



放射線肺障害における脂質変化と予防について(マウス肺による実験的研究)

兒玉, 明久
辻野, 佳世子
河野, 通雄

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 58(4):131-137

(Issue Date)

1998-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00177390>



放射線肺障害における脂質変化と予防について (マウス肺による実験的研究)

神戸大学医学部放射線医学教室 (主任: 河野通雄教授)

兒玉明久, 辻野佳世子, 河野通雄

(平成9年11月21日受付)

【緒 言】

胸部放射線治療の最大の制限因子である放射線肺炎は時に重篤な転機をもたらす胸部悪性腫瘍, 特に肺癌の局所制御を困難にさせている。放射線肺炎の発生機序や防御に関しては古くから様々な研究が為されているがその解明は必ずしも充分とは言えない。近年各種疾患においてフリーラジカルの役割が注目されてきているが, 放射線による抗腫瘍効果ならびに生体障害ともに間接作用と呼ばれる放射線照射により生じたフリーラジカルが関与していると考えられている⁽¹⁾。フリーラジカルが生体膜脂質と反応して生ずる過酸化が障害の主体である可能性が推測されている⁽²⁾。しかし放射線肺炎発症において肺組織脂質の変化を詳細に解析した研究は我々が調べた限りでは殆どなかった。そこでマウス肺を用いて脂質の過酸化と放射線肺障害の関係に関して実験的研究を行った。また抗酸化剤 α トコフェロール (Vitamin E) によるその抑制効果についても検討を行ったので報告する。

【方 法】

C57BL/6J マウス雄 8~10週齢の胸部に対して自製の固定具を用い無麻酔下でライナック (三菱電機株式会社, ML-20MDX) 9 MeV の電子線で 5 Gy および 10 Gy (ピーク値, 線量率: 3 Gy/min) の照射を各群 3~6 匹ずつ行った。10 Gy 照射群は通常飼料のみで飼育し, 5 Gy 照射群は通常飼料または Vitamin E 補強飼料 (約 10 mg/日/匹, オリエンタル酵母 KK) を与え 1 日後, 7 日後, 4 週間後に延髄牽引で屠殺した。直ちに肺を摘出し右肺は脂質分析用に 0.1 mmol リン酸緩衝液内で -80°C で冷凍保存し, 左肺を 10% ホルマリン溶液で固定し H-E 染色後に病理学的検討に供した。脂質分析は試料を室温にて解凍

した後に Folch 法にて肺組織より粗脂質を抽出し Bond Elut NH₂ (Varian Associates, Inc.) に吸着させた後メタノールでリン脂質を溶出し 5% 塩酸メタノール (Nacalai Tesque Inc.) を加えて 110°C 1 時間加熱によりメタノリシスを行いガスクロマトグラフィー (GC 7 A, 島津製作所, カラム: Omegawax 520, 30 m $\times$ 0.531 mm 膜厚, Supelco Inc.) にて主要な脂肪酸の定性的かつ定量的分析を行った⁽³⁾。カラム温度は 150°C から毎分 8°C 昇温で最高 270°C 2 分間保持した。病理組織学的検討はマクロファージ, II 型肺胞細胞, 肺胞隔壁の浮腫, 血管周囲腔の開大, フィブリン沈着, 無気肺と肺気腫の混在の 6 つの所見について平均的に 3 視野内に 1 個認めれば (±), 1 視野内に 1 個認めれば (+), 2 個ならば (++) それ以上ならば (+++) とした。コントロール群も同様の条件下で処置し, 数値検定には unpaired t test を用い $p < 0.05$ を有意とした。

【結 果】

非照射の肺組織脂肪抽出物のクロマトグラムを示す (Fig 1)。マウス肺組織の脂質組成はある程度の個体差はあるものの飽和脂肪酸のステアリン酸 (C16: 0) が 20~40% と高率に含まれており次いでドコサヘキサエン酸 (以下 DHA) (C22: 6) が 10% 前後でパルミチン酸 (C18: 0), オレイン酸 (C18: 1), リノール酸 (C18: 2), アラキドン酸 (C20: 4) は 3~10% であった。その他幾つかの小ピークはあるがその殆どが 2% 以下であり今回の検討からは除外し上記の主要な 6 つの脂肪酸の変化を検討した。まずこれらの脂肪酸の組成比率を各群間で比較を試みたが (図表化せず) 幾つかの脂肪酸で一定の傾向があるものの有意な変化は認めなかった。これは組成比率のみの比較では全ての脂肪酸が放射線照射により変化を受けて

Key Word : Radiation pneumonitis, Lipid peroxidation, Gas chromatography, Vitamin E

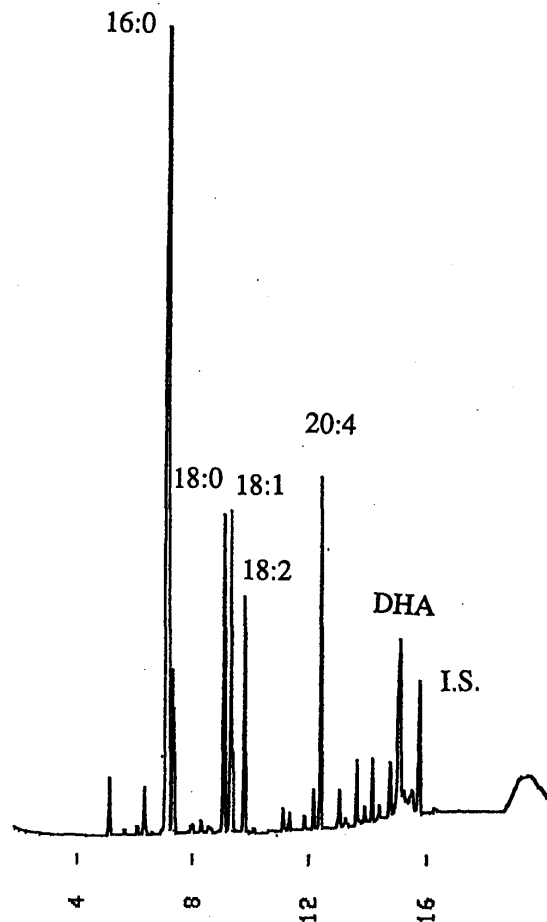


Fig. 1. Elution pattern of various lipids of non-irradiated mouse lung tissue in gas chromatogram.

いる可能性があるため、評価は困難であると考えた。そこで各々の脂肪酸の重量を肺組織重量で除した値で比較した (Fig. 2 a, 2 b, 2 c)。一般的に放射線照射群でこれらの脂質の低減傾向を認めたが、特に DHA ではコントロールの 15.9 (平均値) から 5 Gy 照射 1 日後で 10.1, 10Gy で 8.81 週間後で 2.5 と低下し 4 週後にコントロールの水準に戻る傾向を認めた。アラキドン酸でも同様にコントロールの 7.18 から照射後第 1 日より 5 Gy で 3.98, 10Gy では 4.25 へと有意に低下し 1 週間後より増加に転ずるパターンを示した。オレイン酸、ステアリン酸でも一部有意な変化を伴いアラキドン酸や DHA と似た変化のパターンを示したがパルミチン酸は各群間で有意な変化を認めなかった。また Vitamin E 投与群では照射によりこの 6 つの主要な脂肪酸に有意な変化を認めなかった。

次に病理学的な検討では照射後 1 週間ではどの群もコントロールの非照射群と比べ殆ど有意な変化を認めなかったため 4 週後の変化のみを Table 1 に示す。5 Gy 群, 10Gy 群ともに急性期放射線肺炎の所見と考えられるマクロファージや II 型肺胞細胞の出現、血

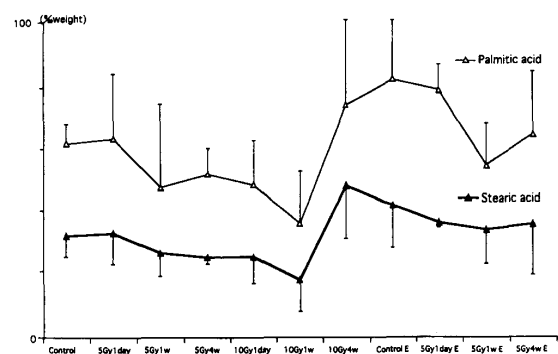


Fig. 2a. Radiation-induced changes of stearic and palmitic acid levels in mouse lung tissue.

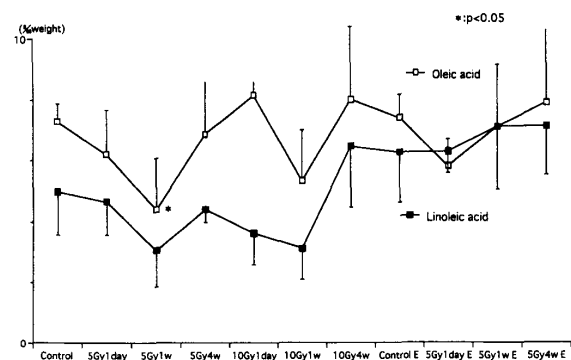


Fig. 2b. Radiation-induced changes of oleic and linoleic acid levels in mouse lung tissue.

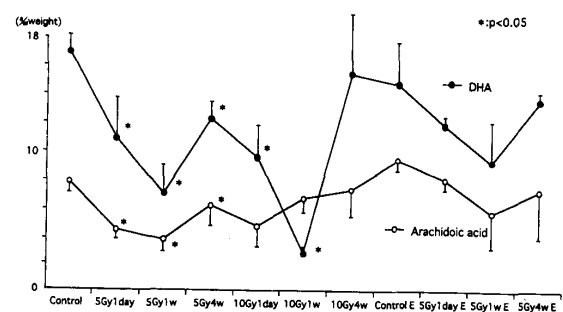


Fig. 2c. Radiation-induced changes of arachidonic acid and DHA levels in mouse lung tissue.

管周囲腔の拡大や肺胞壁の浮腫などを認めた (Fig. 3 a, b, c)。10Gy 群で 5Gy 群に比べ II 型肺胞細胞やフィブリンの沈着がやや強く出現していたがその差は軽度であった。また同じ 5Gy 照射でも Vitamin E 投与群では非投与群と比べその炎症性変化は全般的に軽度であった。

Table 1. Pathophysiological findings of irradiated mice's lungs

Findings	5 Gy	5 Gy+ VE	10Gy
Macrophage	++	+	++
Edema of alveolar wall	++	±	++
Widening of perivascular space	+++	+	+++
Type II pneumocyte	++	+	+++
Fibrin deposit	+	-	++
Emphysema & atelectasis	+	-	+

VE=Vitamin E

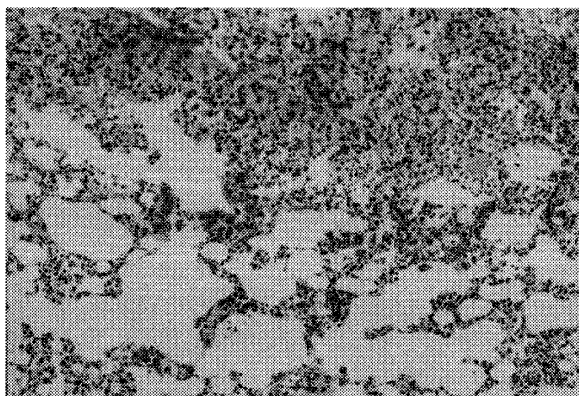


Fig.3a. Light micrograph of mouse's lung 4weeks after 5 Gy irradiation(H and E×200). Edema of alveolar walls and widening of perivascular spaces were recognized.

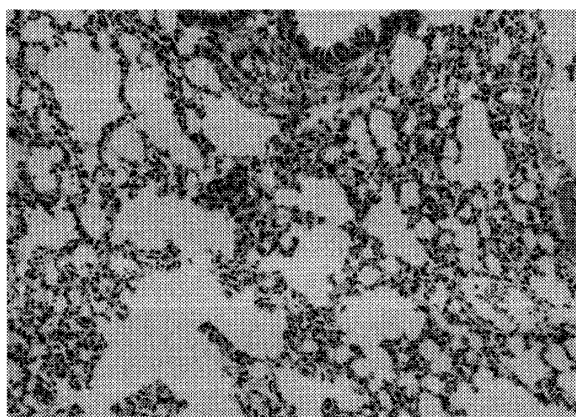


Fig.3b. Light micrograph of mouse's lung 4weeks after 10 Gy irradiation(H and E×200). The similar findings in Fig 3a were recognized.

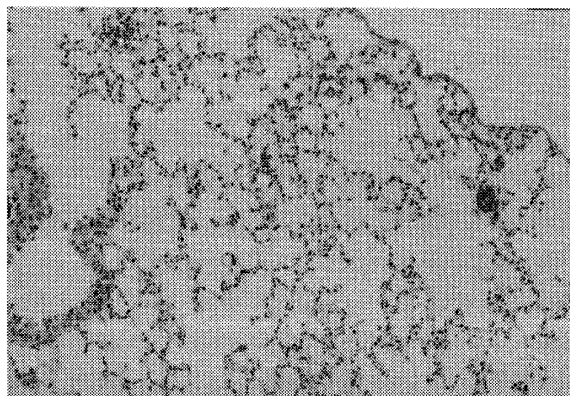


Fig.3c. Light micrograph of mouse's lung with vitamin E 4weeks after 5 Gy irradiation (H and E×200).

Edema of alveolar walls and widening of perivascular spaces were also recognized but these changes were less marked than these in fig. 3a.

【考 察】

一般に光子などの低 LET 放射線は間接作用の比率が高く、その主体はいわゆるフリーラジカルとされている⁽¹⁾。X 線により生ずるフリーラジカルにはヒドロキシラジカルを代表とする反応性の強いラジカルがあり、DNA と反応するとともに生体膜脂質や蛋白などとも反応し、生体障害を生ずると考えられている⁽⁴⁾⁽⁵⁾。一方生体内にはこれらに対する防御系として α トコフェロール (Vitamin E)、SOD、カタラーゼ、グルタチオン等が存在しており、この攻撃と防御のバランスが崩れたときに各種疾患が惹起されると考えられている⁽⁶⁾。フリーラジカルから脂質過酸化に至る研究は Mead 等の先駆的業績を嚆矢として in vitro および in vivo の系でかなり以前より行われているが、放射線肺障害に関して脂質過酸化の詳細な報告は少なかった^{(7)~(9)}。そこで我々は実験的に放射線肺障害における脂質の変化について調べた。またいわゆる radical scavenger として Vitamin E の抗酸化作用についても検討した。Vitamin E はその強力な抗酸化作用と生体膜への局在性など放射線肺障害や酸化ストレスの防護剤としての可能性を示唆する多くの報告があり入手が容易で臨床的にも副作用が少ないと考えられたため実験的に確認することにした⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾。

検討を行った 6 つの主要な脂肪酸は飽和脂肪酸が 2 つと不飽和脂肪酸が 4 つである。一般に前者は放射線に対して安定的と考えられ今回の実験でも有意差をもって変化した群を殆ど認めなかった。一方不飽和脂肪酸ではアラキドン酸、DHA が照射一日後により有

意に減少した。この2つの脂肪酸は放射線で過酸化され易いとされる報告が多くあり今回の実験結果もそれらを肯定するものであった⁽¹²⁾。脂質過酸化反応にはラジカル的な反応と非ラジカル的な反応の2種類があり前者は連鎖的に反応が進行し2つのラジカルより非ラジカル生成物が生じて終了する。一方後者は連鎖的な反応せずに1個の水酸化物が生成されて完結する⁽¹³⁾。両者の定量性については未だ確定できておらず *in vitro* では各種不飽和脂肪酸の酸化物の同定は進んでいるものの *in vivo* では困難とされる⁽¹⁴⁾。今回の実験でも微細なピークを多数有し個体差もかなりあったためこの酸化物を特定することはできなかった。また今回は5 Gyと10 Gyの2群間みの検討で不飽和脂肪酸の減少量と照射線量について相関関係は不明であるが *in vitro* の系での実験では明瞭な正の相関を認めている⁽⁷⁾。しかし Mooibroek 等は *in vitro* の系で主要な不飽和脂肪酸の放射線による過酸化について調べているが不飽和脂肪酸の過酸化は照射線量との一定の相関はあるものの様々な条件によりダイナミックに変化したと言う⁽¹²⁾。

脂質過酸化の時期については我々の結果ではアラキドン酸や DHA などの不飽和脂肪酸の減少は照射後1日より認められ、Mooibroek 等の実験でも照射後直ちに測定を行っている。フリーラジカルの存在時間は非常に短くそれによる脂質過酸化も短時間に起こるとされる⁽¹¹⁾。近年のサイトカインや遺伝子レベルでの放射線肺炎の解明より組織学的な変化が生ずるかなり以前すなわち照射後数時間よりこれらの因子は有意に上昇するとされる⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。アラキドン酸や DHA が照射後1日より有意に減少した我々の実験結果もこれらの遺伝子やサイトカインの動きと一致するものと思われる。一方、Nozue 等のラットでの報告では照射後3週間より脂質過酸化は有意に上昇したとある⁽¹⁷⁾。測定方法と実験動物ともに我々と異なるが、照射3週間後からの脂質過酸化の増加はかなり遅いように思われる。

また我々の実験ではこの減少した不飽和脂肪酸が4週間には回復する傾向を認めた。生体膜の回復の機構は DNA の回復に比べ不明な点が多く十分に解明されていないが、実験的には食餌の脂質構成の違いで血清の脂肪酸ではかなり変化することがあり特定の不飽和脂肪酸の増減をフリーラジカルの指標にすることは問題があるという⁽¹⁸⁾。4週間で過酸化を受けた脂質がかなりの部分が代謝され、食餌より新たな不飽和脂肪酸が蓄積された可能性も考えられる。

このように放射線照射により過酸化を受けた脂肪酸が直接的に放射線肺炎などの生体障害をもたらすのか

は本実験からは明らかでない。文献的にはアラキドン酸の酸化物が血管内皮細胞に対する組織毒性を有するとの報告と、他方脂質の変化が生体膜の形態と機能両面に変化を与え炎症性変化が進むものと示唆する報告がある^{(19)~(21)}。おそらく生体障害にはこの両方のメカニズムが存在すると考えられるが、特に近年、後者に関連する生体膜脂質の情報伝達の上での複雑多岐にわたる重要な役割が急速に解明されつつある⁽²²⁾。放射線照射がこれらの情報伝達に障害となりサイトカインや遺伝子の発現に波及して行く可能性もあるのではないだろうか⁽²³⁾。今後は生体膜脂質に対する放射線による過酸化を介した病態が新しい知見をもとに明らかになって行くものと思われる。

次に病理組織学的検討に関しては Travis らの方法に準じて6つの所見に関して行った⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾。放射線肺炎は大きく急性期、中間期、晩期（肺線維化）の三分されているが彼等はその病理所見を程度に応じてスコア化して時間経過とともに各時期に明瞭なピークを有することを示した。今回は脂質の変化と平行して検討したため照射後長い観察期間をとれなかったが、4週間後の群で急性期の放射線肺炎の所見の出現を認めた。次に照射線量と炎症性変化の関係については Travis らはスコアとの間に一定の相関を認め、我々の5 Gyと10 Gy照射群でも軽度ではあるが炎症の程度の違いを認めた。今回の病理学的な検討では定性的な変化を重視し厳密な定量化を行わなかった事によるものと考えられる。また Vitamin E 投与の5 Gy照射群で通常飼育の5 Gy照射群に比べ炎症性変化の軽減を認めた。これが最終的な晩期の線維化の予防に結び付くかはより長期にわたる観察が必要であるが Vitamin E による放射線肺炎の予防の可能性が脂質の変化と病理組織学的変化の両面より示唆されたと思われた。しかし Radical scavenger としての作用機序から放射線肺炎予防や軽減のための Vitamin E の投与は放射線の抗腫瘍効果も抑制させる恐れがあり慎重に行うべきであると考えられた。

【結 語】

1. マウスを用いて実験的放射線肺障害の研究を行った。
2. 主要な肺組織脂肪酸のなかでアラキドン酸と DHA は照射後第1日より有意に低下し4週間後に回復する傾向を認めた。Vitamin E 投与5 Gy照射群では脂肪酸の有意な変化を認めなかった。
3. 病理組織学的な検討では放射線照射の4週間後で炎症性変化の所見を認めた。5 Gy群と10 Gy群で炎

症の差は軽度であり, Vitamin E 投与 5 Gy 群では非投与 5 Gy 群に比べ炎症の軽減を認めた。

4. 肺組織脂肪酸のなかでアラキドン酸と DHA の変化は放射線肺炎と関連し, その予防には Vitamin E が一定の効果を期待出来る可能性が示唆された。しかし作用機序より抗腫瘍効果も減ずる危険性もあり, 投与に関しては今後の検討が必要であると考えられた。

【謝 辞】

この研究に対して終始御指導していただいた法医学講座の足立順子先生と病理所見について多くのご教示いただいた病理学第二講座の北澤荘平先生に深甚なる謝意を表します。

【文 献】

- (1) Hall E.J.: Radiobiology for the radiologist. 4th ed. Lippincott Co., Philadelphia, P10-13, 1994
- (2) 小沢俊彦, 湯川修身: 放射線による活性酸素の生成. J. Acta. Oxyg. Free Rad., 4(1), 36-45, 1993
- (3) Folch J., Lees M., Sloane-Staneley G. H.: A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem., 226, 497-509, 1957
- (4) Yukawa O., Nakazawa T.: Radiation induced lipid peroxidation and membrane bound enzymes in liver microsomes. Int. J. Radiat. Biol. 37, 621-631, 1980
- (5) McLennan G., Oberley L. W., Autor A. P.: The role of oxygen derived free radicals in radiation induced damage and death of nondividing eucaryotic cells. Rad. Res. 84, 122-132, 1980
- (6) 大柳善彦: 活性酸素と病気. 化学同人, 京都, 1-38, 1989
- (7) Mead J. F.: The irradiation-induced autoxidation of linoleic acid. Science, 115, 470-472, 1952
- (8) Konings A. W. T., Drijver E. B.: Radiation Effects on Membranes. Rad. Res. 80, 494-501, 1979
- (9) 橋村孝久, 河野通雄, 今城吉成: 放射線肺臓炎の発症機序並びに予防に関する実験的研究. 日医放誌, 49(3), 335-343, 1989.
- (10) 福場博保, 美濃真, 五十嵐修 “ビタミンE-基礎と臨床-” 東京医歯薬出版, 東京, 33-77, 1985
- (11) Liu S.-L., Esposti S. D., Yao T., Diehl A. M., Zern M. A.: Vitamin E therapy of acute CCl₄-induced hepatic injury in mice is associated with inhibition of nuclear factor kappa B binding. Hepatology, 22, 1474-1481, 1995
- (12) Mooibroek J., Tieling W. B. and Konings A. W. T.: Comparison of the unsaturated fatty acids, structured as micelles or liposomes, under different experimental conditions. Int. J. Radiat. Biol. 42, 601-612, 1982
- (13) 中村哲也: 生体における過酸化脂質の生成と抑制. 油化学, 29, 309-315, 1980
- (14) Yamamoto Y., Niki E., & Kamiya Y.: Oxidation of lipids. III. Oxidation of methyl linoleate in solution. Lipids, 17, 870-877, 1982.
- (15) McBride W.H.: Cytokine cascades in late normal tissue radiation. Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. 33(1) 233-234, 1996
- (16) Rubin P., Jhonson C. J., Williams J. P., McDonald, S., Finkelstein, J. N.: A Perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. 33, 1, 99-109, 1995
- (17) Nozue M., Ogata T.: Correlation among lung damage after radiation, amount of lipid peroxides, and antioxidant enzyme activities. Exp. and Mole. Pathol. 50, 239-252, 1989
- (18) Briton M., Fong C., Wickens D., Yudukin J.: Diet as a source of phospholipid esterified 9, 11-octadecadienoic acid in humans. Clin. Sci. 83: 97-101, 1992
- (19) Ochi H., Morita S.: Mechanism for endothelial cell injury by 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid, an arachidonate lipoxygenase product. Biochem. Biophys. Acta, 1136, 247-252, 1992
- (20) Myers D. K., Bide R. W.: Biochemical effects of Xirradiation on erythrocytes. Radiat. Res. 27, 250-563, 1966
- (21) Edwards J. C., Chapman D., Cramp W.

- A. : The effect of ionizing radiation on biomembrane structure and function. *Prog. Biophys. molec. Biol.* 43, 71-96, 1984.
- (22) 宇井理生, 香川靖雄, 春日雅人, 野沢義則: 生体膜, 1-61, 講談社, 東京, 1995
- (23) Morgan G. W., Breit S. N.: Radiation and lung: a reevaluation of the mechanisms mediating pulmonary injury. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 31(2), 361-369, 1994
- (24) Travis E. L., Down J. D., Holmes S. J., Hobson B.: Radiation pneumonitis and fibrosis in mouse lung assayed by respiratory frequency and histology. *Rad. Res.*, 84, 133-143, 1980
- (25) Travis E. L.: The sequence of histological changes in mouse lungs after single doses of x-rays. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 6, 345-347, 1980

(要 約)

放射線肺炎の発症に関して脂質過酸化の観点より実験的研究を行った。マウス肺組織脂肪の中で不飽和脂肪酸のアラキドン酸と DHA の組織内重量は放射線照射 1 日後より有意に低下したがステアリン酸やパルミチン酸は有意な変化を認めなかった。Vitamin E 投与群では全ての脂肪酸で有意な変化を示さず, 照射 4 週間後の病理組織的变化とよく対応していた。以上より放射線肺炎の発症にこれらの不飽和脂肪酸が関連し, その予防に Vitamin E が有効である可能性が示唆された。しかし Vitamin E は放射線の抗腫瘍効果も低下させる可能性もあり臨床的に応用することに関しては慎重に対応すべきと考えられた。

Lipid Peroxidation in Radiation Pneumonitis in Mouse Lung and its prevention

Akihisa Kodama, Kayoko Tsujino, Michio Kono

Dept. of Rad. School of Med. Kobe Univ.

ABSTRACT

Lipid peroxidation of the lung in irradiated C57BL6J mice was analyzed by gas chromatography. Among six major fatty acids in the mouse lung tissue, the amounts of two unsaturated fatty acids, arachidonic acid and DHA reduced one day after irradiation, and then recovered up to the level of in the control group four weeks after irradiation. In contrast, the amounts of stearic acid and palmitic acid did not change significantly. The mice fed with vitamin E-enriched food showed no significant changes of fatty acids which were compatible with pathophysiological findings 4 weeks after irradiation. Reduction of both arachidonic acid and DHA following lipid peroxidation in lung tissue, was assumed to play an important role in developement of radiation pneumonitis. Vitamin E seems to enable to prevent or reduce the occurrence and progression of radiation pneumonitis, but as a radical scavenger, it may also weaken the anti-tumor growth effect of low linear energy transfer (LET) irradiation as photon.