシトクロムおよび酸素結合分子の有用な成分となっている。鉄欠乏などの栄養失調は酸化ストレスを引き起こすことがわかっており[44, 45]、酸化ストレスに対する鉄の防御能について報告がなされている[46]。鉄はハーバー・ワイス反応とフェントン反応において、フリーラジカルと相互作用し、高反応性ヒドロキシラジカルと炭素中心ラジカルを産生することが知られている[47]。MRN-100は鉄結合化合物のフェリチンおよびトランスフェリンのタンパク質濃度上昇を刺激することにより、フェントン反応に過剰な鉄が関わるのを阻害することによってその効果を発揮する。主要な細胞鉄貯蔵タンパク質であるフェリチン内に捕捉された鉄は、その状態になれば産生するであろう反応性ラジカルを産生しない。同様に、トランスフェリンには鉄を分離し、血流を介して運搬する役割がある[48]。MRN-100投与後のトランスフェリンおよびフェリチンのタンパク質濃度上昇によって、遊離鉄濃度が低下し、それゆえ、タンパク質の金属触媒酸化の主要生産物であるタンパク質カルボニル基のような反応性ラジカルの蓄積が妨げられることがわかっている[13]。さらに、放射線照射を受けたラットではフリーラジカルが放出されることもわかっている[49, 50]。

放射線照射を受けた哺乳類におけるMRN-100の防護作用に関する直接的な研究はこれまで行われていないが、高齢ラットを用いたわれわれの最近の研究では、MRN-100が抗酸化作用を有することがわかっている[13]。このことは放射線照射を受けたラットにおいて、MRN-100がフリーラジカルを除去することにより防護作用を発揮する可能性があることを示唆しており、放射線照射を受けた魚類においてMRN-100が赤血球系および脾臓組織を防護する能力の理由となりえる。

魚類の肝臓は解剖学的に脾臓と結合しており、肝脾臓と呼ばれる単一の臓器を形成している。肝脾臓は魚類において酸化ストレスを誘発する放射線[51]および汚染物質に関する研究の主要な標的組織である。化学汚染物質への曝露により引き起こされる酸化ストレスについてはさまざまな種類の魚類において十分立証されている。銅[52]や1-メチル-3-オクチルイミダゾリウムブロミド[53]のような数種類の汚染物質は肝脾臓においてROSの産生を招く。放射線に曝露すると、同様にROSの産生が増加することから、造血組織の損傷が生じる[54-56]。したがって、肝脾臓に対する放射線の損傷作用を調べることは特に興味深いと考えた。本研究の結果は放射線に曝露することにより、脾臓壊死、重度変性肝細胞、酵素原顆粒の消失など肝脾臓に劇的な変化が生じることを示している。さらに、放射線照射を受けた供試魚ではSGPT濃度の上昇が認められたが、これは放射線照射によって肝酵素濃度が上昇することを示す他の研究に一致するものである[57-61]。しかし、放射線照射前にMRN-100を投与することにより、SGPT濃度が著明に低下し、肝脾臓組織に組織病理学的病変は認められなかった。同様に、高齢ラットにMRN-100を投与したところ、若年ラット肝臓よりも酸化損傷が多い高齢ラット肝臓にGSH、総チオール量、抗酸化酵素の著明な増加が認められるとともに、脂質過酸化反応、バイオマーカーマロンジアルデヒド、一酸化窒素、タンパク質カルボニル基の著明な阻害も認められた[13]。これらの知見によって、造血組織への放射線誘発性損傷に対するMRN-100の防護作用を説明することができる。

放射線防護剤の安全性は重大な懸念である。MRN-100の生体安全性については、ラットを用いた40日間の投与により研究が行われたが、ラットの行動、体重、生存率に識別可能な変化は認められなかった[13]。さらに、過去の研究において、健常被験者と癌患者に最高12ヶ月間、MRN-100を経口投与したところ、NK細胞活性のような免疫機能の増強が認められたことが示されている[36-38]。

われわれの結論は、MRN-100は供試魚を放射線誘発性致死および放射線誘発性造血組織損傷から防護することにより、放射線防護剤として作用するということである。MRN-100は放射線療法に関連する重度の有害副作用を相殺する有用なアジュバントとして安全な製剤であることを本研究は示している。

M. Ghoneum *et*

J Rad Res
Int J Rad Biology

**γ 線被照射魚 *Tilapia Nilotica* の生存と造血細胞回復における
HydroFerrate 液 MRN-100 の防護作用**

Mamdooh Ghoneum[1], Heba Allah Elbaghdady[2], Abdallah El-Shebly[3], Deyu Pan[4]

チャールズ・ドリュー医科大学耳鼻咽喉科[1]・内科[4] (米国カリフォルニア州ロサンジェルス)
マンスーラ大学理学部動物学科[2] (エジプト 35516、マンスーラ)
(エジプト) 国立海洋漁業研究所[3] (エジプト、アレキサンドリア)

連絡先 : Mamdooh Ghoneum, Ph.D., Charles Drew University of Medicine and Science,
Department of Otolaryngology, 1621 E. 120th Street, Los Angeles, California 90059,
U.S.A. 電話 : (323) 563-5953 ファクシミリ : (310) 474-6724.
E メールアドレス : mghoneum@ucla.edu

抄 録

HydroFerrate 液 MRN-100 は強力な抗酸化化合物で、酸素フリーラジカルおよび過酸化物の除去に有効であると報告されている。本研究は γ 線照射が魚類の血液細胞にもたらす致死性と損傷に対する MRN-100 の防護作用を調べる目的で実施した。224 尾の *Tilapia Nilotica* を、それぞれが 60 尾から構成される 4 つの群にランダム割付した。1 番目の群を対照（照射なし、MRN-100 による処置なし）とし、残りの 3 群は 1.5KR (15Gy) の単回照射による全身 γ 線曝露に付した。その内 2 群は、1 週間にわたり水 1L 当たり 1ml と 3ml の用量にて MRN-100 による前処置を施した後に放射線照射を行い、引き続き 30 日間 MRN-100 による処置を継続した。試験の結果は MRN-100 による処置が、試験魚の生存率を 3.3 倍高めることを示した。放射線照射のみを受けた試験魚の生存率は 26.1%であったのに対し、MRN-100 による処置を受けて放射線を照射された試験魚の生存率は 87.2%であった。 γ 線照射群と γ 線照射+MRN-100 処置群との間の差は 4 日目から有意となった ($p<0.02$)。2)放射線照射は白血球総数 (WBC) の減少 ($p<0.001$) と、総 RBC 系、すなわちヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) を含め、赤血球総数 (RBC) の減少 ($p<0.05$) をもたらした。MRN-100 による処置は WBC 数と RBC 系を、非処置対照群の水準まで完全に回復させ、3)MRN-100 による処置は、放射線照射による血清グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミノアーゼ (SGOT) 増加を相殺した ($p<0.05$)。MRN-100 による処置を受けた試験魚の SGOT 濃度は、非処置対照群の水準にもどった。われわれは MRN-100 が魚類において、 γ 線照射と関連した死亡率および γ 線誘導骨髄抑制に対し、放射線防護作用を持つと結論した。このことは MRN-100 が、放射線療法と関連した重度有害副作用に対抗する補助療法として利用できる可能性を示唆している。

キーワード： HydroFerrate 液、放射線、ROS、生存、WBC、RBC 系

ランニングタイトル： 放射線防護剤としての MRN-100

実験的研究

緒言

電離放射線が細胞のマクロ分子に対する酸化損傷 (Karbownik and Reiter 2000, Karran 2000, Kalpana et al 2011) や造血系の活動停止 (Uma Dev 2003, Fliedner and Graessle 2008) を含め、一連の有害な副作用をもたらすことはよく知られている。従って多くの研究が、放射線症候群の発生を成功裏に防止し、放射エネルギーと物質との間の相互作用の結果として生じるフリーラジカルから細胞や組織を防護する有効な放射線防護法の発見を目指している。数件の研究にて、放射線の副作用を減らす放射線防護剤として作用する複数の薬剤の発見が試みられている。その中にはアミフォスチンやエチオフォスなどの化学合成剤が含まれるが、それらは高い毒性を持ち、重篤な副作用をもたらす場合がある (Weiss 1997)。また食事に含まれる物質の役割も、放射線防護剤としての研究の焦点となっている。ゲニステイン (Landauer et al 2003)、バエルの葉 (*Aegle marmelos*) (Jagetia et al 2004)、オタネニンジン (Kim et al 2007)、および海藻由来のエクコール (Park et al 2008) を含め、多くの物質がこの目的で研究された。ただし植物は化合物の複雑な混合物であり、観察された作用をもたらす活性成分の特定が強く求められている。ホルモンの放射線防護物質としての使用に関し、われわれや他の研究者が調査した結果、ホルモンがさまざまな組織の損傷に対し放射線防護を提供することが示された。例としてはチロキシンを使用した治療による甲状腺の防護 (van Santen et al 2003)、酢酸メドロキシプロゲステロン+テストステロンによる生殖系の防護 (Jégou et al 1991)、エストロゲン治療による白内障発生の抑制 (Dymlacht et al 2008)、エストロン治療による放射線誘導性死亡の抑制 (Ghoneum et al 1987) が挙げられる。さらに抗酸化物質が有効な放射線防護剤となり得ることを示す有望な結果も得られている (Bichay and Roy 1986, Srinivasan and Weiss 1992, Sarma and Kesavan 1993, Satyamitra et al 2001)。MRN-100 は 2 価および 3 価の鉄酸塩から導かれた鉄系化合物の hydroferrate 液で、フリーラジカルの形成を防止することで抗酸化物質としての有効性を示しているため (Badr El-Din et al, 2010)、われわれは魚類の *Tilapia Nilotica* にて、 γ 線照射に対する放射線防護剤としての MRN-100 の能力を調べることに特に興味を持った。

MRN-100 は 2 価および 3 価の鉄酸塩からなる鉄系化合物である。われわれの最近の研究では、高齢ラットへの MRN-100 の毎日の投与が、加齢誘導性活性酸素種 (ROS) への対処となることが示された。MRN-100 による処置はグルタチオン (GSH) と、SOD、CAT、GPx の抗酸化酵素の有意な濃度上昇をもたらした。さらに高齢ラットにおける MRN-100 による処置後に、一酸化窒素 (NO) と血中フリーラジカル総濃度の抑制が観察されている (Badr El-Din et al, 2010)。また MRN-100 は、in vitro にて H₂O₂ が誘導するリンパ球アポトーシスに対する防護作用を持つ (Ghoneum et al, 2009)。生体細胞に対する電離放

射線の有害作用は多くの場合、ROS 産生の増加が媒介しているため (Karbownik and Reiter 2000、Karran 2000、Kalpana et al 2011)、本研究は魚類のナイルティラピア (*Oreochromis niloticus*)における血液細胞への γ 線照射の致死性および損傷に対する MRN-100 の防護作用を調べる目的で実施した。

われわれの研究および他者の研究にて、魚類が寿命のメカニズム研究に優れたモデルであることが示されている。 γ 線の急性照射が魚類 (*Oryzias Latipes*) の寿命を短縮することは既知で (Egami and Etoh 1973、1967、Etoh and Egami 1967、Ghoneum et al 1988)、また *Oryzias Latipes* の胸腺の形態、容量、および分裂指数に影響を与えることも知られている (Ghoneum et al 1979、1981、1983、Ghoneum and Egami 1980、Egami and Ghoneum 1982)。放射線の影響はゼブラフィッシュ (Simon et al, 2011) やアトランティックサーモン (Arts et al, 2010) など他の魚種でも研究されている。

材料および方法

MRN-100

MRN-100 は蒸留水 (DW) を使用して Fe^{2+} および Fe^{3+} イオンの濃度が約 2×10^{-12} mol/l となるように準備した。水道水において、第二鉄の形で存在する鉄分の濃度は一般的に 0 から 0.03 mg/l (0.54×10^{-7} mol/l)の間である。MRN-100 はファイトシンに由来するが、ファイトシンは鉄分および中性脂肪成分を含む植物抽出液で米、小麦、ダイコン種子に含まれる。ファイトシンを蒸留水中に分散する際、塩化第二鉄を加え、脂肪成分を除去し、得られた鉄成分は 2 価鉄塩と 3 価鉄塩に関し分別定量に付して MRN-100 を作成する (Ghoneum and Shaheen 2010、Badr El-Din et al 2010)。MRN-100 は株式会社エイ・シー・エムが提供した。

照射スケジュール

照射は温度調節された室内にて、約 4-MCi ^{137}Cs の γ 線源 (マンスーラ大学病院放射線科) を使用して実施した。全身照射に適用した放射線は 1.5 KR (15 Gy) の 1 回照射で、標的距離 27 cm、照射速度 200 r/min とした。照射中の各群は、汲み置き水道水 2 リットルを含む小さな長方形のガラス容器 (サイズ) 内に留めた。照射直後に試験魚を大型の 200 リットル水槽に移し、実験終了まで水の 10% を毎日交換した。照射後 30 日間、試験魚の生存につき毎日 2 回、朝と夜にモニターした。

Tilapia Nilotica

本研究ではナイルティラピア *Tilapia Nilotica* (6~8 週齢、体重~50±15 gm、体長 16.5±10 cm) を使用した。試験魚はティラピアを専門とする養魚場 (Iman Farm、エジプト・カブルアッシャイク) から購入した。本研究で使用した試験魚の総数は 240 尾であった。試験魚は無作為に分けて 4 つの水槽に入れた (各水槽に 60 尾)。水槽には塩素を除去した汲み置き水道水をそれぞれ 600 リットル入れ、MRN-100 の添加後、水を 200 リットルに減らした。試験期間を通じて試験魚は室内に置き、すべての水槽の水は連続的にエアレーションを行い、温度は約~22±2°C に保った。試験魚には標準的な研究室用浮餌を 1 日 2 回 (午前 8 時と午後 1 時に) 与えた (www.sidpec.com)。試験魚は実験に先立ち 1 週間馴化した。

実験プロトコル

試験魚 240 尾を 60 尾ずつから構成される均等な 4 群 (G1~G4) に分けた。G1 は対照とし、汲み置きして塩素を取り除いた汲み置き水道水のみを与え、MRN-100 も放射線も与えなかった。G2 は γ 線の単回照射のみ行い、MRN-100 による処置は施さなかった。G3 と G4 は放射線への曝露に先立つ 1 週間にわたり、MRN-100 の異なる用量 (それぞれ水 1L 当たり 1 ml および 3 ml) にて処置し、30 日間の期間を通じて MRN-100 による処置を継続した。4 群にて死亡した試験魚につき、1 ヶ月間にわたって毎日記録をとった。

サンプル採取

γ 線への曝露から 1 週間後、各群から 5~7 尾の試験魚を回収し、2~3 分間クローブを与えて麻酔をした。それぞれの試験魚を清潔なタオルの上に載せ、抗凝固溶液 500 μ L を入れた新しい注射器を使用し、血液 1~2 ml を尾静脈から採取した。血液サンプルは、3.8%クエン酸三ナトリウムを 100ml の蒸留水に加えた抗凝固剤溶液入りの消毒した試験管に注いだ。試験管をよく振って試験管の角における血液凝固を防いだ。血液サンプルは自動血液分析装置 (Auto Lab.) にて分析を行い、次の血液パラメーターを推定した：白血球 (WBC) 数、赤血球 (RBC) 数、ヘモグロビン量 (HGB)、ヘマトクリット値 (PCV)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)、血小板数 (PLC)。さらに血液 1ml を残して凝固させ、遠心分離で血清を採取し、アラニンアミノトランスフェラーゼ、血清総タンパク、血清総ビリルビン、血中尿素窒素、およびクレアチニンの生化学パラメーターにつき、各キットのメーカーが指定した方法に従い評価を実施した。

統計解析

測定値は各群の試験魚 5~7 尾の平均±std (標準偏差) として報告し、異なる処置条件から得た試験魚の平均値の差の有意性は、Newman-Keuls 多重比較検定と組み合わせた一元配置分散分析 (ANOVA) によって判定した。p<0.05 の値を有意とした。

結 果

1. 試験魚の生存率に対する MRN-100 の影響

γ線全身照射後の生存率に対する MRN-100 の放射線防護作用を図 1 に示した。γ線照射群 G2 では 30 日以内に 73.9 (74) %の試験魚が死亡した。一方、MRN-100 による前処置 (G3 および G4、それぞれ水 1 L 当たり 1ml および 3ml) は試験魚の生存率改善をもたらし、30 日の期間終了時まで死亡したのは 12.8 (13) %の試験魚のみであった。γ線照射群と γ線照射+MRN-100 群との間の差は 4 日目から有意となった ($p < 0.02$)。γ線照射+MRN-100 群の生存率は、非処置対照群 G1 の値の範囲内であった。

2. 血液検査

試験魚の γ線への曝露から 1 週間後に数種類の血液学的パラメーターを調べた。

2.1 白血球 (WBC) 数

図 2 のデータは、γ線への曝露が WBC 数の高度に有意な減少をもたらすことを示している。(G2 16×10^3 対 G1 238×10^3) は対照群との比較で 93.3%の WBC 数減少を示す ($p < 0.0001$)。MRN-100 による前処置を G3 および G4 に施すと、WBC 数をそれぞれ 256×10^3 および 223×10^3 に回復することができた。これらの水準は対照群の値と同等で、G3 と G1 との間、および G4 と G1 との間の p 値は有意でなかった。

2.2 赤血球 (RBC) 系検査

γ線照射が次の項目を含む RBC 系にもたらす損傷に対する MRN-100 の防護作用を調べた：RBC 数、HGB、PCV、MCH、および MCHC。図 1 は放射線照射と MRN-100 による処置後における RBC 数の結果をまとめたものである。放射線照射への曝露は RBC 数の有意な減少をもたらした。対照群 G1 (0.37×10^6) に対し G2 は 0.19×10^6 であった ($p < 0.05$)。MRN-100 による前処置は RBC 数を、対照群の値の範囲内まで回復させることができた (G3 および G4 はそれぞれ 0.44×10^6 および 0.44×10^6)。放射線照射群 G2 も対照群と比較して HGB 量、PCV 値、MCH 量、MCHC の有意な低下を示した ($p < 0.05$)。MRN-100 による前処置はそれらの値を、非処置対照群の試験魚における値の範囲内まで回復させることができた。一方、平均赤血球容積 (MCV) に関しては、放射線への曝露や MRN-100 による処置による有意な変化は観察されなかった (表 1)。

2.3 血小板数 (PLT)

γ線照射を受けた試験魚は血小板数 (PLT) の有意な変化を示さなかった。同様に MRN-100 による処置は血小板数に変化をもたらさなかった。

3.肝機能

図 4 は MRN-100 の存在／不在下における γ 線照射が、血清グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (SGOT) に与える影響に関するデータを示す。 γ 線を照射した試験魚は SGOT 値の有意な上昇を示し (G2 416.3 対 G1 107.5)、対照に対し 4 倍の低下 (上昇?) を示した ($p < 0.001$)。MRN-100 による前処置は SGOT の用量依存的な低下をもたらし、1ml/L で 205.7、さらに 3ml/L では 125.8 まで低下した。

考 察

本研究の結果は MRN-100 が、 γ 線照射を受けた試験魚の生存率を回復させ、血液細胞の放射線抵抗性を増強できる能力によって示されるように、放射線防護剤として使用できる可能性を持つことを明らかにした。動物における電離放射線への曝露は、急性放射線症候群として知られる一連の生理学的変化をもたらす (Anno et al 2003)、それが 100 ラド (1 グレイ) を超えると造血系への重度損傷によって死亡をもたらす可能性がある (Casarett 1968)。白血球減少、貧血、および血小板減少が急性放射線症候群の典型的な兆候である。本研究では試験魚に対し、1.5KR (15Gy) の単回照射にて全身 γ 線照射を施したが、同照射は 1 ヶ月後の試験魚の生存率を有意に低下させた。一方、MRN-100 による処置は照射を受けた試験魚の生存率を 3.3 倍上昇させた。電離放射線は酸化ストレスを誘発することが知られているが、それは活性酸素種 (ROS) の発生により、細胞内の酸化促進物質と抗酸化物質の状態に不均衡をもたらされるからである (Karran 2000、Bhosle et al. 2005)。 $\cdot O_2^-$ 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ and $\cdot NO_2$ などの ROS は、脂質過酸化、タンパク質修飾、DNA 損傷、および細胞死の誘導により、細胞損傷における重要な役割を果たす (Karbownik and Reiter 2000、Lee et al. 2005、Kalpana et al 2011)。また放射線防護物質としての抗酸化剤の役割は、マウスにおける放射線曝露後の生存率上昇によって示されている (Bichay and Roy 1986、Srinivasan and Weiss 1992、Sarma and Kesavan 1993、Satyamitra et al 2001)。同様に、MRN-100 は加齢誘導性 ROS に対処できる強力な抗酸化化合物であることが示されている。高齢ラットの臓器調査を通じ、MRN-100 が血液中のグルタチオン (GSH) 濃度と抗酸化酵素量の上昇と、脂質過酸化およびフリーラジカル濃度の低下に有効であることが示されている (Badr El-Din et al 2010)。このことは MRN-100 が、放射線誘発死亡に対する防護を提供できる可能性を示唆している。

造血系への損傷が、急性放射線曝露に続く死亡における主要な要因である (Casarett 1968)。放射線に起因する損傷は肉眼解剖と細胞レベルの両方で調べられている。われわれの過去の研究や他者の研究は、魚類および哺乳類の造血組織が放射線に非常に敏感であることを

示し、放射線照射後の最初の数日間で機能が低下することを示している (Ghoneum and Egami1980、Ghoneum et al 1981、1982、Gridley et al 2007、Assayed 2010)。また放射線療法を受けている患者、および γ 線曝露を受けた動物では WBC 数の減少と免疫機能不全が観察されている (Morgan et al 1984、Song et al 2006、Yang et al 2010)。われわれの研究は MN-100 による処置が、放射線への曝露から 1 週間後の WBC 数回復をもたらすことを示した ($p < 0.0001$)。MRN-100 が WBC にて放射線防護作用を発揮する機序は、リンパ球の酸化ストレスを緩和する能力によると考えられる。MRN-100 は抗アポトーシス分子 Bcl-2 の H₂O₂ 誘導性ダウンレギュレーションを抑制し、アポトーシス促進分子 Bax をアップレギュレートすることにより、アポトーシス性 H₂O₂ 誘導信号経路を阻害する (Ghoneum et al, 2009)。また MRN-100 は、ヒト NK 細胞活性を増強する有力な免疫調節物質であることが証明されている (Ghoneum and Kijima 1996、Ghoneum et al 1997、Ghoneum 1998)。この特性は MRN-100 の使用が、放射線と関連した免疫機能不全の回復をもたらすことを示唆している。

貧血は急性放射線症候群の患者で見られることが多く、全身照射に続く赤血球数の減少が報告されている (Gridley et al 2007)。われわれのデータは放射線への曝露が総 RBC 数、HGB 量、PCV 値、MCV 値、MCH 量、および MCHC の有意な減少をもたらすことを示したが、MRN-100 による処置を施した試験魚は RBC 系のすべてのパラメーターで完全な回復を示した。放射線は RBC 減少、脂質酸化、および膜内外脂質の変化をもたらすが、それらはすべてアポトーシスを示すものである (Chukhlovina 1996)。MRN-100 の基礎となるメカニズムが完全には理解されていないものの、MRN-100 は高齢ラットの RBC において、加齢と関連した酸化ストレスを逆転させると報告されている。Hydroferrate 液の MRN-100 は 2 価および 3 価の鉄酸塩から構成される鉄系化合物で、それらの成分が鉄に結合し輸送する能力をもたらしている。鉄ホメオスタシスは複雑なプロセスであり、その理由は鉄の総身体負荷量のみならず、貧血などの刺激にも反応するさまざまな種類のタンパク質が存在するからである。鉄は多くの酵素や、細胞内の酸素輸送タンパク質における主要な触媒部位である。鉄は電子を容易に授受できる能力を持ち、その特性によってチトクロームや酸素結合分子にとって有益な要素となっている。鉄欠乏などの栄養障害は酸化ストレスを誘発することが示されている (Song et al 2006、Galaris and Pantopoulos 2008)。鉄は酸化ストレスに対する防護能力を備えていることが報告されている (Balla et al 1992)。MRN-100 は鉄と結合し、全身に運搬する能力を持つため、MRN-100 による処置は放射線と関連した貧血の回復をもたらす可能性を持つ。

放射線に曝露した肝臓では、数種類の肝酵素の濃度が上昇することが研究で示され (Dawson and Ten Haken 2005、INGOLD et al 1965、Lawrence et al 1995)、全身化学療法を肝臓に向けた放射線照射と組み合わせた場合に、SGOT とアルカリホスファターゼの有意な上昇が観察されている (Thomas et al 1987)。 γ 線照射はまた、照射 1 日後のラットにおける SGOT 値の初期上昇をもたらす (Morgan et al 1984)。本研究では、 γ 線照射

が SGOT 値の有意な上昇をもたらしたが、同上昇は MRN-100 による処置によって修正された。MRN-100 による処置を受けた高齢ラットの肝臓は、GSH 濃度、総チオール (TSH)、および抗酸化酵素の有意な上昇に加え、脂質過酸化、バイオマーカーのマロンジアルデヒド (MDA)、一酸化窒素 (NO)、タンパク質カルボニル群 (PCO) の有意な阻害を示した (Badr El-Din et al 2010)。これらの試験結果は、魚類における放射線誘導性の RBC 系減少に対する MRN-100 の防護作用を説明するものであると考えられる。

合成の放射線防護剤は高い毒性と関連しているため、放射線防護剤の安全性は大きな問題である。そのためわれわれは電離放射線による損傷を排除または抑制できる安全かつ有効な放射線防護物質を調べることにした。MRN-100 の生物安全性は、40 日間にわたるサブリメンテーション後のラットにおいて研究され、動物の行動、体重、または生存率に観察可能な変化は生じなかった (Badr El-Din et al 2010)。また *in vitro* 試験では、MRN-100 の存在下で培養されたヒトおよびマウスリンパ球に異常も細胞死の増加も見られないことが示されている (Ghoneum and Kijima 1996, Ghoneum et al 1997, Ghoneum 1998, Ghoneum et al 2009)。これらの研究は MRN-100 が安全な製品で、放射線による損傷に対する防護に関しさらなる調査に使用できることを示している。本研究で使用された MRN-100 の濃度 (1%および 3%) は、調査したいくつかのパラメーターで示差的な効果を示した (図 2、3、4)。用量に基づく MRN-100 への反応をより正確に測定するため、さらなる研究が必要とされる。

われわれは MRN-100 が放射線防護物質として作用すると結論付けた。MRN-100 は魚類において、放射線誘導性死亡と放射線誘導性造血損傷に対し防護を提供する。このことは MRN-100 が、放射線療法と関連した重度副作用に対抗するのに有用な補助療法となり得ることを示唆している。

図 1

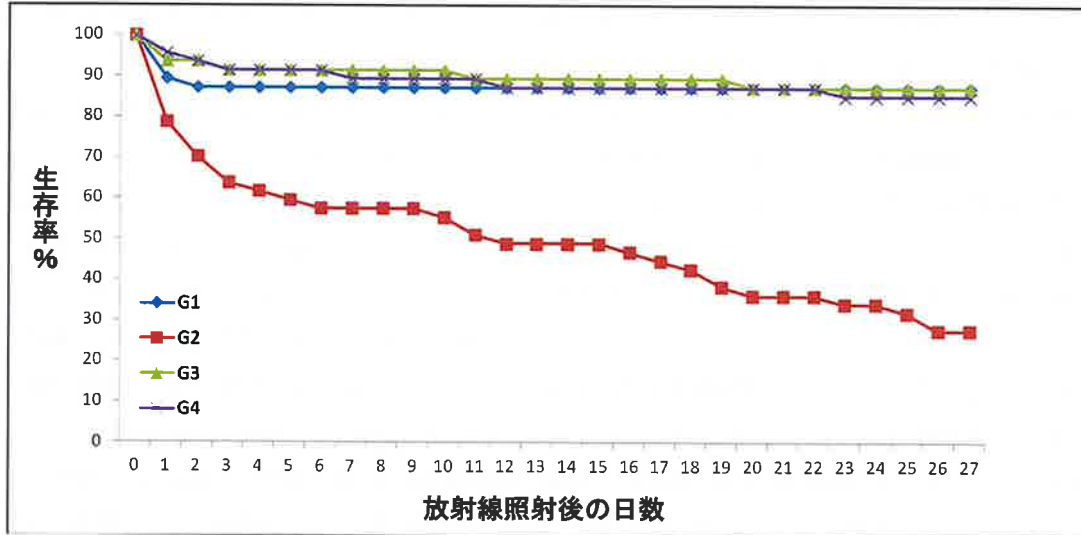


図 2

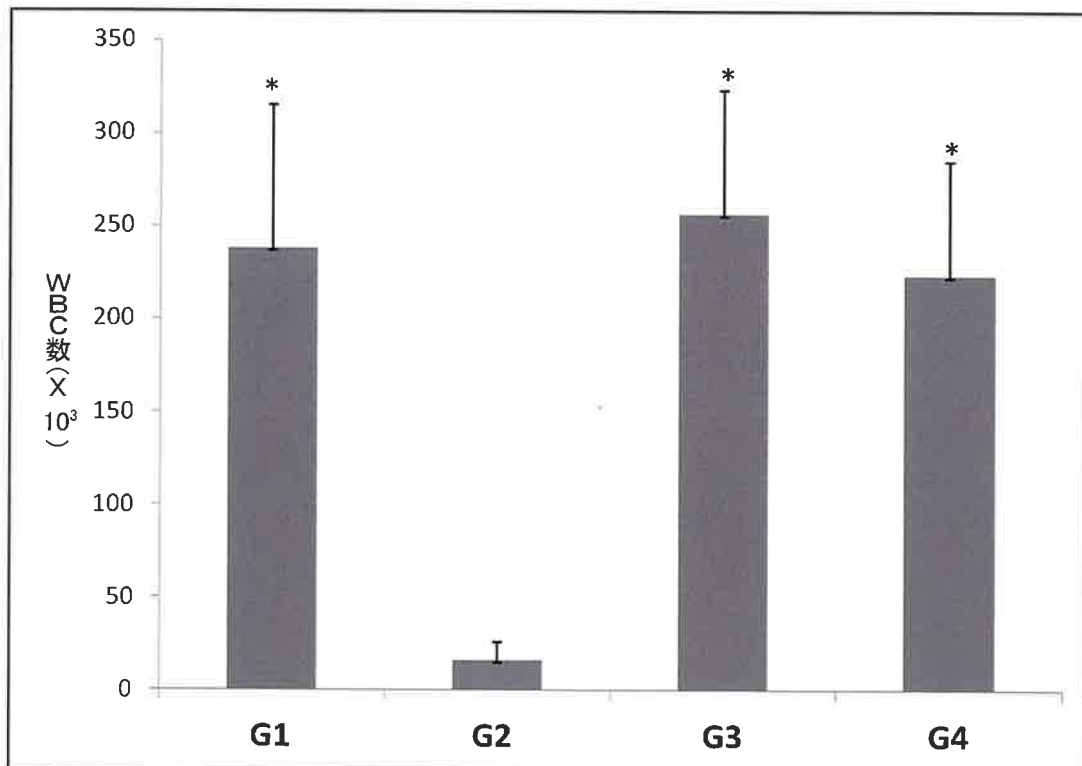


图 3

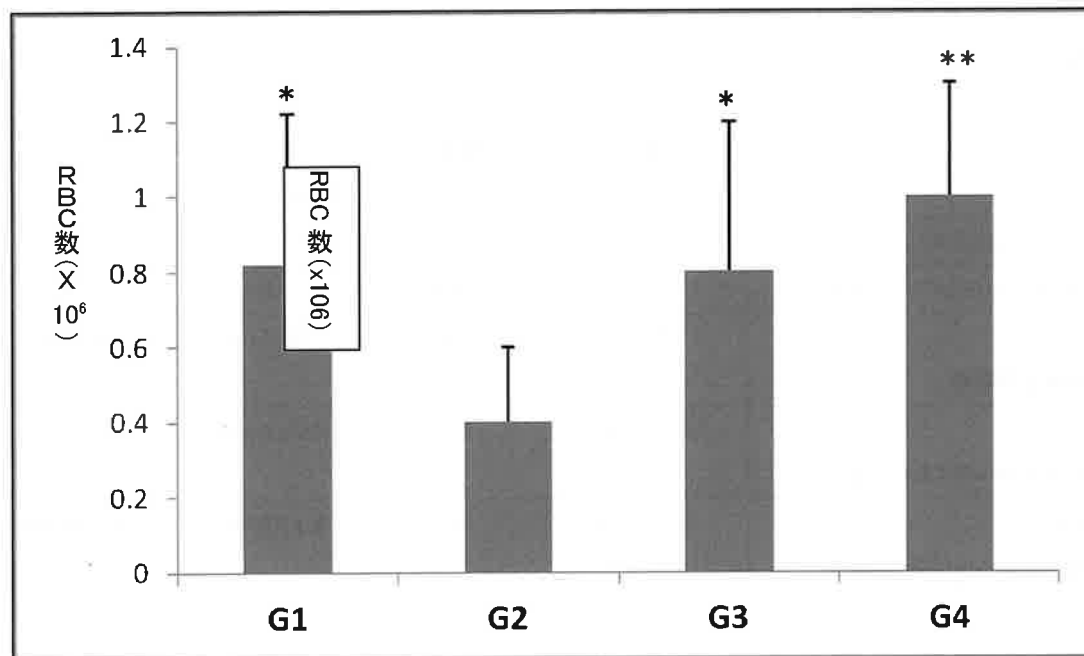


图 4

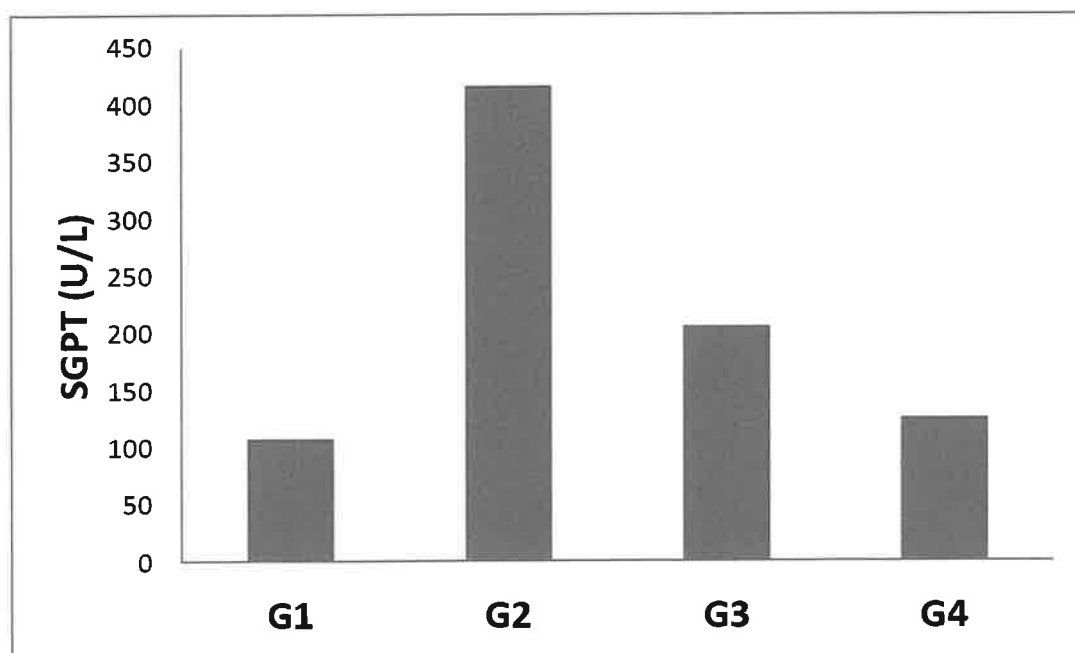


表 1

| RBC パラメーター | G1 (対照) | G2 (放射線照射) | G3 (MRN-100 1ml/L +放射線照射) | G4 (MRN-100 3ml/L +放射線照射) |
|---------------------------|--------------|---------------|------------------------------------|------------------------------------|
| ヘモグロビン (g/dL) | 7.0±3.8** | 2.2±1.0 | 8.6±5.2** | 10.4±2.7*** |
| ヘマトクリット (PCV) 体積濃度 | 13.6±6.8* | 6.4±3.0 | 11.3±8.0 | 15.1±4.2** |
| MCV (fl) 平均赤血球容積 | 148.6±17.3 | 149.8±21.1 | 136.4±16.0 | 154.0±24.7 |
| MCH (pg) 平均赤血球ヘモグロビン量 | 90.8±12.9*** | 51.9±5.0 | 105.6±6.8*** | 100.3±12.*** |
| MCHC (%) 平均赤血球ヘモグロビン濃度 | 64.7±9.8*** | 35.3±3.8 | 78.7±10.4*** | 64.9±24.1** |

表 1 γ 線照射後の *Tilapia Nilotica* における RBC 系に対する MRN-100 の作用。照射 1 週間後、RBC 系 (HGB 量、PCV 値、MCV 値、MCH 量、および MCHC) を調べた。データは各群にて個別に調べた 5~7 尾の平均+SD で表示。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$

図の説明

図1 1.5KRの全身 γ 線単回照射を受けた試験魚の生存率に対するMRN-100の影響。試験魚はそれぞれが47尾の試験魚を含む4つの均等な群(G1~G4)に分けた。4群で死亡した試験魚につき、放射線への曝露後27日間、毎日記録した。

図2 γ 線照射後の*Tilapia Nilotica*のWBC数に対するMRN-100の影響。照射1週間後、尾静脈からWBCを分離した。データは個別に調査した各群5~7尾の試験魚の平均+SDを示す。
* $p < 0.001$

図3 γ 線照射後の*Tilapia Nilotica*のRBC数に対するMRN-100の影響。照射1週間後、尾静脈からRBCを分離した。データは個別に調査した各群5~7尾の試験魚の平均+SDを示す。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図4 γ 線照射後の*Tilapia Nilotica*のSGPT値に対するMRN-100の影響。照射1週間後、SGPT値を調べた。データは個別に調査した各群5~7尾の試験魚の平均+SDを示す。
* $p < 0.001$

